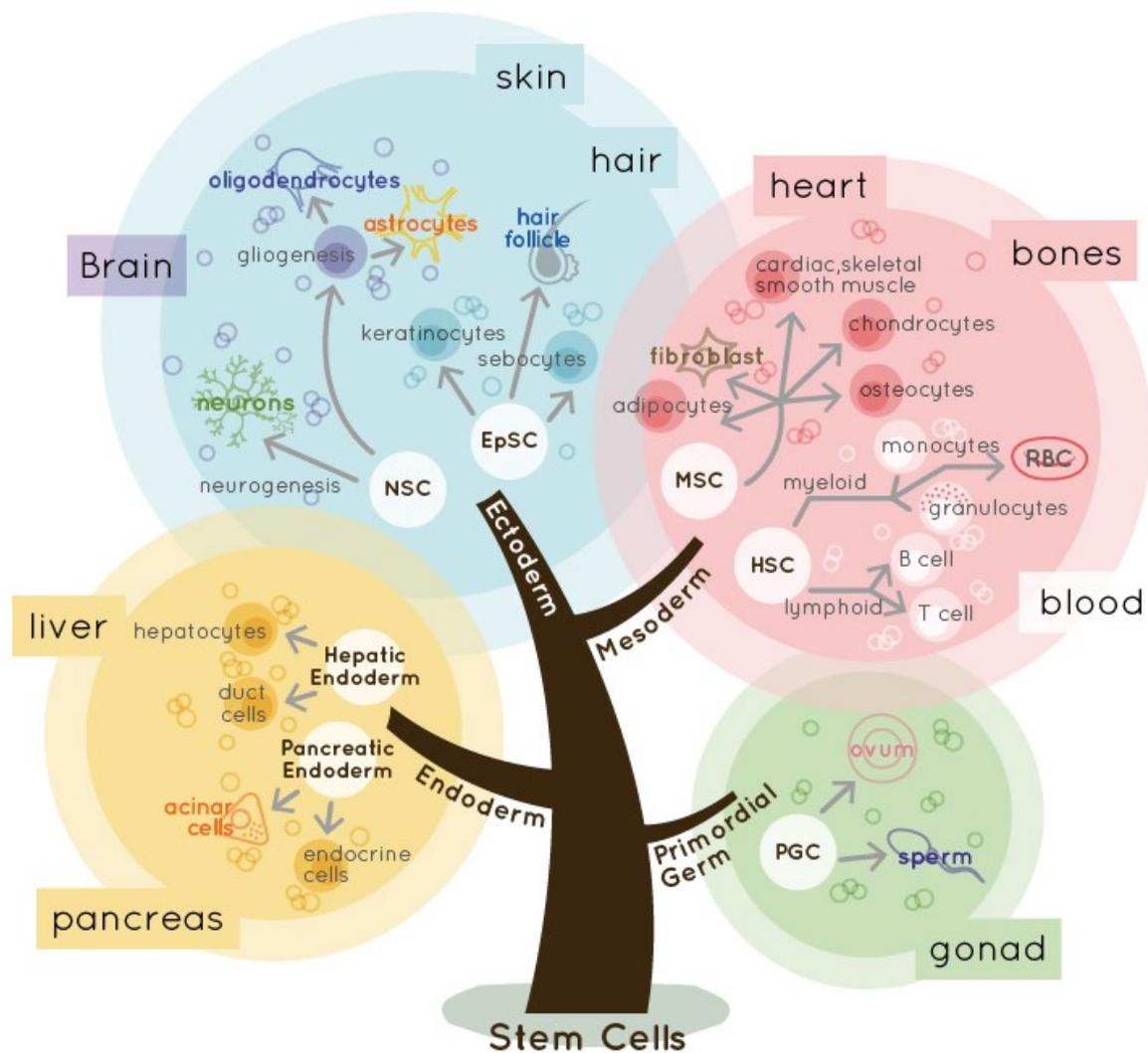


# 創世紀季刊

2016 Q2

Stem Cell



## The tree of stem cell differentiation

Renew

Differentiate

Specialize

服務專線: 0800-211-667

台北: 02-26558877 台中: 04-22602466

服務信箱: [service@biogenesis.com.tw](mailto:service@biogenesis.com.tw)

竹南: 037-687493 高雄: 07-3105441

前言:

早從1960年代恩尼斯特·莫科洛克與詹姆士·堤爾在多倫多大學，利用植入骨髓進入高劑量輻射處理的小鼠，並發現這些植入組織在老鼠體最後會分化、增生成紅血球、粒性白血球及巨噬細胞的群落，進而增進存活率開始便有了“幹細胞”，Stem Cell，這個概念。而後，根據來源、自我更新及分化的能力，又定義“成體幹細胞”(Adult Stem Cells)，以及“胚胎幹細胞”(Embryonic Stem Cells)。在分化能力上，再細分所謂的“單一能力”(unipotent，只分化成一種特定細胞)、“寡能分化”(oligopotent，由單一前驅細胞分化成多種不同功能的細胞)、“多功能”(multipotent，可再分化成不同類型的前驅細胞)、“萬能分化”(pluripotent，有可以分化成任何組織細胞的能力，但最終功能上還是有限制)以及“全能”(totipotent，可分化成任何種類的細胞，無限制性，可發育成完整的各體)幹細胞。

介紹:

幹細胞 (Stem cell) 是一群特殊的細胞，主要具有兩種特徵：

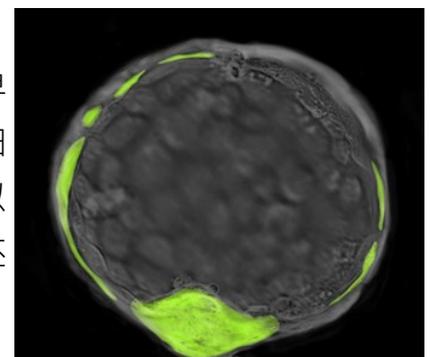
- (一)它未充分的分化、並且具有可以特化生成許多不同細胞類型的潛力。
- (二)可以利用自我更新(self-renew)的方式來提供更多幹細胞。

在人體之中，關於幹細胞的分類，可以粗略分為兩大類：

(一)根據其位置或來源：

### 胚胎幹細胞(embryonic stem cells; ESCs)

胚胎幹細胞是由胚細胞(blastocyst，大約為50-100個細胞所形成的早期胚胎，如右圖)，內膜中未分化的細胞團塊中分離出來。由於此細胞具有高度增生及萬能分化(pluripotent differentiation)的潛力，可以分化發育成為身體內200多種細胞類型中的任何一種。例如：由三胚層衍生出來的組織，或胚外組織，臍帶和胎盤。



Human Blastocyst , Cell 148, 9, 2012

**成體幹細胞(Adult stem cells)：** 組織專一性幹細胞

屬於多功能(multipotent)分化潛力的幹細胞，目前大至上所描述的人類幹細胞，大多是針對此種具有組織專一性及具有幹細胞分化潛力的細胞 (如右列表)。根據不同胚層所分化出來的器官，所能得到的成體幹細胞種類也相當多；其中最為耳熟能詳的就是造血幹細胞、神經幹細胞、脂肪幹細胞。

#### Endodermal Origin

Pulmonary Epithelial SCs

Gastrointestinal Tract SCs

Pancreatic SCs

Hepatic Oval Cells

Mammary and Prostatic Gland SCs

Ovarian and Testicular SCs

#### Mesodermal Origin

Hematopoietic SCs

Mesenchymal Stroma SCs

(MSCs, MPCs, MAPCs, MIAMI cells, BMSCs, FSSCs, USSCs)

Cardiac SCs

Satellite cells of muscle

#### Ectodermal Origin

Neural SCs

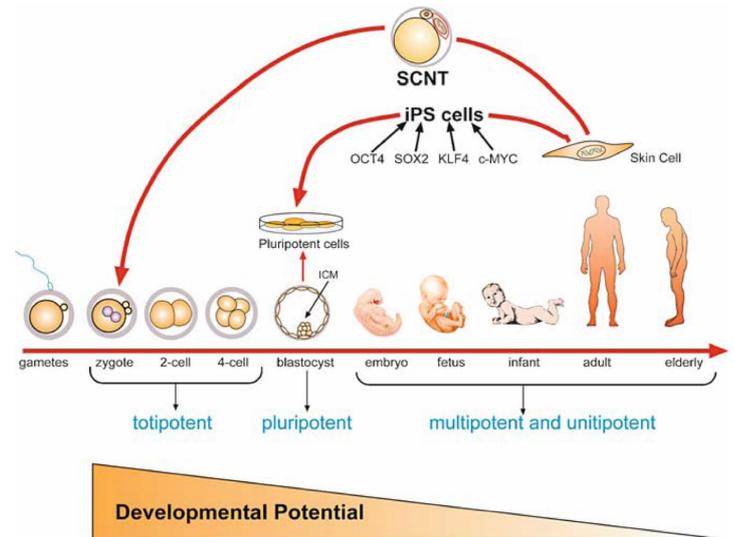
Skin SCs

Ocular SCs

## (二)根據其分化的潛力(Differentiation potency)：

### 全能幹細胞 (Totipotent)：

在哺乳動物的演化上，當卵子受精成受精卵之後，由受精卵時期一直到分裂成四細胞的這段時間，細胞是屬於具有全能幹細胞分化能力的。除了可以分化成為胎盤、臍帶等組織或器官，以維持胎兒的成長，也包含可以發展成各個胚層最後成長為一個新的個體。



### 萬能幹細胞 (Pluripotent)：

萬能幹細胞是由胚胎中未分化的細胞團塊中所分離出來的一群細胞，一般而言，其具有分化成三個胚層：內胚層、中胚層或外胚層的能力，所以可以分化成各種不同的細胞型態。然而單一個細胞或是萬能幹細胞團是無法形成一個新的個體的，因為由胚胎細胞團塊中分離出來後，便無法再度形成胚胎。

### 多功能幹細胞 (Multipotent)：

多功能幹細胞可經由組織或器官之中分離出來，具有自我更新及分化的能力，但不能完全分化成個體或是任意的組織或器官，只有分化成特定組織或器官的能力。

### 專一性幹細胞 (Unipotent)：

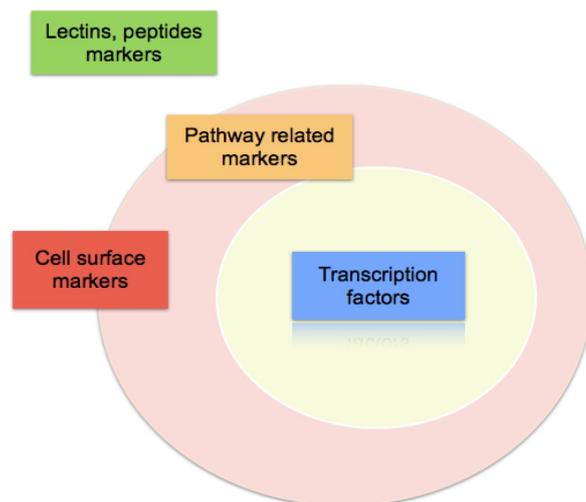
專一性幹細胞，是指具有自我更新，亦有分化能力的細胞，但是其分化的能力並不能和上述不同分化潛力的細胞相比，只能分化成單一細胞。(右上圖及下表，隨著發育的不同時其所取得的幹細胞的能力)

Cell type (location)	Potency	Progeny
Cells at morula stage	Totipotent	Embryonic and extraembryonic tissues ESC
Cell of inner cell mass at blastocyte stage	Pluripotent	Embryo proper (all somatic and germ cells)
Cell of epiblast layer at gastrula stage	Pluripotent	Endoderm, mesoderm and ectoderm
Cell of ectoderm, endoderm or mesoderm	Pluripotent	All somatic cells
Cell of specific tissues	Multipotent	One to several cell types depending on the residing tissue (e.g. hematopoietic stem cell)
Resident cells in a given tissue	Unipotent	Single cell type (e.g. myosatellite cells of muscle)

## 細胞表面標記(Cell surface marker)

近幾年，許多相關的研究都向幹細胞領域邁進，但是由於幹細胞具有自我更新、分化及發育成多種不同細胞或組織的能力，於是其形態和周邊的細胞是非常相近的，所以如何區分幹細胞和周邊的細胞便是相當重要的一個課題。根據幹細胞獨特的基因表現模式，科學家發現在幹細胞的細胞膜表面會呈現一些有別於其它細胞的標記(marker)，而這些幹細胞特有的marker就可以被應用來區分或分離不同形態、分化潛力(differentiation potential)等級的依據。

近幾年，發現許多的marker會扮演不同的角色，如細胞的訊息傳遞 (signal transduction)、決定細胞分化 (differentiation) 或凋亡 (apoptosis)。而細胞膜表面蛋白 (membrane protein) 是最重要的marker之一，因為在進行幹細胞研究、分析的時候，可以不用將細胞打破，便可直接辨認幹細胞以進行分類、分離及分析。



以下將這些marker根據表現階段、位置、特異性的不同，分為幾大類：

### 階段專一性胚胎抗原(Stage specific embryonic antigens; SSEA)：

在胚胎幹細胞發育早期，細胞膜表面會表現特別的醣蛋白，如SSEA-1，-3和-4 (下表)。這些特別的醣蛋白在生長發育時參與和其他細胞的交互作用，調控後續的分化，於是這些醣蛋白便可以應用在早期標記的使用。

SSEAs markers	Characteristics	Classification
SSEA-1 (CD15/Lewis x)	Murine embryos, mouse ES cells, mouse and human germ cells, embryonal carcinoma (EC) cells	Carbohydrate associated molecules
SSEA-3	Primate ES cells, human embryonic germ cells, human ES cells, embryonal carcinoma (EC) cells	Carbohydrate associated molecules
SSEA-4	Primate ES cells, human embryonic germ cells, human ES cells, embryonal carcinoma (EC) cells	Carbohydrate associated molecules

### 轉錄因子(Transcription factor)：

細胞核內的轉錄因子決定了哪些基因要被啟動或抑制，而幹細胞處在持續“變化”的過程，於是轉錄因子的活性或是表現量，便是一個重要的指標。下舉出四個重要的轉錄因子當作幹細胞重要的標記分子(下頁表格)：

**OCT-4 (Octamer-binding transcription factor 4)：**OCT-4屬於POU(POU，Pituitary-specific Pit-1/Octamer transcription factor protein/neural Unc-86)家族中的轉錄因子，參與了細胞自我更新及幹細胞分化的控制。在胚胎幹細胞之中，OCT-4常被用來當作幹細胞的marker，如果在幹細胞中，OCT-4表現量變低了，則表示幹細胞已開始進行分化了。

**SOX-2(Sex determining region Y-box 2)：**SOX-2也屬於POU家族結合子的轉錄因子，在哺乳動物各個時期的發育扮演了相當重要的角色。在胚胎幹細胞中，如果SOX-2和OCT-4的結合位被過度的甲基化，或是出現了miR134 (microRNA-134)去抑制SOX-2的功能，幹細胞便會失去多功能分化的能力。

**KLF4**: 屬於Kruppel-like factor 家族的KLF4轉錄因子，可調控細胞分化、增生、凋亡以及體細胞的重新分化，也被發現與抑制癌細胞生長有相關。

**NANOG**：NANOG轉錄因子對於幹細胞維持其多重分化的能力具有重要的影響。實驗發現，大量表現NANOG會使幹細胞在經歷多次繼代培養之後，仍具有多重分化的能力。

\* 近幾年，誘導性多功能幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; iPSc)的研究中發現，將**SOX-2**、**OCT-4**、**C-MYC**和**KLF-4**一起送到細胞之中，可以使細胞具有多功能分化的能力，此一部份會於後面的段落中詳細介紹。

CORE Nuclear transcription factors	Characteristics Classification	Characteristics Classification
Oct-3/4 (Pou5f1)	Mouse ES cells, human ES cells, embryonal carcinoma (EC) cells POU family Transcription factors	Mouse ES cells, human ES cells, embryonal carcinoma (EC) cells POU family Transcription factors
Sox2	Mouse ES cells, human ES cells, embryonal carcinoma (EC) cells, neural stem (NS) cells POU family binder Transcription factors	Mouse ES cells, human ES cells, embryonal carcinoma (EC) cells, neural stem (NS) cells POU family binder Transcription factors
KLF4	Mouse ES cells, human ES cells, embryonal carcinoma (EC) cells Zinc-finger Transcription factors	Mouse ES cells, human ES cells, embryonal carcinoma (EC) cells Zinc-finger Transcription factors
Nanog	Mouse ES cells, human ES cells, embryonal carcinoma (EC) cells Transcription factors	Mouse ES cells, human ES cells, embryonal carcinoma (EC) cells Transcription factors

下表列舉辨識胚胎幹細胞標記的抗體

## Stem Cell Marker

	Target	arigo Cat.	Host	Clone no.	Applications
Embryonic Stem Cell	SOX2	ARG53588	Rb	SP76	IHC, WB
	OCT4	ARG53393	Rb		IHC
	NANOG	ARG64194	Gt		WB, IHC, EIA
	SSEA3	ARG20019	Rat	MC-631	FACS, IHC, IP, WB
	SSEA4	ARG20023	Ms	MC-813-70	FACS, IHC, IP, WB

### 分化抗原群 (Cluster of differentiation (CD) antigens):

CD抗原是細胞表面蛋白，可以分為不同的種類，像整合素(integrin)，黏著因子(adhesion molecules)，醣蛋白和接受子(Receptor)。不同的細胞會具有不同的CD抗原，而利用抗體去辨認細胞表面的CD抗原以進行細胞的篩選及分離，是常見且有效的方法。

		Target	arigo Cat.	Host	Clone no.	Applications
Ectoderm	Early Ectoderm	Tuj1	ARG62683	Ms	TU-20	FACS, IF, IHC, WB
		NESTIN	ARG52345	Ms	4D11	IF, WB
		PAX6	ARG55204	Rb		WB, IF
	Neural stem cells	CD56 (PE-conjugated)	ARG53878	Ms	MEM-188	FACS, IHC, IP
		CD56 (FITC-conjugated)	ARG62895	Ms	MEM-188	FACS, IHC, IP
		CD133	ARG54138	Ms	6H10-F1-C11	WB
		GLUT1	ARG53090	Ms	SPM498	FACS, IF, WB, IHC
	Epidermic stem cells	Cytokeratin 19	ARG62978	Ms	BA-17	FACS, IF, IHC, IP, WB
		CD29 (PE-conjugated)	ARG53817	Ms	MEM-101A	FACS, IP, WB
		CD29 (FITC-conjugated)	ARG62799	Ms	MEM-101A	FACS, IP, WB
		Cytokeratin 14	ARG53180	Rb	SP53	IHC, WB, FACS
Neuron	NeuN	ARG52283	Ms	1B7	IF, IHC, WB	
Glial	GFAP	ARG52313	Ck		ELISA, FACS, IF, IHC, WB	
Endoderm	Early Endoderm	AFP	ARG62669	Ms	AFP-01	ELISA, IF, IP, WB
		AFP ELISA Antibody Duo	ARG30065	Ms	AFP-Y2	ELISA, WB/ELISA
Mesoderm	Early Mesoderm	SMA	ARG53568	Rb		IHC
		BMP2	ARG20386	Rb		WB
		N-CADHERIN	ARG52603	Rb	SP90	IHC, FACS
	Mesenchymal stem cells	CD44 (PE-conjugated)	ARG53852	Ms	MEM-85	ELISA, FACS, IP, WB
		CD44 (FITC-conjugated)	ARG62853	Ms	MEM-85	ELISA, FACS, IP, WB
		CD45 (PE-conjugated)	ARG53855	Ms	MEM-28	FACS, IF, IHC, IP, WB
		CD45 (FITC-conjugated)	ARG62857	Ms	MEM-28	FACS, IF, IHC, IP, WB
		CD73 (PE-conjugated)	ARG55406	Ms	AD2	FACS
		CD73 (FITC-conjugated)	ARG55405	Ms	AD2	FACS
		CD90 (PE-conjugated)	ARG54208	Ms	5E10	FACS, IP, WB, IHC, IF
		CD90 (FITC-conjugated)	ARG65400	Ms	5E10	FACS, IP, WB, IHC, IF
		CD105 (PE-conjugated)	ARG53754	Ms	MEM-226	FACS, IP, WB
		CD105 (FITC-conjugated)	ARG62701	Ms	MEM-226	FACS, IP, WB
	Hematopoietic stem cells	CD34 (PE-conjugated)	ARG55401	Ms	581	FACS, IHC
		CD34 (FITC-conjugated)	ARG55402	Ms	581	FACS, IHC
		CD133	ARG54138	Ms	6H10-F1-C11	WB
ABCG2/CD338		ARG51346	Rb		WB	
Primordial germ cells	C-KIT	ARG65364	Ms	104D2	FACS, IF, IHC, IP	
	GDF3	ARG20405	Rb		WB	
	DAZL	ARG63869	Gt		WB, IHC	

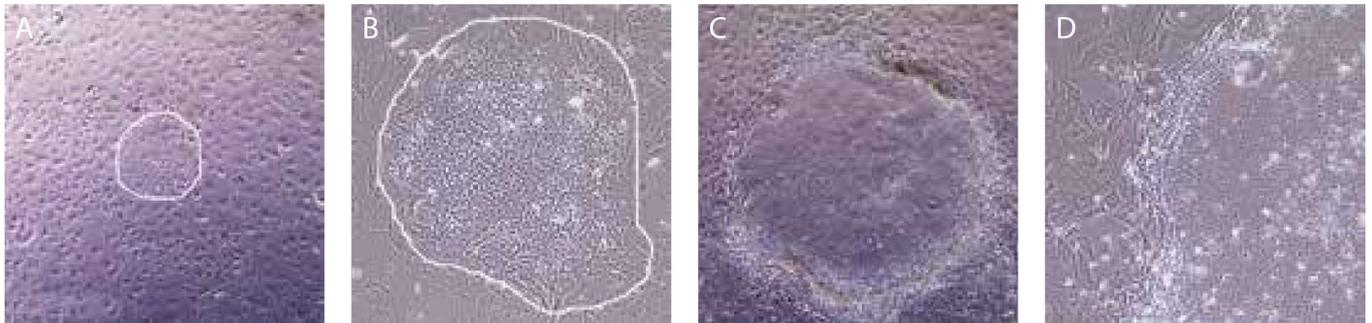
## 幹細胞培養(Stem cell culture)簡介:

幹細胞(stem cell)在現今生物醫學研究上是相當熱門的領域。於是如何在人工的培養狀態下，使幹細胞依舊可維持在未分化的狀態，便是相當重要的課題。不同型態的幹細胞通常需要不同的培養條件，例如：誘導性多態幹細胞(induced pluripotent stem cells ; iPSCs)和人類胚胎幹細胞(hESC)就必須培養在餵養細胞 (feeder cells)之上；老鼠胚胎幹細胞(mouse embryonic fibroblast ; MEF) 或人類包皮層纖維細胞(foreskin fibroblasts ; HFF)就要培養在有塗抹細胞外基質，基底膠膜(basement membrane gel)的平面上。此外，幹細胞的培養液也必需要加入適量的生長因子，例如，間質幹細胞(Mesenchymal stem cells)的培養就要加入fibroblast growth factor (FGF)，老鼠胚胎幹細胞的培養則要加入leukemia inhibitory factor (LIF)。至於一些像iPSCs和hESCs的幹細胞，則需每天都更換新的培養液，避免細胞過度成長，因為細胞過度成長會導致幹細胞進行分化而失去原有的分化潛力。

幹細胞的培養大至上可以分為兩大類(下頁列表)：

### Feeder-dependent stem cell culture:

在此系統之中，feeder cells會主動調整培養液中的生長環境而使得幹細胞能夠維持其萬能、多功能分化的能力，還可以成為支持幹細胞貼附在培養皿中的基礎，進而能生長、增質。



上圖 iPSC生長在feeder-dependent system中的外觀

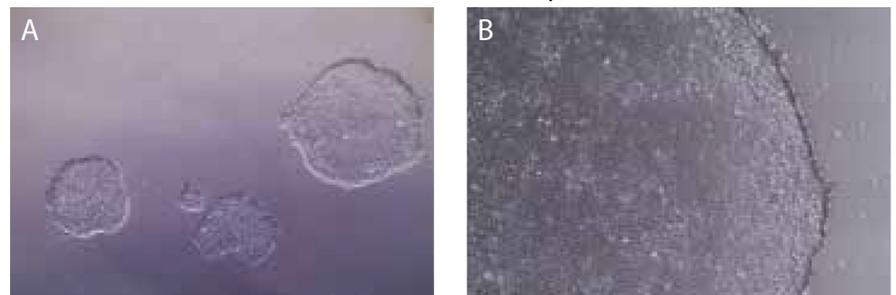
### 無 Feeder cell 培養系統:

此系統是利用在培養皿中先附著一層細胞外基質(extracellular matrix)，進而取代原本需要先培養一層feeder cells的動作。而此系統最重要的就是要控制好幹細胞在維持萬能(pluripotent)分化的能力及開始進行細胞分化之間的平衡，經由調整培養液中的必需胺基酸組成、鹽類、生長因子和營養成份來取代原本feeder cells 所營造的環境。

此系統主要有幾項優點：

1. 容易使用
2. 提高產能
3. 容易大量培養
4. 無需和其它細胞一起培養

下圖，iPSC生長在feeder-free system中的外觀



成功培養幹細胞需要注意的事項有：

1. 每天都要更換新的培養液
2. 監控幹細胞的外觀，判斷是否有開始進行分化的趨勢
3. 繼代培養時，不要超過2-3次的pipette
4. 培養液應避免重覆加熱至37°C，如在二個星期內不使用，建議保存在-20°C的環境下

Product Name	Size	Storage
Pluripotent Stem Cell SFM XF/FF	500 mL	-20°C
ROCK Inhibitor Y27632	10 mg	-20°C
DMEM	500 mL	2°C to 8°C
DMEM: F-12 Medium	500 mL	2°C to 8°C
Fetal Bovine Serum (FBS)	500 mL	-20°C
D-PBS	500 mL	Room temperature
Erythrosin B Stain Solution	40 mL	Room temperature

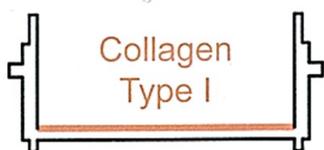
ATCC 建議之幹細胞培養條件

Stem Cell Types			Derived From	Attachment Support	Serum-free
Pluripotent	iPSCs	iPSCs	Post-natal tissues, such as skin, liver, heart	Yes (Feeder Cells or extracellular matrix)	Yes
	ESCs	hESCs	blastocyst stage embryos	Yes (Feeder Cells or extracellular matrix)	Yes
		mESCs	blastocyst stage embryos	Yes (Feeder Cells, or gelatin)	No
Multipotent	Adult Stem Cells	MSCs	Post-natal tissues	No	No
		Cancer Stem Cells (CSCs)	Tumors (such as brain, breast, colon)	No	Yes

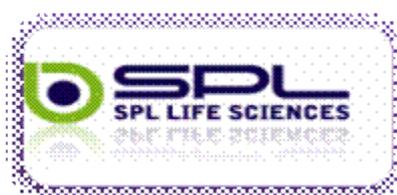
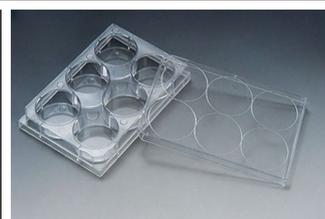
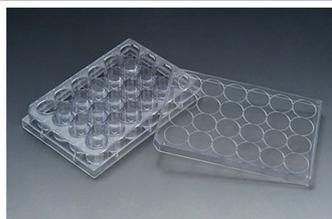
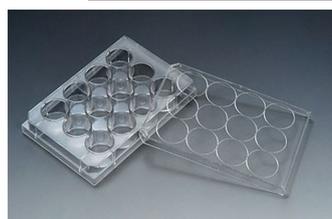
### Feeder-free 幹細胞培養系統

#### Collagen/ Poly-D-Lysine/ Laminin coating 培養皿

SPLCoat™



Type	Collagen Type I	Poly-D-Lysine	Laminin
25T Flask	75025	76025	77125
75T Flask	75075	76075	77175
3.5 cm dish	21035	22035	23035
6 cm dish	21060	22060	23060
10 cm dish	21100	22100	23100
15 cm dish	21150	22150	23150
6 well plate	39006	39206	39306
12 well plate	39012	39212	39312
24 well plate	39024	39224	39324
48 well plate	39048	39248	39348
96 well plate	39096	39296	39396



### Type I Rat Tendon Collagen mg/mL

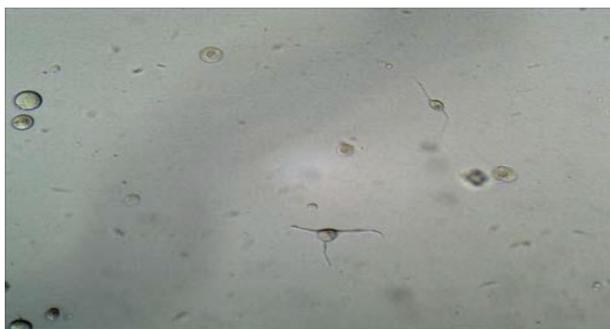
Type I Rat Tendon Collagen 3	Catalog #: TRT320 Concentration: 3mg/mL
Type I Rat Tendon Collagen 6	Catalog #: TRT323 Concentration: 6mg/mL
Type I Rat Tendon Collagen 4	Catalog #: TRT321 Concentration: 4mg/mL
Type I Rat Tendon Collagen 5	Catalog #: TRT322 Concentration: 5mg/mL

### Type I Bovine Tendon Collagen mg/mL

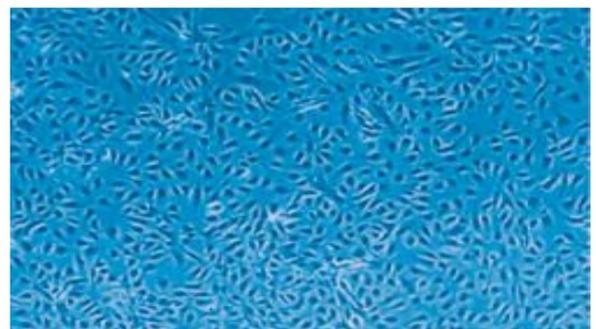
Acid soluble Type I Bovine Collagen 3	Catalog #: TBC320 Concentration: 3mg/mL
Acid soluble Type I Bovine Collagen 4	Catalog #: TBC321 Concentration: 4mg/mL
Acid soluble Type I Bovine Collagen 5	Catalog #: TBC322 Concentration: 5mg/mL

Table: 建議自行coating的條件

Well	Area (cm <sup>2</sup> )	Coating Volume (mL)	Wash volume (mL)
96	0.143	0.025	0.05
24	0.33	0.05	0.1
12	1.12	0.25	0.4
6	4.67	0.6	1
75 mm insert	44	5	8



HUVECs negative control surface



HUVECs w/ Type I Bovine collagen coating

## iPSCs 簡介:

幹細胞如此強而有力的特性，在基礎研究及臨床醫學上提供了光明的願景。於是從1961年後，一直持續不斷有重大的突破。如1963年，John Gurdon利用蛙類的胚胎所建立的一系列實驗；1981年，Martin Evans及Matthew Kaufman建立老鼠幹細胞；1997年轟動一時，由Ian Wilmut達成的“桃莉羊”複製；1998年由Jame Thomson建立的人類幹細胞；2006年由Shinya Yamanaka 從體細胞轉變成幹細胞，iPSCs (Induced Pluripotent Stem Cells)；2007年由Kazutoshi Takahashi建立的人類iPSCs；2008年，不同於iPSCs外送基因的方式，Douglas Melton利用不同的小分子藥物組合去誘發幹細胞產生；2009年，George Daley 和Kevin Eggan利用病人的體細胞轉變成幹細胞來用於疾病研究，開啟一個了對於遺傳疾病完全不同的研究方式。

上述這些研究中，最大的一個轉折點便是2006年的iPSCs 技術，因為它可以直接解決幹細胞來源所帶來的道德問題。由於幹細胞(尤其是pluripotent或totipotent等級)在這之前只能由胚胎取得，而人類胚胎來源更是帶來不小的質疑。Takahashi 與Yamanaka在眾多基因中篩選出了一個最好的組合(Oct4 (Octamer binding transcription factor-4), Sox2 (Sex determining region Y)-box2, Klf4 (Kruppel Like Factor-4) 及c-Myc)，植入體細胞中與增加表現量後，便誘發體細胞重新回到幹細胞的狀態及功能。除了上述這四個基因的組合外，其他研究學者也找到了不同的組合以適用不同的細胞來源，如加入了Nanog以及Lin28來取代Klf4與c-Myc (如下列表)。

Cell Types	Reprogramming factor	Reference
Fibroblast	OSKM*	<i>Cell</i> 126, 663, 2006
	OSLN	<i>Science</i> 318,1917, 2007
Keratinocytes	OSKM	<i>Nat. Biotechnol.</i> 26, 1276, 2008
Cord blood endothelial cells	OSLN	<i>Cell Stem Cell</i> 5, 434, 2009
Cord blood stem cells	OSKM	<i>Blood</i> 114, 5473, 2009
Neural stem cells	O	<i>Nature</i> 461, 649,2009
Melanocytes	OSKM	<i>J. Cell Sci.</i> 122, 3502, 2009
Amniotic cells	OSKM	<i>Cell Stem Cell</i> 4, 16, 2009
Adipose derived stem cells	OSKM	<i>PNAS</i> 107, 3558, 2010
Hepatocytes	OSKM	<i>Hepatology</i> 51, 1810, 2010
Circulating T cells	OSKM	<i>Cell Stem Cell</i> 7, 11, 2010
Astrocytes	OSKM	<i>PLoS ONE</i> 5:e15526, 2010
Peripheral blood	OSKM	<i>Stem Cells Dev.</i> 20, 159, 2011
Kidney mesangial cells	OSKM	<i>J. Am. Soc. Nephrol.</i> 22, 1213, 2011
Urine cells	OS	<i>Nat. Protoc.</i> 7, 2080, 2012

\*縮寫: O- Oct4; S- Sox2; K- Klf4; M- c-Myc; N- Nanog; L- Lin28

由於需要外送基因進入以分化的體細胞中，所以一般微脂體(liposome-based)的方式會造成轉染效率低下，甚至於造成細胞毒性，於是便採取病毒為載體的方式來進行轉染。然而，如需要一起送入四個基因加上適合的啟動子(promoter)，此時病毒載體對於質體大小的限制便是關鍵。綜合上述的限制，目前主要是利用逆轉錄病毒(retrovirus)、慢病毒(lentivirus)以及腺病毒(adenovirus)來達到目的。

除了直接外送四個基因進入細胞表現的方式外，2006年後，眾多研究也開始利用其他方式間接或直接地改變上述四個基因的功能，以達到iPSCs的效果。例如利用其他相關基因表現量的輔助，如LIN28、Nanog、Esrrb、Pax5、C/EBPa、p53、UTF1、DNMT、Wnt3a、SV40 LT(T)及hTERT，或者是直接用小分子藥物改變各基因的調控，如BIX-01294、BayK8644、RG108、AZA、dexamethasone、VPA、TSA、SAHA、PD025901 + CHIR99021(2i)、A-83-01。(相關所需藥物及抗體如下表)

Name	Catalog# (MCE)
BIX-01294	HY-10587
Bay-K-8644 (S), (R)	HY-15124, HY-15125
RG108	HY-13642
5-Azacytidine(AZA)	HY-10586
Dexamethasone	HY-14648
Valproic acid (VPA)	HY-10585
Trichostatin A (TSA)	HY-15144
Vorinostat (SAHA)	HY-10221
CHIR-99021	HY-10182
A 83-01	HY-10432



Name	Ca# (Arigo)
OCT4	ARG53393
SOX-2	ARG53588
KLF4	ARG55610
c-Myc	ARG62962
LIN28A	ARG54122
NANOG	ARG63818
ESRRBL1	ARG64902
PAX5	ARG53434
C/EBPa	ARG55641
P53	ARG10519
UTF1	ARG65194
DNMT1	ARG55201
WNT3	ARG63965
hTERT	ARG54933



在臨床醫學研究或製藥領域上，傳統的進行方式便是先建立動物模式(如最常使用的小鼠)，而後開始一系列的測試。然而，很多人類遺傳疾病在小鼠身上並不會發生，需要用其他方式誘導產生。就算小鼠本身會有相同疾病，其病程、位置、時間等等因素也跟人類不一樣。更別說測試藥品效應時，小鼠與人體的反應往往有不小的差異；再說到製藥後期的毒性測試，不同的動物模式(如小鼠與大鼠)之間、動物與人體的反應也相當的不同，這些因素皆會造成臨床試驗的失敗。在臨床試驗上，據估計約只有10%可以進到最後階段，而有30%在人體確效的部份便失敗，30%甚至在最一開始的安全性測試便宣告結束，這樣的高失敗率導致目前每個新藥的上市成本來到平均約12~17億美金之譜。

綜合上述的各項因素來看，從病人的體細胞所轉換而成的iPSCs便可以帶來相當多的好處。當病人的iPSCs開始分化成特定某一類細胞，如肌肉、神經、免疫細胞，到最後產生病變，這一整個過程的演進，就好像整個疾病的縮影。藉由這樣的重現，可以了解出錯的環結是哪一個步驟，也可以在不同的進程中測試未知藥物的效力。下表舉列了一些利用病人體細胞轉成的iPSCs所進行的研究。

Disease/dyndrome	Reference	Year
$\alpha$ 1-antitrypsin deficiency 甲型抗胰蛋白酵素缺乏症	<i>J. Clin. Invest.</i> 120, 3127	2010
ADA-SCID ADA嚴重複合型免疫缺乏症	<i>J. Clin. Invest.</i> 122, 2141	2012
ALS or Lou Gehrig' s disease肌萎縮性脊髓側索硬化症	<i>Acta Naturae</i> 6, 54	2014
Alzheimer disease阿茲海默症	<i>Nature</i> 482, 216	2012
BMD 貝克氏肌肉失養症	<i>Cell</i> 134, 887	2008
CCALD 兒童腦腎上腺腦白質營養不良	<i>Stem Cell Res. Ther.</i> 3, 39	2012
Downs syndrome/trisomy 21 唐氏症	<i>Cells Transl. Med.</i> 2, 175	2013
DMD 杜顯氏肌肉失養症	<i>Nat. Commun.</i> 4, 1549	2013
Dyskeratosis congenita	<i>Nature</i> 474, 399	2011
Familial dysautonomia (FD) or Riley-Day syndrome	<i>Phil. Trans. R. Soc. B.</i> 366, 2286	2011
Familial hypercholesterolemia家族性高膽固醇血症	<i>J. Clin. Invest.</i> 120, 3127	2010
Friedreich' s ataxia (FRDA) 瑞克氏運動失調症	<i>Cell Stem Cell</i> 7, 631	2010
Gaucher' s type III高雪氏症	<i>Cell</i> 134, 887	2008
Generation of human prostate and urinary tract cells	<i>Eur. Urol.</i> 64, 753	2013
Glycogen storage disease 1a人類第一型肝糖儲積症	<i>J. Clin. Invest.</i> 120, 3127	2010
Hemophilia A A型血友病	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 106, 808	2009
Huntington disease (HD) 亨丁頓舞蹈症	<i>Mol. Cell. Neurosci.</i> 56, 50	2013
Hutchinson-Gilford progeria syndrome早年衰老症候群	<i>Nature</i> 472, 221	2011
LEOPARD syndrome	<i>Nature</i> 465, 808	2010
Lesch-Nyhan syndrome (carrierstate) 尼氏乃罕症候群	<i>Cell</i> 134, 887	2008
Parkinson' s Disease 帕金森氏症	<i>Cell</i> 136, 964	2009
Rett' s syndrome雷特氏症	<i>Mol. Psychiatry</i> 17, 1261	2012
Shwachman-Bodian-Diamond syndrome (SBDS)	<i>Cell Stem Cell</i> 12, 727	2013
Spinal muscular atrophy脊髓肌肉萎縮症	<i>Nature</i> 457, 277	2009
Timothy' s syndrome	<i>Nature</i> 471, 230	2011
Type 1 diabetes mellitus (DM) 第一型糖尿病	<i>Ther. Adv. Endocrinol. Metab.</i> 2, 197	2011



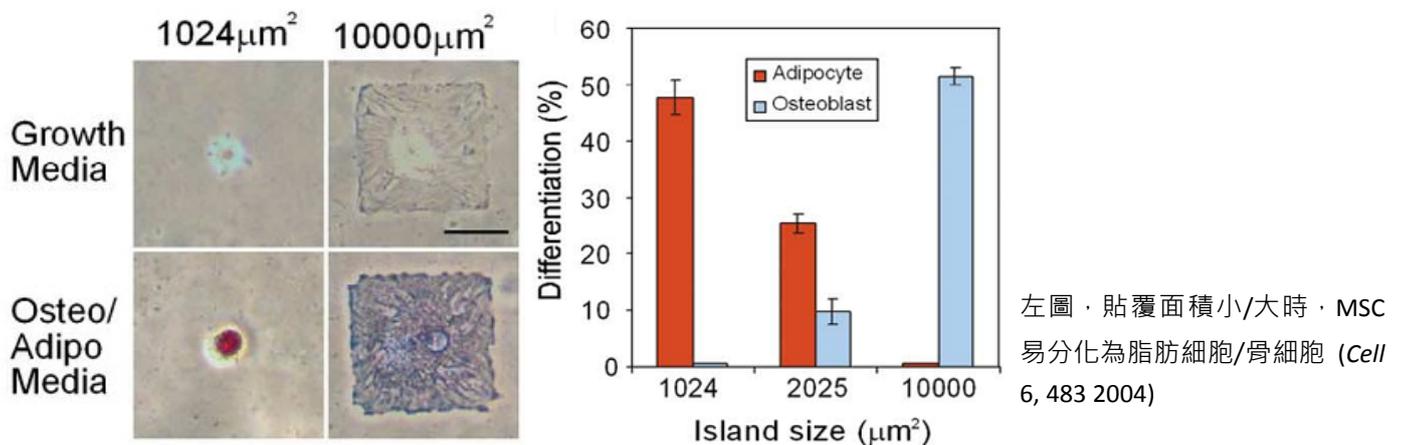
ViGene  
 全球最完整的premade adenovirus · 超過10,000種!  
 最完整的cDNA clones  
 提供Adenovirus · Lentivirus · AAV系統



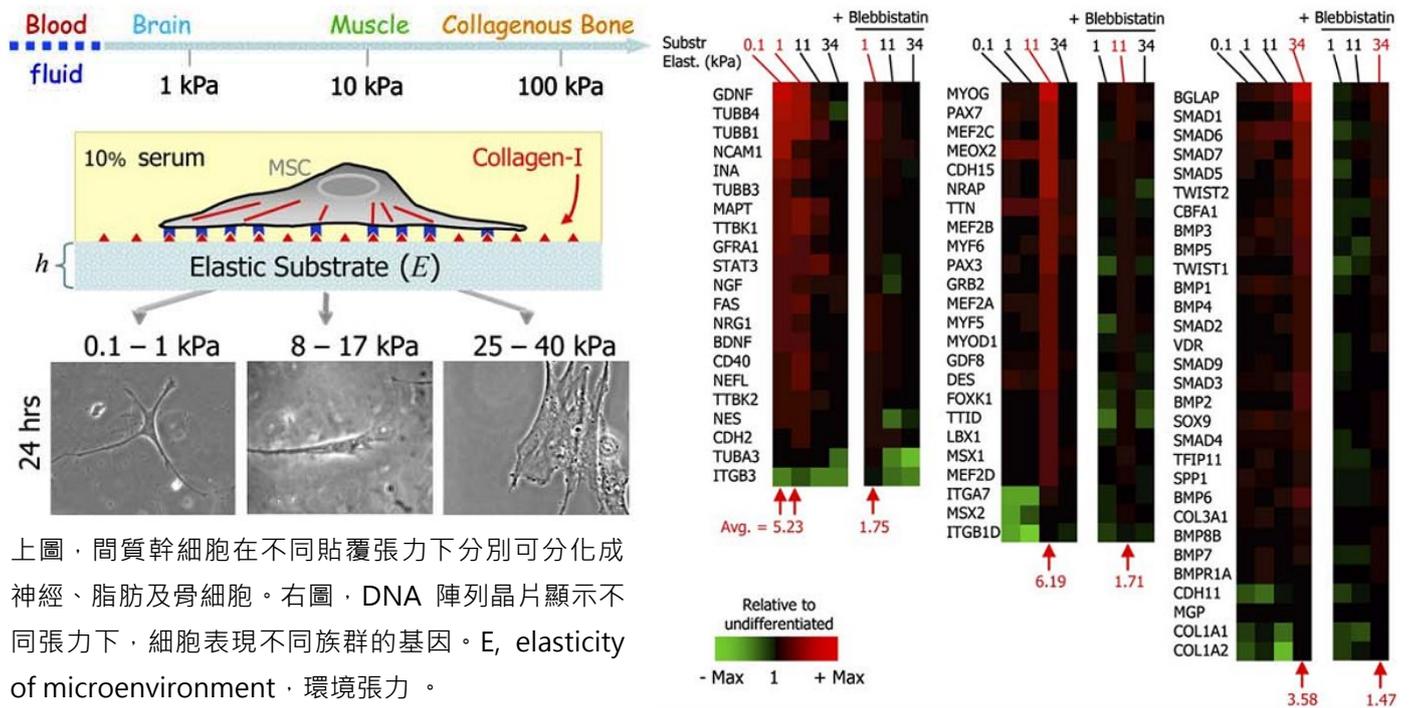
當然，iPSCs的使用也不是毫無極限與缺點，例如因為需要外送幾個發育上重要的基因進入，且常常採取病毒載體的途徑，往往會導致不預期的細胞癌化或病變，如Oct4導致上皮細胞發育不良 (*Cell* 121, 465, 2005)，Sox2誘導大腸癌發生 (*Int. J. Cancer* 122, 1253, 2008)，Klf4在乳癌發生中扮演重要角色 (*Cell Res.* 15, 92, 2005)，更別說已知c-Myc 參與了將近70%的癌症產生。下圖列表便將iPSCs在使用上的利弊作一比較。

	優點	缺點
iPSCs 特性	<ul style="list-style-type: none"> <li>無道德層面上爭議</li> <li>降低免疫排斥</li> <li>降低臨床試驗風險</li> <li>與疾病癥狀一致</li> <li>可以分化成各式細胞</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>細胞提早老化</li> <li>高比例細胞凋亡</li> <li>低效率DNA修復</li> <li>不容易重新分化</li> </ul>
iPSCs 延伸技術與發展	<ul style="list-style-type: none"> <li>持續提供可供研究的細胞</li> <li>提高細胞的保存性</li> <li>成為細胞株的可能性</li> <li>提供個人化研究及治療</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>基因嵌入造成突變</li> <li>可能造成癌化</li> <li>誘發iPSCs的方式不同造成後續研究時的限制</li> <li>各iPSCs無法標準化</li> </ul>
應用	<ul style="list-style-type: none"> <li>高通量藥物效力及毒性測試</li> <li>基因治療或其他臨床治療優勢</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>治療複雜疾病時可能會造成無法預期的副作用</li> </ul>

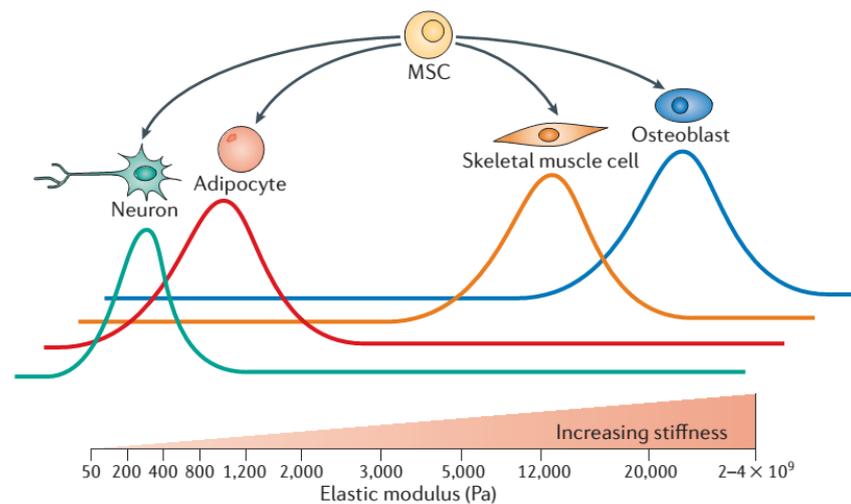
在iPSCs技術突破之前，幹細胞的來源通常都是由活體中取出，因此，間質幹細胞的使用與研究就相對於其他組織的幹細胞來的容易。間質幹細胞(Mesenchymal Stem Cell，簡稱MSC)主要來自於骨髓、週邊臍帶血或脂肪組織中，已知可以分化為脂肪、硬骨、軟骨、肌肉、以及神經等細胞，而這些分化的細胞對於再生醫學或醫療修補的應用上是相當的具有潛力。在眾多調控幹細胞分化成特定細胞的研究中，有幾篇有趣的論文提到了幹細胞的生長環境，尤其是貼覆的表面如何強力地介入分化的過程。如2004年，Rowena McBeath利用限縮細胞可以貼覆的面積，使得MSC只分化成脂肪或骨細胞(如下圖)，甚至於在給予適合的生長因子也無法逆轉貼覆面積帶來的影響。



而Adam J. Engler在2006年利用一系列不同的密度的膠體去模擬不同的貼覆張力，進而測試MSC的分化種類 (Cell 126, 677)，發現貼覆面所能提供的張力，直接影響幹細胞的分化。(如下圖)



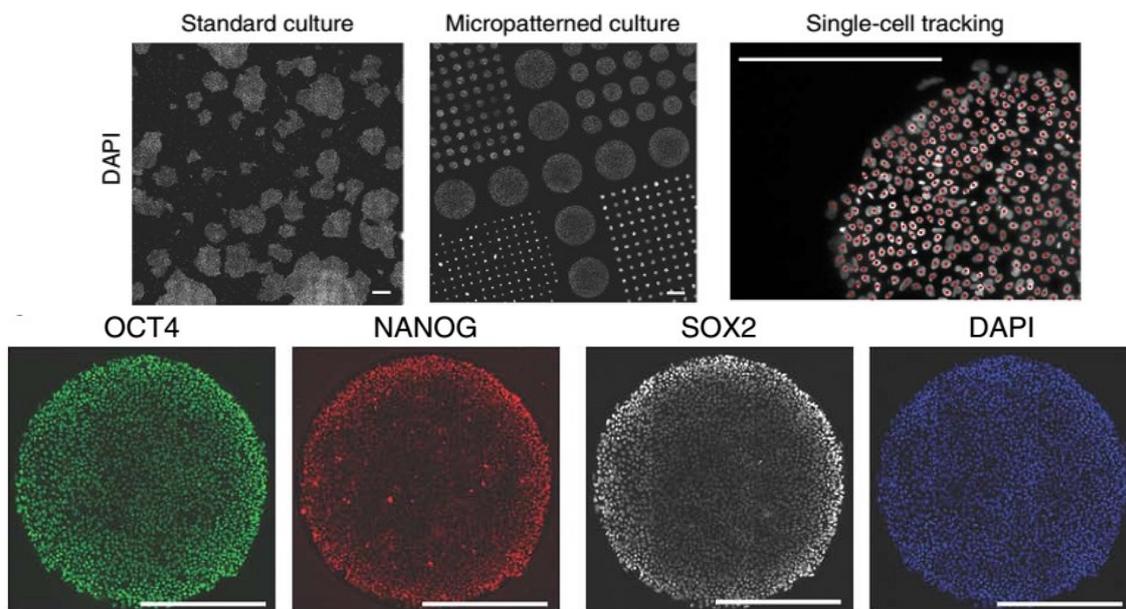
上圖，間質幹細胞在不同貼覆張力下分別可分化成神經、脂肪及骨細胞。右圖，DNA 陣列晶片顯示不同張力下，細胞表現不同族群的基因。E, elasticity of microenvironment，環境張力。



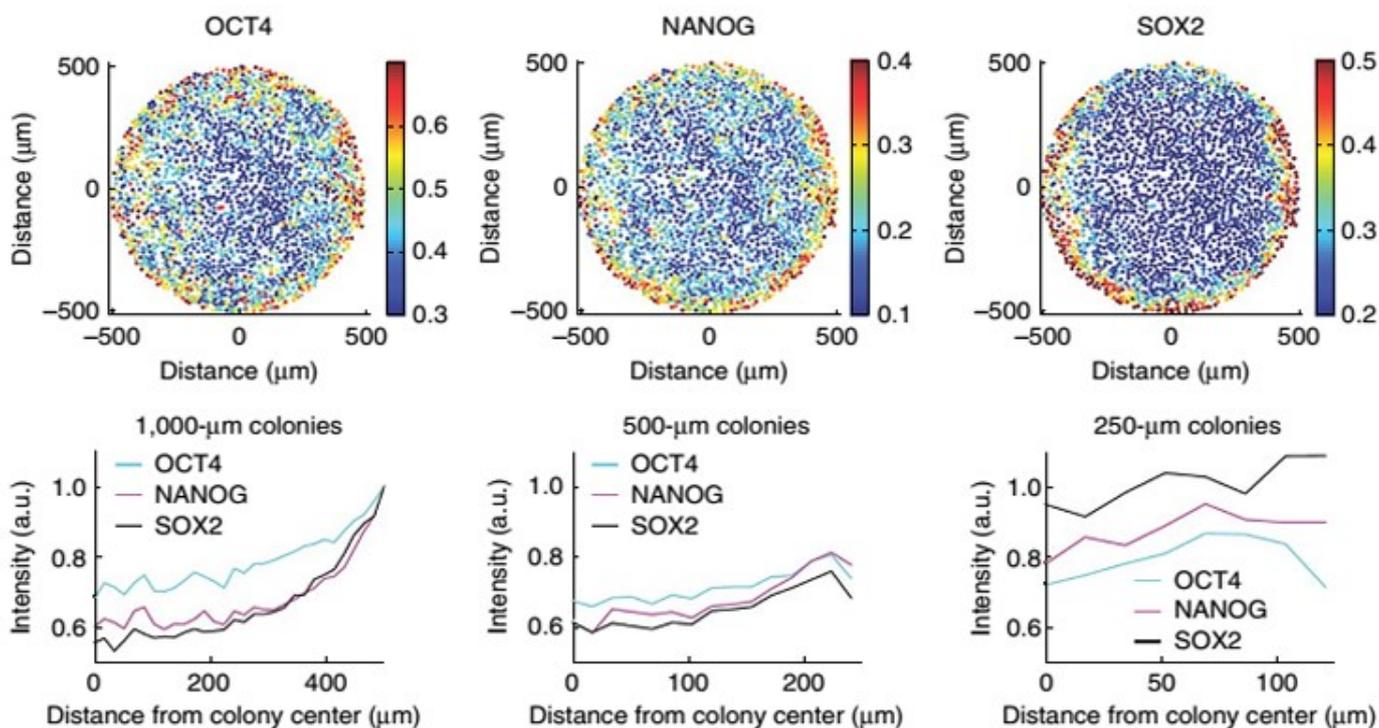
左圖，MSC 依據不同貼覆表面的張力分化成不同種類的細胞

Nature Reviews Molecular Cell Biology 13, 591 (2012)

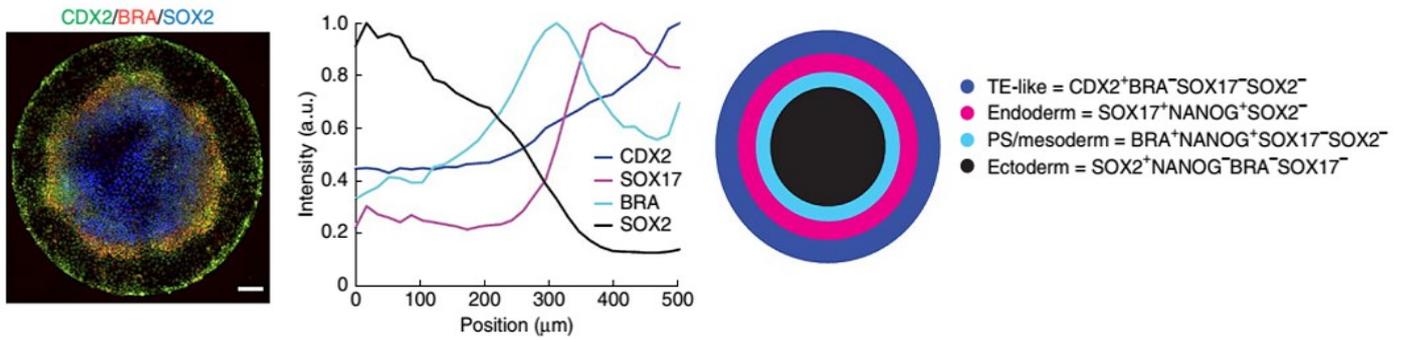
在發育過程中，依據所在位置、種類、特性以及最後形成的組織或器官，將細胞種類分為外胚層 (ectoderm)、中胚層 (mesoderm) 以及內胚層 (endoderm)。前面有提到，幹細胞會依據不同的分化能力而有等級上之分，而每個操作幹細胞實驗的研究者，無不希望自己手上的幹細胞可以分化成不同類型的細胞。所以在幹細胞培養過程中，以不同胚層的重要基因標示，可以進一步確認幹細胞保有的分化能力。在幹細胞未分化成最終目標細胞之前，還具有自我更新與分化能力時，容易長成對稱的球形結構 (sphere)，而這樣球形結構的大小於2014年時被Aryeh Warmflash等人發現跟將來的分化能力有密切相關。(如下面一系列的介紹)



左上圖，在一般培養平台上，幹細胞會容易長成大小不一的叢聚群。上中圖，當在陣列式的玻片上，限制其生長面積時，幹細胞長成球形對稱的聚合體。右上圖，球形對稱可利用不同的免疫染色去標定如外胚層的SOX2及早期中胚層的OCT4與NANOG (*Nature Methods* 11, 847, 2014)

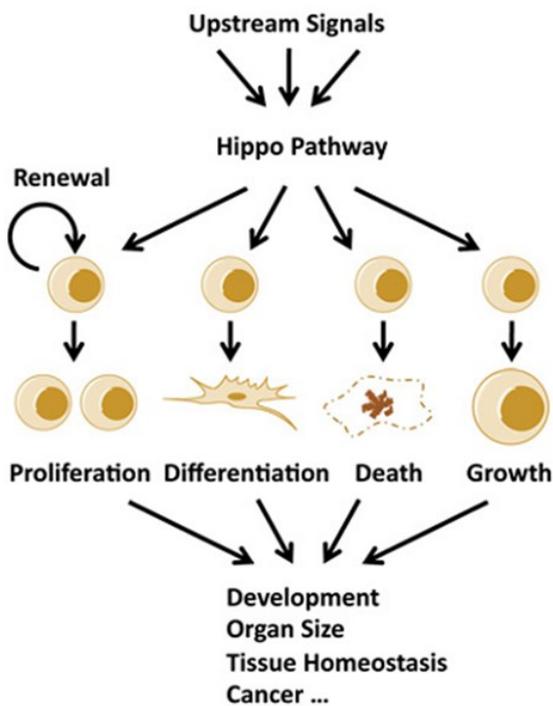


如上圖，分析三種不同球形大小的幹細胞群落，搭配胚層的標定染色。當小於250 mm 時，主要都會分化成外胚層細胞(SOX2<sup>+</sup>)；反之，當大於1000 mm 時，主要以中胚層的分化為主要(OCT4<sup>+</sup>)。介於中間的500 mm 大小，三個胚層的分佈比較均勻，未來的分化種類比較多元。

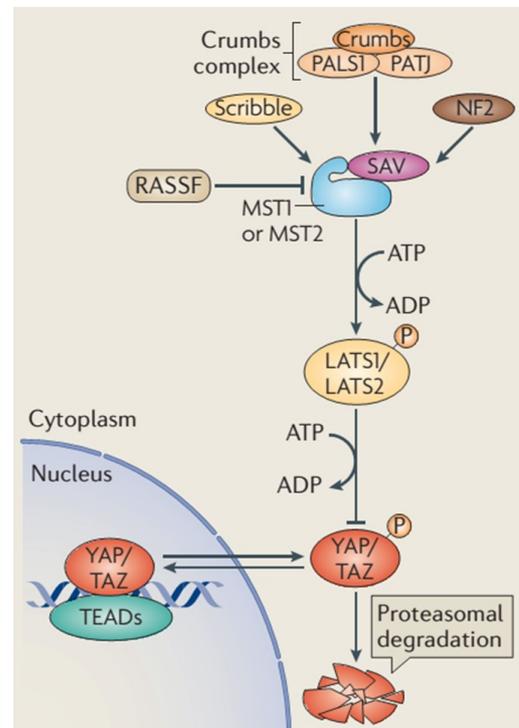


如上圖，500 μm 大小的幹細胞叢聚，經由42小時BMP2生長激素的刺激開始了分層的結構。搭配各胚層的標定染色，可分別長出外胚、中胚、內胚甚至於是滋養外胚層(Trophectoderm，TE)

前面幾個段落介紹了幹細胞的增生及分化與外在所接觸的環境，不管是物理性質(接觸面的張力)或是化學性質(如生長激素的刺激)，都有直接的關係，而這樣的關聯性讓我們不得不聯想到控制細胞大小的訊息傳遞途徑—Hippo pathway。從單一細胞的大小、形狀或運動、多細胞組織的特性到器官的大小，以及各個器官間尺寸的比例，皆與這個訊息傳遞鏈有關(如下左圖)。在Hippo pathway中，最終也最重要的轉錄因子便是YAP (Yes-associated protein)與TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif)，而調控YAP/TAZ的進出細胞核決定了特定基因表現與否(下右圖中簡介了於細胞質內如何調控YAP/TAZ的過程)。

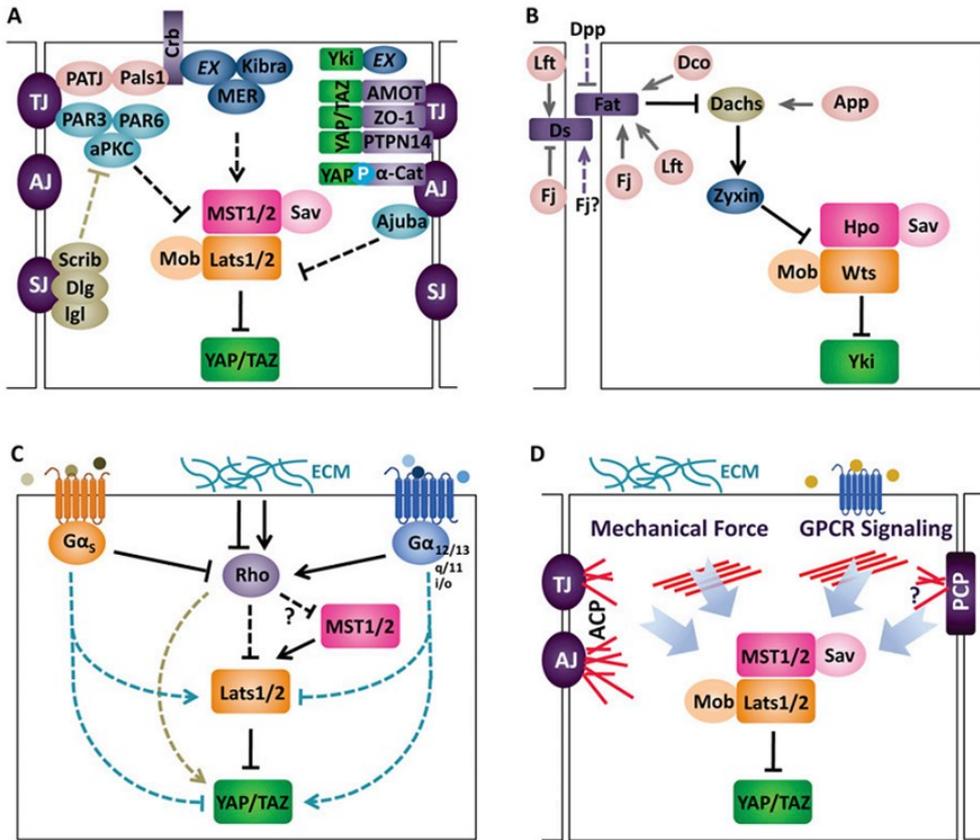


Gene & Development 27,355 2013



Nature Reviews Molecular Cell Biology 13, 591, 2012

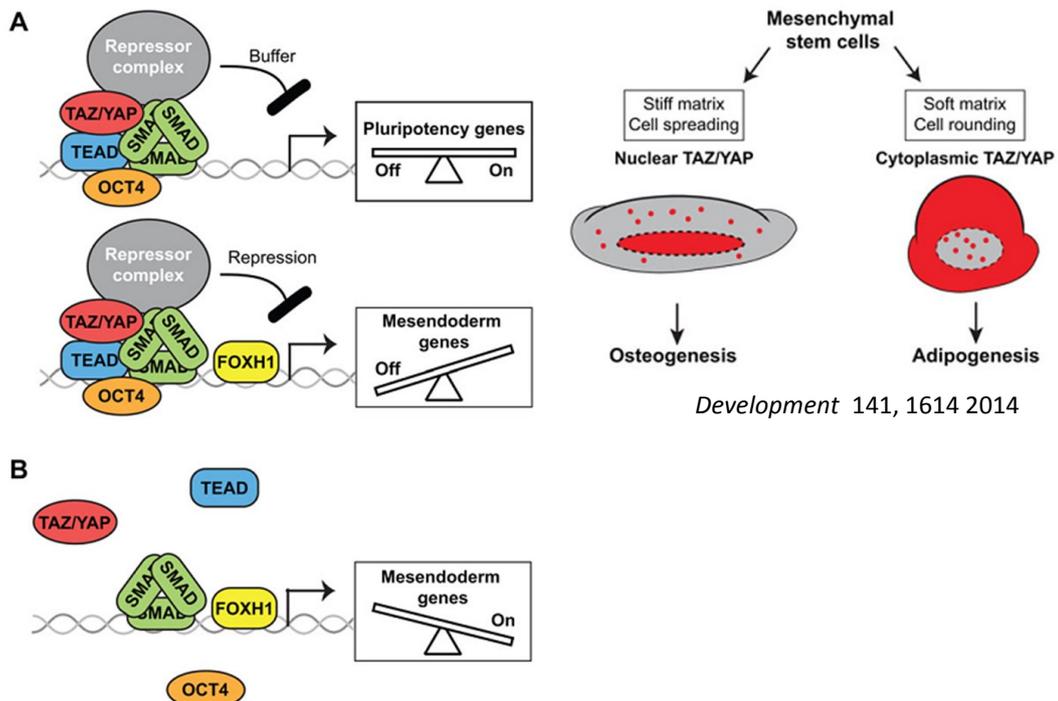
至於外界的訊息如何透過細胞外基質(ECM, extracellular matrix) 傳入細胞質內，雖然有些環節還是未清楚的，但目前認為主要由四大類蛋白質在做調節(如圖)



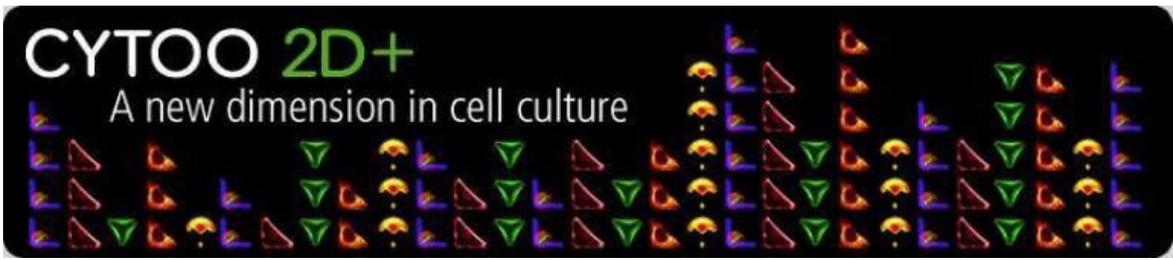
- A. 縱向細胞極性 (apical-basal polarity)
- B. 橫向細胞極性(planar cell polarity)
- C. GPCR 訊息傳遞
- D. 細胞骨架訊息

*Gene & Development* 27,355 2013

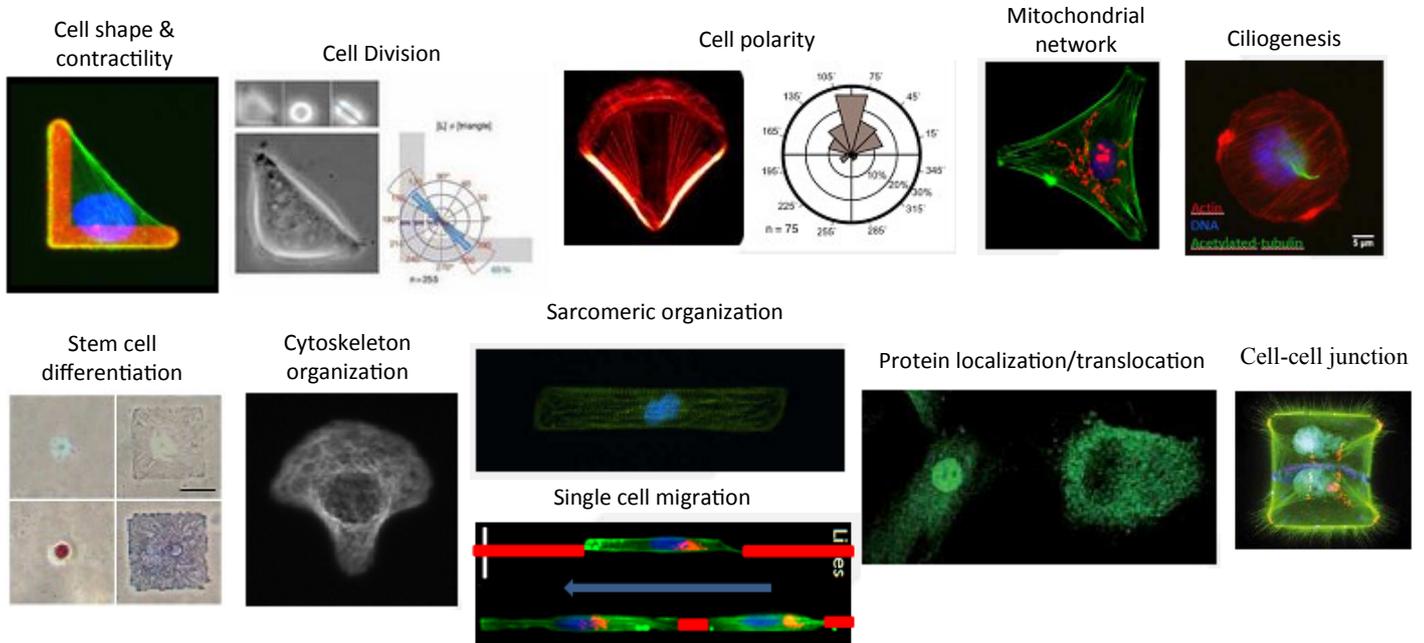
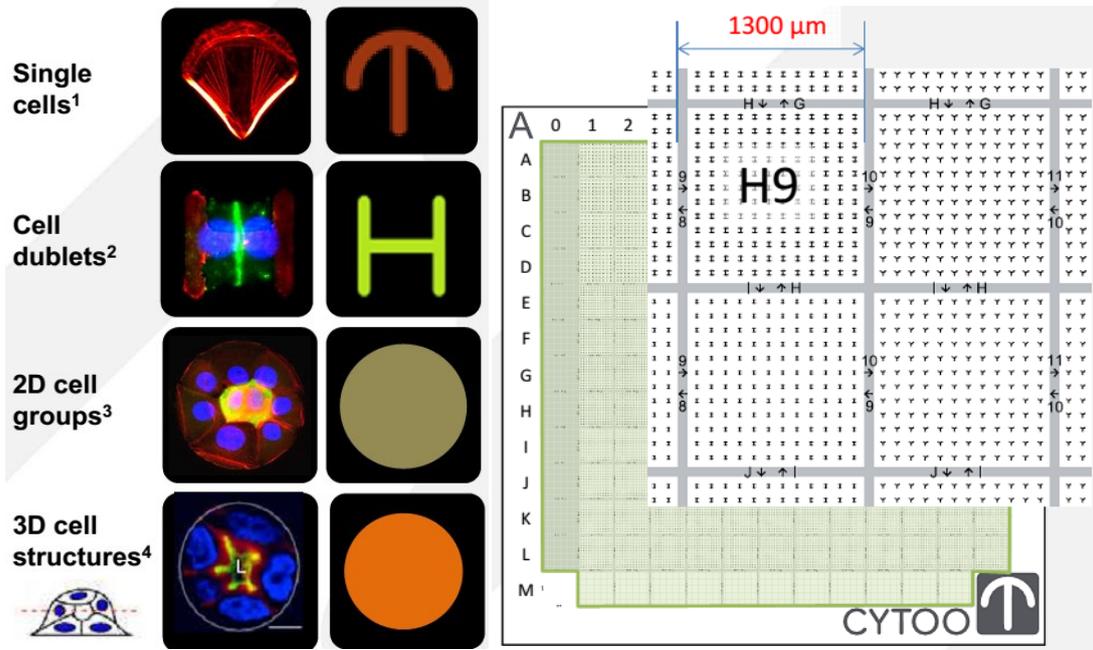
綜合ECM的訊號以及YAP/TAZ進出核調控基因表現，幹細胞便有了不同的分化走向(如下右圖)，源自於細胞核內轉錄因子的不同組合狀態(如下左圖)



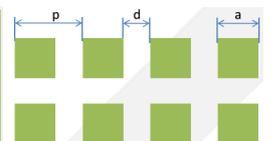
*Development* 141, 1614 2014



CYTOO 提供各種形狀大小細胞貼覆陣列玻片(包含客製化服務)·以供您做各類高通量實驗



Pattern	Area	Side, a	Pitch, p	Gap, d	Zone #
Square 17.3	300 $\mu\text{m}^2$	17.3 $\mu\text{m}$	87.3 $\mu\text{m}$	70 $\mu\text{m}$	1
Square 32	1024 $\mu\text{m}^2$	32 $\mu\text{m}$	102 $\mu\text{m}$	70 $\mu\text{m}$	2
Square 45	2025 $\mu\text{m}^2$	45 $\mu\text{m}$	115 $\mu\text{m}$	70 $\mu\text{m}$	3
Square 100	10000 $\mu\text{m}^2$	100 $\mu\text{m}$	170 $\mu\text{m}$	70 $\mu\text{m}$	4



**Alcian Blue Staining Kit**

**2% Alizarin Red Stain**

**Oil Red O Staining Kit**



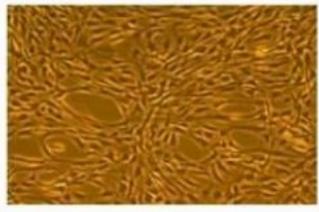
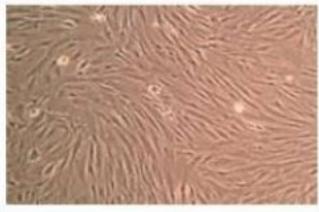
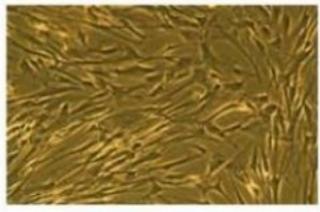
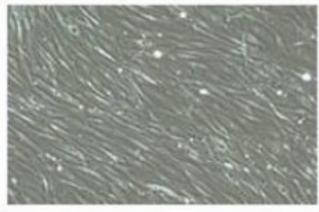
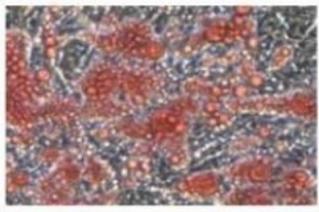
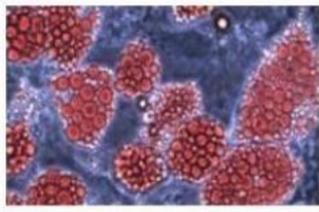
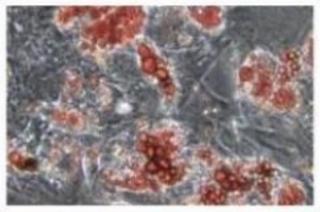
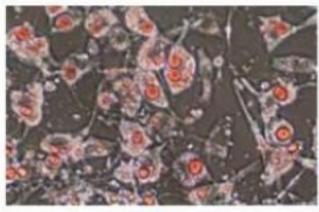
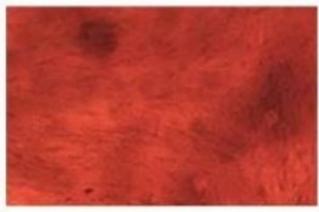
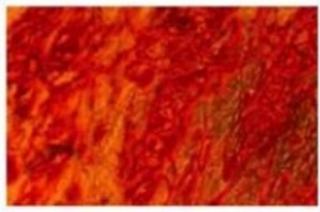
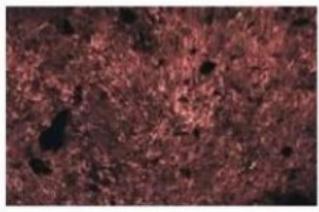
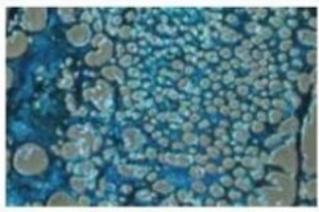
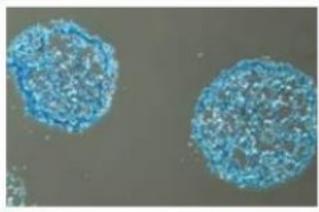
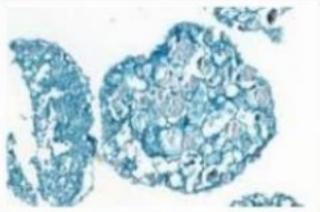
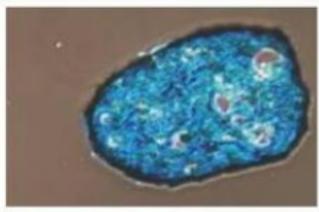
Chondrocytes



Osteocytes



Adipocytes Staining

	HMSC-Ad	HMSC-BM	HMSC-WJ	HMSC-Pre-Adipocyte
Undifferentiated				
Differentiated to Adipocytes				
Differentiated to Osteoblasts				
Differentiated to Chondrocytes				

Ad: adipose tissue; BM: bone marrow; WJ: Wharton's Jelly of umbilical cord

