

Lhx2 tycks hindra uppkomst av levercirros

Genfynd ger möjlighet att utveckla läkemedel mot enormt hälsoproblem



LEIF CARLSSON, docent, universitetslektor, Umeå centrum för molekylär medicin (UCMM), Umeå universitet
leif.carlsson@ucmm.umu.se

ÅKE DANIELSSON, professor, enheten för medicin, institutionen för folkhälsa och klinisk medicin, Umeå universitet

Levercirros, eller skrumplever, kan ses som slutstadiet av en kronisk leversjukdom när levern inte längre klarar av att freda sig mot den skadliga retningen. Vid cirros kan levern inte längre fullgöra sina mycket viktiga funktioner, t ex att detoxifiera skadliga ämnen, producera galla, reglera glukoshalten i blod och tillverka en rad olika proteiner.

När symtom på levercirros uppträder är de oftast antingen relaterade till nedsatt syntetiserande eller detoxifierande förmåga (vätskeretention, encefalopati), portahypertension (esofagusvaricer, ascites) eller ospecifika såsom trötthet, klåda, impotens, gynekomasti och osteopeni.

Risken att utveckla primär levercancer (hepatocellulär cancer) är kraftigt ökad vid levercirros [1], och levercirros är dessutom den främsta indikationen för levertransplantation.

Risken att utveckla cirros varierar stort för olika orsaker och mellan olika individer, varför man har antagit att genetiska faktorer spelar en betydande roll.

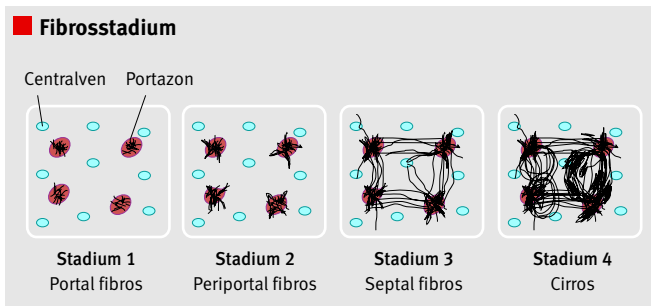
Levercirros – ett världsomspännande hälsoproblem

Levercirros föregås av en period (som varar från några år upp till decennier) av förhöjd bindvävsbildning, dvs leverfibros. Under denna period kan levern kompensera för bindvävsbildningen genom att kontinuerligt bilda nya leverceller och genom sin stora överkapacitet.

Till slut klarar levern inte av att kompensera längre, utan levercirros (efter grekiska kirrhos, gulröd) har utvecklats, och levern består då till stor del av enbart bindväv och regenerationsnoduli av nybildade leverceller med nedsatt funktion. Man kan därför betrakta levercirros som resultatet av en kronisk sår läkning som går över styr. Fibros graderas i fyra olika stadier, där cirros är stadium 4 (Figur 1).

I Fakta 1 är de vanligaste orsakerna till levercirros listade efter förekomst i Sverige. På senare tid har en ny och alarmerande snabbt ökande orsak börjat märkas, nämligen fetma i kombination med typ 2-diabetes (det s k metabola syndromet) [2]. Detta tillstånd, icke-alkoholorsakad steatos (NASH, non-alcoholic steatohepatitis), leder ofta till leversteatos med inslag av inflammation, vilket i sin tur kan leda till leverfibros och efterföljande cirros; icke-alkoholorsakad steatos kan utgöra en stor del av de kryptogena cirroserna [3]. Denna leversjukdom kan även drabba överviktiga barn [4].

Tidigare har levercirros uppfattats som ett irreversibelt tillstånd, men senare data från behandlingsbara leversjukdomar (autoimmun hepatit, hepatit C) talar för att cirros är ett mer dynamiskt tillstånd, som kan gå i regress om skadeorsaken kan behandlas [5].



Figur 1. Histologisk gradering av leverfibros; stadium 4 innebär cirros.

Levercirros är redan idag ett enormt och världsomspännande hälsoproblem och är en av de tio främsta dödsorsakerna i västvärlden. Denna sjukdom drabbar dessutom ofta personer i arbetsför ålder, vilket leder till extra stora kostnader för samhället.

Eftersom fetma dessutom ökar explosionsartat i västvärlden och anses som en epidemi kommer detta sannolikt att leda till motsvarande ökning av levercirros inom en snar framtid [6].

En ökad förståelse på molekylär och cellulär nivå av de mekanismer som orsakar bindvävsbildningen är därför nödvändig för att kunna hitta nya och effektiva behandlingsmetoder.

Ökad bindvävsbildning den gemensamma nämnaren

Den gemensamma nämnaren för alla dessa sjukdomar som kan orsaka levercirros är ökad bindvävsbildning i levern. Detta be-

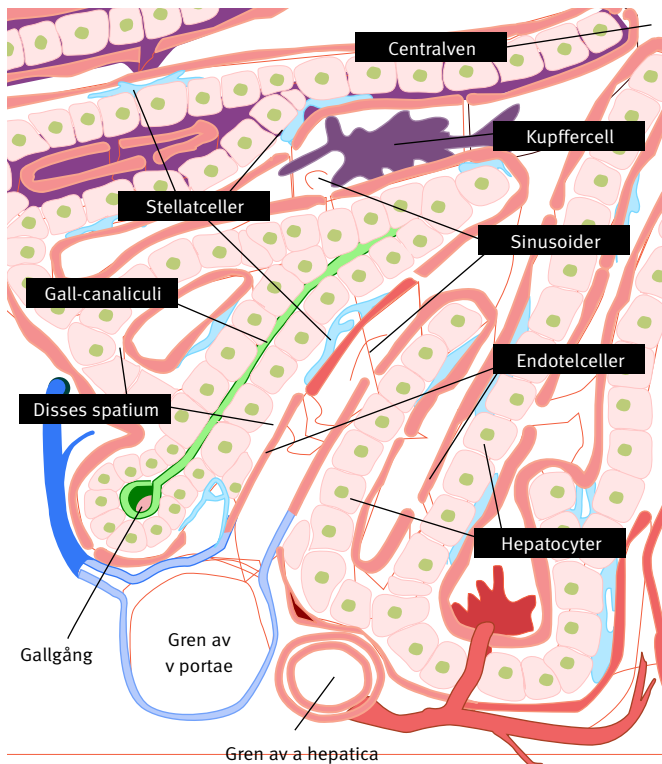
SAMMANFATTAT

Kronisk skada på levern orsakas främst av alkoholmissbruk och kronisk hepatit. Skadan leder till ökad bindvävsbildning, fibros, som i slutändan kan övergå till levercirros med leversvikt som följd. Levercirros är idag ett stort medicinskt problem i västvärlden, och utvecklandet av nya läkemedel är nödvändigt.

Det är en specifik celltyp i levern, de s k stellatcellerna, som är den främsta orsaken till den fibrotiska processen, oavsett bakomliggande sjukdom. Det har nyligen visats att dessa celler uttrycker genen Lhx2 både under fosterutvecklingen och hos vuxna möss.

Möss som har denna gen utslagen utvecklar under fosterutvecklingen en snabb och progressiv leverfibros, som liknar sjukdomsutvecklingen hos människor. Överuttryck av Lhx2 i en human stellatcellslinje hämmar dess fibrogena egenskaper.

Dessa resultat tyder på att Lhx2 fungerar som en »broms« för utveckling av levercirros. Det är just denna »broms« som släpps vid kronisk skada på levern, oavsett vad som orsakat skadan. Sjukdomsförloppet skulle kunna stoppas – och kanske till och med reverseras – om läkemedel som aktiverar denna gens funktion utvecklas.



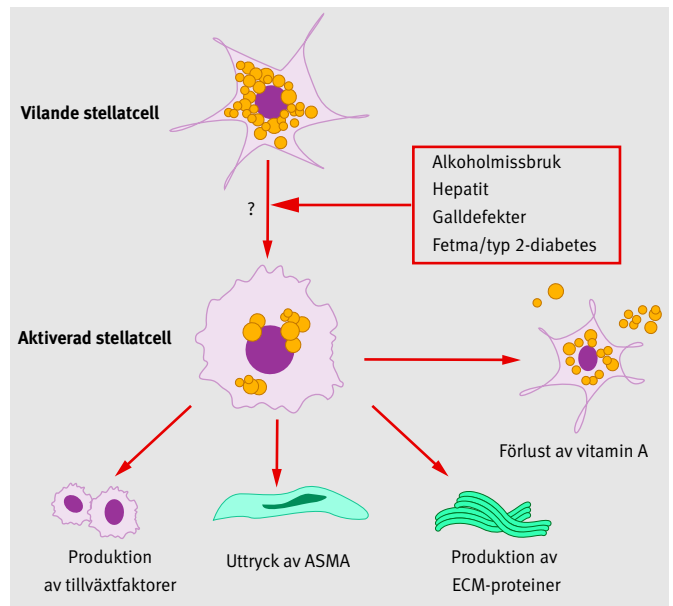
Figur 2. Schematisk bild av en del av en leverlobulus, den minsta organisatoriska enheten i levern, och vilka typer av celler den består av. Stellatcellerna (i blått) är lokaliserade i Disses spatium, som finns mellan hepatocyterna och endotelcellerna i sinusoiderna. Blod som kommer från tarmen filtreras i levern genom att ledas från portavenen (v portae) via sinusoider till centralvenen. I sinusoiderna finns så kallade Kupfferceller. Galla bildas av hepatocyterna och leds i motsatt riktning i gall-caniculi till gallgångarna. Gallgången, portavenen och grenen av a hepatica bildar tillsammans en portatriad (eller portazon) där en leverlobulus består av sex portatriader som omger en centralven i ett hexagonmönster. Observera att alla strukturer inte är skalnlignande återgivna. (Bilden är modifierad från »Friedman S, Arthur M. Reversing hepatic fibrosis. Sci Med. 2002;8:194-205« [8].)

tyder att det finns gemensamma mekanismer på molekylär och cellulär nivå som leder till levercirros. Men för att kunna förklara dessa krävs kunskap om leverns cellulära uppbyggnad och organisation [7].

De celler i levern som utför metabola funktioner är hepatocyter, vilka utgör cirka 80 procent av leverns totala volym. Om man tittar på den minsta organisatoriska enheten i levern, en så kallad leverlobulus, som är ungefär 1 mm i diameter (Figur 2), är hepatocyterna organiserade i parallella plattor.

Blod som kommer från tarmen via portavenen passerar genom sinusoiderna till centralvenen. Galla produceras av hepatocyterna och transporteras i motsatt riktning i små gall-caniculi mellan hepatocyterna ut till små och allt större gallgångar. Sinusoider är en typ av blodkärl där endotelcellerna har uni-

»Levercirros ... drabbar dessutom ofta personer i arbetsför ålder, vilket leder till extra stora kostnader för samhället. Eftersom fetma dessutom ökar explosionsartat i västvärlden och anses som en epidemi kommer detta sannolikt att leda till motsvarande ökning av levercirros inom en snar framtid ...«



Figur 3. Summering av de vanliga förändringarna som en stellatcell genomgår när den blir aktiverad under en sjukdomsprocess som leder till levercirros, oavsett orsak. (ECM = extracellulär matrix; ASMA = α -smooth muscle actin.)

ka porer för optimal interaktion mellan blod och hepatocyter. I sinusoiderna finns även Kupfferceller, som är en typ av makrofag med dess funktioner, dvs fagocytär funktion och sekretion av cytokiner.

Stellatceller har central funktion

Mellan sinusoidernas blodkärlsvägg och hepatocyterna finns ett mellanrum som kallas Disses spatium, och här finns en celltyp som benämns stellatceller. Funktionen av dessa celler i en normal lever är inte helt klarlagd, men stellatceller lagrar en stor del av kroppens vitamin A och har även kallats vitamin A-lagrande eller fettlagrande celler.

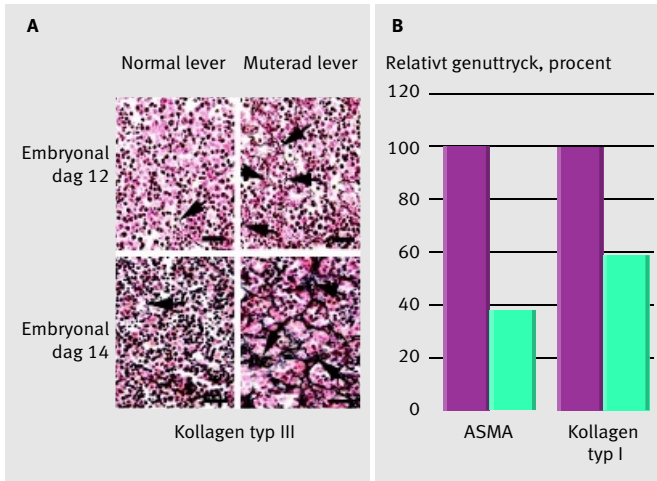
Dessa celler är centrala i förloppet som kan leda till levercirros, eftersom de oberoende av vad som utlöst sjukdomsförloppet genomgår en aktivering, vilket startar bindvävsbildningen [9].

Stellatceller aktiveras vid vävnadsskada, och de retningssignaler som kan aktivera vilande stellatceller har studerats under lång tid. Bland annat utsöndrar Kupfferceller, som blir aktiverade under den initiala inflammatoriska processen vid vävnadsskada, cytokiner, t ex tumörnekrosfaktor α (TNF α) och transformerande tillväxtfaktor β (TGF β), vilket i sin tur bidrar till aktiveringen av stellatceller [10]. Hur dessa signaler

FAKTA 1

Vanligaste orsaker (i fallande ordning) till levercirros hos vuxna i Sverige

- Alkoholmissbruk
- Kronisk virushepatit:
 - hepatit C
 - hepatit B
- Immunologiska lever-/gallväggssjukdomar:
 - autoimmun hepatit (AIH)
 - primär biliär cirros (PBC)
 - primär skleroserande kolangit (PSC)
- Kryptogen levercirros
- Icke-alkoholorsakad steatohepatit (NASH)
- Ärftliga sjukdomar, t ex:
 - genetisk hemokromatos (järminlagringssjukdom)
 - Wilsons sjukdom (kopparinlagringssjukdom)
 - alfa-1-antitrypsinbrist (PiZZ)



Figur 4. A. Möss som har genen *Lhx2* muterad genomgår samma förändringar som sker i det sjukdomsförlopp som orsakar levercirros hos människa. Det är här illustrerat av den progressiva förhöjningen av ECM-proteinet kollagen typ III, som ses som svarta trådar i levern under fosterutvecklingen hos muterade möss (pilar) (ECM = extracellulär matrix).

B. Uttryck av *Lhx2* i en human stellatcellslinje minskar signifikant uttrycket av de gener som är kopplade till levercirrosutveckling; i detta fall aktiveringsmarkören ASMA (α -smooth muscle actin) och ECM-proteinet kollagen typ I. De blå staplarna visar (relativt) genuttryck i stellatceller som uttrycker *Lhx2*, och de röda staplarna visar genuttryck i stellatceller som inte uttrycker *Lhx2*.

tolkas och regleras i stellatcellen har däremot varit relativt okänt.

En stellatcell som blir aktiverad genomgår många förändringar på cellulär och molekylär nivå (Figur 3). Den mest uppenbara förändringen är att den börjar producera ett överskott av extracellulära matrixproteiner som bygger upp bindväven, t ex fibronectin, laminin och olika typer av kollagener som det normalt finns ytterst lite av i levern. Denna förändring leder bl a till att porerna i sinusoidernas endotelceller försvinner, s k kapillariserings, vilket i sin tur leder till försvårad interaktion mellan blodet och hepatocyterna.

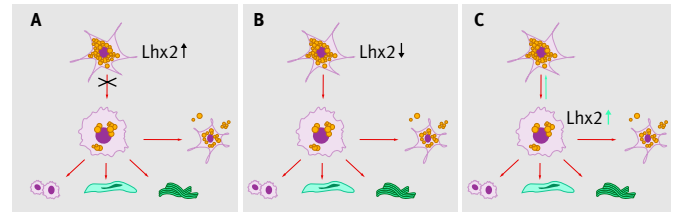
Stellatcellerna får även egenskaper som liknar dem hos glatt muskulatur, eftersom de börjar uttrycka gener som normalt är associerade med dessa celler, t ex α -smooth muscle actin (ASMA).

Andra tydliga förändringar är att aktiverade stellatceller tappar sitt vitamin A-innehåll och börjar producera tillväxtfaktorn PDGF (platelet derived growth factor), som stimulerar dess egen proliferation [9].

Det är aktiveringen av stellatcellen som är gemensam för fibrosutvecklingen, oavsett bakomliggande sjukdom. Vilka mekanismer som reglerar aktiveringsprocessen i stellatcellen har hittills varit relativt okända. En ökad förståelse för denna process skulle kunna underlätta utvecklingen av nya, effektivare läkemedel.

Sådana läkemedel skulle kunna antingen hämma utveckling-

»Tidigare har levercirros uppfattats som ett irreversibelt tillstånd, men senare data från behandlingsbara leversjukdomar (autoimmun hepatitis, hepatit C) talar för att cirros är ett mer dynamiskt tillstånd, som kan gå i regress om skadeorsaken kan behandlas ...«



Figur 5. Summering av vilken roll *Lhx2* har i kontroll av aktivering av stellatceller. **A.** Så länge *Lhx2*-genen är påslagen kan inte stellatcellen bli aktiverad, och då kan den därmed inte starta processen som leder till levercirros. **B.** När *Lhx2*-genen slås av aktiveras stellatcellen, och hela processen som leder till levercirros kan startas. **C.** Försöken med den humana stellatcellslinjen tyder på att en aktiverad stellatcell kan helt eller delvis återgå till en vilande stellatcell om den börjar uttrycka *Lhx2*.

en av fibros eller, ännu hellre, vända tillbaka hela förloppet i en cirrotisk lever, eftersom det nu är känt att detta tillstånd kan vara reversibelt.

Lhx2 upptäcks ha en aktiv roll i stellatceller

De upptäckter som är relevanta för levercirros kom utifrån helt grundvetenskapliga analyser av utvecklingen av levern under fosterstadiet. Intresset var speciellt riktat mot genen *Lhx2* (LIM-homeoboxgen nr 2), eftersom den är inblandad i utvecklingen av levern. Proteinet som denna gen ger upphov till är en transkriptionsfaktor, dvs den reglerar uttrycket av andra gener.

Tidiga resultat visade att *Lhx2* är aktiv i levern under fosterutvecklingen och att den är viktig för leverutvecklingen, eftersom möss som hade denna gen utslagen hade en mindre lever än normala möss. Leverdefekten i de muterade mössen ledde till letal anemi under fosterutvecklingen, eftersom levern vid detta utvecklingsstadium i princip enbart är ett blodbildande organ.

Det var dock okänt varför leverutvecklingen var defekt hos de muterade mössen, och man visste inte i vilken celltyp som *Lhx2* är aktiv. Det första steget var därför att bestämma i vilken celltyp som *Lhx2* är aktiv, och eftersom ett fåtal celler med speciell morfologi, ungefär 5–10 procent av totala antalet celler i levern, uttrycker *Lhx2* kunde vi utesluta att genen är aktiv i hepatocyter hos både vuxna individer och foster.

Sedermere gick det att påvisa att *Lhx2* är aktiv i stellatceller, eftersom celler som uttryckte *Lhx2* även uttryckte ett flertal gener som är typiska för stellatceller [11, 12].

Lhx2 fungerar som »broms«

När vi hade fastställt att *Lhx2* är aktiv i stellatceller började vi leta efter typiska tecken på leverfibros hos dessa musfoster, eftersom förändrade stellatceller är så intimt kopplade till denna sjukdom. När denna aspekt analyserades började saker och ting att falla på plats.

Levern hos de muterade mössen hade tydligt förhöjt innehåll av olika extracellulära matrixproteiner, t ex kollagen typ I, III och IV, fibronectin och laminin. Denna förändring var progressiv och skedde mycket snabbt i de muterade mössens leverar. Måttligt förhöjd deposition av extracellulära matrixproteiner kunde observeras dag 12 i fosterutvecklingen, och redan 2 dagar senare var levern helt fylld av extracellulära matrixproteiner (Figur 4 A). Detta sjukdomsförlopp tar normalt år och till och med decennier hos vissa patienter, emedan dessa muterade möss visade en tydlig sjukdomsutveckling på 2 dagar.

Aktiverade stellatceller uttrycker ASMA, och vi kunde även visa att en majoritet av stellatcellerna i levern hos de muterade mössen uttrycker denna gen, medan stellatcellerna i en normal lever inte uttrycker ASMA.

Vi kunde även se ett nästan fem gånger så starkt uttryck av

den tillväxtfaktor (PDGF) som stimulerar tillväxt av stellatceller i de muterade levrarna som i normal lever. Däremot var det inget ökat uttryck av TNF α eller TGF β i de muterade levrarna, vilket skulle kunna betyda att det mest troliga var att Kupfferceller inte bidrog till aktiveringen av stellatceller [12].

Dessa observationer tyder på att Lhx2 under fosterutvecklingen fungerar som en sorts »broms« i stellatceller för att de inte skall aktiveras. Tar man bort denna »broms«, dvs inaktiverar Lhx2, leder detta till att stellatcellerna spontant aktiveras och startar hela det förlopp som kan leda till levercirros [12].

Om denna tolkning att Lhx2 kan fungera som en »broms« för aktiveringen av stellatceller är korrekt, kanske även Lhx2 skulle kunna »bromsa« en redan aktiverad stellatcell och göra den mindre aktiv.

För att analysera detta använde vi oss av en stellatcellslinje som etablerats från lever i människa, dvs celler med stellatcellslika egenskaper och som går att odla i cellkultur. Denna stellatcellslinje har de flesta egenskaper som en aktiverad stellatcell har, bl a hög produktion av extracellulära matrixproteiner och uttryck av ASMA. Om Lhx2 kunde fungera som en »broms« skulle uttryck av Lhx2 i denna stellatcellslinje leda till att de karakteristika som är typiska för aktiverade stellatceller minskar.

När vi förde in Lhx2-genen i denna humana stellatcellslinje var det just detta vi såg, eftersom uttrycket av det extracellulära matrixproteinet kollagen typ I och aktiveringsmarkören ASMA gick ner med 45–65 procent inom 24 timmar (Figur 4 B) [12].

Dessa resultat indikerar att de observationer vi gjorde i möss har relevans även för människa.

Möjligt att »kortslua« den process som leder till levercirros

Funktionen av Lhx2 i stellatceller och dess roll i utvecklingen av levercirros är sammanfattad i Figur 5. När Lhx2-genen är aktiv i en stellatcell håller den sig vilande och utför den funktion som en stellatcell normalt gör i en frisk lever, hos både vuxna individer och foster (Figur 5 A). Våra resultat tyder på att denna funktion bl a är att styra organisationen och tillväxten av levern, åtminstone under fosterutvecklingen, men det är nog troligt att stellatceller har liknande funktion även i vuxna individers lever.

Om Lhx2-genen nedregleras startas hela den process som kan leda till levercirros (Figur 5 B). Nedregleringen av Lhx2 verkar därför vara den gemensamma molekylära mekanism som sätts igång oavsett om den bakomliggande orsaken till leverskada är alkoholmissbruk, kronisk virushepatit, gallgångsjukdom eller icke-alkoholorsakad steatos. Om man tar bort Lhx2 »kortslua« man alltså hela processen specifik i stellatceller, eftersom den startas utan bakomliggande sjukdom eller via andra celler såsom Kupfferceller.

Genom att använda en stellatcellslinje från människa kunde vi visa att aktiverade stellatceller kan återgå till att bli vilande stellatceller om Lhx2-genen slås på (Figur 5 C).

Det sistnämnda är speciellt tilltalande, eftersom det skulle betyda att cirrosprocessen skulle kunna vändas, eller åtminstone lindras, om man kunde slå på Lhx2 i en aktiverad stellatcell i en cirrotisk lever.

Även om dessa initiala försök i möss och humana cellinjer ser mycket lovande ut återstår en hel del forskning i både djurmodeller och patientmaterial innan ett läkemedel kan utvecklas. Men vi har åtminstone identifierat en molekylär process som verkar vara central för sjukdomsförloppet vid utveckling av levercirros oavsett vad som orsakat sjukdomen.

Eftersom risken för att utveckla cirros kan vara genetiskt betingad, är det även av stort intresse att en utslagen Lhx2-gen hos möss ger leverfibrosutveckling med 100 procents penetrans [12]. Denna genetiska koppling till fibros-/cirrosutveckling skulle delvis kunna förklara den varierande förekomsten av cirros vid olika leversjukdomar.

■ Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.

■ Forskning har stötts av Cancerfonden, Västerbottens lands- och Tobiasstiftelsen.

REFERENSER

- Lopez L, Marrero J. Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol.* 2004;20:248-53.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002;346:1221-31.
- Clark J, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. An unrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. *JAMA.* 2003;289:3000-4.
- Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, Deutsch R, Nievergelt C, Schork NJ, et al. Histopathology of pediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;42:641-9.
- Czaja AJ, Carpenter HA. Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 2004;40:646-52.
- Scheen A, Luyckx F. Obesity and liver disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002;16:703-16.
- Crawford J. Liver cirrhosis. In: *Pathology of the liver.* 4th ed. London: Elsevier Science Limited; 2002. p. 575-619.
- Friedman S, Arthur M. Reversing hepatic fibrosis. *Sci Med.* 2002;8:194-205.
- Friedman S. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275:2247-50.
- Ramadori G, Armbrust T. Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13:777-84.
- Kolterud Å, Wandzioch E, Carlsson L. Lhx2 is expressed in the septum transversum mesenchyme that becomes an integral part of the liver and the formation of these cells is independent of functional Lhx2. *Gene Expr Patterns.* 2004;4:521-8.
- Wandzioch E, Kolterud Å, Jacobsson M, Friedman S, Carlsson L. Lhx2^{-/-} mice develop liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:16549-54. <http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/47/16549>

Läkarfakta 2006

Läkarförbundets statistikfolder över antalet läkare i Sverige bifogas med detta nummer av Läkartidningen. Här hittar du statistik över fördelningen av läkare per ålder, kön, specialitet, län och mycket mer.

