



中空纖維生物反應器

讓你快速製成大量的 Exosomes

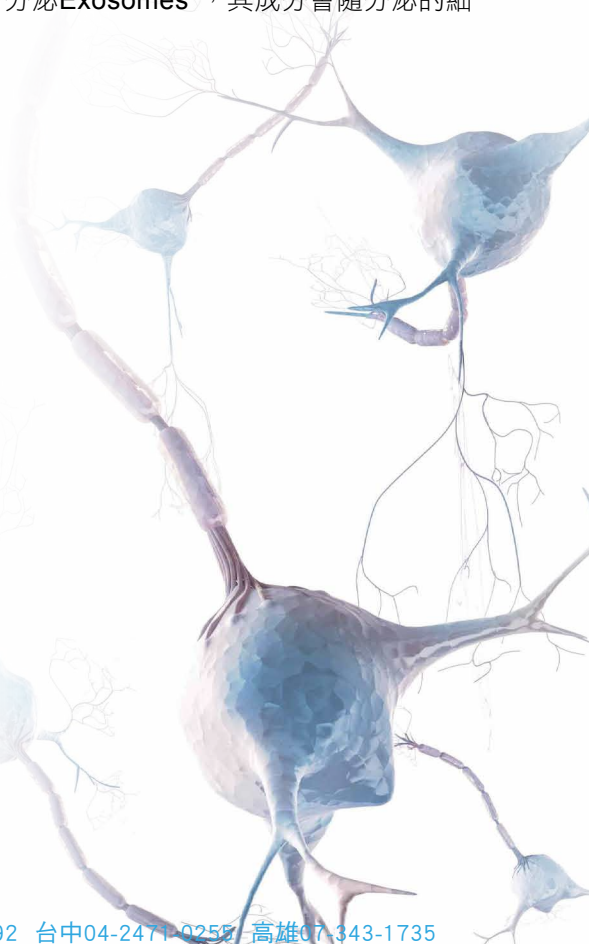
想解開 Exosomes 所攜帶的癌症密碼，卻收集不到足量的 Exosomes 做分析？

撰文：馮芝昕

還記得前年由荷蘭所主導的火星探索移民計畫嗎？這個計劃的目的是在火星建立永久居住地，因此需要派出先鋒部隊探索新的居住地。你知道其實人類體內的癌症細胞也有相同的機制嗎？癌症在體內要轉移到其他部位前也會派出「偵查部隊」到其他組織進行探查或環境整頓，而這些偵察部隊稱為「胞外泌體」(Exosomes，或稱外體小體)。

Exosomes (胞外泌體)是一種細胞進行胞吐作用分泌出的微小囊泡(vesicles)，由雙層脂膜(lipid bilayer)所組成，直徑大小約為30-100nm。Exosomes廣泛分布在體液中，如血液、尿液、淚液、唾液及脊髓液等，甚至羊水及腹水等處皆有其蹤跡。Exosomes內含複雜生物分子，包括醣類，胺基酸、脂質(lipids)、蛋白質(proteins)、調控細胞的核酸片段(mRNAs, miRNAs, DNAs等)和訊息因子等，由於幾乎所有細胞都會分泌Exosomes，其成分會隨分泌的細胞來源及狀態而有所不同。

目前許多研究顯示，這些Exosomes內的生物分子仍具有生物活性，因此認為Exosomes是一種細胞間的溝通方式，Exosomes可進入血液中進行長距離的運輸，來達到細胞組織間系統性溝通和訊息轉移的功能；在胎兒發育、組織再生及免疫調節等過程中，扮演重要的角色。且有別於細胞激素等生物分子直接溶於血液中，Exosomes提供保護性(protective)和高密度(enriched)地運送生物分子，更有效地傳遞訊息。其實生物學家早在三十多年前就已發現Exosomes的存在，但當時不了解其功能，認為是裝載細胞代謝廢物之囊泡；而近年隨著科學技術和檢測儀器的發展日新月異，研究人員才終於可從細部窺探Exosomes在體內的功能，有研究發現癌症細胞分泌Exosomes的量與疾病的進程有關，特別在癌症轉移時對於免疫發炎反應、前轉移微環境(pre-metastatic niche)、癌症轉移趨性(organotropism)等扮演關鍵性的角色。



甚麼是癌症轉移？癌症轉移又是如何發生的呢？

當癌細胞從原發器官經由血液或淋巴液侵犯到遠端器官的過程稱為癌症轉移(metastasis)。在癌細胞轉移之前會先派遣先鋒部隊---Exosomes到遠端器官，由Exosomes吸引骨髓來源細胞Bone marrow-derived cells (BMDC)，一種源於骨髓但在身體其他部位執行功能的細胞)聚集到遠端器官，由BMDC建立一個適合癌細胞生長的微環境(Microenvironment)，癌細胞才會從原發器官出發到遠端器官。

癌細胞是如何決定要轉移到哪裡呢？這要追溯到由Stephen Paget醫師在1889年所提出的「種子與土壤」理論。Paget醫師受到農作物生長過程啟發，雖然植物種子可被帶到任何地方，但只有遇到合適的土壤和環境才會萌芽茁壯；同理，癌細胞可能在轉移過程跑遍全身，但只有遇到適合的組織環境才會著床發展。Paget醫師也研究735例乳癌病患，發現多數病患癌細胞都是轉移至肝臟，而非距離較近且血液和養分都供應充足的脾臟。這證明癌細胞轉移的目的地不是由遠近及機率決定，而是由某種機制掌控。後來科學家研究腫瘤本體，陸續發現許多重要機制，其中多數科學家認為癌細胞可能由趨化激素(Chemokine；是由特定組織是放出來引導特定細胞前往該組織之物質)調控，來決定轉移目的地，例如當某組織感染並釋放趨化激素吸引免疫細胞，同樣有趨化激素受器的癌細胞便可被吸引。但此過程較為被動，後來研究發現癌細胞會主動分泌促進腫瘤發展之因子，促使周邊發展新生血管或釋放更多趨化激素等，這些因子對於轉移效率有關鍵影響，但單顆癌細胞應無法達到這樣的效果，這些結果讓癌細胞轉移之研究受到非常大的挫折。最近終於將此謎底揭曉，癌細胞會先將腫瘤發展因子藉由Exosomes送出至全身，遇到合適環境便可停下打造轉移基地，之後再通知腫瘤本體提供更多帶有發展因子的Exosomes或直接送出癌細胞，最後便達到癌症轉移之結果。

科學家要如何使用Exosomes來治療癌症呢？幾乎身體所有細胞都會分泌Exosomes，對於癌細胞來說Exosomes更是不可或缺的，而大部分的Exosomes均能在血液中被偵測到，因此，若能擷取血液中的Exosomes訊息，便能掌握癌細胞的出現及其後續發展。而Exosomes的出現遠比症狀出現、光學檢查或切片檢查更即時，這樣的技術稱為Liquid Biopsy。2015年更發現Exosomes中的鑰匙，科學家發現癌細胞分泌的Exosomes中的組合蛋白(Integrin)跟Exosomes挑選適合組織之機制息息相關，若組織上的細胞可與Exosomes的Integrin結合，Exosomes便會在此著床進駐；反之則否。研究團隊更發現如果改變Integrin，就能改變Exosomes的目標；而若將Integrin去除，Exosomes就難以發揮作用。

未來將有機會透過各種管道利用Exosomes對抗癌症，包含：

1. 阻止癌細胞分泌Exosomes。
2. 阻止Exosomes與目標細胞結合。
3. 改變Exosomes內部帶有的調控物質。
4. 拔走Exosomes的鑰匙，使其到達不了目標組織。
5. 找到對應於腫瘤的鑰匙，加到帶有藥物的Exosomes上，再送至腫瘤進行破壞。

如何大量收集Exosomes?

由於Exosomes的特殊結構與功能，使其具有廣泛的潛在應用價值，目前正研究如何使其在臨床上可做為診斷多種疾病的生物標記及當作藥物的天然載體。因此，Exosomes的取得、分離及純化對於後續的研究至關重要。現今大多使用Flask培養細胞再收集細胞分泌的Exosomes，但使用此法收集的Exosomes產量少、濃度低，若要收集足夠的Exosomes至少要200個225T Flask，不但浪費空間及培養液，對於研究者來說更是操作不便。美國FiberCell System公司的全密閉式中空纖維生物反應器(Hollow Fiber Bioreactor)可以取代傳統Flask來收集細胞產物；為了收集Exosomes，原廠也做過連續培養細胞以收集Exosomes的實驗，發現Hollow Fiber Bioreactor可以大量製備Exosomes，並比Flask更能節省空間及培養液的消耗(圖一)。由此可看出與Flask相比，Hollow Fiber Bioreactor更有應用於臨床研究Exosomes之潛力。

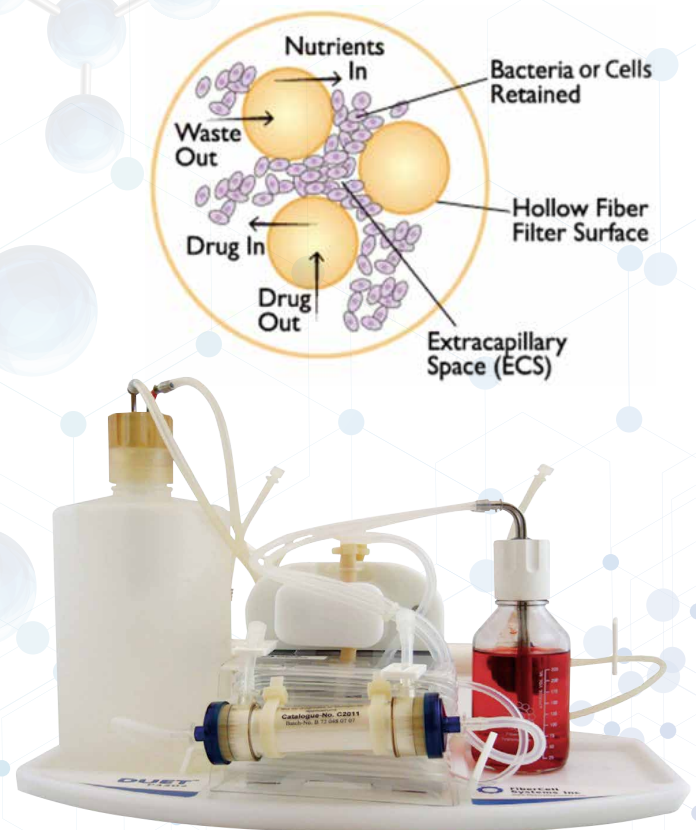
Exosomes Yields

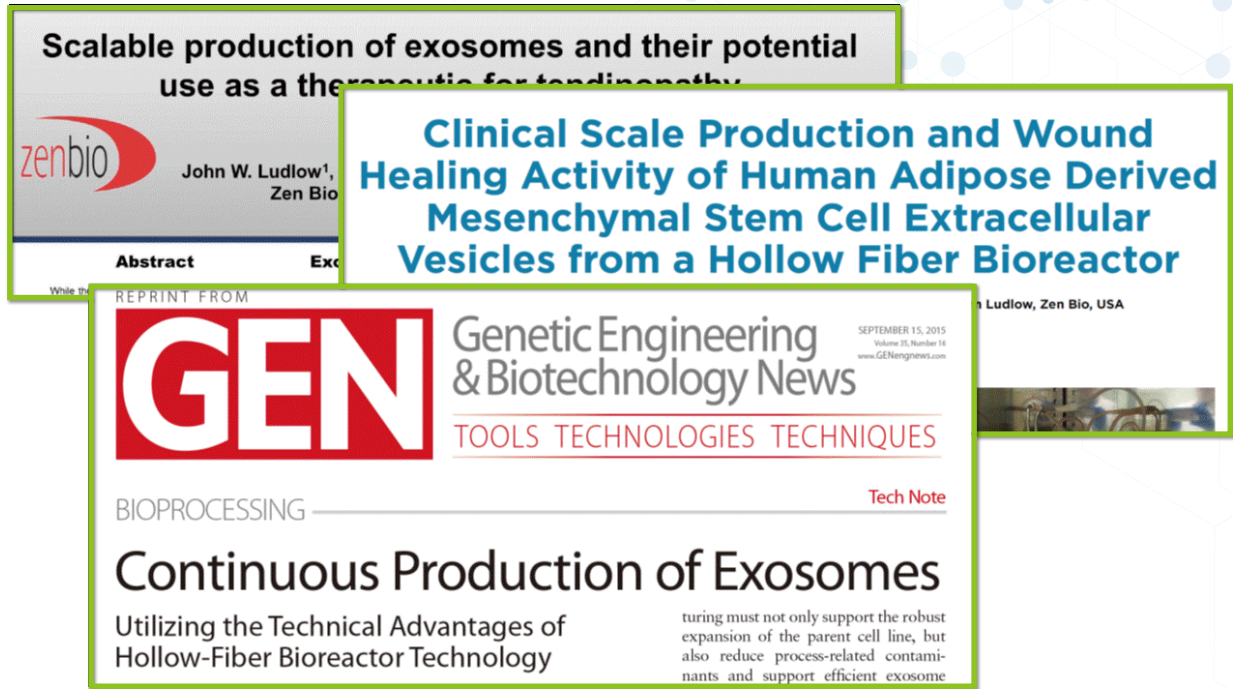
	Media Volume(mL)	Total Exosome Protein(mg)	Total Number of Exosomes(10^9)
Bioreactor #1	40	1.87	22
Bioreactor #1	40	2.77	320
Bioreactor #1	40	1.95	14
Bioreactor #1	40	1.2	17
130 Flasks (T225)	4000	0.9	16

圖一、使用同一個Hollow Fiber Bioreactor持續培養MSC並收集4次Exosomes (八周)的總量，比一般Flask收集量多數倍。



Hollow Fiber Bioreactor中空纖維生物反應器為一用來收集細胞產物之反應器，細胞培養於中空纖維管柱周邊(Extracapillary Space)，培養液則在中空纖維管柱內流動，藉由擴散的方式讓細胞產生的廢物被流動的培養液帶走，同時也從培養液中獲取細胞所需的養分，而Exosomes是無法通過此纖維的，因此細胞產物會停留在纖維管柱周邊。細胞可持續在反應器中培養六個月以上，讓細胞可持續分泌Exosomes，讓Exosomes取之不盡用之不竭。





參考資料：

1. Aya D. Pusic., Kae M. Pusic., Benjamin L.L. Clayton., Richard P. Kraig., 2014. FNY-stimulated dendritic cell exosomes as a potential therapeutic for remyelination. *J. Neuroimmunol.* 266, 12–23.
2. Aya D. Pusic., Kae M. Pusic., Richard P. Kraig., 2014. What are exosomes and how can they be used in multiple sclerosis therapy? *Expert Rev. Neurother.* 14(4), 353–355.
3. Aya D. Pusic., Richard P. Kraig., 2014. Youth and environmental enrichment generate serum exosomes containing miR-219 that promote CNS myelination. *Glia.* 62(2), 284-99.
4. Anthony Rutt, KD Bio, France, John J.S. Cadwell, FiberCell Systems Inc, USA, John Ludlow, Zen Bio, USA. Clinical Scale Production and Wound Healing Activity of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell Extracellular Vesicles from a Hollow Fiber Bioreactor
5. Debra Weiner, 科學人雜誌(中文版), 2014年4月號
6. Geneline, 胞外體與癌症系列專文

