

第九章：將胚胎幹細胞分化為造骨細胞和破骨細胞之研究及應用

前言

骨頭是特化的結締組織，兼具延展性及機械強度，具有各式各樣生理功能，包括提供骨骼肌附著及支持，保護重要臟器免受外力傷害，並且有重要的生理代謝功能。骨骼系統的礦物質基質是主要的離子儲存場所，特別是鈣和磷。骨骼系統包含兩種最主要的細胞，也就是造骨細胞和破骨細胞，這兩種細胞和細胞外基質連結，形成骨骼系統。細胞外基質則包括有機性及無機性兩種，有機性的細胞基質有例如：fibronectin 或生長因子，或是膠原蛋白第一型、第三型等等，無機性的細胞外介質，例如氫氧磷灰質結晶（hydroxyapatite crystals）等等。

骨骼系統會進行循環性的再塑作用，用以因應外在機械壓力之改變，並維持鈣和磷的恆定，而這種循環性的再塑作用由生骨作用和破骨作用之間的平衡取得控制，由上述的生骨細胞和破骨細胞負責。生骨細胞由骨髓的基質幹細胞（MSC；Mesenchymal Stem cell）分化而來，中間過程先經過幾個分化階段，形成前驅細胞，再由前驅細胞分化為造骨細胞，最後再逐漸分化為骨骼細胞。造骨細胞的特性是胞內有很多內質網和游離的核糖體，這些細胞學上的特徵代表造骨細胞具有高度的蛋白質合成活性。

造骨細胞和骨髓細胞是由 gap junctions 連結成一個細胞網路，讓骨骼表面和礦物基質之間可以順利溝通。骨質鬆化則由破骨細胞調控，破骨細胞是由骨髓中的造血前驅細胞分化而來，這些前驅細胞有多核、高度極化，且含大量的粒線

體等特徵，會將礦物質吸收，方法是以其細胞表面和礦物基質形成折疊面，並分泌氫離子，使礦物質溶掉，並將有機的基質成分以酸性蛋白酶分解掉。Frost 於 1969 年首先証明造骨細胞和破骨細胞在時間上和空間上的密切連結，而且它們之間的連結受到 gap junctions、細胞激素、生長因子、維生素和內分泌的調控，一旦這個連結失去平衡，會導致骨骼增生或是骨質疏鬆。

胚幹細胞早期囊胚的內細胞團所建立，其特性為多能性，可分化為各式各樣的細胞，且可以大量擴充，用以作為造骨細胞或是破骨細胞的研究材料可說是很適合，特別是最早期的分化過程，以胚幹細胞來研究才能提供適當資訊。

以下，我們就將胚幹細胞分化為造骨細胞或是破骨細胞目前的研究狀況作一簡介，並且提供日後應用的一些思考。

將胚幹細胞分化為造骨細胞

造骨細胞在正常胚胎發育過程中是由中胚層所分化，具有細胞外基質堆積（主要是第一型膠原蛋白）及礦物質堆積的能力，並且在破骨細胞相鄰時，會分泌 IL-6、RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)，或是前列腺素 E2，刺激破骨細胞進行骨質吸收（疏鬆化），另外，造骨細胞也會分泌 MMPase（基質金屬蛋白酶），是直接參與破骨過程的證據。

在一般造骨過程中，約有 10~20% 造骨細胞會被包埋在骨中，最後分化為骨細胞。研究幹細胞分化為造骨細胞有兩個重要原因，第一，大量的造骨細胞是

以組織工程進行再生醫學治療所必需的；第二，具備造骨細胞分化的調控知識之後，可望讓我們應用在處理骨癌或是骨質疏鬆的病理狀況。

最常進行的造骨細胞分化實驗是以前驅細胞株，例如 MC3T3 細胞作為研究材料，或者是由骨髓基質幹細胞、脂肪組織、胎盤、軟骨組織所分離的初代培養細胞為研究材料，這些不同的研究模式讓我們知道造骨細胞是如何分化的，並且讓許多研究者分離出重要的調控因子。特別是骨髓的基質幹細胞（mesenchymal stem cell；MSC），將其分化完成後可望修補病人自己的骨頭損傷，促進骨折癒合，另外，目前也有移植 MSC 讓骨質疏鬆的兔子長出再生骨的報告，可謂潛力無窮。

骨髓的基質幹細胞也可於體外培養中或是植入腎臟外囊後，分化為骨細胞。不過骨髓的基質幹細胞的缺點是在骨髓中的數目太少，如果要進行有效治療，需要於體外先行培養擴充，但這會導致細胞不穩定，而且於體外擴充的繼代能力是有限的。

Bonab 等人曾報告骨髓的基質幹細胞於 9 個繼代後就會失去幹細胞的特性，而且也會失去分化為骨細胞的潛能，另一方面，骨髓的基質幹細胞也好，或是 MC3T3 細胞，應該視為造骨前驅細胞，以其作為研究材料所看到的分化現象是屬於後段的分化過程，想要研究前段早期的分化現象，可能還是以胚幹細胞作材料較適當。

想要研究胚幹細胞分化為造骨細胞；首先就要取得適當的分化標誌分子，並

加以明確界定，目前常用的標誌分子包括 Cbfa1/Runx2 (主要的造骨轉錄因子)、第一型膠原蛋白、osteopontin (op)、osteonectin、osteocalcin (oc)、bone sialoprotein (BSP) 和鹼性磷酸酶 (ALP) (和礦物堆積有關)。至於培養細胞的礦物質堆積可以 von kossa 或是 Alizarin red 染色法觀察。在體外培養系統分化造骨細胞需要加入適當因子，包括維生素 C、 $1\alpha, 25\text{-OH}$ 維生素 D₃，以及有機磷來源，例如 β -glycerophosphate，這些條件齊備後就可以讓人類的骨髓的基質幹細胞分化為造骨細胞，另外也有人加入 dexamethasone 來促進分化，並且促使礦物質堆積。目前以小鼠胚幹細胞進行造骨細胞分化的細胞株包括 D3、CGR8、E14TG2a，或是再繼代出來的 BK4、HM1、EFC1、R1，其分化流程如下圖所示，一般是以懸滴培養來進行，包括三個步驟，第一步是將 R1 ESC 培養於培養盤的蓋子上，用滴狀的培養液，倒蓋於培養盤上，利用重力將細胞集中起來，培養兩天後，胚幹細胞形成細胞團塊，可稱為 EB (embryonic body，類胚胎體)。第二步是將 EB 移到懸浮培養盤中，再培養 3 天，再進行第三步驟，將 EB 移到底部有 gelatin 的培養盤中，且於培養液中加入促進分化的因子，包括 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid， 10mM β -glycerophosphate， $5\times 10^{-8}\text{M}$ $1\alpha, 25\text{-OH}$ vitamin D₃ 和 10^{-8}M dexamethasone，通常整個分化程序約需要 20~30 天，之後可以見到礦物質堆積，用 alizarin red 就可染色觀察到，且可用前面提到過的標誌分子作確定。

另外也有不需要使用懸滴培養的方法，Bronson 等人將胚幹細胞直接培養於

培養盤中，也可得到造骨細胞，此外有研究者報告認為視黃醛酸(retinoic acid)是剛開始培養時，前面 3 天內所必需的，視黃醛已知會影響胚幹細胞走向神經外胚層和脂肪細胞分化，而抑制心臟細胞分化，顯示出視黃醛具有改變 EB 內的中胚層細胞之能力，因此，視黃醛酸似乎在 EB 剛開始形成階段扮演重要角色。

Zur Nieden 等人曾於 2003 年報告胚幹細胞培養後造骨細胞標誌分子的表現情形，發現可分為三個階段：增殖期、基質形成期和礦物質堆積期，他們發現第一型膠原蛋白的 mRNA 主要表現於第一期的末期階段、基質生成期，且具有特定的 osteonectin 和 ALP mRNA 的表現階段，基質生成期的末段和礦物質堆積的前數次表現 osteopontin 為主，到了礦物質堆積期則表現 BSP 和 Cbfa1/Runx2，一直成熟的造骨細胞形成，最後高度表現的基因是 osteocalcin，代表進入礦物質堆積期。

個別的促進分化因子則依個別階段分別探討其效應，如果僅在形成 EB 時加入維生素 C、維生素 D 和 β -glycerophosphate，那麼造骨細胞的分子標誌根本不會表現，最佳的結果是將其於 EB 形成後全部加入於培養液中。如果加入 compactin 或是 BMP-2，會促進礦物質堆積，也會促進 osteocalcin 和鹼性磷酸酶的表現，這和用大白鼠細胞 ROB-C20 和 ROB-C26 的實驗結果一致，加入 BMP-2 後，會刺激 osteocalcin 表現，並形成造骨細胞。其他非 ESCs 系統所知道的刺激造骨細胞的因子包括 FGF-8、BMP-6 和 phenytoin，這些因子也可取來胚幹細胞系統嘗試看看。

以胚幹細胞刺激分化為造骨細胞已經嘗試於人類的胚胎幹細胞(hESCs)和猴子的胚幹細胞(monkey ESCs)，而且有報告指出不需要使用懸滴培養就可以得到EB，得到的結果和小鼠胚幹細胞的結果一致，而且所需要的促進因子是一樣的，甚至 Karp 等人曾報告(2006 年)省略掉 EB 形成步驟，生成造骨細胞效率更高，且於 10 或 12 天就可形成，不需要用到 4 週，而且表現 ALP 和 osteocalcin 所需時間也縮短。

造骨細胞也可由胚幹細胞分化得來的基質幹細胞(MSC)衍生，且最近已有 hESCs 分化為基質幹細胞的報告，先將 hESCs 分化為基質幹細胞的好處是可得到大量的基質幹細胞，此直接由骨髓分離基質幹細胞要多得多，再將這些基質幹細胞分化為造骨細胞可能較能充分供應臨床所需，而且由胚幹細胞分化得到的基質幹細胞可支持分化的胚幹細胞的生長，為日後建立安全的胚幹細胞庫提供了技術上的可行性。

總之，目前已具備有效率的將胚幹細胞分化為造骨細胞的技術基礎，持續發展後，將可望分析出其他可促進造骨細胞分化的細胞激素，使臨床應用變為較可能。

由胚幹細胞分化破骨細胞

破骨細胞是吸收(疏鬆化)骨骼的細胞，由造血細胞而來的，同樣的，在使用胚幹細胞之前也已經建立了許多破骨細胞的材料來源，包括骨髓、脾臟、周邊血

中的單核球且表現 CD14 的細胞族群(PBMC)或是 RAW264.7 細胞株。主要的鑑定破骨細胞的標誌分子包括 TRAP、CTR、VNR、Cathespink 和細胞侵蝕已礦化質堆積的基質的能力分析。主要的刺激破骨細胞的分化因子是 M-CSF(macrophage-Colony Stimulating Factor)和 RANKL(Receptor Activator of Nuclear Factor K B Ligand)，兩者都和破骨前驅細胞擴充及成熟有關。以 RAW264.7 細胞為研究模式，可發現單獨使用 RANKL 可讓其 5 天內分化為表現 TRAP 標誌分子的破骨細胞。如果讓骨髓細胞和 RAW264.7 細胞一起培養，或是以基質細胞和 RAW264.7 細胞一起培養，則加入 dexamethasone 或是維生素 D₃ 就可分化出破骨細胞，可能基質細胞所分泌的其他因子，包括 IL-6、PGE₂ 或是 RANKL 也參與破骨細胞的生成。

上面所述的是由非胚幹細胞分化破骨細胞目前的研究狀況，由胚幹細胞是否可以分化出破骨細胞？答案是肯定的，目前已有數篇成功的研究報告。小鼠胚幹細胞已被成功分化為破骨細胞者包括有 D3、J1、CCE、R1 等細胞株，而且不需要先生成 EB，只要將胚幹細胞直接種於 24 孔盤即可，或是種於單層的 ST2 或是 OP9 基質細胞即可，ST2 會分泌 M-CSF 以促進破骨細胞生成，OP9 細胞本身缺乏 M-CSF，但是已被證明具備良好的支持淋巴球及造血細胞生成的能力，可能同樣的支持能力也會促進破骨細胞的分化。

目前的破骨細胞分化研究傾向於使用多步驟的培養系統，由基質分泌的支持因子一般都可同時支援造血系統前驅細胞，破骨前驅細胞和成熟破骨細胞的分

化，且大都需要加入維生素 D3 和 dexamethasone，且分化不同的前驅細胞時表現出的標誌分子不同，如果走造血前驅細胞的分化路徑，以表現 Flk-1(fetal liver kinase-1)和 SLC/tal-1 為主，GATA-2 則是分化出破骨前驅細胞的重要標誌分子。如果於培養早期加入 M-CSF，可刺激造血前驅細胞的增殖，反之，在培養晚期加入 M-CSF 則會抑制成熟破骨細胞生成。

上述的破骨細胞分化研究將有助於未來針對過度骨質生成患者的治療，且對骨骼瘤的研究有幫助，目前骨質過度生成(osteopetrosis)患者的治療方式是植入造血系統幹細胞，但結果是失敗的，希望未來以植入破骨細胞或是破骨前驅細胞的治療方式可以提供幫助。

參考資料

1. Woll NL, Heaney JD, Bronson SK. Osteogenic nodule formation from single embryonic stem cell-derived progenitors. Stem Cells Dev. 2006 Dec;15(6):865-79.
2. Yen ML, Chien CC, Chiu IM, Huang HI, Chen YC, Hu HI, Yen BL. Multilineage differentiation and characterization of the human fetal osteoblastic 1.19 cell line: a possible in vitro model of human mesenchymal progenitors. Stem Cells. 2007 Jan;25(1):125-31.
3. Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Embryonic stem cells: new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. Stem Cells. 2006 Nov 9;

[Epub ahead of print]

4. Garreta E, Genove E, Borros S, Semino CE. Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide scaffold. *Tissue Eng.* 2006 Aug;12(8):2215-27.
5. Woll NL, Bronson SK. Analysis of embryonic stem cell-derived osteogenic cultures. *Methods Mol Biol.* 2006;330:149-59.
6. zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation.* 2003 Jan;71(1):18-27.
7. Garreta E, Genove E, Borros S, Semino CE. Osteogenic Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells and Mouse Embryonic Fibroblasts in a Three-Dimensional Self-Assembling Peptide Scaffold. *Tissue Eng.* 2006 Jun 1; [Epub ahead of print]