

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

定向分化兔胚胎幹細胞為視網膜前驅細胞供建立治療糖尿病誘發眼睛病變之動物模式(第3年)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 99-2313-B-040-003-MY3
執行期間：101年08月01日至102年07月31日
執行單位：中山醫學大學視光學系

計畫主持人：曾榮凱
共同主持人：朱志成
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：楊淳茹
碩士班研究生-兼任助理人員：蕭誌頡
碩士班研究生-兼任助理人員：陳雅郁
碩士班研究生-兼任助理人員：李仁翔
博士班研究生-兼任助理人員：林子安

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102 年 11 月 04 日

中文摘要：本研究計畫乃針對國內外日趨嚴重之共通代謝疾病：糖尿病 (diabetes mellitus) 誘發眼睛病變而進行連續性之研究。糖尿病引起之高血糖誘發眼睛病變為造成視覺障礙主要原因之一。本研究計畫目標為建立治療與研究糖尿病誘發眼睛相關疾病之動物模式 (animal model)，並體外分化胚幹細胞成為視網膜前驅細胞 (retinal progenitor cell)，以細胞移植方式取代受損視網膜細胞。10 周齡雄性紐西蘭白兔以 100 ml/kg 劑量之四氧嘧啶 (Alloxan) 誘發第一型糖尿病，並持續每週測試其血糖、體重與眼球屈光狀態，且每周觀察紀錄其水晶體與視網膜變化直至試驗結束，並於試驗期間，每 4 周檢查其視網膜電圖 (Electroretinography, ERG)。以連續三週血糖達 200 mg/dl 為成功誘導糖尿病，此試驗之糖尿病動物成功誘發比例為 85%。此外，結果顯示經誘導糖尿病之動物 (n=20) 體重減輕、血糖增加、屈光不正增加相較於健康之對照組 (n=12) 具顯著差異 ($P < 0.001$)，患糖尿病動物眼睛出現白內障比例則為 69% 顯著高於對照組之 6%，且視網膜電圖檢查亦發現糖尿病動物之 a 與 b 波振幅較對照組降低。另一方面於研究計畫中建立誘導小鼠與紐西蘭白兔胚胎幹細胞分化成視網膜色素上皮前驅細胞之分化系統，可偵測到誘導小鼠胚幹細胞分化後第 3 與 9 天之視網膜前驅細胞專一性標幟 Pax6 與色素生成 Mitf 表現，而 tight junction protein 相關 ZO-1 與視覺循環 (visual cycle) 相關 RPE65 隨之於分化後第 9 與 24 天表現，兔胚幹細胞則僅表現視網膜前驅細胞專一性標幟 Pax6；同時亦將視網膜色素上皮前驅細胞移植入視網膜損傷之動物，再以眼球組織切片觀察發現成功移植入視網膜下。結果顯示此研究成功建立完整糖尿病誘發眼睛相關疾病之紐西蘭白兔動物模式，且成功誘導小鼠胚幹細胞分化成視網膜色素上皮前驅細胞，並首次嘗試將兔胚胎幹細胞進一步誘導分化成視網膜色素上皮前驅細胞之前驅細胞，初步建立兔胚胎幹細胞體外分化視覺相關細胞之系統，且進行並建立視網膜細胞移植方式，雖其修復取代損傷細胞仍有待評估並進一步做後續之研究，但此計畫奠定視網膜色素上皮細胞體外分化與移植等相關研究之重要基礎。

中文關鍵詞：動物模式、細胞移植、糖尿病、分化、眼睛

英文摘要：Hyperglycemia induces eye disorders that cause visual lesions. A serial of primary investigations on physiologic/morphological parameters of rabbit eye disorders induced by diabetes mellitus (DM) are carried out in this three-year proposal. The objectives of this proposal are to use New Zealand

White rabbits for establishing a complete diabetic animal model on eye disorders and to set up a stable differentiation system for rES cells. 10 week-old New Zealand White rabbits were induced to Type I DM by a 100 mg/kg alloxan injection. Body weight, blood glucose, refraction, lens and fundus examinations were evaluated during the 24 weeks trail. Electroretinography (ERG) was recorded every 4 weeks as well. The successful rate of diabetic rabbit induction was 85% by blood glucose over 200 mg/dl for 3 weeks. Results showed that increased blood glucose and refraction as well as decreased body weight were observed in diabetic rabbits when compare to Control group ($P < 0.001$). There was only one eye with cataract induced by DM (6%, $n=12$) in control group to compare with the diabetic group (69%, $n=20$). In addition, a retinal function evaluation by ERG showed that the amplitude of a- and b-wave in diabetic group is lower ($P < 0.05$) than that in Control group. Furthermore, the specific marker of retina precursor cells, Pax6 and pigment synthesis (Mitf) were all observed in mouse embryonic stem (ES) cells on 3 or 9 days after differentiation. The expressions of tight junction protein ZO-1 and visual cycle protein (RPE65) of differentiated mouse ES cells were detected during days 9 and 24. Only Pax6 expression can be detected after rabbit ES cells differentiation. Eye histological examination was performed after transplantation of differentiated cells to retina injured animal. Based on our data, the rabbit model of diabetes-related eye disorders as well as in vitro retina pigment epithelium differentiation and retinal cells transplantation is well established for further studies of eye disorders.

英文關鍵詞： animal model, cell transplantation, diabetes mellitus, differentiation, eye

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告

期末報告

計畫名稱:

定向分化兔胚胎幹細胞為視網膜前驅細胞供建立治療糖尿病

誘發眼睛病變之動物模式

Directed differentiation of rabbit embryonic stem cells into retinal precursor cells as an animal model for treating diabetes-related eye disorders

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2313-B-040-003-MY3

執行期間：99年8月1日 至 102年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學視光學系

計畫主持人：曾榮凱 (中山醫學大學視光學系 副教授)

共同主持人：朱志成 (國立中興大學動物科學系 教授)

計畫參與人員：

林荀龍 (國立中興大學獸醫學系 副教授)

楊淳茹 (國立中興大學動物科學系 碩士生)

蕭誌頡 (中山醫學大學視光學系 碩士生)

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中 華 民 國 102 年 10 月 30 日

目錄

中文摘要及關鍵詞-----	3
英文摘要及關鍵詞-----	4
報告內容-----	5
前言-----	5
研究方法-----	8
研究結果-----	14
結論-----	28
參考文獻-----	29
計畫成果自評-----	33

中文摘要

本研究計畫乃針對國內外日趨嚴重之共通代謝疾病:糖尿病(diabetes mellitus)誘發眼睛病變而進行連續性之研究。糖尿病引起之高血糖誘發眼睛病變為造成視覺障礙主要原因之一。本研究計畫目標為建立治療與研究糖尿病誘發眼睛相關疾病之動物模式(animal model), 並體外分化胚幹細胞成為視網膜前驅細胞(retinal progenitor cell), 以細胞移植方式取代受損視網膜細胞。10 周齡雄性紐西蘭白兔以 100 ml/kg 劑量之四氧嘧啶(Alloxan)誘發第一型糖尿病, 並持續每週測試其血糖、體重與眼球屈光狀態, 且每周觀察紀錄其水晶體與視網膜變化直至試驗結束, 並於試驗期間, 每 4 周檢查其視網膜電圖(Electroretinography, ERG)。以連續三週血糖達 200 mg/dl 為成功誘導糖尿病, 此試驗之糖尿病動物成功誘發比例為 85%。此外, 結果顯示經誘導糖尿病之動物(n=20)體重減輕、血糖增加、屈光不正增加相較於健康之對照組(n=12)具顯著差異($P < 0.001$), 患糖尿病動物眼睛出現白內障比例則為 69%顯著高於對照組之 6%, 且視網膜電圖檢查亦發現糖尿病動物之 a 與 b 波振幅較對照組降低。另一方面於研究計畫中建立誘導小鼠與紐西蘭白兔胚胎幹細胞分化成視網膜色素上皮前驅細胞之分化系統, 可偵測到誘導小鼠胚幹細胞分化後第 3 與 9 天之視網膜前驅細胞專一性標幟 Pax6 與色素生成 Mitf 表現, 而 tight junction protein 相關 ZO-1 與視覺循環(visual cycle)相關 RPE65 隨之於分化後第 9 與 24 天表現, 兔胚幹細胞則僅表現視網膜前驅細胞專一性標幟 Pax6; 同時亦將視網膜色素上皮前驅細胞移植入視網膜損傷之動物, 再以眼球組織切片觀察發現成功移植入視網膜下。結果顯示此研究成功建立完整糖尿病誘發眼睛相關疾病之紐西蘭白兔動物模

式，且成功誘導小鼠胚幹細胞分化成視網膜色素上皮前驅細胞，並首次嘗試將兔胚胎幹細胞進一步誘導分化成視網膜色素上皮前驅細胞之前驅細胞，初步建立兔胚胎幹細胞體外分化視覺相關細胞之系統，且進行並建立視網膜細胞移植方式，雖其修復取代損傷細胞仍有待評估並進一步做後續之研究，但此計畫奠定視網膜色素上皮細胞體外分化與移植等相關研究之重要基礎。

關鍵詞：動物模式、細胞移植、糖尿病、分化、眼睛

Abstract

Hyperglycemia induces eye disorders that cause visual lesions. A series of primary investigations on physiologic/morphological parameters of rabbit eye disorders induced by diabetes mellitus (DM) are carried out in this three-year proposal. The objectives of this proposal are to use New Zealand White rabbits for establishing a complete diabetic animal model on eye disorders and to set up a stable differentiation system for rES cells. 10 week-old New Zealand White rabbits were induced to Type I DM by a 100 mg/kg alloxan injection. Body weight, blood glucose, refraction, lens and fundus examinations were evaluated during the 24 weeks trial. Electroretinography (ERG) was recorded every 4 weeks as well. The successful rate of diabetic rabbit induction was 85% by blood glucose over 200 mg/dl for 3 weeks. Results showed that increased blood glucose and refraction as well as decreased body weight were observed in diabetic rabbits when compared to Control group ($P < 0.001$). There was only one eye with cataract induced by DM (6%, $n=12$) in control group to compare with the diabetic group (69%, $n=20$). In addition, a retinal function evaluation by ERG showed that the amplitude of a- and b-wave in diabetic group is lower ($P < 0.05$) than that in Control group. Furthermore, the specific marker of retina precursor cells, Pax6 and pigment synthesis (Mitf) were all observed in mouse embryonic stem (ES) cells on 3 or 9 days after differentiation. The expressions of tight junction protein ZO-1 and visual cycle protein (RPE65) of differentiated mouse ES cells were detected during days 9 and 24. Only Pax6 expression can be detected after rabbit ES cells differentiation. Eye histological examination was performed after transplantation of differentiated cells to retina injured animal. Based on our data, the rabbit model of diabetes-related eye disorders as well as in vitro retina pigment epithelium differentiation and retinal cells transplantation is well established for further studies of eye disorders.

Keywords: animal model, cell transplantation, diabetes mellitus, differentiation, eye

報告內容

前言

本研究計畫針對國內外日趨嚴重之共通疾病:糖尿病(diabetes mellitus)誘發眼睛病變進行連續性之研究，建立疾病之完整動物模式以供未來相關研究之基礎。

一般將糖尿病區分為第一型糖尿病(Type I, insulin-dependent)與第二型糖尿病即非胰島素依賴型(Type II, insulin-independent), 其中雖以第二型糖尿病佔多數(約 90%), 但通常發生於三十歲以上, 加上年齡增長、肥胖及家族糖尿病史等危險因子更提高罹病機率。於西方國家中, 肥胖因素更導致第二型糖尿病發生年齡有逐漸年輕化趨勢, 自西元 1995 年所統計之五千一百萬人, 預估於西元 2025 年達到七千二百萬人(Negi and Vernon, 2003)。此一複雜之代謝性疾病通常影響小血管而造成許多身體組織廣泛性損傷, 而眼睛則為易受損器官之一, 其可能造成原因不明的視網膜病變、白內障、眼外肌麻痺或視神經病變等眼睛組織病變。糖尿病誘導視網膜病變(diabetic retinopathy)於目前西方國家為造成失明主要原因之一, 且糖尿病患者相較於同年齡族群其發生失明風險亦高出 29 倍, 其因為視網膜之血管受到影響而導致微血管和血小板病變、紅血球變形使產生微血管阻塞(microvascular occlusion), 另一則是造成微血管滲漏(microvascular leakage)而使視網膜出現出血和水腫, 進而產生玻璃體出血、黃斑部水腫、新生血管性青光眼或

視網膜剝離，最後導致視力受損或喪失，故糖尿病視網膜病變為臨床判斷糖尿病導致眼睛疾病之重要指標。

糖尿病除引發視網膜病變外，亦發生視神經病變(optic neuropathy)造成視力喪失與虹膜血管增生(rubeosis iridis)易堵塞房水排出造成較高之眼壓，進而產生新生血管性青光眼(Mitchell et al., 1997; Negi and Vernon, 2003)。此外，因過量葡萄糖經醛糖還原酶(aldose reductase)代謝成山梨醇(sorbitol)累積於水晶體，導致水晶體細胞內滲透壓增加造成細胞脹大，進而改變屈光度(refraction)，故糖尿病患視力會隨血糖濃度而有所變化(Negi and Vernon, 2003)，且因水晶體細胞受損而使發生白內障(cataract)機率顯著升高(Ederer et al., 1981; Klein et al., 1985)。

以免為多種人類疾病之實驗動物模式相較於其他種類動物具相當之優勢，除了較一般家畜與小鼠於實驗操作方便外，其適當大小之體型與世代間距短(約 31 天)，加上其生理方面相較下更接近靈長類(Graves and Moreadith, 1993)，故目前廣泛應用兔為動物模式研究多種人類之疾病，包括人類新血管疾病、神經疾病、脂蛋白代謝(lipoprotein metabolism)異常與心肌症(cardiomyopathy)等相關疾病(Chowdhury et al., 1991; Hoeg et al., 1996; Chen et al., 2001)。而兔亦為許多眼科研究所使用之實驗動物(Toshida et al., 2008; Lodovici et al., 2009)，與小鼠相較之下更適合未來應用於人類之疾病模式，故紐西蘭白兔為此研究計畫最佳且最具潛力之動物模式，尤其以研究葡萄糖與胰島素代謝或糖尿病引起之相關疾病較優於小鼠之模式(Vassilopoulos et al., 2009)。

視網膜病變為目前導致失明主因之一，但目前多數視網膜疾病造成不可逆之視覺損傷仍未有解決方式。胚幹細胞具有無限增值的特性，稱為自我更新(self-renewal)能力，同時也具有分化成體內各胚層相關細胞之能力，稱為分化多能性(pluripotency)；目前於體外培養系統可將胚胎幹細胞分化成三個胚層之能力，包括外胚層、中胚層與內胚層(Evans and Kaufman, 1981)，此特性適合用於探討發育相關疾病與再生醫學研究之模式。研究指出中央神經系統(central nervous system)病變所造成功能性喪失疾病，最佳的治療方式為利用細胞移植代替功能喪失之神經細胞，使其部位恢復功能(Zhao et al., 2008)。

老年性黃斑部病變為常見導致失明的老化疾病之一，病變的視網膜色素上皮細胞無法提供感光細胞正常代謝功能，使感光細胞逐漸壞死，最後導致視力受損或喪失(Rattner et al., 2006)。目前許多研究指出，由猴子或人類胚幹細胞誘導分化為視網膜色素上皮細胞能夠修復視網膜功能受損之大鼠(Haruta et al., 2004; Lund et al., 2006)。

自西元 1981 年老鼠胚幹細胞(Evans et al., 1981)與 1998 年人類胚幹細胞(Thomson et al., 1998)建立以來，胚幹細胞的增殖和分化技術已有很大進展，然而不同物種間進行細胞移植治療時，因個體間所產生免疫排斥現象(Zhao et al., 2001)，成為再生醫學研究發展上重大的阻礙。以兔來當作人類疾病之動物模式相較於其他實驗動物具相當之優勢，不僅在實驗操作上方便於其他家禽與齧齒類動物，其生理方面相較下更接近靈長類(Graves and Moreadith, 1993)，故目前廣泛應用兔為動物模式研究多種人類之疾病，包括人類新血管疾病、神經疾病、脂蛋白代謝(lipoprotein metabolism)異常與心肌症(cardiomyopathy)等相關疾病(Chowdhury et al., 1991; Hoeg et al., 1996; Chen et al., 2001)。以小鼠胚幹細胞分化為視網膜細胞為基礎，建立兔胚幹細胞分化為視網膜細胞

之系統，不僅與小鼠相較之下更適合未來應用於人類之疾病模式，故本研究計畫以建立兔胚幹細胞分化為視網膜相關細胞，提供未來相關研究之基礎。

研究方法

第一年度計畫以紐西蘭白兔為此研究計畫之動物模式，配合視光專業之技術進行兔眼睛相關性狀之評估，目前糖尿病誘發眼睛損傷仍未有良好且完整之動物模式，此動物模式之建立，為未來此方面相關研究之重要基石。

本計畫動物之使用與飼養依中山醫學大學動物實驗管理規則進行試驗。

(一) 糖尿病兔之血糖與眼睛評估：

針對經誘導第一型糖尿病紐西蘭白兔進行血糖(blood sugar)、屈光度(refraction)與裂隙燈生物顯微鏡(slit-lamp biomicroscopy)評估前房(anterior chamber)、角膜(cornea)、虹膜(iris)、水晶體(lens)與視網膜(retina)等一系列檢查，並觀察評估眼睛結構之組織切片。

1. 眼屈光度：利用檢影鏡(retinoscopy)動態檢測，了解動物基本屈光度數。
發生高血糖時會產生水晶體屈光度增加，呈現出近視變化
(Javitt JC et al., 1994)。
2. 眼底檢查：眼底鏡可直接觀察眼睛內部各個組織構造之儀器，包括角膜、水晶體、玻璃體、視網膜、視網膜血管及視神經等。
3. 裂隙燈檢查：使用裂隙燈顯微鏡檢查角膜、水晶體、虹膜和前房等部位。
其可在細分不同檢查方式，分別為 (1) 漫射光照射法：採用非焦點彌散光照射，光源較強，斜向投射，可對眼前部組織

進行全面且立體的觀察；(2) 直接焦點照射法：裂隙光束經過角膜、晶狀體時，將角膜、晶狀體切成一灰白色光學六面體，可觀察角膜、晶狀體的彎曲度、厚度，病變形態、層次及角膜後沉著物、房水浮游物等；(3) 角膜緣分光照射法：將裂隙光照在角膜緣上，光線於角膜內屈折、反射，可觀察角膜之細微變化，如薄翳、水泡、沉著物、血管、穿孔、傷痕等；(4) 後部反光照法：此法燈光的焦點與顯微鏡焦點非於同一平面，而是把燈光照在被檢查者之後方，用於觀察角膜內皮和上皮水腫、上皮小泡、角膜後沉著物及晶狀體空泡；(5) 鏡面反光照法：利用光線照射在角膜或晶狀體表面所形成的表面反光區，以觀察角膜表面淚液膜、後彈力膜、內皮細胞，晶狀體前、後囊和晶狀體核等不同部位；(6) 間接照射法：利用裂隙燈光照射病變部位之周圍組織，而顯微鏡焦點則對準病變部位，可觀察瞳孔括約肌、虹膜上細小出血和新生血管，角膜上皮水腫和新生血管等。

4. 視網膜電波圖(electroretinography, 簡稱 ERG)：檢查動物視網膜功能最重要及敏感之技術，為世界動物眼科醫院之標準視網膜功能檢查方法。動物於局部或短時間全身麻醉下進行非侵入性之精密視網膜電波圖檢測，以特殊隱形眼鏡式之記錄電極等三

種進口檢查電極偵測視網膜之電波反應，並以電波圖之波形及波幅分析動物視網膜之功能。

(二) 糖尿病動物模式之誘發與檢測：

以紐西蘭白兔作為糖尿病動物模式，依據先前初步試驗經驗，以 75 mg/kg 或 100 mg/kg 之 Alloxan 靜脈注射紐西蘭白兔以誘發第一型糖尿病產生，對照組則注射生理食鹽水，並於注射前一週與注射後每週採其耳動脈血，以 GlucoTREND2 (Roche, Indianapolis) 試劑分析並記錄其血糖變化，當其血糖表現高於 200 mg/dl 並持續 3 週則將被用來作為糖尿病之動物模式使用(Sullivan et al., 2002)。

(三) 組織切片評估：

動物於第 24 週之血糖與眼睛評估後犧牲，採集其眼球並經固定、石蠟包埋、切片再以 H & E 染色於顯微鏡下進行觀察評估。

第二年度計畫:本實驗室目前已完成兔胚幹細胞之建立，本年度計畫中同時維持所建立之小鼠與紐西蘭白兔之胚幹細胞株，並依據Osakada等人(2009)誘導小鼠胚幹細胞分化成視網膜感光細胞與色素上皮細胞之方式，於實驗室建立小鼠胚幹細胞分化系統，並首次嘗試將兔胚幹細胞進一步誘導分化成視網膜感光細胞與色素上皮細胞之前驅細胞(precursor cell)，初步建立兔胚幹細胞體外分化視覺相關細胞之系統。

(一) 胚幹細胞培養

1. 小鼠胚幹細胞培養:

將小鼠胚幹細胞培養於餵飼層置於37 °C、5% CO₂ 培養箱中，以 DMEM/F-12 (Sigma)為基礎培養液添加20% 胎牛血清(FBS)、0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma)、2 mM L-glutamine (Sigma)、1000 U/ml murine LIF (Chemicon International, Temecula, CA)、100 IU/mL penicillin、100 mg/mL streptomycin 與1% nonessential amino acids (Invitrogen)進行培養，並每 4-6 天則將 $1.5-3.0 \times 10^6$ 個兔胚幹細胞進行繼代(passage)於具新的餵飼層(feeder layer)之培養皿。

2. 兔胚幹細胞培養:

依據Graves and Moreadith (1993)與本研究室之胚幹細胞培養方法，將兔胚幹細胞培養於餵飼層置於38 °C、5% CO₂ 培養箱中，以 DMEM/F-12 (Sigma) 為基礎培養液添加 20% 胎牛血清 (FBS)、0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma)、2 mM L-glutamine (Sigma)、1000 U/ml murine LIF (Chemicon International, Temecula, CA)、100 IU/mL penicillin、100 mg/mL streptomycin 與 1% nonessential amino acids (Invitrogen)進行培養，並每4-6天則將 $1.5-3.0 \times 10^6$ 個兔胚幹細胞進行繼代於具新的餵飼層之培養皿。

(二) 胚幹細胞分化

1. 小鼠胚幹細胞體外分化:

Day 0 : 將胚幹細胞群落(colony)經酵素處理成單顆細胞狀態移至培養皿以視網膜前驅細胞分化培養液(另添加DKK-1 100 ng/ml+Lefty-A 500 ng/ml)進行培養72小時。

Day 3 : 將含有類胚體(embryoid bodies, EBs)懸浮液移入15 ml離心管並更換新鮮視網膜前驅細胞分化培養液與5%FBS , 培養24小時。

Day 4 : 添加Activin-A (最後濃度10 ng/ml)培養24小時。

Day 5 : 將含有EB的懸浮液移入15 ml離心管中並換成新鮮視網膜前驅細胞分化培養液再移至新的培養皿培養48小時。

Day 7 : 同Day 5步驟。

Day 9 : 將10個EBs/well移到4-well培養皿 , 加入視網膜細胞分化培養液與10% FBS培養24小時。

Day 10 : 加入含DAPT(10 μ M)視網膜細胞分化培養液培養48小時。

Day 12 : 加入新鮮視網膜細胞分化培養液培養48小時。

Day 14 : 同Day 12步驟。

Day 16 : 加入視網膜細胞分化培養液(含10 μ M DAPT、50 ng/ml aFGF、10 ng/ml bFGF、3 nM Shh、500 nM RA與100 μ M Taurine , 培養48小時。

Day 18, 20, 22 : 同Day 16步驟。

Day 24 : 加入視網膜細胞分化培養液(含10 μ M DAPT、3 nM Shh、500 nM RA、100 μ M Taurine , 培養48小時。

Day 26, 28：同Day24步驟。

2. 兔胚幹細胞體外分化：

因目前尚無實驗室嘗試進行兔胚幹細胞體外視覺相關細胞之分化,故以小鼠胚幹細胞分化視網膜感光細胞與色素上皮細胞系統為基礎,利用懸浮培養(floating culture)方式並於不同階段之培養過程添加DKK-1 (R&D Systems, cat. no. 1096-DK-010)、Lefty-A (R&D Systems, cat.no. 746-LF-025)、Activin-A (R&D Systems, cat. no. 338-AC-025)、 DAPT (Calbiochem, cat. no. 565770)、 Acidic FGF (aFGF) (R&D Systems, cat. no. 232-FA-025)、 Basic FGF (bFGF) (Upstate, cat. no. 01-106)、 Shh (R&D Systems, cat. no. 1314-SH-025)、 All-trans retinoic acid (RA) (Sigma, cat. no. R2625)、 Taurine (Sigma, cat. no. T-8691)以誘導兔胚幹細胞分化為視網膜感光細胞與色素上皮細胞之前驅細胞。

(三) 分化細胞之鑑定評估

經誘導小鼠或兔胚幹細胞分化為視網膜感光細胞與色素上皮細胞之前驅細胞,分別以細胞型態與細胞專一性標誌物 (cell markers) 之表現作為分化效率之評估。

將胚幹細胞分化培養至Day 9、 Day 16與Day 28 , 於不同天數以免疫細胞染色法評估視網膜前驅細胞 (retinal progenitor cell) 特定蛋白質Pax6、視網膜感光細胞特定蛋白Crx與視網膜色素上皮細胞特定蛋白ZO-1之表現。

第三年度計畫：主要目的為建立細胞移植技術並瞭解移植後細胞生長情形，提供後續研

究之基礎，使兔胚胎幹細胞治療糖尿病誘發眼睛相關疾病之動物模式能夠完整建立，有效連結基礎研究與未來臨床應用。

(一) 誘導動物視網膜病變

以100 mg/kg之 NaIO_3 注射至雷克斯兔耳靜脈以誘導視網膜病變，於注射二週後評估其眼睛照光之行為反應與視網膜電位圖確認動物視網膜受損。於確認視網膜喪失視覺功能後移植入經體外誘導分化之視網膜色素上皮前驅細胞（圖1），動物經0.1 ml/kg Ziletil 50麻醉後以開瞷器撐開眼瞼供23G穿刺刀於鞏膜開孔（圖1A），並置入光纖照明眼底（圖1B），且藉由40 D（Diopter）直接手術鏡觀察視網膜（圖1C, D），隨後以微量注射針將經分化之視網膜色素上皮前驅細胞移植入下視網膜（subretina）（圖1E, F），完成細胞移植。

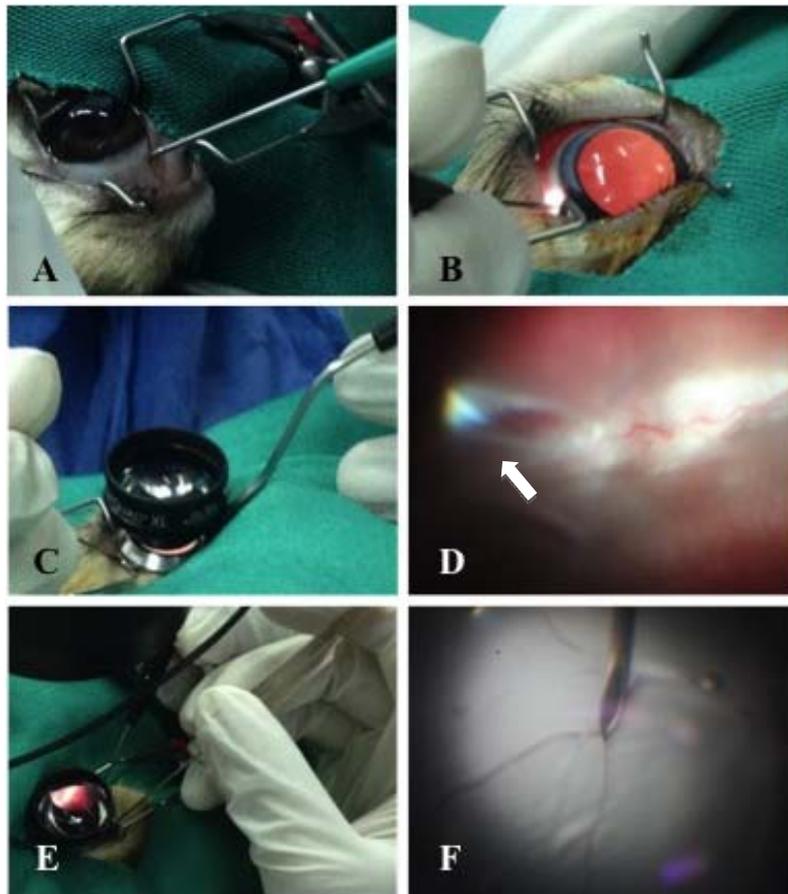


圖1、動物視網膜細胞移植。A為穿刺刀於鞏膜壁開孔供光纖進入照明眼底 (B) ; 透過 40 Diopter直接手術鏡觀察視網膜 (C) , D為視神經與血管出入眼球位置 (箭號處) ; E為利用微量注射針將經分化之視網膜色素上皮前驅細胞移植入下視網膜 (F) 。

結果與討論

第一年度

(一) 體重、血糖與屈光狀態之變化：

結果顯示經誘導第一型糖尿病之紐西蘭白兔(DM)，其體重減輕、血糖與屈光不正增加相較於健康對照組(Control)具顯著差異(表 1)。

表 1. 健康與第一型糖尿病紐西蘭白兔之體重、血糖及屈光狀態變化

組別	N	體重 (kg)	血糖 (mg/dL)	右眼屈光 (D)	左眼屈光 (D)
Control	12	2.82±0.29 ^a	111.59±13.96 ^b	2.48±0.55 ^c	2.46±0.66 ^c
DM	20	2.67±0.30 ^b	338.15±77.10 ^a	3.56±1.30 ^b	3.74±1.40 ^b

Value, mean ± SD.

a, b, c: P<0.001

(二) 水晶體之變化：

結果顯示第一型糖尿病紐西蘭白兔之水晶體通透度隨誘導時間增長而逐漸降低，進而產生白內障(圖 2)。各組間白內障發生比例為 Control 組 6%、DM 組 69%，顯示兔之糖尿病動物模式亦可成功誘發白內障(圖 3)。

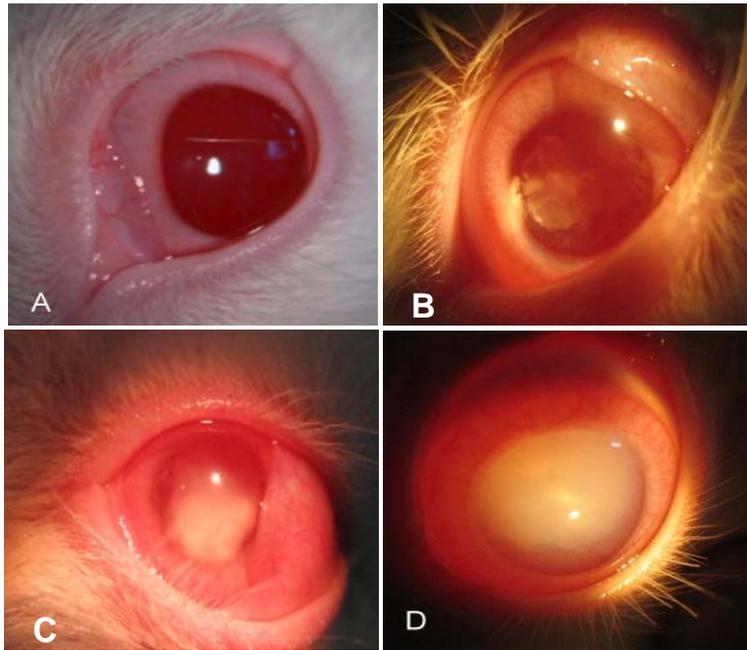


圖 2. 眼球前部外觀檢查。A 為正常眼睛外觀，B, C 為初期白內障，D 為後期白內障。

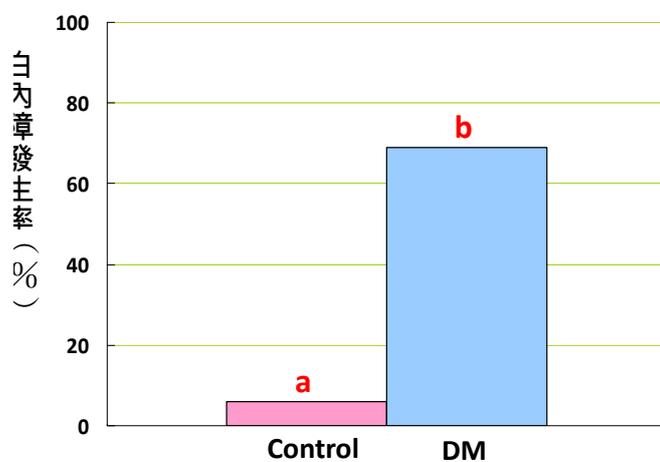


圖 3. 經誘導第一型糖尿病兔之白內障發生率。

a, b: $P < 0.05$

以裂隙燈顯微鏡觀察水晶體發現其血糖值維持在 200-399 mg/dL 產生白內障比率為 25%，400 mg/dL 以上為 78%，白內障之程度達 Grade 3 以上者，Control 組為 0%，DM 組則為 50% (圖 4)，顯示血糖濃度會影響白內障發生率。

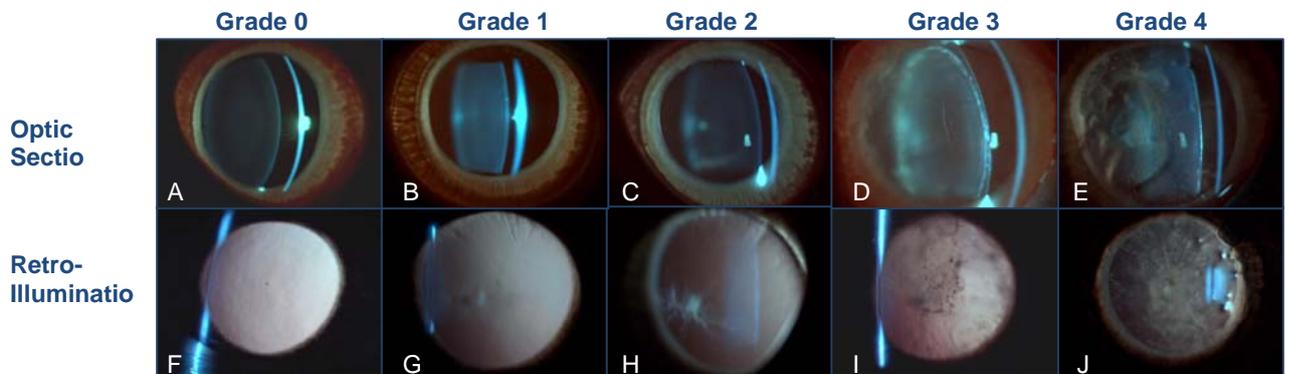


圖4. 裂隙燈顯微鏡水晶體檢查。A-E為光切片觀察水晶體白內障進程，F-J則以背面
正射照射計觀察水晶體內障進程

(三) 視網膜功能評估：

ERG 結果顯示 DM 組振幅低於 Control 組，結果顯示糖尿病會導致紐西蘭白兔之視網膜功能(圖 5)。

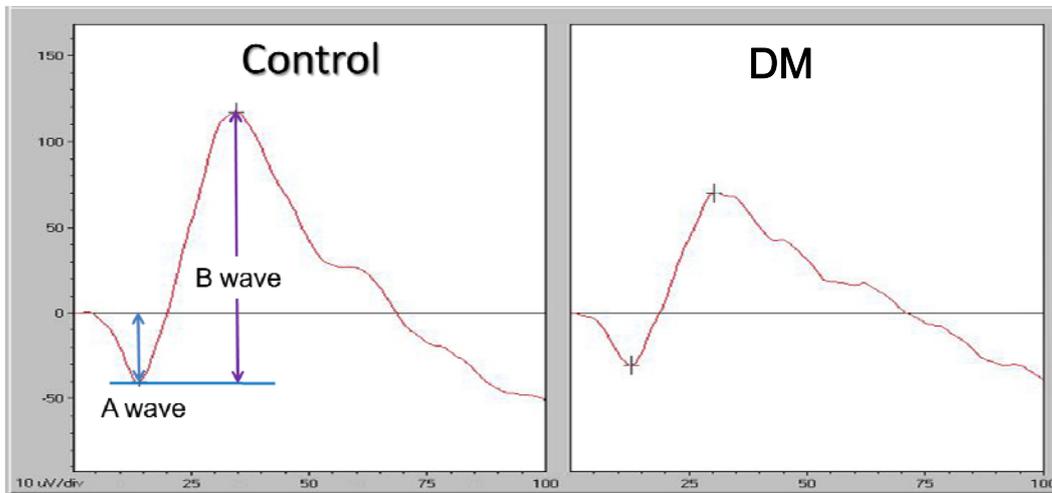


圖 5. 視網膜電圖(ERG)評估糖尿病對視網膜之影響。

(四) 組織切片檢查：

比較健康與糖尿病兔眼睛組織切片，可明顯觀察其水晶體病變與視網膜組織增生及細胞異常(圖 6)。

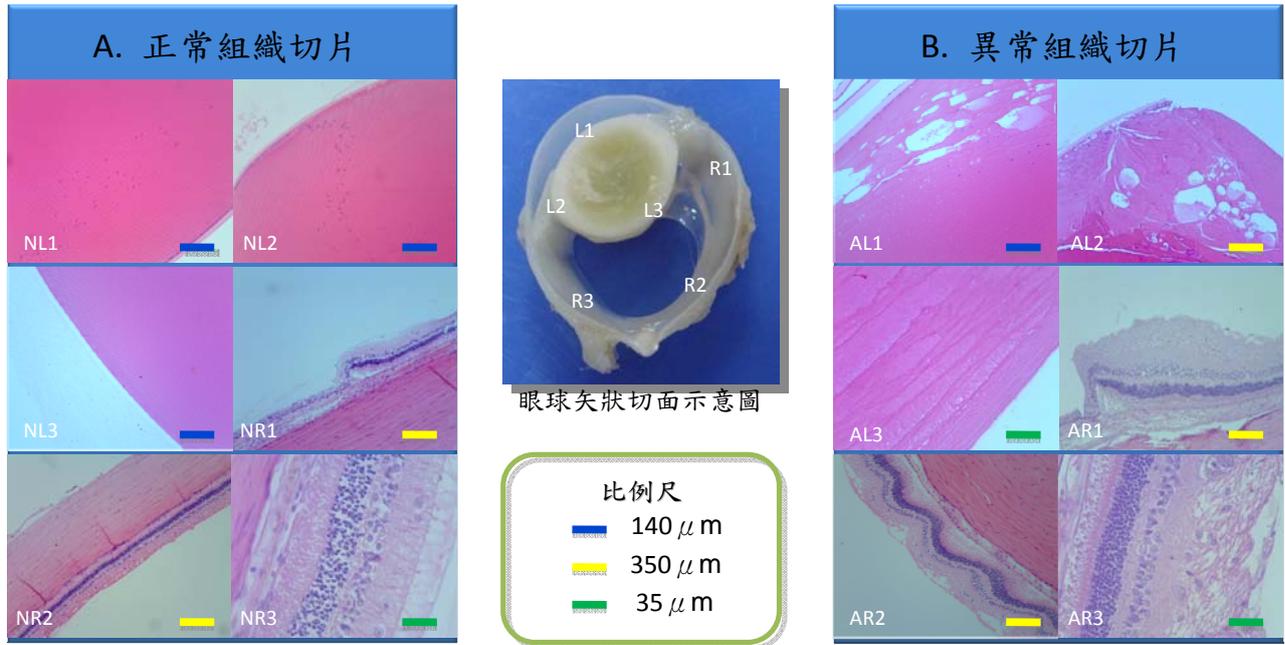


圖6. 組織切片檢查。NL1-3為正常水晶體纖維規則排列；AL1-3為水晶體纖維與晶格損壞導致白內障發生。NR1-3為正常視網膜；AR1-3為視網膜組織增生，細胞發生變異。

第二年度

(一) 分化細胞型態與細胞專一性蛋白質表現評估：

1. 小鼠胚幹細胞-

本試驗結果先以建立小鼠胚幹細胞視網膜分化系統，做為誘導兔胚幹細胞分化之基礎。

於分化培養第 10 天觀察發現神經細胞出現 (圖 7A & D)，接續於第 16 天觀察到神經細胞 (圖 7B) 並發現部分細胞開始有上皮細胞型態 (圖 7E)；於分化培養最後階段 (第 28 天)，神經細胞陸續出現 (圖 7C)，而類似視網膜色素上皮細胞之六角形細胞亦趨增加 (圖 7F)。

將小鼠胚幹細胞分化培養出之神經細胞以表現於外胚層與早期視網膜前驅細胞 (retinal progenitor cell) 之特定蛋白質 Pax 6 進行免疫細胞染色，結果顯示 Pax 6 可於體外分化出之神經細胞表現 (圖 8)。小鼠胚胎幹細胞經體外誘導分化 16 天後之細胞可表現出視網膜前驅細胞特定蛋白質 Pax 6 (圖 9A-D)，並更進一步表現出視網膜感光前驅細胞之專一性蛋白質 Crx (圖 10A-D)；此外也觀察到視網膜色素上皮前驅細胞之專一性蛋白質 Mitf (圖 9E-H) 與 ZO-1 (圖 10E-H) 之表現。

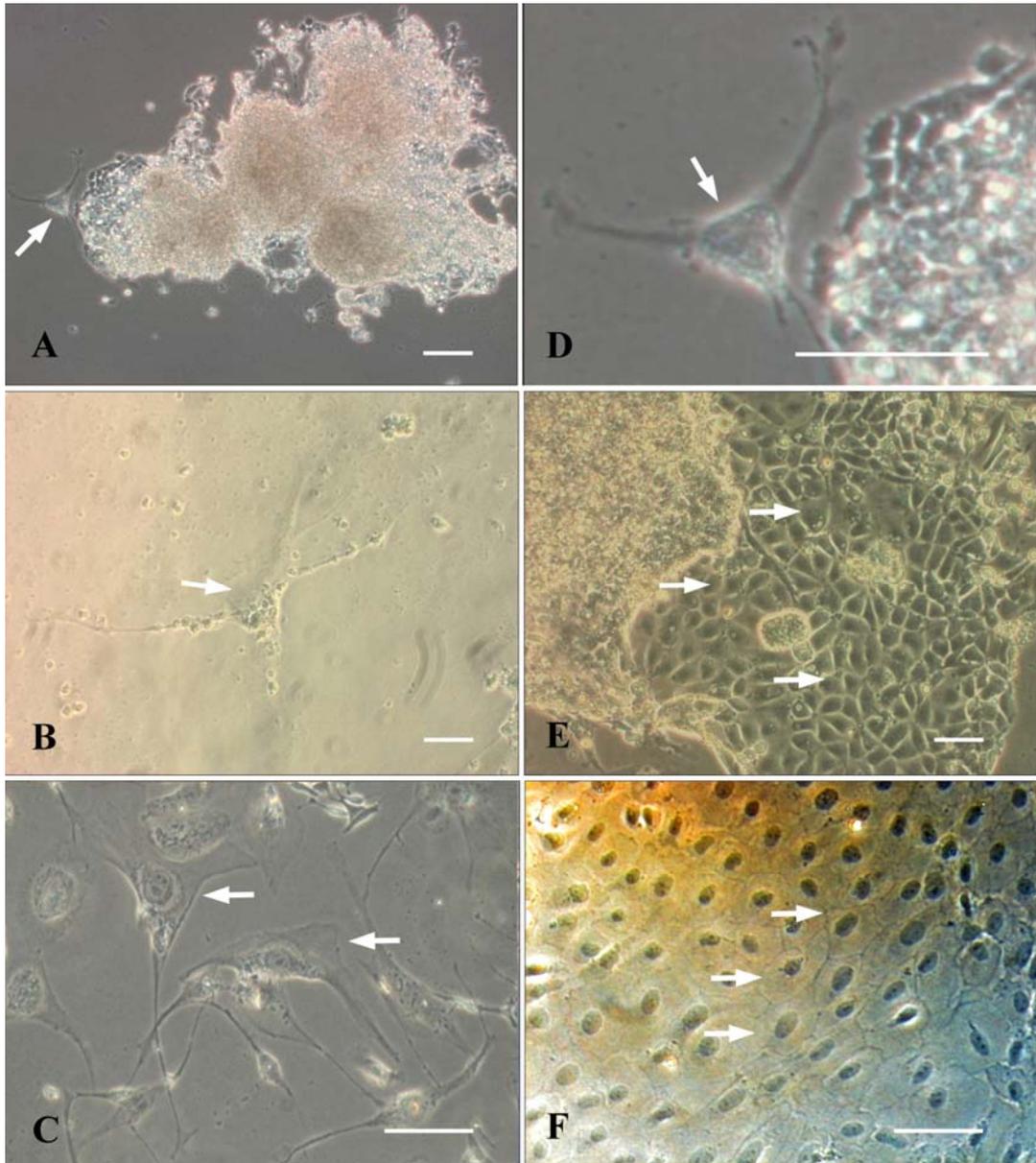


圖 7、不同階段之小鼠胚胎幹細胞體外分化情形。A, D 為小鼠胚胎幹細胞經體外分化 10 天形成神經細胞 (箭號處)。B, D 分別為分化 16 天之神經細胞型態與類視網膜色素上皮細胞 (箭號處)。C, F 分別為分化 28 天之神經細胞型態與類視網膜色素上皮細胞 (箭號處)。比例尺=100 μm 。

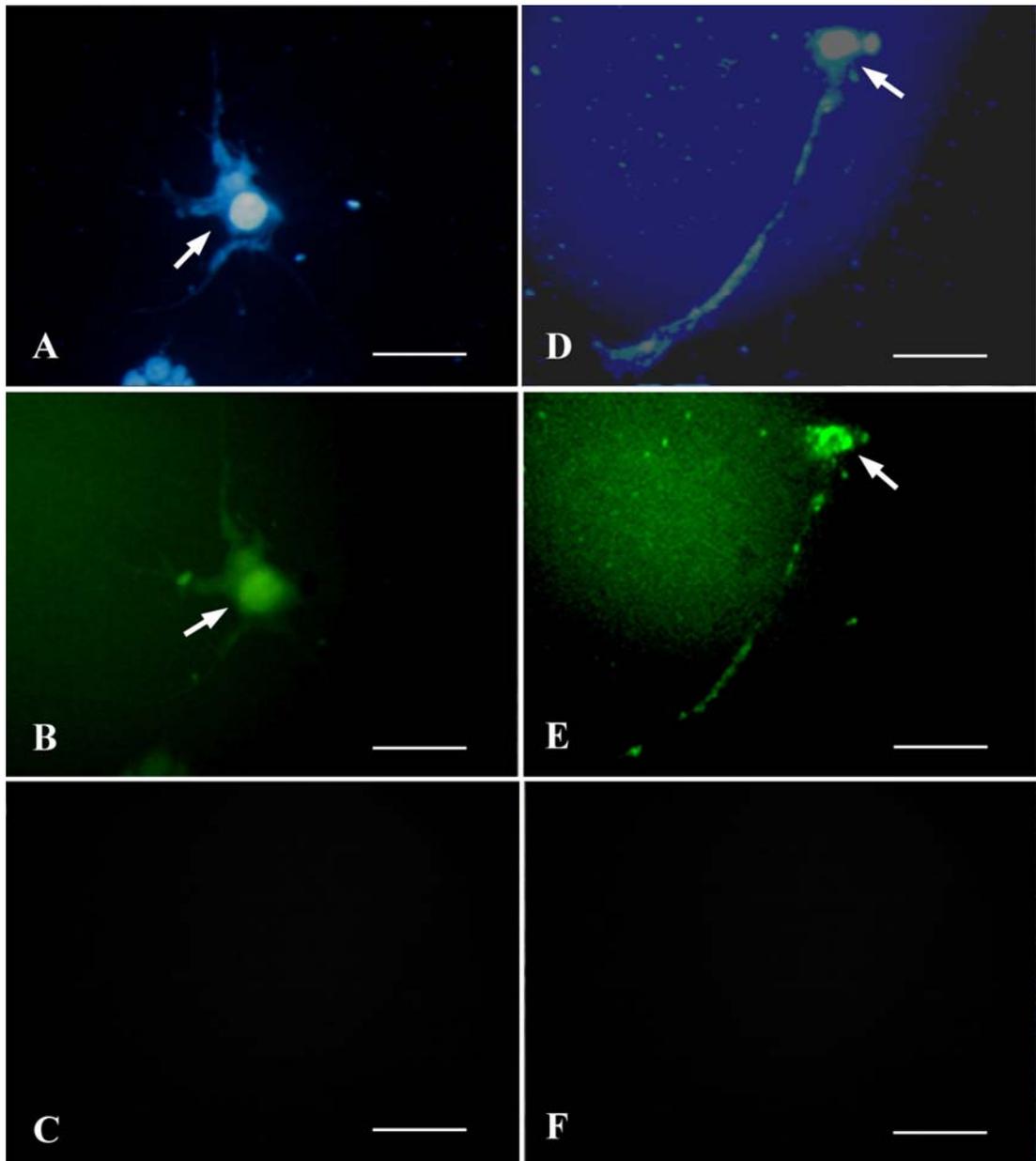


圖 8、由小鼠胚胎幹細胞分化出神經細胞以早期視網膜前驅細胞 (retinal progenitor cell) 之特定蛋白質 Pax 6 進行細胞免疫染色。A, D 以 DAPI 進行細胞核染色 (箭頭處)。B, E 觀察到 Pax 6 可於體外分化出之神經細胞表現 (箭頭處)。C, F 為免疫染色之對照組。比例尺=100 μm 。

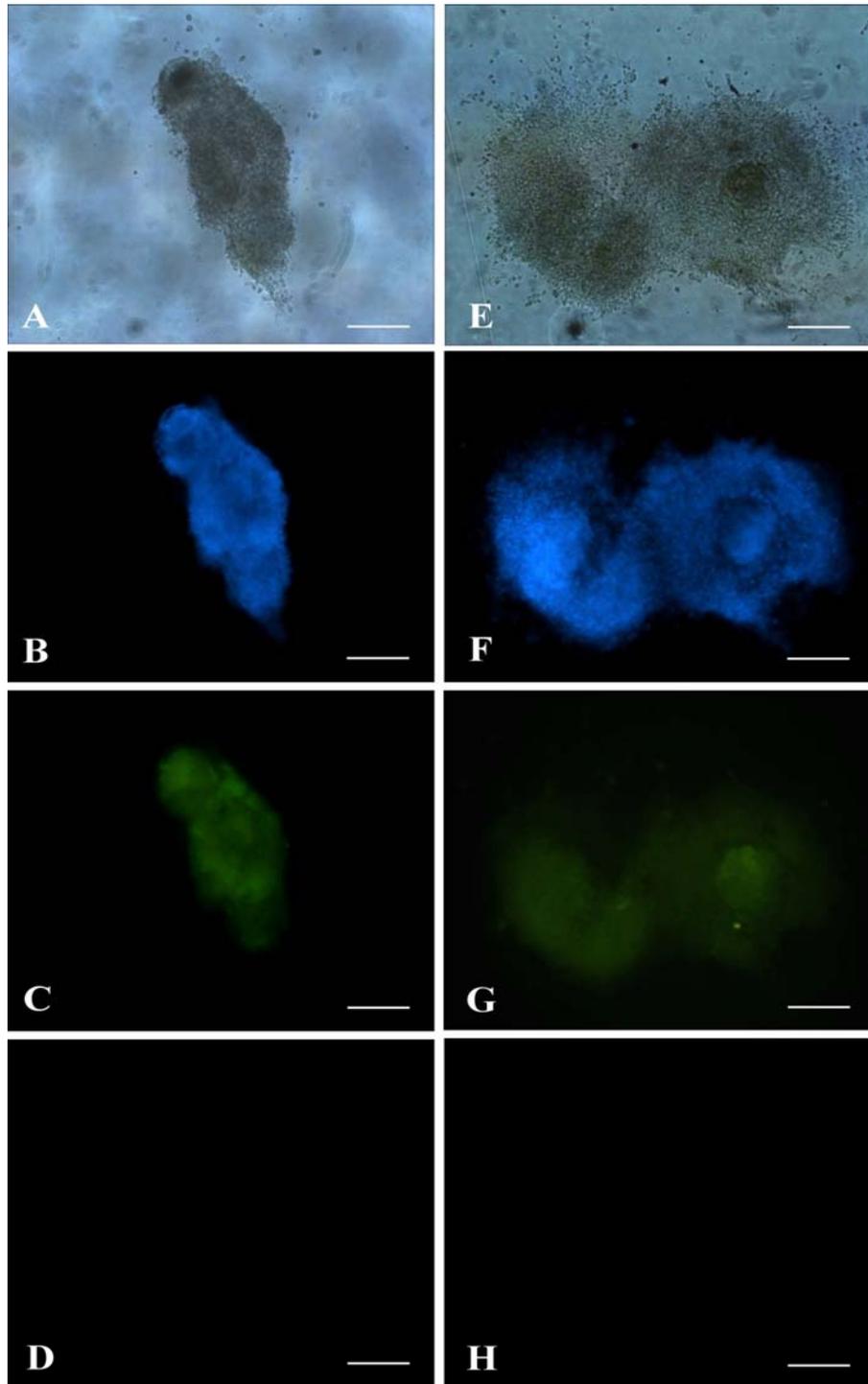


圖 9. 小鼠胚胎幹細胞經體外誘導分化 16 天進行視網膜前驅細胞特定蛋白質 Pax 6 與視網膜色素上皮前驅細胞之專一性蛋白質 Mitf 表現評估。A, E 為可見光下之細胞型態。B, F 以 DAPI 進行細胞核染色。C, G 細胞分別表現出 Pax 6 與 Mitf。D, H

為免疫染色之對照組。比例尺=100 μm 。

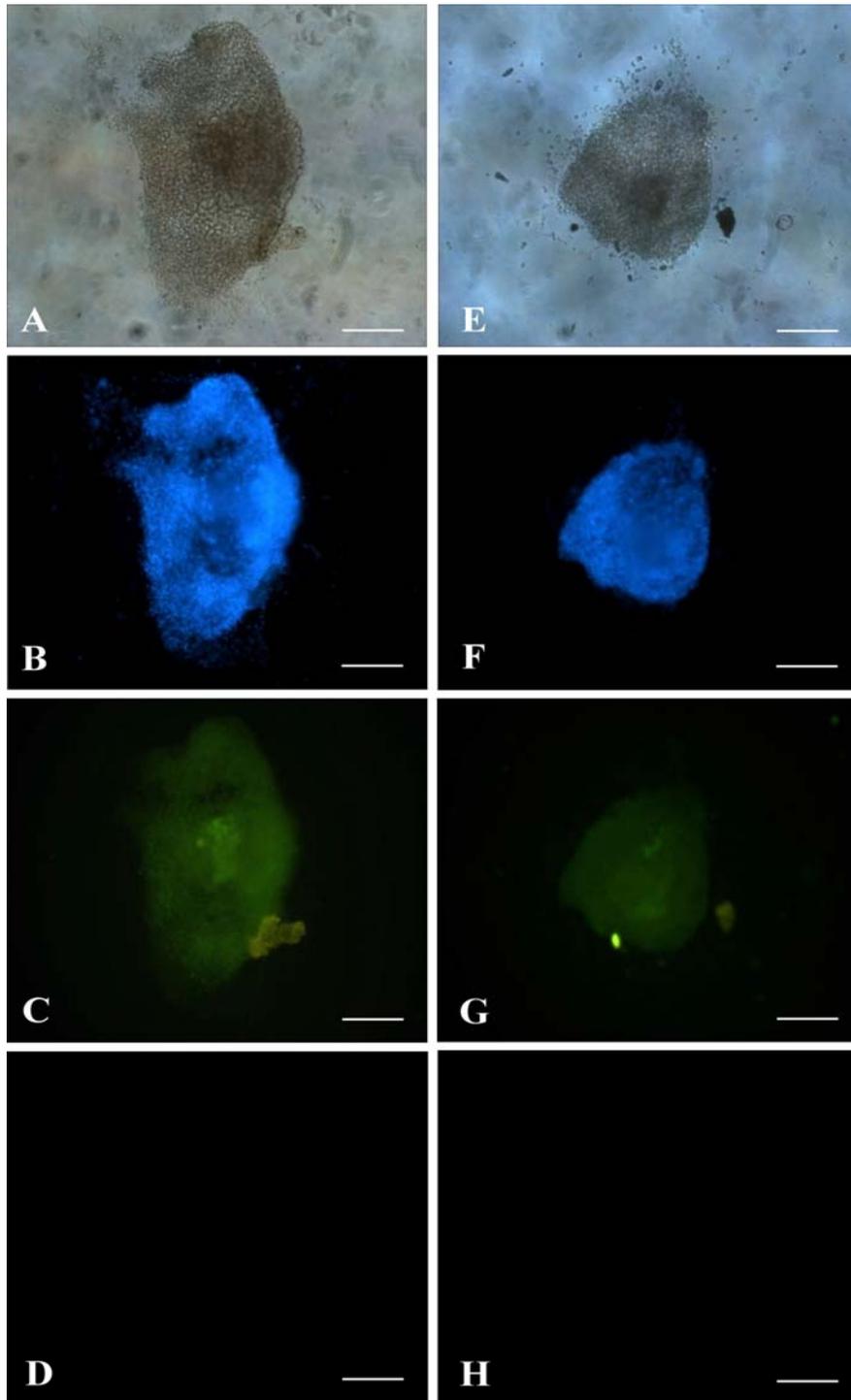


圖 10、小鼠胚胎幹細胞經體外誘導分化 26 天進行視網膜感光前驅細胞之專一性蛋白質 Crx 與視網膜色素上皮前驅細胞之專一性蛋白質 ZO-1 表現評估。A, E 為可見光下之細胞型態。B, F 以 DAPI 進行細胞核染色。C, G 細胞分別表現出 Crx 與

ZO-1。D, H 為免疫染色之對照組。比例尺=100 μm 。

2.兔胚幹細胞-

依據小鼠胚幹細胞視網膜相關細胞分化系統，做為誘導兔胚幹細胞分化之基礎，結果發現兔胚幹細胞於體外分化培養第 4 天，觀察發現神經細胞出現(圖 11A & E)，並於第 9 天將兔胚幹細胞分化培養出之細胞聚落 (colony) 進行免疫細胞染色，觀察於外胚層與早期視網膜前驅細胞 (retinal progenitor cell) 之特定蛋白質 Pax 6(圖 11B-D)與視網膜色素上皮前驅細胞之專一性蛋白質 Mitf 之表現 (圖 1F-H)，結果顯示於經體外分化 9 天之兔胚幹細胞皆僅能觀察到微弱之 Pax 6(圖 11C) 與 Mitf 表現 (圖 11G)，推測應與供偵測用 Pax 6 與 Mitf 之抗體有關，因目前用來偵測兔蛋白質表現之抗體不多，需進一步尋求此一共通問題之解決方式，除繼續尋找適用抗體評估蛋白質表現外，亦針對特定專一表現之基因表現先予以評估。

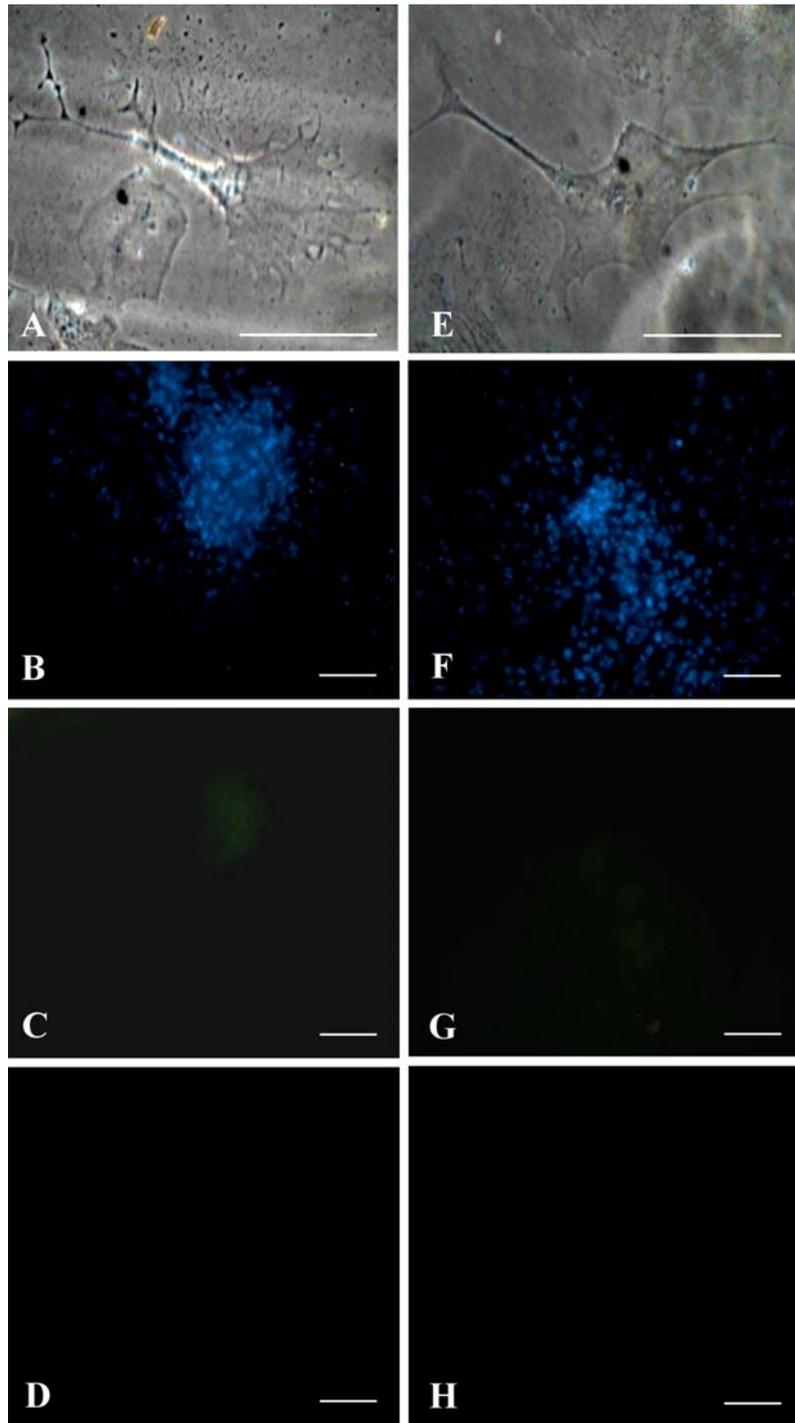


圖 11、兔胚幹細胞經體外分化 4 天形成神經細胞 (A, E)。B, F 以 DAPI 進行細胞核染色。C, G 分化細胞以免疫染色評估視網膜感光前驅細胞之專一性蛋白質 Crx 與視網膜色素上皮前驅細胞之專一性蛋白質 ZO-1，皆未能明顯觀察到其蛋白質表

現。D, H 為免疫染色之對照組。比例尺=100 μm 。

第三年度

以 NaIO_3 導致動物視網膜受損進而喪失視覺，以光照方式觀察其視覺功能喪失與否，發現動物對光照射眼睛已無任何反應，更進一步評估其視網膜電位反應亦無 a 或 b 波反應，此動物則可供視網膜色素上皮前驅細胞移植用。

經細胞移植後，於每二週以視網膜電位圖方式予以評估其視覺恢復情況，但皆仍未有明顯無 a 或 b 波反應，於二個月後將動物犧牲以組織切片觀察視網膜色素上皮細胞。結果發現作為對照組之健康雷克斯兔，其介於感光細胞與脈絡膜間之視網膜色素上皮細胞平均分布 (圖 12A 箭頭處)，相較於經誘導視網膜損傷一週 (圖 12B) 與二週 (圖 12C) 之視網膜色素上皮細胞隨著經誘導時間明顯減少 (箭頭處)，經細胞移植二個月後雖經視網膜電位圖評估無反應，但於下視網膜處 (subretina) 可觀察到經移植入之細胞 (圖 12D 箭號處)。

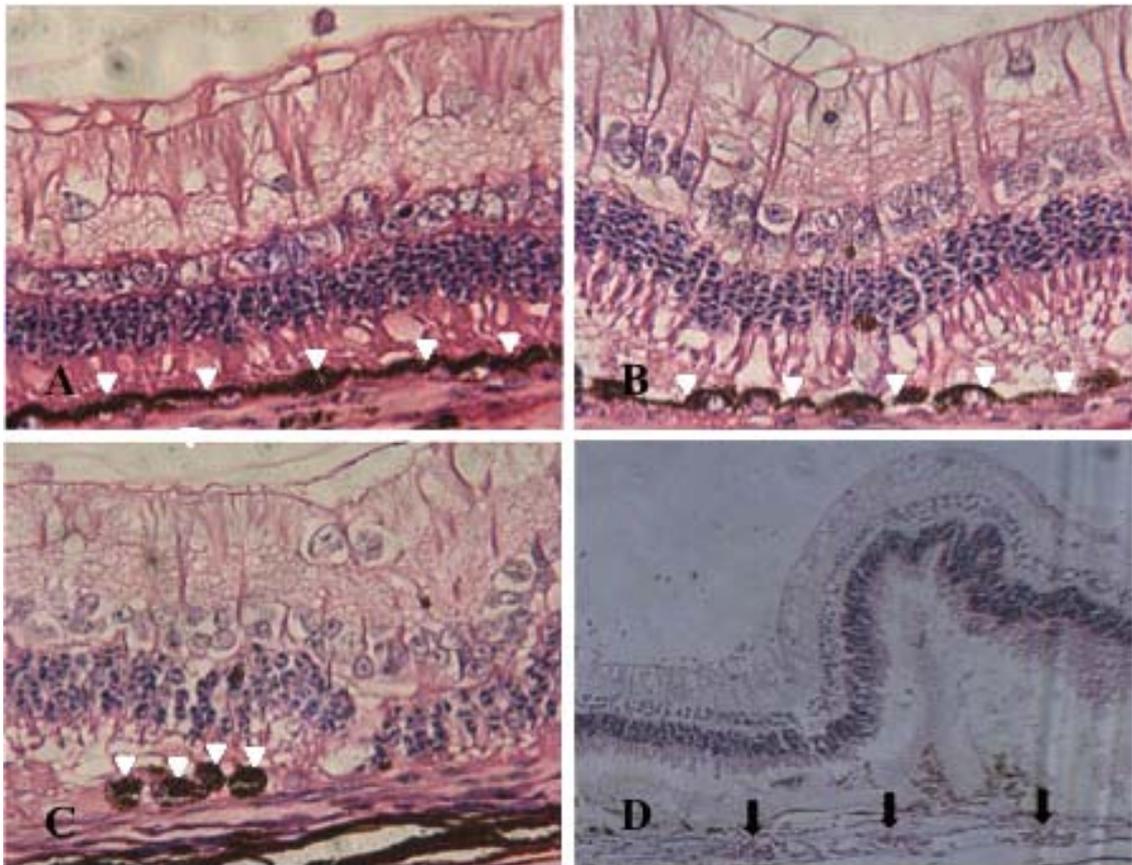


圖 12、雷克斯兔經誘導視網膜色素上皮細胞損傷與經細胞移植後之組織切片。A 為對照組之視網膜切片，其視網膜色素上皮細胞平均分布於感光細胞層與脈絡膜間（箭頭處）；B 為經 NaIO_3 誘導視網膜損傷後一週，可明顯觀察到視網膜色素上皮細胞已逐漸減少並分布不均（箭頭處）；C 則為視網膜受損二週後，其視網膜色素上皮細胞明顯減少（箭頭處）；D 為經細胞移植二個月後之視網膜切片圖，箭號指出下視網膜處（subretina）可觀察到經移植入之細胞。

結論

綜合此三年計劃結果顯示，此研究成功建立完整糖尿病誘發眼睛相關疾病之紐西蘭白兔動物模式，包括水晶體、視網膜等應用於此動物模式之評估方式，以及正常與病變組織之差異性；同時也本年度計畫結果已於實驗室建立小鼠胚幹細胞分化為視網膜神經細胞與色素上皮細胞，亦同時獲得於體外分化視網膜之經驗，並進行兔胚幹細胞分化視網膜相關細胞之系統建立。目前依據小鼠視網膜分化系統可將兔胚幹細胞分化為神經細胞，但仍須進一步確認其為視網膜相關細胞，目前尚未有兔胚幹細胞分化為視網膜細胞相關文獻，雖此為一複雜過程，但透過此研究進行已掌握兔胚幹細胞分化視網膜相關細胞之線索與經驗，也成功建立動物視網膜細胞移植系統，雖細胞移植後之取代受損細胞功能仍有待評估，但奠定後續相關研究進行之重要基礎，可藉由此動物模式進行相關人類視網膜疾病之探討並尋求有效解決策略。

參考文獻

- Chen JM, Cutler C, Jacques C, Boeuf G, Denamur E, Lecointre G, Mercier B, Cramb G and Ferec C. 2001. A combined analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: implications for structure and disease models. *Mol Biol Evol* 18:1771-1788.
- Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, Chowdhury NR, Baker JR Jr, Wilson JM. 1991. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex-vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* 254:1802-1805.
- Del Rio-Tsonis K, Washabaugh CH, Tsonis PA. 1995. Expression of pax-6 during urodele eye development and lens regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5092-5096.
- Del Rio-Tsonis K, Jung J-C, Chiu I-M, Tsonis PA. 1997. Conservation of fibroblast growth factor function in lens regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13701-13706.
- Del Rio-Tsonis K, Tomarev SI, Tsonis PA. 1999. Regulation of prox-1 during lens regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2039-2045.
- Del Rio-Tsonis K, Tsonis PA. 2003. Eye regeneration at the molecular age. *Dev Dyn* 226:211-224.
- Del Rio-Tsonis K, Eguchi G. 2004. Lens regeneration. In *Development of the Ocular Lens* (Lovicu F, Robinson M, eds), pp. 290–311. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ederer F, Hiller R, Taylor HR. 1981. Senile lens changes and diabetes in two population studies. *Am J Ophthalmol* 91:381-395.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Graves KH, Moreadith RW. 1993. Derivation and characterization of putative

- pluripotential embryonic 63 stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod. Dev* 36: 424-433.
- Haruta, M. et al. In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. 2004. *Invest. Ophthalmol* 45,1020–1025.
- Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Be´rard AM, Cornhill JF, Herderick EE, Feldman SH, Haudenschild CC, Vaisman BL, Hoyt RF Jr, Demosky SJ Jr, Kauffman RD, Hazel CM, Marcovina SM, Brewer HB Jr. 1996. Overexpression of lecithin:cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11448 –11453.
- Intawicha P, Ou YW, Lo NW, Zhang SC, ChenYZ, LinTA, Su HL, Guu HF, Chen MJ, Lee KH, Chiu YT, Ju JC. 2009. Characterization of embryonic stem cell lines derived from New Zealand white rabbit embryos. *Cloning Stem Cells* 11:1-11.
- Javitt JC, Aiello LP, Chiang Y, et al. 1994. Preventive eye care in people with diabetes is cost-saving to the federal government. Implications for health-care reform. *Diabetes Care* 17:909-917.
- Jung JC, Del Rio-Tsonis K, Tsonis PA. 1998. Regulation of homeobox-containing genes during lens regeneration. *Exp Eye Res* 66:361-370.
- Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, Takahashi M. 2009. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nat Protoc* 4:811-824
- Klein BE, Klein R, Moss SE. 1985. Prevalence of cataract in a populationbased study of persons with diabetes mellitus. *Ophthalmology* 92:1191-1196.
- Lodovici M, Caldini S, Morbidelli L, Akpan V, Ziche M, Dolara P. 2009. Protective effect of 4-coumaric acid from UVB ray damage in the rabbit eye. *Toxicology.* 255:1-5.
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos

- cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7634-7638.
- Mitchell P, Smith W, Chey T, Healey PR. 1997. Open-angle glaucoma and diabetes: the Blue Mountains eye study, Australia. *Ophthalmology* 104:712-718.
- Negi A, Vernon SA. 2003. An overview of the eye in diabetes. *J R Soc Med* 96:266-272.
- Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, Takahashi M. 2009. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nat Protoc.*4:811-824.
- Osakada, F., Jin, Z.B., Hiram, Y., Ikeda, H., Danjyo, T., Watanabe, K., Sasai Y., Takahashi, M. 2009. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *Cell Science* 122, 3169-3179.
- Rattner, A. & Nathans, J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. 2006. *Nat. Rev. Neurosci* 7, 860–872.
- Sullivan ME, Mumtaz FH, Dashwood MR, Thompson CS, Naseem KM, Bruckdorfer KR, Mikhailidis DP, Morgan RJ. 2002. Enhanced relaxation of diabetic rabbit cavernosal smooth muscle in response to nitric oxide: potential relevance to erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 14:523-532.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Toshida H, Odaka A, Koike D, Murakami A. 2008. Effect of retinol palmitate eye drops on experimental keratoconjunctival epithelial damage induced by n-heptanol in rabbit. *Curr Eye Res* 33:13-18.
- Tsonis PA, Madhavan M, Tancous EE, Del Rio-Tsonis K. 2004a. A newt's eye view of lens regeneration. *Int J Dev Biol* 48:975-980.

- Tsonis PA, Trombley MT, Rowland T, Chandraratna RAS, Del Rio-Tsonis K. 2000. Role of retinoic acid in lens regeneration. *Dev Dyn* 219:588-593.
- Tsonis PA, Madhavan M, Call MK, Gainer S, Rice A, Del Rio-Tsonis K. 2004b. Effects of a CDK inhibitor on lens regeneration. *Wound Repair Regen* 12:24-29.
- Tsonis PA, Vergara MN, Spence JR, et al. 2004c. A novel role of the hedgehog pathway in lens regeneration. *Dev Biol* 267:450-461.
- Vassilopoulos S, Esk C, Hoshino S, Funke BH, Chen CY, Plocik AM, Wright WE, Kucherlapati R, Brodsky FM. 2009. A role for the CHC22 clathrin heavy-chain isoform in human glucose metabolism. *Science* 324: 1192-1196.
- Zhao, C., Deng, W. & Gage, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. 2008. *Cell* 132, 645–660.

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值 (簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性)、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標 (請說明，以100字為限)

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：(以100字為限)

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

此學術研究結合視光臨床與視覺科學，將臨床技術應用於基礎研究，並將此研究成果有機會應用於人類視網膜相關疾病之治療方式。此研究成功建立完整糖尿病誘發眼睛相關疾病之紐西蘭白兔動物模式，將臨床檢查技術應用於動物之水晶體、視網膜等之評估，完整建構未來應用此動物模式之平台，相較於小鼠，實驗用兔更接近人類，更可直接應用人類眼睛相關檢查儀器，不需另行為小鼠量身訂做相關儀器，讓眼睛相關研究容易進行；同時也建立小鼠胚幹細胞分化為視網膜神經細胞與色素上皮細胞，亦將獲得之經驗進行兔胚幹細胞分化視網膜相關細胞之系統建立，進一步成功建立視網膜細胞移植系統，雖細胞移植後之取代受損細胞功能仍有待評估，需藉由後續計畫繼續深入探討，但已奠定後續相關研究進行之重要基礎，能提供國內視覺相關研究之良好動物模式與胚幹細胞分化為視網膜相關細胞之系統，可藉由此動物模式進行相關人類視網膜疾病之探討並尋求有效解決策略。

出國人員姓名 服務機關及職稱	曾榮凱 助理教授，中山醫學大學視光系
會議時間地點	06/19/2011~06/23/2011，匈牙利-布達佩斯
會議名稱	2011 國際高效能液相分離與相關技術（HPLC）研討會
發表論文題目	Determination of Phytochemical Compounds in Longan-flower-water-extract (<i>Dimocarpus longans</i> Lour.) by HPLC and Its Protection against Non-alcoholic Steatohepatitis

一、參加會議經過

於2010年十一月主辦單位以e-mail邀請寄發論文摘要。此研討會之發表的論文和探討的內容為國際頂尖之高效能液相分離和其相關技術之理論及應用探討，包含層面相當廣，同時亦包含發展中之最新技術和未來可能之發展層面和願景，故本人接受大會邀請將研究成果摘要寄至於大會主辦單位並獲得接受，於第36屆國際高效能液相分離與相關技術研討會發表論文。

二、與會心得

此研討會是國際公認在高效能液相層析領域方面最重要性的國際會議，自1973年來每年由北美和歐洲各國輪流主辦。研討會主要分為口頭宣讀、論文壁報以及特別演講等，參與此會議可體會出世界各國的科學家們在此相關領域之努力，並藉此了解現今此相關領域之研究發展趨勢，其中探討領域廣泛，包含所有尖端的高效能液相層析技術、尖端分離理論的基礎研究和所有相關的應用領域。此次大會7百多篇論文發表，來自世界各國的研究人員遠超過千人參加會議，會中poster大約有分為29個領域，從separation dynamics and selectivity、high speed

and high temperature separations、microfluidic and miniaturized separation systems、hyphenated separation、biopharmaceutical and biotechnology analysis、high-throughput separations、chiral separations、clinical and forensics analysis、agricultural and environmental application、nature product analysis、food safety、preparative separations、detectors/detection。與會讓人體會出世界各國的科學家們在高效能液相分離與相關技術之努力，參加此次之研討會真是獲益良多。此外，大會將資料e化收置於隨身碟，也是一種別出心裁的方法，相信將會是一種趨勢。

三、建議

舉凡蛋白質體分析，動物代謝產物分析、天然物分析與分離，食品分析、藥物分離檢測、環境檢測分析等，都需要利用高效能液相分離與相關技術，應用的範圍相當廣泛，包含領域有生物學、化學、食品學、環境科學、營養學、藥學、醫學等，此為一跨領域合作的平台，建議國內專家學者可參加此研討會，或以此模式增加國內學者跨領域之合作，更能開拓展新知研究方向。同時本人認為參加國際會議可以提升台灣能見度與增加學校知名度，並利用此會議時機與國外學者洽談合作事宜或邀請至台灣做學術指導，相信對未來台灣的大學邁向國際化全球化的腳步有加分的效果。

四、攜回資料名稱及內容

帶回許多作者於此次大會發表之壁報論文之reprint，大會之論文摘要集共計6百多篇，以及參展廠商之相關儀器設備資料。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/11/02

國科會補助計畫	計畫名稱: 定向分化兔胚胎幹細胞為視網膜前驅細胞供建立治療糖尿病誘發眼睛病變之動物模式
	計畫主持人: 曾榮凱
	計畫編號: 99-2313-B-040-003-MY3 學門領域: 畜牧
無研發成果推廣資料	

99 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：曾榮凱		計畫編號：99-2313-B-040-003-MY3				計畫名稱：定向分化兔胚胎幹細胞為視網膜前驅細胞供建立治療糖尿病誘發眼睛病變之動物模式	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

此學術研究結合視光臨床與視覺科學，將臨床技術應用於基礎研究，並將此研究成果有機會應用於人類視網膜相關疾病之治療方式。此研究成功建立完整糖尿病誘發眼睛相關疾病之紐西蘭白兔動物模式，將臨床檢查技術應用於動物之水晶體、視網膜等之評估，完整建構未來應用此動物模式之平台，相較於小鼠，實驗用兔更接近人類，更可直接應用人類眼睛相關檢查儀器，不需另行為小鼠量身訂做相關儀器，讓眼睛相關研究容易進行；同時也建立小鼠胚幹細胞分化為視網膜神經細胞與色素上皮細胞，亦將獲得之經驗進行兔胚幹細胞分化視網膜相關細胞之系統建立，進一步成功建立視網膜細胞移植系統，雖細胞移植後之取代受損細胞功能仍有待評估，需藉由後續計畫繼續深入探討，但已奠定後續相關研究進行之重要基礎，能提供國內視覺相關研究之良好動物模式與胚幹細胞分化為視網膜相關細胞之系統，可藉由此動物模式進行相關人類視網膜疾病之探討並尋求有效解決策略。