



中 國 醫 藥 大 學

基礎醫學研究所

碩士學位論文

利用缺氧狀態生成無病毒感染及致癌基因的老鼠  
誘導性多功能幹細胞

**Mouse-induced pluripotent stem cells generated  
under hypoxic conditions in the absence of viral  
infection and oncogenic factors**

指導教授：劉詩平 教授

研 究 生：許千祐

中華民國一〇〇年七月

## 中文摘要：

2006年，日本的一個團隊利用反轉錄病毒將 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 這四個轉錄因子送入成體細胞，製作出誘導性多功能幹細胞。誘導性多功能幹細胞無論在各方法都和胚胎幹細胞十分相似，因此可以用來克服胚胎幹細胞在做臨床治療上所遇到困難。即使如此，誘導性多功能幹細胞仍有至少兩個需要克服的困難：1.使用病毒載體將基因插入成體細胞的染色體中 2.使用了致癌基因 c-Myc, Klf4。在 2008 年，Okita 等人報導他們可以在不使用病毒載體的情況下成功的生成老鼠的誘導性多功能幹細胞，但是他們在這個實驗仍然包含兩個致癌基因：c-Myc, Klf4。本實驗中我們的假說為：只使用兩個轉錄因子：Oct4, Sox2 結合缺氧環境，應可以成功的生成誘導性多功能幹細胞。我們利用質體轉染重複將兩個表現質體（分別包含了 Oct4, Sox2 基因）傳入老鼠胚胎纖維母細胞當中生成誘導性多功能幹細胞，而沒有使用病毒載體。轉染六小時之後，讓細胞處於 3%缺氧環境下二十四小時。這個動作總共重複了四次。在第九天將老鼠胚胎纖維母細胞培養到滋養層細胞上，在第二十一天時我們發現了誘導性多功能幹細胞。根據細胞的形態、鹼性磷酸酶染色、胚胎球實驗和畸胎瘤形成等實驗，我們證實了此誘導性多功能幹細胞具有多能性，和胚胎幹細胞相類似。此一方法不僅可以去除病毒感染的疑慮，也未使用致癌基因，因此對未來應用於臨床上有相當大的幫助。

## **Abstract**

Induced pluripotent stem (iPS) cells from somatic cells by introducing four transcriptional factors: Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4 were reported in 2006. The morphology, proliferation, surface antigens, gene expression, telomerase activity, and epigenetic status of pluripotent cell-specific genes from the iPS cells were similar to those from embryonic stem (ES) cells. This novel technology has potential to overcome hurdles associated with ES cells due to their generation from mature somatic cells. However, at least two hurdles remain: integrating viral transgenes into the somatic genome, and introducing oncogenes: c-Myc and Klf4. In 2008, Okita et al. successfully generated mouse iPS cells without viral vectors, but they used four factors containing the oncogenes, c-Myc and Klf4. We tested our hypothesis that iPS cells can be generated by introducing only Oct4 and Sox2 under hypoxic conditions. We observed that the repeated transfection of two expression plasmids (one containing Oct4 and the other Sox2 cDNA) into mouse embryonic fibroblasts and combined hypoxic condition resulted in iPS cells generation. Six hours post-transfection, MEF cells were subjected to hypoxic conditions for 24 h (3% O<sub>2</sub>); this procedure was repeated four times. The MEF cells were passaged on feeder cells on day 9; iPS cell clones were observed 12 days post-passaging and designated as iPS-OSH cells. The morphology, positive alkaline phosphatase staining, embryonic body and teratoma formation indicated that the iPS-OSH cells had pluripotent capability similar to ES cells. This strategy avoids oncogenic factors and virus integration, thus decreasing the risk of cancer formation.

## 致謝

鳳凰花開，蟬鳴重重，又到了這別離的季節。在中國醫念碩士班的這兩年裡，曾遇到了總總困難，所幸有你們讓一切能順利。

首先要感謝我的父母親，支持我念碩士班，讓我在跌跌撞撞的生命旅途中不至於迷惘。更感謝您們不顧一切的付出與鼓勵，讓我在低落時也能勇敢面對挑戰。這兩年中，最要感謝我的指導教授—劉詩平老師。謝謝您孜孜不倦的教導、也感謝您能亦師亦友的讓我在這兩年裡可以在輕鬆愉快的氣氛中學習到許多知識以及實驗技巧。當然，也要感謝在這兩年中陪伴我度過的同學們，謝謝你們和我一起努力、一起歡笑。還有學姐們，謝謝妳們無私的教導，讓我學會許多實驗上的技巧。最後，要謝謝學弟妹在實驗上的幫忙，謝謝你們幫忙了我許多事。還有身邊的許多人，謝謝你們的幫助及陪伴。

相聚的時光總是匆匆，在這兩年裡，很開心、也很幸運能遇見你們，為我的人生更添繽紛。

## 目錄

中文摘要：	I
Abstract	II
致謝	III
目錄	IV
第一章、簡介	1
第一節、研究背景	1
1.1.1 胚胎幹細胞 (Embryonic Stem Cells, ES cells)	1
1.1.2 誘導性多功能幹細胞 (Induced Pluripotent Stem Cells, iPS)	2
1.1.3 缺氧環境 (Hypoxia)	3
1.1.4 Oct4	4
1.1.5 Sox2	5
第二節、實驗目的	6
第二章、材料與方法	7
2.1 質體構築 Construction of the plasmid	7
2.2 老鼠胚胎纖維母細胞之培養 Mouse embryonic fibroblast cells (MEF) culture	7
2.2.1 誘導性多功能幹細胞的培養 Induced pluripotent stem cells (iPS) culture	8
2.3 西方墨點法 Western Blot	9
2.4 缺氧環境 Hypoxia	10

2.5 即時聚合酶鏈鎖反應 Real-time PCR .....	10
2.6 質體轉染 Transfection .....	11
2.7 鹼性磷酸酶染色 Alkaline phosphatase staining .....	11
2.8 免疫螢光染色-幹細胞標記 Immunofluorescent antibody assay-stem cell marker .....	12
2.9 聚合酶鏈鎖反應 PCR .....	12
2.10 胚胎球的形成和分化 Embryonic bodies formation and differentiation .....	13
2.10.1 免疫螢光染色-三胚層 Immunofluorescent antibody assay-three germ layers .....	14
2.11 畸胎瘤的形成 Teratoma formation .....	15
2.12 微陣列分析 Microarray analysis .....	15
2.13 統計分析 .....	15
2.14 利用誘導性多功能幹細胞生成神經幹細胞 Generation of neural stem cells (NSC) from iPS-OSH .....	16
第三章、結果 .....	18
第一節、經由缺氧環境處理過後胚胎纖維母細胞的 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 蛋白和基因表現 .....	18
第二節、利用 Oct4, Sox2 質體在缺氧環境下生成誘導性多功能幹細 胞 .....	19
第三節、iPS-OSH 細胞中幹細胞特異基因的表現 .....	20



第四節、iPS-OSH 細胞在體外、體內的多能性 .....	21
第五節、利用 Microarray 分析 iPS-OSH 的全基因表現 .....	22
第六節、利用誘導性多功能幹細胞生成神經幹細胞 Generation of neural stem cells (NSC) from iPS-OSH .....	23
第四章、討論 .....	24
參考文獻： .....	26
圖表 .....	30



## 第一章、簡介

### 第一節、研究背景

#### 1.1.1 胚胎幹細胞 (Embryonic Stem Cells, ES cells)

胚胎幹細胞源自囊胚的內部細胞(inner cell mass, ICM) (1, 2)，在動物體中，胚胎幹細胞可以正常分化成三胚層細胞進而生成組織、器官(3-5)。我們將此能力稱之為多能性(Pluripotency)。胚胎幹細胞另一項能力是自我更新(self-renew)。一般的成體細胞只能分化成和自身相同的細胞，最終走向凋亡。但是對於胚胎幹細胞而言，它具有持續保持自體本身細胞不走向分化的能力，也具有分化成三個胚層各種細胞的能力。基於胚胎幹細胞的這兩個能力，讓研究學者們積極的研究它，想藉由胚胎幹細胞分化成各種細胞的能力來解決目前醫學無法治癒的病症。例如：糖尿病、帕金森氏症、中風等。但是胚胎幹細胞卻仍有無法突破的困難點。人類的胚胎幹細胞大多來自於人們做體外人工受精時，多餘的受精卵。如果要用這些受精卵來培養出胚胎幹細胞，第一、有道德倫理上的問題，第二、這些胚胎幹細胞對於病人而言是外來物，將它植入體內的話會有免疫排斥的現象。因此，雖然胚胎幹細胞對於醫學雖然可能會有十分重大的幫助，但是卻因為以上的困難點而無法有更進一步的實質應用。



### 1.1.2 誘導性多功能幹細胞 (Induced Pluripotent Stem Cells, iPS)

大約在十年以前，Wilmut 等人發現了成體細胞可以藉由成體細胞核轉殖(somatic cell nuclear transfer, SCNT)這項技術變回未分化的胚胎時期細胞(6)。但是，一直以來想利用成體細胞核轉殖技術來生成病人專屬細胞的研究卻沒有成功的例子(7, 8)。在 2006 年，一個較少爭議性的新方法產生了。日本的 Yamanaka 等人利用病毒載體將四個轉譯因子，包含 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 傳入老鼠胚胎纖維母細胞中使其變回具有多能性的幹細胞，並將其稱之為誘導性多功能幹細胞(Induced Pluripotent Stem Cells, iPS) (9)。老鼠的誘導性多功能幹細胞有能力分化成三胚層的所有細胞，而且能夠藉由製造嵌合鼠來證實其在動物體內的分化能力。而人類的誘導性多功能幹細胞和人類胚胎幹細胞不管是在體外實驗或是體內實驗皆十分相似。這使得我們可以使用誘導性多功能幹細胞來作藥物開發甚至是生成病人專一的誘導性多功能幹細胞以便治療目前醫學上無法治癒的病症。生成誘導性多功能幹細胞技術的發明對於人類醫療史上可望有重大的突破。目前已經有帕金森氏症以及鐮刀型貧血的動物模式證實誘導性多功能幹細胞具有治療的潛能(10, 11)。但是這些誘導性多功能幹細胞的生成是經由病毒載體將轉譯因子整合入胚胎纖維母細胞的 DNA 中，因此不適合用來作人類的臨床試驗。這是因為如果使用基因整合的病毒來生成誘導性多功能幹細胞的話，可能會造成突變和

無法預期的基因功能異常(3, 12)。因此，也有其他實驗室利用質體轉染的方式來生成誘導性多功能幹細胞(13, 14)。另一個困難點是因為四個轉譯因子當中，c-Myc 和 Klf4 屬於癌相關基因。在使用 c-Myc 這個致癌基因所生成的誘導性多功能幹細胞的後續實驗當中，發現會有腫瘤的產生(3)。

### 1.1.3 缺氧環境 (Hypoxia)

幹細胞、生殖細胞和其他的多能性前驅細胞都生長在十分複雜的微環境當中，這個微環境被稱之為生態區位(niches) (15)。任何細微的變化都有可能影響到這一些細胞的生長狀況，甚至造成細胞的分化或者是造成細胞凋亡。像是幹細胞和基質細胞的接觸、生長環境的溫度和氧氣濃度等等，都會對幹細胞造成立即性的影響，可能影響幹細胞的功能或者是使得幹細胞開始進行分化。在過去也發現了缺氧環境可以促進神經脊幹細胞(neural crest stem cells)、造血幹細胞(hematopoietic stem cells)以及人類胚胎幹細胞的生存(16-19)。另外，缺氧環境也會調解牛囊胚的內細胞團(inner cell mass, ICM)之細胞數目(20)。而缺氧環境也會增加血管細胞以及造血前驅細胞的發展(21, 22)。生物體內的缺氧狀態發生於細胞組織快速生長，超過血液可以供應的情況。例如，發生在胚胎發育之時的缺氧狀態，這個時候的缺氧狀態是指氧氣在環境下的的濃度是 3~5%。

由過去的各项研究以及胚胎發育的環境來看，我們發現幹細胞在生成的時候，缺氧環境是比較有利的(19)。另外，先前的研究也指出，缺氧誘導因子(Hypoxic induced factor-2 $\alpha$ )，會增加 Oct4 的蛋白表現量(23)。因此，我們的假說是，當我們利用質體轉染的技術將質體轉染入老鼠胚胎纖維母細胞之後，導致老鼠胚胎纖維母細胞變回成具有多功能的誘導性多功能幹細胞這個過程之中，缺氧環境是對其有所助益的一個物理環境。

#### 1.1.4 Oct4

Oct4 又稱為 Pou5f1, POU domain, class 5, transcription factor 1。八聚體結合蛋白家族和 Sox 這兩個轉錄因子家族在幹細胞是如何控制自我更新以及如何控制分化的舞台上，扮演了主要角色。八聚體結合蛋白家族的成員最初被發現是藉由它們結合到 DNA 的八個鹼基對上被發現到有許多調控區域的基因。每個八聚體結合蛋白家族的成員皆含有一個雙 POU 結構域，大約是 150~160 個胺基酸所組成，是負責和 DNA 做結合的區域。在 POU 轉錄因子的家族中，POU 結構域被高度保存，藉由它們的原型成員 Oct1, Pit1, Unc86 來表現 POU 結構域。但是，Oct1 幾乎存在所有的細胞當中，因此 Oct4 就成了大家廣泛研究的題材，因為 Oct4 幾乎只在幹細胞當中被發現(2, 24, 25)。此外，在 2006 年 Oct4 已被證實是四個用來生成誘導性多功能幹細胞的轉錄因子之一(9)。最近，也有其

他的轉錄因子組合被用來生成誘導性多功能幹細胞，但是每個組合幾乎都無法不去使用到 Oct4 和 Sox2 這兩個轉錄因子。除非是像神經幹細胞這類可以由細胞內源性表達這些轉錄因子的情況，才可以不去使用 Oct4 和 Sox2 (26, 27)。幹細胞的特性是具有自我更新的能力以及維持全能性。而 Oct4 對於維持胚胎幹細胞以及生殖細胞的不分化扮演一個十分重要的角色(1, 2)。Oct4 在調解胚胎幹細胞的分化以及維持囊胚內細胞(ICM)的多能性也都扮演了很關鍵的角色。改變 Oct4 的表現量會造成胚胎幹細胞失去多能性而導致無法分化成三個胚層的細胞(28, 29)。在 2005 年，發現 Oct4 是和 Nanog、Sox2 結合之後才具有能力去抑制或是活化幹細胞，或者是去控制幹細胞的分化(30)。Oct4 的表現和胚胎發育以及個體出生後的整個生命息息相關。舉例而言，降低 Oct4 的基因表現會影響內胚層的分化作用。當 Oct4 的表現失常之時，胚胎在著床之前就不會有正常的發育(31)。對於成體而言，一般認為 Oct4 只會表現在生殖細胞當中。但是，後來發現 Oct4 也出現在成體幹細胞當中，像是造血幹細胞和多能性成體前驅細胞當中(multipotent adult progenitor cells, MAPCs) (32, 33)。目前有關於 Oct4 表現的分子機轉還未十分清楚。

### 1.1.5 Sox2

Sox 家族和八聚體結合蛋白家族一樣，已經被廣泛研究許久了。在哺乳動物當中，Sox 轉錄因子的家族成員大約有二十種(34)。Sox 蛋白保



持高重複的 DNA 結合域，約八十個胺基酸。這些結構域被稱為 high mobility group (HMG) box 結構域，這是因為它們的序列和 HMG DNA 結合蛋白的 DNA 結合結構域很相似。自從開始克隆 Sox 家族 SRY 之後，Sox 家族就已經被證實是幾乎所有哺乳類的發育上十分關鍵的一個基因 (34)。在過去的幾年裡，Sox2 成了一個被積極研究的轉錄因子。這是因為它和 Oct4 一樣，是生成誘導性多功能幹細胞時不可或缺的轉錄因子之一。此外，Oct4 和 Sox2 已經在基因失活的實驗上被證實，是哺乳動物在發育過程中不可缺少的基因(1, 35)。Sox2 或是 Oct4 基因失活會導致著床前的胚胎死亡。因此，Oct4 和 Sox2 兩者對於胚胎幹細胞的自我更新以及維持多能性皆是必要的。

## 第二節、實驗目的

目前誘導性多能幹細胞的瓶頸為使用病毒載體以及致癌基因，本實驗的目的為找出一個安全的誘導性多能幹細胞生成方法。為了避免使用病毒載體以及致癌基因，我們實驗室選擇使用質體轉染(plasmid transfection) 的方法作為研究的方式，並且避開了 c-Myc 和 Klf4 這兩個致癌基因，僅使用 Oct4 和 Sox2 這兩個基因配合缺氧環境來生成誘導性多功能幹細胞。

## 第二章、材料與方法

### 2.1 質體構築 Construction of the plasmid

mOct4 和 mSox2 cDNA 來自市面上的 clones (Thermo scientific)。這兩個 clones 上分別包含有 Oct4 和 Sox2，可以利用 EcoR1 切出得到我們需要的片段 cDNA，並將接至 pcDNA 3.1 載體上。這兩個質體，pcDNA-Oct4 和 pcDNA-Sox2 使用在質體轉染的實驗上。

### 2.2 老鼠胚胎纖維母細胞之培養 Mouse embryonic fibroblast cells (MEF) culture

本實驗中所使用的細胞為老鼠胚胎纖維母細胞 Mouse Embryonic Fibroblast Cells (MEF)，取自懷孕 13.5 天的 C57BL/6 的胎鼠。首先將懷孕 13.5 天的懷孕母鼠犧牲，再使用外科手術將胎鼠從懷孕母鼠子宮內取出，並且浸泡在裝有 phosphate-buffered saline (PBS) 的培養皿中。用 PBS wash 之後去除四肢、頭尾和內臟，剩下的組織用新鮮的 PBS wash 三次之後用剪刀將其剪碎，將 0.1mM trypsin/1mM EDTA solution (GIBCO BRL) 加到培養皿當中，並且吸起組織放入離心管當中。輕輕搖晃離心管 20 分鐘之後加入細胞培養液中和作用，並且靜置使大團塊之組織塊沈澱至管身底部。吸起上清液至另一離心管當中放入離心機當中 離心。去除離心之後的上清液後，再加入 medium 打散組織，用 pipette 移到細胞



培養皿當中，最後放入二氧化碳細胞培養箱(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)當中培養所得。另外在本實驗所使用的滋養細胞 feeder cells 是將老鼠胚胎母細胞 (MEF Cells)用含有 Mitomycin C (Roche)的細胞培養液培養 2.5 小時(37°C)之後所得到的細胞。因為 Mitomycin C 這個藥物的作用使得老鼠胚胎纖維母細胞的生長週期中止，因此可以用來當作幹細胞的滋養層細胞，避免幹細胞因為接觸到細胞培養皿的底部而分化，同時也提供幹細胞一些生長因子。老鼠胚胎纖維母細胞(MEF Cells)和滋養層細胞(Feeder Cells)的細胞培養液皆為 DMEM (GIBCO BRL)添加 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO BRL)、1% penicillin and streptomycin (p/s) (GIBCO BRL)、1% non-essential amino acids (NEAA) (GIBCO BRL)。

### **2.2.1 誘導性多功能幹細胞的培養 Induced pluripotent stem cells (iPS) culture**

誘導性多功能幹細胞 Induced pluripotent stem cells (iPS)的培養方式和老鼠胚胎幹細胞 mouse embryonic stem cells (mES)相同。在預做誘導性多功能幹細胞 Induced pluripotent stem cells (iPS)培養的前一天，必須先準備滋養層細胞(Feeder Cells)。首先在細胞培養皿的底部用 0.1%的 Gelatin (Sigma)做塗層，一小時之後去除 Gelatin 並且加入滋養層細胞的培養液，並且將滋養層細胞鋪到 Gelatin 之上。隔天便可以繼續做誘導性多功能幹細胞的培養動作。誘導性多功能幹細胞在做細胞培養的時

候，細胞不可以打散成單一細胞，這可能會導致誘導性多功能幹細胞的生長狀況不好。誘導性多功能幹細胞和老鼠胚胎幹細胞相同，在做細胞培養的過程中皆需要每天為其更換培養液。誘導性多功能幹細胞的細胞培養液為 DMEM (GIBCO BRL) 添加 HyClone FBS (Thermo)、1mM  $\beta$ -mercaptoethanol (GIBCO BRL)、1% non-essential amino acids (NEAA) (GIBCO BRL)、LIF (millipore)。

### 2.3 西方墨點法 Western Blot

將已染色之分子量標定蛋白質以及蛋白質樣品，由左至右依序注入樣品槽之中，進行電泳。並在電泳槽內倒入足夠量的 Running buffer。上膠的部份使用 80mA，下膠部份使用 120V。結束之後，小心的取出膠體，浸入 PBST 之中。先將 transfer membrane 和濾紙浸泡在 Transfer buffer 當中，直到紙完全潤濕為止。將膠體小心的放置到 transfer membrane 之上，使 transfer membrane 靠近正極、膠體那一面靠近負極，開始進行 transfer，400mV、1.5 小時。轉印完成之後。將 transfer membrane 置於 blocking solution 之中，用振蕩器震盪 20 分鐘。之後以 1:1000 的比例加入初級抗體，在冷房當中 blocking overnight。隔天利用 PBST 將 transfer membrane 洗三次，每次十分鐘。之後再加入以 1:10000 的比例二級抗體，利用震蕩器震盪 60 分鐘，最後再用 PBST 將 transfer membrane 洗三次，

每次十分鐘。接著將 transfer membrane 小心夾起、蔭乾，加入 ECL 作用之後，進行壓片、洗片之後觀察結果。

## 2.4 缺氧環境 Hypoxia

氧氣分壓(3%)是利用氮氣(N<sub>2</sub>)的含量來控制。將 hermetic chambers (Billups-Rothenberg Inc., Del Mar, CA)放入控制維持在 37°C 的培養箱當中。一但將最佳的氧氣濃度(3%)調控好之後，之後的實驗便在 3%氧氣、5%二氧化碳、92%氮氣的三氣培養箱 (ThermoForma, Waltham, MA)內進行。

## 2.5 即時聚合酶鏈鎖反應 Real-time PCR

用 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA)將細胞所有的 RNA 作萃取之後再利用 SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen)轉成 cDNA。先將 cDNA 做 40 倍稀釋以便進行 Real-Time PCR。將 primer reverse(6 $\mu$ M), primer forward(6 $\mu$ M), SYBR Mix(2X)(Roche)依比例配製。先在 96 孔盤之中，加入樣品 cDNA，再加入 primer 和 SYBR Mix 混合液。離心一分鐘、1000rpm 之後上機。Real-time PCR 是用來確認 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 的基因表現。最後使用 Excel 做分析。Real-Time PCR 所使用的 Primer sequences 列於 Table 1。

## 2.6 質體轉染 Transfection

將 MEF 預先培養在 6-well cell culture plate 上，並且預先準備 plasmids (Oct4、Sox2)。先將 medium 更換成 Opti-MEM (GIBCO BRL)，將 plasmid 加入 fugene(Roche)當中在室溫之下 incubate 15 分鐘之後平均滴入 6-well cell culture plate 之中。放入 incubator 當中 culture 6 小時(37°C，5%CO<sub>2</sub>)。將 Opti-MEM 更換成 MEF medium 之後放入 Hypoxia incubator (ThermoForma, Waltham, MA)中培養 24 小時(37°C，5%O<sub>2</sub>)後，將 6-well cell culture plate 放回 CO<sub>2</sub> incubator 當中(37°C，5%CO<sub>2</sub>)。隔天再做下一次 transfection。本實驗在此共做了四次 transfection (圖一)。

## 2.7 鹼性磷酸酶染色 Alkaline phosphatase staining

Alkaline phosphatase (AP) 染色是使用 Alkaline phosphatase staining kit (Vector)。先將細胞用 PBS wash 兩次後，在室溫下將細胞用 80%酒精固定 overnight，隔天使用 Alkaline phosphatase staining kit (Vector)做染色。移除 80%酒精，並以二次水浸潤清洗細胞後移除。再次加入二次水，於室溫下浸泡作用 2-3 分鐘後移除。於培養皿內加入 100mM Tris-HCl，於室溫下浸泡作用 5 分鐘後移除。接著於培養皿內加入 Alkaline Phosphatase Substrate working sol'n 於室溫下作用，待細胞呈現適當紅色強度(約 20-30 分鐘)。移除 alkaline phosphatase substrate working sol'n，

以 100mM Tris-HCl buffer 浸潤清洗後，於顯微鏡下觀察拍照。alkaline phosphatase substrate working sol'n 的配製如下：取 5ml 100mM Tris-HCl buffer 滴入 red alkaline phosphatase Substrate Kit 的 Reagent 1 兩滴，混合均勻後再滴入 Reagent 2 兩滴，待混合均勻後再滴入 Reagent 3 兩滴並混合。

## 2.8 免疫螢光染色-幹細胞標記 Immunofluorescent antibody assay-stem cell marker

為了確認經 reprogrammed 之後所形成的細胞具有幹細胞的特性，在這裡使用了六個 stem cell marker 做免疫螢光染色。包含 Nanog (Novus)、Oct4 (Cell Signaling)、Sox2 (millipore)、SSEA1 (millipore)、Tra-1-60、Tra-1-80。先將細胞用 0.1% Tween-20 (1x PBS) wash 十分鐘、三次，後用 0.3% Triton-X 100 (1X PBS) wash 三十分鐘，再用 0.1% Tween-20 (1x PBS) wash 十分鐘、三次。5% FBS(1X PBS) blocking 兩個小時之後以 1:100 的比例加入一抗 overnight。第二天用 0.1% Tween-20 (1x PBS) wash 五分鐘後以 1:500 的比例二抗一個小時，再用 0.1% Tween-20 (1x PBS) wash 十分鐘，最後用 DAPI 封片膠(UltraCruz™ Mounting Medium)封片，並用螢光顯微鏡觀察。

## 2.9 聚合酶鏈鎖反應 PCR



用 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 將細胞所有的 RNA 作萃取之後再  
利用 SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen)轉成 cDNA。  
聚合酶鏈反應條件為預變性 94°C 下 1.5 分鐘，然後以 35 個循環擴增 94  
°C 30 秒，60°C 60 秒，72°C 60 秒，隨後 2 分鐘的延伸一步在 72°C，最後  
終止於 10°C。PCR 利用了 ExTaq (Takara)來檢測 Ecat1, Eras, Nanog,  
c-Myc, Esg1, Klf4, Oct3/4, Rex1, Sox2 和 beta-actin 的基因表現。Primers  
列表於 Table 1。

## 2.10 胚胎球的形成和分化 Embryonic bodies formation and differentiation

將 iPS 用 0.1mM trypsin/1mM EDTA solution (GIBCO BRL)作用 5 分鐘之後用 medium 中和並離心，去上清液後加入 EB formation medium 將細胞打散至三到五顆細胞為一團，放入 Ultra Low Cluster Plate (Costar) 當中 culture 二至三天形成 Embryonic bodies。形成 Embryonic bodies 之後，先用 0.1% gelatin coated 在 24-well 上 1 個小時，一個 well 當中放入五至六顆 Embryonic bodies，放入 incubator 當中 culture 三天使其貼附、分化成三個胚層的細胞。EB formation medium 為 DMEM(GIBCO BRL) 添加 20% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO BRL), 1mM  $\beta$ -mercaptoethan (GIBCO BRL), 1% L-glutamin (GIBCO BRL), 1% insulin-transferin-selenium-Gsupplement (ITSG) (GIBCO BRL), 1%



non-essential amino acids (NEAA) (GIBCO BRL)。EB differentiation medium 為 DMEM (GIBCO BRL) 添加 20% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO BRL), 1% L-glutamine (GIBCO BRL), 1% non-essential amino acids (NEAA) (GIBCO BRL), 1% penicillin and streptomycin (p/s) (GIBCO BRL), 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol (GIBCO BRL)。

### **2.10.1 免疫螢光染色-三胚層 Immunofluorescent antibody assay-three germ layers**

Embryonic bodies 分化之後，為了確認其是否具有分化成三個胚層細胞的能力，本實驗使用免疫螢光染色來證實。內胚層細胞利用 Anti-Actin, smooth muscle (ASM) (abcam) 做染色、中胚層細胞利用 (Gata4) (abcam) 做染色、外胚層細胞利用 Anti- $\beta$ -Tubulin III (Tuj1) (sigma) 做染色。先將細胞用 0.1% Tween-20 (1x PBS) wash 十分鐘、三次，後用 0.3% Triton-X 100 (1X PBS) wash 三十分鐘，再用 0.1% Tween-20 (1x PBS) wash 十分鐘、三次。5% FBS(1X PBS) blocking 兩個小時之後以 1:100 的比例加入一抗 overnight。第二天用 0.1% Tween-20 (1x PBS) wash 五分鐘後以 1:500 的比例加入二抗一個小時，再用 0.1% Tween-20 (1x PBS) wash 十分鐘，最後用 DAPI 封片膠(UltraCruz™ Mounting Medium)封片，並用螢光顯微鏡觀察。

## 2.11 畸胎瘤的形成 Teratoma formation

iPS-OSH Cells 打入裸鼠 (SCID mice) 背部的皮下，注射之後的六到八周利用外科手術將 tumors 取下。並將 tumors 浸泡在 4% 的福馬林當中，接著做冷凍切片並且用 hematoxylin 和 eosin 染色。在顯微鏡下觀察一顆 teratoma 當中是否同時具有三個胚層的組織細胞存在。

## 2.12 微陣列分析 Microarray analysis

利用 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) 將 Mouse embryonic fibroblast cells (MEF)、Embryonic stem cells (ES)、Induced pluripotent stem cells from Japan (iPS J) (9)、Induced pluripotent stem cells OSH (iPS-OSH) 的全部 RNA 萃取出來之後，分析 MEF 和其他三種細胞的基因表現量。依據製造廠商的 protocol 將樣品與 Agilent Mouse G3 Whole Genome Oligo 8×60K Microarray (Agilent) 進行雜交。Arrays 的掃描是利用 Microarray Scanner System (Agilent)。數據的分析是利用 GeneSpring GX 軟體 (Agilent)。

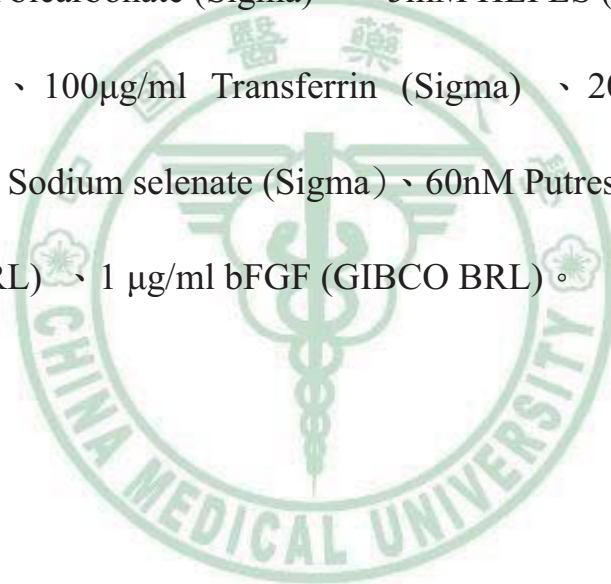
## 2.13 統計分析

相關數據之間差異則使用 one-way ANOVA 分析。再利用 Tukey HSD 事後檢定法分析，若  $p < 0.05$  則表示統計上有顯著差異。

## 2.14 利用誘導性多功能幹細胞生成神經幹細胞 Generation of neural stem cells (NSC) from iPS-OSH

首先將培養了誘導性多功能幹細胞的細胞培養皿用 PBS 沖洗兩次，接著加入 1c.c 的 0.1mM trypsin/1mM EDTA solution (GIBCO BRL) 在 37°C 下培養 1 分鐘。加入 10c.c 的 EB formation medium 後，將細胞打散成單一細胞。離心之後，將細胞養在 15 cm 的細菌培養皿當中，細胞密度為每 c.c 的 medium 中含有  $10^5$  顆細胞。放入二氧化碳細胞培養箱 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 當中培養六天，形成胚胎球(EB)。將培養六天的胚胎球移入離心管中，靜置 10 分鐘。去除大部份的上清液之後，加入 30c.c 的 PBS，靜置 5 分鐘。去除上清液之後，加入 trypsin 在 37°C 下培養 5 分鐘。接著加入 FBS 中止反應，並且打散胚胎球。將含有細胞的液體移入新的離心管當中，並且加入 MHM medium，2 分鐘之後再將離心管中的液體移至新的離心管當中，留下底部 1c.c 的液體用來去除過大的細胞團。離心之後，將細胞養在 10cm 的細胞培養皿當中，細胞密度為每 c.c 的 medium 中含有  $5 \times 10^4 \sim 10^5$  顆細胞。放入二氧化碳細胞培養箱 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 當中培養六天，形成神經球(neurosphere)，在培養的第三天時加入 1 $\mu$ g/ml bFGF。將培養六天的神經球移入離心管中，離心之後去除上清液，加入 1c.c 的 MHM medium，並用 P1000 的 pipetman 將神經球打散。加入 MHM medium 後離心，接著將細胞培養在 24-well 的細胞培

養皿當中。細胞密度為每 well 當中含有  $3.2 \times 10^6$  顆細胞。放入二氧化碳細胞培養箱(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)當中培養五天，使神經球分化成神經幹細胞。在本實驗當中使用的 EB formation medium 為  $\alpha$  MEM (GIBCO BRL) 添加 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO BRL)、1% penicillin and streptomycin (p/s) (GIBCO BRL)、100mM  $\beta$ -mercaptoethan (GIBCO BRL)、200ng/ml Noggin。MHM medium 為 DMEM/F12 (GIBCO BRL) 添加 3mM Sodium bicarbonate (Sigma)、5mM HEPES (Sigma)、25 $\mu$ g/ml Insulin (Sigma)、100 $\mu$ g/ml Transferrin (Sigma)、20nM Progesterone (Sigma)、30ng Sodium selenate (Sigma)、60nM Putrescine (Sigma)、2% B27 (GIBCO BRL)、1  $\mu$ g/ml bFGF (GIBCO BRL)。



### 第三章、結果

#### 第一節、經由缺氧環境處理過後胚胎纖維母細胞的 Oct4, Sox2, c-Myc,

#### Klf4 蛋白和基因表現

我們首先要確認處在缺氧環境下的老鼠胚胎纖維母細胞之 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 的蛋白表現。我們使老鼠胚胎纖維母細胞處在缺氧環境下，預測 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 的蛋白表現量會高於正常氧氣環境下的細胞蛋白表現量。我們將細胞分為四組，在缺氧環境下零小時、四小時、八小時以及二十四小時的時候分別抽取細胞的蛋白質，經由西方墨點法 (Western Blot) 來確認缺氧環境對於 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 這四個轉譯因子的蛋白表現量是否有所影響。我們發現，胚胎纖維母細胞處於缺氧環境下的時候，Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 這四個轉譯因子的蛋白表現量明顯高於完全沒有經過缺氧環境處理的細胞 (圖二)。

接著，我們將 Oct4, Sox2 這兩個轉譯因子利用質體轉染(Plasmid transfection)的方式傳入老鼠胚胎纖維母細胞中，經過六個小時的轉染之後，把細胞分別養在正常氧氣環境的培養箱中以及缺氧環境的培養箱當中。二十四小時之後抽取各組細胞的 RNA，利用 Real-time PCR 來觀察細胞在缺氧環境之下 RNA 的表現量和在正常氧氣環境之下有什麼不同。我們假設細胞當中和胚胎幹細胞較有關係的基因在缺氧環境下表現量會比較高。經由 Real-time PCR 實驗我們可以看到，同時利用質體轉



染傳入 Oct4, Sox2 這兩個基因的老鼠胚胎纖維母細胞之 RNA 表現量在缺氧環境當中表現量高於正常氧環境下的細胞 RNA 表現量。從 Real-time PCR 的數據圖表 (圖三) 當中可以看到，經過缺氧環境處理過後的胚胎纖維母細胞之 Oct4, c-Myc 這兩個基因表現量明顯高於正常氧環境下的細胞基因表現量。但是，Sox2 的基因表現在經過缺氧環境處理之後卻沒有明顯上升。而 Klf4 基因表現在正常氧環境下和缺氧環境下則沒有太大差異。經由以上兩個實驗，我們證實了缺氧環境對於 Oct4 的表現的確是有所幫助的。

## 第二節、利用 Oct4, Sox2 質體在缺氧環境下生成誘導性多功能幹細胞

質體轉染是一項可以將 DNA 質體轉染進入細胞核的技術。我們實驗室設計了利用質體轉染的方法配合缺氧環境(Hypoxia, 3% O<sub>2</sub>)的應用來生成誘導性多功能幹細胞的實驗方法。首先將老鼠胚胎纖維母細胞培養在 10 公分的細胞培養皿上，約 24 小時細胞數量足夠之後，便可以開始質體轉染的實驗。將細胞培養液更換成 Opti-MEM 後，滴入已經和 Fugene HD (Roche)反應的質體 DNA，Oct4 以及 Sox2。轉染經過六小時以後，將細胞培養液更換回老鼠胚胎纖維母細胞的培養液，並且將進行質體轉染過後的細胞放入缺氧環境的培養箱當中培養二十四小時。第三天再做以上動作，並且重複四次。在第九天的時候，將經過四次質體轉



染的細胞培養在滋養細胞之上，每天更換老鼠胚胎幹細胞培養液、持續觀察，直至有類似老鼠胚胎幹細胞的細胞團出現為止（圖一）。我們實驗室，在將經過質體轉染的老鼠胚胎纖維母細胞培養在滋養細胞之上後的第十二天，於顯微鏡下觀察發現了有類似老鼠胚胎幹細胞的細胞團出現（圖四）。我們實驗室將其命為 iPS-OSH。為了確認此細胞團是否為具有和老鼠胚胎幹細胞功能的相似的細胞，我們做了繼代培養並利用實驗證實其多能性。

### 第三節、iPS-OSH 細胞中幹細胞特異基因的表現

在成功的利用質體轉染和缺氧環境生成了 iPS-OSH 之後，為了確認 iPS-OSH 是否和胚胎幹細胞一樣具有幹細胞特異基因表現，我們利用了 PCR 分析證實了以下這些老鼠胚胎幹細胞標記的內生性 mRNA：ES cell associated transcript 1 (Ecat1), ES cell-expressed Ras (ERas), Nanog, myelocytomatosis oncogene (c-Myc), embryonal stem cell specific gene 1 (Esg1), Kruppel-like factor 4 (Klf4), POU domain, class 5, transcription factor 1 (Pou5f1, Oct4), RNA exonuclease 1 homolog (Rex1), SRY-box containing gene 2 (Sox2)。在 iPS-OSH 細胞中這些幹細胞標記的內生性 mRNA 的表現量和老鼠胚胎幹細胞兩者的表現相似，同時也和 iPS J 表現量相似。但是這些幹細胞標記的內生性 mRNA 的表現量在 iPS-OSH 的表現卻不同於老鼠胚胎纖維母細胞的表現量（圖五）。

#### 第四節、iPS-OSH 細胞在體外、體內的多能性

繼代之後的細胞，一部份我們利用了鹼性磷酸酶染色的方法來確認，我們的細胞是否有高量表現鹼性磷酸酶。鹼性磷酸酶會高量表現在快速分裂增生的細胞當中，因此可以用來檢測細胞是否為幹細胞。由圖六我們可以看到，iPS-OSH 的鹼性磷酸酶表現相當明顯，是和老鼠胚胎幹細胞相似的（圖六）。為了更進一步的確認 iPS-OSH 的幹細胞特性，我們使用了以下的幹細胞標記來作免疫螢光染色。包含了 Oct4、Sox2、Nanog、SSEA1、Tra-1-60、Tra-1-81。利用免疫螢光染色的方法，我們可以確認 iPS-OSH 細胞和老鼠胚胎幹細胞的表現相似，都有表現這些幹細胞標記（圖七）。

當 iPS-OSH 可以藉由懸浮培養而形成胚胎球(embryonic body, EB)（圖八(a)），代表這些細胞易於開始分化成三個胚層的一種細胞。在懸浮培養三天之後，將這些類似胚胎球的細胞團培養於預先在培養皿底部用 0.1%的 Gelatin 做塗層的 24-well 細胞培養皿之上，大約在三到五天之後，這些類似胚胎球的細胞團便會分化成各種形態的細胞，包含神經細胞、肌肉細胞、內胚層細胞等等。免疫螢光染色分析證實這些不同類型的細胞在用以下的標記染色後有表現。Tuj1（外胚層標記），ASM（中胚層標記），Gata4（內胚層標記）（圖八(b)）。

另外，畸胎瘤的形成是將 iPS-OSH 利用皮下注射的方式注射到裸鼠

的背部皮下之中。經過六到八週之後，會發現畸胎瘤形成在裸鼠的背部。這些畸胎瘤包含了三胚層的組織，包含：內胚層有呼吸道上皮細胞 (Respiratory epithelium) 和腸上皮細胞 (Gut epithelium)，中胚層有肌肉細胞 (Muscle) 和脂肪細胞 (Adipose)，外胚層有表皮 (Epidermis) 和神經組織 (Neural tissue) (圖九)。證實了 iPS-OSH 細胞在體內以及體外皆具有多能性。

#### 第五節、利用 Microarray 分析 iPS-OSH 的全基因表現

我們也利用了 Microarray 分析了老鼠胚胎幹細胞 (ES)、老鼠胚胎纖維母細胞 (MEF)、日本的誘導性多功能幹細胞 (iPS J) 以及 iPS-OSH 這四種細胞在基因表現上有何相似和相異性。由圖十我們可以看到，老鼠胚胎幹細胞、iPS J 以及我們實驗室生成的 iPS-OSH，這三種細胞在基因的表現上是比較相似的，而老鼠胚胎纖維母細胞則和其他三者的基因表現有較大的差異性。尤其是，Oct4, Sox2, Nanog 這三個基因，在老鼠胚胎幹細胞、日本的誘導性多功能幹細胞以及 iPS-OSH 這三種細胞中的表現幾乎是相同的 (圖十)。在圖十一當中我們可以看到 iPS-OSH 和 iPS J 在全基因的表現上是比較相近的，而兩者又跟老鼠胚胎幹細胞表現量相近，老鼠胚胎纖維母細胞的全基因表現則和另三者細胞較為相異 (圖十一)。

## 第六節、 利用誘導性多功能幹細胞生成神經幹細胞 **Generation of neural stem cells (NSC) from iPS-OSH**

誘導性多功能幹細胞為具有多能性的幹細胞，它具有分化為三個胚層의各種細胞之能力。在這邊，我們想要利用我們生成的 iPS-OSH 來進行分化實驗，希望能利用 iPS-OSH 分化成神經幹細胞，並且能夠在未來應用在中風的治療上。我們利用懸浮培養先讓 iPS-OSH 形成胚胎球，再利用生長因子 B27 讓胚胎球生長成趨向神經的神經球。最後，讓這些神經球分化為神經幹細胞。我們利用 PrP 和 Tuj1 這兩個神經幹細胞的標記來確認我們分化出來的細胞是否為神經幹細胞，由圖十二結果顯示，這些由 iPS-OSH 分化生成的細胞確實有表現 PrP 和 Tuj1 這兩個神經幹細胞的標記，因此可以證實其為神經幹細胞 (圖十二)。



#### 第四章、討論

誘導性多功能幹細胞最早是在 2006 年由日本的一個團隊研究成功的。他們利用了四個轉錄因子：Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 和病毒載體的方式成功的將成體細胞變回多功能幹細胞(9)。目前，研究發現了許多製造誘導性多功能幹細胞的方式，包含：使用反轉錄病毒(9, 36)、慢性病毒(37)、腺病毒(38)、重組蛋白(39)、轉因子(40)、微型核糖核酸(41)以及質體轉染(13, 14)。儘管質體轉染已經避開了使用病毒的方式來製造誘導性多功能幹細胞，但是還是無法避開使用致癌基因。誘導性多功能幹細胞最主要的目的是用來做臨床治療，因此需要一個相當安全的方法來生成誘導性多功能幹細胞。而在我們實驗設計當中，我們試著去避開使用病毒以及致癌基因來使得成體細胞變回多功能幹細胞。我們成功的得到一個較為安全的方法來生成誘導性多功能幹細胞，這個方法對於未來在臨床治療上有較大的幫助。

在 2009 年，日本的 Yoshida 研究團隊發現了缺氧環境有助於生成誘導性多功能幹細胞 (14)。我們的實驗設計和他們之間有兩個主要的不同點 (14)。最主要的不同點在於我們實驗室只使用了兩個轉錄因子來生成誘導性多功能幹細胞，並且避開使用致癌基因。這一點對於未來在臨床治療上是十分重要的，而且使得在使用誘導性多功能幹細胞做細胞治療的過程較為安全。另外，對於缺氧環境的使用也完全不同。我們實驗室

只有在做完質體轉染之後讓成體細胞處於缺氧環境之下 24 小時，處於缺氧環境下的時間總共是 96 小時。而之前的實驗則是讓成體細胞處於缺氧環境下至少 12 天(14)。我們實驗室生成誘導性多功能幹細胞的方法比之前的實驗研究較為安全。

我們實驗室是首次只利用兩個轉錄因子並且避開致癌基因以及病毒載體，便可以成功的生成誘導性多功能幹細胞。在生成誘導性多功能幹細胞的過程中，避免使用致癌基因以及病毒載體，或許可以提供在誘導性多功能幹細胞的研究上一個有效的體外研究模型，以及提供一些可能的治療行為一個新的誘導性多功能幹細胞來源。未來，我們將注重在分化實驗上，並且利用這些細胞做細胞治療。





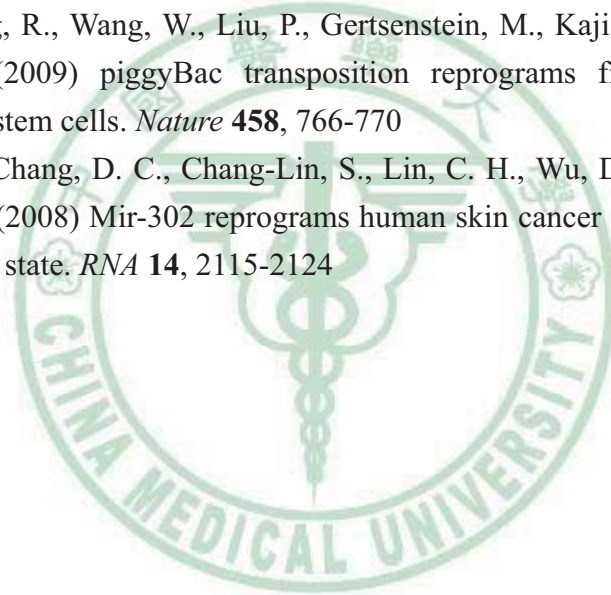
## 參考文獻：

1. Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391
2. Scholer, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* **344**, 435-439
3. Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317
4. Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E., and Jaenisch, R. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**, 318-324
5. Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K., and Hochedlinger, K. (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* **1**, 55-70
6. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813
7. Chung, Y., Bishop, C. E., Treff, N. R., Walker, S. J., Sandler, V. M., Becker, S., Klimanskaya, I., Wun, W. S., Dunn, R., Hall, R. M., Su, J., Lu, S. J., Maserati, M., Choi, Y. H., Scott, R., Atala, A., Dittman, R., and Lanza, R. (2009) Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes. *Cloning Stem Cells* **11**, 213-223
8. French, A. J., Adams, C. A., Anderson, L. S., Kitchen, J. R., Hughes, M. R., and Wood, S. H. (2008) Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* **26**, 485-493
9. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676
10. Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C. W., Meissner, A., Cassady, J. P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L. C., Townes, T. M., and Jaenisch, R. (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* **318**, 1920-1923
11. Wernig, M., Zhao, J. P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., and Jaenisch, R. (2008) Neurons derived from

- reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5856-5861
12. Yamanaka, S. (2007) Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **1**, 39-49
  13. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**, 949-953
  14. Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J. A. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* **324**, 797-801
  15. Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001) Stem cells find their niche. *Nature* **414**, 98-104
  16. Morrison, S. J., Csete, M., Groves, A. K., Melega, W., Wold, B., and Anderson, D. J. (2000) Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J Neurosci* **20**, 7370-7376
  17. Studer, L., Csete, M., Lee, S. H., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B., and McKay, R. (2000) Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* **20**, 7377-7383
  18. Danet, G. H., Pan, Y., Luongo, J. L., Bonnet, D. A., and Simon, M. C. (2003) Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest* **112**, 126-135
  19. Ezashi, T., Das, P., and Roberts, R. M. (2005) Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4783-4788
  20. Harvey, A. J., Kind, K. L., Pantaleon, M., Armstrong, D. T., and Thompson, J. G. (2004) Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod* **71**, 1108-1119
  21. Adelman, D. M., Maltepe, E., and Simon, M. C. (1999) Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes Dev* **13**, 2478-2483
  22. Ramirez-Bergeron, D. L., Runge, A., Dahl, K. D., Fehling, H. J., Keller, G., and Simon, M. C. (2004) Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development* **131**, 4623-4634
  23. Covelto, K. L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J. D., Arsham, A. M., Hu, C. J., Labosky, P. A., Simon, M. C., and Keith, B. (2006) HIF-2 $\alpha$  regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* **20**, 557-570
  24. Niwa, H. (2001) Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells.

25. Hu, T., Liu, S., Breiter, D. R., Wang, F., Tang, Y., and Sun, S. (2008) Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res* **68**, 6533-6540
26. Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008) Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells* **26**, 2467-2474
27. Kim, J. B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M. J., Ruau, D., Han, D. W., Zenke, M., and Scholer, H. R. (2008) Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* **454**, 646-650
28. Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-376
29. Shimozaki, K., Nakashima, K., Niwa, H., and Taga, T. (2003) Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development* **130**, 2505-2512
30. Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., and Young, R. A. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947-956
31. Boiani, M., Eckardt, S., Scholer, H. R., and McLaughlin, K. J. (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev* **16**, 1209-1219
32. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., and Verfaillie, C. M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49
33. Tai, M. H., Chang, C. C., Kiupel, M., Webster, J. D., Olson, L. K., and Trosko, J. E. (2005) Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* **26**, 495-502
34. Kiefer, J. C. (2007) Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn* **236**, 2356-2366
35. Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **17**, 126-140
36. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human

- fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872
37. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J. A. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920
  38. Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**, 945-949
  39. Kim, D., Kim, C. H., Moon, J. I., Chung, Y. G., Chang, M. Y., Han, B. S., Ko, S., Yang, E., Cha, K. Y., Lanza, R., and Kim, K. S. (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 472-476
  40. Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H. K., and Nagy, A. (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**, 766-770
  41. Lin, S. L., Chang, D. C., Chang-Lin, S., Lin, C. H., Wu, D. T., Chen, D. T., and Ying, S. Y. (2008) Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* **14**, 2115-2124



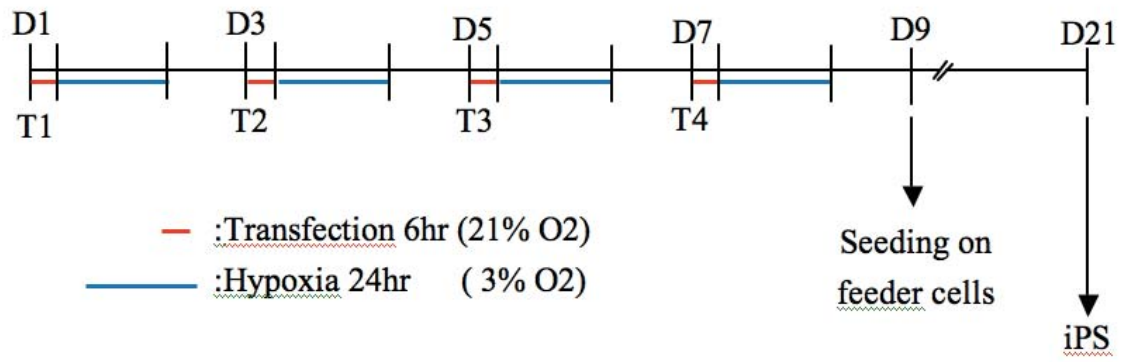
## 圖表

表一、聚合酶連鎖反應引子序列一覽表

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Taqman probe
Taqman64-mActin	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	ACCAGAGGCATACAGGGACA	Roche Universal Probes 64
Taqman6-mOCT4	GAGGCTACAGGGACACCTTTC	GTGCCAAAGTGGGGACCT	Roche Universal Probes 6
Q-m Actin	GTGCGTGACATCAAAGAGAAGC	TGGATGCCACAGGATTCCATAC	
Q-mMYC	CATTCAAGCAGACGAGCA	CGAGTTAGGTCAGTTTATGCAC	
Q-mKLF4	CCTTTCAGTGCCAGAAGT	ACTACGTGGGATTTAAAAGTGC	
Q-mOct	GCCAATCAGCTTGGGCTAGA	TTCTGGCGCCGGTTACA	
Q-mSOX	AGGGCTGGACTGCGAACTG	TTTGCACCCCTCCCAATTC	
Ecat1	TGTGGGGCCCTGAAAGGCGAGCTGAGAT	ATGGGCGCCATACGACGACGCTCAACT	
Esg1	GAAGTCTGGTTCCTTGGCAGGATG	ACTCGATACTGGCCTAGC	
Nanog	CAG GTG TTT GAG GGT AGC TC	CGG TTC ATC ATG GTA CAG TC	
Eras	ACTGCCCTCATCAGACTGCTACT	CACTGCCTTGTACTIONCGGGTAGCTG	
Oct3/4	TCTTCCACCAGCCCCCGGCTC	TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC	
Rex1	ACGAGTGGCAGTTTCTTCTGGGA	TATGACTCACTTCCAGGGGGCACT	
Sox2	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	
Klf4	GCGAACTCACACAGGCGAGAAACC	TCGCTTCCTTCTCCGACACA	
c-Myc	TGACCTAACTCGAGGAGGAGCTGGAATC	AAGTTTGAGGCAGTTAAAATTATGGCTGAAGC	
$\beta$ actin	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	

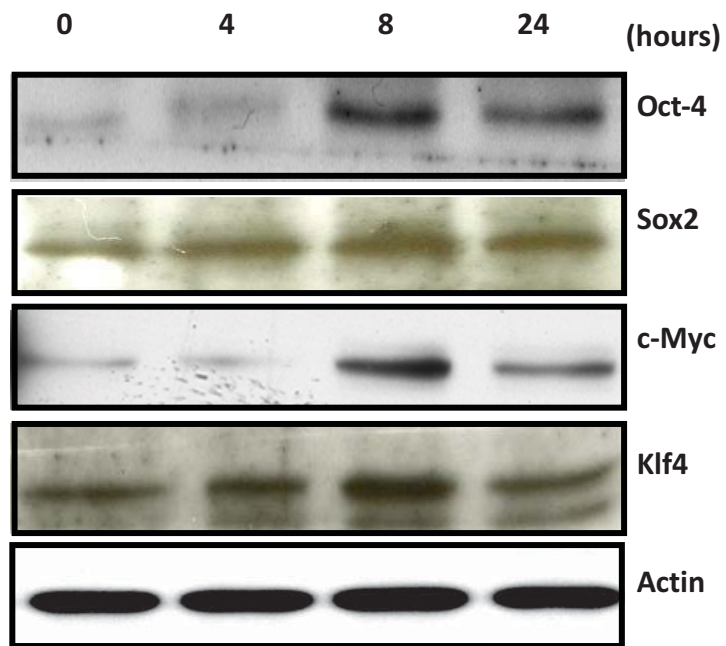




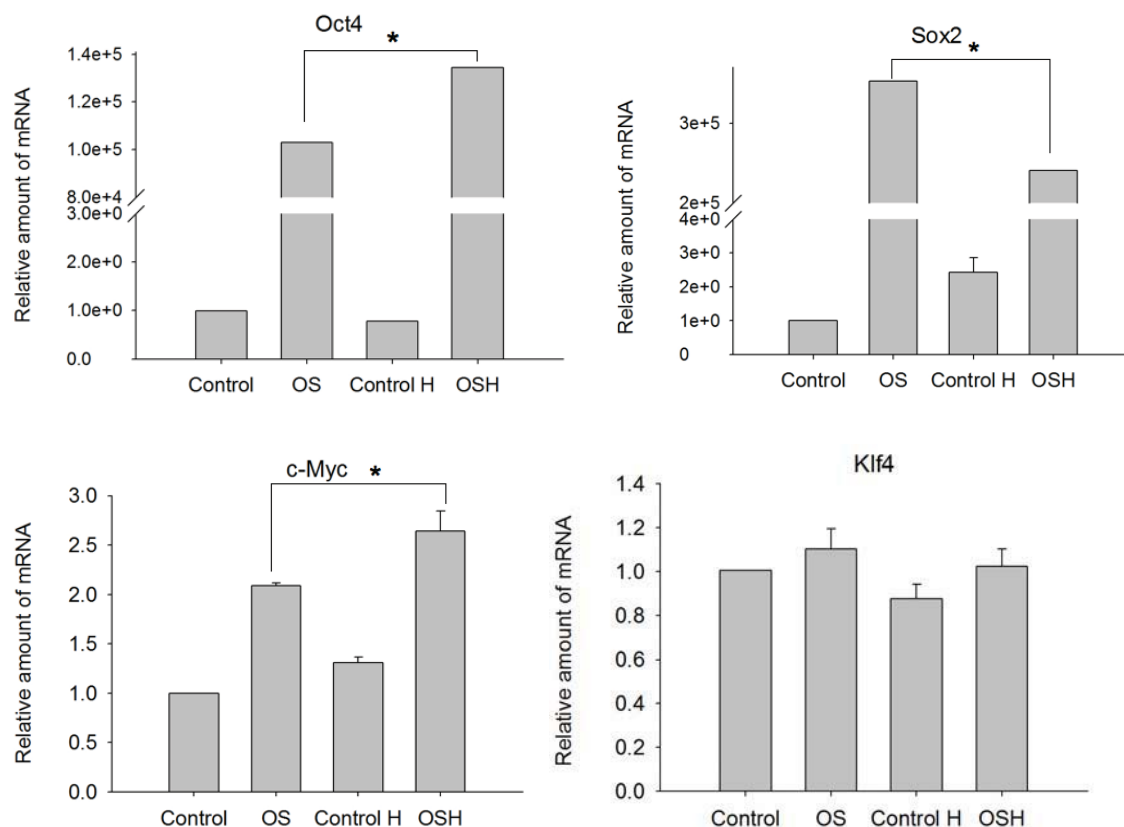


圖一、利用質體轉染和缺氧環境生成誘導性多功能幹細胞。

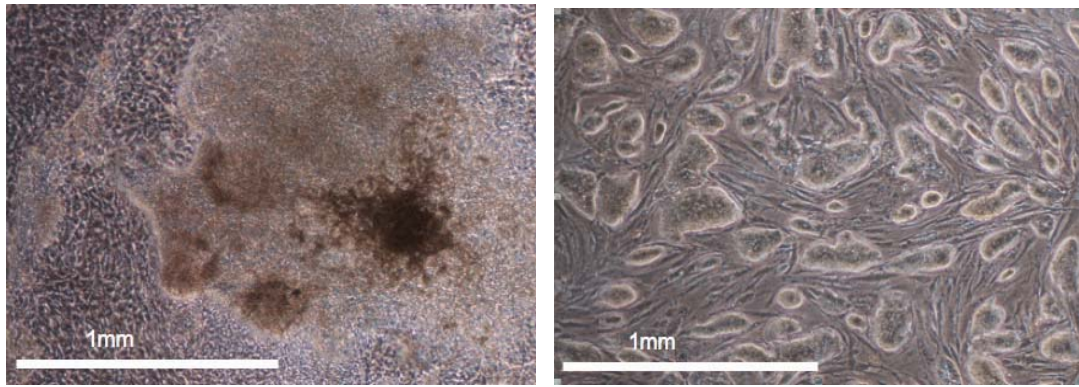




圖二、將胚胎纖維母細胞於缺氧環境下分別培養 0, 4, 8, 24 小時之後，利用西方墨點法分析胚胎纖維母細胞中 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 這四個蛋白的表現量。

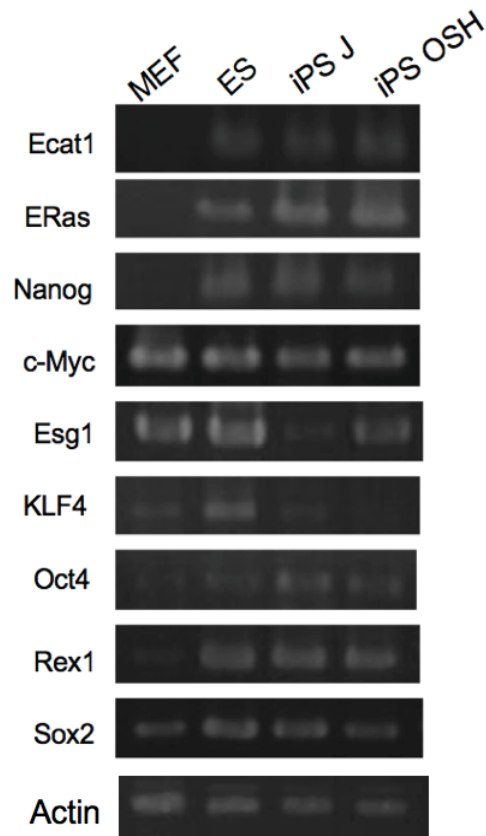


圖三、利用 Real-time PCR 分析老鼠胚胎纖維母細胞經由質體轉染 Oct4, Sox2 這兩個基因之後，在正常氧氣狀態下和缺氧環境中，Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 這四個基因的 mRNA 表現量。Control: 質體轉染入 pCDNA3.1 這個空載體。OS: 質體轉染入 Oct4 和 Sox2 這兩個轉錄因子。Control H: 質體轉染入 pCDNA3.1 這個空載體後處於缺氧環境下 24 小時。OSH: 質體轉染入 Oct4 和 Sox2 這兩個轉錄因子後處於缺氧環境下 24 小時。\*: 表示  $p < 0.05$ 。



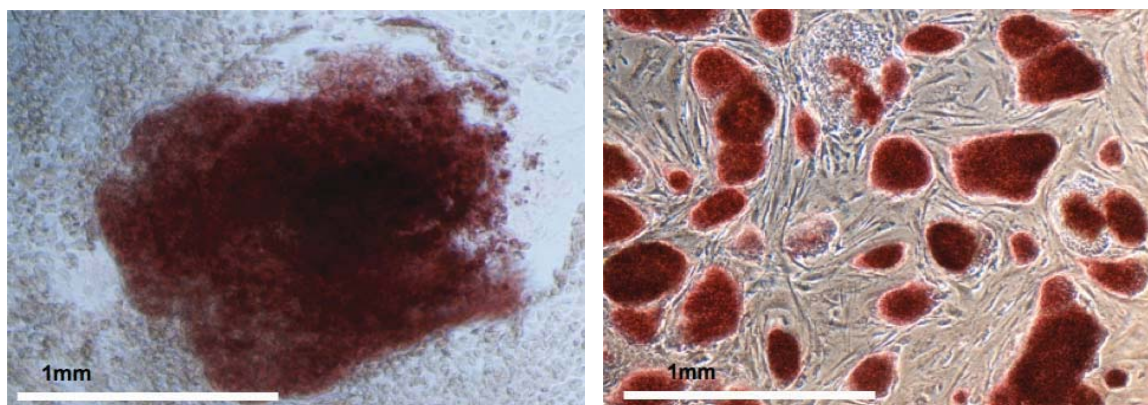
圖四、iPS-OSH 在顯微鏡下的細胞形態。左圖為在顯微鏡下發現疑似胚胎幹細胞時的細胞型態。右圖為將左圖的細胞做繼代之後的細胞型態。





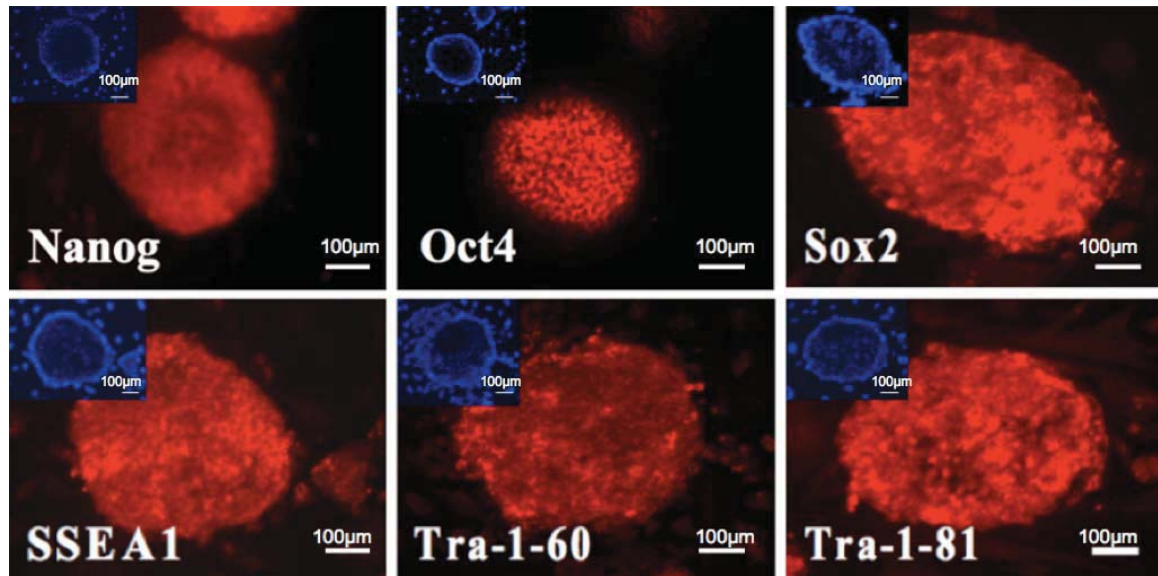
圖五、利用 PCR 分析 iPS-OSH 細胞中幾個內生性 mRNA 的表現量，並且和老鼠胚胎纖維母細胞(MEF)，老鼠胚胎幹細胞(ES)，日本的誘導性多功能幹細胞(iPS J)做比較。





圖六、iPS-OSH，利用鹼性磷酸酶染色分析，證實其具有老鼠胚胎幹細胞之特性。

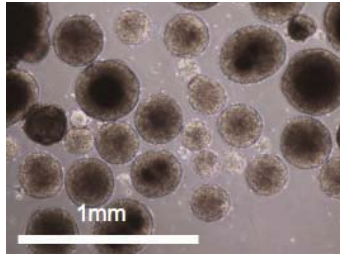




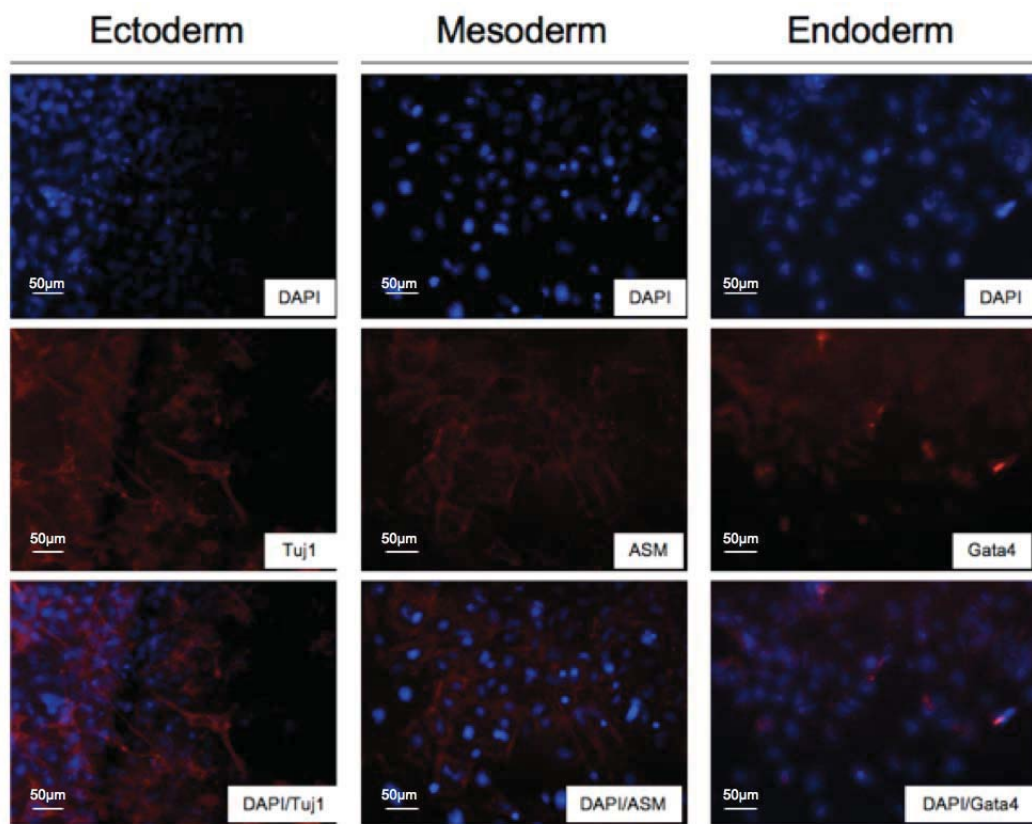
圖七、利用 Nanog, Oct4, Sox2, SSEA1, Tra-1-60, Tra-1-81 這些幹細胞 marker 來確認 iPS-OSH 的幹細胞特性。



(a)

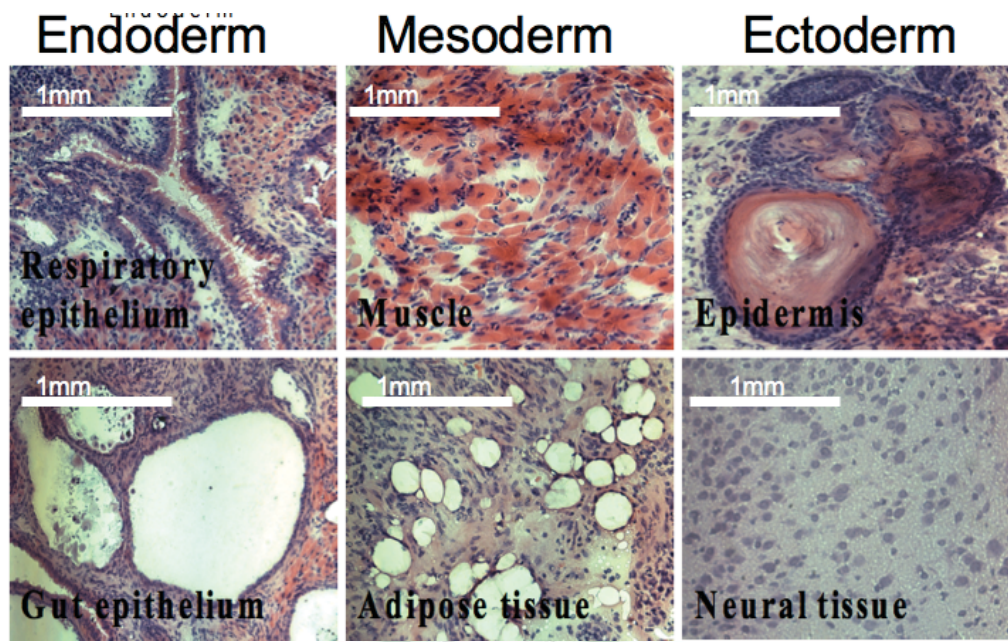


(b)



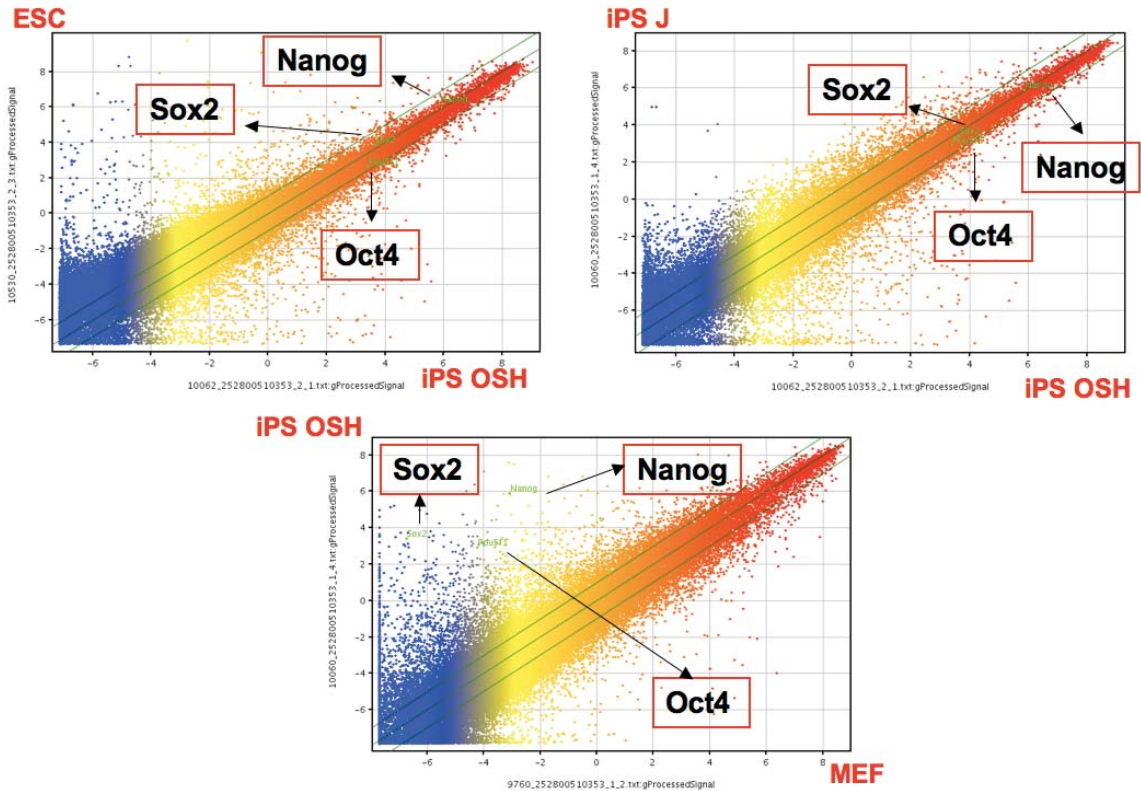
圖八、(a)將 iPS-OSH 利用懸浮培養所形成的胚胎球。(b) iPS-OSH 細胞形成的胚胎球分化之後生成的三胚層細胞。





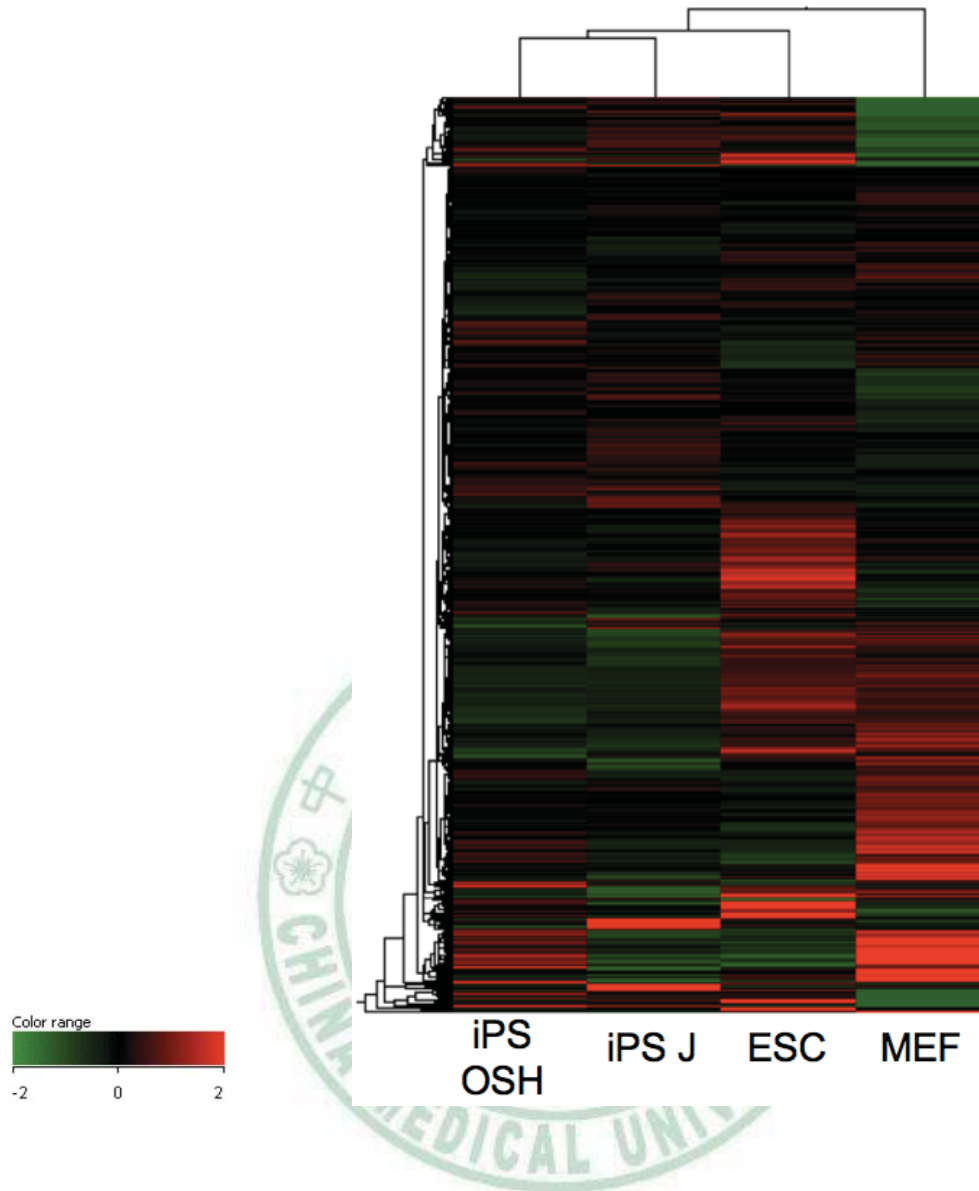
圖九、將 iPS-OSH 皮下注射入裸鼠背部皮下六到八週所形成的畸胎瘤切片，含有三個胚層的細胞。



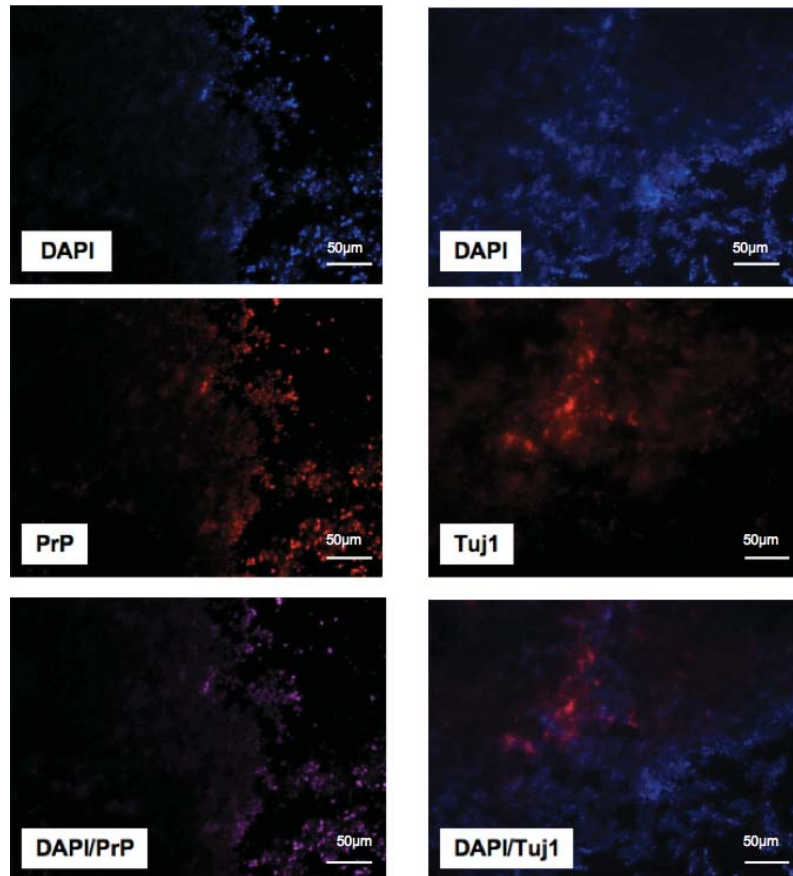


圖十、Microarray 分析胚胎纖維母細胞(MEF)，胚胎纖維幹細胞(ES)，日本的誘導性多功能幹細胞(iPS J)以及 iPS-OSH 在基因表現上的相似及相異性。





圖十一、 Microarray 分析胚胎纖維母細胞(MEF)，胚胎纖維幹細胞(ES)，日本的誘導性多功能幹細胞(iPS J)以及 iPS-OSH 在基因表現上的相似及相異性。



圖十二、iPS-OSH 細胞形成的神經球分化之後生成的神經幹細胞。利用 Prp 和 Tuj1 這兩個神經幹細胞的 marker 來確認細胞是否具有神經幹細胞的特性。