

Anders Vahlquist, professor (anders.vahlquist@medsci.uu.se)

Ola Rollman, docent; båda vid hudkliniken, Akademiska sjukhuset, Uppsala

Berzeliussymposium om gendermatoser:

Kutan genterapi – potentiell behandling för svåra hudsjukdomar

■ Hösten 2001 anordnade Svenska Läkaresällskapet ett Berzeliussymposium i Uppsala. En rad internationella forskare presenterade senaste nytt inom genterapiområdet med inriktning mot hudsjukdomar.

Symposiet fokuserade på möjligheterna att via kutan genterapi påverka monogenetiskt betingade hudsjukdomar av typen iktyos och epidermolysis bullosa, vilka leder till grava defekter i överhudens funktion samt i vissa fall även svåråtkta sår. Ett annat tänkbart användningsområde är terapiresistenta sår av annan genes, till exempel trycksår och bensår. Symposiet berörde också användningen av genmodifierad hud som en lättstyrd bioreaktor för att tillföra eller avlägsna substanser från blodet i samband med vissa metaboliska sjukdomar. Sammanfattningarna av föreläsningarna står att finna i *Acta Derm Venereol* 2001;81:227-39. Flera översiktsartiklar om kutan genterapi har nyligen publicerats [1-4].

Bakgrund

Intresset för att utnyttja huden som tillförselorgan för genetiskt material baseras på dess lättillgänglighet och möjligheten att enkelt kontrollera genuttrycket och avgränsa genterapi till valda delar av vävnaden. Det senare reducerar givetvis riskerna och möjliggör såväl ett snabbt avbrytande av terapin (hudexcision) som en styrning av gendosen genom successiv utvidgning av den behandlade hudytan.

Genutförelse till hud kan ske på i princip två olika sätt (Figur 1). Vid *in vivo*-genterapi sker överföringen direkt till huden. En alternativ väg är *ex vivo*-genterapi då patientens egna hudceller (keratinocyter eller fibroblaster) genmodifieras i kultur och expanderas före återtransplantation i huden.

Ett tekniskt enkelt sätt att introducera DNA i huden är att injicera med en kanyl direkt i läderhuden (dermis), men detta ger en ganska grov fördelning av dosen. I stället används gärna en så kallad genpistol varvid mikroskopiska guldpartiklar täckta med DNA duschas med högt tryck in genom hudytan ned till ett djup av cirka 1 mm. Allra enklast, men relativt ineffektivt, är att med en liposominnehållande kräm applicera DNA direkt på hudytan. DNA-fragmenten får inte vara för stora, och det är enbart överhudscellerna som nås.

Viral genterapi med till exempel retrovirus har fördelen av att ha en högre överföringseffekt och integration av DNA,

SAMMANFATTAT

Nyligen hölls ett symposium i Uppsala där en rad internationella experter presenterade det senaste om ärftliga hudsjukdomar.

Allvarliga gendermatoser, det vill säga ärftligt betingade hudsjukdomar, är sällsynta (prevalens cirka 1:10 000) men orsakar mycket lidande och kan i vissa fall vara direkt livshotande.

De närmare 100 olika gendermatostyperna orsakas bland annat av defekter i överhudens utmognad till hornlager (iktyos) eller störd förankring till underliggande bindväv (epidermolys), vilket leder till kroniska sår.

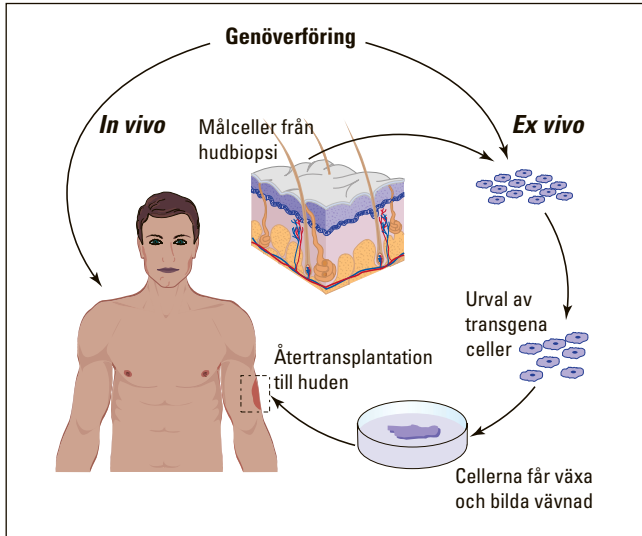
Långt vanligare orsaker till defekt sårhäkning är dock förvärvade tillstånd, till exempel trycksår, venösa bensår och ischemiska sår, vilka också kan vara synnerligen terapiresistenta.

Somatisk genterapi är en tänkbar behandlingsprincip för att stimulera läkningsprocessen vid kroniska sår av skiftande genes, men också för att normalisera bristande hudfunktion i samband med svåra gendermatoser.

Kutan genterapi innebär att DNA tillförs hudceller (kortvarigt eller permanent) i syfte att kompensera för en defekt gen eller för att modulera genuttrycket i samband med en sjukdomsprocess i eller utanför huden.

men metoden har också flera nackdelar [1]. Ett alternativ är direktapplikation av plasmidvektorer i huden. Möjligheten att med »naket« plasmid-DNA nå såväl epidermala keratinocyter som Langerhans' celler är ibland önskvärd.

På symposiet beskrev dr Ulrich Hengge, Essen, regleringen av plasmidupptag i epidermis efter ytlig mikroinjektion av



Figur 1. Principiellt olika vägar för genterapi i huden.

plasmid-DNA i huden. Med denna teknik kan man inducera ett tidsbegränsat (ca 1 vecka) genuttryck, vilket kan utnyttjas för genetisk vaccination av tumörer och infektionssjukdomar.

Stamceller

Dr Fiona Watt, London, beskrev hudens stamceller, som är av central betydelse för en varaktig effekt av genterapi [5]. De senaste årens forskning kring stamcellerna i epidermis visar på en lokalisering till hårfolliklarna, närmare bestämt inom området strax under talgkörtelapparatusens mynning i follikeln. Från denna population av stamceller migrerar cellkloner ut i epidermis och lokaliseras inom epidermisområdena över de dermala papillerna. Stamcellerna har en lätt avvikande morfologi och kännetecknas av speciella ytstrukturer, men någon helt specifik identifieringsmarkör har ännu inte påträffats. Intensiva försök pågår nu för att på ett effektivt sätt kunna nå dessa stamceller med riktad genterapi.

Förutom de epidermala stamcellerna finns andra målceller av intresse för kutan genterapi, särskilt om kortvariga behandlingseffekter är tillräckliga eller önskvärda, till exempel för stimulering av sårhelingsprocessen. Hit hör bland annat TAC (transient amplifying cells), vilka uppstår från delade stamceller och genomgår ett fåtal mitoser innan de utdifferentiellas och slutligen omvandlas till hornceller. Även dessa celler, med en omsättningstid på cirka en månad, bör kunna utnyttjas för temporär genterapi, liksom melanocyterna i basalcellslagret och de antigenpresenterande langerhanska cellerna i övre skiktet av epidermis. I det underliggande dermis är det i stället fibroblasterna eller endotelcellerna som utgör potentiella målceller.

Genterapi för specifika hudsjukdomar

Jouni Uitto, finsk läkare och framgångsrik forskare i USA, gjorde en exposé över de hudsjukdomar som kan komma i fråga för genterapi. Han sammanfattade därmed »the state of the art» vad gäller gendermatoser (Tabell I) [6]. Närmast till hands för genterapi är de mycket svåra, ibland dödligt förloppande sjukdomar, som gemensamt kallas epidermolysis bullosa (Figur 2) och kännetecknas av defekter i överhudens förankring till läderhuden. Rupturer i och omkring basalmembranet leder till utbredd blåsbildning och hudavlossning vid lindrig mekanisk påverkan. Resultatet kan i vissa fall bli svårläkta sår med risk för sammanväxningar mellan fingrar och får samt, på sikt, canceromvandling av såren [7].

Andra uppenbara kandidatsjukdomar för kutan genterapi



Figur 2. Epidermolysis bullosa simplex kännetecknas av blåsor eller utbredd hudavlossning, vilket kan leda till kroniska sårbildningar.



Figur 3. Lamelläriktyos utmärks av grov, generell fjällning i huden med djupa sprickor, barriärdefekter och ibland oförmåga till svettning.

är svåra former av iktyos (tidigare benämnt »fiskfjällssjuka») (Figur 3), som orsakas av defekta strukturproteiner eller enzymrubningar i keratinocyterna, vilket leder till en abnorm förtjockning av hornlagret. Ett exempel är keratinmutationer som, när de uttrycks i övre delen av epidermis, ger blåsbildande iktyos (epidermolytisk hyperkeratos). Om motsvarande mutationer uttrycks i basalcellslagret blir följden epidermolysis bullosa av simplex-typ. Keratinmutationerna är vanligen dominant ärftliga – det muterade proteinet stör polymeriseringen av cellskelettet, som därmed blir skört och kollapsar vid mekanisk eller termisk påverkan. Idag kan endast palliativ behandling med mjukgörande krämer, avlastning och i vissa fall retinoidbehandling erbjudas.

Dr Paul Bowden, Cardiff, beskrev tänkbara vägar för genetisk korrektion vid dominant-negativa keratinsjukdomar. Målet är att hämma uttrycket av det muterade proteinet, vilket sannolikt kan uppnås genom antisense-terapi, det vill säga att släcka ut mRNA-signalen från den muterade allelen genom tillsats av en sekvensspecifik oligonukleotid kodande för den komplementära DNA- eller mRNA-sekvensen. En mer långvarig effekt kan sannolikt erhållas om genen för ett sekvensspecifikt så kallat ribozym (RNA-nedbrytande enzym) överförs till patientens odlade keratinocyter. Cellerna kan därigenom själva tysta sin muterade keratinallel när de återtransplanteras till de mest drabbade hudpartierna.

Vid recessiva gendermatoser, exempelvis iktyosassocierad transglutaminasbrist och epidermolys orsakad av defekt kollagen typ 7 eller laminin, är substitutionsterapi sannolikt den enda framkomliga vägen eftersom patientens bägge genkopior är defekta. Genterapi (ex vivo eller in vivo) bör då kunna genomföras enligt ovan beskrivna princip, fast med överförande av en fullvärdig normal genkopie innehållande korrekta responselement för vävnadsspecifik stimulering av transkriptionen. Framgångsrika sådana försök har gjorts i djurmodeller av gendermatoser, men durationen av behandlingseffekten är ännu otillfredsställande.

Klinisk realitet?

De sjukdomar som ligger bäst till för en klinisk prövning av kutan genterapi är funktional epidermolysis bullosa (JEB) och recessiv dystrofisk epidermolysis bullosa. Försöken beräknas komma igång inom det närmaste året såväl i Italien (dr M De Luca) som i Tyskland/Frankrike (prof Leena Bruckner-Tuderman). Man har i det förstnämnda fallet (JEB) planer på

Tabell I. Exempel på hudsjukdomar med känd gendefekt (s k gendermatoser). Tabellen är modifierad från Uitto och Pulkkinen [6].

Sjukdom	Afficerad gen	Påverkan av	Symtom
<i>Hudskörhetssyndrom</i>			
Epidermolysis bullosa			
– dystrofisk	COL7A1	Förankringen till dermis	Blåsor/ärrbildningar
– junktional	LAMA/B3, LAMC2	Laminin i basalmembran	Utbredd hudavlossning
– simplex	KRT5/14	Keratin i cellskelett	Ytlig blåsbildning
– med muskeldystrofi	PLEC1	Plektin i hud/muskler	Blåsor/muskelfdefekt
– med pylorusatrofi	ITGA6, ITAGB4	Integrin i hemidesmosomer	Blåsor/tarmdefekt
– med hudatrofi	COL17A1	Hemidesmosomprotein	Sår/håravfall
Epidermolytisk keratos			
– lokaliserad	KRT1/10 (mosaik)	Keratin i ytliga hudceller	Skörhet/hyperkeratos
– ytlig (Siemens)	KRT2e	Keratin i hornceller	Ytlig avflagning
– hand-/fotvariant	KRT9	Regionspecifikt keratin	Blåsor/hyperkeratos
<i>Förhorningsrubbingar</i>			
Iktyos			
– könsbunden	STS	Steroidsulfatas	Förtjockat hornlager
– lamelläer	TGM1	Transglutaminas i hud	Förtjockat hornlager
– blåsbildande	KRT1/10 (generell)	Keratin i ytliga hudceller	Skörhet/hyperkeratos
– Nethertons syndrom	SPINK5	Proteasinhjör i huden	Barriärdefekt
– Sjögren–Larsson	FALDH	Fettsyraoxidation	CNS-symtom
– Vohwinkel, typ 1	LORC	Loricin i hornceller	Keratodermi
– typ 2	GJB2	Gap junction (konnexin)	Keratodermi/dövhet
Dariers sjukdom	ATP2A2	Kalciumtransport	Follikulär keratos
Hailey–Haileys sjukdom	ATP2C1	Kalciumtransport	Sår i hudveck
Pachyonychia congenita	KRT6a, 16,17	Keratin i bl a naglar	Nagelförtjockning/cystor
Erythrokeratoderma variabilis	GJB3	Gap junction (konnexin)	Fläckvis förhorning
<i>Hårsjukdomar</i>			
Monilethrix	hHB1, hHB6	Keratin i hår	Skörhet/glest hår
Kongenital atriki	HR	Regulator av hårcykeln	Avsaknad av hår
Trikotiodystrofi	XPB, XPD	Enzym i aminosyrametabolismen	Glest hår/iktyos m m
<i>Pigmenteringssjukdomar</i>			
Waardenburgs syndrom	PAX3	Melanocytfaktor	Fläckvis pigment/dövhet
Albinism (flera typer)	TYR, TYRP-1, OCA2	Tyrosinasrelaterat protein	Total pigmentavsaknad
Tietz syndrom	MITF	Melanocytfaktor	Generell pigmentdefekt
<i>Cancerassocierade syndrom</i>			
Xeroderma pigmentosum	XPA/B/C/D, XPG, CSB	DNA-reparationsenzymer	Cancer på UV-belyst hud
Basalcellsnevussyndrom	PTC	Patched (cellsignalering)	Multipla basaliom/cystor
Cowdens syndrom	PTEN	Tumörsuppressor	Hamartom/tarmpolypos

att med ex vivo-teknik implantera autologa keratinocyter med den normala varianten av laminin-5, vilket återgett epitelet dess normala vidhäftningsfunktion i djurförsök.

Det genomgående största problemet vid epidermolysis bullosa är uppkomsten av smärtsamma sår som inte vill läka på grund av defekt basalmembran. I klinisk praxis är naturligtvis kroniska hudår av andra, icke-hereditära orsaker betydligt vanligare, till exempel olika former av ben-, tryck- och diabetessår. Även för dessa förvärvade tillstånd är det tänkbart att tillämpa principerna för kutan genterapi för att modifiera reparationsprocessen i huden.

Dr Eaglstein, Miami, gjorde en exposé över vår nuvarande kunskap rörande sårhelingsmekanismen och olika hämmande faktorer för vävnadsreparation vid kroniska sår. Vid de flesta typer av svårläkta sår är sannolikt en mängd sam-

verkande biologiska processer störda [8]. Defekter har påvisats när det gäller lokala faktorer som till exempel leukocytaktivitet, kronisk inflammation, vävnadsperfusion, proteasaktivitet, cellulärt åldrande, cytokininaktiviteten och inverkan av bakterier. Således finns en lång rad potentiella angreppspunkter även för en kortverkande genterapi [8].

Dr Gerald Krueger, Salt Lake City, beskrev användningen av genetiskt modifierade fibroblaster som odlats i en speciell mikromiljö, vilket gör att de kan bilda förankringsproteinet kollagen typ 7 och migrera till basalmembranzonen. Dessa celler borde kunna användas vid recessiv dystrofisk epidermolysis bullosa, där defekt bildning av kollagen typ 7 är en grundläggande förklaring till sjukdomssymtomen.

Dr Jeffrey Morgan, Boston, har studerat humana keratinocyter transducerade med genen för keratinocyte growth fac-

ANNONS

ANNONS

tor (KGF), en mediator för celltillväxt och sårsläkning. I en djurmodell kunde han visa att hudtransplantat innehållande de genmodifierade keratinocyterna gav upphov till ett för-tjockat epidermis med tecken till hyperproliferation och stimulering av underliggande blodkärl. Intressant nog hade detta transplantat även en antiseptisk effekt, sannolikt beroende på ökad bildning av antibakteriella peptider i huden.

Dr Kähäri, Åbo, använde sig av ett rekombinant adenovirus (RadFire-EGFP) i en ex vivo-organkultur för att försöka begränsa genuttrycket till vissa celltyper via transkriptionell målstyrning. Vid återtransplantering av genmodifierad hud till försökssåret kunde han inducera markör-genen (grön fluorescens) via ett EGF-känsligt regulatoriskt element. Detta kan bli ett effektivt koncept för att lokalt styra produktionen av olika sårsläkningsstimulerande faktorer hos människa.

Kutan genterapi för systemisk behandling

Dr Dennis Roop, Houston, Texas, redogjorde för de epidermala keratinocyterna som möjliga bioreaktorer för systemisk produktion av proteiner vid metabola sjukdomar. Man har utvecklat ett inducerbart, så kallat GeneSwitch-system som reglerar uttrycket av transgenen så att för höga nivåer och därmed cellskador och biverkningar kan undvikas. I inledande djurförsök har generna för humant tillväxthormon respektive erythropoetin introducerats i huden och visats producera mätbara proteinhalter i blodet. Proteinfrisättningen från de genmodifierade hudcellerna kan på olika sätt styras genom titrering av den tillförda gendosen i huden eller genom GeneSwitch-principen.

Med ett likartat tillvägagångssätt kan olika intracellulära enzymer överuttryckas i hudceller så att de fungerar som ett reningsverk för blodet i de fall enzymerna saknas, i lever eller njure till följd av genetisk defekt eller organsvikt [4]. Förutsättningen är givetvis att enzymsubstratet relativt lätt kan diffundera från blod till hud. Dr Paul Khavari, Stanford, och Århusgruppen under ledning av Lars Bolund har här gjort pionjärinsatser som inger förhoppningar om att kutan genterapi kan komma att användas långt utanför det primära dermatologiska området, till exempel vid behandling av fenylketonuri och andra enzymdefekter med åtföljande ansamling av toxiska metaboliter i blodet.

Konklusioner

Professor Lars Bolund, Århus, sammanfattade mötet och tog upp de praktiska begränsningarna av genterapi hos människa. Han beskrev de viktiga etiska och säkerhetsmässiga överväganden som måste göras innan denna typ av terapi kan påbörjas på utvalda sjukdomstillstånd. Även om det kommer att dröja något innan kutan genterapi blir en realitet inom sjukvården var man på mötet överens om den stora potential som huden utgör i detta sammanhang.

Referenser

1. Khavari PA. Genetic correction of inherited epidermal disorders. *Human Gene Therapy* 2000;11:2277-82.
2. Christensen R, Birk Jensen U, Jensen TG. Cutaneous gene therapy – an update. *Histochem Cell Biol* 2001;115:73-82.
3. van Erp PE, Wingen M. Does antisense make sense in dermatology? *Acta Derm Venereol* 2001;81:385-91.
4. Cao T, Wang XJ, Roop DR. Regulated cutaneous gene delivery: the skin as a bioreactor. *Human Gene Therapy* 2000;11:2297-300.
5. Watt F. Epidermal stem cells as targets for gene transfer. *Human Gene Therapy* 2000;11:2261-6.
6. Uitto J, Pulkkinen L. The gendermatoses: candidate diseases for gene therapy. *Human Gene Therapy* 2000;11:2267-75.
7. Egelrud T, Vahlquist A. Hopp om nya terapier för svåra genetiska hudsjukdomar. *Läkartidningen* 2000;97:4722-6.
8. Martin P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75-81.

Särtryck

Läkartidningen

När Försäkringsmedicinska Sällskapet bildades för att främja försäkringsmedicinens utveckling samlades 14 artiklar publicerade i Läkartidningen 1996 till ett särtryck. Detta belyser hur försäkringsläkare arbetar inom allmän och privat försäkring och tar upp försäkringsmedicinska problem från patientens synvinkel.

Riskbedömning vid barnförsäkringar, etiska problem i samband med gentestning och försäkring, samt de kniviga ärenden som gäller nack-skulderbesvär, inklusive pisksnärtskador, behandlas bland annat i artiklarna.

Priset är 40 kronor

Försäkringsmedicin



Beställer härmed.....ex
av "Försäkringsmedicin"

.....
namn

.....
adress

.....
postnummer

.....
postadress

Insändes till Läkartidningen
Box 5603
114 86 Stockholm

Faxnummer: 08-20 74 35

www.lakartidningen.se
under särtryck, böcker