

# 烏骨雞誘導多能性幹細胞株體外分化能力之探討<sup>(1)</sup>

劉振發<sup>(2)</sup> 陳裕信<sup>(2)</sup> 蕭振文<sup>(3)</sup> 薛佑玲<sup>(4)</sup> 陳立人<sup>(2)(5)(6)</sup>

收件日期：108 年 8 月 15 日；接受日期：108 年 10 月 8 日

## 摘 要

本研究目的為探討烏骨雞誘導多能性幹細胞 (black silkie chicken induced pluripotent stem cells, BSciPSCs) 之體外分化特性和嵌合體形成能力，期供後續相關研究使用。供試之 BSciPSCs 在體外培養已超過 35 繼代 (約 300 天)，經分化多能性專一性抗體 Oct-4、AP 及 PAS 染色後可呈現陽性反應，且利用胚層細胞譜系特異性抗體進行免疫染色方式檢驗 BSciPSCs 衍生的類胚體 (EB) 的結果顯示，BSciPSCs 具有分化形成三胚層的細胞譜系和神經細胞的能力。將 BSciPSCs 移植到孵化 3.5 天 (X-stage) 的來亨雞胚中，檢視孵化第 12 天胚胎的體色分佈，結果有 11% 胚胎體色有黑色分佈，證實為嵌合體。綜合上述結果，在本研究中建立的 BSciPSCs 是具多能性，且有嵌合體形成潛力，冀望此細胞可應用於生物醫學領域研究。

關鍵詞：黑絨烏骨雞、誘導多能性幹細胞、嵌合體。

## 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譜系等不同組織形態與生理功能之細胞 (Robertson and Bradley, 1986; Notarianni and Laurie, 1992; Shiue *et al.*, 2016)，而由於人類的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，認為這些基因與維持胚幹細胞分化多能性的獨特細胞特性有關，最終發現只需要將 4 個轉錄因子：*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4* 與 *C-MYC*，同時成功轉染至小鼠纖維母細胞，即能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。其研究亦指出可以在 iPSCs 衍生的畸胎瘤 (teratoma) 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 年諾貝爾生里暨醫學獎之殊榮，隨後利用此技術相繼建立了人類 (Park *et al.*, 2008)、恆河猴 (Liu *et al.*, 2008)、大鼠 (Liao *et al.*, 2009) 與馬 (Breton *et al.*, 2013) 的 iPSCs。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模式之研究，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) 進行生產；但此方式確有潛在的生產風險，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，近年來亦成功開發利用由鴨的幹細胞 (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重新編程改造，變成具有類似胚幹細胞的特性及功能；並且誘導後的細胞移植到雞胚，也證實能夠參與嵌合體的形成，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。本研究之目的乃接續我們先前已初步建立之烏骨雞誘導多能性幹細胞株 (black silkie chicken induced pluripotent stem cells, BSciPSCs；劉等，2018)，進一步探討其體外分化特性和嵌合體形成能力，期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 2625 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新竹分所。

(4) 國立中山大學生物醫學研究所。

(5) 國立成功大學生物科技研究所。

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

## 材料與方法

### I. 烏骨雞之誘導多能性幹細胞株建立

系利用源自烏骨雞胚胎 ( 孵化 9 天 ) 分離之胚纖維母細胞 (chicken embryonic fibroblasts, cEFs) , 利用市售的細胞重整因子 (reprogramming factors) 套組 (set of lentivirus: EF1A-driven *LIN28*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* and *C-MYC*; Cat. # LV01006L; Creative Biogene, USA) 轉染烏骨雞 cEFs 進行誘導細胞重整已進行烏骨雞之誘導多能性幹細胞株建立 ( 劉等, 2018 ) 。

### II. 誘導幹細胞的特徵檢測分析

#### (i) 細胞 Oct-4 與鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 活性分析：

利用免疫細胞化學染色法 (immunocytochemistry, ICC) 進行分析, 染色時先將細胞以 10% 中性福馬林 (neutral buffered formalin) 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) 進行螢光表現分析。

#### (ii) 過碘酸 Schiff 氏染色 (Periodic acid-Schiff Stain, 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 含 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。

### III. 誘發類胚體 (embryoid body, EBs) 形成與自體分化

利用培養皿之上蓋製作 mTeSR™1 培養基 (Stemcell Technologies, Cat # 85850, Canada) 懸浮培養小滴, 每滴約 20  $\mu$ L。培養皿底部加入 5 mL PBS 以提供濕度防止小滴蒸發。將約  $2.0 \times 10^6$  個未分化之 BSciPSCs 置入單一懸浮培養小滴中, 培養於 37°C 與含 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中, 以誘發類胚體形成, 培養第 7 天之後, 觀察與記錄類胚體形成情形。

形成類胚體後, 以幹細胞培養液培養於預先以 0.1% 明膠 (gelatin) 處理之 4 孔細胞培養盤, 進行貼附培養以誘導自體分化, 並於貼附培養一週與二週之後, 分別以 ICC 進行細胞分化標誌的表現分析。供試之細胞先以 10% 中性福馬林於室溫下固定 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, 加入一級抗體於 4°C 下反應至隔夜。隔天再以二級抗體與 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, Temecula, CA, USA)、atrial natriuretic peptide (ANP, Millipore Cat. #AB1970, Temecula, CA, USA) 與  $\alpha$ -fetoprotein (AFP, Santa Cruz Cat. #SC-8108, Dallas, TX, USA); 二級抗體為 rhodamine (TRITC) (Jackson ImmunoResearch Cat. #111-025-003, PA, USA. for NFL and ANP staining; Cat. #305-025-003, PA, USA. for AFP staining)。染色之結果以倒立式螢光顯微鏡與超高感度冷卻式數位影像系統 (CoolSNAP HQ2 Monochrome, Photometrics, USA) 及影像分析處理系統 MetaMorph 6.Or5 (Universal Imaging, USA) 記錄和分析結果。

### IV. 神經細胞誘導分化

BSciPSCs 進行神經細胞誘導分化前, 先讓 BSciPSCs 形成類胚體後, 再以三階段的誘導培養方式進行神經細胞 (neural cells) 的誘導分化 (Dai *et al.*, 2014)。首先將 BSciPSCs 培養在神經細胞誘導培養基 [DMEM/F12 supplemented with 200 mM L-glutamine, 4 ng/mL bFGF 和  $1 \times N2$  (Gibco)] 培養 12 天後, 將培養基更換為細胞增生培養基 [AB2 (Aruna) medium 添加 200 mM L-glutamine、 $1 \times$  aruna neural supplement (ANS) 和 20 ng/mL bFGF] 培養 7 天後, 之後再將培養基更換為分化培養基 [AB2 medium 添加 200 mM L-glutamine、 $1 \times$  ANS 和 10 ng/mL leukemia inhibitory factor (LIF)] 進行持續培養 7 – 10 天。

經神經細胞誘導分化後的衍生細胞, 亦利用 ICC 如同前揭的方法進行細胞譜系分析。所選用專一性抗體是參照已發表的文獻中被用來檢測神經細胞標誌的 Microtubule-associated protein 2 (MAP-2, Millipore Cat. #MAB378, Temecula, CA, USA)、Glial fibrillary acidic protein (GFAP, Millipore Cat. #SMI-22, Temecula, CA, USA) 和 O4 (Millipore Cat. #SMI-22 MAB345, Temecula, CA, USA) 等抗體 (Lu *et al.*, 2012)。

## V. 畸胎瘤形成測試

選用 5 隻 10 週齡之 NOD-SCID 免疫缺陷小鼠供試。將  $5 \times 10^6$  個 BSciPSCs 懸浮於 1 mL 之 PBS 溶液中，取 100  $\mu$ L 之細胞懸浮液，以注射方式移植於小鼠左側背部之皮下組織。移植 1 個月後犧牲取其畸胎瘤組織進行蘇木素－伊紅染色 (H&E 染色；hematoxylin and eosin stain, H&E stain)，以鑑定畸胎瘤內部細胞分化之樣態。

## VI. 嵌合體形成能力分析

將 BSciPSCs 移植到來亨雞胚胎，藉以探討移植之細胞是否具有參與胚胎分化之能力。細胞移植之操作乃是將  $1 \times 10^8$  個 BSciPSCs 懸浮於 1 mL 之 PBS 溶液中，取 1  $\mu$ L 之細胞懸浮液，利用 Micro-Injector (model IM-88, Nikon; Tokyo, Japan) 以顯微注射方式將其注入到 Stage X 期的來亨雞受精蛋之胚盤位置，移植後的來亨雞受精蛋隨即移入孵化器進行孵化，並於孵化後第 5 天和第 12 天進行照蛋檢查。

## VII. 實驗動物核准編號

本研究涉及之動物試驗於行政院農業委員會畜產試驗所執行，動物之使用、飼養及實驗內容皆依據行政院農業委員會畜產試驗所實驗動物照護及使用小組審查同意 (動物實驗申請表暨同意書編號：106-3) 進行。

# 結果與討論

## I. 雞誘導多能性幹細胞的特徵檢測

胚幹細胞在體外長期培養後，為確認是否仍維持在未分化的狀態並保有多潛能分化特性，一般可利用胚幹細胞未分化狀態所表現的分子標誌來鑑定。有關未分化胚胎幹細胞之鑑定標誌有以下二種，分別為：1. 胚幹細胞之細胞膜表面標誌 (Draper *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 2002)；2. 胚幹細胞表達之與全能分化性相關之專一標誌 (Sperger *et al.*, 2003; Abeyta *et al.*, 2004)。本研究供試之 BSciPSCs 已在體外培養超過 35 繼代 (約 300 天)，為確認是否仍維持在未分化的狀態，遂採用檢測雞始基生殖細胞 (primordial germ cells, PGCs) 和雞胚幹細胞 (Jung *et al.*, 2005; van de Lavoie *et al.*, 2006; Liou *et al.*, 2012) 及雞誘導多能性幹細胞株 (Lu *et al.*, 2012) 的細胞標誌，包括 Oct-4、AP 之 ICC 和 PAS 細胞染色等方法來進行細胞特性檢測分析。結果 BSciPSCs 經以 PAS (圖 1)、Oct-4 與 AP (圖 2) 的 ICC 染色均呈現陽性反應，顯示 35 繼代之 BSciPSCs 仍然維持幹細胞之未分化狀態。

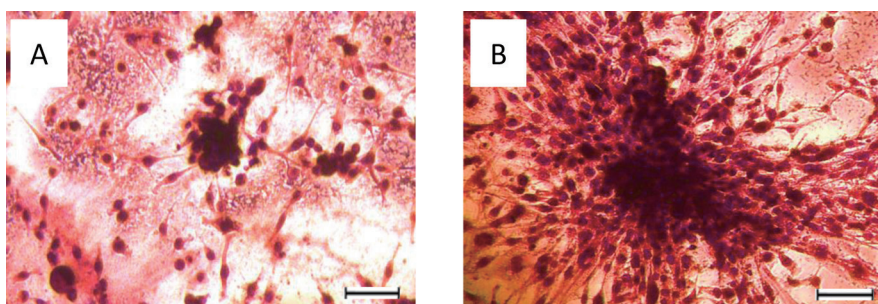


圖 1. 烏骨雞誘導多能性幹細胞利用 periodic acid-Schiff (PAS) 進行組織學染色。A：BSciPSCs 培養 60 天；B：BSciPSCs 培養 280 天。

Fig. 1. Histochemical staining of black silkie chicken induced pluripotent stem cells (BSciPSCs) with periodic acid-Schiff (PAS). A: BSciPSCs cultured for 60 days. B: BSciPSCs cultured for 280 days. Scale bar = 50  $\mu$ m.

## II. 類胚體形成與與自體分化

具有分化多能性之 ESC 及 iPSC 經誘發衍生的 EBs，具有分化形成三個胚層的能力及形成各種不同形態的細胞潛能 (Doetschman *et al.*, 1985; Shen and Leder, 1992; Desbaillets *et al.*, 2000; Odorico *et al.*, 2001)，多種譜系之分化細胞諸如神經細胞、心肌細胞 (cardiomyocytes)、內胚層細胞 (endoderm cells)，如肝及胰細胞和表皮細胞 (epithelia) 均可被偵測檢出 (Assady *et al.*, 2001; Mummery *et al.*, 2002; Draper *et al.*, 2004)。因此誘發 EBs 的形成常被用作測試 ESCs 及 iPSCs 細胞株是否具有體外分化潛力的指標。因此，為了驗證 BSciPSCs 之體外分化潛力，本研究利用懸浮培養對 BSciPSCs 進行體外培養誘發 EBs 形成之測試。結果顯示，BSciPSCs 於懸浮培養 7 天後觀察可見細胞聚集形成圓球狀結構之 EB (圖 3)，其誘發形成之效率為  $92.6 \pm 2.2\%$  (138/150)。

隨後將 EBs 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 ICC 進行



細胞分化標誌的表現分析，以測試 BSciPSCs 在體外分化誘導培養下，是否具有分化成三胚層之潛力。經選用分別代表為外胚層之 NFL、中胚層之 ANP 與內胚層之 *cytokeratin* 等細胞譜系的標誌進行染色，ICC 的結果均呈陽性反應 (圖 4)，顯示 BSciPSCs 具有在體外自體分化為三胚層之潛力。據上述類胚體形成與與自體分化測試結果，證實 BSciPSCs 具有與一般 ESCs 及 iPSCs 相類似之體外分化潛力。

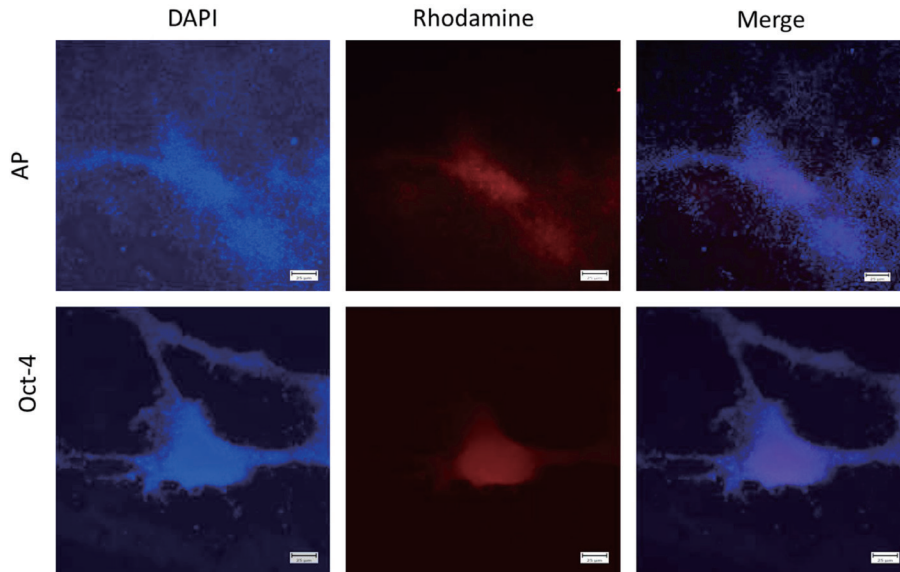


圖 2. 利用 AP 及 Oct-4 抗體對培養 280 天的烏骨雞誘導多能性幹細胞進行免疫組織學染色。

Fig. 2. Immunohistochemical staining of black silkie chicken induced pluripotent stem cells (BSciPSCs) cultured for 280 days with antibodies specifically against to AP and Oct-4. Scale bar = 50  $\mu$ m.

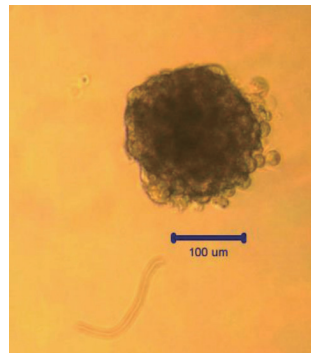


圖 3. 利用懸浮培養可誘發烏骨雞誘導多能性幹細胞形成類胚體。

Fig. 3. The formation of embryoid body from black silkie chicken induced pluripotent stem cells (BSciPSCs) cultured in hanging drops. Scale bar = 100  $\mu$ m.

### III. 神經細胞誘導分化

將 BSciPSC 誘發形成類胚體後，再以三階段的培養方式進行神經細胞譜系的誘導分化 (Dai *et al.*, 2014)。BSciPSC 經誘導神經細胞分化之培養後，利用選用神經細胞譜系包括 MAP-2 (microtubule-associated protein 2)、GFAP 和 O4 等進行 ICC 分析。其中 MAP-2 是一種表現在脊椎動物胚胎和成年人神經元的細胞骨架蛋白 (cytoskeletal protein) (Johnson and Jope, 1992)，常被用作為神經細胞鑑識的標誌，GFAP 為表現在中樞神經系統的星狀神經膠細胞 (astrocytes) 的一種中間絲蛋白 (intermediate filament protein)，係星狀神經膠細胞的特異性細胞標記 (Bignami *et al.*, 1972; Antanitus *et al.*, 1975)；而 O4 則是表現在中樞神經系統寡突細胞 (oligodendrocyte) 的特異性神經細胞標誌 (Nielsen *et al.*, 2006)。

BSciPSCs 以三階段誘導分化的培養方式進行神經細胞的誘導分化約 30 天後，可觀察到細胞的形態變化，由原來圓形的幹細胞形態轉變為神經細胞的樣態；以 MAP-2、GFAP 和 O4 等抗體進行 ICC 檢測分析經誘導分化後的細胞，均呈陽性反應 (圖 5)，證實以三階段誘導分化的培養方式可將 BSciPSCs 誘導朝向神經譜系的特化細胞進行分化。

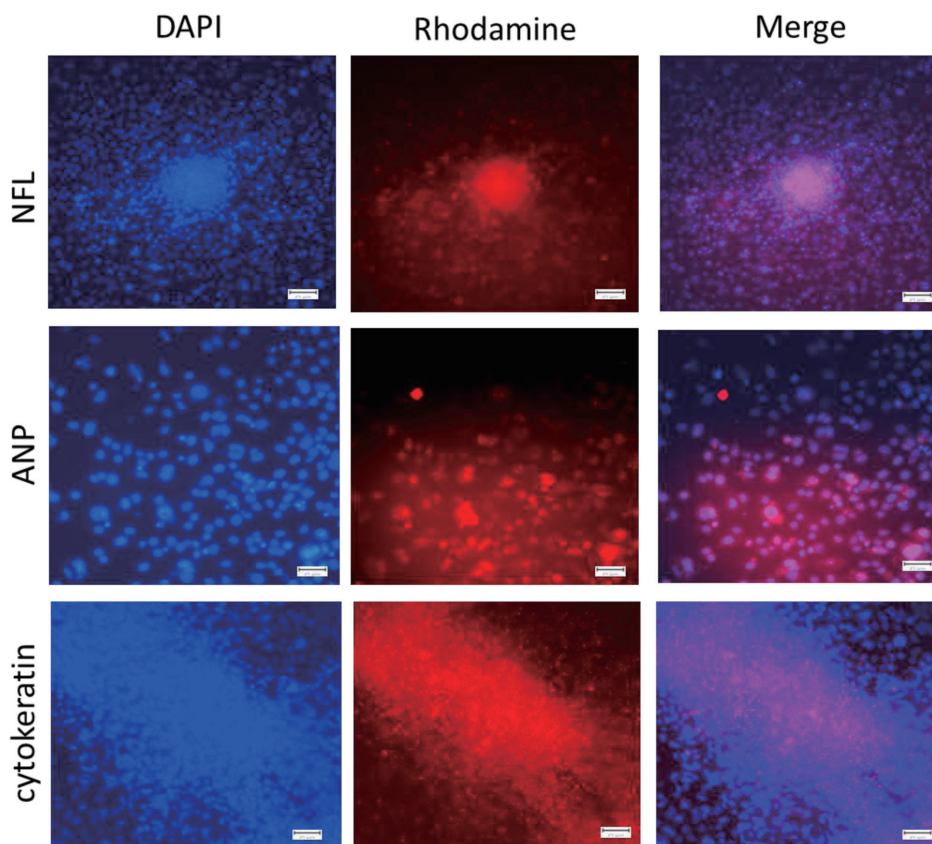


圖 4. 類胚體進行貼附培養後呈現外胚層 neurofilament light (NFL) 標誌、中胚層 atrial natriuretic peptide (ANP) 標誌、內胚層 cytokeratin 標誌。

Fig. 4. Specific expression of ectodermal neurofilament light (NFL) marker, mesodermal atrial natriuretic peptide (ANP) marker and endodermal cytokeratin marker after attaching culture. Scale bar = 25  $\mu$ m.

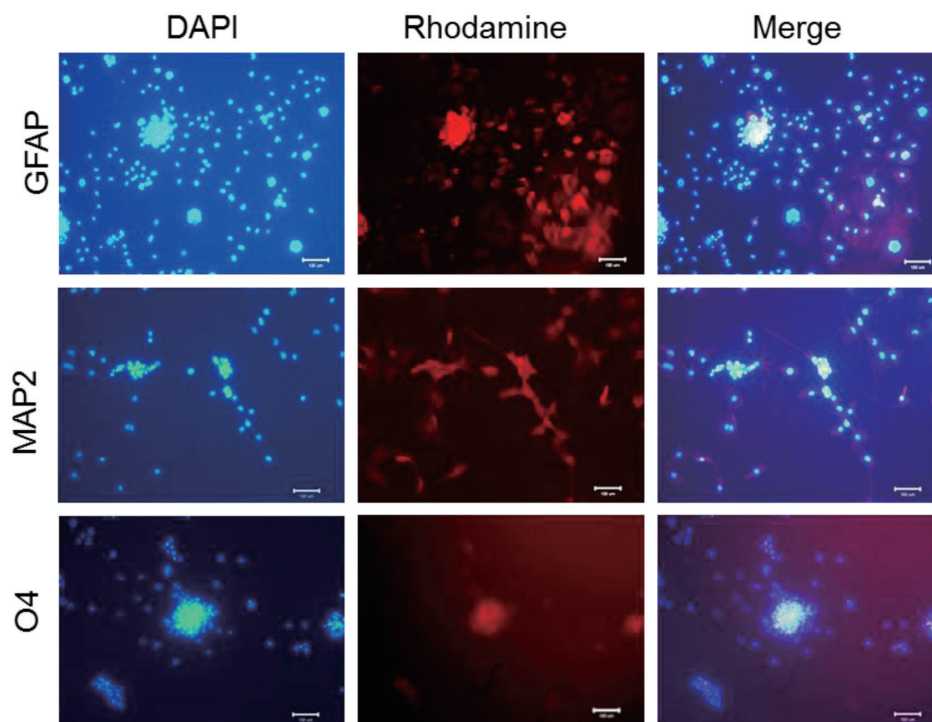


圖 5. 烏骨雞誘導多能性幹細胞神經細胞誘導分化培養後，以 microtubule-associated protein 2 (MAP-2)、Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 和 O4 等抗體檢測，均呈現陽性反應。

Fig. 5. Specific expression of microtubule-associated protein 2 (MAP-2), Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and O4 markers after induction differentiation of neural cells by black silkie chicken induced pluripotent stem cells (BSciPSCs). Scale bar = 100  $\mu$ m.



#### IV. 畸胎瘤形成測試

在建立 ESs 和 iPSCs 細胞株過程中，以體外和體內誘導分化的方式進行細胞株的多能性的評估和確認是必要的程序。將 ESs 或 iPSCs 細胞株以注射方式移植到 NOD-SCID 小鼠皮下，測試其形成畸胎瘤的能力，是常被應用來評估細胞株的體內分化多能性的方法 (Maherali and Hochedlinger, 2008; Muller *et al.*, 2010)。ESCs 與 iPSCs 移植於 NOD-SCID 小鼠，可持續生長並形成畸胎瘤，為幹細胞具有分化多能性特性之表徵，而幹細胞移植於 NOD-SCID 小鼠後所產生之畸胎瘤，係源自於未分化之多能性幹細胞 (Blum and Benvenisty, 2008; Hentze *et al.*, 2009)，且因為 ESCs 與 iPSCs 具有分化成三胚層與生殖細胞譜系等不同組織形態與生理功能之細胞分化多能特性，將其移植到 NOD-SCID 小鼠所形成畸胎瘤，經進一步切片鏡檢，可觀察到源自三胚層的構造，此驗證亦是證實細胞具有多能性特性之證據 (Brivanlou *et al.*, 2003; Hentze *et al.*, 2009)。Nussbaum *et al.* (2007) 的研究顯示，移植  $1 \times 10^5$  個小鼠胚幹細胞，形成畸胎瘤之機率約 50%，而移植  $5 \times 10^5$  個細胞則可 100% 形成畸胎瘤，然而人類胚幹細胞僅需 100 個即可形成畸胎瘤，其發生率約 6.7%，若移植  $1 \times 10^5$  個細胞可 100% 形成畸胎瘤 (Gropp *et al.*, 2012)。本研究移植  $5 \times 10^5$  個 BSciPSCs 細胞到 NOD-SCID 小鼠背部之皮下組織，畸胎瘤的發生率為 100%。本研究將  $5 \times 10^5$  個 BSciPSC 細胞注射移植至 10 週齡之 NOD-SCID 小鼠左側背部之皮下組織，10 天後即可在供試的 6 隻小鼠接受細胞移植的部位觀察到畸胎瘤的形成。後續於注射移植 1 個月後將小鼠犧牲 (安樂死) 取下畸胎瘤 (圖 6)，經固定、脫水、包埋、封蠟、切片後，以蘇木紫與伊紅進行組織染色鏡檢。分析結果顯示畸胎瘤組織切片中，可觀察到神經細胞、纖維母細胞、平滑肌、骨骼肌、脂肪細胞、管狀結構與黏液腺 (mucous gland) 等三胚層之構造 (圖 7)，此等結果可證實本研究所建立的 BSciPSCs 具有體內分化多能性之特性。

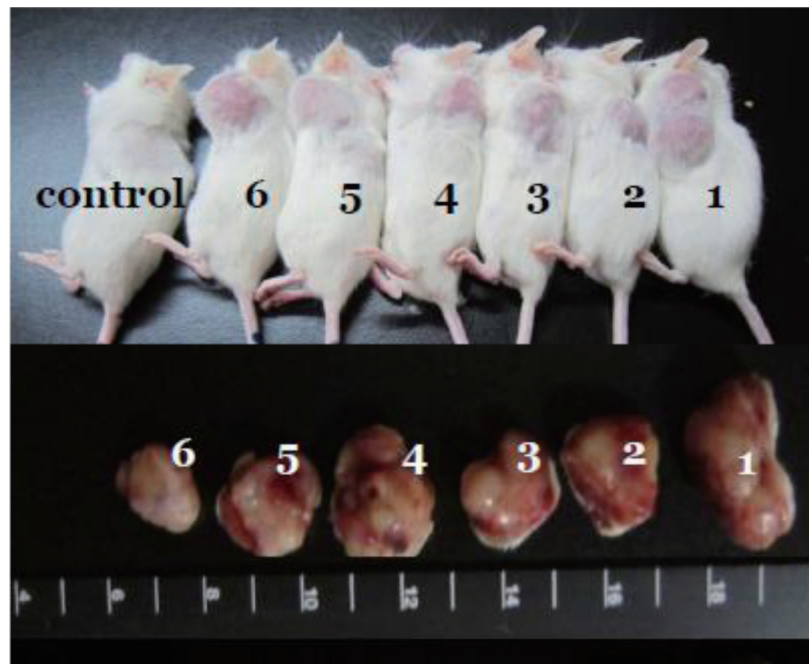


圖 6. 烏骨雞誘導多能性幹細胞移植注射於 NOD-SCID 小鼠可誘發畸胎瘤形成。

Fig. 6. Teratomas derived from injected black silkie chicken induced pluripotent stem cells (BSciPSCs) in NOD-SCID mice.

#### V. 嵌合體形成能力分析

嵌合體形成是評估胚幹細胞多能分化潛力最有效且直接之驗證方法 (Mascetti and Pedersen, 2016)。本研究建立的雞誘導多能性幹細胞株是源自黑絨烏骨雞的胚胎纖維母細胞，黑絨烏骨雞的羽毛、皮膚、肌肉和骨骼均為黑色。為了探討本研究所建立的雞誘導多能性幹細胞株是否具有形成嵌合體的能力，將  $1 \times 10^5$  個 BSciPSC 細胞移植到孵化 3.5 天的來亨雞受精蛋，即 Stage X 期之胚盤位置，共移植 45 個胚胎。移植後的來亨雞受精蛋隨即移入孵化器進行孵化，並定期照蛋觀察胚胎存活情形直到雛雞孵出後，再由外觀進行體色檢視並記錄是否為嵌合體。結果在移植的 45 個胚胎在孵化的過程中，於孵化第 5 天進行照蛋檢查，有 9 個胚胎終止發育，因胚胎尚未成形無法進行觀察；在 12 天進行第二次照蛋檢查，有 13 個胚胎 (約第 10 天) 早期死亡，從外觀檢視發現有 2 個胚胎膚色呈現黑色 (圖 8A)，另外 23 個胚胎有 10 個胚胎後期死亡未能順利孵出；21 天後僅 13 隻雛雞孵出 (孵化率為 29%)，但均無嵌合現象。然而，在後期死亡的 10 個胚胎 (約第 18 天)，從外觀檢視有 3 個胚胎之腳 (趾) 部有呈現黑色，證實 BSciPSCs 具有形成嵌合體之能力 (嵌合率 11%)。

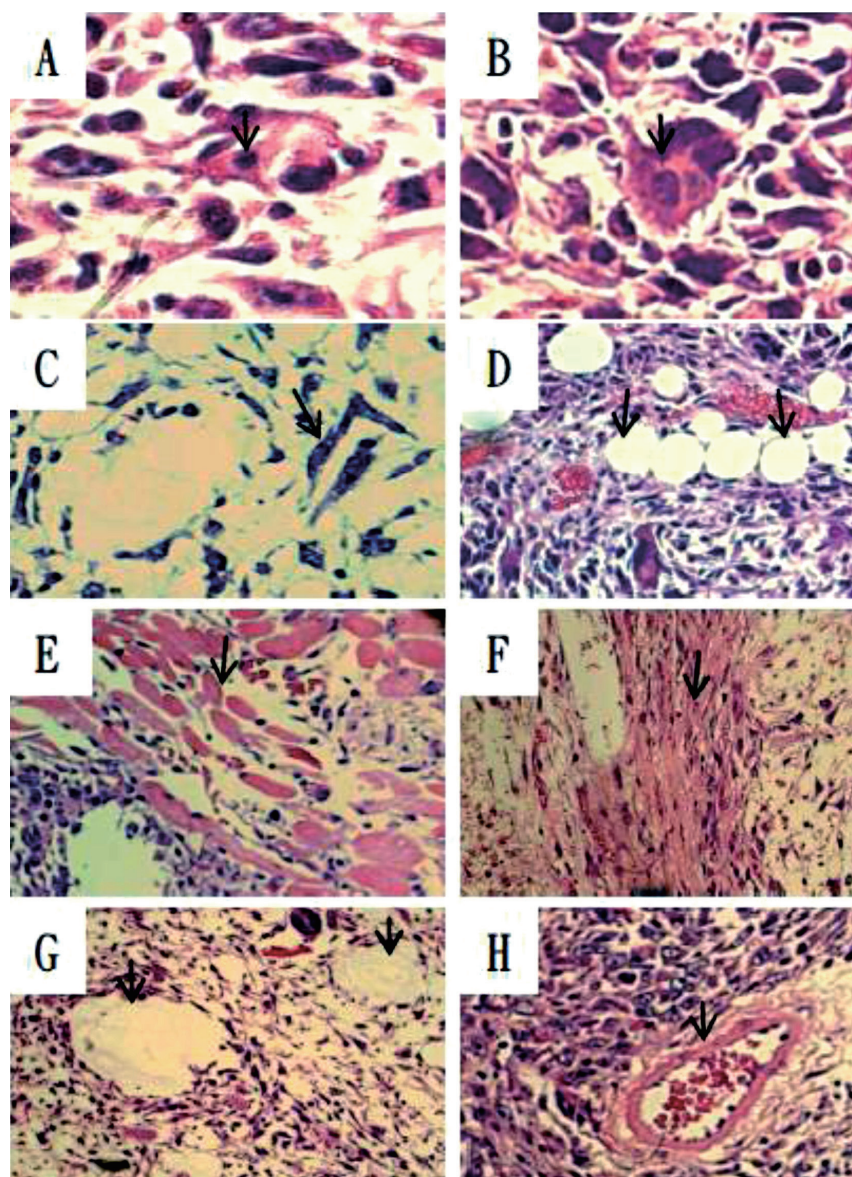


圖 7. 畸胎瘤組織切片可觀察到神經細胞 (A、B)、纖維母細胞 (C)、脂肪細胞 (D)、骨骼肌 (E)、平滑肌 (F)、管狀結構 (G) 與黏液腺 (mucous gland) (H) 等三胚層之構造。(H&E staining)

Fig. 7. The cells and tissues derived from three primitive germ layers in the teratoma, such as neurons (A, B), fibroblast (C), adipocytes (D), skeleton muscle (E) and smooth muscle cells (F), and mucous gland (G) can be found in the histological section of the BSciPSCs-derived tetraomas. (H&E staining)

ESCs 具有自我更新、不斷裂殖、分化成三胚層以及形成身體各種不同類型組織的體細胞之能力，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) (Thomson *et al.*, 1998; Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009)。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，並證實已分化體細胞可藉由重新編程改造因子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC*) 轉染後，成功被誘導成為 iPSCs，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; Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Aasen *et al.*, 2008; Hanna *et al.*, 2008; Haase *et al.*, 2009; West *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Shiue *et al.*, 2016)。

雖然雞的 ESCs 和 PGCs 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 ESCs 或 iPSCs 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，除了雞的 ESCs 和 PGCs 在體外培養的過程中細胞增殖的效率不高 (Lu *et al.*, 2012) 之外，雞的 ESCs 和 PGCs 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 (Petitte *et al.*, 2004; Motono *et al.*, 2010)，因此降低了其相關應用的潛力。另外，雞的 ESC 以誘發 EB 及自體分化進行的體外分化潛能評估驗證中，亦無法像哺乳類的 ESC 具有分化成三胚層及多種不同組織類型的細胞之能力 (Rosselló *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2014)。然而，在已發表的禽



類 iPSCs 研究中均指出，禽類的 iPSCs 亦如同哺乳類的 ESCs 與 iPSCs 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)。



圖 8. 烏骨雞誘導多能性幹細胞注射到白色來亨雞受精蛋後，形成嵌合體。A：孵化 10 天。B：孵化 18 天。

Fig. 8. Chimeric chicken embryos derived from injected black silkie chicken induced pluripotent stem cells (BSciPSCs) in White Leghorn chicken fertilized egg. A: Dead chicks 10 days after incubation; B: Dead chicks 18 days after incubation.

本研究所建立的 BSciPSCs 細胞株除以細胞免疫染色等檢測方式，確認經過長期培養繼代後，仍可維持未分化 ESCs 所表現相關的細胞標誌；亦利用誘發類胚體形成及自體分化，證實其具有在體外分化形成三胚層之能力；並以細胞移植於 NOD-SCID 小鼠產生畸胎瘤和雞胚參與形成嵌合體，進一步證實其具有體內分化之潛能。綜合上述的試驗結果，我們已成功建立 BSciPSCs 細胞株，後續將可提供質量穩定的家禽細胞以利進行更精準的發育生物學、轉基因家禽產製、疾病模式建立和疫苗生產技術開發等研究，同時此 BSciPSCs 技術平臺的建立，也可以運用在因應全球暖化氣候變遷下，進行珍貴或瀕絕鳥禽物種的種原保存及復育。

## 誌 謝

本研究承蒙行政院農業委員會提供研究經費 [106 農科 -2.6.1- 畜 -L1(2)]，由生理組同仁許義明、李秀美與孫碧月等協助本試驗，使其得以順利完成，特此申謝。

## 參考文獻

- 劉振發、廖御靜、康定傑、蕭振文、薛佑玲、陳立人。2018。雞誘導多能性幹細胞株的建立。畜產研究。51：92-102。
- 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.
- Abeyta, M. J., A. T. Clark, R. T. Rodriguez, R. T. Bodnar, R. A. Pera and M. T. Firpo. 2004. Unique gene expression signatures of independently derived human embryonic stem cell lines. *Hum. Mol. Genet.* 13: 601-608.



- Antanitus, D. S., B. H. Choi and L.W. Lapham. 1975. Immunofluorescence staining of astrocytes *in vitro* using antiserum to glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.* 89: 363-367.
- Assady, S., G. Maor, M. Amit, J. ItskovitzEldor, K. L. Skorecki and M. Tzukerman. 2001. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes.* 50: 1691-1697.
- Bignami, A., L.F. Eng, D. Dahl and C. T. Uyeda. 1972. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 43: 429-435.
- Blum, B. and N. Benvenisty. 2008. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv. Cancer Res.* 100: 133-158.
- 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.
- Brivanlou, A. H., F. H. Gage, R. Jaenisch, T. Jessell, D. Melton and J. Rossant. 2003. Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science* 300: 913-916.
- Dai, R., R. Rossello, C. C. Chen, J. Kessler and I. Davison, U. Hochgeschwender and E. D. Jarvis. 2014. Maintenance and neuronal differentiation of chicken induced pluripotent stem-Like cells. *Stem Cells Int.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/182737>.
- 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.
- Draper, J. S., C. Pigott, J. A. Thomson and P. W. Andrews. 2002. Surface antigens of human embryonic stem cells: Changes upon differentiation in culture. *J. Anat.* 200: 249-258.
- Draper, J. S., K. Smith, P. Gokhale, H. D. Moore, E. Maltby, J. Johnson, L. Meisner, T. P. Zwaka, J. A. Thomson and P. W. Andrews. 2004. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22: 53-54.
- Gropp, M., V. Shilo, G. Vainer, M. Gov, Y. Gil, H. Khaner, L. Matzrafi, M. Idelson, J. Kopolovic, N. B. Zak and B. E. Reubinoff. 2012. Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny. *PLoS One* 7: e45532.
- Haase, A., R. K. Olmer, S. Schwanke, S. Wunderlich, C. Merkert, R. Hess, I. Zweigerdt, J. Gruh, S. Meyer, L. S. Wagner, D. W. Maier, S. Han, K. Glage, 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.
- Henderson, J. K., J. S. Draper, H. S. Baillie, S. Fishel, J. A. Thomson, H. Moore and P. W. Andrews. 2002. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stagespecific embryonic antigens. *Stem Cells* 20: 329-337.
- Hentze, H., P. L. Soong, S. T. Wang, B. W. Phillips, T. C. Putti and N. R. Dunn. 2009. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res.* 2: 198-210.
- Johnson, G. V. and R. S. Jope. 1992. The role of microtubule-associated protein 2 (map-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J. Neurosci Res.* 33: 505-512.
- Jung, J. G., D. K. Kim, T. S. Park, S. D. Lee, J. M. Lim and J. Y. Han. 2005. Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells. *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: 58-590.
- 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.
- Maherali, N. and K. Hochedlinger. 2008. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3: 595-605.
- Mascetti, V. L. and R. A. Pedersen. 2016. Contributions of Mammalian Chimeras to Pluripotent Stem Cell Research. *Cell Stem Cell* 19: 163-175.
- 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.
- Muller F. J., J. Goldmann, P. Loser and J. F. Loring. 2010. A call to standardize teratoma assays used to define human pluripotent cell lines. *Cell Stem Cell* 6: 412-414.
- Mummery, C., D. Ward, C. E. van den Brink, S. D. Bird, P. A. Doevendans, T. Opthof, A. Brutel de la Riviere, L. Tertoolen, M. van der Heyden and M. Pera. 2002. Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J. Anat.* 200: 233-242.
- Nielsen, J. A., D. Maric, P. Lau, J. L. Barker and L. D. Hudson. 2006. Identification of a novel oligodendrocyte cell adhesion protein using gene expression profiling. *J. Neurosci.* 26: 9881-9891.
- Notarianni, E., and S. Laurie. 1992. Embryonic stem cell from domestic animals: establishment and potential application. In: *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production: Trends in Research and Applications.* eds. Lauria, A. and Gandolfi, F. Proland Press, London and Chapel Hill. pp. 175-182.
- Nussbaum, J., E. Minami, M. A. Laflamme, J. A. Virag, C. B. Ware, A. Masino, V. Muskheli, L. Pabon, H. Reinecke and C. E. Murry. 2007. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* 21: 1345-1357.
- Odorico, J. S., D. S. Kaufman and J. A. Thomson. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 19: 193-204.
- 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.
- Robertson, E. J., and A. Bradley. 1986. Production of permanent cell lines from early embryos and their use in studying developmental problems. In: *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development.* eds. Rossant, J. and Pedersen, R. A. Cambridge Press. New York. pp. 475-508.
- 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.
- 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.
- Shiue, Y. L., J. R. Yang, Y. J. Liao, T. Y. Kuo, C. H. Liao, C. H. Kang, C. Tai, Gary B. Anderson and L. R. Chen. 2016. Derivation of porcine pluripotent stem cells for biomedical research. *Theriogenology* 86: 176-181.
- Sperger, J. M., X. Chen, J. S. Draper, J. E. Antosiewicz, C. H. Chon, S. B. Jones, J. D. Brooks, P. W. Andrews, P. O. Brown and J. A. Thomson. 2003. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 13350-13355.
- 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. Terlow, 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.

# Evaluation of *in vitro* and *in vivo* differentiation capability of induced pluripotent stem cell lines from the black silkie chicken <sup>(1)</sup>

Jenn-Fa Liou <sup>(2)</sup> Yu-Hisn Chen <sup>(2)</sup> Jen-Wen Shiau <sup>(3)</sup> Yow-Ling Shiue <sup>(4)</sup> and Lih-Ren Chen <sup>(2) (5) (6)</sup>

Received: Aug. 15, 2019; Accepted: Oct. 8, 2019

## Abstract

The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* differentiation capability of the induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from the black silkie chicken (BSciPSCs). The BSciPSCs have been maintained *in vitro* for more than 35 passages (about 300 days). These BSciPSCs continuously expressed pluripotent markers of stem cells including Oct-4, AP, and PAS antigens. The *in vitro* differentiation ability of BSciPSCs was determined by EB formation and spontaneously differentiation induction, and the resultant lineages were verified by immunostaining with antibodies specific against cells from 3 primitive germ layers and neuron cells. Moreover, the *in vivo* differentiation capability of BSciPSCs was further demonstrated by formation of multiple lineaged tetramos in NOD-SCID mice and resulted 11% chimeric chicken embryos after transplantation of BSciPSCs into Leghorn chicken embryos. In conclusion, the BSciPSC lines established in this study can be maintained *in vitro* continuously without losing their *in vitro* and *in vivo* pluripotency. The success of BSciPSCs establishment would provide an alternative modles for biomedicine study.

Key words: Black silkie chicken, Induced pluripotent stem cells, Chimera.

---

(1) Contribution No. 2625 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

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

(4) National Sun Yat-sen University-Kaohsiung Medical University Joint Research Center, Kaohsiung 804, Taiwan.

(5) Institute of Biotechnology, National Chung Kung University, Tainan 701, Taiwan.

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