

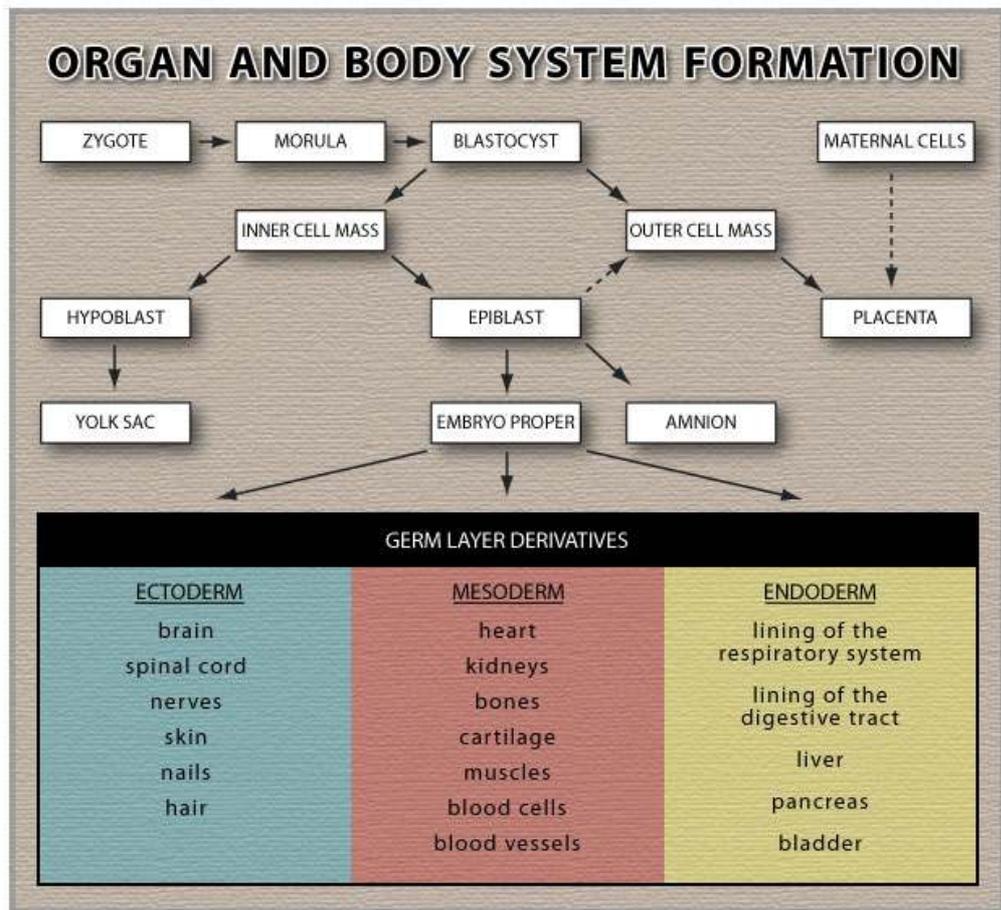
第十章：胚幹細胞分化為神經細胞及其應用

神經系統的發育

所有的胚胎細胞都是由胚幹細胞發育而來，神經細胞也不例外。在胚胎早期的囊胚具有內細胞團，形成外、中、內三個胎層，外胚層細胞之後再分化為兩種細胞族群，包括神經外胚層和表皮層(如圖 10-1 所示)，神經外胚層位於早期胚胎的背側，剛開始是平板狀結構，稱作神經板，之後。神經板彎折為神經管，同時釋出神經嵴細胞(如圖 10-2 所示)，神經管之後發育為中樞神經，神經嵴細胞則發育為周邊神經。

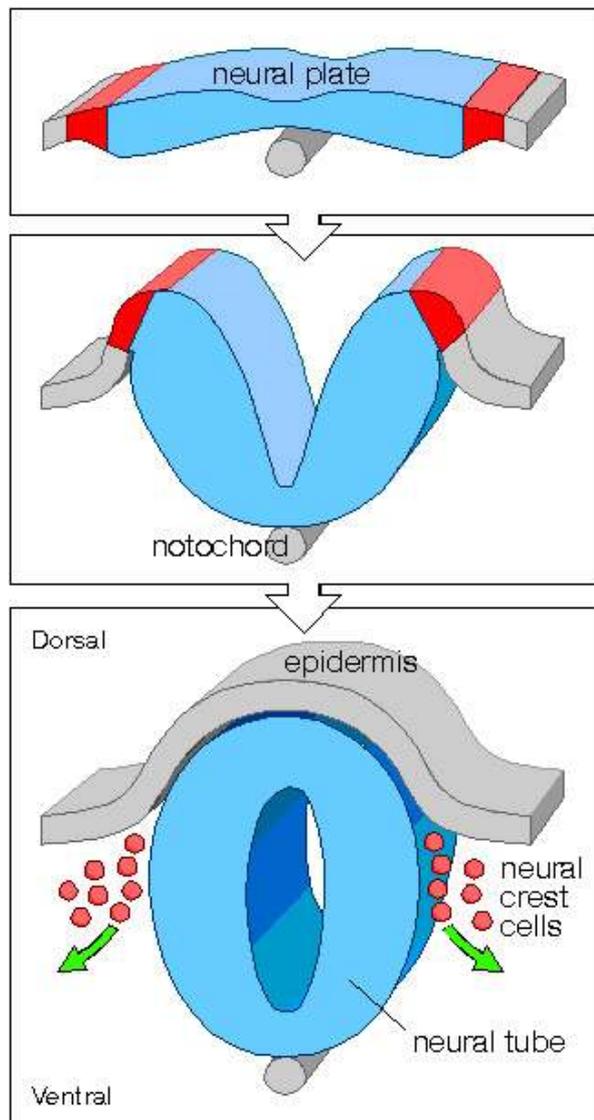
神經細胞分化過程和組織生成受到許多調控基因的控制，例如 Oct4，是囊胚層和外胚層的多能性相關基因，當多能性逐漸消失時，Oct4 的表現也跟著降低，但並沒有完全消失。原始的外胚層形成神經板時，我們會見到 Sox1 表現拉高，Gbx2 的表現也會上升，等到神經管形成且開始閉合時，Gbx2 在神經上皮細胞就會被抑制，而於神經上皮內的未分化前驅細胞的特性是表現 Sox1、Sox2 和 nestin、musashil 和 N-CAM。

圖 10-1: 胚胎形成外、中、內三個胎層後，外胚層細胞分化為兩種細胞族群，包括神經外胚層(neural ectoderm)和表皮層(ectoderm)，神經系統是由神經外胚層分化而來，包括腦和脊髓，表皮層則分化為皮膚、指甲、毛髮等構造。



資料來源: www.ehd.org/dev_article_unit3.php

圖 10-2: 神經外胚層剛開始是平板狀結構稱作神經板(neural plate)，位於胚胎背側，之後彎折為神經管(neural tube)，和表皮層(epidermis)區隔，同時釋出神經嵴細胞(neural crest)，神經管之後發育為中樞神經，神經嵴細胞則發育為周邊神經。



資料來源: www.mun.ca/.../BIOL3530/DB_Ch11/DBNNerS.html

神經上皮被誘導分化後，神經管的頭部和尾端、背側和腹側端會出現各自表現的基因，形成區域特化，且和神經上皮周圍的細胞有關。例如 Shh 蛋白，因為是由神經管腹側(底下)的神經索所分泌，造成 Shh 濃度由腹側端到背側端依次遞減(如圖 10-3)，到神經管的背側端時，Shh 濃度最低，相反的 BMP 由神經管背側端的上皮所分泌，因此由背側端到腹側端依次遞減，導致神經管的背側細胞特化主要受到 BMP4 的影響，而腹側神經管細胞的特化主要調控蛋白為 Shh。

圖 10-3: 神經管背側和腹側端的決定受到特定因子的調控，腹側端的調控因子最有名者為 Shh 蛋白，而背側端的調控因子最有名者為 BMP 蛋白。

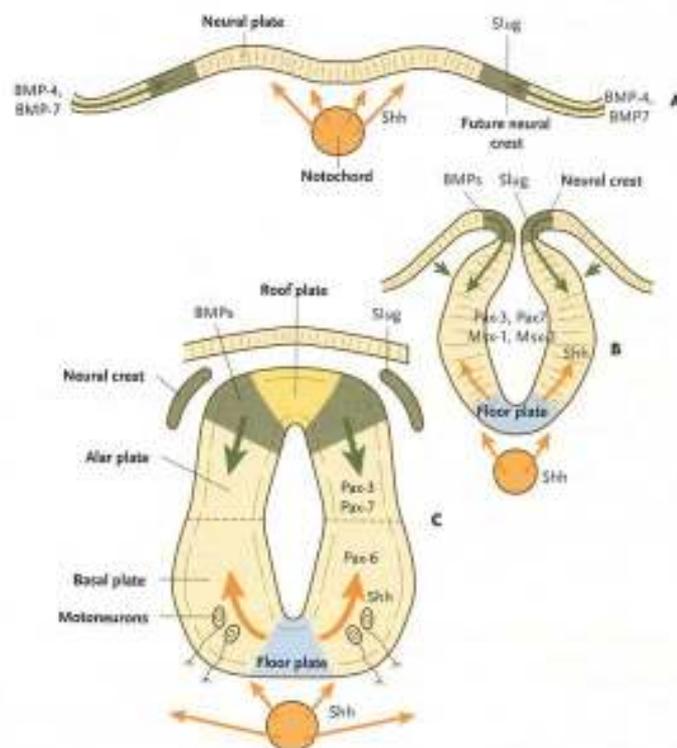


Figure 10-9 Dorsal and ventral signaling in the early central nervous system. A. Signals from sonic hedgehog (Shh) (orange arrows) in the notochord induce the floor plate. B. In the dorsal part of the future neural tube, BMP-4 and BMP-7 (grey arrows) from the ectoderm adjacent to the neural tube induces slug in the future neural crest and maintains Pax-3 and Pax-7 expression dorsally. Ventrally, sonic hedgehog, now produced by the floor plate, induces motorneurons. C. Sonic hedgehog, produced by the floor plate, suppresses the expression of dorsal *hox* genes (*Pax-3* and *Pax-7*) in the ventral half of the neural tube.

資料來源:<http://www.brown.edu/Courses/BI0032/stemcell/GenNDev.html>

上面所說的是背側-腹側端的調控，同樣的，我們可以想見也有頭端-尾端的調控機制，導致區域性的特化，使神經管內的細胞知道自己所處的位置，而進行適當的生長和分化。例如 Hoxc5 和 Hoxc6 控制神經管尾端的區域化。

之後更區域化的基因表現讓特定族群的神經管內細胞被分化出來，例如 Islet-1 表現的細胞分化為運動神經的前驅細胞，而中腦的腹側細胞會分化為分泌多巴胺的特化細胞是由 Shh 和 FGF8 所調控的。

除了胚胎期的神經發育之外，最近的研究也指出神經系統具有新生作用，成年人的腦也具有再生能力。成年人的神經幹細胞首先被發現於次腦室區 (subventricular zone)，該區具有會增殖的神經母細胞，同時也富含星狀細胞。在體外培養系統中，神經幹細胞(NSC; neural stem cell)會聚集成團，最後形成球形細胞團，稱作神經球(neurosphere)，而神經球並不會附著於培養盤中，而是懸浮於培養液中。在神經球內，僅有 10~15%的細胞保留幹細胞的特性，其餘細胞則分化為神經前驅細胞(NPC; neural precursor cell)、神經細胞 (neuronal cell)和膠原細胞(glial cell)，這個體外分化過程和在體內狀況不同，因為在成年人的腦中，幾乎所有的神經幹細胞皆長成神經細胞，相反的，神經球的細胞較具有彈性，除了可長成神經細胞外，尚可長成寡突狀細胞和星狀細胞。

神經幹細胞的分化命運和周圍環境有關，如果將海馬區的幹細胞轉殖於不會長出神經細胞的腦部區域，那麼長出來的大部分是膠原細胞，而非神經細胞，相

反的，如果將海馬區的幹細胞轉殖餘次腦室區，則大部分長出的細胞是神經細胞和星狀細胞，可見神經幹細胞的分化受到環境因子的影響很大。一般證據顯示如果有 BMP 存在時，長出神經細胞的比率較小，反之如果以 noggin 和 BMP 蛋白拮抗時，也會讓本來不是長神經細胞的腦部區域長出神經。

胚幹細胞於體外系統分化為神經細胞

神經細胞是否可由胚幹細胞分化而來？有許多實驗室已經藉由誘導小鼠的胚幹細胞證實其可行性，而且由胚幹細胞分化而得的神經前驅細胞和自然狀況下的胚胎內神經前驅細胞很類似，包括神經上皮細胞標誌分子的表現，例如 Sox1、Sox2 以及 nestin，同時也具有分化為神經細胞和膠原細胞的能力。

胚幹細胞在體外系統的分化過程也提供了研究神經細胞族群的研究模式，而且以人類的胚幹細胞分化出神經細胞的研究模式為日後的神經疾病治療帶來無窮的希望。目前的證據顯示人類胚幹細胞分化為神經前驅細胞的過程和小鼠類似，將這些分化出去的細胞植於小鼠內，可得到一些神經退化疾病症狀的緩解，因此由胚幹細胞治療巴金森氏症、中風和脊髓損傷患者的可能性，目前被寄予厚望。以下我們就小鼠胚幹細胞分化為神經細胞族群的研究現況作一簡介：

小鼠胚幹細胞分化為神經細胞

由胚幹細胞自發分化為神經細胞

如之前章節所述，將胚幹細胞培養於懸浮液中會自然形成細胞團塊，稱為類胚胎體(EB, embryoid body)，仔細分析類胚胎體的細胞排列及細胞種類，可以發現和正常胚胎細胞發育有些有趣的相似點，包括長出三個胚層的細胞，而且剛開始以內胚層細胞為起始，依次長出外胚層和中胚層細胞，由外而內排列依次為外胚、中胚和內胚層細胞，不過和正常胚胎發育不同的是類胚胎體並沒有前後軸和背側-腹側軸的形成，細胞以團塊方式呈現，以球形 360° 排列，沒有胚胎的發育軸。

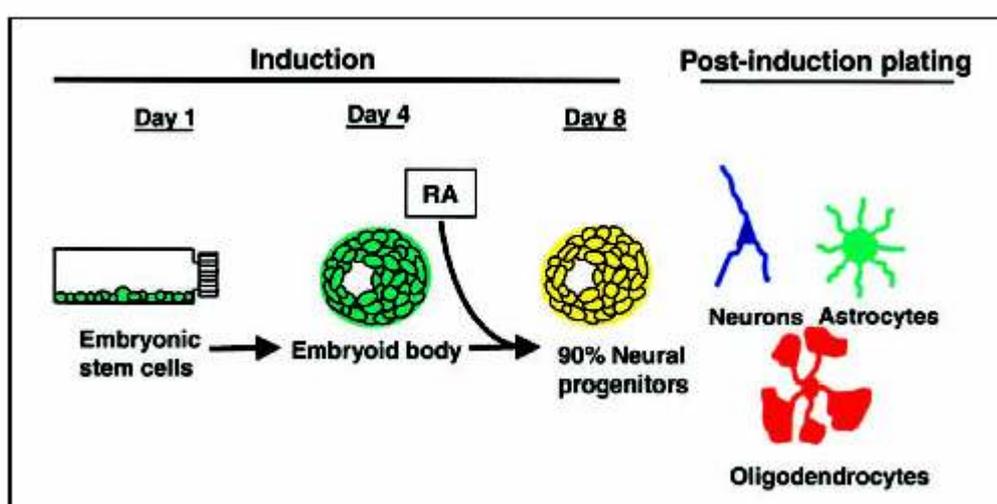
類胚胎體的細胞族群是如何形成的呢？詳細的過程尚待進一步分析，但是一般可接受的概念是類胚胎體分化的過程和正常胚胎發育過程相似，先由胚幹細胞生成中間型的細胞，然後逐漸限制其發育潛能。就神經細胞的分化而言，神經細胞僅佔類胚胎體所有分化細胞的一小部分，且神經細胞的分化並不同步，並且沒有位於類胚胎體中的特定區域，更複雜的是有來自非神經細胞的調控因子，使得於類胚胎體中，研究神經細胞的分化更加難以掌握，為了解決困難，研究者通常將神經細胞的前驅細胞分離出來，使研究的材料單純化。以下我們就將一些實際操作的問題逐一敘述。

使用化學物質誘發胚幹細胞分化為神經細胞

最常用的化合物是視黃醛酸 (retinoic acid; RA)，最主要原因是 RA 在胚胎發育過程中扮演重要角色，特別是在神經分化過程中的角色，很早之前就已被

研究出，剛開始是以胚瘤細胞（EC cell）為研究樣本，胚幹細胞普遍之後，RA 的效應也在胚幹細胞中被證實(如圖 10-4)。

圖 10-4: 視黃醛酸 (retinoic acid; RA), 是於培養系統中誘導胚幹細胞分化為神經細胞過程中最主要的使用的化合物。



資料來源: A subset of ES-cell-derived neural cells marked by gene targeting. Stem cells 21:41-49, 2003.

雖然 RA 誘發神經分化的效應因為其毒性作用較難分析，但是用 RA 刺激後得到的神經前驅細胞，以 Sox1 和 Sox2 作為標誌分子來分析，其表現量為對照組的 5~10 倍，而且 50%~70% 在 RA 處理過後仍然存活的細胞具有神經細胞或是神經膠細胞的特性，例如表現 NeuN、JuJ1 和 GFAP，不過用 RA 處理過的胚幹細胞並不完全分化為神經細胞或神經膠細胞，有些細胞還是會形成內胚細胞或是類似表皮細胞。

另外一個值得注意的現象是，以 RA 處理所得到的神經細胞表現早期脊髓的標誌分子 Hoxc5 和 Hoxc6，而非中腦的標誌分子，這表示 RA 所誘發的神經細胞是屬於頸椎之後的細胞，這一點和 RA 會促使神經管往胚胎尾端的特性分化的現象是一致的。

除了 RA 之外，其他化合物的影響如何呢？加入其他化合物會影響胚幹細胞往神經細胞的方向分化，例如以 RA 誘導類胚胎體後，將其培養於無血清的培養液，內含 insulin、transferrin、sodium selenite、FGF2 以及 fibronectin 會促使具有 nestin 表現的神經上皮前驅細胞數目大量增加；另外一個例子是加入 Shh 蛋白，會使分化出的神經細胞傾向於神經管的腹側細胞的特性，因此會有表現 NKx6.1、Olig2 的細胞大量增加的情形，相反的，背側的神經細胞標誌分子則大量減少，因此若單單以 RA 誘導，所得到的運動神經細胞會減少，但是加入 300nM 的 Shh 蛋白後，可以見到大量的運動神經細胞被分化出來，這顯示可以利用 RA 讓胚幹細胞分化為較尾端（脊髓細胞而非腦細胞）的神經細胞，同時再以 Shh 蛋白處理後，即可得到大量的運動神經元，這個特性可能對以胚幹細胞來治療運動神經受損的技術發展上有很大的幫助。

當然，無論如何分化出來的神經細胞必需具有功能，否則就沒有臨床應用的價值。以 RA 處理所得到的神經細胞經分析後，的確具有功能，其電生理的特性和正常的神經細胞類似，將類胚胎體細胞整團移植於脊髓受損的小鼠後，再以 RA 處理，可得到有限的脊髓功能回復，且移植的細胞會合併於宿主的脊髓內。

這一些小鼠模式實驗讓吾人對以人類胚幹細胞治療脊髓損傷患者抱持著很大的希望。

以操作胚幹細胞培養條件來取得大量的神經前驅細胞

上述方法是單純以化合物誘發胚幹細胞往神經細胞的方向分化，但前面我們也已提到過，單純以化合物誘發胚幹細胞所分化出的細胞並非單純的神經細胞，尚有內胚層細胞和類似表皮細胞混雜於其中，因此另外一個必要的思考是利用培養條件增加神經細胞的比例，有兩種方式可以考慮，第一，是利用選擇性的培養液，幫助神經細胞生長，其餘細胞則被抑制；第二是讓神經前驅細胞更進一步分化，讓其表現出更成熟的標誌分子，再利用標誌分子將其分離純化。上面的兩種作法在此介紹如下：

(一) 以選擇性的培養液處理

具體方法是將胚幹細胞以類胚胎體的方式培養 4 天，培養於已知成分的培養液中，並外加 fibroectin (ITSFn)，如此將可得到大部分於形態上類似於神經上皮細胞的族群，約有 85% 會表現 nestin (神經上皮細胞的標誌分子)。如果加入 FGF2 會促進細胞存活並大量增殖，但是不會促進神經細胞分化，可是如果去掉 FGF2，會有大量細胞死亡。另一個問題是以這樣的方式處理仍然會有表皮細胞的標誌分子表現(例如 CK18)，同時也會培養出多能的前驅細胞，這可以由某個細胞族群表現 SSEA1 偵測出。

另一個以培養液選擇性促進神經細胞分化的方法是將胚幹細胞以極低的密度培養並補充 LIF，這樣可以得到神經細胞團的結構，內含幾乎是 100% 的會表現 nestin 的神經前驅細胞。有些學者認為這種細胞是神經幹細胞，因這種細胞會針對 LIF 做反應，但針對 FGF2 則無影響。另外一個有趣的觀點是 RA 不是分化神經細胞絕對必需的，不過話又說回來，單單以 LIF 處理所得到的神經細胞存活率很低，約僅 1/2000，因此這樣的方式似乎並不是於胚胎內神經細胞分化的正常方法。

(二) 進一步分化後以標誌分子分離

以標誌分子分離的方式常用的作法是利用 Sox2 啟動子序列，因為 Sox2 只僅在會增殖的神經前驅細胞表現，一旦停止細胞進行有絲分裂，Sox2 即不再表現，而且 Sox2 也不會於其餘的非神經前驅細胞中表現，因此將 Sox2 的啟動子序列帶上一段 neomycin 抗性基因，就可於培養液中加入 neomycin (又稱作 G418)，把非神經前驅細胞殺掉，用這個方法約可得到 >90% 的神經前驅細胞族群，而且這些細胞會同時表現 Sox1 和 Sox2。

另一個利用標誌分子分離的例子是以綠色螢光蛋白接於神經細胞特定的啟動子序列之後來幫助分離，一旦神經特定的基因啟動之後，綠色螢光蛋白就會表現，以螢光活化流式細胞分離法 (FACS) 就可將神經細胞分離出來，使用此法可以得到非常均質的神經細胞族群。

一般而言，要比較不同的誘導神經細胞分化的方法是不容易的，因為各個實

驗室所用的方法不同，無法作適當比較，不過共同的特徵就是要表現出神經上皮細胞的標誌分子 nestin，另外如果僅是要擴充細胞數目而不分化，則僅加入 FGF2 就可以達成。更有趣的是，用胚幹細胞分化得到的神經前驅細胞，其後續的分化能力和由體內分離出的神經前驅細胞類似，同樣可以繼續分化為神經細胞，寡突觸細胞和星狀細胞，而這一點很重要，因為如此可以增加以後使用胚幹細胞治療神經疾病的應用層面。

另外一個有趣的對照是以標誌分子分離出的神經上皮細胞和真正胚胎中受到特化而成為神經上皮細胞的特性很相像，例如以胚幹細胞培養出的神經前驅細胞也會表現 Pax3 或是 Pax6，顯示出脊髓背側或是腹側神經細胞的特性，這也暗示在胚幹細胞分化過程中，儘管是在培養盤中進行，也會接受特化神經管腹背側調控因子的影響，不過說也奇怪，培養盤中的特化因子從何而來呢？很有可能是在類胚胎體的階段時，有些類胚胎體的細胞會形成內胚層細胞，而內胚層細胞是已知的調控神經外胚層細胞形態生成的調控因子主要的來源。

既然可由上述的方法取得較為均質性的神經前驅細胞族群，自然會有研究者嘗試將這些神經前驅細胞分化為較為特化的神經細胞。例如，先由 RA 誘發類胚胎體細胞分化為前驅細胞後，利用上述的方法分離出均質的神經前驅細胞株後，有研究者依序先加入 FGF2，再加入 FGF2 以及 EGF，然後是 PDGF，之後再將細胞培養於有 transferrin 的分化專用培養液中，結果可以得到很均一的神經膠前驅細胞，表現出 A2B5 標誌分子，之後再將上述的生長因子去除，可以長出寡突觸

細胞和星狀細胞。同樣的，將胚幹細胞養成類胚胎體細胞後，用 transferrin 處理，再加入 Shh 和 FGF8 之後，可以得到大量的具有分泌多巴胺能力的神經細胞。

以神經調控分子誘導分化方向

如果以正常胚胎發育過程中神經細胞的生長調控基因作為參考，在概念上應該也會對在培養盤中嘗試將胚幹細胞分化為神經細胞的過程會有幫助，而且的確也有許多研究者依據這種概念發展出誘導胚幹細胞分化為神經細胞的培養系統，以下我們舉一些例子來說明。

Aubert 等人曾於 RA 處理過的胚幹細胞中分離出分泌性的 Sfrp2 基因，而且在沒有以 RA 處理過的胚幹細胞中，Sfrp2 是不表現的。Sfrp2 是細胞外的 Wnt 拮抗蛋白，正常狀態下於神經分化中的組織表現，例如神經管。將胚幹細胞中有表現 Sfrp2 的細胞分離後加以分析，可以發現約有超過 60% 的細胞具有 Sox1、Ngn2、Pax7 和 ShcC 等神經前驅細胞標誌分子的表現，顯示可能 Sfrp2 藉由壓抑 Wnt 訊息傳遞，使得胚幹細胞往神經方向分化，相反的將 Wnt 大量表現則會抑制神經細胞分化，而且這種抑制現象已由實驗證明。

另一個例子是 BMP4，BMP4 被發現如果持續於胚幹細胞表現的話，神經分化會被抑制，可能是 BMP4 直接抑制神經分化的過程，也可能是 BMP4 導引胚幹細胞走向其他分化路徑所致。

參考資料

1. Wilson PG, Stice SS. Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 2006;2(1):67-77.
2. Kang SM, Cho MS, Seo H, Yoon CJ, Oh SK, Choi YM, Kim DW. Efficient induction of oligodendrocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2007 Feb;25(2):419-24. Epub 2006 Oct 19.
3. Guillaume DJ, Johnson MA, Li XJ, Zhang SC. Human embryonic stem cell-derived neural precursors develop into neurons and integrate into the host brain. *J Neurosci Res.* 2006 Nov 1;84(6):1165-76.
4. Li XJ, Zhang SC. In vitro differentiation of neural precursors from human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2006;331:169-77.
5. Zhao X, Liu J, Ahmad I. Differentiation of embryonic stem cells to retinal cells in vitro. *Methods Mol Biol.* 2006;330:401-16.
6. Nakayama T, Inoue N. Neural stem sphere method: induction of neural stem cells and neurons by astrocyte-derived factors in embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol.* 2006;330:1-13.
7. Lowell S, Benchoua A, Heavey B, Smith AG. Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol.* 2006 May;4(5):e121. Epub 2006

Apr 11.

8. Cazillis M, Rasika S, Mani S, Gressens P, Lelievre V. In vitro induction of neural differentiation of embryonic stem (ES) cells closely mimics molecular mechanisms of embryonic brain development. *Pediatr Res.* 2006 Apr;59(4 Pt 2):48R-53R. Review.