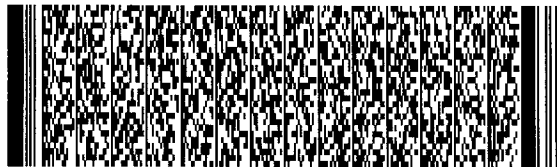


申請日期： P1 11.21	IPC分類
申請案號： P1133P62	C12N 5/10, 5/08, 15/86, A61K48/00

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	多功能體細胞
	英文	SOMATIC PLURIPOTENT CELLS
二、 發明人 (共1人)	姓名 (中文)	1. 黃效民
	姓名 (英文)	1. Shiaw-min Hwang
	國籍 (中英文)	1. 中華民國 TW
	住居所 (中文)	1. 新竹市富群街30巷1弄25號
	住居所 (英文)	1.
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓名 (中文)	1. 食品工業發展研究所
	名稱或 姓名 (英文)	1. FOOD INDUSTRY RESEARCH AND DEVELOPMETN INSTITUTE
	國籍 (中英文)	1. 中華民國 TW
	住居所 (營業所) (中文)	1. 新竹市食品路331號 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所 (營業所) (英文)	1.
	代表人 (中文)	1. 劉廷英
	代表人 (英文)	1. Liu Ting Ying



一、本案已向

國家(地區)申請專利	申請日期	案號	主張專利法第二十四條第一項優先權
美國 US	2002/07/26	60/398,883	有
美國 US	2002/11/04	10/287,362	有

二、主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項第一款但書或第二款但書規定之期間

日期：

四、有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

熟習該項技術者易於獲得,不須寄存。

五、發明說明 (1)

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於一種培養的動物體細胞，更特別地，本發明係有關於一種具有正常核型之培養的動物體細胞。

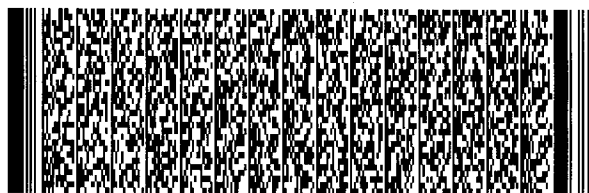
【先前技術】

多功能胚胎幹細胞 (pluripotent embryonic stem, ES) 是由早期的哺乳類胚胎衍生而來。它們在體內 (in vivo) 可分化成所有的細胞系統 (cell lineages)，並且，當它們在體外被誘發時，也可分化成大部分的細胞形式。由於其多功能的特性，一般相信胚胎幹細胞對於治療退化或遺傳疾病有很大的希望。道德因素阻礙了人類幹細胞在研究與治療上的使用。非胚胎來源的 (non-embryonic origin) 多功能細胞 (例如：體細胞) 將避免這層障礙。

曾經有報告指出，有一些體細胞可以發育成不相關之組織形式 (unrelated tissue types) 的細胞，然而，其發育功能是有限的。因此必須使體細胞具有不受限的發育功能。

【發明內容】

本發明之一型態的特色係在提供一個具有正常核型 (karyotype) 之培養的動物體細胞，並且當該細胞在體外被誘發時，會發育成一個胚胎體 (embryoid body)，亦即一個可更進一步發育成具有器官特色之結構的細胞團 (cellular mass)。此類結構的例子包括原腸 (primordial gut)，其結構表現出規則的收縮與舒張。由

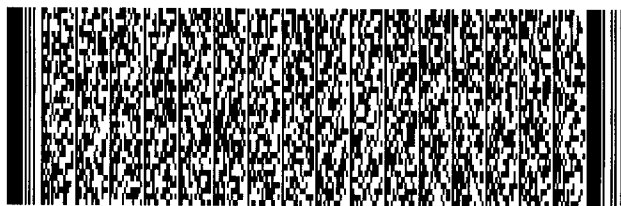


五、發明說明 (2)

於該培養細胞的來源為非胚胎的或非生殖細胞系 (non-germ-line) 的，所以稱之為體細胞 (somatic)。

本發明之另一型態的特色在提供一個具有正常核型之培養的動物體細胞，並且當該細胞被引入嚴重聯合免疫缺陷病 (severely combined immunodeficient, SCID) 小鼠時，會發展成畸胎瘤 (teratoma)。畸胎瘤是一種包含了所有從三種胚胎初發層衍生之組織的腫瘤，這三種胚胎初發層即外胚層 (ectoderm)、中胚層 (mesoderm) 和內胚層 (endoderm)。該組織的例子包括：角膜晶體 (corneal lens) 和發育中的表皮 (developing epidermis) (外胚層)；軟骨 (cartilage) 和橫紋肌 (striated muscle) (中胚層)；以及肝和胃腸道 (gastrointestinal tracts) (內胚層)。在一實施例中，當此培養的動物體細胞在體外被誘發時，可發育成胚胎體 (embryoid body)。在另一實施例中，該培養的細胞未表現階段特異性胚胎抗原-1 (stage-specific embryonic antigen-1, SSEA-1)，亦即 SSEA-1 陰性 (SSEA-1 negative)。

本發明之另一型態中，如同以上所述，本發明的特色在提供一種產生多功能動物細胞的方法。該方法包括：
(1) 從動物組織分離出體細胞；(2) 在飢餓狀態 (starving condition) 下培養該分離的細胞；和(3) 在培養的細胞當中鑑別和集結多功能細胞。當此集結的多功能細胞被引入 SCID 小鼠，該細胞會發育成畸胎瘤。體細胞可從哺乳類動物分離出來，包括人類。利用此方法任何適當的組織都可



五、發明說明 (3)

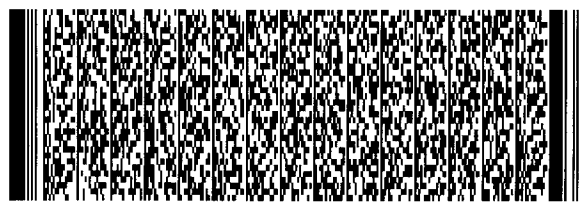
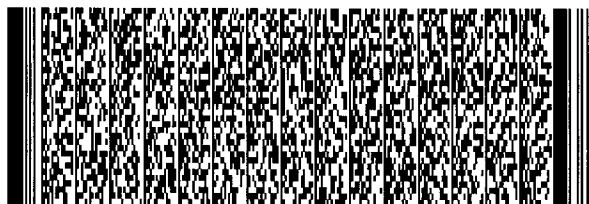
分離出體細胞。此類組織的例子包括：臍帶血 (umbilical cord blood)，骨髓 (bone marrow)，羊水 (amniotic fluid)，脂肪組織 (adipose tissue)，胎盤 (placenta)，和週邊血液 (peripheral blood)。

為了產生多功能細胞，必須在不適合細胞生長的饑餓條件下培養分離的細胞，例如：在含有0.5% 至2% 血清 (serum) 的飢餓培養基 (starving medium) 中培養5-10 天；或在含有10% 至20% 血清的一般培養基 (regular medium) 中培養7-21 天，而不更換介質。一般培養基含有促進細胞增生的營養和因子，飢餓培養基則含較少的營養和因子。該營養包括血清和血清替代物 (serum replacements)；而因子包括胰島素 (insulin)，表皮生長因子 (epidermal growth factors, EGF)，酸性成纖維細胞生長因子 (acidic fibroblast growth factors, aFGF)，和鹼性成纖維細胞生長因子 (basic fibroblast growth factors, bFGF)。在飢餓狀態下培養的細胞當中，我們可以根據其形態學和胚胎幹細胞表面標誌 (cell-surface markers) (例如：階段特異性胚胎抗原-1 陰性) 等特性來鑑定出多功能細胞並將其集結。

令人意外地，本發明的多功能體細胞可在飢餓狀態下產生。本發明的其他特色與優點將會在以下的實施方式和申請專利範圍中呈現。

【實施方式】

本發明係有關於培養的動物體細胞。這些細胞是多功

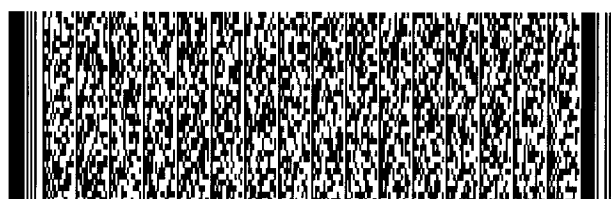
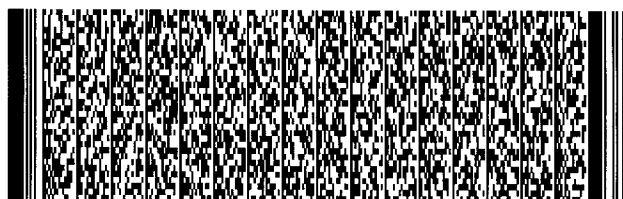


五、發明說明 (4)

能的，因為當它們在體外被誘發時會發育成胚胎體，或者當它們被引入SCID小鼠，則會發育成畸胎瘤。該細胞擁有正常細胞所具備的所有染色體(chromosomes)，並且無顯著的改變。換句話說，它們具有正常的核型。

該細胞具備未分化之胚胎幹細胞的表型(phenotypes)特徵。舉例來說，它們在培養基中會自然地形成平坦的球狀集群(flattened spheroid colonies)，在未分化之胚胎幹細胞的培養物中發現相似的集群。(參見Thomson J. et al., Science, 282:1145-1147, 1998.)。該細胞也可顯示出未分化之胚胎幹細胞的抗原特性，例如：未表現專一階段胚胎抗原(SSEA)-1，但表現出SSEA-3，SSEA-4，TRA-1-60，TRA-1-81，和Oct-4。Oct是轉錄因子(transcription factors)的一員，對於多功能細胞的發育有決定性的影響。Oct-4專一地表現在哺乳動物的生殖細胞系(germ line)細胞和幹細胞，並且對於維持細胞的多功能性是必要的。(參見Nichols J. et al., Cell, 95:379-391, 1998)。

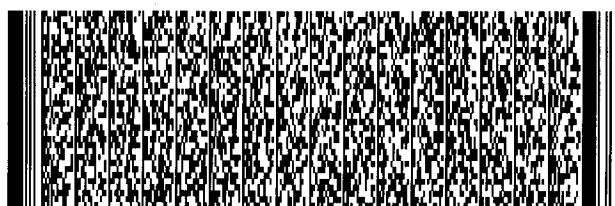
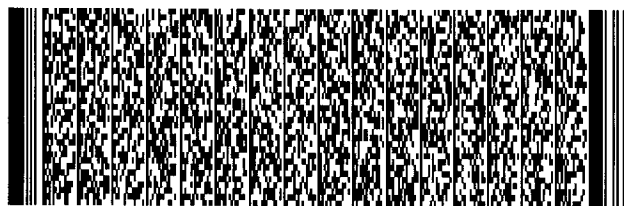
該細胞也可具有高度的端粒酵素(telomerase)活性。端粒酵素是一種核糖核蛋白(ribonucleoprotein)，在細胞複製期間，會增加端粒重覆(telomere repeats)至染色體末端，藉此維持端粒與染色體的長度。在生殖細胞系細胞、幹細胞、和胚胎組織中已經發現端粒酵素的高度表現，但在體細胞中則未發現。因此，在每一次細胞分裂之



五、發明說明 (5)

後，體細胞中的端粒(和染色體)會變得較短。最後，經過有限的生命週期 (life span)，由於失去染色體的去氧核糖核酸 (DNA)，體細胞便進入衰老期。由於回復的端粒酵素表現延長了體細胞的生命週期，本發明之細胞顯現的高度端粒酵素活性暗示其生命週期與幹細胞相當。

本發明的多功能細胞可經由下列步驟產生：自動物組織分離出體細胞，在飢餓狀態下培養此分離的細胞，以及鑑定和集結培養的細胞。該多功能細胞可從間葉 (mesenchymal) 幹細胞製得，而此間葉幹細胞則是利用下述實施例2的方法或習知技術中類似的方法，從臍帶血，骨髓，羊水，脂肪組織，胎盤，或週邊血液細胞等部位分離出來。使用的方法可參考以下著作：Erices A. et al., British J. Haematol., 109:235-242, 2000, Pittenger M. et al., Science, 284:143-147, 1999, Safford K. et al., Biochem. Biophys. Research Comm., 294:371-379, 2002, 和 Erickson G. et al., Biochem. Biophys. Research Comm., 290:763-769, 2002。將間葉幹細胞培養在含有10-20% 幹細胞篩選的 (ES-screened) 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和鹼性成纖維細胞生長因子之甲型修飾的最低基本培養基 (alpha-modified MEM) 中，或上述的飢餓狀態中。在飢餓狀態下將間葉幹細胞轉變成多功能細胞不需要細胞融合，也不需要細胞核轉移 (nucleus transferring)。經過飢餓過程之後，根據細胞的形態學 (例如：細胞大小和

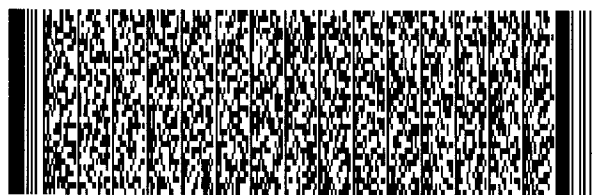


五、發明說明 (6)

形狀)，酵素的活性 (enzymatic activity) (例如：鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 和端粒酵素)，和表面標誌 (例如：SSEA-1 陰性，SSEA-3 陽性，和SSEA-4 陽性)，可鑑定出多功能體細胞。被鑑定的細胞則利用習知技術中任何適當的細胞分離技術集結起來。例如：當細胞傾向於形成群集，則可利用微量吸管 (micropipette) 在顯微鏡下直接取出群集。如果要更快速地取得大量的細胞，則可利用螢光活化細胞分選系統 (fluorescence-activated cell sorting, FACS)，例如：利用與不同螢光標記接合的抗階段特異性胚胎抗原-3 單株抗體，抗階段特異性胚胎抗原-4 單株抗體和抗階段特異性胚胎抗原-1 單株抗體，就可集結階段特異性胚胎抗原-3 陽性，階段特異性胚胎抗原-4 陽性，和階段特異性胚胎抗原-1 陰性細胞。這些細胞將可更進一步地被檢視其多功能性。

我們可利用任何適當的方法來檢測該細胞的多功能性，例如：利用以下實施例5所描述的體內畸胎瘤形成測定 (in vivo teratoma-forming assay)。由於畸胎瘤包含所有三種胚胎初發層的衍生物，所以當一細胞有能力形成畸胎瘤時，即表示該細胞是多功能的。另外，我們也可使用以下實施例6描述的體外胚胎體形成測定 (in vitro embryoid body-forming assay)。胚胎體的形成即表示該細胞是多功能的。

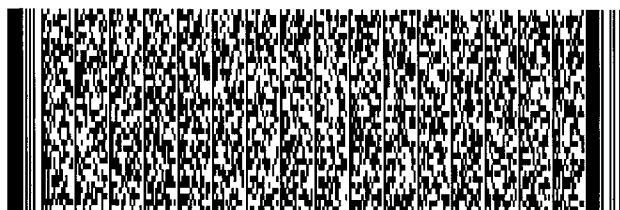
本發明的細胞可多方面地被應用。該細胞可用以治療



五、發明說明 (7)

退化或遺傳性疾病，避免人體胚胎操縱的道德考量。如此一來，我們可從一個缺少對於組織或器官發展必要之作用基因 (functional gene) 的病患身上分離出間葉幹細胞。產生多功能細胞之後，便可引入編碼有該基因之功能性版本之表現核酸載體至該細胞中。此載體可透過不同的技術傳入細胞，包括：磷酸鈣共沉澱法 (calcium phosphate co-precipitation)，二乙氨乙基-葡聚糖-介導轉染 (DEAE-dextran-mediated transfection)，微脂粒感染 (lipofection)，電穿孔法 (electroporation)，顯微微量注射法 (microinjection)，或病毒介導技術 (virus-mediated techniques)。必須選擇不影響細胞多功能性的方法。有關此類技術的描述可參考以下專利，例如：美國專利申請書第 5,591,625 號和美國專利申請書第 20020127715 號。在傳送作用基因進入細胞之後，可利用習知技術將細胞移植回病人身上。由於該細胞是由病人產生，因此不會引起免疫排斥 (immune rejection)。在適當的情況下，該移植的細胞可發育成功能性的組織或器官。為了促進其發育，可對病人施與因子 (factors) 以誘導細胞的發育。此類因子可以是小分子化合物，胜肽 (peptides)，和核酸。其例子包括轉化生長因子 β (transforming growth factor β)，促進骨生成之蛋白質 (bone morphogenic proteins)，和神經生長因子 (nerve growth factor)，但不僅限於此。

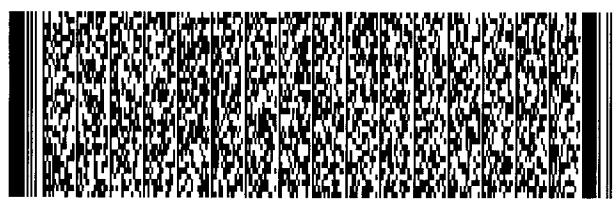
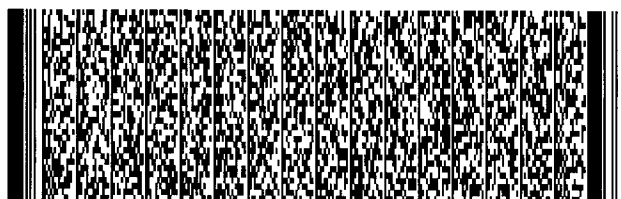
本發明的細胞也可用以研究胚胎發育或分化的機制。



五、發明說明 (8)

我們可將此類細胞視為模式系統 (model system)，而鑑定誘導多功能細胞發育成特定組織或器官的狀態。此外，我們可利用先前描述 (例如：Shen M. et al., Development, 124:429-42, 1997) 之分化的互補核酸篩選 (differential cDNA screening) 來分離胚胎發育期間扮演重要角色的基因。我們可從被誘導發育成如上述之胚胎體的多功能細胞中，準備互補核酸殖系基因庫 (cDNA library)。該基因庫被覆蓋在兩組複製過濾板 (replica filters) 之間，一組過濾板 (A組) 利用未誘發細胞製得的互補核酸篩選，另一組 (B組) 利用相當數量之誘發細胞製得的互補核酸篩選。利用習知技術，用以篩選此基因庫的互補核酸可以被標記和顯現。然後可以從該基因庫中選擇在B組表現出較強 (相較於A組) 雜交訊號的互補核酸轉殖株 (cDNA clones)。這些互補核酸將誘發細胞中過度表現的基因譯成密碼。反之亦然，在未誘發之多功能細胞中過度表現的基因可被分離出來。同樣地，在上述的飢餓過程之前或之後，也可以分離細胞中過度表現的基因。而更進一步地研究所有這些分離的基因則可定義其個別過程之規則。

從非人類動物產生的多功能細胞可利用如 Campbell K. et al., Nature, 380:64-66, 1996. 文章中所描述的方法，發展成動物的器官或轉殖株。因此，這些細胞對於寵物或家畜產業有極大的價值，並且可用以保護瀕臨絕種的動物。



五、發明說明 (9)

本發明已有一些實施例被詳加描述，然而，在不違背本發明的精神和範圍之下，可對該發明作各種修飾。此外，其他實施例也包含在下列的申請專利範圍之內。

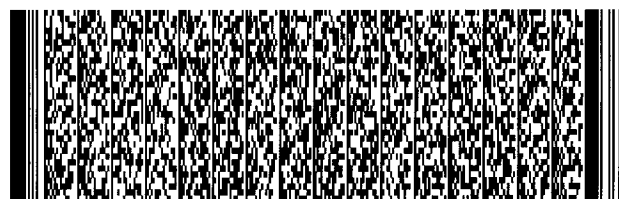
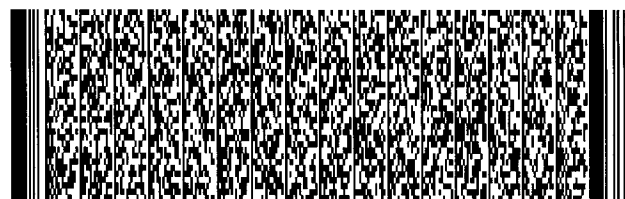
下列特定的實施例僅用以說明本發明，但並非用以限制本發明之揭露。若沒有更進一步的詳述，一般相信熟悉此技藝人士，在以該描述為基礎的情況下，能全然利用本發明。所有在此引用的出版品全部併入參考文獻。

實施例1

利用免疫細胞化學染色 (Immunocytochemistry staining) 檢查細胞標誌。

將胚胎幹細胞表面標誌染色之前，必須於20°C使用4%聚甲醛(paraformaldehyde)將細胞固定10分鐘。將細胞骨架蛋白(cytoskeletal proteins)染色之前，必須於-20°C使用甲醇將細胞固定2分鐘，並且以0.1%非離子性界面活性劑Triton X-100將其穿孔化。將其他細胞內分子染色之前，必須於20°C使用4%聚甲醛將細胞固定10分鐘，並且以0.1% Triton X-100將其穿孔化。

將固定的細胞在一阻斷溶液(blocking solution)中置放30分鐘，此阻斷溶液與培養初始抗體者相同，其中包含了磷酸鹽緩衝液生理食鹽水(phosphate-buffered saline, PBS)，1%胎牛血清(BSA)，和1%血清(Sigma, St. Louis, MO)。然後該細胞被連續培養60分鐘，每一個伴隨初始抗體的細胞在阻斷溶液，生物素化抗小鼠第二抗體(biotinylated anti-mouse secondary antibody)，



五、發明說明 (10)

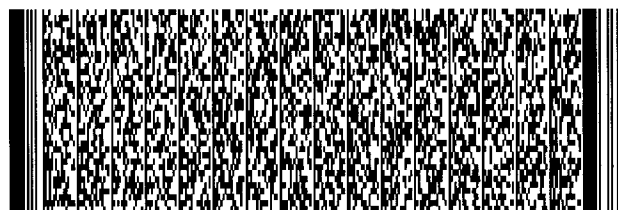
及鍊酶親和素偶聯的馬蘿蔔過氧化物酵素 (streptavidin-conjugated horseradish peroxidase) 當中會被適當地稀釋。在每一個步驟之間都以含有3% 胎牛血清的磷酸鹽緩衝液生理食鹽水沖洗10分鐘。當細胞以二氨基聯苯胺呈色劑 (diaminobenzidine chromagen) (Vector Laboratories Inc., CA) 培養時，馬蘿蔔過氧化物酵素活性即會顯現。經過此顯現作用之後，便可在顯微鏡之下檢視該細胞並將其攝影記錄。

實施例2

自骨髓和臍帶血分離出間葉幹細胞。

人體骨髓自Bio Whittaker公司 (Walkersville, MD) 購得，臍帶血在供應個體同意下取得。為了分離間葉幹細胞，使用Ficol-paque (d=1.077 g/ml, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 密度梯度法 (詳述請參考: Erices A. et al., British J. Haematol., 109:235-242, 2000 或Pittenger M. et al., Science, 284:143-147, 1999) 自人體骨髓或臍帶血中準備單核細胞。

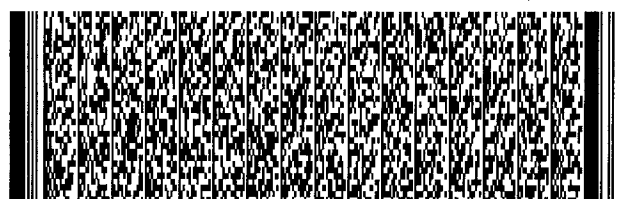
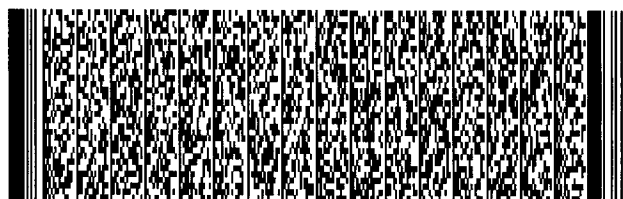
將分離的單核細胞引入組織培養皿中，使其濃度約為 1×10^6 個細胞 / 每平方公分，該培養皿中含有一般介質，帶有20% 幹細胞篩選用胎牛血清 (ES cell-screened FBS) (Hyclone, Logan, UT) 的甲型修飾最低基本培養基 (alpha-modified minimum essential medium, MEM)，4 ng/ml 鹼性成纖維細胞生長因子，100 U/ml 盤尼西林和100



五、發明說明 (11)

$\mu\text{g/ml}$ 硫酸鍊黴素 (streptomycin) (Invitrogen, Carlsbad, CA)。培養兩個禮拜之後，許多細胞黏附在培養皿上，這些形態上相同的細胞會以兩倍的時間（約32至36小時）自我更新。

這些黏附的細胞再進一步地以上述之免疫細胞化學染色檢視其特徵。對抗CD34和CD45 (heamatopoeitic 系 (heamatopoeitic lineage) 的細胞表面抗原) 的抗體是從Bacton Dickinson公司 (Mountain View, CA) 購得。染色的結果顯示細胞對於CD34和CD4呈陰性的反應，表示該細胞不屬於造血系。此外，根據已知的方法（詳述請參考Pittenger M. et al., Science, 284:143-147, 1999），使用適當的培養基，可使細胞被誘發分化成骨細胞 (osteocytes)、軟骨細胞 (chondrocytes) 和脂肪細胞 (adipocytes)。分化的骨細胞利用鈣結節染色法 (von Kossa) 分析；分化的軟骨細胞利用沙黃O (Safranin O) 染色；脂肪細胞利用油紅O (Oil Red O) 染色。上述的方法可參考Colter D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:7841-7845, 2001。這些結果指出分離的細胞是間葉幹細胞 (Prockop D. et al., Nature, 276:71-74, 1997.)。但是，由於這些細胞在被引入SCID小鼠後，無法發育成畸胎瘤，或者當其被誘發時，無法發育成胚胎體，因此其發育潛能是有限的。參見以下的實施例5和實施例6。

實施例3

五、發明說明 (12)

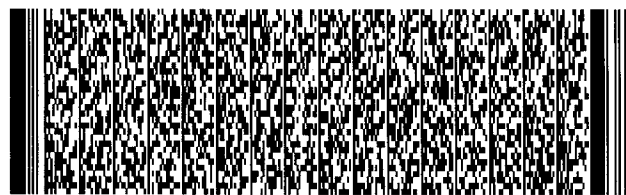
上述之分離的間葉幹細胞在飢餓狀態下培養以產生多功能細胞。

將間葉幹細胞培養在實施例2所描述的一般培養基中3至5個繼代(passages)。然後，將該細胞置於含有0.5%胎牛血清但缺乏鹼性成纖維細胞生長因子的甲型修飾最低基本培養基(飢餓培養基)中5至7天；或選擇將細胞培養在一般培養基中兩星期而不更換培養基。在上述的飢餓過程中，以顯微鏡每日觀察細胞，並未發現細胞融合的現象。在飢餓過程末期，培養物中出現球狀、平坦的群集。使用微量吸管挑出每一個群集，並且將未分化狀態之群集培養於小鼠飼養細胞(feeder cells)(例如：施予絲裂黴素之小鼠胎兒成纖維細胞(mitomycin-treated mouse STO cells)(ATCC CRL-1503))或小鼠胚胎的纖維母細胞(fibroblast cells)上，而其培養基為含有20%幹細胞篩選的胎牛血清、4 ng/ml 鹼性成纖維細胞生長因子和0.1 毫摩爾二巰基乙醇(2-mercaptoethanol)的IMDM培養基(Iscove's modified Dulbecco's medium)。從每一個群集挑出的細胞可維持在未分化狀態，並且持續增生超過四個月(或超過15個繼代)。

實施例4

檢視從群集中取得之細胞的形態學、細胞標誌表現、酵素活性和核型。

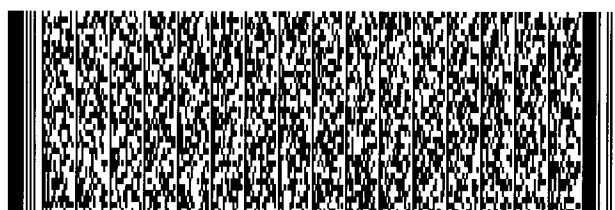
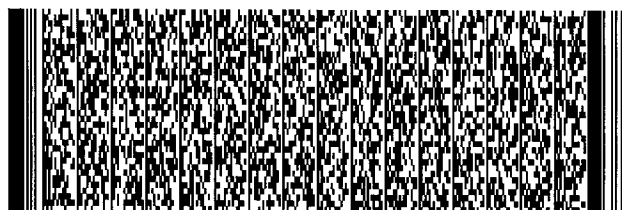
在光學顯微鏡或掃描式電子顯微鏡(scanning electron microscope)下檢視細胞。若以掃描式電子顯微



五、發明說明 (13)

鏡檢視，則需施行以下步驟：將細胞培養在再生用聚酯薄膜 (Melinex film) 上，再以2% 四氧化鐵 (Osmium tetroxide (w/v)) 固定之，然後在4°C 下置放於pH 7.4 的磷酸鹽緩衝液中16小時，最後經由分級的乙醇系列 (graded ethanol series) 脫水。在使用液體二氧化碳 (liquid carbon dioxide) 和以鉻濺射鍍膜 (sputter coating with chromium) 的臨界點乾燥法 (critical-point drying) 之後，以Leo 982 (LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Germany) 掃描式電子顯微鏡檢視細胞，其電場發射設定為2千伏特 (kV) (見 Bozzola J. et al., 1992.)。掃描式電子顯微鏡的樣品準備方法參照：Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists. pp. 40-62. Jones and Bartlett Publishers, Boston。如同Thomson J. et al., Science, 282:1145-1147, 1998 文章中所述，顯微照相的結果顯示該細胞的形態與未分化的幹細胞相似。

同時，也以上述的免疫細胞化學染色顯示該細胞的特徵。自愛荷華大學的Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa city, IA) 取得對抗階段特異性胚胎抗原-1 (MC-480, 1:50)，階段特異性胚胎抗原-3 (MC-631, 1:50)，和階段特異性胚胎抗原-4 (MC-813-70, 1:50) 的抗體。自Santa Cruz Biotechnology公司 (Santa Cruz, CA) 取得抗腫瘤排斥抗原-1-60 (anti-TRA-1-60) 和抗腫瘤排斥抗原-1-81 (anti-TRA-1-81) 抗體。結果顯示該細



五、發明說明 (14)

胞對於階段特異性胚胎抗原-1為陰性反應，而對階段特異性胚胎抗原-3、階段特異性胚胎抗原-4、抗腫瘤排斥抗原-1-60和抗腫瘤排斥抗原-1-81為陽性反應。如同 Reubinoff B. et al., Nature Biotechnol., 18:399-404, 2000. 文章中所述，轉錄因子Oct-4的表現也能藉由反轉錄聚合酵素連鎖反應 (reverse transcription-PCR) 而偵測到。

利用Sigma 86-R套組 (Sigma 86-R kit) (Sigma, St. Louis, MO) 可偵測到細胞的鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase) 活性，該細胞展現高度的鹼性磷酸酵素活性。同時，利用TRAPaze ELSIA端粒酵素檢測也可偵測該細胞的端粒酵素活性 (參考: Kim N. et al., Science, 266:2011-2015, 1994.)，其結果顯示該細胞具有高度的端粒酵素活性。

使用已知的方法 (參考: ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (F. Mitelman, ed.) Karger, Basel (1995)) 確定該細胞的核型。簡而言之，在取出該細胞之前，細胞以1:4稀釋度次培養 (subcultured) 12小時。將該細胞收集在胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (trypsin-EDTA) 中，並在秋水仙素 (colcemid) 中培養1.5小時，然後以低張的氯化鉀 (KCl) 溶解，再以酸或醇固定。利用已知的方法 (見 Freshney, R in "Culture of animal cells—A manual of basic technique" 3rd edition. A John Wiley &



五、發明說明 (15)

Sons, Inc. New York (1994), pp 205-209) 可分析細胞的中期(metaphases)。其結果顯示該細胞具有人類所有的46個染色體，與正常的人類染色體相較之下並無顯著差異。

實施例5

為了測試實施例3中細胞的多功能性，需進行畸胎瘤形成測定(teratoma-forming assay)。

將大約 1×10^5 個細胞植入SCID小鼠的後腿肌肉組織，在植入後6-8週觀察到畸胎瘤。取出畸胎瘤並進行組織檢查(檢查方法參照Thomson J. et al., Science, 282:1145-1147, 1998)。所有檢查的腫瘤都包含從三種胚胎初發層衍生的組織，包括：發育中的胃腸道(gastrointestinal tract)(內胚層)；軟骨、骨(bone)和橫紋肌(中胚層)；和角膜晶體、斷裂的角蛋白(fragmented keratin)和發育中的表皮(外胚層)。實施例2為對照組，該組的間葉幹細胞未在SCID小鼠身上發育成畸胎瘤。

實施例6

以胚胎體形成測定(embryoid body-forming assay)測試實施例3細胞的多功能性。

將該細胞培養在非鍍膜的細菌培養皿(non-coated bacteriologic Petri dishes)中4至6天，該細胞數增加並在懸浮液中形成球狀體(胚胎體)。將胚胎體轉移至塗佈0.1%明膠(gelatin)的室載玻片



五、發明說明 (16)

(chamber-slides)。經過一星期的培養，有許多叢集 (clusters) 自球狀體產生。而在超過12小時的時間中，每一叢集都呈現每一循環5-7秒之規律的收縮與舒張，而此機械的活動與從幹細胞發育而來的似腸道器官 (gut-like organ) (原生腸道) 類似 (參考Yamada T. et al., Stem Cells, 20:41-49, 2002.)。相對地，當間葉幹細胞在同樣的狀態下被誘發，並不會發育成胚胎體。

【其他實施方式】

所有在本專利說明書中所揭露的特色可以任何方式結合，每一個在此專利說明書中所揭露的特色可以另一個提供相同、相等或相似目的之特色所取代。因此，除非特別聲明，否則每一個揭露的特色只是一般相等或相似特色的實施例。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。



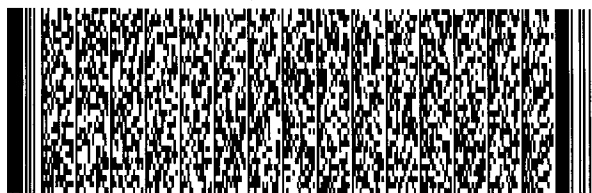
圖式簡單說明

四、中文發明摘要 (發明名稱：多功能體細胞)

本發明揭露一種具有正常核型之培養的動物體細胞；當該細胞在體外被誘發時會發育成胚胎體，當其被引入嚴重聯合免疫缺陷病的小鼠，則會發育成畸胎瘤。本發明也揭露製造該細胞的方法。

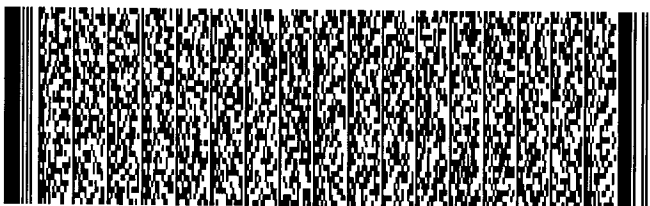
陸、英文發明摘要 (發明名稱：SOMATIC PLURIPOTENT CELLS)

The present invention discloses a cultured somatic animal cell having a normal karyotype; the cell develops into an embryoid body when induced in vitro, or develops into a teratoma when introduced into a SCID mouse. Also disclosed is a method of producing such a cell.



六、申請專利範圍

1. 一種產生多功能動物細胞的方法，該方法包含：
自動物之組織分離出間葉幹細胞；
在飢餓狀態下培養此分離的細胞；以及
在培養的細胞當中鑑定和集結多功能細胞；
其中，當該多功能細胞引入嚴重聯合免疫缺陷症(SCID)小鼠，該細胞會發育成畸胎瘤；
該多功能細胞為階段特異性胚胎抗原-1陰性；以及
該培養步驟為：將細胞置放在含有0.5%到2%血清的培養基中5至10天，或置放在含有10%到20%血清的培養基中7至21天而不更換培養基。
2. 如申請專利範圍第1項所述之產生多功能動物細胞的方法，其中該動物為一哺乳動物。
3. 如申請專利範圍第2項所述之產生多功能動物細胞的方法，其中該哺乳動物為人類。
4. 如申請專利範圍第2項所述之產生多功能動物細胞的方法，其中該組織為臍帶血、骨髓、羊水、脂肪組織、胎盤或週邊血液。
5. 如申請專利範圍第1項所述之產生多功能動物細胞的方法，其中培養步驟為：將細胞置放在含有0.5%血清的培養基中5至7天，或置放在含有20%血清的培養基中兩星期而不更換培養基。
6. 如申請專利範圍第4項所述之產生多功能動物細胞的方法，其中培養步驟為：將細胞置放在含有0.5%血清的培養基中5至7天，或置放在含有20%血清的培養基中兩星



六、申請專利範圍

期而不更換培養基。

