Christer Sylvén, professor i kardiologi, hjärtkliniken, Huddinge Universitetssjukhus, Huddinge

Gen- och cellterapi kan revolutionera kardiologin

Alternativ vid hotande hjärtsvikt efter hjärtinfarkt

Den 26 juni år 2000 offentliggjorde president Clinton och premiärminister Blair vid en gemensam presskonferens att det mänskliga genomet blivit kartlagt. Att två av världens främsta politiska ledare på detta sätt annonserar denna forskarbedrift är anmärkningsvärt. Betydelsen är en indikation på att om samhällsförändringarna under det tjugonde århundradet var baserade främst på de fysiska vetenskaperna så kan innevarande sekel bli de biologiska vetenskapernas århundrade.

Endast en början

Den principiella kartläggningen av det mänskliga genomet är endast en början. Människan har idag sannolikt inte utvecklat de redskap som behövs för att kunna förstå och kanske manipulera de komplexa processer som styrs av genomet. Det oaktat kan vi redan idag utnyttja genetiska egenskaper terapeutiskt inom en rad områden, inte minst inom kardiologin. Genomkunskapen kommer att kunna användas för utveckling av nya effektiva läkemedel med etablerade principer, s k »molecular engineering».

Detta kan ses som en fortsatt utveckling av en sedan tidigare befintlig teknik.

Vad som däremot är ett nytt paradigm är att med den nya biologin kunna utveckla nya vävnader och kunna stimulera dessa till tillväxt.

Tillämpning inom tre områden

Tillämpning kan ske inom kardiologins tre områden: kärl, muskel och elektricitet. Längst har utvecklingen kommit inom kärlområdet, där möjligheten att stimulera till kärlnybildning exploreras såväl experimentellt som kliniskt [1, 2]. Ett flertal angiogenetiska cytokiner har upptäckts som stimulerar olika delar av den angiogenetiska processen (Fakta 1). »Vascular endothelial growth factor» (VEGF) är en familj av substanser som stimulerar olika typer och faser av kärlnybildning (Fakta 2).

Fyra former med olika gener är kända: A, B, C och D. Tre receptorer är kända, varav KDR/flt-1-receptorn stimulerar bildning av nya kapillärer. Kapillären kan sedan omformas till arteriol och artär. Såväl bildandet som expressionen av VEGF och dess receptor ökar vid ischemi. Dock är bildningen nedsatt vid riskfaktorer som hög ålder, högt serumtotalkolesterol och diabetes mellitus.

SAMMANFATTAT

Cellterapi kan för kardiologin inom överskådlig framtid innebära att från embryonala stamceller eller benmärgsceller odla fram kardiomyocyter och med dessa eller med myoblaster behandla bortfall av hjärtmuskel eller pacemakerceller.

Rekrytering av progenitorceller från benmärg kan få betydelse för nybildning av kärl.

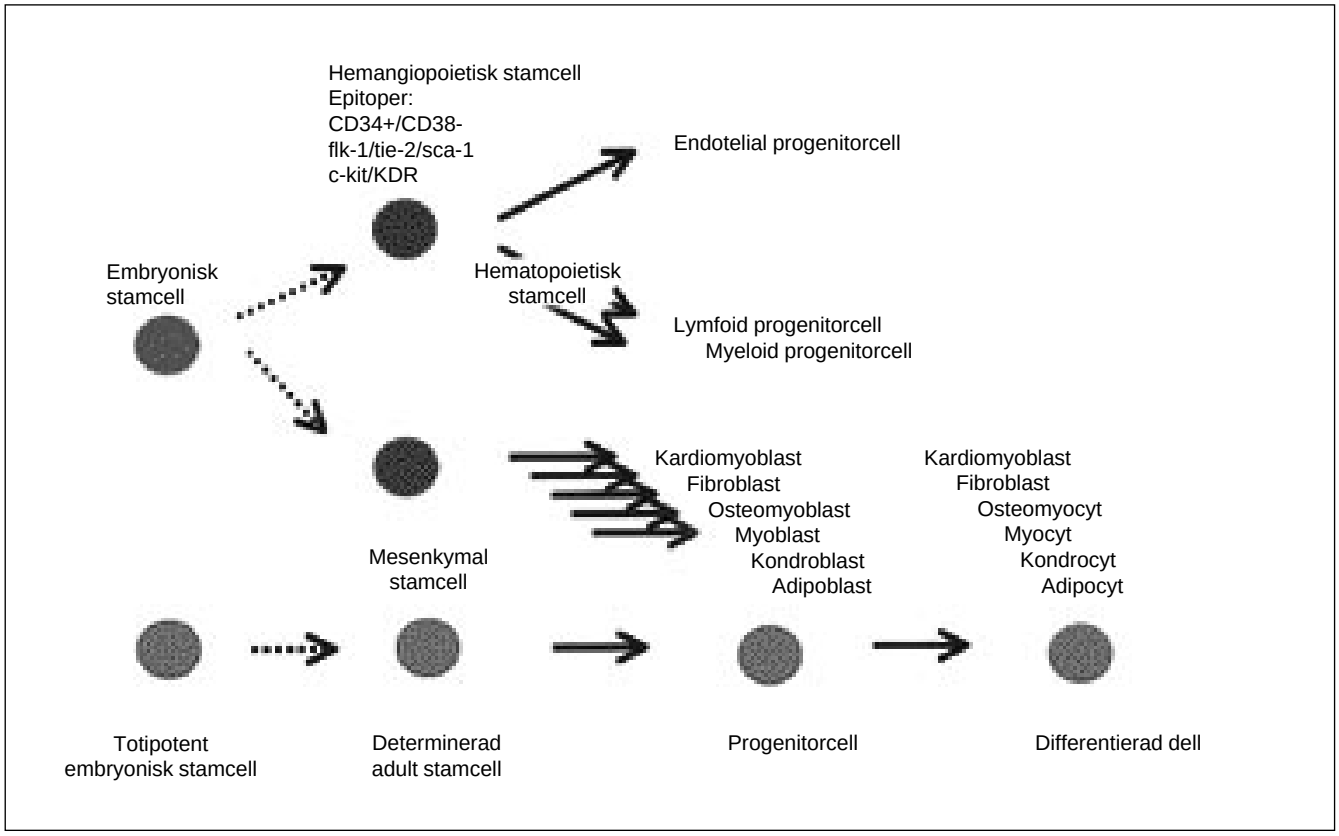
Transient överexpression av angiogenetiska tillväxtfaktorer ger experimentellt och i kliniska fas I-/II-studier evidens för kärlnybildning.

En av kardiologins gåtor är varför vid koronarstenos eller ocklusion en del människor förmår bilda korona kollateraler, medan andra har en nedsatt förmåga till sådan bildning. En sviktande VEGF-funktion skulle kunna vara en viktig faktor bakom en sviktande förmåga till kollateralbildning. Ur det perspektivet är det intressant att kunna överuttrycka VEGF och därigenom stimulera den sviktande kärlbildningsprocessen. VEGF är en substans med kort halveringstid; det är önskvärt att stimulering sker lokalt och under en avgränsad tid, eftersom okontrollerad kärlnybildning inte är önskvärd. Dessa faktorer gör att genterapi är ett intressant alternativ. VEGF-genen kan tillföras i en vektor, som kan vara ett modifierat adenovirus, eller som plasmid-DNA, s k naket DNA.

Djurförsök har visat att såväl efter applikation på kärlvägg med olika depositionskatetrar som efter injektion i skelettmuskel eller myokardiet erhålls en transfektion med bildning av VEGF-mRNA, protein och funktionella effekter som ökad endotelialisering, genomblödning och kollateralbildning.

Additiv effekt med flera tillväxtfaktorer

Även om såväl djurförsök som humana fas I/II-undersökningar indikerar att tillförsel av VEGF eller av »fibroblast growth factor» (FGF) ger en angiogenes är det rimligt att förmoda att en additiv effekt kan erhållas om ett flertal tillväxtfaktorer kombineras. Det kan inte uteslutas att tillförsel vid olika tidpunkter ytterligare kan öka effektiviteten. Den för



Figur 1. *Celldifferentiering.*

kardiell applikation avgörande studien företogs dubbelblint på gris, där det cirkumflexa kranskärlet belagts med en ameroid konstriktor vilken sväller långsamt under cirka fyra veckors tid och stänger av kärlet.

Det visades att tillförsel av antingen adenovirusvektorburen gen för $VEGF_{121}$ eller plasmidburen gen för $VEGF_{165}$ eliminerade den reversibla ischemi som den proximala circumflexa förträngningen/ocklusionen förorsakat. Senare fas I/II-studier på människa, där vektor givits intramyokardiellt via torakotomi, stöder de experimentella fynden. Anginösa symtom minskar och perfusion mätt med skintigrafi förbättras. Studien vid Huddinge sjukhus har möjliggjorts genom etablerandet av benterapicentrum under ledning av med dr Khalid Islam.

Dock måste behandlingen testas i dubbelblinda undersökningar. Preliminära resultat föreligger endast från en dubbelblind studie utförd vid claudicatio intermittens. I jämförelse med placebobehandling hade patienter behandlade med VEGF-vektor signifikanta tecken till angiogenes. En nyligen utvecklad kateterteknik för hjärtat, den s k Noga-tekniken, möjliggör dock perkutan lokalisation av ischemiskt område, med efterföljande injektion av vektor i det ischemiska området. Inom de närmaste åren kommer sannolikt dubbelblinda studier utföras med denna teknik.

Att kärlnybildning erhålls i ett friskt men manipulerat försöksdjur innebär inte att resultaten är direkt överförbara till den åldrade människan med avancerad arterioskleros. För att kärlnybildning skall kunna ske måste det rimligen finnas ett rekryteringskärl från vilket nya kärl kan försörjas.

Intensiv, kanske alltför snabb, utveckling i USA

Utvecklingen av kliniska försök i USA har under de senaste åren varit mycket intensiv, speciellt i Bostonområdet. Dessvärre har utvecklingen varit alltför snabb; till synes har både myndigheter och forskare kommit ur fas. Kliniska undersökningar har tillåtits där den ansvarige forskaren haft kommersiella intressen. Rutinen för rapportering har inte följts eller varit oklar. Oftast utgörs patientpopulationen av patienter med långt framskriden sjukdom för vilka det inte finns några andra behandlingsalternativ.

Ett antal dödsfall har inträffat i samband med utförda studier, men där en definitiv koppling till själva genterapin inte har kunnat fastställas, med undantag för ett uppmärksammat fall. Det var en ung patient med en ärftlig leversjukdom behandlad med hög adenovirusdos. Dessa händelser har resulterat i att forskningen i USA för närvarande går på sparlåga.

Många frågor

Kärlnybildning synes involvera dels utväxt av lokalt befintliga endotelceller, dels rekrytering av cirkulerande endoteliala progenitorceller härrörande från benmärgen, en observation som vidgar fältet betydligt [3-6] (Fakta 3).

En stamcell är en cell som kan ge upphov till flera typer av differentierade celler. Den skall också ha en självförnyelsekapacitet, så att dess population i princip kan leva vidare under individens hela liv (Figur 1). En progenitorcell har kvar förmågan till delning och har också differentierat sig mot ett specifikt cellslag. Vid vävnadsskada sker reparation utgående från denna typ av determinerade stamceller.

För angiogenes har det påvisats att endoteliala progenitorceller från företrädesvis benmärgen rekryteras, och att därvid $VEGF\text{-}A_{165}$ utövar en kemoattraktion till det skadade området där progenitorcellerna integreras och deltar med primär kärlbildning, s k vaskulogenes. Tillförsel av in vitro-odlade sådana celler kunde förhindra bennekros i en musmodell där a femoralis ligerats och myokardischemi där främre nedåtstigande artären (LAD) ligerats.

Har olika former av VEGF olika attraktionskraft på dessa

Fakta 1

Kända cytokiner som deltar i kärlbildning

VEGF (har sekretorisk sekvens);
Angiopoietin;
FGF (fibroblast growth factor);
HIF (hypoxia inducible factor);
PR-39 m fl.

Fakta 2

VEGF-familjen

Sekretoriskt protein;
Olika typer, varav A har olika isoformer med olika grad av vävnadsbindning;
Specifika receptorer, i huvudsak på endotelceller;
Stimulerar endotelfunktioner och endoteltillväxt;
Kemoattraktion på endoteliala progenitorceller.

Fakta 3

Endoteldeterminerade stamceller

Roll vid bildning av nya blodkärl;
Faktorer som ökar bildning och frisättning;
Isolering och expansion av cellpopulation och därefter retransfundera dem;
Genetisk modifiering av celler.

stamceller? Har även andra cytokiner attraktionskraft? Vilka faktorer påverkar bildningen av endoteldeterminerade stamceller? Hur påverkar olika läkemedel denna bildning? Kan specifik stimulering av bildning och frisättning av endoteldeterminerade stamceller bidra till kärltillväxt?

Dessa frågor kommer att utgöra viktiga forskningsincitament.

Myocyttransplantation

Den vuxna kardiomyocyten anses vara terminalt differentierad, resulterande i att vid skada finns det inte regenerationsmöjligheter, ledande till en sviktande och progressivt derangerad pumpfunktion. Möjligen finns det lokala progenitorceller för kardiomyocyter. I så fall räcker de inte för att motverka en större skada. Att tillföra nya progenitorceller är därför en attraktiv hypotes. En av de första specialiserade celltyper som embryonala stamceller i odling spontandifferentierar till är kardiomyoblasten [7]. Från benmärg kan man framodla kardiomyocyter med elektriska egenskaper lika dem som kammarkardiomyocyter har, medan andra differentierar till förmaks- eller sinusnodfenotyp [8]. Fetala kardiomyocyter har påvisats bilda »gap junctions», vilket medför att den elektriska impulsutbredningen sker kontrollerat från cell till cell [9, 10].

Det mest lättåtkomliga cellslaget är myoblaster från skelettmuskel. Dessa kan lätt odlas upp och återinjiceras. I kaninrespektive grismodell har Taylor och medarbetare [11] injicerat myoblaster och påvisat förbättrad såväl systolisk som diastolisk funktion, medan fibroblaster resulterade i enbart förbättrad diastolisk funktion. Myoblaster skapade också »gap junctions». Detta talar för att myoblasterna gav upphov till en kontraktil effekt. Genom att transfektera myoblaster i cellodling med VEGF-vektor erhölls dessutom en bättre kapillarisering än då man använde obehandlade myoblaster.

Nyligen rapporterade en forskargrupp från Paris att man företagit den första myoblasttransplantationen på en patient i samband med bypasskirurgi. Patienten överstod ingreppet väl. Inga arytmier observerades, och ny viabel muskelvävnad kunde påvisas i ett tidigare infarcerat område.

Även om utvecklingsarbete återstår visar dessa experiment att celltransplantation kan bli ett effektivt alternativ till redan existerande behandling av hotande svår hjärtsvikt efter hjärtinfarkt.

Referenser

1. Ferrara N, Alitalo K. Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors. Nat Med 1999; 5: 1339-46.
2. Ylä-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy. Lancet 2000; 355: 213-22.
3. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M et al Age-dependent impairment of angiogenesis. Circulation 1999; 99: 111-20.
4. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J 1999; 18: 3964-72
5. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat Med 1999; 5: 434-8.
6. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci 2000; 97; 3422-7.
7. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-7.
8. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J et al. Cardiomyocytes can be generated from bone marrow stromal cells in vitro. J Clin Invest 1999; 103: 697-705.
9. Li R, Mickle D, Weisel R, Mohabeer M, Zhang J, Rao V et al. Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. Circulation 1997; 96: 179-86.
10. Soonpaa M, Koh G, Klug M, Field L. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. Science 1994; 264: 98-101.
11. Taylor D, Atkins B, Hungspreugs P, Jones T, Reedy M, Hutcheson K et al. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. Nat Med 1998; 4: 929-33.