Stamceller

– biologi, potentialer og risici

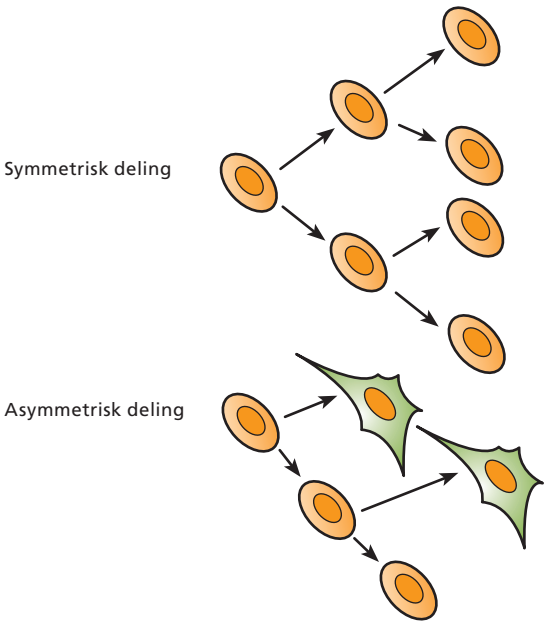
Af Professor Poul Hyttel, Københavns Universitet

FOTOMONTAGE: CARSTEN BRODER HANSEN

Stamceller kan blive ved med at dele sig i al uendelighed og stamceller kan specialisere sig til én eller flere af kroppens celletyper. Stamceller giver associationer om behandling af sygdomme ved indsættelse af nye reserve-celler. Et eksempel er behandling af rygmarvsskader med nervestamceller, og det er korrekt, at stamceller har store terapeutiske perspektiver, hvilket er en af grundene til, at forskningsområdet er i voldsom vækst. Arbejdet med stamceller har dog også vist, at der kan være rigtigt langt fra forskning til anvendelig behandling.

GENERELT OM STAMCELLER

I stamceller kører cellecyklus uafbrudt med den ene mitotiske deling efter den anden, mens "normale" celler ophører med at dele sig efter et vist antal delinger. Denne egenskab betegnes som evnen til selvfornyelse. Dette karaktertræk baserer sig bl.a. på, at stamceller danner enzymet telomerase, som genopbygger kromosomenderne (telomererne), som ellers ville blive afkortet ved hver celledeling. Når stamceller deler sig, sker dette enten symmetrisk eller asymmetrisk (figur 1). Ved en symmetrisk deling deler en stamcelle sig i to nye døtreceller, som hver især er tro kopier af den første. De er dermed begge stamceller. Ved en asymmetrisk deling deler stamcellen sig i én celle, som er en stamcelle, og én celle som differentierer sig til en færdig kropscelle. Symmetriske stamcelledelinger ses bl.a. i embryonale stamceller og resulterer i, at der bliver flere og flere stamceller i den dyrkningsskål, hvori cellerne lever. Asymmetriske stamcelledelinger sker typisk i vores krop, hvor stamceller har til opgave at vedligeholde væv, hvor der sker udskiftning af celler. Et eksempel herpå er huden, hvor der i det nederste cellelag af hudens epithel (epidermis) ligger stamceller, som hele tiden deler sig asymmetrisk til nye stamceller (for at opretholde stamcellebefolkningen i huden) og celler, som straks differentierer sig til hudceller, der gradvist undergår forhorning.



Figur 1. Symmetrisk og asymmetrisk deling af stamceller

STAMCELLERS EVNE TIL AT SPECIALISERE SIG

Stamceller er i sig selv udifferentierede (uspecialiserede). Det kan man se på deres indhold af cellebestanddele: De har et stort kernelegeme (nucleolus), som producerer rigeligt med ribosomer, hviket gør stamcellerne i stand til at have en aktiv

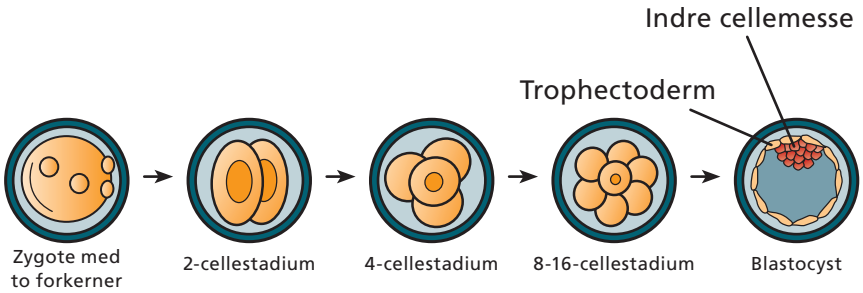
proteinsyntese, som er meget vigtig, når de hele tiden skal dele sig og opbygge nyt cytoplasma. Til gengæld har de kun få organeller i cytoplasma ud over mitochondrier, som giver energi til de fortsatte celledelinger. Stamceller har til gengæld evnen til at differentiere sig til én eller flere af de i alt ca. 230 forskellige typer af celler, som findes i patterdyrkroppen (nerveceller, leverceller o.s.v.). Den mest logiske måde at systematisere stamceller på er ved at karakterisere dem ud fra deres evne til at differentiere sig til kropsceller:

- Stamceller, som kan give ophav til alle kroppens celletyper, betegnes som *pluripotente*
- Stamceller, som kan give ophav til et vist udsnit deraf, betegnes som *multipotente*
- Stamceller, som kun kan give ophav til en enkelt af kroppens celletyper, betegnes som *unipotente*

Stamceller og fosterudvikling hænger uløseligt sammen. Fra befrugtningen og frem gennem anlæggelsen af de forskellige væv og organer, betjener forsteranlægget (embryo) sig af stamcellepincipperne, hvad angår celledelinger og differentiering, til at opbygge de mange komplicerede organer, vi består af, og som hver især udgøres af mange forskellige celletyper. Studier af embryoner er derfor også et vigtigt led i stamcelleforskningen, idet embryonerne er kilde til al information om, hvorledes stamceller deler sig og siden differentierer sig til forskellige celletyper. Det er ud fra embryoner, vi kan aflæse, hvorledes stamceller kan dyrkes og kontrolleres i dyrkningsskålen, så vi kan anvende dem kunstigt til forsknings- og behandlingsformål. Præsentationen af stamcellerne tager derfor udgangspunkt i det helt tidlige knapt én uge gamle embryo og de stamceller, som kommer derfra.

EMBRYONAL UDVIKLING

De pluripotente stamceller er tæt forbundne med den allertidligste embryonaludvikling. Det étcellede befrugtede æg, zygoten, har ligesom hver enkelt celle i de efterfølgende 2- og 4-cellede embryoner evnen til at udvikle sig til et fuldt udviklet foster med fosterhinder og moderkage. Zygoten og cellerne i disse 2- og 4-cellede embryoner betegnes på grund af denne egenskab som totipotente. Når embryo udvikler sig videre og når frem til 8- til 16-cellestadiet, begynder cellerne at opdele sig i to populationer: En indre cellemasse, som anlægger selve embryo, og et ydre cellelag (trophectodermen), som bliver del af den yderste fosterhinde og er involveret i anlæggelsen af moderkagen (figur 2). Trophectodermen udvikler væsketransporterende egenskaber, hvilket fører til, at der inden for dette cellelag dannes en væskefyldt hulhed, hvori den indre cellemasse er placeret i den ene pol. Hermed har embryo udviklet sig til det stadium, som beteg-

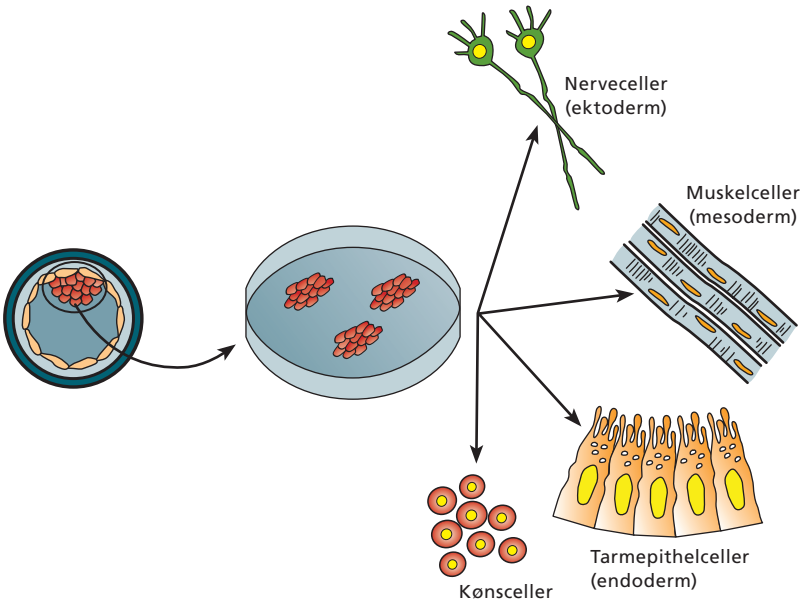


Figur 2. Udviklingen af det befrugtede æg gennem den første uge.

nes en blastocyst. Cellerne i den indre cellemasse er pluripotente og har evnen til at differentiere sig til alle celletyper i kroppen, mens trophectodermen er et differentieret epithel. Nogle dage senere i embryonaludviklingen indtræder gastrulationen, som er den proces, hvorved de tre kimblade, ektoderm, mesoderm og endoderm, samt de celler, som giver ophav til kønscellerne, anlægges. Cellerne i de tre kimblade har et mere begrænset differentieringspotentiale; de betegnes som multipotente.

EMBRYONALE STAMCELLER (ES CELLER) OG GENETISKE MODIFIKATIONER

I 1981 lykkedes det parallelt for to forskergrupper at isolere og dyrke de pluripotente celler fra den indre cellemasse af museblastocyster; de såkaldte embryonale stamceller (ES celler). Det viste sig, at hvis cellerne dyrkedes under optimale betingelser, så havde de evne til fortsat at dele sig, alt imens de bevarede deres pluripotens – evnen til at differentiere sig til alle kroppens celletyper, de tre kimblade, ektoderm, mesoderm, endoderm og kønscellerne (figur 3). Som følge af den sidste egenskab viste det sig endvidere, at hvis ES celler blev indsat i en blastocyst, integrerede de sig i den indre cellemasse og bidrog til udviklingen af den mus, som fødtes derefter. Et sådant individ betegnes som en kimær, idet den består af en blanding af to cellepopulationer: Celler fra blastocystens oprindelige indre cellemasse og celler udviklet fra de indsatte ES celler. Det er vigtigt at forstå, at en kimær ikke er en krydsning (hybrid), idet en krydsning er et individ, hvor hver celle har den samme arvemasse, som blot er den kombinerede arvemasse af de to racer, som krydses (f.eks. en labrador og en schæfer). I en kimær har en del af cellerne den oprindelige blastocysts arvemasse, mens resten har stamcellernes arvemasse. Det er som et dyr, der er bygget af sorte og hvide legoklodser.

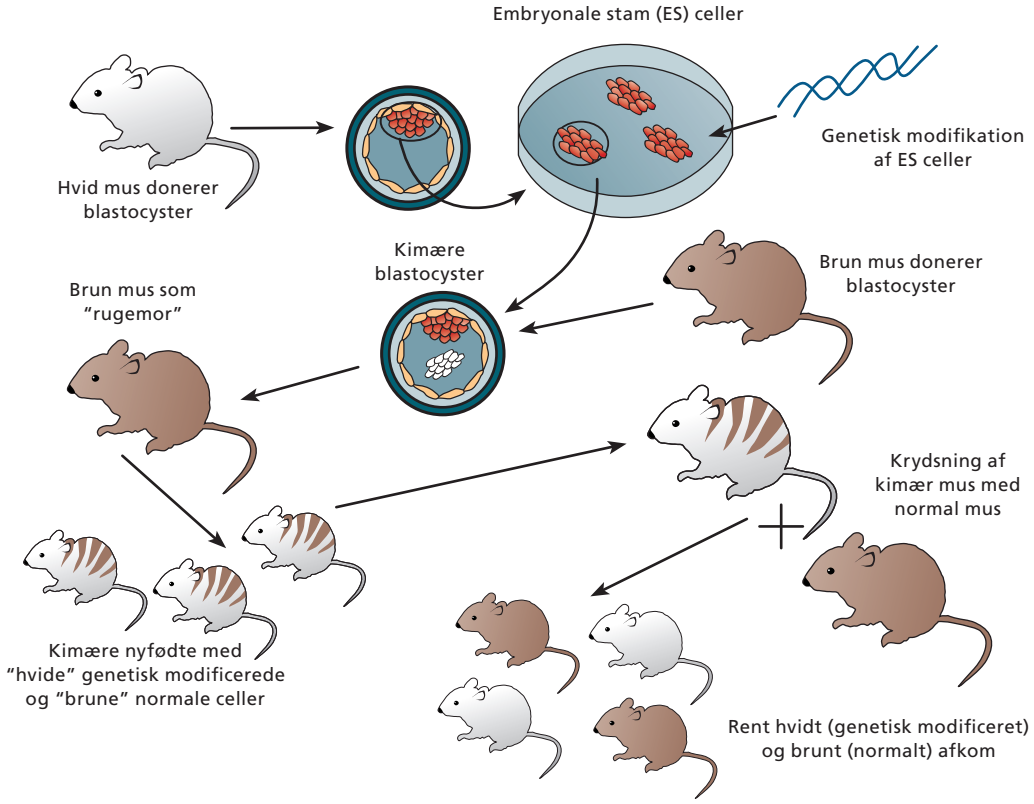


Figur 3. Isolering af den indre cellemasse fra blastocyst og dyrkning af cellerne som pluripotente stamceller, der kan differentiere sig til alle kroppens celletyper.

Teknikken til at fremstille kimære individer på baggrund af ES celler åbnede mulighed for på avanceret vis at tilvirke genetisk modificerede (gensplejsede) mus: ES celler er, bl.a. på grund af deres evne til fortsatte delinger in vitro, særdeles velegnede til at foretage komplicerede genetiske modifikationer på. Sådanne genetiske modifikationer kan være indsættelse af nye gener i musens arvemasse eller såkaldt knock-out (inaktivering) af eksisterende gener i arvemassen. Indsættes de genetisk modificerede ES celler i blastocyster, opnås genetisk modificerede kimærer, og hvis de modificerede ES celler giver ophav til kønsceller i kimærerne, kan der opnås rene genetisk modificerede individer ved at avle videre på kimærerne (figur 4).

DOLLY OG ANDRE STORE HUSDYR

Muligheden for at tilvirke dyr med avancerede genetiske modifikationer ved hjælp af ES celler gjorde disse celler attraktive til forsøg på de større husdyr. Det blev målet at fremstille genetisk modificerede køer, får og grise. I løbet af firserne blev der foretaget en række forsøg på at etablere ES celler hos kvæg, svin og får, men alle forsøgene mislyk-



Figur 4. Brugen af embryonale stamceller hos mus til at tilvirke kimære embryoner og genetisk modificeret afkom.

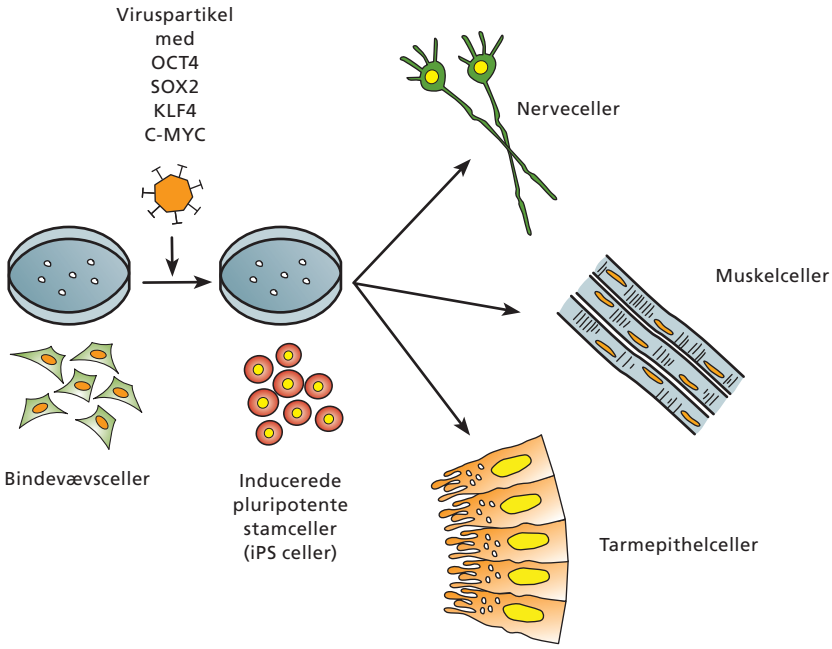
kedes, idet cellerne ikke kunne holdes pluripotente over længere tids dyrkning; de differentierede sig spontant til forskellige celletyper. Det lykkedes derfor heller ikke at anvende disse celler til genetiske modifikationer og til fremstilling af genetisk modificerede kimærer, som det lod sig gøre på mus. Interessen for ES celler hos de større husdyr dalede derfor, og mulighederne for at lave genetiske modifikationer på disse dyrearter begrænsede sig hermed til meget grove, upræcise teknikker såsom injektion af gener i zygotens forkerner. Interessen for ES celler fra større husdyr blev endnu mindre, da det i 1996 (rapporteret i Nature i 1997) lykkedes Wilmut, Campbell og medarbejdere i Skotland at klone får ud fra celler, som var dyrket enten fra den indre cellemasse i blastocyster, eller som var dyrket fra yveret af et voksent får. Sidstnævnte gav ophav til Dolly. Cellerne blev indsat i ægceller, som var tømt for deres arvemasse, men som, når de fik en cellekerne indsat, opførte sig som var de blevet befrugtede og derfor satte gang i fosterudviklingen ud fra den arvemasse, som var kunstigt tilført. Fødslen af Dolly rystede de udviklingsbiologiske dogmer: Det havde været en fast overbevisning, at celler, som én gang var differentierede, ikke kunne af-differentieres og starte forfra igen. Forsøget med Dolly viste imidlertid, at en differentieret ydercelle faktisk kunne af-differentieres af ægcellen og starte forfra igen. At det dermed lod sig gøre at fremstille et individ ud fra en dyrket celle på trods af, at denne ikke var en ES celle, gjorde det muligt at foretage genetiske modifikationer på f.eks. dyrkede bindevævsceller (fibroblaster) og anvende dem til at fremstille genetisk modificerede dyr ved kloning. Dette er den dag i dag den gængse metode til at fremstille genetisk modificerede grise, kvæg og får med. Det har dog vist sig, at der er mange forhindringer i kloningsteknikken, idet omprogrammeringen af den differentierede kropscelles arvemasse til en totipotent tilstand ofte slår fejl med tab af embryoner, fostre eller nyfødte til følge.

ES CELLER OG CELLEBASERET TERAPI

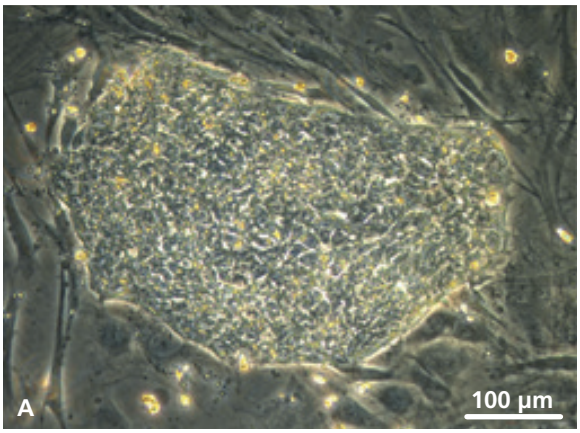
I 1991 lykkedes det Thompson og medarbejdere at isolere ES celler fra blastocyster hos mennesket. Disse celler havde samme differentieringspotentiale som ES celler fra mus; dog kunne det af etiske grunde ikke undersøges, om de kunne bidrage til dannelsen af kimært afkom. På baggrund af de forsøg, som efterfølgende fulgte med differentiering af humane ES celler til en række forskellige celletyper, opstod et voksende håb om at kunne anvende ES celler som baggrund for cellebaseret terapi. Tanken var, at differentiere ES cellerne til netop de typer af reserveceller, som individuelle patienter havde brug for såsom insulinproducerende beta-celler til sukkersyge, dopaminerge nerveceller til Parkinsons sygdom o.s.v. Sådanne behandlinger ville kræve oprettelse af ES cellebanker, idet ES cellerne for at kunne benyttes til terapi skal have samme vævstypeforenelighed med patienten, som er gældende ved organtransplantationer. Samtidig med at de mange potentialer ved ES cellebaseret terapi gav store - og måske også for store - håb, stod det også i stigende grad klart, at en sådan behandling på den anden side indebar væsentlige risici: Hvis der blandt de transplanterede celler fandtes stadigt udifferentierede ES celler, kan disse udvikle sig til uønskede celletyper eller endog kræft. Behandling af menneskelige sygdomme med reserveceller fremstillet af ES celler er endnu kun på forsøgsstadiet, og der er på nuværende tidspunkt kun givet to tilladelser til at foretage sådanne eksperimentelle behandlinger rettet mod rygmarvslæsioner og en arvelig form for blindhed.

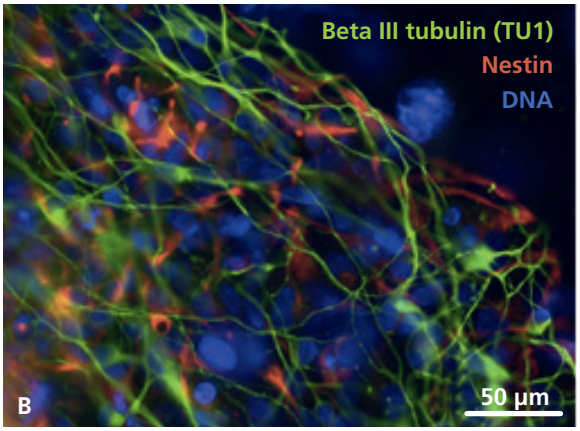
INDUCEREDE PLURIPOTENTE STAMCELLER (IPS CELLER)

En begrænsning ved terapi baseret på ES celler er nødvendigheden af vævstypeforenelighed mellem ES cellerne og patienten. For at eliminere denne begrænsning, blev der iværksat forsøg med såkaldt terapeutisk kloning. Herved forstås det forhold, at der ud fra f.eks. en fibroblast fra en given patient tilvirkes et klonet embryo, hvorfra der etableres ES celler, når det har udviklet sig til blastocyststadiet. For at lave de klonede embryoner skal bruges humane ægceller, hvilket, i kombination med, at de klonede embryoner potentielt set vil kunne udvikle sig til klonede menneskelige individer, har budt på mange etiske overvejelser af denne teknologi. Forsøg med terapeutisk kloning er derfor forbudt i mange lande inklusiv Danmark. I 2006 lykkedes det imidlertid Yamanaka og medarbejdere i Japan at udvikle en helt ny og revolutionerende metode at fremstille pluripotente stamceller på. Det var efterhånden kendt, at ES celler er karakteriseret ved udtryk af et antal helt særlige stamcellegener, som opretholder cellernes delingsevne og pluripotens. Yamanaka opstillede en række forsøg, hvor ekstra kopier af disse gener i forskellige kombinationer blev indsat og udtrykt i fibroblaster, og han kom til det helt fascinerende resultat, at ved at indsætte og udtrykke blot fire væsentlige stamcellegener, var det muligt at omprogrammere fibroblaster til pluripotente stamceller, de såkaldte inducerede pluripotente stamceller (iPS celler, figur 5).



Figur 5. Tilvirkning af inducerede pluripotente stamceller ved omprogrammering af bindevævsceller med stamcellegener pakket i viruspartikler.



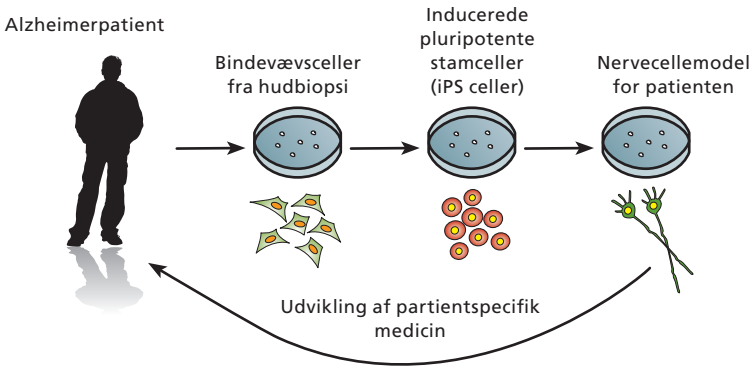


Figur 6. Inducerede pluripotente stamceller (iPS celler) fra gris. (A) Koloni af iPS celler voksende på et lag af musebindevævsceller. Cellerne er omprogrammeret ved viral indsættelse af grisegenerne *OCT4, C-MYC, SOX2* og *KLF4*. (B) Differentiering af iPS celler fra gris til nervestamceller (røde – farvet for proteinet nestin) og nerveceller (grønne – farvet for proteinet beta-III-tubulin). Cellekerner er blåfarvede for DNA.

MOD ET RESERVEDELSMENNESKE?

iPS celler har store perspektiver inden for stamcelleterapi: Med denne teknik i hånden vil det teoretisk være muligt at udtage fibroblaster fra en given patient, omprogrammere dem til iPS celler for derefter at differentiere disse til ønskede reservecellepopulationer til patienten. Sådanne reserveceller vil være fuldstændig immunkompatible med patienten og kan uden immunologiske problemer transplanteres. Der findes nu iPS celler ikke blot fra mus, men også fra mennesker, ligesom iPS celler fra grise, får og hunde også er rapporteret for nylig (figur 6)

Samtidig med nye terapeutiske muligheder med iPS celler kommer også nye risici, i kraft af den måde, cellerne er fremstillet på. For at indsætte og udtrykke de fire stamcellegener benyttedes som udgangspunkt hæmmede retroviruspartikler til at indføre disse gener i ekstra kopier, hvilket betyder, at cellerne også bærer visse sekvenser af virusgener, som kan have uforudsete effekter. Da to af de fire indsatte stamcellegener endvidere er gener, som ofte er involveret i udvikling af kræft (oncogener), skal de risici, som er forbundet med fremtidige behandlinger baseret på iPS celler, vurderes grundigt.



Figur 7. Brugen af inducerede pluripotente stamceller til at fremstille in vitro cellemodel ("mikrohjerne"), i hvilken Alzheimers sygdom kan studeres og medicin udvikles.

Der er sat fokus på metoder til omprogrammering af fibroblaster til iPS celler ved metoder, som enten tillader at fjerne de indsatte stamcellegener igen, eller som er helt fri for indsættelse af ekstra gener. Disse metoder er endnu under udvikling og kræver yderligere optimering, inden de med sikkerhed kan anvendes i terapi. Der er endnu ikke udført terapi baseret på iPS celler på mennesker, men forsøg på mus har vist, at metoden kan anvendes til behandling af flere forskellige sygdomme. Det virker umiddelbart realistisk at tro, at der kan iværksættes forsøgsmæssige behandlinger af mennesker med iPS baserede cellepopulationer inden for en 5 til 8 årig horisont.

NYE CELLEMODELLER

iPS cellerne giver også mulighed for at etablere in vitro cellemodeller for sygdomme. Princippet er, at der udtages en hudbiopsi fra patienten, og at bindevævsceller herfra omprogrammeres til iPS celler, som siden kan differentieres til den celletype, som er syg i patienten. Det har vist sig, at celler, som på denne måde er tilvirket ud fra iPS celler fra en patient, i en del tilfælde udtrykker sygdommen i dyrkningsskålen. Et eksempel er Alzheimers sygdom, hvor forskellige typer af nerveceller i hjernen gradvist uddør. Det vil være muligt at udtage fibroblaster fra sådanne patienter, omprogrammere dem til iPS celler og differentiere disse til forskellige typer af nerveceller, som i deres dyrkningsskåle vil udtrykke visse af de karakteristika, som er forbundet med Alzheimers sygdom. På denne måde kan tilvirkes en "mikrohjerne", som model for patienten, og det lader sig efterfølgende gøre på denne mikrohjerne at studere sygdommens molekylære baggrund på nærmeste hold samt teste, om forskellige stoffer har helbredende effekt derpå og således kunne tænkes at udgøre potentielle lægemidler mod sygdommen i fremtiden (figur 7). På denne måde kan vi nærme os mere og mere individualiseret behandling af alvorlige sygdomme.

I Danmark er der etableret et meget aktivt forskningskonsortium bestående af Rigshospitalet, Københavns Universitet, Aarhus Universitet og flere firmaer (Lundbeck, Bioneer og Pixigene), som har som mål at udvikle sådanne patient-specifikke iPS baserede modeller for Alzheimers sygdom og andre svære nervelidelser.

MULTIPOTENTE STAMCELLER FRA KROPPEN

Vores krop rummer en lang række mindre befolkninger af stamceller, som muligvis i fremtiden vil kunne få stor terapeutisk betydning. Alt andet lige vil langt den mest elegante stamcellebehandling af sygdomme bestå i at kunne aktivere stamceller, som allerede findes i vores egen krop. Faktisk er behandling med sådanne kropsstamceller allerede veletableret inden for de bloddannende (hæmatopoetiske) stamceller, som findes i knoglemarven: Det har gennem flere årtier været anvendt at udtage hæmatopoetiske stamceller fra knoglemarven hos patienter forud for kemoterapi, for siden at implantere dem igen til reetablering af det bloddannende system efter endt behandling. I kroppen findes befolkninger af stamceller i mange væv. Der er tidligere omtalt stamcellerne i huden, og på tilsvarende vis findes stamceller i tarmen, i musklerne, i hjernen og mange andre steder. Disse stamceller er multi- eller unipotente og har til opgave at genopbygge vævene, når der opstår skader. I knoglemarven og i fedtvæv findes ligeledes såkaldte mesenchymale stamceller, som udforskes intenst, og som har vist sig at have et bredt multipotent differentieringspotentiale. Et andet eksempel på sådanne multipotente stamceller er navlesnorsblodstamceller, som kan isoleres fra navlesnoren, nedfryses og gemmes i banker. Differentieringspotentialet af navlesnorsblodstamcellerne er heller ikke fuldt kendt, og deres terapeutiske betydning derfor uvis. Ikke desto mindre er der for nyligt rapporteret om genetablering af immunsystemet med celler deriveret fra navlesnorsstamceller.

Der er ingen tvivl om, at stamceller i fremtiden vil komme til at spille en væsentlig rolle i behandlingen af en række alvorlige sygdomme. Meget tyder på, at de pluripotente stamceller - og især iPS cellerne - har særligt store perspektiver. Der satses imidlertid også på at afdække de potentielle terapeutiske aspekter af de multipotente stamcellepopulationer, som vores krop huser.

FOTO: COLOURBOX