

สุจิตรา คำผาง : การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ลิงวอกเพศผู้ในหลอดทดลองจากเซลล์ต้นกำเนิด  
พลูริโพเทิน (*IN VITRO* SPERMATOGENESIS OF RHESUS MONKEY PLURIPOTENT  
STEM CELLS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 128 หน้า.

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดพลูริโพเทินของลิงวอก เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญสำหรับการศึกษาวิจัยทางชีววิทยาการแพทย์ในมนุษย์ เนื่องจากเซลล์พลูริโพเทินของลิงวอก มีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ และมีความสามารถเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้อย่างไม่จำกัด อีกทั้งยังมีข้อจำกัดด้านจริยธรรมน้อยกว่าการศึกษาวิจัยในมนุษย์ ดังนั้น เซลล์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์พลูริโพเทิน ของลิงวอก จึงเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการศึกษา กลไก กระบวนการเปลี่ยนแปลงและชีววิทยาของโรคที่มีข้อจำกัดในการศึกษาวิจัยในมนุษย์ การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำ เซลล์พลูริโพเทินของลิงวอก ไปเป็นเซลล์ของระบบสืบพันธุ์เพศชาย (Spermatogenic cells; SSCs) โดยวิธี Direct differentiation โดยที่ไม่มีการตัดแปลงพันธุกรรมของเซลล์เซลล์SSCs ที่ได้จากการเหนี่ยวนำภายนอกในร่างกายสามารถจำลองถึงกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชายเช่นเดียวกันกับที่เกิดในร่างกาย โดยการแสดงออกของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่จำเพาะของเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย ได้แก่ การแสดงออกของยีน VASA ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์ชั้นสูง, SALL4 และ PLZF ตัวบ่งชี้ของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ชนิด Spermatogonia, cKit ตัวบ่งชี้ของ Spermatogonia ที่มีการแบ่งตัว และ Piwil1 เซลล์ที่เจริญพัฒนาขึ้นของ Spermatoocyte ไปจนถึงเซลล์ Spermatoid ที่มีสารพันธุกรรมลดลงครึ่งหนึ่งเหมือนในสเปิร์ม ในขณะที่เดียวกันการตรวจสอบด้วยวิธี Fluorescence activated cells sorting โดยใช้องค์ประกอบของสารพันธุกรรม DNA เป็นตัวแยกเซลล์ ช่วยยืนยันว่าการเหนี่ยวนำเซลล์พลูริโพเทินของลิงวอกในหลอดทดลอง สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีสารพันธุกรรมลดลงครึ่งหนึ่ง (Haploid spermatoid cells) ซึ่งเป็นระยะก่อนสร้างสเปิร์มที่สมบูรณ์ได้ ดังนั้น เราจึงใช้กระบวนการเหนี่ยวนำแบบเดียวกันเพื่อใช้เป็นแบบจำลองในอนาคต ในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชายขึ้นใหม่จากเซลล์ผู้ป่วยเอง (Patient specific SSCs) โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดของลิงวอกที่เป็นโรคนันดิงตัน (Transgenic rhesus monkey HD ESCs; rHD ESCs) เหนี่ยวนำให้เป็น rHD SSCs แล้วนำไปตรวจสอบพยาธิสภาพของโรค ผลจากการศึกษาเป็นที่น่าสนใจว่า เราสามารถตรวจสอบกระบวนการ mutation ในลำดับเบสของยีนฮันดิงตันที่มีผลต่อกระบวนการเซลล์สืบพันธุ์เพศชายในหลอดทดลองได้ และแสดงให้เห็นถึงการถ่ายทอดของยีนผิดปกตินี้ ผ่านเซลล์สืบพันธุ์จากรุ่นสู่รุ่น ความไม่เสถียรของลำดับเบสใน rHD SSCs แสดงออกโดยการเพิ่มขึ้นของลำดับเบส CAG ที่ซ้ำกันในอัลลีลที่ก่อโรค (Disease allele) โดยพบการเพิ่มขนาดเบสซ้ำของ CAG ขนาดเล็ก กลาง และขนาดใหญ่ใน rHD SSCsเปรียบเทียบกับเซลล์ก่อนการเหนี่ยวนำ ยิ่งไปกว่านั้นพบว่า ยีน PLZF และ Piwil1 มีการแสดงออกที่ตรงกันข้ามจากกลุ่มควบคุม (Wild type control) โดย PLZF มีการแสดงออกที่คงที่จากวันที่ห้าไปจนกระทั่งสิ้นสุดการเหนี่ยวนำในวันที่สิบเซลล์สืบพันธุ์ลดลงใน

กระบวนการเหนี่ยวนำเซลล์พลูริโพเทนท์ของลิงวอกและเซลล์ที่เป็นโรคนัดงั้นไปเป็นเซลล์  
สเต็มเซลล์เพศชายในครั้งนี้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญสำหรับการศึกษาวัยขั้นพื้นฐานไปถึงขั้นสูงของ  
โรคนัดงั้น การเข้าใจกระบวนการเกิดของโรคนัดงั้นที่มีผลต่อเซลล์สเต็มเซลล์ จะนำไปสู่กระบวนการ  
คิดค้นวิธีการและพัฒนาการรักษาที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การสร้างเซลล์สเต็มเซลล์ในหลอดทดลอง  
ในครั้งนี้ สามารถนำไปสู่กระบวนการทางเลือกในอนาคตสำหรับการรักษาโรคที่มีผลต่อเซลล์สเต็มเซลล์ใน  
เพศชายและยังสามารถเพื่อแก้ปัญหาการลดลงของจำนวนสเปิร์มที่กำลังเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องทั่วโลก



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนักศึกษา ปิรดา คำผาง

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร. อรุณ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. อรุณ

SUJITTRA KHAMPANG : *IN VITRO* SPERMATOGENESIS OF RHESUS

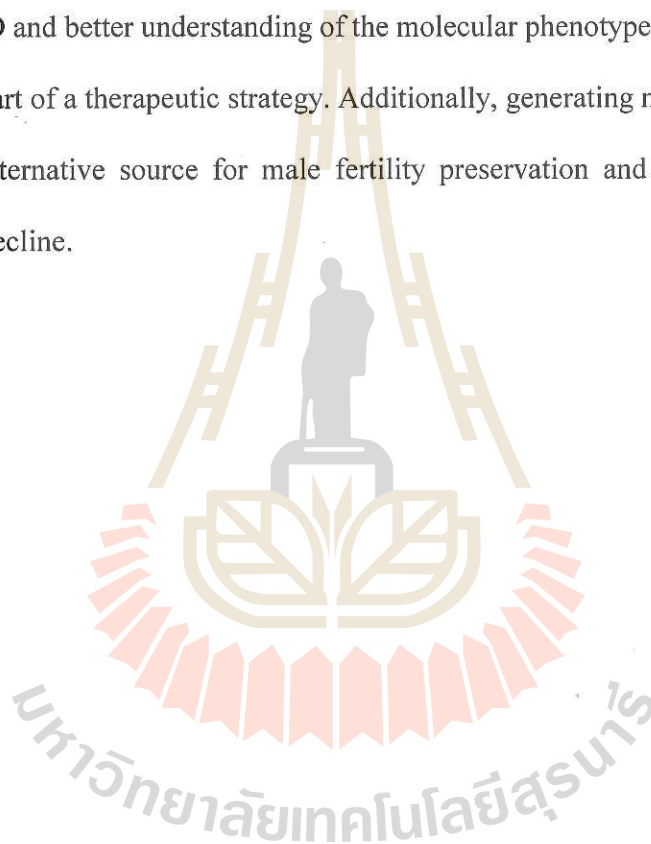
MONKEY PLURIPOTENT STEM CELLS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.

RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 128 PP.

## SPERMATOGENESIS/RHESUS MONKEY/HUNTINGTON DISEASE

Rhesus monkey pluripotent stem cells (rPSCs) are the great promising source for basic and advanced regenerative biomedical research in human. Since rPSCs share the same number of properties similar to human pluripotent stem cells (hPSCs) and an unlimited differentiation capacity with less ethical uses in advance stem cell research, thus, the desired cells derived from rPSCs differentiation are valuable materials for developmental and biological study of human disease. In this study, we demonstrated differentiation ability of rPSCs into advance male germ cells lineages by *in vitro* direct differentiation and without genetic manipulation. Derived rhesus monkey spermatogenic cells (rSSCs) from rPSCs recapitulated *in vivo* spermatogenesis by expressing the molecular phenotype of specific male germ cells including VASA, a predominant germ cells marker of primate SSCs, SALL4, PLZF positive of spermatogonia (Spg) population, cKit and Piwil1 expression showed the marker of differentiating Spg, and more mature spermatocytes to haploid spermatid cells respectively. Taken together, fluorescence activated cells sorting based on DNA content of the cells revealing haploid population are derived from rPSCs induction *in vitro*. Moreover, using this platform we created a model for study of patient specific SSCs production. Transgenic rhesus monkey Huntington disease PSCs (rHD PSCs) were induced to rHD SSCs, and subsequently were used for pathogenic cellular phenotype investigation. We captured CAG repeats mutation during *in vitro* spermatogenesis recapitulating paternal germ line transmission of *HTT* transgene *in vivo*. Instability of trinucleotide repeats (TNR) in rHD SSCs was observed during *in vitro* spermatogenesis by increased small, intermediate and

persistently expressed throughout the 10 days differentiation, whereas Piwil1 mature SSCs marker declined in rHD SSCs by day10. Taken together, reduction of germ cells apoptotic cell deaths against normal SSC apoptosis, are observed in rHD SSCs suggesting pathogenic effects of *HTT* mutation on spermatogenesis progression and male germ cells development. This reveals a potential way to induce rPSCs as well as a pathogenic mode for changing rHD PSCs into male germ cells lineage, thus providing material for basic and advance research of HD and better understanding of the molecular phenotype of SSCs under disease condition as part of a therapeutic strategy. Additionally, generating male germ cells *in vitro* presents an alternative source for male fertility preservation and studies of worldwide sperm count decline.



School of Biotechnology

Academic Year 2019

Student's Signature Sujittra Khampong

Advisor's Signature \_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature \_\_\_\_\_