

出國報告(出國類別：進修博士)

# 腦神經幹細胞與腦微血管內皮細胞於 腦組織重建之應用

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：周中興、主治醫師

派赴國家：英國

報告日期：103年7月7日

出國時間：99年6月28日至103年6月27日

## 摘要

細胞療法(cell-based therapies)具有潛力成為治療神經血管疾病的關鍵方式。率先使用人類腦神經幹細胞經顱移植慢性腦中風病人的計畫，在英國進行第二期臨床試驗(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01151124)。傳遞神經訊號的神經元，必須在神經血管單元 (the neurovascular unit) 內發揮功能，而研究神經系細胞和血管內皮細胞之間的交互作用，將有助提昇神經幹細胞的療效。本研究的基本目標是創新共同培養人腦神經幹細胞和腦微血管內皮細胞的技術，從而研究神經幹細胞分化和血管內皮細胞形態發生的關聯，進一步探討各類細胞於共同培養時，分泌的生長因子及其受體以及相關基因表現的變化，證明源自不同部位的神經幹細胞之血管新生的效力有差異，乃受到細胞間直接接觸與非直接接觸等因子調控，作為重建腦神經血管組織之基礎原理。

目次

封面 .....第 1 頁

摘要 .....第 2 頁

目次 .....第 3 頁

本文 .....第 4 - 14 頁

心得及建議事項 .....第 14 頁

附錄 .....第 14 - 16 頁

## 本文

### 「目的」

腦血管疾病造成神經功能傷害是國人嚴重的健康損失，腦中風是台灣人口的第三大死亡原因（註一），在先進國家例如美國是第四大死因（註二），而中風患者失能與殘障更是加重社會醫療的負擔，例如每年在美國的中風患者之疾病和醫療成本高達 360 億美元（註二）。其中缺血性腦中風(ischemic stroke)患者的比例約為 87%，而現今主要的有效療法是針對急性腦梗塞的血栓溶解治療，卻因為治療時機短暫，必須於中風發生後的三小時內施打（註三），多數腦梗塞患者不符合條件，無法及時接受治療將血栓溶解，因而留下神經功能損害的後遺症。

對於陳舊性腦中風(chronic stroke)患者，幹細胞移植腦部手術是治療腦血管疾病的研究重點之一。人類腦神經幹細胞(neural stem cell)移植治療腦中風患者，在英國已經進入第二期臨床研究(PISCES study; Pilot Investigation of Stem Cells in Stroke; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01151124)（註四），這是根據動物實驗移植神經幹細胞株 CTXOE03 注射入陳舊性腦梗塞的大腦中，組織切片顯示神經幹細胞有效分化成神經系細胞，與神經功能評估的結果有關，而注射位置，與梗塞病灶的距離為其影響因子（註五）。神經幹細胞株 CTXOE03 也應用於周邊動脈阻塞的動物實驗，初步結果顯示移植幹細胞的療效與其血管新生(angiogenesis)作用有關（註六）。因此，比較源自不同區域的人腦神經幹細胞促使血管新生效力的差異，可以選擇更佳的神經幹細胞來源，以提昇細胞移植治療腦中風及相關血管疾病患者的效果。

## 「過程」

人類胚胎腦組織曾應用於腦神經疾病的治療，例如巴金森氏症(Parkinson's disease)患者的胚胎組織腦移植治療(註七)，但是胚胎組織的取得有相關法令的限制，且病患的治療效果未必顯著，也可能出現合併症。近年來，細胞療法和相關細胞株的研發，包括神經幹細胞的研究，不斷地提昇細胞移植在神經疾病的治療，也包括腦血管疾病。過去曾有臨床研究將人類神經細胞株移植入陳舊性腦中風的病人腦部，但主要的預後評估項目，包括肢體的肌肉力量，並沒有顯著進步(註八)。

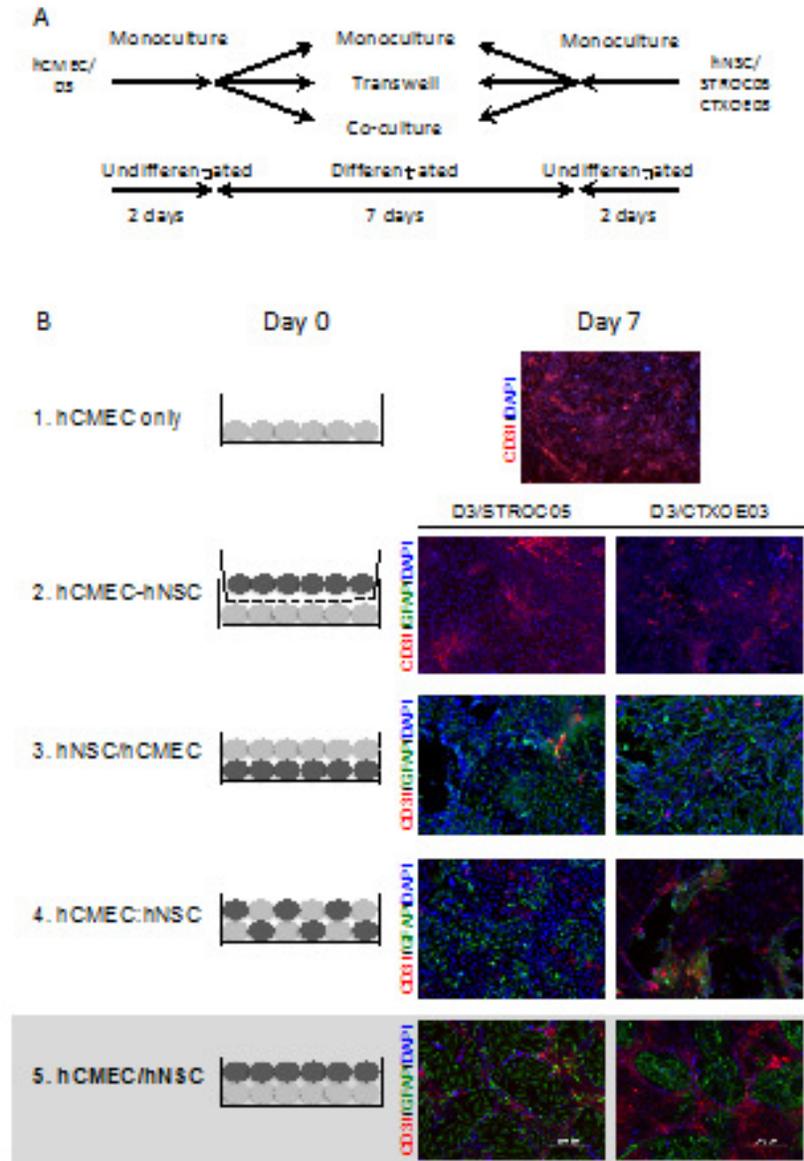
神經幹細胞的特性，包括自我新生(self-renewal)和分化成為所有神經系各類細胞，例如神經元(neuron)、星狀細胞(astrocyte)和寡樹突細胞(oligodendrocyte)。因此，神經幹細胞的腦移植治療，產生的功用不僅是分化成神經元，也可能包括支持神經元功能相關的神經系細胞，以及神經幹細胞對於神經元的直接作用。

然而，移植入腦部的神經幹細胞，受到周遭環境的細胞和胞外基質等影響，未必適當分化而產生理想的療效。由於負責傳遞神經訊號的神經元，必須在神經血管單元 (the neurovascular unit) 內發揮功能，這些神經系細胞受到血管內皮細胞的調控，並和血管內皮細胞交互作用。人類腦神經幹細胞的分化，也受到血管內皮細胞的影響，因此，研究神經系細胞和血管內皮細胞之間的交互作用，將有助提昇神經幹細胞於神經血管疾病的療效。

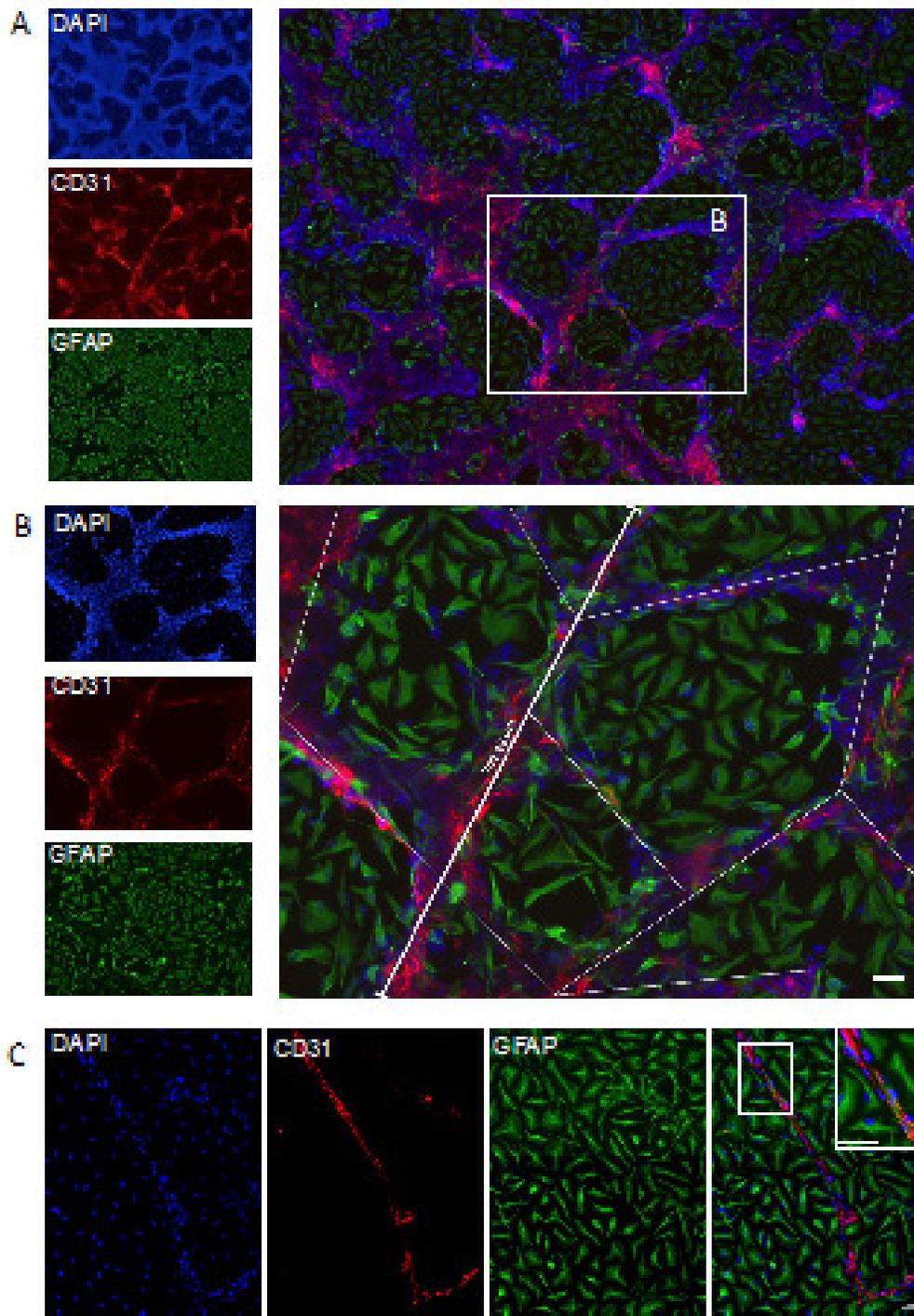
神經幹細胞株 CTXOE03 取自於第 12 週大的人類胚胎之大腦皮層(註九)，進行臨床應用之前，除了動物實驗的證明，細胞株本身也經過分析改良，達到優良製造規範 GMP 的品質管理(註十)，以符合未來大規模臨床研究和治療病人所需。CTXOE03 細胞株的特點包括 c-mycER<sup>TAM</sup> 基因轉殖的技術，細胞在具有 4-hydroxytamoxifen 成分的細胞培養液中，由於 4-hydroxytamoxifen 與修改後的雌激素受體(estrogen receptor)結合，進而活化基因 myc，使神經幹細胞進行複製和自我新生，而不進行分化，而當 CTXOE03 細胞株移植進入腦內，沒有 4-hydroxytamoxifen 存在時，則開始分化為神經系細胞，包括神經元、星狀細胞和寡樹突細胞。這項技術的目的在於掌控神經幹細胞的自我新生和有效分化，減少移植細胞失控不斷增生而癌化的危險性。

然而，腦部神經元的代謝和功能，除了各種神經系細胞的運作，還有賴血管內皮細胞的功能，例如血腦屏障(the blood-brain barrier)的維持和運作(註十一)，以構成真正的腦功能單元——神經血管單元 (註十二)。因此，腦中風患者神經功能的進步，是基於神經血管單元內的神經元在合適的腦部微小環境(microenvironment)中作用。若以細胞移植治療重建腦組織，著眼的重心應該不僅是神經系細胞，還要包括功能密切相關的血管系細胞，例如血管內皮細胞。研究神經血管單元內各類細胞之間的交互作用，探討神經幹細胞如何有效分化成功能良好的神經系細胞，將有助於神經幹細胞應用於腦中風的細胞療法。

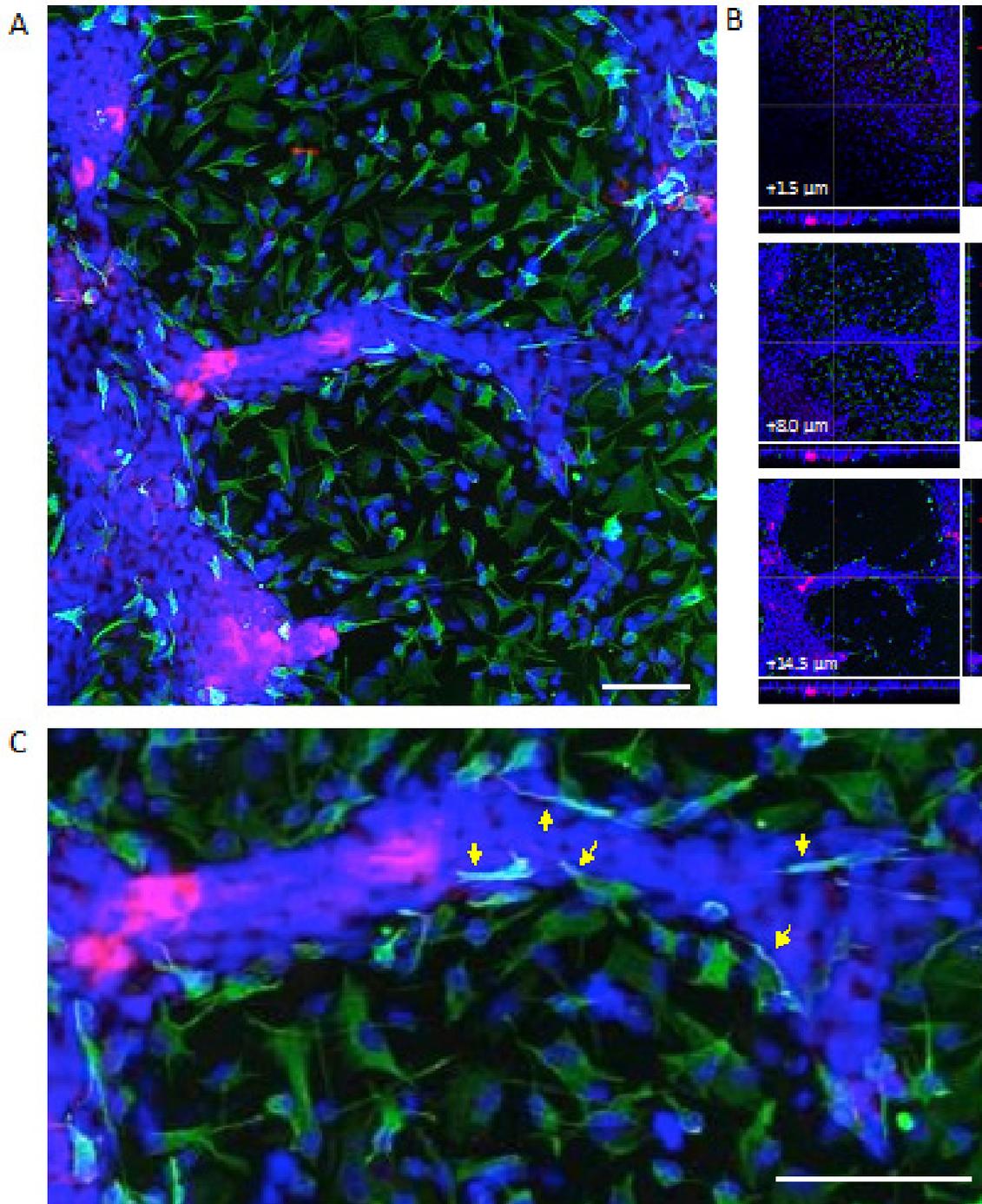
本論文專題採用人類腦微血管內皮細胞株(hCMEC/D3)與人類腦神經幹細胞株 STROC05 和 CTXOE03，創新共同培養細胞的方式，觀察神經血管組織的生成，特別是神經幹細胞促使血管新生的作用(圖一)。神經幹細胞株 STROC05 源自 12 週大的人類胚胎腦組織，與 CTXOE03 細胞株皆為英國 ReNeuron 公司所研發，採取同樣的 c-mycER<sup>TAM</sup> 基因轉殖技術，STROC05 細胞株已應用於神經幹細胞腦移植治療舞蹈症(Huntington's disease)的動物實驗(註十三)。這種新式的細胞培養，可分析神經血管組織生成的構造(圖二、三)，以及神經系和血管系細胞之間的交互作用，包括各種生長因子，及細胞的基因調控(註十四)。



**圖一 共同培養血管內皮細胞和神經幹細胞的各種方式。**(A) 培養單一類細胞和共同培養 D3 人類腦微血管內皮細胞(hCMEC)以及 STROC05 或 CTXOE03 人類腦神經幹細胞(hNSC)的示意圖。(B) **1.** 人類腦微血管內皮細胞(表現 CD31 抗原) 於覆蓋有膠原蛋白的表面生長形成單層細胞，並不會形成類微血管構造(capillary-like structures; CLS)。**2.** 採用 transwell 共同培養，兩類細胞分別在上下兩室以膜相隔而無直接接觸，血管內皮細胞於下室生長，形成單層細胞，並不形成類微血管構造。**3.** 將微血管內皮細胞和神經幹細胞混合後，同時播植進行培養，不會形成顯著的類微血管構造。**4.** 將血管內皮細胞播植於生長分化 7 天的神經幹細胞之上，7 天後，不會形成類微血管構造。**5.** 惟有將神經幹細胞播植於生長分化 7 天的血管內皮細胞層之上，7 天後會形成類微血管構造，這些血管內皮細胞表現 CD31 抗原，相對地，神經幹細胞和星狀細胞則表現 GFAP。Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 將細胞核染為藍色。比例尺，200 μm。

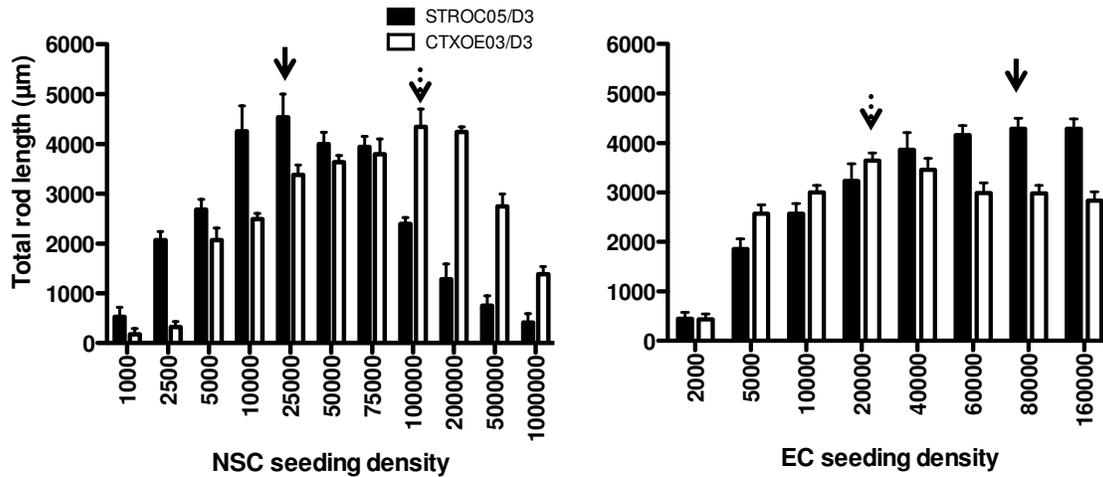


圖二 量測評估血管內皮細胞的形態變化。(A) 細胞培養生成神經血管組織的構造，包括表現 CD31 抗原的血管內皮細胞所形成的類微血管構造，而在其間表現 GFAP 抗原的細胞則源自神經幹細胞。(B) 測量分枝點之間的類微血管構造的長度，以量化評估形成類微血管構造的效率。(C) 有時可發現單層血管內皮細胞之間存有類似微血管的管腔。藍色的 DAPI 為細胞核染劑。比例尺，50  $\mu\text{m}$ 。



圖三 類微血管構造的立體結構。(A) 採用共軛焦顯微鏡(confocal microscope)觀察人類腦微血管內皮細胞(表現標定為紅色的 CD31 抗原)和神經幹細胞(表現標定為綠色的 GFAP 抗原)形成的類微血管立體結構。(B) 在細胞共同培養物的底層，神經幹細胞分佈於單一細胞層，血管細胞也分佈於此細胞層，並於其上形成類微血管構造。(C) 有些神經幹細胞具有星狀細胞的表現型和形態，伸出終足(endfeet) (黃色箭頭標示)圍繞著類血管構造。藍色的 DAPI 為細胞核染劑。比例尺，100  $\mu\text{m}$ 。

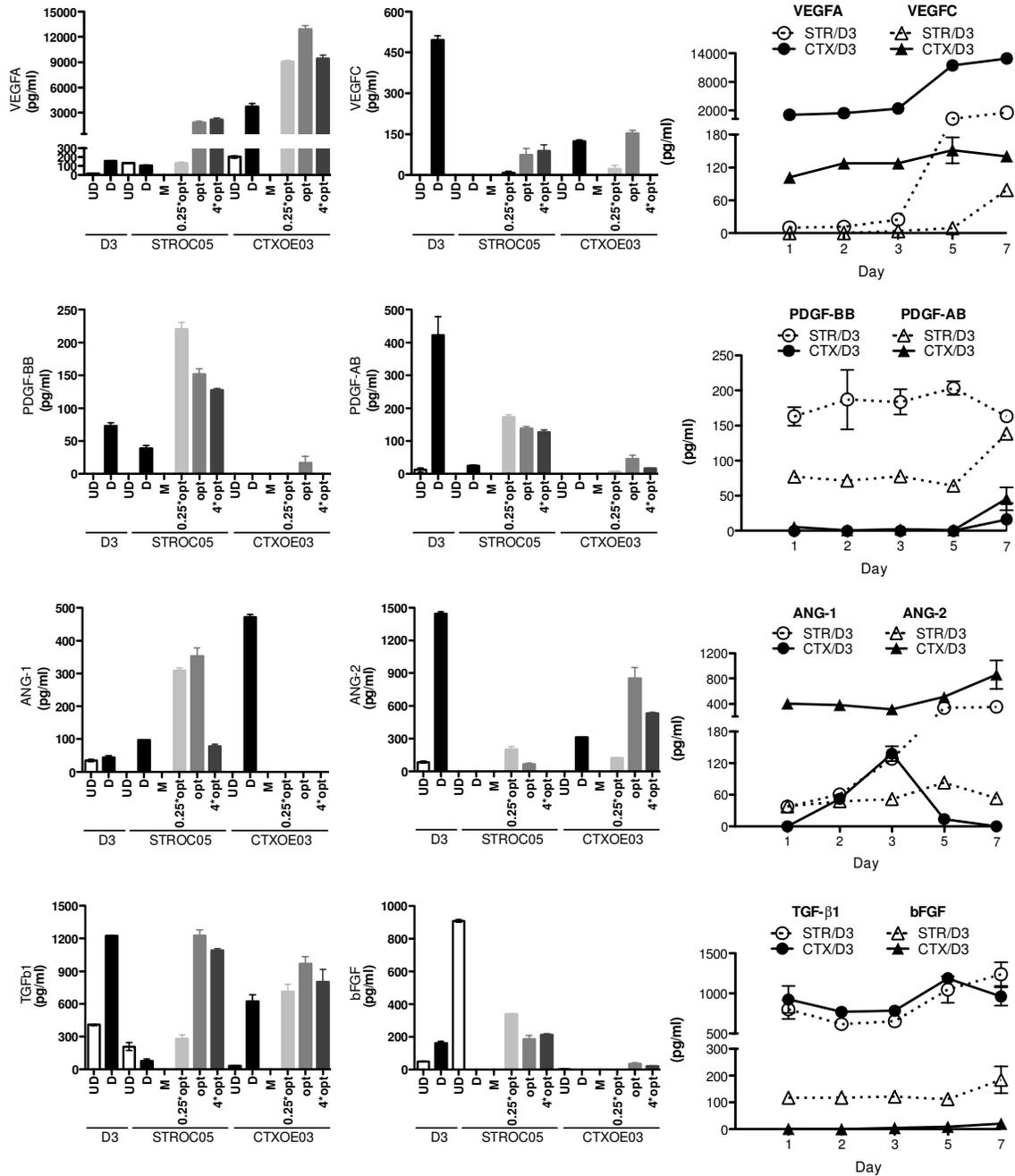
藉由共同培養人類腦微血管內皮細胞和神經幹細胞，並量測類微血管構造生成的效率，本研究證明必須以適當的細胞數目比例，共同培養這兩類細胞，才能有效生成神經血管組織，若要達成最多的類微血管構造，CTXOE03 神經幹細胞所需要的數目是 STROC05 神經幹細胞株的四倍(圖四)。



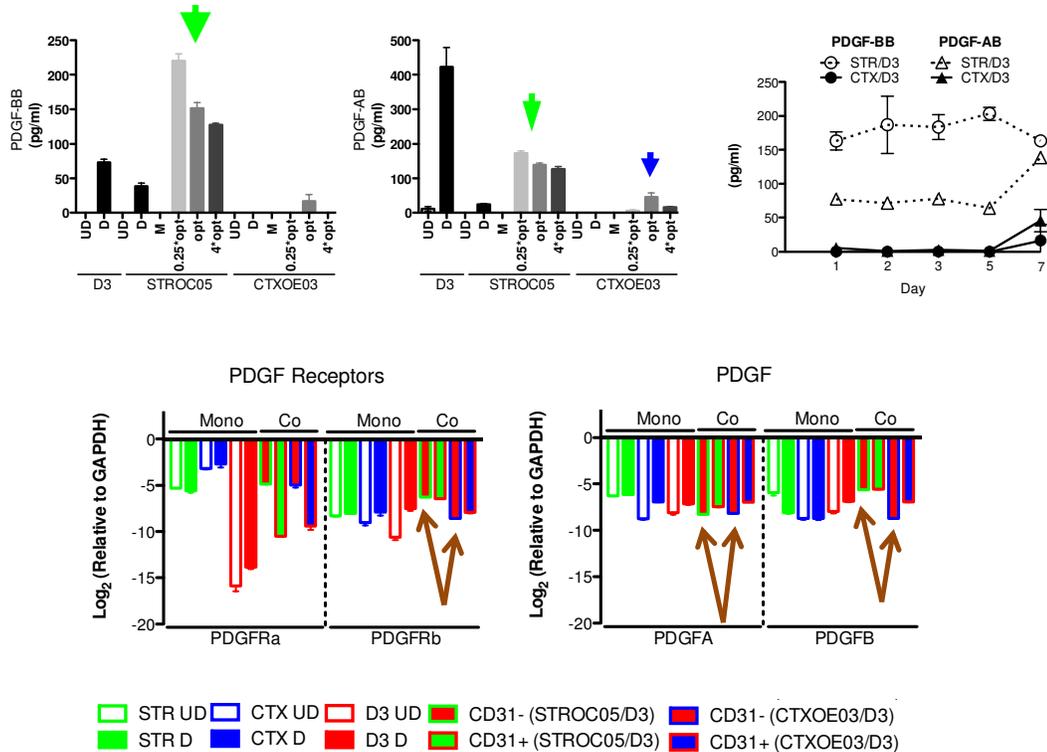
圖四 共同培養血管內皮細胞和神經幹細胞形成類微血管構造的效率。類血管構造的形，取決於神經幹細胞和血管內皮細胞數目的比例。(A) 要形成總長度最長的類微血管構造，共同培養兩類細胞之初的 D3 血管內皮細胞約有 400,000 個，分別需要 25,000 和 100,000 個 STROC05 和 CTXOE03 神經幹細胞進行共同培養，因此，共同培養兩類細胞之初，STROC05 and CTXOE03 神經幹細胞和血管內皮細胞數目的比例，分別為 1 比 16，及 1 比 4。(B) 若要與固定數目 40,000 個 STROC05 或 CTXOE03 神經幹細胞共同培養，而形成總長度最長的類微血管構造，共同培養兩類細胞之初的血管內皮細胞層，分別需要 664,000 和 172,000 個 D3 細胞，而最初播植的細胞數目則分別為 80,000 和 20,000 個 D3 血管內皮細胞，因此，共同培養兩類細胞之初，STROC05 and CTXOE03 神經幹細胞和血管內皮細胞數目的比例，分別為 1 比 16.6，及 1 比 4.3。

這項創新的細胞培養技術，採用高純度的膠原蛋白作為單一培養基質，避免了傳統培養血管內皮細胞進行血管生成分析時採用的混合物 Matrigel 基質所產生的變異性。採用這項技術共同培養神經幹細胞和微血管內皮細胞，不需添加血清於細胞培養液，進一步減少變異性，能準確分析細胞製造的各種生長因子(圖五)。

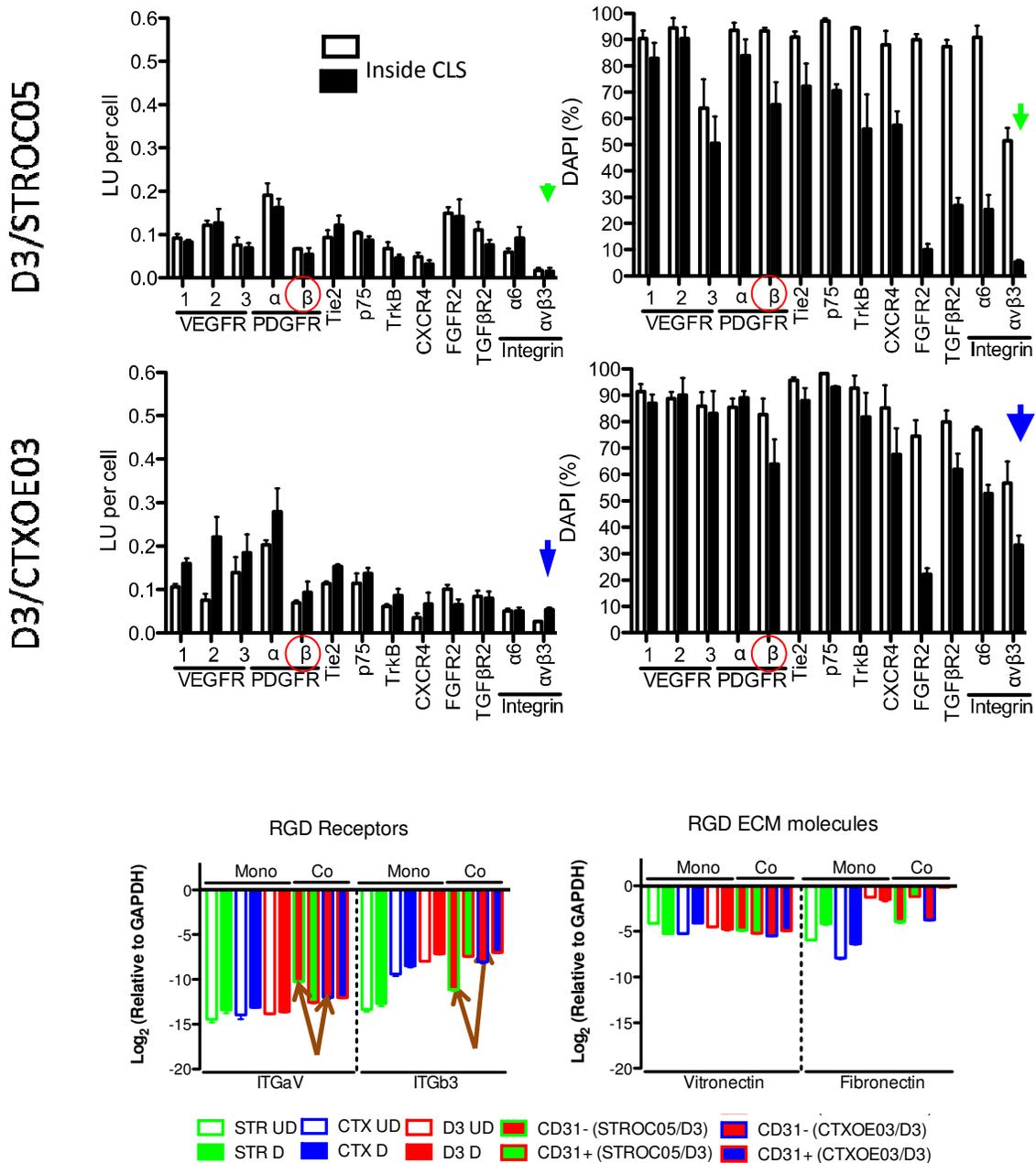
因此，本博士專題進一步評估已開始進行臨床應用的人腦神經幹細胞株 CTXOE03 促使血管新生的效力，與 STROC05 細胞株比較，探討其中各種生長因子對於神經血管單元內各類細胞的影響(註十四)。本研究計畫，將評估神經幹細胞和微血管內皮細胞之間的交互作用(圖六、七、八)，以選擇最合適的神經幹細胞來源，將有助於神經幹細胞應用於腦血管疾病的移植治療。



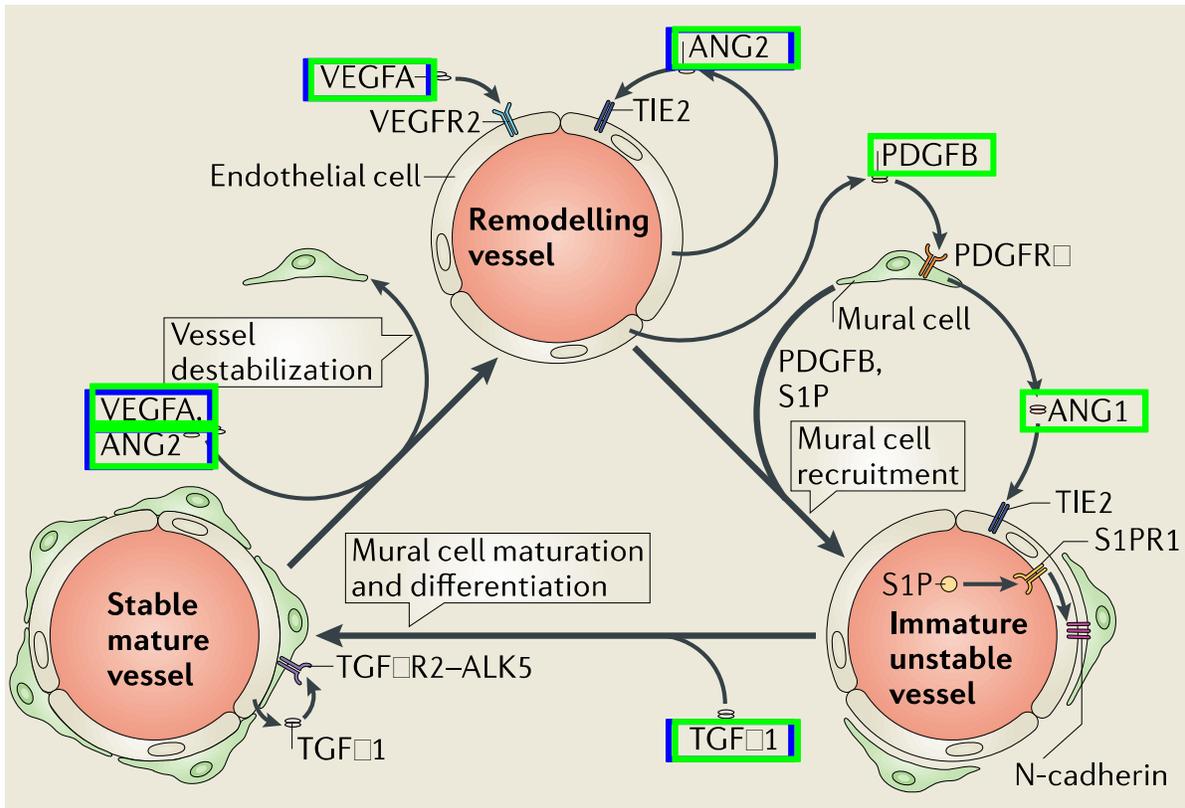
圖五 培養單一種類細胞及共同培養血管內皮細胞和神經幹細胞所分泌之各種生長因子。以酵素結合免疫吸咐法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 進行測量，共同培養血管內皮細胞和 CTXOE03 神經幹細胞(D3/CTXOE03)時，生長因子 vascular endothelial growth factor A (VEGFA)和 angiopoietin-2 (ANG-2)的濃度高於共同培養血管內皮細胞和 STRO05 神經幹細胞(D3/ STRO05)。相反地，platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)、PDGF-AB 和 ANG-1 在 D3/ STRO05 共同培養中的濃度高於 D3/CTXOE03 共同培養。另外，basic fibroblastic growth factor (bFGF)在 D3/CTXOE03 共同培養中的濃度很低或測不出，明顯低於 bFGF 在 D3/ STRO05 共同培養中的濃度。



**圖六 非直接接觸之生長因子 PDGF 影響神經幹細胞促使血管生成之效力。**以酵素結合免疫吸附法(ELISA)測量生長因子 PDGF-BB 和 PDGF-AB，在 D3/CTXOE03 共同培養中甚低或測不到，明顯低於 D3/STROC05 共同培養。因素之一，是 CTXOE03 神經幹細胞在共同培養中表現基因 PDGFB 的程度，低於在共同培養中的 STROC05 神經幹細胞。儘管 PDGFA 於共同培養中 CTXOE03 和 STROC05 兩種神經幹細胞內的表現程度沒有明顯差異，功能性生長因子 PDGF-AB 仍需要足夠的 PDGFB 與 PDGFA 進行結合(dimerization)。以即時聚合酶連鎖反應(rt-PCR)測量，PDGFB 的受體 PDGFR-β 其基因 PDGFRb 的表現程度，在共同培養中的 CTXOE03 神經幹細胞內，也低於共同培養中的 STROC05 神經幹細胞。因此，綜合而言，與 STROC05 神經幹細胞比較，在 CTXOE03 神經幹細胞促使血管生成的過程中，生長因子 PDGF 的影響力較小。



圖七 直接接觸之因子 RGD 胞外基質與其受質  $\alpha v\beta 3$  影響神經幹細胞促使血管生成之效力。(A) 以免疫螢光染色法(immunocytochemistry), 測量 vitronectin 和 fibronectin 等具有 RGD 序列蛋白的胞外基質(extracellular matrix, ECM)之受質 integrin  $\alpha v\beta 3$  的表現程度, 發現在 D3/STROC05 共同培養中的神經系細胞內, 其表現程度甚低, 明顯低於 D3/CTXOE03 共同培養中的神經系細胞。(B) 受質 integrin  $\beta 3$  的基因 ITGb3, 在 D3/STROC05 共同培養中的神經系細胞內, 其表現程度也明顯低於 D3/CTXOE03 共同培養中的神經系細胞。因此, 綜合而言, 與 CTXOE03 神經幹細胞比較, 在 STROC05 神經幹細胞促使血管生成的過程中, 具有 RGD 序列蛋白的胞外基質與其受質  $\alpha v\beta 3$  的影響力較小。



**圖八 血管內皮細胞和壁細胞(mural cell)的交互作用。**首次成功地共同培養血管內皮細胞和神經幹細胞，並探討血管生成之不同階段，其間非直接接觸和直接接觸因子為來源不同的神經幹細胞時所採用和依賴的程度不同，我們首次參考血管內皮細胞和壁細胞的交互作用，解讀其中的分子機轉。儘管在血管生成初期所需要的VEGFA/VEGFR2和ANG2/TIE分子訊號傳遞路徑(molecular signaling pathway)，在D3/CTXOE03共同培養中的神經系細胞內，其表現程度高於D3/STROC05共同培養中的神經系細胞，但是，在D3/CTXOE03共同培養中幾乎測不到PDGFB或ANG1，明顯低於D3/STROC05共同培養，因此，顯著缺少血管生成後期需要的PDGFB/PDGFR $\beta$ 和ANG1/TIE2分子訊號，使得CTXOE03神經幹細胞促使血管生成的效率低於STROC05神經幹細胞(註十五)。

## 「心得及建議事項」

1. 細胞療法(cell-based therapies)已成為治療受損或病變器官及組織的關鍵治療方式。具有高度複雜性的神經系統，依然是有待突破的治療領域，例如，目前僅有少數的臨床試驗應用細胞療法進行腦中風病人的腦組織重建。中樞神經系統功能的恢復，端賴神經元在腦部合適的環境裡，正常地發揮傳遞神經訊號的功能。幹細胞具有分化成多種細胞的潛力，可增進細胞療法的效果，因而成為新的細胞材料作為腦組織重建之用；神經幹細胞可分化成神經系細胞，包括神經元、星狀細胞和寡樹突細胞，這些細胞協同作用，可能增進神經功能的恢復。
2. 本論文專題採用創新的技術共同培養人類腦微血管內皮細胞和神經幹細胞，成功地分析腦微血管形成的各個階段，源自不同部位的神經幹細胞著重利用不同的細胞間非直接接觸和直接接觸因子。這些細胞培養的研究發現，可提供臨床治療決定選擇神經幹細胞的種類，以及移植的細胞數目、位置和時機，將有助提昇神經幹細胞於神經血管疾病的療效，以重建腦神經血管組織。
3. 進行本實驗研究，個人歷經英國倫敦大學和美國匹茲堡大學相關機構的訓練和學習，收穫豐富，期待以相關材料和技術，於國內持續發展，以精進腦神經幹細胞與腦微血管內皮細胞於腦組織重建之應用，幫助治療腦神經血管受損之病患。
4. 建議幹細胞療法將可以做為治療腦中風病患的新選擇，需要在醫院及學院研究室進行更進一步的細胞培養和動物實驗等基礎醫學研究，以提供更明確的證據支持臨床醫師選擇病患並展開治療。

## 「附錄」

### **Abstracts and publications arising from this thesis**

#### 相關會議口頭及海報發表摘要

Chung-Hsing Chou and Michel Modo (2011). "Distinguishing contact-mediated effects from soluble factors of human endothelial cells on the differentiation of a clinical-grade human neural stem cell line". Abstract presented at the 18<sup>th</sup> Annual meeting of the American society of neural therapy and repair in Florida, USA. Published in *Cell Transplantation*, 20, 550.

Chung-Hsing Chou and Michel Modo (2012). "Human neuronal stem cell differentiation and endothelial morphogenesis generate a neurovascular environment in a reciprocal relationship". Abstract presented at the annual meeting of the Society of Neuroscience in New Orleans, USA.

Chung-Hsing Chou and Michel Modo (2013). "Optimization of cellular and acellular components in generating a neurovascular environment". Abstract presented at the 20<sup>th</sup> Annual meeting of the American society of neural therapy and repair in Florida, USA. Published in *Cell Transplantation*, 22, 898-9.

Chung-Hsing Chou and Michel Modo (2014). "Human neural stem cells facilitate angiogenic morphogenesis of human cerebral microvascular endothelial cells". Abstract presented at the 7<sup>th</sup> Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research in Taiwan, the Republic of China

#### 相關著作期刊論文Publications

Image-Guided Injection and Noninvasive Monitoring of Tissue Regeneration in the Stroke-Damaged Brain. In *Cell-Based Therapies in Stroke*, J. Jolkkonen, P. Walczak, eds. (2013) (Springer-Verlag Wien), pp. 93-104.

Chou C-H et al. (2014) Formation of capillary-like structures by adult human brain endothelial cells in coculture with human neural stem cells: An in vitro assay. (under revision)

#### 註解和參考文獻References

註一：衛生署統計顯示民國101年所有死亡人數為153,823人，其中因腦血管疾病而死亡的人數為11,061人，佔所有死亡人數的7.2%，是第三大死亡原因。

註二：Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014 ;128.

註三：The NINDS t-PA Stroke Study Group (1997) Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 28, 2109-18.

註四：Mack, G. S. (2011) ReNeuron and StemCells get green light for neural stem cell trials. *Nature biotechnology*, 29, 95-7.

註五：Smith, E. J., R. P. Stroemer, N. Gorenkova, M. Nakajima, W. R. Crum, E. Tang, L. Stevanato, J. D. Sinden & M. Modo (2012) Implantation site and lesion topology determine efficacy of a human neural stem cell line in a rat model of chronic stroke.

*Stem cells*, 30, 785-96.

- 註六：Katare, R., P. Stroemer, C. Hicks, L. Stevanato, S. Patel, R. Corteling, E. Miljan, I. Vishnubhatla, J. Sinden & P. Madeddu (2014) Clinical-grade human neural stem cells promote reparative neovascularization in mouse models of hindlimb ischemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34, 408-18.
- 註七：Madrado I, León V, Torres C, Aguilera MC, Varela G, Alvarez F, Fraga A, Drucker-Colín R, Ostrosky F, Skurovich M, et al. (1988) Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 1988 Jan 7;318(1):51.
- 註八：Kondziolka, D., G. K. Steinberg, L. Wechsler, C. C. Meltzer, E. Elder, J. Gebel, S. Decesare, T. Jovin, R. Zafonte, J. Lebowitz, J. C. Flickinger, D. Tong, M. P. Marks, C. Jamieson, D. Luu, T. Bell-Stephens & J. Teraoka (2005) Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *Journal of neurosurgery*, 103, 38-45
- 註九：Pollock, K., P. Stroemer, S. Patel, L. Stevanato, A. Hope, E. Miljan, Z. Dong, H. Hodges, J. Price & J. D. Sinden (2006) A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Experimental neurology*, 199, 143-55.
- 註十：Thomas, R. J., A. D. Hope, P. Hourd, M. Baradez, E. A. Miljan, J. D. Sinden & D. J. Williams (2009) Automated, serum-free production of CTX0E03: a therapeutic clinical grade human neural stem cell line. *Biotechnology letters*, 31, 1167-72
- 註十一：Abbott, N. J. (2013) Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of inherited metabolic disease*, 36, 437-49
- 註十二：Neuwelt, E. A., B. Bauer, C. Fahlke, G. Fricker, C. Iadecola, D. Janigro, L. Leybaert, Z. Molnar, M. E. O'Donnell, J. T. Povlishock, N. R. Saunders, F. Sharp, D. Stanimirovic, R. J. Watts & L. R. Drewes (2011) Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature reviews. Neuroscience*, 12, 169-82.
- 註十三：El-Akabawy, G., L. M. Medina, A. Jeffries, J. Price & M. Modo (2011) Purmorphamine increases DARPP-32 differentiation in human striatal neural stem cells through the Hedgehog pathway. *Stem cells and development*, 20, 1873-87
- 註十四：Chung-Hsing Chou, John Sinden, Pierre-Olivier Couraud & Michel Modo (2014) Formation of capillary-like structures by adult human brain endothelial cells in coculture with human neural stem cells: An in vitro assay. (submitted, currently under revision)
- 註十五：Herbert, S. P. & D. Y. Stainier (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12, 551-64.