

建立豬誘導性多能幹細胞之無飼養層培養系統⁽¹⁾

廖御靜⁽²⁾ 陳怡秀⁽²⁾ 林佑靜⁽²⁾ 陳立人⁽²⁾ 楊鎮榮⁽²⁾⁽³⁾

收件日期：111 年 12 月 16 日；接受日期：112 年 6 月 28 日

摘 要

本試驗利用 Matrigel® 細胞外基質代替傳統幹細胞培養所使用之飼養層細胞，配合含有 CHIR99021 與 SB431542 之 StemFit Basic02 與 mTeSR1 幹細胞專用培養液（培養液簡稱 S+2i 與 M+2i），建立豬誘導多能性幹細胞（porcine induced pluripotent stem cell, piPSC）之無飼養層培養系統。結果顯示，S+2i 與 M+2i 可維持 piPSC 之細胞形態及高核質比特性，顯示 piPSC 維持良好的未分化狀態。細胞多能性抗原分析之結果顯示表現較強的 Oct4、Sox2 與 Nanog 標記，SSEA-1、TRA-1-60 與 TRA-1-81 表現度尚可，然 SSEA-3 與 SSEA-4 表現相當微弱。基因表現結果中，多能性基因表現皆有明顯的提升，其中又以 S+2i 表現最佳。經 S+2i 與 M+2i 培養之 piPSC 經誘導類胚體形成後，可於體外分化為三胚層細胞且具 GFAP、SMA 與 AFP 等抗原表現，且皆可成功誘發形成畸胎瘤，然其於活體內之後續三胚層分化能力仍相當有限。本試驗結果不但解決了以往需製備飼養層細胞之問題，此無飼養層培養系統之多能性表現與可利用性，亦優於傳統飼養層培養系統，可供 piPSC 長期培養使用。

關鍵詞：無飼養層培養、誘導多能性幹細胞、豬。

緒 言

自小鼠與人類胚幹細胞（embryonic stem cell, ESC）與誘導多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell, iPSC）建立以來（Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi, 2007），培養系統中常使用胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）與經絲裂黴素 C（mitomycin C）不活化處理之小鼠胎源纖維母細胞（mouse embryonic fibroblast, MEF）或 Sandos inbred mouse (SIM)-derived 6-thioguanine and ouabain resistant (STO) 細胞株，此等體外培養系統提供許多未知生長因子，可保持幹細胞無限自我更新與維持分化多能性。然動物性來源及其衍生物質之生物製劑因含有需多未明之生物因子，產品品質變異較大，因此採用此等培養系統之幹細胞若作為人體移植試驗時，亦可能有動物性病源污染或不良免疫反應之疑慮。因此，目前幹細胞培養之世界趨勢為捨棄含有動物性材料的物質，改用人工合成物質替代。此舉不但符合動物替代（replacement）、減量（reduction）與優化（refinement）的 3R 理念，且可解決動物性來源物質可能導致的不可預期問題，亦可使試驗材料來源單一，提供良好且品質穩定的可控性試驗材料。因此，建立無血清與無飼養層細胞的培養系統為培養多能性幹細胞的重要技術。

目前已有誘導性多能幹細胞（hiPSC）無飼養層培養系統，其效果逐年不斷的優化，然而針對豬（porcine）誘導性多能幹細胞（piPSC）之無飼養層培養系統之研究並不多。為建立多能性幹細胞之無飼養層培養系統，常使用 laminin、collagen、fibronectin、vitronectin 與 Matrigel® 等細胞外基質（extracellular matrix）作為替代飼養層細胞之物質（Amit and Itskovitz-Eldor, 2006; Hakala *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2019）。與傳統幹細胞培養方式相比，以往需不間斷的培養並製備飼養層細胞，供幹細胞繼代之用，改用細胞外基質來替代飼養層細胞，可達到省時、省錢也省力的目的。此外，幹細胞飼養於細胞外基質，除省去準備飼養層細胞之時間外，培養條件較容易掌控，可大幅增加細胞產量，有利於後續各類應用之需。

各種幹細胞培養液與細胞外基質組合後之特性不盡相同，例如比起 collagen 與 fibronectin，以 MEF 調節之培養液（MEF-conditioned medium）配合 laminin 之組合較適合培養人類胚幹細胞（human embryonic stem cell, hESC）（Xu *et al.*, 2001）。此外，laminin-511 E8 fragments 配合 StemFit 培養液，可成功維持 hESC 與 hiPSC 生長（Nakagawa *et al.*, 2014）。若選擇 fibronectin，則培養液中需含有鹼性纖維母細胞生長因子（basic fibroblast growth factor, bFGF）與乙式

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2755 號。

(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。

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

轉型生長因子 (transforming growth factor beta, TGF- β)，方可支持 hESC 生長 (Amit *et al.*, 2004)。Matrigel[®] 源自於小鼠之 Engelbreth-Holm-Swarm teratocarcinoma cells (Kleinman, 2001)，於 2001 首次應用於 hESC 之無飼養層培養系統 (Xu *et al.*, 2001)。因 Matrigel[®] 含有各種生長因子，以及 collagen IV、laminin、proteoglycans 與 entactin 等細胞外基質，故維持幹細胞未分化之效果極佳。雖 Matrigel[®] 較有批次生產品質不一之風險，然仍為目前無飼養層培養基質之首選。為解決 Matrigel[®] 的缺點，發展出了 vitronectin 與成分確定且無任何動物性來源之 Essential 8 培養液之組合 (Braam *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011)。此外，TeSR1 培養液源自於 Thomson 等人 (1998) 之配方，可廣泛應用於含 collagen IV、laminin、vitronectin 與 fibronectin 等細胞外基質之培養系統 (Ludwig *et al.*, 2006; Ludwig and Thomson, 2007)。

小鼠與人類 ESC 與 iPSC 之無飼養層培養系統已趨於完善，然而目前尚未有針對 piPSC 之無飼養層培養系統，因此本試驗以 iMatrix-511、Vitronectin XF 與 Matrigel[®] 細胞外基質配合 StemFit Basic02、mTeSR1 與 E8 等幹細胞專用培養液，評估其對 piPSC 培養於無飼養層培養系統之效果。

材料與方法

I. 以飼養層系統培養豬誘導多能性幹細胞

供試之 piPSC 源自於 Liao *et al.* (2014)，以慢病毒 (lentivirus) 載體將 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 與 *c-Myc* 轉錄因子轉染至豬耳朵纖維母細胞，其培養方法係參照 Yang *et al.* (2009) 所建立之方法進行。幹細胞培養液配方為 DMEM (11885084; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 培養液添加 16% FBS (16141079; Thermo Fisher Scientific)、0.1 mM β -mercaptoethanol (21985023; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、1% non-essential amino acids (11140050; Thermo Fisher Scientific)、1 mM L-glutamine (25030081; Thermo Fisher Scientific) 與核苷酸混合液 (nucleotides mixture, Sigma-Aldrich)。piPSC 培養於經 mitomycin C (M4287; Sigma-Aldrich) 不活化處理之小鼠株化胎體纖維母細胞 (STO cells, ATCC CRL-1503, USA) 飼養層細胞 (feeder cells)，培養箱條件為 37°C 與含 5% CO₂ 之空氣。培養過程中每週重新繼代於新製備的 mitomycin C 不活化處理之 STO 飼養層細胞，每隔 2 天更換 1 次培養液，以保持 piPSC 之未分化狀態。

II. 以無飼養層系統培養豬誘導多能性幹細胞

將 piPSC 由飼養層培養系統中以玻璃針挑起後，置於已用 iMatrix-511 (T303; Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan)、Vitronectin XF (100-0763; STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada) 與 Matrigel[®] (以 DMEM/F12 稀釋 100 倍) (354277; Corning, Corning, NY, USA) 等培養基質處理之培養皿，再以市售之 StemFit Basic02(S) (SFB-500; Ajinomoto Co., Chuo-ku, Tokyo, Japan)、mTeSR1(M) (85850; STEMCELL Technologies) 與 E8(E) (A1517001; Thermo Fisher Scientific) 等幹細胞專用培養液培養。培養液額外添加 3 μ M CHIR99021 (HY-10182; MedChemExpress LLC, Monmouth Junction, NJ, USA) 與 2 μ M SB431542 (HY-10431; MedChemExpress LLC)，上述培養液添加物稱為 2i，添加此 2i 之培養液命名為 StemFit Basic02+2i (S+2i)、mTeSR1+2i (M+2i) 與 E8+2i (E+2i)。繼代時細胞先以 ReLeSR (05872; STEMCELL Technologies) 浸潤，於 37°C 培養箱處理 5 分鐘後，再輕敲培養皿 2 分鐘使細胞分離並分散予以繼代。每次繼代時幹細胞培養液添加 10 μ M Y27632 (HY-10071; MedChemExpress LLC) 以增加細胞存活率，隔日再將培養液換回不含 Y27632 之培養液，每隔 2 天更換 1 次培養液，以保持 piPSC 之未分化狀態。本試驗每組重複 3 次以上，以確保結果可信度。

III. 免疫細胞化學染色

以免疫細胞化學染色法進行多能性標記分析，所選用之專一性抗體有 Oct4 (AB3209; Merck Millipore, Burlington, MA, USA)、Sox2 (ab97959; Abcam, Cambridge, MA, USA)、Nanog (MBS420182; Mybiosource, San Diego, CA, USA)、SSEA-1 (MAB4301; Merck Millipore)、SSEA-3 (MAB4303; Merck Millipore)、SSEA-4 (MAB4303; Merck Millipore)、TRA-1-60(MAB4360; Merck Millipore) 與 TRA-1-81 (MAB4381; Merck Millipore) 等。分化試驗選用之抗體為 glial fibrillary acidic protein (GFAP; ab4648; Abcam)、smooth muscle actin (SMA; ab7817; Abcam) 與 alpha 1 fetoprotein (AFP; 14550-1-AP; Proteintech Group, Inc, Rosemont, IL, USA)。染色時，細胞以 10% 福馬林於室溫下固定 15 分鐘，依序再加入 0.1% Triton X-100 反應 10 分鐘，與 blocking solution (BlockAid[™] Blocking Solution, B-10710, Invitrogen) 反應 1 小時。再加入第一級抗體於 4°C 下反應隔夜後，與第二級抗體反應 1 小時，最後以 DAPI 染色進行螢光分析。

選用之二級抗體為 Goat anti-Rabbit IgG (H + L) (for Oct4, Sox2, and AFP; AP307R; Merck Millipore)、Donkey

anti-Goat IgG (H + L) (for Nanog; AS069; Abclonal, Woburn, MA, USA) 、Rabbit anti-Mouse IgG (H + L) (for SSEA-3, SSEA-4, GFAP, and SMA; 115-025-146; Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) 與 Rabbit anti-Mouse IgM (for SSEA-1, TRA-1-60, and TRA-1-81; AP128R; Merck Millipore) 。

IV. 鹼性磷酸酶之檢測

多能性幹細胞可表現鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AP)，piPSC 以 10% 中性福馬林固定 2 分鐘後，利用鹼性磷酸酶套組 (SCR004; Merck Millipore) 檢測其 AP 表現程度。

V. 類胚體 (embryoid body) 形成之誘導

利用玻璃針將 piPSC 群落挖起，稍微打散後以類胚體培養液進行懸浮培養 5 天，經 5 天的懸浮培養後形成類胚體，此時再以同樣的培養液將類胚體培養於經 0.1% gelatin 處理之培養皿培養 14 天，進行貼附培養以誘發體外自體分化。類胚體培養液配方為 DMEM/F-12 培養液 (11320033; Thermo Fisher Scientific) 添加稀釋 100 倍之 GlutaMAX™ supplement (35050061; Thermo Fisher Scientific)、20% 的 KnockOut™ Serum Replacement (10828028; Thermo Fisher Scientific)、稀釋 100 倍之 non-essential amino acids (Thermo Fisher Scientific) 與稀釋 550 倍之 β -mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific) 。

VI. 幹細胞分化多能性基因表現分析

細胞收集後浸泡於 RNeasy Lysis Buffer™ 保存於 -40℃，待試驗時再解凍使用。細胞 RNA 以 Quick-RNA™ Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) 萃取後，以 PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan) 反轉錄為 cDNA，保存於 -40℃。最後再以 SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan) 進行 Real-time PCR 檢測幹細胞分化多能性基因表現。選用之引子如表 1 所述。

表 1. 引子序列

Table 1. Primer sequences

Gene	F/R	Primer Sequence
<i>Oct4</i>	F	GGTCCGCGTGTGGTTCTG
	R	TCCTCTCGTTGCGAATAGTCA
<i>Sox2</i>	F	TTCACATGTCCCAGCACTACCAGA
	R	TCACATGTGTGAGAGGGGCAGTGTGC
<i>KLF4</i>	F	GAAGGGAGAAGACACTGCGT
	R	CGGGGGAAGTCTTTGCTTCA
<i>MYC</i>	F	GCCAAAAGGTCCGAATCGGGG
	R	CGCAGCACGTCTTTTCTGACAC
<i>Nanog</i>	F	CCGAAGCATCCATTTCAGCG
	R	GGTATTCTGTACTGGCTGAGCC
<i>GAPDH</i>	F	TGGGCGTGAACCATGAGAAG
	R	GGTGGTGCAGGAGGCATT

VII. 畸胎瘤之形成能力

選用 2 隻 6 週齡之 NOD-SCID 雄性小鼠，將 piPSC 移植於左側與右側肩部皮下，進行畸胎瘤生成試驗。每隻小鼠移植時 1×10^6 顆細胞先與含有 100 μ L Matrigel® (354263; Matrix High Concentration, Corning)、100 μ L DMEM/F-12 與 10 μ M Y27632 (MedChemExpress LLC) 的混合液於冰上混合，再將 200 μ L 的細胞混合液裝填於 1 mL 針筒，以 26G 附針將細胞移植於肩部皮下。每 2 週測量一次生成的細胞團塊的大小，試驗小鼠於細胞移植後 2 個月犧牲，採集畸胎瘤樣品進行石蠟組織切片與 HE 染色分析細胞分化狀態。

結果與討論

I. 抑制 GSK3 與 ALK4/5/7 細胞訊息傳遞路徑為以無飼養層培養 piPSC 之關鍵

本試驗使用 iMatrix-511、Vitronectin XF 與 Matrigel 基質，以及市售之 StemFit Basic02、mTeSR1 與 E8 等幹

細胞專用培養液，共 9 種組合篩選出 piPSC 之無飼養層培養條件。將 piPSC 由 STO 飼養層細胞挑起後，培養於無飼養層培養條件。結果顯示，將 piPSC 繼代至無飼養層培養系統後，Vitronectin XF 與 Matrigel® 培養基質條件下之細胞排列較緊密，狀態較 iMatrix-511 組為佳；此外，StemFit Basic02 培養液較能維持一致的細胞形狀，而 E8 與 mTeSR1 組別含有許多雜亂之細胞 (圖 1A)。然而，各組之細胞形態皆已轉變，已開始分化並失去幹細胞之形態特性 (圖 1A)。此結果顯示，iMatrix-511、Vitronectin XF 與 Matrigel 基質，配合市售之 StemFit Basic02、mTeSR1 與 E8 等幹細胞專用培養液，並無法直接使用於 piPSC 無飼養層培養。然而，StemFit Basic02 可維持較佳的細胞形態，為最可能應用於 piPSC 之無飼養層培養系統。因此，將可進一步微調 StemFit Basic02 配方，使符合無飼養層細胞培養 piPSC 之需求。

Ma *et al.* (2018) 指出，CHIR99021 為 glycogen synthase kinase (GSK) 3 路徑的抑制劑，SB431542 為 activin receptor-like kinase (ALK)4、ALK5 與 ALK7 路徑的抑制劑，亦是維持 piPSC 未分化之重要因子。因此，本試驗將 3 μ M CHIR99021 與 2 μ M SB431542 等因子，添加於 StemFit Basic02，並配合 iMatrix-511、Vitronectin XF 與 Matrigel® 基質。結果顯示，iMatrix-511 配合 S+2i，piPSC 仍明顯分化，此組合並不適合用於 piPSC 之無飼養層培養 (圖 1B)。Vitronectin XF 配合 S+2i 可顯著改善 piPSC 的形態，然此系統下細胞生長較緩慢，且仍會有少量分化現象 (圖 1B)。然而 Matrigel® 配合 S+2i，piPSC 貼附性良好，且生長相當快速，繼代後 5 天即需再次繼代。且呈現完整緊密的細胞型態與高核質比的特徵 (圖 1C)，顯示 piPSC 處於未分化之狀態。此外，Matrigel® 配合 M+2i 之組合亦可表現相似的結果，piPSC 細胞群落表面平滑且紮實，顯示 piPSC 維持在良好的未分化狀態 (圖 1C)。然而，E8+2i 初期雖可維持一定的細胞型態，細胞亦表現高核質比特性，然細胞經繼代後無法生長。推測 E8 培養液配方過於簡單，無法長期維持 piPSC 生長。此結果顯示，CHIR99021 與 SB431542 添加於 StemFit Basic02 與 mTeSR1 培養液，並配合 Matrigel® 基質，可維持 piPSC 未分化之幹細胞型態。

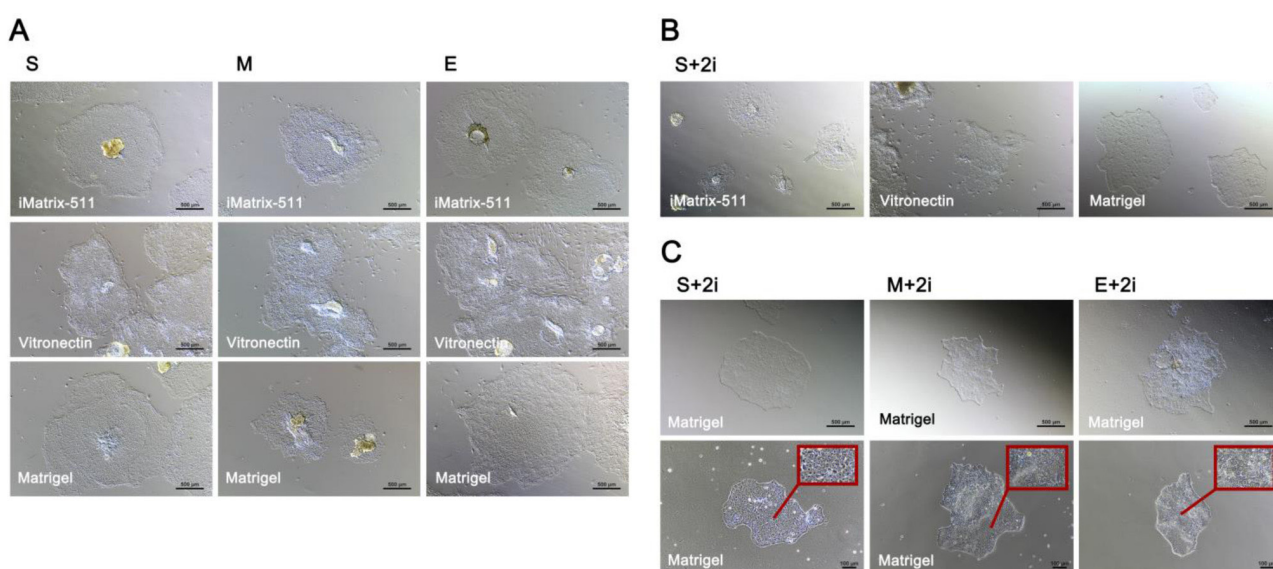


圖 1. 豬誘導多能性幹細胞於無飼養層培養系統之細胞形態。(A) 不同無飼養層培養基質與培養液之組合結果。(B-C) piPSC 培養於 Matrigel® 基質，配合 S+2i、M+2i 與 E8+2i 培養液。S：StemFit Basic02 培養液；M：mTeSR1 培養液；E：E8 培養液；2i：CHIR99021 與 SB431542。

Fig. 1. Morphologies of piPSCs in feeder-free culture systems. (A) piPSCs are cultured in different feeder-free cell culture matrices and media. (B-C) piPSCs maintained in Matrigel® with S+2i, M+2i, and E8+2i culture medium. S, StemFit Basic02 medium; M, mTeSR1 medium; E, E8 medium; 2i, CHIR99021 and SB431542.

II. 無飼養層培養 piPSC 可表現多能性抗原

Oct4、Sox2 與 Nanog 為多能性相關的轉錄因子，而 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 與 TRA-1-81 為多能性相關的細胞表現抗原，皆為多能性幹細胞重要的抗原標誌。持續繼代數代後，S+2i 與 M+2i 皆可維持完整表現 AP、Oct4、Sox2 與 Nanog；SSEA-1、TRA-1-60 與 TRA-1-81 表現尚可，然 SSEA-3 與 SSEA-4 之表現則相當微弱 (圖 2)。近年來已開發出豬胚幹細胞 (porcine embryonic stem cell, pESC) 專屬之培養液，且 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60 與 TRA-1-81 表現已顯著提升 (Choi *et al.*, 2019; Zhi *et al.*, 2022)。然而，本試驗結果與先前 piPSC 研究相似 (Ezashi *et al.*, 2009)，piPSC 之 Oct4、Sox2 與 Nanog 表現量相當高，然而其餘抗原表現仍相當微弱，甚至不表現，顯示目前 piPSC 之多能性表現仍較 pESC 差。

III. 無飼養層培養 piPSC 之多能性基因表現較佳

試驗共檢測 *Oct4*、*Sox2*、*KLF4*、*MYC* 與 *Nanog* 等 5 種多能性相關基因。經由檢測之多能性基因表現可知，該培養條件是否可改善多能性基因表現。試驗以飼養層為對照組，結果顯示無飼養層培養條件下，多能性表現基因皆有提升，其中以培養於 S+2i 者之 *Oct4* 表現量提升最多。

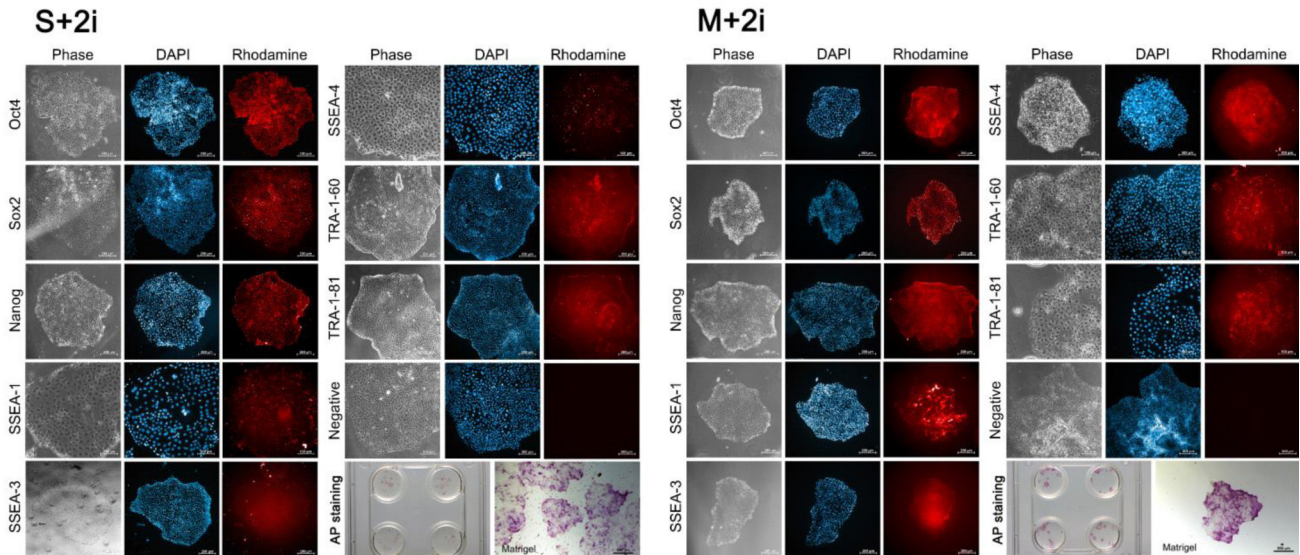


圖 2. 豬誘導多能性幹細胞於無飼養層環境下之多能性抗原表現。S+2i 與 M+2i 可正常表現 AP、Oct4、Sox2 與 Nanog；SSEA-1、TRA-1-60 與 TRA-1-81 表現程度尚可，然而 SSEA-3 與 SSEA-4 表現則相當微弱。S：StemFit Basic02 培養液；M：mTeSR1 培養液；2i：CHIR99021 與 SB431542。

Fig. 2. The pluripotency marker expression of piPSC in the feeder-free culture system. S, StemFit Basic02 medium; M, mTeSR1 medium; 2i, CHIR99021 and SB431542.

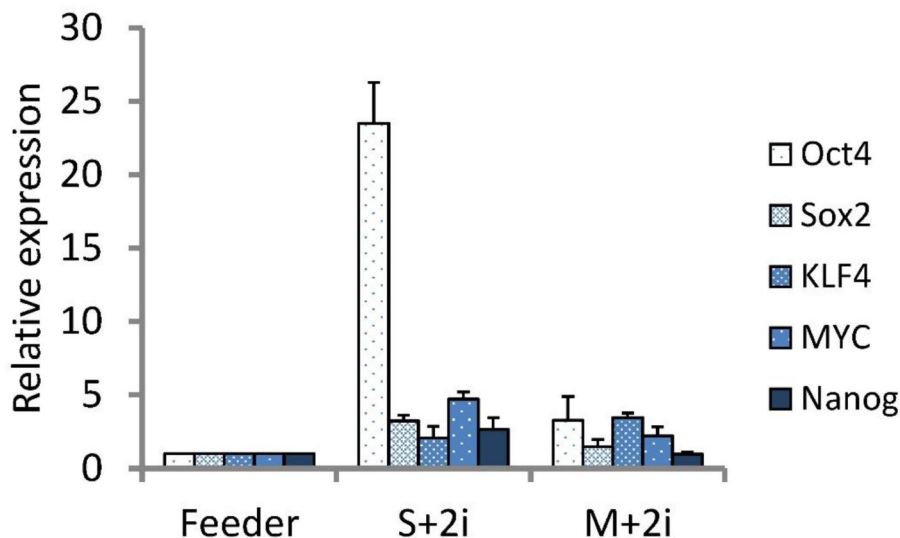


圖 3. 豬誘導性多能幹細胞於無飼養層環境下之多能性基因表現。

Fig. 3. Pluripotency gene expressions of piPSCs in the feeder-free culture system.

IV. 無飼養層培養 piPSC 可形成類胚體並分化為三胚層細胞

類胚體形成為多能性細胞特性之一，此過程可誘發自體分化出三胚層細胞。類胚體形成方式有傳統之懸浮小滴培養，讓細胞懸浮沉降於 U 型液滴底部，細胞聚集後形成類胚體，亦可藉由具低貼附特性之培養皿，讓細胞懸浮於培養皿底部以形成類胚體 (Kurosawa, 2007)。本試驗採用傳統的懸浮小滴培養方法進行，經 5 天的懸浮培養後，S+2i 與 M+2i 皆可形成類胚體 (圖 4)。隨後再將類胚體培養於 0.1% gelatin 處理之 4 孔培養盤進行貼附培養與分化誘導，經 14 天的貼附培養後，可觀察到 S+2i 與 M+2i 分化之細胞具有 GFAP、SMA 與 AFP 抗原表現，顯示分化之細胞包括有外胚層之神經細胞、中胚層之肌肉細胞與內胚層之肝臟相關細胞 (圖 4)。

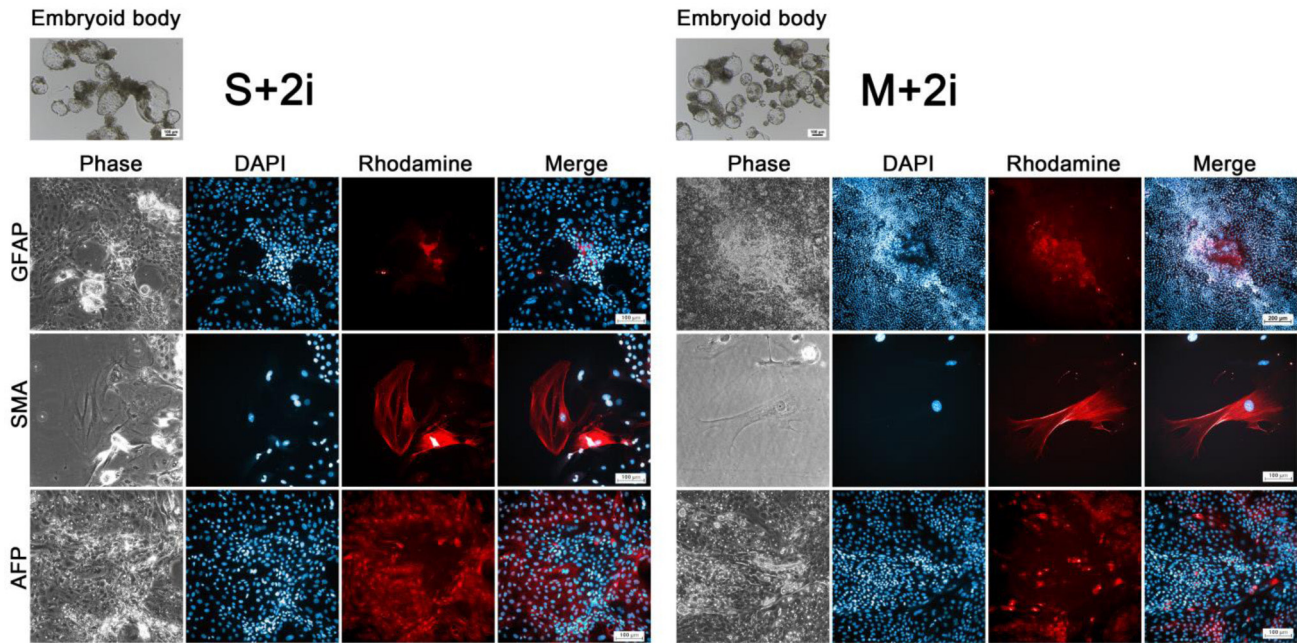


圖 4. 豬誘導性多能幹細胞於無飼養層環境下所形成之類胚體。

Fig. 4. Embryoid body formation of piPSC in the feeder-free culture system.

V. 無飼養層培養 piPSC 可形成畸胎瘤

畸胎瘤形成為檢測多能性幹細胞體內分化能力之方法，試驗將 S+2i 與 M+2i 之細胞移植至小鼠皮下，兩個月後犧牲採集畸胎瘤切片分析。S+2i 與 M+2i 組別畸胎瘤生長速度相當，細胞移植一個月後，即可觸診到畸胎瘤生成。然而，所有組別之畸胎瘤 HE 染色結果皆顯示，結構主要為外胚層（圖 5），難以觀察到中胚層與內胚層結構。綜合類胚體的分化結果與多能性基因表現結果可推測，S+2i 與 M+2i 組別之多能性表現確實提升，於類胚體分化中亦可觀察到三胚層細胞之分化，然此分化能力仍相當有限，分化之細胞量相當稀少。因此，推測因分化之細胞數量較少，畸胎瘤組織中難以形成典型的三胚層俱存的結構。此結果與先前研究相似 (Liao *et al.*, 2014)，係以病毒方式製作之 piPSC，由於導入的外源性多能性基因永久鑲嵌於細胞基因組中，阻礙了後續的分化能力。

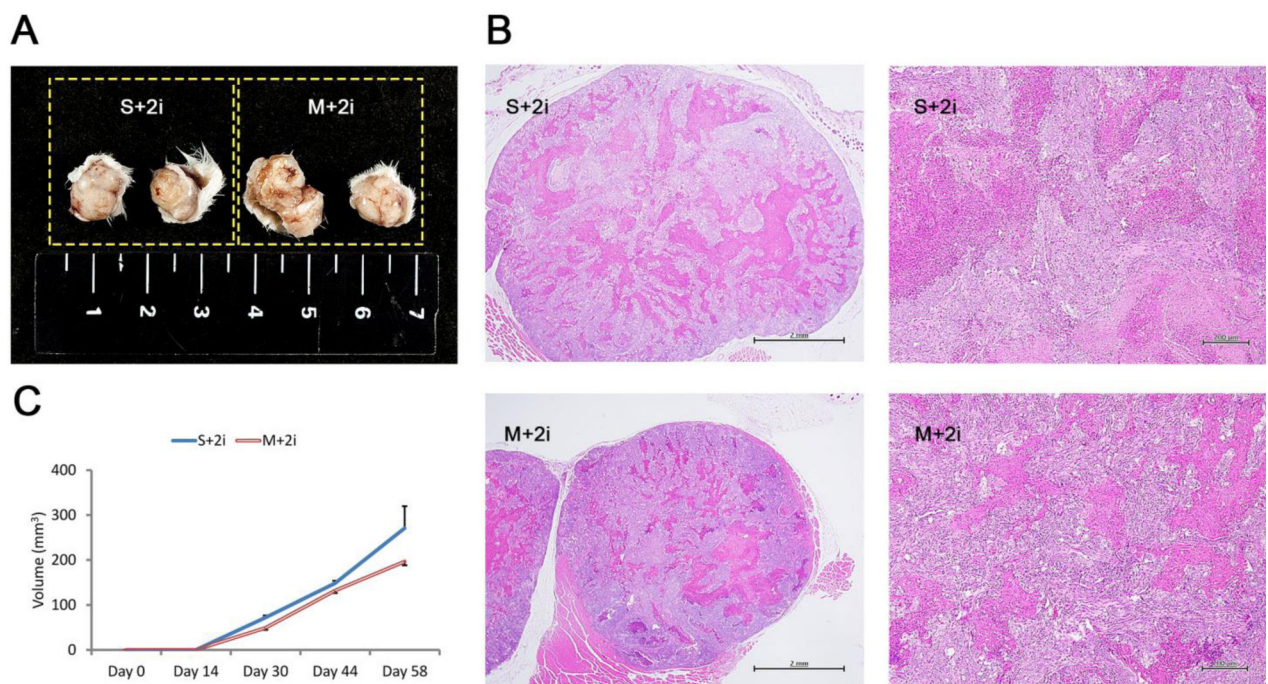


圖 5. 豬誘導性多能幹細胞於無飼養層環境下形成之畸胎瘤。

Fig. 5. Teratoma formation of piPSCs in the feeder-free culture systems.

結 論

本試驗結果顯示，StemFit Basic02 與 mTeSR1 培養液添加 CHIR99021 與 SB431542 抑制劑，配合 Matrigel® 基質，可維持 piPSC 於未分化狀態。此無飼養層培養系統不但解決了以往需要製備飼養層細胞之問題，經此系統培養之 piPSC 的多能性表現與可利用性，亦優於傳統飼養層培養系統者。此無飼養層培養系統，可供未來 piPSC 長期培養與分化試驗之用。然而，以病毒為載體導入外源多能性基因的方式製作出之 piPSC，由於外源的多能性基因會永久鑲嵌於細胞基因組中而阻礙其分化能力。故產製以無外源性基因鑲嵌之 piPSC 是提升其分化多能性的方法之一，再配合最佳化的無飼養層培養系統，未來可望進一步顯著提升 piPSC 之分化能力與其應用性。

參考文獻

- Amit, M. and Itskovitz-Eldor, J. 2006. Feeder-free culture of human embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* 420: 37-49.
- Amit, M., C. Shariki, V. Margulets, and J. Itskovitz-Eldor. 2004. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* 70(3): 837-845.
- Braam, S. R., L. Zeinstra, S. Litjens, D. Ward-van Oostwaard, S. van den Brink, L. van Laake, F. Lebrin, P. Kats, R. Hochstenbach, R. Passier, A. Sonnenberg, and C. L. Mummery. 2008. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. *Stem Cells* 26(9): 2257-2265.
- Chen, G., D. R. Gulbranson, Z. Hou, J. M. Bolin, V. Ruotti, M. D. Probasco, R. Wagner, G. O. Lee, J. Antosiewicz-Bourget, J. M. Teng, and J. A. Thomson. 2011. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods.* 8(5): 424-429.
- Choi, K. H., D. K. Lee, S. W. Kim, S. H. Woo, D. Y. Kim, and C. K. Lee. 2019. Chemically defined media can maintain pig pluripotency network in vitro. *Stem Cell Reports* 13(1): 221-234.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819): 154-156.
- 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. USA.* 106(27): 10993-10998.
- Hakala, H., K. Rajala, M. Ojala, S. Panula, S. Areva, M. Kellomäki, R. Suuronen, and H. Skottman. 2009. Comparison of biomaterials and extracellular matrices as a culture platform for multiple, independently derived human embryonic stem cell lines. *Tissue Eng. Part A* 15(7): 1775-1785.
- Kleinman, H. K. 2001. Preparation of basement membrane components from EHS tumors. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 10: Unit 10.2.
- Kurosawa, H. 2007. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* 103(5): 389-398.
- 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.
- Ludwig, T. and J. A. Thomson. 2007. Defined, feeder-independent medium for human embryonic stem cell culture. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* Chapter 1: Unit 1C.2.
- Ludwig, T. E., M. E. Levenstein, J. M. Jones, W. T. Berggren, E. R. Mitchen, J. L. Frane, L. J. Crandall, C. A. Daigh, K. R. Conard, M. S. Piekarczyk, R. A. Llanas, and J. A. Thomson. 2006. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24(2): 185-187.
- Ma, Y., T. Yu, Y. Cai, and H. Wang. 2018. Preserving self-renewal of porcine pluripotent stem cells in serum-free 3i culture condition and independent of LIF and b-FGF cytokines. *Cell Death Discov.* 4: 21.
- 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(12): 7634-7638.
- Nakagawa, M., Y. Taniguchi, S. Senda, N. Takizawa, T. Ichisaka, K. Asano, A. Morizane, D. Doi, J. Takahashi, M. Nishizawa, Y. Yoshida, T. Toyoda, K. Osafune, K. Sekiguchi, and S. Yamanaka. 2014. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 4: 3594.

- 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.
- 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(5): 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(5391): 1145-1147.
- Xu, C., M. S. Inokuma, J. Denham, K. Golds, P. Kundu, J. D. Gold, and M. K. Carpenter. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19(10): 971-974.
- 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.
- Zhi, M., J. Zhang, Q. Tang, D. Yu, S. Gao, D. Gao, P. Liu, J. Guo, T. Hai, J. Gao, S. Cao, Z. Zhao, C. Li, X. Weng, M. He, T. Chen, Y. Wang, K. Long, D. Jiao, G. Li, J. Zhang, Y. Liu, Y. Lin, D. Pang, Q. Zhu, N. Chen, J. Huang, X. Chen, Y. Yao, J. Yang, Z. Xie, X. Huang, M. Liu, R. Zhang, Q. Li, Y. Miao, J. Tian, X. Huang, H. Ouyang, B. Liu, W. Xie, Q. Zhou, H. Wei, Z. Liu, C. Zheng, M. Li, and J. Han. 2022. Generation and characterization of stable pig pregastrulation epiblast stem cell lines. *Cell Res.* 32(4): 383-400.

Establishment of a feeder-free culture system for porcine induced pluripotent stem cells ⁽¹⁾

Yu-Jing Liao ⁽²⁾ Yi-Shiou Chen ⁽²⁾ Yu-Ching Lin ⁽²⁾ Lih-Ren Chen ⁽²⁾ and Jenn-Rong Yang ⁽²⁾⁽³⁾

Received: Dec. 16, 2022; Accepted: Jun. 28, 2023

Abstract

The present study established the feeder-free culture system for porcine induced pluripotent stem cells (piPSC) by using Matrigel[®], an extracellular matrix used to replace the feeder cells in the traditional stem cell culture, and stem cell culture medium named StemFit Basic02+2i (S+2i) and mTeSR1+2i (M+2i), StemFit Basic02 and mTeSR1 supplemented with CHIR99021 and SB431542. The results showed that S+2i and M+2i maintained the cell morphology and showed high nuclear cytoplasmic ratio, indicating that piPSC showed an undifferentiated state. The pluripotency markers expression of Oct4, Sox2, and Nanog was very high, the expression of SSEA-1, TRA-1-60, and TRA-1-81 was low, but the expression of SSEA-3 and SSEA-4 was very weak. The expression of pluripotency genes was significantly improved, and S+2i exhibited the best results. After embryoid body formation, piPSC *in vitro* differentiated into three germ layer cells, expressing GFAP, SMA, and AFP antigen. Teratomas were successfully formed in both S+2i and M+2i, but their ability to differentiate into three germ layers was still quite limited. Taken together, this study provides a new method for long-term culture of piPSC. This culture system not only solves the problem of preparing feeder cells in a traditional culture system, but also improves the cell pluripotency and utility which is better than traditional feeder-dependent culture systems.

Key words: Feeder-free culture system, Induced pluripotent stem cells, Pigs.

(1) Contribution No. 2755 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, HsinHua Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

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