

第五章：胚幹細胞作為造血細胞的來源

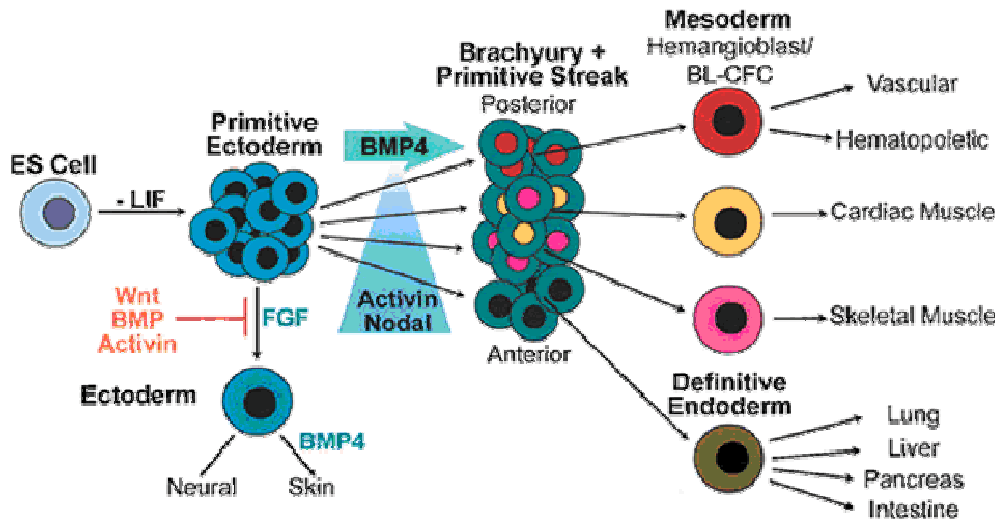
簡介

胚幹細胞於 1981 年首先被分離出，為囊胚內細胞團分離出的原始細胞株。胚幹細胞之特性是可自我更新及分化為三個胚層所能分化的所有細胞，將小鼠的胚幹細胞用顯微操作注入囊胚，可以發現胚幹細胞貢獻到由此長出的小鼠體內所有細胞，包括生殖細胞，利用這個特性再加上用同質性基因重組(homologous recombination)改變胚幹細胞的基因組成，就可以製作出新品種的小鼠，用以攜帶新基因或敲掉想打掉的小鼠基因。因為胚幹細胞的全能特性，可被誘發成各種分化的細胞，包括造血細胞，本章就此介紹以胚幹細胞作為造血細胞的來源的研究現況及未來可能之應用。

由胚幹細胞分化而來的造血細胞株

迄今為止，大部分由胚幹細胞分化出的造血細胞都是由小鼠的動物模式研究而得到的，第一步驟是將胚幹細胞由餵養細胞和維持其不分化的因子(例如 LIF)分出，之後，如果維持血清含量，有很大的部分的胚幹細胞會分化為中胚層細胞，但是如果在無血清培養系統，小鼠的胚幹細胞可被誘導分化成中胚層細胞和血液前驅細胞，特別是加入 BMP4 和 Brachyury。BMP4 也會促進人類胚幹細胞形成中胚層細胞(請參考下列圖 5-1)。

圖 5-1: 將胚幹細胞由餵養細胞和維持其不分化的因子 LIF 分開後, 再加入 BMP4 和 Brachyury 等因子, 就可取得血液血管母細胞(hemangioblast), 由此再分化為血液細胞和血管細胞。



資料來源: www.debra-international.org/research12.htm

由胚幹細胞產生血球前驅細胞有兩大主要的操作系統, 一是先形成之前章節中所提到過的類胚胎體(EB; embryoid body), 另一則於實質細胞上培養, 誘導其進行血液細胞之分化。

類胚胎體的操作系統是於胚幹細胞培養系統中, 將實質細胞移除並去掉 LIF, 則懸浮於培養液中的胚幹細胞會自然形成團塊狀, 稱為類胚胎體。類胚胎體由 Doetschman 等人於 1985 年發現培養於液態培養液中會形成囊狀結構, 其中包含血島(blood islands)結構和胚胎中的血液形成很相像, 之後的實驗確定了類胚胎體中的確有紅血球和白血球形成, 而這些生成的細胞皆可用標誌抗體來標

定，此外將類胚胎體打散後的細胞可用流式細胞儀來計數，如此這個類胚胎體的研究模式可用以研究藥物、細胞激素或是基因操作(gene targeting)對血液前驅細胞分化的影響，而且可藉由加入特定組成的細胞激素來分化特定的血液細胞族群。

如上所述，第二種方式是將胚幹細胞培養於實質細胞(stromal cells)上，刺激其往造血系統的路徑分化，最常使用的系統是 OP9 實質細胞，該細胞由 OP/OP 缺陷小鼠而來，缺乏有功能的 M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor)。OP9 細胞會促進造血系統發育，原因是提供一個適當的微環境，M-CSF 缺乏的狀態下會抑制單核巨噬細胞株的生成，以免單核巨噬細胞株生長過快，擠壓到其他血液細胞族群的生長空間，如果使用正常的實質細胞的話，那麼長出來的細胞大部分都是單核球形成的巨噬細胞，這是我們想避免的狀況。將胚幹細胞細胞鋪平於 OP9 細胞上面後培養五天，胚幹細胞就會形成中胚層細胞的族群，之後再分化為多能性的血液前驅細胞(約再經過 3 天)，然後就如同在類胚胎體內所見到的，紅血球、白血球、B 細胞會於 OP9 細胞上面生成，而且除了血清之外不需要外加其他因子。

在體內的分化過程中，血液前驅細胞和幹細胞是藉由細胞之間的相互作用以及細胞和實質細胞所提供的環境之相互作用而達成分化，將整個系統於培養中做造，有助於胚幹細胞完全分化為血液細胞，因此有學者嘗試使用 3-D 立體骨架合併各種細胞外基質(ECM)，促進類胚胎體的發育，這個系統進一步改善的結果將

會使體外的培養環境更加類似於體內的血液生成環境。

以胚幹細胞作為早期血液生成的研究模式

於胚胎發育過程中，造血系統是由不同發育階段的不同前驅細胞所長成的，第一個可明確辨認的血液細胞位於卵黃囊的原始紅血球，和成年人的紅血球有許多型態、基因表現、細胞激素需求上的差別。血液幹細胞(HSCs)於小鼠胚胎中最早存在於卵黃囊和一個稱為 AGM (aorta-gonad-mesonephors)的區域(參考圖 5-2)，在胚胎發育到中期時，主要的造血活性由卵黃囊和 AGM 轉到肝臟，此時製造出的血液即有成年血液細胞的特性。目前我們已經知道鳥類或是小鼠的造血前驅細胞或是血管內皮細胞都是由單一的細胞族群衍生而來的，這一個細胞族群稱為血液血管母細胞(hemangioblast)。

圖 5-2: AGM (aorta-gonad-mesonephors)區域位於小鼠胚胎背側，是主要動脈、性腺、和中腎管匯集之處，大約正對圖中腹側的圓形氣球狀卵黃囊上方。



資料來源: genex.hgu.mrc.ac.uk

如果想辦法在培養系統中讓胚幹細胞往血液生成的方向分化，那會看到什麼呢？令人驚訝的，胚幹細胞會仿效體內的造血細胞生成的方式來進行分化。比如說，正常胚胎的紅血球生成以幾個波段來進行，剛開始是較原始的紅血球，以後才逐漸生成成熟的成年人體內的紅血球，而這種波段生成的特性，在胚幹細胞的體外分化過程中也可以見到。在類胚胎體(EB)的系統中，也會發現有暫時性的前驅細胞存在，稱做 BL-CFC (blast-colony-forming-cell)，之後再分化為原始紅血球、成熟紅血球和血管內皮細胞。Nishikawa 等人根據上述的結果再擴充實驗，發現這種前驅細胞表現 Flk-1 和 VE-cadherin，而且由單一細胞可以培養出血液細胞或是內皮細胞。因此，這些觀察都支持有所謂(BL-CFC)細胞株存在，而根據這個系統來分析，近年來已增加許多對血液和血管母細胞特性上的知識，例如我們已經知道 BL-CFCs 會表現細胞激素受體 Flk-1，受到 VEGF 的調控。利用胚幹細胞來研究造血系統生成的好處在於胚胎中早期的前驅細胞數量很少，不容易研究，利用胚幹細胞則沒有類似問題。最近 Huber 等人於 2004 年的一篇 Nature 文章中指出最早的血液和血管前驅細胞位於早期胚胎的原條 (primitive streak)，且特性和胚幹細胞養出的 BL-CFCs 很相像，但是分離這種細胞很困難，因為每個早期的鼠胚大約僅有 10 個這種細胞，因此使用胚幹細胞來進行造血系統的分化，因為數量上沒有限制是有很大的優勢，可望於未來和由成年人體內分離出的多能幹細胞作一比較，提供藥物開發和毒性試驗的另一種材料(參考圖 5-3)。

圖 5-3: 使用胚幹細胞來進行造血系統的分化，因為數量上沒有限制是有很大的優勢，可望於未來和由成年人體內分離出的多能幹細胞作一比較，提供藥物開發和毒性試驗的另一種材料。同樣的，針對肝細胞、肌肉細胞、和神經細胞的藥物開發和毒性試驗也有類似的優勢。

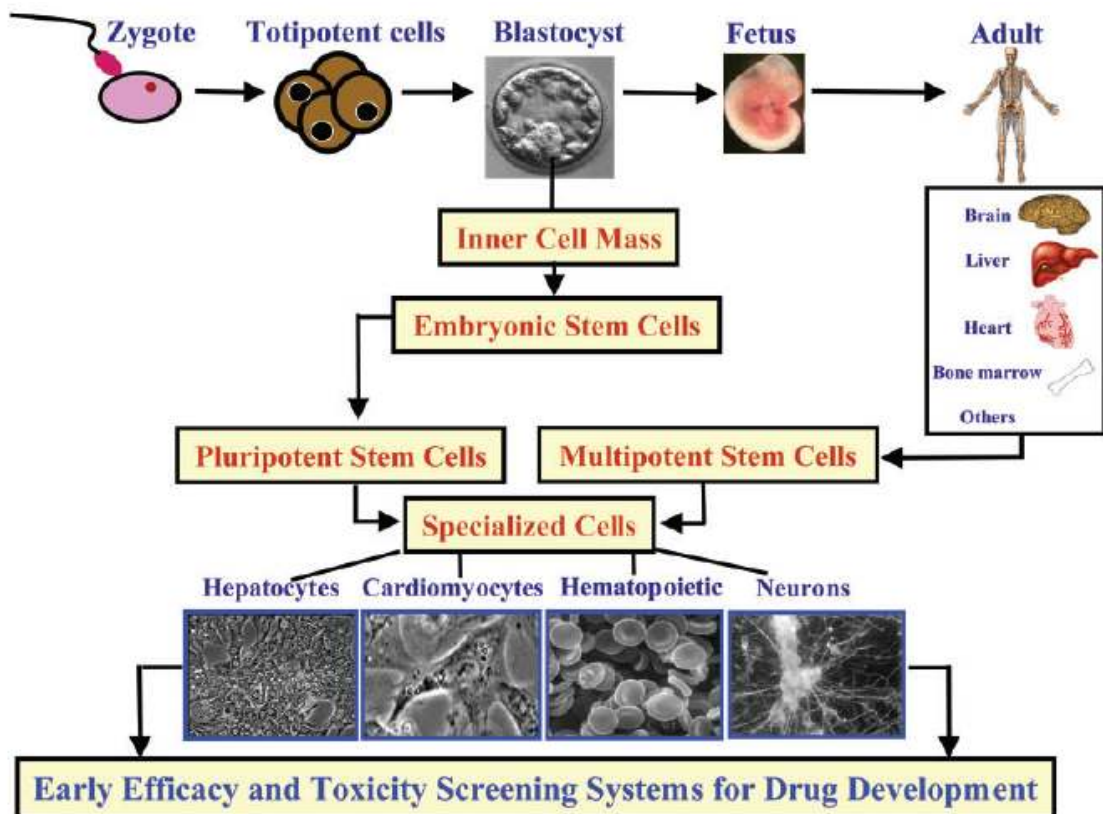


FIG. 1. Origin of embryonic and adult stem cells and their potential applications in toxicology.

資料來源: Use and application of stem cells in toxicology.
Toxicological sciences 79, 214-223, 2004.

由胚幹細胞分化為造血系統幹細胞的研究現況

理論上而言，將單一的造血幹細胞植入適當的宿主，就可以重建整個造血系統於宿主身上，但是以胚幹細胞培養，誘導其分化的造血系統前驅細胞植入動物體內後，僅在動物體內建立相對微弱的系統，且就目前已經被發表的文獻報告來說，其差異性很大。不過最近 Burt 等人於 2004 年發表的成果顯示出以胚幹細胞分化的前驅細胞可提供大量的造血系統建立於宿主，似乎提供了新的技術突破。

大部分胚幹細胞分化而來的造血前驅細胞，其生長的侷限性可能是因為其成熟度不像是正常骨髓中的造血細胞，能夠在成年的骨髓環境中如魚得水。相對的在正常胚胎中，也有這種可稱作“造血前驅細胞”(HSCs)的族群，可見於卵黃囊和 AGM，一般認為在發育過程中，這個族群細胞會發生某些變化，導致其有建立完整造血系統的能力，而這種能力是目前由胚幹細胞培養出的前驅細胞還缺乏的，所以有人將之稱為 pre-HSCs，而非 HSCs。如何將 pre-HSC 轉變為 HSC 呢？操作其基因可能已經提供部分答案。Hox 基因家族是已知參與正常血液生成的調控因子，因此 Humphries 的研究小組嘗試將 HoxB4 導入，發現可以促進 HSCs 的自我更新能力，Daley 等人擴充這項實驗也發現將 HoxB4 強迫於卵黃囊或是胚幹細胞表現後，可讓其長期保持多元特性，且進行多重移植後仍維持這項特性。

想讓胚幹細胞分化為 HSCs 的調控更容易掌握，需要更清楚知道 pre-HSCs 如何在胚胎發育過程中建立發展為造血系統的能力，例如：我們早已知道骨髓中的基質細胞和 HSC 之發育及成熟過程習習相關，可能以後的研究可以將基質細胞

所提供的因子分離出來，用以提供作誘導胚幹細胞往 HSC 分化更好的調控。

以胚幹細胞於體外製造特定的血液細胞

如果不做整體造血細胞的分化，針對特定的血液細胞族群著眼，有沒有辦法由胚幹細胞來製造呢？早期的分化實驗都是得到一群非特定的血液細胞，後來經由分化調控的各種條件的改善，例如添加特別的細胞激素或是改變刺激的方式或是時間，現在已能控制胚幹細胞往特定的血液細胞分化。

這些針對特定血液細胞族群分化的方法提供了較細緻的研究模式，特別是將胚幹細胞作基因修改對血液細胞特定分化路徑的影響，這樣的研究模式提供很大的幫助。以下就針對特定的血液分化細胞分化，逐一作簡介。

(一) 紅血球細胞

將 7-8 天的類胚胎體打散，然後置於甲基纖維培養基中，再加入紅血球生成素(erythropoietin, Epo)和 kit，會得到大部分的類胚胎體細胞分化後的紅血球。Weiss 等人曾將胚幹細胞的 Gata-1 基因敲掉，培養後得到正常形態的紅血球母細胞，之後細胞生長停滯，然後凋亡。在這個系列的實驗中，可以顯示出 Gata-1 在紅血球生成的過程中是具有階段性的調控角色的，在紅血球母細胞的生長和存活上，扮演必須的角色。

將胚幹細胞培養成紅血球的方法曾由 Beug' s 等人發表，他們將類胚胎體(EB)成功培養成 10^7 倍的紅血球，整個過程達數個月之久，而這個過程中，

dexamethasone 扮演重要的角色，其作用在維持細胞的擴充能力，而非分化能力，如果將 dexamethasone 去掉，則細胞停止分裂，開始進行分化到成熟的紅血球的過程。

(二) 巨核球細胞

將胚幹細胞培養於 OP9 基質細胞，並加入 thrombopoietin(Tpo)會製造出富含巨核細胞的族群，且具有巨核球細胞在功能上的特性，包括血小板前驅細胞的產生，且會有適當條件下的纖維蛋白原結合現象產生。同樣的，這個由胚幹細胞培養成巨核球的系統可以提供很好的研究模式，近年來有許多應用這個系統研究巨核球細胞分化過程的報告。

(三) 顆粒球細胞

由胚幹細胞於體外培養製造顆粒球細胞，我們能夠控制到什麼程度？Lieber 等人可以達到約 75%的中性球生成，使用的方法是將 EB 打散出的細胞培養在 OP9 細胞上面添加適當的細胞激素，結果養出的中性球細胞有標誌分子表現，有趨化性，且會製造超氧化物，符合中性球的生理特性。

(四) 漿細胞

以 EB 得到的細胞打散後於懸浮培養液中加入 IL-3 和 KL，結果可以得到純的漿細胞株，將這種細胞株植入缺乏漿細胞的基因缺陷鼠(Kit^w/Kit^{w-v})，結果胚幹細胞養出的漿細胞可在此種小鼠體內存活並且擴充到有生理功能補償作用出現。

(五) 嗜伊紅血球

Hamaguchi-Tsuru 等人曾使用胚幹細胞培養於 OP9 基質細胞，並加入 IL-5 以及 IL-3 或 GM-CSF，可得到約 50% 的嗜伊紅性細胞分化，這些分化的研究和大量嗜伊紅性細胞的取得可望於將來應用於過敏或是氣喘患者，比如說可用這個系統來篩選新的抗發炎藥物或是抑制嗜伊紅細胞的生長和功能。

(六) T 型和 B 型淋巴球

Nakano 等人於 1994 年的 Science 期刊上曾發表以胚幹細胞培養於 OP9 基質細胞上，再加入 IL-7，結果得到早期的 B 細胞，這些細胞大都是 IgM⁺ 且已完成 DJ gene 重組，不過仍有少部分細胞是 IgM⁺，且表現完整的 μ 鍵 RNA，進一步的研究發現加入 IL-7 和 Flt-3 ligand 之後，可得到大量的，具分泌抗體能力的成熟 B 細胞，基本上，這些細胞可用以生產人類或是小鼠的抗體。

將胚幹細胞分化為 T 型淋巴球的挑戰性較大，可能是 T 細胞的正常分化需要經過胸腺的基質細胞處理，於體外培養系統中較難仿造這樣的分化環境。

Zuniga-Pflucker 等人基於這樣的考慮，採用兩段式的分化培養，先將胚幹細胞培養於 OP9 基質細胞，然後再轉種於 Flk⁺CD45⁻ 的胎兒胸腺器官培養盤中，由胸腺提供基質細胞環境，結果成功分化出 T 細胞，但比率甚低。之後，經導入 Notch ligand 之表現，使比率大幅上升。這個由胚幹細胞分化為 T 細胞的系統代表著日後要分析細胞分化為 T 細胞的基因因素和環境因素，以及兩者之間的交互作用將會更加容易。

(七) 巨噬細胞

將胚幹細胞分化為巨噬細胞也有成功的例子，而且除了表現巨噬細胞該有的特性(Mac1 表現以及 lysozyme RNA 的表現)，也表現動脈損傷後所見的巨噬細胞的一些特性，因此可用於冠狀動脈粥腫硬化之研究。也有一些研究者利用這個系統來研究某些基因缺陷之後對巨噬細胞功能的影響，例如 Guillemot 等人就使用這個系統證明 GDID4 和正常巨噬細胞超氧化物的製造有關。

(八) 突觸細胞

突觸細胞(dendritic cells)是強力的抗原呈現細胞，可作用在免疫反應或是自我耐受性上。胚幹細胞分化出的突觸細胞在臨床上有許多潛在的應用，將胚幹細胞養在 IL-3 和 GM-CSF 的環境中會使突觸細胞大量生成，之後可用 TNF- α 加上 IL-4，再加上 LPS 或是 CD40 抗體讓它成熟，得到的細胞和骨髓的突觸細胞很相像。

(九) 自然殺手細胞(NK cells)

自然殺手細胞是自然免疫系統的重要執行者，Lian 等人曾將胚幹細胞分化為具功能的自然殺手細胞，會殺掉某些癌細胞株和缺 MHC-class 1 的淋巴母細胞。自然殺手細胞如果能夠大量培養，勢必將有助於許多抗病毒或抗癌的相關研究。

(十) 蝕骨細胞

蝕骨細胞是由 HSCs 而來，和骨骼的吸收和塑形有關，因此，了解蝕骨細胞

的特性和許多骨骼方面的疾病有關。以胚幹細胞分化成蝕骨細胞的技術已經被建立，是以 M-CSF 和 RANKL 這兩個因子為主要刺激因子，外加維生素 C、dexamethasone 和 $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ 可進一步擴充蝕骨細胞的分化。利用胚幹細胞分化為蝕骨細胞的系統也可以幫助我們對蝕骨細胞生成的瞭解。

人類胚胎幹細胞分化為造血細胞的研究進展

上述的結果都是小鼠的研究成果，至於使用人類胚胎幹細胞的分化現況如何呢？以下作一簡介。

由人類胚幹細胞培養出的血液

由小鼠胚幹細胞培養出血液細胞的許多知識可以應用於人類胚幹細胞的研究，可由培養成類胚胎體 (EB) 或培養於基質細胞上來進行。和鼠胚的系統一樣，人類胚幹細胞分化成血液細胞的過程也反映出在胚胎中造血系統生成的狀況，例如：人類的 EB 也有不同種類血液細胞於不同階段產生，而且人類的 EB 中可製造出中胚層細胞、造血細胞和內皮細胞，其組織結構和卵黃囊中的血島 (blood islands) 一樣，而這些 EB 中的前驅細胞目前極待鑑定其特性，可能包括血液血管的母細胞 (hemangioblasts)。Wang 等人曾加以分離，並證明帶有 CD45、PECAM-1、Flk-1、VE-cadherin 的細胞可分化成血液或內皮細胞，可能就是上述的血液血管母細胞。

雖然我們已從小鼠胚幹細胞的系統知道很多分化成血液細胞的知識，不過不同物種之間的差異很大，包括細胞株的形態，建立細胞株的成功率，表面標誌分子和基因表現，而且現在以無血清的系統分化人類胚幹細胞為血液細胞的技術也還沒有建立，可望於之後數年內被建立好。

目前已經可以由人類幹細胞建立有 CD34 表現，可分化為各種血液細胞的細胞株，可過這些細胞移植到免疫缺乏的小鼠之後，重建血液系統的能力不強，顯示出缺乏移動到其他骨髓區域和骨髓中的基質細胞互動的能力，似乎這種細胞和早期鼠胚的造血系統前驅細胞（pre-HSCs）較類似，和胚胎正常造血系統發育過程中胚幹細胞所扮演的角色很像。另外，如果將 HOXB4 表現在人類胚幹細胞，並不會產生 HSCs 的擴充，可能是技術問題，也可能是人鼠之間的差異。

結論及未來之遠景

具有由胚幹細胞製造血液細胞的能力，無疑地開創了許多臨床醫學的可能，目前以骨髓治療可幫助許多血液疾病患者，但骨髓的有限來源往往令臨床醫師無法提供患者適時且有效的幫助，人類胚幹細胞的大量供應如果在技術上成熟，就可解決這個難題。使用人類胚幹細胞分化出的血液治療另一項好處是可改變其基因，較改變骨髓細胞中的基因容易。人類胚幹細胞的血液療法最終目的當在於使用體細胞移轉技術，為每個患者量身訂作自己所需的胚幹細胞株，配合基因改造，使用 lentivirus 或 siRNA 方法，為患者作最適當的細胞治療，不過，達到

這個目標之前仍有許多困難需克服。

使用由非完全分化的細胞來作治療可能是另一項解決辦法，例如可改造突觸細胞，用以治療癌症或是改善免疫排斥，不過由患者身上可分化出的突觸細胞仍然有限，所以使用人類胚幹細胞作為突觸細胞的最終來源，可能是唯一可以解決這項問題的辦法。此外，人類胚幹細胞相對於胎兒肝臟或是成年人的骨髓而言，其分化為紅血球前驅細胞的潛力相對龐大，可望成為大量生產成熟紅血球的來源，特別是許多罕見的特異性紅血球的來源。基因改造過後的紅血球也可望打破血型的限制，白血球或血小板細胞的族群也能有類似的應用，特別是後者，可藉由基因操作人類胚幹細胞得到的血小板來提升或是抑制凝血功能，這在血管疾病或腦中風醫學上將有很大的應用潛力。

雖然潛能無限，但目前仍有許多問題需要解決，例如使用 3-D 的材料來幫助人類胚幹細胞分化為特定的血液細胞族群，就是目前極需要開發的領域。3-D 的培養環境要考慮生長因子、基質細胞以及細胞外基質對胚幹細胞的作用，有很多實驗需要嘗試；另一方面，持續改善非血清培養系統或是非基質的培養細胞也是目前許多研究者正在努力的方向。

另外，發展細胞治療的有效測試系統也是必要的，使用細胞移植於免疫缺陷的 NOD/SCID 小鼠可能並非最佳的測試系統，可能使用較接近人類的靈長類為測試系統較佳。目前有些實驗室正致力於非人類的靈長類的血液系統發育研究，可望嘗試使用胚幹細胞分化出的血液細胞來作細胞治療相關實驗，這些研究仍在起

始階段，但可望作為臨床前的重要依據。

使用人類胚幹細胞分化血液細胞另一個好處是，除了臨床應用之外，可幫助我們更加容易研究血液系統的發育生物學，畢竟體外的實驗系統較體內系統容易操作，而且使用動物模式的研究結果往往因為物種之間的差異，未能反應出人類血液系統的發育，使用人類胚幹細胞來作為研究模式就較為直接。

參考資料

1. Lengerke C, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yates F, Wang Y, Bansal D, Daley GQ. The Cdx-Hox pathway in hematopoietic stem cell formation from embryonic stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007.
2. Prindull G. Hemangioblasts representing a functional endothelio-hematopoietic entity in ontogeny, postnatal life, and CML neovasculogenesis. *Stem Cell Rev.* 1(3):277-84, 2005.
3. Li F, Lu SJ, Honig GR. Hematopoietic cells from primate embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* 418:243-51, 2006.
4. Weisel KC, Gao Y, Shieh JH, Moore MA. Stromal cell lines from the aorta-gonado-mesonephros region are potent supporters of murine and human hematopoiesis. *Exp Hematol.* 34(11):1505-16, 2006.
5. Krassowska A, Gordon-Keylock S, Samuel K, Gilchrist D, Dzierzak E,

Oostendorp R, Forrester LM, Ansell JD. Promotion of haematopoietic activity in embryonic stem cells by the aorta-gonad-mesonephros microenvironment.

312(18):3595-603, 2006.

6. Umeda K, Heike T, Yoshimoto M, Shinoda G, Shiota M, Suemori H, Luo HY, Chui DH, Torii R, Shibuya M, Nakatsuji N, Nakahata T. Identification and characterization of hemoangiogenic progenitors during cynomolgus monkey embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells*. 24(5):1348-58, 2006.
7. Bowles KM, Vallier L, Smith JR, Alexander MR, Pedersen RA. HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 24(5):1359-69, 2006.
8. Kim SJ, Kim BS, Ryu SW, Yoo JH, Oh JH, Song CH, Kim SH, Choi DS, Seo JH, Choi CW, Shin SW, Kim YH, Kim JS. Hematopoietic differentiation of embryoid bodies derived from the human embryonic stem cell line SNUhES3 in co-culture with human bone marrow stromal cells. *Yonsei Med J*. 2005 Oct 31;46(5):693-9.