

行政院及所屬各機關出國報告書

(出國類別：進修)

胚胎幹細胞生物學與生殖細胞的發育

—以體細胞核移植技術建立胚胎幹細胞

服務機關：台大醫院婦產部

姓名職稱：陳欽德 主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：96年8月1日至97年7月31日

報告日期：97年9月8日

摘要

取自病人之體細胞做為細胞核之來源，藉由「體細胞核移植技術」產生病人基因組一致性之複製囊胚，再建立源自該囊胚內細胞群之胚幹細胞，即所謂「核移植胚幹細胞」，將核移植胚幹細胞進一步於體外誘導分化為病人治療所需要之細胞，即可進行自體細胞移植，此方法具遺傳一致性及免疫相容性之優點，即人類「治療性複製」的基礎。但是人類核移植胚幹細胞的建立仍未成功。

「生殖性複製」則是將體細胞核移植技術產生之複製囊胚植入代理孕母動物。1997年桃莉羊誕生證實了已分化之體細胞可被回復至分化前之狀態。惟「生殖性複製」複製效率仍低，已分化之體細胞再程序化原因有待進一步研究。

此次進修目的即是學習以體細胞核移植技術建立小鼠核移植胚幹細胞，並且為新建立核移植胚幹細胞株進行特徵分析，為人類「治療性複製」技術打下基礎。另一方面也嚐試進行小鼠複製技術，以確認學習「體細胞核移植技術」的成功。

目次

一、目的	4
二、過程	5
(一) 美國康乃迪克大學再生生物學中心簡介	6
(二) 體細胞核移植技術複製小鼠	6
(三) 以體細胞核移植技術建立胚胎幹細胞	7
(四) 三株新建立核移植胚胎幹細胞之鑑定	8
三、心得	9
(一)美國州政府對幹細胞研究經費的資助情形	10
(二)世界各國政府對「體細胞核移植」的態度	10
(三)誘導式多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS cells)	10
四、建議事項	12
五、參考文獻	13

一、目的

取自病人之體細胞做為細胞核之來源，藉由「體細胞核移植技術」產生病人基因組一致性之複製囊胚，再建立源自該囊胚內細胞群之胚幹細胞，即所謂「核移植胚幹細胞」，將核移植胚幹細胞進一步於體外誘導分化為病人治療所需要之細胞，即可進行自體細胞移植，此方法具遺傳一致性及免疫相容性之優點，即人類「治療性複製」的基礎^{5,8}。目前只有小鼠(2000年) 及猴子(2007年)¹ 成功建立核移植胚幹細胞。人類以體細胞核移植技術複製囊胚已經成功(2008年)²，但是人類核移植胚幹細胞的建立仍未成功。

「生殖性複製」則是將體細胞核移植技術產生之複製囊胚植入代理孕母動物。1997年桃莉羊誕生證實了已分化之體細胞可被回復至分化前之狀態。惟「生殖性複製」複製效率仍低，已分化之體細胞再程序化原因有待進一步研究。

此次進修目的即是學習以體細胞核移植技術建立小鼠核移植胚幹細胞，並且為新建立核移植胚幹細胞株進行特徵分析，為人類「治療性複製」技術打下基礎。另一方面也嚐試進行小鼠複製技術，以確認學習「體細胞核移植技術」的成功。

二、過程

(一) 康乃迪克大學再生生物學中心簡介



美國康乃迪克大學(The University of Connecticut)再生生物學中心以複製動物聞名。該中心於 1999 年成功複製出美國第一頭複製牛，是由一頭牛耳朵的皮膚細胞做為供核細胞源而複製的，這種技術稱為「體細胞核移植」，也是 1997 英國科學家 Ian Wilmut 製造全球第一隻複製動物「桃莉羊」所用的技術。該中心 2002 與台灣合作，成功完成複製豬，2004 又成功完成複製鼠。從「桃莉羊」誕生至今，十一年間，也只有 11 種動物以「體細胞核移植」技術複製成功。



Species Cloned From Adult Donor Cells by SCNT

Year	Species	Donor age	References
1997	Sheep (Dolly)	Adult	Wilmut et al., 
1998	Cattle	Adult	Kato et al., 
	Mouse	Adult	Wakayama et al., 
2000	Pig	Adult	Polejaeva et al., T. Wakayama 
	Gaur	Adult (INT)	Lanza et al., 
2001	Mouflon	Adult	Loi et al., 
2002	Cat	Adult	Shin et al., 
	Rabbit	Adult	Chesne et al., 
2003	Horse	Adult	Galli et al., 
2005	Dog	Adult	Lee et al., 
2006	Ferret	Adult	Li et al., 

Messier and Jaenisch. DEVELOPMENTAL DYNAMICS 235:2460-2469, 2006

該中心致力於研究體細胞核移植技術的提升。該中心在 2005 年應用日本公和牛及荷蘭種母牛做為試驗動物，分別測定牛肉及牛奶等超過一百項營養與組成份，發現複製動物的產品具有食用安全性，部分成分甚至超過正常牛隻的產品，並將研究結果發表在美國國家科學院期刊上。其研究結果顯示試驗的複製母牛均可正常分娩小牛，且泌乳曲線與正常母牛沒有顯著差異。美國聯邦食品暨藥物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 於 2008 年 1 月通過複製動物做為人類食品的安全性評估報告表示，來自複製牛、豬、羊的肉、奶，及其後代，與傳統動物的一樣安全。複製動物生產的食品獲得美國官方的認證具有正面的意義。FDA 的報告公布後，主要電



可正常分娩小牛，且泌乳曲線與正常母牛沒有顯著差異。美國聯邦食品暨藥物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 於 2008 年 1 月通過複製動物做為人類食品的安全性評估報告表示，來自複製牛、豬、羊的肉、奶，及其後代，與傳統動物的一樣安全。複製動物生產的食品獲得美國官方的認證具有正面的意義。FDA 的報告公布後，主要電

視媒體 NBC 及 NHK 分別於今年一月及三月至該中心製作及拍攝相關影片，由此可見該中心所做的研究成果獲得高度認同。當時正在此中心進修的我，親身目睹媒體訪問全程，感覺與有榮焉。

體細胞複製動物技術目前已應用在商業化的寵物複製業中，讓寵物主人透過對複製動物產生的移情作用，減緩對寵物死去的悲傷。韓國首爾國立大學的研究團隊與 RNL Bio 公司合作於 2008 年 7 月完成全世界商業寵物複製的首例，複製費用為 15 萬美元。韓國政府也委託首爾國立大學研究團隊複製緝毒



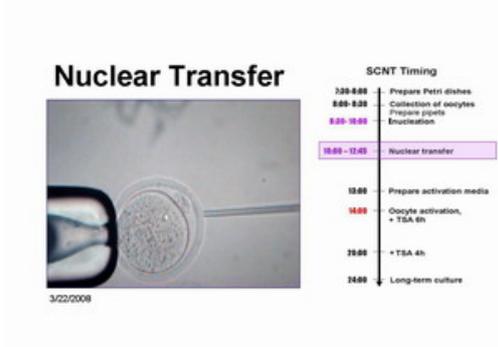
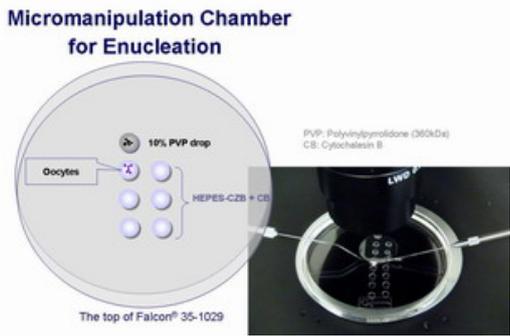
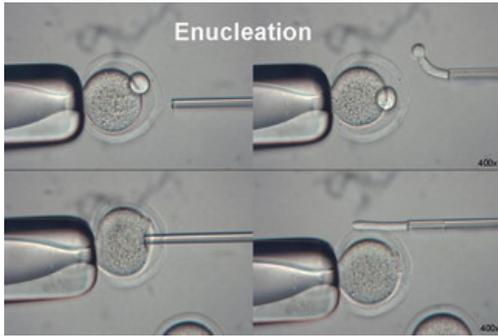
犬，並於 2007 年底成功複製一批緝毒犬。此研究團隊又於 2008 年 9 月證明複製狗有繁殖能力。2005 年誕生的世界第一隻複製狗「首努比」透過人工授精的方式和兩隻相同品種的母複製狗交配成功，共產下 10 個狗寶寶。帶領研究團隊的李柄千表示：「狗寶寶雙親都是複製狗，這是全世界的首例」。「複製狗的繁殖能力為複製嗅探犬、導盲犬開闢了一條道路」。雖然複製動物技術已經相當成熟，然而卵子如何將體細胞核再程序化的作用機轉，至今仍然未明。

(二) 體細胞核移植技術複製小鼠⁷

主要包括體細胞處理、去核、核植入、活化、囊胚植入子宮等五大步驟。此次進修期間，總共獨力完成 31 次體細胞核移植實驗。處理 1246 個卵，去核率為 69.5%，核植入率為 21%，囊胚形成率為 27.7%。但是囊胚植入子宮的複製小鼠實驗均告失敗。

Table 1. Blastocyst formation rates after SCNT

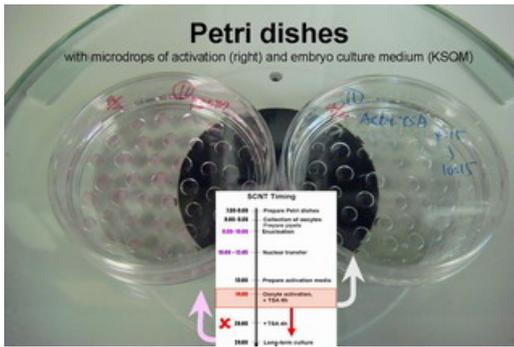
SCNT	No. of oocytes used	No. of oocytes enucleated	No. of surviving oocytes after injection/activation	Enucleation(+) Injection (-) Activation (+)	No. (%) incomplete enucleation	No. (%) blastocyst
1	44	27	13	-	-	5 (38.5%)
2	49	35	9	-	-	2 (22.2%)
3	47	18	5	-	-	0
4	49	44	11	22	-	3 (27.3%)
5	60	23	4	15	1 (6.7%)	0
6	56	36	6	18	0	1 (16.7%)
7*	27	22	4	-	-	3 (75%)
8*	13	12	-	12	0	-
9*	48	27	9	3	1 (33.3%)	2 (22.2%)
10	69	23	4	15	2 (13.3%)	2 (50%)
Sum	462	267 (57.8%)	65 (24.3%)	63	4/63 (6.3%)	18/65 (27.7%)
31	1246	866 (69.5%)	182 (21.0%)			66 (36.3%)



Nuclear Transfer



3/22/2008



(三) 以體細胞核移植技術建立胚胎幹細胞

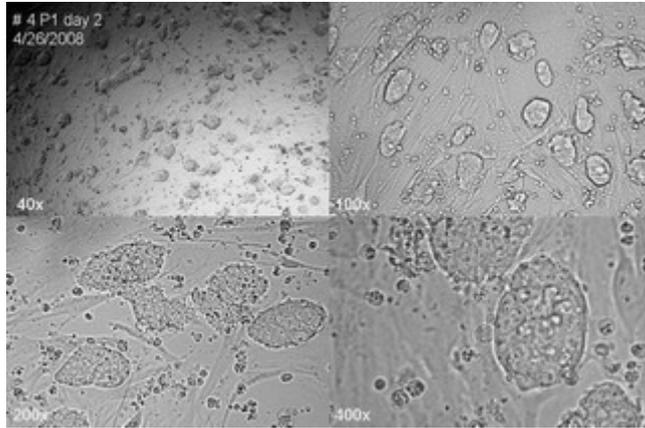
Derivation	MEF	Derivation rate	# 2 control	# 4 NT	# 7 NT
4:50 Day 1	I 24 well	3/9 = 33%			
4:10 Day 6	II 1 st Mechanical 24 well				
Day 9	II 2 nd Mechanical 24 well				
4:16 Day 12	III 1 st Trypsinize 24 well 0.05% 150 µl 2 min				
4:19 Day 15	III 2 nd Trypsinize 24 well				
4:21 Day 17	III 3 rd Trypsinize 24 well				
4:24 Day 20	IV Freeze (P1) 6 well				

此次進修期間，總共建立三株「核移植胚胎幹細胞」。從體細胞核移植開始至建立幹細胞完成約需1個月時間。其間包括2次使用人工挑選及3次使用0.05% trypsin處理。建置成功率為33%。

(四) 三株新建立核移植胚胎幹細胞之鑑定

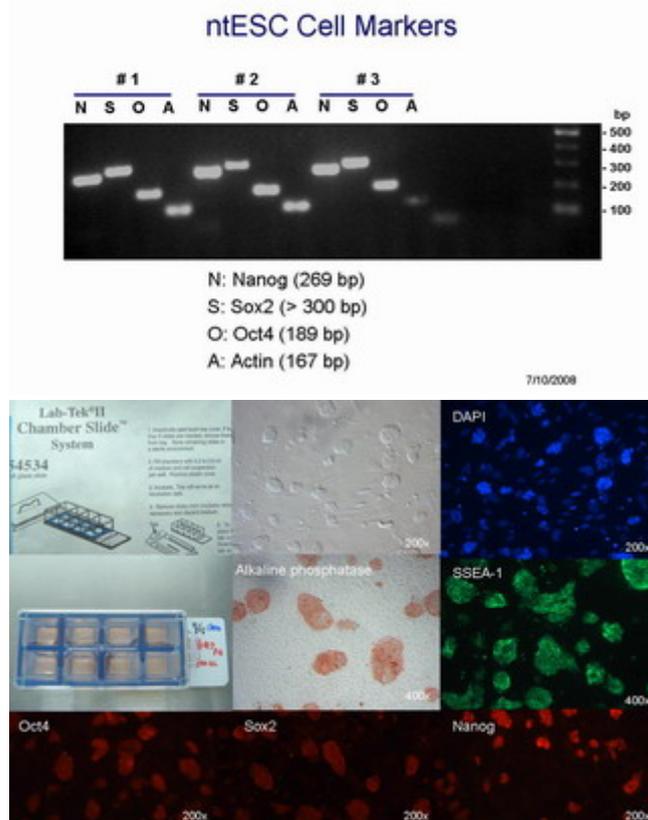
1. 胚胎幹細胞之細胞形態分析

胚胎幹細胞型態特徵。一、具有極大細胞核和極少之細胞質。二、核仁明顯。三、明顯細胞邊界。小鼠之胚胎幹細胞形成如小丘狀之結構。

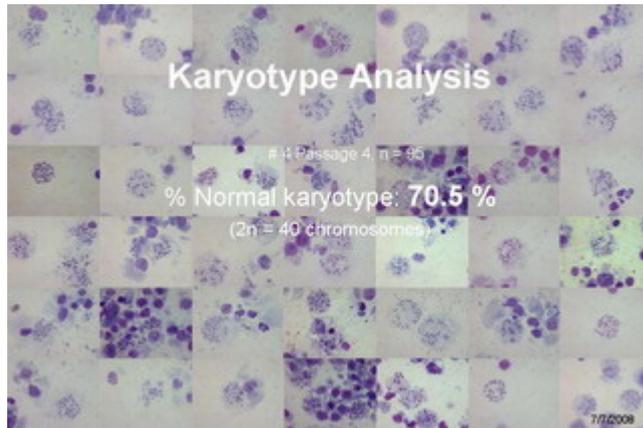


2. 未分化胚胎幹細胞之鑑定標誌

鑑定標誌包括鹼性磷酸酶的活性，階段特異性胚胎抗原SSEA1，Sox2, Oct4, Nanog等基因的表現，可經由免疫細胞化學染色或者RT-PCR 之方法分析，來鑑定小鼠胚胎幹細胞是否處於未分化狀態。



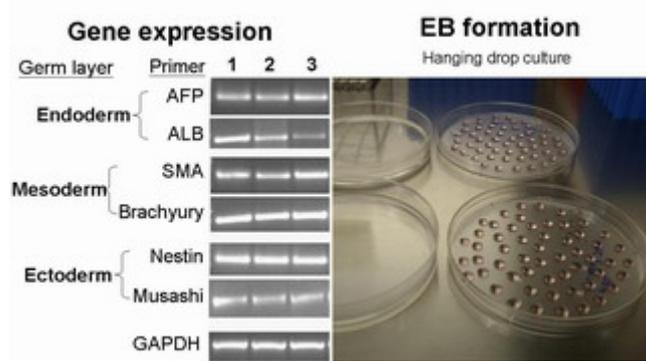
3. 染色體分析 (Karyotype analysis)



小鼠染色體數目為20對40條。新建胚胎幹細胞株，有正常染色體數目的細胞比例超過70%，即為可接受範圍。

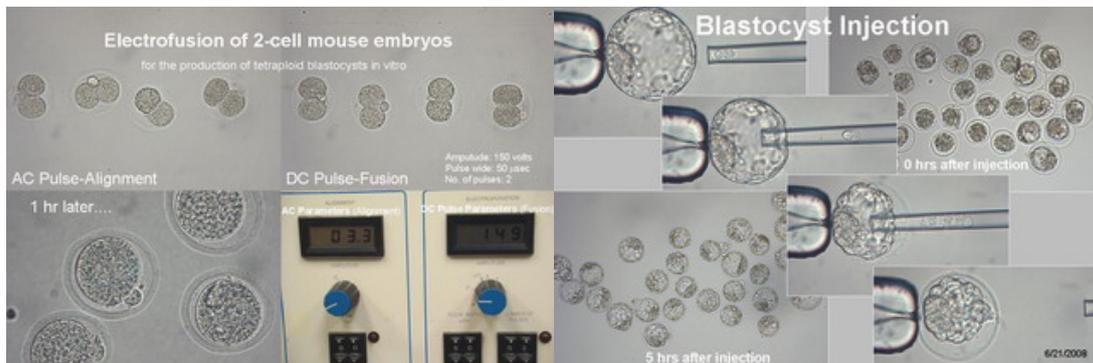
4. 類胚體之細胞形成

胚胎幹細胞之自發性分化可經由胚胎幹細胞之懸浮培養及類胚體之形成而達成，此項分析在鑑定是否可在胚胎幹細胞自發性分化細胞中偵測出代表內、中、外三胚層之分化細胞，其偵測方法可用特定基因表達之RT-PCR分析。



5. Tetraploid complementation

是目前有關胚胎幹細胞全能分化潛力最有效而直接之驗證方法。先用電融合將二細胞時期胚胎融合為四倍體，並培養成囊胚，再將待測胚胎幹細胞打入囊胚，胚胎移植至代理孕母鼠後，如果有胎兒出生，此細胞株即可判定為優良之細胞株。



三、心得

(一) 美國州政府對幹細胞研究經費的資助情形

美國目前只有六個州政府對幹細胞研究提供經費資助，康乃迪克州也是其中之一。2006 年起十年提供每年 1 千萬美金研究經費給州內公私立大學申請。其中康乃迪克大學，Wesleyan 大學及耶魯大學是最大的受益者。

從事幹細胞研究需要有足夠研究經費，康乃迪克州政府資助幹細胞研究經費，雖然說是六個州政府補助最少的，但是獲得資助每位個人研究費至少美金 20 萬，比較在台灣研究經費，此金額已經是人人稱羨。台灣政府及各研究單位要從事幹細胞研究，首先要爭取更充裕的研究經費。

State-funded stem cell research

- California (2005): \$3 billion over 10 years
- New York (2007): \$600 million over 11 years
- New Jersey (2004): the first state to fund stem cell research. (2007) \$450 million over 10 years
- Maryland (2006): \$36 million /first two years
- Illinois (2006): \$15 million
- Connecticut (2006): \$100 million over 10 years

Source: www.icsc.org Updated January 2008



(二) 世界各國政府對「體細胞核移植」的態度



世界各國對胚胎與胚胎幹細胞研究的管理仍無共識。奧地利、愛爾蘭、波蘭是完全禁止相關研究；法國、荷蘭、巴西、加拿大雖准許胚胎與胚胎幹細胞研究，但禁止做體細胞核移植。英國、新加坡、南韓、日本、瑞典、比利時、西班牙、南非、澳大利亞、印度、與中國，允許體細胞核移植研究。美國美國國衛院(NIH)禁止使用聯邦經費從事體細胞核移植研究。哈佛大學於 2006 年開始使用私人經費進行體細胞核移植及相關幹細胞研究。台灣行政院院會在 2008 年 7 月 24 日通過「人類胚胎及胚胎幹細胞研究條例草案」，有條件開放體細胞核移植及相關幹細胞研究，希望此草案能儘快通過立法。

(三) 2007-2008年幹細胞研究的重大突破-誘導式多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS cells)

有關人類胚幹細胞研究是否違反道德倫理和社會法律等問題，一直以來都引起很大的爭議。因為基本上都是使用人類的卵子，大大阻礙治療性複製的進展。

2007年11月日本京都大學山中伸彌⁶和美國威斯康辛大學俞君英/Thomson⁹的研究團隊同時成功地將人類體細胞重新設定變回幹細胞，即所謂「誘導式多能性幹細胞」³。

2008年9月美國哈佛大學研究團隊⁴發表他們利用此新技術建立20種疾病誘導式多能性幹細胞株，對研究疾病致病機轉及疾病治療有莫大幫助。產生「誘導式多能性幹細胞」不需破壞胚胎或是使用人類的卵子，此類幹細胞又具有跟胚胎幹細胞一模一樣的特質，將有助於跨過那些一直以來阻礙胚胎幹細胞研究的法律和道德門檻，對細胞研究是一重大突破。康乃迪克大學自2007年12月也開始組成研究群，定期舉辦視訊會議，互相交換研究心得，共同解決研究所遭遇的困難。台灣相關研究人員更應該通力合作，迎頭趕上。

四、建議事項

1. 台灣政府及各研究單位如果鼓勵幹細胞研究，希望也能爭取到更充裕的研究經費。
2. 希望「人類胚胎及胚胎幹細胞研究條例草案」，能儘快通過立法。對於誘導式多能性幹細胞的相關研究條例，也應該及早因應。
3. 美國研究單位非常重視與國內外其他研究單位的交流與合作，這點值得我們學習。幹細胞的相關研究進展一日千里，學術交流與合作將更形重要。
4. 雖然誘導式多能性幹細胞是目前研究趨勢，但是否能否完全取代治療性複製仍未可知。細胞核移植技術仍是一個重要的技術平台，兩種技術平台都值得繼續研究下去。

五、參考文獻

1. Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007;450:497–502.
2. French AJ, Adams CA, Anderson LS et al. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer (SCNT) with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008;26:485-493.
3. Jaenisch J and Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008;132:567–582.
4. Park IH, Arora N, Huo H et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008;134:877-886.
5. Tabar V, Tomishima M, Panagiotakos G et al. Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice. *Nat Med.* 2008;14:379-81.
6. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861–872.
7. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998;294:369-374.
8. Yang X, Smith SL, Tian XC et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* 2007;39:295–302.
9. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917–1920.