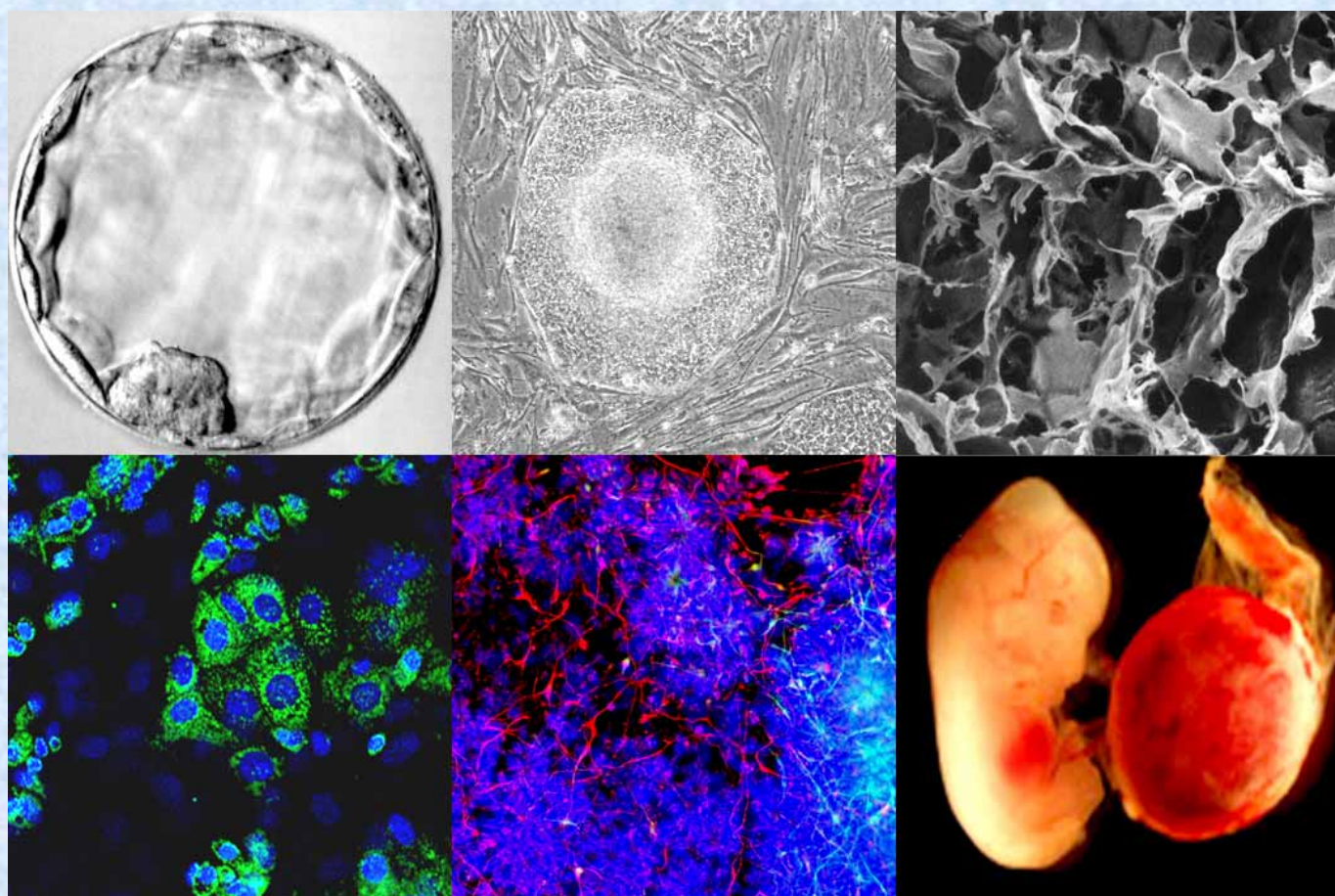


教育部「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」

# 幹細胞學



幹細胞與組織工程 教學資源中心 主編

教育部顧問室 補助

中華民國九十七年二月出版

## 序

在人類基因體計畫完成後，生物技術科技邁入了一個新的紀元，成為二十一世紀最具發展潛力的科技，各科技大國莫不投入大量人力及經費從事教育、研究及產業開發。為因應生物科技突破發展與應用，行政院推動「挑戰 2008—國家重點發展計畫」，由經濟部擬定「兩兆雙星產業發展計畫」，明確勾勒出我國核心與新興產業政策方向。其中生物科技產業就是雙星產業之一，是政府規劃的未來明星產業。為配合政府推動「加強生物技術產業推動方案」，培育生物科技產業人才，教育部顧問室於八十七年七月提出「生物技術科技教育改進計畫」，輔導補助各大學院校提升生物技術教育之內容與層次，全力培育生物科技人才。在第一階段「生物技術科技教育改進計畫」執行四年的成果之基礎上，教育部顧問室從九十年度起推動第二階段的教育改進計畫，期望能引進後基因時代之基因體與蛋白質體，將我國生物技術科技教育與國際接軌。根據生技中心資料，2005 年我國生技人才畢業生高達 6,876 人，其中包括碩士 2,382 人及博士 237 人，但產業需求的是要跨領域、具高度創造力及產業實務經驗的研發人才仍需強化培育。因為生物技術係利用分子生物學及細胞生物學方法，經由生物體或生物程序生產製造可應用的產品，包括一系列關鍵技術如基因工程技術、細胞工程技術、酵素及蛋白質工程技術及生化工程技術的整合。隨著基因體學及蛋白質體學研究的進展，生醫工程、生物光電與奈米科技的興起，以及利用幹細胞改善人類疾病治療，跨領域以及尖端的生物科技人才培育已被認為是二十一世紀生物科技產業創新最重要之關鍵。為確保我國在二十一世紀生物科技競賽的人才優勢，從民國九十三年度起教育部擬在現有的成果上推動第三階段「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」。為加強第三階段計畫的推展，故整合第二階段「生物技術科技教育改進計畫」之六大資源中心，並加入新興領域，如生醫奈米及幹細胞與組織工程，成立七大領域之教學資源中心，此七大領域分別為基因體與蛋白質體醫學、農業與海洋生物技術、生醫奈米科技、幹細胞與組織工程、生技中草製藥、生物資訊與系統生物學及醫衛分子檢驗等，總目標為培育具有前瞻性、跨領域、加強產業經驗及國際觀之尖端生技人才，並特別針對新興領域生醫奈米科技及幹細胞與組織工程兩項主題，邀請學界及產業界之專家學者規劃課程並編撰教材。在計畫辦公室及各資源中心主持人努力下完成具特色之

教材，這些教材內容涵蓋各項新的技術原理、操作實驗及應用，將提供全國大學院校及國、高中學校作為教學之重要參考。在這關係我國生物技術科技教育發展之教材付梓之時，本人在此感謝各位撰稿的先進賢達辛苦的付出與努力，同時也感謝諸位諮議委員與顧問們的熱心指導以及教育部顧問室同仁的鼎力協助，使得這些專書能順利出版，特以為序。

「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」總計畫主持人

中央研究院細胞與個體生物學研究所 特聘研究員 吳金洌

吳金洌

中華民國九十六年八月三日

## 編者序

本教材承蒙教育部顧問室陳主任之重視與鼓勵與「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」吳總主持人之規劃與指導，配合國內幹細胞學界之專家努力，得以編輯成冊，特此致上最高感謝之意。

本書第一章由臺大醫院何弘能副院長與陳信孚醫師負責撰寫，介紹建立人類胚胎幹細胞之技術，為臺灣本土人類胚胎幹細胞研究奠立之重要里程碑。第二章 胚胎幹細胞的鑑定，則是由中研院細胞暨個體生物研究所郭紘志博士以其豐富的教學及研究經驗負責撰寫。第三章 胚幹細胞體外培養與定向誘導分化，則是由中研院基因體研究中心沈家寧博士深入淺出地介紹，並引用了最新日本京都大學山中教授之研究，讓本書能夠提供幹細胞研究最新進展。第四章 成體幹細胞分離培養擴增及體外分化，則由在成體幹細胞領域研究成果豐碩之陽明大學李光申教授領導的團隊來撰寫精闢之內容。第五章 奈米科技暨幹細胞生物學之運用，則由成功大學謝清河教授介紹具有前瞻性的生醫奈米科技及關於幹細胞研究之可能運用。第六章 複製動物技術在幹細胞相關研究之運用，則邀請到臺灣“複製動物之父”鄭登貴教授及其得意門生吳信志博士共同撰寫，介紹幹細胞研究與複製動物之淵源。第七章 組織工程在幹細胞研究之運用，則由中興大學特聘教授徐善慧負責撰寫，介紹由跨領域之化工人才專精組織工程如何應用到幹細胞之研究。第八章 幹細胞的保存與復甦，則由食品工業發展研究所黃效民副主任撰寫，提供關於幹細胞保存之關鍵技術。第九章 幹細胞在臨床之應用，則由中山醫學大學李茂盛教授撰寫，李教授為國內不孕症權威，針對幹細胞之臨床運用提供全面性的介紹。第十章 幹細胞治療研究與臨床試驗，則是由台中榮民總醫院陳甫州主任與工研院陳婉昕博士共同撰寫，對於幹細胞潛在之臨床治療及相關法律規範均有詳細介紹。最後第十一章 幹細胞之生技產業運用，則是由工研院陳婉昕博士參考國內外目前的生技產業，為幹細胞研究之市場發展做全面性介紹。

本書之章節安排需再次感謝鄭登貴教授在計畫前期之縝密規劃。而約稿撰寫協調工作則由中研院游正博所長同時身兼臺灣幹細胞學會理事長之大力協助，始得完成。期望本書之出版，不僅可提供計畫內各夥伴學校開課規劃及授課內容之參考教材，更可為臺灣生物醫學研

究提供經過系統整理的幹細胞科技新知。

「幹細胞與組織工程教學資源中心」主持人  
國立臺灣大學醫學院解剖學暨細胞生物學研究所教授

錢宗良

中華民國九十六年十二月三十日

教育部顧問室「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」

## 幹細胞學

作者 王僅文、李茂盛、李光申、吳信志、何弘能、何慧君、  
何嘉倫、沈家寧、林宇星、邱智東、徐善慧、郭紘志、  
許素菁、莊靜玉、張為芳、張曉旻、陳甫州、陳信孚、  
陳志龍、陳淑華、陳婉昕、黃效民、鄭登貴、謝清河、  
簡皎芸

(依姓氏筆劃為序)

總編輯 游正博、錢宗良

助理編輯 陳佩芬、韓善國、吳少文、曾唯嘉、林宗逸、侯珮珊

幹細胞與組織工程教學資源中心主編

教育部顧問室補助出版

中華民國九十七年二月出版



# 目 錄

	頁碼
第一章 人類胚胎幹細胞之建立 陳信孚、何弘能 The Establishment of Human Embryonic Stem Cells.....	1
第二章 胚胎幹細胞的鑑定 郭紘志、陳淑華、張為芳、莊靜玉 Characterization of Embryonic Stem Cells.....	17
第三章 胚幹細胞體外培養與定向誘導分化 沈家寧、林宇星、張曉旻、陳志龍、 簡皎芸 Cultivation and Differentiation of Embryonic Stem Cells.....	27
第四章 成體幹細胞分離培養擴增及體外分化 李光申、許素菁、何慧君 Isolation, Expansion, and Differentiation of Adult Stem Cells.....	47
第五章 奈米科技於幹細胞生物學之應用 何嘉倫、王僅文、邱智東、謝清河 The Application of Nanotechnology on Stem Cell Biology.....	63
第六章 複製動物技術在幹細胞相關研究之應用 吳信志、鄭登貴 Application of Animal Cloning Technologies in Studies Related to Stem Cells.....	75
第七章 組織工程在幹細胞研究之運用 徐善慧 Tissue Engineering Technique in Stem Cell Research.....	85
第八章 幹細胞的保存與復甦 黃效民 Cryopreservation and Re-cultivation of Stem Cells.....	97
第九章 幹細胞在臨床之應用 李茂盛 Clinical Application of Stem Cells.....	103
第十章 幹細胞治療研究與臨床試驗 陳甫州、陳婉昕 Clinical Trials and Advance Research for Stem Cell Therapies.....	117
第十一章 幹細胞之生技產業運用 陳婉昕 Commercialization of stem cell technology.....	129
作者簡歷 .....	143
索引 .....	149





# 第一章

## 人類胚胎幹細胞之建立

### The Establishment of Human Embryonic Stem Cells

陳信孚 何弘能

臺灣大學醫學院附設醫院婦產部

#### 一、前言

胚胎幹細胞 (embryonic stem cells; ESC) 是多能性 (pluripotent) 或全能性 (totipotent) 的細胞，這種細胞具有自我更新與無限擴增數目的特性，而且在適當環境下，他們可以分化成體內所有三個胚層 (embryonic germ layer) 的細胞，以及生殖細胞 (germ cell)。因此這種細胞不論在科學研究上，或未來的毒物學、藥物學、或甚至臨床應用上，都具有實質的潛能。由科學的角度來看，胚胎幹細胞的培養可以讓人類進一步瞭解各種細胞之形成與分化的機轉與控制的因子，因此對人類生物學的知識可以明顯增進。另外，胚胎幹細胞也可以用來測試藥物或毒物對於細胞分化為特定細胞之影響。而最重要的，胚胎幹細胞如果能有效培育為特定細胞，例如心肌細胞、肝臟細胞、胰臟細胞或甚至卵子等等，並用於移植，則胚胎幹細胞在細胞或器官移植以治療人類疾病上，將具有無限的使用潛能。

小鼠的胚胎幹細胞早在 1981 年就被建立，且有許多後續的研究證實其科學上的無窮價值。而人類胚胎幹細胞 (hESC) 則遲至 1998 年由威斯康辛大學 James Thomson 的團隊<sup>1</sup>首度建立。至今全世界已有許多人類胚胎幹細胞株建立成功與完整的定性<sup>1-3</sup>，但是有許多理由使得建立新的細胞株還是很重要，理由如下：[1] 例如要由國外購買細胞株比較昂貴；[2] 而且每一個細胞株之特性皆有部分差異；[3] 此外，尤其是含有特殊疾病基因之細胞株，以及中國人的細胞株，皆對於研究中國人特定的疾病有其一定的價值，因此我們認為建立自己國人的細胞株相當重要；[4] 還有目前全世界現有之細胞株多半是建立於含有動物物質或動物飼料細胞之培養環境，因此在我們自己的實驗室裡把一個獲得胚胎幹細胞的環境建立好，以便將來可以有效建立特殊的細胞株，例如含特定疾病之細胞株或不含外來動物物質 (xeno-free) 之細胞株，就顯的特別重要。這個章節，我們將簡潔的描述如何建立人類胚胎幹細胞株，以便大家可以參考而確實可以應用，這方面可以參考我們最近發表的文獻<sup>2</sup>。

#### 二、實驗方法

胚胎幹細胞的建立需符合主管機關有關胚胎幹細胞研究之倫理綱領，並得到機構之人體試驗委員會同意，然後在不孕症夫婦同意捐贈多餘胚胎且簽署捐贈同意書之後才能進行實

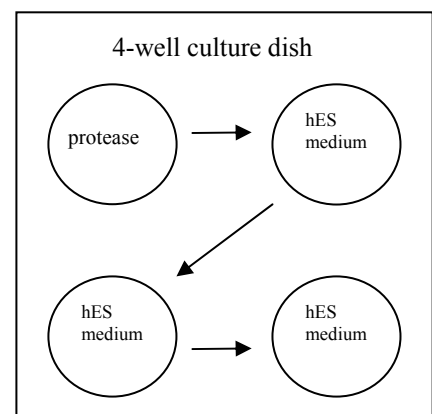
驗。實驗的進行，首先要把冷凍胚胎先解凍，然後在胚胎培養液中培養至第 5 至 6 天，到達囊胚期胚胎 (blastocyst) 的階段 (圖一)。如果捐出的胚胎是新鮮的胚胎，則直接培養至囊胚期來使用。接下去的步驟則進入實質分離人類胚胎幹細胞的階段。人類胚胎幹細胞是由囊胚的內細胞團 (inner cell mass ; ICM) 分離培養而來，因此首先要獲得內細胞團，分離的方法如下：



圖一、囊胚的型態

方法一：只去除透明層 (zona pellucida) 的方法

1. 準備四孔盤一個、蛋白酶 (protease)、胚胎幹細胞培養液 (hES medium)、餵養細胞，與含餵養細胞之培養盤 (organ culture dish ; OCD ; Falcon)，皆應預先準備好放在培養箱中平衡。
2. 將新鮮或解凍後之胚胎培養至囊胚。記錄其型態、胚胎分級 (scoring) (表一)，及發育天數，通常這時候是精卵受精之後 5 到 6 天。
3. 以磷酸緩衝液 (PBS) 配置 0.5% 的蛋白酶，並以 0.22  $\mu\text{m}$  的過濾膜 (filter) 過濾後，取 1 ml 置於四孔培養盤 (4-well culture dish ; NUNC) 的第一孔中，其餘三孔中各加入 0.5 ml hES medium (見附錄三)，置於培養箱中平衡至少 1 小時。
4. 將囊胚置於 37°C、0.5% 的蛋白酶中作用 (四孔培養盤的第一孔)，在顯微鏡下持續觀察，待透明層被酵素部分或完全溶解後 (大約 1 至 6 分鐘左右)，以 hES medium 洗滌三次 (培養盤第二~四孔)，然後立刻將囊胚置於已製備好之含餵養細胞 (MEF) 之培養皿 (OCD) 中培養，使用含生長因子之 hES medium。
5. 兩天後觀察胚胎與餵養細胞黏著程度，然後就可以更換培養液 (hES medium)，更換時動作要慢且輕柔，其後每天換一次培養液。
6. 每日觀察囊胚是否持續附著於餵養細胞且開始增殖，然後於適當時機予以繼代 (約 5 至 12 天後)。之後於每生長一週後進行繼代培養，觀察其生長型態，生長至一個月後則陸續進行胚胎幹細胞特性之鑑定。



表一、人類囊胚分級表（根據 Gardner · Fertil Steril, 2000 修改而來）

等級	敘述
1	囊胚已膨脹，內細胞團明顯，囊胚腔內無退化區域
2	囊胚已膨脹，內細胞團明顯，可見退化區域
3	囊胚已膨脹，無內細胞團，不明顯或有部分退化

位於囊胚內的內細胞團之分級：

A	內細胞團密集且清楚，無暗色細胞；內細胞團呈球形
B	與 A 類似，但有少量的暗色細胞
C	內細胞團明顯但不密集，散佈於滋養層內側；內細胞團呈扁平，無暗色細胞
D	與 C 類似，但有暗色細胞

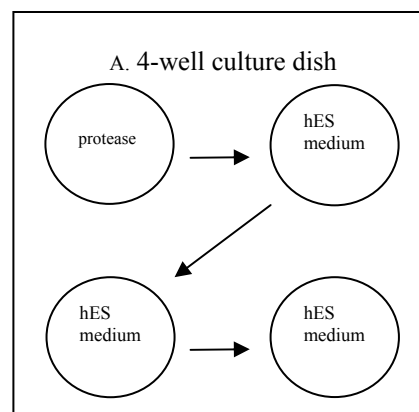
### 方法二：免疫手術法 (immunosurgery)

實驗目的：除去透明層與滋養層細胞 (trophoblast)，以獲得純化之內細胞團

準備：四孔盤三個、蛋白酶、anti-human serum、guinea pig complement、胚胎幹細胞培養液、餵養細胞，含餵養細胞之培養盤，皆應預先準備好放在培養箱中平衡。

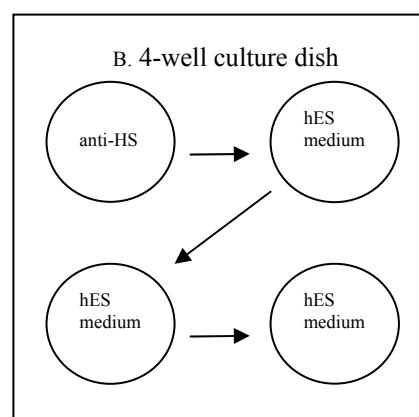
#### A 將囊胚之透明層去除

1. 取一個四孔盤，配置 10 units/ml 蛋白酶，取 80 $\mu$ l 放置於第一孔中並覆蓋上礦物油，其餘三孔中各注入 0.5 ml hES medium。
2. 將 5~6 天的囊胚置入第一孔中作用 1~2 分鐘，觀察囊胚透明層至即將完全溶解。
3. 依序將囊胚置入第 2~4 孔中洗淨殘留的酵素，於第 4 孔中靜置 20 分鐘。



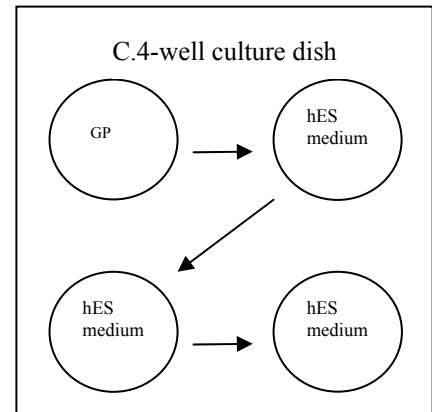
#### B 使用抗人類血清 (anti-human serum ; anti-HS) (附錄二) 來結合滋養層細胞的表面抗原

1. 取另一個四孔盤，以 1:5 比例配置抗人類血清與 hES medium，取 80 $\mu$ l 放置於第一孔中並覆蓋上礦物油，其餘三孔中各注入 0.5 ml hES medium。
2. 將去除透明層的囊胚置入第一孔中作用 30 分鐘。
3. 依序將囊胚置入第 2~4 孔中洗淨殘留的試劑。

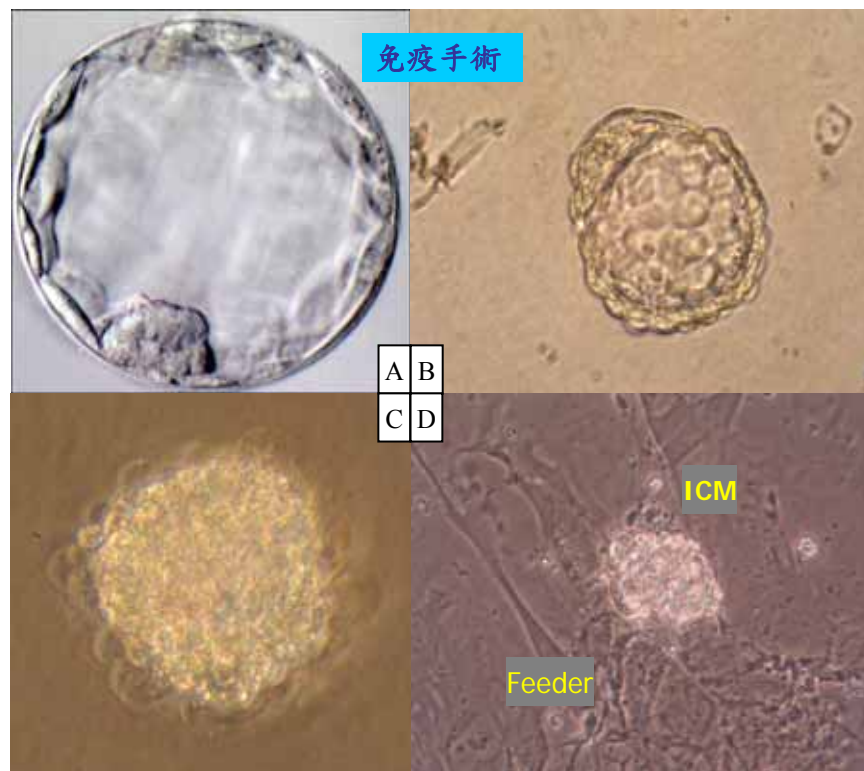


C 加入補體 (complement)，以去除滋養層細胞

1. 取另一個四孔盤，以 1:5 比例配置天竺鼠補體(guinea pig complement；GP) 與 hES medium，取 80 $\mu$ l 置於第一孔中並覆蓋上礦物油，其餘三孔中同樣各注入 0.5ml hES medium。
2. 將 anti-human serum 作用後的囊胚置入第一孔中作用 30 分鐘，觀察滋養層細胞被溶解。
3. 依序將取得之內細胞團置入第 2~4 孔中洗淨殘留的試劑。



D 將處理完成的內細胞團移置於已加入生長因子之 hES medium，且含餵養細胞之培養皿 (OCD) 中，置入培養箱中培養 (圖二)。



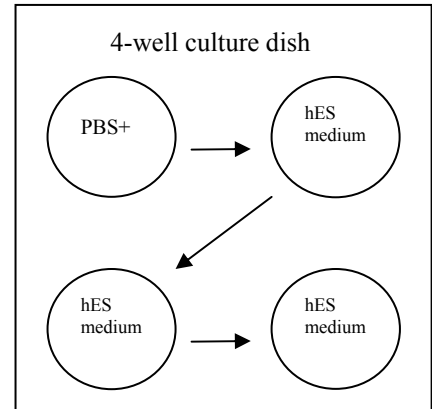
圖二、免疫手術的過程。A. 第六天的囊胚；B. 去除透明帶的囊胚；C. 抗人類血清處理後，加入天竺鼠補體作用中的囊胚；D. 免疫手術完成後放到餵養細胞上的內細胞團。

### 三、胚胎幹細胞的繼代培養

胚胎幹細胞的繼代培養可分兩種方法：

A. 玻璃針切割技術：可控制細胞群落 (colony) 大小的一致性，用於長期繼代。

1. 準備一支巴斯特玻璃滴管 (Pasteur pipette)，以酒精燈將管尖燒熱，待微熔時輕拉管尖，將形成之頸部切斷 (圖三)，利用切斷處之玻璃針鋒利面做切割，而製成玻璃切割針。另外亦可以用 29~30G 胰島素針頭替代。
2. 準備一四孔盤作為清洗使用，加入磷酸鹽緩衝液 (PBS) 於第一孔，其餘三孔分別注入 hES medium，放入培養箱備用。
3. 將已製備好含餵養細胞的培養皿 (OCD) 之培養液更換為已加入 bFGF 之 hES medium，放入培養箱中至少一小時備用。



圖三、玻璃針的製作方法。

4. 使用 hES medium 配置 10  $\mu\text{g/ml}$  的蛋白酶 (dispase) 溶液。  
步驟 1. 當胚胎幹細胞群落生長至大約 5 至 7 天，群落大小直徑約 100  $\mu\text{m}$  左右就可以進行繼代。  
步驟 2. 用準備好之玻璃針或 29~30G 針頭於解剖顯微鏡下進行群落切割，將未分化的部分切割下來。切割方式一般分為輪狀切法及井字切法 (圖四)，可依群落的型態作選擇。  
步驟 3. 切割完畢後換上 0.5 ml dispase 溶液，置於培養箱中約 2~3 分鐘。  
步驟 4. 取出培養皿，於顯微鏡下觀察，可以看見已切下的細胞群落由周邊開始翻起，並逐漸與餵養細胞脫離。  
步驟 5. 用吸管尖 (20~200  $\mu\text{l}$  tip) 將所有要的細胞片吸上來，放入四孔盤中依序清洗。  
步驟 6. 最後將細胞片依序放入準備好含新鮮餵養細胞的培養皿中，每盤培養皿 (OCD)

約放置 7 至 9 片為宜。

步驟 7. 兩天後就可觀察細胞群落是否已貼附完全，並更換培養液。更換時要慢，並特別小心減少干擾剛附著的幹細胞群落，之後每一天要換一次加有 bFGF 之 hES medium。



圖四、玻璃針切割人類胚胎幹細胞技術。1. 以玻璃針切割之情形；2. 井字切法；3. 輪狀切法。

B. 酵素方法：此方法適用快速大量繼代胚胎幹細胞。

1. 把磷酸鹽緩衝液 (PBS) 及人類胚胎幹細胞培養液 (hES medium) 預先回溫。
2. 用磷酸鹽緩衝液配製膠原蛋白酶第四型 (collagenase IV) 200 units/ml 備用。
3. 將製備好已含有餵養細胞之 35-mm 培養皿的培養液更換為已加入 bFGF 之 hES medium，並放入培養箱至少一小時備用。

步驟 1. 使用磷酸鹽緩衝液把已培養 7 天含人類胚胎幹細胞的培養皿清洗兩次。

步驟 2. 把已製備之膠原蛋白酶第四型 0.5 ml 加入培養皿中，然後置於培養箱中 3~6 分鐘。

步驟 3. 用吸管尖 (20~200  $\mu$ l tip) 將略為剝離之胚胎幹細胞群落刮起，放到已含有 6 ml hES medium 之 15 ml 離心管中。

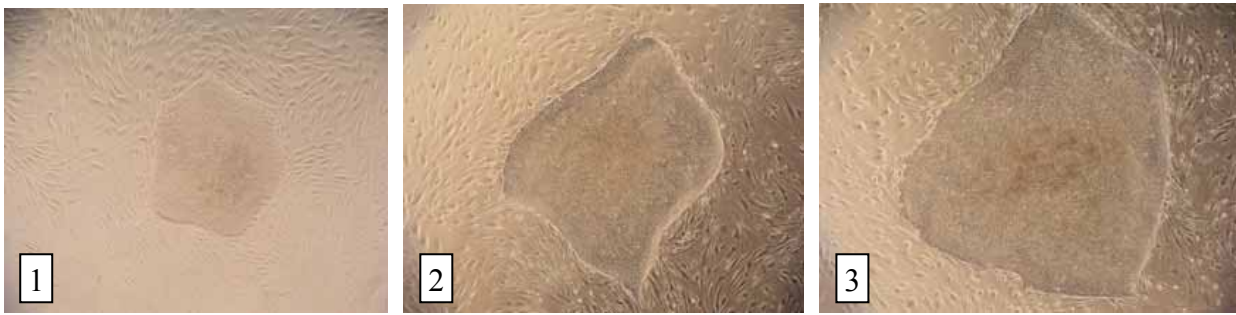
步驟 4. 用電動分注器 (Pipette Aid) 來回吸放 5~10 次使細胞群落打碎成原來大小的 1/10~1/20。

步驟 5. 離心 600 $\times$ g 2 分鐘，抽掉上清液，依分盤數之需要，加入一定量已含 bFGF 之 hES medium 中混和均勻。

步驟 6. 將碎成小片的細胞團塊懸浮液放入含新鮮餵養細胞的 35-mm 或 60-mm 培養皿中。

步驟 7. 兩天後就可觀察細胞是否已貼附完全，並更換培養液，更換時動作輕柔，之後每一天換一次含 bFGF 之 hES medium。

\*註：若是繼代前細胞團塊本身較薄，即可省略酵素作用步驟，直接用電動分注器來回吸放打散細胞，但不宜將細胞團塊打的太碎。



圖五、人類胚胎幹細胞經玻璃針切割後，繼代培養後之外觀。1. 繼代後第 3 天；2.繼代後第 5 天；繼代後第 7 天。

#### 四、胚胎幹細胞的冷凍

採玻璃化（vitrification）冷凍方法，以快凍為原則。

1. 製備冷凍液，配置好的冷凍液可於 4 °C 保存一星期。

名稱	成分	比例
A.ES-HEPES medium	DMEM media	78%
	Fetal Bovine Serum (Hyclone)	20%
	1M HEPES	2%
B.10%Vitrification solution	ES-HEPES	80%
	Ethylene Glycol	10%
	DMSO	10%
C.20%Vitrification solution	ES-HEPES	30%
	1M Sucrose Solution	30%
	Ethylene Glycol	20%
	DMSO	20%

2. 準備一四孔盤依圖示注入冷凍液 A、B 與 C，每一孔至少 0.5 ml，另外用 C 冷凍液分別各做一滴 20  $\mu$ l 及 3  $\mu$ l 冷凍液珠備用。

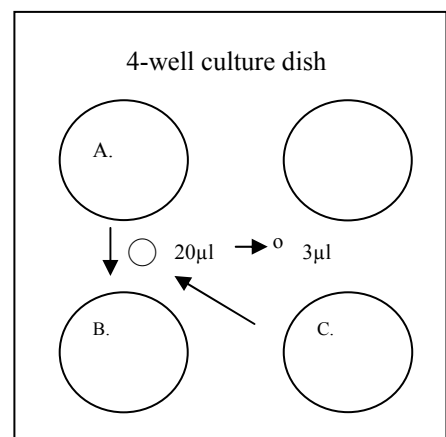
3. 把一冷凍管架在鋁條上，然後標上必要資料、日期，然後放到液態氮內，此時整個管子已裝滿液態氮。

4. 依玻璃針切割法先備好胚胎幹細胞片於清洗四孔盤中。

5. 接著使用吸管尖把胚胎幹細胞片移至冷凍盤的第一個孔 A 液中，開始進行冷凍。

6. 用吸管尖先吸一點 B 液，然後把胚胎幹細胞片由 A 液吸起放到 B 孔中，作用 1 分鐘。

7. 先吸一點 C 液，然後從 B 孔中把細胞片吸起放到 C 孔中作用 25 秒。





8. 接著把胚胎幹細胞片由 C 孔吸到 20  $\mu$ l 的 C 液中。
9. 再把胚胎幹細胞片吸到 3  $\mu$ l 的 C 液中。
10. 最後用冷凍胚胎麥管 (straw) 的窄端用虹吸原理把胚胎幹細胞片吸起，立即放到液態氮中，然後再放進已預備好的冷凍管中，蓋上蓋子，儲存於液態氮儲存桶中。

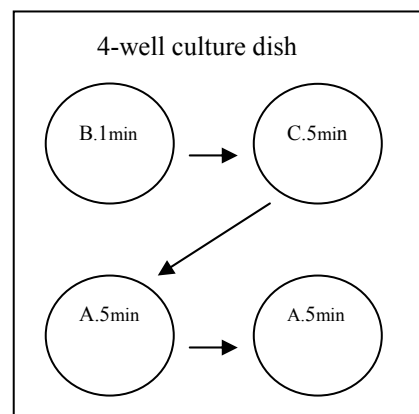
\*註：2~3 分鐘以內要完成一次冷凍；一次最多可冷凍 8 片胚胎幹細胞片。

## 五、胚胎幹細胞的解凍

1. 製備解凍液，配置好的冷凍液可於 4  $^{\circ}$ C 保存一星期。

名稱	成分	比例
A.ES-HEPES medium	DMEM media	78%
	Fetal Bovine Serum (Hyclone)	20%
	1M HEPES	2%
B.0.2M Sucrose medium	ES-HEPES media	80%
	1M Sucrose Solution	20%
C.0.1M Sucrose medium	ES-HEPES	90%
	1M Sucrose Solution	10%

2. 將製備好的 OCD (內含餵養細胞) 內的培養液更換為已含 bFGF 之 hES medium，並放入培養箱中平衡至少一小時備用。
3. 從液態氮儲存桶中取出冷凍胚胎麥管後，放入已裝滿液態氮的攜帶筒中。
4. 利用鑷子把冷凍胚胎麥管從冷凍管中取出，立刻放在第一個孔中 (B. 0.2M sucrose solution)，如擔心胚胎幹細胞片會卡在管壁上，則插入套在注射筒上之吸管尖 (20~200  $\mu$ l tip)，把冷凍小管中的剩餘幹細胞片再加以排出，計時 1 分鐘。
5. 接著將胚胎幹細胞片移入第二個孔中 (C. 0.1M sucrose solution)，計時 5 分鐘。
6. 再將胚胎幹細胞片依序移入第三及第四孔 (A. ES-HEPES medium) 中各 5 分鐘。
7. 最後就可將細胞片置入含新鮮餵養細胞並使用 hES medium (含 bFGF) 之培養皿中。
8. 兩天後觀察胚胎幹細胞是否貼附完全，並更換培養液，之後每天更換培養液。



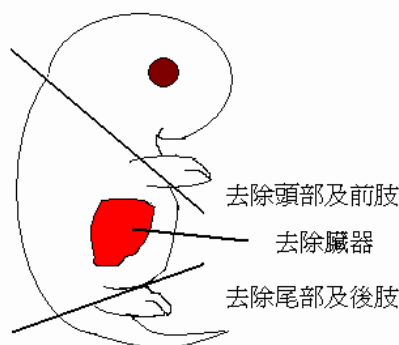
\*註：胚胎幹細胞之冷凍與解凍，也可以使用類似一般大量細胞之冷凍法，但仍須以細胞片 (pieces of colonies)，而非單獨細胞 (single cells) 方式冷凍，以提高存活率。

## 六、餵養細胞 (Feeder cells)

餵養細胞可以提供胚胎幹細胞所需的生長環境並維持不分化的狀態。一般常用的餵養細胞為小鼠胚胎纖維母細胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEF) 或 STO 纖維母細胞株；另外，考慮到動物性污染問題，也可以使用人類包皮纖維母細胞 (human foreskin fibroblast, HFF) (ATCC CRL-1635, Hs68) 或其他來源的細胞 (例如 human placental fibroblast) 等，作為餵養細胞。

### A. 小鼠胚胎纖維母細胞之建立

1. 選用 5 至 6 周大的母鼠與公鼠交配後，將成功配種後出現陰道栓的母鼠分籠飼養。
2. 配種後第 13 日的懷孕母鼠經頸椎脫臼法犧牲後，解剖取下完整子宮置於磷酸緩衝溶液 (PBS) 中。
3. 於解剖顯微鏡下剪開子宮並取出胎小鼠，以鑷子撕開羊膜與胎盤，再逐一去除胎小鼠的頭、尾部、四肢與內部臟器，並移至 10 cm 含 PBS 的培養皿中 (圖六)。
4. 將胎體置入 3 ml 注射針筒中，反覆通過 18 號注射針直到胎體碎成細胞團塊。
5. 將細胞懸浮液靜置 10 分鐘。
6. 吸取上層細胞懸浮液加入含餵養細胞培養液 (MEF medium) (見附錄三) 中，於 37 °C 培養箱 (5 % CO<sub>2</sub>) 中培養。調整細胞數為培養皿中每毫升約有 10<sup>5</sup> 個細胞。
7. 翌日將未能貼附的細胞及組織殘渣移除，更換新的培養液，並檢查細胞貼附及增殖情形，待 2 至 3 日細胞長滿培養皿時，則可進行繼代培養。
8. 繼代培養時，以 PBS (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free) 清洗 2 次，加入 1ml 含 0.05% trypsin- EDTA 溶液，於 37°C 培養箱內培養 2 分鐘，將懸浮細胞打散，再加入 MEF medium 中止 trypsin-EDTA 作用，然後將懸浮細胞以 1 : 3 進行分盤。
9. 隨後每 2 天更換一次培養液，於細胞達到 90 % 滿盤以上即可繼代分盤或進行冷凍保存。實驗室通常使用繼代數為 5 至 6 代者供胚胎幹細胞培養。



圖六、於含 PBS 的培養皿中去除胎小鼠的頭、尾部、四肢與內部臟器

## B. 餵養細胞的冷凍

1. 配製冷凍液 (90% FBS : 10% DMSO) 置於冷凍管中，並置於冰桶中備用。
2. 培養皿中加入 PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free) 清洗 2 次，加入 1.5 ml 含 0.05% trypsin- EDTA 溶液，於 37°C 培養箱 (5%  $\text{CO}_2$ ) 內培養 2 分鐘，將懸浮細胞打散，再加入 MEF medium 中止 trypsin-EDTA 作用。
3. 吸取懸浮細胞液至 15 ml 離心管中，利用血球計數器 (haemocytometer) 進行細胞計數。
4. 於 1000 rpm 離心條件下離心 5 min，吸除上清液。
5. 加入適量的冷凍液，調整冷凍管中的細胞數為  $1.5 \times 10^6$  細胞 / 0.5 ml 冷凍液，置入冷凍管中。
6. 冷凍管先放入冷凍盒 (NALGENE® Cryo 1°C Freezing Container) 內，置於 -80°C 冷凍庫中，隔天再移至液態氮桶中長期保存。

## C. 餵養細胞的解凍

1. 於液態氮桶中取出冷凍管，放入 37°C 水浴中進行解凍至剩一小塊冰塊。
2. 將冷凍管液體移至已加入 MEF medium 的 15 ml 離心管中。
3. 於 2000 rpm 離心條件下離心 5 min，吸除上清液。
4. 加入新的 MEF medium，混合後移至 75-cm<sup>2</sup> flask (Falcon) 中。
5. 最後移至 37°C 培養箱 (5%  $\text{CO}_2$ ) 中培養，之後每 2 天更換一次 MEF medium，待細胞達到 90% 滿盤以上即可繼代。

## D. 餵養細胞之製備

### a. 培養皿的 gelatin coating

1. gelatin (Sigma) 溶於無菌水中使其濃度為 0.1%，滅菌後貯存於 -20°C 冷凍庫中備用。
2. 0.1% gelatin 於室溫或 37°C 回溫後，注入培養皿底部，置於 37°C 培養箱中 20 分鐘。
3. 將培養皿中的 gelatin 移除，再移至 37°C 培養箱中備用。

### b. Mitomycin C 處理

1. 培養皿中細胞長滿時，將培養液更換為含 mitomycin C (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的 MEF medium，於 37°C 培養箱培養 2.5 至 3 小時。
2. 以 PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free) 清洗 2 次，再加入 0.05% trypsin-EDTA 於 37°C 培養箱內培養 2 分鐘，將懸浮細胞打散，再額外加入 10 ml 之 MEF medium 中止 trypsin-EDTA 作用。
3. 吸取懸浮細胞液至 15 ml 離心管中，於 1000 rpm 離心條件下離心 5 min，吸除上清液，加入 5 ml 的 MEF medium，小心混合均勻。
4. 利用血球計數器進行細胞計數，取適當濃度的細胞數 ( $1.75 \times 10^5$  cells/ ml) 置於經 0.1% gelatin 處理過的器官培養皿 (OCD) 或 35-mm culture dish 中。
5. 移至 37°C 培養箱 (5%  $\text{CO}_2$ ) 中進行培養，待細胞貼附於培養皿後 (約 6 小時以上) 即可作為餵養細胞。
6. 培養胚胎幹細胞前，培養皿中的培養液需更換為 hES medium (見附錄三)，置於 37°C 培

養箱中至少平衡 1 小時方可進行培養（圖七）。

### C. $\gamma$ 射線處理

1. 除了使用 Mitomycin C 的方法之外，也可以使用  $\gamma$  射線處理，來使細胞停止分裂增生。細胞長滿培養皿時，加入 0.05% trypsin-EDTA 溶液，於 37°C 培養箱內培養 2 分鐘，將懸浮細胞打散，再額外加入 10 ml 的 MEF medium 中止 trypsin-EDTA 作用。
2. 將細胞移至 Falcon Petri dish，再移至放射線設備以 3000~8000 rad 的  $\gamma$  射線照射（條件需依細胞濃度與設備不同而調整）。
3. 再將  $\gamma$  射線處理後的細胞移至培養盤中。
4. 取細胞懸浮液進行細胞計數，將適當比例的細胞數（ $1.75 \times 10^5$  cells/ml）置於經 0.1% gelatin 處理過的 OCD 或 35-mm culture dish 中。
5. 移至 37°C 培養箱（5% CO<sub>2</sub>）中進行培養，待細胞貼附於培養皿後（約 6 小時以上）即可作為餵養細胞之用。
6. 培養胚胎幹細胞前，需更換為 hES medium，置於 37°C 培養箱中至少平衡 1 小時以上方可進行培養。

### E. Extracellular matrix（細胞外基質）plates 之備製

a. Matrigel（一種細胞外基質）可以取代餵養細胞提供胚胎幹細胞的生長環境：

1. Matrigel（Becton Dickinson）置於 4°C 冰中隔夜解凍，並將 pipettes 置於 -20°C 冷凍庫中預冷（Matrigel matrix 在 22~35°C 下易急速凝膠，所以在操作時須維持低溫）。
2. 操作當天，過程皆需使用預冷的 pipettes 及離心管。
3. 取無血清（serum-free）的 DMEM 培養液，於冰中稀釋 Matrigel 至所需濃度（通常使用濃度為 5%）。
4. 吸取 Matrigel 覆蓋於培養皿底部，室溫靜置 1 小時後，吸除未凝膠的 Matrigel，再以無血清的 MEF medium 洗滌後即備製完成（可存於 4°C 達 2 個月）。
5. 以 Matrigel 培養胚胎幹細胞時須每天更換條件化培養液（conditioned medium）。

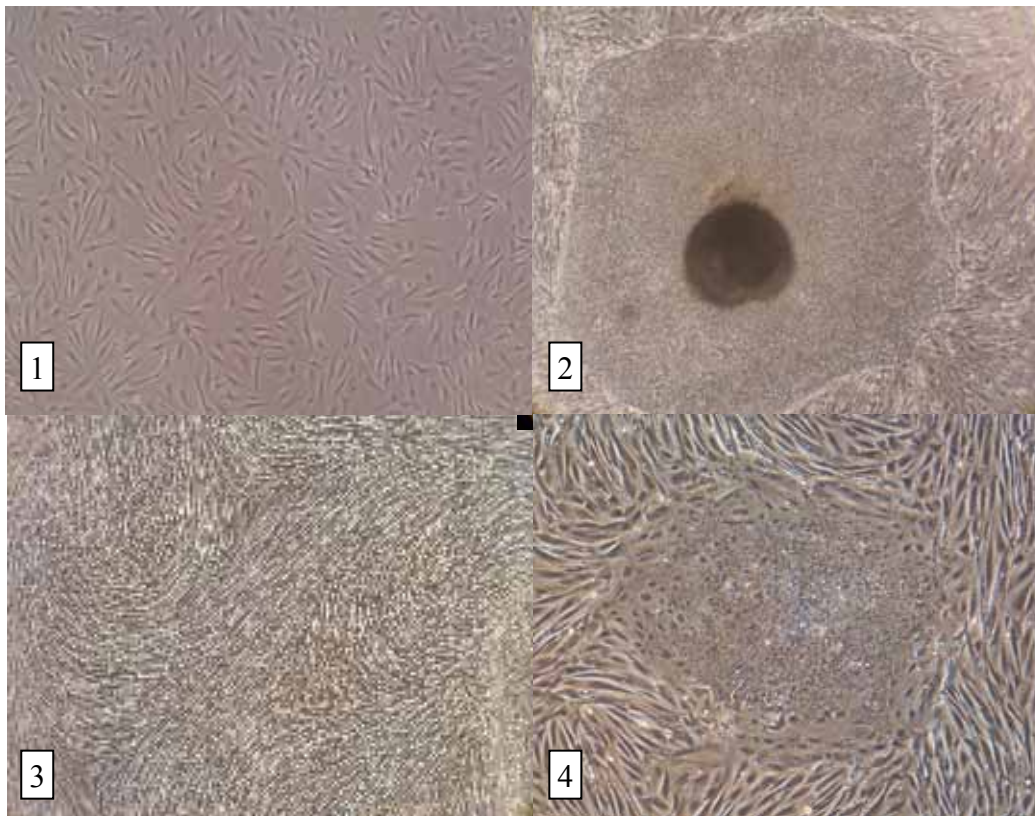
b. 條件化培養液之備製

1. 於含 mitomycin C 處理過的 MEF（ $3 \times 10^6$  cells）的 75-cm<sup>2</sup> flask 中，加入 20 ml 新鮮的 MEF medium。
2. 移至 37°C 培養箱（5% CO<sub>2</sub>）中培養 24 小時後，將 flask 中的培養液收回即為條件化培養液（此 flask 可回收條件化培養液約 7 天）。
3. 條件化培養液過濾（0.22  $\mu$ m filter）後，可提供胚胎幹細胞之培養（培養液可存於 -20 °C 達 1 個月）。

\*註：關於人類餵養細胞的報告，目前使用較多的包括 foreskin fibroblast、uterine endometrium、placenta，以及由人類胚胎幹細胞所分化建立而來的纖維母細胞等等<sup>4</sup>。這些人類來源的餵養細胞不論是使用含血清或不含血清的培養液，都可以有效的維持人類胚胎幹

細胞生長。不過，在 MEF 或人類的餵養細胞下生長之人類胚胎幹細胞型態並不完全相同，例如人類胚胎幹細胞生長在人類餵養細胞下會顯得比較扁平、比較薄、單層且細胞略大，而在 MEF 上則較厚。這些差別在人類胚胎幹細胞的後續分化上之差異，則並不清楚（圖七）。

\*註：關於人類胚胎幹細胞之培養環境，除了餵養細胞與培養液之外，還有些其他條件也可能會影響到細胞的成長。例如培養箱之 CO<sub>2</sub> 濃度大部分是設定於 5~7%，但是這一點還需考量使用的培養液本身最適合的 pH 值而定，因此實驗室對此需做適當的調節。至於是否需使用高純度的 CO<sub>2</sub>，或使用特殊裝置以減低空氣中有害的揮發物質，則同樣需根據各實驗室測試才能得到答案。至於 O<sub>2</sub> 濃度是 21%，或減低至 5% 左右（hypoxic culture），同樣是未決的議題。過去有數篇報告顯示 5% O<sub>2</sub> 有助於胚胎幹細胞的建立與維持，但是我們最近詳盡的分析比較卻發現：在維持人類胚胎幹細胞於未分化的狀態下而言，如果繼代的頻率是常規的 5~7 天左右，則使用 21% O<sub>2</sub> 可能沒有明顯壞處，並且維持的費用也比較低，且不論在各種分化與未分化之基因的表現上，皆無明顯之差異，因此未必需要使用 5% O<sub>2</sub>。因此實驗室對於最適當的人類胚胎幹細胞培養環境需有其自我的分析與測試，並非一種培養環境可以一體適用於所有實驗室。



圖七、顯微鏡下觀察餵養細胞貼附於培養皿及用於培養胚胎幹細胞。1.小鼠胚胎纖維母細胞（mouse embryonic fibroblasts, MEF）； 2.胚胎幹細胞培養於 MEF； 3.人類包皮纖維母細胞（human foreskin fibroblast, HFF）； 4.胚胎幹細胞培養於 HFF 之情形。

## 七、人類胚胎幹細胞建立的新發展

有關於人類胚胎幹細胞的建立與維持，其標準實驗步驟皆已有文獻可供參考，而實驗效果也很好。不過最近數年來，國際間對於人類胚胎幹細胞之建立與維持有許多新的發展；其最重要的目標不外乎：首先是朝向一個非動物餵養細胞<sup>4,5</sup>、無外來非人類物質之介入、無血清，而尤其是在一種培養物質完全透明清楚的培養液（defined medium）中<sup>6,7</sup>，所建立與生長之人類胚胎幹細胞株的實驗方向來發展。另一方向則是朝向一個減少破壞胚胎的方法來建立人類胚胎幹細胞。

對於第一個目標，過去許多研究顯示人類來源的餵養細胞，例 human foreskin feeder、human placental fibroblast 等等細胞，皆可有效建立與維持人類胚胎幹細胞之成長<sup>8</sup>。進一步也有研究顯示：在一個 defined medium 的環境下建立新的人類胚胎幹細胞株<sup>6</sup>，他們使用一種稱為 TeSR1 的培養液，內含 TGFβ、PA、GABA、LiCl、bFGF 等物質，而能達到與 MEF 的 conditioned medium 相同或更好的效果，而且在配合人類之細胞外基質（extracellular matrix）（包括 collagen IV、fibronectin、laminin、與 vitronectin 的使用）之下，並不需要餵養細胞。在使用這種培養環境的情況之下，Ludwig 的團隊建立了兩株新的人類胚胎幹細胞株，可惜其中一株染色體異常，而另一株原為正常，培養 7 個月之後變成第十二對染色體三倍體。因此就這個議題，還有許多研究需要進行，但終極目標是建立一種無餵養細胞，且無外來非人類的物質的培養環境，以便所建立出來的人類胚胎幹細胞株可以達到臨床應用之最基本需求條件<sup>9</sup>。

另外關於減少胚胎之破壞，由於傳統之建立人類胚胎幹細胞方法，皆需要破壞胚胎才能達成。因此在許多國家，或某些宗教團體的倫理與道德考量上，常常會衍生許多爭議。因此為了解決這個議題，有數種方法被設計出來以減少破壞胚胎之必要性。其中一種方法是由 Klimanskaya 團隊<sup>10</sup>所發表的方法：是把胚胎培養至第三天約 8 細胞時期，以顯微操作技術取出 1~2 個胚葉細胞（blastomere），然後藉由此胚葉細胞與原已形成之胚胎幹細胞株共同培養，使此胚葉細胞順利形成新的人類胚胎幹細胞株。如此不但達到建立新的細胞株，而且原來移除 1~2 個胚葉細胞之胚胎，仍能繼續發育至囊胚不受影響。這種技術雖然還需進一步精進與改良，但在解除人類胚胎幹細胞的倫理爭議上，無疑又踏出一大步。

除外，為了將來臨床應用的需要，人類胚胎幹細胞與其培育產生的分化細胞還需要解決排斥的問題。在數種解決的方案當中，近年來為科學家所特別重視的方法之一是：以核轉殖（nuclear transfer；NT）的技術，來得到量身訂做之胚胎幹細胞株（nt-hESC）。由於這種細胞株的核是來自核捐贈者（nuclear donor）的體細胞，因此藉此技術得到的人類胚胎幹細胞之 DNA 與原來捐贈者有 99% 以上的相似，只有粒腺體 DNA 不同。因此一旦將來這種細胞株的產物用於移植回核捐贈者身上，應該不會有排斥問題。可惜的是這種技術用於建立人人類胚胎幹細胞的研究上，截至目前為止並沒有成功的案例。因此由上述的現象，我們可以知道單單只談人類胚胎幹細胞的建立，不談其後續的分化，就有許多困難與議題需釐清與解決。而這同時，當然也代表人類胚胎幹細胞的建立也還有無限的可能存在，值得科學家探討。

## 八、附錄

### (一) 建立人類胚幹細胞之效率

這是過去我們已發表關於人類胚胎幹細胞之建立時，所建立三個細胞株 (NTU1、NTU2 與 NTU3) 之基本資料<sup>2</sup>。

編號	解凍的胚胎時期	囊胚等級	Antiserum (dilution)	第一次繼代天數	第二次繼代天數	建立之細胞株
1	2PN	2BA	Homemade (1:20)	10		
2	2PN	3AA	Homemade (1:10)	8		
3	6 Cell	4AA	Homemade (1:8)	9		
4	6 Cell	4BA	Homemade (1:5)	7		
5	2PN	3AA	Homemade (1:5)	10	14	NTU1
6	2PN	3CA	Sigma (1:5)	9		
7	2PN	4AA	Sigma (1:3)	10	9	NTU2
8	8 Cell	4CA	Sigma (1:3)	****		
9	2PN	3AB	Sigma (1:3)	12		
10	2PN	4BA	Sigma (1:3)	8		
11	2PN	4AB	Sigma (1:3)	12	6	NTU3

### (二) Anti-human serum 的製備

取  $1-2 \times 10^7$  BeWo cells (人類絨毛腺癌細胞株 CCL-98; ATCC, Rockville, MD) 在 0.5 ml 磷酸鹽緩衝液中，以靜脈注射打入紐西蘭 (Zew Zealand) 白兔體內，每 14 天施打一次，共計 3 次。於最後一次施打後 14 天收集白兔血清，再經由 BeWo 細胞測試其培養及細胞溶解的成效來決定使用濃度，完成後儲存於  $-80^\circ\text{C}$ 。另外也可以購買 Sigma 公司的 anti-human serum。

### (三) 相關培養液配置

名稱	成分	比例
DMEM-HEPES medium	DMEM	97.5%
	HEPES	2.5%
1M Sucrose medium (先將 sucrose 溶於 DMEM-HEPES 再調整至 8ml 後加入血清)	Sucrose	3.42g
	DMEM-HEPES	6ml
	Fetal Bovine Serum (Hyclone)	2ml
人類胚胎幹細胞培養液 (hESC medium)	D-MEM	80%
	L-glutamine	1%

(亦可用市售商品取代，如 Primate ES Cell Culture Medium/ ReproCell)	Penicillin/Streptomycin	0.5%
	Hyclone FBS	20%
	NEAA	1%
	$\beta$ -Mercaptoethano	0.1mM
	bFGF	10 ng/ml
MEF medium	DMEM medium	88.5 %
	L-Glutamine-200	1 %
	FBS (Gibco)	10 %
	Penicillin/Streptomycin	0.5 %

(四) 相關試劑

試劑名稱	廠牌型號
DMEM	Gibco11960-044
L-Glutamine-200	Gibco 25030-081
Penicillin/Streptomycin	Gibco 15070-063
non-essential amino acids (NEAA)	Gibco 12383-014
$\beta$ -mercaptoethanol	Gibco 21985-023
PBS+	Gibco 14040-133
PBS-	Gibco 14190-144
Insulun-Transferrin-Selenium (ITS)	Gibco 41400-045
Collagenase IV	Gibco17104-019
Trypsin/EDTA(0.25%)	Gibco 25200-056
HEPES	Gibco 15630-106
Dispase	Gibco 17105-041
Basic Fibroblast Growth Factor/bFGF human, recombinant	Gibco 13256-029
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco 26140-079
Dimethylsulfoxide(DMSO)	Sigma D-2650
Mitomycin-C	Sigma M-4287
Gelatin	Sigma G-1890
Ethylene glycol	Sigma E-9129
Sucrose	Sigma S-7903
Fetal Bovine Serum (FBS)-Hyclone	Hyclone SH30070-03
Primate ES Cell Culture Medium	ReproCeLL RCHEM001



## 九、參考文獻

1. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145-7 (1998).
2. Chen, H. F., Kuo, H. C., Chien, C. L., Shun, C. T., Yao, Y. L., Ip, P. L., Chuang, C. Y., Wang, C. C., Yang, Y. S. & Ho, H. N. Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation. *Human Reproduction* **22**(2):567-77 (2007).
3. Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. & Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol.* **18**(4):399-404 (2000).
4. Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R. & Itskovitz-Eldor, J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* **68**(6):2150-6 (2003).
5. Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., Johnson, J., West, M. D. & Lanza, R. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* **365**(9471):1636-41 (2005).
6. Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A. & Thomson, J. A. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol.* **24**(2):185-7 (2006).
7. Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med.* **10**(1):55-63 (2004).
8. Inzunza, J., Gertow, K., Strömberg, M. A., Matilainen, E., Blennow, E., Skottman, H., Wolbank, S., Ahrlund-Richter, L. & Hovatta, O. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* **23**(4):544-9 (2005).
9. Rodriguez, C. I., Galan, A., Valbuena, D. & Simon, C. Derivation of clinical-grade human embryonic stem cells. *Reproductive Biomedicine Online* **12**(1):112-8 (2006).
10. Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J. & Lanza, R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* **444**:481-5 (2006).

## 第二章

### 胚胎幹細胞的鑑定

## Characterization of Embryonic Stem Cells

郭紘志<sup>1</sup> 陳淑華<sup>1</sup> 張為芳<sup>2</sup> 莊靜玉<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 中央研究院 細胞暨個體生物研究所 <sup>2</sup> 中央研究院 基因體研究中心

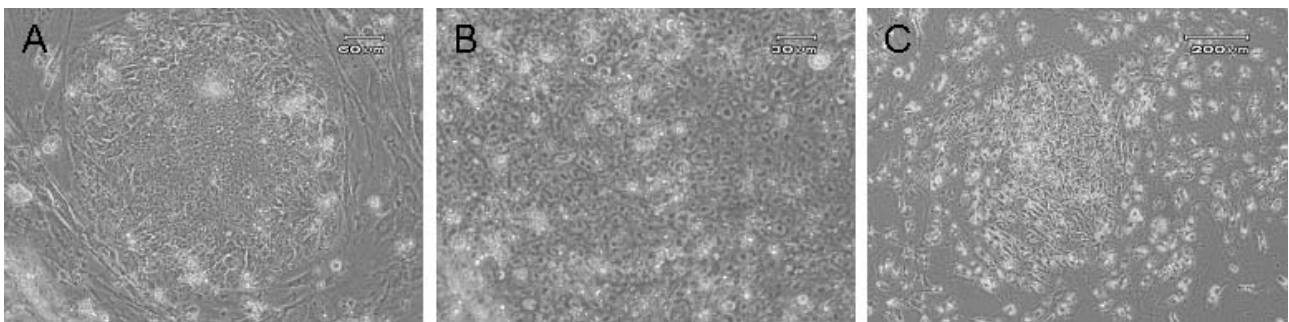
### 一、前言

胚胎幹細胞(embryonic stem cells)的最重要特質是他們具有無限制增殖(proliferation)能力，而不分化，即所謂自我更新(self-renewal)之能力，和具有分化為多重細胞型態之多能分化能力(pluripotency)<sup>1,2</sup>。因為胚胎幹細胞具有以上之能力，所以他們提供了在細胞性治療、藥物開發及基礎研究方面極佳的研究平臺。因此當建立新胚胎幹細胞株、建立新式之培養環境，或經長期培養時，適當之細胞鑑定程序是極其重要的。目前對於胚胎幹細胞之鑑定主要是針對胚幹細胞標誌物及他們全能分化潛力之分析<sup>3,4</sup>，而此類評估之標準包括鑑定其是否表達一些特定之表面抗原，及它們未分化狀態相關之一些轉錄因子，另外在活體及體外證明其多能之分化性及增殖特性也是鑑定程序中重要之步驟，以下將針對各項分析方法進行介紹。

### 二、胚胎幹細胞之細胞形態 (cell morphology) 特徵分析

在常規及長期之胚胎幹細胞培養過程中，細胞之自發性分化(spontaneous differentiation)是經常會遭遇之情況。因此，有關胚胎幹細胞分化與否之簡易、有效之判定，對於維持其良好之培養是非常重要之常規步驟。正常胚胎幹細胞之生長需要特定而良好之培養環境，以避免細胞產生自發性分化<sup>5,6,7</sup>。然而，在目前一般常規之培養方法下經常會有胚胎幹細胞在培養的過程中分化為有別於胚胎幹細胞型態而具有多重細胞型態之分化細胞族群。因此，在一般常規，長期之胚胎幹細胞培養過程中，對於胚胎幹細胞分化與否之型態鑑定是極其重要的。一般而言，未分化之人類胚胎幹細胞會形成緊密之細胞聚落(compact colonies)(圖一 A)。就單一之胚胎幹細胞而言，他們亦具有獨特之細胞型態，以下是胚胎幹細胞通常具有之型態特徵。一、胚胎幹細胞具有極高之核質比(nuclear to cytoplasm ratio)，因此，單一之胚胎幹細胞，看起來像是具有極大之細胞核和極少之細胞質(圖一 B)。二、其細胞核中之核仁(nucleoli)極為明顯(圖一 B)。三、具有明顯之細胞邊界(cell boundary)。相反的，分化之細胞經常失去以上胚胎幹細胞型態特徵<sup>3,4,8</sup>。通常，分化之細胞，

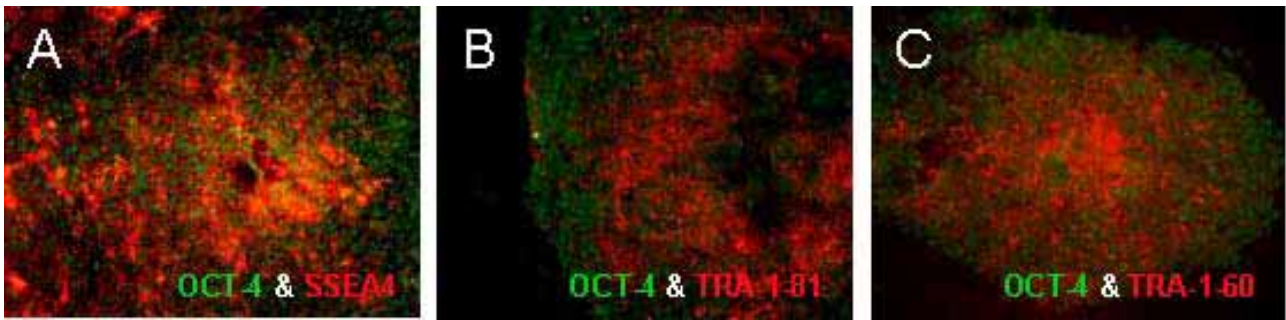
通常具有如扁平化 (flatten)、細胞尺寸變大、或形成立體、堆疊 (pile-up) 之細胞群體結構<sup>5</sup>，分化之細胞通常可在胚胎幹細胞聚落之週邊或中心之區域形成 (圖一 C)。具有良好訓練之胚胎幹細胞培養人員必須對所謂正常胚胎幹細胞型態具有判定之能力，並在細胞繼代 (passage) 時能有效的選擇並剔除分化細胞，否則，則通常會導致分化細胞之大量生長，最後失去胚胎幹細胞。當然胚胎幹細胞在不同的培養環境裡會呈現出些許不同之細胞型態特徵，針對不同培養環境培養之細胞，操作人員必須發展自我之型態特徵判定標準以符合個別之情況<sup>4</sup>。另外不同物種之胚胎幹細胞聚落型態亦有些許之差異，例如靈長類 (包括人類與猴類) 之胚胎幹細胞通常較為扁平，而小鼠之胚胎幹細胞則形成如小丘狀之結構 (dome-like)。



圖一、分化及未分化人類胚胎幹細胞之型態特徵。A 圖顯示人類胚胎幹細胞形成緊密之細胞聚落。B 圖顯示人類胚胎幹細胞具有極高之核質比 (nuclear to cytoplasm ratio)，單一之胚胎幹細胞，看起來像是具有極大之細胞核和極少之細胞質，且其細胞核中之核仁 (nucleoli) 極為明顯。C 圖顯示在人類胚胎幹細胞聚落之週邊形成分化之細胞。

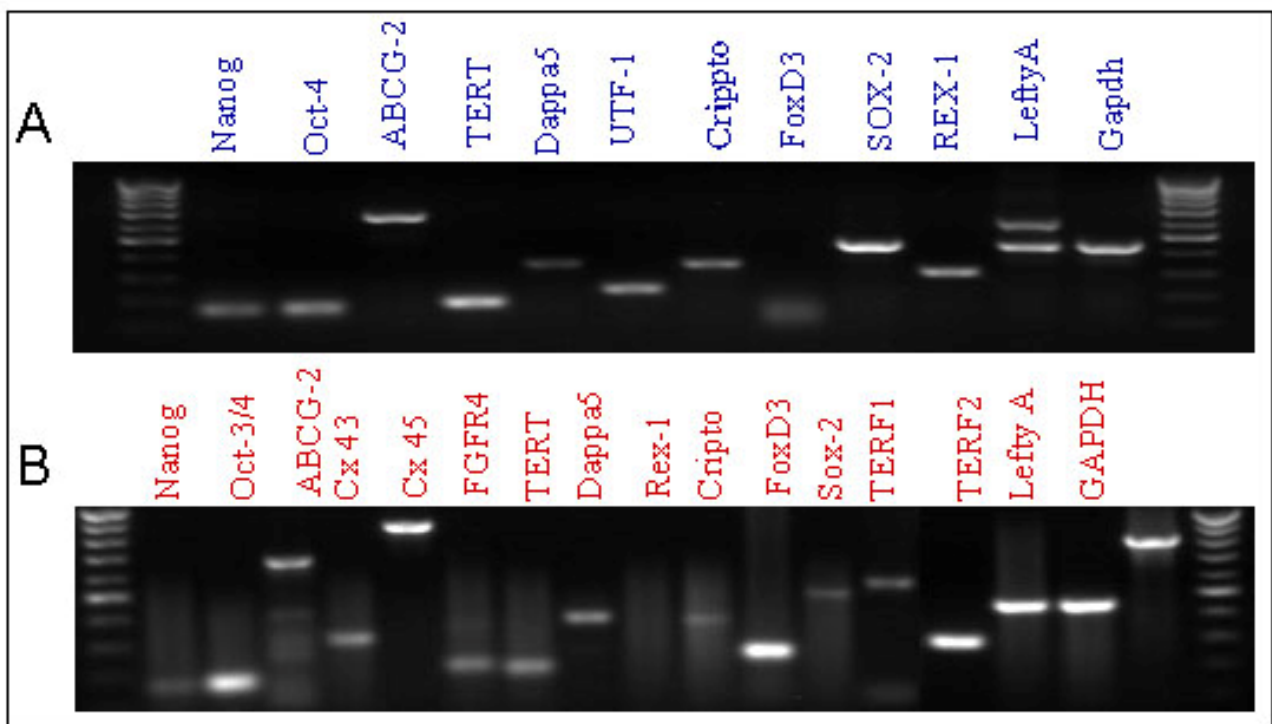
### 三、未分化胚胎幹細胞之鑑定標誌 (markers)

有關未分化胚胎幹細胞之鑑定標誌有以下二種。a. 胚胎幹細胞之細胞膜表面標誌<sup>9,10,11</sup>。b. 胚胎幹細胞表達之與全能分化性相關之專一標誌<sup>12,13,14,15,16</sup>。未分化之人類胚胎幹細胞表達表面抗原可被抗體如 SSEA-3 (stage-specific embryonic antigens)，SSEA-4 之醣脂類 (glycolipids)，TRA-1-60 和 TRA-1-81 和 GCTM-2 (GCTM2 為 protein core of keratan sulfate/chondroitin sulfate pericellular matrix proteoglycan) 等標誌物偵測 (圖二)。



圖二、免疫細胞化學染色 (immunocytochemistry staining) 分析恆河猴胚胎幹細胞表面抗原標誌之表達。A 圖顯示恆河猴胚胎幹細胞同時表達表面抗原標誌 SSEA3 及全能性標誌蛋白 OCT4。B 圖顯示恆河猴胚胎幹細胞同時表達表面抗原標誌 TRA-1-81 及全能性標誌蛋白 OCT4。C 圖顯示恆河猴胚胎幹細胞同時表達表面抗原標誌 TRA-1-81 及全能性標誌蛋白 OCT4。

人類胚胎幹細胞亦表達一系列有關全能分化性之分子標誌。如 OCT3/4，是一個 POU domain 之基因轉錄因子 (transcription factor)；hTERT、有關端體酶 (telomerase) 之表達之重要成分；homeobox 轉錄因子 NANOG、HMG-box 轉錄因子 SOX2、未分化胚胎細胞轉錄因子 (ITF-2C)、zinc finger 蛋白 42 REX1 (圖三)<sup>17,18,19</sup>，除此之外，未分化之胚胎幹細胞亦表達高度之鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 活性。



圖三、非定量 RT-PCR 之方法分析人類 (A 圖) 及恆河猴 (B 圖) 胚胎幹細胞中與全能分化能力相關之標誌基因 (pluripotency-related marker genes) 之表達。

以上所列舉之各種胚胎幹細胞未分化標誌，會在胚胎幹細胞開始進行分化的過程中，降低表達，同時其他與分化細胞相關之細胞標記之表達則提高，例如在人類胚胎幹細胞開始分化時 SSEA-1 之表達即升高，但其並不表達於未分化細胞。在通常實務之鑑定程序，以上所列舉之胚胎幹細胞標誌物提供了一個實用之指標以供評估細胞之狀態，或比較不同之培養環境。

雖然，不同物種之胚胎幹細胞，大致表達類似與全能分化能力相關之基因，然而在表面抗原之表達方面，人類與小鼠之胚胎幹細胞有不同之表現，例如小鼠之細胞表達 SSEA1，相反的，人類之胚胎幹細胞卻不表達 SSEA1，唯有在分化的情況下，SSEA1 才在人類的胚胎幹細胞中表達。

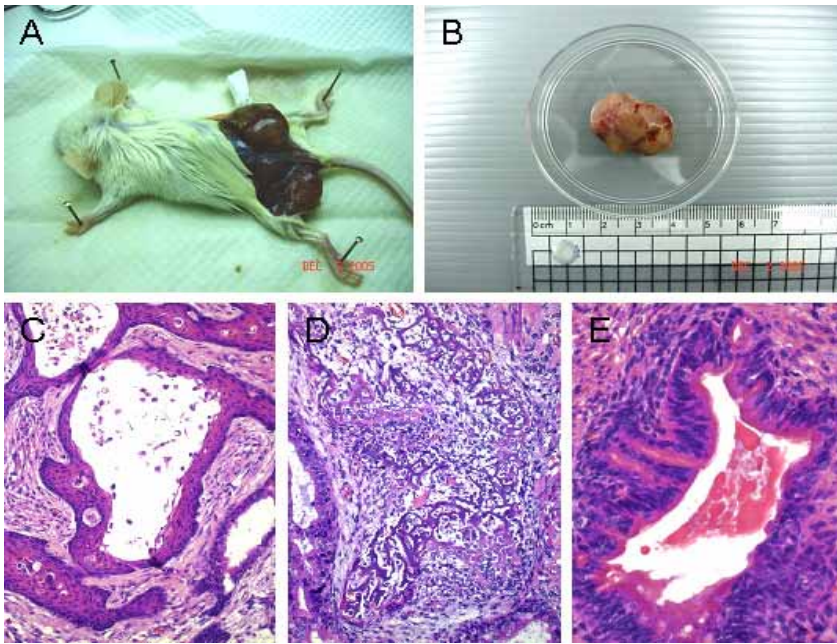
對於以上標誌物表達之分析，可經由免疫細胞化學染色 (immunocytochemistry)，流式細胞定量 (flow cytometry) 或者/和定量 RT-PCR 和非定量 RT-PCR 之方法分析。免疫化學染色法，使用特定之抗體以偵測胚胎幹細胞表達之未分化標誌，此方法可以同時偵測細胞之型態及未分化標誌表達位置之界定，以流式細胞儀進行分析，則提供了在活細胞上，經由細胞染色以界定及定量胚胎幹細胞表達未分化標誌之方法，多種胚胎幹細胞標誌可同時在相同之細胞上被同時偵測。當缺乏抗體以提供胚胎幹細胞之特定標誌時，定量 RT-PCR 是一個替代方法，使用定量 RT-PCR 分析，我們可將相同之細胞族群進行多種標誌基因之表達鑑定，可同時分析與多能分化性相關之基因表達，亦同時可對與分化細胞相關之基因進行偵測，經由相互比對，未分化與分化基因表達之程度，我們可以藉此判定受測細胞之分化/未分化程度。

#### 四、分化潛力之鑑定：

未分化之人類胚胎幹細胞具有全能之分化潛力，有關於全能分化潛力之鑑定有下之方法：

##### A. 畸胎瘤 (teratoma) 形成之活體全能分化潛力鑑定

經由細胞注射 (通常  $5 \times 10^6$  細胞/100  $\mu$ l/每個注射位置) 進入免疫缺乏之老鼠 (immuno-deficient mice) 如 SCID/BEIGE 老鼠之肌肉 (圖四 A-B)，腎臟 (kidney capture) 或者睪丸 (testis) 中，經過數週 (通常 8-12 週) 注射位置會形成大小不一定之畸胎瘤，當畸胎瘤大小到達  $50-100 \text{ mm}^3$  時，將畸胎瘤從動物取出並進行組織切片之分析。經由病理切片之分析，在畸胎瘤之切片中，我們可觀察到多種細胞形態，同時存在於畸胎瘤中，其中應包含有代表內、中、外三胚層之細胞形態 (圖四 C-E) (如神經或皮膚細胞—代表外胚層，胰、肝臟或腸胃道，腺體細胞—代表內胚層細胞，及如肌肉、血液或骨髓細胞—代表中胚層細胞) 20,21。



圖四、畸胎瘤 (teratoma) 形成之活體全能分化潛力鑑定。A 及 B 圖顯示小鼠胚胎幹細胞在注射進入 SCID/BEIGE 老鼠之後腿肌肉 8 週後形成畸胎瘤之情形。C-D 圖經由組織染色分析，顯示人類胚胎幹細胞形成之畸胎瘤中包含有外胚層之表皮組織 (C)、中胚層之硬骨組織 (D)、及內胚層之消化道組織 (E)。

#### B. 類胚體之細胞形成－實驗室環境之全能細胞分化測定。

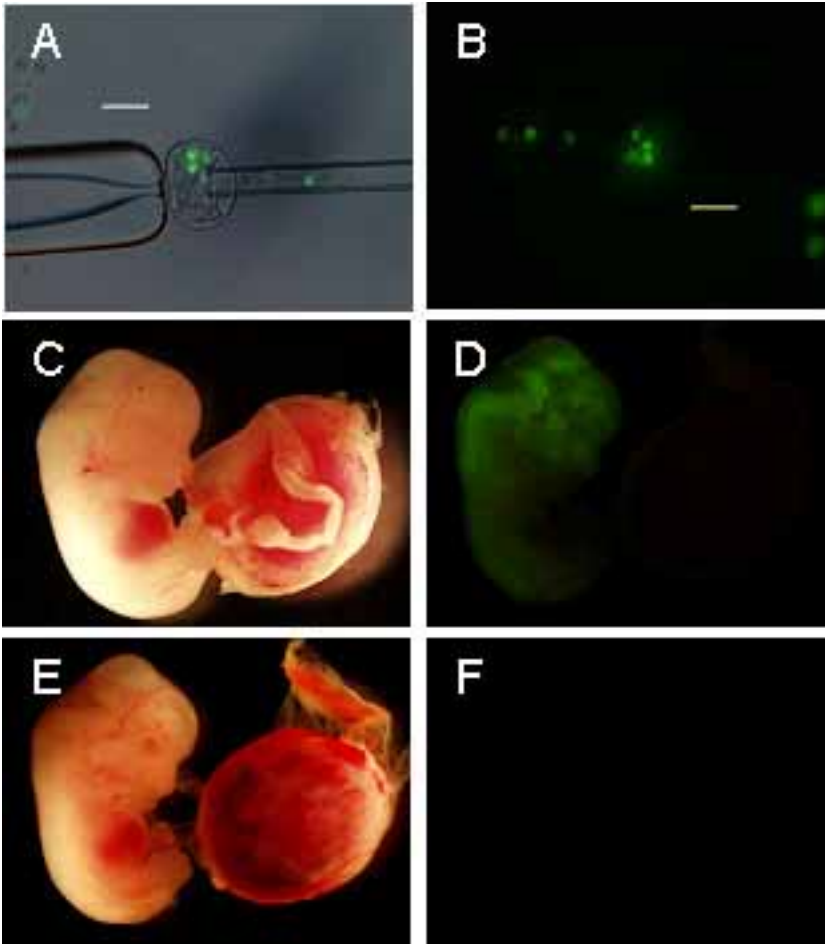
胚胎幹細胞之自發性分化可經由胚胎幹細胞之懸浮培養 (suspension culture) 及類胚體 (embryoid bodies) 之形成而達成<sup>22</sup>，多種之細胞型態如神經細胞 (neural cells)、心肌細胞 (cardiomyocytes)、內胚層細胞 (endoderm cells)，如肝及胰細胞和表皮細胞 (epithelia) 均可在類胚體中被偵測到<sup>23-29</sup>。目前對於胚胎幹細胞分化為特定體細胞之型態，有多種之方法 (請參考其他章節)。但一般而言，均需使胚胎幹細胞脫離原有之培養環境，如剔除 MEF 或 Leukemia inhibitory factor (LIF 小鼠胚胎幹細胞) 之影響然後形成 EB，或者直接將胚胎幹細胞與特定之細胞及胞外基質 (extracellular matrices) 進行共同培養，均會誘導胚胎幹細胞進行自發性分化。

對於此項分析之重點，應是在鑑定是否可在胚胎幹細胞自發性分化細胞中偵測出代表內、中、外三胚層之分化細胞，其偵測方法通常包括對特殊細胞如外胚層之神經，或皮膚細胞，中胚層之肌肉、骨骼細胞及內胚層之肝、胰細胞進行特定標誌物之免疫螢光化學物分析，或特定基因表達之 RT-PCR 分析，當然對各項特定細胞之精密鑑定，均有其特定之方法<sup>23-29</sup> (請參照其他章節)。

#### C. 鑲嵌體形成 (chimera formation)

鑲嵌體形成之分析是目前有關胚胎幹細胞全能分化潛力最有效而直接之驗證方法，然而由於倫理之考量此分析方法只能應用在有關動物胚胎幹細胞之全能分化潛力驗證，而無法使用於人類胚胎幹細胞全能分化潛力驗證，進行此項分析時通常是在顯微操作器 (micromanipulator) 的幫忙下將胚胎幹細胞打入 3.5 天大的囊胚 (blastocysts) (圖五 A-B) 中<sup>30</sup> 或者將桑椹胚時期之胚胎和胚胎幹細胞進行聚合形成聚合體 (aggregates)<sup>31</sup>，若胚胎幹細胞的來源為黑毛之小鼠 (如 B6) 則將其注射進有白毛來源 (如 strain 129) 之胚胎中，反之亦然。在胚胎移植至代理孕母鼠後，並讓此鑲嵌胎兒出生後，如打入之胚胎幹細胞具有好的分化潛力，即可觀察到此鑲嵌小鼠具有黑白毛色混雜之情形，如胚胎幹細胞具有極高之

鑲嵌率時，此細胞株即可判定為優良之細胞株，反之，則非具有高度發育潛力之細胞株。通常，優良之細胞株不但能貢獻至各種不同體組織及器官（圖五 C-F），其亦能分佈至各項組織而生長成成熟之配子，如卵子及精子，因此可被有效利用於生產轉殖基因鼠。



圖五、以鑲嵌體形成分析小鼠胚胎幹細胞全能分化潛力。圖 A-B 顯示將表達綠色螢光蛋白之小鼠胚胎幹細胞經由顯微操作器打入 3.5 天大的囊胚 (blastocysts) 中。圖 C-D 顯示具有高鑲嵌率之小鼠胚胎幹細胞在鑲嵌胎兒中之高度貢獻。圖 E-F 顯示具有低或無鑲嵌能力之小鼠胚胎幹細胞在鑲嵌胎兒中之分佈情形。

## 五、細胞遺傳分析 (cytogenetic analysis)

細胞遺傳之分析，在目前有關胚胎幹細胞之鑑定程序中扮演一個重要之角色，雖然前述有關分化潛力及標定物之表達測試已足夠用以鑒定胚胎幹細胞之身分，然而，當一胚胎幹細胞具有不正常之遺傳組成時，卻會影響細胞株使用者對該細胞株應用之考量，因此在分離新細胞株或細胞株經長期培養後，適當的染色體分析及監測是必要的。目前對於細胞遺傳分析，有不同之方法，從傳統之 G-banding 分析到 CGH (comparative genome hybridization) 或 SKY (spectral karyotyping) 均是可供選擇的方法，然其各有優缺點，G-banding 可提供快速且便宜之染色體檢定，然其所能偵測之異常型態有其限制，雖然 CGH 及 SKY 可提供較高解析度之分析，但其檢測所需之費用高昂，並不是一般實驗室可容易進行之選項，因此，目前較常用之方法仍是 G-banding 之分析。

## 六、結語

以上簡單的提供有關胚胎幹細胞鑑定之介紹及方法，以提供各位讀者在面對胚細胞之領域知識時相關之參考知識，雖然在本文中，我們歸納了幾個有關目前胚幹細胞鑑定之基本程序，但各位讀者必須明瞭，在本文撰寫時，國際上並無一特定之胚胎幹細胞鑑定標準以供參考，個人相信，隨著科技的日新月異及相關研究之進展，日後，必定有更精密而標準化之鑑定程序以供各研究人員參考。

## 七、參考文獻

1. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145–1147 (1998).
2. Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. & Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* **18**:399–404 (2000).
3. Xu, C. Characterization and evaluation of human embryonic stem cells. *Methods in Enzymology* **420**:18-37 (2006).
4. Hoffman, L. M. & Carpenter, M. K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**:699–708 (2005).
5. James, D., Levine, A. J., Besser, D. & Hemmati-Brivanlou, A. TGF $\beta$ /activin/ nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* **132**:273–1282 (2005).
6. Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R. A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* **118**:4495–4509 (2005).
7. Vallier, L., Reynolds, D. & Pedersen, R. A. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev. Biol.* **275**:403–421 (2004).
8. Amit, M. & Itskovitz-Eldor, J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J. Anat.* **200**:225–232 (2002).
9. Henderson, J. K., Draper, J. S., Baillie, H. S., Fishel, S., Thomson, J. A., Moore, H. & Andrews, P. W. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* **20**:329–337 (2002).
10. Badcock, G., Pigott, C., Goepel, J. & Andrews, P. W. The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1–60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan. *Cancer Res.* **59**:4715–4719 (1999).
11. Draper, J. S., Pigott, C., Thomson, J. A. & Andrews, P.W. Surface antigens of human embryonic stem cells: Changes upon differentiation in culture. *J. Anat.* **200**:249–258 (2002).
12. Sperger, J. M., Chen, X., Draper, J. S., Antosiewicz, J. E., Chon, C. H., Jones, S. B., Brooks, J. D., Andrews, P. W., Brown, P. O. & Thomson, J. A. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*



**100**:13350–13355 (2003).

13. Brandenberger, R., Khrebtukova, I., Thies, R. S., Miura, T., Jingli, C., Puri, R., Vasicek, T., Lebkowski, J. & Rao, M. MPSS profiling of human embryonic stem cells. *BMCDev. Biol.* **4**:10 (2004a).
14. Abeyta, M. J., Clark, A. T., Rodriguez, R. T., Bodnar, M. S., Pera, R. A. & Firpo, M. T. Unique gene expression signatures of independently-derived human embryonic stem cell lines. *Hum. Mol. Genet.* **13**:601–608 (2004).
15. Brandenberger, R., Wei, H., Zhang, S., Lei, S., Murage, J., Fisk, G. J., Li, Y., Xu, C., Fang, R., Guegler, K., Rao, M. S., Mandalam, R., Lebkowski, J. & Stanton, L. W. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nat. Biotechnol.* **22**:707–716 (2004b).
16. Bhattacharya, B., Miura, T., Brandenberger, R., Mejido, J., Luo, Y., Yang, A. X., Joshi, B. H., Ginis, I., Thies, R. S., Amit, M., Lyons, I., Condie, B. G., Itskovitz-Eldor, J., Rao, M. S. & Puri, R. K. Gene expression in human embryonic stem cell lines: Unique molecular signature. *Blood*. **103**:2956–2964 (2004).
17. Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Joenisch, R. & Young, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**: 947–956 (2005).
18. Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M. S. & Niwa, H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **9**(6):625-35 (2007).
19. Niwa, H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* **134**(4):635-46 (2007).
20. Pryzborski, S. A. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells* **23**(9):1242-50 (2005).
21. Asano, T., Sasaki, K., Kitano, Y., Terao, K. & Hanazono, Y. In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* **329**:459-67 (2006).
22. Odorico, J. S., Kaufman, D. S. & Thomson, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* **19**:193–204 (2001).
23. Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K. L. & Tzukerman, M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes.* **50**:1691–1697 (2001).
24. Draper, J. S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H. D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T. P., Thomson, J. A. & Andrews, P.W. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **22**:53–54 (2004).
25. Mummery, C., Ward, D., van den Brink, C. E., Bird, S. D., Doevendans, P. A., Opthof, T., Brutel de la Riviere, A., Tertoolen, L., van der Heyden, M. & Pera, M. Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J. Anat.* **200**:233–242 (2002).
26. Nistor, I. G., Totoiu, M. O., Haque, N., Carpenter, M. K. & Keirstead, H. S. Human embryonic

stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia*. **29**:385–396 (2003).

27. Rambhatla, L., Chiu, C. P., Kundu, P., Peng, Y. & Carpenter, M. K. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* **12**:1–11 (2003).
28. Xu, C., Police, S., Rao, N. & Carpenter, M. K. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ. Res.* **91**:501–508 (2002).
29. Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O. & Thomson, J. A. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **19**:1129–1133 (2001).
30. Bryja, V., Bonilla, S. & Arenas, E. Derivation of mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc.* **1**(4):2082-7 (2006).
31. Eakin, G. S. & Hadjantonakis, A. K. Production of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos. *Nat Protoc.* **1**(3):1145-53 (2006).



## 第三章

### 胚幹細胞體外培養與定向誘導分化

# Cultivation and Differentiation of Embryonic Stem Cells

沈家寧 林宇星 張曉旻 陳志龍 簡皎芸

中央研究院 基因體研究中心

## 一、前言

幹細胞 (stem cells)，是屬於發育初期的原始細胞，它之所以廣受矚目在於能夠自我更新，並且具有分化 (differentiation) 成為各式各樣細胞的潛力。早在 19 世紀末，人們在研究海膽的胚胎發育時，就發現早期的胚胎細胞具有很大的潛力，能分化生成海膽各式各樣的細胞，當時這些細胞被稱做「未決定」細胞。隨著生物學的發展，科學家發現這些發育初期的原始細胞是各種細胞的發源之幹，因此就稱這些原始細胞為幹細胞<sup>1</sup>。近年來，科學家發現幹細胞不僅存在於早期的胚胎中，也可以在許多的組織中找到，因此把從早期胚胎分離出來的幹細胞命名為胚幹細胞 (embryonic stem cells)，而從皮膚、骨髓、臍帶血、角膜等成體組織所得到的幹細胞，就稱為成體幹細胞 (adult stem cells) 或體幹細胞 (somatic stem cells)。

目前研究發現大部分從組織分離出來的幹細胞，只能變成有限的幾種組織細胞；但是從早期發育的囊胚所分離出來的胚幹細胞就是所謂的多潛能幹細胞 (pluripotent stem cells)<sup>2</sup>，能夠分化成為各式各樣的細胞。這些細胞在體外與纖維母細胞共同培養之後，能「長生不老地」在體外不斷增生，同時長期維持多潛能分化的特性及正常的遺傳組成；相反地，在體外培養時施以適當的誘導條件下，多潛能胚幹細胞就能夠分化成三胚層及生殖細胞，進一步地這些幹細胞若移植至實驗動物體內，可以分化成多種器官組織細胞，例如最近發現顯示胚幹細胞可以分化成為神經細胞，並且在移植到神經損傷的小鼠後，可以產生新的神經細胞以修復小鼠腦部組織的損傷，顯示幹細胞可以應用在修復人類受損的組織和治療棘手的退化性疾病上，未來並預期可應用在器官移植、新藥開發、基因療法、治療癌症等方面的發展<sup>2</sup>。

## 二、體外培養胚幹細胞

### 1. 什麼是胚幹細胞

在胚胎發育過程中，受精卵 (zygote) 會經過卵裂 (cleavage)，即經歷二細胞時期 (two cell stage)、四細胞時期 (four cell stage)、八細胞時期 (eight cell stage) 再分化形成囊胚 (blastocyst)；在囊胚著床後 (postimplantation) 鼠胚會開始腔腸化 (gastrulation)，在腔

腸化時期上胚板細胞 (epiblast cell) 會分化形成三胚層 (three germ layer)，即外胚層 (ectoderm)、中胚層 (mesoderm)、內胚層 (endoderm)，最終會發育形成完整的個體。胚幹細胞主要的發現與分離培養的研究主要源自於畸胎瘤 (teratoma) 的研究中<sup>3</sup>，為了分析胚胎發育初期何種細胞可以形成畸胎瘤，在利用移植小鼠後產生畸胎瘤的方式，發現在胚胎第3.5天時，囊胚期的內細胞團 (inner cell mass, ICM) 可形成畸胎瘤。最早的小鼠胚幹細胞株在1981年由馬丁博士利用培養惡性胚胎瘤細胞的方法建立出來<sup>4</sup>，囊胚主要分成兩群細胞，外圍的胚胎滋養層 (trophectoderm) 以及內部的內細胞團。在囊胚未著床前，可將內細胞團分離出來，在體外與胚胎纖維母細胞 (embryonic fibroblast) 共同培養後成為具有近乎無限增殖能力的細胞株，維持自我更新 (self-renewal) 狀態。鼠胚幹細胞在體外適當培養之後，可植入囊胚產生嵌合鼠 (chimera mice)，而胚幹細胞可發育成包括生殖細胞在內的所有體細胞，因此美國科學家卡佩奇 (Mario R. Capecchi)、史密西斯 (Oliver Smithies) 及英國科學家艾萬斯 (Martin J. Evans) 等人就利用老鼠胚幹細胞的能形成嵌合鼠特性，發展基因剔除技術 (gene knock-out) 得2007年的諾貝爾醫學獎。雖然在1981年小鼠胚幹細胞株就培養建立出來，但一直到1998年美國科學家湯姆森 (James Thomson) 才首次建立人類的胚幹細胞。在體外培養胚幹細胞株，最重要的就是維持其多潛能分化特性 (pluripotency)，具體的說，即維持胚幹細胞株具有分化成三胚層細胞的能力。雖然分離人類的胚幹細胞的方式與早年馬丁博士的方法類似，但最近研究報告指出，小鼠胚幹細胞與人類胚幹細胞的基因表現有極大的差異，某些基因的表現量從相差2倍到50倍不等<sup>5</sup>，顯示在人類胚幹細胞的培養上必須利用不同的因子來達成維持多潛能分化特性。

## 2. 調節胚幹細胞自我更新的因子與多潛能分化特性的維持

因為胚幹細胞具有多潛能分化特性，所以如何經由不同的訊息傳遞路徑，來調控胚幹細胞的多潛能性，是非常重要的。胚幹細胞欲維持不分化的狀態同時又必須進行自我更新的過程，致使胚幹細胞有不同於分化細胞的特有的轉錄因子，由這些分子間的交互作用及訊息傳導，來維持胚幹細胞的特性，以下將區分成胚幹細胞本身的轉錄因子 (transcription factor) 及外部的自我更新調控因子分別來說明：

### (a) 調節胚幹細胞自我更新與多潛能分化特性的轉錄因子

目前對胚幹細胞的研究發現有一些特定轉錄因子參與調控胚幹細胞多潛能性及自我更新的特性。這些轉錄因子包括 Oct-4、Nanog、Sox-2 及 FoxD3 等。在轉錄調控方面，Oct-4 及 Sox2 扮演重要的樞紐角色，Oct-4 是具有 POU domain 的一類轉錄蛋白，Oct-4 能抑制胚胎滋養層細胞之分化，並藉由辨認與結合啟動子 (promoter) 上 AGTCAAAT 等 8 個特定核苷酸的重覆序列，與具有 HMG box 的 Sox2 結合，同時調控胚幹細胞主要的自我更新基因如 FGF4，藉以維持細胞的多能性<sup>6</sup>；另一個重要的轉錄因子 Nanog，則具有 homeobox domain，Nanog 表現則可抑制胚幹細胞之分化與內胚層細胞之發育<sup>6</sup>；此外研究也發現缺乏 FoxD3 基因的小鼠胚胎存活率很低，同時發現在胚胎發育的過程中，如果缺乏 FoxD3 基因，就無法維持幹細胞在最原始未分化的狀態<sup>6</sup>。進一步最近日本京都大學的山中教授 (Shinya Yamanaka) 的研究發現，將四個與「調控胚幹細胞特性」有關的轉錄因子-Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4，送入纖維母細胞，就可

以使成年小鼠皮膚纖維細胞具有多潛能分化的幹細胞特性<sup>7,8</sup>。

### (b) 調節胚幹細胞自我更新與多潛能分化特性的環境訊息傳遞因子

在 1988 年威廉博士 (Williams RL) 的團隊發現在體外培養小鼠胚幹細胞，白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 在維持其多潛能分化特性上，扮演十分重要的角色<sup>9,10</sup>；LIF 會經由與細胞激素受體 gp130 與其受體 (LIF receptor, LIFR) 結合活化下游的訊息傳遞途徑 JAK/STAT 及 ERK 來維持小鼠胚幹細胞的特性。一方面，LIF 藉同時與 gp130 與 LIFR 等 2 個穿膜蛋白結合，活化細胞內 JAK/STAT 的訊號傳導 (signal transduction)，以控制自我更新基因的活化；另一方面，gp130 的 SH2 domain 自動磷酸化會引發 Grb2-SOS 聚集活化造成 ERK 磷酸化，並啟動增生與分化的基因，因此 LIF 的訊息傳導同時具有調控自我更新基因與分化基因的雙重角色，所以 JAK/STAT 及 ERK 訊息傳導路徑之間的平衡，對於維持小鼠胚幹細胞的自我更新相當重要。但相較於小鼠胚幹細胞，LIF 所誘導的 JAK/STAT 訊息傳遞途徑，在維持靈長類胚幹細胞的多潛能分化特性上並不重要<sup>11,12</sup>，人類胚幹細胞雖然也具有相同的訊號傳導，但是 LIF 所活化的因子卻不足以維持其自我更新的能力。

相反的 Wnt/ $\beta$ -catenin 的訊息傳遞途徑，在維持胚幹細胞的多潛能分化特性上，不論對小鼠胚幹細胞或靈長類 (包括人類) 的胚幹細胞，都扮演了十分重要的角色；2004 年的文獻指出，Wnt 在小鼠胚胎幹細胞和人類胚幹細胞，可經由抑制 GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3b) 來活化/ $\beta$ -catenin，而能有效的維持胚幹細胞處於未分化的狀態<sup>13</sup>。Wnt 是一種富含半胱氨酸的醣蛋白與其受體 Frizzled (Frz) 的結合會活化 Dishevelled (Dsh)，進而抑制 GSK3 $\beta$ -APC-Axin 複合物的活性，使得  $\beta$ -catenin 不會被分解而有機會進入核內進行基因轉錄。所以當 Wnt/ $\beta$ -catenin 的訊息傳遞途徑被活化時，可使小鼠胚幹細胞與人類胚幹細胞即使在無滋養層細胞的培養下，也能保持在不分化的狀態。除此之外，研究也發現 PI3K/Akt 訊息傳遞途徑的活化也會抑制 GSK3 $\beta$  的活性，同時使  $\beta$ -catenin 不會被分解，而有機會進入核內進行基因轉錄，在調控胚幹細胞自我更新的研究中發現，PI3K/Akt 訊息傳遞途徑不單可以調控胚幹細胞的生長 (proliferation)，如果在 PI3K/Akt 訊息傳遞途徑被抑制時，Nanog 基因的表現也會降低並影響到胚幹細胞的自我更新，相反地，如果將持續活化態的 Akt 送入胚幹細胞，發現這將足以維持胚幹細胞的多潛能分化特性<sup>14,15</sup>。

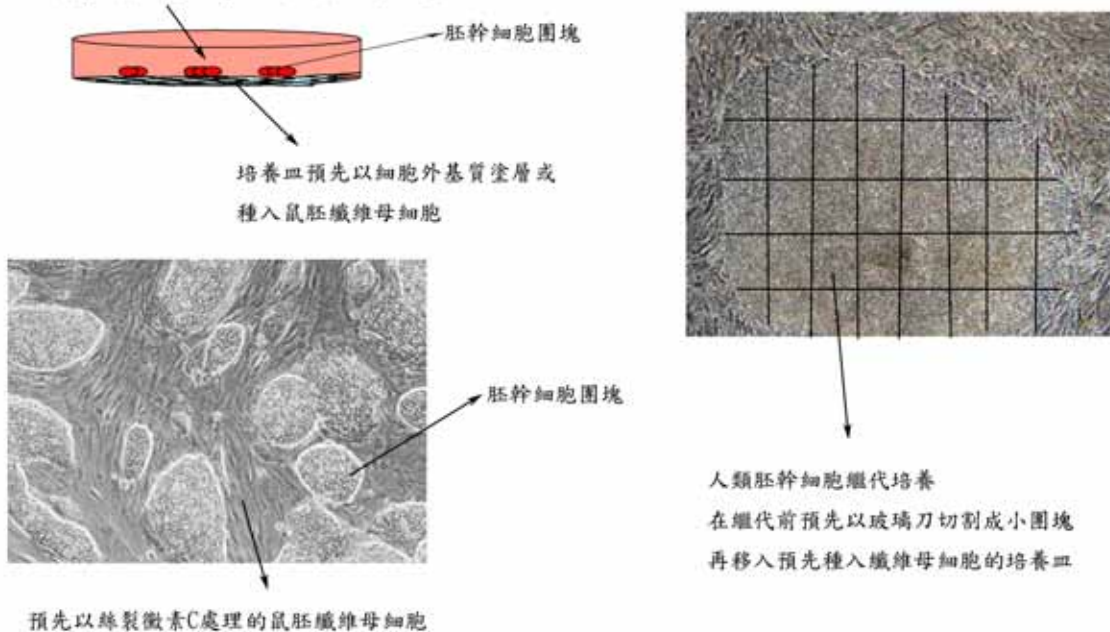
另外，研究也發現鹼性纖維母細胞生長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、乙型腫瘤生長因子 (tumor growth factor  $\beta$ , TGF  $\beta$ )、Nodal、骨形態發生蛋白 (bone morphogenesis protein, BMP) 等訊息傳遞因子也參與維持胚幹細胞的多潛能分化特性。如 bFGF 在培養人類胚胎幹細胞常用的添加物，一般認為 bFGF 可活化 PI3K/Akt 訊號傳導維持胚胎幹細胞的自我更新，在培養液中移除 bFGF 會使得 Oct-4 表現量降低，而使得人類胚胎幹細胞開始分化<sup>16</sup>。而 TGF  $\beta$  透過 Smad2/3 的磷酸化活化來控制下游基因轉錄，如果抑制 Smad2/3 磷酸化會使得人類胚幹細胞減少自我更新的能力，並造成 Oct-4 的表現量降低<sup>17</sup>。Nodal 對於脊椎動物左右對稱性 (left-right axis) 與中胚層及內胚層組織的形成相當重要，藉由第一型 (ALK4/7) 與第二型 Activin 受器結合，活化 Smad2/3 媒介的訊號傳導，實驗證實小鼠與人類胚幹細胞均具有高量 Nodal 表現

<sup>17,18</sup>，當胚幹細胞分化時，Nodal 的表現量即減低，顯示 Nodal 與自我更新的相關性。而在小鼠胚幹細胞培養中，BMP 也是不可或缺的調控因子 <sup>19</sup>，BMP 透過其受體 BMPR1a、1b 與 BMPR2 造成 Smad1/5/8 與 Smad4 磷酸化來傳遞訊息，以參與調控胚幹細胞的多潛能分化特性；但是相反地在人類胚幹細胞培養中，加入 BMP 卻會促使 Nanog 與 Oct-4 表現量減低，進而造成人類胚幹細胞分化 <sup>6,16</sup>。

### 3. 體外培養胚幹細胞

因為胚幹細胞具有多潛能分化特性，所以在培養胚幹細胞之前，基本上必須了解如何經由不同的訊息傳遞路徑，來調控胚幹細胞的多潛能分化特性並維持細胞的增生與自我更新，胚幹細胞欲維持不分化的狀態，同時又必須進行自我更新的過程，致使胚幹細胞有不同於分化細胞的特有的轉錄因子，由這些分子間的交互作用及訊息傳導，來維持胚幹細胞的特性。目前鼠胚幹細胞株培養方法還是參照 1981 年由馬丁博士從培養惡性胚胎瘤細胞的經驗中所建立出來 <sup>4</sup>，在體外透過與胚胎纖維母細胞共同培養，來維持胚幹細胞自我更新狀態。小鼠胚胎幹細胞可以培養在經過絲裂黴素-C (mitomycin C) 處理或是照射 射線的胚胎纖維母細胞或 STO 細胞株上，所使用的小鼠胚胎纖維母細胞分離自 E13.5-E15.5 老鼠胚胎；最近的研究發現小鼠胚幹細胞也可以培養在無滋養層甚至無血清的條件下，透過在培養基添加 LIF、BMP 及 B27 等血清替代因子或培養皿預先以 Matrigel 或是膠原蛋白 (collagen) 等塗層處理下，使大部份小鼠胚幹細胞能自我更新，並保有其多潛能分化特性，(培養流程請參考圖一)。胚幹細胞繼代培養，通常利用酵素如膠原蛋白酶 (collagenase) 或胰蛋白酶 (trypsin) 處理後，使胚幹細胞團自滋養層脫落，並分解成較小的細胞團，移至新的培養皿繼續培養。

如 LIF(鼠胚幹細胞) 或 bFGF (人類胚幹細胞)



圖一、胚幹細胞培養在絲裂黴素 C 處理過的纖維母細胞上；繼代培養時需預先以玻璃刀將胚幹細胞切割成小團塊來培養 (圖：林宇星 (中央研究院基因體研究中心) 提供)

培養人類胚幹細胞的方式類似小鼠胚胎幹細胞，可以培養在經過絲裂黴素-C 處理或是照射 $\gamma$ 射線的鼠胚胎纖維母細胞或是人類纖維母細胞上（圖一），目前也發現 Hs-68、Detroit 551、STO 等纖維母細胞株也可以當作人類胚幹細胞滋養細胞<sup>20</sup>，與鼠胚幹細胞培養不同的是，透過在培養基添加 LIF 或 BMP 並不足以維持胚幹細胞自我更新狀態，並保有其多潛能分化特性；相反地可添加 bFGF 來維持不分化的狀態。然而現有人類胚幹細胞的培養和誘導分化，大都離不開動物源培養基，比如從實驗鼠身上分離出來的纖維母組織細胞和牛胚胎血清等。美國加州的科學家發現動物細胞中含有 N-羥乙酰神經氨酸的硅鋁酸（Neu5Gc），而這種物質在人類遺傳上是不能合成的。如果幹細胞被含有 N-羥乙酰神經氨酸的細胞污染，那麼將其植入人體後就很容易被人類免疫系統識別和攻擊，產生排斥反應<sup>21</sup>。此項研究引發了科學家對幹細胞安全性的擔憂，也讓人們對幹細胞療法的醫學前景充滿疑慮。因此研究人員嘗試發展無動物滋養層及無動物血清培養人類胚幹細胞的系統，添加的物質都是已知的重組蛋白及化合物，預期將可直接應用於醫學移植的用途，目前的缺點是花費太大，且培養液中需加入高濃度的生長激素，才足以維持人類幹細胞自我更新的狀態<sup>22-23</sup>。至於人類胚幹細胞繼代培養，研究發現如果用酵素分解細胞團塊容易造成細胞染色體異常，目前常用的方式還是利用玻璃刀將人類胚幹細胞團切割成小團塊之後在進行繼代培養，此方式不會有因酵素處理胚幹細胞許多代之後，產生染色體異常的情況，但缺點是效率比較不佳。

為鑑定胚幹細胞在培養後，是否維持在未分化的狀態並保有多潛能分化特性，一般可利用胚幹細胞未分化狀態所表現的分子標誌來鑑定，包括(a)鹼性磷酸酶(Alkaline Phosphatase)的活性 (b)Oct-4、Nanog、Sox2 等基因的表現，以及(c)階段特異性胚胎抗原(stages-specific embryonic antigen, SSEA)的表現來鑑定胚幹細胞是否處於未分化狀態（已知 SSEA1 為小鼠胚幹細胞特有的，而 SSEA2/3/4 為人類胚幹細胞特有的）。

### 三、定向誘導胚幹細胞分化

#### 1. 誘導胚幹細胞分化

相較於胚幹細胞在培養時，透過在培養基添加 LIF、BMP 及 Wnt 等因子或利用與胚胎纖維母細胞共同培養，來維持在未分化的狀態並保有多潛能分化特性；胚幹細胞在單獨培養且不添加 LIF、BMP 及 Wnt 等因子時，則會很容易地進行隨機的分化；因此為了有效率地誘導胚幹細胞分化，所以會讓胚幹細胞在懸浮的狀態下培養，在此狀態下培養的鼠胚幹細胞會形成球狀的胚胎小體（embryoid body），並逐漸分化出三胚層：分別為外胚層、中胚層及內胚層的前驅細胞（progenitor）<sup>24</sup>。此外要誘導胚幹細胞分化，也可以採用不經過胚胎小體的培育過程，直接將胚幹細胞培養在基質細胞（stromal cell）上，或是將胚幹細胞培養於細胞外基質（extracellular matrix）上，胚幹細胞會因不同的基質細胞，或是細胞外基質的影響，進而分化成各種不同的前驅細胞<sup>25</sup>。在利用不同的誘導方式下，胚幹細胞已發現至少可於體外分化成外胚層的表皮角質細胞系（keratinocyte lineage）、神經膠質前驅細胞（glial precursor）、多巴胺神經元（dopaminergic neuron）、中胚層的心肌細胞（cardiomyocyte）、內胚層的肝細胞（hepatocyte）等；進一步地研究都希望可以利用胚幹細胞的分化而來的組織細胞進行移植，用以治療了許多損壞性、功能障礙、退化性，或



是目前手術開刀無法治癒之疾病，因此如何定向誘導胚幹細胞分化，進而應用到人類的疾病治療上，是十分重要的課題。

## 2. 誘導胚幹細胞分化為外胚層神經細胞及皮膚細胞

### (a) 外胚層發育與相關因子調控

早期胚胎發育時期，外胚層細胞主要發育為神經系統以及皮膚上皮系統，外胚層細胞若未分化為表皮組織即分化為神經組織，在脊椎動物的囊胚時期，外胚層腹側主要形成表皮前驅細胞，背側主要誘發為神經前驅細胞，早期研究青蛙外胚層發育結果指出，若將背側與腹側外胚層取出作體外培養則兩者皆分化形成表皮，另一項在蠓蠟胚胎發育研究指出，若將與背側相鄰的間葉組織 (mesenchymal tissue) 細胞取出植入外胚層腹側，則使得原先即將分化成表皮的細胞轉而分化成神經細胞系，顯示外胚層的分化方向與其環境所釋放的因子息息相關<sup>26</sup>。

早期針對脊椎動物研究中發現，神經誘導主要來自於其周圍環境所釋放的訊息傳遞因子所調控，其中稱之為神經誘導因子包含 *noggin*、*folliculin*、*chordin* 等<sup>27-29</sup>，由背側中胚層細胞所分泌，並且可在體外培養的條件中誘導外胚層分化為神經細胞。另外亦有相關研究指出 *bFGF* 在神經誘導上亦扮演相當重要角色，在體外培養外胚層細胞中以含有 *bFGF* 的低鈣離子及鎂離子濃度的培養液中可誘導細胞分化具有神經活性<sup>30</sup>，另在缺乏功能的纖維母細胞生長因子受體蛋白 (*FGF receptor*) 的青蛙顯示在胚胎時期無法誘導神經的形成<sup>31</sup>，而 *bFGF* 亦參與調控特定神經細胞晚期分化的過程<sup>32</sup>。

*Wnt* 蛋白所主導的訊息傳遞在神經發育中亦扮演相當重要的角色，在 *Wnt* 與 *Frz* 受體結合後會促使  $\beta$ -catenin 進入細胞核中與其他蛋白結合形成複合體以調控下游基因表現。在早期神經管特化過程中，*Wnt* 蛋白會由前側至後側神經管 (anterior-posterior neural tube) 產生濃度梯度以調節相關區域分別產生前腦，後腦及脊椎神經，另也控制神經傳導中軸突 (axon)、樹突 (dendrite) 以及胞突接合 (synapse) 功能的調控<sup>33</sup>。在皮膚發育過程中，*Wnt* 訊息傳遞也控制皮膚中附屬器官毛髮的發育與成熟，若 *Wnt* 訊息下游的分子無法進行傳遞時，即造成毛髮無法形成<sup>34-35</sup>。

*BMP* 為屬於 *TGF- $\beta$*  家族中的一員，經由和 *BMP* 受體結合來啟動下游基因表現。根據研究指出，在胚胎早期 *BMP-4* 可抑制神經並誘導外胚層往上皮細胞 (epithelial cells) 分化<sup>36</sup>，當進入胚胎晚期，*BMP* 可協同其拮抗分子與 *Smad* 蛋白調節表皮與毛囊細胞的增生與分化。胚胎幹細胞體外誘導分化為外胚層組織所參與的訊息調控主要與胚胎發育過程相似，因此根據胚胎發育研究結果顯示參與調控的生長因子可有助於探討胚幹細胞以體外培養方式誘導出特定的細胞的可能性，而研究胚幹細胞分化過程的現象與參與的訊息調控也可助於了解胚胎發育過程中是經由哪些訊息調控來形成各種組織與器官。

### (b) 胚幹細胞體外誘導分化為外胚層組織

在正常的胚胎發育過程中，外胚層可分化成數種組織細胞，包含中樞神經細胞、周邊神經細胞、皮膚上皮細胞等，由近十年研究發展顯示可經由體外培養的方式成功誘導出許多特定的神經細胞以及皮膚角質細胞，以下就分成皮膚上皮細胞系以及神經細胞系

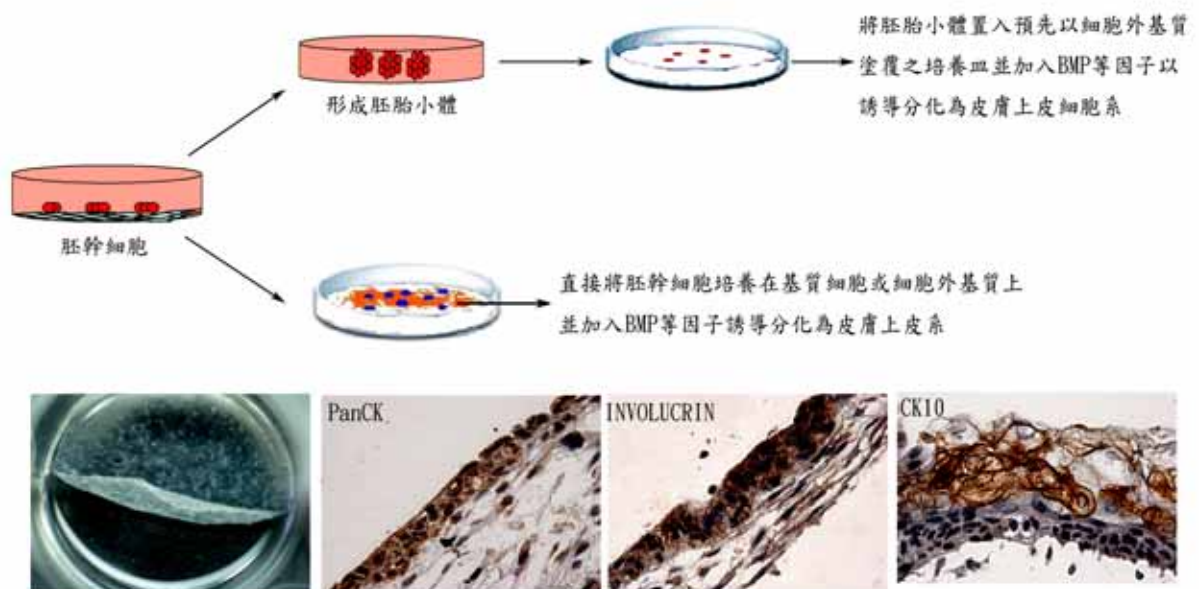
的分化來說明。

### (1) 胚幹細胞分化為皮膚上皮細胞系

在胚胎發育過程中，皮膚的形成須經由一連串與其相鄰的間質細胞訊息交換過程後，誘導器官發育 (organogenesis)，而此訊息交換過程稱為 epithelial-mesenchymal interaction (EMI)，因此在皮膚上皮細胞系的研究中，主要利用皮膚纖維母細胞提供皮膚上皮組織發育所需的生長因子，或利用塗覆有不同細胞外基質的培養盤，並在培養液中加入相關生長因子來誘導胚幹細胞分化成皮膚角質細胞，再經由鑑定細胞是否表現特定細胞角質素 (cytokeratin) 如 CK10 以及 involucrin 來判斷作為胚幹細胞是否分化為表皮細胞。在近幾年關於胚幹細胞誘導成表皮細胞的方法主要有兩種：

(i) 利用細胞分泌的細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 來誘導胚幹細胞分化：將人類纖維母細胞先培養於培養盤上，待長滿後以 EGTA/EDTA 溶液將纖維母細胞除去，則培養盤即存在纖維母細胞所分泌的細胞外基質，此時再將胚幹細胞培養於此培養盤上，於培養液中加入 BMP-4 或維生素 C，可偵測到將近 10% 的細胞表現細胞角質素 CK14，將上述得到的細胞收集，轉而養在塗覆有膠原蛋白的表面上，並以氣體-液體介面 (air-liquid interface) 培養系統使培養的角質細胞下方接觸培養液，上方則與空氣接觸，可分化成複層結構，分析其型態構造類似正常胚胎發育中的皮膚，此外這些分層的細胞中亦表現分化成熟的角質素蛋白，而基底細胞表現纖維母細胞的細胞標誌，證明胚幹細胞具有分化形成表皮移植物的潛力<sup>37</sup>。

(ii) 先是胚幹細胞培養成胚胎小體後，使胚胎小體貼附培養於塗覆有細胞外基質的培養盤上，即可誘導細胞分化為皮膚上皮細胞<sup>38</sup>，表現細胞角質素 CK8、14、17，並可更進一步分化表現成熟的細胞標誌細胞角質素 CK10、Involucrin、Filaggrin 等 (圖二)。



圖二、誘導鼠胚幹細胞分化為皮膚上皮細胞系的兩種方式，並組織染色分析細胞分化後的角質素蛋白表現情形 (圖：鄭凱文 (中央研究院基因體研究中心) 提供)

## (2) 胚幹細胞分化為神經細胞系

另一項重要的胚幹細胞分化研究方向為胚幹細胞分化為神經細胞系，這將可以應用在一些神經退化性疾病治療上，近十年來已有多項研究方法證實能將胚幹細胞誘導分化為神經外胚層細胞，包含以下由不同研究團體所發表的培養條件：

(i) 將胚幹細胞懸浮培養四天形成胚胎小體後，以含有維甲酸 (retinoic acid) 培養液誘導四天，再使胚胎小體貼附培養數天後，即可得到表現 TuJ 以及 neurofilament 的神經細胞<sup>39</sup>。

(ii) 胚胎小體先培養在含有血清的培養液並使之貼附於培養盤 24 小時後，轉而培養於不含血清的環境中 6-8 天後可分化為神經前驅細胞<sup>40</sup>。

(iii) 直接將胚幹細胞培養於不含滋養細胞、不含血清的培養液來誘導分化胚幹細胞，數天後約大於 60% 細胞表現胚胎早期神經外胚層的細胞標誌 Sox1<sup>41</sup>。

(iv) 將胚幹細胞與 PA6 基質細胞共同培養，加入不含血清的培養液，結果顯示大於 90% 的細胞群落表現 TuJ<sup>42</sup>。

由以上方法可誘導部分胚幹細胞分化為神經外胚層，而近幾年來則有許多研究可更進一步分化出某些特定的神經細胞，例如中樞神經中三種主要的神經細胞種類：神經元 (neuron)、星狀細胞 (astrocyte)，寡突細胞 (oligodendrocyte)，經由適當環境的誘導可產生分離出高純度特定的神經細胞<sup>40,43</sup>，除上述例子以外，另有研究結果指出，在胚胎小體的培養系統中使細胞過度表現轉錄調節因子 Nurr1 (nuclear-receptor-related factor 1)，並於培養環境中加入 SHH (sonic hedgehog) 以及 FGF8 (fibroblast growth factor-8) 可產生中腦多巴胺神經元<sup>44</sup>，顯示早期胚胎發育時，此種神經的形成即需要 SHH、FGF8、Nurr1 的調控<sup>45,46</sup>。若將胚幹細胞與 MS5 基質細胞共同培養，加入不同的細胞激素則可刺激其它神經細胞的分化，包括膽鹼性神經元 (cholinergic neuron)、血清素神經元 (serotonergic neuron) 等<sup>43</sup>。

除了成功誘導特定神經細胞分化之外，亦有些研究顯示這些從胚幹細胞分化而來的神經細胞具有治療一些神經退化性疾病的功效，其中巴金森氏症為相當重要的一種神經退化性疾病，在大鼠模式的研究中證實，由胚幹細胞誘導分化的多巴胺神經元在移植回大鼠身上後仍可存活，並產生功能性的突觸以及電生理特性，若移植以 Nurr1 過度表現的細胞顯示在動物身上有更好的治療效果<sup>44</sup>。另也有研究指出，將胚幹細胞誘導成神經細胞、星狀細胞、寡突細胞後移植入大鼠腦中，植入細胞可遷移到終腦、間腦以及中腦的區域<sup>47</sup>；若將寡突細胞植入因髓鞘缺損造成多發性硬化的大鼠脊椎中，植入的細胞可在脊椎形成髓鞘<sup>48</sup>，顯示胚幹細胞在將來有機會可應用在移植修復缺損神經的細胞來源。

## 3. 誘導胚幹細胞分化為中胚層血液細胞及心肌細胞

### (a) 中胚層發育與相關調控因子

胚胎發育經由腔腸化時期開始形成中胚層。中胚層形成後會分化成為造血細胞 (hematopoietic cells)、成骨細胞 (osteocyte)、血管內皮細胞 (vascular endothelial cells)、肌肉細胞 (muscle cells) 等，這些細胞組成了體內的循環系統。細胞外基質與參與細胞訊息傳遞的分子如 TGF- $\beta$ 、BMP4 以及 Wnt 蛋白皆參與了胚胎分化成中胚層

的過程，當  $\beta 1$ -integrin 被剔除時，胚胎發育至第 5.5 天時死亡<sup>49</sup>，此時胚胎的中胚層發育延遲且不全，神經外胚層發育加快，其中 BMP-4 基因表現降低而 Wnt-1 表現量增加。BMP-4 是調控中胚層形成的重要基因，缺乏 BMP-4 或加入 noggin 會抑制中胚層形成或抑制分化為心肌細胞。

### (b) 胚幹細胞體外誘導分化為中胚層組織

在探討基因在細胞分化過程中的功能時，我們通常採用兩種方法：(1) 減少基因表現 (lose-of-function)；(2) 增加基因表現 (gain-of-function)。主要是因為基因表現的些許差異便會影響胚胎發育，藉由這些差異我們可以了解基因在分化過程中的功能，但是由於胚胎內特定細胞數很少因此在研究基因與專一細胞分化的過程較困難。在此胚胎幹細胞提供了解決方法，由於胚幹細胞具有分化為原始三胚層的能力，細胞數目眾多，因此可用來研究胚胎時期時各因子在細胞分化過程中所扮演角色，但是利用胚幹細胞研究中胚層的發育，是否能真實的反應出胚胎中胚層的發育呢？以胚幹細胞分化為血液細胞為例，胚幹細胞形成胚胎小體約四天後開始出現原始紅血球細胞，之後陸續出現巨噬細胞 (macrophage) 與肥大細胞 (mast cells)，顯示胚幹細胞分化過程中細胞分化的順序與胚胎發育早期造血系統的順序相似<sup>50</sup>。胚幹細胞在體外分化為內皮細胞的過程與胚胎內皮細胞出現順序相似，在胚小體形成後第三天開始表現 FLK1，第四天表現 PECAM、tie-2，第五天表現 VE-cadherin、tie-1<sup>51</sup>。胚幹細胞在體外分化為肌肉細胞的過程，基因表現的順序為 Myf5→myogenin→myoD→myf6，基因出現的模式與胚胎相同，例如 Myf5 出現在單核的肌母細胞 (myoblast)，myoD 出現在多核的肌肉細胞。除此之外，在誘導分化的過程中可成功的分化成骨骼肌肉細胞與具有律動的心肌細胞<sup>52</sup>，這些結果說明利用胚幹細胞研究細胞發育可以獲得胚胎發育相似的結果。

在正常的胚胎發育過程中，中胚層可分化成數種組織，包含血液及淋巴細胞、肌肉組織與血管組織等，由近十年研究發展顯示可經由體外培養的方式成功誘導胚幹細胞出許多特定的血液細胞以及心肌細胞，以下就此進一步來說明。

#### (1) 胚幹細胞分化為血液細胞系

以小鼠為例，血液細胞最早出現於小鼠胚胎時期 7.5 天，在卵黃囊內的血島區域發現具有細胞核的原始紅血球細胞 (primitive erythrocytes) 以及巨噬細胞<sup>5</sup>，此時期的細胞不具有造血幹細胞的功能，因為將這個時期的血液細胞進行體內移植並無法重建長期造血系統，而真正的造血幹細胞被發現在胚胎第十天於胚胎 AGM (aorta, gonads and mesonephroi) 區域，在胚胎時期第十一天時胎兒肝臟中也發現造血幹細胞，之後造血幹細胞在骨髓出現，出生後漸由骨髓負責產生血液細胞<sup>54</sup>。

胚幹細胞可以分化為許多種血液細胞，例如；紅血球細胞、巨噬細胞、T 細胞、B 細胞與漿細胞等。胚幹細胞形成胚胎小體約四天後開始分化形成原始紅血球細胞，之後陸續分化成為巨噬細胞與肥大細胞<sup>50</sup>；如將胚幹細胞與基質細胞 OP9 細胞株共同培養後可以促使胚幹細胞在分化的早期階段產生 NK 細胞 (natural killer cell) 與 B 細胞。進一步地如果在 OP9 細胞株表達 Delta-1，被誘導分化的條件和胸腺環境相似，因此透過活化 Notch 之後胚幹細胞可分化為 T 細胞，藉由這些

分化的過程我們可以研究各種基因在細胞分化過程中的功能，並觀察細胞分化的順序<sup>55-56</sup>，例如：GATA-1<sup>-/-</sup>的胚幹細胞無法分化成為紅血球細胞，但仍可分化為其他血球細胞，顯示 GATA-1 的功能是參與調控紅血球的發育過程；此外利用中胚層特定表現的基因 brachyury 以及內皮前驅細胞標記 flk-1 (VEGFR-2) 這兩個基因的表現可以清楚了解中胚層細胞分化成血液血管母細胞 (hemangioblast) 的過程，是由中胚層前驅細胞分化為血液血管中胚層，最後分化為血液血管母細胞<sup>57</sup>。

除了 GATA-1 之外，BMP-4、GATA-2、SCL 基因的功能也藉由胚胎幹細胞的研究而更為清楚。BMP-4 參與調節胚胎分化成為中胚層，BMP4<sup>-/-</sup>胚胎僅能存活至胚胎時期 6.5~9.5 天，其中最明顯的特徵便是缺乏中胚層的發育<sup>58</sup>，BMP4 訊息路徑活化 GATA2 的表現，而 GATA2 可以增加 Bmp4、Flk1 和 Scl 基因表現<sup>59</sup>。其中 SCL 參與血液血管母細胞分化為造血幹細胞 (hematopoietic stem cells) 與內皮前驅細胞 (endothelial progenitor) 的過程<sup>60</sup>，Scl<sup>-/-</sup> 胚幹細胞研究顯示仍然能分化為血液血管母細胞，因此推測 SCL 不參與早期血液血管母細胞的形成過程，已知 Scl<sup>-/-</sup>胚胎僅能存活至胚胎時期 9.5 天，這時期的胚胎在卵黃囊區域缺乏任何造血相關的細胞，此外亦缺乏血管新生的結構，顯示 SCL 參與血管形成，但造血相關基因如 GATA1、EKLF、PU.1 以及球蛋白等皆不表現<sup>61</sup>。

## (2) 胚幹細胞分化為心肌細胞

胚幹細胞分化為心肌細胞的過程中，心肌細胞會產生規率的收縮，因此是所有分化過程中最容易觀察的細胞，胚幹細胞理論上能分化成各種類型的細胞，但在實際操作時，通常僅有不到 1% 的胚幹細胞能分化為心肌細胞，因此克拉格博士曾嘗試用遺傳性篩擇 (genetic selection)，使胚幹細胞能大量分化為心肌細胞，然後用抗藥性篩選形成的心肌細胞，最後把這些細胞注入患有心臟病的小鼠心室肌內，發現足以使病鼠存活下來。其篩選效率可達 99.6%，相對於單獨使用細胞型態來分離只有 3.4% 來看，分離細胞的效率的確相當不錯<sup>62</sup>。此外在心肌分化過程中 Wnt 蛋白扮演重要的角色，由於 Wnt 的家族超過 17 個成員，藉由活化下游的對象  $\beta$ -catenin 或 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 來調節細胞生理。基本上 Wnt 的家族可分為兩群，其中 Wnt3a、Wnt8a 抑制下游 GSK3 $\beta$  藉此活化  $\beta$ -catenin 以調節分化為心肌的過程，基本目前認為 Wnt3a 在胚胎發育初期會促進中胚層形成，但在發育後期會抑制中胚層分化成心肌細胞<sup>63</sup>。而在不同的動物模式中抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 的訊息傳遞路徑，例如表現 Wnt 的抑制物 Dkk1 與 Crescent 於前側內胚層 (anterior endoderm) 而非心臟生成區域，能促進心肌的發育，另外添加 Wnt 則會抑制前側中胚層 (anterior mesoderm) 的心臟生成的區域的心肌形成<sup>64</sup>。另外，Wnt11 表現於早期中胚層中前驅心肌生成的區域 (precardiac region)，研究發現表現 Wnt11 於非心肌生成的區域可以促進心肌生成，也可以調控胚幹細胞分化為心肌<sup>65-66</sup>。

此外，TGF- $\beta$  家族中 Activin、BMP2 及 TGF- $\beta$ 2 皆會促進胚幹細胞分化為心肌細胞，例如在中胚層分化過程中，高濃度的 Activin 會促進分化為心肌細胞，相反地低濃度的 Activin 則會促進分化為造血與內皮細胞<sup>26</sup>，另外，如在胚幹細胞分化的前三天添加 BMP 的競爭抑制蛋白 Noggin，會增加中胚層的細胞並且增加 100 倍的心肌細胞生成；相反地，BMP-4 則會抑制中胚層分化為心肌細胞，因此可能當 Noggin 抑制 BMP-4 時會因

此阻斷造血細胞系的分化並促進細胞往心肌方面分化<sup>68</sup>。

#### 4. 誘導胚幹細胞分化為內胚層胰島細胞及肝臟細胞

##### (a) 內胚層發育與相關調控因子

為了能夠有效的分化胚幹細胞形成內胚層組織，清楚的了解體內訊息調控內胚層分化機制將是必要的。以小鼠模式為例，受精後 6.5 天，上胚板細胞經由腔腸化過程分化形成內胚層與中胚層<sup>69</sup>。內胚層的分化一開始主要由 Nodal 信號負責調控，研究顯示當加入 Activin/Nodal 的競爭性拮抗劑 antivin 時，內胚層的分化為完全消失<sup>70</sup>，而此外 Nodal 的訊息發現是藉由 VegT (Brachyury) 來調控，VegT 是屬於轉錄因子，除了可控制 Nodal 基因的表現外，還可直接活化其他內胚層的轉錄因子。Nodal 除了受到 VegT 的調控外，同時能活化並維持 VegT 的表現，兩者間具正向回饋機制而得以促進內胚層的分化；除了 Nodal 訊號參與內胚層的形成外，BMP 與 Wnt 等因子也參與內胚層的調控，但詳細的機制仍待進一步的研究。Foxa2、Gata4、Sox17、及 Mixl1 等轉錄因子亦已知參與內胚層的形成，常作為內胚層的標誌，主要是因為內胚層的基因表現在發育早期並不具有獨特性，如在腔內內胚層 (visceral endoderm) 同時也可能表現這些基因，因此並不易區分。內胚層發育形成身體各個重要器官，包含肺、肝、胃、胰與腸等，在目前胚幹細胞分化為內胚層組織領域的研究中，主要焦點在於分化胚幹細胞形成成熟的胰島 β 細胞與肝細胞，期待用以治療第一型糖尿病 (Type I Diabetes) 與急性肝臟受損 (acute liver failure) 等相關疾病。

##### (b) 胚幹細胞體外誘導分化為內胚層組織

###### (1) 胚幹細胞分化為胰島細胞系

胰臟發育是由一連串轉錄因子的調控所主導，例如 Pdx1 (pancreatic-duodenal homeobox 1) 是胰臟發育過程中最關鍵的基因，對於早期胰芽 (pancreatic bud) 的發育相當重要，約胚胎期 8.5 天即可測得 Pdx1 的表現<sup>71-72</sup>。隨著胰臟的分化與成熟，最後將僅侷限製造胰島素 (insulin) 的 β 細胞與多肽細胞表現 Pdx1<sup>73</sup>，實驗結果發現，在早期胰芽形成後，若抑制 Pdx1 基因的表現，會使得胰臟的發育停止，胚胎出生後將不具有胰臟，顯示 Pdx1 的表現對於早期胰臟發育調控是必要的<sup>74</sup>。同時，胰臟上皮細胞也會表現其他轉錄因子，包括 Hlx9, Hnf6, Ptf1a 與 Nkx6.1，對於胰臟的早期發育均扮演重要角色<sup>75</sup>。接下來胰臟的發育進展為內分泌細胞的特異化 (specification) 時期，轉錄因子 Neurogenin 3 (Ngn3) 會開始表現，以小鼠發育為例，Ngn3 於胚胎期第 9.5 天開始表現，直到第 15.5 天達到最高值<sup>76</sup>；藉由基因轉殖鼠的實驗結果發現 Ngn3 基因被剔除後，胰臟的內分泌組織發育將受到影響<sup>77</sup>；因此，Ngn3 的表現可視為內分泌前驅細胞的發生。接下來 Ngn3 會引發一連串轉錄因子的表現來調控內分泌細胞的分化，包括 Nkx2.2、NeuroD1、Pax4、Pax6，這些轉錄因子均參與調控胰幹細胞分化形成胰島的過程<sup>78</sup>。

2000 年索利亞博士成功地誘導胚幹細胞分化為胰島素製造細胞，所採用的方式是將含胰島素啟動子的載體送入分化中的胚幹細胞內，篩選帶有抗藥性基因表現的細胞，選擇穩定表現胰島素啟動子的細胞，將其移植入糖尿病老鼠體內，發現當這群細胞植入老

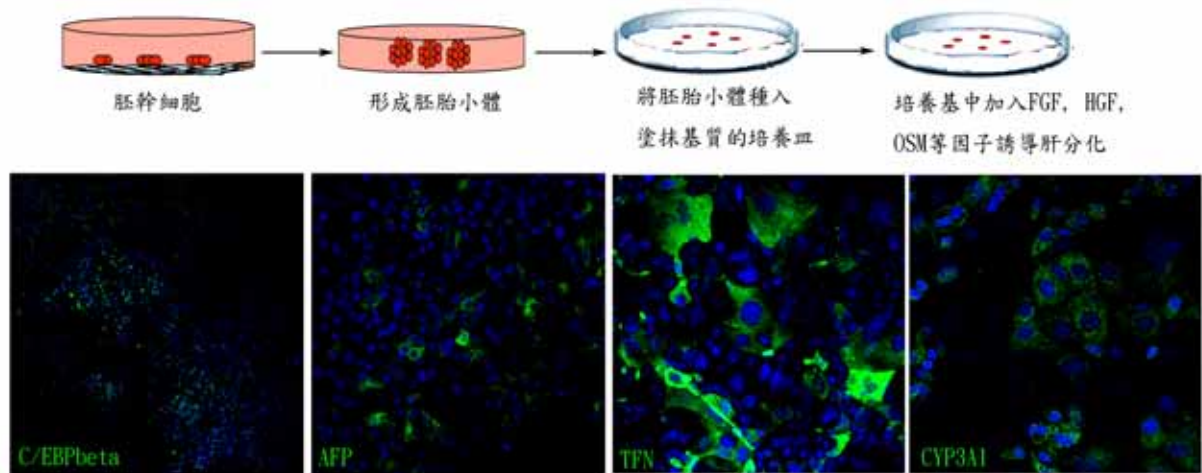
鼠體內後，老鼠的血糖值則可正常受到調控，然而這群細胞無法提供長期類胰島細胞的功能來使得血糖維持恆定<sup>79</sup>。在 2001 年馬偕博士團隊則發表新的方法來分化胚幹細胞成為類胰島細胞，他們所採用的方法是改良自神經細胞的分化方式，先使胚幹細胞進一步形成胚胎小體，之後將細胞轉換到不含血清的培養環境中進行細胞的篩選得到一群帶有 Nestin 基因表現的細胞，再利用 FGF 與 B27 等誘導因子進一步促進細胞的分化與成熟。經過實驗分析結果顯示，從細胞型態上來看，似乎胚幹細胞進一步形成類似胰島的形態，免疫組織染色則可測得胰島素、昇糖素 (glucagon) 與體抑素 (somatostatin) 的表現；同時，體外實驗顯示這群細胞能分泌胰島素來調控血糖。然而，若將細胞移植入糖尿病小鼠體內，卻沒有辦法矯正高血糖的現象<sup>80</sup>。進一步研究分析發現，表現胰島素的細胞其型態分顯示出現濃縮的細胞核，進行細胞凋亡，所以研究人員發現所測得分泌胰島素的程度大多是細胞自培養液吸收取得，而非自行分泌所致<sup>81</sup>。因此，之後有許多研究團隊相繼依據其方法進行改良，包括持續表現轉錄因子 Pax4<sup>82</sup>、採誘發系統表現 Pdx1<sup>83</sup> 或是在最後分化階段加入 PI3K 的抑制劑 LY294002 等<sup>84</sup>，然後再將這些細胞移植入糖尿病小鼠的體內，發現高血糖的現象能得到改善，顯示確實有少量胚幹細胞能分化成胰島素製造細胞。直到 2006 年，達模博士團隊改採模仿體內胰島細胞發育的過程，加入包括 Activin、Wnt、FGF10、維甲酸等多種生長因子使人類胚幹細胞依序進行分化，在不同的階段表現依不同發育的標誌來篩檢，最後分化出能夠表現內分泌荷爾蒙的細胞。利用針對能夠分泌胰島素的細胞來分析，發現其相近於胚胎時期的  $\beta$  細胞能感測血糖濃度的改變，進而釋放出胰島素與 C 胜肽 (C-peptide)，但所表現的量卻未達成熟  $\beta$  細胞的標準<sup>85</sup>，顯示仍有相當的改善空間，但這樣的模式證明了確實我們可以依據胚胎組織發育的模式來進一步分化胚幹細胞成為胰島  $\beta$  細胞。

## (2) 胚幹細胞分化為肝臟細胞系

肝臟的發育主要是起源於前腸管內胚層 (foregut endoderm) 細胞，在接收到來自鄰近的心臟中胚層與間葉組織細胞所傳遞的訊息 FGF 與 BMP2/4<sup>86-87</sup>，細胞進一步從前腸管背部向外生長形成早期的肝芽 (liver bud)，此時的細胞稱為肝原母細胞 (hepatoblast)，這群細胞是具有雙潛能分化特性，能夠分化為肝細胞與膽管細胞 (cholangiocyte)<sup>88</sup>。以小鼠發育為例，胚胎發育第 9.5 天，肝原母細胞開始移行，穿過橫膈間葉 (transversum mesenchyme)，橫膈間質由鬆散的結締組織構成，主要成分為膠原蛋白，所以胎原母細胞在移行可與橫膈間質直接接觸，並排列呈繩索狀，再透過其表現的肝生長因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 來調控肝原母細胞生長；同時內皮細胞在其間形成微血管狀的結構<sup>89</sup>。胚胎發育期第 12 天到第 16 天，血液細胞會進到肝芽，進一步的增生製造抑瘤素 (Oncostatin M, OSM) 傳送下游訊息來促進肝臟的生長與成熟<sup>90</sup>，而在此之前，肝原母細胞尚未進行分化，當血液細胞遷移至其他地方後，肝細胞便開始成熟產生代謝的酵素，以調控體內的代謝作用、血液血清蛋白的濃度以及儲存肝醣與解毒作用。

早期研究胚幹細胞分化成肝細胞使是採取自發性的分化，也就是將胚胎幹細胞以懸浮狀態方式培養，形成具有三胚層結構的胚胎小體，於不同的時間點收集分化的胚胎體，檢測肝細胞的基因與蛋白質相關標誌的表現<sup>91</sup>。但這樣的分化方式僅能得到 0.1~0.5%

的細胞為肝細胞，因此許多研究團隊發展不同的方法來促使胚胎幹細胞往肝族系方面分化。在 2001 年，濱崎博士研究團隊也同樣利用形成胚胎小體的分化方式來進行分化成肝細胞的研究，但在不同的天數中加入特定調控肝發育的生長因子，包括 FGF、HGF、OSM 來促使幹細胞往肝細胞生長與分化（圖三），實驗結果分析顯示相關肝臟基因的表現類似於肝發育的狀態<sup>92</sup>；



圖三、誘導鼠胚幹細胞分化為肝臟細胞系，並組織染色分析細胞分化後的蛋白表現情形（圖：簡皎芸（中央研究院基因體研究中心）提供）

在 2002 年，鎮西博士研究團隊將其進一步的改良後，發現這些由胚胎幹細胞發育而來的肝細胞能表現白蛋白 (albumin) 且能夠製造尿素，如果將這群細胞移植到小鼠肝內，發現在小鼠肝臟內可發現移植細胞能夠表現白蛋白，顯示這群細胞在體內應是有作用的<sup>93</sup>。接下來，研究者希望能進一步觀察肝細胞在體外的發育狀況，並能夠直接分離出這群成熟的肝細胞。為了分析胚胎幹細胞發育而來的肝細胞是否具有能修復受損肝臟的功能，在 2002 年，伊博士等人將綠色螢光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 置入胎兒蛋白 (alpha fetal protein, AFP) 啟動子控制的載體並送入胚胎幹細胞，在誘導胚胎幹細胞往肝族系分化後，如胎兒蛋白持續表現時，細胞會表現綠色螢光，利用流式細胞儀將帶有綠色螢光的細胞分離出來，移植到三種小鼠體內，第一群小鼠體內可表現  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 ( $\beta$ -galactosidase)，第二群小鼠為載脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 缺失，載脂蛋白主要在肝臟合成，可將中密度脂蛋白轉成低密度脂蛋白，第三群小鼠則是結合素 (haptoglobin) 缺失，結合素經由和血清中游離的血紅蛋白 (hemoglobin) 形成穩定的複合物而得以快速清除血清中的血紅蛋白，避免其浸潤腎絲球；這些小鼠在移植前，先進行部分肝切割手術，藉以測量細胞再生的情形，實驗結果發現移植入小鼠體內的細胞均可在小鼠肝臟內被偵測到，並表現肝細胞的載脂蛋白 E 或結合素，修補肝功能<sup>94</sup>。在 2003 年，日本科學山本教授等人則是送入帶有綠色螢光標定胚胎幹細胞分化形成的肝細胞，將這群細胞移植入經四氯化碳所造成的肝損傷小鼠體內，實驗結果發現細胞能夠併入肝組織中，表現肝細胞成熟的標誌並改善肝損傷情形<sup>95</sup>。山本教授團隊在 2005



年研究中，還進一步的發現這些分化後的肝細胞除了能改善肝功能外，還能夠延長肝纖維化小鼠的存活天數<sup>96</sup>。

#### 四、結語

有關人類多潛能胚幹細胞研究是否違反道德倫理和社會法律等問題，一直以來都引起很大的爭議。因為基本上都是使用人體的卵子細胞，或者直接製造胚胎組織來進行相關多潛能胚幹細胞的科學研究。因此許多保守人士認為，即使是以治療疾病和推動科學發展為目的的人類多潛能胚幹細胞的研究，其破壞人類胚胎組織的行為仍然是有違人倫道德的，是無法被接受的！因此人類多潛能胚幹細胞技術研究的一大障礙就是必須先製造人類胚胎才能抽取胚胎幹細胞，然後再銷毀胚胎，所以世界許多國家都對人類多潛能胚幹細胞的研究工作進行限制。為了迴避摧毀胚胎的爭議，最近先進細胞科技的團隊，研發出一種新方法，趕在在受精卵第三次分裂的八細胞階段，從其中取出一顆胚葉細胞，以現有的胚胎幹細胞株加以培養，然後分離形成新的胚胎幹細胞株。剩下七個細胞的受精卵仍然可以繼續發育，植入子宮內著床，產下健康的個體<sup>97</sup>。此外，最近由日本山中教授所發展將成熟的細胞直接轉變為多潛能幹細胞的方式，這樣也不需破壞胚胎，這將可以為許多疾病提供一個可能的治療方法，將有助於跨過那些一直以來阻礙幹細胞科學發展的法律和道德門檻，其對推動細胞治療發展上有其重要意義。

在適當的培養條件下，多潛能細胞可以分化成多種器官組織細胞，例如最近發現顯示胚幹細胞可以分化成為神經細胞，並且在移植到神經損傷的小鼠後，可以產生新的神經細胞以修復小鼠腦部組織的損傷，顯示幹細胞可以應用在修復人類受損的組織和治療棘手的退化性疾病上，未來並預期可應用在器官移植、新藥開發、基因療法與治療癌症等方面的發展<sup>3</sup>。但這些從胚幹細胞所分化而來的組織細胞如心肌細胞，在實際應用上會面臨兩個問題：(a) 在胚幹細胞分化為心肌細胞的過程中，心肌細胞的比例很低；(b) 移植成功的心肌細胞存活的時間不長。針對這樣的困難，必須發展一些解決方案，例如，利用心肌專一表現基因啟動子表現抗藥基因來幫助以抗生素篩選，就可以得到純度很高的心肌細胞，將這些細胞移植到心肌受損的小鼠中可以成功的進行細胞移植<sup>96</sup>；此外於移植的心肌細胞中表現血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 可以促進新血管生成並且改善心臟的功能<sup>98</sup>。藉由這些發現我們可以了解，在現階段仍必須藉由調控其他基因表現來彌補胚幹細胞分化的完整性不足，因此了解這些胚幹細胞分化系統間的差異，並結合其他較安全的方法，才可能有機會應用在修復人類受損的組織和治療棘手的退化性疾病上。

#### 五、參考文獻

1. Ramalho-Santos, M. & Willenbring, H. On the Origin of the Term Stem Cell. *Cell Stem Cell* 1:35-38 (2007).
2. Wobus, A. M., & Boheler, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiology Review* 85:635-78 (2005).
3. Smith, A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17:435-62 (2001).

4. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**:7634-8 (1981).
5. Wei, C. L., Miura, T., Robson, P., Lim, S. K., Xu, X. Q., Lee, M. Y., Gupta, S., Stanton, L., Luo, Y., Schmitt, J., Thies, S., Wang, W., Khrebtukova, I., Zhou, D., Liu, E. T., Ruan, Y. J., Rao, M. & Lim, B. Transcriptome profiling of human and murine ESCs identifies divergent paths required to maintain the stem cell state. *Stem Cells* **23**:166-85 (2005).
6. Niwa, H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* **134**:635-646 (2007).
7. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**:663-76 (2006).
8. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**:313-7 (2007).
9. Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A. & Gough, N. M. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**:684-7 (1988).
10. Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M. & Rogers, D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**:688-90 (1988).
11. Sumi, T., Fujimoto, Y., Nakatsuji, N. & Suemori, H. STAT3 is dispensable for maintenance of self-renewal in nonhuman primate embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**:861-72 (2004).
12. Dahéron, L., Opitz, S. L., Zaehres, H., Lensch, W. M., Andrews, P. W., Itskovitz-Eldor, J. & Daley, G. Q. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**:770-8 (2004).
13. Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine* **10**:55-63 (2004).
14. Bone, H. K. & Welham, M. J. Phosphoinositide 3-kinase signalling regulates early development and developmental haemopoiesis. *Journal of Cell Science* **120**:1752-62 (2007).
15. Watanabe, S., Umehara, H., Murayama, K., Okabe, M., Kimura, T. & Nakano, T. Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* **25**(19):2697-707(2006).
16. Xu, R. H., Peck, R. M., Li, D. S., Feng, X., Ludwig, T. & Thomson, J. A. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature Methods* **2**:185-90 (2005).
17. James, D., Levine, A. J., Besser, D. & Hemmati-Brivanlou, A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* **132**:1273-82 (2005).
18. Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R. A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* **118**:4495-509 (2005).
19. Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**(3):281-92 (2003).
20. Akutsu, H., Cowan, C. A. & Melton, D. Human embryonic stem cells. *Methods in Enzymology* **418**:78-92

(2006).

21. Martin, M.J., Muotri, A., Gage, F. & Varki, A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature Medicine* **11**:228-32 (2005).
22. Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A. & Thomson, J. A. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nature Biotechnology* **24**:185-7 (2006).
23. Amit, M. & Itskovitz-Eldor, J. Maintenance of human embryonic stem cells in animal serum- and feeder layer-free culture conditions. *Methods in Molecular Biology* **331**:105-13 (2006).
24. Pera, M. F., Filipczyk, A. A., Hawes, S. M. & Laslett, A. L. Isolation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Methods in Enzymology* **365**:429-445 (2003).
25. Keller, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & Development* **19**:1129-55 (2005).
26. Chang, C. & Hemmati-Brivanlou, A. Cell fate determination in embryonic ectoderm. *Journal of Neurobiology* **36**:128-51 (1998).
27. Lamb, T. M., Knecht, A. K., Smith, W. C., Stachel, S. E., Economides, A. N., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. & Harland, R. M. Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* **262**:713-8 (1993).
28. Hemmati-Brivanlou, A. & Melton, D. A. Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell* **77**:273-81 (1994).
29. Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L. K. & De Robertis, E. M. *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer- specific homeobox genes. *Cell* **79**:779-90 (1994).
30. Kengaku, M. & Okamoto, H. bFGF as a possible morphogen for the anteroposterior axis of the central nervous system in *Xenopus*. *Development* **121**:3121-30 (1995).
31. Launay, C., Fromentoux, V., Shi, D. L. & Boucaut, J. C. A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous *Xenopus* inducers. *Development* **122**:869-80 (1996).
32. IMason, I. Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nature Reviews of Neuroscience* **8**:583-596 (2007).
33. Ciani, L. & Salinas, P. C. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nature Reviews of Neuroscience* **6**:351-62 (2005).
34. Andl, T., Reddy, S. T., Gaddapara, T. & Millar, S. E. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Developmental Cell* **2**:643-53 (2002).
35. Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G. & Birchmeier, W. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* **105**:533-45 (2001).
36. Wilson, P. A. & Hemmati-Brivanlou, A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* **376**:331-3 (1995).
37. Coraux, C., Hilmi, C., Rouleau, M., Spadafora, A., Hinnrasky, J., Ortonne, J. P., Dani, C. & Aberdam, D. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. *Current Biology* **13**: 849–853 (2003).
38. Troy, T. C. & Turksen, K. Commitment of embryonic stem cells to an epidermal cell fate and differentiation in vitro. *Developmental Dynamics* **232**:293-300 (2005).
39. Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E. & Gottlieb, D. I. Embryonic stem cells express neuronal

properties in vitro. *Developmental Biology* **168**:342–357 (1995).

40. Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M. & McKay, R. D. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mechanism of Development* **59**:89–102 (1996).
41. Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M. & Smith, A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology* **21**:183–186. (2003).
42. Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S. I. & Sasai, Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. **28**:31–40 (2000).
43. Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N. Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A. L., Bruses, J., Rubio, M. E., Topf, N., Tabar, V., Harrison, N. L., Beal, M. F., Moore, M. A. & Studer, L. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in Parkinsonian mice. *Nature Biotechnology* **21**:1200–1207 (2003).
44. Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodríguez-Gómez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sánchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. & McKay, R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**:50–56 (2002).
45. Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J. L., Hynes, M. A. & Rosenthal, A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* **93**:755–766 (1998).
46. Simon, H. H., Bhatt, L., Gherbassi, D., Sgado, P. & Alberi, L. Midbrain dopaminergic neurons: Determination of their developmental fate by transcription factors. *Annals of the New York Academy of Science* **991**:36–47 (2003).
47. Brüstle, O., Spiro, A. C., Karram, K., Choudhary, K., Okabe, S., McKay, R. D. In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:14809–14814 (1997).
48. Brüstle, O., Jones, K. N., Learish, R. D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O. D., Duncan, I. D. & McKay, R. D. Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants. *Science* **285**:754–756 (1999).
49. Fässler, R., Rohwedel, J., Maltsev, V., Bloch, W., Lentini, S., Guan, K., Gullberg, D., Hescheler, J., Addicks, K. & Wobus, A. M. Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *Journal of Cell Science* **109**:2989–2999 (1996).
50. Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T. & Wiles, M. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Molecular and Cell Biology* **13**:473–486 (1993).
51. Vittet, D., Prandini, M. H., Berthier, R., Schweitzer, A., Martin-Sisteron, H., Uzan, G. & Dejana, E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* **88**:3424–3431 (1996).
52. Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H. H., Hescheler, J. & Wobus, A. M. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Developmental Biology* **164**:87–101 (1994).
53. Palis, J., McGrath, K. & Kingsley, P. Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac

explants. *Blood* **86**:156-163 (1995).

54. Cumano, A. & Godin, I. Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. *Current Opinion in Immunology* **13**:166-171 (2001).
55. Cho, S.K. & Zuniga-Pflucker, J.C. Development of lymphoid lineages from embryonic stem cells in vitro. *Methods in Enzymology* **365**:158-69 (2003).
56. Schmitt, T. M., de Pooter, R. F., Gronski, M. A., Cho, S. K., Ohashi, P. S. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nature Immunology* **5**:410-7 (2004).
57. Simon, M. C., Pevny, L., Wiles, M.V., Keller, G., Costantini, F. & Orkin, S. H. Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* **1**:92-8(1992).
58. Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. & Hogan, B. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & Development* **9**:2105-2116 (1995).
59. Lugus, J. J., Chung, Y. S., Mills, J. C., Kim, S. I., Grass, J., Kyba, M., Doherty, J. M., Bresnick, E. H. & Choi, K. GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation. *Development* **134**:393-405 (2007).
60. D'Souza, S., Elefanty, A. & Keller, G. SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development. *Blood* **105**:3862-3870 (2005).
61. Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Köntgen, F., Harvey, R. P., Metcalf, D. & Begley, C. G. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:7075-7079 (1995).
62. Klug, M. G., Soonpaa, M. H., Koh, G. Y. & Field, L. J. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *Journal of Clinical Investigation* **98**:216-24 (1996).
63. Nakamura, T., Sano, M., Songyang, Z. & Schneider, M. A. Wnt and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:5834-5839 (2003).
64. Barandon, L., Couffignal, T., Ezan, J., Dufourcq, P., Costet, P., Alzieu, P., Leroux, L., Moreau, C., Dare, D. & Duplâa, C. Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA. *Circulation* **108**:2282-2289 (2003).
65. Eisenberg, C. & Eisenberg, L. WNT11 promotes cardiac tissue formation of early mesoderm. *Developmental Dynamics*. **216**:45-58 (1999).
66. Terami, H., Hidaka, K., Katsumata, T., Iio, A. & Morisaki, T. Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochemical Biophysical Research Communications* **325**:968-975 (2004).
67. Klug, M., Soonpaa, M., Koh, G. & Field, L. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *Journal of Clinical Investigation* **98**:216-224 (1996).
68. Yuasa, S., Itabashi, Y., Koshimizu, U., Tanaka, T., Sugimura, K., Kinoshita, M., Hattori, F., Fukami, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., Okano, H. & Fukuda, K. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* **23**:607-611 (2005).
69. Tam, P. P. & Behringer, R. R. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mechanisms of*

*Development* **68**:3-25 (1997).

70. Lowe, L. A., Yamada, S. & Kuehn, M. R. Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development* **128**:1831-1843 (2001).
71. Slack, J. M. Developmental biology of the pancreas. *Development* **121**:1569-1580 (1995).
72. Cano, D. A., Hebrok, M. & Zenker, M. Pancreatic development and disease. *Gastroenterology* **132**:745-762 (2007).
73. Offield, M. F., Jetton, T. L., Labosky, P. A., Ray, M., Stein, R. W., Magnuson, M. A., Hogan, B. L. & Wright, C. V. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**:983-995 (1996).
74. Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T. & Edlund, H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**:606-609 (1994).
75. Wilson, M. E., Scheel, D. & German, M. S. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mechanisms of development* **120**:65-80 (2003).
76. Schwitzgebel, V. M., Scheel, D.W., Conners, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D.J., Sussel, L., Johnson, J. D. & German, M. S. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* **127**:3533-3542 (2000).
77. Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. & Guillemot, F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:1607-1611 (2000).
78. Blyszczuk, P. & Wobus, A. M. Stem cells and pancreatic differentiation in vitro. *Journal of biotechnology* **113**:3-13 (2004).
79. Soria, B., Roche, E., Berná, G., León-Quinto, T., Reig, J. A. & Martín, F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. **49**:157-162 (2000).
80. Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R. & McKay, R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* **292**:1389-1394 (2001).
81. Hansson, M., Tønning, A., Frandsen, U., Petri, A., Rajagopal, J., Englund, M. C., Heller, R. S., Håkansson, J., Fleckner, J., Sköld, H. N., Melton, D., Semb, H. & Serup, P. Artifactual insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes*. **53**:2603-9 (2004).
82. Blyszczuk, P., Czyz, J., Kania, G., Wagner, M., Roll, U., St-Onge, L. & Wobus, A. M. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:998-1003 (2003).
83. Miyazaki, S., Yamato, E. & Miyazaki, J. Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes*. **53**:1030-1037 (2004).
84. Hori, Y., Rulifson, I. C., Tsai, B. C., Heit, J. J., Cahoy, J. D. & Kim, S. K. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:16105-16110 (2002).
85. D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K. & Baetge, E. E. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human

embryonic stem cells. *Nature biotechnology* **24**:1392-1401 (2006).

86. Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M. & Zaret, K. S. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* **284**:1998-2003 (1999).
87. Rossi, J. M., Dunn, N. R., Hogan, B. L. & Zaret, K. S. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes & Development*. **15**:1998-2009 (2001).
88. Lemaigre, F. & Zaret, K. S. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development* **14**:582-590 (2004).
89. Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E. & Birchmeier, C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**:699-702 (1995).
90. Kamiya, A., Kinoshita, T., Ito, Y., Matsui, T., Morikawa, Y., Senba, E., Nakashima, K., Taga, T., Yoshida, K., Kishimoto, T. & Miyajima, A. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *The EMBO Journal* **18**:2127-2136 (1999).
91. Abe, K., Niwa, H., Iwase, K., Takiguchi, M., Mori, M., Abé, S. I., Abe, K. & Yamamura, K. I. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Experimental cell research* **229**:27-34 (1996).
92. Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, P. J., Meacham, A. M., Zon, L. I. & Terada, N. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS letters* **497**:15-19 (2001).
93. Chinzei, R., Tanaka, Y., Shimizu-Saito, K., Hara, Y., Kakinuma, S., Watanabe, M., Teramoto, K., Arii, S., Takase, K., Sato, C., Terada, N. & Teraoka, H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* **36**:22-29 (2002).
94. Yin, Y., Lim, Y. K., Salto-Tellez, M., Ng, S. C., Lin, C. S. & Lim, S. K. AFP(+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo. *Stem Cells* **20**:338-346 (2002).
95. Yamamoto, H., Quinn, G., Asari, A., Yamanokuchi, H., Teratani, T., Terada, M. & Ochiya, T. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* **37**:983-993 (2003).
96. Teratani, T., Yamamoto, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Asari, A., Quinn, G., Sasaki, H., Terada, M. & Ochiya, T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology* **41**:836-846 (2005).
97. Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J. & Lanza, R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* **444**:481-5 (2006).
98. Yang, Y., Min, J. Y., Rana, J. S., Ke, Q., Cai, J., Chen, Y., Morgan, J. P. & Xiao, Y. F. VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells. *Journal of Applied Physiology* **93**:1140-1151 (2002).

## 第四章

### 成體幹細胞分離培養擴增及體外分化

#### Isolation, Expansion, and Differentiation of Adult Stem Cells

李光申<sup>1</sup> 許素菁<sup>2</sup> 何慧君<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 國立陽明大學 臨床醫學研究所

<sup>2</sup> 國家衛生研究院 疫苗中心研發中心

<sup>3</sup> 佛教慈濟綜合醫院臺北分院 眼科

#### 一、前言

幹細胞對於生物體由胚胎到成熟個體過程中之細胞增生、分化以及組織修復等作用有著極大的重要性。除了胚胎是幹細胞豐富的來源之外，個體發育後仍有相當數量之未分化的幹細胞存在成熟組織器官中以擔負各組織或器官細胞更新與受傷修復的功能，因此我們可依據細胞分離來源與潛能性之不同將幹細胞大致分為胚胎幹細胞（embryonic stem cells）和成體幹細胞（adult stem cells）兩大類。越來越多實驗結果顯示，存在血液、骨骼、肌肉、乃至於中樞或周邊神經系統的特定細胞群，具有自幹原細胞形成先驅細胞再成為成熟功能細胞的分化能力<sup>1</sup>，這提供了組織工程與再生醫學上對於成體幹細胞在組織修復、再生能力的維持與運用上許多思考的新契機。本章節乃針對目前被研究較多且臨床運用上較為重視的間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell）、造血幹細胞（hematopoietic stem cell）及神經幹細胞（neural stem cell）等成體幹細胞之分離培養的技術、醫療應用的潛能與臨床治療上的開發做整體性的介紹。

#### 二、成體幹細胞

在人類幹細胞研究尚未如此蓬勃發展且無法在許多組織器官中找到相對應的幹細胞存在時，大多數人都相信從各組織中所分離而得的豐富潛能幹細胞只能繼續分化成該特定組織功能相關的細胞，因此認定成體幹細胞的能力和定位遠不如胚胎幹細胞來得重要。然而即使胚胎幹細胞具備能分化成所有組織器官細胞的能力，但是欲達到利用胚胎幹細胞來治療人類疾病的廣泛效用則仍有許多問題亟待克服。近幾年來科學家在成體幹細胞的研究中已證明，只



要找到適合幹細胞體外培養與分化的條件，不僅細胞數目的有限性可以獲得解決且能維持幹細胞的潛能並可分化成多種不同胚層來源的組織功能性細胞的能力，而不限定只能作用成與來源組織相關的細胞種類。除此之外，由於成體幹細胞已在臨床治療使用上有許多成功的經驗，在許多疾病上若能採用適當的患者自體幹細胞進行體外培養、擴增後再植回該病患體內進行疾病的治療，不僅可避免胚胎幹細胞目前來源取得上倫理道德之爭議，也較無免疫排斥性等問題的發生，因此利用成體幹細胞作為細胞治療的臨床使用價值與實際案例也就日益增加。表一乃將胚胎幹細胞與成體幹細胞的許多特性和實際運用上之優劣性做一比較，在此我們將以成體幹細胞為討論的對象，就骨髓幹細胞與神經幹細胞在研究與臨床上的特性與發展進程做說明，並就目前成體幹細胞仍待解決的問題做更深入的討論。

表一、胚胎幹細胞與成體幹細胞之比較。

細胞種類特性	胚胎幹細胞	成體幹細胞
來源 (SOURCE)	早期之胚胎組織 (囊胚的內細胞質團)	成體組織
可塑性 (PLASTICITY)	pluripotent	multipotent
可分化生成之細胞種類	個體內除胚胎外組織的所有細胞	有限制性的細胞種類，通常與其所分離出之組織系統相關
優點	增生能力強 分化潛能大	較無道德爭議 自體移植使用時較無免疫排斥問題
缺點	有道德爭議 須考慮免疫排斥問題 有形成腫瘤之潛在危險性	增生與特定分化能力有所限制

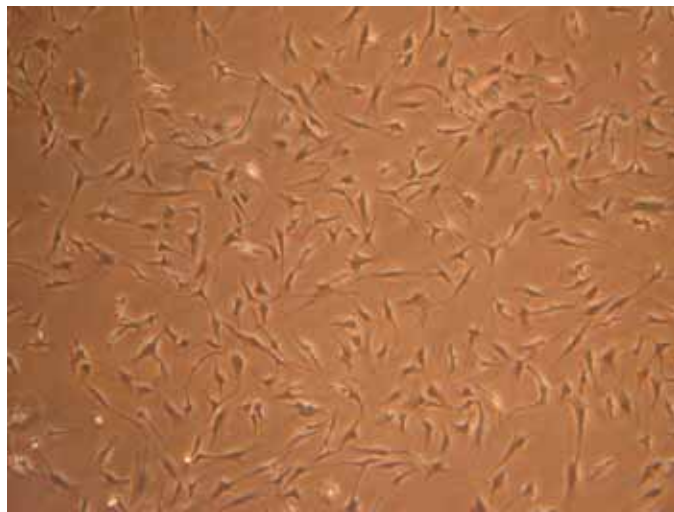
## 1. 骨髓幹細胞 (Bone marrow-derived stem cell) :

幹細胞與原始先驅細胞的臨床運用始於 1950 年代<sup>2-3</sup>。利用致死劑量的輻射線照射 (irradiation) 實驗的老鼠後，把正常老鼠的骨髓移入輻射處理過的鼠體內，發現正常的骨髓細胞能提供輻射老鼠新的血液系統之建立而避免死亡。第一個以骨髓移植來從事人類疾病的臨床治療是用於因骨髓功能異常所導致的先天性再生不良貧血症 (aplastic anemia)，而第一個利用骨髓移植治癒的癌症是淋巴瘤。我們已經明瞭骨髓移植之所以使病人有重生機會，主要是因為骨髓內含有間葉系幹細胞與造血幹細胞的緣故<sup>4</sup>。間葉系幹細胞為近年來熱門之研究課題之一，主要原因乃在於間葉系幹細胞之體外增殖及多重分化能力相當強，使得許多原本臨床上無法輕易解決的疑難雜症，可以藉由大量的體外培養技術獲得適當的成體幹細胞而改變組織工程及細胞治療的方式進一步在疾病的處理上得到良好治療。骨髓中除了間葉系幹

細胞與造血幹細胞之外，還可能有其他型態的成體幹細胞存在，但目前對於其他種類的成體幹細胞特性的了解以及臨床使用價值還不十分明確，我們將只針對 MSC 與 HSC 做說明。

(a) 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, 簡稱 MSC)

自從 1961 年加拿大多倫多大學的科學家 James Till 及 Ernest McCullough 發表人類骨髓中存有造血幹細胞以來，骨髓在當時變被廣泛研究，但研究的重點主要是利用骨髓移植治療各種血液疾病。直到 1970 年代美國國家衛生總署 (NIH) 的科學家 Alex Friedenstein 發現若將大鼠的骨髓移植到另一隻同品系大鼠的腎臟內，所移植的骨髓會有骨骼及軟骨組織的形成，於是證實了骨髓當中除了造血細胞以外，亦存有一些中胚層結締組織之前驅細胞，這在當時可是石破天驚的發現。到了 1980 年代，英國牛津大學的女性科學家 Professor Maureen Owen 更進一步發現將骨髓做體外培養時，造血幹細胞及血液幹細胞乃懸浮在培養系統中而不貼附於培養皿的底部，但骨髓中卻存有另一群會貼附於培養皿底部之貼附型細胞。她針對這些貼附型的細胞做進一步的研究發現持續不斷培養這些細胞時會形成一個個的細胞群落，而這些細胞群落，竟然就是成骨細胞！Professor Owen 的發現更進一步的證實了骨髓中不但含有造血幹細胞也可能含有其他種類的幹細胞。

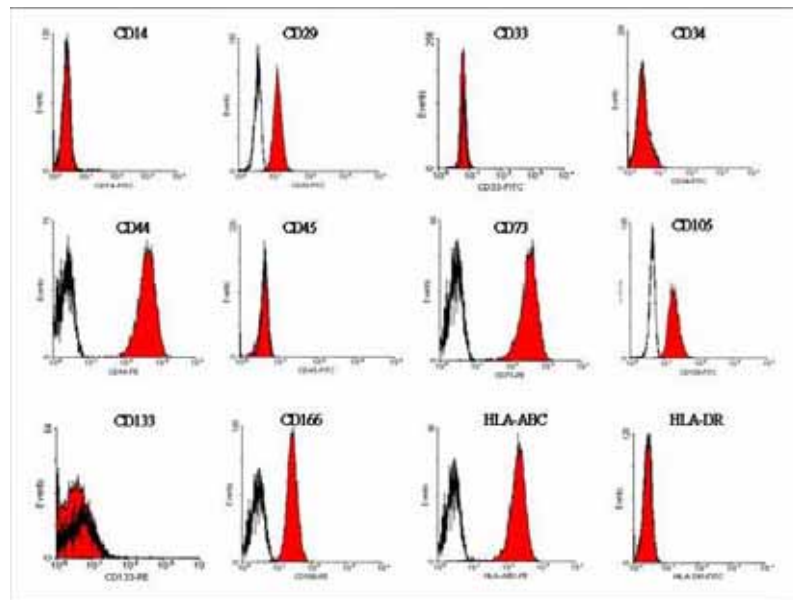


圖一、體外培養骨髓中的間葉系幹細胞

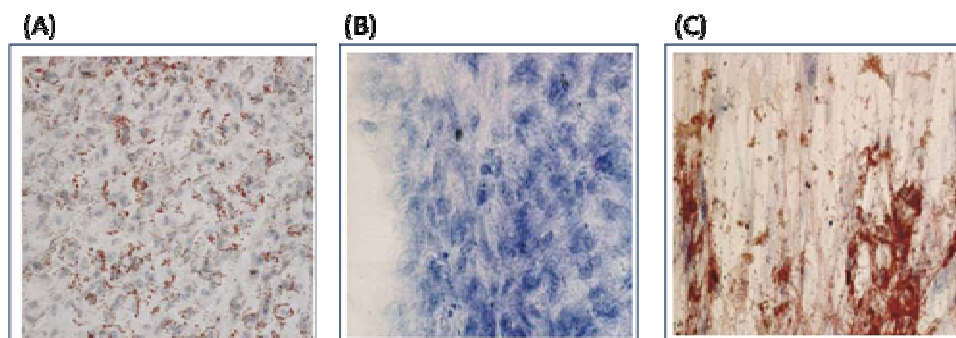
到了 1990 年代，美國 Case Western Reserve University 的 Professor Arnold Caplan 首度將骨髓中存有的這群非造血系統的幹細胞稱之為間葉系幹細胞<sup>5</sup>。間葉系幹細胞其實並不是個新名詞，早在 19 世紀的西文文獻當中，便有科學家使用這個名詞，只是對間葉系幹細胞一詞並沒有清楚具體的描述，因此，Professor Caplan 的貢獻便是給了骨髓中這一群特殊的幹細胞一個清楚的名詞定義。

1999 年 4 月 2 日這項研究正式揭露於美國的權威期刊科學雜誌 (Science

Magazine)。這篇文獻指出人類骨髓中有一群特殊的幹細胞，雖然數目不多，但是這些間葉系幹細胞的生長和分化能力卻極為優異，能夠在體外大量增殖<sup>6</sup>，並偵測到 CD29、CD44、CD73、CD105 (圖二) 等標記分子表現在培養後的間葉系幹細胞表面。早期科學界相信間葉系幹細胞主要存在於人體骨髓之中，這些細胞能夠分化成源自胚胎時期中胚層的各種組織細胞，包括：成骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞及肌肉細胞等 (圖三)。



圖二、間葉系幹細胞細胞表面之標誌分子



圖三、間葉系幹細胞之細胞分化。(A) 脂肪細胞 (B) 軟骨細胞 (C) 成骨細胞

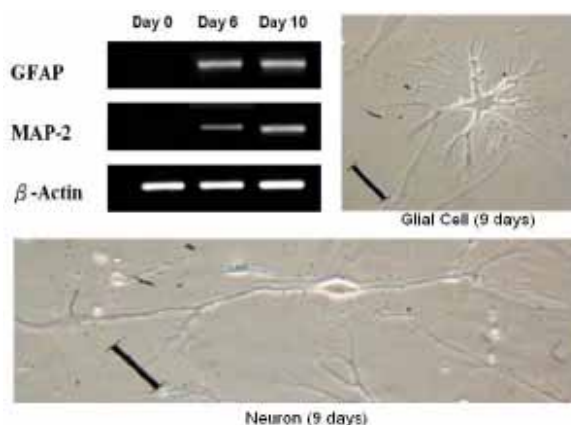
從發生學 (ontogeny) 的角度來說，雖然這些間葉系幹細胞究竟源自胚胎時期的何種細胞尚屬未知，但一般相信間葉系幹細胞的確存在於所有成體骨髓中，數量隨成體年齡而減少。隨著年紀的增長，生物體逐漸有老化現象，目前科學家相信生物體老化後器官及組織修復能力之所以降低的原因主要是體內成體幹細胞數目減少所致。就以骨折的例子來說明。一般而言年輕人發生骨折時較容易癒合，而老年人的骨折則有不易癒合的現象，其中的一個原因即是老年人的間葉系幹細胞數目較少，導致骨骼組織自我修復

的能力下降的影響。另外，老年人較易得骨質疏鬆症的原因也可能和間葉系幹細胞的數目及能力下降有關。

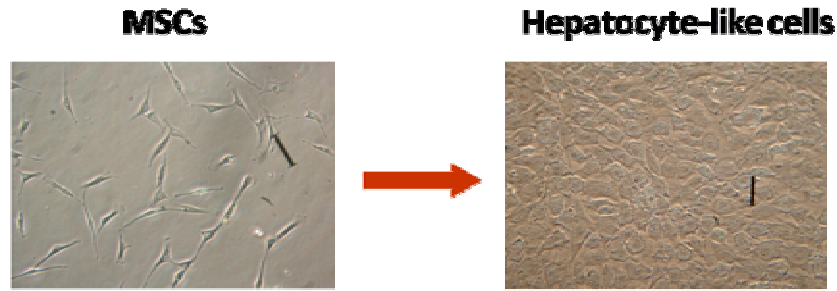
對絕大多數的細胞來說，細胞採對稱分裂產生兩相同的子代細胞而讓細胞的數目增加。然而對具有自我更新能力的幹細胞而言為保持其細胞的潛能性並維持身體修復機轉的恆定性而於是有不對稱細胞分裂（*asymmetrical cell division*）的能力，藉由不對稱分裂的機轉，意即幹細胞分裂時並非產生兩個相同的子代，而是產生一個幹細胞及一個前驅細胞（*progenitor cell*），又稱暫時性增殖細胞（*transit amplify cell, TA cell*）<sup>7-9</sup>，如此，幹細胞方能維持其在成體內數目的恆定。成體幹細胞便利用不對稱分裂中產生的暫時性增殖細胞提供負責分化成修復各式各樣的組織及器官當中所需的細胞。

科學家發現除了骨髓是間葉系幹細胞的來源之外，目前也可自許多不同的組織，包括：髓質骨（*trabecular bone*）<sup>10</sup>、關節中之清液組織（*synovial tissues*）<sup>11</sup>、以及美容手術中抽取的脂肪（*liposuction fat*）<sup>12</sup>等組織中獲得 MSC。最近，有些科學家更進一步指出，間葉系幹細胞極可能存在於人類所有組織當中，他們存在的目的即是為了維持各組織及器官的恆定，亦即許多器官組織之中細胞的老化及凋亡必須進行補充，而這些間葉系幹細胞極可能在器官組織恆定的維持及更新細胞的補充上扮演極重要的角色。

除了上述這些成體來源之外，間葉系幹細胞尚可自臍帶血中取得，筆者們的研究結果顯示，源自臍帶血的間葉系幹細胞增殖及分化能力均佳<sup>13</sup>，除中胚層組織細胞外，亦可分化成源自外胚層的神經細胞（圖四），這些神經細胞在體外確實具有各式各樣成熟神經細胞之功能表現<sup>14</sup>。我們更進一步地發現，間葉系幹細胞亦可分化成源自於內胚層的肝臟細胞（圖五），這些分化的肝臟細胞具有各式各樣正常肝臟細胞所應具有的功能，包括：製造白蛋白、儲存肝醣、代謝含氮廢物以及解毒等等<sup>15</sup>。不難想見，這項發現將可能為各種肝臟疾病的治療帶來新的曙光。因為，臺灣仍是病毒性肝炎高盛行的區域，而病毒性肝炎經常造成肝硬化以及肝癌的發生，或許日後可以使用間葉系幹細胞來治療肝臟疾患，目前我們實驗室也正在朝這方向積極進行研究當中。



圖四、間葉系幹細胞體外分化成神經細胞的分子改變型態圖



圖五、骨髓間葉系幹細胞進行體外肝臟細胞分化之細胞型態圖

臍帶血中含有造血幹細胞是科學家公認的事實。1989年起臍帶血便被法國醫師用來移植治療血液疾病，至今世界上已有數千例臍帶血移植成功治療各種血液疾患的案例。我們的研究更進一步的顯示，臍帶血中不但存有造血幹細胞，也存有間葉系幹細胞，這些臍帶血在醫療運用上具有相當大的潛力。因此，臍帶血不應當作醫療廢棄物被丟棄，應可作為私人儲存或是捐贈至公益臍帶血庫進一步用於幹細胞研究與疾病醫療的開發。

近年來隨著分子生物學及細胞生物學的快速進展，間葉系幹細胞的研究也有許多的突破。自從九十年代末期間葉系幹細胞自人體骨髓的分離方法被確定後，許多的動物實驗及前臨床研究已將間葉系幹細胞的應用推向臨床治療。茲就近年世界各國發表之臨床人體試驗結果整理如下。

在異體間葉系幹細胞移植方面，2004年韓國醫師為一位37歲因為車禍導致第十胸椎骨折合併脊髓損傷導致下肢癱瘓的女性進行世界第一例的配對異體臍帶血幹細胞移植，手術之後病患確實在癱瘓19年之後能夠站起來走了幾步，這樣初步的研究結果，也受到世界媒體的重視以及廣泛報導，然而這病患在幹細胞移植數後幾個月並無法再行走，並且伴隨有無法忍受的疼痛，這個教訓告訴我們任何的臨床研究都不可冒進，必須要有充足的前臨床科學實驗以證明創新治療方法的有效性及安全性。雖然如此，近兩年來在異體間葉系幹細胞移植的研究與臨床試驗上也有成功的案例。另一組韓國醫師使用異體配對間葉系幹細胞移植手術成功的治療了四例患有烏腳病需要截肢的病患。烏腳病的發生和砷中毒以及抽煙有關，這些病患的肢體小動脈造成阻塞，最後導致肢體缺血發黑，這就是烏腳病名稱的由來。嚴重的烏腳病患者在四肢部位常因組織壞死而需要截肢，病患負擔著極為強大的疼痛與生活上的不方便。韓國進行此項成功的細胞移植經驗，值得作為烏腳病治療的重要參考。

2005年韓國的醫師及科學家報告，針對急性中風的患者以自體骨髓純化間葉系幹細胞經由靜脈注射輸入病患體內，此臨床試驗雖然實驗組病患只有五人，但以靜脈注射經體外培養的自體間葉系幹細胞的安全性得到證實，提供了間葉系幹細胞在臨床一期試驗（phase I clinical trial）上極為重要的研究結果與未來幹細胞治療開發成功的信心。

在許多的器官移植的案例中，常發生移植組織對接受者的排斥（Graft Versus Host Disease, GVHD）的併發症<sup>16</sup>。GVHD 的發生是因為移植組織當中的免疫細胞，主要是 T 淋巴球，攻擊接受者的組織而造成個體的損害而發生的疾病，目前臨床上對於移植組織的處理與 GVHD 的發生仍以免疫抑制劑來進行控制，但免疫抑制劑的副作用常給病患極大的副作用且無法有效治癒該疾病的發生而在治療面臨極大的挑戰。近年來由間葉系幹細胞的基礎研究中發現該類成體幹細胞不但能分化成許多不同的組織細胞，它們還具有免疫調節的功能，並且能夠有效調控抑制 T 淋巴球細胞的活化與增生<sup>17</sup>。2004 年瑞典卡洛琳斯卡大學的醫師首度使用患者母親的異體間葉系幹細胞移植成功地治療了一位因為白血病接受異體骨髓移植而產生急性 GVHD 的男孩<sup>18</sup>。2006 年同一個研究團隊更進一步的報告了他們擴大使用異體間葉系幹細胞移植規模治療急性嚴重 GVHD 的經驗，在這個研究當中有八位病患接受了異體間葉系幹細胞移植治療急性嚴重 GVHD 而有六位患者治療成功<sup>19</sup>，這些相關的臨床病例報告給與研究者與臨床工作者極大的鼓舞。

除此之外，異體間葉系幹細胞在骨科疾病的治療，亦有相當大的應用。成骨不全症（osteogenesis imperfecta）是一種先天遺傳性疾病，也就是俗稱的玻璃娃娃，這些病患的骨骼組織無法產生正常的第一型膠原蛋白（type I collagen），導致骨骼相當脆弱，十分容易發生骨折。美國的醫師便使用配對異體間葉系幹細胞移植治療成骨不全症，有初步的成果。隨著周產期醫學的進步，成骨不全症在精密的超音波檢查下，產前診斷亦非難事，配合子宮內移植（*in utero transplantation*）的技術<sup>20</sup>，間葉系幹細胞的移植也被許多玻璃娃娃的治療帶來一絲新曙光。

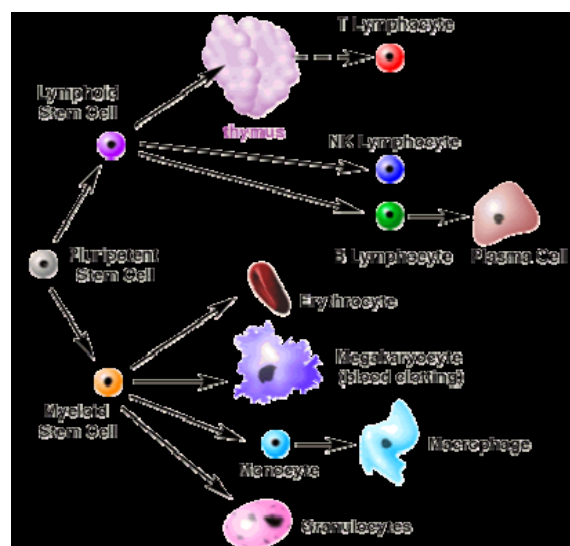
在骨骼組織的創傷修復方面，英國的醫師已經開始臨床試驗使用自體骨髓間葉系幹細胞進行關節軟骨的修復和再生，這項技術如果獲得成功，將可免去許多病患的關節炎之苦。因為目前關節炎是高齡化社會的一個相當盛行的疾病，許多病患因為關節炎導致行動不便，必須接受人工關節手術。而這些關節炎常與早年軟骨的損傷有關，若能夠使用自體骨髓間葉系幹細胞在受傷早期便進行軟骨修復，促進軟骨再生，相信可延緩關節炎的發生。此外，澳大利亞的醫師也開始進行使用自體骨髓間葉系幹細胞幫助骨折癒合的臨床實驗。我們都知道，並不是所有的骨折都能夠順利癒合，在一些情形之下，例如：骨折太粉碎、或是開放性骨折合併感染造成骨髓炎，較易導致骨折不癒合的發生，臨床上對骨折不癒合的治療常常必須「挖東牆補西牆」，意即從骨盆骨挖取較不重要的部分來填補骨骼的缺損，若能使用間葉系幹細胞來幫助骨骼組織的再生，則可免去挖取自體之苦。

由於 MSC 具有多元而廣泛的可塑性，改變了世人原先對於成體幹細胞分化能力受限制的看法，也使得 MSC 未來在細胞療法、組織工程及再生醫學的研究上有機會用於修復或更換受傷與發生變的細胞或組織，對目前脊髓損傷（spinal cord injury）、中風（stroke）、老年失智的阿茲海默症（Alzheimer's disease）、帕金森氏症（Parkinson's

disease) 等難以治癒的疾病，提供了治療的新契機。目前臨床試驗顯示，將 MSC 與造血幹細胞共同注射入體內後可以加入血液系統恢復的速度，說明 MSC 不僅本身具有調節體內細胞修復的能力，同時也扮演調節其他幹細胞功能的可能性<sup>21-22</sup>。

## (b) 造血幹細胞 (Hematopoiesis stem cell, 簡稱 HSC)

1961 年，Till 和 McCulloch 證實了存在於骨髓的先驅細胞可在脾臟形成多原性血球細胞株 (multilineage hematopoietic clones)，其中有一群細胞具有可複製成更多脾臟細胞株的能力，當時他們便猜測在人體中應該有所謂的豐富潛能性血球幹細胞存在。HSC 和 MSC 一樣可從骨髓、嬰兒臍帶血、成人周邊血液與胎盤中分離出來，它們在骨髓中持續自我增生及能夠分化出所有在血液中所有細胞成分的能力，使 HSC 不僅能分化成所有血液組成細胞 (圖六) (來自胚胎中胚層)，在適當的培養條件下這些細胞也能夠分化成為不同胚層組織的細胞，如肺臟或腸組織的表皮細胞 (內胚層)，或是皮膚組織 (外胚層)。相較於其他種成體幹細胞而言，由於血液幹細胞的懸浮性以及被研究與操作的時間較為久遠，HSC 有較為明確的細胞表面分子可供辨識，最常用來分離人體 HSC 的細胞標誌為 CD34、CD38 及 CD133<sup>23</sup>，但由於這些細胞在體外培養擴增時常伴隨細胞分化力的降低使得臨床使用上有極大的限制性，研究人員目前仍試圖希望找出能分離更早期 HSC 的細胞表現分子。過去十年來，由於對血液幹細胞和許多不同血液生長激素的研究有更多的瞭解，造血幹細胞的移植在手續上比骨髓移植要來的簡化許多，移植的副作用也遠較骨髓移植來的輕微，因此利用血液幹細胞做體外培養後的幹細胞移植比例有與日遽增的趨勢，但仍須克服體外培養增生 HSC 時 CD34<sup>+</sup> 表現細胞的比例與細胞分化能力降低的困境與限制。



圖六、血液幹細胞之分化組織圖

1988年法國第一次以臍帶血(umbilical cord blood)成功替罹患再生不良貧血症的5歲男童施行移植手術後<sup>24</sup>，臍帶血幹細胞由於來源容易、成本低廉、移植配對要求較骨髓取得的幹細胞來的低，且臍帶所含的幹細胞數目也遠較原始骨髓和血液樣本內含量來的高，因此臍帶血幹細胞的研究與使用日益受到重視。雖然目前並不清楚臍帶中除了可以分離出MSC與HSC之外，是否還存有功能上更強大的幹細胞，但研究顯示從臍帶血所獲得的HSC或MSC其體外增生的能力比從骨髓或血液取得的幹細胞要來高，並且由於該細胞群表面表現影響免疫反應的分子極少因此移植時所產生的宿主排斥現象也較小，所以可取代骨髓移植使用，並且以這樣方式取得的細胞並不引發胚胎使用的爭議，此乃近幾年臍帶血幹細胞受矚目的原因。

## 2. 神經幹細胞 (Neural stem cell, 簡稱 NSC):

早期由於我們對於神經細胞培養與分化的條件掌控能力不足以至於認為神經組織的細胞不再能夠分化因而相信神經細胞並不具有再生能力，一旦細胞遭受到破壞後便很難修復或治療，這是許久以來神經醫學上的困境。目前研究人員已能在中樞神經系統中找到神經幹細胞(neural stem cells)，可進一步分化產生成神經(neruon)、星狀細胞(astrocyte)、寡突膠質細胞(oligodendrocyte)等不同型態的神經細胞，對於帕金森氏症<sup>25</sup>、老年失智症、脊髓損傷<sup>26</sup>等這類因神經系統病變或損害的疾病提供修復治療的可能。目前用以分離或區分神經幹細胞的方式不外乎是從腦部組織或神經球體(neurosphere)中利用辨識低親和性趨神經受體抗原(low-affinity neurotrophin receptor)、p75、周邊髓質蛋白(peripheral myelin protein)或是直接培養表達CD133<sup>+</sup>、5E12<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD24<sup>-/lo</sup>的細胞<sup>27</sup>。這些神經幹細胞能夠在老鼠體內表現出長效移植生長的能力，具有自我更生、移動(migration)和多細胞系分化等的特性。有研究顯示將神經幹細胞植入腫瘤形成的小鼠後，這些幹細胞因具備特殊的細胞表現分子與移動力而能夠趨向於腫瘤形成部位的特性，未來我們如何運用這些幹細胞的特性進一步從事癌症治療與相關藥物開發將是值得注意的焦點。

## 三、成體幹細胞的分化

成體幹細胞在適當的體外培養環境下，能夠分化成為許多不同種類的成熟體細胞。以間葉系幹細胞分化成為骨細胞為例，培養基中需加入beta-glycerophosphate、ascorbic acid及dexamethasone；分化成軟骨細胞時，則需以transforming growth factor beta或bone morphogenetic protein引導分化。造血幹細胞在適當的引導下，可分化成為淋巴球、血液顆粒球、吞噬細胞、紅血球及血小板等細胞。神經幹細胞則可引導分化成神經元細胞、星狀細胞及膠質細胞等。綜觀文獻中許多體外實驗及動物實驗的結果，關於成體細胞的分化潛能，或稱可塑性(plasticity)<sup>28</sup>有下列五種學說。



1. 成體幹細胞有一些類似胚胎幹細胞特性的細胞，分化能力非常強，它們能夠分化為各式各樣的成體組織，這樣的細胞被發現存在人類及小鼠的骨髓及肌肉中。
2. 成體幹細胞的分化能力較胚胎幹細胞為差，成體中存有不同種類的成體幹細胞，分化成不同的子代，各司其職。
3. 成體幹細胞中有逆分化的現象（de-differentiation）<sup>29</sup>，意即某些特定情形下，已經分化的子代細胞會逆分化回幹細胞的狀態。以神經系統大腦中的細胞為例，有一些星狀細胞在體外實驗及動物實驗中均被證實有逆分化為原始神經幹細胞的現象。
4. 轉分化（trans-differentiation）<sup>30</sup>的現象，意即某些特定組織分離出的成體幹細胞在特定的情形下，會分化為原來不會分化的組織。例如造血幹細胞在正常情形下不會分化成肌肉細胞，但在小鼠實驗中，若對小鼠的前脛肌（tibialis anterior muscle）製造壓傷（crushing injury），則造血幹細胞會經由 Myeloid intermediate 分化成肌肉細胞。
5. 細胞融合（cell fusion）<sup>31</sup>。在 2000 年前後，許多分化潛能（plasticity）的實驗欲證明成體幹細胞具有多功能潛能的特性，其中有許多的實驗提出這些分化的潛能極可能證明是經由幹細胞與特定組織細胞發生細胞融合的結果，其中較著名的是造血幹細胞在動物實驗中分化成肝臟組織。許多人擔心細胞融合可能導致細胞癌化的發生，這使得成體幹細胞的臨床運用風險再度被廣泛的討論。事實上人體內的骨骼肌肉細胞、吞噬細胞以及肝臟細胞都會進行細胞融合的反應，這樣的作用也是一種正常的生理現象，我們需要對進行融合的細胞做更多的研究與了解才能真正去明白這些反應的生理意義而非一味否定這些細胞作用機轉的可能與應用。

## 五、成體幹細胞使用的限制性及需要解決的障礙

現階段除了血液幹細胞移植較不傾向體外培養的使用方式之外，欲使用幹細胞做治療應用時都需要從事細胞分離、進行體外擴增等放大細胞數目的程序以做後續的利用，研究人員必須確保體外增生所獲得的幹細胞仍具有成功分化進而修復組織的特性，因此必須確切掌握以下所列幾項特質，方可提高幹細胞於臨床使用安全性與價值：

1. 產生足夠量的細胞與組織。
2. 分化後的特定性細胞具備所需要的功能。
3. 細胞移植後仍能病患體內存活，避免多次進行移植手術。
4. 細胞移植時不引發接受者體內之免疫排斥性。

目前不論是利用骨髓或是血液等成體幹細胞從事移植手術，都遭遇到下列幾項困難：

1. 並非所有成人的組織器官都可以分離出特定系統的幹細胞。許多器官組織，如心臟或胰島內仍無法找到功能上對應分化的幹細胞。目前利用不同組織轉分化而得的特殊功能性細胞在疾病治療的效用以及長時間能否真正取代受損細胞而正常執行細胞功能仍有待我們進一步的研究。近來有實驗發現，以 MSC 或 HSC 分化而來的類神經細胞，其在體內的移植率和功能性遠較直接由神經組織取得 NSC 所分化的神經細胞要來的低<sup>27,30</sup>，這是我們在使用細胞做為疾病治療上需要多留意的現象。而自不同組織所分離的同一種成體幹細胞也已被證實彼此間所保有的細胞特性還是存有極大的不同，怎麼樣的疾病狀況適合取用那一類的幹細胞做為治療的材料則需要我們更進一步的研究它們的異同才能確定細胞的培養條件而達到最佳的使用效能。

2. 成人幹細胞在體內的數量極為稀少。以骨髓幹細胞來說，約略 10,000~100,000 顆骨髓細胞中才有一顆幹細胞，這樣少的比例並不容易分離或純化。臨床上為取得更為多量的血球幹細胞會讓細胞捐贈者或病患先施打 G-CSF 使得血液幹細胞離開組織而跑到循環系統內而增加能夠收集的幹細胞數量，但這樣的方式所耗費的醫療成本較高，而且不是每一種我們所需要的成體幹細胞都能用同樣的方式增加收集的數量。科學家雖致力於找尋出可用以辨識幹細胞的標誌，以便藉著這些特殊分子的表現利用螢光激發細胞收集 (fluorescence-activated cell sorting) 或是磁性活化細胞收集 (magnetic-activated cell sorting) 的方式將所要的幹細胞分離出來，但這些工作遇到相當大的挑戰，原因在於一旦將幹細胞從體內分離出來培養之後，並不容易保持原本在生物體內的細胞特性，而許多細胞表面標誌分子在不同的培養時間和培養條件都會改變，也不容易找到真正存在體內的幹細胞標誌，這是目前科學家急欲解決的一個問題。以最常被當作血液幹細胞分離的標誌 CD34 分子來說，以往大家都認為只要設法取出表現有 CD34 的血球細胞加以體外分化培養就可以獲得大部分血液的細胞成分，因此早期幾乎就把 CD34<sup>+</sup> 血球細胞視為 HSC，但目前由於細胞分離技術的進步，已有研究發現有許多處於休止期的細胞是不表現 CD34 分子的，但這些細胞仍具有重新構成血液細胞組成的能力，而由更多的實驗證明 HSC 的潛能性不僅和 CD34 分子的表達相關，也需要一同考慮 CD38 以及 CD133 等分子的表現作用才能獲得最大的幹細胞潛能。因此如何找到真正可辨識不同幹細胞的標誌，用以分離獲取更高潛能的細胞仍是未來幹細胞研究的一大重心。

3. 因為成體幹細胞的數目極為稀少，目前科學家多著重於發展利用體外增殖技術來維持並增生具有移植活性幹細胞的技術。然而幹細胞的數目雖可以利用體外培養的方式而獲得增加，但目前在這樣培養系統中養成的細胞卻往往因為離開體內的調節而失去了原來移植活性還無法達到臨床使用上的價值，其主要原因可能有下列幾點。

(a) 幹細胞表面分子表達與分佈的改變：

體外細胞培養的環境容易改變細胞表面分子的表現和分佈性，而讓幹細胞進入細胞分化的狀況，一旦細胞失去某些重要的表達分子或進入分化狀況後，對環境或訊息傳遞的能力也會隨之改變而影響細胞的特性。

(b) 細胞週期的改變：

為了要獲得足夠的細胞數目從事醫療作用，具細胞增殖效果的體外細胞培養通常會改變細胞週期的進行。以造血幹細胞而言，其在體內骨髓的微環境中是處於細胞的休眠狀態，但在體外培養的過程中，許多被用來促進細胞增生能力的生長激素會讓細胞進入活化的狀態，使細胞性質因而改變。因此我們需要對經過體外培養後的細胞所可能改變的細胞特性做更深入的研究與了解以調整未來從事細胞治療上更精準的操控。

(c) 缺乏體內利基 (niche)<sup>32</sup> 的支持：

許多實驗證實在生物體內的微環境 (microenvironment) 中有能夠維持幹細胞特性的利基存在著。不論是細胞間的接觸或是分泌重要的介質分子，利基提供了幹細胞在體內維持更生能力與保持細胞分化力的調控環境。在體外培養擴增的幹細胞失去與天然利基的交互作用，便很容易喪失掉幹細胞的特性或進行不正常的細胞分化，我們需要更多的研究與實證資料以提高細胞治療的安全性。

4. 從病人體內取得的成體幹細胞可能會帶有不正常表現的癌細胞<sup>33</sup>，用這些帶有癌細胞的幹細胞來從事移植的操作是沒有實際的價值的。然而若無法直接從病人身上取得幹細胞做為自體移植 (autologous transplant) 之用，那麼便需要由適當的抗原配對 (HLA matched) 給予者 (donor) 提供幹細胞。抗原配對手續須要耗掉許多時間，在時間成本與醫療使用效應上有其限制性，並且目前仍有 70% 的病人無法從現有的骨髓庫中獲得適當的幹細胞進行移植治療，這些都是限制成體幹細胞使用的因素。

## 六、結語

幹細胞研究的發展對於我們在個體發育的了解、醫療行為的改變、倫理道德的要求與省思以及物種演化與改造等問題上都產生了極大的衝擊與影響，在目前尚無法對於胚胎幹細胞所引發道德與社會問題較有一致性看法之時，成體幹細胞的研究與應用相對的提供我們在臨床診療與科技開發上更多的契機。幹細胞提供了我們探索生命起源與運作的平臺，在那些尚未被開啟的潛藏未知中，期待更多有志之士走入這扇門窗去感受更多的驚奇而獲得更多生命的啟發與感動。

## 七、參考文獻

1. Serafini, M. & Verfaillie, C. M. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med.* **24**:379-88 (2006).
2. Jacobson, L. O., Marks, E. K., Robson, M. J., Gaston, E. O. & Zirkle, R. E. Effect of spleen

- protection on mortality following x-irradiation. *J Lab Clin Med.* **34**:1538–1543 (1949).
3. Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T. R. & Shelton, E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst.* **12**:197–201 (1951).
  4. Herzog, E. L., Chai, L. & Krause, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* **102**:3483-93 (2003).
  5. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* **9**:641-50 (1991).
  6. Pittenger, M. F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. & Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**:143-7 (1999).
  7. Yamashita, Y. M., Mahowald, A. P., Perlin, J. R. & Fuller, M. T. Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* **315**:518-21 (2007).
  8. Smith, G. H. Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Development* **132**:681-7 (2005).
  9. Mitsiadis, T. A., Barrandon, O., Rochat, A., Barrandon, Y. & De Bari, C. Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res.* **313**:3377-85 (2007).
  10. Song, L., Young, N. J., Webb, N. E. & Tuan, R. S. Origin and characterization of multipotential mesenchymal stem cells derived from adult human trabecular bone. *Stem Cells Dev.* **14**:712-21 (2005).
  11. Jones, E. A., English, A., Henshaw, K., Kinsey, S. E., Markham, A. F., Emery, P. & McGonagle, D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum.* **50**:817-27 (2004).
  12. Im, G. I., Shin, Y. W. & Lee, K. B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* **13**:845-53 (2005).
  13. Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. D., Hsieh, S. L. & Chen, T. H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**:1669-75 (2004).
  14. Lee, O. K., Ko, Y. C., Kuo, T. K., Chou, S. H., Li, H. J., Chen, W. M., Chen, T. H. & Su, Y. Fluvastatin and lovastatin but not pravastatin induce neuroglial differentiation in human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* **93**:917-28 (2004).
  15. Lee, K. D., Kuo, T. K., Whang-Peng, J., Chung, Y. F., Lin, C.T., Chou, S. H., Chen, J. R., Chen, Y. P. & Lee, O. K. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* **40**:1275-84 (2004).
  16. Ringden, O. Immunotherapy by Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Adv Cancer Res.* **97C**:25-60 (2007).
  17. Uccelli, A., Pistoia, V. & Moretta, L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* **28**:219-26 (2007).
  18. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M. & Ringdén, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363**(9419):1439-41(2004).

19. Ringdén, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lönnies, H., Marschall, H. U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., Omazic, B., Aschan, J., Barkholt, L. & Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* **81**:1390-7 (2006).
20. Le Blanc, K., Gotherstrom, C., Ringden, O., Hassan, M., McMahon, R., Horwitz, E., Anneren, G., Axelsson, O., Nunn, J., Ewald, U., Norden-Lindeberg, S., Jansson, M., Dalton, A., Astrom, E. & Westgren, M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation* **79**:1607-14 (2005).
21. Chen, X., Xu, H., Wan, C., McCaigue, M. & Li, G. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **24**:2052-9 (2006).
22. Benvenuto, F., Ferrari, S., Gerdoni, E., Gualandi, F., Frassoni, F., Pistoia, V., Mancardi, G. & Uccelli, A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells* **25**:1753-60 (2007).
23. Wagner, W., Ansorge, A., Wirkner, U., Eckstein, V., Schwager, C., Blake, J., Miesala, K., Selig, J., Saffrich, R., Ansorge, W. & Ho, A.D. Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. *Blood* **104**:675-86 (2004).
24. Bacigalupo, A., Hows, J., Gordon-Smith, E. C., Gluckman, E., Van Lint, M. T., Congiu, M., James, D. C., Barrett, A. J., Gmur, J., De Planque, M. M., et al. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia from donors other than HLA identical siblings: a report of the BMT Working Party. *Bone Marrow Transplant* **3**:531-5 (1988).
25. Geraerts, M., Krylyshkina, O., Debyser, Z. & Baekelandt, V. Concise review: therapeutic strategies for Parkinson disease based on the modulation of adult neurogenesis. *Stem Cells* **25**:263-70 (2007).
26. Garbossa, D., Fontanella, M., Fronda, C., Benevello, C., Muraca, G., Ducati, A. & Vercelli, A. New strategies for repairing the injured spinal cord: the role of stem cells. *Neurol Res.* **28**:500-4 (2006).
27. Tamaki, S., Eckert, K., He, D., Sutton, R., Doshe, M., Jain, G., Tushinski, R., Reitsma, M., Harris, B., Tsukamoto, A., Gage, F., Weissman, I. & Uchida, N. Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res.* **69**:976-86 (2002).
28. Goodell, M. A. Stem-cell "plasticity": befuddled by the muddle. *Curr Opin Hematol.* **10**:208-13 (2003).
29. Kai, T. & Spradling, A. Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature* **428**:564-9 (2004).
30. Vieyra, D. S., Jackson, K. A. & Goodell, M. A. Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells. *Stem Cell Rev.* **1**:65-9 (2005).
31. Wurmser, A. E., Nakashima, K., Summers, R. G., Toni, N., D'Amour, K. A., Lie, D. C. & Gage, F. H. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature*

**430:350-6** (2004).

32. Lensch, M. W., Daheron, L. & Schlaeger, T. M. Pluripotent stem cells and their niches. *Stem Cell Rev.* **2**:185-201 (2006).

33. Filip, S., Mokry, J. & English, D. Stem cell plasticity and carcinogenesis. *Neoplasma.* **53**:87-91 (2006).



## 第五章

### 奈米科技於幹細胞生物學之應用

# The Application of Nanotechnology on Stem Cell Biology

何嘉倫、王僅文、邱智東、謝清河

國立成功大學 臨床醫學研究所、醫學工程研究所、微奈米科技研究中心

## 一、前言

奈米科技 (nanotechnology) 為一門整合物理、化學、工程、生物、生命科學及醫學等跨領域的科學，透過各學科間知識及技術的交流，奈米科技成功的破除了各學門的傳統窠臼，建立了一個多重領域的研究技術及知識平臺。奈米科技泛指透過以設計、特徵化、製造等方法，在奈米尺度 ( $10^{-9}$  m) 的範圍內控制物體的尺寸及形態，以創造出新穎物理、化學及生物性質結構、器材以及系統的專門技術<sup>1</sup>。近年來奈米科技的應用已由基礎科學延伸至生物醫學的範疇，為因應各領域對奈米科技的需求遽增，微小化科技與材料的發展於是由微米 (micrometer) 的範圍進入了奈米 (nanometer) 的範圍。奈米生醫材料 (nano-biomaterials) 有別於傳統生物材料之特性，其擁有許多獨特的物理、化學以及生物特徵，所以被廣泛的運用在跨領域的研究及產業。近年來生物醫學融合了各領域的精隨，演化成一門具有高度發展潛力的新領域，其中幹細胞生物學 (stem cell biology) 更是科學家積極研究的主题，而對幹細胞的研究也因為有奈米科技的優勢挹注下，成為二十一世紀研究發展的主要重點之一。奈米科技應用於幹細胞生物學的構想，主要來自於奈米材料擁有獨特的專一性 (specificity)、生物相容性 (biocompatibility)、水溶性 (water-solubility)，且具較低之細胞毒性 (cytotoxicity) 等特性，由於這些得天獨厚的性質，使得奈米材料能夠較安全地被運用在活體實驗中，減少對細胞造成非預期的傷害或損壞。利用奈米材料的特性來輔助幹細胞於醫學上的診斷及治療等應用，已逐漸發展成為一個相當具有前瞻性的生物醫學研究領域。

## 二、奈米生醫材料

### 1. 簡介

奈米材料是奈米科學的基礎，泛指結構中之晶粒大小介於 1 至 100 nm 之間的粉末、顆粒、纖維、薄膜或塊體。由於奈米材料的表面面積較大且擁有特殊的量子效應，其光學、熱學、電學、磁學、力學甚至化學性質亦與微米尺度以下之材料性質大相逕庭。傳統物質經過奈米化處理後，會產生許多不同的效應，其中包括所謂的表面效應，也就是表面原子數與總



原子數比例劇增而引發的化學活性、光學、熱性質等之改變<sup>2</sup>，另外還有光電磁學上所定義的量子尺寸效應 (quantum size effects)，也就是金屬和半導體之價帶 (valence band) 和能帶 (energy band) 的帶隙變寬，而展現絕緣的效應。

不同的奈米材料，在不同的外加場效作用下 (例如：電場、磁場)，會呈現不同的性能及效應。透過奈米生物科技的技術，奈米材料應用的範疇已被延伸至半導體科技、電子材料、光學材料以及生物醫學材料。舉例來說，金奈米微粒可被應用於 DNA 的診斷<sup>3</sup>，而利用鎘化硒 (CdSe) 備製的量子點 (quantum dots, QD) 則因具有較強的螢光強度、較窄的發射光譜 (emission spectrum) 以及較長的生命週期 (半衰期) 等特徵，因此可被利用於分子影像之擷取<sup>4</sup>。另外氧化鐵奈米顆粒 (iron oxide nanoparticles) 因為擁有超順磁 (superparamagnetic) 特性，因此近年來亦被運用於磁核共振影像系統 (Magnetic Resonance Imaging, MRI)<sup>5</sup>。除此之外，隨著奈米科技的蓬勃發展，傳統醫學也有了突破性的進展，特別是有關創新生醫奈米材料的研發，例如微脂粒 (liposomes) 樹狀聚合物 (dendrimers) 提供了新穎的藥物傳遞 (drug delivery) 及控制釋放 (control release) 的機制，可被應用於協助診斷<sup>6</sup> 及改善治療<sup>7,8</sup> 的方法，這也使得現今許多必須借重手術治療才能痊癒的重大疾病，將來藉由奈米生醫材料的應用，臨床醫師可以採用較低侵入性的治療方法，來降低病患對手術治療的依賴性並減少術後病人之復健需求。

## 2. 目前之應用

目前奈米生醫材料已被廣泛的應用於不同領域的研究，其中較常見的包括：顯影劑 (contrast agents)、分子影像 (molecule image)、分子診斷 (molecule diagnosis)、生物感測器 (biosensor)、生物標記 (bio-targeting)、基質 (substrate) 運輸及藥物控制釋放等，其中較具代表性的是應用奈米材料於光學分子及細胞影像 (optical molecular and cellular imaging) 之偵測及磁核共振顯影劑 (MRI contrast agents)：

### (1) 光學分子及細胞影像之偵測

近年來奈米科技將半導體材料表面修飾量子點與生物辨識分子 (biorecognition molecules)，創造出了新的奈米螢光標示材料。相較於傳統的有機染劑 (organic dyes)，這些量子點具有高度的水溶性及生物相容性，且透過控制其尺寸大小可調整其波長，因此藉由單一的光源可同時激發好幾個不同尺寸大小的量子點<sup>9</sup>，而量子點的重要優勢在於其發光週期 (luminescence lifetime) 以及抗光褪現象 (photo bleaching) 的時間較長，所以在測量活體樣品時可利用時間閘控 (time-gating) 的方式來解決自體螢光的問題。另外量子點的光譜發射峰 (emission band) 較窄，因此可以透過調整其組成以及物理維度 (physical dimension)，來決定其在光譜上的位置<sup>10</sup>。由於上述光學的特性，近年來在分子影像的技術領域，量子點已漸漸取代傳統的有機染劑<sup>9</sup>。目前許多利用量子點的生物分析技術已陸續的被研發出來，例如：

#### (a) 量子點結合抗體 (Antibody-conjugated quantum dots)<sup>11</sup>：

將量子點結合抗體，透過靜脈注射方式注入老鼠體內，再進行幹細胞的影像擷取。由於

是透過抗體與抗原的結合，這種量子點可俱專一性的被吸附於特定幹細胞的表面，來達到影像擷取之功效，此法不僅可提高影像之敏感度，亦可利用量子點來進行癌細胞之追蹤。

(b) 螢光共振能量轉移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 連結量子點之生物感測器<sup>12</sup>：

FRET 是一種螢光光譜技術，利用 donor 及 acceptor 的電子能量轉換，來量測分子或蛋白質之間的距離、交互作用以及其形態改變。由於量子點是很好的能量提供 donor，所以利用量子點可以非常有效的達到 FRET 之效果。

此外，另一個常被利用於生醫影像觀察之奈米材料為金奈米顆粒 (gold nanoparticles)，透過表面電漿共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 的技術，金奈米顆粒可被用於色度顯影劑 (colorimetric contrasts)<sup>13</sup>，而決定這些金奈米顆粒的表面電漿共振頻率的因素有很多，包括：顆粒形狀、大小、介電性質 (dielectric properties)、溶劑 (solvent)、配體 (ligand)、集結狀態 (aggregate morphology)、表面功能化 (surface functionalization) 以及周圍液體的折射率 (refractive index)。與其他標示試劑比起來，金奈米顆粒有比較優異的特性，其不會產生一般螢光染劑常見的光解效應 (photo decomposition)，且除了較穩定且毒性較低外，金奈米顆粒也可以依照需求來調整其表面電漿共振的頻率至特定的光譜區域，以促進其作為光學生物影像與奈米級生物感測的應用<sup>14</sup>。

## (2) 磁核共振顯影劑

目前已知以磁鐵礦 (magnetite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )、磁赤鐵礦 (maghemite,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) 或其他鐵磁體 (ferrite) 為核心之奈米顆粒，皆可作為超順磁顯影劑 (superparamagnetic contrast agents) 的材料，此類奈米顆粒統稱為超順磁性氧化鐵奈米粒子 (superparamagnetic iron oxide particles, SPIO)<sup>15</sup>。由於 MRI 可偵測 SPIO 的濃度至微莫爾級 (micromolar level)，所以 SPIO 可提供具有良好敏感性的 MRI 顯影劑。另外，也可在奈米顆粒外圍塗抹一層親水性的聚合物 (hydrophilic polymer)，令其變成水溶性，此法會使其在體內的分佈以及藥物動力特性隨之改變。依據需求，我們可以將配體修飾於 SPIO 的表面來做選擇性結合 (selective binding)，此法除可用來偵測特定的分子之外，亦能夠降低非選擇性結合所造成的背景雜訊 (background noise) 與組織毒性 (toxicity)。

近年來有關 SPIO 的研究已經激起眾多學者的興趣，主要原因有以下幾點：

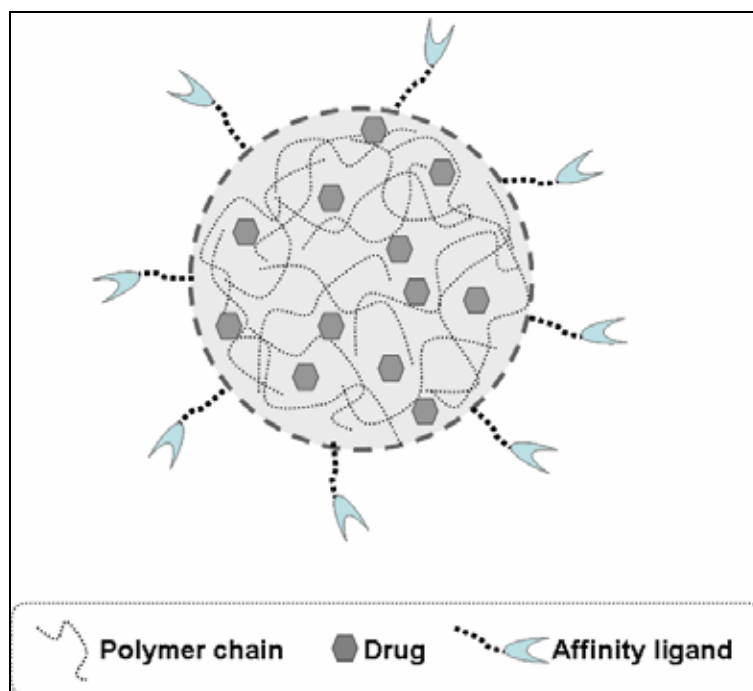
- (a) 與其他顯影劑相比，每一單位的 SPIO 可提供較顯著的訊號變化。
- (b) 氧化鐵奈米粒子可被細胞代謝吸收，相較於其他金屬材料，更適合被運用在活體動物試驗。
- (c) 藉由表面塗層 (coating) 可直接於 SPIO 表面結合配體及官能基 (functional groups) 而達到選擇性結合的效果。
- (d) 可直接使用光學及電子顯微鏡偵測 SPIO。
- (e) SPIO 的磁性可透過控制其尺寸大小來做調整。
- (f) 目前尚無研究發現 SPIO 會對人體造成傷害。

### 三、奈米材料之種類與特性

奈米材料的種類繁多，較常見的有三種：奈米微粒（nanoparticles）、奈米纖維（nanofibers）、奈米線材（nanowires），這幾種材質的特性各有特色，且可被應用的領域及範疇均不同。

#### 1. 奈米微粒

奈米微粒的製備可利用高分子聚合物（polymers）<sup>16</sup>、樹突狀高分子（dendrimers）<sup>17</sup>、微乳劑（microemulsions）<sup>18</sup> 等材料，其優勢來自於其組成結構，包含一個核心以及外鞘，因此當被用做藥物釋放載具時，其所運輸的基因或藥物可被包覆在奈米微粒的核心內，以與外界微環境（microenvironment）如酸鹼值（pH）、離子強度（ionic strength）、化學氧化或還原（chemical oxidation or reduction）、催化酵素（catalytic enzymes）等隔絕，如此除可避免基因或藥物在被運送至目的地前受到周圍環境的破壞，亦可避免與其他不相關的細胞或組織進行非必要的接觸，以減少其副作用。至於微脂粒（liposomes）是指脂質所形成的空心微球，可懸浮於水相中，其脂質膜表面主要是由磷脂質所構成的脂質雙層（lipid bilayers），其結構安排與正常的細胞膜十分近似，如此便具有可與細胞膜融合或被細胞吞食的特性，同時也可依不同用途量身裁製以被運用在生物體內分子辨識、訊號以及通透性的控制<sup>19,20</sup>。再者，奈米微粒亦可在其外鞘表面進行修飾，結合配體或是抗體，透過與接受器（receptor）的專一性結合，將被運輸的基因或藥物引導至特定的細胞，再進行控制性的釋放以產生作用（圖一）。



圖一、奈米微粒核心裝載藥物/表面連結基體示意圖。

## 2. 奈米纖維

奈米纖維是利用奈米生化技術所開發出來的新材料之一，其主要的製造方式包括三種：電紡絲法 (electrospinning)、自我組裝 (self-assembly) 以及相分離法 (phase separation)，其中最常用到的方法是電紡絲法<sup>21</sup>。一般而言，奈米纖維具備高度生物相容性 (biocompatible) 及生物可溶解性 (biodegradable) 等優點，因此可藉由體內正常的新陳代謝加以分解、吸收或是排出體外。不僅如此，由於奈米纖維具有特大表面積與高孔隙性的特性，因此在許多不同的領域都有非常廣泛的用途，其中包括：

(1) 細胞支架 (cell scaffold) 材料：

運用於骨骼肌肉、皮膚、血管、神經等組織工程 (tissue engineering)<sup>21</sup> 或是人工敷料、植入體表面鍍層等。

(2) 藥物、蛋白質、DNA 或細胞運輸的載體<sup>21</sup>。

(3) 電子材料：

奈米纖維可作為高效能儲氫材料、感應器與感光材料，而利用導電高分子可製作具有導體與半導體特性的分子纖維，取代一般電路所用的導電材料。

(4) 負離子纖維材料用於高效率過濾材，有防靜電、除塵、除臭等防治空氣污染的用途。

(5) 光子晶體纖維 (photonic crystal fiber)，其光傳遞功率高可取代傳統的光纖<sup>22</sup>。

## 3. 奈米線材

奈米線材可被用於製作奈米線感測器，這是利用具有分子辨識功能的生物分子來改變奈米線材的表面性質，以偵測與其具有專一性交互作用的分子。由於奈米線材的尺寸極小且敏感度極高，因此受測物之濃度與數量閾值均可降至最低，這便是所謂的超感度偵測器<sup>23</sup>，可用來做早期疾病的偵測。此外，奈米線偵測器也可被植入微整合型生物晶片 (lab-on-a-chip) 中作為疾病診斷以及藥物傳輸的用途，更有文獻指出利用奈米線材的高表面積以及良好電子通路的特色可應用在 DNA 的偵測<sup>24</sup>。因此，利用奈米線材體積小且敏感度高的特性，將其植入儀器或是與其他系統整合，可針對不同目的做高敏感度偵測，其未來應用的範圍將十分廣泛。

## 四、奈米生醫材料於幹細胞生物醫學之應用

### 1. 疾病的診斷

目前在醫療院所診斷疾病時較常使用的先進影像掃描儀器，包括核磁共振影像掃描 (MRI) 及正子放射型斷層掃描術 (Positron Emission Tomography, PET)。MRI 是目前較先進的人體掃描方法，可取得相當清晰的影像，且無需使用任何放射性物質，檢查過程安全且舒適，對人體不會造成傷害。而 PET 則是一種非侵入性之核子醫學造影技術，正子放射藥物可經由吸入、吞食或注射進入體內，再以 PET 偵測此放射藥物在體內之分佈，進行全身器官組織之功能性造影檢查。以上兩種造影技術之原理相近，皆可用於疾病之診斷。但現在病患又多了一個新的選擇，可利用奈米生醫材料來做影像擷取。目前最常用於造影的奈米生醫

材料即為上述之 SPIO，主要用來診斷發炎性疾病 (inflammatory disease) 及退化性疾病 (degenerative disease)，例如局部腦缺血 (focal ischemic lesions)<sup>25,26</sup>、動脈硬化 (atherosclerosis)<sup>27</sup>、多發性硬化 (multiple sclerosis)<sup>28</sup>、腎臟疾病 (kidney disease)<sup>29</sup>、骨關節炎 (osteoarthritis)<sup>30</sup> 等，均可利用 SPIO 做為 MRI 顯影劑的功能，來達到診斷的目的。除此之外，利用奈米線材研發而成的超感度偵測器<sup>23</sup>，除了能提供早期的診斷外，亦能夠提供更準確及精準的結果。

另一種應用則是對於特定疾病細胞的偵測，透過表面修飾方法將螢光分子以及抗體以聚合分子鏈 (polymer chain) 修飾於奈米材料表面，經由抗體及抗原間的特定結合 (specific binding)，將帶有螢光抗體的奈米材料連結到專一的結合器或抗原上，透過特定的偵測法，可以偵測到體內特定細胞如癌幹細胞 (cancer stem cells) 的分佈及含量，進一步瞭解疾病的嚴重程度與發展，以利擬定治療方針與術後照護。

## 2. 疾病的治療與組織的修復

奈米生醫材料應用於疾病的治療與組織的修復，除可利用其細胞追蹤 (cell tracking) 及分子標示 (molecular targeting) 的功能來達到標靶治療 (targeted therapy) 的目的外，藥物傳遞及控制釋放的機制亦是治療的重點之一。奈米材料之應用除了疾病的診斷外，另一個重點是癌症的治療，近年來這種利用分子標示的方法進行標靶性治療已逐漸發展成為一個熱門的領域。除此之外，過去慣用的系統性的給藥常常無法達到有效治療的需求，為了更準確的將藥物、幹細胞或是基因傳遞至發炎、損壞、或需要修復的組織與細胞上，奈米生醫材料的出現，提供了標靶治療及控制性藥物釋放的極佳工具。

### (a) 針對癌幹細胞的治療

目前盛行的癌症治療主要是透過全身性的化學治療，此治療方式常不具專一性，除了會使癌細胞死亡之外，在治療的過程中也會導致正常的細胞一併被破壞，造成許多癌症患者最後不是因為癌症的惡化而死亡，反而是因化療的副作用而失去生命。科學家為了提升癌症病人的生活品質以及治療的效果，不斷地在尋找新的治療方式。深入的研究發現，癌組織多數是由異質細胞族群 (heterogeneous cell population) 所形成，除了癌細胞外，在癌組織內另存有一小部分含有幹細胞特性的癌幹細胞<sup>31</sup>。近年來有許多研究指出，癌幹細胞可能是癌組織中少數具有無限增殖潛能的癌生成細胞，而癌症的形成與復發很可能是由於這些極少數的癌幹細胞不斷增生或復育出癌細胞所造成的<sup>32</sup>。如吾人所知，幹細胞的特徵在於它們會進行不對稱分裂 (asymmetric division)，形成新的幹細胞以及分化的細胞<sup>31-33</sup>。正常幹細胞的分裂會受到生物機制的控制，透過有限度的增生來修補受傷或凋亡的細胞，而癌幹細胞的特徵則是在於它們會不正常的增生，形成大量的癌細胞<sup>31</sup>。許多研究已在身體不同部位的癌細胞中發現癌幹細胞的存在，包括：血液、乳房、中樞神經、胰臟、皮膚、腦部、頸部、直腸、以及前列腺等部位<sup>31,34</sup>。目前的研究認為如果只是把分化的癌細胞移除，殘留下來的癌幹細胞仍會繼續不斷增生，所以如果無法徹底清除體內的癌幹細胞，對癌症的治療就無法達到百分之百的效果或是有復發、轉移之可能，而目前傳統化學療法最大的困難之一就是無法針對

癌幹細胞進行百分之百移除或消滅的動作，因此利用奈米材料進行腫瘤幹細胞的追蹤觀察或標靶治療，在癌症的治療與診斷上十分具有潛力。舉例而言，許多癌幹細胞擁有特殊的 CD133 抗原<sup>35</sup>，因此在奈米材料上修飾 CD133 抗體及螢光材料或抗癌藥物，透過抗體與抗原的特定結合可以辨識及標定癌幹細胞的位置與分布，再利用奈米微粒將藥物包覆在核心內，直接運送到癌幹細胞的位置，以進行特定部位的抗癌治療，其優點除可提高治療的效果外，亦可避免藥物與一般正常細胞的接觸，以減低正常細胞的死亡率與降低藥物的作用。

#### (b) 奈米微粒之藥物傳遞

隨著科技的進展，臨床藥物的治療需求亦需提高其精準度，藥物若直接以全身性的方式給藥如注射或口服，無法達成精準的控制，因為藥物經注射或口服後，會經由血液循環被運輸至全身各個器官，如此除了需接受治療的組織或細胞可能因為大部分藥物被稀釋至其他部位而導致劑量、作用濃度不足以外，也容易造成其他組織的不良反應或副作用，為改善此缺點，許多研究將藥物包覆在奈米微粒內，並視目標細胞表面之抗原及接受器，決定要在奈米微粒上結合相對應之抗體以增加其專一性。如前所述，若在奈米微粒表面修飾特定的抗體，這些抗體將會指引奈米微粒鏈結至細胞膜表面含特定接受器的細胞，再透過與周邊環境的影響與互動，可將藥物釋放至細胞，而當藥物被運輸至特定細胞之前，奈米微粒會保護這些藥物不受破壞或分解，以確保藥物在到達特定組織前不會失去其原本活性，而降低該藥物之療效。

#### (c) 奈米纖維之藥物投遞與控制釋放機制

奈米纖維的優勢是在於它能與細胞或藥物結合，形成支架 (scaffold) 作為細胞貼附與生長的基質，並且提供藥物控制釋放的機制<sup>36</sup>。奈米纖維已被運用在藥物的投遞與組織工程的研究，在藥物投遞方面，利用將藥物包覆在奈米纖維形成的水膠 (hydrogel) 之內，活體注射後可以延長藥物在組織內與細胞接觸的時間，以提高藥物的吸收效率。尤有甚者，透過表面修飾與基因重組的技術，更可以進一步提高奈米纖維的水溶性、免疫相容性 (immunocompatibility) 以及細胞吸收率的專一性，因此可改善傳統藥物投藥的一些問題，例如有限的生體可用率 (bioavailability)、標靶投藥的準確度以及全身性的不良反應或副作用<sup>36</sup>。

奈米纖維能夠裝載的藥物十分多元，包括大、小分子藥物如胺基酸、蛋白質、DNA、siRNA、以及小分子化合物 (small molecules)。另外在組織工程方面的應用，奈米纖維可結合幹細胞或生長因子，如血管內皮生長因子 (Vascular Endothelial Growth Factors, VEGFs) 及血小板衍生生長因子 (Platelet Derived Growth Factors, PDGFs)，形成一個複合式支架 (complex scaffold)，透過直接注射至須進行修復的受損組織位置，可以幫助肌肉、皮膚、血管以及神經等組織進行修復與再生<sup>21</sup>。不同的生長因子因為與奈米纖維連結親和力 (binding affinity) 之強弱不同，其擴散 (diffuse) 出去乃至為細胞所吸收的時間長短亦不同，因此依據奈米纖維所要攜帶的生長因子之不同，就必須設計不同的控制釋放機制，以達到最佳的釋放時間與速率<sup>37</sup>。過去我們的研究曾利用自組裝的胜肽奈米纖維 (self-assembling peptide nanofibers) 攜帶 PDGF 進行受損心肌的修復<sup>36,38</sup>，其效果與直接將 PDGF 注入

心肌有相當顯著的差異，主要的原因即在於奈米纖維與 PDGF 形成的複合式支架能夠將 PDGF 保留在受損的心肌上，而不被血液循環所移除，因此可以延長 PDGF 心肌修復的時間，而提高其治療效果。

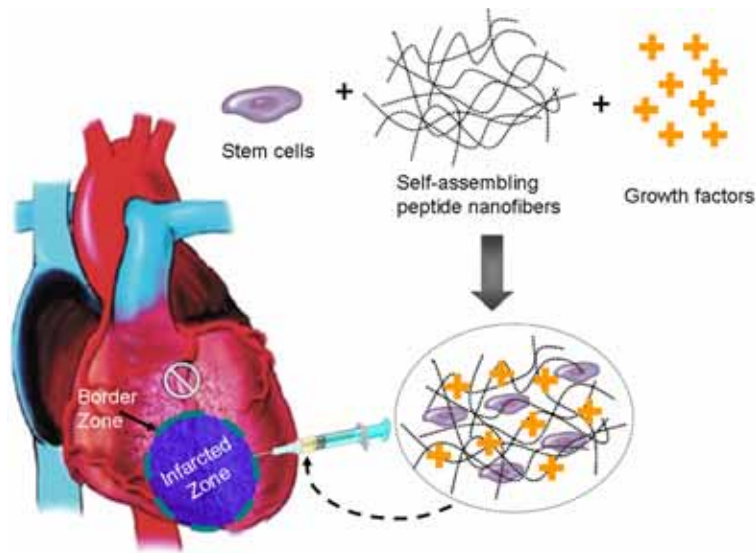
一般而言，利用奈米纖維進行控制性藥物釋放其主要的機制有三種，第一種是奈米纖維隨時間自我分解而釋放出包覆在內層的藥物或生長因子，第二種是透過化學鍵結裂解的方式來釋放所攜帶的藥物或生長因子，第三種則是利用自發性蛋白質分解酵素（protease）來切斷奈米纖維與藥物或生長因子的鍵結<sup>37</sup>。第一種釋放方式主要運用於藥物被包覆在奈米纖維支架內部但不被鍵結，藥物到達目的地後會隨著濃度的梯度由支架內被釋放，其所需要的藥物釋放時間最為短暫。第二種釋放機制是以離子或共價鍵結藥物在奈米纖維支架上，鍵結周圍的奈米纖維自我分解後，被鍵結住的物質就會被釋放，但周邊的微環境也會影響釋放的速率與時間，一般來說此種釋放機制所需的時間最長，亦最不受控制。最後一種則是利用酵素切斷鍵結的奈米支架，此類鍵結需要透過蛋白分解酵素的作用才會被剪斷，因此只有在有酵素存在的狀況下，藥物才會被釋放出來。根據不同的需求，這些釋放的機制可以單獨被應用，或甚至經過處理成為多功能性的釋放，在同樣的奈米纖維上以多重釋放機制來進行細胞或組織之修復。

#### （d） 奈米材料與幹細胞之結合

幹細胞治療最大的限制主要在於它的體內保留率（retention rate）與存活率（survival rate）過低。過去許多研究將幹細胞直接注入體內後，發現大多數幹細胞會馬上死亡，而存活下來的幹細胞在需要修復的組織上停留的時間也極短，往往會隨著血液循環漂流至其他組織部位，因此透過與奈米材料結合後，將幹細胞與奈米材料的支架注射至急需修復的部位，如心肌梗塞後受損之心臟肌肉（圖二），可大大提升移植幹細胞的存活率與保留率，以促進幹細胞治療的效果。除此之外，上述提及的奈米纖維結合幹細胞或生長因子之控制釋放機制及標靶投遞的特性，亦可被應用於幹細胞的研究與治療。例如，由於胜肽奈米纖維本身會自行降解且其生物相容性也相當高，既不會造成宿主免疫反應也不會增加組織發炎程度，因此與傳統生醫材料相比較，具有相當高的優勢。

## 五、未來展望

奈米科技於幹細胞生物學的應用主要目的在達到疾病早期的診斷、提高診斷結果的靈敏度、精準的控制與釋放機制進行藥物投遞及利用標靶治療的方法來提升治療效果，為在精準控制的狀況下達成此目標，必須廣泛的利用上述所提及的生醫奈米材料特色，來研發出高專一度、高準確度以及高敏感度的診斷、治療技術及工具。幹細胞研究及奈米科技發展二者均需要大量的研究人才及資金不斷的注入，各領域對幹細胞的了解日益加深，再加上創新奈米技術的配合及輔助下，讓研究人員可以在奈米的尺度下探討生醫奈米材料與幹細胞之間的交互作用機制，這是過去所無法達成的，因此奈米技術水準與研究平臺的開發，是未來幹細胞研究的重點發展方向之一，希望藉由這些跨領域的結合，能激發出新的火花，提供臨床診斷與治療的新契機。



圖二、利用自組裝肽奈米纖維結合生長因子藥物釋放與幹細胞治療，可以提升幹細胞注射至受損心肌後的存活率與保留率，以促進心肌再生。

## 六、參考文獻

1. Ebbesen, M. & Jensen, T. G. Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications. *J Biomed Biotechnol.* **2006**:515-16 (2006).
2. 高逢時. 科學發展, (行政院國家科學委員會, 臺灣, 2005).
3. Csaki, A., Moller, R. & Fritzsche, W. Gold nanoparticles as novel label for DNA diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* **2**:187-193 (2002).
4. Chan, W.C. & Nie, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* **281**:2016-2018 (1998).
5. Weissleder, R., Moore, A., Mahmood, U., Bhorade, R., Benveniste, H., Chiocca, E. A. & Bacion, J. P. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med.* **6**:351-355 (2000).
6. Winter, P. M., Morawski, A. M., Caruthers, S. D., Fuhrhop, R.W., Zhang, H., Williams, T. A., Allen, J. S., Lacy, E. K., Robertson, J. D., Lanza, G. M. & Wickline, S. A. Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta3-integrin-targeted nanoparticles. *Circulation* **108**:2270-2274 (2003).
7. Roco, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol.* **14**:337-346 (2003).
8. Vinogradov, S. The second annual symposium on nanomedicine and drug delivery: exploring recent developments and assessing major advances. 19-20 August 2004, Polytechnic University, Brooklyn, NY, USA. *Expert Opin Drug Deliv.* **1**:181-184 (2004).
9. Chan, W. C., Maxwell, D. J., Gao, X., Bailey, R. E., Han, M. & Nie, S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol.* **13**:40-46 (2002).



10. Raymo, F.M. & Yildiz, I. Luminescent chemosensors based on semiconductor quantum dots. *Phys Chem Chem Phys*. **9**:2036-2043 (2007).
11. Goldman, E. R., Balighian, E. D., Mattoussi, H., Kuno, M. K., Mauro, J. M., Tran, P. T. & Anderson, G. P. Avidin: a natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. *J Am Chem Soc*. **124**:6378-6382 (2002).
12. Medintz, I. L., Clapp, A. R., Mattoussi, H., Goldman, E. R., Fisher, B. & Mauro, J. M. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat Mater* **2**:630-638 (2003).
13. Jin, R., Cao, Y., Mirkin, C. A., Kelly, K. L., Schatz, G. C. & Zheng, J. G. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. *Science* **294**:1901-1903 (2001).
14. Kim, S., Lim, Y. T., Soltesz, E. G., De Grand, A. M., Lee, J., Nakayama, A., Parker, J. A., Mihaljevic, T., Laurence, R. G., Dor, D. M., Cohn, L. H., Bawendi, M. G. & Frangioni, J. V. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*. **22**:93-97 (2004).
15. Cheng, F. Y., Su, C. H., Yang, Y. S., Yeh, C. S., Tsai, C. Y., Wu, C. L., Wu, M. T. & Shieh, D. B. Characterization of aqueous dispersions of Fe(3)O(4) nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials* **26**:729-738 (2005).
16. Kuang, M., Duan, H., Wang, J., Chen, D. & Jiang, M. A novel approach to polymeric hollow nanospheres with stabilized structure. *Chem Commun (Camb)*, 496-497 (2003).
17. Nakajima, R., Tsuruta, M., Higuchi, M. & Yamamoto, K. Fine control of the release and encapsulation of Fe ions in dendrimers through ferritin-like redox switching. *J Am Chem Soc*. **126**:1630-1631 (2004).
18. Zarur, A. J. & Ying, J. Y. Reverse microemulsion synthesis of nanostructured complex oxides for catalytic combustion. *Nature* **403**:65-67 (2000).
19. 余秀瑛. 微脂粒為基因媒傳之研究. *國科會生命科學簡訊* 第 15 卷(2001).
20. Cortesi, R. & Nastruzzi, C. Liposomes, micelles and microemulsions as new delivery systems for cytotoxic alkaloids. *Pharm Sci Technolo Today* **2**:288-298 (1999).
21. Vasita, R. & Katti, D.S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomedicine* **1**:15-30 (2006).
22. 工研院化工所企推組研發室聞勛琪經理. 奈米化學之發展潛力. *化工產業技術知識網* <http://www.chemtech.com.tw/Column.php?mode=detail&id=32>.
23. Cui, Y., Wei, Q., Park, H. & Lieber, C.M. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science* **293**:1289-1292 (2001).
24. Li, Z., Chen, Y., Li, X., Kamins, T., Nauka, K. & Williams, R. S. Sequence-Specific Label-Free DNA Sensors Based on Silicon Nanowires. *Nano Letters* **4**:245-247 (2004).
25. Saleh, A., Wiedermann, D., Schroeter, M., Jonkmanns, C., Jander, S. & Hoehn, M. Central nervous system inflammatory response after cerebral infarction as detected by magnetic resonance imaging. *NMR Biomed*. **17**:163-169 (2004).
26. Saleh, A., Schroeter, M., Jonkmanns, C., Hartung, H. P., Mödler, U. & Jander, S. In vivo

- MRI of brain inflammation in human ischaemic stroke. *Brain* **127**:1670-1677 (2004).
27. Hyafil, F., Laissy, J. P., Mazighi, M., Tchétché, D., Louedec, L., Adle-Biasette, H., Chillon, S., Henin, D., Jacob, M. P., Letourneur, D. & Feldman, L. J. Ferumoxtran-10-enhanced MRI of the hypercholesterolemic rabbit aorta: relationship between signal loss and macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**:176-181 (2006).
  28. Dousset, V., Brochet, B., Deloire, M. S., Lagoarde, L., Barroso, B., Caille, J. M. & Petry, K. G. MR imaging of relapsing multiple sclerosis patients using ultra-small-particle iron oxide and compared with gadolinium. *AJNR Am J Neuroradiol.* **27**:1000-1005 (2006).
  29. Bos, C., Delmas, Y., Desmoulière, A., Solanilla, A., Hauger, O., Grosset, C., Dubus, I., Ivanovic, Z., Rosenbaum, J., Charbord, P., Combe, C., Bulte, J. W., Moonen, C. T., Ripoche, J. & Grenier, N. In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology* **233**:781-789 (2004).
  30. Simon, G. H., von Vopelius-Feldt, J., Fu, Y., Schlegel, J., Pinotek, G., Wendland, M. F., Chen, M. H. & Daldrup-Link, H. E. Ultrasmall supraparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging of antigen-induced arthritis: a comparative study between SHU 555 C, ferumoxtran-10, and ferumoxytol. *Invest Radiol.* **41**:45-51 (2006).
  31. Soltysova, A., Altanerova, V. & Altaner, C. Cancer stem cells. *Neoplasms.* **52**:435-440 (2005).
  32. Sell, S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* **51**:1-28 (2004).
  33. O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**:106-110 (2007).
  34. Tang, C., Ang, B.T. & Pervaiz, S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J* **21**(14):3777-3785 (2007).
  35. Ferrandina, G., Bonanno, G., Pierelli, L., Perillo, A., Procoli, A., Mariotti, A., Corallo, M., Martinelli, E., Rutella, S., Paglia, A., Zannoni, G., Mancuso, S. & Scambia, G. Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* (2007).
  36. Hsieh, P. C., MacGillivray, C., Gannon, J., Cruz, F. U. & Lee, R. T. Local controlled intramyocardial delivery of platelet-derived growth factor improves postinfarction ventricular function without pulmonary toxicity. *Circulation* **114**:637-644 (2006).
  37. Davis, M. E., Hsieh, P. C., Grodzinsky, A. J. & Lee, R. T. Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials. *Circ Res.* **97**:8-15 (2005).
  38. Hsieh, P. C., Davis, M. E., Gannon, J., MacGillivray, C. & Lee, R. T. Controlled delivery of PDGF-BB for myocardial protection using injectable self-assembling peptide nanofibers. *J Clin Invest.* **116**:237-248 (2006).



## 第六章

### 複製動物技術在幹細胞相關研究之應用

# Application of Animal Cloning Technologies in Studies Related to Stem Cells

吳信志<sup>1,2</sup> 鄭登貴<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>臺灣大學動物科學技術學系 <sup>2</sup>臺灣大學生物科技研究所

## 一、前言

近十餘年來，有關動物複製（animal cloning）、基因轉殖（transgenesis）、及幹細胞（stem cells）之分離、建立和再生醫學（regenerative medicine）等相關領域研究之進展殊為快速；其中若干特定技術，諸如：治療用複製技術（therapeutic cloning）、胚幹細胞（embryonic stem cells, ESCs）及成體幹細胞（adult stem cells, ASCs）之建立、報導基因轉殖（reporter gene transfer）、幹細胞誘導分化、生物可降解性（biodegradable）之組織工程材料，與細胞移植等相關技術之發展，促使人類遺傳性及非遺傳性疾病之治療增添了許多新方法。然而迄今上述領域部分已建立之技術尚未臻成熟階段，仍有待進一步之研究結果驗證及經驗之累積才能進入臨床應用，其間之動物模式研究更存在許多有關倫理道德、宗教、法令規範及動物福利等方面之爭議問題需逐一克服。

取自病人之體細胞做為細胞核之來源，藉由體細胞核移植（somatic cell nuclear transfer, SCNT）技術生產病人基因組一致性之複製囊胚，再建立源自該囊胚內細胞群之胚幹細胞，即所謂之核移植胚幹細胞（ntESCs），將 ntESCs 進一步於體外誘導分化為病人治療所需要之細胞，即可進行自體細胞移植（autograft），此法具遺傳一致性及免疫相容性之優點，可將細胞移植後之排斥問題降至最低，即人類治療用複製之策略應用<sup>1</sup>。此外，結合細胞之基因轉殖及 SCNT 技術，可產製基因轉殖複製囊胚，於體外適當培養條件下可建立轉基因之胚幹細胞，甚至將此複製胚經移置同期化處理之受胎動物後，可獲得攜帶轉殖基因之複製個體（transgenic cloned individuals），尤其產製全身性或組織專一性表現報導基因（reporter gene）之轉基因動物，進一步分離其成體幹細胞，將其誘導分化後或直接進行體內移植，做為再生醫學之動物模式研究的可追蹤性細胞來源，應用此基因轉殖及複製技術平臺，未來在許多人類疾病之細胞治療（cell therapy）、基因治療（gene therapy）及損傷組織之修補上皆具極大之應用潛力。

## 二、幹細胞之分類及應用

舉凡具自我更新 (self renewal) 能力並於體內和/或體外適當環境調節下，可分化為不同成熟細胞系 (cell lineage) 之細胞即稱為幹細胞。依幹細胞之來源區分為胚源性幹細胞及體源性幹細胞 (somatic stem cells)，依幹細胞之分化潛能，可分為 1. 全能性幹細胞 (totipotent stem cells, TSCs): 每一個全能性幹細胞有能力可發育成一個完整的生物個體，包括胎兒及胎盤二部分，如精子和卵子結合成為受精卵後，一個受精卵分裂成為二個完全相同的胚葉細胞 (blastomere)，二個細胞再分裂成為四個細胞，在此時期每個細胞中任何一個細胞被移置於同期化之生殖道中均具有發育成為單獨且完整個體之能力，此種細胞即稱為全能性幹細胞。 2. 多能性幹細胞 (pluripotent stem cells, PSCs): 細胞具有分化成多種細胞或組織能力者稱之，該種幹細胞可發育成胎兒，但無法發育成胎盤組織部份。如由早期囊胚之內細胞群所分離及建立之胚幹細胞株即屬多能性幹細胞。此細胞必須與可發育成胎盤之全能性宿主胚或滋養層細胞結合，由胎盤組織供應胚胎發育所需之營養，才能發育成完整個體。此外，源自胚胎性腺之始基生殖細胞 (primordial germ cells, PGCs) 者如胚生殖細胞及胚胎瘤細胞 (embryonal carcinoma cells, ECs) 亦具有分化成內胚層、中胚層及外胚層等三種胚層細胞之潛能。 3. 複能性幹細胞 (multipotent stem cells, MSCs): 指可以分化成特異性組織之不同細胞，但卻失去了發育成完整個體之能力，包括造血幹細胞、MSCs 及神經幹細胞等。 4. 單能性幹細胞 (unipotent stem cells, USCs): 此種幹細胞只能分化成單一類型或與其相關之多種類型之細胞，如上皮組織基底層之幹細胞、肌肉中之成肌細胞、成熟前之 T-細胞及 B-細胞等。其中由早期胚分離之胚幹細胞最具研發潛力，然而受限於各物種胚幹細胞之分離及培養技術尚未完全建立，以嵌合體動物之產製為標準，目前只有小鼠<sup>2</sup>、大鼠<sup>3</sup>及豬<sup>4</sup>之胚幹細胞首次被證實成功建立；其他種別哺乳動物如牛、羊、兔、倉鼠及雪貂等之胚幹細胞則緊及類胚幹細胞之發展階段，至於人之胚幹細胞株最早由 Thomson *et al.* 所發表<sup>5</sup>，雖於體外試驗已證明其為分化多能性細胞，然亦僅止於類胚幹細胞階段。因此，由攜報導基因之體細胞複製動物以複能性或單能性之幹細胞取代胚幹細胞，做為體外誘導分化之細胞來源，就細胞移植後之生物安全性而言，未來在再生醫學之應用似乎可取代胚幹細胞所扮演之角色。

## 三、複製動物的方法

複製 (clone) 之定義一般指遺傳物質完全相同之個體或產生遺傳物質完全相同個體之過程。其中之個體，可以是特定之去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 片段、單一細胞、或為完整之多細胞生物<sup>6</sup>。截至目前為止，曾被發表之複製動物產製方法有三種，第一種方法為早期胚分切法 (embryo splitting)，將 2 至 16 細胞期之早期胚細胞分離成二組細胞，或桑椹期及囊胚期豬胚被均分成二等分後，被移置於同期化處理之受胎動物生殖道後，可產製獨立雙胞胎，然以此法所得之複製動物頭數僅限於兩頭；第二種方法為胚幹細胞與四倍體胚之配合使用，胚源性幹細胞在體外具增殖及分化成完整個體不同種類細胞之能力，當與早期胚凝聚 (aggregate) 或注入四倍體囊胚腔後，均可與之形成嵌合胚體 (chimeric conceptus)，因四倍體胚細胞僅發育成胎盤組織，胎兒組織之基因組均源自胚幹細胞已被證

實，經胚移置後所出生之個體可直接進行配種及分析其性腺傳承率（germ line transmission），此法可篩選出源自胚幹細胞基因組傳承之複製個體，雖然多種哺乳動物如小鼠、倉鼠、美洲貂、兔子、大鼠、牛、豬、恆河猴及人等均有成功建立胚幹細胞及類胚幹細胞之報導，惟以胚幹細胞成功以此法成功複製動物並具性腺傳承能力者，只有小鼠首次成功被 Wagayama *et al.* 所發表<sup>7</sup>。第三種方法係使用幹細胞或已分化之成年體細胞直接作為供核者，試驗流程未經嵌合體動物之產製，此法自桃莉羊誕生證實了已分化之體細胞可被回復至分化前之狀態後，胎源性成纖維母細胞及成年體細胞逐漸取代胚幹細胞在指定位置基因轉殖及基因剔除之優勢，以體細胞核移植方式進行指定位置基因轉殖綿羊<sup>8</sup>及基因剔除豬<sup>9,10</sup>等試驗被宣告成功。于豬胚幹細胞被證實成功建立之前，複製動物之產製策略主要決定於供核細胞之選擇，目前有三種不同來源之供核細胞可被應用於核移植試驗，包括胚源性細胞、胎兒纖維母細胞及成年體細胞等均有成功產製複製動物之例，理論上後二種細胞均較易取得及培養，而胚源性細胞增殖能力強，較適宜進行指定位置基因轉殖及基因剔除之研究，惟目前之細胞培養技術、遺傳工程技術及核移植技術之快速進展，已克服了許多複製試驗瓶頸，只要具有適當之可繼代性或增殖能力佳之任何種類細胞，均具有複製成完整個體之潛力，未來以此複製囊胚進行胚幹細胞之建立或分離技術平臺，將可作為人類疾病治療用複製之基礎。

### 三、複製動物技術之研究進展

#### 1. 國外體細胞複製動物之研究進展

脊椎動物複製之研究，首由美國科學家Briggs & King<sup>11</sup>成功地自青蛙的胚（2n）細胞成功複製青蛙，開啟脊椎動物複製之門。而1962至1975年Gurdon嘗試將已分化之腸道上皮細胞核及成蛙之角化皮膚細胞進行核移植，並探討其發育潛能，結果發現在經紫外線照射後之卵細胞質內的未知影響因子調節下，得到發育正長之成蛙，此結果更震撼全球生命科學界<sup>12,13</sup>。從此觸發無數研究人員探討複製哺乳動物之興趣，試驗之初係以哺乳動物為對象，重複Gurdon之試驗，但均未能獲得具體之成果，直至1986年Willadsen首次將綿羊八細胞階段之胚葉細胞核轉殖入另一去核卵細胞，成功複製綿羊，創造了以哺乳動物早期胚細胞複製成功之首例<sup>14</sup>。在複製豬研究方面，于1989年Prather 等以4-細胞期豬胚經核移植過程獲得一頭仔豬，此乃最早複製豬隻成功之例<sup>15</sup>；至1990年以早期胚細胞當供核細胞成功產製核移植之動物包括兔子<sup>16</sup>及牛<sup>17</sup>。直至Wilmot *et al.*<sup>18</sup>進一步將成年綿羊之乳腺上皮細胞株，以逐漸降低培養液中血清含量之方式，將其細胞周期回歸至G0期後作為供核細胞，成功獲得核移植綿羊（Dolly），此結果提示，分化後之細胞核可透過人為之處理方式，促使回復（reprogram）至分化前之狀態，同時突破了家畜核移置及基因剔除技術之研究瓶頸。隨後，Schnieke *et al.*<sup>19</sup>即以攜人類第九凝血因子基因之綿羊成纖維母細胞作為供核者，結果獲得人類第九凝血因子基因轉殖綿羊-Polly，可謂集核移置及基因轉殖技術研究之大成。再者Wakayama *et al.*<sup>20</sup>使用已分化之成年母小鼠之自然排出卵丘細胞（cumulus cells）、賽托力氏細胞（Sertoli cells）及腦神經細胞（brain neuronal cells），以預先製備之不同直徑大小玻璃針，將細胞質去除後所得之細胞核作為供核者，經注射於去核卵母細胞質後證實均具有發育成胎兒之潛能，尤其以卵丘細胞核當供核者之試驗結果更進一步證明可發育成完整個體，再次證實體細胞再程序

化後之發育潛能。以綿羊體細胞核移植配合指定位置基因轉殖技術亦於2000年被McCreath *et al.*研發成功<sup>8</sup>；以體細胞當供核者進行複製豬研究之三個團隊，幾乎同時發表複製成功之結果，其中不乏以體內成熟<sup>21,22</sup>與體外成熟<sup>23</sup>之卵母細胞當受核者，且皆成功地獲得複製豬。更新進者，係以豬之 $\alpha$ -1,3-半乳糖基因轉移酵素基因剔除之豬胎兒成纖維母細胞當供核者進行核移植試驗，成功獲得基因剔除複製豬之結果，于2002年相繼由密蘇里大學Lai *et al.*<sup>9</sup>及PPL公司Dai *et al.*<sup>10</sup>所發表，甚至基因座上的成對 $\alpha$ -1,3-半乳糖基因轉移酵素基因剔除豬亦被Phelps *et al.* (2003) 成功獲得<sup>24</sup>，此特性在家畜基因轉殖之研究及應用領域上，極具發展潛力及經濟價值。前述研究成果依專家評估其在人體器官移植應用之臨床試驗，所需時間評估指稱，未來四至六年內可能完成豬器官移植於人體之試驗目標，這項成果可在解決全世界器官短缺危機問題上，可提供近期解決之道，惟迄今仍有許多瓶頸尚待克服，主要係可能造成異種器官移植後之排斥問題（超急性排斥，急性排斥及慢性排斥等）所涉及之基因未能完全釐清所致。以成年體細胞成功複製優良遺傳性能之種公豬于2002年3月首由Infigen 和Genmark公司共同發表。之後，複製貓<sup>25</sup>、兔<sup>26</sup>、驢子<sup>27</sup>、馬<sup>28</sup>、大鼠<sup>29</sup>、狗<sup>30</sup>及狼<sup>31</sup>等，均陸續被成功複製。上述結果提示，體細胞複製動物技術已逐漸成熟，幾乎達可例行化產製之境界，惟複製胚之產製效率及胚移置後發育成完整個體之百分率仍低，約0.1~6%，其原因有待進一步試驗之結果謀求解決。

## 2. 國內複製動物之研究進展

早期臺灣複製哺乳動物之研究始於小鼠及牛胚分割所產製之同卵雙胞胎（identical twins）或三胞胎（triplet）；而應用核移植技術產製複製動物之研究分為二個階段，第一階段係以早期全能性之胚葉細胞當供核細胞所獲得之核移植豬<sup>4</sup>及兔<sup>32</sup>二個成功之例。畜產試驗所1992年發表小耳種迷你豬4細胞期胚葉細胞核移植於雜種豬之去核卵質中，結果成功獲得8頭核移植仔豬，其中存活6頭，2頭死產，最後育成5頭，此核移植小耳種迷你豬之出生體重為小耳種豬之145.45%。離乳體重為純小耳種豬之199.36%，顯示此等操作策略對豬隻之出生及離乳體重有改進之效果，惟六頭核移植豬之核內遺傳組成僅部分豬隻係完全相同；另於胚葉細胞核移植兔之試驗中證實，以八細胞期胚之胚葉細胞進行核移植可獲得核移植仔兔。臺灣動物科技研究所、臺灣大學及美國康乃迪克大學所組成之研究團隊於2001年1月開始採用新的核移植流程進行複製豬之研究，首次以成年母豬耳皮膚成纖維母細胞作為供核者進行完整細胞之核移植，執行11次之複製豬試驗，合計產製795個外觀形態完整之複製胚，經胚移置於11頭同期發情處理之受胚豬，其懷孕率可達55%（6/11），其中三頭受胚豬發生早期流產，合計流產出6個已成形之複製豬胎兒，另3頭受胚豬則順利懷孕至預產期，其中第一頭受胚豬並於2002年2月15日以剖腹產方式成功獲得全球第一頭攜雙轉殖基因之複製豬，其本尊為一頭高繁殖性能之基因轉殖母豬，總計7胎之平均產子頭數12.14頭，每胎平均活仔頭數10.30頭，活仔育成率100%，更難得者係同時於其泌乳期之乳腺同時表現豬乳鐵蛋白及人類第九凝血因子二種重組蛋白質，外源性豬乳鐵蛋白及人類第九凝血因子之表現量均可達200-500  $\mu\text{g/ml}$ ，人類第九凝血因子之表現量為正常人血漿中含量（5  $\mu\text{g/ml}$ ）之40-100倍，這不僅是臺灣第一例以成年母豬體細胞核移置方式所產製的複製豬，並為全球首例以成年母豬耳皮膚細胞作為供核者複製之母豬，同時也是全球第一例雙基因轉殖複製豬

<sup>33</sup>。截至目前為止，除雙基因轉殖複製豬之外，相同研究團隊另複製九頭優良種公豬及五頭斑點迷你豬，且證實有後代之傳承，同時亦將國內體細胞複製動物之效率由雙基因轉殖複製豬之 0.4% 提升十倍至優良種公豬之 4%；另於 2001 年由臺灣大學與畜產試驗所共創體細胞複製牛—畜寶成功之首例，雖只存活一週，確奠定了體細胞複製家畜之基礎，隔年二月又以轉染人類凝血第八因子之單株化體細胞成功產製基因轉殖複製牛—如意，同年七月相同研發團隊再創下國內第一例體細胞複製羊—寶吉、寶祥<sup>34</sup>。此結果提示臺灣之生物科技發展，部分領域已趕上國際先進國家，此家畜核移植技術未來可應用於農業及生物醫學領域，如複製遺傳背景一致性的動物、表現性能優越之基因轉殖動物，生產單一性別家畜及高生產性能之優良種畜，甚至瀕臨絕種野生哺乳動物之復育，以及將來豬隻之基因定位轉殖或基因剔除之研究功異種器官移植及以非繁殖性複製技術生產人之囊胚，並建立人類胚幹細胞，經誘導分化後產生病人自體細胞或組織，作為細胞或組織移植之用。

#### 四、核移植技術在幹細胞領域之應用

##### 1. 攜報導基因幹細胞之建立

核移植技術除應用於農業外，未來可展望於生物醫學領域之應用，包括以家畜作為生產醫藥蛋白之工廠、動物模式之研究、基因轉殖複製、自體細胞移植及將來豬隻之基因定位轉殖 (gene targeting) 或基因剔除 (gene knock out) 之研究，以解決豬器官應用於人類異種器官移植之排斥問題。由於體細胞核之再程序化機制目前尚待釐清，核移植技術被應用於生物醫學及農業之前，效率如何提升及改善複製動物之健康狀況，實為當前面對之最嚴格挑戰。哺乳動物之基因轉殖已執行二十年以上，外源基因嵌入仍為逢機方式，體細胞核移植技術配合同源基因組合 (homologous recombination) 之基因轉染策略，可使用經篩選確認為指定位置基因轉殖及剔除之體細胞進行核移植，此法產製之動物近乎 100% 為基因轉殖動物，此技術已被應用於豬之基因轉殖及複製，未來擬人化之基因轉殖複製豬器官供人類器官移植之器官來源是可預期者。而在幹細胞領域之應用主要以攜報導基因之轉基因動物之自體胚幹細胞建立及誘導分化為特定之細胞系，做為自體細胞移植及配合基因轉殖技術應用於基因治療，做為動物模式研究之用；另可配合基因轉殖複製技術產製攜帶及表現報導基因之基因轉殖個體，再由此基因轉殖個體之組織分離成體幹細胞，取得之成體幹細胞可做為體外誘導分化及體內移植之可追蹤性幹細胞來源，此策略最大之優點即單株化成體幹細胞及轉殖之報導基因之穩定表現。

##### 2. 核移植胚幹細胞 (nuclear-transfer embryonic stem cells, ntESCs) 之建立

胚幹細胞株在桃莉羊出生之前係唯一被認為可應用於指定位置基因轉殖者，以小鼠胚幹細胞進行基因組之遺傳修飾後，經與宿主胚融合及胚移置後所生下之嵌合體小鼠已被證實可性腺傳承至後代，然而除小鼠外並無其他哺乳動物之胚幹細胞被證實具相同之全能性分化能力，所幸者乃體細胞之核移植技術至桃莉羊誕生後被證實可行，單獨體細胞雖不具胚幹細胞之全能性分化能力，然而藉由去核 (enucleated) 之成熟卵母細胞質之再程序化



(reprogramming) 因子之作用即可回復分化之全能性。顯示，體細胞核移植技術成功後，體細胞將取代胚幹細胞在指定位置基因轉殖所扮演之角色。此外，以體細胞經核移植後之早期胚建立胚幹細胞之技術平臺，未來在細胞治療及自體細胞移植領域將扮演重要角色。在生命起源及分化之研究進展中發現，胚幹細胞建立及培養技術當與複製動物技術結合後，可提供新的治療疾病之方法，如藉由成年人體細胞之核移植胚產生自體幹細胞，或經體外誘導分化後生成各式個樣組織方式，以提供自體細胞或組織移植所需之材料。惟同時也引起科學團體、立法機構及許多社會團體如宗教及動物保護團體等之爭議，未來將如何合法地應用核移植技術及有效率地促進人類醫學領域發展，仍有待產、官、學、研之共同努力以謀求解決。

### 3. 自體細胞或組織移植

自第一頭成年母綿羊體細胞複製羊—桃莉於 1997 年被報導後，迄今取自胎兒時期及成年動物之體細胞複製哺乳動物合計 13 種動物種別陸續被產製，甚至藉由體細胞複製小鼠囊胚之體外培養，亦證實可成功建立具多分化潛能之小鼠胚幹細胞株，此技術之成功發展已奠定了人類治療用複製 (human therapeutic cloning) 之臨床應用基礎，除可應用病人本身之體細胞進行非生殖性複製 (nonreproductive cloning) 囊胚之產製外，尚能以該囊胚建立源自病人體細胞基因組之胚幹細胞株，將其誘導分化為病人所需治療或修補之細胞後，即可進行自體細胞移植，此技術流程就免疫學觀點而言，將可提高移植用細胞與宿主之遺傳相容性 (genetic compatibility)。此外，藉由複製動物技術亦可先於體外進行細胞層次之基因組改造 (genome modification)，甚至進行細胞之指定位置基因轉殖，包括外源報導基因、正常基因組序列及組織專一性表現基因的構築策略，同時可促進幹細胞研究之動物模式進展及早日達成先天性遺傳缺陷病人之基因治療目標；胚幹細胞及諸多不同組織來源之成體幹細胞均已被成功分離、純化與定性，除 ESCs 於體內及體外試驗證明確實具備多分化潛能之特性外，原認定於體內自然環境下屬於複分化或單分化潛能之 ASCs，亦陸續於體外特定誘導分化培養條件下，被證明可能具分化為多種細胞系之潛能，甚至藉由體內之試驗證明 ASCs 可參與早期哺乳動物胚及胎兒組織之分化<sup>35</sup>，未來將複製動物技術結合不同來源之體細胞、幹細胞與生醫材料及組織工程產品等之應用，預期對於修復及更新人類受損組織之構造及功能，將極具產業化及臨床之應用價值。

胚幹細胞培育成功促使許多藥廠對其具有極高之憧憬，主要係為利用胚幹細胞分化成特定組織或器官之細胞特性，另可開發誘導或阻礙分化之醫療藥物；同時在研究或測試之正常細胞來源上亦不再依賴由活體組織取得有限且少量之限制，同時在藥物開發過程中，藥物安全性的分析，亦可由特定幹細胞或由幹細胞分化之專一細胞作為試驗之目的，而非傳統上必須進行耗時費力又昂貴的動物實驗。例如利用幹細胞測試藥物對於細胞生長和細胞發育之影響，即可推估知此藥物是否對於懷孕中之胎兒有安全性之考量等。因此，胚幹細胞及細胞核移轉技術可應用於研究人類基因表現，個體發育、疾病及癌症發生原因等，以及開發新藥、分析及篩選有效成份及安全評估，生產特定細胞組織，作為移植、更新及治療人類疾病如帕金森症 (Parkinson's disease)、中風 (stroke)、心臟血管疾病 (cardiovascular disease)、脊椎神經受傷 (spinal cord injury)、肝硬化及糖尿病等。

#### 4. 治療用複製所面臨之問題

複製動物之技術迄今雖已發展至例行化階段，然而以核移植技術所產製之複製動物常發生健康狀況異常之問題，因此以體細胞核移植技術所產生之囊胚，未來是否發展為健康之個體，亦為人類治療用複製過程所建立之病人專一性胚幹細胞正常與否之關鍵，此胚幹細胞經誘導分化後之標的細胞經移植於病人體內進行組織修補或基因治療之過程是否具造成畸胎瘤（teratoma）之風險，均為臨床應用前所應關心之重要課題。

有可將已分化之體細胞再程序化迄全能性細胞狀態之方法，係藉由成熟未受精卵母細胞質完成之，再進一步分離其多分化潛能之胚幹細胞。然而卵母細胞質之取得困難並牽涉到倫理道德及法令規範問題，且捐卵者亦可能承擔取卵及麻醉之風險。另以種間核移植之策略，即藉由非人類之成熟卵母細胞進行再程序化為全能性細胞之過程，然此策略亦需考慮細胞質粒線體 DNA 之優勢與否及其相關基因之後續影響層面問題，且在法令及宗教團體之爭議亦需克服。因此，最好之策略係將已分化之體細胞核直接再程序化至多分化潛能之細胞，新近雖有報告發表已透過指標基因轉殖方式成功地將小鼠體細胞於體外培養迄多分化潛能之類胚幹細胞<sup>36</sup>，然欲將此細胞應用於人類之臨床上，尚需考量人類細胞基因改造之影響效應及可行性，此策略產生胚幹細胞之品質、分化潛能及生物安全性均需慎重考量。

由複製胚體（conceptus）之許多生理學的觀察證據顯示其胎盤功能問題，另有關複製胚發育銘印基因表現之研究結果顯示，胎兒之銘印基因表現傾向於正常過程，惟胎盤之銘印基因表現常出現脫軌現象。複製胚發育最早的異常現象係發現於早期囊胚期之滋養外胚層細胞之過度基因甲基化作用（hypermethylation），雖然於胎盤之 X 染色體上許多基因之表現被發現有異常現象發生，然而於內細胞群之 X 染色體不活化作用似乎是正常者。複製胚之內細胞群及胎兒發育傾向於正常之再程序化過程，而其滋養層細胞及胎盤發育則常發現異常之再程序化現象。因此由內細胞群所建立之胚幹細胞將可能較傾向於正常者<sup>37</sup>。

### 五、結語及未來展望

過程生物技術係二十一世紀全球重點發展科技，而複製科技更結合組織及細胞培養技術、核移植技術、遺傳工程、基因轉殖及胚移置技術等發展生物技術之關鍵性平臺技術，亦為現今哺乳動物基因工程必備之技術。在人類醫學之研究上，與複製科技有關之體細胞核移植技術配合基因轉殖技術與胚幹細胞培養技術，將在異種器官移植及基因治療上扮演舉足輕重之角色，同時在研究人類基因表現，個體發育、疾病及癌症發生原因等均可提供完整之研究模式，因此被認為係未來深具潛力之生物科技。過去部份之研究結果呈現複製動物高死亡、高異常發生的風險，常導致複製動物技術對人類所可能帶來之貢獻被重新評估。雖然如此，大部份複製動物發育不正常之概念，在科學領域中是無法被信服的，就上述核移植技術在未來生物醫學可能發展之潛力及目前國內外之研究進展，此領域仍具持續發展價值，期待能產生健康及功能性替代細胞、組織或擬人化豬器官作為治療或移植之用。

## 六、參考文獻

1. Lanza, R. P., Cibelli, J.B. & West, M. D. Human therapeutic cloning. *Nature Medicine* **5**:975-977 (1999).
2. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos culture in medium condition by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**:7634-7638 (1981).
3. Iannaccone, P. M., Taborn, G. U., Garton, R. L., Caplice, M. D. & Brenin, D. R. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev. Biol.* **163**:288-292 (1994).
4. Chen, L. R., Wu, M. C. & Shiue, Y. L. The cytoplasmic effect of enucleated Landrace oocyte on the expression of small ear nucleus in nuclear transplanted pigs. *Proc 12th ICAR 1992*; Short Communication No. 375 (1992).
5. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Wakitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145-1147 (1998).
6. Smith, L. C. & Wilmut, I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* **40**:1027-1035 (1989).
7. Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, A. C., Studer, L. & Mombaert, P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* **292**:740-743 (2001).
8. McCreath, K. J., Howcroft, J., Campbell, K. H. S., Colman, A., Schnieke, A. E. & Kind, A. J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* **405**:1066-1069 (2000).
9. Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K. W., Cheong, H. T., Greenstein, J. L., Im, G. S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. N., Murphy, C. N., Carter, D. B., Hawley, R. J. & Prather, R. S. Production of  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase Knockout Pigs by Nuclear Transfer Cloning. *Science* **295**:1089-1092 (2002).
10. Dai, Y., Vaught, T. D., Boone, J., Chen, S. H., Phelps, C., Ball, J. S, Monahan, J. A., Jobst, P. M., McCreath, K. J., Lamborn, A. E., Cowell-Lucero, J. L., Wells, K. D., Colman, A., Polejaeva, I.A. & Ayares, D.L. Targeted disruption of the 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnol.* **20**:251 – 255 (2002).
11. Briggs, R. & King, T. J. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into nucleated frog eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **38**:455-463 (1952).
12. Gurdon, J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **10**:622-640 (1962).

13. Gurdon, J. B., Laskey, R. A. & Reeves, O. R. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cell of adult frogs. *J. Embryol. Exp. Morph.* **34**: 93-112 (1975).
14. Willadsen, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* **320**:63-65 (1986).
15. Prather, R. S., Sims, M. M. & First, N. L. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* **41**:414-418 (1989).
16. Collas, P. & Robl, J. M. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.* **43**:877-884 (1990).
17. Bondioli, K. R., Westhusin, M. E. & Looney, C. R. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* **33**:165-174 (1990).
18. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**:810-813 (1997).
19. Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A. & Campbell, K. H. S. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* **278**:2130-2133 (1997).
20. Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R. & Yanagimachi, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* **394**: 369-374 (1998).
21. Polejaeva, I. A., Chen, S. H., Vaught, T. D., Page, R. L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D. L., Colman, A. & Campbell, K. H. S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**: 86-90 (2000).
22. Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. & Perry, A. C. F. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* **289**:1188-1190 (2000).
23. Betthausen, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K. & Enos, J. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nature Biotechnol.* **18**:1055-1059 (2000).
24. Phelps, C. J., Koike, C., Vaught, T. D., Boone, J., Well, K. D., Chen, S. H., Ball, S., Specht, S. M., Polejaeva, I. A., Monahan, J. A., Jobst, P. M., Sharma, S. B., Lamborn, A. E., Garst, A. S., Moore, M., Demetis, A. J., Rudert, W. A., Bottino, R., Bertera, Trucco, S., M., Starzl, T. E., Dai, Y. & Ayares, D. L. Production of  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase-Deficient Pigs. *Science* **299**: 411-414 (2003).
25. Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L. & Westhusin, M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* **415**:859 (2002).
26. Chesne, P., Adenot, P. G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L. & Renard, J. P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* **20**(4):366-369 (2002).
27. Woods, G. L., White, K. L., Vanderwall, D. K., Li, G. P., Aston, K. I., Bunch, T. D., Meerdo, L. N. & Pate, B. J. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* **301**:1063-1064 (2003).

28. Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R. & Lazzari, G. A cloned horse born to its dam twin. *Nature* **424**:635-636 (2003).
29. Zhou, Q., Renard, J. P., Le Friec, G., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A. & Cozzi, J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* **302**:1179 (2003).
30. Lee, B.C., Kim, M. K., Jang, G., Oh, H. J., Yuda, F., Kim, H. J., Hossein, M. S., Kim, J. J., Kang, S. K., Schatten, G. & Hwang, W. S. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* **436**:641 (2005).
31. Kim, M. K., Jang, G., Oh, H. J., Yuda, F., Hwang, W. S., Hossein, M. S., Kim, J., Shin, N. S., Kang, S. K. & Lee, B. C. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* **9**(1):130-7 (2007).
33. Lee, J. W., Wu, S. C. Tian, X. C., Barber, M., Hoagland, T., Riesen, J., Tu, C. F., Lee, K. H., Cheng, W. T. K. & Yang, X. Production of cloned pigs by whole cell intracytoplasmic microinjection. *Biol. Reprod.* **69**:995-1001 (2003).
32. Shen, P.C. The in vitro and in vivo development of NT reconstructed rabbit oocytes: First NT rabbit produced in Taiwan from 8-cell stage blastomere. *J Chin Soc Anim Sci* **25** (Suppl.):62 (1996). (in Chinese)
34. Shen, P. C., Lee, S. N., Wu, J. S., Huang, J. C., Chu, F. H., Chang, C. C., Kung, J.C., Lin, H. H., Chen, L. R., Shiau, J. W., Yen, N. T. & Cheng, W. T. K. The effect of electrical field strength on activation and development of cloned caprine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **92**(3-4):310-20 (2006).
35. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M, Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A. & Verfaillie, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**:41-49 (2002).
36. Zaehres, H. H. & Scholer, R. Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell* **131**(5):834-835 (2007).
37. Yang, X, Smith, S. L., Tian, C. X., Lewin, H. A., Renard, J. P. & Wakayama, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature Genetics* **39**:295-302 (2007).

## 第七章

### 組織工程在幹細胞研究之運用

# Tissue Engineering Technique in Stem Cell Research

徐善慧

中興大學 化學工程學系暨組織工程與幹細胞研究中心

## 一、前言

在前面的幾章中介紹幹細胞的基礎知識。本章將描述幹細胞結合組織工程技術的一些運用。在這一章節中將包涵一些工程的觀念，也更說明了幹細胞為一跨領域的研究。

## 二、定義

### 1. 再生醫學

上個世紀的後期，醫學界有一種新的觀念產生，因為它有別於已現存於醫學界的「治療醫學」與「預防醫學」兩種概念，所以號稱為第三類醫學。這個第三類醫學，就是「再生醫學」(regenerative medicine)，顧名思義，再生這兩個字指的是讓因病變或損傷而已經失去作用的器官或組織再重新生長出來、扮演原先的生理功能。引起了廣泛的重視與討論的「再生醫學」可以大分為兩個部分：第一個部分就是「幹細胞療法」，利用具有多種分化潛力的幹細胞來補充因為疾病或受傷而無法工作的細胞；而第二個部分就是「組織工程」(tissue engineering)。

組織工程技術包含細胞作為其一元件，此細胞可以是幹細胞，也可以是組織細胞，當使用幹細胞時，就是將組織工程技術運用到幹細胞療法中。

### 2. 組織工程

「組織工程」這個詞中的工程二字，與「基因工程」一詞中的工程二字相同，指的並不是「工程學科」的意思，而是殫思竭慮的去設計以強化特殊功能。「組織工程」的定義是，不僅利用細胞來達到再生的功能，而是利用活體取出的細胞，進一步結合適當的可分解材料、或甚至包括其他生物分子，一同努力，再生出新的組織出來，以取代無法工作的組織。雖然在使用的策略上有所不同，「再生醫學」中的「幹細胞療法」與「組織工程」結合之後將更能達到組織再生的目的。

### 3. 支架

在「組織工程」中，細胞是結合適當的可分解材料一同培養後，產生再生組織的，這時

的可分解材料一般是先加工成為組織的形狀，有許多的孔洞，細胞就可以像播種一般灑進去，這個可分解材料被叫做「支架」(scaffold)，其名稱來自功能類似建築時候暫時撐住大樓的鷹架。

由下面的例子可看出組織工程的觀念。若有一位小耳症的病人想要重建缺陷的耳朵，這時可以用可分解材料，先經過加工做成這位病人正常耳朵的樣子（就是耳朵「支架」），然後在病人的耳朵上挖個幾乎看不見的小傷口，取出一點耳朵軟骨細胞，在體外複製大量的軟骨細胞做為種子，再播種回到耳朵「支架」中；種到耳朵「支架」去的軟骨細胞若在體外有合適的環境，經過一段時間（例如一兩個月）就會長出真正的耳朵軟骨出來，這時再把長出來的再生組織移回到病人的身上。由於耳朵的軟骨是彈性軟骨，與關節的透明軟骨不同，在做軟骨組織工程時，需要依修復部位的不同來選擇細胞來源，這時的組織工程「支架」材料上面可以改播種幹細胞，而且在很多情況下，幹細胞被發現較原組織細胞的活性更高，會使再生出來的組織功能上更為接近原來想要的組織。但是在另一方面，幹細胞對於「支架」材料也是更加挑剔，材料的選擇往往影響了幹細胞的分化與它們未來的命運。在最近，有人更把奈米材料的理念引入了「支架」材料的設計中，也就是希望利用奈米材料具有仿生（模擬生物體）的特性，來加強幹細胞的性質。這些研究也引發了許多結合奈米醫學與再生醫學的聯想。

除此之外，「幹細胞療法」中的幹細胞在進行治療時，常是以注射入靜脈、或是在受損的細胞附近直接注入的方式來進行，這些注入的幹細胞雖然具有找到受傷部分的細胞予以修復的能力，在很多時候仍會流失到其他地方。於是，「支架」材料提供了保護「幹細胞」的另一項選擇。

#### 4. 生物反應器 (Bioreactors)

生物反應器的功能是提供一種人工模擬體內的培養環境而設計，除了可以增加組織細胞的大量增殖，生物反應器亦可對培養之組織細胞藉由流體之流動提供養分與氧氣之置換及代謝物之移除，再者結合不同的物理刺激如剪切力 (shear-stress)、流場 (fluid-flow)、壓縮 (compression) 或拉力 (tension) 以模擬人體環境的培養系統。

### 三、支架設計

在這個過程中，工程師能為細胞做些什麼事呢？首先，材料工程師/高分子科學家必須先出面，對於承載細胞的「支架」材料做出完美的設計，讓這些細胞能高高興興的在「支架」材料上面成家立業。包括：「支架」材料上孔洞的大小要讓細胞播種得進去，也能進一步複製及生長，還有，「支架」材料在細胞成家立業、生長出真正的組織後，必須功成身退分解掉。這個過程若不控制得當，細胞就會拒絕工作，組織再生就無法成功。

一般組織工程「支架」除了須具備三維空間的架構，尚需具備一定的條件及功能，提供細胞一個良好的生長環境<sup>1-2</sup>：

- (1) 「支架」材料需具有良好的生物相容性，以利細胞可以順利地貼附、生長及行使其功能。
- (2) 「支架」需具有適當的孔洞大小及高度的孔洞連通性，不同細胞生長所需的環境不同，

所設計的「支架」孔洞大小也會不同；高度的孔洞連通性有利於細胞所需養分以及代謝後所產生廢物的質傳，以便細胞可在良好的環境中生長。

- (3) 「支架」材料需具有生物可降解性，其降解時間能與細胞生長的速度相匹配，隨著細胞的生長而逐漸分解消失，分解後的產物可經由體內代謝吸收。
- (4) 「支架」需具有一定的機械性質，一方面能保護細胞於「支架」中生長，另一方面與修復組織相近的機械性質，可避免應力遮蔽效應的產生，提供正確的力學訊號，有利細胞的生長及組織修復。

作為組織工程「支架」的材料主要分為天然高分子材料及合成高分子材料<sup>3</sup>。常用的天然高分子材料包括膠原蛋白 (collagen)、動物明膠 (gelatin)、透明質酸 (hyaluronic acid)、幾丁聚醣 (chitosan) 及褐藻酸鹽 (alginate) 等，這些天然材料通常具有良好的生物相容性及親水性，結構上也較具生物活性，細胞容易在這些材料上貼附生長，而且降解後的產物較不具毒性，可被人體吸收，但以一般天然高分子材料所製成的「支架」，機械性質較弱，不適合單獨用於高負荷重或硬組織 (如軟骨組織或硬骨組織)，通常需搭配機械性質較佳的合成材料或陶瓷材料；常用的合成高分子材料包括聚乳酸 (polylactide)、聚甘醇酸 (polyglycolide)、前兩者的共聚物聚乳酸-甘醇酸 (polylactide-co-glycolide) 及聚己內酯 (polycaprolactone) 等，合成材料通常較天然材料疏水，其降解速率可依不同的分子量、共聚合比例或混滲比例來調控，降解後的產物為羧酸類及醇類，經由生物體代謝後形成二氧化碳及水分子而排出體外，但這些酸性的降解產物也常會造成細胞凋亡或引起體內的免疫反應<sup>4</sup>，為合成材料較大的缺點。

以下分別為幾種常用高分子材料的介紹：

## 1. 天然高分子材料

### (a) 膠原蛋白

膠原蛋白為生物組織中含量最豐富的蛋白質，由三條多胜肽鏈所組成，靠著彼此鏈間的氫鍵，形成三股螺旋結構，可提供組織所需的強度。隨著人體不同的組織所含的膠原蛋白類型也不同，目前約有 20 幾種被定義，其中含量最大的為第一型膠原蛋白，主要分布於皮膚、骨組織、肌腱及大部分的器官中。膠原蛋白可從生物體組織經由萃取純化，去除會引起免疫排斥的官能基後，經由重組或交聯劑交聯處理，可製作成多孔性的「支架」材料。由於膠原蛋白具有極佳的生物相容性，目前在生物醫學材料上用途最為廣泛，包括創傷敷料 (圖一)、人工皮膚、骨骼填補材、人工軟骨、人工角膜及神經導管等。



圖一、國內臺鹽生技所研發的膠原蛋白敷料



### (b) 動物明膠

明膠基本上為變性 (denature) 的膠原蛋白，組成與膠原蛋白類似，但為單股結構，通常由牛或豬的皮膚或骨頭中萃取出，為水溶性的蛋白質，高溫下為水溶液，低溫時呈現膠狀，在生醫材料上須經交聯修飾後使用，價格較膠原蛋白便宜許多，可利用為替代膠原蛋白另一種物美價廉的材料。

### (c) 透明質酸

透明質酸為一種帶負電荷、以重複性雙醣單元所組成的天然高分子，存在於結締組織中，為一種具有黏彈性的水膠，可潤滑、吸震及保護細胞，取得來源主要分為兩大類，一是由雞冠或動物體的關節滑液或水晶體中取得，另一種是利用生化工程技術，由微生物發酵產生。醫學上使用大多將高分子量的透明質酸直接注入關節中，增加潤滑的作用，減輕關節炎的疼痛。近幾年透明質酸也被運用於組織工程材料中，配合其他高分子材料，可用作人工軟骨或創傷敷料。

### (d) 幾丁聚醣

幾丁聚醣是從甲殼類動物中的幾丁質去乙酰化反應 (deacetylation) 後所形成的多醣聚合體，可溶解於稀的有機酸中，化學結構與透明質酸類似，結構中的胺基通常帶有正電荷。幾丁聚醣除了具有生物相容性及降解性外，還具有獨特的抗菌性，因此被廣泛的利用在各方面，比如具有抗菌效果的傷口敷料 (圖二)；此外，幾丁聚醣單獨存在時，機械強度較差且易脆，可依用途添加其他高分子材料 (如明膠) 改善其物理機械性質；也可搭配陶瓷材料運用於骨骼修復上，具有明顯的骨誘導效果。因其來源易取得且價格便宜，使得幾丁聚醣近幾年在生醫材料上的應用頗受重視。



圖二、幾丁聚醣敷料

### (e) 褐藻酸鹽

褐藻酸鹽是從褐藻類植物中萃取出，為帶有陰電荷的天然多醣類高分子，可溶解於水中形成黏稠溶液態，經由二價離子 (如鈣、鎂) 進行物理交聯，行成高含水率之膠狀載體 (圖三)，可用於包覆細胞或藥物，例如以褐藻酸鹽包覆軟骨細胞進行培養，在褐藻酸鹽膠體中，被包覆的軟骨細胞可維持原有的細胞形態，有助於保持軟骨細胞活性及促進胞外基質的分泌。但褐藻酸鹽所形成的載體，因含水率高，機械性質明顯不足，且應用於大體積的載體會有質傳的問題，故褐藻酸鹽大多製備成微載體，應用有限。



圖三、褐藻酸鹽細胞載體

## 2. 合成高分子材料

### (a) 聚乳酸

聚乳酸為一種人造合成的可降解材料且具有良好的生物相容性，降解速度慢，約需要 1~2 年；具有左旋光性的聚乳酸，機械强度高，目前主要應用於醫用縫線及骨釘骨板等骨修復材料，用於骨修復材料上患者不必經二次手術將材料取出，材料可於體內中分解，但此類聚乳酸材料降解後的酸性產物容易引起局部 pH 值下降，在臨床使用上患者易引起發炎反應。

### (b) 聚甘醇酸

具有優於聚乳酸的生物相容性，降解產物也可被人體代謝，但降解時間太快(1~2 個月)，導致「支架」崩解，局部降解產物羧基乙酸迅速累積，造成 pH 值下降，容易導致細胞的凋亡。故通常使用上會混入一定比例的聚乳酸，此類「支架」材料常用於骨或軟骨組織工程上。

### (c) 聚乳酸-甘醇酸

為聚乳酸與聚甘醇酸的共聚物，可以兩者的分子量、結晶性及共聚合比例，聚合出不同強度及降解速率的高分子，較具發展潛力。在醫療材料上已運用於縫線及骨修復材料，也被廣泛使用於組織工程上，如軟骨支架、硬骨修復材料、人工皮膚、牙科材料及神經導管等，皆有不錯的成果。

介紹完常用的「支架」材料，要製做出適合各式各樣組織所需的組織工程「支架」，一般可利用冷凍乾燥法 (freeze-drying)、微粒造孔 (particulate leaching)、纖維鍵結 (fiber-bonding)、三度空間列印 (three-dimensional printing) 及快速成型法 (rapid prototype) 等<sup>5</sup>。

## 1. 冷凍乾燥法

主要是將高分子溶液在低溫下凝固，溶劑會形成不同大小的冰晶，然後在真空下以冷凍乾燥機將溶劑移除，主要影響「支架」孔洞大小的因素，有高分子溶液的濃度及降溫的過程，在濃度較高或降溫速度較快的情況下，會形成較小的孔洞結構，反之，則會形成較大的孔洞。利用此法可得到高孔隙度的「支架」(圖四、a)，但其缺點為機械性質弱，有溶劑殘留的疑慮，且製作大體積「支架」較為困難。

## 2. 微粒造孔

此種方法是將高分子溶液中添加入篩選過的鹽粉顆粒，混合均勻後，將高分子溶液中的溶劑移除後，再將此塊材置入水中將顆粒溶解，形成孔洞。「支架」的孔洞結構依添加入的鹽粉顆粒大小及多寡，可製作出不同孔洞及孔隙度的「支架」，其缺點與冷凍乾燥法類似，機械性質弱及無法製作大體積的「支架」。

## 3. 纖維鍵結

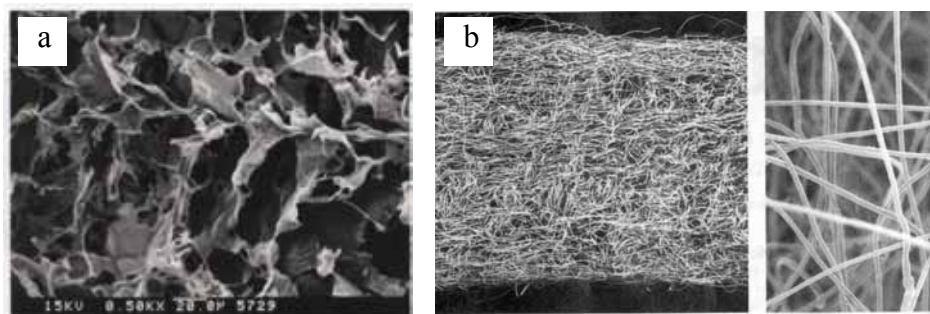
利用電氣紡織 (non-woven) (圖四、b) 或編織 (woven) 的方法來製作「支架」，前者原理為將高分子溶液通過一高壓電場，形成微米級甚至奈米級的細絲，隨機堆疊成一塊高孔隙度的「支架」，此法所製作出的「支架」具有完全連通的孔洞，但其機械性質低且受限於材料種類；後者是將高分子做成細絲，進而編織成所設計的「支架」，但此法步驟較繁複，且也局限於高分子種類。

## 4. 三度空間列印

利用噴墨印表機的原理，配合電腦控制，將材料顆粒與溶劑依設計的路徑，噴出進行堆疊，可經由電腦設計出各式各樣形狀的「支架」，但孔洞連通性及溶劑的殘留為其缺點。

## 5. 快速成型法

將材料加熱熔融後，以機器手臂連結電腦系統，依照電腦中所設計的路徑，加壓射出堆疊成所設計的「支架」形狀。此法所製作出的「支架」的孔洞大小及結構，皆可隨需求而改變，孔洞為完全連通，機械性質佳，但因過程需要經過熱熔融加工，容易破壞材料性質。



圖四、(a) 聚乳酸-聚甘醇酸冷凍乾燥法支架；(b) 聚甘醇酸電氣紡織支架

## 四、生物反應器設計

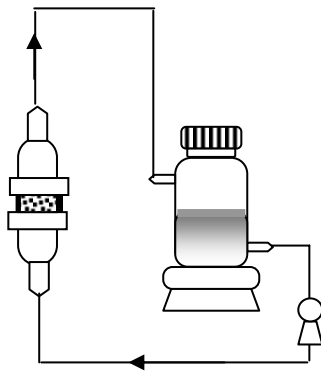
另外一方面，由於「支架」材料上面還沒有血管幫細胞去運送營養與廢物，所以化學工程師/機械工程師這時要介入幫忙。化學工程師要設計與身體情況想仿的動態的流體系統，例如利用外在流場等，促進細胞在「支架」材料中營養的進入與廢物的排除。機械工程師要計算出動態系統中（如流場）是否具有合適的力場，能促進細胞功能健全，此外機械工程師還

要進行良好的支架外觀設計與製造過程等工作。這些都會使得細胞與「支架」材料共培養長出組織的過程更加順利。同樣的，在「支架」材料與幹細胞共培養中系統之中力場與流場的設計，也會影響幹細胞的未來走向。生物機械學家推測，間葉幹細胞雖然具有多才多藝、分化成不同組織細胞的特性，但若施以壓力比較容易變成軟骨、改用切力比較容易變成硬骨、施以拉力則容易變成韌帶等。這些知識的建立尚需要龐大的研究去釐清真象。

目前常見的生物反應器形式計有：

(a) 灌流式生物反應器 (perfusion bioreactors)

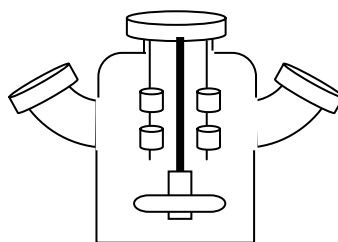
灌流式生物反應器如圖五所示<sup>6</sup>，其作用方式為利用一幫浦帶動培養液，並連續通過培養細胞的支架中，以均勻的將養分傳輸及代謝物移除。此培養方式細胞容易植覆及均勻分布在支架上，並可以調整不同壓力、脈衝等方式模擬體內環境，惟受限於支架之孔洞分佈之均勻性，易造成隧道效應 (channeling effect)，因培養液會容易往支架大孔洞的方向流動，因而造成局部地區養份供應不足的現象。此培養方式最常用於硬骨細胞之培養。



圖五、灌流式生物反應器圖示

(b) 攪拌式生物反應器 (spinner flask bioreactor)

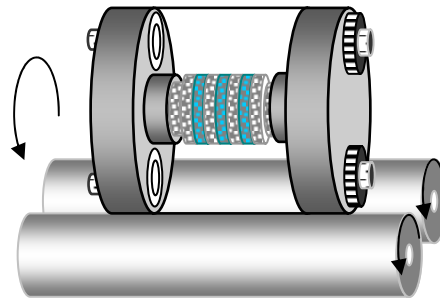
攪拌式生物反應器如圖六所示<sup>7</sup>，是利用攪拌方式來帶動培養液之流動，以增加質傳效果，然而形成之流體易呈現紊流 (turbulent flow) 之現象，流體所產生之較大剪切力對細胞不利。其支架被線懸掛固定於攪拌瓶內，細胞植入方式是藉由流體對流將細胞植覆於支架上，因此細胞植覆率高，但細胞普遍分布於支架外圍，此反應器較常應用於培養軟骨細胞。



圖六、攪拌式生物反應器圖示

(c) 旋轉式生物反應器 (rotating-wall vessels)

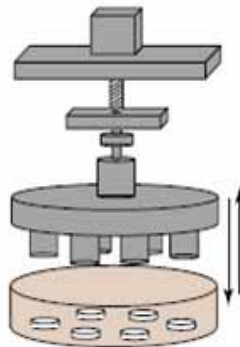
滾筒式生物反應器是利用同心圓旋轉的方式運行，藉由帶動培養液的流動形成不同的剪切力。此反應器是目前較為大眾所常用之反應器類型，相較於其他類型反應器旋轉式生物反應器能提供較低的剪切力。由美國太空總署 NASA 所開發的微重力反應器<sup>8</sup>，其作用原理是藉由轉動培養液所產生的剪切力、重力達到平衡，使培養細胞之支架懸浮於培養液中，呈現微重力狀態，而不致掉落碰壁，並以膜式交換器來進行氧氣與二氧化碳之交換，但隨著培養時間增加，組織之密度增加此時將會無法抵抗重力而掉落至瓶壁。本實驗室所開發之生物反應器如圖七所示，應用於培養氣管之軟骨組織，亦是以同心圓旋轉之方式帶動培養液，並於培養室製造出液-氣介面提供氧氣之置換來培養氣管組織。



圖七、滾筒式生物反應器圖示

(d) 壓縮式生物反應器 (dynamic compression bioreactor)

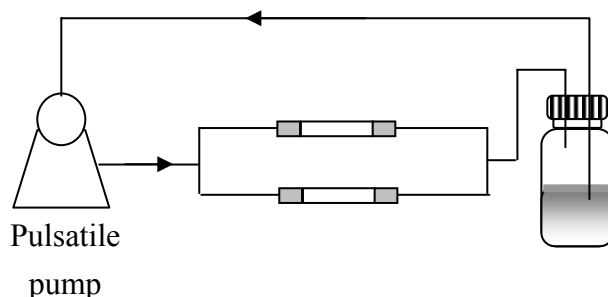
壓縮式生物反應器如圖八所示<sup>9</sup>，是利用給予一壓縮力施予支架上，透過改變支架的形變而將應力傳輸到細胞上，以達到力學刺激之效果。此反應器功能類似模擬人體之關節環境受力方式。另一種反應器是針對肌腱或韌帶所設計，其作用方式是對組織週期性的施加應力及張力來刺激組織。



圖八、動態壓縮生物反應器

(e) 悸動式生物反應器 (pulsatile flow reactor)

悸動式生物反應器如圖九所示<sup>10</sup>是以脈衝式幫浦帶動培養液以固定的頻率通過管狀血管支架，模擬類似人體血液流動的方式，對管腔內的內皮細胞產生刺激。



圖九、悸動式生物反應器

各種組織都有其適合的反應器來進行培養，主要是因應各個體內組織之不同環境。表一為各種反應器之應力分布與培養組織。

表一、為不同反應器之應用於軟骨組織培養之剪切力分布<sup>11</sup>

反應器類型	流體之流速及攪動速度	剪應力範圍(dyn/cm <sup>2</sup> )	培養組織種類
灌流式生物反應器	0.5 ml/min	0~0.8	骨骼
攪拌式生物反應器	50 rpm	0~1.2	軟骨、皮膚
滾筒式生物反應器	13, 37 rpm	0~0.8	軟骨、心血管

在應力（流體剪切力、機械之張力及壓力）對細胞之功能的影響方面如表二所示：應力會導致細胞骨架之重組進而影響到細胞的型態，如血管內的內皮細胞會因流體的帶動而沿著流體方向排列，並促進一氧化氮、凝血調節蛋白的分泌；細胞的增殖、分化與功能的發揮都是受基因調控，因此藉由應力之刺激可促進蛋白質的分泌及轉譯。

表二、為各種機械力對細胞的刺激<sup>12</sup>

細胞類型	刺激方式	條件參數
平滑肌細胞	流體與壓力	120/60mm Hg 0.1 L/min
		10mm Hg 0.6/1.2 L/min
軟骨細胞	靜水壓	0.55–5.03MPa/1Hz
內皮細胞	流體的剪切力	15 dyne/cm <sup>2</sup>

綜合以上所述，反應器的設計無非是要模擬人體各部位之體內環境所建造，並藉由不同之流體流動方式來帶動養分的傳輸供應與均勻的溶氧濃度，並將代謝物排出，以確保生長在

支架內部的細胞旺盛的代謝活性，更進一步透過物理性刺激如改變流體之流動製造出不同的剪應力、流場或結合間歇性的壓縮或拉力的往復刺激，以誘發細胞基質之分泌，使培養之組織較具有功能性。

## 五、結語

幹細胞科技為一新興科技，因此許多工程的觀念在幹細胞科技中扮演的角色至今都還屬於初期發展階段，也因此值得開拓。而且，一般學者都相信，因為幹細胞屬於較年輕的細胞，其具有多種分化潛力的本質，應該會使工程師與幹細胞此次的相遇，比起前面工程師與細胞的第一類接觸，激發出更多的火花出來。

\*感謝本人研究生嚴鴻仁與林振寰整理支架與生物反應器資料。

## 六、參考文獻

1. Thomson, R. C., Wake, M. C., Yaszemski, M. J. & Mikos, A. G. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Adv Polym Sci.* **122**:245-74 (1995).
2. Vacanti, C. A. & Vacanti, J. P. Bone and cartilage reconstruction. In: Lanza, R., Langer, R., Chick, W. (eds.) *Principles of Tissue Engineering*. New York: R.G. Landes Co., p. 619-31 (1997).
3. Perrin, D. E. & English, J. P. Polycaprolactone. In: Domb, A. J., Kost, J. & Wiseman, D. M., editors. *Handbook of Biodegradable Polymers*. Australia: Harwood Academic; p. 63-77 (1998).
4. Babensee, J. E., Anderson, J. M., McIntire, L. V. & Mikos, A. G. Host response to tissue engineered devices. *Adv Drug Deliv Rev.* **33**:111-39 (1998).
5. Widmer, M. S. & Mikos, A. G. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. In: Patrick, Jr. C. W., Mikos, A. G. & McIntire, L. V., editors. *Frontiers in Tissue Engineering*. New York: Elsevier Science; p. 107-20 (1998).
6. Mahmoudifar, N. & Doran, P. M. Tissue engineering of human cartilage in bioreactors using single and composite cell-seeded scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* **91**(3):338-55 (2005).
7. Martin, Y. & Vermette, P. Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. *Biomaterials.* **26**(35):7481-503 (2005).
8. Begley, C. M. & Kleis, S. J. The fluid dynamic and shear environment in the NASA/JSC rotating-wall perfused-vessel bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering.* **70**(1):32-40 (2000).
9. Martin, I., Wendt, D. & Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in*

- Biotechnology*. **22**(2):80-6 (2004).
10. Chen, H. C. & Hu, Y. C. Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnology Letters*. **28**(18):1415-23 (2006).
  11. Bilgen, B. & Barabino, G. A. Location of scaffolds in bioreactors modulates the hydrodynamic environment experienced by engineered tissues. *Biotechnology and Bioengineering*. **98**(1):282-94 (2007).
  12. Engelmayr, Jr. G. C., Sales, V. L., Mayer, Jr. J. E. & Sacks, M. S. Cyclic flexure and laminar flow synergistically accelerate mesenchymal stem cell-mediated engineered tissue formation: Implications for engineered heart valve tissues. *Biomaterials* **27**(36):6083-95 (2006).





## 第八章

### 幹細胞的保存與復甦

# Cryopreservation and Re-cultivation of Stem Cells

黃效民

食品工業發展研究所 生物資源保存及研究中心

## 一、前言

幹細胞 (stem cells) 之冷凍保存，基本上就是將具有分裂能力的幹細胞利用科學方法，添加冷凍保護劑和一定的冷凍條件，置於低溫環境中，長期的保存下來；當需要時加以解凍，仍能恢復原有冷凍保存前之生長特性和生理功能。由於目前幹細胞之研究和發展極為快速，如何將已建立之幹細胞完整的長期保存，成為極為重要之課題。細胞冷凍保存之優點，顯而易見的諸如 1) 不需要長期維持細胞的生長，2) 節省人力、時間、培養基和試劑之消耗，3) 防止細胞持續生長所造成的細胞變異、老化、微生物污染等的機會，4) 方便細胞寄送和運輸，5) 在不同時間和地點，提供相同生理年齡和品質的細胞，6) 長期以後之使用等等。然而細胞冷凍也有實際操作上之缺點和注意事項必須事先了解，例如冷凍後之細胞存活率、冷凍過程對細胞之可回復與不可回復之傷害、冷凍保護劑對細胞之選擇性傷害等等。

事實上，冷凍保存技術已經發展數十年，對於細胞本身之長期保存，已頗為成熟，尤其是成體幹細胞 (adult stem cells)，細胞均呈單一小球，對於熱傳導和冷凍保護劑之浸潤作用均極為有效，冷凍後細胞之傷害較低，存活率極高；然對於以細胞群塊方式保存之胚胎幹細胞 (embryonic stem cells)，則仍有極大之發展空間。

## 二、冷凍保存學

### 1. 基本觀念

冷凍保存最基本的關鍵，就是如何降低冷凍過程時對細胞所產生的直接和間接傷害，讓細胞解凍後，仍保有該有的活性和特徵。實際操作上即在冷凍操作前或冷凍過程中，將保存之細胞適度脫水，以減少細胞內大的冰晶之形成，因為水形成冰體積會膨大，造成細胞物理性的損傷；另一方面，若細胞脫水太嚴重，將形成所謂溶質效應 (solute effect)，細胞內滲透壓太高，細胞皺縮太嚴重，解凍後無法恢復。利用添加適當濃度的冷凍保護劑和

適當的降溫方式，使細胞在冷凍時之傷害降至最小，細胞解凍後之存活率就會提高。另一種方式為完全避免冰晶之形成，由於冰晶之形成需要所謂結晶核，再慢慢長晶，我們可以利用物理原理，使用較高濃度的冷凍保護劑，急速降溫（直接由室溫或 4°C 急速降至 -196°C），此時原為液態之物質將轉化為非晶型類似玻璃之固體狀態（glass-like amorphous solid state），沒有冰晶之形成時間，而避免冷凍過程冰晶之傷害。

## 2. 冷凍保護劑

5%至 10%的甘油（glycerol）或 DMSO（dimethyl sulfoxide）是最常用的冷凍保護劑，雖然 DMSO 對細胞有毒性，但卻比甘油能更快穿透細胞且結果的再現性也較佳，適用性較廣，然 DMSO 可能會促進某些細胞的分化，以及對一些細胞毒性太強，若測試數次後細胞冷凍後之存活率均不佳，此時可以考慮使用甘油作為替代。甘油可以高溫滅菌，而 DMSO 則必須以過濾方式除菌，在使用 DMSO 時要格外小心，因為它可快速穿透接觸的皮膚，破壞皮膚之通透和完整性。一般而言，建議可以考慮購買已滅菌之 DMSO，特別需注意的是，必須使用細胞培養等級或符合臨床使用的 DMSO 或甘油（經過測試以確保其無毒性，並且沒有 endotoxin 殘留），開瓶後需分裝儲存且避光。

目前對於冷凍保護劑的保護機制上並不明瞭，推論一冷凍保護劑可通過細胞膜，對細胞內水分的移出速率和均一性提供適當之保護；推論二直接作用於細胞膜上，使細胞膜之流動性提高，當環境由液態變成固態或解凍時由固態變成液態時，降低細胞膜之傷害。

一般而言，我們建議冷凍培養基的配方為 90-95%的正常細胞培養基添加 5-10% DMSO；其他的冷凍培養基配方，則包括了提高血清濃度（如 20-90%血清）等，然對每一株特定細胞最適合的配方，必須實際實驗測試。特別提醒的是，添加 DMSO 的冷凍培養基必須新鮮配製，並放置於 4°C 下備用；因為將 DMSO 加入培養基的過程會釋放多量熱能，而將培養基的溫度提高至超過 37°C，另放置過久的冷凍培養基，因為 DMSO 易產生過氧化物質和自由基等，對細胞均有毒性，故必須新鮮配製。

## 3. 人類胚胎幹細胞製備

人類胚胎幹細胞於培養盤上生長約一週後，細胞團塊之大小和數目均達到適當且必須繼代時，目前有二種方式可將細胞處理下來，一為機械式切割法（mechanical dissection），另一種為酵素處理法（enzyme digestion）<sup>1</sup>。機械式切割法主要是利用玻璃刀，將人類胚胎幹細胞團塊於解剖顯微鏡下，小心地將團塊切割成數小塊到數十小塊，每小塊約為 100-200 個細胞數，再將此些小塊收集後，置於冷凍培養基中，此方式最大之優點為可以將已分化的胚胎幹細胞部分加以剔除，而將外型健康看似未分化之胚胎幹細胞團塊，有選擇性的收集（圖一）；然而此種方式之缺點為時間和人力消耗極大，加上必須由有經驗和訓練之嫺熟技術人員

為之，且每次可以處理的細胞數量無法太多。機械式切割法一般用於剛建立之胚胎幹細胞上，所需處理的細胞數量亦不多，由於可以將已分化之部分切掉，而專一的挑選較為健康的部分，成功率可以提高，另一項優勢為細胞保持正常染色體核型 (normal karyotype) 之機會較高。另一種方法為使用 collagenase IV 酵素處理位於飼養層細胞 (feeder cells) 上的胚胎幹細胞，此種方式最大的優點為可以處理大量的細胞和培養盤，只要將酵素溶液加入培養盤，2-3 小時後，胚胎幹細胞團塊會自動脫落 (圖二)，而飼養層細胞則仍吸附在原培養盤上，收集胚胎幹細胞團塊再以微量吸管 (pipette) 上下吸放數次 (約五次)，將細胞團塊打散成數小塊，但不要將細胞團塊打的太小，否則細胞不易存活，即使存活細胞亦容易分化或需要超過 10 天之生長，團塊方長成可以分割繼代之大小，惟此種方式無法將已分化之胚胎幹細胞作有效區隔和去除，在連續數次繼代培養之過程中，容易造成細胞分化比率愈來愈高，所得的實驗結果不一致，目前亦有數篇報告顯示，利用酵素處理繼代之胚胎幹細胞，較易有染色體異常之情形發生，尤其是第十二對和第十七對染色體有多一套 (trisomy) 之情形；也因為如此有些學者堅持使用機械切割法，筆者個人之建議則是剛開始建立中之胚胎幹細胞，應該使用機械切割法，待胚胎幹細胞株建立確定完成，且已保存足夠之冷凍管後，方以利用酵素法進行細胞之處理。無論何種方式，最後將細胞團塊置於冷凍培養基中，再分裝於冷凍小管或塑膠管中，進行冷凍程序。

#### 4. 冷凍保存容器和降溫程序

冷凍保存胚胎幹細胞的容器可分為塑膠冷凍小管 (1.2-2.0 ml vials) 和塑膠管，兩者的保存效果大致相同，差別在使用者的習慣和訓練，使用塑膠管者大多利用玻璃化法，將含有小細胞團塊之管，直接浸到液態氮中即刻完成降溫程序，而使用塑膠冷凍小管者則必須注意降溫程序；根據近年之數篇研究報告顯示，胚胎幹細胞之凍後存活率在 10-60%，早期更有報告顯示低於 10%，主要原因為研究人員對於冷凍細胞團塊之經驗極少，加上對於胚胎幹細胞之操作經驗不足所致，尤其是剛建立之胚胎幹細胞生長並不穩定，必須特別注意冷凍流程和解凍後之培養操作。一般而言，熟悉顯微注射、胚胎操作之實驗室或部分使用機械切割方式製備胚胎幹細胞者，習慣使用塑膠管，其所需之胚胎幹細胞團塊不需很多，每支塑膠管中僅有 5-8 個團塊，這種玻璃化降溫方式的好處是方便和快速，且無須購買昂貴的可程式降溫機或使用 -80°C 冰箱，但必須有液態氮之供應和攜帶設備，其原理為將含有高濃度冷凍保護劑之冷凍培養基和細胞團塊吸入塑膠管後直接浸入液態氮中，使細胞和液體進行瞬間玻璃化，雖然細胞內水分無法排出，但由於沒有冰晶之產生，細胞不會因為水分結冰體積膨脹而破裂；惟所儲存或運送時的溫度若高於 -130°C 時，其內容物就會產生冰晶，而破壞胚胎幹細胞團塊之存活效果，所以在儲存和運送方面要非常的小心；實際上操作必須要確保全時浸放於液態氮內，且因為管很細，解凍的很快，在保存和運送時需要特別注意一定

要完全浸在液氮中，才不會回溫，而破壞了胚胎幹細胞之存活，此種方法一般適用於處理樣品數少或細胞量低時較為適合<sup>2</sup>。使用塑膠冷凍小管操作胚胎幹細胞之保存則遵守一般細胞冷凍操作和程序，並沒有特殊之處，簡言之主要是將胚胎幹細胞之小團塊置於含有5-10%DMSO的冷凍培養基後，利用程式降溫儀 (programmable freezer)，以每分鐘降低1-3°C的方式，等速的將冷凍管降至-80°C以下，再移轉至液態氮桶中儲存；依我們實驗室的經驗以每分鐘降低1.5°C可以得到>80%的存活率；若沒有程式降溫儀，一般均使用異丙醇 (isopropanol) 的壓克力容器 (Mr. Frosty, Nalgene product)，將冷凍管放置於此種壓克力容器中，再移到-80°C的冰箱，經過隔夜後再轉移到液態氮桶中保存，異丙醇容器在此種環境下可以提供每分鐘約降低0.4°C的條件。然而，冷凍過程中，最主要之關鍵在於含有細胞之溶液在液態變為固態時，即凝固點溫度，其潛熱 (latent heat) 之釋放，此時已凝固的細胞液會因為潛熱之釋放，又溶解成為液體，造成細胞有反覆結凍、解凍之現象，細胞之冷凍傷害隨之發生，含有5-10%的細胞液其潛熱釋放溫度為-6至-8°C之間，即當細胞液慢慢降溫至凝固點時，因為潛熱大量釋放，溫度反而會短暫的升溫約2-3°C，當潛熱完全去除後，冷凍管內細胞液之溫度才會再持續下降<sup>3</sup>。如果使用程式降溫儀則可以使用儀器本身具有的所謂 seeding 功能，利用先接觸液態氮之金屬鑷子觸碰冷凍管壁將潛熱立刻移除並迅速結冰，溫度即可繼續降低；或撰寫一急速降溫再升溫的小程式，將潛熱完全移除，如此即可獲得一穩定的降溫結果，細胞的凍後存活率也相對提高很多。當冷凍小管之溫度低於-80°C後，即可直接將冷凍小管轉移到液態氮桶中儲存。

## 5. 冷凍細胞的復甦

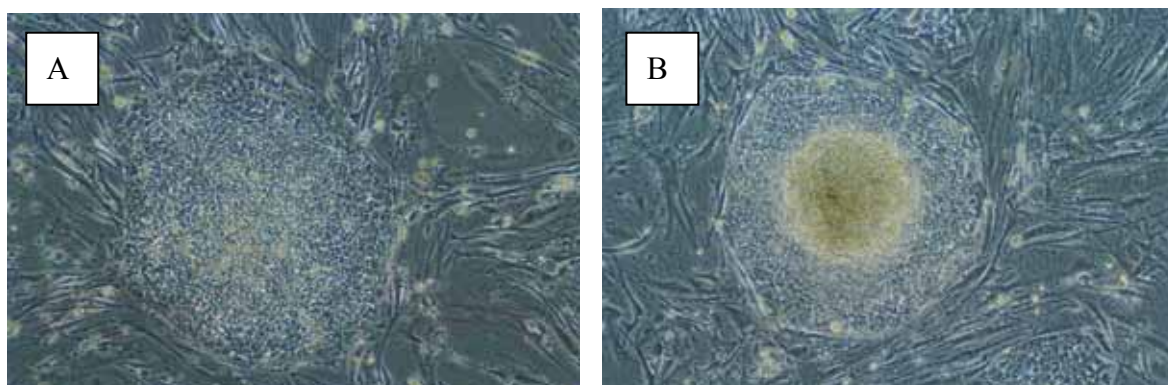
冷凍細胞最主要的目的，為當需要細胞時可以加以解凍，解凍後的細胞必須保持冷凍前之活性和生長特性。除少數臨床工作者必須將解凍的細胞直接注射到病人身上外，大部分的研究人員，當細胞解凍後，必須加以培養，一則可以將不存活的細胞去除，二則細胞培養後，細胞數目可以持續再增加。解凍細胞之操作只有一項原則，即快速讓細胞回復到生長之最適溫度。

對於以塑膠麥管冷凍之胚胎幹細胞，由於細胞液體積很小，一但塑膠麥管離開液態氮後在室溫下很快就溶解，所以建議必須在無菌操作臺或生物安全操作櫃內取出塑膠麥管，並將胚胎幹細胞團塊儘快推出或擠出到清洗液中 (可以胚胎幹細胞培養基為之)，主要目的為去除高濃度的DMSO，再轉移至正式之培養環境中，例如含有飼養層細胞的環境下培養或特殊之細胞外間質 (extracellular matrix)，由於剛解凍之胚胎幹細胞團塊貼附性不高，應儘量避免搖動，即使需要在顯微鏡下觀察，也必須小心移動不要劇烈晃動，並減少觀察頻率，待胚胎幹細胞貼附完成並向外生長後，每天或每隔天更換培養基，直到可以進行所需之試驗或繼代。

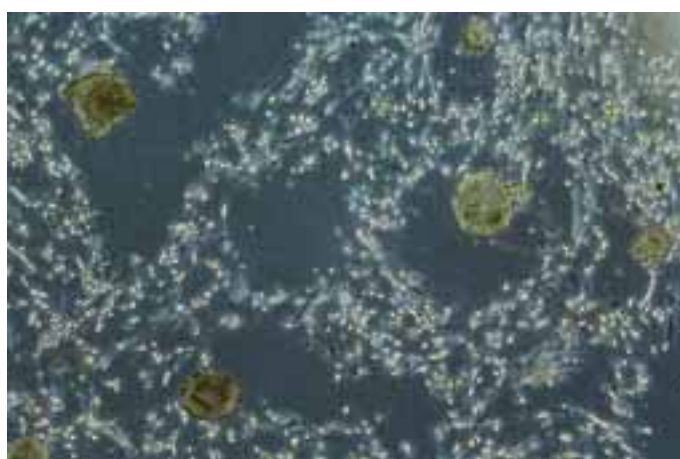
對於以塑膠冷凍小管保存之胚胎幹細胞，操作上則必須額外注意解凍過程，由液態氮或乾冰 (因為運送之需要，由液態氮移轉至乾冰桶內) 直接取出之冷凍小管，其溫度相對極低，

將冷凍小管直接放到 37°C 水浴槽解凍時，必須輕微搖動直到完全解凍，其主要之目的為加速細胞之解凍，然更重要的是確保已解凍之細胞不要再結凍回去。由於解凍過程，事實上是一個動態的進程，所謂解凍乃是溶解速度大於凝結速度，最終至完全溶解，我們可以想像一下，當冷凍小管內之細胞液解凍時，因為熱傳導關係，高溫由外管壁向內傳熱，故管壁邊緣之部分會先行解凍，此時冷凍管內中心之溫度仍在凝結溫度以下，其低溫仍足夠將剛剛解凍之部分，立刻結凍回來，如此若已解凍之細胞又再次結凍，將造成反覆解凍、結凍之微觀變化，對於細胞之傷害極大，所以解凍速度要快，讓此種傷害降到最低，對細胞解凍後之生長影響最小。在水浴槽溶解過程中，不可讓水面淹過冷凍小管之蓋子下緣，甚至觸碰到蓋子，因為容易造成微生物污染。完全解凍後之冷凍小管，以 70% 酒精擦拭管壁，儘速移到無菌操作臺內，依據無菌操作程序將細胞團塊輕輕加入已含有胚胎幹細胞培養基之離心管中，經過適當離心步驟，去除含有 DMSO 的溶液後，再接再種於適當培養環境中，如同上一段所述。

特別注意的是，由液態氮取出冷凍麥管或冷凍小管時，必須注意操作者之安全，液態氮溫度極低 (-196°C) 揮發快速，其危險性就像沸騰的開水一樣，操作者必須使用標準防護工具，千萬不可逞強和大意，以免凍傷，甚至發生意外傷害。



圖一、人類胚胎幹細胞之生長形態：(A)未分化之胚胎幹細胞群落，周圍為飼養層細胞 (B)中間顏色較深者已有明顯分化，旁邊一圈顏色較淡者為未分化之胚胎幹細胞。



圖二、利用 collagenase IV 處理，人類胚胎幹細胞脫落之情形。

### 三、參考文獻

1. Oh, S. K., Kim, H. S., Park, Y. B., Seol, H. W., Kim, Y. Y., Cho, M. S., Ku, S. Y., Vhoi, Y. M., Kim, D. W. & Moon, S. Y. Methods for expansion of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**:605-09 (2005).
2. Reubinoff, B. E., Pera, M. F., & Trounson, A. O. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Human Reprod.* **16**:2187-94 (2001).
3. Ware, C. B., Nelson, A. M. & Blau, C. A. Controlled-rated freezing of human ES cells. *BioTechniques* **38**:879-83 (2005).

## 第九章

### 幹細胞在臨床之應用

### Clinical Application of Stem Cells

李茂盛

中山醫學大學 醫學研究所 教授

#### 一、前言

早在西元 1961 年，加拿大多倫多大學的科學家詹姆士 (James E. Till) 及恩尼斯特 (Ernest McCullough) 分析老鼠骨髓成分，發現可以分化成血球細胞的造血幹細胞<sup>1</sup>。當時骨髓之造血幹細胞便開始被廣泛的研究，企圖用於治療各種血液疾病。此後生物學家陸續開始尋找比造血幹細胞更原始的幹細胞，於是老鼠、兔子、豬及猴子甚至人類的胚胎幹細胞陸續被建立出來，人體幾乎所有組織都存在成體幹細胞，目前已知的成體幹細胞包括骨髓、週邊血液、大腦、脊椎、牙髓腔、血管、骨骼肌、皮膚上皮、消化器官的表皮、眼角膜、視網膜、肝臟、胰臟、脾臟及大腿骨等，此外存在於骨髓、羊水、臍帶及胎盤等組織之間葉幹細胞 (mesenchymal stem cell) 亦因其具有體外增殖及多重分化能力，而被認為具有治療各種疾病之潛力。民國九十五年臺灣十大死因中前四位，亦分別為惡性腫瘤、腦血管疾病、心臟疾病及糖尿病，根據 Perry<sup>2</sup> 於 2000 年統計在美國可能藉由應用具分化潛能的幹細胞治療的疾病及罹病人數的統計心臟血管疾病約五千八百萬人、自體免疫疾病約三千萬人、糖尿病 (Diabetes) 約一千六百萬、骨質疏鬆症約一千萬人、癌症約八百二十萬人、Alzheimer 氏老年癡呆症約四百萬人、帕金森氏症 (Parkinson's disease) 約一百五十萬人以及嚴重燒燙傷、脊椎損傷新生兒缺陷等，共上億的病患等待幹細胞治療為他們帶來治癒的希望，本章將就幹細胞在臨床之應用作一介紹。

#### 二、幹細胞應用於之臨床的三階段

目前已知許多疾病的發生，與特定的組織或細胞功能的喪失與壞死有關，例如糖尿病、帕金森氏症、老年癡呆症、脊椎神經損傷、燒燙傷、心臟衰竭、肝硬化等等。目前的醫療技術雖可以經由移植正常器官或組織而治癒，但正常可移植的器官來源卻嚴重缺乏，且器官捐獻並未形成風氣。至於成體幹細胞或胚幹細胞用於臨床治療的方式，主要可分成三個階段：

##### 1. 將來自某單一組織之成體幹細胞以直接移植的方式輸入給同一組織損傷的患者

最早進行人類異體骨髓幹細胞移植的病例，發表於 1968 年<sup>3,4</sup>，該期刊先後報導了以



骨髓細胞移植治療一個五個月大，罹患性聯遺傳之淋巴球細胞病變之免疫不全症（sex-linked lymphopenic immunological deficiency）及歐德里症候群（Wiskott-Aldrich Syndrome）的案例。這兩例報導皆是直接將骨髓移植入患者體內，而治療成功的病例。血液系統的疾病，可利用骨髓移植以治療無數的患者，而移植到病患體內真正發揮治療效果的，就是存於骨髓內的造血幹細胞。此外，瑞典神經學家於 2000 年將流產胎兒的腦中分離出之神經幹細胞，移植入罹患帕金森氏症的患者腦來治療<sup>5</sup>，並經過長期的追蹤發現移植的神經元仍能存活且可繼續分泌多巴胺（Dopamine），且帕金森氏症的症狀亦有所改善，成體幹細胞是已經具有組織特異性的幹細胞，故可以用來修復其相對應的病變或受損組織，但是可以移植的幹細胞數量，通常是一個移植上的瓶頸。至目前為止，這類的研究已經進行超過十年，許多病患的症狀，明顯地獲得改善。但是，進行一次移植，平均需要摘取六個流產胎兒的腦組織，這些腦組織的來源勢必相當有限，在以臍帶血治療血液疾病上，也一樣存在輸入細胞數量的問題，如何使成體幹細胞增殖至足以治療疾病的數量，還是醫界一個很大的考驗。

## 2. 將幹細胞分化成特定種類的細胞

將幹細胞導向特定的分化方向，使幹細胞在體外定向分化為醫療上所需要特定組織的源祖細胞（progenitor cells），例如根據細胞分化的訊息傳遞所需的特定路徑或特殊的生長因子，使幹細胞被誘導成病人所需的細胞，而針對某些基因發生變異的遺傳疾病則透過基因修飾來改造基因得到治療所需的細胞，來完成細胞替代治療（cell replacement therapy）。將帶有人工培養的活性細胞或組織等移植到體內，使受過損傷的人體臟器或組織再生，進而恢復健康的醫療，這也就是應用所謂的再生醫學。

## 3. 組織工程之運用

當器官嚴重功能損傷，必須進行組織層次的治療或修復甚至器官移植時，須應用組織工程技術，製造出一個適合病患需要的器官。組織工程學需要整合的知識除了基本的細胞學、生物學、生化學、分子生物學外，尚須包括材料學、工程學、外科學及臨床醫學等，此時除了考慮器官的型態功能，其中的血管系統，神經分布及可能遇到的排斥問題，都還是目前醫療界需要努力克服的。

# 三、幹細胞之臨床應用

人類幹細胞體外分化的研究，是近年來十分熱門的主題，除了造血幹細胞是臨床上應用較成功的部分，其他可以應用在臨床治療而無副作用的尚屬少數。人類胚胎的研究，約比小鼠動物的治療模式慢了至少十年，近年來，順利修正動物的模式，而可以用於治療疾病的大部分都還停留在第一期的人體試驗階段。但是我們堅持幹細胞應用於人體的治療，其方法必須是安全而嚴謹的，針對不同幹細胞，直接移植或分化成可以應用於不同種類疾病，整理於表一<sup>5</sup>，本章節將目前已有研究報告的病例，依不同種類幹細胞對疾病治療的效果作一整理，使讀者明瞭幹細胞治療不同的疾病臨床應用的進展

表一、幹細胞或源祖細胞對於多種疾病的潛在治療應用性<sup>5</sup>

疾病分類	細胞來源 <sup>[註一]</sup>	
	幹細胞來源	源祖細胞來源 (progenitor cell)
造血及免疫疾病、再生不良性貧血、自體免疫疾病、癌症	胚胎幹細胞、造血幹細胞 (胎兒、臍帶及成人)	
血管系統疾病、缺血性心臟病	胚胎幹細胞、羊膜間葉幹細胞、脂肪幹細胞	內皮源祖細胞(胎兒肝組織、臍帶血、骨髓)
骨質疏鬆症、骨頭發育不全、骨關節炎、軟骨疾病	胚胎幹細胞、骨髓幹細胞、脂肪間葉幹細胞、胎兒組織間葉幹細胞、臍帶血間葉幹細胞、肌肉衍生的幹細胞	羊膜上皮細胞
肌肉性疾病、骨骼肌缺乏症	胚胎幹細胞、胎兒組織間葉幹細胞、臍帶血間葉幹細胞、骨髓間葉幹細胞、肌肉衍生幹細胞、脂肪幹細胞	羊膜上皮細胞、
心臟衰竭	胚胎幹細胞、臍帶血間葉幹細胞、骨髓間葉幹細胞、脂肪幹細胞、肌肉衍生的幹細胞	羊膜上皮細胞、肝卵圓形細胞
神經系統疾病、巴金森氏症、髓磷脂疾病	胚胎幹細胞、胎兒神經幹細胞、成人神經幹細胞、皮膚(上皮神經脊幹細胞)、表皮神經元鞘幹細胞、骨髓造血及間葉幹細胞、脂肪幹細胞	羊膜上皮細胞、臍帶血細胞
肺部疾病	胚胎幹細胞、成人支氣管肺泡幹細胞、骨髓幹細胞	胎兒肺細胞
肝臟疾病	胚胎幹細胞、胎兒肝臟間葉幹細胞、脂肪幹細胞	臍帶血細胞、羊膜上皮細胞、肝卵圓形細胞
第一型和第二型糖尿病	胚胎幹細胞、來自胎盤的多能幹細胞、成人胰臟幹細胞、脂肪幹細胞、造血幹細胞、間葉幹細胞	胎兒胰腺(類胰島細胞群)、臍帶血細胞、羊膜上皮細胞、肝卵圓形細胞
視網膜疾病	胚胎幹細胞、胎兒神經幹細胞、角膜上皮-視網膜幹細胞	
角膜疾病	邊緣角膜上皮幹細胞、骨髓	

	間葉幹細胞	
皮膚和頭髮疾病	胚胎幹細胞、成人角質幹細胞、表皮神經元鞘幹細胞、突上皮幹細胞	胎兒組織、羊膜上皮細胞、

註一：胚胎幹細胞 (embryonic stem cell)、造血幹細胞 (hematopoietic stem cell)、臍帶血細胞 (UCB, umbilical cord blood)、神經幹細胞 (neural stem cell)、內皮源祖細胞 (endothelial progenitor cell)、間葉幹細胞 (mesenchymal stem cell)、骨髓幹細胞 (bone marrow-derived stem cell)、脂肪幹細胞 (adipose-derived stem cell)、羊膜內皮細胞 (amniotic epithelial cell)、肌肉衍生的幹細胞 (muscle-derived stem cell)、肝卵圓形細胞 (hepatic oval cell)、表皮神經脊幹細胞 (epidermal neural crest stem cell)、支氣管肺泡幹細胞 (bronchioalveolar stem cell)、角質幹細胞 (keratinocyte stem cell)、突上皮幹細胞 (bESC, bulge epithelial stem cell)

## 1. 成體幹細胞之臨床應用

### (a). 造血幹細胞

湯馬士 (Thomas) 於1959年成功完成首例雙胞胎骨髓移植後<sup>7</sup>，移植技術不斷改進，而移植用的造血幹細胞來源已不侷限於骨髓。目前醫學界對於具有形成各種血液細胞能力的造血幹細胞的研究，已經有超過50年的經驗，並有足夠的知識和經驗應用於臨床上的治療上。造血幹細胞，是指在血液或骨髓中具有自我更新並且能分化成多種特定的血球細胞，並且能從骨髓移動到周邊循環血液中，以及回歸到骨髓中的能力，這是移植造血幹細胞的重要基礎。造血幹細胞的移植 (早期叫骨髓移植)，包括：傳統骨髓移植、周邊血液幹細胞移植、以及臍帶血移植<sup>8,9</sup>。

全世界第一例臍帶血移植治療成功的病例報告是 1988 年一位罹患范可尼貧血 (Fanconi's Anemia) 的法國五歲男童，經接受他妹妹的臍帶血後病情獲得改善。目前為止，全世界手足間臍帶血移植數已超出數百例，在非惡性疾病臍帶血移植成效比骨髓移植成效好，而非親屬間臍帶血移植數已超數千例，已經登錄於國際臍帶血網 (Netcord)，共 50,000 到 60,000 單位臍帶血完成 HLA 檢驗可等待配對，其中已配成且移植者約有 1,000 到 2,000 例，孩童約佔 3/4，成人約佔 1/4。臺灣臍帶血移植於 1995 年，在臺大醫院完成首例，接著陸續有林口長庚醫院、臺北榮民總醫院、花蓮慈濟醫院及中國醫院大學兒科部等都有臍帶血移植成功的案例。臍帶血採集方法較簡單，不會傷害母體及胎兒，同時沒有骨髓移植麻醉的危險及疼痛、住院等不便，故已漸漸取代傳統骨髓移植，二者治療上的差異見表二<sup>10</sup>。

藉由臍帶血庫的品質和管理，對臍帶血移植是否成功，固然是相當重要的一環，但是臍帶血移植另一個常遇到的困難，是一單位臍帶血所含的幹細胞總數目不足，對一位成人體重的個體而言，有些人是不夠用的，目前利用二單位或二單位以上的臍帶血，同時植入一位成人病患，來克服臍帶血幹細胞數目的不足，而利用體外培養將臍帶血的量「增大」(expansion) 的方式，也可克服幹細胞數目的不足；此外，亦有科學家利用已培育成功的人類胚胎細胞株，經適當培養與誘導，可使人類胚胎細胞株分化成血液幹細胞，並進一步分化成各種血液細胞，若臨床證實利用此種方式形成之血液幹細胞，可在

人體表現應有的造血功能和建立免疫系統，則血庫之血荒問題不但可以解決，所提供之血液更不需要擔心有病毒污染。

表二、臍帶血是骨髓理想的移植替代品<sup>10</sup>

比較項目	臍帶血移植	骨髓移植
採集過程	對產婦及嬰兒皆無痛苦且無傷害性 <sup>[註一]</sup>	捐髓者必須全身麻醉從大腿兩側腸骨抽取骨髓，還要忍受傷口的疼痛和麻醉後反應的痛苦
造血幹細胞濃度	高於骨髓 10 倍以上，且其增生能力較高	濃度較低且增生能力較弱
人類白血球抗原配對	非親屬之間移植，只需 4~5 個人類白血球抗原相符	非親屬之間移植，必需 6 個人類白血球抗原皆相符，因此配對成功率較低
宿主排斥	發生機會較少，且嚴重程度較低	發生率較高，通常是骨髓移植失敗的主因
病毒感染	較為純淨不易受到感染	較容易遭受感染 <sup>[註二]</sup>
來源	每位新生兒經父母同意，皆可採集，世界多國都已建立龐大的臍帶血銀行	必須捐贈者同意
時效	需要可隨時解凍使用	需要花費長時間尋找配對者

[註一] 除了妊娠不足 32 週、胎盤剝離時間與分娩時間相差 12 小時以上、分娩時發燒高於 38°C、羊水中有胎糞、產婦有嚴重貧血、胎兒呼吸窘迫、紅血球致敏、產婦有 HBV、HCV、HIV、或梅毒感染等情況者不予採集外，正常分娩的胎盤與臍帶都是良好的來源。

[註二] 巨細胞病毒 (Cytomegalovirus; CMV) 感染，是造成異基因造血幹細胞移植病人死亡的主要原因之一，人類巨細胞病毒感染在人群中廣泛存在，在發達國家為 40-60%，發展中國家為 0-100%。因為胎盤具有極佳的過濾能力，使得臍帶血幹細胞的相對純淨，所以臍帶血幹細胞移植和骨髓或周邊血幹細胞移植相比，受感染可能性極低。

### 以造血幹細胞治療糖尿病

糖尿病在國人十大死因從民國 91 年到 95 年連續五年排名第四位，第一型糖尿病在所有疾病中所佔的比例約是百分之五到十，會引發如眼盲、腎衰竭、心臟病和中風等嚴重的併發症。這種病起因於患者自身的免疫系統，攻擊並破壞胰臟裡製造胰島素的 beta 細胞，形成荷爾蒙不足現象，影響到血糖值。大部分的病患在接受臨床診斷時，體內百分之六十到八十的 beta 細胞已經被破壞殆盡。

人類糖尿病細胞治療的成功案例，來自加拿大的醫療團隊自死者的胰臟中分離出胰島細胞並將其移植入糖尿病病人的肝臟中，使其生產胰島素<sup>11</sup>。其結果顯示，部分

病人可不再使用胰島素而過著健康的生活。此研究證明，胰島細胞移植是治療糖尿病的有效方式。但是，這個治療方式仍然受限於胰島細胞的取得不易，兩位器官捐贈者身上所取得的胰島細胞，僅足夠給予一位糖尿病病人。若能利用人類幹細胞，誘導其成為胰島細胞，並進行大量培養，再結合這項移植技術，對糖尿病的治療將會是一大突破。

根據 2007 年四月「美國醫學會」期刊的報導，Voltarelli 醫師所率領的醫療群，進行了一項小型的幹細胞人體治療計畫<sup>12</sup>，這項成果讓第一型糖尿病患者在幾個月內都不需要接受任何治療，這是第一次發現，可以不必補充胰島素治療第一型糖尿病的方法，也是許多試圖利用細胞治療法阻斷，第一期糖尿病病情惡化的第一項成果。

這份報告中指出，一共有十五位被診斷為第一型糖尿病的患者，這些接受治療的患者，年齡從 14 歲到 31 歲，這些病患先注射 cyclophosphamide 及顆粒球細胞生長刺激素 (granulocyte colony-stimulating factor)，刺激病人的骨髓製造幹細胞，並釋放到周邊血液中，再由醫護人員收集週邊血處理後注入患者體內。經 7 到 36 個月的療程後，檢測血中醣化血色素 (hemoglobin A<sub>1c</sub>) 及 peptide C 等生化值，確定有十三人可以不必再注射胰島素並且可維持正常生活。其中一名患者甚至長達三年，沒有使用任何控制血糖的綜合胰島素。它初期顯現的結果令人振奮，除了前述的益處外，副作用也很低，只有一例引起肺炎，另兩例出現內分泌失調<sup>12</sup>，我們也期望，大規模的人體試驗可以儘速展開，確認此治療的安全性，使得第一型糖尿病患者，可因接受這一項治療，不必再長期忍受治療或併發症之苦。

### 以造血幹細胞進行基因療法治療嚴重複合性免疫缺陷症

造血幹細胞為懸浮性細胞，可經血流傳輸，因此可以利用造血幹細胞進行前述的細胞療法修補受損細胞及組織。目前另一個重要的醫療議題是使用造血幹細胞進行基因治療 (gene therapy)。因為利用造血幹細胞做為基因治療的靶細胞 (target cell)，有著勝過以其他細胞做為靶細胞的優點，例如造血幹細胞具有自我更新與分化的能力，能解決外源基因無法長期表現的問題；且當造血幹細胞分化為血液細胞後，其細胞是屬於全身性的分布與循環能夠達到最大範圍的基因修正，因此當前許多基因治療的計畫都是以造血幹細胞為主要的研究對象。

世界上第一個基因治療的臨床試驗是在 1990 年於美國進行，由安德生 (French Anderson) 主持，對象為一患了嚴重複合性免疫缺陷症 (severe combined immunodeficiency disease, SCID) 的女孩<sup>13</sup>，患者因腺苷酸脫氨酶 (adenosine deaminase deficiency, ADA) 的缺乏，而造成免疫功能喪失。1990 年 9 月美國安德生等人，將這位病童本身的血液中 T 細胞取出，利用病毒將正常的 ADA 基因導入細胞，並將帶有修復基因的自體細胞送回體內，經四年治療後確實能維持病人生命，治療後患者的 T 細胞數目上升，細胞和體液免疫功能及臨床症狀有明顯改善，且隨後五年仍能測得轉入載體的序列，其他免疫指標檢測也證實基因治療長期的效果。

在幹細胞基因治療最受注目的病例，是法國醫師 Alain Fischer 對俗稱泡泡兒的疾病做的治療，泡泡兒也是一種肇因於 X 性聯遺傳缺陷的「嚴重型合併性免疫不足症」(SCID-X1)，這種病症係因為 X 染色體的伽瑪 c 鏈 ( $\gamma$  chain) 基因有缺陷，造成免疫系

統的T與B細胞死亡而免疫力喪失，即使是輕微的細菌感染就可能讓病嬰喪命。胎兒出生三個月後即可能發病，會有反覆的霉菌、細菌感染，肺部也因原蟲感染而氣喘，通常都活不過一歲。傳統上治療SCID-X1係採用骨髓移植，可是療程長而且未必都能成功。Fischer率領的醫療團隊治療的流程是先抽出病童的骨髓，篩出病童自體表現CD34+的造血幹細胞，然後讓幹細胞浸泡在含多種蛋白質溶液中，使之容易接受基因轉殖。他利用反轉錄病毒gamma-retroviral vector作為載體，把泡泡兒所缺乏的正常伽瑪c鏈基因置入該無害的病毒中，並在培養皿中讓病兒的幹細胞感染攜帶基因的病毒，再把幹細胞植回病童體內。藉這種修正基因缺陷的方式，達到治療目的。

Fischer的研究團隊，在2000<sup>14-16</sup>年起陸續發表了利用上述方法作基因治療而植入骨髓幹細胞的成功案例，這些臨床治療的病例中有十名接受基因療法的病童，其中九名在臨床症狀上有明顯的改善，已能過正常生活，是至今唯一用基因療法克服的絕症。但後續的觀察又發現，一名在嬰兒期治癒的病童，約三歲時出現白血病症狀，不久之後又出現第二起案例，此種利用造血幹細胞進行的基因療法，因兩名法國嬰兒出現白血病而遭到質疑，這兩起變成白血病的案例，皆因轉入的病毒本來攜帶有正常的伽瑪c的基因，但是正常的基因插入到靠近骨髓細胞的LMO2源致癌症基因（proto-oncogene）的啟動子區域中，科學家推論這兩個基因產生協同作用導致T細胞不正常增生。而在英國倫敦Trasberg率領的醫療團隊對SCID-X1進行人體治療的四個病例<sup>17</sup>，目前尚未傳出失敗的消息，但是由於曾有前車之鑑，這些病例需要更長時間的觀察，等這些泡泡兒年紀更大而且SCID未復發，才能斷言病已治癒。

目前，全世界正在熱烈討論這些外在基因應用在基因治療，是否會在人體其他部位造成突變或導致其他疾病產生？然而，應用基因治療這種最尖端的醫學生物技術治癒遺傳病的夢想，似乎已經在初步的成功經驗，點亮了一盞明燈，但後續可能的副作用仍待更充足的前臨床科學試驗，證明創新療法的有效性與安全性。

聖路易華盛頓大學醫學院，在2003年五月的血液（Blood）期刊裡正式發表的研究報告指出，骨髓或臍帶血裡發現的幹細胞將可利用於治療人類因肝硬化、病毒感染、腫瘤、化學治療或放射治療所引起的肝臟肝細胞缺損。雖然整個實驗在免疫缺乏的實驗鼠身上進行，但實驗的結果顯示人類的幹細胞可以正常的產生血球細胞也能再受損的肝臟裡產生類似肝臟細胞的細胞體<sup>18</sup>。

現今全球每年約進行3萬例造血幹細胞移植，其中白血病患者佔1/3、淋巴癌佔1/3強、原位癌約20%、嚴重再生不良貧血約2%，其餘各類先天性孩童疾病佔3%。故骨髓幹細胞移植可治療非惡性疾病，普遍施行於嚴重性再生不良性貧血及地中海性貧血，亦可救治惡性疾病如白血病等，其他可以應用造血幹細胞的移植治療的疾病還包括：嚴重複合免疫缺陷症、慢性肉芽腫、紅斑性狼瘡、風濕性關節炎及多發性硬化症等。

造血幹細胞除了具有恢復造血的功能外，還有能夠攻擊腫瘤細胞的特性，在臨床上針對患有轉移性腎癌的病患進行異體造血幹細胞的移植時發現約有一半患者的腫瘤體積會縮小。目前推測其可能原因，在於雖然病患體內的腫瘤能夠躲過自體免疫系統的攻擊而長大，然而新移植的異體造血幹細胞能夠在病患體內建立新的免疫系統，並具有對癌細胞進行毒殺的能力，也就是進而抑制腫瘤的生長甚至消滅腫瘤。目前這類的研究已

經擴展到其他原位腫瘤的治療包括肺癌、前列腺癌、卵巢癌、結腸癌、食道癌、肝癌與胰腺癌等。在人類心臟病治療上，美國、德國及巴西等地也陸續傳出成功利用病患之自身骨髓幹細胞，直接打入病患動脈，成功的將病患骨髓幹細胞轉換成心臟肌肉細胞，進而恢復病患心臟機能。

### (b) . 間葉幹細胞之臨床應用

間葉幹細胞主要存在於人體骨髓中，除了骨髓之外，間葉幹細胞尚可取自許多其他的組織，包括髓質骨、週邊血液、脂肪、皮膚、胎兒血液、胎兒肝臟、胎兒骨組織、肺臟、臍帶血等<sup>19-26</sup>。間葉幹細胞能夠分化成中胚層的各种組織細胞，包括硬骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肌肉細胞，甚至可分化成源自於內胚層的肝臟細胞等。最近，有些科學家更進一步指出，間葉幹細胞極可能存在於人類所有組織當中，而它們的存在與維持各組織及器官的恆定有關<sup>27</sup>。

間葉幹細胞在器官移植的案例中，最容易出現的免疫相關併發症，是移植捐贈者的組織對宿主的產生排斥，這是因為移植組織中的T淋巴球攻擊接受者的組織，導致宿主全身器官系統發生病變，稱為移植物對抗宿主疾病 (Graft Versus Host Disease, GVHD)，最終可使宿主死亡，臨床上的治療相當困難<sup>26</sup>。近年來間葉幹細胞具有特殊的免疫調節的功能，間葉幹細胞的第一型組織相容性複合體 (major histocompatibility complex, MHC I) 表現量低而第二型組織相容性複合體不表現，並且可抑制T細胞及B細胞的增生<sup>28</sup>，2004 年瑞典Le Blanc醫師<sup>29</sup>利用移植病患母親的間葉幹細胞，成功地治療接受異體骨髓移植，醫治血癌而產生的急性GVHD的男童。2006 年Le Blanc醫師更進一步應用異體間葉幹細胞移植以治療急性嚴重GVHD病患，其中接受治療的8位病患有6位治療成功，類似成功的案例在中國醫療界也有報導<sup>30-32</sup>。

間葉幹細胞在組織損傷的修復治療上也不斷有成功案例的報導，臨床上第一次成功應用，是以來自骨髓的間葉幹細胞，治療俗稱玻璃娃娃的成骨不全症 (osteogenesis imperfecta)。成骨不全症是一種遺傳疾病，無法正常地製造第一型膠原蛋白，造成骨質極端脆弱且易斷裂，患此種病的孩童會出現畸形及身材矮小的症狀。1999 年由美國Horwitz 等醫師為 3 位成骨不全孩童進行骨髓的間葉幹細胞移植治療，經三個月後於患者骨小梁中可偵測到輸入的成骨細胞，骨中礦物質增加 21-29 公克，對此病的症狀有了初步的治療成果<sup>33</sup>。日本、美國等醫療團隊分別應用骨髓中間葉幹細胞治療骨性關節炎<sup>34,35</sup>，骨髓中間葉幹細胞的移植也用於治療心肌梗塞的治療，德國的 Wollerker 醫師治療團隊將 60 位心肌梗塞的病人分成 2 組，其中 30 人以藥物治療的控制，其餘 30 人則採用自體骨髓細胞作治療，注入骨髓細胞的病患心肌梗塞區域的心臟細胞收縮功能有提高，且治療過程沒有副作用發生的作用<sup>36</sup>。中國的陳醫師也應用病患自體骨髓純化的間葉幹細胞，對 69 名心肌梗塞的患者作治療，也有效的改善病患的心臟功能<sup>37</sup>。

間葉幹細胞應用在脊髓損傷的病例，也同時是異體間葉幹細胞移植的世界首例由南韓醫師 Kang 於 2005 發表於 *Cytherapy* 期刊。這個醫療團隊為一位 37 歲因為車禍導致第十胸椎骨折合併脊髓損傷，而導致下肢癱瘓的女性，進行配對異體臍帶血間

葉幹細胞移植。手術後病患確實在癱瘓 19 年之後能夠站起來走了幾步，這項初步的研究結果也受到世界媒體的重視及廣泛報導。然而，這位病患在幹細胞移植術後幾個月並無法再行走，且伴隨有無法忍受的疼痛，這種移植失敗的原因至今尚不清楚<sup>38,39</sup>。

相較於大部分成體幹細胞，間葉幹細胞具有極佳的自我更新以及增生的能力，除了能做為疾病治療用的細胞源頭之外，間葉幹細胞亦已開始被應用於基因治療的研究中，科學家可以將經過修飾的基因細胞與間葉幹細胞融合，或是將目標基因直接轉殖到間葉幹細胞中，再植入自體的組織中進行修復及治療的工作。嘗試用間葉幹細胞治療的疾病還包括脊髓神經損傷、腦血管疾病，巴金森氏症及阿氏海默氏症等神經疾患，間葉幹細胞同時也發展於治療心肺疾病的應用，如心肌梗塞，心血管疾病或因石綿或多囊性纖維化引致的肺纖維化疾病；間葉幹細胞也被應用來做骨骼、肌肉或軟骨缺損的治療，目前間葉幹細胞的基礎研究在很多疾病的治療上，已經建立很好的動物研究模式，相信臨床的應用也將會也陸續看到成效。

## 2. 胚胎幹細胞之臨床應用

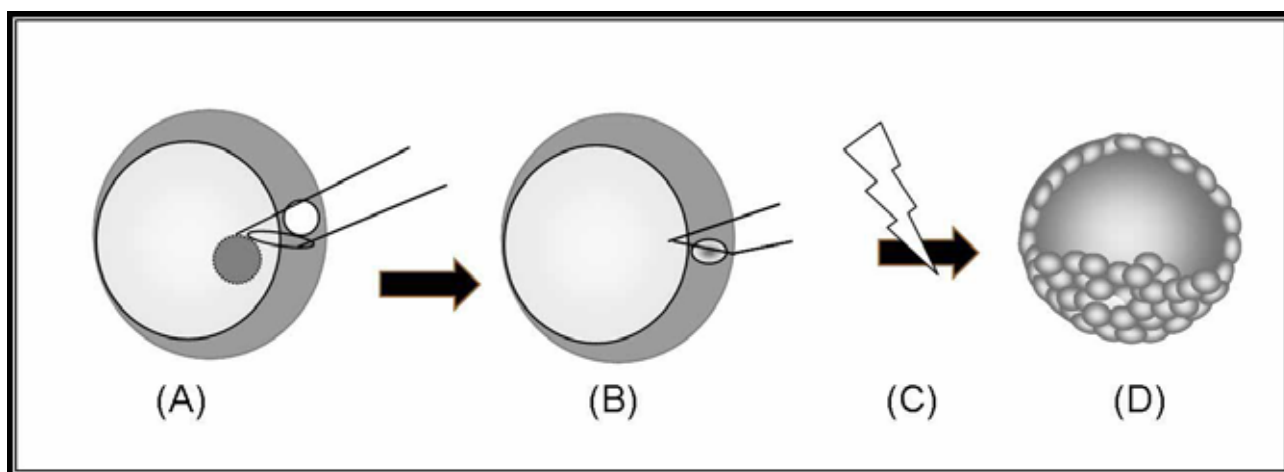
胚胎幹細胞具有較成人幹細胞強的分裂能力，而且可在培養皿中長期培養。但是並不表示將其大量培養，再分送給其他實驗室培養，即可無限制的增殖或順利分化。因為分離胚胎幹細胞的程序若有所不同，其將來分化成各種細胞型的潛力會不同。此外胚胎幹細胞經體外長期培養後，會累積一些無法回復的變化，而且培養的條件不同，這種變化的累積速度也會不同。胚胎幹細胞可能會因為這些原因，而失去分化成某些細胞的能力<sup>40</sup>。因此，長期在體外培養的胚胎幹細胞株應用於臨床治療時，細胞株本身的特性必須相當穩定，而且在繼代培養的過程也必須經常的檢測這些細胞株的特性或染色體等是否有因體外培養刺激所造成的變異，而且不同的胚胎幹細胞株本身的生長速率及特性也不完全相同，筆者與工研院合作建立的 7 株人類胚胎幹細胞即有觀察到此現象。

胚胎幹細胞的第一型人類白血球抗原 (HLA class I) 表現量低且第二型人類白血球抗原 (HLA class II) 不會表現，雖然這種表現較低的白血球抗原的特性可能與腫瘤的生成時的免疫逃脫有關<sup>41</sup>，不過也有學者提出已分化的胚胎幹細胞仍具有免疫的特性<sup>42</sup>。以全世界目前已經建立的約 150 株的胚胎幹細胞，似乎很難對全世界龐大需要幹細胞移植治療的患者達到配對成功的目的，因此解決之道可以利用操作基因的方式剔除 MHC class I 及 MHC II 基因，或者建立更多胚胎幹細胞株以增加具 MHC 相容的胚胎幹細胞株的機會，更多的學者建議使用「體細胞核轉植術」(Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT)，這種技術是指從病人體身上取出體細胞核，顯微注射進入一個去核的人類卵子中，再以電流刺激使其融合為一體，經由發育之後便可得到人造的人類胚胎，不需經由精卵結合便可獲得胚胎，故為無性生殖，所得到的胚胎稱之為「體細胞核轉植術之胚胎」(圖一)。在體外培育成囊胚後進行病人胚胎幹細胞的建立，然後以這個胚胎製造病患專屬的胚胎幹細胞株，再進行進一步體外誘導分化成所須的組織細胞以供治療用。但是以這種無性生殖方法產生的胚胎幹細胞，在臨床的接受性仍有技術瓶頸及應用的爭議，尤其是成熟女性卵子的來源在倫理學上也仍有相當大的討論空間。對於分化後的胚幹細胞若純化不完全在輸入體內治療時，未分化的細胞極有可能在體內分化成



無法控制的畸胎瘤，這種狀況的處理已有學者建議引介自殺基因至胚胎幹細胞，以消滅未分化的多功能細胞避免產生腫瘤的危機<sup>43</sup>。

現有的體外研究或動物實驗陸續證實胚胎幹細胞可以應用在遺傳、損傷及退化性疾病，例如：心血管疾病、肌肉萎縮及神經損傷等疾病，但是現今尚未有人類胚胎幹細胞應用於臨床之病例。由於早期所建立的胚胎幹細胞株，皆是以小鼠胚胎纖維母細胞為滋養層細胞，胚胎幹細胞如要應用於臨床，該胚胎幹細胞株必須完全建立於無異種動物來源的滋養層細胞，如人類皮膚纖維母細胞，應用前亦須確認無動物病毒或反轉錄病毒的污染，此外，用於分化的試劑或培養液也必須符合臨床用藥的品質，才能用於臨床治療<sup>44</sup>。建立第一株人類胚胎幹細胞株<sup>45</sup>的 Thomson 領導的團隊已於 2006<sup>46</sup> 年發表，在無動物污染源的培養條件下，成功建立可能可以應用在臨床等級人類胚胎幹細胞株，筆者也積極的朝這個方向邁進，相信不久的將來胚胎幹細胞在臨床的應用上應可提供極佳的治療利器。



圖一、體細胞核轉植術（資料來源：李茂盛婦產科 鄭恩惠）

- (A) . 將自願者捐贈卵子第一極體及細胞核以顯微操作管吸出
- (B) . 將取自病人的體細胞核，以顯微操作管注入已取出核的卵子中
- (C) . 以適當的電流激活卵子與病人體細胞核產生電融合
- (D) . 以體外培養方式繼續培養胚胎至囊胚期，以提供建立幹細胞

#### 四、幹細胞之臨床應用之展望

在基礎研究及臨床治療上，幹細胞具有極大的潛力，其對人類的健康，勢必能夠提供劃時代的貢獻。根據大多數科學家的經驗，老鼠與人類的差異並不小，因此這部分的突破仍是幹細胞的研究重心。近年來科學家在成體幹細胞的研究與應用上，有令人驚訝的發展，如成體幹細胞多向可塑性的發現，雖然紓解了應用治療性複製的迫切性，但是從病患骨髓培育出此類似多能幹細胞的成功率仍然偏低，距離實質的治療仍有不少地方等待突破。在某些遺傳性缺陷疾病中，遺傳錯誤同樣出現於病人的幹細胞中，這樣的幹細胞不適合進行自體移植，

除非移植異體幹細胞，但是異體幹細胞的免疫排斥反應還沒有完全得到解決。另一方面，在胚胎幹細胞的臨床應用上也有許多需一一克服的困難，首先是胚胎幹細胞的取得，各國政府由於擔心此技術被使用於複製人，因此於對新胚胎幹細胞建立的採用圍堵的政策，但是站在醫療的角度上，我們應該主動地為正在遭受疾病痛苦煎熬的病患，謀求最大的福祉。

幹細胞的應用開發仍在當前全球最尖端的醫學中心進行中，臺灣的醫學界及各研究單位的醫師及科學家們也期望在幹細胞的臨床應用上有更多的突破，儘管不斷改進幹細胞人工誘導的定向分化技術、組織工程技術，以及各種動物實驗的結果令人滿意，我們仍需要更多、更嚴謹的臨床研究，祈能使幹細胞成為一完整安全的新醫療方案，造福全球許多在痛苦中的生活病患。

## 五、參考資料

1. Till J. E. & McCulloch, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* **14**:213-22 (1969).
2. Perry, D. Patient' voices: The powerful sound in the stem cell debate. *Science* **287**:1423 (2000).
3. Gatti, R., Meuwissen, H., Allen, H., Hong, R. & Good, R. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *The Lancet* **292**:1366-1369 (1968).
4. Bach, F., Albertini, R., Joo, P., Anderson, J. & Bortin, M. Bone-marrow transplantation in a patient with the wiskott-aldrich syndrome. *The Lancet* **292**:1364-1366 (1968).
5. Barinaga, M. Fetal neuron grafts pave the way for stem cell therapies. *Science* **287**:1421-1422 (2000).
6. Mimeault, M., Hauke, R. & Batra, S. K. Stem Cells: A Revolution in Therapeutics - Recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and Cancer Therapies. *Clin Pharmacol Ther.* **82**:252-264 (2007).
7. Thomas, E. & Clift, R. *Hematopoietic Cell Transplantation*. Thomas, E. D., Blume, K. G., Forman, S. J. (eds.), Blackwell Science, Malden, MA, 1999, pp. 807-816.
8. Prentice, D. A. & Tarne, G. Treating disease with adult stem cell. *Science* **315**: 328 (2007).
9. Armitage, J. O. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* **330**:827-838 (1994).
10. 巫康熙. 臍帶血移植. 婦幼關懷雜誌 **13**:11-13 (2006).
11. Smaglik, P. Diabetes therapy boosts stem-cell campaign. *Nature* **406**:224 (2000).
12. Voltarelli, J. C., Couri, C. B. E., Stracieri, A. B. P. L., Oliveira, M. C., Moraes, D. A., Pieroni, F., Coutinho, M., Malmegrim, K.C.R., Foss-Freitas, M.C., Simões, B. P., Foss, M. C., Squiers, E. & Burt, R.K. Autologous Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Newly Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus. *J Ameri. Med. Assoc.* **297**:1568-1576 (2007).
13. Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klien, H., Berger, M., Muller, C. A., Ramsey, J. W., Muul, L., Morgan, R. A. & Anderson, W. F. Tlymphocyte-directed gene therapy for ADA deficiency SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* **270**:475-480 (1995).

14. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L. & Fischer, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**:669-672 (2000).
15. Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., Fischer, A., Davies, E. G., Kuis, W., Leiva, L. & Cavazzana-Calvo, M. Sustained Correction of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency by ex Vivo Gene Therapy. *The New England Journal of Medicine* **346**:1185-1193 (2002).
16. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* **302**:415-419 (2003).
17. Gaspar, H. B., Parsley, K. L., Howe, S., King, D., Gilmour, K. C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt M, Von Kalle, C., Barington, T., Jakobsen, M. A., Christensen, H. O., Ghonaium, A., White, H. N., Smith, J. L., Levinsky, R. J., Ali, R. R., Kinnon, C. & Thrasher, A. J. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* **364**:2181-2187 (2004).
18. Wang, X., Ge, S., McNamara, G., Hao, Q-L., Crooks, G. M. & Nolte, J. A. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* **101**:4201-4208 (2003).
19. Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J. A. & *et al.* Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* **2**:477-488 (2000).
20. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J. & *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**:211-28 (2001).
21. Chunmeng, S. & Tianmin, C. Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats. *Transplant Proc.* **36**:1578-1581 (2004).
22. Sottile, V., Halleux, C., Bassilana, F., Keller, H. & Seuwen, K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* **30**:699-704 (2002).
23. Campagnoli, C., Roberts, I. A., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I. & Fisk, N. M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* **98**:2396-402 (2001).
24. in 't Anker, P. S., Noort, W. A., Scherjon, S. A., Kleijburg-van, der. Keur. C., Kruisselbrink, A. B., van Bezooijen, R. L. & *et al.* Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multi line age

- differentiation potential. *Haematologica* **88**:845-52 (2000).
25. Erices, A., Conget, P. & Minguell, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* **109**:235-42 (2000).
  26. Igura, K., Zhang, X., Takahashi, K., Mitsuru, A., Yamaguchi, S. & Takashi, T. A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* **6**:543-53 (2004).
  27. Jackson, L., Jones, D. R., Scotting, P. & Sottile, V. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. *Journal of Postgraduate Medicine* **53**:121-127(2007).
  28. Murase, N., Starzl, T. E, Minoru, T., et al. Variable chimerism, graft-versus-host disease and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from lewis to brown norway rats. *Transplantation* **60**:158 (1995).
  29. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* **36**:2566-2573 (2006).
  30. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M. & Ringden, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363**:143914-14341 (2004).
  31. Fang, B., Song, Y. P., Liao, L. M., Han, Q. & Zhao, R. C. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* **38**:389-390 (2006).
  32. Ringdén, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lönnies, H., Marschall, H.U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., Omazic, B., Aschan, J., Barkholt, L. & Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* **27**:1390-1397 (2006).
  33. Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A. & et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* **5**:309-313 (1999).
  34. Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S.M., Mukhachev, V., Lavroukov, A. & et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* **344**:385-386 (2001).
  35. Wakitani, S., Imoto, K., Yamamoto, T., Saito, M., Murata, N. & Yoneda, M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* **10**:199-206. (2002).
  36. Wollert, K. C., Meyer, G. P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C. & et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet* **364**:141-148. (2004).
  37. Chen, S.L., Fang, W. W., Ye, F., Liu, Y. H., Qian, J., Shan, S. J. & et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* **94**:92-95 (2004).

38. Kang, K. S., Kim, S. W., Oh, Y. H., Yu, J. W., Kim, K. Y., Park, H. K., Song, C. H. & Han, H. A. 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy* **7**:368-373 (2005).
39. 李光申. 間葉系幹細胞 科學發展 **414**, 18 ~ 21 (2007).
40. Ethical Issues in Human Stem Cell Research, Volume I: Report and Recommendations of the National Bioethics Advisory Commission, Rockville, Maryland, September 1999, p1-24.
41. Cabrera, C. M., Nieto, A., Cortes, J. L., Montes, R. M., Catalina, P., Cobo, F., Barroso-Del-Jesus, A. & Concha, A. The low rate of HLA class I molecules on the human embryonic stem cell line HS293 is associated with the APM components' expression level. *Cell Biol. Int.* **20**:20 (2007).
42. Li, L., Baroja, M. L., Majumdar, A., Chadwick, K., Rouleau, A., Gallacher, L., Ferber, I., Lebkowski, J., Martin, T., Madrenas, J. & Bhatia, M. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells* **22**:448–456 (2004).
43. Hannes, H., Ralph, G. & Alan, C. Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *TRENDS in Biotechnology* **25**:24-32 (2006).
44. Skottman, H., Dilber, M. S. & Hovatta, O. The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines. *FEBS Lett.* **580**:2875-2878 (2006).
45. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldo, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145-1147 (1998).
46. Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A. & Thomson, J. A. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* **24**:185–187 (2006).

## 第十章

### 幹細胞治療研究與臨床試驗

#### Clinical Trials and Advance Research for Stem Cell Therapies

陳婉昕<sup>1</sup> 陳甫州<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 工業技術研究院 生技醫藥所

<sup>2</sup> 台中榮民總醫院 幹細胞中心

#### 一、前言

幹細胞具有自我更新與分化的能力，可將培養保有分化潛能的幹細胞分化為成熟之先趨細胞及組織細胞，或將體內的幹細胞分離後，直接作為進行自體移植治療，於體外培養增殖後誘導其分化，都具有臨床應用極大的潛力。由於目前全球幹細胞治療的積極研發，許多醫藥或是醫療技術尚無法完全治療的重症，如心臟衰竭、帕金森氏症、脊髓損傷或腦中風等患者，都對未來幹細胞的醫療應用寄予厚望，希望幹細胞能為這些疾病帶來一線曙光<sup>1,2</sup>。幹細胞因為取得來源、分化潛力之不同，具有不同之特性，故在臨床應用上與發展時程也各不相同，成體幹細胞雖然分化能力較有限，較不易於體外長期培養增生，但是因其可能自體取得，或是異體移植時已累積數十年的臨床配對與治療經驗，直接可因應血液疾病治療上的需求，所以，現階段幹細胞移植醫療應用，以成體幹細胞移植手術或臨床試驗為主，這些移植幹細胞的主要來源包括取自骨髓、周邊血液及臍帶血中之血液幹細胞與間葉幹細胞，1999年以前血液幹細胞移植手術還是以骨髓移植手術為主，但是，骨髓移植手術數量已開始遞減，取而代之的是周邊血液移植手術則有漸增的數量，目前周邊血液移植手術與骨髓移植手術數量大約是6:4，同時也開始有臍帶血移植手術，最近五年來臍帶血移植手術則是有漸增的趨勢。至於間葉幹細胞的臨床試驗則有日趨重要，目前正在執行或已完成的間葉幹細胞臨床試驗已有16個，其中包括以治療移植物抗宿主病(GVHD)六個和急性心肌梗塞四個臨床試驗為主，人胚幹細胞於1998年底才成功被分離培養<sup>3</sup>，具有廣大之分化潛能，可分化為成體二百六十餘種成熟細胞，胚幹細胞在體外易於培養增殖，但未分化狀態之細胞，可能有在體內形成畸胎瘤或癌化之風險，所以其臨床應用需先經過誘導分化之步驟，以降低上述之缺點，除此之外，在進行異體移植時還可能產生免疫排斥等問題尚待解決，是研發中的主要課題，雖然成體幹細胞要進行異體移植亦需解決免疫排斥之問題，但是在臨床應用上已經有相當多的經驗能克服這些問題，近年來，間葉幹細胞之研究也有助於解決免疫排斥之問題，人胚幹細胞研究因為起步晚，所以臨床應用之發展時程將會較慢些，但是人胚幹細胞具備絕佳之發展潛能，包括糖尿病、心臟血管疾病、血液疾病、肝臟疾病、神經退化性疾病或對目前常規方法難以見效的其他疾病，都可能囊括在其研究之領域，幹細胞臨床試驗與研究範圍廣闊，研究內涵

與許多最新進展也日新月異無法一一介紹，本章將就幹細胞在重要的臨床應用領域與研究現況做一簡單之概述。

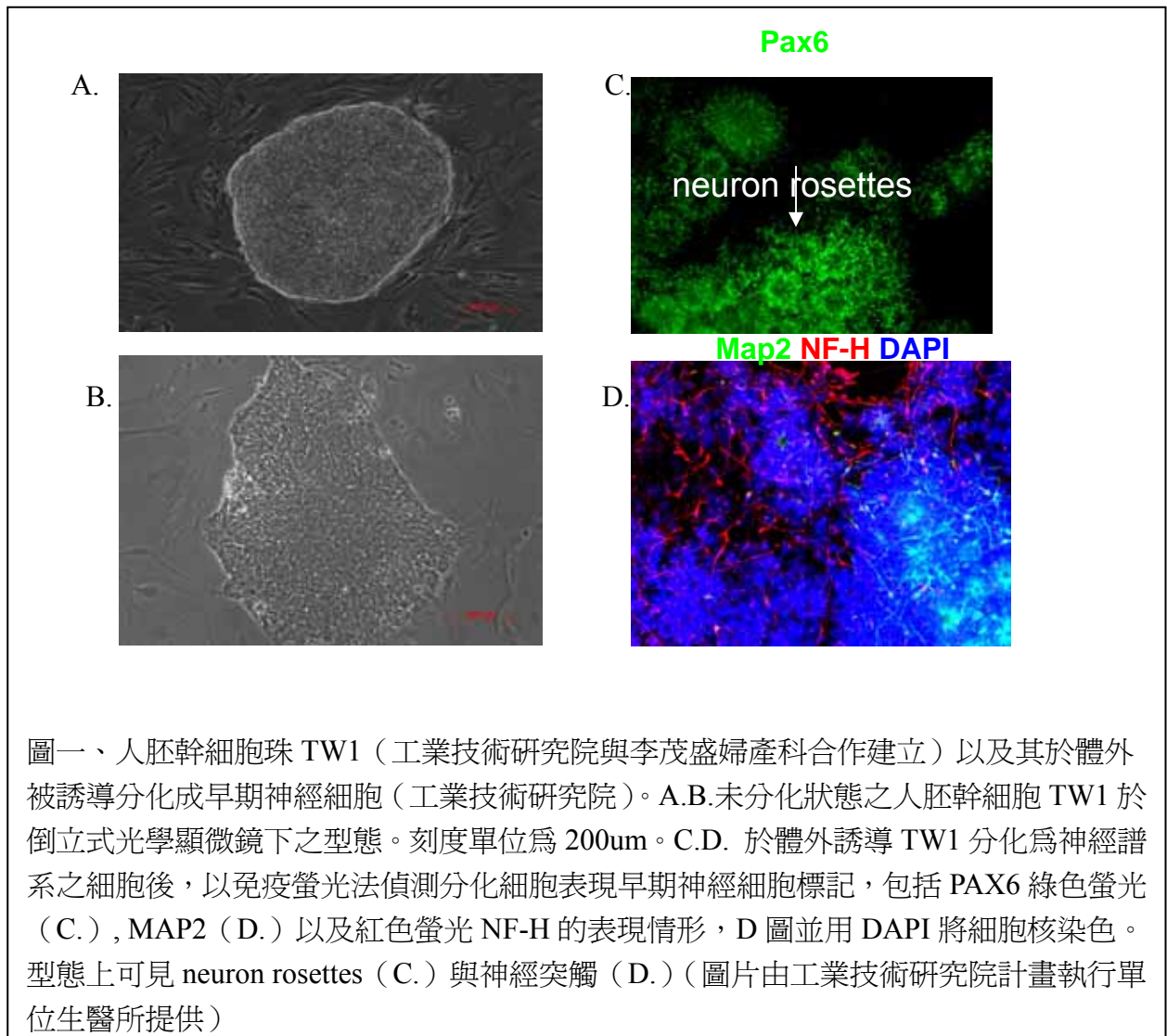
## 二、幹細胞臨床醫療應用之關鍵因素

要進行幹細胞臨床治療，必須先考慮幾個關鍵因素<sup>4</sup>，包括：所使用的幹細胞種類、足夠的細胞數以及純度、細胞植入體內的方式和免疫排斥問題。

### 1. 所使用的幹細胞種類：

不同的幹細胞具有不同特性，治療時施行方式與考量也有不同，所以將來要應用於細胞移植醫療時，所要開發的技術重點也不盡相同。成體幹細胞研究與應用歷史最久，包括取自骨髓、周邊血液、骨骼肌與胎兒組織的幹細胞，因可取自病患直接進行移植醫療，沒有免疫排斥或移植細胞傳染病原之問題，成為最早使用於臨床再生醫學之用途，但是，也因其不易於體外長期培養增殖，且分化能力較為有限，故不能適用於所有壞損組織之修復。目前已有臨床應用者如取自骨髓或臍帶血之血液幹細胞（Hematopoietic Stem Cells, HSCs）治療血液疾病，除了血液幹細胞以外，目前比較有潛能之成體細胞為間葉幹細胞（Mesenchymal Stem Cell, MSC），此類幹細胞存在於骨髓、臍帶血、臍帶、脂肪組織、羊水胎盤等，目前多為取自骨髓，間葉幹細胞可被誘導分化成為軟骨、硬骨、脂肪、肌肉及神經等組織細胞，目前已有臨床試驗進行修復軟硬骨、心肌等。此外，因其具有免疫調節功能，亦有應用於治療移植之免疫細胞對宿主之排斥（GVHD），或應用於異體移植修復心肌梗塞造成之心肌壞死者<sup>5,11</sup>。

人胚幹細胞（human embryonic stem cells）為一種取自發育 4 至 5 天囊胚期（blastocysts）之內細胞團塊（inner cell mass），具有全能分化潛力之幹細胞（pluripotent stem cells），在胚胎發育時期能發育成三胚層，包括外胚層細胞、中胚層細胞及內胚層細胞以及生殖細胞，並進一步發育組成成體所有二百六十餘種細胞，而且它可在體外複製、增生，仍保有可分化成人體各種器官與組織細胞的能力，故具有醫療應用之潛力。但是由於目前取得來源為體外受精之卵子，必需克服社會倫理道德之疑慮，在實際操作上也遇到相當大的困難，是必需面對的問題。因為於 1998 年才成功被分離培養，人胚幹細胞之研發使用時程較短，各國均投入大量資源投入其研發，法規也漸漸鬆綁。其特性雖可於體外長期培養增生而仍保有分化潛能，但未分化狀態之細胞，可能會在體內形成畸胎瘤，在各國科學家積極研發之下，已瞭解一旦胚幹細胞分化，可能就失去形成畸胎瘤的能力，所以其臨床應用可先經過誘導分化之步驟，在安全性上就比較能被接受。目前研發時程上，已有許多體外誘導分化之報導，如圖一所示，人胚幹細胞可於體外誘導分化為早期之神經細胞，近一、二年並進展至臨床前動物試驗，部分研究已證實分化之細胞移植於動物體內，可修復壞損之組織功能，例如由人胚幹細胞分化為寡突細胞（oligodendrocytes）純度超過 98%，移植大鼠受損之脊髓，可幫助急性脊髓損傷神經再生與運動功能之恢復<sup>6</sup>。除此之外，針對免疫排斥之問題、各種細胞之臨床研發與應用實例，將於之後再詳述。



圖一、人胚幹細胞珠 TW1（工業技術研究院與李茂盛婦產科合作建立）以及其於體外被誘導分化成早期神經細胞（工業技術研究院）。A.B.未分化狀態之人胚幹細胞 TW1 於倒立式光學顯微鏡下之型態。刻度單位為 200um。C.D. 於體外誘導 TW1 分化為神經譜系之細胞後，以免疫螢光法偵測分化細胞表現早期神經細胞標記，包括 PAX6 綠色螢光（C.），MAP2（D.）以及紅色螢光 NF-H 的表現情形，D 圖並用 DAPI 將細胞核染色。型態上可見 neuron rosettes（C.）與神經突觸（D.）（圖片由工業技術研究院計畫執行單位生醫所提供）

## 2. 足夠的細胞數以及純度

依照要修復的組織與功能，所需之細胞數不盡相同，例如脊髓損傷與心肌修復所需之細胞數目，差距很大，所以必須仔細考量，於臨床前動物試驗中找出適當範圍，才可能進行臨床試驗，另外如前所述，不同細胞特性不同，胚幹細胞之應用必須經過分化誘導，如何誘導分化，要誘導為何種細胞，誘導的比率與純度為何，那個分化階段的細胞，才能達到移植醫療之效果，都是很重要的議題，必須仔細研究，而成體幹細胞也有可能需要經過適當的純化步驟，如何取得足夠所需之特性的幹細胞，是幹細胞臨床醫療應用重要的課題。

## 3. 細胞植入體內的方式

依受損部位之不同，需考慮植入細胞之方式，血液疾病之治療可經由靜脈注射幹細胞，其他組織疾病者，則可以直接將細胞注射於受損部位，例如可用心導管將幹細胞定位移植到心肌壞死之心臟部位、利用生物可降解薄膜之包埋技術、或直接定位移植導入中風或脊髓損



傷部位，在這些特殊部位幹細胞的存活率探討，如何有效施打或移植技術，又如何將細胞打到所要部位，而不致有太多幹細胞隨液體流失，這也是細胞治療中重要的一個需進行研發之技術。

#### 4. 免疫排斥問題

若進行異體移植，則需考慮免疫排斥問題，人胚幹細胞之抗原會隨著細胞分化而顯現，如前所述，針對人胚幹細胞免疫排斥之問題，有短、中長程可以解決的方法，例如使用免疫抑制藥物、建立細胞庫搭配抗原配對與藥物、與胚幹細胞分化之免疫細胞共同移植、以基因工程法剔除免疫抗原 MHC、核轉殖製造個人化之細胞。而成體幹細胞用於異體移植時，需經免疫抗原配對尋找捐贈者，而目前許多研究也顯示，間葉幹細胞可具備有免疫調節功能，將來應用於治療時可以減少移植之免疫細胞對宿主之排斥 (GVHD)，目前應用朝向可於異體移植之臨床研究。

### 三、幹細胞臨床醫療應用之開發歷程

幹細胞之臨床移植醫療，是一項新的醫療技術，其開發歷程與新藥開發一樣，有嚴格之法規規範，嚴謹之臨床前研究與臨床試驗，以確保各項幹細胞移植醫療的安全與有效性，以謀求病人最大的福祉。

除了前述之考量 (1) 所要使用的幹細胞種類，(2) 如何取得足夠的細胞數以及純度，(3) 有效的細胞植入體內之方式，(4) 免疫排斥等問題。針對所要治療的疾病或受損組織，研究分析細胞特性、功能並考量所要使用之幹細胞，而後研究如何取得足夠量的適用的幹細胞，包括分離、純化或是誘導分化的方法，於體外分析研究中，除了確定取得細胞具備所需之特性、功能，而後選定動物疾病或組織受損模式，進行幹細胞移植動物體內之試驗，包括安全與有效性，以及移植修復之機制探討，同時需瞭解適當的細胞數目。若是能取得動物試驗證明細胞移植之安全性與有效性，接者便可申請人體臨床試驗，遵循細胞治療人體試驗申請之相關規範，在台灣為衛生署 92 年公告之「體細胞治療人體試驗申請與操作規範」，以及「人體細胞組織優良操作規範」，臨床試驗一般分成三期，第一期是安全性測試，通常是以正常人測試移植細胞之安全性，在第二期則為有效性之測試，通常在少於 10 個左右病人身上做測試，同時看安全與有效性，最後，在第三期是大樣本有效性測試，通常需要上百至千人的測試，結果以統計分析確定其有效性。幹細胞移植醫療之人體試驗，通常第一期與第二期試驗會同時進行，亦即在病人身上同時測試安全與有效性，三期臨床試驗都成功驗證安全與有效性後，便可申請產品上市。做為一個細胞移植醫療之產品，製程並需符合臨床優良製造操作規範 GMP，確保移植細胞之品質與安全。

雖然廿年前科學家已經從小鼠胚中培養出來的胚幹細胞，也能在試管中分化成其他種類的細胞，再加上 1997 年英國的科學家衛爾馮 (Wilmut) 等人，以成年羊的乳線細胞核融入去掉細胞核的卵子，複製了桃莉羊，當 1998 美國威斯康新大學湯姆生 (Thomson) 成功的

在實驗室裡培養出人類胚幹細胞，確實具有多種分化潛力（pluripotent）的幹細胞時，科學家都相信在理論上合併這兩項研究發現，可以應用在治療複製（therapeutic cloning）或複製人類，所以在近年來生命科學研究的領域裡，大概很能再找到一個比“人胚幹細胞”還要炙手可熱的話題<sup>17</sup>。生物學家對胚幹細胞愛不釋手，因為到目前為止，沒有任何一種成體幹細胞能比胚幹細胞更具全能性的分化，台灣也有許多實驗室也已經培養出人胚幹細胞。近年來新聞報導複製人類胚胎與幹細胞治療的臨床研究的消息，引起了各界的關切，美國總統布希及議員們紛紛也重申禁止利用胚胎複製人的相關研究，卻有限度的開放胚幹細胞的研究。但是相較之下，成體幹細胞卻是目前在臨床上最有潛能應用在人類疾病的細胞種類，血液科醫生應用累積 40 年來的移植經驗，已在血液疾病上的應用積極地收集、純化、培育各種成體幹細胞，目前朝向更有效的治療各種血液疾病進展。

近年來有許多幹細胞的突破，由人胚胎的幹細胞（hESC）分化成的心臟細胞，移植到受傷的老鼠心臟後，還能產生正常的心肌功能；將胚幹細胞誘導分化後移植到腦或脊髓，也能分化成神經細胞並恢復傳導作用；在未來的糖尿病以及腎臟疾病的研究，更能協助醫生在各式各樣的疾病治療策略上，有全面性的影響。所以，將來人類幹細胞具有潛力能誘發成不同種類的細胞並進而應用在疾病治療上，目前國際上已有些幹細胞醫療之產品與人體試驗之進行，文獻上更有許多有關幹細胞移植醫療之動物實驗報導，以下僅就相關研究與應用實例依不同醫療之應用領域介紹之<sup>8</sup>。

#### 四、神經幹細胞臨床試驗研究

##### 1. 神經幹細胞的重要性

現代醫學科技雖然發達，但是對於神經損傷所造成的神經系統疾病，包括車禍和運動傷害導致脊髓損傷及神經退化性疾病（包括腦中風、巴金森氏症等），偏重於症狀減輕的治療方法，仍然沒有徹底治本的療法，或多或少皆會造成部份神經元永久性的缺損或死亡，神經系統無法再生足夠的新神經元以維持神經網路之正常聯繫時，導致身體的神經系統或運動功能難以完全恢復。直至上世紀，具有多向分化潛能的神經幹細胞被培養出來，是神經生物學領域上重要的進展，近年來，並發現腦組織內還存在具有多向分化潛能的神經幹細胞，這些重大的發現終於打破傳統認知中「神經系統損傷後不可再生」的觀念<sup>16</sup>。

過去一般的觀念認為，動物的中樞神經系統的神經細胞在出生前或出生後不久就不能再生，這種觀念意味著成體動物的腦和脊髓內的神經細胞只會逐漸凋亡減少，無法再生或更新，對於後天發生中樞神經系統的損傷，不可能進行神經修復，神經功能的恢復只能依靠鄰近或其他中樞部位進行結構上的代償。1980 年代中期，美國洛克菲勒大學兩位學者在研究金絲雀的發聲學習行為中，發現成年鳴禽金絲雀腦中確實有新的神經細胞產生，並且這些新的神經細胞能夠在前腦參與協調控制發聲學習的神經中樞，對於如何產生這些新生神經細胞的機轉則是未知，直至 1992 年科學家才發現，在胚胎及成體中樞神經系統的室管膜下區（subventricle zone, SVZ），存在著一群能自我更新、分裂增殖及能分化成為大部分類型神

經細胞的細胞群，經離體實驗證實，此細胞群能聚集成大小不一的神經球 (neurospheres)，繼代培養若干次後，可分離得到神經幹細胞 (neural stem cells, NSCs)，此為首次提出神經幹細胞的概念。在 1996 年的美國《科學》雜誌刊載一篇革命性的實驗報告，這篇由台北榮總鄭宏志醫師在瑞典的研究成果，約兩千字的報告紀錄兩隻脊椎被截斷的大白鼠，透過兩種不同手術的成效，以傳統接合手術治療的大白鼠，康復效果並不理想；但另一隻大白鼠，利用最新的醫學技術—肋間神經結合神經膠修復，六個月後，後腳明顯恢復行動，這是全球第一宗在哺乳動物上成功的脊椎修復手術，推翻了幾百年來神經無法再生的理論。

所以長期以來科學家一直認為，成體動物腦內神經細胞並不具備更新能力，一旦受損乃至死亡，不可能再生，這種觀點使科學家對帕金森氏症、阿茲海默症及腦脊髓損傷的治療受到了很大的限制，雖然傳統藥物及外科手術治療可以有相當的進展，但是仍不能達到滿意且持久的療效，隨著神經幹細胞研究與最新的進展，對於治療上述的中樞神經退化疾病將可開創出劃時代的重大意義。

## 2. 神經幹細胞的治療應用

神經再生的契機，使得神經幹細胞研究成為當今生命科學矚目的焦點之一。神經幹細胞在醫學的應用與展望，主要應用在治療神經退化疾病或是神經再生與修復等，例如脊髓受傷、腦中風、阿茲海默症、帕金森氏症、腦部創傷等病患將是最有可能的受患者，現在的研究發展中，也有將神經幹細胞移植技術與基因治療合併，利用具有特定基因工程載體的神經幹細胞為治療工具，提供新的移植技術，以提昇神經幹細胞在再生醫學上的應用<sup>7,18</sup>。

神經幹細胞研究在神經發育學和修復受損神經組織中扮演著重要的角色，目前在神經幹細胞的兩大研究主題中，一是人胚胎神經幹細胞，可以由多功能性的胚幹細胞分化而來，胚幹細胞的發展歷史與特性已在前面簡述過，單就學術研究層面而言，利用人胚幹細胞來研究神經幹細胞可能是最佳的選擇。二是利用自體或異體之成體或墮胎組織幹細胞，在治療腦中風方面，台灣在 2007 年也有新的臨床試驗，中國醫藥大學由林欣榮教授領軍的研究團隊，以自體幹細胞直接注射損傷的腦神經，成功改善了 5 名腦中風患者病情，病患從原本手不能動，治療後不但手可以握杯子、還可以擠牙膏，走路的步伐也變快了，臨床試驗還在進行中，根據目前的治療成果可以說是相當顯著。

在北京首都大學附屬朝陽醫院黃紅雲醫師在病人受傷椎骨上下處鑽兩個小孔，然後注射入從墮胎組織所培養的鼻鞘神經細胞，鼻鞘神經細胞移植被認為是治療脊髓損傷最有前景的方法之一。鼻鞘神經細胞起源於嗅基底膜，分布在嗅球、嗅神經並可伴隨嗅束遷徙入腦。它不同於星形細胞和許旺氏細胞，但是，同時具有這兩種細胞的特性，它存在並遷徙於周圍神經和中樞神經之間，在嗅球內，它是惟一接觸和包被嗅神經軸突的膠質細胞，在整個中樞神經系統通路中，它包被嗅神經軸突，以防止它們與其他中樞神經系統細胞接觸，鼻鞘神經細胞在其膜上可以分泌許多與細胞黏合和軸突生長和促進神經生長的分子，也能分泌大量不同種類的神經滋養和支持因子。毫無疑問，嗅鞘細胞的這些特性為損傷神經修復和再生以及功

能恢復建立了很好的內在環境。鼻鞘神經細胞會分泌這些滋養物質，以刺激殘存的軸突再生，並協助分泌髓鞘包裹在再生軸突的外層，同時隨著再生軸突遷移形成造橋的作用，鼻鞘神經細胞移植病患在術後一至二個星期通常會發生劇烈疼痛，根據朝陽醫院的報導，接著在一至一年半後內每位病患均有程度不等的功能改善，當然，這些改善的機轉並不清楚，值得進一步去研究並釐清。

### 3. 神經幹細胞基因治療理念

另外有一個新的研究發展理念，以神經幹細胞的移植合併基因治療，此研究將神經幹細胞作為神經系統疾病基因治療的載體，具有其他細胞移植所不能比擬的優勢，首先，帶有特定基因的神經幹細胞植入宿主體內後，可直接進入並整合神經網絡，使治療基因表達與微環境調控連結，且其分化所產生的神經細胞將逐漸取代有缺陷或死亡的神經細胞網路。再者，治療基因種類、表達時機與效能及這些神經細胞的分佈，不會侷限於解剖學上神經幹細胞的周圍，還可以根據整體的需求，更廣泛地遷移分佈或支持局部的受創神經組織。

神經幹細胞作為移植細胞或基因載體，還具備許多移植治療上的優點：神經幹細胞可以分化成神經元或神經膠原細胞，結構上易與宿主固有組織融合而有較低免疫反應；能在腦內做遠距離遷移活動；對宿主中樞神經系統損害較低；比較不干擾其他正常的腦細胞功能；因著載體基因表達比較穩定，維持時間比較長；共存於中樞神經系統中，所以，它不受限於腦血管障壁的屏障，能直接在中樞神經系統中運送基因產物或替補失去這些功能之神經細胞。

移植治療研究過程中有兩項因素需要特別注意，細胞數量的多寡及神經元分化的比率是一項重要的考量，神經幹細胞在體外培養可以分化為神經細胞，但是分化為特定神經細胞的比例並不高，而且每次誘導分化時會有程度上的差異。以目前的研究技術，仍無法做到產出完全均一的神經細胞分化比率，同時也尚未建立一套標準化的操作流程，若貿然將誘導之神經幹細胞或伴隨其所產出的具有隨機性分化的細胞，直接移植到病患身上，其所產生的臨床風險將難以評估及承擔。

儘管神經幹細胞廣泛存在神經系統，但是在移植治療時選定移植標的區時，還要考量到不同腦區所需之神經細胞與膠原細胞的分化時機與比率，在微環境訊息等生物學特徵的調適，才能精確地選擇移植的神經幹細胞，同時提昇移植後細胞的存活率、細胞間突觸的建立以及減低免疫排斥反應。利用基因修飾的神經幹細胞治療疾病在臨床上將會有廣大的應用前景，但應用成功與否仍仰賴對神經幹細胞的分化影響因子及機轉的深入研究了解；同時，如何發展出一套簡便又有效的神經幹細胞體外增殖與特定神經元的大量誘導分化，也都是將來解決問題的致勝關鍵點。

## 五、心血管疾病幹細胞臨床應用

儘管心血管疾病在臨床上已經有諸多重大的突破，如成功完成心臟移植手術等，但要恢

復一個受損之心臟，仍是一項令人敬畏的浩大工程。近來研究發現，利用幹細胞來治療修補受損的心臟細胞，能產生新的心肌細胞外，亦能形成新的血管來彌補原先的血液供應，研究中也發現血管內皮幹細胞確實功不可沒。另外有些研究則發現，血管內皮幹細胞能改善糖尿病小鼠的血管形成，由於糖尿病患者的血管形成能力很差，如果預先從體內取出把血管內皮幹細胞分離，在體外進行大量培養，之後再將其植回體內，藉此改善糖尿病患者的血管形成能力，也能對糖尿病或心臟衰竭之治療有相當程度之貢獻。

目前治療心臟血管疾病已經有許多有效的治療方法，如外科手術、藥物治療或是器官移植等，但是對於移植心臟來源始終是不足，此外這些病患無法維持長久之存活時間，也是還有相當的困擾，近來，科學家利用特定的培養環境將幹細胞分化成心肌細胞與血管內皮細胞，藉以替代受損的心臟細胞，使心臟恢復原有的功能性<sup>14</sup>，這種修補方法比傳統的異體心臟移植簡單、方便且來源豐富，並且毋須漫長等待一顆可移植的心臟，這些幹細胞可從自體取得並分離，因此病人本身所冒移植後的排斥風險也遠比移植異體心臟小很多。

美國研究人員查克·默裏等人在 2007 年 9 月號《自然·生物技術》雜誌上撰文說，他們成功利用人胚幹細胞修復了實驗鼠受損的心肌，這一進展為用幹細胞技術治療人類心臟病帶來了希望<sup>9</sup>。美國華盛頓大學和傑龍生物醫藥公司的研究人員首先誘導實驗鼠發生心臟病，然後在其體內植入由人胚幹細胞分化成的心肌細胞，實驗結果發現，一段時間後，實驗鼠受損的心肌開始重新生長，整個心臟的功能也有所改善。華盛頓大學的查克·默裏說，他們的實驗結果“特別重要”，因為心臟病患者發病後的主要問題之一，就是心臟受損不能復原，新實驗結果表明，幹細胞療法有可能使受損心臟恢復正常，由此可知在治療心血管疾病上血管內皮幹細胞是相當具有遠景。

胚幹細胞理論上能分化成各種類型的細胞，但在實際操作時，通常僅有不到 1% 的胚幹細胞能分化為心肌細胞，而且移植後這些心肌細胞大多死亡<sup>9</sup>，用幹細胞治療心臟血管疾病的研究在此之前一直受阻於這難題，查克·默裏等人的新實驗在解決上述問題取得了突破。首先，研究人員在幹細胞培養過程中加入了兩種生長因子，使得胚幹細胞分化為心肌細胞的成功率達到 90%；其次，他們在心肌細胞移植時混入多種細胞滋養因子、生長因子和抑制細胞死亡的成分，使移植成功率從過去的 18% 上升至 100%，研究人員表示，他們計劃下一步對豬和羊等大型動物進行類似實驗，預計兩年內開展人體早期臨床研究，無疑地，幹細胞將為心臟血管疾病患者帶來莫大的福音。

## 六、造血幹細胞臨床應用

臨床上針對惡性血液疾病的治療方式，不外乎為放射性療法與化學性療法兩種，藉此來抑制殺死惡性腫瘤細胞，到了 80 年代，骨髓移植成為治療惡性血液疾病之造血支持治療的主要措施，藉此重建修復被破壞的造血與免疫系統，由於臍帶血中含有豐富的造血幹細胞，1988 年醫學界成功地利用人類臍帶血移植治療貧血症，從此開創了臍帶血移植的先例。

一般認為造血幹細胞除了造血功能外，多項研究發現造血幹細胞有著令人興奮的跨胚層分化能力，其能夠分化成為非血液系統的細胞，如神經細胞、血管內皮細胞、心肌細胞等<sup>10,15</sup>。

另外，它還有一項令人驚訝的特性，就是能夠攻擊腫瘤細胞。推測原因在於新移植的異體造血幹細胞，能夠在患者體內建立一套新的免疫系統，進而對癌細胞產生毒殺作用，即所謂的 Graft-Versus-Tumor，因而消滅或抑制腫瘤生長。

當造血幹細胞分化為血液細胞後，是屬於全身性的分佈與循環，因此利用造血幹細胞做為基因治療的標的細胞，也勝於其他種類的幹細胞之優點，因此當前許多基因治療的計畫，都是以造血幹細胞為主要的研究對象<sup>12</sup>。經過五十多年來的造血幹細胞研究與臨床試驗，目前，造血幹細胞已成為最被人們所了解的幹細胞，並且也是應用最廣的幹細胞。

## 七、未來的挑戰與展望

相對於生物學家對人類胚幹細胞的厚愛，許多團體卻對人胚幹細胞的研究有道德的質疑，在建立人胚幹細胞株，必須使用體外人工受精胚囊，然後再從內質團（inner cell mass）裡分離出人胚幹細胞培養，這種培育過程具有一定程度的道德爭議。因此，除了人胚幹細胞與成體幹細胞的多能性幹細胞外，日本山中伸的研究小組發表了“誘導式多能性幹細胞”（induced pluripotent stem cells, iPS cells），能將小鼠纖維母細胞轉變成類似的胚幹細胞，還能和成鼠形成嵌合體（chimera），為了能精確地將纖維母細胞轉變成胚幹細胞，他們使用四個轉錄因子，或利用另一個表現在胚幹細胞裡的分子 -Nanog 作為鑑定誘導式多能性幹細胞的標記，另外，美國科學家也利用四個相同或部份相同的轉錄因子，也成功地將各種體細胞轉變成 iPS 細胞，他們的實驗數據也幾乎完全符合山中伸研究小組發表的結果，最近他們更利用人皮膚的纖維母細胞也被誘導成 iPS 細胞，將來這些 iPS 細胞更更能提供學者研究除了人胚幹細胞以外的選擇空間。

近幾年來，對幹細胞的基礎研究和臨床前應用研究均取得了可喜的進展，幹細胞之所以吸引人，其魅力莫過於能「再生新的細胞」；但相對來說，精確誘導分化的調控機制也就成為目前幹細胞研究的重大難題。隨著不斷的研究，仍有許多問題未能明確，如：人體如何能獲得足夠移植的幹細胞？移植進入人體的幹細胞與體內原有的細胞相互作用與影響？移植幹細胞能否在體內增殖分化？其關鍵因子是什麼？幹細胞移植到動物體內後是否有潛在的致瘤性？這些都有待深入研究和解決。

神經幹細胞的研究和臨床應用方面的價值日益成為中樞神經系統退化疾病、腦脊髓損傷與再生醫學研究的焦點，神經幹細胞移植無疑將成為各種疾病的治療帶來希望的曙光。然而腦內神經元種類繁多且功能極為複雜，不同功能的神經元分佈在腦內不同部位，透過合成及釋放神經傳遞物質以發揮各自獨特的功能，又相互整合神經網絡的訊息。因此，即使誘導神經幹細胞分化成我們想要的神經細胞，細胞本身是否具有生理功能性，能否與周圍的神經形成適當的網絡，整合執行該有的生理功能，這些都是當前急需解決的問題。

總之，幹細胞移植對於治療糖尿病、心臟血管疾病、肝臟疾病、神經退化性疾病或對目前常規方法難以見效的其他疾病，除了提供另一選項以外，也提供研究學者更廣闊的思路和

誘人的前景，但是，要將幹細胞治療大量用於臨床治療之前，科學家還有一些關鍵問題需要解決，或許將來幹細胞的研究與應用能提供再生醫學一個較佳的解決方案。

綜合前面所述，目前幹細胞的來源、分離、培養及鑑定還有許多研究工作待突破，幹細胞之誘導、分化及遷移機轉也有待進一步研究<sup>13,19</sup>。雖然臨床幹細胞應用中還存在許多未解決的問題，但由於其廣泛的應用前景，仍成為目前科學界研究最重要的焦點之一。若以病患的細胞訂製胚幹細胞，並能誘導分化成特定的細胞，就可以自體修補損傷或退化的細胞，而不用擔憂免疫排斥問題，因此，未來在培養的人胚幹細胞加入某些特定生長因子，就可能培養出心臟細胞、神經細胞、胰臟細胞等等，來治療這些受傷的器官及組織。目前，幹細胞移植到臨床前動物身上，已經有相當好的成果，但是應用在人身上是否也會有同樣的功效，還要等待未來的發展證實。生物學家目前已能利用各種適當的細胞訊息傳遞分子，在培養皿裡忠實地將人胚幹細胞引導成為各種不同的體細胞（例如運動神經元，多巴胺分泌神經元，肝臟細胞等）。這也是為何大家對於人胚幹細胞寄予厚望，希望有朝一日胚幹細胞能完成治癒人類各種難纏的糖尿病、心臟血管疾病與神經退化性疾病的夢想。

## 八、參考文獻

1. Lovell-Badge, R. The future for stem cell research. *Nature* **414**:88-91 (2001).
2. Kirschstein, R. & Skirboll, L. R. *Stem Cells: Scientific Progress and future directions* <http://stemcells.nih.gov/stemcell/scireport.asp>.ES-1-ES-7 p1-5 (2001).
3. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S. & Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**: 1145-7 (1998).
4. Preti, R. A. Bringing safe and effective cell therapies to the bedside. *Nature biotechnology* **23**:801-804 (2005).
5. Howard, W. K., Scott, C. T. & Herrera, S. Chasing a cellular fountain of youth *Nature Biotechnology* **23**:807 - 815 (2005).
6. Keirstead, H. S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu M., Cloutier, F., Sharp, K. & Steward, O. Human embryonic stem-cell derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience* **25**:4694-4705 (2005).
7. Chang, Y. C., Shyu, W. C., Lin, S. Z. & Li, H. Regenerative therapy for stroke. *Cell Transplant* **16**:171-81 (2007).
8. Kassem, M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells* **6**:369-74 (2004).
9. Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, A. V., Muskheli, V., Fugate, J. A., Dupras, S. K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., O'Sullivan, C., Collins, L., Chen, Y., Minami, E., Gill, E. A., Ueno, S., Yuan, C., Gold, J. & Murry, C. E. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol.* **25**:1015-24 (2007).

10. Nishiyama, N., Miyoshi, S., Hida, N., Uyama, T., Okamoto, K., Ikegami, Y., Miyado, K., Segawa, K., Terai, M., Sakamoto, M., Ogawa, S. & Umezawa, A. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* **25**:2017-24 (2007).
11. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D. M., Leri, A. & Anversa, P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci.* **938**:221-9 (2001).
12. Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. & Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**:242-5 (1996).
13. Pearse, D. D. & Bunge, M. B. Designing cell- and gene-based regeneration strategies to repair the injured spinal cord. *J Neurotrauma.* **23**:438-52 (2006).
14. Pittenger, M. F. & Martin, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* **95**:9-20 (2004).
15. Prat-Vidal, C., Roura, S., Farre, J., Galvez, C., Llach, A., Molina, C. E., Hove-Madsen, L., Garcia, J., Cinca, J. & Bayes-Genis, A. Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits. *Transplant Proc.* **39**:2434-7 (2007).
16. Rietze, R. L. & Reynolds, B. A. Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol.* **419**:3-23 (2006).
17. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145-7 (1998).
18. Watson, D. J., Walton, R. M., Magnitsky, S. G., Bulte, J. W., Poptani, H. & Wolfe, J. H. Structure-specific patterns of neural stem cell engraftment after transplantation in the adult mouse brain. *Hum Gene Ther.* **17**:693-704 (2006).
19. Zeng, Z., Yuan, X., Liu, G., Zeng, X., Zeng, X., Ng, H., Chen, H., Jiang, T., Akasaki, Y., Kessey, K., Black, K. L. & Yu, J. S. Manipulation of proliferation and differentiation of human bone marrow-derived neural stem cells in vitro and in vivo. *J Neurosci Res.* **85**:310-20 (2007).





# 第十一章

## 幹細胞之生技產業運用

### Commercialization of stem cell technology

陳婉昕

工業技術研究院 生技與醫藥研究所

#### 一、前言

幹細胞 (stem cells) 因具有自我更新 (self-renewal) 與分化為成熟組織細胞的能力，又可取自人體，於體外培養誘導分化後，呈現人類組織細胞之特性與功能，故具有基礎醫學如胚胎發育與疾病細胞機制探討，以及臨床醫療如藥物篩選與移植醫療應用之潛力<sup>1-2</sup>。其展現的應用潛力，不僅引起研發的熱潮，各國政府均投入大量研發經費，更帶動私人資金之投入，一些與幹細胞有關之產業，包括研發市場與與大家寄予厚望之醫療應用，開始形成。而幹細胞因為來源、分化潛力、分離、培養技術難易度不同，現皆段之臨床醫療應用時程不盡相同，故各個公司之標的與經營模式亦有所不同，本章將就目前幹細胞相關產業之現況及政策法規等做一簡單之概述。

#### 二、幹細胞的來源、特性與應用

##### 1. 幹細胞的分類

幹細胞依在體內發育的階段與分化潛力的不同，可分為萬能分化潛能 (totipotent)，複能分化潛能 (pluripotent) 與多分化潛能 (multipotent) 細胞<sup>3</sup>。

- (1) 萬能分化潛能的細胞擁有最廣的分化潛力，可發育為一個新的個體以及發育為個體所需的母體組織如胎盤之中來自胚胎之部分，此類細胞如受精卵 (zygote)；
- (2) 複能分化潛能的細胞可發育為組成成體的所有二百六十餘種細胞，包括內、中、外三胚層與生殖細胞，此類細胞如胚胎幹細胞 (embryonic stem cells) 以及胚胎生殖細胞 (embryonic germ cells)
- (3) 多分化潛能細胞分化能力有限，僅可分分化為數種成熟之組織細胞，如成體幹細胞。

## 2. 幹細胞的來源

幹細胞依其取得的組織來源，可分為：

- (1) 胚胎組織：此類細胞均為複能分化潛能的細胞，如
  - (a) 胚胎幹細胞：在人類，為取自發育四至五天囊胚期(blastocyst)內細胞團塊(inner cell mass)的細胞，每顆內細胞團塊分離培養出的細胞都是胚胎幹細胞。
  - (b) 胚胎生殖細胞：在人類，為取自 5-10 週胚胎組織中，將發育成生殖腺的細胞。
- (2) 成體與胎兒組織：幹細胞只佔其中約 0.001% (成體組織) 至 1% (胎兒組織) 的比例，為多分化潛能細胞，依所取得之部位分可分為：
  - (a) 骨髓 (bone marrow)：含有造血幹細胞 (hematopoietic stem cells)，可分化為血液中各種細胞，1990 年代開始，進行骨髓移植治療血癌，即是利用骨髓內含有此類幹細胞之特性； 1999 年後，發現骨髓內並含有間質幹細胞 (mesenchymal stem cells)，可分化為軟骨、硬骨、肌肉與脂肪細胞等。
  - (b) 臍帶 (umbilical cord)：包括臍帶血 (umbilical cord blood)，其中亦含有造血幹細胞與間質幹細胞，近年來並發現臍帶部分含有豐富之間質幹細胞，可分離應用。
  - (c) 成體幹細胞 (adult stem cells)：其他存在於成體組織中之幹細胞，如脂肪組織、神經、心臟、皮膚與肝臟組織。
  - (d) 胎兒幹細胞：存在於胎兒組織中的幹細胞。

另外有一類幹細胞此章之中不會討論，那就是腫瘤幹細胞 (cancer stem cells)，這是很新、很重要的一個領域，將來的研發將會帶出癌症機轉之新觀念並衝擊到抗癌藥物之開發。但因其無法應用於細胞移植醫療，故此章中不予討論。

## 3. 幹細胞之特性與應用

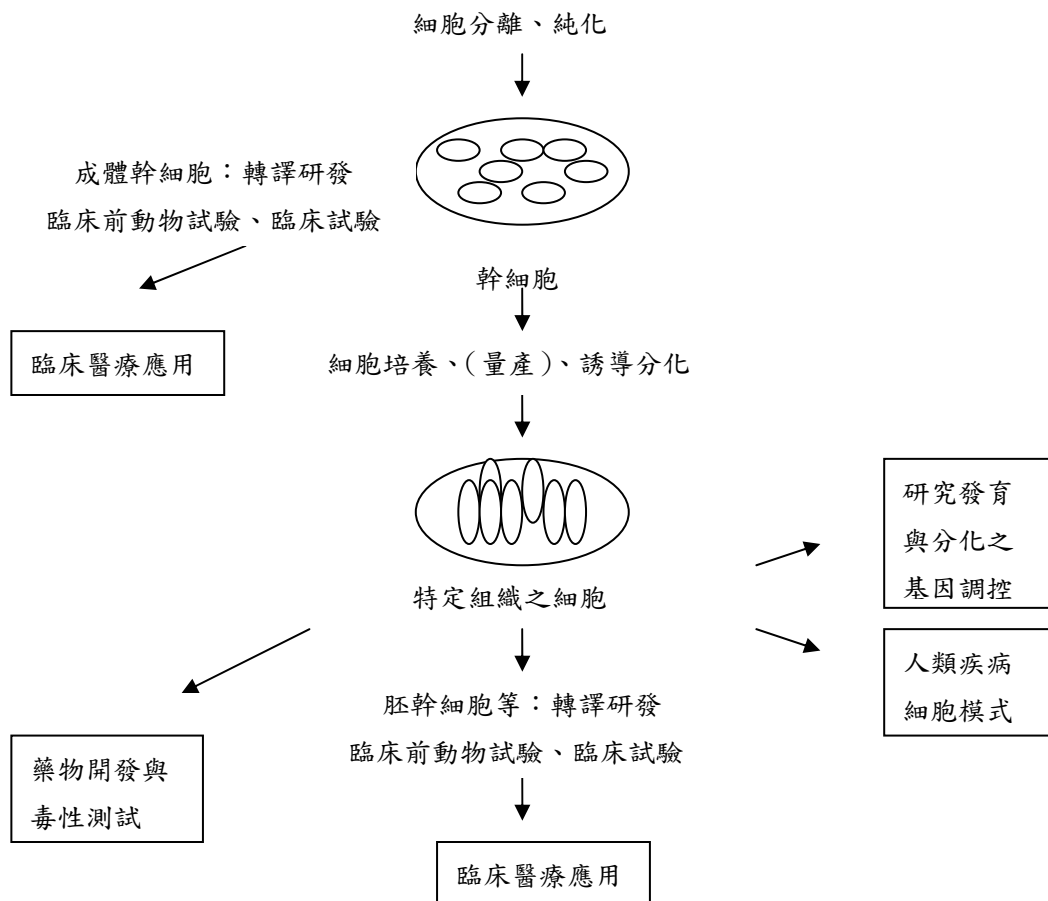
如上所述，幹細胞依其來源與分化潛能不同，特性不盡相同，目前研發與應用方向也不盡相同。一般而言，取自胚胎之幹細胞分化潛力廣，體外長期培養、量產相對容易，細胞生命週期相對年輕，但有道德倫理議題，細胞需經誘導分化後才可進行移植醫療，否則會形成畸胎瘤 (teratoma)，並有免疫排斥問題待解決，但其寬廣的分化潛能，是成體幹細胞所不能及的，所以吸引許多人的研究，也有一些公司投入其臨床應用包括藥物篩選與細胞移植醫療之研發。

成體組織的細胞分化潛力較有限，體外不易長期培養與量產，生命週期較老，但因其較無道德倫理議題，又可取自自體，直接進行細胞移植醫療，沒有免疫排斥問題，所以目前已經進行臨床試驗或甚至有產品上市的幹細胞醫療公司，多是以此為標的，尤其是取自骨髓之幹細胞，目前醫療應用最多，但是自體移植這類個人化的產品模式，因為成本昂貴，會限制將來的市場發展，所以異體移植是成體幹細胞目前研發方向之一。而骨髓間質幹細胞因具有免

疫調節之功能，故為極具潛力的應用標的，亦有些公司利用其特性，進行臨床試驗。

### 三、幹細胞於基礎醫學研發與臨床應用之技術發展

如圖一所示，幹細胞具有基礎醫學如胚胎發育與疾病細胞機制探討，以及臨床醫療如藥物篩選與移植醫療應用之潛力，針對這些應用目前正發展相關技術，包括細胞分離、培養、大量培養、分化誘導、轉譯研發（translational study）試驗、臨床前動物試驗與臨床試驗。要進行臨床試驗或藥物研發商品化前，這些技術的開發每個環節都十分重要，不同細胞並有不同執行方法，比如成體幹細胞要進行細胞醫療，可抽取後直接打回病人體內，不需經過培養分化，但是人胚幹細胞則必須經過誘導分化，使其失去因自發性分化形成畸胎瘤的能力後，才可進行移植醫療。而不同的應用所需細胞不同，量產上也是需要考慮的。而人胚胎幹細胞因體外長期培養、量產相對容易，所以進行藥物研發與毒性篩選應用者，多是使用人胚胎幹細胞。所以一個產品之開發，需對不同幹細胞特性、科學上研發進展、產品最終標的，有非常清楚之瞭解，這張圖簡單介紹各種應用可能需要的相關技術，也是學術界與產業界正積極進行之研發方向。



圖一、幹細胞於基礎醫學研發與臨床應用之技術發展

#### 四、各國幹細胞研發應用相關法規

所有產品要商業化的第一步就是要符合相關法規，幹細胞產品除要符合相關醫療法規，確保使用安全、有效性外，針對胚胎幹細胞，並因國情不同，有不同之研究應用相關規範，故而進行產品技術研發前，必須瞭解當地的相關規範。以下就此議題簡單介紹。

##### 1. 世界各國對胚胎與胚胎幹細胞研究之政策

全世界對胚胎與胚胎幹細胞研究之政策規範，依各國宗教、歷史背景，可進行不同程度之研究，大家的共識是不能進行複製人之研究，其他根據陳英鈺教授所譯之 LeRoy WATERS 資料，將之分為六類，以下就此六類討論之：

- **第一類 禁止所有人類胚胎研究：**如愛爾蘭、奧地利、波蘭、挪威、哥斯大黎加、梵諦岡。
- **第二類 只允許研究現有的胚胎幹細胞株，**不得進行人類胚胎研究與製造新的胚胎幹細胞株，如德國
- **第三類 允許使用流產或人工生殖的剩餘胚胎，**製造新的胚胎幹細胞株，如加拿大、以色列、日本、澳洲、印度、瑞士、巴西。
- **第四類 允許使用剩餘胚胎，**以及特別為研究目的，以體外受精方式（IVF）製造胚胎進行研究，如英國、比利時、新加坡（需逐案審查）。
- **第五類 允許使用剩餘胚胎，**以及特別為研究目的，以體細胞核轉移至人類卵細胞或受精卵方式製造胚胎進行研究：英國、比利時、瑞典、韓國（總統批准）、以色列（逐案審查）、印度（逐案審查）、新加坡（逐案審查）、臺灣（逐案審查）、中國。
- **第六類 允許使用剩餘胚胎，**以及特別為研究目的，將人類體細胞核轉殖至非人類卵細胞製造胚胎進行研究：中國

至於美國，其聯邦政府經費補助之研究限於第二類。但私人經費以及有些州政府經費，如加州州政府則不受限於第二類研究，可進行新的胚胎幹細胞株建立與體細胞核轉移研究。

臺灣行政院衛生署於 2002 年 2 月 19 日公告「胚胎幹細胞研究的倫理規範」使胚胎

幹細胞研發有倫理規範可尋，之後經各界廣泛、長時間討論後，於 2007 年 8 月 9 日修訂並公告「人類胚胎與胚胎幹細胞研究倫理政策指引」，全文如圖二所示，草案並送立法院審議中。

- 一、 人類胚胎及胚胎幹細胞研究（以下簡稱胚胎及其幹細胞研究），應本尊重及保障人性尊嚴、生命權之原則及維護公共秩序善良風俗為之。
- 二、 胚胎及其幹細胞研究應遵守政府有關法令之規定。
- 三、 胚胎及其幹細胞研究不以下列方式為之：
  - （一） 使用體細胞核轉植技術製造胚胎並植入子宮。
  - （二） 以人工受精方式，製造研究用胚胎。
  - （三） 製造雜交體。
  - （四） 體外培養已出現原條之胚胎。
  - （五） 繁衍研究用胚胎或將研究用胚胎植入人體或其他物種之子宮。
  - （六） 繁衍具有人類生殖細胞之嵌合物種。
  - （七） 以其他物種細胞核植入去核之人類卵細胞。
- 四、 胚胎及其幹細胞來源，應為無償提供之自然流產、符合優生保健法規定之人工流產、人工生殖剩餘胚胎，或以體細胞核轉植製造且尚未出現原條之胚胎或胚胎組織。
- 五、 胚胎及其幹細胞來源之取得，應於事先明確告知同意事項，經提供者完全理解後，依自由意願簽署書面同意書後為之。
- 六、 以人類卵細胞進行體細胞核轉植研究，應為依法施行人工生殖之剩餘卵細胞，且經受術夫妻或捐贈人書面同意；或經告知成年婦女並取得其書面同意捐贈之卵細胞。前項卵細胞之提供者，應具行為能力，且不得與計畫主持人有職務上之關係。
- 七、 胚胎及其幹細胞研究計畫應經研究機構倫理委員會或委託其他機構之研究倫理委員會審查通過後為之。前項審查，應注意下列事項：
  - （一） 研究計畫須符合促進醫療與科學發展、增進人類健康福祉及治療疾病之目的。
  - （二） 難以使用其他研究方法獲得成果。
  - （三） 計畫內容具備科學品質並符合倫理要求。

圖二、「人類胚胎與胚胎幹細胞研究倫理政策指引」，衛署醫字第 0960223086 號公告  
<http://dohlaw.doh.gov.tw/Chi/FLAW/FLAWDAT0202.asp>

## 2. 幹細胞臨床醫療應用相關法規

隨著幹細胞研發進展，有些科學證據，大多是來自體外與動物試驗，顯示其於臨床移植醫療之效果，故各國紛紛進行針對幹細胞臨床醫療應用制訂相關法規，以準備其於人體醫療之驗證與實施，法規之宗旨均在於確保此細胞醫療技術於人體使用之安全與有效性。美國藥物與食品檢驗局（U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA)）之中 Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) 為負責規範與查驗之單位，相關規範可由網站 <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> 參考「Guidance for Reviewers Instructions and Template for Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Reviewers of Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)」，而臺灣衛生署則於 2002 公告人體細胞組織優良操作規範（91.12.13 衛署醫字第○九一○○七八六七七號公告），並於 2003 年公告「體細胞治療人體試驗申請與操作規範」（衛署醫字第○九二○二○二四七七號公告，全文詳網址 <http://dohlaw.doh.gov.tw/Chi/FLAW/FLAWDAT01.asp?lsid=FL027594>）以確保細胞治療產品之安全與有效性。另外針對「細胞與材料/藥物」或者是「細胞與醫療器材」之複合產品，則除細胞本身受此規範，與其並用之產品亦需合乎其於人體使用之規範。

## 五、幹細胞產業現況

自從 1998 年美國科學家 James Thomson 第一次成功於體外分離培養人胚幹細胞後<sup>1</sup>，因其展現的生長與分化潛力，對於許多目前沒有藥物或醫療方式的重症疾病，開啟了無限的醫療新希望，故而在全世界引起一股對幹細胞研發之熱潮，各國政府紛紛投入大量研究資源，而民間資金亦隨之投入，私人公司開始成立，一股新興的產業悄悄萌芽。

政府經費的投入方面，美國聯邦經費中，NIH 於 2006 年於幹細胞相關研發經費共美金 6.43 億元（約臺幣 212 億），而加州政府於 2005 年底通過公投，同意舉債，每年 2.95 億美元（約 97 億臺幣）共十年，支助幹細胞研發經費，包括人胚幹細胞與成體細胞，此舉不僅吸引許多科學家，也促成一些幹細胞相關公司於加州的成立與研發。英國、以色列、瑞典、新加坡、加拿大、韓國與中國在這方面也很積極。

根據 Frost & Sullivan 2004 的市場報告，全球共有超過 200 個公司與學術機構從事幹細胞相關研發工作，並快速成長。而據統計全球直接從事幹細胞研究與產品開發的，較有規模的公司在 2004 年大於 50 餘家，雖然有些公司因資金耗盡而倒閉，但又有更多成立，故至 2006 年已超過 100 家，這些公司，尚不包括提供幹細胞研發試劑、工具的公司。而公司標的包括人胚幹細胞與成體幹細胞，應用領域涵蓋細胞儲存（cell banking），細胞放大，藥物研發，藥物毒性測試與細胞醫療。這些公司最終目標大多是進行細胞醫療，但在這長期研發時程之中，因為公司資金籌募之故，為維持公司持續之經營，有許多營運模式，其中一種是混合商業模式，即利用既有正在開發之技術，順便提供服務以賺取收益，例如 Cambrex Bioscience 以其分離間質幹細胞之技術提供販售人骨髓間質幹細胞，以及培養液，並提供 cGMP 設備供人類細胞之生產。又如 Cellartis AB 販售開發之人胚幹細胞株與繼代培養切割工具。另外

這一、二年有些具潛力的小公司，被大公司收購。

茲依公司產品應用領域，將幹細胞相關產業與公司分成三類介紹之：

### 1. 開發幹細胞研發所需之試劑與工具的公司：

幹細胞許多領域都還在研發階段，所以如培養液、培養基質、抗體、細胞來源、細胞生長與分化所需之生長因子與試劑等，目前需求量極大，如前所述，各國政府與民間甚至公司挹注龐大經費於幹細胞之研發，且金額正急速增加中，其中有大半經費將會用於採購研發耗材，包括試劑與工具等，所以幹細胞的研發市場是目前極大的一個產業契機，原本經營細胞研發試劑的公司，紛紛投下大量資金，採取不同策略，希望可以搶攻幹細胞之研發市場。以培養液為例說明之，見表三與表四，

表一、細胞培養液等相關試劑 2005 年營業額與市占率前幾名的公司<sup>4</sup>

公司	2005 年營業額 單位：億美元	市場佔有率 百分比
Invitrogen	4.62	36%
Sigma-Aldrich	2.62	20%
Fisher Scientific	1.90	14%
Cambrex	1.50	11%
Serologicals	1.36	10%
Others	1.00	9%
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100%</b>

表一顯示 2005 年細胞培養液等相關試劑年營業額與市占率前幾名的公司，分別是名列第一的 Invitrogen，市占率 36%，2005 年營業額 4.62 億美金（約臺幣 153 億元），Sigma-Aldrich 第二，市占率 20%，2005 年營業額 2.62 億美金（約臺幣 87 億元），而 Serologicals 則以市占率 10%，年營業額 1.36 億美金（約臺幣 45 億元）居於第五，由表二可知，此公司 2005 年併購 Specialty Media，並與專營幹細胞研發試劑的 Chemicon 公司合併，而後於 2006 年被 Millipore 併購，Millipore 這二、三年積極切入幹細胞研發市場，藉由併購專營幹細胞研發試劑、工具，如培養液、培養基質、生長因子 LIF(leukemia inhibitory factor) 與幹細胞特有抗體等的公司 Serologicals Corporation\_Chemicon，使其能快速跨入此領域，並率先於 2007 年上旬推出第一個無異種成分 (Xeno-free) 的人胚幹細胞培養液。而 Invitrogen 則於 2006 年 6 月宣布，已向全球最大的人胚幹細胞研發公司 Geron Corporation 取得授權，可開發、製造與銷售人胚幹細胞培養相關試劑，



於 2007 年下半年推出人胚幹細胞無滋養層培養液與基質。另外 Sigma-Aldrich 於 2006 年 10 月宣布已開發一種神經幹細胞增生之培養液<sup>4</sup>。

表二、幹細胞研發市場主要公司<sup>4</sup>

公司	與幹細胞相關訊息
Invitrogen	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 2005 年併購以研發市場所需之檢驗試劑與抗體（含幹細胞特有抗體）為主要業務的公司 BioSource International</li> <li>2. 2006 年並取得向全球最大的人胚幹細胞研發公司 Geron Corporation 取得授權，可開發、製造與銷售人胚幹細胞培養相關試劑</li> <li>3. 2007 年推出人胚幹細胞無滋養層培養液與基質</li> </ol>
Sigma-Aldrich_ JRH Biosciences	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 2005 年併購以細胞培養液、試劑與培養技術開發為主要業務的公司 JRH Biosciences</li> <li>2. 2006 年開發一種神經幹細胞增生之培養液。</li> </ol>
Millipore Corporation_ Serologicals Corporation_ Chemicon	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 2005 年併購以幹細胞細胞培養液、試劑生長因子與抗體為主要業務的公司 Serologicals</li> <li>2. 2007 年推出全球第一個無異種成分的人胚幹細胞培養液</li> </ol>

## 2. 開發幹細胞技術產品應用於藥物毒性測試與藥物研發

利用人幹細胞可分化為成熟有功能性的組織細胞之特性，使其成為人的組織細胞，可提供體外測試平臺，進行藥物有效性與安全性測試。例如 Cellular Dynamics International . Inc (<http://www.cellular-dynamics.com/>)，這個 2005 年由 Dr. James Thomson (全世界第一個成功於體外分離培養人胚幹細胞的科學家<sup>1</sup>)，Dr. Crig January 與 Dr. Tim Kamp 等科學家與 Tactics II 創投成立的公司，利用 Thomson 與 Kamp 開發的技術，將人胚幹細胞誘導分化為人心肌細胞 (cardiomyocytes)，希望能應用於藥物安全與有效性的篩選，包括對心臟之毒性測試，提升藥物臨床試驗的成功率。另外如 VistaGen Inc. ([http://www.vistagen.com/html\\_pages/homepage.htm](http://www.vistagen.com/html_pages/homepage.htm)) 也利用人胚幹細胞技術提供藥物篩選與研發平臺，初期鎖定治療糖尿病與中樞神經系統之藥物。而瑞典公司 Cellartis AB

(<http://www.cellartis.com/>) 亦致力開發人胚幹細胞技術應用於藥物研發與毒性測試以及再生醫學，第一階段為誘導分化為肝臟細胞與心肌細胞進行藥物研發與毒性測試。

### 3. 開發幹細胞技術與產品應用於細胞治療

細胞治療是所有幹細胞公司的最終目標，根據 2006 cell therapy commercialization D&MD 市場調查報告，目前細胞治療市場美國約為 2 億美金，歐洲為 3 億美金，並快速成長當中，預估至 2011 年美國約為 2.8 億美元，歐洲為 4.6 億美元，其中人胚幹細胞占約 20% 成體幹細胞約 45%，細胞移植相關器材用品占 20%。而根據 stem cell analysis and market forecast 2006-2016 報告，全球幹細胞相關產品市場在 2011 年為 13 億美元，2016 年將會達 80.5 億美元，而治療標的以整形外科 (orthopedic indications) 占最大比例約為 30-40%，其次是糖尿病，抗發炎，神經修復，心血管疾病，牙科治療與其他疾病。並預估 2016 年至少會有 16 個幹細胞產品通過 FDA 審核，用於疾病醫療上，屆時將會有上千個醫生使用於治療上百萬個病人<sup>5</sup>。表五列出幾個已有細胞治療產品上市之公司，表六則是細胞治療產品已進入臨床試驗之公司，表七為以人胚幹細胞相關技術為產品並積極進行細胞治療技術產品開發的公司，主要是幹細胞治療的公司，由這些資料可看出目前已有產品或以進入臨床試驗者多是利用成體幹細胞，其中又以間質幹細胞為主，治療標的主要是心臟（尤其是心肌梗塞）、中樞神經、軟硬骨之修復。而美國 Osiris Therapeutics 更利用骨髓間質幹細胞有免疫調節功能的特性，開發應用於醫療移植排斥引起的嚴重反應（graft-versus-host disease），且已進入臨床試驗第三期，表示已通過第一期（phase I）安全性測試，第二期（phase II）小樣本有效性測試，所以可進入第三期（phase III）大樣本有效性測試，目前結果良好，一般來說，第三期試驗結果證實有效、安全後，技術產品即可上市。

表三、有細胞治療產品上市的公司<sup>6</sup>

公司/所在地	細胞種類	治療標地	產品狀況/商品名
Genzyme Cambridge, 美國	軟骨細胞 (Chondrocytes)	修復軟骨損傷 (cartilage defects)	上市 (Carticel)
CellTran Sheffield, 英國	角質細胞 (Keratinocytes) 角膜 細胞 (corneal cells) 與 黑色素細胞 (melanocytes)	燒燙傷，糖尿病 引起之創傷	上市 (Myskin) a polymer combined with autologous keratinocytes
Organogenesis Canton, 美國	角質細胞 (Keratinocytes) 與纖維 母細胞 (fibroblasts)	慢性創傷	上市 (Apligraf)

TheraVitaе Bangkok, Thailand and Ness Ziona,以色列 <a href="http://www.theravitae.com">http://www.theravitae.com</a>	周邊血裏的血管生成前 軀細胞 (Angiogenic precursor cells from peripheral blood)	心臟疾病	上市 (VesCell, 泰 國)
ViaCell Cambridge,美國	臍帶血幹細胞 (Cord blood stem cells)	血液疾病、心臟 疾病、糖尿病、 中風	上市 (Viacord, pediatric transplantation product)
Vet-Stem Poway, 美國	馬匹的脂肪組織幹細胞 (Horse adipose-derived stem cells)	修復馬匹的韌 帶、肌腱損傷	上市 (Vet-Stem Stat stem cell collection and transplant service for horses)

表三所列有細胞治療產品上市的公司中,可看出全世界第一個經 FDA 審核通過上市之細胞治療產品是 Genzyme 的 Carticel,這是一個利用軟骨細胞修復關節受損之商品。而 TheraVitaе 在泰國上市之產品 VesCell,則是利用周邊血裏的血管生成前軀細胞(Angiogenic precursor)修復心肌梗塞之病人。ViaCell 是美國那斯達克 (Nasdaq) 股票上市公司,美國最大的臍帶血收集公司,除了開發利用臍帶血幹細胞治療血液疾病、心臟疾病、糖尿病外,也利用其冷凍、儲存細胞技術,發展冷凍保存卵子的技術產品 (Viacyte) 正在跟 FDA 申請 510K 審核後預計上市。而 Vet-Stem 則是鎖定馬匹 (尤其是賽馬) 為治療對象,抽取馬匹的脂肪組織幹細胞修復韌帶、肌腱,

表四、產品已經在進行臨床試驗的公司<sup>6</sup>

公司/所在地	細胞來源	治療標的	臨床試驗狀況
TiGenix Leuven,比利時	軟骨細胞與間質幹 細胞 (Chondrocytes and MSCs)	骨關節炎, 軟骨、心肌損 傷、肌肉萎縮	Phase III
Aastrom Biosciences Ann Arbor, 美國 <a href="http://www.aastrom.com/">http://www.aastrom.com/</a>	骨髓幹細胞 (Bone marrow-derived stem cells)	骨頭移植、血管組織、 軟骨組織修復	Phase I&III (US, Spain), (Germany) Phase I/II Phase I/II
Osiris Therapeutics Baltimore, 美國 <a href="http://www.osiristx.com/abou&lt;br/&gt;t.php">http://www.osiristx.com/abou t.php</a>	骨髓間質幹細胞 MSCs from bone marrow	移植排斥引起的嚴重反 應 (Graft-versus-host disease)、心肌受損、新 月形膝關節受損	Phase III (US) (US) Phase I/II (US)

BioHeart Sunrise, 美國	骨骼肌 (Skeletal muscle cells)	心肌梗塞引起心臟衰竭	PhaseI/II (US, Europe)
GenVec Gaithersburg, 美國	骨骼肌之肌肉母細胞 (Myoblasts from skeletal muscle)	心臟衰竭	PhaseI
Stem Cells Palo Alto, 美國	由腦、肝臟與胰臟取得之神經幹細胞 (Neural stem cells from brain, liver, and pancreas)	中樞神經併發症引起的代謝異常	IND
Vesta Therapeutics Durham, 美國	肝細胞與肝臟前驅細胞 (Hepatocytes and hepatocyte progenitor cells)	肝臟疾病	Phase I (US)

表四中可看出產品已經在進行臨床試驗的公司，治療標的多是軟、硬骨與心臟方面的疾病，所使用的細胞多是成體幹細胞，包括 Astron Biosciences 利用骨髓間質幹細胞進行骨組織修復已進行到臨床試驗第三期，Osiris Therapeutics 也利用骨髓間質幹細胞除了進行前段介紹的用於醫療移植排斥引起的嚴重反應，另外於 2006 年開始進行異體移植治療心肌梗塞臨床試驗第一期。Stem cells Inc. 則是利用神經幹細胞來治療中樞神經、肝臟與胰臟的疾病，它也是個美國那斯達克股票上市公司。

表五、以人胚幹細胞相關技術為產品的公司

公司	經營方向
Geron Menlo Park, California and Edinburgh, 美國 <a href="http://www.geron.com/">http://www.geron.com/</a> Nasdaq:GERN	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 以人胚幹細胞相關技術進行細胞治療脊髓損傷、心衰竭、糖尿病、關節炎等</li> <li>2. 藉由調控染色體終端酵素進行包括癌症之醫療 (telomerase regulation therapeutics)</li> </ol>

ES Cell International Singapore, 新加坡 <a href="http://www.escellinternational.com/">http://www.escellinternational.com/</a>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 以人胚幹細胞相關技術進行細胞治療糖尿病、心衰竭、退化性神經病變</li> <li>2. 提供人胚幹細胞株</li> </ol>
Cellartis AB Goteborg, Sweden <a href="http://www.cellartis.com/">http://www.cellartis.com/</a>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 開發人胚幹細胞技術應用於藥物研發與毒性測試</li> <li>2. 人胚幹細胞量產與品質提升</li> <li>3. 提供人胚幹細胞株</li> </ol>

表五則是列出以人胚幹細胞相關技術進行細胞治療為產品的公司，其中最大的是美國美國那斯達克股票上市公司 Geron，它開發利用人胚幹細胞衍生細胞進行移植醫療的技術與產品之腳步，居於世界之冠，公司經營策略是與學術、研發機構密切合作，其豐富優異的期刊論文，包括數篇在 Nature Biotechnology<sup>7</sup>，The Journal of Neuroscience<sup>8</sup>，Stem cells 等知名國際期刊發表者，以及佈局完整、品質優良的專利，涵蓋了人胚幹細胞培養、分化、移植排斥、醫療應用等範圍，醫療應用中包括了神經、心臟、軟硬骨、肝臟、糖尿病等疾病，使得公司發展有極為優厚、獨特的利基，這也是為何 Invitrogen 要於 2006 年向其取得授權，開發、製造與銷售人胚幹細胞培養相關試劑。Geron 並率先在 2004-2005 年著手建立符合臨床使用優良操作規範 GTP 等級的細胞，並與 University of California at Irvine 的 Hans S. Keirstead 合作，將人胚幹細胞分化為寡突前驅細胞 (oligodendrocyte progenitor cell)<sup>9</sup>，而後將人胚幹細胞衍生的寡突前驅細胞 (human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell) 植入脊髓損傷的大鼠體內，發覺可以幫助修復受損神經並恢復運動功能 (locomotion)<sup>8</sup>，所以 2007 年即向美國 FDA 提出臨床試驗申請，計畫利用人胚幹細胞衍生的寡突前驅細胞，移植醫療急性脊髓損傷的病人，若此人體臨床試驗通過，將會是第一個人胚幹細胞技術應用於細胞移植醫療之產品，Geron 在這方面，確實是開路先鋒。ES Cell International 則是利用澳洲莫爾本大學的人胚幹細胞技術，在新加坡成立的公司，新加坡政府投入相當多經費，也是最大股東，除了建立的人胚幹細胞株，於 2006 年宣布建立了無異種源污染的、GTP 等級的細胞株，可供臨床應用，公司也致力於利用人胚幹細胞技術治療糖尿病。Cellartis AB 除了之前所述開發人胚幹細胞技術應用於藥物研發與毒性測試，也擁有 30 多個人胚幹細胞細胞株，其中 2 個是可於美國聯邦政府經費支助下使用的，並有全世界第一個無異種源污染的人胚幹細胞細胞株，公司並致力於人胚幹細胞量產與品質提升，包括發展自動化培養系統。公司的經營策略是與學術界或產業界其他公司合作開發。

總結以上幹細胞相關產業狀況，可看到這個新興領域，在研發市場、藥物研發、毒性測試以及細胞治療均有些產業與公司開始發展，研發市場目前多是些大公司投入，但藥物研發、毒性測試以及細胞治療多是新成立的公司，而在幹細胞移植醫療方面，成體幹細胞已有些產品，也有許多正在有明確法規的國家如美國，進行人體臨床試驗，甚至已經到第三期；人胚幹細胞則正在起步階段，全世界第一個案例正在美國由 Geron 向 FDA 提出人體臨床試驗申請。綜觀目前學術界於幹細胞科學研發與公司之技術發展，可見的未來，幹細胞必定會成為

一個有潛力的新產業。

## 六、參考文獻

1. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**:1145-7(1998).
2. Lovell-Badge, R. The future for stem cell research. *Nature* **414**:88-91 (2001).
3. Kirschstein, R. & Skirboll, L. R. *Stem Cells: Scientific Progress and future directions* <http://stemcells.nih.gov/stemcell/scireport.asp>.ES-1-ES-7 p1-5 (2001).
4. Anscomb, A. Cell Culture: The World Market for Media, Sera, and Reagents Aklorama Information. P57-75 (2007).
5. Young, R. R. CFA. *Stem Cell Analysis and Market Forecast 2006-2016*, RRY publications. P1-35 (2007).
6. Howard, W. K., Scott, C. T. & Herrera, S. Chasing a cellular fountain of youth. *Nature Biotechnology* **23**:807--815 (2005).
7. Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold J. D. & Carpenter, M. K. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* **19**:971-974 (2001).
8. Keirstead, H. S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu M., Cloutier, F., Sharp, K. & Steward, O. Human embryonic stem-cell derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience* **25**:4694-4705 (2005).
9. Nistor, G. I., Totov, M. O., Haque, N., Carpenter, M. K. & Keirstead, H. S. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia*. **49**:385-396 (2005).



## 作者簡歷

### 陳信孚

現任：

臺大醫院婦產部 主治醫師  
臺大醫學院臨床醫學研究所 助理教授  
臺灣生殖醫學會 常務理事  
臺灣幹細胞醫學會 監事  
臺灣婦產科醫學會 副秘書長  
最高學歷：  
臺灣大學醫學系醫學士  
經歷：  
臺大醫院婦產部 住院醫師  
臺大醫院婦產部生殖內分泌科 研究員  
加拿大英屬哥倫比亞大學婦產科 博士後研究員  
巴黎大學附設醫院婦產部生殖內分泌科 研究員  
中華民國不孕症暨生殖內分泌醫學會 秘書長  
臺大醫學院婦產科臨床 講師  
臺灣生殖醫學會 理事  
臺大醫學院婦產科 助理教授  
E-mail : [hfchen@ntu.edu.tw](mailto:hfchen@ntu.edu.tw)

### 何弘能

現任：

臺大醫學院婦產科/免疫研究所 教授  
臺大醫院 副院長  
最高學歷：  
國立臺灣大學醫學院醫學士  
經歷：  
美國加州大學洛杉磯分校 研究員  
美國匹茲堡大學 研究員  
臺大醫院婦產部 主治醫師  
臺大醫院醫學研究部 主任

臺灣生殖醫學會 理事長

E-mail : [hnho@ntu.edu.tw](mailto:hnho@ntu.edu.tw)

### 郭紘志

現任：

中央研究院細胞暨個體生物學研究所 助研究技師  
最高學歷：  
英國倫敦大學英皇學院博士  
經歷：  
美國奧立岡國家靈長類研究中心 博士後研究員  
美國奧立岡國家靈長類研究中心 研究科學家  
E-mail : [kuohuch@gate.sinica.edu.tw](mailto:kuohuch@gate.sinica.edu.tw)

### 陳淑華

現任：

中央研究院資訊科學研究所 博士後研究員  
最高學歷：  
國立臺灣大學動物學研究所博士  
經歷：  
中央研究院細胞暨個體生物學研究所 博士後研究員

### 張為芳

現任：

中央研究院基因體研究中心 研究助理  
最高學歷：  
國立中興大學動物科學研究所碩士

### 莊靜玉

現任：

國立臺灣大學生物科技研究所 博士研究生



最高學歷：

英國倫敦大學帝國學院碩士

經歷：

英國倫敦大學 MRC 神經發育研究中心 研究助理

中央研究院基因體研究中心 研究助理

### 沈家寧

現任：

中央研究院基因體研究中心 助研究員

最高學歷：

英國巴斯大學發育生物學博士

經歷：

國立陽明大學醫學生物技術研究所 兼任助理教授

臺灣幹細胞學會 秘書長

英國巴斯大學再生醫學中心 博士後研究員

美國德州大學醫學部病理及微免系 訪問學者

E-mail : [cnshe@gate.sinica.edu.tw](mailto:cnshe@gate.sinica.edu.tw)

### 林宇星

現任：

國防醫學院生命科學研究所 博士班研究生

最高學歷：

國立中興大學生物化學研究所碩士

經歷：

中研院生醫所國防研究役

E-mail : [omstares@hotmail.com](mailto:omstares@hotmail.com)

### 張曉旻

現任：

國立陽明大學微生物及免疫學研究所 博士班研究生

最高學歷：

長庚大學醫學生物技術研究所碩士

經歷：

林口長庚醫院 研究助理

E-mail : [snowdreams2002@yahoo.com.tw](mailto:snowdreams2002@yahoo.com.tw)

### 陳志龍

現任：

國防醫學院生命科學研究所 博士班研究生

最高學歷：

國立中興大學生物化學研究所碩士

經歷：

中研院分生所國防研究役

E-mail : [Jyhliong.chen@gmail.com](mailto:Jyhliong.chen@gmail.com)

### 簡皎芸

現任：

國立臺灣大學生物科技研究所 博士班

最高學歷：

國立成功大學藥理研究所碩士

經歷：

中研院基因體研究中心 研究助理

E-mail : [happyepi@gate.sinica.edu.tw](mailto:happyepi@gate.sinica.edu.tw)

### 李光申

現任：

國立陽明大學臨床醫學研究所 副教授

臺北榮民總醫院骨科部 主治醫師

最高學歷：

英國倫敦大學 (University College London)

醫學工程研究所博士

經歷：

臺北榮民總醫院骨科 住院醫師/總醫師

英國倫敦皇家骨科醫院 臨床進修醫師

英國倫敦大學醫學工程中心 研究員

臺東榮民醫院骨科 主任

### 許素菁

現任：

國家衛生研究院疫苗研發中心 助研究員

最高學歷：

國立臺灣大學微免所博士

經歷：

美國杜蘭大學 (Tulane University) 博士後研究

E-mail : [mschsu@nhri.org.tw](mailto:mschsu@nhri.org.tw)

### 何慧君

現任：

佛教慈濟綜合醫院臺北分院眼科 主治醫師

最高學歷：

國立陽明大學生物藥學研究所博士

經歷：

臺大醫院 實習醫師

臺北榮民總醫院眼科部 住院醫師

臺北榮民總醫院眼科部 住院總醫師

臺東榮民醫院眼科 主治醫師

國立陽明大學醫學院 PBL 小組 課程教師

### 何嘉倫

現任：

國立成功大學臨床醫學研究所 專任助理

最高學歷：

加拿大多倫多大學

經歷：

國立成功大學臨床醫學研究所

生達製藥股份有限公司

扶陞國際貿易有限公司

E-mail : [Kate88h@gmail.com](mailto:Kate88h@gmail.com)

### 王僅文

現任：

成功大學醫學工程研究所 博士生

最高學歷：

中山醫學大學口腔材料科學研究所碩士

經歷：

高雄長庚醫院基因治療實驗室 研究助理

成功大學生物科技中心研究組 助理

E-mail : [p8892109@mail.ncku.edu.tw](mailto:p8892109@mail.ncku.edu.tw)

### 邱智東

現任：

成功大學臨床醫學 博士後研究員

最高學歷：

陽明大學醫學工程博士

E-mail : [tung2chi@gmail.com](mailto:tung2chi@gmail.com)

### 謝清河

現任：

國立成功大學附設醫院 主治醫師

國立成功大學臨床醫學研究中心 助理教授

最高學歷：

美國華盛頓大學(University of Washington)

博士

高雄醫學大學醫學士

經歷：

Research fellow, Cardiovascular Division, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Research Assistant/Graduate Student, Department of Bioengineering, University of Washington, Seattle, WA, USA

E-mail : [phsieh@mail.ncku.edu.tw](mailto:phsieh@mail.ncku.edu.tw)

### 吳信志

現任：

臺灣大學動物科學技術學系 助理教授

最高學歷：

國立臺灣大學農學博士

經歷：

臺灣動物科技研究所 副研究員

仁德醫護管理專科學校 兼任助理教授

美國康乃迪克大學 訪問學者

臺灣養豬科學研究所 副研究員

臺灣養豬科學研究所 助理研究員

美國農業部 訪問學者

臺灣養豬科學研究所 研究助理

E-mail : [scw01@ntu.edu.tw](mailto:scw01@ntu.edu.tw)

### 鄭登貴

現任：

臺灣大學動物科技學系 終身特聘教授兼生物科技研究所 所長

最高學歷：

英國劍橋動物生理學研究所哲學博士

經歷：

臺灣大學畜產學系生物技術中心 主任

臺灣大學畜產學系系 主任

臺灣大學畜產學系 教授

臺灣大學畜牧學系 副教授

臺灣畜產試驗所生理系 系主任

臺灣畜產試驗所生理系 研究員

臺灣畜產試驗所生理系 副研究員

臺灣畜產試驗所生理系 技士

E-mail : [wtkcheng@ntu.edu.tw](mailto:wtkcheng@ntu.edu.tw)

### 徐善慧

現任：

中興大學化工系 特聘教授/組織工程與幹細胞研究中心 主任

最高學歷：

美國凱斯西儲大學生物醫學工程學博士

經歷：

美國哈佛大學訪問研究

日本京都大學訪問研究

E-mail : [shhsu@dragon.nchu.edu.tw](mailto:shhsu@dragon.nchu.edu.tw)

### 黃效民

現任：

食品工業發展研究所

生物資源保存及研究中心 副主任

最高學歷：

美國 Rutgers University 微生物和分子遺傳博士

經歷：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 副研究員、研究員、資深研究員

E-mail : [hsm@firdi.org.tw](mailto:hsm@firdi.org.tw)

### 李茂盛

現任：

中山醫學大學醫學研究所 教授

最高學歷：

日本東邦大學醫學博士

經歷：

中山醫學大學附設醫院婦產部兼產科 主任

中山醫學大學附設醫院不孕症研究室 主任

中山醫學大學護理系 系主任

中山醫學大學研究所 指導教授

中臺醫事技術學院 兼任教授

中國醫藥大學醫學系 專任教授

E-mail : [msleephd@giga.net.tw](mailto:msleephd@giga.net.tw)

### 陳甫州

現任：

臺中榮民總醫院教學研究部 研究員兼任幹細胞中心主任

最高學歷：

美國奧克拉荷馬大學化學暨生化系博士

經歷：

國立中興大學化學系 兼任副教授/教授

中國化學會中區分會 理事長

臺灣神經創傷學會 常務理事

臺灣幹細胞學會 理事

國立中興大學醫學科技研究所 合聘教授

E-mail : [fucheng@vghtc.gov.tw](mailto:fucheng@vghtc.gov.tw)

### 陳婉昕

現任：

工業技術研究院

生技與醫藥研究所幹細胞技術部 經理

最高學歷：

中研院與國防醫學院合辦生命科學研究所博

士

經歷：

工研院生醫中心幹細胞應用技術開發計畫

(人胚幹細胞與骨髓間葉幹細胞相關計畫)

副理/研究員

工研院生醫中心肝組織工程技術發展計畫

(人胚幹細胞相關計畫) 研究員

E-mail : [WhsinChen@itri.org.tw](mailto:WhsinChen@itri.org.tw)



## 索引

A.		$\beta$ -galactosidase $\beta$ -半乳	39
adenosine deaminase	108	糖苷酶基因	
deficiency (ADA)		basic fibroblast growth	5,6,8,13,29,31,32
腺苷酸脫胺酶		factor (bFGF) 鹼性纖維	
aggregate(s) 聚合體	21,76	母細胞生長因子	
aggregate morphology	65	bioavailability 生體可用	69
集結狀態		率	
albumin 白蛋白	39	biocompatibility 生物相	63
alginate 褐藻酸鹽	87	容性	
alkaline phosphatase	19,31	biodegradable 生物可	67,75
鹼性磷酸酶		降解性	
alpha fetal protein	39,	bioreactor(s) 生物反應	86
(AFP) 胎兒蛋白		器	
Alzheimer's disease	53	dynamic compression	92
老年失智症		壓縮式生物反應器	
animal cloning	75	perfusion 灌流式生物	91
動物複製		反應器	
anti-human serum	3,4,14	spinner flask 攪拌式	91
抗人類血清		生物反應器	
aplastic anemia	48	biorecognition	64
再生不良貧血症		molecules 生物辨識分	
apolipoprotein E (ApoE)	39	子	
載脂蛋白 E		biosensor 生物感測器	64
astrocyte 星狀細胞	34,55	bio-targeting 生物標記	64
atherosclerosis	68	blastocyst(s) 囊胚	2,21,22,27,118,130
動脈硬化		blastomere 胚葉細胞	13,76
autograft 自體細胞移植	75	bone marrow 骨髓	130
autologous transplant	58	bone morphogenesis	29,30,31,32,36,37
自體移植		protein (BMP) 骨形態發	
axon 軸突	32	生蛋白	
B.		C.	
		cardiomyocytes 心肌細	21,136

胞			
cardiovascular disease	80	cell replacement	104
心臟血管疾病		therapy 細胞替代治療	
<b>cell(s) 細胞</b>		cell scaffold 細胞支架	67
brain neuronal 腦神經細胞	77	cell tracking 細胞追蹤	68
cumulus 卵丘細胞	77	channeling effect 隧道效應	91
embryonal carcinoma 胚胎瘤細胞	76	chimera 嵌合體	125
embryonic germ 胚胎生殖細胞	129	chimeric conceptus 嵌合胚體	76
endoderm 內胚層細胞	21	chitosan 幾丁聚醣	87
epiblast 上胚板細胞	28	cholangiocyte 膽管細胞	38
epithelial 上皮細胞	32	cleavage 卵裂	27
feeder 飼養層細胞	9,99	clone 複製	76
germ 生殖細胞	1	comparative genome hybridization (CGH) 基因體雜交比較法	22
hematopoietic 造血細胞	34	collagen 膠原蛋白	30,87
mast 肥大細胞	35	collagenase 膠原蛋白酶	6,30,99,101
muscle 肌肉細胞	34	colony 細胞群落	5
neural 神經細胞	21	colorimetric contrasts 色度顯影劑	65
oligodendrocyte	140	compact colonies 細胞聚落	17
progenitor 寡突前驅細胞		complement 補體	4
primordial germ 始基生殖細胞	76	compression 壓縮	86
progenitor 源祖細胞	51,104,105	conceptus 複製胚體	81
Sertoli 賽托力氏細胞	77	contrast agents 顯影劑	64
stromal 基質細胞	31	cytogenetic analysis 細胞遺傳分析	22
target 靶細胞	108	cytotoxicity 細胞毒性	63
transit amplify 暫時性增殖細胞	51		
vascular endothelial 血管內皮細胞	34	<b>D.</b>	
cell banking 細胞儲存	134	dendrimers 樹狀聚合物	64,66
cell boundary 細胞邊界	17	dendrite 樹突	32
cell fusion 細胞融合	56	deoxyribonucleic acid (DNA) 去氧核糖核酸	13,64,67,69,76,81
cell morphology 細胞型	17		

diabetes 糖尿病	103	因子	
dielectric properties 介電性質	65	filter 過濾膜	2
differentiation 分化	27,47	flatten 扁平化	18
dimethyl sulfoxide (DMSO) 二甲基亞砜	10,98,100,101	flow cytometry 流式細胞定量	20
dopamine 多巴胺	104	fluid-flow 流場	86
		fluorescence resonance energy transfer (FRET) 螢光共振能量轉移	65
E.		focal ischemic lesions 局部腦缺血	68
ectoderm 外胚層	28	four cell stage 四細胞時期	27
eight cell stage 八細胞時期	27	freeze-drying 冷凍乾燥法	89
electrospinning 電紡絲法	67		
embryo splitting 早期胚分切法	76	G.	
embryoid bodies 類胚體	21	gastrulation 腔腸化	27
emission spectrum 發射光譜	64	gelatin 動物明膠	10,11,87
endoderm 內胚層	28	gene knock out 基因剔除	28,79
enzyme digestion 酵素處理法	98	gene targeting 基因定位轉殖	79
epithelia 表皮細胞	21	gene therapy 基因治療	75,108
extracellular matrix (ECM) 細胞外基質	13,31,33,100	genetic compatibility 遺傳相容性	80
		genetic selection 遺傳性篩擇	36
F.		genome modification 基因組改造	80
Fanconi's Anemia 范可尼貧血	106	germ line transmission 性腺傳承率	77
feeder cells 餵養細胞	9,99	glial precursor 神經膠質前驅細胞	31
ferrite 鐵磁體	65	glucagon 昇糖素	38
fiber-bonding 纖維鍵結	89	glycerol 甘油	98
fibroblast 纖維母細胞	137	gold nanoparticles 金奈米顆粒	65
embryonic 胚胎纖維母細胞	28		
fibroblast growth factor (FGF) 纖維母細胞生長	34,38,39		



Graft Versus Host Disease (GVHD) 移植 物對抗宿主疾病	53,110,117,118, 120,137,138	immunocytochemistry 免疫細胞化學染色	20
granulocyte colony- stimulating factor 顆粒 球細胞生長刺激素	108	immunosurgery 免疫手 術法	3
green fluorescence protein (GFP) 綠色螢光 蛋白	39	inner cell mass (ICM) 內細胞團	2,28,118,125,130
H.		insulin 胰島素	37
haemocytometer 血球 計數器	10	<i>in utero</i> transplantation 子宮內移植	53
haptoglobin 結合素	39	irradiation 輻射線照射	48
hemangioblast 血液血 管母細胞	36	iron oxide nanoparticles 氧化鐵奈米顆粒	64
hemoglobin 血紅蛋白	39	isopropanol 異丙醇	100
hepatoblast 肝原母細 胞	38	K.	
hepatocyte 肝細胞	31	keratinocyte lineage 表皮角質細胞系	31
hepatocyte growth factor (HGF) 肝生長因 子	38,39	kidney capture 腎臟	20
heterogeneous cell population 異質細胞族 群	68	L.	
human foreskin fibroblast (HFF) 人類包 皮纖維母細胞	9,12	latent heat 潛熱	100
hyaluronic acid 透明質 酸	87	Leukemia inhibitory factor (LIF) 白血病抑制 因子	21,29,30,31,135
hydrogel 水膠	69	ligand 配體	65
hypermethylation 過度 基因甲基化作用	81	liposomes 微脂粒	64,66
I.		liver bud 肝芽	38
immunocompatibility 免疫相容性	69	locomotion 運動功能	140
		M.	
		macrophage 巨噬細胞	35
		maghemite 磁赤鐵礦	65
		magnetite 磁鐵礦	65
		Magnetic Resonance Imaging (MRI) 磁核共 振影像系統	64,65,67,68
		mechanical dissection 機械式切割法	98

mesenchymal tissue	32	經元	
間葉組織		dopaminergic 多巴胺神	31
mesoderm 中胚層	28	經元	
microenvironment 微環	58,66	serotonergic 血清素神	34
境		經元	
micromanipulator 顯微	21	niche 利基	58
操作器		nonreproductive cloning	80
micrometer 微米	63	非生殖性複製	
microemulsions 微乳劑	63	nucleoli 核仁	17,18
mitomycin C 絲裂黴素	10,11,30		
-C		O.	
molecule diagnosis 分子	64	oligodendrocyte(s) 寡	34,55,118
診斷		突細胞	
molecule image 分子影	64	oncostatin M (OSM) 抑	38,39
像		瘤素	
mouse embryonic	2,9,11,12,13,21	ontogeny 發生學	50
fibroblasts (MEF) 小鼠		organic dyes 有機染劑	64
胚胎纖維母細胞		organogenesis 誘導器	33
multilineage	54	官發育	
hematopoietic clones		osteoarthritis 骨關節炎	68
多原性血球細胞株		osteocyte 成骨細胞	34
multiple sclerosis 多發	68	osteogenesis	53,110
性硬化		imperfecta 成骨不全症	
multipotent 多分化潛能	129		
myoblast 肌母細胞	35	P.	
		pancreatic bud 早期胰	37
N.		芽	
nano-biomaterials 奈米生	63	Parkinson's disease 帕	80
醫材料		金森氏症	
nanofibers 奈米纖維	66	particulate leaching 微	89
nanometer 奈米	63	粒造孔	
nanoparticles 奈米微粒	66	PBS 磷酸緩衝液	2,5,6,9,10
nanotechnology 奈米科	63	peripheral myelin	55
技		protein 周邊髓質蛋白	
nanowires 奈米線材	66	photo decomposition	65
Netcord 國際臍帶血網	106	光解效應	
neuron 神經元	34	photonic crystal fiber 光	67
cholinergic 膽鹼性神	34	子晶體纖維	

pipette 微量吸管	99	rapid prototype 快速成型法	89
pile-up 堆疊	18	regenerative medicine 再生醫學	75,85
Platelet Derived Growth Factor (PDGF) 血小板衍生生長因子	69,70	reporter gene 報導基因	75
pluripotency 多潛能分化特性	17,28	reprogramming 再程序化	80
pluripotent 複能分化潛能	1,121,129	retinoic acid 維甲酸	34
polycaprolactone 聚己內酯	87	rotating-wall vessels 旋轉式生物反應器	92
polyglycolide 聚甘醇酸	87	RT-PCR 反轉錄聚合酶連鎖反應	19,20,21
polylactide 聚乳酸	87	S.	
polymers 高分子聚合物	66	scaffold 支架	69,86
Positron Emission Tomography (PET) 正子放射型斷層掃描術	67	Science Magazine 科學雜誌	49,50
postimplantation 著床	27	self-renewal 自我更新	17,28,129
primitive erythrocyte 原始紅血球細胞	35	severe combined immunodeficiency disease (SCID) 嚴重複合性免疫缺陷症	20,21,108,109
programmable freezer 程式降溫儀	100	sex-linked lymphopenic immunological deficiency 性聯遺傳之淋巴球細胞病變之免疫不全症	104
progenitor 前驅細胞	31,36	shear-stress 剪切力	86
proliferation 無限制增殖	17,29	signal transduction 訊號傳導	29
protease 蛋白酶	2,70	solute effect 溶質效應	97
proto-oncogene 源致癌症基因	109	solvent 溶劑	65
pulsatile flow reactor 悸動式生物反應器	93	somatic cell. nuclear transfer (SCNT) 體細胞核轉植術	75,111
Q.		somatostatin 體抑素	38
quantum dots (QD) 量子點	64	spectral karyotyping (SKY) 螢光染色光譜之	22,
quantum size effects 量子尺寸效應	64		
R.			

染色體分析法		stroke 中風	53,80
spinal cord injury 脊髓損傷	53,80	substrate 基質	64
spontaneous differentiation 自發性分化	17	subventricle zone (SVZ) 室管膜下區	121
stages-specific embryonic antigen (SSEA) 階段特異性胚胎抗原	18,19,20,31	superparamagnetic 超順磁	64
stem cell(s) 幹細胞	75,85,97,103,117	superparamagnetic iron oxide (SPIO) 超順磁性氧化鐵奈米粒子	65,68
adult 成體幹細胞	27,47,75,97,130	Surface Plasmon Resonance (SPR) 表面電漿共振	65
bone marrow-derived 骨髓幹細胞	48,106	suspension culture 懸浮培養	21
cancer 腫瘤幹細胞	68,130	synapse 胞突接合	32
embryonic 胚胎幹細胞	47,75,97,106,129	synovial tissues 滑液組織	51
hematopoietic 造血幹細胞	36,47,106,118		
mesenchymal 間葉系幹細胞	47,49,103,106,130	T.	
multipotent 複能性幹細胞	76	targeted therapy 標靶治療	68
neural (NSCs)神經幹細胞	47,55,106,122	tension 拉力	86
nuclear-transfer 核移植	79	teratoma 畸胎瘤	20,21,28,81,130
embryonic (ntESCs) 核移植胚胎幹細胞		testis 睪丸	20
pluripotent (PSCs) 多潛能幹細胞	27,76	therapeutic cloning 治療用複製技術	75,121
somatic 體源性幹細胞	27,76	three-dimensional printing 三度空間列印	89
totipotent (TSCs)全能性幹細胞	76	tibialis anterior muscle 前脛肌	56
unipotent 單能性幹細胞	76	tissue engineering 組織工程	67,85
stem cell biology 幹細胞生物學	63	totipotent 萬能分化潛能	1,129
		toxicity 組織毒性	65
		trabecular bone 髓質骨	51
		transcription factor 轉錄因子	19,28
		transgenesis 基因轉殖	75

transversum	38
mesenchyme 橫膈間葉	
trophectoderm 胚胎滋養層	28
trophoblast 滋養層細胞	3
trypsin 胰蛋白酶	30
tumor growth factor $\beta$ 乙型腫瘤生長因子	29
turbulent flow 紊流	91
zygote	
two cell stage 二細胞時期	27
U.	
umbilical cord 臍帶	130
umbilical cord blood 臍帶血	55,106,130
V.	
vascular endothelial growth factor (VEGF) 血管內皮生長因子	40,69
vitrification 玻璃化	7
W.	
water-solubility 水溶性	63
Wiskott-Aldrich Syndrome 歐德里症候群	104
Z.	
zygote 受精卵	27,129

## 版權頁

### 幹細胞學

發行單位：教育部顧問室「生物及醫學科技人才培育先導型計畫」幹細胞與組織工程教學資源中心

發行人：幹細胞與組織工程教學資源中心主持人 錢宗良

地址：100 臺北市中正區仁愛路一段一號六樓 幹細胞與組織工程教學資源中心

電話：02-23123456 分機 8193

傳真：02-23915292

作者：陳信孚、何弘能、郭紘志、陳淑華、張為芳、莊靜玉、沈家寧、林宇星、張曉旻、陳志龍、簡皎芸、李光申、許素菁、何慧君、何嘉綸、王僅文、邱智東、謝清河、吳信志、鄭登貴、徐善慧、黃效民、李茂盛、陳甫州、陳婉昕

顧問：計畫總辦公室－吳總主持人金洌教授、黃協同主持人慶璦教授、呂協同主持人紹俊副教授

教育部顧問室－張召集人文昌教授、林諮議委員榮耀教授、楊諮議委員照雄教授、宋諮議委員賢一教授、高諮議委員景輝教授、胡小姐郁芬

編審委員：中央研究院游正博所長、臺灣大學鄭登貴教授、臺北醫學大學施子弼教授、臺灣大學醫學院何弘能教授、成功大學謝清河助理教授、中央研究院沈家寧博士、中央研究院郭紘志博士、臺北醫學大學附設醫院蔣永孝主任、國家衛生研究院邱英明主任、工業技術研究院陳婉昕研究員

總編輯：游正博、錢宗良

助理編輯：陳佩芬、韓善國、吳少文、曾唯嘉、林宗逸、侯珮珊

出版日期：民國 97 年 2 月