

發明專利說明書

※申請案號：095100906

※IPC分類：

一、發明名稱：

多能嗅覺幹細胞

Pluripotent Olfactory Stem Cells

二、中文發明摘要：

本發明係揭露一種從鼻息肉組織培養多能動物幹細胞之方法，本發明亦揭露關於製造細胞及治療腦部損傷或促進腦血管新生、腦神經元新生、細胞回流至腦部及神經營養因子在腦部表現之方法。

三、英文發明摘要：

Disclosed is a cultured pluripotent animal cell that is prepared from nasal polyps. Also disclosed are methods for making the cell and methods of treating a brain tissue damage or of promoting cerebral angiogenesis, cerebral neurogenesis, stem cell homing to the brain, neurotrophic factor expression in the brain.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第()圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

[0001] 本發明係關於多能幹細胞組合物之製備，可用於治療多種退化性或遺傳性之疾病。

【先前技術】

[0002] 由於多能幹細胞可分化成不同的細胞系，故可用於治療多種退化性或遺傳性疾病。在各種多能幹細胞之中，胚胎幹細胞被認為具有上述之功能。然而，道德上的疑慮一直阻礙著人類胚胎幹細胞在研究及治療上之應用，而非胚胎之胚胎幹細胞則能夠規避此一障礙。此類非胚胎之多能幹細胞包括成人骨髓間葉幹細胞或基質幹細胞(Sanchez-Ramos *et al.*, 2000, *Exp. Neurol.*, 164(2): 247-256及Woodbruyet *et al.*, 2000, *J. Neurosci. Res.*, 61(4): 364-370)及臍帶血幹細胞(Galvin-Partonet *et al.*, 2003, *Pediatr. Transplant.* 2003; 7(2): 83-85及Haet *et al.*, 2001 *Neuroreport.*, 2(16): 3523-3527)。然而，由於體外擴增之需求及人類白血球抗原配對的條件，限制了這些細胞在臨床上的應用，因此，需要另一種多能細胞。

【發明內容】

[0003] 本發明至少某程度上係以以下之非預期發現為基礎：(i)原始細胞可自動物的鼻息肉製備出來；(ii)這些細胞可分化成不同的細胞系，包括：嗅神經包被細胞及嗅神經纖維母細胞；(iii)移植嗅神經原始細胞、嗅神經包被細胞及嗅神經纖維母細胞可促進腦血管新生、腦神經元新生、幹細胞回流至腦部或神經營養因子在腦部之表現。

[0004] 據此，本發明一方面係以一種製備多能幹細胞組合物的方法為特徵，其係藉由下列步驟完成：(i)從動物鼻息肉獲取一組織，不論是人類或非人類的動物；(ii)在允許細胞遷移的條件下培養組織；(iii)收集由從培養組織遷移之細胞，以獲得一多能幹細胞組合物。而收集到的細胞主要為p75⁺，S100⁺及GFAP⁺，這些分離出來的細胞可分化成嗅神經包被細胞及嗅神經纖維母細胞，因此被命名為嗅覺幹細胞或嗅神經包被原始細胞。

- [0005] 本發明亦提供一種由前述方法所製備之多能幹細胞組合物。該細胞組合物係可包含嗅神經包被原始細胞/幹細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞。前述三種細胞皆可分化成神經及血管組織，因此，可用於治療腦部組織損傷。
- [0006] 因此，本發明另一方面係以一治療腦部組織損傷的方法為特徵，其係藉由顱內施予需治療之個體(可為人類或非人類之動物)一有效量之細胞組合物，該組合物係包含嗅神經包被原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞。前述之腦部組織損傷係因腦缺血或神經退化性疾病(如：阿茲海默症、癲癇症、亨丁頓舞蹈症、巴金森氏症或脊髓小腦症)所致。而嗅神經包被原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞除可藉由上述之製備方法自動物鼻息肉中培養出來，亦可根據習知技術予以製備。至於移植至個體的細胞係可為個體之同源細胞或異源細胞。
- [0007] 名詞「治療」係指施予個體一組合物，該個體係有腦部之損傷或可能發展為腦部損傷之高危群或因腦部損傷而導致身體機能異常。治療的目的係為治癒、減輕、解除、治療、預防或改善上述腦部之損傷或異常、損傷或異常所致之症狀、異常或損傷後之疾病狀態或易於造成損傷、異常之患病體質。名詞「有效量」係指可立即產生預期療效之組合物的量，例如前述對個體可產生之效果，而前述治療方法可單獨使用或與其他藥物或療法併用。
- [0008] 上述提及之嗅神經包被原始細胞、嗅神經包被細胞及嗅神經纖維母細胞係可自顱內施予需治療之個體一有效量之細胞組合物，以促進腦血管新生、腦神經元新生、幹細胞回流至腦部或神經營養因子在腦部之表現，而該個體可能有腦組織之損傷。
- [0009] 為促進腦血管新生，前述方法可進一步包含測量個體在施予前述組合物前後，其腦血管元新生之程度，以確認該組合物對促進腦血管新生之效果，該測量方法則可藉由標準腦部造影技術進行之，例如：電腦斷層掃描(CT)、杜卜勒超音波影像技術(DUI)、核磁共振造影技術(MRI)及氫質子核磁共振頻譜(¹H-MRS)。為促進腦神經元新生，可藉由測量個體在施予前述組合物前後，其腦神經元新生之情況，以確認該組合物對促進腦神經元新生之效果；而該測量方法，例如可包括以下各個實施例所述之標準神經行為測量法(standard neurological behavioral measurement)。為增加神經營養因子(SDF-1、BDNF、GDNF、NGF、TGF-β、FGF-II、VEGF)的含量，該治療方法進一步包含測量個體在施予前述組合物前後，其腦部神經營養因子含量增加之情況，以確認該組合物對增進神經營養因子之效果。
- [0010] 關於本發明之一個或多個實施態樣的細節，將於以下敘述中加以說明，而本發明之其他特徵、目的及優點將於以下之實施方式及申請專利範圍中予以顯現。
- 【實施方式】**
- [0011] 本發明係關於經分離或經培養之嗅神經幹細胞/包被原始細胞，這些多能細胞具有可分化成多種細胞系之潛能，且具有纖維母細胞及星狀細胞之表現型特徵，該培養細胞主要為紡錘形。前述大多數的細胞會共同表現p75/GFAP、75/S100、膠質纖維酸性蛋白/纖維連接蛋白(GFAP/fibronectin)或GFAP/S100，且會表現及分泌SDF-1、G-CSF、CXCR4、SCF、c-kit及G-CSF-R。
- [0012] 前述多能幹細胞係分離自鼻息肉組織，該組織係為由動物鼻竇內層過度生長所產生之膠狀組織，其培養方法可依據以下實施例一所描述之方法或該領域習知技術中類似之方法進行之。其中，可將細胞培養於DMEM/F12培養基之中，該培養基含有B27培養基添加劑、10%胎牛血清(FCS)及1%青黴素/鏈黴素(100 U/ml)，並可進一步利用習知技術中任何適當的細胞分離技術以豐富細胞的抗原性(antigenicity)及型態。為快速增加細胞數量，可利用螢光活化細胞分選系統(Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)，例如，anti-p75、膠質纖維酸性蛋白(GFAP)、S100或連結不同螢光標誌物的纖維連接蛋白單株抗體皆可用於豐富細胞數量。
- [0013] 測試前述細胞的「多能性」，可利用任何適當的體內或體外培養方法為之。舉例而言，可將幹細胞移植至脊椎傳導完全受損的鼠體模型中，並利用以下實施例一所述之方法，測試經辣根過氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)所標定之皮質脊髓徑(corticospinal tract)或後肢的功能；或者，亦可依實施例五所述之方法，檢測移植至動物的腦部的幹細胞是否能分化成神經元、神經膠質細胞或血管膠質細胞。經確認後，前述幹細胞即可多方面應用，包括治療退化性疾病；而且，由於這些幹細胞非源自胚胎細胞(如：體細胞)，則在人類胚胎的操作上，即可摒除道德上之疑慮。
- [0014] 上述之方法可用於製備嗅神經包被細胞(OECs)，傳統上，嗅神經包被細胞是一種獨特的神經膠質細胞群，係為分離自前腦的嗅球的過度生長物。該生長物由嗅神經末端的球狀擴增物所組成，其係位於大腦半球額葉的下表面、鼻腔的上方。在嗅球中，嗅神經包被細胞先

被嗅覺受器神經元所形成的軸突所包覆，而嗅神經包被細胞亦會引導新形成的軸突的生長及其藉由突觸從鼻腔到中樞神經與嗅神經相連。因為，嗅神經包被細胞具備此種引導能力，故在實驗過程中，常利用老鼠的嗅神經包被細胞來修補動物損傷的髓鞘及脊髓。然而，即使並非不可能達到前述療效，但該細胞在人體的臨床應用上的確受到限制。事實上，由於嗅神經包被細胞位於中樞神經系統，要從嗅球中分離出嗅神經包被細胞本身就是個令人望之卻步的難題，同時，也容易損及嗅覺系統或腦部。因此，在老鼠實驗中，係以鼻黏膜的固有層作為嗅神經包被細胞的替代來源。

- [0015] 本發明之方法係從鼻息肉製備嗅神經包被細胞，此方法較易達成，故用以作為嗅神經包被細胞的實際來源。藉由此方法所製備的嗅神經包被細胞具有修補脊髓損傷或分化成神經元、神經膠質細胞或血管內皮細胞的能力。並可利用適當方法，包括實施例一至五所述之方法，去確認細胞的潛能。
- [0016] 如同包被原始細胞及嗅神經纖維母細胞，亦可藉由標準方法將經確認功能的嗅神經包被細胞予以儲存，而自顱內將嗅神經包被細胞提施予給有需要的個體。
- [0017] 本發明的範圍係為一種治療個體腦組織損傷或改善腦部損傷症狀所造成的失調現象的方法。前述方法包括確認一個體已為或可能為發展中之腦組織損傷的高危險群。該個體可為人類或非人類之哺乳動物，如：貓、狗或馬。而腦組織受損的例子則可包含腦部缺血（如：慢性中風）或神經退化性疾病（如：巴金森氏症、阿茲海默症、脊髓小腦症或亨丁頓舞蹈症）所致者。接受治療的個體係可藉由標準技術來診斷其病症及異常，而治療方法則必須施予需要接受治療個體一有效量之前述包被原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞。一般而言，係施予個體 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$ 個細胞。雖然有多個部位可施予幹細胞治療，但施予部位視部位的本質及是否有特殊的損傷而定。以下實施例三所述大約符合對缺血的老鼠模型施予幹細胞治療的過程，至於其他物種的其他異常之治療則需藉由比較解剖學進行瞭解。
- [0018] 依以下實施例三~九所述，可依標準方法達到幹細胞的療效。為確認其促進腦血管新生之療效，可利用標準的腦部顯影技術，例如：電腦斷層掃描(CT)、杜卜勒氏超音波顯影、(DUI)、核磁共振造影(MRI)及氫質子磁共振頻譜($^1\text{H-MRS}$)來檢測個體在接受治療前後的差異。舉例來說， $^1\text{H-MRS}$ 代表一種獲取關於腦部代謝活動的生化資訊之非侵入性方法(Lu et al., 1997, Magn. Reson. Med. 37, 18-23)。此種技術可應用於評估涉及經細胞移植或未經細胞移植之腦缺血個體的代謝變化。例如，其可用於研究腦內N-乙醯天門冬胺酸(N-acetylaspartate)濃度之變化，以作為評估神經元功能完整性之標誌。雖然神經元碎片的再分配與trapping限制了N-乙醯天門冬胺酸作為定量神經元標誌的用途，但缺血腦部中N-乙醯天門冬胺酸的降低仍可做為神經元消失或功能障礙的指標(Demougeot et al., 2004, J. Neurochem. 90, 776-83)。
- [0019] 此外，可藉由測量動物在施予嗅覺幹細胞治療前後的神經元標記、血管標記、神經膠質標記、滋養因子或樣本中(如：腦脊髓液)的細胞死亡相關蛋白的表現量，以確認療效。而前述之表現量則取決於mRNA或蛋白質的含量而定，至於測量組織樣本或體液中mRNA含量的方法係為同領域中所熟知的技術。為了測量mRNA的含量，可將純化或未純化之細胞溶解後，以雜交分析(利用可偵測之標記基因特異性DNA或RNA探針)及定量或半定量的反轉錄聚合酶連鎖反應(利用適當的基因特異性引子)進行分析。或者，亦可利用定量或半定量的原位雜交技術來分析組織切片或利用可偵測的(如：螢光或酵素)標記基因特異性DNA或RNA探針來分析未溶解的細胞懸浮液中mRNA的含量。另外的mRNA定量方法還包括核糖核酸酶保護分析法(Ribonuclease Protection Assay, RPA)及基因表達序列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)等以分析為基礎的技術。
- [0020] 而測量組織樣本或體液中蛋白質含量的方法亦為同領域中所熟知的技術。其中某些方法係運用特異性地結合至標的蛋白的抗體(如：單株或多株抗體)來完成。在此種分析方法中，當抗體或二次抗體結合至標的蛋白時，可以偵測到已被標記。或者，前述抗體可以與生物素結合。此種情況可由可被偵測到已被標記的親合素(一種結合至生物素的多肽)的存在而定。這些方法的合併使用(包括「多層三明治」分析法)，即可用以提升方法學上的敏感度。某些測量蛋白質的方法(如：酵素連結免疫吸附分析法或西方墨點法)可應用於體液或細胞溶解物的分析，而其他方法(例如：免疫組織化學方法或螢光流式細胞術)則可用於組織切片或未溶解的細胞懸浮物的分析。至於適當的標誌物則包括利用放射核素(例如： ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 或 ^{32}P)、酵素(如：鹼性磷酸酶、辣根過氧化酶、螢光酶或 β -半乳糖苷酶)、螢光/發光劑(如：螢光素、若丹明、藻紅素、綠色螢光蛋白、藍色螢光蛋白及由Quantum Dot Corporation、Palo Alto, CA所供應之Qdot^{T M} 奈米微粒)。其他可運用之方法還包括定量免疫沉澱法(quantitative immunoprecipitation)或補體結合分

析法(complement fixation assay)。

- [0021] 利用上述分析之結果，可決定適當的幹細胞劑量範圍及投與途徑。劑量取決於投與途徑、配方的本質(the nature of the formulation)、患者疾病的本質、個體的體型大小、體重、表面積、年齡、性別、其他藥物的給藥狀況及醫生的判斷等。劑量的改變必須考量不同的投與方式所能達到的效能而定，至於如何變化則可有效運用此領域中的熟知的實驗途徑。例如：經由顱內施予個體的劑量是 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$ /次，較佳劑量是 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ /次，更佳劑量是 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ /次。而為了避免或將宿主排斥的可能性降到最低，最好是利用個體自體移植的方式。
- [0022] 異體或自體移植嗅神經原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞皆可運用。就前者而言，利用人類白血球抗原配對(HLA matching)可避免或將宿主產生排斥反應的可能性降到最低；就後者而言，則可自待治療個體體內純化出自體細胞，儲存後後可加以利用。
- [0023] 以下提供的特殊實施例僅在闡明本發明，並非以任何方式限制所揭露的其他部分。縱無進一步之闡述，該領域熟習此技藝之人士亦可根據此處之說明而充分實施本發明。在此引用的發表資料均完整地收錄於參考文獻中。進一步來說，以下所提出之方法任何並不能用於限制本發明之申請專利範圍。
- [0024] 從鼻息肉的外科取樣中製備人類嗅神經原始細胞、嗅神經包被細胞及嗅神經纖維母細胞。
- [0025] 取得人類鼻息肉樣本(5mm^3 , 1克重)後，將其收集於裝有Hanks鹽類平衡溶液(Hanks balanced salt solution, HBSS; Gibco/BRL)的盒內；取樣的流程經過慈濟大學醫院內的人體試驗委員會(Institutional Review Board)的認可，亦已取得受試患者的書面同意。
- [0026] 在解剖顯微鏡下，將每個鼻息肉樣本分切成小片，於室溫下將其置於磷酸鹽緩衝液中。二十四小時內，在將前述鼻息肉樣本移至含有胰蛋白酶(trypsin)及乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)的10ml Dulbecco改良細胞培養液(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)/F12培養基前，先以解剖刀將組織切片磨碎，將此最終混合物於 37°C 的水浴下，培養五分鐘。前述磨碎的組織先以DMEM/F12溶液進行漂洗，再以火焰拋光的巴斯德吸管吸取組織，將其收集後以 600g 離心十分鐘。再將形成小丸的終產物再懸浮於含有B27培養基添加劑、10%胎牛血清(FCS)及1%青黴素/鏈黴素($100\text{U}/\text{ml}$)的DMEM/F12培養基($300,000 \text{ cell}/\text{ml}$)。將前述再懸浮組織樣本置於表面覆有多聚賴氨酸(Poly-L-Lysine)的燒瓶內(75cm^2)，在 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 的環境下進行培養，五到七天後，將細胞自樣本中分離移出。一個星期重複一次上述步驟，直到三至四星期，可發現細胞慢慢地散開而附著於燒瓶表面。而其中主要的細胞型態為紡垂型，兩端扁平如纖維母細胞狀或類似星狀細胞。
- [0027] 細胞的免疫組織化學研究係使用不同的抗體來進行，包括特異結合至低親合性神經生長因子受器(p75, 1:100, Chemicon)、膠質纖維酸性蛋白(GFAP, 1:1200, Sigma)、纖維連接蛋白(FN, 1:1000, Molecular Probe)、S100(1:1000, Dako)、少突膠質細胞標誌4(O4, 1:100, Chemicon)、基質細胞衍生因子1(SDF-1, 1:200, R&D)、CXC受器 type 4(CXCR4, 1:100, Chemicon)、粒細胞集落刺激因子(G-CSF, 1:100, Abcam)、粒細胞集落刺激因子受器(G-CSF-R, 1:100, Novus)、幹細胞因子(SCF, 1:200)、anti-c-Kit(1:300)、神經絲蛋白-200(NF-200, 1:300, Sigma)、 β III-微管蛋白(Tuj-1, 1:200, Chemicon)、微管相關蛋白質-2(MAP-2, 1:300, BM)或神經元核(Neu-N, 1:300, Chemicon)。將前述細胞置於表面覆有多聚賴氨酸的玻璃片，以標準密度，使其在 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 的環境下生長二十四小時。並以一種改良方法將這些細胞群的抗原性予以定量(Edmund, 2003, *Glia*. 41: 224-236)。之後，利用紫外光濾片，在200倍的放大倍數下，任選一個視野進行觀察，並以Spot digital camera(Diagnostic Instruments)及Northern Eclipse 5.0 software(Empix Imaging)進行影像的捕捉及評估。
- [0028] 此種免疫組織化學分析顯示多數細胞會共同表現p75/GFAP、p75/S100、膠質纖維酸性蛋白/纖維連接蛋白或GFAP/S100，而S100、p75及GFAP的細胞表現率分別是 $94\% \pm 2.8\%$ 、 $95\% \pm 3.3\%$ 及 $70\% \pm 2.1\%$ 。
- [0029] 為了確認這些細胞的修補能力，將一個細胞的等量樣本(aliquot)移植到脊髓受損、完全橫斷的老鼠模型。更明確來說，係將作為實驗模型的老鼠分成三個群組，先讓實驗群組的每隻老鼠都利用標準方法接受上述第八胸椎(T8 level)脊髓細胞的移植，而其他兩個對照組的老鼠則接受一種培養基或不接受任何細胞或培養基。八個星期後，將辣根過氧化酶注射到老鼠的運動皮質區(motor cortex)，並進行正向神經路徑追蹤之研究(anterograde tracing study)。兩天後，收集脊髓並加以檢測，發現被根過氧化酶所標定的皮質脊髓徑(CST)跨越了脊髓橫斷的位置及尾端。這些皮質脊髓徑的纖維拓展至腰脊髓且大部分可在

脊髓白質觀察到這些現象。雖然在脊髓的近端殘枝(proximal stump)可發現被標定的纖維，但在另外兩組控制組老鼠脊髓橫斷的位置以下，並未發現被根過氧化酶所標定的纖維。

- [0030] 老鼠後肢的功能也在血腦障壁的評估範圍之內(BBB scale)。在統計上，與其他兩個對照組相較，實驗組老鼠在幹細胞移植後三星期，其後肢的功能有明顯的改善，此種差異持續發生並在八週後益發明顯。免疫組織化學分析同時也確認了移植人類細胞、髓鞘的形成及沿著髓鞘生成的軸突的存在。
- [0031] 非預期地，實驗也發現從鼻息肉製備出來的細胞亦可成功移植到不同物種，且在不需使用任何免疫抑制藥物的情況下，可比傳統嗅神經包被細胞存活更久的時間。例如：在Lakatos 2003中描述到嗅神經包被細胞僅可存活2-10天(Lakatos A, Brain 2003; 126: 598-609)。並且，相較於老鼠的嗅球嗅神經包被細胞，以鼻息肉製備出來的細胞移植治療後亦可達到恢復較佳後肢運動功能的效果(BBB scale about 11)。這些結果暗示利用前述方法，從鼻息肉製備出來的細胞可能含有嗅球嗅神經包被原始細胞，並且擁有傳統自嗅球製備出來的嗅神經包被細胞的再生能力。
- [0032] 以雙免疫螢光染色來檢測SDF-1、G-CSF之表現，以及利用上述方法所製備之細胞的受器CXCR4與G-CSF-R的表現。其中，發現前述細胞可共同表現以下的蛋白對(pair of proteins)：SDF-1與GFAP、SDF-1與p75、CXCR4與GFAP、CXCR4與p75、G-CSF與GFAP、G-CSF與p75、G-CSF-R與GFAP、G-CSF-R與p75、SCF與GFAP、SCF與p75、c-kit與GFAP及c-kit與p75。
- [0033] 亦可在進行缺氧-復氧處理後，以西方墨點法檢測SDF-1、G-CSF、CXCR4與G-CSF-R在上述細胞內的表現。簡言之，將細胞置於37°C的缺氧腔室內十二小時(Bug Box, Ruskinn Technology, UK)，並對腔室持續灌注95%N₂-5%O₂，以維持一個PO₂<1mmHg的氣相環境(OM-14 oxygen monitor; Sensor Medics Corporation, Yorba Linda, CA)。經缺氧處理後，將前述細胞再放回37°C的常氧培養箱(95% air-5% O₂)分別進行不同時間(三十分鐘、一小時、四小時、十二小時、二十四小時及四十八小時)的復氧處理。在每個時間點收集細胞樣本並將其儲存於-80°C的環境下。為進行西方墨點法，需將細胞溶解於含320mM蔗糖、5mM HEPES、1μg/ml亮抑酶肽(leupeptin)及1μg/ml抑胰肽酶(aprotinin)。再將細胞溶解物以13,000g離心十五分鐘。之後，將其置於一緩衝液中(含62.5mM Tris-HCL、10%甘油、2% SDS、0.1%溴酚藍及50mM DTT)，再進行聚丙烯醯胺凝膠(4%~12%)電泳(SDS polyacrylamide electrophoresis)。然後再與適當稀釋抗體：SDF-1(1:200, R&D)、CXCR4(1:100, Chemicon)、SCF(1:200)、c-Kit(1:300)、G-CSF(1:100, Abcam)、G-CSF-R(1:100, Novus)、activated Akt(1:200, Calbiochem)、activated ERK1/2(1:200, Santa-Cruz)、activated p38(1:200, Santa-Cruz)、activated JNK(1:200, Santa-Cruz)或β-肌動蛋白(1:2000, Santa-Cruz)共同培養之後，將蛋白質移到Hybond-P的尼龍膜上。再按計畫進行membrane blocking、初次與二次抗體的培育及化學發光反應，而各個偵測帶的強度則以Kodak Digital Science 1D Image Analysis System(Eastman Kodak, Rochester, NY)予以定量。同時，可發現與未經缺氧-復氧處理的細胞(控制組)相較之下，在經處理後的四小時，SDF-1、CXCR4、G-CSF、G-CSF-R、SCF或c-Kit的蛋白質含量會隨著時間的經過而增加。
- [0034] 並且，相對於控制組，p-Akt及p-ERK1/2肌動蛋白的比值，可達到約兩倍的巔峰值，但並未顯示出經缺氧-復氧處理的細胞與未經處理的控制組細胞間，p38及JNK的顯著差異。
- [0035] 除了經過特殊的ERK1/2 pathway inhibitor wortmannin PD98059(10 μM, Cell Signaling Technology, Inc.)及Akt pathway inhibitor wortmannin或LY294002(10nM, Calbiochem)的前處理，需重複進行上述的分析。而這些抑制劑之所以抑制酵素與細胞的結合，係為了阻礙ERK1/2與Akt轉錄訊號的傳遞，藉此，也發現SDF-1的表現維持在一個控制量上。這個結果顯示Akt與ERK1/2的活化，會牽涉到SDF-1含量的變化。
- [0036] 將依實施例一所述方法製備出來的細胞移植到具有腦缺血症狀的老鼠體內，並檢測其在神經學行為上的成效。
- [0037] 取Sprague-Dawley品系的雄性成鼠(250-300g)，進行三條血管結紮(中動脈結紮)，所有外科手術的程序皆按照前述Shyug書上(Shyug et al. Circulation 2004; 110: 1847-54)所提及的組織指導方針(Intitutional guideline)之規定，以滅菌/無菌的技術進行。手術後一星期，將這群老鼠分成兩組並以水合氯醛(chloral hydrate)麻醉(0.4g/kg, ip)後，將一組進行細胞移植(治療組)，另一組則進行模擬移植(mock-transplanted, 控制

組)。

- [0038] 移植用的細胞係以含10%胎牛血清(FCS)、抗生素的DMEM培養基在5% CO₂ /95% air、37°C潮濕氣壓的環境下進行培養。為了追蹤細胞，在移植前五小時，先於37°C下，將細胞培養在1 μg/ml的bis-benzimide(Hoechst 33342; Sigma, U. S. A)中，被標定的細胞會呈現藍色螢光。收集標定後的細胞，以PBS漂洗三次，在利用流式細胞儀(cytometer)計算，以確定有足夠細胞可供移植。按照前述Shyug書上描述的方法(Shyug et al. Circulation 2004; 110: 1847-54)，利用26-gauge Hamilton注射針將細胞(在3-5 μl的DMEM培養基中，大約有1x10⁶個細胞)由顱內注入上述老鼠鄰近右MCA、低於dura 3.0mm-5.0mm的三個皮質區。
- [0039] 在腦缺血前及細胞移植後第一、七、十四及二十八天進行五天的行為測試，包括測試治療組老鼠(n=10)及控制組老鼠(n=10)身體的不對稱性、活動性及握力。此種行為測量值將可藉由基準指數的數值予以標準化。身體不對稱性試驗係根據以上Shyug書中所述之方法，藉由大腦中動脈結紮(MCA ligation)前後老鼠身體的擺動的差異來加以評估。由於腦部缺血會導致不平衡的活動性，因此所有的老鼠都顯現出明顯的身體不對稱性：在腦部缺血第一天，身體都會轉向腦部缺血區域的對側。而在細胞移植治療後的十四~二十八天，與控制組老鼠相較，治療組的老鼠身體的不對稱性明顯地減少。
- [0040] 在腦缺血前後，也都會進行所有老鼠活動性的檢測(Shyug et al. Circulation 2004; 110: 1847-54)。在發生腦缺血後第十四天至第二十八天進行檢測時發現，相較於控制組老鼠，經細胞移植的老鼠，其垂直活動力、垂直移動時間及垂直移動的動作數目明顯增加。
- [0041] 握力強度係依照Dunnett等人書中所述之改良方法(Dunnett et al. 1998, Neurosci. Lett. 246: 1-4)，利用Grip Strength Meter(TSE-Systems, Germany)，在細胞移植前及移植後二十八天進行分析。在個別測量、計算老鼠前肢的握力強度率(grip strength ratio)時，若該數值介於在二十個測量值的平均數之間，其握力強度可以拉到缺血區域的對側及同側。此外，對於細胞移植前後握力強度率也會加以計算，並將前後的改變當作評估治療前數值的比例。
- [0042] 結果顯示接受細胞移植治療的老鼠，其握力強度率高於控制組老鼠。
- [0043] 利用西方墨點法及反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)檢測神經營養因子、抗細胞凋亡蛋白(antiapoptotic protein)及突觸可塑性相關蛋白(synaptic plasticity-related protein)在前述老鼠體內的表現。
- [0044] 細胞移植後第三、七、十四及二十八天，先利用水合氯醛(chloral hydrate)將老鼠麻醉(0.4g/kg, ip)，再將缺血的皮質區及紋狀區取出後立即置於冰塊之上，並利用人造均質機(plastic homogenizer)將此腦組織均質化。之後，將組織中全部的蛋白質分離後，按照Issa書中所述的方法(Issa, 2005, Angiogenesis 8: 53-6)，利用具特异性、抗BDNF、GDNF、VEGF、SDF(1:200)、SCF(1:200)、G-SCF(1:100)、Bcl-2(1:200; Santa-Cruz)、Bcl-xL(1:200; Transduction Laboratories)、Bad(1:200; Santa-Cruz)、Bax(1:200; Transduction Laboratories)、GAP-43(synapse, Chemicon)、Synaptophysin(1:50; DAKO)、HuC/D(1:200; Clonogene)或Actin(1:2000; Santa-Cruz)。
- [0045] 同時，發現到在治療組老鼠(n=7)體內，SDF-1、GDNF及BDNF的含量高於控制組老鼠。而SDF-1、GDNF或BDNF與GAPDH的比例在移植後三~七天內達到2~3.5倍的高峰。這些結果顯示在治療組老鼠身上所獲得的神經功能的改善，係與上述三種因子有所關聯。
- [0046] 利用定量逆轉錄聚合酶連鎖反應_QRT-PCR_及傳統逆轉錄聚合酶連鎖反應以評估SDF-1、BDNF、GDNF、NGF、TGF-β、FGF-II及VEGF的表現的結果。其中，RNA係使用RNeasy[®] kit_Qiagen_，而所使用的特殊引子則摘要於表一。

表一：營養因子的 PCR 引子序列

因子序列	PCR 片段
SDF-1 sense-TTGCCAGCACAAAGACACTCC antisense-CTCAAAGCAAACCGAATACAG	243bp
BDNF sense-CAGTGGACATGTCCGGTGGGACGGTC antisense-TTCTTGGCAACGGCAACAAACCACAAC	533bp
GDNF sense-CCACACCGTTTAGCGGAATGC antisense-CGGGACTCTAAGATGAAGTTATGGG	638bp
NGF sense-GTTTTGGCCAGTGGTCGTGCAG antisense-CCGCTTGCTCCTGTGAGTCCTG	498bp
TGF-β sense-CCGCCTCCCCATGCCGCC antisense-CGGGGCGGGGCTTCAGCTGC	710bp
FGF-II sense-TCACTTCGCTTCCCGCACTG antisense-GCCGTCCATCTTCCTTCATA	252bp
VEGF sense-GCTCTCTTGGGTGCACTGGA antisense-CACCGCCTTGCTTGTCACA	431bp

- [0048] 透過廠商(Roche Diagnostics)的使用說明，利用SYBR Green作為螢光染料進行定量逆轉錄聚合酶鍊式反應來決定標的mRNA(target mRNA)的相對量，並以內部標準來標準化GAPDH的含量。整個定量逆轉錄聚合酶鍊式反應過程的改良係依照Luo等人書中所描述的方法為之(Luo *et al.* 2004, *Respir. Res.* 5: 20)；而傳統逆轉錄聚合酶鍊式反應的進行則按照Shyu等人書中所描述的方法為之(Shyu *et al.* 2004, *Cell Mol. Neurobiol.* 2004; 24: 257-68)。從結果中發現治療組老鼠的體內SDF-1、GDNF及BDNF的含量明顯高於控制組老鼠，而西方墨點之結果亦同。
- [0049] 關於SDF-1及其受器CXCR4可提供營養供給至胚胎神經元及成熟神經元的事實已為人所知(Hillet *al.* , 2004, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63: 84-96; Zhenget *al.* , 1999, *J. Neuroimmunol.* 98: 185-200; 及Eventet *al.* , 2001, *J. Neurosci.* 21: 5389-96.)。再者，SDF-1可作為造血幹細胞(Hematopoietic stem cell, HSCs)的趨化因子(chemoattractant)(Joet *al.* , 2001 *J. Clin. Invest.* , 105: 101-11及Shirozuet *al.* , 1995, *Genomics*, 28: 495-500)。而G-CSF及SCF亦可使造血幹細胞從骨髓釋放至週邊血液(PB)(Demetri, *Blood.* 1991; 78: 2791-808; Hematti, *Stem Cell* 2004; 22: 1062-9)。從上述的結果暗示：移植的細胞可促進造血幹細胞回流至腦部。
- [0050] 在腦部缺血處，可利用雙螢光免疫組織化學及雷射掃描共軛焦顯微鏡(Laser Scanning Confocal Microscopy)確認上述移植細胞是否可分化成神經元、神經膠質細胞或血管內皮細胞。
- [0051] 如同前述之方法，取Sprague-Dawley品系的雄性成鼠(250-300g)，進行三條血管結紮(中動脈結紮)及細胞移植(治療組)與細胞模擬移植(mock-transplantation)(控制組)。依照Shyug書上所描述之方法(Shyug *et al.* *Circulation* 2004; 110: 1847-54)，在細胞移植後第二十八天，利用水合氯醛(chloral hydrate)將老鼠(n=10)麻醉(0.4g/kg, ip)，以4%三聚甲醛(paraformaldehyde)進行灌注、沈浸後，以生理食鹽水進行transcardial perfusion，以固定腦組織。之後，以標準方法取得腦組織切片，以免疫螢光染色法檢測神經元、神經膠質細胞或血管內皮細胞特異性標誌的表現。其中，所使用的細胞型態特異性標誌包括：GFAP(1:400, Sigma)、von Willebrand因子(vWF, 1:400, Sigma)、神經巢蛋白(Nestin, 1:400, Chemicon)、微管相關蛋白(microtubule-associated protein 2, MAP-2, 1:200, BM)、神經元核(Neu-N, 1:300, Chemicon)、CXCR4(1:100, Santa-Cruz)及Doublecortin (Dcx, 1:300)。當移植細胞的核被bisbenzimidazole所標定，又會被激發光所激發而放射出藍色的螢光。至於需要以bisbenzimidazole及細胞特異性標誌染色的細胞數目，則按照Li等人書上所描述的方法來決定(Liet *al.* , 2002, *Neurology*, 59: 514-23)。

- [0052] 此外，結果可發現某些經bisbenzimidazole標定的細胞也會在半影區(penumbra)表現GFAP、MAP-2及Neu-N，也發現在梗塞的週邊區域(perி-infarcted)，經bisbenzimidazole標定的細胞及神經巢蛋白的抗體會產生位置重疊(co-localization)的現象。經bisbenzimidazole標定的細胞對於MAP-2、GFAP、Neu-N及Nestin之比例係為正的，分別約為5%、8%、6%及2%。這樣的結果顯示，移植細胞係以trans-differentiated及產生新的神經元及血管組織以修補腦部的損傷區域。
- [0053] 本實施例將對上述關於細胞移植對流動的週邊血液幹細胞(MPBSCs)的移動及神經元突觸的形成加以檢測。根據上述方法取得腦組織切片後，將針對週邊血液幹細胞的特異性標誌CXCR4及Dcx進行雙免疫染色。而切片染測結果係以共軛焦顯微鏡(confocal microscopy)觀察之。
- [0054] 結果發現，大多數移植細胞在半影區會與CXCR4產生位置重疊(co-localization)的現象，而Dcx則分佈在缺血區域周圍。這些的結果顯示，流動的週邊血液幹細胞會移動到半影區，以修補腦部的損傷。進一步來說，關於移植細胞及宿主細胞間的突觸形成則可藉由突觸素(synaptophysin)的位置重疊分析而證實。
- [0055] 本實施例將對上述關於細胞移植對腦血管新生及血管重建(vascular remodeling)的成效加以評估。
- [0056] 如同前述，對老鼠分別進行三條血管結紮(中動脈結紮)及細胞移植(治療組)與細胞模擬移植(mock-transplantation)(控制組)，並在細胞移植後的第二十八天，進行腦部微循環(microcirculation)的分析。將每隻老鼠以靜脈注射方式施予異硫氰酸螢光素-葡聚糖(FITC-dextran，一種螢光血管標記(fluorescent plasma marker))，並依Morris等人書中所述之方法(Morris *et al.* 1999, Brain Res. Brain Res. Protoc. 4: 185-91)，在螢光顯微鏡下觀察之(Carl Zeiss, Axiovert 200M)。為了定量腦血管密度及檢測巨噬球對血管重建的效果，利用水合氯醛將每隻老鼠都進行麻醉，並灌注0.4%的三聚甲醛。之後，取來老鼠的組織切片(6 μ m)，並以可與Cy-3(1:500, Jackson Immunoresearch PA USA)結合的對特異性抗體CD-31(1:100, BD)、OX-42(1:400, serotec)或ED-1(1:500, serotec)加以染色。而血管數目則按照Taguchi等人書中所描述的方法決定(Taguchi *et al.* 2004, J. Clin. Invest. 114: 330-8)。
- [0057] 結果顯示，數個經bisbenzimidazole標定的細胞會在治療組老鼠的缺血的大腦半球的周邊血管及內皮細胞周圍中顯現出血管的表現型(positive for vWF)。同時也發現，相較於控制組的老鼠，經細胞移植的治療組老鼠的異硫氰酸螢光素-葡聚糖的微血管灌注明顯提高。而利用抗CD-31染色所測量的血管密度也顯示，治療組老鼠(n=4)在半影區也明顯比控制組的老鼠(n=4)出現較多的血管新生現象。
- [0058] 雙免疫螢光染色法及異硫氰酸螢光素-葡聚糖灌注法亦可證實血管新生與巨噬球/小神經膠質細胞(macrophage/microglia, MA/MI)間的關聯。每個組織切片positive MA/MI的總數則按照Pipp等人書中所描述的方法來決定(Pipp *et al.* , 2003, Circ. Res. 92: 378-85)。而經bisbenzimidazole標定的移植細胞顯現出巨噬球/小神經膠質細胞的表現型(OX-42⁺ 及 ED-1⁺)並可滲透至缺血的大腦半球的周邊血管區域(perivascular region)(以異硫氰酸螢光素-葡聚糖灌注的血管)。並且，治療組老鼠在血管周圍的MA/MI數值高於控制組的老鼠。
- [0059] 進行西方墨點法時，可利用抗 β 1-整合素(β 1-integrin, Chemicon)的特異性抗體來檢測 β 1-整合素的表現。結果發現， β 1-整合素在治療組老鼠(n=4)體內的表現明顯高於控制組的老鼠(n=4)。除了在老鼠缺血的腦部另外注射合成的環狀RGD胜肽(synthetic cyclic RGD peptide)外，並對老鼠重複進行上述大腦中動脈結紮、細胞移植及細胞模擬移植的過程，再對其進行前述神經性行為的評估。其中，可發現 β 1-整合素及神經性行為的表現並未在治療組老鼠與控制組老鼠間顯現出明顯的差異(每個群組中，n皆=4)。這個結果顯示環狀RGD胜肽會抑制 β 1-整合素的活化並涉及移植的效果。
- [0060] 一個增高的血管密度可提升神經元存活的機會並與增高的腦血流量(cerebral blood flow, CBF)有所關聯，前述兩者升高的結果將使氧氣及營養成分更能有效地被傳送。為了檢測缺血腦部的腦血流量，將前述麻醉的治療組老鼠與控制組老鼠都注射diamox，以雷射杜卜勒微流儀(laser doppler flowmetry, LDF)觀察之。
- [0061] 簡言之，根據Tuettenberg等人書中所描述的方法(Tuettenberg *et al.* , 2001, Neurosci. Lett. 315: 65)，係將在麻醉狀態下的老鼠置於腦脊髓定位儀(stereotaxic frame)，持續以雷射杜卜勒微流儀(laser doppler flowmetry, LDF)(LDF monitor, Moore Instrument England)測量baseline local cortical blood flow (bCBF)。在腹腔內注射乙酰脞胺(Diamox, Lederle(50mg/kg))後，進行相對腦血流量

(relative Cerebral Blood Flow; rCBF)的檢測，以界定baseline local cortical blood flow改變的比例。此一結果顯示：相較於控制組老鼠，治療組老鼠在缺血的中腦動脈皮質區(middle cerebral artery cortex)的相對腦血流流量有明顯的增加。

- [0062] 本實施例係對細胞移植後第二十八天的老鼠進行血腦障壁屏障的完整性(BBB integrity)之評估。
- [0063] 先對每隻老鼠靜脈注射第二型的辣根過氧化酶(type II horseradish peroxidase, HRP, Sigma)，注射劑量為 10^4 U/kg。並於注射三十分鐘後依照Ferrari書中所描述的方法(Ferrari, 2004, Am. J. Pathol. 165: 1827-1837)來檢測辣根過氧化酶的活性，結果發現，細胞移植會促進受損血腦障壁的修補。
- [0064] 在本說明書中所揭露的所有特徵都可能與其他方法結合，且所揭露的每一個特徵都可能被其他具有相同、相等或相似目的的特徵所取代。因此，除了特別顯著的特徵之外，本說明書所揭露的所有特徵皆僅為相等或相似特徵中的一個例子。
- [0065] 雖然本發明已將較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾。因此，其他實施例亦包含於以下的申請專利範圍中。
- 【圖式簡單說明】
- 【主要元件符號說明】
- 【序列式】
- [0066]

七、申請專利範圍：

1. 一種製備多能幹細胞組合物之方法，包含：從動物鼻息肉獲得一組織；在允許細胞遷移的條件下培養組織；及收集從培養組織移出之細胞，以獲得一多能幹細胞組合物。
2. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中前述主要收集之細胞係為 $p75^+$ ， $S100^+$ 或 $GFAP^+$ 。
3. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中前述動物係為人類。
4. 一種治療大腦組織損傷之方法，係包含施予需治療之個體一有效量之細胞組合物，該組合物係包含嗅神經原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞，其中前述細胞係藉由顱內施予至個體。
5. 如申請專利範圍第4項所述之方法，其中前述腦部組織損傷係因腦缺血所致。
6. 如申請專利範圍第4項所述之方法，其中前述腦部組織損傷係因神經退化性疾病所致。
7. 如申請專利範圍第4項所述之方法，其中前述神經退化性疾病係為阿茲海默症、巴金森氏症或癲癇症。
8. 如申請專利範圍第4項所述之方法，其中前述細胞組合物係藉由一方法所製備，該方法係包含：從動物鼻息肉獲得一組織；在允許細胞遷移的條件下培養組織；及收集從培養組織遷移之細胞，以獲得一多能幹細胞組合物。
9. 如申請專利範圍第4項所述之方法，其中前述嗅神經原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞與接受治療之個體係屬自體同源。
10. 如申請專利範圍第4項所述之方法，其中前述個體係為人類。
11. 一種促進個體腦血管新生之方法，係包含施予需治療之個體一有效量之細胞組合物，該組合物係包含嗅神經原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞，其中前述組合物係藉由顱內方式施予。
12. 如申請專利範圍第11項所述之方法，係進一步包含測量個體在施予前述組合物前後，其腦血管元新生的程度，以確認該組合物對促進腦血管新生之效果。
13. 一種促進個體腦神經元新生之方法，係包含施予需治療之個體一有效量之細胞組合物，該組合物係包含嗅神經原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞，其中前述組合物係藉由顱內方式施予。
14. 如申請專利範圍第13項所述之方法，係進一步包含測量個體在施予前述組合物前後，其腦神經元新生的程度，以確認該組合物對促進腦神經元新生之效果。
15. 一種促進幹細胞回流至個體腦部的方法，係包含施予需治療之個體一有效量之細胞組合物，該組合物係包含嗅神經原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞，其中前述組合物係藉由顱內方式施予。
16. 一種增加個體腦部神經營養因子含量之方法，係包含施予需治療之個體一有效量之細胞組合物，該組合物係包含嗅神經原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞，其中前述組合物係藉由顱內方式施予。

17. 如申請專利範圍第16項所述之方法，其中前述神經營養因子係為SDF-1、BDNF、GDNF、NGF、TGF- β 、FGF-II、VEGF或SCF-1。
18. 如申請專利範圍第16項所述之方法，係進一步包含測量個體在施予前述組合物前後，其腦部神經營養因子的含量，以確認該組合物對增進神經營養因子之效果。
19. 一種多能細胞組合物，係根據前述申請專利範圍第1項所述之方法所製備。
20. 如申請專利範圍第19項所述之多能細胞組合物，其中前述細胞組合物係包含嗅神經原始細胞、嗅神經包被細胞或嗅神經纖維母細胞。
21. 如申請專利範圍第19項所述之多能細胞組合物，其中前述動物係為人類。

八、圖式：