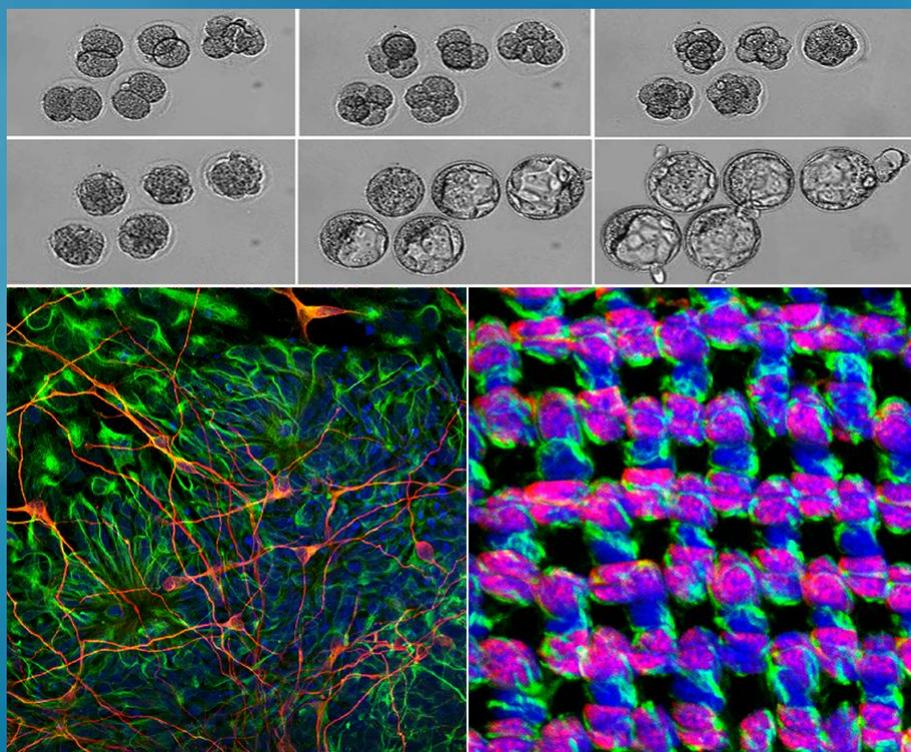


科技部再生醫學科技發展計畫

再生醫學： 臨床與產業運用



再生醫學科技發展計畫辦公室 主編

科技部生命科學研究發展司 補助

編者序

再生醫學為世界各國發展迅速的重要研發主題，許多已開發國家針對進入高齡化社會的需求及罹患退化性疾病人口比例大幅增加，嘗試以再生醫學進行自體組織或器官再生相關技術之加速研發，期能為未來的臨床應用奠定基石。其中有關幹細胞之大量培養及後續專一分化具有功能性及療效之細胞，為目前再生醫學在細胞治療領域急需突破之關鍵技術。早期之研究使用人類胚胎作為幹細胞來源一直有倫理及宗教信仰的爭議，但自 2006 年日本京都大學山中伸彌教授在技術層面上以特定基因調控因子組合使成體細胞重編程為誘導性多潛能幹細胞後，除了解決早期使用胚胎幹細胞的倫理爭議外，進而開啟了以誘導性多潛能幹細胞轉換分化為具有特定功能細胞的相關研究與臨床實驗。近年來使用自體或異體幹細胞結合生醫材料、三維立體列印技術並誘導使其分化為特定細胞，具有提供組織再生或器官移植來源缺乏的潛力。此外，利用幹細胞與腫瘤細胞生長快速之共同特性與基因編輯等技術，將可做為治療癌症或遺傳性疾病之發展策略，期能邁向精準醫療之目標。

再生醫學教材可整合許多跨領域研究成果包括分子遺傳、發育生物學、幹細胞生物學、基因工程、細胞療法、生醫材料及組織工程等綜合應用。本書從近年發展迅速的表觀基因體學為起始，介紹表觀遺傳如何調控細胞的分化及再程序化，並介紹如何應用新穎技術分析染色質絲與核蛋白間交互作用對於調控幹細胞生長與分化的重要性。第二、三章介紹幹細胞、間葉幹細胞、誘導性多潛能幹細胞及癌幹細胞的來源及分類原則；並簡述產業化大量生產幹細胞的品質管理要點。第四章介紹重編程製作誘導性多潛能幹細胞技術之發展；解說各國學者以小分子化學藥物及基因調控因子組合誘發幹細胞或前驅細胞定向分化成具功能性的細胞如心肌、神經、胰島素細胞等方式及其作為細胞治療或臨床應用的潛力。第五章介紹細胞表面醣脂質於幹細胞分化成熟時的結構演化，以及如何發展抗體做為未來診斷或免疫治療的標的。本書第六到第十章則分別以臨床醫師與研究者的觀點介紹以幹細胞分化為心肌、神經、關節軟骨或牙

齒再生之相關技術及臨床試驗進展，並說明成體幹細胞目前的研究發展與相關製品的可能產業應用。第十一章以法人研發角度介紹幹細胞結合生醫材料增進人工關節生物相容性及功能在臨床的相關應用。最後，在十二章則以法規輔導的角色介紹各國對於細胞治療或組織工程產品如何管理以及制定細胞及基因治療臨床試驗相關參考法規與對於細胞或基因重組製品的管理原則。本書並提供由臺灣幹細胞學會配合國際幹細胞學會對於幹細胞研究及臨床轉譯指南的中文譯本，加入在附錄中，期以提供國內探討再生醫學倫理規範以及立法參考。

本書除了介紹再生醫學對於各種疾病的治療潛在應用及法規管理外，也期待本教材能吸引各界有志之士投入再生醫學研究，共同推動細胞治療及個人化醫療的臨床應用，並藉由前瞻創新的研發帶動相關的生技產業。最後期望本書能藉此傳遞科學普及教育的理念，增進社會大眾對於再生醫學的正確認知，裨益己身與家人的健康關照，進而對於產業未來的發展與社會福祉的精進，能有更深一層的體認。

「再生醫學科技發展計畫辦公室」計畫主持人

國立臺灣大學醫學院解剖學暨細胞生物學科暨研究所 教授

錢宗良

中華民國 107 年 8 月 1 日

序

再生醫學科技發展之目的在於探討替代或再生因先天缺陷、疾病、外傷和老化所造成之受損人體細胞、組織或器官之方法，以期恢復或建立正常之功能，其策略在於整合跨領域科技，包括藥物開發、基因治療、幹細胞移植、組織工程等。由於再生醫學科技將可使高齡化社會中因衰老而失能之老人，和因意外傷害而失能之青中壯年病患重獲機能，進而減輕長期照護之壓力，因此國際上對再生醫學研究日益重視。我國再生醫學研究隨著國際趨勢發展，許多大專院校及醫學中心均已設立相關之幹細胞實驗室，此外部份財團法人亦設立了幹細胞保存及治療研究相關設施。因此，在國家科技前瞻規劃方向上，若能有效整合學研單位團隊與潛在之產業鏈，國內之再生醫學與幹細胞治療在國際健康產業上將具有更佳之競爭力，亦可同時帶動我國相關生技產業與未來智慧健康產業之發展。

過去十年間，國內學研界於再生醫學領域已累積了相當良好之基礎，各單位已建構適當之軟硬體設施。同時在衛生福利部努力下，相關法規也正在積極修訂中。科技部主導之再生醫學科技發展計畫，規劃推展所涉專業領域多元，屬跨領域及跨部會之合作計畫；配合政府「亞太生技醫藥研發產業中心」政策之研發重點，將有效整合各部會資源，齊力推動我國再生醫學及細胞治療研究與衍生產業之發展，進而帶動國內經濟成長。

本書由負責協助執行科技部「再生醫學科技發展計畫」之推動辦公室規劃，邀請國內參與幹細胞研究學者與再生醫學相關臨床醫師，加上工研院及衛福部食品藥物管理署工作同仁共同參與撰寫。內容包含再生醫學許多跨領域研究包括分子遺傳、幹細胞生物學、細胞療法、生醫材料及組織工程等綜合應用。本書針對產業及臨床運用，特別安排章節以工研院法人研發觀點介紹幹細胞結合生醫材料如何在臨床的相關應用，與負責法規協合之食藥署以法規輔導的角色介紹如何管理及制定細胞及基因治療臨床試驗相關參考法規與未來產品的管理原則。本書內容豐富總計十二章與三項附

錄，不論在學術研究教學或是臨床運用甚至產業規劃發展，均具有極高參考價值。

最後，藉此機會感謝參與科技部「再生醫學科技發展計畫」的執行團隊，及衛福部醫事司、食藥署同仁之共同參與，期待本書之出版能為臺灣在人才培育、社會科普教育之推廣略盡棉薄之力，更期許藉由本計畫之推動，達到政府推動亞太生技醫藥研發產業中心，以建置台灣成為亞太生技醫藥研發產業重鎮之目標。

科技部生命科學研究發展司 司長



中華民國 107 年 8 月 3 日

科技部生命科學研究發展司「再生醫學科技發展計畫」

再生醫學：臨床與產業運用

作者 王羽淇、王英凱、王德原、吳友志、吳玟欣、呂 仁、
沈欣欣、林劭品、林佩如、邱英明、洪士杰、洪榮堂、
高健育、張至宏、梁毓津、許溥昇、郭勇哲、陳立綸、
陳尚甫、陳泓志、陳貞云、陳郁君、陳敏慧、陳鈴津、
彭學薇、游正博、游芷芸、湯文宏、黃彥華、黃瀨瑩、
楊明嘉、楊芝宜、廖智菁、臧天睿、劉育秉、蔡佩宜、
鄭媛元、賴思全、賴培倫、駱婉珣、謝欣庭、謝清河、
顏伶汝、蘇鈺婷

(依姓氏筆劃為序)

總編輯 錢宗良

編輯 黃祥博、鄭欣怡、李欣芳、王琇嵐、甘偉君

再生醫學科技發展計畫辦公室 主編

科技部生命科學研究發展司 補助

中華民國 107 年 9 月 出版

目 錄

頁碼

第一章	表觀基因體學於再生醫學之貢獻與應用 游芷芸、謝欣庭、許溥昇、楊芝宜、林劭品 The Implications and Applications of Epigenomics in Regenerative Medicine.....	1
第二章	早期發育組織來源間葉幹細胞之優勢及臨床應用性 顏伶汝 Clinical and Immunomodulatory Advantages of Using Developmentally Early Stage Human Mesenchymal Stem Cells.....	19
第三章	微環境與幹細胞轉譯醫學 郭勇哲、吳友志、吳玟欣、賴思全、彭學薇、蘇鈺婷、黃彥華 Niche and Stem Cell Translational Medicine.....	31
第四章	小分子藥物細胞再編程於再生醫學之發展與應用 呂仁、賴培倫、陳尚甫 Development and Application of Reprogramming by Small Molecules in Regenerative Medicine.....	49
第五章	醣鞘脂於胚胎幹細胞分化過程之變化與癌症免疫治療之應用 梁毓津、洪榮堂、陳鈴津、游正博 Roles of Glycosphingolipids in Embryonic Stem Cell Differentiation and Glycan-Targeting Cancer Immunotherapy.....	59
第六章	心肌再生醫學之研究進程與應用策略 陳泓志、湯文宏、陳貞云、臧天睿、鄭媛元、黃瀨瑩、陳立綸、謝清河 Heart Regeneration—Progress & Novel Strategies.....	85
第七章	幹細胞之應用於神經再生 高健育、邱英明 Application of Stem Cells in Regenerating Nerve Tissues.....	99
第八章	間葉幹細胞-第一個被核准上市的幹細胞藥物 洪士杰 Mesenchymal Stem Cell-The First Approved Stem Cell Drug.....	111

第九章	軟骨再生的研究與臨床產業應用 陳郁君、張至宏 Research and Clinical Application of Cartilage Regeneration.....	121
第十章	幹細胞於口腔組織再生 陳敏慧 Stem Cells for Oral Tissue Regeneration.....	133
第十一章	工業技術研究院再生醫學研發重點 沈欣欣、駱婉珣、王羽淇、王英凱、蔡佩宜、林佩如、楊明嘉、劉育秉、 廖智菁 Research Focus of the Regeneration Medicine Technology in ITRI.....	153
第十二章	再生醫學產業運用的最後一哩路-管理法規調和與上市查驗程序 王德原 Regulations and Premarket Approvals for Regenerative Medicine.....	183
索引	199
作者簡歷	211
附錄一	2016 ISSCR 幹細胞研究及臨床轉譯指南摘要初譯.....	219
附錄二	細胞及基因治療產品管理法(草案).....	227
附錄三	特定醫療技術檢查檢驗醫療儀器施行或使用管理辦法.....	237

第一章

表觀基因體學於再生醫學之貢獻與應用

The Implications and Applications of Epigenomics in Regenerative Medicine

游芷芸¹ 謝欣庭¹ 許溥昇¹ 楊芝宜^{1,2} 林劭品^{1,3,4,5}

¹ 國立臺灣大學生物科技研究所 ² 國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所

³ 國立臺灣大學聯合中央研究院基因體與系統生物學學位學程

⁴ 中央研究院農業生物科技研究中心

⁵ 國立臺灣大學發育生物學與再生醫學研究中心

一、前言

地球上大大小小的生物都用 DNA 編碼記載著決定個體樣貌的藍圖。一個複雜的多細胞生物體，是由各式各樣功能不同的細胞群體構成的，而這些不同樣貌的細胞顯然有著截然不同的基因表現。先後任職於英國牛津以及劍橋大學的約翰·戈登(John Gurdon)教授在 1960 年代曾以成年青蛙體細胞核取代蛙卵細胞核，成功讓這些已經分化完全的體細胞重新長成蝌蚪，而這些蝌蚪後來又再長成了青蛙。這說明了同一生物個體上的不同細胞在整個發育過程都保有同樣的 DNA 序列，直到成年也不例外。既然一個個體身上的所有細胞都帶有相同的 DNA，究竟是什麼因素決定了細胞內的哪些基因要表現？讓一個細胞顯現不同的外觀與功能呢？

二十世紀末，表觀遺傳學(epigenetics)興起，補足我們過去熟悉的孟德爾遺傳定律的不足，相對於以研究基因序列為核心探討生物學功能的古典遺傳學，表觀遺傳學完整地解釋了在不改變 DNA 的序列下，細胞如何調控特定基因表達、進而造成細胞表現型相異的分子機轉。表觀遺傳學字首 epi- 是源自希臘文「在...之上」的意思。我們可以想像在細胞裡，染色體上註記了密密麻麻的記號，標示該在何時啟動或是停止表現何段基因序列，而同一個個體的不同細胞裡面，DNA 序列一模一樣，染色體上的標記卻是千變萬化、大有區隔的。除此之外，細胞利用轉錄出來之 RNA 對染色體進行的調控，也可列為廣義表觀遺傳的範疇。

如果把構成 DNA 序列的 A、T、C、G 含氮鹼基比喻成五線譜上的音符，表觀基因體就像是樂譜上標記演奏力度的聲情記號，決定了演奏生命樂曲各章節的輕重緩急，讓同樣一首曲子，在不同排列組合的聲情標記下，幻化出無數種表達方式。這些仰賴 DNA 與組蛋白上微小化學修飾的基因調節，我們稱作「表觀遺傳修飾(epigenetic

modification)」。各式各樣的表觀遺傳因子能在染色質上不同位置添加或移除表觀遺傳修飾，或是結合特定的修飾以集合某些基因活化或靜默所需的蛋白酵素，來改變基因體運作的方式。透過表觀遺傳修飾，生物體能在有限的 DNA 序列下，有效率地放大出千變萬化的輸出組合，去分化成不同細胞系或適應各種環境刺激。

表觀遺傳學的調控機制，包含直接在 DNA 上進行甲基化修飾；以及於染色質層次，在纏繞 DNA 的組蛋白(histone)上做各種共價修飾，或以組蛋白變體(histone variants)置換部分典型組蛋白分子(canonical histone proteins)，甚至是利用染色質重塑複合體(chromatin remodeling complexes)，在消耗能量(ATP)的前提下，改變核小體(nucleosomes；DNA 與組蛋白之聚合體)的分佈情形，進而重塑染色質的構造，對於不同基因體區位進行鬆緊有別之包覆作用。此外，數種功能性 RNA 亦參與表觀基因體之調控：如長度大於 200nt 之非編碼 RNA(non-coding RNA)，或是與 mRNA 互補之反股 RNA(anti-sense RNA)，或經後轉錄調控產生之微小 RNA(smallRNAs，含長約 21nt 之 siRNAs 或長約 26-30nt 之 piRNAs)等功能性 RNA 均可與表觀基因調節因子或染色體交互作用，利用 RNA 之序列專一性，促成特定序列之表觀基因調節，進而影響基因表現。

二、表觀遺傳調控的特性：「穩定性」及「可逆性」

接下來，就讓我們用「幹細胞」與從幹細胞分化(differentiate)出來的「體細胞(somatic cell)」來論述表觀遺傳學的特性。人類的多潛能性幹細胞(pluripotent stem cell)具有分化成多達兩百多種體細胞的可能性。在分化以前，多潛能性幹細胞內「維持全能分化性所需的基因」以及「維持幹細胞自我更新」的基因(pluripotent genes)會有標示著「開啟」的表觀遺傳修飾，使這些基因持續活躍表現；一旦細胞分化進入特定的組織成為體細胞，這些基因就會被抑制性的表觀遺傳因子標示為「靜默」，讓這顆細胞不再具有多功能分化特性。體細胞會根據自己所屬的組織類型同時會改變表觀基因遺傳修飾，以啟動自己的「組織特異性基因(tissue specific gene)」，確立自己的細胞型，發展與幹細胞截然不同的基因群表現(圖一)。不同組織的細胞中，被啟動的組織特異性基因是不一樣的，只有屬於自己的組織特異基因會持續活躍，不屬於其職責所在的則會被靜默使之維持在關閉狀態，讓分化成具特定功能的細胞只能依照它被授予的使命進行運作。表觀遺傳修飾中，最難移除的記號，就是在 DNA 上的甲基(-CH₃, methyl group)了，從多功能分化性幹細胞到體細胞分化的過程中，對不再需要表現的多功能分化相關基因之啟動子(promoter)區段加上 DNA 甲基化修飾，幾乎是代表永遠不再啟動這段序列的信息。除非細胞受到極高度的外在因素的影響，不然一個細胞一旦分化完成，就會遵從刻印在 DNA 與組蛋白上的使命渡過它的一生。這些細胞特異的表觀遺傳修飾即使經過一次又一次的有絲分裂(mitosis)，它們也能維持的很好，非常不容易改變，這就是表觀遺傳的「穩定性」，用以維持分化後細胞之身分。

在自然的情況下，一般的體細胞分化完畢後終其一生是不會「走回頭路」或是隨意「改變身分」成為另外一種細胞的，但有一個有名的例外 variant。我們知道生殖細胞是

已經分化的細胞，無論是精細胞、還是卵細胞，它們的染色體上都有著獨一無二的生殖細胞特異表觀修飾風貌，但當精卵結合發生的時候，來自精子的父系原核(paternal pronucleus)會在受精卵進行細胞分裂前便開始去除 DNA 的甲基印記、來自卵子的母系原核(maternal pronucleus)則會緊接著在受精卵細胞分裂時也開始逐漸失去 DNA 甲基標記。伴隨著 DNA 上的甲基流失，所有的表觀遺傳修飾在此時都會發生大改寫，並重新營造幹細胞特異的一套表觀遺傳記號。這個逆向分化的狀況，我們稱之為「細胞再程序化(cellular reprogramming)」。因為我們發育過程中，變化僅在於表觀遺傳修飾而非 DNA 序列，這讓已分化的細胞在特定情況下仍有脫離當前職位，重新決定自己的定位與方向的潛力，我們生命的循環、世代的更迭就是仰賴表觀遺傳的「可逆性」。此等表觀基因體之可逆性，於再生醫學領域扮演關鍵角色。具有強力再生能力之物種，如蠐螬(Salamander)，之所以可於截肢後重新長出包含皮膚、肌肉、硬骨與軟骨、血管、神經在內之完整肢體，即部分仰仗於截肢處細胞逆分化之能力。

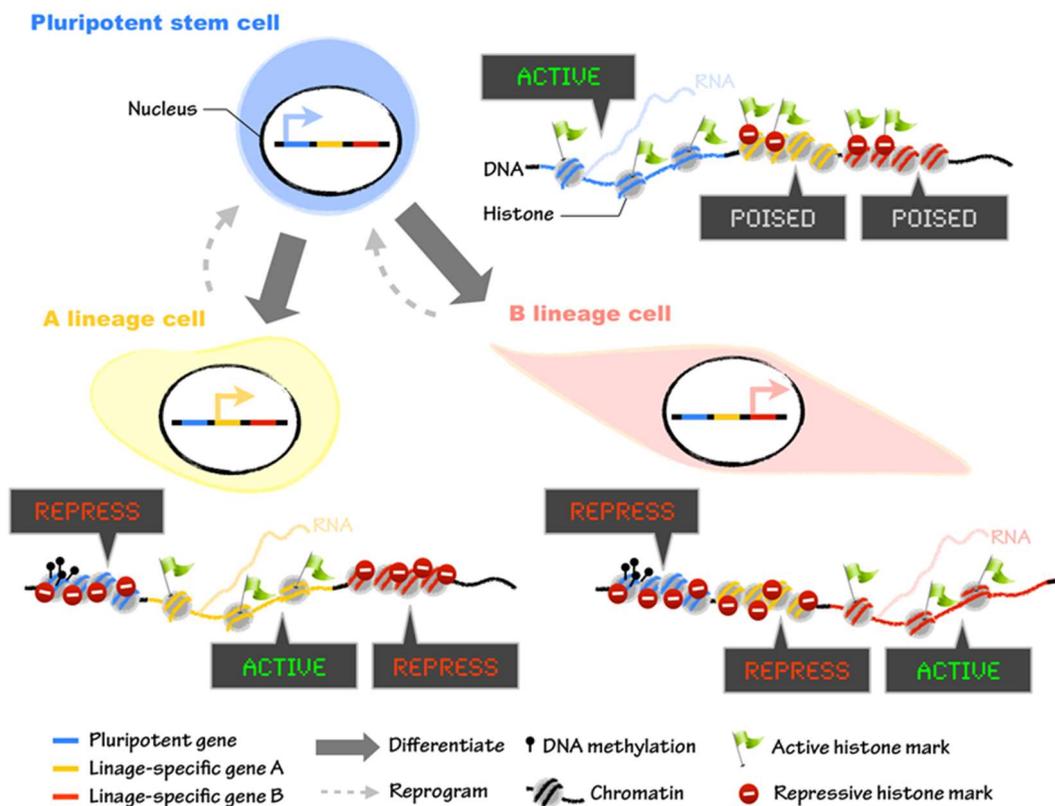
無論是幹細胞分化為體細胞，或是分化後的專職細胞回溯到幹細胞的路程上，染色質上面五花八門的表觀遺傳修飾，會透過各式各樣的表觀遺傳調控因子(epigenetic regulator/modulator)來增加或是移除。這些表觀遺傳調控因子可以分為三大類：第一類是讀者(reader)，負責辨認特定表觀修飾標記；第二類像支筆(writer)，負責在染色體上畫上各種符號；另一類則是橡皮擦(eraser)，負責將各種記號擦除，這些記號在不同的位置上會使得染色質結構有不一樣的改變，有些使結構鬆散讓基因易於被轉錄；有些則相反，使結構緊密而抑制基因表現。我們稱染色質鬆的區段為「真染色質(euchromatin)」，因為排列疏鬆，於特殊染色質染劑，如吉姆薩染劑(Giemsa stain)染色後，在高倍影像系統下呈現較淡的顏色；而緊密不易表現基因的區段為「異染色質(heterochromatin)」，通常呈現較深的顏色。在染色體上，這些真、異染色質區域黑白相間排列稱為 G 顯帶(G-banding)，G 顯帶在不同的細胞內就像是標幟細胞種類的條碼一樣。

三、體細胞核轉移與誘導性多潛能幹細胞

在現代，幹細胞儼然是再生醫學領域的明日之星，然而，醫用幹細胞的取得並不容易。由上一個小節，我們知道已經特化的精卵可以透過精卵結合帶動的「表觀修飾之重建」，於囊胚(blastocyst)期造就(1)可分化為胚胎本體之內細胞群(離體培養後成為胚胎幹細胞(embryonic stem cells)，或稱為多潛能性幹細胞(pluripotent stem cells)，及(2)可分化為胎盤及絨毛膜在內之胚外組織(extra-embryonic tissue)的滋養層細胞。而本章一開始提到的約翰·戈登博士用青蛙進行**體細胞核轉移**(somatic cell nuclear transplantation, SCNT)技術使非生殖細胞的一般體細胞，也能夠透過移入去核卵母細胞，在適當刺激下回到相當於受精卵的狀態，重拾全能分化潛力¹。1997年，在蘇格蘭羅斯林研究所(Roslin Institute)PPL Therapeutics 生物技術公司的伊恩·威爾穆特(Ian Wilmut)和基思·坎貝爾(Keith Campbell)帶領下，更以震驚世人的複製羊「桃莉羊」，成功將體細胞核轉移技術應用在哺乳類動物²。爾後，越來越多卓越的科學團隊陸續找出各物種的體細胞核轉移

條件。把已分化的細胞一路推回初始的全能分化性(totipotency)，將不再是登天難事。然而，從胚胎取得具有多能性的幹細胞，涉及了重大道德議題。於是，科學家開始發想，有甚麼辦法可以不觸及胚胎或卵的使用，讓成熟的體細胞直接坐時光機回到過去具有多潛能分化能力的時候？

在 2006 年，日本京都大學山中伸弥(Shinya Yamanaka)團隊在小鼠尾巴分離出的纖維母細胞中，外源導入四個幹細轉錄因子 *Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4* 和 *c-Myc*(合稱：OSKM，又稱為山中因子 Yamanaka factors)到，成功誘導纖維母細胞再程序化，進而形成類似胚胎幹細胞的多功能分化的細胞³，而我們稱此細胞為**誘導型多潛能幹細胞**(induced pluripotent stem cell, iPS cells)。值得注意的是：一般體細胞的內源性 OSKM 啟動子是被嚴格標示為靜默的。山中博士送進小鼠纖維母細胞的外源 OSKM，啟動體細胞一連串的細胞再程序指令，使得 epigenetic eraser 和 writer 在染色體各個關鍵位置發揮作用，到了逆分化路程的末端，連內源 *oskm* 基因的啟動子區段也呈現出多潛能性幹細胞應有的表觀遺傳修飾，重新開始活躍表現。



圖一、幹細胞分化及體細胞去分化(再程序化)過程中表觀基因體變化情形。

這項重大研究成果震驚科學各界，山中伸弥博士也因此與約翰·戈登博士共同獲得諾貝爾獎。前仆後繼的研究很快的讓山中因子成功應用於人類細胞，因為不需考慮胚胎及卵的使用，**誘導型多潛能幹細胞**為再生醫學材料點亮無限希望。

在多潛能性幹細胞中(pluripotent stem cells)，與多能性相關之基因(pluripotent genes；如 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 等)會被標上各式具「活化(active)」意味之表觀遺傳修飾，開啟基因穩定表現；而各種決定細胞譜系身分的組織特異性表現基因(lineage-specific genes)的啟動子則同時被標上「活化」與「抑制(repress)」表觀記號，而形成「待機」(poised)狀態(圖一)。而在分化後的體細胞裡，這些組織特異性表現之基因會留下「活化」的標記，開啟特定族群的組織特異基因表現、或是只留下「抑制」的標記關閉和自己細胞譜系不相關的基因(圖一)。讓細胞能根據這些標記，朝向特定的細胞譜系發展；至於多分化潛能相關之基因，則被標記啟動子 DNA 甲基化等「強力靜默」標示，徹底關閉基因表現(以防畸胎瘤等源自多分化潛能相關基因不正常開啟導致之病變)。

四、微環境變化對於表觀遺傳學的影響

表觀遺傳修飾相對於 DNA 遺傳密碼，是比較動態、有可塑性的。一個活細胞可藉由感應外在環境的物理、化學、與生物性變化，透過一系列的訊息傳遞，由外而內去影響到核內染色體，就像塗改、撕貼便利貼一樣移除、或寫上新的表觀修飾符號，進而改變自身的型態、基因的表現，甚至更進一步的調控周遭的細胞，一同對環境的改變作出適當的反應。

現在讓我們把鏡頭拉近，看看一顆細胞是如何透過如同我們的感官一樣的受體(receptor)去感應，並透過如同神經系統或血液系統的傳導，進而使如同大腦般的調控中心做出反應的呢？我們知道細胞的基本空間概念由外而內是細胞膜包覆細胞質，而細胞質內有一個被核膜所包覆的細胞核，這個細胞核也就是一個細胞的大腦，它會對所接受的到訊號進行一連串的反应進而調控基因的開啟(turn-on)或關閉(turn-off)。而這個傳導的過程是透過傳訊級聯反應(signaling cascades)來進行的，在細胞的表面上會有各式各樣的蛋白質受體，當它們接受到外來物質或者外在力量的影響時，會將其傳至細胞內的第二傳訊者(second messenger)，而第二傳訊者就可以開啟傳訊級聯反應將外界對細胞的影響傳遞到細胞核中。細胞核中的各種表觀遺傳修飾蛋白質就會對 DNA 或者組蛋白進行前面小節所描述的化學性修飾。透過表觀遺傳標記的調動，可以號召、集合，或驅離、解散核醣核酸聚合酶(RNA polymerase)，以及各轉錄因子；也可以召來不同的抑制因子等等。如此一來就可以達到基因的開啟或關閉的目的。我們可以透過體外培養的(*in vitro* cultured)細胞給予不同微環境刺激，來了解外在物理、化學、與生物性因素與表觀遺傳學之間的關係。

1. 生物性刺激方面

除上述卵子萃取物及特定轉錄因子可戲劇性地將已分化的細胞重塑為幹細胞之外，尚有許多其他生物性因子，如細胞與細胞間之接觸，細胞與細胞外基質(extracellular matrix)間之互動⁴，或添加於細胞培養基中之生長因子、細胞激素(cytokines)等，均可啟動訊息連結而影響表觀基因體修飾。

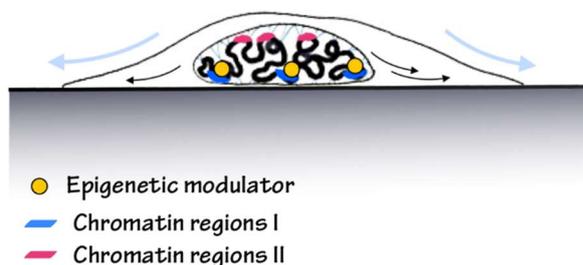
2. 化學性刺激方面

研究者近年來使用多種小分子化學藥物之組合，嘗試誘導細胞之再程序化(去分化)或由某特定細胞譜系轉分化(trans-differentiation)為另一種細胞譜系之反應。所選用之化合物大多具有直接抑制組蛋白去乙酰化酶、組蛋白去甲基化酶、DNA 甲基化酶等表觀基因體修飾酵素之活性。其他具有抑制特定訊息傳遞途徑之化合物，亦可間接改變細胞之表觀基因體，進而取得另一種細胞身分之標記^{5,6}。

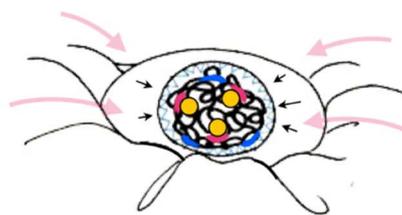
3. 物理性環境

物理性環境亦可與表觀基因體互相影響而對細胞命運產生戲劇性的改變。在環境中機械力(mechanical forces)與基質表面形貌的差異(physical material properties)皆會對細胞產生物理性的刺激。機械力可由外而內(outside-in)影響表觀遺傳學的信號，鄰近的細胞間彼此會透過細胞骨架聯結進而對環境的變化進行反應。當細胞處於流體環境時，流體對細胞表面所產生具有方向性的推力，使得細胞與細胞核形狀發生相對應的改變，同時在細胞表面有多種受體可對這個推力做出反應，影響下游的訊息傳遞路徑⁷，依照細胞與細胞核形狀的改變，調控各式甲基化酶將相對應的基因開啟或關閉，使細胞能夠依照環境朝所需的形態進行分化。研究顯示，單一方向之流體剪應力(shear stress)刺激，可促使特定影響表觀標記之酵素離開細胞核，以利基因表現⁸；亂流剪應力則造成相反的效果。我們可以透過研究力學應變和剪應力間接對細胞的表觀遺傳調控，蒐集並參考這些資訊來發展、設計材料，或利用外力來驅動表觀基因體之重塑。基質表面形貌的差異對細胞之刺激，則主要可以分成細胞的黏附與形狀的改變(cell adhesion and shape)以及基質堅硬度(matrix stiffness)。細胞染色質的排列會受到細胞外的彈性(extracellular elasticity)及基質軟硬程度來調控：硬的基質(>50kPa)能產生細胞張力，增加細胞核體積，讓染色質比較鬆散，增加組蛋白的乙酰化、增進基因表現(圖二. I)；而在較軟的基質上，細胞因為張力較小，則有相反的效果(圖二. II)⁹。就算是完全相同之材質，不同之表面形貌(如常條型表面刻痕或蜂巢狀刻痕之差別)，或 3D 結構(如立體生物醫材之孔徑大小等)，亦可改變細胞核形狀與表觀標示，而誘導不同方向之細胞譜系分化或再程序化。

I. Hard surface



II. Soft surface



圖二、物理性刺激對細胞表觀基因體及細胞命運之影響。圖中以培養基材之軟硬為例，描述在機械力與培養基質表面形貌等物理環境不同的情況下，細胞骨架和細胞核型態會因為細胞內空間型態改變，影響到染色體的結構，相對應的表觀基因調控因子因此在染色質上有著分佈上的差異，造成基因表達的不同、最終影響細胞命運。

五、幹細胞治療的安全性

誘導型多潛能幹細胞(Induced pluripotent stem cell)是由已分化的成體體細胞(adult somatic cell)經過再程序化(Reprogramming)誘導而成，其具有分化成許多細胞譜系(cell lineage)的能力，因此被視為再生醫學領域中最有潛力的治療方式。然而這樣的治療方式真的這麼有效，沒有風險嗎？其實並不然，因為再程序化的過程是一連串的基因及表觀遺傳(epigenetic)的修飾受到改變，必須克服體細胞原有的記憶屏障，才有機會產生具有多潛能分化能力(pluripotent)的細胞，而這個過程其實和一個腫瘤生成(tumorigenesis)的過程有些類似。根據研究顯示，兩過程皆須克服的表觀遺傳屏障(epigenetic barriers)如下¹⁰：

1. 表觀抑制標記 H3K9 甲基化下降¹¹

由於3號組蛋白第9個胺基酸(H3K9)高度甲基化會維持體細胞的異染色質狀態(heterochromatic state)，所以被視為是生成誘導型多潛能幹細胞最主要的屏障。然而，H3K9 甲基化下降也被認為是維持腫瘤惡性的因素。

2. 異常的高度或低度 DNA 甲基化

已分化的成體細胞經過表觀基因體再程序化誘導為多潛能性幹細胞之過程，對於全基因組之 DNA 甲基化均造成顯著改變，然而甲基化模式的變換也是癌細胞的特點。曾有研究顯示，藉由減少 DNMT1(DNA methyltransferase 1，維持性 DNA 甲基

轉移酶)的表現,降低 DNA 整體甲基化程度時,在老鼠體內會形成 T 細胞淋巴瘤¹²,減少 DNMT1 也會促進誘導型多潛能幹細胞的生成¹³;另外曾在急性骨髓性白血病中發現 DNMT3A(a *de novo* DNA methyltransferase)的突變,然而將 *Dnmt3A* 基因剔除也可加速人類細胞再程序化成誘導性多潛能幹細胞¹⁴。

總歸來說,體細胞在程序化形成誘導型多潛能幹細胞與癌前病變細胞需要面臨一些相同的表觀遺傳屏障來改變細胞命運。可想而知,在此二過程中,也會有許多表觀遺傳的調控蛋白參與其中,例如:UTX, macroH2A, JHDM1B, EZH2, TET2 or DNMTs¹⁰。既然如此,是否有什麼方法可以讓我們提前知道再程序化的過程中是否有癌化的可能性?前述所提及再程序化與腫瘤形成過程有許多共同點,因此讓人不免擔心在治療過程中會有癌化的可能性,但這兩者之間的關聯並不是絕對的。曾有研究顯示,一些表觀遺傳調控蛋白在這兩個過程中扮演了相反角色,像是缺少 TET2,會造成骨髓癌化¹⁵,卻會抑制再程序化中的間質上皮轉換步驟(mesenchymal-to-epithelial transition, MET)¹⁶;DOT1L(H3K79 甲基轉移酶)會藉由基因 MLL-AF9 轉位誘導促進白血病發生¹⁷,卻會避免誘導性多潛能幹細胞的形成¹⁴;又或者 SWI-SNF complex 中的成員會促進再程序化的進行¹⁸,但其在癌症中經常可以發現有突變的情形。或許這些表觀遺傳調控蛋白之表現量具有潛力讓我們可以辨識究竟再程序化的過程有無癌化病變的可能性。

除了誘導型多潛能幹細胞在再程序化的過程有可能走向癌化外,另外還有可能影響到印痕基因(imprinted gene)的維持¹⁹。由於在再程序化過程中,多功能分化基因(pluripotency genes)、發育階段特異性基因(developmental genes)、組織特異性基因(tissue-specific gene)等大部分基因會歷經再程序化的改變,而源自雙親特異性的印痕基因(parental-origin-specific imprinted genes)的表觀遺傳標記則應該被維持住¹⁹。雖然目前對於印痕基因如何避免再程序化的改變仍不完全清楚,但是如果在這過程中印痕基因的表觀遺傳標記無法維持,則會降低細胞多功能分化的能力。舉例來說,先前有研究發現在部分老鼠誘導性多潛能幹細胞株中,原先母系表現的 *Dlk1-Dio3* cluster 內的印痕基因包含 *Gtl2/Meg3*, *Rian* 和 *Mirg* 都異常地不表現,並同時發現這些基因之相對應調節序列具有高度 DNA 甲基化及組蛋白低度乙酰化,原本未甲基化的母系染色體區位卻高度甲基化,此等誘導性多潛能幹細胞株不易形成嵌合體(chimeras),也無法順利發展成完全由誘導型多潛能幹細胞衍生的動物(iPSC-derived animals)²⁰;本實驗室於人類胚幹細胞與誘導性多潛能幹細胞之研究亦發現,長期於體外培養增生之人類多潛能幹細胞,於 *Dlk1-Dio3* 印痕基因座時常發生異常高度甲基化,伴隨母系染色體之 *MEG3* 與下游 *microRNAs* 異常靜默之現象,由於 *MEG3* 與下游 *microRNAs* 等功能性 RNA 被指出具腫瘤抑制功能,失去 *MEG3* 表現不僅造成我們於研究中觀察到的神經系分化障礙,亦提高了相關細胞治療之風險²¹。然而,於使用多潛能性幹細胞作為研究或治療用途前,簡單測試一下 *MEG3* 與下游 *microRNAs* 之表現情形,即可有效避免損失與風險。

六、表觀遺傳學上應用的技術

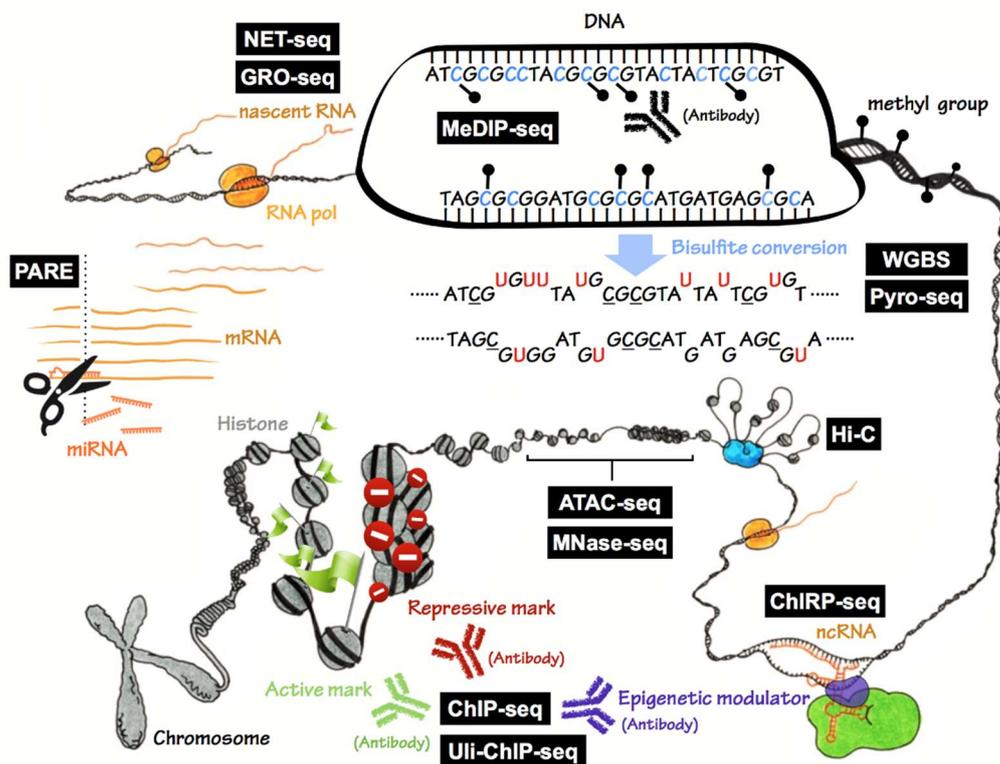
表觀遺傳修飾以極精緻的排列組合密密麻麻標記在染色體各處，以當前人類科技，難以直接透過光學顯微鏡去定位特定一種表觀遺傳標記的修飾位置。因此，研究表觀遺傳學最常見的科學方法，是將細胞內標記特定表觀遺傳修飾的染色體片段，或是染色體有交互作用的蛋白質、RNA基因組成。透過這一小節，我們將了解研究表觀遺傳學最需要的幾個面向，以及常見的幾項應用技術(圖三)。

1. 檢測染色質上的表觀遺傳修飾或是染色質與特定蛋白質之間交互作用的方法

Chromatin immunoprecipitation-sequencing(ChIP-Seq)(圖三)：「染色質免疫沈澱定序」是透過辨認「標記有特定表觀遺傳修飾的組蛋白」或是特定「表觀遺傳調節因子」的抗體，去共沉澱纏繞在特定表觀遺傳標記的組蛋白的DNA區段，或是與特定表觀遺傳調節因子結合的DNA片段。沈澱下來的DNA純化後，再經由次世代定序，找出特定表觀遺傳修飾標記出現的染色質區域以及調節因子在基因組上的結合位²²⁻²⁴。當研究樣品的數量很稀少而珍貴時，可以使用Ultra-low-input Chromatin immunoprecipitation sequencing(Uli-ChIP-seq)²⁵，原理和ChIP-Seq是一樣的，只是Uli-ChIP-seq實驗所需要使用的細胞數目較前者精省許多，且樣品的前處理步驟也經過特殊的修改。研究人員可依據樣品細胞數量的多寡選擇適合的ChIP-Seq方法。

2. 檢測多個不同區段染色體之間的相對空間關係

Chromosome conformation capture by high-throughput sequencing(Hi-C)(圖三)：這個技術叫做「染色體構象捕獲定序」。在教科書上，為了簡化複雜的分子生物學樣貌，我們常常把DNA與染色質以直線來表示，但實際上，在一個細胞裡面，不同基因座之間的交互作用是呈現3D立體結構的。不同區段的染色質可能透過「摺疊」，讓拉直後相距上萬個以上核苷酸長度的兩個位置(甚至是在不同染色體上的基因座)在立體空間可以非常靠近，讓表觀遺傳修飾調節因子集中在那些點進行修飾作用。Chromosome conformation capture Hi-C的原理，是先用化學或物理方法聯結彼此靠近的DNA或和它們接觸的蛋白質，然後對DNA進行小片段截切，接著，以特殊標幟外源序列用DNA 連接酶串起立體空間裡相對位置非常靠近的片段。對這些串起來的片段進行定序，就可以推出不同位置染色體片段的空間關係圖譜²⁶。



圖三、表觀基因體標記之分析方法：由圖的左下角的染色體看起，首先介紹的是：找出特定表觀遺傳修飾在染色體上位置的方法：Chromatin immunoprecipitation sequencing(ChIP-seq)和Uli(Ultra-low-input)-ChIP-seq，藉由辨認特定修飾的抗體來抓出我們想要觀察的染色質片段(而換成辨識表觀遺傳修飾蛋白或是轉錄因子的抗體則可以這些蛋白相對應之基因序列)。染色質結構則可用判別核小體(nucleosome)排列鬆緊程度的 Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing (ATAC-seq)、Micrococcal nuclease sensitive site sequencing(MN-seq)以及偵測不同區段染色質之間關係的 Chromosome conformation capture by high-throughput sequencing(Hi-C)來討論。至於功能性 RNA 作用之標的區位則可運用 Chromatin Isolation by RNA purification(ChIRP-seq)來探討。接下來是 DNA 甲基化的部份，除了用辨認甲基化 DNA 的抗體獲取特定 DNA 片段進行 Methylated DNA immunoprecipitation sequencing(MeDIP-seq)以外，透過「亞硫酸鈉處理」，我們可以輕易地由定序後的結果還原被甲基化的 DNA 位點。而細胞在詮釋以上表觀遺傳標示之綜合效應，所演繹出之當下的基因表現，可以 Native Elongating Transcript sequencing(NET-seq)和 Global Run-On sequencing(GRO-seq)分析即時生成的 RNA。此外，如 microRNA 及 PIWI-interacting RNA(piRNA)等功能性 RNA 對於轉錄體之調控潛力，可由 Parallel Analysis of RNA ends(PARE)獲得證實。以上基因轉錄前後之調控，對於細胞命運之決定均有重大影響，特定表觀標記也可作為有效之診斷或檢測指標。

3. 偵測染色質鬆緊程度

DNA要進行複製或轉錄的時候，不會一次解開全部的核小體，只會鬆開需要活躍的區位，以讓表觀遺傳修飾因子或是轉錄因子等等蛋白質來結合。因此，同一細胞內，染色體不同區段會有緊密維持高級結構的染色質區段，也會有「開放的染色質(open chromatin)」區段。這種染色質的鬆緊程度，我們常用「染色質可嵌入性(chromatin accessibility)」來描述。

(1) Micrococcal nuclease sensitive site sequencing(MNase-seq)「微球菌核酸酶敏感性分析定序」(圖三)：我們知道DNA是纏繞在組蛋白上的。因此當染色質開放，就表示DNA收納得比較「不緊」、核小體和核小體之間的距離拉開。而未繞在組蛋白上的DNA失去蛋白的保護、裸露出來，就可以被微球菌核酸酶(MNase)，即一種DNA內切酶切割。切割完的DNA經過定序，和全基因組序列比較後，留下來、被定序到的序列就是受到組蛋白保護的染色質片段。我們可以根據定序後的圖譜回推染色質的鬆緊程度²⁸。

(2) Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing(ATAC-seq)「轉座酶可接近的染色質定序分析/轉座子可嵌插性定序分析」：這是一種利用DNA轉座酶(transposase)結合高通量定序技術來研究染色質可嵌入性的方法。DNA轉座，是把染色體一個區域搬到另外一個區域的現象，這種轉座插入DNA的位點，必須是開放性的染色體，否則會被染色質的高級結構給阻擋。2013年，美國Stanford大學的William Greenleaf教授團隊將一種刻意突變過、有高度嵌插DNA能力的轉座酶帶著一段序列已知的轉座子放入細胞核中，跳躍子有較高機率嵌插進染色質裸露區，也就是染色體較「鬆」的區段，再利用已知序列進行PCR後定序。ATAC-seq的結果，可以分為兩大類別：一個類別是無核小體區段(nucleosome-free reads)，由一連串多個嵌入之片段放大而來的訊號，常常是啟動子、增強子(enhancer)所在的位點；另一類是核小體訊號(nucleosome signal)，得自較緊密的核小體和核小體之間嵌入點的訊號。和傳統的MNase-seq相比，ATAC-seq的實驗重複性更佳，操作時間較短並簡單，加上ATAC-seq需要較少的細胞量，定序結果的訊號更精準完善，因此是目前研究染色體可嵌入性較受歡迎的作法。

4. 偵測與特定RNA交互作用的染色體或RNA片段

(1) Chromatin Isolation by RNA purification(ChIRP-seq)(圖三)

利用可與特定RNA序列雜合之探針以及與之結合之染色體片段進行共沈澱，定序這些RNA的目標DNA，就可以知道特定功能性RNA是調控染色體的哪些地方²⁹。

(2) Degradome sequencing analysis(圖三)

「降解組定序分析」，又稱RNA末端並行分析(Parallel Analysis of RNA ends, PARE)。這個方法是透過定序找出被截切的mRNA。當定序結果裡發現某RNA片段末端有很大的比例斷在同一個位置，那麼這段RNA便很有可能是因為受到特定miRNA的調控被進一步截切而非隨機斷裂的。再配合miRNA的資料庫，我們可以藉此篩選出可信度更高的miRNA標靶mRNA^{30,31}。

5. 利用即時生成的RNA直接反映基因組當下的活躍程度：

(1) Native Elongating Transcript sequencing(NET-Seq)(圖三)

「新合成RNA定序」顧名思義就是藉由定序得知正在轉錄中的新生成RNA。不同於一般轉錄子定序看的是整個細胞裡的各種RNA，NET-seq只分離出還抓著DNA的新生RNA，因此可以直接反映表觀基因組當下對該段DNA序列調控的結果³²。

(2) Global Run-On sequencing(GRO-seq)

「轉錄中RNA聚合酶定序圖譜」是在整個基因組上指出參與轉錄的RNA聚合酶的位置、數量。無論是透過NET-seq或是GRO-seq，都可以提供我們基因組正在進行轉錄的位置，直接表達特定DNA區段當下的活躍程度³³。

6. DNA甲基化分析：

(1) Methylated DNA immunoprecipitation sequencing(MeDIP-seq)(圖三)

「甲基化DNA免疫沉澱定序」利用能專一辨認DNA上5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine)的抗體對甲基化的DNA進行免疫沉澱。再經由定序得知DNA上有甲基修飾的位置³⁴。

(2) Bisulfite sequencing(圖三)

DNA甲基化的甲基是加在胞嘧啶(cytosine, C)上面的，經過「亞硫酸鈉處理(bisulfite treatment)」的胞嘧啶會轉換為尿嘧啶(uracil, U)，而甲基化的胞嘧啶則會維持甲基化胞嘧啶的分子結構，不受影響，藉此處理，再進行定序，對照未經亞硫酸鈉處理的基因序列，就可以分辨單個胞嘧啶是否有甲基化³⁵。在亞硫酸鈉處理後對全基因組進行定序的方法，稱作「whole genome bisulfite sequencing(WGBS)」³⁶而「亞硫酸鈉-焦磷酸定序(Bisulfite pyrosequencing)」和WGBS對DNA樣本的前處理相同，不同的是定序方法，用這個方法通常觀察的是一段已知的序列而非全基因組。

七、表觀遺傳於再生醫學的應用

前面曾提及幹細胞治療中的再程序化過程是受到一連串表觀遺傳調控蛋白的調控、修飾，進而改變細胞命運。因此，從表觀遺傳學的角度來看，我們想知道是不是能

夠採取什麼方法將其應用於再生醫學治療上？

首先是如何診斷？希望透過一些表觀遺傳的調控蛋白或是標記當作生物標記 (biomarker)，以此判斷誘導型多潛能幹細胞的生成過程是否正常，接著是如何改善(加速)體細胞再程序化過程之正確性？希望透過剔除或是過度表現某些表觀遺傳調控蛋白，抑或是標記來加速再程序化過程，以降低再程序化過程中造成的失誤。以下針對如何判別為誘導型多潛能幹細胞以及如何加速再程序化過程，或降低再程序化過程中失誤率進行說明。

1. 診斷方面

- (1) 再程序化的早期，必須降低體細胞基因表現，因此需要一些抑制性表觀遺傳調控蛋白的參與，像是 PRC2(Polycomb repressive complex 2)，它會在體細胞相關基因染色質上標記 H3K27me3 這類抑制型標記，讓體細胞相關基因表現降低，因此 polycomb-mediated H3K27me3 被視為一個有效的標記來區分體細胞及誘導型多潛能幹細胞^{14, 37}。Wdr5(MLL-HMTase 的次分子，也是 H3K4me 的結合蛋白)在再程序化早期是被需要的，因它會和 Oct4 有互動，並活化多功能分化基因表現；TET2(參與 DNA 去甲基化的酵素)在再程序化過程會在多功能分化基因的啟動子加上 5-hydroxymethylcytosine(5hmc)標記，進而刺激多功能分化基因表現¹⁶，此外 Tet family 也是活化 miR-200 所需的蛋白，而 miR-200 為間質上皮轉換步驟必要的參與分子³⁸。所以在早期可以檢測這些蛋白是否有表現，作為檢查點，確認再程序化過程正常。
- (2) 再程序化的中期，會開始表現一部份的多功能分化相關的基因，像是 *Nanog*, *Oct4*, *Esrrb*^{39, 40} 等等，此外在晚期，必須去除原先一開始加入的多功能分化的因子(Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc)，因此需要細胞內源性的多功能分化基因表現，像是 *Sox2*, *Dppa4*^{39, 41} 等等，才能維持誘導型多潛能幹細胞的多潛能分化能力，而這些基因的表現都有賴於表觀基因體修飾蛋白的參與。舉例來說，UTX(H3K27 去甲基酶)和 OSK 蛋白互動並移除多功能分化相關基因上的抑制型標記 H3K27me3⁴²，所以未來可能可以藉由這些內源性多功能分化相關基因的表現來當作檢測的生物標記。
- (3) 根據上一個主題，我們知道再程序化過程有可能影響到印痕基因的維持，根據之前的研究發現誘導型多潛能幹細胞培養過久，容易造成母系表現的 *Dlk1-Dio3* locus 內的印痕基因 *Meg3* 高度甲基化而不表現^{43, 44}，或許可以偵測誘導性多潛能幹細胞是否有此基因的表現，若無代表再程序化可能出現問題，此外在這基因座(locus)上還有許多 non-coding RNA 座落，所以也有機會可以拿來當作檢測的生物標記。

2. 加速再程序化

- (1) 由於 H3K9me3 主要是維持體細胞異染色質狀態的標記，對於再程序化來說是抵觸的標記。故先前有研究提出，在老鼠系統中剔除 Suv39h1、Suv39h2、Setdb1 或 Ehmt2 會使部分再程序化中的細胞有效地轉變成誘導性多潛能幹細胞^{11, 45}；同時在人類的系統也有相似的發現，當剔除 Suv39h1/2 會促進人類細胞再程序化，並有效地使再程序化參與蛋白結合到細胞原有 H3K9me3 的位置上¹⁴。
- (2) H3K79me3 主要調控參與分化過程的基因其表現，這對再程序化過程來說也是相較抵觸的標記。因此在先前研究有發現在再程序化早期剔除 Dot1 組蛋白甲基化酶可以促進再程序化的進行，而且在剔除 Dot1 的情況下，不用外加 Klf4 也可順利進行再程序化¹⁴。
- (3) H3K36me2 和 H3K79me3 相似，主要調控參與分化過程的基因其表現，這對再程序化過程來說也是相較抵觸的標記。像是之前的研究顯示降低 Jhdmla, Jhdmlb(H3K36me2 的去甲基化酶)的基因表現會削弱再程序化的進行；反之如果過量表現 Jhdmla, Jhdmlb，則會加強再程序化^{46, 47}，而此主要藉由促進細胞週期的進程或是加速再程序化因子對早期轉錄的反應。
- (4) 如前述提及誘導型多潛能幹細胞再程序化的過程是一連串基因及表觀遺傳(epigenetic)的修飾改變，而這過程也包括了染色質的重組。因此如果能加速染色質的重組，或許能夠加速再程序化的進行。的確過去有研究顯示 Baf155/Brg1(ATP-dependent chromatin remodeling complex)過量表現的話，可以促進 Oct4 結合到其目標的，進而促進再程序化的進行⁴⁸。
- (5) 再程序化過程中，除了要關閉已分化的基因外，也需要開啟多功能分化基因的表現。曾有研究發現，當過表現 Mbd3 時(其為 nucleosome remodeling and demethylation complex, NuRD 的其中一個組成次分子)，會藉由建立異染色質特性並關閉胚胎幹細胞特異性的基因，包括 Nanog、Oct4，進而抑制誘導性多潛能幹細胞的誘發；反之，剔除 Mbd3 可以改善體細胞的再程序化並加速誘導型多潛能幹細胞生成，此外也不需再另外加入 c-Myc 和 SOX2⁴⁹。
- (6) 目前的研究也有發現表觀遺傳的藥物被可以加速再程序化⁵⁰，如：5-azacytidine(AZA) (DNA 甲基化的抑制劑)，會在再程序化過程中，讓多功能分化的基因，像是 Oct4、Nanog 能夠去甲基化，進而表現¹³；BIX(組蛋白甲基轉移酶 G9a 的抑制劑)可以刺激老鼠胚胎纖維母細胞產生誘導性多潛能幹細胞⁵¹；valproic acid(VPA)，suberoylanilide hydroxamic acid(SAHA)，和 trichostatin A(TSA) 都是組蛋白去乙酰化酶的抑制劑 (HDAC inhibitor)，被發現可以改善誘導型多潛能幹細胞生成的效率⁵²；Vitamin C 可作為一個輔因子，刺激低度甲基化，造成 H3K36 去甲基酶活性上升，進而改善再程序化的效率⁵³。

八、結語

表觀基因體之調節能夠決定幹細胞分化的潛力。「組織特異基因」在未分化的幹細胞裡是不表現的，我們無法透過量化基因表現得到訊息；而在分化潛力截然不同的兩個幹細胞裡，同一基因即使都不表現，卻可能有天差地別的表觀基因標記，此時觀察表觀基因修飾的不同，便能提供我們很好的線索。簡單地說，幹細胞分化潛能可以「啟動子被表觀修飾標示為『待機(poised)』的組織特異性基因數目多寡決定」，待機的基因越多，表示分化的潛力越強。因為當基因被標示為待機狀態時，只要提供適當的分化條件，就能輕易地開啟這個基因的表現，不像那些被標示成「靜默(silence)」的基因，難以被一般分化條件的刺激啟動而不易依照指示分化。而當某個組織特異基因的啟動子更進一步地在 DNA 上被標示甲基化等強效靜默表觀標記，這個細胞基本上沒有機會分化成該特異基因所代表的細胞譜系。由此我們可以知道，表觀基因體的訊息具有層次上的分別，不但能呈現細胞當下之基因表現狀況，更有機會預測未來基因表現之潛力，與幹細胞分化之能力，亦或細胞治療後癌化之風險。所以表觀基因標記不但可作為診斷及追蹤治療效果之依據，甚至可推測治療效果或患病機率，在健康醫學上的應用顯而易見。近年來表觀基因體診斷技術日益精進，讓我們有機會用更少的細胞，甚至單一細胞，取得更完整與更精準的表觀基因體資訊，以表觀標記作為有效臨床診斷及疾病預測的技術也日趨成熟。

除了應用於診斷方面，具調節表觀基因體功能之小分子藥物也已經在臨床或細胞分化與再程序化方向有所應用。不過此等分子多半不具專一性，因此在開啟想打開的基因時，將連帶開啟不該打開的基因，或者在關閉癌化基因的同時，也影響了抑癌基因的表現，造成副作用層出不窮。近來已有科學家更改新興基因編輯技術 CRISPR/Cas9 平台，置換核酸切割酵素為表觀基因調控因子，利用嚮導 RNA(guide RNA)將所需的特定表觀基因體修飾帶到特定 DNA 序列，此一突破將大幅減少臨床醫療上的副作用，表觀基因體相關之研究與應用，必可顯著增加再生醫學之治療效果與安全性。

九、參考文獻

1. Gurdon, J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* **10**, 622-640 (1962).
2. Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. & Campbell, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813 (1997).
3. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
4. Ko, K.S., Arora, P.D. & McCulloch, C.A. Cadherins mediate intercellular mechanical signaling in fibroblasts by activation of stretch-sensitive calcium-permeable channels. *J Biol Chem* **276**, 35967-35977 (2001).

5. Lai, P.L. *et al.* Efficient Generation of Chemically Induced Mesenchymal Stem Cells from Human Dermal Fibroblasts. *Sci Rep* **7**, 44534 (2017).
6. Xie, X., Fu, Y. & Liu, J. Chemical reprogramming and transdifferentiation. *Curr Opin Genet Dev* **46**, 104-113 (2017).
7. Dupont, S. *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179-183 (2011).
8. Illi, B. *et al.* Shear stress-mediated chromatin remodeling provides molecular basis for flow-dependent regulation of gene expression. *Circ Res* **93**, 155-161 (2003).
9. Kocgozlu, L. *et al.* Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. *J Cell Sci* **123**, 29-39 (2010).
10. Apostolou, E. & Hochedlinger, K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* **502**, 462-471 (2013).
11. Chen, J. *et al.* H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet* **45**, 34-42 (2013).
12. Gaudet, F. *et al.* Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* **300**, 489-492 (2003).
13. Mikkelsen, T.S. *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**, 49-55 (2008).
14. Onder, T.T. *et al.* Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* **483**, 598-602 (2012).
15. Moran-Crusio, K. *et al.* Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* **20**, 11-24 (2011).
16. Doege, C.A. *et al.* Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. *Nature* **488**, 652-655 (2012).
17. Krivtsov, A.V. *et al.* H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* **14**, 355-368 (2008).
18. Kadoch, C. *et al.* Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat Genet* **45**, 592-601 (2013).
19. Li, Y. & Sasaki, H. Genomic imprinting in mammals: its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. *Cell Res* **21**, 466-473 (2011).
20. Stadtfeld, M. *et al.* Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* **465**, 175-181 (2010).
21. Mo, C.F. *et al.* Loss of non-coding RNA expression from the DLK1-DIO3 imprinted locus correlates with reduced neural differentiation potential in human embryonic stem cell lines. *Stem Cell Res Ther* **6**, 1 (2015).
22. Barski, A. *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823-837 (2007).
23. Shen, Y. *et al.* A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature* **488**,

- 116-120 (2012).
24. Wang, Z. *et al.* Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* **40**, 897-903 (2008).
 25. Brind'Amour, J. *et al.* An ultra-low-input native ChIP-seq protocol for genome-wide profiling of rare cell populations. *Nat Commun* **6**, 6033 (2015).
 26. Kircher, M. & Kelso, J. High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays* **32**, 524-536 (2010).
 27. Doganli, C., Sandoval, M., Thomas, S. & Hart, D. Assay for Transposase-Accessible Chromatin with High-Throughput Sequencing (ATAC-Seq) Protocol for Zebrafish Embryos. *Methods Mol Biol* **1507**, 59-66 (2017).
 28. Meyer, C.A. & Liu, X.S. Identifying and mitigating bias in next-generation sequencing methods for chromatin biology. *Nat Rev Genet* **15**, 709-721 (2014).
 29. Chu, C., Quinn, J. & Chang, H.Y. Chromatin isolation by RNA purification (ChIRP). *J Vis Exp* (2012).
 30. German, M.A. *et al.* Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nat Biotechnol* **26**, 941-946 (2008).
 31. Addo-Quaye, C., Eshoo, T.W., Bartel, D.P. & Axtell, M.J. Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the Arabidopsis degradome. *Curr Biol* **18**, 758-762 (2008).
 32. Churchman, L.S. & Weissman, J.S. Native elongating transcript sequencing (NET-seq). *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 4**, Unit 4 14 11-17 (2012).
 33. Gardini, A. Global Run-On Sequencing (GRO-Seq). *Methods Mol Biol* **1468**, 111-120 (2017).
 34. Down, T.A. *et al.* A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. *Nat Biotechnol* **26**, 779-785 (2008).
 35. Chatterjee, A., Stockwell, P.A., Rodger, E.J. & Morison, I.M. Comparison of alignment software for genome-wide bisulphite sequence data. *Nucleic Acids Res* **40**, e79 (2012).
 36. Stevens, M. *et al.* Estimating absolute methylation levels at single-CpG resolution from methylation enrichment and restriction enzyme sequencing methods. *Genome Res* **23**, 1541-1553 (2013).
 37. Fragola, G. *et al.* Cell reprogramming requires silencing of a core subset of polycomb targets. *PLoS Genet* **9**, e1003292 (2013).
 38. Hu, X. *et al.* Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* **14**, 512-522 (2014).
 39. David, L. & Polo, J.M. Phases of reprogramming. *Stem Cell Res* **12**, 754-761 (2014).
 40. Buganim, Y. *et al.* Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* **150**, 1209-1222 (2012).
 41. Golipour, A. *et al.* A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct

- from the pluripotency network. *Cell Stem Cell* **11**, 769-782 (2012).
42. Mansour, A.A. *et al.* The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature* **488**, 409-413 (2012).
 43. Nishino, K. *et al.* DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet* **7**, e1002085 (2011).
 44. Papp, B. & Plath, K. Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell* **152**, 1324-1343 (2013).
 45. Soufi, A., Donahue, G. & Zaret, K.S. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* **151**, 994-1004 (2012).
 46. Liang, G., He, J. & Zhang, Y. Kdm2b promotes induced pluripotent stem cell generation by facilitating gene activation early in reprogramming. *Nat Cell Biol* **14**, 457-466 (2012).
 47. Wang, T. *et al.* The histone demethylases Jhdmla/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* **9**, 575-587 (2011).
 48. Singhal, N. *et al.* Chromatin-Remodeling Components of the BAF Complex Facilitate Reprogramming. *Cell* **141**, 943-955 (2010).
 49. Kaji, K., Nichols, J. & Hendrich, B. Mbd3, a component of the NuRD co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells. *Development* **134**, 1123-1132 (2007).
 50. Huang, C. & Wu, J.C. Epigenetic Modulations of Induced Pluripotent Stem Cells: Novel Therapies and Disease Models. *Drug Discov Today Dis Models* **9**, e153-e160 (2012).
 51. Shi, Y. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* **3**, 568-574 (2008).
 52. Huangfu, D. *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* **26**, 795-797 (2008).
 53. Esteban, M.A. *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **6**, 71-79 (2010).

第二章

早期發育組織來源間葉幹細胞之優勢及臨床應用性

Clinical and immunomodulatory advantages of using developmentally early stage human mesenchymal stem cells

顏伶汝

國家衛生研究院細胞及系統醫學研究所

一、前言

近年來，幹細胞研究已確認在成體內的多數組織及器官都還含有幹細胞的存在¹，包含間葉幹細胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。間葉幹細胞為一種具有組織特異性之幹細胞(tissue-specific stem cells)或稱組織幹細胞，不但有分化為硬骨、軟骨、及脂肪的功能，且有免疫抑制功能^{2,3}。但如果從成體分離組織幹細胞包含間葉幹細胞，這些幹細胞的數量會隨著年齡的增長而變的少，或有功能性的改變、甚至於喪失或癌化。此外，成體組織幹細胞的取得不論是從骨髓、神經或是脂肪組織，都要使用侵入性手術的方法，因此構成成體幹細胞研究與應用上的障礙及問題。之外，為了達到能夠應用在臨床高量的細胞數目，成體來源的幹細胞需在體外大量培養而在此過程會導致細胞老化(senescence)，造成增生能力、分化功能及其他幹細胞特有的功能改變或降低⁴。因此，目前以早期發育組織包含胎兒來源的胚外組織(extra-embryonic tissue)及人類胚胎幹細胞(human embryonic stem cells, hESCs)等多潛能性幹細胞(pluripotent stem cells, PSCs)為分離組織幹細胞包含間葉幹細胞越來越是重要的趨勢。本章節將討論這類組織所分離的間葉幹細胞之優勢，包含功能性及其他臨床應用上考慮的優勢，以及臨床應用上還存在的挑戰。

二、早期發育組織來源分離出之幹細胞的優勢

目前，已有不少實驗室發現從胎兒時期的胚外組織，包含臍帶(umbilical cord)^{5,6}、羊水(amniotic fluid)⁷、羊膜(amnion)及胎盤(placenta)^{8,9}，都可以成功地分離出間葉幹細胞。利用胎兒來源的胚外組織分離幹細胞有多種優勢，而最重要的一點可能是這些組織在胎兒出生後一般就會被丟棄，故取得一般也不需要使使用侵入性手術的方式。更重要的，因為這些組織的發育階段為較早期，相較於成體幹細胞它的端粒(telomere)長度較

長，分離出之幹細胞的生長速度也優於成體來源的細胞，在體外培養時會有較好增生的能力¹⁰。之外，胎兒來源細胞所累積的基因突變(genetic mutations)相當少，當然也會比成體來源的細胞少，故臨床應用時會較無產生癌症的疑慮，可排除目前已發生在應用成體幹細胞的相關問題^{11,12}。

胎兒在子宮內的成長及發育，會產生幫助自體成長及的相關胚外組織及器官，包含胎盤、羊膜、羊水、及臍帶等組織及器官。胎盤是最主要提供養份給胎兒的器官，對於胎兒的生長與發育很重要，生產過後它就會被丟棄。這個器官也包含許多不同種類的細胞，包含上皮細胞、間葉細胞與造血細胞，且會分泌很多細胞激素(cytokines)。在胎盤上有胎膜，此組織是由羊膜和絨毛膜合併黏在一片所組成的，構造上會形成一個羊膜腔(amniotic cavity)，裡面含羊水由胎兒的尿液所構成，羊水的功能為一層緩衝區來保護成長中的胎兒。胎膜的內層就是羊膜，此組織包含了上皮層、中間層與緻密層，而胎膜的外層緊貼著羊膜的是絨毛膜，絨毛膜中含有間葉細胞與絨毛外滋養層母細胞(trophoblast)。從絨毛膜及羊膜延伸出來形成繩索狀連接到胎兒腹部的是臍帶連接著胎兒與胎盤，提供胎兒養分的通道。人類的臍帶包含兩條動脈與一條靜脈，位於一個特殊的結締組織瓦頓氏凝膠(Wharton's jelly)中¹³。胎兒出生時在胎盤及臍帶所殘留的血(umbilical cord blood)，可收集及分離出所謂臍帶血之造血幹細胞(hematopoietic stem cells, HSCs)，已在近5~10年進入臨床應用在治療血液疾病，例如白血病及先天性貧血，而臍帶血內也含有間葉幹細胞^{14,15}。

近年來，組織幹細胞例如間葉幹細胞也被發現可從人類多潛能性幹細胞(PSCs)衍生出^{16,17}。人類多潛能性幹細胞包含了人類胚胎幹細胞(hESC)及誘導型多潛能幹細胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)¹⁸⁻²⁰。這類的幹細胞代表最早發育階段的幹細胞，增生能力幾乎無限，且能夠分化成為成體的所有體細胞及生殖細胞包含精子及卵子。在所有的幹細胞種類，PSCs有最廣的分化能力，但此幹細胞的缺點之一為產生畸胎瘤(teratoma)的可能性。如PSCs在未完全分化時被移植到非胚胎的組織、器官上，很可能會產生此腫瘤。因此，如把PSCs先分化為組織幹細胞，可保留PSCs的高度增生能力但會去除產生畸胎瘤的疑慮，故PSCs所衍生的間葉幹細胞，例如人體胚胎幹細胞衍生的間葉幹細胞(hESC-MSCs)及誘導型多潛能幹細胞衍生的間葉幹細胞(iPSC-MSCs)，都含有較成體間葉幹細胞更強的增生功能，但無PSCs產生畸胎瘤的疑慮。

這些早期發育組織分離出來的間葉幹細胞之外也被發現會表現出與人類胚胎幹細胞相同的細胞表面標記(surface marker)，例如SSEA-4及TRA-相關抗原，暗示著此發育階段所分離出的間葉幹細胞其多向分化能力較成體幹細胞更具潛力^{9,10,17,21,22}。綜合以上因素，近年來由早期發育組織分離出來的間葉幹細胞，逐漸引起眾多學者研究的興趣及臨床應用的可行性。

三、早期發育組織之間葉幹細胞特殊的免疫調節作用

幹細胞在臨床應用的來源可為自體取得，或異體、捐贈者取得。如為自體取得則沒

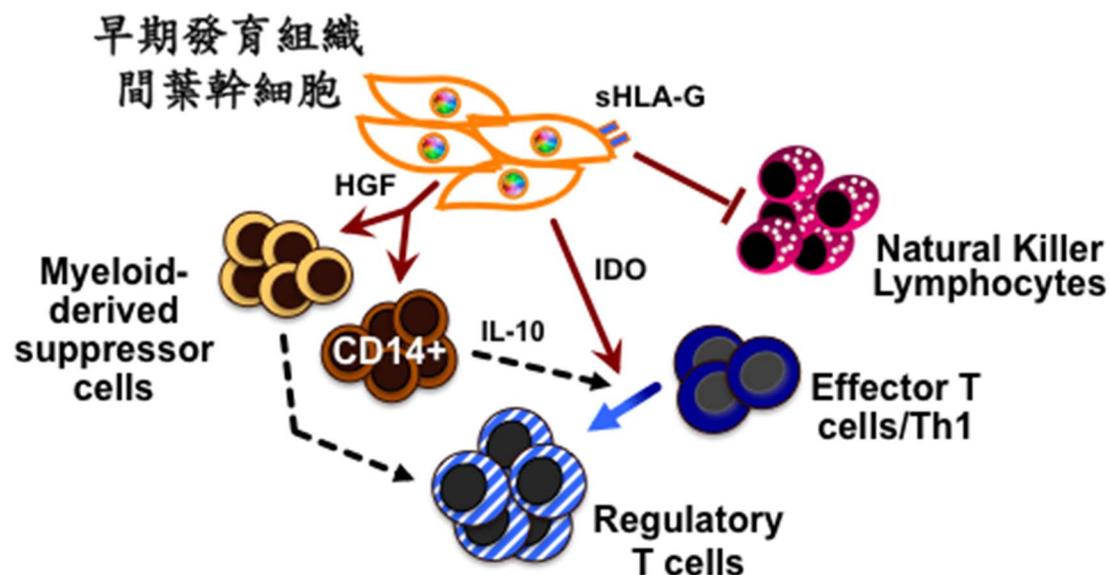
有免疫排斥的問題，但可取得的幹細胞種類有相當大的限制，故各個器官、組織所擁有的幹細胞之量是很少的，可能只會佔一個器官或組織總細胞數的 0.001~0.0001%。如是從捐贈者取得的，會需要先進行免疫配對來降低排斥的問題，而好處是能取得的幹細胞範圍較廣，也可選至較年輕的捐贈者取得幹細胞。目前已有研究顯現，成體幹細胞的數量及品質會隨著捐贈者的年齡降低²³，而這問題在自體取得幹細胞的狀況常會面臨到，因為自體幹細胞的捐贈者大多是在病變發生的時候才會取得幹細胞，而幹細胞治療所適應的疾病，大多數都為壞死或退化性的疾病，則是好發在年長的人。光是幹細胞的量，從出生到 60 歲有估計可能會降低 30~100 倍²³。即使幹細胞的量沒有減少，如造血幹細胞的量是會隨者年齡增加，但功能性大幅退化而致癌率卻大幅增加。之外，最新的研究發現，如利用發病後才取得自體幹細胞來應用在治療上，療效會顯著的降低，故發病本身就會使得自體的幹細胞有不良的反應，使得這些自體幹細胞的治療功能降低²⁴。因此使用自體幹細胞做治療，除了沒有免疫排斥的缺點，治療優點會比想像中的少，而還可能有致癌的疑慮。

基於以上所提的疑慮，除了利用自體幹細胞做治療，從第三者的異體捐贈者(3rd party allogeneic donor)取得幹細胞進行治療還是很重要的一個選擇。而利用異體捐贈者的任何細胞、組織，即使有進行免疫抗原的配對，都還是多少會面臨到免疫排斥的問題，而排斥如果嚴重的話，可造成受贈者(recipient)的死亡。但多年的臨床經驗顯示，在造血幹細胞移植的受贈者，如造血幹細胞是來自胎兒來源的臍帶血，相較於接受成人的骨髓造血幹細胞的受贈者，臍帶血的造血幹細胞在移植時引起的免疫反應相對輕微，故受贈者的預後具有統計學上的顯著差異²⁵。因此，如需利用第三者異體捐贈者的細胞或組織，選用越早期來源的細胞、組織應該會引起越少的免疫反應。此原則，不止在造血幹細胞移植病患有此現象，在間葉幹細胞也有此結果²⁶。以胎盤來源及成體骨髓來源的間葉幹細胞做比較，我們發現胎盤間葉幹細胞可以抑制被刺激的人類周邊血單核球增生，且效果顯著的比成體骨髓間葉幹細胞好²⁶。人類胚胎幹細胞與多數胚外組織分離的間葉幹細胞跟成體骨髓間葉幹細胞及一般體細胞一樣，都會表現 MHC I (Major Histocompatibility Complex Class I) 分子，但是表現很少或是根本不表現在多數免疫細胞所會表現的 MHC II 分子與輔助刺激因子(costimulatory molecule)^{27,28}。成體骨髓間葉幹細胞在伽瑪干擾素(interferon- γ)的刺激 48 小時後會大量表現造成免疫反應的 MHC II 之 HLA-DR 表面蛋白質，而 hESC-MSCs 在持續刺激 7 天之後也不會有此反應^{28,29}。綜合以上的結果，這些早期發育組織的間葉幹細胞所引起的免疫反應會比成體間葉幹細胞更弱。

其實目前已確定，不同組織來源的間葉幹細胞大致上都有免疫抑制的能力，基於這個原因，目前利用間葉幹細胞進行臨床治療免疫或發炎相關疾病的臨床實驗約有 240 件，佔所有間葉幹細胞臨床實驗的 40%左右³。不管是成體骨髓或早期發育組織來源的間葉幹細胞，有不少共同的機制針對免疫抑制功能，包含分泌吲哚胺-2,3-雙加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)^{26,30} 代謝 tryptophan 抑制免疫反應³¹，以及增加 CD4⁺CD25^{bright} 調節性 T 細胞(T regulatory cell / Tregs)^{26,32,33}，一群有免疫耐受性及抑制

發炎免的 T 淋巴細胞-。但越來越多研究顯示，早期發育組織來源的間葉幹細胞的免疫抑制能力可能比成體間葉幹細胞更強^{29,34}。從胎盤及人類胚胎幹細胞分離出來的間葉幹細胞具有特別的免疫耐受性，包含表現 HLA-G。此蛋白為胎盤專一性的 MHC-I 抗原，在懷孕期間調節免疫耐受性很重要的因子³⁵，對自然殺手淋巴細胞(natural killer lymphocytes / NKs)擁有免疫抑制的效果³⁶。NKs 為執行先天免疫反應(innate immunity)的細胞，而這種免疫反應在調節母體與胎兒的耐受性(maternal-fetal tolerance)扮演著非常重要的角色³⁷。我們發現胎盤及從人類胚胎幹細胞分離的間葉幹細胞)都會表現 HLA-G，而在成體骨髓間葉幹細胞並沒有這個現象，而這兩種早期發育組織來源的間葉幹細胞對於 NKs 的免疫抑制力比成體間葉幹細胞更強^{22,26}。胎盤間葉幹細胞還會高度表現肝臟生長因子(hepatocyte growth factor, HGF)，一個與許多癌症的增生有相關的分子，而此幹細胞會透過分泌 HGF 來調控兩類先天免疫反應細胞：骨髓衍生抑制細胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)及 CD14+單核細胞(monocytes)^{38,39}。這兩種先天免疫反應細胞都有相當強的免疫抑制功能，而胎盤間葉幹細胞所分泌的 HGF 會使得 MDSCs 的數目增加，也會使得 CD14+單核細胞分泌 interleukin-10 來增加有免疫抑制功能的 Tregs (圖一)。

基於間葉幹細胞的免疫抑制功能，有不少研究學者覺得這類的幹細胞可成為「產品現貨」或「既製品」(“off-the-shelf product”)而不需要幹細胞捐贈者及使用的受贈者做免疫配對。目前已有少數案件及試驗利用半配對(haplo-matched)甚至於完全沒有配對(unmatched 3rdparty)的成體間葉幹細胞進行臨床測試^{40,41}。如果利用早期發育組織來源的間葉幹細胞可能更可以達到此目標，使得間葉幹細胞的臨床應用更為廣泛、免疫治療效果更為顯著。



圖一：早期發育組織來源間葉幹細胞之免疫調節功能機制。

早期發育組織來源的間葉幹細胞透過表現分泌吲哚胺-2,3-雙加氧酶(indoleamine-2,

3-dioxygenase, IDO), 調控 CD4 T 淋巴細胞 [作用性 T 細胞(effector T cells)及 Th1 補助性 T 細胞(Th1)] 進而影響[調節性 T 細胞(regulatory T cells)]。這些間葉幹細胞也會透過分泌肝臟生長因子(hepatocyte growth factor; HGF)調控 CD14⁺ 單核細胞(CD14⁺ monocytes, CD14⁺)分泌 interleukin-10(IL-10)及骨髓衍生抑制細胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)來增加調節性 T 細胞。之外, 早期發育組織來源間葉幹細胞會表現細胞表面 HLA-G (sHLA-G)來抑制自然殺手淋巴細胞 (natural killer lymphocytes)的功能。

四、早期發育組織之間葉幹細胞分化為骨骼肌的特性

肌少症(sarcopenia)是骨骼肌(skeletal muscle; SkM)強度及功能的退化, 在老化的過程無法避免的現象。人體 40%的體積為骨骼肌, 而在世界人口快速老化之下, 肌少症所帶來的行動不便及影響生活的品質, 及更嚴重的併發症包含增加跌倒的風險等問題, 對於老人本身、家庭、及社會所造成的代價相當龐大。而雖然骨骼肌本身是有幹細胞稱為衛星細胞(satellite cells), 但是這些內源性幹細胞的再生不足以克服與衰老和損傷相關的變化。因此, 有不少研究是否可利用人類間葉幹細胞分化為骨骼肌, 治療肌少症這個與老化息息相關的變化。

雖然骨骼肌此體細胞與間葉幹細胞都是中胚層(mesoderm)衍生的相關體細胞, 但骨骼肌已知有幹細胞的存在, 且間葉幹細胞的標準分化驗證並不合此體細胞形態。故如利用最常用的成體骨髓間葉幹細胞, 是不容易分化成骨骼肌, 故僅有少數報告有此結果⁴²⁻⁴⁶, 並且, 也有報告指出此分化是不能實現的^{47, 48}。因此, 我們利用早期發育組織的間葉幹細胞包含胎盤間葉幹細胞、人類胚胎幹細胞衍生的間葉幹細胞、及胎兒骨髓間葉幹細胞, 都發現這類的幹細胞可成功分化為骨骼肌, 但同時比較的成體間葉幹細胞確無法成功達到同樣的結果⁴⁹。其實, 有一些報導也是指出利用人類胎盤來源、臍帶來源、或臍帶血來源的間葉幹細胞, 都可分化為骨骼肌^{50, 51}, 而且在動物疾病模式這些早期發育組織來源的間葉幹細胞也有治療骨骼肌疾病或問題的現象^{49, 50}。這些結果, 顯示早期發育組織的間葉幹細胞分化為骨骼肌是優於成體間葉幹細胞。

為何早期發育組織的間葉幹細胞較成體間葉幹細胞更能分化為骨骼肌? 從發育學可了解, 骨骼肌的發育基礎是出於體軸旁中胚層(paraxial mesoderm), 與硬骨及軟骨的發育基礎不同, 後兩者為間葉幹細胞的後代體細胞。之外, 近年的研究也指出, 骨骼肌與棕色脂肪(brown fat)在早期發育時可能是共享同一幹細胞, 而是由 PRDM16 這個轉錄因子所控制的^{52, 53}。棕色脂肪與一般脂肪不同, 一般脂肪為白脂肪(white fat), 不但與棕色脂肪是有不同的幹細胞, 故白脂肪的幹細胞為間葉幹細胞, 是為轉錄因子 PPAR γ 所控制的⁵⁴。棕色脂肪在生理及功能性也跟白脂肪不同: 棕色脂肪消耗熱量較高, 儲存熱量能力較低, 而白脂肪主要功能為儲存熱量, 消耗熱量的能力非常低。在人類, 棕色脂肪在新生兒時段量是最多, 隨著年齡的增加到了成人的階段, 會降到只剩微量⁵⁵, 而白脂肪量的變化是相反的。基於這些原因, 早期發育組織的間葉幹細胞可能還具有能夠分化成骨骼肌的潛力。而我們也發現, 與成體間葉幹細胞相比, 多種早期發育組織的間

葉幹細胞還能高度表現血清反應因子(SRF)，是控制骨骼肌分化的一個重要轉錄因子⁴⁹。此發現與近期的一些針對骨骼肌的研究吻合，不管是小鼠或人類，骨骼肌的血清反應因子會隨著年齡降低⁵⁶，而如果把小鼠骨骼肌的SRF表現剔除，此小鼠的骨骼肌會較正常小鼠更快發生肌少症⁵⁷。這些研究總體顯示：對於分化為骨骼肌，早期發育組織的間葉幹細胞比成體間葉幹細胞更為合適。

五、早期發育組織之間葉幹細胞分化為心肌的特性

缺血性心臟病(ischemic heart disease)及相關的心血管相關疾病目前為全球主要的致死原因之一。嚴重的心血管疾病會造成大量心肌細胞(cardiomyocyte)死亡引起心臟功能受損，損害程度嚴重時會導致病患猝死。目前所使用的治療方式主要為降低相關的危險因子，如：血清脂質和血壓，或是緩解疾病症狀，如：使用抗血小板藥物和 β 受體抑制劑等藥物。然而，這些藥物治療並無法治癒缺血所造成的心肌細胞缺損。雖然有文獻報導指出人類心臟具有再生能力，但這個的現象是非常有限而此微弱的變化還會隨著年齡而減弱⁵⁸。因此，隨著幹細胞研究的進展，使用心臟之外來源的幹細胞來進行心臟修復越來越受到重視，而成體間葉幹細胞是經常被使用的選擇⁵⁹。雖然在體外(in vitro)及小動物實驗，成體骨髓間葉幹細胞可分化為心肌細胞及有效改善缺血性心臟病的症狀，但在大動物及人體臨床實驗所得到的結果並非所預期的⁶⁰。目前已發現，有許多因素會影響細胞治療的臨床結果，包括使用的細胞或幹細胞種類、體積、治療傳送方法、和治療後細胞存活率等因素⁵⁹。此外，由於心血管疾病發病率隨著年齡增長而增加⁶¹，而幹細胞的數量與功能卻會隨著年齡增長而下降^{23,62}，因此最常用於臨床試驗的自體骨髓來源的間葉幹細胞，可能無法達到最佳的效果。同樣地，從病患自體取得的骨髓幹細胞在功能上會受影響，而這也可能是造成人體實驗與動物研究結果具有差異性的原因²⁴。

這些研究結果，雖然發現間葉幹細胞在治療心血管疾病上是有效，但也顯示自體和成人的幹細胞可能不是最佳選擇。近年來，有越來越多的體外和活體實驗結果顯示早期發育組織來源的間葉幹細胞更具有心肌細胞分化的潛力，和修復心臟的能力⁶³⁻⁶⁶。這些研究顯示，如將早期發育組織來源的間葉幹細胞與啮齒動物的心肌細胞共培養時，可促進表達包括GATA4, Mef2c, α -心肌肌動蛋白(α -CA)和心肌肌鈣蛋白-T(cTnT)等心肌細胞相關基因。此外，體外功能實驗也證實當胎盤或臍帶間葉幹細胞進行心肌分化後，會產生自主性跳動及有心肌細胞特異性的電流生理模式^{63,66}。一項使用雞胚的研究也發現注射入的臍帶間葉幹細胞可進行遷徙並修復心臟損傷⁶⁷，而且也更優於成人骨髓間葉幹細胞的治療成效⁶⁶。在大型動物試驗、心肌梗塞的豬疾病模式中，我們的研究以及另外一個報告發現如果在心臟梗塞區域內及周圍，直接注射胎盤或臍帶間葉幹細胞，都可觀察到心臟功能的修復。最重要的是，在這兩項研究中，移植入的早期發育組織來源的間葉幹細胞都可長期在豬心臟中被觀察到並表達如連接蛋白43(Connexin 43)等心臟相關蛋白質^{65,66}。這種結果，所植入的間葉幹細胞可長期留在心臟內，可能只有利用早期發育組織來源的間葉幹細胞才常見的，而說明了是為何早期發育組織來源的間葉幹細胞在

大動物的實驗結果會比往來利用的成體間葉幹細胞的結果來的顯著及穩定⁶⁸。故在心肌應用方面，早期發育組織來源的間葉幹細胞看起來可能有特定的優勢。

六、總結

間葉幹細胞擁有多分化潛力及免疫調節功能但又不產生畸胎瘤，故這類幹細胞的臨床應用不限於再生醫學領域，也可應用至免疫及發炎疾病。成體來源的間葉幹細胞有可自體應用的優勢，但取得需做侵入性的行為，取得的細胞數也有限且如從病患取得可能功能性會受影響。早期發育組織來源的間葉幹細胞不但取得較為容易，細胞增生能力較強，免疫調節能力也可能比成體來源的間葉幹細胞更為顯著。而且，最近的研究顯示分化能力尤其是分化為骨骼肌及心肌，可能潛力也比成體來源的幹細胞更佳。因此，早期發育組織來源的間葉幹細胞在幹細胞治療方面非常具有潛力，可能是臨床應用最好之一的幹細胞來源。

七、參考文獻

1. Korbling, M. & Estrov, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* **349**, 570-582 (2003).
2. Chen, P.M., Yen, M.L., Liu, K.J., Sytwu, H.K. & Yen, B.L. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* **18**, 49 (2011).
3. Wang, L.T. *et al.* Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J Biomed Sci* **23**, 76 (2016).
4. Ho, P.J., Yen, M.L., Tang, B.C., Chen, C.T. & Yen, B.L. H₂O₂ accumulation mediates differentiation capacity alteration, but not proliferative decline, in senescent human fetal mesenchymal stem cells. *Antioxid Redox Signal* **18**, 1895-1905 (2013).
5. Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A. & Smirnov, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* **21**, 105-110 (2003).
6. Wang, H.S. *et al.* Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **22**, 1330-1337 (2004).
7. Tsai, M.S., Lee, J.L., Chang, Y.J. & Hwang, S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* **19**, 1450-1456 (2004).
8. Fukuchi, Y. *et al.* Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* **22**, 649-658 (2004).
9. Yen, B.L. *et al.* Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* **23**, 3-9 (2005).

10. Guillot, P.V., Gotherstrom, C., Chan, J., Kurata, H. & Fisk, N.M. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells* **25**, 646-654 (2007).
11. Serakinci, N. *et al.* Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* **23**, 5095-5098 (2004).
12. Rubio, D. *et al.* Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* **65**, 3035-3039 (2005).
13. Georgiades, P., Ferguson-Smith, A.C. & Burton, G.J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* **23**, 3-19 (2002).
14. Erices, A., Conget, P. & Minguell, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* **109**, 235-242 (2000).
15. Lee, O.K. *et al.* Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**, 1669-1675 (2004).
16. Barberi, T., Willis, L.M., Socci, N.D. & Studer, L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* **2**, e161 (2005).
17. Yen, M.L. *et al.* Efficient Derivation & Concise Gene Expression Profiling of Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Progenitors (EMPs). *Cell Transplant* **20**, 1529-1545 (2011).
18. Thomson, J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).
19. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
20. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872 (2007).
21. Campagnoli, C. *et al.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* **98**, 2396-2402 (2001).
22. Yen, B.L. *et al.* Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors possess strong immunosuppressive effects toward natural killer cells as well as T lymphocytes. *Stem Cells* **27**, 451-456 (2009).
23. Rao, M.S. & Mattson, M.P. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* **122**, 713-734 (2001).
24. Wang, X. *et al.* Donor myocardial infarction impairs the therapeutic potential of bone marrow cells by an interleukin-1-mediated inflammatory response. *Sci Transl Med* **3**, 100ra190 (2011).
25. Barker, J.N. & Wagner, J.E. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev Oncol Hematol* **48**, 35-43 (2003).
26. Chang, C.J. *et al.* Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. *Stem Cells* **24**, 2466-2477 (2006).

27. Gotherstrom, C. *et al.* Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol* **190**, 239-245 (2004).
28. Drukker, M. *et al.* Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9864-9869 (2002).
29. Drukker, M. *et al.* Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells* **24**, 221-229 (2006).
30. Meisel, R. *et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103**, 4619-4621 (2004).
31. Munn, D.H. *et al.* Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* **281**, 1191-1193 (1998).
32. Maccario, R. *et al.* Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* **90**, 516-525 (2005).
33. Aggarwal, S. & Pittenger, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815-1822 (2005).
34. Li, L. *et al.* Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells* **22**, 448-456 (2004).
35. Moffett, A. & Loke, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* **6**, 584-594 (2006).
36. Ljunggren, H.G. & Karre, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* **11**, 237-244 (1990).
37. Moffett-King, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* **2**, 656-663 (2002).
38. Yen, B.L. *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells mediate the expansion of myeloid-derived suppressor cells through the HGF/c-met axis and STAT3. *Stem Cell Reports* **1**, 139-151 (2013).
39. Chen, P.M. *et al.* Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. *J Leukoc Biol* **96**, 295-303 (2014).
40. Le Blanc, K. *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363**, 1439-1441 (2004).
41. Le Blanc, K. *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* **371**, 1579-1586 (2008).
42. Burlacu, A. *et al.* Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Eur J Cell Biol* **87**, 173-184 (2008).
43. Dezawa, M. *et al.* Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* **309**, 314-317 (2005).
44. Gunetti, M. *et al.* Myogenic potential of whole bone marrow mesenchymal stem cells in vitro

- and in vivo for usage in urinary incontinence. *PLoS One* **7**, e45538 (2012).
45. Lee, J.H., Kosinski, P.A. & Kemp, D.M. Contribution of human bone marrow stem cells to individual skeletal myotubes followed by myogenic gene activation. *Exp Cell Res* **307**, 174-182 (2005).
 46. Wakitani, S., Saito, T. & Caplan, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **18**, 1417-1426 (1995).
 47. Delorme, B. *et al.* Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells* **27**, 1142-1151 (2009).
 48. Gang, E.J. *et al.* Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. *Exp Cell Res* **315**, 2624-2636 (2009).
 49. Ting, C.H., Ho, P.J. & Yen, B.L. Age-related decreases of serum-response factor levels in human mesenchymal stem cells are involved in skeletal muscle differentiation and engraftment capacity. *Stem Cells Dev* **23**, 1206-1216 (2014).
 50. Conconi, M.T. *et al.* CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med* **18**, 1089-1096 (2006).
 51. Kocafe, C., Balci, D., Hayta, B.B. & Can, A. Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem cells for myogenic differentiation and muscle repair. *Stem Cell Rev* **6**, 512-522 (2010).
 52. Seale, P. *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961-967 (2008).
 53. Yin, H. *et al.* MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16. *Cell Metab* **17**, 210-224 (2013).
 54. Rosen, E.D. *et al.* PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* **4**, 611-617 (1999).
 55. Cypess, A.M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* **360**, 1509-1517 (2009).
 56. Lahoute, C. *et al.* Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS One* **3**, e3910 (2008).
 57. Sakuma, K., Akiho, M., Nakashima, H., Akima, H. & Yasuhara, M. Age-related reductions in expression of serum response factor and myocardin-related transcription factor A in mouse skeletal muscles. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 453-461 (2008).
 58. Bergmann, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98-102 (2009).
 59. Segers, V.F. & Lee, R.T. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* **451**, 937-942 (2008).
 60. Rosenzweig, A. Cardiac cell therapy--mixed results from mixed cells. *N Engl J Med* **355**, 1274-1277 (2006).
 61. Christoffersen, M. *et al.* Visible age-related signs and risk of ischemic heart disease in the

- general population: a prospective cohort study. *Circulation* **129**, 990-998 (2014).
62. Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C. & Kassem, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* **33**, 919-926 (2003).
 63. Okamoto, K. *et al.* 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res* **313**, 2550-2562 (2007).
 64. Yannarelli, G. *et al.* Human umbilical cord perivascular cells exhibit enhanced cardiomyocyte reprogramming and cardiac function after experimental acute myocardial infarction. *Cell Transplant* **22**, 1651-1666 (2013).
 65. Zhang, W. *et al.* Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* **24**, 549-558 (2013).
 66. Nishiyama, N. *et al.* The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* **25**, 2017-2024 (2007).
 67. Torre-Perez, N. *et al.* Migration and differentiation of human umbilical cord stem cells after heart injury in chicken embryos. *Stem Cells Dev* **18**, 27-36 (2009).
 68. Liu, Y.H. *et al.* Human Placenta-Derived Multipotent Cells (hPDMCs) Modulate Cardiac Injury: From Bench to Small & Large Animal Myocardial Ischemia Studies. *Cell Transplant* **24**, 2463-2478 (2015).

第三章

微環境與幹細胞轉譯醫學

Niche and Stem Cell Translational Medicine

郭勇哲^{1,2} 吳友志² 吳玟欣¹ 賴思全^{1,3} 彭學薇^{1,3} 蘇鈺婷¹ 黃彥華^{1,2,3,4}

¹ 臺北醫學大學醫學院醫學系生物化學暨細胞分子生物學科

² 臺北醫學大學細胞治療與再生醫學研究中心

³ 臺北醫學大學醫學院醫學科學研究所

⁴ 臺北醫學大學細胞治療與再生醫學國際博士學位學程

一、前言

幹細胞(stem cell)是一群少量存在於生物體中的特異性細胞，於 1961 年由 James Till 和 Ernest McCulloch 在研究小鼠骨髓對輻射敏感性時意外發現¹，此群細胞具有兩種特殊且重要的能力：(1)可透過不對稱分裂(asymmetric division)產生出一個與原來母細胞具有相同能力與特徵之細胞，稱為自我更新(self-renewal)；(2)具有自我分化(differentiation)的能力。此群細胞在生物體從受精卵到成體的整個發育的過程中扮演著重要的角色。在一定的條件之下，它可以分化成各種功能的細胞，從而將這群細胞正名為幹細胞²。由幹細胞分化出來的細胞稱為子代細胞(daughter cell)或前驅細胞(progenitor cell)，隨著分化代數的增加，而逐漸失去幹細胞的能力，並持續分化成為有特定功能的成熟細胞。在過去幾十年來，人類對於幹細胞的研究，主要都集中在幹細胞本身，以及體細胞重新編程(reprogramming)成幹細胞，這些研究驅動著幹細胞學的快速進展。然而近年來，許多研究發現，基質細胞(stromal cells)、細胞外基質(extracellular matrix, ECM)與缺氧壓力(hypoxia)，對幹細胞間有許多的相互作用，並與幹細胞能力的維持及生理作用有很大的關聯性，這些幹細胞以外的物質統稱為微環境(niche)。微環境對於幹細胞的特性維持以及修復扮演很重要的角色，同時也在不同的組織中具有不同的性質。在大部分的正常情況下，微環境可以保護幹細胞不要過度的增殖，而維持其幹細胞特性，使其細胞週期緩慢甚至是處在細胞休眠期(G0 phase)的靜止狀態，而當細胞受到特定刺激時則會重新啟動進入細胞週期以進行分化。而這些刺激主要是來自於與微環境之間的交互作用，生長因子、細胞激素、氧氣濃度等都會影響到幹細胞的分化的趨向³，因此臨床應用也同樣要考量到微環境與幹細胞之間的關聯性。

二、幹細胞分類

1. 以分化能力區分

- (1) 全能性幹細胞(totipotent stem cell)：具有可以分化為一整個完整生物體的能力的幹細胞，為受精卵到桑葚胚期間的任一細胞⁴。
- (2) 多潛能性幹細胞(pluripotent stem cell)：所具有的分化能力次於全能性幹細胞，不具有完全的分化能力，例如：胚胎幹細胞、原始生殖細胞(primordial germ cell, PGC)及誘導型多潛能幹細胞。
- (3) 多效性幹細胞(multipotent stem cell)：是由多潛能性幹細胞所分化而來，分化能力次於多潛能性幹細胞，如：造血幹細胞(可產生出紅血球、白血球和血小板)、骨髓間葉幹細胞以及脂肪間葉幹細胞等。
- (4) 單能性幹細胞(unipotent stem cell)：這群細胞是幹細胞中所具有的分化潛能最低階的幹細胞，具有自我更新的能力，但只能分裂產生跟自己同樣的幹細胞，如：肌肉幹細胞只能分化為肌肉細胞。

2. 以幹細胞種類區分

- (1) 胚胎幹細胞(Embryonic stem cell, ES cell)：由胚胎的囊胚中取出內細胞團塊(inner cells mass)，加以分離培養，並可以在體外具有分化為三胚層(3 embryonic germ layers)的能力，意即可分化為外胚層、中胚層以及內胚層的所有細胞，並且表現 OCT4、NANOG 這些與幹細胞生長發育密切相關的轉錄蛋白⁵。OCT4 與 NANOG 的表現可確認幹細胞為未分化狀態及具自我更新能力之指標。
- (2) 胚胎生殖細胞(Embryonic germ cell, EG cell)：由胚胎的生殖脊(genital ridges)中取出原始生殖細胞(primordial germ cell, PGC)，加以分離培養而得之多潛能性幹細胞⁶。原始生殖細胞為生殖系細胞的來源，並表現 OCT4、NANOG 及 SSEA-1 等指標基因。此細胞可經由自我更新來維持生殖幹細胞之數量，並進行分化作用產生精子及卵子。
- (3) 成體幹細胞(Adult stem cell)：在胎兒或是成人的成體組織中所發現的幹細胞，又稱為組織特異性幹細胞(tissue-specific stem cell)。成年動物的組織器官，如上皮或造血系統具有修復以及再生的能力即與成人幹細胞有很大的關係。另外，根據技術而言，即使來自胎兒組織或臍帶血的幹細胞也被歸類為成體幹細胞。當組織受到外傷、老化、疾病損害時，成體幹細胞就會增殖分化，產生新的細胞來取代它們，保持有機體的穩定平衡。

特定類型的成體幹細胞僅產生特定組織，比如造血幹細胞(hematopoietic stem cell, HSC)、間葉幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)、神經幹細胞(neural stem cell)、成骨幹細胞(osteogenic stem cell)等，由於其數量很少，且與組織中其他細胞無明顯差異，但成體幹細胞的可塑性(plasticity)則是非常具潛力的⁷。

- (4) 誘導型多潛能幹細胞(Induced pluripotent stem cell, iPSC)：在體細胞中導入特定的基因(Yamanaka 因子：*OCT4*、*SOX2*、*cMYC*、*KLF4*)，來使已經分化的體細胞重新編程，而逆分化(de-differentiation)成具有幹細胞的特性⁸。
- (5) 癌症幹細胞(Cancer stem cell, CSC)：近年認為造成癌症的復發、轉移與抗藥性的原因，是因腫瘤當中有一小群癌幹細胞的存在。癌幹細胞目前認為有幾個來源，包含：1.成體幹細胞突變；2.幹細胞微環境變異；3.曾經歷突變的已分化細胞再進行逆分化作用(de-differentiation)；4.癌細胞與幹細胞的細胞融合作用。

三、多潛能性幹細胞(Pluripotent stem cells)

1. 胚胎幹細胞(Embryonic stem cell, ESC)

胚胎幹細胞取自早期胚胎組織(囊胚期或未著床之前)的內細胞團塊，胚胎多數皆來自精卵體外受精技術(in vitro fertilization)後所得之，並非取自母體內的胚胎。體外培養之胚胎幹細胞需培養數個月才能確保此群細胞具有長期生長及自我更新之能力。胚胎幹細胞在體外培養時呈球狀體(sphere)，亦稱為細胞聚落(colony)。胚胎幹細胞受到微環境的刺激後，改變細胞命運並同時進行不對稱分裂，此改變與表觀遺傳學(epigenetics)密切相關，依靠組織蛋白及 DNA 的化學修飾(去/甲基化、去/乙醯基化)，以進行各種細胞型態之分化。已知胚胎幹細胞可分化成滋養層細胞以及外胚層、中胚層與內胚層等組織，科學家目前也已建立人類胚胎幹細胞株(human embryonic stem cell line)以供研究使用⁵。體外培養幹細胞之技術創始期是利用單層生長之胚胎纖維母細胞(monolayer embryonic fibroblast)當作餵養層(feeder cells)，並添加白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)至培養皿中，此種特定的微環境可使幹細胞在體外穩定生長。體外培養技術的進步使得培養皿微環境變得更人工化，不再需要細胞餵養層，只需要預先在培養皿披覆一層視實驗需求的不同種類重組蛋白，並添加特定因子，即可使幹細胞在無血清培養情況下穩定生長⁹⁻¹¹。這項技術性突破使得體外培養之幹細胞不再遭受來自齧齒類動物纖維母細胞的蛋白巨分子及病毒影響之風險。

2. 胚胎生殖細胞(Embryonic germ cell, EGC)

原始生殖細胞(Primordial germ cell, PGC)源起於胚質(germ plasm)，為早期胚胎一特定的微環境。大約 40 顆原始生殖細胞聚集在早期胚胎尿膜(allantois)底部與原條(primitive streak)後側處，並在一缺氧及含有驅化物濃度梯度的微環境下同步進行細胞對稱性增生(symmetric self-renewal proliferation)與細胞遷徙。隨著胚胎發育，原始生殖細胞從原條後側沿著後腸(hindgut)一路爬行至生殖脊，再發育成生殖系幹

細胞(germline stem cell, GSC)，隨後再依性別形成精原幹細胞(spermatogonia stem cell, SSC)及卵原細胞(oogonia)⁶。由生殖脊中取出原始生殖細胞，在體外加以分離培養而得之多潛能性幹細胞即為胚胎生殖細胞⁶。

研究指出，形成擬胚體(embryoid body, EB)的胚胎生殖細胞可以在體外特定條件下，分化成有搏動能力的心肌細胞、具神經玫瑰環(neural rosettes)形狀的神經細胞。另外，將基因改造後帶螢光的胚胎生殖細胞轉殖入囊胚期(blastocytes)的胚胎內並植入假孕母鼠體內，以產生螢光嵌合鼠(chimeras)。分析嵌合鼠身體組織發現多種功能正常的器官，包括腎臟、心臟、小腸、大腦及附睪等皆可發現帶螢光之細胞。因此也確信多能性胚胎生殖細胞具有分化成三種胚層的能力¹²。

在正常的雄性個體發育過程中，生殖系幹細胞可發揮細胞更新(renewal)與分化之間的平衡作用，但僅能分化成單一細胞種類，即精子。然而近來的突破性研究顯示，從初生鼠(0-2 天齡)睪丸組織內所取得的生殖系幹細胞能在充滿明膠(gelatin)的微環境中，在體外培養成類胚胎幹細胞(ES-like cells)，在基因印記圖譜(genomic imprinting pattern)上顯示出此種類胚胎幹細胞相似於胚胎幹細胞與胚胎生殖細胞¹⁰。另一研究也指出從成年個體的睪丸組織內所取得的生殖系幹細胞也能在體外培養成具有多能性，並會自發性地分化成內胚層、中胚層與外胚層，也具有種系傳遞(germline transmission)能力之類胚胎幹細胞¹³。這種細胞可塑性(plasticity)使胚胎幹細胞或胚胎生殖細胞不再需要從胚胎上提取，可轉而從成體睪丸組織取得即可，這消除了很巨大的倫理議題，並提升其在生物科技及臨床再生醫學的應用潛力。

3. 誘導型多潛能幹細胞(Induced pluripotent stem cell, iPSC)

2006 年山中伸彌(Shinya Yamanaka)團隊藉由反轉錄病毒(retrovirus)將四個關鍵轉錄因子 *OCT4*、*SOX2*、*cMyc* 與 *KLF4*(亦稱為 Yamanaka 因子)導入小鼠已經分化的皮膚纖維母細胞後，即可使體細胞基因組重新編程，進而逆分化形成具有多潛能性幹細胞的特性，稱為誘導型多潛能幹細胞(iPSC)。同時確認 iPSC 可在裸鼠皮下長成具有三胚層之畸胎瘤，也能移植回到囊胚體中參與胚胎發育，形成嵌合鼠(chimeras)⁸。2007 年詹姆士·湯姆森(James A. Thomson)團隊藉由慢病毒(lentivirus)將四個關鍵因子 *OCT4*、*SOX2*、*NANOG* 與 *LIN28* 導入人類已經分化的細胞後也同樣製出 iPSC¹⁴。雖然 iPSC 已成為事實，但由於體細胞基因組重新編程效率不高(0.01%-0.1%)，所以從 2007 年後就有多組研究團隊應用不同的因子以設法提高基因組重新編程效率以及 iPSC 安全性。利用病患自體之細胞所形成之 iPSC 細胞，除了應用於再生醫學之外，亦可進一步用於個人化精準醫療。由於 iPSC 由病患自體得來，因此可獲得具有個別性與專一性之細胞材料，成為藥物篩選的最佳平台。另外，將其做特定細胞誘導分化後，可以建構不同之疾病模型，成為研究致病機制與新藥開發之細胞來源。目前最新的進展是合併 iPSC 與 CRISPR/Cas9 基因編輯技術，Sara E. Howden 博士可在 2 周內即得到獲得基因修復的 iPSC¹⁵，這對個人化細胞治療的進展又推升了一大步。由於 iPSC 在臨床應用上有著極大潛力，Shinya Yamanaka

教授因為誘導型多潛能幹細胞研究與 John B. Gurdon 教授共同獲頒 2012 年諾貝爾生理及醫學獎。

4. 多能幹細胞之應用限制

隨著科技的進步，多能幹細胞的分離及體外培養技術的精進，使科學家可以在實驗室製造出某些需要的人體細胞、器官或是組織，並成為細胞替代療法(cell replacement therapies, CRT)，為人體疾病的治療開闢新的路徑；然而牽涉到人體胚胎的應用，所引發的法理、宗教與倫理道德方面的問題將會是相當敏感且具有爭議的。然而，現在的胚胎幹細胞不是病患自身的，若用於幹細胞治療時，是無法躲開免疫系統之攻擊與排斥作用。雖然誘導型多潛能幹細胞(iPSC)之自體移植可有效迴避排斥作用與倫理等議題，可是 iPSC 轉化效率需再提升。最終由於 ESC、EG 與 iPSC 屬性為多潛能性幹細胞，目前並無絕對把握可控制其不走向腫瘤之發展，這對於患者來說無疑是一大風險。為解決這樣的問題，科學家們不斷的尋找及開發更新的技術，試圖來尋找能夠替代亦能解決疾病的細胞療法，成體幹細胞則成了另一個希望。

四、成體幹細胞(Adult stem cell)

1. 間葉幹細胞(Mesenchymal stem cell, MSC)

間葉幹細胞是成體幹細胞之一，屬於非造血性的基質細胞(stromal cells)且具有分化、以及再生(regeneration)的能力，而最早の間葉幹細胞是由骨髓中所分離而來¹⁶，而目前在許多的組織中都有發現間葉幹細胞的存在，如軟骨組織、脂肪組織、牙髓、肌肉、韌帶、肺組織、臍帶血、周邊血液等¹⁷，雖然在這些組織中間葉幹細胞所占有的比例是相當低的，但可以藉由在體外(*in vitro*)培養的方式來大幅的增加間葉幹細胞的數量，同時在體外培養同樣能具有分化各種組織、細胞的能力。由於沒有如胚胎幹細胞有倫理上的問題，而成為近年來研究的焦點之一。

間葉幹細胞缺少主要組織相容性複合體II(major histocompatibility complex class II, MHC class II)，這種只存在於抗原呈現細胞(antigen-presenting cells, APCs)表面上的蛋白，因降低了抗原的呈現，進而避免刺激免疫細胞的活化，故間葉幹細胞具有某種程度的免疫抑制(immunosuppression)能力¹⁸。基於以上間葉幹細胞所具有的特性，而被科學家認為這是組織工程(tissue engineering)中再生醫學的最佳候選者。根據文獻指出，在移植的手術中，因間葉幹細胞具有遷徙(migratory)能力可自行移動到傷口，並且具有免疫抑制能力，在進行細胞治療移植時可大幅降低因移植物抗宿主疾病(graft-versus-host disease, GvHD)之發生¹⁸。GvHD 是骨髓移植後新植入之細胞攻擊宿主時可能出現的致命併發症，包括脫髮、皮疹、肺炎、腹痛、肝炎、黃疸、消化道紊亂和嘔吐等。目前間葉幹細胞的相關研究以骨髓間葉幹細胞以及脂肪間葉幹細胞的相關應用為最大宗；而目前間葉幹細胞的臨床試驗到 2017 年為止已經

高達了 638 件：主要用以治療移植物抗宿主疾病、全身性紅斑狼瘡(systemic lupus erythematosus)、類風溼性關節炎(rheumatoid arthritis)、自體免疫性腦脊髓炎(autoimmune encephalomyelitis)等疾病的治療¹⁹⁻²¹。

(1) 骨髓間葉幹細胞(Bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BMSC)

在 1939 年，在治療再生不良性貧血的病人時，嘗試將健康的骨髓輸到患者體內，雖然失敗但卻成為發展骨髓移殖的開端。1953 年在動物實驗上進行骨髓移植手術，手術後證實經由異體移植的小鼠骨髓，可以有效的重新恢復被輻射線所傷害的小鼠骨髓，重新具有造血的功能，因而發現骨髓中不只含有骨髓間葉幹細胞也含有豐富的造血幹細胞，而開啟了一系列的相關研究^{17,22}。然而，此技術應用到人體骨髓移殖手術的嘗試都失敗了。後期則因為免疫學的發展，了解具有相同的白血球抗原(human leukocyte antigen, HLA)才不會產生排斥作用，同時合併消炎藥的使用以及一些支持療法的開發可提升骨髓移殖成功率，因此骨髓移植是當時大家公認為治療血液惡性腫瘤及再生不良性貧血最好的方法，例如多發性骨髓瘤、淋巴瘤、重型地中海貧血、白血病等的病患。1990 年 Thomas 博士(Dr. E. Donnall Thomas)以骨髓移殖的成就與美國 Murry 博士(Dr. Joseph E. Murray)共同獲得諾貝爾生理及醫學獎。

間葉幹細胞最早是在骨髓中所發現，然而，骨髓中所含有間葉幹細胞的比例是相當低的，在骨髓中約 10000 個有核細胞才有 1 個骨髓間葉幹細胞¹⁷。骨髓移植開啟了第一例的幹細胞治療，然而骨髓移植後常伴隨有移植物抗宿主疾病的發生²³，因此，近年來的研究多致力於骨髓間葉幹細胞與周遭微環境的交互作用，骨髓幹細胞可以分泌出一些細胞激素，例如白細胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、細胞激素-11、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)以及顆粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)，而形成細胞所需要的特殊的環境，進而吸引巨噬細胞等免疫細胞的遷移，而產生後續免疫反應的活化²⁴。由 2004 年的文獻指出，即使骨髓間葉幹細胞來自同一捐贈者，當在培養在不同環境下時，會表現出不同的基因圖譜(gene profile)。於 2012 年，市面上第一款間葉幹細胞之藥物-Prochymal 已被核准用於幹細胞治療，此款間葉幹細胞藥物是萃取自成人之骨髓間葉幹細胞，目前用以治療那些對激素類藥物無反應的 GvHD 兒童患者以及 Crohn's disease，由於間葉幹細胞之藥物優點為可以一藥物治療多種不同之疾病，因此，Prochymal 也被利用於治療肺部慢性阻塞所導致之疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、急性心肌梗塞以及第一型糖尿病，並已進展到臨床試驗第二階段。另外，骨髓間葉幹細胞目前的臨床試驗方向為治療癌症、肢體長度異常(limb length discrepancies)[NCT01210950]、膝關節軟骨損傷(articular cartilage defects)和骨關節炎(osteoarthritis)[NCT00850187]、類風溼性關節炎[NCT01873625]、髖關節炎(osteoarthritis of the Hip)[NCT0

01499056]、肌萎縮性側脊髓索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)等的相關臨床試驗研究。

(2) 脂肪間葉幹細胞(Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, ADMSC)

脂肪間葉幹細胞也是成體幹細胞的來源之一，考量到骨髓間葉幹細胞的分化能力會隨著細胞代數的增加而降低²⁵，以及脂肪在人體中佔有的比例極高，而認為這是一個較為可行的方式，由脂肪抽出物所分離萃取出來的細胞(ADMSCs)已經被證實為與骨髓幹細胞具有高度的相似性，而在所有的骨髓細胞中骨髓幹細胞的含量只有 0.0001%–0.01%²⁵，但在脂肪組織中每公克可以萃取出含有約 $10^5\sim 10^6$ 個幹細胞，且脂肪幹細胞的分化能力較不易受到捐贈者的年齡所影響，在近年的前臨床動物實驗研究中指出 2.5×10^8 的脂肪間葉幹細胞，無法於免疫缺陷小鼠產生腫瘤，於臨床試驗上，經由靜脈注射的方式，移植自體 4×10^8 個脂肪間葉幹細胞，進入 8 位脊椎受損的男性，經過 3 個月的密切追蹤後，發現沒有不適的情形發生，且因移植物抗宿主疾病較不易產生，因此，脂肪間葉幹細胞可以當作一個替代骨髓移植的細胞治療方式²⁶。並且已有文獻指出脂肪間葉幹細胞用以治療克隆氏症(Crohn's disease)部分臨床試驗以順利進展至第 2 階段，而目前其他同時進行之臨床試驗也包括：治療血栓閉塞性脈管炎(Buerger's disease)[NCT01302015]、類風溼性關節炎、退化性關節炎(degenerative arthritis)、膝部骨關節炎(knee osteoarthritis)、嚴重性肢體缺血(critical limb ischemia)、朗堡氏病(Romberg's disease)等疾病的治療。

(3) 胎盤間葉幹細胞(Placenta-derived mesenchymal stem cell, pcMSC)

近年來在胎盤組織和臍帶血、牙齒等醫療廢棄物中發現有間葉幹細胞的存在，這種不需要利用侵入性就可以取得間葉幹細胞的方式，相較於傳統取得間葉幹細胞的方法(抽骨髓以及抽脂)，在操作上相對就顯得簡單了許多。生產後會產生許多的醫療廢棄物，根據文獻指出最早是在臍帶血、羊水等發現間葉幹細胞的存在，由於臍帶血所含有的間葉幹細胞數量極低，而使得間葉幹細胞的萃取開始往羊水、胎盤的方向研究²⁷，胎盤間葉幹細胞的來源可以分別來自胎盤中的羊膜(amniotic membrane)、絨毛膜蛻膜(choriodecidual membrane)，亦或是將整個胎盤組織均質化後而得到²⁸。間葉幹細胞雖具有一定程度免疫抑制能力，但許多的病患在經過骨髓移植後，還是會產生移植物抗宿主疾病。因此，找到具有更強大的免疫抑制能力或甚至是具有免疫調控能力(immune regulation)的幹細胞，就成為幹細胞治療的一個重要的關鍵。胎盤是存在於母體內的外來物質，部分屬於母親，部分屬於胎兒，卻不會被母體的免疫系統攻擊排斥，因其同時具有免疫調控、免疫抑制以及免疫耐受性(immune tolerance)的功能²⁹，然而目前對其如何達到免疫抑制以及調控的機轉仍未知，有幾種推論為：(1) 在胎兒與母親間有些物理性的分隔；(2) 胎兒的抗原發育尚未成熟，

而不會被母體的免疫系統偵測到；(3) 在胎盤這裡母親的免疫系統具有免疫耐受性；而目前的研究大多支持第3點，如 Munn DH.所提出在囊胚的滋養層母細胞(trophoblast)會表現像是色胺酸的相關代謝酵素(tryptophan catabolizing enzyme, indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)，而導致色胺酸的含量降低，並抑制 T 細胞的增生，而達到保護胎兒避免被母親的 T 細胞所攻擊³⁰。另外，也有研究發現，由胎盤所分泌的人類白血球抗原-G(human leukocyte antigen G, HLA-G)，可以有效的誘導 CD8 陽性的 T 細胞(CD8⁺ T cells)走向細胞凋亡(apoptosis)的途徑，以及抑制 CD4 陽性的 T 細胞(CD4⁺ T cells)和自然殺手細胞(natural killer cells)增生。同時，滋養層母細胞也會表現 Fas 配體(Fas ligand)(CD95L, 細胞凋亡時所表現)，而使得母體內表現 CD95 的淋巴細胞(lymphocytes)因結合上該 CD95L, 而走向細胞凋亡³¹。因此，雖然目前對如何達到免疫抑制的說法眾說紛紜，但可以確信的是，由胎盤所衍生而來的間葉幹細胞會具有較佳的免疫抑制能力²⁹。目前，胎盤間葉幹細胞的研究主要是著重在免疫調控的相關研究、探討細胞的幾個重要幹細胞表現因子，例如 OCT4 等幾個 Yamanaka 因子的表現量分析³²、分化為其他細胞能力，以及功能性的測試，例如心肌細胞及肝細胞等的的能力，以供後續利用³³。此外，臨床試驗的部分有骨髓異常增生症、肺纖維化的治療、僵直性脊椎炎、嚴重性貧血、第二型糖尿病和增加子宮內膜異位症患者的胚胎著床率。

(4) 間葉幹細胞之臨床安全性

腫瘤的生長與其所處的微環境息息相關，不同於正常情況下之微環境，腫瘤微環境包含了被改變的胞外基質、未轉化的細胞(纖維母細胞、肌上皮細胞等)以及間葉幹細胞。因此間葉幹細胞對腫瘤細胞的互動及影響在近幾年被廣泛地探討。在小鼠實驗中，脂肪間葉幹細胞會誘導血管新生並促進攝護腺癌生長³⁴。而骨髓間葉幹細胞會分泌 IL6 以促進大腸癌細胞的生長並增加癌症起始細胞(TIC)的數量³⁵，也會促進乳癌細胞的轉移³⁶。但亦有研究指出骨髓間葉幹細胞會抑制體內神經膠細胞瘤(glioma)的生長³⁷。另外，胎盤間葉幹細胞對腫瘤細胞有抑制生長之效果(專利號：US7993918 B2)。綜合以上，目前對於間葉幹細胞之臨床安全性仍有正反之議論，不同來源之間葉幹細胞作用於不同的腫瘤細胞均會導致相異(促進或抑制腫瘤生長)之結果，此部分仍待更多的研究以歸納出如何更精確更安全地使用間葉幹細胞來替癌症病患做細胞替代性療法(CRT)。

2. 周邊血液幹細胞(Peripheral blood stem cell, PBSC)

先前臨床研究指出某些病人做完化學治療後，骨髓內已達到完全沒有細胞的程度，但細胞重新生長以後，周邊血流中存在少量“多能性”循環細胞，這些細胞經檢查後不是原本的血液性疾病的 DNA，這樣的實驗證實了循環幹細胞能夠在清髓性

治療後重建整個淋巴造血系統，造血幹細胞在人體的骨髓空間中再生和能保持相同的細胞濃度的能力歸因於它們的穩定的功能，建立了血液幹細胞移殖的基本概念。在 1988 年，周邊血液幹細胞已用來治療急性骨髓性白血病病患，這便是自體周邊血液幹細胞移殖。後續的臨床研究是將化學治療後的病患，注射白血球生長激素以刺激骨髓，而能夠在周邊血流中收集到更多幹細胞，便可以做自體周邊血液幹細胞移殖之用。自體周邊血液幹細胞移殖會使病人的造血系統恢復得比傳統的骨髓移殖快，並降低輸血頻率。此外，周邊血液幹細胞從人體的取得也比較安全，所以臨床上開始以周邊血液幹細胞移殖來取代傳統骨髓移殖。

(1) 微小血液幹細胞(Small blood stem cel, SB)

微小血液幹細胞是從周邊血及骨髓所分離出來的微小幹細胞，細胞直徑介於 2–5 μm ，細胞表面之篩選標記為 LGR5⁺、CD61⁻及 LIN⁻(不表現 CD34、CD105 與 CD117 等細胞表面蛋白)。研究指出微小血液幹細胞表現 OCT4 及 NANOG 等多能性蛋白。可在體內與體外實驗模式中分化成為神經細胞(外胚層)，肝細胞(內胚層)以及骨骼肌肉細胞(中胚層)³⁸。

(2) 卵裂球樣幹細胞(Blastomere-like stem cell, BLSC)

卵裂球樣幹細胞首次發現於非胚胎期的骨骼肌組織及周邊血中，細胞直徑小於 5 μm 。細胞表面標記為 CD66e⁺(不表現 CD10、CD13、CD56、CD90、CD106、CD123、CD166、MHC Class-I 及 HLA DR-II 等細胞表面蛋白)。可在體外分化成三種胚層(germ layer)之幹細胞及生殖細胞³⁹。

(3) 極微小類胚胎幹細胞(Very small embryonic like stem cell, VSEL)

極微小類胚胎幹細胞首次發現於人類臍帶血以及老鼠骨髓中。人類 VSEL 細胞直徑介於 3–7 μm ，細胞表面標記為 CD133⁺、CXCR4⁺、CD45⁻及 LIN⁻，並表現 SSEA-4、OCT4、NANOG 及 REX-1。具有高度爬行能力，可在體外分化成三種胚層(germ layer)之幹細胞⁴⁰。但仍有研究對此細胞提出高度懷疑，研究結論指出極微小類胚胎幹細胞是否真的存在是有爭議的⁴¹。

綜合以上，科學家們致力於尋找各種可能的成體幹細胞來治療在過去所不易治療的疾病，但是具優質臨床潛力的幹細胞必須盡量滿足以下條件：(1) 容易取得；(2) 有好的生物標記可供篩選；(3) 容易純化；(4) 容易藉由培養得到大量的細胞；(5) 容易引發分化；(6) 沒有免疫反應；(7) 沒有倫理的問題；(8) 不會導致癌症的發生等，搜尋完全滿足這些條件的成體幹細胞，是相當耗時耗力的，通常單一種類之幹細胞只有符合上述少數幾項條件。

五、癌症幹細胞(Cancer stem cell, CSC)

根據世界衛生組織統計，2015 年度全球因癌症致死人數已達 880 萬人，且死亡人數仍有上升的趨勢。癌症公認是基因突變所引起，癌症發展過程中癌細胞需額外獲得六種功能，包含：1. 增強自我生長訊號；2. 對抑制生長訊號不敏感；3. 逃脫細胞凋亡機制；4. 細胞無限制的增生；5. 血管增生；6. 增強組織侵犯及轉移能力⁴²。傳統的癌症治療是以化學藥物治療、放射線治療與手術切除來達成殺死所有癌細胞的目標，但日後卻仍造成腫瘤復發。而復發後的癌細胞其對於化學藥物及放射線治療的耐受性上升，導致更難控制癌細胞擴展。1997 年 Dr. Bonnet 等人發現，血癌細胞中一小群 CD34⁺CD38⁻ 細胞可以在免疫缺陷的小鼠體內重新形成人類血癌，證明某些癌細胞可能有幹細胞特性⁴³。之後陸續可從其他腫瘤組織中分離出癌症幹細胞，或稱癌症起始細胞(tumor-initiating cell, TIC)。研究指出能夠抑制癌幹細胞的生長、減少癌幹細胞的數量甚至是破壞癌幹細胞所處的微環境，都能有效的減少腫瘤的發生和腫瘤大小、降低腫瘤轉移與復發情形，以及回復腫瘤對毒殺藥物的敏感性。

腫瘤微環境在腫瘤的生成、進展、侵犯、轉移皆扮演相當大的角色。腫瘤生長初期，人體當中的自體免疫細胞，將啟動前來抑制癌細胞的增生，例如纖維母細胞(fibroblasts)、自然殺手細胞(natural killer)、巨噬細胞(macrophage)以及 T 細胞(T cell) 等等；免疫細胞利用分泌細胞激素與抗原抗體呈現方式，造成癌細胞的細胞凋亡⁴⁴。此時，巨噬細胞轉化成腫瘤相關巨噬細胞(tumor associate-macrophage)，使腫瘤產生血管新生並對抗正常免疫力，同時讓腫瘤快速增生、惡化，由此可知腫瘤周邊的微環境與腫瘤發展有緊密關係⁴⁵。

六、肝癌幹細胞

肝癌幹細胞的形成方式可能為正常肝細胞遭受致癌因子的影響使其轉變而成；亦可能為致癌因子影響成熟肝細胞的重新編程(reprogramming)⁴⁶。其致癌因子其中可能為自體免疫細胞在受到病毒感染時所釋放的激素，進而誘導癌幹細胞產生，近幾年的研究亦證實，肝癌病患受到 B 型肝炎病毒感染造成早期復發與不良預後有高度正相關性⁴⁷。HepG2 為 HBV 病毒感染肝癌細胞株，其 HB 蛋白質的表現大幅增加多功能轉錄因子(pluripotency transcription factors)表現，如 OCT4、NANOG、SOX2 以及和幹細胞相關的標記因子 EpCAM、 β -CATENIN 等，由此可知肝臟若有 HBV 病毒的感染會使幹細胞的特性存在於癌細胞族群內⁴⁸。

肝癌難以治癒原因為癌細胞之抗藥性以及早期復發。文獻證實 IL-6 及 IGFIR 訊息路徑導致肝癌細胞表現多能幹細胞因子 OCT4，並增加癌幹細胞特性(cancer-stemness properties)與促使肝癌患者早期復發⁴⁹。人類的 OCT4 基因位於 6 號染色體上(6p21.31)，具有多個轉錄起始位點，可轉錄出不同的 mRNA 亞型，從而轉譯成多種蛋白質。OCT4 isoform 1 是轉錄的主要亞型之一，具有 5 個外顯子，4 個內含子，轉譯之蛋白具有 DNA

結合結構域—POU 結合區，它能與特定的 DNA 序列結合從而調控下游基因的轉錄。OCT4 為胚胎幹細胞的特異性基因，主要表達於胚胎和生殖細胞腫瘤中，如睪丸生殖細胞瘤、精原細胞瘤、胚胎性癌和胚胎癌細胞系中。但部分研究發現在非生殖系統之腫瘤細胞和組織，如胰腺癌細胞株、肝癌細胞株、子宮頸癌細胞株、人乳腺癌細胞株以及乳腺癌組織和膀胱癌組織中也檢測到了 OCT4 的表現^{50,51}，這些現象顯示癌細胞之幹細胞基因有再次啟動的情形，近期的研究也發現 B 型肝炎病毒導致 IL-6 大量累積於肝癌細胞，這與 OCT4 基因再次啟動有密不可分的關係⁴⁹。

表觀遺傳學(epigenetics)是在不涉及 DNA 序列改變下而影響基因的轉錄調節，既是可以被干擾和逆轉的遺傳或再程序化(reprogramming)。其調控機制可分兩大部分，以基因選擇性轉錄表達的調控，其包括 DNA 甲基化、組織蛋白修飾、基因體印記(genomic imprinting)以及染色質構形重塑(chromatin remodeling)等；另外一種則是基因轉錄後的調控，包括基因序列中非編碼 RNA(ncRNA)、反義 RNA(asRNA)、微小 RNA(miRNA)、內含子(intron)以及核糖開關(riboswitches)等。由此可知，表觀遺傳學主要影響真核生物中細胞分化的過程，其中，在胚胎形態形成的過程中，全能幹細胞將逐漸分化成完全不同且具有不同功能、不同類型的細胞，並透過抑制其他細胞和活化與其相關的基因而進行持續性的細胞分裂，由此可知其調控基因相當廣泛與重要，而在目前研究中已經發現當表觀遺傳修飾出現異常時會促使癌症的發生⁵²。

DNA 甲基化是表觀遺傳修飾的形式之一，主要維持生物正常生長與發育之調節基因功能，作用機轉為不改變 DNA 序列的情況下，透過 DNA 甲基化轉移酶(DNA methyltransferase, DNMT)，將甲基(-CH₃)以共價鍵結至胞嘧啶第 5 個碳原子結構上，稱為甲基化修飾，而在哺乳動物當中，DNA 甲基化通常發生在序列裡 CpG 聚集區域(cytosine-phosphate-guanine islands)，而在被甲基化修飾後的 DNA 區域將無法與轉錄因子結合，使基因表達沉默化(gene silencing)⁵³。

DNMT 家族當中有 4 種成員，分別 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 與 DNMT3L，其中 DNMT3A、DNMT3B 為“建立型”甲基化修飾，分別在胚胎時期作用，可將 DNA 雙股未甲基化之位置進行甲基化修飾，與胚胎之分化有相當重要的影響。DNMT1 未具有甲基作用結構區域，不能單獨進行甲基化修飾之功能，但具有催化 DNMT3A 與 DNMT3B 的甲基化進行之能力，而 DNMT1 則是“維持型”甲基化修飾⁵⁴。許多研究指出，腫瘤組織中會高度表現 DNMTs，例如結腸癌、前列腺癌、乳癌以及肝癌等等；結腸癌研究中得知病患組織具有 DNMT1 高度表現，利用動物實驗使用 DNMT 抑制劑後，明顯降低小鼠息肉現象⁵⁵。2009 年 Wang 等人，證實胰臟癌病患腫瘤組織具較高 DNMT1 表現量，其生存率亦較低⁵⁶。此外，Girault 等人在 2003 年提出乳癌研究中，病患腫瘤組織中有高度表現 DNMT3B。甚至在肝癌研究中亦發現，當 HBV 病毒感染時會促使 DNMT1 與 DNMT3A 高度表現，進而使甲基化修飾發生在腫瘤抑制基因中。以上研究可證明 DNMTs 的異常表現在癌症調控中具有關鍵性角色^{57,58}。

在腫瘤細胞中，常出現甲基化現象的異常，腫瘤細胞會出現全基因組範圍內的低度甲基化和某些特定基因的高度甲基化現象，而基於 DNMTs 作用的重要性，現在的研究

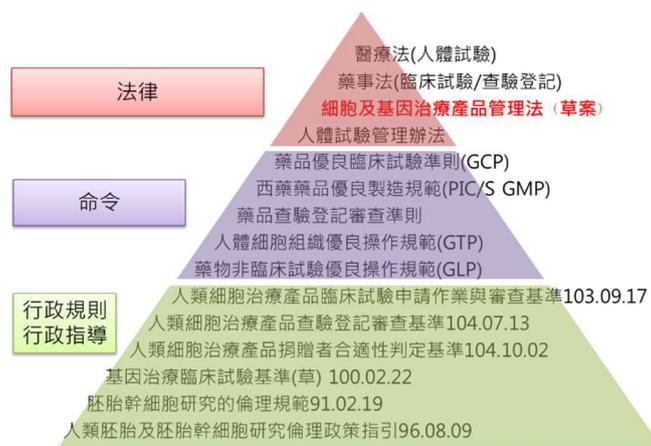
主要集中在藥物開發去針對 DNMTs 活性做干擾。各種有 DNA 去甲基化作用的化合物已被設計出來，並陸續進入臨床試驗，特別是作用於 DNMT 的抑制劑。DNMT 抑制劑對於治療基因啟動子區域有高度高甲基化的癌症有重要之意義。

七、臨床細胞治療產品與產業應用

針對各種難治性疾病、遺傳性疾病與癌症性疾病等嚴重影響生活品質的疾病，許多的研究機構及藥廠已如火如荼地鉅資開發臨床用藥物/化合物製劑，唯治標不治本的藥物並無法根除疾病本身，因此利用幹細胞治療作為重建或重新修補受損組織是未來醫療的趨勢之一。

臨床用細胞治療(cell therapy)產品之製造與品質管控是非常關鍵的步驟。當某一細胞產品之治療用途的基礎機轉研究與前臨床動物試驗皆已完備，再進入臨床使用前，人體臨床試驗是不可或缺的一環。為確保受試者的安全，臨床試驗皆須有嚴格之管控，目前國際間與國內法規大多將細胞治療所使用的細胞產品歸類為藥品管理，而非醫療技術。將細胞治療產品歸納為藥物管理則需於製造產品過程中符合一定之品質要求與規範。台灣現行藥事法規新藥上市需執行臨床試驗後，方能向主管機關申請藥品上市之查驗登記，獲准後方得販售。如前述所說，如果將細胞治療產品視為一藥品管理，當新藥需執行臨床試驗時，須依據現行藥事法與藥品優良臨床試驗準則(GCP)辦理，該試驗藥物之製造需符合「西藥藥品優良製造規範」(PIC/S GMP, PIC/S: guide to good manufacturing practice for medicinal products)。然而因細胞產品之獨特性，為此主管機關並不強制要求在臨床試驗初期階段就需設立 PIC/S GMP 工廠製造細胞產品，但細胞產品之製造過程仍符合「人體細胞組織優良操作規範」(good tissue practices, GTP)，並另行頒布了數個與細胞治療產品相關辦法與審查基準，包含了「人類細胞治療產品捐贈者合適性判定基準」、「人類細胞治療產品臨床試驗申請作業與審查基準」、「人類細胞治療產品查驗登記審查基準」等(圖一)。

GTP 規範是為預防因使用人體細胞組織物而導入、傳播及擴散傳染病，用以協助執行之機構確保其人體細胞組織物未含有傳染病病原，在製造過程中未受污染，且不致因製造不當而影響人體細胞組織物效用與完整性。目前台灣法規，無 GTP 實驗室的認證，而是採取依臨床試驗案逐案審查，確保細胞產品製造過程符合 GTP 規範，為此從細胞來源開始就需接受嚴格的管控，從捐贈者是否帶有傳染病與合適性判斷、組織檢體採集、檢體運送條件、實驗室內之無菌操作與細胞擴增培養、使用之試劑耗材、細胞產品之儲存條件與效期、細胞產品運送至醫療院所等皆需嚴格把關。



圖一、細胞治療相關法規。

當細胞產品依循著既定的製造流程被生產出來後，我們該如何去確保最終細胞產品是否符合當初設定的品質要求？這時候就需要一個允收標準(或放行測試)來確保細胞產品達到 GTP 規範的有效性與完整性。人類細胞治療產品之放行測試應包括但不限於：確保細胞治療產品安全性(safety)的微生物測試：包括無菌試驗、黴漿菌試驗等；確保產品特性的鑑別(identity)測試：例如細胞表面標誌分析等。純度(purity)：除了製造過程中無法避免的物質外，應不含其他的物質。包括熱原性/內毒素(pyrogenicity/endotoxin)及殘留污染物(residual contaminants)等；效價(potency)：測量產品生物性功能；細胞存活率(viability)：目前可被接受最低存活率 70%；細胞劑量(cell dose)等。當產品確保其符合預期之有效與安全後，方能使用於臨床試驗中。

八、結語

針對各種難治性疾病、遺傳性疾病與癌症性疾病等嚴重影響生活品質的疾病，許多的研究機構及藥廠已如火如荼地鉅資開發臨床用化合物製劑(小分子藥物)、蛋白質製劑(重組蛋白質、單株抗體)及細胞製劑(Prochymal)。但一些治標不治本的藥物並無法根除疾病本身，因此利用幹細胞治療作為重建或重新修補受損組織是未來醫療的大趨勢之一。另外，開發癌症幹細胞為標的之專一性標靶療法，也有潛力克服細胞抗藥性以增加治癒癌症的機會。在治療策略上，合併新穎免疫療法、多標靶治療與傳統療法正為未來個人化醫療之趨勢。總結以上，細胞治療的 GTP 規範只適用於初期之臨床試驗的細胞產品，未來當細胞產品需進入 Phase III 的大規模臨床試驗，則需將細胞產品的製程提升至 PIC/S GMP 規範，以提供大量的安全性的細胞來源。任何治療都可能帶有風險或副作用，只有嚴格管控的細胞製程能有效降低產品污染之風險，讓臨床細胞治療邁向成功

之路。

九、參考文獻

1. Till, J.E. & Mc, C.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**, 213-222 (1961).
2. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111 (2001).
3. Scadden, D.T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**, 1075-1079 (2006).
4. Wobus, A.M. & Boheler, K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* **85**, 635-678 (2005).
5. Thomson, J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).
6. Saitou, M. & Yamaji, M. Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4** (2012).
7. Lakshminpathy, U. & Verfaillie, C. Stem cell plasticity. *Blood Reviews* **19**, 29-38 (2005).
8. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
9. Huang, Y.H. *et al.* Hypoxia inducible factor 2alpha/insulin-like growth factor receptor signal loop supports the proliferation and Oct-4 maintenance of mouse germline stem cells. *Mol Hum Reprod* **20**, 526-537 (2014).
10. Kanatsu-Shinohara, M. *et al.* Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* **119**, 1001-1012 (2004).
11. Leitch, H.G. *et al.* Rebuilding pluripotency from primordial germ cells. *Stem Cell Reports* **1**, 66-78 (2013).
12. Leitch, H.G. *et al.* Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development* **137**, 2279-2287 (2010).
13. Guan, K. *et al.* Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* **440**, 1199-1203 (2006).
14. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920 (2007).
15. Howden, S.E. *et al.* Simultaneous Reprogramming and Gene Correction of Patient Fibroblasts. *Stem Cell Reports* **5**, 1109-1118 (2015).
16. Pittenger, M.F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
17. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.

- Stem Cells* **25**, 2739-2749 (2007).
18. Aggarwal, S. & Pittenger, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815-1822 (2005).
 19. Trounson, A. & McDonald, C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell* **17**, 11-22 (2015).
 20. Trounson, A., Thakar, R.G., Lomax, G. & Gibbons, D. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med* **9**, 52 (2011).
 21. Squillaro, T., Peluso, G. & Galderisi, U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* **25**, 829-848 (2016).
 22. Kaplan, H.S., Brown, M.B. & Paull, J. Influence of bone-marrow injections on involution and neoplasia of mouse thymus after systemic irradiation. *J Natl Cancer Inst* **14**, 303-316 (1953).
 23. Horowitz, M.M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555-562 (1990).
 24. Ehninger, A. & Trumpp, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 421-428 (2011).
 25. Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C. & Kassem, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* **33**, 919-926 (2003).
 26. Ra, J.C. *et al.* Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Humans. *Stem Cells and Development* **20**, 1297-1308 (2011).
 27. Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A. & Smirnov, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* **21**, 105-110 (2003).
 28. in't Anker, P.S. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* **22**, 1338-1345 (2004).
 29. Makrigiannakis, A. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nature Reviews Immunology* **1**, 172-172 (2001).
 30. Li, C.D., Zhang, W.Y., Jiang, X.X. & Mao, N. Human-placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells. *Cell and Tissue Research* **330**, 437-446 (2007).
 31. Jerzak, M. & Bischof, P. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodelling. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* **100**, 138-142 (2002).
 32. Ryan, J.M., Pettit, A.R., Guillot, P.V., Chan, J.K.Y. & Fisk, N.M. Unravelling the Pluripotency Paradox in Fetal and Placental Mesenchymal Stem Cells: Oct-4 Expression and the Case of the Emperor's New Clothes. *Stem Cell Reviews and Reports* **9**, 408-421 (2013).

33. Makhoul, G., Chiu, R.C.J. & Cecere, R. Placental Mesenchymal Stem Cells: A Unique Source for Cellular Cardiomyoplasty. *Annals of Thoracic Surgery* **95**, 1827-1833 (2013).
34. Lin, G. *et al.* Effects of transplantation of adipose tissue-derived stem cells on prostate tumor. *Prostate* **70**, 1066-1073 (2010).
35. Tsai, K.S. *et al.* Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice. *Gastroenterology* **141**, 1046-1056 (2011).
36. Karnoub, A.E. *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557-563 (2007).
37. Nakamura, K. *et al.* Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* **11**, 1155-1164 (2004).
38. Wang, J. *et al.* Identification of a distinct small cell population from human bone marrow reveals its multipotency in vivo and in vitro. *PLoS One* **9**, e85112 (2014).
39. Stout, C.L. *et al.* Primitive stem cells residing in the skeletal muscle of adult pigs are mobilized into the peripheral blood after trauma. *Am Surg* **73**, 1106-1110 (2007).
40. Kucia, M. *et al.* A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+) SSEA-1(+) Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* **20**, 857-869 (2006).
41. Miyanishi, M. *et al.* Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic stem cells? *Stem Cell Reports* **1**, 198-208 (2013).
42. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
43. Bonnet, D. & Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**, 730-737 (1997).
44. Guo, J., Wang, B., Fu, Z., Wei, J. & Lu, W. Hypoxic Microenvironment Induces EMT and Upgrades Stem-Like Properties of Gastric Cancer Cells. *Technol Cancer Res Treat* **15**, 60-68 (2016).
45. Quail, D.F. & Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* **19**, 1423-1437 (2013).
46. Chiba, T., Iwama, A. & Yokosuka, O. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Therapeutic implications based on stem cell biology. *Hepatol Res* **46**, 50-57 (2016).
47. Ma, S. *et al.* miR-130b Promotes CD133(+) liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Cell Stem Cell* **7**, 694-707 (2010).
48. Arzumanyan, A. *et al.* Does the hepatitis B antigen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells? *Cancer Res* **71**, 3701-3708 (2011).
49. Chang, T.S. *et al.* Activation of IL6/IGFIR confers poor prognosis of HBV-related hepatocellular carcinoma through induction of OCT4/NANOG expression. *Clin Cancer Res* **21**, 201-210 (2015).
50. Lu, Y. *et al.* Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* **340**, 113-123 (2013).

51. Wang, Y.D. *et al.* OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death Dis* **4**, e760 (2013).
52. Bao, X. *et al.* [The prognostic value of early BCR-ABL transcripts level in 251 patients with chronic myeloid leukemia after treatment with imatinib]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **36**, 553-558 (2015).
53. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**, 662-673 (2002).
54. Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A. & Anant, S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol* **4**, 80 (2014).
55. el-Deiry, W.S. *et al.* High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3470-3474 (1991).
56. Wang, W., Gao, J., Man, X.H., Li, Z.S. & Gong, Y.F. Significance of DNA methyltransferase-1 and histone deacetylase-1 in pancreatic cancer. *Oncol Rep* **21**, 1439-1447 (2009).
57. Li, H. *et al.* Hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma tissues upregulates expression of DNA methyltransferases. *Int J Clin Exp Med* **8**, 4175-4185 (2015).
58. Zhao, J. *et al.* Epigenetic silence of ankyrin-repeat-containing, SH3-domain-containing, and proline-rich-region- containing protein 1 (ASPP1) and ASPP2 genes promotes tumor growth in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **51**, 142-153 (2010).

第四章

小分子藥物細胞再編程於再生醫學之發展與應用

Development and Application of Reprogramming by Small Molecules in Regenerative Medicine

呂 仁 賴培倫 陳尚甫

中央研究院基因體研究中心

一、前言

2012 諾貝爾生理學或醫學獎得主日本科學家山中伸弥(Dr. Yamanaka S.)與其學生高橋和利(Dr. Takahashi K.)於 2006 年利用功能性篩選在 24 個轉錄因子中，率先以病毒載體轉染方式將轉錄因子(Oct4、Sox2、Klf4 與 c-Myc)送入小鼠纖維母細胞，並成功將之再編程為誘導型多潛能幹細胞(inducible pluripotent stem cells, iPSCs)¹。此研究為幹細胞生物學開闢了嶄新的方向，並奠基了人類對萬能性幹細胞的功能特性與認知，更解決了以胚胎幹細胞為實驗材料的倫理議題，也可透過將 iPSCs 分化而得到各種形式具有功能性之體細胞，以供研究與治療之應用。然而，誘導 iPSCs 分化成為不同細胞形式的過程需要二至三個月的誘導時間，因此許多研究致力於以病毒感染方式將轉錄因子送入細胞內直接轉換細胞命運，而達到迅速得到所需要細胞的目的。這些在特異性篩選下所得到的候選轉錄因子，不同種類的組合可將不同之體細胞轉換成不同的目標細胞，並可搭配不同的環境變因、生長因子、細胞激素來優化細胞轉換之效率。

二、細胞命運之轉換

利用病毒或載體轉染來轉分化細胞已經被廣泛研究，透過系統性篩選轉錄因子並給予不同組合轉錄因子之處理，可在體外將纖維母細胞轉換成不同形式的細胞，包含肌母細胞(myoblasts)²、神經細胞(neurons)³、心肌細胞(cardiomyocytes)³、巨噬細胞(macrophages)⁴與肝細胞(hepatocytes)等等^{5,6}。近年來許多有趣的研究以小分子藥物部分取代轉錄因子，或重新組成不同之轉換細胞配方，以優化並盡可能避免因為病毒轉染可能造成之基因變異。化學藥物能更有效率的進入細胞作用，傳輸時間短，沒有免疫排斥問題，不會造成病毒性插入性突變(insertion mutagenesis)，並具有低成本等許多優點。這些化學藥物能透過調節細胞內之內生性蛋白或生長因子進而達到改變細胞命運的目

的。過去在體細胞轉分化的相關研究中，多處以轉錄因子搭配化學小分子藥物以轉換細胞命運。在神經系細胞的重新編程方面，Zhu 等人發現轉錄因子 OCT4 轉染纖維母細胞搭配處理化學藥物 A83-01、CHIR99021、NaB、Lysophosphatidic acid、Rolipram 與 SP600125 可將纖維母細胞轉換為神經幹細胞⁷。為了製造神經前驅細胞 Wang 等人利用了五種小分子藥物(CHIR99021、PD0325901、thiazovivin、A-83-01 與 DMH1)搭配轉錄因子 Oct4、Sox2、Klf4 與 c-Myc 將人類之尿道上皮細胞(human urinal epithelial cells)成功轉換為神經前驅細胞(neural progenitor cells, NPCs)⁸。

表一、藥物轉分化細胞之種類及效率

Species	Small molecules	Additional factors	Original cell type	Terminal cell type	Reprogramming efficiency	Induction time	Reference
Mouse	CHIR99021, RepSox, Forskolin, VPA	ICARIIN, PD169316, Rolipram	MEFs, TTFs	Cardiomyocytes	~50 beating cluster in 50,000 MEFs	24 days	Fu <i>et al.</i> ⁹
	Forskolin, ISX9, CHIR99021, I-BET151	BDNF, GDNF	Fibroblasts	Neurons	>30% of initial cells	21-35 days	Li <i>et al.</i> ¹⁰
	VPA, CHIR99021, SB431542, Parnate, OAC1		MEFs, TTFs	Astrocytes	<38% of initial cells	25 days	Tian <i>et al.</i> ¹¹
	CHIR99021, LDN193189, A83-01, Hh-Agl.5, Retinoic acid, SMER28, RG108, Tranylcypromine	bFGF	MEFs, TTF	NSCs	~24.20%~30.04% in 15,000 cells	10 days	Zhang <i>et al.</i> ¹²
	VPA, CHIR99021, 616452, Tranylcypromine, Forskolin	2i	MEFs	PSCs	1-20 colonies in 50,000 fibroblasts	60 days	Hou <i>et al.</i> ¹³
	VPA, CHIR99021, 616452, Tranylcypromine,	N2B27-2i, LIF	MEFs, MNFs, MAFs	PSCs	1,000-9,000 colonies in 50,000 fibroblasts	40 days	Zhao <i>et al.</i> ¹⁴

	Forskolin, AM580, EPZ004777, SGC0946, 5-aza-dC						
	VPA, CHIR99021, 616452, Tranilcypromine, Forskolin, EPZ004777, Ch 55, DZNep	2i	NSCs,	PSCs	3 colonies in 80,000 cells	52 days	Ye <i>et al.</i> ¹⁵
	VPA, CHIR9902, 616452, Tranilcypromine, Forskolin, AM580, EZNep	2i	IECs	PSCs	9 colonies in 100,000 cells	52 days	Ye <i>et al.</i> ¹⁵
	VPA, CHIR99021, Repsox, Forskolin, SP600125, Go6983, Y27632, Dorsomorphin	bFGF, BDNG, GDNF, NT3	Fibroblasts	Neurons	10-20% of initial cells	21-28 days	Hu <i>et al.</i> ¹⁶
Human	CHIR99021, A83-01, BIX01294, AS8351, SC1, Y27632, OAC2	SU16F, JNJ10198409	Fibroblasts	Cardiomyocytes	~80 beating clusters in 30,000 cells	30 days	Cao <i>et al.</i> ¹⁷
	SB202190, SP600125, Go6983, Y27632, PD0325901, CHIR99021	bFGF, TGF, hLIF	Fibroblasts	Mesenchymal stem cells	38% of initial cells	6 days	Lai <i>et al.</i> ¹⁸

MEF, mouse embryonic fibroblast; TTF, tail-tip fibroblast; MNFs, mouse neonatal dermal fibroblasts; MAFs, mouse adult lung fibroblasts; NSCs, neural stem cells; PSCs, pluripotent stem cells; IECs, small intestinal epithelial cells.

Wang 等人發現轉錄因子 OCT4 轉染小鼠纖維母細胞搭配處理化學藥物 CHIR99021、SB431542、Parnat 與 Forskolin 可將纖維母細胞轉換為心肌細胞 (cardiomyocytes)¹⁹。在成熟的心肌細胞方面，Efe 等人首度利用暫時轉染 OCT4、SOX2、KLF4 搭配後處理生長因子 BMP4 之方法將小鼠之纖維母細胞轉換為心肌細胞²⁰。除了以上 Wang 所述轉錄因子之轉染搭配化學藥物之外，利用化學藥物完全取代轉錄因子之轉染，逐漸成為一個新興且吸引人的細胞重編程方法。許多研究開始致力於利用化學藥物取代一個或同時取代多個轉錄因子以增進未來細胞治療於臨床上之便利性與可行性。繼諾貝爾獎得主山中伸彌利用四個轉錄因子 OCT4、SOX2、KLF4 與 c-Myc 製造出人造胚胎幹細胞後，Hou 等人首度不使用任何轉錄因子，成功的利用 7 種小分子藥物 VPA、CHIR99021、E616452、Tranylcypromine、Forskolin、3-deazaneplanocin A (DZNep) 與 TTNPB 成功將小鼠之纖維母細胞重編成為 iPSCs¹³。更有趣的是，Hanna 等人成功利用化學藥物(2-mercaptoethanol、Y27632、Go6983、PD0325901、CHIR99021、SP600125 與 SB203580)搭配生長因子(LIF、TGF 1、bFGF 與 insulin)透過改變表位基因調控之狀態(epigenetic state)，將人造人類多功能胚胎幹細胞(iPSCs)或人類胚胎幹細胞(ESCs)由基態(ground state)轉換為相較於胚胎幹細胞更前期的原始態(naïve state)，這些原始態的胚胎幹細胞能與小鼠之胚胎融合形成人鼠融合體(chimerism)^{21, 22}。此後，一些小分子藥物如 Forskolin、D4476 與 2-Methyl-5-hydroxytryptamine 被發現具有潛力能取代轉錄因子 Oct4 功能製造多潛能性幹細胞 iPSCs¹³。利用小分子藥物轉換體細胞命運成為許多幹細胞學家主要的研究目標，其中最主要由小分子藥物誘導成功的為神經系統相關細胞^{8, 23-26}。

1. 利用小分子藥物製造神經系統細胞

Zhang 等人利用 9 種小分子藥物(SB431542、LDN193189、TTNPB、thiazovivin、VPA、CHIR99021、DAPT、SAG 與 Purmo)成功將人類星狀神經膠細胞(human astroglial cells)轉換為神經細胞(neurons)¹²。這些成功轉換的星狀細胞能有效形成具有功能之突觸網絡，並能成功轉植入小鼠腦部修復神經組織¹²。隨後，Zhang 等人使用九種小分子藥物搭配生長因子(CHIR99021、A-83-01、LDN193189、RA、Hh-Agl.5、RG108、Parnate、SMER28、bFGF)提高細胞內生性轉錄因子 Sox2 之表現量，而成功轉換小鼠纖維母細胞為神經幹細胞(NSCs)²⁷。而 Lin 等人只利用三種小分子藥物(VPA、CHIR99021、Repsox)成功將小鼠胚胎之纖維母細胞於低氧環境培養下(hypoxia condition)轉換為神經前驅細胞(NPCs)²⁸。

最近兩篇代表性的研究同時發表在頂尖期刊 Cell Stem Cell，利用小分子藥物可以直接將小鼠或人類的纖維母細胞轉換為有功能性的神經細胞，這些細胞具有神經突觸之外形並具有電生理信號傳遞的能力^{10, 16}。Li 等人利用四個小分子藥物 forskolin、ISX9、CHIR99021 與 I-BET151 成功將小鼠之纖維母細胞轉換為神經細胞¹⁰，同時 Hu 等人亦利用 7 種小分子藥物 VPA、forskolin、CHIR99021、RepSox (TGFβR-1/ALK-5 inhibitor)、SP600625、GO6983、Y-27632 兩階段誘導將人類正常

纖維母細胞與阿茲海默症病人之纖維母細胞轉換為神經細胞¹⁶。綜合以上研究成果顯示，一些小分子藥物如 Y27362、thiazovivin (Rock inhibitors)、CHIR99021 (GSK-3 inhibitor)、RepSox (ALK5 inhibitors)、SB431542 (TGF- β inhibitors)、forskolin (cAMP signaling activator) 在神經重編成的過程中扮演舉足輕重的角色。

2. 利用小分子藥物製造心臟系統細胞

除了誘導式之神經系統細胞之外，第二類主要轉換之目標細胞種類為心肌細胞 (cardiomyocytes) 或其前驅細胞 (progenitors)^{19, 20}。在肌肉前驅細胞方面，Zhang 等人利用小分子藥物 CHIR99021、SU5402 搭配生長因子 BMP4，Activin A 成功轉換纖維母細胞為誘導型心肌前驅細胞 (iCPCs; induced Cardiovascular Progenitor Cells)，這些心肌前驅細胞具有在體外培養增生的能力，而使這些細胞保有增生能力並侷限這些細胞在前驅細胞階段的主要小分子藥物可能為 CHIR99021 (Wnt activator)。在特定的誘導條件下，這些細胞能有效分化為成熟之心肌細胞 (cardiomyocytes)、內皮細胞 (endothelial cells)、與平滑肌細胞 (smooth muscle cells)，並能夠有效修補小鼠之心肌梗塞缺損模式 (myocardial infarction model)²⁹。然而，這些細胞雖然表現了心肌細胞之特異性標記如 cTnT 與 α -actinin，但心肌細胞主要之轉錄因子 Gata4 與 Nkx2.5 之表現量卻甚弱，尚須進一步優化調整其誘導條件。值得注意的是，Cao 等人高效率的利用九種小分子藥物 (CHIR99021、A-83-01、BIX01294、AS8351、SC1、Y27632、OAC2、SU16F 與 JNJ10198409) 成功將人類纖維母細胞轉換為具有功能性之心肌細胞。這些誘導式心肌細胞具有與人類天然之心肌細胞非常相似的基因 (transcriptome) 與表位基因 (epigenetic map) 表現圖譜，並具有標準的電生理傳導特性 (action potential)¹⁷。除了神經系統與心肌系統之誘導式細胞外，胰臟細胞、肝臟細胞與其前驅細胞，亦是科學家們有興趣轉換之細胞種類³⁰⁻³²。

3. 利用小分子藥物製造胰臟與肝臟細胞

Li 等人利用 Yamanaka factors 搭配小分子藥物 ActA、BIX-01294、lithium chloride 發現小鼠纖維母細胞能成功轉換成類內胚層細胞 (endoderm-like cells)³⁰。這些類內胚層前驅細胞能在藥物處理下 (RA、A-83-01、LDE225、ascorbic acid) 進一步分化成類胰島前驅細胞。有趣的是，這些胰島前驅細胞能進一步移植到第一型糖尿病之小鼠身上並有效分化成具功能性之胰島細胞。隨後，Zhu 等人利用小分子藥物 CHIR99021、NaB、Parnate、RG108 與 5-N-ethylcarboxamidoadenosine 便足以轉換人類之纖維母細胞為 β 型胰島細胞 (pancreatic beta cells)³¹，同年 Zhu 等人亦成功將人類之纖維母細胞轉換為肝臟前驅細胞 (hepatic progenitor cells)，這些誘導式肝臟細胞具有相似未成熟嬰兒之肝細胞特性能在體外放大培養並能成功分化為成熟的肝臟細胞，並可移植至鼠體改善慢性肝功能衰竭 (chronic liver failure)³²。這些研究成果皆促進了未來細胞治療在臨床上的實際應用價值。

總體而言，單獨利用小分子藥物轉化細胞命運亦成為未來改變細胞命運之主流，利用小分子藥物取代利用病毒載體承載轉錄因子轉染方法，能完全避免病毒載體所造成之基因突變(mutagenesis)，小分子藥物容易取得與低成本也將成為增進應用價值的一大亮點。

三、利用化學藥物製造人類間質幹細胞

僅於過去三年間，已有許多來自不同團隊的相關研究成果刊載於國際期刊，以精準使用純粹的化學雞尾酒藥劑，成功將小鼠纖維母細胞誘導為神經細胞¹⁶、心肌細胞³³、神經幹細胞³⁴以及萬能幹細胞^{13,14}；隨後也有數個團隊指出，相同的概念得以印證於人類纖維母細胞，並將其誘導為神經細胞¹⁶和許旺細胞(Schwann cell)³⁵。然而，迄今尚未有成功以化學誘導產生人類幹細胞的報導，遂使此一付之闕如的篇章成為領域內之重點研究主題。

本團隊於今年率先發表此研究，成功透過六個化學分子(SB202190、SP600125、Go6983、Y27632、PD0325901及CHIR99021)組成的雞尾酒試劑，將人類皮膚纖維母細胞誘導為間質幹細胞，並符合國際細胞療法協會(International Society for Cellular Therapy, ISCT)之所有定義³⁶，包括表面標記物表達(surface markers)、多能分化(multipotency)、自我更新(self-renewal ability)、免疫調節³⁷⁻⁴⁰(immunomodulatory)等能力，並大幅提升急性肺損傷(acute lung injury, ALI)小鼠的存活率；此後，本團隊更進一步優化試劑，同時降低藥劑之使用並提高轉化效率，並於拓展實驗中發現此一策略亦可提升老化幹細胞之分化能力，與其相關的回春作用(rejuvenation)與機制也逐漸明朗。

四、間質幹細胞之細胞治療與臨床應用

由於胚胎幹細胞(embryonic stem cells, ESCs)或誘導型多潛能幹細胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)於體內難以掌控，帶有形成融合瘤及致癌的可能，亦對其衍生細胞的解析尚未明朗。相較之下，間質幹細胞並不具致癌性，卻帶有多能分化能力，可分化為硬骨、軟骨、纖維母細胞、胰臟小島細胞、神經、肝細胞、肌細胞、色素細胞，易具備釋放細胞激素以調節免疫功能之能力，因廣泛應用於臨床醫學，至今全球約有七百項臨床試驗正在執行。例如：成骨不全、骨質疏鬆、軟組織損傷、各種神經心血管損傷等再生療法，以及間接調節以緩解急性肺損傷(ALI)、移植物抗宿主疾病(GvHD)、克隆氏症(Crohn's disease)、第一型糖尿病、多發性硬化症(multiple sclerosis)、關節炎、帕金森氏症、阿茲海默症、肌萎縮性脊髓側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)、肝炎、黏多醣症(Hurler's syndrome)等病症。此外，間質幹細胞在多項臨床試驗中指出，雖然於部分免疫病症之細胞療法中，免疫系統對異體間質幹細胞有一定程度的容忍度；但仍有更多試驗指出自體間質幹細胞之相容性更佳，可於並列試驗(side-by-side)中勝出。

然而，間質幹細胞的主要來源是胎兒臍帶血與胎盤組織，並非現今普及的自體細胞來源；而成體則可透過收取骨髓、脂肪組織，進一步分離萃取而得自體間質幹細胞，然而成體間質幹細胞的數量與能力隨著年齡增長而遞減，不同組織間萃取而得的間質幹細胞也具備一定程度的異質性。若透過藥物處理，便可利用回春作用提高患者之幹細胞能力，亦可依不同需求調整其分化潛能性，於此，更進一步印證小分子化學雞尾酒試劑之應用價值。

五、結語

相較於 iPSCs 的誘導過程中，大多透過反轉錄病毒為載體，轉染細胞表達轉錄因子，埋下了潛在的不確定因子，故基於安全考量難以應用於細胞療法。許多研究紛紛投入化學誘導(chemical induction)，試圖以小分子化合物將體細胞直接轉化(direct conversion)成為不同的功能性細胞。小分子化合物具有調控胞內細胞傳訊的功能，在適度的生理劑量下，可避免細胞毒殺性(cytotoxicity)並影響標的途徑(target pathway)，複數個小分子化合物更可以組合成雞尾酒試劑(cocktail)，透過協同作用(synergistic effect)便足以影響細胞命運的決定(cell fate decision)。除了具有不修改細胞基因、可完全移除的無足跡(foot-print free)特性，更可即時調整劑量(dosage)與施藥時間(duration)，如此高度彈性卻又可以具備高精準度的特性，使得這樣的概念遂成當今之顯學。本團隊首創以化學分子誘導產生人類間質幹細胞，使化學誘導之概念得以印證，成為進一步其應用於臨床治療的一線曙光，可謂銜接了幹細胞生物學與再生醫學的重大發現。

六、參考文獻

1. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
2. Davis, R.L., Weintraub, H. & Lassar, A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000 (1987).
3. Ieda, M. *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **142**, 375-386 (2010).
4. Feng, R. *et al.* PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6057-6062 (2008).
5. Huang, P. *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* **475**, 386-389 (2011).
6. Sekiya, S. & Suzuki, A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* **475**, 390-393 (2011).
7. Zhu, S. *et al.* Small molecules enable OCT4-mediated direct reprogramming into expandable human neural stem cells. *Cell Res* **24**, 126-129 (2014).

8. Wang, L. *et al.* Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. *Nat Methods* **10**, 84-89 (2013).
9. Fu, Y. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Research* **25**, 1013-1024 (2015).
10. Li, X. *et al.* Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell Stem Cell* **17**, 195-203 (2015).
11. Tian, E. *et al.* Small-Molecule-Based Lineage Reprogramming Creates Functional Astrocytes. *Cell Rep* **16**, 781-792 (2016).
12. Zhang, L. *et al.* Small Molecules Efficiently Reprogram Human Astroglial Cells into Functional Neurons. *Cell Stem Cell* **17**, 735-747 (2015).
13. Hou, P. *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* **341**, 651-654 (2013).
14. Zhao, Y. *et al.* A XEN-like State Bridges Somatic Cells to Pluripotency during Chemical Reprogramming. *Cell* **163**, 1678-1691 (2015).
15. Ye, J. *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse neural stem cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds. *Cell Res* **26**, 34-45 (2016).
16. Hu, W. *et al.* Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell* **17**, 204-212 (2015).
17. Cao, N. *et al.* Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* **352**, 1216-1220 (2016).
18. Lai, P.L. *et al.* Efficient Generation of Chemically Induced Mesenchymal Stem Cells from Human Dermal Fibroblasts. *Sci Rep* **7**, 44534 (2017).
19. Wang, H. *et al.* Small molecules enable cardiac reprogramming of mouse fibroblasts with a single factor, Oct4. *Cell Rep* **6**, 951-960 (2014).
20. Efe, J.A. *et al.* Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* **13**, 215-222 (2011).
21. Fang, R. *et al.* Generation of naive induced pluripotent stem cells from rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* **15**, 488-496 (2014).
22. Gafni, O. *et al.* Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* **504**, 282-286 (2013).
23. Corti, S. *et al.* Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res* **318**, 1528-1541 (2012).
24. Kim, J. *et al.* Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 7838-7843 (2011).
25. Thier, M. *et al.* Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* **10**, 473-479 (2012).
26. Lee, J.H. *et al.* Single Transcription Factor Conversion of Human Blood Fate to NPCs with

- CNS and PNS Developmental Capacity. *Cell Rep* **11**, 1367-1376 (2015).
27. Zhang, M. *et al.* Pharmacological Reprogramming of Fibroblasts into Neural Stem Cells by Signaling-Directed Transcriptional Activation. *Cell Stem Cell* **18**, 653-667 (2016).
 28. Cheng, L. *et al.* Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res* **25**, 645-646 (2015).
 29. Zhang, Y. *et al.* Expandable Cardiovascular Progenitor Cells Reprogrammed from Fibroblasts. *Cell Stem Cell* **18**, 368-381 (2016).
 30. Li, K. *et al.* Small molecules facilitate the reprogramming of mouse fibroblasts into pancreatic lineages. *Cell Stem Cell* **14**, 228-236 (2014).
 31. Zhu, S. *et al.* Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts. *Nat Commun* **7**, 10080 (2016).
 32. Zhu, S. *et al.* Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature* **508**, 93-97 (2014).
 33. Fu, Y. *et al.* Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Research* **25**, 1013-1024 (2015).
 34. Cheng, L. *et al.* Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res* **24**, 665-679 (2014).
 35. Thoma, E.C. *et al.* Chemical conversion of human fibroblasts into functional Schwann cells. *Stem Cell Reports* **3**, 539-547 (2014).
 36. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317 (2006).
 37. Kim, E.S. *et al.* Intratracheal transplantation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuates Escherichia coli-induced acute lung injury in mice. *Respir Res* **12**, 108 (2011).
 38. Bustos, M.L. *et al.* Activation of human mesenchymal stem cells impacts their therapeutic abilities in lung injury by increasing interleukin (IL)-10 and IL-1RN levels. *Stem Cells Transl Med* **2**, 884-895 (2013).
 39. Hao, Q. *et al.* Study of Bone Marrow and Embryonic Stem Cell-Derived Human Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Escherichia coli Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Stem Cells Transl Med* **4**, 832-840 (2015).
 40. Fang, X. *et al.* Human Mesenchymal Stem (Stromal) Cells Promote the Resolution of Acute Lung Injury in Part through Lipoxin A4. *J Immunol* **195**, 875-881 (2015).

第五章

醴鞘脂於胚胎幹細胞分化過程之變化與癌症免疫治療之應用

Roles of glycosphingolipids in embryonic stem cell differentiation and glycan-targeting cancer immunotherapy

梁毓津^{1,2,5} 洪榮堂^{1,2} 陳鈴津^{1,2,4} 游正博^{1,2,3}

¹ 林口長庚紀念醫院 ² 長庚大學幹細胞與轉譯癌症研究所

³ 中央研究院細胞與系統生物學研究所

⁴ 中央研究院基因體學研究中心 ⁵ 長庚科技大學健康產業科技研究所

一、前言

醴鞘脂(glycosphingolipid, 簡稱 GSL)存在於細胞表面, 由鞘氨醇(sphingosine)、長鏈脂肪酸(fatty acid)及寡醴等 3 個基本結構組成。鞘氨醇為帶有不飽和烴基鏈之十八碳氨基醇; 長鏈脂肪酸, 鏈長約 18~26 碳原子, 以醴胺鍵與鞘氨醇結合成為神經醴胺(ceramide); 寡醴, 由 1~20 個單醴分子組合成的寡醴鏈以醴苷鍵(glycosidic bond)聯接在鞘氨醇第一個碳原子的羥基上。醴鞘脂以疏水性的神經醴胺嵌合於細胞質膜脂雙層結構中, 而具極性的寡醴則伸展於細胞膜外側。醴鞘脂具有調節細胞間訊息交互作用的功能, 對生物體的發育及外界環境因子的刺激扮演重要的角色。本實驗室以單株抗體, 基質輔助雷射脫附游離法質譜儀(matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry, MALDI-MS)和串聯質譜儀(Tandem Mass Spectrometer, MS/MS)分析, 系統性地描繪出醴鞘脂在人類胚胎幹細胞和誘導型多潛能幹細胞(iPS)分化成各種細胞譜系(lineage)時的變化。我們除了看到眾所周知的人類胚胎幹細胞特異性標記 SSEA-3 (Stage-specific embryonic antigen 3)及 SSEA-4 的表現, 也發現幾個以前沒有被識別過的 globo-或 lacto-系列的醴鞘脂, 例如: Gb4Cer, Lc4Cer, fucosyl (n)Lc4Cer, Globo H, 及 disialyl-Gb5Cer。另外, 本實驗室還詳細闡述人類胚胎幹細胞分化過程中, 醴鞘脂核心結構會由 globo-/lacto-系列轉換為 ganglio-系列。這種醴鞘脂核心結構的轉變與小鼠胚胎發育期間醴鞘脂的變化相似, 說明醴鞘脂核心結構的轉變可能是不同物種胚胎分化過程的共同現象, 醴鞘脂的轉變與胚胎分化之間有密切關聯。本實驗室也證明醴鞘脂種類轉變現象與醴基轉移酶基因表達有關。另一方面, 癌症生長過程中, 異常醴基化是常見的特徵之一, 許多腫瘤相關醴抗原已陸續被發現。其中, 針對腫瘤相關醴抗原 GD2 為標的之免疫治療, 已於人體試驗證實其顯著的治療效果, 並獲得 FDA 批准, 現為治療神經母細胞瘤的標準醫療方針。另一個以腫瘤相關醴抗原為標的之 Globo H 疫苗, 也可在

人體內引起體液性免疫反應並降低乳癌復發的機率。因此，如何以腫瘤相關醣抗原為標的發展合適的免疫療法，將是治療癌症重要的方向之一。本章節，我們將介紹醣鞘脂在幹細胞分化時的變化，腫瘤相關醣抗原的生物活性及其機制，與目前以腫瘤相關醣抗原為標的之臨床試驗的進展。

二、簡介

胚胎幹細胞和誘導型多潛能幹細胞都是一群具有自我更新能力的細胞，可以分化成內、中、外三個主要生物胚層，進而繼續分化生成不同類型的組織^{1,2}。胚胎幹細胞的來源為囊胚期胚胎內之內細胞團塊(inner cell mass)或胚胎發育稍後期的上胚葉(epiblasts)細胞。誘導型多潛能幹細胞則是將終端分化的細胞經由人工誘導重編程，重新激活內源多能性基因，使細胞回復至類似胚胎幹細胞的多潛能性狀態(pluripotency)³。另外，胚胎幹細胞及誘導型多潛能幹細胞可分為初始(naïve)或活化(primed)兩種狀態。囊胚期胚胎之內細胞團塊的胚胎幹細胞屬於初始狀態，具有較佳的嵌合體囊胚形成能力(chimera formation)⁴，易應用於細胞治療及再生醫學研究。取自上胚葉的胚胎幹細胞處於著床後囊胚後期，屬於活化狀態。大多數實驗室所用小鼠胚胎幹細胞是胚胎著床前的內細胞團塊，屬於初始狀態⁵。而人類胚胎幹細胞是胚胎著床後的上胚葉細胞，屬於活化狀態⁶。初始或活化兩種不同來源的胚胎幹細胞，有不同的培養需求，其基因表達、表觀遺傳特性，與分化能力也不同^{4,7}。因此，在實驗前必須先確定研究的目的，方能使用合適的胚胎幹細胞進行實驗。

哺乳動物細胞表面有各種特殊的醣分子以醣苷鍵與蛋白質或脂質結合，這些醣分子能夠調節細胞間的相互作用及有機體的發育和功能。目前已知，超過85%的哺乳動物細胞其細胞膜上的蛋白質或脂質皆帶有特定的醣分子。而且胚胎幹細胞表面的醣分子與癌症細胞表面醣分子有高度的相似性，可應用於癌症的診斷或治療。醣鞘脂由極性寡醣與疏水性神經酰胺組成，為細胞膜的組成成分，存在於所有真核生物。在動物組織中，依據寡醣核心結構，可將醣鞘脂分為三種形式：(1) ganglio 和 isoganglio 系列，(2) lacto 和 neolacto 系列，及(3) globo 和 isoglobo 系列^{8,9}。醣鞘脂可以介導細胞黏附和信號的轉導^{8,10}，也是特定類型細胞分化標誌^{11,12}。細胞表面的醣鞘脂抗原，可用抗體檢測。例如，Lewis x (CD15，也稱為 SSEA-1)被認為是小鼠多能幹細胞的標誌，在胚胎細胞黏附和遷移扮演重要的角色。人類自然殺手細胞抗原 1 (Human natural killer cell antigen-1, HNK-1) (sulfo-3GlcA β 13Gal β 14GlcNAcCer) 主要表達在神經細胞和自然殺手細胞的細胞表面，在細胞間信息交互作用扮演重要角色¹³。Sonnino 和 Prinetti 兩位學者提出膜結構小域(membrane domain)概念。描述醣鞘脂集群在細胞表面，與各種膜蛋白，包含 caveolin1、integrin、生長因子受體、tetraspanins 等互動形成膜結構小域，藉此共同調控細胞的黏附，增長及運動^{14,15}。醣鞘脂也可能參與上皮-間質轉變(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^{16,17}，影響胚胎發育和腫瘤轉移的過程。

細胞表面醣鞘脂的型式和胚胎發育有密切的關聯。小鼠胚胎在四細胞期，表現 globo

系列的醣鞘脂 SSEA-3 和 SSEA-4，然後在胚胎進一步發展時即迅速消失⁸。相反的，醣鞘脂 SSEA-1 在胚胎發育初始並沒有出現，直到小鼠胚胎的桑椹胚階段(morula stage)才表達⁸。Ganglio 系列的醣鞘脂，如 GM3、GD3、GM2 以及 GD2，則必須在後期神經嵴形成時才開始出現^{11,18}。GD3、GD1a 與 GT1b 則在老鼠體節形成後逐漸出現¹⁹。另一方面，人類胚胎幹細胞或誘導型多潛能幹細胞表面標誌的變化可用來監測這些幹細胞的多能性以及其分化過程。例如前述的 SSEA-3 和 SSEA-4 即是常用的人類胚胎幹細胞及誘導型多潛能幹細胞標誌，而 O4，O1 抗原，A2B5 抗原，GD3 則被認為是神經系細胞的標誌。然而，由於醣分子結構的多樣性，不同的醣鏈可能具有部分相似性。因此某些單株抗體會交叉作用於不同種類卻包含相同的醣基抗原的醣分子結構。單獨使用與這些單株抗體偵測的細胞，可能不一定能準確的辨別醣鏈結構與種類^{9,20}。因此除了單株抗體之外，必須借助質譜技術解析細胞表面醣分子的組成及結構，才能全面而系統性的確認細胞表面醣鞘脂醣鏈結構與種類及組成型式。

細胞表面醣分子結構會隨著細胞的生長、分化及疾病而有所變化。細胞病變時，細胞表面的醣分子便會有異常變化。舉例而言，當癌症發生時，癌細胞表面經常會出現異常的醣分子表現，這些異常醣分子通常有助於腫瘤發生和轉移。如果這些異常醣分子在腫瘤高度表達而在正常組織少量或不表達，即可能是適合的癌症治療標的^{10,21}。自 1990 年代開始，已有許多腫瘤相關醣抗原被視為癌症治療標的，並進行臨床試驗，但大多數試驗在早期階段就宣告終止。直到最近，以 GD2 為標的之 Dinutuximab 單株抗體免疫療法，於第三期人體臨床試驗證實可以有效提升神經母細胞瘤患者的存活率，並獲得美國 FDA 核准上市^{22,23}。此外，以 Globo H 為標的之 OPT822/OPT821 疫苗，已進行至第二期人體試驗，並發現該疫苗可以誘發乳癌患者產生體液性免疫反應並降低該患者的乳癌的復發率。因此，鑑定出特定的腫瘤相關醣分子，研究它們的生物活性，並以它們為標的製作疫苗或早期檢測的工具，發展有效的癌症療法，是醣科學領域的重要研究方向之一，也是標靶藥物開發的關鍵。

三、人類胚胎幹細胞分化為擬胚體(Embryoid Body)時醣鞘脂的變化

本章節使用的醣鞘脂名稱皆根據國際生物化學名稱委員會(IUPAC IUBMB)命名。醣鞘脂結構書寫方式如表一。左側為非還原性末端，右側為還原性末端，最後 Cer 代表神經醯胺。醣鏈中單醣的名稱以縮寫表示(表一)，其後以 α 或 β 表示糖苷鍵構型，兩個醣之間的鍵結以碳的編號表達。如 β -1,4 代表單醣的 1 號碳和另一個單醣的 4 號碳以 β 構型鍵結在一起。

研究細胞表面醣鞘脂可以使用辨識醣抗原的單株抗體，以流式細胞儀分析。然而，許多研究報告指出這些辨識醣抗原的單株抗體會交叉作用於不同種類的醣鞘脂。例如，單株抗體 MC-631 除了辨識 SSEA-3 的抗原 GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal，也能夠和 Forssman, Gb4Cer, Globo H 和 fucosyl Lc4Cer 反應。而 MC-813-70 單株抗體可以辨識 SSEA-4 的抗原 NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc，也會與 GM1b，GD1a，及 sialylated core1 O-醣蛋白抗原

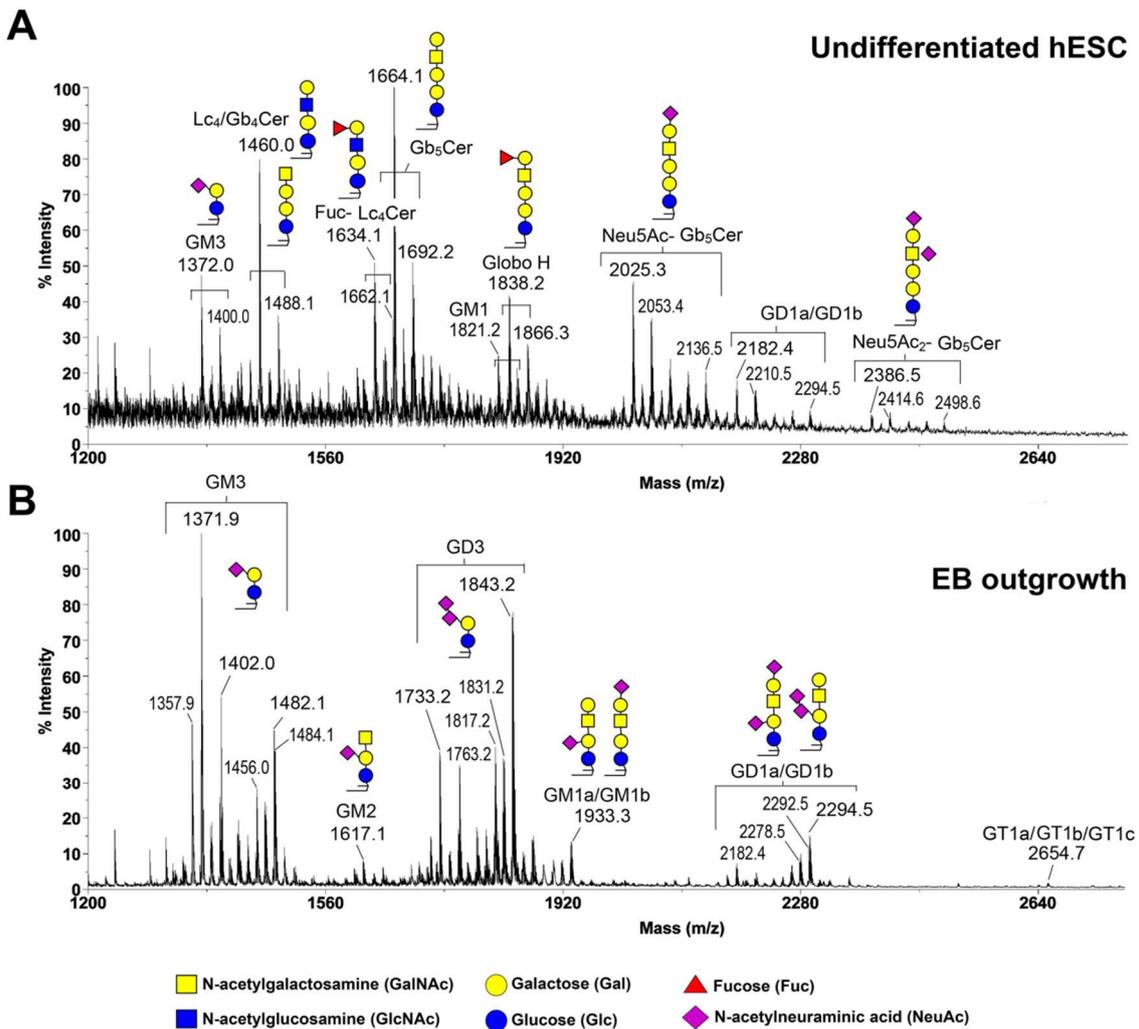
有交叉作用^{20, 24}。同時，辨認醣抗原的單株抗體無法區分醣抗原是附著於神經醯胺亦或蛋白質。

表一，人類胚胎幹細胞或誘導型多潛能幹細胞以及其分化後的衍生細胞上的醣鞘脂。

Name	Structure
nLC ₄ Cer	Galβ4GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1-1'Cer
LC ₄ Cer	Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1-1'Cer
H type 1 antigen	Fucα1-2Galβ3GlcNAcβ3Galβ4Glcβ1-1'Cer
Fucosyl-nLC ₄ Cer	Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
Gb3Cer	Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
Gb4Cer	GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
Gb ₅ Cer	Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
Sialyl-Gb ₅ Cer	NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
Forssman antigen	GalNAcα1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
Globo H	Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
Disialyl-Gb ₅ Cer	NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer NeuAcα2-6(NeuAcα2-3)Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer NeuAcα2-8NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GM3	NeuAcα2-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GD3	NeuAcα2-8NeuAcα2-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GM2	GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GM1a	Galβ1-3GalNAcβ1-3(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GM1b	NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GD1a	NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GD1b	Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-8NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GD1c	NeuAcα2-8NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GT1a	NeuAcα2-8NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GT1b	NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-8NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
GT1c	Galβ1-3GalNAcβ1-4(NeuAcα2-8NeuAcα2-8NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcβ1-1'Cer

醣鞘脂名稱根據國際生物化學名稱委員會(IUPAC IUBMB)的命名。醣鞘脂結構書寫方式，左側為非還原性末端，右側為還原性末端，最右側 Cer 代表神經醯胺(ceramide)。醣鏈中單醣的名稱以縮寫表示，其後以 α 或 β 表示糖苷鍵構型，兩個醣之間的鍵結以碳的編號表達。單醣及其縮寫：葡萄糖(glucose, Glu)、半乳糖(galactose, Gal)、N-乙醯半乳糖胺(N-Acetylgalactosamine, GalNAc)、N-乙醯葡萄糖胺(N-Acetylglucosamine, GlcNAc)、岩藻糖(Fucose, Fuc)、N-乙醯神經胺酸(又稱唾液酸)(N-Acetylneuraminic acid, Sialic acid, NeuAc)。(本表改編自參考文獻^{25, 26})

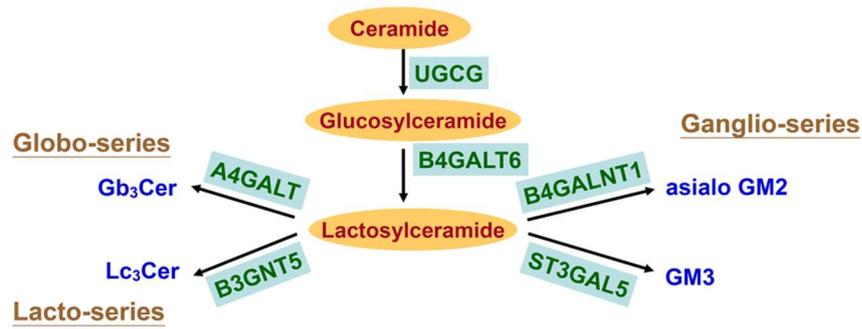
基於上述原因，本實驗室使用 MALDI-MS 和 MS/MS，系統性的分析醣鞘脂在未分化人類胚胎幹細胞與分化形成擬胚體時的變化²⁵。我們採用 Folch 法提取細胞總體的醣鞘脂，再以全甲基化將醣鏈上所有羥基轉化為甲醚基以降低醣分子的極性，讓中性和帶負電荷的醣鞘脂可以同時被分析，也可以提高質譜檢測醣鞘脂的靈敏度。圖一是以質譜儀分析人類胚胎幹細胞分化前後醣鞘脂的變化。圖中，帶有相同醣鏈的鞘醣脂，因為神經酰胺碳鏈長度的不同，同一種醣鞘脂在質譜分析下會產生一組信號群。我們將不同的醣鞘脂，以數組峰群表示，並以框線區隔及標註。醣鞘脂種類的判定主要是根據醣鞘脂以 MALDI-MS 分析所得的 m/z 值所推斷。並以 MS/MS 確認。



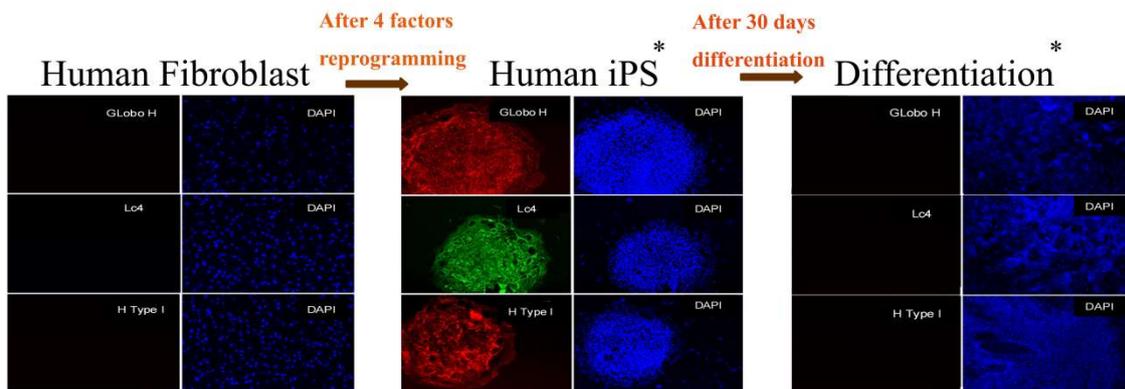
圖一：利用基質輔助雷射脫附游離質譜法 (matrix-assisted laser desorption-ionization, MALDI-MS) 方法分析人類胚胎幹細胞(A)與分化 16 天後擬胚體(B)型成時醣鞘脂的變化。細胞醣鞘脂以 Folch 法提取並加以全甲基化反應 (permethylation)。醣鞘脂種類的判定根據醣鞘脂分子以 MALDI-MS 分析所得的 m/z 值所推斷。並以 MS/MS 分析確認其醣鏈種類與鍵結關係。(本圖改編自參考文獻²⁵)

利用單株抗體及質譜儀，我們發現人類胚胎幹細胞分化前具有較高量的 globo 系列及 lacto 系列的醣鞘脂。Globo 系列醣鞘脂的核心結構為 Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer，lacto 系列的醣鞘脂則具有 Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 的核心結構(表 1)。人類胚胎幹細胞分化前的醣鞘脂包括有 SSEA-3 和 SSEA-4，其結構分別為 Gb5Cer 及 sialylated-Gb5Cer。Gb5Cer 的前驅物 Gb4Cer 和 Gb3Cer(圖一)，與 sialylated-Gb5Cer 再多一個唾液酸根(sialic acid)的 Disialyl-Gb5Cer 也表現在分化前的類胚胎幹細胞。另外，上皮細胞腫瘤，如乳腺癌、結腸癌、肺癌等癌細胞會大量表現的 Globo H(又稱為 fucosylated Gb5Cer)，也會表現在人類胚胎幹細胞。另一方面，lacto 系列的醣鞘脂如 Lc4Cer(又名 type 1)和 fucosyl Lc4Cer(又名 H type 1)(圖一)也表現在分化前的人類胚胎幹細胞之。利用 H type 1 單株抗體及流式細胞儀觀察到 H type 1 抗原 Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc，可以觀察到 H type 1 僅表現於未分化的人類胚胎幹細胞，分化後的擬胚體細胞就偵測不到 H type 1 抗原²⁵。Tang 研究團隊也證實，帶有 H type 1 醣鏈的醣鞘脂(fucosyl Lc4Cer)是胚胎抗原(表一)並將其命名為 SSEA-5²⁷。利用 anti-SSEA-5 單株抗體移除未分化的胚胎幹細胞或誘導性胚胎幹細胞，可以降低胚胎幹細胞分化過程產生畸胎瘤(teratoma)的機會。Matsumoto 等學者發現另一個單株抗體 R-17F，可以辨認相同的 H type 1 抗原並且對人類胚胎幹細胞和誘導性胚胎幹細胞產生毒殺效應²⁸。另外，Barone 研究團隊利用抗體與凝集素結合細胞表面上特定的醣分子，並以質譜及核磁共振儀，全面性分析胚胎幹細胞或誘導性胚胎幹細胞的醣鞘脂種類²⁹。他們觀察到，在人類胚胎幹細胞或誘導型多潛能幹細胞上存在 GlcCer、GalCer、LacCer、Ga2Cer、Gb3Cer 和 Type 2 等中性的醣鞘脂。另外，也發現某些特殊的酸性醣鞘脂，如硫脂(sulfatide)或 sialyl Lc4Cer (sialyl lactotetra)³⁰。當細胞分化為肝細胞或心肌細胞時，sialyl Lc4Cer 就不再表現。

另一方面，我們將人類胚胎幹細胞分化為具有內、中、外三胚層細胞的擬胚體時，globo 和 lacto- 系列的醣鞘脂越來越少，取而代之的是具有 Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer 核心結構並含有唾液酸殘基的 ganglio-系列(表一與圖二)。我們觀察到 Ganglio-系列醣鞘脂 GD3 只高度表達在分化後的擬胚體細胞中，而在分化前的人類胚胎幹細胞並沒有發現。GM3 及 GD1a/GD1b，在分化前後都有程度相當的表現。GM2、GM1 和 GT1a/GT1b/GT1c，則只在分化後的擬胚體有較明顯的表現(圖一)。MS/MS 分析的結果證實同分異構體的 GM1a/GM1b 和 GD1a/GD1b 在分化後的擬胚體細胞都有表現。醣鞘脂由 globo- lacto-系列轉變為 ganglio-系列在不同的人類胚胎幹細胞株，如 HES5 和 H9 也可觀察到，並且其分化前後醣鞘脂的組合形式也都極為相似。再者，小鼠胚胎發育時，觀察到的醣鞘脂變化與人類胚胎幹細胞分化大致吻合⁸。除此之外，小鼠胚胎發育的各個階段，包括排卵、精子形成與胚胎發生，醣鞘脂也會有不同的變化³¹。以上這些證據顯示醣鞘脂種類與胚胎發育有密切的關聯。



圖二：人類胚胎幹細胞分化過程醣鞘脂核心結構由 globo-和 lacto-系列切換為 ganglio-系列。醣鞘脂醣鏈部分的生合成首先是由葡萄糖鍵結到神經酰胺形成 GlcCer，GlcCer 繼而接上半乳糖形成 Gal-GlcCer (LactosylCer)。每一個醣分子加入醣鞘脂醣鏈時都有一個關鍵的醣基轉移酶負責醣鏈的合成。當人類 ES 細胞開始分化時，負責 ganglio-系列的醣基轉移酶開始大量增加，而 globo-或 lacto-系列的醣基轉移酶則相對減少。因此醣鞘脂生合成反應傾向合成較多的 ganglio 系列醣鞘脂以及較少的 globo-或 lacto-的結構，因而導致細胞的醣鞘脂核心結構由 globo-和 lacto-系列切換為 ganglio-系列。(本圖改編自參考文獻²⁵)



圖三：誘導型多潛能幹細胞(induced pluripotent stem cell, iPS)分化成各種細胞譜系(lineage)時醣鞘脂的變化。纖維母細胞、纖維母細胞誘導的多能幹細胞並及其分化後的衍生細胞的免疫螢光染色結果。使用的抗體如圖所示，包含 Globo H、Lc4Cer 和 H type 1 antigen。(本圖改編自參考文獻³²)

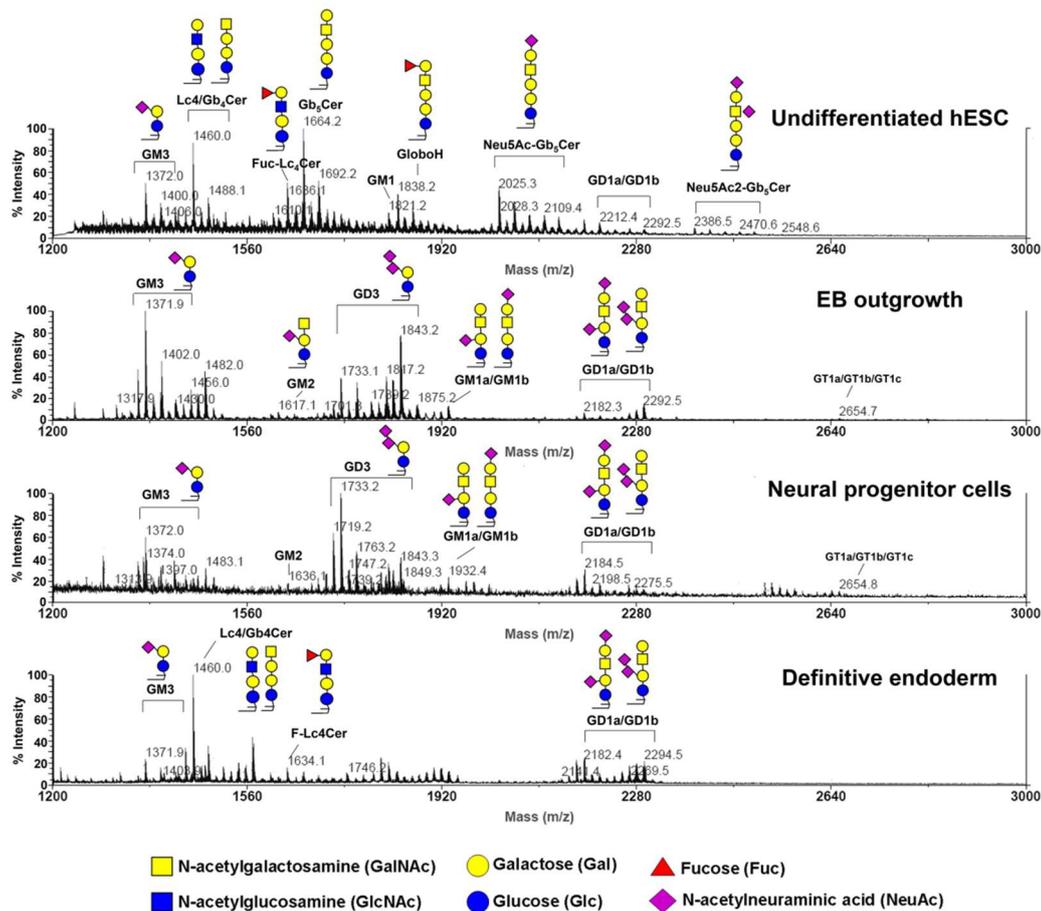
誘導性多能性細胞為將分化的成體細胞重新逆轉成為具有多能性的細胞，對再生醫學領域的研究有重要意義。本實驗室將表一人類成纖維細胞導入 Oct4、Sox2、Klf4 和

c-Myc 四種轉錄因子，促使細胞重新編程成為誘導性多能性細胞，並分析其分化過程中醣鞘脂的變化。如圖三所示，誘導性多能性細胞可以重新表現出胚胎幹細胞特有的醣鞘脂，包含 globo H、Lc4Cer 以及 H type1。這些胚胎幹細胞特有的醣鞘脂也在誘導性多能性細胞分化之後，隨即消失。這些結果顯示細胞的多能性與細胞表面的醣鞘脂有明顯的關聯。

四、胚胎幹細胞分化成特定譜系細胞時醣鞘脂的改變

利用胚胎幹細胞分化出來的特定組織細胞，進行修復人體損傷或退化的器官組織是再生醫學的重要應用目標。為了對細胞分化成特定譜系的特性有更多的了解，本實驗室進一步將人類胚胎幹細胞分化成不同譜系的前驅細胞(progenitor cell)並分析其醣鞘脂的變化²⁶。當人類胚胎幹細胞分化成神經前驅細胞(neural progenitor)時，神經細胞譜系特有的細胞標誌，如 Nestin，Pax6 與 Sox1，都有明確的表現。另一方面，當人類胚胎幹細胞分化成定型內胚層(definitive endoderm)細胞時，細胞則表現內胚層譜系細胞特有的標誌，如 SOX17 及 FOXA2。這些譜系專一性的細胞標誌代表多能性胚胎幹細胞轉變為定向分化。至於醣鞘脂的變化，我們以質譜為主配合單株抗體，發現神經前驅細胞的醣鞘脂表現，以 ganglio-系列為主，其中 GD3 和 GM3 最多。其他 ganglio-系列，如 GM1 及 GD1 也在神經前驅細胞有表現。值得注意的是，GD3 只表現在神經前驅細胞；GM3、GM1 與 GD1 在人類胚胎幹細胞與神經前驅細胞兩種細胞都有發現。Lacto-或 Globo-系列醣鞘脂，例如 Lc4Cer、fucosyl Lc4Cer 及 Gb5Cer (SSEA3)，則主要表現於人類胚胎幹細胞(圖四)。

另一方面，人類胚胎幹細胞分化成定型內胚層細胞時，醣鞘脂的主要成分為 Lc4Cer/Gb4Cer，fucosyl Lc4Cer 次之，其他如 GM3，GM1，GD1，Globo H 及 fucosyl Lc4/nLc4Cer，也有少量的表現。比較人類胚胎幹細胞與定型內胚層細胞，醣鞘脂質譜分析的結果，發現兩種細胞在 m/z 1460 位置(相當於 Lc4Cer 或 Gb4Cer)都有強的訊號。因為 Lc4Cer 或 Gb4Cer 這兩種醣鞘脂的醣鏈部分都是由兩個 galactose、一個 glucose 以及一個 N-acetylglucosamine 所構成，只是醣分子排列順序不同，在質譜上呈現的訊號位置都是 m/z 1460。因此我們進一步藉由串聯質譜(MS-MS)的分析，將醣鏈裂解，分析其碎片的組合，區分 Lc4Cer 或 Gb4Cer 這兩種醣鞘脂。結果顯現，不論人類胚胎幹細胞或是最後內胚層細胞的 m/z 1460 訊號都含有 Lc4Cer 以及 Gb4Cer 兩種醣鞘脂。然而，人類胚胎幹細胞中 Lc4Cer 的表現較多，而在內胚層細胞則是 Gb4Cer 的表現較高。



圖四：利用基質輔助雷射脫附游離質譜法 (matrix-assisted laser desorption-ionization, MALDI-MS) 方法分析(A)人類胚胎幹細胞、(B)擬胚體、(C)神經前驅細胞、(D)定型內胚層細胞，醣鞘脂的變化。細胞醣鞘脂以 Folch 法提取並加以全甲基化反應 (permethylation)。醣鞘脂種類的判定根據醣鞘脂分子以 MALDI-MS 分析所得的 m/z 值所推斷。並以 MS/MS 分析確認其醣鏈種類與鍵結關係。(本圖改編自參考文獻²⁶)

另外值得注意的是，如上所述，不同的醣抗原可能含有某段相同被單株抗體所辨識的醣抗原決定位。本實驗室發現，以單株抗體 MC631 偵測定型內胚層細胞表面的抗原，有高達 62.9% 是 SSEA-3 抗原陽性的細胞。但以質譜分析定型內胚層細胞，在質譜圖譜上幾乎是偵測不到 m/z 1664.2，該位置相當於 Gb₅Cer (即 SSEA-3 抗原) 的訊號，顯示定型內胚層細胞並沒有表現 Gb₅Cer 醣鞘脂。因此，單株抗體 MC631 在定型內胚層細胞上所辨識的抗原，並非來自 Gb₅Cer 醣鞘脂，而是其他帶有 SSEA-3 抗原決定位的其他醣

鞘脂或醣蛋白。類似的例子也出現在單株抗體 MC813-70 偵測 SSEA-4 (Neu5Ac-Gb5Cer) 醣鞘脂的情況。從質譜結果得知，不論細胞分化為擬胚體、神經前驅細胞或定型內胚層細胞，質譜圖譜中都沒有看到到代表 SSEA-4 的 m/z 2025.3~2135.1 訊號。然而以單株抗體 MC813-70 偵測 SSEA-4 抗原時，在擬胚體神經前驅細胞或定型內胚層細胞都仍有相當程度的 MC813-70 陽性的免疫螢光訊號出現。這兩個例證，再次說明單株抗體分析醣抗原時，具有抗體交叉反應的缺點，也顯示質譜分析醣抗原的優點與必要性。

五、醣基轉移酶主導醣鞘脂核心結構的轉變

醣鞘脂上的醣鏈結構是由一連串的醣基轉移酶逐步催化醣分子而形成。當人類胚胎幹細胞分化為擬胚體時，我們發現負責合成 globo-以及 lacto-系列醣鞘脂的醣基轉移酶，如 A4GALT、B3GNT5、B3GALT5、FUT1 與 FUT2 基因表現量明顯減少，約為未分化時的 20%-30%。相對地，負責合成 ganglio-系列醣鞘脂的醣基轉移酶，如 B4GALNT1、ST8SIA1 與 ST3GAL1 基因表現則明顯增加，比未分化時增加約十倍之多。因此我們推論人類胚胎幹細胞分化為擬胚體時，醣鞘脂的核心結構由 globo-以及 lacto-系列轉變為 ganglio-系列是因為不同醣基轉移酶的基因表現所造成²⁵。相似的結果，也在人類胚胎幹細胞分化成神經前驅細胞時發現²⁶，globo-以及 lacto-系列醣鞘脂的醣基轉移酶，B3GALT5、FUT1 及 FUT2 基因表現量為未分化時的 10%以下。而 ganglio-系列醣鞘脂的醣基轉移酶 ST3GAL5 與 ST8SIA1 比未分化時增加 3-10 倍。另一方面，當人類胚胎幹細胞分化成定型內胚層細胞時，醣鞘脂各系列的醣基轉移酶基因表現都有不同程度的降低，這個現象說明了定型內胚層細胞醣鞘脂的質譜訊號較弱的現象。其中，特別低表現量之 Gb5 合成酶，可能是造成 Gb4 在定型內胚層細胞表現較高的原因造成。

六、醣靶向的癌症免疫治療

醣分子與蛋白質或脂質結合時可調控細胞與外界的訊息溝通。舉例而言，血型、精卵子結合、免疫細胞的交互作用、病毒或細菌入侵人體等，都必須透過與特定醣分子的交互作用才得以完成。當細胞病變時，細胞表面的醣分子也會因為合成或代謝的變化而有所異常。這些大量表現於癌細胞表面的異常醣分子已引起研究學者的關注，並將它們稱為“腫瘤相關醣抗原”(tumor-associated carbohydrate antigen)。這些腫瘤相關醣抗原可能協助癌細胞生長、抵抗宿主的免疫系統、作為辨識癌細胞的生物標記，或成為癌症治療藥物的標靶。

文獻上報導過的許多腫瘤相關醣抗原，與人類胚胎幹細胞或者其初步分化的細胞，擁有高度的共同性。例如：Globo H、SSEA-3、GD3、GD2、GM2、Neu5GC-GM3、Tn、sialyl Tn、Lewis^y、sialyl Lewis^x、sialyl Lewis^a、Lewis^x、Thomsen-Friedenreich 及 polysialic acids 等⁸。然而，癌細胞為何會表現胚胎幹細胞時期的醣抗原，其詳細的機制還有待釐清。不過，某些腫瘤相關醣抗原只表現於胚胎幹細胞而在正常組織不表現或僅微量表

現，即可被當成癌症免疫治療的標靶。到目前為止，有五個以腫瘤相關糖抗原為標的之癌症免疫治療，曾進入第 III 期臨床試驗，簡述如下：

1. 以 GD2 為標靶的單株抗體療法，屬於被動免疫療法。將辨識 GD2 的單株抗體 Dinutuximab 輸入神經母細胞瘤病人體內，讓抗體發揮對抗癌細胞的效用。
2. 以 sialyl-Tn 為免疫原，鑰孔帽貝血藍蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH) 為攜帶蛋白質的 sialyl-Tn-KLH 疫苗，治療乳癌³³
3. 以 GM2 為免疫原的 GM2-KLH 疫苗，治療黑色素瘤³⁴
4. 以 Globo H 為免疫原的 Globo H-KLH 疫苗(NCT01516307)，治療乳癌。這些癌症疫苗以癌細胞的特殊腫瘤糖抗原為藥物投入病人體內，誘導免疫系統活化，使病患自己產生對抗癌細胞的免疫反應而清除癌細胞。這種治療，屬於主動免疫療法。
5. 使用以 Neu5GC-GM3 為標靶之抗獨特型疫苗(anti-idiotypic vaccine) Racotumomab 治療肺癌。Racotumomab 可模擬 Neu5GC-GM3 抗原，誘導病患自身產生特異性免疫反應對抗癌細胞上的 Neu5GC-GM3 抗原³⁵。

Sialyl-Tn-KLH 疫苗(Theratope)³⁶ 及 GM2-KLH 疫苗³⁷ 之第三期臨床試驗結果顯示，對病人的存活時間沒有助益。但是該疫苗的事後比較分析，發現該疫苗可對於接受過荷爾蒙治療之乳癌患者的存活期，擁有延長的效果。另一方面，以隨機分配法測試 Racotumomab 疫苗之臨床試驗，初步結果顯示該疫苗可稍微延長肺癌患者之 progression-free survival 及 overall survival，此結果已達到統計的顯著性。因此，Racotumomab 疫苗已進入更大規模的隨機臨床試驗³⁵。至於 Globo H-KLH 疫苗，其第二/三期臨床試驗結果顯示，能產生抗 Globo H 抗體的病患群裏，其 progression-free survival 與 overall survival 都有顯著改善，目前正籌劃進行全球性第三期臨床試驗。截至目前為止，只有 Dinutuximab，以 GD2 為標靶的單株抗體，在第三期臨床試驗證實可以增加神經母細胞瘤患者的 event free survival 和 overall survival，並獲得美國和歐洲監管機構批准可以用於治療病人。此外，Dinutuximab 也是 50 多個臨床癌症抗體藥中唯一一個以腫瘤相關糖抗原為標靶之藥物^{23, 38, 39}。

七、GD2 免疫療法的理論基礎

GD2 屬於 ganglio- 系列中 b- 系的糖鞘脂，結構為 GalNAc β 1-4 (NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3) Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer (表一)。GD2 只有少量表現於正常大腦組織、神經前驅細胞、和周邊神經纖維及皮膚色素細胞。相反地，在某些癌細胞，如神經母細胞瘤(>98%)，黑色素瘤，神經膠細胞瘤，小細胞肺癌及惡性肉瘤則有相當高的 GD2 的表現^{40, 41}。值得注意的是，GD2 也表現在幹細胞，如胚胎神經幹細胞、間質幹細胞以及乳癌幹細胞。Andreeff 研究團隊也發現，在 H-Ras 轉化的人類乳腺細胞株中，GD2 陽性的細胞群具有癌症幹細胞特性⁴²。本實驗室在惡性葉狀乳房腫瘤(phyllodes tumor)也

觀察到 GD2⁺ALDH⁺細胞群具有癌症幹細胞特性，例如：乳腺球群細胞形成能力上升、腫瘤形成頻率增加與分化成不同譜系的神經細胞能力增加。綜合以上所述，在乳癌以及間質幹細胞，GD2 陽性細胞很可能代表著一群具有幹細胞潛力的特殊細胞⁴³。

另外也有一些報導顯示 GD2 可能對腫瘤細胞增殖和侵襲至關重要^{44,45}。例如，GD2 陽性的腫瘤細胞與 anti-GD2 單株抗體結合，可誘導細胞失去貼附性繼而引發細胞死亡⁴⁶；或者，抑制 metalloproteinase-2 表達可以降低細胞的侵襲能力；anti-GD2 單株抗體會與 CD166 結合，降低磷酸肌醇 3-kinase 的活性和 Akt 蛋白激酶的磷酸化⁴⁷。除此之外，Anti-GD2 單株抗體 14G2a 還可抑制 Aurora 激酶、MYCN、ID1 與 TLX2 的表達，並增加 p53、JUN、SVIL 及 RASSF6 的表現^{48,49}。類似的結果也出現在另一個 anti-GD2 抗體 3F8。3F8 抗體與 GD2 陽性的腫瘤細胞結合，可活化 caspase 3，7 和 8 訊息途徑，並抑制抗凋亡分子，如 survivin 及 cytochrome C，達到抑制 GD2 陽性的腫瘤細胞生長並誘導其細胞凋亡⁵⁰。此外，有研究顯示，抗體 3F8 可活化人類神經母細胞瘤 SH-SY5Y-TrkB 細胞內之 Src-family 激酶，進而磷酸化 N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B，而誘導鈣離子流通⁵¹。此現象或可解釋 anti-GD2 抗體注射導致神經病變性疼痛的現象。另一方面，在三陰性乳腺癌細胞 MDA-MB-231，可以降低 GM2/GD2 合成酶，減少 c-Met 磷酸化，抑制細胞生長⁵²。

另外，人類血小板與純化的 GD2 共同培養時，會增加 integrin α 2 β 1 調控的 focal adhesion kinase 磷酸化，進而增強血小板與膠原蛋白的黏附性⁵²，這項結果也暗示 GD2 可能藉由血小板促進腫瘤轉移^{53,54}。除了血小板，GD2 還可以減少 CD34⁺骨髓前驅細胞中 CD83 與 CD86 的表達，這表示 GD2 可能阻礙 CD34⁺細胞分化為樹突狀細胞⁵⁵。此外，Ladisch 等人的研究顯示，GD2 可以抑制 T 細胞的增殖⁵⁶。從腎細胞癌釋出的 GD2 可以結合在循環系統中的 T 細胞而誘導 T 細胞凋亡⁵⁷。而且，在活化的 CD4⁺ T 細胞可以觀察到新生的 GD2 與 T 細胞受體共同集群於細胞表面，與此同時也可發現 GM2/GD2 合成酶的表達上升⁵⁸。這些發現顯示，GD2 可能藉由調節免疫活性而促進腫瘤生長。

目前大部分研究 GD2 與癌症形成的分子機制，通常利用 anti-GD2 單株抗體或操縱 GD2/GM2 合成酶的表現。但操縱合成酶的表現所造成的效應，可能不單純是因為 GD2 表現改變所引起，GD2 合成路徑與相關的醣鞘脂的變化也可能參與其中。

八、GD2 免疫療法的臨床試驗

以 GD2 為標的之癌症免疫治療主流是運用各種 GD2 專一性的單株抗體進行被動免疫療法。曾在臨床試驗中被評估過的 GD2 單株抗體，包括小鼠單株抗體 14G2a 和 3F8；人鼠嵌合單株抗體 ch14.18；人類單株抗體 Hu14.18 和 Hu3F8，以及與細胞激素組成融合蛋白的單株抗體。另一方面，以主動免疫療法為研發方向的策略，例如運用 GD2 本身或 GD2 抗獨特型抗體(GD2-directed anti-idiotypic antibody)模擬 GD2 抗原，也都正在發展中。

以 GD2 為標靶的臨床試驗方面，小鼠單株抗體 14G2a^{59,60} 在第一期臨床試驗顯示，

該抗體可能造成的毒性反應，包括疼痛、心動過速、低血壓、高血壓、發熱、低鈉血症及蕁麻疹。這些毒性反應與給與 14G2a 抗體的劑量與輸液速率有關⁶¹⁻⁶³。此外，為了提高 14G2a 的 antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)，將 IL-2 與 14G2a 合併使用，有兩個病人顯示臨床反應⁶⁴。為了改善 14G2a 在人體的藥物動力性質而製造人鼠嵌合單株抗體 ch14.18，此抗體蛋白質 Fc 序列與人類產生的抗體相似，但仍包含部分鼠類蛋白質序列⁶⁵，結果顯示，ch14.18 的 ADCC 活性比 14G2a 高 50–100 倍⁶⁶。另外，ch14.18 的半衰期(66.6 ± 27.4 h)較 14G2a (18.3 ± 11.8 h)長，但毒性與 14G2a⁶⁷⁻⁶⁹類似。

因為 GM-CSF 會引起顆粒細胞的 ADCC，並誘導單核細胞，嗜酸性與嗜中性細胞生成⁷⁰。因此有研究團隊以 ch14.18 合併 GM-CSF 進行臨床試驗，並發現 10/49 神經母細胞瘤患者顯示出臨床反應^{22,71}。這些早期試驗顯示，大部分有臨床反應的受試者具有相對較輕的疾病症狀，尤其是在骨髓中腫瘤細胞較微量($\leq 10\%$)的患者。這也使得後續 anti-GD2 免疫療法的設計主要針對具有殘存微小神經母細胞瘤之患者。

根據上述所有臨床試驗，陳鈴津教授設計並執行使用 ch14.18 抗體治療神經母細胞瘤患者之第三期臨床試驗，以隨機分配方式將高危險神經母細胞瘤患者分為兩群，分別接受標準療法及免疫療法。標準療法以維他命 A 酸治療六個周期；免疫療法則是以維他命 A 酸合併五個連續 ch14.18 抗體治療周期並交替使用 GM-CSF 及 IL-2。臨床試驗結果顯示，226 名隨機患者接受免疫治療，其 2 年無病徵發生存活率($66\% \pm 5\%$ 比 $46\% \pm 5\%$ ， $P = 0.01$)和總存活率($86\% \pm 4\%$ 比 $75\% \pm 4\%$ ， $P = 0.02$)相較於接受標準療法有顯著提高²²。這項重大突破性進展讓 ch14.18 抗體(Dinutuximab, Unituxin®)在 2015 年獲得美國和歐洲監管機構批准上市。現今 Dinutuximab 已被認為是高危險神經母細胞瘤的標準治療方式，這也是世界第一例，首次證實腫瘤相關醣抗原可成為免疫療法之標的²³。

為了進一步提高療效，研究者以 CDR 可變區嫁接的方式製造出人類化的 14.18 抗體(hu14.18)⁷²。並且，在 Fc 區導入 K322A 突變，限制補體 C5a 結合以減少 anti-GD2 單株抗體引起的神經性疼痛，同時保持其 ADCC 活性⁷³。第一期臨床試驗顯示，病人對 hu14.18K322A 比 ch14.18 有更大的耐受劑量。此外，針對復發或有抗性的神經母細胞瘤患者，以化療藥物結合 ch14.18 或 hu14.18K322A 的臨床試驗也取得了明顯的臨床反應效果^{74, 75}。這些結果支持下列觀點為高危險神經母細胞瘤的患者在第一線化療時應合併 Dinutuximab 免疫療法。此外，將抗體與細胞激素(cytokine)連結在一起，使腫瘤微環境中細胞激素的濃度提高，藉此活化免疫細胞，將可提升抗體的療效。依此概念，有研究學者將 hu14.18 抗體連結 IL-2 形成 Hu14.18-IL-2 融合蛋白。此融合蛋白在神經母細胞瘤和黑色素瘤病患被證實的確有抗癌活性⁷⁶⁻⁷⁸，並且，患者若具有 KIR-ligand 無法配對的基因型，將會有較好的臨床反應^{79,80}。

另一個 anti-GD2 抗體 3F8，是小鼠 IgG3 單株抗體。3F8 抗體在臨床試驗顯示出類似 14G2a 的副作用以及抗腫瘤的活性⁸¹。第二期臨床試驗裏，第四期神經母細胞瘤的患者接受合併 GM-CSF 及 cis-retinoic 的 3F8 治療，有 62% 的患者存活 5 年無死亡復發事件發生⁸²。另外，也發現患者 FCGR2A (Fc gamma receptor 2A)基因若為 R/R 型，其接受 3F8 單株抗體治療有較佳的預後⁸³。最近，人類化的 3F8 (hu3F8)已成功製備完成，目

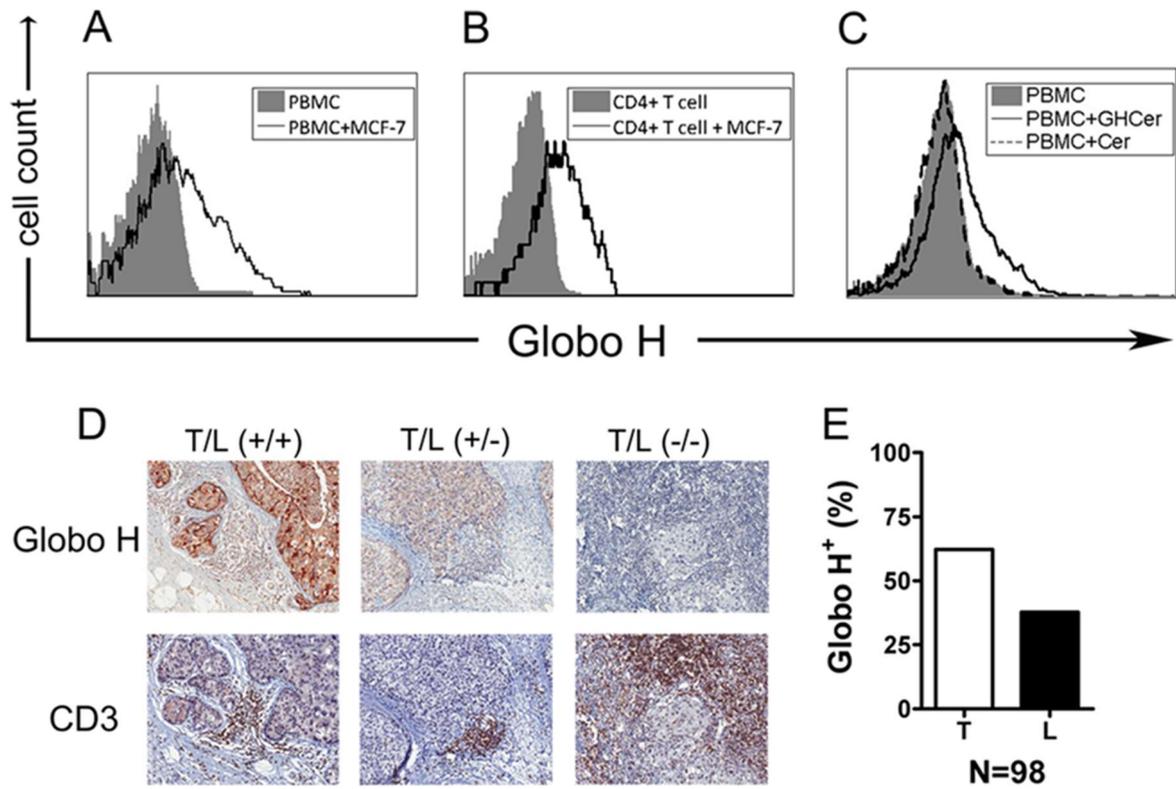
前正進入第一期臨床試驗⁸⁴。

單株抗體 1A7 為 anti-idiotypic antibody，此抗體是以 14G2a 抗體為抗原，製備出能特異性結合 14G2a 抗體之可變區的抗體。1A7 可模擬 GD2 抗原，於人體誘發 anti-GD2 抗體產生，屬於主動免疫治療之一種。1A7 已在晚期神經母細胞瘤和黑色素瘤病患進行過臨床試驗，受試者對 1A7 的耐受性良好⁸⁵，並且產生免疫球蛋白，該免疫球蛋白除了可結合 GD2⁺腫瘤細胞，並具有 CDC 及 ADCC 活性⁸⁶⁻⁹⁰。除此之外，接受 1A7 疫苗的受試者，並沒有出現神經痛的症狀，值得期待其在後續臨床試驗的治療效果。

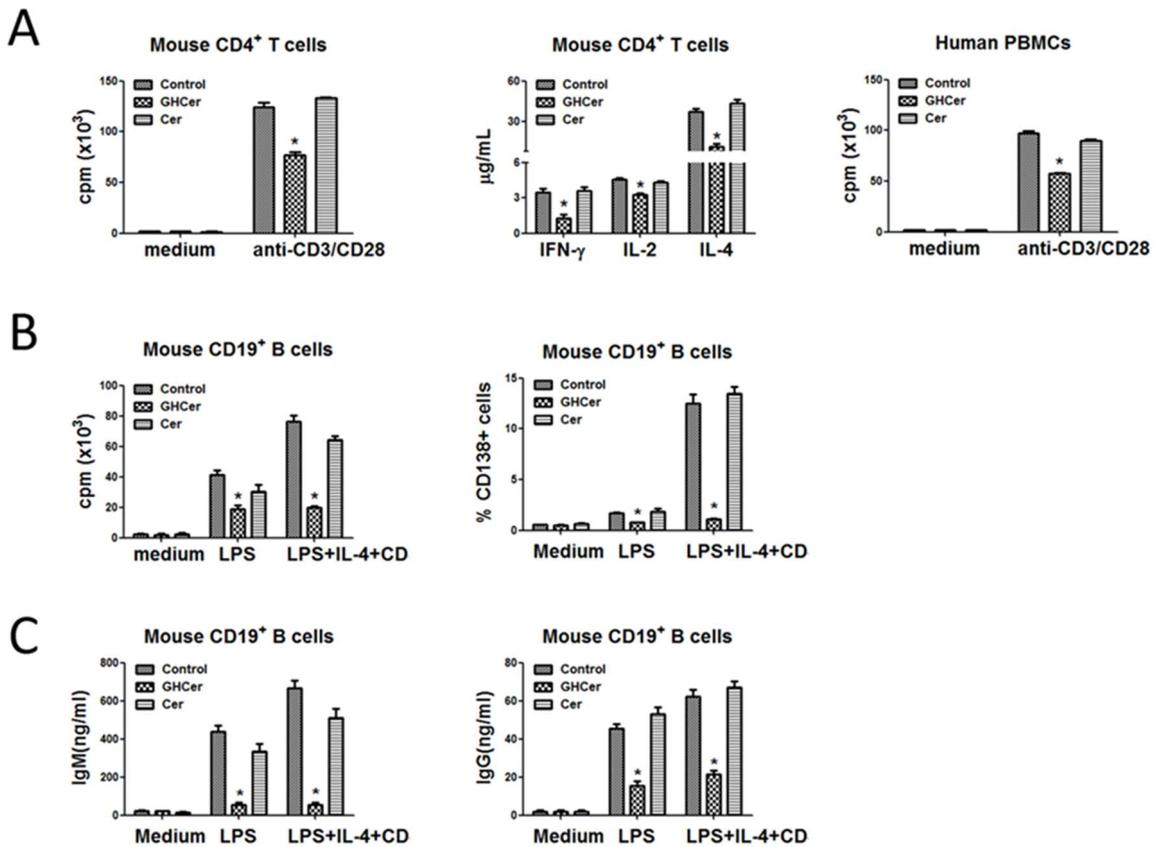
另一個主動免疫療法策略為使用純化的 GD2 作為疫苗輸注於人體，激活免疫系統產生 anti-GD2 抗體。由於 GD2 抗原性不佳，因此常需使用高抗原性蛋白質作為佐劑來增強免疫反應。例如：以高抗原性蛋白支架 KLH 攜帶 GD2 抗原，並添加免疫促進劑 monophosphoryl lipid A (MPL-A)。GD2-KLH + MPL-A 疫苗已在神經膠細胞瘤患者進行測試，受試者對該疫苗並無不良反應，但是未能引起 anti-GD2 抗體或臨床反應⁹¹。另外，給予受試者 GD2-KLH + QS-21 及口服葡聚糖作為佐劑，大多數受試者卻可以成功產生 anti-GD2 抗體，並且有一些受試者有清除微小殘留腫瘤的反應⁹²。類似的結果，也在於 GM2-KLH + GD2-KLH + QS-21 疫苗第一期臨床試驗被發現，該疫苗可以在黑色素瘤或肉瘤患者成功誘導出 anti-GM2 (97%)和 anti-GD2 (73%)免疫球蛋白⁹³。這些成果也顯示蛋白質載體和佐劑對增強醣分子疫苗的抗原性有顯著的影響。

九、Globo H 的免疫治療法

Globo H，為帶有六個醣分子的醣鞘脂(表一)，最初在人類乳腺癌細胞株 MCF-7 被發現²⁴，隨後發現 Globo H 也表現在多種上皮細胞腫瘤，包括乳癌、結腸癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌、肺癌與前列腺癌等^{94,95}。本實驗室發現，有 61%的乳癌患者表現 Globo H 和 77.5%的乳癌患者表現 Globo H 的前驅物 SSEA-3。進一步分析其癌組織內的乳癌幹細胞，發現分別有 20%和 62.5%的族群表現 Globo H 及 SSEA-3⁹⁶。本實驗室是首先發現 Globo H-ceramide 免疫抑制效應的研究團隊⁹⁷。我們將 Globo H 陽性的腫瘤細胞與淋巴細胞共同培養，發現淋巴細胞會呈現出 Globo H 陽性的染色(圖五)。結果顯示，Globo H-ceramides 可以跑到 T 和 B 細胞，進而抑制其增殖和降低細胞激素或免疫球蛋白的產生(圖六)。我們發現免疫細胞，接收了 Globo H，其 Notch 的表達減低，且抑制 Notch 的 DNA-binding id3、cbl-b、egr2/3 以及 itchy 表達上升，因而導致 T 細胞活化受抑制。這些結果首先證實 Globo H-ceramide 可扮演免疫檢查站(immunologic checkpoint)分子的角色，腫瘤細胞可藉由它逃避免疫系統監督，而促進癌症發生。

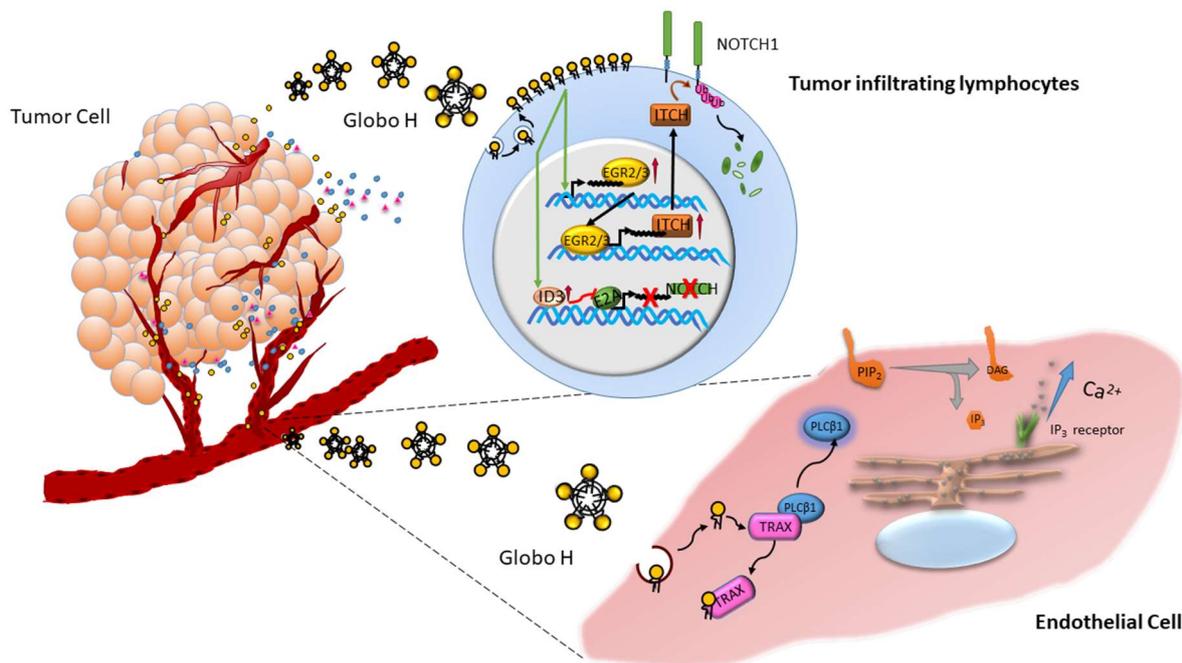


圖五，在生體外和生體內淋巴細胞可以吸收腫瘤細胞釋出的 Globo H。人類周邊血液單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 與 Globo H 陽性的 MCF-7 腫瘤細胞共同培養後，由流式細胞儀分析 (A) PBMC 或 (B) CD4⁺ T 細胞中 Globo H 的表達。(C) 小鼠脾細胞與合成的 Globo H-ceramide 共同培養後，由流式細胞儀分析小鼠脾細胞 Globo H 的表達。(D) 乳腺癌組織切片以 VK9 抗體 (anti-Globo H) 或 CD3 抗體進行免疫組織化學染色。T：腫瘤；L：淋巴細胞；+：Globo H 陽性；-：Globo H 陰性。(E) Globo H 在腫瘤或浸潤淋巴細胞的百分比。(本圖改編自參考文獻⁹⁷)



圖六，Globo H-ceramide 對免疫細胞增殖以及生產的細胞因子或免疫球蛋白的影響。(A)小鼠免疫細胞與 Globo H-ceramide 共同培養後，以 CD3 和 CD28 單株抗體活化免疫細胞，分析免疫細胞的生長及細胞因子的產生(B, C)小鼠免疫細胞與 Globo H-ceramide 共同培養後，以 LPS (lipopolysaccharide)、IL-4(interleukin-4)、mCD40 L 活化免疫細胞，分析免疫細胞的生長及細胞激素的產生。(本圖改編自參考文獻⁹⁷)

本實驗室也發現 Globo H-ceramide 除了對免疫細胞有抑制作用，對血管生成也有影響⁹⁸。我們發現 Globo H-ceramide 在體外可促使內皮細胞管腔形成，並含有 Globo H-ceramide 的 Matrigel plug 會有血管生成現象。此外，將 MCF-7 腫瘤細胞中 Globo H 高表現的細胞群，接種於免疫缺失小鼠中，腫瘤細胞增長速度與血管密度都大於 Globo H 低表現的腫瘤細胞群。在病人乳腺癌組織樣本中，Globo H 陽性的樣本，其血管密度亦高於 Globo H 陰性的樣本。另外我們也發現，Globo H-ceramide 會與 translin associated factor X (TRAX) 結合，將 PLCβ1 由 TRAX 釋放，PLCβ1 引起 Ca²⁺ 釋放而誘導血管生成(圖七)。本實驗室是第一個發現 Globo H-ceramide 可促使血管生成並說明其機制的研究團隊。



圖七，腫瘤釋出的 Globo H-ceramide 促進微環境血管的生成。內皮細胞吸收腫瘤以微泡 (microvesicles) 形式釋出至微環境的 Globo H-ceramide (Globo H-Cer)。Globo H 與 TRAX 結合後，PLCβ1 與 TRAX 分離，導致 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) 水解形成 inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) 以及 diacylglycerol (DAG)。IP₃ 與 IP₃ 受體在內質網(ER) 結合後誘發鈣離子流通 (calcium influx) 而引發血管生成。(本圖改編自參考文獻⁴²)

當胚胎幹細胞發育進入原腸胚形成期後 Globo H 就會消失。而且，Globo H 在癌症組織高量表達而在正常組織只有微量表達。而且本實驗室的研究結果顯示 Globo H-ceramide 具有多重角色，如幹細胞標記、免疫檢查站分子與血管生成因子。這些特點都支持 Globo H-ceramide 是良好的癌症免疫療法的標靶。因此我們將 Globo H 與 KLH 結合，並混合 α-GalCer 為佐劑，製成 Globo H-KLH/α-GalCer 疫苗。在小鼠動物實驗中，我們發現該疫苗可以誘導 Globo H 和 SSEA-3 特異性抗體產生。這項結果顯示，Globo H-KLH/α-GalCer 疫苗將可用於治療會表現 Globo H 或 SSEA-3 的腫瘤細胞與癌症幹細胞，例如乳癌幹細胞⁹⁶。

兩個第一期臨床試驗，使用 GD2-KLH 合併 QS-21 為佐劑，治療復發的前列腺癌患者 (n = 18)⁹⁹ 和轉移性乳腺癌患者 (n = 27)¹⁰⁰，結果顯示疫苗具安全性並且能誘導體液性抗體反應。另一個跨國隨機 II 期/III 期臨床試驗，分別以 Globo H-KLH/OPT-821 疫苗和安慰劑治療轉移性乳腺癌患者，共有 349 名患者參與試驗。結果顯示，對疫苗產生抗體反應的患者，Globo H-KLH 疫苗可以顯著改善患者無進展生存期和總生存期。基於這些樂觀的結果，第三期全球性臨床試驗正在進行中。另一個卵巢癌疫苗的二期臨床試驗也

在正在進行。

此外，為了克服監管相關法規和載體蛋白 KLH 取得的問題，新一代 Globo H 疫苗已經進行開發。在臨床前研究期間曾測試三個載體蛋白，包括牛血清白蛋白、破傷風類毒素和基因改造的白喉類毒素。此外，也測試許多佐劑，包括 α -GalCer 及其類似物 7DW8-5、C34 與 C17 或者不同種類的佐劑，如 alum 和 MF59。最後發現，Globo H-CRM197 DT + C34 的組合，可以產生最多 anti-Globo H 的 IgG 與 IgM 抗體，並且與 Globo H-KLH/QS-21 有相同的效果¹⁰¹。Globo H-CRM197 DT + C34 疫苗目前已進入臨床發展的早期階段。

十、結語

在生物體內各種的醣分子常以醣苷鍵鍵結於蛋白質或脂質而發揮其功能並影響細胞內外各項生理反應。DNA 或勝肽的組成是較單純的線性連接，而醣分子的連結卻有許多複雜的分支結構。以六碳醣而言，其中五個碳都可以連結其他的單醣，每一個連結點又有空間結構中上下方向的不同，這使得多醣結構的排列變化多端，也因此醣分子的合成與分析一直都是研究者努力突破的目標。本章節所探討的醣鞘脂是由疏水性的神經酰胺與相對親水性較高的寡醣鏈結而成。因為醣分子結構的複雜性，分析醣鞘脂醣分子結構的方法除了利用抗體之外，為避免抗體的交叉作用，還需要配合質譜儀分析醣分子的組成與結構。利用抗體以及 MALDI-MS 和 MS/MS 分析，本實驗室完整地分解人類胚胎幹細胞或誘導型全能幹細胞醣鞘脂結構的變化及其分化成不同細胞時醣鞘脂的變化。除了已知的人類胚胎幹細胞標誌 SSEA-3 與 SSEA-4 之外，我們證明 globo-和 lacto-系列的醣鞘脂，如 Gb4Cer、Lc4Cer、fucosyl Lc4Cer、GloboH 以及 disialyl Gb5Cer 表現於人類胚胎幹細胞或誘導型全能幹細胞。本實驗室也指出人類胚胎幹細胞分化時，醣鞘脂核心結構會從 globo-/lacto-系列轉變為 ganglio-系列，並發現核心結構的變化與醣轉移酶表現量間有正關聯。另外，當人類胚胎幹細胞分化成特定譜系細胞時，醣鞘脂也有相應的變化。分化為神經前驅細胞時，醣鞘脂核心結構主要由 ganglio-系列組成，以 GD3 為最多。分化成定型內胚層時，醣鞘脂則以 Gb4Cer 為主，並伴隨少量的 SSEA-3、SSEA-4 及 GD3。這些特定譜系分化細胞的醣鞘脂變化也與其個別的醣轉移酶表現量有正關聯。胚胎幹細胞或前驅細胞上的表面醣抗原也可在癌細胞上發現。近年來許多抗癌免疫療法都以這些醣抗原為標的。因此，了解醣抗原在胚胎幹細胞與癌細胞表現的種類是相當重要的。尤其令人振奮是，以 GD2 為標的之 Dinutuximab 抗體已證實可以增加神經母細胞瘤患者的存活率並獲得 FDA 批准成為標準療法。這代表了解醣鞘脂的活性及相關的分子機制將可以發展新的癌症治療策略且改善治療效果。

十一、參考文獻

1. Thomson, J.A. *et al.* 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. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
 4. Theunissen, T.W. *et al.* Molecular Criteria for Defining the Naive Human Pluripotent State. *Cell Stem Cell* **19**, 502-515 (2016).
 5. Pera, M.F., Reubinoff, B. & Trounson, A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* **113**, 5-10 (2000).
 6. Tesar, P.J. *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196-199 (2007).
 7. De Los Angeles, A. *et al.* Hallmarks of pluripotency. *Nature* **525**, 469-478 (2015).
 8. Hakomori, S. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 325-346 (2008).
 9. Hakomori, S.I. & Ishizuka, I. Glycolipids: animal. *Encyclopedia of Life Sciences* Chichester, UK, John Wiley & Sons Ltd. 2006.
 10. Hakomori, S. Glycosynaptic microdomains controlling tumor cell phenotype through alteration of cell growth, adhesion, and motility. *FEBS Lett* **584**, 1901-1906 (2010).
 11. Yu, R.K., Macala, L.J., Taki, T., Weinfield, H.M. & Yu, F.S. Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain. *J Neurochem* **50**, 1825-1829 (1988).
 12. Yu, R.K. Development regulation of ganglioside metabolism. *Prog Brain Res* **101**, 31-44 (1994).
 13. Jungalwala, F.B. Expression and biological functions of sulfoglucuronyl glycolipids (SGGLs) in the nervous system--a review. *Neurochem Res* **19**, 945-957 (1994).
 14. Prinetti, A., Loberto, N., Chigorno, V. & Sonnino, S. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 184-193 (2009).
 15. Sonnino, S. & Prinetti, A. Sphingolipids and membrane environments for caveolin. *FEBS Lett* **583**, 597-606 (2009).
 16. Guan, F., Handa, K. & Hakomori, S. Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 7461-7466 (2009).
 17. Guan, F., Schaffer, L., Handa, K. & Hakomori, S. Functional role of gangliotetraosylceramide in epithelial-to-mesenchymal transition process induced by hypoxia and by TGF-beta. *FASEB J* **24**, 4889-4903 (2010).
 18. Hakomori, S. Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain. *Glycoconj J* **17**, 143-151 (2000).

19. Ngamukote, S., Yanagisawa, M., Ariga, T., Ando, S. & Yu, R.K. Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycogenes in mouse brains. *J Neurochem* **103**, 2327-2341 (2007).
20. Kannagi, R. *et al.* Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J* **2**, 2355-2361 (1983).
21. Handa, K. & Hakomori, S. Carbohydrate to carbohydrate interaction in development process and cancer progression. *Glycoconj J* **29**, 627-637 (2012).
22. Yu, A.L. *et al.* Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *New Engl J Med* **363**, 1324-1334 (2010).
23. Dhillon, S. Dinutuximab: first global approval. *Drugs* **75**, 923-927 (2015).
24. Kannagi, R. *et al.* New globoseries glycosphingolipids in human teratocarcinoma reactive with the monoclonal antibody directed to a developmentally regulated antigen, stage-specific embryonic antigen 3. *J Biol Chem* **258**, 8934-8942 (1983).
25. Liang, Y.J. *et al.* Switching of the core structures of glycosphingolipids from globo- and lacto- to ganglio-series upon human embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22564-22569 (2010).
26. Liang, Y.J. *et al.* Changes in glycosphingolipid composition during differentiation of human embryonic stem cells to ectodermal or endodermal lineages. *Stem Cells* **29**, 1995-2004 (2011).
27. Tang, C. *et al.* An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nat Biotechnol* **29**, 829-834 (2011).
28. Matsumoto, S. *et al.* A Cytotoxic Antibody Recognizing Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) on Human Induced Pluripotent Stem (hiPS) Cells. *J Biol Chem* **290**, 20071-20085 (2015).
29. Barone, A. *et al.* Structural complexity of non-acid glycosphingolipids in human embryonic stem cells grown under feeder-free conditions. *J Biol Chem* **288**, 10035-10050 (2013).
30. Barone, A. *et al.* Sialyl-lactotetra, a novel cell surface marker of undifferentiated human pluripotent stem cells. *J Biol Chem* **289**, 18846-18859 (2014).
31. Kwak, D.H., Seo, B.B., Chang, K.T. & Choo, Y.K. Roles of gangliosides in mouse embryogenesis and embryonic stem cell differentiation. *Exp Mol Med* **43**, 379-388 (2011).
32. Liao, C.-H. & Yu, J. Human Embryonic Stem Cell Differentiation: Role of Glycosphingolipid Structure, in *Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 8: Therapeutic Applications in Disease and Injury*. (ed. M.A. Hayat) 179-190 (Springer Netherlands, Dordrecht; 2012).
33. Miles, D. *et al.* Phase III Multicenter Clinical Trial of the Sialyl-TN (STn)-Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) Vaccine for Metastatic Breast Cancer. *Oncologist* **16**, 1092-1100 (2011).
34. Eggermont, A.M.M. *et al.* Adjuvant Ganglioside GM2-KLH/QS-21 Vaccination Versus Observation After Resection of Primary Tumor > 1.5 mm in Patients With Stage II Melanoma: Results of the EORTC 18961 Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol* **31**, 3831-+ (2013).

35. Alfonso, S. *et al.* A randomized, multicenter, placebo-controlled clinical trial of racotumomab-alum vaccine as switch maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* **20**, 3660-3671 (2014).
36. Ibrahim, N.K. *et al.* Survival Advantage in Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Therapy plus Sialyl Tn-KLH Vaccine: Post Hoc Analysis of a Large Randomized Trial. *J Cancer* **4**, 577-584 (2013).
37. Eggermont, A.M. *et al.* Adjuvant ganglioside GM2-KLH/QS-21 vaccination versus observation after resection of primary tumor > 1.5 mm in patients with stage II melanoma: results of the EORTC 18961 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* **31**, 3831-3837 (2013).
38. Kushner, B.H. Chemoimmunotherapy for high-risk neuroblastoma. *Lancet Oncol* **18**, 845-846 (2017).
39. Mody, R. *et al.* Irinotecan-temozolomide with temsirolimus or dinutuximab Crosstafark in children with refractory or relapsed neuroblastoma (COG ANBL1221): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **18**, 946-957 (2017).
40. Klassen, H., Schwartz, M.R., Bailey, A.H. & Young, M.J. Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. *Neurosci Lett* **312**, 180-182 (2001).
41. Schulz, G. *et al.* Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer Res* **44**, 5914-5920 (1984).
42. Yu, A.L., Hung, J.T., Ho, M.Y. & Yu, J. Alterations of Glycosphingolipids in Embryonic Stem Cell Differentiation and Development of Glycan-Targeting Cancer Immunotherapy. *Stem Cells Dev* (2016).
43. Lin, J.J. *et al.* Malignant phyllodes tumors display mesenchymal stem cell features and aldehyde dehydrogenase/disialoganglioside identify their tumor stem cells. *Breast Cancer Res* **16**, R29 (2014).
44. Yoshida, S. *et al.* Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res* **61**, 4244-4252 (2001).
45. Shibuya, H. *et al.* Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Sci* **103**, 1656-1664 (2012).
46. Doronin, I.I. *et al.* Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. *BMC Cancer* **14** (2014).
47. Agrawal, V. & Frankel, A.E. 14G2a anti-GD2 crossreactivity with the CD166 antigen. *J Immunother* **33**, 1014-1015 (2010).
48. Horwacik, I. *et al.* Analysis of genes involved in response to doxorubicin and a GD2 ganglioside-specific 14G2a monoclonal antibody in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Acta Biochim Pol* **62**, 423-433 (2015).
49. Horwacik, I., Durbas, M., Boratyn, E., Wegrzyn, P. & Rokita, H. Targeting GD2 ganglioside

- and aurora A kinase as a dual strategy leading to cell death in cultures of human neuroblastoma cells. *Cancer letters* **341**, 248-264 (2013).
50. Tsao, C.Y. *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of GD2 ganglioside-specific monoclonal antibody 3F8 in human melanoma cells. *Oncoimmunology* **4** (2015).
 51. Tong, W.Y., Maira, M., Gagnon, M. & Saragovi, H.U. Ligands Binding to Cell Surface Ganglioside GD2 Cause Src-Dependent Activation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Signaling and Changes in Cellular Morphology. *PLoS One* **10** (2015).
 52. Mahata, B., Banerjee, A., Kundu, M., Bandyopadhyay, U. & Biswas, K. TALEN mediated targeted editing of GM2/GD2-synthase gene modulates anchorage independent growth by reducing anoikis resistance in mouse tumor cells. *Sci Rep-UK* **5**, 9048 (2015).
 53. Weber, M.R. *et al.* Activated tumor cell integrin $\alpha v\beta 3$ cooperates with platelets to promote extravasation and metastasis from the blood stream. *Thromb Res* **140 Suppl 1**, S27-36 (2016).
 54. Tsuruo, T., Kawabata, H., Iida, H. & Yamori, T. Tumor-induced platelet aggregation and growth promoting factors as determinants for successful tumor metastasis. *Clinical & experimental metastasis* **4**, 25-33 (1986).
 55. Shurin, G.V. *et al.* Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res* **61**, 363-369 (2001).
 56. Ladisch, S., Becker, H. & Ulsh, L. Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses. *Biochim Biophys Acta* **1125**, 180-188 (1992).
 57. Biswas, S. *et al.* Elevated levels of select gangliosides in T cells from renal cell carcinoma patients is associated with T cell dysfunction. *J Immunol* **183**, 5050-5058 (2009).
 58. Villanueva-Cabello, T.M., Mollicone, R., Cruz-Munoz, M.E., Lopez-Guerrero, D.V. & Martinez-Duncker, I. Activation of human naive Th cells increases surface expression of GD3 and induces neoexpression of GD2 that colocalize with TCR clusters. *Glycobiology* **25**, 1454-1464 (2015).
 59. Mujoo, K., Cheresch, D.A., Yang, H.M. & Reisfeld, R.A. Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth. *Cancer Res* **47**, 1098-1104 (1987).
 60. Mujoo, K. *et al.* Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. *Cancer Res* **49**, 2857-2861 (1989).
 61. Uttenreuther-Fischer, M.M., Huang, C.S., Reisfeld, R.A. & Yu, A.L. Pharmacokinetics of anti-ganglioside GD2 mAb 14G2a in a phase I trial in pediatric cancer patients. *Cancer Immunol Immun: CII* **41**, 29-36 (1995).
 62. Murray, J.L. *et al.* Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by

- prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *J Clin Oncol* **12**, 184-193 (1994).
63. Saleh, M.N. *et al.* Phase I trial of the murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a in metastatic melanoma. *Cancer Res* **52**, 4342-4347 (1992).
 64. Frost, J.D. *et al.* A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group. *Cancer* **80**, 317-333 (1997).
 65. Gillies, S.D., Lo, K.M. & Wesolowski, J. High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes. *J Immunol Methods* **125**, 191-202 (1989).
 66. Mueller, B.M., Romerdahl, C.A., Gillies, S.D. & Reisfeld, R.A. Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. *J Immunol* **144**, 1382-1386 (1990).
 67. Yu, A.L. *et al.* Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J Clin Oncol* **16**, 2169-2180 (1998).
 68. Handgretinger, R. *et al.* A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer* **31A**, 261-267 (1995).
 69. Uttenreuther-Fischer, M.M., Huang, C.S. & Yu, A.L. Pharmacokinetics of human-mouse chimeric anti-GD2 mAb ch14.18 in a phase I trial in neuroblastoma patients. *Cancer Immunol Immunol : CII* **41**, 331-338 (1995).
 70. Tomonaga, M., Golde, D.W. & Gasson, J.C. Biosynthetic (recombinant) human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: effect on normal bone marrow and leukemia cell lines. *Blood* **67**, 31-36 (1986).
 71. Simon, T. *et al.* Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol* **22**, 3549-3557 (2004).
 72. Metelitsa, L.S. *et al.* Antidisialoganglioside/granulocyte macrophage-colony-stimulating factor fusion protein facilitates neutrophil antibody-dependent cellular cytotoxicity and depends on Fcγ₂R_{II} (CD32) and Mac-1 (CD11b/CD18) for enhanced effector cell adhesion and azurophil granule exocytosis. *Blood* **99**, 4166-4173 (2002).
 73. Sorkin, L.S. *et al.* Anti-GD(2) with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain* **149**, 135-142 (2010).
 74. Margolin, K.A. *et al.* Randomized phase II trial of sorafenib with temsirolimus or tipifarnib in untreated metastatic melanoma (S0438). *Clin Cancer Res* **18**, 1129-1137 (2012).
 75. Dhillon, S. Erratum to: Dinutuximab: First Global Approval. *Drugs* **75**, 1831 (2015).
 76. King, D.M. *et al.* Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients. *J Clin Oncol* **22**, 4463-4473 (2004).
 77. Albertini, M.R. *et al.* Phase II trial of hu14.18-IL2 for patients with metastatic melanoma.

- Cancer Immunol Immun* : CII **61**, 2261-2271 (2012).
78. Osenga, K.L. *et al.* A phase I clinical trial of the hu14.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: a study of the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res* **12**, 1750-1759 (2006).
 79. Delgado, D.C. *et al.* Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcγ receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer Res* **70**, 9554-9561 (2010).
 80. Shusterman, S. *et al.* Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol* **28**, 4969-4975 (2010).
 81. Cheung, N.K. *et al.* Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J Clin Oncol* **5**, 1430-1440 (1987).
 82. Cheung, N.K. *et al.* Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J Clin Oncol* **30**, 3264-3270 (2012).
 83. Cheung, N.K. *et al.* FCGR2A polymorphism is correlated with clinical outcome after immunotherapy of neuroblastoma with anti-GD2 antibody and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol* **24**, 2885-2890 (2006).
 84. Cheung, N.K., Guo, H., Hu, J., Tassev, D.V. & Cheung, I.Y. Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo. *Oncoimmunology* **1**, 477-486 (2012).
 85. Eger, C. *et al.* Generation and Characterization of a Human/Mouse Chimeric GD2-Mimicking Anti-Idiotypic Antibody Ganglidiximab for Active Immunotherapy against Neuroblastoma. *PLoS One* **11**, e0150479 (2016).
 86. Zeytin, H.E., Tripathi, P.K., Bhattacharya-Chatterjee, M., Foon, K.A. & Chatterjee, S.K. Construction and characterization of DNA vaccines encoding the single-chain variable fragment of the anti-idiotype antibody 1A7 mimicking the tumor-associated antigen disialoganglioside GD2. *Cancer Gene Ther* **7**, 1426-1436 (2000).
 87. Foon, K.A. *et al.* Clinical and immune responses in advanced melanoma patients immunized with an anti-idiotype antibody mimicking disialoganglioside GD2. *J Clin Oncol* **18**, 376-384 (2000).
 88. Sen, G., Chakraborty, M., Foon, K.A., Reisfeld, R.A. & Bhattacharya-Chatterjee, M.B. Induction of IgG antibodies by an anti-idiotype antibody mimicking disialoganglioside GD2. *J Immunother* **21**, 75-83 (1998).
 89. Foon, K.A. *et al.* Antibody responses in melanoma patients immunized with an anti-idiotype antibody mimicking disialoganglioside GD2. *Clin Cancer Res* **4**, 1117-1124 (1998).
 90. Sen, G., Chakraborty, M., Foon, K.A., Reisfeld, R.A. & Bhattacharya-Chatterjee, M.

- Preclinical evaluation in nonhuman primates of murine monoclonal anti-idiotypic antibody that mimics the disialoganglioside GD2. *Clin Cancer Res* **3**, 1969-1976 (1997).
91. Becker, R., Eichler, M.K., Jennemann, R. & Bertalanffy, H. Phase I clinical trial on adjuvant active immunotherapy of human gliomas with GD2-conjugate. *Brit J Neurosurg* **16**, 269-275 (2002).
 92. Kushner, B.H. *et al.* Phase I trial of a bivalent gangliosides vaccine in combination with beta-glucan for high-risk neuroblastoma in second or later remission. *Clin Cancer Res* **20**, 1375-1382 (2014).
 93. Chapman, P.B. *et al.* Vaccination with a bivalent G(M2) and G(D2) ganglioside conjugate vaccine: a trial comparing doses of G(D2)-keyhole limpet hemocyanin. *Clin Cancer Res* **6**, 4658-4662 (2000).
 94. Zhang, S. *et al.* Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens. *Int J Cancer* **73**, 50-56 (1997).
 95. Zhang, S. *et al.* Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers. *Clin Cancer Res* **4**, 295-302 (1998).
 96. Chang, W.W. *et al.* Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11667-11672 (2008).
 97. Tsai, Y.C. *et al.* A Prevalent Cancer Associated Glycan, Globo H Ceramide, Induces Immunosuppression by Reducing Notch1 Signaling. *J Cancer Sci Ther* **5**, 264-270 (2013).
 98. Cheng, J.Y. *et al.* Globo-H ceramide shed from cancer cells triggers translin-associated factor X-dependent angiogenesis. *Cancer Res* **74**, 6856-6866 (2014).
 99. Slovin, S.F. *et al.* Carbohydrate vaccines in cancer: immunogenicity of a fully synthetic globo H hexasaccharide conjugate in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5710-5715 (1999).
 100. Gilewski, T. *et al.* Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: a phase I trial. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3270-3275 (2001).
 101. Huang, Y.L. *et al.* Carbohydrate-based vaccines with a glycolipid adjuvant for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2517-2522 (2013).

第六章

心肌再生醫學之研究進程與應用策略

Heart Regeneration—Progress & Novel Strategies

陳泓志¹ 湯文宏¹ 陳貞云¹ 臧天睿¹ 鄭媛元¹ 黃瀟瑩¹ 陳立綸¹ 謝清河^{1,2,3,4}

¹ 中央研究院生物醫學研究所 ² 臺灣大學基因體暨蛋白體醫學研究所
³ 臺灣大學臨床醫學研究所 ⁴ 臺大醫院心血管外科

一、前言

心血管相關疾病為全球主要死亡原因之一；近年來心血管相關疾病的死亡率在臺灣逐年攀升，且連續多年蟬聯臺灣十大死因第二，實為民眾不可輕忽的重大疾病。由於心血管相關疾病缺乏明顯病癥，因而與癌症相比，心血管相關疾病反而容易被疏忽。常見的心血管疾病為心肌梗塞，其成因主要為提供心臟血流的冠狀動脈硬化，導致血流受阻不通、大量心肌細胞因缺氧迅速死亡，可能引發心律不整，甚至心臟停止跳動而猝死。在心臟發生損傷後（例如心肌梗塞），心臟受損的部位會產生心室肥大(ventricular hypertrophy)的現象來因應心臟所受到的衝擊，此一現象稱為病理性重塑(pathological remodeling)。然而，此一病理性重塑並無法恢復心臟的功能，加之心臟本身是一個自我修復能力非常有限的器官，在缺乏對於受損心肌細胞修復之機制下，正常心功能將受嚴重影響，甚者乃至死亡¹。傳統的治療方式以移除阻塞為目的，然而若能於心肌梗塞發生後減少心肌細胞的死亡，甚至進一步刺激心肌細胞的增生，對於日後心功能的復原則大有助益，因此心肌再生的相關研究主要著眼於這兩方面。目前針對減少心肌梗塞導致的心肌細胞死亡，與後續刺激心肌細胞增生的研究與治療策略可以再分為幾個細項：包括(1)誘導型多潛能幹細胞(induced pluripotent stem cell)與心肌再生、(2)免疫與心肌保護、(3)非編碼核糖核酸(noncoding RNA)於心肌再生的角色、(4)基因療法，以及(5)標靶治療。本章將對上述幾項心肌再生治療之策略與應用加以說明。

二、心肌再生治療之策略

1. 「誘導型多潛能幹細胞」(induced pluripotent stem cell)之應用

日本京都大學山中伸彌教授於2006年發現將4個轉錄因子(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, OSKM)導入成熟的小鼠皮膚纖維母細胞內，可使該細胞重編程(reprogram)回到類似小鼠胚胎幹細胞的狀態，並具有分化成各種細胞之能力，這些細胞被稱為

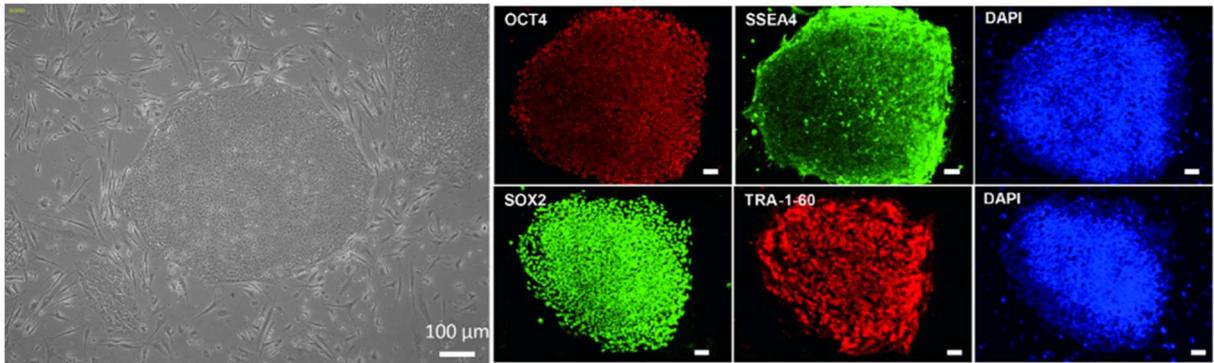
「誘導型多潛能幹細胞」(induced pluripotent stem cell, 簡稱iPSC)²。同樣的技術亦被證實可以使成熟的人類體細胞重編程回到類似人類胚胎幹細胞的狀態^{3,4}(圖一)。誘導型多潛能幹細胞技術吸引人之處在於：

- (1) 其可以避免因運用人類胚胎幹細胞所衍生的醫學倫理爭議。
- (2) 能被分化成不同型式的體細胞。
- (3) 能忠實反映原始病人之基因表達。
- (4) 可以模擬病患對於藥物的反應，故而非常適合作為人類體外疾病研究模式(圖二)。

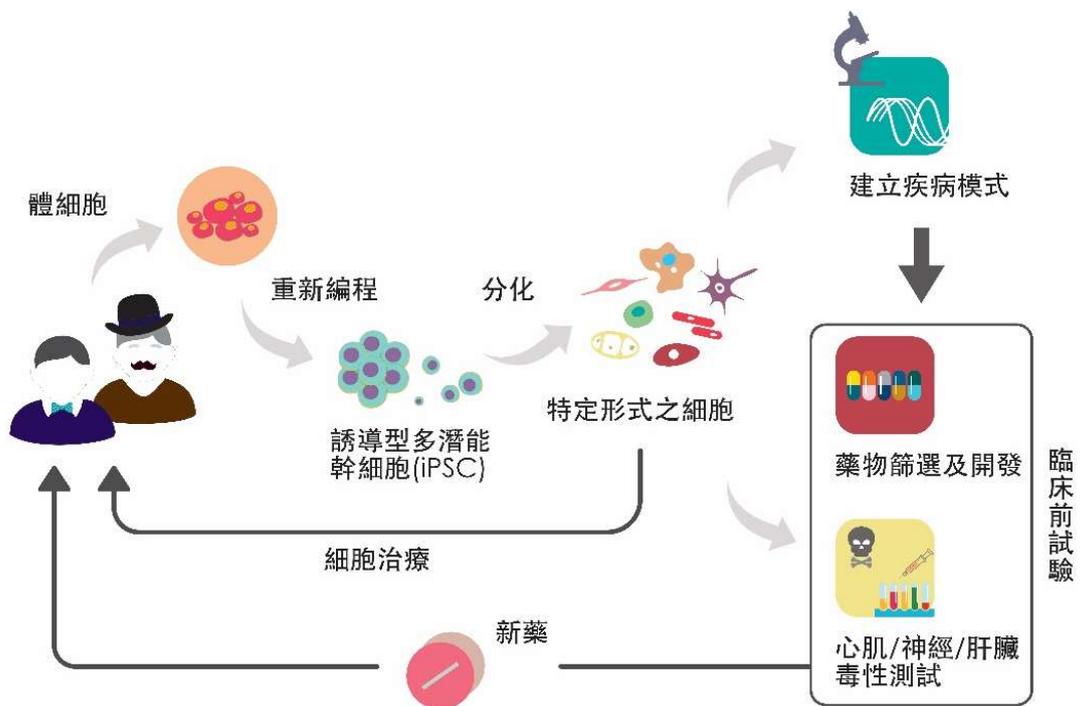
因此，將患者的特異性誘導型多潛能幹細胞作為疾病模型，進而發展疾病治療或新藥開發的方式，已成為近幾年再生醫學領域的新趨勢。美國總統歐巴馬於2015年宣布的精準醫療啟動計畫(Precision Medicine Initiative)即以誘導型多潛能幹細胞作為標的，代表著精準醫療時代已正式來臨。

由於誘導型多潛能幹細胞產製除須具備幹細胞培養經驗外，亦需耗費相當大的人力與時間。因此，日本、美國、韓國、英國等已開發國家皆已在大型學研單位設立誘導型多潛能幹細胞核心設施，提供誘導型多潛能幹細胞產製等相關服務，並輔導產業界及學術界進入誘導型多潛能幹細胞領域。台灣在2015年建立了「人類疾病誘導型多潛能幹細胞服務聯盟」，為台灣產學研界唯一一個多潛能幹細胞核心設施，提供誘導型多潛能幹細胞產製服務、誘導型多潛能幹細胞特性檢驗與誘導型多潛能幹細胞公開寄存服務。誘導型多潛能幹細胞服務聯盟是一個結合眾多專家和團隊所形成的服務聯盟，主要由中央研究院生物醫學科學研究所、台灣大學附設醫院、台北榮民總醫院、食品工業發展研究所與國家衛生研究院五個機構所組成(圖三)。此聯盟可有效縮短研究人員在摸索誘導型多潛能幹細胞產製過程中所損耗的時間及成本，同時協助國內產學研界利用誘導型多潛能幹細胞技術作為研究發展平台，以進行人類疾病模式之建立、疾病發生成因探討、藥物篩選、新藥開發、藥物基因體學研究、細胞治療及個人化醫療等相關再生醫學之開發。

隨著將誘導型多潛能幹細胞分化成多種體細胞的技術的進步，現在已經能夠持續穩定的將誘導型多潛能幹細胞分化為心肌細胞⁵。這些分化後的心肌細胞不僅能夠提供用作細胞治療的材料，同時也可以被作為篩檢臨床上正在使用或是即將進入臨床試驗之藥物的心臟毒性的素材^{6,7}。而這項技術目前所遇到的侷限，在於由誘導型多潛能幹細胞分化而得的心肌細胞，並非完全成熟的心肌細胞，因此如何將之分化為更成熟的心肌細胞，為誘導型多潛能幹細胞分化之心肌細胞被廣泛應用前亟待解決的議題。



圖一、在顯微鏡下的人類誘導型多潛能幹細胞之生長型態與多潛能性分子免疫螢光標記結果。



圖二、將人類體細胞重編程為誘導型多潛能幹細胞(iPS cells)後，再依需求分化成各類型細胞，後續可進行疾病模式建立、藥物篩選/新藥開發、及藥物毒性測試等研究。



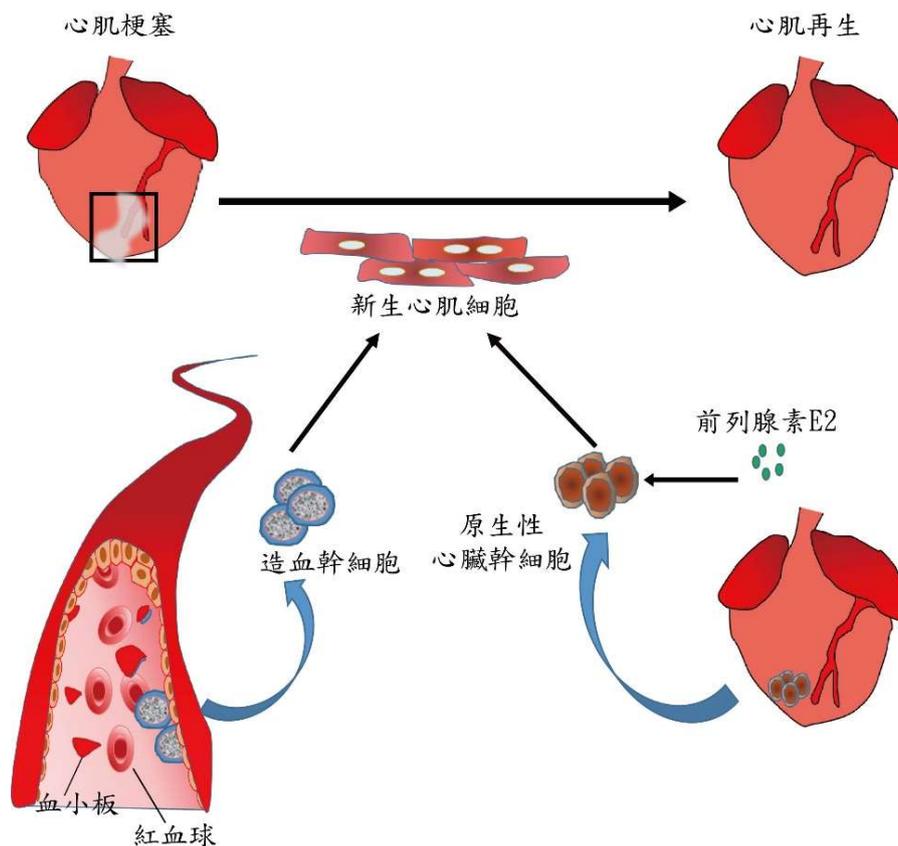
圖三、中央研究院生物醫學科學研究所，iPSC 核心設施細胞培養室空間與設備。

2. 免疫與心肌保護

在研究小鼠心臟受損後再生過程中，藉由成鼠心肌細胞世系追蹤系統(cell lineage tracing)，發現小鼠心肌受損壞死後，其修復來源主要依賴心臟內部的原生性心臟幹細胞(cardiac progenitor cells)分化而來，而非由仍存活的舊心肌細胞複製分裂而成⁸。而除了原生性心臟幹細胞外，血液循環中的造血幹細胞亦可作為修復受損心肌所需之細胞來源。血液或骨髓中的細胞在心臟受損後，會經由血液循環進入心肌梗塞壞死的區域(infarct area)，透過與原本存在於心臟內的心肌細胞融合(fusion)或透過轉分化(transdifferentiation)形成新的心肌細胞兩種方式來參與心肌細胞再生⁹(圖四)。如何利用藥物來促進原生性心臟幹細胞心肌受損後進行分化，進而達到有效修復心肌損傷及維持正常心功能的效果，為現今心肌再生領域相當重要的一個課題。同時，利用藥物治療受損心肌亦可避免患者接受細胞治療方式中所可能產生因施打外來細胞造成排斥的疑慮。

組織受傷時會引發發炎反應，然而發炎反應對於受傷的組織並非毫無益處。在發炎反應發生的過程中，藉由調節發炎反應產生之巨噬細胞(macrophages)的種類，包含古典活化巨噬細胞(classical activated macrophage, M1)以及替代活化巨噬細胞(alternatively activated macrophage, M2)；兩種巨噬細胞間的轉換可以營造出發炎反應不同時期局部組織的微環境，提供受損組織一個適合組織再生的微環境¹⁰。心肌梗塞(myocardial infarction, MI)發生時，亦伴隨有強烈的發炎反應以及大量巨噬細胞的聚集。在心肌梗塞剛發生的 1-3 天內，大量古典活化巨噬細胞會聚集在患部，營造心肌受損的早期微環境，此時稱為心肌梗塞的第 1 期(phase 1)反應；而在心肌梗塞發生後的 4-7 天內，則由大量的替代活化巨噬細胞營造心肌梗塞第 2 期(phase 2)反應的微環境¹¹⁻¹³。近期的研究指出，身體產生發炎反應時會自動生成前列腺素 E2(prostaglandin E₂, PGE₂)，雖然前列腺素 E2 長久以來被歸類為促炎性分子

(proinflammatory molecule)，但是前列腺素 E2 也能夠藉由改變巨噬細胞的種類，來調節發炎反應產生的微環境，並促進受損組織再生¹⁴。前列腺素 E2 在目前臨床上的應用，主要是被用來軟化子宮頸、引發子宮收縮而作為催產劑。可是，前列腺素 E2 促進受損組織再生的功能，同樣可以被應用在心臟受損時的心肌再生與修復。在小鼠的實驗中，於心臟受損的早期施打前列腺素 E2 能夠加強心肌受損早期所引發的發炎反應，從而營建原生性心臟幹細胞一個適合分化的環境，亦即前列腺素 E2 具有促進原生性心臟幹細胞在心肌受損時分化成心肌細胞的能力¹⁵(圖四)。藉由找出更多體內原本就有、且可以幫助心肌修復的物質，或許能改善因心肌梗塞所造成的心肌死亡，進而提供一個更安全的心血管疾病治療方式，也為未來的醫藥發展開創一個新的思考方向。

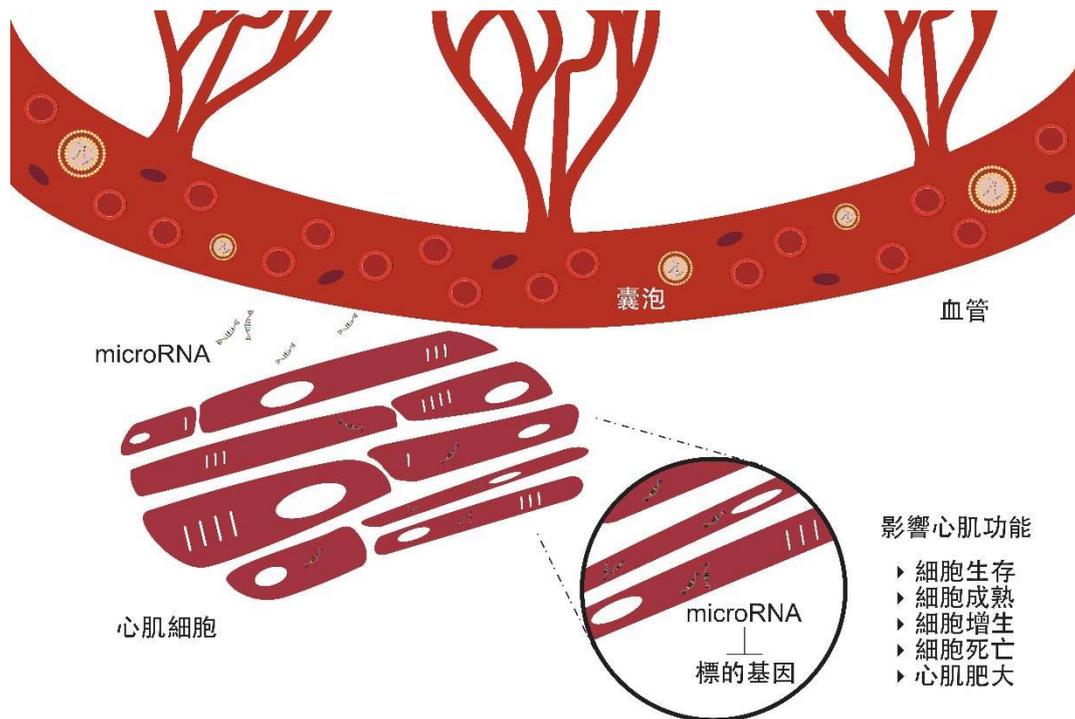


圖四、原生性心臟幹細胞分化，或血液循環中的造血幹細胞藉由融合(Fusion)或透過轉分化(transdifferentiation)而成的新生心肌細胞參與心肌梗塞後之心肌再生和修復。

3. 非編碼核糖核酸(noncoding RNA)於心肌再生的角色

自從去氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid, DNA)被確認為遺傳物質之後，科學家致力於基因定序相關的研究，以期了解生物體的遺傳訊息，從而達到疾病預防與治療的功效。當人類基因組計劃(Human Genome Project, HGP)完成人類基因體圖譜的繪製後，科學家發現真正可以表現出蛋白質的基因數比想像中的少很多。在人類基因體的訊息中，約略只有 2% 能夠被轉錄(transcription)並轉譯(translation)成蛋白質，其餘的遺傳訊息在被轉錄成核糖核酸(Ribonucleic acid, RNA)後並不會進行蛋白質轉譯，因此在當時被認為是一些無用的物質，而被稱之為垃圾核糖核酸(junk RNA)¹⁶。然而隨著研究的進展，這些不會轉譯出蛋白質的核糖核酸(又稱非編碼核糖核酸，noncoding RNA)被發現具有基因調控的功能。不過，這些非編碼核糖核酸並不是透過改變去氧核糖核酸的序列(例如基因突變)調控基因表現，而是藉由調控轉錄、轉譯的過程以及核糖核酸物質的穩定性來調控基因的功能，這樣的調控機制被稱為表觀基因調控(epigenetic regulation)¹⁶。近年來，小分子核糖核酸(microRNA)的發現便是一個很典型的例子。

有別於可以表現出蛋白質的核糖核酸(訊息核糖核酸，messenger RNA，簡稱 mRNA)大約是數百到數千個核糖核酸組成，小分子核糖核酸只由約 22 個核糖核酸組成。屏除小分子核糖核酸和訊息核糖核酸的大小差異，二者皆由第二型的核糖核酸聚合酶(RNA polymerase II)轉錄出來的¹⁷；剛轉錄出來的初級轉錄子(primary transcript)會經由兩次核糖核酸酶(RNase)分解過程，而形成小分子核糖核酸。目前小分子核糖核酸已知能夠透過與訊息核糖核酸的序列配對，抑制訊息核糖核酸的轉譯或是促進其分解；換句話說，小分子核糖核酸會抑制它標的基因的表現，進而影響到基因功能以及細胞反應¹⁸。有趣的是一個小分子核糖核酸可以抑制數百個它的標的基因。小分子核糖核酸除了會影響細胞內的表現，它還可以被釋出細胞外，成為細胞間溝通的媒介。由於在血液、尿液以及脊髓液中均可偵測到小分子核糖核酸，因此，體液中的小分子核糖核酸在近年的研究被視為一種可用於疾病的預測及診斷指標之新的生物指標^{19, 20}(圖五)。這種作為生物指標的功能也可以被應用在心血管疾病的偵測與預防。



圖五、在心肌細胞中的小分子核糖核酸(microRNA)會經由抑制標的基因的轉譯而影響標的基因的功能，進而影響到心肌細胞功能。這些小分子也可以在體液(例如血液)中被偵測到，可以作為疾病檢測的新穎性生物指標。

除了作為生物指標外，小分子核糖核酸也可以應用在心肌細胞的分化上。目前利用胚胎幹細胞或是誘導型多潛能幹細胞分化成心肌細胞的重要課題，是如何使分化而得的心肌細胞由未成熟的狀態進一步分化為成熟的心肌細胞，其中基因轉殖是最常見的策略。然而，利用一般基因轉殖技術的限制在於轉殖基因的大小會影響到轉殖的成功率。小分子核糖核酸因為很小，故此可以克服轉殖基因大小的限制，提供較高的轉殖成功率。例如將小分子核糖核酸 miR-125b、miR-199a、miR-221 與 miR-222 送入胚胎幹細胞分化出來的心肌細胞後，可以發現心肌細胞逐漸表現出成熟心肌細胞的指標，包括肌節構造的形成、間隙接合蛋白的表現、電生理的反應以及粒線體代謝的提升²¹。這樣趨於成熟的心肌細胞對於未來藥物測試或心肌移植提供較佳的細胞來源。

小分子核糖核酸的研究在近年開始蓬勃發展。然而，讓科學家感到有興趣的不僅只是因為它的“小”和它的表觀基因調節功能，這樣的小分子核糖核酸容易利用化學方法合成或修飾，成為可以生產製作的“藥”，為未來的醫藥發展開創一個新的策略方法。

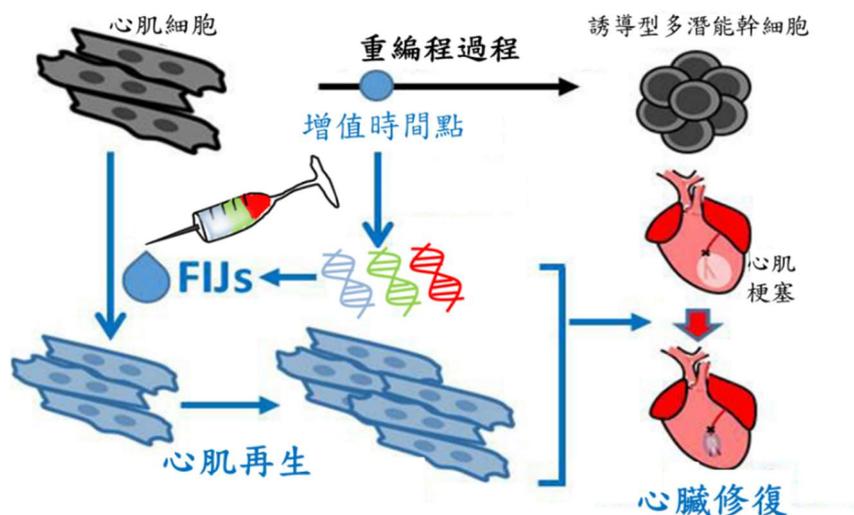
4. 基因療法

利用藥物治療心臟疾病已經行之有年，然而因為化合物本身具有一定的副作用以及非專一性，因此，近年來利用基因轉殖技術針對專一性基因做改變或修復的基因治療逐漸成為眾所矚目的熱門議題。在心肌再生研究的領域中，心肌梗塞發作之後往往造成下游心肌細胞的死亡進而影響心臟功能，所以如何能夠減少心肌梗塞之後造成的心肌細胞死亡為重要的研究方向。心臟為了維持穩定的跳動，其主要組成物心肌細胞必須要維持恆定性，所以在出生後，心臟在經歷了最後一輪的複製後，便停止增生，並與周邊的心肌細胞連接以達到穩定且統一的心臟跳動。因此，不同於一般的骨骼肌，心臟受到傷害時，心肌細胞的再生以及復原能力極弱，其少許增生的能力並不足以克服心臟受傷所造成的功能受損。因而，要於眾多基因當中找到在心肌梗塞後具有保護心肌，或是能夠促進心肌再生的基因，成為基因療法最主要的課題。經由對癌細胞的研究，許多基因已被報導與癌細胞增生有著密切關係，因此可以借鏡癌細胞的研究結果來搜尋具有治療心肌損傷潛力的基因，而 Survivin 便是其中一個選項。

Survivin 是人類細胞的內生性的基因，但是在大部分的癌細胞中都可以發現其大量表現。一方面，survivin 可以有效的降低癌細胞的細胞凋亡，增加癌細胞的存活率；另一方面，survivin 在細胞分裂時能夠讓染色體平均的分配到兩個細胞中，同時也可以穩定分裂時細胞骨架的延長²²。Survivin 所擁有的這兩種功能與癌細胞具有能夠大量分裂增生以及不易死亡的特性有相當的關聯性，因此，若能將 survivin 應用在心肌梗塞後的心肌細胞修復與增生上，勢必能夠改善心臟功能的復原狀況。在老鼠的發育過程中，survivin 在心臟的表現量會從胚胎時期的高峰期，隨著時間逐漸減少，到成年時期幾乎無法觀察到 survivin 的表現。在過去的研究報導也指出，老鼠的心肌細胞若是沒有 survivin 的表現，會造成心臟發育的不正常，影響到心臟功能，而且老鼠的存活率在出生半年之後也只有 50%²³，這些結果顯現了 survivin 在心肌細胞的重要性。因此，如果能進一步利用基因轉殖將 survivin 經由肌肉或是靜脈注射進入成鼠心臟中並進行心肌梗塞手術，將可以釐清 survivin 是否具有促進心肌細胞在心肌梗塞後增生的功能、心臟功能的復原、心室疤痕的面積減小以及心室變薄狀況的紓緩。

然而，如同藥物治療一般，單一基因的轉殖效果也許有限；除此之外，在茫茫基因大海中，要能挑出萬中選一的基因做治療，更是難上加難。在愛滋病的治療當中，藉由混合多種藥物來增加單一藥物的效能，以期得到最高的治療效果，此種方法如調配雞尾酒一般，故而被稱作雞尾酒療法。同樣的概念亦可被應用在心肌梗塞的基因治療過程，亦即混和多個基因配合轉殖技術來增進單一基因對心肌細胞增生或減緩細胞凋亡的作用，促進心肌再生，進而恢復心臟功能(圖六)。山中伸彌教授所研發利用混和 4 個轉錄因子(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, OSKM)的基因轉殖方式，有效地將成體細胞重編組成類似胚胎時期細胞的誘導型多潛能幹細胞，提供了心肌

再生基因雞尾酒療法的基礎²。此一“回春”技術的要件在於提高細胞增殖能力，而形成的誘導型多潛能幹細胞亦須要保持高度的增殖能力，以維持汰舊換新並增加多潛能發展性的特性²。因此，若是對心肌細胞進行重編程成為誘導型多潛能幹細胞，在此過程中，心肌細胞勢必恢復其增殖能力以轉變成誘導型多潛能幹細胞。而憑藉了解心肌細胞的重編程過程中幫助其增生的時間點，並且更進一步從中發現新的基因組成來幫助心肌增生，將可提供嶄新的方式來協助心臟疾病的治療。利用此一概念進行篩選的研究顯示，當小鼠發生心肌梗塞後，以心肌細胞重編程的早期過程中三個關鍵基因(FoxM1、Id1 及 Jnk3)作為組合處理，能夠有效促進實驗鼠的心肌增生，進而協助其心臟損害後的功能修復(圖六)²⁴。除了應用在心肌再生的領域外，這個研究結果同時也揭示經由深入解析早期細胞重編程的過程，能夠有效改變前驅細胞的特性，並且藉由此研究方式，將可以提供促進其他組織再生能力的重要資訊。

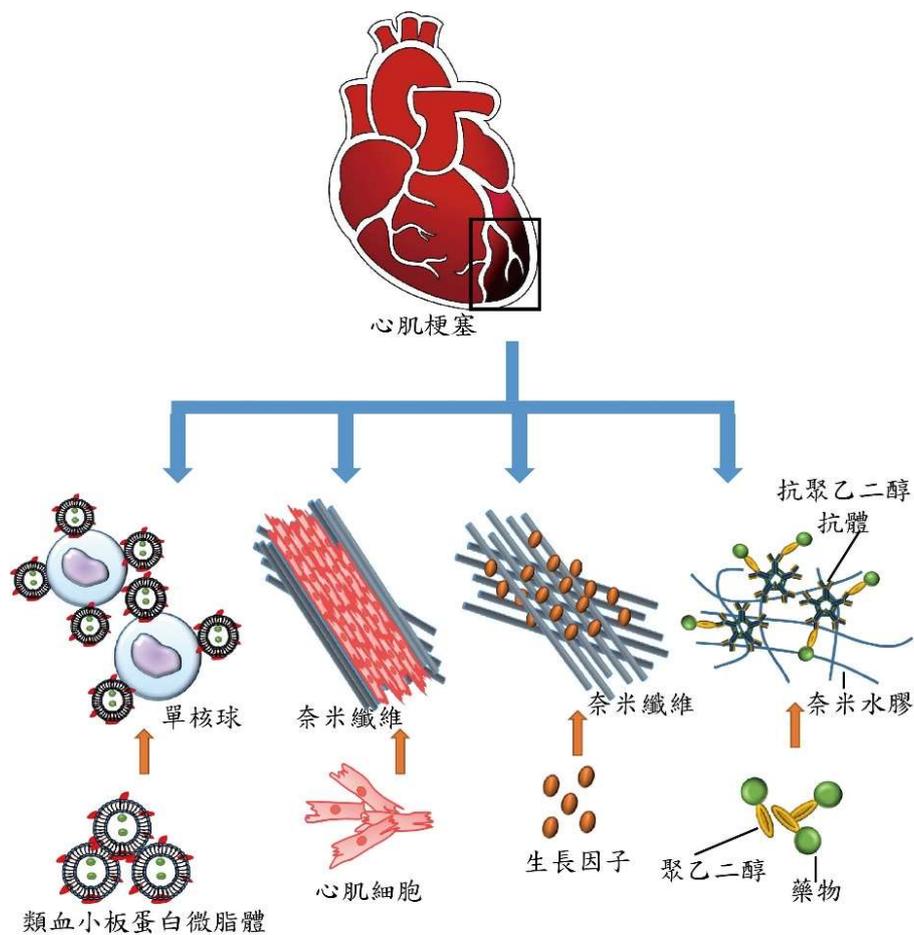


圖六、針對心肌再生所研發的基因雞尾酒療法(FIJs)。

5. 標靶治療

在利用藥物治療心臟疾病的研究領域中，缺乏有效的藥物投遞系統一直是該領域發展的一個阻礙，但同時也是其發展的重心所在。目前治療癌症的藥物投遞系統主要依賴高滲透與長滯留效應(enhanced permeability and retention effect, EPR effect)，然而，藉由這種高滲透長滯留效應將藥物帶到心肌梗塞後受損處的治療方式，會因為藥物停留的時間過短，以致無法對受損心肌起到保護的作用²⁵。因此，專一地將藥物送到心肌受損處，並延長藥物停留在該處的時間，將能讓藥物更有效地保護受損的心肌。在小鼠的研究當中，當小鼠心臟被誘發產生心肌梗塞時，脾臟產生的單核球(monocyte)會經循環系統往心肌梗塞發生後心肌損傷的位置聚集；與此同時，循環系統中的血小板會附著在單核球表面，一同被運送並停留在受損的心肌處²⁶。這種血小板-單核球複合細胞群通過循環系統聚積在心肌梗塞處的過程，並未牽涉到高滲透與長滯留效應，故而有潛力可以被應用來建立一個能夠專一地將藥物送達心臟受損處的投遞系統²⁷。基於這樣的概念加之結合奈米藥物投遞系統，利用血小板膜蛋白合成的類血小板蛋白微脂體(platelet-like proteoliposome, PLP)能夠有效地聚集在小鼠心臟發生心肌梗塞處，且利用類血小板蛋白微脂體包覆抗氧化藥物能夠有效地將藥物投遞至心肌梗塞受損處，並改善受損心臟的心功能²⁸。

除了改善藥物遞送的系統外，結合其他生物相容性(biocompatible)的奈米材料，配合藥物或抗體的運用，亦可增加藥物或細胞停留在受損心肌的時間，提高對心血管疾病治療的功效。例如將心肌細胞移植在奈米纖維(nanofiber)技術合成的貼片上，貼片上規則排列的奈米纖維可以引導移植的心肌細胞規律排列在心肌受損處；如此一來移植心肌細胞的跳動能夠與原本的心肌組織同步，並改善受損心臟的功能²⁹。另外，結合奈米纖維與血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的療法，可以專一地在患部持續釋放血管內皮生長因子，藉此在患部建立適合血管新生的局部微環境，幫助心肌梗塞後的動脈新生與心肌修補³⁰。另外，利用玻尿酸(hyaluronic acid, 簡稱 HA)製成的奈米水膠結合抗體(抗聚乙二醇抗體, anti-PEG antibody)所組成的新型奈米藥物投遞系統，使得接有聚乙二醇的奈米藥物可以經循環系統專一地投遞至注射混合抗體之奈米水膠的患處，提高藥物作用於患處的時間³¹；換句話說新開發的奈米藥物投遞系統具有導航能力，可重複且精準地將藥物、幹細胞或血管生長因子等投遞至人體患部，進而達到促進心血管疾病患者的心血管再生的功效。



圖七、心肌再生醫學之標靶治療策略。

三、結語

心血管疾病的治療，尤其是心肌細胞在受損後的保護與增生，一直以來困擾著臨床醫師與科學家。縱使心肌再生醫學的領域目前還在起步的階段，但是隨著如誘導型多潛能性幹細胞的產製與分化、新型藥物發展與基因治療等新技術的引進，為心臟再生醫學提供另一個思考面向，也使得該領域呈現蓬勃發展的氣象。然而，這些醫療策略與手段的應用需要除了本身技術發展的成熟度外，同時也必須仰賴好的遞送系統將具療效的細胞或藥物送到患處，並且延長細胞與藥物停留在患處的時間，以達到心肌受損後最佳保護與治療的效果。新治療素材的開發以及更有效的遞送系統之發展，將可為心肌再生提供新的方向與展望，並使再生醫療往前邁進一步。

四、參考文獻

1. Burchfield, J.S., Xie, M. & Hill, J.A. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation* **128**, 388-400 (2013).
2. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
3. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872 (2007).
4. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920 (2007).
5. Burridge, P.W. *et al.* Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* **11**, 855-860 (2014).
6. Matsa, E. *et al.* Transcriptome Profiling of Patient-Specific Human iPSC-Cardiomyocytes Predicts Individual Drug Safety and Efficacy Responses In Vitro. *Cell stem cell* **19**, 311-325 (2016).
7. Burridge, P.W. *et al.* Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* **22**, 547-556 (2016).
8. Hsieh, P.C. *et al.* Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* **13**, 970-974 (2007).
9. Wu, J.M. *et al.* Circulating cells contribute to cardiomyocyte regeneration after injury. *Circ Res* **116**, 633-641 (2015).
10. Cheng, B., Chen, H.C., Chou, I.W., Tang, T.W. & Hsieh, P.C. Harnessing the early post-injury inflammatory responses for cardiac regeneration. *J Biomed Sci* **24**, 7 (2017).
11. Shiraishi, M. *et al.* Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. *J Clin Invest* **126**, 2151-2166 (2016).
12. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* **204**, 3037-3047 (2007).
13. Dewald, O. *et al.* CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* **96**, 881-889 (2005).
14. Nemeth, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* **15**, 42-49 (2009).
15. Hsueh, Y.C., Wu, J.M., Yu, C.K., Wu, K.K. & Hsieh, P.C. Prostaglandin E(2) promotes post-infarction cardiomyocyte replenishment by endogenous stem cells. *EMBO Mol Med* **6**, 496-503 (2014).
16. Alexander, R.P., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M. & Gerstein, M.B. Annotating non-coding

- regions of the genome. *Nat Rev Genet* **11**, 559-571 (2010).
17. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**, 4051-4060 (2004).
 18. Iwakawa, H.O. & Tomari, Y. The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol* **25**, 651-665 (2015).
 19. Wang, G.K. *et al.* Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* **31**, 659-666 (2010).
 20. Mitchell, P.S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10513-10518 (2008).
 21. Lee, D.S. *et al.* Defined MicroRNAs Induce Aspects of Maturation in Mouse and Human Embryonic-Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Rep* **12**, 1960-1967 (2015).
 22. Altieri, D.C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* **22**, 8581-8589 (2003).
 23. Levkau, B. *et al.* Survivin determines cardiac function by controlling total cardiomyocyte number. *Circulation* **117**, 1583-1593 (2008).
 24. Cheng, Y.Y. *et al.* Reprogramming-derived gene cocktail increases cardiomyocyte proliferation for heart regeneration. *EMBO Mol Med* **9**, 251-264 (2017).
 25. Cung, T.T. *et al.* Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* **373**, 1021-1031 (2015).
 26. Sarma, J. *et al.* Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* **105**, 2166-2171 (2002).
 27. Nahrendorf, M., Pittet, M.J. & Swirski, F.K. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* **121**, 2437-2445 (2010).
 28. Cheng, B. *et al.* Biomimicking Platelet-Monocyte Interactions as a Novel Targeting Strategy for Heart Healing. *Adv Healthc Mater* **5**, 2686-2697 (2016).
 29. Lin, Y.D. *et al.* A nanopatterned cell-seeded cardiac patch prevents electro-uncoupling and improves the therapeutic efficacy of cardiac repair. *Biomater Sci* **2**, 567-580 (2014).
 30. Lin, Y.D. *et al.* Instructive nanofiber scaffolds with VEGF create a microenvironment for arteriogenesis and cardiac repair. *Sci Transl Med* **4**, 146ra109 (2012).
 31. Wu, J.P. *et al.* Reloadable multidrug capturing delivery system for targeted ischemic disease treatment. *Sci Transl Med* **8**, 365ra160 (2016).

第七章

幹細胞之應用於神經再生

Application of Stem Cells in Regenerating Nerve Tissues

高健育 邱英明

國家衛生研究院細胞及系統醫學研究所

一、前言

神經系統可分為中樞神經系統(Central Nervous System, CNS)與周邊神經系統(Peripheral Nervous System, PNS), 急性神經退化的起因主要為創傷造成之脊椎損傷(Spinal Cord Injury, SCI)、創傷性腦損傷(Traumatic Brain Injury, TBI)、周邊神經壓迫斷裂或中風。另外, 特殊疾病如: 肌萎縮性脊髓側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、巴金森氏症(Parkinson's disease, PD)與阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)則是造成慢性神經退化的重要肇因。

神經再生(Neuroregeneration)泛指神經組織、細胞及與神經功能相關之構造的再生或修復, 其過程包含了神經元(neuron)、軸突(Axon)、突觸(Synapse)、神經膠細胞(glia)與髓鞘(myelin sheath)等重要構造之新生。中樞神經系統一般被認為自我修復能力極差, 主要因為損傷部位周邊環境會產生許多抑制因子; 周邊神經系統則具有自我修復能力, 然而在近端殘枝(proximal stump)太短、廣泛性軸索退化(Axonal degeneration)或慢性神經病變的情況下, 則周邊神經無法完全自癒。神經系統損傷所導致的**神經退化疾病(Neurodegenerative Diseases)**進而造成之失能問題造成嚴重之社會、家庭與經濟的負擔, 然而目前並無有效治療神經退化疾病的方法。因此, 發展促進神經系統修復的策略是目前再生醫學重要的課題與挑戰。近年來興起的幹細胞療法被視為具有促進神經修復再生潛力的明日之星。本章節將介紹幹細胞療法的科學基礎, 並討論其在神經退化疾病治療之發展。

二、神經幹細胞

20 世紀前半葉的神經科學家一致認為在成體動物的腦內不會再有神經新生, 直到 1962 年, 科學家 Joseph Altman 在大腦皮質中發現的第一個神經新生(Neurogenesis)的證據, 在接下來的幾十年內, 雖然神經新生的現象在不同動物、不同腦區與使用不同方法觀察到, 但神經科學界仍不斷爭論這個理論, 一直到了 90 年代, 由於

5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)標記法的建立，人們才在大鼠腦內觀察到神經新生並與海馬迴的學習與記憶功能做連結，並且在靈長類腦內觀察到神經新生¹，神經新生的研究才逐漸開始被主流科學所重視。同時在 90 年代陸續發現了許多細胞生長與營養因子，如：纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factors, FGF)與表皮細胞生長因子(Epidermal growth factor, EGF)等，科學家利用這些因子建立神經組織的培養方法，在培養過程中發現了一群具自我複製且能分化為神經細胞與神經膠細胞的細胞群²並稱之為神經幹細胞(Neural stem cells)。在此之後，人們在哺乳類腦內不同神經新生的區域也都發現到神經幹細胞的存在。

1. 分離與鑑定

神經幹細胞會常駐於神經新生發生的位置，神經幹細胞與周圍的細胞、血管與胞外基質(Extracellular matrix)組成的微環境稱之為 Neurogenic niche³，在哺乳動物的腦內主要有兩個 Neurogenic niche，位於側腦室的 **Subventricular zone(SVZ)**與位於海馬迴齒狀迴區(dentate gyrus)的 **subgranular zone(SGZ)**。

SVZ 的神經幹細胞(又名為 B 型細胞)會有和血管接觸的底端突起(basal process)與表面有初級纖毛(primary cilium)的頂端突起(apical process)，初級纖毛會與腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)接觸。當 SVZ 的神經幹細胞活化時，會生成快速增生的先驅細胞(transient amplifying progenitor 或 C 型細胞)，C 型細胞會經由細胞分裂而生成神經母細胞(Neuroblast)，神經母細胞會經由稱為 rostral migratory stream 的路徑遷移(migration)到嗅球(olfactory bulb)並進一步分化為成熟的神經細胞。

SGZ 的神經幹細胞稱為類放射狀膠質細胞(Radial glia-like NSCs)或第一型細胞(type 1 cells)，SGZ 神經幹細胞會與血管接觸，一旦被活化後，SGZ 神經幹細胞會開始活躍地自我更新(self-renew)與細胞分裂生成神經母細胞，神經母細胞會進一步分化為神經細胞並遷移至海馬迴中的特定位置，SGZ 中的神經新生對於海馬迴的學習、記憶功能有重要的相關性。

幹細胞的基礎定義：①自我更新(self-renewal)②能產生分化的子代細胞(progeny)。鑑定神經幹細胞的自我更新與分化通常是透過其形成神經球(Neurospheres)⁴的效率與在培養皿中分化為神經細胞(Neuron)、星狀神經膠細胞(Astrocyte)與寡突神經膠細胞(oligodendrocyte)的能力，這種能分化成三種不同神經細胞系(lineage)的能力稱之為 tri-potent。胚胎幹細胞(Embryonic stem cells)具有分化成不同胚層細胞的能力，稱之為 Pluripotent。近年來由於流式細胞儀(flow cytometry)的發展，研究者們可對細胞膜表面抗原(cell surface markers)或其他標記方式來純化神經幹細胞。

(1) 神經球(Neurospheres)

由腦內 SVZ 或 SGZ 取出之神經組織，經過酵素作用打散組織團塊，將其培養於非貼附型(non-adherent)培養皿與添加 EGF 與 FGF 的無血清培養基中，

會有一小群細胞開始進行細胞分裂增殖，經過數天後，增生的細胞會形成球狀組織懸浮於培養皿中，稱之為神經球，此時大部分的細胞會表現神經前驅細胞標記(neural precursor markers)—Nestin、轉錄因子 Sox2 與 BLBP。一般為了驗證神經幹細胞的自我更新能力，會利用酵素將神經球打散並進行第二次的神經球生成實驗(secondary spheres)。神經球生成為簡單且方便驗證神經幹細胞自我更新能力的試驗方法，可進一步用來估計組織內或細胞群內神經細胞的含量，並可利用來繼代(passage)神經幹細胞。

(2) 神經幹細胞的分化

當自我更新狀態良好之神經幹細胞培養於可貼附的培養皿(Adherent monolayer cultures)上並移除 EGF 與 FGF 後，就能自主開始分化，在經過六至七天的培養後，進行免疫染色(Immunostaining)來驗證分化的結果。近年來對於神經幹細胞分化能力的驗證漸趨於嚴謹，都需要進行特定細胞系的分化並計算效率。神經幹細胞分化成為神經細胞、星狀膠質細胞與寡突細胞及其測試的方法表列於圖一⁵。

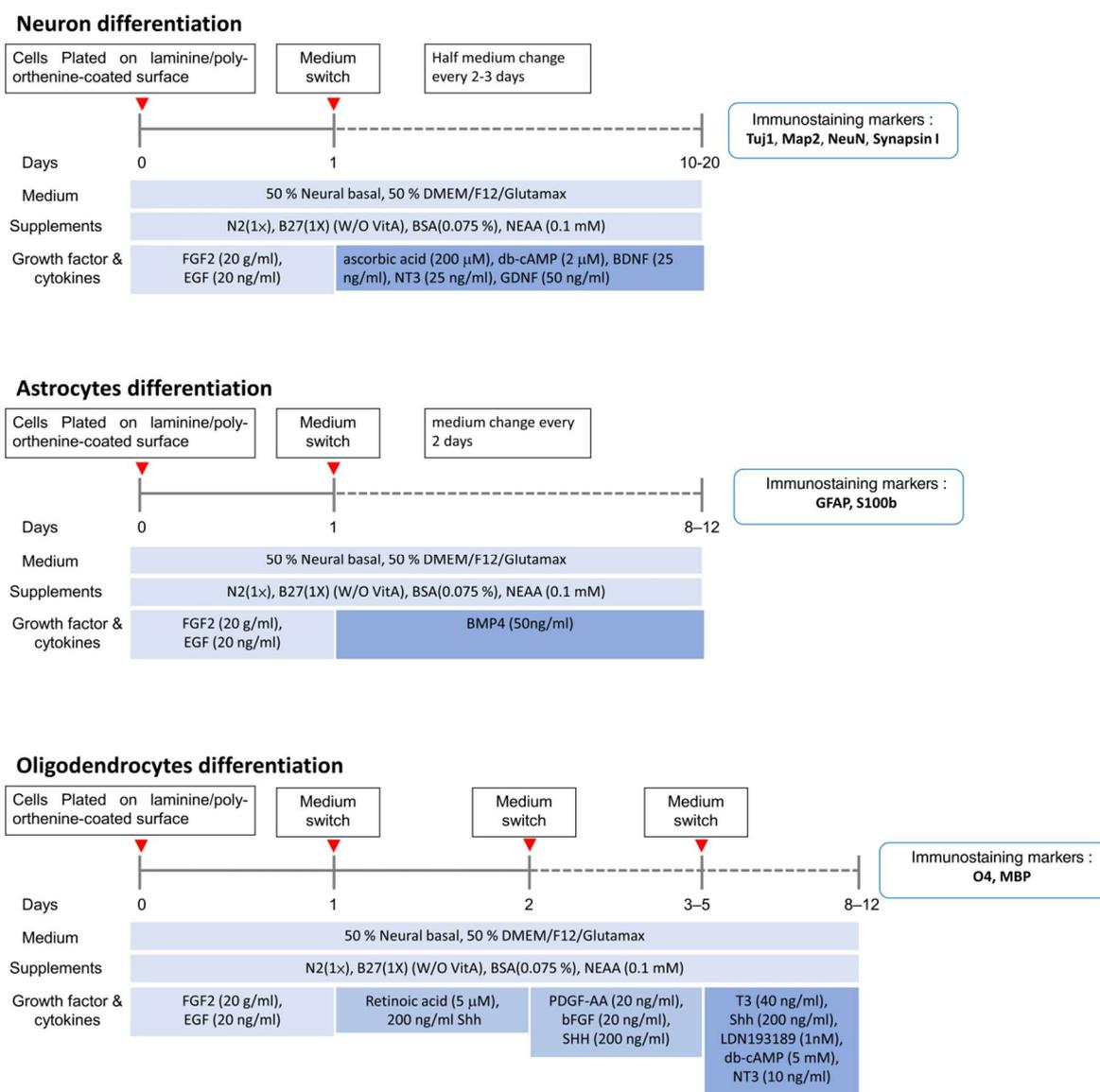
(3) 利用特定標記以純化神經幹細胞

流式細胞儀與組織染色(Immunohistochemistry)技術的進步，使得研究者得以利用細胞表面標記、特殊螢光染劑、染劑排出法(dye efflux)與報導基因法(reporter gene)來發展分離與鑑定神經幹細胞的方法。值得注意的是，目前仍未發現神經幹細胞專有的細胞標記，因此在操作上一般都搭配兩種以上之標記(如 CD133 和 GFAP)，且需利用神經球生成與細胞分化等功能性來定義神經幹細胞。

- A. 細胞表面標記：CD133 糖蛋白係一廣泛使用的幹細胞標記，常被用來分選神經幹細胞。此外，CD24 與 SSEA-1 也經常被使用。值得一提的是，利用 GFAP 報導基因搭配 CD133 與 EGFR 可以在 SVZ 中分選出具有高度增殖性與分化能力的活化態神經幹細胞⁶。
- B. 報導基因法：先前的研究指出，相較於其他腦組織，某些特定基因在神經幹細胞會有較高的表現量，因此，研究者們利用這些基因的啟動子(promoter)所構築之報導基因(例如：GFP)來發展基因轉殖動物(transgenic reporter animal)，這些轉殖動物的腦部切片中可觀察到報導基因與神經幹細胞具有高度的同位性(Colocalization)，進一步的免疫染色、流式細胞儀分選與體外實驗也證實了報導基因可以與其他標記方法搭配來定位神經幹細胞。可以用在成體神經幹細胞標定之報導基因啟動子有：GFAP、Nestin、Querkopf 與 FGF1B 等⁷⁻¹⁰。

2. 神經幹細胞之應用

使用細胞來治療疾病或受損之器官謂為細胞治療(cell therapy)，幹細胞之增殖與分化特性能用來替代受損死亡之細胞或是提供有利於組織自癒的微環境。神經幹細胞具有分化為神經與神經膠細胞的特性，因而具應用於細胞治療的潛力，在幹細胞學與臨床前試驗(preclinical studies)持續發展下，將能實現利用神經幹細胞重建受損神經網路的終極目標。本節將介紹神經幹細胞於神經系統疾病或損傷的研究與應用。



圖一、神經幹細胞分化為神經細胞、星狀膠質細胞與寡突細胞及其測試的方法，詳細描述及背景資料可參考文獻⁵。

- (1) 巴金森氏症(Parkinson's disease, PD)源自於腦內黑質緻密部(Substantia nigra pars compacta, SNpc)中的多巴胺神經元(dopaminergic (DA) neurons)大量死亡所造成，患者會有嚴重的動作缺陷如顫抖、僵直或站立不穩等症狀，目前主要透過藥物增加腦內多巴胺量(如：L-DOPA)或腦部深層電刺激的方式治療，但目前的療法都無法用來根治巴金森氏症並且長期使用會產生耐受性的問題。因此，利用細胞來替換死亡的多巴胺神經元提供了治療巴金森氏症的新希望。

在早期的臨床研究中，移植衍生於胎兒腹側中腦(ventral mesencephalon)組織之DA神經元能改善PD症狀¹¹，但由於使用胎兒組織之道德性問題，且移植後之DA神經元存活率低，用於治療需使用大量組織，研究者們開始尋找其他能用於治療PD的細胞來源。在動物實驗中，神經幹細胞在PD模式大鼠的腦中能分化為DA神經元。除了直接轉殖神經幹細胞外，利用特定的轉錄因子(Acs11, Myt11, Brn2, Lmx1a, Lmx1b, Nurr1, Pitx3)將纖維母細胞再程序化為多巴胺神經元並移植，目前研究已證實移植後的多巴胺神經元能存活於PD模式動物的腦中，且能實際改善PD功能性缺失¹²。除了神經幹細胞以外，用於製造DA神經元的幹細胞來源有：胚胎幹細胞(embryonic stem cells, ESCs)、間質幹細胞(mesenchymal stem cells, MSCs)與誘導型多潛能幹細胞(Induced pluripotent stem cells, iPSCs)。除了細胞治療外，目前也有研究者利用基因工程的方式改造神經幹細胞，使其經轉殖後能在腦內特定區域大量分泌神經滋養因子(如：BDNF, VEGF, GDNF and IGF-1)以保護DA神經元¹³，並在動物實驗中改善PD症狀。

- (2) 阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)是一種蔓延全腦的神經元與突觸缺失的疾病，病人會有漸進式的記憶與認知障礙之症狀，腦中會有A β 斑塊(A β plaques)與神經元纖維纏結(Neurofibrillary Tangles)堆積是其重要特徵。對於阿茲海默症之成因多數仍未知，因此目前無治療之方法，臨床上的藥物多半藉由增加神經傳遞物質(neurotransmitters)乙醯膽鹼(Acetylcholine)來達到舒緩症狀的效果。

在動物模式中，移植經基因工程改造而大量表現膽鹼乙醯轉移酶(choline acetyltransferase)或腦衍生神經滋長因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的神經幹細胞，能有效改善因老化或AD而造成之認知失調，因此，開發神經幹細胞來替代在AD疾病進程中退化的神經元具有臨床應用的潛力¹⁴。

- (3) 肌萎縮性脊髓側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)又稱漸凍人症，是一種發生於成人的神經退化疾病，特徵為持續漸進式的運動神經元

缺失，最後造成肌肉無力且萎縮，晚期患者會有呼吸困難且無法吞嚥的現象，一般在臨床症狀出現後的平均存活年限約4-5年。遺傳性ALS常見的成因為SOD1的突變，目前學界對偶發性ALS的成因尚沒有定論，可能的致病因子為：氧化壓力、蛋白質異常堆疊、粒線體異常、麩胺酸興奮毒性 (glutamate-mediated excitotoxicity) 或神經滋養因子分泌不足等，目前並無有效治療方法。利用神經幹細胞能分化為運動神經元的特性，具有治療ALS的潛能，在近期的一個一期臨床試驗中，研究人員將源自於胎兒之神經幹細胞以脊髓注射方式送入ALS患者體內¹⁵，在經過6到18個月的追蹤後，並無發生不良反應，證明胎兒神經幹細胞之安全性，具有進一步發展為ALS療法的潛力。另外，目前的研究也有嘗試利用幹細胞來製造滋養因子以減緩ALS中運動神經元的死亡速度¹⁶。

- (4) 中風(stroke)後所造成的漸化性神經退化及失能的治療方法是目前醫學所迫切需求的。在腦中風後，會有一群神經幹細胞由SVZ遷移至腦損傷區，這群神經幹細胞會在腦損傷區分化成astrocyte並參與疤痕組織生成，研究人員利用調節Ascl1基因的表現量讓遷移至腦損傷區之神經幹細胞分化為神經細胞¹⁷，因此透過策略性地將幹細胞操縱到特定位置並執行特定功能，是未來幹細胞治療的發展方向。在人體試驗中，已有不同來源的神經幹細胞正進行缺血性腦中風(Ischemic stroke)的臨床前試驗(例如：胎兒腦部、人類腦皮質或經由胚胎幹細胞所衍生的神經幹細胞株)，由於用於治療之人類細胞來源有道德性之爭議，且在製程放大上除了有增殖限制外，如何維持基因體的穩定性也需要考量，因此如何確保臨床治療之細胞來源是目前再生醫學的重要課題，目前已有研究使用myc基因來不朽化(**immortalization**)**神經幹細胞株**且能維持細胞的基因體穩定性與分化能力。研究者們進一步利用c-myc基因結合estrogen receptor (ER)產生c-mycER^{TAM}融合蛋白來製造穩定的神經幹細胞株CTX¹⁸，其細胞特點為能使用在培養基中添加4-hydroxytamoxifen (4-OHT)的方式達到不朽，而在沒有4-OHT與生長因子的環境中就會開始分化，經過長期培養能維持正常染色體核型(karyotype)，這些特性使得CTX細胞容易在符合cGMP的規範下進行大規模製造與細胞儲存，CTX細胞株已進入人體臨床試驗，大腦中動脈阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAo)是一種被廣泛使用的大鼠缺血性中風模式，且能夠模擬人類在經歷缺血性中風後的功能性缺失(如：單側麻痺、感覺障礙、視覺忽略等)，CTX細胞能夠改善MCAo大鼠的功能性缺失且能存活於受試動物腦內。在臨床試驗方面，CTX細胞已完成人體臨床一期試驗，此試驗受試者為60歲以上之長期慢性中風的男性患者，接受 2×10^6 、 5×10^6 、 10×10^6 、 20×10^6 細胞數之單一劑量移植，試驗結果並無發生嚴重不良反應與腫瘤生成，證明其安全性，且在某些患者之功能性評

分有出現改善，目前CTX細胞正進行臨床二期試驗以驗證其改善中風之效用¹⁹。

- (5) 周邊神經損傷(Peripheral nerve injury)會造成神經纖維退化導致動作與感覺異常。在神經損傷後，斷裂的神經能以外科手術縫合;若斷裂範圍較大雖然能進行神經移植手術，但神經組織來源有限，因此有開發相關移植物以幫助神經再生的需求。其中神經導管(nerve conduits)能移植於兩神經斷點間提供軸突成長(axonal sprouting)的機械性支撐與導引，此外，組織再生時分泌的神經營養能保留於導管內發揮效用，且導管能抑制疤痕組織侵入損傷區，因此導管是目前神經修復最好的選擇²⁰。然而，目前不管是移植神經或導管，都未能考量到許旺細胞(Schwann cells)於神經再生所扮演的角色，下列為許旺細胞參與神經再生所執行的功能：

- A. 分泌神經滋養因子
- B. 協同巨噬細胞以清除受損區的組織殘骸
- C. 形成通道結構以導引神經再生

近期的研究發現，雖然機制尚未明瞭，移植於損傷區之神經幹細胞能分化為許旺細胞來執行上述功能。本實驗室利用具微結構的聚乳酸(PLA)材質導管結合神經幹細胞後，移植於坐骨神經損傷小鼠模式，發現能促進軸突再生。經收集導管內的組織並利用蛋白質陣列(Protein array)分析，發現神經組織修復時會伴隨IL12p80蛋白質量的顯著增加。當我們將神經幹細胞混合IL12p80連同導管移植到坐骨神經損傷小鼠模式後，發現IL12p80的添加能明顯幫助神經再生。同時體外分化實驗也證實IL12p80能促進神經幹細胞分化為許旺細胞，因此IL12p80具有進一步開發為促進周邊神經修復藥物的潛力²¹。未來若能針對幹細胞參與神經再生之機制有更深入的了解，將能對特定目標蛋白設計藥物以促進神經新生。

腦腫瘤治療：腦腫瘤的治療非常棘手，其中又以多形性膠質母細胞瘤(Glioblastoma Multiforme, GBM)最為惡性，即便利用外科手術或放射線處理，患者的平均存活率能只有12到15個月，而一般的抗腫瘤藥物又無法越過血腦屏障，近年的研究發現，腦腫瘤細胞會分泌訊號因子誘使神經幹細胞遷移至腦腫瘤區，這樣的特性能應用於發展腦腫瘤治療的新策略²²，研究顯示，利用基因工程改造使神經幹細胞表現細胞毒性因子後成為細胞毒性神經幹細胞，在GBM動物模式中經這類細胞治療後能減少70%~90%的腫瘤體積，且能增加試驗動物的存活時間，細胞毒性神經幹細胞近期也已完成第一例的一期人體臨床試驗，目前改造神經幹細胞用以治療腦腫瘤主要經由下列方式：

- (1) 使神經幹細胞表現能將藥物前驅物轉變為毒性分子的酵素，例如：利用病毒載體thymidine kinase表現於神經幹細胞，並藉此將ganciclovir轉變為具細胞毒性的ganciclovir triphosphate。
- (2) 使神經幹細胞分泌抗腫瘤因子，例如：TRAIL、IL4、IL12、IL23、IFN β

等。

(3) 利用神經幹細胞傳遞溶腫瘤病毒(Oncolytic virus)至病灶。

3. 用於細胞治療之神經幹細胞來源

應用於細胞治療之細胞來源除了需符合道德規範外，也需要符合細胞大量生產時cGMP之規範，因此在應用上使用穩定的細胞株有其便利性。先前已提到利用c-MYC基因產生的不朽化神經幹細胞株CTX，另外也有研究利用端粒酶反轉錄酶(hTERT)、SV40 large T antigen、c-Myc Mutant T58A等外源基因產生穩定細胞株。除了直接使用神經幹細胞外，也有研究利用胚胎幹細胞或間質幹細胞於體外分化為神經幹細胞後再行治療的方法。而其分化後的神經幹細胞也在不同的神經系統動物疾病模式證明其效力(例如：MCAo、6-OHDA損傷等)，值得注意的是，雖然不同來源的神經幹細胞在臨床前的動物實驗都收到不錯的結果，但是鮮少在臨床試驗獲得類似的成效。有下列幾點原因²³：

- (1) 存在於不同神經組織捐贈者的遺傳背景(genetic background)差異。
- (2) 神經幹細胞之分化特性會受到分離來源之起始組織影響。
- (3) 實驗室的細胞培養環境與cGMP要求的差異。
- (4) 最終細胞治療產物的運送條件造成細胞狀況不佳。
- (5) 細胞純度鑑定僅依賴少數分子標記。
- (6) 不同批次的生產未執行完整的分化品質控管。

近年來由於分子生物學的發展，利用基因組定序、轉錄體與蛋白質體等技術，得以對於細胞群或單一細胞進行分析得知細胞群內的多型性進而控管細胞產物之品質，但是這些分析耗費巨大開發成本，因此開發細胞治療產品時使用穩定的細胞株或許能幫助得到穩定的治療品質，製造細胞產物時應注意進行分化試驗以確保不同批次產品有一致的效力。另外，為了降低臨床試驗的失敗率，於臨床前試驗時應改進動物模式以能更精準模擬人體疾病狀況。

細胞治療與器官移植一樣會有免疫排斥的問題，**細胞再程序化(reprogramming)**技術能提供自體來源之幹細胞，此方法在 2006 年由京都大學山中伸彌教授所開發，最先的技術使用病毒將 Oct4、Sox2、Klf4 與 c-Myc 基因送入體細胞使其再程序化為誘導型多潛能幹細胞(induced pluripotent stem cells, iPS)，此技術後來被衍伸應用在將不同來源之體細胞誘導為不同種類的細胞，日前日本政府也通過了將 iPS 細胞應用於人體的臨床試驗申請。於神經再生的應用上，雖然能將 iPS 細胞在體外先行分化為神經幹細胞或神經細胞再做細胞移植，但會有 iPS 殘留或 iPS 基因再啟動的問題而增加腫瘤發生的風險。為了克服這個問題，研究人員開發了略過 iPS 階段直接將體細胞再程序化為神經幹細胞或神經細胞的方法，透過在體細胞(通常為纖維母細胞)表達特定轉錄因子與 miRNA 製造神經幹細胞或神經細胞，一般來說 SOX2 轉錄因子高度表現是神經幹細胞的特徵，當 SOX2 表現量被抑制時神經幹細胞會停止細胞週期並開始分化。基因組的分析顯示 SOX2

會與幾百個與神經分化相關的基因啟動子做結合，此外 SOX2 也會調控組蛋白修飾。先前的研究發現將 SOX2 送入纖維母細胞大量表現後，能將之再程序化為神經幹細胞(誘導型神經幹細胞，induced neural stem cells, iNSCs)²⁴，再程序化的神經幹細胞除了有 SOX2 與 Nestin 的表現外，也具 tripotent 分化能力，由於經由外源性基因再程序化的細胞於臨床應用有其風險性，最近的研究發現利用化學小分子組合(CHIR99021、LDN193189、A83-01、Parnate、RG108、Retinoic Acid、SMER28、Hg-Ag 1.5)也能將小鼠纖維母細胞再程序化為神經幹細胞⁵，其技術大大減低了應用上的風險與門檻。目前利用化學小分子再程序化技術在人類細胞雖然未見成功，但未來若能深入了解細胞再程序化過程中參與的機制與訊息傳遞的路徑，其成功是可預期的。

除了製造神經幹細胞外，也能藉由再程序化技術將體細胞直接轉變為神經細胞(誘導型神經元，induced neurons, iNs)，如利用 miR124、BRN2 和 MYT1L 因子來再程序化纖維母細胞為 iNs 的方法²⁵，本實驗室進一步利用 SH2B adaptor protein 1beta (SH2B1) 來增加製造 iNs 的效率²⁶。細胞再程序化技術也能應用於製作體外疾病模式，將源自於特定神經系統疾病(如 AD、ALS、PD 等)病人的皮膚、血液或尿液檢體中分離出來的體細胞藉由特定因子來製造帶有特定基因型的誘導細胞，能提供體外藥物篩選平台建立的細胞材料，且能藉由分析其細胞的分泌體或蛋白質體來開發可靠的神經疾病的生物探針，有助於未來精準醫療之發展。此外，3D 培養技術於近年來有顯著的發展，利用 3D 培養 iPS 細胞所形成的類器官(Organoid)能提供更接近實際體內環境的發育與疾病體外模式，目前已建立類腸道、視網膜、內耳、腎臟與腦等類器官培養方法。類腦組織在小頭症(microcephaly)、茲卡病毒、自閉症(autism spectrum disorder)等神經發育疾病的相關研究已有許多的應用^{27,28}。

三、參與神經再生的滋養因子

神經再生的過程涉及複雜的訊息傳遞，而滋養因子扮演重要的調控腳色，這類的因子與他們的受體(receptor)通常以家族(family)存在於基因組內，在神經組織受傷後，這類因子影響再生過程中各類參與細胞的增生、存活、遷移與分化。因此，幾十年來科學家致力於神經滋養因子應用於神經治療的研究。幾類重要的滋養因子介紹如下。

1. 神經營養因子(Neurotrophin)

其家族成員包括 Nerve Growth Factor (NGF)、Brain-Derive Neurotrophic Factor (BDNF)、Neurotrophin-3 (NT-3)與 Neurotrophin-4 (NT-4)等。NGF 能幫助受損神經的功能回復與再髓鞘化，當與受體(TrkA)結合後會形成複合體進入到神經元細胞體(soma)內啟動下游訊息傳遞。目前已有研究利用含有 NGF 的緩釋型材料來幫助神經再生²⁹。BDNF 與 NGF 約有 40%的相似度，在海馬迴的神經新生扮演重要角色³⁰，在培養神經幹細胞時加入 BDNF 會刺激神經幹細胞往神經方向分化，BDNF 基因表現量下降與多型性是許多神經疾病的風險因子³¹，如：精神分裂症、憂鬱症與

AD 等，而在 AD 模式小鼠中使用病毒提升小鼠腦內 BDNF 的表現量能改善小鼠的記憶力，因此，利用外加或藥物提升腦內特定區域的 BDNF 表現量深具開發潛力。

2. 神經膠細胞株衍生神經滋養因子(Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)

GDNF 的表現量會在神經受損區有上升的現象，研究顯示 GDNF 能保護運動神經元與多巴胺神經元，具有治療 PD 的潛力³²。

3. 纖維母細胞生長因子(Fibroblast growth factors, FGF)

FGF1 主要表現於神經組織，能活化纖維母細胞生長因子受體(FGFR)1-4。在細胞試驗中，FGF1 能促進 PC12 神經元突生長(neurite outgrowth)³³，此外還能促進神經幹細胞自我更新³⁴。動物試驗中，在神經導管中加入 FGF1 能促進周邊神經修復³⁵，近期的研究顯示，FGF1 能透過 PI3K-CREB-IRE1a/XBP1 的路徑在 APP/PS1 的 PD 小鼠模式中改善功能性缺失並且能於細胞試驗中保護神經細胞免受 A β ₁₋₄₂ 澱粉蛋白的毒性影響³⁶。

四、結語與展望

老年化的社會即將到來，發展神經幹細胞來治療神經退化性疾病的技術具迫切性。然而自體幹細胞數量稀少，而異體來源之胚胎幹細胞有倫理道德的問題需解決。近年來發展的不朽神經幹細胞株或細胞再程序化技術將有望能滿足未來大量細胞治療的需求，然而目前在細胞的鑑定、製程、運送、保存與確效上未能有一致的標準，也因此動物實驗的結果往往無法在人體試驗中獲得證實。除了應用細胞本身外，幹細胞所衍生之相關滋養因子也能用於神經損傷的治療，由於蛋白質製造技術之進步，滋養因子得以大量製造，然目前要應用於臨床上仍需累積更多研究。未來藉由進一步累積對神經幹細胞的知識，我們希冀能以基因工程、生物藥劑或小分子藥物來調控神經幹細胞的活化，以激發存在於人體內自癒的能力。

伍、參考文獻

1. Gould, E. *et al.* Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5263-5267 (1999).
2. Reynolds, B.A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-1710 (1992).
3. Conover, J.C. & Notti, R.Q. The neural stem cell niche. *Cell Tissue Res* **331**, 211-224 (2008).
4. Pastrana, E., Silva-Vargas, V. & Doetsch, F. Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells. *Cell Stem Cell* **8**, 486-498 (2011).

5. Zhang, M. *et al.* Pharmacological Reprogramming of Fibroblasts into Neural Stem Cells by Signaling-Directed Transcriptional Activation. *Cell Stem Cell* **18**, 653-667 (2016).
6. Codega, P. *et al.* Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* **82**, 545-559 (2014).
7. Sheikh, B.N., Dixon, M.P., Thomas, T. & Voss, A.K. Querkopf is a key marker of self-renewal and multipotency of adult neural stem cells. *J Cell Sci* **125**, 295-309 (2012).
8. Hsu, Y.C., Kao, C.Y., Chung, Y.F., Chen, M.S. & Chiu, I.M. Ciliogenic RFX transcription factors regulate FGF1 gene promoter. *J Cell Biochem* **113**, 2511-2522 (2012).
9. Ahmed, A.I. *et al.* Endogenous GFAP-positive neural stem/progenitor cells in the postnatal mouse cortex are activated following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **29**, 828-842 (2012).
10. Wang, J. *et al.* Transcriptome analysis of neural progenitor cells by a genetic dual reporter strategy. *Stem Cells* **29**, 1589-1600 (2011).
11. Peschanski, M. *et al.* Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain : a journal of neurology* **117 (Pt 3)**, 487-499 (1994).
12. Kim, J. *et al.* Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **9**, 413-419 (2011).
13. Rangasamy, S.B., Soderstrom, K., Bakay, R.A. & Kordower, J.H. Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease. *Progress in brain research* **184**, 237-264 (2010).
14. Choi, S.S., Lee, S.R., Kim, S.U. & Lee, H.J. Alzheimer's disease and stem cell therapy. *Experimental neurobiology* **23**, 45-52 (2014).
15. Glass, J.D. *et al.* Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells* **30**, 1144-1151 (2012).
16. Klein, S.M. *et al.* GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Human gene therapy* **16**, 509-521 (2005).
17. Faiz, M. *et al.* Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell* **17**, 624-634 (2015).
18. Stevanato, L. *et al.* c-MycERTAM transgene silencing in a genetically modified human neural stem cell line implanted into MCAo rodent brain. *BMC Neurosci* **10**, 86 (2009).
19. Sinden, J.D., Hicks, C., Stroemer, P., Vishnubhatla, I. & Corteling, R. Human Neural Stem Cell Therapy for Chronic Ischemic Stroke: Charting Progress from Laboratory to Patients. *Stem Cells Dev* **26**, 933-947 (2017).
20. Ni, H.C., Lin, Z.Y., Hsu, S.H. & Chiu, I.M. The use of air plasma in surface modification of peripheral nerve conduits. *Acta Biomater* **6**, 2066-2076 (2010).
21. Lee, D.-C. *et al.* Neural Stem Cells Promote Nerve Regeneration through IL12-induced

- Schwann cell Differentiation. *Molecular and Cellular Neuroscience* (2016).
22. Bago, J.R. *et al.* Therapeutically engineered induced neural stem cells are tumour-homing and inhibit progression of glioblastoma. *Nature communications* **7**, 10593 (2016).
 23. Temple, S. & Studer, L. Lessons Learned from Pioneering Neural Stem Cell Studies. *Stem cell reports* **8**, 191-193 (2017).
 24. Ring, K.L. *et al.* Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell* **11**, 100-109 (2012).
 25. Ambasadhan, R. *et al.* Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* **9**, 113-118 (2011).
 26. Hsu, Y.C. *et al.* Signaling adaptor protein SH2B1 enhances neurite outgrowth and accelerates the maturation of human induced neurons. *Stem cells translational medicine* **3**, 713-722 (2014).
 27. Qian, X. *et al.* Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* **165**, 1238-1254 (2016).
 28. Mason, J.O. & Price, D.J. Building brains in a dish: Prospects for growing cerebral organoids from stem cells. *Neuroscience* **334**, 105-118 (2016).
 29. Xu, X. *et al.* Polyphosphoester microspheres for sustained release of biologically active nerve growth factor. *Biomaterials* **23**, 3765-3772 (2002).
 30. Hsu, Y.C., Lee, D.C. & Chiu, I.M. Neural stem cells, neural progenitors, and neurotrophic factors. *Cell Transplant* **16**, 133-150 (2007).
 31. Zuccato, C. & Cattaneo, E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neurology* **5**, 311-322 (2009).
 32. Patel, N.K. & Gill, S.S. GDNF delivery for Parkinson's disease. *Acta neurochirurgica. Supplement* **97**, 135-154 (2007).
 33. Lin, W.F. *et al.* SH2B1beta enhances fibroblast growth factor 1 (FGF1)-induced neurite outgrowth through MEK-ERK1/2-STAT3-Egr1 pathway. *Cell Signal* **21**, 1060-1072 (2009).
 34. Lee, D.C. *et al.* Isolation of neural stem/progenitor cells by using EGF/FGF1 and FGF1B promoter-driven green fluorescence from embryonic and adult mouse brains. *Mol Cell Neurosci* **41**, 348-363 (2009).
 35. Ni, H.C., Tseng, T.C., Chen, J.R., Hsu, S.H. & Chiu, I.M. Fabrication of bioactive conduits containing the fibroblast growth factor 1 and neural stem cells for peripheral nerve regeneration across a 15 mm critical gap. *Biofabrication* **5**, 035010 (2013).
 36. Meng, T. *et al.* Tat-haFGF(14–154) Upregulates ADAM10 to Attenuate the Alzheimer Phenotype of APP/PS1 Mice through the PI3K-CREB-IRE1 α /XBP1 Pathway. *Molecular therapy. Nucleic acids* **7**, 439-452 (2017).

第八章

間葉幹細胞 – 第一個被核准上市的幹細胞藥物

Mesenchymal Stem Cell-The First Approved Stem Cell Drug

洪士杰^{1,2}

¹ 中國醫藥大學新藥開發研究所 ² 中央研究院立生物醫學科學研究所

一、匣子

埃及神祇歐西里斯(Osiris)與愛妻伊西斯(Isis)治理埃及。受到歐西里斯弟弟賽斯(Seth)的嫉妒，謀取篡位。最後竟將其大卸十四塊，丟進尼羅河，不死心的伊西斯找回丈夫的屍塊拼湊回去，竟能再度復活。基於這個埃及傳說，一家目前納斯達克(Nasdaq)上市幹細胞生技公司，在 1992 年就以 Osiris 為名在美國馬里蘭州成立(<http://www.osiris.com/>)。所用的技術平台是由間葉幹細胞(Mesenchymal Stem Cell, MSC)研究先驅者阿諾·卡普蘭博士(Dr. Arnold Caplan)所領導的凱斯西儲大學(Case Western Reserve University)團隊所提供。由於該公司 MSC 取自健康成人骨髓，沒有宗教倫理的爭議。再則 MSC 具有低免疫排斥特性，可以直接做為異體移植；而且間葉幹細胞是一種多潛能的幹細胞，有化分為各胚層細胞的能力。因此他的產品可有四種優勢：第一、從一位健康成人骨髓取出 MSC 經過放大增殖，可備製一萬人次使用。第二、可供患者直接使用，不需要配對。第三、由於間葉幹細胞可分化為不同類型細胞，因此有潛力治療各式各樣疾病。第四、使用簡單，只需要靜脈注射或局部打針，因此可以產業化。話雖說如此，其中還是有許多技術需不斷的改良和發展。直到 1998 年他們才做第一個人體試驗。其間尚有許多大公司資金的挹注，如美國 Genzyme 和日本 JCR 等。因此他們可以同時進行如 GvHD(移植物抗宿主病)、Crohn's disease(克隆氏症)、Acute Radiation Syndrome(急性輻射損傷)、第一型糖尿病、急性心肌梗塞、慢性阻塞性肺疾和骨關節炎等疾病之人體臨床試驗。終於在 2012 年 5 月以治療兒童 GvHD(移植物抗宿主病)取得加拿大藥證，名為 Prochymal，為世界第一個被核准上市的幹細胞藥物(<http://www.medicalnewstoday.com/articles/245704.php>)。這個振奮人心好消息，證明幹細胞治療可以產業化，意義非凡。諷刺的是，這個成果是在該公司成立二十年後才實現，表示幹細胞產業還有一段長路要走。

二、間葉幹細胞

間葉幹細胞(或稱間質幹細胞或間充質幹細胞)最早由骨髓分離出，為擁有自我複製更新能力及具多分化能之基質細胞¹。可以分化成多種類型的成熟細胞，包括：成骨細胞、脂肪細胞及軟骨細胞等中胚層細胞及神經細胞等非中胚層的成熟細胞²。除了因為具多分化能而可以利用於促進新生骨及軟骨等組織的再生用途外；間葉幹細胞還因為具有分泌激素及成長因子的「旁分泌」效應，因此還可以利用來影響組織再生、抑制發炎反應及調控免疫能力³。間葉幹細胞的這些功能或用途，已經在過去多種的細胞實驗、動物臨床前試驗及臨床試驗中被證實，目前已經邁向廣泛利用於多種臨床應用的里程碑中。

三、間葉幹細胞發現之歷史

在 1924 年，俄羅斯出生的形態學家亞歷山大·馬克西莫夫(Alexander A. Maximow)利用病理檢驗方法，發現一個特殊形狀的前驅細胞，後來證明可以發育成不同類型的血球細胞，即所謂的造血幹細胞(Haematopoietic Stem Cell, HSC)⁴。

在 1960 年代，細胞學家歐內斯特·麥卡洛克(Ernest McCulloch)和詹姆斯·提爾(James Edgar Till)第一次發現骨髓內存在具有自我複製更新能力的細胞。經體外克隆性(clone)試驗研究證實，這些具克隆潛力的骨髓細胞同時具有多分化能的潛力⁵。並藉此研究，真正的發現骨髓中存在有造血幹細胞。

在 1970 年代，Friedenstein 和同事們，在體外培養試驗系統中，證實骨髓內除了造血幹細胞的存在外，還存在基質細胞(stroma cell)，這些細胞也具有自我複製更新能力⁶。由於其形成的細胞聚落內的細胞形狀像成纖維細胞，因此將這些細胞簡稱為「聚落形成單位成纖維細胞」(CFU-f)。這些成纖維前體基質細胞後來也可以在正常和經放射線照射的小鼠造血器官中分離出。

在 1980 至 1990 年代隨後的實驗發現，骨髓細胞的可塑性和他們的命運，可以由不同的環境因素所控制。這些實驗後來證實，雖然這些可以形成成纖維細胞聚落的基質細胞不能像造血幹細胞一樣分化成血球細胞，但可以分化成成骨細胞或脂肪細胞⁷。

四、骨髓間葉幹細胞之研究演進

間葉幹細胞最早是在骨髓分離出，被認為是骨髓的基質細胞。起初，研究者認為這群基質細胞和造血幹細胞一樣都存在於骨髓中，且都屬於中胚層分化的組織；但異於造血幹細胞，基質細胞不會分化成血球細胞，但可以做為基質提供造血幹細胞分裂或增殖時所需要的分子。除此之外，他們還認為基質細胞是結締組織的一部分，屬於功能性細胞，長期駐留在該結構中，且可以幫助支持結構的形成。雖然「基質細胞」這個定義準確的描述骨髓間葉幹細胞的功能之一，但這個定義卻無法說明最近發現的間葉幹細胞在組織修復及再生的角色。

在 1999 年，Pittenger 發表於「科學」雜誌的文章，第一次證實人類骨髓間葉幹細胞具有自我複製更新的能力，並能同時分化成包括成骨細胞、脂肪細胞及軟骨細胞等中胚層細胞¹。由於具有自我複製更新及多分化潛能的能力，首次被確定和胚胎幹細胞或造血幹細胞一樣，同屬於「幹細胞」的一種。這個研究利用體外化學誘導的分化方法，輕易的讓間葉幹細胞可以一致的分化成特定種系的分化細胞。如在抗壞血酸、類固醇及無機磷存在的情況下，間葉幹細胞可以分化成成骨細胞；而在 3-異丁基-1-甲基黃嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、較高濃度的類固醇及胰島素的存在下，間葉幹細胞可以分化成脂肪細胞。重要的是，成骨細胞及脂肪細胞這兩項分化都需要血清存在。與此相反，在無血清存在下，轉化生長因子- β (Transforming growth factor beta, TGF- β)能誘導間葉幹細胞分化成軟骨細胞。這幾個體外化學誘導分化方法，目前已經成為鑑定間葉幹細胞身分的標準或生產臨床試驗等級間葉幹細胞之釋放標準的必備檢驗步驟⁸。

同年 Horwitz 及 Prockop 兩位美國學者的共同研究，首次完成間葉幹細胞的人體移植臨床試驗，利用增殖的人類骨髓間葉幹細胞來治療「成骨不全」疾患，即俗稱的玻璃娃娃，這些病人因為第一膠原蛋白基因變異，以致形成的骨頭脆弱，無法抵抗重力或扭曲，因此在容易因為日常生活中輕微的撞擊或扭傷而造成骨折。病人因為多次骨折後，身體肢體變形，無法獨自站立或步行。經由移植他人的骨髓間葉幹細胞後，這些病人情況獲得改善，並能開始站立⁹。這些臨床試驗結果發表於「自然醫學」雜誌，雜誌的編輯還因此寫了一篇「間葉幹細胞不再是骨髓的次等公民」的評論，正式將間葉幹細胞和造血幹細胞等同看待，提升了間葉幹細胞的臨床應用的重要性¹⁰。

在 2002 年，Jiang 等發表於「自然」雜誌的文章，將帶有 LacZ 標記的老鼠間葉幹細胞移植於老鼠的囊胚，並將此囊胚放入著床於代理孕母的子宮內，生出的仔鼠經由切片檢查，除了精卵外，所有組織都有 LacZ 標記的嵌入¹¹。此研究第一次證實骨髓間葉幹細胞其分化的潛能近似胚胎幹細胞一樣，可以分化成所有身體組織。但往後的研究者嘗試要重複此實驗，但不容易成功。因此骨髓間葉幹細胞是否近似胚胎幹細胞一樣是全分化能，仍存在爭議。

在 2004-2012 年間，骨髓間葉幹細胞已經利用於臨床試驗以治療包括：成骨不全、心肌梗塞、移植物抗宿主病(Graft versus host disease, GVHD)、炎性腸疾病和敗血症等全身性疾病。其中包括完成兩項臨床第三期的臨床試驗：利用靜脈注射異體來源人類骨髓間葉幹細胞來治療移植物抗宿主病及炎性腸疾病。試驗成果證實以異體來源人類骨髓間葉幹細胞來做全身性治療的安全性。但於美國進行之第三期臨床試驗的結果，因為安慰劑組也顯示療效，無法充分證明異體人類骨髓間葉幹細胞對於此兩項疾病的療效。Emory 大學 Galipeau 教授針對此做評論，認為此臨床試驗失敗的原因，可能包括：細胞老化、喪失旁分泌效應、捐贈者異質性、冷凍儲存技術及異體排斥等問題¹²。另一方面，同一生物科技公司生產的異體人類骨髓間葉幹細胞於加拿大第三期臨床試驗的結果，和安慰劑組相比仍顯示有意義的進步療效，因此加拿大衛生當局於 2012 年 5 月核准此產品於加拿大上市用以治療小孩的移植物抗宿主病。同年紐西蘭也核准此產品的上市及使用。

五、間葉幹細胞之身體其他來源

除了骨髓之外，今天許多的實驗室可以從其他非骨髓組織中，如羊水、臍帶或胎盤、成人的脂肪組織、肌肉或韌帶、眼睛的角膜基質，或脫落的寶寶牙齒的牙髓，分離出間葉幹細胞。舉例來說，最年輕、最原始的骨髓間葉幹細胞可以從羊水或臍帶組織等分離出。羊水是水狀液體，包圍襯墊著並藉以保護羊膜內的胚胎。由於比水的比熱容高，羊水能提供胎兒一個恆定溫度的環境。此外，羊水讓胚胎能夠自由活動，不會讓子宮壁壓的太緊。羊水是由羊膜分泌，羊膜在受精兩週後開始成長並且灌水。再過 10 週後液體包含蛋白質、碳水化合物、脂質與磷脂質、尿素與電解質。到懷孕中期胚胎會在羊水中呼吸，並且發育肺與胃腸道。羊膜穿刺術是最普遍的產前診斷，傳統的羊膜穿刺術是在懷孕 15-16 週進行，早期羊膜穿刺術是在懷孕第 10 到 14 週進行。診斷的樣本是取自於發育中的胎兒週圍的羊水。這項診斷主要是針對胎兒的唐氏症、鐮刀型紅血球疾病、囊腫性纖維化等先天遺傳疾病和單基因遺傳疾病的基因分析，還有胎兒成熟度的鑑定、開放性神經管缺損和子宮內胎兒溶血的診斷。

為何羊水可以做為產前診斷試驗的標本？原因是羊水中含有胎兒的皮膚和其他發育過程中脫落的細胞，檢驗時主要是針對這些細胞進行 2-3 個星期的培養後，收取細胞進行核型分析(karyotype analysis)、生化分析及 DNA 分析，來排除遺傳性和先天性缺陷的可能性。也因為如此，研究者發現羊水內的細胞是一個異質性高的細胞群體，其中有一群細胞形狀像間葉幹細胞，經培養於間葉幹細胞的培養液中，這群細胞可以持續分裂增殖，最後鑑定發現具有間葉幹細胞的特性¹³。

臍帶組織是一個連接發展中的胚胎和胎盤的多管狀結構，其基因來源也是屬於胎兒。正常情況下，臍帶是由兩條動脈及一條靜脈組成，藉由胎盤從母體提供胚胎發育所需的血液及養分來源。在臍帶內包圍動脈及靜脈的間質組織，由於形狀像沃頓商學院的果凍，因此被稱為「沃頓果凍間質」。臍帶組織來源的間葉幹細胞，曾經被報告可以從臍帶血及沃頓果凍間質中分離出¹⁴。但前者爭議較大，很多實驗室無法從臍帶血中分離出間葉幹細胞。原因之一是其含量非常稀少，一般認臍帶血中的間葉幹細胞含量，決定於胎兒的週齡，一般足月產胎兒的臍帶血中的間葉幹細胞已經歸位，因此和成人的周邊血一樣，從此血液中分離不出間葉幹細胞。而未足月產胎兒的臍帶血中可能還存在少量未歸位的間葉幹細胞，因此從此血液中可以分離出間葉幹細胞。因為出生後的新生兒臍帶容易獲得，通常被扔掉，且收集不構成危險，因此較容易獲得。且臍帶間葉幹細胞和成人骨髓來源的間葉幹細胞相比，被認為更原始且分化能力更強，因此可以作為間葉幹細胞臨床應用的來源。

脂肪組織也是間葉幹細胞的來源之一。脂肪內含有最豐富的脂肪間葉幹細胞，而這些間葉幹細胞，和骨髓間葉幹細胞一樣具有多分化的能力，可分化成各種不同種系的成熟細胞並幫助組織修復與再生。美容手術中常進行的抽脂過程可以分離出脂肪間葉幹細胞。以往抽脂過後剩下的脂肪組織，都是以廢棄或是回填作處理。現在研究者可以從這些抽脂過後剩下的脂肪組織中，將脂肪間葉幹細胞分離取出後利用，使抽脂美容的手術

達到更大的效益。但和骨髓間葉幹細胞相比，脂肪間葉幹細胞其脂肪細胞的分化能力較佳，不易分化成成骨細胞，且實驗也顯示此細胞較不適應用於軟骨修復或再生^{15,16}。研究者目前也正積極研究應用脂肪間葉幹細胞於臨床試驗以治療各種疾病。

另外一個極其豐富的間葉幹細胞的來源是發展的下頷第三白齒的牙芽^{17,18}。和骨髓或脂肪間葉幹細胞一樣具有多分化的能力，可分化成各種不同種系的成熟細胞並幫助組織修復與再生。牙芽間葉幹細胞可能參與牙齒組織的形成及孩童時期牙齒的替換，最終可能形成牙釉質、牙本質、血管及牙髓神經等組織。由於過了孩童期即不再有牙芽，因此他們被認為可以像臍帶血一樣，極容易收集，並經由個人銀行業務儲存起來，構成一個間葉幹細胞的主要來源，以供未來研究和多種臨床治療之用。這些牙芽幹細胞和骨髓間葉幹細胞相比，牙芽間葉幹細胞其成骨細胞的分化能力較佳，甚至可以分化成牙釉質及牙本質等比骨頭堅硬的組織，但非常不易分化成脂肪細胞。

六、間葉幹細胞之形態及特徵

人類骨髓間葉幹細胞，於相位差顯微鏡下呈現成纖維細胞樣的形態。骨髓間葉幹細胞的特徵是由骨髓內少數小細胞體且形態為細而長的細胞，經不斷分裂及增殖而形成。骨髓間葉幹細胞其細胞體內含有一種又大又圓的細胞核具有突出的核仁，周圍環繞著細而分散的染色質顆粒，且核具有透明的外觀。細胞體的其餘部分包含少量的高爾基體、粗面內質網、粒線體，和多聚核糖體。廣泛分散和一些網狀纖維填充相鄰的細胞外基質細胞，這是細而長，但沒有其他類型的膠原纖維。

七、間葉幹細胞之國際鑑定標準

國際細胞治療學會(International Society for CellularTherapy, ISCT)已提出了一系列的標準來界定間葉幹細胞⁸。此標準包括：一種細胞可以被分類為骨髓間葉幹細胞，如果是在正常培養條件下，顯示出了塑料的黏附性能，並具有成纖維樣形態。培養的骨髓間葉幹細胞在其表面 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和 CD166 的表達為陽性，而缺乏細胞 CD11b、CD14、CD19、CD34、CD45、CD79A 和 HLA-DR 的表面標誌物的表達。同時這些細胞可以經體外化學誘導的分化方法分化成成骨細胞，脂肪細胞及軟骨細胞等中胚層細胞。

八、間葉幹細胞之分化能力

骨髓間葉幹細胞有很大的自我更新能力，同時保持其多分化特性。除了先前提到檢驗是否為間葉幹細胞的一個標準測試，即確認能否分化成成骨細胞、脂肪細胞及軟骨細胞外；間葉幹細胞也被證實可以分化成具神經電位的神經元細胞¹⁹、心肌細胞²⁰和肝臟組織²¹。但也有揮之不去的疑問，懷疑間葉幹細胞分化成的這些組織是否真的有能力，

可以用於再生醫學治療不同退化疾病^{22,23}。同樣地，雖然有文獻指出，間葉幹細胞甚至具有胚胎幹細胞一樣的複分化能，可以分化成身體三個胚層的所有組織^{11,24}，但是還是有些說法解釋這些發現可能錯誤²⁵。因此，間葉幹細胞除了分化成成骨細胞，脂肪細胞及軟骨細胞外，其他如外胚層的神經及內胚層的肝臟細胞，仍舊存在疑問，等待更多的實驗去證明。

九、間葉幹細胞之免疫調節作用

大量研究證明人類間葉幹細胞當移植至異體宿主時，因為不表現部份的 HLA 抗原，可以不被異體宿主免疫細胞認識，因此可以逃避免疫細胞的攻擊。除此之外，間葉幹細胞還可以干擾樹突狀細胞和 T 細胞的功能，並能藉由分泌激素來產生一個局部免疫被抑制的微環境²⁶。實驗也證明，人類間葉幹細胞的免疫調節功能可以藉由暴露於發炎環境，例如藉由增加局部干擾素來提升 interferon-gamma(IFN γ)的濃度²⁷。

十、間葉幹細胞之臨床使用及細胞給予途徑

當體內應付損傷或退化時，骨髓間葉幹細胞可以被激活和調動來做修補的動作。然而，此效率是很低的，尤其當個體步入老化時。例如，損壞的肌肉在年輕時可以很快修復，但成年後其癒合就非常緩慢。如果有激活骨髓間葉幹細胞的方法，那麼這樣的傷口會癒合得很快。再生醫學就是在這樣的思維下產生，在體外增殖幹細胞再回輸體內。利用體外增殖後的幹細胞來做治療，需要考慮幹細胞回輸的路徑。早期的臨床試驗多使用靜脈移植來治療疾病，例如間葉幹細胞在移植物抗宿主疾病和敗血症等全身性疾病的治療，就是使用靜脈來給予全身給予間葉幹細胞。但是，很多待治療的疾病其實只有影響部分組織，因此學界開始採用局部施打幹細胞來治療，可以增加局部的幹細胞濃度，而達到治療的效果。屬於發炎性腸道疾病(inflammatory bowel disease, IBD)之一的克隆氏症就是一個例子。雖然也是全身性自體免疫疾病，但其影響的組織以腸道為主。最近發表以間葉幹細胞成功治療克隆氏症的第三期臨床試驗，就是採用局部移植²⁸。直接注射或移植細胞到局部需要維修的組織上，可能是未來幹細胞給予途徑的首選。靜脈注射等經由血管輸送幹細胞至全身，當通過肺靜脈時，大部分的幹細胞會被隔離在肺部，常因此失去治療的效用。

十一、低氧培養對間葉幹細胞的優點

筆者過去所帶領的團隊，對低氧氣濃度培養增殖骨髓間葉幹細胞做全面性及多角度的探討。過去近十年來已獲致豐碩成果，不唯在學術界先後發表近多篇相關論文於「分子細胞」，「血液」，「幹細胞」，「老化細胞」及「肝臟學雜誌」等國際知名期刊。同時相關研究成果也申請台灣、中國、歐洲及美國專利。為台灣間葉幹細胞做為新式治療的未來發展與研究，規劃更有利的條件與更開闊的空間。這些成果分別證明低氧培養間葉幹

細胞，可以降低因增殖所造成細胞老化，增加細胞的分裂，並增加幹細胞的效率，也可以促進體外及體內之分化能力²⁹；低氧還能促進骨髓間葉幹細胞之旁分泌(paracrine)作用，增進各種生長因子或激素的分泌，其中包括重要的血管生成因子如血管內皮生長因子和白細胞介素 6(interleukin-6)³⁰。且低氧下間葉幹細胞之分泌物可以促進皮膚傷口癒合，並能增加血管新生因而增進糖尿病鼠骨折癒合的能力。最後，低氧在促進間葉幹細胞移植後的移動、歸位及著床上，也扮演重要的角色³¹。

筆者參與的團隊迄今共有 20 多篇論文有關低氧對間葉幹細胞影響的發表。於 2012 年 7 月發表於「分子細胞」之論文³²，針對學界有關多能性轉錄因子 Oct4 和 Nanog 是否表現於成體幹細胞如間葉幹細胞，至今仍爭議不斷的問題作探討。這篇論文有突破性的發現證明間葉幹細胞可以表現近於胚胎幹細胞所表現的 Oct4 和 Nanog，對此爭議不休的議題畫下完美句點，同時也指出 Oct4 和 Nanog 對間葉幹細胞之維持自我更新和未分化狀態扮演重要角色。研究發現間葉幹細胞分別於早期培養、低氧或是 p21 基因剔除的三種狀況下，Oct4 和 Nanog 的表現、幹細胞本身增殖和分化潛能分別明顯優於間葉幹細胞於晚期培養、常氧或是表現正常 p21 基因等狀況。同時在這種三種狀況下，細胞自發性分化的情況也會受到限制。導致這樣的結果主要是因為 Oct4 和 Nanog 會直接接合在 Dnmt1(DNA methyl-transferase I，去氧核糖核酸甲基化轉移酶 I)基因啟動子上，增加 Dnmt1 的表現，同時也發現細胞週期抑制分子 p16 與 p21、發育與分化相關的基因的表現都會同時被抑制。這些實驗數據皆顯示出，Oct4 和 Nanog 在維持間葉幹細胞之幹細胞特性所扮演重要的角色。

2012 年 5 月美國生技公司於加拿大取得上市核准的全世界第一個幹細胞藥物即為骨髓間葉幹細胞，這說明了幹細胞將成為未來的醫療趨勢。筆者團隊的研究成果，證明低氧培養可以提升以間葉幹細胞做為新式治療之成功發展，未來將以此技術增殖的優良間葉幹細胞進行臨床試驗。目前已經完成一系列的臨床前試驗，證明間葉幹細胞可以促進缺血下肢的修復，骨折癒合及關節修復。同時研究團隊已經完成細胞治療核心實驗室的建置及查核。相信在不久的將來此技術就可以應用於臨床治療對多種疾病帶來幫助。

十二、間葉幹細胞應用實務化所需要探討的問題

1. 臨床的實際運用對那類疾病的治療有好處

間葉幹細胞可以應用在許多急性損傷、發炎、自體免疫疾病以及退化等慢性病的治療。2012年5月美國生技公司於加拿大取得上市核准的全世界第一個幹細胞藥物即為骨髓間葉幹細胞，該細胞有效的控制移植物抗宿主疾病的發生。目前已在臨床試驗的研究案例還包含：促進骨骼關節及肌肉再生、提高造血幹細胞移植的成功率，減緩自體免疫疾病或克隆氏症等症狀的惡化、治療心肌梗塞、周邊血管堵塞及糖尿病等疾病。這些疾病利用間葉幹細胞治療都可以明顯減輕病狀與增加存活率。

2. 現行治療方法及未來以間葉幹細胞做治療的成效比較

(1) 周邊動脈血管因為疾病而堵塞，使得循環不良，不但會造成下肢疼痛及間歇性跛行，嚴重時更會造成肢體壞死，導致截肢。目前外科治療方式以重建肢體循環為主，方法包括血管繞道手術，經皮導管氣球擴張術或藉由支架置放術來打通肢體的血管。利用外科手術再配合局部注射間葉幹細胞進行治療，不但能夠促進血管新生，也能提高治療效果，降低截肢的比例。

(2) 關節軟骨因外力而造成損傷及退化，治療方式包括關節鏡擴創或骨髓刺激外，也可以利用自體骨軟骨植體來治療；早期退化性關節炎只能給予消炎藥物或玻尿酸製劑作症狀治療，並無積極抑制病程之藥品，而晚期退化性關節炎在主要用人工關節置換術。這些方法無法修復已受損的軟骨，未來復發或是二次手術機率也提高。間葉幹細胞有分化成軟骨及促進血管新生的能力，目前外國研究顯示，在第二期臨床實驗證明間葉幹細胞能大幅提升關節炎病人的治療效果，進而減少置換人工膝關節的需求；而老人家常見的股骨頭壞死，也能因為間葉幹細胞的再生能力，除了降低症狀之外，也能減少人工髖關節置換。間葉幹細胞對因社會老化衍生骨肌肉系統疾病的增加，提供有效且安全的解決方法。

(3) 移植物抗宿主疾病常發生於配對不全之骨髓移植時，產生移植物免疫對抗宿主，造成多器官衰竭。過去只能以類固醇或其他免疫抑制劑來治療，其失敗率高達 50%，而且伴隨嚴重的副作用。間葉幹細胞已通過第三期臨床實驗，可改善移植物免疫對抗宿主，增加移植病患之存活率，也能大幅降低副作用。

(4) 克隆氏症屬於慢性疾病，患者須長期透過藥物控制病情，包括服用 5-ASA 局部消炎藥、類固醇或可抑制免疫系統的硫唑嘌呤(Azathioprine)，但後兩者的藥物副作用多，部分患者病情反覆，所以要經常調整藥物劑量。間葉幹細胞已完成第三期臨床實驗，以靜脈或局部注射式的生物製劑作為最新治療。外國研究顯示，注射生物製劑的患者，臨床病徵有明顯改善，大大紓緩不適感覺之餘，亦有望減低日後罹患癌症及腸切除的風險，效果比傳統藥物更佳。

十三、參考文獻

1. Pittenger, M.F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
2. Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-74 (1997).
3. Prockop, D.J. & Oh, J.Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther* **20**, 14-20 (2012).
4. Becker, A.J., Mc, C.E. & Till, J.E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen

- colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**, 452-454 (1963).
5. Till, J.E. & McCulloch, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**, 213-222 (1961).
 6. Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F. & Keiliss-Borok, I.V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* **17**, 331-340 (1974).
 7. Owen, M. & Friedenstein, A.J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* **136**, 42-60 (1988).
 8. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317 (2006).
 9. Horwitz, E.M. *et al.* Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* **5**, 309-313 (1999).
 10. Gerson, S.L. Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens. *Nat Med* **5**, 262-264 (1999).
 11. Jiang, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49 (2002).
 12. Galipeau, J. The mesenchymal stromal cells dilemma--does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy* **15**, 2-8 (2013).
 13. Fukuchi, Y. *et al.* Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* **22**, 649-658 (2004).
 14. Wang, H.S. *et al.* Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **22**, 1330-1337 (2004).
 15. Hennig, T. *et al.* Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol* **211**, 682-691 (2007).
 16. Lee, R.H. *et al.* Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* **14**, 311-324 (2004).
 17. Miura, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5807-5812 (2003).
 18. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13625-13630 (2000).
 19. Hung, S.C. *et al.* In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. *Stem Cells* **20**, 522-529 (2002).
 20. Makino, S. *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* **103**, 697-705 (1999).
 21. Sato, Y. *et al.* Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are

- differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* **106**, 756-763 (2005).
22. Franco Lambert, A.P., Fraga Zandonai, A., Bonatto, D., Cantarelli Machado, D. & Pegas Henriques, J.A. Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work? *Differentiation* **77**, 221-228 (2009).
 23. Leiden, J.M. Beating the odds: a cardiomyocyte cell line at last. *J Clin Invest* **103**, 591-592 (1999).
 24. Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L. & Discher, D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677-689 (2006).
 25. Verfaillie, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* **12**, 502-508 (2002).
 26. Brighton, C.T. & Hunt, R.M. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am* **73**, 832-847 (1991).
 27. Sheng, H. *et al.* A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res* **18**, 846-857 (2008).
 28. Panes, J. *et al.* Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet* **388**, 1281-1290 (2016).
 29. Tsai, C.C. *et al.* Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* **117**, 459-469 (2011).
 30. Hung, S.C., Pochampally, R.R., Chen, S.C., Hsu, S.C. & Prockop, D.J. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* **25**, 2363-2370 (2007).
 31. Hung, S.C. *et al.* Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS One* **2**, e416 (2007).
 32. Tsai, C.C., Su, P.F., Huang, Y.F., Yew, T.L. & Hung, S.C. Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell* **47**, 169-182 (2012).

第九章

軟骨再生的研究與臨床產業應用

Research and Clinical Application of Cartilage Regeneration

陳郁君^{1,2} 張至宏^{1,2}

¹ 亞東紀念醫院骨科部 ² 元智大學生物科技與工程研究所

一、軟骨損傷與退化性關節炎

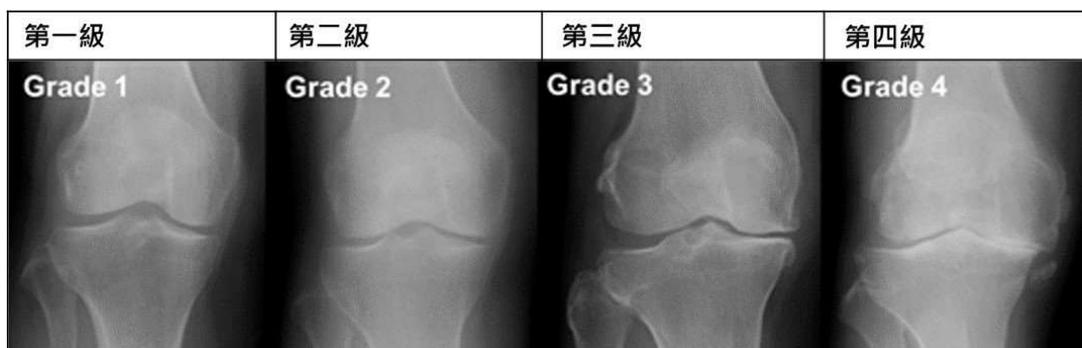
人體關節會因運動傷害、創傷、過度使用等等之因素，產生軟骨損傷與發炎，最後導致退化性關節炎(Osteoarthritis, OA or degenerative arthritis)的發生，患者常會有關節腫脹及疼痛感。其發生率會隨著人的年紀增長而增加，有將近 80% 65 歲以上的成年人在生活上受到退化性關節炎的影響¹，間接影響其生活品質，因此，這類的健康問題很值得我們去注意。

由於軟骨組織本身無血管的特性，所以其自我修復能力相當有限，輕微傷害即有可能導致漸進式的毀壞與退化。軟骨組織的受損可以分為半層或部分厚度缺損(Partial thickness defect)及全層缺損(Full thickness defect)，其中半層缺損為軟骨組織的局部受損或剝蝕，尚未到達下層的硬骨層；而全層缺損則是軟骨組織的受損或剝蝕已深入下層的硬骨層。國際修復協會(International Cartilage Repair Society, ICRS)就依照軟骨缺損退化的程度將其分為五級(圖一)，第零級為正常的軟骨；第一級為軟骨組織看似接近正常，僅表層出現微細的裂縫或裂紋；第二級為軟骨組織產生半層缺損，但其深度小於軟骨層深度的一半；而當缺損的深度大於軟骨層的一半，但又還沒到達硬骨層，即視為第三級缺損退化；若組織受損情形持續加重，受損深度已經深達硬骨層，即為第四級缺損退化，組織產生全層缺損²。

臨床上，ICRS 分級適用於軟骨缺損，而另一個常見的分級方法為 Kellgren-Lawrence 分級法(Kellgren-Lawrence Grade, KL Grade)適用於退化性關節炎的分級。Kellgren 和 Lawrence 依據膝關節的 X 光片影像將退化程度分成五級(圖二)，其中零級表示的是正常健康的膝關節影像；膝關節產生一級退化時，軟骨影像僅有輕微磨損；二級退化時，關節間距輕微變窄，影像上可以看到有明顯骨刺；三級退化時，軟骨有中度磨損，關節明顯變窄，硬骨影像輕微變白；四級退化時，軟骨已經磨穿，硬骨影像明顯變白，硬骨磨損變形³。患者若於初級輕度軟骨退化時給予合適的治療方式，則可降低未來患部施做人工關節置換的可能性。



圖一、國際修復協會(International Cartilage Repair Society, ICRS)軟骨缺損退化分級標準⁴



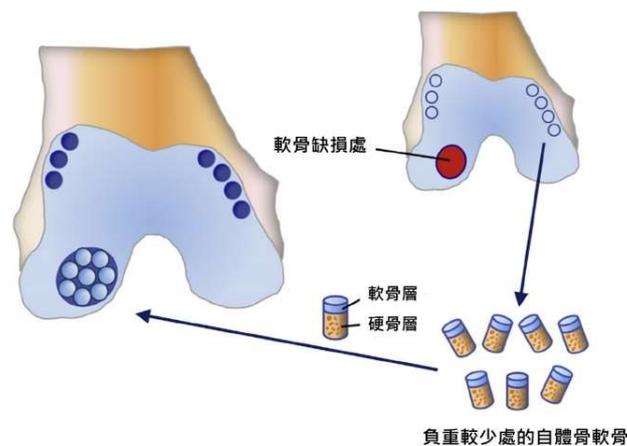
圖二、Kellgren-Lawrence (Kellgren-Lawrence Grade, KL Grade)分級標準⁵

臨床上，針對輕中度膝關節軟骨受損，較常見的治療方式為給予乙醯胺酚類、非類固醇消炎止痛口服藥物、或關節內注射類固醇，以效抑制發炎舒緩疼痛。另外，醫師亦可能給予患者施行玻尿酸注射療程，以增加關節潤滑度，減少軟骨磨損。血小板濃縮液注射療程也是近年來門診診間內常採用的治療方式之一，該治療方式可以使軟骨組織修復，減少發炎。

若患者的膝關節受損程度進展到中重度，就有可能需要進行馬賽克鑲嵌術(Mosaicplasty)、微骨折手術(Microfracture)、自體軟骨細胞移植(Autologous Chondrocyte Implantation, ACI)、基質誘導自體軟骨細胞移植(Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation, MACI)或自體基質誘導軟骨再生(Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis, AMIC)，到了嚴重的關節磨損與退化時，就必須接受人工關節置換。

二、臨床上缺損軟骨再生的治療方式

馬賽克鑲嵌術(Mosaicplasty)為臨床上常見的治療軟骨缺損的方式之一，又稱為自體骨軟骨移植術(Osteochondral Autograft)(圖三)。該手術主要是取病患本身負重較少處的自體骨軟骨，並將其移植到軟骨缺損處。該種手術方式由於是以病患自體的骨移植塊促進骨癒合，所以不會發生免疫排斥現象，且不會有疾病傳播的問題。但它主要的問題在於自體組織的有效性及供區的健全性，此治療方法涉及到毀壞健康的非承載負荷組織，對於供區或是受區都有可能發生因手術而退化，且移植上去的軟骨與受區軟骨間不能密合的問題仍有待解決。



圖三、馬賽克鑲嵌術示意圖⁶

1. 自體軟骨細胞移植(Autologous Chondrocyte Implantation, ACI)

較大面積的軟骨缺損最常見的治療方式為自體軟骨細胞移植(Autologous Chondrocyte Implantation, ACI)，該種治療方式是透過關節鏡，將非負重區域的正常自體軟骨組織從關節表面取出，經體外酵素作用，分離出軟骨細胞，並於特殊的

實驗室內進行培養與增殖，大約四至六周，待細胞增生量足夠補缺損位置，再將細胞液注射到已經縫上骨膜(Periosteal Flap)的軟骨缺損處讓其修復受損組織，並於於軟骨缺損處的外圍，外加生物膠予以封住，防止細胞液外漏流失。但此種手術仍有些問題與限制，像是(1)患者需要進行兩次手術才能完成療程，第一次手術為取患者的自體軟骨組織，第二次手術為植入擴增後的軟骨細胞。(2)軟骨細胞於單層細胞增生分化後，其細胞的表現型可能會消失，傾向於分化成纖維母細胞，而失去分泌細胞間質的能力，有去分化的風險存在。(3)植入的細胞為流動性液體，有流失的可能性存在。(4)細胞液是以懸浮液的形式注入骨膜，由於重力的影響，這些細胞可能會集中在某些區域，造成移植後軟骨的不均勻生長。(5)有文獻指出，縫製骨膜帳會使得軟骨細胞肥大化 hypertrophy，加速軟骨組織退化的速度。也有些動物實驗顯示，此種治療方式可能導致所移植的細胞與移植點的軟骨及軟骨下骨整合不良，尤其是在骨軟骨損傷的情況中特別明顯。移植部位整合不良可能會使局部壓力提升，最後導致所修復組織的退化⁷。

2. 基質誘導自體軟骨細胞移植 (Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation, MACI)

為了改良上述的缺點，自體軟骨細胞移植技術接下來就發展出了第二代以及第三代的技術，其中第二代的自體軟骨細胞移植是採用 Chondro-Gide[®] Collagen I/III 第一/三型雙層膠原蛋白膜，將膜縫合在軟骨缺損處後再注射入細胞懸浮液，這樣的治療方式可免除手術當中取骨膜的步驟，手術的流程較為簡易。而第三代的自體軟骨細胞移植則是融入了組織工程的概念，將萃取分離出的軟骨細胞種植在 Chondro-Gide[®] Collagen I/III 第一/三型雙層膠原蛋白膜上，該雙層膠原蛋白膜的外層為緻密層，可避免細胞直接受到外力擠壓，防止細胞流失，內層為多孔立體結構，可提供細胞生長貼附的環境，可使細胞均勻分布於其中，並可刺激細胞合成第二型膠原蛋白 (Type II Collagen) 及醣胺聚糖 (Glycosaminoglycan)。使用時僅需將此含有細胞的雙層膠原蛋白膜貼附於軟骨受損處，外圍再塗上一圈生物膠固定即可，免除了手術縫合骨膜的步驟，大大降低了手術時間。

由於第三代自體軟骨細胞移植是將細胞種植在膠原蛋白基質上，因此該技術又稱為基質誘導自體軟骨細胞移植 (Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation, MACI)。有文獻指出採用此種方式治療軟骨缺損，在術後半年對患者做切片檢查，結果約有 75% 的患者於受損區上新生成類透明軟骨 (Hyaline-like Cartilage)⁸。

3. 微骨折手術 (Microfracture)

針對小面積的軟骨缺損，臨床上醫師較常採用微骨折手術 (Microfracture) 來做軟骨患部的治療，此種治療方式僅適合用來修復小於 2-4 平方公分面積的軟骨缺損傷口。在執行微骨折手術時，醫師會利用關節鏡伸進關節中，先將關節內鈣化的軟

骨清除掉，並在軟骨缺損處的骨頭上鑽出很小的洞，使得一部分的骨髓和血液從小洞中流出，形成血液凝塊，由於其內含有多功能間葉幹細胞，可從中分化出新的軟骨細胞，以促進軟骨生長。然而此種手術有其限制：限制一為新生成的軟骨組織常屬於纖維軟骨(Fibrous Cartilage)，與人體軟骨的透明軟骨(Hyaline Cartilage)結構不同，其機械特性較差，且自我修復能力有限，纖維軟骨僅能視為性質類似的替代品，並無法真正修復受損的軟骨組織。限制二為此種方式僅能修復小傷口(<2-4平方公分)軟骨缺損，並不適用於大面積的軟骨缺損治療。此外，此種治療方式有較高的風險有可能在手術後的3-5年癥狀會復發，迫使患者需要再次接受手術治療⁹。此外，根據哈佛大學 Tom Minas 教授的研究，接受過微骨折手術後如果失敗，再接受自體軟骨細胞移植補救，則成效往往不如預期¹⁰。

4. 自體基質誘導軟骨再生(Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis, AMIC)

臨床上為了改善微骨折手術僅能做小面積軟骨修補的限制，醫師會結合 Chondro-Gide[®] Collagen I/III 第一/三型雙層膠原蛋白膜與微骨折手術做軟骨修補，該種手術方式稱為自體基質誘導軟骨再生(Autologous matrix-induced chondrogenesis, AMIC)。與微骨折手術主要的差異是在為患者施行完骨頭鑽洞後，醫師會裁剪一塊與骨頭鑽洞處大小相同的 Chondro-Gide[®] Collagen I/III 第一/三型雙層膠原蛋白膜，並將其敷於軟骨缺損表面上。此種手術方式可用於修補大於 2.5 平方公分，小於 9 平方公分的軟骨缺損面積，它還可以改善血液凝塊的穩定度，降低由於血液凝塊收縮而導致凝塊從軟骨損處掉落的風險，並由於雙層膠原蛋白膜的阻隔，可防止纖維母細胞在患部貼附生長，有利於組織生成與天然軟骨類似的類透明軟骨基質¹¹。2013 年 J. Gille 教授發表了關於 AMIC 的治療效果，論文當中指出共有 57 位病患參與此試驗，他們的平均年齡為 37 歲左右，平均軟骨缺損面積約為 3.4 平方公分，絕大多數的病患都對於治療成果相當滿意，在術後的兩年對患者做療效評估，其中疼痛指數 VAS 從術前的 7 分下降到 2 分，Lysholm score 也從術前的 50 分改善到 85 分¹²。

三、臨床上應用於軟骨再生的基材

1. 應用於基質誘導自體軟骨細胞移植(Matrix-induced Autologous Chondrocyte Implantation, MACI)的基材

由於目前臨床上常採用的治療方式皆有其限制與缺點，因此近年來有許多公司開發出各式基材應用於MACI手術。依照材料的成分大致可以分為膠原蛋白為主、玻尿酸為主、纖維蛋白為主以及青少年軟骨為主，這四大類的基材，以下分別就這些基材做介紹。

膠原蛋白類的基材為目前臨床上使用最為大宗的產品，由 Geistlich Pharma AG 所生產的 Chondro-Gide[®] 主要是由第一/三型的雙層膠原蛋白膜所組成的，外層緻密層可防止細胞液外漏，內層特殊的 3D 多孔結構有利於自體軟骨細胞貼附與生長。另外，日本多以第一型膠原蛋白當作支架，Atelocollagen 主成分是第一型的膠原蛋白(高研株式会社 Koken Co Ltd, Tokyo, Japan)，使用時需將軟骨細胞懸浮液與 3% 的膠原蛋白液以 1:8 的比例混和，然後再將細胞-膠原蛋白混和膠體置放於 6 公分細胞培養盤，培養 3-4 周後再植入已縫上骨膜的軟骨缺損處。日本越智光夫(Ochi M.) 教授團隊利用此技術治療 26 位患者，術後兩年有 88% 的患者的運動和日常活動能力評分 Lysholm score 分數高達 90 分以上，以關節鏡觀察患部修復情形，有 93% 的患者呈現好或是極佳的軟骨修復成果¹³。CaReS[®] 是將軟骨細胞與取自大鼠尾巴的第一型的膠原蛋白液混和成膠體，採用此種膠體修復軟骨缺損具有(1)與周圍軟骨組織貼附結合性極佳，(2)僅需做微小關節切開術即可的優點。Schneider 研究團隊針對 116 位病患進行 CaReS[®] 軟骨修補手術，一年後對患者做術後追蹤，IKDC 分數由原先的 42 分上升至 71 分左右，疼痛評估也由原先的 6.7 分左右下降至 3.2 分¹⁴。

Hyalograft C[®] 是個以玻尿酸為基材的產品，該產品內含已酯化的玻尿酸，將玻尿酸進行酯化反應可以抵抗酵素對於玻尿酸的降解，延長基材的降解時間，並且由於基材已經進行過酯化反應，製成片狀使用上較為方便，操作容易。Hyalograft C[®] 可用來修補 2-6 平方公分面積的軟骨缺損，患者於術後兩年追蹤成效皆不錯¹⁵。

BioCart II[®] 是纖維蛋白類的基材，它是將纖維蛋白液與玻尿酸、凝血酶混和均勻，冷凍乾燥後，再將軟骨細胞植入於支架上。Nehrer 團隊利用此基材修復 8 位患者的軟骨缺損，缺損面積從 1.8 到 7.1 平方公分都有，術後一年患者的運動和日常活動能力評分 Lysholmscore 從原先的 56 分上升至 84 分，MRI 影像分析也可看到約有 75-100% 的缺損處已修復成功¹⁶。

DeNovo NT[®] 與 RevaFlexTM (DeNovo ET) 都是以青少年軟骨為主的產品，DeNovo NT[®] 是將青少年軟骨切成小片狀，使用時先於軟骨缺損處塗上一層纖維蛋白膠，之後再將 DeNovo NT[®] 植入。RevaFlexTM (DeNovo ET) 則是將軟骨進行酵素分解，體外培養一個月後，再將其植入軟骨缺損處即可¹⁷。

2. 應用於自體基質誘導軟骨再生 (Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis, AMIC) 的基材

相較於應用在 MACI 手術的基材產品，開發出來應用在 AMIC 手術上的產品相對較少，目前僅有膠原蛋白類以及甲殼素類的基材。

膠原蛋白類的基材常見的還是僅有 Chondro-Gide[®] 這項產品，如前所述，它能改善患者的 Lysholm score 從術前的 50 分到 85 分，VAS 指數也從術前的 7 分下降至 2 分。

BST-CarGel[®] 是由甲殼素 (Chitosan) 與 β -甘油磷酸 (β -glycerol phosphate) 感溫性膠體混和上患者自體周邊血液的產品，膠體與周邊血的混和比例為 1:3，臨床上採

用此種產品治療軟骨缺損，它的 T2 影像與天然軟骨的影像強度相近，在患者的感受上，退化性關節炎量表 WOMAC 分數也顯著的提升¹⁸。

四、幹細胞促進軟骨缺損處再生的臨床試驗

臨床上的微骨折手術療法，儘管其成效不錯，能讓幹細胞自骨髓腔中流出修復組織，但在骨髓液當中所獲得的間質幹細胞量並不多，且新生成的軟骨多為纖維軟骨，所以近年來各個研究團隊皆嘗試將幹細胞自體內取出，在特殊的實驗室內進行離心分離與萃取擴增後，再將其植入軟骨缺損處做臨床上軟骨再生的治療。期望利用幹細胞的高增殖率(High Proliferation Rate)與具軟骨分化潛力(Chondro-differentiation potential)的特性，使得新生的組織與天然軟骨相類似。

來自新加坡的 James H. Hui 教授的研究團隊在 2010 年就執行了一個以患者的自體骨髓幹細胞做軟骨缺損治療的前瞻性人體臨床試驗(Cohort study)，共收案了 72 位病人，其中 36 位執行傳統的自體軟骨細胞移植手術(Autologous Chondrocyte Implantation, ACI)，另外 36 位則施以新型的骨髓幹細胞療法。新型的骨髓幹細胞療法是抽取患者的骨髓液約 36 毫升，並將間質幹細胞分離擴增至 $10-15 \times 10^6$ ，再將其注射入已縫好的骨膜的軟骨缺損處做軟骨修復，結果顯示以新型的自體骨髓幹細胞做軟骨缺損治療，在術後一年可顯著的改善患者的生活品質，膝關節功能性評估像是主觀膝部評估表 IKDC、與運動和日常活動能力有關的 Lysholm score 的分數上也有顯著的改善¹⁹。

Haleem 教授的研究團隊則是合併了骨髓間質幹細胞與血小板濃縮液(platelet rich plasma)，該團隊將間質幹細胞自骨髓分離並擴增至 15×10^6 後，將細胞與血小板濃縮液、纖維蛋白原(Fibrinogen)與凝血酶(Thrombin)各 1 毫升混和均勻後，再將其注入縫好的骨膜內，該技術可用來修復大於 4 平方公分的大面積的軟骨缺損，患者術後一年的臨床指標 Lysholm score 與綜合患者疼痛與膝關節功能評估的 Revised Hospital for Special Surgery Knee (RHSSK) score 皆有顯著提升，該人體臨床試驗共收案 5 位病人，其中 3 位受試者皆於治療一年後可於 MRI 影像中觀察到軟骨缺損處已被完整的覆蓋，並且影像深淺與鄰近的正常軟骨組織相類似²⁰。

Wakitani 教授則是將受試者的自體間質幹細胞擴增至約 1.3×10^7 時均勻的包覆於 2 毫升的 0.25% 第一型膠原蛋白膠內，並將其平鋪放置於膠原蛋白膜上，待薄膜成膠後，就將其保存於含 15% 受試者自體血清的細胞培養液當中。當手術要進行時，於軟骨傷口清創後，醫師將此幹細胞-膠原蛋白複合膜縫製於軟骨缺損處上，在植入的 42 周後可於組織切片中看到有透明軟骨的生成²¹。

另外如日本越智光夫(Ochi M.)教授使用 atelocollagen 作為支架來幫 51 例骨軟骨受損患者進行自體軟骨細胞移植，其效果良好²²。義大利 Insubria 大學的 Cherubino 教授應用雙層膠原蛋白膜為支架對 13 例患者進行自體軟骨細胞移植，其中 6 例膝關節受損患者完全或接近完全復原²³。

五、幹細胞治療退化性關節炎的臨床試驗

利用細胞療法治療退化性關節炎為近年來熱門的研究議題之一，由於幹細胞具有自我更新(Self Renewal)及免疫抑制(Immune-suppressive)的特性，因此，紛紛有研究團隊發表使用幹細胞治療初到中期的退化性關節炎的臨床文獻。

最早在 2011 年 Davatchi F. 教授團隊發表了一篇利用自體骨髓間質幹細胞治療中到重度的退化性關節炎，共收案了四位受試者，抽取受試者 30 毫升的骨髓液，從內分離純化出骨髓間質幹細胞，並於體外實驗室內培養約 4-5 周，隨後注射入 $8-9 \times 10^6$ 的細胞(懸浮於 5.5 毫升的液體中)至患者膝關節腔內，一年後做術後追蹤發現患者因走路而產生膝關節疼痛的時間變長了，VAS 指標也從術前的 80-90 進步到 40-65，但是於 X 光片上並無看到骨骼間距有改善的狀況²⁴。

另一個西班牙的 Orozco L. 教授團隊所執行的臨床試驗，是打入數量更多的幹細胞到膝關節腔內，該試驗共收案 12 位 Kellgren and Lawrence 等級 1-2 的受試者，並在他們的關節腔內注射 40×10^6 的骨髓間質幹細胞，一年後的術後追蹤顯示患者的 VAS 數值有顯著改善，而 Lequesne 和 WOMAC 指標有顯著的上升，並由 T2 MRI 影像上可看到其中 11 位受試者的軟骨效果良好²⁵。

韓國的 Kang Sup Yoon 教授團隊則是利用皮下抽脂技術，分離出脂肪間質幹細胞，並於試驗當中嘗試比較不同的細胞注射量對於退化性關節炎的治療成效，第一期的臨床試驗共收案了 9 位 Kellgren and Lawrence 等級 1-2 的受試者，分別給予受試者施打低(10×10^6)、中(50×10^6)、高(100×10^6)濃度的脂肪間質幹細胞，高細胞劑量組別的受試者 WOMAC 分數在術後半年有顯著改善，從關節鏡的檢查當中也可發現軟骨缺損的面積變小，切片上也可看見有類透明軟骨的新生軟骨組織生成²⁶。

另一位 Yong-Gon Koh 的研究團隊，也是利用脂肪間質幹細胞(Adipose Tissue-derived MSC)來治療膝關節退化，不同的是，他們是從患者的膝關節脂肪墊萃取出間質幹細胞，並將約 1.18×10^6 個細胞與 3 毫升的血小板濃縮液混和，再注入關節腔內。此臨床試驗共收案 25 位受試者，兩年後發現 Lysholm 分數有顯著改善，WOMAC 分數從原先的 50 分降至 30 分，VAS 疼痛指標也從原先的 4.8 分降至 2 分²⁷。而筆者的研究團隊與艾默生醫股份有限公司也從 2014 年開始進行一系列的人體膝關節脂肪墊幹細胞體外細胞功能測試，並著手向衛生福利部食品藥物管理署(Taiwan Food and Drug Administration)進行第一期臨床試驗的申請程序，該試驗於 2017 年年初通過，允以進行，目前正積極進行中。

六、台灣的軟骨再生研究

儘管上述的軟骨缺損治療方式都普遍使用於目前的臨床治療，但都有其可改善的空間。因此台灣便有數個研究團隊嘗試開發新基材與新技術以促進軟骨再生。

筆者與劉華昌教授的研究團隊嘗試以骨髓間質幹細胞包覆於膠原蛋白膠體內，以 1

$\times 10^6$ 每毫升的細胞包覆密度做骨軟骨缺損的治療。以豬隻做為動物實驗的對象，在其膝蓋骨製造直徑 6.5mm，深度 3mm 的軟骨缺損，其後再將膠原蛋白膠填入其中。術後六周從 HE 切片上可以發現軟骨再生效果良好，軟骨表面外觀完整，組織內有蛋白多糖生成²⁸。該實驗技術更進一步推進至臨床試驗，從 2008 年開始劉教授即利用幹細胞進行軟骨修復的第一期臨床試驗，由工研院生醫所協助生產病患的骨髓間葉幹細胞，至目前為止，已有十二名患者接受幹細胞治療，年齡從四十八歲至八十七歲不等，患者的 IKDC 分數於術後皆有改善，從 MRI 影像中也能看到原先的軟骨缺損處已被修復軟骨組織所取代，患者的膝關節功能也恢復得不錯。

江清泉教授的研究團隊主要是發展兩相材料作為骨軟骨再生的基材，該團隊開發出上層為多孔性的 poly(L-lactic-co-glycolic acid)(PLGA)，下層為 beta-TCP 的支架，使用前需將軟骨組織碎片以膠原蛋白酵素分解後，注入支架當中。植入裸鼠鼠背一個月後可發現有新生組織生成²⁹。另外，採用同樣的概念，他們於多孔性的 PLGA 基材當中改採注入軟骨細胞懸浮液，並將其注入豬隻的軟骨缺損處，半年後犧牲動物做組織切片可發現有透明軟骨的生成³⁰。Poly-lactide-co-glycolide acid/ β -tricalcium phosphate 雙向基材已經進行了臨床試驗，共收案了 10 位受試者，術後兩個月可發現 KOOS 分數較術前顯著上升，VAS 分數顯著下降，組織切片上亦有發現透明軟骨生成³¹。

基於天然軟骨內可能會有促進軟骨再生的因子的概念，北科大方旭偉教授與筆者的研究團隊過去嘗試結合骨髓間質幹細胞與軟骨碎片做軟骨缺損的治療。實驗當中我們將 6×10^6 個骨髓間質幹細胞、30-60 毫克的軟骨碎片以及纖維蛋白膠做混和，然後再將此複合物植入裸鼠的鼠背上做動物體內試驗。於植入後的兩周將動物犧牲，從組織切片的結果上可以看到有新生軟骨的生成，並且複合物內的幹細胞可表現第二型膠原蛋白與蛋白聚糖(Aggrecan)³²。在接續的研究當中，我們將軟骨碎片做去細胞的處理，然後再將其與滑膜液幹細胞、膠原蛋白膠做混和製成複合物，將此複合物於體外培養一個月，一個月後可發現幹細胞在沒有外界生長因子的刺激下，仍可分泌第二型膠原蛋白 SOX-9，此去細胞軟骨碎片在未來應可作為軟骨再生治療的基材³³。

而在藥物製劑應用於退化性關節炎方面，高雄醫學大學的研究團隊開發以副甲狀腺素的部分胺基酸序列 PTH(1~34)，對關節腔進行注射治療，實驗發現該藥物能抑制關節軟骨退化。該技術目前已通過台灣、美國、日本、歐盟七國的專利，還獲得第八屆國家新創獎的肯定。目前該技術已經完成臨床前藥理與毒理試驗，待臨床試驗申請程序完備後，將正式進入人體試驗。

七、結語

人體關節會因多種因素，產生軟骨損傷與發炎，最後導致退化性關節炎的發生，對於初中期的退化，臨床上常見的處置方式為止痛藥給予或玻尿酸注射，然而這些治療方式往往只能做症狀的舒緩，而無法真正修復或再生軟骨。針對中重度的退化，往往醫師就需要為患者進行馬賽克鑲嵌術、微骨折手術、自體軟骨細胞移植、基質誘導自體軟骨

細胞移植或自體基質誘導軟骨再生的手術，以修復軟骨，才能改善患者的生活品質。儘管上述的軟骨缺損治療方式都普遍使用於目前的臨床治療，但都有其可改善的空間。因此目前便有許多學者專注於軟骨治療的基礎研究，也有許多新興的生技公司著手進行軟骨再生醫材、退化性關節炎幹細胞療法的開發，期望能夠在目前臨床上已知的基礎上，開發出更為理想、療效更佳的技术或產品，為人類帶來更優質的生活。

八、參考文獻

1. Gupta, S., Hawker, G.A., Laporte, A., Croxford, R. & Coyte, P.C. The economic burden of disabling hip and knee osteoarthritis (OA) from the perspective of individuals living with this condition. *Rheumatology* **44**, 1531-1537 (2005).
2. Brittberg, M. & Winalski, C.S. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am* **2**, 58-69 (2003).
3. Kellgren, J.H. & Lawrence, J.S. Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **16**, 494-502 (1957).
4. http://www.drstorm.dk/Instruks_for_laeger/knae/IKDC/icrs.htm
5. <http://prgmobileapps.com/AppUpdates/ors2015/Abstracts/abs1719.html>.
6. Hunziker, E.B., Lippuner, K., Keel, M.J. & Shintani, N. An educational review of cartilage repair: precepts & practice--myths & misconceptions--progress & prospects. *Osteoarthritis Cartilage* **23**, 334-350 (2015).
7. Gillogly, S.D., Voight, M. & Blackburn, T. Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Sports Phys Ther* **28**, 241-251 (1998).
8. Zheng, M.H. *et al.* Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment. *Tissue Eng* **13**, 737-746 (2007).
9. Bedi, A., Feeley, B.T. & Williams, R.J., 3rd Management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am* **92**, 994-1009 (2010).
10. Minas, T., Gomoll, A.H., Rosenberger, R., Royce, R.O. & Bryant, T. Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. *Am J Sports Med* **37**, 902-908 (2009).
11. Anders, S., Volz, M., Frick, H. & Gellissen, J. A Randomized, Controlled Trial Comparing Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC(R)) to Microfracture: Analysis of 1- and 2-Year Follow-Up Data of 2 Centers. *Open Orthop J* **7**, 133-143 (2013).
12. Gille, J. *et al.* Outcome of Autologous Matrix Induced Chondrogenesis (AMIC) in cartilage knee surgery: data of the AMIC Registry. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* **133**, 87-93 (2013).
13. Ochi, M., Uchio, Y., Kawasaki, K., Wakitani, S. & Iwasa, J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone*

- Joint Surg Br* **84**, 571-578 (2002).
14. Schneider, U. *et al.* A prospective multicenter study on the outcome of type I collagen hydrogel-based autologous chondrocyte implantation (CaReS) for the repair of articular cartilage defects in the knee. *Am J Sports Med* **39**, 2558-2565 (2011).
 15. E. Kon, G.F., L. Andriolo, F. Tentono and M. Marcacci Confirmed techniques for articular cartilage repair: the hyalograft-c system. *Journal of Orthopedics* **4**, 91-98 (2012).
 16. Nehrer, S., Chiari, C., Domayer, S., Barkay, H. & Yayon, A. Results of Chondrocyte Implantation with a Fibrin-Hyaluronan Matrix: A Preliminary Study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **466**, 1849-1855 (2008).
 17. Marc Tompkins, H.D.A., Kevin F. Bonner DeNovo NT Allograft. *Operative Techniques in Sports Medicine* **21** (2013).
 18. <http://www.medistgroup.com/dokumanlar/2592013163457783.pdf>
 19. Nejadnik, H., Hui, J.H., Feng Choong, E.P., Tai, B.C. & Lee, E.H. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med* **38**, 1110-1116 (2010).
 20. Haleem, A.M. *et al.* The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. *Cartilage* **1**, 253-261 (2010).
 21. Wakitani, S. *et al.* Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 199-206 (2002).
 22. Ochi, M., Uchio, Y., Tobita, M. & Kuriwaka, M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs* **25**, 172-179 (2001).
 23. Cherubino, P., Grassi, F.A., Bulgheroni, P. & Ronga, M. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J Orthop Surg* **11**, 10-15 (2003).
 24. Davatchi, F., Abdollahi, B.S., Mohyeddin, M., Shahram, F. & Nikbin, B. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis* **14**, 211-215 (2011).
 25. Orozco, L. *et al.* Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation* **95**, 1535-1541 (2013).
 26. Jo, C.H. *et al.* Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* **32**, 1254-1266 (2014).
 27. Koh, Y.G. *et al.* Mesenchymal stem cell injections improve symptoms of knee osteoarthritis. *Arthroscopy* **29**, 748-755 (2013).
 28. Chang, C.H. *et al.* Tissue engineering-based cartilage repair with mesenchymal stem cells in a porcine model. *J Orthop Res* **29**, 1874-1880 (2011).

29. Liao, C.J. *et al.* Injecting partially digested cartilage fragments into a biphasic scaffold to generate osteochondral composites in a nude mice model. *J Biomed Mater Res A* **81**, 567-577 (2007).
30. Jiang, C.C. *et al.* Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite. *J Orthop Res* **25**, 1277-1290 (2007).
31. Chiang, H. *et al.* Clinical feasibility of a novel biphasic osteochondral composite for matrix-associated autologous chondrocyte implantation. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 589-598 (2013).
32. Chen, C.C. *et al.* Cartilage fragments from osteoarthritic knee promote chondrogenesis of mesenchymal stem cells without exogenous growth factor induction. *J Orthop Res* **30**, 393-400 (2012).
33. Chang, C.H. *et al.* Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* **102**, 2248-2257 (2014).

第十章

幹細胞於口腔組織再生

Stem Cells for Oral Tissue Regeneration

陳敏慧

國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所

一、前言

自從1998年人類幹細胞(stem cells)首度成功地被分離並培養出細胞株(cell lines)，即引發醫界極大的振奮，隨著基因體資訊的發展，幹細胞(stem cells)的應用與生物材料的研發，帶來再生醫學極大的發展潛力。以目前的發展，幹細胞已可應用於多種組織的再生了，而奈米生物技術(nanobiotechnology)的發展亦使得再生醫學有更大的突破。利用幹細胞進行口腔組織再生具有特別的重要性，由於口腔組織與其他器官在發育過程及結構上有許多相關性，藉著幹細胞進行口腔組織再生的研究也可作為其他組織器官再生應用模式的參考。

二、內容

1. 幹細胞的特性與分類

幹細胞乃是具有無限分裂能力，可產生特化細胞的功能，可分為全能性幹細胞(totipotent stem cells)、多潛能性幹細胞(pluripotent stem cells)及多效性幹細胞(multipotent stem cells)。

(1) 全能性幹細胞(Totipotent stem cells)

當精子與卵結合之後，即形成一個具有發育為完整有機體潛力的細胞，此受精卵稱為「全能性的」(totipotent)，在受精之初的一小時，受精卵可分裂為兩個一致的全能性細胞，也就是說，如果將兩個細胞其中任何一個放在子宮內，他們皆有發育成為一個胎兒的能力，事實上，雙胞胎的形成，也就是當兩個全能性細胞彼此分開之後各自形成一個基因一致的獨立個體。

(2) 多潛能性幹細胞(Pluripotent stem cells)

而當受精卵在受精之後四天，細胞也經過數次分裂過程之後，這些全能效

性細胞即開始特化(specialized)，細胞聚集形成一個中空的囊胚(blastocyst)，此囊胚的外層細胞群可繼續形成胎盤及胎兒在子宮內發育所需的各種支持性組織，而囊胚的內層細胞最後會形成人體各種組織，雖然內層細胞可以形成人體內各種不同類型的細胞，但是由於這些內層細胞無法形成胎盤或在子宮發育所需的支持組織，所以這些內層細胞並不能形成一個有機體，我們稱這些內層細胞為“多潛能”(pluripotent)——也就是他們可以形成多種類型的細胞但是並非胎兒發育所需要的所有細胞類型。由於其效能並非完全的，他們不是全能性的也非胚胎本身，事實上，如果將一個內層細胞放在子宮內，它並無法形成一個胎兒。

(3) 多效性幹細胞(Multipotent stem cells)

複效性細胞可進一步特化為多效性幹細胞(multipotent stem cells)這些多效性細胞，可再形成具特別功用的細胞，例如造血幹細胞可產生紅血球、白血球及血小板，而皮膚幹細胞則可形成各種類型的皮膚細胞，這些更特化的幹細胞稱為“多效性的”(multipotent)。

多效性幹細胞乃存在於小孩及成人體內，也扮演極重要的角色。以造血幹細胞為例，造血幹細胞存在骨髓腔內，也有少量存在於血液循環中，藉著造血幹細胞我們的造血細胞才能不斷地更新，造血幹細胞對於維持生命是相當重要的。

如前所述，多效性幹細胞可在某些成人組織中發現，事實上，這些幹細胞可補充我們體內逐漸被破壞喪失的細胞，例如前面所提到的造血幹細胞(hematopoietic stem cells)，多效性幹細胞尚未在所有類型的成人組織都完全被發現，但是在這方面的研究仍不斷在增加中。例如，幹細胞曾被認為不存在於成人神經系統中，但是，目前已有報告顯示神經幹細胞可由大鼠及老鼠的神經系統中成功地被分離出來，而人體的神經幹細胞也已自胎兒組織中被分離出來。此外，一種可能類似神經幹細胞的細胞也已由癲癇患者接受手術移除的腦部組織中被分離出來了。

至於成體幹細胞(adult stem cells)是否具有與多潛能性幹細胞相同的潛力？至今仍少有證據指出在哺乳類中的多效性細胞如造血幹細胞可以改變其變化過程而產生皮膚細胞、肝細胞或任何血球類型以外的細胞。然而，學者由動物實驗中已逐漸對此觀點產生疑問。在動物實驗中，已證實有些成體幹細胞以往被認為是只能專一發育為一種特化細胞，事實上是可發育成它種特化細胞的。例如，在老鼠的研究指出，將神經幹細胞置於骨髓腔裏面，可以產生一些不同類型的血球細胞，此外，以大鼠進行的實驗已證實，在骨髓中的幹細胞可以產生肝細胞，這些令人興奮的發現指出，即使在幹細胞已開始特化的情況下，在某些特殊環境中，幹細胞比原先所想像的更具變通性。

在先前的研究指出，成體幹細胞具有極大的潛力可以用來進行研究及發展細胞療法¹，例如，以成體幹細胞進行移植有許多優點，如果能自患者身上分離幹細胞導引其分離及特化，再移植回患者體內，這些細胞應該不會引發排斥作用；再者，以成體幹細胞進行細胞療法必然可減少甚或避免利用取自人體胚胎或胎兒組織所可能造成的道德爭議。

雖然如此，成體幹細胞的應用，在實際上卻有許多的限制。首先，並非體內所有的組織皆已被分離出成體幹細胞。再者，成體幹細胞的存在量極為有限，不易被分離及純化，而且其數量會隨著年齡而遞減。任何試圖以患者自體的幹細胞來進行治療的方法皆需要將幹細胞自患者體內分離出來，進行培養到足夠的量才能進行治療。對於某些緊急的病症，可能沒有太多的時間可以培養足夠的細胞來進行治療。而在某些由於基因缺陷所造成的病症中，基因的問題仍可能存在於患者的幹細胞中，取自這些患者的細胞亦可能不適用於進行移植作用。有證據顯示，取自成體的幹細胞可能沒有像年輕細胞所具有的增殖力，而且成體幹細胞因為歷經日常生活中各種因素的影響，包括日光照射，毒性物質影響及 DNA 一再複製可能產生誤差的種種影響，皆可能使 DNA 有更多不正常的現象，這些潛伏性的缺點皆會限制成體幹細胞的被應用。

為了確定許多體內特化細胞及組織的來源，以發展新的治療法，針對成體幹細胞發展潛力的研究以及相較於多潛能性幹細胞的探討是很重要的。幹細胞可針對多數重症提供新的療法，並可被導引分化為特定細胞，促進組織及器官的再生²。因此，積極致力於各種相關的研究是必要的。科學家需要找出這些細胞的最佳來源，一旦被認定之後，即可藉以發展新的細胞療法。幹細胞系的發展，包括複效性及多效性幹細胞，可運用於促進組織及器官的再生，為發展再生醫學的重要細胞來源。

A. 骨髓間葉幹細胞(Bone marrow mesenchymal stem cells)

在骨髓中至少有兩種幹細胞：一是造血幹細胞，另一是非血球性幹細胞，這些細胞被稱為間葉幹細胞(mesenchymal stem cells, MSCs)這些間葉幹細胞已被證實具有分化為骨母細胞(osteoblasts)、脂肪細胞(adipocytes)、軟骨細胞(chondrocytes)、肌細胞(myocytes)及神經元(neurons)等。因此，這些細胞已被認為具有極大潛能可針對疾病進行基因治療法的利器。在過去的研究中已發現至少有兩種不同形態的間葉幹細胞：其一是錐型較大的細胞，另一是極小的快速再生細胞。

在典型的細胞治療法中，利用分化細胞進行移植，在臨床及技術上的問題乃在於培養及放大這些分化細胞所面臨的問題，再者，在體外分化的細胞經過多次培養以增加他們的數量時，這些細胞會失去他們的表型(phenotype)³⁻⁶。在成體中，一種多效性幹細胞可用以維持結締組織包括骨骼、軟骨、肌肉、韌帶及其他組織。這些多效性幹細胞可分化為各種幹細胞系，也就是造骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、肌細胞，而被統稱為「間

葉幹細胞」(MSCs)^{6,7}。

間葉幹細胞(MSCs)已成功地自許多種動物，包括人類⁸、大鼠^{9,10}、老鼠¹¹、狗¹²、兔子^{13,14}，由於間葉幹細胞具多方分化的潛力，使間葉幹細胞在細胞治療上佔很重要的地位，而細胞治療主要靠分離出來細胞的移植而修復組織的缺損。若關節軟骨(articular cartilage)在受傷害並未穿過軟骨下的骨組織的情形下就不會產生修復的現象，因此可以看出骨髓成份對於關節軟骨修復的重要性¹⁵，無效的修復乃是由於軟骨自身的修復力不夠加上骨髓的軟骨生成細胞無法達到預期修復的部位。相反地，如果關節軟骨的傷害延伸過軟骨下層硬骨(subchondral bone)，則修復過程可確保間葉幹細胞可由骨髓轉移到受傷處而進行軟骨分化作用，然而，由動物及人體切片分析，可顯示事實上，組織修復合成的主要是纖維軟骨(fibrocartilage)而不是真正的關節軟骨¹⁶。

骨髓所得的細胞及骨膜前驅細胞(progenitor cells)都與骨折的修復有關 O'Driscoll and Salter¹⁷，骨折的修復藉著軟骨內骨化(endochondral ossification)作用及骨痂(callus)形成需要局部細胞由骨髓間隙移入骨折間縫中，這些細胞分化為軟骨細胞而最終分化為肥大的軟骨細胞(hypertrophic chondrocytes)如果在骨折處有足夠的機械穩定度，將有血管滲入的現象而新形成的軟骨會有軟骨內骨化(endochondral ossification)的作用。這過程會使骨折處有骨化的形成。

為了改進骨與軟骨的修復，各種不同的生物移植法包括利用前驅細胞的移植皆已曾被發展。例如，骨或軟骨前驅細胞已被利用來進行移植，整個骨髓曾被用來治療骨缺損^{18,19}，而軟骨周膜及骨膜曾被用來治療軟骨缺損^{20,21}，製備及分離含有前驅細胞的大量培養的骨髓及軟骨周圍細胞都曾用來移植在軟骨缺損部位²²⁻²⁴而骨髓細胞則被用來移植在骨缺損區¹²。再者，許多研究皆指出生物作用因素如骨形成蛋白質(bone morphogenetic protein)可引導在動物模型中骨區及其他區形成骨，而且，許多研究皆涉及到利用生物作用因素來促進軟骨缺損的修復^{18,25}，雖然這些移植皆曾被報告出來可以促進骨及軟骨的修復，仍有許多有待研究的地方，特別是在軟骨修復方面，有待發展一個臨床上可以應用的治療法。這些治療的基本策略乃是利用間葉幹細胞在移植體之內發生或是對於移植的生物活化因素所產生的軟骨分化作用。然而對於這些細胞的分化及軟骨再生(chondrogenesis)作用，目前的所知仍極少。成功的體外軟骨再生曾鳥類及胚胎哺乳類細胞及細胞系成功地達成，而更多有價值的訊息曾自這些研究被得著²⁶⁻²⁸，然而，直到最近，仍無體外的 bone 系統可以促使間葉幹細胞形成軟骨而可用來直接研究分化過程，學者曾提出一個培養系統可以促進兔子的骨髓所得的前驅細胞在體外有軟骨分化現象。Johnstone 等人¹³也已發現加入轉化生長因子- β (Transforming growth factor beta, TGF- β)可促

進骨髓所得前驅細胞分化為軟骨細胞，人體的間葉幹細胞曾被分離並與非生骨性的人體造纖維細胞混合結果發現，在故意將 25-50%非間葉前驅細胞混入之後，並不會造成間葉幹細胞的骨髓骨生成量的明顯影響²⁹，此結果亦使得將來利用間葉幹細胞在臨床應用的可行性提高，因為在移植 100%的間葉幹細胞必然可能來自體內的結締組織及滲入其他循環系統的一些細胞，這些可能會稀釋原本人體間葉幹細胞的濃度。

間葉幹細胞具有不斷繁殖而不會失去其多效性的能力⁶，有兩個不同的策略可以用來達到間葉幹細胞組織修復的作用，第一種方法是利用間葉幹細胞尚未在分化的階段大量培養，在局部特殊環境之下，間葉幹細胞將再分化成適當的細胞系並負擔組織再生(tissue regeneration)的過程。另一種方法是將大量培養的幹細胞可直接在體內導引分化為特定細胞系再進行移植而促進治癒過程。不論要採用何種策略，間葉幹細胞的複製及分化對於規律的充分瞭解是必要的。

近年來，學者對於利用取自骨髓的間葉幹細胞以進行組織的修復有濃厚的興趣，主要是由於此間葉幹細胞廣泛地存在，很容易取得，而且在進行細胞培養時可大量繁殖。間葉幹細胞可提供修復骨骼肌肉組織所需的細胞來源。建立生物體外模式以研究這些前驅細胞(progenitor cells)的分化機制是很必要的。過去本研究團隊已發展出以體外模式使用間葉幹細胞可以成功地具有軟骨再生作用以建立一個可靠而可重覆得著的細胞培養模式。乃是利用人體骨髓幹細胞，將之分層離心後，可取得具有吸附性的細胞，再將此細胞以 trypsin 取下。利用 TGF 及 dexamethasone 使之分化軟骨細胞。利用 Alcian blue 將軟骨特有的多醣蛋白體(proteoglycans)染色法可定量軟骨分化，而特定的 oligonucleotide primers 可用以在 RT-PCR 作用中分辨膠原纖維第一類型、第二類型及第十類型的 mRNAs。

B. 下顎骨骨髓幹細胞(Mandibular bone marrow stem cells)

就胚胎發育的根源而言，口腔顎顏面組織中所含的幹細胞有其特殊性而值得加以利用。由胚胎發育的過程來看，口腔顎顏面是最早發育的部位，其中有許多極具潛力的幹細胞，下顎骨的骨髓幹細胞(bone marrow stem cells)的來源來自神經嵴(neural crest)，與其他四肢長骨的骨髓幹細胞來源不同，更具分化潛力，也可導引分化為骨、軟骨、血管、神經細胞。口腔內的每個牙齒皆是一個器官，源自胚胎時期上皮細胞(epithelial cells)與間葉組織(mesenchymal tissue)之互動作用。下顎骨(mandible)的骨髓幹細胞的來源也是來自神經嵴，與其他四肢長骨的骨髓幹細胞來源不同，更具分化潛力，因此利用下顎骨骨髓幹細胞可治療牙周病，促進骨再生，此外亦可導引為軟骨及骨組織。

C. 牙齒幹細胞(Dental stem cells)

在牙齒內部及周圍有許多幹細胞，包括恆牙牙髓幹細胞(dental pulp stem cells, DPSC)、乳牙牙髓幹細胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)、根尖幹細胞(apical papilla stem cells, SCAP)、牙周幹細胞(periodontal stem cells, PDLSC)及牙齦幹細胞(gingival stem cells, GSC)。

2. 誘導型多潛能幹細胞(Induced Pluripotent Stem Cells)(iPSC)

誘導型多潛能幹細胞是由成體細胞直接誘導成的多潛能性幹細胞，依誘導方式及細胞來源不同敘述如下：

(1) 傳統誘導型多潛能幹細胞

傳統誘導型多潛能幹細胞是由成體細胞直接誘導成的多潛能性幹細胞，首先是由日本學者山中伸弥 Shinya Yamanaka 實驗室利用 4 個特殊基因(包括 Oct4、Sox2、cMyc 及 Klf4)將成體細胞誘導成多潛能性幹細胞³⁰，上述四個幹細胞基因是最傳統的作法。但是目前亦可用其他相關性的轉換因子所取代如 miRNAs 小分子或甚至是不相關基因，例如細胞譜系特異因子(lineage specifiers)。由於多潛能性幹細胞最典型的是胚胎幹細胞，利用體細胞誘導產生之誘導型幹細胞則可免去使用胚胎幹細胞的爭議而且可以讓個人使用自己的體細胞誘導成多潛能性幹細胞，亦可減少免疫排斥的問題，但是此誘導型幹細胞的產生仍然相當緩慢而且量亦很少，一般在老鼠細胞約需 1-2 週而在人體細胞則需 3-4 週，而且其成功率大約只有 0.01%到 0.1%，而這一切仍有改善的空間。初代的誘導型多潛能幹細胞於 2006 年上述日本學者 Shinya Yamanaka 團隊利用 4 個基因誘導成體細胞之後，以 Fbx15 選擇取得，所表現的性質介於纖維母細胞及胚胎幹細胞之間，而第二代的誘導型多潛能幹細胞分別由三個其他團隊，包括 Yamanaka 團隊、加州合作的哈佛大學團隊及麻省理工大學團隊在 2007 年分別發現同樣以 4 個基因(Oct4、Sox2、cMyc 及 Klf4)誘導老鼠纖維母細胞之後，改以 Nanog 取代原先用 Fbx15 誘導後的細胞，可得到和胚胎幹細胞完全相同功能的誘導型多潛能幹細胞，因而也建立了“黃金標準”作業流程³¹。人體誘導型多潛能幹細胞³²是在 2007 年分別由日本 Yamanaka 學者團隊及美國 James Thomson 團隊將人體纖維母細胞誘導形成，日本 Yamanaka 團隊都是以 Oct4、Sox2、cMyc 及 Klf4 四個基因以 retroviral 進行誘導而 Thomson 團隊則利用 Oct4、Sox2、Nanog 及 Lin28 以 lentiviral 系統進行誘導。由皮膚纖維母細胞產生誘導型多潛能幹細胞時需要皮膚取樣，因此又有學者想利用更易取得的細胞進行研究。2008 年有利用由髮囊(hair pluck)取得人體角質細胞進行誘導³³，2010 年有由周邊血液細胞誘導成 iPSC³⁴，2012 年有由膀胱取得腎臟上皮細胞進行誘導成 iPSC³⁵。目前確知 Oct3/4 及 Soxgen family(Sox1、Sox2、Sox3 及 Sox15)是絕對需要的因子，如無此 2 類基因絕對無法誘導成功，而 Klf 家族

(Klf1、Klf2、Klf4 及 Klf5)和 Myc 家族(c-Myc、L-Myc 及 N-Myc)Nanog 及 LIN28 都是具促進誘導效率的作用。

(2) 化學方式取代基因誘導方式進行誘導

其他誘導方式另有學者利用化學方式想取代基因誘導方式進行誘導，2008 年由 Melton 等人⁷ 探討 histone deacetylase(HDAC)抑制劑 Valproic acid 的作用發現可比 Yamanaka 團隊的基因誘導有 100 倍的效果³⁶。研究者認為這個成分可以產生類似由 c-Myc 所產生的訊息，也是一種類似 Sox2 的作用調控機制。在 2008 年 Deng 團隊利用 BIX-01294 加上細胞膜鈣離子通道活化來抑制 histone methyl transferase(HMT)而促進誘導效果³⁷。在 2013 年，北京大學 Deng 團隊發現可完全不用基因改變而誘導產生多潛能性幹細胞乃是採用雞尾酒法，利用七個小分子包括 DZNep 導引老鼠體細胞成幹細胞，他們稱之為 CiPS cells，具 0.2%的效果³⁸，此外，Deng 團隊又利用化學藥物取代基因轉殖法，由觀察纖維母細胞轉化成幹細胞是經由間葉細胞-上皮細胞的轉化過程 (Mesenchymal-Epithelial transition)，因此，Deng 團隊找到二種化學物質 ALK5 抑制劑 SB431412 及 MEK(mitogen-activated protein kinase)抑制劑 PD0325901，結果發現可有 100 倍的誘導效率。Thiazovivin 又另加了三個可促進細胞活性的化學分子，使誘導效率增加為 200 倍，也是誘導人類纖維母細胞成幹細胞的時間由 4 週縮短成 2 週。

(3) 蛋白質誘導多潛能性幹細胞

2009 年已證實，可以不必改變成體細胞的基因而誘導成幹細胞³⁹，其方法就是只要利用某些蛋白質經由 poly-arginine anchor 進入細胞，即可誘導產生多潛能性幹細胞，這種方式即為蛋白質誘導多潛能性幹細胞 (protein-induced pluripotent stem cell, piPSC)。

(4) 利用 mRNA 誘導多潛能性幹細胞

利用 mRNA 誘導形成多潛能性幹細胞，曾有許多人嘗試，而最被認可的是採用未改質(non-modified)的 mRNA，而利用 jetPEI 進行轉染(transfection)效果佳，細胞存活率亦大，可將 7-10 代的纖維母細胞放在 6-well 培養皿上 (2×10^5 cells/well) 一天，先將培養液改成 OPTI-MEM basal media (Life Technologies)，再以 3 μ g 的 mRNA for Oct4(O)、Sox(S)、Klf4(K)、cMyc(M)、Nanog(N)、hTERT(T)及 GFP 或 3 μ g 的混合 reprogramming factor-mRNA (每個 factor 量都一致)加入 150mM sodium-chloride solution 中，這些成分皆在室溫下放置 30 分鐘再放入培養液中，在轉染(transfection) 4 小時之後，再將培養液改為纖維母細胞或 iPS 常用的培養液^{40,42}。

(5) 牙齒誘導型多潛能幹細胞

在牙科，誘導型多潛能幹細胞(iPSC)可由根尖幹細胞(SCAP)、牙髓幹細胞(DPSC)及乳牙牙髓幹細胞(SHED)^{41, 42} 第三白齒幹細胞(third molar tooth stem cells)⁴³、頰側黏膜纖維母細胞(stem cells from oral mucosa)^{43, 44}、牙齦及牙周韌帶纖維母細胞(fibroblasts from gingival and periodontal ligament)⁴⁵ 獲得。研究顯示在老鼠模式中，利用誘導型多潛能幹細胞可分化成牙釉質母細胞(ameloblast)及牙齒間葉細胞，而且這些誘導型多潛能幹細胞可分化成內、中、外三胚層的細胞。因此，誘導型多潛能幹細胞可分別由原先將被丟棄的口腔組織產生而且可被用來進行自體口腔組織再生，例如牙周再生，並可依患者個人狀況進行口腔疾病的調控，也可用以設計診斷工具，亦可用於幫助了解口腔器官在發育過程中複雜的特點。

針對誘導型多潛能幹細胞(iPSC)^{30, 46-49} 的特點可歸納如下：

- A. 誘導型多潛能幹細胞很容易獲得。
- B. 誘導型多潛能幹細胞可增生及分化形成三種胚層(內、外、中胚層)的細胞。
- C. 誘導型多潛能幹細胞可由各種來源取得產生患者特異性或疾病特異性的細胞，可用於治療。
- D. 誘導型多潛能幹細胞可提供無限的幹細胞特性而可同時避免使用胚胎幹細胞可能引發的倫理爭議。
- E. 誘導型多潛能幹細胞可由自體取得，因此可避免使用胚胎幹細胞的倫理及免疫排斥考量，所以自體 iPSC 細胞可降低免疫排斥也有高生物相容性。
- F. 誘導型多潛能幹細胞可較容易大量製造，因此可提供臨床應用的無限來源。

然而誘導型多潛能幹細胞也有潛在的缺點⁴⁹⁻⁵³ 如下：

- A. 研究發現誘導型多潛能幹細胞似乎也可能會保有它原始來源的記憶而限制其分化的潛力^{54, 55}，研究發現如果經由早期繼代培養，iPSC 細胞似乎會記得其組織來源的特性，因此不用誘導型多潛能幹細胞來源可能產生不同的 reprogramming 而有不同的再生能力。
- B. 殘餘的未分化之誘導型多潛能幹細胞在 target site 有可能會無法控制而形成多生瘤⁵⁰。
- C. 亦有學者擔心人為形成的誘導型多潛能幹細胞會有非屬自然的特性⁴⁹。
- D. 由病毒帶基因轉化的誘導型多潛能幹細胞，病毒進入人體有潛在造成細胞轉化變異而造成細胞有致癌基因的危險。

如前所述，牙齒誘導型多潛能幹細胞可由根尖幹細胞(SCAP)、牙髓幹細胞(DPSC)、乳牙牙髓幹細胞(SHED)、第三臼齒幹細胞、頰側黏膜纖維母細胞、牙齦及牙周韌帶纖維母細胞⁷獲得。而牙齒來源的幹細胞(如 SHED、SLAP 及 DPSCs)可轉化成誘導型多潛能幹細胞的成功率比其他非齒源性的來源如新生兒皮膚纖維母細胞及成人皮膚纖維母細胞高。

3. 口腔組織再生之重要性

再生醫學(regenerative medicine)乃藉由細胞、智慧型生醫材料、生物活化分子訊息提供適當的訊息以促進生物組織或器官有再生的能力，因此再生醫學結合奈米技術與幹細胞組織再生可括三大方面的研究與應用：

- (1) 細胞：包括自體移植(autograft)/異體移植(allograft)，已分化細胞/幹細胞(stem cells)由局部或全身性注入幹細胞，探討內在幹細胞機制加以活化、控制、全然應用。
- (2) 智慧型生醫材料：將生物訊息分子結合在生醫材料上以模擬細胞外基質(extracellular matrix)，塗佈高分子以促進細胞貼附或控制生長因子以促進組織再生^{3,4}。
- (3) 生物活化分子訊息：以奈米技術(nanotechnology)探討再生過程的分子作用機轉，發展可適時釋放蛋白質、胜肽(peptide)與基因的類似生物訊息之系列裝置，利用最高劑量與釋放機制作成無侵犯性傳輸系統，以探討組織再生。隨著基因體資訊的發展，幹細胞(stem cells)的應用與生物材料的研發，帶來再生醫學極大的發展潛力。

以目前的發展，幹細胞已可應用於多種組織的再生，包括肌肉、軟骨、骨組織、肝臟、心臟、腦神經、肺臟、小腸及血液細胞等，牙齒再生更開啟了器官再生的契機。而奈米生物技術(nanobiotechnology)的發展亦使得再生醫學有更大的突破。

口腔組織再生，特別具有挑戰性及重要性，主要原因是由於：口腔顎顏面具有複雜的神經分佈可提供特殊的感覺反應及控制肌肉語言、呼吸、咀嚼及情緒的進行表達；口腔顎顏面有很多的血管供應可支持高度能量的需求；口腔顎顏面具有全身最複雜的關節；口腔顎顏面具有很多獨特的器官及組織：包括唾液腺、舌頭、牙齒及牙周組織；此外，任何這些組織的重建必需符合美觀的需求，而且由於臉部分是表現個人形象最重要的部位，因此，口腔組織再生特別具有意義及其重要性。

4. 幹細胞於口腔組織再生之應用

- (1) 利用下顎骨骨髓幹細胞進行下顎骨及顛顎關節重建

口腔顎顏面(oral-maxillo-facial)對於一個人的外觀有很大的影響，許多口腔癌患者在接受手術治療後如前所述下顎骨骨髓幹細胞具有相當特殊的潛力，因此學者致力於利用下顎骨骨髓幹細胞放在支架上進行下顎骨的再生，利用雙

重細胞導引方式培養，幹細胞分別導引軟骨及骨細胞，則可建立顳顎關節再生(temporomandibular joint regeneration)治療顳顎關節受損之患者，同時也可利用幹細胞與生醫材料(biomaterials)支架作用下顎骨之重建。研究也指出，癌症之發生可能與癌幹細胞(cancer stem cells)有關。若能找到癌幹細胞並針對其進行治療將對口腔癌(oral cancer)之治療有更大的突破。

(2) 利用下顎骨骨髓幹細胞進行唾液腺再生與神經再生

許多患者因罹患口腔癌接受放射線治療而造成唾液腺功能不全，目前學者積極研究唾液腺再生(salivary gland regeneration)之方法，研究已証實可利用骨髓幹細胞轉分化(transdifferentiation)為唾液腺細胞^{54, 55}，而且在動物實驗亦證明利用骨髓幹細胞進行細胞療法可修復因放射照射後功能受損之唾液腺⁵⁵。利用下顎骨骨髓幹細胞將來亦可能有助於治療唾液腺功能不全之患者或因口腔癌接受放射治療而唾液腺功能受損者。此外，若能導引下顎骨髓幹細胞分化為神經細胞亦可能針對三叉神經病之患者給予治療。

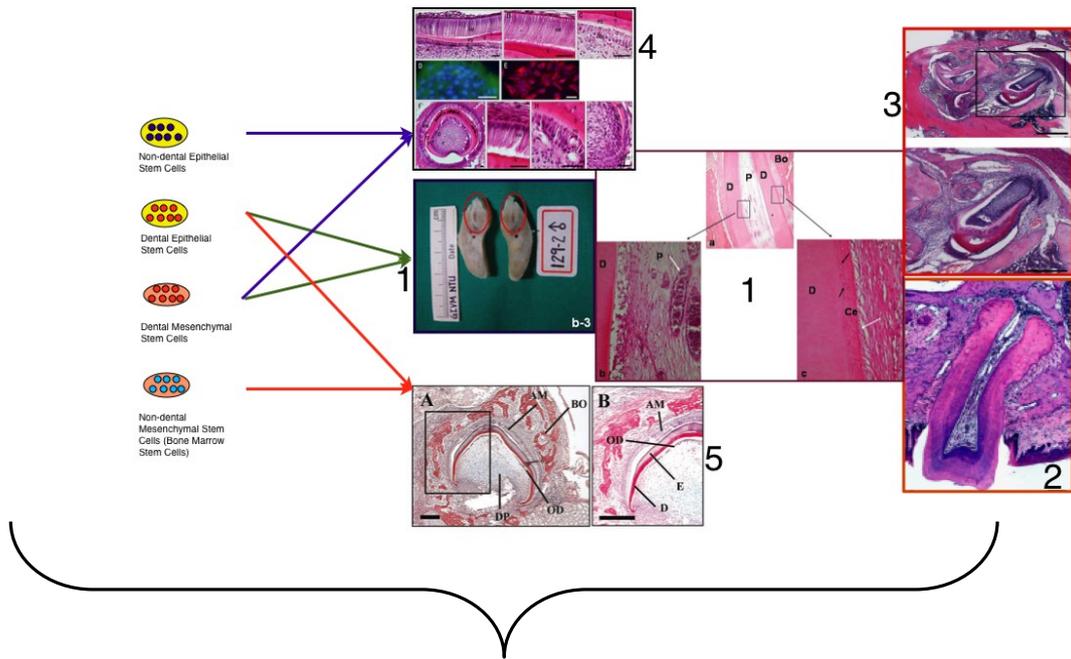
(3) 利用牙齒幹細胞進行牙齒再生

牙齒遠比一般所見更為複雜，因為牙齒本身乃是一個完整的器官，牙齒的胚胎發育過程及發育的原則與身體許多其他的器官都類似，乃是經由外胚層(ectoderm)的胚胎上皮細胞(embryo epithelium)與中胚層(mesoderm)的間葉細胞的交互作用而開始，因此進行牙齒再生的研究，除了解決缺牙的問題之外，其實有另一層更重要的關鍵意義：那就是引領器官再生(organ regeneration)跨越新的一步。因為科學家皆已認知，自然界生命成長的過程有其一致性與共通性，而“遵循自然原則”就是最明智的方法，一切有關再生醫學的研究，其實就是在探討自然界生命成長的過程，加以模擬其生長所需之條件，才可能成功；由於牙齒的發育與其他器官依樣都是在胚胎時期即開始，因此，一旦牙齒再生能夠成功即表示其他器官的再生有機會成功，牙齒再生可以成為其他器官再生的研究模式。如果研究者可以製造新的牙齒，則將可躍進而製造更大的器官，而導引醫學治療到再生醫學的新世紀。再者，牙齒的數量多且較易取得，並且不致於立即造成危害生命的情形，因此讓科學家有更多探討與研究的空間，這也是為何牙齒再生成為科學家極感興趣的研究重點，而牙齒再生的相關研究，進年來也有許多的突破與進展。

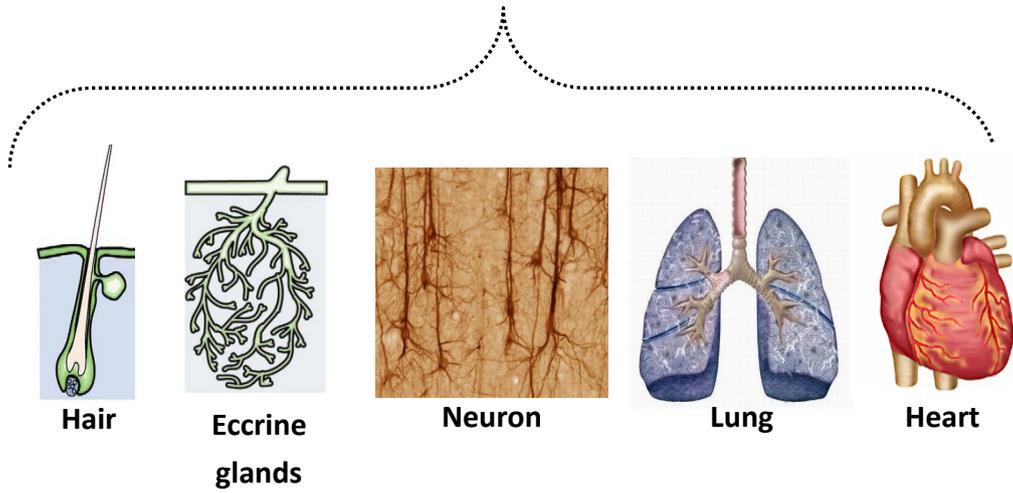
A. 由牙齒發育探討牙齒再生

大部份器官(例如羽毛器官、毛髮器官、哺乳動物之腺體器官、唾液腺器官、脾臟等)是藉二種不同的胚胎細胞，包括上皮細胞及間葉細胞相互作用而形成，當然牙齒也不例外。在胚胎時期，口腔上皮細胞(此將形成口腔的上皮)會首先釋出訊息給間葉細胞(此細胞會形成顎骨及軟組織)導引他們開始形成牙齒，當間葉細胞接到指引的訊息，間葉細胞會傳出訊息回給上皮細胞，這樣來回的交互作用在胚胎牙齒發育過程一直持續進行，牙齒再生可以成為其他器官再生的研究模式(圖一)。

Regenerative Medicine-Bioengineered Organ Model



Stem Cell-Based Regenerative Medicine



圖一以牙齒再生作為其他器官再生模式

最初，未來將形成牙齒的組織只不過是增厚的胚胎上皮細胞而已，接著此上皮組織開始穿到下層的間葉組織而逐漸有不同時期的表現，包括所謂苞狀期(bud stage)、帽狀期(cap stage)，鐘形期(bell stage)等。其外層

即形成牙釉質(enamel)而內層的間葉組織則形成牙本質(dentin)及牙髓(pulp)，牙骨質(cementum)及牙周組織(periodontal tissue)。一般嬰兒在出生 6~8 週會開始長出牙齒，即使在牙齒開始形成之前，它的形狀即會由其所在位置而決定，有些來自上皮細胞導引牙齒再生的訊息亦同樣會對顎骨的間葉組織的形成基因有導引的作用，已知的有 homeobox 基因群，這些 homeobox 基因乃在胎胚發育期參與決定各種器官的形態與位置，在發育中的人類顎骨不同的 homeobox 基因會在不同部位被啟動，導引不同的牙胚分別變成白齒、小白齒、犬齒及門牙等，例如其中一個 homeobox 基因稱為 Barx1 會被間葉細胞啟動或表現在白齒所會生長的後牙區，在動物實驗中，若在一般會長前牙的部位將間葉細胞故意表現 Barx1 則牙齒即長成白齒的形狀，由於能預測或控制牙齒形態的能力是製造組織再生牙齒的關鍵，科學家即可利用類似 Barx1 這種基因的活性，在實驗室中作初步培養製造牙齒，可當作預測未來牙齒形態的標記。換句話說，我們必須提供正確的訊息，在適當的時候，導引牙齒再生。在牙齒發育過程中所需的各種生長因子及訊息傳導因子皆已陸續被發現，而更有意義的是大部分這些訊息傳導因子(signal transduction factors)除了在牙齒發育過程一直扮演重要角色之外，也同時對於其他器官有著極重要的導引作用；瞭解牙齒發育的訊息傳導因子，也可使我們明白天生顎顏面生長缺損造成牙齒發育不全的因素，進而可以預防治療此缺陷。帽形期含有牙釉質器官(enamel organ)上皮細胞及牙本質間葉細胞，將此二者分離之後若再放在一起，於體外分開培養即可形成牙齒雛型；利用骨髓幹細胞來源作為間葉細胞與牙釉質器官的上皮細胞一起作用亦可發現具有形成牙齒成份的傾向，由此更確認在牙齒再生的可行性。有關牙齒生長時形態決定基因陸續被發現，加上幹細胞以分子技術啟動及利用的方式亦增加牙齒再生的可行性。

2002 年美國波士頓 Forsyth Institute 的研究團隊⁵⁶在與人同樣有二列牙齒的豬身上進行牙齒再生的研究，主要取自 6 個月尚未萌出的牙胚，為了得到混合的牙釉質上皮細胞(enamel epithelial cells)及牙髓間葉細胞(pulp mesenchymal cells)，豬的牙齒乃切成小碎片再用酵素分解；混合的細胞，則置入牙齒形狀的生物可解性材料(biodegradable materials)支架中再將此支架連細胞植入老鼠的腹部繫膜(omentum)處，繫膜在小腸周圍，該處是脂肪組織含有大量血管，此步驟很重要，因為生長發育牙齒組織需要有足夠的血管以提供養分及氧氣供他生長。最初，支架提供細胞支持，之後，支架會裂解而被新的組織所取代，當植入經 20-30 週後，在原始支架所在的位置，可發現有像牙齒一樣結構的小牙齒形成，可見其形態及組織就像自然成熟的牙冠，他們也包含正常牙的組織而顯示牙釉質、牙本質、牙髓及牙根可在支架上再生，似乎細胞可知其該有的位置而形成牙釉質與牙齒組織。另一可能的解釋乃是這些排列的細胞只是“剛好”有利於

牙齒發育，因此，Forsyth Institute 研究團隊則以另一個實驗測試，以由老鼠白齒分離的口腔上皮細胞(oral epithelial cells)及間葉細胞進行實驗，這一次細胞在培養皿上生長 6 天再種回老鼠身上，經 12 週後，取出長出的組織檢視，再次可見小牙齒內結構包含牙釉質、牙本質及牙髓組織皆形成在原先的支架中⁵⁷，打破了“無人知道成體顎骨是否可提供訊息供牙齒形成”的疑慮。這些新的結果乃是極令人鼓舞的，因為此證實了細胞可以認識自己且可有牙根的形成，再者細胞再增生之後細胞也不會受影響，也證實了在哺乳動物牙齒再生的可行性，而使在人體進行牙齒再生更有成功的機會。同時，此團隊探討在此實驗中的新牙齒組織，可能不只是由於分散的牙齒細胞會辨識，相反的，在第三白齒的牙胚可能含有隱藏的牙齒幹細胞而可形成新的組織，如果這是事實，這表示新的牙齒幹細胞可能就存在牙齒中而可促進牙齒的再生。

英國倫敦國王學院的 Sharpe 等人⁵⁸則由胚胎牙齒發育的自然過程去複製牙齒，此方式需要徹底瞭解控制牙齒初期形成的主要原則，以及扮演胚胎口腔上皮及間葉細胞的細胞來源。此團隊主要以老鼠細胞進行實驗，以幹細胞及正常細胞，自胚胎及成體來源以探測不同細胞產生牙齒的可行性。在大部份的情況，此研究團隊將間葉細胞以離心管聚集成團，此細胞團再置於上皮之下培養數天，而在此組織內的基因活性乃被加以測定以確定牙齒的早期發育，其次，這些牙齒前期細胞乃植入動物體內含血管滋潤的部位(如老鼠的腎臟)約 26 天，在這些過程中，只有在上皮是來自胚胎的來源以及在間葉細胞含有一些幹細胞才会有牙齒的形成，如果由骨髓取得的幹細胞取代口腔間葉細胞，移植的細胞會形成正確的牙齒結構；所以，似乎胚胎間葉細胞可由成人幹細胞所取代而形成新牙；很可惜，許多年來研究顯示，胚胎的上皮細胞含有特殊的訊息，可促牙齒再生在出生後即告消失。Sharpe 團隊仍試圖由成人體內找到可取代胚胎上皮細胞的來源，無論如何，由成人幹細胞與胚胎口腔上皮細胞結合所可得到牙齒的結果是很令人興奮的；更有意義的是這些牙齒也與正常老鼠牙齒的大小一致，他們乃是被新骨及結締組織所包圍，且顯示初期牙根形成的現象。第二步乃是要看這些組織在口內亦可形成牙齒，在胚胎的顎骨，軟組織，牙齒及骨頭並未受外界力如咬合力及說話干擾，而在成人顎骨則是很硬而忙碌的地方。無人知道此成人顎骨是否可提供牙齒形成所需的訊息或在胚胎所能給予的環境，為了查證此點，Sharpe 研究團隊由胚胎老鼠取下牙胚再移植入成體老鼠口內，3 週之後，牙齒即在無牙區長出來，有正確的方向及大小並附著在牙槽骨中，且有軟結締組織在其間。顯然，成體口腔可提供牙齒發育的良好環境，這是達到牙齒再生的先決條件之一。

B. 牙齒再生的展望

目前臺大研究團隊自迷你豬取得牙胚細胞，經培養後再植入原迷你豬的牙槽骨中，已成功地長出與迷你豬的牙齒一樣大小的牙齒。利用支架亦能再生具有牙本質、牙髓、牙骨質與牙周膜等如同像牙根一樣的結構⁵⁹。團隊研究亦發現利用骨髓幹細胞可促進牙齒的再生⁶⁰。而細胞與材料的互動亦會造成很大的影響，研究發現材料的親疏水性會影響細胞的生長，牙胚細胞在疏水性材料上較容易增生，但是疏水性材料如聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol) 卻可讓高密度的牙胚細胞聚集成團並有促進分化 (differentiation) 及礦化 (mineralization) 之作用，而且是透過細胞外訊息調控激酶 ERK-路徑扮演負調控因子的角色^{61, 62}。這些研究顯示利用材料的特性，可調控細胞的生長與分化，對於組織再生之應用有重要影響。未來的研究將針對牙胚細胞的特性有更多的鑑定，並且探討牙齒再生過程不同階段中，與周圍牙槽骨組織所發生的各種訊息傳導機制。研究亦發現生長因子如第九型纖維生長因子 (FGF9) 對於牙齒再生有促進之作用，而利用電子細胞表面電阻感應器 Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) 可作為體外即時動態觀測系統探討牙齒再生過程中上皮細胞與間葉細胞產生互動作用 (epithelial invagination) 的時間點，也可用以進一步探討其他相關生長因子的影響⁶³。

相較於其他器官組織工程，牙齒再生的研究在很短的時間內即已得到相當多的進展，整體而言最大的挑戰乃是要找到簡單而快速可控制牙齒發育的方法，另一目標是預測及控制牙齒的形狀及大小。

牙齒再生仍有待更多的研究，包括幾個方向：

- (a) 分離牙胚中牙釉質器官上皮細胞及間葉組織中所含的成體幹細胞並鑑定其特性。
- (b) 找出在牙齒發育階段後期所含的幹細胞。
- (c) 探討成體幹細胞如何對於外界機械作用力及感應化學物質的訊息，而成為具牙齒再生力的細胞。
- (d) 分離並利用成人骨髓幹細胞及牙髓幹細胞中具牙齒再生力之幹細胞。
- (e) 模擬上皮細胞與間葉細胞在牙齒發育中的交互作用，以促進牙齒再生機制。
- (f) 探討適合牙胚細胞生長的生物性支架設計
- (g) 探討牙齒再生過程不同階段中，與周圍牙槽骨組織所發生的各種訊息傳導機制。

5. 其它幹細胞於口腔組織再生之應用

此外，在牙齒所發現的各種幹細胞，皆有相當大的潛力，目前在牙齒已陸續發

現各種不同的幹細胞，包括：乳牙牙髓幹細胞(SHED)⁶⁴，恆牙牙髓幹細胞(DPSC)⁶⁵，未完全發育牙根尖幹細胞(SCAP)⁶⁶，牙周幹細胞(PDLSC)⁶⁷等。乳牙牙髓幹細胞(SHED)存在於乳牙牙髓具有相當大的潛力，可被引導分化為骨、軟骨、神經等，在相關的骨再生、神經再生皆有可能應用，因此，目前已有乳牙銀行的產生，以保留脫落的乳牙，可分離乳牙牙髓幹細胞⁶⁰作為將來可能的應用，以補足未留下臍帶血的遺憾。在恆牙的牙髓中亦可找到幹細胞並已證實具有轉分化為牙本質母細胞(odontoblasts)，促進牙本質再生(dentinogenesis)的作用，可被應用於治療齲齒，以及作為覆髓(capping)細胞治療。此外，恆牙牙髓幹細胞已證實可促進神經分化，亦可用以促進視神經再生^{68, 69}。研究發現在牙根發育的2/3之根尖，具有相當特別的牙根尖幹細胞(stem cells from apical papilla)，可促進牙根發育、牙本質及牙周的形成，因此可應用於治療牙斷裂或根尖發育不全⁷⁰，如合併牙周幹細胞(periodontal stem cells)亦可能治療因車禍撞擊的牙根重植之修護。學者發現利用氫氧磷灰石(hydroxyapatite)作用牙根中間管狀，放置牙根尖幹細胞，周圍放置牙周幹細胞植入豬的口內，可形成具牙周膜之牙根，甚至可利用此牙根在其上製造牙冠，不失為缺牙患者的福音。牙周幹細胞可應用於促進牙周之再生，可用於治療牙周病，將來可針對拔下的埋伏智齒的牙周可加以利用。牙齒幹細胞皆可被導引成誘導型多潛能幹細胞，亦帶來更多應用的契機。

三、結語

幹細胞在口腔組織再生的應用有相當大的潛力與價值，許多的應用仍在研究階段，有待學者更多的努力，以期早日應用於臨床。相信再生醫學所帶來的革新及效果將是令人興奮而可預期的，其運用將可造福更多的人群。

四、參考文獻

1. Baksh, D., Song, L. & Tuan, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine* **8**, 301-316 (2004).
2. Tuan, R.S., Boland, G. & Tuli, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis research & therapy* **5**, 32-45 (2003).
3. Benya, P.D. & Shaffer, J.D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**, 215-224 (1982).
4. Bonaventure, J. *et al.* Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Experimental cell research* **212**, 97-104 (1994).
5. Bruder, S.P. & Caplan, A.I. Osteogenic cell lineage analysis is facilitated by organ cultures of

- embryonic chick periosteum. *Developmental biology* **141**, 319-329 (1990).
6. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **9**, 641-650 (1991).
 7. Silbermann, M. *et al.* Chondroid bone arises from mesenchymal stem cells in organ culture of mandibular condyles. *Journal of craniofacial genetics and developmental biology* **7**, 59-79 (1987).
 8. Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M. & Caplan, A.I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* **13**, 81-88 (1992).
 9. Dennis, J.E. & Caplan, A.I. Porous ceramic vehicles for rat-marrow-derived (*Rattus norvegicus*) osteogenic cell delivery: effects of pre-treatment with fibronectin or laminin. *The Journal of oral implantology* **19**, 106-115; discussion 136-107 (1993).
 10. Dennis, J.E., Haynesworth, S.E., Young, R.G. & Caplan, A.I. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell transplantation* **1**, 23-32 (1992).
 11. Dennis, J.E. & Caplan, A.I. Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Journal of cellular physiology* **167**, 523-538 (1996).
 12. Kadiyala, S., Young, R.G., Thiede, M.A. & Bruder, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell transplantation* **6**, 125-134 (1997).
 13. Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M. & Yoo, J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* **238**, 265-272 (1998).
 14. Wakitani, S. *et al.* Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **71**, 74-80 (1989).
 15. Hunziker, E.B. & Rosenberg, L.C. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **78**, 721-733 (1996).
 16. Shapiro, F., Koide, S. & Glimcher, M.J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **75**, 532-553 (1993).
 17. O'Driscoll, S.W. & Salter, R.B. The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *Clinical orthopaedics and related research*, 131-140 (1986).
 18. Paley, D., Young, M.C., Wiley, A.M., Fornasier, V.L. & Jackson, R.W. Percutaneous bone

- marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits. *Clinical orthopaedics and related research*, 300-312 (1986).
19. Werntz, J.R. *et al.* Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **14**, 85-93 (1996).
 20. Coutts, R.D., Woo, S.L., Amiel, D., von Schroeder, H.P. & Kwan, M.K. Rib perichondrial autografts in full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Clinical orthopaedics and related research*, 263-273 (1992).
 21. Kreder, H.J., Moran, M., Keeley, F.W. & Salter, R.B. Biologic resurfacing of a major joint defect with cryopreserved allogeneic periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model. *Clinical orthopaedics and related research*, 288-296 (1994).
 22. Chu, C.R. *et al.* Osteochondral repair using perichondrial cells. A 1-year study in rabbits. *Clinical orthopaedics and related research*, 220-229 (1997).
 23. Grande, D.A. *et al.* Repair of articular cartilage defects using mesenchymal stem cells. *Tissue engineering* **1**, 345-353 (1995).
 24. Wakitani, S. *et al.* Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **76**, 579-592 (1994).
 25. Otsuka, Y. *et al.* Requirement of fibroblast growth factor signaling for regeneration of epiphyseal morphology in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Development, growth & differentiation* **39**, 143-156 (1997).
 26. Denker, A.E., Nicoll, S.B. & Tuan, R.S. Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation; research in biological diversity* **59**, 25-34 (1995).
 27. Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N. & Aubin, J.E. Continuously growing bipotential and monopotent myogenic, adipogenic, and chondrogenic subclones isolated from the multipotential RCJ 3.1 clonal cell line. *Developmental biology* **142**, 313-318 (1990).
 28. Zimmermann, B. & Cristea, R. Dexamethasone induces chondrogenesis in organoid culture of cell mixtures from mouse embryos. *Anatomy and embryology* **187**, 67-73 (1993).
 29. Lennon, D.P., Haynesworth, S.E., Arm, D.M., Baber, M.A. & Caplan, A.I. Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **219**, 50-62 (2000).
 30. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
 31. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317 (2007).
 32. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by

- defined factors. *Cell* **131**, 861-872 (2007).
33. Aasen, T. *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology* **26**, 1276-1284 (2008).
 34. Staerk, J. *et al.* Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* **7**, 20-24 (2010).
 35. Zhou, T. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nature protocols* **7**, 2080-2089 (2012).
 36. Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. & Hochedlinger, K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**, 945-949 (2008).
 37. Shi, Y. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell stem cell* **3**, 568-574 (2008).
 38. Hou, P. *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* **341**, 651-654 (2013).
 39. Zhou, H. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell* **4**, 381-384 (2009).
 40. Rohani, L. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells using non-synthetic mRNA. *Stem cell research* **16**, 662-672 (2016).
 41. Yan, X. *et al.* iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem cells and development* **19**, 469-480 (2010).
 42. Tamaoki, N. *et al.* Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *Journal of dental research* **89**, 773-778 (2010).
 43. Oda, Y. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *The Journal of biological chemistry* **285**, 29270-29278 (2010).
 44. Miyoshi, K. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa. *Journal of bioscience and bioengineering* **110**, 345-350 (2010).
 45. Wada, N. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of periodontal research* **46**, 438-447 (2011).
 46. Silva, M. *et al.* Generating iPSCs: translating cell reprogramming science into scalable and robust biomanufacturing strategies. *Cell stem cell* **16**, 13-17 (2015).
 47. Nakagawa, M. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* **26**, 101-106 (2008).
 48. Amabile, G. & Meissner, A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends in molecular medicine* **15**, 59-68 (2009).
 49. Otsu, K. *et al.* Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. *Frontiers in physiology* **5**, 36 (2014).
 50. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920 (2007).

51. Kim, K. *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* **467**, 285-290 (2010).
52. Polo, J.M. *et al.* Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* **28**, 848-855 (2010).
53. Hynes, K., Menicanin, D., Mrozik, K., Gronthos, S. & Bartold, P.M. Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines. *Stem cells and development* **23**, 1084-1096 (2014).
54. Lin, C.Y. *et al.* Transdifferentiation of bone marrow stem cells into acinar cells using a double chamber system. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* **106**, 1-7 (2007).
55. Lin, C.Y. *et al.* Cell therapy for salivary gland regeneration. *Journal of dental research* **90**, 341-346 (2011).
56. Young, C.S. *et al.* Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *Journal of dental research* **81**, 695-700 (2002).
57. Young, C.S. *et al.* Tissue-engineered hybrid tooth and bone. *Tissue engineering* **11**, 1599-1610 (2005).
58. Ohazama, A., Modino, S.A., Miletich, I. & Sharpe, P.T. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *Journal of dental research* **83**, 518-522 (2004).
59. Kuo, T.F. *et al.* Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine. *Journal of biomedical materials research. Part A* **86**, 1062-1068 (2008).
60. Kuo, T.F. *et al.* Bone marrow combined with dental bud cells promotes tooth regeneration in miniature pig model. *Artificial organs* **35**, 113-121 (2011).
61. Chen, R.S., Chen, Y.J., Chen, M.H. & Young, T.H. The behavior of rat tooth germ cells on poly(vinyl alcohol). *Acta biomaterialia* **5**, 1064-1074 (2009).
62. Chen, R.S., Chen, M.H. & Young, T.H. Induction of differentiation and mineralization in rat tooth germ cells on PVA through inhibition of ERK1/2. *Biomaterials* **30**, 541-547 (2009).
63. Tai, Y.Y., Chen, R.S., Lin, Y., Ling, T.Y. & Chen, M.H. FGF-9 accelerates epithelial invagination for ectodermal organogenesis in real time bioengineered organ manipulation. *Cell communication and signaling : CCS* **10**, 34 (2012).
64. Miura, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5807-5812 (2003).
65. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G. & Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13625-13630 (2000).
66. Sonoyama, W. *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS one* **1**, e79 (2006).

67. Seo, B.M. *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**, 149-155 (2004).
68. Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S.A. & Gronthos, S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* **26**, 1787-1795 (2008).
69. Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W. & Scheven, B.A. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Investigative ophthalmology & visual science* **54**, 7544-7556 (2013).
70. Banchs, F. & Trope, M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *Journal of endodontics* **30**, 196-200 (2004).

第十一章

工業技術研究院再生醫學研發重點

Research Focus of the Regeneration Medicine Technology in ITRI

沈欣欣 駱婉珣 王羽淇 王英凱 蔡佩宜 林佩如 楊明嘉 劉育秉 廖智菁

工業技術研究院生醫與醫材研究所再生醫學技術組

一、前言

再生醫學是一個橫跨材料科學、細胞工程、組織工程和分子生物學的轉譯應用領域，目標在於再生人體細胞、組織或器官，讓老化或是因疾病、創傷損壞的組織器官功能，恢復或再建立正常功能。

再生醫學領域包括：

- 透過活性分子、藥物、或是細胞治療，刺激人體自身的修復機制，讓器官組織傷口癒合或功能修復。
- 透過生醫材料或是細胞工程，改造受損的組織和器官，再創造其應有的功能。
- 在實驗室中以體外工程手段，培養出組織和器官，並在身體無法自癒時植入它們，也就是組織工程的研發範疇。

再生醫學已經是目前全球科技亟欲追求的重要醫療技術，期望透過科學與工程技術的不斷精進，為未來人類醫療，帶來大革命。除了減緩老化，更做到再造組織的夢想。醫療技術夢想雖然遠大，但技術本身將用在人體或與人體連結，除了有效之外，就是要足夠安全。因此，先進國家法規單位，都對於再生醫學領域的應用與產品研發，訂出標準與規範。我國衛福部也在近幾年，參考歐美日各國，逐步建立各項再生醫學、細胞治療相關的規範，提供國內產品研發之依據。

工業技術研究院生醫與醫材研究所，在國內生醫技術領域中之產、官、學、醫鏈結與轉譯研究上，扮演重要的角色。主要投入的核心技術，在於促進國內生醫相關技術與產品進入臨床試驗、通過國際法規驗證，以進入市場，並具國際競爭力。

二、生醫材料醫療器材 GMP 設施與管理

醫療器材產業相較其他產業是一成熟科技應用的保守產業，由於該產業之產品應用與生命緊密的結合，因此需要穩定的技術、完整的醫療法規與品質驗證管理等，引入產品開發過程，以確認產品使用之安全與功效。目前全球醫療器材主要跟隨美國與歐盟科

技腳步發展，隨著新興市場崛起，更多人需要完善的醫療服務，帶動醫療相關產業急速擴張成長。

根據 BMI Espicom 數據顯示，2014 年全球醫療器材市場規模為 3,403 億美元，雖然受到全球未來經濟發展的未明朗，進而影響到各先進國家持續以緊縮醫療支出為主要考量，然而在高齡化議題持續加劇的大趨勢，且先進國家市場逐步復甦以及新興國家的快速成長下，帶動全球醫療器材市場呈現穩健的向上成長，預估 2017 年將可成長至 4,053 億美元，2014-2017 年之年複合成長率達 6.0%。

分析台灣優勢商品也不斷隨著時間與市場需求而變化，從以往以附加價值較低的手套、醫療耗材到現在的血糖計與隱形眼鏡，顯示我國醫療器材產業持續進步，走向附加價值高、醫院治療用的高階創新醫材。近年來由於政府為加速國內醫療產業轉型及升級，目前國內廠商在體外診斷試劑、人工關節、人工牙根等醫療產品也具備不錯的研發與製造能量，為因應此全球發展趨勢，以及協助我國醫材產業升級，本工廠之任務是將就產業發展之缺口，並建立環境設施與高階植入醫材之研發平台，其彌補產業發展之不足。

而國內的醫材廠商極多數是由傳統產業轉型而成，目前部份試圖建立自有品牌，但仍多以代工製造業務為主，主要在於國內缺乏體內植入式醫療器材開發經驗，且從投入到最後收益，必須花費五年至十年不等的時間才能有所成果，對於製造商而言在經營上若必須虧損十年之後才能獲利的情況下，無法投入高成本做產品開發，絕大多數的廠商會選擇退出市場，目前雖有廠商生產醫療器材產品，但公司規模一直無法進入國際市場，至於高單價高技術門檻的醫療器材，國內醫院主要都是使用進口產品。整合來說，目前台灣生醫材料產業開發新產品，面臨兩個問題，第一是開發廠商缺乏經驗以及相關技術與法規之人才，第二是目前國內缺乏 GMP 設計與製造之代工環境，不足以提供生醫材料新產品臨床前試驗及人體臨床試驗階段使用之樣品。而這也是本分項之目的，以此建構之能量，協助廠商提昇產業開發新產品，增加國際競爭力。

工研院生醫材料產品製造工廠為目前台灣唯一具有符合台灣、歐盟及美國法規認證之醫療器材 GMP 製造廠。本製造工廠不但可支援上游一般研發單位，生產符合臨床試驗用之生醫材料，以進行臨床試驗驗證產品安全性與功效性，對於生醫材料之專利分析、產品開發、設計管制、物化性測試均有相當之能力。另外在植入式高階醫材研發上，生醫材料產品製造工廠也已累積完整之設計開發文件與經驗，具備高品質之製程技術與 GMP 環境，並可小量而多樣生產多種產品，將可協助國內醫療器材廠商落實產品商業化。除了孕育養成生醫領域之核心人力，建立檢測、認驗證實驗室與試量產工廠，藉以提升國家整體醫療器材與醫藥技術之開發，並作為創新前瞻高階植入式醫材產品化之基礎。

目前國內在臨床醫師與學術界在醫療器材產品開發方面，從創意研發、臨床設計、臨床驗證及試驗具有相當豐富之研發能量，但是從產品技術面導入到符合國際規範之品質系統要求的產品，其開發經驗卻相對的薄弱。而台灣醫療器材產業主要分為醫療器材代工廠及醫療器材品牌公司兩類，其中醫療器材代工廠主要著重金屬、器械及射出成型

開發設計與量產製造，而醫療器材品牌公司則著重於臨床試驗、產品認證、產品查驗登記及產品上市行銷，在產品/製程創意研發、專利分析以及符合法規要求之設計開發及管制能力則顯得不足。目前本工廠除了每年固定維持既有符合 TFDA GMP、ISO13485 及歐盟 93/42/EEC 品質系統外，已完成 2 件陶瓷骨材產品通過 TFDA 查驗登記，落實生醫材料產品製造工廠從產品設計開發、製造到上市認證之能量，由於國內醫療器材公司在高階植入醫療器材滅菌確效及無菌包裝之包材確效方面之能力較為薄弱，由於在之前已建立高溫高壓滅菌確效方法，並更進一步完成醫療元件、無菌製程之清潔確效 GLP 實驗室之建置，以補足國內醫療器材廠商在產品開發過程中不足之處，其中無菌製程清潔確效試驗及檢測方法部份，由於國內已有多家廠商具有 PIC/s GMP 藥廠且具備有無菌充填確效之能量，但在醫療器材廠商目前較無相關之經驗及能量、以及無菌充填後對於廠房及設備清潔確效方面並無合適之單位。

藉由工研院生醫材料產品製造工廠所累積之完整設計開發文件與經驗，具備高品質之製程技術與符合 ISO13485 品質系統管理下，可小量而多樣生產各種生醫材料產品，將可以作為承接醫界技術到業界商品化間之斷層，並結合國內醫療器材廠商落實產品的重要關鍵，減低產品開發的風險，提高學界及產業界開發新產品的意願，並有效縮短產品開發時間，同時可協助廠商在產品開發過程中，整合國內臨床醫師、生醫材料廠商等，來解決長久以來生醫產業遭遇之瓶頸。藉由生醫材料產品製造工廠扮演銜接橋樑之腳色，將可帶動國內生醫材料產業，轉型為更高層次之複合式醫用植入醫材。計畫中除了依據 ISO13485 規範完成產品開發所需之設計輸入與輸出之管制、於產品開發過程中於各階段將依據 ISO14971 進行風險分析之管控，並將依據 ISO10993 進行產品相關之生物相容性測試與動物功效性之驗證。最後，將針對產品完成滅菌確效 (ISO11135 and ISO11737)、產品安定性試驗及包材完整性測試 (ISO11607)，以及完成符合臨床研究品質規格之三批次試量產。此系列創新型高附加價值醫用植入式產品開發，將可帶動國內醫療器材產業走向高技術門檻產品，提升國內醫療技術水準，帶動產業發展與投資，並開拓國內外市場。

三、生醫材料與水膠的臨床與產業運用

1. 生醫材料產業趨勢

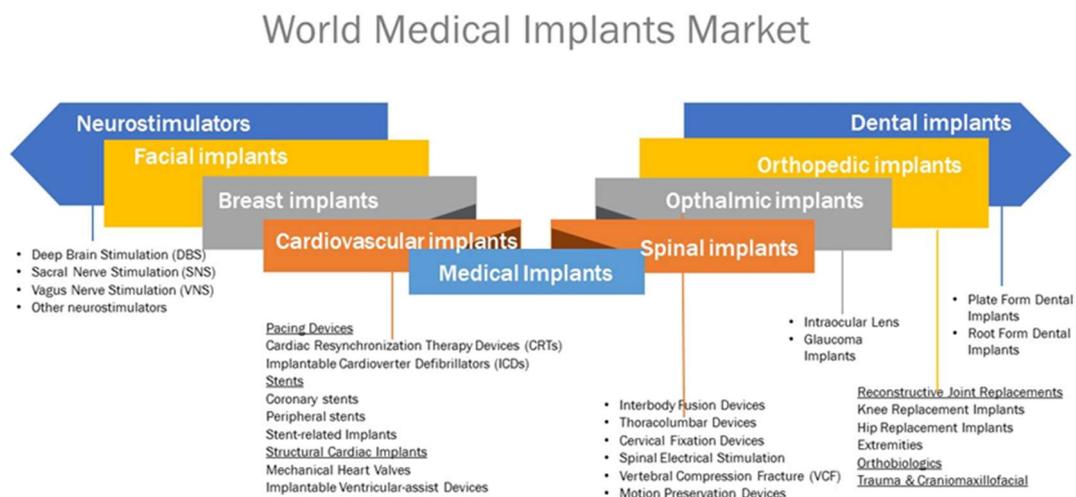
生物材料是泛指是其具有良好生物相容性可以植入體內，達到修補，取代或是直接與生物體接觸達到幫助治癒，矯正和恢復組織或是器官功能的材料。來源有人工合成或是天然來源材料。目前生醫材料可延伸到結合藥物傳輸系統所用的材料，生物感應器的材料，也包括支持身體功能的體外醫療器材之材料例如：洗腎套管，鼻胃管等。

相關生物材料市場預計到 2022 年將達到 1160 億美元。依材料種類來分類生醫材料，主要可分為四大類¹：

- (1) 高分子有機聚合體(Polymer)
- (2) 陶瓷(Ceramic)
- (3) 金屬(Metal)
- (4) 複合性材料(Composites)

在臨床應用金屬材料所衍生之醫療產品，大致以手術器械及骨科內外固定裝置等醫療器材為主。陶瓷材料則以植入式骨科填補材料為主要其應用。高分子有機聚合體依來源不同分為：天然高分子和合成高分子材料，天然高分子材料由於生物相容性較佳，有利於細胞吸附增殖和分化。除在傳統醫療器材上生醫材料之應用，朝向功能缺損的身體部分，協助傷口痊癒，增進器官與組織的功能，及修復或取代有缺陷、不正常的組織器官等應用是未來趨勢，對於再生醫學的發展中生醫材料也是重要一環。

以臨床使用部位可以區分為牙科，骨科，眼科，脊椎，心血管，胸腔，臉部和神經八大類(圖一)，其中骨科植入物根據 2015 年世界市場分析，占了最大的產值，主要是由於肥胖和骨質疏鬆相關骨折增加。此外，由於高齡化趨勢，選擇矯正外科手術的患者從 55 歲以下的年齡組增加到 80 歲以上。同時，越來越多的人意識到許多植入物手術對改善患者術後品質上升，特別是在印度和中國這樣的發展中國家的患者中尤其如此。加上改善發展中國家醫療衛生基礎設施也導致骨科植入物市場的增長。未來如何開發新技術，如使用 3D 技術和雕塑 CAD 創建客製化患者的植入物，特別是膝關節置換術，其具有比現有植入物多的優點會是發展主流¹。

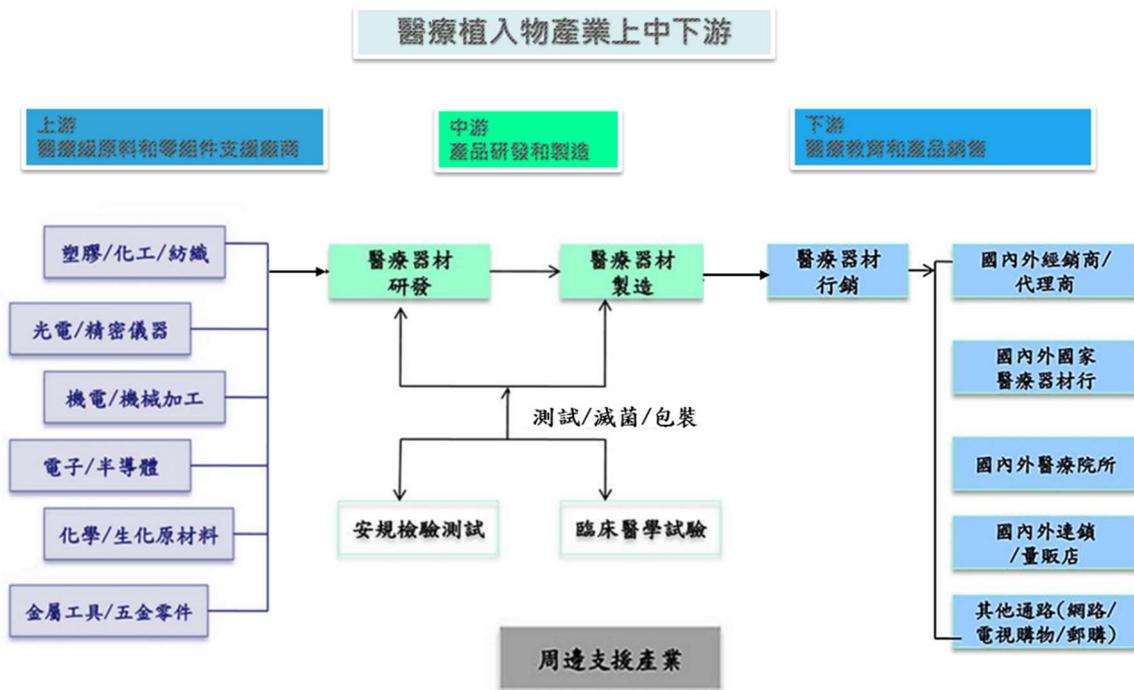


圖一、根據 Secondary Literature & AMR Analysis¹ 分析生醫植入物。

發展中國家和已開發國家醫療植入物情形會隨人口比例，文化和生活型態造成不同醫療行為，例如：以德國的醫療植入物市場為例，由於生活方式因素增加和吸煙率上升(德國 15 歲以上人口平均接近 24.5%)吸煙者，18 至 25 歲的年齡組為 35.2 %是吸煙者)和肥胖症造成全國慢性病發病率上升等因素。德國是因心臟病死亡率最高的國家之一，甚至高於美國或英國，所以對於心血管植入物需求遠高於其他已開發國家。除瑞士外，德國的牙科服務比任何其他歐洲國家都多，這使其成為牙科植入物行業的是具有吸引力的市場。

據世界衛生研究院報導，2010 年 65 歲以上人口約為 5.24 億，預計到 2050 年將達 15 億，達到世界人口的 16%。初估計，到 2020 年，日本的 27%，英國的 16%，英國的 24%，俄羅斯的 17%，中國的 14%的人口將在 65 歲以上。隨著高齡化的增長，慢性疾病如心血管疾病，神經病變，老年相關創傷和骨關節相關骨科植入物都有強大需求。

從全世界和業界及研發領域的觀點來看，因為生醫材料用途具多樣性，開發風險遠較新藥開發小。以生醫材料是生技領域中類似關鍵零組件的概念產品，以製造導向為模式，且開發的成果及技術可應用至不同的領域，甚至跨入新興之組織工程領域發展，開拓不同型式的產品線、增加營收很適合台灣的產業發展(圖二)。再加



圖二、醫療植入物上中下游鏈。

上，生醫材料是屬於高單價，量少，產品生命週期長以及毛利率高的產業，發展所需人力偏向高階人才，不需勞力密集，值得我國相關產業切入。在經過經濟部多年推動之下，已經有由上游醫療級原料建立如：膠原蛋白以及其相關產品的應用開發及其他醫材如：敷料，隱形眼鏡及人工血管、人工骨、人工洗腎等套件，也開始在台灣嶄露頭角。到中游已有多家廠商建立 GMP 廠以製造產品充分掌握醫材來源、品質，以及降低原料成本展開開發不同型式的產品線，或者 OEM 代工生產其他國外大廠產品。在下游醫療院所以及通路整合部分，近年由於政府獎勵，越多廠商引進國外相關生醫材料技術，並開始與國內研究單位合作開發適合國內的產品。

2. 水膠醫療植入物的臨床與產業運用

生醫材料有許多型式例如：膜片狀，固狀等其中水膠型式由於其獨特的性能，如高含水量，柔軟度，柔韌性和良好生物相容性而變得特有醫療植入物。天然水膠材料(例如：玻尿酸，明膠等)和合成的親水性聚合物(PLGA，HEMA，矽水膠等)可以物理或化學交聯以產生水膠。它們與生物組織的相似性為醫學領域的應用開闢了許多機會。目前，水膠多用於製造隱形眼鏡，衛生用品，和傷口敷料(圖三)。



圖三、水膠的應用²。

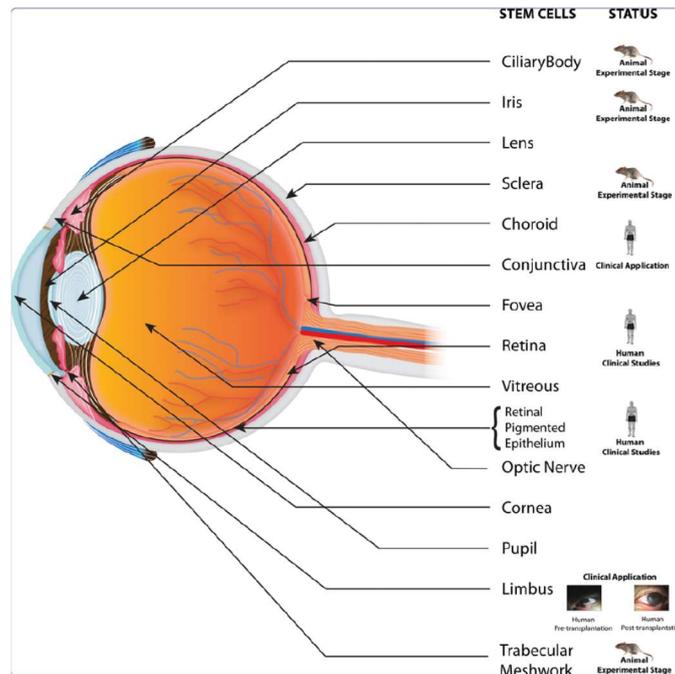
工研院生醫所研發出一種感溫水膠，在室溫下呈現液態狀，一旦注入骨頭細胞中，會隨著體溫呈現膠質狀，修補骨骼，也就是說往後骨頭受傷，開刀不會是唯一途徑。工研院溫感水膠最大優勢在於溫度感範圍較廣(25-55°C)，另外，此溫感水膠因裂解速度較慢，可有效適量釋放藥劑，減少用藥時產生副作用。溫感水膠顛覆的一般液態對溫度的物理反應，遇熱(>25°C)為固態，遇冷(20°C以下)為液態，溫感水膠的特質不只使用在植牙、修部骨缺、包覆各類藥劑還可應用到疫苗、皮膚照護以及口腔治療。「可吸收性溫感水膠」載體能準確釋放藥劑，可達到在人體內適時適量藥物釋放目的，具體來說，預期在使用水凝膠來遞送治療性蛋白質和肽的更多發展。未來工研院已將溫感水膠使用用於關節炎治療，預估未來也將搭配麻醉藥劑、止血劑及各項敷材臨床上應用。

水膠廣泛存在於日常產品中，它們的潛力尚未得到充分的探索。許多基於水膠的藥物輸送裝置和支架已經被長期學術研究和專利，在組織工程和藥物遞送中的醫療級水膠產品仍然受到商業化限制，真正進入醫療市場販售很少，在某種程度上與其高生產成本有關。未來這醫療領域上會有更多突破和商品化可行性。

四、生醫材料在眼科醫療上的應用

世界衛生組織(WHO)的統計顯示，全球目前的低視力患者已超過 2.53 億人，其中約有 65%為視覺障礙者並 81%失明患者年齡平均在 50 歲以上³。隨著全球人口老化及 3C 產品的普及，以老年人為主的眼疾白內障、青光眼、黃斑部病變以及糖尿病性視網膜疾病等，其患病率逐年增加並有年輕化之趨勢；除此之外，眼部疾病如乾眼症、結膜炎、葡萄膜炎(Uveitis)等的發病率也明顯上升。此現象促使全球眼科市場激增，也促進醫材醫藥公司增加投資研發之經費，用以提研出新型生物製劑產出更有效的藥物。眼科疾病患病率的增加，從全球眼科市場之潛力及成長可知，眼科植入式醫材市場預計至 2019 年將達到 26.9 億美元⁴，並且應用於眼科藥物之市場產值預計 2016 年至 2025 年將由 244 億美元成至 343 億美元⁵。就台灣而言國民健康署統計資料顯示，台灣每年白內障手術人口數約有 14-16 萬人次、黃斑部病變患者人數約 24 萬，大約每 10 個老人就有一人罹患黃斑部病變之疾病、眼睛組織之移植手術如眼角膜、玻璃體或是視網膜黃斑部等移植之人口數每年也有約 9200 位。由上述資料可知，眼科疾症將為未來人類迫切需要面對及克服之臨床問題之一。

眼科領域的再生醫學起步較其他科別早，原因在於眼睛之組織為與外部接觸之人體組織，一方面易於觀察並相對容易執行，同時眼睛也為人體免疫特權器官(immune-privileged organ)之一，對於外來物質具有較低之排斥反應。目前眼科運用再生醫學進行細胞治療的研究相當豐富，由眼外至眼內之研究及發展如圖四所示，資料顯示眼部的再生醫學研究從組織分類有如角膜、結膜、虹膜、鞏膜、脈絡膜、小梁網以及視網膜等⁶。



圖四、眼睛組織之細胞治療目前研發進度⁶。

由最外部的組織說起，角膜和結膜幹細胞治療目前已呈現具有眼表面重建之功用，角膜等眼表組織的再生經取得少量健康之角膜緣輪部幹細胞(limbal stem cell)進行細胞量的放大後再移植回角膜受傷的部位進行修復及再生。除了使用眼部細胞外，文獻上亦討論使用非角膜緣輪部幹細胞類進行角膜的再生，如口腔黏膜上皮細胞(oral mucosal epithelial cell)及骨髓間質幹細胞(Bone marrow mesenchymal stem cells)等^{7, 8}。文獻指出，使用患者自己健康之角膜輪部幹細胞進行培養後移植的案例，在進行多次的移植治療後將可使臨床手術成功率由原來的 68.5% 提升至 81.8%⁹。視網膜組織修復之再生醫學研究，文獻指出近年來以胚胎幹細胞衍生的視網膜色素上皮(Retinal pigment epithelium)已被用於治療黃斑部失養症和老年黃斑疾變的患者，另外，尚有使用誘導型多潛能幹細胞(induced pluripotent stem cell, iPS)衍生成視網膜色素上皮細胞，用以進行老年黃斑部變性之視網膜組織再生已進行臨床研究，目前仍在安全性評估之階段。除此之外，針對眼部虹膜、睫狀體和鞏膜的細胞治療目前仍處於動物實驗階段，而特定組織如虹膜色素上皮，睫狀體上皮和脈絡膜上皮幹細胞以及小梁網等細胞治療則尚在實驗室的研究中¹⁰。在於恢復視力的治療當中，角膜和視網膜為其至關重要的兩個區域，就眼表的角膜而言因患部相對容易進入，目前重新再造角膜上皮細胞並進行角膜修復的研究已相當成功，但距離重建全角膜的再生仍然具有相當大的挑戰性。而針對視網膜的修復而言，目前來說較可行的兩種方式分別為移植內皮前驅細胞(endothelial precursors)進行視網膜血管及神經元之修復，以及移植視網膜色素上皮細胞來減緩黃斑部病變的惡化並延長視覺功能的有效性等⁶。由上述資料可知，應用於眼科之再生醫學最接近商品化者為眼角

膜再生，最熱門之研究主題則為視網膜再生醫學領域。

眼部再生醫學在臨床上的應用，除了上述所需取得健康具功能性之細胞外，另一項關鍵之要素則是搭配適當之細胞培養載體。目前用於眼科再生醫學之細胞載體種類有取自人體組織的羊膜⁸以及生醫高分子如纖維蛋白膠(fibrin glue)¹¹、膠原蛋白(collagen)及合成性高分子，如這幾年較為熱門的溫感性高分子聚異丙基丙烯酰胺聚合物(Poly(N-isopropylacrylamide) polymer, PNIPAN)等¹²。目前最廣泛使用的載體仍以羊膜為主，主要原因在於羊膜取自人體並且不具致免疫性(immunogenic)，羊膜組織因含有IV型膠原蛋白、層粘連蛋白(laminin)及纖維連接蛋白(fibronectin)等因子，在吸引角膜細胞的貼附上發揮重要之作用。纖維蛋白膠亦為組織修復載體的選項之一，材料優勢在於具有黏性不需縫合並且文獻証實具有保護細胞活性之效果¹³。膠原蛋白載體因組織結構與眼組織最為相似，以能有效的降低材料抗原性(antigenicity)及與植入後與眼周邊組織之融合為目標進行開發，目前已進行至臨床研究¹⁴。PNIPAN 聚合物為溫度敏感型之載體，這種聚合物會隨著溫度改變逆轉聚合物之水合性質，若將培養溫度降低至30°C以下會使得高分子膨脹而讓細胞與載體完全分離，此種特性在細胞培養上相當具有優勢，能有效且容易的收取培養後的細胞，開發的目標則為確保載體本身不至影響細胞之特性為主¹²。

工研院研發適用眼科再生醫學基質之載體，以膠原蛋白基質複合生物可吸收高分子，製程技術製作成高透明且高含水之細胞載體，並開發輔助組織修復之角膜敷料(圖五)。載體及敷料材質具透氧度並通過ISO-10993之生物相容性試驗，經過細胞貼附測試對於人類角膜上皮細胞/內皮細胞、脂肪幹細胞(Adipose Derived Stem Cells)及間質幹細胞(mesenchymal stem cells)等具有良好之貼附性，用於角膜保護及再生醫學領域具有相當之潛力。



圖五、工研院眼科再生醫學細胞載體及角膜敷料。

有鑑於器官捐贈角膜組織來源的短缺，並移植後伴隨著病毒感染性的風險及移植後

可能造成的排斥反應，以再生醫學觀念開發新型、安全並有效的細胞移植方式，將可為目前臨床問題找到適當的解決方式。眼科的組織再生於角膜重建上已有顯著之成果，未來對於視網膜組織的重建以目前的臨床研究資料顯示也有樂觀之成效，因此再生醫學細胞治療將是未來提供恢復視力的有利手段，若能有效的定義取得之細胞及細胞載體本身之穩定性、安全性及有效性，進一步導入到產品化開發，將可切入到全球每年上百億美元¹⁵之細胞治療市場，帶動台灣整體生技產業，增加產業的競爭力。

五、3D 積層製造在醫療器材的應用

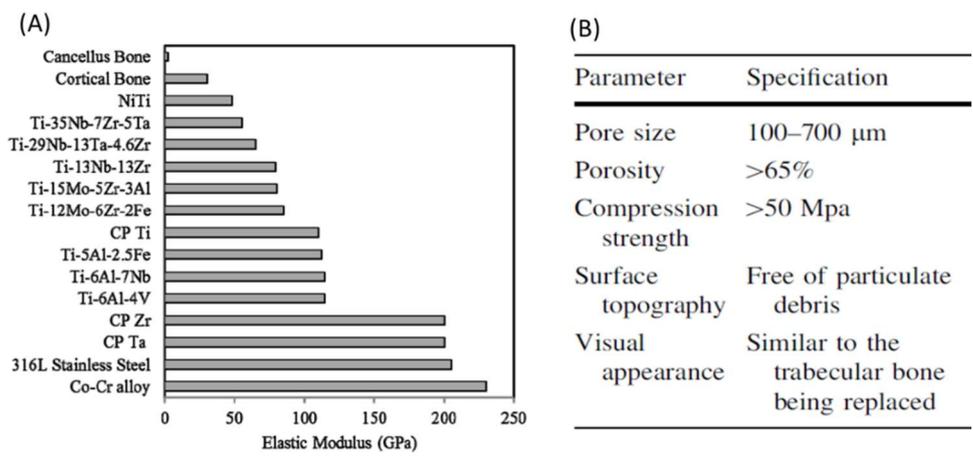
傳統骨科植入物加工技術多以電腦數值控制(Computer Numerical Control, CNC)進行加工，然而隨著醫材與工業領域的蓬勃發展，CNC 的加工瓶頸限制逐漸浮現，如對於表面粗化、孔洞結構、深槽深孔、中空、輕量化結構或複雜曲率的關節設計加工，以多軸 CNC 加工機部份技術特徵無法理想的製作。

雷射金屬積層製造技術，不同於傳統減法式或除料式的加工特性，採用逐層堆積製造之增材製造或加法製造(Additive Manufacturing, AM)，其製程為先通過電腦輔助設計(CAD)建立模型，再進行三維模型「分割」成逐層的截面，將此截面利用粉末狀金屬如鈦合金粉末用雷射熔融方式，通過逐層堆疊累積來構造物體，是一種以數位模型檔案為基礎的直接製造技術，幾乎可以製造任意形狀及內部結構的三維實體，其特色為可縮短複雜工件之製作工期，免除多道製程以及轉換加工機所需的時間，並且可使製造進入批量客製化的領域，大幅提升製造效率，因此本文將探討積層製造與傳統 CNC 加工於植入醫材應用，並以中空骨釘(Cannulated screw)為實例進行驗證及比較。

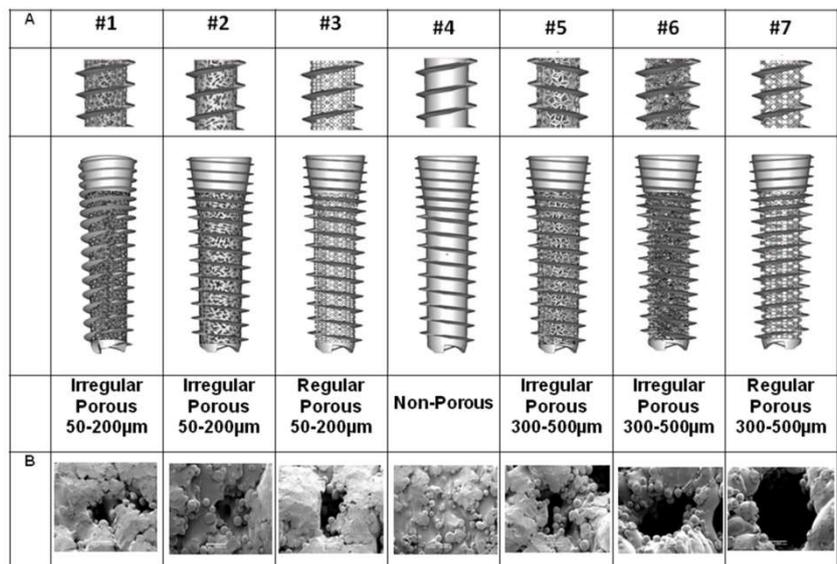
1. 3D 列印技術應用於中空骨釘植入醫材設計與開發

鈦合金製造的結構物具有相當廣泛的優點，如：強度高、耐磨損、耐腐蝕與機械性能良好等優點而被廣泛應用人體永久植入式重建支架的結構基材，包括骨釘、骨板、人工關節、心血管支架、人工心臟瓣膜、脊椎植入醫材與牙科應用等。然而近 10 年來研究發現傳統鑄造或鍛造的棒材經 CNC 加工法後的實心鈦合金植入物(Ti-6Al-4V)，其楊氏模數或彈性模數(Elastic modulus) 超過緻密骨(cortical bone) 3 倍以上，如圖六(A)，導致應力遮蔽效應(stress shielding effect)，造成植體周圍之骨質萎縮流失使骨融合不易，致使骨整合失敗，嚴重時會產生植體鬆動滑脫。且做為人體植入式醫材，通常植入醫材的壽命需要長達 12~15 年，而對於年紀大的患者，若面臨再次手術，致死率的風險將提高甚多。因此優良的人體植入式醫材結構設計必須具有誘導骨組織長入加速骨癒合，並達到骨整合效果以延長植體使用年限，因此文獻建議植入物的結構參數如圖六(B)。

然而植入物需要具備孔洞結構與足夠機械性能的概念很早就被證實，可是植入醫材如何將外部形貌、良好機械性質與具備生物相容性等特性作整合，更需要利用



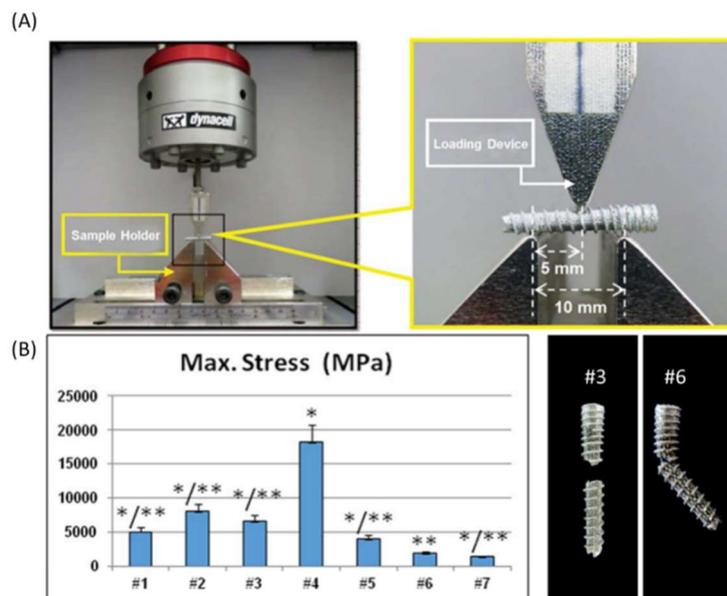
圖六、(A)植入式生醫合金之彈性模數¹⁶；(B)骨科植入物結構需求¹⁷。



圖七、雷射製作生醫骨釘 ITR I：(A)外觀與孔洞結構參數設計；(B) Scanning electron microscopy (SEM) 影像圖。

新穎 3D 列印仿生數位化製造技術，藉由醫療影像取得病患的個人化數據作為客製化外部形貌設計，分析病患骨質密度設計出個人化植體內部孔隙度與適當孔洞結構，如同人體具有緻密骨與疏鬆骨的仿生結構，透過 3D 列印特殊成形的製造方式來達到多量聯通孔洞，且具微小孔隙之結構體，故使該類植入物獲得更適合的力學強度、支撐效能、結構型態及表面特性，可讓骨質密集地向內生長，並解決現有臨床上所遭遇的問題。所以工研院運用選擇性雷射熔融技術(Selective laser melting, SLM)，配合微細粉體鋪層技術及相關軟、硬體系統，完成上述多孔性植入式生醫中空骨釘 ITRI 之研製工作，其產品與 SEM 分析如圖七。

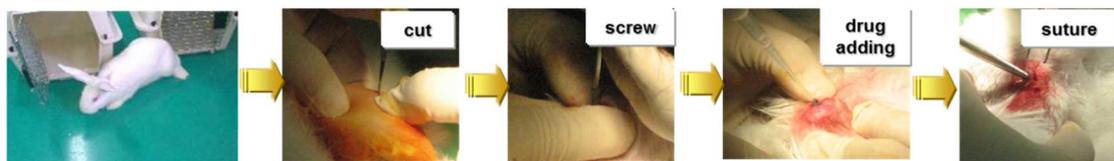
多孔性植入式生醫中空骨釘 ITRI 經過 3 點抗彎力學試驗的結果如圖八，最大應力範圍是 1358-18179MPa。由於全部骨釘樣品具有相同的形狀，抗彎力學強度隨著支柱體積的減小、孔徑增加或孔隙率降低而顯著降低。對於多孔骨釘植入物而言，孔洞的不規則排列也似乎導致比規則孔洞具有更好的機械性能。



圖八、雷射製作生醫中空骨釘 ITRI 體外力學測試：(A) 三點抗彎(3-point bending)力學測試架設圖；(B)中空骨釘 ITRI 三點抗彎力學測試結果。

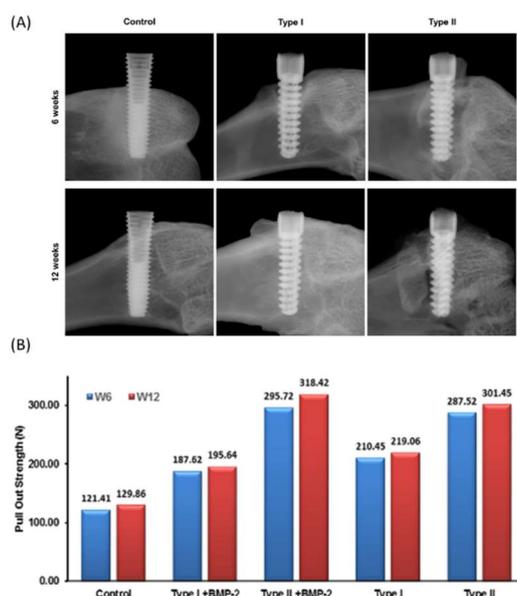
2. 3D 列印醫材的臨床前動物實驗效能驗證

醫療器材為達成宣稱功效及符合宣稱規格之準則，除了安全性和功能性體外力學的測試外，實驗動物的參與是不可或缺的一環，不僅僅在驗證醫材的臨床功效性上，也進一步為醫材在人體使用上之安全做把關。雷射製作生醫骨釘 ITRI 動物實驗規劃將二十四隻成年 1 歲的雌性紐西蘭大白兔(New Zealand white rabbit)隨機分為對照組(市售之骨釘)和實驗(多孔)組。實驗組分為五組：group A (市售之骨釘)、group B(type I 骨釘不含生長因子 BMP-2)、D (type I 骨釘含生長因子 BMP-2)以及 group C (type II 骨釘不含生長因子 BMP-2)與 group E(type II 骨釘含生長因子 BMP-2)，其中 type I 骨釘等同圖八的#3 骨釘，type II 骨釘等同圖八的#6 骨釘。實驗中將控制組與生醫骨釘植入物 ITRI 插入左右腳的股骨股關節處，其流程如圖九。紐西蘭白兔六週和十二週飼養後犧牲，用 micro-CT 分析骨長入與進行拔出力學測試評估骨融合效果。



圖九、以紐西蘭大白兔來進行雷射製作生醫中空骨釘 ITRI 之手術植入過程。

從圖十(A)的 micro-CT 結果可看出，相較於控制組及實驗組的兩個組別，於骨釘孔隙處可看到較緻密的類新生骨組織，顯示具有較佳之生物相容性，骨細胞較易生長進孔洞骨釘內。六週與十二週拔出力學測試(pull out test)結果，我們使用為 5 mm/min 的速率拉至完全鬆脫後作為實驗時間的結束。結果如下圖十(B)，控制組較容易拔出，只需約 120 N 的力量即可鬆動。相較之下，type I 的骨釘無論是否攜帶 BMP-2，都較於市售組別有較高的力學強度(約 190 N 以上)。type II 的組別具有最高的力學強度(約可高達 300 N 的強度)，添加 BMP-2 的生長因子理論上應該有明顯的骨融合效果，但是對於雷射積層製造的生醫骨釘在拔出力學效應上的提升影響有限，由此可見雷射積層製造的生醫骨釘具有優良的骨融合效果。



圖十、生醫骨釘 ITRI 動物實驗效能驗證：(A) micro-CT 分析骨長入；(B)骨釘植入後六週與十二週拔出力學實驗。

積層製造技術具有新的設計與製造思維，此技術未來會廣泛影響各種產業，工研院於 2012 年引進國內第一台金屬材料雷射 3D 列印設備，進行各種鈦合金、鈷鉻合金、不鏽鋼等生醫材料開發，應用於具仿生結構設計的中空骨釘、牙根、軟硬組織修復裝置、人工關節及脊椎之椎間融合裝置等產品，並進行動物試驗及產品效能驗證，目前已有很好的成效。未來在 3D 列印設備日趨普及、材料成本降低的趨勢下，結合 3D 列印靈活設計的優點，可針對不同患者的需求進行個人化精準醫療的設計，相信能協助再生醫學產業創造更多差異化及高值化之關鍵新穎產品。

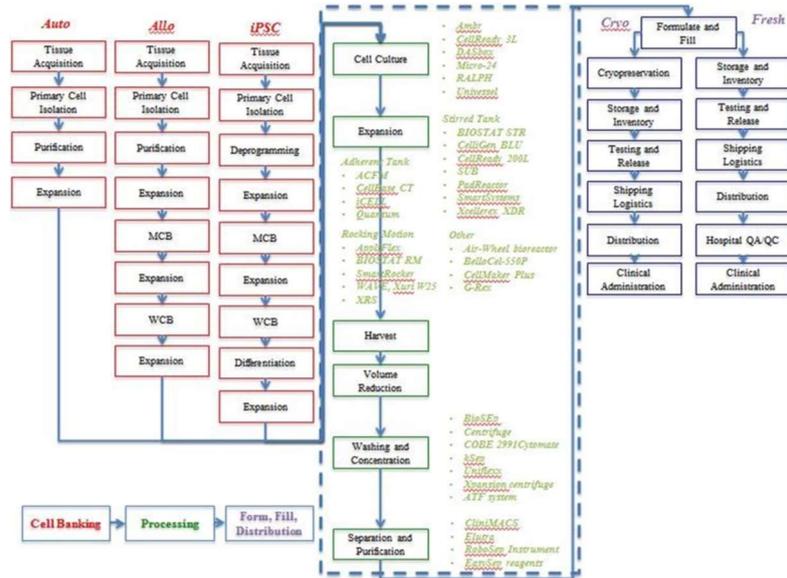
六、細胞治療產品研發與 GTP 細胞工廠之營運

隨著細胞研發技術不斷的精進及成熟，疾病治療的科學證據亦越來越明確顯著，國際間上市產品與日俱增，市場接受度(market adaptation)亦日漸增高，目前細胞治療產品主要可分為三類，分別為癌症免疫細胞治療(免疫細胞、嵌合抗原受體重組 T 細胞-CAR-T)、幹細胞治療(以間質幹細胞為主)，及體細胞(如纖維母細胞、黑色素細胞等)治療，其療效可達到傳統藥物無法達到之組織再生效果，具有傳統技術及藥物之無可取代性，為生醫技術高值化的重要手段之一，許多國際藥廠及醫療器材大廠都投入研發，希望能提早佈局，在此新興產業佔有一席之地。

迄今全球細胞治療公司約有 225~300 家，若不計入學術研究單位案例，約有 324 項細胞產品於臨床試驗階段發展商業化。近年來除了創投公司對此新興產業投入大量資金

及高度興趣之外，國際上許多大型藥廠或醫材廠亦投資大筆資金在細胞治療產品研發上，或進行併購及投資細胞治療公司。例如：Osiris Therapeutics 的 Prochymal 為全球第一個核准的幹細胞藥物，應用於治療兒童的急性移植物抗宿主病。2013 年 Osiris 將 Prochymal 和 Chondrogen 以 1 億美元出售給 Mesoblast，之後 Mesoblast 與 JCR 達成幹細胞合作協議，JCR 於 2015 年以 TemCell® HS 的名稱獲得日本上市許可並取得 Prochymal 的日本銷售權。富士軟片(Fujifilm Holdings)於 2015 年以 3.07 億美元收購 Cellular Dynamics International(CDI)，結合富士的高度生物相容性重組胜肽與 CDI 的 iPS 相關技術，開發更好、更安全的藥物和新型幹細胞療法。日本 Astellas Pharma 也於 2015 年以 3.79 億美元收購美國 Ocata 胚胎幹細胞技術，發展商業化眼科之再生療法。除了幹細胞外，2017 年為細胞免疫療法元年，美國 FDA 核准諾華(Novartis)旗下的用於治療復發性和難治性 B 細胞急性淋巴細胞白血病(ALL)的 25 歲以下患者 CAR-T 療法 Kymriah (tisagenlecleucel)上市。另外；Gilead 以 119 億美元現金收購 Kite Pharma，目前 Kite 所開發的 CAR-T 產品 Yescarta™esaxicabtagene ciloleucel 已獲得美國 FDA 核准上市，成為 FDA 批准的第一個治療非霍奇金淋巴瘤(包括瀰漫性大 B 細胞淋巴瘤、轉化型濾泡性淋巴瘤、原發縱隔 B 細胞淋巴瘤)的 CAR-T 產品。由這些與日俱增的商業投資及併購案例，在在顯示細胞治療產業的未來發展潛力。

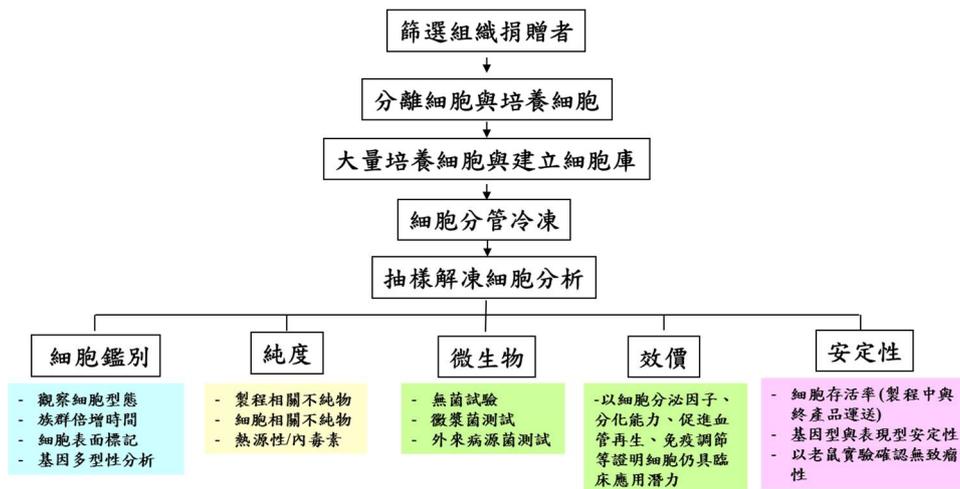
目前 TFDA 將細胞醫療產品以藥品來作產品驗證規範而美國 FDA 則以生物製劑管理，因此；細胞治療產品商業化生產(俗稱量產)是必須的，亦即需量產具安全、均一、高度穩定及規格明確的細胞原料，以提供穩定的細胞供臨床使用。此外；細胞的終產品無法滅菌，醫療級細胞產品必需在符合 TFDA 所規範的 GMP 細胞生產設施及 PIC/S GMP 中所建立，以確保製造的過程中不受到微生物污染，保障細胞植入物之安全性。所生產的細胞需符合臨床醫療用細胞產品相關法規要求，包括 TFDA 的「人類細胞治療產品捐贈者合適性判定基準」、「人類細胞治療產品臨床試驗申請作業與審查基準」；「體細胞治療人體試驗申請與操作規範」；「人體細胞組織優良操作規範」；「人體器官、組織及細胞優良操作規範」；以及美國 FDA 「CFR-Code of Federal Regulations Title21, PART 1271 Human cells, tissues, and cellular and tissue-based products」與國際法規 International Conference on Harmonisation (ICH) ICH Topic Q5D, ICH Topic Q5A (R1)等法規。現行法規規範下人類細胞治療產品製程與製程管控，需將細胞治療產品製造與純化時所用使用的各種程序作詳細描述，並提供製造過程流程圖，且在圖中指出生產與純化過程及製程中與最終產品測試(圖十一)，此外；細胞治療產品由於原料是活細胞，在本質上就具備有多樣性及不穩定性，因此；在細胞治療產品品質管理中需檢測微生物測試、純度分析、安定性、鑑別測試、效價…等以確保細胞的穩定性(圖十二)。



Source : Rahul Rekhi, University of Oxford

圖十一、細胞產品製程。

細胞產品品管流程圖

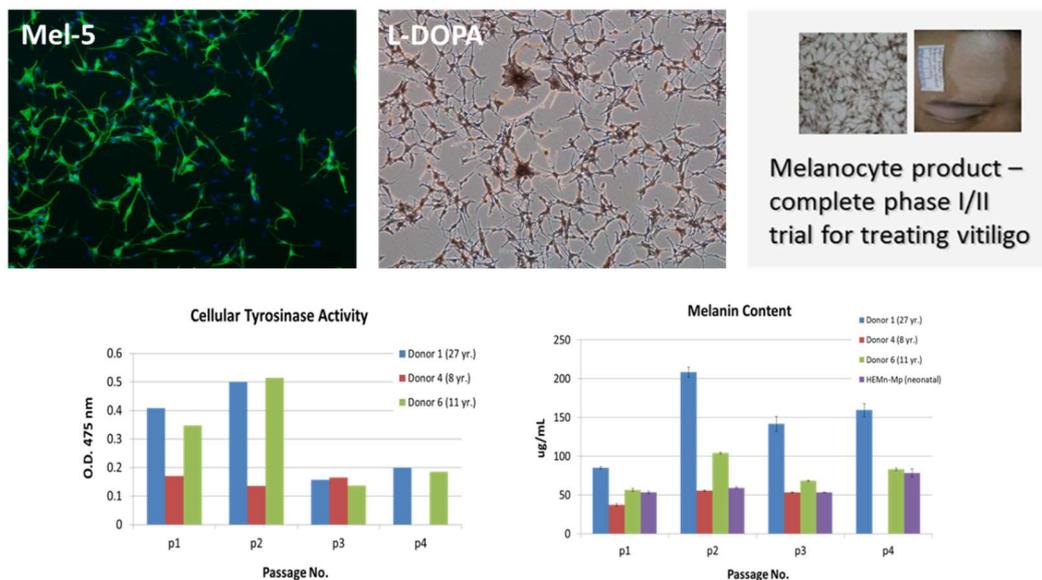


圖十二、細胞產品品管流程圖。

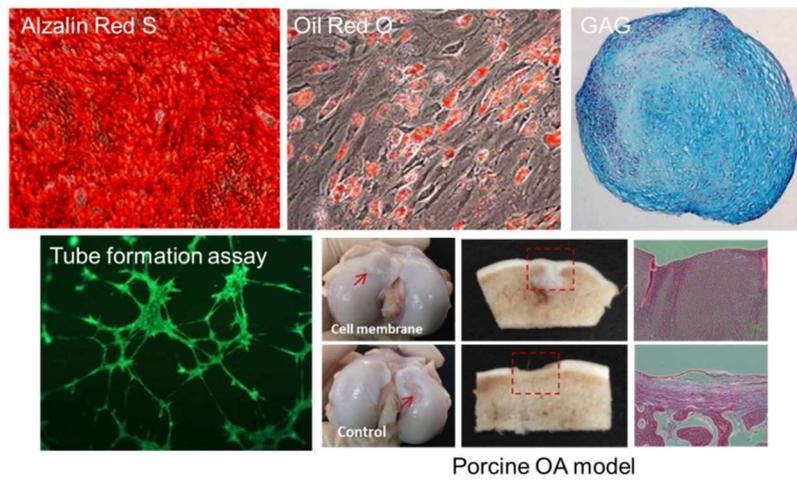
工研院生醫所利用工研院符合衛福部 TFDA 所制定之『人體細胞組織優良操作規範』及國際規範的細胞製備工廠，並依據人類細胞治療產品臨床試驗申請作業與審查基準相關規範生產華人黑色素細胞庫並建立品管標準(圖十三)，以工研院研發之 ITRI-M 培養基來分離培養黑色素細胞，可獲得足夠量的細胞供臨床使用，並以 Mel-5 和 L-DOPA 染色確認黑色素細胞的純度，以細胞內酪胺酸酶活性(tyrosinase activity)及黑色素(melanin)含量來判定黑色素細胞功能。此細胞已進行白斑症臨床 I/II 試驗，臨床試驗結果顯示黑色素細胞植入患部後，可改善患者膚色。除此之外；亦使用華人黑色素細胞建構含黑色素細胞仿生表皮組織，可應用於化妝品原料之美白/美黑功能測試。

除了黑色素細胞庫外，工研院生醫所亦建置骨髓間質幹細胞庫(BMSCs)，並將其製程標準化、品管規格化及生產工業化/商品化(圖十四)，以工研院研發之無血清培養基培養，細胞可達到量產的水準、培養 9 代仍具有分化能力且表面抗原均符合 ISCT 規定，亦具有血管新生的潛力。在豬的退化性關節炎動物模式中可促進豬軟骨再生。

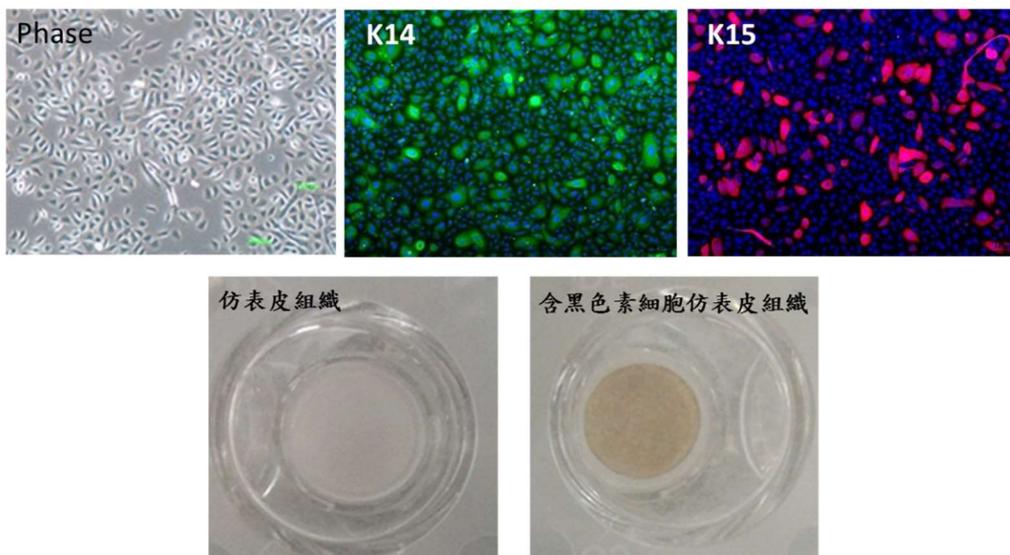
與皮膚相關之細胞產品除了華人黑色素細胞庫外，工研院生醫所亦建立人類角質細胞，以未分化細胞標記(K14 和 K15)確認細胞品質，並且利用所建立的人類角質細胞及黑色素細胞建構仿表皮組織，可應用於華人/亞洲人的化妝品及相關產品開發(圖十五)。



圖十三、華人黑色素細胞庫鑑定與應用。



圖十四、骨髓間質幹細胞庫(BMSCs)鑑定與應用。



圖十五、人類角質細胞庫鑑定與應用。

隨著細胞治療相關技術蓬勃發展，臨床上需求不斷增加，各國法規單位陸續核准細胞治療產品，因此；如何能具備合乎法規且有標準化製程、如何選擇對疾病治療具有功能性之細胞和自動化技術降低細胞製備成本，將是細胞治療產品未來在商業化過程中扮

演關鍵的角色。

細胞治療產品製造場所 GTP 維運方面：細胞治療可達到傳統藥物無法達到之組織再生效果，單價及獲利均高，但產品生產技術不易，進入門檻極高。由於細胞本身異質(heterogeneous)的特性，增加了產品製造生產的複雜度，加上繁複的量產流程及法規上的考量，尤其是細胞治療產品還包括異體(allogeneic)及自體(autologous)產品二大類，其中異體產品需考量細胞庫建置、數量及完整的品管檢測，而自體產品之生產製造為 patient-specific，製造生產為單一批次生產每個病人的細胞，生產製造又與異體產品考量點不同，因此細胞治療產品生產製造的複雜程度是一般傳統藥物所不及的。為使產品具競爭力，如何降低此類高的生產成本，例如考量物料成本(costs of goods)、產程最適化(process optimization)的策略、生物反應器(bioreactor)/密閉系統生產(closed-system manufacturing)及自動化生產及資料處理(automation of manufacturing process and data management)等細胞製造相關技術，為細胞治療產品開發的重要課題。

細胞治療產品難以像藥物或生醫材料，能夠完整分析產品規格特徵，因此細胞產品規格需以「製造流程」來輔助定義產品內容。類似產品仍須作完整的臨床試驗，是此產業最大的挑戰，但也是產業中創造獨門的機會與優勢。一旦產品上市，將可能獨占市場，競爭力高，後繼者難以模仿及追趕。細胞治療產品在歐洲歸屬於 Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP)，在美國為 human cells, tissues, and cellular and tissue-based product (HCT/P)，上市路徑類似生物製劑，需經過一至三期臨床試驗，證明安全、有效與品質，在台灣申請 New Drug Application (NDA)、在美國則是申請 Biologics License Application (BLA)核准上市。美國 FDA 將細胞治療產品由 Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) 審查及管制，台灣 TFDA 則未另外設置細胞治療產品的專責審查及管制單位，將細胞治療產品歸類為新興藥品，由 TFDA 藥品組負責審查、給證、備查及管理。

由於細胞治療產品無法終端滅菌(terminal sterilization)的特殊性，「製造」為細胞治療產品開發過程中最大的瓶頸之一。我國「人類細胞治療產品臨床試驗申請作業與審查基準」(9/17/2014，部授食字第 1031408234 號公告)行政規則/指導(Guidance)明文規定：臨床試驗的「人類細胞治療產品之製造方法、設施及管制措施，包括人體細胞組織提供者之篩選與檢驗、人體細胞組織物之採集、處理、貯存、標示、包裝及配送等過程應符合「人體細胞組織優良操作規範」(Good Tissue Practice, GTP)」。而上市的細胞治療產品製造場所除了需符合 GTP 之外，還需要符合 PIC/S GMP，明訂於「人類細胞治療產品查驗登記審查基準」(7/13/2015，FDA 藥字第 1041406449 號)：「申請查驗登記的人類細胞治療產品，其細胞或組織檢體的採集和製造，須符合優良組織操作規範(Good Tissue Practice, GTP)，以及藥品優良製造準則之西藥藥品優良製造規範(Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme Good Manufacturing Practice, PIC/S GMP)」。因此，細胞治療產品在進入第三期臨床試驗前，最好取得 PIC/S GMP 製造品質，以便與上市的產品製造銜接。對於細胞治療產品之組織來源，亦需遵循「人類細胞治療產品捐贈者合適性判定基準」(10/2/2015，FDA 藥字第 1041409729 號)。上述這些指引規定，主要希望

能確保細胞治療產品於取得來源、生產製造及運送等過程中不受到病原菌污染、或避免發生不同批次或產品之間的交叉污染。

細胞治療產品上市需經過三期臨床試驗，申請試驗藥品臨床試驗(Investigational New Drug, IND)時，除了提供臨床試驗計畫書(protocol)、受試者同意書(informed consent form)、主持人手冊(investigator brochure)、製造管制文件(Chemistry, Manufacture and Control, CMC)、產品品質證明文件(最終產品檢驗規格成績書及產品安定性試驗)及非臨床試驗(動物毒理、安全性試驗)等資料，在我國 TFDA 風險管理組需針對臨床試驗申請案進行細胞製造場所的 GTP 查核(GTP inspection)。細胞製造場所肩負產品製程重責大任，為確保符合 GTP 法規的要求，一個好的細胞製造場所通常需具備以下管理原則：

- (1) 運作團隊：需包含製造、品質管制、物料管理、儀器管理、文件管理、品質保證、清潔人員及廠務工程師等負責人員，各司其職並設有合格被授權的代理人，以確保人員的運作不間斷。
- (2) 環境監控：細胞製造場的溫度、濕度、壓差、機儀運作、環境微粒子、環境微生物之監控，以確保環境符合法規標準。
- (3) 設施設備及機儀：機儀設備需進行 3Q (安裝驗證 IQ、操作驗證 OQ、及性能驗證 PQ)，並進行日常清潔、批次清潔維護、及週期性的確認校驗，以確保機儀設備運作正常。
- (4) 物料管理與確效：倉儲區包括待驗區、合格區及不合格區，物料進、出貨記錄及定期清點，定期或不定期進行物料的批次確效，以確保合格物料之使用。
- (5) 文件管理：制定品質文件系統、標準作業程序及記錄，並進行定期及不定期之文件審閱修訂，以確保文件及時更新。
- (6) 品質管制：建立細胞品管測試方法、執行測試、確效及能力比對，以確保生產製造的細胞產品品質。
- (7) 稽核及管理審查：進行內部稽核及年度管審會，以定期及不定期檢視及檢討細胞製造場所之運作情形，檢討不符合事項、進行異常事件調查，必要時擬定計劃、進行改善措施。

細胞治療產品開發需要長時間與大量經費支持，及符合 GTP 規範的細胞製造場所配合，生產穩定、高品質、量產的細胞，以提供臨床試驗或常規治療之用。細胞治療公司依其營運模式，生產製造細胞通常有二種方式，一是自行擁有及管理細胞製造場所，此種方式的初期投資較大，需要投入大量資本及人力，進行廠房的建置、營運及專業的管理，但較能掌握細胞產程機密資訊與細胞品質，國際公司如 Sanpower group(前身為 Dendreon)及 Vericel(前身為 Genzyme)等企業即以此模式進行細胞生產製造上市細胞治療產品，國內僅少數細胞治療公司如仲恩生醫(Steminent Biotherapeutics)具備此能力。另一類型則是選擇適合的委外生產代製單位(contract and development manufacturing organization, CDMO)，由具備經驗的 CDMO 協助進行產程開發及代製，此種方式早期投資金額較小，對於中小型 start-up 公司的營運較具彈性，國外上市產品如澳洲 Mesoblast

公司的異體間質幹細胞產品 Prochymal 即採用委外代製方式，委由 CDMO Lonza 集團進行細胞生產製造，估計於國外委外生產代製的細胞產品約占一半左右。

國際上現有約 20 家細胞治療產品 CDMO 公司，較具規模者多位在美國及歐洲，僅少數在亞洲，例如包括：Angel Biotechnology(UK)、Apceth(Germany)、Bio Elpida(France)、Brammer Bio(US)、Cell and Gene Therapy Catapult(UK)、KBI BioPharmaceuticals(US)、Lonza AG(US and Singapore)、MaSTherCell(Belgium)、Medinet(Japan)、PCT/Caladrius(US)、PharmaCell(Netherlands)、WuXi AppTec(US)等，國內則僅有艾默生醫(EMO Biomedicine)及工研院細胞製備工廠(ITRI Cell Manufacture Facility)提供委外生產代製服務。不像一般傳統藥品具長時間的保存期及使用的便利性，細胞治療產品的保存、運送及使用，有其保存期限及運送條件的侷限性及專業，因此細胞代製廠的地理位置需位在可接受之地區，以涵蓋其區域性市場的範圍。委外代製有洩漏公司製程機密的可能性之缺點，不過，好處是可以減少廠房及人力投資、初期可較有效率及彈性運用資金，並由外部專業團隊協助，提升產品的生產量(scalability)及加速產品的開發時程(speed to market)，因此建議中小型或草創時期的公司可採取委外代製模式進行產品開發及生產，較具成本效益(cost-effective)。

七、細胞培養基之研發生產與寵物醫療試行

從 Genentech 公司在 1978 年以基因工程技術製造出第一個基因重組藥物胰島素，並於 1982 年獲准上市開始。胰島素的成功上市，刺激了生技製藥業的蓬勃發展，並吸引了大量人力與資源的投入，並在 2004 年造就了 158 億美元的銷售額，也因此生技醫藥構成了目前生物技術當中最重要的一塊領域。目前生技醫藥領域的主要產品包括了蛋白質藥物、疫苗、基因治療、癌症治療以及細胞治療等。其中蛋白質藥物及疫苗產業是生技醫藥領域中發展最為快速的一環。生技製藥領域需運用各類細胞培養技術來生產具商業價值的生技產品，包括許多方面，包含了醫藥用蛋白質、基因藥物、病毒疫苗以及單株抗體等。而且生技製藥領域的收入中，有超過 70% 是從這些動物細胞培養製程而來的，而且正在持續增加中。生技工業級利用生物反應器(發酵槽)製藥，有 60%-70% 的收入，也是從動物細胞大規模培養製程來的，而這些以培養細胞為主體的生技產業，其共同的需求就是要以大量的培養基來培養細胞。從蛋白藥物、疫苗以及基因與細胞治療等從研發、試量產、臨床測試到產品上市的過程來看，都需要經過培養基的研發和複雜的培養基篩選過程，確認培養基後其接續的試量產、產品量產皆須要大量的使用培養基。因此，這些以培養細胞為主體的生技產業其培養基的使用成本佔所有研發與製程的 40%-60%，由此可看出培養基在此產業的重要性。

以培養基培養細胞是生技醫藥領域的基礎技術，細胞培養除基礎培養基之外一般皆需要添加 5%-20% 來自胎牛的血清，血清內含有豐富的生長因子與細胞生長相關的各類營養成分，因此添加血清可以快速促進細胞生長。自從牛隻爆發狂牛症(bovine spongiform encephalopathy)案例以來，人們開始注意到細胞培養中添加胎牛血清的安全

性疑慮，尤其是運用在人類醫療的生技醫藥產品。為了讓細胞醫藥產品更為安全，在細胞培養添加血清會有幾個缺點：

- 血清的來源帶有傳染病源，甚至有人畜共通傳染疾病的可能性。
- 因血清成份複雜無法確知，其化學組成可能導致不利影響，且其高蛋白質含量亦不利於下游產品純化與回收。
- 也由於成份的複雜，牛隻來源組群不同，造成批次間品質差異甚大。

基於生物安全以及上述疑慮的考量，不需要添加血清就可以培養細胞之無血清培養基技術的發展也顯得愈來愈重要，國際各大藥廠亦開始積極地投入發展。

細胞培養技術中常用的無添加血清培養基分類有：

- (1) 無血清培養基(Serum-Free Media, SFM)，只要沒有添加任何來源血清就屬於此類。
- (2) 無蛋白質成分培養基(Protein-Free Media, PFM)，此類培養基成份除不含有血清外，亦不能含有任何蛋白以及分子量大於 10 Kds 以上的多肽(polypeptides)，但可以添加小分子蛋白水解物(hydrolysate)，如：大豆水解物(soybean hydrolysate)。
- (3) 化學可定義培養基(Chemically Defined Media, CDM)，除不含有血清外，不能含有任何蛋白以及大分子量多肽，也不能含有小分子蛋白水解物，完全不能含有任何未知的成份。
- (4) 無動物成分培養基(Animal Component-Free Media, ACFM)，此類培養基需具備化學可定義培養基，且其任何成份皆不能來自動物。
- (5) 無異源成分培養基(Xeno-free Media, XFM)，這類培養基是比較特別，廣意是可以為含或不含血清，其各類成份不能來自動物，但可以是來自人類，這類培養基稱之。以上各類培養基會依製程需求、應用目標需求和品質需求的不同來選擇使用。

細胞培養相關試劑市場在 2011 年已有約 26.4 億美元，2015 年來到約 40 億美元，其中無血清培養基於 2005 年佔細胞培養相關市場 24%到 2012 年已經提升至 42%，2012 年後無血清培養基每年會以 3%的成長率增加，至 2015 年就會達約 20 億美元的市場值，未來將會有可觀持續成長率。全球各大生技公司正積極投入利用無血清培養基培養動物細胞，用以生產蛋白質藥物、疫苗及細胞治療的技術開發，當然無血清培養基的研發也被國際知名培養基大廠列在重要研發目標，並已經有相當的經驗和成果。反觀國內生技產業起步比歐美先進國家晚，大規模細胞量產製程研發人才較為缺乏，無血清培養基的研發更是缺乏經驗，只能依賴和遷就在篩選使用現有已商業化的培養基產品，一方面不是最佳化，二是生產成本受到國外培養基販售公司牽制。因受限上述兩大因素，至使台灣生技產業一直無法快速進步。所以台灣需要積極投入培養基開發及製程經驗的累積，加速建制置培養基研發能量，以協助國內生技醫藥產業研發自有最適化培養基之研發及製造，不用再依靠和受限於國外培養基公司，前期用以協助國內產業生產符合品質要求之

培養基自給自足，以掌握自主性，進而促使台灣生技產業快速的進步，提高國際競爭力。

為解決國內生技醫藥產業所欠缺的培養基研發和培養基 GMP 量產能力兩環節，工業技術研究院生醫與醫材研究所整合細胞無血清培養基之研發能力及 GTP/GMP 之經驗，建立培養基研發及 GMP 試量產平台工廠及試量產能力，以協助國內生技醫藥產業研發自有最適化培養基之研發及製造，不用再依靠和受限於國外培養基公司，前期用以協助國內產業生產符合品質要求之培養基自給自足，以掌握自主性，提高國際競爭力；待累積足夠之能量將與國內通路公司跨足大陸市場進而佈局全球。

細胞治療人體臨床與法規驗證需要非常完整的數據與文件，在過程中，工研院生醫所運用寵物醫療之實施與試運行，作為人體臨床應用的前導嘗試。隨著科技的進步、社會結構的不同與人們思想的改變，台灣每年新生兒出生人數持續下滑，根據行政院農委會統計數據顯示貓狗等寵物飼養數量卻逐年增加，台灣從 94 至 104 年短短 10 年當中，狗的飼養數量從 114 萬攀升到 173 萬隻，養狗的人口比例高達 25%，家貓數量從 22 萬增加到近 60 萬隻，養貓則約有 4%，每三個人當中就有一個人有養狗或養貓，也就是說狗和貓的總數已經約有台灣總人口的十分之一，而且持續增加。寵物填補了因晚婚、少子化和高齡化等家庭結構改變後的空虛，因此寵物需求的產業市場量每年快速成長，市場樂觀預估台灣寵物市場的產值將高達約 300 億元以上，新興的寵物經濟市場正在逐漸起飛中。

隨著寵物飼養量的大幅增加，以及寵物在家族成員扮演重要角色日益提高，寵物的醫療也逐漸被重視。市場數據顯示，全球寵物醫療市場在 2013 年至少有 80 億美元以上的規模，一般預估寵物醫療市場將會以 7.86% 成長率持續上升，到 2019 年將會來到 130 億美元以上的經濟規模。也因應寵物醫療市場的需求，獸醫師的人數以每年至少約 200 位的速度增加中，目前獸醫人數已達 4 千多人，獸醫院亦以每年新開 100 家的速度增加。台灣不落其後正趕上這波市場的潮流。

寵物醫療與人類醫療一樣都有各種疾病與治療的模式，細胞治療也廣泛被運用在寵物身上，其中幹細胞醫療常被用在治療寵物的各種組織損傷和退化性疾病，例如：韌帶損傷和骨關節炎等疾病。幹細胞(Stem Cells)是身體內還未分化的初始細胞，可以自我分裂增殖，以及分化成各種不同特定功能的細胞。這種具有再生及分化能力的初始細胞，稱之為幹細胞。間質幹細胞(Mesenchymal Stem Cell, 簡稱 MSC)是其中一種幹細胞，他分屬於成體幹細胞，源至於胎兒早期發育之中胚層，屬於多潛能性幹細胞，具有高度自我分裂增生及多向分化的能力，可分化為軟骨、硬骨細胞、脂肪細胞、神經細胞、肝臟細胞以及肌肉胞等。因其具有再生與修復組織的能力，因此常被運用於組織受損、再生或各種老化疾病的治療。

早期動物幹細胞醫療可追溯到 2003 年美國將自體幹細胞使用在賽馬發生嚴重肌腱、韌帶的損傷治療上並且後續的商業化。當時的獸醫師已能進行馬的韌帶損傷、肌腱損傷、骨關節炎等相關的幹細胞治療。更在幹細胞治療商業化後，專業的獸醫師已能運用動物自體的幹細胞來治療動物的骨關節炎、韌帶損傷以及肌腱損傷等疾病。至目前為止，已有許許多多治療成功的案例，也已有許多針對狗或貓幹細胞治療的研究，這包含

了骨關節炎、神經受損、肌腱和韌帶損傷、皮膚炎、角膜損傷和腎臟疾病等，並且證實了幹細胞運用於寵物醫療臨床上的效果，這些成果說明了幹細胞於寵物醫療臨床上的運用價值與潛力，但至今幹細胞應用於寵物醫療並還未被廣泛的使用與重視，因此還具有相當大的發展空間。

人類疾病的發生與病程和寵物疾病有許多相類似的方面，其治療的模式與用藥更是相近。在積極發展人類醫療的同時，若也能顧及寵物醫療的研發和運用，這將可對人類與寵物有莫大的幫助。在寵物醫療上許多的治療經驗與模式，將可以運用於人類各種相對疾病的治療，使人類醫療的發展更趨快速。寵物醫療的發展不僅可以嘉惠於人的好朋友寵物外，也可以造福於人類自己，換句話說：寵物醫療是人類醫療的前哨站，也應加以重視。

工業技術研究院生醫與醫材研究所為奠定幹細胞再生醫療技術能力與未來應用潛力，近年來積極以自行研發的高效率間質幹細胞無血清培養基為基礎，開發了無血清間質幹細胞體外快速增殖細胞量產技術，先期將該量產技術運用於寵物醫療並且建立了數個狗和貓的間質幹細胞庫，同時建立細胞針劑保存與運送技術。工研院生醫所為加速幹細胞醫療產品化之進程，積極與國內寵物醫院合作進行寵物幹細胞醫療臨床試驗。於2015年發表了第一隻拉布拉多犬髖關節退化治療成功的案例，後續自今亦有不少狗骨關節炎在這技術治療下減輕或恢復的案例，並且持續進行臨床治療試驗以收集更多的臨床數據。工研院在進行寵物醫療臨床試驗中累積許多的臨床數據和經驗，這些經驗除了可以使寵物幹細胞醫療趨完善外，更能將這些治療的經驗與技術應用於未來的人類醫療並加速其進程，寵物和人類共蒙其利。

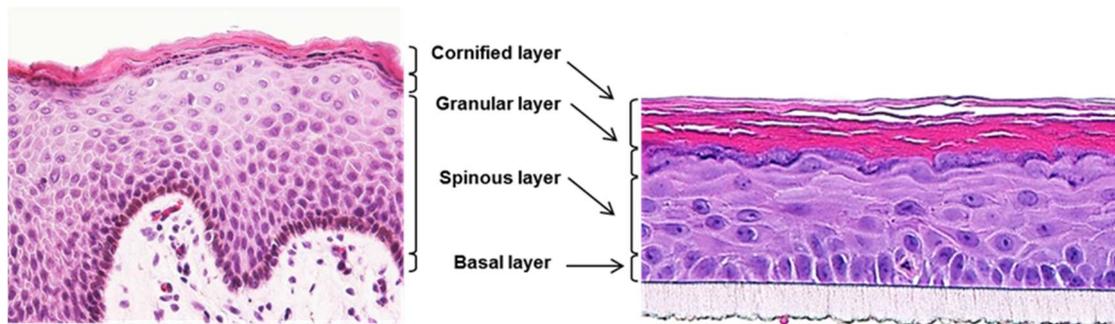
八、仿生皮膚組織的開發與驗證

皮膚是人體面積最大的器官，面積約 1.5 至 2 平方公尺，重量則是約為體重的 15%。皮膚也是人體最重要的第一線防護牆，皮膚的損傷，造成病原的入侵、水分的流失、體溫的失調，當損傷面積超過一定比例，將會危及生命之維持。1960 年代開始嘗試使用人工材料合成的人工皮膚來治療燒傷病人。人工皮膚經過三十年的努力，終於獲得具體成果，Organogenesis 公司所生產的 Apligraf，為具有活細胞的人工皮膚組織，目前已通過美國食品藥物管理局(FDA)認證，臨床上證實對腿部潰瘍有不錯的療效。皮膚為組織工程技術中，發展較成熟的技術。相較其他組織工程技術發展一直無法有很好的突破，可能原因在於現有的技術無法製備生產出複雜的組織結構。

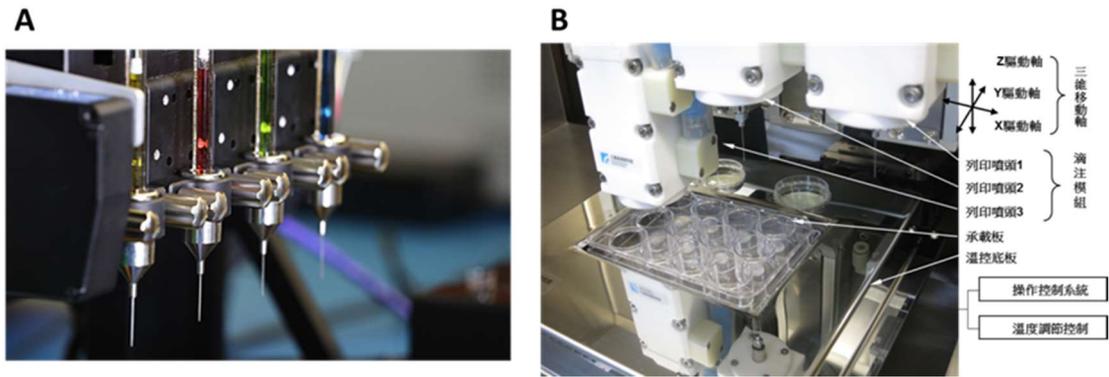
工研院生醫所開發之 EPI TRI 仿生皮膚(圖十六)依循組織工程三個構成要素：細胞、支架及訊息因子所建構而成¹⁸。細胞是組織形成的第一重要因素。細胞：組織工程所需要的細胞必須符合以下條件：1. 能在體外大量培養；2. 培養出來的細胞必須具有正常的分化功能。由嬰兒包皮取得皮膚分離出角質細胞、纖維母細胞及黑色素細胞，經由工研院生醫團隊標準化的分離技術及品管獲得大量維持分化功能之皮膚細胞。支架：人類皮膚組織大約 70% 為膠原蛋白，生物膠(Bio-ink)的配方設計也是以膠原蛋白為主要

原料，設計方向為其硬度及性質盡量符合真皮組織的特性。培養環境：體外培養要控制皮膚細胞分化也要持續增生相關的訊息因子如 keratinocyte growth factor (KGF)¹⁹、tumor growth factor- α (TGF- α)、epidermal growth factor (EGF)、epinephrine、cholera toxin 及 insuline 等，可使表皮細胞增生。calcium²⁰、hydrocortisone、vitamine D 等，則可使表皮細胞驅向分化。這些訊息因子在培養環境中不同階段的比例控制是決定組織發育成型的重要因素。

2015 年法國歐萊雅集團與生物 3D 列印領先廠商 Organovo 公司開始投入研發生物 3D 列印設備，目前所發表之 NovoGen Bioprinter 如圖十七(A)，就是採用多噴頭將皮膚細胞及生物墨水組合列印成特定結構的皮膚組織。工研院生醫所也於 2015 年投入仿生皮膚的研發，透過組織工程方法初步完成 EPiTRI 仿生皮膚。為了因應仿生皮膚自動化生產之需求，工研院建立一套仿生皮膚 3D 列印設備，如圖十(B)，是工研院生醫所與雷射中心透過跨位技術合作所研發的成果，由生醫所開發特殊的材料與製程、雷射中心開發設備，其主要功能是将膠原蛋白溶液和細胞培養溶液由設定的噴頭進行定量精密擠出，並在培養皿裡面列印出仿生皮膚結構。

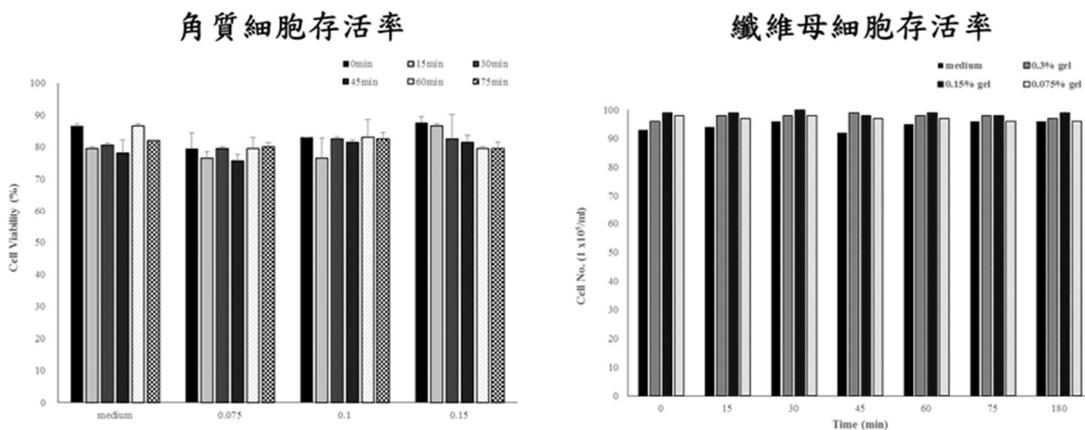


圖十六、EPiTRI 仿生表皮組織切片 H&E 染色圖(右)，與正常人類皮膚細胞(左)的表皮層構造相同。



圖十七、(A) Organovo 的 NovoGen Bioprinter 設備圖；(B)工研院生物 3D 列印機示意圖。

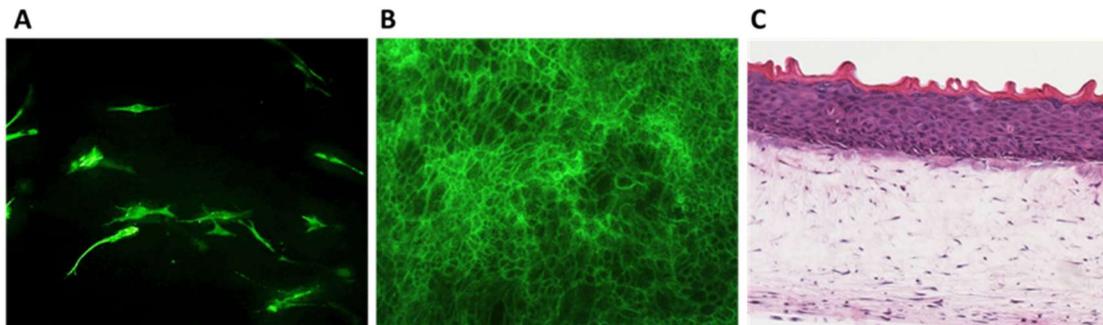
目前藉由工研院生物 3D 列印機列印皮膚組織，大量列印過程中需確保細胞可均勻分布，並於列印後細胞仍保有良好的存活率及細胞活性。人類角質母細胞於生物膠 (Bio-ink) 中 1.5 小時列印過程中，細胞可均勻分佈，沒有沉澱現象且列印後細胞存活率高達 90% 以上。人類纖維母細胞於不同濃度之生物膠 (Bio-ink) 中列印期間長達 3 小時，細胞均勻分佈且無沉澱現象，列印後細胞存活率也高達 90% 以上。(圖十八)



圖十八、皮膚細胞在列印過程中不同濃度生物膠下可以存活之時間。

工研院生物 3D 列印機列印皮膚組織先列印一層一層堆疊真皮組織(圖十九(A))後再將角質細胞(圖十九(B))列印於上，完成列印後的仿真皮結構，經由體外培養曝氣刺

激角質細胞分化，成熟後仿全皮組織(圖十九(C))其纖維母細胞生長良好，角質細胞的分化也接近成熟狀態具不同細胞型態分為基底層、棘層、顆粒層、角質層，擁有完整屏障功能之仿生皮膚組織。



圖十九、生物膠上的細胞型態。(A)纖維母細胞 Phalloidin 染色；(B)角質細胞 Phalloidin 染色；(C)仿生全皮組織 H&E 染色。

近年來生物 3D 列印的人工皮膚組織受到關注，主要是因為生物列印方法允許以標準化、自動化的方式生產皮膚，並且該工藝比手動生產便宜。生物 3D 列印仿生皮膚在兩個領域極具應用潛力，其中一個潛力是治療與修復人體燒傷的皮膚，另一個應用潛力則是應用在化妝品的體外測試。目前已經有不少業者都強攻化妝品測試領域，其中已有生物 3D 列印設備廠商與化妝品製造商結合，針對化妝品測試領域開發 3D 列印人工皮膚組織，例如生物 3D 列印領先廠商 Organovo 公司與法國歐萊雅集團已合作研發可應用在化妝品測試應用的生物 3D 列印設備 NovoGen Bioprinter；另外，中國大陸的化妝品企業伽藍集團，也推出用於測試的 3D 列印亞洲人皮膚組織。根據 The Business of Fashion 研究報告指出，2017 年全球體外檢測市場預估有 99 億美元，而生物 3D 列印人工皮膚組織雖然剛在起步階段，但相關分析師預估到 2020 年，生物 3D 列印人工皮膚組織應用在體外檢測的產值將可突破 10 億美元²¹。

九、參考文獻

1. <https://www.alliedmarketresearch.com/medical-implants-market>.
2. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001430571400409>.
3. Global data on visual impairments 2010. *World Health Organization*
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/en/> (Updated October 2017).
4. Biomaterials market for implantable devices-Global industry analysis, size, share, growth,

- trends and forecast, 2013-2019. *Transparency Market Research 2014*.
5. Ophthalmic drugs market – Global industry analysis, size, share, growth, trends, and forecast 2017 – 2025. . *Transparency Market Research 2017*.
 6. Dhamodaran, K., Subramani, M., Ponnalagu, M., Shetty, R. & Das, D. Ocular stem cells: a status update! *Stem cell research & therapy* **5**, 56 (2014).
 7. Pellegrini, G. *et al.* Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *The Journal of cell biology* **145**, 769-782 (1999).
 8. Pellegrini, G., De Luca, M. & Arsenijevic, Y. Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Seminars in cell & developmental biology* **18**, 805-818 (2007).
 9. Rama, P. *et al.* Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *The New England journal of medicine* **363**, 147-155 (2010).
 10. Mandai, M. *et al.* Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *The New England journal of medicine* **376**, 1038-1046 (2017).
 11. Rama, P. *et al.* Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* **72**, 1478-1485 (2001).
 12. Nishida, K. *et al.* Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *The New England journal of medicine* **351**, 1187-1196 (2004).
 13. Ronfard, V., Rives, J.M., Neveux, Y., Carsin, H. & Barrandon, Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation* **70**, 1588-1598 (2000).
 14. Fagerholm, P. *et al.* A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study. *Science translational medicine* **2**, 46ra61 (2010).
 15. Stem Cells Market Analysis By Product (Adult Stem Cells, hESC, Induced Pluripotent Stem Cells), By Application (Regenerative Medicine, Drug Discovery), By Technology, By Therapy, And Segment Forecasts, 2014 - 2025. *Grand View Research Report ID: 978-1-68038-130-6*.
 16. Li, Y. *et al.* New Developments of Ti-Based Alloys for Biomedical Applications. *Materials (Basel, Switzerland)* **7**, 1709-1800 (2014).
 17. Stamp, R., Fox, P., O'Neill, W., Jones, E. & Sutcliffe, C. The development of a scanning strategy for the manufacture of porous biomaterials by selective laser melting. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **20**, 1839-1848 (2009).
 18. Shieh, S.J., Terada, S. & Vacanti, J.P. Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* **25**, 1545-1557 (2004).
 19. Marchese, C. *et al.* Human keratinocyte growth factor activity on proliferation and differentiation of human keratinocytes: differentiation response distinguishes KGF from EGF

- family. *Journal of cellular physiology* **144**, 326-332 (1990).
20. Boyce, S.T. & Ham, R.G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *The Journal of investigative dermatology* **81**, 33s-40s (1983).
21. <https://www.businessoffashion.com/articles/intelligence/is-the-global-cosmetics-market-moving-towards-a-cruelty-free-future>.

第十二章

再生醫學產業運用的最後一哩路-管理法規調和與上市查驗程序

Regulations and Premarket Approvals for Regenerative Medicine

王德原^{1,2}

¹ 衛生福利部食品藥物管理署 ² 國立台北科技大學生化與生醫工程研究所

一、前言

每個人在一生中難免會經歷許多受傷、意外等狀況，嚴重者可能對身體器官組織產生不可回復的損壞。此外，當個體存在基因缺陷、體質差異等其他多種因素，亦常導致身體器官組織產生退化性病變或功能失常，幸運者在接受適當醫療照護後可順利恢復健康，然而有許多人卻受限於醫療技術的瓶頸，無法康復甚至失去生命。因此，找到可用以重建或更換病人受損器官組織之療法，自古以來即是再生醫學(regenerative medicine)¹的終極目標。早自西元十六世紀義大利籍醫師 Tagliacozzi，便嘗試以患者正常手臂的皮膚肌肉，來重建其鼻部的壞死組織，此後至今近四百年時間，外科醫師因應病患需求建立解決病人重建器官組織需求的兩種模式，其一、為摘取捐贈者器官後，直接移植至患者體內以重建受損器官組織，但此種方式因異體移植引發的排斥作用，卻造成異體器官移植的極大困擾，且移植用器官來源極為有限更為問題核心。其二、外科醫師將病患需求結合化學與機械原理，以仿生工程學(bionic engineering)概念，設計與人體器官結構功能相仿的替代器官或組織(prosthesis)或替代組織^{2,3}，然而即便在機械電子科技十分發達的二十一世紀，仿生工程產品在臨床上之應用仍有其限制，在長期使用義肢後常會發現，其金屬或塑膠材質與人體組織相接處，因始終無法與身體組織融合，往往出現組織發炎反應或纖維化構造。而仿生工程產品更因其本質上仍多為模擬人體活組織器官之機械裝置，在功能、結構或與人體組織相容性等方面，與真正人體器官差異頗大，此外，仿生工程產品亦有使用年限的問題須考慮，接受移植者往往需歷經多次外科手術更換新的替代物後，才能延續其使用價值。

相形之下，純粹以生物性基質材料與活細胞組成之生物組織產品，在人體組織相容性、功能性與構造等方面和人體之配合度，遠非仿生工程產品所能相比，於再生醫學的應用上，更有其無可取代的獨特性^{2,3}。生物組織工程的發展，則以 1980 年代美國麻省理工學院生物系 Eugene Bell 博士的研究為代表，其利用所開發出之動物膠原蛋白純化技術以及人體上皮細胞(epithelial cells)、內皮細胞(endothelial cells)與纖維母細胞(fibroblasts)等多種成體細胞之體外培養技術，成功在實驗室中培養出皮膚類似物

(skin-equivalent)、人工血管、人工外耳、人工膀胱等組織工程人體器官的雛形^{4,5}，部份成果亦開始進行臨床測試，然而體外培養成體細胞在移植入人體後的存活率，以及如何有效誘導體外培養成體細胞皆能朝預設目標進行分化，仍為其中難以突破的關卡⁶。

近幾年來，世界各國在幹細胞(stem cells)領域的研究與生醫材料技術的不斷突破，顯示幹細胞實為再生醫學中，修補重建受損人體器官組織的最佳來源。幹細胞為一種同時具有自我更新(self-renewal)與分化效力(potency)的細胞，其中自我更新係指幹細胞可重複進行細胞分裂周期，且在細胞分裂後所生成的子代細胞中，至少有一個與母細胞相等之細胞，維持其原始特徵不進行細胞分化。幹細胞的分化效力則又可簡單區分為全能分化效力(totipotent)、多元分化效力(pluripotent)、多樣分化效力(multipotent)、少樣分化效力(oligopotent)與單一分化效力(unipotent)等五種類型，totipotent 係指單一細胞即可分化成一完整個體的能力，如受精卵；pluripotent 則指具有分化成一個體所有細胞族系(cell lineages)能力的細胞，如1995至1998年間，美國科學家J. A. Thomson博士在實驗室內培養出靈長類與人體胚胎幹細胞，並成功驗證胚胎幹細胞具有 pluripotent 的特性^{7,8}；multipotent 代表具有分化成建構一或多種完整組織所需多種細胞族系的能力，如造血幹細胞即具備此種分化效力；oligopotent 則顯示具有分化成組成單一組織所需的二種或二種以上細胞族系的能力，如腦組織中的神經幹細胞等成熟器官組織內有限的成體幹細胞；unipotent 則指該細胞僅具備分化成單一細胞族系的能力，如精原細胞。幹細胞在高等多細胞生物由胚胎發育為成熟個體的過程中，扮演關鍵性的角色，即便在個體發育成熟後，目前研究業已證實成體幹細胞(adult stem cells)仍然普遍存在於個體多處組織與器官中，肩負以細胞更新及受傷修復等方式維持個體各個組織、器官恆定的重任，因此結合幹細胞培養與組織工程技術，將促使人體組織、器官的複製與再生，不再是遙遠的夢想，或許在不久的將來，人類器官都可以在實驗室培養，需要時再植回人體，修補缺損的器官，使量身訂製「器官」不再是遙不可及之夢想。

二、國際管理概況

將再生醫學相關技術落實於人用醫療產品後，不論是以體細胞體外培養後植入人體為主體之細胞治療產品(cell therapeutic products)，或是移植用單純人體細胞與組織，甚至是結合生物基質、人體細胞與生長因子三者為一的組織工程醫療(tissue engineered medical products, TEMPs)產品，在定義上皆屬於人體細胞組織產品(human cells, tissues, and cellular and tissue-based products, HCT/Ps)之一環，人體細胞組織產品依其細胞組織的來源不同，可再區分為自體(autologous)或異體(allogeneic)之人體細胞組織產品，以及異種(xenogeneic)移植產品。而人體細胞組織產品因其來自人體不同部位之器官、組織或細胞，因其在型態、生理特性與超微結構等方面之差異頗大，導致不同人體細胞組織產品之種類、功能與表現特徵特性亦各不相同，此外，若從藥品、生物藥品或醫材的角度來看，人體細胞組織產品其來源與量產規模迥異於現行藥品、生物藥品與醫材的管理模式，因此面對此等特殊狀況，迫使先進國家管理階層必須儘速發展一套新管理架

構，以適時將正萌芽的此類新興生物科技產品產業導入適當的規範要求。

而為因應美、歐等國在幹細胞治療領域的研究發展迅速，美、歐各國皆已先後研究評估出其國內所需之管理機制，綜觀其管理概念，大概可歸納出二項重點，首先為考量不同人體細胞組織產品間在其類別、組成、特性、生物活性與臨床用途等方面皆有很大差異，因此依據產品風險高低採取分級分類的原則，大概已成為美國、歐洲等先進國家管理人體細胞組織產品的基本法則；再者，人體細胞組織產品的一大特徵即在於其產品原料來源含有人體細胞組織成份，甚至人體細胞組織產品即為人體器官組織之一部份或全部，因此人類傳染病及其病原體的篩檢與控管，以及處理過程中確保人體細胞組織產品未受微生物污染，更為各國在人體細胞組織產品原料、製程管制方面的重點項目。

以下分別以美國、歐盟與澳洲為例，簡要說明先進國家在再生醫學領域技術產品的管理現況。

1. 美國現行管理架構與執行概況

美國係全世界最早開始評估研究如何管理人體細胞組織產品的國家，亦為全世界最早開始正式執行管制措施的國家。因應再生醫學領域科技日新月異，亦伴隨幹細胞分離與體外培養技術的快速進步，美國在 1990 年代初期即有多項細胞治療與基因治療的人體試驗在知名大學醫學院或醫學中心進行，然而在 90 年代中期數起因實驗室操作不當導致受試者死亡事件，確也喚起美國國內消保團體的注意，要求聯邦政府必須對這些以人為實驗對象的試驗介入管理，因此美國食品暨藥物管理局(Food and Drug Administration, US FDA)在國會要求下，開始進行研究，以評估如何將人體細胞組織類之研究與產品開發，納入 US FDA 的管理架構中。US FDA 編制內負責生物科技產品檢驗管理單位，生物製劑評估研究中心(Center for Biological Evaluation and Research, CBER)便於 1997 年公告移植用人體組織管理草案⁹ (21 CFR Part 1270, Human Tissues Intended for Transplantation)，且在接受產、學、研、醫各界建議與試行一段時間後，於 2001 年再正式公告人體細胞組織產品管理法規¹⁰ (21 CFR Part 1271, Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products)，並於 2005 年 5 月 25 日正式實施，法規內容包含註冊列名登錄制度(registration and listing)、捐贈者合適性判定(donor eligibility)與現行人體細胞組織優良操作規範(current good tissue practice, CGTP)等三大部分，此外，CBER 亦在 2001 年修訂 21 CFR Part 600 法規¹¹，正式將生物製劑類產品的定義擴大，以便將部分高風險性人體細胞組織產品納入生物藥品方式來管理。

21 CFR Part 1271 法規之管轄範圍，在 1997 年之草案階段即以包含硬骨、韌帶、肌腱、軟骨、眼球組織、皮膚、動靜脈血管、心包膜、羊膜、腦硬膜、異體心臟瓣膜、細胞治療以及基因治療產品，而至 2001 年正式公告法規的範圍，更增加分離自周邊血液與臍帶血液之血液幹細胞與前驅細胞、精卵細胞以及胚胎組織，但是具有血管之器官(vascularized organs)、經最小處理的骨髓(minimally manipulated bone marrow)、異種組織細胞、血液製劑、人體分泌物或萃取物以及體外診斷試劑等，則

排除在 21 CFR Part 1271 法規管轄範圍之外¹⁰。

CBER 管理人體細胞組織產品之精神，在於依據美國公共衛生服務法第 361 與 351 章節定義，參照風險高低之不同，將該類產品區分為低風險性的 361 類產品(PHS 361 HCT/Ps)與高風險性的 351 類產品(PHS 351 HCT/Ps)，其中低風險性產品如庫存之移植用人體組織細胞以及自體移植之周邊血液單核細胞等，須符合僅經由最小程度處理(minimal manipulate)、為同源性使用(homologous use)、產品不與其他藥物或醫療器材結合、自體移植或二等親內異體移植及不會在身體引發系統性作用等條件，且因此無新增之臨床安全顧慮，因此 CBER 依據 21 CFR Part 1271 法規之要求，建置註冊列名登錄制度，係 CBER 特別針對非屬醫療器材與生物藥品的低風險性人體細胞組織產品所創設的管理制度，此新制度透過要求機構、實驗室與保存庫透過每年向 CBER 更新登錄資料方式，配合 FDA 的 CGTP 查核，促使從事 361 類人體細胞組織產品業務的各機構與保存庫符合 CGTP 規範要求，進而達到確保人體細胞組織產品無散佈傳染病風險，亦無在處理過程中遭受污染的疑慮，而此種針對低風險性產品的管理，並無新增臨床風險的疑慮，因此僅對機構的設施與程序控管，未涉及產品本身的管理(表一)。

表一、美國現行之人體細胞組織產品管理架構¹²

人體細胞組織物	產品製程品質與安全	臨床安全與效益評估	上市前查驗登記審查	細胞組織來源管制	批次放行
361 HCT/Ps (Tissue Banks)	GTP	無須進行臨床評估	僅需辦理人體組織保存庫註冊登記	捐贈者和適性判定程序	不適用
351 HCT/Ps (Medical Devices)	GTP、醫療器材QSR	需進行臨床試驗(IDE)	需申請上市前查驗(510K、PMA)	捐贈者和適性判定程序	不適用
351 HCT/Ps (Biologics)	GTP、藥品GMP	需進行臨床試驗(IND)	需申請上市前查驗(BLA)	捐贈者和適性判定程序	免除

而對於如細胞治療產品等高風險性人體細胞組織產品，則因其需在實驗室中進行體外培養、活化、增殖等程序，且在研發與製備過程中尚涉及自體、異體或異種細胞移植的議題，這些高風險性產品多用以治癒(cure)、預防(prevent)、診斷(diagnose)人類疾病，且通常兼具醫療技術與生物科技產品的二種性質，因此將此類

351 產品納入 US FDA/CBER 現行生物藥品管理體系，除需符合 CGTP 規範規定以及在細胞組織捐贈者須完成特定傳染病項目的篩檢外，其製程尚需符合 CGMP (current good manufacture practice) 的製造規範，且產品上市前需先經三階段臨床試驗評估其安全與效用，且亦須通過上市前生物藥品審核檢驗程序 (Biologics License Application, BLA)，以取得生物藥品上市許可 (Biological Approvals)，與傳統疫苗、血液製劑等生物藥品相比，人體細胞組織物類製劑尚須依據 CGTP 規定，建立追溯機制，以利在發現捐贈者有散佈傳染病疑慮時，可立即通報產品接受者進行適當處置。21 CFR Part 1271 法規的第二項重要規定，係為捐贈者合適性判定的細部規範，其適用於包含高低風險在內所有含有人體細胞組織成分的產品，規定這些產品的來源必須進行相關傳染病及其病原 (relative communicable disease agent and disease, RCDAD) 的篩檢，即所有人體細胞組織產品至少需進行 B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)、C 型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)、第一與第二型人類後天免疫不全症候群病毒 (human immunodeficiency virus type 1 and type 2, HIV-1/2) 與梅毒 (*Treponema pallidum*) 的檢驗，並進行傳染性海綿狀腦病變 (transmissible sponge-form encephalitis, TSE) 的病史審查，以避免散佈人類重大傳染病，若人體細胞組織產品屬於富含活體白血球類細胞組織，則尚需進行第一與第二型人類 T 細胞白血病毒 (human T cell leukemia virus type I and II, HTLV-I/II) 與巨細胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 二類病毒的檢驗，若為生殖組織類之人體細胞組織產品，則需加做 HTLV-I/II、CMV 二類病毒及衣原體 (*Chlamydia trachomatis*)、淋病球菌 (*Neisseria gonorrhoea*) 的檢驗。

21 CFR Part 1271 法規的第三項重要規定 CGTP，係用以規範從事相關業務之機構，必須建立品質計畫，並對環境、設施、物料、製程、確效、貯存、標示、追蹤、記錄與運送等建立管制程序，以確保產品品質與效能。而 21 CFR Part 1271 法規最後內容，則賦予 CBER 進行機構查核的權利，且強制規定美國國內相關機構若明顯違反 21 CFR Part 1271 法規規定，CBER 可直接處以產品回收、中止生產等強制處分，而機構負責人與品質主管將被處以最高一百萬美元之罰金與相關刑事處分。

美國自 2005 年正式實施 21 CFR 1271 法規起，迄 2017 年 8 月底 US FDA 已經陸續核准 13 件自體與異體細胞治療產品取得生物藥品 (351 HCT/Ps、Biologics) 上市許可，其實早在美國新法規實施之前，為了協助美國國內生技醫藥產業發展，US FDA 的 CBER 與醫療器材與輻射健康中心 (Center for Device and Radiological Health, CDRH) 已分別於 1997、1998 年，審查通過 Organogenesis 公司的 Apligraf® (BLA Reference No: 96-0372) 與 Genzyme Tissue Repair 公司的 Carticel® (Premarket Approval Application: P950032) 兩種細胞治療產品，以新興醫療器材 (異體雙層細胞培養人工皮膚) 及生物藥品 (自體軟骨細胞體外培養移植技術) 取得上市許可。

美國在 2005 年 5 月 25 日正式實施新法規後，其中，第一件依據 21 CFR Part 1271 規定，向 CBER 申請上市查驗並通過審查取得 US FDA 生物藥品上市許可的產品，是由 Dendreon 公司所研發的 PROVENGE® 於 2010 年拔得頭籌，PROVENGE® 屬於

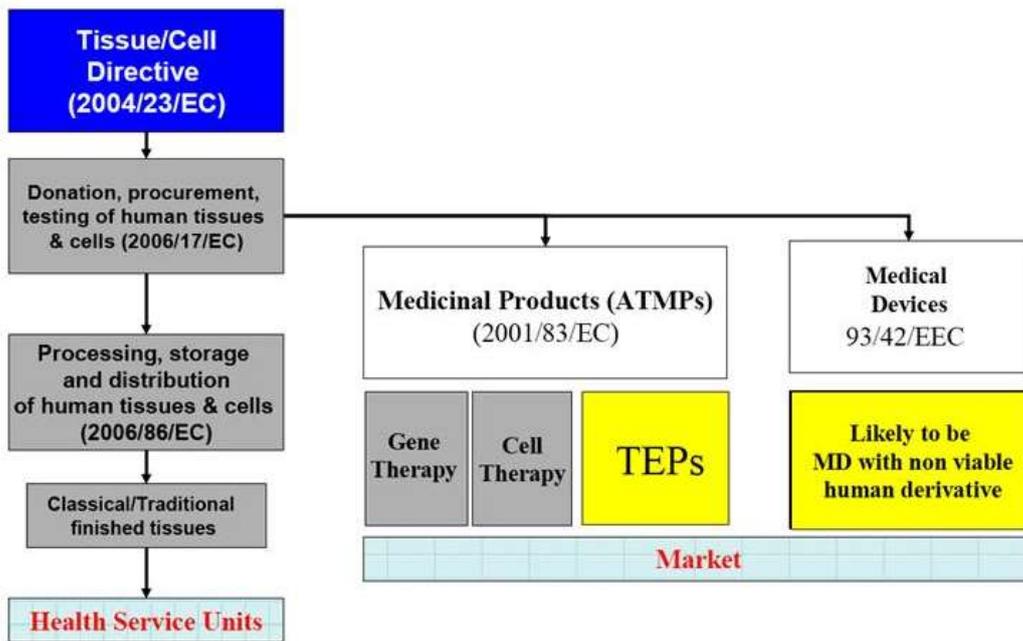
自體免疫細胞治療產品，用以治療無症狀或鮮少症狀(激素艱難)型前列腺癌(asymptomatic or minimally symptomatic metastatic castrate resistant (hormone refractory) prostate cancer)，考量 PROVENGE®為每一製造批次僅有一產品的自體細胞移植，CBER 同意 Dendreon 公司可免送檢體至 CBER 檢驗(是否符合 21 CFR 610.2 法規的生物藥品通則規格項目)，並免除上市後逐批將產品送 CBER 申請批次放行(Lot Release)，改以持續監控 Dendreon 公司執行批次放行試驗結果來驗證 PROVENGE 試的法規符合性。至 2011 年，CBER 再接續核准 Fibrocell Technology 公司研發，用以改善成人中度至重度鼻唇外觀褶皺的自體纖維母細胞(autologous fibroblasts)產品 LaVivo，以及紐約捐血中心(New York Blood Center, Inc)申請移植用最少處理(minimal manipulated)之無關連異體胎盤/臍帶血液前驅細胞(Hemacord)的上市許可，而 CBER 最新核准上市的細胞治療產品，則是在 2017 年 8 月 30 日核准由諾華(Norvatis)公司申請的 KYMRIAH®，其為一種用於治療 25 歲以下、難治性或二次後復發 B 細胞前體急性淋巴細胞性白血病(B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, BCP-ALL)患者的基因修飾 CD19 分化方向的自體 T 細胞免疫治療(CD19-directed genetically modified autologous T-cell immunotherapy)產品，而 KYMRIAH®亦為 US FDA 首次核准上市的基因治療產品。總計自 2005 年起至 2017 年 8 月，US FDA/CBER 共核准了 13 件人體細胞組織產品的上市許可，其中包含了 7 件無關聯異體血液前驅細胞(unrelated allogenic hematopoietic progenitor cells, HPC)、2 件自體移植免疫細胞、2 件體外培養自體體細胞移植、1 件體外培養異體二型細胞於膠原蛋白中共同培養移植。

2. 歐盟管理概況

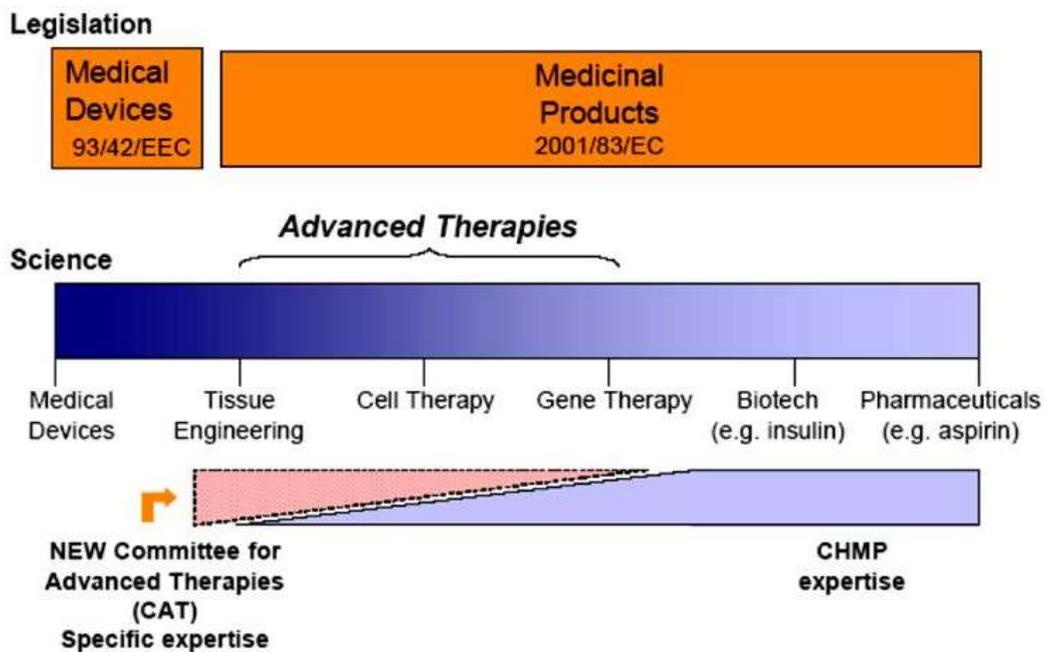
歐洲先進國家對於醫療用途人體細胞組織物的管理，歐洲議會執行委員會(The European Parliament and of the Council)於 2004 年發佈用於人體醫療用途之人體組織與細胞標準指令¹³(Directive 2004/23/EC of The European Parliament and of The Council on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells)，對於機構的監督與管理機制、人體細胞與組織其捐贈、摘取、檢驗、處理、保存與配送相關之品質與最低安全性都有規定，歐盟並在 2006 年 2 月公告與捐贈、獲得、檢驗人體組織細胞有關之技術基準執行指令(Implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells)¹⁴，要求各會員國必須於 2006 年 11 月前，依據該指引完成各國國內相關立法工作。例如英國衛生部即於 2004 年公告人體組織法案(Human Tissue Act)¹⁵，以因應人體器官組織管理需求。

歐盟人體醫療用途之人體組織與細胞標準指令¹³的主要內容，在建置人體組織細胞的捐贈、摘取、檢驗、保存、處理、貯存與運送之作業標準，其範圍涵蓋人體組織細胞，包括來自周邊血液、臍帶血液與骨髓之血液幹細胞、包含精卵之生殖細

胞、胎兒組織與細胞(fetal tissues and cells)、成體幹細胞(adult stem cells)以及胚胎幹細胞(embryonic stem cells)。至於在同一次手術中用於自體移植的組織細胞、血液與血液成分物、與在捐贈者體內功能相同之移植用器官或部分器官，以及除臨床試驗外用於研究之人體細胞組織等，皆不受該指令之管轄。而該指令亦詳細說明捐贈者應施予篩檢之項目，對於所有人體細胞組織產品，皆須進行抗愛滋病抗體(Anti-HIV-1 與 Anti-HIV-1)、B 型肝炎表面抗原與抗 B 型肝炎核心抗體(HBsAg 與 Anti-HBc)、抗 C 型肝炎抗體(Anti-HCV-Ab)與梅毒的血清免疫學檢驗，此外，亦須針對人體細胞組織之性質，再行加做如 Rh 因子(RhD)、組織相容性抗原(histocompatibility antigen, HLA)、CMV、弓漿蟲(toxoplasma)、EB 病毒(Epstein Barr virus, EBV)、*Trypanosoma cruzi* 等檢驗項目¹³。歐盟指令亦賦予會員國將可對從事人體細胞組織產品相關機構進行查核的權利，但與美國 CBER/FDA 執行方式不同，歐盟國家多以授權民間發證機構(Notified Body)與認證組織(Accreditation Organization)來執行相關認證評鑑事務。然而僅以歐盟指令 Directive 2004/23/EC 的內容，仍僅限於對人體醫療用途之人體組織細胞的採集、篩檢、貯存等作業的規範，若要一體適用於所有類型的人體細胞組織產品，則對於高風險性細胞治療或組織工程等先進醫療產品而言(advanced therapeutic medical products, ATMPs)，仍有所不足，因此該指令除供移植用人體組織細胞作為處理規範外，對於含人體細胞組織成分的高階治療醫藥產品，該指令係作為該類產品在上游原料端的管制措施，以避免人類傳染病的散佈，而這些高風險性高階治療醫藥產品仍須依其性質屬性，納入現行歐盟醫療器材或生物製劑類產品的管理途徑，以取得上市資格(圖一)¹⁶。而為因應此一需求，歐盟技術委員會預定在 2007 年底會召集科技專家成立新的委員會(Committee for Advanced Therapies, CAT)，以討論介於醫療器材指令 93/42/EEC¹⁷(包含 class I、class IIA、class IIB 與 class III 四等級醫療器材產品)與醫藥產品指令 2001/83/EC¹⁸(包含一般藥品、基因工程製劑、生物藥品等)之間的細胞治療製劑、基因治療製劑以及組織工程醫藥產品(含結合藥品與細胞組織、結合醫材與細胞組織或結合藥品、醫材與細胞之複合型產品(combination products))等高階醫療產品(圖二)¹⁶。而自 2009 年至 2016 年間，歐盟亦陸續核准了 8 件先進醫療產品在歐洲上市(表二)。



圖一、歐盟人體細胞組織產品管理架構¹⁶



圖二、歐盟高階治療醫藥產品管理架構¹⁶

表二、歐洲先進醫療產品核准現況

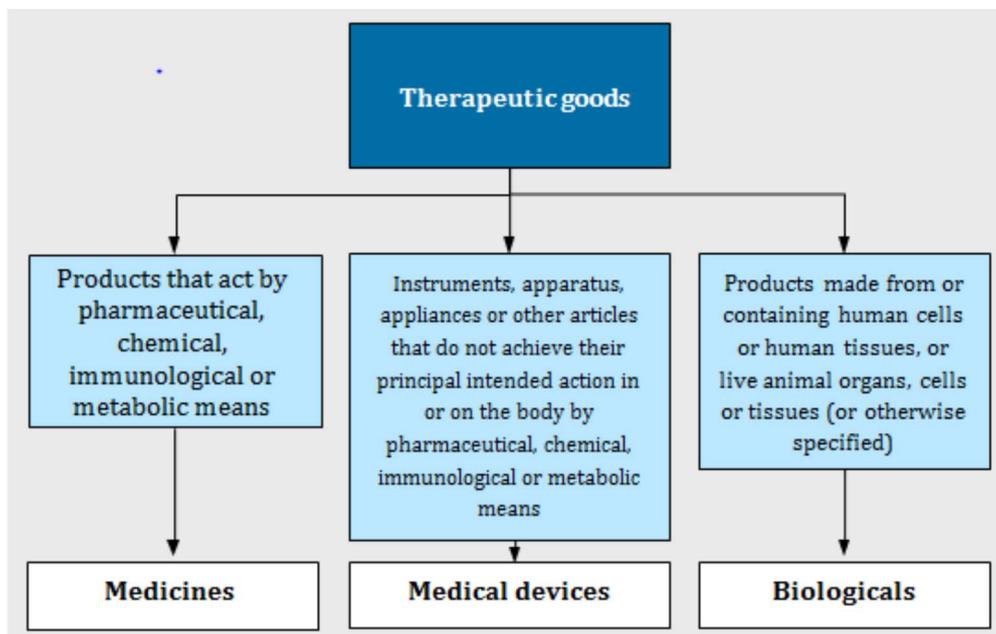
核准 年分	產品 名稱	產品 特點	申請 業者	臨床 適應症
2009	ChonfroCelect	細胞治療：自體軟骨細胞體外培養	Tigenix	膝蓋軟骨缺損
2012	Glybera	基因治療：人類 Lipoprotein Lipase 基因 LPLS447X 轉植質體	UniQure	Lipoprotein Lipase 缺損
2013	MACi	細胞治療：自體軟骨細胞在細胞外基 質進行體外培養	Vericel	膝蓋軟骨缺損
2013	PROVENGE	細胞治療：自體 PAP-GM-CSF 抗原 呈現細胞之體外培養	Dendreon	前列腺癌
2014	Holoclar	細胞治療：自體角膜上皮細胞體外培 養	Chiesi	輪部幹細胞缺損
2015	Imlygic	基因治療：攜帶 GM-CSF 基因之基 因改造第一型人類單純皰疹病毒	Amgen	無法切除黑色素 瘤
2016	Zalmoxis	基因改造細胞治療：反轉錄病毒載體 轉植人類低親和性神經生長因子接 受器之異體 T 細胞體外培養	MioMed	高風險惡性血癌
2016	Strimvelis	基因改造細胞治療：反轉錄病毒載體 轉植人類 ADA 基因自體 CD34 ⁺ 細胞 體外培養	GSK	ADA 缺乏症候群

3. 澳洲之管理架構

澳洲醫療用品管理局 TGA(Therapeutic Goods Administration)，為因應未來面對人體細胞組織產品的管理需求，在參考美國推行的分級分類管理原則後，於 2002 年發布法規草案，預定將人體細胞組織與細胞治療產品區分為三級管理¹⁹，其中低風險之 class 1 級人體細胞組織產品係指非庫存之單純人體細胞組織，如自體移植用周邊血液單核細胞，係以類似簡化之美國 361 類產品管理模式，須符合相當於 GTP 之規範標準；中低風險之 class 2 級人體細胞組織產品，則為庫存之單純人體細胞組織，須符合相當於包含 GTP 標準在內之澳洲 GMP(good manufacture practice)，且保存庫通過檢查以取得 TGA 核發之許可執照；至於高風險之 class 3 級人體細胞組織產品，則為非直接自捐贈者移植至患者的產品，且與非人體組織成分結合；或在患者體內產生藥理、化學或代謝效果；或已被處理至改變細胞組織原有特性；或在生產過程中，使用如單株抗體等生物性試劑參與細胞擴大(expansion process)或選擇(selection

process)等程序之產品，除須符合相當於包含 GTP 標準在內之 GMP，其製造廠亦需取得 TGA 核發許可執照，且須提供相關產品文件以供 TGA 進行產品審核，確保品質、安全、效用無虞，以取得 TGA 核發上市許可。

澳洲 TGA 在歷經多年法規研究，為了在原有醫療產品法(*Therapeutic Goods Act 1989, TG Act*)²⁰ 中納入人體細胞組織產品，重新將醫療產品法所管轄之醫療產品(依據 *TG Act* 係指任何用於醫療照護作為治療、預防或診斷疾病、營養補給、缺損或傷害的產品)劃分為藥品(Medicines)、醫療器材(Medical devices)及生物製劑(Biologicals)等三大類別(圖三)，其中新增列之生物製劑管理框架(Biologicals Regulatory Framework)已於 2011 年 5 月 31 日正式生效，係專責用以管理在澳洲製造、輸入、輸出、上市查驗人體細胞組織物(human cell and tissue-based products)或活體動物器官、細胞與組織產品(living animal organ, cell and tissue-based products)的法規機制，管轄對象包含製造廠、藥商、健康照護專業人員及其他所有相關從業機構與人員²¹。



圖三、澳洲醫療產品之產品分類圖²¹

與 2002 年公開的法規草案不同處，在於將生物製劑從原先依風險高低區分為三等級擴大到正式法規的四等級(four classes)，且其風險劃分，係基於用於製備產品的方法(the methods used to prepare and process the products during their manufacture)，以

及其產品用途是否與原先的生物性功能相同(whether their intended use is the same as their usual biological function)。依據澳洲醫療產品法規定，人體細胞組織物依據風險高低分為四等級，Class 1 biologicals 為公共風險極低但對使用者個人利益高的生物製劑，例如移植用屍皮，此類產品並無科學或技術上的特殊定義，惟須主動向 TGA 提出申請列入醫療產品規範(Therapeutic Goods Regulations 1990, TG Regulations)的附表 16 中。Class 1 biologicals 的製造廠無須事先取得 TGA 的製造許可，只要自行宣告符合品質、安全與效用的強制性標準，並將自行宣告書面聲明送交 TGA 備查，產品亦無須向 TGA 申請上市前評估。Class 2 biologicals 亦屬於低風險生物製劑，如冷凍人體硬骨、人體心臟瓣膜、眼角膜等移植用人體器官組織，為僅使用一或數種簡單的最小處理程序製備，且僅作為同源性使用(homologous use，指捐贈者細胞組織，具有與接受者被取代、重建、置換細胞或組織相同的生物功能)的生物製劑。Class 2 biologicals 必須由 TGA 評估是否符合相關標準，製造廠必須呈現其符合澳洲人體血液及組織優良製造規範(Australian Code of Good Manufacture Practice for human blood and tissues)的規定。Class 3 biologicals 為中度風險的生物製劑，如去礦物質硬骨、用於皮膚修復的體外培養脂纖維母細胞，或用於軟骨修復的體外培養軟骨細胞，其製程中使用的生產方法已超出最小處理的程度，可能作為同源或非同源性使用，如同 Class 2 biologicals，其製造廠亦必須呈現其符合澳洲人體血液及組織優良製造規範的規定。至於高風險的 Class 4 biologicals，如基因修飾細胞等，其製程已改變細胞組織原有之功能與狀態，其可能作為同源或非同源性使用。Class 4 biologicals 需要額外的臨床數據佐證，並經過 TGA 在安全、效用與品質的方面的審查、評估與分析，始可供患者使用，其製造廠除了必須呈現其符合澳洲人體血液及組織優良製造規範，且須事先取得 TGA 核發的製造許可。

三、我國人體細胞組織產品管理現況與未來展望

前行政院衛生署為因應國內幹細胞與組織工程技術等再生醫學的臨床發展需求，亦順應國際新興生物科技產品管理趨勢，且為預防因使用人體細胞組織物而導入、傳播及擴散傳染病，早於 2000 年 12 月即公告「人體細胞組織優良操作規範²²(good tissue practice, GTP)」，並於 2002 年正式實施，以作為機構為醫學研究與醫療應用需求處理人體細胞組織物的作業基準，協助機構確保其人體細胞組織物未含有傳染病病原，在製造過程中未受污染，且不致因製造不當而影響人體細胞組織物效用與完整性。我國之 GTP 與美國在 2005 年正式發佈實施之 21 CFR Part 1271 法案內容第三部分 CGTP 內容類似，亦適用於製造人體細胞組織產品所使用之方法、設施及管制措施，包括人體細胞組織提供者之篩檢與檢驗、人體細胞組織物之採集、處理、貯存、標示、包裝及配送等過程。

綜觀我國 2002 年生效的人體細胞組織優良操作規範，其制定目的在於預防因使用人體細胞組織物而導入、傳播及擴散傳染病，並協助機構確保其人體細胞組織物未含有

傳染病病原，在製造過程中未受污染，且不致因製造不當而影響人體細胞組織物效用與完整性。而其範圍涵蓋骨骼、韌帶、皮膚、心瓣膜、眼角膜等人體組織、取自臍帶血或周邊血液之造血幹細胞、自體移植用之軟骨及合成基質上之上皮細胞以及精液或其他生殖組織等項目，惟生殖組織目前仍未包含在體細胞治療人體試驗之範圍，其係屬於人工生殖相關法令所管制。而我國人體細胞組織優良操作規範之例外項目，則包含使用於移植並帶有血管之人體器官、全血、血液成分血或血液衍生產品、乳汁、膠原及細胞因子 (cell factors) 等人體分泌物或抽取物、人體細胞組織物製造過程之輔助物、人類以外動物之細胞、組織或器官與體外診斷醫療器材。

我國人體細胞組織優良操作規範內容包括總則、品質計畫、組織與人員、作業程序、設施與場所、環境管制與監控、設備、物料與試劑、製程管制、製程變更、製程確效、標示管制、貯存、收受與配送、紀錄、追蹤、怨訴檔案與附則在內共計拾捌章六十四條²²，其特色在於以品質管理系統為基本架構，意即規範機構必須建立品質計畫、制定作業程序並加強文件管理，以符合規範要求。此外，更以風險管理為特殊要求，規範機構必須預防因使用人體細胞組織物而導入、傳播及擴散傳染病，並透過建立捐贈者傳染病篩檢、細胞處理製程管制與確效、實驗室設施與設備之品質管制、細胞使用物料之品質管制、細胞無菌操作與處理程序之確效、細胞放行前檢驗項目與規格、產品標示與追蹤、對於細胞放行送後才獲得之不良檢驗結果的通報與補救程序等作業管制程序，進而協助機構確保其人體細胞組織物未含有傳染病病原，在製造過程中未受污染，且不致因製造不當而影響人體細胞組織物效用與完整性。

因細胞治療在我國尚屬醫療法第 8 條所稱之新醫療技術，其應用於人體治療前，應經人體試驗階段驗證安全及療效，且為配合我國人體細胞組織優良操作規範的推動，前行政院衛生署醫事處(以下簡稱前醫事處)為提升國內體細胞治療人體試驗案細胞處理實驗室品質需求，與前行政院衛生署藥物食品檢驗局(以下簡稱前藥檢局)著手共同研議，於 2005 至 2006 年辦理國內從事體細胞治療人體試驗細胞處理實驗室之輔導訪查作業，以瞭解國內細胞實驗室品質安全現況，並自 2007 年起正式對體細胞治療新醫療技術人體試驗案，規範申請機構之細胞處理實驗室需符合 GTP 規範以確保受試者安全，並可促使擬量產上市之高風險性細胞治療產品，建立未來管理機制運作模型，以作為整合國內新興高風險性人體細胞組織產品量產化上市查驗與 GMP 製程管制的管理雛型，並可加速法規管理國際化整合工作，於此階段，國內被核准的第一、二階段體細胞治療新醫療技術人體試驗每年約有 20 個計畫在執行。此外，對於少數以新藥研發目標向前行政院衛生署藥政處(前藥政處)申請上市查驗登記臨床試驗的異體細胞治療產品，雖該類產品並不符合我國藥事法新藥定義，然為確保該類產品細胞組織未含傳染病原、未於製程中受微生物污染，且不致因製造不當而影響受試者細胞組織物效用與完整性，前藥政處亦要求該類產品臨床試驗時，其細胞組織處理實驗室或工廠，必須接受並通過前藥檢局的 GTP 查核，以確保受試者安全無虞。隨著前行政院衛生署食品衛生處、前藥政處、前藥檢局及前行政院衛生署管制藥品管理局於 2010 年 1 月整併為前行政院衛生署食品藥物管理局(以下簡稱前食藥局)，前述細胞治療產品處理實驗室或工廠的 GTP 查

核業務，亦由前醫事處與前藥檢局一併轉移至新成立的前食藥局風險管理組接續辦理，而前食藥局則再於 2013 年 7 月 23 日配合前行政院衛生署升格為衛生福利部，同步升格為食品藥物管理署(以下簡稱食藥署)。

另一方面，為了與人體細胞組織物國際管理趨勢接軌，前醫事處除了推動細胞治療新醫療技術的細胞處理實驗室必須接受並通過 GTP 查核，亦同步著手研訂低風險性移植用人體器官保存業務的管理機制，以妥善管理國內包含臍帶血庫、軟硬骨庫、皮庫、眼角膜庫等之人體器官保存庫，並將人體細胞組織優良操作規範適度簡化修正，作為人體器官保存庫之運作與品質管理依據。而為完善相關法制程序，醫事處援引人體器官移植條例²³第 14 條第 1 項授權，已制定人體器官保存庫管理辦法²⁴，除提供人體細胞組織優良操作規範之母法依據，亦將在辦法正式公告後，實施人體器官保存庫之設置登記與現場查核作業，確保人體器官保存庫庫存細胞組織的品質與安全。因此，前醫事處與前藥檢局再次聯手合作推動的人體器官保存庫設置登記的工作，讓我國人體器官移植邁入系統化管理階段，亦使我國成為全亞洲第一個立法建立移植用人體器官組織保存管理制度的國家，至 2017 年 8 月國內已有公私立共 112 機構，通過衛福部食藥署嚴格的資料審查與實地履勘程序，取得 17 大類人體器官保存庫設置許可，其中包含 66 間硬骨庫、26 間軟骨庫、7 間骨粉庫、5 間筋膜庫、34 間肌腱庫、34 間韌帶庫、7 間皮膚庫、5 間心瓣膜庫、3 間心包膜庫、9 間血管庫、26 間周邊血液幹細胞庫、18 間臍帶血庫、6 間骨髓庫、37 間眼角膜庫、25 間鞏膜庫、30 間羊膜庫及 1 間神經組織庫。這樣的努力，在 2015 年 6 月 27 日晚間於新北市八里區八仙樂園發生的塵爆不幸事件中，發揮了極大的作用，對於事件中的燒燙傷患者，醫療機構除了立即可從前述合法設立的皮膚庫中取得安全無虞的移植用皮膚外，也因為我國已建立人體器官保存庫管理機制，使當時為解決移植用皮膚之不足，行政院可立即動用第二預備金，緊急以 1 億元臺幣向荷蘭、美國皮庫購買 110 萬平方公分大體皮膚，完全滿足塵爆燒燙傷患者後續醫療需求，也讓該塵爆事件燒燙傷患者有了令人難以置信的存活率。

雖然從人體器官移植條例授權建立的人體器官保存庫管理機制，成功的規範了國內包含最少處理(minimal manipulated)人體細胞組織在內的移植用人體器官保存機構與相關作業程序，但是要建制與國際調和的人體細胞組織產品管理制度，對於非屬最少處理且需經體外培養加工程序的細胞治療與組織工程等再生醫學醫藥產品而言，我國仍缺少了可以讓這些產品通過上市前查驗審查的法規環境，不過，在衛福部與食藥署相關公務體系的運作努力之下，讓這最後一哩路已有跡可循。

其一，為增進國人接受新興科技治療之可近性，以及為了促進國內細胞治療產業發展，衛福部於 2017 年 7 月 25 日以衛授食字第 1061406617 號函公告「細胞及基因治療產品管理法(草案)」²⁵，以 60 日期間廣納各界意見，作為該管理法最終修正參考。「細胞及基因治療產品管理法(草案)」補上了人體細胞組織產品管理的最後環節，對於經過體外加工製程的細胞及基因治療產品，未來必須符合該法的規定，至於細胞製造或操作過程，不經加工或體外培養程序，且操作過程不改變細胞原有生物特性的移植用人體細胞組織，則無須受此法管理，而僅在其庫存管理部分需符合人體器官保存庫管理辦法相

關規定。待此法日後正式公告實施，即代表我國對人體細胞組織物的管理，在歷經 10 年以上的法規與實務研究後，最後仍舊採取與美國、歐盟類似的高低風險分級管理方式，與國際接軌並無二致。此外，衛福部在 2017 年公告的「細胞及基因治療產品管理法(草案)」中，已於第 3 條條文明訂細胞治療產品、基因治療產品與組織工程產品的定義用語，該法所稱細胞治療產品，係指以診斷、治療或預防人類之疾病為目的，對於人體之細胞施以加工而成之產品，所稱基因治療產品，係指以診斷、治療或預防人類之疾病為目的，會使人體內含有重組基因之產品，而所稱組織工程產品，係指以移植、修復或重建人類之組織或器官為目的，對於人體之細胞施以加工而具有組織結構或機能之產品，前述所稱之加工，則指使細胞體外增殖或分化，改變細胞活性或生物特性，細胞混合非細胞成分或細胞貼附於非細胞成分，使細胞成片或堆疊，或使細胞含有或表現外來基因等處理方式。草案第 4 條規範了細胞與基因治療產品的捐贈者和適性，第 5 條明定細胞與基因治療產品須經中央衛生主管機關查驗登記取得許可證後，使得製造、輸入。草案第 6 條則是參考日本藥機法 23 條之 26 規定，對於部分細胞及基因治療產品尚未進行療效驗證，但有足夠數據可推定其療效時，為顧及國民得儘速使用細胞及基因治療產品之權利，給予附條件、期限之暫時性許可證。草案第 7 條規定為確保細胞及基因治療產品之品質及防止傳染病之發生、傳染及蔓延，細胞及基因治療產品之製造工廠應符合中央衛生主管機關所定之標準(可能是 PIC/s GMP 加上 GTP)，第 8 條則為確保民眾權益，規定中央衛生主管機關對經核准製造或輸入之細胞及基因治療產品得指定期間監視其安全性，並要求產品商應建立病人登錄與追蹤系統。

其二，為因應未來醫藥科技進步，衛福部目前正研議修正藥事法第 7 條，對於新藥之定義範圍，擬將新興生技產品發展列為重點考量，儘量涵蓋所有新藥型態與未來研發技術進展。因此，衛福部食藥署在參考近年在體細胞治療人體試驗的現行實務做法、歷次專家會議與公聽會時產、學、研、醫各界所提建議，並兼顧法律明確性原則，傾向在藥事法第 7 條增訂生物藥品的定義，以完善細胞治療及基因治療產品的法規環境。此項修法未來若能順利在立法院完成三讀，我國人體細胞組織產品的法規建置與國際調和工作至此算告一段落，配合「細胞及基因治療產品管理法」，共同建構了我國新興生技再生醫療產品的商品化法規體系，讓未來完成三階段臨床試驗的新興產品，可依法申請上市查驗登記並取得許可證，達成再生醫學產品商品化的重要產業目標。

其三，為因應細胞治療及基因治療產品的特殊性，現行各國藥典中收載的品質檢驗方法並未都能適用，因此各國藥典近年來在改版過程中，已逐漸將細胞產品所需的各式通則與試驗法收載於新版藥典之中。中華藥典為我國藥品品質標準與檢驗方法的重要技術規範，配合國家未來細胞治療及基因治療產品的品質與檢驗管理需要，衛福部食藥署在編修於 2016 年 12 月發行的中華藥典第八版²⁶時，已納入多項細胞治療及基因治療產品的規格標準與檢驗方法，供相關參與生產細胞產品的實驗室與工廠有所依循。舉例來說，中華藥典第八版已收載細胞培養用胎牛血清品管檢驗使用之通則(6012)胎牛血清品質屬性與功能檢測法、鑑別細胞特徵使用之通則(6028)組織學及免疫組織化學分析用生物檢體之製備、針對細胞培養最易汙染微生物的通則(7009)黴漿菌試驗法與(7009.1)以

核酸擴增技術檢測黴漿菌之分析方法確效指引，以及適用於監測細胞產品細菌內毒素污染的通則(7010)單核球活化試驗法與(7010.1)單核球活化試驗法指引等。目前中華藥典正在進行第九版的編修工作，將持續收錄細胞治療產品、基因治療產品與組織工程產品所需之各項特殊試驗法，以完備品質標準與檢驗方法體系。

四、結語

醫療用途之人體細胞組織產品，將其捐贈者篩檢、採集、處理、儲存檢驗予配送等程序納入品質管理系統以維護產品之安全、品質與效用，並避免散佈傳染病病原，已成為各先進國家新興醫藥管理之重要課題，而為因應緊急醫療之無國界需求，各國對於人體細胞產品的管理亦快速朝全球化調和方向前進，而台灣在此新興生物技術醫療技術與產品管理全球化趨勢中，已急起直追並借鏡美國、歐盟等先進國家的法規演進趨勢，將相關產品依據其風險高低，實施分層分類管理的機制，並針對人體細胞組織特性以及具有感染、散佈人類傳染病之潛在威脅，制定一套特殊的品質管理規範(如 GTP)，因此前衛生署自 91 年底公告人體細胞組織優良操作規範開始，後續於 98 年公告人體器官保存庫管理辦法，衛福部再於 106 年「細胞及基因治療產品管理法(草案)」，並研議修正藥事法新增細胞治療及基因治療產品的生物藥品定義，逐步建構完成我國人體細胞組織產品的管理模式並能與國外管理制度銜接，達成醫療產業全球化目標。

五、參考文獻

1. [http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative Medicine 2006.pdf](http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative%20Medicine%202006.pdf).
2. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**:920-926 (1993).
3. Strain, A. J. & Neuberger, J. A bioartificial liver - state of the art. *Science* **295**:1005-1009 (2002).
4. Vacanti, J. P. & Langer, R. Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* **354**:si32-34 (1999).
5. Weinberg, C. B. & Bell, E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* **231**:391-400 (1986).
6. Griffith, L. G. & Naughton, G. Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities. *Science* **295**:1009-1014 (2002).
7. Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A. & Hearn, J. P. Isolation of a Primate Embryonic Stem Cell Line. *Proc the Natl Acad of Science* **92**:7844-7848 (1995).
8. 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).
9. Code of Federal Regulations. Title 21, Food and Drugs, Part 1270 Human Tissue Intended for Transplantation, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (1997).
 10. Code of Federal Regulations. Title 21, Food and Drugs, Part 1271 Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-based Products, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (2006).
 11. Code of Federal Regulations. Title 21, Food and Drugs, Part 600 Biological Products General, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services (2001).
 12. 王德原。96 年度初階臨床試驗訓練課程：細胞治療產品與 GTP 規範。財團法人台灣醫界聯盟基金會(2007)。
 13. Directive 2004/23/EC of The European Parliament and of The Council. On setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. *Off J of the Euro Union* **7.4**:48-58 (2004).
 14. Commission Directive 2006/17/EC. Implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. *Off J of the Euro Union* **9.2**:40-52 (2006).
 15. Human Tissue Act. Human Tissue Authority (2004).
 16. Brown P. Cell Therapy Liaison Meeting. Annual Meeting of International Society for Cell Therapy (2007).
 17. Council Directive 93/42/EEC. Concerning Medical Devices (1993).
 18. Directive 2001/83/EC. The European Parliament and of the Council. On the community code relating to medicinal products for human use. *Off J of the Euro Union* **28.11**:67-128 (2001).
 19. Therapeutic Goods Administration. Summary of Proposed Framework for the Regulation of Cell and Tissue Therapies (2004).
 20. Therapeutic Goods Administration. Therapeutic Goods Act (1989).
 21. Therapeutic Goods Administration. Australian Regulatory Guidelines for Biologicals Part 1 – Introduction to the Australian Regulatory Guidelines for Biologicals (2017).
 22. 行政院衛生署，2002 年，人體細胞組織優良操作規範，衛署醫字第 0910078677 號公告。
 23. 行政院衛生署，2002 年，人體器官移植條例，總統華總(一)義字第 091001377790 號令。
 24. 行政院衛生署，2009 年，人體器官保存庫管理辦法，衛署醫字第 0980205329 號令。
 25. 衛生福利部，2017 年，細胞及基因治療產品管理法(草案)，衛授食字第 1061406617 號函。
 26. 衛生福利部，2016 年，中華藥典第八版，部授食字第 1051902455 號令。

索引

A.

acetylcholine 乙醯膽鹼	103	apical papilla stem cells (SCAP)	
acute lung injury (ALI) 急性肺損傷	54	根尖幹細胞	138,140,147
acute radiation syndrome 急性輻射損傷	111	apoptosis 細胞凋亡	38
adherent monolayer cultures		articular cartilage 關節軟骨	136
可貼附的培養皿	101	asRNA 反義 RNA	41
adipocytes 脂肪細胞	135	assay for transposase-accessible chromatin	
adipose derived stem cells 脂肪幹細胞	161	sequencing (ATAC-seq) 轉座子可嵌插性定序分	
adipose tissue-derived mesenchymal stem cell		析 / 轉座酶可接近的染色質定序分析	10,11
(ADMSC) 脂肪間葉幹細胞	37	astrocyte 星狀神經膠細胞	50,100,104
adult somatic cell 成體體細胞	7	asymmetric division 不對稱分裂	31
adult stem cell 成體幹細胞	32,35,134,184,188	autism spectrum disorder 自閉症	107
aggrecan 蛋白聚糖	129	autograft 自體移植	141
allantois 胚胎尿膜	33	autoimmune encephalomyelitis	
allogeneic 異體	171,184	自體免疫性腦脊髓炎	36
allograft 異體移植	141	autologous 自體	171,184
alternatively activated macrophage (M2)		autologous chondrocyte implantation (ACI)	
替代活化巨噬細胞	88	自體軟骨細胞移植	123,127
Alzheimer's disease (AD) 阿茲海默症	103,107	autologous matrix-induced chondrogenesis	
ameloblast 牙釉質母細胞	140	(AMIC) 自體基質誘導軟骨再生	123,125,126
amnion 羊膜	19	axon 軸突	99
amniotic cavity 羊膜腔	20	axonal degeneration 軸索退化	99
amniotic fluid 羊水	19	axonal sprouting 軸突成長	105
amniotic membrane 羊膜	37	azathioprine 硫唑嘌呤	118
amyotrophic lateral sclerosis (ALS)			
肌萎縮性脊髓側索硬化症	36,54,99,103,104	B.	
animal component-free media (ACFM)		basal process 底端突起	100
無動物成分培養基	174	B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia	
antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity		(BCP-ALL)	
(ADCC)	71	B 細胞前體急性淋巴細胞性白血病	188
antigenicity 抗原性	161	bell stage 牙齒發生之鐘形期	143
antigen-presenting cells (APCs) 抗原呈現細胞	35	biocompatible 生物相容性	94
Anti-HBc 抗 B 型肝炎核心抗體	189	biodegradable materials 生物可解性材料	144
Anti-HCV-Ab 抗 C 型肝炎抗體	189	bio-ink 生物膠	176,178
		biomarker 生物標記	13

bionic engineering 仿生工程學	183	cell surface markers 細胞膜表面抗原	100
bioreactor 生物反應器	171	cell therapeutic products 細胞治療產品	184
bisulfite pyrosequencing		cell therapy 細胞治療	42,102
亞硫酸鈉-焦磷酸定序	12	cellular reprogramming 細胞再程序化	3
blastocyst 囊胚	3,134	cementum 牙骨質	144
blastocytes 囊胚期之細胞	34	central nervous system (CNS) 中樞神經系統	99
blastomere-like stem cell (BLSC)		ceramic 陶瓷	156
卵裂球樣幹細胞	39	ceramide 神經醯胺	59,62
bone marrow mesenchymal stem cells		cerebrospinal fluid (CSF) 腦脊髓液	100
骨髓間葉(質)幹細胞	135,160	chemical induction 化學誘導	55
bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMSC) 骨髓間葉幹細胞	36	chronic obstructive pulmonary disease (COPD) 化學可定義培養基	174
bone marrow stem cells 骨髓幹細胞	137	chimeras 嵌合鼠 / 嵌合體	8,34
bone morphogenetic protein 骨形成蛋白質	136	chimera formation 嵌合體囊胚形成能力	60
bovine spongiform encephalopathy 狂牛症	173	chimerism 融合體	52
brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 腦衍生神經滋長因子	103,107,108	chitosan 甲殼素	126
brown fat 棕色脂肪	23	<i>Chlamydia trachomatis</i> 衣原體	187
bud stage 牙齒發生之苞狀期	143	choline acetyltransferase 膽鹼乙醯轉移酶	103
Buerger's disease 血栓閉塞性脈管炎	37	chondrocytes 軟骨細胞	135,136
C.		chondro-differentiation potential 軟骨分化潛力	127
calcium influx 鈣離子流通	75	condrogenesis 軟骨再生	136
callus 骨痂	136	chorioiddecidual membrane 絨毛膜蛻膜	37
acute radiation syndrome 急性輻射損傷	111	cromatin 染色質	
cancer stem cell (CSC) 癌症幹細胞	33,39,142	accessibility 染色質可嵌入性	11
cancer-stemness properties 癌幹細胞特性	40	immunoprecipitation-sequencing (ChIP-Seq) 染色質免疫沈澱定序	9,10
cannulated screw 中空骨釘	162	remodeling 染色質構形重塑	41
canonical histone proteins 典型組蛋白分子	2	remodeling complexes 染色質重塑複合體	2
cap stage 牙齒發生之帽狀期	143	chromosome conformation capture by high-throughput sequencing (Hi-C)	
cardiac progenitor cells 心臟幹細胞	88	染色體構象捕獲定序	9,10
cardiomyocyte 心肌細胞	24,49,50,51,52,53	chronic liver failure 慢性肝衰竭	53
CD19-directed genetically modified autologous T-cell immunotherapy		chronic obstructive pulmonary disease (COPD) 慢性阻塞呼吸疾病	36
CD19 分化方向的自體 T 細胞免疫治療	188	classical activated macrophage (M1)	
cell replacement therapies (CRT) 細胞替代療法	35,38	古典活化巨噬細胞	88

cohort study 前瞻性人體臨床試驗	127	donor eligibility 捐贈者合適性判定	185
collagen 膠原蛋白	124,125,131,147,148,161	dopaminergic (DA) neurons 多巴胺神經元	103
colocalization 同位性	101		
colony 細胞聚落	33	E.	
connexin 43 連接蛋白 43	24	ectoderm 外胚層	142
cortical bone 緻密骨	162	effector T cells 作用性 T 細胞	22
critical limb ischemia 嚴重性肢體缺血	37	electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) 電子細胞表面電阻感應器	146
Crohn's disease 克隆氏症	36,37,54,111	embryo epithelium 胚胎上皮細胞	142
current good manufacture practice (cGMP)		embryoid body (EB) 擬胚體	34,61
現行藥品優良製造規範	104,106,187	embryonic germ cell (EG cell / EGC)	
current good tissue practice (CGTP)	185,186	胚胎生殖細胞	32,33
現行人體細胞組織優良操作規範	,187,193	embryonic germ layers 三胚層	32
cytokine 細胞激素	5,20,71	embryonic stem cell (ESC)	
cytomegalo virus (CMV) 巨細胞病毒	187,189	胚胎幹細胞	3,32,33,54,100,103,188
cytosine-phosphate-guanine islands		enamel 牙釉質	144
CpG 聚集區域	41	epithelial cells 牙釉質上皮細胞	144
cytotoxicity 細胞毒殺性	55	organ 牙釉質器官	144
		endochondral ossification 軟骨內骨化	136
D.		endoderm-like cells 類內胚層細胞	53
daughter cell 子代細胞	31	endothelial cells 內皮細胞	53,183
de-differentiation 逆分化	33	endothelial precursors 移植內皮前驅細胞	160
definitive endoderm 定型內胚層	66	endotoxin 內毒素	43
degradome sequencing analysis		enhanced permeability and retention effect (EPR effect) 高滲透與長滯留效應	94
降解組定序分析	11	enhancer 增強子	11
dental pulp stem cells (DPSC)		epiblasts 上胚葉	60
牙髓幹細胞	138,140,141,146	epidermal growth factor (EGF)	
dental stem cells 牙齒幹細胞	138	表皮細胞生長因子	100,101,177
dentate gyrus 海馬迴齒狀迴區	100	epigenetic 表觀遺傳	7,14
dentin 牙本質	144	barriers 表觀遺傳屏障	7
dentinogenesis 牙本質再生	147	map 表位基因	53
developmental genes 發育階段特异性基因	8	modification 表觀遺傳修飾	1
differentiation 分化	31,146	regulation 表觀基因調控	90
direct conversion 直接轉化	55	regulator / modulator 表觀遺傳調控因子	3
DNA methyltransferase (DNMT)		state 改變表位基因調控之狀態	52
DNA 甲基化轉移酶	41	epigenetics 表觀遺傳學	1,33,41
DNA methyl-transferase I			
去氧核糖核酸甲基化轉移酶 I	117		

epithelial cells 上皮細胞	137,183	gene silencing 基因沉默	41
epithelial invagination		genetic background 遺傳背景	106
上皮細胞與間葉細胞產生互動作用	146	genetic mutations 基因突變	20
epithelial-mesenchymal transition		genital ridges 生殖脊	32
(EMT) 上皮-間質轉變	60	genomic imprinting 基因體印記	41
Epstein Barr virus (EBV) EB 病毒	189	genomic imprinting pattern 基因印記圖譜	34
ES-like cells 類胚胎幹細胞	34	germ layer 胚層	39
euchromatin 真染色質	3	germ plasm 胚質	33
expansion process 細胞擴大	191	germline stem cell (GSC) 生殖系幹細胞	34
extracellular matrix (ECM)		germline transmission 種系傳遞	34
細胞外基質	5,31,100,141	Giemsa stain 吉姆薩染劑	3
extra-embryonic tissue 胚外組織	3,19	gingival stem cells (GSC) 牙齦幹細胞	138
		glia 神經膠細胞	99
F.		glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)	
Fas ligand Fas 配體	38	神經膠細胞株衍生神經滋養因子	103,108
feeder cells 餵養層	33	glioblastoma Multiforme (GBM)	
fibrin glue 纖維蛋白膠	161	多形性膠質母細胞瘤	105
fibrinogen 纖維蛋白原	127	glioma 神經膠細胞瘤	38
fibroblast growth factors (FGF)		Global Run-On sequencing (GRO-seq)	
纖維母細胞生長因子	100,101,108	轉錄中 RNA 聚合酶定序圖譜	10,12
fibroblasts 纖維母細胞	40,183	glucose (Glu) 葡萄糖	62,66
fibrocartilage / fibrous cartilage 纖維軟骨	125,136	glutamate-mediated excitotoxicity	
fibronectin 纖維連接蛋白	161	麩胺酸興奮毒性	104
flow cytometry 流式細胞儀	100	glycosaminoglycan 醣胺聚糖	124
Food and Drug Administration (US FDA)		glycosidic bond 醣苷鍵	59
美國食品暨藥物管理局	185	glycosphingolipid (GSL) 醣鞘脂	59
foot-print free 無足跡	55	apical papilla stem cells (SCAP)	
Fucose (Fuc) 岩藻糖	62	Good Manufacture Practice (GMP)	
		藥品優良製造規範	191
G.		Good Tissue Practice (GTP)	
β -glycerol phosphate β -甘油磷酸	126	組織優良操作規範	42,171,193
galactose (Gal) 半乳糖	32,66	graft-versus-host disease (GvHD)	
G-banding G 顯帶	3	移植抗宿主病	35,36,54,111,113
GD2-directed anti-idiotypic antibody		granulocyte-macrophage colony stimulating factor	
GD2 抗獨特型抗體	70	(GM-CSF) 顆粒細胞-巨噬細胞群落刺	
gelatin 明膠	34	激因子	36,71,191
gene profile 基因圖譜	36	ground state 基態	52

GTP inspection	GTP 查核	172	human embryonic stem cell line	
			人類胚胎幹細胞株	33
H.				
hair pluck	髮囊	138	human embryonic stem cells (hESCs)	
			人類胚胎幹細胞	19,20
haplo-matched	半配對	22	human genome project (HGP)	
HBsAg	B 型肝炎表面抗原	189	人類基因組計劃	90
hemacord	臍帶血液前驅細胞	188	human immunodeficiency virus type 1 and type 2	
hematopoietic stem cells (HSCs)			(HIV-1/2) 第一與第二型人類後天免疫	
造血幹細胞	20,32,112,134		不全症候群病毒	187
hepatic progenitor cells	肝臟前驅細胞	53	human leukocyte antigen G (HLA-G)	
hepatitis B virus (HBV)	B 型肝炎病毒	40,41,187	人類白血球抗原-G	22,23,38
hepatitis C virus (HCV)	C 型肝炎病毒	187	human leukocyte antigen (HLA)	
hepatocyte growth factor (HGF)			白血球抗原	36
肝臟生長因子	22,23		human natural killer cell antigen-1 (HNK-1)	
hepatocytes	肝細胞	49	人類自然殺手細胞抗原 1	60
hESC-MSCs	人體胚胎幹細胞衍生的		human T cell leukemia virus type I and II (HTLV-I/II)	
間葉幹細胞	20,21		第一與第二型人類 T 細胞白血病毒	187
heterochromatin	異染色質	3	Human Tissue Act	人體組織法案
heterogeneous	異質	171		188
hindgut	後腸	33	human urinal epithelial cells	
histocompatibility antigen (HLA)			人類尿道上皮細胞	50
組織相容性抗原	189		Hurler's syndrome	黏多醣症
histone	組蛋白	2		54
histone deacetylase (HDAC)			hyaline Cartilage	透明軟骨
組蛋白去乙酰化酶	139			124
histone deacetylase inhibitor (HDAC inhibitor)			hyaline-like Cartilage	類透明軟骨
組蛋白去乙酰化酶抑制劑	14			124
histone methyl transferase (HMT)			hyaluronic acid (HA)	玻尿酸
組蛋白甲基轉移酶	139			94
histone variants	組蛋白變體	2	hydroxyapatite	氫氧磷灰石
homologous use	同源性使用	186,193		147
human astroglial cells	人類星狀神經膠細胞	52	hypertrophic chondrocytes	軟骨細胞
human cell and tissue-based products				136
人體細胞組織物	192		hypoxia	缺氧
human cells, tissues, and cellular and tissue-based product (HCT/P)				31
人體細胞組織產品	167,171,184,185		I.	
			3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	
			3-異丁基-1-甲基黃嘌呤	113
			immortalization	不朽化
				104
			immune tolerance	免疫耐受性
				37
			immune-privileged organ	
			人體免疫特權器官	159
			immunogenic	致免疫性
				161
			immunohistochemistry	組織染色
				101

immunomodulatory 免疫調節	54	iPSC-MSCs	
immunostaining 免疫染色	101	誘導性多功能幹細胞衍生的間葉幹細胞	20
immunosuppression 免疫抑制	35	ischemic heart disease 缺血性心臟病	24
imprinted gene 印痕基因	8	ischemic stroke 缺血性腦中風	104
<i>in vitro</i> 體外	24,35		
<i>n vitro</i> fertilization 體外受精	33	J.	
incuded Cardiovascular Progenitor Cells (iCPCs)		junk RNA 垃圾核糖核酸	90
誘導型心肌前驅細胞	53		
indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)		K.	
吲哚胺-2,3-雙加氧酶	21,22,38	karyotype analysis 核型分析	114
induced neural stem cells (iNSCs)		Kellgren-Lawrence Grade (KL Grade)	
誘導型神經幹細胞	107	Kellgren-Lawrence 分級法	121,122
induced neurons (iNs) 誘導型神經元	107	Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)	
induced pluripotent stem cell (iPSC)		鑰孔帽貝血藍蛋白	69
誘導型多潛能幹細胞	4,7,20,33,34,35,54,59,65 ,85,86,87,103,106,140,160	knee osteoarthritis 膝部骨關節炎	37
infarct area 壞死區域	88	L.	
inflammatory bowel disease (IBD)		laminin 層粘連蛋白	161
發炎性腸道疾病	116	lentivirus 慢病毒	34
informed consent form 受試者同意書	172	leukemia inhibitory factor (LIF)	
innate immunity 先天免疫反應	22	白血病抑制因子	33,36
inner cell mass 內細胞團塊	32,60	lineage specifiers 細胞譜系特異因子	138
insertion mutagenesis 插入性突變	49	lineage-specific genes 細胞譜系特異基因	5
interferon- γ / interferon-gamma(IFN γ)		lymphocytes 淋巴細胞	38
伽瑪干擾素	21,116	Lysholm score 膝關節評分量表	125,126,127
interleukin-6 (IL-6)		M.	
白細胞介素 6 / 細胞激素-6	36,117	5-methylcytosine 5-甲基胞嘧啶	12
International Cartilage Repair Society (ICRS)		macrophage 巨噬細胞	40,49
國際修復協會	121,122	major histocompatibility complex class I / II	
International Society for Cellular Therapy (ISCT)		主要組織相容性複合體第I / II類	21,35
國際細胞療法協會	54,115,169	mandible 下顎骨	137
intron 內含子	41	maternal pronucleus 母系原核	3
investigational new drug (IND)		maternal-fetal tolerance 母體與胎兒的耐受性	22
試驗藥品臨床試驗	172	matrix stiffness 基質堅硬度	6
investigator brochure 主持人手冊	172	matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS)	
iPSC-derived animals			
誘導型多能性幹細胞衍生的動物	8		

基質輔助雷射脫附游離法質譜儀	59,63,67,76	multiple sclerosis 多發性硬化症	54
matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI)		multipotent stem cell 多效性幹細胞	32,133,134
基質誘導自體軟骨細胞移植	123,124,125,126	mutagenesis 突變	54
melanin 黑色素	169	myelin sheath 髓鞘	99
membrane domain 膜結構小域	60	myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)	
mesenchymal stem cell (MSC) 間葉幹細胞		骨髓衍生抑制細胞	22,23
/ 間質幹細胞	19,32,35,103,111,135,136,161,175	myoblasts 肌母細胞	49
mesenchymal tissue 間葉組織	137	myocardial infarction (MI) 心肌梗塞	88
mesenchymal-epithelial transition		myocytes 肌細胞	135
間葉細胞-上皮細胞的轉化過程	139	N.	
mesenchymal-to-epithelial transition (MET)		N-acetylgalactosamine (GalNAc)	
間質上皮轉換步驟	8	N-乙醯半乳糖胺	62
mesoderm 中胚層	23,142	N-acetylglucosamine (GlcNAc)	
messenger RNA (mRNA)		N-乙醯葡萄糖胺	62
訊息核糖核酸	1,12,40,90,137,139	N-acetylneuraminic acid (Sialic acid / NeuAc)	
methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-seq) 甲基化 DNA 免疫沉澱定序	10,12	N-乙醯神經胺酸(唾液酸)	62,64
microcephaly 小頭症	107	naïve / naïve state 初始 / 原始態	52,60
micrococcal nuclease (MNase) 微球菌核酸酶	11	nanofiber 奈米纖維	94
sensitive site sequencing (MNase-seq)		native elongating transcript sequencing (NET-Seq) 新合成 RNA 定序	10,12
微球菌核酸酶敏感性分析定序	10,11	natural killer cells 自然殺手細胞	38,40
microfracture 微骨折手術	123,124	natural killer lymphocytes/NKs	
microRNA / miRNA 小分子核糖核酸		自然殺手淋巴細胞	22,23
/ 微小 RNA	8,10,12,41,90,91,106,138	ncRNA 非編碼 RNA	41
microvesicles 微泡	75	<i>Neisseria gonorrhoea</i> 淋病球菌	187
migration 遷移	100	nerve conduits 神經導管	105
mineralization 礦化	146	neural 神經(的)	
minimally manipulated bone marrow		crest 神經脊嵴	137
經最小處理的骨髓	185	precursor markers 神經前驅細胞標記	101
mitogen-activated protein kinase (MEK)	139	progenitor cells (NPCs) 神經前驅細胞	50,52
mitosis 有絲分裂	1		,66
monocyte 單核球	94	rosettes 神經玫瑰環	34
monolayer embryonic fibroblast		stem cell 神經幹細胞	100
單層生長之胚胎纖維母細胞	33	neurite outgrowth 神經元突生長	108
morula stage 桑椹胚階段	61	neuroblast 神經母細胞	100
mosaicplasty 馬賽克鑲嵌術	123	neurodegenerative diseases 神經退化疾病	99

neurofibrillary tangles 神經元纖維纏結	103	Parallel Analysis of RNA ends (PARE)	
neurogenesis 神經新生	99	RNA 末端並行分析	12
neuron 神經元 / 神經細胞	49,52,99,100,135,143	paraxial mesoderm 軸旁中胚層	23
neuroregeneration 神經再生	99	parental-origin-specific imprinted genes	
neurospheres 神經球	100	源自雙親特異性的印痕基因	8
neurotransmitters 神經傳遞物質	103	Parkinson's disease (PD) 巴金森氏症	99,103
neurotrophin 神經營養因子	107	partial thickness defect 部分厚度缺損	121
niche 微環境	31	paternal pronucleus 父系原核	3
noncoding RNA 非編碼核糖核酸	85,90	pathological remodeling 病理性重塑	85
nucleosome 核小體	1,10	peptide 胜肽	141
nucleosome signal 核小體訊號	11	periodontal stem cells (PDLSC)	
nucleosome-free reads 無核小體區段	11	牙周幹細胞	138,147
		periodontal tissue 牙周組織	144
O.		periosteal flap 骨膜	124
odontoblasts 牙本質母細胞	147	peripheral blood stem cell (PBSC)	
olfactory bulb 嗅球	100	周邊血液幹細胞	38
oligodendrocyte 寡突神經膠細胞	100	peripheral nerve injury 周邊神經損傷	105
oligopotent 少樣分化效力	184	peripheral nervous system (PNS)	
omentum 腹部繫膜	144	周邊神經系統	99
oncolytic virus 溶腫瘤病毒	106	permethylation 全甲基化反應	63,67
oogonia 卵原細胞	34	Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme	
oral epithelial cells 口腔上皮細胞	145	Good Manufacturing Practice	
oral mucosal epithelial cell		(PIC/S GMP)藥品優良製造準則之西藥	
口腔黏膜上皮細胞	160	藥品優良製造規範	42,43,155,167,171,196
oral-maxillo-facial 口腔顎顏面(的)	141	phenotype 表型	135
organ regeneration 器官再生	142	phyllodes tumor 葉狀乳房腫瘤	69
organoid 類器官	107	placenta 胎盤	19
osteoarthritis / OA / degenerative arthritis		placenta-derived mesenchymal stem cell	
骨關節炎 / 退化性關節炎	36,121	(pcMSC) 胎盤間葉幹細胞	37
osteoarthritis of the Hip 髖關節炎	36	plasticity 可塑性	34
osteoblasts 骨母細胞	135	platelet rich plasma 血小板濃縮液	127
osteochondral autograft 自體骨軟骨移植術	123	platelet-like proteoliposome (PLP)	
osteogenic stem cell 成骨幹細胞	32	類血小板蛋白微脂體	94
		pluripotency 多潛能性	60
P.		pluripotent 多潛能	134
pancreatic beta cells β 型胰島細胞	53	/ 多元分化效力	184
paracrine 旁分泌	117	/ 多潛能分化能力	7

pluripotency genes 多功能分化基因	8	receptor 受體	5,107
pluripotent genes 多能性相關之基因	1,5	recipient 受贈者	21
pluripotency transcription factors 多功能轉錄因子	40	regeneration 再生	35
pluripotent stem cells (PSCs) 多潛能性幹細胞	1,3,5,19,20,32,33,133	regenerative medicine 再生醫學	138,141
poly(N-isopropylacrylamide) polymer (PNIPAN) 聚異丙基丙烯酰胺聚合物	161	registration and listing 註冊列名登錄制度	185
polymer 高分子有機聚合體	155	regulatory T cells 調節性 T 細胞	23
polypeptides 多胜肽	174	rejuvenation 回春作用	54
polyvinyl alcohol 聚乙烯醇	146	relative communicable disease agent and disease (RCDAD) 相關傳染病及其病原	187
primary cilium 初級纖毛	100	reporter gene 報導基因法	101
primary transcript 初級轉錄子	90	repress 抑制	5
primitive streak 原條	33	reprogram 重編程	85
primordial germ cell (PGC) 原始生殖細胞	32,33	reprogramming 再程序化	7,41,106
process optimization 產程最適化	171	/ 重新編程	31,40
prochymal 細胞製劑	36,43,111,167,173	residual contaminants 殘留污染物	43
progenitor cell / progenitors 前驅細胞	31,53,66,136,137	retinal pigment epithelium 視網膜色素上皮	160
proinflammatory molecule 促炎性分子	89	retrovirus 反轉錄病毒	34
promoter 啟動子	1,101	RhD Rh 因子	189
prostaglandin E2 (PGE2) 前列腺素 E2	88	rheumatoid arthritis 類風溼性關節炎	36
prosthesis 替代器官或組織	183	riboswitches 核糖開關	41
protein array 蛋白質陣列	105	RNA polymerase 核糖核酸聚合酶	5
protein-free media (PFM) 無蛋白質成分培養基	174	RNA polymerase II 第二型的核糖核酸聚合酶	90
protein-induced pluripotent stem cell (piPSC) 蛋白質誘導複效性幹細胞	139	Rnase 核糖核酸酶	90
proteoglycans 多醣蛋白體	137	Romberg's disease 朗堡氏病	37
proximal stump 近端殘枝	99	S.	
pulp 牙髓	144	sarcopenia 肌少症	23
pulp mesenchymal cells 牙髓間葉細胞	144	satellite cells 衛星細胞	23
pyrogenicity 熱原性	43	Schwann cell 許旺細胞	54,105
		secondary spheres 第二次的神經球生成實驗	101
		selection process 選擇	191
		selective laser melting (SLM) 選擇性雷射熔融技術	164
R.		self-renew / self-renewal 自我更新	31,54,100,184
radial glia-like NSCs 類放射狀膠質細胞之神經幹細胞	100	senescence 老化	19
		serum-free media (SFM) 無血清培養基	174

shear stress 剪應力	6	temporomandibular joint regeneration	
Shinya Yamanaka 山中伸弥	4,34,138	顛顎關節再生	142
signal transduction factors 訊息傳導因子	144	teratoma 畸胎瘤	20,64
signaling cascades 傳訊級聯反應	5	terminal sterilization 終端滅菌	171
small blood stem cell (SB) 微小血液幹細胞	39	The European Parliament and of the Council	
soma 細胞體	107	歐洲議會執行委員會	188
somatic cell 體細胞	1	Therapeutic Goods Act 1989 (TG Act)	
spermatogonia stem cell (SSC) 精原幹細胞	34	醫療產品法	192
sphingosine 鞘氨醇	59	Therapeutic Goods Administration (TGA)	
spinal cord injury (SCI) 脊椎損傷	99	澳洲醫療用品管理局	191
stage-specific embryonic antigen 3		Therapeutic Goods Regulations 1990	
人類胚胎幹細胞特異性標記 SSEA-3	59	(TG Regulations) 醫療產品規範	193
stem cell 幹細胞	31,133,175,184	third molar tooth stem cells 第三白齒幹細胞	140
stem cells from apical papilla 牙根尖幹細胞	147	thrombin 凝血酶	127
stem cells from human exfoliated decid-uous teeth		tissue engineered medical products (TEMPS)	
(SHED) 乳牙牙髓幹細胞	138,140,141,146,147	組織工程醫療	184
stem cells from oral mucosa		tissue regeneration 組織再生	137
頰側黏膜纖維母細胞	140	tissue-specific stem cell 組織特異性幹細胞	19, 32
stromal cells / stroma cell 基質細胞	31,35,112	totipotency 全能分化性	4
subchondral bone 軟骨下層硬骨	136	totipotent 全能性 / 全能分化效力	133,184
substantia nigra pars compacta (SNpc)		totipotent stem cell 全能性幹細胞	133
黑質緻密部	103	toxoplasma 弓漿蟲	189
symmetric self-renewal proliferation		transcription 轉錄	90
細胞對稱性增生	33	transcriptome	53
synapse 突觸	99	transdifferentiation / trans-differentiation	
synergistic effect 協同作用	55	轉分化	6,88,89,142
systemic lupus erythematosus		transfection 轉染	139
全身性紅斑狼瘡	35	transforming growth factor beta (TGF-β)	
T.		轉化生長因子-β	113,136
T cell T 細胞	40	transgenic reporter animal 基因轉殖動物	101
Taiwan Food and Drug Administration		translation 轉譯	90
食品藥物管理署	128	transmissible sponge-form encephalitis (TSE)	
Tandem Mass Spectrometer (MS/MS)		傳染性海綿狀腦病變	187
串聯質譜儀	59,63,64,66,67,76	transposase 轉座酶	11
target pathway 標的途徑	19,55	traumatic brain injury (TBI) 創傷性腦損傷	99
telomere 端粒	19	<i>Treponema pallidum</i> 梅毒	187
		trophoblast 滋養層母細胞	20,38

<i>Trypanosoma cruzi</i> 克魯氏錐蟲	189	xenogenic 異種	184
tryptophan catabolizing enzyme 色胺酸的相關代謝酵素	38	Y.	
tumor associate-macrophage 腫瘤相關巨噬細胞	40	Yamanaka factors 山中因子	4,33,34,38,53
tumor-associated carbohydrate antigen 腫瘤相關醣抗原	68		
tumorigenesis 腫瘤生成	7		
tumor-initiating cell (TIC) 癌症起始細胞	40		
Type II Collagen 第二型膠原蛋白	124		
tyrosinase activity 酪胺酸酶活性	169		
U.			
umbilical cord 臍帶	19		
unipotent 單分化效力	184		
unipotent stem cell 單能性幹細胞	32		
unrelated allogenic hematopoietic progenitor cells (HPC) 無關聯異體血液前驅細胞	188		
uracil 尿嘧啶	12		
V.			
vascular endothelial growth factor (VEGF) 血管內皮生長因子	94,103		
vascularized organs 具有血管之器官	185		
ventral mesencephalon 腹側中腦	103		
ventricular hypertrophy 心室肥大	85		
very small embryonic like stem cell (VSEL) 極微小類胚胎幹細胞	39		
W.			
Wharton's jelly 瓦頓氏凝膠	20		
white fat 白脂肪	23		
WHO 世界衛生組織	159		
whole genome bisulfite sequencing (WGBS) 亞硫酸鈉處理之全基因組定序	12		
X.			
xeno-free media (XFM) 無異源成分培養基	174		

作者簡歷

游芷芸

現任：

國立臺灣大學生物科技研究所 博士候選人

最高學歷：

國立臺灣大學獸醫所碩士

E-mail：d01642006@ntu.edu.tw

謝欣庭

現任：

國立臺灣大學生物科技研究所 碩士生

最高學歷：

臺北醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系
學士

經歷：

2016 年考取醫事檢驗師證照

E-mail：R05642008@ntu.edu.tw

許溥昇

現任：

國立臺灣大學 生物科技研究所 碩士生

最高學歷：

輔仁大學食品科學系

E-mail：r06642008@ntu.edu.tw

楊芝宜

現任：

國立臺灣大學 生物科技研究所 碩士生

最高學歷：

私立東吳大學微生物學系

E-mail：miumiu88909@gmail.com

林劭品

現任：

國立臺灣大學生物科技研究所 副教授

國立臺灣大學/中央研究院 基因體與系統生物學學程 核心教師

中央研究院農業生物科技研究中心 副研究員

國立臺灣大學發育生物學與再生醫學研究中心 副執行長

最高學歷：

英國劍橋大學生理、發育生物學與神經科學研究所博士

經歷：

臺灣幹細胞學會秘書長

美國哥倫比亞大學 遺傳與發育生物學研究所博士後研究員

馬偕醫院醫學研究科助研究員

E-mail：shaupinglin@ntu.edu.tw

顏伶汝

現任：

財團法人國家衛生研究院細胞及系統醫學研究所 研究員級主治醫師兼副所長

財團法人國家衛生研究院細胞及系統醫學研究所再生醫學研究團隊 研究員級主治醫師

最高學歷：

加州大學舊金山分校(UCSF)醫學院，
M.D.

經歷：

國泰醫院婦產科兼任主治醫師

ES Cell International(澳洲)，人類胚胎幹細胞研究專員訓練

UCSF 胚胎幹細胞研究中心訪問學者

國家衛生研究院幹細胞研究中心博士後研究學者

臺大醫院婦產部(建教訓練名額)第二、
第三年住院醫師及總住院醫師
UCLA 婦產科第一年住院醫師
UCLA 病理科醫學二年級後臨床研究員
E-mail : blyen@nhri.org.tw

郭勇哲

現任：
臺北醫學大學生物化學暨細胞分子生物
學科 博士後研究員
臺北醫學大學校級細胞治療與再生醫學
研究中心 博士後研究員
最高學歷：
國立成功大學基礎醫學研究所博士
經歷：
國立臺灣大學解剖學暨細胞生物學研究
所博士後研究員
E-mail : s03271@tmu.edu.tw

吳友志

現任：
臺北醫學大學 校級細胞治療與再生醫學
研究中心 助理研究員
臺北醫學大學 GTP 核心實驗室 品質主管
最高學歷：
國防醫學院生命科學研究所博士
經歷：
臺北醫學大學生物化學暨細胞分子生物
學科博士後研究員
E-mail : yuchihwu@tmu.edu.tw

吳玫欣

現任：
臺北醫學大學生物化學暨細胞分子生物
學科 博士後研究員
最高學歷：
臺北醫學大學醫學科學研究所博士

經歷：
臺北醫學大學生物化學暨細胞分子生物
學科講師
E-mail : hsin@tmu.edu.tw

賴思全

現任：
臺北醫學大學醫學科學研究所 博士生
最高學歷：
中國醫藥大學碩士
E-mail : miracle0820@gmail.com

彭學薇

現任：
臺北醫學大學醫學科學研究所 博士生
最高學歷：
臺北醫學大學醫學科學研究所碩士
E-mail : kiop995320@gmail.com

蘇鈺婷

現任：
臺北醫學大學生物化學暨細胞分子生物
學科 研究技術員
最高學歷：
臺北醫學大學醫學科學研究所碩士
經歷：
衛生福利部疾病管制署研究技術員
E-mail : chang840840@gmail.com

黃彥華

現任：
臺北醫學大學生物化學暨細胞分子生物
學科 特聘教授
臺北醫學大學 GTP 核心實驗室 主任
臺灣幹細胞學會 理事
臺灣細胞治療學會 理事
最高學歷：

國立臺灣大學生化科學研究所博士

經歷：

中央研究院生物醫學研究所博士後研究員

E-mail : rita1204@tmu.edu.tw

呂仁

現任：

中央研究院基因體研究中心 副研究員
(兼任)國立臺灣大學生命科學院基因體與系統生物學 副教授

(合聘)慈濟大學生命科學系 副教授

最高學歷：

國立臺灣大學微生物學博士

經歷：

耶魯大學博士後研究

E-mail : jeanlu@gate.sinica.edu.tw

賴培倫

現任：

中央研究院基因體研究中心 博士後研究學者

最高學歷：

國立臺灣大學基因體與系統生物學博士

經歷：

中央研究院博士後研究學者

E-mail : d01b48001@ntu.edu.tw

陳尚甫

現任：

斯克里普斯研究所(The Scripps Research Institute) 博士研究生

最高學歷：

國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所 碩士

經歷：

中央研究院基因體研究中心研究助理

E-mail : r04b43027@ntu.edu.tw

梁毓津

現任：

臺北榮民總醫院醫學研究部助理研究員

最高學歷：

國防醫學院生命科學研究所博士

經歷：

林口長庚紀念醫院幹細胞與轉譯癌症研究所助理研究員

E-mail : yuh.jin.liang@gmail.com

洪榮堂

現任：

林口長庚紀念醫院幹細胞與轉譯癌症研究所 助理研究員

最高學歷：

國防醫學院生命科學研究所博士

經歷：

中央研究院基因體研究中心博士後研究員

E-mail : felixhjt@gmail.com

陳鈴津

現任：

林口長庚紀念醫院幹細胞與轉譯癌症研究所 特聘講座教授暨副所長

長庚大學 特聘講座教授

最高學歷：

美國芝加哥大學微生物免疫學博士

國立臺灣大學醫學院醫科醫學士

經歷：

中央研究院基因體研究中心特聘研究員 兼副主任

國立臺灣大學醫學院兼任教授

Professor and Chief, Division of Pediatric Hematology/Oncology, University of

California, San Diego, USA
E-mail : aliceyu@cgmh.org.tw

游正博

現任：

林口長庚紀念醫院幹細胞與轉譯癌症研究所 特聘講座教授暨所長

林口長庚紀念醫院細胞治療中心 主任
長庚大學 特聘講座教授

最高學歷：

美國芝加哥大學生物物理學博士
國立臺灣大學醫學院醫科醫學士

經歷：

中央研究院細胞與個體生物學研究所特聘研究員兼所長

中央研究院基因體研究中心特聘研究員兼幹細胞中心主任

中央研究院動物所特聘研究員兼所長
臺灣幹細胞學會創始理事長

Director, Experimental Hematology,
Department of Molecular Hematology and
Experimental Medicine, The Scripps
Research Institute, USA

E-mail : johnyu@cgmh.org.tw

陳泓志

現任：

中央研究院生物醫學科學研究所 博士後研究員

最高學歷：

英國伯明罕大學生物科學博士

E-mail : byronbio@ibms.sinica.edu.tw

湯文宏

現任：

中央研究院生物醫學科學研究所 研究助理

最高學歷：

國立陽明大學醫學生物技術暨檢驗學系
研究所碩士

E-mail : tony000861213@gmail.com

陳貞云

現任：

中央研究院生物醫學科學研究所 博士後研究員

最高學歷：

國立陽明大學 分子醫學博士學位學程博士

經歷：

臺大醫院腎臟內科研究助理

中央研究院生物化學所研究助理

E-mail : julep1982@gmail.com

臧天睿

現任：

大江生醫股份有限公司 產品設計專員

最高學歷：

國立臺灣大學臨床醫學研究所 博士

經歷：

中央研究院生物醫學科學研究所研究助理

E-mail : calvin0621@gmail.com

鄭媛元

現任：

中央研究院生物醫學科學研究所 博士後研究員

最高學歷：

國防醫學院生命科學所博士

E-mail : natascha@ibms.sinica.edu.tw

黃瀟瑩

現任：

中央研究院生物醫學科學研究所 博士後
研究員

最高學歷：

國立臺灣大學動物科學與技術學系博士

E-mail：jennifer0820@ibms.sinica.edu.tw

陳立綸

現任：

中央研究院生物醫學科學研究所 研究助
理

最高學歷：

國立陽明大學醫學工程學系碩士

E-mail：lilun0817@ibms.sinica.edu.tw

謝清河

現任：

中央研究院生物醫學科學研究所 研究員
臺大醫學院基因體暨蛋白質體醫學研究所/
臨床醫學研究所 教授

臺大醫院心臟血管外科 兼任主治醫師

最高學歷：

美國華盛頓大學生物工程系博士

經歷：

高雄長庚醫院住院醫師

臺大醫院心臟血管外科住院/總住院醫師
美國哈佛醫學院/麻省理工學院心臟血管
醫學博士後研究員

成大醫學院臨床醫學研究所教授

成大醫院心臟血管外科主治醫師

美國華盛頓大學生物工程系兼任副教授

E-mail：phsieh@ibms.sinica.edu.tw

高健育

現任：

財團法人國家衛生研究院細胞及系統醫
學研究所 博士後研究員

最高學歷：

國立清華大學生物科技研究研究所博士
E-mail：kcy7427p@gmail.com

邱英明

現任：

財團法人國家衛生研究院細胞及系統醫
學研究所 特聘研究員

最高學歷：

美國佛羅里達州立大學化學研究所博士
經歷：

財團法人國家衛生研究院幹細胞研究中
心特聘研究員兼主任

美國俄亥俄州立大學醫學系、分子學、
細胞生化學教授

美國俄亥俄州立大學 Arthur G.James 癌症
醫院及研究所「腦腫瘤基因治療組」主
任

美國俄亥俄州立大學醫學、生化、分子
遺傳與癌症中心人體藥物組助理教授、
副教授

美國馬里蘭州美國國家癌症中心博士後
研究員

E-mail：ingming@nhri.org.tw

洪士杰

現任：

中國醫藥大學新藥開發研究所 所長
中國醫藥大學附設醫院整合幹細胞中
心 主任

最高學歷：

東京大學醫學博士

國立陽明大學醫學士

經歷：

國立陽明大學臨床醫學研究所教授
臺北榮民總醫院主治醫師

E-mail：hung3340@gmail.com

陳郁君

現任：

亞東紀念醫院骨科部 研究員

元智大學通識部 兼任助理教授

最高學歷：

國立臺灣大學醫學工程學研究所博士

經歷：

台拉維夫大學生物醫學工程系訪問學者

E-mail：f94548002@gmail.com

張至宏

現任：

亞東紀念醫院骨科部部主任、台灣再生醫學會 理事長

最高學歷：

國立臺灣大學醫學工程學研究所博士

經歷：

臺灣再生醫學會秘書長

臺灣骨科研究學會秘書長

元智大學生物科技與工程研究所教授

臺灣肩肘關節醫學會理事

中華民國關節鏡及膝關節學會理事

國立臺灣大學醫學院醫學系骨科兼任助理教授

國際外科學院院士

臺灣骨科創傷醫學會常務理事

E-mail：orthocch@mail.femh.org.tw

陳敏慧

現任：

臺大臨床牙醫學研究所 教授兼所長

臺大醫院牙體復形美容牙科主任、主治醫師

臺大醫學院轉譯醫學博士班學程 教授

最高學歷：

紐西蘭奧克蘭大學生物醫學材料工程學博士

國立臺灣大學 EMBA 管理碩士

國立臺灣大學牙醫學士

經歷：

臺大醫院牙科住院醫師、總醫師、兼任主治醫師

馬偕醫院分院牙科主任、主治醫師

美國凱斯西儲大學教學醫院研究員

紐西蘭奧克蘭大學研究員

中華民國牙體復形學會理事長、監事、理事、專科醫師甄審主委

中華牙醫學會監事、理事

台灣再生醫學會監事、理事

中華民國老人口腔醫學會理事、專科醫師甄審主委

E-mail：minhueychen@ntu.edu.tw

沈欣欣

現任：

工研院生醫所 組長

最高學歷：

國立陽明大學遺傳學研究所博士

經歷：

工研院生醫所副營運長

工研院生醫所組長

工研院生醫所副組長

E-mail：shenhsin@itri.org.tw

駱婉珣

現任：

工研院生醫所 經理

最高學歷：

國防醫學院細胞生物暨解剖所碩士

經歷：

工研院生醫所 研究員

工研院生醫所 副研究員

凱得生科技股份有限公司 副研究員

E-mail：WanShiunLou@itri.org.tw

王羽淇

現任：

工研院生醫所 經理

最高學歷：

國立臺灣大學化工所 博士

經歷：

Cytophics / Senior Researcher

Biotechplex / Researcher

University of Cincinnati / Postdoc Fellow

E-mail : yuchiw@itri.org.tw

Ph.D., Program in Cell Regulation,
University of Texas Southwestern Medical
Center

經歷：

Postdoc, Stanford University

Researcher and Senior Researcher,

Biomedical Technology and Device

Research Laboratories, Industrial

Technology Research Institute

E-mail : pjlin@itri.org.tw

王英凱

現任：

工研院生醫所 經理

最高學歷：

國立臺灣大學醫學院生化所博士

經歷：

工研院生醫所資深研究員

億康生物科技股份有限公司市場行銷部
經理

賽宇細胞科技股份有限公司高級研究員

工研院生醫中心研究員

E-mail : ikwang@itri.org.tw

楊明嘉

現任：

工研院生醫所 副理

最高學歷：

國立臺灣大學醫學工程所博士

經歷：

工研院生醫所研究員

臺大醫院心臟外科博士後研究員

E-mail : s1979329@itri.org.tw

蔡佩宜

現任：

工研院生醫所 經理

最高學歷：

國立中正大學化工所碩士

經歷：

工研院生醫所 研究員

E-mail : peiyi@itri.org.tw

劉育秉

現任：

工研院生醫所 研究員

最高學歷：

國立陽明大學醫學工程博士

E-mail : YBLiou@itri.org.tw

林佩如

現任：

工研院生醫所 副理

最高學歷：

廖智菁

現任：

工研院生醫所 研究員

最高學歷：

國立成功大學藥理所碩士

經歷：

台大醫院新竹分院醫檢師

E-mail : RitaLiao@itri.org.tw

王德原

現任：

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組
組長

最高學歷：

長庚大學基礎醫學研究所博士

經歷：

衛生福利部食品藥物管理署北區管理中
心簡任技正、副主任

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組
簡任技正

行政院衛生署食品藥物管理局研究檢驗
組科長、簡任技正

行政院衛生署藥物食品檢驗局藥物生物
學組技士、技正、科長

E-mail：dywang@fda.gov.tw

附錄一

2016 ISSCR 幹細胞研究及臨床轉譯指南摘要初譯

臺灣幹細胞學會

文件下載：http://www.tsscr.org.tw/2016_09_28.htm

※說明:

1. 此份文件為國際幹細胞學會(International Society for Stem Cell Research; ISSCR)於 2016 年 5 月 12 日所公布之“Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation”其中綱要之翻譯初稿。
2. 臺灣幹細胞學會秘書處公開此翻譯初稿之用意為加速國內討論相關倫理規範與立法參考。
3. 本文件不具有任何法律效力，也不代表本學會或本學會任一成員之想法或主張。
4. 此為部分翻譯初稿，期待各界比較原始文件，指出其中需要修訂或更正之處，學會秘書處不保證翻譯用字的精確性，對翻譯內容也不負任何法律責任。

台灣幹細胞學會秘書處

ISSCR 2016 幹細胞研究及臨床轉譯指南(摘要)

條文	說明
2.1.1	所有涉及人類胚胎著床前期，人類胚胎及胚胎來源之細胞，或體外產生經受精實驗或用於製造胚胎之人類生殖細胞之研究，需經具特定評估資歷之胚胎研究監管(EMRO)部門審批及監測。 通過遺傳或化學方式將體細胞轉變為多潛能(pluripotent)幹細胞(例如: iPSC)之研究，如果不涉及人類胚胎之生成，或研究用人類全或多功能幹細胞之敏感層面，需相關人體實驗審查，但不需經人體胚胎研究監管(EMRO)部門審核。
2.1.2	胚胎研究監管(EMRO)由未直接參與待審核研究計畫之評審團進行。成員包括具相關資歷之學術人員，倫理學家及社區公眾。
2.1.3	評審及監管採分類制(三類)，以確保人類胚胎及胚胎幹細胞研究之合法性；全球研究之一致性；以及界定需評審之研究計畫之性質；
2.1.4	ISSCR 支持在嚴謹之胚胎研究監管(EMRO)體系下進行之涉及修改生殖細胞，合子及/或人類著床前胚胎核遺傳物質之相關實驗室基礎研究，以加深對生命原理之了解，協助以修改核遺傳物質預防遺傳疾病之醫療行為之潛在安全性及可行性評估。ISSCR 申明：人類在科學面及倫理面取得進一步共識前，任何以生殖為目的之修改人類胚胎核遺傳物質之行為目前都是不成熟的，須予以禁止。
2.1.5	人類全/多功能幹細胞與其他動物細胞嵌合體之研究，凡涉及中樞神經系統及/或生殖系統嵌合，應設特項研究監管；可以從嚴謹之動物實驗中已獲得之結果作為參考及合理之推論。同時，應遵循對動物之人道原則。
2.2.1	所有供人類胚胎及幹細胞研究使用之生殖細胞，胚胎，或體細胞之獲取必須先通過嚴格之審查。
2.2.2	所有用於胚胎及胚胎幹細胞研究之組織來源 (包括所有生殖細胞捐贈者)

均需在組織預期轉送研究團隊之時，或在收集及儲存待用時 徵得捐贈者之書面同意。

-
- 2.2.3** 對組織取得方式之審查應確保捐贈者明確了解參與研究之自願性
-
- 2.2.4** 研究監管部門授權研究執行機構對胚胎,生殖細胞,及體細胞之提供者酌給補償。
-
- 2.2.5** 通過臨床以外獲取研究用卵細胞之途徑,其補償不得涉嫌非法之誘導行為。
-
- 2.2.6** 研究用捐贈者同意書必須區別於臨床受試者同意書
-
- 2.2.7** 對人體組織之取得方式及取得同意書之流程需具備嚴格之規範
-
- 2.3.1** 涉及建立新的人類胚胎幹細胞株之計畫需具科學合理性,須由具適當專業背景之研究人員執行. 新的人類胚胎幹細胞株應與其他研究業人員分享
-
- 2.3.2** 新的人類胚胎幹細胞株建立計畫書中應詳盡概括新細胞株之儲存及公開性. 新的多能幹細胞株在建立及初次發表後應盡快公開配送。
-
- 2.3.3** 研究人員及細胞株儲存庫需建立相關政策說明是否需要以及如何將研究中之意外發現反饋給受試者/捐贈者. 相關政策應在受試者/捐贈者簽屬同意書時做詳盡說明. 受試者/捐贈者可以選擇是否以及希望對哪些發現有被告知權. 司法規定對大眾健康相關之發現應依法通報。
-
- 2.3.4** ISSCR 建議 建立國家級和世界級之儲存庫, 在全球範圍內協調新幹細胞株之儲存及配送。
-
- 2.3.5** 對於會在研究領域內廣泛使用的細胞株,應建立細胞株來源檔. 受試者/捐贈者同意書及基因組與功能鑑定相關原始資料中應包含可驗證來源之內容。
-
- 2.3.6** 從事幹細胞研究之機構, 無論公立或私立, 學術或非學術, 均應建立規範機制, 以確保研究人員在進行符合科學合理性及倫理規範之研究時, 對研究材料之取得, 不應受到不當之經濟或行政之干預。
-
- 2.4.1** 學術, 行業及研究機構應制定內部規範標準以支持 ISSCS 擬定之行為規範的實施
-
- 3.1.1.1** 涉及異體使用之細胞捐贈, 捐贈者應提供書面及具有法律效力之同意書. 同意書中應明述捐贈細胞之用途(如: 研究和治療), 預期外發現之反饋,商業應用之可能性等適用細則。
-
- 3.1.1.2** 如同血液捐贈與器官捐贈, 細胞捐贈者也應進行傳染性疾病, 其他風險因子及遺傳病之篩檢。
-
- 3.1.2.1** 所有試劑及製程應具品管及 SOP, 以確保生產中使用試劑之品質及方法之規範. 臨床應用之幹細胞, 如須經過多步體外操作,應遵循優良生產規範(GMP)。
-
- 3.1.2.2** 細胞製程之評審及監管嚴格程度取決於以下風險誘導因素:對細胞之操作程度, 來源及用途, 臨床試驗之性質, 受試者數量。
-
- 3.1.2.3** 用於細胞培養及保存之試劑如果為動物來源, 應盡量用來源為人或化學成分確定之試劑取而代之。
-

- 3.1.2.4 在設計使用於人體之細胞放行標準時,應將培養誘導之異常降到最低.評審過程中應明確界定放行標準中對中間及終產物之測試.
-
- 3.1.2.5 贊助機構,行業及控管部門應共同努力,建立具臨床實用性之細胞株的公共資料庫.資料庫中的資訊應可以協助為特定疾病尋找有療效潛力之細胞
-
- 3.2.1.1 鑒於幹細胞治療相關之臨床前研究對動物模型之高需求量, 研究人員應遵循 3 “R” 原則: **Reduce numbers** (減少實驗動物數量), **Refine protocols**(精緻實驗方法), **Replace animals with in vitro or non animal experimental platforms**(以體外或非動物實驗平台取代動物實驗).
-
- 3.2.1.2 在臨床前試驗對安全及療效取得嚴謹之論證後方可進行早期人體試驗. 人體試驗之執行決策應參考臨床前試驗結果, 及考量相關風險, 負擔與社會倫理敏感性.
-
- 3.2.1.3 所有測試安全性及療效性之臨床前試驗的設計必須精準且公正的考量臨床指標. 尤其, 以評估臨床試驗是否啟動為目的之臨床前研究, 應具高度內在確效性; 臨床代表性及可重複性.
-
- 3.2.2.1 用於臨床試驗之細胞必須經過嚴格之鑑定以評估其潛在毒性. 相關鑑定包括體外研究, 以及動物臨床與組織生理學檢測.
-
- 3.2.2.2 所有幹細胞產品, 尤其是經體外繼代培養, 遺傳修飾或具多能性, 都需進行嚴格之致瘤性風險評估.
-
- 3.2.2.3 所有細胞產品, 無論是局部或是系統注射, 都必須對細胞進行詳盡及靈敏的生物分布性研究.
-
- 3.2.2.4 在啟動多元之高風險試驗/研究前, 除細胞產品之安全性外, 研究人員需確立其他元素(如: 裝置, 或手術輔助治療)之安全性及最佳化.
-
- 3.2.2.5 臨床前研究人員應採取相應措施對長期風險及最新與不可預測之安全問題進行偵測.
-
- 3.2.2.6 研究人員, 調控及評審機構可以利用幹細胞研究體系提升臨床前毒理研究之預測性.
-
- 3.2.3.1 在合理設計之臨床前研究取得具臨床意義的充足證據後, 方可開始正式人體試驗. 除非類似產品在類似人類疾病治療中顯現出明顯療效, 否則, 仍應先使用合適之臨床及組織生理學動物模型.
-
- 3.2.3.2 應通過小型動物模型來評估細胞治療帶來的型態及功能修復, 作用機制, 以及治療方案之優化.
-
- 3.2.3.3 以下情形之幹細胞研究應使用大型動物模型: 大型動物模型比小型動物模型更接近人類之解剖及病理, 且臨床試驗對受試者具高風險性.
-
- 3.2.4.1 資助方, 基礎研究及臨床研究人員應發表臨床前研究之完整內容與結果. 其他人員應可以從發表內容中評估試驗結果於結論之嚴謹性,
-
- 3.3.1.1 所有涉及幹細胞臨床應用之研究均需經獨立之人體試驗委員會的嚴格審查, 批准及持續監測.
-
- 3.3.1.2 幹細胞臨床研究計畫之評審過程應包括獨立專家對試驗方案之審查. 評審

專家應具備以下能力：評估臨床前體外及活體試驗；評估試驗設計之嚴謹性(包括：是否有足夠的計劃分析點；實驗統計分析方法是否正確；疾病相關之受試者保護問題。)

-
- 3.3.2.1** 臨床試驗的啟動要基於對該療法已取得的證據之上。
-
- 3.3.2.2** 試驗應具合理的風險評估(利大於弊)，區分風險並最小化之。認可未知風險；預估對受試者及社會之福祉。
-
- 3.3.2.3** 當測試療法之受試者不具提供有效同意書之能力時，試驗風險應最低化，除非該療法之利大於其風險。
-
- 3.3.2.4** 幹細胞療法之臨床目標為：可替代或更優於現有療法；應對特殊之治療需求。現有療法之替代療法定義為：現有療法具某些缺點，而幹細胞療法一旦安全性及療效性得到證實，可以克服現有療法之缺點。
-
- 3.3.2.5** 幹細胞臨床研究受試者之招募對象應為該療法之可能受益者。除非有合理證據，否則，不應拒絕符合條件之候選人參與該幹細胞臨床研究。除非不具科學和理性，否則，受試者應兼顧兩性及不同種族及信仰群體。
-
- 3.3.2.6** 研究開始前，應先取得受試者或其法定代理人簽署之受試者同意書。研究進程中，如預期之風險與療效有重大改變，或出現新的療法，應更新並重新簽署受試者同意書。
-
- 3.3.2.7** 對於患有影響認知能力病症之受試者，在取得其同意書前，應先對其認知能力進行正式評估。
-
- 3.3.2.8** 研究人員應遵循保護受試者隱私權之原則。
-
- 3.3.2.9** 病患出資，或付費加入之臨床試驗，因其經費來源之特殊性，對試驗的科學嚴謹性及公正性是一種考驗。因此，此類試驗需先通過獨立評審機構之審核，並接受嚴格監管，以確保研究之嚴謹性，透明度，及病患福祉。
-
- 3.3.3.1** 有關幹細胞療法之臨床前及早期臨床試驗，在受試者同意書取得程序中應對預期療效做合理說明，以避免對療效之過度誇大或誤解。
-
- 3.3.3.2** 新穎療法在最初試驗時，應遵循以下原則：即使高風險試驗方法之預期療效高於低風險試驗方法，仍應先進行低風險試驗方法之研究。
-
- 3.3.3.3** 對於早期臨床試驗，研究人員應採取措施合理優化設計，以最大化其科學價值。
-
- 3.3.4.1** 幹細胞療法之臨床研究應與當地現有或具合理可行性之最佳療法做比較。
-
- 3.3.4.2** 對於某些病症，當目前尚無有效治療方法，且幹細胞治療之實施具侵犯性時，試驗設計應考慮加入 placebo (安慰劑)組 或 sham (控制)組，並與試驗組做對比。此設計的前提是已有經驗表明其可行性及安全性。
-
- 3.3.5.1** 臨床研究應具有獨立的資料及數據追蹤計畫。實驗數據應在事先規定好的時間點或有需求時及時整理並更新。數資管理人員及單位應獨立於研究團隊。
-
- 3.3.5.2** 鑒於移植之細胞產品可能留存人體，依幹細胞療法之特性，有必要對受試者健康狀況進行長期追蹤。並應持續保護受試者之隱私權。受試者如需退

出試驗，應採取漸退式，以確保其身心之健康。

- 3.3.5.3** 有關幹細胞治療之人體試驗，考慮可能出現受試者死亡之情形，應事先徵得受試者同意，允許對屍體進行局部或整體解剖，以了解移植細胞著床及功能相關信息，以助科學之進步。研究方在做計畫預算時，應盡量將用於屍體解剖相關費用計入預算中。並制定相關機制以確保該經費之長期預留。
- 3.3.6.1** 所有人體試驗均須在公共資料庫中登記。
- 3.3.6.2** 研究人員應對試驗之不良反應及其程度做書面報告，並分析不良反應與治療方式是否有一定相關性。
- 3.3.6.3** 不論試驗結果如何(有效，無效或證據不足)，研究人員都應該按國際期刊發表準則及時發表累積之實驗結果。
- 3.4.1** 醫師級科研人員可以在正式人體臨床試驗範疇之外，為極少數病患提供未經證實療效之幹細胞治療。此時，應嚴格遵照本章節規定之條款。
- 3.5.1.1** 任何新醫療產品在納入常規臨床使用前，必須對其適用症及病患群做合理的風險及療效認證。
- 3.5.1.2** 幹細胞療法進入臨床使用後，開發方，生產方，醫事方及監管方仍須對該療法之安全性，療效性及應用性資料做持續的系統性追蹤，收集及報告。
- 3.5.1.3** 建立特定病患群登記制，將對特定群體接受幹細胞治療之安全性及療效預測提供重要參考價值。
- 3.5.1.4** 鑒於幹細胞治療結果之不確定性，任何幹細胞療法在用於治療非適應(off label)病症時，應謹慎為之。
- 3.5.2.1** 幹細胞醫療之研發應著眼於實現對患者，社會醫療體系及醫療費用承擔方之共同經濟價值。
- 3.5.2.2** 開發方，出資方，醫事方及醫療費用承擔方應協力確保，有生命危險及重病患，不會因幹細胞療法之費用過高而無法接受治療。
- 4.1** 幹細胞研究領域之人員，在對公眾進行宣教時，應秉持務實，公正，負責之態度。
- 4.2** 研究機構人員及資方在媒體或醫事通訊中描述人體臨床試驗時，應聲明研究的首要目的是系統評估該療法之安全性及有效性，而非治療；對結果的報告應公正。當試驗預設的首要功效指標結果不具統計意義時，不應刻意強調具統計意義的次要指標。
- 4.3** 為病患介紹幹細胞療法時，應以尊重病患福祉及科學嚴謹性為首要原則。
- 5.1** 研發方，產業界及調控方應協力制定標準，規範幹細胞相關之基礎及醫療研究的設計，執行，結果釋譯及報告。並確保制定規範之執行。
- 5.2** 本指南應定期更新，以應對科學之進步，新挑戰之出現及社會考量之演變。

附錄二

細胞及基因治療產品管理法(草案)

衛生福利部 食品藥物管理署

文件下載：<https://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?cid=3&id=22304>

細胞及基因治療產品管理法（草案）

總說明

106年7月

目前仍有許多無法憑藉現今醫療技術及現存化學或生物藥品，得以治癒之疾病，故各界引領期盼能透過先進醫療技術及藥品之研發，早日獲得完善的治療。由醫藥學界、生技產業界為主導，積極投入各種先進醫療技術及藥品之研發，以尋求人類疾病治療之突破，嘉惠眾多病人，解除病人之痛楚，進而改善病人之生活品質。於此細胞治療產品或基因治療產品之發展，扮演著重要且關鍵的角色，並帶給眾多病人得以治癒病痛的一線曙光。

爰此，在醫藥行政方面實有必要建置一個確保細胞、基因治療產品之品質、安全及療效之法規範，以促進病人權利、維護公共衛生，並提供清楚、明確及調和現有相關規定之法制環境，促使從事細胞、基因治療產品之研發者能有所依循。

就此，美國食品藥物管理局（U.S. Food and Drug Administration, 下稱 FDA）基於國會立法之「公共衛生服務法」（Public Health Service Act, 下稱 PHS Act）之立法授權，制定頒行所謂 21 Code of Federal Regulation（下稱 CFR）1271 之 Regulation，除將細胞治療及基因治療產品，統稱為「人類細胞、組織、與細胞或組織產品」（Human cells, tissues, and cellular or tissue-based products, 下稱 HCT/Ps）並予以定義外，亦依 HCT/Ps 之風險高低予以不同法規制，而就其上市販賣程序、條件等明文規制之；再者，歐盟於 2003 年 6 月頒布 Directive 2003/63/EC，以修正 Directive 2001/83/EC，正式將基因治療產品（gene therapy medicinal product, GTMP）及體細胞治療產品（somatic cell therapy medicinal product, CTMP）規定為所謂先進治療產品（advanced therapy medicinal product, ATMP），並規定此等產品申請上市販賣時所需提出之資料外，更於 2007 年頒布內容直接對加盟國發生拘束力之 Regulation 1394/2007，再將組織工程產品（tissue engineered medicinal product, TEMP），正式納入 ATMP 範圍內，且明定此等 ATMP 產品上市販賣審查所需文件及程序等事項；另外，日本則是修訂原先之「藥事法」，而制定「有關醫藥品、醫療機器等之品質、有效性及安全性確保等之法律」（Pharmaceutical and Medical Device Act, PMD. Act）。除於原有關於藥品、醫療器材之規制外，新增有關組織工程產品、細胞治療及基因治療（統稱「再生醫療等製品」）之定義及專門章節規定，將從事「再生醫療等製品」之製造、販賣相關之製造販賣業、製造業及販賣業之「許可」程序及如何確保具品質、有效

性及安全性之「再生醫療等製品」上市販賣審查前之「承認」程序等事項，予以明文，甚且就「再生醫療等製品」之上市販賣審查，制定所謂「附條件期限之承認制度」。

綜上，爰參考美、歐、日等國內外相關立法例，擬具細胞及基因治療產品管理法，另外，考量細胞及基因治療產品之特性，及其實際醫療使用情形，經對於人類細胞加工之細胞及基因治療產品應符合本法規定，但細胞製造或操作過程，不經加工或體外細胞培養程序，且操作過程不改變細胞原有的生物特性，此類之細胞治療不以本法產品管理。本法未規定者如製造商及販賣商管理、許可證核發或展延等事宜、公開事項及專利保護、產品標籤、仿單、包裝及標示等管理、安全監視、不良反應通報、稽查及取締等，依醫療法、藥事法及其他有關法律之規定辦理。本法其要點如下：

- 一、為確保細胞及基因治療產品之品質、安全性及有效性，防止因使用該產品而引起傳染病之導入、傳播及擴散，特參考美、日、歐有關細胞、基因治療等產品法規，制定本法。（條文第一條）
- 二、有關本法於中央及各地方之主管機關，予以明文規定。（條文第二條）
- 三、明確定義有關本法細胞及基因治療產品之用詞。（條文第三條）
- 四、確認捐贈者之合適性，使細胞或基因治療產品無傳染性疾病的風險；並確保捐贈者之權益，須明確告知及說明該研發所涉相關權益，經充分理解，簽署書面同意。（條文第四條）
- 五、明確規定經中央衛生主管機關查驗登記取得許可證後，始得製造、輸入。（條文第五條）
- 六、部分細胞及基因治療產品尚未進行療效驗證，但有足夠數據可推定其療效，為顧及國民得儘速使用細胞及基因治療產品之權利，在確保安全性之前提下，核准暫時性許可證之細胞及基因治療產品。（條文第六條）
- 七、為確保細胞及基因治療產品之品質及防止傳染病之發生、傳染及蔓延，細胞及基因治療產品之製造工廠，應符合中央衛生主管機關所定標準，且工廠相關設備等設立標準等事項。（條文第七條）
- 八、為保障民眾權益，經核准製造或輸入之細胞及基因治療產品，中央衛生主管機關得指定期間，監視其安全性。（條文第八條）
- 九、為保障民眾權益，避免誤信宣傳廣告，限制細胞及基因治療

產品之廣告。(條文第九條)

- 十、授權中央衛生主管機關訂定相關辦法，以利實務執行。(條文第十條)
- 十一、明定違反本法規定之罰則。(條文第十一至十二條)
- 十二、明定由主管機關執行本法之罰則。(條文第十三條)
- 十三、明定由中央衛生主管機關另訂本法之施行細則。(條文第十四條)
- 十四、明定主管機關等相關主體宣導及準備本法施行之因應時間。(條文第十五條)

細胞及基因治療產品管理法(草案)

條文	說明
<p>第一條(立法目的)</p> <p>為確保細胞及基因治療產品之品質、安全性及有效性，防止因使用該產品而引起傳染病之導入、傳播及擴散，特制定本法。</p> <p>本法未規定者，適用其他有關法律之規定。</p>	<p>為確保細胞及基因治療產品之品質、安全性及有效性，防止因使用該產品而引起傳染病之導入、傳播及擴散，特參考美國 21 CFR 1271、日本藥機法及歐盟 Regulation 1394/2007 等有關細胞、基因治療等產品法規之立法目的，爰將確保細胞及基因治療產品之品質、安全性及有效性，防止引起傳染病之導入、傳播及擴散，列為本法之立法目的。</p>
<p>第二條(主管機關)</p> <p>本法所稱衛生主管機關：在中央為衛生福利部；在直轄市為直轄市政府；在縣(市)為縣(市)政府。</p>	<p>有關本法於中央及各地方之主管機關，特予以明文規定。</p>
<p>第三條(用詞定義)</p> <p>本法用詞定義如下：</p> <p>一、本法所稱細胞治療產品，指以診斷、治療或預防人類之疾病為其目的，對於人體之細胞施以加工而成之產品。</p> <p>二、本法所稱基因治療產品，指以診斷、治療或預防人類之疾病為其目的，會使人體內含有重組基因之產品。</p> <p>三、本法所稱組織工程產品，指以移植、修復或重建人類之組織或器官為目的，對於人體之細胞施以加工而具有組織結構或機能之產品。</p> <p>四、本法所稱細胞及基因治療產品商，指細胞或基因治療產品製造業及販賣業。</p>	<p>一、本條係有關細胞及基因治療產品之定義。綜合參考美國 21 CFR 1271、日本藥機法、歐盟 Directive 2003/63/EC 及 Regulation 1394/2007 規定。</p> <p>二、本法所稱之加工，指使細胞體外增殖或分化，改變細胞活性或生物學特性，細胞混合非細胞成分或細胞貼附於非細胞成分，使細胞成片或堆疊，或使細胞含有或表現外來基因等處理方式。</p> <p>三、依循藥事法中關於藥商之管理，將從事細胞及基因治療產品製造業及販賣業，統稱為細胞及基因治療產品商。</p>

<p>第四條 (確保捐贈者之合適性)</p> <p>為確保細胞或基因治療產品無傳染性疾病之風險，研發及製造細胞及基因治療產品，應確保捐贈者之合適性。</p> <p>從事細胞及基因治療產品之研發時，對於捐贈者，應於明確告知及說明該研發所涉相關權利義務，經充分理解，簽署書面同意後，始得為之。</p>	<p>一、為保障民眾權益，確保用於細胞或基因治療的人類細胞產品符合安全、無傳染性疾病的風險性，爰制定本條。</p> <p>二、另有關捐贈者合適性判斷等辦法，則授權中央衛生主管機關定之。</p>
<p>第五條 (查驗登記)</p> <p>製造、輸入細胞及基因治療產品，應將其成分、規格、性能、製法之要旨，檢驗規格與方法及有關資料或證件，連同原文和中文標籤、原文和中文仿單及樣品，並繳納費用，申請中央衛生主管機關查驗登記，經核准發給細胞及基因治療產品許可證後，始得製造或輸入。</p> <p>前項輸入細胞及基因治療產品，應由細胞及基因治療產品許可證所有人及其授權者輸入。</p> <p>細胞及基因治療產品製造、輸入許可證有效期間為五年，期滿仍須繼續製造、輸入者，應事先申請中央衛生主管機關核准展延之。但每次展延，不得超過五年。屆期未申請或不准展延者，註銷其許可證。</p>	<p>一、明確規定經中央衛生主管機關查驗登記取得許可證後，始得製造、輸入，爰參考藥事法第三十九條制定本條第一項。</p> <p>二、另有關辦理查驗登記相關審查程序等辦法，則授權中央衛生主管機關定之。</p>
<p>第六條 (附條件及期限之暫時性許可)</p> <p>細胞及基因治療產品推定具備有關申請之療效性，與確認安全性者，經中央衛生主管機關審查後，得核發附條件及給予不超過五年效期之暫時性許可證。</p> <p>取得前項暫時性許可證之細胞及基因治療產品商，應依中央衛生主管機關之規定進行該細胞及基因治</p>	<p>一、部分細胞及基因治療產品尚未進行療效驗證，但有足夠數據可推定其療效，為顧及國民得儘速使用細胞及基因治療產品之權利，在確保安全性之前提下，爰參照日本藥機法二十三條之二十六規定，給予附條件、期限之暫時性許可證，與第六條之許可證區隔。</p> <p>二、依本條取得暫時性許可證之細</p>

<p>療產品之使用成效試驗，並將結果報告中央衛生主管機關，且於所核准之效期內重新申請許可證。</p>	<p>胞及基因治療產品，應持續進行細胞及基因治療產品之使用成效試驗，並於效期內重新申請查驗登記，如符合第六條規定者，改發給產品許可證。</p>
<p>第七條（細胞及基因治療產品製造標準）</p> <p>細胞及基因治療產品之製造應符合相關優良操作規範，並經中央衛生主管機關檢查合格，取得藥物製造許可後，始得製造。</p> <p>輸入細胞及基因治療產品之國外製造廠，準用前項規定。</p>	<p>為確保細胞及基因治療產品之品質及防止傳染病之發生、傳染及蔓延，細胞及基因治療產品之製造工廠，應符合中央衛生主管機關所定標準，且工廠相關設備等設立標準等事項，另授權中央衛生主管機關定之，爰參考藥事法第五十七條及第五十七條之一規定，制定本條。</p>
<p>第八條（細胞及基因治療產品商之資料維護義務）</p> <p>細胞及基因治療產品商應建立病人登錄系統，以追蹤被施予細胞及基因治療產品之病人。</p> <p>前項所稱登錄系統於該細胞及基因治療產品許可證屆期、廢止之日起三十年內須維持有效。</p>	<p>一、為保障民眾權益，經核准製造或輸入之細胞及基因治療產品，中央衛生主管機關得指定期間，監視其安全性。細胞及基因治療產品商應建立病人登錄系統，以追蹤被施予細胞及基因治療產品之病人，有效促進上市後安全監控，爰制定本條。</p> <p>二、另有關細胞及基因治療產品上市後安全監控等辦法，則授權中央衛生主管機關定之。</p>
<p>第九條（廣告管理）</p> <p>非細胞及基因治療產品商不得為其廣告。</p> <p>細胞及基因治療產品之廣告以登載於學術性醫療刊物為限。</p> <p>採訪、報導或宣傳，其內容暗示或影射醫療效能者，視為細胞或基因治療產品廣告。</p>	<p>為保障民眾權益，避免誤信宣傳廣告，爰制定限制細胞及基因治療產品之廣告。</p>
<p>第十條（另訂辦法）</p> <p>第四條捐贈者合適性、第五條第一項細胞及基因治療產品許可證查驗登記、或依規定辦理細胞及基因治療產品許可證變更、移轉登記及</p>	<p>授權中央衛生主管機關訂定相關辦法，以利實務執行。</p>

<p>辦理細胞及基因治療產品許可證展延登記、換發及補發之申請條件、審查程序、核准基準、第七條第一項及第二項之申請條件、檢查程序、相關優良操作規範、第八條所稱登錄系統及其他應遵行事項之辦法，由中央衛生主管機關定之。</p>	
<p>第十一條(罰則) 違反本法第五條、第七條第一項規定者，處十年以下有期徒刑，得併科新臺幣一億元以下罰金。 犯前項之罪，因而致人於死者，處無期徒刑或十年以上有期徒刑，得併科新臺幣二億元以下罰金；致重傷者，處七年以上有期徒刑，得併科新臺幣一億五千萬元以下罰金。 因過失犯第一項之罪者，處三年以下有期徒刑、拘役或科新臺幣一千萬元以下罰金。 第一項之未遂犯罰之。</p>	<p>明定違反本法規定之罰則。</p>
<p>第十二條(罰則) 違反第八條者處新臺幣三萬元以上二百萬元以下罰鍰。 違反第九條規定者，處新臺幣二十萬以上五百萬以下罰鍰。</p>	<p>明定違反本法規定之罰則。</p>
<p>第十三條(執法機關) 本法所定之處罰，由直轄市、縣(市)主管機關為之，必要時得由中央衛生主管機關為之。 依本法所處之罰鍰，經限期繳納，屆期未繳納者，依法移送強制執行。</p>	<p>明定由主管機關執行本法之罰則。</p>
<p>第十四條(施行細則) 本法施行細則，由中央衛生主管機關定之。</p>	<p>明定由中央衛生主管機關另訂本法之施行細則。</p>
<p>第十五條(施行日期) 本法自公布後一年施行。</p>	<p>給予主管機關等相關主體宣導及準備本法施行之因應時間。</p>

附錄三

特定醫療技術檢查檢驗醫療儀器施行或 使用管理辦法

衛生福利部 醫事司

文件下載：<https://dep.mohw.gov.tw/doma/cp-3132-12821-106.html>

特定醫療技術檢查檢驗醫療儀器施行或使用管理辦法

105年12月09日修正

- 第 1 條 本辦法依醫療法(以下簡稱本法)第六十二條第二項規定訂定之。
- 第 2 條 本辦法所稱特定醫療技術、檢查、檢驗或醫療儀器(以下簡稱特定治療檢查檢驗項目)，其項目、適應症、操作人員資格、條件及相關事項，如附表。
- 第 3 條 特定治療檢查檢驗項目，其屬可發生游離輻射設備或須使用放射性物質者，並應符合游離輻射防護法有關規定。
- 第 4 條 醫療機構施行或使用特定治療檢查檢驗項目，應向所在地直轄市或縣(市)主管機關申請登記後，始得為之。
- 直轄市或縣(市)主管機關對於醫療機構登記之申請，認有不符第二條附表規定者，不予登記。但其得補正者，得先限期令其補正。
- 第 5 條 醫療機構依前條規定向所在地直轄市或縣(市)主管機關申請登記，應檢具下列文件：
- 一、符合第二條附表所定資格條件之證明文件影本。
 - 二、使用之醫療器材其輸入或製造許可證明文件影本。
 - 三、其他經中央主管機關規定之文件。
- 第 6 條 醫療機構經登記施行或使用特定治療檢查檢驗項目後，終止或停止施行或使用，或操作人員有異動時，應於事實發生之日起三十日內向原登記

之直轄市或縣(市)主管機關申請變更登記。

第 7 條 醫療機構施行或使用特定治療檢查檢驗項目，因情事變更致不符第二條附表規定者，應即停止施行或使用，並應於二個月內補正。

違反前項規定，除依本法第一百零三條、第一百零七條規定處罰外，直轄市或縣(市)主管機關並得廢止該項登記。

第 8 條 醫療機構施行或使用之特定治療檢查檢驗項目，其有逾越第二條附表規定之適應症者，除依本法第一百零三條、第一百零七條規定處罰外，直轄市或縣(市)主管機關並得廢止其登記。但有下列情形者，不在此限：

一、情況緊急者。

二、經中央主管機關核准施行人體試驗者。

三、國外已許可列入適應症者，得先令其改善。

第 9 條 醫療機構經依前二條之規定受廢止登記者，自受廢止登記之日起二個月內，不得就同一項目重新申請登記；操作人員自廢止登記之日起六個月內，不得登記、施行或使用該特定治療檢查檢驗項目。

第 10 條 本辦法第二條附表修正前，已施行或使用特定治療檢查檢驗項目者，應於本辦法第二條附表修正施行之日起六個月內，依本辦法規定補正申請登記。

第 11 條 本辦法自發布日施行。

本辦法中華民國一百零四年十二月二十九日修正發布之第二條附表，除

項目十九至二十一有關操作醫師資格規定，自一百零八年一月一日施行外，自發布日施行。

國家圖書館出版品預行編目(CIP)資料

再生醫學：臨床與產業運用 / 王羽淇等作；錢宗良總編輯。-- 臺北市：科技部生科司再生醫學科技發展計畫辦公室，民 107.09

面；公分

ISBN 978-986-05-6694-9(平裝)

1.幹細胞 2.生物技術 3.文集

368.407

107014819

再生醫學：臨床與產業運用

出版單位：科技部生命科學研究發展司再生醫學科技發展計畫辦公室

發行人：再生醫學科技發展計畫辦公室主持人 錢宗良

地址：10051 臺北市中正區仁愛路一段一號六樓 再生醫學科技發展計畫辦公室

電話：02-23123456 分機 88193

傳真：02-23915292

作者：王羽淇、王英凱、王德原、吳友志、吳玟欣、呂仁、沈欣欣、林勁品、林佩如、邱英明、洪士杰、洪榮堂、高健育、張至宏、梁毓津、許溥昇、郭勇哲、陳立綸、陳尚甫、陳泓志、陳貞云、陳郁君、陳敏慧、陳鈴津、彭學薇、游正博、游芷芸、湯文宏、黃彥華、黃靜瑩、楊明嘉、楊芝宜、廖智菁、臧天睿、劉育秉、蔡佩宜、鄭媛元、賴思全、賴培倫、駱婉珣、謝欣庭、謝清河、顏伶汝、蘇鈺婷（依姓氏筆劃為序）

顧問：蔡少正、莊偉哲

編審委員：盧國賢、方偉宏

總編輯：錢宗良

編輯：黃祥博、鄭欣怡、李欣芳、王琇嵐、甘偉君

出版日期：民國 107 年 9 月

I S B N：978-986-05-6694-9

印刷：曦望數位設計印刷庇護工場

地址：108 臺北市萬華區西園路 2 段 261 巷 12 弄 44 號 1 樓

電話：02-23093138

