

第三章：治療性的胚幹細胞株移植簡介

前言

以人類胚幹細胞(hESCs)植入人體嘗試細胞治療，都有免疫排斥的問題要解決，而目前解決之道僅能給予長期的免疫抑制藥物，不過現在正發展以核移轉(NT, nuclear transfer)來為患者量身訂做胚幹細胞，稱為「人類核移轉胚幹細胞」(hNT-ESCs)，可望避免掉免疫排斥問題。這個技術在 1990 年末期經常被媒體報導及討論，不過僅限於其倫理問題和可能應用，當時技術上的瓶頸尚未克服，一直到今天該技術瓶頸還是存在，雖然全世界曾經一度認為沒有問題。

核移轉技術是一種被用以作生殖的胚胎技術，在 2004 年時，用核移轉技術來作特定的胚幹細胞首先被發表，不過很遺憾的這個報告後來被發現是偽造數據的結果。儘管如此，因為這種為特定病人量身訂做的「治療性選殖」(therapeutic cloning)仍是許多實驗室研究的主要目標，就目前而言，先前的假結果對整個「治療性選殖」，乃至於整個胚幹細胞研究領域的影響如何還是很難說，雖然已有許多媒體的負面報導，使得許多研究經費萎縮，但畢竟使用量身訂做的胚幹細胞對許多無法治療的疾病患者有積極意義。

那麼甚麼是「人類核移轉胚幹細胞」(hNT-ESCs)呢？就技術層面而言，hNT-ESCs 是取患者的單一細胞和一個去核的卵細胞結合，併裝為另一個胚胎製作而成(參考圖 3-1)，製作過程需要將細胞核移轉到卵細胞中，因此需要顯微操作(micromanipulation)，在操作過程中取得的胚胎，其細胞質有兩個來源，一

個是貢獻細胞核的體細胞，另一個是去核的卵細胞，因此細胞質的粒線體會有兩種來源，可稱作「異質細胞質」(heteroplasma)，可能會攜帶粒線體 DNA 相關的遺傳疾病；另外核移轉是否會導致染色體異常，以及倫理上的問題及其他可能規避犧牲早期胚胎的替代方案，都是值得探討的。

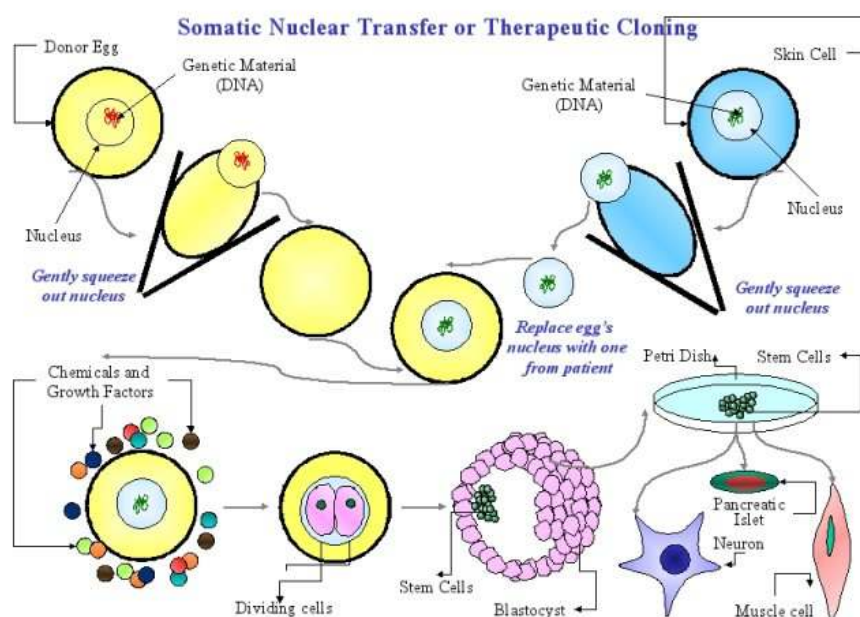


圖 3-1: 治療性選殖的操作步驟是由卵細胞去掉細胞核後，接受由病人體細胞 (例如圖中的皮膚細胞) 取得的細胞核，拼湊成的細胞再用各種方式刺激，使其長成囊胚後再分離內細胞團，用以建立胚幹細胞株。因為細胞核是由病人體細胞而來，該胚幹細胞株的遺傳形性和病人一致，可用胚幹細胞分化出的任何細胞或組織來治療該病人，不會有免疫排斥問題，因此稱為「治療性選殖」(therapeutic cloning)。

資料來源: www.reeve.uci.edu/anatomy/stemcells.php

以核移轉製作胚幹細胞(NT-ESCs)於動物模式的研究第一篇成功的小鼠 NT-ESC(稱為 murine NT-ESC 或 mNT-ESC)，於 2000 年被發表，之後 2001、2002、2003 年另有三篇文章分別被發表於 Science、Cell 和 Nature Biotechnology，但是就人類的「治療性選殖」而言，第一篇用自己的細胞核移轉後製作出的 ESCs 再移植到自己體內的報導迄今尚未出現，原因主要還是在於技術瓶頸有待克服。

以分化的 NT-ESCs 治療疾病

理論上以分化的 NT-ESCs 可治療或至少緩和某些疾病，不過到目前為止這類研究還很少，以動物模式所作的相關研究則顯示 ESC 細胞植入的治療法潛力無窮。舉例來說，有人將小鼠的 mESC 分化出的多巴胺分泌神經細胞植入到小鼠的巴金森氏症(該患者的腦中多巴胺分泌不足)模式，結果發現可以有效改善其症狀。國內陽明大學的傅毓秀博士也有進行類似的研究，不過其多巴胺分泌細胞是由臍帶的實質幹細胞(mesenchymal stem cell)而來，類似的研究也已在靈長類進行，可追蹤植入於腦中的細胞到 12~14 週，而且具有緩和巴金森氏症的效果，不過長期的監控療效仍應該持續進行，特別要注意的是大量細胞於轉殖後死亡的現象，最大原因可能還是要歸咎於免疫排斥問題，可能會阻斷以後臨床上的應用，單就排除免疫排斥問題而言，在這一點上使用 NT-ESCs 可能會提供很大的幫助。

目前人類及靈長類 NT-ESC 細胞株的發展狀況

在 2005 年 5 月曾有一篇製造出以未分化的 hESC 作核移轉後，取得囊胚的報告，可惜該囊胚未能分離出胚幹細胞。在該篇報告中，卵細胞由數個來源取得，包括(1)體外授精或精蟲注射失敗的未能受精的卵細胞，(2)以超級誘導排卵後，在進行卵泡減量時所取得的卵細胞，(3)由卵巢手術或子宮手術過程中取得的不成熟卵細胞，由該報告中的結果顯示出不同的卵細胞來源可能影響核移轉的成果。

另外，同樣在 2005 年也有 Lavoie 等人發表以受精失敗的卵細胞進行核移轉的實驗成果，核移轉沒太大問題，但是移轉後的胚胎(hNT embryo; human embryo after nuclear transfer)發育不良，僅停留在囊胚期之前的階段，因此到目前為止，使用老的，或是不成熟的，或是無法授精的卵細胞來作 hNT embryo 似乎效果都不好，和小鼠的同類型實驗成果比較顯得進步緩慢，這可能是物種不同所以特性不同，也可能是人卵細胞品質本身就較差導致不佳的成果，總之，進一步再改善 hNT 技術才能得到 NT-ESCs 的細胞株，這是毋庸置疑的。

非人類的靈長類動物使用核移轉來建置胚幹細胞效果也是不佳，到目前為止，用核移轉的技術作靈長類的人工生殖很少有成功的例子，一般認為是因為使用核移轉沒有辦法處理好染色體的排列，而且細胞骨架在核移轉操作過程中會被破壞，可能是在去核動作中，細胞的有絲分裂相關蛋白被破壞，雖然仍有成功的例子被報告過，但是很少有實驗室可以重複這樣的結果。如果用已經開始分化到

某個程度的細胞來作核移轉，則效果更差，到目前為止，還沒有非人的靈長類 NT-ESC 細胞株被建立，可見其困難度。不過儘管很困難，嘗試建立靈長類的 NT-ESC 細胞株是重要的，假如我們要將這個技術推到人類的話，這是必要的前置作業。

使用和建立人類 NT-ESC 細胞株的限制

如上面所說的，臨床上使用人類的 NT-ESC 細胞株目前是不可能的，有一些我們現在沒有辦法達成的目標，包括(1)使用完全知道確定成份的培養液來建立 ESCs，以避免外來的污染，(2)在 in vivo 狀況下，誘發 hESCs 分化為特定的細胞族群，(3)純化並且分離均質的細胞族群，(4)克服特定位置的畸型瘤生長，(5)快速擴充已分化的 hESCs，在上述的困難未被克服之前臨床應用是不可能的。當然，除了技術問題外，還有其他倫理相關問題也待克服，以下我們就倫理和社會因素來作簡短的考量。

倫理和社會因素考量

倫理考量最重要的疑點是有一天可能會有人類卵細胞或是胚胎的買賣，在美國每顆人類卵細胞價錢約為 1000~2000 美元，用以支持相關的臨床處置，假如 NT-ESC 的成功率有很大部分是取決定捐贈卵細胞女性的年齡的話，無疑地，人卵細胞的販賣市場會非常興盛。目前為止，還好沒有這個市場出現，前述的費用

是用於支付醫學處置費用，而不是賣卵的費用；在印度、美國、加拿大和英國，也有行之有年的“共享卵子”支援系統，有多餘卵細胞的不孕症婦女捐贈一些給沒有卵細胞的患者，用以換取支付一部分的試管嬰兒治療費用。

取得大量的高品質卵細胞就目前而言也是另外一項限制因素。在英國，目前的限制是進行試管嬰兒治療的婦女在取得 12 顆以上卵子時，可以捐贈 2 顆供作研究，不過同意捐贈的夫婦有限，就目前取得的卵細胞而言，其捐贈婦女的平均年齡是 32 歲。另一個卵細胞的可能來源是胚幹細胞，就如我們在之前提到的，小鼠的胚幹細胞已經成功的被誘導分化為卵細胞(或類似卵細胞)，人類的卵細胞來源如果用同樣方式取得，就不會有倫理上的問題。

在許多文獻報導上，社會倫理觀感對許多新科技的發展疑慮不斷出現，這可以解釋為科技進步的速度較一般社會大眾的思考要快。以胚幹細胞等方式來作生殖也讓人不無疑慮，因為現在立法規範不甚完備。NT-ESCs 的技術成熟後，公眾的疑慮可能可以較緩和，特別是 NT-ESCs 不必消耗掉卵細胞，但可用來治療疾病，不過研究者仍應對核移轉相關研究的倫理問題嚴肅以對。

使用多餘的胚胎來建立胚幹細胞株已經不斷受到爭議，如果製造出核移轉後的胚胎，其爭議性必將擴大，主要的爭議觀點是在於早期胚胎如何被看待，如果被當作是一個早期生命的話，那麼不論是自然受孕的胚胎或是以核移轉製作出的胚胎，其生命價值應該被同等看待。有些宗教團體，如梵蒂岡認為生命於受精後就已經開始，其他宗教團體，像是回教和猶太教則認為生命開始於完整形成的胎

兒，也因為這個認定而不反對夫妻之間以試管嬰兒技術繁衍下一代。當然，也有許多其他宗教團體和個人有許多分歧的觀點和認定，唯一可確定的是，這些問題在未來會持續爭議下去，而且大部分的科學家、倫理學家和公眾團體傾向反對以核轉移的方式來作人類生殖，並且認為全球性的禁止是必需的。

核移轉製造胚胎或胚幹細胞目前的立法規範

歐洲議會目前對「治療性的胚胎選殖」(therapeutic cloning)抱持保守的態度，不過目前僅是規範原則問題，尚未有立法。歐盟對細胞核移轉技術目前則是禁止以公共經費支持，所以歐盟國家均已簽署「基本人權憲章」(Charter of Fundamental Rights)，禁止使用核移轉技術來作人類生殖。歐盟執委會則和歐洲會議不同，持著較有彈性的觀點，並且於最近(2006年9月)召集專家討論核移轉的倫理和科學觀點。

目前 20 個歐盟國家中，僅有 4 個國家，包括瑞典、比利時、芬蘭和英國，已經立法允許選殖人類胚胎作為治療用途，並有許多附帶限制條件，要注意的是，這邊所說的是治療用途，而非生殖用途，這是要特別強調的。除了一部分國家立法規範外，歐盟國家和一部分非歐盟國家已經在 1997 年的 Oviedo 會議和 1998 年的胚胎選殖規範(Protocol on Cloning, 1998)中簽定協議，其最重要的大綱在於製作人類胚胎僅能用於研究用途，而且包括核移轉技術所製作出的胚胎。不過 Oviedo 會議所規範的範圍仍有模糊性，有些國家像是法國和德國抱持

著強烈反對用體細胞核移轉技術製造人類胚胎的態度，而且這些國家向聯合國提案要求於 2006 年 9 月之後禁止全球作類似的實驗。

美國對人類胚幹細胞的研究則是有轉向的傾向，特別是核准聯邦經費用於胚幹細胞的研究，不過目前的支持僅限於使用 2001 年 8 月 19 日之前已經建立的胚幹細胞株，而且限制政府經費用以支持核移轉研究，不過私人經費用於核移轉技術相關研究則不受限。美國布希總統於 2002 年元月建立生物倫理諮詢委員會，用以監控幹細胞相關研究及提供立法或規範建議。目前的狀況是有許多實驗室只要不使用政府經費，仍持續進行人類胚幹細胞和核移轉的相關研究，如哈佛大學就是其中之一，而各州有各自的立法規範，其步調不一。

在亞洲國家(中國、南韓、新加坡)則立法支持使用體細胞核移轉進入去核卵細胞所製造出的胚胎，作為研究用途。特別是南韓，已經注入大量研究經費在這個領域上，但是在報告造假狀況出現之後，經費是否仍能大量被渾注有待觀察。無可置疑的，目前大部分的研究活動都在法律規範下進行，但是不同國家的規範寬鬆不同，像是英國的立法規定較嚴格，南韓則較寬鬆。反對的人會擔心假如現在允許使用核移轉技術於研究上，難保有一天會同意使用於人類生殖上。不過有些研究者並不擔心這個問題，因為現在使用核移轉製造出的靈長類胚胎，其早期發育和著床就很困難了，要擔心同樣的技術用來達成生殖的目的還言之過早。不過，最近哈佛大學的 Meissner 和 Jaenish 於 2006 年的 Nature(2006;439:212-215)發表了使用 Cdx-2 缺陷小鼠來作核移轉的胚胎，似乎可以排除著床困難的問題。

NT-ESCs 的粒線體非均質問題

使用患者體細胞的細胞核進行移轉所製造出的胚幹細胞應該不會有主要的免疫排斥問題，但是由卵細胞之細胞質帶來的外來粒線體是較少被考慮的，究竟這樣兩種不同來源粒線體共存的狀態(heteroplasmy; 參閱圖 3-2)，是否會持續存在於核移轉後製造出的胚幹細胞目前並不清楚，不過在其他非人類的動物研究中發現，粒線體非均質問題是普遍可見於胚幹細胞和由這樣方式出生的下一代體內，但是也有例外，像是牛藉由核移轉技術出生後，體內並沒有粒線體非均質狀況發生，而是完全由卵細胞的粒線體來提供，這是否因為物種的差異或是技術層面上的差異所造成的，有待進一步研究。

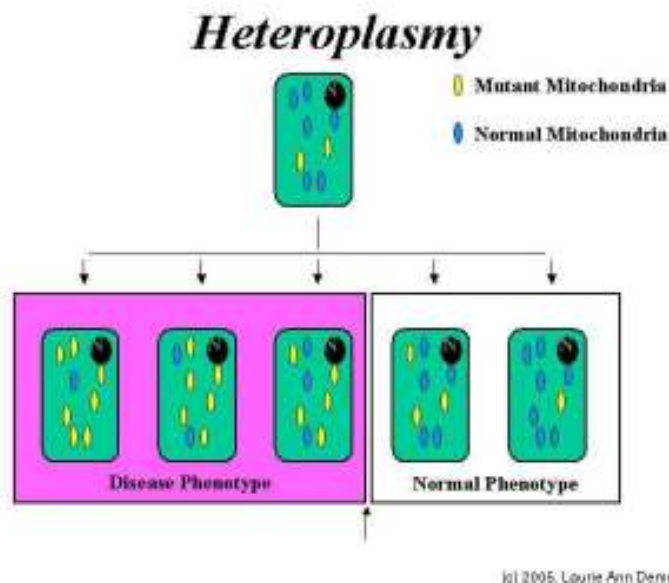


圖 3-2: 粒線體非均質問題是源自於兩種不同來源粒線體共存的狀態

(heteroplasmy)，於核移轉之後發生。突變型的粒線體若所占比率太高，如圖中左側的三個細胞所示，則會呈現疾病，反之則如圖中右側的二個正常細胞。

資料來源: ocw.tufts.edu/.../20/lecturenotes/301011/301031

另外一項需要考慮的問題是粒線體非均質性可能造成免疫排斥，畢竟如果大部分或全部的粒線體由卵細胞帶來，作出的胚幹細胞可能受到患者的免疫系統排斥，導致粒線體膜的電位異常，誘發植入的細胞凋亡，雖然目前沒有直接的報告針對這個問題，但是有使用核移轉後製造出的牛胚幹細胞，於體外培養出的組織植入牛體之後的評估報告，發現有兩種粒線體基因轉譯出的 miHA 胜肽存在於牛體內，不過沒有誘發 T-cell 反應，也有其他報告顯示出植入的細胞可能會因粒線體基因不合導致細胞凋亡。針對免疫排斥問題，有研究者認為口服免疫抑制劑 cyclosporine A 可克服這個問題，但是這樣又何必用核移轉技術呢？有些人認為植入免疫排斥問題較少區域，例如腦、眼睛和睪丸可能較適用於 NT-ESCs 得來的細胞植入，這個想法似乎在理論上較可行。

核移轉的接受細胞帶有粒線體基因缺陷的可能

粒線體 DNA 是位於細胞核外的 DNA，本身缺乏自我保護及修補配備，因此很容易帶來基因缺陷，以核移轉技術將細胞核植入去核的卵細胞時，這個卵細胞本身的粒線體可能就帶有缺陷，因此，由核移轉技術製造出的胚胎或是胚幹細胞可由接受的卵細胞帶來基因缺陷。目前，已知有超過 12 種臨床疾病和粒線體缺陷有關，而且有超過 150 種粒線體 DNA 的點突變已被發現過，這些 DNA 缺陷很可能藉由核移轉技術保留下來，因此在實際應用於臨床上時，可能要先排除這項可能。

基因序列本身(genetic)突變和非基因序列本身(epigenetic)突變的效應

另外一個值得擔心的問題是核移轉過程會不會導致基因突變或是非基因突變的遺傳效應。非基因突變的遺傳效應會於原始生殖細胞生成及受精作用時發生，也會於核移轉過程中發生。和試管嬰兒及自然生成的胚胎相比，核移轉製造出的胚胎會出現較高比率的基因異常表現，這是已經被證實的，除此之外，核移轉的胚胎 DNA 也有異常甲基化的現象，其他非基因突變的效應還包括 X 染色體去活化異常、基因打印缺陷和核蛋白乙基化作用的改變，一般相信，上述的改變會影響著床並且導致發育異常，特別是導致胎盤生長異常，較容易被觀察到，因為這一類的改變不會直接影響到胚胎生長，至少在著床前的發育是沒有問題的，也因此這一類的非基因突變效應不會影響到建立 NT-ESCs 細胞株，如果拿到這種建立起來的 NT-ESCs 細胞株，那就不妙了。另一個問題是我們要考慮到目前使用的人類卵細胞都是受精不成功的卵細胞，用來作核移轉的接受細胞自然會有較多染色體異常的狀態，因而導致經常可見的發育停止，而這也印證了在很多由核移轉建立的小鼠胚幹細胞的觀察，分化缺陷是常見的。

其它非胚幹細胞的細胞治療材料來源

胚幹細胞或以核移轉得來的胚幹細胞有時也不是絕對必需的，有時也可以考慮使用患者自身的成年幹細胞來作治療，例如骨髓就是一個成年幹細胞的重要來源。和胚幹細胞不同的是，成年幹細胞並非全能性，而是僅具有多能性，僅能分

化成某些特定的細胞族群，不過，以某些細胞治療的臨床應用來說，這也就夠了，因此，許多研究者所看的重點是成年幹細胞的分化，而非胚幹細胞的分化。使用成年幹細胞當然可以規避掉免疫排斥問題，不過最近的研究指出長期於體外培養的成年幹細胞有癌化現象，必須要密切注意。

結論

製造為病人量身訂做的胚幹細胞在技術上已經越來越接近真實，不過許多諸如 hESC 的分化，培養方法的改進，細胞治療技術的改善，都是仍然需要努力的研究重點，以核移轉技術來發展胚幹細胞的相關治療可能是一個捷徑，但是核移轉技術帶來的粒線體基因缺陷遺傳也是要進一步釐清的。

參考資料

1. Hall VJ, Stojkovic P, Stojkovic M. Using therapeutic cloning to fight human disease: a conundrum or reality? *Stem Cells* 24(7): 1628–1637, 2006.
2. Allsopp T. ES cell technology: an introduction to genetic manipulation, differentiation, and therapeutic cloning. *Advances in Drug Delivery Review*. 12(57:13), 1904–1917, 2005.
3. Trounson AO. Future and applications of cloning. *Methods in Molecular Biology* 348:319–332, 2006.

4. Edwards RG. Genetics, epigenetics, and gene silencing in differentiating mammalian embryos. *Reproductive Biomedicine Online* 13(5):732-753, 2006.
5. Hiendleder S. Mitochondrial DNA inheritance after SCNT. *Advance in Experimental Medicine and Biology* 591:103-116, 2007.
6. Bowles EJ, Campbell KH, and St. John JC. Nuclear transfer: preservation of a nuclear genome at the expense of its associated mtDNA genome(s). *Current Topics in Developmental Biology* 77:251-290, 2007.