

Bilden visar en enda ependymcell som isolerats från hjärnvävnad. Innan den isolerades injicerades en röd fluorescerande substans (Dil) i vävnaden, en substans som nu framträder i stamcellen. De cilier som går ut åt vänster vetter normalt in mot håligheten i ventrikeln (bilden t v).

Odlade celler från en stamcell från vuxen hjärna (t h). Cellerna är märkta med antikroppar mot ett nervcellspecifikt protein (bIII-tubulin, röda celler) eller ett astrocytspecifikt protein (GFAP, gröna celler).

Stamceller i hjärnan har identifierats

## Försök med mänsklig vävnad ska bekräfta resultaten av djurstudier

**En svensk forskargrupp blev först i världen med att identifiera stamceller som kan utvecklas till nervceller i det vuxna nervsystemet. Dessa kan på sikt bli en måltavla vid farmakologisk behandling mot sjukdomar som Parkinson och Alzheimer. Nu planeras studier på mänsklig hjärnvävnad för att bekräfta de fynd som är gjorda med djurmodeller.**

**– Jag tror att möjligheten att föra över våra resultat på mänskliga är mycket stor, säger docent Jonas Frisé vid Karolinska institutet.**

Var försiktig med de nervceller i hjärnan som du föds med – några nya får du inte! Det har länge varit en etablerad »sanning» inom neurobiologin,



**INTERVJU**

PETER ÖRN

trots att man redan i början av 1960-talet fann indikationer på att det kan ske en nybildning av dessa celler. Forskare hade då upptäckt att vissa markörer, som bara inkorporeras i delande celler, gick att spåra i nervceller hos vuxna gnagare. Cellerna hade alltså nybildats.

Men uppfattningen om att det inte nybildas några nya nervceller i hjärnan hos en vuxen individ förblev rådande. Forskningsresultaten från 1960-talet föll nästan i glömska, och det skulle dröja fram till 1992 innan en kanadensisk forskargrupp visade att de nya nervceller, som man redan under 1960-talet hade påvisat, inte härstammar från befintliga nervceller utan från stamceller. Det blev ett genombrott.

– De hade tagit celler från mushjärnor och odlat dessa under olika betingelser. En del av dessa celler gav upphov till såväl nervceller som stödjecellerna astrocyter och oligodendrocyter, berättar docent Jonas Frisé, avdelningen för cell- och molekylärbiologi vid Karolinska institutet.

– Men forskarna hade ingen aning om varifrån i hjärnan dessa celler härstammade eftersom hela hjärnvävnaden användes vid försöken.

Runt om i världen har man försökt identifiera vilka celler som är stamceller för dessa nybildade nerver i hjärnan. Celler från olika hjärnregioner har testats, men det var först i januari i år som

Jonas Friséns forskargrupp vid Karolinska institutet kunde presentera stamceller från en vuxen organism som bildar nya nervceller och stödjeceller [Cell 1999; 96: 25-34].

### Barriärceller var stamceller

De är de s k ependymcellerna som i såväl in vitro- som in vivo-studier visat sig kunna ge upphov till samtliga huvudklasser av hjärnceller. Ependymcellerna ligger som en barriär mellan hjärn- och ryggmärgsvävnaden och cerebrospinalvätskan längs hjärnans ventrikelsystem och ryggmärgens centralkanal.

Ingen annan forskargrupp har studerat dessa celler i jakten på nervstamsceller. De har helt enkelt ansetts som ganska ointressanta just med tanke på deras förmodade barriärfunktion

– Men egentligen har man vetat mycket lite om dessa cellers funktion. Som barriärceller är de ganska oviktiga. Efter neurokirurgiska operationer, då lager av ependymceller tagits bort, har inga negativa effekter kunnat påvisas. Cellerna har därför ingen oersättlig barriärfunktion, säger Jonas Frisé.

Att ependymcellerna kunde vara nervstamsceller var ganska logiskt med tanke på deras lokalisering. I motsvarande region befinner sig nämligen de stamceller som under fosterutvecklingen styr anläggningen av hela det centra-

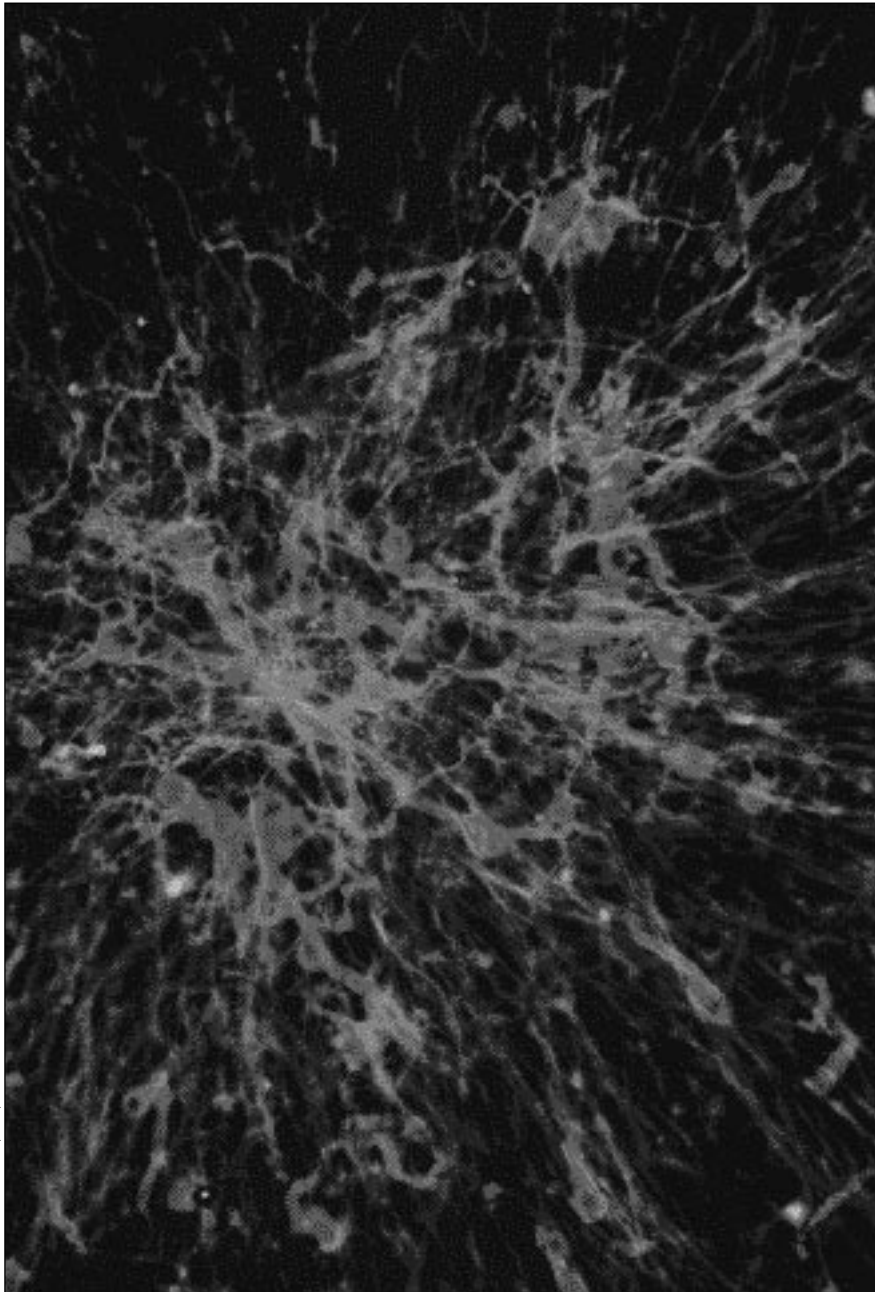


FOTO: CLAS JOHANSSON, CMB, KAROLINSKA INSTITUTET

la nervsystemet, dvs längs insidan av neuralröret vars ena ände utvecklas till hjärna och den andra till ryggmärg.

När organismen är färdigutvecklad, då neuralröret har utvecklats till ett ventrikelsystem och en ryggmärg, lägger sig ependymcellerna i ett lager på insidan av hålrummet.

### Genfynd väckte nyfikenheten

Lokaliseringen av nervstamsceller under det embryonala stadiet var en av anledningarna till att Jonas Friséns forskargrupp intresserade sig för just ependymceller. En annan var den forskning kring ryggmärgsskador som Jonas Friséns bedrev sedan tidigare. Fynd som gjordes vid dessa skadestudier vittnade om att det kunde finnas stamceller i ryggmärgen.

Ett sådant fynd var nestin-genen, en gen som normalt uttrycks under den

embryonala anläggningen av centrala nervsystemet men som också visade sig uttryckas vid ryggmärgsskador.

– Vi trodde som alla andra att ependymcellerna var ganska ointressanta barriärceller. Men sedan såg vi att nestin-genen slogs på i ependymcellerna vid en ryggmärgsskada och att nya celler tycktes bildas.

– När vi gjorde netin-fyndet började vi ifrågasätta ependymcellernas roll som endast barriärceller, säger Jonas Frisé.

Ryggmärgsskadeprojektet genomfördes tillsammans med professor Urban Lendahls forskargrupp på samma institution. Urban Lendahls forskning har främst varit inriktad på genens funktion under den embryonala utvecklingen, men tillsammans inledde deras forskargrupper nu ett gemensamt projekt i syfte att öka förståelsen för epen-

dymcellernas funktion i den vuxna organismen.

För att studera ependymceller i den levande organismen har forskarna vid Karolinska institutet injicerat en röd fluorescerande substans i ependymlagret runt ventrikeln i möss och råttor. Därigenom har man kunnat identifiera eventuella dotterceller, eftersom dessa ärver inmärknigen. Om nya neuron bildas som bär på substansen så måste de ha sina ursprung i de befintliga ependymcellerna.

Forskarna prövade även andra märkörer. Bland annat injicerades retrovirus som bygger in sin arvmassa i ependymcellerna. Dotterceller till den infekterade cellen ärver arvmassan och dessa kan på så sätt detekteras.

– Vi såg att det fanns celler i ependymlagret som gav upphov till nya celler, men att dessa inte var lokaliserade till ependymlagret. Först bildades en population snabbt delande celler som lade sig strax intill ependymlagret. När dessa celler sedan delar sig får vi bland annat nervceller som vandrar till olika regioner i hjärnan.

– De resultat vi nyligen har presenterat i tidskriften *Cell* bygger på iakttagelser i luktbulben. Det är en av de regioner i hjärnan i vilka man sedan tidigare vet att det sker en viss nybildning av nervceller, säger Jonas Frisé.

– Men det finns stor anledning att misstänka att motsvarande nybildning av nervceller även sker i andra regioner av hjärnan. Vi vet exempelvis att det kan ske en nybildning av nervceller även i hippocampus, och vi har försökt kartlägga om ependymcellerna kan ge upphov till dessa.

### 6 procent utmognade

Av de celler som odlades in vitro var det bara 6 procent som delade sig och gav upphov till nya nerv- eller stödjeceller. Det kan bero på att betingelserna för stamcellerna inte var optimala i det in vitro-system som användes, eller att fel signalmolekyler tillsattes.

Men orsaken kan också vara att det rör sig om en heterogen population celler, varav inte fler än omkring 5–10 procent är stamceller. Resten kanske är barriärceller.

– Resultatet kan även tolkas så att bara 6 procent av ependymcellerna var på »humör» att dela sig då studien genomfördes. Det finns en viss anledning att misstänka att det förhåller sig så; i exempelvis blodsystemet finns det många stamceller, varav bara en del är aktiva och producerar nya celler vid en viss tidpunkt. Under en livstid är vissa stamceller aktiva i organismen under kanske några år, medan andra är det vid andra tidpunkter.

– Personligen tror jag att 100 procent

av ependymcellerna har stamcellskapacitet, men med all sannolikhet har vi inte perfekta in vitro-betingelser, säger Jonas Frisé.

Huruvida ependymcellerna skulle vara den enda typen av stamceller för nybildning av nervceller i den vuxna organismen är ännu omöjligt att säga. Det kan till exempel vara så att den nybildning av celler som går att påvisa i hippocampus härstammar från en separat stamcellpopulation som finns just i den regionen.

– Vi kan inte utesluta att det utöver ependymcellerna även finns andra typer av stamceller. Men å andra sidan har inga andra stamcellstyper identifierats.

### **Söker styrmolekylerna bakom celldifferentieringen**

När det stod klart att ependymcellerna bär på det för stamceller karakteristiska beteendet – de är multipotenta samt självförnyelsebara, dvs de kan dela sig till två celler varav en förblir en stamcell – var nästa steg att försöka identifiera vilka signalmolekyler som styr celldelningen och differentieringen av dotterceller.

In vitro-studier bekräftade att en enda ependymcell kan utvecklas till såväl nervceller som astrocyter och oligodendrocyter i den klon av nya celler som stamcellen ger upphov till. I viss mån gick det även att med olika signalmolekyler styra vilken celltyp som skulle utmognas.

Tillsattes exempelvis tillväxsfaktorn PDGF (platelet derived growth factor) så utmognade i huvudsak nervceller. Men om man i stället tillsatte sköldkörtelhormon till cellodlingen bildades främst oligodendrocyter.

– Nu måste vi lära oss vilka molekyllära mekanismer som styr en stamcell att dela sig, och när det är gjort vilka mekanismer som bestämmer vilken typ av cell som ska mogna ut, säger Jonas Frisé.

För att försöka identifiera dessa signalmolekyler utgår Jonas Friséns forskargrupp från stamcellernas genetiska aktivitet.

– Vi försöker isolera de gener som slås på när en stamcell ger upphov till differentierade dotterceller. Jag tror att det är den vägen man måste gå om man en dag ska kunna utveckla läkemedel; man måste förstå hur cellens eget styrsystem fungerar för att sedan kunna påverka det direkt, säger Jonas Frisé, vars forskargrupp även inlett ett samarbete med ett läkemedelsföretag i syfte att försöka utveckla sådana möjligheter.

### **Samma signaler som under fosterutvecklingen**

Inom embryonalforskningen har flera viktiga signalmolekyler identifierats,

vilka bland annat styr stamcellerna då centrala nervsystemet bildas.

Vissa av dessa intresserar även Jonas Friséns forskargrupp. Den har bland andra testat molekylen Sonic hedgehog, som i studier visat sig vara betydelsefull vid bildningen av nervceller i ryggmärgen under tredje till fjärde fosterveckan [se även LT 1998; 38: 4044-5].

– Det skulle inte alls förvåna mig om det till stor del är samma molekyler som styr differentieringen på embryonal nivå som i den vuxna organismen. Men vi har ännu inte sett några effekter av de signalmolekyler vi hunnit testa.

– Det betyder dock inte att dessa inte är viktiga. Men förmodligen rör det sig om ett mycket komplext samspel; först ger en signalmolekyl sin speciella »puff» för att få igång differentieringen, sedan kommer nästa molekyl och styr nästa steg, därefter bidrar ytterligare signalmolekyler i utmognaden. Så fungerar det ju även under fosterutvecklingen, säger Jonas Frisé.

Stamcellerna styrs av signaler i den vävnad som de befinner sig i. En helt ny studie har visat att om stamceller från hjärnan hos en vuxen organism transplanteras till benmärgen, så ger dessa stamceller upphov till blodceller i stället för nervceller [Science 1999; 283: 534-6].

– Men huruvida hjärnstamceller därför skulle kunna ge upphov till alla celler i kroppen, och inte bara vara multipotenta, vet vi inte. Vad vi säkert vet nu är att de kan ge upphov till blodceller också.

### **Snabb celldelning efter skada**

Jonas Friséns tidigare forskning rörande ryggmärgsskador hade visat att netin-genen – som även aktiveras i ependymcellerna vid celldelning – slås på vid en skada. Frågan var nu om ependymcellerna kan ge upphov till nya nervceller efter en ryggmärgsskada.

En markör, en röd fluorescerande substans (DI1), injicerades i djurmodellens ventrikelsystem där den togs upp av ependymcellerna. Sedan gjordes ett snitt i ryggmärgen för att studera ependymcellernas beteende vid skada.

– Normalt så delar sig stamceller mycket långsamt, men efter den skada som vi framkallade i ryggmärgen började ependymcellerna dela sig oerhört snabbt. En dag efter skadan kvantifierade vi delningen till 50 gånger mer än normalt.

– Genom inmärknigen av cellerna med fluorescerande substans kunde vi se att dottercellerna vandrade ut och slog sig ner i skadeområdet. Vi kunde även slå fast att det handlade om astrocyter, och det är känt sedan länge att astrocyter bildar den ärrvävnad som man ser efter en skada. Vad vi nu kunde

visa var att en del av dessa astrocyter hade bildats av ependymceller, och vandrat ut till skadan, säger Jonas Frisé.

Däremot bildades inga nya nervceller i det skadade området, vilket forskarna kanske hade hoppats på men egentligen inte förväntade sig.

– Det finns ingen forskning som har visat att nya nervceller skulle uppkomma efter den här typen av skador. Men naturligtvis vore det bättre att få nya nervceller än stödjeceller. Genom att förstå mekanismerna för hur stamcellernas dotterceller mognar ut kan man kanske i framtiden påverka dottercellerna att slå om till att bli nervceller i stället för att bli stödjeceller.

### **Nya nervceller hos människa**

Att nervceller verkligen kan nybildas i hjärnan hos vuxna människor visade nyligen en forskargrupp vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset i Göteborg, i samarbete med forskare vid Salk Institute for Biological Studies i USA [Nature Medicine 1998; 4: 1313-7].

Studien bygger på analyser av hjärnvävnad från fem äldre individer som avled i en tumorsjukdom i hjärnan, för vilken de fick behandling med en tymidin-analog substans som tas upp av cellernas arvsmassa vid celldelning.

Med hjälp av bland annat lasermikroskopi kunde forskarna detektera den aktuella substansen i samtliga vävnadsprov, och det gick även att avgöra att det rörde sig om nya nervceller och inte stödjeceller. Om cellerna var funktionella är inte visat.

Huruvida de nervceller som härstammar från ependymcellerna i in vitro-försöken vid Karolinska institutet är funktionella är lika osäkert.

Jonas Frisé menar dock att man utifrån de studier som är publicerade om nybildning av nervceller i hippocampus och luktbluben kan misstänka att så är fallet.

Hittills har det handlat om ependymceller från djurmodeller. Men Jonas Friséns forskargrupp planerar nu att även börja använda human ventrikelvävnad i in vitro-försök. Vävnaden kan tas bort i samband med olika neurokirurgiska ingrepp.

– När det handlar om att lära sig styra utmognaden av de celler som utvecklas av stamceller, så är det ju hos människan man slutligen vill göra det. Därför vill vi odla humana stamceller och försöka påverka dessa med olika signalmolekyler eller genetiskt, och på det sättet styra celldifferentieringen.

– Jag tror att vi i det här avseendet är ganska lika de djurmodeller vi använder, och möjligheten att föra över de resultat vi nu fått fram till situationen hos människan ser jag som goda, säger Jonas Frisé •