

雞誘導多能性幹細胞株的建立⁽¹⁾

劉振發⁽²⁾ 廖御靜⁽²⁾ 康定傑⁽³⁾ 蕭振文⁽⁴⁾ 薛佑玲⁽⁵⁾ 陳立人⁽²⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾

收件日期：106 年 6 月 28 日；接受日期：106 年 9 月 12 日

摘 要

本研究目的為建立雞誘導多能性幹細胞 (chicken induced pluripotent stem cells, ciPSC)，並探討雞誘導多能性幹細胞之分化多能性、胚體形成效率與分化潛力等特性，期供後續相關研究使用。試驗結果顯示，利用慢病毒 (lentivirus) 將轉錄因子基因 *LIN28*、*NANOG*、*SOX2*、*OCT3/4*、*KLF4* 和 *c-MYC* 轉染雞胚纖維母細胞 (chicken embryo fibroblasts, cEFs) 6 – 7 天後，cEFs 之細胞形態逐漸由梭狀轉為圓形之上皮細胞形態，持續培養 21 天後形成類似幹細胞群落形態。ciPSC 體外培養已超過 35 代 (300 天)，經分化多能性專一性抗體 Oct-4、AP 與 PAS 染色後可呈現陽性反應；在形態學上亦呈現具明顯細胞邊界、高核質比及大細胞核仁等幹細胞特徵。使用懸浮小滴培養技術培養，具有高效率 ($92.6 \pm 2.2\%$) 的類胚體 (embryoid body) 形成率；顯示所建立之雞誘導多能性幹細胞具有分化多能性之潛能。本研究已成功建立 ciPSC，冀望此細胞可應用於生物醫學和人類疾病領域研究。

關鍵詞：雞、胚纖維母細胞、誘導多能性幹細胞。

緒 言

哺乳動物的胚幹細胞 (embryonic stem cells, ESCs) 是一種具有自我更新、不斷裂殖、同時亦能分化成三胚層與生殖細胞系等不同組織形態與生理功能之細胞 (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009)。由於人類胚幹細胞之取得來源仍有道德倫理上的爭議，因此幹細胞研究專家希望能找到其它的取代方式。誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 的幹細胞科技在 2006 年公開發表，由日本京都大學的 Yamanaka 與其研究團隊，鎖定了胚幹細胞中具活化關鍵的 24 個候選基因，認為這些基因是胚幹細胞的獨特性，最終發現只需要將 4 個或更少的轉錄因子 (*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4* 與 / 或 *c-MYC*)，同時成功轉染至小鼠纖維母細胞，產製出具有分化多能性之幹細胞，既此稱為誘導多能性幹細胞。並且可以在其衍生的畸胎瘤 (teratoma) 的切片中，檢出分化為軟骨細胞、神經細胞、肌肉細胞、脂肪細胞與上皮細胞等不同胚層的細胞，此研究成果在幹細胞研究領域造成大轟動 (Takahashi and Yamanaka, 2006)，並且獲得 2012 諾貝爾醫學獎之殊榮。隨後利用此技術相繼建立了人類 (Park *et al.*, 2008)、猴子 (Liu *et al.*, 2008)、大鼠 (Liao *et al.*, 2009) 與馬 (Breton *et al.*, 2013) 的 iPSC。

家禽是一種很好的模式動物，常被使用在發育生物學與疾病之研究；另外，許多疫苗的生產也是利用家禽 (雞) 的胚胎或是初代培養的雞胚纖維母細胞 (primary chicken embryonic fibroblasts) 生產，但此方式確有其潛在的風險，例如無特定病原雞蛋短缺、病毒株毒性過強無法利用雞胚蛋培養。因此，近年來亦有成功開發利用由鴨子的胚幹細胞 (EB66 細胞株) 作為疫苗與蛋白質生產平臺 (Olivier *et al.*, 2010)。在家禽誘導多能性幹細胞株的建立研究，Lu *et al.* (2012) 利用哺乳動物的特定的基因 (*POU5F1*、*NANOG*、*SOX2*、*LIN28*、*KLF4*、*C-MYC*) 轉殖到鵪鶉的胚纖維母細胞 (quail embryonic fibroblasts, qEFs)，成功誘導胚胎纖維母細胞進行再程式化，轉變成具有類似胚幹細胞特性與功能的細胞株，並將誘導後的細胞移植到雞胚，也證實誘導後的細胞能順利移行，形成嵌合體。這是第一例禽類利用哺乳動物基因進行家禽誘導多能性幹細胞的研究。本研究之目的擬使用人類細胞之再程式化因子 (reprogramming factors) 建立雞誘導多能性幹細胞株，供後續相關研究使用。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2575 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(5) 國立中山大學高雄醫學大學聯合研究中心。

(6) 南臺科技大學生物科技系。

(7) 國立成功大學生物科技研究所。

(8) 通訊作者，E-mail：lrchen@mail.tlri.gov.tw。

材料與方法

I. 雞之胚纖維母細胞 (cEFs) 分離與培養

- (i) 將烏骨雞孵化第 9 天的胚取出，並將血液與蛋黃洗淨後，移至另一個裝有 10 mL Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) 的培養皿中將雞胚的頭部與內臟去除。
- (ii) 將去除頭部與內臟的胚體移至裝有 3 mL 的 0.25% Trypsin - 0.02% EDTA (Invitrogen, USA) 溶液的 6 cm 無菌培養皿中，以滅菌剪刀或解剖刀細切為組織碎片。以無菌之 5 mL 注射筒將上述含組織碎片的 0.25% Trypsin - 0.02% EDTA 溶液吸入注射筒中，再予以推出。重複吸推數次以將組織碎片細化之。
- (iii) 將細化含組織碎片的 0.25% Trypsin - 0.02% EDTA 溶液注入 6 cm 無菌培養皿中，移入二氧化碳培養箱中培養 5 min。
- (iv) 將含組織碎片的 0.25% Trypsin - 0.02% EDTA 溶液移到離心管中，加入含 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) 及胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Invitrogen) cEF 培養基 (DMEM + 10% FBS + 1% penicillin / streptomycin) 到 10 mL，充分混和後將離心管直立靜置在室溫中 5 min。
- (v) 以 2,000 rpm 離心 5 min，棄上清液後將細胞打散後再以 10 mL 的 cEF 培養基重新懸浮。以相同條件再離心一次。
- (vi) 將上清液移除後，把細胞打散後以 10 mL 的 cEF 培養基重新懸浮，充分混合後將離心管的細胞懸浮液，以 1×10^6 之細胞培養到一個 10 cm 的培養皿中，置於二氧化碳培養箱中，以 37°C 含 5% 二氧化碳的空氣進行體外培養。
- (vii) 培養期間每 2 - 3 天更換一次培養基，培養期間當細胞長到 70 - 80% 滿時，立即進行繼代培養或進行冷凍保存，以維持細胞旺盛的分裂能力。

II. 再程式化因子 (reprogramming factors) 之轉染

利用市售的再程式化因子套組 (set of lentivirus: EF1A-driven *LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* and *C-MYC*; Cat. # LV01006L; Creative Biogene, USA)。cEFs 再程式化因子之轉染操作流程略述如下，先將 6 個再程式化因子分裝 (3 μ L/ 瓶) 置於 -80°C 保存備用。取培養 2 - 3 代後之 6×10^5 的細胞置換到 3 cm 的培養皿進行培養，並在細胞於培養皿生長到 50 - 70% 滿後將培養液移除。同時取出已分裝之凍存的重新編程改造因子，置於 30°C 水浴槽解凍後，分別加入已備妥之 1 mL 的培養液中輕輕混合後加入到培養皿中，再加入 2 mL 的培養液就完成 cEFs 轉染操作，隨後立即將細胞移入培養箱於 37°C 與含 5% CO₂ 空氣及相對溼度 100% 條件下培養，24 h 後移除轉染的培養液，並將培養液換為雞胚生殖幹細胞基礎培養液 [DMEM 內含 10 units / mL of human leukemia inhibitory factor (hLIF; Sigma-Aldrich)、5 ng/mL of human stem cell factor (hSCF; Sigma-Aldrich)、10 ng/mL of human basic fibroblast growth factor (hbFGF; Sigma-Aldrich)、10 ng/mL of human insulin-like factor-I (hIGF-I; Sigma-Aldrich) 和 0.04 ng/mL of human interleukin-11 (hIL-11; Sigma-Aldrich)] 進行後續之細胞誘導培養。

III. 誘導幹細胞的特徵檢測分析

- (i) Oct-4 與 alkaline phosphatase (AP) 活性分析：利用免疫細胞化學染色法進行分析，染色時先將細胞以 10% 福馬林於室溫下固定 30 min，再加入 0.3% Triton X-100 反應 10 min，再加入 5% FBS 反應 2 h，之後加入一級抗體於 4°C 下反應隔夜後，加入二級抗體 rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H + L) (for Oct-4 staining, Jackson ImmunoResearch Cat # 111-025-003, West Baltimore Pike, PA, USA)，rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure rabbit anti-mouse IgG (H + L) (for AP staining, Jackson ImmunoResearch Cat # 315-025-003, West Baltimore Pike, PA, USA)，然後以螢光顯微鏡 (DM IRB; Leica, Wetzlar, Germany) 進行螢光分析。
- (ii) Periodic acid-Schiff (PAS) 細胞染色分析：將培養盤中的細胞培養液吸出，以 PBS 清洗一次再加入 1 mL 的 10% 福馬林的無水酒精固定細胞 5 min，以 PBS 清洗二次後，加入 1 mL periodic acid (Sigma-Aldrich)，於室溫下反應 5 min 後以 PBS 清洗二次。再加入 Schiff reagent (Sigma-Aldrich)，於室溫下反應 10 min 後以 PBS 清洗二次，再以顯微鏡進行呈色反應之觀察。

IV. 誘發類胚體 (embryoid body) 形成與自體分化

利用培養皿之上蓋製作 TeSR1 medium (Stemcell Technologies, Canada) 幹細胞懸浮培養小滴，每滴約 20 μ L。培養皿底部加入 5 mL PBS 以提供濕度防止小滴蒸發。將約 2.0×10^6 個未分化之雞誘導多能性幹細胞置入單一懸浮培養小滴中，培養於 37°C 與含 5% CO₂ 空氣的培養箱中，以誘發類胚體形成。培養 7 天之後，觀察記錄類胚體形成。

形成類胚體後，以胚幹細胞培養液培養於預先以 0.1% gelatin 處理之 4 孔細胞培養盤，進行貼附培養以誘

導自體分化。於貼附培養一週與二週之後，分別以免疫細胞化學染色法進行分化標誌的分析。供試之細胞先以 10% 中性福馬林 (neutral buffered formalin) 於室溫下固定 30 min，再以 0.3% Triton X-100 反應 10 min 後，以 5% FBS 作用反應 2 h。之後，加入一級抗體 (primary antibody) 於 4°C 下反應至隔夜。隔天再以二級抗體 (secondary antibody) 與 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色進行螢光分析。使用之一級抗體為 neurofilament light (NFL, Millipore Cat. #AB9568)、atrial natriuretic peptide (ANP, Millipore Cat. #AB1970) 與 α -fetoprotein (AFP, Santa Cruz Cat. #SC-8108, Dallas, TX, USA)；二級抗體為 rhodamine (TRITC) (Jackson ImmunoResearch Cat. #111-025-003, for NFL and ANP staining; Cat. #305-025-003, for AFP staining)。染色之結果以倒立螢光顯微鏡 (DMIRB, Leica, Germany) 與超高感度冷卻式數位影像系統 (CoolSNAP HQ2 Monochrome, Photometrics, USA) 及影像分析系統 MetaMorph 6.0r5 (Universal Imaging, USA) 記錄和分析結果。

結果與討論

I. 雞胚纖維母細胞分離與誘導多能性幹細胞之培養

將源自烏骨雞孵化第 9 天的胚去除頭部與內臟去除後，所取得之雞胚纖維母細胞再以 DMEM，添加 10% 胎牛血清以及 100 U/ml penicillin-100 g/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) 之培養液進行培養，剛從雞胚組織所分離的 cEFs 於最初放入培養皿開始培養 24 h 後，更換培養液以移除未貼附的死亡細胞與懸浮的組織碎片，之後定期每 2 天更換培養液，約於 6 – 7 天時進行繼代。經過 48 h 培養後可見 cEFs 開始增生，細胞呈現梭狀，即已建立初代之雞胚纖維母細胞 (cEFs) 株 (圖 1)，最後將其保存於 -80°C 冰箱中備用。

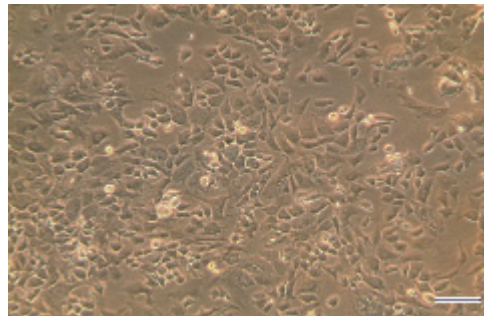


圖 1. 自孵化第 9 天胚分離之雞胚纖維母細胞 (cEFs) 的形態。

Fig. 1. The morphology of chicken embryo fibroblasts (cEFs) collected from a 9-day-old embryo. Scale bar = 20 μ m.

取體外培養至第 3 代的 cEFs 作為轉染誘導的細胞，取 6 孔培養盤每孔放置約 6×10^5 的細胞，再利用已構築之 iPS Lentivirus-LIN28, Lentivirus-NANOG, Lentivirus-SOX2, Lentivirus-OCT3/4, Lentivirus-KLF4 和 Lentivirus-C-MYC 轉錄因子之慢病毒顆粒進行轉染。轉染 24 h 後移除慢病毒顆粒轉染液，並將培養液換為雞胚生殖幹細胞基礎培養液，培養溫度條件為 37°C，氣相條件為含 5% 二氧化碳的空氣。培養期間每二天更換細胞培養液，並持續觀察 cEFs 之形態變化。轉染後之 cEFs 經 5 – 6 天培養至第 1 代時，細胞形態逐漸由梭狀轉變成圓形之上皮細胞形態 (圖 2)；經 12 天培養至第 2 代時，上皮細胞樣之細胞開始聚集，於 21 天後明顯聚集形成胚幹細胞之群落形態 (圖 2)；經 28 – 30 天培養至第 4 代時，細胞多數均已聚集為類胚幹細胞之群落形態，形成了誘導多能性幹細胞株。

惟在初期的誘導培養期間，細胞形態雖有因為基因的重整而有所改變，但生長狀態出現增生緩慢的現象。因此，將重整的細胞重新置放到經 mitomycin C 不活化處理之 STO 供養層細胞中進行後續之培養，重整細胞在與 STO 供養層細胞共培養的情況下增生緩慢的現象獲得改善，但是重整細胞形成群落的情形不明顯，只出現小的細胞群落，無法像一般胚幹細胞幹細胞可以形成明顯而較為聚集的細胞群落之形態。此現象亦發生在 Lu *et al.* (2012) 的研究中，故其將誘導的細胞自 STO 移除，重新置換到以 0.1% Matrigel[®] 處理之培養皿，並將培養液更換成 mTeSR1 stem cell medium (Stemcell Technologies, Cat. #05850)。本實驗亦參照其操作，在誘導細胞與 STO 共培養約 1 個月後，就以第四型的膠原蛋白酶將重整細胞自含有 STO 的培養皿中分離，重新置換到以 0.1% Matrigel[®] 處理之 4 孔細胞培養皿，亦將培養液更換成 mTeSR1 stem cell medium 中繼續培養。重整細胞自 STO 分離後單獨培養，其生長速率明顯改善，而且細胞增生會相互聚集形成明顯的細胞群落 (圖 3)，且不同群落間亦會有細胞延伸相互接觸之現象產生。

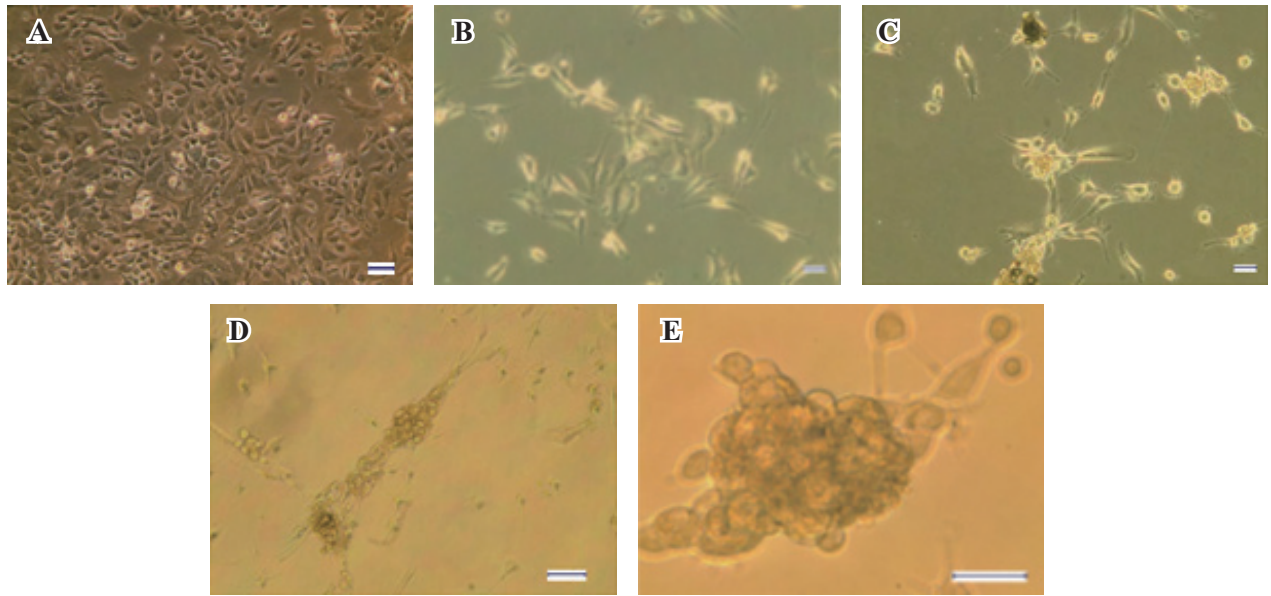


圖 2. 雞之胚纖維母細胞經再程式化因子 (*LIN28*、*NANOG*、*SOX2*、*OCT3/4*、*KLF4* 和 *C-MYC*) 轉染後之細胞形態。
A：cEFs 轉染前；B：轉染後第 3 天；C：轉染後第 9 天；D：轉染後第 12 天。E：轉染後第 21 天。

Fig. 2. The morphology of cEFs infected with reprogramming factors (*LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* and *C-MYC*).
A: cEFs prior to addition of reprogramming factors; B: day 3 post transfection; C: day 9 post transfection; D: day 12 post transfection; E: day 21 post transfection. Scale bar = 50 μ m.

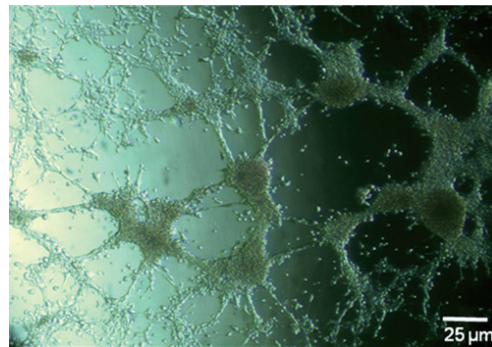


圖 3. ciPSC 細胞增生聚集形成明顯的細胞群落。

Fig. 3. The ciPSC cells proliferate and aggregate to form distinct colonies. Scale bar = 25 μ m.

利用再程式化因子轉染，進行 ciPSC 誘導過程中，並非所有 cEFs 均被成功轉染。因此，在誘導後的培養過程中，於初期仍可觀察到 cEF 的存在。惟此現象隨會著細胞繼代次數的增加而逐漸減少，約在細胞經過 8 代培養後就少有發現，持續繼代至 12 – 13 代後就再也沒有發現 cEF 的存在 (圖 4)。此乃因 cEF 為已分化之細胞，無法於體外長時間的培養，故此等未被再程式化因子轉染之 cEF 存在的情形會隨著培養 (繼代) 時間的增加而減少，最後僅留下有成功被程式化因子轉染的細胞 (iPSC) 存活。

Rosselló *et al.* (2013) 指出以雞的 cEFs 利用再程式化因子轉染，進行 ciPSC 誘導，在細胞群落形成後且細胞呈現出明顯的圓形狀，並具有暗色的細胞核，此即是為雞誘導幹細胞的形態。但若培養條件變更或細胞老化時則此等幹細胞的特徵 (圓形狀，並具有暗色的細胞核) 就會喪失，並回復成 cEFs 之形態。

除了細胞外觀形態的改變外，細胞內部胞器亦有變化，有文獻指出在哺乳動物細胞於再程式化和分化過程中，細胞內擔任能量代謝的胞器 "粒線體 (mitochondria)" 會發生改變，如小鼠 ESCs 和 iPSC 等未分化之多能性細胞之粒線體是呈現具不成熟嵴 (immature cristae) 的圓形狀，能量代謝主要藉由厭氧糖解 (anaerobic glycolysis) 方式產生能量，但當這些多能性細胞分化成為體細胞，或已分化細胞則是呈現具有成熟嵴 (mature cristae) 的細長形之粒線體，且能量代謝轉變為以有氧代謝 (aerobic metabolism) 為主 (Choi *et al.*, 2015)。Choi *et al.* (2016) 將雞的 CEF 誘導成為 ciPSLCs (chicken iPS-like cells) 後觀察細胞內粒線體的構造，發現原本具有成熟嵴的細長形粒線體之 CEF，經再程式化成為 ciPSLCs 後其粒線體構造由具有成熟嵴的細長形轉變成為具不成熟嵴的圓形狀，此現象與小鼠相似 (Choi *et al.*, 2015)。

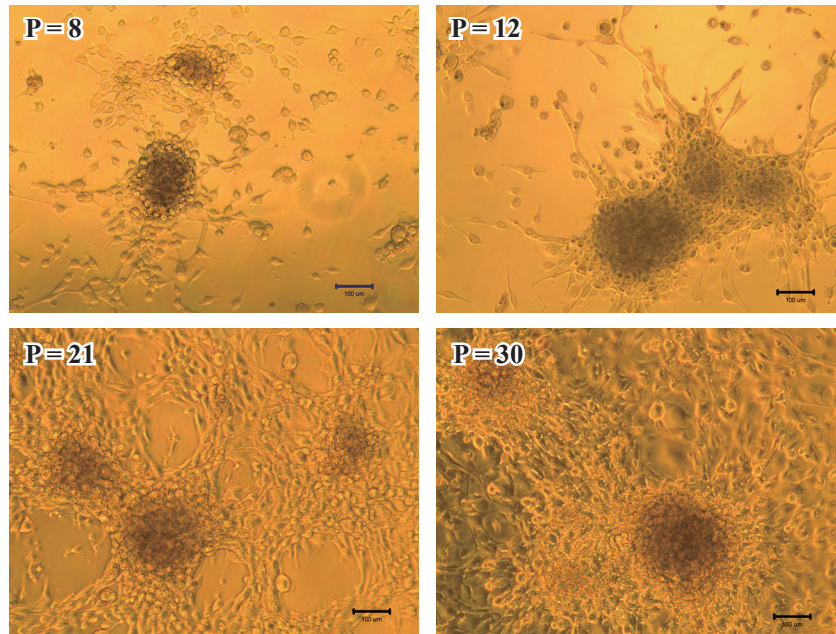


圖 4. 雞誘導多能性幹細胞 (ciPSC) 於不同繼代培養，均呈現類幹細胞之群落形態。

Fig. 4. Morphology of chicken induced pluripotent stem cells (ciPSC) at different subculture passages. Scale bar = 100 μ m.

觀察本研究所建立的 ciPSC 亦是呈現出明顯的圓形狀，並具有暗色的細胞核。因為是在沒有滋養層細胞共培養的情況下，在繼代的培養過程中發現於細胞增生的初期，若是在單一細胞的情況下，此細胞會發展出類似 "觸鬚" 之特徵並朝向周圍之細胞延伸，此時細胞外觀形態會從圓形變成梭形，當觸鬚與周圍之細胞接觸後，細胞就會逐漸恢復成圓形狀。如是在細胞群落的情況下，則位於內部位置之細胞會逕行分裂增生，聚集堆疊形成顏色較深的細胞群落，但在群落外圍之細胞亦會發展出類似 "觸鬚" 之特徵，向外延伸企圖與其他週遭細胞進行接觸，並在接觸後回復成圓形狀。不論是單一細胞或群落外圍之細胞當觸鬚與其他細胞接觸後，除了細胞會恢復成圓形狀外，此時細胞核顏色亦會逐漸變為深色，並進行分裂增生形成細胞群落之形態 (圖 3)。

截至目前 ciPSC 已於體外無滋養層培養條件下，培養超過 35 代 (300 天)，並已凍存於液態氮中。冷凍保存的 ciPSC 解凍後再培養仍保有良好的存活率與生長效率。本研究之雞胚纖維母細胞經細胞再程式化因子轉染後，5—6 天可觀察到細胞形態改變，由梭形狀 (纖維母細胞之形態) 轉變成圓形之上皮細胞形態，持續培養 9 天後，這些圓形狀之細胞開始聚集成類幹細胞之群落形態。這與 Lu *et al.* (2012) 利用哺乳動物的特定的重組因子轉殖到鵪鶉的胚纖維母細胞 (quail embryonic fibroblasts, qEFs)，進行鵪鶉誘導多能性幹細胞 (quail iPSCs, qiPSCs) 所觀察到的變化情形類似，惟在鵪鶉的胚胎纖維母細胞經轉染再程式化因子後，細胞形態的改變 (約轉染後 24 h) 及形成類幹細胞之群落形態 (約轉染後 6 天)，與本實驗進行雞胚胎纖維母細胞再程式化因子轉染後誘導成為類幹細胞的形態之時間有些許差異，推測為雞與鵪鶉之品種間差異所致，有待後續相關實驗來驗證。

II. 雞誘導型幹細胞的特徵檢測分析

經過誘導後的類幹細胞群落之細胞，選用已被發表用來檢測雞始基生殖細胞 (PGCs) 和雞幹細胞 (ESCs) 的細胞標誌 Oct-4 與 AP 利用免疫組織學染色方式，以及 PAS 染色進行分化多能性測試 (Jung *et al.*, 2005; van de Lavoie *et al.*, 2006; Liou *et al.*, 2012)。結果顯示經過誘導後的類幹細胞群落之 ciPSC 經以 PAS (圖 5)、Oct-4 與 AP (圖 6) 的染色測試均呈陽性反應，初步推測其可能具有幹細胞之分化多能性。另外，在利用顯微鏡觀察分析，亦可見 ciPSC 群落形態亦呈現具明顯細胞邊界、高核質比及大細胞核仁等幹細胞型態學特徵 (圖 7)。此等形態學外觀亦與先前文獻發表之鵪鶉 (Lu *et al.*, 2012) 及雞 (Rosselló *et al.*, 2013) 的誘導多能性幹細胞之特徵相類似。有關 ESCs 或 iPSc 所形成群落形態之特徵，均是有許多單一的 ESCs 或 iPSc 聚集而成且兩者外觀形態類似，但物種間可能存在些許的差異。Rosselló *et al.* (2013) 指出小鼠 iPSC 的細胞群落內的個體別細胞較大且大小較為平均，但雞的 iPSc 細胞群落內的個體別細胞較小且呈現更為緊密的聚集，兩者之群落形態是有些差異。在人 iPSC 和小鼠 iPSC 細胞群落，亦被觀察到類似的差異 (Nichols and Smith, 2009)。

III. 類胚體形成與與自體分化

胚幹細胞衍生的類胚體 (embryoid bodies, EBs) 具分化形成三個胚層的能力及形成各種不同型態的細胞潛能 (Doetschman *et al.*, 1985; Shen and Leder, 1992; Desbaillets *et al.*, 2000)。因此，EBs 的形成是常被用於測試胚幹細

胞株具三胚層細胞分化潛力的指標。為了驗證 ciPSC 分化潛力，本研究利用懸浮培養進行 ciPSC 之體外培養誘發為類胚體測試。結果顯示，ciPSC 於懸浮培養 7 天後觀察可見細胞聚集形成圓球狀結構之類胚體 (圖 8)，其形成效率為 $92.6 \pm 2.2\%$ (138/150, $n = 5$)。

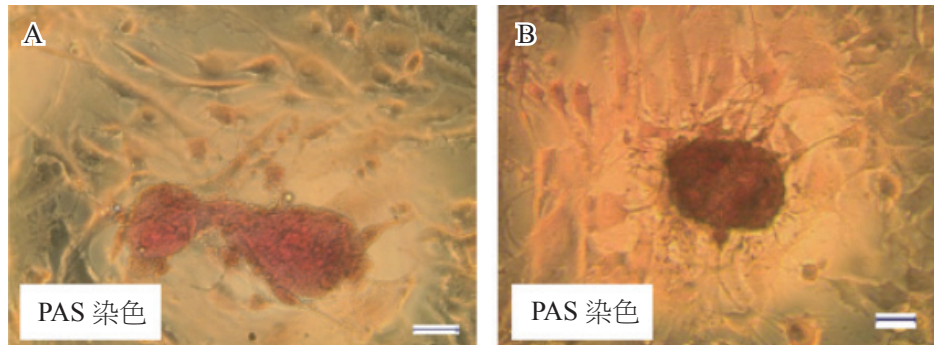


圖 5. 雞誘導多能性幹細胞 (ciPSC) 利用 periodic acid-Schiff (PAS) 進行組織化學染色。A：ciPSCs 培養 60 天；B：ciPSCs 培養 280 天。

Fig. 5. Histochemical staining of chicken induced pluripotent stem cells (ciPSC) with periodic acid-Schiff (PAS). A: ciPSCs cultured for 60 days; B: ciPSCs cultured for 280 days. Scale bar = 50 μ m.

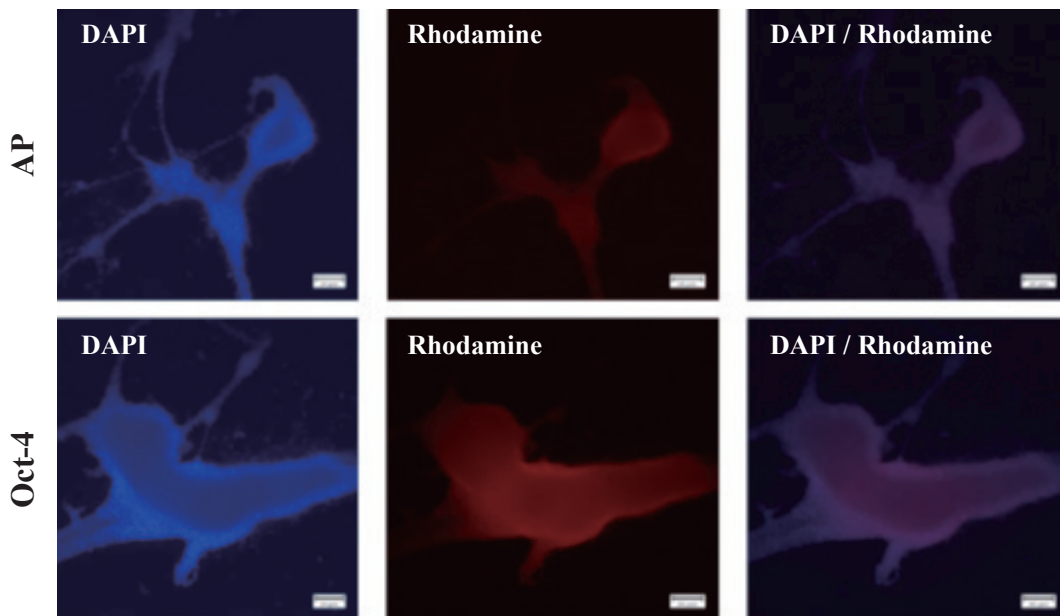


圖 6. 利用 AP 及 Oct-4 抗體對培養 280 天的雞誘導多能性幹細胞 (ciPSC) 進行免疫組織化學染色。

Fig. 6. Immunohistochemical staining of ciPSC cultured for 280 days with antibodies specifically against to AP and Oct-4. Scale bar = 50 μ m.

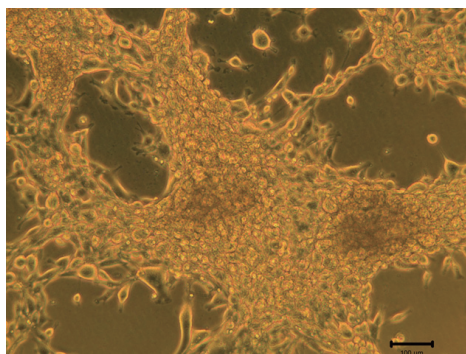


圖 7. 雞之誘導多能性幹細胞 (ciPSC) 型態學觀察，可見呈現具明顯細胞邊界、高核質比及細胞核大等幹細胞特徵。

Fig. 7. The morphological of ciPSC colonies were highly refractive, and at the single-cell level they showed clear cell borders, high nuclear-to-cytoplasm ratio, and prominent nucleoli characteristics. Scale bar = 100 μ m.

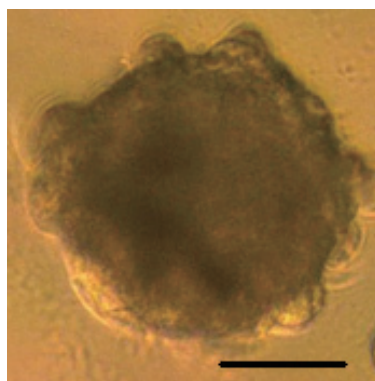


圖 8. 利用懸浮培養可誘發 ciPSC 形成類胚體。

Fig. 8. The embryoid body of ciPSC formed in hanging-drop culture. Scale bar = 100 μ m.

隨後將類胚體收集改以貼附培養方式進行誘導自體分化，經過約 10 – 14 天的誘導分化後，利用免疫細胞化學染色法進行細胞分化標誌的表現分析，以測試 ciPSC 是否具有分化成三胚層之潛力。選用的細胞標誌分別為 NFL (外胚層)、ANP (中胚層)、cytokeratin (內胚層) 之細胞表面標誌，測試結果均呈陽性反應 (圖 9)，顯示 ciPSC 具自體分化為三胚層之潛力。依據類胚體形成與自體分化測試結果，證實雞之誘導多能性幹細胞具有與一般胚幹細胞相似之初步分化潛力。

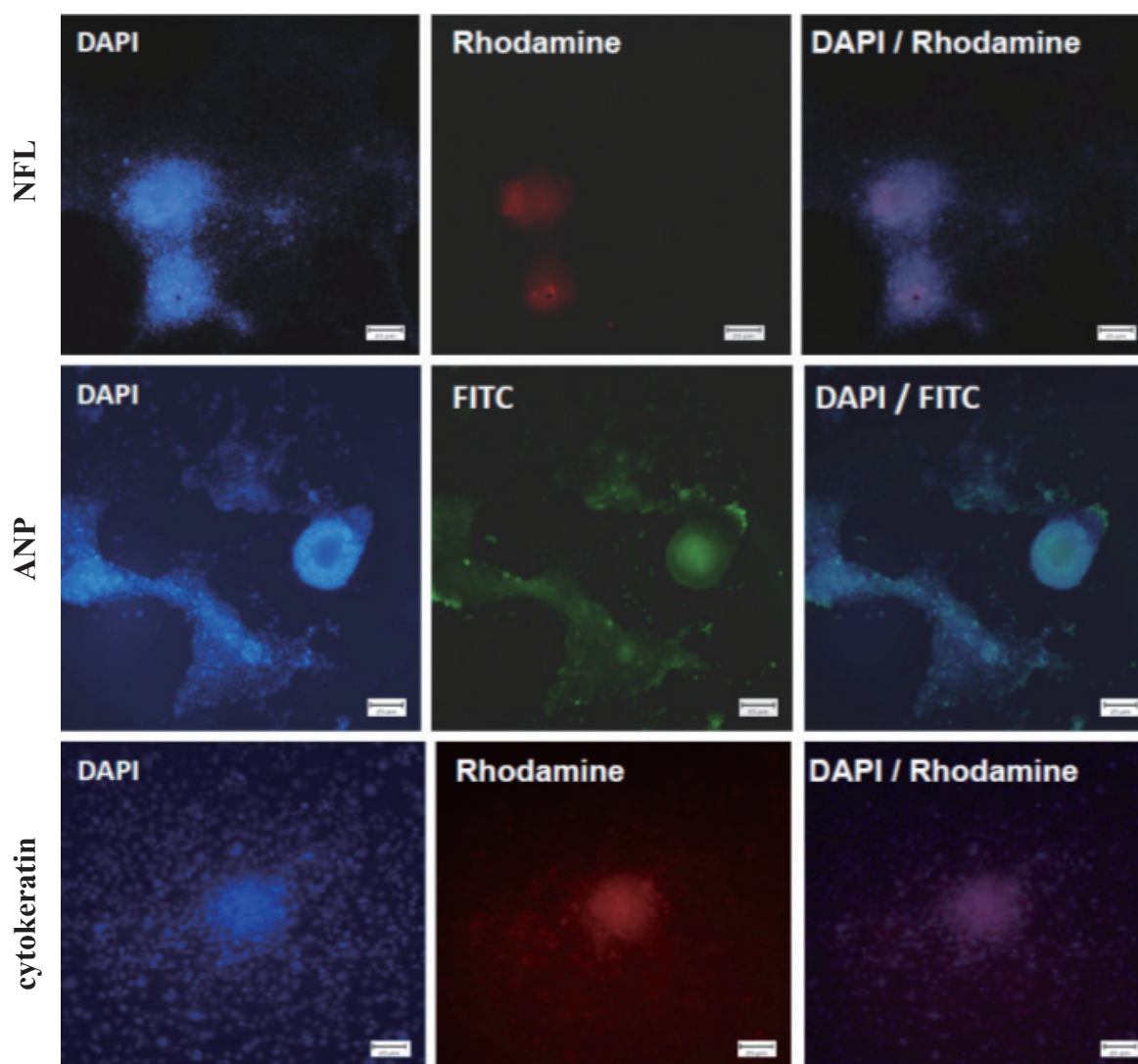


圖 9. 類胚體進行貼附培養後呈現外胚層 NFL 標記、中胚層 ANP 標記、內胚層 cytokeratin 標記。

Fig. 9. Specific expression of ectodermal NFL marker, mesodermal ANP marker and endodermal cytokeratin marker after attachment culture. Scale bar = 50 μ m.

胚幹細胞具有自我更新、不斷裂殖和分化成三胚層及多種不同組織類型的體細胞之能力。在許多的研究報告中亦證實 iPSCs 亦有與 ESCs 相類似之分化潛能 (Thomson *et al.*, 1998; Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009) 及在體外 (*in vitro*) 和體內 (*in vivo*) 的環境中均表現出高度的可塑性 (plasticity) (Takahashi and Yamanaka, 2006)。於 2006 年小鼠 iPSC 首次發表後，此誘導技術已被應用在多種哺乳動物測試，均證實已分化體細胞皆可藉由再程式化因子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*) 轉染後，成功被誘導成為 iPSC。目前 iPSCs 已進一步被應用於再生醫學、基礎發育生物學、藥物篩選、基因轉殖、基因標靶 (gene targeting) 等領域之研究 (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Hanna *et al.*, 2008; Aasen *et al.*, 2008; Haase *et al.*, 2009; West *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010)。雖然雞的 ESC 和 PGC 細胞株已被建立 (Pain *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2010)，但截至目前這些細胞並未像哺乳類的 ESC 或 iPSC 被普遍應用，尤其是在基因標靶 (gene targeting) 的相關研究。探究其原因乃是因為雞的 ESC 和 PGC 在體外培養的過程中細胞增殖的效率並不高 (Lu *et al.*, 2012)，除此之外，雞的 ESC 和 PGC 在形成嵌合體的潛力也會隨著體外培養繼代次數的增加而顯著降低 (Motono *et al.*, 2010; Petite *et al.*, 2004)，因此降低了其相關應用的潛力。另外在體外分化潛能測試，雞的 ESC 亦沒有像哺乳類的 ESC，具有分化成三胚層及多種不同組織類型的細胞之能力。然而，在已發表的禽類的 iPSC 研究中均指出，禽類的 iPSC 亦如同哺乳類的 ESC 與 iPSC 一樣具有分化形成三胚層及多種不同組織類型細胞之能力，因此禽類的 iPSC 未來在相關領域的應用性將可提升 (Lu *et al.*, 2012; Rosselló *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2014)。本研究所建立的 ciPSC 細胞株除以細胞免疫染色等檢測方式，確認表現相關的細胞標誌，亦利用懸浮培養證實具類胚體形成及自體分化形成三胚層之能力，證實具有與一般胚幹細胞相似之分化潛能。

綜合上述的試驗結果，本研究已成功建立類 ciPSC 細胞株，後續將持續進行細胞核形分析、畸胎瘤形成及嵌合體的等相關探討，在進一步改善其品質後。可望提供質量穩定的家禽細胞以進行轉基因家禽產製，建構生物工廠供生產高價值醫療用蛋白質。此技術平臺同時也可以運用在因應全球暖化氣候變遷下，進行珍貴鳥禽種原的保存及復育瀕臨絕種動物。

致 謝

本研究由生理組同仁許義明、李秀美與孫碧月等協助完成，特此致謝。

參考文獻

- Aasen, T., A. Raya, M. J. Barrero, E. Garreta, A. Consiglio, F. Gonzalez, R. Vassena, J. Bilic, V. Pekarik, G. Tiscornia, M. Edel, S. Boué and J. C. I. Belmonte. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26: 1276-1284.
- Agustin, L. M., G. E. Erika, M. C. Alexander, M. D. Ashley, B. S. Karla, A. T. Panagiotis and D. T. Katia. 2014. Reprogramming of the chick retinal pigmented epithelium after retinal injury. *BMC Bio.* <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/12/28>.
- Breton, A., R. Sharma, A. C. Diaz, A. G. Parham, A. Graham, C. Neil, C. B. Whitelaw, E. Milne and F. X. Donadeu. 2013. Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts. *Stem Cells Dev.* 22: 611-621.
- Choi, H. W., J. H. Kim, M. K. Chung, Y. J. Hong, H. S. Jang, B. J. Seo, T. H. Jung, J. S. Kim, H. M. Chung, S. J. Byun, S. G. Han, H. G. Seo and J. T. Do. 2015. Mitochondrial and metabolic remodeling during reprogramming and differentiation of the reprogrammed cells. *Stem Cells Dev.* 24: 1366-1373.
- Choi, H. W., J. S. Kim, S. Choi, Y. J. Hong, S. J. Byun, H. G. Seo and J. T. Do. 2016. Mitochondrial remodeling in chicken induced pluripotent stem-like cells. *Stem Cells Dev.* 25: 472-476.
- Dai, R., R. Rossello, C. C. Chen, J. Kessler, I. Davison, U. Hochgeschwender and E. D. Jarvis. 2014. Maintenance and neuronal differentiation of chicken induced pluripotent stem-like cells. *Stem Cells Int.* 2014: 182737.
- Desbaillets, I., U. Ziegler, P. Groscurth and M. Gassmann. 2000. Embryoid bodies: an *in vitro* model of mouse embryogenesis. *Exp. Physiol.* 85: 645-651.
- Doetschman, T. C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt and R. Kenter. 1985. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87: 27-45.

- Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
- Haase, A., R. Olmer, K. Schwanke, S. Wunderlich, S. Merkert, C. Hess, R. Zweigerdt, I. Gruh, J. Meyer, S. Wagner, L. S. Maier, D. W. Han, S. Glage, K. Miller, P. Fischer, H. R. Schöler and U. Martin. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 5: 434-441.
- Hanna, J., S. Markoulaki, P. Schorderet, B. W. Carey, C. Beard, M. Wernig, M. P. Creighton, E. J. Steine, J. P. Cassady, R. Foreman, C. J. Lengner, J. A. Dausman and R. Jaenisch. 2008. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133: 250-264.
- Jung, J. G., D. K. Kim, T. S. Park, S. D. Lee, J. M. Lim and J. Y. Han. Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells. 2005. *Stem Cells* 23: 689-698.
- Liao, J., C. Cui, S. Chen, J. Ren, J. Chen, Y. Gao, H. Li, N. Jia, L. Cheng, H. Xiao and J. Xiao. 2009. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 4: 11-15.
- Liou, J. F., J. W. Shiau, J. Tailiu, C. Tai, L. R. Chen and M. C. Chang. 2012. Culture of chicken gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken embryonic fibroblast (cEF) cells conditioned medium and *in vivo* migration. *J. Anim. Vet. Adv.* 11: 2196-2203.
- Liu, H., F. Zhu, J. Yong, P. Zhang, P. Hou, H. Li, W. Jiang, J. Cai, M. Liu, K. Cui, X. Qu, T. Xiang, D. Lu, X. Chi, G. Gao, W. Ji, M. Ding and H. Deng. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3: 587-590.
- Lu Y., D. W. Franklin, J. J. Brian, L. M. Jennifer, T. J. Erin, G. C. Amalia, B. B. Robert and L. S. Steven. 2012. Avian-induced pluripotent stem cells derived using human reprogramming factors. *Stem Cells Dev.* 21: 394-403.
- Martin, G. R. 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.
- Motono, M., Y. Yamada, Y. Hattori, R. Nakagawa, K. Nishijima and S. Iijima. 2010. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *J. Biosci. Bioeng.* 109: 315-321.
- Nichols, J and A. Smith. 2009. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4: 487-492.
- Olivier S., J. Marine, B. Cédric, B. Sylvana, M. Thomas, N. Olivier, A. Audrey, D. Séverine, S. Boussad, G. Fabienne, G. Laurent, B. Mathilde, V. Henri, B. Nicola and M. Majid. 2010. EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity. *mAbs* 2: 405-415.
- Pain, B., M. E. Clark, M. Shen, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut and R. J. Etches. 1996. Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122: 2339-2348.
- Park, I. H., R. Zhao, J. A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T. A. Ince, P. H. Lerou, M. W. Lensch and G. Q. Daley. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451: 141-146.
- Petitte, J. N., G. Liu, and Z. Yang. 2004. Avian pluripotent stem cells. *Mech. Dev.* 121: 1159-1168.
- Rosselló, R. A., C. C. Chen, R. Dai, J. T. Howard, U. Hochgeschwende and E. D. Jarvis. 2013. Mammalian genes induce partially reprogrammed pluripotent stem cells in non-mammalian vertebrate and invertebrate species. *eLife* 2: e00036. DOI: 10.7554/eLife.00036.
- Rui, D., R. Ricardo, C. Chun-chun, K. Joeran, D. Ian, H. Ute and J. D. Erich. 2014. Maintenance and neuronal differentiation of chicken induced pluripotent stem-like cells. *Stem Cells Int.* 2014: 182737.
- Shen, M. M. and P. Leder. 1992. Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 8240-8244.
- Takahashi, K and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
- van de Lavoie, M. C., J. H. Diamond, P. A. Leighton, C. Mather-Love, B. S. Heyer, R. Bradshaw, A. Kerchner, L. T. Hooi and

- T. M. Gessaro. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441: 766-769.
- West, F. D., S. L. Terlouw, D. J. Kwon, J. L. Mumaw, S. K. Dhara, K. Hasneen, J. R. Dobrinsky and S. L. Stice. 2010. Porcine induced pluripotent stem cells produce chimeric offspring. *Stem Cells Dev.* 19: 1211-1220.
- Wu, Y., Y. Zhang, A. Mishra, S. D. Tardif and P. J. Hornsby. 2010. Generation of induced pluripotent stem cells from newborn marmoset skin fibroblasts. *Stem Cell Res.* 4: 180-188.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin and J. A. Thomson. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920.
- Zhao, X. Y., W. Li, Z. Lv, L. Liu, M. Tong, T. Hai, J. Hao, C. L. Guo, Q. W. Ma, W. Liu, Z. Fanyi and Z. Qi. 2009. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 461: 86-90.

Establishment of induced pluripotent stem cell lines in chicken ⁽¹⁾

Jenn-Fa Liou ⁽²⁾ Yu-Jing Liao ⁽²⁾ Ting-Chieh Kang ⁽³⁾ Jen-Wen Shiau ⁽⁴⁾
Yow-Ling Shiue ⁽⁵⁾ and Lih-Ren Chen ^{(2) (6) (7) (8)}

Received: Jul. 28, 2017; Accepted: Sep. 12, 2017

Abstract

The purpose of this study was to establish chicken induced pluripotent stem cells (ciPSC) line and to study their cellular characters including pluripotency, embryoid body formation efficiency, and *in vitro* differentiation capability. The results showed that the morphology of chicken embryo fibroblasts (cEF) transformed into colony type from spindle type 6-7 days after being infected with lentivirus, which was constructed with reprogramming transcription factors of *LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* and *c-MYC*. The transformed cells have been maintained *in vitro* for more than 35 passages (300 days). These ciPSCs continuously expressed pluripotent markers of stem cells including Oct-4, AP, and PAS antigens. Morphologically, ciPSC colonies were highly refractive, and at the single-cell level they showed clear cell boundary, high nuclear-to-cytoplasm ratio, and prominent nucleoli. The efficiency of embryoid body formation ($92.6 \pm 2.2\%$) was excellent induced by hanging-drop culture. These results demonstrated that the ciPSC line established in this study was pluripotent.

Key words: Chicken, Embryonic fibroblasts, Induced pluripotent stem cells.

(1) Contribution No. 2575 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

(4) Hsinchu Branch, COA-LRI, Miaoli 36841, Taiwan, R. O. C.

(5) National Sun Yat-sen University-Kaohsiung Medical University Joint Research Center, Kaohsiung 80424, Taiwan.

(6) Institute of Biotechnology, Southern Taiwan University, Tainan 71005, Taiwan.

(7) Institute of Biotechnology, National Chung Kung University, Tainan 70101, Taiwan.

(8) Corresponding author, E-mail: lrchen@mail.tlri.gov.tw.