

## 第六章:使用胚幹細胞和其它細胞治療糖尿病的可能性

### 前言

血中糖份的平衡需要靠胰臟的  $\beta$ -細胞分泌胰島素，一般健康的人於禁食狀態下，胰島素的分泌速度為基礎量，但是於進食後胰島素的分泌速度會增為原來的 5~10 倍，為達成這樣的任務，不止需要有經常功能的胰臟  $\beta$ -細胞，還需有一堆儲備細胞以備不時之需。正常的健康胰臟約含有 100 萬個胰島，每個胰島包含二千個  $\beta$ -細胞，因此估計  $\beta$ -細胞約佔整個胰臟體積的~1.5%，總重約 1~2 克。在人類，胰臟的  $\beta$ -細胞失去 40%大約還能維持血糖濃度的恆定性，超過這個極限血糖濃度就上升到無法控制的程度。

糖尿病分為兩型，第一型糖尿病是由自體免疫缺陷，去攻擊自己的  $\beta$ -細胞而來的。整個病程起初是胰島素分泌減少，然後若干年後出現糖尿(血清內的糖濃度上升到無法控制)，原因是  $\beta$ -細胞的數目銳減，一般高血糖狀況出現時， $\beta$ -細胞已經失掉 90%，另外殘留的  $\beta$ -細胞則會存在很長的時間，這個  $\beta$ -細胞的變化情形可由患者死後的胰臟組織切片觀察到，有些學者認為有  $\beta$ -細胞殘留是因為胰臟本身具有類似幹細胞的族群存在，保留部份再生能力，不過這種類似幹細胞存在於何處仍有待釐清。

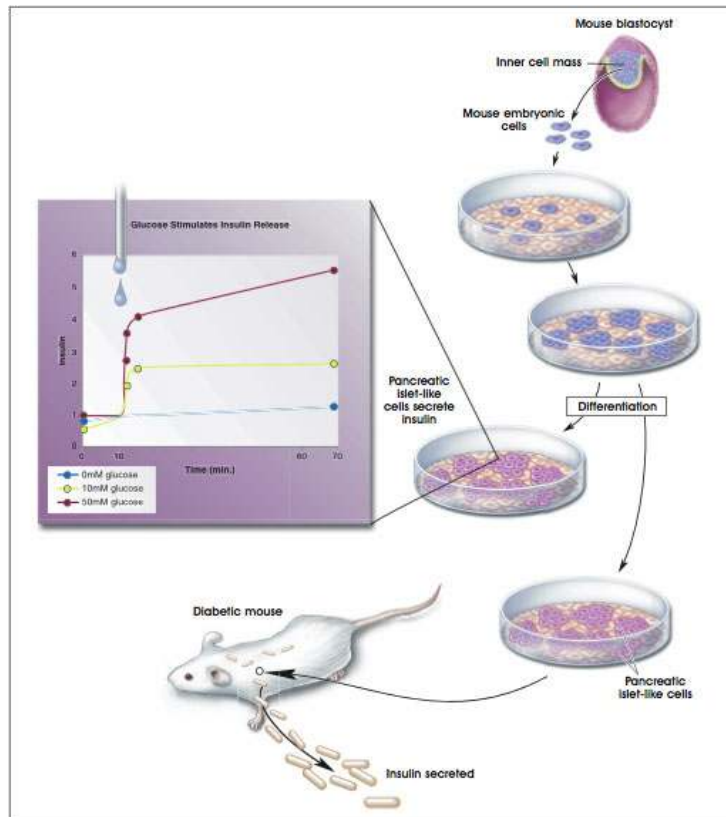
第二型的糖尿病也有  $\beta$ -細胞損失的狀況，約失去~65%的  $\beta$ -細胞族群，常見比正常高 10 倍的  $\beta$ -細胞凋亡，不過不是自體免疫所造成的。一般認為是毒性分子，例如：hIAPP，游離脂肪酸、或是過多葡萄糖所造成。在實驗動物例如

豬、狗、或是非人類的靈長類動物，若失去相同數目的  $\beta$ -細胞，也會有血糖濃度過多的狀況。這些觀察皆指出  $\beta$ -細胞控制正常血糖狀況的重要性，也因此給我們以  $\beta$ -細胞來作細胞治療的想像空間，當然另外一個可行的治療方法是胰臟移植，不過移植器官的來源、免疫排斥和手術危險永遠是要考慮的因素；另一個可行的嘗試可能是移植  $\beta$ -細胞就好，不用移植整個胰臟，不過目前其成功率不比移植整個胰臟好，也受限於來源問題。

基於這樣的需求背景下，有許多研究者寄望於使用胚幹細胞作為糖尿病細胞治療的來源(參考圖 6-1)，將胚幹細胞培養成類似胰臟  $\beta$ -細胞，且具有根據血糖濃度分泌胰島素的能力，再將這些細胞植入體內作治療。這個來源可行嗎？現在的發展狀況如何？這是本章所要探討的，我們首先將討論為什麼使用胚幹細胞及使用胚幹細胞的困難點，再進一步比較使用由成人體內幹細胞分化而來的  $\beta$ -細胞的可行性，最後並對未來發展及應用作一總結。

圖 6-1: 以胚幹細胞作為糖尿病細胞治療的來源是將胚幹細胞培養成類似胰臟

$\beta$ -細胞，且具有根據血糖濃度分泌胰島素的能力，再將這些細胞植入體內作治療。



資料來源: [stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter7.asp](http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter7.asp)

### 為什麼使用胚幹細胞

理論上因為胚幹細胞的全能性，它能分化為各種細胞，包括  $\beta$ -細胞，因此使用胚幹細胞在概念上是可行的；其次是因為胚幹細胞的來源不受限(記得它的特性是可以不斷擴充)，如果細胞植入治療具有自行更新複製的能力，則治療細胞來源也是不受限的，這是其另一項優勢。

## 使用胚幹細胞的困難點

當然，使用胚幹細胞也不是全然優勢的，目前有以下困難必需要克服。

### (一) 倫理和宗教上的考慮

目前仍有許多倫理和宗教上的疑慮導致某些政府禁止或是高度限制此類型的研究，例如天主教會不斷要求國際上禁止人類胚幹細胞的研究，因為胚幹細胞是由破壞人的胚胎而來，依天主教教義定義，胚胎完整保有人的權利和機制，是需要被保護的。因為這種倫理上的疑慮，美國國會通過廣泛性禁止聯邦研究經費應用於人類胚幹細胞相關的研究，不過這項禁令稍後稍作修改，允許贊助已經存在的人類胚幹細胞株進行相關研究。

也有研究者認為，可以使用不適合植入人類子宮的試管胚胎來分離胚幹細胞，不過美國布希總統公開聲明表示，「沒有無用的剩餘胚胎這回事」(詳見 2005 年 5 月 26 日的紐約時報)，所以目前的考慮點在於，到底什麼時候才可以判定人類胚胎「已死亡」，不宜再植入子宮內？Landry 和 Zucker 兩位學者曾經於 2004 年發表早期胚胎死亡的定義，他們認為在胚胎神經發育之前的許多早期胚胎器官上的發育不全，約可作為胚胎死亡的定義，如果基於這樣的定義的話，和羅馬天主教的教義就不致於有衝突，這樣的定義因此似乎可為研究人類胚幹細胞的倫理因素困境解套。不過最近技術上的突破可能是更好的消息，Chung 及其同事們研發出使用單一胚葉細胞建立胚幹細胞株的技術，另外，Meissner 和 Jaenisch 利用細胞核轉移方式由小鼠的囊胚建立胚幹細胞株，上述的技術突破發表於 2006

年的「自然」期刊發表，因為兩項技術皆不傷害原來的胚胎，似乎為解決目前的倫理困境帶來一絲曙光。

## (二) 建立和擴充細胞的考量

為了達到可用於臨床治療的規劃，第一步必需取得胚幹細胞，大量培養後又不失其多能分化的特性，而且也需考慮在培養過程中無污染，以免失去臨床應用的價值。目前胚幹細胞株已被建立的有鼠、兔、豬、靈長類和人類，人類的胚幹細胞已被擴充而且維持不分化的幹細胞特性，方法是培養於小鼠胚胎纖維母細胞上，以後者作為餵養細胞。將餵養細胞清除後，人類胚幹細胞具有分化為三個胚層細胞的能力，證明其具有全能分化的特性，不過很可惜的是有文獻指示目前有限的人類胚幹細胞株因為這樣的培養方式，已被小鼠基因污染，失去了臨床應用的潛在價值。不過技術上而言，目前培養和擴充人類胚幹細胞，使用小鼠細胞作為餵養細胞已非絕對必需，將來的人類胚幹細胞大致上不會有類似問題發生。Wang 及其同事於 2005 年發表了成功培養人類胚幹細胞超過 30 代，但是不使用小鼠餵養細胞，而是以血清取代物再加上高濃度的 bFGF 來進行培養。

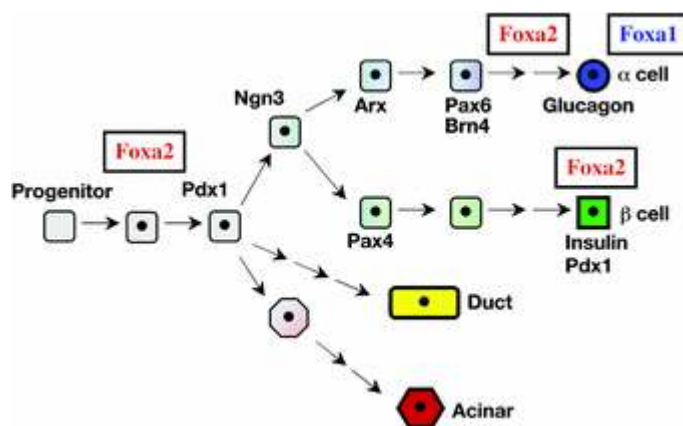
## (三) 將人類胚幹細胞分化為 $\beta$ -細胞的考量

除了培養和擴充胚幹細胞之外，第二步是要能夠將人類胚幹細胞分化為  $\beta$ -細胞。人類胚幹細胞在正常胚胎發育過程中，其實是處在非常複雜且極端變化的

外在環境當中，而人類胚幹細胞在分化過程中也有自身的基因調控，其之所以成為  $\beta$ -細胞的前驅細胞其實是自己和環境互動的結果，在人類的  $\beta$ -細胞發育過程，嚴格來說是從剛授精就已經開始，而且一直到出生後一年才算分化完成。

在正常的胚胎發育過程中，胰臟由一個腹側和一個背側的隆起(bud)而來，而這兩個隆起是由原始的腸腔內皮長出。之後，一連串的轉錄因子被活動，驅動背側和腹側隆起進一步分化為特定的細胞類型，包括外分泌細胞、內分泌細胞和管狀結構細胞。在這個過程中一個很重要的調控基因是 PDX-1，在所有的胰臟前驅細胞都有這個基因表現，如果將 PDX-1 敲掉，則胰臟是長不出來的，可見其重要性。接下來的一個重要調節基因是 Notch，Notch 控制下游的 HES1。另外還有 NGN3 (neurogenin3)，調控內分泌細胞的分化，將其和所有的胰臟前驅細胞區隔出來，NGN3 底下則有一系列的其他基因控制  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  細胞的分化，其中和  $\beta$ -細胞分化最有關的基因有 Foxa2、Pax4 和 Pdx-1(如圖 6-2 所示)。

圖 6-2: 控制  $\beta$ -細胞分化最有關的數個調控基因及其先後作用順序



資料來源: [www.clinsciusa.org/cs/108/0195/cs1080195.htm](http://www.clinsciusa.org/cs/108/0195/cs1080195.htm)

儘管我們對上述的一連串轉錄因子調控  $\beta$ -細胞的分化有某些瞭解，其實尚有許多問題待解決，例如很明顯的， $\beta$ -細胞如何在 3 度空間被排列和及其與其它細胞的空間對應，就是需要再研究的。 $\beta$ -細胞通常於胚胎發育過程中被分化於胰臟內的血管和神經的終端，這是體外研究所無法做到的，可能細胞外的訊息，例如細胞外基質蛋白(extracellular matrix proteins)和  $\beta$ -細胞分化的空間排列有極大的關係。

在人的胚胎發育過程中，具有功能的  $\beta$ -細胞分化要花費 18 個月的時間，在體外作這麼久的分化似乎不可行，特別是人類的胚幹細胞在數天的培養過程中即有老化傾向，並且會進行分化而失去多能性。

#### **(四) 免疫排斥問題的考量**

要利用人類的胚幹細胞培養分化出的  $\beta$ -細胞來治療糖尿病的另一個考量是免疫排斥問題，如果植入的  $\beta$ -細胞會被宿主排斥，則免疫抑制勢在必行，不過就理論上而言，人類的胚幹細胞可以被操作變為免疫相容性較高的  $\beta$ -細胞，避免被排斥。

#### **(五) 目前的研究進展**

目前研究已證實可由人類胚幹細胞分化為具有分泌胰島素能力的  $\beta$ -細胞，但是考慮需要大量擴充的臨床治療，技術上仍有待進一步突破。以人類的胚

幹細胞分化出的  $\beta$ -細胞目前的確可見到標誌分子，例如：insulin、GLUT-2 和葡萄糖活化酶 (Glucokinase) 的表現，但對葡萄糖的反應性較低，且分化比率可能也偏低。另一問題是激發人類胚幹細胞分化為  $\beta$ -細胞的過程中也會使其他類型的細胞被分化，例如： $\alpha$ -細胞或是管狀細胞，因此還要將這些其他細胞分離才能進行細胞移植治療，技術上又有一層障礙，所以目前雖然用各種不同方法促使人類胚幹細胞分化，最後僅得到約所有培養細胞的 1~3% 成為  $\beta$ -細胞，技術上尚需進一步突破。

#### (六) 植入胰島？還是植入 $\beta$ -細胞？

另一個值得考慮的問題是究竟要讓人類胚幹細胞分化為胰島較好還是分化為  $\beta$ -細胞較佳？正常的胰島中， $\beta$ -細胞被分化於較核心區域，而其他像是  $\alpha$  和  $\delta$  細胞則被排列於胰島周邊較多，而且胰島的主要血管供應來自於核心區的微小動脈，先經過  $\beta$ -細胞密集區域，再到周邊其他細胞，另外， $\beta$ -細胞一般皆利用 gap junction 互相連結，以利電生理的傳遞，這樣的結構設計其實是讓  $\beta$ -細胞可以和其他胰島細胞互相協調工作，因此單一存在的  $\beta$ -細胞和成堆一起的  $\beta$ -細胞可以想見，其生理活性是不一樣的。

在健康的人體內，胰島素分泌具有一致性的脈動，而且是有神經網路相協調的，這樣的設計可能較難於體外培養系統達成，所以可行的方法是養出胰島再植入較佳，不過想像培養單一細胞的困難度，想到培養具功能整合的細胞群可能更



不容易。最重要的是如果沒有功能協調的一堆  $\beta$ -細胞於植入體內後，會不會導致致命性的低血糖狀況是要考慮的。

#### (七) 要將人類胚幹細胞分化出的 $\beta$ -細胞植到何處？

假設上述的困難都已經排除了，下一步我們要考慮的將是要將這些人類胚幹細胞分化出來的胰島素分泌細胞、或是細胞團、或是整個胰島移植於何處？有數個問題是需要考慮的，人類胚幹細胞具有發展成畸型瘤或是其它癌症的可能，那麼這些細胞是不是要用一個囊袋包起來一起植入，以防癌細胞到處亂跑？到底要植入多少細胞？用多大的囊袋？而這樣的植入能維持多久？這些問題都是要考慮的。

如果分化出來的  $\beta$ -細胞不需要考慮癌症問題，那些應該植入高含氧量的位置，因為  $\beta$ -細胞對缺氧是很敏感的，其次也要考慮植入細胞分泌的胰島素是要分泌到門脈循環或是全身循環，因為肝臟是主要的胰島素反應器官，理論上應該讓胰島素分泌到門脈循環和正常的生理調節較相像。另一個可考慮的植入位置是腸黏膜，因其血管豐富而且區域性的生長因子，例如 GLP-1 (Glucagon-like peptide 1)、GLP-2、gastrin 等多胜類濃度很高，不過將  $\beta$ -細胞植入腸黏膜的外科手術技術要求很高。

#### (八) 植入的 $\beta$ -細胞能維持多久？

以近年來將胰島植入人體的經驗而言，大部份植入的胰島壽命有限，因此大都數患者在 5 年內都回到用胰島素治療的狀態，因此如果用人類胚幹細胞來治療糖尿病，可能要讓細胞植入後能維持自己生長的能力，或是需要定期作移植，如果是前者，如何維持  $\beta$ -細胞的增殖和凋亡將是一大挑戰。成年人的  $\beta$ -細胞很明顯地具有相當的彈性，用以對分泌需求增加時得以因應，例如在胰島素阻抗或是肥胖時， $\beta$ -細胞的大小和數量都會增加，將人類胚幹細胞分化出來的  $\beta$ -細胞植入人體是否能有這樣的彈性調整能力不無疑問，而且萬一植入細胞的生長失控，則和植入癌細胞相同。之前有研究者觀察到具分泌能力的  $\beta$ -細胞成功地由人類胚幹細胞分化而來，但之後發展成畸型瘤，因此這樣的危險是很可能的。

### 由成人體內幹細胞分化而來的 $\beta$ -細胞

成人體內究竟有沒有  $\beta$ -細胞的幹細胞，這個問題一直飽受爭議，有許多提議這種幹細胞存於外分泌細胞、胰管細胞、肝臟、脾臟、或甚至是骨髓當中，不過迄今這些提議都沒有很直接的證據。

#### (一) 由外分泌腺而來的幹細胞

有某些研究支持新的胰島形成可由外分泌的管腺細胞而來，這樣的假設有某些理由支持。在發育過程中，內分泌管其實是由外分泌管分枝而產生的，因此，在人或是鼠類的胰臟內，往往可於外分泌管中見到內分泌細胞，而且在整個胰臟

內到處可以見到胰島存在於外分泌管周邊，有某些地緣關係。另外一些證據來自於長期增加胰島素分泌需求時(例如將葡萄糖持續打入血液中、或是部份胰臟切除)，會有代償性的胰島生成，而這些胰島生成也經常是位於外分泌腺的周邊，也有研究者觀察到在第一型糖尿病的成年患者身上的胰臟外分泌腺周邊，比一般正常成年人具有更多纖維化組織，似乎暗示新的胰島生成，並在外分泌管周邊死去，造成此處經常發炎而纖維化，也有人觀察到外分泌管腔旁邊有單一  $\beta$ -細胞存在，並且認為是剛由外分泌管分化出來的細胞。最近的研究結果指出 PDX-1 高度表現於人的胰臟管，而非 acinar tissue，似乎代表著胰島和胰管較為類似。不過，胰臟  $\beta$ -細胞由外分泌管分化而來的假設迄今仍無直接證據，有人利用細胞追蹤技術也找不到其關聯性，其實際狀況有待進一步證明。

## (二) 由外分泌細胞轉分化(transdifferentiation)

由外分泌的 acinar 細胞轉分化為  $\beta$ -細胞也被提出是成年人補充  $\beta$ -細胞之來源之一，這個觀念是來自於以免疫抑制劑治療第一型糖尿病患者後，有許多散佈於外分泌細胞實質層的  $\beta$ -細胞出現，而且最近有些體外培養的實驗發現可將 acinar 組織轉成  $\beta$ -細胞相似的表現型特徵，不過要注意的是，散佈的  $\beta$ -細胞在正常的胰臟也會出現，未必就是由 acinar 細胞轉分化而來。

## (三) 上皮轉為實質細胞的分化

由上皮轉分化為實質細胞的觀念是於 2004 年 Gershengorn 等人所提出的，他們認為成年人的  $\beta$ -細胞可分化為類似纖維母細胞，可以移動和複製，然後再分化成胰島中的內分泌細胞，不過這個假設於人體中沒有被證實過，原因是人體中做這類實驗是不可能的。

#### (四) 由骨髓而來的幹細胞

骨髓細胞可否分化為胰臟的  $\beta$ -細胞？這個問題一直被高度爭議著。Ianus 等人於 2003 年曾做過一個實驗將骨髓細胞由雄鼠分離出後移植入雌鼠，這些雄鼠用螢光蛋白標記，於移植後 4-6 週追蹤，可發現雌鼠的 1.7~3% 胰臟  $\beta$ -細胞是來自於植入的骨髓細胞，不過之後的三篇報導卻無法證實上述的實驗結果。

#### (五) 新的 $\beta$ -細胞來自原有的 $\beta$ -細胞複製？

最近的研究開始質疑胰臟有  $\beta$ -細胞幹細胞的說法，Dor 等人於 2004 年發表於「自然」期刊的論文指出，大部份的  $\beta$ -細胞是來自原來的  $\beta$ -細胞，而且另一篇報導利用 cyclin D<sub>2</sub> 基因敲掉的老鼠作實驗也發現原有的細胞複製應該是維持出生後小鼠  $\beta$ -細胞數目的最主要機制，不過若以 Ki67 和胰島素為標誌分子來作分析，可以見到成年人的  $\beta$ -細胞複製相對於小鼠而言是極度緩慢，不足以應付生理需求，因此成年人的  $\beta$ -細胞補充可能來自不同來源。

## 由內源性來源來補充 $\beta$ -細胞的可能策略

雖然新的  $\beta$ -細胞來源尚待澄清，有些間接證據指出，經常性的  $\beta$ -細胞補充可能發生於成年人體內。 $\beta$ -細胞族群會因需求增加，例如於懷孕時的增胖狀態下， $\beta$ -細胞會自然增加，另外如果成年人的  $\beta$ -細胞不會自行補充的話，那麼即使是健康成年人也會發生的細胞凋亡要如何補充呢？

假設  $\beta$ -細胞真的會自然補充，那麼糖尿病患者可以藉由自然補充而受益，祇要增加其自然補充之活化，減緩其細胞凋亡情形即可得到改善。有些實驗利用腸道內分泌試圖增加其自然補充的活性，例如利用 gastrin、GLP-1、GLP，或是利用一些生長因子，例如 EGF、IGF-1 或 IGF-2、TGF- $\beta$ 、生長激素(GH)或是 betacellulin，不過這些實驗皆於小鼠動物模式中進行，其實際效用應用於人類尚待證實，另外，剛形成的  $\beta$ -細胞也較容易凋亡，因此也可能長得多也死得多，如此則對糖尿病患者沒有幫助。

不論是第一型或第二型糖尿病都可見到  $\beta$ -細胞大量凋亡的現象，因此利用預防其凋亡的方式，也可能是治療的方法之一，這在小鼠的模式已經被證明可以把糖尿的狀況完全或部份回復，不過於人體中這個概念尚未被嘗試過。

## 人體中的 $\beta$ -細胞代償速度

如果要以預防新生  $\beta$ -細胞的死亡來治療或改善糖尿病，那麼  $\beta$ -細胞自然的代償率就很重要，要新生的細胞數目夠多才能有顯著效果。Finewood 等人曾

經用 BrdU 來定量  $\beta$ -細胞的代償率，發現在成年大白鼠中其週轉率約為 2%，不過也有人發現成年小鼠的  $\beta$ -細胞會複製者僅佔約 1/1400/每日，算一算僅有補充所有  $\beta$ -細胞 0.0701% 的能力，就算沒有  $\beta$ -細胞會自行凋亡，要完全補足 50% 的  $\beta$ -細胞也要約 1429 天，遠遠超過小鼠的正常壽命。人體中類似的實驗無法進行(基於人道理由)，但由其他資訊推算，人的  $\beta$ -細胞自然補充比小鼠慢得多，因此懷孕期的  $\beta$ -細胞增加現象是非常特殊的調控導致的結果，而這個特殊的調控我們目前並不清楚。

### 摘要與總結

由人類胚幹細胞分化為  $\beta$ -細胞的發展使許多人預期有一天我們可以用人類胚幹細胞來治療糖尿病，但是由於倫理上及技術上的限制，這個夢想在近期內將很不容易實現，因此可能需要更加努力嘗試人類胚幹細胞以外的方法。由成年人體內幹細胞作為新的  $\beta$ -細胞來源目前尚有很大爭議，而且這些細胞的來源目前也不清楚。我們僅知道在小鼠的實驗中，的確有補充新的  $\beta$ -細胞現象發生，如果這個現象應用於人體，可能可以改善甚至治療糖尿病，不過這種可能我們現在知道的非常有限，但已經有很活躍的研究能量投入其中。

## 參考資料

1. Gangaram-Panday ST, Faas MM, de Vos P. Towards stem-cell therapy in the endocrine pancreas. *Trends Mol Med*. 2007 Feb 16, Epub ahead of print.
2. Sun B, Roh KH, Lee SR, Lee YS, Kang KS. Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 23;354(4):919-23.
3. Madsen OD, Serup P. Towards cell therapy for diabetes. *Nat Biotechnol*. 2006 Dec;24(12):1481-3.
4. Santana A, Ensenat-Waser R, Arribas MI, Reig JA, Roche E. Insulin-producing cells derived from stem cells: recent progress and future directions. *J Cell Mol Med*. 2006 Oct-Dec;10(4):866-83. Review.
5. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer 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*. 2006 Nov;24(11):1392-401.
6. Yue F, Cui L, Johkura K, Ogiwara N, Sasaki K. Glucagon-Like Peptide-1 Differentiation of Primate Embryonic Stem Cells into Insulin-Producing Cells. *Tissue Eng*. 2006 Jun 1; [Epub ahead of print]