



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201606083 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 02 月 16 日

(21) 申請案號：104120990 (22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 10 月 01 日

(51) Int. Cl. : C12N5/071 (2010.01) C12N5/074 (2010.01)
C12N15/85 (2006.01)

(30) 優先權：2012/10/01 美國 61/708,128
2012/10/24 美國 61/717,871

(71) 申請人：臺北榮民總醫院 (中華民國) TAIPEI VETERAN GENERAL HOSPITAL (TW)
臺北市北投區石牌路 2 段 201 號

(72) 發明人：邱士華 CHIOU, SHIH HWA (TW)；簡越 CHIEN, YUEH (TW)；邱光裕 CHIOU,
GUANG YUH (TW)；楊逸萍 YANG, YI PING (TW)

(74) 代理人：江謝令涵

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：18 共 91 頁

(54) 名稱

製備誘導多能幹細胞之方法及其應用

METHOD FOR PREPARING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AND ITS APPLICATIONS

(57) 摘要

本發明係關於一種用於製備誘導多能幹細胞(induced pluripotent stem cell, iPSCs)之新穎方法，其係藉由引入三種基因 Oct3/4、Sox2 與 Parp1 至體細胞。本發明亦關於藉由前述方法所製造之 iPSCs。亦提供一種藉由使用 PAR 基化(PARylated)之蛋白質或具有 PAR 基化活性之酵素以將細胞回春之方法。進一步提供的是一種用於誘導干擾素- γ 可誘導性蛋白質-10(IP-10)之分泌之方法，包括將一有效量的 iPSCs 或 iPSC-CM 投予至有需要之個體。

The present invention relates to a novel method for preparing induced pluripotent stem cells (iPSCs) by introducing three genes, Oct3/4, Sox2, and Parp1, into somatic cells. The present invention also relates to the iPSCs produced by the aforementioned method. Also provided is a method of rejuvenating cells by use of a PARylated protein or an enzyme with PARylation activity. Further provided is a method for inducing the secretion of interferon- γ inducible protein-10 (IP-10) comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of iPSCs or iPSC-CM.

指定代表圖：

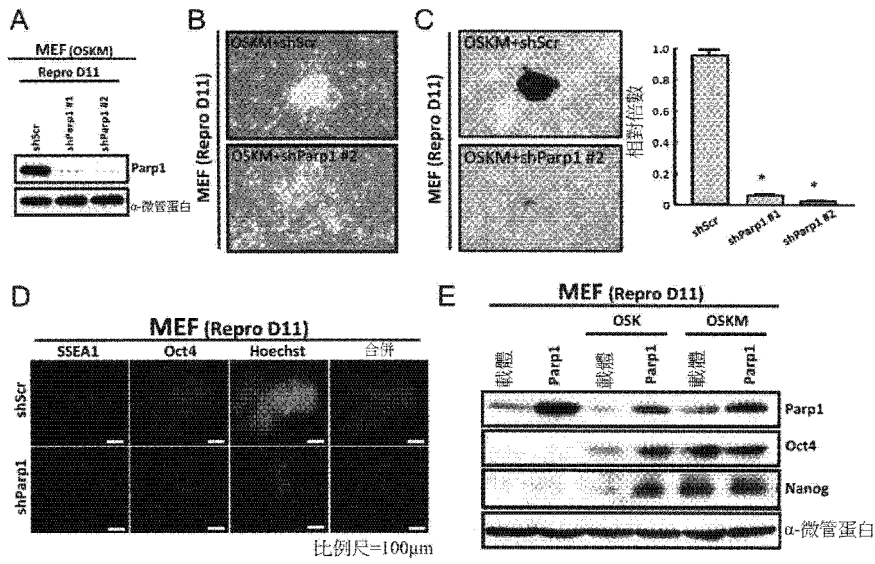


圖 2

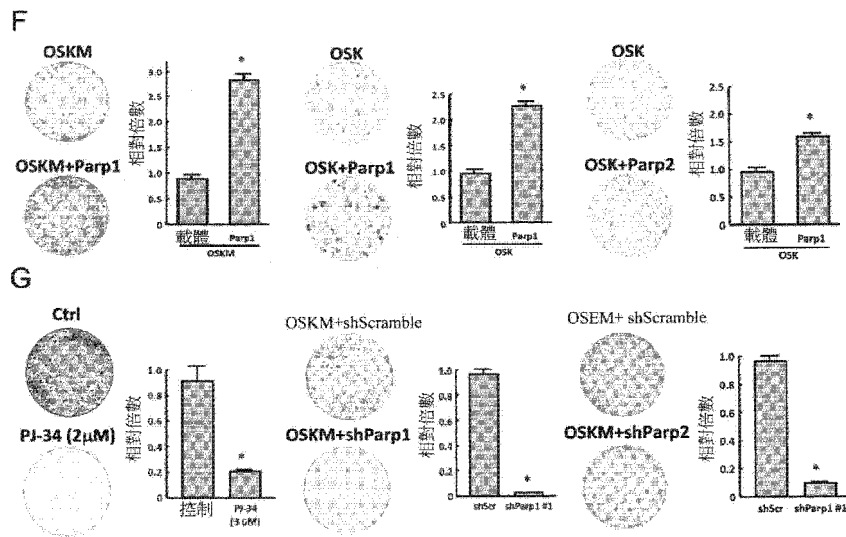


圖 2(續)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

製備誘導多能幹細胞之方法及其應用/METHOD FOR PREPARING
INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AND ITS APPLICATIONS

【交互參照之相關申請案】

【0001】 本專利申請案主張於2012年10月1日申請之美國臨時專利申請案第61/708,128號之優先權，在此將其全文併入以為參照。本申請案亦主張於2012年10月24日申請之美國臨時專利申請案第61/717,871號之優先權，在此將其全文併入以為參照。

【技術領域】

【0002】 本發明概括而言係關於一種製備誘導多能幹細胞之方法，及一種經由此方法使細胞回春之方法。本發明亦關於一種用於治療組織損傷之方法。

【先前技術】

【0003】 於產生誘導性多能幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 之細胞的重新編程技術為幹細胞生物學與再生醫學之具有前景的策略。以往資料已顯示核的重新編程可藉由三種方法以實驗地誘導：核轉移、細胞融合或轉錄因子的強制表現 (Yamanaka與Blau, 2010, Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. Nature. 465:704-12.)。成熟卵母細胞與胚胎幹細胞 (embryonic stem cell, ESCs) 含有重新編程因子 (蛋白質、RNAs、脂質與小分子) 是可為所知的，該因子可使此等體細胞進行有效的核的重新編程，為一種將體細胞轉換成多能性

狀態的過程 (Jullien等人, 2010, Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:5483-8. ; Wang等人, 2010, Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:17639-44.)。最近的證據強烈顯示核蛋白在重新編程過程期間之染色質再成型與表觀遺傳的修飾中調節的樞軸角色 (Jullien等人, 2011, Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:453-9.)。然而, 於細胞的重新編程期間核中因子調節過程之確切分子機制仍然未確定。

【0004】 誘導多能幹細胞 (iPSCs) 係首先由於2012年獲得諾貝爾醫學獎之Shinya Yamanaka的團隊開展。Yamanaka成功地藉由已被鑑定為於胚胎幹細胞(ESCs)中特別重要的基因之轉染以製造iPSCs, 並分離用於製造多能性幹細胞之必要的四個關鍵多能性基因: Oct-3/4、Sox2、c-Myc與Klf4 (Takahashi與Yamanaka, 2006, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.)。前人繼而發現藉由轉錄因子誘導的核的重新編程重設了表觀遺傳的標誌, 導致體細胞的表體基因組之整體逆轉至類ESC狀態 (Maherali等人, 2007, Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell.* 1:55-70. ; Papp與Plath, 2011, Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res.* 21:486-501.)。然而, 涉及後轉譯交互作用及修飾之機制仍然未確定。以質譜學 (mass spectrometry, MS) 為基礎之蛋白質體學分析為現有方法中對幹細胞生物學中蛋白質體譜之整體調查最強大的工具 (Rigbolt等

人，2011，System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci Signal.* 4:rs3.；Van Hoof等人，2009，Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 5:214-26.）。雖然表觀遺傳的事件中核蛋白質的重要性已被關注（Jullien等人，2010，Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:5483-8.），但關於所涉及之官能性蛋白質及調節重新編程與維持多能性之機制仍所知甚少。

【0005】 Yamanaka等人於US專利 第8,058,065號(2009年6月9日申請並於2011年11月15日頒證)中亦提供藉由經引入基因Oct3/4、Klf4、c-Myc及Sox2之體細胞的核重新編程而製備誘導多能幹細胞(iPSC)之方法。該藉由誘導分化該所獲得之iPSC而製備體細胞之方法係揭示於美國專利第8,129,187號中(2010年2月18日申請並於2012年3月6日頒證)。然後，Yamanaka等人提供藉由引入編碼Oct3/4、Klf4及Sox2且不含c-Myc之基因製備誘導多能幹細胞(iPSC)之方法(美國專利第8,278,104號，2008年6月13日申請並於2012年10月2日頒證)。Sakurada等人提供一種使用兩或多種由包含外生的Oct3/4、Sox2與Klf4基因之iPSCs分化之分離的細胞群體而用於藥物探索之方法及平台(美國專利第8,257,941號，2009年6月12日申請並於2012年9月4日頒證)。

【0006】 Irion提供一種用於自血液細胞中產生無整合之人類誘導多能幹細胞之方法，係使用一或多種以重新編程因子(a) Oct4、Sox2、Klf4及

c-Myc ; (b) Oct4、Sox2及Klf4 ; (c) Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc及Nanog ; 或 (d) Oct 4、Sox2、Lin-28及Nanog編碼的DNA表現載體(美國專利第8,048,675號, 2010年5月12日申請並於2011年11月1日頒證)。

【0007】 因此,使用蛋白質體學的途徑鑑別涉及核重新編程之調節中的新穎核因子,俾使闡明於重新編程過程期間核中複雜分子網路為重要的。

【0008】 誘導多能幹細胞(iPSCs)可藉由基因或化學試劑的轉導作用從成體細胞被重新編程。iPSCs享有胚胎幹細胞(ESCs)的特徵且可以自我更新及三胚層(tridermal)分化,提供於疾病模式化之資源及於移植之潛在來源。iPS細胞相較於胚胎幹(embryonic stem, ES)細胞之主要優點為iPS細胞可由患者自身的體細胞衍生,藉此避免移植後的免疫抗拒及因使用ES細胞而引起在倫理上之關注。近來,人類囊腫纖維化iPSCs被示範以製造疾病特定的肺前驅細胞及最後於免疫不全的小鼠中形成呼吸皮膜(Mou H, Zhao R, et al. Cell Stem Cell 2012; 10:385-397)。此外,人類iPSCs可形成肌原的前驅子及神經元,致使其移植至有神經肌肉疾病或中風疾病之模式生物後產生功能之回復(Darabi R et al. Cell Stem Cell 2012; 10:610-619; 及Oki K et al. Stem Cells 2012; 30:1120-1133)。然而,iPSCs的可能保護性角色及根本的機制仍然未知。

【發明內容】

【0009】 於本發明中不可預期的發現誘導多能幹細胞(iPSCs)可成功地由轉染體細胞以表現Oct3/4、Sox2及Parp1而沒有具致癌性的c-Myc及/或Klf4而製備。於本發明中,亦不可預期地發現干擾素(IFN)- γ 可誘導性

蛋白質-10 (inducible protein-10, IP-10) (一種負責修復或再成型組織傷害修復之趨化激素) 係涉及於由多能幹細胞 (iPSCs) 或iPSC-條件化之培養基 (iPSC-conditioned medium, iPSC-CM) 所介導的效應。

【0010】 據此，於一方面，本發明提供一種不使用c-Myc及/或Klf4而從體細胞製備誘導多能幹細胞 (iPSCs) 之方法。該方法包括(a)轉染分離的體細胞以表現Oct3/4、Sox2及Parp1；及(b)在適當的條件下培養如於步驟(a)中所獲得之該已轉染的體細胞，藉此將該體細胞轉換成iPSCs及維持多能性及自我更新能力。

【0011】 於另一方面，本發明提供一種從體細胞製備誘導多能幹細胞 (iPSCs) 的方法，包括：(a)使分離的體細胞接觸或暴露於Oct3/4、Sox2及Parp1；及(b)在適當的條件下培養如於步驟(a)中所獲得之該體細胞，藉此將體細胞群體之至少一亞群轉換成為iPSCs及維持多能性與自我更新能力。

【0012】 於又一方面，本發明提供一種重新編程成體細胞之方法，包括將被PAR基化的/可被PAR基化的蛋白質或具有PAR基化活性之酵素投予至細胞。

【0013】 於再一方面，本發明亦提供一種將個體中細胞或衰老細胞回春化之方法，包括將可被PAR基化的蛋白質或具有PAR基化活性的酵素投予至個體。

【0014】 於另一方面，本發明提供一種用於誘導IP-10之分泌的方法，包括將有效量的iPSCs或iPSC-條件化之培養基投予至有需要之個體。

【0015】 於另一方面，本發明提供一種用於治療組織傷害之方法，其

包括將治療有效量之iPSCs或iPSC-條件化之培養基投予至有需要之個體，其中該治療有效量為能夠誘導足夠以抑制發炎反應之IP-10的量。

【0016】 於再另一方面，進一步提供一種組合物，其包括用於個體中誘導IP-10之分泌之iPSCs或iPSC-條件化之培養基。

【0017】 應理解前述一般敘述及以下詳細敘述兩者僅為例示性及闡明性，並不限制本發明。

【圖式簡單說明】

【0018】 前述之摘要以及以下本發明之詳細敘述，當與所附之圖式一併閱讀時將可更加理解。

【0019】 於圖式中：

【0020】 圖1顯示於多能或分化狀態之Parp1與PAR基化活性。圖1A：於Re-7 iPSCs中ALP與SSEA-1之型態及染色。BF，亮視野。比例尺 =100 μm 。來自Re-7 iPSCs與MEFs之核蛋白質藉由1D-DIGE分離成五部份。圖1B：圓餅圖，顯示於來自iPSCs之所有核蛋白質中基因功能的GO分類。圖1C：於多能幹細胞中Oct4、Nanog、c-Myc、Parp1及PAR基化活性之表現，包括以OSKM (Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc) 或OSK (Oct4、Sox2、Klf4) 轉染的iPSCs與ESCs。圖1D：上方：多能性因子Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc及Parp1之展開；下方：於重新編程過程期間之PAR基化活性。圖1E：於分化6天後EBs中之Parp1表現與PAR基化活性。圖1F：左側：Re-7 iPSCs分化成類骨、類肝或類神經元之細胞，分別由茜素紅、PAS及神經元特定標記Nestin與MAP2之陽性染色確認。比例尺=100 μm 。右側：偵測於Re-7 iPSCs

中Parp1、Parp2、TopII-alpha、Oct4、Sox2及Klf4蛋白質，於分化成指定的特定譜系之前及之後。西方墨點轉漬係代表獨立的細胞配製物之三個分別的實驗。

【0021】 圖2顯示Parp1表現與PAR基化活性對iPSC重新編程係至為重要的。圖2A：西方墨點轉漬確認在重新編程11日（Repro D11）時Parp1剔降型（knockdown）於Par1表現剔降的效應。圖2B：於以OSKM轉染的MEFs中之Parp1剔降於重新編程期間影響自我更新與增生的能力。圖2C：以ALP染色之重新編程細胞示範以Parp1剔降之iPSCs之群體尺寸。圖2D：在Repro D11時以Parp1剔降之iPSCs中對ESC標記SSEA-1及Oct4之免疫螢光染色。圖2E：於OSK-或OSKM-轉染的MEFs中偵測Parp1與Oct4表現於Repro D11之過度表現的Parp1。圖2F：以ALP染色之重新編程細胞及具有或不具有Parp1過度表現（左側）以OSKM轉染、具有或不具有Parp1過度表現（中間）以OSK轉染及具有或不具有Parp2過度表現（右側）以OSK轉染之MEFs之相對重新編程效率，於21日之後-重新編程。圖2G：左側：以ALP染色之重新編程細胞及以PAR基化抑制因子PJ-34處理之重新編程細胞（OSKM）與沒有抑制因子之細胞相比之重新編程效率。以ShRNA-Parp1（中間）處理的或shRNA-混碼對照組（右側）處理的OSKM-轉染的MEFs，於21日之後-重新編程。西方墨點轉漬係代表獨立的細胞配製物之三個分別的實驗。此處顯示之ALP染色為六個獨立實驗之平均值 \pm SD。*P< 0.05 相對親代。

【0022】 圖3顯示Parp1可替代Klf4或c-Myc以產生嵌合體小鼠。圖3A：以ALP-陽性群體計數比較OSK、OSM與OSP之間的重新編程效率。圖

3B：流動式細胞測量術顯示在重新編程0日（左側）或11日（右側）時於以對照載體或以Parp1轉染的MEFs之細胞循環分析。圖3C：於重新編程期間在Nanog-GFP訊息MEF株中由OSP轉染化之Nanog-GFP之表現活性。圖3D：產OSP之iPSCs可穩定地培養至至少50個具高ALP活性之繼代。圖3E：RT-PCR顯示在第50繼代時於產OSP之iPSCs中之類-ESC基因特徵（signature）。圖3F：免疫螢光法指出在第50繼代時於OSP-iPSCs中多能性因子的蛋白質表現。圖3G：亞硫酸氫鹽定序顯示於MEFs與OSP-iPSCs中Oct4與Nanog之啟動子的甲基化譜。空心與填滿的圓圈分指示未甲基化及甲基化的CpG二核苷酸。圖3H：活體外（*Ex vivo*）生檢體與組織分析揭露於裸小鼠中OSP-iPSCs之腎下（subrenal）接枝中的畸胎瘤形成。OSP-iPSCs之搬運力產生嵌合體小鼠，如被覆顏色所確認（右下方）。比例尺 = 100 μ m。顯示於此處的ALP染色為六個獨立實驗的平均值 \pm SD。西方墨點轉漬或其他數據係代表獨立的細胞配製物之三個分別的實驗。

【0023】 圖4顯示c-Myc為調節Parp1表現與PAR基化活性之關鍵因子。圖4A：西方墨點轉漬顯示於5日Parp1表現與PAR基化程度，以指定的因子後-MEF細胞轉染。圖4B：以ALP染色的重新編程細胞顯示表現OSK與混碼shRNA、OSK及c-Myc shRNA或OSK、c-Myc shRNA及Parp1之細胞的相對重新編程效率。圖4C：以c-Myc shRNA處理之多能幹細胞中Parp1、Oct4、Sox2、Klf4及Nanog之表現以及PAR基化活性。圖4D：包含序列性刪除或點突變小鼠Parp1啟動子之訊息構築體之示意表現。圖4E：如圖4D所指出包含序列性刪除或點突變小鼠Parp1 啟動子之訊息構築體之螢光酵素活

性。圖4F：染色質免疫沉澱（Chromatin immunoprecipitation, ChIP）分析以IgG或c-Myc Ab用於免疫沉澱，接著藉著對Parp1啟動子使用C1、C2與C3引子組及對週期蛋白D2啟動子之引子之PCR。圖4G：以qPCR（qChIP）之圖4F（ChIP）之定量結果。輸入，總溶解產物之2%。西方墨點轉漬係代表獨立的細胞配製物之三個分別的實驗。此處所顯示之ALP染色（圖4B）為六個獨立實驗之平均值 \pm SD，而其他實驗（圖4E和4G）係來自三個獨立實驗。於圖4B中，* $p < 0.05$ 對 shScr，# $P < 0.05$ 對 shc-Myc。於圖4G中，* $p < 0.05$ 對 IgG對照組。

【0024】 圖5顯示Parp1維持多能幹細胞中染色質-再成型蛋白質之PAR基化。圖5A：於iPSCs中PAR基化的蛋白質藉由PAR基化的蛋白質沉澱試驗法（拉下（pull-down）測定法）製備並由LC-MS/MS分析。西方墨點轉漬確認此等鑑定的PAR基化蛋白質之表現（Neg：具突變親和域之陰性樹脂；PAR：PAR親和樹脂）。圖5B：於總溶解產物（輸入）中，西方墨點轉漬顯示於重新編程過程期間於多能幹細胞中Parp1、Parp2、Chd1L、DNA連接酶III、Ssrp1與Xrcc6之表現量。圖5C：使用PAR親和樹脂和沉澱試驗法，評估於MEFs、重新編程D6細胞、重新編程D12細胞、miPSCs、mESCs與Re-7 iPSCs中已鑑定之PAR基化蛋白質的表現譜（Con：具有突變親和域之陰性樹脂）。圖5D：共-免疫沉澱顯示Parp1與Parp2、Chd1L、DNA連接酶III、Xrcc-6及Ssrp1交互作用。圖5E：評估來自iPSC-衍生胚樣體之總蛋白質。圖5F：於iPSC-衍生胚樣體之分化過程期間Parp1、Chd1L、DNA連接酶III、Ssrp1、Xrcc-6與Parp2之蛋白質表現。西方墨點轉漬係代表獨立的細胞配製物之三

個分別的實驗。

【0025】 圖6提供顯示使用Ingenuity IPA分析藉Parp1-交互作用與Parp1-PAR基化的蛋白質於核重新編程與多能性之維持中蛋白質-交互作用網路之圖表。

【0026】 圖7顯示iPSCs或iPSC-條件化培養基改良高的潮氣容積-誘導的肺水腫與傷害 (VILI)。圖7A提供肺的總體病理影像，其指出高的潮氣容積- (V_T30)誘導的出血、肺充血水腫及iPSCs或iPSC-條件化培養基之恢復再生效果。圖7B-7E提供投予MEF、iPSC或iPSC-條件化培養基於肺EBD (圖7B)、BAL總蛋白質 (圖7C)、濕乾比 (圖7D) 與 PaO_2/FiO_2 比 (圖7E) 在低潮氣容積 (V_T6) 或高潮氣容積 (V_T30) 下於小鼠接收機械通氣之效果。此處數據顯示為三個獨立實驗之平均值 \pm SD (* $P < 0.05$ 對以PBS處理之非通氣對照組；† $P < 0.05$ 對以PBS處理、 V_T30 -通氣的小鼠)。

【0027】 圖8顯示iPSCs或iPSC-條件化培養基回復高的潮氣容積誘導的結構性損傷及嗜中性球的滲浸。圖8A提供組織的檢查；圖8B提供 V_T30 誘導的呼吸道結構性損傷與iPSCs或iPSC-條件化培養基之恢復再生效果的定量；及圖8C-8F提供投予MEF、iPSC或iPSC-條件化培養基於嗜中性球的滲浸 (圖8C)、MPO活性 (圖8D)、HMGB1分泌 (圖8E) 與PAI-1分泌 (圖8F) 於支氣管肺泡灌洗中在低的潮氣容積 (V_T6) 或高的潮氣容積 (V_T30) 下於小鼠接收機械通氣之效果。此處數據顯示三個獨立實驗之平均值 \pm SD (* $P < 0.05$ 對以PBS處理之非通氣小鼠；† $P < 0.05$ 對以PBS處理之 V_T30 -通氣小鼠)。

【0028】 圖9顯示藉由iPSC-條件化培養基之超微結構的 (ultramicrostructural) 復原。圖9A提供TEM圖像，揭露藉由iPSCs或iPSC-條件化培養基治療之呼吸道超微結構的復原；圖9B-9E提供投予iPSC-條件化培養基於MIP2的表現 (圖9B)、製造硝酸鹽/亞硝酸鹽 (圖9C)、MDA (圖9D) 與GSH (圖9E) 於小鼠接收 V_T30 通氣之效果 (此處數據顯示三個獨立實驗之平均值 \pm SD; * $P < 0.05$ 對只以PBS處理之非通氣小鼠 (PBS); † $P < 0.05$ 對 V_T30 -通氣小鼠 (V_T30)); 及圖9F提供由細胞介素陣列偵測之iPSC-CM的細胞介素譜。

【0029】 圖10顯示IP-10於iPSC-條件化培養基在VILI中修補再生效果的涉入。圖10A提供定量RT-PCR，指出於 V_T30 通氣小鼠中iPSCs與iPSC-條件化培養基兩者皆招致IP-10 (上方)、MIG (中間) 及i-TAC (下方) 之表現；圖10B提供於接收 V_T30 通氣的小鼠中由iPSCs刺激之IP-10分泌的ELIZA數據；及圖10C-10E提供IP-10中和抗體投予肺於傷害分數 (圖10C)、嗜中性球的滲浸 (圖10D) 與 PaO_2/FiO_2 比 (圖10E) 於接收 V_T30 通氣的小鼠之效果。此處數據顯示三個獨立實驗之平均值 \pm SD。於圖10A中，* $P < 0.05$ 對僅有PBS；† $P < 0.05$ 對僅 V_T30 。於圖10B中，* $P < 0.05$ 對MEF-處理的小鼠。於圖10C-10E中，* $P < 0.05$ 對無治療之 V_T30 -通氣小鼠；† $P < 0.05$ 對以iPSC-CM治療或不以iPSC-條件化培養基治療之IP-10中和抗體-未治療群組。

【0030】 圖11顯示iPSCs或iPSC-條件化培養基之靜脈下移植改善了博來黴素 (bleomycin) 誘導之肺纖維化後之肺傷害。圖11A提供阿士克羅夫特肺纖維化分數 (Ashcroft lung fibrosis score)；及圖11B-11C分別提供破

壞性指數及平均線性截距 (Lm) 值，其係於以iPSCs或iPSC-條件化培養基治療後在7、14與21日獲得。數據係表示為平均值 \pm SD (* p <0.05 對於指定日之博來黴素-處理PBS對照組； n =每群組為6)。

【0031】 圖12顯示iPSCs或iPSC-條件化培養基之靜脈下移植減弱博來黴素誘導的肺纖維化強度。圖12A-12B提供於接受iPSCs或iPSC-條件化培養基之博來黴素處理的小鼠中染色之第1型膠原蛋白與 α -SMA之定量；及圖12C提供於在氣管內博來黴素注射後14及21日時來自於接受iPSCs或iPSC-條件化培養基之小鼠肺中的羥補胺酸含量。數據以平均值 \pm SD表現(* p <0.05 對於指定日之博來黴素-處理PBS對照組； n =每群組為5)。

【0032】 圖13提供於被博來黴素傷害的小鼠中在iPSC治療後3日於肺的細胞介素與趨化激素之變化。圖13A提供以密度測定法定量並以像素密度表現之各個細胞介素與趨化激素之表現，其中來自被博來黴素傷害的iPSCs或iPSC-條件化培養基接受者之肺蛋白質被萃取並使用細胞介素陣列試驗套組分析；及圖13B-E提供即時PCR結果：IP-10 (圖13B)、MIG (圖13C)、iTAC (圖13D) 及CXCR3 (圖13E)，其在博來黴素-誘導的肺傷害後3日自整個肺萃取出並分析，其中結果係以倍數表現相對PBS-處理的肺表現。數據以平均值 \pm SD表現(* p <0.05 對博來黴素-處理的PBS對照組； n =每群組為5)。

【0033】 圖14顯示於博來黴素-注射的小鼠之生存者上iPSCs(圖14A)或對應的iPSC-條件化培養基(圖14B)治療之劑量相關之效果。數據以平均值 \pm SD表現(* p <0.05； n =每群組為5)。

【0034】 圖15顯示IP-10的涉入於博來黴素-誘導的肺纖維化上iPSC-條件化培養基的保護效果。圖15A提供IP-10-中和抗體於iPSC-條件化培養基介導保護上對抗由博來黴素所誘導的致死性之效果；及圖15B-15E提供IP-10-中和抗體在測量於以iPSC-CM治療之被博來黴素傷害的小鼠中膠原蛋白沉積上（圖15B）、肌纖維母細胞（myofibroblast）累積上（圖15C）、嗜中性球的累積上（圖15D）及阿士克羅夫特纖維化分數上（圖15E）之效果。數據以平均值±SD表示（* $p < 0.05$ 對博來黴素-處理的PBS；# $p < 0.05$ 對經博來黴素處理的iPSC-條件化培養基群組； $n =$ 每群組為5）。

【0035】 圖16顯示iPS細胞緩和了肝傷害及誘導的肝組織損傷。圖16A提供於接受載劑（PBS）、iPS或iHL細胞輸液之小鼠中肝酵素（ALT、AST）的血清量，其係在注射CCl₄後之不同時間點決定（ $n = 6$ ，* $P < 0.05$ 對載劑，# $P < 0.05$ 對iPS）；及圖16B提供後CCl₄治療在48 h測量的指定群組之Ki67增生指數與BrdU標記指數（ $n = 6$ ，* $p < 0.05$ 對PBS，# $p < 0.05$ 對iPS）。iPS，誘導多能幹細胞（induced pluripotent stem cells）；iHL，iPS-衍生的類肝細胞（iPS-derived hepatocyte-like cells）；ALT，丙胺酸轉胺酶（alanine aminotransferase）；AST，天門冬胺酸鹽轉胺酶（aspartate aminotransferase）；CCl₄，四氯化碳（carbon tetrachloride）。

【0036】 圖17提供在iPS輸液後於傷害的小鼠中肝的趨化激素之變化。圖17A提供由細胞介素陣列評估之iPS-誘導的肝的細胞介素輪廓，其中肝蛋白質被萃取出並藉由細胞介素陣列試驗套組分析，且個別的細胞介素表現藉由密度測定法定量並以相對於被CCl₄傷害且不含iPS細胞之群組

之倍數變化表現；圖17B顯示在CCl₄傷害後iPS細胞於IP-10、MIG及iTAC的 mRNA表現上的效果（n=6，*p<0.05 相對正常對照組；#p<0.05 相對CCl₄ 群組）及圖17C提供在傷害後24h時均質化肝萃取物中肝的IP-10之ELISA與西方墨點轉漬分析（n=4，*p<0.05 相對CCl₄群組）。

【0037】 圖18顯示IP10為介導iPS有益效果之重要因子。圖18A提供重組IP10（rIP-10）在濃度1.0至2.5 mM CCl₄之傷害後24 h增加受傷害的肝細胞生存率的效果；圖18B顯示rIP-10於肝損傷上的保護效果；圖18C示範抗-IP-10中和抗體於減緩iPS細胞的保護效果之效應（n=6，*p<0.05 相對CCl₄ 群組，#p<0.05 相對CCl₄+iPS群組）；圖18D示範抗-IP-10中和抗體在iPS輸液後減少於輸入區域之肝細胞的增生；及圖18E提供以CCl₄、CCl₄+iPS細胞或rIP10處理之小鼠的存活曲線（*p<0.05，n=每一群組中為6）。

【實施方式】

【0038】 除非另外定義，本文使用之所有技術及科學術語具有與本發明所屬技術領域中習知技藝者一般了解的相同意義。本文所有提及的出版物係藉由參考方式併入於本文，以揭示及描述相關於所引述出版物之方法及/或材料。

【0039】 如本文所使用，冠詞「一（a）」或「一（an）」意謂一個或多於一個（亦即，至少一個）該詞之文法物體，除非僅以單數態於特定使用之冠詞上另外清楚說明。

【0040】 如本文中所使用「多能性」乙詞係指在不同條件下，具有分化成多於一種分化細胞類型之能力的細胞，且較佳為分化成所有三種生殖

細胞層之細胞類型特徵。

【0041】 如本文所使用「iPSC」及「誘導多能幹細胞」乙詞係可替換地使用且係指自一非多能細胞人工衍生取得（藉由如誘導或完全反轉），典型地為成體細胞，例如藉由誘導強制表現一或多個基因。

【0042】 本發明係基於發現在重新編程過程中Parp1可用於取代c-Myc與Klf4且其效率為明顯地相近於彼等就製造iPSC方面而言由c-Myc、Oct4與Sox2（OSM）重新編程之效率。更甚者，於iPSC及ESCs中數個Parp1有關的與PAR基化交互作用的蛋白質亦於本發明中鑑定，包括涉及於DNA修復與染色質再開（re-opening）之彼等者，藉此提供對iPSC技術及對老化的細胞或組織的再生醫學之有用工具。

【0043】 聚(ADP-核糖)聚合酶1（Poly(ADP-ribose) polymerase 1，Parp1）作為蛋白質之Parp家族之一員，係於核中富含的高度守恆的DNA結合蛋白質。Parp1係已知為數種核事件之關鍵效應子，諸如DNA修復、複製及轉錄（Jagtap與Szabo，2005，Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 4:421-40；Kraus，2008，Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol.* 20:294-302.）。其催化稱為聚(ADP-核糖基化)（PAR基化）（poly(ADP-ribosylation) (PARylation)）之過程，其中NAD⁺係用作合成具有尺寸分佈自2至200 ADP-核糖單元之聚(ADP-核糖)聚合物的受質（Krishnakumar與Kraus，2010，The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell.* 39:8-24.）。此

Parp1-催化的PAR基化已牽涉於數種過程，包括染色質再成型、增強劑結合、共調節（coregulation）及絕緣（Kraus，2008）。

【0044】 在一方面，本發明提供一種從體細胞製備誘導多能幹細胞（iPSCs）之方法，包括：(a)轉染分離的體細胞以表現Oct3/4、Sox2及Parp1；及(b)在適當的條件下培養如於步驟(a)中所獲得之該已轉染的體細胞，藉此將該體細胞轉換成iPSCs及維持多能性與自我更新能力。

【0045】 分離的體細胞之轉染可根據任何由本領域中習知技藝者已知之方法進行。於一實例中，分離的體細胞可以一或多個質體或病毒載體轉染，該質體或病毒載體包括以可操作方式連結至啟動子之Oct3/4、Sox2與Parp1。

【0046】 於另一方面，本發明提供一種從體細胞製備誘導多能幹細胞（iPSCs）之方法，包括：(a)使分離的體細胞接觸或暴露於Oct3/4、Sox2及Parp1；及(b)在適當的條件下培養如於步驟(a)中所獲得之該體細胞，藉此將該體細胞群體之至少一亞群轉換成為iPSCs及維持多能性與自我更新能力。本發明特徵在於該方法不包括將該體細胞轉染、接觸或暴露以/至c-Myc、Klf4、Nanog、Lin28或其任意組合之步驟，以與先前技術有所區別。

【0047】 於本發明中亦提供由本文所描述方法所製備之iPSC。

【0048】 本發明亦提供一種製備iPSCs之方法，其包括(a)提供分離的體細胞；(b)以Oct3/4、Sox2及Parp1轉染分離的體細胞、使分離的體細胞與此等接觸、或暴露以表現此等；及(c)在適當的條件下培養如於步驟(b)中所獲得之該體細胞，藉此將該體細胞轉換成iPSCs及維持多能性與自我更新能力。

【0049】 本發明亦提供一種重新編程成體細胞之方法，包括將被PAR基化的/可被PAR基化的蛋白質投予至細胞。此外，據信細胞回春作用可由重新編程過程進行。據此，本發明提供一種將個體中細胞或衰老細胞回春化之方法，包括將被PAR基化的/可被PAR基化的蛋白質投予至該細胞或該個體。

【0050】 本文中所使用「重新編程」乙詞係指消除及再成型表觀遺傳標記的過程，諸如DNA甲基化，其中原始的DNA甲基化圖樣被消除且再建立。

【0051】 本文中所使用「細胞的回春作用」之片語係指使此類細胞的端粒尺寸、基因表現譜、氧化壓力或粒線體的代謝與胚胎幹細胞的彼等者無法分辨之過程。

【0052】 如本文中所使用「個體」乙詞係指人類或哺乳類，諸如患者、寵物（如狗、貓或其類似者）、家畜（例如母牛、綿羊、豬、馬及其類似者）或實驗室動物（例如大鼠、小鼠、天竺鼠及其類似者）。

【0053】 於一較佳的具體實施例中，可被PAR基化的或關於PAR基化的蛋白質係選自由下表所列之蛋白質及其組合所組成之群組中者：

no	蛋白質名稱
1	聚[ADP-核糖]聚合酶 1 (Poly[ADP]-ribose polymerase 1)
2	FACT 錯合次單元 SPT16 (FACT complex subunit SPT16)
3	聚[ADP-核糖]聚合酶 2 (Poly[ADP]-ribose polymerase 2)
4	類-染色質域-解旋酶-DNA-結合蛋白質 1 (Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like)
5	DNA連接酶3 (DNA ligase 3)
6	FACT 錯合次單元 SSRP1 (FACT complex subunit SSRP1)
7	富含白胺酸重複非飛行-交互作用蛋白質 2 (Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2)
8	X-射線修復交錯互補蛋白質 6 (X-ray repair cross-complementing protein 6)

- 9 X-射線修復交錯互補蛋白質 1 (X-ray repair cross-complementing protein 1)
- 10 剪接因子U2AF 35kDa 次單元 (Splicing factor U2AF 35 kDa subunit)
- 11 蛋白質永久同系物 (Protein timeless homolog)
- 12 核仁RNA解旋酶 2 (Nucleolar RNA helicase 2)
- 13 U1小核核糖核蛋白A (U1 small nuclear ribonucleoprotein A)
- 14 酪胺醯基-DNA磷酸二酯酶 1 (Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1)
- 15 Aprataxin及類PNK因子 (Aprataxin and PNK-like factor)
- 16 複製蛋白質A 70kDa DNA結合次單元 (Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit)
- 17 核中的細胞凋亡性染色質凝結引發子 (Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus)
- 18 不均勻的核中核糖核蛋白A3 (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3)
- 19 易裂X心智遲滯蛋白 1同系物 (Fragile X mental retardation protein 1 homolog)
- 20 無髮的重組結合蛋白抑制因子 (Recombining binding protein suppressor of hairless)
- 21 剪接因子U2AF 65kDa 次單元 (Splicing factor U2AF 65 kDa subunit)

【0054】 於本發明之一實例中，該蛋白質為類-染色質域-解旋酶-DNA-結合蛋白質1 (Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like, Chd1L)。

【0055】 於本發明中，具有PAR基化活性之酵素亦可用以重新編程或回春化成體細胞。於本發明之一實例中，該酵素為Parp 1。

【0056】 本文中所使用「成體細胞」乙詞係指在胚胎發展後遍及身體所發現之細胞。

【0057】 於本發明中，係示範iPSCs或其iPSC-CM具有於受傷組織中誘導IP-10製造的效能，諸如受傷的肺與肝 (圖10、圖13A與圖17)。據此，本發明提供誘導IP-10之分泌的方法，其包括將有效量的iPSCs或iPSC-條件化培養基投予至有需要之個體。

【0058】 本文中所使用「iPSCs」或「iPS細胞」乙詞係指可自個體的體細胞生產及能夠自我更新且在適當的誘導後分化成數種不同細胞類型之

誘導多能幹細胞。本文中所使用之體細胞可來自人類或哺乳類。

【0059】 如本發明之一具體實施例所示，IP-10-中和抗體之投予增加嗜中性球的滲浸、損害肺充氧作用並惡化於呼吸器-誘導的肺傷害（ventilator-induced lung injury，VILI）模型中由iPSC-條件化培養基介導之保護效應（圖10）。於另一具體實施例，IP-10中和阻擋博來黴素-注射的小鼠之存活率上iPSC-條件化培養基治療或iPSC移植之正面效果（圖15）。於進一步具體實施例，IP-10中和抗體的施用減弱了於CCl₄-傷害的肝上iPSCs的保護效果（圖18）。

【0060】 據此，由本文所提供方法於個體中誘導的IP-10分泌係在有效於修復組織傷害的量，包括但不限於肺傷害、肝傷害及彼等由角膜損傷、肢體病症、腎疾病與局部缺血造成者。局部缺血的實例為局部中風（focal stroke）及心肌梗塞。

【0061】 考量於受傷組織中由iPSCs及iPSC-條件化培養基誘導之增加的IP-10量之保護效果，本發明亦提供一種用於治療組織傷害（例如肺或肝傷害）之方法，其包括將治療有效量之iPSCs或iPSC-CM投予至有需要之個體，其中該治療有效量為能夠誘導足夠量之IP-10以抑制發炎反應的量。

【0062】 另一方面，本發明亦提供一種組合物，其包括用於個體中誘導IP-10之分泌之iPSCs或iPSC-條件化培養基。

【0063】 以下之特定實施例係理解為僅為闡述性，而非以無論任何形式限制本揭示之其餘處。不須進一步詳述，據信所屬技術領域中習知技藝者可基於本文之敘述利用本發明至其最大程度。本文中所引述之所有揭露

者其整體以參考形式併入本文。

【0064】 實施例 - (I)

【0065】 1. 材料及方法

【0066】 1. iPSC系之產生及細胞培養

【0067】 於此研究中使用C57/B6小鼠且所有涉及動物的程序係由台北榮民總醫院之動物委員會認可。鼠科的iPSCs係由衍生自13.5日大的C57/B6小鼠胚胎之小鼠胚胎纖維母細胞 (MEFs) 生產。該iPSCs係由反轉錄病毒載體的轉導作用重新編程，該反轉錄病毒載體係以四個轉錄因子 (Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc ; OSKM) 或三個轉錄因子 (Oct4/Sox2/Klf4 ; OSK) 編碼，如先前所描述 (Li等人，2011，Reprogramming induced pluripotent stem cells in the absence of c-Myc for differentiation into hepatocyte-like cells, *Biomaterials*, 32:5994-6005.)。總共選擇及建立12株 (Re-1至Re-12 ; OSKM)。Re-7 iPSCs之株已穩定的通過超過100 th通道及具有高的多能性。因此，於此研究中選擇並廣泛地使用Re-7 iPSCs。簡言之，未分化的iPSCs係被例行性地培養及於六孔培養盤中於有絲分裂-鈍化的MEFs (50,000 細胞/cm²) 上延展 (BD Technology)，其係在0.3%白血病抑制性因子存在下、於由Dulbecco's Modified Eagle's培養基 (DMEM ; Sigma) 所組成並以15%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS ; Invitrogen)、100 mM最小所需培養基 (minimal essential medium, MEM) 非必要胺基酸 (Sigma)、0.55 mM 2-巰基乙醇 (2-mercaptoethanol ; Gibco) 及抗生素 (Invitrogen) 補充之iPSC培養基中。每三至四日，殖株以0.2%膠原蛋白酶IV (collagenase IV ; Invitrogen) 脫附、於單一槽中以0.025%胰蛋白酶 (Sigma) 與0.1%雞血清 (Invitrogen) 在PBS中解離，且重新固定至MEFs上。針對胚樣體 (embryoid

body, EB) 形成, iPSCs係藉0.25%胰蛋白酶-EDTA解離至單一槽懸浮液並在 2×10^6 細胞/100 mm盤的密度下固定至具有於DMEM中之15% FBS、100 mM MEM非必要胺基酸、0.55 mM 2-巰基乙醇與抗生素之非-黏著的培養碟上。於浮動培養4日後, 將EBs轉移至明膠-塗布的盤上並於同樣的培養基中維持24 h。然後將EBs分配於試管內如先前描述的分化至三胚層譜系 (Li等人, 2011)。

【0068】 2. 鹼性磷酸酶活性 (Alkaline phosphatase activity, ALP)、茜素紅 (Alizarin red) 及PAS染色

【0069】 為了偵測於原始盤上細胞的AP活性, 將細胞以80%酒精固定, 然後將固定的細胞根據製造商指示使用載體藍鹼性磷酸酶受質套組III(Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III) (Vector Laboratories) 染色。茜素紅染色及PAS染色如先前描述的進行 (Li等人, 2011)。

【0070】 3. 一維膠體電泳 (SDS-PAGE) 及膠內分解

【0071】 每個細胞種類, 將從各種條件下 10^7 細胞萃取的核蛋白質藉由在 95°C 下沸騰10分鐘變性。1D膠體電泳如前所描述的 (Liu等人, 2012, IKKalpha activation of NOTCH links tumorigenesis via FOXA2 suppression. Mol Cell. 45:171-84.), 且以10% SDS-PAGE進行。在膠體由VisPRO 5分鐘蛋白質染色套組 (VP01-500, Visual Protein, 台北, R.O.C.) 染色後, 將每一道線切下成10個相等切面, 接著藉由 β -巰基乙醇 (β -Mercaptoethanol) (1% v/v) 於25 mM碳酸氫銨 (ammonium bicarbonate) 中在室溫及暗處下還原20分鐘, 且以5% v/v 4-乙烯基吡啶 (4-Vinylpyridine) 於25 mM碳酸氫銨中烷化20分鐘。然後以0.1% v/v 蛋白質體學等級修飾胰蛋白酶 (Sigma, 密蘇里, USA) 於25 mM碳酸氫銨中在 37°C 下整夜而完成

分解。胰蛋白酶分解的胜肽之萃取物係於SpeedVac濃縮器 (Jouan, RC1022, Thermo Savant, 米福爾德, MA, USA) 中乾燥。

【0072】 4. LC-MS/MS分析

【0073】 LC-MS/MS分析係如描述通過使用LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific Inc., 不來梅, 德國) 來進行。簡言之, 分解胜肽的每一樣品係重建至20 μ l的0.1%甲酸 (formic acid, FA)。首先將胜肽注射並藉由奈米流HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, 聖塔克拉拉, CA, USA) 以C18 管柱 (75 μ m ID \times 360 μ m OD \times 15 cm; Agilent Technologies, 聖塔克拉拉, CA, USA) 分離, 並在通過接續的奈米噴灑尖端 (New Objective, 沃本, MA) 時變成離子化顆粒。於操作HPLC中, 在分流器後流速係處於0.4 μ l/min。用於LC-MS/MS系統之LC梯度於120分鐘內從2%ACN躍升至40% ACN, 且該系統係在自動化數據先決取樣之設定下, 以200-2000 m/z全掃描自每個Orbitrap MS掃描最多3個最強峰之模式進行。將具有+2或+3電荷態之胜肽進一步送入CID。以Xcalibur (2.0 SR2版) 於原始數據檔案中獲得圖譜。蛋白質鑑定係經由TurboSEQUENT (Thermo Finnigan, 聖荷西, CA, USA) 使用UniProt資料庫完成。只要於定序中符合3個具有Xcorr > 2.5之胜肽, 即確認蛋白質。

【0074】 5. PAR基化蛋白質純化

【0075】 因PAR基化蛋白質包含具有對巨域高親和力的聚-ADP-核糖, 與Af1521巨域共軛的該PAR親和樹脂組 (鬱金香) 係用於拉下 (pulldown) PAR基化的蛋白質。將蛋白質從細胞藉由溶解 (lysis) 緩衝劑 (例如: 50mM Tris, pH 8, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% 甘油, 1 mM

DTT、0.5%去氧基膽酸鹽（deoxycholate）及蛋白酶抑制劑）萃取並在4°C中以樹脂培育整夜。在培育後，以溶解緩衝劑清洗樹脂三次，接著在95°C下藉由加入1X SDS-樣品緩衝劑10分鐘以解離蛋白質。

【0076】 6. 基因本體、途徑及網路分析

【0077】 將過濾的基因與蛋白質送至使用 AltAnalyze 成組模型 GO-Elite (http://www.genmapp.org/go_elite) 之基因本體富集分析。GO-Elite 實施一過表現統計干擾，其可鑑別具核蛋白質之顯著富集的基因本體 (gene ontology, GO) 範疇。具有z-分數>2、排列為P<0.01與對每個GO項三或多個調節的蛋白質之基因本體項係報告為顯著的。使用 Ingenuity Pathway Analysis 網路工具 (IPA, <http://www.ingenuity.com/>) 進行正則途徑及基因交互作用網路的分析。IPA在規律更新的Ingenuity Pathways Knowledge Base的基礎上建構假定的蛋白質交互作用簇，該Base係由數百萬種從公開文獻中收集之蛋白質間個別關係所組成之資料庫。每個基因交互作用由其所載之出版物擷取出之證據支持、使用本體以結構化並儲存於資料庫中。為了進一步探索介於目標-PAR基化蛋白質（列於表1）及幹細胞性（stemness）基因或於調節細胞重新編程中其他因子之間的潛在關係，於此研究中使用 Ingenuity Pathway Analysis 網路工具 (IPA, <http://www.ingenuity.com/>) 之生化資訊分析。首先，吾人上傳一數據組（包含在蛋白質體實驗中鑑定之PAR基化蛋白質（表1））至IPA網。然後吾人選擇「New core analysis」選項以產生蛋白質間交互作用網路。吾人進一步使用「Experimentally Observed」以限制信度，設定參考標準為「Ingenuity Knowledge Base (Gene Only)」並輸

出10個網路（每個網路70個分子）。圖6中假定的網路係從此等目標-PAR基化蛋白質、ESC-相關蛋白質及其他由IPA分析自資料庫候選之蛋白質產生。實線係代表由文獻數據庫所支持之「直接的」蛋白質對蛋白質交互作用關係，而虛線係代表由文獻數據庫所支持之「間接的」交互作用。

【0078】 7. 對標記基因之定量PCR與RT-PCR

【0079】 逆轉錄反應係使用SuperScript™ III逆轉錄酶（Invitrogen）進行。於之後的定量PCR（qPCR）與RT-PCR中使用cDNA。根據製造商指示以Power SYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems）進行qPCR。以7900HT快速即時PCR系統（Fast Real-Time PCR System）（Applied Biosystems）偵測訊號。

【0080】 8. shLuc與shParp1與shParp2表現構築體及慢病毒屬轉導作用

【0081】 使用對小鼠基因Parp1與Parp2之小型髮夾RNA（small hairpin RNA，shRNA）探針以獲得於MEFs中Parp1與Parp2之穩定脫落。對照組細胞被允許穩定地表現shLuc（pLKO.1-shLuc）。細胞以使用三個質體為基礎的慢病毒屬系統（所有質體係可來自RNAi 聯盟[TRC]）所產生之shRNA慢病毒屬載體感染。慢病毒係藉由293T細胞在每一10 cm盤含 5×10^6 細胞下使用Lipofectamine 2000（LF2000，Invitrogen Life Technologies，喀斯巴德，CA，USA）的轉染化製造。在轉染化48 h後收集上清液然後過濾之。培養生長中的（subconfluent）細胞係在8 mg/ml 聚凝胺（polybrene）（Sigma）的存在下以慢病毒屬載體感染。感染的細胞係以嘌呤黴素（puromycin）（2 mg/ml）選擇直至對照的未感染細胞完全死亡。使用免疫漬墨以確定shParp1

與shParp2之剔降效率 (Chen等人, 2011, Autophagy inhibition enhances apoptosis triggered by BO-1051, an N-mustard derivative, and involves the ATM signaling pathway. *Biochem Pharmacol.* 81:594-605.)。

【0082】 9. 螢光素酶活性測定法

【0083】 STO細胞係於24孔組織培養碟中生長至70%匯流然後在0.2 μg 之pGL3-PARP啟動子螢火蟲螢光素酶 (promoter firefly luciferase) 或PARP啟動子突變體及10ng之SV40水母螢光素酶質體 (SV40 Renilla luciferase plasmids, Promega) 的存在下以0.2 μg 之pMXs與pMXs-c-Myc共轉染。後轉染二十四小時, 於100 μl 訊息子溶解緩衝劑中收成細胞然後送至根據製造商協定之雙螢光素酶測定法 (雙-螢光素酶訊息子測定法系統(Dual-Luciferase Reporter Assay System), Promega)。

螢火蟲螢光素酶活性係對水母螢光素酶活性標準化, 且數據係以三個獨立實驗之平均標準偏差表現, 每者進行三重複試驗。

【0084】 10. 染色質免疫沉澱 (ChIP) 與小鼠PARP啟動子突變體之位置導向突變

【0085】 染色質免疫沉澱 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 之研究協定係根據製造商的指示 (EZ ChIP套組, Upstate) 使用抗-c-Myc (sc-764, Santa Cruz) 抗體。具有缺失或點突變株之小鼠PARP啟動子係由根據製造商指示之位置導向突變而創造 (Phusion定點突變套組(Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit), Finnzymes), 且所有突變體係使用PARP (-2000) 作為模板以放大之。放大的片段係以合適的前置引子以於反置引子中MluI切斷序列及HindIII切斷序列進一步放大之。然後, 在限制切斷位

置添加之PCR產物被次選殖入pGL3螢光素酶訊息子質體。於ChIP測定法中由沉澱的錯合物析出之DNA針對PARP啟動子的片段放大。作為ChIP研究之陽性對照組，c-Myc鍵結至其訊息目標、細胞週期蛋白D2啟動子（Bouchard等人，1999，Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. EMBO. 18:5321-5333.）。

【0086】 11. 西方墨點轉漬分析及免疫螢光染色

【0087】 西方墨點轉漬係如先前描述進行（Li等人，2011）。針對免疫染色，將細胞在蓋玻片上培養，以4%聚甲醛固定，且以0.5% Triton X-100滲透化。細胞以單株的抗-SSEA1抗體（Abcam）與抗-Oct4單株的抗體（Cell Signaling）染色，然後在Olympus顯微鏡下顯現前以經螢光團標記之二級抗體（Jackson Immunoresearch）、Hoechst及DAPI（Sigma）培育。

【0088】 12. 藉由胚囊注射製造嵌合體小鼠

【0089】 小鼠iPS細胞（衍生自C57BL/6J品系，黑毛色）引入至來自C57BL/6J-Tyrc2J品系（白化體）之小鼠胚囊係如先前描述且含一些修飾進行（Sung等人，2006，Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. Nat Genet. 38:1323-8.）。成體嵌合體藉由毛色確認，顯示iPSCs係負責於產生成體嵌合小鼠。此研究由台灣中研院基因轉殖鼠模型核心實驗室所協助。

【0090】 13. 統計分析

【0091】 結果係以平均值 \pm SD報告。統計分析係使用Student's t檢定或單因子或二因子變異數分析（ANOVA），如適當，接著Turkey測試而進行。

存活率分析係使用對數等級檢定進行。結果在 $P < 0.05$ 下認為是統計上有意義的。

【0092】 II. 結果

【0093】 1. 於重新編程及多能細胞中增加的Parp與PAR基化活性

【0094】 使用蛋白質體學質譜分析之近來研究已確認iPSCs和ESC的蛋白質體譜之間顯著的近似性（Jin等人，2011，Analysis of differential proteomes of induced pluripotent stem cells by protein-based reprogramming of fibroblasts. *J Proteome Res.* 10:977-89；Munoz等人，2011，The quantitative proteomes of human-induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Mol Syst Biol.* 7:550；Phanstiel等人，2011，Proteomic and phosphoproteomic comparison of human ES and iPS cells. *Nat Methods.* 8:821-7.）。然而，此等研究係以整體細胞溶解產物進行，且並未專注於核事件之分化調節。於吾人之先前工作中，吾人藉由過度表現四種基因Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc（OSKM；Re-7 iPSC株）或三種基因（OSK不含c-Myc）（Li等人，2011）而產生了小鼠iPSCs。為了辨別體細胞及重新編程的多能細胞間核蛋白質譜的差異，製備來自MEFs與Re-7 iPSCs之核蛋白質萃取物。此等萃取物然後藉SDS-PAGE（圖1A）被分離至五個部份。首先，吾人使用1D LC-MS/MS建立了此等核萃取物之分化表現輪廓。基於基因本體（GO）資料庫分析，於iPSCs之核蛋白質輪廓中表現量增加調節（upregulated）主要過程包括關於RNA加工、染色質包裝與再成型、細胞結構與機動性、及蛋白質生物合成之彼等者，以及涉及於mRNA轉錄與DNA複製之彼等者（圖1B）。此外，使用介於1D LC-MS/MS與2D-差異性凝膠電泳資料庫之間的統計比較分析，吾人鑑定了相對於MEFs之112個於iPSCs中最为表現量增加調節的核蛋白質。

【0095】 ESCs與iPSCs兩者維持其等之基因體穩定性與多能性，係藉由增強DNA修復及NHEJ活性，與已於ESCs與iPSCs兩者中發現高量的DNA修復蛋白質表現，包括Parp1、DNA ligIII、Rad51及XLF (Fan等人，2011，Human induced pluripotent cells resemble embryonic stem cells demonstrating enhanced levels of DNA repair and efficacy of nonhomologous end-joining. *Mutat Res.* 713:8-17.)。由Doege等人提供之漂亮的研究顯示Parp1係涉及在體細胞重新編程期間，於多能性所在地直接接續的轉錄誘導之表觀遺傳的修飾(Doege等人，2012，Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. *Nature.* 488:652-5.)。使用蛋白質體學分析及西方墨點轉漬 (圖1C)，吾人發現於iPSCs而非MEFs中核溶解產物之高Parp1表現量。Parp1之廣泛的特徵官能之一為藉由附接聚(ADP-核糖)鏈 (PAR基化) 之目標蛋白質的後轉譯修飾 (Krishnakumar與Kraus，2010)。使用聚(ADP-核糖)親和樹脂以拉下PAR基化蛋白質，吾人進一步示範了相較於MEFs中，於iPSCs中Parp1為最高度表現的PAR基化蛋白質 (表1)。

表1：

no	蛋白質名稱	登錄	基因名稱	MW (kDa) / pI	pep # (獨特)	PEP
1	聚[ADP-核糖] 聚合酶 1	P11103	Parp1	113.10 / 9.05	70(17)	<1.00E-307
2	FACT 錯合次 單元 SPT16	Q920B9	Supt16h	119.82 / 5.50	16(16)	5.92E-148
3	聚[ADP-核糖] 聚合酶 2	O88554	Parp2	63.40 / 8.65	15(15)	3.28E-134
4	類-染色質域- 解旋酶-DNA- 結合蛋白質 1	Q9CXF7	Chd11	101.44 / 6.20	11(11)	1.54E-54
5	DNA連接酶3	P97386	Lig3	113.07 / 9.16	10(10)	3.32E-104
6	FACT 錯合次	Q08943	Ssrp1	80.86 /	4(4)	9.96E-09

7	單元 SSRP1 富含白胺酸重 複非飛行-交 互作用蛋白質 2	Q91WK0	Lrrfip2	6.33 47.15 / 5.54	3(3)	4.01E-61
8	X-射線修復 交錯互補蛋白 質 6	P23475	Xrcc6	69.48 / 6.35	3(3)	2.00E-10
9	X-射線修復 交錯互補蛋白 質 1	Q60596	Xrcc1	68.97 / 5.97	3(3)	8.30E-07
10	剪接因子 U2AF 35kDa 次單元	Q9D883	U2af1	27.82 / 9.09	2(2)	3.35E-34
11	蛋白質永久同 系物	Q9R1X4	Timeless	137.50 / 5.36	2(2)	1.11E-22
12	核仁 RNA 解 旋酶 2	Q9JIK5	Ddx21	93.55 / 9.19	2(2)	3.57E-05
13	U1 小核核糖 核蛋白A	Q62189	Snrpa	31.84 / 9.81	2(2)	3.52E-04
14	酪胺醯基 -DNA 磷酸二 酯酶 1	Q8BJ37	Tdp1	68.69 / 7.67	2(2)	1.81E-04
15	Aprataxin及類 PNK因子	Q9D842	Aplf	54.97 / 5.05	2(2)	2.55E-03
16	複製蛋白質A 70kDa DNA 結合次單元	Q8VEE4	Rpal	69.04 / 8.13	2(2)	2.24E-03
17	核中的細胞凋 亡性染色質凝 結引發子	Q9JIX8	Acin1	150.72 / 5.71	1(1)	3.75E-10
18	不均勻的核中 核糖核蛋白 A3	Q8BG05	Hnrnpa3	39.65 / 9.10	1(1)	5.56E-05
19	易裂X心智遲 滯蛋白 1同系 物	P35922	Fmr1	68.99 / 7.27	1(1)	4.56E-03
20	無髮的重組結 合蛋白抑制因 子	P31266	Rbpj	58.54 / 8.43	1(1)	2.56E-03
21	剪接因子 U2AF 65kDa 次單元	P26369	U2af2	53.52 / 9.19	1(1)	1.14E-03

【0096】 因此，吾人進一步試圖闡明Parp1與PAR基化是否可於促進細胞的重新編程與維持多能性中扮演重要角色。明顯地，Parp1蛋白質，以及Oct4、Nanog及c-Myc，係於全細胞溶解產物中及於Re-7 iPSCs之核部份中為表現量增加調節的（圖1C）。於以OSKM（Re-7細胞）或OSK、Yamanaka博士之iPSC株（miPSCs）與ESC產生之iPSCs中一致地觀察到此伴隨著增加的PAR基化活性之Parp1的表現量增加調節（圖1C）。Parp1與PAR基化，以及此等多能性因子，於MEFs中完全無法偵測（圖1C）。在重新編程過程將MEFs轉換成iPSCs期間，Parp1與Oct4、Sox2、Nanog及c-Myc在OSKM之轉染後為表現量增加調節的，且此等蛋白質在重新編程之誘導15日後達到最大表現（圖1D，上方）。於重新編程過程期間亦觀察到增加的PAR基化活性（圖1D，下方）。此外，吾人分析PAR基化是否被Re-7 iPSCs之分化所影響。與Parp1之表現量減少調節（downregulation）相似，PAR基化活性於iPSC-衍生的胚樣體（EBs）中呈現時間相關性方式顯著的降低（圖1E）。分化成不同譜系係由特定的程序誘導。類神經元、類骨（中胚層）與類肝（內胚層）細胞係分別由免疫螢光、茜素紅與PAS染色確認（圖1F，左側）。在Re-7 iPSCs以每種程序分化至不同譜系後，西方墨點轉漬顯示了Parp1蛋白質、以及Parp2、拓樸異構酶II α 、Klf4、Oct4與Sox2係實質上為表現量減少調節的（圖1F，右側）。一同考慮，重新編程與三胚層分化期間Parp1/PAR基化活性之分化輪廓建議了Parp1/PAR基化可能於重新編程效率的調節及獲取多能性質扮演重要角色。

【0097】 2. Parp1與PAR基化調節iPSC重新編程之效率

【0098】 吾人接著評估PAR基化之抑制或Parp1之剔降是否干擾細胞重新編程。為了調查Parp1於重新編程過程早期階段之角色，吾人首先藉由西方墨點轉漬法確認於兩個由MEF衍生的iPSC株在OSKM轉染11日後Parp1剔降的效果。於兩個Parp1剔降之重新編程的株體中，在重新編程後11日時Parp1表現為幾乎無法偵測（圖2A）。以OSKM與shRNA轉染的細胞之兩株體對抗Parp1（OSKM+shParp1）具有顯著減少的自我更新與增生性的能力（圖2B），形成了較小的株體，且相較於以混碼的對照shRNA（OSKM+混碼shRNA）轉染的細胞對ALP染色為較低陽性（圖2C）。同時，所得的ESC標記（包括Oct4與SSEA-1）係藉此Parp1剔降顯著抑制的（圖2D）。為了進一步證實Parp1促進細胞重新編程，吾人於MEFs中以OSKM或OSK使用慢病毒屬轉染系統同時過度表現Parp1。西方墨點轉漬法確認了在重新編程後11日時Parp1的過度表現（圖2E）。吾人接著檢驗在重新編程後21日時對iPSC產生之效率上Parp1剔降或過度表現的效果。Parp1過度表現顯著地增強於以OSKM或OSK轉染的MEFs中重新編程效率（圖2F，分別於左側與中間）。明顯的，Parp2過度表現亦增強於以OSK轉染的MEFs中重新編程效率（圖2F，右側），但Parp2過度表現的效果係顯著地低於Parp1過度表現之效果。更甚者，各種PAR基化抑制劑的投予在重新編程後21日時一致地導向由OSKM誘導之iPSC產生效率的減少（PJ-34：圖2G，左側；ABT-888與3-胺基苯甲醯胺：數據未顯示）。由慢病毒遞送的shRNA所製之Parp1剔降株導致iPSC產生效率的顯著抑制（圖2G，中間），及Parp2剔降株在重新編程後21日時亦在類似程度下壓制iPSC產生（圖2G，右側）。綜而言之，此等數據顯示調變Parp1

與PAR基化活性影響了重新編程效率與iPSCs之多能狀態，顯示Parp1與PAR基化對核重新編程為重要的。

【0099】 3. 於OSKM重新編程程序中以Parp1取代Klf4或c-Myc而製造iPSCs與產生嵌合體動物

【0100】 c-Myc，一種原致癌基因，係對增強重新編程效率為必要的因子，但其亦增加重新編程的體細胞之致腫瘤性的風險（Nakagawa等人，2010，Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:14152-7.）。因為Parp1可增加於OSK-轉染程序中iPSC產生之效率，吾等調查了以Parp1取代Klf4與c-Myc之潛力。引人注目地，具有Parp1之OS(OSP)的iPSC之重新編程效率係顯著高於OSK之效率，但係類似於c-Myc共轉染之OS(OSM；圖3A)。吾人接著試圖調查Parp1所介導的重新編程與iPSC產生對細胞循環的相關性。細胞循環分析顯示Parp1過度表現於MEFs中相對於母體MEFs或以對照載體轉染的MEFs，並未顯示效果（圖3B）。此外，吾人觀察到重新編程後11日時於以OSK及OSP轉染的MEFs中細胞循環推移至S-階段（圖3B）。此推移亦於多能幹細胞中觀測到，包括mESCs、Yamanaka博士的iPSC株(miPSCs)，及由OSK或OSP的轉染化產生之iPSCs（數據未顯示），如先前所描述（Fujii-Yamamoto等人，2005，Cell cycle and developmental regulations of replication factors in mouse embryonic stem cells. J Biol Chem. 280:12976-87.）。此等數據指示重新編程效率與iPSC產生上之Parp1效果為與細胞循環相獨立的。此外，在Nanog-GFP訊息子MEF株中重新編程期間，OSP轉染活化了Nanog-GFP的表現（圖3C）。OSP-重新編程的iPSCs之高繼代係對小鼠ESCs之標記，諸如ALP活性（圖3D）、類ESC基因特徵（圖3E）、特定階段的胚胎的抗原（SSEA-1）及Oct4，

以及幹細胞性因子的蛋白質（圖3F）為穩定陽性的。亞硫酸氫鹽定序顯示，於OSP-iPSCs中Oct4與Nanog之啟動子，相較於母體MEFs具有甚為較低之甲基化狀態（圖3G）。重要的是，於此等iPSCs轉殖至裸小鼠之背部側邊後六週，吾人觀察到包含多種組織之畸胎瘤的形成，包括神經元上皮（外胚層）、軟骨與角質細胞（中胚層）及平滑肌（中胚層）（圖3H，上方及左下方）。此外，吾人注射此等OSP-iPSCs至接著被移植至擬懷孕小鼠之子宮的胚囊。成體嵌合體藉由毛色確認，示範了OSP-iPSCs係負責於產生成體嵌合小鼠（圖3H，右下方）。此等觀察顯示Parp1過度表現在c-Myc或Klf4不存在下有效率地增強小鼠體細胞至iPSCs之重新編程。

【0101】 4. c-Myc為Parp1與PAR基化的直接調節子

【0102】 假使Parp1於重新編程期間之表現量為增加調節的，吾人假設一或多種外生性的轉錄因子Oct4、Sox2、Klf4及c-Myc可為誘導Parp1表現及PAR基化活性的上游調節子。因此，吾人評估個體或結合Yamanaka的因子於MEFs中在Parp1表現及PAR基化活性上強制表現的效應（圖4A）。基因轉染化五日後，單獨c-Myc或OSM與OSKM之轉染的強制過度表現導致於MEFs中Parp1蛋白質表現以及PAR基化活性實質增加（圖4A）。為了進一步處理Parp1是否為重新編程過程中c-Myc之主要下游效應子之議題，吾人於MEFs中剔降了c-Myc與過度表現的Parp1加OSK。此結果表示Parp1的過度表現補償了c-Myc剔降且允許沒有c-Myc之有效率的重新編程（圖4B）。此外，c-Myc剔降顯著地阻擋ALP活性（數據未顯示），且抑制了於iPSCs中Parp1、Oct4、Sox2、Klf4及Nanog之蛋白質量以及PAR基化活性（圖4C）。綜而言之，此等結果顯示由c-Myc部份調節的Parp1與Parp1具相關性的PAR基化之

活化於促進重新編程與維持幹細胞的多能狀態中扮演重要角色。

【0103】 吾人接著決定c-Myc是否藉由融合Parp1啟動子至螢光素酶訊息子質體並與c-Myc共-表現訊息子而調節Parp1表現。鑑定了於Parp1的近端啟動子域（-2000至-100鹼基對）中三個推定的c-Myc-結合位置且缺失構築體於螢光素酶訊息子質體中複製（圖4D）。共轉染化實驗顯示c-Myc活化了含有三（-2000）或二近端（-1100）c-Myc結合位置的Parp1啟動子之轉錄活性。反之，缺少c-Myc-C1與c-Myc-C2（-600）的Parp1啟動子缺失突變體抑制了c-Myc-活化的Parp1轉錄（圖4E），顯示C2為回應c-Myc活性的重要位置。不具有所有三個c-Myc結合位置（-125）或於C2具有點突變（c-Myc-C2 mt）的Parp1啟動子構築體一致地無法由c-Myc刺激。為了調查c-Myc是否可直接的結合至於Parp1啟動子域中C2 c-Myc結合位置，吾人使用C1、C2與C3引子組進行染色質免疫沉澱（ChIP）測定法（圖4F）。結果顯示內生的c-Myc的確僅結合至Parp1啟動子的C2位置、而非C1或C3位置。作為陽性對照組，c-Myc結合至其報告的目標：週期蛋白D2啟動子。圖4G顯示圖4F中ChIP與定量PCR（qChIP）之結果。此等數據強烈地表示含C2的Parp1啟動子域對於iPSCs中Parp1的最大活性為必需的。吾人一同示範了c-Myc為Parp1與PAR基化的直接調節子。

【0104】 5. 於多能與分化狀態中PAR基化目標及Parp1/PAR基化-關聯的蛋白質之表現量之鑑定

【0105】 PAR基化係先前認為的Parp1之主要催化功能；吾人因此試圖鑑定於多能幹細胞中涉及Parp1-介導的PAR基化之蛋白質。吾人使用聚

(ADP-核糖)親和樹脂以拉下於iPSCs與MEFs中PAR基化的蛋白質。iPSCs中以LC-MS/MS鑑定的PAR基化的蛋白質係列於表1中。於此等候選的蛋白質中，Parp1、Chd1L、DNA連接酶III、Ssrp1、Xrcc6與Parp2係由LC-MS/MS鑑定為每蛋白質具有多於3胜肽。為了確認此等結果，吾人使用特定抗體的西方墨點轉漬法以偵測此等候選蛋白質的表現。相比於輸入（總溶解產物）欄，於陰性對照欄（具有突變的親和域之樹脂）中未有可偵測的訊號，且從此六個蛋白質之特定訊號僅於接續PAR親和樹脂純化之iPSCs中觀察到（圖5A），吾人試圖進一步評估於重新編程過程及多能幹細胞中此等候選蛋白質之表現輪廓。首先，吾人發現Chd1L、DNA連接酶III、Ssrp1與Xrcc-6的總蛋白質量於MEF溶解產物中為適度的，且於重新編程過程中逐漸地增加（圖5B）。Chd1L的總蛋白質表現與多能性之關聯並未如其與重新編程狀態同等強烈（圖5B）。反之，當使用PAR親和樹脂以從總細胞萃取物拉下此等候選蛋白質時，所有候選蛋白質於重新編程過程中逐漸地被PAR基化，且此等蛋白質之最大PAR基化係見於iPSCs、Yamanaka的miPSC株（miPSC）及mESCs中，而非於MEFs中（圖5C）。顯著地，如藉由拉下測定法所偵測，重新編程中Parp2量D6與D12相較於Parp1未顯著地改變（圖5B與5C）。共免疫沉澱進一步確認了Parp2、Chd1L、DNA連接酶III、Xrcc-6及Ssrp1和Parp1交互作用以形成錯合物（圖5D）。為了探索分化是否影響PAR基化的蛋白質之表現，比較對照組（細胞溶解產物的總待驗量；圖5E）與從iPSC衍生的胚胎體(EBs)的PAR樹脂拉下者（pull-downs）（圖5F）。於總待驗量中，在ED分化後3日、6日與9日時沒有六個蛋白質的顯著變化（圖5E）。PAR基化的

Parp1、Chd1L、DNA連接酶III、Ssrp1、Xrcc-6與Parp2的表現於iPSC-衍生的EBs之分化過程期間係降低的（圖5F）。顯著地，此等六個PAR基化的蛋白質之表現量在EBs分化9日後為顯著地表現量減少調節的（圖5F）。此等數據建議於重新編程期間Chd1L、DNA連接酶III、SSrp1、Xrcc-6/Ku-70與Parp2的PAR基化的量增加，且於細胞的多能狀態中為高的，但於分化過程期間為減少的。

【0106】 此外，吾人進一步探索Parp1於後轉譯修飾中的角色以獲得對於多能幹細胞中PAR基化的蛋白質之功能性結果的分化圖樣之額外深入了解。以IPA軟體套裝使用基因網路分析以建構網路模組，吾人發現Parp1可能為調節相關於DNA修復的途徑、染色質修飾、多齒蛋白（polycomb）錯合物及組織蛋白修飾之關鍵因子。引人注目地，生物資訊分析揭露了由Parp1所PAR基化的蛋白質於核重新編程之核網路及多能狀態中顯著地與Oct4、Nanog、c-Myc、Klf4、CTNNB1、WDR5、SUZ12、EZH2、DNMT3A/B及JARID2交互作用（圖6）。此外，吾人進一步探索Parp1於後轉譯修飾中的角色以獲得對於多能幹細胞中PAR基化的蛋白質之功能性結果的分化圖樣之額外深入了解。以IPA軟體套裝使用基因網路分析以建構網路模組，吾人發現Parp1可能為調節相關於DNA修復的途徑、染色質修飾、多齒蛋白（polycomb）錯合物及組織蛋白修飾之關鍵因子。引人注目地，生物資訊分析揭露了Parp1-PAR基化的蛋白質於核重新編程之核網路及多能狀態中顯著地與Oct4、Nanog、c-Myc、Klf4、CTNNB1、WDR5、SUZ12、EZH2、DNMT3A/B及JARID2交互作用（圖6）。

【0107】 總之，使用蛋白質體學方法，吾人比較了MEFs、ESCs與iPSCs間核蛋白質表現譜，且吾人鑑定了Parp1為核重新編程與多能性的樞紐調節子。吾人的數據示範了Parp1的表現與PAR基化於重新編程期間增加且於分化上減少。Parp1於促進iPSC製造及產生具有Oct4/Sox2-轉染的細胞之嵌合體小鼠中取代Klf4與c-Myc（圖3）。吾人進一步顯示c-Myc直接地結合至Parp1啟動子以增強其表現，導致增加的PAR基化活性。以OSK加RNAi取代c-Myc轉染的MEFs之減少的重新編程效率由異位的Parp1所恢復（圖4）。最後，吾人顯示Parp1與數種DNA修復-關聯的蛋白質與染色質再成型-關聯的蛋白質交互作用，其於重新編程的與多能的細胞中係高度表現的且PAR基化的（圖5）。此等數據指示（部份經由內生的c-Myc之）Parp1與PAR基化的活化有效地促進核重新編程與多能性的維持。

【0108】 實施例 - (II)

【0109】 I. 呼吸器-誘導的肺傷害模型

【0110】 急性肺傷害（acute lung injury，ALI）與急性呼吸窘迫症候群（acute respiratory distress syndrome，ARDS）為急性呼吸衰竭之疾病且顯然的為非心源性的肺水腫、呼吸窘迫與低血氧症。於患者中高潮氣容積-誘導的機械通氣已顯示增加於肺中病態的過度膨脹之風險、引出發炎性媒介子的產生、新生發炎性細胞與最終誘導一類型的ALI，稱為呼吸器-誘導的肺傷害（ventilator-induced lung injury，VILI）。近來，間質幹細胞（mesenchymal stem cells，MSCs）調節發炎反應之治療效能已於敗血症-誘導的ALI中示範（Mei SH et al. Am J Respir Crit Care Med 2010;

182:1047-1057；與Chien MH et al. Crit Care Med 2012; 40:1245-1253)。另一研究進一步指示MSC療法通過角質細胞生長因子-仰賴的旁分泌機制增強了於VILI中的肺修復（Curley GF et al. Thorax 2012；67:496-501）。然而，改善ALI或VILI之基於幹細胞療法的生物分子機制仍然未知。

【0111】 1. 材料與方法

【0112】 1.1 藉由轉導Oct4/Sox2/Klf4之iPSC產生

【0113】 小鼠胚胎的纖維母細胞（Mouse embryonic fibroblasts，MEFs）係藉由如先前描述之Oct4/Sox2/Klf4（OSK）的異位的轉染化重新編程為iPSCs（Li HY et al. Biomaterials 2011; 32:5994-6005）。將未分化的iPSCs培養於非活化的MEF上，且形成非常近似於ESCs之株體。此等iPSC株體係對鹼性磷酸酶（AP）與SSEA-1呈陽性，分別藉由AP與免疫螢光染色偵測。吾人使用胚樣體形成及各種分化協定調查此等iPSCs之多能性。iPSCs係可以分化為類軟骨細胞、類骨細胞及類肝細胞與神經元譜系的細胞（數據未顯示）。

【0114】 1.2 實驗動物

【0115】 重量介於20與25 g間、年齡介於6與8週間的雄性C57BL/6係得自於Jackson實驗室（巴哈伯，ME）及國研院動物中心（台北，台灣）。VILI的小鼠模型係如先前描述的建立（Li LF et al. *Respir Res* 2011；12:90）。於每個實驗中將動物隨機地分配至七個群組：群組1，對照組，具有磷酸鹽-緩衝的鹽水（phosphate-buffered saline，PBS）之未通氣的小鼠；群組2，對照組，具有誘導的多能細胞（iPS）細胞之未通氣的小鼠；群組3，具有

PBS之 V_T 6 ml/kg小鼠；群組4，具有PBS之 V_T 30 ml/kg小鼠；群組5，具有小鼠胚胎的纖維母細胞（MEF）之 V_T 30 ml/kg小鼠；群組6，具有iPSCs之 V_T 30 ml/kg小鼠；群組7，具有經iPSCs的調節培養基之 V_T 30 ml/kg小鼠；（對每個依凡氏藍染料（Evans blue dye, EBD）測定法 $n = 5$ ，肺沖提液灌洗（bronchoalveolar lavage, BAL）全蛋白質、肺水、嗜中性球細胞、髓過氧化酶（myeloperoxidase, MPO）、HMGB1與PAI-1 mRNA、免疫組織化學（immunohistochemistry, IHC）、終端去氧核苷酸基轉移酶-介導的dUTP-生物素原位末端標記（TUNEL）、蘇木精與曙紅（hematoxylin and eosin, H&E）染色； $n = 3$ 對電子顯微術）。

【0116】 1.3 反轉錄-聚合酶鏈反應

【0117】 為了分離總RNA，將肺組織於TRIzol試劑中（Invitrogen Corporation, 卡耳斯巴德, CA）根據製造商的指示均質化。將總RNA（1 μ g）藉由使用GeneAmp PCR系統9600（PerkinElmer, Life Sciences, Inc., 波士頓, MA）如先前描述反轉錄（Li LF et al. *Respir Res* 2011; 12:90）。

【0118】 1.4 肺傷害的評估

【0119】 肺水的分析、依凡氏藍染料分析、VILI的組織病理學分級、細胞計數以及髓過氧化酶測定法係於Chien MH等人中描述（*Crit Care Med* 2012; 40:1245-1253）。

【0120】 為了PAI-1與HMGB1的測量，在研究期間的最後將肺經由氣管造口術以20-隔板血管造影導管（angiocatheter）（假滴注）及0.6 ml的0.9%正常鹽水灌洗3次。將流出物聯合並在2,000 rpm下離心10 min。為了細胞介

素的進一步分析，將上清液在 -80°C 下冷凍。具有偵測極限下限為 0.02 ng/ml 之PAI-1與具有偵測極限下限為 1 ng/ml 之HMGB1係於BAL流體中使用商業可得、含有對大鼠及小鼠PAI-1具有交叉反應性之抗體的免疫分析套組測量（Molecular Innovations, Inc.，南菲爾德，MI）及HMGB1（Shino-Test corporation，神奈川，日本）。每個樣品係根據製造商的指示進行二重複實驗。

【0121】 為使用穿隧式電子顯微術，將肺在 4°C 下固定於3% 戊二醛於 0.1 M 二甲基胍酸鹽緩衝液中（ $\text{pH } 7.4$ ） 1 h 。然後將肺後固定（postfixed）於1% 四氧化鐵（ $\text{pH } 7.4$ ）中，於階層系列的乙醇中脫水，且嵌入EPON-812中。切下薄的切面（ 70 nm ），以醋酸氧鈾及檸檬酸鉛染色，並於Hitachi H-7500 EM穿隧式電子顯微鏡（Hitachi, Ltd.，東京，日本）上檢查。

【0122】 1.5 統計評估

【0123】 肺水、BAL總蛋白質、EBD測定法、PAI-1與HMGB1、MPO及組織病理學測定法之數據係使用Statview 5.0（Abacus Concepts Inc. Cary, NC; SAS Institute, Inc.）分析。使用ANOVA評估差異之間的統計顯著性，接著藉由以雪費（Scheffe）檢定之多重比較，以及 P 值 < 0.05 係認為是統計上有意義的。

【0124】 2. 結果

【0125】 2.1 IPSCs或iPSC-條件化培養基減弱了高潮氣容積-誘導的

VILI

【0126】 吾人以大氣空氣施用高潮氣容積（ $V_{T30}\text{ ml}$ ，註記為 V_{T30} ）

通氣4小時以誘導於雄性C57BL/6小鼠中之VILI，並檢查靜脈內傳輸iPSCs或iPSC-條件化培養基（iPSC-CM）之治療效果。概略的病理學發現指示在 V_T30 機械性通氣下動物肺受傷害，但在低潮氣容積（ V_T6 ml，註記為 V_T6 ）下則無，顯示了出血的圖樣、嚴重的鬱血及因為水腫的擴大（圖7A）。 V_T30 亦增加了肺的依凡氏藍染料（EBD）含量、肺沖提液灌洗（BAL）總蛋白質以及濕-對-乾的比例，指示血管的滲漏。然而，相比於非通氣的小鼠， V_T6 未顯示於此等參數上的效應（圖7B-7D）。由 V_T30 誘導的巨觀的肺鬱血及血管滲透性的提昇並未因MEF治療影響，但實質上因以iPSCs或iPSC-條件化培養基之治療而抑制（圖77B-7D）。此外，當相比於非通氣小鼠或者接收 V_T6 之小鼠，具 V_T30 之 PaO_2/FiO_2 比例（氣體交換的指數）係顯著地惡化（圖7E）。引人注目地，具有 V_T30 於充氧的減少係藉由投予iPSCs或iPS-CM而顯著地改善。因此，此等數據建議iPSCs或iPSC-條件化培養基改善微血管的滲漏、肺水腫、總肺傷害及幫助因 V_T30 誘導的VILI模型中恢復呼吸功能。

【0127】 2.2 iPSCs或iPSC-條件化培養基抑制了VILI-關聯的發炎性反應

【0128】 吾人接著檢查iPSCs或iPSC-條件化培養基是否導致於此VILI模型中結構的恢復。組織學檢查揭露了 V_T30 導致肺泡的鬱血、出血、肺泡壁的增厚及嗜中性球的滲浸，其係因iPSCs或iPSC-條件化培養基的投予而有大幅度的恢復（圖8A）。肺傷害分數定量確認了 V_T30 -誘導的嚴重損傷以及iPSCs與iPSC-條件化培養基的治療潛力（圖8B）。嗜中性球的計數與髓過氧化酶（MPO）測定法揭露了當相比於非通氣小鼠或接收了 V_T6 之小鼠，

嗜中性球在 V_T30 下的機械性通氣後遷移至小鼠中受傷的肺位置（圖8C與8D）。同時，HMGB1與PAI-1蛋白質量對 V_T30 治療反應而提昇（圖8E與8F），指示於此模型中對嗜中性球之化學吸引因子之表現量增加的調節。顯著地，iPSC或iPSC-CM減弱嗜中性球遷移及HMGB1與PAI-1蛋白質量提昇（圖8C-8F）。iPSC或iPSC-條件化培養基於肺傷害分數上與嗜中性球遷移的抑制效果為劑量-依附的，且於接收 5×10^5 iPSC/kg或對應的iPSC-條件化培養基（數據未顯示）於高潮氣容積-誘導的ALI中觀察到最大的抑制。此等數據示範iPSCs與iPSC-條件化培養基兩者減弱嗜中性球滲浸及於高潮氣容積-誘導的ALI中之發炎反應。

【0129】 2.3 藉由iPSC-CM之超微結構的復原

【0130】 穿隧式電子顯微術(Transmission electron microscopy, TEM)顯示了 V_T30 而非 V_T6 之投予導致了於MEF或PBS接收者中呼吸道超微結構的急性傷害（圖9A）。iPSCs或iPSC-條件化培養基之投予一致地回復了於接收者中呼吸道的超微結構（圖9A）。基於iPSCs與iPSC-條件化培養基在VILI上恢復再生的效果之觀察（圖7與圖8），iPSCs發揮於主導地旁分泌方法中其等之保護功能。除了於呼吸參數上的效果，嗜中性球的滲浸與化學吸引因子表現以外，吾人調查了 V_T30 與iPSC-條件化培養基投予對於接收者中巨噬細胞發炎性蛋白質-2 (macrophage inflammatory protein-2, MIP2) 的表現、硝酸鹽/亞硝酸鹽、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 與來自肺組織之總巯胱甘肽 (glutathione, GSH) 上之效果。隨著VILI的誘導， V_T30 招來了MIP2化學吸引因子與硝酸鹽/亞硝酸鹽的產生、MDA含量與降低的GSH產生（圖

9B-9E)。顯然地，iPSC-條件化培養基投予有效地抑制了於接收者中MIP2之表現量增加的調節、硝酸鹽/亞硝酸鹽與MDA的產生，但提昇了GSH產生（圖9B-9E）。此外，吾人於細胞介素陣列中發現數種細胞介素（包括uPA與TIMP-4）係由iPSCs分泌至調節的培養基（圖9F）。

【0131】 2.4 IP-10係涉及於VILI中iPSC-CM之修復的反應

【0132】 IP-10、由IFN- γ (MIG) 誘導的單核球介素 (monokine) 與IFN- γ 可誘導性T-細胞化學吸引因子 (iTAC) 為三種結合至一般受器CXCR3之趨化激素。此三種趨化激素可由INF- γ 誘導。於此等趨化激素間，IP-10已展現了對抗肝炎、肺的纖維化與心肌梗塞之保護能力，且已涉及組織修復及再成型。據此，吾人調查IP-10是否涉及於V_T30-誘導的VILI模型中iPSC-CM的修復效果。定量RT-PCR顯示V_T30溫和地增加了IP-10與MIG之表現（圖10A），但於CXCR3表現上未顯示效果（數據未顯示）。iPSCs的移植大大地增加了IP-10與MIG的表現，而iPSC-條件化培養基之單獨投予適度地增加其等的量（圖10A）。ELISA數據揭露了iPSCs與iPSC-條件化培養基刺激了對其RNA量類似的IP-10分泌圖樣（圖10B）。為了檢查IP-10於iPSC-條件化培養基的修復效果中的貢獻，吾人藉由投予IP-10中和抗體（IP-10 nAb）評估了IP-10中和的效應。單獨的IP-10 nAb顯著地損害結構改變、肺傷害分數、嗜中性球的滲浸及於V_T30-處理的小鼠中PaO₂/FiO₂比例。IP-10 nAb亦實質地阻擋由iPSC-CM對此等參數上產生之修復效果（圖10C-10E）。一同考慮，此等發現示範了IP-10作為樞紐的角色且係涉及於VILI中iPSC-條件化培養基對呼吸道結構的損傷與充氧能力之修復效果。

【0133】 II. 博來黴素-誘導的肺發炎模型

【0134】 於急性呼吸窘迫症候群（acute respiratory distress syndrome, ARDS）期間臨床地表露肺的纖維化，其具有致死率高達40%，且於自發性的肺纖維化（idiopathic pulmonary fibrosis, IPF）期間臨床地表露肺的纖維化，其特徵在於攻擊性纖維化過程及表現出對全身健康之主要負擔。博來黴素於動物研究中已用於模型化纖維的肺傷害，因於動物中博來黴素-誘導的肺損傷之特徵包括肺泡的上皮之急性發炎性傷害、接著不可逆的纖維化，其係與ARDS與IPF之症狀重疊。纖維化之延伸亦與初始傷害的嚴重性呈比例。博來黴素的氣管內投予僅需要單一劑量以造成傷害與纖維化，且纖維化於14日後開始並於21-28日後發生最大反應。先前的研究已發現發炎在早期即減緩可導致如膠原蛋白沉積之後續事件的減弱（Moodley Y et al. Am J Pathol 2009; 175:303-313）。因此，發展對於肺纖維化病因之早期期間對改良肺的損傷之有效策略係最優先的。

【0135】 1. 材料與方法**【0136】 1.1 iPSC產生、iPSC培養與調節培養基的製備**

【0137】 小鼠iPSCs，其表現近似於ESC的基因特徵（亦即Oct4、Sox2、Nanog、Klf-4、Fbx5、Eras、Dppa5a與Rex1的表現與多能狀態），係藉由引入三種基因（Oct4/Sox2/Klf4）且不包括c-Myc而建立。簡言之，鼠的iPSCs係從衍生自13.5日大的胚胎衍生的C57/B6小鼠之胚胎纖維母細胞（MEFs）而產生。iPSCs係經由基於pMX的反轉錄病毒載體之轉導作用重新編程，該基於pMX的反轉錄病毒載體係以三種轉錄因子（Oct-4、Sox2與

Klf4) 根據描述於先前研究中的程序以及些微修飾而編碼 (Takahashi K et al. Cell 2006; 126:663-676)。在每一100-mm碟 3.6×10^6 細胞的密度下培育Plat-E 包裝細胞整夜。隔日，使用Fugene 6轉染化試劑 (Roche Applied Science, 印第安納波利斯, IN) 將以小鼠互補DNA編碼的基於pMX的反轉錄病毒載體引入Plat-E細胞。轉染化四十八小時後，收集含病毒的上清液用於目標細胞感染。在準備病毒感染中，轉導作用前一日於6孔板中每孔種入 8×10^5 MEFs。將含有病毒的上清液通過 $0.45\text{-}\mu\text{m}$ 過濾器過濾且補充 $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ 聚凝胺 (Sigma-Aldrich, 聖路易斯, MO)。混合各含有三種反轉錄病毒之一的等量上清液，轉移至纖維母細胞碟並培育整夜。在感染後，將細胞重新放置於新鮮培養基中。轉導作用六日後，將細胞通過SNL饋入層並使用小鼠ESC 培養基培養。選擇株體2至3周。

【0138】 針對小鼠iPSC培養，將未分化的iPSCs係被例行性地培養及於六-孔培養盤中於有絲分裂-鈍化的MEFs ($50,000$ 細胞/ cm^2) 上延展 (BD Technology, 富蘭克林湖, NJ)，其係在0.3%白血病抑制性因子(leukemia inhibitory factor, LIF)存在下、於由Dulbecco's Modified Eagle's培養基 (DMEM; Sigma-Aldrich) 所組成並以15%胎牛血清 (FBS; Invitrogen, 卡爾斯巴德, CA)、 100 mM 最小所需培養基非必要胺基酸 (Sigma-Aldrich)、 0.55 mM 2-巰基乙醇 (Gibco, 蓋瑟斯堡, MD) 及抗生素 (Invitrogen) 補充之iPS培養基中。每3至4日，殖株以0.2% 膠原蛋白酶IV (Invitrogen) 脫附、於單一槽中以0.025%胰蛋白酶 (Sigma-Aldrich) 與0.1%雞血清 (Invitrogen) 在磷酸鹽-緩衝的鹽水(PBS)中解離，且重新固定至MEFs上。

【0139】 針對經iPSC調節的培養基，將小鼠iPSCs以每 cm^2 20,000細胞放置並於10-ml體積的無血清基底培養基（DMEM-高葡萄糖（Gibco）與100 mM濃度的非必要胺基酸（Gibco）、0.3% LIF與1%的青黴素-鏈黴素）於10-cm碟（Corning Incorporated）中培育48 h。然後，收集於整體培養基中胰蛋白酶化的iPSCs並在1500 rpm下離心10 min以獲得待用於後續活體內實驗之調節培養基的上清液。

【0140】 1.2 實驗動物

【0141】 將8-10周大的C57BL/6J小鼠（來自國研院動物中心，台北，台灣）維持於12-h光-暗循環並提供其食物與水的自由取得。台北榮民總醫院之實驗動物使用的倫理委員會（Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals）認可了實驗步驟及程序，其亦符合「實驗動物照護及使用之指南」（Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）。

【0142】 C57BL/6J小鼠係在輕微麻醉下以50 μl PBS中1.5 U/kg硫酸博來黴素（Merk，達姆施塔特，德國）氣管內注射以誘導肺的纖維化。於指定實驗中，小鼠在誘導肺傷害24h後經由尾動脈注射接收了iPSCs（ 2×10^6 細胞於200 μl 的PBS；iPSC-處理的小鼠）或PBS 200 μl （PBS-處理的小鼠）。選擇肺傷害24h後細胞投予以最佳化於早期發炎期間的細胞併入肺中。針對中和抗體研究，在傷害之4h前與4h後給予小鼠兩劑（0.5 μg /劑，i.p.）的抗-IP-10 抗體（Abcam，ab9938，劍橋，UK）。

【0143】 進行進一步的實驗，其中將非重新編程的MEFs（ 2×10^6 細胞於200 μl 的PBS中；MEF-處理的小鼠）與來自經iPSCs的調節的培養基（200

µl的iPSC-CM) 在博來黴素-誘導的肺傷害24小時後注射入尾靜脈，分別作為細胞治療對照組與旁分泌治療。將動物於後-博來黴素注射3、7、14或21日之後犧牲，因為此等時間點代表最大發炎(3與7日)及纖維化(14與21日)的階段。將樣品自每支小鼠中收集以評估肺傷害，其係根據羥脯胺酸測定法、肺的生理學、組織學、免疫組織化學及細胞介素與髓過氧化酶(MPO)分析進行。

【0144】 1.3 組織學、阿士克羅夫特肺纖維化分數與形態分析

【0145】 將來自動物每個群組的肺在博來黴素-誘導的肺傷害7、14與21日之後切開。將肺組織固定於4%聚甲醛中，使用分級的乙醇系列脫水，嵌入石蠟區塊中，切成3-µm切面並以蘇木精與曙紅(H&E)使用標準的組織學技術染色。藉由兩個使用阿士克羅夫特評分法(Ashcroft T et al. *J Clin Pathol* 1988; 41:467-470)的分開研究進行肺纖維化嚴重性的組織病理學盲評估。肺纖維化係於根據以下準則以0至8的尺度評分：等級0，正常的肺；等級1-2，肺泡壁或支氣管壁的微小的纖維增厚；等級3-4，中度的壁增厚而沒有對肺架構的明顯損傷；等級5-6，增加的纖維化及對肺結構的明確損傷；及等級7-8，結構的嚴重變形與大的纖維化面積。跟隨於每個樣品中在100x放大下30個隨機選擇區域的檢查，將所有視野的平均分數作為對每個樣品的纖維化分數。根據破壞性指數值定量肺泡壁的破壞，其係使用先前描述的技术測量(Saetta M et al. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:764-769)。空域(airspace)尺寸係藉由使用修飾的Thurlbeck法(Thurlbeck WM. *Am Rev Respir Dis* 1967; 95:752-764)測量平均線性截距(Lm)而定量。簡言之，

在200x放大下30個視野係從每隻小鼠的兩個切片隨機的觀測，且進行於每個視野中的點計數。然後，總距離除以肺泡截距的數目提供了Lm的值。

【0146】 1.4 免疫組織化學

【0147】 使用一級抗體將Ly6C (Santa Cruz Biotechnology, 聖塔克魯茲, CA)、膠原蛋白I (Abcam, 劍橋, UK) 及 α -平滑肌肌動蛋白 (α -SMA) (Biomed, 福斯特城, CA) 作為目標進行免疫組織化學性染色。簡言之，將肺的石蠟切面去石蠟化及再水化。使肺切面經受抗原檢索並以過氧化酶-阻擋試劑阻擋。將切面以一級抗體在4°C下培育整夜。在洗滌後，將肺切面以SuperSensitive™系統山葵過氧化酶-標記的聚合物 (BioGeneX, 聖拉曼 (San Ramon), CA) 在室溫下培育1小時。然後將切面以3,3'-二氨基聯苯胺四鹽酸鹽 (BioGeneX, San Ramon, CA) 顯像並以蘇木精對比染色。為了定量地分析刮痕區域的IHC強度，每攝影視野之IHC訊號的百分比係使用Image Pro Plus軟體分析 (Media Cybernetics, Inc., 銀泉, MD)。計算15個隨機選擇的視野之平均值。

【0148】 1.5 羥脯胺酸測定法

【0149】 將來自冷凍肺組織的均質物在冰上於三氯醋酸中培育然後於12N HCl中烘烤。將樣品的等分試樣於蒸餾水中重組然後於1.4%氫胺T於10%異丙醇與0.5 M醋酸鈉中培育20 min。添加艾氏 (Erlich's) 溶液，然後將樣品在65°C下培育15分鐘。測量在550 nm之吸收度，並根據對標準曲線的比較決定羥脯胺酸的量。

【0150】 1.6 細胞介素ELISA陣列

【0151】 將用於ELISA之肺組織均質化於PBS中，具包含10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛胰蛋白酶抑制劑（Aprotinin）、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亮抑酶肽（Leupeptin）及10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 天門冬胺酸蛋白酶抑制劑（Pepstatin）之蛋白酶抑制劑。將Triton X-100添加至最終濃度為1%。將樣品在 $\leq -70^\circ\text{C}$ 下冷凍、解凍、然後在10,000 g下離心5 min 以移除細胞屑。於上清液中樣品蛋白質濃度的定量係使用總蛋白質測定法進行。細胞介素量係根據與商用ELISA套組（R&D Systems，明尼亞波利斯，MN）提供的製造商指示決定。於發展的X-射線薄膜上細胞介素陣列數據係藉由以ImageScanner III（GE Healthcare）掃描薄膜而定量並使用ImageQuant軟體分析陣列影像檔案（GE Healthcare）。

【0152】 2. 結果

【0153】 2.1 iPSCs與iPSC-條件化培養基於博來黴素-誘導的肺傷害上的組織病理效果

【0154】 博來黴素的氣管內注射造成了先前紀錄的導致肺傷害的事件順序。傷害的早期的特徵在於嗜中性球的肺泡炎，然而晚期的特徵在於纖維化的斑點區域，如藉由博來黴素傷害的肺之組織病理學的檢查而證實。iPSCs或iPSC-條件化培養基的、而非MEFs的靜脈內傳導在博來黴素後處理7日時減少了浸潤性嗜中性球的數目與於博來黴素-傷害的肺中觀察到的傷害面積。此外，隨著博來黴素處理後14與21日時iPSCs或iPSC-條件化培養基的投予，博來黴素-誘導的間隙的增厚、發炎與肺架構的變形減弱。由博來黴素處理的iPSCs接收者亦顯示顯著低於單獨MEFs或PBS之阿士克羅夫特肺纖維化分數（圖11A）。根據破壞性指數的測量，隨著iPSCs之處理亦

觀測到博來黴素-損害的肺結構復原(圖11B)。iPSC-條件化培養基於阿士克羅夫特肺纖維化分數與破壞性指數上的恢復再生效果係些微的低於iPSCs。肺泡的平均線性截距(Lm)(平均肺泡尺寸的形態測量學參數)隨著iPSCs或iPSC-條件化培養基之傳遞亦回復至接近正常的量(圖11C)。

【0155】 2.2 iPSCs與iPSC-CM兩者皆減弱博來黴素-誘導的肺纖維化之強度

【0156】 肺纖維化的特徵在於原纖維膠原蛋白類之類型1膠原蛋白的累積。膠原蛋白-1之免疫-染色示範了於PBS-處理的小鼠中纖維化的厚帶，而以iPSCs或iPSC-條件化培養基處理之受博來黴素挑戰的接收者的肺係顯著的保護免於博來黴素-誘導的纖維化(圖12A)。亦檢查肌纖維母細胞的累積，其係被認為是重要的纖維化效應子細胞。如藉由肺切面對 α -SMA之染色所指示，博來黴素後處理14與21日時，iPSCs接收者或iPSC-條件化培養基小鼠相較於PBS-處理的小鼠於肌纖維母細胞中展現顯著的減少(圖12B)。藉由測量羧脯胺酸含量進一步評估肺膠原蛋白含量。於iPSC-處理的群組與iPSC-條件化培養基-處理的群組中的值係相較於受PBS處理的群組的值在14日與21日時為顯著較低的，顯示博來黴素所誘導的膠原蛋白合成係於以iPSCs或iPSC-條件化培養基處理的小鼠中被顯著地壓制(圖12C)。

【0157】 2.3 iPSCs增加了抗-纖維變性趨化激素IP-10於受傷肺中的製造

【0158】 因為吾人觀測到隨著博來黴素-誘導的肺傷害以iPSCs與iPSC-CM處理之結果為降低的發炎與纖維化，吾人接著想要調查此效果的

潛在機制。因從發炎轉移至纖維化在發病期間的早期階段發生，吾人假設細胞介素譜將反應細胞介素於接續的膠原蛋白沉積上的影響。iPSCs與iPSC-CM於肺細胞介素與趨化激素量上的效果係使用細胞介素陣列測定法評估（圖13A）。隨著以iPSCs或iPSC-條件化培養基處理，存有細胞介素與趨化激素表現之減少，其係習知於介導發炎（亦即IL-1、IL-2、IL-10、TNF- α 與MCP-1）與纖維化（亦即INF- γ 與MCP-5）。除了示範數種可能介導發炎與纖維化之細胞介素/趨化激素的降低量，ELISA數據亦顯示iPSCs與iPSC-CM處理兩者均刺激了IP-10的製造（圖13A）。即時PCR進一步指示iPSCs或iPSC-條件化培養基的投予在後-博來黴素傷害3日時顯著地增加了IP-10的mRNA表現（圖13B）。此外，此等處理降低了INF- γ mRNA表現，但於MIG、iTAC或CXCR3 mRNA表現上沒有顯示效果（圖13C-13E）。

【0159】 2.4 iPSCs與iPSC-CM挽救了於細胞劑量-相依方法中博來黴素-處理的接收者之存活

【0160】 為了驗證iPSCs與iPSC-條件化培養基對抗博來黴素所誘導的肺纖維化之保護效果，吾人亦評估並比較關於對博來黴素挑戰之接收者存活，iPSCs與iPSC-條件化培養基之處理效能。如圖14A中所示，小鼠首先以3.0 U/kg博來黴素硫酸鹽氣管內注射，劑量為足以誘導接收者致死（lethalit）。顯著地，iPSCs的靜脈內傳輸導致於接收者存活之劑量相依的改善，且iPSCs之最大保護效果係在 2×10^6 細胞的劑量下觀測到。以iPSC-條件化培養基（從在指定的細胞劑量下iPSC培養物收集）處理類似地於細胞劑量-相依方法中改善了接收者存活（圖14B）。全體地且基於iPSCs與iPSC-

條件化培養基於肺纖維化及接收者存活中所觀察到的保護效果上，此等結果建議iPSCs發揮其等於主導旁分泌方法中的保護效果。

【0161】 2.5 IP-10作為對iPSC-CM-介導的修復反應之主要貢獻者

【0162】 為了闡明IP-10是否於iPSC-條件化培養基處理的修復效果中扮演重要角色，吾人藉由投予兩種不同劑量（亦即0.5 $\mu\text{g}/\text{劑}$ 與0.3 $\mu\text{g}/\text{劑}$ ）之IP-10中和抗體（IP-10 nAb）評估了中和IP-10的效果。於細胞劑量-相依方法中，IP-10 中和降低了接收iPSC-條件化培養基處理的博來黴素-注射的小鼠之存活率（圖15A），或接收iPSC移植者的存活率（數據未顯示）。吾人進一步示範了IP-10 nAb投予大幅地阻斷於膠原蛋白沉積（對膠原蛋白-1陽性染色；圖15B）、肌纖維母細胞累積（對 α -SMA陽性染色；圖15，C）、發炎性細胞累積（對Ly6C陽性染色；圖15D）與肺纖維化（圖15E）上iPSC-條件化培養基的效應。IP-10 nAb的投予亦惡化了iPSCs的修復效果，於iPSC-條件化培養基中觀察到的相同（數據未顯示）。一同考慮，此等發現示範IP-10為iPSC與iPSC-CM-介導的膠原蛋白沉積抑制的與肺纖維化中發炎抑制之主要貢獻者。

【0163】 III. CCl₄--誘導的急性肝傷害模型

【0164】 肝疾病與傷害為遍及世界的重要醫療問題。肝移植為現今對肝衰竭與末期肝疾病之最有效的治療法。然而，其受限於捐贈者的犧牲、昂貴的醫療成本、手術風險以及需要終身的免疫抑制劑。肝細胞移植的發展與應用已企圖治療不同形式的肝疾病。相較於正位的肝移植，其具有最小化的侵入程序及較少的手術併發症。幹細胞移植近來亦已增加可觀的注

意性。幹細胞具有對支持組織再生與產生大量的可待移植的捐贈細胞之潛力 (Kakinuma S et al. J Gastroenterol 44: 167-172 ; Navarro-Alvarez N et al. Curr Stem Cell Res Ther 2009; 4 : 141-146 ; Yoshimi A et al. Biol Blood Marrow Transplant 2009; 15 : 389-390 ; 及Si-Tayeb K et al. Hepatology (巴爾的摩, Md) 2010; 51 : 297-305)。

【0165】 1. 材料與方法

【0166】 1.1 細胞培養研究

【0167】 小鼠的生殖-主管的iPS細胞係由京都大學 (Dr. Shinya Yamanaka) 與RIKEN BRC, 日本 (Takahashi K et al. (2006) Cell 126: 663-676) 提供。將IPS細胞如先前描述的培養 (Okita K et al. (2007) Nature 448: 313-317.9)。iPS細胞係成功地被誘導而分化成類肝的 (iHL) 細胞, 具有類似於初級肝細胞之功能。針對重組IP-10 (rIP-10, 派普泰克 (Peprotech), NC) 研究, 肝細胞係在相同密度下種於24-孔的板上。在後-傷害4 h時給予rIP-10 (0.5 ng或5 ng)。肝細胞的活性係藉由甲基噻唑四唑 (MTT, Sigma) 測定法於24 h時評估。

【0168】 1.2 實驗動物

【0169】 小鼠 (C57/B6, 8至10周) 係住在籠中並允許其食物與水的自由取得。給予小鼠四氯化碳 (CCl₄, Sigma) 於礦物油中 (0.35 μl/g, 單劑, i.p.) 以誘導肝傷害。在後-傷害4h時, 小鼠係隨機地接收經由尾靜脈之載體 (PBS)、iPS細胞或iHL (2x10⁶ 細胞/於100 μl PBS中) 輸液。於研究的時間點, 小鼠在針對肝生物化學排定的時間時從面靜脈抽血 (~100 μl)。

當小鼠犧牲時，血液係從心與肝獲取並製備以用於後續的實驗，包括組織化學、細胞介素測定法、蛋白質與基因表現分析。針對中和抗體研究，在傷害前4 h與傷害後4h時給予小鼠兩劑（0.5 $\mu\text{g}/\text{劑}$ ，i.p.）的抗-IP-10抗體（Abcam，ab9938，劍橋，UK）。針對72 h存活研究，小鼠於0、24與48 h時接收重複的CCl₄傷害。iPS細胞（ 2×10^6 細胞/於100 μl PBS）或重組IP10（rIP10，0.5 ng）係於4 h時給予一次且直到傷害後72 h觀測小鼠的致死率。所有動物接受根據美國國家科學院準備的實驗動物照護及使用之指南（NIH出版no. 86-23，1985修訂）之人道照護且由台北榮民總醫院（VGH99-173）之國家實驗動物中心（Institutional Animal Care and Use Committee）（IACUC）認可。所有實驗謹遵美國生理學協會（American Physiological Society）對實驗動物照護及使用之指導準則。

【0170】 1.3 肝傷害的組織定量

【0171】 肝的石蠟切面藉由H.E.染色並在40x 放大之顯微鏡下拍照以評估傷害的程度。壞死的面積藉由使用電腦化的型態測定系統（MicroCam，M&T OPTICS，台灣）測量每個肝五個獨立視野測定並以視野面積的百分比表現。

【0172】 1.4增生肝細胞的偵測

【0173】 在犧牲前2 h時，小鼠注射了5-溴-2'-去氧尿苷（5-bromo-2'-deoxyuridine，BrdU，50mg/kg，i.p.，Sigma）。於接續的免疫組織化學研究使用過氧化酶-耦合的小鼠單株抗-BrdU（DAKO，M0744）與抗-Ki67（DAKO，M7249）以偵測增生性的肝細胞。每動物的感興趣區域

的十張照片（不同入口與中央靜脈區域）係於x200放大的顯微鏡下照得。於統計分析中使用每動物每面積的BrdU-陽性或Ki67-陽性細胞之平均數目。

【0174】 1.5 西方墨點轉漬

【0175】 組織溶解產物於含有50 mM Tris-HCl, pH 7.4、150 mM NaCl、0.25%去氧膽酸（deoxychoic acid）、1% NP40、1 mM EDTA、1 mM 釩酸鈉（Na orthovanadate）、1 mM 氟化鈉（Na fluoride）、1 mM 苯甲基磺醯化氟（phenylmethylsulfony fluoride）、1ug/ml牛胰蛋白酶抑制劑（aprotinin）、1ug/ml亮抑酶肽（leupeptin）與1 ug/ml 天門冬胺酸蛋白酶抑制劑（peptstain）之緩衝劑中於冰上如先前描述的製備（Kao CL et al. (2010) Stem Cells Dev 19: 247-2580）。樣品蛋白質的濃度係使用蛋白質測定法套組（Bio-Rad，赫拉克勒斯，CA）決定。特定量的總蛋白質係進行10% SDS-PAGE凝膠電泳然後轉移至PVDF膜。膜係以5%非脂肪牛乳阻斷並在4°C下以一級抗體培育整夜。然後於Tris-緩衝的鹽水Tween-20（TBST）中將膜清洗5次，然後以山葵過氧化酶-共軛的二級抗體在室溫下培育2 h。然後將膜藉由TBST清洗六次且以ECL（Pierce Biotechnology，羅克福德，IL）使特定帶可視化，並以數位影像系統（ChemiGenius2 攝影憑證化（photodocumentation）系統，Syngenes，劍橋，UK）捕捉。

【0176】 1.6 細胞介素陣列與IP-10 ELISA

【0177】 將肝組織均質化並製備於具有蛋白酶抑制劑（蛋白酶抑制劑（10 µg/mL牛胰蛋白酶抑制劑、10 µg/mL亮抑酶肽與10 µg/mL天門冬胺酸蛋白酶抑制劑）與1% Triton X-100之PBS中。將組織溶解產物在10,000 g下離

心5分鐘以移除細胞碎屑。定量蛋白質濃度（DC-Bradford蛋白質測定法，Bradford，Bio-Rad，赫拉克勒斯，CA，USA）且使用200 μg 的蛋白質藉由商業化測定法套組（小鼠細胞介素陣列盤A與IP-10免疫測定法，R&D，MN）根據製造商指示使用於細胞介素的分析。於細胞介素陣列研究中個別細胞介素的表現係藉由密度測定法定量，並以相對於沒有細胞處理的受傷害肝中其等表現之倍數變化表現。

【0178】 1.7 統計分析

【0179】 結果係表示為平均值 \pm SEM。藉由使用獨立的Student *t*檢定與單因子或二因子變異數分析（ANOVA）及當適當時Tukey事後檢測而進行統計分析。存活分析係使用對數等級檢定進行。p值 < 0.05 被認為是統計上有意義的。

【0180】 2. 結果

【0181】 2.1 IPS細胞緩和了肝傷害及促進再生

【0182】 為了建立肝傷害動物模型，吾人以CCl₄注射小鼠並藉由測量ALT與AST評估肝細胞傷害的程度。如圖16A中所示，CCl₄-傷害的小鼠顯示了在24小時時血清ALT與AST的尖峰水平。iPS或iHL細胞的輸液顯著地減少了接著CCl₄處理後24與36 h時ALT與AST量（ $n=6$ ， $P<0.05$ ）（圖16A）。吾人接著調查肝細胞增生，其係肝再生的關鍵徵兆。使用BrdU併入以定量於S階段之肝細胞。Ki67的陽性免疫染色代表於細胞循環進程中的肝細胞。於所有三群組在後-傷害24 h時，藉由抗-Ki67抗體與抗-BrdU抗體僅偵測到少數增生的肝細胞（數據未顯示）。增生性反應的差異在48 h時變得明顯（圖

16B)。相較於對照組，於iPS群組中存在多於兩倍的增生肝細胞。反之，於iHL群組中增生肝細胞的數量係顯著地低於iPS群組，指示僅iPS細胞具有促進肝再生的潛力。

【0183】 2.2 IPS細胞增加了於受傷的肝中肝的IP-10表現

【0184】 藉由細胞介素陣列評估iPS細胞-誘導的肝細胞介素的改變（圖17A）。於所有測試的細胞介素間，IP-10與MIG分別為表現量增加調節的7-倍與6-倍。進一步的研究顯示了IP-10與MIG的mRNA表現在傷害後24 h時顯著地增加（圖17B）。反之，iTAC的表現（其屬於如IP-10與MIG之相同細胞介素家族）減少了（圖17B）。於後-傷害48 h時，IP-10 MIG的量減少，但於iPS群組中的IP-10的表現仍然顯著地高於不以iPS處理之CCl₄群組（ $p < 0.05$ ）。於蛋白質量，ELISA與西方墨點轉漬分析的結果顯示了在後-傷害24 h時藉由iPS細胞的肝的IP-10的顯著增加（圖17C）。

【0185】 2.3 IP-10為介導iPS細胞的有益效果之重要因子

【0186】 從上述結果，IP-10可為重要的保肝媒介子。吾人然後調查重組IP-10(rIP-10)是否促進受傷肝細胞的增生。結果顯示0.5或5 ng的rIP-10在CCl₄濃度為1.0至2.5 mM下足夠地增加受傷肝細胞的生存率（圖18A）。於受傷的小鼠中，rIP-10的注射顯著地減少了肝損傷的程度且rIP-10的效果可相比於單獨的iPS細胞。結合rIP-10與iPS的處理於受傷小鼠中沒有額外的有益效果（圖18B）。抗-IP-10中和抗體的施加減弱了iPS細胞的保護效果（圖18C）。此外，Ki67或BrdU染色揭露了在iPS輸液後於入口區域之肝細胞增生係顯著地被抗-IP-10中和抗體減少（圖18D）。

【0187】 2.4 IPS細胞與IP-10改善了重複傷害的小鼠之存活

【0188】 為了評估iPS細胞與IP-10之存活效果，於重複的CCl₄-傷害的小鼠中評估72-小時的存活率，其等於第一劑量後給予額外的兩劑量CCl₄(於24與48小時時給予)。一半的重複的傷害小鼠係隨機分成兩群組以接收iPS細胞或rIP10(5 ng)處理。當相比於未處理的群組(53.3%，P<0.05)時rIP-10與IPS群組兩者均具有顯著較高的72-小時存活率(分別為100%及85.7%)(圖18E)。於iPS與rIP-10群組之間未注意到顯著的差異。

【0189】 本領域中習知技藝者將認知可對以上描述的具體實施例作出未悖離其廣義發明概念之改變。因此咸理解本發明並未由所揭示特定的具體實施例限制，而係意欲涵蓋由隨附申請專利範圍所界定之本發明精神與範圍內之修改。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

【序列表】(請換頁單獨記載)

201606083

發明摘要

※ 申請案號：

104120990 (由102135595分案)

※ 申請日：

102101

※IPC 分類：C12N 5/21 (2010.01)

C12N 5/74 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

製備誘導多能幹細胞之方法及其應用/METHOD FOR PREPARING
INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS AND ITS APPLICATIONS

【中文】

本發明係關於一種用於製備誘導多能幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPSCs) 之新穎方法，其係藉由引入三種基因Oct3/4、Sox2與Parp1至體細胞。本發明亦關於藉由前述方法所製造之iPSCs。亦提供一種藉由使用PAR基化 (PARylated) 之蛋白質或具有PAR基化活性之酵素以將細胞回春之方法。進一步提供的是一種用於誘導干擾素- γ 可誘導性蛋白質-10 (IP-10) 之分泌之方法，包括將一有效量的iPSCs或iPSC-CM投予至有需要之個體。

【英文】

The present invention relates to a novel method for preparing induced pluripotent stem cells (iPSCs) by introducing three genes, Oct3/4, Sox2, and Parp1, into somatic cells. The present invention also relates to the iPSCs produced by the aforementioned method. Also provided is a method of rejuvenating cells by use of a PARylated protein or an enzyme with PARylation activity. Further provided is a method for inducing the secretion of interferon- γ

inducible protein-10 (IP-10) comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of iPSCs or iPSC-CM.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種重新編程成體細胞之方法，包括將一被或可被 PAR 基化之蛋白質投予至細胞。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該可被 PAR 基化之蛋白質係選自由下表所列之蛋白質及其組合所組成之群組中者：

編號	蛋白質名稱
1	聚[ADP-核糖]聚合酶 1
2	FACT 錯合次單元 SPT16
3	聚[ADP-核糖]聚合酶 2
4	類-染色質域-解旋酶-DNA-結合蛋白質 1
5	DNA 連接酶3
6	FACT 錯合次單元 SSRP1
7	富含白胺酸重複非飛行-交互作用蛋白質 2
8	X-射線修復交錯互補蛋白質 6
9	X-射線修復交錯互補蛋白質 1
10	剪接因子U2AF 35kDa 次單元
11	蛋白質永久同系物
12	核仁RNA解旋酶 2
13	U1小核核糖核蛋白A
14	酪胺醯基-DNA磷酸二酯酶 1
15	Aprataxin及類PNK因子
16	複製蛋白質A 70kDa DNA結合次單元
17	核中的細胞凋亡性染色質凝結引發子
18	不均勻的核中核糖核蛋白A3
19	易裂X心智遲滯蛋白 1同系物
20	無髮的重組結合蛋白抑制因子
21	剪接因子U2AF 65kDa 次單元。

3. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該蛋白質為類-染色質域-解旋酶-DNA-結合蛋白質 1 (Chd1L)。
4. 一種重新編程成體細胞之方法，包括投予具有 PAR 基化活性之酵素至細胞。

5. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該酵素為 Parp1。
6. 一種將個體中細胞或衰老細胞回春化之方法，包括將被或可被 PAR 基化的蛋白質投予至該細胞或該個體。
7. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該細胞的回春作用包括使此類細胞的端粒尺寸、基因表現譜、氧化壓力或粒線體的代謝與胚胎幹細胞者無法分辨。
8. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該可被 PAR 基化的蛋白質係選自由下表所列之蛋白質及其組合所組成之群組中者：

編號	蛋白質名稱
1	聚[ADP-核糖]聚合酶 1
2	FACT 錯合次單元 SPT16
3	聚[ADP-核糖]聚合酶 2
4	類-染色質域-解旋酶-DNA-結合蛋白質 1
5	DNA連接酶3
6	FACT 錯合次單元 SSRP1
7	富含白胺酸重複非飛行-交互作用蛋白質 2
8	X-射線修復交錯互補蛋白質 6
9	X-射線修復交錯互補蛋白質 1
10	剪接因子U2AF 35kDa 次單元
11	蛋白質永久同系物
12	核仁RNA解旋酶 2
13	UI小核核糖核蛋白A
14	酪胺醯基-DNA磷酸二酯酶 1
15	Aprataxin及類PNK因子
16	複製蛋白質A 70kDa DNA結合次單元
17	核中的細胞凋亡性染色質凝結引發子
18	不均勻的核中核糖核蛋白A3
19	易裂X心智遲滯蛋白1同系物
20	無髮的重組結合蛋白抑制因子
21	剪接因子U2AF 65kDa 次單元。

9. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該蛋白質為類-染色質域-解旋酶

-DNA-結合蛋白質 1 (Chd1L)。

10. 一種將個體中細胞回春化或將個體中細胞衰老化之方法，包括將具有 PAR 基化活性之酵素投予至該細胞或該個體。
11. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中該酵素為 Parp1。

