บทคัดย่อ

ในปัจจุบันวิทยาการและการวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดเป็นที่ได้รับการยอมรับกันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (induced pluripotent stem cell; iPSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพสูงคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic stem cell; ESCs) ในด้านความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์ได้ทุกส่วน นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* proliferation) ได้ไม่จำกัด สามารถคงสภาพของตัวเอง (self renewal) แต่การได้มาซึ่งเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมีความโดดเด่นมากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ตรงที่สามารถสร้างได้จากเซลล์ร่างกายซึ่งแตกต่างจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ต้องอาศัยกระบวนการแยกเอาเซลล์มาจากตัวอ่อนมนุษย์ในระยะบลาสโตซีสต์เท่านั้น ซึ่งมีผลต่อให้เกิดความเสี่ยงและขัดแย้งต่อหลักจริยธรรมได้ อย่างไรก็ตามการสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจำเป็นต้องมีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เป็นกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ reprogramming ของยีน ได้แก่ *Oct4*, *SOX2*, *Klf-4*, และ *c-Myc* ซึ่งถูกค้นพบโดย Takahashi และ Yamanaka ในปี ค.ศ. 2006 โดยใช้ Retrovirus ในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ อย่างไรก็ตามยังมีความกังวลถึงผลจากการเพิ่มการแสดงออกของยีนทั้ง 4 โดยเฉพาะ *Klf-4* และ *c-Myc* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการของเซลล์มะเร็งและความเสี่ยงที่เกิดจากการใช้ไวรัสในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ การศึกษาในครั้งนี้จึงต้องการทดสอบกระบวนการผลิตเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ โดยลดการใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ reprogramming ให้เหลือเพียงแค่ยีน *Oct4* เพียงยีนเดียวเท่านั้น โดยใช้วิธีที่ไม่ใช้ไวรัสในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ ร่วมกับการใช้ 5-Azacytidine ซึ่งเป็นสารควบคุมการแสดงออกเหนือยีน (epigentic modifier reagent) ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4* ร่วมกับการใช้ 5-Azacytidine สามารถสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ได้ จากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ (cell morphology) และการตรวจสอบคุณสมบัติบัติของเซลล์ด้วยกระบวนการต่างๆ อย่างไรก็ตามยังพบความผิดปกติของโครโมโซมจากเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่สร้างได้ อันเนื่องมาจากการแสดงออกของยีนที่ไม่สามารถควบคุมการแสดงออกที่มากเกินไปของยีน *Oct4* จาก plasmid ที่นำส่งยีน

อย่างไรก็ตามเซลล์ต้นกำเนิดคล้ายตัวอ่อนที่สร้างได้ในการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาผลกระทบของยีน *Oct4* ต่อความผิดปกติของเซลล์และสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการฝึกเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่ดีได้เนื่องจากมีความคงสภาพสูงมาก และเป็นแนวทางในการผลิตเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ที่มีประสิทธิภาพและเพิ่มความปลอดภัยในการนำเซลล์คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ไปใช้เพื่อการศึกษาวิจัยในอนาคต

Abstract

In present, stem cell research and technology is widely approved globally and also in Thailand. Induced pluripotent stem cells or iPSCs is a pluripotent cell similarly to embryonic stem cells (ESCs). It has potential to differentiate into many cell type of human body. Moreover, iPSCs are self-renew cell and limitless *in vitro* proliferation. The outstanding point of iPSCs comparing with ESCs is it can be generated from adult somatic cell. However, ESCs establishment need to sacrifice human embryo at blastocyst stage which may rise ethical controversial. However, iPSCs generation require overexpressing of 4 reprograming genes (*Oct4*, *SOX2*, *Klf-4*, and *c-Myc*) which the first discovered by Takahashi and Yamanaka in 2006 by using retrovirus as a vector. Because of concerning of 4 genes overexpression especially *KLF-4* and *c-Myc* which are oncogene and viral vector using, this research aimed to produce viral free iPSCs by reduced 4 reprograminggenes to only *Oct4* together with 5-Azacytidine (epigenetic modifier regent). To test the possibility of single reprogramming gene viral free iPSCs generation methods.

The results from this study indicated that the use of 5-Azacytidine combined with over expression of *Oct4* gene showed ability to generate human iPS like colonies and other ESCs properties. iPSCs characterization methods demonstrated the chromosomal abnormality with may occurred from the over expression of *Oct4* in the plasmid. However, human fibroblast derived iPSCs in this study may provide the alternative protocol to produce stem cells for the future therapeutic use.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี