

หน้าสรุปโครงการวิจัย (Executive Summary)

ชื่อโครงการ: การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เพื่อการกระตุ้นการเจริญพัฒนาของเซลล์คอนโดรซัยต์

Project Title: Production of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) for Stimulation of Chondrocyte Development

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : อาจารย์ ดร. วราภรณ์ เกษกาญจน์

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคหรือภาวะความผิดปกติที่ความสัมพันธ์กับกระดูกและกระดูกอ่อน เป็นปัญหาสุขภาพของผู้สูงอายุที่สำคัญของประเทศต่างๆทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย โดยปัจจุบันมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากจำนวนประชากรผู้สูงอายุในประเทศที่เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีความรู้และการบริการทางการแพทย์ที่ก้าวหน้าอย่างต่อเนื่อง และการรักษามีค่าใช้จ่ายสูงซึ่งเป็นปัญหาเป็นอย่างมากโดยเฉพาะประชากรในประเทศไทยซึ่งส่วนใหญ่มีรายได้น้อย อย่างไรก็ตามการรักษารโรคหรือซ่อมแซมภาวะความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับสัมพันธ์กับกระดูกและกระดูกอ่อน มักมีข้อจำกัดเนื่องจากการขาดระบบหลอดเลือดที่มาเลี้ยงเซลล์ เซลล์มีปริมาณน้อย การเจริญเติบโตของเซลล์รวมถึงเนื้อเยื่อต่างๆภายนอกเซลล์ ซึ่งใช้เวลานาน ทำให้กระบวนการรักษาหรือซ่อมแซมเนื้อเยื่อเหล่านี้ในภาวะปกติจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาที่ยาวนานมาก และปัญหาพบได้มากขึ้นในกลุ่มผู้สูงอายุซึ่งมีความเสื่อมถอยของประสิทธิภาพการเจริญพัฒนาของกระดูกและเนื้อเยื่อรอบกระดูก

ในปัจจุบันมีการรายงานว่ากลุ่มของโปรตีนที่เรียกว่า Bone morphogenetic proteins (BMPs) มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโต การเจริญพัฒนาของเซลล์กระดูกและเนื้อเยื่อรอบกระดูก รวมถึงการซ่อมแซมโครงสร้างของกระดูก และสมานบาดแผลที่เกิดจากความผิดปกติของกระดูก นอกจากนี้ยังพบว่าควบคุมการเปลี่ยนแปลงหรือเจริญพัฒนาของเซลล์ (differentiation factors) มีผลทำให้เซลล์ต้นกำเนิด (mesenchymal stem cells) สามารถแทรกซึมเข้าสู่บริเวณที่จะมีการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาทดแทน ดังนั้นจึงได้มีการนำความรู้นี้มาประยุกต์ใช้ในการแพทย์ โดยมีการนำโปรตีนชนิดนี้มา ร่วมกับการรักษาทางออร์โธปิดิก โดยช่วยในการรักษาโดยตรง หรือช่วยส่งเสริมการยึดเกาะระหว่างวัสดุที่ใช้สำหรับโครงร่างกระดูกและเนื้อเยื่อที่ล้อมรอบวัสดุนั้น การนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการรักษาที่มีความจำเป็นต้องกระตุ้นการสร้าง การซ่อมแซม และการเจริญเติบโตของกระดูกขึ้นมาใหม่ อย่างไรก็ตามระบบการเสริมสร้างของกระดูกและกระดูกอ่อนในผู้สูงอายุจำนวนมากมักมีปัญหาด้านระยะเวลาซึ่งต้องใช้เวลานาน จึงมีแนวคิดในการส่งเสริมการรักษาโดยใช้โปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูก (Osteoinductive proteins หรือ Growth factor) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการชักนำองค์ประกอบที่สำคัญต่างๆในการสร้างกระดูกและเนื้อเยื่อรอบกระดูกให้มีการ

เจริญเติบโต และมีการสร้างเนื้อเยื่อของกระดูกขึ้นมาใหม่ เพื่อช่วยลดระยะเวลาการรักษาและเพิ่มคุณภาพชีวิตต่อผู้สูงอายุ

มีรายงานการค้นคว้าวิจัยพบว่า Bone morphogenetic proteins ชนิดที่ 2 (BMP-2) ของมนุษย์มีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการนี้ โดยกระตุ้นการเจริญเติบโตและควบคุมการพัฒนาของเซลล์กระดูก กระดูกอ่อนตั้งแต่ในระยะตัวอ่อนจนกระทั่งการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกและกระดูกอ่อนอย่างสมบูรณ์ และยังพบว่าช่วยส่งเสริมการยึดเกาะระหว่างวัสดุที่ใช้เป็นโครงร่างของกระดูก และเนื้อเยื่อที่ล้อมรอบวัสดุนั้น มีการศึกษาวิจัยประสิทธิภาพของ BMP-2 ในสัตว์ทดลองหลายชนิด ร่วมกับตัวนำส่งชนิดต่าง ๆ เช่น คอลลาเจน hydroxyapatite หรือ biodegradable polymers พบว่าสามารถช่วยในการซ่อมแซมความบกพร่องของกระดูกได้ การศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการรักษาของ BMP-2 โดยทำให้มีการแผ่ขยายของโครงสร้างโพรงจมูก (maxillary sinus floor) การสร้างกระดูกขึ้นมาใหม่เฉพาะที่ (localized bone regeneration) การซ่อมแซมเนื้อเยื่อในช่องปาก (periodontal repair)

ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านพันธุวิศวกรรมโปรตีนทำให้สามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ในปริมาณที่สูงตามความต้องการ ทำให้สามารถมีโอกาสนำการพัฒนาการผลิตโปรตีนที่ต้องการที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพให้มีความบริสุทธิ์ปริมาณสูงเพียงพอที่จะสามารถนำไปสู่การพัฒนาเข้าสู่การรักษาทางคลินิกได้ ในต่างประเทศเริ่มมีการนำมาใช้รักษาในทางคลินิก แต่อย่างไรก็ดีในประเทศไทยยังไม่มี การนำโปรตีนชนิดนี้มาใช้ทางการแพทย์เนื่องจากมีราคาที่สูงมาก ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ในการรักษาสำหรับผู้ป่วยที่มีรายได้น้อยได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญและจำเป็นของการพัฒนาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิด Bone morphogenetic protein-2 บริสุทธิ์ที่ผลิตขึ้นได้เองในประเทศ เพื่อการรักษาและเพิ่มคุณภาพชีวิตให้กับผู้สูงอายุในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์ โดยทำการโคลนยีนที่แยกได้จากเซลล์กระดูกระยะตัวอ่อน ศึกษาการแสดงออกของยีน และแยกบริสุทธิ์โปรตีน โดยอาศัยเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย

3. สรุปผลการวิจัย

-ยีนที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์ถูกสกัดจากเซลล์กระดูกระยะตัวอ่อน (Human fetal osteoblast cell line) ทำการเตรียมอาร์เอ็นเอรวมและเปลี่ยนเป็น complementary DNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase ยีนขนาด 342 คู่เบสถูกเพิ่มจำนวนโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR)

-ยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ถูกเพิ่มตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoR* I, *Nco* I, กรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว และตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด Factor Xa ในบริเวณ

ปลายด้าน 5' และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *BamH* I และ *Hind* III ในบริเวณปลายด้าน 3' เพื่อประโยชน์ในการโคลนยีนและการแยกบริสุทธิ์

-การหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในพลาสมิดและเวกเตอร์พาหะสำหรับการแสดงออกของยีน ถูกวิเคราะห์โดยอาศัยเทคนิคการตรวจหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ เพื่อเป็นการพิสูจน์ลำดับเบสที่ถูกต้อง ลำดับเบสที่ได้ถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากลนานาชาติ ผลการวิเคราะห์พบว่า ชิ้นดีเอ็นเอมีลำดับเบสตรงกับยีน mature BMP-2 ของมนุษย์ 100% จึงสรุปได้ว่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ศึกษาคือ ดีเอ็นเอสำหรับยีน Bone morphogenetic protein-2 ของมนุษย์จริง

-การศึกษาแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์โดยอาศัยเวกเตอร์พาหะชนิดที่ไม่มี fusion protein ภายใต้ T7 promoter พบการแสดงออกของโปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ในรูปแบบ inclusion bodies ในส่วน pellet เท่านั้น ไม่พบการแสดงออกในส่วน supernatant เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ในขณะที่ผลการแสดงออกโดยอาศัยเวกเตอร์พาหะชนิดที่มี Thioredoxin fusion protein พบว่า มีการแสดงออกของ hBMP-2 ขนาด 28 กิโลดาลตัน ในรูปแบบทั้ง soluble protein และพบ inclusion bodies ในส่วน pellet สรุปได้ว่าการมี Trx fusion protein ร่วมอยู่ด้วยสามารถช่วยการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ให้สามารถผลิตในรูปแบบ soluble protein ได้

-คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ภายใต้การควบคุมของ lacUV5 promoter และ protein A promoter ในรูปแบบ soluble protein เมื่อมีการแสดงออกที่อุณหภูมิ 30°C ภายใต้การชักนำด้วย 1mM IPTG โดยสรุปได้ว่าการมี fusion protein ชนิด ZZ สามารถช่วยให้โครงสร้างและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ สามารถผลิตในรูปแบบ soluble protein ได้

-การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์สามารถใช้เทคนิค Ni-NTA affinity chromatography ได้

4. ผลงานที่ได้จากการวิจัย

- นำเสนอผลงานต่อที่ประชุมระดับนานาชาติในรูปแบบโปสเตอร์ หัวข้อ Molecular Cloning of Gene Encoding Human Bone Morphogenetic Protein-2 ในการประชุม The 2nd Thailand-Japan International Academic Conference (TJIA2009) "Integrated Research for Sustainable Development", 20th November 2009, Katsura Int'tech Center, Katsura Campus, Kyoto University, Japan (Abstract ในภาคผนวก)
- นำเสนอผลงานต่อที่ประชุมระดับชาติในรูปแบบโปสเตอร์ หัวข้อ Production of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in *Escherichia coli* ในการประชุม "นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว." ครั้งที่ 10 ระหว่างวันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (Abstract ในภาคผนวก)

5. ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

- ได้ยื่นสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์ และได้องค์ความรู้ในการศึกษารีคอมบิแนนท์โปรตีน Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์ โดยใช้เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยด้านกระดูกและกระดูกอ่อนต่อไป
- เผยแพร่ผลงานวิจัยประชุมระดับนานาชาติในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Molecular Cloning of Gene Encoding Human Bone Morphogenetic Protein-2” The 2nd Thailand-Japan International Academic Conference (TJIA2009): Integrated Research for Sustainable Development, November 20, 2009 ณ มหาวิทยาลัยเกียวโต เมืองเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น (Abstract ในภาคผนวก)
- เผยแพร่ผลงานวิจัยประชุมระดับชาติในรูปแบบโปสเตอร์ หัวข้อ Production of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in *Escherichia coli* ในการประชุม“นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 10 ระหว่างวันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (Abstract ในภาคผนวก)