



Snabb och effektiv framställning av mänskliga astrocyter underlättar forskning om svåra neurologiska sjukdomar

Forskare vid Lunds universitet har utvecklat en ny bättre metod för att odla fram mänskliga astrocyter från embryonala stamceller. Den nya metoden är både enklare och avsevärt snabbare än tidigare tillvägagångssätt och kommer att underlätta forskning på astrocyters roll i neurologiska sjukdomar. Studien, som genomfördes på Stamcellscentrum inom det strategiska forskningsområdet StemTherapy, beskrivs i denna artikel av forskargruppledaren **Henrik Ahlenius** vid Lunds universitet.

Astrocyter är den vanligast förekommande typen av gliaceller i det centrala nervsystemet hos däggdjur. Längre trodde man att dessa celler enbart hade en stödjefunktion i hjärnan som support för nervceller. Under de senaste årtionden har det dock framkommit att dessa celler har flertalet viktiga funktioner, är nödvändiga för hjärnans normala funktion och är involverade i många om inte alla neurologiska sjukdomar.¹ Bland annat tillhandahåller astrocyter näring till nervceller, de tar upp överflödiga signalsubstanter för att begränsa neurotoxicitet, de kommunicerar via kanalförbindelser, koordinerar nervcellsaktivitet, skickar kalciumsignaler genom att reglera sina nivåer av intracellulärt kalcium samt stödjer bildningen av synapser. Astrocyter kan även kontrollera vattenbalans, via vattenkanaler, och blodflöde vid sina kontakter med blodkärl vilket är en del av blod-hjärnbarriären. Astrocyter bidrar även till immunförsvaret i hjärnan; de kan till exempel svara på skador och inflam-

mation i hjärnan genom att frisätta signaleringsmolekyler, så kallade cytokiner.

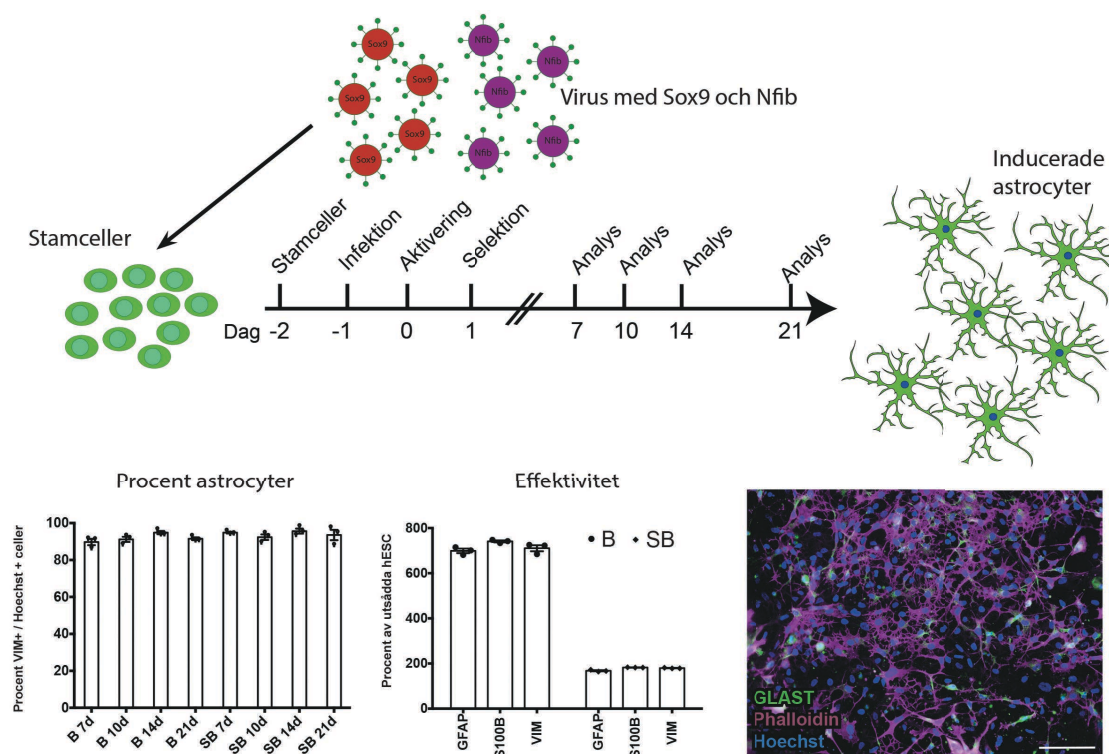
Forskning på astrocyter har till stor del begränsats till musmodeller eftersom det är svårt att få tillgång till mänsklig hjärnvävnad och att det är mycket komplicerat att odla fram dessa celler från människa. Studier har visat att det är stora och fundamentala skillnader mellan mänskliga och musastrocyter. Bland annat är mänskliga astrocyter mycket större, morfologiskt mer komplexa och kontakter avsevärt mycket fler synapser än astrocyter i möss. Det är därför mycket viktigt att utveckla nya metoder för att framställa mänskliga astrocyter.

Pluripotenta celler såsom embryonala stamceller (ES-celler), utvunna från det tidiga fostret, och inducerat pluripotenta stamceller (iPS-celler), skapade från somatiska celler som till exempel hudceller, har förmågan att mogna ut till alla olika typer av celler i kroppen.^{2,3} Sedan dessa ES-/iPS-celler isolerades och framställdes för första



"Astrocyter bidrar även till immunförsvaret i hjärnan; de kan till exempel svara på skador och inflammation i hjärnan genom att frisätta signaleringsmolekyler, så kallade cytokiner."

Figur 1



Figur 1: Schematisk bild (övre) som visar metoden. Stamceller infekteras med virus som bär på transkriptionsfaktorerna Sox9 och Nfib, celler som uttrycker faktorerna selekteras och odlas i medium som möjliggör bildandet av astrocyter som sedan analyseras vid olika tidpunkter. Graf (nedre, vänster) som visar att över 90 procent av cellerna uttrycker det astrocytspecifika proteinet Vimentin efter 7, 14 och 21 dagar. Graf (nedre, mitten) som visar att metoden är mycket effektiv och genererar 2–7 gånger så många astrocyter (GFAP-, S100B- och Vimentin-positiva celler) som startmängden stamceller. Bild (nedre, höger) visar exempel på inducerade astrocyter färgade för astrocytmarkören GLAST och Phalloidin för att tydliggöra morfologin. Bilder från Isaac Canals, Nature Methods.

gången har flera metoder utvecklats för att odla fram olika typer av celler, bland annat astrocyter. De traditionella metoderna är dock oftast komplicerade och mycket tidskrävande. Det kan ta flera månader att få fram funktionella astrocyter från mänskliga ES-/iPS-celler.

TRANSKRIPTIONSAKTORER INDUCERAR DIFFERENTIERING AV STAMCELLER TILL ASTROCYTER

I min forskargrupp är vi intresserade av hur åldrande och neurodegenerativa sjukdomar påverkar hjärnan och dess celler. För att förstå dessa processer använder vi oss av Crispr/Cas9, den populära så kallade gensaxen, för att introducera sjukdomsframkallande mutationer i mänskliga ES-celler som vi sedan differentierar till nervceller och på så sätt skapa modeller av dessa sjukdomar. I ett sådant projekt vi jobbar med blev det uppenbart att det inte var tillräckligt att studera enbart nervceller utan även viktigt att studera astrocyter och deras interaktion med andra celler.

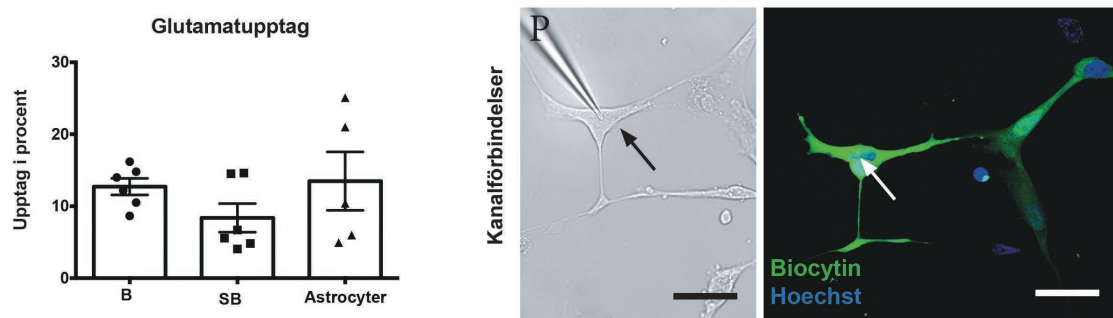
Eftersom de existerande protokollen för att framställa astrocyter från stamceller är komplicerade och extremt tidskrävande bestämde vi oss för att utveckla en ny bättre metod.⁴

Isaac Canals, post-doc i mitt laboratorium, är försteförfattare av studien och den som tillsammans med andra forskare vid Lunds universitet drivit projektet.

Vi baserade våra försök på tidigare resultat där överuttryck av gener och transkriptionsfaktorer som är involverade i bildningen av nervceller har visats kunna omprogrammera både hudceller och stamceller till nervceller.⁵

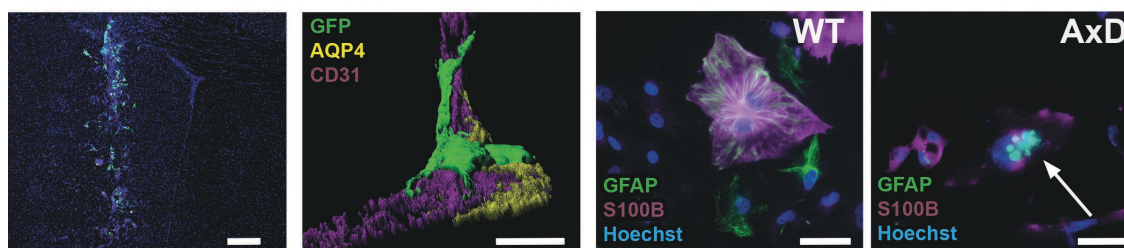
Vi identifierade först ett antal transkriptionsfaktorer (NFIA, NFIB och Sox9) som är viktiga, under embryonal utveckling, för bildandet av astrocyter och även visats kunna omprogrammera hudceller från möss till astrocyter.⁶ Sedan använde vi oss av virus för att överuttrycka dessa faktorer i humana embryonala stamceller. Vi testade olika kombinationer av NFIA, NFIB samt Sox9 och kom fram till att NFIB eller NFIB tillsammans med Sox9 på ett mycket effektivt och snabbt sätt inducerade stamcellerna att bilda astrocyter [figur 1]. Man kan säga att dessa transkriptionsfaktorer driver på och påskyndar utvecklingen av astrocyter samtidigt som vi i cellodlingsmediet tillsätter faktorer som hjälper till utvecklingen. Detta gör att stamcellerna inte har något annat val än att snabbt bilda astrocyter.

Figur 2



Figur 2: Figuren visar exempel på funktionalitet hos inducerade astrocyter. Grafen (vänster) visar att inducerade astrocyter (B och SB) tar upp glutamat lika effektivt som normala astrocyter. Fas-kontrast- och fluoroscensbilder (höger) visar att inducerade astrocyter har förmågan att bilda kanalförbindelser och på så sätt kunna sprida biocytin (färgat i grönt) från cell till cell. P=pipett där biocytin injiceras. Pilarna visar den injicerade cellen. Cellkärnor är infärgade blåa med Hoechst. Bilder från Isaac Canals, Nature Methods.

Figur 3



Figur 3: Immunofluorescensbilder som visar 1) att iAs inmärkt med GFP (gröna) överlever i mushjärnor efter transplantation. 2) Att transplanterade astrocyter (gröna) kontakter CD31 inmärkt (violetter) blodkärl och uttrycker vattenkanalen AQP4 (gult) på karaktäristiskt sätt. 3) Att astrocyter tillverkade från normala stamceller (WT) uttrycker de astrocytspecifika proteinerna GFAP (grönt) och S100B (violett) medan 4) stamceller som bär på mutationen för Alexanders sjukdom (AxD) ger upphov till astrocyter där GFAP aggregerar. Cellkärnor är infärgade blåa. Bilder från Isaac Canals, Nature Methods.

"Att det är möjligt att framställa astrocyter på så kort tid som ett par veckor är en fantastisk förbättring av de existerande metoderna som kräver flera månader för att producera liknande celler."

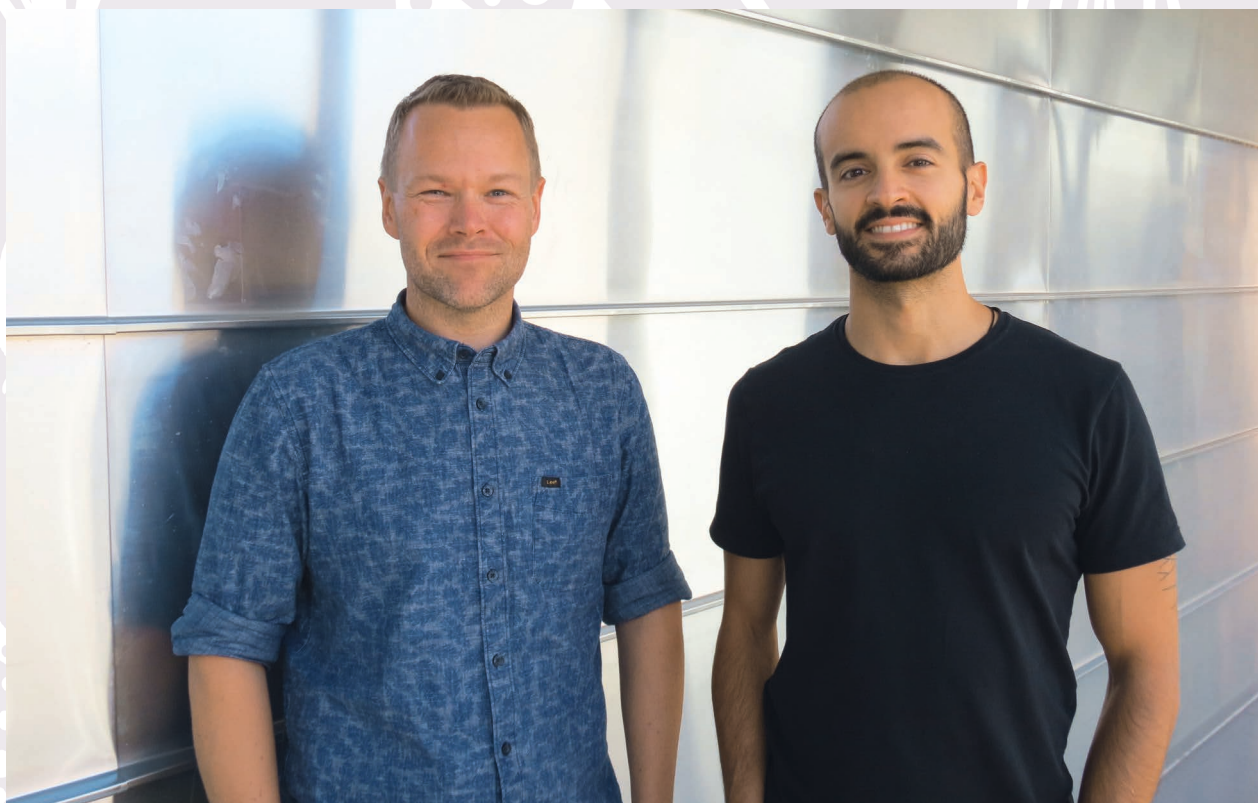
Redan efter en till två veckor hade stamcellerna dramatiskt ändrat sin morfologi till stjärnformade celler med komplexa utskott som mycket väl efterliknar morfologin hos mänskliga astrocyter. Vi kallar dessa celler inducerade astrocyter eller förkortat iAs. Att det är möjligt att framställa astrocyter på så kort tid som ett par veckor är en fantastisk förbättring av de existerande metoderna som kräver flera månader för att producera liknande celler.

INDUCERADE ASTROCYTER HAR EN LIKANDE FENOTYP SOM HOS MÄNSKLIGA ASTROCYTER

För att säkerställa att iAs inte bara ser ut som, utan verkligen är astrocyter så undersökte vi med färgningar vilka proteiner de uttrycker. Vi kunde visa att över 90 procent av cellerna uttryckte kända astrocytmarkörer såsom GFAP, S100b och Vimentin redan efter en vecka. De uttryckte även andra viktiga astrocytmarkörer som GLAST och Aldh1l1. En annan viktig egenskap hos mogna mänskliga astrocyter är att de slutar att dela sig vilket skiljer dem från stamceller och omogna astrocyter som kontinuerligt delar sig. De astrocyter vi framställer slutar att dela sig efter 2–3 veckor, ett tecken på att de snabbt mognar.

Vi kunde dessutom visa att vår metod är mycket effektiv. Vi beräknar att två till sju gånger så många astrocyter som startmängden stamceller kan bildas med vår metod. Detta innebär att stora mängder astrocyter kan produceras på kort tid.

För att se hur väl iAs överensstämmer med astrocyter i den mänskliga hjärnan, jämförde vi genuttrycket i individuella celler med hjälp av kvantitativ singel cell-PCR. Resulta-



Forskargruppledare Henrik Ahlenius (vänster) och post-doc Isaac Canals (höger) som tillsammans med andra forskare vid Lunds universitet ligger bakom studien. Bild från Claire McKay.

ten från dessa försök visade att iAs är en homogen population av astrocyter och har ett genuttryck som mycket väl liknar det hos astrocyter framodlade från kirurgiskt avlägsnad hjärnvävnad från patienter.

HAR SAMMA FUNKTIONER SOM MÄNSKLIGA ASTROCYTER

Som nämnts tidigare har astrocyter många och viktiga funktioner i den mänskliga hjärnan. Om de celler vi framställer skall ha någon nytta för forskning och eventuella framtida behandlingar måste de vara funktionella. Vi testade därför om de astrocyter vi framställer med vår metod uppvisar dessa funktioner samt jämförde dem med normala astrocyter. Resultaten visade att iAs kan utföra alla testade funktioner på liknande sätt som astrocyter från den mänskliga hjärnan. De kan bland annat återuppta glutamat, bilda kanalförbindelser, skicka kalciumsignaler, svara på inflammationsstimuli genom att utsöndra cytokiner och stödja bildningen av synapser mellan nervceller [figur 2]. Detta är ännu ett bevis för att de celler vi framställer verkligen är astrocyter och ett mycket viktigt framsteg eftersom vi nu på ett bättre och enklare sätt kan studera dessa processer.

KAN ANVÄNDAS FÖR TRANSPLANTATION

Det mest betydande användningsområdet för stamcellsderiverade astrocyter är för forskning på deras normala funktion och för att studera sjukdomar. De skulle dock teoretisk även kunna användas för transplantation till hjärnan vid sjukdomar där astrocyter dör eller skadas. Vi testade därför om de astrocyter som vi framställer har möjlighet att överleva och integrera i hjärnan på möss efter transplantation.

Vi injicerade iAs i hjärnan på både nyfödda och vuxna immundefekta möss och analyserade hjärnorna efter en till tre månader. Dessa försök visade att iAs överlevde både i hjärnan hos nyfödda och vuxna djur, att de fortsatt hade astrocytlik morfologi och uttryckte astrocytspecifika proteiner. Vi visade även att de integrerat i hjärnvävnaden eftersom de även efter transplantation hade funktionella kanalförbindelser med både transplanterade och endogena celler i mushjärnorna. De transplanterade cellerna visade även tecken på att ta del i blod-hjärnbarriären eftersom de ofta hade utskott som kontaktade blodkärl. I dessa kontakter uttryckte de också vattenkanaler på ett för astrocyter korrekt sätt. Att iAs kan överleva och integrera i hjärnan på möss stödjer ytterligare vår slutsats att de är likvärdiga normala mänskliga astrocyter och att de i framtiden potentiellt skulle kunna användas terapeutiskt [figur 3].

GER NY KUNSKAP OM NEUROLOGISKA SJUKDOMAR

Eftersom vi är intresserade av att skapa modeller av neurologiska sjukdomar var det viktigt för oss att bevisa att de astrocyter vi skapar verkligen kan efterlikna symtom hos patienter. Vi valde därför att studera Alexanders sjukdom, en demyeliniserande sjukdom som uppstår på grund av mutationer i en gen som specifikt uttrycks i och orsakar problem i astrocyter. Även om astrocyter sannolikt är involverade på ett eller annat sätt i alla neurologiska sjukdomar, så är Alexanders sjukdom en av de få där det är klart att problemet ligger i astrocyterna.

Vi använde oss av CRISPR/Cas9 för att introducera en sjukdomsframkallande mutation i den astrocytspecifika genen GFAP i mänskliga embryonala stamceller. Sedan an-

vände vi oss av vår metod för att tillverka astrocyter från normala och muterade stamceller. När vi sedan jämförde dessa såg vi att det bildades proteinaggregat innehållande GFAP i de muterade cellerna men inte i de normala astrocyterna. Aggregering av GFAP är ett av de mest tydliga tecken på Alexanders sjukdom i patienter och detta kunde alltså återspeglas med vår metod. Vi kunde även visa att uttrycket av vissa gener och kalciumsignalering var annorlunda i muterade jämfört med normala astrocyter, något som har föreslagits vara förändrat i patienter med Alexanders sjukdom.

Dessa försök visar att vår metod kan användas för att generera betydande ny kunskap om sjukdomsmekanismer, skapa modeller av och utreda astrocyters roll i neurologiska sjukdomar.

SAMMANFATTNING

Sammanfattningsvis har vi utvecklat en överlägsen metod för att snabbt och effektivt generera mänskliga astrocyter från embryonala stamceller. Dessa inducerade astrocyter är mogna, fullt funktionella och efterliknar mycket väl astrocyterna i den mänskliga hjärnan. De kan användas för transplantation och för att skapa cellbaserade modeller av sjukdomar i hjärnan. Vår metod kommer att bli mycket viktig för forskningen på astrocyters normala funktion och deras roll i neurologiska sjukdomar.

Studien har redan haft stor internationell genomslagskraft, många laboratorier runt om i världen börjar nu an-

vända vår metod och detta har lett till flertalet spännande samarbeten. I min grupp kommer vi nu att använda vår metod för att studera astrocyters roll i svåra neurologiska sjukdomar såsom åldersrelaterade demenssjukdomar och demyeliniserande sjukdomar.



HENRIK AHLENIUS
PhD, docent, Lunds Stamcellscentrum,
Lunds universitet
henrik.ahlenius@med.lu.se

REFERENSER

1. Molofsky AV, et al. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev* 2012; 26:891-907.
2. Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131:861-872.
3. Thomson JA, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.
4. Canals I, et al. Rapid and efficient induction of functional astrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Methods* 2018.
5. Ang CE, Wernig M. Induced neuronal reprogramming. *J Comp Neurol* 2014; 522:2877-2886.
6. Caiazzo M, et al. Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors. *Stem cell reports* 2015; 4:25-36.



VIMPAT® lakosamid

Ett behandlingsalternativ i monoterapi och tilläggsbehandling vid partiella anfall med eller utan sekundär generalisering hos barn från 4 års ålder, ungdomar och vuxna med epilepsi¹

VIMPAT®
lakosamid

FRÅN 4 ÅR

ÄVEN
MONOTERAPI

- ✓ Låg interaktionspotential¹
- ✓ 3 beredningsformer tillgängliga (1:1 doskonvertering)¹
- ✓ Initiering av Vimpat® kan ske med laddningsdos^{1*}

* Laddningsdos rekommenderas ej för barn och ungdomar under 50 kg.
Referens: 1. Vimpat® Produktresumé, juli 2018.

Vimpat® (lakosamid). Övriga antiepileptika (N03AX18). Rx. **Indikation:** Vimpat är indicerat som monoterapi och tilläggsbehandling vid partiella anfall med eller utan sekundär generalisering hos barn från 4 års ålder, ungdomar och vuxna med epilepsi. **Kontraindikationer:** Överkänslighet mot den aktiva substansen eller mot något hjälpämne. Känd AV-block II eller III. **Varningar och försiktighet:** Behandling med lakosamid har förknippats med yrsel, vilken kan öka förekomsten av olycksfall eller fall. Därför bör patienterna rådas till försiktighet tills de vet hur de reagerar på läkemedlet. Säkerhet och effekt för pediatrika patienter med epilepsisyndrom, där fokala och generaliserade anfall kan samexistera, som behandlas med lakosamid har inte fastställts. Dosrelaterad förlängning av PR-intervall har observerats med lakosamid i kliniska studier. Lakosamid ska användas med försiktighet till patienter med kända konduktionsstörningar, svår hjärtsjukdom (t.ex. hjärtinfarkt eller hjärtsvikt i anamnesen), hos äldre patienter eller när lakosamid används i kombination med läkemedel som förknippas med PR-förlängning. AV-block II eller högre har rapporterats efter marknadsföringen. Patienter bör känna till symtomen på AV-block II eller högre (t.ex. långsam eller oregelbunden puls, känsla av att vara yr och svimfärdig) och symtomen på förmaksflimmer och -fladder (t.ex. hjärtklappning, snabb eller oregelbunden puls, andnöd). Patienter bör rådas att söka medicinsk rådgivning om något av dessa symtom uppträder. Suicidtankar och självmordsbeteende har rapporterats hos patienter som behandlats med antiepileptika för flera indikationer. En metaanalys av randomiserade placebokontrollerade studier med antiepileptika har också visat en liten ökad risk för suicidtankar och självmordsbeteende. Mekanismer för denna risk är inte kända och tillgängliga data utesluter inte en eventuell ökad risk för lakosamid. Patienter bör därför övervakas för tecken på suicidtankar och självmordsbeteende och lämplig behandling bör övervägas. Patienter (och deras vårdgivare) bör rådas till att uppsöka medicinsk rådgivning om tecken på suicidtankar och självmordsbeteende uppstår. Lakosamid ska endast ges till vuxna och pediatrika patienter med grav nedsatt leverfunktion när den terapeutiska nyttan förväntas överväga eventuella risker. Vimpat sirap innehåller natriummetylparahydroxibensoat

(E219) vilket kan orsaka allergiska reaktioner (eventuellt fördöjda). Vimpat sirap innehåller sorbitol (E420). Patienter med det sällsynta ärftliga tillståndet fruktosintolerans bör inte använda detta läkemedel. Vimpat sirap innehåller aspartam (E951), en källa till fenylalanin, vilket kan vara skadligt för människor med fenylketonuri. Vimpat sirap och infusionsvätska innehåller natrium. Detta bör beaktas av patienter som ordinerats saltfattig kost. **Trafik:** Behandling med lakosamid har förknippats med yrsel och dimsyn. Således ska patienterna rådas att inte köra eller använda potentiellt farliga maskiner tills de vet hur lakosamid påverkar deras förmåga att utföra sådana aktiviteter. **Interaktioner:** Lakosamid bör användas med försiktighet hos patienter som behandlas med läkemedel som förknippas med PR-förlängning (t.ex. karbamazepin, lamotrigin, esikarbazepin och pregabalin) och hos patienter som behandlas med klass I-antiarytmika. Försiktighet rekommenderas vid samtidig behandling med starka hämmare av CYP2C9 (t.ex. flukonazol) och CYP3A4 (t.ex. itraconazol, ketokonazol, ritonavir, klaritromycin) vilka kan medföra ökad systemisk exponering för lakosamid. Sådana interaktioner har inte fastställts *in vivo*, men är möjliga baserat på *in vitro*-data. Starka enzym-inducere såsom rifampicin eller Johannesört (*Hypericum perforatum*) kan minska systemisk exponering av lakosamid i måttlig grad. Därför bör initiering eller utsättning av dessa enzyminducere ske med försiktighet. Även om data beträffande interaktion mellan lakosamid och alkohol saknas så kan en farmakodynamisk effekt inte uteslutas. **Graviditet och amning:** Det finns inga adekvata data från användning av lakosamid hos gravida kvinnor. Den potentiella risken för människa är ökad. Lakosamid ska inte användas under graviditet såvida det inte är absolut nödvändigt. Det är ökat om lakosamid utsöndras i bröstmjölk. En risk för det nyfödda barnet/spädbarnet kan inte uteslutas. Djurstudier har visat utsöndring av lakosamid i bröstmjölk. För säkerhets skull ska amning avbrytas under behandling med lakosamid. **Läkemedelsform och styrkor:** Filmtragerade tabletter 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg. Sirap 10 mg/ml. Infusionsvätska, lösning 10 mg/ml. **Förmån:** Tabletter (F), sirap (F), infusionsvätska, lösning (EF). **Särskilda förvaringsanvisningar:** Sirap: Förvaras i skydd mot kyla. Infusionsvätska, lösning: Förvaras vid högst 25 °C. **För övrig information och aktuella priser se www.fass.se.** Enligt produktresumé 2018-07-26. UCB PHARMA AB, Klarabergsgatan 29, 1112 Stockholm, www.ucb.com Innehavare av godkännande för försäljning: UCB Pharma S.A, Allée de la Recherche 60, B-1070 Bryssel, Belgien