

รายงานการวิจัย (ครบ 1 ปี)

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การพัฒนาเทคโนโลยีเซลล์ต้นกำเนิดบำบัดและยับยั้งการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง
ภาวะโลหิตจางในโรคไตวายเรื้อรัง

(ภาษาอังกฤษ) Development of Gene Therapy Technology for
Treatment of Anemia in Chronic Kidney Disease

รายนามคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย) นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม
(ภาษาอังกฤษ) Dr. Chavaboon Dechsukhum, M.D.
สังกัด สาขาวิชาพยาธิวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา 30000

2. ผู้ร่วมโครงการ

(ภาษาไทย) ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ลีอนันต์ศักดิ์ศิริ
(ภาษาอังกฤษ) Asst. Prof. Dr. Wilairat LEEANANSAKSIRI
สังกัด สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
111 ถ. มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา 30000

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีที่พิมพ์ 2553

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขแห่งชาติ ปี 2552

บทคัดย่อ

ภาวะซีดถือเป็นภาวะที่สำคัญที่พบในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงเป็นอย่างมากและเป็นสาเหตุของการเกิดอาการข้างเคียงอื่นตามมาเพิ่มขึ้น เช่น โรคหัวใจ เป็นต้น การรักษาภาวะโลหิตจางในผู้ป่วยไตวายจึงนับเป็นส่วนสำคัญในการดูแลผู้ป่วยให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น และลดอัตราการตายลง อย่างไรก็ตามการรักษาโดยการฉีดอีริโทรพอยอิตินพบว่ามีข้อด้อยบางประการ ได้แก่ ราคาที่สูง ระดับที่ไม่สม่ำเสมอในเลือด และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน การวิจัยนี้จึงได้มุ่งพัฒนาการรักษาโดยวิธียีนบำบัดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน erythropoietin ในเซลล์ผู้ป่วยเอง โดยใช้ Lentiviral vector ในการนำพาเข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ผลการทดลองสามารถสร้าง Lentiviral vector ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน erythropoietin ได้สำเร็จ และได้ทดสอบประสิทธิภาพในการนำเข้าสู่เซลล์ พบว่า Lentiviral vector สามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ดี เซลล์ที่ได้จะถูกนำไปคัดเลือกรับต่อโดยวิธี Flow cytometry with cell sorting เพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของยีน erythropoietin ต่อไป

Abstract

Anemia in chronic renal failure has a great impact on the quality of life of the patients and is the major factor in determining the other complications including heart disease. The prevention of anemia becomes the crucial part of the management of these patients. The standard treatment is erythropoietin injection which has some drawbacks including high cost, fluctuated blood level and development of autoantibody. This study aims to develop the gene therapy method to induce erythropoietin gene expression in the human cells which can be used for cell therapy for the patients. In this study, the Lentiviral vector expressing human erythropoietin gene can be successfully produced. Furthermore, this vector can be transduced into the target cells with about 30% efficiency. These positive cells will be further enriched by cell sorting for further molecular studies.

Key words

อีริโทรพอยอิติน ไตวาย โลหิตจาง ยีนบำบัด

Erythropoietin, Chronic kidney disease, Anemia, Gene therapy

สารบัญเรื่อง

หัวข้อเรื่อง	หน้า
1. บทคัดย่อ.....	6
2. บทนำ.....	7
3. การทบทวนวรรณกรรม.....	12
4. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย.....	15
5. ผลการดำเนินงาน.....	19
6. อภิปรายและวิจารณ์ผล.....	25
7. สรุปผลการวิจัย.....	25
8. บรรณานุกรม.....	28

บทนำรวม

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) นับเป็นโรคที่ต้องใช้งบประมาณในการรักษาสูงมากและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั้งในระดับประเทศและระดับโลก โดยมีอุบัติการณ์ของโรคดังกล่าวในประเทศไทยโดยเฉลี่ย 123 คน ต่อประชากร 1,000,000 คนและสูงสุดที่ประเทศไต้หวัน โดยเฉลี่ย 376 คน ต่อประชากร 1,000,000 คน ตามผลสำรวจของสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทยและ RDS ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 2004 ซึ่งโรคนี้นับเป็นโรคที่ยากต่อการรักษาให้หายขาดและมีค่ารักษาที่สูงมาก ข้อมูลทางสถิติของโรคไตวายในประเทศไทยนั้นพบว่าสาเหตุส่วนใหญ่ เกิดจาก glomerulonephritis ร้อยละ 51.61 จากเบาหวาน ร้อยละ 20.72 ความดันโลหิตสูงร้อยละ 15.22 โรคนี้ร้อยละ 1.44 และจากสาเหตุอื่น ๆ ร้อยละ 11.01 โดยมีผู้ป่วยส่วนใหญ่ ต้องได้รับการรักษาโดย การฟอกเลือด ในแบบ hemodialysis หรือ peritoneal dialysis รวมถึงการทำ kidney transplantation ผู้ป่วยเหล่านี้ จำเป็นต้องได้รับการดูแลที่ดี เพื่อป้องกันภาวะข้างเคียงอื่น ๆ ดังกล่าวแล้ว เพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี และมีอัตราการตายที่น้อยลง

ภาวะซีด (Anemia) ถือเป็นภาวะที่สำคัญที่พบในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) ซึ่งส่งผลกระทบให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงเป็นอย่างมากและเป็นสาเหตุของการเกิดอาการข้างเคียงอื่นตามมาเพิ่มขึ้น เช่น โรคหัวใจ เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในผู้ป่วยโรคไตวาย

การใช้วิธีรักษาในแบบ gene therapy นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง โดยมีหลักการคือ ใช้ vector ที่อาจเป็น viral หรือ non – viral vector เพื่อนำพาส่วนของยีนที่สร้างโปรตีนที่เราต้องการ เข้าสู่เซลล์ของผู้ป่วย เพื่อให้เซลล์สามารถสร้างโปรตีนในร่างกายผู้ป่วยในระดับที่มากพอ เพื่อให้ผลในการรักษา วิธีนี้จะมีผลดีกว่าการฉีด recombinant protein หลายประการ เช่น ทำให้ได้โปรตีนที่มีโครงสร้างเหมือนกับโปรตีนปกติที่พบในร่างกายมนุษย์ มีระดับโปรตีนที่คงที่กว่า ทำให้มีผลการรักษาที่ดี มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่ามาก และไม่ต้องฉีดโปรตีนเข้าร่างกายบ่อย ๆ ทำให้มีความสะดวกในการดูแลผู้ป่วย นอกจากนี้จะไม่ทำให้เกิด antibodies ต่อโปรตีน ดังนั้น วิธีการรักษาโดยเทคนิค gene therapy ถือเป็นการรักษาที่ควรได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงและใช้ในผู้ป่วยได้อย่างปลอดภัย การสร้างแหล่งการผลิตเซลล์เม็ดเลือดแดงได้เองอย่างถาวรด้วยเทคโนโลยีเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด โดยไม่ต้องฉีด erythropoietin ให้แก่ผู้ป่วยก็เป็นอีกหนึ่งวิธีที่น่าสนใจและสามารถทำให้ผู้ป่วยหายขาดจากภาวะโลหิตจางได้ เพิ่มโอกาสการรอดชีวิตและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยก็จะดีขึ้นตามลำดับ

องค์ความรู้ใหม่และเทคโนโลยียีนบำบัดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัดที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคภาวะโลหิตจางซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อนและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ในการรักษาภาวะโลหิตจางสูงให้หมดไปได้ โดยมีค่าใช้จ่ายในการรักษาต่ำ

กว่าวิธีให้ recombinant erythropoietin มาก และมีความปลอดภัยสูง เหมาะสำหรับการพัฒนาเพื่อนำไปสู่การรักษาโรคในทางคลินิกต่อไปในอนาคต ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการแก้ไขภาวะ anemia ในผู้ป่วยโรคไตวายและโรคอื่นที่มีภาวะดังกล่าว ซึ่งจะช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตและลดค่าใช้จ่ายในการรักษาแก่ผู้ป่วย ซึ่งท้ายที่สุดจะส่งผลที่ดีต่อประเทศไทยโดยรวม

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ผลิต **Lentiviral vector** ที่สามารถสร้าง **Erythropoietin** เพื่อรักษาภาวะโลหิตจางในโรคไตวาย
2. สร้าง **human fibroblast cell** ที่สามารถสร้าง **Erythropoietin (EPO)** ที่มีปริมาณเพียงพอที่จะกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง และสามารถนำไปใช้ในทดลองขั้นต่อไป
3. ทดสอบประสิทธิภาพของ **EPO** ที่สร้างได้ต่อความสามารถในการสร้างเม็ดเลือดแดงจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในห้องปฏิบัติการ
4. สร้างระบบที่สามารถทำลายเซลล์ที่ได้รับยับยั้งได้หากเซลล์นี้ก่อปัญหาให้แก่ร่างกาย โดยเทคนิค **suicidal gene**

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- กระบวนการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพในการรักษาภาวะโลหิตจางและมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด
- เซลล์บำบัดที่มีประสิทธิภาพในการรักษาภาวะโลหิตจางและมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด
- ได้ระบบการจัดการกับเซลล์บำบัดในกรณีเกิดความผิดปกติในการเจริญเติบโต โดยใช้เทคนิค **Suicidal gene**
- จดสิทธิบัตร 1 เรื่อง
- ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติอย่างน้อย 2 เรื่อง
- ผลิตนักศึกษาปริญญาโท 1 คน

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โรงพยาบาล วิทยาศาสตร์การแพทย์ วงการแพทย์ ผู้ป่วยโรคมะเร็งและครอบครัว นักวิชาการ ผู้ที่เกี่ยวข้องและผู้สนใจทั่วไป และเป็นส่วนส่งเสริมทางวิชาการของศูนย์วิจัยความเป็นเลิศด้านการวิจัยเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์/เนื้อเยื่อและยีนบำบัดของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง

1. บทคัดย่อ

ภาวะซีดถือเป็นภาวะที่สำคัญที่พบในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงเป็นอย่างมากและเป็นสาเหตุของการเกิดอาการข้างเคียงอื่นตามมาเพิ่มขึ้น เช่น โรคหัวใจ เป็นต้น การรักษาภาวะโลหิตจางในผู้ป่วยไตวายจึงนับเป็นส่วนสำคัญในการดูแลผู้ป่วยให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น และลดอัตราการตายลง อย่างไรก็ตามการรักษาโดยการฉีดอีรีโทรพอยอิตินพบว่ามีข้อด้อยบางประการ ได้แก่ ราคาที่สูง ระดับที่ไม่สม่ำเสมอในเลือด และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน การวิจัยนี้จึงได้มุ่งพัฒนาการรักษาโดยวิธียีนบำบัดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน erythropoietin ในเซลล์ผู้ป่วยเอง โดยใช้ Lentiviral vector ในการนำพาเข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ผลการทดลองสามารถสร้าง Lentiviral vector ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน erythropoietin ได้สำเร็จ และได้ทดสอบประสิทธิภาพในการนำเข้าสู่เซลล์ พบว่า Lentiviral vector สามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ดี เซลล์ที่ได้จะถูกนำไปคัดแยกต่อโดยวิธี Flow cytometry with cell sorting เพื่อนำไปศึกษาการแสดงออกของยีน erythropoietin ต่อไป

Abstract

Anemia in chronic renal failure has a great impact on the quality of life of the patients and is the major factor in determining the other complications including heart disease. The prevention of anemia becomes the crucial part of the management of these patients. The standard treatment is erythropoietin injection which has some drawbacks including high cost, fluctuated blood level and development of autoantibody. This study aims to develop the gene therapy method to induce erythropoietin gene expression in the human cells which can be used for cell therapy for the patients. In this study, the Lentiviral vector expressing human erythropoietin gene can be successfully produced. Furthermore, this vector can be transduced into the target cells with about 30% efficiency. These positive cells will be further enriched by cell sorting for further molecular studies.

2. บทนำ

2.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) นับเป็นโรคที่ต้องใช้งบประมาณในการรักษาสูงมากและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั้งในระดับประเทศและระดับโลก โดยมีอุบัติการณ์ของโรคดังกล่าวในประเทศไทยโดยเฉลี่ย 123 คน ต่อประชากร 1,000,000 คนและสูงสุดที่ประเทศไต้หวัน โดยเฉลี่ย 376 คน ต่อประชากร 1,000,000 คน ตามผลสำรวจของสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทยและ RDS ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 2004 ซึ่งโรคนี้นับเป็นโรคที่ยากต่อการรักษาให้หายขาดและมีค่ารักษาที่สูงมาก ข้อมูลทางสถิติของโรคไตวายในประเทศไทยนั้นพบว่าสาเหตุส่วนใหญ่ เกิดจาก glomerulonephritis ร้อยละ 51.61 จากเบาหวาน ร้อยละ 20.72 ความดันโลหิตสูงร้อยละ 15.22 โรคนี้ร้อยละ 1.44 และจากสาเหตุอื่น ๆ ร้อยละ 11.01 โดยมีผู้ป่วยส่วนใหญ่ ต้องได้รับการรักษาโดย การฟอกเลือด ในแบบ hemodialysis หรือ peritoneal dialysis รวมถึงการทำ kidney transplantation ผู้ป่วยเหล่านี้ จำเป็นต้องได้รับการดูแลที่ดี เพื่อป้องกันภาวะข้างเคียงอื่น ๆ ดังกล่าวแล้ว เพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี และมีอัตราการตายที่น้อยลง

ภาวะไตวายเรื้อรังเป็นความเสื่อมในการทำงานของไตเป็นเวลาดึกต่อกันเกินกว่า 6 เดือน และไม่สามารถรักษาให้กลับคืนมาเป็นปกติได้ ซึ่งการบอกว่าผู้ป่วยมีภาวะไตวายเรื้อรัง หรือไม่นั้น จำเป็นต้องพิจารณาจากประสิทธิภาพในการทำงานของไต คือ ค่าที่เรียกว่า Creatinine clearance ซึ่งค่าปกติคือ 120 มล./วินาที ความรุนแรงของโรคสามารถแบ่งได้ตามค่า serum creatinine โดยในภาวะ severe end stage renal disease จะมีค่า serum creatinine สูงกว่า 10 มก./ดล. และมีค่า creatinine clearance < 10 มล./นาที่ ผลดังกล่าวนำไปสู่การคั่งของสารที่มีอันตรายต่อร่างกายหลายชนิด ที่เรียกว่า uremic toxin ซึ่งสารเหล่านี้ จะนำไปสู่อาการข้างเคียงของโรคหลายชนิด ที่เกิดขึ้นกับระบบต่าง ๆ ของร่างกายที่สำคัญ เช่น ระบบประสาทส่วนกลางจะเกิดภาวะ uremic encephalopathy

ระบบหัวใจและหลอดเลือด จะพบภาวะ Ischemic cardiomyopathy , dilated cardiomyopathy รวมถึงภาวะ uremic pericarditis ระบบต่อมไร้ท่อจะพบภาวะความผิดปกติของ hypothalamic – pituitary – target gland axis ทำให้เกิด hypogonadism, delayed puberty, anovulation , infertility และ impotence ระบบที่สำคัญที่ได้รับผลกระทบอย่างมาก คือ ระบบเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งจะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ทั้งหมด คือ เม็ดเลือดแดงจะพบภาวะซีดจากการขาดสาร erythropoietin (1-3) ซึ่งสร้างจาก proximal tubular cells และ interstitial cells ซึ่งจะพบเมื่อไตถูกทำลาย มากกว่า 3 ใน 4 นอกจากภาวะซีดแล้วยังพบการทำงานของเกล็ดเลือด ที่ต่ำลง ร่วมกับความผิดปกติของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น neutrophils และ lymphocytes ปัจจัยเหล่านี้จะนำไปสู่ภาวะเลือดแข็งตัวผิดปกติและการติดเชื้อสูงขึ้น

ภาวะซีด (Anemia) ถือเป็นภาวะที่สำคัญที่พบในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงเป็นอย่างมากและเป็นสาเหตุของการเกิดอาการข้างเคียงอื่นตามมาเพิ่มขึ้น เช่น โรคหัวใจ เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในผู้ป่วยโรคไตวายได้ การศึกษาอัตราการตายในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่ได้รับการรักษาโดยการล้างไต ทั้งแบบ hemodialysis และ peritoneum dialysis จำนวนรวม 855 คน เป็นเวลานาน 15 ปี (4) พบว่าระดับ hemoglobin ในเลือดเป็นตัวบ่งชี้ถึงอัตราการตายของผู้ป่วยเป็นอย่างดี โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับ hemoglobin ต่ำกว่า 12 g/dl มีอัตราการตายสูงกว่าผู้ป่วยที่มีระดับ hemoglobin ในเลือดน้อยกว่า 12 g/dl ประมาณ 2.13 เท่า และ 1.85 เท่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับ hemodialysis และ peritoneal dialysis ตามลำดับ นอกจากการศึกษาแบบเทียบอัตราการตาย และเวลาที่ต้องรักษาตัวในโรงพยาบาล เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีระดับ hemoglobin ในเลือดต่างกัน พบว่าระดับ hemoglobin ที่น้อยกว่า 9 g/dl มีโอกาสเสียชีวิตจากโรคมามากกว่าผู้ป่วยที่มีค่า hemoglobin ระหว่าง 11-12 g/dl ถึง 2.11 เท่า และถ้าผู้ป่วยมีระดับ hemoglobin ระหว่าง 12-13 g/dl พบว่ามีโอกาสเสียชีวิตจากโรคเป็น 0.84 เท่า ของกลุ่มที่มี hemoglobin ระหว่าง 11-12 g/dl (5) นอกจากนี้การศึกษาในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่ได้รับการรักษาโดย hemodialysis จำนวน 5517 ราย เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง อัตราการตาย ในผู้ป่วยและระดับ hemoglobin ในเลือด ในเวลา 1, 3 และ 6 เดือน ก่อนเสียชีวิต (6) พบว่าระดับ hemoglobin ในเลือด 3 เดือนก่อนเสียชีวิต มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายของผู้ป่วยอย่างชัดเจน โดยในผู้ป่วยที่มีระดับ hemoglobin <9 g/dl , 9-10 g/dl , 10-11 g/dl มีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตจากโรค เป็น 1.74 , 1.25 , 1.22 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีระดับ hemoglobin ระหว่าง 11-12 g/dl ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาลดภาวะซีดต่ออาการในระบบหัวใจและหลอดเลือด พบว่าระดับ hemoglobin ที่ลดลง ทุก ๆ 1 g/dl เพิ่มความเสี่ยงต่อการพบความผิดปกติในระบบหัวใจ คือ ภาวะ left ventricular dilation ถึง 1.46 เท่า และเพิ่มภาวะการเกิดภาวะหัวใจวาย ถึง 1.46 และ 1.28 เท่า ในแบบ de novo และ recurrent heart failure ตามลำดับ (7) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายมีความสำคัญต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย รวมถึงอัตราการตายของโรคอย่างมาก

โดยเหตุดังกล่าวการรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง เป็นสิ่งที่มีความจำเป็นเพื่อลดผลข้างเคียงต่าง ๆ ในผู้ป่วย ในปัจจุบันวิธีการรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังใช้วิธีการให้โปรตีน erythropoietin ฉีดให้ผู้ป่วย โดยโปรตีนที่ใช้เป็นโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นในห้องทดลอง (recombinant human erythropoietin) ซึ่งมีปัญหาและข้อควรระวังหลายประการ ซึ่งการรักษาในปัจจุบันจะใช้วิธีการฉีด erythropoietin (EPO) ให้ผู้ป่วย 30-70 units/kg 2 ครั้งต่อสัปดาห์ ร่วมกับการให้เหล็ก โฟลิก วิตามิน บี / ซี อย่างไรก็ตามการรักษาโดย การฉีด EPO มีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก เนื่องจากต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ทำให้มีข้อจำกัดในการใช้โดยทั่วไปการฉีด erythropoietin ให้ผู้ป่วยจำเป็นต้องเพิ่มระดับ erythropoietin ในเลือด สูงกว่าระดับ base – line คือให้มีระดับ 40 –

200 mU/ml (40-200 U/L) จากค่าปกติ 5-36 mU/ml ดังนั้นจำเป็นต้องฉีดให้ผู้ป่วยไปอย่างต่อเนื่องไปตลอดชีวิต เนื่องจากระดับโปรตีนในเลือดมีระยะครึ่งอายุที่ต่ำ (3 – 48 ชม.) การฉีดยาทำให้มีระดับโปรตีนที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ได้ผลการรักษาที่ไม่ดี นอกจากนี้โปรตีนที่ใช้รักษาส่วนใหญ่เป็น recombinant protein ที่สร้างในห้องทดลอง โดยใช้เซลล์ที่ไม่ใช่มาจากมนุษย์ (nonhuman mammalian cells) ทำให้โปรตีนที่ได้มีโครงสร้างต่างไปจากโปรตีนปกติในมนุษย์ เช่น มีความต่างกันในด้าน amino acid , glycosylation and formulation (8) โดยการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบ antibodies ต่อโปรตีนดังกล่าว ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดย recombinant erythropoietin ซึ่งทำให้เกิดอันตรายในผู้ป่วยอย่างรุนแรงและอาจเสียชีวิตได้ (9, 10) ข้อจำกัดอื่นๆได้แก่การที่ค่าใช้จ่ายในการซื้อโปรตีน erythropoietin มีสูงมาก และทำให้มีผลต่อการตัดสินใจในการเลือกใช้ยาดังกล่าวในผู้ป่วย และอาจทำให้การเริ่มใช้ยาช้ากว่าที่ควรเป็น ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะนำวิธีการรักษาแนวใหม่มาใช้เพื่อรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง

การใช้วิธีการรักษาแบบ gene therapy นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง โดยมีหลักการคือ ใช้ vector ที่อาจเป็น viral หรือ non – viral vector เพื่อนำพาส่วนของยีนที่สร้างโปรตีนที่เราต้องการ เข้าสู่เซลล์ของผู้ป่วย เพื่อให้เซลล์สามารถสร้างโปรตีนในร่างกายผู้ป่วยในระดับที่มากพอ เพื่อให้ผลในการรักษา วิธีนี้จะมีผลดีกว่าการฉีด recombinant protein หลายประการ เช่น ทำให้ได้โปรตีนที่มีโครงสร้างเหมือนกับโปรตีนปกติที่พบในร่างกายมนุษย์ มีระดับโปรตีนที่คงที่กว่า ทำให้มีผลการรักษาที่ดี มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่ามาก และไม่ต้องฉีดโปรตีนเข้าร่างกายบ่อย ๆ ทำให้มีความสะดวกในการดูแลผู้ป่วย นอกจากนี้จะไม่ทำให้เกิด antibodies ต่อโปรตีน ดังนั้น วิธีการรักษาโดยเทคนิค gene therapy ถือเป็นการรักษาที่ควรได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงและใช้ในผู้ป่วยได้อย่างปลอดภัย การสร้างแหล่งการผลิตเซลล์เม็ดเลือดแดงได้เองอย่างถาวรด้วยเทคโนโลยีเซลล์ต้นกำเนิดบำบัด โดยไม่ต้องฉีด erythropoietin ให้แก่ผู้ป่วยก็เป็นอีกหนึ่งวิธีที่น่าสนใจและสามารถทำให้ผู้ป่วยหายขาดจากภาวะโลหิตจางได้ เพิ่มโอกาสการรอดชีวิตและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยก็จะดีขึ้นตามลำดับ

องค์ความรู้ใหม่ของเทคโนโลยียีนบำบัดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัดที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคภาวะโลหิตจางซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อนและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ในการรักษาภาวะโลหิตจางสูงให้หมดไปได้ โดยมีค่าใช้จ่ายในการรักษาต่ำกว่าวิธีให้ recombinant erythropoietin มาก และมีความปลอดภัยสูง เหมาะสำหรับการพัฒนาเพื่อนำไปสู่การรักษาโรคในทางคลินิกต่อไปในอนาคต ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการแก้ไขภาวะ anemia ในผู้ป่วยโรคไตวายและโรคอื่นที่มีภาวะดังกล่าว ซึ่งจะช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตและลดค่าใช้จ่ายในการรักษาแก่ผู้ป่วย ซึ่งท้ายที่สุดจะส่งผลที่ดีต่อประเทศไทยโดยรวม

2.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ผลิต **Lentiviral vector** ที่สามารถสร้าง **Erythropoietin** เพื่อรักษาภาวะโลหิตจางในโรคไตวาย
5. สร้าง **human fibroblast cell** ที่สามารถสร้าง **Erythropoietin (EPO)** ที่มีปริมาณเพียงพอที่จะกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง และสามารถนำไปใช้ในทดลองขั้นต่อไป
6. ทดสอบประสิทธิภาพของ **EPO** ที่สร้างได้ต่อความสามารถในการสร้างเม็ดเลือดแดงจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในห้องปฏิบัติการ
7. สร้างระบบที่สามารถทำลายเซลล์ที่ได้รับยับยั้งได้หากเซลล์นี้ก่อปัญหาให้แก่ร่างกาย โดยเทคนิค **suicidal gene**

2.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้จะศึกษาการรักษาภาวะโลหิตจางในโรคไตวาย ด้วยการผลิต erythropoietin โดยใช้ Lentiviral vector system ในการนำพาส่วนของยีน Erythropoietin เข้าสู่ human fibroblast cell ซึ่งจะมีผลให้เซลล์ดังกล่าวสามารถสร้าง Erythropoietin (EPO) อย่างถาวร จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการสร้าง EPO ทั้งระดับ mRNA และโปรตีน ขั้นต่อไปจะทดสอบประสิทธิภาพของ EPO ที่สร้างได้ต่อความสามารถในการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง (In vitro) โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดของมนุษย์ (human hematopoietic stem cell) เป็นต้นแบบ

2.4 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

จากข้อจำกัดในการใช้ recombinant erythropoietin ในการแก้ไขภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายดังที่ได้กล่าวแล้ว จึงมีความพยายามในการพัฒนาวิธีการแบบใหม่เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว การใช้วิธีการรักษาแบบ gene therapy นับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ในการรักษาภาวะซีดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการรักษาสูงกว่า และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีแบบเดิม โดยมีหลักการคือ ใช้ vector ที่อาจเป็น viral หรือ non – viral vector เพื่อนำพาส่วนของยีนที่สร้างโปรตีนที่ต้องการ เข้าสู่เซลล์ในตัวผู้ป่วยเอง เพื่อให้เซลล์สามารถสร้างโปรตีนในร่างกายผู้ป่วยในระดับที่มากพอ เพื่อให้ผลในการรักษา วิธีนี้จะมีผลดีกว่าการฉีด recombinant protein หลายประการ เช่น ทำให้ได้โปรตีนที่มีโครงสร้างเหมือนกับโปรตีนปกติที่พบในร่างกาย มีระดับโปรตีนที่สูงกว่า ทำให้มีผลการรักษาที่ดี มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่ามาก และไม่ต้องฉีดโปรตีนเข้าร่างกายบ่อย ๆ ทำให้มีความสะดวกในการดูแลผู้ป่วย นอกจากนี้จะไม่ทำให้เกิด antibodies ต่อโปรตีน ดังนั้น วิธีการรักษาโดยเทคนิค gene therapy ถือเป็นการรักษาที่ควรได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงและใช้ในผู้ป่วยได้อย่างปลอดภัย

โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยียับยั้งการเกิดโรคโลหิตจางจากการขาด Erythropoietin (EPO) โดยใช้ lentiviral vector ให้สร้าง Erythropoietin ได้อย่างถาวรในร่างกาย รวมทั้งมีระดับที่สูงพอในเลือดเพื่อแก้ไขภาวะโลหิตจางพร้อมทั้งมี green fluorescent protein (GFP) เพื่อติดตามได้ว่าเซลล์ใดบ้างที่ได้รับยีนบำบัดนี้ การที่มี GFP เพื่อติดตามเหมาะสำหรับการศึกษาในสัตว์ทดลองซึ่งจะทำให้ช่วยบอกได้ว่าเซลล์ที่มียีนบำบัดมีปริมาณ และการกระจายตัวในร่างกายอย่างไร ซึ่งทำให้สามารถตอบคำถามในเชิงลึกได้ จุดเด่นอีกจุดหนึ่งของโครงการนี้คือ Lentivirus vector ที่จะใช้ในการทดลองนี้จะถูกปรับปรุงให้มีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้นโดยการตัดเอาส่วนของ suicide gene (Thymidine kinase) เข้าสู่ vector ดังกล่าว ซึ่งถูกควบคุมการแสดงออกโดย inducible promoter วิธีการนี้จะทำให้เราสามารถทำลายเซลล์ที่ได้รับยีนบำบัดได้หากเซลล์นี้ก่อปัญหาให้แก่ร่างกาย เช่นการเจริญเติบโตเป็นเนื้องอก ซึ่งมีโอกาสเป็นเช่นนั้นน้อยมาก นอกจากนี้ Lentiviral vector ที่นำมาใช้นี้ถูกตัดยีนส่วนที่ไม่ปลอดภัยต่อเซลล์มนุษย์ออกหมดและตัว vector เองก็ไม่สามารถสร้างเป็นไวรัสใหม่ได้ ทำให้มีความปลอดภัยสูง การนำ lentivirus vector มาใช้เป็นพาหะในการนำยีนเข้าสู่เซลล์นับว่าเป็นวิธีที่น่าสนใจเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการนำยีนเข้าสู่เซลล์สูง (เกือบ 100% ของเซลล์เป้าหมายจะได้รับยีนบำบัด) และสามารถนำยีนเข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่ขึ้นกับระยะการแบ่งตัวของเซลล์ (resting cells and dividing cells) ซึ่งต่างจาก retrovirus อื่นๆ อันทำให้สามารถใช้ได้ดีกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนัง (subcutaneous tissue) และ กล้ามเนื้อ ทำให้สะดวกและง่ายต่อการฉีดให้ผู้ป่วย นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนได้เป็นเวลานาน (permanent expression of transgene) การนำยีนทั้งหมดนี้มาสร้างลงบน vector ตัวเดียวกันยังไม่มีผู้ใดทำและศึกษามาก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้กับ Lentiviral vector ที่มีประสิทธิภาพสูง หลังจากสร้าง lentiviral vector ให้มียีน ทั้ง 3 อย่างเสร็จ (Erythropoietin gene, suicidal gene and GFP gene) ขั้นตอนต่อไปจะทำการนำพา vector ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ human fibroblast cell line (HFF-1) ตามด้วยการคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีนบำบัดเพื่อนำไปเพิ่มจำนวนต่อไป แล้วจึงทดสอบปริมาณการแสดงออกของ Erythropoietin gene ทั้งระดับ mRNA และ โปรตีน ที่สร้างจากเซลล์ดังกล่าว ท้ายสุดจะทดสอบประสิทธิภาพของ EPO ที่สร้างได้ต่อความสามารถในการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง (In vitro) โดยใช้ human hematopoietic cell เป็นต้นแบบในการศึกษา

องค์ความรู้ใหม่ของเทคโนโลยียับยั้งการเกิดโรคโลหิตจางและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัดที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะนำไปสู่การสร้างเทคโนโลยีที่สำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคโลหิตจางจากโรคไตวาย ซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อนและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง โดยมีค่าใช้จ่ายในการรักษาที่ต่ำ และมีความปลอดภัยสูง เหมาะสำหรับการพัฒนาเพื่อนำไปสู่การรักษาในทางคลินิกต่อไปในอนาคต ซึ่งทั้งหมดนี้หากผู้ป่วยสามารถสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปกติได้เองจะสามารถยุติการให้ erythropoietin ให้แก่ผู้ป่วย ซึ่งจะช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตและลดค่าใช้จ่ายในการรักษาแก่ผู้ป่วย ซึ่งท้ายที่สุดจะส่งผลที่ดีต่อประเทศไทยโดยรวม

3. การทบทวนวรรณกรรม / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

Erythropoietin เป็น glycoprotein ที่สร้างจาก proximal renal tubules โดยจะถูกควบคุมการสร้างโดย ภาวะ hypoxia ซึ่งเกิดขึ้นในโรคหลายอย่าง เช่น chronic renal failure โดย erythropoietin ที่สร้างขึ้นจะไปจับและกระตุ้น receptor ที่อยู่บน erythroid progenitor cells (11) โดยพบว่าในภาวะที่เกิด erythropoietin – receptor complex จะทำให้ erythroid progenitor cell เจริญจนเป็น mature erythrocytes แต่ในภาวะที่ไม่มี erythropoietin เซลล์ erythroid progenitor จะตายไป (12) ภาวะปกติ ปริมาณ EPO ในเลือดเป็น 10 – 20 U/Lite ซึ่งเพียงพอในการกระตุ้นการสร้าง red blood cell ให้เป็นปกติและไม่มีภาวะ hypoxia ทำให้ปริมาณ erythropoietin อยู่ใน base – line level อย่างไรก็ตามในภาวะ anemia ระดับ erythropoietin ในเลือดจะมีระดับที่สูงขึ้น แบบ exponential โดยพบว่าเมื่อมี hematocrit เป็น 20% จะมีการเพิ่มของ ระดับ erythropoietin ในเลือดถึง 100 เท่า

ยีน Erythropoietin ในมนุษย์อยู่บน chromosome ที่ 7 (7pter – q22) มีขนาดของยีน 5.4 kb (13-18) ซึ่งจะสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วย 193 amino acid โดยโปรตีนจะถูกตัดเอา amino acid จำนวน 27 ตัว ออกจากบริเวณ N – terminus ในระหว่างการหลั่งออกนอกเซลล์ และจะทำให้ได้โปรตีนขนาด 18 Kd (19) นอกจากนี้โปรตีนยังมีการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ เช่น glycosylation เพื่อให้มีการทำงานได้เต็มที่ (19) Erythropoietin ในมนุษย์ถูกสร้างจากเซลล์ไตเป็นส่วนใหญ่ โดยพบว่าเซลล์ที่สร้าง เป็นเซลล์ที่อยู่ใน interstitium ของ renal cortex โดยพบว่า ในภาวะ hypoxia กระตุ้นให้เซลล์ดังกล่าวมีจำนวนมากขึ้น (20) ในภาวะคนไข้ที่เป็น end – stage renal disease และ anemia พบว่าปริมาณ erythropoietin ลดต่ำลงอย่างมาก แต่จะกลับสู่ระดับปกติเมื่อได้รับการปลูกถ่ายไต (21) Erythropoietin จะทำงานผ่านการกระตุ้น erythropoietin receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดแดง ซึ่งได้แก่ CFU-E และ BFU-E โดย BFU-E ต้องการ GM-CSF หรือ IL3 นอกเหนือจาก erythropoietin ในการเจริญเติบโต เป็น mature erythroid cells (22-23) การศึกษาพบว่า BFU – E มีจำนวน erythropoietin receptor ที่ต่ำกว่า CFU-E และมีการตอบสนองต่อ erythropoietin ต่ำกว่า ทำให้เชื่อว่าระดับ erythropoietin receptor มีความสำคัญในการตอบสนองของ progenitor cells ต่อ erythropoietin โดยพบว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงในระยะ basophilic erythroblast และเซลล์ในระยะต่อมา มีระดับ erythropoietin receptor ต่ำลง พร้อมกับการที่ไม่พึ่งพา erythropoietin ในการเจริญเติบโต (12, 24) การศึกษากลไกการทำงานของ erythropoietin พบว่าผ่านทาง JAK-2 kinase ซึ่งถูกกระตุ้นเมื่อมีการจับของ erythropoietin บน receptor จากนั้นจะมีการเกิด tyrosine phosphorylation ของโปรตีนหลายตัว โดยเฉพาะ STAT-5 ซึ่งนำไปสู่การเจริญเติบโตของเซลล์ (25)

มีการศึกษาไม่มากนัก เพื่อใช้เทคนิค gene therapy เพื่อสร้าง erythropoietin ในเซลล์ เพื่อหวังผลในการประยุกต์ใช้ในผู้ป่วย ตัวอย่างเช่น การศึกษาโดยใช้ adenoviral vector เพื่อสร้าง erythropoietin (EPO) ในเซลล์ไตของหนูของผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง จำนวน 10 คน (26) พบว่าสามารถ

กระตุ้นการสร้างโปรตีนในเซลล์ และเมื่อนิยดเซลล์เข้าผู้ป่วย (Intradermal implantation) สามารถตรวจระดับ โปรตีน EPO ได้ตั้งแต่วันที่ 1 หลัง tissue implantation และ สามารถตรวจพบได้นาน 14 วัน หลังการฉีดเนื้อเยื่อดังกล่าว การศึกษาดังกล่าวไม่พบผลข้างเคียงในผู้ป่วยที่ร้ายแรง อย่างไรก็ตาม การตรวจเนื้อเยื่อที่ได้รับ viral vector ในผู้ป่วย พบว่ามีการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอย่างมาก

ผลการศึกษาดังกล่าวนี้นำ adenoviral vector ซึ่งเชื่อว่าอาจกระตุ้น immune system ได้ และการแสดงออกของยีนเป็นแบบชั่วคราว เหตุผลดังกล่าวการใช้วิธีอื่น ๆ เช่น ใช้ retroviral vector หรือ lentivirus vector จึงได้รับความสนใจในการนำมาใช้ในการสร้าง EPO เพื่อนำไปรักษาในผู้ป่วยภาวะซีดจากไตวาย การศึกษาส่วนใหญ่ เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง เช่น มีการใช้ retrovirus vector เพื่อสร้าง EPO ในเนื้อเยื่อของหนูในลักษณะ ex vivo หลังจากฉีดเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนบำบัดดังกล่าว เข้าไปยังตัวหนู (intraperitoneal transplantation) พบว่าสามารถตรวจวัด EPO ได้ในเลือด (27) นอกจากการศึกษาโดยใช้ DBA/2FG-pcy mouse model of polycystic kidney disease พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้าง EPO ในหนู หลังจากฉีด adenoviral vector ที่สร้าง EPO เข้าสู่ช่องท้องของหนู (28) โดยทำให้หนูมีระดับ hematocrit และ reticulocyte count ที่สูงขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตาม ผลที่เกิดขึ้นมีลักษณะแบบ transient ซึ่งอย่างน้อยอธิบายได้จาก ชนิดของ virus vector ที่ใช้ในการศึกษาอื่นใช้ transgenic mouse strain 134.3 Lc, Epo – Tag^H ซึ่งไม่สามารถสร้าง EPO ได้ พบว่าเมื่อใช้เซลล์กล้ามเนื้อที่ได้รับยีนบำบัด(transgene) ที่สร้าง EPO สามารถตรวจพบระดับ EPO ในเลือด แบบชั่วคราวได้ (29)

การศึกษาในสัตว์ที่ใกล้เคียงกับมนุษย์ คือ non – human primate โดยใช้ adenoassociated virus (AAV) ที่สร้าง EPO พบว่าเมื่อนิยด vector สู่เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ปอด ของสัตว์ดังกล่าว (30, 31) สามารถตรวจพบระดับ EPO สูงขึ้นในเลือด อย่างไรก็ตามในสัตว์ทดลอง บางส่วน เกิดภาวะ autoimmune anemia ที่พบร่วมกับ anti – EPO antibody ในเลือด นอกจากการรักษาภาวะ anemia ใน โรคไตวายแล้ว ยังมีการศึกษาอื่น เพื่อวิเคราะห์ผลของ EPO – expression vector ต่อภาวะซีดที่เกิดในโรค thalassemia โดยกลุ่มจาก Pasteur Institute ได้ศึกษาผลใน mouse model of β - thalassemia (32) พบว่าเมื่อนำ adenovirus – associated virus (AAV) เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของ หนู ส่งผลให้มีการสร้าง EPO ในเลือด ร่วมกับการกระตุ้น β - minor globin (the mouse equivalent to human γ - globin) ตามด้วยภาวะการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ดีขึ้น (32) ผลงานวิจัยจากกลุ่มอื่น (33) ก็ให้ผลที่คล้ายกัน ดังนั้นจะเห็นว่า วิธีการ gene therapy เพื่อกระตุ้นการสร้าง EPO ในผู้ป่วยเอง เป็นวิธีที่มีผลดีกว่าการรักษาแบบเดิม และสามารถพัฒนานำไปสู่การใช้ในทางคลินิกได้ ในอนาคต อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยเฉพาะให้มีการสร้างได้อย่างถาวร และมีระดับที่สูงพอในเลือดเพื่อแก้ไขภาวะโลหิตจางในผู้ป่วย รวมทั้งมีความปลอดภัยมากขึ้น การนำ lentivirus vector เป็นวิธีการที่น่าสนใจ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการเข้าสู่เซลล์ที่

ดีกว่า และสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนได้เป็นเวลานานกว่า ดังนั้น ในงานวิจัยที่เสนอนี้จะมุ่งเพื่อพัฒนา lentivirus vector มาใช้ในงานดังกล่าว เพื่อสร้าง Erythropoietin ที่สามารถพัฒนาไปใช้ในผู้ป่วยได้ในอนาคต โดยการทดลองนี้จะใช้ Lentivirus vector ในการนำพา erythropoietin gene เข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (human fibroblast cell line, HFF-1) ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จากนั้นจึงวิเคราะห์การสร้างโปรตีน Erythropoietin จากเซลล์ดังกล่าว รวมทั้งผลต่อการกระตุ้นการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงจาก human hemetopoietic stem cell ในหลอดทดลอง นอกจากนี้ lentivirus vector ที่จะใช้ในการทดลองนี้จะถูกปรับปรุงให้มีความปลอดภัยขึ้น โดยตัดต่อเอาส่วนของ suicidal gene (Thymidine kinase) เข้าสู่ vector ดังกล่าว ซึ่งควบคุมการแสดงออกโดย inducible promoter เพื่อป้องกันอันตรายจาก insertional mutagenesis ที่อาจเกิดขึ้นได้แม้มีโอกาสน้อยก็ตาม

ปัญหาที่สำคัญในการใช้ Lentivirus ที่สามารถ integrate เข้าสู่ genome ของ host cells ดังกล่าวแล้วได้แก่ การทำให้เกิดภาวะผ่าเหล่าของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง (insertional mutagenesis) ซึ่งแม้จะเกิดได้น้อย แต่ก็อาจเป็นอันตรายได้ ดังนั้น จึงมีแนวทางในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว วิธีหนึ่งที่สามารถช่วยได้คือ วิธีใช้เทคนิค suicidal gene (34) ซึ่งเป็นการนำส่วนของยีนที่สามารถสร้าง enzyme ที่สามารถเปลี่ยนสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (prodrug) ไปเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic substance) เป็นผลให้เซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน ดังกล่าวตายไป และเป็น enzyme ที่ไม่พบในเซลล์มนุษย์ ในปัจจุบัน ได้มีการใช้ enzyme และ prodrug หลายชนิดในการทำให้เกิดผลดังกล่าว ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เช่น ระบบที่ใช้ HSV-tk / GCV และระบบที่ใช้ Cytosine deaminase (CD)/5-FC โดยในระบบ HSV-tk / GCV นั้น จะใช้ยีน HSV-Thymidine kinase ที่สร้าง enzyme Thymidine Kinase ที่สามารถเปลี่ยนสาร gancyclovir (GCV) เป็น toxic substance คือ GCV- triphosphate ส่วนระบบ Cytosine deaminase /5-FC นั้นจะใช้ยีน Cytosine deaminase ที่พบใน bacteria ซึ่งสามารถสร้าง enzyme Cytosine deaminase ที่สามารถเปลี่ยนสาร 5-FC ที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกายไปเป็นสาร 5-Fluorouracil (5-FU) ที่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งทั้งสองระบบนั้นสามารถให้ผลที่ดีจากการศึกษาในห้องทดลอง โดยการศึกษาเปรียบเทียบโดย Nishihara et al. (34) พบว่าระบบ HSV-tk / GCV มีผลการรักษาที่ดีที่สุด (Best therapeutic index) โดยมีค่า IC₅₀ parental cells / IC₅₀ transduced เป็น 30-120 เท่า ขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่ศึกษา อย่างไรก็ตาม CD/5-FC system มีผลที่เรียกว่า bystander effects (สารพิษที่สร้างจากเซลล์หนึ่งจะกระจายไปทำลายเซลล์ที่อยู่ข้างเคียง) ดีที่สุด การศึกษาในโครงการนี้จะเลือกระบบ HSV-tk / GCV ซึ่งมีหลักฐานว่าน่าจะให้ผลดีที่สุด

องค์ความรู้ใหม่และเทคโนโลยียีนบำบัดและเซลล์ต้นกำเนิดบำบัดที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งโลหิตจางซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อนและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ในการรักษาภาวะโลหิตจางเรื้อรังได้โดยมีค่าใช้จ่ายในการรักษาดำ และมีความปลอดภัยสูงมากกว่าวิธีการอื่น เหมาะสำหรับการพัฒนาเพื่อนำไปสู่การรักษา

โรคในทางคลินิกต่อไปในอนาคต ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาภาวะโลหิตจางจากโรคไตวายและโรคอื่นที่มีภาวะดังกล่าว ช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตและลดค่าใช้จ่ายในการรักษาแก่ผู้ป่วย นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคอื่นๆ โดยเฉพาะโรคทางพันธุกรรมเช่น Thalassemia ซึ่งท้ายที่สุดจะส่งผลที่ดีต่อกระบวนการดูแลรักษาผู้ป่วยของประเทศโดยรวม

4. ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเลี้ยงเซลล์ลายในห้องปฏิบัติการ

เลี้ยง fibroblast cell line HFF-1 ที่ซื้อจาก ATCC (American Type Cell Culture) ในน้ำเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM medium ที่ถูกเสริมด้วย 10% Fetal bovine serum เซลล์ถูกปล่อยให้เจริญเติบโตในตู้บ 37°C ที่มี 5% CO₂ เซลล์จะถูกปล่อยให้เจริญจนได้ความหนาแน่นประมาณ 80% แล้วจึงถูก trypsinized และ subculture ในอัตราที่เหมาะสม

4.2 การเตรียม Erythropoietin - Lentiviral vector และ การ Transduction

ทำการตัดต่อยีน Erythropoietin ที่ได้เข้าสู่ modified pPRIME lentiviral vector จากนั้น ทำการคัดเลือก clone และทำการตัดต่อ suicide gene thymidine kinase เข้าสู่พาหะที่ได้เพื่อสร้างเป็นพาหะที่สมบูรณ์ตามต้องการ จากนั้นนำพาหะที่ได้เข้าสู่ packaging cell line เพื่อสร้างเป็นไวรัส (lentivirus vector) ที่พร้อมจะนำเข้าสู่เซลล์ HFF-1 (human fibroblast cell line) ต่อไปโดยมีวิธีการสรุปดังนี้

1. เลี้ยง 293T packaging cell lines ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) Supplemented by 10%FCS, 0.1%P/S and 0.1% Glutamine. นำ WT1-siRNA Lentivirus vector เข้าสู่เซลล์โดยใช้ Fugene 6 transfection reagent (Roche) และทิ้งไว้ข้ามคืน
2. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ แล้วทิ้งไว้ประมาณ 48 ชม. นำส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ ข้างบนไปใช้ในการ Transduction ในเซลล์
3. เลี้ยง fibroblast cell line ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมโดยได้ความหนาแน่นของเซลล์ ประมาณ 1×10^6 ต่อ 1 flask (15 ml tissue culture flask) 1 วัน ก่อนการทดลอง Transduction
4. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงใหม่ โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนของไวรัสผสมอยู่มาแทน ทำซ้ำ ทุก ๆ 8-12 ชม. รวม 3 ครั้ง
5. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ให้เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีไวรัสผสมอยู่ ให้เซลล์เจริญเติบโตข้ามคืนที่ 37 °C

6. ใช้วิธี Flow cytometry หรือ fluorescent microscope เพื่อคัดเลือกลเซลล์

4.3 การวัดการแสดงออกของ erythropoietin ในระดับ RNA และ โปรตีน

นำ fibroblast cell line ที่ได้รับยีนบำบัด มาตรวจสอบว่ามีการแสดงออกของ erythropoietin ในระดับ RNA และ โปรตีนหรือไม่โดย วิธี real-time RT-PCR และ ELISA ตามลำดับ

วิธี Real-time RT-PCR ในการวัดการแสดงออกของ erythropoietin ในระดับ RNA ที่ถือเป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูงสุดในการตรวจปริมาณ mRNA ของยีน ที่สนใจ โดยมีวิธีการโดยสังเขปดังนี้

- สกัด Total RNA หรือ mRNA จากเซลล์โดยใช้ Trizol reagent หรือ Oligo-dT purification ตามลำดับ

โดยจะเก็บ RNA ที่ได้ใน DEPC water ที่มี RNase inhibitor ผสมอยู่

- วัดปริมาณ RNA ที่ได้โดย spectrophotometer

- นำ RNA ที่ได้ไปใช้ในปฏิกิริยา Reverse transcription ที่ประกอบด้วย 75 mM KCl, 50 mM Tris (pH

8.3), 3 mM $MgCl_2$, 500 mM dNTPs และ 2 μ M Primers โดยปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา ที่ 42°C เป็นเวลา 1

ชม. จากนั้นจึงทำลาย MMLV โดยอบที่อุณหภูมิ 95°C 5 นาที

- นำ cDNA ที่ได้ไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย 56 mM KCl, 19.6 mM Tris(pH 8.3), 1.6 mM

$MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 1 μ M Primers และ 10-100 nM Taqman Probe

- ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่อง cobas taqman โดยใช้ภาวะดังนี้, Denaturation 95°C 1 นาที, Annealing

ที่ 60 °C 30 วินาที และ Extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที และทำปฏิกิริยารวม 45 รวม

- ข้อมูลที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดย Analysis software เพื่อคำนวณหาปริมาณ mRNA ของแต่ละยีน โดยวิธี

คำนวณจากค่า Threshold cycle (Ct) ของยีนแต่ละยีน เปรียบเทียบกับ Ct ของ House keeping gene

GAPDH

ทำการตรวจวิเคราะห์ผลการแสดงออกของโปรตีน erythropoietin ที่หลั่งออกจากเซลล์ ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ ELISA Kit (Promega) จากนั้นตรวจสอบหาปริมาณ erythropoietin โดยเครื่อง ELISA Reader

4.4 การตรวจสอบคุณสมบัติของ erythropoietin จาก cell ที่ได้รับยีนบำบัดต่อการสร้าง เซลล์เม็ดเลือดแดง

ทำการทดสอบว่า fibroblast cell line ที่ได้รับยีนบำบัดและสามารถผลิต erythropoietin ได้ และหลังออกสู่น้ำเลี้ยงเซลล์นั้นสามารถทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (HSC) เปลี่ยนแปลงเป็น เซลล์เม็ดเลือดแดงได้หรือไม่ การทดสอบขั้นนี้จะบ่งบอกถึงความสำเร็จในการสร้างยีนบำบัดที่ใช้ งานได้จริง การทดสอบสามารถทำได้โดยการแยกเลี้ยง fibroblast cells ที่ได้รับยีนบำบัดใน 15 ml tissue culture flask จนกระทั่งได้เป็น monolayer จากนั้นนำ HSC มาเลี้ยงด้านบนของ tissue culture flask ทั้งสองที่เตรียมไว้ และนำเซลล์ทั้งหมดเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบเซลล์เม็ดเลือดที่ได้โดยวิธีการตรวจสอบรูปร่าง และการตรวจสอบการ แสดงออกของยีนที่จำเพาะของเม็ดเลือดสายต่าง ๆ วิธีการตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ทำได้โดยนำ เซลล์ที่ต้องการตรวจสอบมาเตรียมบน slide โดยวิธี cytopspin จากนั้นนำสไลด์ที่ได้มาย้อมสี Wright staining และตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

4.5 การตรวจสอบชนิดของเซลล์เม็ดเลือดหลัง Differentiation

นำเซลล์ที่ได้หลังกระบวนการ Differentiation มาตรวจสอบชนิดของเซลล์โดยวิธีการ ตรวจสอบรูปร่าง และการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่จำเพาะของเม็ดเลือดสายต่าง ๆ

วิธีการตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ทำได้โดยนำเซลล์บางส่วนของส่วนที่ 1 – 7 ในข้างต้นมา เตรียมบน slide โดยวิธี cytopspin จากนั้นนำสไลด์ที่ได้มาย้อมสี Wright staining และตรวจสอบ รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.6 การตรวจสอบการการทำลายเซลล์โดยระบบ suicidal gene

นำเซลล์ fibroblast cells ที่ได้รับยีนบำบัด EPO – expressing lentiviral vector มาเลี้ยงในน้ำ เลี้ยงเซลล์ complete IMDM ที่มีส่วนผสมของ Flt3L, SCF, TPO, IL-6 และมีส่วนผสมของยา gancyclovir ซึ่งจะ induce suicidal gene system expression โดยมีตัวควบคุม (control) 4 กลุ่มคือ 1) เซลล์ชนิดเดียวกับกลุ่มทดลองแต่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มียา gancyclovir 2) เซลล์ชนิดเดียวกับ กลุ่มทดลองแต่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มียา gancyclovir 3) fibroblast cells ที่ได้รับยีนบำบัดและเลี้ยง ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มียา gancyclovir 4) fibroblast cells ที่ได้รับยีนบำบัดและเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ ไม่มียา gancyclovir นำเซลล์ทั้งหมดที่เตรียมได้เลี้ยงที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 7 วัน โดยทำการ ตรวจสอบ proliferation rate และ apoptosis ต่อไป โดยทดสอบเซลล์หลังจากเลี้ยงเซลล์ได้ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 วัน

4.6.1 การศึกษา proliferation rate

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ fibroblast cells หลังการได้รับ gancyclovir โดยจะใช้น้ำยาสำเร็จรูป คือ CellTiTer 96 Aqueous one solution cell proliferation assay kit (Promega, USA) โดยมีวิธีการทดลองโดยสรุปดังนี้

- แยกเลี้ยงเซลล์ fibroblast 4 กลุ่มข้างต้น ใน 96-well titer plate ให้ได้ปริมาณ 3000 cell ต่อหลุม
- หลังจากนั้น 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชม. จึงเติมสารละลาย MTS+PES ในน้ำเลี้ยงเซลล์ ปล่อยให้ทิ้งไว้ 4 ชม.
- นำเซลล์ที่ได้ไปวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นโดย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 490 nm นำค่าที่วัดได้ไปสร้างเป็น growth curve

4.6.2 การวัดอัตราการเกิด Apoptosis

ตรวจวัดอัตราการเกิด Apoptosis โดยการวัดการทำงานของ Caspase 3 ของเซลล์ที่ต้องการทดสอบ จากข้อ 9.11 เนื่องจาก caspase 3 เป็นโปรตีนที่ถูกกระตุ้นในช่วงต้นของกระบวนการเกิด Apoptosis โดยจะถูกเปลี่ยนเป็น Active enzyme ที่สามารถย่อยสลายโปรตีน caspase ตัวอื่นๆ ได้ ดังนั้นการวัด activity ของ caspase 3 เป็นการบ่งถึงระดับ Apoptosis ที่เกิดขึ้น (จำนวนเซลล์ที่เกิด apoptosis) โดยการวัดจะใช้สารที่สามารถย่อยด้วย active caspase 3 คือ สาร Ac-DEVD-pNA เติมในสารสกัดโปรตีนที่แยกได้จากเซลล์ที่ต้องการศึกษา ซึ่งเมื่อสารดังกล่าวถูกย่อยโดย active caspase 3 จะทำให้เกิดสีที่สามารถวัดได้ที่ 405 nm ค่าที่วัดได้จะแปรผันตามปริมาณ active caspase 3 ที่เกิดขึ้น จะใช้ชุดตรวจชื่อว่า CaspACE™ Assay system, colorimetric โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- สกัดโปรตีน จากเซลล์ที่ต้องการศึกษา โดยจะสกัดจากเซลล์ทั้งในกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม ในปริมาณที่เท่ากัน
- เติมสารละลาย caspase assay buffer และสาร DVED-pNA
- ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไป 4 ชม. ที่ 37°C
- วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นโดยวัด absorbance ที่ 405 nm
- นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ apoptosis ที่เกิดขึ้น

5. ผลการดำเนินงานที่ได้ดำเนินการไปแล้วทั้งหมด

5.1 การเตรียม Erythropoietin-expressing Lentiviral vector

ได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอนเพื่อให้ได้ Lentiviral vector ที่สามารถสร้างโปรตีน Erythropoietin ใน human fibroblast cells ดังนี้

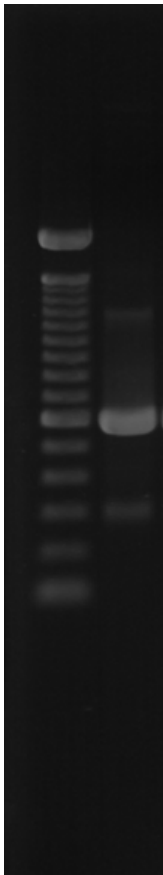
5.1.1 เพิ่มปริมาณ Lentiviral vector และ packaging vector เพื่อใช้ในการ transfect เข้าสู่ packaging cells โดยงานส่วนนี้ได้เสร็จสิ้นแล้ว

การวิจัยนี้ใช้ lentivirus vector ชนิด pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector และ packaging vectors ที่ประกอบด้วย pLP1, pLP2, pLP/VSV vectors โดยการ transform vector ดังกล่าว เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (supercompetent cells, One Shot Stbl™ Competent *E.coli*) ปล่อยให้แบคทีเรียเจริญใน LB agar ที่มี ampicillin ผสมอยู่ เลือก clone แล้วจึงเลี้ยง clone ให้มีปริมาณมากใน LB broth เพื่อนำไปสกัด plasmid โดยวิธี Column purification method (PureLink™ HiPure Plasmid Mediprep Kit)

5.1.2 สร้างส่วนของ cDNA ซึ่งประกอบด้วย complete coding sequence ของ Human erythropoietin gene และ clone เข้าสู่ pCR®8/GW/TOPO® vector (Invitrogen).

การทดลองที่ผ่านมาสามารถสร้างส่วนของ complete coding DNA ของ Human erythropoietin gene เข้าสู่ pCR®8/GW/TOPO® vector (Invitrogen) ได้แล้ว และสามารถแสดงผลการทดลองให้เห็นดังภาพ ที่ 1 ซึ่งเป็นการทำการทดลองโดยวิธี PCR โดยใช้ pCR®8/GW/TOPO® vector ที่มีส่วนของ complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ เป็นแม่แบบ (template) เพื่อ ยืนยันว่ามีส่วน complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ โดยจากรูปแสดงให้เห็นว่า ได้ PCR product ในขนาดที่ถูกต้องคือ 582 bp เมื่อตรวจวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis with UV detection โดยผลการทดลองสามารถแสดงได้ ดังรูปต่อไปนี้

Lane 1 2



Lane 1: 100 bp ladder

Lane 2: PCR product of pENTR221-EPO clone2

- PCR product showed expected sized 582 bp of EPO gene

Figure 1 เป็นการทำให้ PCR โดยใช้ pCR®8/GW/TOPO® vector ที่มีส่วนของ complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ เป็นแม่แบบ (template) เพื่อ ยืนยันว่ามีส่วน complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ โดยจากรูปแสดงให้เห็นว่า ได้ PCR product ในขนาดที่ถูกต้องคือ 582 bp

5.1.3 ทำการย้ายส่วน cDNA of EPO gene เข้าสู่ pLenti 7.3/V5-DEST

Gateway vector โดยใช้เทคนิค LR recombination

ได้ทำการย้าย cDNA of EPO gene เข้าสู่ pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector ได้สำเร็จ และมี orientation ที่ถูกต้อง ซึ่งยืนยันโดยใช้ primers รวม 3 คู่ ที่ประกอบด้วย ส่วนของ plasmid และ ส่วนของ EPO gene ในการทำ PCR ได้แก่ F-EPO + R-EPO, CMV-F + InR-EPO และ InF-EPO + V5-R โดยใช้ผลดังรูปที่ 2 โดยในรูปเป็นการทำ PCR โดยใช้ clone ของ plasmid รวม 3 clones ได้แก่ clone 3, 4, 5 (ย่อเป็น C3, C4, C5 ตามลำดับ) ทั้งนี้ผลการศึกษาใน lanes 2-4 เป็นผลของ clone 3 lanes 5-7 เป็นผลของ clone 4 ทั้งนี้ผลการศึกษาใน lanes 8-10 เป็นผลของ clone 5

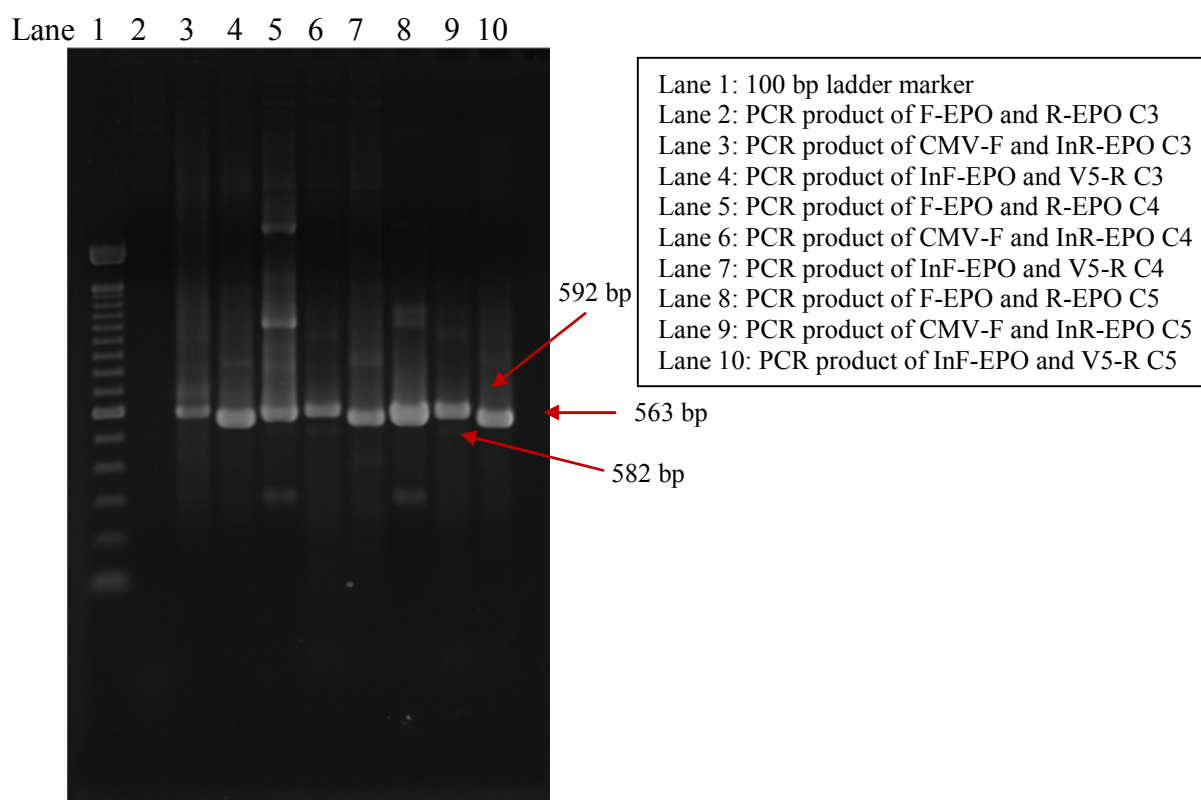


Figure 2 เป็นการทำ PCR โดยใช้ pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector ที่มีส่วนของ complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ เป็นแม่แบบ (template) เพื่อ ยืนยันว่ามีส่วน complete cDNA ของ erythropoietin gene อยู่ และที่ orientation ที่ถูกต้อง โดยจากรูปแสดงให้เห็นว่า ได้ PCR product ในขนาดที่ถูกต้องคือ 582 bp, 592 bp, 563 bp เมื่อใช้ primers 3 คู่ คือ F-EPO + R-EPO, CMV-F + InR-EPO และ InF-EPO + V5-R โดยในรูปเป็นการทำ PCR โดยใช้ clone ของ plasmid รวม 3 clones ได้แก่ clone 3, 4, 5 (ย่อเป็น C3, C4, C5 ตามลำดับ) ทั้งนี้ผลการศึกษาใน lanes 2-4 เป็นผลของ clone 3, lane 5-7 เป็นผลของ clone 4 ทั้งนี้ผลการศึกษาใน lanes 8-10 เป็นผลของ clone 5

ทั้งนี้ได้แสดงตำแหน่ง และ sequence ของ primers ดังภาพที่ 3 และ ขนาดของ PCR product ที่ amplify ได้ ดังตารางที่ 1

Figure 3 แผนภูมิแสดง ตำแหน่ง และ sequences ของ primers ที่ใช้ในการ screen Lentiviral vector ที่มี cDNA of EPO gene

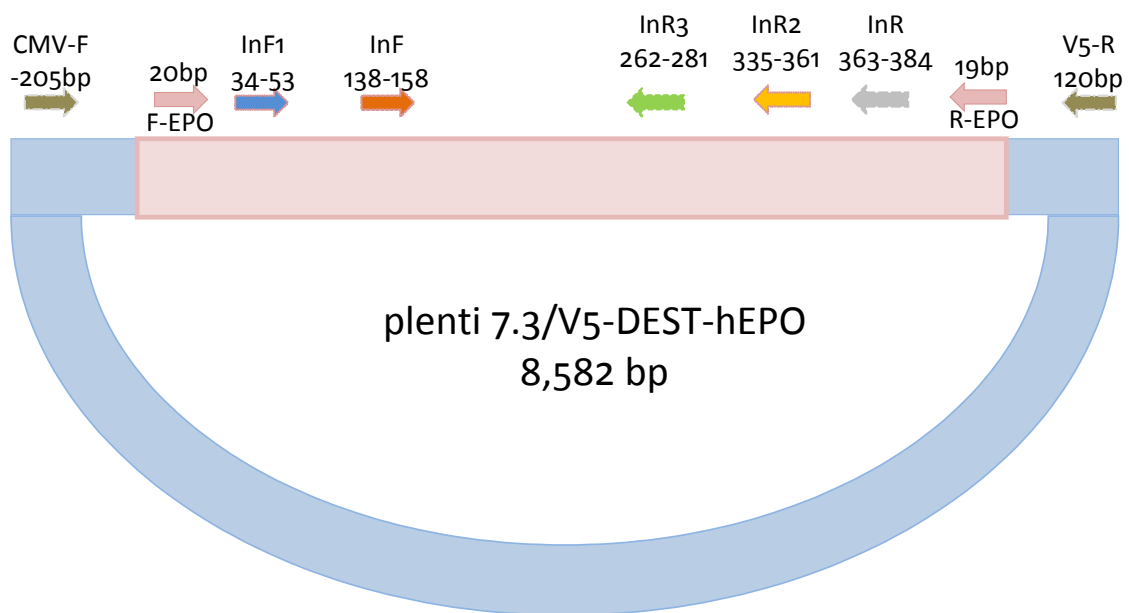


Table 1 แสดงขนาดของ PCR product ที่ amplify ได้ ซึ่งใช้ในการคัดกรองหา Lentiviral vector ที่มี EPO cDNA

Primer	Sequence
F-EPO	5'- <u>ACCAT</u> GGGGGTGCACGAATG-3'
InF1	5'-CTTCTCCTGTCCCTGCTGTC-3'
InF	5'-CAAGGAGGCCGAGAATATCAC-3'

Primer	Sequence
R-EPO	5'-TCTGTCCCCTGTCCTGCAG-3'
InR	5'-CACTGACGGCTTTATCCACATG-3'
InR2	5'-GAAGAGTTGACCAACAGGGC-3'
InR3	5'-AGGCCCTGCCAGACTTCTAC-3'

Primers		Product size (bp)
CMV-F + InR	205 + 384 + 3 (acc)	592
CMV-F + InR2	205 + 361 + 3	569
CMV-F + InR3	205 + 281 + 3	489
InF + V5-R	442 + 120	563
InF 1+ V5-R	546 + 120	666

หมายเหตุ ตัวเลขใน Column 2 เป็นการคำนวณขนาด PCR product ได้ จากระยะห่างของ Primers

5.1.3 การสร้าง Lentiviral vector และ การนำ Lentiviral vector ที่มียีน erythropoietin เข้าสู่เซลล์

ได้ทำการสร้าง Lentiviral vector โดยใช้ packaging cells (293T packaging cell lines) โดยการ Transfect plasmids 4 ชนิดเข้าสู่เซลล์ ดังกล่าว ได้แก่ packaging plasmids 3 ชนิด คือ pLP1 (gag/pol), pLP2 (rev), pLPv (env) และ Lentiviral plasmid เข้าสู่เซลล์ จากนั้นปล่อยให้เซลล์ สร้างไวรัส และปล่อยออกมาสู่ อาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการ transduction เข้าสู่เซลล์ เป้าหมายต่อไป

จากนั้นได้ทำการทดลองในการ นำ Lentiviral vector ที่เป็น empty vector ซึ่งไม่มีส่วนของยีน erythropoietin แต่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ GFP (green fluorescent protein) ในเซลล์เป้าหมายได้ โดยวิธี transduction ทั้งนี้เพื่อใช้ในการบอกประสิทธิภาพของการนำพา Lentiviral vector เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ด้วยการใช้เทคนิคดังกล่าว สามารถนำพาส่วนของ Lentiviral vector เข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ ไม่ต่ำกว่า 30% โดยการตรวจปริมาณเซลล์ ที่มีไวรัสได้โดยการสังเกตโดยใช้ Fluorescent microscope ร่วมกับการใช้ Flow cytometry ทั้งนี้เซลล์ที่มีไวรัส จะติดสี Green fluorescence ให้เห็นได้ จากนั้นเซลล์ที่ได้ดังกล่าวจะถูกนำไป แยกเฉพาะเซลล์ที่มี virus อยู่โดยใช้เครื่อง flow cytometry with cell sorting ทั้งนี้การวัดระดับ GFP จะทำในช่วงเวลา 48 ชม. หลังการทำ viral transduction

ผลการทดลองที่แสดงให้เห็นประสิทธิภาพในการนำพา Lentiviral vector เข้าสู่เซลล์ ถูกแสดงให้เห็นดังรูปต่อไปนี้ (Figure 4)

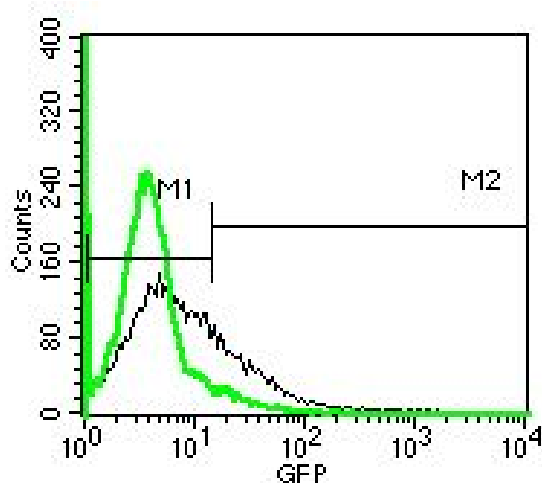


Figure 4 Histogram of GFP⁺ expression of infected cells analyzed by flow cytometry. The target cells were transduced with Lentiviral vector and then were analyzed by flow cytometry to measure the efficiency of transduction. The data showed that about 30% of target cells can uptake the viral vector.

5.1.4 การสร้างส่วนของ thymidine kinase gene เพื่อ clone เข้าสู่ Lentiviral vector

โดยในขณะนี้ได้อยู่ในระหว่างการ สร้าง cDNA of thymidine kinase gene จาก Herpes simplex virus Type I ซึ่งได้รับความร่วมมือจาก Department of Micrology มหาวิทยาลัยมหิดล ในการให้ Herpes viral DNA เพื่อใช้ในการทดลองดังกล่าว โดยได้อยู่ในระหว่างการปรับเปลี่ยนตัวแปรต่าง ใน PCR reaction เพื่อให้สามารถสร้างส่วน complete coding sequence ของ Thymidine kinase gene ซึ่งมีขนาด 1131 bp ได้ จากนั้นจึงนำส่วนของ cDNA โคลนเข้าสู่ Lentiviral vector ต่อไป

6. อภิปรายและวิจารณ์ผล

การวิจัยนี้สามารถได้ผลการทดลองดังนี้

6.1 สามารถสร้างส่วน coding sequence ของ ยีน human erythropoietin ได้สำเร็จ

6.2 สามารถตัดต่อส่วนของยีนดังกล่าวเข้าสู่ Lentiviral vector

6.3 สามารถสร้าง Lentiviral vector จาก packing cells ได้สำเร็จ

6.4 สามารถ transduce Lentiviral vector ที่ผลิตได้เข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้สำเร็จ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เทคนิค การกระตุ้นการทำงานของยีน ในเซลล์มนุษย์ โดยการใช้ Lentiviral vector เป็นพาหะ นั้น เป็นเทคนิค ที่มีประสิทธิภาพสูง ในคุณลักษณะต่างๆ

โดยเฉพาะในด้านประสิทธิภาพการนำพาเข้าสู่เซลล์ เป้าหมาย โดยเฉพาะเซลล์มนุษย์ ซึ่งสูงกว่า Non-viral vector นอกจากนี้ยังสามารถ กระตุ้นการแสดงออกของยีนในเวลานานกว่า viral vector อื่นๆ เนื่องจากความสามารถในการแทรกตัวเข้าสู่ genome ของ เซลล์

ดังนั้นการใช้ Lentiviral vector จึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำนาาประยุกต์ ใช้ในการรักษาโรค ที่ต้องการให้มีการแสดงออกของยีนเป็นเวลานาน เช่น genetic disease และ การรักษาภาวะเสื่อมหรือ ถูกทำลายของเซลล์ อย่างถาวร เช่น ภาวะไตวาย ที่สนใจในการศึกษานี้ เป็นต้น

7. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

7.1 สรุปผลการทดลอง

การวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการรักษาภาวะโลหิตจางเรื้อรัง ในผู้ป่วยไตวาย โดยใช้เทคนิค gene therapy ในการกระตุ้นการทำงานของ ยีน erythropoietin ในเซลล์ผู้ป่วยเอง เพื่อลดปัญหาการรักษาแบบเดิม ที่ใช้การฉีด โปรตีน erythropoietin ในการทดลองนี้เลือกใช้ Lentiviral vector เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีหลายประการดังกล่าวแล้ว ผลการทดลองจากการทำวิจัย ในระยะ 10 เดือน จากระยะเวลาทั้งหมด 2 ปี พบว่าได้มีการดำเนินการเป็นไปตามแผนที่ตั้งไว้ และมีผลการทดลองที่

เป็นไปตามที่คาดไว้ สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ ซึ่งได้แก่การสามารถสร้าง Lentiviral vector ที่มีส่วนของยีน human erythropoietin ได้สำเร็จ และหลังการนำ Lentiviral vector ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ พบว่ามีประสิทธิภาพสูง ในการเข้าสู่เซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่แสดงให้เห็นว่า Lentiviral vector มีความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ทั้งชนิดที่เป็น dividing and non-dividing cells

ในระยะ เวลาประมาณ 14 เดือนของโครงการจะปีนการทดสอบเพื่อดูประสิทธิภาพของ การแสดงออกของยีน erythropoietin และผลการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง จาก human hematopoietic stem cells ผลการศึกษาที่ได้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปรักษา ในมนุษย์ ต่อไป

7.2 งานตามโครงการที่จะทำต่อไป

เดือนที่ 7-12

- สร้าง DNA of Thymidine kinase gene โดยเทคนิค PCR
- Clone complete Thymidine kinase coding sequence เข้าสู่ pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector โดยใช้ LR recombinase technology
- Transfect pLenti 7.3/V5-DEST Gateway vector เข้าสู่ packaging cells (293T/17 cells) ร่วมกับ packaging vectors ที่ประกอบด้วย pLP1, pLP2, pLP/VSV vectors
- นำ viral vector transducer เข้าสู่ เซลล์ human fibroblast
- คัดเลือกเซลล์ (clone) ที่มี lentiviral vector ที่ต้องการ โดยใช้ วิธี flow cytometry
- เลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ human fibroblast

เดือนที่ 13-18

- ตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน erythropoietin ระดับ RNA และ โปรตีน โดย real-time PCR and ELISA

เดือนที่ 19-24

- ทดสอบประสิทธิภาพของ erythropoietin ต่อการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือด

แดงใน In vitro

- ตรวจสอบระบบ suicide gene
- สรุปผลการทดลองเตรียม manuscript เพื่อตีพิมพ์

8. บรรณานุกรม

1. Eschbach JW, Haley NR, Adamson JW. The anaemia of chronic renal failure: pathophysiology and effects of recombinant erythropoietin. *Contributions Nephrol* 1990;78:24-36
2. Zehnder C, Zuber M, Sulzer M, Meyer B, Straumann E, Jenzer HR, Blumberg A. Influence of long – term amelioration of anemia and blood pressure control on left ventricular hypertrophy in hemodialyzed patients. *Nephrology* 1992;61(1):21-5
3. อุษณา ฤวิระ. Renal replacement therapy in Thailand. Hemodialysis and CAPD บรรณาธิการ:
อุษณา ฤวิระ, พรพรรณบุปผา ชูวิเชียร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ:เวชสาร, 1993:137-59.
4. Cannella G, LaCanna G. Sandrini M, Gaggiotti M, Nordio G, Movilli E, Maiorca R. Renormalization of high cardiac output and of left ventricular size following long – term recombinant human erythropoietin treatment of anemic dialyzed uremic patients. *Clin Nephrol* 1990;34(6):272-8
5. Ofsthun N, Labrecque J, Lacson E, Keen M, Lazarus JM. The effect of higher hemoglobin level on mortality and hospitalization in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2003; 63:1980-1984
6. Avram MM, Blaustein D, Fein PA, Goel N, Chattopadhyay J, Mittman N. Hemoglobin predicts long-term survival in dialysis patients: a 15-year single-center longitudinal study and a correlation trend between prealbumin and hemoglobin. *Kidney Int Suppl.* 2003 Nov;(87):S6-11
7. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity, and mortality in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1996 Jul;28(1):53-61.
8. Besarab A. Physiological and pharmacodynamic considerations for route of EPO administration. *Semin Nephrol.* 2000;20: 364-374
9. Bennett CL, Luminari S, Nissenson AR, et al. Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N Engl J Med.* 2004;351: 1403-1408
10. Lippin Y, Dranitzki-Elhalel M, Brill-Almon E, Mei-Zahav C, Mizrachi S, Liberman Y, Iaina A, Kaplan E, Podjarny E, Zeira E, Harati M, Casadevall N, Shani N, Galun E:

- Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure *Blood* 2005; 106:2280-2286
11. Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood*. 1989 Jul;74(1):103-9.
 12. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*. 1990 Apr 20;248(4953):378-81
 13. Watkins PC, Eddy R, Hoffman N, Stanislovitis P, Beck AK, Galli J, Vellucci V, Gusella JF, Shows TB. Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7pter----q22. *Cytogenet Cell Genet*. 1986;42(4):214-8.
 14. Powell JS, Berkner KL, Lebo RV, Adamson JW. Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Sep;83(17):6465-9
 15. Law ML, Cai GY, Lin FK, Wei Q, Huang SZ, Hartz JH, Morse H, Lin CH, Jones C, Kao FT. Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Sep;83(18):6920-4
 16. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985 Feb 28-Mar 6;313(6005):806-10.
 17. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985 Feb 28-Mar 6;313(6005):806-10.
 18. Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene
 19. Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem*. 1986 Mar 5;261(7):3116-21
 20. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, Caro J, Graber SE. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood*. 1989 Aug 1;74(2):645-51
 21. Denny WF, Flanigan WJ, Zukoski CF 3rd. Serial erythropoietin studies in patients undergoing renal homotransplantation. *J Lab Clin Med*. 1966 Mar;67(3):386-97

22. Emerson SG, Yang YC, Clark SC, Long MW. Human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3 have overlapping but distinct hematopoietic activities.
J Clin Invest. 1988 Oct;82(4):1282-7
23. Emerson SG, Sieff CA, Wang EA, Wong GG, Clark SC, Nathan DG. Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity.
J Clin Invest. 1985 Sep;76(3):1286-90
24. Sawyer ST, Koury MJ: Erythropoietin requirement during terminal erythroid differentiation: The role of surface receptor for erythropoietin. J Cell Biol 105:191a, 1987 (abstr, suppl)
25. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. Nephrol Dial Transplant. 1999;14 Suppl 2:22-8. Review
26. Verhelst D, Rossert J, Casadevall N, Kruger A, Eckardt KU, Macdougall IC. Treatment of erythropoietin-induced pure red cell aplasia: a retrospective study. Lancet. 2004;363: 1768-1771
27. Einbinder T, Sufaro Y, Yusim I, et al. Correction of anemia in uremic mice by genetically modified peritoneal mesothelial cells. Kidney Int. 2003;63: 2103-2112
28. Osada S, Ebihara I, Setoguchi Y, Takahashi H, Tomino Y, Koide H. Gene therapy for renal anemia in mice with polycystic kidney using an adenovirus vector encoding the human erythropoietin gene. Kidney Int. 1999;55: 1234-1240
29. Bohl D, Heard JM. Delivering erythropoietin through genetically engineered cells. J Am Soc Nephrol. 2000;11(suppl 16): S159-162
30. Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, et al. Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. Blood. 2004;103: 3303-3304.
31. Gao G, Lebherz C, Weiner DJ, et al. Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. Blood. 2004;103: 3300-3302
32. Bohl D, Bosch A, Cardona A, Salvetti A, Heard JM. Improvement of erythropoiesis in beta-thalassemic mice by continuous erythropoietin delivery from muscle. Blood. 2000;95: 2793-2798
33. Dalle B, Payen E, Regulier E, et al. Improvement of mouse beta-thalassemia upon erythropoietin delivery by encapsulated myoblasts. Gene Ther. 1999;6: 157-161

34. Nishihara E, Nagayama Y, Narimatsu M, Namba H, Watanabe M, Niwa M, Yamashita S. Treatment of thyroid carcinoma cells with four different suicide gene/prodrug combinations in vitro. *Anticancer Res.* 1998 May-Jun;18(3A):1521-5.

ส่วนประกอบตอนท้าย

สรุปภาพรวมของแผนงาน

ภาวะซีดถือเป็นภาวะที่สำคัญที่พบในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง ซึ่งส่งผลกระทบให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยลดลงเป็นอย่างมากและเป็นสาเหตุของการเกิดอาการข้างเคียงอื่นตามมาเพิ่มขึ้น การรักษาภาวะโลหิตจางในผู้ป่วยไตวายจึงนับเป็นส่วนสำคัญในการดูแลผู้ป่วย ให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น และลดอัตราการตายลง อย่างไรก็ตามการรักษาโดยการฉีดอีรีโทรพอยอีติน พบว่ามีข้อด้อยบางประการ ได้แก่ ราคาที่สูง ระดับที่ไม่สม่ำเสมอในเลือด และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน การวิจัยนี้จึงได้มุ่งพัฒนาการรักษาโดยวิธียีนบำบัดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง โปรตีน erythropoietin ในเซลล์ผู้ป่วยเอง โดยใช้ Lentiviral vector ในการนำพาเข้าสู่เซลล์ ไฟโบรบลาสต์ ผลการทดลองสามารถสร้าง Lentiviral vector ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ ยีน erythropoietin ได้สำเร็จ และได้ทดสอบประสิทธิภาพในการนำเข้าสู่เซลล์ พบว่า Lentiviral vector สามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ ในระดับที่สูงพอในการนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ในการคลินิก ซึ่งจะช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาแบบวิธีเดิมลงได้เป็นอย่างมาก และยังมีประสิทธิภาพในการรักษาที่สูงกว่าเดิม ในที่สุดจะทำให้ผู้ป่วยไตวายจำนวนมากมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น และมีชีวิตที่ยืนยาวมากขึ้น

ประวัติคณะผู้วิจัย

CURRICULUM VITAE

Name: Chavaboon Dechsukhum.

อาจารย์ นพ. ดร. ชวบูลย์ เดชสุขุม

Address: Pathologist

School of Pathology

Institute of Medicine

Suranaree University of Technology

Office 044-223947 Mobile 081-6095528

EDUCATION BACKGROUND

Institution and location	Degree	Year	Field
Prince of Songkla University Hatyai, Songkhla, Thailand	M.D.	1984-1990	Medicine
Mahidol University Bangkok, Thailand	Diploma Thai Board	1990-1993	Anatomical Pathology
Medical College of Virginia/VCU Richmond, VA, USA	Ph.D.	1995-2000	Pathology
Medical College of Virginia/VCU Richmond, VA, USA	Post-doctoral fellow	2000-2001	Molecular Pathology

WORK EXPERIENCE

- Pathologist and lecturer, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Thailand (1993-1995)
- Post-Doctoral Fellow in Molecular Pathology of Cancer at the Department of Pathology, Faculty of Medicine, Medical College of Virginia campus of Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA (August 2000-April 2001)
- Lecturer and Pathologist, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University (May 2001-2008)
- Graduate program committee in Biomedical science, Prince of Songkla University (August 2001-2007)
- Chair, Research committee, Pathology Department, Prince of Songkla University (October 2001-2003)
- Lecturer and Pathologist, Institute of Medicine, Suranaree University of Technology (2008 present)
- Teaching Courses (last 5 years)
Undergraduate Courses in Medicine : 13 courses including 311-211, 311-221, 311-231, 311-232, 311- 251, 311-261, 311-311, 311-312, 311-321, 364-351, 388-421, 364-790 and 364-791

Graduate level of Biomedical Science and Board Certificate for Physician

364-950 Molecular Pathology

364-951 373-521 Mammalian Cell Biology

364-952 950-561 Applied Molecular Techniques

ACADEMIC AWARD

- Royal Thai Government Scholarship Award for Ph.D. Study in USA
- King Scholarship award
- Royal Ananthamahidol award
- Stem Cell Travelling award, International Society for Stem Cell Research 2008

LICENSE

- Medical License: Thailand
- Board Certificate of Anatomical Pathology: Thailand

MEMBERSHIP

- Thai Medical Association
- Association of Pathologist (Thai)
- Asian-Pacific Society for Molecular Immunohistology
- International Society for Stem Cell Research

PUBLICATIONS

1. Dechaphunkul A, Kanngurn S, Dechsukhum C, Tanutit P, Khow-Ean U, Sunpaweravong P The significance of galectin-3 immunohistochemistry, clinical characteristics and liver imaging in differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from adenocarcinoma liver metastasis Journal of Medical Association of Thailand. 2010. May;93(5):523-8
2. Phoophitphong T, Hanprasertpong J, Dechsukhum C, Geater A. Correlation of angiogenesis and recurrence-free survival of early stage cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy with pelvic lymph node dissection. J Obstet Gynaecol Res. 2007. 33(6):840-8.
3. Ruxapon Navakanit, Potchanapond Graidist, Wilairat Leeanansaksiri, Chavaboon Dechsukhum. 2007. Growth Inhibition of Breast Cancer Cell Line MCF-7 by siRNA Silencing of Wilm Tumor 1 Gene. Journal of Medical Association of Thailand. 2007. Nov;90(11):2416-21.
4. Wilairat Leeanansaksiri, Chavaboon Dechsukhum. Regulation of Stem Cell Fate in Hematopoietic Development. J. Med.Asso.Thailand. , 2006 89 (10) : 1788-1797.
5. Netinatsunthorn W, Hanprasertpong J, Dechsukhum C, Leetanaporn R, Geater A. 2006. WT1 gene expression as a prognostic marker in advanced serous epithelial

ovarian carcinoma: an immunohistochemical study. BMC Cancer. 2006 Apr

11;6(1):90

6. Hirunpat S, Riabroi K, Dechsukhum C, Atcharyasathian V, Tanomkiat W:
Nasopharyngeal extension of globus tympanicum: An unusual clinical and imaging
manifestation. AJNR Am J Neuroradiol. 2006. 27(9):1820-2.
7. Wandee Khaimook, Siriporn Hirunpat, Chawaboon Dejsukum: Meningioma of the
Internal Auditory Canal: A Case Report. J Med Assoc Thai, 2005, 88:1707-1711
8. Atima Saetung, Arunporn Itharat, Chawaboon Dechsukum, Chatchai
Wattanapiromsakul, Niwat Keawpradub, Pranee Ratanasuwan: Cytotoxic Activity of
Thai Medicinal Plants for Cancer Treatment. Songkla J Sci Tech, 2005, 27:469-478.
9. Thitinan Tansathit, Saibua Chichareon, Sathana Tocharoenvanich, Chavaboon
Dechsukum: Diagnostic evaluation of Karman endometrial aspiration in patients
with abnormal uterine bleeding. J Obstet Gynaecol Res Gyn Res, 2005, 31:480-485.
10. Krittaya Kritpracha, Jitti Hanprasertpong , Verapol Chandeying, Chavaboon
Dechsukum, Alan Geater: Survival analysis in advanced epithelium ovarian
carcinoma in relation to proliferative index of MIB – 1 immunostaining. J Obstet
Gynaecol Res Gyn Res, 2005, 31:268-276
11. Dumur CI, Dechsukhum C, Ware JL, Cofield SS, Best AM, Wilkinson DS, Garrett
CT, Ferreira- Gonzalez A. Genome-wide Detection of LOH in Prostate Cancer
Using Human SNP Microarray Technology. Genomics 2003,81(3):260-9
12. Dumur CI, Dechsukhum C, Wilkinson DS, Garrett CT, Ware JL, Gonzalez AF:
Analytical validation of a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction
quantitation of different transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1).
Anal Biochem 2002, 309(1):127-36
13. Damon SE, Plymate SR, Carroll JM, Sprenger CC, Dechsukhum C, Ware JL,
Roberts CT: Transcriptional regulation of IGF-I receptor gene expression in prostate
cancer cells. Endocrinology 2001,142: 21-7.
14. Dechsukhum C, Ware JL, Gonzalez AF, Wilkinson DS, Garrett CT: Detection of
novel truncated WT1 transcript in human neoplasia. Mol Diag 2000,5:117-28.

15. Antisook C, Dechsukhum C, Sthapanachai C, Wongwisitsak N. Hepatocellular carcinoma: Correlation of histological grading with immunohistochemical identification of proliferative hepatocyte with PC10. Siriraj Hospital Gazette 1999; 51:71-6

PATENT PENDING (จดสิทธิบัตร)

“A nucleic acid marker of cancer” Serial No.09/434,620, filed Nov.5, 1999

Joy L Ware, Chavaboon Dechsukhum, Carleton T Garrett

(Detection of novel WT1 transcript in human malignancy, including prostate, breast cancer and acute leukemia)

ABSTRACTS

1. Dechsukhum C, Ware JL, Gonzalez AF, Wilkinson DS, Garrett CT: Possible role of WT1 in human neoplasia. Presented at FASEB meeting New Orlenes, April 1997.
2. Dechsukhum C, Ware JL, Gonzalez AF, Wilkinson DS, Garrett CT: Wilms' tumor (WT1) gene expression as a possible marker of tumor aggressiveness. Presented at AMP annual meeting, Baltimore MD, November 1997.
3. Dechsukhum C, Ware JL, Gonzalez AF, Wilkinson DS, Garrett CT: Possible role of Wilms' tumor suppressor gene expression in prostate cancer cell behavior. Presented at AACR annual meeting, New Orlenes LA, March 1998.
4. Dechsukhum C, Ware JL, Gonzalez AF, Wilkinson DS, Garrett CT: Detection of novel WT1 transcripts with an intronic start site in human prostate cancer cell lines. Presented at AACR annual meeting, Philadelphia PA, April 1999.
5. WT1 silencing by siRNA inhibited growth of breast cancer cell. Annual national meeting of graduate students. Chulalongkorn University, 2006
6. Cord blood stem cell fate regulation by Id1. ISSRC annual meeting, Philadelphia PA, USA 2008
7. Differentiation of human embryonic stem cell into insulin producing cells. ISSCR annual meeting, Barcelona, Spain 2009

8. Expansion of human placental mesenchymal stem cells. Third international congress on stem cells and tissue formation, Dresden, Germany, 2010

2. ผู้ร่วมวิจัย

Name: Ms. Wilairat Leeanansaksiri

Current Appointment : Faculty Member at School of Microbiology,
Chair: Research Center for Transplantation and Gene
Therapy Technology

Contact Address: School of Microbiology

111 University Avenue

Suranaree University of Technology

Maunag District, Nakhon Ratchasima

Thailand, 30000

Tel: 66-44-224628 Fax: 66-44-224633

E-mail: wilairat@sut.ac.th

Other Appointments: Chair: Research Center for Transplantation and Gene Therapy
Technology

Representative: CRN Microbiology- SUT

Vice Chair: School of Biology

Education

1988 - 1992 Khon Kaen University, Thailand
B.Sc. (Medical Technology)

1992 - 1995 Khon Kaen University, Thailand
M.Sc. (Medical Biochemistry)

1996 - 2001 Medical College of Virginia,

Virginia Commonwealth University, USA

Ph.D. (Microbiology and Immunology)

2002-2004

National Institute of Health, USA

Postdoctoral Fellow

(Stem Cell Regulation, Gene Therapy and Transplantation)

2005

Oregon National Primate Center

Visiting Scientist at Dr. Don P. Wolf Laboratory

(Stem Cell Regulation and Fertilization)

Publications and Abstracts:

1. Wilairat Leeanansaksiri PhD, Chavaboon Dechsukhum MD, PhD2006. Regulation of Stem Cell Fate in Hematopoietic Development. J. Med.Asso.Thailand . October 89 (10) : 1788-1797.
2. Leeanansaksiri W, Wang H, Gooya JM, Renn K, Abshari M, Tsai S, Keller JR. 2005. IL-3 induces inhibitor of DNA-binding protein-1 in hemopoietic progenitor cells and promotes myeloid cell development. J Immunol. Jun 1;174(11):7014.
3. Leeanansaksiri,W., Dechsukhum C. Embryonic and Somatic Stem Cell Fate Regulation. 2005. Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology Conference.1:13.
4. Wilairat Leeanansaksiri, Hui Wang, John Gooya, Katie Renn, Chavaboon Dechsukhum, Jonathan Keller. 2005. Hematopoietic stem cell fate regulation and cancer. Proceedings of the first annual meeting of Asia-pacific society for molecular immunohistology. 1:12.
5. Wilairat Leeanansaksiri, Shirley K. DeSimone, Thomas Huff, Ewald Hanappel, and Thomas F. Huff. 2004. Thymosin β_4 and its N-terminal tetrapeptide, AcSDKP, inhibit proliferation, and induce dysplastic, non-apoptotic nuclei and degranulation of mast cells. Chemistry & Biodiversity. 1:1091.
6. W. Leeanansaksiri, H. Wang, J. Gooya, K. Renn, J. R. Keller. 2004. Role of Id1 in Hematopoietic stem cell fates, Proliferation and Immortalization. Hematopoiesis: 56.

7. Wilairat Leeanansaksiri, Hui Wang, John Gooya, Katie Renn, Jonathan R. Keller. 2003. Role of Id1 in Proliferation and Immortalization of Stem Cells and Role of Id1 in Myeloid versus Lymphoid and Erythroid Cell Fates. *Blood. J. American Society of Hematology* 1:133.
8. Suh H-C, Heath V, Holman M, Ortiz M, Gooya J, Renn K, Leeanansaksiri W, Friedman A, Johnson P, and Keller J. 2003. C/EBPalpha is required for common myeloid progenitor (CMP) differentiation and inhibits erythroid development. *Molecular Aspects of Myeloid Stem Cell Development and Leukemia*. 5: 49.
9. Leeanansaksiri W, Wang H, Gooya JM, and Keller JR. 2003. IL-3 Induction of HLH protein Id1 in purified hematopoietic stem cells: A role for Id1 in myeloid versus lymphoid and erythroid cell fates. *Molecular Aspects of Myeloid Stem Cell Development and Leukemia*. 5: 13.
10. W. Leeanansaksiri, T. Paisley, A. Gonzalez, T. F. Huff. 2001. Role of a new Dominant negative GATA-2 isoform in mast cell development. *FASEB J*. 15 (4): 653.
11. Leeanansaksiri, W., Paisley, T.E., and Huff, T.F. 1999. Expression of GATA-2 Isoforms in Mast Cells And Mast Cell Lines. *FASEB J*. 13 (4): 35.
12. S.K. DeSimone, G. Klisch, W. Leeanansaksiri, and T. F. Huff. 1999. Does High Cell Density Culture of Yolk Sac Cells Increase Proliferation or Change Their Differentiation to Mast Cells? *FASEB J*. 13 (4): 335.
13. W. Leeanansaksiri, S. DeSimone, G. Klisch, T. Paisley, and T.F. Huff. 1998. Effect of thymosin β 4 and its N-terminal tetrapeptide AcSDKP on mast cell proliferation and degranulation. *FASEB J*. 12(5): 897.
14. S. DeSimone, T. Paisley, G. Klisch, W. Leeanansaksiri, and T.F. Huff. 1998. Differentiation of murine stem cells to mast cells: Comparison of embryonic stem, yolk sac, fetal liver, and bone marrow cells. *FASEB J*. 12(5): 895.
15. Leeanansaksiri, W., C. Wongkham, W. Maleewong, P. Intapan. Characterization of a specific DNA fragment of *Paragonimus heterotremus*. 1994. *Proceeding of the Federation of Asian and Oceanian Biochemistry and Molecular Biology*. November: 108.
16. Wilairat Leeanansaksiri and Sopit Wongkham. 1994. Ribozyme. *J. Med. Tech*.

Ass.of Thailand. 22(1): 65.

Papers in preparation

1. Wilairat Leeanansaksiri, Thomas E. Paisley, Thomas F. Huff. A naturally occurring alternatively spliced isoform of murine GATA-2 inhibits embryonic stem cell derived mast cell phenotype.
2. Leeanansaksiri W, Gooya J, Renn K, Keller JR. Role of Id1 in hematopoietic progenitor immortalization.
3. Wilairat Leeanansaksiri. Regulation of hematopoietic stem cell fate.
4. Wilairat Leeanansaksiri, John Gooya, Katie Renn, Jonathan R. Keller. Id1 as target for gene therapy of leukemia.
5. Wilairat Leeanansaksiri, Thomas E. Paisley, Thomas F. Huff. Quantitative real time RT-PCR of protease genes in embryonic stem cell derived mast cell.
6. Wilairat Leeanansaksiri, Chavaboon Dechsukhum, Srila Sumpao. Potential of EGFR as a marker in metastasis of human breast cancer.

Teaching courses

Undergraduate Level

Microbiology for Public Health
Microbiology for Institute of Agriculture
Microbiology and Parasitology
Man and Environment
Principles of Biology II
Principles of Biology Laboratory II
Biochemistry Laboratory
Medical Microbiology and Parasitology
Medical Immunology
Medical Immunology Laboratory
Medical Microbiology
Medical Microbiology Laboratory

Graduate level

Stem Cell Biology
Stem Cell in Medicine
Stem Cell Therapy I
Stem Cell Therapy II
Stem Cell Therapy III
Stem Cell Technology
Principles in Molecular Biology Techniques
Immunology
Cell Biology
Advance Food Microbiology
Advance Medical Biochemistry, Stem Cell (Medical School, KKU)
Special Topic in Dentistry, Stem Cell (Dental School, KKU)
Special Topic in Immunology
 Special Topic in Immunology (Advance)
Special Topic in virology
 Special Topic in Bacteriology

Teaching experiences for undergraduation and graduation schools

1. Dental school, Medical College of Virginia-Virginia Commonwealth University, USA
2. Medical school, Khon Kaen University, Thailand
3. Dental school. Kohn Kaen University, Thailand
4. Suranaree University of Technology, Thailand

Professional Membership

1. American Association for the Advancement of Science
2. Association of Medical Technologist of Thailand
3. Science Association of Thailand
4. National Cancer Registrars Association, USA
5. International Society for Stem Cell Research

6. Asian-Pacific Society for Molecular Immunohistology

7. Asian Reproductive Society

License

Medical Technologist since 1992 : Thailand

Academic awards

1993-1994	The National Science and Technology Development Agency Award
1995	Graduate Research Award, Khon Kaen University
1996-2001	The Royal Thai Scholarship Award for Ph.D. in USA/Canada
2001	Young Faculty Research Grant, SUT
2002-2004	Postdoctoral Fellowship, NIH, USA
2003	American Society of Hematology Traveling Award, USA
2004	Excellent Research Award (Stem cell), USA
2005	National Research Institute of Thailand
2006	Thailand Research Fund
2006	National Research Council of Thailand

Invited Speaker

For International Meeting and University

1. Experimental Biology Meeting, USA. 2001
2. Fifth International Meeting on Myeloid Stem Cell Development and Leukemia, USA, 2003
3. American Society of Hematology Meeting, USA, 2003.
4. National Institute of Health, USA, 2004
5. The First Asia-Pacific Society For Molecular Immunology Meeting, China, 2005.
6. The 2nd Asian Reproductive Biotechnology Conference, Thailand. 2005.

For Thailand

1. Annual Meeting, Medical School, Khon Kaen University, 2001.

2. School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, 2001.
3. Special Seminar, Biology Olympian Camp II, Suranaree University of Technology, 2002.
4. Special Seminar Section, Teacher Academic Training Conference, Nakorn Ratchasima, Thailand, 2002.
5. Department of Biochemistry, School of Medicine, Khon Kaen University, 2002.
6. Department of Biochemistry, School of Medicine, Khon Kaen University, 2004.
7. School of Dentistry, Khon Kaen University, 2004.
8. School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 2005.
9. School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, 2005.
10. School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, 2005.
11. The First Annual Meeting on Gene Therapy, Cancer and Holistic Medicine, School of Microbiology, Suranaree University of Technology, 2005.
12. Research Center, SUT, 19 October, 2006.
13. Medical Technology Associated of Thailand and Gibthai, October 28, 2006