

Verbundprojekt: Stammzellbasierte Regeneration bei Schlaganfall

Regeneratives Potential von neural-induzierten mesenchymalen Stammzellen nach Schlaganfall

Förderkennzeichen: 01GN0508

– Schlussbericht –

Prof. Dr. Josef Priller

Molekulare Psychiatrie und Experimentelle Neurologie
Charité-Universitätsmedizin Berlin

Charitéplatz 1
10117 Berlin

Tel: 030 450 517209

Fax: 030 450 517962

Email: josef.priller@charite.de

I Kurze Darstellung

Im vorliegenden Schlussbericht sollen die Zielsetzungen und Ergebnisse des Projektes „Regeneratives Potential von neural-induzierten mesenchymalen Stammzellen nach Schlaganfall“ zusammengefasst werden. Das Projekt war Teil des Verbundes „Stammzellbasierte Regeneration nach Schlaganfall“ geleitet von Prof. Dr. M. Götz (München) und Prof. Dr. U. Dirnagl (Berlin) im Rahmen des Förderschwerpunktes „Zellbasierte, regenerative Medizin“.

1. Aufgabenstellung

Ziel des Forschungsvorhabens war die Bewertung der Plastizität und regenerativen Kapazität adulter, neural-induzierter mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks (MSC) in einem Mausmodell der fokalen zerebralen Ischämie (Schlaganfall).

Dabei sollten zunächst MSC aus dem Knochenmark der Maus isoliert und umfangreich charakterisiert werden. Durch eine gezielte genetische Modifikation der MSC und durch Exposition mit Faktoren des zentralen Nervensystems (ZNS) war beabsichtigt, MSC neural zu differenzieren. Anschließend sollten diese neural-induzierten MSC in einem Schlaganfall-Modell der Maus auf ihr regeneratives Potential hin untersucht werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Projekt war in den Verbund „Stammzellbasierte Regeneration nach Schlaganfall“ des BMBF-Förderschwerpunktes „Zellbasierte, regenerative Medizin“ eingebunden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben war in drei Abschnitte gegliedert.

1. Isolierung und Charakterisierung von murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC)
2. Neurale Differenzierung von mMSC durch Transduktion mit Pax6 und Kultur auf Astrozyten oder Hippocampuschnitten
3. Bestimmung des regenerativen Potentials von neural-induzierten mMSC im Schlaganfallmodell der Maus

Im ersten Abschnitt sollten Stammzellen aus dem Knochenmark von adulten C57BL/6 Mäusen gewonnen werden. Die seltene Population von MSC sollte durch spezielle Kulturbedingungen aus dem heterogenen Zellgemisch isoliert werden. Anschließend sollte durch Analyse von diversen Oberflächenmarkern und *in vitro*

Differenzierungs-Experimenten eine Aufreinigung und Charakterisierung der mMSC erfolgen.

Im zweiten Abschnitt sollten mMSC gezielt in neurale Zelltypen differenziert werden. Dazu sollten sie mit dem Transkriptionsfaktor *pax6* transduziert und anschließend die neurale Differenzierung durch Behandlung mit ZNS-Wachstumsfaktoren und/oder Kultivierung auf Astrozyten bzw. organotypischen Hippocampuskulturen erleichtert werden.

Im letzten Abschnitt sollte schließlich das regenerative Potential der neural-induzierten mMSC im experimentellen Schlaganfall untersucht werden. Dazu sollten Mäuse nach transientem Verschluss der A. cerebri media (MCAO) eine intravenöse Transplantation von neural-induzierten mMSC erhalten und die Effekte der Transplantation auf das Schlaganfallvolumen sowie die neurologischen Defizite der Tiere untersucht werden. Darüber hinaus sollte festgestellt werden, ob mMSC in das Infarktareal einwandern können.

4. Stand der Wissenschaft und Technik

Mit einer Inzidenz von ca. 180/100.000 und einer Mortalität von 20-40% stellt der Schlaganfall die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar. Da 20-30% der Betroffenen an dauerhaften neurologischen Defiziten leiden, ist der Schlaganfall auch die häufigste Ursache für erworbene Behinderungen im Erwachsenenalter. Aufgrund der hohen gesundheitspolitischen und ökonomischen Implikationen des Schlaganfalls (jährliche Behandlungskosten in Deutschland ca. 7 Milliarden €), macht es sich dieses Verbundvorhaben zum Ziel, nach neuen regenerativen Behandlungsansätzen für den Schlaganfall zu suchen.

Adulte mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks erscheinen in diesem Zusammenhang als ein vielversprechendes Werkzeug. Sie sind leicht aus dem erwachsenen Organismus zu isolieren, können durch ihre schnellen Proliferationseigenschaften beinahe beliebig vermehrt werden und sind durch ihre hohe Plastizität in der Lage, verschiedenste Gewebetypen zu ersetzen (Pittenger et al., 1999; Anjos-Afonso et al., 2007; Jiang et al., 2003). In früheren Studien konnte bereits die therapeutische Wirksamkeit von MSC beim experimentellen Schlaganfall nachgewiesen werden (Übersicht bei Chopp und Li et al., 2002). Als Wirkmechanismen wurden neben der Transdifferenzierung von MSC zu Neuronen (Chen et al., 2001a) auch trophische Effekte der MSC (Li et al., 2002) sowie eine Unterstützung der Geweberegeneration durch Inhibition der Gliazellenbildung (Li et al., 2005) diskutiert.

Diese ermutigenden experimentellen Befunde bildeten die Grundlage für eine erste klinische Schlaganfall-Studie, in der Patienten mit Ischämie im Versorgungsgebiet der A. cerebri media eine intravenöse Injektion von autologen MSC erhielten (Bang et al., 2005). Es zeigte sich, dass die Behandlung mit MSC sicher war; ein Wirksamkeitsnachweis war bei der geringen Fallzahl aber nicht möglich. Gegenwärtig laufen eine Reihe weiterer klinischer Studien in Phase II, um das therapeutische Potential von MSC beim Schlaganfall zu untersuchen. Mit Ergebnissen ist frühestens in 2010 zu rechnen.

Einer der limitierenden Faktoren für die Behandlung mit MSC ist die sehr begrenzte Einwanderung der Zellen in das Gehirn. Darüber hinaus ist die Differenzierung von MSC zu Zellen mit neuronaler Antigenexpression im MCAO-Gehirn nach intravenöser Gabe mit ca. 1% sehr gering (Chen et al., 2001a). Selbst bei der intrazerebralen Transplantation von MSC stieg diese Rate nur auf 5% (Chen et al., 2001b). Darüber hinaus zeigen eigene Befunde und die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Coyne et al., 2006), dass MSC im ZNS nur 1-2 Wochen überleben können oder sogar aktiv abgestoßen werden. Ziel dieses Vorhabens war deshalb die direkte Differenzierung von MSC zu neuronalen Zellen vor der Transplantation im MCAO-Modell. Erste Hinweise für die Realisierbarkeit einer solchen Strategie ergaben sich in einem Rattenmodell der intrazerebralen Transplantation von Azacytidin-behandelten MSC nach MCAO (Kang et al., 2003).

Während des Vorhabens erfolgten kontinuierliche Literatursuchen über Datenbank-Recherchen (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed). Zudem wurden nationale und internationale wissenschaftliche Tagungen besucht, um einen direkten Austausch mit Partnern des Konsortiums und anderen Neurowissenschaftlern zu ermöglichen.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Teilprojektes wurde intensiv mit den folgenden Wissenschaftlern des Verbundes „Stammzellbasierte Regeneration nach Schlaganfall“ zusammengearbeitet:

- Prof. Dr. Magdalena Götz, GSF (vormals Max-Planck Institut für Neurobiologie), München
- Dr. Michael Hack, GSF (vormals Max-Planck Institut für Neurobiologie), München
- Prof. Dr. Ulrich Dirnagl, Charité, Berlin

Innerhalb des BMBF-Förderschwerpunktes „Zellbasierte, regenerative Medizin“ bestand ein wissenschaftlicher Austausch mit:

- Prof. Dr. Dagmar Dilloo, Universität Bonn (vormals Universität Düsseldorf)
- Prof. Dr. Reinhard Henschler, DRK, Frankfurt am Main

Außerhalb des BMBF-Förderschwerpunktes „Zellbasierte, regenerative Medizin“ bestand ein projektbezogener wissenschaftlicher Austausch mit:

- Prof. Dr. Darwin J. Prockop, Texas A&M University, Temple (vormals Tulane University, New Orleans), USA

II Eingehende Darstellung

1. Isolierung und Charakterisierung von murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSC)

1.1 Isolierung und Proliferationseigenschaften der mMSC des Knochenmarks

Nach Präparation des Knochenmarks aus adulten C57BL/6 Mäusen wurde das heterogene Knochenmarkzellgemisch ausgesät und hieraus die sehr seltenen mMSC isoliert. Dies gelang unter Ausnutzung der Plastikadhärenz der Zellen und nach Etablierung geeigneter Zellkulturbedingungen, wie der Auswahl eines speziellen chargenselektionierten Serums und der Aussaat der Zellen in sehr niedriger Zelldichte (50 Zellen/cm^2) im Verlauf der weiteren Subkultivierungen. Unter diesen Experimentalbedingungen wurden kontaminierende hämatopoetische Zellen – die gerne die mMSC überwuchern und deren Proliferation hemmen – aus den Kulturen eliminiert werden. Unter dem Mikroskop imponierten die mMSC morphologisch als runde, teils polygonale oder spindelförmige, koloniebildende Zellen (Abb. 1A).

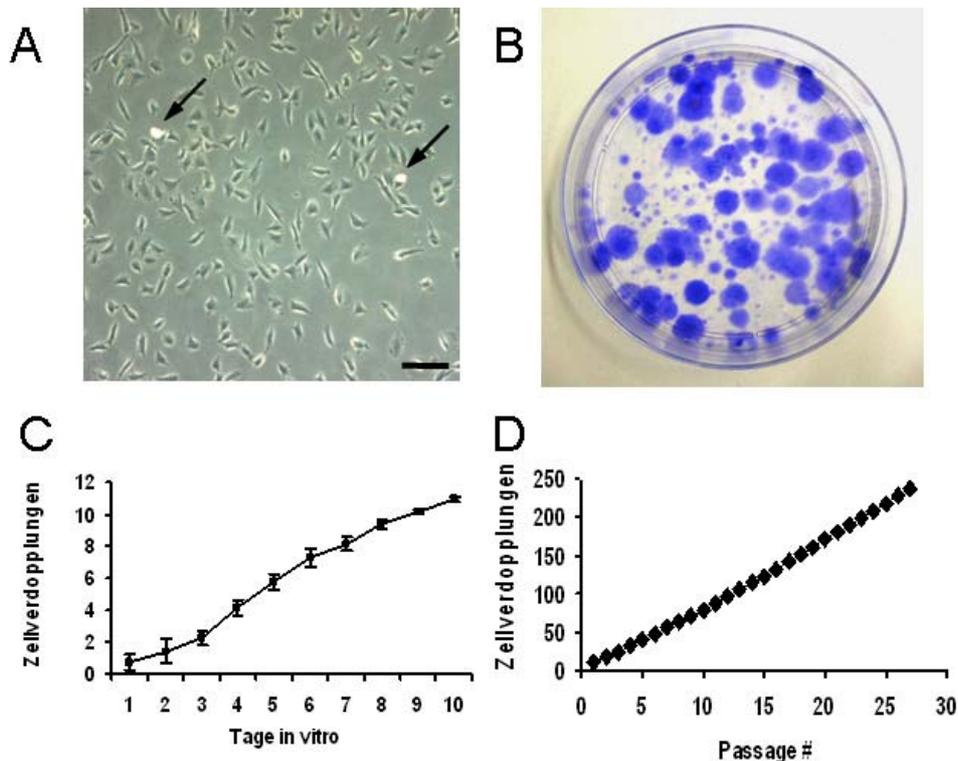


Abb. 1. A) mMSC der Passage 8 zeigen die typische runde, spindelförmige oder polygonale Morphologie. Die Pfeile zeigen auf mitotische Zellen. B) Ergebnis eines t-CFU Assays nach Crystalviolettffärbung. C) Erstellung einer Wachstumskinetik der mMSC im Verlauf einer Passage ($n=6$). D) Der lineare Verlauf der Zellzahlverdopplungen/ Passage illustriert die konstante Proliferationsgeschwindigkeit der mMSC während einer Kulturdauer von 27 Subkulturen.

In weiterführenden Proliferationsassays wurde das Wachstumsverhalten der Zellen analysiert. Im t-CFU-assay, bei dem 100 Zellen in eine Petrischale ausgesät wurden und nach 14d die gewachsenen Kolonien mit einer Crystalviolettffärbung visualisiert