

豬誘導多能性幹細胞移植追蹤之研究⁽¹⁾

廖御靜⁽²⁾ 劉宇旂⁽²⁾ 陳怡秀⁽²⁾ 李佳馨⁽²⁾ 陳立人⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾ 楊鎮榮⁽²⁾⁽⁵⁾

收件日期：104 年 3 月 1 日；接受日期：104 年 5 月 11 日

摘 要

本研究目的為建立表現綠色螢光蛋白質之豬誘導多能性幹細胞 (porcine induced pluripotent stem cell, piPS cell) 與探討細胞移植後之追蹤性。試驗係利用電穿孔法施以 2 次直流電脈衝，將外源性綠色螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 報導基因轉染進畜試黑豬誘導多能性幹細胞，探討經轉染後之細胞的 GFP 基因表現並檢視其多能性分化能力，以及其經活體移植後之表現。實驗結果顯示，piPS 細胞經轉染後可以持續且穩定表現綠色螢光；利用懸浮培養技術將細胞分化成類胚體與自體分化為三胚層後，綠色螢光仍可持續表現。此外，將表現綠色螢光之 piPS 細胞移植於非肥胖糖尿病型重症聯合免疫缺陷型 (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency, NOD-SCID) 小鼠，可誘發形成畸胎瘤 (teratoma)，且移植部位之螢光表現可於移植後第 30 天利用活體影像分析系統檢出；畸胎瘤體積於 piPS 細胞移植後 90 天內顯著增加，綠色螢光強度亦逐次明顯。因此，本研究建立之表現綠色螢光的 piPS 細胞不論是細胞分化與細胞移植後，GFP 之表現持續且穩定，可做為細胞移植後之活體追蹤與即時監控之標的，有利於細胞移植治療研究。

關鍵詞：豬誘導多能性幹細胞、綠色螢光蛋白質、自體分化、畸胎瘤、細胞移植。

緒 言

誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS cell) 產製技術由日本京都大學的 Yamanaka 研究團隊於 2006 年發表，該團隊鎖定具活化胚幹細胞中的 24 個關鍵候選基因，探討利用這些基因自體細胞誘導成為胚幹細胞之可能性，而最終發現只需要將 4 個轉錄因子 *Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4* 與 *c-Myc* 同時轉染至小鼠纖維母細胞，即可產製出具有分化多能性之細胞；這種細胞異體移植所誘發形成的畸胎瘤中，可分化形成軟骨細胞、神經細胞、肌肉細胞、脂肪細胞與上皮細胞等分屬不同胚層的細胞，顯示此等細胞具類似於胚幹細胞之分化多能性，因此稱為誘導多能性幹細胞 (Takahashi and Yamanaka, 2006)。Camobell *et al.* (1996) 發表複製羊桃莉時即證實體細胞再程式化 (reprogramming) 之可能，利用體細胞核轉置技術 (somatic cells nuclear transfer) 或細胞融合技術 (cell fusion)，確實均能使已分化之體細胞再程式化為未分化之細胞 (Tada *et al.*, 2001; Cowan *et al.*, 2005; Egli *et al.*, 2007)。而 Yamanaka 等人所建立的誘導多能性幹細胞技術，係利用基因轉染技術產製具分化多能性的幹細胞，此技術之建立有利於病人客製化醫療與細胞替代性療法研究，並可解決幹細胞移植醫療時的免疫反應問題，以及迴避了產製胚幹細胞的道德與倫理爭議，為幹細胞科技上的一大突破。利用此轉染技術已相繼建立了誘導多能性幹細胞的物種，包括有人類 (Park *et al.*, 2008)、大鼠 (Liao *et al.*, 2009)、恆河猴 (Liu *et al.*, 2008)、豬 (Esteban *et al.*, 2009; Ezashi *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Montserrat *et al.*, 2011; Hall *et al.*, 2012; Fujishiro *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2014) 與馬 (Breton *et al.*, 2013) 等。研究顯示，使用反轉錄病毒 (retrovirus) 或慢病毒 (lentivirus) 載體進行誘導多能性幹細胞的產製，可以改善轉染效率過低的問題；然而，病毒載體的永久性嵌入細胞基因體中，其所帶來的基因突變或是腫瘤形成之疑慮，都將妨礙到誘導多能性幹細胞最終的醫療應用性。為避免這樣的困擾，目前已發展出不會嵌入基因體中的技術，如非嵌入式腺病毒載體法 (non-integrating adenovirus) (Stadtfield *et al.*, 2008)、質體轉染法 (plasmid transfection) (Okita *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2009)，或是利用 valproic acid (VPA) 小分子化合物進行誘導的方法 (Huangfu *et al.*, 2008)，均可以避免病毒載體嵌入而造成誘導多能性幹細胞應用上的限制，大大地提升誘導多能性幹細胞未來在客製化醫療領域上的進展。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2233 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 國立成功大學生物科技研究所。

(4) 南臺科技大學生物技術研究所。

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

有關綠色螢光蛋白質 GFP 的特性很早就已有研究，然而基因片段直到 1992 年才由 *Aequorea victoria* 水母分離出來 (Prasher *et al.*, 1992)。原先只是為了研究水母發光的機制而將其分離出來，卻意外的促進往後生物學的研究。水母本身的 GFP 活化需借助鈣離子，當鈣離子與水母蛋白 (aequorin) 結合後，能量會轉移至 GFP 以激發綠光。此種能量轉移可利用紫外光 (ultraviolet light) 刺激來模擬 (Misteli and Spector, 1997)。GFP 有 238 個胺基酸，可利用紫外光或藍光來激發，無須透過任何輔因子 (cofactor) 幫助，相較於 β -galactosidase 與 luciferase 需額外添加受質或輔因子來激發，在應用操作上更為便利 (Chalfie *et al.*, 1994; Misteli and Spector, 1997)。GFP 已廣泛應用於幹細胞研究，例如 (1) 當作基因表現的報導基因 (Obokata *et al.*, 2014)；(2) 追蹤動物胚胎發育時的細胞遷徙 (Takahashi and Yamanaka, 2006; Obokata *et al.*, 2014)；(3) 活體動物之細胞移植定位 (Yang *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013a, 2013b; Liao *et al.*, 2014) 等多項研究，增加幹細胞科技研發之應用與實用性。本研究即利用電穿孔法將 GFP 基因轉染進豬誘導多能性幹細胞，使其保持細胞分化多能性，同時穩定且持續表現綠色螢光；並於進行活體移植後，配合活體影像分析系統追蹤移植後之螢光變化，探討細胞移植後之可追蹤性。

材料與方法

I. 豬誘導多能性幹細胞培養

供試之畜試黑豬誘導多能性幹細胞源自於 Liao *et al.* (2014)，其培養方法係參照 Yang *et al.* (2009) 所建立之方法進行。幹細胞培養液使用 DMEM (DMEM, high glucose, no pyruvate, Invitrogen, NY, USA) 添加 16% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Invitrogen)、0.1 mM β - 硫基乙醇 (beta-2-mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、1% 非必需胺基酸 (nonessential amino acids, Sigma-Aldrich)、1 mM 麩胺醯胺 (L-glutamine, Sigma-Aldrich)、核苷酸混合液 (nucleotides mixture, Sigma-Aldrich) 等配製成的培養液，細胞培養於 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich) 貼附之 4 孔細胞培養盤 (4-well dish, Nunc 176740, Roskilde, Denmark)，並置於 37°C 與含 5% CO₂ 的培養箱。培養過程中，每週重新繼代於經絲裂黴素 (mitomycin C, Sigma-Aldrich) 不活化處理之小鼠株化胎體纖維母細胞 (STO cell, ATCC CRL-1503, USA) 之飼養層進行共同培養，培養期間觀察細胞生長情況，使細胞穩定生長以供試驗分析用。

II. 綠色螢光蛋白質轉染與豬誘導多能性幹細胞之選殖

豬誘導多能性幹細胞群落 (colony) 以細拉之玻璃針挖起，利用 0.25% trypsin-0.02 mM EDTA (Invitrogen) 將細胞團塊解離成單細胞，再以幹細胞培養液中和反應。之後以 0.2 × g 離心 3 min 去除上清液。細胞經磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗淨 3 次後，將細胞濃度調整為 5 × 10⁴ cells/mL，置於電穿孔專用管 (Cuvettes Plus™, Model No. 620, BTX, San Diego, CA, USA)。隨後，細胞懸浮液添加 20 μ g 的 pAAV-hrGFP Control Plasmid (Stratagene, Santa Clara, CA, USA) 後，先以 4°C 冰鎮 5 min 後，參照 Yang *et al.* (2009) 所建立之電穿孔條件，以電穿孔儀 (Electro Cell Manipulator, BTX ECM 2001, San Diego, CA, USA) 施以電壓 150 V/cm、時間 10 min 之直流電脈衝數 2 次進行電穿孔基因染轉。轉染後之細胞於室溫靜置 5 min 後，再依上述方式進行體外培養。待細胞貼附並開始生長後，以細拉之玻璃針將表現綠色螢光之細胞群落以機械方式分離挑選，再進一步予以株化培養。

III. 誘發類胚體形成與自體分化

利用培養皿之上蓋製作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。未分化之豬誘導多能性幹細胞群落以細拉之玻璃針挖起後，將單一細胞群落置入單一懸浮培養小滴中，培養於 37°C 與含 5% CO₂ 的培養箱以誘發類胚體形成。培養第 7 天之後，觀察記錄類胚體 (embryoid body) 形成與綠色螢光表現。形成類胚體後，以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。培養一週與二週之後，分別進行免疫細胞化學染色法進行細胞分化與綠色螢光表現分析。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)。染色之結果以倒立式螢光顯微鏡 (DMIRB, Leica, Germany) 與超高感度冷卻式數位影像系統 (CoolSNAP HQ2 Monochrome, Photometrics, USA) 及影像分析處理系統 MetaMorph 6.0r5 (Universal Imaging, USA) 記錄和分析結果。

IV. 細胞移植於 NOD-SCID 小鼠以誘發畸胎瘤形成

選用 5 隻 8 週齡之雌性非肥胖糖尿病型重症聯合免疫缺陷型 (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency, NOD-SCID) 小鼠 (樂斯科股份有限公司, Bio-LASCO, Taiwan) 供試。母鼠以舒泰 (Zoletil 50, Virbac, Carros, France) / 若朋 (Rompun 20, Bayer, Taipei, Taiwan) 所調製之混合藥劑 (以 10:1 之比例混合再以 PBS 稀釋 5 倍) 實施腹腔注射 0.1 mL 麻醉後, 將約 1×10^6 個表現綠色螢光之豬誘導多能性幹細胞懸浮於 100 μ L 之 PBS 溶液中, 直接注入 5 隻處理組母鼠左肩皮下部位進行細胞移植; 5 隻對照組母鼠則僅於左肩皮下部位注入 100 μ L 不含細胞之 PBS 溶液。母鼠經細胞移植後, 每隔 15 天測量移植部位之畸胎瘤體積, 並以活體影像分析系統 (IVIS 50, Xenogen Corp., Alameda, CA, USA) 偵測移植部位之螢光表現強度。分析結果以相對表現強度表示, 即以同一影像中之處理組測量區域之螢光強度 (region of interest, ROI) 除以控制組測量區域之螢光強度表示 (處理組 ROI/ 對照組 ROI)。移植 3 個月後犧牲取其畸胎瘤組織, 經脫水、包埋、封蠟、切片後, 以蘇木紫 (hematoxylin) 與伊紅 (eosin) 進行組織染色。

V. 統計分析

所有試驗數據以 Mean \pm SEM 表示, 並依據 SAS 之 General Linear Model (GLM) 模式進行統計分析 (SAS, 2006), 當 $P < 0.05$ 表示有差異顯著性。

結果與討論

I. 建立表現綠色螢光之豬誘導多能性幹細胞

參照 Yang *et al.* (2009), 利用施以電壓 150 V/cm、時間 10 mini sec 之直流地電脈衝數 2 次之電穿孔操作, 成功將外源性綠色螢光蛋白質報導基因轉染入豬誘導多能性幹細胞; 並以機械方式將表現綠色螢光的幹細胞群落挑起, 置於經不活化處理後之 STO 飼養層細胞進行繼代培養。此等豬誘導多能性幹細胞經體外培養可持續且穩定表現綠色螢光 (圖 1)。此外, 其經過體外自體分化培養誘發為類胚體後, 綠色螢光仍可持續且穩定表現, 未因分化過程而消失 (圖 2)。續將類胚體進行貼附培養誘導分化, 則可自體分化為外胚層 (NFL 陽性)、中胚層 (ANP 陽性) 與內胚層 (AFP 陽性) 之細胞, 綠色螢光亦持續表現 (圖 3)。

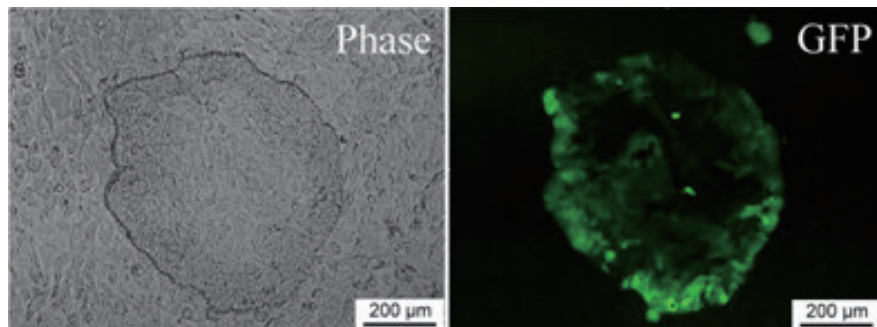


圖 1. 表現綠色螢光之豬誘導多能性幹細胞群落。

Fig. 1. The colony of GFP-expressing porcine induced pluripotent stem cells.

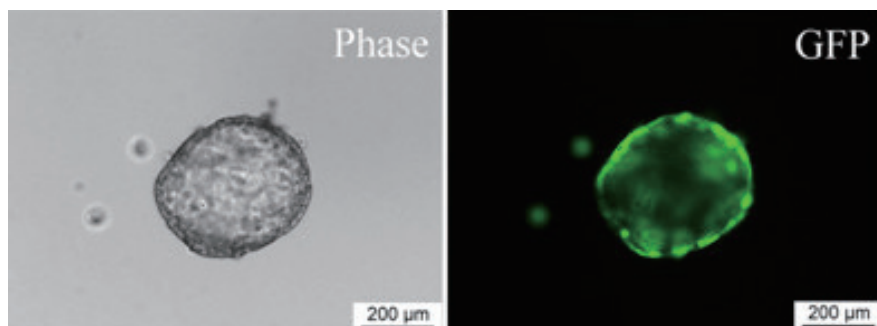


圖 2. 利用懸浮小滴培養可誘發豬誘導多能性幹細胞形成類胚體且持續表現綠色螢光。

Fig. 2. The embryoid body of porcine induced pluripotent stem cells formed in hanging drop culture expressing GFP signal continuously.

先前已有研究報告指出，將 GFP 基因片段構築於帶有 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 與 *c-Myc* 之反轉錄病毒質體 (retroviral plasmid)，再轉染入豬耳朵細胞產製帶有綠色螢光之豬誘導多能性幹細胞，得到的幹細胞群落可持續且穩定表現綠色螢光，且無論體外自體分化或體內畸胎瘤分化皆不影響其綠色螢光之表現 (Montserrat *et al.*, 2011)。此外，Yang *et al.* (2010; 2013a) 以電穿孔方式將 GFP 基因轉染入豬胚幹細胞之研究顯示，所產製之豬胚幹細胞均可穩定表現綠色螢光，且此等細胞經定向誘導分化為神經細胞後，仍可持續且穩定表現綠色螢光。因此，經轉染外源性綠色螢光蛋白質報導基因的豬胚幹細胞或誘導多能性幹細胞無論是否分化，皆可穩定表現綠色螢光，此特性將有利於細胞移植後，用以監控追蹤細胞生長與分佈情形。

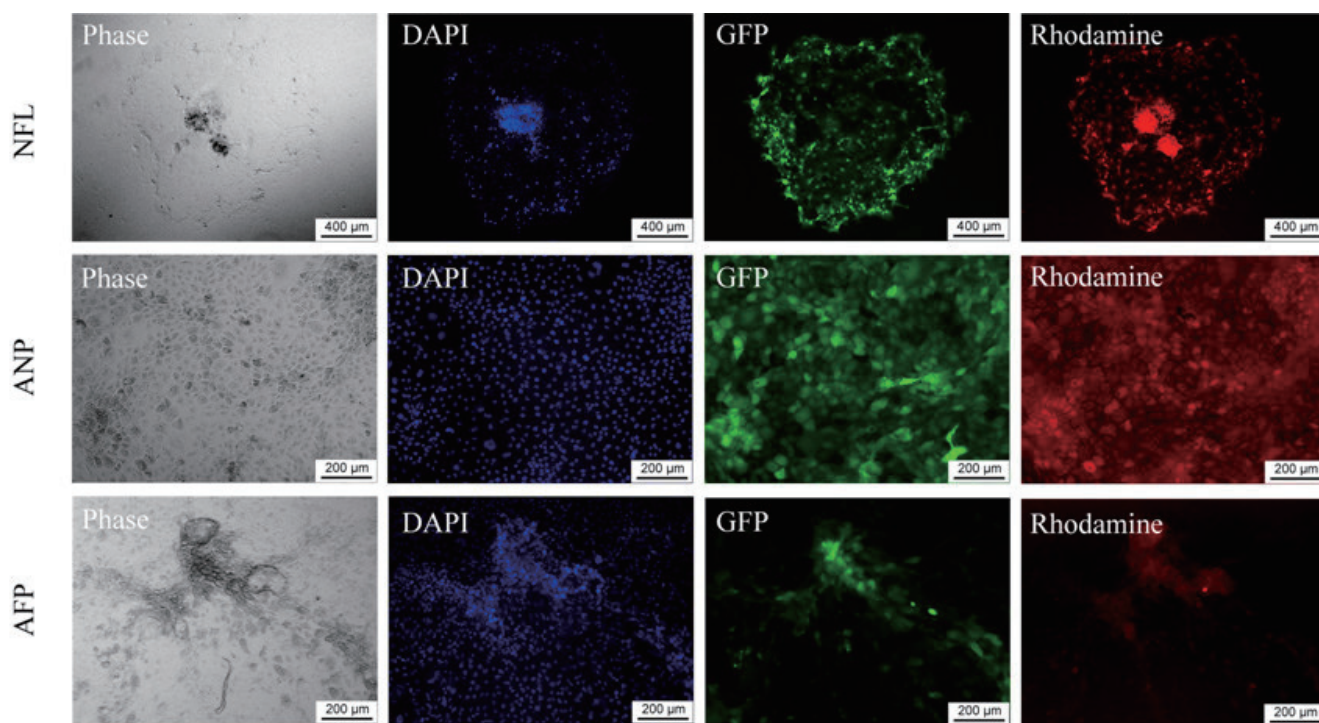


圖 3. 類胚體進行貼附培養後呈現外胚層 NFL 標記、中胚層 ANP、內胚層 AFP 標記與綠色螢光之專一性表現。

Fig. 3. Specific expression of ectodermal NFL marker, mesodermal ANP marker, endodermal AFP marker and GFP signal of embryoid body after the attached culture.

II. 細胞移植後誘發之畸胎瘤體積與螢光強度分析

將約 1×10^6 個表現綠色螢光之豬誘導多能性幹細胞懸浮於 100 μ L 之 PBS 溶液中，移植於 5 隻 NOD-SCID 小鼠左肩皮下部位，移植後每隔 15 天以 IVIS 50 活體影像分析系統進行螢光強度分析直至第 90 天，以追蹤細胞移植後畸胎瘤體積與螢光強度之變化。結果顯示，在持續 90 天的追蹤期中，均可檢出活體影像上的螢光訊號強度 (圖 4)。在移植後第 30 天，即可於 NOD-SCID 小鼠左肩皮下移植部位觀察到畸胎瘤生成，此時畸胎瘤體積為 $7.71 \pm 0.00 \text{ mm}^3$ ；至第 45 天、第 60 天與第 75 天時，畸胎瘤體積分別增加至 31.95 ± 3.52 、 92.03 ± 31.31 與 $89.87 \pm 15.97 \text{ mm}^3$ ；至移植後第 90 天時，畸胎瘤體積則迅速增加為 $554.14 \pm 210.98 \text{ mm}^3$ ($P < 0.05$) (圖 5A)。移植部位之相對螢光強度 (處理組 ROI/ 對照組 ROI) 亦隨畸胎瘤體積增加而增強，於移植後第 30 天、第 45 天與第 60 天分別為 2.33 ± 0.55 、 2.65 ± 0.91 與 2.73 ± 0.39 倍，第 75 天時畸胎瘤體積急遽增加，相對螢光強度倍數增加至 7.79 ± 1.94 倍 ($P < 0.05$)，而第 90 天時增加為 17.47 ± 3.79 倍 ($P < 0.05$) (圖 5B)。於移植後第 90 天，將 NOD-SCID 小鼠犧牲後取得畸胎瘤，經脫水、包埋、封蠟與切片後，進行蘇木紫與伊紅染色，鏡檢可觀察到角質化細胞群 (keratin pearl)、脂肪細胞 (adipose cell) 與管狀結構 (glandular structure) 等分別衍生自三胚層之分化細胞組織構造 (圖 6)。

胚幹細胞與誘導多能性幹細胞移植於 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。幹細胞移植後所產生之畸胎瘤，係源自於未分化之多能性幹細胞，以極少之數量即可誘發 NOD-SCID 小鼠之畸胎瘤生成 (Blum and Benvenisty, 2008; Hentze *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Miura *et al.*, 2009)。研究顯示，移植 1×10^5 個小鼠胚幹細胞，形成畸胎瘤之機率約 50%，而移植 5×10^5 個細胞可 100% 形成畸胎瘤 (Nussbaum *et al.*, 2007)。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 1×10^5 個細胞可 100% 形成畸胎瘤 (Gropp *et al.*, 2012)。本研究結果顯示，所建立之表現綠色螢光豬誘導多能性幹細胞，

在移植到 NOD-SCID 小鼠後第 30 天，因畸胎瘤體積小，尚難以肉眼或是手感觸得，然其自發螢光訊號即可利用 IVIS 50 活體影像分析系統測得，且螢光訊號的表現持續增加，直至追蹤期間結束時，均可監測相對螢光強度的顯著性差異，顯示表現綠色螢光豬誘導多能性幹細胞可做為活體細胞移植後之追蹤標的，提供即時監控經移植細胞的狀況，有利於活體細胞移植之治療研究。

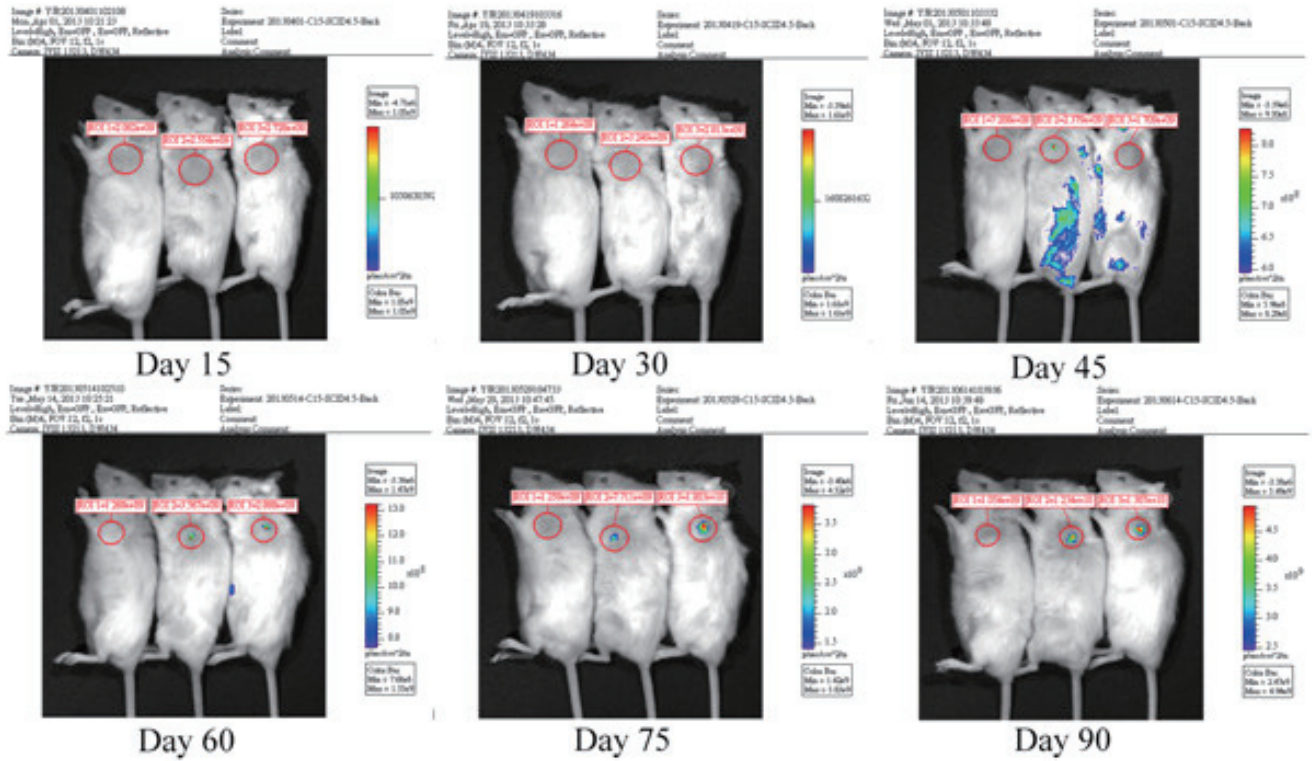


圖 4. 追蹤 90 天之 IVIS 活體連續影像。影像中之小鼠為同一批次；左邊小鼠為對照組，中間與右邊小鼠為處理組。
Fig. 4. Mice were from the same batch in these images. The control mouse was shown at the left and the mice of treatment groups were placed aside.

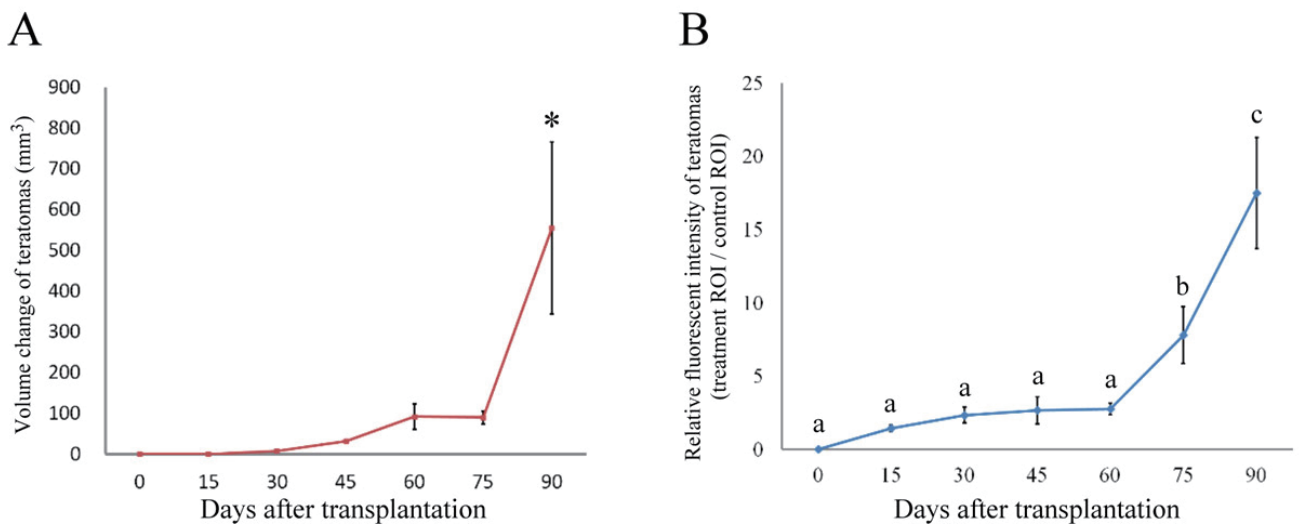


圖 5. 表現綠色螢光之豬誘導多能性幹細胞移植於 NOD-SCID 小鼠後之畸胎瘤體積變化 (A) 與螢光強度分析 (B)。相對表現強度係以處理組測量區域之螢光強度除以控制組測量區域之螢光強度來表示 (處理組 ROI / 對照組 ROI)。

Fig. 5. The volume change (A) and relative fluorescent intensity (B) of teratomas in NOD-SCID mice after grafted with GFP-expressing porcine induced pluripotent stem cells. The relative fluorescence intensity of treatment groups were exhibited as the fluorescence intensity detected from the region of interest (ROI) on mice in each treatment groups divided by that of the control group (treatment ROI / control ROI).

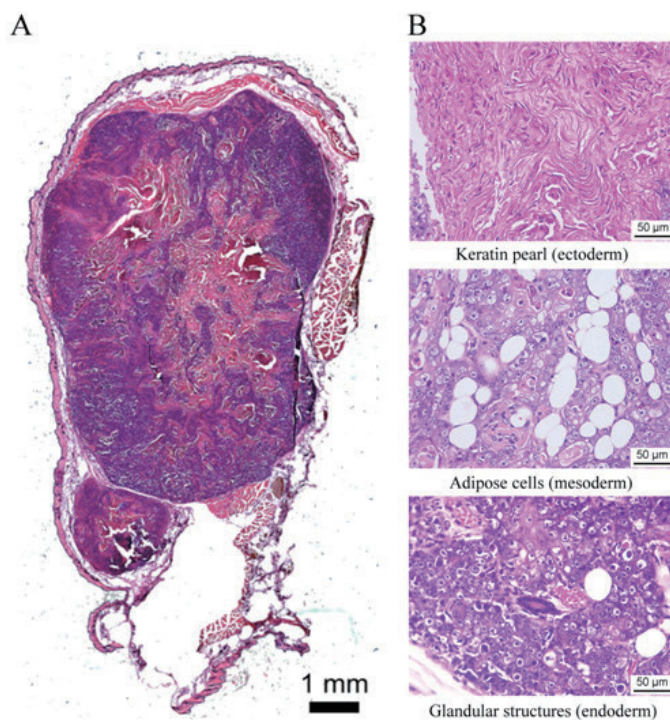


圖 6. 畸胎瘤組織切片。(A) 畸胎瘤全景圖。(B) 畸胎瘤切片可觀察到角質化細胞群、脂肪細胞與管狀結構等三胚層之構造。

Fig. 6. Histological sections of teratoma. (A) Overall view of teratoma. (B) The cells and tissues derived from three primitive germ layers in the teratoma, such as keratin pearl, adipose cells and glandular structures were observed in teratoma sections.

參考文獻

- 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(4): 611-621.
- Campbell, K. H., J. McWhir, W. A. Ritchie and I. Wilmut. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380(6569): 64-66.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148): 802-805.
- Cowan, C. A., J. Atienza, D. A. Melton and K. Eggan. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309(5739): 1369-1373.
- Egli, D., J. Rosains, G. Birkhoff and K. Eggan. 2007. Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* 447(7145): 679-685.
- Esteban, M. A., J. Xu, J. Yang, M. Peng, D. Qin, W. Li, Z. Jiang, J. Chen, K. Deng, M. Zhong, J. Cai, L. Lai and D. Pei. 2009. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J. Biol. Chem.* 284(26): 7634-7640.
- Ezashi, T., B. P. Telugu, A. P. Alexenko, S. Sachdev, S. Sinha and R. M. Roberts. 2009. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(27): 10993-10998.
- Fujishiro, S., K. Nakano, Y. Mizukami, T. Azami, Y. Arai, H. Matsunari, R. Ishino, T. Nishimura, M. Watanabe, T. Abe, Y. Furukawa, K. Umeyama, S. Yamanaka, M. Ema and H. Nagashima. 2013. Generation of naive-like porcine induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev.* 22(3): 473-482.
- Gonzalez, F., M. B. Monasterio, G. Tiscornia, N. M. Pulido, R. Vassena, L. B. Morera, I. R. Piza and J. C. I. Belmonte. 2009. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(22): 8918-8922.
- 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(9): e45532.

- Hall, V. J., M. Kristensen, M. A. Rasmussen, O. Ujhelly, A. Dinnyés and P. Hyttel. 2012. Temporal repression of endogenous pluripotency genes during reprogramming of porcine induced pluripotent stem cells. *Cell. Reprogram.* 14(3): 204-216.
- 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(3): 198-210.
- Huangfu, D., R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, M. Snitow, A. E. Chen and D. A. Melton. 2008. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26(7): 795-797.
- Lee, A. S., C. Tang, F. Cao, X. Xie, K. van der Bogt, A. Hwang, A. J. Connolly, R. C. Robbins and J. C. Wu. 2009. Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells. *Cell Cycle* 8(16): 2608-2612.
- 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(1): 11-15.
- Liao, Y. J., C. H. Liao, J. W. Liao, K. Yuan, Y. Z. Liu, Y. S. Chen, L. R. Chen and J. R. Yang. 2014. Establishment and characterization of novel porcine induced pluripotent stem cells expressing hrGFP. *J. Stem Cell Res. Ther.* 4: 208.
- 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(6): 587-590.
- Misteli, T. and D. L. Spector. 1997. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat. Biotechnol.* 15(10): 961-964.
- Miura, K., Y. Okada, T. Aoi, A. Okada, K. Takahashi, K. Okita, M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe, M. Ohnuki, D. Ogawa, E. Ikeda, H. Okano and S. Yamanaka. 2009. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* 27(8): 743-745.
- Montserrat, N., E. G. Bahima, L. Batlle, S. Häfner, A. M. Rodrigues, F. González and J. C. Izpisua Belmonte. 2011. Generation of pig iPS cells: a model for cell therapy. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 4(2): 121-130.
- 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(7): 1345-1357.
- Obokata, H., T. Wakayama, Y. Sasai, K. Kojima, M. P. Vacanti, H. Niwa, M. Yamato and C. A. Vacanti. 2014. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature* 505(7485): 641-647.
- Okita, K., M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka and S. Yamanaka. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322(5903): 949-953.
- 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(7175): 141-146.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast and M. J. Cormier. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2): 229-233.
- SAS. 2006. Enterprise Guide 4.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Stadtfeld, M., M. Nagaya, J. Utikal, G. Weir and K. Hochedlinger. 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322(5903): 945-949.
- Tada, M., Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji and T. Tada. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* 11(19): 1553-1558.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4): 663-676.
- Wu, Z., J. Chen, J. Ren, L. Bao, J. Liao, C. Cui, L. Rao, H. Li, Y. Gu, H. Dai, H. Zhu, X. Teng, L. Chenga and L. Xiao. 2009. Generation of pig-induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J. Mol. Cell Biol.* 1(1): 46-54.
- Yang, J. R., Y. L. Shiue, C. H. Liao, S. Z. Lin and L. R. Chen. 2009. Establishment and characterization of novel porcine embryonic stem cell lines expressing hrGFP. *Cloning Stem Cells* 11(2): 235-244.
- Yang, J. R., C. H. Liao, C. Y. Pang, L. L. H. Huang, Y. T. Lin, Y. L. Chen, Y. L. Shiue and L. R. Chen. 2010. Directed differentiation into neural lineages and therapeutic potential of porcine embryonic stem cells in rat Parkinson's disease model. *Cell. Reprogram.* 12(4): 447-461.
- Yang, J. R., C. H. Liao, C. Y. Pang, L. L. Huang, Y. L. Chen, Y. L. Shiue and L. R. Chen. 2013a. Transplantation of porcine embryonic stem cells and their derived neuronal progenitors in a spinal cord injury rat model. *Cytherapy* 15(2): 201-208.
- Yang, J. R., C. W. Hsu, S. C. Liao, Y. T. Lin, L. R. Chen and K. Yuan. 2013b. Transplantation of embryonic stem cells improves the regeneration of periodontal furcation defects in a porcine model. *J. Clin. Periodontol.* 40(4): 364-371.

Study of traceability of porcine induced pluripotent stem cells after transplantation ⁽¹⁾

Yu-Jing Liao ⁽²⁾ Yu-Zhan Liu ⁽²⁾ Yi-Shiou Chen ⁽²⁾ Ja-Xin Lee ⁽²⁾
Lih-Ren Chen ^{(2) (3) (4)} and Jenn-Rong Yang ^{(2) (5)}

Received: Mar. 1, 2015; Accepted: May 11, 2015

Abstract

The purpose of this study was to establish the green fluorescent protein expressing porcine induced pluripotent stem cells (piPS/GFP⁺ cells) and to investigate the traceability after cell transplantation. By using electroporation with 2 DC pluses of 150 V/cm and 10 mini sec, we successfully transfected GFP reporter gene into piPS cells, thereafter, which continuously and steadily expressed GFP signal. The embryoid formation derived from piPS/GFP⁺ cells by hanging drop culture also maintained GFP expression, induced and spontaneous differentiated into cells and tissues of the three germ layers. Furthermore, the teratomas were found in the NOD-SCID mice after piPS/GFP⁺ cells transplantation. The GFP expression of the transplanted piPS/GFP⁺ could be detected by using in vivo imaging system on day 30 after transplantation. The size of teratomas was significantly enlarged on day 90 after transplantation, along with the increment of the GFP signal intensity. Therefore, the GFP expression of piPS/GFP⁺ cells can be continuously and steadily maintained regardless of the differentiation or transplantation. The piPS/GFP⁺ cells could serve as a traceable target after transplantation and could be beneficial for the development of cell transplantation therapeutics.

Key words: Porcine induced pluripotent stem cells, Green fluorescent protein, Spontaneous differentiation, Teratoma.

(1) Contribution No. 2233 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) Institute of Biotechnology, National Cheng Kung University, Tainan 70101, Taiwan. R.O.C.

(4) Institute of Biotechnology, Southern Taiwan University, Tainan 71005, Taiwan. R.O.C.

(5) Corresponding author, E-mail: jryang@mail.tlri.gov.tw.