

Stamceller i behandlingen af neurodegenerative lidelser

Lektor Morten Meyer, ph.d.-studerende Pia Jensen & professor Jens Zimmer Rasmussen

STATUSARTIKEL

Syddansk Universitet,
Institut for Molekylær
Medicin, Neurobio-
logisk Forskning

I den voksne pattedyrs- og menneskehjerne dannes der nye nerveceller hele livet igennem. Efter de første år er denne neurogenese og de tilknyttede stamceller primært lokaliseret til: a) den subventrikulære zone under laget af ependymceller, der beklæder lateralventriklernes, og b) fascia dentata-delen af hippocampus i hjernens tindingelap. Fra den subventrikulære zone fortæl i lateralventriklernes migrerer der dagligt tusinder af umodne neurale progenitorceller (hos rotter 20.000-80.000 pr. dag) mod lugtekolben, hvor de danner dopaminerge og *gamma-amino butyric acid*-(GABA)-erge nerveceller [1]. I fascia dentata-delen af hippocampus, som er et vigtigt center for indlæring og hukommelse, er den neurogene zone placeret under korncellelaget, som tilføres nye nerveceller gennem hele livet [2, 3]. Den reelle tilvækst i antallet af nerveceller og/eller astroglia-celler er dog altid et resultat af balancen mellem celledeling, programmeret celledød (apoptose) og neuronal *versus* astroglial celledifferentiering. Aktiviteten af celledeling og nydannelsen af nerveceller reduceres og ændres med alderen i retning af astroglia-celler, men øges af fysisk aktivitet og stimulerende omgivelser [3, 4]. Ved depression sker der et fald i såvel celledeling som i dannelse af hippokampale nerveceller, mens behandling med serotonerge antidepressiva har den modsatte effekt [5]. Funktionelt set synes de overlevende, nydannede kornceller, som integreres i det eksisterende neuronale og synaptiske netværk,

at være af særlig betydning for ny indlæring, som kræver at tidligere indlærte procedurer må opgives [6]. I forbindelse med iskæmiske og traumatiske cerebrale læsioner opreguleres neurogenesen i hjernens normale neurogene områder samt i de læsionsnære subependymale områder i hjernen og rygmarven, hvor der normalt ikke forekommer detekterbar nydannelse af nerveceller. Neokortikale og striatale vaskulære læsioner medfører således en kraftig opregulering af celledelingen i subventrikulærzonen og migration af nydannede neurale progenitorceller og neuroblaster hen mod og ind i læsionsområdet [7]. Den efterfølgende overlevelse af nydannede nerveceller i læsionsområdet har dog vist sig at være skuffende lav. Dette skyldes sandsynligvis mangel på såvel: a) lokal trofisk støtte i infarkt- og penumbra-områderne, som b) autokrin opregulering af vækst- og overlevelsesfaktorer, baseret på stimulering af nerveforbindelser som under hjernens udvikling. Bortset fra tilfælde med mindre lokaliserede tab af nerveceller [8] må den naturligt forekommende neurogenese anses for at være utilstrækkelig til alene at kunne kompensere for tab af nerveceller i den udvoksede hjerne.

STAMCELLER OG NEUROLOGISKE SYGDOMME

Mange neurologiske lidelser er karakteriseret ved tab af nerveceller, der er forårsaget af fysiske traumer, iskæmi, blødning eller neurodegenerative sygdomme som chorea Huntington, amyotrofisk lateral sklerose samt Alzheimers og Parkinsons sygdom.

Mange års forskning og investering i farmakologisk og vækstfaktor-baseret neuroprotektion har ikke skabt de forventede behandlingsmæssige gennembrud for disse sygdomme, men har – sammen med anden forskning – skabt grundlaget for stamcellebaseret celleterapi som en anden mulighed. Det være gennem: a) erstatning af tabte celler ved tilførsel/transplantation af eksogene, stamcellederivede celler (celleerstatningsterapi), eller b) beskyttelse af overlevende celler og/eller stimulation af endogene neurale stamceller gennem tilførsel af vækstfaktorer/antiinflammatoriske stoffer, der er produceret af tilførte/transplanterede stamcellederivede eller genmodificerede celler (cellefabrikterapi) [9].

Eksperimentelle studier og kliniske behandlingsforsøg udført i 1980'erne og 1990'erne viste således:



FAKTABOKS

Vigtige trin frem mod stamcellebaseret terapi

Metoder til isolering og opformering af humane embryonale stamceller, inducerede pluripotente stamceller og vævsderivede, neurale stamceller med dannelse af stabile cellelinjer.

Standardiserede procedurer, der er baseret på kortlægning af »nogle-gener« og regulerende faktorer, til kontrolleret uddifferentiering af stamceller til specificerede, stabile og transplanterbare celletyper.

Biologisk og regulatorisk anerkendt sikker produktion og indgift (transplantation) af cellerne til de rigtige målområder i organismen.

Standardiserede procedurer til reduktion af risici for immunologisk betingede afstødning og sygdomsbetingede autoimmune reaktioner, hvor dette er relevant.

Funktionelle test til validering af signifikant og/eller kvalitativt bedre effekt i forhold til eksisterende behandling.

1) at nerveceller i føtalt hjerne- og rygmarsvæv kan overleve transplantation som små vævsblokke eller cellesuspensioner til rygmærven og hjernen af dyr (og mennesker), og 2) at transplanterede umodne nerveceller, som i forskellig grad er afhængige af recipientalder og nervecelletype, kan integreres i recipientens neuronale netværk og have funktionel og adfærdsmæssig effekt som vist i dyreeksperimentelle sygdomsmodeller og Parkinson- og Huntington-patienter [10, 11].

I forhold til føtalt hjernevæv forventes brug af stamceller som udgangspunkt for neural celleterapi at byde på en række væsentlige fordele i form af: a) reduktion i mængden af oprindeligt donormateriale, fordi celler kan opformeres inden brug, og b) en høj grad af standardiseret ensartethed af det kvalitative celleindhold i transplantaterne.

UDFORDRINGER VEDRØRENDE STAMCELLER OG NEURODEGENERATIVE SYGDOMME – FOKUS PÅ PARKINSONS SYGDOM

Isolering af embryonale stamceller fra blastocyster og neurale vævsstamceller fra fosterhjerter og neurogene områder i den voksne hjerne er i dag rutine i mange laboratorier.

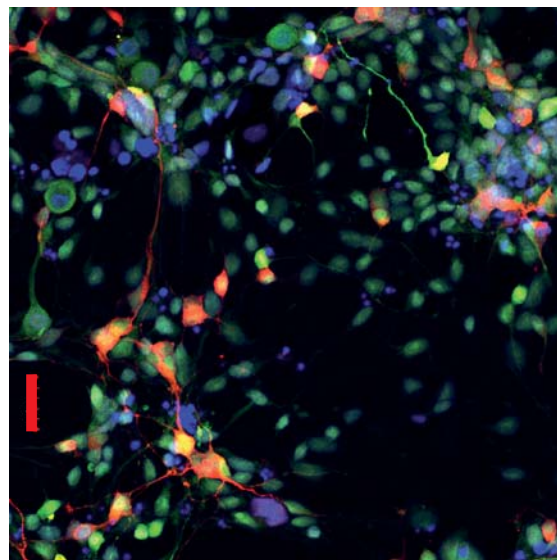
Der mangler dog stadig afgørende viden om de ydre faktorer og cellulære interaktioner, der kan fastholde disse stamceller på et bestemt udviklingsstrin under opformering og siden præcist kontrollere deres videreudvikling i neural og derefter cellespecifik neuronal og glial retning. Hertil kommer sikkerhedsmæssige krav om, at isolering, opformering og differentiering af celler til human transplantation kun må udføres i certificerede faciliteter jævnfør EU's vævsdirektiv om donation, udtagning og testning af humane celler og nationale myndigheders bestemmelser.

For Parkinsons sygdom forventes det, at der inden for en meget kort årrække vil blive udført kliniske behandlingsforsøg med intrastriatal transplantation af umodne dopaminerge nerveceller, der er dannet fra stamceller. Dette skyldes, at *proof of concept* for celleterapi allerede er opnået med umodne dopaminerge nerveceller fra aborterede fosterhjerter, som viste stærkt forbedret motorisk funktionstilstand, når antallet af de dopaminerge nerveceller i transplantaterne var tilstrækkeligt stort [10].

Stamcellebaseret udvikling af transplanterbare dopaminerge nerveceller forventes at kunne løse problemerne med: a) at det kun er 5-15% af det forventede antal dopaminerge celler, der overlever i transplantaterne af føtalt hjernevæv, hvilket medfører behov for væv fra op til otte fosterhjerter pr. patient, b) en manglende standardisering af donorvævet pga.

FIGUR 1

Eksempel på induceret differentiering af humane neurale stamceller, der er derivet fra mesencephalon af et ti uger gammelt foster. Efter ti dages differentiering ved tilsætning af væksfaktorer efterfulgt af immunocytokemisk farvning ses tyrosinhydroxylase-positive (dopaminerge) neuroner (rød) og *gamma-aminobutyric acid* (GABA)-erge neuroner (grøn). Endvidere ses 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)-farvede cellekerner (blå). Målestok = 30 μ m.



variation i donoralder, samt c) udvikling af dyskinesi hos nogle transplanterede patienter, som forklares ved et højt indhold af serotonerge nerveceller i transplantaterne.

Imod celleterapi til Parkinsonpatienter kunne tale, at man siden 2008 i nogle, men ikke alle, undersøgte transplantater fra afdøde Parkinson-patienter har observeret Parkinsonlignende forandringer (*Lewy bodies*), hvilket kunne indikere, at transplantaterne angribes af sygdommen [12, 13]. Disse observationer kan bidrage med ny forståelse af årsagerne til og mekanismerne i Parkinsons sygdom, men de er ikke et væsentligt argument imod celleterapi, da: a) de nævnte forandringer tager 10-15 år om at udvikles, hvilket skal sammenholdes med, at stamcellebaseret celleterapi typisk vil blive tilbudt 50-70-årige patienter, og b) forandringerne ikke synes at have påvirket transplantaternes funktion [13]. Endelig forventer man, at udvikling af ensartede, transplanterbare dopaminerge neuroblaster fra *master*-cellelinjer markant vil forbedre mulighederne for at sammenligne resultater mellem centre og dermed optimere behandlingen [14]. For yderligere information om overlevelse og mulige forandringer i transplantater til Huntingtonpatienter se [11].

Ved Neurobiologisk Forskning, Syddansk Universitet, udføres eksperimentelle studier af humane neurale stamcellers modning til dopaminerge nerveceller med det formål at optimere udbyttet af dopaminerge nerveceller og teste deres funktionelle effekt i dyremodeller for Parkinsons sygdom (Figur 1) [15].



NEUROLOGISKE SYGDOMME OG CELLETERAPI

Parkinsons sygdom

+ Lokaliseret tab af en bestemt celletype (dopaminerge nerveceller) svarende til motoriske symptomer. Humant proof of concept opnået ved intrastriatal transplantation af celler fra føtal ventral mesencephalon (positiv effekt på motoriske symptomer og medicinbehov, hvis der er et tilstrækkeligt antal overlevende dopaminerge neuroner).

– Transplantater placeres i basalganglier – ikke i substantia nigra – med øget risiko for ufuldstændig etablering af normale neuronale netværk. Ved sygdommen ses også tab af andre dopaminerge og noradrenerge nerveceller, samt ikkemotoriske kognitive symptomer. Udvikling af dyskinesi, sandsynligvis pga. forekomst af serotonerge neuroner i transplantaterne af føtal væv. Transplantater kan efter en år-række udvikle parkinsonistiske celleforandringer, som dog ikke er bevist at påvirke transplantaternes funktion.

Chorea Huntington

+ Primært tab af bestemt neurontype (medium-sized spiny neuron) i basalganglier. Humant proof of concept med intrastriatal transplantation af cellesuspension fra føtal basalgangliæ væv.

– Føtale transplantater stopper ikke degeneration af basalganglier og hjernebark, som ikke har relation til transplantatet.

Amyotrofisk lateral sklerose

+ Tab af veldefineret celletype: motoriske forhornsceller i rygmarven.

– Progredierende sygdom med heterogent tab af motorneuroner på forskellige niveauer af rygmarven, hvilket gør homotopisk transplantation særdeles vanskelig.

Sklerose

+ Tab af en bestemt celletype: myelindannende oligodendrocytter i centralnervesystemet.

– Disseminerede (spredte) læsioner; multiple transplantationer er derfor nødvendige, medmindre systemisk applicerede celler selv kan søge mod læsions-

stederne (*homing*). Autoimmun sygdom, ved hvilken transplanterede celler må formodes at blive angrebet af sygdommen. En mulig løsning kunne være transplantation af såvel oligodendroblaster til centralnervesystemet som etablering af et »nyt« immunsystem ved transplantation af egne bloddannende stamceller, der er isoleret fra blodet inden kemoterapeutisk ødelæggelse af det oprindelige immunsystem.

Alzheimers sygdom

+ Mulig effekt af neuroprotektive og antiinflammatoriske stoffer, der er frigivet fra intracerebrale indkapslede cellefabrikker i igangværende humane studier. Primært fokalt tab af nerveceller i hippocampusområdet.

– Ikke humant proof of concept. Tab af forskellige nervecelletyper i hjernebarken; det er vanskeligt at definere målområde og celletype for transplantation.

Rygmarvsskader

+ Mulig effekt af humerale neurotrofiske og antiinflammatoriske faktorer fra transplanterede »cellefabrikker«.

– Tab af forskellige nerve- og gliacelletyper og afbrydelse af lange nervebaner medfører behov for kombinationsterapi i form af brobygning, celleerstatning og vækstfaktorer.

Cerebral iskæmi, haemorrhagia cerebri

+ Mulig effekt af humerale neurotrofiske og antiinflammatoriske faktorer fra transplanterede »cellefabrikker«. Firmaet ReNeuron Ltd. er tæt på at kunne indlede et klinisk fase I-forsøg med transplantation af en neurotrof, neuronal cellelinje til områder, der er ødelagt af forudgående stroke-læsioner. En tysk neurokirurgisk gruppe har udført nogle få transplantationer af indkapslede, genmodificerede celler til akutte stroke-læsioner. For yderligere eksempler se tabel i [9].

– Variation i læsioners størrelse og beliggenhed; tab af komplekst væv med forskellige celletyper; manglende systematik og sammenlignelighed i de fleste cellefabrik/vækstfaktor-studier.

INDUCEREDE PLURIPOTENTE STAMCELLER – TERAPI OG PATOGENESE

Baseret på forskningen i embryonale stamceller og kernetransplantation (terapeutisk kloning) kan man nu ved tilførsel af 2-4 gener/transkriptionsfaktorer, som er aktive i embryonale stamceller, reprogrammere modne somatiske celler. For eksempel kan humane bindevævsceller reprogrammeres, så de får egenskaber som embryonale stamceller. Ved brug af standardiserede protokoller og cellespecifik differentiering af sådanne humane, inducerede pluripotente stamceller (iPS)-celler vil man fra det enkelte individ kunne producere celler af forskellig type til autolog transplantation uden risiko for immunologisk afstødning. Neurale cellelinjer fra personer med neurodegenerative sygdomme vil tilsvarende kunne anvendes til eksperimentelle studier af sygdomsmekanismer og test af medicin. Indtil nu er det lykkedes at behandle parkinsonistiske rotter med neurale celler udviklet fra iPS-celler, der var frembragt ved reprogrammering af bindevævsceller [16]. Bindevævsceller fra patienter med Parkinsons sygdom [17], amyotrofisk lateral sklerose [18] og spinal muskel-

dystrofi [19] er desuden blevet reprogrammeret til iPS-celler og uddifferentieret til henholdsvis dopaminproducerende celler og motorneuroner med henblik studier af sygdomsmekanismer [20].

CELLETERAPI BASERET PÅ CELLEFABRIKSKONCEPTET

Som spin-off fra tidligere studier af neuronal transdifferentiering af bloddannende og mesenkymale stamceller fra knoglemarven (som ikke er bekræftet), synes det klart, at såvel mesenkymale som neurale progenitorceller, der er transplanteret til læsionsområder i hjernen, kan reducere omfanget af cerebrale infarkter og funktionelle udfald gennem frisætning af neuroprotektive, antiinflammatoriske og angiogenetisk aktive stoffer [9]. Afprøvning af sådanne humortalt virkende cellefabrikker i kliniske fase I-forsøg er igangsat eller forestående på patienter med cerebrale infarkter (ReNeuron, Ltd., London i samarbejde med Glasgow Southern General Hospital, Scotland), rygmarvsskader (Geron Corporation, California, USA) og Alzheimers sygdom (NsGene A/S, Ballerup). Cellerne, som i visse tilfælde er genmodificerede, transplanteres enten direkte til læsionsområderne eller

indsættes indkapslet med mulighed for mekanisk fjernelse. Cellefabrikkonceptet er i øvrigt det nærmeste, man – meget venligt sagt – kommer et biologisk funderet argument for den »stamcelleterapi« mod degenerative sygdomme, som diverse klinikker i udlandet uden videnskabelig evidens tilbyder i form af autolog transplantation af personers egne knoglemarvsceller.

KONKLUSION

Celleterapi mod neurologiske sygdomme med transplantation af stamcellederivede celletyper til erstatning af tabte celler eller med henblik på lokal humoral frigørelse af neuroprotektive og/eller restorative stoffer er i flere tilfælde på vej mod klinisk afprøvning, primært for at vurdere de sikkerhedsmæssige aspekter, men også for at vurdere en mulig effekt. Fremskridt på området er baseret på multidisciplinær translational forskning, herunder på samarbejde med regulatoriske myndigheder. På grundlag af eksisterende *proof of principle*, opnået ved transplantation af føtalt væv, forventes Parkinsons sygdom at være tættest på regulær eksperimentel klinisk behandling, mens »cellefabrikker«, der producerer humorale faktorer, kan vise sig at blive gavnlige i behandling af cerebral infarkt eller Alzheimers sygdom.

KORRESPONDANCE: Jens Zimmer Rasmussen, Neurobiologisk Forskning, Institut for Molekylær Medicin, Syddansk Universitet, Winsløwparken 21 st., 5000 Odense C. E-mail: jzimmer@health.sdu.dk

ANTAGET : 24. august 2010

INTERESSEKONFLIKTER: Ingen

LITTERATUR

1. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 2002;22:629-34.
2. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998;4:1313-7.
3. Knoth R, Singec I, Ditter M et al. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 2010;5:e8809.
4. Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2001;21:1628-34.
5. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000;20:9104-10.
6. Garthe A, Behr J, Kempermann G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One* 2009;4:e5464.
7. Thored P, Wood J, Arvidsson A et al. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 2007;38:3032-9.
8. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 2000;405:951-5.
9. Zhang ZG, Chopp M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol* 2009;8:491-500.
10. Piccini P, Pavese N, Hagell P et al. Factors affecting the clinical outcome after neural transplantation in Parkinson's disease. *Brain* 2005;128:2977-86.
11. Bachoud-Lévi AC. Neural grafts in Huntington's disease: viability after 10 years. *Lancet Neurol* 2009;8:979-81.
12. Li JY, Holton JL, Soulet D et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008;14:501-3.
13. Cooper O, Astradsson A, Hallett P et al. Lack of functional relevance of isolated cell damage in transplants of Parkinson's disease patients. *J Neurosci* 2009;29:256-66.
14. Lindvall O, Björklund A. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 2004;1:382-93.
15. Jensen P, Pedersen EG, Zimmer J et al. Functional effect of FGF2- and FGF8-expanded ventral mesencephalic precursor cells in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2008;1218:13-20.
16. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5856-61.
17. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009;136:964-77.
18. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008;321:1218-21.
19. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009;457:277-80.
20. Ebert AD, Svendsen CN. Human stem cells and drug screening: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:367-72.