รายงานการวิจัย

การใช้ Differentiation Therapy ในการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรมและความรุนแรงของเซลล์มะเร็งในการรักษามะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา

(Modulation of epigenetic profile and aggressiveness of Glioblastoma through differentiation therapy)

โดย

อาจารย์ ดร.นพัต จันทรวิสูตร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

This research is funded by Chulalongkorn University.

I would like to thank Center of Excellence in Systems Biology, Chulalongkorn University for all the supports.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย 1

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ 2

สารบัญเรื่อง 3

สารบัญตาราง 4

สารบัญรูปภาพ 5

บทนำ 6

- ที่มาและความสำคัญ 6
- การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 7
- วัตถุประสงค์โครงการ 11
- ขอบเขตของโครงการวิจัย 11
- ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย 11

วิธีดำเนินการวิจัย 12

- วัสดุ 12
- อุปกรณ์ 12
- น้ำยาและสารเคมี 13
- วิธีดำเนินการวิจัย 15

ผลการวิจัยและวิเคราะห์ผลการวิจัย 21

สรุปผลการวิจัย 31

แนวทางการดำเนินงานในอนาคต 32

บรรณานุกรม 33

สารบัญตาราง (List of Tables)

หน้า

ตารางที่ 1 Primers สำหรับ real-time PCR..17

สารบัญรูปภาพ (List of Illustration)

หน้า

รูปที่ 1 ความสามารถในการเจริญของเซลล์มะเร็งสมอง H4 และ U87MG ใน condition ที่มียา AZD8055 ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-4.0 μM)....21
รูปที่ 2 Wound healing assay ของเซลล์มะเร็งสมองสามชนิด ได้แก่ H4, LN229, และ U87MG....22
รูปที่ 3 ระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน ที่เกี่ยวข้องกับ mTOR signaling pathway....23
รูปที่ 4 ระดับการแสดงออกของยีน LIN28B และโปรตีน LIN28A/B ในเซลล์มะเร็งสมอง....23
รูปที่ 5 Wound healing assay เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ U87MG และ H4 ณ ชั่วโมงที่ 0 และ 16....24
รูปที่ 6 Western blotting analysis ของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ mTORC2 และ LIN28....25
รูปที่ 7 Wound healing assay ในสภาพการเลี้ยงเซลล์ U87MG แบบต่าง ๆ....25
รูปที่ 8 ตำแหน่งของโปรตีน RICTOR และ FLNA ในเซลล์ U87MG และ H4 วิเคราะห์โดยวิธี immunofluorescence staining....26
รูปที่ 9 Western blotting analysis ของเซลล์ U87 WT และ U87 RICTOR knockdown....27
รูปที่ 10 การแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยใช้คุณสมบัติ SSC และ FSC โดยสีแดงแสดงประชากรขนาดเล็กและสีน้ำเงินแสดงประชากรขนาดใหญ่....27
รูปที่ 11 แสดงกราฟข้อมูลการแสดงออกของยีน *RICTOR, OCT4, SOX2* และ *LIN28B*, เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรทั้งหมด ประชากรขนาดใหญ่ และประชากรขนาดเล็ก จากเซลล์ U87 WT และ U87 RICTOR KD (*, $p < 0.05$)....28
รูปที่ 12 ร้อยละการอยู่รอดของประชากรรวม ประชากรขนาดใหญ่ และประชากรขนาดเล็กของเซลล์ U87MG ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (*$p < 0.05$)....29
รูปที่ 13 ปริมาณโปรตีนจากส่วนต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่มีปฏิสัมพันธ์กับ mTORC2....30

(ภาษาไทย): การใช้ Differentiation Therapy ในการเปลี่ยนแปลงสภาวะเหนือพันธุกรรม และความรุนแรงของเซลล์มะเร็งในการรักษามะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา

(ภาษาอังกฤษ): Modulation of epigenetic profile and aggressiveness of Glioblastoma through differentiation therapy

ผู้วิจัย: อาจารย์ ดร.นพัต จันทรวิสูตร

บทคัดย่อ

มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา (Glioblastoma) เป็นมะเร็งสมองชนิดที่พบมากที่สุด และมีความรุนแรงมากที่สุดชนิดหนึ่งเมื่อเทียบกับมะเร็งชนิดอื่น ๆ โดยมีอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยต่ำ เนื่องจากทางเลือกของวิธีการรักษามีน้อย และผู้ป่วยมักเกิดการกลับเป็นซ้ำ นำมาซึ่งความจำเป็นในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชีววิทยาของเซลล์มะเร็งชนิดนี้ เพื่อเพิ่มความเข้าใจที่จะทำให้นำไปสู่หนทางการรักษาได้ในอนาคต การศึกษาวิจัยนี้ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของมะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา กับการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (stemness-related genes) โดยเฉพาะ LIN28/let-7 pathway และวิถีการส่งสัญญาณในเซลล์มะเร็ง โดยมุ่งเน้นศึกษาวิถีเอ็มทอร์สอง (mTORC2 signaling pathway) นอกจากนี้ ยังต้องการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง mTORC2 signaling pathway ในเซลล์มะเร็งสมองกับยีนดังกล่าว โดยในการศึกษานี้ ได้ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งกลัยโอมาชนิดเกรดสูง (U87MG) และเกรดต่ำ (H4) ได้แก่ ความสามารถในการเจริญ ความสามารถในการเคลื่อนที่ การแสดงออกของยีนและการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งพบว่า ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน LIN28B และระดับกิจกรรมของโปรตีนในวิถี mTORC2 ในเซลล์ U87MG มีความสอดคล้องกับความสามารถในการเคลื่อนที่ และความมีลักษณะคล้าย mesenchymal cells นอกจากนี้ ยังพบว่าตำแหน่งของกลุ่มโปรตีน mTORC2 ในเซลล์ น่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เซลล์มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมามีความรุนแรงมากกว่าเซลล์มะเร็งกลัยโอมาระยะเริ่มต้น ทั้งนี้ ในประชากรของ U87MG พบว่ามีลักษณะของความหลากหลายทางกายภาพสูง โดยมีเซลล์ที่มี ขนาดต่าง ๆ กันอยู่ในประชากร ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ ประชากรเซลล์ขนาดใหญ่ และ ประชากรเซลล์ขนาดเล็ก ซึ่งเมื่อทำการแยกเซลล์ทั้งสองประชากรออกจากกัน ก็พบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (*OCT4, SOX2* และ *LIN28B*) และยีนที่เกี่ยวข้องกับ mTORC2 (*RICTOR*) มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป และส่งผลต่อความสามารถในการเจริญ โดยหากเซลล์ประชากร ขนาดต่าง ๆ อยู่แยกจากกัน จะทำให้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดและอัตราการเจริญลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นข้อมูลที่จะสามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาได้ในอนาคต เพื่อเข้าใจถึงพื้นฐานและการสื่อสารภายใน เซลล์มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา รวมไปถึงมะเร็งชนิดอื่น ๆ ที่มีความรุนแรง เพื่อใช้สำหรับการพัฒนาวิธีการรักษาแบบใหม่โดยไม่มุ่งเน้นที่การทำลายเซลล์มะเร็งเป็นหลัก แต่เป็นการปรับให้ความรุนแรงของเซลล์มะเร็งลดลง

Abstract

Glioblastoma multiforme (Glioblastoma; GBM) is the most common type of malignant primary brain tumors. It is classified as a Grade IV astrocytoma, and also one of the most aggressive types of cancers with low survival rates. The median survival has not been much improved even though there are many new generations of therapies. GBM patients usually have few treatment options with high recurrence rates. Therefore, the knowledge about the cellular and molecular biology of GBM still need to be more elucidated to increase the understandings and opportunities for treatment development to improve patients' quality of lives. This research aims to study the relationships among aggressiveness of glioblastoma and stemness-related gene expressions, especially LIN28/let-7 pathway, and the signal transduction in GBM cells specifically the mTORC2 signaling pathway. In this study, high-grade glioma cell line (U87MG) is used as a representative of GBM. In comparison to GBM, we used the low-grade glioma cell line (H4). Characterizations of cell proliferation under different culturing conditions, cell migration, and expressions of genes and proteins involved with LIN28 and mTORC2 pathways were performed. In addition, the association between activities of mTORC2 and invasive characteristics was investigated. The results showed that LIN28B protein level and mTORC2 activity of U87MG are associated with cell migration ability. From our results, U87MG cells seem to acquire many stem cell-like properties such as loss of cell-cell adhesion, highly migratory, and expressions of the stemness-related genes that correlate with the highly aggressive behavior. Besides, membrane localization of mTORC2 in U87MG might also be one of the supportive properties for the cells to have enhanced aggressiveness. Moreover, we further investigated whether the heterogeneity of U87MG has any effects on its invasive phenotype by sorting cells by their sizes into large and small populations using FACS. Comparing between two populations being cultured together or separately, our results showed that when large and small U87MG cells were cultured together, the proliferation rate is higher. The expression of three stemness-related genes (*OCT4*, *SOX2* and *LIN28B*) and mTORC2-related gene (*RICTOR*) was found to be significantly higher. Therefore, it is supposed that the intercellular and intracellular regulations of the cancer cells are important to their characteristics. Ultimately, the knowledge from this study might apply to other deadly cancers, and become beneficial for the improvement of current therapeutics or the development of new treatments focusing on reducing the aggressiveness of cancer cells by promoting cell differentiation.

บทนำ (INTRODUCTION)

ที่มาและความสำคัญ

มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมาเป็นมะเร็งสมองชนิดที่พบมากที่สุด และมีความรุนแรงมากที่สุดชนิดหนึ่ง ทำให้คนไข้โดยเฉลี่ยเสียชีวิตภายในระยะเวลาประมาณไม่เกิน 18 เดือน ทั้งนี้ วิธีการรักษายังมีไม่มาก และมะเร็งมักต้านทานต่อการรักษาทำให้การรักษาไม่ได้ผล จึงนับเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่ต้องการการแก้ไข ด้วยความสำคัญของมะเร็งชนิดนี้ National Research Council of Thailand Grant (under the Research University Network Initiative) จึงได้สนับสนุนโครงการความร่วมมือที่มีจุดมุ่งหมายเพื่อการเก็บรวบรวมตัวอย่างของมะเร็งสมองของคนไข้ไทย โดยจะทำการประเมินด้วย Molecular classification ล่าสุดของ WHO ด้วย markers ที่แนะนำไว้เดิม นอกจากนี้ เพื่อใช้โอกาสดังกล่าวให้เป็นประโยชน์สูงสุด ผู้วิจัยจึงต้องการต่อยอดนำกลุ่มตัวอย่างมาค้นหา markers ใหม่เพิ่มเติม อีกทั้งต้องการทำการค้นคว้าวิจัยในเชิงลึก เพื่อหาวิธีการรักษาใหม่ โดยความเข้าใจ เกี่ยวกับด้านสภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) และคุณสมบัติของกลุ่มประชากรย่อยของเซลล์มะเร็ง ที่ใกล้เคียงกับสเต็มเซลล์ทำให้แนวคิดใหม่อย่าง differentiation therapy ซึ่งคือการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็ง ที่มีความรุนแรงสูงและมีคุณสมบัติใกล้เคียง ความเป็นสเต็มเซลล์ได้เปลี่ยนแปลงสถานะของเซลล์มาเป็นเซลล์ ที่จำเพาะเจาะจงมากขึ้นอันจะทำให้มะเร็งมีความรุนแรง (aggressiveness) และมีโอกาสกลับเป็นซ้ำลดลง เป็นวิธีที่เพิ่มความเป็นไปได้ในการรักษาให้หายขาดหรือควบคุมความรุนแรงของโรค จนไม่กระทบต่อสุขภาพของผู้ป่วย ด้วยสาเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจเกี่ยวกับกลุ่มยีนที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสถานะของเซลล์ (differentiation) โดยเฉพาะ LIN28/let-7 pathway ซึ่งทำงานในระดับของสภาวะเหนือพันธุกรรม และเห็นว่าการใช้ small interfering RNA (siRNA) มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้รักษาระดับคลินิก จึงเห็นความสำคัญที่จะทำความ เข้าใจกลไกของ LIN28/let-7 pathway และทดสอบประสิทธิภาพของการใช้ differentiation therapy ในการปรับเปลี่ยนสภาวะเหนือพันธุกรรมและลดความรุนแรงในเซลล์มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา ซึ่งผลที่ได้จะเป็นแนวทางอันนำไปสู่การนำ siRNA therapy เข้าสู่การประยุกต์ใช้เป็นการรักษาใหม่ต่อไป

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

Glioblastoma (GBM)

กลัยโอบลาสโตมาเป็นมะเร็งสมองชนิดรุนแรง พบได้มากที่สุดคือราว 15% ของมะเร็งสมองทั้งหมด การรักษาปัจจุบันเน้นใช้การผ่าตัด ควบคู่ไปกับการใช้คีโมและการฉายรังสี อย่างไรก็ดีมะเร็งมักต้านทานต่อการรักษาทำให้การรักษาไม่ได้ผล คนไข้กลับมาเป็นมะเร็งใหม่หลังการรักษาภายในระยะเวลาอันสั้น ทำให้คนไข้โดยเฉลี่ยเสียชีวิตภายในหนึ่งปีและมีคนไข้ที่รอดชีวิตไปได้นานถึงสามปีเพียง 3-5 % เท่านั้น (Gallego, O., 2015) มะเร็งสมองชนิดนี้ เกิดมาจากเซลล์เกลียหรือเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เกลียในสมองส่วนกลาง ความรุนแรงของมะเร็งสมองชนิดนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์โดยเซลล์ที่มีคุณสมบัติเข้าใกล้สเต็มเซลล์ต้นกำเนิดมาก ก็จะยิ่งมีความรุนแรง (aggressiveness) มาก ส่งผลต่อโอกาสที่จะรักษาได้ผลวิถีสัญญาณและกระบวนการในเซลล์ที่ปัจจุบันพอทราบกันว่ามีบทบาทในมะเร็งชนิดนี้ ได้แก่ยีนที่เกี่ยวข้องกับ cell cycle, aging และ morphogenesis (Serão, Nicola VL, et al., 2011) โดยเฉพาะยีนที่เป็นตัวหลักในมะเร็งหลายชนิด เช่น *RAS*, *TP53*, *PIK3* และ *CDKN2A/B* เป็นต้น (Appin, Christina L., and Daniel J. Brat., 2014) โดยยีนที่มีความพยายามที่จะใช้ยารักษาแบบมุ่งเป้าคือ *EGFR* ซึ่งพบว่าถูก amplified มากถึง 40-50% ในมะเร็งชนิดนี้ (Parsons, D. Williams, et al., 2008) และหนึ่งในวิถีสัญญาณที่ถูกกระตุ้นโดยโปรตีน EGFR คือ PI3K/AKT/mTORC1 ซึ่งพบว่าสัญญาณนี้ถูกกระตุ้นในมะเร็งกลัยโอบลาสโตมากถึง 90% จากต้นเหตุต่าง ๆ กันทำให้ช่วงหลังมีการหันมาศึกษาถึงผลของการใช้ inhibitor ของ mTOR เช่น rapamycin ในการยับยั้งมะเร็งกลัยโอบลาสโตมาเพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ดี ภายหลังพบว่ามะเร็งบางกลุ่มมีโปรตีน EGFR ที่กลายพันธุ์ทำให้ยายับยั้งไม่ได้ผล อีกทั้งพบว่ามะเร็งชนิดนี้มักมีการแสดงออกของ mTORC2 เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งยา rapamycin ไม่ได้มีคุณสมบัติในการยับยั้ง mTORC2 (Cloughesy, Timothy F., Webster K. Cavenee, and Paul S. Mischel., 2014)

Differentiation therapy

ความเข้าใจที่มีมากขึ้นเกี่ยวกับ cancer stem cells และกระบวนการเจริญจนสมบูรณ์ของเซลล์ (cell differentiation) ทำให้มีความพยายามที่จะเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงสเต็มเซลล์นั้นมีคุณสมบัติเป็นเซลล์จำเพาะ (differentiate) เพื่อลดความรุนแรงของเซลล์มะเร็งลง ซึ่งในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมามีการใช้ความรู้ที่ว่า bone morphogenic protein (BMP) สามารถเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงสเต็มเซลล์ของระบบประสาทเป็นเซลล์แอสโทรไซต์ได้ มาใช้เป็นแนวคิดในการให้ BMP แก่เซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมาเพื่อนำมาใช้เป็นการรักษาใหม่ อย่างไรก็ดีพบว่าการใช้ BMP นั้นยังมีข้อจำกัด เพราะแม้เซลล์ที่ได้รับ BMP จะเริ่มมีคุณสมบัติหลายอย่างใกล้เคียง differentiated cells แต่ก็ยังมีคุณสมบัติของสเต็มเซลล์หลงเหลืออยู่แสดงถึงการเหนี่ยวนำที่ไม่สมบูรณ์ (Carén, Helena, et al., 2015) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาโมเลกุลที่ยับยั้งการทำงานของ phosphodiesterase 4 (PDE4) พบว่าการให้โมเลกุลนี้แก่เซลล์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำ differentiation ได้ ซึ่งเมื่อ นำเซลล์มะเร็งของมนุษย์ไปปลูกถ่ายในหนู ก็พบว่าเซลล์มะเร็งนั้นเจริญไปเป็นเซลล์ประสาทเต็มวัยได้ (Kang, Tae-Wook, et al., 2014) ส่งเสริมแนวคิดในการใช้

differentiation therapy ในการรักษา อย่างไรก็ดีการใช้ BMP หรือ โมเลกุลเหล่านี้ก็ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากแนวคิดนี้ยังอยู่ในระยะเริ่มต้น จึงต้องมีการศึกษาวิจัยต่อเนื่องถึงความเป็นไปได้ และค้นหาโมเลกุลชนิดอื่นหรือเป้าหมายอื่น เพื่อก้าวข้ามข้อจำกัดต่าง ๆ ต่อไป

LIN28/let-7 pathway controls differentiation and metabolism through epigenetic mechanisms

ในงานวิจัยด้านสเต็มเซลล์มีการค้นพบว่า LIN28/let-7 pathway เป็นหนึ่งในวิถีที่ควบคุมสภาวะความเป็นสเต็มเซลล์และความเป็นเซลล์จำเพาะ (undifferentiated vs differentiated states) LIN28 เองนั้นเป็น RNA binding protein ที่มีบทบาทควบคุมทั้งการเจริญเติบโตเมตาบอลิซึม และวัฏจักรของเซลล์ ในปี 2008 นักวิจัยค้นพบว่า LIN28 นั้นสามารถจับกับ microRNA ที่ชื่อว่า let-7และยับยั้งกระบวนการสร้าง mature let-7 ได้ และในทางกลับกัน let-7 microRNAs ก็ยับยั้ง LIN28 ด้วยการจับกับ 3'UTR และทำให้ mRNA ถูกย่อยสลายหรือไม่ถูกแปลเป็นโปรตีน (Viswanathan, Srinivas R., George Q. Daley, and Richard I. Gregory., 2008) การที่ LIN28/let-7 ทำหน้าที่ตรงข้ามและยับยั้งกันและกันนั้น ทำให้เซลล์สามารถดำรงอยู่ในสภาวะใดสภาวะหนึ่งได้ กล่าวคือ ถ้า LIN28 สูง ก็จะยับยั้ง let-7 และทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะของสเต็มเซลล์ กลับกันในเซลล์ที่จำเพาะเจาะจง จะมีระดับ let-7 สูง และ let-7 เหล่านี้ก็จะยับยั้ง LIN28 ทำให้ระดับของ LIN28 ต่ำ การทดลองพบว่าหากใส่ let-7 ในสเต็มเซลล์ปริมาณมากและลด LIN28 ก็จะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ differentiate ได้ (Melton, Collin, Robert L. Judson, and Robert Blelloch., 2010)

บทบาทการทำงานของ LIN28/let-7 ในการควบคุมเมตาบอลิซึมมีรายงานชี้ให้เห็นว่า บทบาทของ LIN28 นั้นส่วนหนึ่งผ่านการยับยั้ง let-7 ซึ่งยับยั้ง IGF1R, INSR, IRS2, PIK3IP1, AKT2, TSC1 and RICTOR อันเป็นส่วนหนึ่งของวิถีสัญญาณ Insulin-PI3K-mTOR (Zhu, Hao, et al., 2011) โดยเฉพาะ RICTOR นั้นเป็นส่วนหนึ่งของ mTORC2 ด้วยซึ่งหมายความว่า LIN28/let-7 อาจยับยั้งครอบคลุมได้ทั้ง mTORC1 และ mTORC2 นอกจากหน้าที่ในการควบคุม let-7 microRNA แล้ว LIN28 ก็ยังสามารถจับกับ mRNA และควบคุมการสร้างโปรตีนจาก mRNA ที่เป็นเป้าหมายเหล่านั้นได้ ความเปลี่ยนแปลงของ LIN28 จึงมีผลที่ครอบคลุมกว้างกว่าผลที่ผ่านทาง let-7 เพียงอย่างเดียว (Shyh-Chang, Ng, and George Q. Daley, 2013) โดยหนึ่งใน mRNA target ของ translational regulation ของ LIN28 ก็คือ IGF2 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ Insulin signaling เช่นกัน ล่าสุดนี้ ผู้วิจัยพบว่าการควบคุมเมตาบอลิซึมของ LIN28 ก็มีผลต่อสภาวะความเป็นสเต็มเซลล์โดยการควบคุมจาก LIN28 มีส่วนที่ไม่ได้ผ่าน let-7 แต่เป็นการจับกับ mRNA target เพื่อควบคุมระดับของ protein ที่มีหน้าที่เกี่ยวของกับกระบวนการ oxidative phosphorylation (OxPhos) ส่งผลให้เซลล์ใช้กระบวนการ glycolysis มากกว่า OxPhos ซึ่งมีผลต่อสถานะของสเต็มเซลล์ (Zhang, Jin, Ratanasirintrawoot, Sutheera et al., 2016) ซึ่งการเปลี่ยนจากการใช้ OxPhos ไปเป็น glycolysis นั้นเป็นปรากฏการณ์ที่พบในมะเร็งเช่นกันที่เรียกว่า Warburg Effect ดังนั้นจะเห็นได้ว่า differentiate state และ metabolic state ของเซลล์มีความเกี่ยวโยงกัน โดย LIN28 pathway เป็นตัวที่ควบคุมทั้งคู่ การมุ่งปรับเปลี่ยน LIN28 ในเซลล์มะเร็งจึงน่าจะมีผลดี เพราะช่วยปรับเปลี่ยนหลายกระบวนการดังกล่าว ไปในทิศทางเดียวกัน

การทำงานของ LIN28 ถือได้ว่าผ่าน epigenetic mechanism ในหลายระดับไม่ว่าจะเป็นผ่านการยับยั้งกระบวนการการสร้าง microRNA (microRNA processing/maturation) ผ่านการควบคุมการเกิด translation ของ mRNAs ที่เป็นเป้าหมาย ซึ่งมีทั้งการยับยั้งและการกระตุ้น และในการทดลองในสเต็มเซลล์พบว่าการยับยั้ง LIN28 ส่งผลให้เกิด hypomethylation ของ H3K9 and H3K27 และพบว่าระดับของ H3K9me3 และ H3K27me3 ที่ promoter ของยีนที่สำคัญในสภาวะพลูริโพเทนท์ของสเต็มเซลล์ลดลง และเมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานว่า LIN28A สามารถจับกับดีเอนเอได้โดยทำงานร่วมกับ TET1 ในการเปลี่ยนแปลง DNA methylation โดยตรง (Zeng, Yaxue, et al., 2016) ซึ่งการทำงานในลักษณะนี้ยังมีเพียงรายงานเดียวจึงยังต้องรอการพิสูจน์และศึกษาเพิ่มเติมจากกลุ่มวิจัยอื่นๆ ควบคู่ไปด้วยเพื่อยืนยันต่อไป

<u>LIN28/let-7 pathway in cancer</u>

ในด้านมะเร็งนั้นมีรายงานเกี่ยวกับบทบาทของ LIN28/let-7 เช่นกันโดยส่วนมากเป็นความสัมพันธ์ของ LIN28B (LIN28 paralog) กับมะเร็งหลายชนิด เช่น ในมะเร็งเต้านม มะเร็งสมองชนิดนิวโรบลาสโตมา มะเร็งลำไส้ มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น (Zhou, Jianbiao, Siok-Bian Ng, and Wee-Joo Chng., 2013) ล่าสุดในปี 2014 งานวิจัยในมะเร็งตับของกลุ่มเดิมของผู้วิจัยได้รายงานหลักฐานที่หนักแน่นของบทบาทของ LIN28B ในกระบวนการ เกิดและดำเนินไปของมะเร็ง และยังพบว่าการยับยั้ง LIN28B ด้วย การให้ siRNAs ผ่านการฉีดเข้าเส้นเลือดหรือเยื่อบุช่องท้องนั้น ให้ผลดีในรักษามะเร็งในหนู นอกจากนั้นยังได้ค้นพบว่า RNA binding protein อีกตัวหนึ่งคือ IGF2BP3 (IMP3) เป็นยีนที่ถูกควบคุมโดย LIN28/let-7 และมีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งตับจากการแสดงออก ของ LIN28B อีกด้วย (Nguyen, Liem H., et al., 2014)

จากความสัมพันธ์ที่เพิ่งค้นพบใหม่เหล่านี้เองผู้วิจัยจึงต้องการที่จะศึกษาว่า LIN28 และ IMP3 นั้นเป็นยีนที่สำคัญในการเกิดมะเร็งกลัยโอบลาสโตมาและมีความเกี่ยวข้องกับลักษณะที่รุนแรง (aggressive) ของมะเร็งกลัยโอบลาสโตมาหรือไม่ จากการสืบค้นพบเพียงสองรายงานเท่านั้นที่ได้พูดถึงบทบาทของ LIN28A ในมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา โดยพบว่าระดับของ LIN28 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อมีความสัมพันธ์กับระยะเวลารอดชีวิตของคนไข้ และแสดงให้เห็นว่าการลด LIN28A ในเซลล์ไลน์ลดปริมาณการเกิดโคโลนีของเซลล์มะเร็ง (Qin, Rong, et al., 2014) และอีกรายงานหนึ่งพบการแสดงออกของ LIN28A และ LIN28B ในมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา และพบว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีนนี้ในเซลล์ สามารถส่งเสริมการเติบโตของมะเร็งในหนูเมื่อนำเซลล์ไปปลูกถ่าย และพบว่าสำหรับสเต็มเซลล์ระบบประสาท (neural stem cells) ที่มี P53-/KRAS/TERT การแสดงออกของ LIN28A จะส่งเสริมการเกิดมะเร็ง ดังจะเห็นได้จากอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำเมื่อนำเซลล์มะเร็งไปปลูกถ่ายในหนู (Mao, X. G., et al., 2013)

ในส่วนของ IMP3 นั้น สืบค้นพบเพียงสามรายงาน ชิ้นแรกพบว่า IMP3 เป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้ที่แสดงถึง gender-dependent association ของ progression and survival ของมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา (Serão, Nicola VL, et al., 2011) ชิ้นที่สองรายงานถึงความสำคัญของ IMP3 ในการกระตุ้น PI3K/MAPK ผ่าน IGF2 และความสามารถในการเป็นตัวบ่งชี้ของมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา (Suvasini, Ramaswamy, et al., 2011) และชิ้นที่สามรายงานถึงการทำงานของ miR-129-1 ในการยับยั้ง IMP3 ส่งผลให้เกิด cell cycle arrest

ในเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมา (Kouhkan, Fatemeh, et al., 2016) การที่ความสัมพันธ์ของทั้ง LIN28A/LIN28B, IMP3 และ let-7 มีการศึกษาน้อยและยังไม่ได้ถูกศึกษาอย่างละเอียด เป็นโอกาสอันดีที่เราจะทำความเข้าใจ เกี่ยวกับการทำงานของกระบวนการเหล่านี้ ในมะเร็งกลัยโอบลาสโตมาและโอกาสที่ยีนในกลุ่มนี้ จะเป็นตัวบ่งชี้หรือตัวพยากรณ์โรคหรือตัวพยากรณ์ความต้านทานการรักษา ที่มีประสิทธิภาพดีสำหรับใช้ในการวินิจฉัยมะเร็งกลัยโอบลาสโตมา รวมถึงการใช้ความเข้าใจเกี่ยวกับสเต็มเซลล์และ LIN28/let-7 มาศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ differentiation therapy เพื่อนำไปสู่การใช้ siRNA treatment รักษามะเร็งกลัยโอบลาสโตมา

<u>RNA delivery methods</u>

เทคโนโลยีความก้าวหน้าในการนำส่ง RNA เข้าสู่เซลล์มะเร็งนั้นรุดหน้าไปมาก ข้อดีของ RNA ที่เล็กมวลโมเลกุลน้อย และมีประจุ ทำให้การนำส่งด้วย liposome, nanoparticle หรือ การทำ conjugate ระหว่าง RNA กับ โมเลกุลนำส่งโดยตรงมีศักยภาพสูง การใช้ RNA ในการรักษานั้นมีที่เข้าสู่ clinical trial แล้วมากมาย ทั้ง microRNAs เช่น การใช้ miR-34 ในการรักษามะเร็งตับซึ่งอยู่ Phase I (Farooqi, Ammad Ahmad, et al., 2016) และการใช้ siRNAs ที่มีเข้าถึงทั้ง Phase I และ Phase II และมีหนึ่งตัวคือ Patisiran ที่ ใช้ GalNAc conjugate กับ siRNA โดยตรงซึ่งขณะนี้เข้าสู่ Phase III trial แล้ว (Zuckerman, Jonathan E., and Mark E. Davis., 2015) นอกจากนี้การใช้ gene therapy ก็มีความก้าวหน้าและได้รับการยอมรับมากขึ้นเช่นกัน รวมทั้งมีการทดลองจริง ในคนไข้ใน clinical trials ของหลายๆ โรคเช่น โรคของระบบเลือด และ โรคตับ แล้วเห็นผลการรักษาที่ดี (Naldini, Luigi., 2015) ซึ่งหากโครงการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการรักษาเหล่านี้ด้วย RNA ได้ผลดี ก็น่าจะสามารถเป็นตัวนำร่องให้กับโครงการต่อเนื่องที่จะศึกษาประสิทธิภาพของการนำส่งรูปแบบต่างๆ เช่นการใช้ nanoparticles หรือ lentiviral vectors เพื่อทดสอบในระดับสัตว์ทดลองเป็นขั้นตอนต่อไป

วัตถุประสงค์โครงการ :

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพใหม่ที่จะใช้จำแนกกลุ่ม และพยากรณ์โรค หรือพยากรณ์การต้านการรักษาของมะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา เพื่อเป้าหมายในการเป็นตัวช่วยสำหรับการวินิจฉัยของแพทย์ และศึกษาศักยภาพของการใช้ differentiation therapy ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมาโดยจะทำความเข้าใจเกี่ยวกับ LIN28/let-7 pathway ซึ่งประกอบด้วย RNA binding proteins และ microRNAs ที่มีบทบาทในกลไกการเกิดโรคและการดำเนินไปของโรคมะเร็งสมองกลัยโอ-บลาสโตมา ผ่านทางกระบวนการควบคุมสภาวะเหนือพันธุกรรม และทดสอบการใช้ small RNA treatment เพื่อเปลี่ยนแปลง pathway ดังกล่าว โดยจะวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับการแสดงออกของยีนและระดับโปรตีน เพื่อทำความเข้าใจเครือข่าย เชื่อมโยงของการควบคุม วิเคราะห์ epigenetic profile ของเซลล์ซึ่งจะสะท้อนถึง ความสมบูรณ์ในการ เปลี่ยนแปลงสถานะของเซลล์ รวมถึงตรวจสอบคุณลักษณะความรุนแรงและกระบวนการภายในเซลล์ของเซลล์มะเร็ง เพื่อดูผลของการรักษา อันจะให้ความเข้าใจเกี่ยวกับศักยภาพของการนำวิธีนี้ไปใช้ในการรักษาจริงในคนไข้ต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะศึกษาในเซลล์ไลน์มะเร็งสมองซึ่งได้แก่ U87MG และ H4 และทำการทดสอบให้การรักษาด้วยวิธี differentiation therapy และวิเคราะห์การทำงานของกลุ่มยีนที่สนใจในระดับหลอดทดลองเท่านั้น

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

ในปัจจุบันมีความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับคุณสมบัติของเซลล์ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ความรุนแรงและความสามารถในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และมีความรู้เกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติเหล่านั้น เนื่องจากมะเร็งสมองชนิด กลัยโอบลาสโตมามีความรุนแรงสูง และมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับสเต็มเซลล์ จึงมีแนวคิดว่าการเปลี่ยนแปลงสถานะ ให้เซลล์จำเพาะเจาะจงมากขึ้น จะเป็นหนึ่งในวิธีการรักษาที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งมะเร็งชนิดนี้ จากการศึกษาสเต็ม เซลล์และมะเร็งชนิดอื่นพบว่า LIN28/let-7 pathway สามารถควบคุมกระบวนการ differentiation ได้โดยผ่าน epigenetic mechanisms ดังนั้นหาก LIN28/let-7 pathway มีบทบาทสำคัญในมะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมาจริง การเปลี่ยนแปลงกระบวนการนี้ในเซลล์มะเร็งโดยการใช้ small interfering RNA (siRNA) treatment เพื่อลดหรือเพิ่มยีนที่มีบทบาทหลักจะสามารถเหนี่ยวนำลดคุณสมบัติความเป็นสเต็มเซลล์ และลดความรุนแรงของเซลล์มะเร็ง จนมีประสิทธิภาพในการใช้รักษาได้ นอกจากนี้ความเข้าใจในกลไกการทำงาน ของ LIN28/let-7 pathway ยังจะทำให้สามารถค้นพบเป้าหมายอื่น ๆ ทั้งใน pathway นี้และ pathway อื่นที่เชื่อมโยงกันที่ถูกกระตุ้นในเซลล์มะเร็งชนิดนี้ อันจะนำมาซึ่งการหาเป้าหมายการรักษาใหม่ได้อีกด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย (MATERIALS & METHODS)

1. วัสดุ (Materials)

1. Automatic pipette: (0.1-0.2 µl), (0.5-10.0 µl), (2.0-20.0 µl), (20.0-200.0 µl) and (100-1,000 µl) (Eppendorf, Germany)
2. Micro centrifuge tube: 1.5 ml (ExtraGene, USA)
3. Parafilm (Plastic Packaging, USA)
4. Petri dishes: 100 mm, 150 mm (Thermo Scientific, USA)
5. PCR tube: 0.2 ml and 0.5 ml (Bioline, USA)
6. Pipette tip: 10 µl, 20 µl, 200 µl and 1,000 µl (Thermo Scientific, USA)
7. Plate: 6 and 96 Well Plate (Thermo Scientific, USA)
8. Polypropylene conical tube: 15 ml and 50 ml (ExtraGene, USA)
9. Real-Time PCR tube (Kisker Biotech, Netherlands)

2. อุปกรณ์ (Equipments)

1. Autoclave (Hirayama, USA)
2. BD FACSAria™ II (Becton Dickinson, USA)
3. Q Exactive Orbitrap Mass spectrometer (Thermo, USA)
4. LSM800 confocal microscope (Zeiss, Germany)
5. Centrifuge Universal 320r (Hettich Centrifuge, UK)
6. Class II Laminar Airflow (Thermo Scientific, USA)
7. Electrophoresis chamber set (Major Science, USA)
8. SDS-PAGE chamber set (Bio-Rad, USA)
9. Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
10. Freezer -80°C (Panasonic, Japan)
11. Heating block (Bioer Technology, USA)
12. Microwave oven (Sharp, Japan)
13. Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA)
14. StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Scientific, USA)

3. น้ำยาและสารเคมี (Reagents and chemicals)

- น้ำยาสำหรับใช้ในการสกัด RNA

1. Absolute ethanol (Merc, Germany)
2. Chloroform (RCI Labscan, Thailand) 3. Nuclease free water
3. DNase I (Cat. no. M0303S, New England Biolabs, England)

4. QIAzol Lysis Reagent (Cat. no.79306217004, Qiagen, Germany)
5. miRNeasy Mini Kit (Cat. no. 217004, Qiagen, Germany)

- **cDNA reverse transcription kit**

1. miRCURY LNA RT kit (Qiagen, Germany)

- **น้ำยาสำหรับใช้ในการทำ agarose gel electrophoresis**

1. Agarose molecular grade (AMRESCO, USA)
2. EDTA Tetrasodium Dihydrate (USB, Hongkong)
3. RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (INtRON, USA)
4. 100 base pair DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

- **น้ำยาสำหรับใช้ในการทำ Real-Time PCR**

1. 2X Luna® Universal SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Cat. no.M3003, New England Biolabs, England)
2. Specific primers (Integrated DNA Technologies, Singapore)

- **น้ำยาสำหรับใช้ในการเลี้ยงเซลล์**

1. 0.25% Trypsin EDTA (Gibco)
2. Antibiotic-Antimycotic (Gibco)
3. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low glucose (Hyclone)
4. Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone)
5. DMSO (Sigma-Aldrich, USA)

- **น้ำยาสำหรับใช้ในการทำ Cell proliferation assay**

1. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Cat. no.G358c, Promega)

- **น้ำยาสำหรับใช้ในการทำ SDS-PAGE, Western Blotting analysis และ IP**

1. Polyacrylamide (*Thermo* Fisher Scientific, USA)
2. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Affymetrix, USA)
3. Tris (Affymetrix, USA)
4. Tris-HCl (Affymetrix, USA)
5. Sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich, USA)
6. Ammonium persulfate (APS)
7. EDTA (Affymetrix, USA)
8. Glycine (OmniPur, USA)
9. Dithiothreitol (DTT) (GE Healthcare, USA)

10. N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
11. Triton-X-100 (Affymetrix, USA)
12. EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, USA)
13. Tris-buffered saline (TBS) (Affymetrix, USA)
14. β-mercaptoehanol (Sigma-Aldrich, USA)
15. Tween 20 (Affymetrix, USA)
16. Bromophenol blue (Sigma-Aldrich, USA)
17. Coomassie Brilliant Blue (*Thermo* Fisher Scientific, USA)
18. Bradford reagent (BIO-RAD, USA)
19. Blocking buffer (LI-COR, USA)
20. Methanol (Sigma-Aldrich, USA)
21. Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA)
22. Hepes (Merck, USA)
23. Protein A and protein G magnetic beads (*BIO-RAD*, USA)
24. CHAPS (Sigma-Aldrich, USA)
25. Sodium chloride (Merck, USA)

- **น้ำยาสำหรับใช้ในการย้อมเซลล์ (Immunofluorescence staining)**
  1. Anti-fade solution (Invitrogen, USA)
  2. Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)
  3. DAPI (Invitrogen, USA)
  4. Ethanol (Merck, USA)
  5. Paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)
- mTOR inhibitor
  1. AZD8055 (STEMCELL Technologies, Canada)
  2. Rapamycin (STEMCELL Technologies, Canada)
- **แอนติ้บอดี้**
  1. Alexa Fluor 488, anti-rabbit IgG (Life Technologies, USA)
  2. Anti-Alexa Fluor 568, anti-mouse IgG (Life Technologies, USA)
  3. RDye 680RD Goat anti-Rabbit IgG (LI-COR, USA)
  4. IRDye 800RD Goat anti-Mouse IgG (LI-COR, USA)
  5. AKT (pan) antibody (Cell Signaling Technology, USA)
  6. pAKT (Ser473) antibody (Cell Signaling Technology, USA)

7. RICTOR antibody (Abcam, England)
8. S6 antibody (Cell Signaling Technology, USA)
9. pS6 antibody (Ser235/236) (Cell Signaling Technology, USA)
10. LIN28A antibody (Cell Signaling Technology, USA)
11. LIN28B antibody (Cell Signaling Technology, USA)

- **น้ำยาสำหรับการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโทรเมทรี**

1. Acetonitrile (Honeywell)
2. Formic acid (FA) (Sigma-Aldrich, USA)
3. Triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB) (Sigma-Aldrich, USA)
4. Trifluoroacetic acid (TFA) (Merck, USA)
5. Trypsin: molecular grade (Promega)

- **Cell lines**

U-87 MG, H4, LN229 (ATCC, USA)

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ U87MG H4 และ LN229 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose ที่ประกอบด้วย 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และ 1% Antibiotic-Antimycotic เมื่อเซลล์โตแน่นภาชนะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 80-90% ต้องทำการย้ายเซลล์ไปใส่ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม CO_2 ที่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.2 การวัดการเจริญของเซลล์ Cell proliferation assay

ทำการเลี้ยงเซลล์ U87MG และ H4 ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose โดยมีการเติมยา AZD8055 ในกรณีที่ต้องการสังเกตความสามารถในการยับยั้งเซลล์ เมื่อเซลล์โตแน่นภาชนะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 80-90% จากนั้นทำให้เซลล์หลุด ออกจากภาชนะโดยเติม 0.25% trypsin ปริมาตร 5 ml ในภาชนะเลี้ยงเซลล์แล้วนำไปบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นใส่น้ำยาเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin (neutralization step) และปิเปตขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้เซลล์แยกตัวเป็นเซลล์เดี่ยว (single cell suspension) นับจำนวนเซลล์ด้วย Hemocytometer แล้วดูดลงใน 96-well plate จำนวน 2,000 cell/well จากนั้น ทำการวัด proliferation ด้วย MTS assay โดยทำการวัดที่ 24, 48 ละ72 ชั่วโมง ตามลำดับ เริ่มต้นด้วยการปิเปต CellTiter 96® AQueous One Solution ปริมาตร 20 µl/well แล้วบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัด cell proliferation ตั้งค่าการดูดกลืนสงที่ 490 nm จากนั้นคำนวณ %viability เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ

4.3 Wound healing assay

ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งสมองชนิดต่าง ๆ ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose โดยเลี้ยงใน 6-well plate เมื่อเซลล์โตแน่นภาชนะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 80-90% ทำการสร้างช่องว่างระหว่างเซลล์ด้วย tip ขนาด 200 µl ให้มีความกว้างประมาณ 1 mm จากนั้นทำการสังเกตและเปรียบเทียบความกว้างของแต่ละประชากรทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4 การสกัด RNA ด้วย miRNeasy Mini Kit

นำเซลล์มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยการเติม chloroform ปริมาตร 140 µl เพื่อย่อยเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ centrifuge ตั้งความเร็วที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วดูดเอา upper aqueous phase ไปใส่ใน micro- centrifuge หลอดใหม่ จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 600 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ centrifuge ตั้งความเร็วที่ 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นล้าง pellet ด้วย RWT buffer ปริมาตร 700 µl of RWT buffer แล้วนำนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ centrifuge ตั้งความเร็วที่ 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และล้าง pellet อีกครั้งด้วย RPE buffer ปริมาตร 500 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ centrifuge ตั้งความเร็วที่ 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการละลาย pellet ของ RNA ด้วย RNase free water ปริมาตร 30 µl และเติม DNase ปริมาตร 3 µl จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

4.5 Reverse transcription (RT) and และ real-time PCR

ทำ Reverse transcribed โดยใช้ชุดคิท miRCURY LNA RT kit (Qiagen, Germany) เริ่มต้นด้วยการเตรียมตัวอย่างอาร์อ็นเอ ที่สกัดได้จากข้อ 4.3 โดยใช้ความเข้มข้น 10 ng ทำการเติม RNA template ปริมาตร 11.5 µl และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาบ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลาทำการเติม master mix RT ปริมาตร 7.5 µl ของ master mix RT และบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อได้ cDNA แล้วก็นำมาทำ real-time PCR โดยใช้ temperature-cycling program คือ initial 15 วินาที ที่ 95 องศาเซลเซียส เพิ่มจำนวน DNA ทั้งหมด 45 รอบ ในขั้นตอน denaturation ที่ 10 วินาที อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส30 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ 2 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส และในขั้นตอน final elongation ใช้เวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 Primers สำหรับ real-time PCR

No.	Name and Nucleotide positions	Sequene (5'-3')	No. of Sequene	Tm
1	h1*RICTOR*_F_5073-5092	AAATGCATGAAGAAGCAGAG	20	54
	h1*RICTOR*_R_5270-5249	AACAGTGTACAGAAGATACTC	21	52

2	h*OCT4*_F_595- 615	TATTCAGCCAAACGACCATCT	21	57
	h*OCT4*_R_697- 678	TCAGCTTCCTCCACCCACTT	20	60
3	h*SOX2*_F_919- 941	GCACATGAACGGCTGGAGCAACG	23	67
	h*SOX2*_R_1124- 1101	GCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGG	24	65
4	h*LIN28B*_F_279- 301	CATCTCCATGATAAACCGAGAGG	23	58
	h*LIN28B*_R_443- 423	GTTACCCGTATTGACTCAAGG	21	56
5	GAPDH_F_ 86-105	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	20	60
	GAPDH_R_192-171	TCAATGAAGGGGTCATTGATGG	22	58

4.6 Agarose gel electrophoresis

เมื่อได้ PCR product จากการทำ real-time PCR แล้ว นำมาตรวจสอบขนาดที่ได้จากการตรวจสอบในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยเริ่มต้นจากการเตรียม agarose ความเข้มข้น 2.0% ทำการเตรียม buffer โดยผสม 40 mM Tris, pH 7.8, 5 mM sodium acetate, 2 mM EDTA, 1X RedSafe Nucleic Acid Staining Solution จากนั้นเขย่าและนำเข้าไมโครเวฟเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทเจลลงในภาชนะสำหรับขึ้นรูปเจล จากนั้นทำการส่องภายใต้แสงยูวี (UV; ultraviolet) เพื่อตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่ได้

4.7 การเตรียมเซลล์สำหรับแยกเซลล์ด้วย Flow cytometric โดยใช้คุณสมบัติ side scatter และ forward scatter

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำการดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS) 1 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะโดยเติม 0.25% trypsin ปริมาตร 5 ml ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 mm หรือพอให้ท่วมผิวเซลล์แล้วนำไปบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำภาชนะมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวภาชนะหมดแล้ว จากนั้นใส่น้ำยาเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin (neutralization step) ปริมาตร 5 ml และปิเปตขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้เซลล์แยกตัวเป็นเซลล์เดี่ยว (single cell suspension) และนับจำนวนเซลล์ด้วย Hemocytometer โดยใช้ 300,000 เซลล์สำหรับแยกเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer จากนั้นนำเซลล์นำเซลล์ suspension ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที และดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์ออก ให้เหลือเฉพาะเซลล์ pellet และใส่เพาะ 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นนำเซลล์ไปทำการแยกเซลล์ด้วย Flow cytometry โดยแยกด้วยขนาด แบ่งเป็นประชากรขนาดใหญ่และประชากรขนาดเล็ก เพื่อใช้ในการทำการทดลองต่อไป

4.8 การตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค Western blotting analysis

- การเตรียมสารลายโปรตีนตัวอย่าง

ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย 1X PIC (ใน PBS) เติม lysis buffer ประมาณ 70 µl ใน plate แล้วขูดเซลล์ออกมาเติมลงในหลอด จากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ 16,000×g เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสมาเติมลงใน microtube อันใหม่ ทำการวัดความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่างด้วย Bradford reagent โดยเจือจางโปรตีนตัวอย่าง 1 µl กับ Type I H2O 9 µl ลงใน 96-well plate จากนั้นเติม Bradford reagent 200 µl /well ทำการบ่ม 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD595 ด้วยเครื่อง microplate reader เทียบค่าความเข้มข้นโดยใช้ 1 mg/ml BSA เป็นสารมาตรฐาน จากนั้น ทำการปรับความเข้มข้นสารละลายโปรตีนให้ได้ 25 µg protein ด้วย Type I H2O ให้ได้ปริมาตรรวม 20 µl เติม 5x Laemmli ปริมาตร 5 µl ใน microtube แล้วให้ความร้อนที่ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที ด้วย heat box นำมาปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge เมื่อครบเวลา ก่อนนำตัวอย่างไปใช้รันเจล

- การเตรียม Tris-glycine SDS-PAGE

เตรียมส่วนผสมของเจลในส่วน separating gel รอประมาณ 20 นาที เมื่อ separating gel แข็งตัวแล้ว เติม stacking gel โดยนำชิ้น gel comb มาใส่ด้านบนทันที รออีกประมาณ 15 นาที

- การรัน SDS-PAGE

เติม 1x running buffer ให้ถึงระดับที่กำหนดในเครื่อง western blot tank จากนั้น เติม marker (4-6 µl/well) และตัวอย่างโปรตีนประมาณ 35 µl/well ตั้งค่า voltage ที่ 95V แล้ว run ให้ band เลยชั้น staking จึงเพิ่มเป็น 130V เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หรือขึ้นอยู่กับการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนบนเจล

- ย้ายโปรตีนสู่ membrane

นำ nitrocellulose membrane ฟองน้ำ เพื่อมารวมกับ cassette สำหรับประกบเจล เตรียม transfer buffer โดยมีส่วนผสมคือ 10x Towbin buffer + 20% methanol + Type I H2O ทำการ transfer ที่สภาวะ 30V ที่ 4 °C overnight หลังจาก transfer เสร็จแล้ว ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการ transfer โดยล้าง membrane ด้วย Type I H2O แล้วย้อม ด้วยสารละลาย Ponceau S สังเกต band โปรตีนที่เกิดขึ้น ล้าง Ponceau S ด้วย wash buffer (1x Towbin + 0.1% tween 20)

- Blocking โปรตีนบน membrane

ผสมน้ำยา blocking buffer (Odessey buffer) กับ 1x TBS อัตราส่วน 1:1 10 ml เทลงบน membrane ให้ครอบคลุมทั้งหมด บ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C

- Probe antibody ลงบน membrane

เตรียม primary antibody ความเข้มข้น 1 : 500 µl เจือจางใน blocking buffer จากนั้น บ่ม primary antibody ใน membrane ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืนที่ 4°C ล้าง antibody ด้วย wash buffer ประมาณ 4-5 รอบ รอบละ 5 นาที เมื่อครบเวลา ทำการเตรียม secondary antibody ความเข้มข้น 1 : 10000 µl ที่จำเพาะต่อ primary antibody ใน blocking buffer บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้าง antibody ด้วย wash buffer ประมาณ 4-5 รอบ รอบละ 5 นาที นำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง Odyssey® CLx Imager

4.9 การศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค immunoprecipitation (IP)

เพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะต่าง ๆ โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงลงใน 150 mm^2 cell culture dishes ให้มีปริมาณเซลล์ที่เท่ากัน เพาะเลี้ยงให้ได้ความหนาแน่นประมาณ 90% จากนั้น ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วย 1X PIC (protease inhibitor cocktail) ที่ละลายใน PBS แล้วเก็บ cell ใน -80 °C ทำการเตรียม lysis buffer (40 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM pyrophosphate, 10 mM glycerophosphate, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate และ 0.3% CHAPS) จากนั้น ปิเปต Protein A magnetic beads ปริมาตร 40 µl กับ RICTOR antibody 4 µl แล้วเติม lysis buffer ให้มีปริมาตรรวม 1 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง บน rotating mixer เมื่อครบเวลาแล้วทำการล้าง antibody ที่ไม่จับ bead โดยใช้ magnetic bar จากนั้น นำส่วนใสออกแล้วล้างด้วย lysis buffer 3 ครั้ง เติม lysis buffer 1 ml ลงใน plate แล้วทำการขูดเซลล์ด้วย scraper ออกจากภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วใส่ลงใน tube ทำการปั่นตกตะกอนเพื่อให้ได้ lysate ที่ 16,000×g แล้วนำส่วนใสใส่ในหลอดที่มี Protein A กับ antibody บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืนที่ 4 °C ทำการแยกโปรตีนที่ไม่จับกับ antibody โดยใช้ magnetic bar แล้วเก็บส่วนตะกอนไว้ จากนั้น ล้าง beads ด้วย wash buffer 500 µl (โดยใช้ wash buffer ที่มี 150 mM NaCl 3 รอบ และ 300 mM NaCl 1 รอบ และใช้ magnetic bar เพื่อนำเอา wash buffer ออกทั้งหมด แล้วใส่ 1x Laemmli buffer ที่มี 5% β-mercaptoethanol ปริมาตร 40 µl นำตัวอย่างไปต้มที่ 95 °C 10 นาที เพื่อแยก antibody, ตัวอย่างโปรตีน และ beads ออกจากกัน จากนั้น นำตัวอย่างทั้งหมดมารันบน SDS-PAGE แล้วย้อม Coomassie Brilliant Blue เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย MS ในขั้นตอนต่อไป

4.10 การศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค mass spectrometry โดยวิธี in-gel tryptic digestion

หลังจากทำ SDS-PAGE แล้ว ย้อมโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue แล้วตัด gel บริเวณขนาดโปรตีนที่สนใจ นำชิ้นเจลที่ตัดแล้วมาล้างด้วย 100 mM ammonium bicarbonate กับ acetonitrile ความเข้มข้น 1:1 แล้ว Destain ด้วย 100% acetonitrile แล้วนำมาระเหยน้ำด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ควบคุมความดัน (vacuum centrifugation) จากนั้น นำโปรตีนมาลดพันธะ disulfide โดยการเติม 10 mM Dithiothreitol (DTT) แล้วบ่มที่ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใส่ 50 mM iodoacetamide ที่ 45 °C เป็นเวลา 45 min เพื่อให้เกิด alkylation และล้างด้วย 100 mM ammonium bicarbonate กับ acetonitrile ความเข้มข้น 1:1 ดูดออก แล้วใส่ 100 mM ammonium bicarbonate ตั้งไว้ 10 นาที แล้วดูดออกเช่นกัน ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง ย่อยโปรตีนด้วย trypsin โดยให้ความเข้มข้นของ trypsin ไม่เกิน 300 ng ต่อเจล 1 tube แล้วบ่มที่ 37°C ข้ามคืน สกัด peptide ที่ได้ออกจากเจล โดยเติม 50 % acetonitrile กับ 1 % Trifluoroacetic acid (TFA) (1: 1) แล้วดูด peptide ใส่ LoBind tube ทำเช่นนี้อีก 2 รอบ Peptide ที่ผ่านการสกัดแล้ว นำมาเติม 0.1 % formic acid 30 µl จากนั้นทำการ desalting ด้วย C18 column จากนั้น นำเปปไทด์ตัวอย่างเข้าวิเคราะห์ในเครื่อง LC-MS/MS วิเคราะห์ผลการทดลองจากเครื่อง LC-MS/MS

ด้วยโปรแกรม Proteome Discoverer™ Software เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน RICTOR และโปรตีนอื่น ๆ ที่น่าสนใจในมะเร็งสมอง

4.11 การศึกษาตำแหน่งของโปรตีนที่สนใจในเซลล์ด้วยเทคนิค immunofluorescence staining (IF)

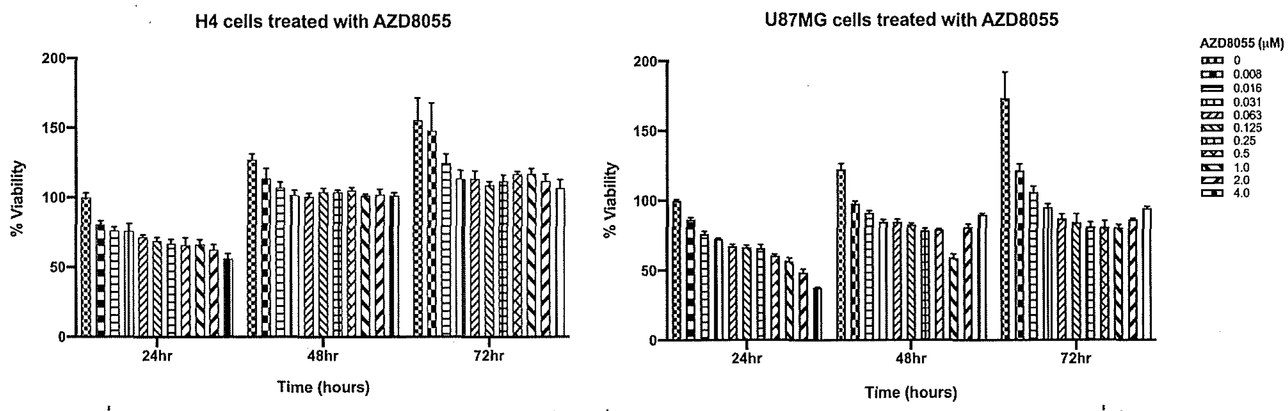
เลี้ยงเซลล์ประมาณ 5,000 cells/well ใน 8-well chamber slide แล้วบ่มเลี้ยง 24 ชั่วโมง ต่อมาทำการลดซีรัมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารปกติ (10% FBS) ที่มี AZD8055 ความเข้มข้น 2 µM หรือไม่มี (control) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้น เติม fixing reagent (4% paraformaldehyde) ใน chamber slide แล้วบ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อตรึงเซลล์ให้ติดกับ slide ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วเติม 0.2% triton X-100 แล้วบ่ม 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเจาะรูเซลล์ ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเป็นขั้น Blocking ใช้ 1% BSA ใน PBS บ่ม 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือบ่มข้ามคืนที่ 4 °C เติม primary antibody ความเข้มข้น 1 : 200 แล้วบ่ม 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือบ่มข้ามคืนที่ 4°C แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง เติม secondary antibody โดยให้มีความเข้มข้น 1 : 200 แล้วบ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือบ่มข้ามคืนที่ 4 °C แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง ย้อมเซลล์ด้วย DAPI (1:500) บ่ม 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้น ถอด chamber ออกจากตัว slide จุ่มสไลด์ใน 100% EtOH อย่างเร็ว จากนั้นรอให้แห้ง หยด anti-fade solution แล้วปิด cover slide ให้แน่น เก็บที่ 4 °C ในที่มืด ตรวจสอบผลโดยนำสไลด์ที่ได้มาส่องภายใต้ confocal microscopy

ผลการวิจัยและวิเคราะห์ผลการวิจัย (RESULTS AND DISCUSSION)

การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเซลล์มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา

<u>การศึกษาความสามารถในการเจริญของเซลล์ของเซลล์โดยวิธี MTS proliferation assay</u>

เซลล์มะเร็งสมองสองชนิดที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ U87MG และ H4 เป็นมะเร็งสมองที่มีความรุนแรงต่างกัน โดยเซลล์มะเร็งสมองชนิด H4 จะเป็นเซลล์มะเร็งกลัยโอมาเกรดต่ำ (low-grade glioma) ในขณะที่ U87MG เป็นเซลล์กลัยโอมาเกรดสูง (high-grade glioma) หรือ กลัยโอบลาสโตมา (Glioblastoma; GBM) ซึ่งเป็นการจัดกลุ่มตามวิธีของ WHO ทั้งนี้ เมื่อนำเซลล์ทั้งสองชนิดมาเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญโดยใช้วิธี MTS proliferation assay และเพิ่มตัวแปรเป็นการเติมยายับยั้ง mTOR kinase activity (AZD8055) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลปรากฏว่า เซลล์ทั้งสองชนิดมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน โดยเมื่อผ่านไปเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ U87MG สามารถเจริญได้มากกว่า อาจเป็นเพราะเซลล์มะเร็งที่มีความรุนแรงน้อย ยังมีกระบวนการ contact inhibition จึงทำให้เซลล์ที่โตแผ่เป็นระนาบ ไม่สามารถโตซ้อนกันได้ เมื่อเซลล์มีการเจริญเต็มพื้นที่ก็อาจเริ่มมีการเพิ่มจำนวนน้อยลง นอกจากนี้ อาจเป็นเพราะเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมา (U87MG) สามารถทนต่อสภาพความเครียดของเซลล์ซึ่งเกิดจากการที่ pH ลดลงต่ำเมื่อมีจำนวนเซลล์สูงได้ดีกว่า H4 นอกจากนี้ เมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ mTOR kinase ด้วยยา AZD8055 พบว่า การเจริญของเซลล์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ที่ไม่มีการให้ยา อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าการยับยั้งการทำงานของ mTORC1 และ mTORC2 ไม่สามารถทำให้เซลล์มะเร็งสมองตายได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่าที่ควร (รูปที่ 1)

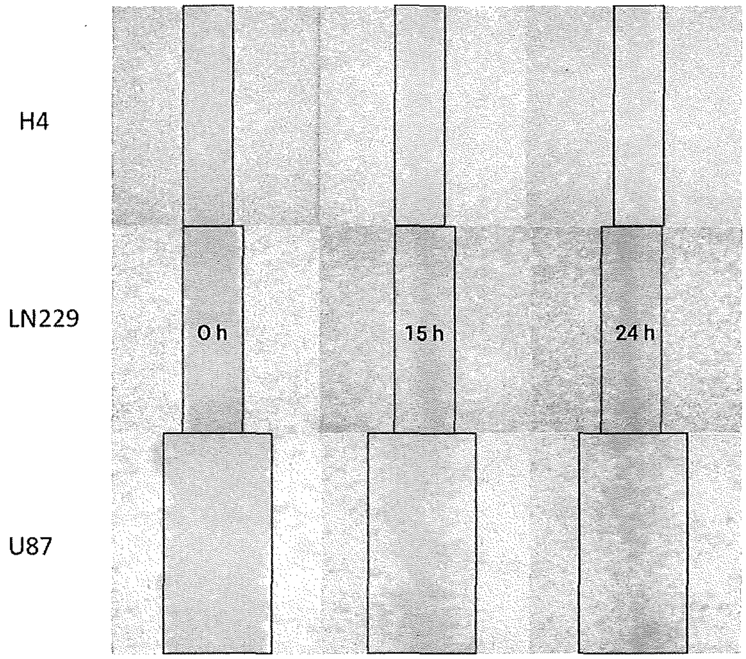


รูปที่ 1 ความสามารถในการเจริญของเซลล์มะเร็งสมอง H4 และ U87MG ใน condition ที่มียา AZD8055 ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-4.0 μM)

<u>การศึกษาความรุนแรงของเซลล์มะเร็ง (cancer aggressiveness)</u>

ในการบ่งชี้ว่าเซลล์มะเร็งมีความรุนแรงมากหรือน้อย โดยทั่วไปจะดูจากคุณสมบัติหลาย ๆ ประการ ซึ่งหนึ่งในคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งคือการเคลื่อนที่ของเซลล์ กล่าวคือ เซลล์มะเร็งที่มีความรุนแรง

สามารถลุกลามได้มากกว่า จะมีความสามารถในการเคลื่อนที่มากกว่า เนื่องจากไม่ต้องการ cell-cell ดังในเซลล์ปกติ จึงมีลักษณะความคล้าย mesenchymal cells ซึ่งทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้น เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งสมองกลัยโอมาประเภท ต่าง ๆ จึงได้มีการเปรียบเทียบเซลล์ H4 U87MG และ LN229 โดยเซลล์ LN229 เป็นมะเร็งกลัยโอมาขั้นสูงอีกชนิดหนึ่ง โดยใช้วิธี wound healing assay ทั้งนี้ ผลการทดลอง พบว่า ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ทั้งสามชนิดมีการเรียงลำดับ ดังนี้ เซลล์ U87MG สามารถเคลื่อนที่ปิดช่องว่างได้รวดเร็วที่สุด รองลงมาคือ LN229 และ H4 ซึ่งเป็นไปตามที่คาดไว้ นอกจากนี้ ยังมีข้อสังเกตอีกหนึ่งอย่างคือ U87MG มี cell adhesion ค่อนข้างน้อย หลุดออกจากจานเพาะเซลล์ค่อนข้างง่ายกว่าเซลล์อีกสองชนิด ซึ่งก็เป็นคุณสมบัติอีกอย่างหนึ่งที่สามารถบ่งบอกได้ว่าเซลล์ชนิดนี้มีลักษณะความเป็น mesenchymal cells เพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 Wound healing assay ของเซลล์มะเร็งสมองสามชนิด ได้แก่ H4, LN229, และ U87MG

คุณสมบัติต่อมาที่สามารถใช้พิจารณาความรุนแรงของเซลล์มะเร็งสมอง ได้แก่ ระดับการแสดงออกและการทำงานของกลุ่มโปรตีน mTORC1 และ mTORC2 เนื่องจากกลุ่มโปรตีนทั้งสองชนิดมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์มะเร็งและความสามารถในการเคลื่อนที่ โดยเฉพาะ mTORC2 ดังนั้น จึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของ โปรตีน รวมไปถึง mRNA ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ mTORC2 signaling pathway ได้แก่ RICTOR และ AKT และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ mTORC1 ได้แก่ S6 ดังรูปที่ 3 ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ทั้งสามชนิดมีการแสดงออก ของโปรตีน RICTOR ในระดับใกล้เคียงกัน แต่ระดับ mRNA ของยีน *RICTOR* ในเซลล์ H4 และ LN229 มีปริมาณเยอะกว่าค่อนข้างมาก ซึ่งเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ น่าจะมีกลไกในการควบคุมปริมาณ mRNA โดยวิธีต่าง ๆ ทำให้ไม่ถูกแปลออกมาเป็นโปรตีนได้ ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับ let-7 miRNA นอกจากนี้ เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *AKT* พบว่า LN229 มีปริมาณ mRNA สูงที่สุด แต่เมื่อวัดระดับ

โปรตีนกลับใกล้เคียงกับ U87MG และ H4 อย่างไรก็ตาม การจะตรวจสอบระดับ กิจกรรมของโปรตีนนี้ต้องดูที่การเกิด phosphorylation ที่ตำแหน่งสำคัญ นั่นคือ S473 ซึ่งเมื่อตรวจสอบ พบว่า U87MG มีระดับกิจกรรมของ mTORC2 มากที่สุด ซึ่งตรงข้ามกับระดับกิจกรรมของ mTORC1 ซึ่งตรวจสอบได้จากปริมาณ pS6(S235/236) ซึ่งเซลล์ H4 มีการแสดงออกมากที่สุด และจะพบว่า mTORC2 activitiy นั้นมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งสมอง อย่างไรก็ตาม เพื่อให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น จึงต้องทำการตรวจสอบเพิ่มเติมต่อไป

	H4	LN229	U87
RICTOR mRNA	29.777	24.145	1.000
RICTOR			

	H4	LN229	U87
Akt mRNA	1.087	6.341	1.000
Total Akt			
pAkt (S473)			

	H4	LN229	U87
Total S6			
pS6(S235/236)			

รูปที่ 3 ระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน ที่เกี่ยวข้องกับ mTOR signaling pathway

ดังที่กล่าวไปข้างต้นในส่วนของบทนำ LIN28 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการแสดงออกถึงความเป็นสเต็มเซลล์ในมะเร็งชนิดต่าง ๆ ดังนั้น หากตรวจสอบการแสดงออกของยีนและโปรตีนนี้ จะทำให้เพิ่มความชัดเจนยิ่งขึ้นถึงสมมติฐานว่าหากเซลล์มีคุณสมบัติความเป็นสเต็มเซลล์เพิ่มขึ้น จะนำมาซึ่งคุณสมบัติที่แสดงออกถึงความรุนแรงของมะเร็ง จึงทำการตรวจสอบระดับ mRNA และโปรตีนของ LIN28 ทั้ง 2 isoforms ได้แก่ LIN28A และ LIN28B และเนื่องจาก mRNA ของ *LIN28A* ไม่สามารถตรวจพบ ในขณะที่ปริมาณ mRNA ของ *LIN28B* (รูปที่ 4) พบว่า LN229 มีมากที่สุด รองลงมาคือ U87 และ H4 ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบระดับโปรตีนก็ไม่สามารถพบโปรตีน LIN28A ในเซลล์ทั้งสามชนิด แต่พบ LIN28B ใน U87MG โดยที่ไม่สามารถ detect ได้ในเซลล์ชนิดอื่น ๆ และเมื่อตรวจสอบระดับ let-7 miRNA โดยวิธี real-time PCR ก็ยังไม่พบการแสดงออก อย่างไรก็ตาม ในกรณีของ let-7 miRNA นี้ควรทำซ้ำเพิ่มเติมเพื่อให้มั่นใจว่าผลการทดลองมีความน่าเชื่อถือหรือไม่

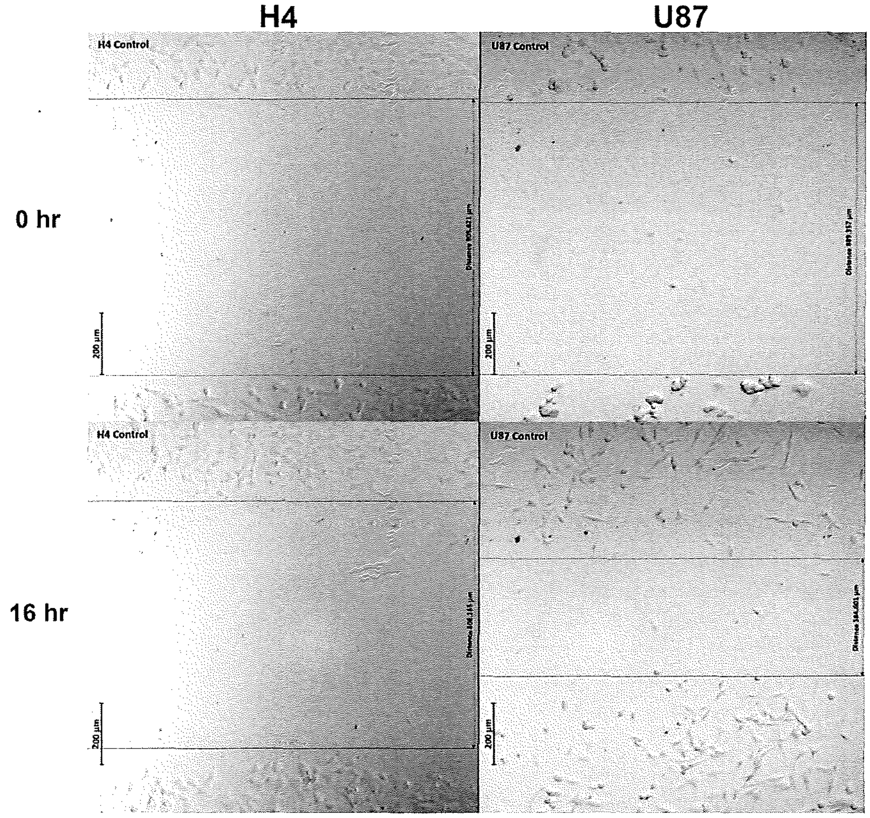
	H4	LN229	U87
LIN28B mRNA	0.411	2.567	1.000
LIN28B			
LIN28A			

รูปที่ 4 ระดับการแสดงออกของยีน LIN28B และโปรตีน LIN28A/B ในเซลล์มะเร็งสมอง

<u>การศึกษาความสัมพันธ์ของ LIN28 mTORC2 และ ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์</u>

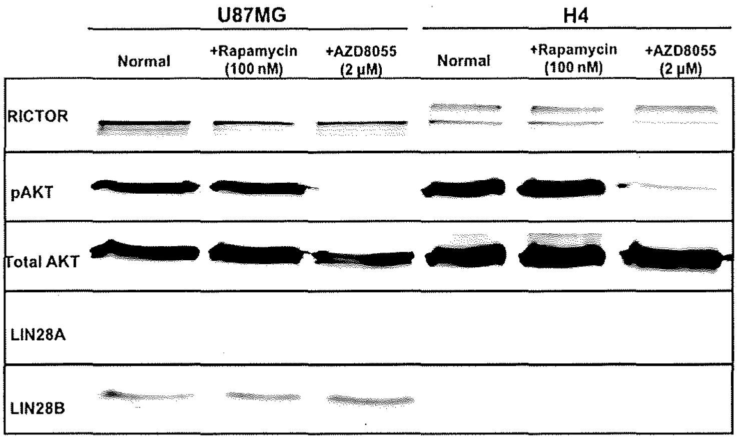
จากการทดลองเบื้องต้น ผู้วิจัยจึงทำการดำเนินการทดลองในลำดับต่อไปด้วยเซลล์มะเร็งสมองสองชนิด ได้แก่ U87MG และ H4 เนื่องจากเป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งสมองขั้นสูงและต่ำ ตามลำดับ ในขณะที่ LN229 มีคุณสมบัติอยู่ระหว่างกลาง ทำให้ผู้วิจัยมุ่งเน้นที่จะศึกษาความรุนแรงของเซลล์มะเร็งในเซลล์ U87MG

และเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งระยะต้น H4 โดยเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ทั้งสองชนิดโดยเทคนิค live cell imaging โดยรูปที่ 5 แสดงภาพเซลล์เมื่อระยะเวลาเริ่มต้น และจบที่ เวลาประมาณ 16 ชม. โดยจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า U87MG นั้น มีการเคลื่อนที่ได้รวดเร็วกว่า ได้ระยะทาง มากกว่า H4 หลายเท่า โดย U87MG เคลื่อนที่ได้มากกว่า 200 μm ในระยะเวลา 16 ชั่วโมง



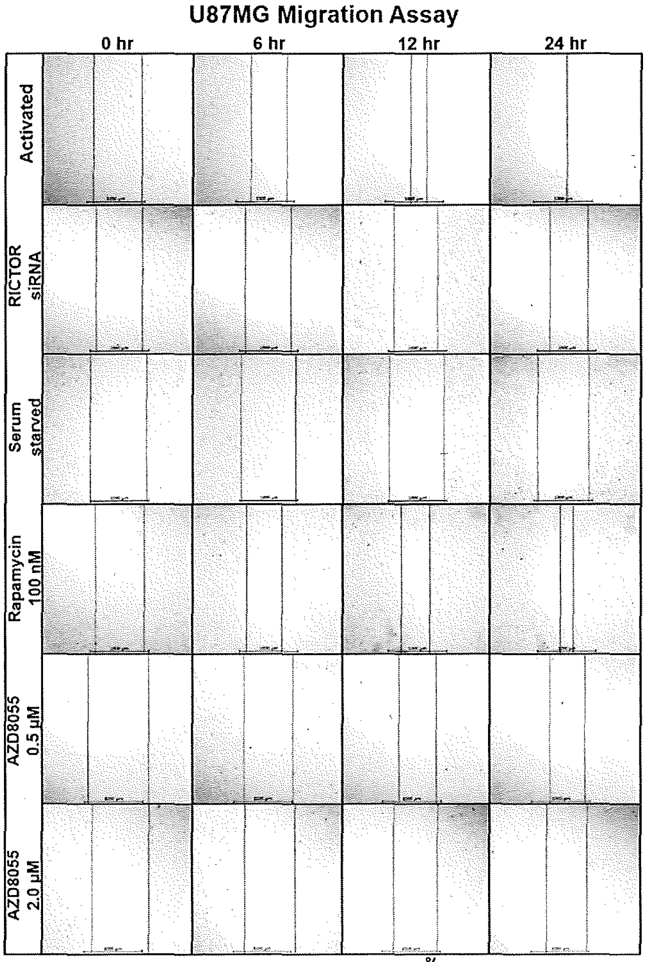
รูปที่ 5 Wound healing assay เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ U87MG และ H4 ณ ชั่วโมงที่ 0 และ 16

ต่อมา ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ LIN28, mTORC2 ในเซลล์ทั้งสองชนิดโดยวิธี Western blotting analysis (รูปที่ 6) ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณโปรตีน RICTOR มีมากกว่าเล็กน้อยใน U87MG และสังเกตพบ extra band ที่ตำแหน่งสูงกว่าโปรตีน RICTOR ปกติ (ซึ่งในการรันเจล หากใช้เจลที่มี acrylamide % สูง จะไม่สามารถเห็น bands นี้ได้) ซึ่งอาจจะเป็นโปรตีนที่มีการเติมฟอสเฟต หรืออาจจะเป็น isoform อื่น ๆ ของ RICTOR นอกจากนี้ เมื่อเติมตัวยับยั้ง mTOR ซึ่งคือ rapamycin จะเห็นได้ว่าปริมาณ pAKT มีปริมาณปกติ สอดคล้องคุณสมบัติของ rapamycin ที่ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมของ mTORC2 ได้ ในขณะที่ AZD8055 สามารถยับยั้งการทำงานของ mTORC2 ได้ดี นอกจากนี้ ยังได้ตรวจสอบปริมาณโปรตีน LIN28A และ LIN28B ในเซลล์ทั้งสองชนิด ก็จะพบว่าปริมาณโปรตีนทั้งสองชนิดพบใน U87MG มากกว่า H4 และ LIN28A พบได้น้อยกว่า LIN28B อย่างชัดเจน จึงอาจสามารถวิเคราะห์ได้ว่า LIN28B เป็นตัวแปรที่สำคัญในการทำให้ U87MG มีความแตกต่างจาก H4 รวมทั้งปริมาณ RICTOR ก็อาจจะมีผลเช่นเดียวกัน



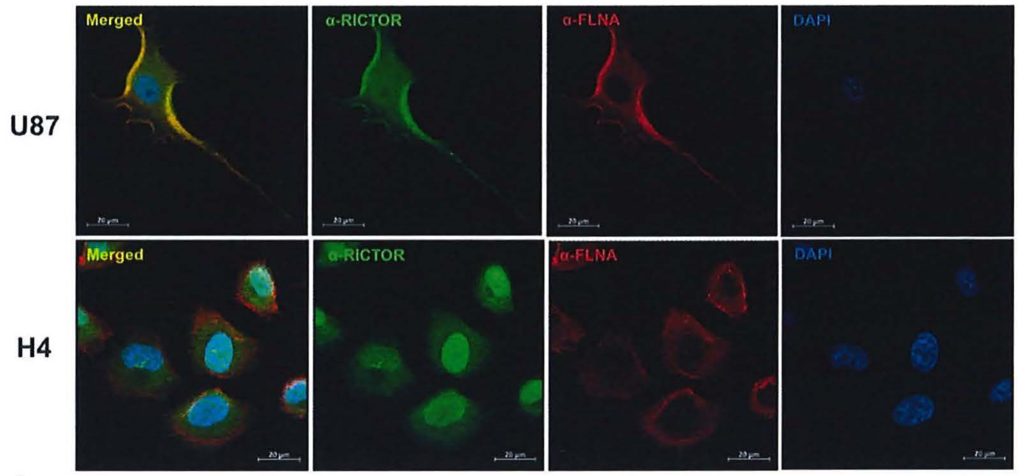
รูปที่ 6 Western blotting analysis ของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ mTORC2 และ LIN28

จากนั้น ผู้วิจัยได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของ RICTOR ในเซลล์ U87MG ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่สุดของ mTORC2 เพื่อทดสอบสมมติฐานว่า mTORC2 มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนที่ของ U87MG หรือไม่ (รูปที่ 7) ก็จะพบว่าการที่เซลล์มีปริมาณ RICTOR น้อยลง ทำให้ส่งผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ รวมถึงการยับยั้งกิจกรรมของ mTORC2 โดยใช้ mTOR inhibitor AZD8055 ทำให้เซลล์เคลื่อนที่ได้ช้าลง ในขณะที่ rapaymcin ไม่สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 7 Wound healing assay ในสภาพการเลี้ยงเซลล์ U87MG แบบต่าง ๆ

เนื่องจากความแตกต่างระหว่างปริมาณ RICTOR ของเซลล์มะเร็งสมองสองชนิดมีความแตกต่างกันไม่ชัดเจนนัก ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาตำ แหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของโปรตีน mTORC2 ในเซลล์ เนื่องจากผู้วิจัยเคยค้นพบว่าตำแหน่งของ mTORC2 สามารถบ่งชี้ความสามารถของเซลล์ในการเคลื่อนที่ได้ (Chantaravisoot, Naphat, et al., 2015) ซึ่งผลการศึกษาด้วยวิธี immunofluorescence staining เพื่อดูตำแหน่งของโปรตีน RICTOR และ Filamin-A (FLNA) พบว่าตำแหน่งของโปรตีน RICTOR และ FLNA ในเซลล์ U87MG ส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณใกล้เยื่อหุ้มเซลล์ในขณะที่โปรตีนเหล่านั้นพบที่บริเวณอื่น ๆ มากกว่าในเซลล์ H4 จึงน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์ U87MG มีความสามารถในการเคลื่อนที่



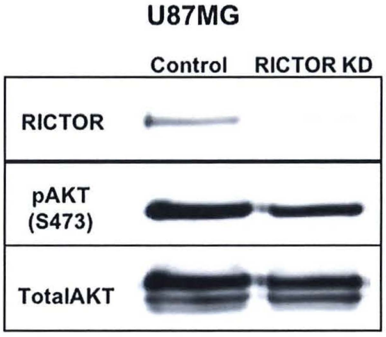
รูปที่ 8 ตำแหน่งของโปรตีน RICTOR และ FLNA ในเซลล์ U87MG และ H4 วิเคราะห์โดยวิธี immunofluorescence staining

การศึกษาความสัมพันธ์ของขนาดของเซลล์มะเร็งสมองกลัยโอบลาสโตมา กับคุณสมบัติการเจริญและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสเต็มเซลล์

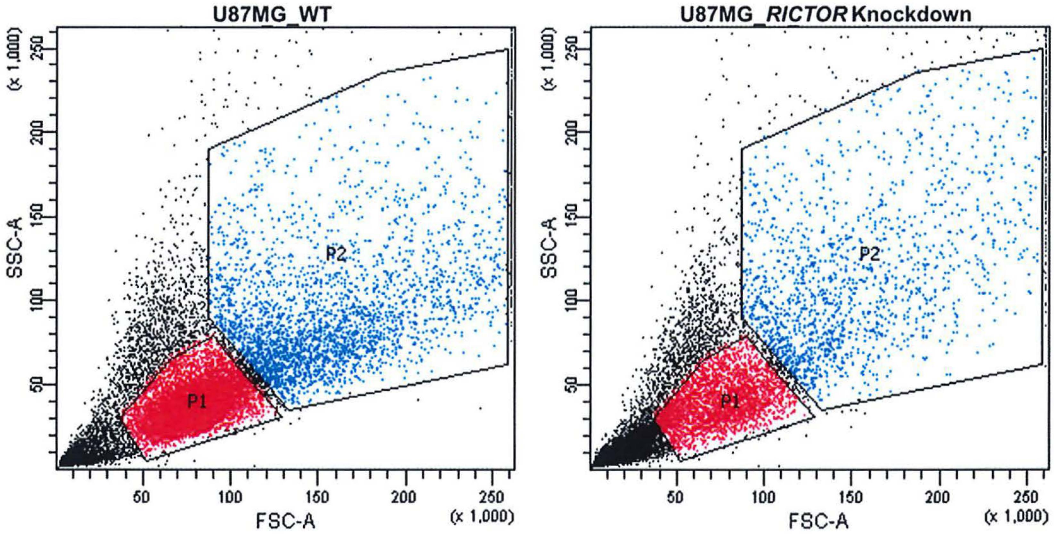
<u>การแยกเซลล์ U87MG ออกเป็นประชากรขนาดต่าง ๆ</u>

เนื่องจากมะเร็งสมองกลัยโอบลาสโตมา มีความหลากหลายทางสัณฐานของเซลล์ค่อนข้างสูง ระหว่างทำการทดลองผู้วิจัยสังเกตพบว่าเซลล์ U87MG มีความแตกต่างของขนาดเซลล์ค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับ H4 และ LN229 ซึ่งเซลล์ที่มีขนาดใหญ่นั้น มีลักษณะแตกต่างโดยสิ้นเชิงจากเซลล์ขนาดเล็ก ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาหาคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะสามารถทำให้เข้าใจถึงการควบคุมการทำงานของเซลล์กลัยโอบลาสโตมา และสามารถอธิบายที่มาและสาเหตุที่ทำให้มะเร็งชนิดนี้มีความรุนแรงเป็นพิเศษ ผู้วิจัยจึงทำการแยกเซลล์ U87MG ออกเป็นประชากรขนาดใหญ่และเล็ก นอกจากเซลล์ U87 wild-type (U87 WT) ผู้วิจัยได้นำเซลล์ U87MG ที่ผ่านการ knockdown ยีน *RICTOR* (U87 RICTOR KD) ด้วยวิธี CRISPR-Cas9 มาทำการทดลองด้วย ซึ่งเซลล์ U87 RICTOR KD มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย Western blotting analysis (รูปที่ 9) โดยทำการแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยพิจารณาคุณสมบัติ side scatter (SSC) และ forward scatter (FSC) โดยประชากรเซลล์ทั้งหมด

ที่นำไปทำการแยกเซลล์ (cell sorting) ตามขนาด (รูปที่ 10) จากจำนวนเซลล์ตั้งต้น 300,000 เซลล์ สามารถแยกออกเป็น ประชากรเซลล์ขนาดเล็ก (บริเวณ P1) 13.6% และประชากรเซลล์ขนาดใหญ่ (บริเวณ P2) 53.8% ดังนั้นพบว่าจำนวนประชากรเซลล์ที่มีขนาดใหญ่มีจำนวนน้อยกว่าประชากรที่มีขนาดเล็กประมาณ 4 เท่า นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาเซลล์ที่ผ่านการลดปริมาณ RICTOR protein จะพบว่ามีเซลล์ขนาดเล็กกว่าบริเวณ P1 เพิ่มขึ้น และเซลล์ในบริเวณ P2 ลดลง แต่ภาพรวม สัดส่วนของเซลล์ขนาดใหญ่และเล็กยังคงเดิม



รูปที่ 9 Western blotting analysis ของเซลล์ U87 WT และ U87 RICTOR knockdown

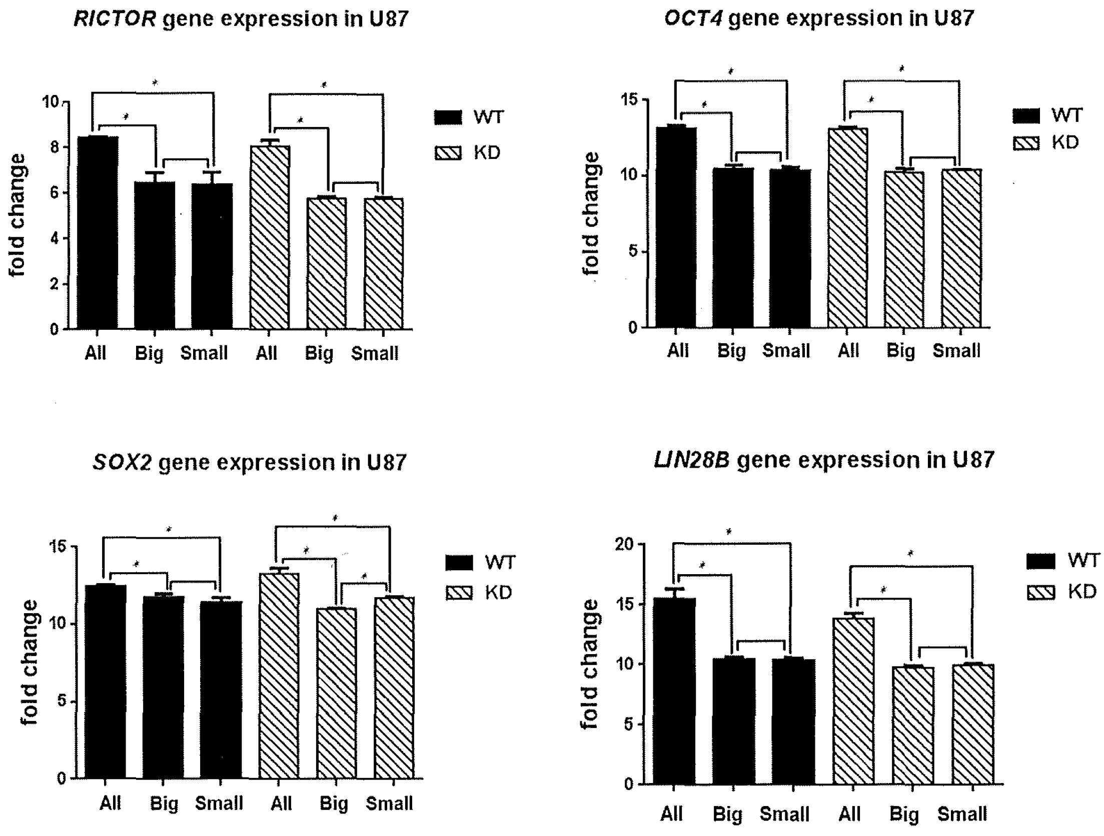


รูปที่ 10 การแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยใช้คุณสมบัติ SSC และ FSC โดยสีแดงแสดงประชากรขนาดเล็กและสีน้ำเงินแสดงประชากรขนาดใหญ่

<u>การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความเป็นสเต็มเซลล์ในประชากร U87MG ขนาดต่าง ๆ</u>

ผู้วิจัยทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนจำนวน 4 ชนิด ได้ แก่ *RICTOR, LIN28B, OCT4* และ *SOX2* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ mTORC2 จำนวน 1 ยีน (*RICTOR*) และเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติความเป็นสเต็มเซลล์จำนวน 3 ยีน (*LIN28B, OCT4* และ *SOX2*) ผลการทดลอง (รูปที่ 11) พบว่า ประชากรของเซลล์ U87 WT และ U87 RICTOR KD แทบไม่มีความแตกต่างกันของการแสดงออกของยีน *RICTOR* แม้ว่าจะทำการลดการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Crispr-Cas9 และตรวจสอบด้วย qRT-PCR และ

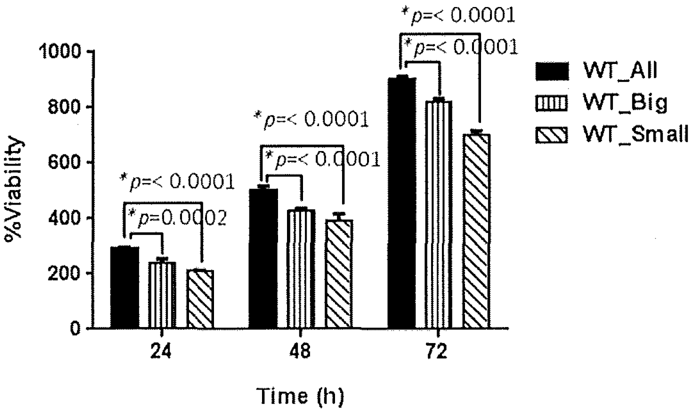
western blot เรียบร้อยแล้ว แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ไปเป็นจำนวนหลาย passage พบว่าเซลล์กลับมามีการแสดงออกของยีนดังเดิม จึงคาดว่าอาจจะเป็นเพราะในเซลล์ U87MG น่าจะมีความผิดปกติของการแสดงออกของยีนจำพวก gene amplification ซึ่งเป็นสาเหตุให้เอนไซม์ Cas9 ไม่สามารถทำให้เกิด gene knockout ได้ 100% และเมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อมาเรื่อย ๆ เซลล์ที่มีปริมาณโปรตีน RICTOR น้อย จะไม่สามารถเจริญได้ทันเซลล์อื่น ๆ จึงทำให้การแสดงออกกลับมาใกล้เคียงปกติดังเดิม อย่างไรก็ตาม มีผลการทดลองที่น่าสนใจ กล่าวคือ ประชากรเซลล์ U87MG ที่มีขนาดแตกต่างกันกลับมีการแสดงออกของยีนต่างใกล้เคียงกัน โดยประชากรเซลล์ขนาดใหญ่และเล็กมีการแสดงออกของยีน *SOX2* แตกต่างกันเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เมื่อนำเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการแยกด้วย FACS มาทดสอบพร้อมกัน พบว่าเซลล์กลุ่มนี้มีการแสดงออกของยีนทุกชนิดที่ตรวจสอบสูงมากกว่าประชากรกลุ่มที่มาจากการแยกขนาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจหมายความว่าเซลล์ทั้งสองประชากรมีการสื่อสารกันซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของยีนต่าง ๆ นอกจากนี้ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมาทุกกลุ่ม มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสเต็มเซลล์จริง ซึ่งสามารถเชื่อมโยงได้กับคุณสมบัติความคล้าย mesenchymal cells และความสามารถในการเคลื่อนที่



รูปที่ 11 แสดงกราฟข้อมูลการแสดงออกของยีน RICTOR, OCT4, SOX2 และ LIN28B, เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรทั้งหมด ประชากรขนาดใหญ่ และประชากรขนาดเล็ก จากเซลล์ U87 WT และ U87 RICTOR KD (*, $p < 0.05$)

<u>ความสามารถในการเจริญของเซลล์ U87MG จากประชากรขนาดต่าง ๆ</u>

เนื่องจากเซลล์ U87 RICTOR KD ยังไม่สามารถแสดงออกที่แตกต่างของยีน *RICTOR* ผู้วิจัยจึงเน้นพิจารณาเฉพาะเซลล์กลุ่ม U87 WT เป็นหลัก และเมื่อทำการศึกษา cell proliferation โดยวิธี MTS proliferation assay ของประชากร U87 WT ทั้ง 3 กลุ่ม (ประชากรรวม ประชากรเซลล์ขนาดใหญ่ และประชากรเซลล์ขนาดเล็ก) ดังรูปที่ 12 ก็พบว่า เมื่อเริ่มเลี้ยงเซลล์ที่ปริมาณเท่ากัน ณ ชั่วโมงที่ 0 จะมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่อยู่รอดในกลุ่มประชากรเซลล์รวม มากกว่าอีกสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากผลการทดลองนี้ พบว่าเซลล์กลุ่มใหญ่และเล็ก มีแนวโน้มที่จะมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันที่จะสามารถช่วยสร้างสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ (microenvironment) ให้เซลล์ทั้งหมดสามารถโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่เซลล์ขนาดเล็กมีแนวโน้มที่จะมีการเจริญน้อยกว่ากลุ่มประชากรอื่น ๆ เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น เช่น ที่ 72 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การทดลองในอนาคตจะพยายามทำซ้ำและปรับ condition เพื่อให้ได้ U87 RICTOR knockdown (or knockout) stable cell line ตามแผนเดิมที่วางเอาไว้ เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบ และตอบคำถามเพิ่มเติมว่า mTORC2 signaling pathway กับ LIN28 pathway มีความสัมพันธ์กันอย่างไร

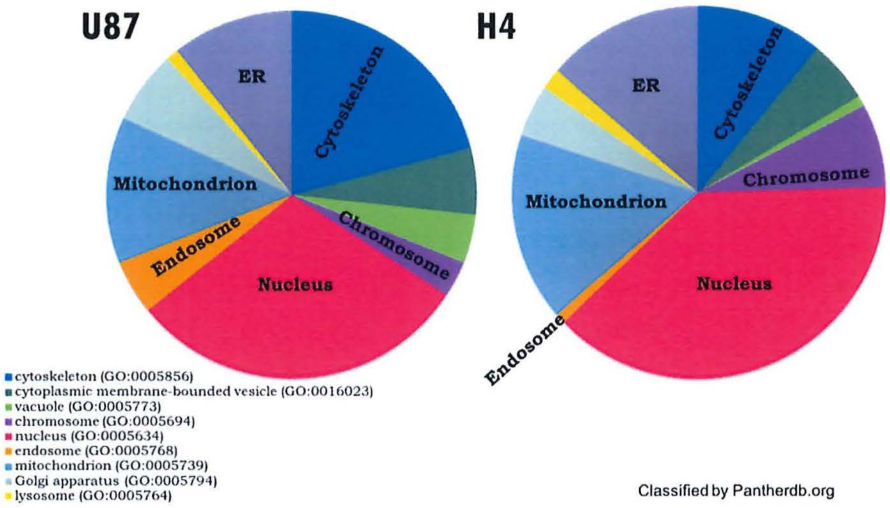


รูปที่ 12 ร้อยละการอยู่รอดของประชากรรวม ประชากรขนาดใหญ่ และประชากรขนาดเล็กของเซลล์ U87MG ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (*p < 0.05)

การศึกษาโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ mTORC2

เมื่อทำการศึกษาโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับ mTORC2 ในเซลล์ U87MG และ H4 โดยวิธี affinity-purification coupled with mass spectrometry โดยทำการดึงโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ RICTOR ออกมา และทำการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วย mass spectrometry แล้วนำโปรตีนทั้งหมดดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์ความเกี่ยวข้องกับส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ ซึ่งจากรูปที่ 13 พบว่า mTORC2 ใน U87MG มีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนโครงร่างของเซลล์ cytoskeleton มากกว่า H4 อย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ และตำแหน่งของ mTORC2 ที่ได้จากการศึกษาด้วย immunofluorescence staining นอกจากนี้ พบว่ามีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ RNA binding function และ RNA processing

อยู่จำนวนมากกว่า 120 ชนิด ซึ่งเหมาะแก่การนำไปศึกษาต่อ ยอดเพิ่มเติม เพื่อหาโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับ LIN28/let-7 pathway



รูปที่ 13 ปริมาณโปรตีนจากส่วนต่าง ๆ ภายในเซลล์ ที่มีปฏิสัมพันธ์กับ mTORC2

สรุปผลการวิจัย (CONCLUSION)

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สามารถแสดงให้หลักฐานว่าเซลล์มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา หรือกลัยโอมาเกรดสูง มีคุณสมบัติต่าง ๆ ที่ส่งเสริมให้มีความร้ายแรงมากกว่าเซลล์มะเร็งสมองกลัยโอมาเกรดต่ำ กล่าวคือ มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา มีการแสดงออกและกิจกรรมของ mTORC2 ที่บริเวณใกล้กับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้และมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนโครงร่าง ซึ่งโปรตีนเหล่านี้เป็นองค์ประกอบหลัก ที่สนับสนุนให้เซลล์เคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว ประกอบกับคุณสมบัติความเป็น mesenchymal cells ที่มี cell-cell adhesion ซึ่งคุณสมบัตินี้ เป็นคุณสมบัติที่พบในสเต็มเซลล์ จึงมีความเป็นไปได้สูงว่าเซลล์มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาส-โตมา มีคุณสมบัติความเป็น cancer stem cells สูง จึงทำให้มีความรุนแรงมากกว่ามะเร็งสมองชนิดอื่น ๆ ซึ่งหลักฐานที่ได้จากการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสเต็มเซลล์ทั้ง 3 ชนิดที่ได้ทำการทดลองในงานวิจัยนี้ก็สอดคล้องกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ นอกจากนี้ ยังพบว่ามะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา มีความหลากหลายของรูปร่างสูงและมีขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งประชากรของเซลล์กลุ่มที่มีขนาดแตกต่างกันนี้ น่าจะมีปฏิสัมพันธ์ต่อกันช่วยสนับสนุนให้เซลล์อยู่รอด เจริญรวดเร็ว และส่งเสริมความเป็นสเต็มเซลล์ให้เพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ร่วมกัน

แนวทางการดำเนินงานวิจัยในอนาคต (FUTURE DIRECTIONS)

เนื่องจากการโครงการทั้งหมดตามวัตถุประสงค์เดิมของการขอรับทุน เป็นโครงการระยะเวลา 2 ปี รายงานฉบับนี้เป็นรายงานเมื่อจบปีที่ 1 ของการวิจัย มีการดำเนินการตามแผนของปีที่ 1 อย่างครบถ้วน ทั้งนี้จึงยังไม่มีผลการศึกษาในส่วนของการใช้ differentiation therapy ด้วย small interfering RNA เพื่อยับยั้งเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโตมา ซึ่งจะได้ดำเนินการเป็นลำดับถัดไป อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ได้วางรากฐานและเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับความเชื่อมโยงของ mTORC2 signaling pathway และ LIN28A/B ซึ่งจะทำให้สามารถนำความรู้ไปใช้ประโยชน์และต่อยอดการดำเนินการได้ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม (BIBLIOGRAPHY)

1. Appin, Christina L., and Daniel J. Brat. "Molecular genetics of gliomas." The Cancer Journal 20.1 (2014): 66-72.
2. Carén, Helena, et al. "Glioblastoma Stem Cells Respond to Differentiation Cues but Fail to Undergo Commitment and Terminal Cell-Cycle Arrest." Stem cell reports 5.5 (2015): 829-842.
3. Chantaravisoot N., et al. "Significance of Filamin A in mTORC2 function in glioblastoma.", Molecular Cancer 14.127 (2015).
4. Chen, Yunching, Dong-Yu Gao, and Leaf Huang. "In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies." Advanced drug delivery reviews 81 (2015): 128-141.
5. Cloughesy, Timothy F., Webster K. Cavenee, and Paul S. Mischel. "Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 9 (2014): 1-25.
6. Farooqi, Ammad Ahmad, et al. "Is miR-34a a Well-equipped Swordsman to Conquer Temple of Molecular Oncology?." Chemical biology & drug design 87.3 (2016): 321-334.
7. Gallego, O. "Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma." Current Oncology 22.4 (2015): e273.
8. Kang, Tae-Wook, et al. "Growth arrest and forced differentiation of human primary glioblastoma multiforme by a novel small molecule." Scientific reports 4 (2014).
9. Kouhkan, Fatemeh, et al. "MicroRNA-129-1 acts as tumour suppressor and induces cell cycle arrest of GBM cancer cells through targeting IGF2BP3 and MAPK1." Journal of medical genetics 53.1 (2016): 24-33.
10. Louis, David N., et al. "The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary." Acta neuropathologica 131.6 (2016): 803-820.
11. Mao, X. G., et al. "LIN28A facilitates the transformation of human neural stem cells and promotes glioblastoma tumorigenesis through a pro-invasive genetic program." Oncotarget 4.7 (2013): 1050-1064.
12. Melton, Collin, Robert L. Judson, and Robert Blelloch. "Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells." Nature 463.7281 (2010): 621-626.
13. Naldini, Luigi. "Gene therapy returns to centre stage." Nature 526.7573 (2015): 351-360.
14. Nguyen, Liem H., et al. "Lin28b is sufficient to drive liver cancer and necessary for its maintenance in murine models." Cancer Cell 26.2 (2014): 248-261.
15. Parsons, D. Williams, et al. "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." Science 321.5897 (2008): 1807-1812.
16. Qin, Rong, et al. "LIN28 is involved in glioma carcinogenesis and predicts outcomes of glioblastoma multiforme patients." PLoS One 9.1 (2014): e86446.
17. Serão, Nicola VL, et al. "Cell cycle and aging, morphogenesis, and response to stimuli genes are individualized biomarkers of glioblastoma progression and survival." BMC medical genomics 4.1 (2011): 1.
18. Shyh-Chang, Ng, and George Q. Daley. "Lin28: primal regulator of growth and metabolism in stem cells." Cell stem cell 12.4 (2013): 395-406.

19. Suvasini, Ramaswamy, et al. "Insulin growth factor-2 binding protein 3 (IGF2BP3) is a glioblastoma-specific marker that activates phosphatidylinositol 3-kinase/mitogen-activated protein kinase (PI3K/MAPK) pathways by modulating IGF-2." Journal of Biological Chemistry 286.29 (2011): 25882-25890.
20. Viswanathan, Srinivas R., George Q. Daley, and Richard I. Gregory. "Selective blockade of microRNA processing by Lin28." Science 320.5872 (2008): 97-100.
21. Zeng, Yaxue, et al. "Lin28A Binds Active Promoters and Recruits Tet1 to Regulate Gene Expression." Molecular cell 61.1 (2016): 153-160.
22. Zhang, Jin, Ratanasirintrawoot, Sutheera, et al. "LIN28 regulates stem cell metabolism and conversion to primed pluripotency." Cell Stem Cell 19.1 (2016): 66-80. *Co-first authors
23. Zhou, Jianbiao, Siok-Bian Ng, and Wee-Joo Chng. "LIN28/LIN28B: an emerging oncogenic driver in cancer stem cells." The international journal of biochemistry & cell biology 45.5 (2013): 973-978.
24. Zhu, Hao, et al. "The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism." Cell 147.1 (2011): 81-94.
25. Zuckerman, Jonathan E., and Mark E. Davis. "Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer." Nature Reviews Drug Discovery 14.12 (2015): 843-856.

NAPHAT CHANTARAVISOOT, Ph.D.

Home address: 79/513 Patumwan Resort Condominium Payathai Rd. Rajthevee Bangkok 10400

Work address: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Pattayapat Bldg. 11th floor, King Chulalongkorn Memorial Hospital

1873 Phraram 4 Rd. Pathumwan Bangkok 10330

Lab phone: (+662) 256-4482 Mobile: (+668) 9748-8409

E-mail address: cnaphat@gmail.com, naphat.c@chula.ac.th

EDUCATION

Ph. D. in Microbiology Immunology & Molecular Genetics, 2015

University of California, Los Angeles, California, USA

B.Sc. in Biology (1st Class Honors with Gold Medal), 2008.

Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

ACADEMIC POST

Academic lecturer, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, November 2015- present

AREA OF INTEREST

Roles of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in cancers

Roles of mTOR complex 2 in cancer migration and invasion

Systems Biology and proteomic analysis in cancers and autoimmune diseases

Cancer immunotherapy, cancer vaccine and neoantigen discovery

SCHOLARSHIPS AND FELLOWSHIP

Thai government scholarship under the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST) to study abroad in biological science. (Ph.D. degree; 5-year scholarship), 2009 - 2014.

The 2007 Thailand Advanced Institute of Science and Technology's Pilot Project Scholarship for the training program at NSTDA, March 2007- May 2007.

Honors Program Research Fellowship, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 2006 - 2008.

Awarded a scholarship to attend The 2003 Professor Harry Messel International Science School (ISS) from The Science Foundation for Physics within the University of Sydney, Australia, 2003.

DPST scholarship (High school – B.Sc.), 2001- 2008.

PUBLICATIONS

Pacharakullanon N, Wongkongkathep P, Kalpongnukul N, Pisitkun T, **Chantaravisoot N**. Role of mTORC2 in the Regulation of Tau Proteins in Neuroblastoma Cells. ***Manuscript in preparation.***

Chantaravisoot N, Wongkongkathep P, Pacharakullanon N, Tamanoi F, Loo JA, Pisitkun T. Identification of mTORC2 Associated Interactome Involved with Invasiveness of Brain Cancer Cells by Affinity Purification-Mass Spectrometry. ***Manuscript in preparation.***

Chantaravisoot N, Wongkongkathep P, Pacharakullanon N, Pisitkun T, Tangkijvanich P. Significance of mTORC2 in Hepatocellular Carcinoma Migration. ***Manuscript in preparation.***

Wongkongkathep P, Audomson T, **Chantaravisoot N**, Wongprom B, Thimuam A, Boonkrai C, Pisitkun P, Pisitkun T. STING Interactome Revealed by Affinity Enrichment Mass Spectrometry. ***Manuscript in preparation.***

Chantaravisoot N, Wongkongkathep P, Loo JA, Mischel PS, Tamanoi F. Significance of Filamin A in mTORC2 Function in Glioblastoma. *Mol Cancer.* 2015 Jul 2;14:127. doi: 10.1186/s12943-014-0396-z

Chantaravisoot N & Tamanoi F. Structure, Function and Regulation of Tor Complexes from Yeasts to Mammals Part B. *Enzym.* 2010; 28: 301–16.

Hardt M, **Chantaravisoot N** & Tamanoi F. Activating mutations of TOR (target of rapamycin). *Genes Cells.* 2011 Feb; 16(2): 141–51.

PRESENTATIONS

Poster Presentation, "The mTOR complex 2 promotes glioblastoma migration via the interactions with multiple actin-binding and microtubule-associated proteins", AACR Annual Meeting 2019, Georgia World Congress Center, Atlanta, USA, April 2019.

Oral Presentation, "Defining the roles of mTORC2 in Glioblastoma migration by systems biology approaches", Cancer Precision Medicine Academic Conference 2018, Siriraj Hospital, Thailand, December 2018.

Poster Presentation, "The mTOR complex 2-associated interactome and cell migration ability determination in brain cancers", AACR Annual Meeting 2018, McCormick Place Convention Center, Chicago, USA, April 2018.

Oral Presentation, "Systems biology for studying mTORC2 signaling pathway in brain cancers", 2nd CU FPhS-RIKEN CDB and IAMPS34, Arnoma Grand Hotel, Bangkok, March 2018.

Oral Presentation, "Systems Biology for Studying mTOR Signaling Pathway in Cancers", Research University Network – Cancer Precision Medicine meeting 2017, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, November 2017.

Poster Presentation, "Identification of the Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2-associated interactome involved in brain cancer cell motility by affinity purification-mass spectrometry", AACR Annual Meeting 2017, Washington Convention Center, Washington D.C., USA, April 2017.

Oral Presentation, "Studying Roles of mTOR Complex 2 Signaling Pathway in Brain Cancer Cell Migration", MDCU Congress 2016, Bhumisiri Building, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, August 2015.

Oral Presentation, "Characterization of mTORC2 Signaling Pathway in Brain Cancer", Chulalongkorn University-National Chung Cheng University Workshop on "Cancer Biology and Signaling", Chulalongkorn University, Bangkok, June 2015.

HONORS AND AWARDS

Sidney Rittenberg Award for Ph.D. candidates, MIMG Department, University of California, Los Angeles, December 2014.

Outstanding Academic Record Award from The Professor Dr. Tab Nilanidhi Foundation (The Tab Foundation), Faculty of Science, Chulalongkorn University, August 2008.

Gold Medal from Chulalongkorn University (highest cumulative GPA in Department of Biology), July 2008.

TRAININGS

Participated in the 7th AOHUPO/ 9th PST Symposium 2014 Young Scientist Program, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, August 2014.

OTHER ACTIVITIES

Volunteered as a campaign creator of the CU Immunotherapy Fund, a fundraising project supporting cancer immunotherapy research in Chulalongkorn University.

Volunteered as an MC for the cancer exhibition in the CUSB Day event, KBank Siam Pic-Ganesha Theatre, November 2017.

Volunteered as an interpreter for student finalists from Thailand in the Intel International Science and Engineering Fair 2014, LA Convention Center, Los Angeles, May 2014.