รายงานประจำปี 2555

"โครงการ การเปลี่ยนเซลล์ร่างกายปกติเป็นเซลล์ประสาทชนิดจำเพาะโดยตรงด้วยโปรตีนและRNA"

Direct Reprogramming of Somatic Cells into Specific Neuronal Population with Recombinant Protein and RNA

หน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2555 ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยของโครงการมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในหน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัดที่ปฏิบัติหน้าที่ โดยทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

และขอขอบพระคุณผู้เกี่ยวข้องที่มิได้เอ่ยนามไว้ในครั้งนี้

บทคัดย่อภาษาไทย

โรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทเป็นหนึ่งในปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ มีประชากรทั่วโลกกว่าหนึ่งร้อยล้านคนที่ประสบปัญหาและส่วนใหญ่ก็ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ การปลูกถ่ายเซลล์ประสาทเป็นความหวังหนึ่งที่จะสามารถนำมารักษาผู้ป่วยได้ เช่นในผู้ป่วยที่เป็นโรคพาร์กินสัน การสร้างเซลล์ประสาทชนิดโดพามิเนอร์จิก (dopaminergic neuron) ที่มีความจำเพาะต่อผู้ป่วยนั้นมีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งของเซลล์เพื่อนำมาใช้รักษาผู้ป่วยได้ ในการศึกษาครั้งนี้ ทางกลุ่มวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเซลล์ประสาทชนิดโดพามิเนอร์จิกโดยตรงจากเซลล์ dermal fibroblasts และ patient specific induced pluripotent stem cells (psiPSCs)ของผู้ป่วย โดยใช้ไวรัส โปรตีนและ modified RNA โดยในปีแรกของการศึกษานั้นทางกลุ่มวิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์ประสาทชนิดโดพามิเนอร์จิกจาก psiPSCs โดยการใช้ Nurr1-MT-Akt protein ซึ่งพบว่าสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเซลล์ประสาทชนิดโดพามิเนอร์จิกได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการสร้างเซลล์ประสาทชนิดโดพามิเนอร์จิกนั้นสามารถทำให้ดีขึ้นได้โดยการใช้ state specified protein ซึ่งในการศึกษาที่จะดำเนินการต่อไปนั้น ทางกลุ่มผู้วิจัยจะศึกษาประสิทธิภาพของ state specified gene ในการสร้างเซลล์ประสาทชนิดโดพามิเนอร์จิกโดยตรงจากเซลล์ dermal fibroblast โดยอาศัยไวรัส โปรตีนและ modified RNA

เลขหมู่
เลขทะเบียน 018132
วัน, เดือน, ปี 8 ก.พ. 62

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Neurological disorders are one of the major health problems. Hundreds millions of people worldwide are affected and most could not be cured. Neural cell transplantation offers a promising therapy for patient. For Parkinson's disease, generation of patient specific dopaminergic neural cell provides the potential cell source for treatment. In this study, we aim to generate dopaminergic neuron directly from patient dermal fibroblasts and patient specific induced pluripotent stem cells (psiPSCs) by using virus, protein and modified RNA. In this first year, dopaminergic neurons were successfully generated from psiPSCs. Using Nurr1-MT-Akt protein could enhanced dopaminergic neuron production compared to standard protocol. These result suggest that, differentiation of dopaminergic neurons could be potentially improved by using state specified protein. Next study, we will test the potential of state specified gene on direct reprogramming of dermal fibroblast into functional dopaminergic neuron by using virus, protein and modified RNA.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญภาพ	ฉ
1. บทนำ	1
2. เนื้อเรื่อง	9
3. อภิปราย / วิจารณ์ (Discussion) ผลการทดลอง	20
4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	20
บรรณานุกรม	21
ประวัตินักวิจัยและคณะ	25

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัยการเปลี่ยนเซลล์ร่างกายปกติเป็นเซลล์ประสาทชนิดจำเพาะโดยตรงด้วยโปรตีนและRNA	3
2.	การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในขั้นตอนการสร้างเซลล์ประสาทชนิดจำเพาะจากเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท(Abeliovich 2007)	8
3.	plasmid construct ที่ใช้ในการสร้าง Lentivirus ที่ใช้ในการ direct reprogram	13
4.	การสร้าง Nurr1-WT และ Nurr1-MT-Akt	15
5.	การสร้าง Dopaminergic neuron จาก human Embryonic stem cell	16
6.	Dopaminergic neuron ที่สร้างได้จาก human Embryonic stem cell	18
7.	การสร้าง Dopaminergic neuron จาก human Embryonic stem cell โดยไม่ใช้เซลล์พี่เลี้ยง	19

1. บทนำ

โรคระบบประสาท ไม่ว่าจะเป็นโรคสมองขาดเลือด พาห์คินสัน ไขสันหลังบาดเจ็บ นับเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีผู้ที่เจ็บป่วยทุพลภาพด้วยโรคกลุ่มนี้จำนวนมาก ด้วยความสามารถในการซ่อมแซม การสร้างใหม่ของเซลล์ในระบบประสาทที่ไม่เพียงพอ ทำให้ยังไม่สามารถรักษาอาการเหล่านี้ให้หายขาดได้ ทางออกที่สำคัญในการแก้ไขปัญหานี้คือการสร้างเซลล์ประสาทเพื่อนำไปแทนที่เซลล์ประสาทที่สูญเสียไป

เซลล์ที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคระบบประสาทสามารถนำมาได้จากหลายแหล่ง ซึ่งเซลล์แต่ละชนิดก็จะมีข้อดีขอเสียแตกต่างกันไป สำหรับในปัจจุบันเซลล์ต้นกำเนิดจัดเป็นความหวังที่จะนำมาใช้ในการรักษา ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท หรือการเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนไปเป็นเซลล์ระบบประสาทแต่ทั้งสองวิธีก็ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ การนำเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทของผู้ป่วยออกมาทำการเพิ่มจำนวนเป็นไปได้ยาก และการใช้เซลล์จากบุคคลอื่น ทั้งเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท และเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนก็จะมีปัญหาที่สำคัญคือความเข้ากันไม่ได้ของเนื้อเยื่อเมื่อทำการปลูกถ่าย

จากความก้าวหน้าในศาสตร์ด้านregenerative medicine ในช่วงไม่กี่ปีมานี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะสร้างเซลล์ประสาทจากเซลล์ร่างกายทั่วไป โดยอาจใช้วิธีการ reprogramming ไปเป็น pluripotent stem cell ด้วย induce pluripotent stem cell technology ซึ่งค้นพบโดย Professor Shinya Yamanaka ในปี 2549แล้วเปลี่ยนเป็นเซลล์ประสาทชนิดต่างๆที่ต้องการอีกครั้ง ข้อดีคือสามารถแก้ปัญหาความไม่เข้ากันของเนื้อเยื่อเพราะมาจากตัวผู้ป่วยเอง และสามารถใช้สร้างโมเดลไว้ศึกษากลไกของโรคได้ อีกเทคนิคที่เพิ่งมีรายงานในปี 2553นี้โดย Wernig และคณะคือการเปลี่ยนเซลล์ fibroblast ไปสู่เซลล์ประสาทโดยตรง โดยใช้virus หลายชนิดนำยีนที่สำคัญต่อการพัฒนาการของเซลล์ประสาทเข้าสู่เซลล์ ซึ่งในทางทฤษฎีอาจมีข้อดีเทียบกับการ reprogram สู่ pluripotency state คือใช้เวลาน้อยกว่า และโอกาสเกิดเนื้องอกน้อยกว่า อย่างไรก็ดีจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมก่อนนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้อย่างได้ผลและปลอดภัย

ในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา (2551-2553) จากการสนับสนุนของ สวทช. ผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการสร้าง induce pluripotent stem cell (iPSC) จากเซลล์คนปกติและจากผู้ป่วย Parkinson's disease รวม 5 lines ตลอดจนพัฒนาเทคนิคในการสร้าง iPSC โดยใช้ recombinant protein และRNA แทนไวรัส และจากทุนงบประมาณแผ่นดิน2552-2553 ประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์คุณสมบัติคล้ายเซลล์ประสาทจาก

mesenchymal stem cell โดยใช้ไวรัสนำยีนที่ที่สำคัญต่อการพัฒนาการของเซลล์ประสาทเข้าสู่เซลล์จึงมีความพร้อมที่ใช้เทคนิค และเครื่องมือที่สร้างได้มาใช้ในการพัฒนาเทคนิค direct reprogramming ให้มีความปลอดภัยยิ่งขึ้นและใช้ในการกระตุ้นให้เซลล์กลายเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติจำเพาะที่ต้องการคือ dopaminergic neuron เพื่อเปรียบเทียบกับที่สร้างจาก human iPS cells คนปกติและคนไข้ Parkinson's disease ต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 พัฒนาวิธีการ direct reprogrammingไปสู่เซลล์ประสาท dopaminergic neuron

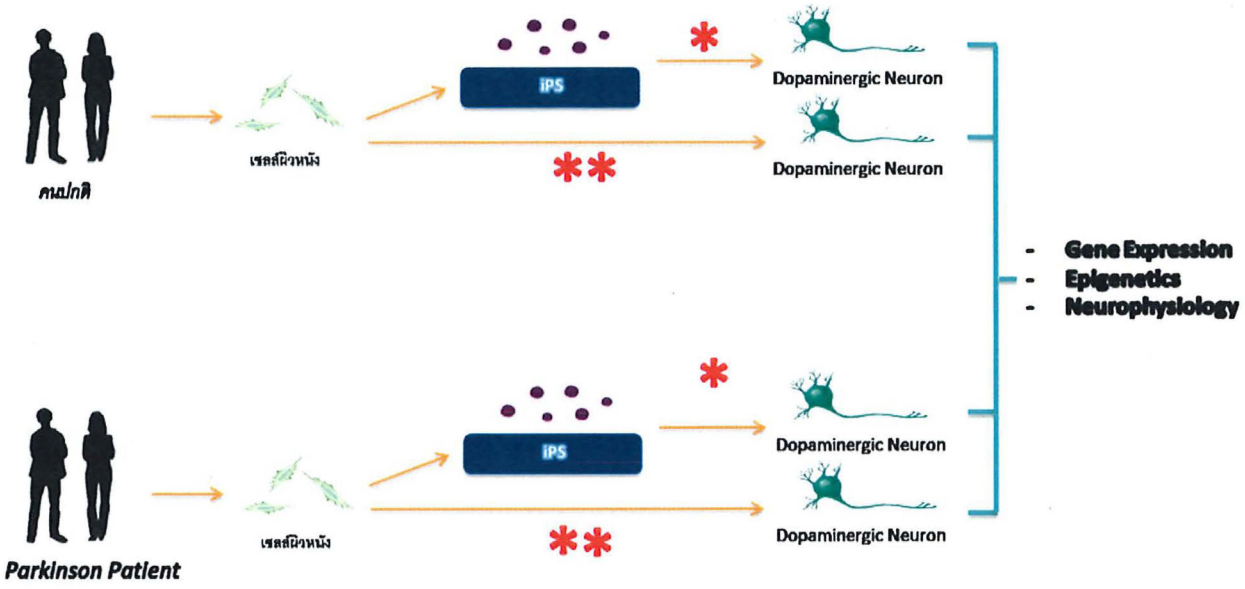
2.2 พัฒนาการใช้ protein และRNA แทนไวรัสในการ direct reprogramming และ differentiation ไปเป็นdopaminergic neuron

2.3 ทดสอบเปรียบเทียบเซลล์ที่ reprogrammed ไปเป็น dopaminergic neuron ทั้ง direct และจาก iPSC ในด้าน gene expression, epigenetic และ neurophysiology

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การทดลองในหลอดทดลอง

4. ทฤษฎีสมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัยการเปลี่ยนเซลล์ร่างกายปกติเป็นเซลล์ประสาทชนิดจำเพาะโดยตรงด้วยโปรตีนและRNA

พิสูจน์ว่า dopaminergic neuron สามารถสร้างด้วย direct reprogramming หรือไม่ มีคุณสมบัติอย่างไรเทียบกับที่สร้างผ่าน pluripotent stem cell ตลอดจนพัฒนาวิธีการใช้ protein และ RNA แทนไวรัสในการ reprogramming ไปสู่ dopaminergic neuron ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

โรคทางระบบประสาทส่วนมากเกินจากการสูญเสียคุณสมบัติที่สำคัญของเซลล์ระบบประสาท เช่น โรคพาร์กินสันเกิดจากการเสียสมดุลของสารโดปามีนในสมอง เซลล์สมองส่วนที่สร้างโดปามีน (Dopaminergic neuron) ตายไปมากกว่าร้อยละ 80โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ในระบบประสาท ดังนั้นการรักษาโรคทางระบบประสาทเหล่านี้จำเป็นจะต้องอาศัยการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์ระบบประสาทเข้าไปแทนที่เซลล์ที่สูญเสียไป หรือการรักษาแบบ Regenerative Medicine

แหล่งของเซลล์ประสาทที่จะนำมาใช้ในการปลูกถ่ายสามารถหาได้จากหลายแหล่งไม่ว่าจะเป็นการใช้เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท (Neural Stem Cell, NSC) ซึ่งมีการค้นพบและสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนภายนอกร่างกายได้ (Reynolds and Weiss 1992) ในปัจจุบันได้มีการทดลองปลูกถ่ายHuman neural stem cell ในหลายบริเวณของสมองซึ่งพบว่าเซลล์ที่ทำการปลูกถ่ายสามารถอยู่รอด และมีการสร้างการเชื่อมต่อกับเซลล์ประสาทของผู้รับได้ (Fricker, Carpenter et al. 1999) และจนปัจจุบันยังไม่ถูกรายงานเรื่องเนื้องอก นอกจากนี้แหล่งของ NSC ที่นำมาใช้ในการรักษายังสามารถสร้างได้จากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Embryonic Stem Cell, ESC) เนื่องจาก ESC เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในร่างกายได้ทุกชนิด จึงจัดเป็นเซลล์ที่เป็นความหวังสูงสุดในการนำมาใช้ในการรักษาโรคทุกชนิดที่ยังรักษาไม่ได้ในปัจจุบันร่วมทั้งโรคทางระบบประสาทด้วย (Lerou and Daley 2005) จากงานวิจัยพบว่าmouse embryonic stem cell เมื่อควบคุมให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยอาศัยการทำงานของยีน เช่น nurr1 สามารถเกิดการเปลี่ยนปลงไปเป็น dopaminergic neuron จำนวนมากได้ ซึ่งเมื่อปลูกถ่ายไปแล้วทำให้หนูโมเดลของโรค parkinsonอาการดีขึ้นได้ (Kim, Auerbach et al. 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ human embryonic stem cells ในการรักษาอาการสัตว์ทดลองได้เช่นกันแต่มีอัตราการเกิดเนื้องอกที่สูงทำให้ต้องหาวิธีพัฒนาต่อไปก่อนนำมาใช้ในผู้ป่วยจริง (Carson, Aigner et al. 2006; Roy, Cleren et al. 2006)

แต่อย่างไรก็ดีการใช้เซลล์ทั้งสองชนิดนี้ในการรักษายังมีข้อจำกัดอยู่ แม้ว่า NSC จะมีความปลอดภัยสูงเมื่อนำมาใช้ในการรักษา แต่ปริมาณของ NSC นั้นมีไม่เพียงพอต่อความต้องการ เนื่องจากการได้มาของ NSC นั้นเป็นไปได้ยาก นอกจากนี้การปลูกถ่าย ไม่ว่าจะเป็น NSC หรือว่า ESC ที่มีการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ในระบบประสาท ที่เป็นเซลล์ของบุคคลอื่น จะทำให้เกิดการต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ทำให้การใช้ Human Embryonic Stem Cell line ที่มีอยู่ในปัจจุบันไม่สามารถ

นำมาใช้ในการรักษาโรคในผู้ป่วยทุกรายได้ ดังนั้นการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่มีความจำเพาะต่อคนไข้แต่ละคน (Patient-specific pluripotent stem cell) จึงเป็นความหวังที่สำคัญสำหรับการรักษาผู้ป่วยด้วยวิธีนี้

การสร้างเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจำเป็นต้องอาศัยกลไกในการเปลี่ยนแปลงเซลล์ชนิดหนึ่ง ให้ย้อนกลับไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน หรือที่เรียกว่า Reprogramming

จากความสำเร็จของ Lan Wilmut (Campbell, McWhir et al. 1996) ในการสร้างโคลน (Cloning) แกะตัวแรกของโลกได้เป็นผลสำเร็จ โดยการใช้นิวเคลียสของแกะตัวเต็มวัยใส่เข้าไปในเซลล์ไข่ที่มีการนำนิวเคลียสออกแล้ว จากนั้นกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวเหมือนไข่หลังการผสม แล้วทำการย้ายฝาก ซึ่งสามารถสร้างลูกแกะที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันกับแกะเจ้าของเซลล์ทุกประการ (Somatic cell nuclear transfer, SCNT) ทำให้ความหวังในการสร้าง Patient-specific pluripotent stem cell น่าจะสามารถเป็นไปได้ โดยการใช้นิวเคลียสจากเซลล์ของผู้ป่วย(Hochedlinger and Jaenisch 2003; Jaenisch 2004) ย้ายเข้าไปแทนที่นิวเคลียสของไข่ ซึ่งจากงานวิจัยในหนูพบว่า การทำ SCNT สามารถสร้าง ntESC (nuclear transfer Embryonic Stem Cell) ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับ Embryonic Stem Cell ทุกประการ และยังสามารถแก้ไขความผิดปกติทางพันธุกรรมได้อีกด้วย(Wakayama, Tabar et al. 2001; Rideout, Hochedlinger et al. 2002) แต่อย่างไรก็ดีการทำ SCNT ในสัตว์ชั้นสูง ไม่ว่าจะเป็นลิง หรือมนุษย์พบว่ามีโอกาสประสบความสำเร็จต่ำมากในการที่จะกระตุ้นให้ไข่เกิดการแบ่งตัวหลังจากการปลูกถ่ายนิวเคลียสไปจนถึงระยะ Blastocyst อีกทั้งข้อจำกัดของปริมาณไข่จำนวนมากที่ต้องการสำหรับการทำแต่ละครั้ง และในปัจจุบันยังไม่สามารถสร้างเป็น Embryonic Stem cell line ที่ปกติได้สำเร็จ ทำให้การสร้าง Patient-specific pluripotent stem cell ด้วยวิธี SCNT ยังไม่สามารถทำได้ในปัจจุบัน

แต่ด้วยความก้าวหน้าทางการวิจัยทางด้านเซลล์ต้นกำเนิด Shinya Yamanaka ประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้าย Embryonic Stem Cell จากเซลล์ผิวหนัง (Fibroblast) หรือที่เรียกว่า induced Pluripotent Stem Cell, iPSCโดยการใช้ยีนสี่ชนิด คือ Oct4, SOX2, Klf4 และ c-MYC ผ่านการใช้ไวรัสเป็นตัวนำพาเข้าเซลล์ ซึ่งประสบความสำเร็จในการสร้าง iPSCทั้งในสัตว์ทดลอง (หนู) และในคน (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi, Tanabe et al. 2007) iPSCจึงจัดเป็นความหวังในการสร้าง Patient-specific pluripotent stem cell ที่จะนำมาใช้ในการรักษา แต่จะต้องมีการแทนที่ยีนบ้างตัวเช่น Klf4 และ c-MYC ซึ่งเป็นยีนที่ก่อมะเร็ง และการเปลี่ยนวิธีจากการใช้ไวรัส เป็นการใช้การนำยีนเข้าเซลล์ด้วยวิธีอื่นที่

มีความปลอดภัยมากกว่า ในปัจจุบัน การสร้าง iPSCของทั้งเซลล์คน และเซลล์หนูสามารถทำได้โดยการไม่ใช้ไวรัส เช่นการใช้ DNA ที่ไม่มีการแทรกตัวเข้าไปในโครโมโซม(Yu, Hu et al. 2009) การใช้รูปแบบของโปรตีน (Kim, Kim et al. 2009; Zhou, Wu et al. 2009) หรือการใช้ RNA (Warren et al. 2010) ซึ่งทำให้ iPSCที่ได้มีความปลอดภัยสูงในการนำมาใช้ในการรักษา แต่อัตราการเกิด iPSCจากวิธีทั้งสองยังอยู่ในระดับที่ต่ำมาก จึงต้องมีการศึกษาหาวิธีในการเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้าง iPSCจากวิธีเหล่านี้ ในปัจจุบันมีการศึกษาโดยการเปลี่ยนแปลง iPSCของเซลล์หนู Rat ให้เป็น neural cell แล้วทำการปลูกถ่ายในหนู Rat model ของโรคพาร์คินสัน พบว่าช่วยให้อาการของหนูดีขึ้น (Wernig, Zhao et al. 2008) แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการสร้างเซลล์ประสาทจาก iPSCมาใช้ในการรักษาโรคทางระบบประสาท แต่อย่างไรก็ดีการใช้ iPSCในการสร้างเซลล์เพื่อนำมาใช้ในการรักษาต้องผ่านหลายขั้นตอน (multistep process) ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนการสร้าง iPSCและทำการเปลี่ยน iPSCให้ได้เซลล์ที่ต้องการ ซึ่งสุดท้ายก่อนทำการปลูกถ่ายให้คนไข้ต้องทำการคัดเลือกเซลล์ที่ยังมีคุณสมบัติเป็น pluripotent ออกเพื่อป้องกันการเกิดเนื้องอกภายหลัง

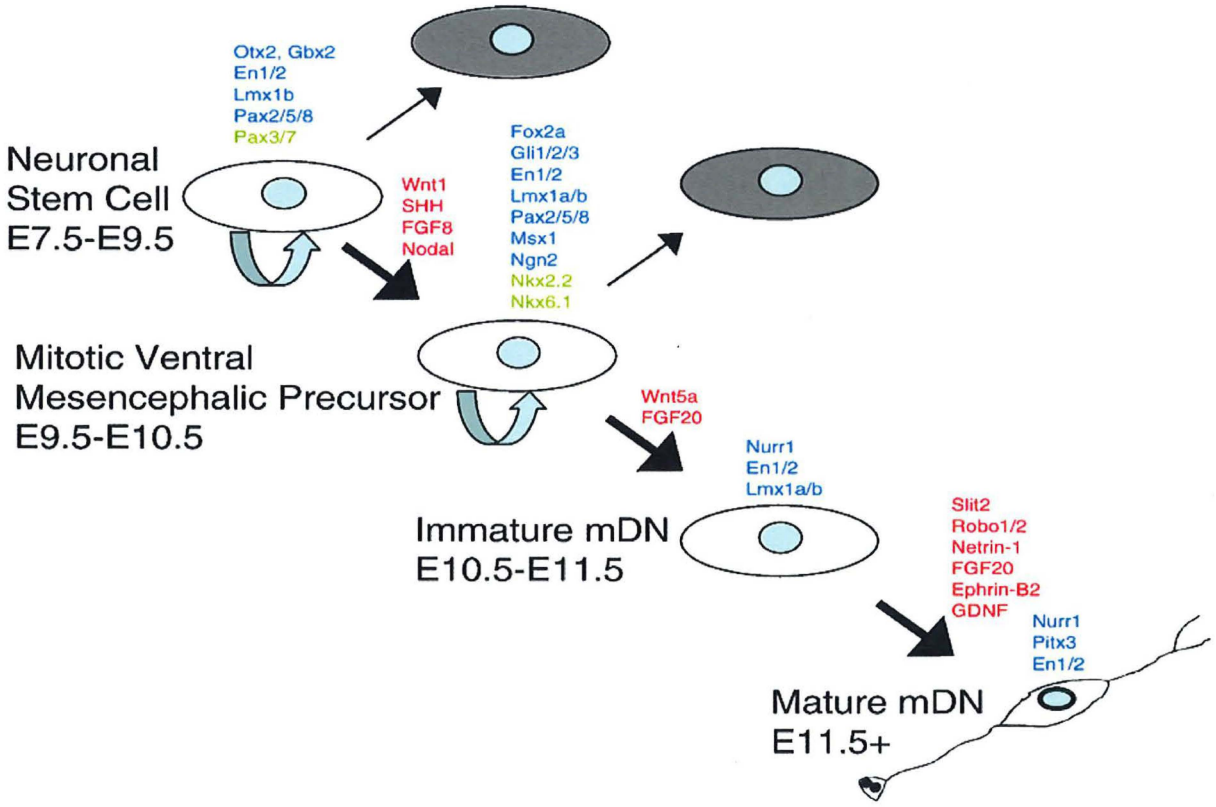
จากความรู้ในการศึกษาการเกิด Transdifferentiationโดยการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากระบบหนึ่ง ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงข้ามระบบ โดยการหาโปรตีนที่สำคัญในเซลล์แต่ละชนิด เพื่อใช้ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ชนิดหนึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ต้องการ เช่น การทำให้เซลล์ผิวหนังมีการแสดงออกของยีน MyoDซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญ และมีการแสดงออกในเซลล์กล้ามเนื้ออยู่มาก พบว่าสามารถทำให้เซลล์ผิวหนังแสดงคุณสมบัติที่คล้ายกับเซลล์กล้ามเนื้อได้ (Davis, Weintraub et al. 1987; Schafer, Blakely et al. 1990) การทำให้เกิดการแสดงออกของ Cebpaใน B-cell และการแสดงออกของ PU.1 และ Cebpaใน fibroblast สามารถเปลี่ยน เซลล์ทั้งสองชนิดให้มีลักษณะคล้ายกับ Macrophage ได้ (Feng, Desbordes et al. 2008; Bussmann, Schubert et al. 2009) นอกจากนี้ การทำให้มีการแสดงออกร่วมกันของโปรตีน 3 ชนิด Neurogenin 3, Pdx1 และ Mafaสามารถเปลี่ยน pancreatic exocrine cells ไปเป็น β-cells ที่สามารถทำงานได้จริงในสัตว์ทดลอง (Zhou, Brown et al. 2008) แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้โปรตีนจำเพาะในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์ที่ต้องการ รวมกับความรู้ที่ได้จากการสร้าง iPSCที่ทำให้เห็นว่าการใช้โปรตีนที่สำคัญและจำเพาะต่อ Pluripotent state แค่เพียง 4 ชนิดก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผิวหนังย้อนกลับไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนได้ ดังนั้นถ้าหากเราสามารถหาโปรตีนจำเพาะของเซลล์แต่ละชนิดที่เพียงพอที่จะเปลี่ยนเซลล์ชนิดหนึ่งให้ไปเป็นเซลล์ที่เราต้องการได้ ก็จะทำให้เราไม่จำเป็นต้องย้อน State ของเซลล์กลับไปในระยะ

pluripotent state ซึ่งจะเป็นการลดขั้นตอนจากการที่ต้องเปลี่ยนเซลล์กลับไปเป็น iPSCออกไป โดยการเปลี่ยนเซลล์ผิวหนังมาเป็นเซลล์ชนิดที่ต้องการ หรือ Direct Reprogramming ได้เลย

จากผลงานวิจัยของ Wernig และคณะ (Vierbuchen, Ostermeier et al.) ในปี 2010 ได้ทำการศึกษาการเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผิวหนังที่ได้จากตัวอ่อนของหนู (mouse embryonic fibroblast, MEF) และเซลล์ที่ได้จากผิวหนังของหนูตัวเต็มวัย (Tail tip fibroblast, TTF) ในการเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในระบบประสาท โดยการเลือกโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ในระบบประสาทมา 19 ชนิด ได้แก่ Ascl1, Nhlh1, Brn2, Brn4, Klf4, Id1, Id4, Lhx2, NeuroD1, Olig2, Hes5, Zic1, Dlx1, Myt1L, PAX6, C-MYC, SOX2, Mef2c และ Nr2f1 โดยใช้ไวรัสในการส่งผ่านเข้าเซลล์ พบว่าโปรตีนทั้ง 19 ชนิด สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก MEF และ TTF ไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ระบบประสาท ทั้งการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะ การมี Membrane potential และสามารถสร้างการเชื่อมต่อกับเซลล์ประสาทอื่น (synaptic formation) ได้ในหลอดทดลอง ซึ่งจัดเป็นการเกิด Direct Reprogramming ไปเป็นเซลล์ระบบประสาทที่สมบูรณ์ที่สุดเท่าที่มีการศึกษามา นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาหาปริมาณโปรตีนที่น้อยที่สุดที่เพียงพอจะทำให้เซลล์ทั้งสองชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในระบบประสาท พบว่าการใช้โปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ระบบประสาทเพียง 3 ชนิด ได้แก่ Mash1, Brn2, Myt1l เพียงพอที่จะทำให้เซลล์ MEF และ TTF เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ระบบประสาทได้ นอกจากการศึกษาการเปลี่ยนเซลล์ผิวหนังไปเป็นเซลล์ในระบบประสาทแล้ว ยังมีการศึกษาการเกิด Direct Reprogramming ไปเป็นเซลล์ในระบบอื่นด้วย เช่น การเปลี่ยนเซลล์ผิวหนังไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Ieda, Fu et al.) โดยการใช้โปรตีนจำเพาะ 3 ชนิดคือ Gata4, Mef2c และ Tbx5 นำส่งโดยการใช้ไวรัสสามารถเปลี่ยนเซลล์ผิวหนังของหนูให้เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ทั้งการแสดงออกของยีน และความสามารถในการเกิด spontaneous contraction และการเกิด action potentials ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

ด้วยเหตุผลนี้ทำให้การศึกษาการเกิด Direct Reprogramming ของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ผิวหนังให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดที่ต้องการได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน และนับเป็นความหวังในการสร้างเซลล์ทุกชนิด ที่จะนำมาใช้ในการรักษา เนื่องจากไม่ต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนเหมือนการใช้ iPSCแต่จะต้องมีการพัฒนาวิธีการให้มีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้นโดยการเปลี่ยนจากการใช้ไวรัสในการนำส่งเป็นโปรตีน หรือการใช้ RNA ที่ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA เพื่อป้องกันการเกิดการกลายพันธุ์

สำหรับการสร้าง Dopaminergic neuron ด้วยเทคนิค Direct Reprogramming ในโครงการวิจัยนี้ชนิดของโปรตีนจำเพาะที่ใช้จะเป็นโปรตีนที่เกิดข้องกับการสร้างเซลล์ระบบประสาทตามการเกิดวิวัฒนาการ (Abeliovich and Hammond 2007) คือ NGN2 และ Mash1 (Pro-neural gene) ซึ่งยีนทั้งสองชนิดมีความสำคัญทั้งในขั้นตอนการเกิดเป็นเซลล์ระบบประสาท และความคุมการแสดงออกของยีนชนิดอื่นๆที่มีความสำคัญใน Dopaminergic neuron อีกด้วย(Andersson, Jensen et al. 2006; Kele, Simplicio et al. 2006) และ Brn2, Myt1l จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น ร่วมกับโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างจำเพาะใน Dopaminergic neuron ได้แก่ Nurr1 (Saucedo-Cardenas, Quintana-Hau et al. 1998; Wallen and Perlmann 2003), Pitx3 (Maxwell, Ho et al. 2005) และ Engrailed 1/2 (Alberi, Sgado et al. 2004) ซึ่งยีนทั้งสามชนิดมีความสำคัญต่อการสร้าง และการทำงานของ Dopaminergic neuron



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในขั้นตอนการสร้างเซลล์ประสาทชนิดจำเพาะจากเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท(Abeliovich 2007)

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 3 เรื่อง
- นำเสนอผลงานในการประชุมระดับนานาชาติ 2 ครั้ง
- กรรมวิธีใหม่ 1 วิธี
- นิสิตปริญญาเอก 1 คน ปริญญาโท 1 คน
- เตรียมความพร้อมสำหรับการนำไปใช้ในการทดลองรักษาต่อไป

7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

จัด workshop ด้าน reprogramming ให้นักวิจัยที่สนใจ1 ครั้ง

8. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. สร้าง tool สำหรับการสร้าง induced-Dopaminergic neuron

1.1 สร้าง Lenti-virus

ทำการสร้าง Construct ของ Lenti virus โดยการ Clone full length cDNAของยีน human NGN2, Mash1, Brn2, Myt1L, Nurr1, Ptx3 และ En1/2 จาก mRNA ของ human ES cell หรือ plasmid โดยวิธี PCR แล้วนำเข้าสู่ pLenti-Tet-onsystem (Invitrogen) โดย standard molecular biology methods แล้วนำ plasmid construct ที่ได้มาใช้ในการสร้างอนุภาคไวรัสโดยการใช้ 293FT เป็น host cell โดยการ plate cell ประมาณ $6X10^6$ cells /100 mm dish แล้ว incubate overnight ก่อน transfect ด้วย 3 ug/ml ของ construct plasmid ที่สร้างได้ร่วมกับ 9 ug/ml Virapower packing mixโดยใช้ Lipofectamine 2000 หลัง transfection 48 ชั่วโมง ทำการเก็บ supernatant แล้วกรองผ่าน 0.45 uM pore-size cellulose acetate filterเก็บ stock virus ที่ -80 ก่อนนำไปทดสอบ viral titer

1.2 สร้างและปรับปรุง protein transduction vector และ stable cell lines

ทำการ Clone full length cDNAของhuman NGN2, Mash1, Brn2, Myt1L, Nurr1, Ptx3 และ En1/2 เข้าสู่ insect cell protein expression system ที่ใส่ protein transduction sequence และ 6X-His tag เพื่อใช้

ในการ purify protein จากนั้นทำการตรวจสอบ sequence และทดสอบการผลิตโปรตีนแต่ละตัวโดย western blot และทดสอบความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ของโปรตีนแต่ละตัวโดย immunohistochemistry, real-time PCR ดูการเปลี่ยนแปลงของ target genes คัดเลือก vector ที่มีประสิทธิภาพไปใช้สร้าง stable cell line

1.3 Purification of His tag protein

แยกโปรตีนโดยใช้หลักการของ AffinityChromatography (AKTA prime, GE Heathcare) โดยอาศัยความสามารถของ His tag protein ในการจับกับ Metal ion ที่อยู่บน แล้วทำการ elute fusion protein ด้วย 250 mM imidazole ใน ก็ทำจะให้ได้โปรตีนเฉพาะโปรตีนที่ต้องการ ซึ่งต้องนำไปยืนยันด้วย western blot โดยเทียบกับ (+) control และวัดความเข้มข้นโปรตีน โปรตีนที่ได้สามารถนำไปทำการทดลองต่อได้เลยหรือ aliquot แล้วเก็บที่ -80°C

2. สร้าง induced Dopaminergic neuron

2.1 สร้าง induced Dopaminergic neuron ด้วย conventional method และทดสอบคุณสมบัติ

-Infect lenti-virus ที่ประกอบด้วย human NGN2, Mash1, Brn2, Myt1L, Nurr1, Ptx3 และ En1/2 เข้าไปใน fibroblast จากนั้นทำการสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์ และนำไปทดสอบคุณสมบัติ ซึ่งเซลล์จะมีการคัดแยกโดยอาศัยสารเรืองแสงที่เป็น Reporter คือ GFP และ RFP โดยใช้ Flow cytrometry (FACS AraiII, BD Biosciences)

- Immunohistochemistry

Fix เซลล์ที่อยู่ใน 24 well plate หรือ coverslip ซึ่งเคลือบด้วย fibronectinหรือ Poly D-lysine หรือ ชิ้นเนื้อบน slide ที่เป็น Fresh frozen tissue ด้วย 4% formadehyde 15 นาที หรือ Cool Methanol ตาม Manual ของแต่ละ Antibody ที่จะใช้ Permeabilizationด้วย 0.2% TritonX-100 in PBS buffer with 0.1% BSA 5 นาทีBlocking ด้วย 10% Goat serum in PBS (หรือตามแต่ชนิดของ Primary antibody ที่มีกำหนดไว้) 45 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที ย้อม Primary antibody ได้แก่ TH, Synaptophysin, Synapsinในอัตราส่วนที่เหมาะสมขึ้นกับ antibody incubate 37°C 1 hrหรือ o/n ที่ 4 °C และ wash ด้วย buffer อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที

จากนั้นย้อม Secondary antibody ซึ่งเป็น Fluorescenceในอัตราส่วน 1:100 Incubate อุณหภูมิห้อง ในที่มืด ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้ว wash ด้วย PBS buffer อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที ในที่มืดทุกครั้ง Nuclear staining ด้วย 1 ug/ml DAPI in PBS 20 นาที แล้วล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที วิเคราะห์ด้วย axiovision software

- Realtime-PCR

สกัด RNA จากเซลล์โดยใช้ Tri-reagent technique จากนั้นนำมาทำ RT-PCR ด้วย Thermoscript RT-PCR Kit (Invitrogen) แล้วนำ cDNAที่ได้มาทำ Real-time PCR (SYBR green)โดยใช้ primer ของ ยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ระบบประสาท NGN2, Mash1, Synaptophysin, synapsin, NeuroD, Nurr1 เป็นต้น

- Bisulfite Sequencing

Genomic DNA 1ug ถูก treat ด้วย CpGenome DNA modification kit จากนั้น Purfied DNA ด้วย QIAquick column Amplified โดยใช้ PCR ที่ตำแหน่ง promoter region ของ human Oct3/4 ,Nanogและ Rex 1 Clone PCR product เข้าใน cloning vector วิเคราะห์ผลโดยใช้ sequencing

- Chromatin immunoprecipitation

นำ $1X10^7$ cells ไป crosslinkedด้วย 1% paraformaldehyde เป็นเวลา 5 min ที่ RT แล้วเติม glycineก่อน sonicateเพื่อตัด chromatin-DNA complex ให้เป็นชิ้นเล็กๆImmunoprecipitationด้วย Dynabeads Protein G-linked กับ anti-trimethyl Lys 4 histone H3 , anti-trimethyl Lys 27 histone H3 หรือ normal rabbit IgG antibody แล้ว Eluateนำมาใช้เป็น template สำหรับทำ quantitative PCR

- Neurophysiological Test

สำหรับการวัดศักย์ไฟฟ้าขณะทำงาน (action potential) ในระดับหนึ่งเซลล์ การทดลองใช้เทคนิค whole-cell patch-clamp recording ซึ่งใช้ขั้วไฟฟ้าที่เป็นแท่งแก้วขนาดเล็กเข้าไปจับเซลล์ที่ต้องการทดสอบ และปรับระดับศักย์ไฟฟ้าระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane potential) ให้คงที่โดย voltage-clamp mode จากนั้นจะให้กระแสไฟฟ้า (current injection) เข้าสู่เซลล์เพื่อกระตุ้นให้เกิดศักย์ไฟฟ้าขณะทำงาน การวิเคราะห์ข้อมูลทำได้โดยวัดค่าคุณสมบัติของศักย์ไฟฟ้าขณะทำงาน ได้แก่ ความถี่ (frequency), ขนาด (amplitude; mV), ความยาว (duration; msec) ศักย์ไฟฟ้าที่เกิดการกระตุ้น (threshold potential; mV) และ

เวลาที่เกิดหลังการกระตุ้น (delay time; msec) ของเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิด การวัดและวิเคราะห์ทางไฟฟ้าสรีรวิทยาทุกขั้นตอนใช้เครื่องมือขยายสัญญาณและเครื่องกระตุ้น Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA) วิธีนี้สามารถเปลี่ยนสภาวะภายในของเซลล์เพื่อการวิเคราะห์ข้อมูลได้หลากหลายมากขึ้นด้วยการปรับสูตรสารละลายภายในขั้วไฟฟ้า (internal solution)

2.2 ทดสอบการใช้ protein transduction หรือ noncoding RNA แทน viral vector ในการควบคุม gene expression และ epigenetic

เริ่มใช้ protein transduction แทน virus ทดสอบประสิทธิภาพ แล้วเริ่มศึกษา time-course ของ combination ของแต่ละสารในการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ epigenetic ซึ่งจะมีการศึกษาการเกิด DNA Methylation และ Histone modification รวมทั้งการใช้ Micro array และศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ที่สร้างได้ตามข้อ 2.1

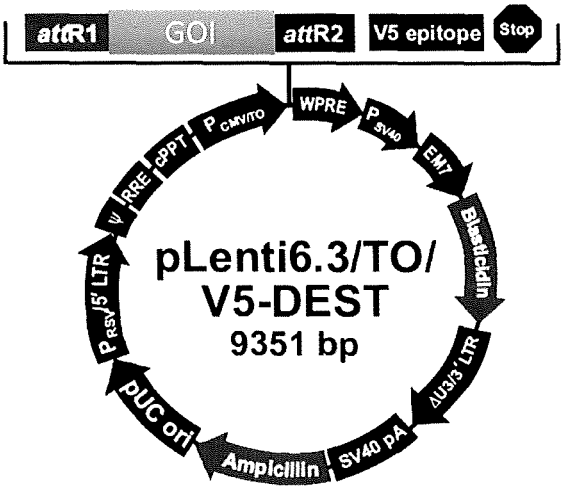
-Microarray study

เปรียบเทียบ gene expression profile ของ iPS cell ที่ได้เทียบกับ embryonic stem cell โดยใช้ illumine micro array chip (bead based)

9. **ผลการวิจัย**

1. การสร้างไวรัสที่ใช้ในการ direct reprogram เซลล์ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น dopaminergic neuron

ในการเหนี่ยวนำเซลล์ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น dopaminergic neuron จะอาศัยการทำงานของโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างจำเพาะใน dopaminergic neuron ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการสร้าง Lentivirus เพื่อใช้สำหรับการ direct reprogram เซลล์ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น dopaminergic neuron ทั้งหมด 5 ชนิด คือ pLenti6.3-NGN2-V5, pLenti6.3-PAX6-V5, pLenti6.3-Mash1-V5, pLenti6.3-Brn2-V5 และ pLenti-MYT1L-V5 ซึ่งยีนทั้ง 5 ชนิด มีการแสดงออกอย่างจำเพาะในเซลล์ของระบบประมาท และมีความสำคัญต่อการ direct reprogram เซลล์ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ระบบประสาทรวมไปถึง dopaminergic neuron



ภาพที่3 plasmid construct ที่ใช้ในการสร้าง Lentivirus ที่ใช้ในการ direct reprogram

ในขณะนี้อยู่ระหว่างการทดสอบการใช้ Lentivirus ทั้ง 5 ชนิดในการ direct reprogram เซลล์ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น dopaminergic neuron

2. การสร้าง tool ในการควบคุมการเปลี่ยน iPSC ไปเป็น dopaminergic neuron โดยไม่ใช่ virus

ในปัจจุบันการสร้างเซลล์ประสาทชนิด Dopamine (Dopaminergic (DA) neurons) จาก human Embryonic stem cell (hESC) และ human induced Pluripotent stem cell (hiPSC) ยังมีประสิทธิภาพไม่สูงมากนัก ทางกลุ่มวิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาวิธีในการสร้าง Dopaminergic neuron ในมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยการใช้โปรตีนจำเพาะต่อ Dopaminergic neuron ในการเหนี่ยวนำ hESC และ hiPSC

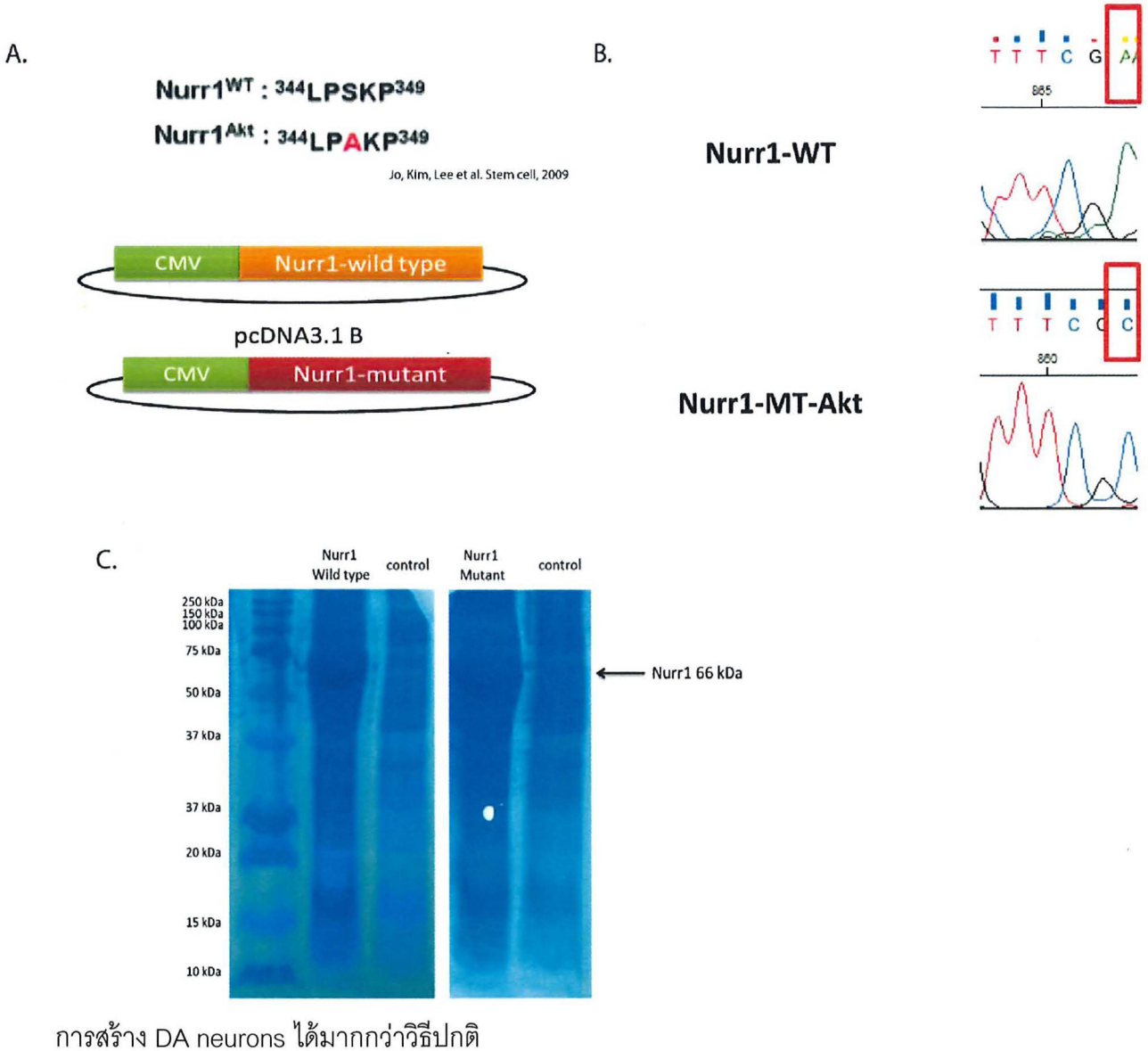
จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโปรตีน Nurr1 เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อกระบวนการเกิด DA neurons และการเพิ่มการแสดงออกของ โปรตีน Nurr1 สามารถเปลี่ยน neural precursor (NP) cells ไปเป็น DA neurons ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยจึงมีความสนใจในการนำ โปรตีน Nurr1 มาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้าง Dopaminergic neuron จาก hESC และ hiPSC

งานวิจัยของ A-YOUNG JO ในปี 2009 พบว่า การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Amino acid บริเวณ Akt-target sequence ของ โปรตีน Nurr1 (Nurr1-MT-Akt) จะช่วยป้องกันการถูกทำลายของโปรตีนจากกลไกในร่างกายได้ ทำให้โปรตีนสามารถทำงานภายในเซลล์ได้นานกว่า โปรตีน Nurr1 ปกติ (Nurr1-WT) และยังสามารถสร้าง DA neurons จาก NP cell ได้ดีกว่าการใช้ Nurr1-WT อีกด้วย

ทางกลุ่มวิจัยได้ทำการสร้าง Plasmid สำหรับสร้าง Nurr1-WT โดยการเพิ่มจำนวน Nurr1 mRNA ด้วยเทคนิค PCR จาก human NP cells และทำการตัดต่อเข้า pcDNA3.1/myc/His.B (ภาพที่ 4A)และทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสของ DNA ของ Nurr1 ที่ตำแหน่ง Akt-target sequence โดย QuikChange Lightning site Directed Mutagenesis Kit สำหรับสร้าง Nurr1-MT-Akt plasmid (ภาพที่ 4B) ซึ่ง plasmid ที่สร้างได้จะนำมาใช้ในการสร้าง Nurr1-WT และ Nurr1-MT-Akt จาก mammalian cell line (COS-7) และตรวจสอบขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Comassie blue (ภาพที่ 4C)

ทางกลุ่มวิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถของโปรตีนที่สร้างได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้ hESC และ hiPSC เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น DA neuron โดยการเติม Nurr1-WT หรือ Nurr1-MT-Akt แล้วทำการเปรียบเทียบปริมาณ DA neuron ที่ได้ (ภาพที่ 5A) พบว่า กลุ่มที่มีการใช้ Nurr1-MT-Akt สามารถพบ DA neuron ที่มีการแสดงออกของ Tyrosine Hydroxylase ในปริมาณที่

มากกว่าการใช้ Nurr1-WT (ภาพที่ 5B) แสดงให้เห็นว่าการใช้ Nurr1-MT-Akt สามารถเพิ่มประสิทธิภาพใน



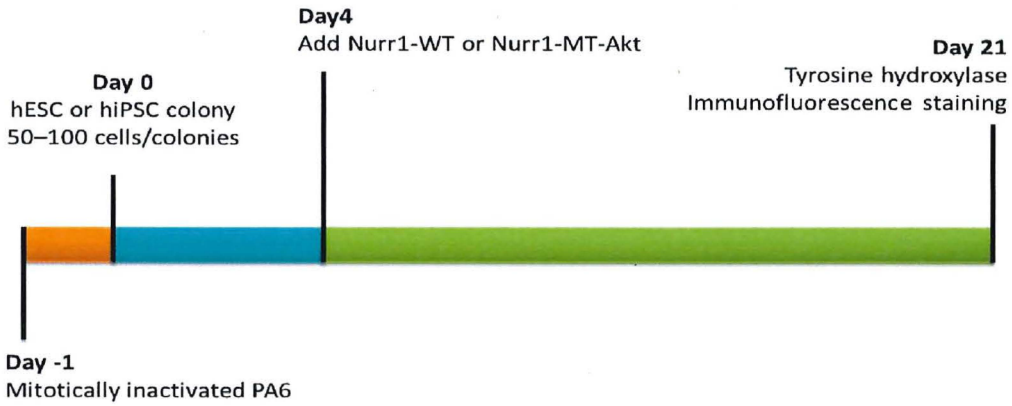
การสร้าง DA neurons ได้มากกว่าวิธีปกติ

ภาพที่4 การสร้าง Nurr1-WT และ Nurr1-MT-Akt

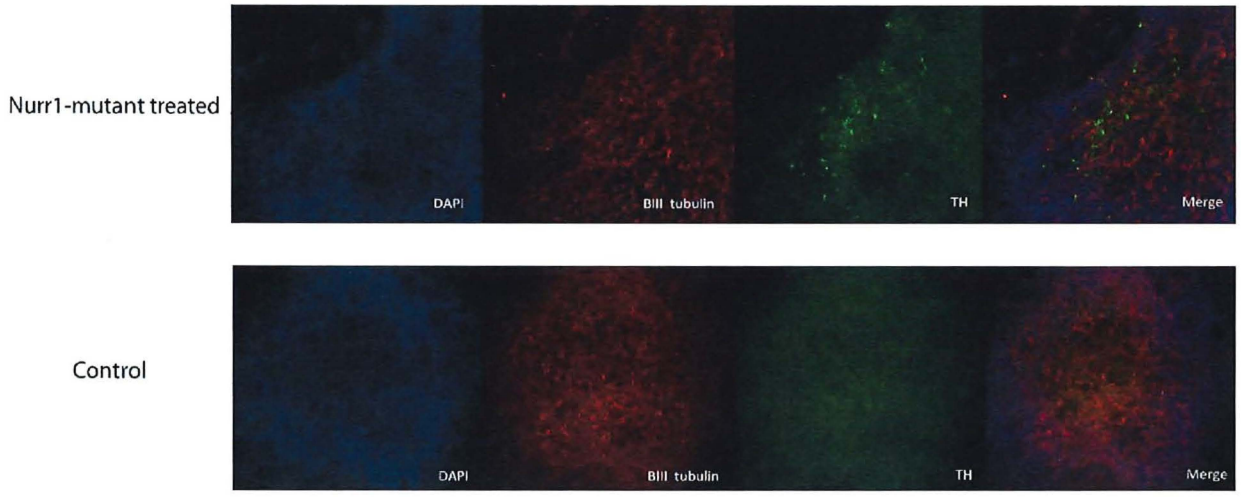
A. ตำแหน่งของ Akt binding sequence และ Plasmid construct

B. DNA base ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากการทำ Direct mutagenesis

A.



B.



C. โปรตีน Nurr1-WT และ Nurr1-MT-Akt ที่ได้เมื่อทำการทดสอบด้วยการย้อมสี Comassie blue

<u>ภาพที่ 5</u> การสร้าง Dopaminergic neuron จาก human Embryonic stem cell

A. ขั้นตอนการสร้าง Dopaminergic neuron จาก human Embryonic stem cell

B. Dopaminergic neuron ที่สร้างได้จาก human Embryonic stem cell ที่มีการใช้ Nurr1-WT (control) และ Nurr1-MT-Akt

ปัจจุบันทางกลุ่มวิจัย สามารถพัฒนาวิธีการสร้างเซลล์ประสาทชนิด DA neurons จาก human Embryonic stem cell (hESC) และ human induced Pluripotent stem cell (hiPSC) ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น (ภาพที่ 6) แต่อย่างไรก็ดี การสร้างเซลล์ DA neurons ที่ใช้เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง PA6 stromal cells เพื่ออาศัยคุณสมบัติ stromal cell-derived inducing activity (SDIA) จากเซลล์ PA6 ในการชักนำให้เซลล์ hESC และ hiPSC เกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็น DA neurons แต่เนื่องจากเซลล์ PA6 ที่ใช้ในการสร้าง DA neurons นั้นเป็นเซลล์ที่ได้มาจากหนู ดังนั้นเซลล์ DA neurons ที่สร้างได้นั้นก็อาจมีการปนเปื้อนจากเซลล์ของสัตว์ หรือสิ่งที่เซลล์ของสัตว์สร้างขึ้น

ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ทางกลุ่มวิจัยจึงศึกษาวิธีการสร้าง DA neuron ด้วยวิธีที่ไม่อาศัยเซลล์พี่เลี้ยง รวมทั้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้าง DA neuron จาก hESC และ hiPSC จึงได้มีการนำเอา small molecule คือ dorsomorphine และ SB-431542 มาใช้ร่วมด้วย โดย small molecule ทั้งสองจะทำหน้าที่ยับยั้ง BMP signals และ TGFβ/activin/nodal signal ตามลำดับ ซึ่งจะทำให้เซลล์ hESC และ hiPSC เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ประสาทได้ดี วิธีการสร้างเซลล์ dopaminergic neuron โดยไม่ใช้เซลล์พี่เลี้ยงมีวิธีการทดลองดังนี้

- ทำการแยกเซลล์ hESCs หรือ hiPSCs ให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยใช้ Accutase

- นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงต่อใน 96-well low cell-adhesion plates เพื่อให้เซลล์โตเป็น sphere โดยใช้เซลล์จำนวน 9000 cells/well เลี้ยงใน differentiation medium ซึ่งประกอบด้วย DMEM/F12 , 5% KSR, 2mM glutamine, 0.1mM nonessential amino acids และ 0.1mM 2-mercaptoethanol

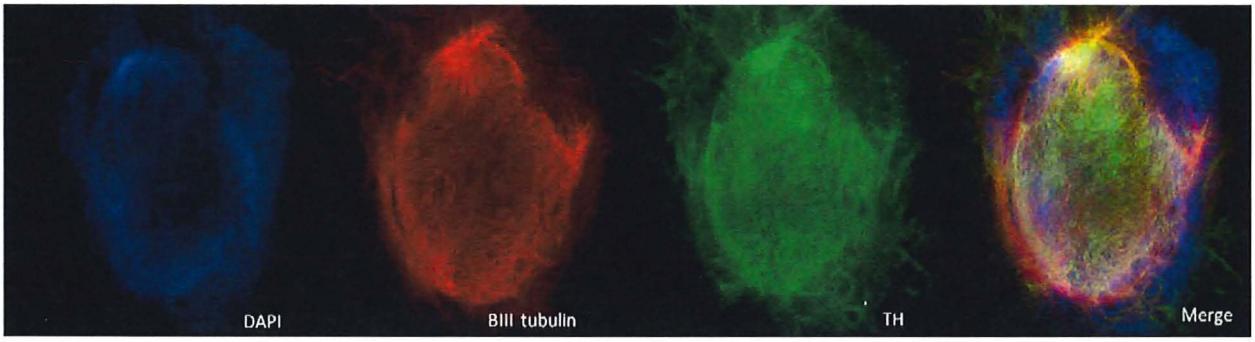
- ในสามวันแรกของการเลี้ยงจะทำการเติม 50μM Y-27632, 2μM dorsomorphin (DM) และ 10μM SB-431542 (SB) ลงไปใน differentiation medium ด้วย

- ทำการเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

- จากนั้น นำ sphere ที่ได้มาเพาะเลี้ยงต่อใน Petri dish โดยในวันที่ 14-28 จะทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ neurobasal medium ที่เสริมด้วย B-27, 2mM L-glutamine, 200 mg/ml Sonic hedgehog (Shh) และ 100 mg/ml fibroblast growth factor (FGF)-8

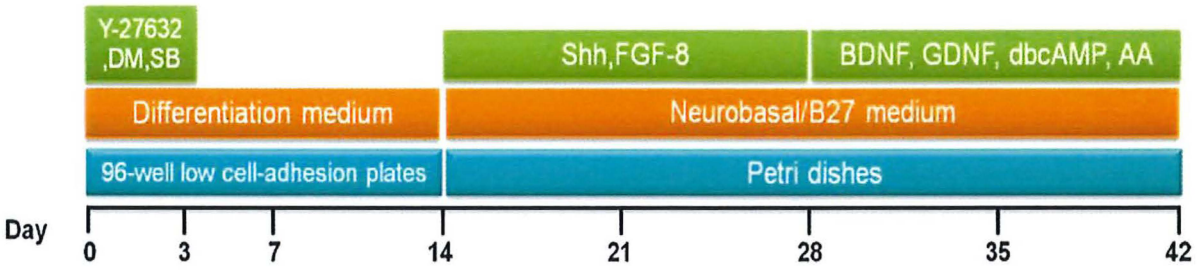
- หลังจากวันที่ 28 ทำการเพาะเลี้ยงโดยเปลี่ยนมาใช้ neurobasal medium ที่เสริมด้วย B-27, 2mM L-glutamine, 2 ng/ml glial cell–derived neurotrophic factor (GDNF), 10 ng/ml brain-derived neurotrophic factor (BDNF), 1mM dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) และ 200nM ascorbic acid(AA)

ปัจจุบันจากการสร้าง DA neuron ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถสร้าง hESC-derived spheres และชักนำให้เปลี่ยนแปลงเป็น DA neurons (ภาพที่7) ขณะนี้อยู่ระหว่างการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ที่ได้ต่อไป

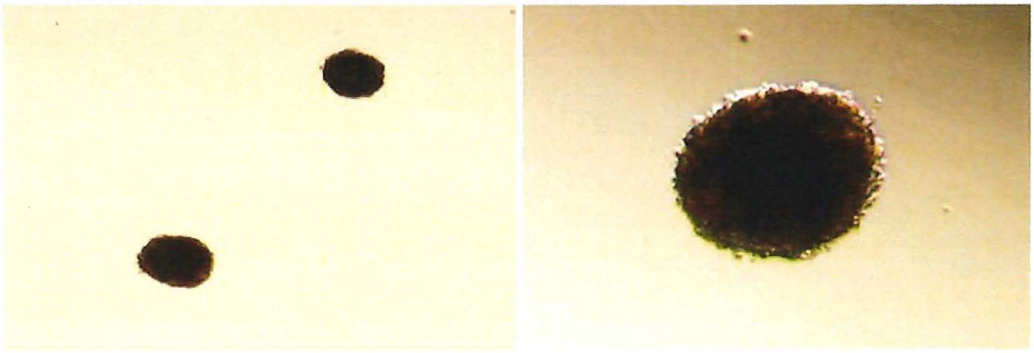


ภาพที่ 6 Dopaminergic neuron ที่สร้างได้จาก human Embryonic stem cell

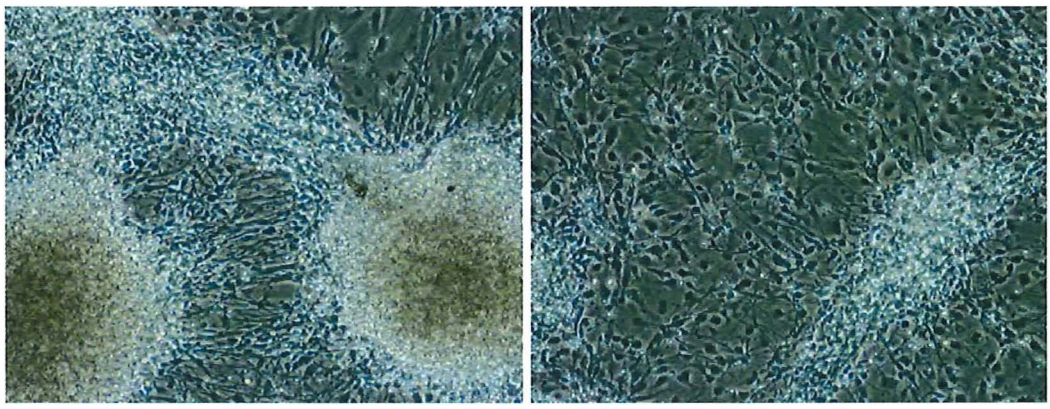
A.



B.



C.



ภาพที่ 7 การสร้าง Dopaminergic neuron จาก human Embryonic stem cell โดยไม่ใช้เซลล์พี่เลี้ยง

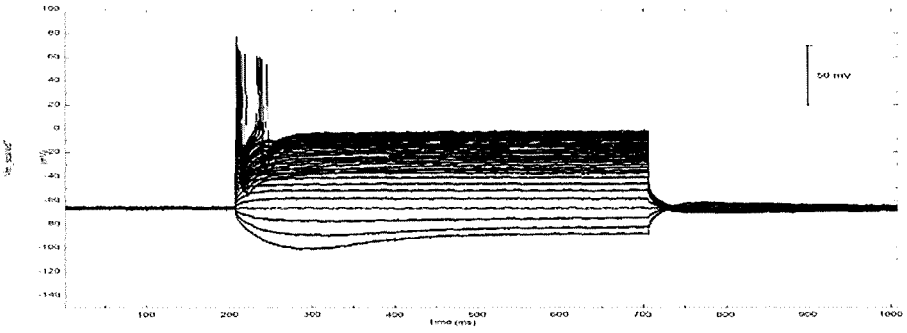
A. ขั้นตอนการสร้าง Dopaminergic neuron จาก human Embryonic stem cell

B. hESC-derived spheres ที่สร้างได้จาก human Embryonic stem cell หลังจากทดลอง 14 วัน

C. ลักษณะของเซลล์ประสาทที่ได้จาก hESC-derived spheres

3. การทดสอบคุณสมบัติของ dopaminergic neuron ที่สร้างได้

เพื่อทำการทดสอบว่า dopaminergic neuron ที่สร้างได้มีคุณสมบัติเหมือน dopaminergic neuron หรือไม่ เซลล์ที่สร้างได้จะนำมาทดสอบความสามารถในการเกิด action potential ด้วยเทคนิค Patch Clamp (Current Clamp แบบ Whole cell recording)



ภาพที่ 8 ตัวอย่างกราฟแสดงการเกิด action potential ของเซลล์ประสาทชนิด TG ที่แยกได้จากสัตว์ทดลอง

10. อภิปราย และวิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการวิจัย ทางกลุ่มวิจัยสามารถสร้าง dopaminergic neuron จาก iPSC โดยการเหนี่ยวนำด้วย growth factor ได้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกับที่มีรายงานในต่างประเทศ (ภาพที่ 6) และเมื่อทำการสร้าง dopaminergic neuron จาก iPSC โดยใช้ growth factor ร่วมกับการใช้โปรตีน Nurr1-MT-Akt ที่สร้างขึ้น (ภาพที่ 4) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้าง dopaminergic neuron ได้มากกว่าปกติ (ภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่า โปรตีน Nurr1-MT-Akt สามารถใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้าง dopaminergic neuron จาก iPSC ได้ 25

11. สรุป และเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

จากผลงานวิจัยในระยะเวลา 1 ปี ทางกลุ่มวิจัยได้สร้างไวรัสที่ใช้สำหรับควบคุม ควบคุม dopaminergic neuron differention, และสร้างระบบที่ใช้สำหรับการสร้าง, เพาะเลี้ยง และทดสอบ dopaminergic neuron สำเร็จแล้ว

สำหรับการวิจัยในขั้นต่อไป ทางกลุ่มวิจัยจะทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงเซลล์ผิวหนังไปเป็นเซลล์ dopaminergic neuron ด้วย ไวรัส และโปรตีนที่สร้างได้ และทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ประสาทที่สร้างได้ สำหรับเป็นแนวทางในการสร้างเซลล์ประมาทสำหรับการศึกษา และการนำไปใช้ต่อไปในอนาคต

12. บรรณานุกรม

1. Abeliovich, A. and R. Hammond (2007). "Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates." DevBiol 304(2): 447-54.

2. Alberi, L., P. Sgado, et al. (2004). "Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons." Development 131(13): 3229-36.

3. Andersson, E., J. B. Jensen, et al. (2006). "Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2." Development 133(3): 507-16.

4. Bussmann, L. H., A. Schubert, et al. (2009). "A robust and highly efficient immune cell reprogramming system." Cell Stem Cell 5(5): 554-66.

5. Campbell, K. H., J. McWhir, et al. (1996). "Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line." Nature 380(6569): 64-6.

6. Carson, C. T., S. Aigner, et al. (2006). "Stem cells: the good, bad and barely in control." Nat Med 12(11): 1237-8.

7. Davis, R. L., H. Weintraub, et al. (1987). "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts." Cell 51(6): 987-1000.

8. Feng, R., S. C. Desbordes, et al. (2008). "PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells." ProcNatlAcadSci U S A 105(16): 6057-62.

9. Fricker, R. A., M. K. Carpenter, et al. (1999). "Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain." J Neurosci 19(14): 5990-6005.

10. Hochedlinger, K. and R. Jaenisch (2003). "Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy." N Engl J Med 349(3): 275-86.

11. Ieda, M., J. D. Fu, et al. "Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors." Cell 142(3): 375-86.

12. Jaenisch, R. (2004). "Human cloning - the science and ethics of nuclear transplantation." N Engl J Med 351(27): 2787-91.

13. Kele, J., N. Simplicio, et al. (2006). "Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons." Development 133(3): 495-505.

14. Kim, D., C. H. Kim, et al. (2009). "Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins." Cell Stem Cell 4(6): 472-6.

15. Kim, J. H., J. M. Auerbach, et al. (2002). "Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease." Nature 418(6893): 50-6.

16. Lerou, P. H. and G. Q. Daley (2005). "Therapeutic potential of embryonic stem cells." Blood Rev 19(6): 321-31.

17. Maxwell, S. L., H. Y. Ho, et al. (2005). "Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantianigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development." DevBiol 282(2): 467-79.

18. Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science 255(5052): 1707-10.

19. Rideout, W. M., 3rd, K. Hochedlinger, et al. (2002). "Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy." Cell 109(1): 17-27.

20. Roy, N. S., C. Cleren, et al. (2006). "Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes." Nat Med 12(11): 1259-68.

21. Saucedo-Cardenas, O., J. D. Quintana-Hau, et al. (1998). "Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons." ProcNatlAcadSci U S A 95(7): 4013-8.

22. Schafer, B. W., B. T. Blakely, et al. (1990). "Effect of cell history on response to helix-loop-helix family of myogenic regulators." Nature 344(6265): 454-8.

23. Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell 131(5): 861-72.

24. Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell 126(4): 663-76.

25. Vierbuchen, T., A. Ostermeier, et al. "Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors." Nature 463(7284): 1035-41.

26. Wakayama, T., V. Tabar, et al. (2001). "Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer." Science 292(5517): 740-3.

27. Wallen, A. and T. Perlmann (2003). "Transcriptional control of dopamine neuron development." Ann N Y AcadSci 991: 48-60.

28. Wernig, M., J. P. Zhao, et al. (2008). "Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease." ProcNatlAcadSci U S A 105(15): 5856-61.

29. Yu, J., K. Hu, et al. (2009). "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences." Science 324(5928): 797-801.

30. Zhou, H., S. Wu, et al. (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins." Cell Stem Cell 4(5): 381-4.

31. Zhou, Q., J. Brown, et al. (2008). "In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells." Nature 455(7213): 627-32.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นพ.ดร. นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) NipanIsrasena MD., Ph.D.

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1008 00589 93 2

3. ตำแหน่งปัจจุบันผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

หน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคาร อ.ป.ร. ชั้น 9

ถนน ราชดำริ ลุมพินี ปทุมวัน กรุงเทพ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3590

โทรสาร 02-251-1965

Email nipan.i@chula.ac.th, inipan@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

1989- 1995	MD	ChulalongkornUniversityHospital, Bangkok, Thailand
1995- 1996		Neurology Fellow
		ChulalongkornUniversityHospital, Bangkok, Thailand
1997- 2003	PhD	Neuroscience, AlbertEinsteinCollege of Medicine
		New York, USA

i 28214250

NorthwesternUniversity, Chicago, USA (research fellow)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Neuroscience – Neural and embryonic stem cell biology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

a. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-

b. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

1: Israsena N, Mahavihakanont A, Hemachudha T. Rabies virus infection and microRNAs. Adv Virus Res. 2011;79:329-44. Review. PubMed PMID: 21601053.

2: Jalali A, Bassuk AG, Kan L, Israsena N, Mukhopadhyay A, McGuire T, Kessler JA. HeyL promotes neuronal differentiation of neural progenitor cells. J Neurosci Res. 2011 Mar;89(3):299-309. doi: 10.1002/jnr.22562. Epub 2011 Jan 5. PubMed PMID: 21259317; PubMed Central PMCID: PMC3079914.

3: Israsena N, Supavonwong P, Ratanasetyuth N, Khawplod P, Hemachudha T. Inhibition of rabies virus replication by multiple artificial microRNAs. Antiviral Res. 2009 Oct;84(1):76-83. Epub 2009 Jul 29. PubMed PMID: 19646485.

4: Laothamatas J, Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Ampawong S, Tepsumethanon V, Shuangshoti S, Phumesin P, Asavaphatiboon S, Worapruekjaru L, Avihingsanon Y, Israsena N, Lafon M, Wilde H, Hemachudha T. Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. J Neurovirol. 2008 Apr;14(2):119-29. PubMed PMID: 18444083.

5: Kan L, Israsena N, Zhang Z, Hu M, Zhao LR, Jalali A, Sahni V, Kessler JA. Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis. Dev Biol. 2004 May 15;269(2):580-94. PubMed PMID: 15110721.

6: Israsena N, Hu M, Fu W, Kan L, Kessler JA. The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. Dev Biol. 2004 Apr 1;268(1):220-31. PubMed PMID: 15031118.

7: Israsena N, Kessler JA. Msx2 and p21(CIP1/WAF1) mediate the proapoptotic effects of bone morphogenetic protein-4 on ventricular zone progenitor cells. J Neurosci Res. 2002 Sep 15;69(6):803-9. PubMed PMID: 12205674.

8: Israsena N, Phanthumchinda K, Sinsawaiwong S, Lerdlum S. Spontaneous carotid dissection. J Med Assoc Thai. 1997 Jun;80(6):406-10. PubMed PMID: 9240017.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายศักนัน พงศ์พันธุ์ผู้ภักดี ผศ.ดร.
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Saknan Bongsebandhu-phubhakdi, PhD
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1014-02236-60-7
3. ตำแหน่งปัจจุบันผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์
   (e-mail) ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   1873 ถนนพระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   saknan@live.jp
5. ประวัติการศึกษา

   1997-2001 B.Sc. Engineering (Bioengineering), Honors degree,
   Faculty of Bioscience and Biotechnology,
   Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan

   2001-2003 M.Sc. Engineering (Biological Information)
   Graduate School Bioscience and Biotechnology,
   Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan

   2003-2007 Ph.D. Medicine (Neuroscience)
   Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   Neurophysiology, Electrophysiology
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
   12.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

12.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

Role of nociceptin in the rat trigeminal system evoked by cortical spreading depression: Ratchadapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University (2007-2008)

Effects of serotonin depletion to synaptic transmission and synaptic plasticity in the hippocampus: The Thailand Research Fund(2009-2011)

12.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน(อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

Bongsebandhu-Phubhakdi S, Phisonkulkasem T, Srikiatkhachorn A.

Nociceptin/Orphanin FQ Modulates Cortical Activity and Trigeminal Nociception. Headache. 2011 Sep;51(8):1245-53.

Bongsebandhu-phubhakdi S, Manabe T. The Neuropeptide Nociceptin Is a Synaptically Released Endogenous Inhibitor of Hippocampal Long-Term Potentiation. *J Neurosci* 2007; 27: .4850-4858.

Bongsebandhu-phubhakdi S, Haruyama T, Kobatake E. Electrophysiological methods for drug assessment. ***Asian Biomed.***2007; 1: 265-272.

Bongsebandhu-phubhakdi S, Phisolkulkasem D, Srikiatkhachorn A. Enhancing effect of nociceptin in cortical spreading depression: electrophysiological study in animal model of migraine. ***Asian Biomed.*** 2009; 3: 325-329.Ratchadapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Bongsebandhu-phubhakdi S, Phisolkulkasem D, Srikiatkhachorn A.Nociceptin/Orphanin FQ modulates cortical activity and trigeminal nociception. Cephalalgia. 2010; on peer-review process.Ratchadapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Haruyama T, Bongsebandhu-phubhakdi S, Nakamura I, Mottershead D, Keinanen K, Kobatake E, Aizawa M. A Biosensing System Based on Extracellular Potential Recording of Ligand-Gated Ion Channel Function Overexpressed in Insect Cells. ***Anal. Chem.*** 2003; 75: 918-921.