



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201636032 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 10 月 16 日

(21) 申請案號：104140661

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 04 日

(51) Int. Cl. : *A61K35/51 (2015.01)* *A61P27/02 (2006.01)*

(30) 優先權：2014/12/05 美國 62/088,429
2015/02/27 美國 62/126,370
2015/09/18 美國 62/220,873

(71) 申請人：健生生物科技公司 (美國) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)
美國

(72) 發明人：哈里斯 伊恩 HARRIS, IAN (GB)；德吉內卡 娜汀 DEJNEKA, NADINE SOPHIA (US)

(74) 代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：8 共 225 頁

(54) 名稱

使用前驅細胞治療眼睛病況

TREATMENT OF OCULAR CONDITIONS USING PROGENITOR CELLS

(57) 摘要

用於使用前驅細胞諸如產後衍生細胞及來自該等細胞之條件培養基治療眼科疾病、促進功能性神經元突觸之發育並改善神經元外生之方法及組成物係經揭示。亦揭示由促進突觸形成及神經元生長之細胞分泌之營養因子及其他劑。

Methods and compositions for treating ophthalmic disease, promoting development of functional neuronal synapses and improving neuronal outgrowth using progenitor cells, such as postpartum-derived cells, and conditioned media from the cells, are disclosed. Trophic factors and other agents secreted by the cells that promote synapse formation and neuronal growth are also disclosed.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 使用前驅細胞治療眼睛病況

TREATMENT OF OCULAR CONDITIONS USING
PROGENITOR CELLS

【相關申請案之交互參照】

【0001】 本申請案主張 2014 年 12 月 5 日提出申請之美國臨時申請案第 62/088,429 號、2015 年 2 月 27 日提出申請之美國臨時申請案第 62/126,370 號及 2015 年 9 月 18 日提出申請之美國臨時申請案第 62/220,873 號之權益；上述各案之全部內容以全文引用方式併入本文中。

【技術領域】

【0002】 本發明係關於用於眼科疾病及病症，尤其是眼睛病況，諸如視網膜變性病狀的基於細胞或再生性療法的領域。本發明提供使用前驅細胞（諸如臍帶組織衍生細胞、胎盤組織衍生細胞）及由該些細胞製備之條件培養基來再生或修復眼細胞及組織之方法及組成物。

【先前技術】

【0003】 眼睛是一個複雜且敏感的身體器官，會罹患許多疾病及其他影響其正常發揮功能之能力的有害病狀。許多該些病狀與特定眼細胞及由該些細胞組成之組織的損傷或變性相關聯。舉例而言，視神經及視網膜之疾病及變性病狀為全世界失明之首要原因。角膜、

水晶體及相關眼組織之損傷或變性為全世界視力喪失之另一顯著原因。

【0004】 視網膜含有七層交替細胞及將光信號轉化成神經信號之過程。視網膜光受體與鄰近視網膜色素上皮(RPE)形成功能單元，其在許多病症中由於遺傳突變或環境條件（包括年齡）而變得不平衡。此導致光受體經由細胞凋亡或繼發性變性而損失，從而導致視力之進行性劣化並在一些情況下導致失明（有關綜述參見例如，Lund, R. D.等人，Progress in Retinal and Eye Research, 2001; 20:415-449）。具有此模式之兩類眼病症為年齡相關性黃斑變性(AMD)及色素性視網膜炎(RP)。

【0005】 AMD 在美國是 50 歲或年齡更大之人口中視力喪失之最普遍原因且其盛行率隨年齡升高。AMD 之原發性病症似乎係因 RPE 功能異常及在布魯赫氏(Bruch's)膜中之變化所致，其特徵在於特別是脂質沉積、蛋白質交聯及營養素滲透性降低（參見 Lund 等人，2001 見前文）。多種要素可導致黃斑變性，包括遺傳構成、年齡、營養、吸煙、及暴露於陽光。非滲出性、或「乾性(dry)」形式之 AMD 佔 AMD 病例之 90%；其他 10%為滲出性、新生血管形式（「濕性(wet)」AMD）。在乾性 AMD 患者中，視網膜色素上皮(RPE)之逐漸消失導致環繞狀之萎縮區域。因為光受體損失跟隨在 RPE 消失之後，所以受影響之視網膜區域僅剩極少或完全無視覺功能。

【0006】 AMD 之當前療法涉及諸如例如雷射療法及醫藥介入之程序。雷射波束藉由轉移熱能來破壞黃斑下之滲漏血管，以延緩

視力喪失之速率。雷射療法之缺點在於，由波束遞送之高熱能亦破壞附近的健康組織。Neuroscience 第 4 版（Purves, D，等人 2008）指出「目前沒有乾性 AMD 之治療。」

【0007】 RPE 移植在人類中尚未成功。舉例而言，Zarbin, M, 2003 指出「在正常老化情況下，人類布魯赫氏膜（尤其在黃斑下區域中）經歷許多改變（例如，厚度增大、ECM 及脂質之沉積、蛋白質之交聯、高級糖化終產物之非酶形成）。此等改變及由於 AMD 之額外改變可能降低 ECM 配體（例如，層黏蛋白、纖連蛋白素、及膠原蛋白 IV）之生物可利用性，且造成 AMD 眼睛中極為不良的 RPE 細胞存活。因此，儘管人類 RPE 細胞表現附著於此等 ECM 分子所需之整合素，但是老化的黃斑下人類布魯赫氏膜上之 RPE 細胞存活仍然受損。」(Zarbin, MA, Trans Am Ophthalmol Soc, 2003; 101:493-514)。

【0008】 色素性視網膜炎主要被認為是一種遺傳性疾病，其中超過 100 種突變與光受體損失相關聯（參見 Lund 等人，2001，見前文）。儘管大部分突變以光受體為目標，但有些突變直接影響 RPE 細胞。綜上，此等突變影響諸如光受體與 RPE 細胞之間的分子運輸及光傳導之過程。

【0009】 其他較不常見但亦有損健康的視網膜病變也可涉及導致視力喪失及失明之進行性細胞變性。此等視網膜病變包括例如糖尿病視網膜病變及脈絡膜新生血管膜(CNVM)。

【0010】 用於細胞及組織修復及再生之基於幹細胞的療法的出現，對許多前述細胞變性病變及其他視網膜病狀提供有前景之治療。幹細胞能夠自我更新及分化以產生多種成熟細胞譜系。此類細胞之移植可用來作為重構靶標組織之臨床工具，從而恢復生理及結構功能。幹細胞技術之應用範圍廣泛，包括組織工程化，基因療法遞送、及細胞治療，亦即，經由外源性供應可生產或含有生物治療劑之活細胞或細胞組分來遞送該些劑至靶標位置。(有關綜述，參見例如，Tresco, P. A.等人，*Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, 42: 2-37)。

【0011】 細胞療法證明在治療神經病症上具有高度潛能。移植細胞被認為藉由置換損傷細胞或藉由提供增強神經健康和再生的營養因子來促進恢復及神經保護。(Doeppner TR, Hermann DM, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014;8:357; Atala A, *Lancet*, 2014/2015; 385(9967):487-488 ; Popovich PG, *Cell*, 2012;150:1105-1106 ; Lindvall O , 等人 , *Journal of Clinical Investigation*, 2010;120:29-40 ; Rao MS, *Mechanisms of Aging Development*, 2001; 122:713-734)。神經元突起(neuronal process)的萎縮為許多神經病症之普遍事件；因此，提供可引起神經突外生(outgrowth)的因子可於這些疾病中提供治療效果。特定言之，人類臍組織衍生細胞(hUTC)可為對神經元損失有前景之治療。人類臍帶可在無倫理顧慮之情況下收集自產後臍帶，顯示在體外培養期間具有核型穩定性，且可擴增(Lund 等人, *Stem Cells*, 2007; 25(3):602-61)。

各種動物疾病模型已證明 hUTC 投予之治療潛能。舉例而言，將 hUTC 遞送至中風動物模型 (Moore 等人, *Somatosensory and Motor Research*, 2013; 30:185-196; Zhang L, 等人, *Brain Research*, 2012; 1489:104-112; Zhang L, 等人, *Cell transplantation*, 2013; 22:1569-1576; Jiang Q, 等人, *PloS One*, 2012; 7(8):e42845; Zhang L, 等人, *Stroke*; 2011;42:1437-1444); 及視網膜變性動物模型 (Lund 等人, *Stem Cells*, 2007 見前文), 已顯示這些細胞增強功能恢復且防止神經元發生進行性變性及細胞死亡。

【0012】最近，已顯示產後衍生細胞改善視網膜變性 (US 2010/0272803)。皇家外科學院 (Royal College of Surgeons, RCS) 大鼠具有影響外節吞噬之酪胺酸受體激酶 (Mertk) 缺陷，從而引起光受體細胞死亡。(Feng W. 等人, *J Biol Chem.*, 2002, 10: 277 (19): 17016-17022)。發現將視網膜色素上皮 (RPE) 細胞移植至 RCS 大鼠之視網膜下空間中會限制光受體損失之進展且保留視覺功能。亦已證明，產後衍生細胞可在 RCS 模型中用於促進光受體救援且因此保留光受體。(US 2010/0272803)。將人類臍帶組織衍生細胞 (hUTC) 經視網膜下注射至 RCS 大鼠眼睛中改良視覺銳度且改善視網膜變性。此外，以衍生自 hUTC 之條件培養基 (CM) 進行治療，可使體外失養性 RPE 細胞恢復對 ROS 之吞噬。(US 2010/0272803)。此處進一步研究 hUTC 改善視力之機制。

【發明內容】

【0013】 本發明提供適用於眼科疾病及病症的基於細胞或再生性療法的組成物及方法。詳言之，本發明之特徵在於用於治療眼科疾病或病狀之方法及組成物，包括醫藥組成物，該等方法及組成物包括使用諸如產後衍生細胞之前驅細胞及由該些細胞產生之條件培養基來再生或修復眼細胞及組織。產後衍生細胞可為臍帶組織衍生細胞或胎盤組織衍生細胞。

【0014】 本發明之一個態樣為一種藉由誘導神經元細胞中突觸新生來治療眼科疾病之方法，其包含投予前驅細胞群或由前驅細胞群製備之條件培養基。在本發明之一實施例中，神經元細胞或神經元為視網膜神經元諸如視網膜神經節細胞、光受體（視桿細胞及視錐細胞）、視網膜無軸突細胞、水平細胞或雙極細胞。在本發明之具體實施例中，前驅細胞為產後衍生細胞。在本發明之實施例中，產後衍生細胞係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織或胎盤組織。在進一步實施例中，前驅細胞分泌營養因子。在一實施例中，條件培養基含有前驅細胞群分泌之營養因子。在實施例中，前驅細胞（諸如產後衍生細胞）分泌之營養因子誘導突觸新生。在實施例中，營養因子選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2 及血小板反應蛋白-4。

【0015】 在本發明之一態樣中，藉由誘導神經元細胞中神經突外生來治療眼科疾病之方法包含投予前驅細胞群或由前驅細胞群製備之條件培養基。在本發明之一實施例中，神經元細胞或神經元為視網膜神經元諸如視網膜神經節細胞、光受體（視桿細胞及視錐細

胞)、視網膜無軸突細胞、水平細胞或雙極細胞。在本發明之具體實施例中，前驅細胞為產後衍生細胞。在本發明之實施例中，產後衍生細胞係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織或胎盤組織。在進一步實施例中，前驅細胞分泌營養因子。在一實施例中，條件培養基含有前驅細胞群分泌之營養因子。在實施例中，前驅細胞(諸如產後衍生細胞)分泌之營養因子誘導突觸新生。在實施例中，營養因子選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2 及血小板反應蛋白-4。

【0016】 本發明之進一步態樣為一種誘導神經突外生之方法，其包含投予前驅細胞群或由前驅細胞群製備之條件培養基。在本發明之一實施例中，神經元細胞(神經元)為視網膜神經元，例如，視網膜神經節細胞、光受體(視桿細胞及視錐細胞)、視網膜無軸突細胞、水平細胞或雙極細胞。在本發明之實施例中，前驅細胞為產後衍生細胞。在實施例中，產後衍生細胞係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織或胎盤組織。在進一步實施例中，前驅細胞分泌營養因子。在一實施例中，條件培養基含有前驅細胞群分泌之營養因子。在實施例中，前驅細胞(諸如產後衍生細胞)分泌之營養因子誘導神經突外生。在進一步實施例中，由前驅細胞分泌之營養因子選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2 及血小板反應蛋白-4。

【0017】 本發明之另一實施例為一種使視網膜神經元中的功能性突觸發育之方法，其包含投予前驅細胞群或由前驅細胞群製備之條件培養基。在本發明之實施例中，視網膜神經元為視網膜神經

節細胞、光受體（視桿細胞及視錐細胞）、視網膜無軸突細胞、水平細胞或雙極細胞，且前驅細胞為產後衍生細胞。在實施例中，產後衍生細胞係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織或胎盤組織。在進一步實施例中，前驅細胞分泌營養因子。在一實施例中，條件培養基含有前驅細胞群分泌之營養因子。在實施例中，前驅細胞（諸如產後衍生細胞）分泌之營養因子誘導神經突外生。在進一步實施例中，由前驅細胞分泌之營養因子選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2 及血小板反應蛋白-4。

【0018】 在本發明之實施例中，由前驅細胞（例如產後衍生細胞）群製備之條件培養基含有由該細胞群分泌之營養因子。此類由該等細胞分泌之營養因子選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2 及血小板反應蛋白-4。產後衍生細胞為臍帶組織衍生細胞(UTC)或胎盤組織衍生細胞(PDC)。

【0019】 在一實施例中，前驅細胞促進視網膜神經元中的功能性突觸之發育。在另一實施例中，由前驅細胞分泌之營養因子促進神經元中的功能性突觸之發育。在特定實施例中，營養因子選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2 及血小板反應蛋白-4。在另一實施例中，前驅細胞群支持神經元細胞之生長。

【0020】 在進一步實施例中，由前驅細胞群製備之條件培養基支持神經元細胞之生長。在本發明之實施例中，由上文所述之前驅細胞群製備之條件培養基含有由該細胞群分泌之營養因子。在特定

實施例中，營養因子選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2 及血小板反應蛋白-4。

【0021】 本發明之另一態樣之特徵在於一種用於促進視網膜變性中的突觸發育之方法，該方法包含向對象投予有效促進突觸發育之量的條件培養基。在本發明之一實施例中，條件培養基由產後衍生細胞群製備。在一具體實施例中，產後衍生細胞係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織或胎盤組織。如在其他實施例中，條件培養基含有該細胞群分泌之營養因子。此類由該等細胞分泌之營養因子選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2 及血小板反應蛋白-4。

【0022】 在本發明之實施例中，產後衍生細胞係衍生自實質上不含血液之人類臍帶組織或胎盤組織。在實施例中，該細胞能夠在培養物中擴增且具有分化成神經表型之細胞的潛能；其中該細胞需要 L-纈胺酸以供生長且能夠於至少約 5%氧氣中生長。該細胞進一步包含下列特徵中之一或多者：(a)在培養物中進行至少約 40 次倍增的潛能；(b)在經塗布或未經塗布的組織培養容器上附著並擴增，其中經塗布之組織培養容器包含明膠、層黏蛋白、膠原蛋白、聚鳥胺酸、玻璃連接蛋白、或纖連蛋白素之塗層；(c)生產組織因子、波形蛋白(vimentin)、及 α -平滑肌肌動蛋白(alpha-smooth muscle actin)中之至少一者；(d)生產 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 、PD-L2 及 HLA-A,B,C 中之至少一者；(e)不生產 CD31、CD34、CD45、CD80、CD86、CD117、CD141、CD178、B7-H2、HLA-G、及

HLA-DR,DP,DQ 中之至少一者，如藉由流動式細胞測量術所偵測；

(f)針對編碼下列之至少一種基因的基因表現（相對於纖維母細胞、間葉幹細胞或髂骨嵴骨髓細胞之人類細胞）係經增加：介白素 8；內質網蛋白(reticulon) 1；趨化激素（C--X--C 模體）配體 1（黑色素瘤生長刺激活性物， α ）；趨化激素（C--X--C 模體）配體 6（顆粒性細胞趨化蛋白質 2）；趨化激素（C--X--C 模體）配體 3；腫瘤壞死因子， α -誘發蛋白質 3；C 型凝集素超家族成員 2；威爾姆斯(Wilms)腫瘤 1；醛去氫酶 1 家族成員 A2；腎素(renin)；氧化低密度脂蛋白受體 1；智人(Homo sapiens)殖株 IMAGE:4179671；蛋白質激酶 C ζ ；假想蛋白質 DKFZp564F013；卵巢癌向下調控因子 1；及殖株 DKFZp547k1113 之智人基因；(g)針對編碼下列之至少一種基因的基因表現（相對於纖維母細胞、間葉幹細胞或髂骨嵴骨髓細胞之人類細胞）係經減少：矮小同源盒(short stature homeobox) 2；熱休克 27 kDa 蛋白質 2；趨化激素（C--X--C 模體）配體 12（基質細胞衍生因子 1）；彈性蛋白（瓣上主動脈狹窄，威廉-波倫(Williams-Beuren)症候群）；智人 mRNA；cDNA DKFZp586M2022（來自殖株 DKFZp586M2022）；間葉同源盒 2（生長休止特異性同源盒(growth arrest-specific homeo box)）；sine oculis 同源盒同源物 1（果蠅(Drosophila)）； α B 水晶體蛋白；形態發生紊亂關聯活化物 2 (disheveled associated activator of morphogenesis 2)；DKFZP586B2420 蛋白質；類似於 neuralin 1 者；結合四素(tetranectin，纖維蛋白溶酶原(plasminogen)結合蛋白質)；src 同源體 3 (SH3)與多

半胱氨酸區(cysteine rich domain)；膽固醇 25-羥化酶；矮小相關轉錄因子 3 (runt-related transcription factor 3)；介白素 11 受體， α ；原膠原蛋白 C-內肽酶增強子(procollagen C-endopeptidase enhancer)；捲曲同源物 7 (frizzled homolog 7) (果蠅)；假想基因 BC008967；第三型膠原蛋白 $\alpha 1$ ；固生蛋白 C (tenascin C, hexabrachion)；易洛魁族同源盒蛋白質 5 (iroquois homeobox protein 5)；希菲斯特蛋白 (hephaestin)；整合素 $\beta 8$ ；突觸囊泡糖蛋白 (synaptic vesicle glycoprotein) 2；神經胚細胞瘤，致腫瘤性抑制因子 1；類胰島素生長因子結合蛋白質 2，36 kDa；智人 cDNA FLJ12280 fis，殖株 MAMMA1001744；類細胞介素受體因子 1；鉀中間物/小電導鈣活化通道，次家族 N，成員 4；整合素 $\beta 7$ ；具有 PDZ-結合模體之轉錄共活化物(TAZ)；sine oculis 同源盒同源物 2 (果蠅)；KIAA1034 蛋白質；囊泡相關膜蛋白質 5 (肌短蛋白(myobrevin))；含 EGF 類 fibulin 細胞外基質蛋白質(EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein) 1；早期生長反應蛋白質(early growth response) 3；無背端同源盒(distal-less homeo box) 5；假想蛋白質 FLJ20373；醛基-酮基還原酶家族 1，成員 C3 (3- α 羥類固醇去氫酶(3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase)，II 型)；雙聚糖(biglycan)；具有 PDZ-結合模體之轉錄共活化物(TAZ)；纖連蛋白素 1；腦啡肽前質(proenkephalin)；整合素，類 $\beta 1$ (具有類 EGF 重複區)；智人 mRNA 全長插入物 cDNA 殖株 EUROIMAGE 1968422；EphA3；KIAA0367 蛋白質；利尿鈉肽受體 C (natriuretic peptide receptor C)/鳥苷酸環化酶 C (guanylate

cyclase C) (心房利尿鈉肽受體 C (atrionatriuretic peptide receptor C)); 假想蛋白質 FLJ14054; 智人 mRNA; cDNA DKFZp564B222 (來自植株 DKFZp564B222); BCL2/類腺病毒 E1B 19 kDa 交互作用蛋白質 3 (adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like); AE 結合蛋白質 1; 細胞色素 c 氧化酶次單元 VIIa 多肽 1 (肌肉); 類似於 neuralin 1 者; B 細胞轉位基因 1; 假想蛋白質 FLJ23191; 及 DKFZp586L151; 及(h)不表現 hTERT 或端粒酶。在一實施例中, 臍帶組織衍生細胞進一步具有以下特徵: (i)分泌 MCP-1、IL-6、IL-8、GCP-2、HGF、KGF、FGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1b、I309、MDC、RANTES、及 TIMP1 中之至少一者; (j)不分泌 TGF- β 2、MIP1a、ANG2、PDGFbb、及 VEGF 中之至少一者, 如藉由 ELISA 所偵測。在另一實施例中, 胎盤組織衍生細胞進一步具有以下特徵: (i)分泌 MCP-1、IL-6、IL-8、GCP-2、HGF、KGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1a、RANTES、及 TIMP1 中之至少一者; (j)不分泌 TGF- β 2、ANG2、PDGFbb、FGF、及 VEGF 中之至少一者, 如藉由 ELISA 所偵測。

【0023】 在特定實施例中, 產後衍生細胞具有以下細胞型之所有識別特徵: 細胞型 UMB 022803 (P7) (ATCC 存取號 PTA-6067); 細胞型 UMB 022803 (P17) (ATCC 存取號 PTA-6068)、細胞型 PLA 071003 (P8) (ATCC 存取號 PTA-6074); 細胞型 PLA 071003 (P11) (ATCC 存取號 PTA-6075); 或細胞型 PLA 071003 (P16) (ATCC 存取號 PTA-6079)。在一實施例中, 衍生自臍組織之產後衍生細胞具有細胞型 UMB 022803 (P7)(ATCC 存取號 PTA-6067)或細胞型 UMB

022803 (P17) (ATCC 存取號 PTA-6068) 之所有識別特徵。在另一實施例中，衍生自胎盤組織之產後衍生細胞具有以下細胞型之所有識別特徵：細胞型 PLA 071003 (P8) (ATCC 存取號 PTA-6074)；細胞型 PLA 071003 (P11) (ATCC 存取號 PTA-6075)；或細胞型 PLA 071003 (P16) (ATCC 存取號 PTA-6079)。

【0024】 在某些實施例中，產後衍生細胞在一或多種酶活性存在下分離，該些酶活性包含金屬蛋白酶活性、黏液分解活性及中性蛋白酶活性。較佳地，該等細胞具有正常核型，其在細胞繼代培養時維持。在較佳實施例中，產後衍生細胞包含 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90 中之各者。在一些實施例中，產後衍生細胞包含 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 、及 HLA-A,B,C 中之各者。在較佳實施例中，產後衍生細胞不包含 CD31、CD34、CD45、CD117 中之任一者。在一些實施例中，產後衍生細胞不包含 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、或 HLA-DR,DP,DQ 中之任一者，如藉由流動式細胞測量術所偵測。在實施例中，該些細胞不表現 hTERT 或端粒酶。

【0025】 在本發明之實施例中，細胞群為實質上均質性產後衍生細胞群。在特定實施例中，該族群為均質性產後衍生細胞群。在本發明之實施例中，產後衍生細胞係衍生自實質上不含血液之人類臍帶組織或胎盤組織。

【0026】 在某些實施例中，如上文所述之產後衍生細胞群或由產後衍生細胞群產生之條件培養基係與至少一種其他細胞型一起投

予，該等其他細胞型諸如星狀細胞、寡樹突細胞、神經元、神經前驅、神經幹細胞、視網膜上皮幹細胞、角膜上皮幹細胞、或其他多潛能性或多能性幹細胞。在這些實施例中，其他細胞型可與該細胞群或該條件培養基同時、或在之前、或在之後投予。

【0027】 同樣地，在這些及其他實施例中，如上文所述之產後衍生細胞群或由該細胞群製備之條件培養基係與至少一種其他藥劑諸如用於眼治療之藥品、或另一有益的輔助劑諸如消炎劑、抗細胞凋亡劑、抗氧化劑或生長因子一起投予。在這些實施例中，其他藥劑可與該細胞群或該條件培養基同時、在之前、或在之後投予。

【0028】 在各種實施例中，產後衍生細胞群或由產後衍生細胞（臍或胎盤）產生之條件培養基係向眼睛表面投予、或向眼睛內部或向靠近眼睛之位置（例如於眼睛後面）投予。產後衍生細胞群或條件培養基可經由套管或自植入於眼睛內或靠近眼睛之患者體內之裝置投予，或可藉由植入具有產後衍生細胞群或條件培養基之基質或支架來投予。

【0029】 本發明之另一態樣之特徵在於一種用於促進視網膜變性病狀中的功能性突觸發育之組成物，該組成物包含有效促進功能性突觸發育之量的產後衍生細胞群或由細胞群製備之條件培養基。較佳地，條件培養基由如上文所述之產後衍生細胞製備。更佳地，產後衍生細胞係分離自實質上不含血液之產後臍帶或胎盤。變性病狀可為急性、慢性或進行性病狀。

【0030】 在某些實施例中，組成物包含至少一種其他細胞型，諸如星狀細胞、寡樹突細胞、神經元、神經前驅、神經幹細胞、視網膜上皮幹細胞、角膜上皮幹細胞、或其他多潛能性或多能性幹細胞。在這些或其他實施例中，組成物包含至少一種其他藥劑，諸如用於治療眼變性病變之藥品或其他有益的輔助試劑，例如消炎劑、抗細胞凋亡劑、抗氧化劑或生長因子。

【0031】 在一些實施例中，組成物為進一步包含醫藥上可接受之載劑之醫藥組成物。

【0032】 在某些實施例中，醫藥組成物經調配用於向眼睛表面投予。或者，其可經調配用於向眼睛內部或靠近眼睛處（例如眼睛後面）投予。組成物亦可調配為含有產後衍生細胞或條件培養基之基質或支架。

【0033】 根據本發明之另一態樣，提供一種用於治療具有眼變性病變之患者的套組。該套組包含醫藥上可接受之載劑、產後衍生細胞群或由產後衍生細胞（較佳為上文所述之產後衍生細胞）群產生之條件培養基、及於治療患者之方法中使用該套組之說明書。該套組亦可含有一或多種額外組分，諸如用於產生條件培養基之試劑及說明書、或至少一種其他細胞型之族群、或一或多種可用於治療眼變性病變之劑。

【0034】 在一實施例中，本發明為一種用於誘導視網膜變性中突觸形成之方法，該方法包含向對象投予有效誘導突觸形成之量的產後衍生細胞群或由產後衍生細胞群製備之條件培養基，其中該等

產後衍生細胞係衍生自實質上不含血液之人類臍帶組織或胎盤組織，且其中該細胞群能夠在培養物中擴增、具有分化成至少一神經表型之細胞的潛能、在繼代之後維持正常核型、且具有以下特徵：

- a) 在培養物中進行 40 次族群倍增的潛能；
- b) 生產 CD10、CD13、CD44、CD73 及 CD90；及
- c) 不生產 CD31、CD34、CD45、CD117 及 CD141，且

其中產後衍生細胞群分泌營養因子，或由產後衍生細胞群製備之條件培養基含有由該細胞群分泌之營養因子。在一實施例中，由細胞群分泌之營養因子選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2 及血小板反應蛋白-4。在一些實施例中，細胞群為實質上均質性族群。在具體實施例中，細胞群為均質性。產後衍生細胞為臍帶組織衍生細胞或胎盤組織衍生細胞。在實施例中，臍帶組織衍生細胞群分泌 MCP-1、IL-6、IL-8、GCP-2、HGF、KGF、FGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1b、I309、MDC、RANTES 及 TIMP1。此外，臍帶組織衍生細胞群不分泌 TGF- β 2、MIP1a、ANG2、PDGFbb 及 VEGF，如藉由 ELISA 所偵測。在另一實施例中，胎盤組織衍生細胞群分泌 MCP-1、IL-6、IL-8、GCP-2、HGF、KGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1a、RANTES 及 TIMP1。在實施例中，胎盤組織衍生細胞群不分泌 TGF- β 2、ANG2、PDGFbb、FGF 及 VEGF，如藉由 ELISA 所偵測。另外，細胞群不表現 hTERT 或端粒酶。在實施例中，臍帶組織衍生細胞群相對於纖維母細胞、間葉幹細胞或髂骨嵴骨髓細胞之

人類細胞，具有編碼介白素 8 與網狀內皮素 1 之基因表現增加。在實施例中，該細胞群生產波形蛋白與 α -平滑肌肌動蛋白。

【0035】 在另一實施例中，本發明為一種用於誘導視網膜變性中突觸形成之方法，該方法包含向對象投予有效誘導突觸形成之量的臍帶組織衍生細胞群或由人類臍帶組織衍生細胞群製備之條件培養基，其中該等細胞係衍生自實質上不含血液之人類臍帶組織，且其中該細胞群能夠在培養物中擴增、具有分化成至少一神經表型之細胞的潛能、在繼代之後維持正常核型、且具有以下特徵：

- a) 在培養物中進行 40 次族群倍增的潛能；
- b) 生產 CD10、CD13、CD44、CD73 及 CD90；及
- c) 不生產 CD31、CD34、CD45、CD117 及 CD141，且

其中臍帶組織衍生細胞群分泌營養因子，或由人類臍帶組織衍生細胞群製備之條件培養基含有由該細胞群分泌之營養因子。在一實施例中，由細胞群分泌之營養因子選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2 及血小板反應蛋白-4。在一實施例中，細胞群分泌 MCP-1、IL-6、IL-8、GCP-2、HGF、KGF、FGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1b、I309、MDC、RANTES 及 TIMP1。在實施例中，該細胞群不分泌 TGF- β 2、MIP1a、ANG2、PDGFbb 及 VEGF，如藉由 ELISA 所偵測。在一些實施例中，細胞群為實質上均質性族群。在具體實施例中，細胞群為均質性。另外，細胞群不表現 hTERT 或端粒酶。在實施例中，該細胞群相對於纖維母細胞、間葉幹細胞或髌骨嵴骨

髓細胞之人類細胞，具有編碼介白素 8 與網狀內皮素 1 之基因表現增加。在實施例中，該細胞群生產波形蛋白與 α -平滑肌肌動蛋白。

【0036】 在上文所述之實施例中，臍衍生細胞或胎盤衍生細胞具有下列特徵中之一或多者：HLA-A,B,C 陽性；CD10、CD13、CD44、CD73、CD90 陽性；HLA-DR,DP,DQ 陰性；不生產或為 CD31、CD34、CD45、CD117 及 CD141 陰性。在實施例中，該等細胞生產波形蛋白與 α -平滑肌肌動蛋白。

【0037】 在上文所述之進一步實施例中，臍衍生細胞相對於纖維母細胞、間葉幹細胞或髂骨嵴骨髓細胞之人類細胞，具有編碼介白素 8 與網狀內皮素 1 之基因表現增加。在實施例中，臍衍生細胞不表現 hTERT 或端粒酶。

【0038】 在上文所述之本發明之一實施例中，視網膜變性、視網膜病變或視網膜/黃斑病症為年齡相關性黃斑變性。在一替代實施例中，視網膜變性、視網膜病變或視網膜/黃斑病症為乾性年齡相關性黃斑變性。

【圖式簡單說明】

【0039】 圖 1A 至圖 1M. hUTC 誘導經培養 RGC 之間的功能性突觸形成。(圖 1A) 實驗設計之示意圖。將經純化 RGC 單獨培養或與跨孔插入物中之 hUTC、NHDF 或大鼠 ASC 共培養 6 天。藉由基於免疫細胞化學及電生理學之檢定分別測定突觸之數目及功能。(圖 1B) 用對突觸前蛋白 (Bassoon 蛋白，紅色) 及突觸後蛋白 (Homer 蛋白，綠色) 具特異性之抗體染色之代表性 RGC 影像。底部：入口

處（白框）以較高放大率顯示且經共定位之突觸點(synaptic puncta)（合併，黃色）用白色箭頭標記。比例尺：20 μm 。（圖 1C）經共定位突觸點數目之增加倍數（ $n=59$ 至 161 個細胞/條件）及（圖 1D）突觸密度（每單位樹突長度突觸之數目， $n=30$ 個細胞/條件）之定量顯示，hUTC（類似於 ASC）誘導經培養 RGC 之間的興奮性突觸形成。（增加倍數係藉由將每細胞突觸數目用單獨 RGC 條件中之每細胞突觸數目正規化來計算）。圖 1E 至圖 1I 顯示經誘導突觸具電生理學功能。（圖 1E）全細胞膜片鉗記錄之實例跡線(trace)顯示 mEPSC。mEPSC 之（圖 1F）事件間間隔之累積機率曲線及（圖 1G）平均頻率之定量顯示，與 hUTC 或 ASC 共培養誘導突觸事件數目增加。（圖 1H）mEPSC 振幅之累積機率曲線證明當相較於經單獨培養 RGC 時，與 hUTC 或 ASC 共培養之 RGC 中的大振幅事件增加。（圖 1I）mEPSC 振幅平均值在不同條件之間無區別。（對於電生理實驗， $n=15$ 個細胞/條件。所有數據表達為平均值 $\pm$ SEM，且顯著性表示為*** $p<0.0001$ 、** $p<0.001$ 、及* $p<0.05$ ，n.s.表示不顯著。）圖 1J 至圖 1M 顯示經 hUTC 及 ASC 共培養誘導突觸之電生理波形性質。相較於 CTR(單獨 RGC)，與 ASC 或 hUTC 共培養之 RGC 所記錄之 mEPSC 顯示（圖 1J、圖 1K）上升 τ 及衰退 τ （圖 1L、圖 1M）兩者皆增加。 $n=15$ 個細胞/條件。所有數據表達為平均值 $\pm$ SEM，且顯著性表示為*** $p<0.0001$ 、** $p<0.001$ 、及* $p<0.05$ 。

【0040】 圖 2A 至圖 2N. hUTC 條件培養基(UCM)誘導經培養 RGC 之間的功能性突觸形成。（圖 2A）實驗設計之示意圖。經純化

RGC 經 UCM (在各種濃度下) 或 ACM 處理 6 天。藉由基於免疫細胞化學及電生理學之檢定分別測定突觸之數目及功能。(圖 2B) 用對突觸前蛋白 (Bassoon 蛋白, 紅色) 及突觸後蛋白 (Homer 蛋白, 綠色) 具特異性之抗體染色之代表性 RGC 影像。底部: 入口處 (白框) 以較高放大率顯示且經共定位之突觸點 (synaptic puncta) (合併, 黃色) 用白色箭頭標記。比例尺: 20 μm 。(圖 2C) 突觸數目之增加倍數 ($n=65$ 至 157 個細胞/條件) 及 (圖 2D) 突觸密度 (每單位樹突長度突觸之數目, $n=30$ 個細胞/條件) 之定量顯示, UCM (類似於 ACM) 誘導經培養 RGC 之間的興奮性突觸形成。(突觸數目之增加倍數係藉由將每細胞經共定位突觸點之數目用單獨 RGC 條件中之突觸數目正規化來計算。(圖 2E) 全細胞膜片鉗記錄之實例跡線顯示經單獨培養或用 ACM (80 $\mu\text{g/mL}$) 或 UCM (80 $\mu\text{g/mL}$) 處理之 RGC 的 mEPSC。mEPSC 之 (圖 2F) 事件間間隔之累積機率曲線及 (圖 2G) 平均頻率之定量顯示, 用 UCM 或 ACM 處理誘導突觸事件數目增加。(圖 2H) mEPSC 振幅之累積機率曲線證明相較於經單獨培養 RGC, 當用 UCM 或 ACM 處理 RGC 時, 大振幅事件增加。(圖 2I) mEPSC 振幅平均值在不同條件之間無顯著區別。(對於電生理實驗, $n=15$ 個細胞/條件。所有數據表達為平均值 $\pm$ SEM, 且顯著性表示為 *** $p<0.0001$ 、** $p<0.001$ 、及* $p<0.05$ 。) 圖 2J 至圖 2N UCM 誘導突觸數目及電生理性質之變化。(圖 2J) 用各種濃度 ACM 及 UCM 處理之 RGC 中的突觸數目定量。結果表示為突觸數目之增加倍數(相對於單獨 RGC 條件中經共定位突觸點數目之數目

正規化， $n=29$ 至 157 個細胞/條件)。經 ACM 或 UCM 處理之 RGC 所記錄之 mEPSC 證明相較於經單獨培養 RGC，(圖 2K、圖 2L) 上升 τ 及 (圖 2M、圖 2N) 衰退 τ 兩者皆增加 ($n=15$ 個細胞/條件)。所有數據表達為平均值 $\pm$ SEM，且顯著性表示為*** $p<0.0001$ 、** $p<0.001$ 、及* $p<0.05$ 。

【0041】 圖 3A 至圖 3J.經 hUTC 分泌因子促進 RGC 生存及神經突外生。(圖 3A) 經生存檢定試劑處理之 RGC 代表影像 (鈣黃綠素-AM 用於活細胞 (綠色) 且乙錠同質二聚體 (Ethidium Homodimer)-1 用於死亡細胞 (紅色))。比例尺：100 μm 。(圖 3B) 相較於最低培養基中培養之 RGC，在各種濃度的 ACM 及 UCM 存在下之 RGC 存活率定量。($n=9$ 至 10 個顯微鏡視野/條件) (圖 3C) UCM 媒介之生存作用在所測試之所有 UCM 濃度下皆為毛喉素依賴性 ($n=9$ 至 18 個顯微鏡視野/條件)。UCM ($40 \mu\text{g/mL}$)之生存作用與 (圖 3D) BDNF 及 (圖 3E) CNTF 之生存作用具有相加性。($n=18$ 至 20 個顯微鏡視野/條件) (圖 3F) 單獨培養或經 ACM 或 UCM 處理之 RGC 的代表性骨架化跡線。比例尺：100 μm 。(圖 3G) 神經突複雜性之 Sholl 分析證明，相較於經單獨培養 RGC，經條件培養基處理 RGC 之精細化增加 ($n=20$ 至 24 個細胞/條件)。相較於經單獨培養 RGC，當用 UCM 或 ACM 處理 RGC 時，(圖 3H) 總神經突外生、(圖 3I) 突起數目及 (圖 3J) 分支數目定量證明增加 ($n=25$ 至 36 個細胞/條件)。圖形表示為相對於單獨 RGC 條件之值正規化

的增加倍數。所有數據表達為平均值 $\pm$ SEM，且顯著性表示為***
 $p<0.0001$ 、** $p<0.001$ 、及* $p<0.05$ ，n.s.表示不顯著。

【0042】 圖 4A 至圖 4E.表徵 UCM 中之突觸形成因子。(圖 4A)
 實驗設計之示意圖。經純化 RGC 用 UCM 處理 6 天，該 UCM 藉由
 使用不同截留分子量之離心濃縮管離拆。隨後如之前所述定量突觸
 數目。(圖 4B) 代表性 RGC 影像顯示經共定位突觸點（突觸前：
 Bassoon 蛋白（紅色），突觸後：Homer 蛋白（綠色）。底部：白框
 以較高放大率顯示。白色箭頭指示經共定位突觸點。比例尺：20 μ m。
 (圖 4C) 定量突觸數目之增加倍數。增加倍數係藉由將經共定位突
 觸點/細胞之數目相對於單獨 RGC 條件中所獲得之值正規化來計算
 (n=30 至 44 個細胞/條件)。(圖 4D) 代表性 RGC 影像顯示在加巴
 噴丁(GBP, 32 μ M)存在或不存在下用 UCM 處理之 RGC 中之經共定
 位突觸點（白色箭頭，突觸前：Bassoon 蛋白（紅色）及突觸後：
 Homer 蛋白（綠色）。比例尺：20 μ m。(圖 4E) 定量相對於單獨
 RGC 條件正規化之突觸數目之增加倍數(n=24 至 25 個細胞/條件)。
 經 UCM 誘導之突觸新生受 GBP 抑制。所有數據表達為平均值 $\pm$ SEM，
 且顯著性表示為*** $p<0.0001$ 、** $p<0.001$ 、及* $p<0.05$ 。

【0043】 圖 5A 至圖 5K. TSP1、TSP2 及 TSP4 為 hUTC 誘導
 突觸新生所需。(圖 5A) TSP 剔除實驗之實驗設計示意圖（圖 5 至
 圖 7）。TSP1、TSP2 及 TSP4 表現係藉由慢病毒 shRNA 轉導 hUTC
 而靜默且收集剔除(KD) UCM。RGC 經 KD UCM 處理 6 天。測定
 UCM 對突觸形成（突觸檢定）、突觸功能（電生理學）、神經元生存

(生存檢定)、及神經突外生(外生檢定)之作用。(圖 5B) 西方墨點法確認使用慢病毒 shRNA 轉導剔除 TSP1、TSP2 及 TSP4。稱為 HEVIN 之不相關之 hUTC 分泌蛋白用作加樣對照組。(圖 5C) 經凌亂對照組 UCM (SCR-CTR)及 TSP-KD UCM 處理之 RGC 中的突觸數目增加倍數係相對於單獨 RGC 條件正規化($n=30$ 個細胞/條件)。(圖 5D) 經各種 TSP-KD UCM 處理之 RGC 中的突觸數目增加倍數係相對於單獨 RGC 條件正規化($n=76$ 至 81 個細胞/條件)。(圖 5E) 在純化 TSP 存在下經 TSP1+2+4-KD UCM 處理之 RGC 中的突觸數目增加倍數係相對於單獨 RGC 條件正規化($n=30$ 個細胞/條件)。添加所有三種 TSP (TSP1、TSP2 及 TSP4) 救援 TSP1+2+4-KD UCM 之突觸新生作用。各種不同處理之 RGC 的代表影像可見圖 5H 至圖 5J。圖 5F 及圖 5G 證明嘌呤黴素對慢病毒感染 hUTC 之選擇。(圖 5F) 未經慢病毒轉導之 hUTC 在各種嘌呤黴素濃度下之第 3 天及第 5 天殺死曲線($n=3$ 個顯微鏡視野/條件)。(圖 5G) 經慢病毒感染及未經慢病毒感染之 hUTC 在嘌呤黴素($0.9 \mu\text{g/mL}$)存在下之第 3 天及第 5 天代表性影像。比例尺： $50 \mu\text{m}$ 。圖 5H 至圖 5L 顯示 hUTC 分泌之 TSP 誘導 RGC 之間的突觸形成。(圖 5H 至圖 5J) 顯示經共定位突觸點之 RGC 代表性影像(突觸前：Bassoon 蛋白(紅色)，突觸後：Homer 蛋白(綠色))證明當使用 TSP1+2+4-KD UCM 時，UCM 之突觸新生活性喪失。該喪失可藉由將純化 TSP1 或 TSP2 或 TSP4 (150 ng/ml)添加至 KD UCM 中而部分救援。添加所有三種 TSP 救援 UCM 之完整突觸新生作用。底部：白框以較高放大率顯

示。白色箭頭指示經共定位突觸點。比例尺：20 μm 。(圖 5K) 在用各種 TSP-KD UCM 處理之後定量突觸密度(經共定位突觸點數目/神經突長度)之變化。(圖 5L)定量經單獨培養 RGC(陰性對照組)或經 KD CTR UCM 處理之 RGC 在純化 TSP 存在下的突觸形成($n=30$ 個細胞/條件)。將純化 TSP 添加至 KD CTR UCM 中不引起突觸數目進一步增加。所有數據表達為平均值 $\pm$ SEM, 且顯著性表示為*** $p<0.0001$ 、** $p<0.001$ 、及* $p<0.05$, n.s.表示不顯著。

【0044】 圖 6A 至圖 6I. TSP1、TSP2 及 TSP4 為 hUTC 誘導突觸功能增加所需。(圖 6A)全細胞膜片鉗記錄之實例跡線顯示經 AMC (陽性對照組)、SCR-CTR、TSP1+2+4-KD UCM 處理之 RGC 或經單獨培養 RGC(陰性對照組)之 mEPSC。UCM (TSP1+2+4-KD) 中 TSP 之靜默廢除由 SCR-CTR 達成之(圖 6B、圖 6C)頻率及(圖 6D、圖 6E)振幅兩者之增加。定量數據係顯示為累積機率曲線(圖 6B、圖 6D)及平均值之柱狀圖(圖 6C、圖 6E)。 $n=15$ 個細胞/條件。

(圖 6F)全細胞膜片鉗記錄之實例跡線顯示經 ACM(陽性對照組)、SCR-CTR 或 TSP1+2+4-KD UCM 處理之 RGC 或經單獨培養 RGC(陰性對照組)之 mEPSC。UCM (TSP1+2+4-KD)中 TSP 之靜默廢除由 SCR-CTR 達成之頻率(圖 6G 至圖 6H)及振幅(圖 6I 至圖 6J)兩者之增加。定量數據係顯示為累積機率曲線(圖 6G、圖 6I)及平均值之柱狀圖(圖 6H、圖 6J)。 $n=15$ 個細胞/條件。圖 6K 至圖 6N 證明 TSP 剔除對經 UCM 處理 RGC 之波形性質之作用。(圖 6K、圖 6L)上升 τ 或(圖 6M、圖 6N)衰退 τ 不受 hUTC 中 TSP 表現靜默

之顯著影響，如藉由經 KD-CTR 及 TSP1+2+4-KD UCM 處理之 RGC 記錄之間具有類似值所證明（ $n=15$ 個細胞/條件）。所有數據表達為平均值 $\pm$ SEM，且顯著性表示為*** $p<0.0001$ 、** $p<0.001$ 、及* $p<0.05$ 。

【0045】 圖 7A 至圖 7O. TSP 為 UCM 誘導神經突外生所需，但不為細胞生存所需。（圖 7A）經 SCR-CTR、KD-CTR 或 TSP1+2+4-KD UCM 處理之 RGC 相較於單獨 RGC（陰性對照組）之代表性骨架化跡線。比例尺：100 μ m。相較於兩個對照組（SCR-CTR 及 KD-CTR），TSP 靜默之 hUTC UCM (TSP1+2+4-KD UCM)導致總神經突外生之（圖 7B）長度、（圖 7C）突起及（圖 7D）分支減少（ $n=40$ 至 48 個細胞/條件）。hUTC 中之 TSP 靜默導致降低（圖 7E）總神經突外生長度（ $n=120$ 至 169 個細胞/條件）及（圖 7F）由 Sholl 分析所示之複雜性（ $n=25$ 個細胞/條件）之 UCM。#指示相較於單獨 RGC 條件，總外生顯著減少($p<0.05$)。（圖 7G）經 KD-CTR 處理或經 TSP1+2+4-KD UCM 在純化 TSP 存在下處理之 RGC 之代表性骨架化跡線。比例尺：100 μ m。將純化 TSP 添加至 TSP1+2+4-KD UCM 中恢復 UCM 增強（圖 7H）總神經突生長（ $n=29$ 至 33 個細胞/條件）及（圖 7I）複雜性（ $n=30$ 個細胞/條件）之功能。#指示相較於單獨 RGC 條件，總外生顯著減少($p<0.05$)。（圖 7J）經生存檢定試劑處理之 RGC 代表影像（鈣黃綠素-AM 用於活細胞（綠色）且乙錠同質二聚體-1 用於死亡細胞（紅色））。比例尺：100 μ m。（圖 7K）定量經各種 TSP-KD UCM 條件處理之 RGC 的存活百分比（ $n=30$ 個顯微

鏡視野/條件)。TSP2 或 TSP4 或所有三種 TSP 之靜默導致 UCM 之生存促進作用減小。(圖 7L) 將純 TSP 添加至 TSP1+2+4-KD UCM 中不恢復 KD-UCM 之完整生存作用 (n=20 個顯微鏡視野/條件)。圖 7M 至圖 7O 顯示 TSP 涉及 UCM 誘導之 RGC 神經突外生。(圖 7M) 經 SCR-CTR、KD-CTR 及 TSP-KD UCM 處理之 RGC 相較於單獨 RGC (陰性對照組) 之代表性骨架化跡線。比例尺: 100 μm 。hUTC 中之 TPS 剔除導致 (圖 7N) 突起及 (圖 7O) 分支數目減少 (n=120 至 169 個細胞/條件)。將突起及分支數目之倍數變化相對於單獨 RGC 對照組正規化。圖 7P 至圖 7R 顯示添加純化 TSP 救援 TSP1+2+4-KD UCM 之神經突外生功能。(圖 7P) 經 KD-CTR 處理或經 TSP1+2+4-KD UCM 在純化 TSP 存在下處理之 RGC 之代表性骨架化跡線。比例尺: 100 μm 。將純化 TSP 添加回 TSP1+2+4-KD UCM 中 (圖 7Q) 對突起數目僅具有些微作用, 但 (圖 7R) 恢復分支數目之倍數變化 (n=29 至 33 個細胞/條件)。所有數據表達為平均值 $\pm$ SEM, 相對於單獨 RGC 正規化, 且顯著性表示為*** $p<0.0001$ 、** $p<0.001$ 、及* $p<0.05$ 。

【0046】 圖 8A 至 8J.在 CSPG、Nogo-A 或 MBP 存在下, hUTC 分泌之 TSP 誘導神經突外生。總神經突外生之定量係於塗布有遞增濃度之 (圖 8A) CSPG (n=45 至 79 個細胞/條件) 或 (圖 8B) Nogo-A (n=30 至 37 個細胞/條件) 之蓋玻片上進行。圖形表示為相對於接種於不含有 CSPG 或 Nogo-A 之蓋玻片上的 RGC 外生值正規化的增加倍數。接種至 (圖 8C) CSPG (0.05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 或 (圖 8D) Nogo-A (1

ug/cm²)塗布蓋玻片上之經 SCR-CTR、TSP KD UCM 及純化 TSP 處理之 RGC 的代表性骨架化跡線。比例尺：100 μm。圖 8E 至圖 8F. 總神經突外生之定量係於接種至 (圖 8E) CSPG (0.05 ug/cm², n=62 至 103 個細胞/條件) 或 (圖 8F) Nogo-A (1 ug/cm², n=25 至 29 個細胞/條件) 塗布蓋玻片上之 RGC 進行。圖形表示為相對於僅經生長培養基 (單獨 RGC) 培養之 RGC 值正規化之各種培養條件下的增加倍數。(圖 8G) 在 MBP (10 ug/mL)存在下, 經 SCR-CTR 或 TSP1+2+4-KD UCM 單獨或補充純化 TSP 處理之 RGC 之代表性骨架化跡線。比例尺：100 μm。(圖 8H) 在生長抑制物質存在下, 經純化 TSP 處理之 RGC 之代表性骨架化跡線。比例尺：100 μm。(圖 8I) 總神經突外生之定量證明在 MBP 存在下, 經 UCM 分泌 TSP2 之神經突外生活性增強。(n=40-54 個細胞/條件)。圖形表示為相對於單獨 RGC 條件之值正規化的增加倍數。(圖 8J) 在 CSPG、Nogo-A 或 MBP 存在下, 用純化 TSP 處理 RGC 能夠誘導顯著外生 (n=41 至 54 個細胞/條件)。所有數據表達為平均值±SEM, 且顯著性表示為*** $p<0.0001$ 、** $p<0.001$ 、及* $p<0.05$, n.s.表示不顯著。#指示相較於單獨 RGC 條件, 總外生顯著減少($p<0.05$)。

【0047】 本發明之其他特性與益處將因以下之詳細說明與實例而清楚易見。

【實施方式】

【0048】 本說明書中提及各種專利及其他出版物。這些出版物之各者之全部內容以引用方式併入本文中。在下列說明性實施例之

詳細說明中，參照形成本說明書之一部分的隨附圖式。這些實施例係以足夠詳細之方式說明以讓熟習該項技術者能夠實行本發明，並會理解到尚可利用其他實施例，而且可在不偏離本發明之精神或範疇下作出邏輯結構、機械、電性與化學上的變化。為了避免非為所屬技術領域中具有通常知識者能夠實行本文中所述之實施例所需之細節，本說明書可能會省略某些所屬技術領域中具有通常知識者所習知之資訊。因此，以下實施方式不應理解為限制性意義，且說明性實施例之範疇由隨附申請專利範圍所限定。

定義

【0049】 本說明書及申請專利範圍中所使用之各種用語如以下闡述所定義且意欲闡明本發明。

【0050】 幹細胞(stem cell)為未分化之細胞，其係以單一細胞同時具有自我更新及分化以生產後裔細胞(progeny cell)的能力來定義，包括自我更新前驅(self-renewing progenitor)、非更新前驅(non-renewing progenitor)與最終分化細胞(terminally differentiated cell)。幹細胞之特徵亦在於其具有體外分化為多個胚層（內胚層、中胚層與外胚層）之各種細胞譜系之功能性細胞的能力，以及在移植後形成多個胚層之組織的能力，並且能夠在注入胚胎(blastocyst)後實質上促成大多數（如果不是全部）組織形成。

【0051】 幹細胞依據其發展潛能分類如下：(1)全能性(totipotent)；(2)多能性(pluripotent)；(3)多潛能性(multipotent)；(4)

少能性(oligopotent)；與(5)單能性(unipotent)。全能性細胞能夠形成所有胚胎與胚外細胞型。多能性細胞能夠形成所有胚胎細胞型。多潛能性細胞包括該些能夠形成細胞譜系亞群，但全部在特定組織、器官、或生理系統內之細胞（例如，造血幹細胞(HSC)可生產後裔，包括 HSC（自我更新）、血液細胞限制少能性前驅、及作為血液正常組分之所有細胞型及元件（例如，血小板））。少能性細胞可以形成比多潛能性幹細胞更受限之細胞譜系亞群；及單能性細胞能夠形成單一細胞譜系（例如生精幹細胞）。

【0052】 幹細胞亦根據其獲得來源來分類。成體幹細胞(adult stem cell)通常為多潛能性未分化細胞，其在包含多重分化細胞型之組織中發現。成體幹細胞可自我更新。在正常環境下，其亦可分化以產生其始源組織之特化細胞型，並且亦可能產生其他組織型。誘導多能性幹細胞（iPS 細胞）為轉化成多能性幹細胞之成體細胞。

（Takahashi 等人，*Cell*, 2006; 126(4):663-676；Takahashi 等人，*Cell*, 2007;131:1-12）。胚胎幹細胞(embryonic stem cell)為來自胚胎階段胚胎之內細胞團(inner cell mass)的多能性細胞。胎體幹細胞(fetal stem cell)為源自胎體組織或膜之幹細胞。產後幹細胞(postpartum stem cell)為多潛能性或多能性細胞，其實質上源自生產後所能取得之胚外組織，亦即胎盤及臍帶。已發現這些細胞擁有多能性幹細胞之特性特徵，包括快速增生及分化為多種細胞譜系之潛能。產後幹細胞可為血液衍生（例如該些得自臍帶血之幹細胞）或非血液衍生（例如得自臍帶及胎盤之非血液組織）。

【0053】 胚胎組織通常定義為源自胚胎（在人類係指自受精至發育約六週之期間）之組織。胎體組織係指源自胎體之組織，胎體在人類係指自發育約六週至分娩之期間。胚外組織為與胚胎或胎體相關但非源自胚胎或胎體之組織。胚外組織包括胚外膜（絨毛膜、羊膜、卵黃囊及尿囊）、臍帶及胎盤（其自身形成自絨毛膜及母體底蛻膜）。

【0054】 分化 (Differentiation) 為未特化（「未定向 (uncommitted)」）或特化較低之細胞藉以獲得特化細胞（諸如舉例來說神經細胞或肌肉細胞）特徵的過程。已分化細胞為佔據細胞譜系內較高特化（「定向 (committed)」）位置之細胞。用語定向 (committed) 當應用於分化過程時，係指細胞在分化路徑中已進行達到一點，在正常環境下達到該點之細胞將會持續分化為特定細胞型或細胞型亞群，並且在正常環境下無法分化為不同細胞型或回復為較低分化之細胞型。去分化 (De-differentiation) 係指細胞藉以回復至細胞譜系內較低特化（或定向）位置的過程。如本文中所使用，細胞之譜系 (lineage) 定義細胞之遺傳，即細胞係來自哪些細胞以及細胞可形成哪些細胞。細胞之譜系將細胞放置於發育及分化之遺傳方案 (hereditary scheme) 內。

【0055】 廣義而言，前驅細胞 (progenitor cell) 為能夠產生較其本身更高分化之後裔，但又保有補充前驅池之能力的細胞。就此定義而言，幹細胞本身亦為前驅細胞，如同終末分化細胞之較直接前體細胞 (more immediate precursor)。當提及本發明之細胞時，如以下

所更詳述說明者，可使用此較廣之前驅細胞定義。狹義而言，前驅細胞通常定義為在分化路徑中作為中間者之細胞，即其係由幹細胞所形成並且在成熟細胞型或細胞型亞群之生產中作為中間者。此類型之前驅細胞通常無法自我更新。因此，如果在本文中提及此類型之細胞，將會稱其為非更新前驅細胞(non-renewing progenitor cell)或中間前驅或前體細胞(intermediate progenitor or precursor cell)。

【0056】 如本文中所使用，片語「分化成眼譜系或表型(differentiates into an ocular lineage or phenotype)」係指細胞變得部分或完全定向至特定眼表型，包括但不限於視網膜及角膜幹細胞、視網膜及虹膜之色素上皮細胞、光受體、視網膜神經節及其他視神經譜系（例如，視網膜神經膠細胞、微膠細胞、星狀細胞、繆氏細胞(Mueller cell)）、形成水晶體之細胞、及鞏膜、角膜、角膜緣(limbus)及結膜之上皮細胞。片語「分化成神經譜系或表型(differentiates into a neural lineage or phenotype)」係指細胞變得部分或完全定向至 CNS 或 PNS 之特定神經表型，亦即，神經元或膠細胞，後一類別包括但不限於星狀細胞、寡樹突細胞、許旺氏細胞(Schwann cell)及微膠細胞。

【0057】 本文所例示且較佳用於本發明之細胞通常稱為產後衍生細胞（或 PPDC）。其有時亦可更具體地被稱為臍衍生細胞或胎盤衍生細胞（UDC 或 PDC）。此外，該些細胞可被描述為幹細胞或前驅細胞(progenitor cell)，後項用語係以廣義的方式來使用。用語衍生(derived)係用來指明細胞係得自其生物來源，且於體外生長或

經其他方式調控（例如培養於生長培養基以擴增族群及/或生產細胞系(cell line)）。臍幹細胞及胎盤幹細胞之體外調控以及本發明之臍衍生細胞及胎盤衍生細胞之獨有特性係詳述於後文中。藉由其他手段分離自產後胎盤及臍之細胞亦被認為適合用於本發明中。這些其他細胞在本文中稱為產後細胞（而非產後衍生細胞）。

【0058】 使用各種用語來描述在培養物中之細胞。細胞培養物(cell culture)通常係指取自活體生物並且在受控制條件下生長（「在培養物中(in culture)」或「經培養(cultured)」）的細胞。初代細胞培養物(primary cell culture)為直接取自生物且在第一次亞培養前之細胞、組織或器官的培養物。當細胞置於生長培養基中並處於有利細胞生長及/或分裂之條件下時，其在培養物中擴增從而導致更大的細胞群。當細胞在培養物中擴增時，細胞增生之速率有時係以細胞數目倍增所需的時間量來量測。此稱為倍增時間(doubling time)。

【0059】 細胞系(cell line)為由初代細胞培養物之一或多個亞培養(subcultivation)所形成的細胞群。每一輪亞培養稱為一個繼代(passage)。當細胞經過亞培養時，將它們稱為已繼代。特定之細胞群或細胞系有時會以其繼代次數來指稱或表徵。例如，繼代十次的經培養細胞群可稱為 P10 培養物。初代培養物（在細胞自組織分離出來後的第一次培養物）係命名為 P0。在第一次亞培養後，該些細胞係描述為二次培養物（P1 或繼代 1）。在第二次亞培養後，該些細胞即變成三次培養物（P2 或繼代 2），依此類推。所屬技術領域中具有通常知識者將會理解到，在繼代期間會有多次族群倍增；因此，

培養物之族群倍增次數大於其繼代次數。在繼代間隔期間的細胞擴增（即族群倍增次數）取決於許多因素，包括但不限於接種密度、基材、培養基、生長條件及繼代間隔時間。

【0060】 用語生長培養基(Growth Medium)通常係指足以培養 PPDC 之培養基。詳言之，用於培養本發明之細胞的一種目前較佳培養基包含達爾伯克改良必需培養基(Dulbecco's Modified Essential Media)（在本文中亦縮寫為 DMEM）。尤其較佳的是 DMEM-低葡萄糖（在本文中亦稱為 DMEM-LG）(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)。DMEM-低葡萄糖較佳係補充有 15% (v/v)胎牛血清（例如限定之胎牛血清，Hyclone, Logan Utah）、抗生素/抗黴劑（較佳 50 至 100 個單位/毫升青黴素、50 至 100 微克/毫升鏈黴素、及 0 至 0.25 微克/毫升兩性黴素 B；Invitrogen, Carlsbad, Calif.）、及 0.001% (v/v) 2-巰基乙醇(Sigma, St. Louis Mo.)。如以下實例中所使用，生長培養基係指具有 15%胎牛血清及抗生素/抗黴劑之 DMEM-低葡萄糖（當包括青黴素/鏈黴素時，其較佳分別為 50 U/ml 及 50 微克/ml；當使用青黴素/鏈黴素/兩性黴素時，其較佳分別為 100 U/ml、100 微克/ml 及 0.25 微克/ml）。在一些情況下，使用不同生長培養基，或提供不同補充劑，這些通常在文中指明為生長培養基之補充劑。

【0061】 條件培養基(conditioned medium)為其中特定細胞或細胞群係經培養且隨後移除之培養基。當細胞培養於培養基中時，其可分泌可提供營養支持給其他細胞之細胞因子。此類營養因子包

括但不限於荷爾蒙、細胞介素、細胞外基質(ECM)、蛋白質、囊泡、抗體、及顆粒。含有細胞因子之培養基為條件培養基。

【0062】 通常，營養因子(trophic factor)係定義為促進細胞生存、生長、分化、增生及/或成熟之物質，或刺激細胞提高活性之物質。細胞之間經由營養因子的交互作用可發生在不同類型的細胞之間。藉助營養因子之細胞交互作用見於基本上所有的細胞型中，且為神經細胞型之通訊所尤其顯著的手段。營養因子亦可以自泌(autocrine)之方式作用，亦即，細胞可生產影響其自身生存、生長、分化、增生及/或成熟之營養因子。

【0063】 當提及經培養脊椎動物細胞時，用語衰老(senescence)（還有複製性衰老(replicative senescence)或細胞衰老(cellular senescence)）係指歸因於有限細胞培養物之性質；亦即，其無法生長超過有限的族群倍增次數（有時稱為海富利克界限(Hayflick's limit)）。儘管細胞衰老最先係使用纖維母細胞樣細胞(fibroblast-like cell)來描述，但是可在培養物中成功生長之大部分正常人類細胞型均經歷細胞衰老。不同細胞型之體外壽命不同，但是最大壽命通常少於 100 次族群倍增（此為培養物中之所有細胞變衰老且因此使培養物無法分裂之倍增次數）。衰老並非取決於時序時間，而是由培養物所經歷之細胞分裂、或族群倍增之次數所量測。

【0064】 用語眼(ocular)、眼科(ophthalmic)及視(optic)在本文中可互換使用以定義「眼睛的、或有關眼睛、或與眼睛相關(of, or about, or related to the eye)」。

【0065】 用語眼變性病狀(ocular degenerative condition) (或病症(disorder)) 為包括性用語，涵蓋涉及細胞損傷、變性或損失之眼睛（包括眼睛與腦之間的神經連接）的急性及慢性病狀、病症或疾病。眼變性病狀可與年齡有關，或可因受傷或創傷所致，或可與特定疾病或病症有關。急性眼變性病狀包括但不限於與細胞死亡相關之病狀或影響眼睛的損害，包括由以下引起之病狀：腦血管機能不全、局灶性或瀰漫性腦創傷、瀰漫性腦損傷、傳染性或發炎性眼睛病狀、視網膜裂開或脫附、眼內病灶（挫傷穿透、壓迫、撕裂）或其他身體受傷（例如，物理或化學灼傷）。慢性眼變性病狀（包括進行性病狀）包括但不限於視網膜病變及其他視網膜/黃斑病症，諸如色素性視網膜炎(RP)、年齡相關性黃斑變性(AMD)、脈絡膜新生血管膜(CNVM)；視網膜病變，諸如糖尿病視網膜病變、閉塞性視網膜病變、鐮狀細胞視網膜病變及高血壓視網膜病變、中央視網膜靜脈阻塞、頸動脈狹窄、視神經病變，諸如青光眼及相關症候群；水晶體及外眼之病症例如角膜緣幹細胞缺乏(LSCD)，亦稱為角膜緣上皮細胞缺乏(LECD)，諸如發生於化學或熱受傷中、Stevens-Johnson 二氏症候群、隱形眼鏡誘導之角膜病變、眼瘢痕性類天皰瘡、先天無肛膜或外胚層發育不良疾病、及多發性內分泌缺乏相關角膜炎。

【0066】 用語治療眼變性病狀(treating an ocular degenerative condition)或眼變性病狀之治療(treatment of an ocular degenerative condition)係指緩解如本文所定義之眼變性病狀之作用，或延緩、暫停或逆轉眼變性病狀之進展，或延緩或預防眼變性病狀之發生。

【0067】 用語有效量(effective amount)係指試劑或醫藥組成物諸如生長因子、分化劑、營養因子、細胞群或其他藥劑之濃度或量，該濃度或量可有效產生預期結果，包括如本文所述之體外或體內之細胞生長及/或分化，或治療眼變性病狀。關於生長因子，有效量可在約 1 奈克/毫升至約 1 微克/毫升之範圍內。關於向患者體內投予之 PPDC，有效量可在少至數百或更少、至多達數百萬或更多之範圍內。在特定實施例中，有效量可在 10^3 至 11^{11} 個細胞之範圍內，更特定言之為至少約 10^4 個細胞。應理解待投予之細胞數目將取決於待治療病症之細節，包括但不限於待治療之大小或總體積/表面積，以及投予位點與待治療區域之位置之靠近性，以及醫藥生物學家熟悉的其他因素而變化。

【0068】 用語有效期間(effective period)（或時間(time)）及有效條件(effective condition)係指對於劑或醫藥組成物而言，為達成其預期結果所必需或較佳的時間期間或其他可控條件（例如，體外方法之溫度、濕度）。

【0069】 用語患者(patient)或對象(subject)係指用本文所述之醫藥組成物或根據本文所述之方法治療之動物，包括哺乳動物，較佳為人類。

【0070】 用語醫藥上可接受之載劑(pharmaceutically acceptable carrier)（或培養基(medium)）可與用語生物可相容之載劑或培養基(biologically compatible carrier or medium)互換使用，係指試劑、細胞、化合物、材料、組成物、及/或劑型，其不僅可與供治療性投予

之細胞及其他藥劑相容，而且在合理的醫學判斷之範疇內適用於與人類及動物之組織接觸，而無過度毒性、刺激、過敏反應、或符合合理的利益/風險比的其他併發症。

【0071】 在本文中使用若干關於細胞置換療法 (cell replacement therapy) 之用語。用語自體轉移 (autologous transfer)、自體移植 (autologous transplantation)、自體移接 (autograft) 及類似用語係指其中細胞捐贈者亦為細胞置換療法之接受者之治療。用語同種異體轉移 (allogeneic transfer)、同種異體移植 (allogeneic transplantation)、同種異體移接 (allograft) 及類似用語係指其中細胞捐贈者與細胞置換療法之接受者為相同物種，但非相同個體之治療。捐贈者細胞與接受者組織相容性匹配之細胞轉移有時稱為同基因轉移 (syngeneic transfer)。用語異種轉移 (xenogeneic transfer)、異種移植 (xenogeneic transplantation)、異種移接 (xenograft) 及類似用語係指其中細胞捐贈者與細胞置換療法之接受者為不同物種之治療。如本文中所使用之移植係指將自體、或同種異體捐贈者細胞置換療法引入至接受者。

【0072】 如本文中所使用，用語「約」在指稱一可測量的值（例如數量、持續時間及類似者）時，意欲涵蓋在指定值之 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更佳為 $\pm 5\%$ 、甚至更佳為 $\pm 1\%$ 、且仍更佳為 $\pm 0.1\%$ 內的變異，若此類變異為適合執行所揭露之方法者。

說明

【0073】 眼變性病狀涵蓋成因分歧之急性、慢性及進行性病變及疾病，共同特徵為特定或易受傷害之眼細胞群的功能異常或損失。此共同性使能夠開發用於修復或再生易受傷害、受損或失去之眼組織或細胞之類似治療方式，其中之一為基於細胞之療法。眼變性病狀之細胞療法的開發受限於相對較少類型的幹細胞或前驅細胞，包括眼衍生幹細胞本身（例如，視網膜及角膜幹細胞）、胚胎幹細胞及少數類型的成體幹細胞或前驅細胞（例如，神經、黏膜上皮及骨髓幹細胞）。分離自產後臍帶及胎盤之細胞已被識別為適用於此目的之前驅細胞之顯著新來源。（US 2005-0037491 及 US 2010-0272803）。此外，由分離自產後胎盤及臍帶組織之細胞所產生之條件培養基提供另一種用於治療眼變性病狀之新來源。因此，在本文所述之各種實施例中，本發明之特徵在於用於（修復及再生眼組織）之方法及醫藥組成物，該方法及醫藥組成物使用來自前驅細胞諸如分離自產後臍帶或胎盤之細胞的條件培養基。本發明適用於眼變性病狀，但預期尤其適用於一些難以治療或治癒或無可得治療或療法之眼病症。這些眼病症包括但不限於年齡相關性黃斑變性、色素性視網膜炎、糖尿病性及其他視網膜病變。

【0074】 預期衍生自前驅細胞（諸如根據所屬技術領域中已知之任何方法分離自產後臍帶或胎盤之細胞）之條件培養基適合用於本發明中。然而，在一實施例中，本發明使用衍生自如上文所定義之臍帶組織衍生細胞(hUTC)或胎盤組織衍生細胞(PDC)之條件培養基，該等細胞係衍生自較佳地根據下文所述之方法使之實質上不含

血液之臍帶組織或胎盤。hUTC 或 PDC 能夠在培養物中擴增且具有分化成其他表型之細胞的潛能。某些實施例之特徵在於由此類前驅細胞所製備之條件培養基、包含條件培養基之醫藥組成物、及使用該醫藥組成物治療急性或慢性眼變性病狀患者之方法。本發明之產後衍生細胞係經其在培養物中之生長性質、其細胞表面標記、其基因表現、其生產某些生化營養因子之能力、及其免疫性質表徵。衍生自產後衍生細胞之條件培養基係經該些細胞所分泌之營養因子表徵。

製備細胞

【0075】 用於本發明之組成物及方法中之細胞、細胞群及包含細胞溶解產物、條件培養基及其類似物之製劑係描述於本文，且詳細描述於美國專利第 7,524,489 號、及第 7,510,873 號、及美國公開申請案第 2005/0058634 號中，其各自以引用方式併入本文中。根據使用產後細胞之該些方法，將哺乳動物臍帶及胎盤在足月或不足月懷孕結束時或結束後不久例如在排出胎衣(after-birth)後回收。產後組織可在無菌容器例如燒瓶、燒杯、培養皿或袋中自生產地運輸至實驗室。該容器可具有溶液或培養基，包括但不限於鹽溶液如達爾伯克改質伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)，或者任何用來運輸用於移植之器官的溶液如威斯康辛大學溶液(University of Wisconsin solution)或全氟化化合物溶液(perfluorochemical solution)。可將一或多種抗生

素及/或抗黴劑（例如但不限於青黴素 (penicillin)、鏈黴素 (streptomycin)、兩性黴素 B (amphotericin B)、建它黴素 (gentamicin) 與制黴菌素 (nystatin)）加至該培養基或緩衝液。產後組織可用抗凝劑溶液例如含肝素溶液來潤洗。較佳者為使該組織在萃取 PPDC 前保持在約 4-10°C 下。更佳者為使該組織在萃取 PPDC 前未經冷凍。

【0076】 PPDC 之分離較佳為在無菌環境中進行。臍帶可藉由該項技術領域中習知之手段來與胎盤分開。或者，臍帶與胎盤未經分開即可使用。較佳為在分離 PPDC 前自產後組織移除血液與碎屑。例如，產後組織可用緩衝液來清洗，諸如但不限於磷酸鹽緩衝鹽水。清洗緩衝液亦可包含一或多種抗黴劑及/或抗生素，諸如但不限於青黴素、鏈黴素、兩性黴素 B、建它黴素及制黴菌素。

【0077】 包含完整胎盤或臍帶、或其片段或區段之產後組織係藉由機械力（切碎或剪切力）來崩解。在目前較佳實施例中，分離程序亦利用酶消化法。許多種酶在該項技術領域中係習知可用來自複雜組織基質中分離出個別細胞以利於在培養物中生長。此類酶為市售可得，範圍從弱消化性（例如去氧核糖核酸酶及中性蛋白酶分散酶 (dispase)）到強消化性（例如木瓜酶及胰蛋白酶）皆有。相容於本文中之酶的非詳盡無遺清單包括黏液分解酶活性物、金屬蛋白酶 (metalloprotease)、中性蛋白酶、絲胺酸蛋白酶（例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶或彈性蛋白酶）與去氧核糖核酸酶。目前較佳者為選自金屬蛋白酶、中性蛋白酶與黏液分解酶活性物之酶活性物。例如，膠原蛋白酶已知可用來自組織分離出各種細胞。去氧核糖核酸酶可

消化單股 DNA 並且可使分離期間的細胞結塊(cell clumping)降至最低。較佳方法涉及用例如膠原蛋白酶及分散酶、或膠原蛋白酶、分散酶、及玻尿酸酶進行酶處理，且提供此類方法，其中在某些較佳實施例中，膠原蛋白酶與中性蛋白酶分散酶之混合物係用於解離步驟中。更佳者為該些於至少一種來自溶組織芽胞梭菌(*Clostridium histolyticum*)之膠原蛋白酶以及蛋白酶活性物、分散酶與嗜熱菌蛋白酶中之任一者存在下來進行消化之方法。再佳者為同時使用膠原蛋白酶與分散酶酶活性物來進行消化之方法。同樣較佳者為包括除了膠原蛋白酶與分散酶活性物外使用玻尿酸酶活性物來進行消化之方法。熟悉該項技藝人士將會瞭解到，許多種此類酶處理在該項技術領域中皆為習知可用於自各種組織來源分離出細胞。舉例而言，酶組合之 LIBERASE™ Blendzyme 3 (Roche)系列適合用於本發明方法中。其他酶來源為習知者，並且熟悉該項技藝人士亦可直接自此類酶之天然來源獲得這些酶。熟悉該項技藝人士亦擁有充足知識，能夠針對新的或其他酶或酶組合在用於分離本發明之細胞方面評估其實用性。較佳酶處理費時 0.5、1、1.5 或 2 小時或更久。在其他較佳實施例中，組織在解離步驟之酶處理期間係培養於 37°C 下。

【0078】 在本發明之一些實施例中，產後組織係分開為包含各種組織態樣舉例而言例如胎盤之新生兒、新生兒/母體及母體態樣的區段。分開之區段接著根據本文中所述之方法藉由機械及/或酶解離來解離。新生兒或母體譜系之細胞可藉由該項技術領域中習知的任

何手段來識別，例如藉由核型分析(karyotype analysis)或 Y 染色體之原位雜交。

【0079】 經分離之細胞或 PPDC 自其所生長出之產後組織可用來起始或接種細胞培養物。將經分離之細胞轉移至無菌組織培養容器，並且容器未經塗布或經細胞外基質或配體如層黏蛋白、膠原蛋白（原生、變性或交聯）、明膠、纖維蛋白素與其他細胞外基質蛋白質塗布。PPDC 係於任何能夠維持該等細胞生長之培養基中培養，諸如但不限於 DMEM（高或低葡萄糖）、進階 DMEM、DMEM/MCDB 201、伊格爾基礎培養基(Eagle's basal medium)、哈姆 F10 培養基((Ham's F-10 medium, F10)、哈姆 F-12 培養基、伊思考夫改質達爾伯克培養基(Iscove's modified Dulbecco's medium)、間葉幹細胞生長培養基(Mesenchymal Stem Cell Growth Medium, MSCGM)、DMEM/F12、RPMI 1640 及 cellgro FREE™。培養基可補充一或多種組分，包括例如胎牛血清(FBS)(較佳為約 2-15% (v/v))；馬血清(ES)；人血清(HS)；β-巰基乙醇(beta-mercaptoethanol, BME 或 2-ME)，較佳為約 0.001% (v/v))；一或多種生長因子，例如血小板衍生生長因子(PDGF)、表皮生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、血管內皮生長因子(VEGF)、類胰島素生長因子-1 (IGF-1)、白血球抑制因子(LIF)及紅血球生成素；胺基酸，包括 L-纈胺酸；以及一或多種抗生素及/或抗黴劑以控制微生物污染，例如青黴素 G、硫酸鏈黴素、兩性黴素 B、建它黴素及制黴菌素，不論單獨或組合使用。培養基較佳包含生長培養基(DMEM-低葡萄糖、血清、BME、及抗生素)。

【0080】 細胞係以允許細胞生長之密度接種於培養容器中。在一較佳實施例中，細胞在約 0 至約 5 體積百分比的 CO₂ 在空氣中培養。在一些較佳實施例中，細胞在約 2 至約 25 百分比的 O₂ 在空氣中、較佳在約 5 至約 20 百分比的 O₂ 在空氣中培養。細胞較佳在約 25 至約 40°C 下培養，且更佳在 37°C 下培養。細胞較佳於培養器中培養。培養容器中的培養基可為靜止或經攪拌，例如使用生物反應器。較佳為使 PPDC 在低氧化應力(oxidative stress)下生長（例如添加麩胱甘肽、維生素 C、過氧化氫酶、維生素 E、N-乙醯半胱胺酸）。如本文所用之「低氧化應力(Low oxidative stress)」係指對於所培養細胞無自由基傷害或最低自由基傷害之條件。

【0081】 用於選擇最適當培養基、培養基製備與細胞培養技術之方法在該項技術領域為熟知者，並且係描述於各種不同來源中，包括 Doyle 等人，(編)，1995, Cell & TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley & Sons, Chichester；與 Ho 及 Wang(編)，1991, ANIMAL CELL BIOREACTORS, Butterworth-Heinemann, Boston，上述皆以引用方式併入本文中。

【0082】 在培養分離之細胞或組織片段一段足夠時間後，PPDC 將會生長出來，此係因自產後組織遷移出來或因細胞分裂所致，或者兩者皆是。在本發明的一些實施例中，PPDC 係經繼代或移除至含有與初始使用之培養基相同或不同類型之新鮮培養基的分開培養容器中，其中細胞群可經有絲分裂擴增。本發明之細胞可在

繼代 0 與衰老之間的任何時點使用。較佳為將細胞繼代約 3 與約 25 次之間，更佳為繼代約 4 至約 12 次，並且較佳為繼代 10 或 11 次。可執行選殖(Cloning)及/或次選殖(subcloning)以確認已分離出細胞的殖株族群(clonal population)。

【0083】 在本發明之一些態樣中，存在於產後組織中的不同細胞型係經離拆(fractionated)為亞群，而 PPDC 可自該些亞群分離出來。此可使用細胞分離標準技術來達成，包括但不限於進行酶處理以將產後組織解離為其組分細胞，接著選殖及選擇特定細胞型，例如但不限於根據形態及/或生化標記來選擇；選擇性生長所欲之細胞（正向選擇）、選擇性破壞不欲之細胞（負向選擇）；根據混合族群中之差別細胞可凝集性來進行分離，例如使用黃豆凝集素；冷凍-解凍程序；在混合族群中之細胞的差別貼附性；過濾；傳統區帶(zonal)離心；離心淘析（對流離心(counter-streaming centrifugation)）；單元重力分離(unit gravity separation)；逆流分配(countercurrent distribution)；電泳；及螢光活化細胞分選(FACS)。有關殖株選擇及細胞分離技術之綜述，參見 Freshney, 1994, CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES，第 3 版，Wiley-Liss, Inc., New York，其以引用方式併入本文。

【0084】 視需要更換培養基，例如使用例如吸量管小心將培養基自皿吸出，然後以新鮮培養基補足。持續培養直到皿中累積足夠細胞數目或密度。可將原始外植之組織區段取出，然後使用標準技術或使用細胞刮杓來讓剩餘細胞進行胰蛋白酶消化(trypsinized)。在

胰蛋白酶消化後，將細胞收集、移至新鮮培養基然後如上述培養。在一些實施例中，培養基在胰蛋白酶消化後約 24 小時更換至少一次以移除任何飄浮細胞。培養物中剩餘之細胞被視為是 PPDC。

【0085】 PPDC 可經凍存。因此，在以下更詳細描述之較佳實施例中，用於自體轉移之 PPDC（無論是用於母親或嬰兒）可衍生自在嬰兒出生後之適當產後組織，接著經過凍存以使得之後需要移植該些細胞時可供使用。

細胞之特徵

【0086】 本發明之前驅細胞諸如 PPDC 可藉由下列加以表徵：例如生長特徵（例如族群倍增能力、倍增時間、到達衰老之繼代數）、核型分析（例如正常核型；母體或新生兒譜系）、流動式細胞測量術（例如 FACS 分析）、免疫組織化學法及/或免疫細胞化學法（例如偵測表位）、基因表現概況（例如基因晶片陣列分析；聚合酶連鎖反應（例如反轉錄酶 PCR、即時 PCR 及傳統 PCR））、蛋白質陣列分析、蛋白質分泌法（例如藉由血漿凝固檢定或 PDC 條件培養基分析（例如藉由酶聯免疫吸附檢定法(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)））、混合淋巴球反應（例如作為 PBMC 刺激作用之量測）及/或其他該項技術領域中所習知的方法。

【0087】 衍生自臍組織之 PPDC 之實例係於 2004 年 6 月 10 日寄存於美國菌種保存中心(ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110)，且所獲派之 ATCC 存取號如下：(1)細胞株代

號 UMB 022803 (P7)所獲派之存取號為 PTA-6067；以及(2)細胞株代號 UMB 022803 (P17)所獲派之存取號為 PTA-6068。衍生自胎盤組織之 PPDC 之實例係寄存於 ATCC (Manassas, Va.)，且所獲派之 ATCC 存取號如下：(1)細胞株代號 PLA 071003 (P8)於 2004 年 6 月 15 日寄存且所獲派之存取號為 PTA-6074；(2)細胞株代號 PLA 071003 (P11)於 2004 年 6 月 15 日寄存且所獲派之存取號為 PTA-6075；以及(3)細胞株代號 PLA 071003 (P16)於 2004 年 6 月 16 日寄存且所獲派之存取號為 PTA-6079。

【0088】 在各種實施例中，PPDC 擁有以下生長特徵中之一或多者：(1)它們需要 L-纈胺酸以在培養物中生長；(2)它們能夠在含有約 5%到至少約 20%氧的氣氛中生長(3)它們具有在培養物中進行至少約 40 次倍增（在到達衰老前）的潛能；以及(4)它們在經塗布或未經塗布的組織培養容器上附著並擴增，其中經塗布之組織培養容器包含明膠、層黏蛋白、膠原蛋白、聚鳥胺酸、玻璃連接蛋白、或纖連蛋白素之塗層。

【0089】 在某些實施例中，PPDC 擁有正常核型，其在細胞繼代時維持。核型分析尤其可用於識別並區分衍生自胎盤之新生兒與母體細胞。核型分析方法為所屬技術領域中具有通常知識者可使用且習知者。

【0090】 在其他實施例中，PPDC 可藉由生產某些蛋白質來表徵，包括：(1)生產波形蛋白(vimentin)與 α -平滑肌肌動蛋白(alpha-smooth muscle actin)中之至少一者；以及(2)生產 CD10、CD13、

CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 、PD-L2 與 HLA-A,B,C 細胞表面標記中之至少一者，如藉由流動式細胞測量術所偵測。在其他實施例中，PPDC 可藉由不生產下列之至少一者來表徵：CD31、CD34、CD45、CD80、CD86、CD117、CD141、CD178、B7-H2、HLA-G 以及 HLA-DR,DP,DQ 細胞表面標記，如藉由流動式細胞測量術所偵測。尤其較佳者為生產波形蛋白與 α -平滑肌肌動蛋白的細胞。

【0091】 在其他實施例中，PPDC 可藉由針對編碼下列之至少一者的基因之基因表現（相對於纖維母細胞、間葉幹細胞或髂骨嵴骨髓細胞之人類細胞）係經增加來表徵：介白素 8；內質網蛋白 (reticulon) 1；趨化激素（C--X--C 模體）配體 1（黑色素瘤生長刺激活性物， α ）；趨化激素（C--X--C 模體）配體 6（顆粒性細胞趨化蛋白質 2）；趨化激素（C--X--C 模體）配體 3；腫瘤壞死因子， α -誘發蛋白質 3；C 型凝集素超家族成員 2；威爾姆斯(Wilms)腫瘤 1；醛去氫酶 1 家族成員 A2；腎素(renin)；氧化低密度脂蛋白受體 1；智人 (Homo sapiens)殖株 IMAGE:4179671；蛋白質激酶 C ζ ；假想蛋白質 DKFZp564F013；卵巢癌向下調控因子 1；及殖株 DKFZp547k1113 之智人基因。在一實施例中，衍生自臍帶組織之 PPDC 可藉由針對編碼下列之至少一者的基因之基因表現（相對於纖維母細胞、間葉幹細胞或髂骨嵴骨髓細胞之人類細胞）係經增加來表徵：介白素 8；內質網蛋白 (reticulon) 1；或趨化激素（C--X--C 模體）配體 3。在另一實施例中，衍生自胎盤組織之 PPDC 可藉由針對編碼腎素或氧化

低密度脂蛋白受體 1 之至少一者的基因之基因表現（相對於纖維母細胞、間葉幹細胞或髌骨嵴骨髓細胞之人類細胞）係經增加來表徵。

【0092】 在其他實施例中，PPDC 可藉由針對編碼下列之至少一者的基因之基因表現（相對於纖維母細胞、間葉幹細胞或髌骨嵴骨髓細胞之人類細胞）係經減少來表徵：矮小同源盒 2；熱休克 27 kDa 蛋白質 2；趨化激素（C--X--C 模體）配體 12（基質細胞衍生因子 1）；彈性蛋白（瓣上主動脈狹窄，威廉-波倫(Williams-Beuren)症候群）；智人 mRNA；cDNA DKFZp586M2022（來自殖株 DKFZp586M2022）；間葉同源盒 2（生長休止特異性同源盒(growth arrest-specific homeo box)）；sine oculis 同源盒同源物 1（果蠅(Drosophila)）；αB 水晶體蛋白；形態發生紊亂關聯活化物 2 (disheveled associated activator of morphogenesis 2)；DKFZP586B2420 蛋白質；類似於 neuralin 1 者；結合四素(tetranectin，纖維蛋白溶酶原(plasminogen)結合蛋白質)；src 同源體 3 (SH3)與多半胱氨酸區(cysteine rich domain)；膽固醇 25-羥化酶；矮小相關轉錄因子 3 (runt-related transcription factor 3)；介白素 11 受體，α；原膠原蛋白 C-內肽酶增強子(procollagen C-endopeptidase enhancer)；捲曲同源物 7 (frizzled homolog 7)（果蠅）；假想基因 BC008967；第三型膠原蛋白 α1；固生蛋白 C (tenascin C, hexabrachion)；易洛魁族同源盒蛋白質 5 (iroquois homeobox protein 5)；希菲斯特蛋白(hephaestin)；整合素 β8；突觸囊泡糖蛋白(synaptic vesicle glycoprotein) 2；神經胚細胞瘤，致腫瘤性抑制因子 1；類胰島素生

長因子結合蛋白質 2，36 kDa；智人 cDNA FLJ12280 的，殖株 MAMMA1001744；類細胞介素受體因子 1；鉀中間物/小電導鈣活化通道，次家族 N，成員 4；整合素 $\beta 7$ ；具有 PDZ-結合模體之轉錄共活化物(TAZ)；sine oculis 同源盒同源物 2（果蠅）；KIAAI034 蛋白質；囊泡相關膜蛋白質 5（肌短蛋白(myobrevin)）；含 EGF 類 fibulin 細胞外基質蛋白質(EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein) 1；早期生長反應蛋白質(early growth response) 3；無背端同源盒(distal-less homeo box) 5；假想蛋白質 FLJ20373；醛基-酮基還原酶家族 1，成員 C3（3- α 羥類固醇去氫酶(3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase)，II 型）；雙聚醣(biglycan)；具有 PDZ-結合模體之轉錄共活化物(TAZ)；纖連蛋白素 1；腦啡肽前質(proenkephalin)；整合素，類 $\beta 1$ （具有類 EGF 重複區）；智人 mRNA 全長插入物 cDNA 殖株 EUROIMAGE 1968422；EphA3；KIAA0367 蛋白質；利尿鈉肽受體 C (natriuretic peptide receptor C)/鳥苷酸環化酶 C (guanylate cyclase C)（心房利尿鈉肽受體 C (atrionatriuretic peptide receptor C)）；假想蛋白質 FLJ14054；智人 mRNA；cDNA DKFZp564B222（來自殖株 DKFZp564B222）；BCL2/類腺病毒 E1B 19 kDa 交互作用蛋白質 3 (adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like)；AE 結合蛋白質 1；以及細胞色素 c 氧化酶次單元 VIIa 多肽 1（肌肉）。

【0093】 在其他實施例中，衍生自臍帶組織之 PPDC 可藉由分泌選自血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2、及血小板反應蛋白-4 之營養因子來表徵。在實施例中，PPDC 可藉由分泌 MCP-1、IL-6、

IL-8、GCP-2、HGF、KGF、FGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1b、I309、RANTES、MDC 及 TIMP1 中之至少一者來表徵。在一些實施例中，衍生自臍帶組織之 PPDC 可藉由不分泌 TGF- β 2、ANG2、PDGFbb、MIP1a 及 VEGF 中之至少一者來表徵，如藉由 ELISA 所偵測。在替代實施例中，衍生自胎盤組織之 PPDC 可藉由分泌 MCP-1、IL-6、IL-8、GCP-2、HGF、KGF、HB-EGF、BDNF、TPO、MIP1a、RANTES 及 TIMP1 中之至少一者，且不分泌 TGF- β 2、ANG2、PDGFbb、FGF 及 VEGF 中之至少一者來表徵，如藉由 ELISA 所偵測。在進一步實施例中，PPDC 不表現 hTERT 或端粒酶。

【0094】 在較佳實施例中，細胞包含二或更多種以上列舉之生長、蛋白質/表面標記生產、基因表現或物質分泌之特徵。更佳者為該些包含三、四、或五或更多種該等特徵之細胞。再佳者為包含六、七或八或更多種該等特徵之 PPDC。再佳者為該些包含所有上述特徵之細胞。

【0095】 在特別較佳的實施例中，細胞係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織，該等細胞能夠在培養物中擴增、不生產 CD117 或 CD45、且不表現 hTERT 或端粒酶。在一實施例中，細胞不生產 CD117 及 CD45 且可選地亦不表現 hTERT 及端粒酶。在另一實施例中，細胞不表現 hTERT 及端粒酶。在另一實施例中，細胞係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織、能夠在培養物中擴增、不生產 CD117 或 CD45、且不表現 hTERT 或端粒酶、且具有一或多種以下特徵：表現 CD10、CD13、CD44、CD73 及 CD90；不表現 CD31 或

CD34；相對於人類纖維母細胞、間葉幹細胞或髂骨嵴骨髓細胞，表現增加水準之介白素 8 或內質網蛋白 1；且具有分化之潛能。

【0096】 在本發明之數個態樣中所使用之目前較佳的細胞為具有上述特徵之產後細胞，並且尤其是其中該些細胞具有正常核型並且在繼代時維持正常核型者，而進一步是其中該些細胞表現下列各標記者：CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 及 HLA-A,B,C，其中該些細胞生產免疫學上可偵測且對應上列標記之蛋白質。再佳者為除了前述者外不生產對應於任何下列標記之蛋白質之該些細胞：CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 或 HLA-DR,DP,DQ 如由流動式細胞測量術所偵測。在進一步較佳實施例中，該些細胞不表現 hTERT 或端粒酶。

【0097】 具有譜系分化的潛能而導致各種表型之某些細胞係不穩定且因此可自行分化。目前較佳用於本發明的細胞為不會例如沿著神經譜系自行分化之細胞。當較佳細胞生長於生長培養基中時，生產在其表面上之細胞標記，及其各種基因之表現模式（如使用 Affymetrix GENECHIP 所測定）為實質上穩定的。經由多次族群倍增的繼代，該些細胞例如在其表面標記特徵方面仍保持實質上恆定。

【0098】 然而，PPDC 之一個特徵在於可藉由使其經歷分化誘導細胞培養條件來有意地誘導其分化成各種譜系表型。在治療某些眼變性病狀的用途中，可使用所屬技術領域中已知的一或多種方法誘導 PPDC 分化成神經表型。舉例而言，如本文所例示，可將 PPDC

接種於經層黏蛋白塗布之培養瓶中之含有 B27 (B27 補充物, Invitrogen)、L-麩醯胺酸及青黴素/鏈黴素之 Neurobasal-A 培養基 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), 其組合在本文稱為神經前驅擴增(NPE) 培養基。NPE 培養基可進一步補充有 bFGF 及/或 EGF。或者, 可藉由以下誘導 PPDC 體外分化: (1)將 PPDC 與神經前驅細胞共培養; 或(2)使 PPDC 於神經前驅細胞條件培養基中生長。

【0099】 PPDC 分化成神經表型可藉由具有伸長突起之雙極細胞形態來證明。經誘導之細胞群可針對巢蛋白(nestin)之存在染色為陽性。經分化之 PPDC 可藉由偵測巢蛋白、TuJ1 (BIII 微管蛋白)、GFAP、酪胺酸羥化酶、GABA、04 及/或 MBP 來評估。在一些實施例中, PPDC 展現出形成神經球(neurosphere)之神經元幹細胞形成之三維體特徵的能力。

細胞群

【0100】 本發明之另一態樣之特徵在於前驅細胞諸如產後衍生細胞或其他前驅細胞之族群。產後衍生細胞可分離自胎盤或臍組織。在較佳實施例中, 細胞群包含上文所述之 PPDC, 且這些細胞群係描述於下節中。

【0101】 在一些實施例中, 細胞群為異質性。本發明之異質性細胞群可包含至少約 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%的細胞。本發明之異質性細胞群可進一步包含前

驅細胞（產後衍生細胞）、或其他前驅細胞，諸如上皮或神經前驅細胞，或其可進一步包含經完全分化之細胞。

【0102】 在一些實施例中，該族群實質上為均質性，即實質上僅包含 PPDC(較佳為至少約 96%、97%、98%、99%或更多的細胞)。在一些實施例中，細胞群係均質性。在實施例中，本發明之均質性細胞群可包含臍衍生細胞或胎盤衍生細胞。臍衍生細胞之均質性族群較佳為不含母體譜系細胞。胎盤衍生細胞之均質性族群可為新生兒或母體譜系。細胞群之均質性可藉由任何該項技術領域中所習知的方法來達成，例如根據習知方法藉由細胞分選（例如流動式細胞測量術）或藉由殖株擴增達成。因此，較佳均質性 PPDC 族群可包含產後衍生細胞之殖株細胞系。當分離出具有高度所欲功能性之細胞殖株時，此類族群為尤其有用的。

【0103】 本文亦提供在一或多種因子存在下，或在刺激幹細胞沿著所欲路徑（例如，神經、上皮）分化之條件下培養之細胞群。此類因子為所屬技術領域中已知的且熟悉該項技藝人士將會瞭解到，判定合適的分化條件可以常規實驗完成。此類條件之最佳化可藉由統計實驗設計及分析來完成，例如回應面方法論(response surface methodology)允許同時最佳化例如在生物培養物中的多個變數。目前較佳因子包括但不限於以下因子，諸如生長或營養因子、去甲基化劑、與神經或上皮譜系細胞共培養或於神經或上皮譜系細胞條件培養基中培養，以及所屬技術領域中已知用以刺激幹細胞沿著這些路徑分化的其他條件（關於可用於神經分化之因子，參見例如 Lang,

K. J. D.等人，2004, J. Neurosci. Res.76: 184-192；Johe, K. K.等人，1996, Genes Devel. 10: 3129-3140；Gottlieb, D., 2002, Ann. Rev. Neurosci. 25: 381-407)。

【0104】 在本發明之實施例中，與 RGC 共培養之 hUTC 對 RGC 中之突觸形成、及神經元生存及外生具有正面作用。hUTC 及 RGC 之共培養物展現突觸點(synaptic punctum)之數目增加且與星狀細胞（陽性對照組）可相比。（圖 1B 至圖 1D）。

【0105】 微興奮性突觸後電流 (miniature excitatory postsynaptic current, mEPSC)之量測顯示 hUTC 影響突觸形成。RGC 經單獨培養或在 hUTC 或 ASC 存在下培養（圖 1A）。RGC 與 hUTC 之共培養類似與星狀細胞之共培養，引起突觸事件之頻率增加（圖 1E 至圖 1G、圖 1F，克拉斯卡－瓦立斯(Kruskal-Wallis)檢驗， $p<.0001$ ，圖 1G，單向 ANOVA， $p<.0001$)，這與所觀察到的突觸數目增加一致（圖 1B 至圖 1D）。hUTC 亦增加突觸後電流之振幅。類似於星狀細胞，hUTC 加強突觸活性（圖 1H、圖 1I）。mEPSC 峰之波形顯示上升及衰退 τ 均隨 hUTC 處理而增加（圖 1J 至圖 1M）。hUTC 誘導經培養 RGC 中之興奮性突觸形成且增強突觸功能。

條件培養基

【0106】 在一個態樣中，本發明提供來自經培養之前驅細胞諸如產後衍生細胞、或其他前驅細胞之條件培養基，其如下文所述用於體外及體內。此類條件培養基之使用允許由細胞分泌之有益營養

因子同種異體地用於患者中，而無需引入可能引起排斥、或其他不良免疫反應之完整細胞。條件培養基係藉由於培養基中培養細胞(諸如細胞群)，隨後自培養基移除該些細胞來製備。在某些實施例中，產後細胞為 UTC 或 PDC，更佳為 hUTC。

【0107】 由上文所述之細胞群所製備之條件培養基可按原樣使用、經進一步濃縮例如藉由超濾或凍乾、或甚至乾燥後使用、經部分純化後使用、如所述技術領域中已知與醫藥上可接受之載劑或稀釋劑組合使用、或與其他化合物諸如生物製品例如醫藥上可用的蛋白質組成物組合使用。條件培養基可在體外或體內單獨使用，或例如與自體或同基因活細胞一起使用。條件培養基若經引入體內，可被引入局部治療位點、或引入遠端以提供例如需要的細胞生長或營養因子給患者。

【0108】 先前已證明，人類臍帶組織衍生細胞改良視覺功能且改善視網膜變性 (US 2010/0272803)。亦已證明，產後衍生細胞可在 RCS 模型中用於促進光受體救援且因此保留光受體。(US 2010/0272803)。將 hUTC 經視網膜下注射至 RCS 大鼠眼睛中改良視覺銳度且改善視網膜變性。此外，以衍生自 hUTC 之條件培養基(CM)進行治療，可使體外失養性 RPE 細胞恢復對 ROS 之吞噬。(US 2010/0272803)。此處，本發明之實施例揭示先前未知的 hUTC 對促進神經突外生及突觸新生，尤其對視網膜神經元，包括視網膜神經節細胞、光受體(視桿細胞及視錐細胞)、視網膜無軸突細胞、水平細胞及雙極細胞的正面作用。

【0109】 如本文所提供，製備 hUTC 條件培養基(UCM)且評估其對視網膜神經節細胞之突觸形成、神經元生存、及神經突外生之作用。RGC 係與各種濃度的 hUCM 一起培養。突觸分析顯示 hUCM 以濃度依賴性方式誘導 RGC 之突觸形成，類似於星狀細胞條件培養基(ACM)。(圖 2B)。UCM 對 Homer 蛋白(Homer)及 Bassoon 蛋白(Bassoon)兩種突觸點數目具有正面作用。(圖 2B 至圖 2D、圖 2J)。

【0110】 已顯示星狀細胞調控突觸形成。突觸形成被認為係經由經分泌突觸新生分子誘導，諸如血小板反應蛋白、hevin、富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican)、BDNF、TGF β -1、膽固醇及蝶素。(Clarke, *Nature Reviews Neuroscience*, 2013;14:311-321; Bolton and Eroglu, *Current Opinion in Neurobiology*, 2009;19:491-497)。在表徵本發明之 hUCM 時，星狀細胞及由形狀細胞製備之條件培養基有時用作陽性對照組。

【0111】 hUCM 亦加強功能性突觸，如藉由 mEPSC 之振幅及頻率增加所示。(圖 2E 至圖 2N)。除了在 hUTC 移植之後觀察到的功能恢復外，動物疾病模型中的先前研究顯示，這些細胞對神經結構之保留具有作用 (Lund 等人, 2007, 同上; Moore 等人, *Somatosensory and motor research*, 2013; 30:185-196; Zhang L, 等人, *Brain Research*, 2012; 1489:104-112; Jiang Q, 等人, *PloS One*, 2012; 7: e42845; Zhang L, 等人, *Stroke*; 2011; 42:1437-1444)。使用 RGC 培養系統顯示 UCM 對突觸新生及神經突外生之作用。除了 hUCM

對突觸形成之作用外，其促進在無任何其他生長因子(例如，BDNF、及 CTNF)存在下之 RGC 生存。(圖 3A 至圖 3E)。

【0112】 hUCM 亦增強 RGC 神經突外生，如藉由總突起長度、突起數目及分支數目增加所證明。(圖 3F 至圖 3J)。

【0113】 在本發明之實施例中，hUTC 分泌促進體外純化 RGC 之間的功能性突觸之發育的因子。此外，hUTC 亦支持神經元生長及功能。

細胞改質、組分及產物

【0114】 前驅細胞諸如產後細胞(較佳 PPDC)亦可經基因改質以生產治療可用的基因產物，或生產用於治療腫瘤之抗癌藥物。基因改質可使用多種載體(vector)中之任一者實現，包括但不限於整合型病毒載體，例如，反轉錄病毒載體或腺相關病毒載體；非整合型複製載體，例如，乳突病毒載體、SV40 載體、腺病毒載體；或複製缺陷型病毒載體。將 DNA 引入至細胞中之其他方法包括使用脂質體、電穿孔、粒子槍、或藉由直接 DNA 注射。

【0115】 宿主細胞較佳係經 DNA 轉形或轉染，該 DNA 受到一或多種適當的表現控制元件諸如啟動子或增強子序列、轉錄終止子、多腺苷酸化位點等其他元件，及可選擇的標記控制或與其操作性相連。任何啟動子可用於驅動插入基因之表現。舉例而言，病毒啟動子包括但不限於 CMV 啟動子/增強子、SV40、乳突病毒、艾司坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)或彈性蛋白基因啟動子。在一些實施例

中，用於控制關注基因之表現的控制元件可允許基因之調節表現，以使得產物僅於需要時在體內合成。若需要暫態表現，則組成性啟動子係較佳地用於非整合型及/或複製缺陷型載體中。或者，可誘導啟動子可用於當需要時驅動插入基因之表現。可誘導啟動子包括但不限於與金屬硫蛋白及熱休克蛋白質有關之啟動子。

【0116】 在引入外來 DNA 之後，可允許經工程化之細胞生長於濃化培養基中且隨後切換至選擇性培養基。外來 DNA 中之可選擇的標記賦予選擇抗性且允許細胞將例如質體上之外來 DNA 穩定地整合至其染色體中且生長以形成細胞群落(foci)，其轉而可經選殖且擴增成細胞系。此方法可有利地用於工程化表現基因產物之細胞系。

【0117】 細胞可經基因工程化以「敲除(knock out)」或「剔除(knock down)」在植入位點處促進發炎或排斥之因子之表現。以下討論用於減少靶標基因表現水準或靶標基因產物活性水準之負調控技術。如本文中所使用之「負調控(Negative modulation)」係指相對於靶標基因產物在調控處理不存在下之水準及/或活性，減少該靶標基因產物之水準及/或活性。神經元或膠細胞之天然基因之表現可使用許多技術來減少或敲除，包括例如藉由使用同源重組技術使基因失活來抑制表現。一般而言，編碼蛋白質之重要區域之外顯子（或位在該區域 5'側之外顯子）由陽性可選擇的標記（例如 neo）中斷，防止由靶標基因生產正常 mRNA 且導致基因之失活。基因亦可藉由產生基因之一部分之刪除、或藉由刪除整個基因來失活。藉由使用

具有兩個與靶標基因同源之區域且該兩區域在基因體中相隔遙遠之建構體，可將在該兩個區域之間的序列刪除 (Mombaerts 等人，1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084-3087)。反義、DNA 酶、核糖核酸酶、小干擾 RNA (siRNA) 及抑制靶標基因表現之其他此類分子亦可用於減少靶標基因活性之水準。舉例而言，抑制主要組織相容性基因複合體 (HLA) 表現之反義 RNA 分子已顯示在免疫反應方面最為多樣化。此外，三螺旋分子可被用於減少靶標基因活性之水準。這些技術由 L. G. Davis 等人 (編)，1994, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY，第 2 版，Appleton & Lange, Norwalk, CT 詳細描述。

【0118】 在其他態樣中，本發明提供自產後幹細胞製備之細胞溶解產物及細胞可溶部分，產後細胞較佳 PPDC、或包含 PPDC 之異質性或均質性細胞群、以及經基因改質或經刺激以沿著神經性路徑分化之 PPDC 或其族群。此類溶解產物及其部分具有許多用途。在體內使用細胞溶解產物可溶部分 (亦即，實質上不含膜) 例如允許將有益的細胞內環境 (intracellular milieu) 同種異體地用於患者，而不需引入最可能觸發排斥、或其他不良免疫反應之可察覺量的細胞表面蛋白質。溶解細胞之方法為所屬技術領域中所熟知且包括機械破裂、酶破裂、或化學破裂、或其組合之各種手段。此類細胞溶解產物可由在生長培養基中之細胞直接製備，因此含有分泌的生長因子及其類似物，或可由經例如 PBS 或其他溶液清洗而不含培養基

之細胞製備。經清洗之細胞可以大於原始族群密度之濃度再懸浮(若較佳)。

【0119】 在一實施例中，全細胞溶解產物係例如藉由使細胞破裂而稍後不分離細胞部分來製備。在另一實施例中，藉由所屬技術領域中已知的常規方法，例如離心、過濾、或類似方法，將細胞膜部分與細胞之可溶部分分離。

【0120】 由前驅細胞(諸如產後衍生細胞)群所製備之細胞溶解產物或細胞可溶部分可按原樣使用、經進一步濃縮例如藉由超濾或凍乾、或甚至乾燥後使用、經部分純化後使用、如所述技術領域中已知與醫藥上可接受之載劑或稀釋劑組合使用、或與其他化合物諸如生物製品例如醫藥上可用的蛋白質組成物組合使用。細胞溶解產物或其部分可在體外或體內單獨使用，或例如與自體或同基因活細胞一起使用。溶解產物若經引入體內，可被引入局部治療位點、或引入遠端以提供例如需要的細胞生長因子給患者。

【0121】 在進一步實施例中，產後細胞較佳 PPDC 可於體外培養以生產高產率之生物產物。舉例而言，此類細胞不論是天然生產受關注的特定生物產物(例如，營養因子)，或經基因工程化以生產生物產物，皆可使用本文所述之培養技術選殖擴增。或者，細胞可於誘導分化成所要譜系之培養基中擴增。在任一情況下，由細胞生產且分泌至培養基中之生物產物可使用標準分離技術容易地自條件培養基分離，例如，諸如差別蛋白質沉澱、離子交換層析、膠濾層析、電泳、及 HPLC 等不及備舉。可使用「生物反應器(bioreactor)」

以利用流動法饋送例如體外三維培養物。基本上，在新鮮培養基通過三維培養物時，生物產物被洗出培養物且隨後可自流出物進行如上文所述之分離。

【0122】 或者，關注的生物產物可保留於細胞內，因此其收集可能需要將細胞進行如上文所述之溶解。隨後可使用上文所列舉之技術中之任一或多者將生物產物純化。

【0123】 在另一實施例中，藉由於液體、固體或半固體基材上培養產後細胞（較佳 PPDC）所生產之細胞外基質(ECM)係經製備、收集且用作為植入活細胞至需要組織修復或置換之對象中之替代物。將細胞體外培養於如本文其他地方所述之三維架構上，且培養條件將使得所要量之 ECM 分泌至架構上。將細胞及架構移除，且 ECM 係經處理以供進一步使用，例如作為可注射製劑。為實現此目的，將架構上之細胞殺死且將任何細胞碎屑自架構移除。此製程可以許多不同方式進行。舉例而言，可將活組織置於不加冷凍保存劑之液態氮中驟冷凍，或可將組織浸沒於無菌蒸餾水中以使得細胞因滲透壓爆裂。

【0124】 一旦細胞被殺死，細胞膜可能破裂且細胞碎屑藉由溫和清潔劑清洗諸如 EDTA、CHAPS 或兩性離子清潔劑處理來移除。或者，組織可經酶消化及/或用破壞細胞膜且允許移除細胞內容物之試劑萃取。此類酶之實例包括但不限於玻尿酸酶、分散酶、蛋白酶、及核酸酶。清潔劑之實例包括非離子清潔劑，諸如，例如烷芳基聚醚醇(TRITON X-100)、辛苯氧基聚乙氧基乙醇(Rohm and Haas

Philadelphia, Pa.)、BRIJ-35、聚乙氧基乙醇月桂醚 (Atlas Chemical Co., San Diego, Calif.)、聚山梨醇酯 20 (TWEEN 20)、聚乙氧基乙醇去水山梨醇單月桂酸酯(Rohm and Haas)、聚乙烯月桂醚(Rohm and Haas)；及離子清潔劑，諸如，例如十二烷基硫酸鈉、硫酸化高級脂族醇、於支鏈或非支鏈中含有 7 至 22 個碳原子之磺化烷烴及磺化烷基芳烴。

【0125】 ECM 之收集可以多種方式實現，其取決於例如新組織係形成於可生物降解或不可生物降解之三維架構上。舉例而言，若架構為不可生物降解者，則 ECM 可藉由使架構經歷超音波處理、高壓射水機、機械刮削、或用清潔劑或酶溫和處理、或以上之任何組合來移除。

【0126】 若架構為可生物降解者，則 ECM 可例如藉由使架構降解或溶解於溶液中來收集。或者，若可生物降解架構係由其自身可與 ECM 一起注射之材料組成，則可將架構及 ECM 全部一起處理以用於稍後注射。或者，可藉由上文所述之用於自不可生物降解架構收集 ECM 之任何方法，將 ECM 自可生物降解架構移除。所有收集製程係經較佳地設計，以使 ECM 不致變性。

【0127】 在收集 ECM 之後，可將其進一步處理。舉例而言，可使用所述技術領域中熟知的技術諸如超音波處理，將 ECM 均質化成微細粒子，以使得其可通過外科針。若需要，ECM 之組分可藉由 γ 照射來交聯。較佳地，ECM 可經 0.25 至 2 百萬雷得之間照射，

以使 ECM 滅菌及交聯。使用具有毒性的劑諸如戊二醛之化學交聯係可能但通常不佳的。

【0128】 蛋白質諸如存在於 ECM 中之各種類型之膠原蛋白之量及/或比率，可藉由將本發明之細胞所生產之 ECM 與一或多種其他細胞型之 ECM 混合來調整。此外，可將生物活性物質諸如蛋白質、生長因子及/或藥品併入至 ECM 中。例示性生物活性物質包括組織生長因子，諸如 TGF- β ，及類似物，其促進注射位點之癒合及組織修復。此類額外劑可用於上文所述之任何實施例中，例如與全細胞溶解產物、可溶細胞部分、或經進一步純化的由細胞所生產之組分及產物一起利用。

醫藥組成物

【0129】 在另一態樣中，本發明提供醫藥組成物，其於多種用於治療眼變性病狀之方法中使用非胚胎幹細胞諸如產後細胞（較佳 PPDC）、其細胞群、由此類細胞所生產之條件培養基、及由此類細胞所生產之細胞組分及產物。某些實施例涵蓋包含活細胞（例如，單獨 PPDC 或 PPDC 與其他細胞型混合）之醫藥組成物。其他實施例涵蓋包含 PPDC 條件培養基之醫藥組成物。其他實施例可使用 PPDC 之細胞組分（例如，細胞溶解產物、可溶細胞部分、ECM、或前述任一者之組分）或產物（例如，由細胞天然生產或經由基因改質所生產之營養因子及其他生物因子、培養該些細胞之條件培養基）。在任一情況下，醫藥組成物可進一步包含其他活性劑，諸如消

炎劑、抗細胞凋亡劑、抗氧化劑、生長因子、神經營養因子或所屬技術領域中已知的神經再生、神經保護或眼科藥品。

【0130】 可添加至醫藥組成物之其他組分之實例包括但不限於：(1)其他神經保護或神經有益藥品；(2)選定之細胞外基質組分，諸如所屬技術領域中已知的一或多種類型的膠原蛋白、及/或生長因子、富血小板血漿、及藥品（或者，PPDC 可經基因工程化以表現且生產生長因子）；(3)抗細胞凋亡劑（例如，紅血球生成素(EPO)、EPO 模擬體(mimetibody)、血小板生成素(thrombopoietin)、類胰島素生長因子(IGF)-I、IGF-II、肝細胞生長因子、凋亡蛋白酶抑制劑）；(4)消炎化合物（例如，p38 MAP 激酶抑制劑、TGF- β 抑制劑、斯他汀類(statins)、IL-6 及 IL-1 抑制劑、PEMIROLAST、TRANILAST、REMICADE、SIROLIMUS、及非固醇類消炎藥品(NSAIDS)（諸如 TEPOXALIN、TOLMETIN、及 SUPROFEN））；(5)免疫抑制或免疫調節劑，諸如鈣調磷酸酶(calcineurin)抑制劑、mTOR 抑制劑、抗增生劑、皮質類固醇及各種抗體；(6)抗氧化劑，諸如普洛布克(probucol)、維生素 C 與 E、輔酶 Q-10、麩胱甘肽、L-半胱胺酸及 N-乙醯半胱胺酸；以及(6)局部麻醉劑等不及備舉。

【0131】 本發明之醫藥組成物包含前驅細胞諸如產後細胞（較佳 PPDC）、由該些細胞產生之條件培養基、或其組分或產物，其與醫藥上可接受之載劑或培養基調配。合適的醫藥上可接受之載劑包括水、鹽溶液（諸如林格氏溶液）、醇、油、明膠、及碳水化合物，諸如乳糖、直鏈澱粉、或澱粉、脂肪酸酯、羥甲基纖維素、及聚乙

烯吡咯啉。此類製劑可經滅菌，且若有需要與輔助劑諸如潤滑劑、防腐劑、穩定劑、潤濕劑、乳化劑、用於影響滲透壓之鹽、緩衝劑、及著色劑混合。通常但不排他地，包含細胞組分或產物而非活細胞之醫藥組成物係經調配成液體。包含 PPDC 活細胞之醫藥組成物一般係經調配成液體、半固體（例如，凝膠）或固體（例如，基質、支架及類似物，以適用於眼科組織工程）。

【0132】 醫藥組成物可包含醫藥化學家或生物學家所熟悉之輔助劑組分。舉例而言，其可含有在一定範圍內的抗氧化劑，該些範圍取決於所使用之抗氧化劑之種類而異。普遍使用的抗氧化劑之合理範圍為約 0.01 重量/體積%至約 0.15 重量/體積%之 EDTA、約 0.01 重量/體積%至約 2.0 重量/體積%之亞硫酸鈉、及約 0.01 重量/體積%至約 2.0 重量/體積%之偏二硫酸鈉。所屬技術領域中具有通常知識者可使用約 0.1 重量/體積%之濃度的上述各者。其他代表性化合物包括巯基丙醯基甘胺酸、N-乙醯基半胱胺酸、 β -巯基乙胺、麩胱甘肽及類似物質，但亦可採用合適於眼投予之其他抗氧化劑，例如抗壞血酸及其鹽或亞硫酸鹽或偏二硫酸鈉。

【0133】 可使用緩衝劑以將眼滴劑配方之 pH 保持在約 4.0 至約 8.0 之範圍內；以便使眼睛之刺激最小。至於直接玻璃體內或眼內注射，配方應在 pH 7.2 至 7.5，較佳在 pH 7.3 至 7.4。眼科組成物亦可包括適合用於向眼睛投予之張力劑。其中合適者為氯化鈉以使配方與 0.9%鹽水溶液大致等滲。

【0134】 在某些實施例中，醫藥組成物係與黏度增強劑一起調配。例示性劑為羥乙基纖維素、羥丙基纖維素、甲基纖維素、及聚乙烯吡咯啉酮。若需要，醫藥組成物可添加共溶劑。合適的共溶劑可包括甘油、聚乙二醇(PEG)、聚山梨醇酯、丙二醇、及聚乙烯醇。亦可包括防腐劑，例如，氯化烷基二甲基苄基銨、氯化苯鈦、氯丁醇、乙酸苯汞、硝酸苯汞、硫柳汞、對羥苄酸甲酯、或對羥苄酸丙酯。

【0135】 用於注射之配方較佳經設計用於單次使用投予且不含有防腐劑。可注射溶液應具有等於 0.9%氯化鈉溶液（290 至 300 毫滲莫耳之滲透壓）之等滲度。此可藉由添加氯化鈉或如上文所列舉之其他共溶劑、或如上文所列舉之賦形劑諸如緩衝劑及抗氧化劑獲得。

【0136】 眼前房之組織浸浴於前房液中，而視網膜係持續暴露於玻璃體。這些流體/凝膠以高度還原之氧還狀態存在，因為其含有抗氧化劑化合物及酶。因此，眼科組成物中包括還原劑可為有利的。合適的還原劑包括 N-乙醯半胱胺酸、抗壞血酸或鹽形式、及亞硫酸鈉或偏二硫酸鈉，其中抗壞血酸及/或 N-乙醯半胱胺酸或麩胱甘肽尤其適合用於可注射溶液。

【0137】 包含細胞或條件培養基、或細胞組分或細胞產物之醫藥組成物可以所屬技術領域中已知的數種遞送方式中之一或多者遞送至患者眼睛。在可適合用於一些情況中之一個實施例中，組成物以眼滴劑或洗眼劑之形式局部遞送至眼睛。在另一實施例中，組成

物可經由週期性眼內注射或藉由輸注於灌洗溶液諸如 BSS 或 BSS PLUS (Alcon USA, Fort Worth, Tex.)中遞送至眼睛內之各種位置。或者，組成物可以所屬技術領域中具有通常知識者已知的其他眼科劑量形式施加，諸如預形成或原位形成凝膠或脂質體，例如 Herrero-Vanrell 之美國專利第 5,718,922 號中所揭露。在另一實施例中，組成物可經由隱形眼鏡（例如 Lidofilcon B, Bausch & Lomb CW79 或 DELTACON (Deltafilcon A)）或其他暫時停留在眼睛表面上的物體遞送至或遞送通過需要治療之眼睛之水晶體。在其他實施例中，可採用諸如膠原蛋白角膜護罩（例如 BIO-COR 可溶性角膜護罩，Summit Technology, Watertown, Mass.）之支持物。組成物亦可藉由輸注至眼球中來投予，該輸注係經由滲透泵(ALZET, Alza Corp., Palo Alto, Calif.)之套管或藉由植入定時釋放膠囊(OCCUSENT)或可生物降解盤(OCULEX, OCUSERT)之任一者進行。此等投予途徑具有向眼睛提供醫藥組成物之連續供應之優點。此可有利於角膜之局部遞送。

【0138】 包含於半固體或固體載劑中之活細胞之醫藥組成物一般經調配用於外科植入眼損傷或痛苦之部位。應理解，液體組成物亦可藉由外科程序投予，例如條件培養基。在具體實施例中，半固體或固體醫藥組成物可包含半透性凝膠、格架(lattice)、細胞支架及類似物，其可為不可生物降解者或可生物降解者。舉例而言，在某些實施例中，使外源性細胞與其周圍環境隔絕，但仍使該些細胞

得以分泌且遞送生物分子至周圍細胞可為合意的或適當的。在這些實施例中，細胞可經調配成包含活的 PPDC 或含 PPDC 之細胞群之自主性植入物(autonomous implant)，該等活的 PPDC 或含 PPDC 之細胞群係由不可降解、選擇性可滲透之阻障圍繞以物理性分離移植細胞與宿主組織。此類植入物有時稱為「免疫保護性(immunoprotective)」，因為其具有防止免疫細胞及巨分子在醫藥誘導免疫抑制不存在下殺死移植細胞之能力（有關此類裝置及方法之綜述，參見例如 P. A. Tresco 等人，2000, *Adv. Drug Delivery Rev.* 42: 3-27）。

【0139】 在其他實施例中，不同種類之可降解凝膠及網狀物(network)可用於本發明之醫藥組成物。舉例而言，尤其合適於持續釋放配方之可降解材料包括生物相容性聚合物，諸如聚(乳酸)、聚(乳-共-乙醇酸)、甲基纖維素、玻尿酸、膠原蛋白、及類似物。藥品遞送媒劑中可降解聚合物之結構、選擇及用途已綜述於數個出版物中，包括 A. Domb 等人，1992, *Polymers for Advanced Technologies* 3:279-291。Wong 等人之美國專利第 5,869,079 號揭示可生物降解持續釋放眼植入物中親水性與疏水性實體之組合。此外，Guo 等人之美國專利第 6,375,972 號、Chen 等人之美國專利第 5,902,598 號、Wong 等人之美國專利第 6,331,313 號、Ogura 等人之美國專利第 5,707,643 號、Weiner 等人之美國專利第 5,466,233 號及 Avery 等人之美國專利第 6,251,090 號各描述可用於遞送醫藥組成物之眼內植入物裝置及系統。

【0140】 在例如用於修復神經病灶諸如損傷或切斷之視神經之其他實施例中，遞送於可生物降解（較佳生物可再吸收或生物可吸收）支架或基質之上或之中的細胞可為合意的或適當的。這些一般三維生物材料含有附著至支架、分散於支架內、或併入包埋於支架中之細胞外基質中之活細胞。一旦植入至身體之目標區域中，這些植入物變得與宿主組織整合，其中移植細胞逐漸變得確立（參見例如 P. A. Tresco 等人，2000，見前文；亦參見 D. W. Hutmacher, 2001, J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 12: 107-174）。

【0141】 可用於本發明中之支架或基質（有時統稱為「架構 (framework)」) 材料之實例包括非織物墊、多孔發泡體、或自組裝肽。非織物墊可例如使用包含乙醇酸及乳酸(PGA/PLA)之合成可吸收共聚物之纖維形成，其以商品名 VICRYL(Ethicon, Inc., Somerville, N.J) 銷售。亦可利用由例如聚(ϵ -己內酯)/聚(乙醇酸) (PCL/PGA) 共聚物組成之發泡體，其藉由諸如冷凍乾燥、或凍乾之製程形成，如美國專利第 6,355,699 號中所討論。亦可使用諸如自組裝肽（例如，RAD16）之水凝膠。原位形成可降解網狀物亦適用於本發明中（參見例如，Anseth, K. S.等人 2002, J. Controlled Release 78: 199-209；Wang, D.等人，2003, Biomaterials 24: 3969-3980；He 等人之美國專利公開案 2002/0022676）。這些材料係經調配成適用於注射之流體，且隨後可藉由多種手段（例如，改變溫度、pH、暴露於光）誘導以原位或體內形成可降解水凝膠網狀物。

【0142】 在另一實施例中，架構為毛氈(felt)，其可由自生物可吸收材料（例如，PGA、PLA、PCL 共聚物或摻合物、或玻尿酸）製成之多絲纖維紗(multifilament yarn)組成。使用由捲曲、裁剪、分梳及針刺所組成之標準紡織加工技術將紗製成毛氈。在另一實施例中，細胞係經接種至可為複合結構之發泡體支架上。

【0143】 在許多上文所提及之實施例中，可將架構模製成有用的形狀。此外應理解，可將 PPDC 培養於預形成、不可降解之外科或可植入裝置上，該培養方式為例如對應於用於製備例如含纖維母細胞 GDC 血管內線圈之方式（Marx, W. F.等人，2001, Am. J. Neuroradiol. 22: 323-333）。

【0144】 在接種細胞之前，基質、支架或裝置可經處理以增強細胞附著。舉例而言，在接種之前，尼龍基質可用 0.1 莫耳乙酸處理且培養於聚離胺酸、PBS、及/或膠原蛋白中以塗布尼龍。聚苯乙烯可使用硫酸類似地處理。架構之外表面亦可經改質以改善細胞之附著或生長及組織之分化，諸如藉由血漿塗布架構或添加一或多種蛋白質（例如，膠原蛋白、彈性纖維、網狀纖維）、醣蛋白、醣胺聚醣（例如，硫酸肝素、軟骨素-4-硫酸鹽、軟骨素-6-硫酸鹽、硫酸皮膚素、硫酸角蛋白）、細胞基質及/或其他材料，諸如但不限於明膠、藻酸鹽、瓊脂、瓊脂糖、及植物膠等其他者。

【0145】 含有活細胞之架構係根據所屬技術領域中已知的方法製備。舉例而言，細胞可自由生長於培養容器中至次長滿或長滿、自培養物剝離(lifted)且接種至架構上。若需要，可在接種細胞之前、

之期間、或之後，將生長因子添加至培養基以觸發分化及組織形成。或者，架構本身可經改質以使得其上之細胞生長增強，或使得排斥植入物之風險減少。因此，可將一或多種生物活性化合物包括但不限於消炎劑、免疫抑制劑或生長因子添加至架構以用於局部釋放。

使用方法

【0146】 前驅細胞諸如產後細胞（較佳 hUTC 或 PDC）、或其細胞群、或由此類細胞所生產之條件培養基或其他組分或產物可以多種方式使用以支持且有利眼細胞及組織之修復及再生。此類用途涵蓋體外、離體及體內方法。以下所闡述之方法係關於 PPDC，但其他前驅細胞亦可適用於該些方法中。

體外及離體方法

【0147】 在一實施例中，前驅細胞諸如產後細胞（較佳 hUTC 或 PDC）、及由其產生之條件培養基可於體外使用以篩選多種化合物之有效性及醫藥劑、生長因子、調節因子及類似物之細胞毒性。舉例而言，此類篩選可於實質上均質性 PPDC 族群上進行以評估欲與 PPDC 一起調配或共同投予以用於治療眼病症之候選化合物之效力或毒性。或者，出於評估新醫藥藥品候選者之效力之目的，此類篩選可於經刺激以分化成眼睛中所發現之細胞型之 PPDC、或其前驅上進行。在此實施例中，PPDC 保持在體外且暴露於欲測試之化

合物。潛在細胞毒性化合物之活性可藉由其損傷或殺死培養物中之細胞的能力來量測。此可藉由活體染色技術容易地評估。

【0148】 如上文所討論，PPDC 可於體外培養以生產由細胞自然生產、或由細胞在經誘導以分化成其他譜系時所生產、或由細胞經由基因改質所生產之生物產物。舉例而言，發現 TIMP1、TPO、KGF、HGF、FGF、HBEGF、BDNF、MIP1b、MCP1、RANTES、I309、TARC、MDC 與 IL-8 皆分泌自生長於生長培養基中之臍衍生細胞。臍衍生細胞亦分泌血小板反應蛋白-1、血小板反應蛋白-2、及血小板反應蛋白-4。發現 TIMP1、TPO、KGF、HGF、HBEGF、BDNF、MIP1a、MCP-1、RANTES、TARC、伊紅趨素(Eotaxin)、與 IL-8 皆分泌自培養於生長培養基中之胎盤衍生 PPDC（參見實例）。

【0149】 就此而言，本發明之實施例之特徵在於使用 PPDC 以生產條件培養基。自 PPDC 生產條件培養基可來自未分化之 PPDC 或來自在刺激分化之條件下培養之 PPDC。此類條件培養基係經考慮用於例如上皮或神經前驅細胞之體外或離體培養，或用於體內以支持包含 PPDC 之均質性族群或包含 PPDC 及其他前驅之異質性族群之移植細胞。

【0150】 出於多種目的可使用 PPDC 之細胞溶解產物、可溶細胞部分或組分、或其 ECM 或組分。如上文所提及，此等組分中的一些可用於醫藥組成物中。在其他實施例中，細胞溶解產物或 ECM 係用於塗布或以其他方式處理欲用於外科、或用於植入、或用於離

體目的之物質或裝置，以促進在此類治療程序中所接觸之細胞或組織之癒合或生存。

【0151】 如實例 12 及 14 中所述，已證明當 PPDC 與成體神經前驅細胞共培養生長時，PPDC 具有支持該些細胞生存、生長及分化之能力。同樣，先前研究指出，PPDC 可經由營養機制發揮支持視網膜細胞之功能。(US 2010-0272803)。因此，PPDC 有利地用於體外共培養物中以提供營養支持給其他細胞，尤其神經細胞及神經和眼前驅（例如，神經幹細胞及視網膜或角膜上皮幹細胞）。至於共培養，將 PPDC 與所要其他細胞在兩種細胞型相接觸之條件下共培養可為合意的。此可例如藉由將細胞以異質性細胞群之形式接種於培養基中或接種至合適的培養基材上來達成。或者，首先可使 PPDC 生長至長滿，且隨後充當培養物中第二所要細胞型之基材。在此後者之實施例中，在共培養時期之後，可例如藉由膜或類似裝置將細胞進一步物理分離，以使得該其他細胞型可經移除且單獨使用。使用 PPDC 共培養以促進神經或眼細胞型之擴增及分化可具有在研究及臨床/治療領域中之適用性。舉例而言，可利用 PPDC 共培養以利培養物中之此類細胞之生長及分化，例如為了基礎研究目的或用於藥品篩選檢定。PPDC 共培養亦可用於神經或眼前驅之離體擴增，以供稍後投予用於治療目的。舉例而言，神經或眼前驅細胞可自個體收集、與 PPDC 共培養離體擴增、隨後返回至該個體（自體轉移）或另一個體（同基因或同種異體轉移）。在此等實施例中，應理解在離體擴增之後，可將包含 PPDC 及前驅之混合細胞群向需要治療之

患者投予。或者，在自體轉移為適當的或合意的情況下，可將共培養細胞群在培養物中物理分離，使得能夠移除自體前驅以用於向患者投予。

體內方法

【0152】 如實例中所闡述，前驅細胞(PPDC)、或由此類細胞產生之條件培養基可有效地用於治療眼變性病狀。一旦移植至眼睛中之目標位置中，前驅細胞或來自前驅細胞（諸如 PPDC）之條件培養基原位提供營養支持給眼細胞，包括神經元細胞。

【0153】 前驅細胞(PPDC)、來自前驅細胞之條件培養基可與以下一起投予：其他有益的藥品、生物分子（諸如生長因子、營養因子）、條件培養基（來自前驅細胞或分化細胞培養物）、或其他活性劑（諸如消炎劑、抗細胞凋亡劑、抗氧化劑、生長因子、神經營養因子或如所屬技術領域中已知的神經再生或神經保護藥品）。當條件培養基與其他藥劑投予時，其可以單一醫藥組成物之形式一起投予，或與其他藥劑同時或依次（在投予其他藥劑之前或之後）投予之分開醫藥組成物。

【0154】 可與前驅細胞（諸如 PPDC）及條件培養基產物一起投予之其他組分之實例包括但不限於：(1)其他神經保護或神經有益藥品；(2)選定之細胞外基質組分，諸如所屬技術領域中已知的一或多種類型的膠原蛋白、及/或生長因子、富血小板血漿、及藥品（或者，細胞可經基因工程化以表現且生產生長因子）；(3)抗細胞凋亡

劑（例如，紅血球生成素(EPO)、EPO 模擬體(mimetibody)、血小板生成素(thrombopoietin)、類胰島素生長因子(IGF)-I、IGF-II、肝細胞生長因子、凋亡蛋白酶抑制劑）；(4)消炎化合物（例如，p38 MAP 激酶抑制劑、TGF- β 抑制劑、斯他汀類(statins)、IL-6 及 IL-1 抑制劑、PEMIROLAST、TRANILAST、REMICADE、SIROLIMUS、及非固醇類消炎藥品(NSAIDS)（諸如 TEPOXALIN、TOLMETIN、及 SUPROFEN））；(5)免疫抑制或免疫調節劑，諸如鈣調磷酸酶(calcineurin)抑制劑、mTOR 抑制劑、抗增生劑、皮質類固醇及各種抗體；(6)抗氧化劑，諸如普洛布克(probucol)、維生素 C 與 E、輔酶 Q-10、麩胱甘肽、L-半胱胺酸及 N-乙醯半胱胺酸；以及(6)局部麻醉劑等不及備舉。

【0155】 液體或流體醫藥組成物可經投予至眼睛中更一般的位置（例如，局部地或眼內地）。

【0156】 其他實施例涵蓋藉由投予醫藥組成物來治療眼變性病狀之方法，該些醫藥組成物包含來自前驅細胞（諸如 PPDC）之條件培養基、或由該些細胞天然生產或經由細胞之基因改質生產之營養因子及其他生物因子。此外，這些方法可進一步包含投予其他活性劑，諸如生長因子、神經營養因子或如所屬技術領域中已知的神經再生或神經保護藥品。

【0157】 用於投予來自前驅細胞（諸如 PPDC）之條件培養基、或本文所述之任何其他醫藥組成物之劑量形式及方案係根據良好的醫療實踐得以發展，其考慮到個別患者之條件，例如，眼變性病狀

之性質與程度、年齡、性別、體重及一般醫學病狀、及醫學從業者已知的其他因素。因此，欲向患者投予之醫藥組成物之有效量係藉由如所屬技術領域中已知的這些考量判定。

【0158】 在開始細胞治療之前，以醫藥免疫抑制患者可為合意的或適當的。此可經由使用全身或局部免疫抑制劑來實現，或可藉由遞送於囊封裝置中之細胞來實現，如上文所述。這些及其他用於減少或消除對移植細胞之免疫反應之手段為所屬技術領域中已知的。替代地，條件培養基可自經基因改質以減少其免疫原性 (immunogenicity) 之 PPDC 製備，如上文所提及。

【0159】 移植細胞於活體患者中之生存可經由使用多種掃描技術來判定，例如，電腦化斷層 (CAT 或 CT) 掃描、磁共振成像 (MRI) 或正電子發射斷層攝影 (PET) 掃描。判定移植之生存亦可藉由移除組織且目視或經由顯微鏡檢查該組織來進行事後分析。或者，細胞可用對神經或眼細胞或其產物（例如，神經傳遞質）具特異性之染色劑處理。移植細胞亦可藉由事先併入示蹤染料諸如玫瑰紅或螢光素標記微球、快藍 (fast blue)、鐵微粒、雙苯甲醯胺或基因引入之報告基因產物，諸如 β -半乳糖苷酶或 β -葡萄糖醛酸酶來識別。

【0160】 將移植細胞或條件培養基功能性整合至眼組織或對象中可藉由檢查受損或患病之眼功能的恢復來評估。舉例而言，治療黃斑變性或其他視網膜病變之有效性可藉由視覺銳度之改善及評估立體眼底彩色相片之異常及分級來判定。（年齡相關性眼睛疾病研

究調查小組, NEI, NIH, AREDS 報告第 8 號, 2001, Arch. Ophthalmol. 119: 1417-1436)。

套組及存庫(Bank)

【0161】 在另一態樣中，本發明提供套組，其於多種如上所述用於眼再生及修復之方法中利用前驅細胞(諸如 PPDC)、及細胞群、由該些細胞(較佳 PPDC)所製備之條件培養基及其組分及產物。當用於治療眼變性病狀、或其他計劃治療時，該些套組可包括一或多種細胞群或條件培養基(包括至少產後細胞或衍生自產後細胞之條件培養基)、及醫藥上可接受之載劑(液體、半固體或固體)。套組亦可選地可包括例如藉由注射投予細胞及條件培養基之手段。套組進一步可包括使用細胞及條件培養基之說明書。經製備用於野外醫院用途，諸如軍事用途之套組可包括全程序供應(full-procedure supply)，其包括組織支架、手術用縫線、及類似物，其中細胞或條件培養基與急性受傷之修復結合使用。如本文所述之用於檢定及體外方法之套組可含有例如以下中之一或多者：(1) PPDC 或其組分、或 PPDC 之條件培養基或其他產物；(2)用於實踐體外方法之試劑；(3)適當時選用的其他細胞或細胞群；及(4)用於指導體外方法之說明書。

【0162】 在另一態樣中，本發明亦提供用於存庫(banking)本發明之組織、細胞、細胞群、條件培養基、及細胞組分。如上文所討論，細胞及條件培養基易於凍存。因此本發明提供凍存細胞於存庫

中之方法，其中該些細胞經冷凍儲存且與基於細胞之免疫、生化及基因性質之細胞的完整表徵相關聯。冷凍細胞可經解凍及擴增或直接用於自體、同基因、或同種異體治療，其取決於程序之要求及患者之需要。較佳地，關於每一凍存樣本之資訊儲存於電腦中，其可基於外科醫師、程序及患者之要求來搜尋，其中合適的匹配係基於細胞或族群之表徵來得到。較佳地，使本發明之細胞生長且擴增至所要量之細胞，且治療性細胞組成物係在基質或支持物存在或不存在下分開製備或以共培養之形式製備。儘管對於一些應用而言，使用新鮮製備之細胞可為較佳的，但是可藉由將細胞冷凍且將資訊輸入於電腦中以將電腦條目與樣本相關聯來將剩餘物凍存且存庫。即使在不需要將來源或捐贈者與此類細胞之接受者匹配的情況中，出於免疫目的，存庫系統使其易於將例如存庫細胞之所需生化或基因性質與治療需要匹配。在找到與所需性質相匹配之存庫樣本後，可擷取樣本且製備以供治療使用。如本文所述所製備之細胞溶解產物、ECM 或細胞組分亦可經凍存或以其他方式保留（例如，藉由凍乾）且根據本發明存庫。

【0163】 提供以下實例以更詳細描述本發明。該等實例意欲說明而非限制本發明。

【0164】 以下縮寫可出現於實例以及說明書與申請專利範圍中之其他地方：ANG2（或 Ang2）為血管生成素 2；APC 為抗原呈現細胞；BDNF 為腦衍生神經營養因子(brain-derived neurotrophic factor)；bFGF 為鹼性纖維母細胞生長因子(basic fibroblast growth

factor) ; bid (BID) 為「一日兩次」(每天兩次) ; CK18 為細胞角蛋白 (cytokeratin) 18 ; CNS 為中樞神經系統 ; CNTF 為睫狀神經營養因子 (ciliary neurotrophic factor) ; CXC 配體 3 為趨化激素受體配體 (chemokine receptor ligand) 3 ; DMEM 為達爾伯克(Dulbecco's)最低必需培養基 ; DMEM:lg (或 DMEM:Lg、DMEM:LG) 為具有低葡萄糖之 DMEM ; EDTA 為乙二胺四乙酸 ; EGF (或 E) 為表皮生長因子(epidermal growth factor) ; FACS 為螢光活化細胞分選(fluorescent activated cell sorting) ; FBS 為胎牛血清 ; FGF (或 F) 為纖維母細胞生長因子(fibroblast growth factor) ; GBP 為加巴噴丁(gabapentin) ; GCP-2 為顆粒性細胞趨化蛋白質(granulocyte chemotactic protein)-2 ; GDNF 為膠細胞衍生神經營養因子(glial cell-derived neurotrophic factor) ; GF AP 為膠細胞纖維酸性蛋白質(glial fibrillary acidic protein) ; HB-EGF 為肝素結合表皮生長因子 (heparin-binding epidermal growth factor) ; HCAEC 為人類冠狀動脈內皮細胞(Human coronary artery endothelial cell) ; HGF 為肝細胞生長因子(hepatocyte growth factor) ; hMSC 為人類間葉幹細胞(Human mesenchymal stem cell) ; HNF-1 α 為肝細胞特異性轉錄因子 (hepatocyte-specific transcription factor) ; HVVEC 為人類臍靜脈內皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell) ; I309 為趨化激素及 CCR8 受體之配體 ; IGF-1 為類胰島素生長因子(insulin-like growth factor) 1 ; IL-6 為介白素(interleukin) 6 ; IL-8 為介白素 8 ; K19 為角蛋白(keratin) 19 ; K8 為角蛋白 8 ; KGF 為角質細胞生長因子(keratinocyte growth factor) ;

LIF 為白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor); MBP 為髓鞘鹼性蛋白(myelin basic protein); MCP-1 為單核細胞趨化蛋白質(monocyte chemotactic protein) 1; MDC 為巨噬細胞衍生趨化激素(macrophage-derived chemokine); MIP1 α 為巨噬細胞發炎蛋白質(macrophage inflammatory protein) 1 α ; MIP1 β 為巨噬細胞發炎蛋白質 1 β ; MMP 為基質金屬蛋白酶(matrix metalloprotease, MMP); MSC 為間葉幹細胞(mesenchymal stem cell); NHDF 為正常人類皮膚纖維母細胞(Normal Human Dermal Fibroblast); NPE 為神經前驅細胞擴增培養基(Neural Progenitor Expansion media); NT3 為神經營養蛋白(neurotrophin) 3; 04 為寡樹突細胞(oligodendrocyte)或膠細胞分化標記(glial differentiation marker) 04; PBMC 為周邊血液單核細胞(Peripheral blood mononuclear cell); PBS 為磷酸鹽緩衝鹽水(phosphate buffered saline); PDGF-CC 為血小板衍生生長因子(platelet derived growth factor) C; PDGF-DD 為血小板衍生生長因子 D; PDGFbb 為血小板衍生生長因子 bb; PO 為「經口」(經由嘴巴); PNS 為周邊神經系統(peripheral nervous system); Rantes (或 RANTES) 為調控活化、正常 T 細胞表現與分泌(regulated on activation, normal T cell expressed and secreted); rhGDF-5 為重組人類生長及分化因子(recombinant human growth and differentiation factor) 5; SC 為皮下(subcutaneously); SDF-1 α 為基質衍生因子(stromal-derived factor) 1 α ; SHH 為聲蠅(sonic hedgehog);

SOP 為標準作業程序；TARC 為胸腺與活化調控趨化激素 (thymus and activation-regulated chemokine)；TCP 為組織培養塑膠(Tissue culture plastic)；TCPS 為組織培養聚苯乙烯；TGF β 1 為轉形生長因子(transforming growth factor) β 1；TGF β 2 為轉形生長因子(transforming growth factor) β 2；TGF β -3 為轉形生長因子 β -3；TIMP1 為基質金屬蛋白酶組織抑制因子(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) 1；TPO 為血小板生成素(thrombopoietin)；TSP 為血小板反應蛋白；TUJ1 為 BIII 微管蛋白(Tubulin)；VEGF 為血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor)；vWF 為馮威里氏因子(von Willebrand factor)；及 α FP 為 α -胎蛋白(fetoprotein)。

【0165】 以下實例進一步說明但不限制本發明。

實例 1

前驅細胞對神經突外生及突觸新生之作用

【0166】 突觸新生為神經元之間尤其是突觸前神經元(Bassoon 蛋白)與突觸後神經元(Homer 蛋白)之間的突觸形成。這種突觸形成之過程係由星狀細胞調節，星狀細胞除了促進突觸形成以外，亦提供支持給神經元生存及生長，包括視網膜神經節細胞。已顯示，向視網膜變性模型視網膜下投予離體人類臍組織衍生細胞(hUTC)保留光受體及視覺功能。(US 2010/0272803)。此處，檢測 hUTC 之

治療態樣且表徵衍生 hUTC 對功能性突觸形成（突觸新生）、神經元生存及外生之作用。

材料和方法

【0167】 人類臍組織衍生細胞(*hUTC*)：獲自以下實例 4 至 16 中所述、及詳細描述於美國專利第 7,524,489 號與第 7,510,873 號、及美國公開申請案第 2005/0058634 號中之方法，兩者皆以引用方式併入本文中。簡言之，人類臍帶係經捐贈者同意捐贈且於活產後獲得。將組織絞碎且用酶消化。在用含有 0.5 U/mL 膠原蛋白酶(Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany)、5 U/mL 中性蛋白酶(Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany)、及 2 U/mL 玻尿酸酶(Cumulase; Origio a/s, Måløv, Denmark)之混合物的達爾伯克改良伊格爾培養基(DMEM)-低葡萄糖(Lg) (SAFC Biosciences, Lenexa, KS) 幾乎完全消化之後，將細胞懸浮液過濾通過 70 μ m 過濾器，且將上清液以 250 x g 離心。將分離之細胞於 DMEM-Lg 中清洗數次且以 5,000 個細胞/cm² 之密度接種於含有 15% (vol/vol)胎牛血清(FBS; SAFC Biosciences)之 DMEM-Lg 中（5% (vol/vol)二氧化碳，37°C）。當細胞達到大致 70%長滿時（約 3 至 4 天），使用 TrypLE (Gibco, Grand Island, NY)繼代。將細胞擴增數次並存庫。使用凍存 hUTC(16 至 20 次族群倍增)。

【0168】 視網膜神經節細胞：將視網膜神經節細胞(RGC)如先前所述藉由順序免疫淘選(immuno-panning)從任一性別之 P7（出生

後第 7 天) 史-道二氏大鼠(Charles River, Wilmington, MA)視網膜純化出(Winzeler A, Wang JT., Cold Spring Harbor Protocols , 2013 ; 643-652)。簡言之，解剖視網膜並用木瓜酶(6 U/mL, Worthington, Burlingame, CA)解離。經解離細胞首先用西非單葉豆凝集素(Bandeiraea Simplicifolia Lectin) I (BSL, Vector laboratories, Burlingame, CA)塗布之培養皿淘選以移除免疫細胞、細胞碎屑及纖維母細胞。將未結合細胞轉移至塗布有抗 Thy1 (殖株 T11D7) 之培養皿中從而實現 RGC 之特異性分離。將經純化 RGC 小心地用胰蛋白酶消化後再接再種至 24 孔盤中之經聚-D-離胺酸(PDL)及層黏蛋白塗布玻璃蓋玻片上 (35,000 個細胞/蓋玻片)。將 RGC 培養於含有 B27 (Invitrogen, Grand Island, NY)、腦衍生神經營養因子(BDNF)、睫狀神經營養因子(CNTF)、胰島素及毛喉素(forskolin)之無血清生長培養基中(培養基之完整配方可見 Winzeler and Wang, Cold Spring Harbor Protocols , 同上)。

【0169】 皮質星狀細胞(ASC): 使用如 McCarthy KD, de Vellis J., J. Cell Biology, 1980; 85:890-902 中所述之標準方法分離自任一性別之 P1 史-道二氏大鼠幼崽。關於星狀細胞共培養，跨孔插入物(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)係藉由在星狀細胞生長培養基 (AGM，描述於 McCarthy KD, de Vellis J., J. Cell Biology, 1980; 85:890-902) 中的每個插入物接種 125,000 個皮質星狀細胞來製備。第二天用 RGC 生長培養基置換 AGM，且將跨孔插入物轉移至在蓋玻片上含有 4 DIV (體外天數) RGC 之 24 孔盤中。

【0170】 正常人類皮膚纖維母細胞 (NHDF)：獲自 Lonza (Walkersville, MD)。依據製造商規程，使細胞擴增並在繼代 4 時凍存。

【0171】 將 RGC 與 hUTC、作為陽性對照組之 ASC、或作為陰性對照組之 NHDF 細胞系共培養歷時六天。以 10K、20K、30K、100K 及 200K 接種 DIV3 之 hUTC 及 NHDF。以 130K 接種星狀細胞。25K、50K 及 100K 個 hUTC、130K 個星狀細胞、以及 100K、150K 及 200K 個 NHDF 係用於計算對突觸形成之作用。

【0172】 關於共培養實驗，在與 RGC 共培養前一天將 25,000 個 hUTC 接種至 hUTC 生長培養基中之跨孔插入物中。在共培養當天用 RGC 生長培養基置換 hUTC 生長培養基且將跨孔插入物轉移至具有生長於玻璃蓋玻片上之 4 DIV RGC 的 24 孔盤中。

【0173】 根據製造商推薦，將 NHDF 培養於纖維母細胞基礎培養基(FBM, Lonza)中。關於與 RGC 之共培養，在與 RGC 共培養前一天將 150,000 個 NHDF 接種至 FBM 培養基中之跨孔插入物中。第二天用 RGC 生長培養基置換 FBM，且將跨孔插入物轉移至在蓋玻片上含有 4 DIV RGC 之 24 孔盤中。

【0174】 藉由免疫細胞化學定量突觸數目（突觸檢定）：突觸形成係藉由共定位突觸前（Bassoon 蛋白）及突觸後（Homer 蛋白）標記之免疫細胞分析以及電生理學來評估。將 35,000 個 RGC 單獨培養於玻璃蓋玻片上歷時 4 DIV 且在 4 DIV 時添加跨孔插入物或條件培養基。為了阻斷 TSP 誘導之突觸形成，將 32 μ M 加巴噴丁(GBP)

與條件培養基一起添加，如 Eroglu C，等人，Cell, 2009; 139:380-392 中所述。在 7 DIV 時，經共培養細胞接受新鮮生長培養基。當使用條件培養基時，在 7 DIV 提供補充有條件培養基之生長培養基。在 10 DIV 時，用 4% PFA (w/v)固定 RGC 且對突觸前及突觸後標記 Bassoon 蛋白（小鼠抗 Bassoon 蛋白，1:1000，RRID: AB_2038857, Enzo, Farmingdale, NY）及 Homer 蛋白-1（兔抗 Homer 蛋白，1:500，RRID: AB_1966438, Synaptic Systems, Goettingen, Germany）進行染色。經 Alexa 共軛二級抗體（Invitrogen，山羊抗兔 AF-488 (1:1000, RRID: AB_10563748) 及山羊抗小鼠 AF-594 (1:500, RRID: AB_10561507) 係用於偵測。將蓋玻片固定於玻片(VWR Scientific, Radnor, PA)上具有 DAPI (Vector Laboratories)之 Vectashield 封片劑中。RGC 係於 Zeiss Axioimager M1 落射螢光顯微鏡(Carl Zeiss, Thornwood, NY)上使用 63X 物鏡成像。藉由 DAPI 螢光隨機識別出與其最鄰近之細胞距離至少兩個細胞直徑的健康形態單一細胞。在每次實驗中，成像及分析每個條件至少 15 至 20 個細胞，且所顯示之結果為 2 至 3 次獨立實驗之平均值。用 NIH 影像處理包 ImageJ 之定製插件(plugin)（由 Barry Wark 書寫，可向 Duke University 之 Cagla Eroglu 索取）分析經共定位突觸點之擷取影像。染色規程及定量方法細節詳述於 Ippolito DM, Eroglu C., J Vis Exp,. 2010; 16(45):2270。藉由計數每 100 μm 樹突中經共定位突觸點之數目來測定突觸密度（每神經突長度中之突觸數目）。對於此分析，每個影

像隨機選擇一個近側樹突/細胞。所顯示之突觸密度結果係來自一個 30 個細胞/條件之實驗。

【0175】 RGC 之電生理學記錄：藉由全細胞膜片鉗以 -70 mV 之保持電位記錄微興奮性突觸後電流(mEPSC)。將細胞保持在 23°C 至 24°C 下、0.2 mL/min 流率之細胞外溶液連續灌注下。細胞外溶液含有：124 mM NaCl、2.5 mM KCl、2 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 、26 mM NaHCO_3 、1.2 mM NaH_2PO_4 、10 mM D-葡萄糖(pH 7.4)。在記錄期間將河豚毒素(TTX, Abcam, 1 μM , Abcam, Cambridge, MA)添加於細胞外溶液中。膜片吸量管中之內部溶液(2.5 至 5 $\text{M}\Omega$)含有：120 mM 甲磺酸銫、5 mM NaCl、10 mM 氯化四乙銨、10 mM HEPES、4 mM 利多卡因 N-乙基溴化物、1.1 mM EGTA、4 mM ATP 鎂鹽、及 0.3 mM GTP 鈉鹽，pH 用 CsOH 調整至 7.2 且滲透壓用蔗糖設成 300 mOsm。信號係藉由 MultiClamp 700B 放大器(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)記錄，並用 Digidata 1440A 數化器(Molecular Devices)以 10 kHz 過濾及以 20 kHz 數位化。在全細胞組態中，僅當串聯電阻 < 20 $\text{M}\Omega$ 時才接受記錄。所有數據於 pCLAMP10 (Molecular Devices)中使用峰偵測軟體分析。所顯示之數據係得自 15 個細胞/條件，該等數據係經由 3 次獨立實驗記錄。

【0176】 神經突外生檢定：將 RGC 以低密度(1,500 個細胞/蓋玻片)接種至經聚-D-離胺酸(PDL)及小鼠層黏蛋白(20 ng/ml)塗布之玻璃蓋玻片上歷時 24 小時，隨後用 4% PFA (w/v)固定，並用兔抗 β 微管蛋白抗體(LI-COR, RRID: AB_1850029, Lincoln, NE)及接著的

山羊抗兔 AF-488 進行免疫染色以可視化神經突。24 小時之後，將神經突藉由用 CellTracker Red CMPTX 染料(Inivtirogen)培養 15 min 接著用 4% PFA (w/v)固定來可視化。使用 Zeiss Axioimager M1 落射螢光顯微鏡(Carl Zeiss)上之 20X 物鏡擷取單一 RGC 及其神經突之影像。在每次實驗中，成像及分析每個條件至少 30 個細胞，且所顯示之結果為 2 至 3 次獨立實驗之平均值。神經元形態係使用 Metamorph 軟體(Molecular Devices)中之神經突外生應用模組分析。如 Ferreira TA, 等人, Nature Methods, 2014; 11:982-984 中所述，使用 Fiji 之插件進行 Sholl 分析。

【0177】 使用單向變異數分析(ANOVA)接著使用各對(Each Pair)司徒頓(Student) t (費雪(Fisher) LSD) 後檢驗進行經定量數據之統計分析。對於神經突外生檢定之 Sholl 分析，進行共變異數分析(ANCOVA)。對於 mEPSC 之累積機率，使用克拉斯卡－瓦立斯檢驗，接著使用鄧恩(Dunn)多重比較事後測試進行分析。將嵌入有 SAS 9.2 軟體(SAS)之 JMP Genomics 5 用於所有數據之統計分析。所有數據表達為平均值±SEM，且顯著性表示為*** $p < 0.0001$ 、** $p < 0.001$ 、及* $p < 0.05$ 。

結果

【0178】 當經純化 RGC 與跨孔插入物中之 hUTC 一起共培養時，發現經純化 RGC 之間發生突觸數目及功能之變化。與初代大鼠星狀膠質細胞(astroglial)培養物(ASC)共培養之 RGC 提供陽性對照

組，因為研究顯示星狀細胞強烈增加突觸數目並增強突觸活性（Pfriege FW, Barres BA, Science, 1997; 277:1684-1687; Ullian EM, 等人，Science, 2001; 291:657-661）。用 NHDF 處理之 RGC 提供陰性對照組，因為其在視網膜變性模型中不誘導顯著的功能或結構恢復（Lund 等人，2007，同上）。hUTC 及 RGC 之共培養物展現突觸點(synaptic punctum)之數目增加且與星狀細胞（陽性對照組）可相比。（圖 1B 至圖 1D）。4 DIV 之後，RGC 係與 hUTC、ASC 或 NHDF 共培養額外 6 天，且突觸數目係藉由用突觸前及突觸後蛋白對（分別為 Bassoon 蛋白及 Homer 蛋白）免疫染色來評估（圖 1A）。使用先前所述之方法，以突觸前及突觸後標記之共定位來測定突觸（Ippolito DM, Eroglu C., J Vis Exp,. 2010，同上）（圖 1B，箭頭處）。相較於單獨培養的 RGC，hUTC 誘導 RGC 之間形成興奮性突觸（圖 1B、圖 1C）。而與 NHDF 共培養不誘導突觸數目之顯著增加（圖 1B、圖 1C、圖 1D）。每單位神經突長度突觸數目之定量顯示 hUTC 主要藉由增加突觸密度提高突觸數目（圖 1D，單向 ANOVA， $p<.0001$ ）。

【0179】全細胞膜片鉗記錄量測微興奮性突觸後電流(mEPSC)。RGC 經單獨培養或在 hUTC 或 ASC 存在下培養（圖 1A）。RGC 與 hUTC 之共培養類似與星狀細胞之共培養，引起突觸事件之頻率增加（圖 1E 至圖 1G、圖 1F，克拉斯卡－瓦立斯(Kruskal-Wallis)檢驗， $p<.0001$ ，圖 1G，單向 ANOVA， $p<.0001$ ），這與所觀察到的突觸數目大量增加一致（圖 1B 至圖 1D）。hUTC 亦增加突觸後電流之振幅。類似於星狀細胞，hUTC 增強突觸活性（圖 1H、圖 1I，克拉斯卡－

瓦立斯檢驗， $p < .0001$)。mEPSC 峰之波形顯示上升及衰退 τ 均隨 hUTC 處理而增加 (圖 1J 至圖 1M)。hUTC 誘導經培養 RGC 中之興奮性突觸形成且增強突觸功能，與 ASC 類似。

實例 2

條件培養基對神經突外生及突觸新生之作用

【0180】 評估 hUTC 條件培養基在 RGC 培養中之作用。

【0181】 如以上實例 1 中所述獲得 hUTC、RGC 及星狀細胞。

【0182】 製備條件培養基：將純星狀細胞培養物或 hUTC 生長於 10-cm 組織培養皿(Corning, Corning, NY)中之其個別生長培養基中直至 70%長滿。隨後用溫 DPBS (Gibco)清洗細胞兩次，向各皿中添加 10 mL 條件化培養基，條件化培養基係由補充有 L-麩醯胺酸(2 mM, Gibco)、丙酮酸鈉(1 mM, Gibco)、青黴素(100 U/mL)及鏈黴素(100 μ g/mL, Gibco)之 Neurobasal® (Gibco)組成。培養基係經細胞條件化 5 天。收集無細胞條件培養基且藉由使用 5 kDa 截留分子量 Vivaspin 20 離心濃縮管(Sartorius, Bohemia, NY)濃縮 10 次。依據製造商推薦藉由 Bradford 檢定(Thermo Scientific, Grand Island, NY)量測各條件培養基之蛋白質濃度。於低蛋白質結合管(Eppendorf, Hamburg, Germany)中之星狀細胞條件培養基(ACM)及 hUTC 條件培養基(UCM)之等分係經快速冷凍於液態氮中，且在-80°C 下儲存直至使用。為了離拆具有不同截留分子量之 UCM，使用 30 kDa 及 100 kDa Vivaspin 20 離心濃縮管。為了收集 5 至 100 kDa UCM 部分，將 100

kDa Vivaspin 20 之流出物(flow-through)用 5 kDa Vivaspin 20 濃縮管濃縮。為了收集 5 至 100 kDa UCM 部分，將 100 kDa Vivaspin 20 之流出物用 5 kDa Vivispan 濃縮管濃縮。關於處理方面，使冷凍等分在冰上緩慢融化，且將條件培養基以所需濃度添加至冰冷 RGC 生長培養基（突觸及外生檢定）或最低培養基（生存檢定）中。

【0183】 條件培養基之西方墨點分析：10 至 20 μ g 條件培養基係經製備於含有 5% β -巰基乙醇(v/v)之 5x Laemmli 加樣緩衝液(Thermo Scientific)中以用於聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)。將蛋白質於 95°C 變性 15 分鐘。將蛋白質於 10% SDS-PAGE 凝膠(BioRad, Hercules, CA)中分離且隨後轉移至 PVDF 膜(Millipore)上。為了偵測 TSP，使用山羊抗人類 TSP1 (1:250, RRID: AB_2201958)、TSP2 (1:250, RRID: AB_220268)、TSP4 (1:200, RRID: AB_2202087) (R&D Systems)。對於加樣對照組，使用山羊抗 Hevin 抗體(1:250, RRID: AB_2195103, R&D systems)偵測另一種 hUTC 分泌蛋白，稱為 Hevin/SPARCL1。山葵過氧化酶(HRP)共軛抗山羊抗體(R&D, 1:5000)用作二級抗體。依據製造商推薦，用 Amersham™ ECL 西方墨點分析系統套組(GE Healthcare, Winterville, NC)或 SuperSignal® West Femto 最大靈敏度受質(Thermo Scientific)進行偵測。

【0184】 突觸檢定、電生理學記錄、及神經突外生檢定描述於實例 1 中。

【0185】 細胞生存檢定：將 RGC 直接接種至 24 孔組織培養盤上（7,500 個細胞/孔）。孔係經 PDL 及層黏蛋白塗布。將細胞培養

於含有 Neurobasal® (Invitrogen)、SATO 補充物 (100 µg/ml 運鐵蛋白、100 µg/ml 牛血清白蛋白、60 ng/ml 助孕酮、16 µg/ml 腐肉鹼、40 ng/ml 亞硒酸鈉)、N-乙醯半胱胺酸(5 µg/ml)、三碘甲狀腺胺酸(4 µg/ml)、L-麩醯胺酸(2 mM)、青黴素(100 U/mL)、鏈黴素(100 µg/mL)、丙酮酸鈉(1 mM)及毛喉素(5 µM)之最低培養基中。為了測試 UCM 及 ACM 對生存之作用，在毛喉素、BDNF (200 ng/mL)或 CNTF (40 ng/mL)不存在/存在下，將最低培養基補充各種濃度的條件培養基。依據製造商之說明書，使用 LIVE/DEAD®哺乳動物細胞存活性套組 (Invitrogen)在 3 DIV 時評估細胞存活性。在施加套組劑之後 15 分鐘進行存活性計數，且使用 Zeiss Axio Observer A1 落射螢光顯微鏡 (Carl Zeiss)之 20X 物鏡擷取代表影像。每次實驗中計數每個處理至少 10 個視野，且所顯示之結果為 2 至 3 次實驗之平均值。存活百分比之計算為活細胞數目除以死亡細胞及活細胞之總數乘以 100。

【0186】 經定量數據之統計分析係如實例 1 中所述進行。

結果

【0187】 將 RGC 饋以各種濃度的 hUTC 條件培養基(hUCM)。hUTC 係經單獨培養且收集 hUTC 條件培養基(UCM) (圖 2A)。將 RGC 用 UCM 處理，且使用與實例 1 中相同的檢定，評估條件培養基對突觸數目及功能之作用。突觸分析顯示，hUCM 足以用濃度依賴性方式類似於 hUTC 在跨孔插入物中誘導 RGC 之突觸形成並增強突觸功能 (圖 2B 至圖 2N)，類似於星狀細胞條件培養基(ACM)。(圖

2B 至圖 2D 及圖 2J)。濃度在 20 至 80 μg 總蛋白質/mL 培養基之間的 UCM 顯示完全突觸新生活性。UCM 可取代 hUTC 共培養。hUCM 亦加強功能性突觸，如藉由 mEPSC 之振幅及頻率增加所示。(圖 2E 至圖 2I)。

【0188】 這些結果證明 hUTC 誘導突觸形成且增強突觸功能。hUTC 之突觸新生作用有助於藉由將這些細胞遞送至動物疾病模型而發生的功能恢復。

【0189】 除了 hUCM 對突觸形成之作用外，其促進在無任何其他生長因子（例如，BDNF、及 CNTF）存在下之 RGC 生存。(圖 3A、圖 3D 及圖 3E)。將 RGC 於最低培養基中培養 3 DIV，該最低培養基缺少培養基補充物 B27 及生長因子 BDNF、CNTF 及胰島素，但含有毛喉素（稱為最低培養基對照條件之 CTR）。在這些最低培養基條件下，小於 5% RGC 於 3 DIV 結束時存活（圖 3A 左圖及圖 3B）。添加生長因子諸如 BDNF 或 CNTF 僅在有毛喉素存在下增加 RGC 存活率（Meyer-Franke A，等人，Neuron,. 1995; 15:805-819）。培養基中之毛喉素增加模擬進行中神經元活性之神經元中的 cAMP 含量，其對於 CNS 神經元之生存來說係關鍵的（Meyer-Franke 等人，1995）。將 UCM 添加至最低培養基中以濃度依賴性方式刺激 RGC 生存（圖 3A 右圖及圖 3B）；而相同濃度下之 ACM 不促進 RGC 生存（圖 3B）。

【0190】 UCM 之生存促進活性在有毛喉素存在下之最低培養基中具功能性（圖 3C）。這些結果證明 UCM 刺激 RGC 生存。在較

低濃度(40 $\mu\text{g/ml}$)下，UCM 之生存作用與 BDNF 或 CNTF 之生存作用似乎有相加性（圖 3D、圖 3E）。

【0191】 UCM 亦增強 RGC 神經突外生，如藉由總突起長度、突起數目及分支數目增加所證明。（圖 3F 至圖 3J）。RGC 生長培養基在接種時具有 UCM 顯示 UCM 含有促進神經突外生及精細化之因子（圖 3F 至圖 3J）。ACM 亦促進神經突外生（圖 3F 至圖 3J）；UCM 一般在誘導整體精細化及分枝中更有效（圖 3F 及圖 3J）。Sholl 分析顯示，相較於經單獨培養的 RGC，UCM 增加神經元複雜性（圖 3G）。

【0192】 總之，hUTC 分泌促進體外純化 RGC 之間的功能性突觸之發育的因子。此外，hUTC 亦支持神經元生存及生長。

實例 3

由前驅細胞分泌之突觸形成因子

【0193】 已顯示，來自 hUTC 之分泌蛋白體(secretome)對功能性突觸之發育、及神經元的生存及外生具有正面作用。在此實例中，識別由 hUTC 分泌之突觸形成因子。

【0194】 免疫細胞化學檢定：如以上實例 1 中所述獲得 hUTC 及 RGC。如實例 2 製備 hUTC 條件培養基(UCM)。

【0195】 藉由截留分子量(MWCO)約 5 kDa 至約 100 kDa 分離 UCM 中之蛋白質。將 80 $\mu\text{g/mL}$ UCM 用於培養 RGC，並藉由免疫細

胞化學突觸檢定進行分析。經分離蛋白質 > 5 kDa、> 30 kDa、及 > 100 kDa 係與單獨 RGC 及 UCM 5-100 kDa 進行比較。(圖 4A)。

【0196】 使用突觸新生阻斷劑加巴噴丁(GBP)，以進一步識別由 hUTC 分泌之突觸形成因子。

【0197】 神經突外生檢定：為了測試在病理學（亦即生長抑制性）培養條件下之神經突外生，將 RGC（1,500 個細胞/蓋玻片）接種至塗布有各種濃度的硫酸軟骨素蛋白聚醣(CSPG, EMD Millipore, Billerica, MA)、Nogo-A (R&D Systems, Minneapolis, MN)或有可溶性髓鞘鹼性蛋白(MBP, 10 ug/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)存在之蓋玻片上。24 小時之後，將神經突藉由用 CellTracker Red CMPTX 染料(Invtirogen)培養 15 min 接著用 4% PFA (w/v)固定來可視化。使用 Zeiss Axioimager M1 落射螢光顯微鏡(Carl Zeiss)上之 20X 物鏡擷取單一 RGC 及其神經突之影像。在每次實驗中，成像及分析每個條件至少 30 個細胞，且所顯示之結果為 2 至 3 次獨立實驗之平均值。神經元形態係使用 Metamorph 軟體(Molecular Devices)中之神經突外生應用模組分析。如 Ferreira TA，等人，Nature Methods, 2014; 11:982-984 中所述，使用 Fiji 之插件進行 Sholl 分析。

【0198】 剔除檢定：用慢病毒 shRNA 培養 hUTC 以製備剔除(KD) UCM。隨後將 RGC 培養於 KD UCM 中並分析突觸形成、電生理學、及神經元生存及外生。(圖 5A)。靶向人類 *THBS1*、*THBS2* 或 *THBS4* mRNA（其分別轉譯成 TSP1、TSP2 及 TSP4）之選殖至 pLKO.1-puro 載體中之 shRNA 建構體池係購自 Thermo Scientific。

空 pLKO.1 puro 載體係購自 Addgene (質體 8453, Cambridge, MA) 且用作剔除對照組。個別建構體之剔除效率藉由轉染至 hUTC 中來測定。選擇各 TSP 之一個顯示最有效剔除之 shRNA 建構體用於後續慢病毒生產。

【0199】 為了製備慢病毒，在轉染前一天以每 T75 培養瓶 8×10^6 個細胞接種 293T 慢病毒包裝細胞。第二天，將含有 *Thbs1* (選殖編號 TRCN00224)、*Thbs2* (選殖編號 TRCN53972)、*Thbs4* (選殖編號 TRCN54048) 之 shRNA 之 pLKO.1-puro 慢病毒質體、或剔除對照組 (Addgene 質體 8453) 轉染至 293T 細胞中。對於凌亂 shRNA 對照組，使用含有 *Thbs1* (5'-ATAACTCCGATCGTTCAATAT-3')、*Thbs2* (5'-GTTACATCTCGATACGATACA-3') 及 *Thbs4* (5'-ATATAAGACGCTAGATCCACA-3') shRNA 之相同正義及反義凌亂序列之寡核苷酸。將亂序 shRNA 寡核苷酸黏合(anneal)且選殖至 pLKO.1-puro 中並用於生產慢病毒。依據製造商推薦，使用 X-tremeGENE 轉染試劑(Roche, Basel, Switzerland)共轉染包裝質體 R8.2 及 VSV-G。在轉染後 48 及 72 小時收集慢病毒上清液，且過濾通過 0.45 μm 過濾器(Millipore)。使用 Lenti-X™ GoStix™ (Clontech, Mountain View, CA)偵測病毒粒子。在補充聚凝胺(polybrene) (2 $\mu\text{g/ml}$, Sigma)之後，經過濾上清液用於感染 hUTC。經轉導 hUTC 藉由將嘌呤黴素(900 ng/mL)添加至 hUTC 培養基中 5 天來進一步選擇，之後再用於條件化用於 RGC 實驗之培養基。

【0200】 重組 TSP 之生產及純化：經純化重組人類 TSP1 係購自 R&D Systems。對於 TSP2 純化，表現小鼠 TSP2 之 CHO 細胞系係用於生產條件培養基。使用親和力層析術程序利用 HiTRAP 肝素 HP (GE Healthcare) 如先前所述 (Oganesian A, 等人, Molecular Biology of Cell, 2008; 19:563-571) 自培養基純化出經分泌重組 TSP2。對於 TSP4，依據製造商之說明書，使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)，將 6-組胺酸標記大鼠 TSP4 建構體 (pcDNA3-TSP4，如 Kim DS, 等人, J Neurosci, 2012; 32:8977-8987 中所述) 轉染至 HEK293 細胞中。依據製造商之說明書，藉由 Ni-螯合層析法使用 Ni-NTA 樹脂 (Qiagen, Venlo, Netherlands) 自培養基純化出經分泌重組 TSP4。用 30 kDa 截留 Vivaspin 20 (Sartorius) 將經純化重組 TSP 濃縮至 1 mg/mL，且將等分快速冷凍於液態氮中並在 -80°C 下儲存直至使用。

【0201】 突觸檢定、電生理學記錄、及神經突外生檢定描述於實例 1 中。經定量數據之統計分析係如實例 1 中所述進行。條件培養基之西方墨點分析描述於實例 2 中。

結果

【0202】 使用不同截留分子量粒徑篩析柱離拆含有 hUTC 分泌之突觸形成因子之 UCM (圖 4A)，結果 UCM 之突觸新生作用集中在大於 100 kDa 之部分內 (圖 4B、圖 4C)。UCM 與 RGC 之培養的免疫細胞化學顯示在 5 至 100 kD 範圍內的突觸形成因子的作用最小，

大於 100 kDa 之因子具有最大作用。(圖 4B、圖 4C)。與 TSP 在 UCM 誘導突觸形成中之作用一致，添加 GBP 阻斷突觸形成因子。(圖 4D、圖 4E)。加巴噴丁為已知的突觸新生血小板反應蛋白家族阻斷劑，此結果顯示 TSP 家族蛋白為 hUTC 所分泌之主要突觸形成因子。

【0203】 異構體特異性 shRNA 係使用慢病毒媒介之方式用於個別或組合地剔除 TSP1、TSP2 及 TSP4。(圖 5A)確認 TSP 為 hUTC CM 中之突觸形成因子。西方墨點法確認各 TSP 由對應 shRNA 特異性剔除(圖 5B)。慢病毒轉導不具有 shRNA 之相同親代質體載體所生產之 UCM (KD-CTR)或用含有凌亂 TSP1、TSP2 及 TSP4 shRNA 之慢病毒三重感染所生產之 UCM (SCR-CTR)係用作對照組。UCM 係自經慢病毒感染之 hUTC 生產，且施加至 RGC 以識別 TSP 剔除之作用(圖 5A)。TSP-1、TSP-2 及 TSP-4 之 shRNA 建構體係經遞送至 hUTC，導致剔除各 TSP 之表現。(圖 5B 及圖 5D)。RGC 中突觸數目及突觸密度之定量顯示所有三種 TSP(TSP1、TSP2 及 TSP4)皆有助於 UCM 之突觸新生功能(圖 5C、圖 5D、圖 5H 至圖 5J)。相較於 KD-CTR UCM，TSP 之個別剔除使突觸數目減少(圖 5C、圖 5D、圖 5H 至圖 5J)。剔除所有三種 TSP(TSP1+2+4-KD)廢除 UCM 之突觸新生作用(圖 5C、圖 5D、圖 5J)。

【0204】 用純 SP1、TSP2 及 TSP4(各 150 ng/ml)補充 TSP1+2+4-KD UCM 使 TSP1+2+4-KD UCM 之突觸新生作用恢復(圖 5C、圖 5E、圖 5I)。將純 TSP 添加至 KD-CTR UCM 不會進一步增加突觸數目(圖 5K)。

【0205】 mEPSC 電生理學記錄顯示，靜默 TSP 之表現降低 hUTC 之突觸新生作用，其中 mEPSC 之振幅及頻率減小。用 ACM（陽性對照組）、SCR-CTR 或 TSP1+2+4-KD UCM 處理之 RGC 顯示，靜默 TSP 之表現減少經 UCM 所誘導之突觸事件頻率增加（圖 6F、圖 6G、圖 6H）。這與 TSP（TSP1、TSP2 及 TSP4）為 UCM 誘導突觸新生所需之發現一致（圖 5）。TSP 剔除對 mEPSC 峰性質諸如振幅（圖 6I、圖 6J）及上升 τ （圖 6K、圖 6L）具有較溫和作用。此外，TSP 剔除不影響 UCM 增加衰退 τ 之能力（圖 6M、圖 6N）。靜默 hUTC 中之 TSP1、TSP2、及 TSP4 消除這些細胞誘導突觸數目增加之能力。TSP 之損失不完全減弱 UCM 對突觸電流振幅及 mEPSC 峰波形之作用。

【0206】 此外，靜默 TSP 表現廢除 UCM 之神經突外生作用（圖 7A、圖 7B、圖 7C、圖 7D、圖 7E）。TSP1、TSP2 或 TSP4 之單一剔除廢除 UCM 之神經突外生促進作用（圖 7E），包括對突起數目及分支數目之作用（圖 7N 至圖 7O）。剔除 TSP2 或 TSP4 或所有三種 TSP（但僅剔除 TSP1 則無）減小 UCM 之生存促進活性（圖 7K）。用純 TSP 個別地或所有一起補充 TSP1+2+4-KD UCM 不救援 UCM 之生存促進功能（圖 7L）。用純 TSP（TSP1、TSP2 及 TSP4）（各 150 ng/ml）補充 TSP1+2+4-KD UCM 恢復 UCM 之神經突外生刺激功能（圖 7H、圖 7i、圖 7Q、圖 7R）。

【0207】 在 CNS 損傷時，由反應性神經膠細胞生產之硫酸軟骨素蛋白聚醣(CSPG)、及髓鞘蛋白（諸如 Nogo A）係自變性神經元釋

放。這些蛋白質抑制軸突再生(Niederost 等人, 2002; Silver 及 Miller, 2004; Usher 等人, 2010; Walker 等人, 2012), 妨礙神經元修復及損傷。經修改 RGC 神經突外生檢定說明 hUTC 在抑制生長之條件下促進神經突外生。在使用 CSPG 或 Nogo-A 之經修改 RGC 神經元外生檢定(圖 8A 及圖 8B)中, CSPG 自 $0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 開始阻礙神經突外生且在 $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 或更高濃度下完全阻斷生長(圖 8A)。Nogo-A 自 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 開始阻斷 RGC 中之神經突外生, 其中在 $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 下抑制超過 50% 之神經突生長(圖 8B)。經編碼凌亂 shRNA 之慢病毒轉導之 UCM (SCR-CTR UCM) 誘導接種至具有 $0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ CSPG 或 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Nogo-A 之蓋玻片上之 RGC 中之神經突外生(圖 8A 及圖 8B)。hUCM 即使在生長抑制條件下亦誘導神經突外生。SCR-CTR UCM 無法在高 CSPG ($> 0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 及 Nogo-A ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 濃度下引起神經突外生(圖 8A 及圖 8B)。

【0208】 不同於 SCR-CTR UCM, 當存在 $0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ CSPG(圖 8C 及圖 8E) 或 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Nogo-A(圖 8D 及圖 8F) 時, TSP1+2+4-KD UCM 不引起神經突外生, 顯示 TSP 對於在生長抑制條件下 hUCM 之神經突外生促進作用而言具重要性。單獨添加經純化 TSP2 或 TSP4 或一起添加所有三種 TSP 救援 TSP1+2+4-KD UCM 在 CSPG 或 Nogo-A 存在下誘導神經突外生之能力(圖 8C 至圖 8F)。這些結果顯示 TSP (尤其 TSP2 及 TSP4) 負責 hUCM 在 CSPG 或 Nogo-A 存在下之生長刺激作用。

【0209】 CNS 損傷所產生之髓鞘碎屑亦排出高含量髓鞘蛋白 MBP (Liu 等人, 2006; Stapulionis 等人, 2008)。在 10 $\mu\text{g/ml}$ 可溶性 MBP 存在下進行之 RGC 外生檢定顯示 MBP 對 CNS 神經元具有神經突外生抑制作用。先前研究顯示, MBP 在高於 10 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度下誘導神經毒性 (Zhang 等人, 2014)。此處, 10 $\mu\text{g/ml}$ 之 MBP 導致 RGC 中神經突外生之損失 (圖 8J, 相較於在正常生長培養基條件下之 RGC 培養, 外生減少 $14 \pm 0.07\%$)。SCR-CTR UCM 在 MBP 存在下誘導神經突外生, 且當 TSP 經靜默時, UCM 之這種作用喪失 (亦即 TSP1+2+4-KD UCM, 圖 8G 及圖 8I)。僅將純 TSP2 添加回 TSP1+2+4-KD UCM 中救援外生促進作用。這些結果顯示, 在 MBP 存在下, TSP2 可媒介神經突外生, 且在生長抑制條件下, hUTC 分泌之 TSP (TSP2 及 TSP4) 媒介神經突外生。在 CSPG、Nogo-A 或 MBP 存在下, 將純 TSP 添加至生長培養基亦誘導 RGC 神經突外生 (圖 8H 及圖 8J)。

實例 4

自產後組織衍生細胞

【0210】 此實例描述自胎盤及臍帶組織製備產後衍生細胞。在足月或不足月生產後獲得產後臍帶及胎盤。細胞係收集自五位不同捐贈者之臍帶及胎盤組織。測試不同的細胞分離方法產生具有以下潛能之細胞的能力：1) 分化成具有不同表型之細胞的潛能, 此為幹

細胞共有之特徵；或 2) 提供可用於其他細胞及組織之營養因子之潛能。

方法及材料

【0211】 臍細胞分離：臍帶係得自國家疾病研究交換中心 (NDRI, Philadelphia, Pa.)。組織係在正常分娩後獲得。細胞分離規程係在層流櫃 (laminar flow hood) 中無菌執行。為了移除血與碎屑，將臍帶於抗黴劑及抗生素（100 個單位/毫升青黴素、100 微克/毫升鏈黴素、0.25 微克/毫升兩性黴素 B）存在之磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS; Invitrogen, Carlsbad, Calif.) 中清洗。接著在 150 cm² 組織培養盤上並且於 50 毫升的培養基（DMEM-低葡萄糖或 DMEM-高葡萄糖；Invitrogen）存在下機械解離組織，直到將組織切碎為細泥。將切碎的組織轉移至 50 毫升錐形管（每管約 5 公克的組織）。

【0212】 隨後將組織於 DMEM-低葡萄糖培養基或 DMEM-高葡萄糖培養基中消化，各培養基含有如上文所述之抗黴劑及抗生素。在一些實驗中，使用膠原蛋白酶與分散酶的酶混合物（「C:D」）（膠原蛋白酶 (Sigma, St Louis, Mo.)，500 個單位/毫升；與分散酶 (Invitrogen)，50 個單位/毫升，在 DMEM-低葡萄糖培養基中）。在其他實驗中，使用膠原蛋白酶、分散酶與玻尿酸酶的混合物（「C:D:H」）（膠原蛋白酶，500 個單位/毫升；分散酶，50 個單位/毫升；與玻尿酸酶 (Sigma)，5 個單位/毫升，在 DMEM-低葡萄糖中）。使含有組

織、培養基與消化酶的錐形管在 37°C 下在迴轉式振盪器(Environ, Brooklyn, N.Y)中以 225 rpm 培養 2 小時。

【0213】 在消化後，將組織以 150 x g 離心 5 分鐘，且將上清液吸出。將團塊再懸浮於 20 毫升的生長培養基 (DMEM-低葡萄糖 (Invitrogen)、15 百分比(v/v)胎牛血清 (FBS；定義牛血清(defined bovine serum)；批號 AND18475；Hyclone, Logan, Utah)、0.001% (v/v) 2-巰基乙醇(Sigma)、每 100 毫升 1 毫升如上文所述之抗生素/抗黴劑。使細胞懸浮液通過 70 微米尼龍細胞濾器(BD Biosciences)過濾。使額外 5 毫升包含生長培養基的潤洗液通過濾器。接著使細胞懸浮液通過 40 微米的尼龍細胞濾器(BD Biosciences)，然後用額外 5 毫升的生長培養基潤洗液來趕出。

【0214】 將濾液再懸浮於生長培養基 (總體積 50 毫升) 中然後以 150 x g 離心 5 分鐘。將上清液吸出然後將細胞再懸浮於 50 毫升的新鮮生長培養基中。將此過程再重複兩次。

【0215】 在最終離心後，將上清液吸出然後將細胞團塊再懸浮於 5 毫升的新鮮生長培養基中。使用台盼藍染色來測定存活細胞數目。接著在標準條件下培養細胞。

【0216】 將分離自臍帶的細胞以 5,000 個細胞/cm² 接種於經明膠塗布 T-75 cm² 培養瓶(Corning Inc., Corning, N.Y.)上並且於具有如上文所述之抗生素/抗黴劑的生長培養基中。2 天後(在各種實驗中，細胞培養 2 至 4 天)，將用過的培養基自瓶吸出。用 PBS 清洗細胞三次以去除碎屑與血衍生細胞。接著用生長培養基補充細胞並讓其

生長至長滿（自繼代 0 至繼代 1 約 10 日）。在後續繼代時（自繼代 1 至 2 等等），細胞在 4 至 5 日後達到次長滿（75 至 85 百分比長滿）。針對這些後續繼代，以 5000 個細胞/cm² 接種細胞。使細胞在加濕培養器中於 5 百分比二氧化碳及大氣氧氣、37°C 下生長。

【0217】 胎盤細胞分離：胎盤組織係獲自 NDRI (Philadelphia, Pa.)。該些組織係來自孕婦且在正常外科分娩時獲得。胎盤細胞係如臍細胞分離所述分離。

【0218】 以下實例應用於自胎盤組織分離母體衍生及新生兒衍生之分開細胞群。

【0219】 細胞分離規程係在層流櫃(laminar flow hood)中無菌執行。將胎盤組織在有抗黴劑及抗生素（如上文所述）存在之磷酸鹽緩衝鹽水(PBS; Invitrogen, Carlsbad, Calif.)中清洗以移除血及碎屑。隨後將胎盤組織解剖成三區：頂線（新生兒側或態樣）、中線（混合的細胞分離新生兒及母體）及底線（母體側或態樣）。

【0220】 將分開的區個別於具有抗生素/抗黴劑之 PBS 中清洗數次以進一步移除血及碎屑。接著在 150 cm² 組織培養盤上於 50 毫升的 DMEM-低葡萄糖存在下機械解離各區，直到將各區切碎為細泥。將泥轉移至 50 毫升錐形管中。各管含有大致 5 公克組織。將組織於含有抗黴劑及抗生素（100 U/毫升青黴素、100 微克/毫升鏈黴素、0.25 微克/毫升兩性黴素 B）及消化酶之 DMEM-低葡萄糖或 DMEM-高葡萄糖培養基中消化。在一些實驗中，使用膠原蛋白酶與分散酶的酶混合物（「C:D」），其於 DMEM-低葡萄糖培養基中含有

500 個單位/毫升之膠原蛋白酶(Sigma, St Louis, Mo.)與 50 個單位/毫升之分散酶(Invitrogen)。在其他實驗中，使用膠原蛋白酶、分散酶與玻尿酸酶的混合物(C:D:H) (膠原蛋白酶，500 個單位/毫升；分散酶，50 個單位/毫升；與玻尿酸酶(Sigma)，5 個單位/毫升，在 DMEM-低葡萄糖中)。使含有組織、培養基與消化酶的錐形管在 37℃ 下在迴轉式振盪器(Environ, Brooklyn, NY)中以 225 rpm 培養 2 小時。

【0221】 在消化後，將組織以 150^xg 離心 5 分鐘，將所得上清液吸出。將團塊再懸浮於 20 毫升具有青黴素/鏈黴素/兩性黴素 B 之生長培養基中。使細胞懸浮液過濾通過 70 微米的尼龍細胞濾器(BD Biosciences)，用額外 5 毫升的生長培養基潤洗液來趕出。使總細胞懸浮液通過 40 微米的尼龍細胞濾器(BD Biosciences)，接著用額外 5 毫升的生長培養基作為潤洗液。

【0222】 將濾液再懸浮於生長培養基（總體積 50 毫升）中然後以 150 x g 離心 5 分鐘。將上清液吸出然後將細胞團塊再懸浮於 50 毫升的新鮮生長培養基中。將此過程再重複兩次。在最終離心後，將上清液吸出然後將細胞團塊再懸浮於 5 毫升的新鮮生長培養基中。使用台盼藍排除測試來測定細胞計數。接著在標準條件下培養細胞。

【0223】 *LIBERASE* 細胞分離：於具有 *LIBERASE*(Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.)(每毫升 2.5 毫克，Blendzyme 3；Roche Applied Sciences, Indianapolis, Ind.)與玻尿酸酶（5 個單位/

毫升，Sigma)之 DMED-低葡萄糖培養基中將細胞自臍帶組織分離。組織消化與細胞分離係如以上之其他蛋白酶消化所述，但使用 LIBERASE/玻尿酸酶混合物代替 C:D 或 C:D:H 酶混合物。用 LIBERASE 消化組織會使來自產後組織迅速擴增的細胞族群得以分離出來。

【0224】 使用其他酶組合之細胞分離：對於使用不同酶組合以自臍帶分離出細胞的程序進行比較。用於消化比較之酶包括：i)膠原蛋白酶；ii)分散酶；iii)玻尿酸酶；iv)膠原蛋白酶:分散酶混合物(C:D)；v)膠原蛋白酶:玻尿酸酶混合物(C:H)；vi)分散酶:玻尿酸酶混合物(D:H)；與 vii)膠原蛋白酶:分散酶:玻尿酸酶混合物(C:D:H)。觀察利用這些不同酶消化條件之細胞分離的差異（表 4-1）。

【0225】 自臍帶中之殘餘血液分離細胞：進行其他嘗試以藉由不同方式將細胞池自臍帶分離。在一個例子中，將臍帶切片然後用生長培養基清洗以排出血塊與凝膠狀材料。收集血、凝膠狀材料與生長培養基之混合物然後以 150 x g 離心。將團塊再懸浮並接種於經明膠塗布培養瓶上之生長培養基中。透過這些實驗，分離出會迅速擴增的細胞群。

【0226】 自臍帶血分離細胞：亦自獲自 NDR1 之臍帶血樣本分離細胞。此處所使用之分離規程為 Ho 等人之國際專利申請案 WO 2003/025149 中者（Ho, T. W.，等人，「Cell Populations Which Co-Express CD49C and CD90」，申請號 PCT/US02/29971）。將臍帶血(NDR1, Philadelphia PA)樣本（分別為 50 毫升與 10.5 毫升）與裂

解緩衝液（經過濾器滅菌之 155 mM 氯化銨、10 毫莫耳碳酸氫鉀、0.1 毫莫耳 EDTA、緩衝至 pH 7.2（所有組分皆來自 Sigma, St. Louis, Mo.））混合。使細胞以 1:20 臍帶血對裂解緩衝液的比例溶解。使所生成的細胞懸浮液渦動 5 秒鐘，然後在環境溫度下培養 2 分鐘。將溶解產物離心（以 $200\times g$ 離心 10 分鐘）。將細胞團塊再懸浮於完全最低必需培養基(Gibco, Carlsbad, Calif.)中，該培養基含有 10 百分比胎牛血清(Hyclone, Logan Utah)、4 毫莫耳麩醯胺酸(Mediatech, Herndon, Va.)、每 100 毫升 100 個單位青黴素與每 100 毫升 100 微克鏈黴素(Gibco, Carlsbad, Calif.)。將再懸浮之細胞離心（以 $200\times g$ 離心 10 分鐘）、將上清液吸出然後在完全培養基中清洗細胞團塊。將細胞直接接種至 T75 培養瓶(Corning, N.Y.)、T75 經層黏蛋白塗布培養瓶或 T175 經纖維連蛋白素塗布培養瓶（均來自 Becton Dickinson, Bedford, Mass.）。

【0227】 使用不同酶組合與生長條件分離細胞：為了要判定細胞群是否可在不同條件下分離並且在分離後是否可立即在各種條件下擴增，根據以上提供之程序使用 C:D:H 的酶組合，將細胞在含有或未含 0.001 百分比(v/v) 2-巰基乙醇(Sigma, St. Louis, Mo.)的生長培養基中消化。在多種條件下接種如此分離之胎盤衍生細胞。所有細胞皆於青黴素/鏈黴素存在下生長。（表 4-2）。

【0228】 使用不同酶組合與生長條件分離細胞：在所有條件下，細胞在繼代 0 與 1 之間附著及擴增良好（表 4-2）。條件 5 至 8 與 13

至 16 中之細胞皆顯示在接種後良好增生多達 4 次繼代，將這些細胞在此時點凍存且存庫。

結果

【0229】 使用不同酶組合之細胞分離：C:D:H 組合提供最佳分離後細胞產率，並且比起其他條件在培養中產生擴增更多代的細胞（表 4-1）。單獨使用膠原蛋白酶或玻尿酸酶無法獲得可擴增的細胞群。未試圖判定此結果是否專屬於所測試之膠原蛋白。

表 4-1：使用不同酶組合以自臍帶組織分離出細胞

酶消化	分離出之細胞	細胞擴增
膠原蛋白酶	X	X
分散酶	+ (>10 h)	+
玻尿酸酶	X	X
膠原蛋白酶:分散酶	++ (< 3 h)	++
膠原蛋白酶:玻尿酸酶	++ (< 3 h)	+
分散酶:玻尿酸酶	+ (>10 h)	+
膠原蛋白酶:分散酶:玻尿酸酶	+++ (< 3 h)	+++

說明:+=良好，++=非常良好，+++ =極為良好，X =不成功

【0230】 使用不同酶組合與生長條件分離細胞：在所有針對酶消化與生長所測試的條件下，細胞皆在繼代 0 與 1 之間附著及擴增良好（表 4-2）。實驗條件 5 至 8 與 13 至 16 中之細胞皆在接種後良好增生多達 4 次繼代，將這些細胞在此時點凍存。所有細胞皆經凍存以備進一步研究。

表 4-2：產後細胞在不同條件下之分離與培養擴增：

條件	培養基	15% FBS	BME	明膠	20% O ₂	生長因子
1	DMEM-Lg	Y	Y	Y	Y	N
2	DMEM-Lg	Y	Y	Y	N (5%)	N
3	DMEM-Lg	Y	Y	N	Y	N
4	DMEM-Lg	Y	Y	N	N (5%)	N
5	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (層黏蛋白)	Y	EGF/FGF (20 ng/ml)
6	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (層黏蛋白)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/ml)
7	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (纖連蛋白素)	Y	PDGF/VEGF
8	DMEM-Lg	N (2%)	Y	N (纖連蛋白素)	N (5%)	PDGF/VEGF
9	DMEM-Lg	Y	N	Y	Y	N
10	DMEM-Lg	Y	N	Y	N (5%)	N
11	DMEM-Lg	Y	N	N	Y	N
12	DMEM-Lg	Y	N	N	N (5%)	N
13	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (層黏蛋白)	Y	EGF/FGF (20 ng/ml)
14	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (層黏蛋白)	N (5%)	EGF/FGF (20 ng/ml)
15	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (纖連蛋白素)	Y	PDGF/VEGF
16	DMEM-Lg	N (2%)	N	N (纖連蛋白素)	N (5%)	PDGF/VEGF

【0231】 自臍帶中之殘餘血液分離細胞：已成核細胞附著且生長快速。以流動式細胞測量術分析這些細胞，而這些細胞與透過酶消化所得之細胞相似。

【0232】 自臍帶血分離細胞：製劑含有紅血球及血小板。在前3 個星期期間沒有已成核細胞之附著與分裂。在接種後 3 個星期更換培養基但仍未觀察到細胞附著與生長。

【0233】 概述：可使用膠原蛋白酶（基質金屬蛋白酶）、分散酶（中性蛋白酶）與玻尿酸酶（分解玻尿酸之黏液分解酶）的酶組合，將細胞群自臍帶及胎盤組織有效地衍生出來。亦可使用名為 Blendzyme 之 LIBERASE。特定言之，亦可使用 Blendzyme 3 並搭配玻尿酸酶來分離細胞，Blendzyme 3 為膠原蛋白酶（4 Wunsch 單位

/g) 與嗜熱菌蛋白酶 (1714 酪蛋白單位/g)。當在明膠塗布之塑膠上的生長培養基中培養時，這些細胞迅速擴增許多個繼代。

【0234】 亦自臍帶中的殘餘血分離出細胞，但該殘餘血並非臍帶血。自組織洗出的血塊中之所以存在於所用之條件下會貼附與生長之細胞，可能是因為細胞在解剖過程期間釋出。

實例 5

產後衍生細胞之核型分析

【0235】 細胞療法所用之細胞系較佳為均質性並且不含任何污染細胞型。細胞療法所用之細胞應具有正常染色體數目(46)及結構。為了要識別出均質性且不含非產後組織來源之細胞的胎盤及臍帶衍生細胞系，對於細胞樣本之核型進行分析。

方法及材料

【0236】 在含有青黴素/鏈黴素之生長培養基中培養來自男新生兒之產後組織的 PPDC。選用來自男新生兒(X,Y)的產後組織以能夠區別新生兒衍生細胞與母體衍生細胞(X,X)。將細胞以每平方公分 5,000 細胞接種於 T25 培養瓶(Corning Inc., Corning, N.Y.)中的培養基中並且擴增至 80%長滿。將含有細胞之 T25 培養瓶用生長培養基填充至頸部。由快遞員將樣本送至臨床細胞遺傳學實驗室（估計實驗室至實驗室交通時間為一小時）。在中期(metaphase)分析細胞，此時染色體係最佳可視化。在所計數之二十個處於中期的細胞中，有

五個分析出具有正常均質性核型數目(兩個)。如果觀察到兩個核型，即將細胞樣本歸類為均質性。如果觀察到超過兩個核型，即將細胞樣本歸類為異質性。當識別出異質性核型數目(四個)時，即計數額外中期細胞並加以分析。

結果

【0237】 所有送交染色體分析的細胞樣本皆判讀為展現正常外觀。16 個經分析之細胞系中的三個展現異質性表型(XX 與 XY)，從而指示存在有同時衍生自新生兒與母體來源的細胞(表 5-1)。將衍生自組織胎盤-N 之細胞自胎盤之新生兒態樣分離。在繼代零，此細胞系顯現出均質性 XY。然而，在繼代九，該細胞系為異質性(XX/XY)，指出先前未偵測出的母體來源細胞存在。

表 5-1. PPDC 的核型結果

組織	繼代	所計數的中期細胞	所分析的中期細胞	核型數目	ISCN 核型
胎盤	22	20	5	2	46, XX
臍	23	20	5	2	46, XX
臍	6	20	5	2	46, XY
胎盤	2	20	5	2	46, XX
臍	3	20	5	2	46, XX
胎盤-N	0	20	5	2	46, XY
胎盤-V	0	20	5	2	46, XY
胎盤-M	0	21	5	4	46, XY[18]/46, XX[3]
胎盤-M	4	20	5	2	46, XX
胎盤-N	9	25	5	4	46, XY[5]/46, XX[20]
胎盤-N C1	1	20	5	2	46, XY
胎盤-N	1	20	6	4	46, XY[2]/46,

C3					XX[18]
胎盤-N C4	1	20	5	2	46, XY
胎盤-N C15	1	20	5	2	46, XY
胎盤-N C20	1	20	5	2	46, XY
胎盤-N C22	1	20	5	2	46, XY

說明：N-新生兒側；V-絨毛區；M-母體側；C-殖株

【0238】 概述：染色體分析識別出核型顯現為正常（由臨床細胞遺傳學實驗室判讀）的胎盤及臍帶衍生細胞。核型分析亦識別出不含母體細胞的細胞系，此係由均質性核型來判定。

實例 6

藉由流動式細胞測量術評估人類產後衍生細胞表面標記

【0239】 藉由流動式細胞測量術來表徵細胞表面蛋白質或「標記」可用來判定細胞系的身份(identity)。表現的一致性可由多個捐贈者來判定，並且在暴露於不同處理與培養條件的細胞中判定。自胎盤及臍分離出的產後衍生細胞(PPDC)系係經表徵（藉由流動式細胞測量術），從而提供用於識別這些細胞系的概況。

方法及材料

【0240】 培養基及培養容器：將細胞培養於具有青黴素/鏈黴素之生長培養基(Gibco Carlsbad, Calif.)中。使細胞在經血漿處理之T75、T150 與 T225 組織培養瓶(Corning Inc., Corning, N.Y.)中培養

直到長滿。培養瓶的生長表面係藉由在室溫下培養 2% (w/v)明膠 (Sigma, St. Louis, Mo.) 20 分鐘來塗布明膠。

【0241】 抗體染色及流動式細胞測量術分析：將瓶中之貼附細胞於 PBS 中清洗且用胰蛋白酶/EDTA 脫附。將細胞收集、離心，且以每毫升 1×10^7 的細胞濃度再懸浮於 3% (v/v) FBS 於 PBS 中。根據製造商規範，將關注的細胞表面標記之抗體（請見後文）加至一百微升的細胞懸浮液然後將混合物在黑暗中在 4°C 下培養 30 分鐘。在培養之後，將細胞用 PBS 清洗且離心以移除未結合的抗體。將細胞再懸浮於 500 微升 PBS 中且藉由流動式細胞測量術分析。流動式細胞測量術分析係用 FACScalibur™儀器(Becton Dickinson, San Jose, Calif.)來執行。表 6-1 列舉所使用之細胞表面標記之抗體。

表 6-1：用於表徵細胞表面標記之抗體。

抗體	製造商	目錄號
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD13	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555394
CD31	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555446
CD34	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555821
CD44	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555478
CD45RA	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555489
CD73	BD Pharmingen (San Diego, CA)	550257
CD90	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555596
CD117	BD Biosciences (San Jose, CA)	340529
CD141	BD Pharmingen (San Diego, CA)	559781
PDGFr-α	BD Pharmingen (San Diego, CA)	556002
HLA-A, B, C	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555553
HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG- PE	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

【0242】 胎盤與臍比較：在繼代 8 將胎盤衍生細胞與臍衍生細胞進行比較。

【0243】 繼代對繼代比較：在繼代 8、15、及 20 分析胎盤衍生細胞及臍衍生細胞。

【0244】 捐贈者對捐贈者比較：為了比較捐贈者之間的差異，將來自不同捐贈者之胎盤衍生細胞互相比較，且將來自不同捐贈者之臍衍生細胞互相比較。

【0245】 表面塗層比較：將培養於經明膠塗布培養瓶上的胎盤衍生細胞與培養於未經塗布培養瓶上之胎盤衍生細胞進行比較。將培養於經明膠塗布培養瓶上的臍衍生細胞與培養於未塗布培養瓶上之臍衍生細胞進行比較。

【0246】 消化酶比較：對於四種用於分離與製備細胞的處理進行比較。分離自用 1) 膠原蛋白酶；2) 膠原蛋白酶/分散酶；3) 膠原蛋白酶/玻尿酸酶；與 4) 膠原蛋白酶/玻尿酸酶/分散酶處理之胎盤之細胞係經比較。

【0247】 胎盤層比較：將衍生自胎盤組織之母體態樣之細胞與衍生自胎盤組織之絨毛區之細胞以及衍生自胎盤之新生胎兒態樣之細胞進行比較。

結果

【0248】 胎盤與臍比較：藉由流動式細胞測量術分析之胎盤衍生細胞及臍衍生細胞顯示 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、

PDGFr- α 及 HLA-A, B, C 之陽性表現，此係由相對於 IgG 對照組的螢光值增加來指示。這些細胞之 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141、與 HLA-DR, DP, DQ 的可偵測表現為陰性，此係由螢光值與 IgG 對照組可相比來指示。考慮到陽性曲線之螢光值之變異。陽性曲線之平均值（亦即 CD13）及範圍（亦即 CD90）顯示一些變異，但曲線顯現正常，證實為均質性族群。兩個曲線個別展現大於 IgG 對照組之值。

【0249】 繼代對繼代比較——胎盤衍生細胞：藉由流動式細胞測量術分析之繼代 8、15、及 20 之胎盤衍生細胞皆陽性表現 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 及 HLA-A, B, C，如相對於 IgG 對照組的螢光值增加所反映。該些細胞之 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 與 HLA -DR, DP, DQ 的表現為陰性，具有與 IgG 對照組一致的螢光值。

【0250】 繼代對繼代比較——臍衍生細胞：藉由流動式細胞測量術分析之繼代 8、15 與 20 之臍衍生細胞皆表現 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 與 HLA-A, B, C，由相對於 IgG 對照組的螢光增加來指示。這些細胞為 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 與 HLA-DR, DP, DQ 陰性，此係由螢光值與 IgG 對照組一致來指示。

【0251】 捐贈者對捐贈者比較——胎盤衍生細胞：藉由流動式細胞測量術分析分離自分開捐贈者之胎盤衍生細胞各表現 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 與 HLA-A, B, C，其中螢光

值相對於 IgG 對照組增加。該些細胞為 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 與 HLA-DR, DP, DQ 表現陰性，此係由螢光值與 IgG 對照組一致來指示。

【0252】 捐贈者對捐贈者比較——臍衍生細胞：藉由流動式細胞測量術分析分離自分開捐贈者之臍衍生細胞各顯示 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 與 HLA-A, B, C 之陽性表現，此係反映在螢光值相對於 IgG 對照組增加。這些細胞之 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 與 HLA-DR, DP, DQ 的表現為陰性，具有與 IgG 對照組一致的螢光值。

【0253】 明膠表面塗層對胎盤衍生細胞之作用：藉由流動式細胞測量術分析在經明膠塗布或未經塗布培養瓶上擴增之胎盤衍生細胞皆表現 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 與 HLA-A, B, C，如相對於 IgG 對照組的螢光值增加所反映。這些細胞為 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 與 HLA-DR, DP, DQ 表現陰性，此係由螢光值與 IgG 對照組一致來指示。

【0254】 明膠表面塗層對臍衍生細胞之作用：藉由流動式細胞測量術分析在明膠上或未經塗布培養瓶上擴增之臍衍生細胞皆陽性表現 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 與 HLA-A, B, C，其相對於 IgG 對照組具有增加的螢光值。這些細胞之 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 與 HLA-DR, DP, DQ 的表現為陰性，具有與 IgG 對照組一致的螢光值。

【0255】 用於製備細胞之酶消化程序對細胞表面標記概況之作用：藉由流動式細胞測量術分析之使用各種消化酶所分離之胎盤衍生細胞皆表現 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 與 HLA-A, B, C，如藉由相對於 IgG 對照組之螢光值增加所指示。這些細胞為 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 與 HLADR, DP, DQ 表現陰性，如藉由螢光值與 IgG 對照組一致來指示。

【0256】 胎盤層比較：藉由流動式細胞測量術分析之分別分離自胎盤之母體、絨毛、及新生兒層的細胞顯示 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 及 HLA-A, B, C 之陽性表現，如藉由相對於 IgG 對照組的螢光值增加所指示。這些細胞為 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 與 HLA-DR, DP, DQ 表現陰性，如藉由螢光值與 IgG 對照組一致來指示。

【0257】 概述：胎盤衍生細胞及臍衍生細胞的流動式細胞測量術分析結果已建立這些細胞系的身份。胎盤衍生細胞及臍衍生細胞為 CD10、CD13、CD44、CD73、CD90、PDGFr- α 、HLA-A,B,C 陽性，且為 CD31、CD34、CD45、CD117、CD141 及 HLA-DR, DP, DQ 陰性。此身份在變項包括捐贈者、繼代、培養容器表面塗層、消化酶與胎盤層的變異間皆一致。觀察到在個別螢光值直方圖曲線平均值與範圍上有一些變異，但在所有測試條件下的所有陽性曲線皆為正常並且表現出大於 IgG 對照組的螢光值，因而確認該些細胞包含具有該些標記之陽性表現的均質性族群。

實例 7

產後組織表型的免疫組織化學特徵

【0258】 人類產後組織（即臍帶及胎盤）中所發現的細胞之表型係以免疫組織化學法分析。

方法及材料

【0259】 組織製備：將人類臍帶及胎盤組織收集且在 4°C 下浸漬固定於 4% (w/v)多聚甲醛中隔夜。使用針對下列表位的抗體來執行免疫組織化學法：波形蛋白(1:500; Sigma, St. Louis, Mo.)、肌間線蛋白 (desmin, 1:150, 對抗兔而生成; Sigma; 或 1:300, 對抗小鼠而生成; Chemicon, Temecula, Calif.)、 α -平滑肌肌動蛋白(SMA; 1:400; Sigma), 細胞角蛋白 18 (CK18;1:400; Sigma), 馮威里氏因子(vWF; 1:200; Sigma)與 CD34 (人類 CD34 Class III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, Calif)。此外，測試以下標記：抗人類 GRO α --PE (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J)、抗人類 GCP-2 (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Calif)、抗人類氧化 LDL 受體 1 (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech)與抗人類 NOGO-A (1:100; Santa Cruz Biotech)。用解剖刀修剪經固定之樣品，然後將其置於在含乙醇之乾冰浴上的 OCT 包埋化合物(Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, Calif)內。接著使用標準低溫恒溫器(Leica Microsystems)將冷凍之包埋塊切片 (10 μ m 厚) 然後固定於玻片上以備染色。

【0260】 免疫組織化學：類似於先前研究執行免疫組織化學（例如，Messina，等人，2003，*Exper. Neurol.* 184: 816-829）。用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)清洗組織切片然後將其暴露於含 PBS、4% (v/v) 山羊血清(Chemicon, Temecula, Calif)與 0.3% (v/v) Triton (Triton X-100; Sigma)的蛋白質阻斷液中 1 小時以獲取細胞內抗原。在感興趣表位會位於細胞表面(CD34、ox-LDL R1)上的情況中，省略該程序的所有步驟中之 Triton 以避免表位流失。再者，在一級抗體係對抗山羊(GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A)而生成的情況中，整個程序中使用 3% (v/v) 驢血清來取代山羊血清。接著在室溫下將一級抗體（稀釋於阻斷液中）施用於切片歷時 4 小時。將一級抗體溶液移除，用 PBS 清洗培養物，然後施用二級抗體溶液（在室溫下 1 小時），該二級抗體溶液含有阻斷劑以及山羊抗小鼠 IgG--Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, Oreg.)及/或山羊抗兔 IgG-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes)或驢抗山羊 IgG--FITC (1:150; Santa Cruz Biotech)。清洗培養物，然後施用 10 微莫耳 DAPI (Molecular Probes) 10 分鐘以可視化細胞核。

【0261】 在免疫染色後，在 Olympus 倒立落射螢光顯微鏡 (Olympus, Melville, N.Y.)上使用適當螢光濾光片來可視化螢光。高於對照組染色的螢光信號即代表陽性染色。使用數位彩色攝影機與 ImagePro 軟體(Media Cybernetics, Carlsbad, Calif.)來擷取代表影像。針對三重染色的樣本，一次僅使用一個發射濾光片來拍攝各影像。

接著使用 Adobe Photoshop 軟體(Adobe, San Jose, Calif.)來製備分層合成影像(Layered montage)。

結果

【0262】 臍帶特徵：波形蛋白、肌間線蛋白、SMA、CK18、vWF 與 CD34 標記係表現於臍帶內發現之細胞亞群中。特定而言，vWF 與 CD34 表現限制於臍帶內所含之血管。CD34+細胞係位於最內層(管腔側)上。波形蛋白表現係發現於整個臍帶基質與血管中。SMA 限於動脈及靜脈的基質與外壁，但血管本身則不含。僅在血管內觀察到 CK18 與肌間線蛋白，且肌間線蛋白限於中層及外層。

【0263】 胎盤特徵：波形蛋白、肌間線蛋白、SMA、CK18、vWF 與 CD34 標記全部在胎盤內觀察到且為區域特異性。

【0264】 *GRO α* 、*GCP-2*、*ox-LDL RI*、及 *NOGO-A* 組織表現：此等標記皆未在臍帶或胎盤組織內觀察到。

【0265】 概述：人類臍帶及胎盤內的細胞中皆會表現波形蛋白、肌間線蛋白、 α -平滑肌肌動蛋白、細胞角蛋白 18、馮威里氏因子與 CD 34。

實例 8

使用寡核苷酸陣列分析產後組織衍生細胞

【0266】 Affymetrix GENECHIP 陣列係用來比較臍衍生與胎盤衍生細胞與纖維母細胞、人類間葉幹細胞與另一個衍生自人類骨髓

之細胞系的基因表現概況。此分析提供產後衍生細胞之特徵並識別這些細胞的獨特分子標記。

方法及材料

【0267】 細胞之分離及培養：人類臍帶與胎盤係得自國家疾病研究交換中心(NDRI, Philadelphia, Pa.)，來自正常足月分娩並且獲得患者同意。如實例 6 中所述接受組織並分離細胞。將細胞培養於經明膠塗布的組織培養塑膠培養瓶上之生長培養基（使用 DMEM-LG）中。培養物係在 37°C 下以 5% CO₂ 培養。

【0268】 人類皮膚纖維母細胞係購自 Cambrex Incorporated（Walkersville, Md.; 批號 9F0844）與 ATCC CRL-1501 (CCD39SK)。將兩個細胞系在 DMEM/F12 培養基(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)中培養，培養基含有 10% (v/v)胎牛血清(Hyclone)與青黴素/鏈黴素(Invitrogen)。使細胞生長於標準組織處理塑膠上。

【0269】 人類間葉幹細胞(hMSC)係購自 Cambrex Incorporated（Walkersville, Md.; 批號 2F1655、2F1656 與 2F1657）並根據製造商規範在 MSCGM 培養基(Cambrex)中培養。使細胞在 37°C 下以 5% CO₂ 生長於標準組織培養塑膠上。

【0270】 人類髌骨嵴骨髓係接受自 NDRI 並獲得患者同意。骨髓係根據 Ho 等人(W003/025149)所概述之方法來處理。將骨髓與裂解緩衝液(155 mM NH₄Cl、10 mM KHCO₃ 與 0.1 mM EDTA, pH 7.2)混合，並且混合比例為 1 份骨髓對 20 份裂解緩衝液。使細胞懸浮液

渦動、在環境溫度下培養 2 分鐘然後以 $500\times g$ 離心 10 分鐘。將上清液丟棄，並將細胞團塊再懸浮於補充 10% (v/v)胎牛血清與 4 mM 麩醯胺酸之最低必需培養基 α (Invitrogen)中。將細胞再次離心然後將細胞團塊再懸浮於新鮮培養基中。使用台盼藍排除法(Sigma, St. Louis, Mo.)來計數存活單核細胞。將單核細胞以 5×10^4 個細胞/cm² 接種於組織培養塑膠瓶中。將細胞在 37°C 下以 5% CO₂、在標準大氣 O₂ 或在 5% O₂ 下培養。將細胞培養 5 日並且未進行培養基更換。在 5 日的培養後將培養基與非貼附細胞移除。將貼附細胞維持於培養中。

【0271】 *mRNA* 之分離及 *GENECHIP* 分析：將活性生長之細胞培養物用細胞刮杓自培養瓶移除於冷 PBS 中。將細胞以 $300\times g$ 離心 5 分鐘。將上清液移除，然後將細胞再懸浮於新鮮 PBS 並再次離心。將上清液移除，然後立即將細胞團塊冷凍並儲存在-80°C 下。將細胞 mRNA 萃取出來然後轉錄為 cDNA，隨後將其轉錄成 cRNA 且經生物素標記。使經生物素標記之 cRNA 與 HG-U133A *GENECHIP* 寡核苷酸陣列(Affymetrix, Santa Clara, Calif.)雜交。雜交與數據收集係根據製造商規範來執行。分析係使用「Significance Analysis of Microarrays」(SAM)第 1.21 版電腦軟體 (Stanford University; Tusher, V. G.等人，2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5116-5121) 執行。

結果

【0272】 分析了十四個不同細胞群。細胞以及繼代資訊、培養基材與培養基係列於表 8-1。

表 8-1.以微陣列研究分析之細胞。細胞系依其識別碼列出，並列出分析當時之繼代數、細胞生長基材與生長培養基。

細胞群	繼代	基材	培養基
臍(022803)	2	明膠	DMEM, 15% FBS, 2-ME
臍(042103)	3	明膠	DMEM, 15% FBS, 2-ME
臍(071003)	4	明膠	DMEM, 15% FBS, 2-ME
胎盤(042203)	12	明膠	DMEM, 15% FBS, 2-ME
胎盤(042903)	4	明膠	DMEM, 15% FBS, 2-ME
胎盤(071003)	3	明膠	DMEM, 15% FBS, 2-ME
ICBM (070203) (5% O ₂)	3	塑膠	MEM 10% FBS
ICBM (062703) (std O ₂)	5	塑膠	MEM 10% FBS
ICBM (062703)(5% O ₂)	5	塑膠	MEM 10% FBS
hMSC (批號 2F1655)	3	塑膠	MSCGM
hMSC (批號 2F1656)	3	塑膠	MSCGM
hMSC (批號 2F1657)	3	塑膠	MSCGM
人類纖維母細胞(9F0844)	9	塑膠	DMEM-F12, 10% FBS
人類纖維母細胞 (CCD39SK)	4	塑膠	DMEM-F12, 10% FBS

【0273】 數據藉由主組分分析(Principle Component Analysis)評估，分析在細胞中有差別表現的 290 個基因。此分析允許族群之間相似性之相對比較。

【0274】 表 8-2 顯示計算用於細胞對比較之歐幾里德距離(Euclidean distance)。歐幾里德距離係根據基於 290 個基因的細胞比較結果，這些基因在不同細胞型間有差別表現。歐幾里德距離與 290 個基因之表現之間的相似性成反比（亦即，距離越大，存在的相似性越小）。

表 8-2.細胞對的歐幾里德距離。

細胞對	歐幾里德距離
ICBM-hMSC	24.71
胎盤-臍	25.52
ICBM-纖維母細胞	36.44
ICBM-胎盤	37.09
纖維母細胞-MSC	39.63
ICBM-臍	40.15
纖維母細胞-臍	41.59
MSC-胎盤	42.84
MSC-臍	46.86
ICBM-胎盤	48.41

【0275】 表 8-3、8-4 與 8-5 顯示在胎盤衍生細胞中增加表現(表 8-3)、在臍衍生細胞中增加表現(表 8-4)及在臍與胎盤衍生細胞中減少表現(表 8-5)之基因。標題「探針組 ID」之欄係指製造商對於定位於晶片上具體位點上之數種寡核苷酸探針組之識別碼，該些探針組與經列名之基因(「基因名稱」欄)雜交，該等基因包含可在 NCBI (GenBank)數據庫內以指定存取號(「NCBI 存取號」欄)查找之序列。

表 8-3.相較於其他經檢定之細胞系，顯示在胎盤衍生細胞中特異地增加表現之基因

在胎盤衍生細胞中增加之基因		
探針組 ID	基因名稱	NCBI 存取號
209732_at	C 型(鈣依賴型，碳水化合物辨識區)凝集素，超家族成員 2 (經活化誘發)	AF070642
206067_s_at	威爾姆斯(Wilms)腫瘤 1	NM_024426
207016_s_at	醛去氫酶 1 家族，成員 A2	AB015228
206367_at	腎素	NM_000537
210004_at	氧化低密度脂蛋白(類凝集素)受體 1	AF035776

214993_at	智人(<i>Homo sapiens</i>)，植株 IMAGE:4179671， mRNA，部分 cds	AF070642
202178_at	蛋白質激酶 C， ζ	NM_002744
209780_at	假想蛋白質 DKFZp564F013	AL136883
204135_at	卵巢癌向下調控因子 1	NM_014890
213542_at	智人 mRNA；cDNA DKFZp547K1113 (來自植株 DKFZp547K1113)	AI246730

表 8-4.相較於其他經檢定之細胞系，顯示在臍衍生細胞中特異地增加表現之基因

在臍衍生細胞中增加之基因		
探針組 ID	基因名稱	NCBI 存取號
202859_x_at	介白素 8	NM_000584
211506_s_at	介白素 8	AF043337
210222_s_at	內質網蛋白 1	BC000314
204470_at	趨化激素 (C-X-C 模體) 配體 1 (黑色素瘤生長刺激活性物)	NM_001511
206336_at	趨化激素 (C-X-C 模體) 配體 6 (顆粒性細胞趨化蛋白質 2)	NM_002993
207850_at	趨化激素 (C-X-C 模體) 配體 3	NM_002090
203485_at	內質網蛋白 1	NM_021136
202644_s_at	腫瘤壞死因子， α -誘發蛋白質 3	NM_006290

表 8-5.相較於其他經檢定之細胞系，顯示在臍衍生細胞與胎盤衍生細胞中減少表現之基因

在臍衍生細胞與胎盤衍生細胞中減少之基因		
探針組 ID	基因名稱	NCBI 存取號
210135_s_at	矮小同源盒 2	AF022654.1
205824_at	熱休克 27kDa 蛋白質 2	NM_001541.1
209687_at	趨化激素 (C-X-C 模體) 配體 12 (基質細胞衍生因子 1)	U19495.1
203666_at	趨化激素 (C-X-C 模體) 配體 12 (基質細胞衍生因子 1)	NM_000609.1
212670_at	彈性蛋白 (瓣上主動脈狹窄，威廉-波倫 (Williams-Beuren) 症候群)	AA479278
213381_at	智人 mRNA；cDNA DKFZp586M2022 (來	N91149

	自殖株 DKFZp586M2022)	
206201_s_at	間葉同源盒 2 (生長休止特異性同源盒 (growth arrest-specific homeo box))	NM_005924.1
205817_at	sine oculis 同源盒同源物 1 (果蠅)	NM_005982.1
209283_at	α B 水晶體蛋白	AF007162.1
212793_at	形態發生紊亂關聯活化物 2	BF513244
213488_at	DKFZP586B2420 蛋白質	AL050143.1
209763_at	類似於 neuralin 1 者	AL049176
205200_at	結合四素 (tetraneurin, 纖維蛋白溶酶原 (plasminogen)結合蛋白質)	NM_003278.1
205743_at	src 同源體 3 (SH3)與多半胱氨酸區	NM_003149.1
200921_s_at	B 細胞轉位基因 1, 抗增生性	NM_001731.1
206932_at	膽固醇 25-羥化酶;	NM_003956.1
204198_s_at	矮小相關轉錄因子 3	AA541630
219747_at	假想蛋白質 FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	介白素 11 受體, α	NM_004512.1
202465_at	原膠原蛋白 C-內肽酶增強子(procollagen C-endopeptidase enhancer)	NM_002593.2
203706_s_at	捲曲同源物 7 (frizzled homolog 7) (果蠅)	NM_003507.1
212736_at	假想基因 BC008967	BE299456
214587_at	第八型膠原蛋白 $\alpha 1$;	BE877796
201645_at	固生蛋白 C (tenascin C, hexabrachion);	NM_002160.1
210239_at	易洛魁族同源盒蛋白質 5 (iroquois homeobox protein 5)	U90304.1
203903_s_at	希菲斯特蛋白(hephaestin)	NM_014799.1
205816_at	整合素 $\beta 8$	NM_002214.1
203069_at	突觸囊泡醣蛋白 2	NM_014849.1
213909_at	智人 cDNA FLJ12280 fis, 殖株 MAMMA1001744	AU147799
206315_at	類細胞介素受體因子 1	NM_004750.1
204401_at	鉀中間物/小電導鈣活化通道, 次家族 N, 成員 4	NM_002250.1
216331_at	整合素 $\beta 7$	AK022548.1
209663_s_at	整合素 $\beta 7$	AF072132.1
213125_at	DKFZP586L151 蛋白質	AW007573
202133_at	具有 PDZ-結合模體之轉錄共活化物(TAZ)	AA081084
206511_s_at	sine oculis 同源盒同源物 2 (果蠅)	NM_016932.1
213435_at	KIAA1034 蛋白質	AB028957.1
206115_at	早期生長反應蛋白質 3	NM_004430.1
213707_s_at	無背端同源盒(distal-less homeo box) 5	NM_005221.3
218181_s_at	假想蛋白質 FLJ20373	NM_017792.1
209160_at	醛基-酮基還原酶家族 1, 成員 C3 (3- α 羥類固醇去氫酶, II 型)	AB018580.1
213905_x_at	雙聚醣	AA845258
201261_x_at	雙聚醣	BC002416.1

202132_at	具有 PDZ-結合模體之轉錄共活化物(TAZ)	AA081084
214701_s_at	纖連蛋白素 1	AJ276395.1
213791_at	腦啡肽前質	NM_006211.1
205422_s_at	整合素，類 $\beta 1$ （具有類 EGF 重複區）	NM_004791.1
214927_at	智人 mRNA 全長插入物 cDNA 殖株 EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
206070_s_at	EphA3	AF213459.1
212805_at	KIAA0367 蛋白質	AB002365.1
219789_at	利尿鈉勝肽受體 C/鳥苷酸環化酶 C(心房利 尿鈉勝肽受體 C)	AI628360
219054_at	假想蛋白質 FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	智人 mRNA；cDNA DKFZp564B222（來自 殖株 DKFZp564B222）	AW025579
204929_s_at	囊泡相關膜蛋白質 5（肌短蛋白）	NM_006634.1
201843_s_at	含 EGF 類 fibulin 細胞外基質蛋白質 1	NM_004105.2
221478_at	BCL2/類腺病毒 E1B 19kDa 交互作用蛋白質 3	AL132665.1
201792_at	AE 結合蛋白質 1	NM_001129.2
204570_at	細胞色素 c 氧化酶次單元 VIIa 多肽 1(肌肉)	NM_001864.1
201621_at	神經胚細胞瘤，致腫瘤性抑制因子 1	NM_005380.1
202718_at	類胰島素生長因子結合蛋白質 2，36kDa	NM_000597.1

【0276】 表 8-6、8-7 與 8-8 顯示在人類纖維母細胞（表 8-6）、ICBM 細胞（表 8-7）與 MSC（表 8-8）中增加表現之基因。

表 8-6.相較於所檢定之其他細胞系，顯示在纖維母細胞中增加表現的基因。

在纖維母細胞中增加之基因
雙特異性磷酸酶 2
KIAA0527 蛋白質
智人 cDNA：FLJ23224 fis，殖株 ADSU02206
動力蛋白，細胞質，中間多肽 1
錨蛋白 3，郎式結（錨蛋白 G）
抑制素， βA （活化素 A、活化素 $AB\alpha$ 多肽）
外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 4（推定功能）
KIAA1053 蛋白質
微管相關蛋白質 1A
鋅指蛋白 41

HSPC019 蛋白質
智人 cDNA：FLJ23564 fis，殖株 LNG10773
智人 mRNA；cDNA DKFZp564A072（來自殖株 DKFZp564A072）
LIM 蛋白質（類似於大鼠蛋白質激酶 C-結合 enigma）
B 細胞中之卡帕(kappa)輕鏈多肽基因增強子的抑制劑，激酶錯合物相關蛋白質
假想蛋白質 FLJ22004
人類（殖株 CTG-A4）mRNA 序列
EST，中等類似於類細胞介素受體因子 2；細胞介素受體 CRL2 前體[智人]
轉形生長因子 β 2
假想蛋白質 MGC29643
以單株抗體 MRC OX-2 識別出的抗原
推定 X 性聯視網膜病變蛋白質

表 8-7.相較於所檢定之其他細胞系，顯示在 ICBM 衍生細胞中增加表現的基因。

在 ICBM 細胞中增加之基因
•心臟錨蛋白重複蛋白質 •MHC 第 I 型區域 ORF •整合素 α10 •假想蛋白質 FLJ22362 •UDP-N-乙醯基-α-D-半乳胺糖:多肽 N-乙醯基半乳胺糖轉移酶 3 (GalNAc-T3) •干擾素誘導蛋白質 44 •SRY（性別決定區 Y）-盒 9（短指發育不良，體染色體性別顛倒） •角蛋白相關蛋白質 1-1 •類海馬鈣蛋白質 1 •jagged 1（阿拉吉歐症候群） •蛋白聚糖 1，分泌顆粒

表 8-8.相較於所檢定之其他細胞系，顯示在 MSC 細胞中增加表現的基因。

在 MSC 細胞中增加之基因
•介白素 26 •麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶（α-葡萄糖苷酶） •核受體次家族 4，群組 A，成員 2 •v-fos FBJ 鼠骨肉瘤病毒致癌基因同源物 •假想蛋白質 DC42

-
- 核受體次家族 4，群組 A，成員 2
 - FBJ 鼠骨肉瘤病毒致癌基因同源物 B
 - WNT1 可誘導傳訊路徑蛋白質 1
 - MCF.2 細胞系衍生轉形序列
 - 鉀通道，次家族 K，成員 15
 - 軟骨成對類型同源異型蛋白質 1
 - 智人 cDNA FLJ12232 fis，殖株 MAMMA1001206
 - 智人 cDNA FLJ34668 fis，殖株 LIVER2000775
 - jun B 原致癌基因
 - B 細胞 CLL/淋巴瘤 6（鋅指蛋白質 51）
 - 鋅指蛋白質 36，C3H 型，同源物（小鼠）
-

【0277】 概述：本檢測係為了提供衍生自臍帶與胎盤之產後細胞的分子特徵而執行。此分析包括衍生自三個不同臍帶與三個不同胎盤的細胞。此檢測亦包括兩個不同的皮膚纖維母細胞系、三個間葉幹細胞系與三個髂骨嵴骨髓細胞系。這些細胞所表現之 mRNA 係使用寡核苷酸陣列來分析，該陣列含有 22,000 個基因的探針。結果顯示，290 個基因在這五種不同細胞型中有差別表現。這些基因包括十個在胎盤衍生細胞中特異地增加的基因，以及七個在臍帶衍生細胞中特異地增加的基因。發現相較於其他細胞型，四十四個基因具有在胎盤與臍帶中特異地較低的表現水準。選定基因之表現已藉由 PCR 來確認（參見以下實例）。此等結果證明，產後衍生細胞具有獨特的基因表現概況，例如相較於骨髓衍生細胞及纖維母細胞。

實例 9

產後衍生細胞之細胞標記

【0278】 在前述實例中，衍生自人類胎盤及人類臍帶之細胞的相似性及差異性係藉由比較其基因表現概況與衍生自其他來源之細

胞的基因表現概況來評估（使用寡核苷酸陣列）。識別六個「簽名」基因：氧化 LDL 受體 1、介白素-8、凝乳酶、內質網蛋白、趨化激素受體配體 3 (CXC 配體 3)、及顆粒性細胞趨化蛋白質 2 (GCP-2)。此等「簽名」基因在產後衍生細胞中以相對高的水準表現。

【0279】 進行此實例中所述之程序以驗證微陣列數據且找出基因與蛋白質表現之間的一致性/不一致性，以及建立一系列可靠的檢定以用於偵測胎盤衍生細胞與臍衍生細胞之唯一識別符。

方法及材料

【0280】 細胞：胎盤衍生細胞（三個分離株，包括一個經核型分析所識別主要為新生兒之分離株）、臍衍生細胞（四個分離株）、及正常人類皮膚纖維母細胞（NHDF；新生兒及成人），生長於經明膠塗布之 T75 培養瓶中具有青黴素/鏈黴素之生長培養基中。間葉幹細胞(MSCS)係生長於間葉幹細胞生長培養基 Bullet 套組(MSCGM; Cambrex, Walkerville, Md.)中。

【0281】 至於 IL-8 規程，將細胞自液態氮解凍且以 5,000 個細胞/cm² 接種於經明膠塗布之培養瓶中，於生長培養基中生長 48 小時且隨後於 10 毫升血清饑餓培養基 [DMEM--低葡萄糖 (Gibco, Carlsbad, Calif.)、青黴素/鏈黴素 (Gibco, Carlsbad, Calif.) 及 0.1% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA; Sigma, St. Louis, Mo.)] 中再生長 8 小時。在此處理之後，萃取 RNA 且將上清液以 150xg 離心 5 分鐘以移除細胞碎屑。隨後將上清液冷凍在 -80°C 下以供 ELISA 分析。

【0282】 *ELISA* 檢定之細胞培養物：將衍生自胎盤與臍之產後細胞，以及衍生自人類新生兒包皮之人類纖維母細胞培養在經明膠塗布之 T75 培養瓶中的生長培養基中。將細胞在繼代 11 時冷凍於液態氮中。將細胞解凍且轉移至 15 毫升離心管。在以 $150 \times g$ 離心 5 分鐘之後，將上清液丟棄。將細胞再懸浮於 4 毫升培養基中且計數。使細胞以 375,000 個細胞/培養瓶生長於含有 15 毫升生長培養基之 75 cm^2 培養瓶中 24 小時。將培養基更換成血清饑餓培養基 8 小時。在培養結束時以 $14,000 \times g$ 離心 5 分鐘來收集血清饑餓培養基（且保存在 -20°C 下）。

【0283】 為了估計各培養瓶中細胞之數目，各培養瓶中添加 2 毫升胰蛋白酶/EDTA (Gibco, Carlsbad, Calif)。在將細胞自培養瓶脫附之後，用 8 毫升生長培養基中和胰蛋白酶活性。將細胞轉移至 15 毫升離心管且以 $150 \times g$ 離心 5 分鐘。移除上清液且將 1 毫升生長培養基添加至各管以再懸浮細胞。使用血球計估計細胞數目。

【0284】 *ELISA* 檢定：由細胞分泌至血清饑餓培養基之 IL-8 之量係使用 *ELISA* 檢定(R&D Systems, Minneapolis, Minn.)來分析。所有檢定皆根據製造商所提供之說明書來測試。

【0285】 總 *RNA* 分離：將 *RNA* 自長滿之產後衍生細胞及纖維母細胞萃取出或就 IL-8 表現而言自如上文所述處理之細胞萃取。根據製造商之說明書(RNeasy[®] Mini Kit; Qiagen, Valencia, Calif)，將細胞用 350 微升含有 β -巰基乙醇(Sigma, St. Louis, Mo.)之緩衝液 RLT 溶解。根據製造商之說明書(RNeasy[®] Mini Kit; Qiagen, Valencia,

Calif)，將 RNA 萃取出且使其經歷 DNase 處理 (2.7 U/樣本) (Sigma St. Louis, Mo.)。用 50 微升經 DEPC 處理水將 RNA 沖提出來然後儲存於 -80°C 下。

【0286】 反轉錄：RNA 亦自人類胎盤及臍萃取出。將組織 (30 毫克) 懸浮於 700 微升含有 2-巰基乙醇之緩衝液 RLT 中。將樣本機械均質化且根據製造商之規範進行 RNA 萃取。用 50 微升經 DEPC 處理水將 RNA 萃取出來然後儲存於 -80°C 下。使用隨機六聚物以 TaqMan[®]反轉錄試劑(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)來反轉錄 RNA，反轉錄在 25°C 下歷時 10 分鐘、在 37°C 下歷時 60 分鐘、且在 95°C 下歷時 10 分鐘。樣本儲存於 -20°C。

【0287】 藉由 cDNA 微陣列識別為在產後細胞中所獨特調節之基因 (簽名基因--包括氧化 LDL 受體、介白素-8、凝乳酶、及內質網蛋白) 係使用即時及傳統 PCR 進一步研究。

【0288】 即時 PCR：使用 Assays-on-Demand[®]基因表現產物對 cDNA 樣本執行 PCR：使用具有 ABI Prism 7000 SDS 軟體之 7000 序列偵測系統(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)，根據製造商之說明書(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)，將氧化 LDL 受體 (Hs00234028)；凝乳酶(Hs00166915)；內質網蛋白(Hs003825 15)；CXC 配體 3 (Hs00171061)；GCP-2 (Hs00605742)；IL-8 (Hs00174103)；及 GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, Calif.)與 cDNA 及 TaqMan[®] Universal PCR 主混合物混合。熱循環條件為開始 50°C 歷時 2 min 及 95°C 歷時 10 min，接著為 40 個 95°C 歷時 15 sec 及 60°C

歷時 1 min 之循環。根據製造商之規範分析 PCR 數據 (Applied Biosystems 關於 ABI Prism 7700 序列偵測系統之使用者佈告#2)。

【0289】 傳統 PCR：使用 ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, Mass., USA)執行傳統 PCR 以確認即時 PCR 之結果。使用 2 微升 cDNA 溶液、1x AmpliTaq Gold 通用混合物 PCR 反應緩衝液(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)及在 94℃ 下初始變性歷時 5 分鐘來執行 PCR。擴增係針對各引子組最佳化。針對 IL-8、CXC 配體 3、及內質網蛋白 (94℃ 歷時 15 秒、55℃ 歷時 15 秒及 72℃ 歷時 30 秒持續 30 個循環)；針對凝乳酶 (94℃ 歷時 15 秒、53℃ 歷時 15 秒及 72℃ 歷時 30 秒持續 38 個循環)；針對氧化 LDL 受體與 GAPDH (94℃ 歷時 15 秒、55℃ 歷時 15 秒及 72℃ 歷時 30 秒持續 33 個循環)。擴增所使用之引子列舉於表 9-1 中。最終 PCR 反應中之引子濃度為 1 微莫耳，除了 GAPDH，其為 0.5 微莫耳。GAPDH 引子與即時 PCR 相同，除了未將製造商之 TaqMan[®]探針添加至最終 PCR 反應。將樣本於 2% (w/v)瓊脂糖凝膠上運行(run)且用溴化乙錠(Sigma, St. Louis, Mo.)染色。使用 667 Universal Twinpack 膜(VWR International, South Plainfield, N.J.)使用焦距 Polaroid 照相機(VWR International, South Plainfield, N.J.)擷取影像。

表 9-1：使用之引子

引子名稱	引子
氧化 LDL 受體	S: 5'- GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3 (SEQ ID NO:1) A: 5'-AGAATGGAAAACTGGAATAGG -3' (SEQ ID NO:2)

腎素	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC -3' (SEQ ID NO:3) A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG -3' (SEQ ID NO:4)
內質網蛋白	S: 5'- TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID NO:5) A: 5'- AGTAAACATTGAAACCACAGCC-3' (SEQ ID NO:6)
介白素-8	S: 5'- TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID NO:7) A: 5'-CTTCAAAACTTCTCCACAACC- 3' (SEQ ID NO:8)
趨化激素(CXC) 配體 3	S: 5'- CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID NO:9) A: 5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC -3' (SEQ ID NO:10)

【0290】 免疫螢光：將 PPDC 在室溫下用冷 4% (w/v)多聚甲醛 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.)固定 10 分鐘。使用臍衍生細胞及胎盤衍生細胞各者在繼代 0 (P0) (分離後直接使用) 的一個分離株，及臍衍生細胞及胎盤衍生細胞之繼代 11 (P 11) (兩個胎盤衍生細胞分離株、兩個臍衍生細胞分離株) 及纖維母細胞(P 11)。使用針對以下表位的抗體執行免疫細胞化學：波形蛋白(1:500, Sigma, St. Louis, Mo.)、肌間線蛋白(1:150; Sigma--對抗兔而生成;或 1:300; Chemicon, Temecula, Calif--對抗小鼠而生成)、 α -平滑肌肌動蛋白(SMA; 1:400 ; Sigma)，細胞角蛋白 18 (CK18; 1:400 ; Sigma)，馮威里氏因子(vWF; 1:200; Sigma)與 CD34(人類 CD34 Class III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, Calif)。此外，於繼代 11 產後細胞上測試以下標記：抗人類 GRO α --PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.)、抗人類 GCP-2 (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Calif)、抗人類氧化 LDL 受體 1 (ox-LDL R1; 1:100 ; Santa Cruz Biotech)與抗人類 NOGA-A (1:100; Santa Cruz, Biotech)。

【0291】 用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)清洗培養物然後將其暴露於含 PBS、4% (v/v)山羊血清(Chemic on, Temecula, Calif)與 0.3% (v/v)

Triton (Triton X-100; Sigma, St. Louis, Mo.)的蛋白質阻斷液中 30 分鐘以獲取細胞內抗原。當感興趣表位係位於細胞表面(CD34、ox-LDL R1)上時，省略該程序的所有步驟中之 Triton X-100 以避免表位流失。再者，在一級抗體係對抗山羊(GCP-2、ox-LDL R1、NOGO-A)而生成的情況中，全程會使用 3% (v/v)驢血清來取代山羊血清。接著在室溫下將一級抗體（稀釋於阻斷液中）施用於培養物歷時 1 小時。將一級抗體溶液移除，用 PBS 清洗培養物，然後施用二級抗體溶液（在室溫下 1 小時），該二級抗體溶液含有阻斷劑以及山羊抗小鼠 IgG--Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, Oreg.)及/或山羊抗兔 IgG-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes)或驢抗山羊 IgG--FITC (1:150, Santa Cruz Biotech)。隨後清洗培養物，然後施用 10 微莫耳 DAPI (Molecular Probes) 10 分鐘以可視化細胞核。

【0292】 在免疫染色後，在 Olympus®倒立落射螢光顯微鏡 (Olympus, Melville, N.Y.)上使用適當螢光濾光片來可視化螢光。在所有情況下，陽性染色代表高於對照組染色的螢光訊號，其中遵照上文所概述的全部程序，除了施加一級抗體溶液。使用數位彩色攝影機與 ImagePro®軟體(Media Cybernetics, Carlsbad, Calif)來擷取代表影像。針對三重染色的樣本，一次僅使用一個發射濾光片來拍攝各影像。接著使用 Adobe Photoshop®軟體(Adobe, San Jose, Calif)來製備分層合成影像(Layered montage)。

【0293】 製備細胞以進行 FACS 分析：將培養瓶中之貼附細胞於磷酸鹽緩衝鹽水(PBS) (Gibco, Carlsbad, Calif)中清洗且用胰蛋白

酶/EDTA (Gibco, Carlsbad, Calif)脫附。將細胞收集、離心，且以每毫升 1×10^7 的細胞濃度再懸浮於 3% (v/v) FBS 於 PBS 中。將一百微升等分遞送至錐形管中。細胞內抗原經染色之細胞係用 Perm/Wash 緩衝液(BD Pharmingen, San Diego, Calif)穿透。將抗體按製造商規範添加至等分中且將細胞在 4°C 下於黑暗中培養 30 分鐘。在培養之後，將細胞用 PBS 清洗且離心以移除過量抗體。將需要二級抗體之細胞再懸浮於 100 微升 3% FBS 中。按製造商規範添加二級抗體且將細胞在 4°C 下於黑暗中培養 30 分鐘。在培養之後，將細胞用 PBS 清洗且離心以移除過量二級抗體。將經清洗之細胞再懸浮於 0.5 毫升 PBS 中且藉由流動式細胞測量術分析。使用以下抗體：氧化 LDL 受體 1 (sc-5813; Santa Cruz, Biotech)、GROa (555042; BD Pharmingen, Bedford, Mass.)、小鼠 IgG1 κ (P-4685 及 M-5284; Sigma)、驢抗山羊 IgG (sc-3743; Santa Cruz, Biotech.)。流動式細胞測量術分析係用 FACScalibur™ (Becton Dickinson San Jose, Calif.)來執行。

結果

【0294】 在來自衍生自人類胎盤、成體及新生兒纖維母細胞與間葉幹細胞(MSC)之細胞的 cDNA 上所執行之針對選定「簽名」基因之即時 PCR 之結果指出，氧化 LDL 受體及凝乳酶兩者在胎盤衍生細胞中相較於其他細胞以較高水準表現。獲自即時 PCR 之數據係藉由 AACT 方法分析且以對數標度之形式表達。臍衍生細胞中內質網蛋白與氧化 LDL 受體表現水準相較於其他細胞為較高的。在產後

衍生細胞與對照組之間未發現 CXC 配體 3 及 GCP-2 之表現水準有顯著差異。即時 PCR 之結果係藉由傳統 PCR 確認。PCR 產物之定序進一步驗證這些觀察。使用上表 9-1 中所列舉之傳統 PCR CXC 配體 3 引子，發現產後衍生細胞與對照組之間 CXC 配體 3 之表現水準沒有顯著差異。

【0295】 產後細胞介素 IL-8 之生產在經生長培養基培養及經血清饑餓培養之產後衍生細胞兩者中均提高。所有即時 PCR 數據皆用傳統 PCR 及藉由定序 PCR 產物來驗證。

【0296】 當檢測生長於無血清培養基中之細胞的上清液中 IL-8 之存在時，最高量在衍生自臍細胞及胎盤細胞之一些分離株之培養基中偵測出（表 9-2）。在衍生自人類皮膚纖維母細胞之培養基中未偵測出 IL-8。

表 9-2：藉由 ELISA 所量測之 IL-8 蛋白質表現

細胞型	IL-8
人類纖維母細胞	ND
胎盤分離株 1	ND
UMBC 分離株 1	2058.42±144.67
胎盤分離株 2	ND
UMBC 分離株 2	2368.86±22.73
胎盤分離株 3（正常 O ₂ ）	17.27±8.63
胎盤分離株 3（低 O ₂ ，W/O BME）	264.92±9.88
對胎盤及臍帶衍生細胞以及人類皮膚纖維母細胞執行之針對介白素-8 (IL-8)的 ELISA 檢定結果。此處所表示之值為皮克/百萬細胞，n=2, sem。	

ND：未偵測到

【0297】亦藉由 FACS 分析檢測胎盤衍生細胞的氧化 LDL 受體、GCP-2 及 GRO α 之生產。經測試細胞為 GCP-2 陽性。此方法未偵測到氧化 LDL 受體及 GRO。

【0298】亦藉由免疫細胞化學分析測試胎盤衍生細胞之選定蛋白質之生產。在分離後（繼代 0），立即將衍生自人類胎盤之細胞用 4%多聚甲醛固定且暴露於針對六種蛋白質之抗體：馮威里氏因子、CD34、細胞角蛋白 18、肌間線蛋白、 α -平滑肌肌動蛋白、及波形蛋白。經染色細胞呈現 α -平滑肌肌動蛋白及波形蛋白陽性。此模式直到繼代 11 仍保留。在繼代 0 時僅一些細胞(<5%)為細胞角蛋白 18 染色陽性。

【0299】衍生自人類臍帶之細胞在繼代 0 時藉由免疫細胞化學分析探查到選定蛋白質之生產。在分離後（繼代 0），立即將細胞用 4%多聚甲醛固定且暴露於針對六種蛋白質之抗體：馮威里氏因子、CD34、細胞角蛋白 18、肌間線蛋白、 α -平滑肌肌動蛋白、及波形蛋白。臍衍生細胞為 α -平滑肌肌動蛋白及波形蛋白陽性，其中染色模式直到繼代 11 仍一致。

【0300】**概述：**對於以下四種基因，已確立藉由微陣列與 PCR（即時及傳統兩者）所量測之基因表現水準之間的一致性：氧化 LDL 受體 1、凝乳酶、內質網蛋白、及 IL-8。這些基因之表現在 PPDC 中的 mRNA 水準上受到差別調節，其中 IL-8 在蛋白質水準上亦受差別調節。藉由 FACS 分析，在衍生自胎盤之細胞中的蛋白質水準上未偵測出氧化 LDL 受體之存在。藉由 FACS 分析，GCP-2 及 CXC

配體 3 於胎盤衍生細胞中在 mRNA 水準上之差別表現未經確認，但是在蛋白質水準上偵測出 GCP-2。儘管此結果未由最初獲自微陣列實驗之數據反映出，但是此可能由於方法之靈敏度不同所致。

【0301】 在分離後（繼代 0），立即染色衍生自人類胎盤之細胞呈現 α -平滑肌肌動蛋白及波形蛋白陽性。此模式亦在繼代 11 的細胞中觀察到。波形蛋白及 α -平滑肌肌動蛋白表現可在繼代（在生長培養基中及在這些程序中所利用之條件下）細胞中保留。在繼代 0 之衍生自人類臍帶之細胞係經探查 α -平滑肌肌動蛋白及波形蛋白之表現，且兩者皆為陽性。此染色模式直到繼代 11 仍保留。

實例 10

產後衍生細胞之體外免疫評估

【0302】 體外評估產後衍生細胞(PPDC)之免疫特徵以預測這些細胞在體內移植後可能引發之免疫反應（若有的話）。藉由流動式細胞測量術檢定 PPDC 中 HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ、CD80、CD86、及 B7-H2 之存在。這些蛋白質係由抗原呈現細胞(APe)表現且為純真 CD4 + T 細胞之直接刺激所需（Abbas 及 Lichtman, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 第 5 版(2003) Saunders, Philadelphia, 第 171 頁）。亦藉由流動式細胞測量術分析細胞系中 HLA-G（Abbas 及 Lichtman, 2003, 見前文）、CD 178（Coumans, 等人, (1999) Journal of Immunological Methods 224, 185-196）、及 PD-L2（Abbas 及 Lichtman, 2003, 見前文；Brown,

等人(2003) The Journal of Immunology, 170:1257-1266) 之表現。認為存在於胎盤組織中的細胞所表現之這些蛋白質媒介子宮內胎盤組織之免疫豁免狀態。為了預測胎盤與臍衍生細胞系於體內引發免疫反應之程度，於單向混合淋巴球反應(MLR)中測試細胞系。

方法及材料

【0303】 細胞培養：於用 2%明膠(Sigma, St. Louis, Mo.)塗布之 T75 培養瓶(Corning Inc., Corning, N.Y.)中之含有青黴素/鏈黴素之生長培養基中培養細胞至長滿。

【0304】 抗體染色：將細胞於磷酸鹽緩衝鹽水(PBS) (Gibco, Carlsbad, Calif)中清洗且用胰蛋白酶/EDTA (Gibco, Carlsbad, Mo.)脫附。將細胞收集、離心，且以每毫升 1×10^7 的細胞濃度再懸浮於 3% (v/v) FBS 於 PBS 中。按製造商規範將抗體（表 10-1）添加至一百微升細胞懸浮液中且在 4°C 下於黑暗中培養 30 分鐘。在培養之後，將細胞用 PBS 清洗且離心以移除未結合的抗體。將細胞再懸浮於五百微升 PBS 中且使用 FACSCalibur™儀器(Becton Dickinson, San Jose, Calif.)藉由流動式細胞測量術分析。

表 10-1.抗體

抗體	製造商	目錄號
HLA-DRDPDQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557227
CD86	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555665
B7-H2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	552502
HLA-G	Abcam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD 178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681

PD-L2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557846
小鼠 IgG2a	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
小鼠 IgG1 κ	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

【0305】 混合淋巴球反應：將標記為細胞系 A 之繼代 10 臍衍生細胞與標記為細胞系 B 之繼代 11 胎盤衍生細胞之凍存小瓶於乾冰上送至 CTBR (Senneville, Quebec)以使用 CTBR SOP No. CAC-031 進行混合淋巴球反應。自多個男性及女性自願捐贈者收集周邊血液單核細胞(PBMC)。用絲裂黴素 C 處理刺激物（捐贈者）同種異體 PBMC、自體 PBMC、及產後細胞系。將自體及經絲裂黴素 C 處理之刺激物細胞添加至回應物（接受者）PBMC 且培養 4 天。在培養之後，將^[3H]-胸苷添加至各樣本中且培養 18 小時。在收集細胞之後，萃取放射性標記 DNA，且使用閃爍計數器量測^[3H]-胸苷併入。

【0306】 同種異體捐贈者刺激指數(SIAD)係經計算為：接收者之平均增生加上經絲裂黴素 C 處理之同種異體捐贈者之平均增生除以接收者之基線增生。PPDC 刺激指數係經計算為：接收者之平均增生加上經絲裂黴素 C 處理之產後細胞系之平均增生除以接收者之基線增生。

結果

【0307】 混合淋巴球反應（胎盤衍生細胞）：七個人類自願血液捐贈者係經篩選以識別出在與其他六個血液捐贈者進行混合淋巴球反應時會展現穩固增生反應的單一同種異體捐贈者。此捐贈者係經選擇為同種異體陽性對照組捐贈者。剩餘六個血液捐贈者係選擇

為接受者。將同種異體陽性對照組捐贈者及胎盤衍生細胞系用絲裂黴素 C 處理且與六個個別同種異體接收者培養於混合淋巴球反應中。反應係使用兩個細胞培養盤重複三次執行，每盤具有三個接收者(表 10-2)。平均刺激指數之範圍為 1.3 (盤 2) 至 3 (盤 1)，且同種異體捐贈者陽性對照組之範圍為 46.25(盤 2)至 279(盤 1)(表 10-3)。

表 10-2.混合淋巴球反應數據—細胞系 B (胎盤)

增生檢定之 DPM								
		盤 ID：盤 1						
分析	培養	重複						
編號	系統	1	2	3	平均值	SD	CV	
IM03-7769	接收者之增生基線	79	119	138	112.0	30.12	26.9	
	自體刺激之對照組 (經絲裂黴素 C 處理之自體細胞)	241	272	175	229.3	49.54	21.6	
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768 (經絲裂黴素 C 處理)	2397 1	2235 2	20921	22414.7	1525. 97	6.8	
	與細胞系 (經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型) 之 MLR	664	559	1090	771.0	281.2 1	36.5	
SI(捐贈者)					200			
SI(細胞系)					7			
IM03-7770	接收者之增生基線	206	134	262	200.7	64.17	32.0	
	自體刺激之對照組 (經絲裂黴素 C 處理之自體細胞)	1091	602	524	739.0	307.3 3	41.6	
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768 (經絲裂黴素 C 處理)	4500 5	4372 9	44071	44268.3	660.4 9	1.5	
	與細胞系 (經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型) 之 MLR	533	2582	2376	1830.3	1128. 24	61.6	
SI(捐贈者)					221			
SI(細胞系)					9			

IM03-7771	接收者之增生基線	157	87	128	124.0	35.17	28.4
	自體刺激之對照組（經絲裂黴素 C 處理之自體細胞）	293	138	508	313.0	185.81	59.4
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768（經絲裂黴素 C 處理）	24497	34348	31388	30077.7	5054.53	16.8
	與細胞系（經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型）之 MLR	601	643	a	622.0	29.70	4.8
SI(捐贈者)					243		
SI(細胞系)					5		
IM03-7772	接收者之增生基線	56	98	51	68.3	25.81	37.8
	自體刺激之對照組（經絲裂黴素 C 處理之自體細胞）	133	120	213	155.3	50.36	32.4
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768（經絲裂黴素 C 處理）	14222	20076	22168	18822.0	4118.75	21.9
	與細胞系（經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型）之 MLR	a	a	a	a	a	a
SI(捐贈者)					275		
SI(細胞系)					a		
IM03-7768 (同種異體捐贈者)	接收者之增生基線	84	242	208	178.0	83.16	46.7
	自體刺激之對照組（經絲裂黴素 C 處理之自體細胞）	361	617	304	427.3	166.71	39.0
細胞系 B 型	接收者之增生基線	126	124	143	131.0	10.44	8.0
	自體刺激之對照組（經絲裂黴素 C 處理之自體細胞）	822	1075	487	794.7	294.95	37.1

盤 ID：盤 2

分析編號	培養系統	重複			平均值	SD	CV
		1	2	3			
IM03-7773	接收者之增生基線	908	181	330	473.0	384.02	81.2
	自體刺激之對照組（經絲裂黴素 C 處理之自體細胞）	269	405	572	415.3	151.76	36.5
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768（經絲裂黴素	29151	28691	28315	28719.0	418.70	1.5



	C 處理) 與細胞系 (經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型)之 MLR	567	732	905	734.7	169.02	23.0
SI (捐贈者) SI (細胞系)					61 2		
IM03- 7774	接收者之增生基線	893	1376	185	818.0	599.03	73.2
	自體刺激之對照組 (經絲 裂黴素 C 處理之自體細 胞)	261	381	568	403.3	154.71	38.4
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768 (經絲裂黴素 C 處理)	5310 1	42839	48283	48074. 3	5134.1 8	10.7
	與細胞系 (經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型)之 MLR	515	789	294	532.7	247.97	46.6
SI (捐贈者) SI (細胞系)					59 1		
IM03- 7775	接收者之增生基線	1272	300	544	705.3	505.69	71.7
	自體刺激之對照組 (經絲 裂黴素 C 處理之自體細 胞)	232	199	484	305.0	155.89	51.1
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768 (經絲裂黴素 C 處理)	2355 4	10523	28965	21014. 0	9479.7 4	45.1
	與細胞系 (經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型)之 MLR	768	924	563	751.7	181.05	24.1
SI (捐贈者) SI (細胞系)					30 1		
IM03- 7776	接收者之增生基線	1530	137	1046	904.3	707.22	78.2
	自體刺激之對照組 (經絲 裂黴素 C 處理之自體細 胞)	420	218	394	344.0	109.89	31.9
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768 (經絲裂黴素 C 處理)	2889 3	32493	34746	32044. 0	2952.2 2	9.2
	與細胞系 (經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型)之 MLR	a	a	a	a	a	a
SI (捐贈者) SI (細胞系)					35 a		

表 10-3.胎盤細胞及同種異體捐贈者在與六個個別同種異體接收者的混合淋巴球反應中之平均刺激指數。

	接受者	胎盤
--	-----	----

盤 1 (接收者 1 至 3)	279	3
盤 2 (接收者 4 至 6)	46.25	1.3

【0308】 混合淋巴球反應（臍衍生細胞）：六個人類自願血液捐贈者係經篩選以識別出在與其他五個血液捐贈者進行混合淋巴球反應時會展現穩固增生反應的單一同種異體捐贈者。此捐贈者係經選擇為同種異體陽性對照組捐贈者。剩餘五個血液捐贈者係選擇為接受者。將同種異體陽性對照組捐贈者及胎盤細胞系用絲裂黴素 C 處理且與五個個別同種異體接收者培養於混合淋巴球反應中。反應係使用兩個細胞培養盤重複三次執行，每盤具有三個接收者（表 10-4）。平均刺激指數之範圍為 6.5（盤 1）至 9（盤 2），且同種異體捐贈者陽性對照組之範圍為 42.75（盤 1）至 70（盤 2）（表 10-5）。

表 10-4.混合淋巴球反應數據—細胞系 A（臍帶）

分析編號	培養系統	重複			平均值	SD	CV
		1	2	3			
IM04-2478	接收者之增生基線	1074	406	391	623.7	390.07	62.5
	自體刺激之對照組（經絲裂黴素 C 處理之自體細胞）	672	510	1402	861.3	475.19	55.3
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768（經絲裂黴素 C 處理）	43777	48391	38231	43466.3	5087.12	11.7
	與細胞系（經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型）之 MLR	2914	5622	6109	4881.7	1721.36	35.3
SI（捐贈者） SI（細胞系）					708		
IM04-2479	接收者之增生基線	530	508	527	521.7	11.93	2.3
	自體刺激之對照組（經絲裂黴素 C 處理之自體細胞）	701	567	1111	793.0	283.43	35.7
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768（經絲裂黴素 C 處理）	25593	24732	22707	24344.0	1481.61	6.1

	與細胞系（經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型）之 MLR	5086	3932	1497	3505.0	1832.21	52.3
SI（捐贈者） SI（細胞系）					477		
IM04-2480	接收者之增生基線	1192	854	1330	1125.3	244.90	21.8
	自體刺激之對照組（經絲裂黴素 C 處理之自體細胞）	2963	993	2197	2051.0	993.08	48.4
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768（經絲裂黴素 C 處理）	25416	29721	23757	26298.0	3078.27	11.7
	與細胞系（經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型）之 MLR	2596	5076	3426	3699.3	1262.39	34.1
SI（捐贈者） SI（細胞系）					233		
IM04-2481	接收者之增生基線	695	451	555	567.0	122.44	21.6
	自體刺激之對照組（經絲裂黴素 C 處理之自體細胞）	738	1252	464	818.1	400.04	48.9
	MLR 同種異體捐贈者 IM03-7768（經絲裂黴素 C 處理）	13177	24885	15444	17835.3	6209.52	34.8
	與細胞系（經絲裂黴素 C 處理之細胞 B 型）之 MLR	4495	3671	4674	4280.0	534.95	12.5
SI（捐贈者） SI（細胞系）					318		

盤 ID：盤 2

分析編號	培養系統	重複			平均值	SD	CV
		1	2	3			
IM04-2482	接收者之增生基線	432	533	274	413.0	130.54	31.6
	自體刺激之對照組（經絲裂黴素 C 處理之自體細胞）	1459	633	598	896.7	487.31	54.3
	MLR 同種異體捐贈者 IM04-2477（經絲裂黴素 C 處理）	24286	30823	31346	28818.3	3933.82	13.7
	與細胞系（經絲裂黴素 C 處理之細胞 A 型）之 MLR	2762	1502	6723	3662.3	2724.46	74.4
SI（捐贈者） SI（細胞系）					709		
IM04-2477	接收者之增生基線	312	419	349	360.0	54.34	15.1
	自體刺激之對照組（經絲	567	604	374	515.0	123.50	24.0

	裂黴素 C 處理之自體細胞)						
細胞系 A 型	接收者之增生基線 自體刺激之對照組(經絲 裂黴素 C 處理之自體細胞)	5101	3735	2973	3936.3	1078.19	27.4
		1924	4570	2153	2882.3	1466.04	50.9

表 10-5.臍帶衍生細胞及同種異體捐贈者在與五個個別同種異體接收者的混合淋巴球反應中之平均刺激指數。

	接受者	臍帶
盤 1 (接收者 1 至 4)	42.75	6.5
盤 2 (接收者 5)	70	9

【0309】 抗原呈現細胞標記（胎盤衍生細胞）：藉由流動式細胞測量術所分析之胎盤衍生細胞之直方圖顯示 HLA-DR, DP, DQ、CD80、CD86、及 B7-H2 之陰性表現，如藉由與 IgG 對照組一致的螢光值所說明，這表示胎盤細胞系缺乏直接刺激 CD4 + T 細胞所需之細胞表面分子。

【0310】 免疫調節標記（胎盤衍生細胞）：藉由流動式細胞測量術所分析之胎盤衍生細胞之直方圖顯示 PD-L2 之陽性表現，如藉由相對於 IgG 對照組螢光值增加所說明，以及 CD178 及 HLA-G 之陰性表現，如藉由與 IgG 對照組一致的螢光值所說明。

【0311】 抗原呈現細胞標記（臍衍生細胞）：藉由流動式細胞測量術所分析之臍衍生細胞之直方圖顯示 HLA-DR, DP, DQ、CD80、CD86、及 B7-H2 之陰性表現，如藉由與 IgG 對照組一致的螢光值

所說明，這表示臍細胞系缺乏直接刺激 CD4 + T 細胞所需之細胞表面分子。

【0312】 免疫調節細胞標記（臍衍生細胞）：藉由流動式細胞測量術所分析之臍衍生細胞之直方圖顯示 PD-L2 之陽性表現，如藉由相對於 IgG 對照組螢光值增加所說明，以及 CD178 及 HLA-G 之陰性表現，如藉由與 IgG 對照組一致的螢光值所說明。

【0313】 概述：在用胎盤衍生細胞系進行之混合淋巴球反應中，平均刺激指數之範圍為 1.3 至 3，且同種異體陽性對照組之平均刺激指數之範圍為 46.25 至 279。在用臍衍生細胞系進行之混合淋巴球反應中，平均刺激指數之範圍為 6.5 至 9，且同種異體陽性對照組之平均刺激指數之範圍為 42.75 至 70。胎盤及臍衍生細胞系對於刺激蛋白質 HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ、CD80、CD86、及 B7-H2 之表現為陰性，如藉由流動式細胞測量術所量測。胎盤及臍衍生細胞系對於免疫調節蛋白質 HLA-G 及 CD178 之表現為陰性且對於 PD-L2 之表現為陽性，如藉由流動式細胞測量術所量測。同種異體捐贈者 PBMC 含有表現 HLA-DR, DQ、CD8、CD86、及 B 7-H2 之抗原呈現細胞，從而允許純真 CD4 + T 細胞之刺激。胎盤及臍衍生細胞上不存在直接刺激純真 CD4+ T 細胞所需之抗原呈現細胞表面分子及存在免疫調節蛋白質 PD-L2，可說明於 MLR 中相較於同種異體對照組，這些細胞所展現之刺激指數較低。

實例 11

由產後衍生細胞分泌之營養因子

【0314】 對於來自胎盤及臍衍生細胞之選定營養因子的分泌係經量測。所偵測之選定因子包括：(1)已知具有血管生成活性之因子，諸如肝細胞生長因子(HGF) (Rosen 等人(1997) Ciba Found. Symp.212:215-26)、單核細胞趨化蛋白質 1 (MCP-1) (Salcedo 等人(2000) Blood 96;34-40)、介白素-8 (IL-8) (Li 等人(2003) J. Immunol. 170:3369-76)、角質細胞生長因子(KGF)、鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)、血管內皮生長因子(VEGF)(Hughes 等人(2004) Ann. Thorac. Surg. 77:812-8)、基質金屬蛋白酶 1 (TIMP1)、血管生成素 2 (ANG2)、血小板衍生生長因子(PDGF-bb)、血小板生成素(TPO)、肝素結合表皮生長因子(HB-EGF)、基質衍生因子 1 α (SDF-1 α)；(2)已知具有神經營養/神經保護活性之因子，諸如腦衍生神經營養因子(BDNF) (Cheng 等人(2003) Dev.Biol. 258;319-33)、介白素-6 (IL-6)、顆粒性細胞趨化蛋白質-2 (GCP-2)、轉形生長因子 β 2 (TGF β 2)；及(3)已知具有趨化激素活性之因子，諸如巨噬細胞發炎蛋白質 1 α (MIP1 α)、巨噬細胞發炎蛋白質 1 β (MIP1 β)、單核細胞化學吸引因子-1 (MCP-1)、Rantes (調控活化、正常 T 細胞表現與分泌)、I309、胸腺與活化調控趨化激素(TARE)、伊紅趨素(Eotaxin)、巨噬細胞衍生趨化激素(MDC)、IL-8。

方法及材料

【0315】 細胞培養物：將胎盤與臍之 PPDC 以及衍生自人類新生兒包皮之人類纖維母細胞培養於經明膠塗布之 T75 培養瓶中的具有青黴素/鏈黴素之生長培養基中。將細胞在繼代 11 時凍存並儲存於液態氮中。在解凍細胞後，將生長培養基加至細胞，接著轉移至 15 毫升離心管中然後以 150 x g 離心細胞 5 分鐘。捨棄上清液。將細胞沉澱物再懸浮於 4 毫升生長培養基中，然後計數細胞。使細胞以 375,000 個細胞/75 cm² 接種於含有 15 毫升生長培養基之培養瓶中且培養 24 小時。將培養基更換為無血清培養基（DMEM-低葡萄糖 (Gibco)、0.1% (w/v) 牛血清白蛋白 (Sigma)、青黴素/鏈黴素 (Gibco)）歷時 8 小時。在培養結束時以 14,000^xg 離心 5 分鐘來收集無血清條件培養基，然後儲存在 -20°C 下。

【0316】 為了要評估各培養瓶中的細胞數目，用 PBS 清洗細胞然後使用 2 毫升胰蛋白酶/EDTA 脫附。藉由加入 8 毫升生長培養基來抑制胰蛋白酶活性。將細胞以 150xg 離心 5 分鐘。將上清液移除然後將細胞再懸浮於 1 毫升的生長培養基中。使用血球計估計細胞數目。

【0317】 *ELISA* 檢定：使細胞在 37°C 下生長於 5% 二氧化碳與大氣氧氣中。亦使胎盤衍生細胞（批次 101503）生長於 5% 氧氣或 β -巰基乙醇 (BME) 中。各細胞樣本所生產之 MCP-1、IL-6、VEGF、SDF-1 α 、GCP-2、IL-8 及 TGF- β 2 之量係以 *ELISA* 檢定 (R&D Systems, Minneapolis, Mn.) 來量測。所有檢定皆依據製造商說明書來執行。

【0318】 *SearchLight*[™]多工 *ELISA* 檢定：趨化激素（MIP1a、MIP1b、MCP-1、Rantes、1309、TARC、伊紅趨素(Eotaxin)、MDC、IL8）、BDNF 與血管生成因子(HGF、KGF、bFGF、VEGF、TIMP1、ANG2、PDGF-bb、TPO、HB-EGF)皆使用 *SearchLight*[™] Proteome Arrays (Pierce Biotechnology Inc.)來量測。Proteome Arrays 為多工三明治法 *ELISA*，用於進行每孔二至 16 種蛋白質的定量量測。藉由將四至 16 種不同捕捉抗體(capture antibody)以 2 × 2、3 × 3、或 4 × 4 圖案點樣至 96 孔盤的各孔中而生產陣列。在進行三明治法 *ELISA* 程序後，將整個盤成像以捕捉盤上各孔內之各點樣處所產生的化學發光信號。在各點樣處所產生的信號量係正比於原始標準品或樣本中的目標蛋白質之量。

結果

【0319】 *ELISA* 檢定：MCP-1 及 IL-6 係由胎盤及臍衍生細胞以及皮膚纖維母細胞分泌（表 11-1）。SDF-1 α 係由培養於 5% O₂ 中之胎盤衍生細胞及纖維母細胞所分泌。GCP-2 及 IL-8 係由臍衍生細胞及在 BME 或 5% O₂ 存在下培養之胎盤衍生細胞所分泌。GCP-2 亦由人類纖維母細胞所分泌。TGF- β 2 未由 *ELISA* 檢定偵測出。

表 11-1. *ELISA* 結果：營養因子之偵測

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1 α	GCP-2	IL-8	TGF- β 2
纖維母細胞	17 $\pm$ 1	61 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	ND	ND
胎盤(042303)	60 $\pm$ 3	41 $\pm$ 2	ND	ND	ND	ND	ND

臍(022803)	1150±74	4234±289	ND	ND	160±11	2058±145	ND
胎盤(071003)	125±16	10±1	ND	ND	ND	ND	ND
臍(071003)	2794±84	1356±43	ND	ND	2184±98	2369±23	ND
胎盤(101503)	21±10	67±3	ND	ND	44±9	17±9	ND
BME							
胎盤(101503)	77±16	339±21	ND	1149±137	54±2	265±10	ND
5% O ₂ , W/O							
BME							

說明：ND：未偵測到。 , =/- sem

【0320】 *SearchLight*[™]多工 *ELISA* 檢定：TIMP1、TPO、KGF、HGF、FGF、HBEGF、BDNF、MIP1b、MCP1、RANTES、I309、TARC、MDC 與 IL-8 皆分泌自臍衍生細胞(表 11-2 及 11-3)。TIMP1、TPO、KGF、HGF、HBEGF、BDNF、MIP1a、MCP-1、RANTES、TARC、Eotaxin、與 IL-8 皆分泌自胎盤衍生細胞 (表 11-2 及 11-3)。未偵測到 Ang2、VEGF 或 PDGF-bb。

表 11-2. Searchlight 多工 ELISA 檢定結果

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306.3	ND	ND	230.5	5.0	ND	ND	27.9	1.3	ND
P1	24299.5	ND	ND	546.6	8.8	16.4	ND	ND	3.81.3	ND
U1	57718.4	ND	ND	1240.0	5.8	559.3	148.7	ND	9.3	165.7
P3	14176.8	ND	ND	568.7	5.2	10.2	ND	ND	1.9	33.6
U3	21850.0	ND	ND	1134.5	9.0	195.6	30.8	ND	5.4	388.6

說明：hFB (人類纖維母細胞)，P1 (胎盤衍生細胞(042303))，U1 (臍衍生細胞(022803))，P3(胎盤衍生細胞(071003))，U3(臍衍生細胞(071003))。ND：未偵測到。

表 11-3. Searchlight 多工 ELISA 檢定結果

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	伊紅趨素 (Eotaxin)	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39.6	ND	ND	0.1	ND	ND	204.9
P1	79.5	ND	228.4	4.1	ND	3.8	12.2	ND	413.5
U1	ND	8.0	1694.2	ND	22.4	37.6	ND	18.9	51930.1
P3	ND	ND	102.7	ND	ND	0.4	ND	ND	63.8

U3	ND	5.2	2018.7	41.5	11.6	21.4	ND	4.8	10515.9
----	----	-----	--------	------	------	------	----	-----	---------

說明：hFB（人類纖維母細胞），P1（胎盤衍生 PPDC (042303)），U1（臍衍生 PPDC (022803)），P3（胎盤衍生 PPDC (071003)），U3（臍衍生 PPDC (071003)）。
ND：未偵測到。

實例 12

產後衍生細胞之短期神經分化

【0321】 檢測胎盤與臍衍生細胞（統稱為產後衍生細胞或 PPDC）分化成神經譜系細胞之能力。

方法及材料

【0322】 產後細胞之分離與擴增：將來自胎盤與臍組織之 PPDC 如實例 4 中所述分離且擴增。

【0323】 修改的伍德柏-布萊克(Woodbury-Black)規程(A)：此檢定改編自最初執行以測試骨髓基質細胞之神經誘導潛能(1)之檢定。將臍衍生細胞(022803) P4 與胎盤衍生細胞(042203) P3 解凍且以 5,000 個細胞/cm² 培養擴增於生長培養基中直到達到次長滿(75%)。隨後將細胞進行胰蛋白酶消化且以每孔 6,000 個細胞接種於 Titretek II 玻片(VWR International, Bristol, Conn.)上。在對照組方面，間葉幹細胞(P3; 1F2155; Cambrex, Walkersville, Md.)、造骨細胞(P5; CC2538; Cambrex)、脂肪衍生細胞 (Artecel，美國專利第 6,555,374 B1 號) (P6；捐贈者 2) 與新生兒人類皮膚纖維母細胞(P6; CC2509; Cambrex)亦在相同條件下接種。

【0324】 最初將所有細胞於 DMEM/F12 培養基(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)中擴增 4 天,該培養基含有 15% (v/v)胎牛血清(FBS; Hyclone, Logan, Utah)、鹼性纖維母細胞生長因子 (bFGF ; 20 奈克/毫升 ; Peprotech, Rocky Hill, N.J.)、表皮生長因子 (EGF ; 20 奈克/毫升 ; Peprotech) 與青黴素/鏈黴素(Invitrogen)。四天後,將細胞於磷酸鹽緩衝鹽水(PBS; Invitrogen)中潤洗且隨後培養於 DMEM/F12 培養基+20% (v/v) FBS+青黴素/鏈黴素中 24 小時。24 小時後,將細胞用 PBS 潤洗。隨後使細胞於包含 DMEM/F12 (無血清)之誘導培養基中培養 1 至 6 小時,該培養基含有 200 mM 丁基化羥基甲氧苯、10 μ M 氯化鉀、5 毫克/毫升胰島素、10 μ M 毛喉素(forskolin)、4 μ M 丙戊酸、與 2 μ M 氫皮質酮(所有化學品皆來自 Sigma, St. Louis, Mo.)。隨後將細胞固定於 100%冰冷甲醇中且執行免疫細胞化學(參見以下方法)以評估人類巢蛋白表現。

【0325】 修改的伍德柏-布萊克規程(B): 將 PPDC (臍(022803) P11 ; 胎盤(042203) P11) 與成體人類皮膚纖維母細胞(1F1853, P11) 解凍且以 5,000 個細胞/ cm^2 培養擴增於生長培養基中直到達到次長滿(75%)。隨後將細胞進行胰蛋白酶消化且以與(A)類似的密度接種,但是接種至(1) 24 孔經組織培養物處理之盤(TCP, Falcon brand, VWR International)、(2) TCP 孔+2% (w/v)明膠 (在室溫下吸附 1 小時)、或(3) TCP 孔+20 μ g/毫升吸附小鼠層黏蛋白 (在 37°C 下吸附最少 2 小時 ; Invitrogen)。

【0326】 和(A)中完全相同，細胞最初係經擴增且在前述時間框下轉換培養基。如前述在 5 天 6 小時固定一組培養物，但此次在室溫下使用冰冷的 4% (w/v)多聚甲醛(Sigma)歷時 10 分鐘。在第二組培養物中，將培養基移除且轉換成神經前驅擴增培養基(NPE)，其由含有 B27 (B27 補充物；Invitrogen)、L-麩醯胺酸(4 mM)、及青黴素/鏈黴素(Invitrogen)之 Neurobasal-A 培養基(Invitrogen)組成。將 NPE 培養基用視黃酸(RA; 1 μ M; Sigma)進一步補充。4 天後將此培養基移除且在室溫下將培養物用冰冷的 4% (w/v)多聚甲醛(Sigma)固定 10 分鐘，並針對巢蛋白、GFAP、與 TuJ1 蛋白質表現進行染色 (參見表 12-1)。

表 12-1.所用之一級抗體摘要

抗體	濃度	供應商
大鼠 401 (巢蛋白)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
人類巢蛋白	1:100	Chemicon
TuJ1 (BIII 微管蛋白)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
酪胺酸羥化酶(TH)	1:1000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
肌間線蛋白 (小鼠)	1:300	Chemicon
α - α -平滑肌肌動蛋白	1:400	Sigma
人類核蛋白(hNuc)	1:150	Chemicon

【0327】 兩階段分化規程：將 PPDC (臍(042203) P11、胎盤(022803) P11)、成體人類皮膚纖維母細胞(P11；1F1853; Cambrex)解凍且以 5,000 個細胞/cm² 培養擴增於生長培養基中直到達到次長滿(75%)。隨後將細胞進行胰蛋白酶消化且以 2,000 個細胞/cm² 接種，

但在補充有 bFGF (20 奈克/毫升; Peprotech, Rocky Hill, N.J.) 與 EGF (20 奈克/毫升; Peprotech) 之 NPE 培養基[整個培養基組成物進一步稱為 NPE+F+E]存在下接種至經層黏蛋白(BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J.)塗布之 24 孔盤上。同時,亦將分離自海馬體(P4; (062603))之成鼠神經前驅接種至經層黏蛋白塗布之 24 孔盤上之 NPE+F+E 培養基中。將所有培養物保持在此類條件下歷時 6 天之時期(在該時間期間餵養細胞一次),此時將培養基轉換成表 12-2 中所列舉之分化條件再歷時 7 天之時期。將培養物在室溫下用冰冷的 4% (w/v)多聚甲醛(Sigma)固定 10 分鐘,且針對大鼠巢蛋白、GF AP、及 TuJ1 蛋白質表現進行染色。

表 12-2.兩階段分化規程之條件概述

條件#	A	B
	分化前	2 nd 階段分化
1	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + SHH (200 ng/ml) + F8 (100 ng/ml)
2	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + SHH (200 ng/ml) + F8 (100 ng/ml) + RA (1 μ M)
3	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + RA (1 μ M)
4	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)
5	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	生長培養基
6	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	條件 1B + MP52 (20 ng/ml)
7	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	條件 1B + BMP7 (20 ng/ml)
8	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	條件 1B + GDNF (20 ng/ml)
9	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	條件 2B + MP52 (20 ng/ml)
10	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	條件 2B + BMP7 (20 ng/ml)
11	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	條件 2B + GDNF (20 ng/ml)
12	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	條件 3B + MP52 (20 ng/ml)
13	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	條件 3B + BMP7 (20 ng/ml)
14	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	條件 3B + GDNF (20 ng/ml)
15	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + MP52 (20 ng/ml)

16	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + BMP7 (20 ng/ml)
17	NPE + F (20 ng/ml) + E (20 ng/ml)	NPE + GDNF (20 ng/ml)

【0328】 多重生長因子規程：將臍衍生細胞(P11; (042203))解凍且以 5,000 個細胞/cm² 培養擴增於生長培養基中直到達到次長滿(75%)。隨後將細胞進行胰蛋白酶消化且以 2,000 個細胞/cm² 接種至有 NPE+F (20 奈克/毫升) +E (20 奈克/毫升) 存在之 24 孔經層黏蛋白塗布之盤 (BD Biosciences) 上。此外，一些細胞含有 NPE+F+E+2% FBS 或 10% FBS。在四天「分化前(pre-differentiation)」條件之後，將所有培養基移除且將樣本轉換成 NPE 培養基，該培養基補充有聲蝟 (SHH; 200 奈克/毫升; Sigma, St. Louis, Mo.)、FGF8 (100 奈克/毫升; Peprotech)、BDNF (40 奈克/毫升; Sigma)、GDNF (20 奈克/毫升; Sigma)、及視黃酸(1 μ M; Sigma)。在培養基更換後七天，在室溫下將培養物用冰冷的 4% (w/v)多聚甲醛(Sigma)固定 10 分鐘，且針對人類巢蛋白、GFAP、TuJ1、肌間線蛋白、及 α -平滑肌肌動蛋白表現進行染色。

【0329】 神經前驅共培養規程：將成鼠海馬前驅(062603)以神經球或單一細胞 (10,000 個細胞/孔) 接種至經層黏蛋白塗布之 24 孔盤(BD Biosciences)上之 NPE +F (20 奈克/毫升) + E (20 奈克/毫升) 中。

【0330】 分開地，將臍衍生細胞(042203) P11 與胎盤衍生細胞(022803) P11 解凍且以 5,000 個細胞/cm² 培養擴增於 NPE +F (20 奈克/毫升) +E (20 奈克/毫升) 中歷時 48 小時之時期。隨後將細胞進

行胰蛋白酶消化且以 2,500 個細胞/孔接種至神經前驅之現有培養物上。此時，將現有培養基交換成新鮮培養基。四天後，將培養物在室溫下用冰冷的 4% (w/v)多聚甲醛(Sigma)固定 10 分鐘，且針對人類核蛋白(hNuc; Chemicon)進行染色（上文表 12-1）以識別 PPDC。

【0331】 免疫細胞化學：使用表 12-1 中所列舉之抗體執行免疫細胞化學。用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)清洗培養物然後將其暴露於含 PBS、4% (v/v)山羊血清(Chemicon, Temecula, Calif)與 0.3% (v/v) Triton (Triton X-100; Sigma)的蛋白質阻斷液中 30 分鐘以獲取細胞內抗原。接著在室溫下將一級抗體（稀釋於阻斷液中）施用於培養物歷時 1 小時。接著，將一級抗體溶液移除，用 PBS 清洗培養物，然後施用二級抗體溶液（在室溫下 1 小時），該二級抗體溶液含有阻斷溶液以及山羊抗小鼠 IgG--Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR)及山羊抗兔 IgG-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes)。隨後清洗培養物，然後施用 10 微莫耳 DAPI (Molecular Probes) 10 分鐘以可視化細胞核。

【0332】 在免疫染色後，在 Olympus 倒立落射螢光顯微鏡 (Olympus, Melville, N.Y.)上使用適當螢光濾光片來可視化螢光。在所有情況下，陽性染色代表高於對照組染色的螢光訊號，其中遵照上文所概述的全部程序，除了施加一級抗體溶液。使用數位彩色攝影機與 ImagePro 軟體(Media Cybernetics, Carlsbad, Calif)來擷取代表影像。針對三重染色的樣本，一次僅使用一個發射濾光片來拍攝

各影像。接著使用 Adobe Photoshop 軟體(Adobe, San Jose, Calif)來製備分層合成影像(Layered montage)。

結果

【0333】 修改的伍德柏-布萊克規程(A)：在於此神經誘導組成物中培養之後，所有細胞型轉形成具有雙極形態及伸長突起之細胞。亦觀察到其他更大的非雙極形態。此外，所誘導之細胞群為巢蛋白染色陽性，巢蛋白為多潛能神經幹細胞與前驅細胞之標記。

【0334】 修改的伍德柏-布萊克規程(B)：當在組織培養塑膠(TCP)盤上重複時，未觀察到巢蛋白表現，除非將層黏蛋白預吸附至培養物表面。為進一步評估巢蛋白表現細胞是否可隨後繼續產生成熟神經元，將 PPDC 與纖維母細胞暴露於 NPE+RA (1 μ M)中，RA 為已知可誘導神經幹細胞與前驅細胞分化成此類細胞(2, 3, 4)之培養基組成物。將細胞針對 TuJ1(不成熟與成熟神經元之標記)、GFAP(星狀細胞之標記)、及巢蛋白進行染色。在此類條件下未偵測出 TuJ1，也未觀察到具有神經元形態之細胞。此外，PPDC 不再表現巢蛋白及 GFAP，如藉由免疫細胞化學所判定。

【0335】 兩階段分化：將臍與胎盤 PPDC 分離株(以及分別作為陰性及陽性對照組細胞型之人類纖維母細胞與啮齒動物神經前驅)接種於經層黏蛋白(神經促進)塗布之盤上且暴露於已知促進神經前驅分化成神經元與星狀細胞之 13 種不同生長條件(與兩種對照組條件)。此外，添加兩種條件以檢測 GDF5 與 BMP7 對 PPDC 分化之

影響。一般而言，採取兩步驟分化方式，其中首先將細胞放置於神經前驅擴增條件中歷時 6 天之時期，接著放置於全分化條件歷時 7 天。在形態學上，臍與胎盤衍生細胞兩者在此程序之整個時程皆展現細胞形態之基本改變。然而，未觀察到神經元或星狀細胞形狀之細胞，除了在對照組、神經前驅接種之條件中。免疫細胞化學（對人類巢蛋白、TuJ1、與 GFAP 為陰性）確認形態學之觀察。

【0336】 多重生長因子：在暴露於各種神經分化劑一週之後，將細胞針對指示神經前驅（人類巢蛋白）、神經元(TuJ1)、與星狀細胞(GFAP)之標記進行染色。在第一階段中生長於不含血清之培養基的細胞具有與該些含血清（2%或 10%）之培養基中的細胞不同之形態，指出潛在的神經分化。特定言之，在將臍衍生細胞暴露於 EGF 與 bFGF，接著暴露於 SHH、FGF8、GDNF、BDNF、與視黃酸之兩步程序之後，細胞顯示類似於所培養的星狀細胞之形態的伸長突起。當 2% FBS 或 10% FBS 包括在分化之第一階段中時，細胞數目增加且細胞形態與高密度對照組培養物無異。人類巢蛋白、TuJ1、或 GFAP 的免疫細胞化學分析未證明潛在的神經分化。

【0337】 神經前驅與 PPDC 共培養：PPDC 係經接種至兩天前接種於神經擴增條件(NPE+F+E)中的大鼠神經前驅之培養物上。儘管經接種之 PPDC 之視覺確認證明這些細胞係以單一細胞接種，但是接種後 4 天（總計 6 天）的人類特異性核染色(hNuc)顯示，其趨向於捲成球狀(ball up)且避免與神經前驅接觸。此外，當 PPDC 附著時，這些細胞展開且似乎受到大鼠來源的分化神經元之神經支配，

表示 PPDC 可能已分化成肌細胞。此觀察係基於在相位差顯微鏡下之形態。另一觀察為，一般大型細胞本體（大於神經前驅）擁有類似神經前驅之形態，其中薄突起以多個方向跨出。hNuc 染色（發現於一半的細胞核中）顯示，在一些情況下，這些人類細胞可與大鼠前驅融合且採取其表型。僅含有神經前驅之對照組孔相較於含有臍或胎盤 PPDC 之共培養孔，具有較少總前驅及明顯分化之細胞，此進一步表示，臍與胎盤衍生細胞兩者均影響神經前驅之分化及行為，其作用係藉由釋放趨化激素與細胞介素，或藉由接觸媒介作用。

【0338】 概述：進行多個規程以判定 PPDC 分化成神經譜系細胞之短期潛能。這些包括形態學之相位差成像與針對巢蛋白、TuJ1、及 GFAP（分別為與多潛能神經幹細胞及前驅細胞、不成熟及成熟神經元、及星狀細胞相關聯的蛋白質）之免疫細胞化學之組合。

實例 13

產後衍生細胞之長期神經分化

【0339】 評估臍與胎盤衍生細胞（統稱為產後衍生細胞或 PPDC）進行長期分化成神經譜系細胞之能力。

方法及材料

【0340】 *PPDC* 之分離與擴增：如先前實例中所述將 PPDC 分離與擴增。

【0341】 *PPDC* 細胞解凍與接種：將先前生長於生長培養基中之 *PPDC* 冷凍等分（臍(022803) P11；(042203) P11；(071003) P12；胎盤(101503) P7）解凍且以 5,000 個細胞/cm² 接種於經層黏蛋白 (BD, Franklin Lakes, N.J.)塗布之 T-75 培養瓶中之含有 B27（B27 補充物，Invitrogen）、L-麩醯胺酸(4 mM)、及青黴素/鏈黴素（10 毫升）之 Neurobasal-A 培養基(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)，其組合在本文中稱為神經前驅擴增(NPE)培養基。將 NPE 培養基用 bFGF（20 奈克/毫升，Peprotech, Rocky Hill, N. J.）及 EGF（20 奈克/毫升，Peprotech, Rocky Hill, N. J.）進一步補充，本文稱為 NPE+bFGF+EGF。

【0342】 對照組細胞接種：此外，將成體人類皮膚纖維母細胞 (P11, Cambrex, Walkersville, Md.)與間葉幹細胞(P5, Cambrex)解凍且以相同細胞接種密度接種於經層黏蛋白塗布之 T-75 培養瓶中之 NPE+bFGF+EGF 中。作為進一步對照組，使纖維母細胞、臍與胎盤 *PPDC* 生長於生長培養基中歷時所有培養物所指定的時期。

【0343】 細胞擴增：每週將所有培養物之培養基用新鮮培養基替換一次且觀察細胞之擴增。大致上，各培養物由於在 NPE+bFGF+EGF 中生長受限，在一個月期間內僅繼代一次。

【0344】 免疫細胞化學：在一個月期間之後，將所有培養瓶在室溫下用冷 4% (w/v)多聚甲醛(Sigma)固定 10 分鐘。使用針對 TuJ1（BIII 微管蛋白；1:500；Sigma, St. Louis, Mo.）及 GFAP（膠細胞纖維酸性蛋白質；1:2000；DakoCytomation, Carpinteria, Calif.）之

抗體執行免疫細胞化學。簡言之，用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)清洗培養物然後將其暴露於含 PBS、4% (v/v)山羊血清(Chemicon, Temecula, Calif.)與 0.3% (v/v) Triton (Triton X-100; Sigma)的蛋白質阻斷液中 30 分鐘以獲取細胞內抗原。接著在室溫下將一級抗體（稀釋於阻斷液中）施用於培養物歷時 1 小時。接著，將一級抗體溶液移除，用 PBS 清洗培養物，然後施用二級抗體溶液（在室溫下 1 小時），該二級抗體溶液含有阻斷劑以及山羊抗小鼠 IgG--Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR)及山羊抗兔 IgG-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes)。隨後清洗培養物，然後施用 10 微莫耳 DAPI (Molecular Probes) 10 分鐘以可視化細胞核。

【0345】 在免疫染色後，在 Olympus 倒立落射螢光顯微鏡 (Olympus, Melville, N.Y.)上使用適當螢光濾光片來可視化螢光。在所有情況下，陽性染色代表高於對照組染色的螢光訊號，其中遵照上文所概述的全部程序，除了施加一級抗體溶液。使用數位彩色攝影機與 ImagePro 軟體(Media Cybernetics, Carlsbad, Calif.)來擷取代表影像。針對三重染色的樣本，一次僅使用一個發射濾光片來拍攝各影像。接著使用 Adobe Photoshop 軟體(Adobe, San Jose, Calif.)來製備分層合成影像(Layered montage)。

表 13-1.所用之一級抗體摘要

抗體	濃度	供應商
TuJ1 (BIII 微管蛋白)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA

結果

【0346】 NPE+bFGF+EGF 培養基延緩 PPDC 之增生且更改其形態。在接種之後，一亞群之 PPDC 立即附著至經層黏蛋白塗布之培養瓶。此可能因為細胞隨冷凍/解凍過程變化而死亡或由於新的生長條件。附著的細胞採用不同於在生長培養基中所觀察到的細胞之形態。

【0347】 臍衍生細胞之殖株表現神經元蛋白質：培養物係於解凍/接種後一個月固定且針對神經元蛋白質 TuJ1 及 GFAP(在星狀細胞中發現之中間絲)進行染色。儘管發現生長於生長培養基中之所有對照組培養物及生長於 NPE+bFGF+EGF 培養基中之人類纖維母細胞及 MSC 為 TuJ1-/GFAP-，但是在臍與胎盤 PPDC 中偵測出 TuJ1。在具有及不具有類神經元形態之細胞中觀察到表現。所有培養物中皆未觀察到 GFAP 之表現。表現 TuJ1 且具有類神經元形態之細胞的百分比小於或等於總族群之 1% (n=3 個經測試的臍衍生細胞分離株)。儘管未定量，但是 TuJ1 + 且不具有神經元形態之細胞在臍衍生細胞培養物中之百分比高於在胎盤衍生細胞培養物中之百分比。這些結果似乎具有特異性，因為生長培養基中之年齡匹配的對照組不表現 TuJ1。

【0348】 概述：用於自臍衍生細胞產生經分化之神經元（基於 TuJ1 表現與神經元形態）之方法係經發展。儘管早於一個月的體外培養未檢測出 TuJ1 之表現，但是很明顯，至少一小族群的臍衍生細

胞可經由預設分化(default differentiation)或經由在暴露於補充有 L-麩醯胺酸、鹼性 FGF、與 EGF 之最低培養基一個月的長期誘導而形成神經元。

實例 14

用於神經前驅支持之 PPDC 營養因子

【0349】 臍與胎盤衍生細胞（統稱為產後衍生細胞或 PPDC）經由非接觸依賴性（營養）機制對成體神經幹細胞與前驅細胞存活及分化之影響係經檢測。

方法及材料

【0350】 成體神經幹細胞與前驅細胞分離：Fisher 344 成鼠係藉由 CO₂ 窒息接著頸椎脫位術殺死。使用骨鉗將全部大腦完整移除，且基於在大腦之運動與體感覺區域之後的冠狀切口將海馬體組織解剖(Paxinos, G. & Watson, C. 1997. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates)。組織係於含有 B27（B27 補充物；Invitrogen）、L-麩醯胺酸（4 mM; Invitrogen）、及青黴素 / 鏈黴素 (Invitrogen) 之 Neurobasal-A 培養基(Invitrogen, Carlsbad, Calif.)中清洗，其組合在本文稱為神經前驅擴增(NPE)培養基。將 NPE 培養基用 bFGF（20 奈克/毫升，Peprotech, Rocky Hill, N.J.）及 EGF（20 奈克/毫升，Peprotech, Rocky Hill, N.J.）進一步補充，本文稱為 NPE+bFGF+EGF。

【0351】 在清洗之後，移除上覆腦膜，且將組織用解剖刀切碎。收集切碎之組織且添加 75%總體積之胰蛋白酶/EDTA (Invitrogen)。亦添加 DNase (100 微升/8 毫升總體積，Sigma, St. Louis, Mo.)。接著，使組織/培養基依序通過 18 號針頭、20 號針頭、與最終 25 號針頭各一次(所有針頭皆來自 Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.)。將混合物在 250 g 下離心 3 分鐘。移除上清液，添加新鮮 NPE+bFGF+EGF 且將團塊再懸浮。使所得細胞懸浮液通過 40 微米細胞濾器(Becton Dickinson)，接種於經層黏蛋白塗布之 T-75 培養瓶(Becton Dickinson)或低團簇 24 孔盤(Becton Dickinson)上，且生長於 NPE+bFGF+EGF 培養基中直到獲得概述研究所需之足夠細胞數目。

【0352】 *PPDC* 接種：先前生長於生長培養基中之產後衍生細胞(臍(022803) P12、(042103) P12、(071003) P12; 胎盤(042203) P12) 係以 5,000 個細胞/跨孔插入物(transwell insert) (適用 24 孔盤之大小) 接種且於生長培養基中於插入物中生長一週之時期以達成長滿。

【0353】 成體神經前驅接種：生長為神經球或單一細胞之神經前驅係以大致 2,000 個細胞/孔之密度接種至經層黏蛋白塗布之 24 孔盤上之 NPE+bFGF+EGF 中歷時一天之時期以促進細胞附著。一天後，根據以下方案添加含有產後細胞之跨孔插入物：

- a. 跨孔 (臍衍生細胞於生長培養基中，200 微升) +神經前驅 (NPE+bFGF+EGF，1 毫升)

- b. 跨孔（胎盤衍生細胞於生長培養基中，200 微升）+神經前驅（NPE+bFGF+EGF，1 毫升）
- c. 跨孔（成體人類皮膚纖維母細胞[1 F 1853; Cambrex, Walkersville, Md.] P12 於生長培養基中，200 微升）+神經前驅（NPE+bFGF+EGF，1 毫升）
- d. 對照組：單獨神經前驅（NPE+bFGF+EGF，1 毫升）
- e. 對照組：單獨神經前驅（僅 NPE，1 毫升）

【0354】 免疫細胞化學：在共培養物中 7 天之後，將所有條件在室溫下用冷 4% (w/v)多聚甲醛(Sigma)固定 10 分鐘之時期。使用針對表 14-1 中所列舉之表位的抗體來執行免疫細胞化學。簡言之，用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)清洗培養物然後將其暴露於含 PBS、4% (v/v) 山羊血清(Chemicon, Temecula, Calif.)與 0.3% (v/v) Triton (Triton X-100; Sigma)的蛋白質阻斷液中 30 分鐘以獲取細胞內抗原。接著在室溫下將一級抗體（稀釋於阻斷液中）施用於培養物歷時 1 小時。接著，將一級抗體溶液移除，用 PBS 清洗培養物，然後施用二級抗體溶液（在室溫下 1 小時），該二級抗體溶液含有阻斷溶液以及山羊抗小鼠 IgG--Texas Red (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR)及山羊抗兔 IgG-Alexa 488 (1:250; Molecular Probes)。隨後清洗培養物，然後施用 10 微莫耳 DAPI (Molecular Probes) 10 分鐘以可視化細胞核。

【0355】 在免疫染色後，在 Olympus 倒立落射螢光顯微鏡 (Olympus, Melville, N.Y.)上使用適當螢光濾光片來可視化螢光。在

所有情況下，陽性染色代表高於對照組染色的螢光訊號，其中遵照上文所概述的全部程序，除了施加一級抗體溶液。使用數位彩色攝影機與 ImagePro 軟體(Media Cybernetics, Carlsbad, Calif.)來擷取代表影像。針對三重染色的樣本，一次僅使用一個發射濾光片來拍攝各影像。接著使用 Adobe Photoshop 軟體(Adobe, San Jose, Calif.)來製備分層合成影像(Layered montage)。

表 14-1.所用之一級抗體摘要

抗體	濃度	供應商
大鼠 401 (巢蛋白)	1:200	Chemicon, Temecula, CA
TuJ1 (BIII 微管蛋白)	1:500	Sigma, St. Louis, MO
酪胺酸羥化酶(TH)	1:1000	Chemicon
GABA	1:400	Chemicon
GFAP	1:2000	DakoCytomation, Carpinteria, CA
髓鞘鹼性蛋白(MBP)	1:400	Chemicon

【0356】 神經前驅分化之定量分析：海馬神經前驅分化之定量係經檢測。每個條件計數最少 1000 個細胞，或若更少，則計數該條件中所觀察到的細胞總數。對於給定染色劑為陽性的細胞百分比係藉由將陽性細胞數目除以藉由 DAPI (核) 染色所判定之細胞總數來評估。

【0357】 質譜分析及 2D 凝膠電泳：為了識別獨特的、因共培養而分泌之因子，將在培養物固定之前所取得的條件培養基樣本在 -80°C 下冷凍隔夜。隨後將樣本施加至超濾自旋裝置 (截留 MW 為 30 kD)。將滯留物(Retentate)施加至免疫親和層析法 (抗 Hu-白蛋白；IgY) (免疫親和不將白蛋白自樣本移

除)。藉由 MALDI 分析濾液。將通過液(pass through)施加至 Cibachron Blue 親和層析法。藉由 SDS-PAGE 及 2D 凝膠電泳分析樣本。

結果

【0358】 *PPDC* 共培養刺激成體神經前驅分化：在與臍或胎盤衍生細胞培養之後，經共培養之衍生自成鼠海馬體之神經前驅細胞展現沿著中樞神經系統中所有三大譜系的顯著分化。在共培養五天之後清楚觀察到此作用，其中許多細胞發展出複雜突起且喪失屬於前驅細胞分裂表徵之相明亮特徵。相反地，在 bFGF 及 EGF 不存在下單獨生長之神經前驅外觀不健康且存活受限。

【0359】 在程序完成之後，將培養物針對指示未分化幹細胞及前驅細胞(巢蛋白)、不成熟及成熟神經元(TuJ1)、星狀細胞(GFAP)、及成熟寡樹突細胞(MBP)之標記進行染色。沿著所有三種譜系之分化係經確認，儘管對照組條件並未展現顯著分化，如大部分細胞保留巢蛋白陽性染色所證明。儘管臍及胎盤衍生細胞皆誘導細胞分化，但是與胎盤衍生細胞之共培養物中的所有三種譜系之分化程度小於與臍衍生細胞之共培養物中。

【0360】 與臍衍生細胞共培養之後的分化神經前驅之百分比係經定量(表 14-2)。臍衍生細胞顯著提高成熟寡樹突細胞(MBP)之數目(24.0%相較於兩種對照組條件之 0%)。此外，共培養提高培養物中 GFAP+星狀細胞與 TuJ1+神經元的數目(分別為 47.2%與

8.7%)。這些結果係經巢蛋白染色之確認，指示在共培養之後喪失前驅狀態（13.4%相較於對照組條件 4 之 71.4%）。

【0361】 雖然分化似乎亦受成體人類纖維母細胞影響，但是此類細胞無法促進成熟寡樹突細胞之分化，也不能產生可察覺量的神經元。儘管未定量，但是纖維母細胞似乎確實增強神經前驅之生存。

表 14-2.對照組相較於與臍衍生細胞跨孔共培養中前驅分化之定量

(E=EGF, F=bFGF)

抗體	F+E / Umb [條件 1]	F+E/F+E [條件 4]	F+E/移除 [條件 5]
TuJ1	8.7%	2.3%	3.6%
GFAP	47.2%	30.2%	10.9%
MBP	23.0%	0%	0%
巢蛋白	13.4%	71.4%	39.4%

【0362】 獨特化合物之識別：檢測來自臍及胎盤衍生共培養物之條件培養基，與適當對照組（NPE 培養基±1.7%血清，來自與纖維母細胞之共培養的培養基）之差異。潛在之獨特化合物係經識別且自其各自 2D 凝膠切除。

【0363】 概述：成體神經前驅細胞與臍或胎盤 PPDC 之共培養導致該些細胞之分化。此實例中所表現的結果指示，在與臍衍生細胞共培養之後，成體神經前驅細胞之分化尤其突出。特定言之，在臍衍生細胞之共培養物中產生顯著百分比的成熟寡樹突細胞。

實例 15

產後衍生細胞之移植

【0364】 衍生自產後臍及胎盤之細胞可用於再生性治療。對藉由用可生物降解材料將產後衍生細胞(PPDC)移植至 SCID 小鼠中所生產之組織進行評估。所評估之材料為 Vicryl 非織物、35/65 PCL/PGA 發泡體、及 RAD 16 自組裝肽水凝膠。

方法及材料

【0365】 細胞培養：胎盤及臍衍生細胞係生長於經明膠塗布之培養瓶中之生長培養基 (DMEM-低葡萄糖(Gibco, Carlsbad Calif.)、15% (v/v)胎牛血清(批號 SH30070.03; Hyclone, Logan, Utah)、0.001% (v/v) β 巯基乙醇(Sigma, St. Louis, Mo.)、青黴素/鏈黴素(Gibco))中。

【0366】 樣本製備：將一百萬個存活細胞接種於 15 微升生長培養基中至 5 mm 直徑、2.25 mm 厚 Vicryl 非織物支架 (64.33 毫克/cc；批號 3547-47-1) 或 5 mm 直徑 35/65 PCL/PGA 發泡體(批號 3415-53)上。使細胞附著兩小時，之後添加更多生長培養基以覆蓋支架。使細胞於支架上生長隔夜。亦將不具有細胞的支架培養於培養基中。

【0367】 RAD16 自組裝肽(3D Matrix, Cambridge, MA)係以無菌 1% (w/v)水溶液之形式獲得，將其與 1×10^6 個細胞於 10% (w/v) 蔗糖(Sigma, St Louis, Mo.)、10 mM HEPES 於達爾伯克改良培養基(DMEM; Gibco)中以 1:1 混合，之後立即使用。細胞於 RAD 16 水凝膠中之最終濃度為 1×10^6 個細胞/100 微升。

【0368】 測試材料(N=4/Rx)

- a. Vicryl 非織物+ 1×10^6 個臍衍生細胞
- b. 35/65 PCL/PGA 發泡體+ 1×10^6 個臍衍生細胞
- c. RAD 16 自組裝肽+ 1×10^6 個臍衍生細胞
- d. Vicryl 非織物+ 1×10^6 個胎盤衍生細胞
- e. 35/65 PCL/PGA 發泡體+ 1×10^6 個胎盤衍生細胞
- f. RAD 16 自組裝肽+ 1×10^6 個胎盤衍生細胞
- g. 35/65 PCL/PGA 發泡體
- h. Vicryl 非織物

【0369】 動物製劑：根據動物福利法案(Animal Welfare Act)之現行規定操作及飼養動物。藉由遵守動物福利法規(9 CFR)且符合 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th edition 中所公布的現行標準來實現對上文公共法案之遵守。

【0370】 小鼠（小家鼠(*Mus Musculus*)）/Fox Chase SCID/雄性 (*Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, Ind.*)，5 週齡：SCID 小鼠之所有操作皆在層流櫃中進行。將小鼠個別稱重且用 60 毫克/kg KETASET（鹽酸氯胺酮, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, Iowa）與 10 毫克/kg ROMPUN (xylazine, Mobay Corp., Shawnee, Kans.)及鹽水之混合物進行腹膜內注射來麻醉。在導入麻醉之後，使用動物電剪將動物自背頸區域至背腰區域之整個背部的毛髮剃光。隨後將該區域用氯己定二乙酸鹽(chlorhexidine diacetate)刷洗，用醇潤洗，乾燥，然

後用 1%有效碘(available iodine)之帶碘化合物(iodophor)水溶液塗抹。
將眼科軟膏施加至眼睛以預防在麻醉期間組織乾燥。

【0371】 皮下移植技術：在小鼠背部做出四個皮膚切口，各大致 1.0 cm 長。兩個頭側位點(cranial site)係橫向地定位於背外側胸腔、手觸摸肩胛骨下邊緣後方約 5-mm 之區域，其中一個在脊柱左側，另一個在脊柱右側。另外兩個位點係橫向地定位於後薦腰(caudal sacro-lumbar)處、手觸摸髂骨嵴後方約 5-mm 之臀肌區域，中線兩側各一。根據試驗計劃，將植入物隨機放置於這些位點中。使皮膚與下伏結締組織分離以製成小口袋，將植入物放入（或 RAD16 為注射入）切口後方約 1 -cm 處。將適當測試材料植入至皮下空間。將皮膚切口用金屬夾封閉。

【0372】 動物安置：在整個研究時程中，將小鼠個別安置於微型隔離籠中，溫度範圍為 64°F 至 79°F，相對濕度為 30%至 70%，且保持大致 12 小時亮/12 小時暗循環。將溫度與相對濕度盡可能地保持在所述範圍內。食物由經照射的 Pico Mouse Chow 5058 (Purina Co.)組成且無限制飲水。

【0373】 小鼠在其指定期間藉由二氧化碳來進行安樂死。將皮下植入位點連同其上覆皮膚切除且冷凍以用於組織學研究。

【0374】 組織學：將切除皮膚連同植入物用 10%中性緩衝福馬林(Richard-Allan Kalamazoo, Mich.)固定。將樣本連同上覆及相鄰組織由中間對切，使用常規方法用石臘處理及包埋切割表面。使用常

規方法，藉由薄片切片機獲得五微米組織切片且用蘇木精與曙紅 (Poly Scientific Bay Shore, N.Y.) 染色。

結果

【0375】 30 天後，經植入 SCID 小鼠皮下之發泡體（無細胞）中有極小的內生長。相反地，含有臍衍生細胞或胎盤衍生細胞之植入發泡體中充滿廣泛的組織。於 Vicryl 非織物支架中觀察到一些組織內生長。接種臍或胎盤衍生細胞之非織物支架顯示基質沉積及成熟血管增加。

【0376】 概述：合成性可吸收非織物/發泡體盤（5.0 mm 直徑×1.0 mm 厚）或自組裝肽水凝膠係經衍生自人類臍或胎盤的細胞接種，且雙側皮下植入於 SCID 小鼠之背脊部。結果證明，產後衍生細胞可大幅增加可生物降解支架中高品質的組織形成。

實例 16

臍組織衍生細胞中之端粒酶表現

【0377】 端粒酶的功能是合成端粒重複序列(telomere repeat)，端粒重複序列用來保護染色體完整性並延長細胞的複製壽命（Liu, K，等人，PNAS, 1999;96:5147-5152）。端粒酶由兩個組分所組成，即端粒酶 RNA 模板(hTER)與端粒酶反轉錄酶(hTERT)。端粒酶的調控係由 hTERT 而非 hTER 的轉錄來決定。hTERT mRNA 的即時聚合

酶連鎖反應(PCR)因而是一種已獲認可的細胞端粒酶活性測定方法。

【0378】 細胞分離。執行即時 PCR 實驗以測定人類臍帶組織衍生細胞的端粒酶生產。根據上文所述之實例製備人類臍帶組織衍生細胞。一般而言，得自國家疾病研究交換中心(Philadelphia, Pa.)的臍帶在正常分娩後會經過清洗以去除血液與碎屑然後進行機械解離。隨後將組織在 37°C 下用包括膠原蛋白酶、分散酶與玻尿酸酶之消化酶培養於培養基中。根據上文實例中所述之方法培養人類臍帶組織衍生細胞。間葉幹細胞與正常皮膚纖維母細胞(cc-2509 批號 9F0844)係得自 Cambrex, Walkersville, Md。多能性人類睪丸胚胎性癌(畸胎瘤)細胞系 nTera-2 細胞(NTERA-2 cl.D1) (參見 Plaia 等人, Stem Cells, 2006;24(3):531-546) 係購自 ATCC (Manassas, Va.)並且將其根據上文中所述之方法來培養。

【0379】 總 RNA 分離。使用 RNeasy®套組(Qiagen, Valencia, Ca.)將 RNA 自細胞萃取出來。用 50 微升經 DEPC 處理水將 RNA 沖提出來然後儲存於-80°C 下。使用隨機六聚物以 TaqMan®反轉錄試劑(Applied Biosystems, Foster City, Ca.)來反轉錄 RNA，反轉錄在 25°C 下歷時 10 分鐘、在 37°C 下歷時 60 分鐘、且在 95°C 下歷時 10 分鐘。將樣本儲存在-20°C 下。

【0380】 即時 PCR。使用 Applied Biosystems Assays-On-Demand™ (亦已知為 TaqMan® Gene Expression Assays) 根據製造商規範(Applied Biosystems)在 cDNA 樣本上執行 PCR。此

商用套組廣泛用來檢定人類細胞中的端粒酶。簡言之，使用 7000 序列偵測系統(搭載 ABI prism 7000 SDS 軟體(Applied Biosystems))，將 hTert (人類端粒酶基因) (Hs00162669)及人類 GAPDH (內部對照組) 與 cDNA 及 TaqMan® Universal PCR 主混合物混合。熱循環條件初始為 50℃ 歷時 2 分鐘然後 95℃ 歷時 10 分鐘，接著進行 40 次 95℃ 歷時 15 秒鐘然後 60℃ 歷時 1 分鐘的循環。依據製造商規範來分析 PCR 數據。

【0381】 人類臍帶組織衍生細胞 (ATCC 存取號 PTA-6067)、纖維母細胞及間葉幹細胞係針對 hTert 及 18S RNA 來檢定。如表 16-1 中所示，hTert 及因此端粒酶皆未在人類臍帶組織衍生細胞中偵測到。

表 16-1		
	hTert	18S RNA
臍細胞(022803)	ND	+
纖維母細胞	ND	+
ND-未偵測到；+偵測到信號		

【0382】 人類臍帶組織衍生細胞 (分離株 022803，ATCC 存取號 PTA-6067) 及 nTera-2 細胞皆經檢定，結果顯示在兩批人類臍帶組織衍生細胞中皆無端粒酶表現，然而畸胎瘤細胞系則顯示高表現水準 (表 16-2)。

表 16-2					
細胞型	hTert		GAPDH		hTert norm
	Exp. 1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	

nTera2	25.85	27.31	16.41	16.31	0.61
022803	-	-	22.97	22.79	-

【0383】 因此，可做出本發明之人類臍組織衍生細胞不表現端粒酶之結論。

【0384】 本說明書中提及各種專利及其他出版物。這些出版物之各者之全部內容以引用方式併入本文中。

【0385】 儘管上文已藉由實例與較佳實施例說明本發明之各種態樣，但是應理解，本發明之範疇並不由前文描述限定，而是以下根據專利法原理正確解讀的申請專利範圍來限定。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

無

序列表

<110> 哈理斯伊恩(HARRIS, IAN)
<110> 戴尼卡那丁(DEJNEKA, NADINE)

<120> 使用前驅細胞治療眼病狀

<130> JBI5060

<140>
<141> 2015-12-__

<150> 62/088,429
<151> 2014-12-05
<150> 62/126,370
<151> 2015-02-27
<150> 62/220,873
<151> 2015-09-18

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成引子

<400> 1
gagaaatcca aagagcaaat gg 22

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成引子

<400> 2
agaatggaaa actggaatag g 21

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成引子

<400> 3
tcttcgatgc ttcgattcc 20

<210> 4
<211> 21

104606-序列表

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成引子

<400> 4
gaattctcgg aatctctgtt g 21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成引子

<400> 5
ttacaagcag tgcagaaaac c 21

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成引子

<400> 6
agtaaacatt gaaaccacag cc 22

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成引子

<400> 7
tctgcagctc tgtgtgaagg 20

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成引子

<400> 8
cttcaaaaac ttctccacaa cc 22

<210> 9
<211> 17
<212> DNA



104606-序列表

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列說明：合成引子

<400> 9
cccacgccac gctctcc 17

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列說明：合成引子

<400> 10
tcctgtcagt tggcgctcc 19

發明摘要

※ 申請案號：104/40661

※ 申請日：104.12.4

※IPC 分類：A61K ³⁵/₅₁ (2015.01)
A61P ²⁷/₀₂ (2006.01)

【發明名稱】 使用前驅細胞治療眼睛病況

TREATMENT OF OCULAR CONDITIONS USING
PROGENITOR CELLS

【中文】

● 用於使用前驅細胞諸如產後衍生細胞及來自該等細胞之條件培養基治療眼科疾病、促進功能性神經元突觸之發育並改善神經元外生之方法及組成物係經揭示。亦揭示由促進突觸形成及神經元生長之細胞分泌之營養因子及其他劑。

【英文】

● Methods and compositions for treating ophthalmic disease, promoting development of functional neuronal synapses and improving neuronal outgrowth using progenitor cells, such as postpartum-derived cells, and conditioned media from the cells, are disclosed. Trophic factors and other agents secreted by the cells that promote synapse formation and neuronal growth are also disclosed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

申請專利範圍

1. 一種向具有視網膜變性之對象之眼睛投予產後衍生細胞群之方法，其中該細胞群為均質性人類臍帶組織衍生細胞群，其中該等人類臍帶組織衍生細胞係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織，其中該細胞群分泌至少一種突觸形成因子，且其中該突觸形成因子係選自 TSP-1、TSP-2 及 TSP-4。
2. 一種誘導視網膜神經元中突觸形成或神經突外生之方法，其包含向對象之眼睛投予均質性人類臍帶組織衍生細胞群，其中該細胞群係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織，其中該人類臍帶組織衍生細胞群分泌至少一種突觸形成因子，且其中該突觸形成因子係選自 TSP-1、TSP-2 及 TSP-4。
3. 一種使具有視網膜變性之對象之視網膜神經元中的功能性突觸發育之方法，其包含向該對象之眼睛投予包含均質性人類臍帶組織衍生細胞群之組成物，其中該細胞群係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織，其中該人類臍帶組織衍生細胞群分泌至少一種突觸形成因子，且其中該突觸形成因子係選自 TSP-1、TSP-2 及 TSP-4。
4. 一種向具有視網膜變性之對象之眼睛投予人類臍帶組織衍生細胞群之方法，其中該細胞群係分離自實質上不含血液之人類臍帶組織，其中該人類臍帶組織衍生細胞群分泌至少一種突觸形成因子，且其中該突觸形成因子係選自 TSP-1、TSP-2 及 TSP-4。

5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所述之方法，其中分離自實質上不含血液之人類臍帶組織之該細胞群能夠在培養物中擴增、具有分化成至少一種神經表型之細胞的潛能、維持在繼代之後之正常核型、且具有以下特徵：
 - a) 在培養物中進行 40 次族群倍增的潛能；
 - b) 生產 CD10、CD13、CD44、CD73 及 CD90；
 - c) 不生產 CD31、CD34、CD45、CD117 及 CD141；及
 - d) 相對於為纖維母細胞、間葉幹細胞或髌骨嵴骨髓細胞之人類細胞，增加編碼介白素 8 與內質網蛋白 1 (reticulon 1) 之基因的表現。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中該細胞群為 HLA-A、HLA-B、HLA-C 陽性，及 HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ 陰性。
7. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述之方法，其中該等視網膜神經元係選自由視網膜神經節細胞、光受體（視桿細胞及視錐細胞）、視網膜無軸突細胞、水平細胞或雙極細胞所組成的群組。
8. 如申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項所述之方法，其中向該眼睛之投予係選自投予至眼睛之內部或投予於該眼睛後面。
9. 如申請專利範圍第 3 項所述之方法，其中該組成物為醫藥組成物。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述之方法，其中該醫藥組成物包含醫藥上可接受之載劑。

