

再生醫學之細胞核重編程方法概論

洪森渠¹ 郭啟泰²

¹私立樹林仁愛醫院 內科部心臟內科

²私立財團法人長庚紀念醫院 內科部心臟內科

摘要

數個世紀以來，經過許多前輩的努力，臨床上人類疾病中的感染性疾病目前已獲得良好的控制，但對於因外力或老化引起的細胞、組織或器官損傷卻一直未有良好對策。大約一百年前，人們已發現移植是對抗這類損傷疾病的好方法，但移植來源物的品質、短缺以及移植排斥反應卻大大地限制移植治療。近年來，幹細胞的發展和科學家對於細胞核重編程程序的瞭解，促使了個人化細胞療法的研究，而細胞核重編程，是一種將已分化細胞轉換成另一種細胞的方法，目前通常是先轉化為幹細胞狀態，之後再藉由誘導分化成所需要的特定功能性細胞後做移植治療。本文針對細胞核重編程，扼要介紹五種製造方法：體細胞核移植法、細胞融合法、萃取物浸泡法、轉錄因子表現法及依賴轉錄因子表現而改變分化狀態的方法。

關鍵詞：再生 (Regenerative)
重編程 (Reprogramming)
幹細胞 (Stem cell)
細胞治療 (Cell therapy)

前言

細胞的損傷與老化一直是人類疾病的重要原因，自古以來，替換這些損壞的細胞就是治療的夢想與目標，於是便開啟了再生醫學的序頁。所謂的再生醫學是指利用健康細胞來修復，取代已受損或壞死的細胞，進而恢復因疾病或外力導致的損傷組織或器官。再生醫學涉及的領域相當廣泛，包含幹細胞生物學、基因療法、發育生物學、細胞療法、組織工程等相關學問。目前以幹細胞及其定向誘導分化後的細胞移植為發展主軸，其中許多專家的研究近年來有重大進展。本文即對再生醫學細胞核重

編程方法的目前進程作介紹，希望能吸引更多有志之士投入，為未來修復人類受損的組織和治療棘手的退化性疾病上的進步效力。

重編程方法

臨床上當身體的器官或組織損壞時，選擇移植植物來替換機能不全的器官或組織的歷史已超過50年，移植的來源包含自體、異體或異種。異體及異種除來源供應有問題外，還有免疫及排斥問題。因此適合的作法是使用個體自己本身的細胞做自體移植，但器官或組織損壞通常表示此處負責功能的細胞已死亡或數量極少，且分化完全的功能性體細胞其自我複製

再生能力一般皆很低，因此取得數量足夠且功能健全的分化細胞就一直是再生醫學的重要課題。而幹細胞是指一個細胞具有自我再生複製的能力，並且在適當的環境下可誘導分化成體內各式各樣的細胞，所以，使用幹細胞誘導分化後的細胞當作移植來源是一個很理想的方法。幹細胞存在許多地方，主要有存在胚胎的胚胎幹細胞(embryonic stem cell)及成熟個體的成體幹細胞(adult stem cell)。胚胎幹細胞為多能性(pluripotent)或全能性(totipotent)，在適當的環境下可誘導分化成體內三個胚層的所有細胞^{1,2}。但胚胎幹細胞有著來源稀少、取得困難、以及爭議最大的道德倫理問題，因為要取得胚胎幹細胞還是需從早期胚胎中進行分離。至於成體幹細胞雖較無道德倫理爭議，但也有數量稀少、分化後功能不佳、異體免疫排斥、及移植後不易存活等問題。所以，從自己體細胞直接製造出多能性或全能性的幹細胞便成為一個極具吸引力的方法。目前製造幹細胞有許多方法，但都是利用重編程(reprogramming)的技術來達成。重編程程序是指將已分化的細胞狀態做改變，通常是變成類似或完全的胚胎細胞狀態，來得到多能性或全能性的能力³。細胞的分化狀態通常和專屬的基因表現息息相關，所以重編程程序通常要關掉原先分化細胞專屬的基因表現，再打開新的基因群，一般皆為胚胎發育相關基因群，也因此和基因表現互為連動的轉錄形式(transcription)就非常重要，這也是現在幹細胞的製造和誘導分化皆涉及許多特定轉錄因子的原因。以下約略介紹製造幹細胞的幾種方法。

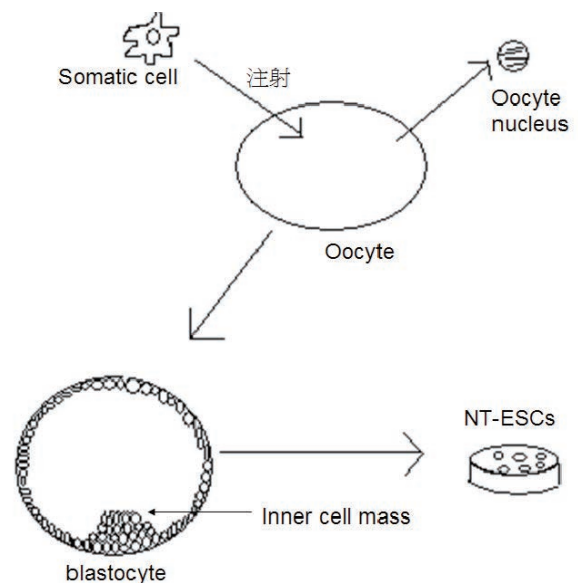
一、體細胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)(圖一)

此方法是最早發展但也是爭議最大的一種。作法是先將處於減數分裂M II phase的卵細胞核破壞或剔除，然後植入新的細胞核。早在1962至1975年間，J. B. Gurdon就嘗試將成蛙之已分化之腸道上皮細胞核及角化皮膚細胞核進行細胞核移植，結果得到發育正常的成蛙，此舉震撼當時的科學界^{4,5}，也讓他獲得了2012年

的諾貝爾醫學獎。利用這個方法後來發展出生物複製技術(cloning)，1997年Wilmut等人使用成年綿羊之乳腺上皮細胞當做供核來源，再使用體細胞核移植技術製造出複製羊Dolly⁶，此技術目前已成熟地使用於許多物種上，科學界也從此實驗系統了解許多重編程程序的機轉與步驟。此技術也可從cloned embryo製造出胚胎幹細胞(embryonic stem cell, ESC)，這是所有已分化細胞的起源，不論在科學研究或臨床應用上，都具有很大的潛能與價值。但是此方法的成功率一般低於1%以下⁷，且常伴隨許多複製個體不正常⁸，目前認為低成功率和個體不正常可能是體細胞基因組重編程不完全之故。另外此方法需同物種雌性的卵細胞，若用到臨床人類使用上易引起倫理及宗教的爭議，所以現在世界各國關於人類幹細胞的研究都有許多倫理綱領，需符合才能進行實驗。

二、細胞融合(cell fusion)(圖二)

此方法是將體細胞與幹細胞(如胚胎幹細胞)的細胞膜融合，而後驅動體細胞基因組再編程程序⁹。融合後，在有絲分裂前，兩個細胞核常維持個別獨立狀態(heterokaryon)，但有絲分裂後，細胞核也會融合成混合基因組

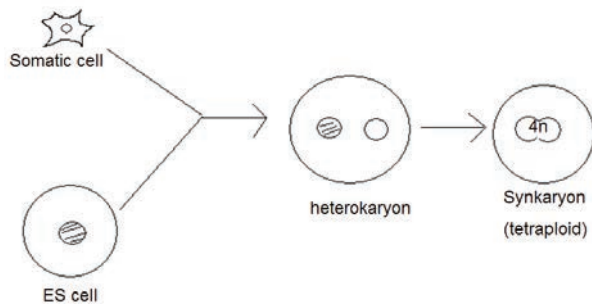


圖一：somatic cell nuclear transfer。
(NT-ESC: nuclear transfer-embryonic stem cell)

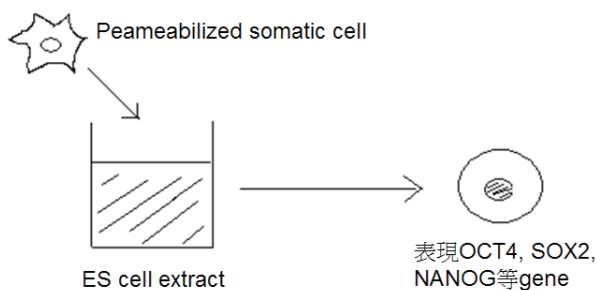
(synkaryon)。此方法可跨物種使用，但常造成混合基因組中染色體遺失，若同一物種使用，則會造成異於正常個體的多倍數染色體現象。此方法的好處是通常不需特別細胞培養基即可做到，提供一個研究早期重編程序容易又有用的技術¹⁰。

三、萃取物浸泡法 (extract treatment) (圖三)

此方法是將有著全能性的幹細胞或卵細胞的細胞質萃取或提煉出來，再將欲重編程的細胞膜打洞穿孔(peameabilized)後浸泡於此萃取物，一段時間後再將打洞的細胞膜封住，即可表現出一些原先有關幹細胞全能性能力的基因組¹¹。此方法可跨物種使用，但因效果低且無法完全活化幹細胞基因組，故此研究系統較少發展¹²。不過此方法容易研究增加或刪除某些因子或物質的影響¹³，也可以使用某些已分化的細胞萃取物浸泡法來轉移分化(transdifferentiate)¹⁴。並且可使用此方法浸泡過的細胞當作誘導式多能性幹細胞或體細胞核移植的供應細胞進行研究^{15, 16}。



圖二：cell fusion。



圖三：extract treatment of permeabilized somatic cells。

四、轉錄因子表現法(transcription factor over-expression)(圖四)

最有名使用此方法的人就是獲得2012年諾貝爾醫學獎日本山中伸彌教授(Shinya Yamanaka)¹⁷，他將四個轉錄因子(Oct4, Sox2, Klf4, and Myc)利用病毒轉染進體細胞，在適當的細胞培養技術下，即可得到類似胚胎幹細胞能力的細胞，一般稱此為『誘導式多能性幹細胞』(induced pluripotent stem cells, iPSCs)¹⁸。這個方法需要大量的DNA複製及細胞分裂來產生，但成功率仍不高，過去這幾年有許多技術改進及機轉探討，希望能改善此方法的成效¹⁹。除了效率不高外，此方法還涉及致癌基因Myc和病毒轉染系統的使用，所以產生癌症的疑慮一直無法降低，故目前有大量的研究目標在改良此系統，如直接使用轉錄因子等小分子物質^{18, 20}。國際上現在頂尖的幹細胞實驗室皆花大量的人力物力，希望發展出能產生足夠量的誘導式多能性幹細胞，並能安全地使在人類身上的再生治療系統²¹。

五、依賴轉錄因子表現而改變分化狀態的方法(transdifferentiation by transcription factor overexpression)

這可說是上一個方法的改良法，就是將體細胞直接從一個類型轉換至需要的類型，並不經過幹細胞的過程。目前使用許多轉錄因子作用已成功在同胚層(如內胚層)²²及不同胚層(如中胚層至外胚層)^{23, 24}間不同細胞類別的轉換。這個方法有兩個很大的優點，第一是某些細胞



圖四：transcription factor overexpression。(iPS cell: induced pluripotent stem cell)

分化類型轉換的成功效率很高，第二是不需要致癌基因的使用，故致癌機會比一般的重編程序低，這樣用在人體的治療上將更安全²⁵。

誘導分化

通過以上方法，目前約略解決了再生醫學的第一道大關卡，即重編程序程序和幹細胞製造，但接下來則碰到再生醫學第二道關卡：定向誘導分化。許多損壞性、功能障礙、退化性疾病的治療通常需要成熟且功能完整的體細胞，故如何誘導分化幹細胞成為我們需要的體細胞就是再生醫學的另一大主題。幹細胞在單獨培養且不添加白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)^{26, 27}，骨形態發生蛋白(bone morphogenesis protein, BMP)及Wnt等因子時，很容易進行隨機的分化，因此為了有效率地誘導幹細胞分化，一般可將幹細胞在懸浮的狀態下培養，或直接將幹細胞培養在基質細胞(stromal cell)或細胞外基質(extracellular matrix)上。懸浮培養會形成球狀的胚胎小體(embryoid body)，並慢慢分化成三個胚層的前驅細胞(progenitor)²⁸，而使用基質細胞或細胞外基質培養的幹細胞，則會因基質細胞或細胞外基質不同的影響而分化成各種不同的前驅細胞。這些前驅細胞在加入許多如雞尾酒式的誘導因子後，可以朝我們想讓它發展的各種方向分化，但實際應用上會遇到幾個問題：1. 誘導分化的成功效率低。2. 誘導分化的細胞移植後存活的時間不長。3. 誘導分化的細胞功能不如成熟的體細胞。因此現階段努力的方向為更瞭解分化系統的機轉，更完美地調控基因表現及誘導因子，以期能得到可修復受損組織和退化性疾病的再生細胞。

未來展望

長久以來，基於對生命的探索及對疾病治療需要，人們就不斷在研究細胞分化及老化的機轉與過程，近十年來，由於基因科學及幹細胞學的進步，我們對這方面的認知總算跨進了一大步，但目前仍有許多問題尚待解決，如重編程序成功率不高，誘導分化的新細胞功能

與體細胞有差距，存活率不長，以及致癌可能性的掌控。期待有一天，有優良的操作方法，製造出克服上述問題的個人化細胞治療，開創出對抗受損或老化疾病的新境界。

參考文獻

1. Gurdon JB, Byrne JA, Simonsson S. Nuclear reprogramming and stem cell creation. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(Supp 1): 11819-22.
2. Yu J, Vodyanik MA, Smuga OK, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917-20.
3. Gurdon JB, Melton DA. Nuclear reprogramming in cells. *Science* 2008; 322: 1811-15.
4. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 1962; 10: 622-40.
5. Gurdon JB, Laskey RA, Reeves OR. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cell of adult frogs. *J Embryol Exp Morph* 1975; 34: 93-112.
6. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-13.
7. Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* 2007; 39: 295-302.
8. Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, et al. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2002; 419: 583-86.
9. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010; 465: 704-12.
10. Piccolo FM, Pereira CF, Cantone I, et al. Using heterokaryons to understand pluripotency and reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011; 366: 2260-5.
11. Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelién AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 2005; 6: 5719-35.
12. Bru T, Clarke C, McGrew MJ, Sang HM, Wilmut I, Blow JJ. Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. *Exp Cell Res* 2008; 314: 2634-42.
13. Singhal N, Graumann J, Wu G, et al. Chromatin-remodeling components of the baf complex facilitate reprogramming. *Cell* 2010; 141: 943-55.
14. Hakelién AM, Landsverk HB, Robl JM, Skälhegg BS, Collas P. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 460-6.
15. Bui HT, Kwon DN, Kang MH, et al. Epigenetic reprogramming in somatic cells induced by extract from germinal vesicle stage pig oocytes. *Development* 2012; 139: 4330-40.
16. Ganier O, Bocquet S, Peiffer I, et al. Synergic reprogramming of mammalian cells by combined exposure to mitotic

- Xenopus egg extracts and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 17331-6.
17. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
 18. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 678-84.
 19. Papp B, Plath K. Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell* 2013; 152: 1324-43.
 20. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 101-6.
 21. Okita K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011; 366: 2198-207.
 22. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature* 2008; 455: 627-32.
 23. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463: 1035-41.
 24. Vierbuchen T, Wernig M. Direct lineage conversions: unnatural but useful? *Nat Biotechnol* 2011; 29: 892-907.
 25. Sancho MI, Baek SH, Izpisua JC. Lineage conversion methodologies meet the reprogramming toolbox. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 892-9.
 26. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; 336: 684-7.
 27. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336: 688-90.
 28. Pera MF, Filipczyk AA, Hawes SM, Laslett AL. Isolation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Methods in Enzymology* 2003; 365: 429-45.

Nuclear Reprogramming in Regenerative Medicine

Sen-Chu Hong¹, and Chi-Tai Kuo²

¹*Cardiology Divisions, Department of Internal Medicine, ShuLin Ren-ai Hospital, Taiwan;*

²*Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, Chang Gung University, and Chang Gung Memorial Hospital-Linkou, Taiwan*

Regenerative medicine is a burgeoning medical therapies that repair, replace, restore and regenerate damaged or diseased cells, tissues and organs. This field encompasses a variety of research including cell therapy, tissue engineering, biomaterial engineering, growth factors and transplantation science. The cell therapy, which is considered to be the most important issue of regenerative medicine, is a treatment of diseases or injuries in human beings by the administration of autologous, allogeneic or xenogeneic cells that have been manipulated or altered ex vivo. Autologous cell therapy uses the cells from the patients, and avoids the need to suppress immune rejection of the transplanted cells. By nuclear reprogramming process and induced differentiation, a form of autologous cell therapy will be possible in the future and provide a source for cells that could be transplanted back to patients to restore function of organs affected by disease or aging. Nuclear reprogramming, the first step of autologous cell therapy, is a process that specialized cells change to an embryonic like state. Here, we briefly introduce five experimental methods about nuclear reprogramming: somatic cell nuclear transfer, cell fusion, extract treatment, transcription factor overexpression and transdifferentiation by transcription factor overexpression. (*J Intern Med Taiwan* 2014; 25: 267-271)