รหัสโครงการ SUT3-304-54-12-22

รายงานการวิจัย

การศึกษากระบวนการเจริญไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในระบบประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

(The model for neural stem cell development by using human embryonic stem cells as a model)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-54-12-22

รายงานการวิจัย

การศึกษากระบวนการเจริญไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในระบบประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

(The model for neural stem cell development by using human embryonic stem cells as a model)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. ปริญญา น้อยสา

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์มีความสามารถในการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ร่างกายประเภทต่างๆได้ทุกเซลล์ รวมทั้งเซลล์ในระบบประสาท การศึกษาพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ให้ไปเป็นเซลล์จำเพาะหนึ่งๆที่ต้องการมีความสำคัญอย่างมาก เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการและลดการปนเปื้อนเซลล์ประเภทอื่นๆ โครงการวิจัยนี้ศึกษากระบวนการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทและทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้ โดยเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ถูกเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทด้วย Dorsomorphin ซึ่งเป็นสารยับยั้งสัญญาณ Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) หลังจากการเหนี่ยวนำ 15 วัน เซลล์มีการแสดงออกของ PAX6 และ MASH1 ซึ่งเป็นยีนจำเพาะต่อเซลล์ในระบบประสาท เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นเมื่อมีการเติม basic fibroblast growth factor ลงไปในน้ำยาเลี้ยงเซลล์และที่สำคัญเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทสามารถถูกเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ประสาทประเภทต่างๆได้อีกด้วย เช่นเซลล์ประสาทโดปามิน เซลล์ประสาทกาบา และ เซลล์ค้ำจุนระบบประสาท เป็นต้น ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าผู้วิจัยสามารถพัฒนาวิธีเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Human embryonic stem cells are pluripotent, an ability to give rise all body cell types. The development of protocol to generate specific cell types is desirable in order to obtain cells for therapeutic purposes. This study established an efficient protocol to drive human embryonic stem cells toward neural lineage by using bone morphogenetic protein (BMP) antagonist. After 15 days, human embryonic stem cells appear as neural rosette and upregulate neuronal genes, including PAX6 and MASH1. Bipolar neural progenitors is absent after 30 days of induction and mitotically respond to basic fibroblast growth factor. Noteworthy, the resulting neural progenitors are multipotent, generating several neuronal cell types. Altogether, this study has successfully established an efficient protocol to derive neural progenitors from human embryonic stem cells, which will be useful for basic and therapeutic purposes.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อภาษาไทย	4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	5
สารบัญ	6
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	7
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	8
ขอบเขตของการวิจัย	8
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	10
บทที่ 3ผลการวิจัย	15
บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	
สรุปผลการวิจัย	20
ข้อเสนอแนะ	20
บรรณานุกรม	21
ภาคผนวก	23
ประวัติผู้วิจัย	24

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1 บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การศึกษาการพัฒนาการของตัวอ่อนสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นเรื่องที่ทดลองได้ยาก ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากหลายๆปัจจัย อาทิ ขนาดของตัวอ่อน, จำนวนของตัวอ่อนที่สามารถนำมาศึกษา และ ความซับซ้อนของโครงสร้างตัวอ่อน โดยเฉพาะตัวอ่อนมนุษย์ ที่จะมีปัจจัยทางด้านกฎหมายและศีลธรรมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย จากที่ทราบกันดีว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (human embryonic stem cells) นั้นได้มาจากเซลล์ตัวอ่อนมนุษย์ในระยะบลาสโตซิสต์ที่เหลือทิ้งจากคลินิกรักษาผู้มีบุตรยาก (Thomson et al., 1998) ซึ่งเซลล์ที่ได้ในระยะนี้อยู่ในระยะตั้งต้นก่อนที่ตัวอ่อนจะตัดสินใจเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดจำเพาะชนิดต่างๆของร่างกาย เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์มีคุณสมบัติพิเศษคือความสามารถในการแบ่งตัว (proliferation) คงสภาพ (self renewal) และเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ชนิดจำเพาะอื่นๆ (pluripotent) ได้เป็นอย่างดีเมื่อถูกเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Pomp et al., 2005) ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าการศึกษาติดตามกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์นี้ไปสู่เซลล์จำเพาะชนิดหนึ่งๆนั้นจะนำมาซึ่งข้อมูลที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเจริญพัฒนาในระยะเริ่มแรกของตัวอ่อนมนุษย์ก็เป็นได้ นอกจากนี้จากคุณสมบัติพื้นฐานดังกล่าวของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ทำให้มีการศึกษาทดลองอย่างมากเกี่ยวกับเซลล์ประเภทนี้ ตั้งแต่การศึกษาทางชีววิทยาการเจริญ จนถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

การเพาะเลี้ยงและการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ในห้องทดลองนั้นจะถูกควบคุมทั้งจากสัญญาณภายนอกและภายในเซลล์ (Niwa, 2007) ดังนั้นสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ผู้ทำการทดลองต้องการจึงมีความสำคัญและกำลังได้รับการศึกษากันอย่างกว้างขวาง การสร้างเซลล์ประสาท (neurons) และ เซลล์ค้ำจุนเซลล์ประสาท (glia) ในห้องทดลอง ที่สามารถนำเซลล์เหล่านี้ไปใช้ทดแทนเซลล์เก่าที่สูญเสียไปจากการตาย หรือ บาดเจ็บของเซลล์นั้น เป็นกุญแจสำคัญของกระบวนการเซลล์บำบัด (cell therapy) สำหรับผู้ป่วยด้วยโรคทางระบบประสาทต่างๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์คินสัน หรือ โรคไขสันหลังอักเสบ เป็นต้น การศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานถึงแหล่งที่มาของเซลล์ที่สามารถนำมาสร้างเป็นเซลล์ในระบบประสาทเหล่านี้ได้ อาทิ เซลล์ต้นกำเนิดจากรกและถุงน้ำคร่ำ, เซลล์ต้นกำเนิดสมองของทารกที่เสียชีวิต หรือเซลล์ต้นกำเนิดจากอวัยวะอื่นๆของผู้ป่วยเอง เป็นต้น แต่เมื่อได้ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติความสามารถในการคงสภาพ (self renew), การเพิ่มจำนวน (proliferation) และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะชนิดหนึ่งๆ (differentiation potential) แล้ว เซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้มีข้อจำกัดในคุณสมบัติดังกล่าวอยู่มาก และจากปัญหานี้เองเป็นการจุดประกายให้แก่นักวิทยาศาสตร์เพื่อหาเซลล์จากแหล่งอื่นๆมาทดแทน และเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ก็เป็นหนึ่งในตัวเลือกที่ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์อย่างกว้างขวางในการประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแหล่งสำหรับการสร้างเซลล์ชนิดต่างๆของร่างกาย รวมทั้งเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทมนุษย์

เป็นที่ทราบกันดีว่าการสร้างเซลล์ประสาทและเซลล์ค้ำจุนระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์นั้น สามารถกระทำได้หลายวิธี รวมถึงการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท (neural stem cells) ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นเซลล์จำเพาะทั้งสองชนิดดังกล่าวนั้นได้ต่อไป ทั้งนี้นอกจากความเป็นไปได้ในการใช้เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เพื่อการรักษาผู้ป่วยแล้วแล้ว ยังได้มีการค้นพบว่าลำดับการพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์นั้นมีขั้นตอนการพัฒนาที่คล้ายคลึงกับเหตุการณ์ที่พบได้ในช่วงการเจริญของระบบประสาทส่วนกลางมนุษย์ในระยะตัวอ่อน (early embryonic central nervous system development) ซึ่งการศึกษานี้เป็นไปไม่ได้เลยที่นักชีววิทยาระบบประสาทจะทำการวิจัยดังกล่าวโดยตรงจากตัวอ่อนของมนุษย์ จากเหตุผลข้างต้นนี้เองทำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ได้รับการยอมรับในปัจจุบันว่าเป็นเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง แต่อย่างไรก็ตามกลไกการควบคุมกระบวนการเปลี่ยนแปลงนี้ยังคงต้องได้รับการศึกษาต่อไปอีกมาก เพื่อความเข้าใจกับการเจริญของระบบประสาทมนุษย์ในระดับโมเลกุลและปลอดภัยสูงสุด เมื่อต้องนำเซลล์เหล่านี้มารักษาผู้ป่วยในอนาคต

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเพาะเลี้ยงและขยายจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ในห้องทดลอง
2. เพื่อพัฒนาวิธีการในการเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ต้นกำเนิดในระบบประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์
3. เพื่อทดสอบคุณสมบัติของเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในระบบประสาท

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

เพาะเลี้ยงและขยายจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ได้จากการร้องขอธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดแห่งสหราชอาณาจักร (UKSCB) และทำการแช่แข็งเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ไว้บางส่วนเพื่องานวิจัยอื่นในอนาคต จากนั้นพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ได้ให้เจริญไปเป็นเซลล์ในสายพัฒนาการของเซลล์ประสาทและท้ายสุดคาดหวังว่าจะได้เซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในระบบประสาทมนุษย์ ซึ่งคุณลักษณะของเซลล์ที่ได้ในแต่ละระยะของการเหนี่ยวนำ เช่น อัตราการแบ่งตัว การแสดงออกของยีนและโปรตีน และ ความสามารถในการสร้างเซลล์ชนิดจำเพาะ จะถูกทำการศึกษาเปรียบเทียบกับคุณลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่พบในตัวอ่อนจากการรายงานมาก่อนหน้า

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้วิธีเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในระบบประสาทที่มีประสิทธิภาพ

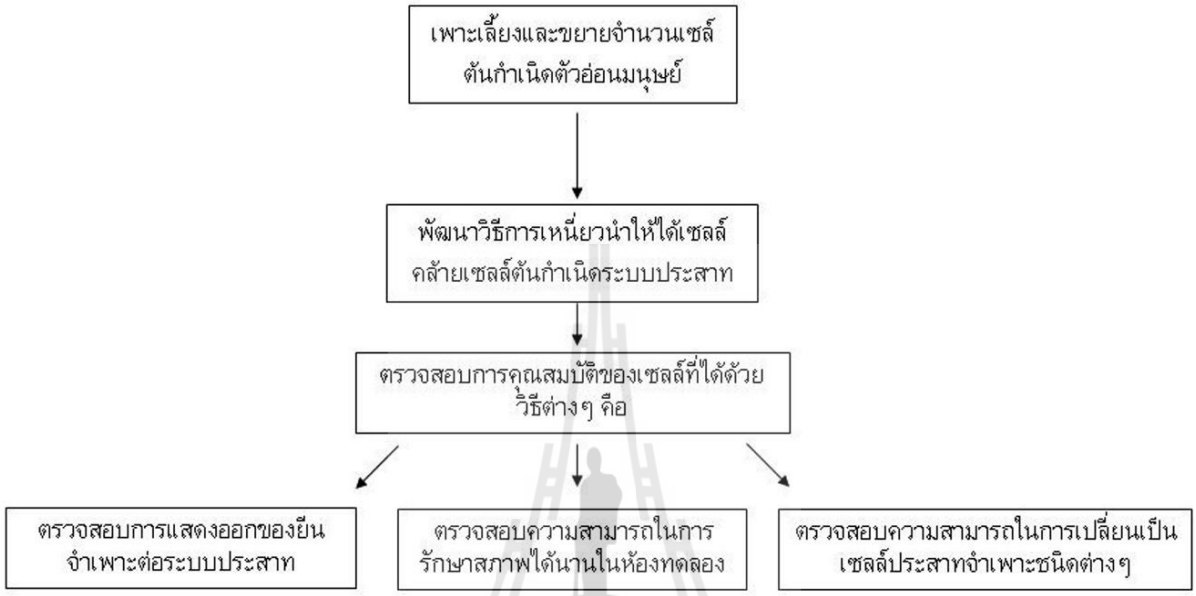
2. ได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดในระบบประสาทจากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ซึ่งสามารถนำเซลล์นี้ไปศึกษาชีววิทยาของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทได้ต่อไป

3. เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้สามารถถูกเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ประสาทชนิดจำเพาะได้หลายประเภท ซึ่งจะมีผลกระทบต่อวงการเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อมของระบบประสาท

4. สามารถเผยแพร่ความรู้นี้ในวารสารวิชาการ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ต่อไป

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ไปเป็นเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท โดยแผนงานวิจัยสำหรับโครงการวิจัยนี้สามารถสรุปให้เห็นภาพได้โดยแผนภูมิข้างล่าง



โดยดำเนินการร้องขอเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จากธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดแห่งสหราชอาณาจักร (UK Stem Cell Bank) เซลล์ที่ได้รับจะถูกทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนตามกระบวนการมาตรฐานของธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดที่บัญญัติไว้ เซลล์จะถูกทำการทดสอบความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์โดยศึกษาดูการแสดงออกของยีน และ ความสามารถในการสร้างเซลล์ชนิดจำเพาะต่างๆ ในห้องทดลอง โดยจะทำงานวิจัยในขั้นนี้ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งมีห้องเลี้ยงเซลล์ที่สะอาดได้มาตรฐานในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

2.1. การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงจากตัวอ่อนหนู

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของตัวอ่อนหนูถูกแยกออกมาจากตัวอ่อนหนูอายุ 13.5 วัน หลังการปฏิสนธิ (d.p.c) โดยเซลล์ในส่วนหัวและอวัยวะภายในถูกแยกออกไป เซลล์ไฟโบรบลาสต์ตัวอ่อนหนูที่ได้จะถูกเลี้ยงเพื่อการขยายจำนวนในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (DMEM+10% fetal calf serum + L–Glutamine + Penicillin/Streptomycin) จากนั้นเซลล์จะถูกเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวจนกว่าจะต้องการใช้โดยเซลล์ในระยะนี้ถูกเรียกว่าเซลล์ในลำดับที่ 0 จากนั้นเมื่อต้องการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากตัวอ่อนหนูในการเป็นเซลล์พี่เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ เซลล์จะถูกนำออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวและเอากลับมาเลี้ยงในห้องทดลองเพื่อการขยายจำนวนอีกครั้งหนึ่ง เซลล์นี้สามารถถูก

เลี้ยงได้ในห้องทดลองไม่เกินลำดับที่ 5 ก่อน ที่จะถูกยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ด้วย 100 ng/ml Mitomycin-C เป็นระยะเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกล้างด้วย PBS 3-5 ครั้ง และแช่ในเอนไซม์ทริปซิน 3-5 นาที เพื่อเก็บเซลล์ออกมาหลังจากนั้นน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีส่วนประกอบของซีรั่มจะถูกเพิ่มเข้าไปสู่เซลล์เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และเซลล์จะถูกปั่นตกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเซลล์จะถูกน้ำไปเลี้ยงในจานทดลองที่เคลือบด้วย 0.1% โปรตีนเจลาติน ก่อนล่วงหน้าไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนที่พร้อมจะถูกใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงสำหรับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

2.2. การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไลน์เชฟ 3 และ เชฟ 6 (Shef3 and Shef6 hESCs) ที่ได้รับการบริจาคจากธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์ มหาวอทยาลัยเชฟฟิลด์ ประเทศสหราชอาณาจักร จะถูกเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยงไฟโบรบลาสต์ตัวอ่อนหนูที่เตรียมก่อนหน้านี้ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ชนิดจำเพาะ (Knockout-DMEM (Invitrogen), 20% Knockout-Serum replacement (Invitrogen), 0.1 mM Non-essential amino acid (NEAA, Invitrogen), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma), 0.1mM L-Glutamine (Invitrogen), 0.1 mM Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) และ 4 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; R&D system) โดยจะมีการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวันและเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์นี้จะมีการย้ายไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์อันใหม่ทุกๆอาทิตย์โดยการใช้เอนไซม์คอลลาจีเนสในการย้ายเซลล์ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่หนาแน่นในจานเลี้ยงเซลล์สามารถถูกแช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเพื่อการเก็บรักษาไว้ในอนาคตได้

2.3. การแช่แข็งเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่หนาแน่นในจานเลี้ยงเซลล์สามารถถูกเก็บรักษาในระยาวได้ในไนโตรเจนเหลว โดยเซลล์จะถูกแยกออกมาจากจานเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีทางเมคานิคด้วยการใช้ไปเปตแตกโคโลนีของเซลล์ออกเป็นโคโลนีเล็กๆในน้ำยาแช่แข็งเซลล์ (90% Knockout-Serum Replacement + 10% Dimethyl Sulfoxide) แล้วย้ายน้ำยาที่มีเซลล์อยู่ด้วยนี้สู่หลอดแช่แข็งเซลล์ (Corning) และเก็บหลอดดังกล่าวที่ตู่แช่ -80°C ข้ามคืนก่อนที่จะย้ายไปเก็บในไนโตรเจนเหลวต่อไป

2.4. การพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 2 จะดำเนินการดังต่อไปนี้ ทำการพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทโดยวิธีการต่างๆทั้ง การเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีสังเคราะห์ที่จำเป็นต่อการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท การแสดงออกของยีนและโปรตีนที่สำคัญจะถูกติดตามอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาของกระบวนการเหนี่ยวนำ โดยคุณลักษณะความ

เป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทจะถูกทดสอบโดยความสามารถในการเพิ่มจำนวน การคงสภาพ และการเปลี่ยนสภาพ

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จะถูกเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีสังเคราะห์ชื่อ Dorsomorphin ที่จะไปยับยั้งสัญญาณ Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) โดยแรกเริ่มของการทดลองเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่หนาแน่นในจานเลี้ยงเซลล์จะถูกแยกให้เป็นโคโลนีขนาดเล็ก (5–10 เซลล์ต่อ โคโลนี) เพื่อให้ทุกเซลล์มีโอกาสสัมผัสกับสารเหนี่ยวนำได้มากที่สุด ซึ่งทำได้โดยการแช่เซลล์ใน 0.02% Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma) เป็นเวลา 7–9 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย PBS แล้วเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ลงไป ก่อนที่จะแตกโคโลนีของเซลล์ด้วยการดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์ขึ้นลง 5–6 ครั้ง จากนั้นทำการย้ายกลุ่มเซลล์ที่ได้ไปยังจานเลี้ยงเซลล์อันใหม่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตรที่เตรียมไว้ก่อนล่วงหน้า โดยจานเลี้ยงเซลล์นี้จะถูกเคลือบด้วยโปรตีนเพื่อช่วยในการเกาะของเซลล์แตกต่างกัน คือ Geltrex (Invitrogen) โดยผู้ทำการทดลองจะเลือกชนิดของโปรตีนสำหรับเคลือบจานทดลองที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเซลล์ต่อไป เซลล์จะถูกเลี้ยงในน้ำยา N2B27 ที่ผสม Dorsomorphin ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (5 μM) โดยเซลล์ที่ได้จะถูกทำการตรวจสอบในการทดลองต่อไป

2.5. การตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท

การแสดงออกของยีนและโปรตีนที่สำคัญจะถูกติดตามอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาของกระบวนการเหนี่ยวนำ โดยคุณลักษณะความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทต่างๆจะถูกทดสอบ เช่น การแสดงออกของยีนและโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท ความสามารถในการเพิ่มจำนวน การรักษาสภาพ และการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ประสาทจำเพาะต่างๆ เป็นต้น

2.6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนและโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท

เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทสามารถตรวจสอบได้จากการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะหลายชนิด ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าเซลล์ที่ได้จากการทดลองนี้มีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทเซลล์ ผู้ทำการทดลองต้องตรวจสอบการแสดงออกของยีนและโปรตีนจำเพาะชนิดต่างๆ เซลล์ที่ได้หลังการเหนี่ยวนำจะถูกนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของวิธีการเหนี่ยวนำ โดยวิธีการตรวจสอบการแสดงออกของยีนจะใช้การทำพีซีอาร์ปกติ (conventional RT–PCR) เพื่อดูระดับการแสดงออกของยีนจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทต่างๆ เช่น PAX6, SOX1, SOX2, Musashi1, Nestin และ MASH1 เป็นต้น โดย RNA ของเซลล์ที่ระยะต่างๆของการเหนี่ยวนำจะถูกแยกและเปลี่ยนไปเป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธี reverse transcription จากนั้น cDNA ที่ได้จะถูกนำไปตรวจสอบ

ระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนจำเพาะดังกล่าวด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนนั้นๆ ดังแสดงในภาคพนวก หน้า 23 การแสดงออกของยีนเหล่านี้ในระดับโปรตีนจะถูกยืนยันด้วยการย้อมโปรตีนด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่างๆ (Immunostaining) และทำการส่องกล้องจุลทรรศน์สำหรับส่องสารเรืองแสง

2.7. การตรวจสอบความสามารถในแบ่งตัวและตอบสนองต่อโปรตีนกระตุ้นการเจริญ

เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทมีคุณสมบัติในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเพื่อตอบสนองต่อปัจจัยกระตุ้นการเจริญที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม และเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ระยะการเจริญที่ต่างกันก็จะตอบสนองต่อปัจจัยที่กระตุ้นการเจริญที่ต่างกันด้วย (Okada et al., 2008) ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ว่าเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่จะได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ระยะใดของตัวอ่อนมนุษย์ ดังนั้นเราจะดูการตอบสนองโดยการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทเมื่อได้รับปัจจัยกระตุ้นการเจริญแตกต่างกัน เช่น fibroblast growth factor2 (FGF2) หลังจากใส่ปัจจัยกระตุ้นการเจริญเหล่านี้แล้ว อัตราการแบ่งตัวของเซลล์จะถูกตรวจสอบด้วยวิธี Bromo deoxyuridine (BrdU) labeling ซึ่งหลักการคือเซลล์ที่มีการแบ่งตัวจะมีการสร้าง DNA สายใหม่และเมื่อใส่ BrdU nucleotide base homolog ลงไปในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ เซลล์ที่กำลังสร้างสาย DNA ขึ้นมาใหม่จะใส่ BrdU เข้าไปในสาย DNA ด้วย จากนั้นเราสามารถตรวจสอบเซลล์ที่มีการแบ่งตัวได้จากการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ BrdU และทำการย้อมอีกครั้งด้วยแอนติบอดีลำดับที่สองที่เชื่อมกับสารก่อการเรืองแสงซึ่งผู้ทำการทดลองสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สำหรับดูสารเรืองแสง อัตราการแบ่งตัวของเซลล์สามารถคำนวณได้จากจากจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดกับแอนติบอดีต่อ BrdU ต่อจำนวนนิวเคลียสเซลล์ทั้งหมดที่ย้อมด้วย DAPI

2.8. การทดสอบความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้ในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทจำเพาะชนิดต่างๆ

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ 3 จะดำเนินการดังต่อไปนี้เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จะถูกชักนำต่อไปด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์และสารเคมีที่เหมาะสม เพื่อให้เป็นเซลล์ประสาทจำเพาะชนิดต่างๆ เช่น เซลล์ประสาทที่หลั่งโดปามิน, กลูตามิน หรือ กาบา เป็นต้น เซลล์ประสาทชนิดต่างๆดังกล่าวจะถูกทดสอบด้วยการย้อมกับแอนติบอดีต่อสารสื่อประสาทซึ่งสามารถจำแนกชนิดของเซลล์ประสาทชนิดต่างๆได้

ผู้ทำการวิจัยคาดหวังว่าเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำจะสามารถมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทจำเพาะชนิดต่างๆได้เมื่อถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อในการใช้วิจัยพยาธิสภาพของโรคระบบประสาทและโอกาสทางการแพทย์ต่อไป เพื่อตอบคำถามวิจัยนี้เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จะถูกชักนำต่อไปด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์และสารเคมีต่างๆกันตามที่ได้มีการศึกษา

กันมาก่อนหน้า เพื่อกระตุ้นให้เป็นเซลล์ประสาทจำเพาะชนิดต่างๆ คือ เซลล์ประสาทที่หลั่งโดปามิน (Park et al., 2004), อะเซติลคลอริน (Nilbratt et al., 2010) และ กาบา (Yan et al., 2013) ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่าเมื่อเซลล์ประสาทพวกนี้บกพร่องจะก่อให้เกิดโรคพาร์คินสัน โรคอัลไซเมอร์ และโรคสคิธโซฟรีเนีย ตามลำดับ โดยหลังจากการเหนี่ยวนำให้ได้เซลล์ประสาทชนิดจำเพาะ เซลล์จะถูกตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อเซลล์ประสาทชนิดนั้นๆด้วยวิธีพีซีอาร์ และทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ด้วยการย้อมกับแอนติบอดีต่อสารสื่อประสาทหรือโปรตีนจำเพาะซึ่งสามารถจำแนกชนิดของเซลล์ประสาทชนิดต่างๆได้ เช่น เซลล์ประสาทโดปามิน ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ เอ็นไซม์ไทโรซิน ไฮดรอกซิเรส เซลล์ประสาทอะเซติลคลอรินย้อมด้วยแอนติบอดีต่อเอ็นไซม์ คลอริน อะเซติลทรานเฟอเรส และเซลล์ประสาทกาบาย้อมด้วยแอนติบอดีต่อเอ็นไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซีเลส

สถานที่ทำการวิจัย ทดลอง หรือเก็บข้อมูล

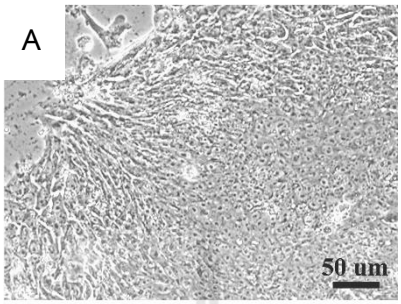
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์, การพัฒนาวิธีเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท, การตรวจวิเคราะห์ทางชีววิทยาโมเลกุล การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ที่ได้ และการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้ไปเป็นเซลล์ประสาทจำเพาะชนิดต่างๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3 ผลการวิจัย

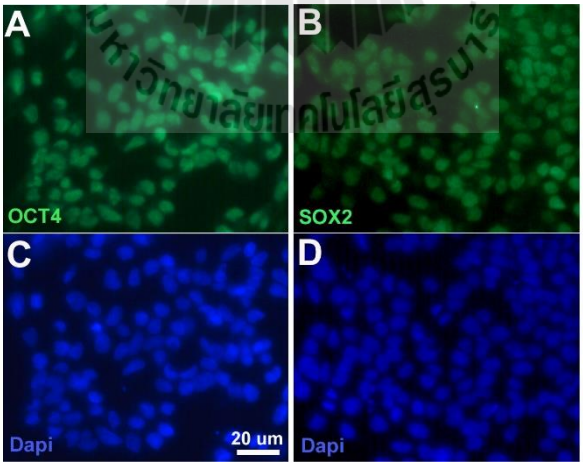
3.1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ได้ถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและพยายามเพิ่มจำนวนให้เพียงพอต่อการทดลองในขั้นต่อไป ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการนี้แสดงลักษณะทางกายภาพที่สมบูรณ์เช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ในห้องปฏิบัติการอื่นๆ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1. ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ

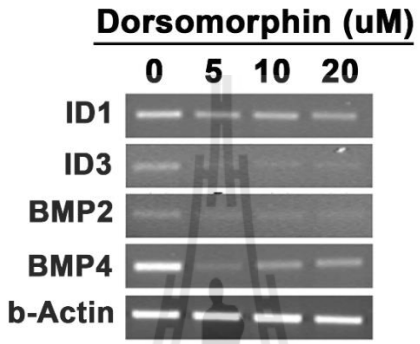
โดยเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้รับการยืนยันคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยการทำ Immunocytochemistry จำเพาะต่อโปรตีนที่มีความจำเป็นในการคงสภาพเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ ซึ่งในการทดลองนี้ผู้ทำการทดลองตรวดสอบการแสดงออกของโปรตีน OCT4 และ SOX2 และจากผลการทดลองพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ถูกเลี้ยงนั้นแสดงออกโปรตีนสองชนิดนี้ในระดับที่สูง (รูปที่ 2)



รูปที่ 2. ผลการย้อมแอนติบอดีต่อโปรตีน OCT4 และ SOX2 ในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

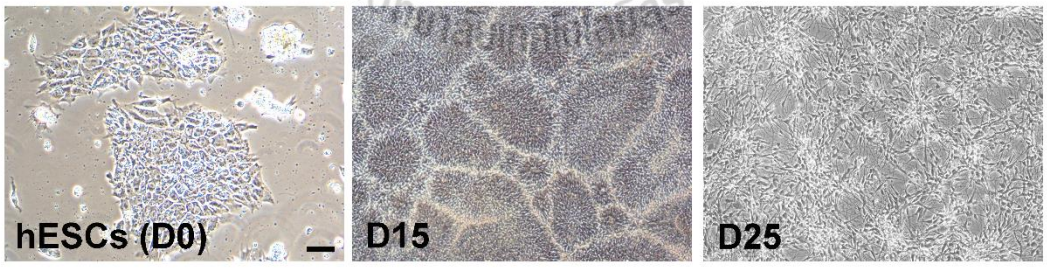
3.2. การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดประสาทจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

สัญญาณ Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) มีความสำคัญต่อการยับยั้งการพัฒนาของระบบประสาท (Bachiller et al., 2000) ดังนั้นเพื่อให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์จึงถูกเหนี่ยวนำด้วยสารยับยั้งสัญญาณ BMPs ที่ชื่อ μ โดยทดลองเติม Dorsomorphin ลงไปในน้ำยาเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 5, 10 และ 20 μM จากนั้นจึงตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสัญญาณ BMPs โดยพบว่า ID3, BMP2 และ BMP4 (รูปที่ 3) ถูกยับยั้งการแสดงออกเมื่อมีการเติม Dorsomorphin ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 5 μM ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปผู้วิจัยจะใช้ความเข้มข้น Dorsomorphin ที่ 5 μM นี้ ในการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์ในสายพัฒนาการของระบบประสาท



รูปที่ 3. การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสัญญาณ Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

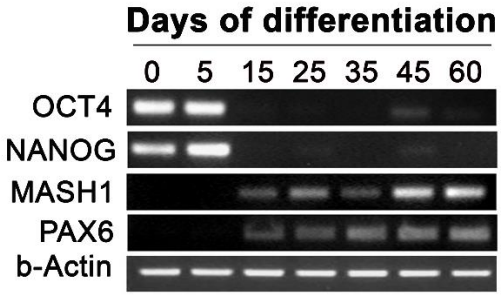
เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์มีการเปลี่ยนรูปร่างตลอดช่วงการเหนี่ยวนำ (รูปที่ 4) โดยหลังจากการเหนี่ยว 15 วัน เซลล์แสดงลักษณะเป็น neural rosette ก่อนที่จะเปลี่ยนสภาพเป็น Bipolar neural progenitors ในวันที่ 25 ของการเหนี่ยวนำ ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดในระบบประสาท



รูปที่ 4. ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ในห้องปฏิบัติการก่อนและหลังถูกเหนี่ยวนำให้พัฒนาไปเป็นเซลล์ในสายพัฒนาการของระบบประสาท

ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ติดตามการแสดงออกของยีนจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์และเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทตลอดระยะเวลาของการเหนี่ยวนำ และพบว่าการแสดงออกของยีนจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ คือ OCT4 และ NANOG ลดระดับการแสดงออก ในขณะที่ยีนจำเพาะต่อเซลล์ต้น

กำเนิดระบบประสาท คือ MASH1 และ PAX6 เพิ่มระดับการแสดงออกตลอดระยะเวลาการเหนี่ยวนำ (รูปที่ 5)

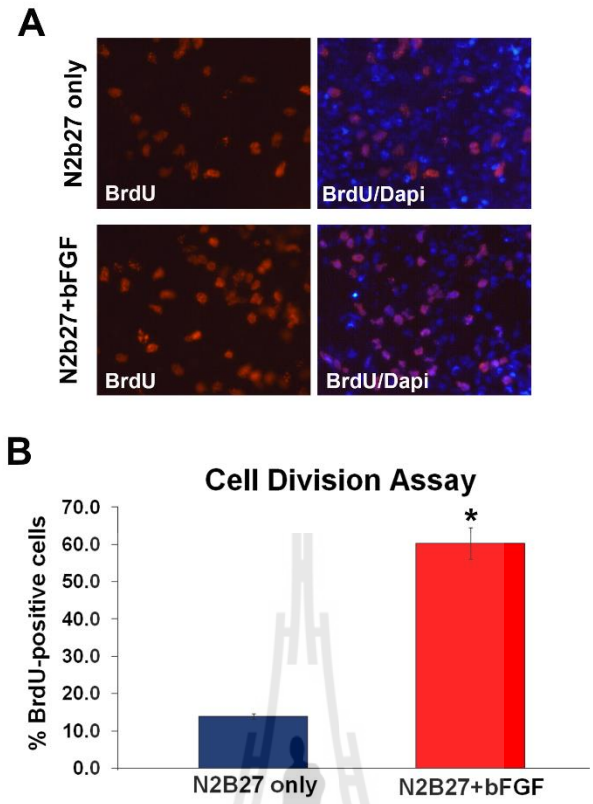


รูปที่ 5. การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบประสาทที่ตรวจพบหลังการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์

3.3. การตอบสนองต่อสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ basic fibroblast growth factor

เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทจะต้องมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนและรักษาสภาพได้ และ basic fibroblast growth factor ก็เป็นหนึ่งในสัญญาณที่สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทได้ (Adepoju et al., 2014) ดังนั้นเพื่อทดสอบว่าเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำสามารถตอบสนองต่อ basic fibroblast growth factor ได้ ผู้วิจัยจึงทดสอบอัตราการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี BrdU assay เมื่อมีการเพิ่ม basic fibroblast growth factor ปริมาณ 20 ng/ml ลงในระบบ โดยพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำมีอัตราการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้น จาก 12.4 ± 0.35 % เป็น 61.7 ± 0.22 % โดยเป็นอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 6)

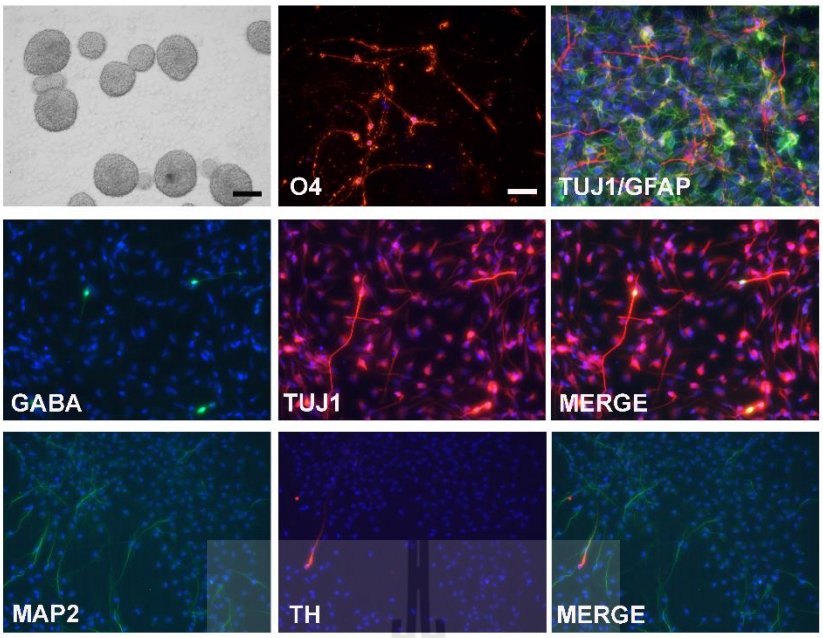
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 6. อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์เมื่อถูกกระตุ้นด้วย basic fibroblast growth factor (bFGF)

3.3. การเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทไปเป็นเซลล์ประสาทประเภทต่างๆ

คุณสมบัติที่สำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทคือความสามารถในการสร้างเซลล์ประเภทต่างๆ ของระบบประสาทได้ (Gage, 2000) ดังนั้นเพื่อยืนยันว่าเซลล์ต้นกำเนิดประสาทที่ได้จากการศึกษานี้มีความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่แท้จริง ผู้วิจัยจึงเหนี่ยวนำให้เซลล์เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์จำเพาะด้วยการเลี้ยงเซลล์แบบลอยให้กลายเป็นก้อนเซลล์ประสาท (neurospheres) เป็นเวลา 7 วัน ก่อนที่นำมาเกาะบน coverslip เพื่อย้อมดูว่าได้เซลล์ประเภทใดบ้าง โดยพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ถูกให้เปลี่ยนสภาพสามารสร้างเซลล์โอลิโกเดนโดรไซต์ เซลล์ค้ำจุนระบบประสาท เซลล์ประสาทกาบา และเซลล์ประสาทโดปามินได้ (รูปที่ 7) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ในการศึกษานี้มีความสามารถในการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ประเภทต่างๆได้หลากหลายและมีคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่แท้จริง



รูปที่ 7. ความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ในการสร้างเซลล์ประสาทประเภทต่างๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ

4.1. สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทได้อย่างทีประสิทธิภาพโดยการยับยั้งสัญญาณ Bone Morphogenetic Proteins ด้วยสารเคมีที่ชื่อ Dorsomorphin ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 μM ซึ่งการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทในการศึกษานี้ให้ผลดีเทียบเท่าการใช้โปรตีนสังเคราะห์ในการยับยั้งสัญญาณ BMPs ที่ได้จากรายงานก่อนหน้า (Chambers et al., 2009; Gerrard et al., 2005) โดยเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้มีลักษณะเป็น bipolar neural progenitors และมีการแสดงออกของยีน MASH1 และ PAX6 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์ในระบบประสาท ที่สำคัญคือเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่ได้จากการเหนี่ยวนำนี้มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ประเภทต่างๆในระบบประสาทได้หลากหลาย ซึ่งยืนยันคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทที่แท้จริง

4.2. ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากกระบวนการเหนี่ยวนำเพื่อให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทในงานวิจัยนี้ต้องใช่เวลาประมาณ 25 วัน ในการเหนี่ยวนำ ดังนั้นเพื่อลดระยะเวลาการเหนี่ยวนำให้สั้นลง ผู้วิจัยอาจพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำโดยใช้สารเคมีอื่นๆร่วมกับ Dorsomorphin หรือ นำส่งยีนที่สำคัญในการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทเพื่อช่วยเร่งการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปเป็นเซลล์จ้นกำเนิดระบบประสาทได้เร็วขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. บรรณานุกรม

Adepoju, A., Micali, N., Ogawa, K., Hoeppner, D.J., McKay, R.D., 2014. FGF2 and insulin signaling converge to regulate cyclin D expression in multipotent neural stem cells. Stem cells 32, 770–778.

Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J.A., Anderson, R.M., May, S.R., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Harland, R.M., Rossant, J., De Robertis, E.M., 2000. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. Nature 403, 658–661.

Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., Studer, L., 2009. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. Nature biotechnology 27, 275–280.

Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. Science 287, 1433–1438.

Gerrard, L., Rodgers, L., Cui, W., 2005. Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. Stem cells 23, 1234–1241.

Nilbratt, M., Porras, O., Marutle, A., Hovatta, O., Nordberg, A., 2010. Neurotrophic factors promote cholinergic differentiation in human embryonic stem cell–derived neurons. Journal of cellular and molecular medicine 14, 1476–1484.

Niwa, H., 2007. How is pluripotency determined and maintained? Development 134, 635–646.

Okada, Y., Matsumoto, A., Shimazaki, T., Enoki, R., Koizumi, A., Ishii, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Okano, H., 2008. Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell–derived neural stem/progenitor cells. Stem cells 26, 3086–3098.

Park, S., Lee, K.S., Lee, Y.J., Shin, H.A., Cho, H.Y., Wang, K.C., Kim, Y.S., Lee, H.T., Chung, K.S., Kim, E.Y., Lim, J., 2004. Generation of dopaminergic neurons in vitro from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors. Neuroscience letters 359, 99–103.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Pomp, O., Brokhman, I., Ben-Dor, I., Reubinoff, B., Goldstein, R.S., 2005. Generation of peripheral sensory and sympathetic neurons and neural crest cells from human embryonic stem cells. Stem cells 23, 923-930.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282, 1145-1147.

Yan, Y., Shin, S., Jha, B.S., Liu, Q., Sheng, J., Li, F., Zhan, M., Davis, J., Bharti, K., Zeng, X., Rao, M., Malik, N., Vemuri, M.C., 2013. Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells. Stem cells translational medicine 2, 862-870.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. ภาคผนวก

ตาราง 1. รายการไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Gene	Forward primers	Reverse primers
OCT4	GACAACAATGAAAATCTTCAGGAGA	TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA
NANOG	AGCCTCTACTCTTCCTACCACC	TCCAAAGCAGCCTCCAAGTC
MASH1	TCGCACAACCTGCATCTTTA	CTTTTGCACACAAGCTGCAT
PAX6	AACAGACACAGCCCTCACAAACA	CGGGAACTTGAACTGGAACTGAC
beta-Actin	TCACCACCACGGCCGAGCG	TCTCCTTCTGCATCCTGTCG
ID1	ACCCTGCCCCAGAACCGCAAG	TTGTTCTCCCTCAGATCCG
ID3	ACTCACTCCCCAGCATGAAG	AAGCTCCTTTTGTCGTTGGA
BMP2	CTTCTAGCGTTGCTGCTTCC	TGCTTGCATTCTGATTCACC
BMP4	ACCTGAGACGGGGAAGAAAA	TTAAAGAGGAAACGAAAAGCA

ตาราง 2. รายการแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลอง

Protein	Species	Company
TUJ1	Mouse monoclonal	Sigma
GFAP	Rabbit polyclonal	DAKO
GABA	Rabbit polyclonal	Sigma
MAP2	Rabbit polyclonal	Chemicon
TH	Mouse monoclonal	Chemicon
OCT4	Rabbit polyclonal	ABCAM
SOX2	Rabbit polyclonal	ABCAM
BrdU	Mouse monoclonal	DSHB

7. ประวัตินักวิจัย

<u>หัวหน้าโครงการวิจัย</u>

1. ชื่อ-นามสกุล นาย ปริญญา น้อยสา

Mr. Parinya Noisa

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

3 4899 00186 66 5

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
โทรศัพท์ 044-224653 (office), 092-664-1118 (cell)
โทรสาร 044-224154
E-mail p.noisa@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

5.1. ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยมหิดล ปีการศึกษา 2545
5.2. ปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีเซลล์ต้นกำเนิด
Imperial College London, UK ปีการศึกษา 2553

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

6.1. Developmental biology
6.2. Biology of stem cells
6.3. Induction of neural progenitor cells from human pluripotent stem cells
6.3. Genetic modification of mammalian cells
6.4. Recombinant protein production

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

7.2. หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

7.3. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : มีผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์แล้วดังนี้

1. Wu, J., Habegger, L., **Noisa, P**., Szekely, A., Qiu, C., Hutchison, S., Raha, D., Egholm, M., Lin, H., Weissman, S., Cui, W., Gerstein, M, Snyder, M., Dynamic Transcriptomes during Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Revealed by Short, Long, and Paired–end Sequencing, ***Proc Natl Acad Sci USA***, 2010; 16;107(11):5254–9.
2. **Noisa, P**., Urrutikoetxea–Uriguen, A., Li, M., Cui, W., Generation of Human Embryonic Stem Cell Reporter Lines Expressing GFP Specifically in Neural Progenitors, ***Stem Cell Rev***, 2010 Sep;6(3):438–49
3. **Noisa, P**., Urrutikoetxea–Uriguen, A., Cui, W., Generation of Human Embryonic Stem Cells Carrying Lineage Specific Reporters, ***Methods Mol Biol,*** 2011;690:95–106
4. Imsoonthornruksa, S., **Noisa, P**., Parnpai, R., Ketudat–Cairns, M., A Simple Method for Production and Purification of Soluble and Biologically Active Recombinant Human Leukemia Inhibitory Factor (hLIF) Fusion Protein in Escherichia coli, ***J Biotechno,*** 2011; 20; 151(4):295–302
5. Surmacz, B., **Noisa, P**., Risner–Janiczek, JR., Hui, K., Ungless, M., Cui, W., Li, M., DLK1 Promotes Neurogenesis of Human and Mouse Pluripotent Stem Cell–Derived Neural Progenitors Via Modulating Notch and BMP Signalling. ***Stem Cell Rev,*** 2011;doi: 10.1007/s12015–011–9298–7
6. **Noisa, P**., Parnpai, R., Technical Challenges in the Derivation of Human Pluripotent Cells. **Stem Cells Int.** 2011;2011:907961 (*Review)*
7. Kunkanjanawan, T., **Noisa, P**., Parnpai, R., Modeling Neurological Disorders by Human Induced Pluripotent Stem Cells**.** ***J Biomed Biotechnol,*** 2011:350131 (*Review)*
8. **Noisa, P**., Ramasamy, S. T., Lamont, R.F., Yu, L. S. J., Sheldon, M., Russell, A., Jin, X., Cui, W., Identification and Characterisation of the Early Differentiating Cells in

Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. ***PLOS One,*** 2012; doi:10.1371/journal.pone.0037129

9. Tommiska, J., Toppari, J., Vaaralahti, K., Känsäkoski, J., Laitinen, E.M., **Noisa, P**., Kinnala, A., Niinikoski, H., Raivio, T., PROKR2 mutations in autosomal recessive Kallmann syndrome. ***Fertil Steril,*** 2012; doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.003
10. Jongkamonwiwat, N., **Noisa, P.,** Biomedical and clinical promises of human pluripotent stem cells for neurological disorders. ***Biomed Res Int,*** 2013; doi: 10.1155/2013/656531 *(Review)*
11. **Noisa, P.,** Lund, C., Kanduri, K., Lund, R., Lähdesmäki, H., Lahesmaa, R., Lundin, K., Chokechuwattanalert, H., Otonkoski, T., Tuuri, T., Raivio, T.. Notch signaling regulates the differentiation of neural crest from human pluripotent stem cells. ***J Cell Sci.*** 2014;doi: 10.1242/jcs.145755

8. ผลงานวิชาการอื่นๆ (เช่น Proceeding ตำรา ฯลฯ)

8.1. ตำรา

A chapter of "Embryonic Stem Cell Therapy for Osteo-Degenerative Diseases"**Parinya Noisa**, Alai Urrutikoetxea-Uriguen and Wei Cui, Generation of Human Embryonic Stem Cells Carrying Lineage Specific Reporters.

8.2. การนำเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ

– **Noisa, P**., Li., M., Cui., W., Characterization of neural progenitors derived from human embryonic stem cells. The 2nd ESTools meeting, Budapest, Hungary, 2008

– **Noisa, P.,** Urrutikoetxea-Uriguen, A., Li, M., Cui, W., Establishment of Nestin-GFP human embryonic stem cell reporter lines. The Annual Meeting of the International Consortium of Stem Cell Network, Vancouver, Canada, 2008

– **Noisa, P**., Jin, X., Russell, A., Cui, W., Identification of transient population during early neural differentiation from human embryonic stem cells. The 17th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Barcelona, Spain, 2009

– **Noisa, P**., Jin, X., Russell, A., Cui, W., SSEA4+/TRA-1-81- cells are an intermediate state during early neural differentiation from human embryonic stem cells. The 4th Meeting of European Consortium of Embryonic Stem cell Research, Rome, Italy, 2010

8.3. รางวัลที่เคยได้รับ

- Travel fellowship award from the International Consortium Stem Cell network, 2008
- Travel fellowship award from the British Society of Cell Biology, 2009
- Academy of Finland Research Fellowship, 2012
- The Sigrid Juselius Foundation Awardee, 2012

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี