

第四章: 胚幹細胞治療的需求及條件考量

前言

移植醫學面臨的最大問題是器官或是組織來源不足，可能的來源包括有自己、同種的其他個體、異種、初代或繼代培養的細胞株，或是成體幹細胞。移植醫學的最基本技術是培養、增殖、操作上述的這些細胞，但是這些最基本的技術往往也是決定成敗的關鍵。就目前的狀況而言，只能達到同種異體的細胞移植，而且還要有一定的組織相容性，才比較有成功的把握。

目前的現況是我們瞭解較多的是造血系統幹細胞的體內分化，以及間質幹細胞的體外分化過程，其它的成年體幹細胞的臨床應用還有很大的爭議，可能是培養系統的差別或是細胞融合問題，導致目前的爭議狀況，不過雖然有上述的限制，胚幹細胞或是成體幹細胞的研究仍然是解決未來數以千萬的巴金森氏症、糖尿病、脊髓損傷、心臟衰竭患者的希望，而且可能是最佳希望。

以在動物胚幹細胞研究模式中所得到的成果，證明以胚幹細胞作為再生醫學材料的來源在原則上是可行的。不過在將胚幹細胞分化得到的細胞移植之前，有些實驗障礙是必需先克服的，包括有效率的胚幹細胞的取得，而且要掌握到胚幹細胞於培養系統中的基因變化，包括染色體內的和染色體外的基因表現變化，之後還要具備分離純化特定細胞族群的能力，而且要能在長期培養之後維持胚幹細胞的染色體穩定，去除癌化的可能，而且一旦移植到體內之後，也要能夠和細胞存在的環境在形態上和功能上相結合，就如同正常的細胞一樣，最後是要確保植

入的胚幹細胞生成物不會被免疫系統排斥掉，或是演變成癌腫瘤。

許多上面所說的條件皆已被廣泛研究過，但是大部分是以小鼠的胚幹細胞為材料，針對人類的胚幹細胞的相關研究目前仍然非常不足。

以下我們就針對各種需要考慮的事項逐一作簡介：

(一) 基因變化的考量

到目前為止約有 77 株人類胚幹細胞（不包含私人或最近剛建立的）可以用作研究，但是僅有約 22 株人類胚幹細胞可於體外培養系統中增殖（詳見 <http://escr.nih.gov/>），而且雖然有些細胞株已經過 2 年的培養，持續不斷地繼代再繼代，並且維持染色體的穩定，但這也並不表示這些細胞株的基因是穩定的。就體細胞培養而言，大約每次細胞分裂就會有一個基因突變出現，因此如果一株細胞繼代 200 次，可預期會累積 200 個突變，大部分的突變可能不會導致任何問題，但是如果突變發生於致癌基因，那麼要拿這些細胞來治療就很難預料後果，這是拿人類胚幹細胞來作臨床治療實務上，必需要考慮的。

基因變化有許多不同的層次，而且未必是基因序列上的改變，基因序列外的修改，例如：DNA 甲基化、乙基化、鹼基蛋白的修飾，或是染色絲上的位置變異，雖然不影響到基因序列，一般也可認定為會影響到人類胚幹細胞的發育潛能。不同批號的血清也會影響到基因序列外的修改狀況，曾有研究者發現這會導致 Oct-3/4 表現量減小，使小鼠的囊胚細胞數目減少導致發育不良。基因序列外的修改對人類胚幹細胞的影響，雖然一般認為是負面的，但是影響程度究竟如何

呢？目前有許多研究室正在評估中。

以上述的資料而言，現有的人類胚幹細胞株可能不適宜用以作為治療應用或是支援治療試驗所需，原因是我們還不知道現有的細胞株有多少是帶有基因序列外的修改狀況，因此持續性地建立新的細胞株可能是需要的，但是以目前的法規限制來看，這又似乎不太容易，至少在美國是如此。

(二) 癌化作用

人類胚幹細胞會癌化嗎？其實很早被知道的一個事實是，如果將未分化或是處於分化早期階段的胚幹細胞移植到子宮外的一些位置，例如皮下組織，會長出畸型瘤。這個現象其實就推理上而言是不足為奇的，因為胚幹細胞本身的許多特性和癌細胞很類似，包括無限增殖能力，不需要有培養盤上的依附，且培養時細胞密度很高也不會自行抑制，從這個觀點來看，如果拿胚幹細胞來作治療，很可能會有部分未分化完全的細胞被移植到體內，導致畸型瘤長出的副作用，而這種副作用於小鼠體內到目前為止並沒有長期的預後評估，更不用說在人體內的評估了。

如果胚幹細胞已經分化完全再移植到體內進行細胞治療，是否就可以完全避免癌瘤長出？其實這才是重點，可以想見的，發展出篩選出癌化的細胞技術將會是胚幹細胞未來應用於臨床治療的關鍵，或是如果篩選不可能完全，至少也要發展出使植入後長出的癌瘤細胞走向凋亡的策略。

(三) 胚幹細胞的純化和純細胞株篩選

基於上述癌化細胞的考量，有一些純化和篩選胚幹細胞的技術被發展出來，目的在於得到特定表現型或是想辦法去掉未分化完全的細胞，在這個目的上，有些細胞就特別有趣，包含已經往某一個方向分化的前驅細胞、高度增殖的細胞，以及具有分化成數種不同特性細胞者，都是值得密切研究的標的。

在實驗上中目前有兩項分離方式，第一是利用細胞特定的表面抗原，配合流式細胞儀作細胞分類，或是以帶上抗體的小磁珠來分離細胞，第二是用基因轉殖的方式將可用以篩選的 DNA 序列導入胚幹細胞，有時是分化為特定細胞才會表現的標記或是不分化時特有的標記，用以分離出已分化完成或是尚未分化的細胞。例如 Li 等人就曾於 1998 年發表用特定細胞才會有的啟動子加上藥物抗性序列，如此，胚幹細胞一旦分化為特性細胞（例如神經細胞），就會啟動藥物抗性能力，可以在加入藥物的細胞培養盤中存活，而其餘尚未分化或是分化階段尚未到足以表現神經細胞的啟動子的細胞族群則會被藥物殺死，如此就可以將分化完成的細胞純化出來。

儘管上述的細胞分離概念看似完美，但我們必需注意的是迄今仍無單一分離方式被證實可以得到 100% 的純化細胞株，也因現況如此，以複合式的篩選方式來純化細胞是目前的趨勢，希望可以分離出單純的由胚幹細胞分化出的細胞株。

(四) 特異性的組織植入和功能分析

想到利用胚幹細胞分化出的特定細胞株作治療，根本問題在於這些細胞一旦被植入患者體內，是否有能力合併入患者本身的組織並且正常工作，這一點在胚

小鼠胚幹細胞的實驗治療上是肯定的。最近在 2006 年 11 月 9 日的 Nature 期刊上有一篇以視神經幹細胞治療先天性失明小鼠的實驗成果，發現視神經幹細胞可讓遺傳性失明的小鼠達到一定的視力回復，而其成功的關鍵在於植入的細胞可以和原來的細胞建構出正常的神經網路，而且令人興奮的是，視神經的前驅細胞已經被證實可由人類胚幹細胞分化取得，為以後使用胚幹細胞治療眼盲患者奠定了一個良好的基礎。不僅是視神經系統的修補，目前還有心肌細胞、神經膠原細胞、運動神經原、胰島素分泌細胞、肝細胞、造血前驅細胞，也有初步的成果。

(五) 由胚幹細胞分化的細胞之免疫特性和排斥問題

以人類胚幹細胞做細胞治療的另一項成敗關鍵是免疫排斥問題，顯然的，免疫排斥問題如果沒有解決，則細胞治療是註定會失敗的，尤其是雖然 MHC-1 在人類胚幹細胞的表現量很低，但是植入患者體內開始分化後可能表現上升很多，而且就算是沒有 MHC-1 的表現仍然可能會受到自然殺手細胞攻擊。

面對免疫排斥問題，目前有四大解決途徑曾被提出：

第一，使用傳統器官移植後服用抑制免疫排斥劑的方法，不過很不幸的是目前大部分的抗排斥藥物都有伺機性感染、藥物相關毒性、皮膚不適和移植後淋巴球異常增殖等併發症。另外也有研究者提出更具特異性的免疫排斥處理方法，同時移植由同一株胚幹細胞分化出的造血前驅細胞或是先以著床前階段的胚胎細胞處理，讓患者的免疫系統先適應。

第二，另外一個吸引人的想法是乾脆將人類胚幹細胞會導致免疫排斥的基因

完全除去，其中一個可能的作法是完全除去 MHC-1 上的所有基因，如此可製造出一體通用於所有患者的人類胚幹細胞，不過，完全除掉 MHC-1 上的基因的後果難以評估，就算是完全除去 MHC-1、MHC-2 上的所有基因可能還是會有問題，畢竟免疫排斥還有自然殺手細胞等非組織相容因素。

第三種選擇是建立組織相容性的人類胚幹細胞庫，類似骨髓移植細胞庫一樣，僅有相容性的人類胚幹細胞才拿來作細胞治療。據估算根據每一個 HLA 的亞型來建立，就需要至少 200 株的人類胚幹細胞才足以因應，這表示需要建立大量的人類胚幹細胞細胞庫，其工作量是難以估算的，而且根據現行法律規定，也沒有實現這種人類胚幹細胞庫的可能。

第四項選擇是為患者量身定做胚幹細胞株，稱為「治療性的選殖」(therapeutic cloning)，使用體細胞（來自患者）的細胞核，以核移轉技術將其植入去核的卵細胞（來自捐贈者），製造出理論上應該符合患者免疫系統的胚幹細胞，不過最近這項技術被認為是杜撰的，而之前發表的論文也被撤掉，所以其可行性仍待進一步證明，我們在上一個章節中已經針對「治療性的選殖」作介紹。

以胚幹細胞為基礎的實驗現況

在細胞治療的領域中，已有自體骨髓移植或同種異體骨髓移植被廣泛應用於臨床治療，不過到目前為止，沒有以胚幹細胞株作為細胞治療的材料在人類身上試驗過，儘管現況如此，人類胚幹細胞的無限來源可望更廣泛的被應用於細胞治

療，特別是下列三個原因令人覺得特別樂觀：第一是人類胚幹細胞可於培養系統中無限擴充，解決了來源不足的大問題；第二，人類胚幹細胞可於體外進行基因修改，可望用以治療先天性基因缺陷，例如 CFTR 缺陷導致纖維囊腫的問題；第三是目前已有無數的促使人類胚幹細胞分化的實驗正在進行，這類的實驗有所突破之後將使胚幹細胞可以應用於所有細胞相關的疾病。

以下我們針對細胞治療用於動物模式再作進一步舉例說明：

(一) 用於心臟修補

Loren Field 的研究室首先於 1996 發表第一篇以小鼠胚幹細胞分化出的細胞修補心臟的研究報告，將心肌細胞純化後打入先天性心肌異常小鼠的心室肌內層，發現 7 週之後植入的細胞仍然存活，且沒有腫瘤長出。之後，Min 等人使用心肌梗塞的大白鼠為模式，發現由胚幹細胞分化得到的細胞，具有類似心搏收縮的能力，將這些細胞於植入心臟後，會促進心肌功能，而且植入的細胞會表現心肌細胞特有的 α -actin、 α -myosin 重鏈、troponin-1，且型態和正常心肌細胞類似，顯示出植入的細胞具有符合正常功能的分化和結構。

上述的結果似乎證實了以小鼠的胚幹細胞治療心肌疾病的可行性，然而要完全純化心肌細胞並且於植入後穩定存在於心臟內，迄今並沒有確定 100% 成功的報告。

(二) 用於形成血管

最近的文獻報告中，有研究者嘗試用人類胚幹細胞分化為血管內皮細胞，並且於分化過程中具有血管內皮特性的基因表現，例如：GATA-2、PECAM-1、HK-1、VE-cadherin 都有表現，利用 PECAM-1 的抗體將培養 13 天的類胚胎體細胞分離後培養於人工骨架上，然後植入 SCID（嚴重合併性免疫缺陷鼠），可以得到細小的血管結構，顯示出以胚幹細胞建構人工血管的潛力。

(三) 以胚幹細胞修補神經

胚幹細胞於體外系統中相當易於培養出類似神經細胞的結構，因此，有許多研究者嘗試用胚幹細胞的產物進行神經修補，或是至少預防神經受損的傷害擴大。Brustle 等人首先證明由胚幹細胞長出的神經細胞可以存活，並對環境刺激作適當反應，且將長出的神經細胞植入腦中後，會因腦中局部環境的不同做出適當反應，之後的報告更指出胚幹細胞可於體外培養出星狀細胞和寡突觸細胞，而且將來這些細胞植入神經膠質缺陷的小鼠，可看到有效的神經膠質修補，使原先失去的神經功能得到回復。

前面的先驅報告之後，類似的神經細胞移植實驗文獻報告大量出現，例如有研究胚幹細胞分化為分泌多巴胺的中腦神經細胞，用以治療巴金森氏症的研究，而且人類胚幹細胞也已證實可分化為分泌多巴胺的神經細胞，可謂開啟了巴金森氏症治療的新希望。另一個例子是由小鼠胚幹細胞分化為可分泌 GABA 的神經細

胞，用以嘗試治療 Huntington 症（杭亭頓症）的大白鼠，也有以寡突觸細胞嘗試修補神經膠原的實驗。這一類實驗在小鼠的研究已經有相當基礎，並且已示範出可能性，接下來的工作就是去證明人類胚幹細胞也有類似的功能。

（四）以胚幹細胞治療糖尿病

已經有人證實以小鼠的胚幹細胞可分化為胰島素分泌細胞並且可改善小鼠糖尿病模式的症狀，但是同樣的治療方式是否可應用於人類的糖尿病，目前仍有待評估。要達成治療糖尿病的目標，技術上的需求將包括篩選具有較多胰島素分泌的細胞及使用這些細胞在培養液中進行組織工程，也包括建立胰島素分泌細胞所需的環境，當然最後的目標是讓具有功能的胰島素細胞於移植到患者體內後長期存活，不過目前沒有這樣的評估報告。

以胚幹細胞和成人幹細胞進行細胞治療的前景比較

使用胚幹細胞作為細胞治療之用，其實有時候並不是唯一的選擇，成年幹細胞（ASC，adult stem cell）也可以是細胞治療另一種材料來源，而且成年幹細胞還有機會被誘導轉分化（transdifferentiation）為其它種類的細胞，例如骨髓中的造血幹細胞可分化為神經、肌肉、或是肝細胞，神經或是骨骼肌幹細胞則可轉分化為造血細胞，中胚層幹細胞分化為心肌細胞，間質幹細胞分化為脂肪細胞、軟骨、或是硬骨細胞，像這種富有彈性的成年幹細胞的分化表現，令人覺得

其實也是潛力無窮，只是有些成年幹細胞的轉分化特性還沒有被完全掌控，也因此，仍有些爭議存在。但是使用成人幹細胞確實是具有某些胚幹細胞所沒有的優勢，至少，使用患者自己的成體幹細胞不會有免疫排斥的問題。

以我們現在的瞭解而言，成體幹細胞和胚幹細胞相比，其發育上的潛能是比較侷限的。如果將成年幹細胞注入小鼠的囊胚，成年幹細胞的確可貢獻於一些不同的組織中，但是其分佈因不同囊胚而異；成年幹細胞注入小鼠體內結果也類似，可貢獻於一些不同的組織，但是無法知道會是貢獻於那些組織，這是和胚幹細胞不同的，後者是可以貢獻到胚胎內所有的組織。

以幹細胞進行細胞治療的基本概念

無論是胚幹細胞也好，成年幹細胞也罷，取用幹細胞來作治療，目前應該可以想見有底下四個基本概念：

第一，直接將幹細胞植入於待治療的位置，或是將幹細胞植入於循環系統中，都要考慮這些細胞的正確走向（homing），和最後這些細胞所處理環境或是它的「窩」（niche）；胚幹細胞分化所得到的前驅細胞需要事先加以純化才能使用，以免同時將癌細胞植入病人體內。

第二，以植入幹細胞分化出來的細胞來作治療，牽涉到幹細胞培養、分化和篩選過程，可能在這些過程當中，細胞會有基因內或基因外的 DNA 序列變化，但是也提供了篩選出最佳細胞的機會。

第三，近年來組織工程的發展已經提供了將幹細胞於體外培養成 3-D 立體結構的可能性，以具有生物分解性的材料建構骨架 (scaffolds)，然後將細胞種於支架上，俟細胞長成立體結構後再整個用於組織或器官修補，已被應用於許多方面，例如：硬骨、軟骨、和肌肉的修補。

第四，除了外來的幹細胞治療外，也可考慮動員體內現有的幹細胞來進行治療，最明顯的例子是捐血之後，捐血者體內的造血幹細胞很快的被動員起來，進行失去血液的補充工作。人體內有許多可能可以動員的幹細胞來源，包括：肝臟、腦、皮膚、心臟、骨髓和腸道，雖然目前最被認知的幹細胞動員系統是骨髓，有個有趣的觀察是作骨髓移植往往可見到被移植的骨髓細胞會進行心肌的修補和胰臟的修補，因此是否以後其它體內的幹細胞也可被動員起來，用於再生醫學是目前一個值得努力的方向。

參考資料

1. Bettiol E, Clement S, Krause KH, Jaconi ME. Embryonic and adult stem cell-derived cardiomyocytes: lessons from in vitro models. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 157:1-30, 2006.
2. Hentze H, Graichen R, Colman A. Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *Trends Biotechnol.* 25(1):24-32, 2007.
3. Engelmann MG, Franz WM. Stem cell therapy after myocardial infarction: ready

for clinical application? *Curr Opin Mol Ther.* 8(5):396-414, 2006.

4. D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 24(11):1392-401, 2006.
5. Min JY, Huang X, Xiang M, Meissner A, Chen Y, Ke Q, Kaplan E, Rana JS, Oettgen P, Morgan JP. Homing of intravenously infused embryonic stem cell-derived cells to injured hearts after myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 131(4):889-97, 2006.
6. Buhnemann C, Scholz A, Bernreuther C, Malik CY, Braun H, Schachner M, Reymann KG, Dihne M. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* 129(Pt 12):3238-48, 2006.
7. Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JW, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu Z, Duan Y, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med.* 203(10):2315-27, 2006.

8. Takahashi J. Stem cell therapy for Parkinson's disease. Ernst Schering Res Found Workshop. 60:229-44, 2006.