

Stamceller, med vekt på de mesenchymale:

Cellebiologi og potensielt terapeutisk bruk

Stud.med. Trude Basso



Prosjektoppgave ved det Medisinske Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

12.09.06

Innhold

1. Innledning	4
1.1 Metode	4
1.2 Sammendrag	4
2. Stamceller	6
3. Embryonale stamceller	8
3.1 Embryonale stamceller	8
3.2 Høsting og dyrking	8
3.2.1 Høsting	8
3.2.2 Forhindre uønsket differensiering	9
3.2.3 Differensiering vha embryoide bodies	9
3.2.4 Differensiering vha andre metoder	9
3.2.5 Teratomer	10
4. Somatiske (adulte) stamceller	11
4.1 Somatiske stamceller	11
4.1.1 Definisjon	11
4.1.2 Sirkulerende mesenchymale stamceller	11
4.1.3 Andre ikke-vevsspesifikke mesenchymale stamceller	12
4.1.4 Vevsspesifikke mesodermalt deriverte stamceller	12
4.2 Stamceller i benmargen	14
4.2.1 Mesenchymale stamceller	14
4.2.2 Andre stamceller i benmargen	15
5. Stamcellenisjer	16
5.1 Samspill mellom mesenchymale celler og hematopoietiske stamceller i benmargen	16
5.1.1 Mikromiljøet	16
5.1.2 Hvilende stamceller	17
5.1.3 Signaliseringsveier	17
6. Plastisitet	19
6.1.1 Embryologiske kimlag	19
6.1.2 Hva menes med plastisitet?	19

6.1.3	Forklaringsmodeller for bytte av cellelinjer.....	20
6.1.4	Transdifferensiering.....	21
6.2	<i>Plastisitet av mesenchymale stamceller</i>	21
6.2.1	Forventet differensiering.....	21
6.2.2	Til andre mesodermale cellelinjer.....	22
6.2.3	Til endotel.....	22
6.2.4	Til nevroektodermale celler.....	23
6.2.5	Til endoderm.....	23
7.	Klinisk terapeutisk bruk av mesenchymale stamceller.....	24
7.1	<i>En liten innledning til temaet</i>	24
7.2	<i>Et utvalg forskningsområder</i>	25
7.2.1	Lungefibrose.....	25
7.2.2	Nevrologiske sykdommer og skader.....	25
7.2.3	Ortopedi.....	26
7.2.4	Kardiovaskulære sykdommer.....	27
7.2.5	Muskelsykdommer.....	28
7.2.6	Utslettet benmargsfunksjon etter høydose kjemoterapi.....	28
7.2.7	Aplastisk anemi.....	29
7.2.8	Ved behov for immunsuppresjon.....	29
8.	Avsluttende kommentarer.....	30
9.	Referanser.....	31

1. Innledning

1.1 Metode

Oppgaven er et litteraturstudie av artikler søkt fra databasen Medline våren og sommeren 2005. Senere publiserte artikler er ikke inkludert. Oppgaven ble ikke endelig ferdig på det overnevnte tidspunkt pga praksissemester og barnefødsel med påfølgende permisjon. Alle artikkeltreff i Medline er ikke studert. Å gjøre dette ville være en formidabel jobb som ville gå langt ut over intensjonen med denne oppgaven, både hva gjelder omfang og tidsbruk. Isteden har jeg, sammen med min veileder, professor Steinar Funderud ved Radiumhospitalet, forsøkt å samle og gjennomgå artikler relevante for å få en bred oversikt over emnet mesenchymale stamceller og disse cellenes potensielle anvendelse.

1.2 Sammendrag

Stamceller er av mange ansett som svært viktig for framtidens medisin. Optimismen rundt dette feltet har de senere år svingt i takt med at publisering av ny lovende forskning kommer vekselvis med rapporter som tilbakeviser resultatene. Denne oppgaven vil forsøke å gi en oversikt over forskning på en svært spennende og mangfoldig stamcellegruppe: de mesenchymale. Disse cellene er progenitorer for de ulike komponentene til skjelettet, nærmere bestemt ben, brusk, fett, muskler og hematopoietisk stroma.

Stamceller (SC) er celler som opprettholder evnen til å dele seg og proliferere postnalt. De gir opphav til progenitorceller som kan differensiere til spesialiserte celler. Stamceller vil in vivo funksjonelt rekonstruere vev (Verfaillie C, 2002). Man skiller mellom embryonale (ESC) og somatiske (adulte) stamceller (SSC).

Embryonale stamceller er benevnelsen på celler isolert fra tidlige embryoer. Disse cellene er pluripotente og har potensiale i seg til å gi opphav til alle celletyper kroppen består av, men ikke ekstraembryonale membraner og vev.

Man finner celler med stamcelleegenskaper i alle kroppens vev. En overordnet inndeling av somatiske stamceller er hematopoietiske-, nevralt-, gastro-intestinale-, epidermale-,

hepatiske- og mesenchymale stamceller (MSC). MSC har evne til å differensiere til flere cellelinjer og kalles derfor multipotente. De hematopoietiske stamcellene finner man i benmargen side om side med de mesenchymale. Disse sistnevnte finner man også i adipøst vev, samt i føtale lunger. De hematopoietiske- og mesenchymale stamcellene hører embryologisk til mesodermen. De nevrale- samt de epidermale stammer fra ekto- og nevroektodermen, mens de gastro-intestinale stamcellene samt stamcellene i respirasjonstractus kommer fra endodermen.

Som nevnt vil denne oppgaven fokusere på de mesenchymale stamcellene. Disse gir opphav til chondrocytter, adipocytter, osteoblaster, myocytter og hematopoietisk stroma. Man mangler per i dag veldefinerte antigen(Ag)markører på mesenchymale stamceller og dette gjør at cellene man henter ut er heterogene med henhold til differensieringsgrad. Enkelte forfattere velger derfor å kalle dem en gruppe mesenchymale precursorceller i stedet for stamceller. I denne oppgaven vil også mesangioblaster og multipotente adulte progenitorceller (MAPC) regnes som mesenchymale stamceller og derfor inkluderes.

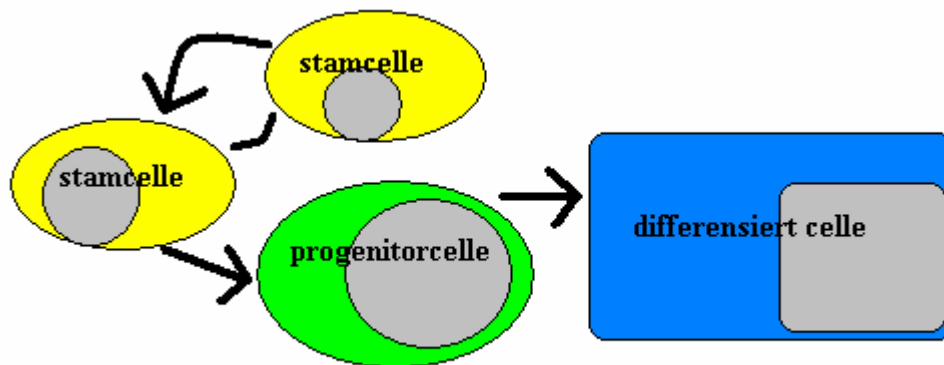
In vitro og in vivo er det forsøkt vist at én gitt stamcelle kan gi modne celler fra en annen stamcellelinje. Dette kan tenkes å skje på flere måter, hvorav såkalt ekte plastisitet ved hjelp av transdifferensiering er en av hypotesene. Eksperimentelt har man vist at én stamcelletype tilhørende ett vev kan differensiere til celler tilhørende andre vev. Hvorvidt det også er mulig å krysse grensene til de tre opprinnelige embryonale kimlagene endo-, meso- og ektoderm er i dag et hett tema. Er så tilfellet vil dette sette tidligere teorier omhandlende celleutvikling på prøve.

For at en stamcelle kan starte differensieringen i en bestemt retning, er den avhengig av et bestemt nærmiljø av andre celler og kjemiske signalsubstanser i ekstracellulærmatrix (ECM). Dette kalles en nisje eller et mikromiljø og vil bli omtalt i et eget kapittel.

Et svært viktig forskningsfelt i dag er potensielt klinisk bruk av stamceller. Siste del av denne oppgaven vil diskutere grunntanker bak denne forskningen, samt trekke fram eksempler på sykdommer og sykdomsgrupper der det i dag blir forsøkt med behandling ved hjelp av mesenchymale stamceller. Genterapi med bruk av stamceller vil ikke bli videre omtalt i denne oppgaven.

2. Stamceller

Stamceller (SC) er celler som opprettholder evnen til å dele seg og proliferere postnalt. De gir opphav til nye stamceller og mer spesialiserte progenitorceller som kan differensiere til spesifikke celler.



Stamcellene man finner i blastocystene, det vil si 4-8 dager postconceptisk, er de mest potente stamcellene man har. Disse kan gi opphav til alle kroppens celler og har fått betegnelsen pluripotente stamceller. Etter hvert i embryogenesen mister disse cellene sine pluripotente karakterer og de kan nå deles inn i stamceller etter hvilken derm de tilhører. Disse cellene kalles derfor multipotente ektodermale-, endodermale- og mesodermale stamceller. Herfra utvikler cellene seg til linjespesifikke progenitorceller med varierende potensial innenfor sin derm (Young og Black, 2004). Figuren på neste side illustrerer dette.

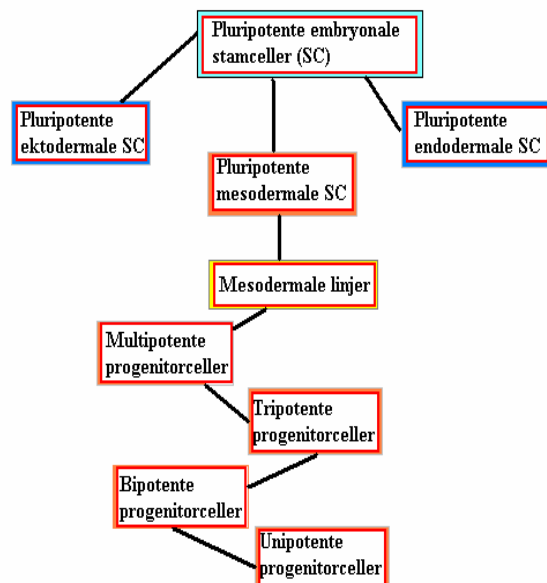


Fig1: Stamcellehierarki

Som et eksempel på dette viser den neste figuren hvordan man mulig kan tenke seg det hierarkiske systemet innenfor den mesodermale linjen som i siste instans gir chondrocytter og osteoblaster. PC er i figuren progenitorceller.

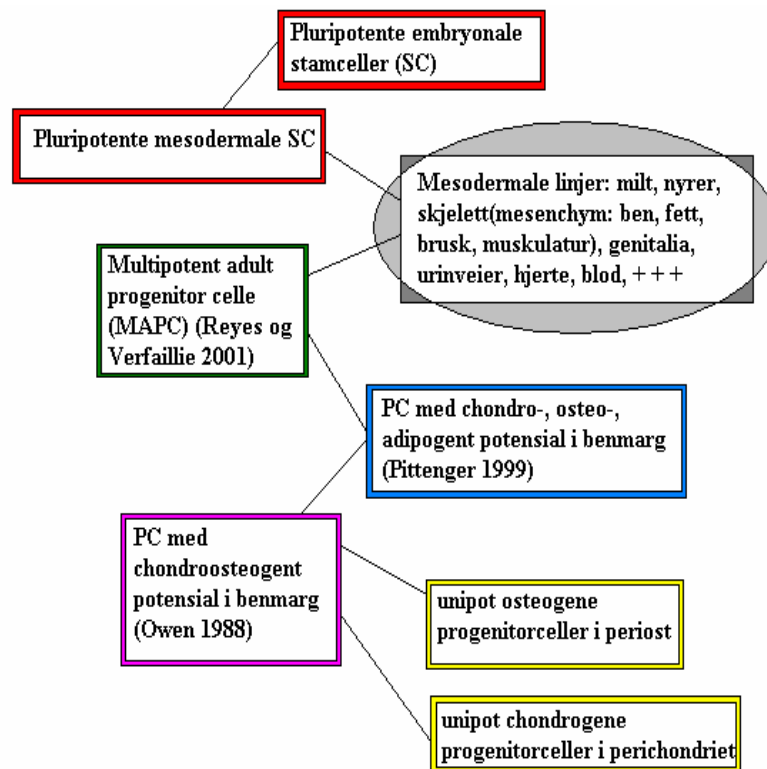


Fig 2: Eksempel på tenkt stamcellehierarki

3. Embryonale stamceller

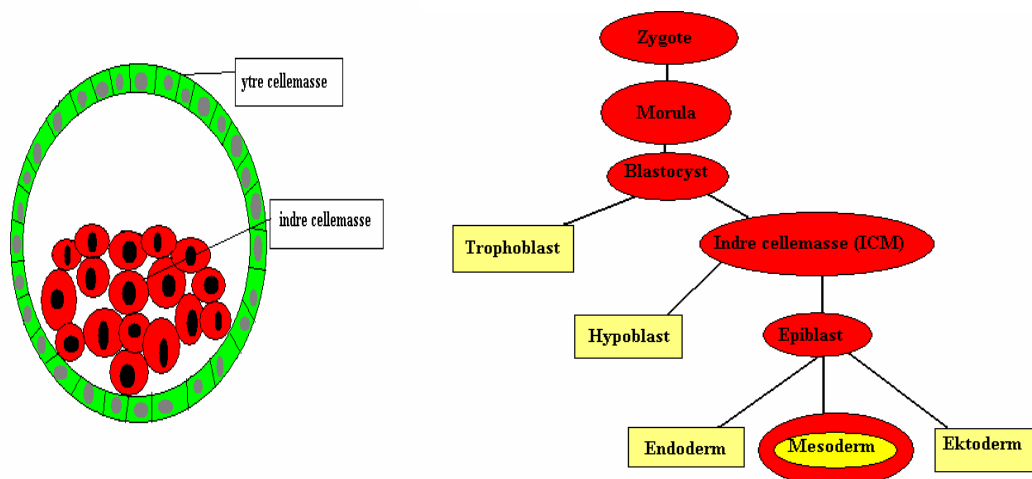
3.1 Embryonale stamceller

Embryonale stamceller er pluripotente celler med potensial i seg til å danne alle kroppens ulike celler. I motsetning til en befruktet eggcelle kan de ikke spesialisere seg til ekstraembryonale membraner (fosterhinner) og vev (placenta), og har derfor mistet sine totipotente egenskaper som skal til for å tillate embryogenesen.

3.2 Høsting og dyrking

3.2.1 Høsting

Fire til fem døgn etter fertiliseringen danner cellene (blastomerene) en blastocyst med en indre cellemasse (ICM) og et ytre, omsluttende cellelag der cellene nå benevnes trofoblaster. Blastomerene i ICM, som vi nå kan kalle embryonale stamceller, vil hurtig degenerere hvis de dyrkes in vitro lenger enn til dag 6-7. Cellene i ICM slutter å dele seg i nærvær av trofoblaster, så innen denne kontakten oppstår, blir de embryonale stamcellene med pluripotent potensial fjernet. Dette gjøres ved at in vitro fertiliserte humane embryoer kultiveres til dette utviklingstrinn. Den indre cellemasse isoleres så ved immunokirurgi. Cellene man nå har høstet, dvs. de embryologiske stamcellene kan i utgangspunktet dyrkes i det uendelige, men for at dette skal være mulig må uønsket differensiering hindres.



3.2.2 Forhindre uønsket differensiering

For å hindre spontan differensiering har cellene inntil nylig blitt dyrket på embryonale musefibroblaster (MEF) (Thomson et al., 1998), human penisforhud (Amit et al., 2003), føtal muskel og hud (Richards et al., 2002) eller humant benmargsstroma (Cheng et al., 2003). Nye metoder utarbeides stadig for å ekskludere risiko for overføring av xenopatogener (ved bruk av museceller) og dyrkning på MEF blir av denne grunn ikke lenger anvendt som metode (Steinar Funderud, muntlig 2006). Denne oppgaven ble skrevet før man gikk bort fra bruk av MEF og denne metoden nevnes derfor flere steder. Nye, forbedrede dyrkningsmetoder er svært viktig, især med tanke på terapeutisk bruk da det her ikke er tillatt å bruke humane ES dyrket på musefibroblaster.

3.2.3 Differensiering vha embryoide bodies

Uten hemmende faktorer og med stadig fornying av MEF vil ESC spontant organisere seg i sfæriske embryoide bodies (EB) der cellene starter en heterogen differensiering mot ulike celletyper. For å geleide cellene inn på en ønsket differensieringsbane må ulike vekstfaktorer settes inn i de EBenes miljø for på den måten å skape en kunstig nisje. EB er en potent kilde for høsting av ønskede celletyper. ESC i EB er in vitro blitt differensiert i en cardiomyocytisk-, nevronal-, hematopoietisk- og endotelial retning (Zhang SC et al., 2001; Levenberg et al., 2002; Kehat et al., 2001; Vodyanik et al., 2005). Forsøk på å dyrke frem pancreatiske beta-celler (langerhanske øyer) har vist lovende, men foreløpig for svake resultater.

3.2.4 Differensiering vha andre metoder

Alternative metoder for å direkte differensiere ESC uten å måtte gå via dannelse av EB er også arbeidet fram. Ved å dyrke cellene uten å fornye MEF har ESC vist å spontant differensiere i en tidlig nevroektodermal retning. Disse cellene har så blitt tilsatt vekstfaktorer i serumfritt medium. Dette gav nevroektodermale progenitorceller i sfærisk form (Reubinoff et al., 2001). Ved kokultur med musestroma er hematopoietisk differensiering mulig (Kaufmann et al., 2001). Cardiomyocytter som viser rytmiske kontraksjoner er også dyrket fram uten å måtte gå via dannelse av EB (Mummery et al., 2002).

3.2.5 Teratomer

Humane ESC transplantert inn i SCID-mus danner neoplasmer av ulike, ikke-stedegne vev, kalt teratomer. Teratomene som opptrer etter transplantasjon inneholder celler utgått fra endo-, meso- og ektodermale kimlag og viser ESCenes pluripotente egenskaper (Thomson et al., 1998). Kloning av pluripotente ESC har bekreftet dette funnet (Amit et al., 2000).

4. Somatiske (adulte) stamceller

4.1 Somatiske stamceller

4.1.1 Definisjon

Med somatiske stamceller menes celler i organer og vev hos fødte individer som er i stand til å opprettholde, generere og erstatte terminalt differensierte celler i deres spesifikke vev ved skade eller celledturnover (Hennessy B et al., 2004). Disse cellene blir også kalt adulte stamceller, men dette er en betegnelse man ønsker å gå bort fra. Somatiske stamceller kan deles inn i sirkulerende og vevsspesifikke stamceller.

4.1.2 Sirkulerende mesenchymale stamceller

De sirkulerende stamcellene har sin opprinnelse i benmargen og sirkulerer med blodet før de slår seg ned i skadet eller sykt vev. Her gjennomgår de differensiering til stede-gne celler. I hvilken grad dette skjer under normale forhold i kroppen vet man i dag ikke. Hvilke faktorer som eventuelt fører til en slik cellemobilisering er heller ikke kjent.

Hypotesen om sirkulerende mesenchymale stamceller ble fremmet etter at systemisk infusjon av benmargsderiverte mesenchymale stamceller gav homing av celler ikke bare til benmarg, men også til andre mesenchymale vev (Pereira et al., 1995; Prockop, 1997). Senere er det gjort en rekke forsøk på å detektere sirkulerende MSC i perifert blod (PB). Celler er høstet før og etter mobilisering fra benmarg vha granulocyt-monocyt colony stimulating factor (G-CSF) med tildels motstridende resultater. Fernandez et al., (1997) fant morfologisk fibroblast-like celler som adhererte til petriskålen ved dyrkning av mononukleære celler hentet fra perifert blod etter behandling med GM-CSF, men ikke ved dyrkning av mononukleære celler fra normalt perifert blod. Andre grupper gjorde forsøk på å gjenta suksessen uten å lykkes (Lazarus et al., 1997; Wexler et al., 2003). Flere forsøk på å dyrke fram mesenchymale stamceller fra buffycoat (øverste lag etter sentrifugering av PB) har vært suksessfulle (Zvaifler et al., 2000; Kuznetsov et al., 2001; Huss et al., 2000; Wu et al., 2003). Disse cellene er videre differensiert i adipogen og osteogen retning (Zvaifler et al., 2000; Kuznetsov et al., 2001). Sammen med en rekke dyreforsøk viser disse forsøkene at det er overveiende sannsynlig at det eksisterer en liten populasjon sirkulerende MSC.

En grov hypotese for regenerering av skadet eller ødelagt parenchym blir derfor: Unipotente, differensierte celler med evne til å gjennomgå et varierende antall delinger vil først prøve å erstatte de ødelagte cellene. Senere vil vevsspesifikke stamceller med evne til å differensieres til flere av vevets celler spille en rolle. Til slutt har man sirkulerende stamceller i perifert blod som eksisterer i et svært lite antall med evne til å slå seg ned i det skadede vevet og her gjennomgå differensiering, transdifferensiering eller fusjon. Det er mulig av benmargen fungerer som en pool for disse cellene og at flere kan mobiliseres ved behov.

4.1.3 Andre ikke-vevsspesifikke mesenchymale stamceller

Gjenstående stamceller fra tidlig fosterstadium i flere vev?

Hvorvidt det eksisterer stamceller på et svært tidlig utviklingstrinn ute i kroppens forskjellige vev er ikke endelig avklart. Verfaillies gruppe mener å ha funnet en sjelden stamcelletype de har valgt å kalle multipotente adulte progenitorceller (MAPC) i flere av kroppens vev, nærmere bestemt benmarg, hjerne og muskel (Lakshminath U og C Verfaillie, 2005). Disse cellene kan eksperimentelt danne celler fra alle de tre embryonale kimplagene (Jiang Y et al., 2002), og spørsmålet blir derfor om de utgjør en rest fra tidlig fosterstadium. Om disse cellene eksisterer *in vivo*, eller om de er et resultat av lang tids dyrking *ex vivo* er ikke avklart.

4.1.4 Vevsspesifikke mesodermale deriverte stamceller

De vevsspesifikke stamcellene er enten forpliktete stamceller som differensierer langs én linje eller ikke forpliktete stamceller som kan differensiere langs flere linjer.

Muskelvev

Blant de mesodermale cellene er satelittceller i skjelettmuskler eksempel på forpliktete, unipotente vevsspesifikke progenitorceller. Side om side med disse finner man myocytter med stellar morfologi med evne til å danne ben, brusk og fett og disse er da følgelig ikke-vevsspesifikke progenitorer med multipotent potensial. I skjelettmuskulatur er det funnet progenitorer som kan gi opphav til glatte muskelceller og som også kan differensiere til pericytter (Majka et al., 2003).

Fettvev

Adipogene progenitorer eksempler på forpliktede celler i fettvev. Her finner man også adipogene, ikke-vevsspesifikke bipotente celler som i tillegg til fett også kan differensiere til brusk (Roufosse, 2003). I subkutanøst fettvev har man funnet en multipotent stamcelle som har fått navnet adipose-derived adult stem (ADAS) cell. Disse cellene viser sammenfallende egenskaper med de mesenchymale stamcellene i benmargen og kan differensiere til osteoblaster, chondrocytter, myocytter og adipocytter. I tillegg viser de evne til neural differensiering og de kan fungere som hematopoietisk stroma (Gimble J og Guilak F, 2003). På grunn av lokalisasjon er disse cellene svært tilgjengelige og dermed spesielt interessante med tanke på klinisk bruk

Brusk

Unipotente chondrogene precursorceller er identifisert i perichondrialt bindevev som omslutter brusken (Cruess, 1982). Stamceller i perichondriet hos foster er vist å kunne differensiere i adipogen-, osteogen-, chondrogen og stromal retning. Disse antas å være spesielt viktige ved tidlig dannelse av brusk og ben og også for dannelsen av benmargen (Arai et al., 2002).

Ben

I benvev finnes flere typer precursorceller. De er lokalisert til periost, langs den indre endosteale overflaten (Cruess, 1982) og i benmargsstroma. Disse sistnevnte cellene har multipotente egenskaper (Owen og Friedenstein, 1988).

Benmarg

I benmargen har man vevsspesifikke stromaceller som er avgjørende for at en normal hematopoiese skal kunne skje. Disse mesenchymale cellene er multipotente og kan bli alle de mesodermale cellene osteoblaster, chondrocytter, myocytter og adipocytter. Mer om stamcellene i benmargen kommer i neste avsnitt.

Hud

Det funnet en progenitorcelle i dermis med multipotente egenskaper. Disse cellene kan differensiere til nevroner, gliaceller, adipocytter og glatte muskelceller (Toma JG et al., 2001).

4.2 Stamceller i benmargen

Stamcellene i benmargen vil her bli utdypet noe. Human benmarg er organet som best er undersøkt som kilde for somatiske stamceller. Benmargens celler er særlig viktig gjennom sin funksjon i immunforsvaret og erytropoiesen, men også fordi de viser evne til differensiering, transdifferensiering og fusjon til andre organers og vevs stedegne celler. Hos voksne personer på ca 70 kg utgjør benmargen 1.75 L. Dette kan seksdobles ved alvorlig blødning eller infeksjon. (Hassan HT og El-Sheemy M, 2004).

Benmargen inneholder somatiske stamceller tilhørende de hematopoietiske cellelinjene, de mesenchymale, samt endoteliale precursorer. I tillegg er det mulig at det finnes multipotente adulte progenitorceller (MAPC) *in vivo* (Jiang Y et. al 2002), samt mesoangioblaster.

4.2.1 Mesenchymale stamceller

Det har til nå ikke vært entydig enighet rundt hva som skal klassifiseres som mesenchymale stamceller. Den mest snevre definisjonen inkluderer kun stamcellene som adherer til underlaget ved utsåing av benmarg og som danner colony forming unit-fibroblast (CFU-F). En CFU-F dannes fra en enkelt precursorcelle. Får koloniene lov til å ekspandere vises stor grad av heterogenitet ved at størrelsene, veksthastigheten, morfologien og fenotypen er sterkt varierende.

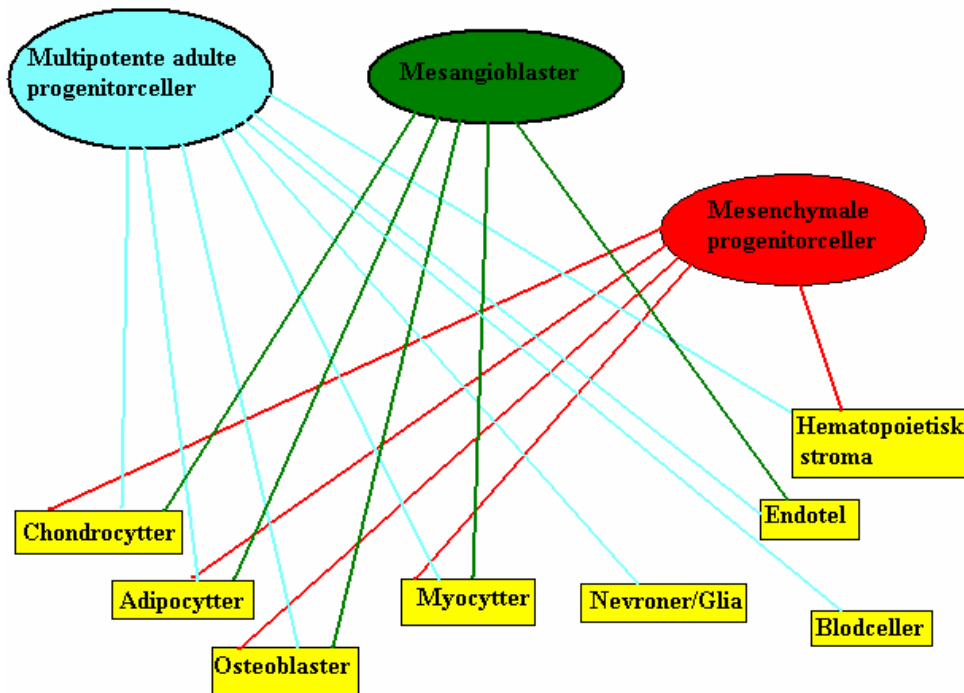
Under riktige omstendigheter differensieres CFU-F til celler i den mesenchymale cellerekken: adipocytter, chondrocytter, osteoblaster og myocytter. Dette gjelder både *in vitro* (Friedenstein AJ et al., 1982; Herbertson A et al., 1997; Berry L et al., 1992) og *in vivo* (Friedenstein AJ et al., 1982; Ashton BA et al., 1980). I benmargen danner de hematopoietisk stroma som er nødvendig for hematopoiesen og dette diskuteres videre under avsnittet om nisjer.

Utvider man begrepet *mesenchymale stamceller* er det naturlig å inkludere mesoangioblaster og tidligere omtalte MAPC. I det videre arbeidet inkluderes disse celletypene i den mesenchymale stamcellefamilien.

Multipotente adulte progenitorceller (MAPCs) med evne til å dele seg opp til 80 ganger er en sjelden form for mesenchymale stamceller som ved siden av adipocytter, chondrocytter, osteoblaster og myocytter også differensieres til endotheliale- og hematopoietiske celler.

Ved encelletransplantasjoner i mus har man sett at denne cellen prolifererer og etter hvert grafted inn i de fleste vev, være seg endodermale, ektodermale eller mesodermale (Jiang et al., 2002).

Mesoangioblaster er multipotente progenitorer som uttrykker angiopoietiske markører. De finnes i den embryonale dorsale aorta samt i blodkar i benmargen. De kan differensiere til skjelettmuskulatur og andre mesodermalt deriverte vev, og vaskulære- og mesodermale ekstravaskulære vev (Cossu G og Bianco P, 2003).



4.2.2 Andre stamceller i benmargen

De hematopoietiske stamcellene i benmargen utgjør et potensielt reservoar for alle kroppens blodceller. De kan differensiere til myeloide og lymfoide progenitorceller som gir henholdsvis erytrocytter, monocytter, herunder dendrittiske celler, og granulocytter og B-celler, T-celler, plasmaceller og NK-celler.

Endoteliale precursorer i benmargen er viktig for postnatal neovaskularisering. Om det er snakk om hemangioblaster som man kjenner dem fra embryostadiet, med lik evne til å danne både blodceller og blodkar, eller om disse precursorene er mindre potente med evne kun til å lage blodkar diskuteres. Forskning viser at ekstra rene populasjoner av hematopoietiske stamceller evner å danne endotel og blodceller på encelle nivå (Bailey AS et al., 2004).

5. Stamcellenisjer

Alle stamceller innehar en evne til å balansere sitt selvfornyingspotensial med bevart evne til differensiering. Historisk har det vært mest fokus på de indre mekanismene i stamcellene som gjør dette mulig. I de senere år har fokus i stadig større grad blitt flyttet til cellens ytre miljøet og til direkte interaksjon mellom forskjellige celler og ekstracellulære signalsubstanser. I denne sammenhengen har det blitt klart at én enkelt stamcelle trenger et spesielt mikromiljø for å kunne utføre sine oppgaver. Dette har fått navnet en stamcellenisje. En definisjon på en nisje kan være som følger:

En nisje er en spesifikk lokalisasjon i et vev der stamceller kan holde til i en ubegrenset periode. Herfra kan de gi opphav til progenitorceller mens de stadig fornyer seg selv (Ohlstein B et al., 2004).

Nisjer er viktige også for rekruttering av stamceller, kalt homing. Et eksempel på dette er at stamcellene i transplantert benmarg finner veien fra perifert blod og tilbake til sitt mikromiljø (nisje).

5.1 Samspill mellom mesenchymale celler og hematopoietiske stamceller i benmargen

5.1.1 Mikromiljøet

Mikromiljøet i benmargen er et svært komplekst system med ut ukjent antall celletyper. Stromale celler er bindevevsceller som finnes i løst bindevev. Bindevevscellene omfatter fibroblaster, chondroblaster, adipocytter, glatte muskelceller og osteoblaster. Med andre ord er det snakk om mesenchymale celler i et organ. I benmargen spiller disse en avgjørende rolle for dannelsen av blodceller, også kalt hematopoiesen.

5.1.2 Hvilende stamceller

For at en stamcelle skal bevare sin evne til selvfornyng er den avhengig av å være i en hvilende (quiescent) fase. Det er framsatt to teorier på hvorfor en hvilende stamcelle blir aktivert. Den første går ut på at det ved deling rett og slett ikke blir plass til begge cellene i nisjen. Den ene skyfler derfor ut og differensieres, mens den andre kan gå i dvale igjen – til neste celledeling. Den andre går ut på at ytre påvirkning i form av signaler som forteller om for eksempel skade, aktiverer stamcellene slik at de mobiliseres ved behov. Mye tyder på at den første teorien er vanlig i tidlig utvikling, mens det hos voksne individer kanskje heller er den siste teorien om aktivering pga signaler som er den mest korrekte (E Fuchs et al., 2004).

Hematopoietiske stamceller i hvilende fase er adherente til osteoblaster i trabekelbenet. HSCs mer differensierte datterceller beveger seg fysisk i retning fra de endosteale osteoplastene mot sentrum av benmargen. Disse cellene er i stadig utvikling mot endelig differensierte celler også etter at de har forlatt sin nisje (Nilsson et al., 2001).

De mesenchymale stamcellene synes å hvile perivaskulært i benmargens små blodkar (Shi og Gronthos, 2003). Hva de her er adherente til er ikke kjent, heller ikke hvordan de fysisk beveger seg i det differensiering initieres.

5.1.3 Signaliseringsveier

Jeg fant lite informasjon om de mesenchymale stamcellenes nicher og signaliseringsveier og bruker her i hovedsak de hematopoietiske stamcellenes signaliseringsveier som eksempel.

Tie-2/Ang-1

Hvilende hematopoietiske stamceller uttrykker tyrosin kinase reseptoren Tie2. Liganden til denne reseptoren er Angiopoietin-1 (Ang-1) som finnes på endosteale osteoblaster. Interaksjonen Tie2 og Ang-1 gjør at hvilende stamceller er adherente til benvevet i benmargen (Arai et al., 2004).

Cadheriner

HSC adhererer også til osteoblaster via N-cadherin-mediated adherens junctions (Zhang et al., 2003). Cadheriner gir celle-celle-adhesjoner.

Integriner

Integriner medierer adhesjon til den basale lamina komponert av ekstracellulær matrix. HSC uttrykker to integriner som binder fibronectin på stromale celler i benmargen. Viktigheten av

dette er vist ved at hematopoiesen blokkeres ved å tilføre antibodies mot disse integrinene (Whetton og Graham, 1999).

Notch

HSC uttrykker transmembranreseptoren Notch. Aktivering av Notch-signaliseringsveien omdanner en transkripsjonsrepressor til en -aktivator. Utviklingsmessig kan én nabo undertrykke Notch-signalering mens den andre kan aktivere den. På denne måten oppstår det en mulighet til å påvirke en celledes skjebne. Denne signaliseringsveien anses som svært viktig for plastisitet og for valg av cellelinje. Osteoblaster uttrykker ligand til denne reseptoren og kan på denne måten være med på å undertrykke differensiering av HSC samtidig som disses evne til selvfornyning opprettholdes (Calvi et al., 2001).

BMP / TGF β

Osteoblaster i benmargen reagerer negativt på Dpp, et signal tilhørende bone morphogenetic protein (BMP) / transforming growth factor β (TGF β) systemet. Antallet osteoblaster øker ved genetisk mutering av BMP og dette virker dermed indirekte på det hematopoietiske system ved at flere HSC kan adherere og dermed bevare sitt selvfornyingspotensial (Zhang et al., 2003).

JAK-STAT

En annen signaliseringsvei er Janus kinase signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT). Denne er vist å opprettholde kultiverte embryonale stamceller på et udifferensiert utviklingstrinn i mus (Matsuda et al., 1999). Hos menneske tyder det på at JAK2 sammen med Flt-3-tyrosin kinase reseptor eller c-Kit er viktig for selvfornyning av HSC (Zhao et al., 2002). Stromainduert matrix i benmarg kan enzymatisk frigi Kit-ligand og dermed stimulere proliferasjon av normalt hvilende HSC (Heissig et al., 2002).

Wnts

Wnts er en familie sekresjonsligander som er svært viktig for celledifferensiering under embryogenesen samt for celleproliferasjon og valg av cellelinje hos voksne individer. Renset Wnts stimulerer isolerte HSC til å proliferere i kultur (Willert et al., 2003). MSC uttrykker flere Wnts, deres reseptorer og ko-reseptorer og også ulike Wnt inhibitorer. For MSC er Wnts viktig for å opprettholde en udifferensiert, prolifererende stamcellepopulasjon, samt for å regulere differensiering i osteogen, adipogen, chondrogen og myogen retning (Boland GM et al., 2004; Ridgeway AG et al., 2000; Bergwitz C et al., 2001; Rudnicki JA et al., 1997; Bennett CN et al., 2002; Ross SE et al., 2000).

6. Plastisitet

6.1.1 Embryologiske kimlag

Det tradisjonelle synet på cellers utviklingspotensial har vært at stamceller tilhørende et vev utgått fra et av de tre embryologiske kimlagene, for all fremtid vil ha regenerative egenskaper begrenset til de cellelinjene som dannes fra dette laget. Dvs. ektodermalt deriverte cellene danner hud og nerver, mesodermale celler gir blod, ben, brusk, fett og muskler, og endodermen gir celler i respirasjons- samt gastrointestinaltractus.

Mange forsøk, in vivo, og ikke minst in vitro, har utfordret dette synet. Det er framlagt hypoteser om at en stamcelles linjetilhørighet ikke er så streng som tidligere antatt. Det er mulig at enkelte stamceller innehar en evne til å ta opp egenskaper til celler tilhørende en annen cellelinje utgående fra et annet kimlag, samtidig som de opprinnelige, forventede egenskapene forsvinner (Wagers A og Weissman, 2004). Det er dette som ligger bak teorien om plastisitet av stamceller.

6.1.2 Hva menes med plastisitet?

Det foreligger flere definisjoner på plastisitet. En av dem er som følger:

Med plastisitet menes at en enkelt celle kan 1) differensiere i multiple cellelinjer. Cellene skal være 2) funksjonelle in vitro som in vivo og 3) grafting skal være robust og varig (Lakshmiathy U og Verfaillie CM 2005).

Det har vært stor forskningsaktivitet på området, men endelige konklusjoner foreligger foreløpig ikke. Oppnådde resultater er tildels ikke reproducerbare og lite samkjøring av protokoller gjør at mye av forskningen ikke kan sammenlignes. Det er også lite forskning som bestreber å belyse alle de tre punktene som kreves for at det skal være snakk om ekte plastisitet.

Slett ikke alle forskere er enige i at bruk av en slik streng definisjon vedrørende stamceller og deres evt. plastisitet gagnar faget. Det har kommet innspill om at stamcellene må ses på som en heterogen cellegruppe in vivo og at de derfor må anses som en populasjon, snarere enn enkeltceller, med plastiske egenskaper. Undersøking og differensiering av klonede celler

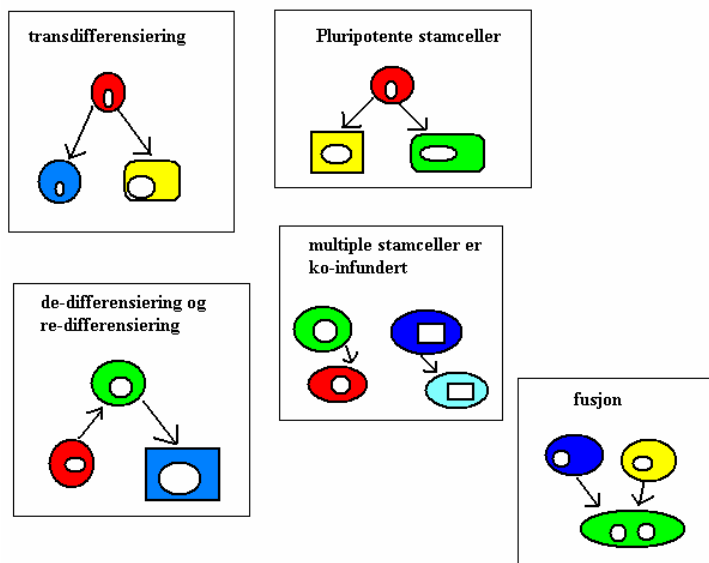
blir dermed et forenklet ideal uten grobunn i virkeligheten, og at hvis kloning skal nyttes som metode, må 1000 ulike kloner gjøres bare i benmargen (Quesenberry et al., 2004).

PJ Quesenberry et. al har framlagt en hypotese om at stamceller på encellenivå og som gruppe, av natur er heterogene celler som først viser sitt potensial når de blir plassert i en bestemt miljømessig setting, en nisje. Denne hypotesen er først framsatt av Blau et al. i 2001. Quesenberry hevder i samme artikkel at kravene om robusthet og funksjonalitet foreløpig er premature, og derfor irrelevante. Påvist konvertering av svært få celler bør være nok ved initiering av forsøk på stamcelleplastisitet. På samme måte argumenterer de med at påvisning av bestemte overflatemarkører på dette stadiet av forskningen må anses å være tilstrekkelig bevis på funksjonalitet (Quesenberry et al., 2004).

6.1.3 Forklaringsmodeller for bytte av cellelinjer

Det er fremlagt fem teorier som kan forklare hvorfor man finner at enkelte celler kan differensiere i andre cellelinjer in vivo og in vitro enn i utgangspunktet forventet.

1. Infusjonene har ikke vært rene. Dvs. at multiple stamceller er ko-infundert og at man derfor har fått grafting i multiple vev.
2. Hvis det finnes sanne pluripotente celler postnatalt, dvs. mulige «overlevninger» fra fosterstadiet, kan dette forklare evne til differensiering langs multiple cellelinjer.
3. Sann plastisitet. Dvs. man har stamceller som har evne til å de-differensieres og senere re-differensieres i en annen cellelinje.
4. Genuin transdifferensiering med reprogrammering av cellekjernen.
5. De transplanterte cellene gjennomgår fusjon med stedegne celler.



Tradisjonelt har transdifferensiering av cellene, og tildels egenskapene til pluripotente stamceller, blitt ansett som årsak til egentlig plastisitet. Fusjon blir ofte brukt som argument mot teorien om plastisitet, på tross av at den innledende forskning på dette fenomenet ble gjort nettopp for å belyse akkurat plastisitet. Her bør det bemerkes at fusjon av celler er en naturlig forekommende prosess i bl.a. lever og muskler, og at stamcellers evt. evne til å fusjonere med hepatocytter og myocytter like gjerne kan være et tegn på multilinjeegenskaper hos disse cellene som det kan være et argument mot plastisitet (Quesenberry et al., 2004).

6.1.4 Transdifferensiering

Kriterier for ekte transdifferensiering ble postulert av Wagers og Weissmann og framlagt i tidsskriftet Cell i 2004. Her er det satt opp fem punkter som alle må være oppfylt for at transdifferensiering sikkert skal ha funnet sted:

- 1. Sikker overgang fra en cellelinje til en annen. Dette krever donormarkører, vevsspesifikke markører for den nye cellelinjen, og integrering og funksjonalitet i målvevet.*
- 2. Linjetransisjonen skal etterfølges av re-programmering av den transdifferensierte nukleus.*
- 3. Cellene skal være minimalt manipulerte.*
- 4. Utelukkelse av mulig fusjon som årsak til nye markører.*
- 5. Resultatene må være reproduserbare av andre laboratorier, med andre metoder.*

Skal man etterfølge disse kravene til det fulle, finnes det per i dag ikke publisert forskning som beviser at transdifferensiering, og dermed «ekte plastisitet» finner sted (Wagers AJ og Weissmann, 2004). Likevel, og uten bruk av en så streng definisjon, vil det følgende avsnitt søke å belyse differensiering, og mulig plastisitet av mesenchymale stamceller.

6.2 Plastisitet av mesenchymale stamceller

6.2.1 Forventet differensiering

Mesenchymale stamceller finnes hos mennesket i benmargen, i føtale lunger (Anker PS et al., 2003) samt i adipøst vev (Zuk PA et al., 2002). Disse kan som forventet differensieres in

vivo og in vitro til de mesodermale cellelinjene osteogen, chondrogen og adipogen uten at dette kan beskrives som plastisitet. MAPC og mesangioblaster kan også differensiere i disse cellelinjene.

6.2.2 Til andre mesodermale cellelinjer

Til skjelettmuskulatur

Ikke fullt så innlysende er det kanskje at benmargsderiverte celler også kan differensieres til skjelettmuskulatur. Både MSC, MAPC, mesangioblaster og hematopoietiske celler er funnet å kunne danne celler som uttrykker myogene markører. For MSC og MAPS gjelder dette foreløpig kun in vitro (Wakitani S et al., 1995). Mesangioblaster er injisert arterielt i mus og har in vivo graftet i sykt muskelvev (Sampaolesi M et al., 2003). Etter transplantasjon av ikke-rensede mononukleære benmargsceller (Ferrari G et al., 1998) og berikede HSC (Gussoni E et al., 1999) i mus har man observert grafting og bedret funksjon i dystrofisk muskelvev. Det er ikke foreløpig avklart om dette skjer via direkte fusjon med muskelfibrene eller ved differensiering først til satelittceller som så gir opphav til myocytter som i sin tur på normalt vis fusjoneres med muskelfiberen.

Til cardiomyocytter

En studie har vist differensiering av MSC til rytmisk kontraherende celler med positive hjertemarkører (Makino S et al., 1999). Om alle MSC kan differensiere på denne måten til å bli mulig funksjonelle cardiomyocytter eller om denne protokollen kun gjelder for denne spesielle cellelinjen er ikke avklart. Flere transplantasjonsforsøk har vist donormarkører i hjertemuskulatur. Om dette kommer som følge av fusjon eller sann differensiering til cardiomyocytter vites ikke. De anvendte protokollene har definert cardiomyocytene etter morfologi og ved et fåtall overflatemarkører. Kvantitativt er observert grafting svært sjelden og det er ikke vist at disse cellene har noen form for funksjonalitet (Verfaillie C, 2004).

6.2.3 Til endotel

MAPC uttrykker vaskulo-endotelial vekstfaktor (VEGF) reseptoren Flk 1 og ved tilsetning av VEGF uttrykker cellene VE-cadherin, CD34 og senere von Willebrand faktor (vWF) og plate-endotel celleadhesjonsmolekyl (PECAM). Etter 14-21 dager har 80 % av cellene endotelial morfologi og fenotype og viser funksjonell karakteristik ved at de frigir vWF ved stimulering med histamin, de danner tuber og deltar i neovaskularisering in vivo (Verfaillie et al., 2003).

Adhererende fibroblastlike celler dyrket fram fra humant blod, har vist å differensiere til endoteliale celler etter å ha blitt dyrket på fibronectin eller gelatin i nærvær av endoteliale vekstfaktorer. Disse cellene kan ta opp acetyleret LDL og utviser endoteliale markører som ULEX og von Willebrand faktor (Asahara T et al., 1997)

6.2.4 Til nevroektodermale celler

MSC fra benmarg er in vitro blitt differensiert til antatte nevroektodermale celler, nærmere bestemt neuroner. I dette forsøket ble stromale celler ekspandert i kultur som udifferensierte celler gjennom 20 celledelinger før en enkel protokoll for nevronal differensiering ble indusert. Cellene ble karakterisert vha morfologi og fenotype. Funksjon ble ikke vektlagt her. Rett etter indusering viste cellene markører for nevronale progenitorceller, men disse forsvant raskt. Dette kan implisere en normal nevronutvikling av disse cellene (Woodbury D et al., 2000). Dyreforsøk har vist en mulig in vivo nevronal differensiering av MSC til astrocytter etter injeksjon i neonatale musehjernner (Kopen GC et al., 1999). MAPC er in vitro differensiert til celler som viser nevronale markører (Jiang Y et al., 2002).

6.2.5 Til endoderm

Til hepatocytter

MAPC dyrket med hepatogene vekstfaktorer viser etter 14-21 dager funksjonelle karakteristikker av hepatocytter. Disse cellene utskiller albumin og urea, har et lager av glycogen, tar opp LDL og induserer cyt p450 ved tilsetning av phenobarbital (Schwartz RE et al., 2002).

Til pancreatiske betaceller

To individuelle studier viser grafting av transplantert benmarg i pancreas og differensiering av disse cellene til insulinsekreterende endocrine celler. Studiene belyser ikke om donorcellene er hematopoietiske- eller mesenchymale progenitorceller, eller om de kommer fra endoteliale precursorer (Janus A et al., 2003; Hess D et al., 2003).

7. Klinisk terapeutisk bruk av mesenchymale stamceller

7.1 En liten innledning til temaet

Stamceller benyttet til terapeutisk bruk kan enten være høstet fra pasienten selv, *autologe stamceller*, eller være fra et annet typelikt individ, *allogene stamceller*. Stamceller fra en annen art kan høstes og brukes ved xenotransplantasjoner.

Høsting av stamceller fra et menneske kan skje vha mobilisering av benmargceller ut i blodbanen eller ved direkte høsting fra stedegent vev, som benmarg, fettvev osv.

Man kan deponere homogene cellegrupper, framskaffet vha celledatering ex vivo eller ved cellekloning, eller man kan velge å transplantere en heterogen cellegruppe som for eksempel usortert benmarg.

Som følge av kartleggingen av de multipotensielle egenskapene til mesenchymale stamceller er det knyttet stor interesse og optimisme rundt bruk av disse stamcellene i klinikken.

Man kan bruke stamcellene som rene støtteceller, som ved intensiv cellegiftsbehandling, eller de kan brukes i regenerativ medisin etter skader påført det opprinnelige vevet, eller ved medfødte funksjonsfeil. Genterapi er en tredje mulighet.

Stamcellene kan deponeres lokalt og direkte inn i det skadede vevet, eller settes til sirkulasjonen ved systemisk infusjon og fra der forvente homing til det skadede vevet.

Ved genterapi kan man se for seg at stamceller høstes fra verten, genmodifiseres og settes tilbake, men nå med alle funksjoner intakt.

Områder der det foregår forskning på bruk av mesenchymale stamceller i klinikken er blant annet kardiovaskulær reparasjon, lungefibrose, ryggmargsskade, gjenoppbygging av ben, brusk, sener, menisk, cerebrale insult, traumer mot hjernen, idiopatisk aplastisk anemi, medfødt metabolske sykdommer som Hurlers syndrom (metachromatisk leukodystrofi), muskeldystrofier, osteogenesis imperfecta, og ved høydose kjemoterapi.

7.2 Et utvalg forskningsområder

7.2.1 Lungefibrose

Ortiz et al. publiserte i 2003 en artikkel der murine mesenchymale celler ble systemisk infusert i mus både før og etter administrasjon av bleomycin, et stoff som gir inflammasjon i lungevevet. MSC viste stor grad av homing til det skadede lungevevet hvor de gjennomgikk en differensiering til en epitel-lik fenotype. De forsøksdyrene som ble infusert med MSC viste klart mindre grad av inflammasjon og deponering av collagen i lungevevet enn kontroll dyr som bare ble utsatt for bleomycin (Ortiz et al., 2003). Dette viser at MSC har potensiale i seg til å kunne brukes klinisk ved miljøpåførte skader på lungene.

7.2.2 Nevrologiske sykdommer og skader

Slag

To studier har vist signifikant funksjonell forbedring etter cerebralt insult påført rotter. I det ene forsøket ble ikke-hematopoietiske stamceller fra benmargen merket og transplantert inn i rottens striatum etter en embolisk arteria cerebri media okklusjon. Funksjonen ble vurdert med rotarod test og modifiserte tester på nevrologisk alvorlighetsgrad som inkluderte motorisk- og sensorisk funksjon samt reflekser (Li et al., 2000). På tilsvarende måte viste Chen et al., 2001 samme funksjonelle forbedring etter systemisk infusjon av stamceller fra benmargen etter et arteria cerebri media infarkt. I begge disse studiene ble det fremmet en hypotese om at benmargscellene påvirker tilhelingsprosessen vha humorale faktorer, cytokiner med mer, snarere enn ved egen differensiering til nevroner, gliaceller osv. Dette fordi det kun ble funnet et svært lite antall transplanterte celler som utviste nevrone spesifiske markører.

Ryggmargsskade

Transplantasjon av stromale benmargsceller etter kontusjonsskade av ryggmargen hos rotter viste markert funksjonell forbedring sammenlignet med dyr i kontrollgruppen. Også her var antallet merkede transplanterte celler som viste nevrone spesifiske markører lavt, noe som igjen styrker teorien om at virkningsmekanismen her kan synes å være utskillelse av stoffer som fremmer tilhelingen i det stedegevevet (Chopp M et al., 2000).

Traumatisk hjerneskade

Spesielt den motoriske funksjonen hos rotter påført hjerneskade viste forbedring etter direkte transplantasjon og systemisk infusjon av benmargsceller. Histologiske undersøkelser viste at de transplanterte cellene overlevde, prolifererte og migrerte mot skadestedet i hjernen.

Antallet av disse cellene som viste nevrospesifikke markører var lavt, noe som igjen peket på at disses påvirkning på andre celler er den viktigste virkningsmekanismen (Mahmood et al., 2001 a+b).

Parkinsons sykdom

Transplantasjon av benmargsceller inn i parkinsonistiske rotters striatum er vist å gi bedret funksjonsnivå sammenlignet med kontrollgrupper. Hvorfor dette skjer er ikke avklart, men man antar at benmargscellene enten fremmer frigjøringen av dopamin eller sekreterer nevrotrope faktorer som bedrer funksjonen (Li et al., 2001).

7.2.3 Ortopedi

Fusjonering/ regenerering av benvev

Flere grupper har med suksess brukt porøs keramikk i kombinasjon med mesenchymale stamceller fra benmarg i diverse dyreforsøk med stort hell (Petite et al., 2000; Quarto et al., 2001). Dette kan i dag nærmest regnes som gullstandarden ved benvevs-bygging (bone-engineering).

Her følger to eksempler på forskning gjort på dette feltet:

Osteogene progenitorer er selektert ut fra full benmarg ved hjelp av spesielt porøse matrix. Dette danner et graft rikt på utvalgte celler. En benmargs-klott er deretter lokalt deponert i graftet. Modellen bruker fusjon av ryggvivler som eksempel og forsøket ga signifikant bedret fusjonering sammenlignet med kontrollgruppen (Muschler et al., 2003).

Craniofaciale ossøse defekter på 5 mm hos mus viste full tilheling etter to uker påfølgende transplantasjon av benmarg transportert i gelatinsvamper. Hos dyr som fikk gelatinsvamp alene, eller ingen av delene så man kun noe tilheling perifert i defekten (Krebsbach et al., 1998).

Osteogenesis imperfecta

Denne genetiske sykdommen oppstår etter mutasjon i et av genene som koder for kollagen type 1. Resultatet er lav høyde, frakturer og bendeformiteter. Ved allogen transplantasjon av mesenchymale stamceller inn i benvevet til tre barn med osteogenesis imperfecta fant man at mengden trabekulært benvev økte flere ganger så mye som hos friske barn i samme aldersgruppe. Dette resulterte i færre frakturer og økt vekstrate (Horwitz et al., 1999). Et pikefoster med multiple intrauterine frakturer ble diagnostisert med osteogenesis imperfecta. I gestasjonsuke 32 ble hun transplantert med HLA-mismatched MSC fra et guttefoster. Stamcellene graftet i benvevet og dannet funksjonelt benvev hos den immunkompetente verten. Ved to-års alder hadde jenta hatt to frakturer og hun fulgte sin vekstkurve. Psykomotorisk utvikling var normal (Le Blanc K et al., 2005).

Osteoartritt

Forsøksdyr ble påført unilateral osteoartritt i kneet ved å fjerne fremre korsbånd samt mediale menisk. Etter seks uker ble det lokalt transplantert autologe mesenchymale stamceller fra benmargen. Resultatet var svært oppløftende med regenerering av mediale menisk, mindre degenerering av brusk, mindre osteofyttisk remodellering og mindre subchondral sklerose. Stamcellene ble funnet å grafte i menisken, fettputen og synssovialhinnen, men ikke i leddbånd (Murphy et al., 2003).

7.2.4 Kardiovaskulære sykdommer

Et stort antall studier er etter hvert gjort på bruk av stamceller fra benmargen i forbindelse med hjerteinfarkt. I flere studier er det vist forbedret funksjon av myocardiet etter transplantasjon og mobilisering av stamceller fra benmargceller. Så langt synes det som at det er de hematopoietiske cellene og/eller hemangioblastene som gir forbedring av funksjon og ikke de mesenchymale (Orlic D et al., 2003).

Arteria coronaria sinistra hos mus er blitt okkludert for å skape hjerteinfarkt. Stamceller fra benmargen ble injisert i det friske omkringliggende vevet. Nye blodkar og myocytter ble dannet og den hemodynamiske funksjonen i hjertene forbedret seg betraktelig sammenlignet med dyr i kontrollgruppen (venstre ventrikkels ende-diastolisk trykk økte 35 til 40 % sammenlignet med kontrollen.). Forsøket ble også utført etter at HSC var ekskludert fra transplantatet. Ingen nye myocytter ble da observert i det iskemiske myocardiumet (Orlic et al., 2003).

En annen protokoll innebar infusjon av mobiliserende cytokiner dagen før og etter et påført infarkt. Mengden stamceller i blodet økte 250 ganger og disse viste evne til homing til det skadede myocardiumet. Nye blodkar og myocytter ble funnet i det iskemiske vevet. Ejeksjonsfraksjonen økte 114 ganger mer for mus behandlet med cytokiner enn mus i kontrollgruppen. Resultatene har ikke latt seg reprodusere på mennesker (studien er ikke avsluttet) eller bavianer (Orlic et al., 2003).

En gruppe søkte å undersøke sikkerheten i å transplantere MSC inn a arteria coronaria hos friske hunder. Under administrasjonen viste EKG infarktforandringer og undersøkelser sju dager postoperativt viste mikroskopiske og makroskopiske tegn på gjennomgatte mikroinfarkter i hjertene (Vulliet et al., 2004). Den første randomiserte studien på bruk av stamceller hos mennesker etter hjerteinfarkt ble publisert i Lancet i 2004. Her ble hematopoietiske CD34+ celler brukt, og denne undersøkelsen viste ikke samme tendens til mikroinfarkter. Forfatterne av artikkelen mener dette har sammenheng med den betydelig mindre størrelsen på disse cellene sammenlignet med mesenchymale stamceller (Wollert et al., 2004).

7.2.5 Muskelsykdommer

Muskeldystrofier

Ideen bak stamcelleterapi for muskeldystrofier er å få friske stamceller til å inkorporeres og proliferere i muskler med defekt dystrofinfunksjon, for på den måten å få musklene til å starte produksjon av dystrofin. Myoblaster er forsøkt levert direkte i musklene (Partridge et al., 1989), mens satelittceller høstet fra muskler eller Side Population (SP) celler fra benmarg (celler med hematopoietisk- og muskelplastisitet) er systemisk transplantert ved intravenøs tilgang. Forsøkene har vist grafting av donorceller i vev og cellene har produsert dystrofin, men i en så liten skala at det ikke har hatt betydning for det kliniske funksjonsnivået (Gussoni et al., 1999).

7.2.6 Utslettet benmargsfunksjon etter høydose kjemoterapi

MSC danner benmargstroma og har derfor en viktig funksjon som støtteceller for at normal hematopoiese skal kunne finne sted. Fram til i dag har HSC blitt transplantert alene eller med MSC som tilfeldige medpassasjerer i lite antall. Studier viser nå at transplantasjon av MSC i tillegg til HSC bedrer grafting og fremskynder gjenoppbygging og funksjonalitet av benmargen ved både autonome og allogene transplantasjoner. MSC synes å gi denne virkningen uten selv å grafte i benmargen (Cilloni et al., 2002). En studie på 28

brystkreftpasienter som skulle gjennomgå HSC-transplantasjon etter høydose kjemoterapi ble utført i 2000. Pasientene fikk infundert MSC sammen med HSC intravenøst og viste hurtig tilbakekomst av normal benmargsfunksjon (Koç ON et al., 2000).

7.2.7 Aplastisk anemi

Det er gjort forsøk på å transplantere allogene MSC intravenøst til en pasient med alvorlig end-stage aplastisk anemi. Tanken var å styrke hematopoiesen i pasientens benmarg ved å gjenoppbygge mikromiljøet. Selv om pasienten døde, ble det post mortem funnet tilheling av stroma i pasientens benmarg – bortfall av interstitiell blødning, ødem og adipocyttnekrose. Donorceller hadde graftet i benmargen. Ingen reparasjon av hematopoietisk vev ble observert. Forfatteren peker på det sannsynlige behovet for å kombinere transplantasjon av hematopoietiske og mesenchymale stamceller ved tilsynelatende utslettet hematopoietisk funksjon (Fouillard et al., 2003).

7.2.8 Ved behov for immunsuppresjon

Mesenchymale stamceller stimulerer verken allogene mononukleære celler eller T-celleproliferasjon in vitro. I stedet synes det som MSC aktivt inhiberer T-celleproliferasjon. Det er etter sigende humorale faktorer produsert av MSC som gir den immunmodulerende effekten (Tse WT et al., 2003). Dette gjør MSC interessante i forbindelse med graft-versus-host (GVH) reaksjoner, autoimmune sykdommer og ved organtransplantasjoner for å forhindre forkastelse.

En ni år gammel gutt med akutt behandlingsresistent GVH i tarm og lever ble behandlet med MSC intravenøst fra sin HLA-haploidentiske mor. GVH gikk i remisjon, men gjenoppsto ved seponering av immunsuppressiva (Le Blanc et al., 2004).

8. Avsluttende kommentarer

Ingen bestrider at mye gjenstår før full forståelse av mesenchymale stamceller er nådd. Man har til en viss grad kartlagt cellenes potensielle differensieringsretninger, men ingen har klart å vise om, og eventuelt i hvilken utstrekning slik differensiering skjer som en del av kroppens normale vedlikehold. Og hvordan skjer differensieringen? Foreslåtte, dog ikke beviste, forklaringsmodeller som er diskutert er transdifferensiering, fusjon, og sann plastisitet. De oppståtte cellelinjene kan og være resultater av urene cellepopulasjoner. Kanskje er cellenes uventede differensieringsretninger kun et fenomen skapt på grunn av behandlingen de får ved de respektive laboratoriene? Enkelte har hevdet det. Er cellene ødelagte sett fra kroppens perspektiv, og vil det da være slik at potensialet man i dag ser for bruk i klinikken må revurderes? Og i tilfellet hvorfor? Mange spørsmål mangler endelig svar.

Dagens publiseringer baserer seg langt på vei på dyremodeller og resultatene har vist til dels stor variasjon mellom artene. Noe forskning har også vist seg vanskelig å reprodusere. Dette setter fingeren på hvor problematisk det er så lenge ingen felles konsensus er fattet vedrørende hvilke celler man faktisk snakker om, hvilke medier og teknikker som blir brukt og så videre. Det foreligger i dag flere forslag til hvilke markører som bør brukes for å oppnå en slik samordnet forskning. Men før en slik enighet er oppnådd, vil adherering til forskjellige plastikkunderlag og kultivering i en lang rekke ulike dyrkningsmedier fortsatt være mest utbrett som metode for å separere ut mesenchymale stamceller. Dette utgjør en stor kilde for usikkerhet og mulige feiltolkninger.

Mesenchymale stamcellers virkning på skadet eller ødelagt vev synes å være forskjellig fra vevstype til vevstype. I nevrologisk vev synes det som om effekten MSC utøver ved tilheling ikke innebærer en differensiering i nevrogen retning, men snarere utskillelse av cytokiner og andre humorale faktorer. Ved benregenerering derimot, ser man funksjonell grafting av stamcellens datterceller i selve vevet.

Så til spørsmålet om bruk av mesenchymale stamceller utgjør en potensiell helserisiko for pasienten. Ingen forskere har, etter hva jeg har lest, rapportert om teratomdannelse eller annen kreftrisiko ved transplantasjon av MSC. Tromber er, som nevnt, rapportert ved MSC-infusjon i hjerter og viser at man må utvise særs forsiktighet under klinisk utprøving. Bruk av MSC er per i dag ikke en del av konvensjonelle behandlingsprotokoller. Flere studier er påkrevd innen alle kliniske felt før disse stamcellene kan nyttes i pasientbehandling.

9. Referanser

- Amit M et al., (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol.* 2000 Nov 15;227(2):271-8.
- Amit M et al., (2003). Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 2003 Jun;68(6):2150-6. Epub 2003 Jan 22.
- Arai F et al., (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 2004 Jul 23;118(2):149-61.
- Arai F et al., (2002). Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med.*
- Ashton BA et al., (1980). Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res.* 1980 Sep;(151):294-307.
- Asahara T et al., (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
- Bailey AS et al., (2004). Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood.* 2004 Jan 1;103(1):13-9. Epub 2003 Sep 4.
- Bennett CN et al., (2002). Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem.* Aug 23;277(34):30998-1004. Epub 2002 Jun 7.
- Bergwitz C et al., (2001). Wnts differentially regulate colony growth and differentiation of chondrogenic rat calvaria cells. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Apr 23;1538(2-3):129-40.
- Berry L et al., (1992). Bone-marrow-derived chondrogenesis in vitro. *J Cell Sci.* 1992 Feb;101 (Pt 2):333-42.
- Beyth et al., (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005 Mar 1;105(5):2214-9. Epub 2004 Oct 28.
- Le Blanc K et al., (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004 May 1;363(9419):1439-41.
- Le Blanc K et al., (2005). Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005 May;11(5):321-34. Review.
- Blau HM et al., (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell.* 2001 Jun 29;105(7):829-41. Review.
- Boland GM et al., (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2004 Dec 15;93(6):1210-30.
- Brown KL, Cruess RL, (1982). Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am.* 1982 Feb;64(2):270-9. Review.
- Calvi LM et al., (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003 Oct 23;425(6960):841-6.
- Cheng L et al., (2003). Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells.* 2003;21(2):131-42.
- Chopp M et al., (2000). Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000 Sep 11;11(13):3001-5.
- Cilloni D et al., (2000). Limited engraftment capacity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells following T-cell depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2000 Nov 15;96(10):3637-43.
- Koç ON et al., (2000). Rapid hematopoietic recovery after co-infusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Clin Oncology.* 2000 Jan;18(2):307-16.
- Cossu G, Bianco P, (2003). Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Oct;13(5):537-42. Review.
- Fernandez M et al., (1997). Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant.* 1997 Aug;20(4):265-71.
- Ferrari G et al., (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998 Mar 6;279(5356):1528-30. Erratum in: *Science* 1998 Aug 14;281(5379):923.
- Fouillard et al., (2003). Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia.* 2003 Feb;17(2):474-6.
- Friedenstein AJ et al., (1982). Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol.* 1982 Feb;10(2):217-27. [Links](#)
- Fuchs E et al., (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004 Mar 19;116(6):769-78. Review.
- Gimble J, Guilak F, (2003). Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr Top Dev Biol.* 2003;58:137-60. Review.
- Gussoni E et al., (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* 1999 Sep 23;401(6751):390-4.

- Hassan HT, El-Sheemy M, (2004). Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. *J R Soc Med.* 2004 Oct;97(10):465-71. Review.
- Heissig B et al., (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 2002 May 31;109(5):625-37.
- Hennessy B et al., (2004). Circulating stem cells and tissue repair. *Panminerva Med.* 2004 Mar;46(1):1-11. Review.
- Herbertson A et al., (1997). Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell cultures. *Bone.* 1997 Dec;21(6):491-500.
- Hess D et al., (2003). Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol.* 2003 Jul;21(7):763-70. Epub 2003 Jun 22.
- Horwitz EM, (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine.* . 1999 Mar;5(3):309-13.
- Huss R et al., (2000). Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells.* 2000;18(4):252-60.
- Ianus A et al., (2003). In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(6):843-50
- in't Anker PS et al., (2003). Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica.* . 2003 Aug;88(8):845-52.
- Jiang Y et al., (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002 Jul 4;418(6893):41-9. Epub 2002 Jun 20
- Jiang Y et al., (2002). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol.* 2002 Aug;30(8):896-904.
- Kaufman DS et al., (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Sep 11;98(19):10716-21. Epub 2001 Sep 4.
- Kehat I et al., (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 2001 Aug;108(3):407-14.
- Kopen GC et al., (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Sep 14;96(19):10711-6.
- Krebsbach PH et al., (1998). Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation.* 1998 Nov 27;66(10):1272-8.
- Kuznetsov SA et al., (2001). Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001 May 28;153(5):1133-40.
- Lakshminpathy U, Verfaillie CM (2005). Stem cell plasticity. *Blood Rev.* 2005 Jan;19(1):29-38. Review.
- Lazarus HM et al., (1997). Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J Hematother.* 1997 Oct;6(5):447-55.
- Levenberg S et al., (2002). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Apr 2;99(7):4391-6.
- Li Y et al., (2001). Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience lett.* 2001 Dec;316(2):67-70.
- Li Y et al., (2000). Intrastratial transplantation of bone marrow non-hematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Sep;20(9):1311-9
- Mahmood A et al., (2001). Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. *Neurosurgery.* a 2001 Apr;94(4):589-95.
- Mahmood A et al., (2001). treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery.* b 2001 Nov;49(5):1196-203
- Majka SM et al., (2003). Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J Clin Invest.* 2003 Jan;111(1):71-9.
- Makino S et al., (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999 Mar;103(5):697-705.
- Matsuda T et al., (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* 1999 Aug 2;18(15):4261-9.
- Mummery C et al., (2002). Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J Anat.* 2002 Mar;200(Pt 3):233-42.
- Murphy jm et al., (2003). Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheumatism* 2003 Dec;48(12):3464-74.
- Muschler GF et al., (2003). Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthopaedics.* 2003 Feb;(407):102-18
- Nilsson SK et al., (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood.* 2001 Apr 15;97(8):2293-9.
- Ohlstein B, (2004). The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Dec;16(6):693-9. Review.

- Ortiz et al., (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Jul 8;100(14):8407-11.
- Orlic D, (2003). Adult Bone Marrow Stem Cells Regenerate Myocardium in Ischemic Heart Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003 May;996:152-7.
- Orlic D, (2003). Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant*. 2003;7 Suppl 3:86-8. Review
- Owen M, Friedenstein AJ (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60. Review.
- Partridge, TA et al., (1989). Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*. 1989 Jan 12;337(6203):176-9.
- Pereira RF et al., (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 May 23;92(11):4857-61.
- Petite H et al., (2000). Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotech*. 2000 Sep;18(9):959-63
- Prockop DJ, (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4. Review.
- Quarto R et al., (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *New England Journal of Medicine*. 2001 Feb 1;344(5):385-6.
- Quesenberry PJ et al., (2004). Stem cell plasticity: an overview. *Blood Cells Mol Dis*. 2004 Jan-Feb;32(1):1-4. Review
- Reubinoff BE et al., (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001 Dec;19(12):1134-40.
- Richards M et al., (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2002 Sep;20(9):933-6.
- Ridgeway AG et al., (2000). Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin. *J Biol Chem*. 2000 Oct 20;275(42):32398-405.
- Ross SE et al., (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. 2000 Aug 11;289(5481):950-3.
- Roufosse CA et al., (2004). Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):585-97
- Rudnicki JA et al., (1997). Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro. *Dev Biol*. 1997 May 1;185(1):104-18
- Sampaolesi M et al., (2003). Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 2003 Jul 25;301(5632):487-92.
- Schwartz RE et al., (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002 May;109(10):1291-302.
- Shi S, Gronthos S (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003 Apr;18(4):696-704.
- Teng YD et al., (2002). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Mar 5;99(5):3024-9.
- Thomson JA et al., (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7
- Toma JG et al., (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001 Sep;3(9):778-84.
- Tse WT et al., (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 Feb 15;75(3):389-97
- Verfaillie CM. (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology* 2002 Nov;12(11):502-8. Review
- Verfaillie C et al., (2003). Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;996:231-4. Review
- Vodyanik MA et al., (2005). Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):617-26
- Vulliet, P Richard et al., (2004). Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*. 2004 Mar 6;363(9411):783-4.
- Wagers AJ, Weissman IL, (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004 Mar 5;116(5):639-48. Review.
- Wakitani S et al., (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995 Dec;18(12):1417-26.
- Wexler SA et al., (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*. 2003 Apr;121(2):368-74.
- Whetton AD, Graham GJ (1999). Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol*. 1999 Jun;9(6):233-8. Review.

- Willert K et al., (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 2003 May 22;423(6938):448-52.
- Wilton et al., (2000). Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin. *J Biol Chem* 2000 Oct 20;275(42):32398-405.
- Willert K et al., (2004). Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):141-8.
- Woodbury D et al., (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000 Aug 15;61(4):364-70.
- Wu GD et al., (2003). Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation*. 2003 Mar 15;75(5):679-85.
- Young HE, Black AC jr. (2004). Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004 Jan;276(1):75-102. Review.
- Zhang J et al., (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):836-41.
- Zhang SC et al., (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001 Dec;19(12):1129-33.
- Zhao S et al., (2002). JAK2, complemented by a second signal from c-kit or flt-3, triggers extensive self-renewal of primary multipotential hemopoietic cells. *EMBO J*. 2002 May 1;21(9):2159-67
- Zuk PA et al., (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.
- Zvairfler NJ et al., (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000;2(6):477-88.