

Christian Caprara, Luca Mariotta, Mauro Gola, Gianni Soldati¹

Stammzellen aus Fettgewebe in der regenerativen Medizin

Einer der Meilensteine, den die moderne Medizin noch erreichen muss, ist die Entwicklung klinischer Therapien auf der Basis von Stammzellen, um verletzte, degenerative oder von Geburt an kranke Gewebe wiederherzustellen. Da die Verwendung embryonaler Stammzellen mit grossen ethischen Bedenken verbunden ist, wächst das Interesse an Stammzellen aus erwachsenem Gewebe. Diese adulten Stammzellen sind in der Lage, sich in verschiedene Zelltypen zu verwandeln, die in der regenerativen Medizin eingesetzt werden könnten; deshalb sind zahlreiche Quellen zur effizienten und ergiebigen Isolierung adulter Stammzellen erforscht worden. Verglichen mit den klassischen Quellen wie dem Knochenmark ist das subkutane Fettgewebe die ergiebige Quelle mesenchymaler Stammzellen beim Erwachsenen. Adipöse Stammzellen (Adipose-derived Stem Cells – ASC) können enzymatisch aus Fettgewebe isoliert werden, das durch Fettabsaugung gewonnen wurde, und dann entweder expandiert und zu verschiedenen Zelltypen differenziert oder in sogenannten «Stammzellbanken» in Flüssigstickstoff gelagert werden. Diese Zellbanken sollten die Bestimmungen für Good Manufacturing Practice (GMP) erfüllen, um künftig zur Behandlung von Patienten genutzt werden zu können.

Im 20. Jahrhundert wurde eine enorme Zahl medizinischer Entdeckungen gemacht und Fortschritte erzielt, welche die Gesundheitsversorgung erheblich verbesserten. Ungeachtet dieser Fortschritte befassen sich viele konventionelle Behandlungen nur mit der Prävention von Krankheiten oder bestehen hauptsächlich in palliativer Betreuung, die zwar die Symptome, aber nicht die Ursachen der Erkrankung

Organe vollständig zu ersetzen oder wiederherzustellen, und bietet so den Menschen, die an derzeit nicht heilbaren Krankheiten leiden, neue Hoffnung und Lösungen.

Zentrale Bedeutung der Stammzellen

In der regenerativen Medizin kommt den Stammzellen eine zentrale Rolle zu. Ein gründliches Verständnis ihrer Biologie ist somit entscheidend, um neue, zellbasierte Behandlungen zur künftigen klinischen Anwendung zu entwickeln. Stammzellen sind nichtspezialisierte Zellen, die sich in spezialisierte Zellen einer bestimmten Linie differenzieren oder durch Teilung weitere Stammzellen generieren. Sie sind demnach eine natürliche Quelle neuer Zellen in den verschiedenen Geweben und tragen so zur Selbstheilungskraft des Körpers bei [3–5]. Nischen adulter Stammzellen wurden interessanterweise in nahezu allen Organen entdeckt, auch im Gehirn [6, 7]. Um für regenerativmedizinische Zwecke genutzt werden zu können, müssen Stammzellen verschiedene Voraussetzungen erfüllen: Sie müssen in grosser Zahl verfügbar sein, durch ein möglichst wenig invasives Verfahren gewonnen werden, sich auf reproduzierbare Weise in verschiedene Zelllinien differenzieren können, dem Empfänger gefahrlos transplantierbar und unter Einhaltung der Good Manufacturing Practices (GMP) hergestellt

worden sein, um die Sicherheit der Patienten zu gewährleisten.

Stammzellenquellen

Eine der grossen Aufgaben ist es, geeignete, sichere und ethisch unbedenkliche Stammzellenquellen zu finden. Embryonale Stammzellen sind zwar pluripotent – d.h. in der Lage, sich in beinahe jeden Zelltyp zu differenzieren – und mithin für regenerativmedizinische Zwecke besser geeignet, rechtliche und ethische Auseinandersetzungen über ihre medizinische Verwendung haben jedoch zu einer umfassenden Untersuchung der Vorräte adulter Stammzellen im menschlichen Körper geführt. Ein besonderer Typ adulter Stammzellen, die mesenchymalen Stammzellen (MSC), ist multipotent (d.h. in der Lage, unterschiedliche Zelltypen zu generieren) und kann sich gemäss der adipogenen (Fettgewebe), osteogenen (Knochengewebe), chondrogenen (Knorpelgewebe), myogenen (Muskelgewebe) sowie neurogenen Linie (Nervengewebe) ausdifferenzieren [8]. Bisher sind mehrere Quellen für MSC identifiziert worden, darunter Knochenmark, Muskeln, Blut und menschliche, subkutane Fettgewebepots [9]. Traditionell war das Knochenmark das Gewebe der Wahl, um MSC zu isolieren; die Entnahme an dieser Stelle ist allerdings ein relativ invasiver und schmerzhafter Eingriff, und zudem ist die Zellausbeute aus diesem Gewebe nicht besonders

Ungeachtet dieser Fortschritte befassen sich viele konventionelle Behandlungen nur mit der Prävention von Krankheiten ...

bekämpft. Dies trifft besonders für angeborene Störungen, irreversible Verletzungen und für chronisch-degenerative Erkrankungen zu, die nicht heilbar sind und die heute aufgrund der Bevölkerungsalterung eine wachsende Zahl von Menschen betreffen [1].

Die regenerative Medizin ist eine revolutionäre multidisziplinäre Wissenschaft, die sich infolge der jüngsten Fortschritte in den Biowissenschaften entwickelt hat; viele auf ihr beruhenden Strategien werden derzeit in die klinische Praxis umgesetzt [2]. Dieser rasch wachsende Forschungsbereich lässt die faszinierende Möglichkeit zutage treten, geschädigte Gewebe und

¹ Dr. Christian Caprara, Dr. Luca Mariotta, Dr. Mauro Gola und Dr. Gianni Soldati, Swiss Stem Cell Foundation, 6925 Gentilino

hoch [10]. Aus diesen Gründen kommt dem Fettgewebe heute wachsendes Interesse als alternative Quelle von MSC zu. Aufgrund der steigenden Inzidenz von Fettleibigkeit in den Industrieländern steht subkutan Fettgewebe überdies in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Verglichen mit Knochenmark ist Fettgewebe leichter zugänglich und kann durch Fettabmung unter Lokalanästhesie in grösseren Mengen und mit minimaler Belastung der Patienten gewonnen werden. Darüber hinaus ist die relative Ausbeute an Stammzellen pro Gramm Ausgangsgewebe 500-mal höher als bei Knochenmark [11]. Besonders wichtig ist, dass im Vergleich zu MSC aus dem Knochenmark die adipösen Stammzellen (ASC) anscheinend die gleiche Fähigkeit besitzen, auf das Mesoderm zurückgehende Zellen zu bilden und ein ebenso hohes Potential für die klinische Verwendung aufweisen [11].

Zur Isolierung von ASC muss das Lipospiat einem enzymatischen Prozess unterzogen werden, um die Adipozyten von der sogenannten stromal-vaskulären Fraktion (SVF) – einer heterogenen Zellpopulation aus Blutzellen, Fibroblasten, Perizyten, Endothelzellen und ASC – zu trennen [12]. Wir haben vor kurzem unsere Methode zur Extraktion der SVF (Patent Nr. PCT/EP2012/069261) zur Durchführung in einem Reinraum, d.h. unter aseptischen Bedingungen und somit im Einklang mit den GMP-Bestimmungen, angepasst. Dies hat grosse Vorteile und ermöglicht, unter effektiven und gefahrlosen Bedingungen, Stammzellen für die klinische Anwendung zu isolieren. Während sich die Verwendung der ASC derzeit auf die plastische und rekonstruktive Chirurgie beschränkt, wollen wir in naher Zukunft ASC für Tissue Engineering und Zelltherapien isolieren.

Stammzellenlagerung

ASC können ebenso wie Nabelschnurblutstammzellen problemlos tiefgefroren und in sogenannten Zellbanken jahrelang in Flüssigstickstoff gelagert werden. Bei Bedarf kann man sie auftauen und kultivieren, da sie ihr hohes Wachstums- und Differenzierungspotential behalten [13]. Der erste Schritt, die modernen Zelltherapien

Referenzen

- Hickey, T., Speers, M. A. & Prohaska, T. R. Public Health and Aging. (JHU Press, 1997).
- Giordano, A., Galderisi, U. & Marino, I. R. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 211, 27–35 (2007).
- Fox, A. et al. Mobilization of endothelial progenitor cells into the circulation in burned patients. *Br J Surg* 95, 244–251 (2008).
- Hennemann, B. et al. Mobilization of CD34+ hematopoietic cells, colony-forming cells and long-term culture-initiating cells into the peripheral blood of patients with an acute cerebral ischemic insult. *Cytotherapy* 10, 303–311 (2008).
- Leone, A. M. et al. Endogenous G-CSF and CD34+ cell mobilization after acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 111, 202–208 (2006).
- Mimeault, M. & Batra, S. K. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev and Rep* 4, 27–49 (2008).
- Barker, N., Bartfeld, S. & Clevers, H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell* 7, 656–670 (2010).
- Mundra, V., Gerling, I. C. & Mahato, R. I. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Mol. Pharmaceutics* 10, 77–89 (2013).
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. & Jacobs, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling* 9, 12 (2011).
- Fennema, E. M., Renard, A. J. S., Leusink, A., van Blitterswijk, C. A. & de Boer, J. The effect of bone marrow aspiration strategy on the yield and quality of human mesenchymal stem cells. *Acta Orthop* 80, 618–621 (2009).
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O. & Michalek, J. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells and Development* 21, 2724–2752 (2012).
- Astori, G. et al. 'In vitro' and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med* 5, 55 (2007).
- Minonzio, G. et al. Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. *Cryobiology* (2014). doi:10.1016/j.cryobiol.2014.07.005

den Patienten verfügbar zu machen, ist also das Lagern von Stammzellen in Zellbanken. Zahlreiche Banken sind bereits zu Forschungszwecken erfolgreich eingerichtet worden. Aufgrund des grossen Aufwandes, mit dem die Einhaltung der strengen GMP-Bestimmungen einhergeht, wurde indes weniger Augenmerk darauf gelegt, diese Techniken auf klinischen oder industriellen Massstab auszubauen. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen alle Produktionsphasen überwacht werden, darunter Personal, Reagenzien, Instrumente, Dokumentation, Herstellungsverfahren und -bedingungen, Analysen und Freigabe. Die klinische Anwendung er-

Cellules souches dérivées du tissu adipeux pour la médecine régénérative

Dans la médecine moderne, les traitements cliniques basés sur les cellules souches destinés à régénérer les tissus lésés, dégénérés ou touchés par des affections congénitales constituent un progrès majeur annoncé, qui doit cependant encore être concrétisé. Etant donné que l'utilisation de cellules souches embryonnaires pose un immense dilemme moral, les cellules souches provenant de tissus adultes bénéficient d'un intérêt croissant. Ces cellules souches adultes sont capables de se différencier en de multiples types cellulaires qui pourraient être utilisés dans la médecine régénérative. Dès lors, de nombreuses sources ont été explorées pour l'isolement efficace et «abondant» de cellules souches adultes. Dans cette perspective, par rapport à des sources classiques comme la moelle osseuse, le tissu adipeux sous-cutané est la source la plus riche en cellules souches mésenchymateuses chez l'adulte. Par méthode enzymatique, les cellules souches dérivées du tissu adipeux peuvent être isolées du tissu adipeux obtenu par liposuccion. Elles peuvent alors soit faire l'objet d'une expansion, soit se différencier pour générer différents types cellulaires, soit être stockées dans de l'azote liquide dans des «banques de cellules souches», qui devraient être conformes aux règles de bonnes pratiques de fabrication, afin d'être utilisées pour le traitement futur de patients.

fordert üblicherweise grosse Mengen an Stammzellen, mithin eine beträchtliche Vermehrung und schliesslich eine Kultivierung auf festen Unterlagen, um eine bestimmte Form zu erreichen. Die kultivierten Zellen können ausserdem in vitro zu der gewünschten Linie ausdifferenziert werden.

Ausblick

Um den Patienten Stammzellen zur Verfügung zu stellen, die ihrem Bedarf entsprechend kultiviert und differenziert wurden, sind noch einige wesentliche Aspekte zu untersuchen und zu klären, etwa die Frage nach dem am besten geeigneten Medium für die Zellkultur und nach der Genomstabilität der kultivierten Zellen. Der neuste Stand ist, für jeden Patienten eine individuelle Therapie zu gestalten, die folglich sehr teuer ist. Es ist also angebracht, mehr in die klinische Forschung zu investieren, um Zelltherapien als Standardbehandlung zu entwickeln.

Korrespondenz:
luca.mariotta@sscf.ch