

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

terapi; men trods betydelige fremskridt inden for dette felt har der vist sig uventede vanskeligheder. Således kan klonal sygdom være et problem efter behandling med genmanipulerede stamceller [13].

Til slut skal nævnes, at forudgående SCT vil gøre en patient immunologisk tolerant over for andre organer, der efterfølgende transplanteres fra den samme donor; et forhold, der måske vil kunne udnyttes til at afværge kronisk rejektion efter transplantation af solide organer [14].

Korrespondance: Carsten Heilmann, Pædiatrisk Klinik II 4064, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø.

Antaget den 5. november 2003.

H:S Rigshospitalet, Pædiatrisk Klinik II, og Hæmatologisk Klinik II.

Litteratur

1. Frickhofen N, Heimpel H, Kaltwasser JP et al. Antithymocyte globulin with or without cyclosporin. *Blood* 2003;10:1236-42.
2. Bacigalupo A, Brand R, Oneto R et al. Treatment of acquired severe aplastic anemia: bone marrow transplantation compared with immunosuppressive therapy. *The European Group for Blood and Marrow Transplantation experience. Semin Hematol* 2000;37:69-80.
3. Storb R, Etzioni R, Anasetti C et al. Cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin in preparation for allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia. *Blood* 1994;84:941-9.
4. Bacigalupo A, Oneto R, Bruno B et al. Current results of bone marrow transplantation in patients with acquired severe aplastic anemia. Report of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. On behalf of the Working Party on Severe Aplastic Anemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Acta Haematol* 2000;103:19-25.
5. Olivieri NF. The beta-thalassemias. *N Engl J Med* 1999; 341:99-109.
6. Lucarelli G, Galimberti M, Giardini C et al. Bone marrow transplantation in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850:270-5.
7. Antoine C, Müller S, Cant A et al. Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99. *Lancet* 2003;361:553-60.
8. Alter BP. Cancer in Fanconi anemia. 1927-2001. *Cancer* 2003; 97:425-40.
9. Gluckman E, Auerbach AD, Horowitz MM et al. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Blood* 1995; 86:2856-62.
10. Guardiola P, Pasquini R, Dokal I et al. Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2000; 95:422-9.
11. Krivit W. Stem cell bone marrow transplantation in patients with metabolic storage diseases. *Adv Pediatr* 2002;49:359-78.
12. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321:1174-8.
13. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003;348:255-6.
14. Jacobsen N, Taaning E, Ladefoged J et al. Tolerance to an HLA-B, DR disparate kidney allograft after bone-marrow transplantation from the same donor. *Lancet* 1994;i:800-1.

Mesenkymal stamcelleterapi – nøglen til regenerativ medicin?

Moustapha Kassem, Jens Kastrup, Gitte Olsen & Hans Erik Johnsen

Resumé

Mesenkymale stamceller (MSC) findes i knoglemarven og kan blive ophav til forskellige celletyper, f.eks. osteoblaster, kondrocytter, adipocytter, endotelceller og myocytter. MSC isoleres fra knoglemarven ved hjælp af fysiske eller kombinerede fysiske og immunologiske metoder. MSC kan også isoleres fra perifert blod og fra »stroma« af mange organer. Der er gennemført flere studier, som viser, at det praktisk er muligt at anvende MSC i klinikken f.eks. i behandling af store knogle- og bruskdefekter, til gendannelse af blodkar (vaskulogenese og angiogenese), i behandling af ikkehelende hudsår og ved systemisk transplantation sammen med hæmatopoietisk stamcelletransplantation eller til behandling af systemiske knoglesygdomme. Mange af disse studier er så lovende, at det kan forventes, at behandling med MSC vil blive akuel i den nærmeste fremtid.

Mesenkymale stamceller (MSC), også kaldet marvstromale celler eller multipotente *adult progenitor* celler (MAPC), findes i knoglemarven blandt de ikkehæmopoietiske celler. I øjeblikket er der stor interesse for forskning i MSC-biologien, idet resultaterne i nyere studier tyder på, at differentieringspotentialet for disse celler er meget større end tidligere antaget, og at de kan anvendes i behandling af en række sygdomme.

MSC-biologien er beskrevet i en tidligere oversigtsartikel i Ugeskrift for Læger [1]. Formålet med denne nye oversigtsartikel er derfor at opdatere emnet med de nyeste forskningsresultater.

Isolation af MSC fra knoglemarven, »stromaet« af mange organer og fra perifert blod

Der anvendes forskellige metoder til isolering af hMSC fra

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

knoglemarven. Den traditionelle metode er baseret på isolering af hMSC fra mononukleær cellefraktion af knoglemarven, ved at de adhærer til plastikoverfladen af dyrkningsflasker [2]. Der er beskrevet flere alternative metoder til at isolere en mere homogen cellepopulation baseret på cellernes immunologiske eller kombinerede immunologiske og fysiske egenskaber [3, 4]. MSC kan også isoleres fra det stromale væv fra mange organer. For eksempel kan MSC isoleres fra fedtvæv, muskler, synovialmembraner, føtal pancreas, lever, hjerne og vaskulære elementer i mælketænder [5]. MSC kan også isoleres fra perifert blod [6] og navlestrengsblod [7].

Karakterisering af MSC

Morfologisk er MSC fibroblastlignende celler. De udtrykker ikke overfladeantigener, der er karakteristiske for hæmatologiske stamceller, men er positive for stromacellemarkerne Stro-1 og CD105. MSC kan in vitro og in vivo uddifferentieres til flere forskellige mesodermderiverede celletyper, inkl. osteoblaster, adipocytter, kondrocytter og myocytter, men også til ikkemesodermderiverede celletyper som neuralceller, leverceller og insulin-producerende β -celler [8]. Den sidstnævnte proces, hvor celler kan differentiere til andre celletyper end dem, der findes i det oprindelige kimmællelag, kaldes transdifferentiering.

Klinisk anvendelse af MSC: regenerativ medicin

Regenerativ medicin er en ny medicinsk disciplin, som har til formål at anvende stamceller til behandling af degenerative og aldersbetingede sygdomme (Fig. 1). På grund af en række praktiske egenskaber ved MSC er de formentlig den første stamcelletype, som vil blive anvendt i klinisk behandling. MSC-isolering er nem at foretage, og der kræves kun en knoglemarvspunktur, som er en rutineprocedure på alle medicinske afdelinger. MSC kan dyrkes in vitro i autolog eller allogent serum fra mennesker, derved kan man undgå kontaminering med mulig infektionsreagens fra dyr. MSC kan dyrkes fra pa-

tientens egen knoglemarv (autolog MSC), og der er derfor ingen risiko for immunologiske reaktioner. Endelig medfører brugen af autologe MSC (i modsætning til brugen af embryonale stamceller) ikke etiske problemer, idet det grundlæggende blot drejer sig om autolog transplantation.

Der er gennemført flere studier, som viser, at det praktisk er muligt at anvende MSC i klinisk behandling. Disse studier er typisk karakteriseret som *proof-of-principle*-forsøg med få patienter, uden kontrolpersoner eller randomisering. I de følgende afsnit vil vi redegøre for virkningerne af MSC ved sygdomme, hvor behandling med MSC enten allerede er afprøvet hos patienter, eller hvor de rapporterede resultater fra eksperimenter i dyremodeller er så lovende, at det kan forventes, at behandling med MSC vil blive mulig i den nærmeste fremtid.

Med MSC kan man reparere knogle- og bruskefejder

Da MSC kan differentiere til osteoblaster, har man anvendt MSC til reparation af ikkehelende knoglebrud eller til vævsrekonstruktion efter traume. Der findes i litteraturen beskrevet flere dyrestudier, som viser, at MSC kan bruges til udbedring af knoglededefekter, især efter transduktion af cellerne med gener, som fremmer knogledannelse [10], eller efter dyrkning på specielle knoglefremmende substrater [11]. Man har prøvet MSC-transplantation til reparation af store knoglededefekter hos mennesker. I en kasuistisk publicering har man rapporteret om behandling med gode resultater af store knoglededefekter hos tre patienter [12]. Ligeledes har man ved dyreforsøg vist, at MSC kan differentiere til kondrocytter, og at de kan anvendes til reparation af bruskefejder [13]. Disse fund kan blive relevante i behandlingen af patienter med lokaliserede bruskskader.

MSC til etablering af nye blodkar (vaskulogenese) og muskelceller (myogenese)

Mononukleære celler fra knoglemarven (MNC) eller en subpopulation heraf, AC133⁺ (hæmatopoietisk stromacellemarker), har i flere mindre, urandomiserede, kliniske sikkerhedsstudier været anvendt for at opnå vækst af kollaterale blodkar (angiogenese) eller dannelse af de novo-blodkar (vaskulogenese) efter akut hjerteinfarkt (AMI) og ved kronisk myokardieiskæmi [14-16]. Både implantation direkte i myokardiet og intrakoronar infusion af cellerne syntes at bedre hjertemusklens blodgennemstrømning og funktion. Intramyokardial injektion af skeletmuskelmuskelceller har ligeledes været rapporteret at kunne forbedre hjertes pumpeevne hos patienter med svær hjerteinsufficiens [17], men ved brug af denne celletype har det dog vist sig, at mange af patienterne fik betydelige behandlingskrævende ventrikulære rytmeforstyrrelser.

I et mindre, randomiseret, klinisk studie af patienter med perifer ekstremitetsiskæmi uden yderligere medicinske og kirurgiske behandlingsmuligheder viste behandling med injektion af MNC fra knoglemarven (som indeholder MSC og

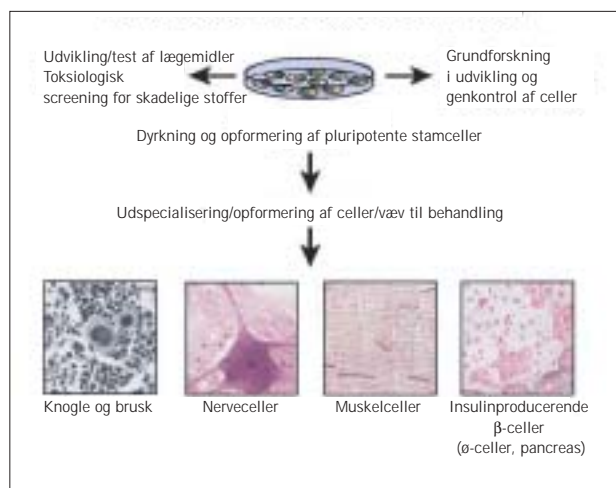


Fig. 1. Mulig klinisk anvendelse af mesenchymale stamceller (modificeret fra [9]).

også andre stamcelletyper) direkte i m. gastrocnemius at forbedre ilttensionen i benene og øge gangdistancen [18].

Man har også diskuteret, om man kan bruge MSC i behandlingen af patienter med cerebrale infarkter [19]. I en rottemodel med induktion af cerebralt infarkt påvistes en gavnlig effekt af lokal implantation af MSC på udbredelsen af hjerneskade. Det er interessant, at de positive effekter af MSC-implantation ikke skyldtes transdifferentiering af MSC til hjerneceller, men en lokal modificerende effekt af MSC på vævsskaden.

MSC kan bruges til behandling af ikkehelende hudsår

Hos tre patienter, der havde kroniske, ikkehelende hudsår trods maksimal medicinsk og kirurgisk behandling med hudautograft, var lokal applikation af MSC både klinisk og histologisk effektiv [20].

MSC kan bruges i kombination med genterapi

MSC har vist sig at være en god vehikel til genterapi. Man overfører eksogene gener til MSC og disse genmodificerede celler kan overleve in vivo i en længere periode. For eksempel har man vist, at MSC med overført IL-3 [21] eller faktor IX-gen [22] kan producere biologisk aktive proteiner, henholdsvis IL-3 og faktor IX, over en længere periode. Man har diskuteret, om man kan transplantere disse genmodificerede celler til behandlingen af patienter med manglende eller nedsat produktion af proteiner eller hormoner.

Systemisk transplantation

Tilstedeværelsen af cirkulerende MSC kunne tyde på, at man kan anvende MSC i en systemisk transplantationbehandling, analogt med brugen af hæmopoietiske stamceller (HSC). Det er dog fortsat meget kontroversielt. Muligheden for ved MSC at krydse den vaskulære barriere in vivo er begrænset [23]. Interessant, men også meget diskutabelt, har *Horowitz et al* rapporteret om, at systemisk transplantation af HLA-matchet allogene MSC var effektivt hos (om end få) patienter med svær osteogenesis imperfecta [24].

Man har også undersøgt systemisk transplantation af MSC sammen med HSC mhp. at optimere det hæmopoietiske mikromiljø og hermed forbedre *engraftment* og regeneration af hæmopoiesen. Hypotesen er baseret på flere in vitro-studier, som har vist, at knoglemarvens stroma efter helkropsbestråling (som udføres inden HSC-transplantation) har nedsat evne til at understøtte vækst af HSC [25]. I immuninkompetente mus er det for nylig vist, at samtidig indgift af MSC og HSC øger myelo- og megakaryocytopoiesen i forhold til ved indgift af HSC alene. Dette gjaldt specielt for grafter med få HSC, hvorimod der for de større HSC-grafter ikke var nogen gevinst ved den samtidige MSC-infusion [26]. I det eneste kliniske studie, der hidtil er udført, er det vist, at koinfusion af autologe ex vivo-ekspanderede MSC kan foregå uden at påføre patienterne yderligere bivirkninger, og at kotransplantation af MSC hos disse patienter med cancer mammae, be-

handlet med højdosis kemoterapi og autolog HSC-transplantation, syntes at bedre den hæmopoietiske regeneration [27].

Begrænsning i brugen af MSC i behandling

Anvendelse af MSC i behandling møder to væsentlige problemer. For det første kræver anvendelsen af MSC i klinisk terapi et stort antal celler, men MSC har begrænset livslængde in vitro, og det er derfor kun muligt at få et begrænset antal celler via celledyrkning. Årsagen til dette er, at de dyrkede MSC i de fleste protokoller er telomerasenegative [28]. Induktion af et højt niveau af cellulær telomeraseaktivitet kunne forlænge livslængden for MSC in vitro og derfor give mulighed for at få et tilstrækkeligt antal celler til kliniske behandlingsprotokoller [29]. Et andet potentielt problem er den multipotentialitet (eller pluripotentialitet), som cellerne udviser. Selv om nuværende data viser, at cellernes mikromiljø begrænser cellernes differentieringsmuligheder, og at en implanteret MSC således ikke danner »teratomer« in vivo, arbejder man med at udvikle differentieringsprotokoller, som inducerer differentieringen af MSC til en bestemt celletype før transplantation.

Fremtidige perspektiver

Det forventes, at anvendelsen af MSC i den kliniske behandling af diverse degenerative og aldersbetingede sygdomme vil have fundet sin plads ved siden af den nuværende medikamentelle behandling inden for en overskuelig årrække. Stamcellebehandling kan i nogle tilfælde potentielt rette de patofysiologiske processer, som er årsag til visse sygdommes udvikling, eller udbedre vævsskader, og behandlingen er derfor et meget lovende nyt princip. En anden vigtig gevinst ved stamcelleforskning er informationer om, hvordan vi kan regulere de endogene stamcellers aktivitet og funktion i forskellige organer, så det bliver muligt at forbedre vævsregeneration og -fornyelse, og dermed undgå eller reducere de funktionstab, som er resultatet af aldring og akutte eller kroniske sygdomme.

Korrespondance: *Moustapha Kassem*, Endokrinologisk Afdeling M, Odense Universitetshospital, DK-5000 Odense C.

Antaget den 29. oktober 2003.

Odense Universitetshospital, Endokrinologisk Afdeling M, H:S Rigshospitalet, Hjertecenteret, Medicinsk Afdeling B, Århus Universitetshospital, Århus Amtssygehus, Hæmatologisk Afdeling, og Amtssygehuset i Herlev, Hæmatologisk Afdeling.

Litteratur

1. Justesen J, Stenderup K, Kassem MS. Mesenkymale stamceller. Ugeskr Læger 2001;163:5491-5.
2. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. 1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. J Bone Miner Res 1993;8:1453-8.
3. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. J Cell Sci 2003;116:1827-35.
4. Reyes M, Lund T, Lenvik T et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood 2001;98:2615-25.
5. Miura M, Gronthos S, Zhao M et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:5807-12.
6. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S et al. Circulating skeletal stem cells. J Cell Biol 2001;153:1133-40.
7. Rosada C, Justesen J, Melsvik D et al. The human umbilical cord blood:

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

- a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int* 2003;72:135-42.
8. Ianus A, Holz GG, Theise ND et al. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003;111:843-50.
 9. Stem cells <http://stemcells.nih.gov/stemcell/scireport.asp/Maj,2000>.
 10. Peng H, Wright V, Usas A et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 2002;110:751-9.
 11. Ikeuchi M, Dohi Y, Horiuchi K et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes osteogenesis within atelopeptide type I collagen solution by combination with rat cultured marrow cells. *J Biomed Mater Res* 2002;60:61-9.
 12. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385-6.
 13. Adachi N, Sato K, Usas A et al. Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *J Rheumatol* 2002;29:1920-30.
 14. Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction – (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-17.
 15. Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913-8.
 16. Tse HF, Kwong YL, Chan JKF et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47-9.
 17. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279-80.
 18. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:427-35.
 19. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* 2002;90:284-8.
 20. Badiavas EV, Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol* 2003;139:510-6.
 21. Lee K, Majumdar MK, Buyaner D et al. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol Ther* 2001;3:857-66.
 22. Gordon EM, Skotzko M, Kundu RK et al. Capture and expansion of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with a transforming growth factor-beta1-von Willebrand's factor fusion protein for retrovirus-mediated delivery of coagulation factor IX. *Hum Gene Ther* 1997;8:1385-94.
 23. Devine SM, Cobbs C, Jennings M et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003;101:2999-3001.
 24. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-13.
 25. Domenech J, Roingard F, Herault O et al. Changes in the functional capacity of marrow stromal cells after autologous bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 1998;29:533-46.
 26. Angelopoulou M, Novelli E, Grove JE et al. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2003;31:413-20.
 27. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW et al. Rapid hematopoietic recovery after co-infusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18:307-16.
 28. Kveiborg M, Kassem M, Langdahl B et al. Telomere shortening during aging of human osteoblasts in vitro and leukocytes in vivo: lack of excessive telomere loss in osteoporotic patients. *Mech Ageing Dev* 1999;106:261-71.
 29. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 2002;20:592-6.

Gendannelse af myokardium med stamcelleterapi

Historiske og biologiske perspektiver

Jacob Fog Bentzon, Erling Falk & Moustapha S. Kassem

Resumé

Den simple opdagelse, at hjertemuskelceller dannes i hjertet hos voksne mennesker, tegner spændende nye perspektiver for behandling og forebyggelse af hjertesvigt. Efter det nye paradigme er forstærkning af den fysiologiske regeneration ved hjælp af stamcelletransplantation en rationel behandling, og det princip har allerede været undersøgt i flere kliniske forsøg. De initialt lovende resultater forsøges nu konfirmeret i dobbeltblindede, randomiserede, længerevarende forsøg.

På det basale niveau har erkendelsen placeret en biologisk gåde centralt i studiet af hjertets sygdomme. Evnen til at gendanne funktionelt væv – rekonstitution – er en egenskab der ikke direkte følger af evnen til at regenerere celler. Uanset at celler kan regenereres i de fleste væv hos mennesker, heler vi med ardannelse. De bagvedliggende faktorer er dårligt forståede, men muligvis kan stamcelletransplantation med markant opgradering af lokal regenerationskapacitet modulere heling mod rekonstitution frem for ardannelse.

Det er en indgroet lære at den vigtigste celle i kardiologien, hjertemuskelcellen, ikke kan dele sig og derved erstatte celler der er tabt som følge af iskæmi eller idiopatisk kardiomyopati. Dogmet dateres tilbage til den begavede italienske patolog *Giulio Bizzozero* (1846-1901). Efter blandt andet at have vist at knoglemarven er kilde til blodets celler, og have identificeret og foreslået funktionen af *piastrine* (små plader) – eller blodplader – foretog han på baggrund af egne og andres resultater en kategorisering af kroppens væv efter deres evne til at regenerere [1] (**Fig. 1**). *Walther Flemming* (1843-1905) havde opdaget og beskrevet mitose i årtierne før, og det stod klart at forekomsten af mitotiske celledelinger varierede meget mellem væv. *Bizzozero* inddelte i labile væv som undergår kontinuerlig cellefornyelse gennem hele livet, stabile væv hvor celledannelse ikke ses under normale forhold, men kun i forbindelse med visse patologiske tilstande, og permanente væv hvor celledannelse er irreversibelt standset ved eller kort efter fødslen. I den sidste kategori placerede han nervevæv og