

รณัท กุลกาญจนาวรรณ : แบบจำลองโรคฮันติงตันจากลิงตัดแปลงพันธุกรรมสำหรับการทดสอบยาและการรักษาด้วย MicroRNA-196a (TRANSGENIC NON-HUMAN PRIMATE HUNTINGTON'S DISEASE MODEL FOR DRUG DISCOVERY RESEARCH AND MicroRNA-196a THERAPY) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย, 146 หน้า.

โรคฮันติงตัน (Huntington's disease: HD) เป็นโรคความเสื่อมของระบบประสาทซึ่งเกิดจากการเพิ่มของนิวคลีโอไทด์ CAG ซึ่งถอดรหัสเป็น polyglutamine (polyQ) ในยีนฮันติงติน (Huntingtin: Htt) การเพิ่ม polyQ นำมาสู่การสร้างโปรตีนฮันติงตินกลายพันธุ์ที่เกิดการเกาะกันเป็นกลุ่มก้อน ในปัจจุบันยังไม่มีการรักษาโรคฮันติงตัน แบบจำลองโรคฮันติงตันในลิงตัดแปลงพันธุกรรมซึ่งแสดงออกถึงการดำเนินไปของโรคและลักษณะทางพยาธิสภาพเหมือนกับมนุษย์ แสดงถึงศักยภาพในการใช้ลิงตัดแปลงพันธุกรรมเป็นต้นแบบของโรคฮันติงตัน ปัจจุบันพบว่าลิงตัดแปลงพันธุกรรมโรคฮันติงตันมีการเปลี่ยนแปลงทางประสาทพยาธิสภาพโครงสร้างประสาทวิทยา พฤติกรรม และ สารชีวโมเลกุลที่เหมือนกับผู้ป่วยจริง นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท (neural progenitor cells: NPCs) จากลิงตัดแปลงพันธุกรรมโรคฮันติงตันได้ถูกศึกษาและแสดงให้เห็นถึงความสามารถแปรสภาพไปเป็นเซลล์ประสาทซึ่งสามารถพัฒนาถึงลักษณะจำเพาะของโรคฮันติงตันได้แก่ การเกาะกันเป็นก้อนของโปรตีนกลายพันธุ์ และ ก้อนโปรตีนในนิวเคลียส แม้กระทั่งความไวต่อสภาวะความเครียดออกซิเดชัน ในงานวิจัยนี้เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทและเซลล์ประสาทของลิงฮันติงตันได้ถูกทดสอบการเป็นต้นแบบในการวิจัยเพื่อค้นคว้ายาในหลอดทดลองจึงได้ใช้ riluzole (RI) memantine (ME) และ methylene blue (MB) ทดสอบในเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทและเซลล์ประสาทของลิงฮันติงตัน ซึ่งยาเหล่านี้ได้แสดงถึงความสามารถในการป้องกันผลของโรคฮันติงตันและโรคความเสื่อมของโรคระบบประสาทอื่น ๆ มาแล้ว ในการศึกษาพบว่ายาเหล่านี้สามารถป้องกันระบบเซลล์ประสาทจากโรคฮันติงตันได้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ apoptosis และ การเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนของโปรตีนฮันติงตินที่กลายพันธุ์

ในขณะที่ความสนใจในพยาธิวิทยาของโรคฮันติงตันได้หันมาสู่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค ซึ่งรวมไปถึงการศึกษาในอาร์เอ็นเอที่ไม่มีการถอดรหัส (non-coding RNA) ในงานวิจัยนี้ได้พบแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ miR-196a ทั้งในสมองลิงตัดแปลงพันธุกรรมโรคฮันติงตันและสมองของผู้ป่วย อีกทั้งเมื่อเพิ่มการแสดงออกของ miR-196a ซึ่งพบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์จากโรค และ apoptosis ถูกทำให้บรรเทาลงในเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทและเซลล์ประสาทของลิงตัดแปลงพันธุกรรมโรคฮันติงตัน และยังพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis ลดลงเช่นกัน จากการย้อมด้วย mitotracker พบว่ารูปร่างและการทำงานของไมโทคอนเดรียถูก

ทำให้ดีขึ้นและพบการเพิ่มการแสดงออกของยีน *CBP* และ *PGC-1 α* ในเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทของลิงตัดแปลงพันธุกรรมโรคฮันติงตัน ดังนั้นการเพิ่มการแสดงออกของ *miR-196a* สามารถการแก้ไขสภาพของเซลล์ในเซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาทและเซลล์ประสาทที่เป็นโรคฮันติงตัน จากผลการทดลองสามารถบ่งชี้ถึงการควบคุมพยาธิสภาพของโรคฮันติงตันของ *miR-196a* ซึ่งอาจจะนำมาสู่การเข้าใจถึงการควบคุมเชิงโมเลกุลของโรคฮันติงตันและการพัฒนาการรักษาแนวใหม่ได้

โดยสรุปงานศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองโรคฮันติงตันจากลิงตัดแปลงพันธุกรรมเป็นแบบจำลองที่มีศักยภาพในการเป็นตัวแทนพยาธิสภาพของโรคฮันติงตัน การค้นคว้า และการพัฒนาการรักษาด้วยยีน การเพิ่มการแสดงออกของ *miR-196a* แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการป้องกันพยาธิสภาพของโรคฮันติงตัน และแสดงถึงโอกาสในการรักษาซึ่งอาจจะมีผลต่อการควบคุมโรคความเสื่อมทางระบบประสาทอื่นๆด้วย



TANUT KUNKANJANAWAN : TRANSGENIC NON-HUMAN PRIMATE
HUNTINGTON'S DISEASE MODEL FOR DRUG DISCOVERY RESEARCH
AND MicroRNA-196a THERAPY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.
RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 146 PP.

TRANSGENIC NON-HUMAN PRIMATE HUNTINGTON'S DISEASE
MODELING/DRUG SCREENING/ MicroRNA-196a THERAPY

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disease caused by an expansion of CAG trinucleotide repeat encoded for polyglutamine (polyQ) in the Huntingtin (*Htt*) gene which leads to the formation of mutant HTT (mHTT) protein aggregates. Currently, no cure for HD was found. Transgenic HD nonhuman primate (HD-NHP) animal models have been developed. These animals recapitulate a progressive development of clinical and pathological features similar to human HD patients, which supports the potential preclinical application of the HD-NHP model. To date, phenotypes observed in HD-NHP include neuropathological, neuroanatomical, behavioral and biomolecular abnormalities. Additionally, neural progenitor cells (NPCs) derived from HD monkeys have been developed. These cells are capable of differentiating into neurons, and upon differentiation developed distinct HD cellular phenotypes. Observed phenotypes included the formation of mHTT aggregates and intranuclear inclusions, as well as increased susceptibility to oxidative stress. In this study potential application of HD monkey NPCs (HD NPCs) and neurons (HD neurons) were evaluated as an *in vitro* platform for drug discovery research. To demonstrate proof-of-concept in this system, HD NPCs and neurons were treated with

riluzole (RI), memantine (ME), and methylene blue (MB). These known compounds have been shown to have a protective effect in HD and other neurodegenerative diseases. In this context, three compounds were tested for their neuroprotective properties on HD phenotypes cytotoxicity, apoptosis, and aggregation of mHTT protein.

Recently attention to HD pathology has turned to genetic alterations associated with the disease. This includes the investigation of non-coding RNA. Elevated expression of miR-196a has been observed in both HD-NHP and human HD brains. Cytotoxicity and apoptosis were ameliorated by the overexpression of miR-196a in HD-NHP neural progenitor cells (HD-NPCs) and differentiated neurons (HD-neurons). The expression of apoptosis related genes was down regulated. Mitochondrial morphology and activity were improved as indicated by mitotracker staining and the upregulation of *CBP* and *PGC-1 α* in HD-NPCs overexpressing miR-196a. Here, the amelioration of HD cellular phenotypes in HD-NPCs and HD-neurons overexpressing miR-196a were demonstrated. Our results also suggested that the regulatory role of miR-196a in HD pathogenesis may hold the key for understanding molecular regulation of HD and can be used to develop novel therapeutic.

In summary, this study demonstrated HD-NHP model is a potential model for HD pathology, drug discovery, and development of gene therapy. Moreover, overexpression of miR-196a showed protective potential on HD pathology and presented a unique therapeutic opportunity that may impacts across related neurodegenerative diseases

School of Biotechnology

Academic Year 2015

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____