



財團法人食品工業發展研究所

第 76 期

生物資源保存及研究簡訊 第21卷第4期

中華民國97年12月發行

補助單位：經濟部技術處 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

中心新聞 1

- ◎『創新加值新思維，紅麴產業新契機』本所主辦之2008紅麴國際研討會圓滿落幕
- ◎恭賀本中心葉慧蓉副研究員獲得國際眼角膜醫學會2008 Troutman Cornea Prize

研發成果 4

新資源

- ◎特殊細胞株收集保存

新技術

- ◎建立基因改造的幹細胞

知識專欄 8

新知識

- ◎幹細胞與再生醫學之應用

專利微生物 12

『創新加值新思維，紅麴產業新契機』 2008紅麴國際研討會圓滿落幕



▲2008紅麴國際研討會於97年12月16-17日在國立台灣大學凝態科學/物理學館2F國際會議廳隆重舉行，參與研討會之海內外學者專家業者約200人。圖為海外學者及專家合影，包括泰國Busaba Youngsmith教授、韓國鄭好軫會長、中國大陸周立平教授、本所劉廷英所長、台灣菸酒股份有限公司徐安璇總經理、林讚峰副總經理、國立台灣大學微生物與生物化學研究所潘子明所長，以及10餘位中國大陸之與會專家等。

2008紅麴國際研討會於97年12月16-17日在國立台灣大學凝態科學／物理學館2F國際會議廳隆重舉行。本次會議主要以“創新加值新思維，紅麴產業新契機”為主軸，期待由參與此會議的產學研專家分享紅麴知識與研究經驗，能引發各項紅麴研發的新議題，促進各界的合作，創造紅麴研發與應用的新價值。此國際研討會邀請泰國Kasetsart大學微生物系Busaba Youngsmith教授、中國浙江工業大學周立平教授、韓國特化城市支援協定會鄭好軫(Jeong Ho-Jin)會長，及12位中國大陸的專家學者與業界朋友，近200人參與此研討會，共同發表15篇口頭專題報告及40篇壁報論文，內容涵蓋食品工業、產業資訊、預防醫學、分子生物、基因體研究以及發酵工程等領域。會議議程是由主辦單位--財團法人食品工業發展研究所劉廷英所長以及台灣菸酒股份有限公司徐安璇總經理、國立台灣大學微生物與生物化學研究所潘子明所長等三人的致詞揭開序幕。(續下頁)

主要專題(keynote speech)是邀請浙江工業大學周立平教授進行專題講述，周教授自本草綱目、天工開物開始記述紅麴在中國歷史紀錄上的醫學應用與生產技術，紅麴深深影響著中國人的生活飲食與民族文化。另外兩位海外之邀請專家Busaba Youngsmith教授及鄭好軫 (Jeong Ho-Jin) 會長，分別講述新型紅麴黃色素的開發與應用在泰國傳統烘培食品，且由動物實驗證實具抗氧化及抗腫瘤之特性，與韓國食品藥物管理局在紅麴產品的相關法規之定義與介紹，產品的保健標準Monacolin K含量應在4~8mg之間。由三位海外專家個別的演講中，可說明紅麴在亞洲地區無論是在醫藥或保健或食品應用，影響深遠。



▲海內外學者專家進行專題演講

(由左至右依序為中國周立平教授，泰國Busaba Youngsmith教授，韓國鄭好軫會長，中國陳福生教授，台灣潘子明教授，林讚峰副總經理，袁國芳主任，中國朱建中總經理，陳豪鋒總經理及趙海教授)

台灣大學潘子明教授一直致力於紅麴的研究，近年更是在預防醫學領域上之應用多所著墨，尤其是對阿茲海默症危險因子的降低及提升記憶學習能力，為紅麴新功效帶來契機。台灣菸酒公司林讚峰副總經理報告其篩選之高抗氧化紅麴菌應用在飲料、食品及肉製品上，成功地在紅麴產品的多樣化中開創台灣菸酒公司新商機。中國大陸業者北京京信生化製品廠與丹溪酒業公司，分別提出紅麴在降血糖的臨床試驗報告及紅麴酒糟發酵生產降血壓物質之研究。此外中國科學研究院成都研究所趙海教授也介紹如何有效生產多樣化之紅麴降血脂產物及降低桔黴素之發酵生產方法。

本所生資中心袁國芳主任及陳倩琪博士介紹本所在經濟部科專與行政院科發基金的支持下，建立基因體研發相關技術平台，完成2004年紅麴菌全基因體序列草圖，並為我國第一個獨立完成之真核生物全基因體解碼，將紅麴由傳統提升到現代基因體的研發層次，承先啟後，帶動產業創新。同時中國大陸多位學者包括華中農業大學陳福生教授及其學生邵彥春博士、李利女士等三人與浙江工業大學嘉曉勤博士，也分別介紹如何利用分子生物學技術進行紅麴菌鑑定與發育相關基因之研究與阻斷桔黴素合成基因之研究成果。



▲海內外專家學者進行綜合討論與交流

(由左至右依序為本所廖啓成副所長，台灣大學潘子明教授，台灣菸酒公司林讚峰副總經理，中國浙江工業大學周立平教授)

流活動，才可能以現代生物技術強化傳統工藝，進而帶動海峽兩岸紅麴產業的發展。與會者並期待本所卓越的研究成果可考慮至大陸宣傳，甚至介紹到全世界，期許可以將千年傳統的紅麴以‘國菌’來發展，建立台灣本土紅麴菌之研發特色發揚光大。

(文：生資中心陳倩琪研究員)

恭賀本中心葉慧蓉副研究員獲得國際 眼角膜醫學會2008 Troutman Cornea Prize

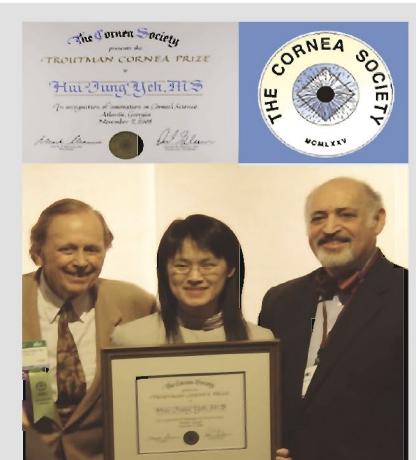
生資中心副主任黃效民博士所帶領的細胞資源保存與研發單元，利用傳統角膜移植手術後廢棄的角膜輪部組織，成功地於體外進行角膜幹細胞之組織增生培養與冷凍保存，相關技術發表於國際期刊Cornea 2008; 27:327-333: Cryopreservation of Human Limbal Stem Cells Ex Vivo Expanded on Amniotic Membrane（作者順序為葉慧蓉，姚少凌，陳欣怡，鄭惠川，黃效民），第一作者葉慧蓉小姐並受邀於The Cornea Society/ EBAA (Eye Bank Association of American) 2008 Fall Education Symposium 和 AAO (American Academy of Ophthalmology) 2008年會上發表演說，且獲得該學會2008年度新創獎(Troutman Cornea Prize)獎勵，含證書一只，獎金5,000美元。

角膜輪部幹細胞位於眼睛黑眼球與白眼球的交界處，可以向內增生分化為角膜上皮細胞，並向外增生分化為結膜上皮細胞，是天然的屏障可阻擋結膜組織入侵角膜。當缺乏角膜輪部幹細胞時，便無法維持角膜的澄清透明，而導致視力減退甚至失明。臨牀上對於角膜輪部幹細胞缺損的病人之治療方式為：於體外增殖培養自體或異體之角膜輪部幹細胞進行移植，其缺點為需要較長時間進行體外增殖培養。

傳統角膜移植手術後，輪部幹細胞往往被當成醫療廢棄物丟棄，為了增加角膜幹細胞培養後的利用性與接受度，我們於94年度申請創新前瞻計畫，並執行『體外培養眼角膜輪部幹細胞之冷凍保存技術開發建立』之相關研究，結果顯示角膜輪部幹細胞經過21天於羊膜上的培養後，可增生出約3-6層的角膜上皮細胞層，並且表現ABCG2、vimentin與K3等的特殊標記。進一步利用不同濃度的血清與DMSO所組成的冷凍保存液，進行角膜輪部上皮細胞冷凍保存的效果探討，結果顯示，體外增生的角膜輪部幹細胞，於液態氮內冷凍保存八週後解凍，其輪部上皮細胞的凍後存活率為 $53.8 \pm 5.8\%$ ，並且仍具有增生能力。

(文：生資中心葉慧蓉副研究員)

在最後的綜合討論中，近200位與會者共同的心聲是期待本所明年可以再舉辦紅麴國際研討會，繼續延續紅麴的研究能量與彼此交流。此外紅麴的特殊性，確實需投入更多的研究心力，對基礎瞭解的更深，才能使產生具功效之新產物。跟乳酸菌相比，紅麴的基礎與應用研究確實較少，如果可以加強兩岸以及韓國等交



▲(由左至右) Troutman Cornea Prize 創辦人Dr. R.C. Troutman、葉慧蓉副研究員與The Cornea Society主席Dr. M.J. Mannis。

Cryopreservation of Human Limbal Stem Cells Ex Vivo Expanded on Amniotic Membrane

Hui-Jung Yeh, MS,* Chao-Ling Yao, PhD,* Hsin-I Chen, BS,* Huey-Chuan Cheng, MD,†‡
and Shiaw-Min Hwang, PhD*

Purpose: After cornea transplantaion, the donor's limbal zone is currently discarded as medical waste. However, the limbal zone is rich in limbal stem cells and can be used in therapeutic applications of limbus loss. This study aimed to increase the availability of limbal stem cells and develop the optimal conditions of cryopreservation of ex vivo expanded limbal stem cells.

Methods: Pieces of the limbus were cultured on amniotic membrane (AM) to outgrow limbal stem cells as cell sheets for 3 weeks. Different formulas of cryoprotectants were tested to preserve the expanded cell sheets in liquid nitrogen. Before and after cryopreservation, expanded cell sheets were assessed for cellular characteristics by viability, histologic examination, and expression of ABCG2, vimentin, and keratin 3.

Key Words: limbal stem cells, amniotic membrane, ABCG2, vimentin, cryopreservation

Results: Expanded cell sheets usually exhibited 3-6 stratified layers after 3-week culture on AM and expressed specific markers of ABCG2 and vimentin for limbal stem cells. The effects of cryopreservation with different cryoprotectants were analyzed by histopathology, stem cell morphology, cell viability, and PCR analysis. The optimal condition of cryopreservation for expanded limbal cell sheet was 40% DMSO-modified Eagle medium, 30% fetal bovine serum, and 10% dimethyl sulfoxide. After 8-weeks cryopreservation in liquid nitrogen, the characteristics of limbal stem cells were maintained, and the average viability of thawed cells was $53.8\% \pm 5.8\%$.

Conclusion: These results showed that limbal stem cells expanded on AM could be cryopreserved and provide a promising source without delay, if banking for patients with limbal stem cell deficiency in the future.

(Cornea 2008;27:327-333)

圖: Cornea 2008; 27: 327-333。

新資源

特殊細胞株收集保存

生資中心／副研究員
廖麗娟

食品工業發展研究所自民國七十一年七月起接受經濟部委託，執行「菌種保存與研究」科技專案，至今已滿二十六年，在細胞保存方面，承國家衛生研究院於民國八十七年七月於本所建立細胞庫核心設施計畫，委託本所建立國家級之細胞庫，對外收集國內外特殊的菌種，以提供國內

學者學術研究使用。於今年更積極計畫保存國內學者研究特殊疾病多年來所收集保存的細胞株，並以特殊細胞株保存計畫與對方簽訂合作計畫，以提供國內更多元的研究資源。

於今年4月與台北榮民總醫院教學研究部蕭廣仁研究員簽訂特殊細胞株保存計畫合約，感謝

蕭廣仁老師研究室提供本所更多元化細胞株來源，而蕭廣仁老師實驗室所提供的細胞株主要應用於臨床生化的研究、發展預防醫學計畫和由其中衍生的相關基礎及應用醫學之研究。其研究項目主要為遺傳性代謝異常疾病，其相關的研究結果亦可應用於其它遺傳疾病及先天性疾病的研究與防治。主要的研究方向：

- 1.苯酮尿症之研究：利用生化學方法，建立四氫生喋呤(tetrahydrobiopterin; BH4)缺乏型苯酮尿症的確認診斷系統；同時亦利用分子生物學方法，探討國人四氫生喋呤缺乏型苯酮尿症的致病機轉。並利用DNA聚合酵素鏈反應和限制酵

表1. 已公開之特殊保存細胞株*

BCRC 編號	疾 病 名	OMIM	細胞 種類	BCRC 編號	疾 痘 名	OMIM	細胞 種類
08C0001	Normal	----	L	08C0027	Normal	----	F
08C0002	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L	08C0028	Normal	----	F
08C0003	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L	08C0029	Normal	----	F
08C0004	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L	08C0030	Normal	----	F
08C0005	Normal	----	L	08C0031	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L
08C0006	Normal	----	L	08C0032	Phenylketoneuria due to PHD	261600	A
08C0007	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L	08C0033	Normal	----	F
08C0008	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L	08C0034	Normal	----	F
08C0009	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L	08C0035	Normal	----	F
08C0010	Phenylketoneuria due to PHD	261600	L	08C0036	Normal	----	F
08C0011	Normal	----	F	08C0037	Phenylketoneuria due to PHD	261600	F
08C0012	Normal	----	F	08C0038	Fabry disease	301500	F
08C0013	Normal	----	F	08C0039	Phenylketoneuria due to PHD	261600	A
08C0014	Normal	----	F	08C0040	Normal	----	L
08C0015	Normal	----	F	08C0041	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L
08C0016	Normal	----	F	08C0042	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L
08C0017	Phenylketoneuria due to PHD	261600	L	08C0043	Normal	----	L
08C0018	Phenylketoneuria due to PHD	261600	L	08C0044	Normal	----	L
08C0019	Phenylketoneuria due to PHD	261600	L	08C0045	Normal	----	L
08C0020	Phenylketoneuria due to PHD	261600	L	08C0046	Phenylketoneuria due to PHD	261600	L
08C0021	Normal	----	L	08C0047	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	A
08C0022	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L	08C0048	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	F
08C0023	Fabry disease	301500	L	08C0049	Phenylketoneuria due to PHD	261600	F
08C0024	Phenylketoneuria due to 6PTSD	261640	L	08C0050	Phenylketoneuria due to PHD	261600	F
08C0025	Normal	----	F	08C0051	Phenylketoneuria due to PHD	261600	F
08C0026	Normal	----	F				

附註：6PTSD: 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin Synthase Deficiency;

PHD: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency

OMIM: 疾病國際編碼, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>

細胞種類: F = Fibroblast; L = Lymphoblast; A = Amniocytic Cells

*所有檢體採集於衛生署頒定 "研究用人體採集與使用注意項目"，故無須取得檢體採集同意書。

素反應，研究中國人苯酮尿症的苯丙氨酸羥化酵素和BH4代謝酵素的基因結構及其突變。

2.有機酸血(尿)症之研究：用生化學方法建立丙酸血症(propionic acidemia)及甲基丙二酸血症(methylmalonic acidemia)之確認及鑑別診斷之方法，並進一步利用分子生物學技術，研究該疾病發生的

分子機轉。
3.研發及建置：華人基因變異資料庫(CGVdb)。蕭老師並將國內特殊遺傳疾病者血液或組織建立培養成細胞株並發表於國外期刊可供研究使用(表一)。目前本所已完成部分細胞株可於網頁上公開提供給學術研究單位，其BCRC編號為08CXXXX，於未來，陸續將會有更多的國內學者寄存的細

胞株陸續於生資中心網頁中公開，敬請參考下列網址<http://strain.bcrc.firdi.org.tw/BSAS/index.jsp>。

參考資料

- 蕭廣仁教授網路資料<http://www.kjhsiao.idv.tw/>
- K.M. Liu et al, Arch Neurol 65, 387 (2008)

新技術

建立基因改造的幹細胞

生資中心／副研究員
洪啓仁

簡介

成體幹細胞(adult stem cell)自我更新(self-renewing)與跨胚層分化等可塑性之潛力已相繼被發現，卻又不像胚胎幹細胞(embryonic stem cell)受道德規範而導致應用發展受限，因此吸引科學家投入相關研究。成體幹細胞來自於成體組織，例如骨髓、臍帶血、骨骼肌、脂肪組織、皮膚、肝臟等，其中則以骨髓及臍帶血較為人熟知。骨髓及臍帶血成體幹細胞中主要含有造血幹細胞(hematopoietic stem cell, HSC)及間葉幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)，兩者較大的差異是各具有不同的分化能力，前者主要分化成血小板、紅血球、白血球等血液細胞，後者則具有分化為硬骨、軟骨、脂肪細胞等之能力

。間葉幹細胞近年跨胚層分化能力相繼被發現，例如將間葉幹細胞打入小鼠的中樞神經系統(central nerve system)，經大腦後可以分化為星狀細胞(astrocyte)與神經元(neuron)型態及特徵之能力，或是將間葉幹細胞打入體內可以分化為不同型態的表皮組織(epithelial cell type)，因此間葉幹細胞橫向分化相關發展則被列為成體幹細胞的研究重點。除了骨髓及血液外，更多研究結果顯示可以從不同的組織來源分離到間葉幹細胞，例如骨骼肌、臍帶、羊水、胎兒的血液、肝及肺等結締組織中分離出間葉幹細胞，因此其相關研究更顯得重要。

發展瓶頸

目前研究人員針對間葉幹細

胞之高可塑性潛力進行分子機制之探索，藉此了解細胞如何分化成特定組織，此外，研究人員對於植入的幹細胞如何誘導體內幹細胞分化為特定組織亦感興趣，而這些基礎研究成果是未來疾病治療上非常有利的參考依據。雖然目前有非常多的動物實驗或臨床實驗已有突破性的發展，然而離實際治療應用卻有很多的瓶頸必須突破，例如植入的間葉幹細胞數量少或植入後實際轉移至受傷部位進行橫向分化及修復組織的數量並不多。造成間葉幹細胞數量不足的主因是細胞於體外培養時分裂次數有限(10~25次)，無法取得足量細胞是整個研究應用受限的徵結點¹。針對上述問題，細胞資源保存與研發單元已提出「建立不老化及可發螢光之人類間葉幹細胞株」計劃解決上述問題。

技術現況及趨勢

目前株化(immortalize)細胞、增加細胞分裂次數的方式可分成以下幾種方式：第一種方式是直接加入EBV病毒以株化血液中的

B淋巴球，藉此取得可以不斷分裂、永生的類淋巴母細胞(B-lymphoblastoid cell line, B-LCLs)，該項方法簡單但只侷限於帶有CD21表現的B淋巴球。第二種方式是轉入病毒基因來株化細胞，例如Simian virus 40 (SV40) T antigen、adenovirus E1A and E1B、and human papillomavirus (HPV) E6 and E7。以上兩種為病毒轉型方式(viral transformation)，其主要的作用機制是有效抑制抑癌基因(tumor suppressor gene)之表現或使得細胞內原致癌基因(proto-oncogene)突變，促使細胞可以不斷地增生。雖然病毒轉型的效率高但卻有著容易引起遺傳物質不穩定，造成染色體形成非整倍體(aneuploid)等缺點，因此目前的趨勢是使用人類端粒酶基因(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)進行細胞株化。

在自然的生理狀態下，動物細胞之染色體末端的端粒會隨著細胞分裂次數愈多而逐漸縮短，進而引起老化(senescence)及細胞凋亡(apoptosis)。維持端粒長度通常必須靠端粒酶來維持，但遺憾的是，像成體幹細胞這樣的初代細胞(primary cells)無法表現其內源性的端粒酶(endogenous hTERT)，這意味著成體細胞只能走向老化死亡，但如果加入外源的端粒酶(exogenous hTERT)時，卻可有效地表達基因以維持端粒長度、避免細胞老化，同時可避免遺傳物質不穩定而保有細胞原有的特性²。

檢視目前國際上建立不老化間葉幹細胞的文獻及專利，主要是以病毒載體(viral vector)為媒介將端粒酶基因帶入細胞內^{3,4,5}，其中以retrovirus或lentivirus為主。

以Lentivirus或retrovirus載體轉基因效率佳，且進入細胞核後將基因插至染色體中，藉此確保細胞經長時間的分裂後仍然保有外源基因之表現，然而該項優點卻是造成遺傳物質插入突變(insertional mutagenesis)、引起細胞變異之缺點，此外更有文獻指出以病毒載體為媒介容易造成幹細胞失去分化之功能⁶。

以物理、化學方式，如加入轉染試劑、通入短暫電流等將外源基因送入間葉幹細胞表現的方式則是屬於非病毒轉染(non-viral transfection)，該方式可有效避免病毒載體使用上之缺點，但由於轉基因效率差、且容易造成細胞死亡，因此國際上少見以該方式建立出的含外源基因之間葉幹細胞，因此本單元希冀能突破上述的瓶頸，建立具有高染色體穩定性、低減少細胞變異性且維持細胞原有之功能與特性的轉殖間葉幹細胞。

基因改造幹細胞之特性

本所建立出來的具有人類端粒酶基因的間葉幹細胞經長時間培養測試，平均可以維持200次

以上的細胞分裂次數(population doubling time)且維持穩定的細胞分裂時間(如圖1所示)，而這比正常細胞足足多了10倍的細胞分裂次數，且保有正常的間葉幹細胞特性，包括了：(1)表面抗原的分析(2)幹細胞功能測試(3)突變及腫瘤生成分析。從表面抗原及功能測試的結果來看，不同代數的端粒酶基因改造細胞其表面抗原的表現與一般骨髓或臍帶血間葉幹細胞相同，而且始終維持分化的功能(如圖2所示)。從核型分析(karyotype analysis)的結果來看，染色體並未突變，且更進一步進行腫瘤生成測試(tumorigenesis test)，結果顯示不會誘導免疫不全老鼠(SCID mice)腫瘤生成，而這些都符合我們使用非病毒轉染方式以有效降低突變率及維持正常功能之期望。當確定被建立出來的端粒酶基因改造幹細胞保有其原有的特性而且又可大量增殖後，將可以應用於細胞老化、分化研究及組織工程等實驗。

幹細胞如何被吸引至受傷組織並發揮其修復功能，這一直是幹細胞研究非常令人感興趣的領域，因此在我們初步解決幹細胞不足的問題後，接下

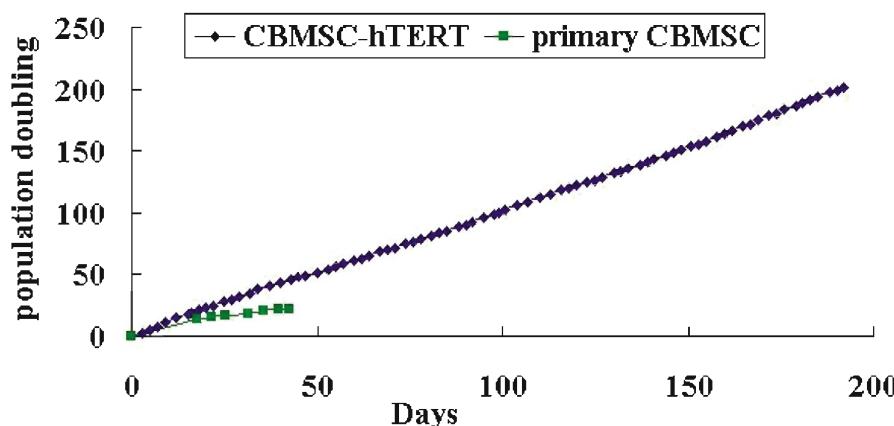


圖1 轉殖具有人類端粒酶基因的間葉幹細胞與正常間葉幹細胞的分裂能力

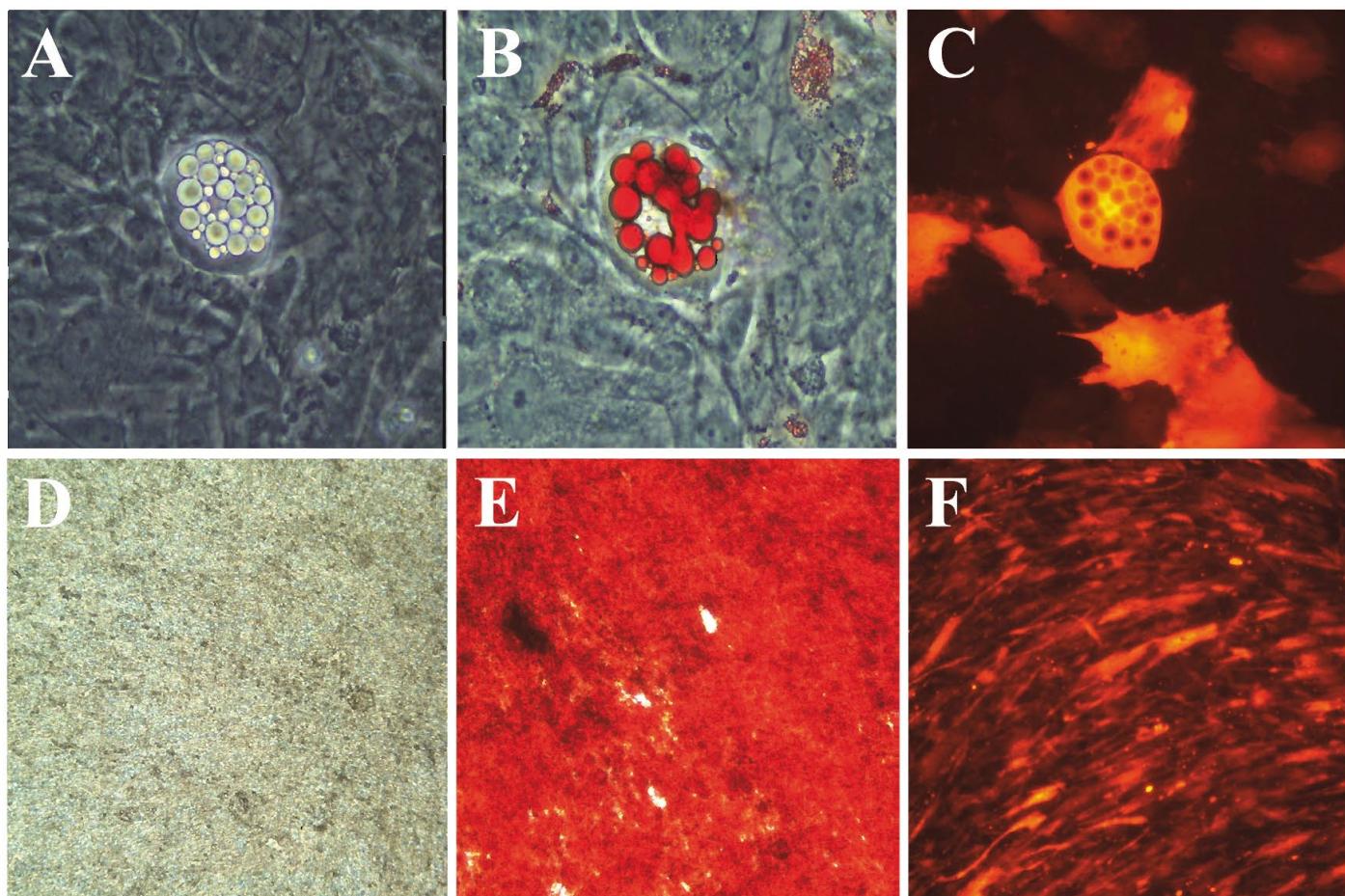


圖2 帶有有人類端粒酶基因與紅色螢光基因的間葉幹細胞依然具有分化為脂肪細胞以及硬骨細胞的能力。分化為脂肪細胞後，(A)在顯微鏡下的脂肪細胞的型態，(B)經過Oil Red O的染色，證明細胞內有油滴的存在，(C)在螢光顯微鏡下發出紅色螢光。分化為硬骨細胞後，(D)在顯微鏡下的硬骨細胞的型態，(E)經過Alizarin Red S的染色，證明有礦物質的沈積，(F)在螢光顯微鏡下發出紅色螢光。

來則更進一步建立可以表現紅色螢光的幹細胞以增加動物實驗追蹤之便利性(如圖2C與2F所示)。為了確定轉入的紅色螢光蛋白是否會影響端粒酶基因改造間葉幹細胞之特性，因此我們仍然進行表面抗原的分析、幹細胞功能測試、突變及腫瘤生成分析，結果細胞仍維持正常之特性且不影響細胞生長分裂之速度，此外在 *in vitro* 培養環境下，螢光表現仍可維持二個月以上。經過一連串的測試後，我們將表現螢光的幹細胞打入器官受損的老鼠以進行動物

實驗。從實驗結果觀察，打入的螢光細胞可以有效地被吸引至受損的區域。

結語

本所建立建立之基因改造間葉幹細胞，其保有正常細胞的特性卻沒有分裂代數的限制，且在 *in vitro* 及 *in vivo* 實驗下觀察，細胞仍維持正常功能，因此我們有效地克服目前幹細胞研究瓶頸，並期許未來可以藉由基因改造之間葉幹細胞加速創造更多的研究

成果，藉此縮短未來實際應用於醫療之時程。

參考文獻

- 1.S. Shi, *Nat Biotechnol* 20, 587 (2002)
- 2.A.G Bodnar, *Science* 279, 349 (1998)
- 3.United States Patent 6645763.
- 4.United States Patent 20030049236.
- 5.H. Hirofumi, *Cancer Sci* 96, 149 (2005)
- 6.A. Falk, *Exp Cell Res* 279: 34 (2002)

新知識

幹細胞與再生醫學之應用

生資中心／研究員
許瓈文

前言

近來再生醫學不論是在科學研究或是治療醫學方面，已是一門新興且快速發展的研究領域。2007年由Dr. Darr等指稱再生醫學發展的主要目標，在於進行細胞、組織或是器官的修復、取代或是再生，以恢復受到損傷的功能。它可以幫助人體形成新的具有功能性的組織，來取代已喪失或是受損的組織。將可以解決目前仍尚未有有效治療方式的疾病之治療，提供更具有療效性的治療方法。而人體與生俱來就具有可以利用體內既有存在的幹細胞來進行再生與修復的能力，而且這種幹細胞幾乎是廣泛的存在於人體每一種組織器官當中。這種程序在演化過程當中被高度的發展，所以利用幹細胞來修復受損的組織器官，已被公認為是最佳可行的治療方式。因此，儘管直到今日大部分的研究都著重在幹細胞生物學上，卻只有極少部分是與臨床治療應用相關。但是，幹細胞對於轉譯醫學（translational medicine）未來的發展，仍然帶來極大的希望。

本篇新知將針對幹細胞在目前與未來可能的應用，以及組織工程與幹細胞的相關技術，並參考今年六月發表在Journal of Tissue Engineering and Regenerative

Medicine 的一篇回顧報導，做相關的整理與介紹。

觀念與定義

組織工程(Tissue-engineering)

組織工程的概念，最早是在1933年由Dr. Biscgelié發現老鼠的腫瘤細胞可以在具有生物相容性的聚合物薄膜上生長時所提出的。至於『組織工程』這個名稱則是直至1985年才由Dr. Fung提出。他的這項概念是基於傳統上對於組織的定義，是一種介於細胞與器官之間可以用來進行活體器官研究的最基本的單位。而在1993年由Dr. Langer等發表在“Science”的一篇研究論文則是表示，組織工程是一門包含各個學科領域的學問，包括工程原理的應用以及將生命科學的研究延伸至發展生物可替代性物質，以進行組織的修復、維持或是改善其功能性。自此，組織工程的相關研究便開始迅速的發展，同時也激勵了無數的科學家及臨床醫師積極投入這個研究領域。

幹細胞(Stem cells)

幹細胞最早的相關研究，是在1963年由Dr. Becker的研究團隊所開始的。他們發現在將骨髓細胞注射到事先以 γ 射線照射過的

老鼠身上之後，可以觀察到小鼠脾臟處的nodule生長，會依注射進入小鼠體內骨髓細胞數目比例的不同而有所不同，所以他們推斷每個nodule都是從單一個骨髓細胞發育生長而來的。之後他們更進一步的證實，這些細胞具有無限制的自我更新能力，亦即幹細胞最主要的特性之一。因此，幹細胞在定義上具有兩個最主要的特性，包括：具有自我更新的能力，以製造生產出更多的幹細胞；並且在適當的條件之下，可以分化成各式各樣不同種類的細胞。而目前在幹細胞概括的分類上，主要可分為胚胎（embryonic）以及非胚胎（non-embryonic）幹細胞。其中胚胎幹細胞是屬於一種全能型（totipotent）的幹細胞，具有分化成所有胚層的能力。而非胚胎幹細胞也稱為成體幹細胞，則是具有特殊功能性的，其分化成各種細胞的能力是有所限制的，是屬於具有特定分化能力型的細胞。

幹細胞之利基(Stem cell niche)

許多幹細胞相關研究的構想，都是著重在如何去決定幹細胞未來會走向分化成何種細胞的命運。目前有一部份的幹細胞研究重點是集中在幹細胞的微環境（microenvironment）或稱作是“利基（niche）”。所謂的“利基”包括了訊息分子、細胞內的訊息傳遞，以及幹細胞與其鄰近之細胞外基質之間的反應。這個三度空間的微環境，被認為是可以去影響調控基因，並且使幹細胞具有幹性（stemness）的活性特徵，亦即自我更新與發育分化成特定細胞之能力。而另一個與幹細胞相關的有趣理論，則是認為幹細胞也許是一種已分化完全的細胞

，但是他會依據不同宿主的“利基”，而表現出各種不同的細胞型態。亦即在將成體幹細胞移植到一個完全不同的“利基”後，幹細胞會分化成與新環境當中已存在的細胞相同類似的型態。但是這種幹細胞具有可塑性的論點，也遭受到許多研究人員的質疑。特別的是有科學家認為這種幹細胞的分化結果，應當是屬於一種“細胞與細胞之間的融合”，而並非幹細胞的可塑性。因此，未來也必須要進一步的深入研究，以完全瞭解幹細胞分化潛力的詳細機制。

胚胎幹細胞

胚胎幹細胞最早是在1981年，由Dr. Martin所提出的。之後直至1988年，才由Dr. Thompson研究團隊建立出人類的第一株胚胎幹細胞，截至今日已至少有225株人類胚胎幹細胞被建立起來。而所謂的胚胎幹細胞株，在定義上是指細胞可以長久無限制的一直培養下去。這種株化的不朽細胞，並不會因時間而失去他的活力，而且由於細胞有穩定的來源，再加上他已充分徹底的被鑑定，因此在組織工程的應用方面具有十分大的潛力。然而在臨床治療使用上，胚胎幹細胞仍然面臨了一個相當重要的問題，也就是這類的幹細胞或許會在進行細胞治療移植之後，仍然不斷的繼續分裂增殖，因而導致畸胎瘤的形成。

非胚胎幹細胞

非胚胎幹細胞的來源很多，

包括：羊水、臍帶組織(Wharton's jelly)、脂肪組織、中樞神經系統、骨髓、視網膜以及皮膚等處，都可以找到幹細胞的存在。在這邊將針對具有移植潛力的成體幹細胞，來一一進行討論。

源自骨髓之基質幹細胞 (Bone marrow-derived stromal stem cells)

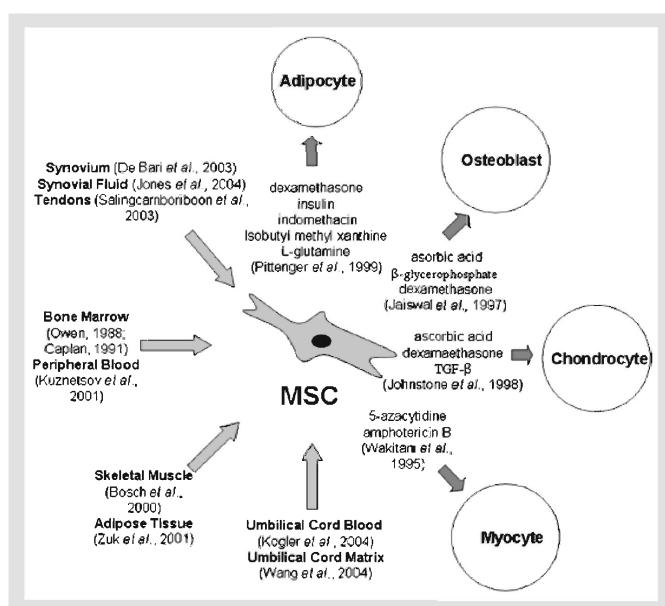
“基質”(stromal)這個字彙是源自於古希臘文，在生物學上“基質”是指組織或是“實質”(parenchyma)，具有支持活細胞的特殊功能。血液學家則是將骨髓基質視為是一群由各種不同細胞組成的結締組織細胞，具有支持骨髓造血系統構造的功能。這個錯綜複雜的系統細胞構造，構成了造血幹細胞的“利基”，而造血幹細胞同樣的也具有支持骨髓細胞的功能，因此便形成了一個“雙向利基”的微環境。而在骨髓間葉幹細胞當中，有一群次要的細胞是屬於未分化的特殊功能性幹細胞，具有發育生成“mesenchyme”的能力，亦即從胚胎的中胚層發育而來的一個團塊組織。這群細胞被認為是廣泛的存在於所有出生後的組織當中，並且定義為間葉幹細胞(MSC)。

骨髓幹細胞的分離，最早是在1960年代被發表，此後便陸續有許多實驗，是針對其相關特性來進行研究。研究人員證實，這些細胞在*in vitro*的培養環境條件下，可以進一步的分

化成各種不同lineage的細胞，包括骨骼、肌腱、脂肪、軟骨以及肌肉細胞。而在周邊血液當中，同樣的也可以找到間葉幹細胞的存在，但是相對於造血幹細胞，間葉幹細胞的數量卻是十分的稀少且多變的，雖然目前已經可以利用特殊的細胞表面標誌來鑑別其是否為間葉幹細胞，然而在型態上，並未有明確的特徵可以區別幹細胞具有何種特殊的分化潛力。間葉幹細胞之來源及在*in vitro*狀態下之分化能力，可參見圖一簡圖所示。

源自脂肪組織之幹細胞 (Adipose-derived stem cells)

源自於脂肪組織的幹細胞(簡稱ADSCs)，不論是在*in vitro*或是*in vivo*的研究當中，都發現具有分化成新生骨骼的能力。除此之外，亦包括：軟骨細胞、脂肪細胞、肝臟細胞、心肌細胞、血球細胞以及神經細胞。目前有許多的研究都在探討ADSCs的特性，而這些研究結果都顯示，雖然ADSCs不論是在型態上或是基因的表現上，都與骨髓間葉幹細胞



圖一 間葉幹細胞之來源及*in vitro*狀態下之分化能力，*J Tissue Eng Regen Med.* 2, 169 (2008)。

是十分類似的，然而二者例如在軟骨細胞的分化能力上，卻仍然還是有所差異的。

骨髓間葉幹細胞已知是與免疫抑制作用有關的一群細胞，特別是目前已將骨髓間葉幹細胞應用在臨床移植治療上，可用作控制移植者與被移植者之間所產生的免疫反應，而ADSCs也被發現到具有與骨髓間葉幹細胞類似的免疫抑制能力。因此ADSCs被認為或許是再生醫學治療上另一個合適的替代來源，主要是因為ADSCs可以長期的在*in vitro*的環境條件下，具有穩定不斷地增殖複製的能力。雖然目前骨髓相對的是一個較為可靠的幹細胞來源，但是由於他必須透過一種侵入性的方式來收集取得，而且得到的幹細胞數目也會因年齡不同而有所差異，平均骨髓中只有0.01–0.001%的單核球細胞具有形成colony-forming units的能力。因此，從脂肪組織當中可以獲得大量的幹細胞之優勢，也是未來ADSCs在再生醫學的治療應用方面，相當具有發展遠景的原因之一。

源自皮膚之前驅幹細胞(Skin-derived precursor stem cells)

皮膚是人體最大的器官。如同神經組織，皮膚也是從外胚層發育分化而來的。2001年Dr. Toma的研究團對發表他們已經可以從初生及成體齧齒動物的皮膚中，分離出具有特殊功能性的幹細胞。他們表示這些細胞可以在體外進行大量的增殖複製，並分化成神經細胞與各種中胚層的細胞。

皮膚前驅細胞的發現，在治療應用上是相當重要的。由於皮膚前驅細胞廣泛的存在於皮膚組

織當中，因此從皮膚組織分離神經前驅細胞以應用在退化性神經疾病的治療，被認為是相當可行的。但是皮膚前驅細胞其完整的分化潛力，仍需待進一步的研究確立。

源自羊水之幹細胞(Amniotic fluid-derived stem cells)

關於胚胎幹細胞在倫理道德上的爭議，使得研究人員一直在尋找一個適合的，並且不會造成任何倫理道德方面爭議的幹細胞來源。因此，從人類羊水當中發現並分離出具有特殊功能性的幹細胞，著實是一個相當理想的替代性細胞來源。此外，這些未分化的細胞，部分也會表現有胚胎幹細胞特有的標誌。因此，羊水幹細胞被認為是一群介於胚胎幹細胞與非胚胎幹細胞之間的一種幹細胞。羊水幹細胞具有大量增殖複製的能力，而且在*in vivo*的實驗條件下，羊水幹細胞也不會形成畸胎瘤(teratomas)。而在*in vitro*的試驗中，羊水幹細胞也具有分化成三個胚層細胞的能力，包括脂肪細胞、骨骼細胞、心肌細胞、內皮細胞、神經細胞以及肝臟細胞等等。因此，如何從羊水當中分離出在基因及型態表現上都相當穩定的的多能性幹細胞，對於未來在再生醫學的發展上，是相當重要的。

源自臍帶之幹細胞(Umbilical cord-derived stem cells)

臍帶/胎盤組織主要有兩個部分是存在有幹細胞的，包括臍帶血(umbilical cord blood)與臍帶基質(Wharton's jelly)。其中臍帶血同時富含有多能性幹細胞以及造血幹細胞，至於臍帶基質中則是發現有特殊功能性之幹細胞的

存在。而在將這類的幹細胞應用在異體移植上時發現，他們僅會引起極低的免疫反應，甚至在局部的區域會有免疫抑制的功能。由於臍帶或胎盤組織是屬於孕婦生產後所排出的醫療廢棄物，故他的細胞來源並不造成爭議。因此，由於臍帶/胎盤幹細胞具有這些特點，所以目前臍帶細胞被公認為是獲得幹細胞的最佳途徑來源。

幹細胞在臨床治療與實驗研究之應用

骨骼組織(Bone tissue)

骨骼發生缺陷通常都是由於先天的病變，或是因為外傷、手術以及腫瘤等原因，而造成大量的骨質流失與骨骼缺陷。而治療骨骼缺陷的方法，臨牀上除了利用如BMPs生長因子的投予方式之外，以骨髓間葉幹細胞來作為替代性細胞治療，也是目前較新發展出的一種治療方法。大多數的實驗研究結果都顯示，骨髓間葉幹細胞確實具有幫助骨骼再生，促進缺陷骨骼痊癒的功能。因此，未來將骨髓間葉幹細胞進一步的應用在臨床疾病的治療上，應當也可以得到不錯的治療成效。

軟骨(Cartilage)

關節軟骨一旦受損之後，其再生修復的能力是非常低的，因此其後通常緊接著就會衍生出退化性關節炎等病變。目前較為有效的治療方式，是將自體的非負重功能之軟骨組織取出後在體外進行增殖培養，之後再將這些增殖後的軟骨細胞移植到受損的關節部位。經由這樣的細胞移植

治療方式，可以讓骨關節炎的不適症狀獲得一段時間的緩解。

但自體軟骨移植最主要的缺點在於必須要先以侵入性的方式，才能取得軟骨細胞。而骨髓間葉幹細胞相對於此，則似乎是一個不錯的替代細胞來源。利用骨髓間葉幹細胞將其誘導分化成軟骨細胞，或許可以得到更高品質的軟骨，亦即有較多的透明質成分以及較適當的重建構造，因而可以獲得較佳的生物機械特性。

肌腱與韌帶

(Tendons and ligaments)

間葉幹細胞已廣泛的應用在許多臨床病徵的治療，目前最新的實驗研究是嘗試將間葉幹細胞應用在肌腱與韌帶的修復治療上。由於這些組織在復原的過程當中會形成所謂的“疤痕”組織，使得日後患者會很容易會在相同的患部再次造成損傷或是形成纖維性的黏著。因此目前有越來越多的相關研究，是嘗試利用細胞來進行這些相關組織的再生性治療。實驗發現，在將骨髓間葉幹細胞利用膠原蛋白載體的方式送到患部之後，可以觀察到這種治療方式與控制組相較起來，肌腱的復原速度是有明顯的較為快速。但是在臨牀上若要進展到利用整段的肌腱韌帶來做移植修復的階段，則仍然還是有很多需要努力的地方。因此目前肌腱損傷在臨牀治療上，大多仍是以加速他的復原速度為主要目標。

脊髓(Spinal cord)

外傷所造成的脊髓損傷，通常都會導致嚴重的神經損壞。雖然目前已知脊髓當中仍存在具有再生能力的幹細胞，但是這些既有的幹細胞對於脊髓損傷的修復

治療，並不具有太大的效果。由於已經有研究人員表示，他們可以成功的將骨髓間葉幹細胞在*in vitro*的環境下其誘導分化成神經細胞，因此就有一些科學家嘗試利用將骨髓間葉幹細胞移植到受損的脊髓當中，來幫助神經軸突再生。然而幹細胞對於脊髓損傷修復治療的黃金關鍵期，通常只有在受損後的幾個星期之內。而若是經由靜脈或是動脈將骨髓細胞注射到人體的方式，也可以觀察到病患在運動與感覺神經方面有短暫的改善情形。這些結果發現都十分的振奮人心，但是截至目前為止，科學家對於幹細胞在脊髓的再生醫療上詳細的作用機制，則仍然還不是非常的清楚。這也是未來仍待研究人員，積極研究探索的一個方向。

心肌(Cardiac muscle)

自從人體具有內生性的自我修復機制被發現以來，過去長久一直認為心臟是屬於已分化完全的器官這個理論，就受到了質疑。因此研究人員也假設，心臟或許可以透過幹細胞來調控他的再生與修復機制。事實上，在心臟裡面確實可以找到一群具有分裂複製能力的細胞，而這些細胞可能是源自於既有的心臟外膜(epicardium)。而且在將這些幹細胞直接注射到心肌梗塞的實驗動物心臟受損處之後，發現這些細胞的確可以促進心肌細胞及血管的再生，同時心臟的收縮功能確實也會看到有顯著的改善情形。

另一個替代性的細胞來源—也就是骨髓間葉幹細胞，目前已發現在*in vitro*的培養系統下，具有分化成心肌細胞的能力。而在*in vivo*的實驗也已經證實，他會釋放出一種促進血管新生的生長

因子，以避免心肌細胞產生計畫性的細胞死亡，同時並刺激內生性心肌細胞的增殖複製與再生。而類似的實驗結果，在之後也陸續的從一些臨床治療方面的試驗結果當中得到證實。但是關於幹細胞移植到人體後，究竟是如何啟動修復作用，則仍然是未明的。此外，目前也還未有相關的證據顯示，骨髓間葉幹細胞在進行移植治療後，確實能產生出具有收縮功能性的心肌細胞。

結論

目前在幹細胞的實驗研究及臨床治療應用上，都已初步獲得一些有趣的結果。尤其是以骨髓間葉幹細胞在動物實驗及臨床試驗所獲得的成果，讓研究人員認為幹細胞應用在人類疾病的治療上是十分有希望的。雖然幹細胞具有分化成各式各樣不同種類細胞的潛能，但是由於牽涉倫理道德方面的爭議，使得幹細胞的使用受到多所限制。因此，羊水細胞、臍帶細胞、脂肪及皮膚組織等，為幹細胞提供了一個不受爭議的新來源。當前實驗室及動物試驗在幹細胞的相關研究，已進展到研究如何以細胞的治療方式，將其實際的應用在組織再生之臨床治療上，包括骨骼缺損、發生骨折後無法癒合、肌腱的修復、軟骨修復、骨關節炎、缺血性心臟疾病以及脊髓損傷等等疾病的治療。更多的相關試驗仍然持續的進行著，以確立幹細胞在再生醫學上可能扮演的功能與角色。

參考文獻

Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N, *J Tissue Eng Regen Med*. 2, 169 (2008).

審定公告之專利寄存生物材料

資料範圍自 97 年 9 月至 97 年 11 月

專利名稱關鍵字/公告號	寄存生物材料名稱	BCRC編號	專利申請人
具多分化能力的胎盤幹細胞及製備方法 / I299752	胎盤衍生多功能性幹細(Placenta-derived multipotent cell) PDMC	960221	財團法人國家衛生研究院
鳥傳染性支氣管炎病毒之減毒疫苗 / I300807	鳥感染性支氣管炎病毒(avian infectious bronchitis virus) 2575	970039	國立台灣大學
	鳥感染性支氣管炎病毒(avian infectious bronchitis virus) 2296	970040	
纖維寡醣之製造方法 / I301155	<i>Trichoderma reesei</i> GL-1	930082	旭化成化學股份有限公司(日本)
異常球菌 Deinococcus 胺基端醯化胺基酸消旋製法及方法 / I301837	pQE-naaar (在大腸桿菌 XLI-Blue 內)	940476	國立中興大學
鑑定番茄斑點萎凋病毒屬之西瓜銀斑病毒血清群之單株抗體及製備方法 / I301853	融合瘤 WNSs239F1A8	960280	國立中興大學
抑制子宮頸癌之融合蛋白 / I302535	大腸桿菌 BL21(DE3) plys/pPE-E7-K3 SB-131	940480	生寶生物科技股份有限公司
桿菌 D747 菌株,植物病害及害蟲防除劑及使用方法 / I302942	桿菌(<i>Bacillus</i> sp.) D747	910213	組合化學工業股份有限公司(日本)
自克弗爾(kefir)粒分離與培養之製品 / I302943	乳酸桿菌屬(<i>Lactobacillus</i> sp.) SIID1719-6b	910301	卡羅澤利亞日本有限公司(日本)

- 說明：1. 上述生物材料為申請專利而依有關專利申請之生物材料寄存辦法寄存於食品所，相關專利已審定公告，其專利名稱之關鍵字、專利公告號及專利申請人資料如上表。
 2. 任何人可依有關專利申請之生物材料寄存辦法第十七條向食品所申請提供上述生物材料，作為研究及實驗用。
 3. 洽詢專線：(03)5223191轉233或513。

早期公開之專利寄存生物材料

資料範圍至 97 年 11 月

專利名稱關鍵字/公開號	寄存生物材料名稱	BCRC編號	專利申請人
土壤添加物配方及其製法與應用 / 200838986	幾丁質分解性放射線菌(<i>Streptomyces saraceticus</i>) SS31	910343	蔡東纂
製造生物性堆肥之枯草桿菌菌株 / 200840868	枯草桿菌(<i>Bacillus</i> sp.) TCB9407	910339	行政院農業委員會台中區農業改良場

- 說明：1. 上述生物材料為申請專利而依有關專利申請之生物材料寄存辦法寄存於食品所，相關專利已公開但尚未審定公告，其專利名稱之關鍵字、專利公開號及專利申請人資料如上表。
 2. 上述專利申請案因尚未審定公告，生物材料尚無法依有關專利申請之生物材料寄存辦法第十七條向食品所申請提供。
 3. 洽詢專線：(03)5223191轉233或513。

生物資源保存及研究簡訊 第76期

發行者：財團法人 食品工業發展研究所

發行人：劉廷英所長

主 編：陳倩琪

編 輯：劉桂郁、黃麗娜

王培銘、姚少凌

本著作權依補助契約歸屬財團法人 食品工業發展研究所

地址：新竹市食品路331號

電話：(03)522-3191-6

傳真：(03)522-4171-2

承印：國大打字行

電話：(03)526-4220

ISSN：1021-7932

GPN：2009001214

ISSN 1021-7932

