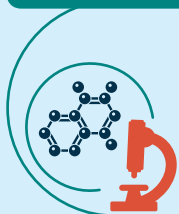




運用生物技術發展，農業產業創新加值



## 豬誘導多能性幹細胞， 治療骨質疏鬆症

楊鎮榮<sup>1</sup>

### 壹、前言

聯合國訂定 65 歲以上老年人口占總人口的比例達 7% 時，即稱為「老

齡化社會」。根據我國內政部統計，民國 89 年時臺灣 65 歲以上的老年人口即占總人口的 8.6%，已超過 7% 標準，成為名副其實的「老齡化社會」。

| 註 1：行政院農業委員會畜產試驗所。

到了民國 93 年，社會老齡化有日趨嚴重的現象，65 歲以上的老年人口所占比例已大幅攀升到 9.4%。研究顯示，骨質疏鬆症（osteoporosis）為一種常見於老齡化社會的退化性疾病，尤其以女性族群居多，因為女性賀爾蒙中的雌激素可抑制骨質流失，然而停經後雌激素分泌量銳減，骨質回流於血液的現象增加導致骨質流失。因此女性發生骨質疏鬆症之機率為男性 4 ~ 5 倍，超過 45 歲的女性有一半患有骨質疏鬆症，50 歲以上男性也有十二分之一的患病機率。骨質疏鬆症所引起駝背、腰痠與背痛等症狀，嚴重時造成骨折，導致行動障礙甚至死亡，影響生活品質且成了全民健康保險的重大負擔。

行政院農業委員會畜產試驗所（簡稱畜試所）幹細胞研發團隊，多年戮力於移植豬胚幹細胞於人類疾病模式動物之治療與應用，已成功進行大鼠與豬之帕金森氏症、脊髓損傷與牙周炎等動物模式之移植治

療，獲得極佳療效。本篇報導針對利用蘭嶼豬為試驗動物，經外科手術卵巢摘除、低鈣飼糧與去氫皮質醇（prednisolone）餵飼誘發骨質疏鬆症後，再移植豬誘導多能性幹細胞進行治療，期對於骨質疏鬆症與幹細胞療法研究，提供做為骨質疏鬆症疾病治療之應用參考。

## 貳、蘭嶼豬為骨質疏鬆症之模式動物

畜試所臺東種畜繁殖場自行繁殖並通過「國際實驗動物管理評鑑及認證協會」（AAALAC）認證之蘭嶼豬，為研究人類疾病模式之最佳實驗動物。本研究以蘭嶼豬為骨質疏鬆症模式動物，並通過「實驗動物照護及使用小組」核准動物實驗申請（畜試動字 105-3 號），利用外科手術摘除卵巢後，模擬停經婦女卵巢失去生理功能之狀態，再餵飼 0.5% 低鈣飼糧（飼糧配方如表 1），並且依據每公斤體重添加 1 毫克去氫皮質醇之比

表 1. 蘭嶼豬骨質疏鬆症之正常飼糧與低鈣飼糧配方

原料	正常飼糧配方（1% 鈣）	低鈣飼糧配方（0.5% 鈣）
玉米粉	743	759
大豆粕	225	225
二磷酸鈣	10	0
碳酸鈣	15	9
鹽	5	5
豬維生素預混物	1	1
豬礦物質預混物	1	1
總計	1,000	1,000

例，先行充填於膠囊再混入飼糧中，餵飼 1 年以誘發蘭嶼豬骨質疏鬆症疾病模式。

經過 1 年餵飼誘發骨質疏鬆症後，骨質疏鬆症蘭嶼豬的體重明顯低於對照組，並且在第 8 個月時，體重變化即無明顯增加，生長漸趨緩慢（圖 1）。犧牲部分骨質疏鬆症蘭嶼豬，採集左肢脛骨進行骨質密度分析，發現骨質疏鬆症蘭嶼豬之骨小樑厚度顯著減少（圖 2）。

利用隨動液壓測試系統（MTS Bionix® Servohydraulic Test System）以三點測試方式，檢測脛骨可承受之骨斷裂剪應力，以瞭解脛骨硬度。結果顯示，骨質疏鬆症蘭嶼豬之脛骨可承受力量較對照組小（圖 3）。最後，脛骨粉碎研磨後測定灰分、鈣與磷等礦物含量，結果骨質疏鬆症蘭嶼豬之礦物含量皆較對照組低（圖 4）。結果顯示，此實驗設計已成功誘發蘭嶼豬骨質疏鬆症疾病模式。

圖 2. 骨質疏鬆症誘導後之骨小樑厚度變化。骨質疏鬆症蘭嶼豬之骨小樑厚度明顯低於對照組。

### 參、豬誘導多能性幹細胞誘導成骨細胞分化

將未分化之豬誘導多能性幹細胞以細拉之玻璃針挑起後，先分離成單一細胞，再以成骨細胞誘導液進行誘導分化。誘導初期，細胞形態為卵圓狀，但誘發 4 周後，細胞形成明顯伸長之偽足特徵，呈現成骨細胞細長型結構之形態（圖 5）

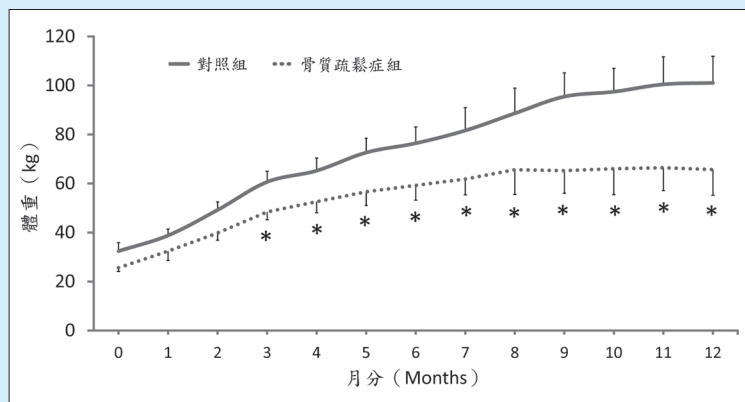


圖 1. 蘭嶼豬於試驗期間的體重變化。骨質疏鬆症蘭嶼豬於試驗期間的體重明顯低於對照組。

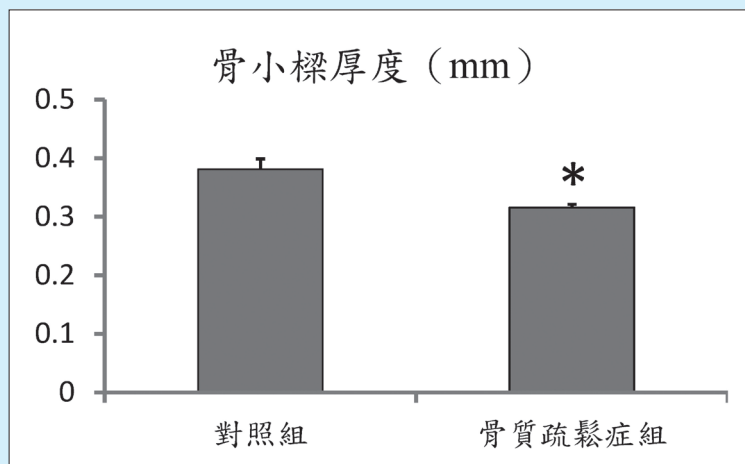


圖 2. 骨質疏鬆症誘導後之骨小樑厚度變化。骨質疏鬆症蘭嶼豬之骨小樑厚度明顯低於對照組。

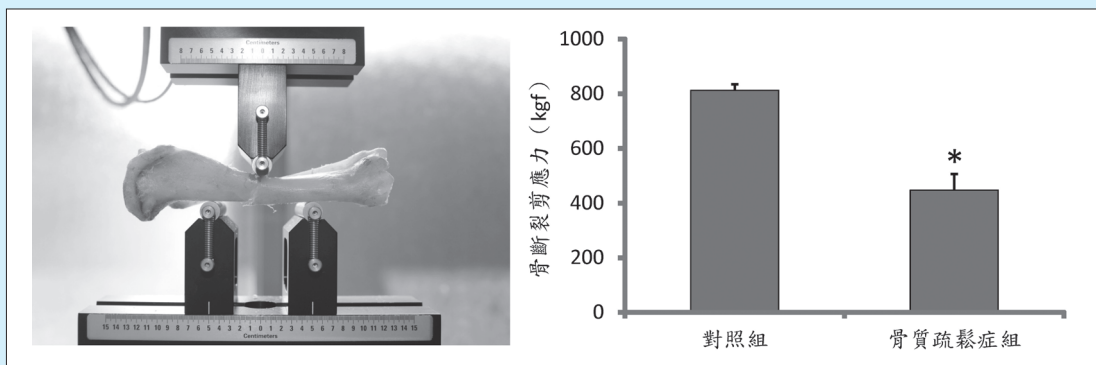


圖 3. 骨質疏鬆症誘導後之骨斷裂剪應力變化。利用隨動液壓測試系統以三點測試方式檢測脛骨可承受之骨斷裂剪應力，結果顯示骨質疏鬆症蘭嶼豬之脛骨可承受的骨斷裂剪應力明顯低於對照組。

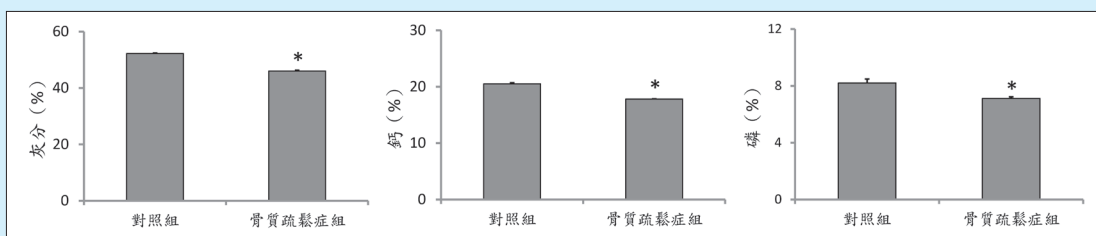


圖 4. 骨質疏鬆症誘導後之骨礦物質變化。骨質疏鬆症蘭嶼豬之脛骨灰分、鈣與磷等礦物質含量明顯低於對照組。

#### 肆、豬誘導多能性幹細胞移植試驗

具骨質疏鬆症之蘭嶼豬於第 13 個月時，開始進行豬誘導多能性幹細胞移植試驗。移植前蘭嶼豬隻先禁食 12 小時，豬隻左肢脛骨上方剃毛消毒後，以解剖刀劃開表皮與肌肉層，再以高速鑽孔機將脛骨鑽洞以暴露出移植孔（圖 6A），從移植孔將成骨細胞移植於脛骨骨髓腔中（圖 6B），每頭骨質疏鬆症蘭嶼豬移植 1 百萬顆細胞。脛骨之移植孔以骨臘封口，再以縫線將傷口縫合。移植後 6 個月犧牲蘭嶼豬，進行四肢腿骨之取樣做為骨質密度、骨頭斷裂剪應力，以及灰分、鈣與磷等礦物質含量測定。



圖 5. 豬誘導多能性幹細胞經定向誘導分化之成骨細胞呈現細長型結構。



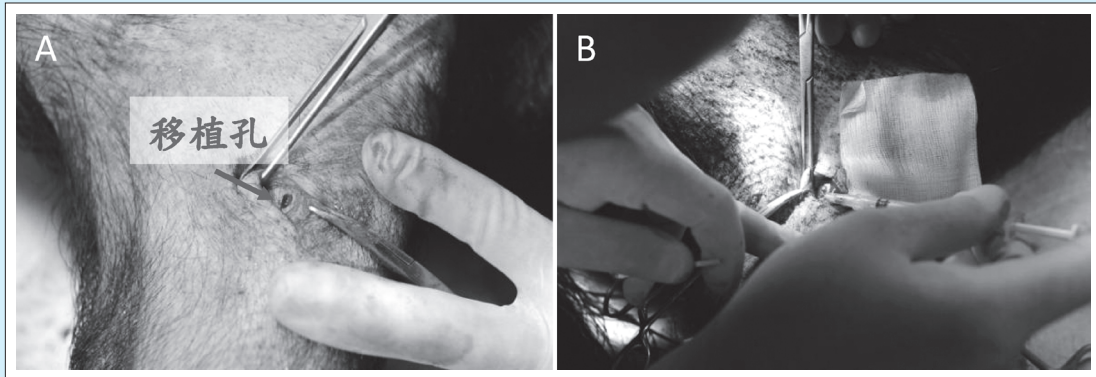


圖 6. 豬誘導多能性幹細胞誘導分化之成骨細胞移植於蘭嶼豬左肢脛骨骨髓腔。(A) 以高速鑽孔機將脛骨鑽洞；(B) 從移植孔將成骨細胞移植於脛骨骨髓腔中。

## 伍、移植後之骨質密度評估

### 一、骨質密度測定

採集蘭嶼豬之左肢脛骨，經去筋去肉之後浸泡於 95% 酒精 2 天，以微電腦斷層掃描 (micro-CT) 儀器分析骨質相關指標變化。結果顯示，移植處骨頭有明顯之硬塊隆起 (圖 7)，且骨質疏鬆症蘭嶼豬左肢脛骨之骨體積百分比、骨小樑厚度與骨小樑數目，與未接受幹細胞移植之右肢脛骨比較，皆呈現顯著增加 (圖 8)。

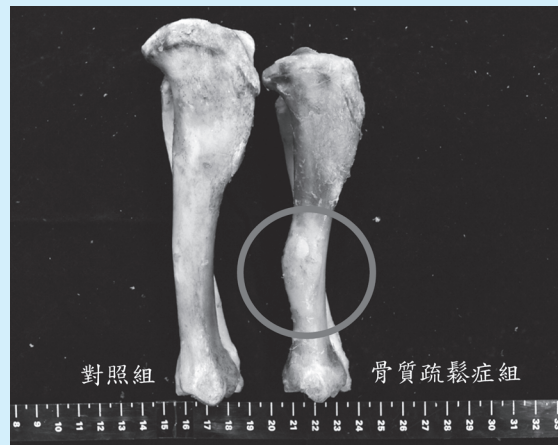


圖 7. 豬誘導多能性幹細胞移植於骨質疏鬆症蘭嶼豬可促進骨質新生作用。左肢脛骨處有明顯之硬塊隆起 (圓圈處)。

### 二、骨斷裂剪應力之臨界破壞值分析

骨質疏鬆症蘭嶼豬之左肢脛骨，利用隨動液壓測試系統以三點測試方式分析脛骨可承受多大之軸向力，以瞭解移植後骨斷裂剪應力之臨界破壞值大小。分析結果顯示，骨質疏鬆症蘭嶼豬之左肢脛骨經幹細胞移植後，骨斷裂剪應力臨界破壞值較低，顯示

可承受之力量仍較小 (圖 9)。

### 三、骨質灰分、鈣和磷含量測定

骨質疏鬆症蘭嶼豬左肢脛骨粉碎研磨後測定灰分、鈣與磷之含量。結果顯示，左肢脛骨經幹細胞移植後其骨質灰分、鈣與磷等礦物質含量仍低於對照組 (圖 10)。

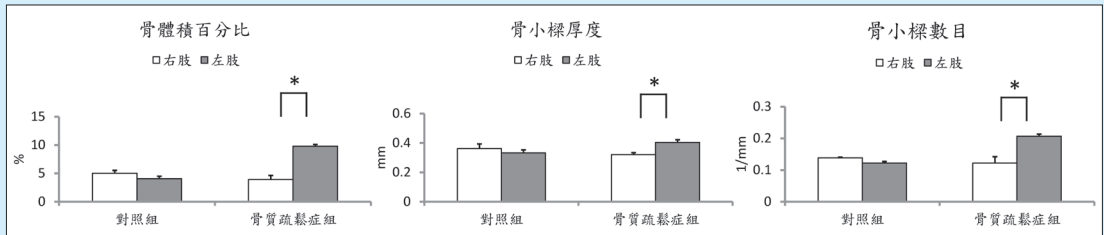


圖 8. 豬誘導多能性幹細胞移植後之骨小樑結構變化。骨質疏鬆症蘭嶼豬左肢脛骨移植後之骨體積百分比、骨小樑厚度與骨小樑數目皆呈現顯著增加。

## 陸、結論與建議

本研究利用蘭嶼豬為骨質疏鬆症模式動物，經摘除卵巢、0.5% 低鈣飼糧與去氫皮質醇餵飼 1 年後，成功誘發蘭嶼豬骨質疏鬆症疾病模式。再以豬誘導多能性幹細胞定向誘導分化之成骨細胞進行移植治療。移植後，骨質疏鬆症蘭嶼豬左肢脛骨之骨體積百分比、骨小樑厚度與骨小樑數目皆增加；然而，移植後之脛骨骨斷裂剪應力，以及灰分、鈣與磷等礦物質含量改善效果有限，探究可能需待骨質疏鬆症所引發的生理變化減緩後，再進行幹細胞移植始能全發揮幹細胞治療效果。本研究結果已發表於國際學術期刊《公共科學圖書館》(PLoS

ONE 2018. 13(8): e0202155)，並且以「豬胚幹細胞於人類疾病模式之應用與治療——骨質疏鬆症疾病模式」之主題，獲得財團法人生技醫療科技政策研究中心所主辦之「國家新創獎 2019 年度續獎」殊榮，為建立蘭嶼豬骨質疏鬆症模式及臨床前治療應用，提供極有價值的參考。

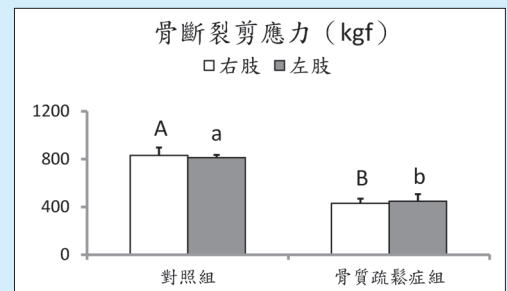


圖 9. 豬誘導多能性幹細胞移植後之骨斷裂剪應力變化。骨質疏鬆症蘭嶼豬左肢脛骨移植後之骨斷裂剪應力表現仍低於對照組。

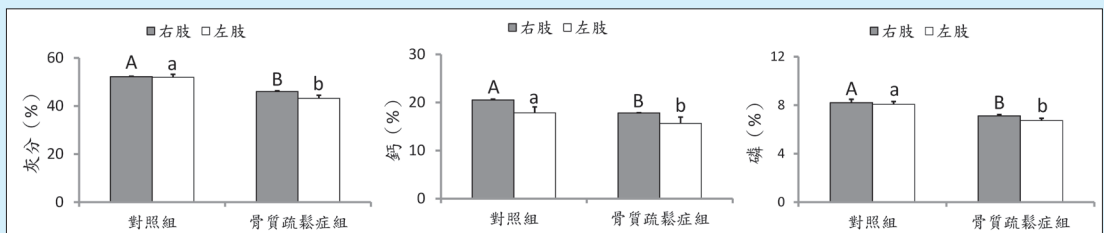


圖 10. 豬誘導多能性幹細胞移植後之骨礦物質變化。骨質疏鬆症蘭嶼豬左肢脛骨移植後之灰分、鈣與磷含量等礦物質含量仍低於對照組。