

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัย เรื่อง “เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Embryonic Stem Cell)” เป็นโครงการต่อเนื่องซึ่งได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔ เพื่อต่อยอดการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ซึ่งดำเนินการต่อเนื่องมาตั้งแต่ปีงบประมาณ ๒๕๕๐

ในขั้นตอนของการดำเนินโครงการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้รับสนับสนุนเป็นอย่างดี ทำให้อุปสรรคต่างๆ ได้รับการแก้ไขและนำไปสู่ผลสำเร็จ ซึ่งขอขอบพระคุณ

ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล อธิการบดี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพุ คณบดี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศาสตราจารย์นายแพทย์อดิสร ภัทราดุลย์ อดีตคณบดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คุณพารณ อิศรเสนา ณ อยุธยา และ ดร.เสนาะ ชูนากุล บริษัทปูนซิเมนต์ไทย

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ยาใจ ณ สงขลา อดีตคณบดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตลอดจนคณาจารย์จากสถาบันในต่างประเทศที่ช่วยสนับสนุนในการพัฒนาเทคโนโลยี

Professor Outi Hovatta, Karolinska Institute, Sweden

Professor András Dinnyés, Hungary

Professor Shinichi Nishikawa, Deputy Director of RIKEN Center for Developmental Biology and
Group Director of the laboratory for Stem Cell, Japan

Professor Shin Kawamata, RIKEN Center for Developmental Biology, Japan

Dr. Doug Sipp, RIKEN Center for Developmental Biology, Japan

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพ.นิพัฏจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงมนตกานต์ ตันสถิตย์ รองหัวหน้าภาควิชาฝ่ายบริหาร
หัวหน้าหน่วย embryology ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บุคลากรหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสัตวศาสตร์-นิเวศวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุกท่านที่ช่วยสนับสนุนทางเทคนิค ทำหน้าที่สนับสนุนงานวิจัยซึ่งไม่สามารถสำเร็จลงได้หากปราศจากความช่วยเหลือของ
คุณเสาวรัตน์ โพธิ์ประดิษฐ์ ซึ่งช่วยบริหารจัดการงบประมาณวิจัย และจัดเตรียม ต้นฉบับรายงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม ๒๕๕๕

บทคัดย่อ

ถึงแม้เซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์ที่สร้างจากตัวอ่อน (human embryonic stem cells; hESCs) จะมีคุณสมบัติที่สำคัญคือสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆของร่างกาย อาจจะสามารถนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะเสื่อมของเซลล์หรืออวัยวะต่างๆได้ในอนาคต แต่ข้อจำกัดที่สำคัญของการนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมาใช้ คือ การต่อต้านเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ไม่ได้สร้างมาจากเซลล์ของผู้ป่วยเอง

ในอดีตได้มีความพยายามในการนำเทคนิคการย้ายฝากนิวเคลียส (nuclear transfer) มาใช้ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยย้ายนิวเคลียสจากเซลล์ร่างกายของผู้ป่วย ไปใส่ไข่ตัวรับ (recipient oocyte), กระตุ้นให้ไข่แบ่งตัวจนถึงระยะบลาสโตซิสต์, แยกกลุ่มเซลล์อินเนอร์เซลล์แมส (inner cell mass; ICM) และเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จนเจริญเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน วิธีนี้เคยได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก รวมทั้งคณะผู้วิจัยด้วย อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อจำกัดของจำนวนไข่ที่ต้องใช้ และความยากทางด้านเทคนิค จนกระทั่งนักวิจัยชาวญี่ปุ่นค้นพบวิธีการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ร่างกาย ให้กลับไปมีคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน โดยไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อน จึงทำให้นักวิจัยทั่วโลก ให้ความสนใจและทำวิจัยทางด้านนี้นั้นเป็นจำนวนมาก

เช่นเดียวกับคณะผู้วิจัย หลังจากได้ทดลองทำการสร้างตัวอ่อนด้วยเทคนิคการย้ายฝากนิวเคลียส แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการสร้างตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ จึงไม่สามารถแยกเซลล์อินเนอร์เซลล์แมส และสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนด้วยเทคนิคการย้ายฝากนิวเคลียสได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการเปลี่ยนแผนการดำเนินงานวิจัย โดยมีจุดมุ่งหมายในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ร่างกาย ด้วยความร่วมมือกับห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิด และ เซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสถาบันวิจัย RIKEN เมืองโกเบ ประเทศญี่ปุ่น คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์เลือดจากสายสะดือ ด้วยการ ใช้ Sendai virus และ episomal vectors ซึ่งถือว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำที่ได้จากทั้งสองวิธีนี้เป็น เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำที่มีความปลอดภัยเพราะเป็น transgene-free และเหมาะสมในการนำมาใช้ในทางคลินิกเป็นอย่างมาก ในอนาคต

Derivation of human induced pluripotent stem cells from CD34+ cells derived from cord blood

Abstract

Although human embryonic stem cells (hESCs) has the ability to differentiate into several cell types of human body, and hESCs can possibly be used for cell replacement therapy in the future, but the major obstacle of using hESCs is immunorejection.

There were several attempts to create human embryos by nuclear transfer (NT) technique. These NT-derived embryos were used for isolation of the inner cell mass (ICM) and subsequent derivation of hESCs. Due to the lack of donated oocytes and technical difficulty, researchers including us failed to generate hESCs by this technique. Until the discovery of Japanese researchers about generating the pluripotent stem cells by inducing somatic cells, these induced cells shows similar characteristic as hESCs. This finding caught the attention of researchers around the world.

Our group had tried but failed to generate human embryos by using NT technique. Thus, we couldn't generate NT-derived hESCs as proposed. We changed the plan and focused on generating of hiPSCs with the collaboration with the researchers from the laboratory of stem cell and cell therapy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and RIKEN institute, Kobe, JAPAN. We successfully generated hiPSCs from cord blood cells by using temperature sensitive Sendai virus and episomal vectors. These hiPSCs are considered as the transgene-free hiPSCs which is suitable for using in clinical trial or therapeutic purposes in the future.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	๑
บทคัดย่อภาษาไทย.....	๒
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๓
สารบัญเรื่อง.....	๔
สารบัญภาพ.....	๕
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	๖
บทนำ (Introduction).....	๗
เนื้อเรื่อง (Main Body)	
ขั้นตอนและวิธีดำเนินงาน (Materials & Methods).....	๘
ผลการวิจัย.....	๑๒
อภิปรายผลการวิจัย.....	๒๐
สรุป.....	๒๒
บรรณานุกรม(Bibliography).....	๒๓
ภาคผนวก(Appendix).....	๒๖
<i>Eighteen-Year Cryopreservation Does Not Negatively Affect the Pluripotency of Human Embryos : Evidence from Embryonic Stem Cell Derivation. BioResearch Open Access. 2012;1(4):1-8</i>	
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	๓๗

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ ๑ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย Sendai virus TS7	๑๓
รูปที่ ๒ ลักษณะของ เซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย Sendai virus ทั้ง 5 สายพันธุ์ 13PFX1, 13PFX2, 13PFX3, 13PFX4 และ 13PFX5	๑๔
รูปที่ ๓ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย episomal vectors และ electroporation	๑๕
รูปที่ ๔ ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย episomal vector และ electroporation	๑๖
รูปที่ ๕ การแสดงออกของ Sendai viral genes, pluripotent genes และ house keeping gene ของเซลล์ CD34+	๑๗
รูปที่ ๖ การแสดงออกของ pluripotent markers ด้วยวิธีการย้อมสีทางอิมมูโน	๑๘
รูปที่ ๗ การเปลี่ยนแปลงของ surface markers ของ 13PFX1 เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงเป็น hematopoietic lineage	๑๙
รูปที่ ๘ ลักษณะโครโมโซมของเซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 13PFX1	๒๐

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulphoxide
EB	embryoid body
FBS	fetal bovine serum
hESCs	human embryonic stem cells
HFF	human foreskin fibroblast
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iPSCs	induced pluripotent stem cells
PBS	phosphate buffer saline
PFA	paraformaldehyde
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
SeV	Sendai Virus
SSEA-4	stage specific embryonic antigen-4
TRA-1-60	tumor recognition antigen-1-60
TRA-1-81	tumor recognition antigen-1-81

๑. บทนำ

ปัจจุบัน เซลล์ต้นกำเนิด (Stem Cells) เป็นกลุ่มเซลล์ที่ได้รับความสนใจจากแพทย์ นักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ และประชาชนทั่วไปเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เพราะเซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติที่สำคัญคือการแบ่งตัวได้เรื่อยๆ หรือ ไม่มีขีดจำกัด ในสภาวะที่เหมาะสม และนักวิจัยสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ เช่น เซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ หรือ เซลล์ที่สร้างเซลล์เม็ดสีในชั้นเรตินาของตา เป็นต้น (Lu and Yang, 2011; Torrez et al., 2012; Kuroda et al., 2012) ด้วยลักษณะพิเศษดังกล่าว ทำให้มีความคาดหวังในการที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากสภาวะเสื่อมของอวัยวะต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นโรคที่เกิดความบกพร่องของระบบเลือด โรคที่เกี่ยวกับความเสียหายหรือ เสื่อมของเซลล์ในระบบประสาท อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน มีเพียงการรักษาโรคในระบบเลือดโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากไขกระดูกที่ประสบความสำเร็จ และได้รับการยอมรับในทาง การแพทย์ถึงความปลอดภัย ส่วนการรักษาสภาวะเสื่อมของเซลล์ หรือ โรคอื่นๆโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดนั้น ยังอยู่ในขั้นตอนของการศึกษาและวิจัย (Aggarwal et al., 2012)

โดยทั่วไปแล้วเซลล์ต้นกำเนิดนั้นมีหลายชนิด ขึ้นอยู่กับแหล่งที่แยกเซลล์ต้นกำเนิดออกมาได้ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (Aggarwal et al., 2012) เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อของตาชั้น limbus (Zhang et al., 2011) หรือ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อของโพรงประสาทฟัน (Huang et al., 2009) ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้แยกมาจากเนื้อเยื่อของอวัยวะที่ได้รับการพัฒนาเต็มที่แล้ว การแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดเมื่อนำมาเลี้ยงในห้องทดลองก่อนการปลูกถ่ายกลับเข้าสู่ผู้ป่วยมีขีดจำกัด และมีความสามารถในการถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะได้น้อยกว่า เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากตัวอ่อนในระยะก่อนการฝังตัว หรือที่เรียกว่า เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic stem cells; ESCs) เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนนี้ เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหนือกว่าเซลล์ต้นกำเนิด จากแหล่งอื่นๆ เพราะสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้ทุกชนิดของเซลล์ในร่างกายมนุษย์ (Thomson et al., 1998) ดังนั้น นักวิจัยจึงพยายามศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมาใช้ในการรักษาผู้ป่วย อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดที่สำคัญสองประการของการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมาใช้ในการทางคลินิกก็คือ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน จำเป็นต้องแยกกลุ่มเซลล์ออกจากตัวอ่อน ซึ่งในภาคสังคมเข้าใจว่าเป็นการทำลายตัวอ่อน และเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนนี้ จะมีลักษณะทางพันธุกรรมไม่ตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ดังนั้น เมื่อผู้ป่วยได้รับการปลูกถ่ายเซลล์จากเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน อาจเกิดปัญหาของการต่อต้านเซลล์ที่ปลูกถ่ายเข้าไปจากระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย (Okita et al., 2011)

จากความสำเร็จในการวิจัยของนักวิจัยชาวญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 2007 ที่สามารถสร้างเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน โดยใช้เซลล์ผิวหนังของคน เรียกเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ (induced pluripotent stem cells; iPSCs) (Takahashi et al., 2007) ถือเป็นการค้นพบที่จุดประกายให้ แพทย์ นักวิทยาศาสตร์ และนักวิจัยทั่วโลกมีความหวังในการประยุกต์ใช้เซลล์ต้นกำเนิดในการรักษาโรคต่างๆที่เกิดจากสภาวะเสื่อมของเซลล์ในร่างกายของมนุษย์ ทั้งนี้เพราะเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ไม่ต้องทำลายตัวอ่อน และสามารถสร้างขึ้นมาได้จากเซลล์ในร่างกายของผู้ป่วยเอง ดังนั้น ปัญหาการต่อต้านเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้โดยระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยจะไม่เกิดขึ้น หลังจากการปลูกถ่ายเข้าสู่ร่างกายของผู้ป่วย

ในปีที่สี่ของโครงการวิจัยคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยโดยทดสอบคุณสมบัติต่างๆของสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้ทั้งสี่สายพันธุ์ ได้แก่ Chula2.hES, Chula3.hES, Chula4.hES และ Chula5.hES เสร็จเรียบร้อยแล้ว และได้รับการตอบรับการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสาร Bioresearch open access เป็นที่เรียบร้อยแล้ว (Pruksananonda et

al., 2012) และนอกจากนั้น คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพื่อสร้างตัวอ่อนจากเทคนิคการย้ายฝากนิวเคลียส (nuclear transfer) และทำการกระตุ้นไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิแต่ไม่มีการแบ่งตัว ด้วยสารเคมี เพื่อเป็นการสร้างตัวอ่อนในระยะ blastocyst สำหรับใช้แยกเซลล์ต้นกำเนิด แต่ผลการทดลองไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เนื่องจากไข่สองใบที่ได้รับการย้ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ไฟโบรบลาสไม่เกิดการแบ่งตัว และจากการทดลองกระตุ้นไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิแต่ไม่มีการแบ่งตัว ด้วยสารเคมี พบว่าตัวอ่อนที่ได้รับการกระตุ้น สามารถเจริญจนถึงระยะ compact-morula แต่ไม่สามารถเจริญถึงระยะ blastocyst ได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงไม่สามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนที่มาจากเทคนิคการย้ายฝากนิวเคลียสได้

ในปีที่ห้า ซึ่งเป็นปีสุดท้ายของโครงการวิจัย คณะผู้วิจัยได้ทำการเปลี่ยนแปลงการดำเนินงานวิจัย โดยมีจุดมุ่งหมายในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ร่างกาย ด้วยความร่วมมือกับห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิด และ เซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสถาบันวิจัย RIKEN เมืองโกเบ ประเทศญี่ปุ่น คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์เลือดจากสายสะดือ ด้วยการ ใช้ Sendai virus และ episomal vectors โดยเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำที่ได้จากทั้งสองวิธีนี้ถือว่าเป็น transgene free human iPSCs ซึ่งจัดว่าเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในทางคลินิกเป็นอย่างมากในอนาคต

ปัจจุบันเทคโนโลยีการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการใช้ไวรัสบางสายพันธุ์ เป็นพาหะนำยีนที่เกี่ยวข้องเข้าสู่จีโนมของโฮสต์ ซึ่งทำให้มีความเสี่ยงที่จีโนมหรือส่วนของไวรัสจะผนวกรวมเข้ากับจีโนมของโฮสต์หลังจากผ่านขั้นตอนการเหนี่ยวนำ (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007) ดังนั้นเพื่อการเลือกใช้ไวรัส สายพันธุ์ที่ไม่เป็นอันตราย และจีโนมของไวรัสไม่ผนวกเข้ากับจีโนมของโฮสต์ เช่น Sendai virus (Ban et al., 2011; Nishishita et al., 2012; Macarthur et al., 2012) นอกจากนั้นวิธีการใช้ episomal vectors ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับ pluripotency ร่วมกับวิธี electroporation ก็ถือเป็นวิธีที่ปลอดภัยและได้รับการรายงานถึงความสำเร็จในการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ (Yu et al., 2009; Hu et al., 2011) นอกจากนั้น การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำนั้น สามารถใช้เซลล์ต่างๆจากร่างกาย โดยเฉพาะเซลล์ผิวหนัง แต่ข้อด้อยคือ ต้องใช้การผ่าตัดหรือศัลยกรรมเล็ก เพราะฉะนั้น หากสามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำโดยใช้ เซลล์จากระบบเลือด น่าจะทำให้ลดขั้นตอนการเก็บตัวอย่างขึ้นผิวหนัง และทำได้ง่ายกว่า

ดังนั้นในรายงานฉบับนี้จะได้อธิบายถึงการดำเนินการวิจัย และผลสำเร็จของการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์เลือดที่เก็บได้จากสายสะดือ

๒. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

๒.๑ การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง (Preparation of feeder cells)

การทดลองนี้เซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกได้จากหนังหุ้มองคชาติ (foreskin fibroblast) ซึ่งซื้อจากบริษัทผู้ผลิต American Type Cell Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา เซลล์จะถูกเลี้ยงด้วยน้ำยาเลี้ยงและวิธีการต่างๆตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ เมื่อจะใช้เซลล์ไฟโบรบลาสเป็นเซลล์พี่เลี้ยง เซลล์จะถูกยับยั้งการแบ่งตัวด้วยการเติม mitomycin C ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ต่อ มล. ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ และ เลี้ยงในตู้ปรับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยการใช้ 0.05 % trypsin-EDTA และ seed เซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย 0.1% gelatin โดยจำนวนของเซลล์พี่เลี้ยงประมาณ 50,000 เซลล์ ต่อ ตร.ซม.

น้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงประกอบด้วย (IMDM, 10% FBS, 1% Glutamax, 1% penicillin-streptomycin) เซลล์ที่เลี้ยงจะถูกใช้ภายใน 5-7 วัน หลังจากวันที่เตรียม น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำยาที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ อย่างน้อย 3-5 ชั่วโมง ก่อนใช้เซลล์ที่เลี้ยงเพื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ

๒.๒ การเคลือบผิวของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย Matrigel หรือ Pronectin

ละลาย Matrigel (BD Bioscience) บนน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เจือจางในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ DMEM ด้วย dilution factor 250-300 ไมโครลิตร เคลือบ Matrigel ที่เจือจางแล้ว บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน สำหรับใช้เลี้ยงเซลล์ นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Matrigel ไว้ที่ตู้ปั่นเพาะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 10-15 นาที ก่อนใช้งาน

การเคลือบผิวจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย Pronectin จะทำคล้ายๆกับการใช้ Matrigel รายละเอียดของการเคลือบด้วย Pronectin ดังที่ได้รับการอธิบายจากผลงานของ Nishishita และคณะ 2012

๒.๓ การแยก endothelial เซลล์ จากเลือดจากสายสะดือ

การทดลองในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัย Foundation of biomedical and innovation (FBRI) เมืองโกเบ ประเทศญี่ปุ่น ขั้นตอนทั้งหมดผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมตามระเบียบของประเทศญี่ปุ่น

เก็บเลือดจากสายสะดือทารกที่มีสุขภาพดี ทำการแยกเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียว โดยใช้เทคนิค Lympholyte-H density gradient และเก็บเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ CD34 ด้วยการใช้ immunomagnetic separation

๒.๔ การสร้าง และ เลี้ยง Sendai viral vector

Sendai virus vector ที่ใช้ในการวิจัยนี้ เป็น RNA ไวรัสที่ผลิตโดยบริษัท DNAVEC เมืองSendai ประเทศญี่ปุ่น โดยจะสร้าง open reading frames (ORFs) ของ human Oct 3/4 จาก NCCIT cDNA และ ORFs ของ human Sox2, Klf4 และ c-Myc เพิ่มปริมาณของยีนโดย Juckett cell cDNA ด้วยกระบวนการ RT-PCR เพิ่มจำนวนของยีนทั้งสี่ด้วย Not I-tagged gene specific forward primer และ Not I-tagged gene specific reverse primer ที่มีส่วนประกอบของ SeV-specific transcriptional regulatory signal sequences ขึ้นส่วนยีนที่ถูกเพิ่มจำนวนแล้วจะถูกใส่ใน F-deficient SeV vector ถ่ายฝาก template ของ pSeV/ Δ F ที่มียีนแต่ละตัว และแต่ละ pCAGGS-plasmid ที่มี T7 RNA polymerase, NP, P, F5R และ L gene เข้าสู่เซลล์ 293T จากนั้นเลี้ยงเซลล์ 293T ในน้ำยาเลี้ยง DMEM ที่เติม 10% heat-inactivated fetal bovine serum และเลี้ยงต่อเนื่องหนึ่ง ถึง สามวัน เพื่อสร้าง seed SeV/ Δ F vector จากนั้นเพิ่มปริมาณ vector โดยการใช้ LLC-MK2/F7/A ซึ่งจะเป็น Sendai virus F ที่มีการแสดงออกของ LLC-MK2 ปริมาณของ vector หรือ ทำการตรวจวัดระดับของ vector titers ด้วยการย้อมสีทางอิมมูโน โดยใช้ anti-SeV rabbit polyclonal serum

๒.๕ การสร้าง และเพิ่มจำนวน Episomal vector

Episomal vectors ที่ใช้ในการวิจัยนี้ ได้รับการอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด โดย ผศ.นพ.นิพัทธ์ อิศรเสนา episomal vectors ที่ใช้ได้แก่ pCXLE-hOct3/4-shp53-F, pCXLE-hSK(Sox2-klf4) และ pCXLE-hML (c-Myc-2A-Lin28)

๒.๖ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+

๒.๖.๑ การใช้ Sendai virus

Sendai virus ที่ใช้ในการทดลองเป็น Temperature sensitive strains ซึ่ง factors ทั้งสี่ชนิดได้แก่ Oct 3/4, Sox2, Klf4 และ c-Myc จะถูกย้ายฝากเข้าเซลล์ที่แยกได้จากเซลล์ของเลือดจากสายสะดือ ด้วยวิธีที่เคยรายงานมาก่อนหน้าในปี คศ. 2006 โดย Yamanaka และ คณะ ยกเว้นในการทดลองนี้ จะได้ทำการใช้ Sendai virus แทนการใช้ retrovirus หรือ lenti virus โดยจะใช้ sendai virus ที่ความเข้มข้น 8 ng/ml polybrene

๒.๖.๒ การใช้ episomal vectors และ electroporation

เลี้ยงเซลล์ CD34+ ในน้ำยาเลี้ยงนาน 2-5 วัน ก่อนทำการ transfection เมื่อทำการ transfection นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยง และ นับเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้ trypan blue assay และใช้เซลล์จำนวน 1×10^6 เซลล์ในการ transfect ซึ่ง episomal vectors ที่ใช้ได้แก่ pCXLE-hOct3/4-shp53-F, pCXLE-hSK(Sox2-klf4) และ pCXLE-hML (c-Myc-2A-Lin28) โดยใช้ CD34 Nucleofector kit (Lonza) และใช้ Amaxa electroporation machine หลังจากเซลล์ผ่านขั้นตอนการ transfect แล้ว เลี้ยงเซลล์ในสภาพแขวนลอยต่อไปอีก 3-5 วันก่อนนำเซลล์ลงเลี้ยงกับเซลล์ที่เลี้ยงหรือจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Matrigel

๒.๗ การเลี้ยงเซลล์ CD34+ ที่ผ่านการย้ายฝากยีน

ทำการเก็บเซลล์ที่ผ่านกระบวนการย้ายฝากยีนแล้ว เลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 6-well plate ในน้ำยาที่ประกอบด้วย cytokine ต่างๆ ดังนี้ คือ IL-7 หรือ CSF, GM-CSF, IL-1 และ IF-3 ติดต่อกัน 4 วัน ในวันที่ 5 ย้ายเซลล์ลงเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์ที่เลี้ยงอยู่ และเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ knockout DMEM, 20% Knockout serum replacement, 1% penicillin-streptomycin, 1% Glutamax, 1% non essential amino acid, 0.05 mM β -mercaptoethanol และ 8 ng/ml human recombinant FGF หรือเลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Matrigel เลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำยา ReproFF หรือ ReproFF2 ที่ผลิตจากบริษัท ReproCeLL ประเทศญี่ปุ่น

เลี้ยงเซลล์ CD34+ ที่ผ่านการย้ายฝากยีนติดต่อกันนาน 25-40 วัน หรือจนกระทั่งเห็นโคโลนีของเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เจริญขึ้นมา จากนั้นทำการตัดแบ่งโคโลนีดังกล่าวด้วยเข็มเบอร์ 23 ก่อนที่จะย้ายโคโลนีของเซลล์ไปเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ต่อไป

๒.๘ การเลี้ยงและการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ

เมื่อโคโลนีของ เซลล์ต้นกำเนิดมีขนาดประมาณ 2000-3000 ไมครอนจะทำการ เพิ่มจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิด ด้วยวิธีการตัดด้วย glass pipette หรือ เข็มขนาด 23G หรือด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ dissociation solution (ReproCeLL, JAPAN) การตัดด้วย glass pipette หรือ เข็มขนาด 23G นั้น โคโลนีจะถูกตัดออกเป็นชิ้นเล็กประมาณ 5-8 ชิ้นขึ้นอยู่กับขนาดของโคโลนี จากนั้นโคโลนีที่ถูกตัดจะถูกนำไปเลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยงที่เตรียมไว้ล่วงหน้า

ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิด ด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น ทุกๆ 5-7 วัน หรือขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของโคโลนี และขนาดของโคโลนี

๒.๙ การแช่แข็งเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ

ใช้วิธีการแช่แข็งเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional method) ทำได้โดย ตัดแบ่งโคโลนีออกเป็นกลุ่มเซลล์ประมาณ 500-5,000 เซลล์ แล้วใส่กลุ่มเซลล์ในน้ำยาแช่แข็ง ปริมาตร 1 มล. ที่อยู่ใน cryotube น้ำยาแช่แข็งมีส่วนประกอบคือ Knockout serum replacement (KSR) 90% และ DMSO 10% ในกล่องสำหรับแช่

แข็ง (freezing container; Mr Frosty; Nalgene, USA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิลบ 80 องศาเซลเซียส นาน 12-24 ชั่วโมง แล้วเก็บ cryotube ไว้ในไนโตรเจนเหลว

๒.๑๐ การพิสูจน์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+

๒.๑๐.๑ การย้อมสีภูมิคุ้มกัน (Immunostaining)

Fix colonies ด้วย 4% paraformaldehyde (PFA) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10-15 นาที จากนั้นจะทำการ block colonies ด้วย blocking buffer ซึ่งประกอบด้วย phosphate buffer saline (PBS), 0.5% bovine serum albumin (BSA) และ 0.1% Triton-X ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (overnight) แล้ว incubate colonies ด้วย primary antibodies ที่ถูกเจือจางด้วย PBS+0.5% BSA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้ว incubate ด้วย secondary antibodies ที่เจือจางด้วย PBS+0.5% BSA นาน 2 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS อีก 2 ครั้ง จากนั้นทำการ counterstaining ด้วย Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 มก./มล. ตรวจสอบผลการทดสอบ immunostaining ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบรังสี UV

Primary antibodies ที่ใช้จะมีความจำเพาะต่อ Oct-4, Nanog, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-4, CD10 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

Secondary antibody ที่ใช้คือ Goat anti-mouse หรือ Goat anti-rabbit conjugated-FITC หรือ Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA)

๒.๑๐.๒ การทดสอบการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ถึงสถานะการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำด้วยวิธี reverse-transcription polymerase reaction (RT-PCR)

สกัด total RNA จาก undifferentiated hiPSCs ด้วยการใช้ Trizol reagent (Invitrogen) ตามวิธีที่มาตรฐาน ทำการสังเคราะห์ cDNA จาก 1 mg ของ total RNA โดยการใช้ superscript reverse transcriptase (Invitrogen) ทำการ amplify PCR โดยใช้ primers สำหรับ pluripotent markers ตรวจสอบ PCR products โดยการย้อมด้วย ethidium bromide และ 2% agarose gel

๒.๑๐.๓ การตรวจหา markers บนเซลล์ต้นกำเนิดโดย Flow cytometer

FACS antibodies ที่ใช้ได้แก่ SSEA-4 APC, CD34 APC และ CD43 FITC จากบริษัท BD Biosciences เซลล์ถูกย่อยเป็นเซลล์เดี่ยวด้วย 0.05% Trypsin-EDTA (Invitrogen), ล้างด้วย 5% FBS ใน PBS ย้อมด้วย primary antibodies นาน 20 นาที ล้าง primary antibodies ด้วย 5% FBS ใน PBS และย้อมต่อด้วย secondary antibodies ที่เหมาะสมกับ primary antibodies นาน 20 นาที จากนั้นล้าง primary antibodies ด้วย 5% FBS ใน PBS และปั่นเหวี่ยง ดูด supernatant ทั้งและ resuspend ตะกอนของเซลล์ด้วย 5% FBS ใน PBS จำนวน 500 ไมโครลิตร และนำไปตรวจด้วย Flow cytometer

๒.๑๐.๔ การตรวจโครโมโซมด้วยวิธี Karyotyping

ทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่สภาวะ metaphase ด้วยการใช้ colcemid solution ทำการสลายเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์ด้วย hypotonic solution และใช้เทคนิค G-banding เพื่อตรวจสอบลักษณะของโครโมโซมของเซลล์

๒.๑๑ การกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะด้วยการเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ในระบบเลือด (hematopoietic differentiation)

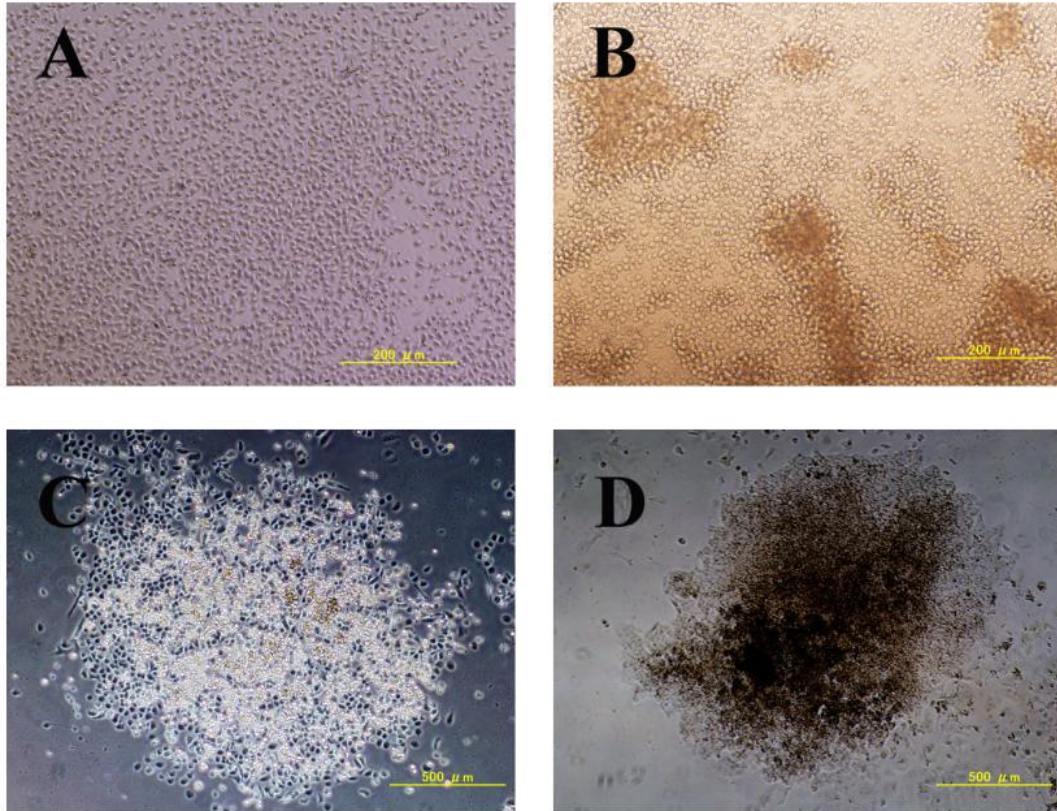
ใช้วิธีการและขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เซลล์สายพันธุ์ 13PFX1 เปลี่ยนเป็นเซลล์ในระบบเลือด ที่รายงานก่อนหน้านี้โดย Salvagiotto และคณะ(2011) ทำการย่อยกลุ่มเซลล์ให้เป็นกลุ่มเล็กๆหรือเซลล์เดี่ยวๆ โดยใช้ dissociation solution แล้วเลี้ยงกลุ่มเซลล์เล็กๆของเซลล์ต้นกำเนิด ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย human recombinant collagen IV (Chemicon) ในน้ำยา IMDM ที่เติม BIT (bovine serum albumin, human recombinant insulin, human transferrin; Stem Cell Technologies), 450 μ M monothioglycerol, 0.1 mM non essential amino acid, 2 mM L-glutamine, recombinant human BMP4 (50 ng/ml, R&D), recombinant human VEGF (50 ng/ml, Invitrogen) and recombinant bFGF (50 ng/ml) เลี้ยงติดต่อกันนาน 6 วัน ที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 37 องศาเซลเซียส และเลี้ยงในสภาพที่มีระดับของ O_2 ที่ 5% หลังจากวันที่ 6 และ 9 ทำการตรวจสอบหาการแสดงออกของ markers ที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเซลล์ในระบบเลือดโดยทำการตรวจการแสดงออกของ SSEA-4 ซึ่งเป็น pluripotent markers, CD34 และ CD43 ซึ่งเป็น hematopoietic markers ด้วยการใช้ Flow cytometer

๓. ผลการวิจัย

๓.๑ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดโดยการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย Sendai virus TS7

คณะผู้วิจัยได้ทำการ infect เซลล์ CD34+ จำนวน 1×10^6 เซลล์ ด้วย 20 MOI ของ Sendai virus TS7 หลังจากที่ผ่านมาการ infect แล้ว ทำการเลี้ยงเซลล์ CD34+ ในน้ำยาและในสภาพแวนลอย ต่อเนื่องกัน 5 วัน (รูปที่ 1 A และ 1B) ในช่วงท้ายของการเลี้ยงแบบแวนลอยจะพบว่าเซลล์เกาะกลุ่มกัน (รูปที่ 1B) ดังนั้นจึงต้องเข้าไปเปิดทำการดูดและเป่าเซลล์เบาๆก่อนนำไปเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Matrigel หรือ Pronectin

เมื่อเลี้ยงเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ จะพบว่าเซลล์บางส่วนเกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงเซลล์ และเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ (รูปที่ 1C และ 1D) ซึ่งเซลล์ที่เจริญเป็นกลุ่มนี้ มีทั้งเซลล์ที่มีลักษณะไม่เหมือนเซลล์ต้นกำเนิด (รูปที่ 1C) และเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิด (รูปที่ 1D)

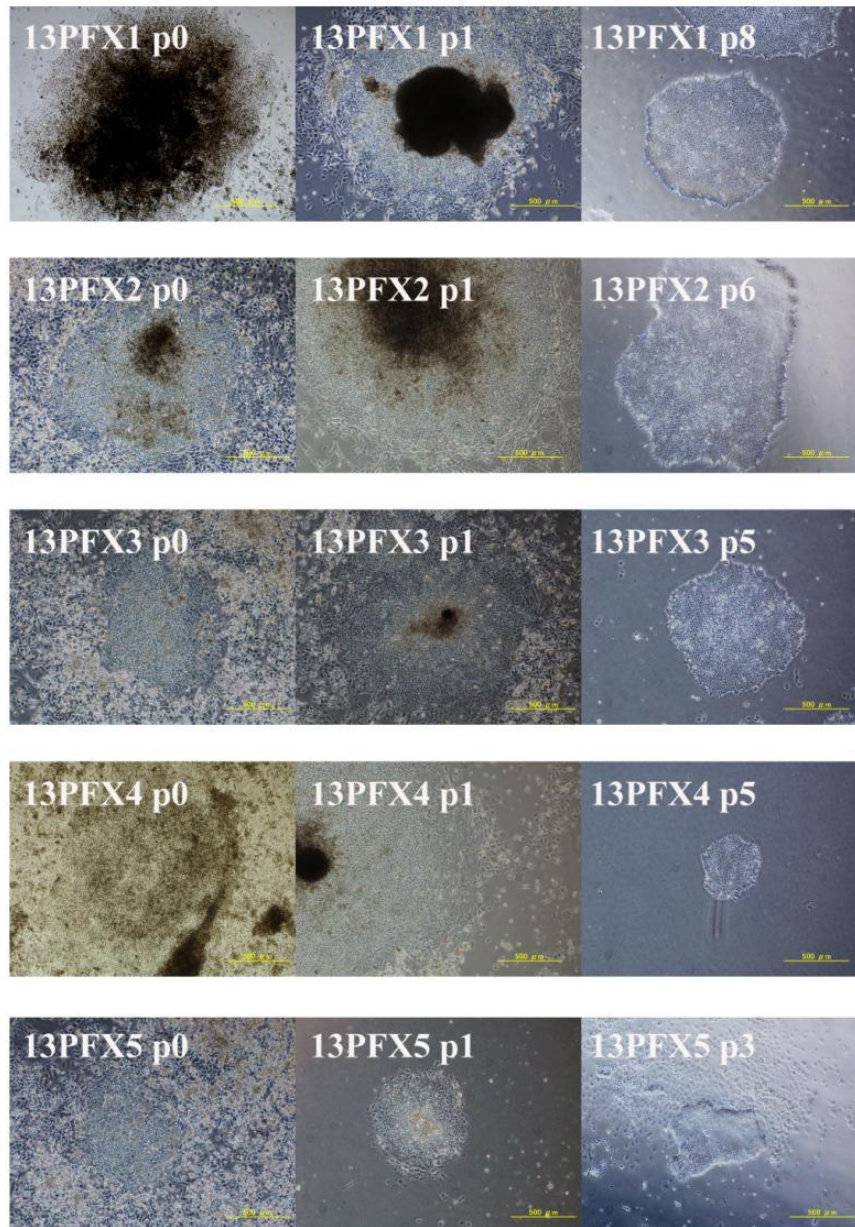


รูปที่ ๑ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34⁺ ด้วย Sendai virus TS7

เซลล์ CD34⁺ ที่เลี้ยงในน้ำยา X-vivo 10 ที่เติม 50 ng/ml interleukin-6, 50 ng/ml soluble interleukin-6 receptor, 50 ng/ml stem cell factor, 10 ng/ml thrombopoietin และ 20 ng/ml Flt 3/4 ligand ก่อนทำการ infection ด้วย Sendai virus (A). เซลล์ CD34⁺ ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการใช้ SeV ที่มี transcription factors, Oct-4, Klf4 และ c-Myc เลี้ยงเป็นเวลา 6 วันในสภาพ suspension culture เริ่มเกาะกันเป็นกลุ่ม (B) หลังจากเลี้ยงเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย SeV บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Pronectin ต่อเนื่อง 20 วัน จะพบเซลล์ที่เจริญเติบโตเป็นกลุ่ม (C, D) ซึ่งกลุ่มเซลล์ในรูป D ต่อมาเจริญเป็นสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 13PFX1

๓.๒ การเพิ่มจำนวนและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34⁺ ด้วย Sendai virus

คณะผู้วิจัยสามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ เซลล์ CD34⁺ โดยการใช้ Sendai virus TS7 ที่มี ยีน Oct-4, Sox2, Klf4 และ c-Myc ทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์ (รูปที่ 2) สายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้ แสดงคุณสมบัติพื้นฐานของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด โดยเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ แต่ละเซลล์มีขนาดเล็ก ภายในเซลล์เห็นนิวเคลียสใหญ่ และชัดเจนและมีอัตราส่วนพื้นที่ของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมที่สูง เซลล์ต้นกำเนิดทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถถูกเพิ่มจำนวนและแช่แข็งได้ ด้วยวิธีมาตรฐานเดียวกันกับวิธีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน และแช่แข็งเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากตัวอ่อน



รูปที่ ๒ ลักษณะของ เซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย Sendai virus ทั้ง 5 สายพันธุ์ 13PFX1, 13PFX2, 13PFX3, 13PFX4 และ 13PFX5 เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำทั้ง 5 สายพันธุ์แสดงลักษณะเบื้องต้นคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากตัวอ่อน คือมีการเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ แต่ละเซลล์มีขนาดเล็ก ภายในเซลล์เห็นนิวเคลียสใหญ่และชัดเจนและมีอัตราส่วนพื้นที่ของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมที่สูง

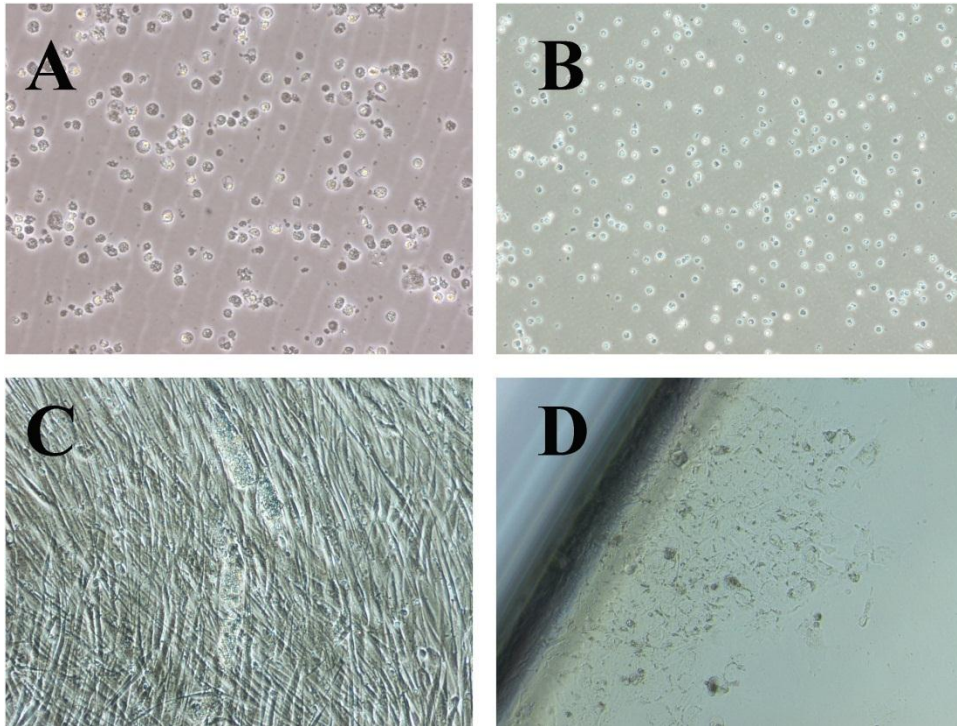
๓.๓ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดโดยการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย episomal vectors

คณะผู้วิจัยได้ทำการ transfect episomal vectors ที่มียีน ต่างๆคือ Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc เข้าสู่เซลล์ CD34+ ด้วยกระแสไฟฟ้า หรือที่เรียกว่า electroporation ผู้วิจัยได้ใช้เซลล์ CD34+ จำนวน 1×10^6 เซลล์ และใช้เครื่อง electroporation ของบริษัท Amaxa โปรแกรม U08 และใช้ CD34 Nucleofector kit

หลังจากที่ทำการ transfect เซลล์ด้วย episomal vectors แล้ว เซลล์ CD34+ ถูกเลี้ยงในน้ำยาที่ประกอบด้วย X-vivo 10 ที่เติม 50 ng/ml interleukin-6, 50 ng/ml soluble interleukin-6 receptor, 50 ng/ml stem

cell factor, 10 ng/ml thrombopoietin และ 20 ng/ml Flt 3/4 ligand ในสภาพแขวนลอย นาน 6 วัน (รูปที่ 3A) ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงต่อบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Matrigel หรือที่มีเซลล์ที่เลี้ยงอยู่ (รูปที่ 3B)

หลังจากที่เลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Matrigel หรือ ที่มีเซลล์ที่เลี้ยงอยู่ ผู้วิจัยพบว่า มีกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดเจริญขึ้นในสภาวะที่เลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยงหลังจากที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่เลี้ยง นาน 5 วัน หรือ 11 วันหลังจาก transfection (รูป 3C) ในขณะที่พบกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดเจริญ ขึ้นในสภาวะที่เลี้ยงบน Matrigel ประมาณ 14 วัน หลังเลี้ยงบน Matrigel หรือ 20 วันหลัง transfection (รูปที่ 3D)



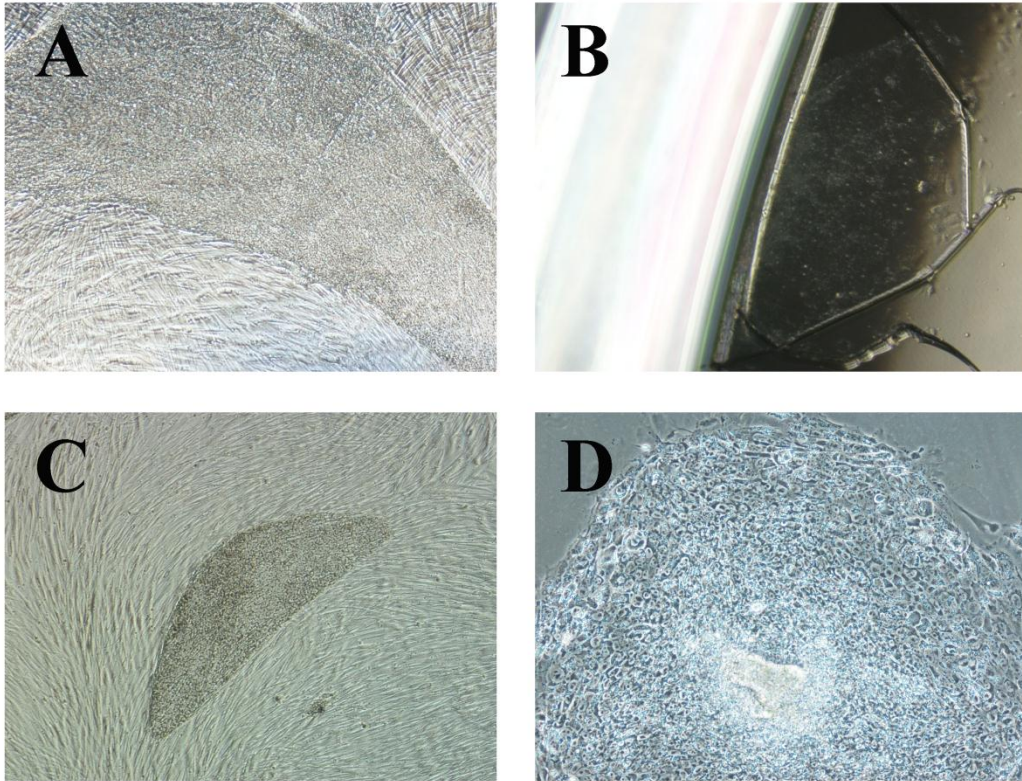
รูปที่ ๓ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย episomal vectors และ electroporation

เซลล์ CD34+ จะถูก transfect ด้วย episomal vectors และเลี้ยงนาน 6 วันในสภาพแขวนลอยในน้ำยาที่ประกอบด้วย ประกอบด้วย X-vivo 10 ที่เติม 50 ng/ml interleukin-6, 50 ng/ml soluble interleukin-6 receptor, 50 ng/ml stem cell factor, 10 ng/ml thrombopoietin และ 20 ng/ml Flt 3/4 ligand (A) เซลล์ จะถูกเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ที่เลี้ยง หรือ ที่เคลือบด้วย Matrigel (B) เลี้ยงต่อเนื่องจนกระทั่งพบ กลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดเจริญขึ้นมา พบกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดกลุ่ม แรกๆที่เจริญบนเซลล์ที่เลี้ยง (C) และบน Matrigel (D) ประมาณ 11 และ 20 วันตามลำดับ หลังจากเซลล์ผ่าน กระบวนการ transfection

๓.๔ การเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย episomal vectors และ electroporation

เมื่อขนาดของกลุ่มเซลล์เจริญจนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มม. ทำการตัดแบ่งกลุ่มเซลล์นั้น ด้วยเข็มขนาด 23G ออกเป็นชิ้นเล็กๆ (รูปที่ 4A และ 4B) แล้วนำไปเลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยง หรือ ทำการตัดแบ่งกลุ่มเซลล์ ออกเป็นชิ้นเล็กๆ และย่อยด้วย dissociation solution และนำชิ้นของเซลล์ไปเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบ ด้วยMatrigel

ด้วยวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย episomal vectors และ electroporation นี้ คณะผู้วิจัยสามารถสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิด ได้ทั้งสิ้น 9 สายพันธุ์ โดย 8 สายพันธุ์ สร้างและเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยง (รูปที่ 4C) และ อีก 1 สายพันธุ์สร้างและเลี้ยงบน Matrigel (รูปที่ 4D)



รูปที่ ๔ ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย episomal vector และ electroporation

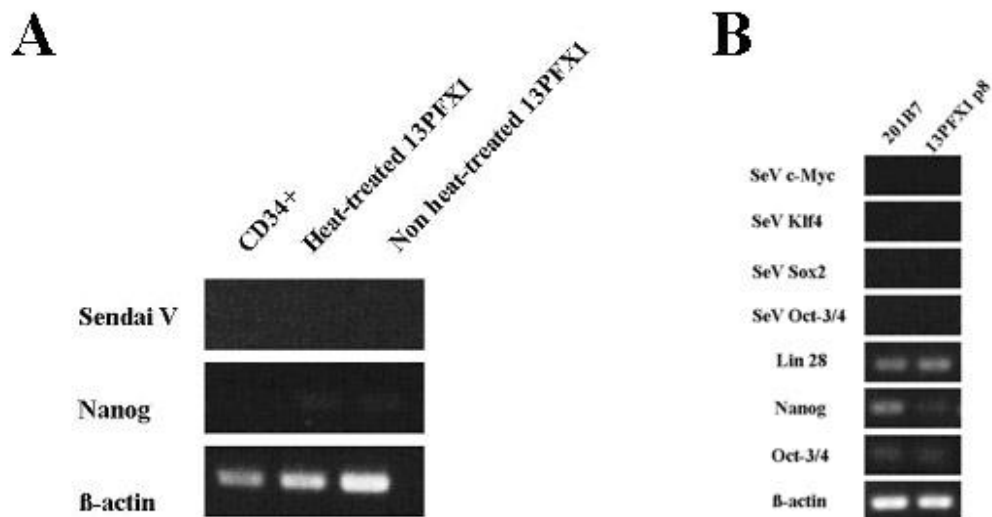
หลังจากที่ขนาดของกลุ่มเซลล์ที่คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดเจริญบนเซลล์พี่เลี้ยง (A) และบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Matrigel (B) มีขนาดพอที่จะเพิ่มจำนวน ทำการตัดแบ่งกลุ่มเซลล์ออกเป็นชิ้นด้วยเข็มขนาด 23G และนำชิ้นของเซลล์บนเซลล์พี่เลี้ยง หรือ บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Matrigel เซลล์จะสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ในทั้งสองภาวะที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง (C) และปราศจากเซลล์พี่เลี้ยง (D)

๓.๕ การพิสูจน์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากเหนี่ยวนำ

๓.๕.๑ การทดสอบการแสดงออกของ pluripotent gene ด้วยวิธี RT-PCR

เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดสร้างได้ด้วยการใช้ Sendai virus TS7 และ Sendai virus สายพันธุ์นี้เป็น RNA ไวรัส และมีความไวต่ออุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส ไวรัสจะเสื่อมและหายไปจากเซลล์ หลังจากเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้จากการใช้ Sendai virus TS7 ที่ 38 องศาเซลเซียส ต่อเนื่องนาน 4-5 วัน คณะผู้วิจัยตรวจสอบหา RNA ของไวรัสหลังจากเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 13PFX1 ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสต่อเนื่องกัน 5 วัน ซึ่งตรวจไม่พบ Sendai virus ในเซลล์ต้นกำเนิด (รูปที่ 5A) นอกจากนั้น ยังทำตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent genes ที่เกี่ยวข้องกับการคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของสายพันธุ์ 13PFX1 ในระยะแรกคณะผู้วิจัยทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย Sendai virus TS7 ซึ่งยีนที่เลือกตรวจสอบได้แก่ endogenous Oct3/4, Nanog, Lin28 และตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่มาจาก Sendai virus ได้แก่ SeV Oct 3/4, SeV Sox2, SeV Klf และ SeV c-Myc โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 201B7 เป็นเซลล์ควบคุม พบว่า เซลล์ต้น

กำเนิดที่คณะผู้วิจัยสร้างขึ้นสายพันธุ์ 13PFX1 มีการแสดงออกของ endogenous genes Oct3/4, Nanog, Lin28 แต่ไม่มีการแสดงออกของ SeV Oct 3 /4, SeV Sox2, SeV Klf และ SeV c-Myc เช่นเดียวกับ 201B7 (รูปที่ 5B)

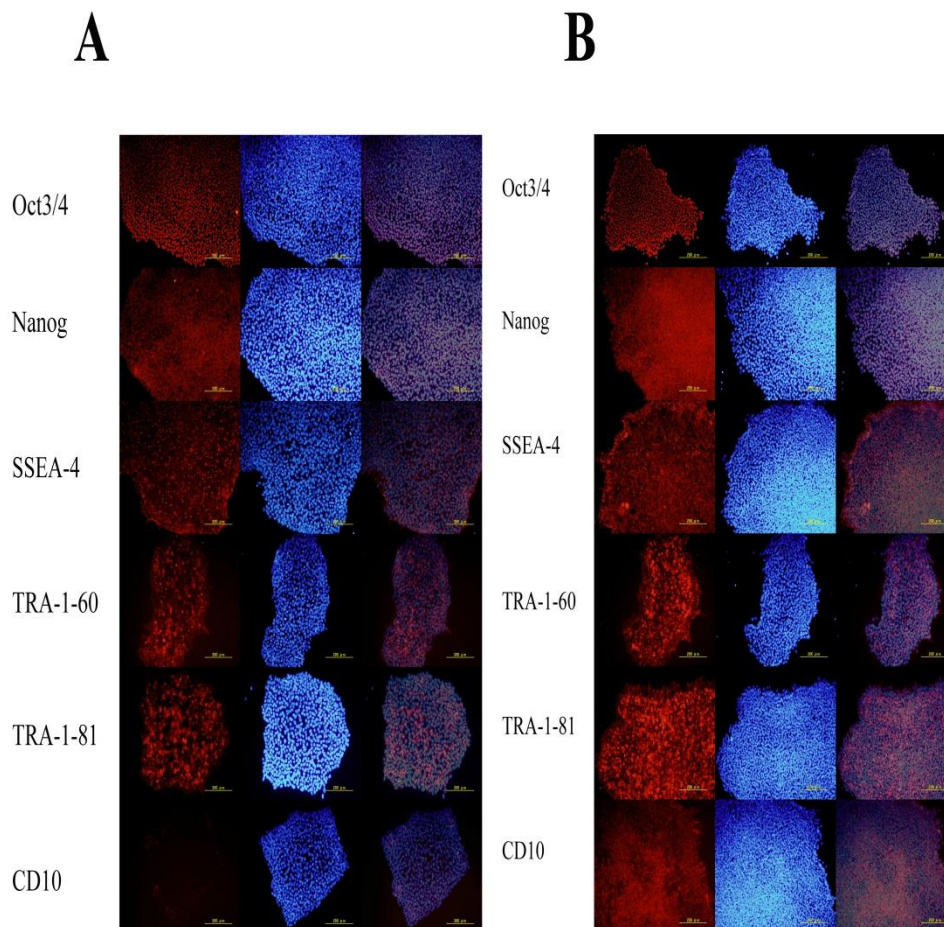


รูปที่ ๕ การแสดงออกของ Sendai viral genes, pluripotent genes และ house keeping gene ของเซลล์ CD34⁺

ตรวจไม่พบ Sendai virus ใน RNA ของเซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 13PFX1 ที่ผ่านและไม่ผ่าน การเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส (A) เซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 13PFX1 มีการแสดงออกของ endogenous Oct3/4, Nanog, Lin28 แต่ไม่มีการแสดงออกของ ยีน SeV Oct 3/4, SeV Sox2, SeV Klf4 และ SeV c-Myc เช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 201B7 ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย Retrovirus และถือเป็นเซลล์ ในกลุ่มควบคุม

๓.๕.๒ การทดสอบการแสดงออกของ pluripotent markers ด้วยวิธีการย้อมสีทางอิมมูโน

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการแสดงออกของ pluripotent markers ของเซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 13PFX1 และ 13PFX2 ที่สร้างได้จากการเหนี่ยวนำโดยใช้ Sendai virus TS7 ผลการทดสอบพบว่า เซลล์สายพันธุ์ 13PFX1 มีการแสดงออกของ Oct 3/4, Nanog, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 แต่มีการแสดงออกของ CD10 น้อยมาก (รูปที่ 6A) ในขณะที่ 13PFX2 มีการแสดงออกของ Oct 3/4, Nanog, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 และ CD10 (รูปที่ 6B) ซึ่งทั้งหมดเป็น markers สำคัญที่บ่งชี้ว่า 13PFX2 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ

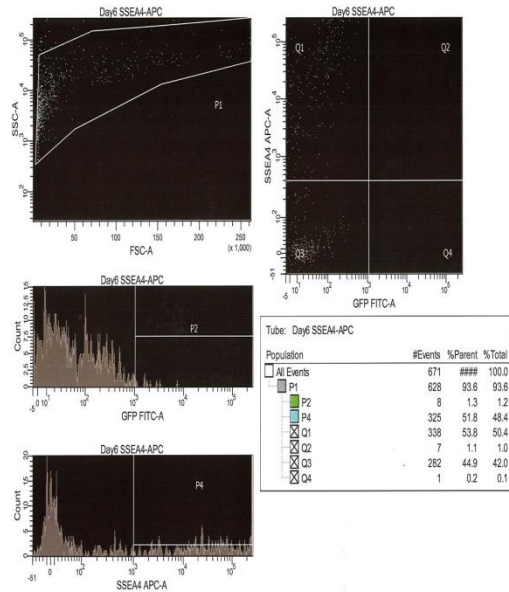


รูปที่ ๖ ผลการทดสอบการแสดงออกของ pluripotent markers ด้วยวิธีการย้อมสีทางอิมมูโน
เซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 13PFX1 (A) 13PFX2 (B) ที่สร้างได้จากการเหนี่ยวนำด้วย Sendai virus มีการแสดงออกของ pluripotent markers ต่างๆที่เป็น markers หลักของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ได้แก่ Oct3/4, Nanog, SSEA-4, TRA 1-60, TRA 1.81 และ CD10 (สีแดง คือ สีของ markers, สีฟ้า คือสีของนิวเคลียสของเซลล์)

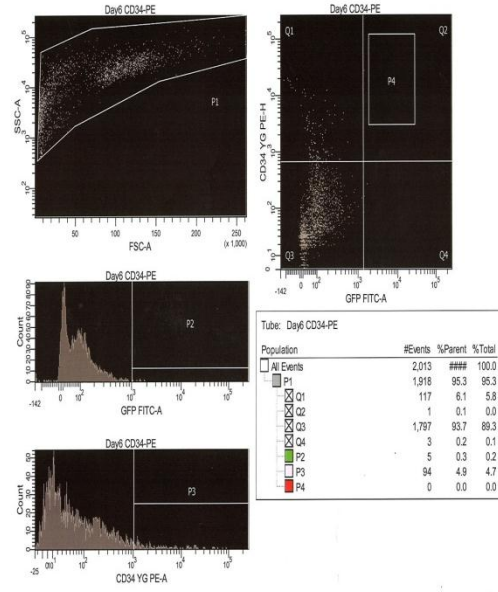
๓.๕.๓ การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ ภายในห้องปฏิบัติการ

คณะผู้วิจัยได้ทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ ของเซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย Sendai virus โดยการเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเลือด หรือ hematopoietic lineage ด้วยวิธีการที่รายงานก่อนหน้านี้ โดย Salvagiotto และคณะ (2011) ผู้วิจัยทำการตรวจสอบการแสดงออกของ surface markers ที่เกี่ยวข้องคือ SSEA-4, CD34 และ CD43 บนผิวของเซลล์ 13PFX1 ที่ผ่านการกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเลือด โดยใช้ FACS ในวันที่ 6 และ 9 หลังเหนี่ยวนำ พบว่าหลังถูกเหนี่ยวนำ เป็นเวลา 6 วัน เซลล์ยังคงมีการแสดงออกของ SSEA-4 ซึ่งเป็น pluripotent markers อยู่ประมาณ 48.4 % (รูปที่ 7A) และมีการแสดงออกของ CD34+ ซึ่งเป็น markers ที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนเป็น hematopoietic lineages ประมาณ 4.7% (รูปที่ 7B) เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของ markers ในวันที่ 9 หลังจากการเหนี่ยวนำ พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของ CD34 ประมาณ 23-25% (รูปที่ 7C) และ CD43 ประมาณ 0.5% (รูปที่ 7D)

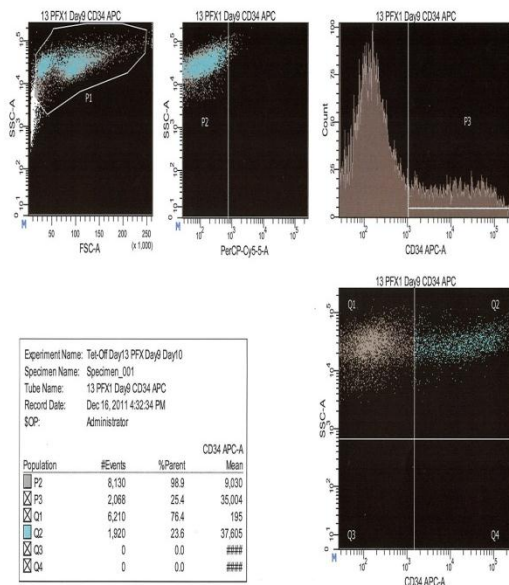
A



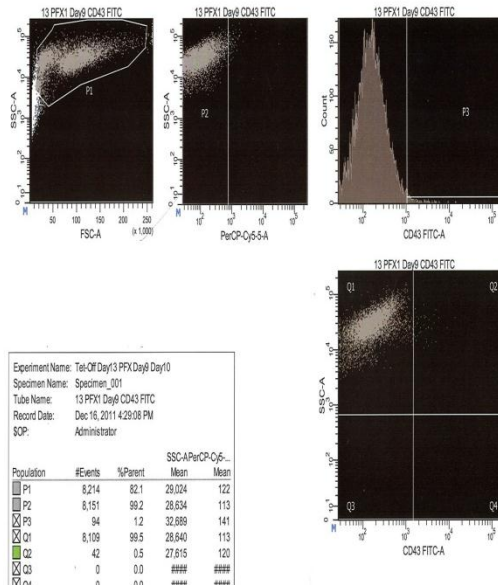
B



C



D

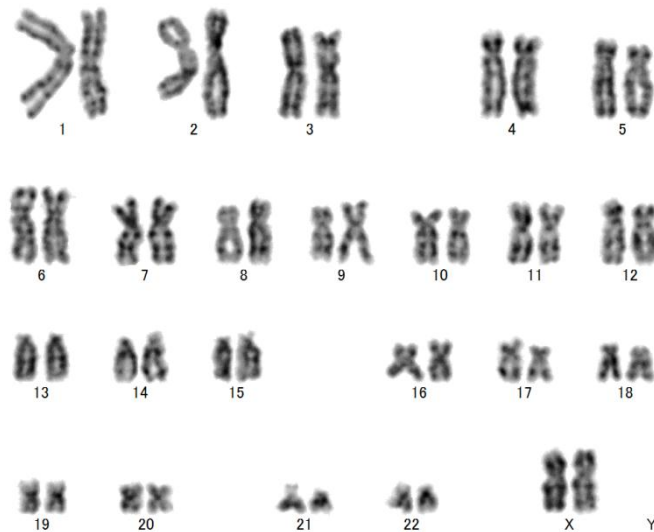


รูปที่ ๗ การเปลี่ยนแปลงของ surface markers ของ 13PFY1 เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น hematopoietic lineage

หลังจากถูกเหนี่ยวนำเป็นเวลา 6 วัน เซลล์ยังคงมีการแสดงออกของ SSEA-4 (A) แต่เซลล์เริ่มมีการแสดงออกของ CD34 (B) หลังจากการถูกเหนี่ยวนำเป็นเวลา 9 วัน เซลล์มีการแสดงออกของ CD34 มากขึ้น (C) และตรวจพบการแสดงออกของ CD43 แต่มีระดับต่ำ (D)

๓.๕.๓ การตรวจสอบโครโมโซมของเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ

เพื่อเป็นการทดสอบและยืนยันว่าการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ .ให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง และมีความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ คณะผู้วิจัยทำการทดสอบ karyotype ของเซลล์ 13PFY1 พบว่า เซลล์ยังมี karyotype ที่ปกติ และมีลักษณะโครโมโซมเป็น 46, XX (รูปที่ 8)



รูปที่ ๔ ลักษณะโครโมโซมของเซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 13PFX1

ทำการทดสอบลักษณะโครโมโซมของสายพันธุ์ 13PFX1 ด้วยวิธี G-banding

พบว่าเซลล์มีโครโมโซมที่ปกติ โดยแสดงลักษณะโครโมโซมเป็น 46, XX

๔. อภิปรายผลการวิจัย

ตั้งแต่ปี คศ. 2006 มีการรายงานถึงความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดโดยใช้เซลล์ร่างกายของมนุษย์หรือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ด้วยใช้ extopic expression ของยีน Oct3/4, Sox2, Klf4 และ c-Myc หรือใช้ชื่อย่อว่า OKSM (Lowry et al., 2008, Maherali et al., 2007, Takahashi et al., 2007, Takahashi and Yamanaka 2006, Yu et al., 2009, Yu et al., 2007) หลังจากนั้นก็มีรายงานความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำโดยได้มีการศึกษาผลของอายุ ชนิดต่างๆของเซลล์ และแหล่งที่มาของเซลล์ เป็นผลทำให้ในปัจจุบันพบว่า สามารถลดจำนวนของยีนที่ใช้ในกระบวนการ reprogramming และเพิ่มประสิทธิภาพของการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ (Giorgetti et al., 2009, Kim et al., 2009, Kim and Daley 2009)

เลือดจากสายสะดือจัดเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วย hematopoietic, mesenchymal และ endothelial precursors เซลล์จากเลือดจากสายสะดือ ซึ่งมาจากทารกแรกเกิดจัดเป็นเซลล์อ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มาจากแหล่งอื่นๆของคนที่ยาวมาก และที่สำคัญพบว่าเซลล์เหล่านี้มี immunological immunity ค่อนข้างต่ำ (Hanley et al., 2010) มีรายงานความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำโดยใช้เซลล์จากเลือดของสายสะดือ Hasse และคณะ (2009) ใช้ endothelial cells ในขณะ Giorgetti และคณะ (Giorgetti et al., 2009) ใช้ CD 133+ ซึ่งถือเป็นเซลล์ในกลุ่ม hematopoietic progenitor cells ที่ต่อไปจะเจริญเป็น myeloid lineages (Menendez et al., 2001; Menendez et al., 2002) Takenaka และคณะ (2011) ใช้ CD34+ ร่วมกับ retrovirus ที่ over-express ยีน OKSM และยังแสดงให้เห็นว่าการทำให้ p53 ภายในเซลล์ลดลง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการ reprogram ของเซลล์ Ye และคณะ (2009) สามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำโดยใช้เซลล์จากเลือดและ CD34+ โดยใช้ retrovirus vectors ที่มียีน pMXs-Oct4, pMXs-Sox2, pMXs-Klf4 และ pMXs-c-myc จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้คณะผู้วิจัยให้ความสนใจในการเลือกใช้เซลล์จากเลือดจากสายสะดือในการทดลองนี้

ในปีสุดท้ายของโครงการวิจัย คณะผู้วิจัยได้ส่งนักวิจัยของโครงการไปร่วมทำวิจัยกับนักวิจัยของสถาบันวิจัย RIKEN Center of Developmental Biology เมืองโกเบ ประเทศ ญี่ปุ่น โดยมีจุดประสงค์ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำโดยใช้ Sendai Virus สายพันธุ์ที่มีความไวต่ออุณหภูมิ Temperature sensitive; TS7 ไวรัสสายพันธุ์นี้มีข้อเด่นคือ เป็น RNA ไวรัส จึงไม่ทำให้เกิดการ integrate ของจีโนมของไวรัส เข้าสู่ DNA ของเซลล์ CD34+ ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย ectopic genes ซึ่งได้แก่ Oct3/4, Sox2, Klf4 และ c-Myc (Ban et al, 2011, Nishishita et al., 2012) และสามารถทำลายไวรัสสายพันธุ์นี้ได้ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยไวรัสแล้ว ในตู้เพาะบ่มเซลล์และตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 38 องศาเซลเซียส (Ban et al., 2011, Nishishita et al., 2012) คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีการที่รายงานโดย Ban และคณะ (2011) เมื่อเลี้ยงเซลล์ CD34+ ที่ผ่านการ infect ด้วย Sendai virus ที่มียีน Oct3/4, Sox2, Klf4 และ c-Myc บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Pronectin นาน 20-24 วัน จึงพบกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดเจริญขึ้นมา คณะผู้วิจัยได้ทำการตัดแบ่งกลุ่มของเซลล์เป็นชิ้นเล็กๆและเลี้ยงต่อเนื่องบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Pronectin แต่ผู้วิจัยพบว่าเซลล์มีการเจริญของเซลล์ค่อนข้างช้า ดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนสภาพการเลี้ยงจากการเคลือบจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย Pronectin เป็น Matrigel และพบว่าเซลล์มีการเจริญที่ดีขึ้น ทั้งนี้อาจจะเนื่องจาก Pronectin เป็น purify pronectin ส่วน Matrigel เป็น extracellular matrix ที่มีส่วนผสมของสารหลายตัวเช่น laminin, fibronectin และ gelatin (Lam and Longaker, 2012) จึงทำให้เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์มากกว่า ซึ่งจากการสังเกตนี้ทำให้ผู้วิจัยเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Matrigel ด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ คณะผู้วิจัยสามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย Sendai virus TS7 ทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์

เมื่อทำการตรวจหา RNA ของ Sendai virus ในเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านขั้นตอนการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส พบว่าตรวจไม่พบการแสดงออก หรือ การคงอยู่ของ Sendai virus ในเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสองแบบดังกล่าว ซึ่งในทางทฤษฎีควรจะตรวจไม่พบ RNA ของ Sendai virus TS7 เฉพาะในเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส แต่เซลล์ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ควรจะยังคงตรวจพบ RNA ของ Sendai virus TS7 อย่างไรก็ตามวิธีการที่คณะผู้วิจัยเลือกใช้คือการตรวจสอบการแสดงออกของยีนของ Sendai virus TS7 ด้วยเทคนิค RTPCR อาจจะยังมีความแม่นยำน้อย เพราะจากการรายงานของ Ban และคณะ (2011) มีการตรวจสอบด้วยการย้อมสีทางอิมมูโนที่เลือกใช้ fluorochrome-conjugated antibodies ที่จำเพาะต่อ antigen ของ Sendai virus TS7 ดังนั้นหากคณะผู้วิจัยต้องการยืนยันให้แน่นอนว่าไม่มีการคงอยู่ของ Sendai virus TS7 ในเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างขึ้นนั้นจำเป็นต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธีดังกล่าว

เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้จากการทดลองนี้ พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมีการแสดงออกของ pluripotent genes ได้แก่ Oct3/4, Nanog และ Lin28 โดยยีนที่แสดงออกเป็น endogenous genes ไม่ใช่ extopic genes ที่มาจาก Sendai viral vectors ผลการตรวจสอบนี้ยืนยันเบื้องต้นได้ว่าเซลล์ CD34+ เกิดการ reprogramming สมบูรณ์ นอกจากนั้นเซลล์ต้นกำเนิด ยังมีการแสดงออกของ pluripotent markers ที่บ่งชี้ถึงการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และเป็น pluripotent markers กลุ่มเดียวกับที่มีการแสดงออกในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Takahashi et al., 2007; Takenaka et al, 2011) ที่น่าสนใจก็คือ ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของ CD10 ซึ่งเคยมีรายงานว่า CD10 เป็น markers ที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของ Pluripotency ของเซลล์ต้นกำเนิด (Young et al., 1999) ผู้วิจัยพบว่า 13PFX1 ไม่มีการแสดงออกของ CD10 แต่ 13PFX2 มีการแสดงออกของ CD10 ดังนั้นผลดังกล่าวควรมีการศึกษาต่อไปว่า CD10 เป็น pluripotent markers จริงหรือไม่ หรือหาก CD10 เป็น pluripotent markers จริง แสดงว่า 13PFX1 เกิดการ reprogram ที่ไม่สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับ 13PFX2

เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้ คณะผู้วิจัยได้ทดลองเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในกลุ่มเลือด หรือ hematopoietic lineage โดยใช้ขั้นตอนและวิธีการที่รายงานโดย Salvagiotto และคณะ (2011) ซึ่งวิธีการนี้จัดเป็นวิธีที่พยายามที่จะสร้างเซลล์ในกลุ่มเลือดที่ปราศจากการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ซึ่งอาจจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยในโรคทางระบบเลือดได้ในอนาคต หลังจากเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในระบบเลือด ผู้วิจัยพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 13PFX1 สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ CD34 โดยการแสดงออกเพิ่มขึ้นภายใน 9 วันของการเหนี่ยวนำ อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ ยังเป็นเพียงการทดลองเบื้องต้น คณะผู้วิจัยยังจำเป็นต้องปรับปรุง และพัฒนากระบวนการเหนี่ยวนำเซลล์ต้นกำเนิดให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะของโครโมโซมด้วยวิธี G-banding พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดสายพันธุ์ 13PFX1 ยังคงมีโครโมโซมที่ปกติคือ 46, XX ไม่มีการเพิ่มขึ้นหรือย้ายตำแหน่งของโครโมโซม ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่า การเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย Sendai virus TS7 ให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิด ไม่ได้ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ ความสามารถในการคงสภาพโครโมโซมที่ปกติของเซลล์ต้นกำเนิดนี้มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ ของเซลล์ต้นกำเนิดโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะในร่างกายของหนู หรือ teratoma assay ทั้งนี้เพราะหากโครโมโซมมีความผิดปกติ จะทำให้กระตุ้นให้เกิด teratoma หรือ teratocarcinoma ในสัตว์ได้ง่ายกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่มีโครโมโซมปกติ (Blum and Benvenisty, 2009) และอาจจะส่งผลต่อการแปลผล การทดสอบคุณสมบัติของสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้

ถึงแม้ว่าการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย Sendai virus TS7 จะถือว่าเป็นวิธีที่ใช้สร้าง non-integrating iPSCs และมีความปลอดภัยในการนำไปใช้ในทางคลินิก แต่หากมีวิธีอื่นที่ดีกว่าย่อมสร้างความมั่นใจแก่แพทย์ และนักวิจัยที่จะนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วย ดังนั้นคณะผู้วิจัยร่วมกับนักวิจัยจากห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้ดำเนินการวิจัยสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดโดยการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ โดยการใช้ episomal vectors และใช้กระแสไฟฟ้าในการเปิด cell membrane ของเซลล์เพื่อให้ episomal vectors สามารถเข้าสู่นิวเคลียสและ DNA ของเซลล์ CD34+ วิธีดังกล่าวเรียกว่า electroporation ซึ่งวิธีการนี้มีการรายงานมาก่อนหน้าถึงความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และ mononuclear เซลล์ที่เก็บจากไขกระดูก (Yu et al., 2009; Hu et al., 2011) ผลการทดลองในการทดลองแรกของคณะผู้วิจัย สามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ CD34+ ด้วย episomal vectors และ electroporation ได้ทั้งสิ้น 9 สายพันธุ์ โดย 8 สายพันธุ์สร้างและเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง และอีก 1 สายพันธุ์สร้างและเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วย Matrigel ระยะเวลาตั้งแต่เซลล์ CD34+ ถูก transfect ด้วย ectopic genes จนกระทั่งมีกลุ่มของเซลล์ต้นกำเนิดเจริญขึ้น ใช้เวลาประมาณ 10-12 วัน เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง และประมาณ 20 วัน เมื่อเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงที่เคลือบด้วย Matrigel จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า การเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์พี่เลี้ยงมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ CD34+ ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย ectopic genes มากกว่าการเลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงที่เคลือบด้วย Matrigel

๕. สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองในที่สุดท้ายของโครงการวิจัย แสดงให้เห็นว่า ความรู้และประสบการณ์ของคณะผู้วิจัยในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ร่างกาย ซึ่งใน

ที่นี้คือเซลล์ CD34+ จากเลือดสายสะดือ เนื่องจากข้อจำกัดต่างๆในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนที่ได้จากเทคนิคการย้ายฝากนิวเคลียส ซึ่งทำให้คณะผู้วิจัยไม่สามารถดำเนินการวิจัยได้จนเสร็จสิ้นตามที่ได้เสนอไว้ในโครงร่างการวิจัย แต่คณะผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่า สามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำได้ และเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้น่าจะเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพสูง เทียบเท่ากับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน ในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางคลินิก

บรรณานุกรม

1. Aggarwal R, Lu J, Pompili VJ, Das H. Hematopoietic stem cells: Transcriptional regulation, *Ex Vivo* expansion and clinical application. *Curr Mol Med*. 2012;12(1): 34-49.
2. Ban H, Nishishita N, Fusak N, et al. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 14234–14239.
3. Blum B and Benvenisty N. The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell Cycle*. 2009; 8:23: 3822-3830.
4. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell*. 2009; 5: 353–357.
5. Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell*. 2009; 5: 434–441.
6. Hanley PJ, Cruz CR, Shpall EJ, Bollard CM. Improving clinical outcomes using adoptively transferred immune cells from umbilical cord blood. *Cytherapy*. 2010; 12: 713–720.
7. Hu K, Yu J, Suknuntha K, et al. Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood*. 2011; 117: e109-e119.
8. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissue vs. those from other sources, Their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009; 88(9): 792-806.
9. Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ, et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*. 2009; 461: 649–643.
10. Kim PG, Daley GQ. Application of induced pluripotent stem cells to hematologic disease. *Cytherapy*. 2009; 11: 980–989.
11. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, et al. Highly Sensitive In Vitro Methods for Detection of Residual Undifferentiated Cells in Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Human iPS Cells. *PLoS One*. 2012; 7(5): e37342.
12. Lam MT, Longaker MT. Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012; Doi: 10.1002/term.1499. [Epub ahead of print].

13. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 2883–2888.
14. Lu TY, Yang L. Uses of cardiomyocytes generated from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2011; 2(6): 44.
15. MacArthur CC, Fontes A, Ravinder N, et al. Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells by a Nonintegrating RNA Sendai Virus Vector in Feeder-Free or Xeno-Free Conditions. *Stem Cells Int*. 2012; 564612.
16. Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 2007; 1:55–70.
17. Menendez P, del Canizo MC, Orfao A. Immunophenotypic characteristics of PB-mobilised CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001;15: 53–61.
18. Menendez P, Perez-Simon JA, Mateos MV, et al. Influence of the different CD34+ and CD342 cell subsets infused on clinical outcome after non-myeloablative allogeneic peripheral blood transplantation from human leucocyte antigen-identical sibling donors. *Br J Haematol*. 2002; 119: 135–143.
19. Nishishita N, Shikamura M, Takenaka C, Takada N, Fusak N, Kawamata S. Generation of Virus-Free Induced Pluripotent Stem Cell Clones on a Synthetic Matrix via a Single Cell Subcloning in the Naïve State. *PLoS One*. 2012; 7(6): e38389.
20. Okita K, Nagata N, Yamanaka S. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Circ Res*. 2011; 109(7): 720-721.
21. Pruksananonda K, Rungsiwiwut R, Numchaisrika P, et al. Eighteen-year cryopreservation does not negatively affect the pluripotency of human embryos: evidence from embryonic stem cell derivation. *Bioresearch Open Access*. 2012; 1(4): 1-7.
22. Salvagiotto G, Burton S, Daigh CA, Rajesh D, Slukvin II, Seay NJ. A defined, feeder-free, serum-free system to generate in vitro hematopoietic progenitors and differentiated blood cells from hESCs and hiPSCs. *PLoS One*. 2011; 6(3): e17829.
23. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861–872.
24. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663–676.
25. Takenaka C, Nishishita N, Takada N, Jakt LM, Kawamata S. Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. *Exp Hematol*. 2010; 38: 154–162.
26. Thomsom JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cells line from human blastocysts. *Science*. 1998; 282:1145-1147.

27. Torrez LB, Perez Y, Yang J, Zur Nieden NI, Klassen H, Liew CG. Derivation of Neural Progenitors and Retinal Pigment Epithelium from Common Marmoset and Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Int.* 2012; 417865. Epub 2012 Mar 20.
28. Ye Z, Zhan H, Mali P, et al. Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood.* 2009; 114: 5473–5480.
29. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science.* 2009; 324:797–801.
30. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007; 318: 1917–1920.
31. Young HE, Steele TA, Bray RA, et al. Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56 and MHS class-I. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 221: 63-71.
32. Zhang Y, Li CX, Sun L. Investigation of immunogenicity of cryopreserved limbal stem cells. *Int J Ophthalmol.* 2011; 4(6): 590-593

ภาคผนวก

BioResearch Open Access
Volume 1, Number 4, 2012
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/biores.2012.0242

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Eighteen-Year Cryopreservation Does Not Negatively Affect the Pluripotency of Human Embryos: Evidence from Embryonic Stem Cell Derivation

Kamthorn Pruksananonda,^{1,2} Ruttachuk Rungsiwut,¹⁻³ Pranee Numchaisri,^{1,2}
Vichuda Ahnonkitpanit,^{1,2} Nipan Isarasena,⁴ and Pramuan Virutamasen^{1,2}

Abstract

Human embryonic stem (hES) cells are considered to be a potential source for the therapy of human diseases, drug screening, and the study of developmental biology. In the present study, we successfully derived hES cell lines from blastocysts developed from frozen and fresh embryos. Seventeen- to eighteen-year-old frozen embryos were thawed, cultured to the blastocyst stage, and induced to form hES cells using human foreskin fibroblasts. The Chula2.hES cell line and the Chula4.hES and Chula5.hES cell lines were derived from blastocysts developed from frozen and fresh embryos, respectively. The cell lines expressed pluripotent markers, including alkaline phosphatase (AP), Oct3/4, stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4, and tumor recognition antigen (TRA)-1-60 and TRA-1-81 as detected with immunocytochemistry. The real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) results showed that the cell lines expressed pluripotent genes, including *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *UTF*, *LIN28*, *REX1*, *NODAL*, and *E-Cadherin*. In addition, the telomerase activities of the cell lines were higher than in the fibroblast cells. Moreover, the cell lines differentiated into all three germ layers both *in vitro* and *in vivo*. The cell lines had distinct identities, as revealed with DNA fingerprinting, and maintained their normal karyotype after a long-term culture. This study is the first to report the successful derivation of hES cell lines in Thailand and that frozen embryos maintained their pluripotency similar to fresh embryos, as shown by the success of hES cell derivation, even after years of cryopreservation. Therefore, embryos from prolonged cryopreservation could be an alternative source for embryonic stem cell research.

Key words: embryo transfer; infertility; reproductive technology; stem cells

Introduction

IN HUMAN-ASSISTED reproductive technology, the technique of cryopreservation, which involves storing an oocyte, sperm or embryo at sub-zero temperatures, is well established, effective and applied in most infertility centers around the world.¹ Researchers were initially concerned with the effects of cryopreservation or cryostorage on the survival, development and molecular biology of the frozen embryo after thawing.²⁻⁴ However, recent reports have demonstrated that cryostorage does not adversely affect post-thaw survival or pregnancy outcome during *in vitro* fertilization (IVF) or oocyte donation in patients. Moreover, a healthy boy was born from 20-year-old cryopreserved pronuclear (PN) embryos.^{5,6}

Embryos that display poor morphology after freeze-thawing are discarded or donated for research purposes, including human embryonic stem (hES) cell derivation. The hES cells that are derived from the pluripotent cells of a preimplantation stage embryo display unique characteristics, such as self-renewal and differentiation into all adult cell types. Thus, hES cells are not only considered to be potential sources for drug screening tests and regenerative medicine therapies, they might also serve as a model for the study of early human embryonic development.⁷ To date, more than 1000 hES cell lines have been derived in laboratories worldwide, and rapid advances in the knowledge and technologies associated with the culture conditions of hES cells have made it possible to derive new hES cell lines under clinical or near clinical conditions for further use.⁸ Although the embryos

¹Human Embryonic Stem Cell Research Center; Departments of ²Obstetrics and Gynecology (Reproductive Medicine Unit), and ⁴Pharmacology, Faculty of Medicine; Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

³King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand.

may display poor morphology, they remain a major source of starting material for the isolation of hES cells, and several methods have been applied to improve the success of hES cell derivation. Culturing poor-quality embryos in a modified culture medium increased blastocyst formation,⁹ and using mesenchymal stem cells as feeder cells also facilitated the derivation of hES cells from poor-quality embryos.¹⁰ However, a recent publication demonstrated that there was no correlation between the morphology of cells at the blastocyst stage and the success of hES cell derivation.¹¹ Thus, the success of hES cell derivation can be expected even with poor-quality frozen-thawed embryos. As previously discussed, the duration of cryopreservation does not affect pregnancy outcome; thus, it would be interesting to determine whether long-term cryopreserved embryos could generate hES cell lines similar to fresh embryos.

In the present study, we aimed to derive hES cells from embryos that were previously frozen for 17–18 years under culture conditions that minimize contact with animal products. Moreover, an examination of the poor quality of fresh embryos that were not suitable for transfer was also included in this study.

Materials and Methods

Human embryos and ethical approval

The human embryos used in the present study were donated with informed consent from a couple that participated in the IVF program for infertility treatment. The isolation of hES cells was performed after obtaining the approval of the Institutional Review Board (IRB number 096/50), Faculty of Medicine, the Chulalongkorn University. The procedure was performed according to the National Guidelines for Stem Cell Research issued by the Thai Medical Council and the Ministry of Public Health.

Embryo culture

Frozen embryos at the PN stage were thawed, transferred to droplets of the global medium (LifeGlobal) supplemented with 10% serum substitute (Irvine Scientific), covered with light oil (LifeGlobal), and cultured at 37°C in 5% O₂, 6% CO₂, and 89% NO₂. The poor-quality donated fresh embryos were cultured under the same culture conditions. After 3–4 days of culture, only the embryos that developed to the blastocyst stage were collected and transferred to the hES cell laboratory for hES cell isolation.

Preparation of the feeder layer

Commercial human foreskin-derived fibroblasts (HFF; CRL-2429, ATCC) were used. HFFs were cultured and maintained according to the manufacturer's protocol. To use HFFs as feeder cells, the confluent fibroblasts were mitotically inactivated with 10 µg/mL mitomycin C (Sigma) for 2.5–3 h, dissociated with 0.05% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (Invitrogen), counted, and plated on a 0.1% gelatin-coated dish (BD Bioscience).

Isolation of the inner cell mass and the propagation of hES cells

The zona pellucida of the blastocyst was removed through a brief incubation with 0.1% acidified Tyrode's solution with close monitoring under a stereomicroscope. Zona-free blasto-

cysts were directly plated onto the feeder cells. For propagation, the hES cells were mechanically dissociated into small pieces every 5–7 days using a 23G needle, detached from the culture dish, and plated onto new feeder cells; the culture medium was changed daily. The hES cell medium was the knock-out Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 20% knockout serum replacement, 1% Glutamax[®], 1% nonessential amino acids, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 1% penicillin-streptomycin (all purchased from Invitrogen), and 8 ng/mL fibroblast growth factor (bFGF; R&D Systems).

Alkaline phosphatase staining and immunostaining

The hES cell colonies were fixed using 4% paraformaldehyde. The alkaline phosphatase (AP) activity was detected using an AP detection kit (Sigma), according to the manufacturer's protocol. The primary antibodies used were mouse antibodies against stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4, tumor recognition antigen (TRA)-1-60 and TRA-1-81, and rabbit anti-Oct3/4 (all purchased from Abcam). For the detection of the antibodies, fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit or Cy3-conjugated goat anti-mouse antibodies were used.

Real-time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted using TRI REAGENT[®] (Molecular Research Center, Inc.). A total of 1 µg of total RNA was reverse transcribed using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Inc.), according to the manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with PCR master mix (2×) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Inc.). The PCR conditions and primers were described previously.¹²

Differentiation of hES cells

To determine their *in vitro* differentiation ability, hES cells were mechanically dissociated into small clumps and cultured in suspension in the hES cell culture medium without bFGF. Three-dimensional structures called embryoid bodies (EBs) were observed for up to 21 days. To determine their *in vivo* differentiation ability, a teratoma formation assay was performed. Approximately 1 × 10⁶ hES cells were injected under the testicular capsule of 4- to 6-week-old nude mice. After 10–12 weeks, the mice were euthanized, and the teratomas were removed, fixed with 10% buffered formalin phosphate (Sigma), and embedded in paraffin blocks. Next, 4 µm sections were stained with hematoxylin and eosin. The care of the animals was conducted in accordance with the institutional guidelines of the Ethics Committee for Animal Laboratory Use (Approval No. 15/52).

Telomerase analysis

The telomerase activity of the hES cell lines was measured using a TRAPeze Telomerase Detection Kit (Chemicon), according to the manufacturer's instructions.

Karyotype analysis

The hES cells were incubated with 10 ng/mL of colcemid (Karyomax, Invitrogen) for 3–4 h at 37°C and 5% CO₂. Subsequently, the cells were trypsinized, treated with KCl solution (Bio Industries), and fixed with fixative (3:1 methanol:acetic

HUMAN EMBRYONIC STEM CELL DERIVED FROM 18-YEAR-OLD FROZEN EMBRYO

3

acid). The metaphases were spread onto microscope slides and stained using a standard G-banding technique. The chromosomes were classified according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature. At least 15–20 metaphases were analyzed per cell line.

DNA fingerprinting

Total genomic DNA was extracted from the undifferentiated hES cells using a DNeasy Tissue Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Fifteen short tandem repeat (STR) loci and amelogenin were amplified using an AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions and detected using a 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Results

Development of embryos after long-term cryopreservation

Upon approval from the ethics committee, a total of 23 embryos were thawed and cultured according to the standard protocol of the IVF Unit, King Chulalongkorn Memorial Hospital. A total of 17 of the 23 (73.9%) embryos survived after thawing: 12 (70.6%) of the surviving embryos arrested at the initial stage of development, and five (29.4%) embryos developed to the blastocyst stage after 4 days of culture. Of the five blastocysts, we only obtained one expanded blastocyst with a tightly packed inner cell mass (ICM; Fig. 1A); the other blastocysts were not fully expanded, showing thick or broken zona pellucidae and small ICMs (Fig. 1B–D).

Isolation of ICMs and hES cell culture

Although their quality was not high, five blastocysts from frozen-thawed embryos and eight fresh blastocysts were used for hES cell derivation. Due to the difficulty of the localization of the ICM within blastocysts (Fig. 2A), the mechanical separation of the ICM from the trophoblast (TE) was not achieved. Thus, the zona pellucida was isolated, and the blastocysts were directly plated onto inactivated HFFs that were

used as the feeders. At 24 h after the initial plating, the cultures were examined for the attachment of the blastocysts to the feeder layer. Three to four days after coculture with feeder cells, a prominent ICM surrounded by TE cells was observed (Fig. 2B). This ICM was separated from the TE using a 23G needle and plated on a layer of fresh feeder cells. Within 24 h, the ICM was attached to the new feeder cells. Seven days after the second plating of the ICM, hES-like cells began growing from the ICM clump (Fig. 2C). The newly formed hES-like cells were dissociated using a needle and plated onto fresh feeder cells. Mechanical passaging was applied to propagate the hES cells. The established hES cell line (Fig. 2D) exhibited a vigorous growth rate during a long-term culture and was routinely passaged every 5–7 days. The efficiency of the derivation of the hES cell lines from blastocysts developed from frozen-thawed and fresh embryos is summarized in Table 1.

Morphology of hES cells on different densities of feeder cells

The cell line derived from the 18-year-old cryopreserved embryo, Chula2.hES, displayed the typical features of hES cells, including flat colonies, a high nuclear/cytoplasmic ratio with clearly distinguished nucleoli, and a defined border of colonies. At the early stage of Chula2.hES derivation (passage numbers 3–8), three different densities of feeder cells were tested. As shown in Figure 2E, after growing five subsequent cultures on three different feeder cell densities of 1.75×10^4 , 3.5 , and 7.0×10^4 cells/cm², we found that Chula2.hES cells cultured on 1.75×10^4 cells/cm² tended to differentiate more easily compared with other feeder cell densities. Moreover, the attachment of Chula2.hES cells cultured on 7.0×10^4 cells/cm² decreased after subsequent passages. Thus, a feeder cell density of 3.5×10^4 cells/cm² was selected for the culture of Chula2.hES cells and the derivation of the other lines, Chula4.hES and Chula5.hES.

Characterization of hES cells

All of the hES cell lines exhibited the AP activity and expressed hES cell markers, including SSEA4, TRA-1-60,

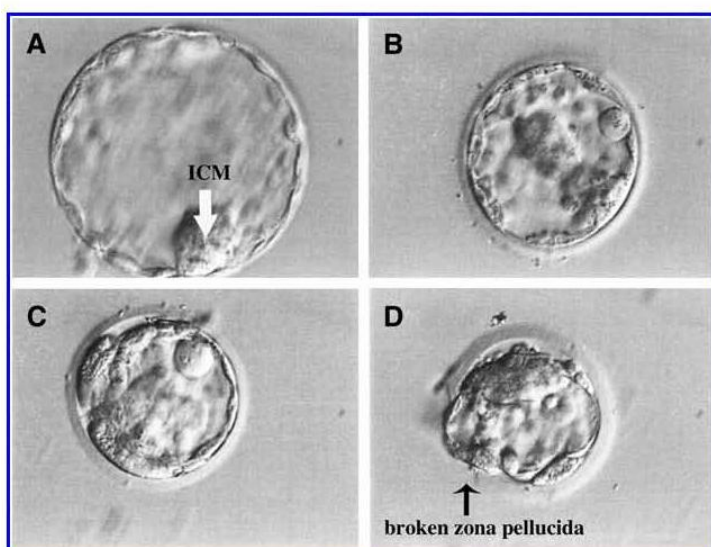
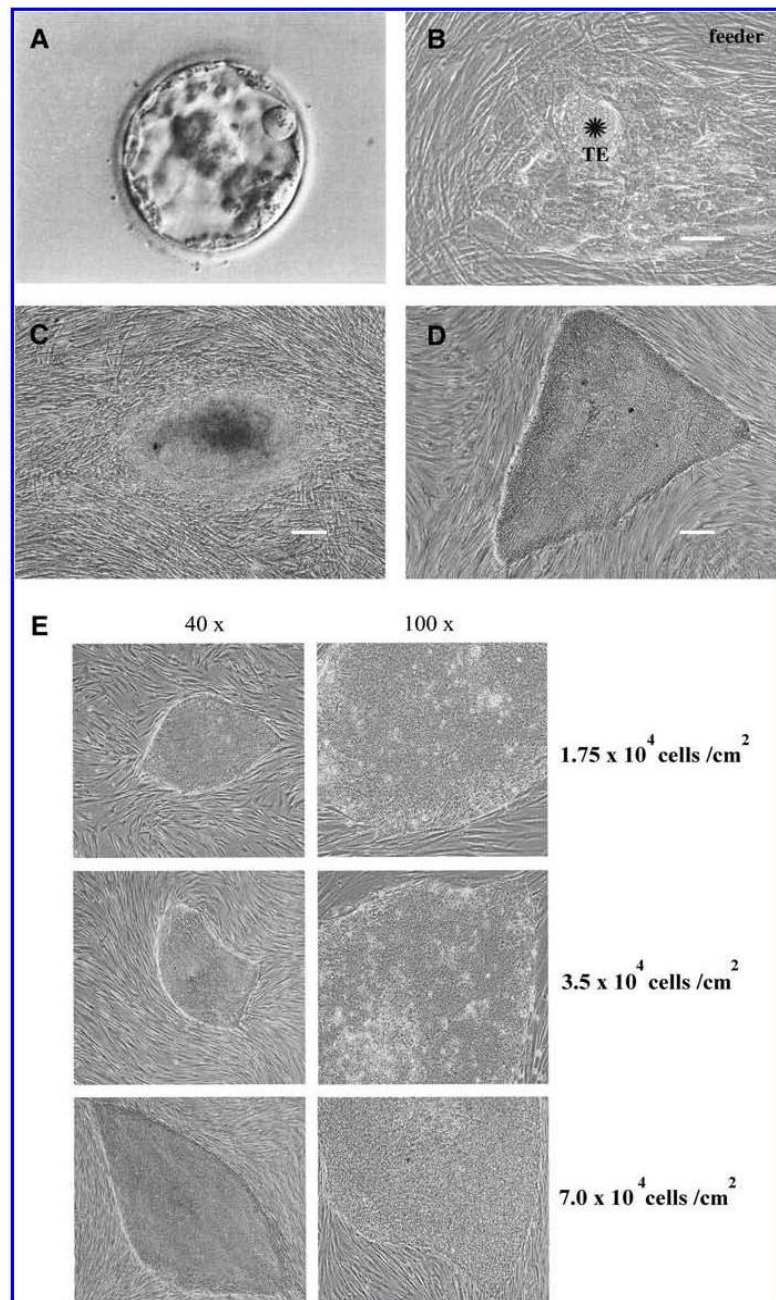


FIG. 1. Morphology of the blastocysts developed from long-term cryopreserved embryos. Six days after thawing and culture, the surviving embryos developed to the blastocyst stage. Different morphologies of the blastocysts, including fully expanded blastocysts with a clear and tightly packed ICM (white arrow; A), non-fully expanded blastocysts with thick zona pellucidae and small ICMs (B–D), and broken zona pellucida during the freezing–thawing process, were observed (black arrow; D). All of the images were obtained using a 40× objective phase-contrast microscope. ICM, inner cell mass.

FIG. 2. Derivation of a hES cell line from a blastocyst developed from a frozen-thawed embryo. The images show the successful derivation of the Chula2.hES line from a poor-quality intact blastocyst developed from an 18-year- frozen embryo (A). The zona pellucida of the blastocyst was removed, and the entire blastocyst was plated on feeder cells. Three days after plating, an outgrowth of ICM (indicated by the star) surrounded by a TE was observed (B). The ICM was mechanically removed from the TE and plated onto new feeder cells. Seven days after removing the TE, an outgrowth of putative hES-like cells was observed (C), which later generated the stable hES cell line Chula2.hES (D). The morphologies of the colonies and individual Chula2.hES cells on three different feeder cell densities (E). A density of 35,000 cells/cm² was selected for further propagation. Scale bars = 100 μ m, hES, human embryonic stem; TE, trophectoderm.



TRA-1-81, and Oct3/4 (Fig. 3A). The real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) results confirmed that the Chula2.hES, Chula4.hES, and Chula5.hES cells are pluripotent cells, as shown by the expression of pluripotent genes, including *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *UTF*, *REX1*, *LIN28*, *NODAL*, and *E-Cadherin*, which was similar to the NIH registered hES cell line BG01 (Fig. 3B). The ability of the hES cell lines to differentiate into embryonic germ layers was demonstrated.

To evaluate their *in vivo* differentiation, Chula2.hES, Chula4.hES, and Chula5.hES cells were allowed to grow and differentiate for 10–12 weeks after injection into nude mice. The histopathological analysis of the teratomas revealed the presence of tissues derived from the ectoderm, endoderm, and mesoderm layers (Fig. 3C). For *in vitro* differentiation, the hES cell lines were mechanically dissociated into small clumps and cultured in suspension. All of the cell lines

HUMAN EMBRYONIC STEM CELL DERIVED FROM 18-YEAR-OLD FROZEN EMBRYO

5

TABLE 1. COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELL DERIVATION USING BLASTOCYSTS DEVELOPED FROM FROZEN–THAWED AND FRESH EMBRYOS

Embryos	Blastocysts used <i>n</i>	Attached <i>n</i> (%)	ICM outgrowth <i>n</i> (%)	hES-like cells <i>n</i> (%)	Cell lines <i>n</i> (%)	Name
Frozen–thawed	5	5 (100.0)	3 (60.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	Chula2.hES
Fresh	8	7 (87.5)	5 (62.5)	3 (37.5)	2 (25.0)	Chula4.hES Chula5.hES
Total	13	12 (92.3)	8 (61.5)	4 (30.8)	3 (23.1)	

ICM, inner cell mass; hES, human embryonic stem.

were able to form three-dimensional structures, called EBs (Fig. 3D). When the telomerase activity of the hES cell lines was analyzed, all of the cell lines displayed a high telomerase activity, which was higher than the activity of HFFs (Fig. 3E), suggesting immortal replication ability.

Identification of hES cell lines

The chromosomal stability of the hES cell lines was assayed through conventional karyotyping. The cells were karyotyped using standard G-banding. At least 15–20 metaphases of each cell line were counted. Karyotyping revealed that the Chula2.hES line, which was derived from an 18-year-old frozen embryo, had a normal male chromosome content of 46 XY. The Chula4.hES and Chula5.hES cells, which were derived from blastocysts developed from fresh embryos, showed normal male and female chromosome contents of 46 XY and 46 XX, respectively (Fig. 4A). A total of 16 STR loci were analyzed for the three newly established hES cell lines, and each cell line showed distinct STR loci (Fig. 4B).

Discussion

In our previous study, we examined different protocols for the derivation of hES cells, but only one hES-like cell line was successfully generated from a frozen–thawed embryo using human skin fibroblasts as feeder cells.¹² In the present study, a total of 12 and 11 PN stage embryos, which had been frozen in 1990 and 1991, respectively, were thawed and cultured in a commercial medium without the supplementation of growth factors or cytokines. The survival rate of the frozen–thawed embryos in our study (73.9%) was consistent with that of other studies in which the embryo culture medium was supplemented with an Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 or a combination of human recombinant leukemia inhibitory factor (hrLIF) and human basic fibroblast growth factor (hbfGF).^{9,10} The ROCK inhibitor positively enhances the survival and proliferation of several cell types.^{13–15} Five embryos survived the freeze–thaw process and developed to the blastocyst stage, which demonstrated that the cryopreserved embryos in this study maintained their developmental ability, even after 17–18 years of cryostorage.

We attempted to isolate hES cells from the low-quality blastocysts derived from the frozen–thawed embryos without modifying the culture conditions. Modifying embryo culture conditions, such as culturing embryos in a modified culture medium composed of the G2.5 medium supplemented with hrLIF, hrbFGF, and human serum albumin^{9,16} or two additional days of culturing after reaching an early blastocyst stage,^{16,17} shows a beneficial effect on hES cell derivation. However, poor-quality blastocysts developed from either

fresh or frozen–thawed embryos were used for hES cell derivation, and both showed the ability to generate hES cell lines. As our results showed, hES cell lines could be derived from blastocysts developed from frozen–thawed and fresh embryos with no difference in efficiency, and the cryopreservation of the embryo did not affect the efficiency of hES cell derivation.

The hES cells derived for medical purposes should not be exposed to animal components. Although the hES cell lines derived in this study were not completely xeno-free cell lines, the animal components will be removed from the culture conditions in our future studies. However, in this study, we did not add serum to the culture medium and further minimized contact with animal components in the culture conditions by using commercial HFFs as feeder cells and mechanical passage for hES cell propagation. The method for the isolation of the ICM also affects the success of hES cell derivation. To derive xeno-free hES cells, we considered mechanical methods for the isolation of the ICM or whole-blastocyst culture techniques. Both methods have previously been reported for the successful derivation of hES cell lines.^{18,19} However, due to their poor quality, the blastocysts contained a relatively small ICM; thus, the only method that could be used in this study was whole-blastocyst culture. Three to 4 days after the initial plating of the whole blastocyst onto feeder cells, a dome-shaped ICM was observed. This phenomenon demonstrates that our culture conditions support the growth of an ICM in poor-quality blastocysts. The complication of using this method is that the ICM is cultured in close contact with the TE. Contact with the TE might decrease the success of hES cell derivation by inducing the differentiation of the ICM.²⁰ To avoid losing the pluripotency of the cells in the ICM, we mechanically removed the ICM outgrowth from the TE at approximately 3–4 days after the initial plating, plated the ICM on new feeder cells, and subsequently split the hES-like cells into small pieces for further propagation. Thus, three hES cell lines, Chula2.hES, Chula4.hES, and Chula5.hES, were successfully established. Other groups have also reported the early separation of the ICM from the TE.^{21,22} Although some reports have suggested that in whole-blastocyst culture, the ICM clump should be separated from the TE outgrowth and split into small pieces at 7–10 days after initial plating,^{18,20,23} no hES cell line could be derived in our hands using this method. In fact, the ICM clump should comprise a large number of pluripotent cells before the first splitting, as human pluripotent cells preferably grow as a group of cells.

Based on previous reports, the feeder cell density is an important parameter for hES cell culture. The morphology of the hES cell colonies was different when cultured on different feeder cell densities.²⁴ To our knowledge, there are no standard criteria for the feeder cell density for the derivation and

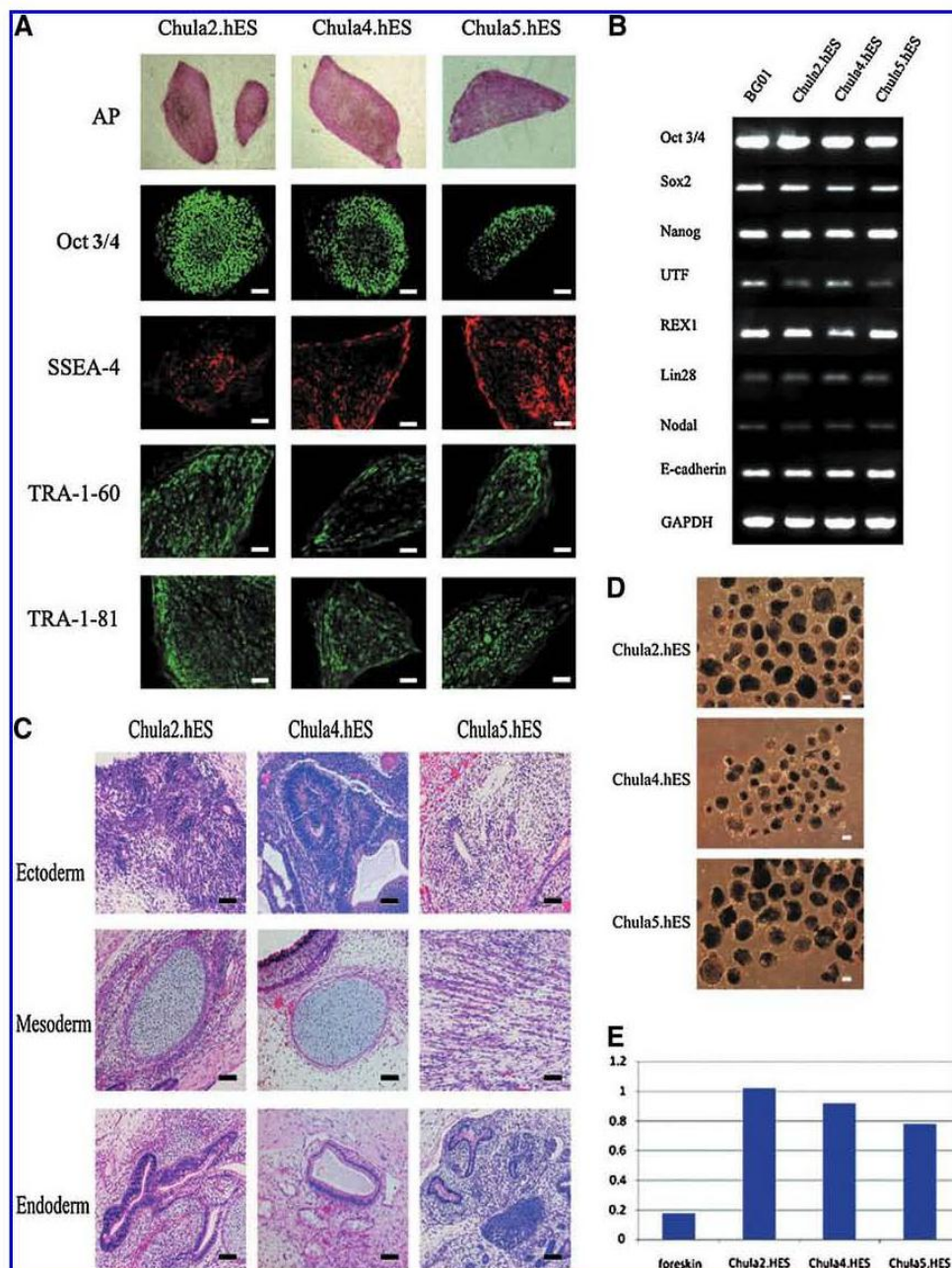


FIG. 3. Characterization of the hES cell lines. The Chula2.hES, Chula4.hES, and Chula5.hES cells expressed pluripotent markers, including AP, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60, and TRA-1-81, as detected with immunostaining (A), and pluripotent genes, including *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *UTF*, *REX1*, *LIN28*, *NODAL*, and *E-Cadherin*, as detected with RT-PCR. GAPDH was used as a housekeeping gene, and the NIH registered hES cell line BG01 was used as the control (B). The *in vivo* differentiation of the hES cell lines was assessed using a teratoma assay. Ectodermal, mesodermal, and endodermal tissues were found in the teratomas of Chula2.hES, Chula4.hES, and Chula5.hES cells (C). The *in vitro* differentiation of the hES cell lines was determined using EB formation (D). The immortal replication ability of hES cell lines was measured through the high level of telomerase activity, and the levels were higher than in foreskin fibroblasts, which were used as feeder cells (E). The scale bars in (A) and (C) represent 100 μ m, and the scale bar in (D) represents 10 μ m. All of the images of AP in A were acquired with a 10 $\times$ objective phase-contrast microscope. AP, alkaline phosphatase; SSEA, stage-specific embryonic antigen; TRA, tumor recognition antigen; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; EB, embryoid body.

HUMAN EMBRYONIC STEM CELL DERIVED FROM 18-YEAR-OLD FROZEN EMBRYO

7

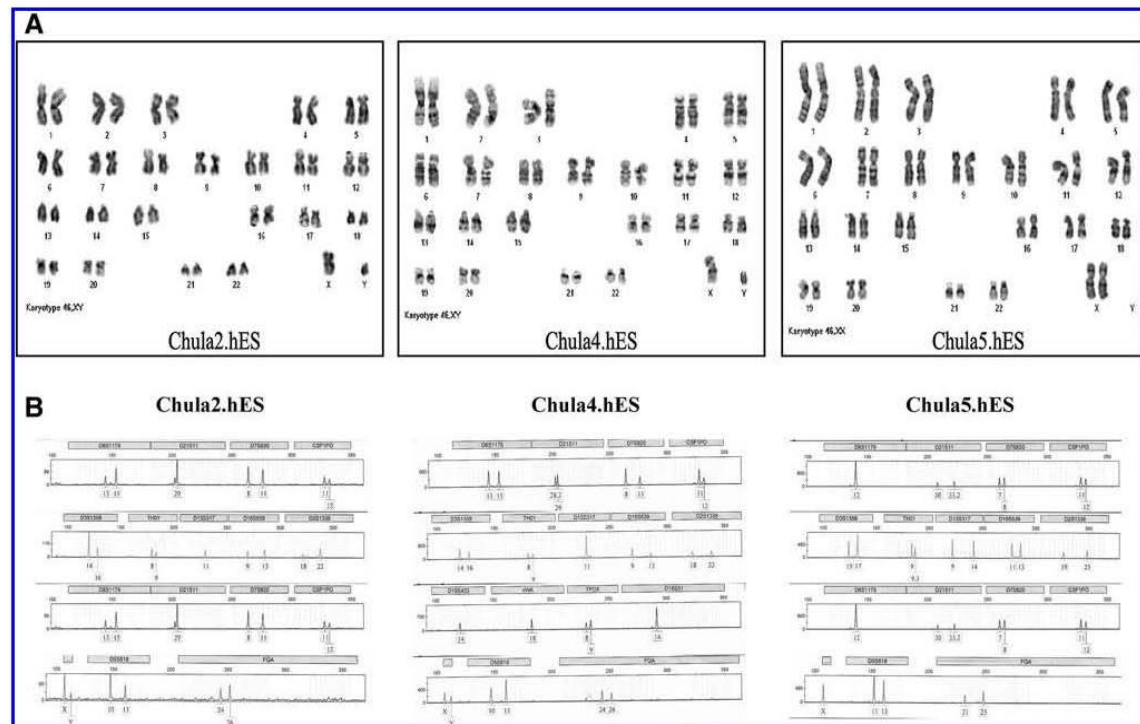


FIG. 4. (A) The karyotype analysis of three different hES cell lines using the G-banding method and DNA fingerprinting. Chula2.hES, Chula4.hES, and Chula5.hES cells were able to maintain their normal karyotype after long-term culture, as detected with standard G-banding. The Chula2.hES, Chula4.hES, and Chula5.hES cells exhibit 46 XY, 46 XY, and 46 XX, respectively. **(B)** The Chula2.hES, Chula4.hES, and Chula5.hES cells displayed different DNA fingerprinting, which indicates that the three cell lines were derived from different embryos.

maintenance of a new hES cell line. Inzunza et al.²³ suggested that when using commercially available HFFs as the feeder, a density of approximately 5.3×10^4 cells/cm² could be applied for derivation, and subsequently, a density of 1.23×10^5 cells/cm² could be used for hES cell maintenance. Ellerström et al.²⁰ used a density of approximately 6.9×10^4 HFF cells/cm² for the derivation of xeno-free hES cells. We tested three different feeder cell densities for the derivation of the Chula2.hES line (passage numbers 3–8). Our results demonstrated that the Chula2.hES line demonstrated the best morphology of undifferentiated cells when cultured on 3.5×10^4 cells/cm² compared with their growth on 1.75 and 7.0×10^4 cells/cm²; thus, this density was selected for the derivation of other cell lines. In contrast to Chula2.hES cells, during the first and second passages of Chula4.hES and Chula5.hES cells, both of the cell lines tended to differentiate easily when cultured on 3.5×10^4 cells/cm² of feeder cell density. The spontaneous differentiation of Chula4.hES and Chula5.hES lines can be explained by the low density of feeder cells resulting in insufficient levels of secreted factors, extracellular matrix, several molecules, and cellular contacts that are provided by the feeder cells for the maintenance of hES cells in the undifferentiated state.²⁵ To avoid losing the pluripotent cells, we increased the density of the HFF cells from 3.5 to 5.0×10^4 cells/cm², which resulted in the establishment of two stable cell lines, Chula4.hES and Chula5.hES. The 7.0×10^4 cells/cm² feeder density was not

selected for culturing the hES cell lines because a high feeder cell density would result in a more rapid depletion of nutrients and oxygen within the *in vitro* culture milieu, which could be detrimental to the growth of hES cells. In addition, a high feeder cell density could also physically hinder the attachment and growth of ES colonies during serial passages.²⁴ Notably, our results also demonstrated that different cell lines might prefer different feeder cell densities.

The Chula2.hES line isolated from frozen-thawed embryos showed a morphology that was typical of hES cells and expressed pluripotent markers, such as AP, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, and Oct3/4, and pluripotent genes, such as OCT3/4, SOX2, NANOG, UTF, REX1, LIN28, NODAL, and E-Cadherin. The Chula2.hES line showed high levels of telomerase activity, indicating that these cells can infinitely proliferate. The Chula2.hES cells differentiated into three embryonic germ layers through the formation of EBs, a three-dimensional structure formed in suspension culture, and teratoma tissue after injection into the testicular capsule of nude mice. The ability of differentiation strongly demonstrated the pluripotency of Chula2.hES cells. The characteristics displayed by Chula2.hES cells were similar to Chula4.hES and Chula5.hES cells, which were derived from blastocysts developed from fresh embryos. The pattern of DNA fingerprinting of all of the hES cell lines was different, confirming that the cell lines are derived from different embryos. Furthermore, all of the hES cell lines maintained their normal karyotype after prolonged culture. Taken

together, our results showed that Chula2.hES, Chula4.hES, and Chula5.hES cell lines have the same pluripotency as other existing hES cell lines.^{7,26,27}

In conclusion, this is the first report of the successful derivation of hES cell lines in Thailand. The success of hES cell derivation in the present study demonstrated that an 18-year cryopreservation did not adversely affect the pluripotency of a human embryo, and this embryo maintained its pluripotency similar to fresh embryos, as shown by the success of the derivation of Chula2.hES, Chula4.hES, and Chula5.hES lines.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ms. Praewphan Ingrungruenglert for the RT-PCR analysis. This work was supported through funding from the Thai Government Research Budget 2007–2011 (Grant No. GRB.APS.05.54.30.01) and the National Research University Project of CHE (HR1161I).

Author Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

- Capalbo A, Rienzi L, Buccheri M, et al. The worldwide frozen embryo reservoir: Methodologies to achieve optimal results. *Ann NY Acad Sci.* 2011;1221:32–39.
- Balaban B, Uman B, Ata B, et al. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: Vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Human Reprod.* 2008;23:1976–1982.
- Boonkusol D, Gal AB, Bodo S, et al. Gene expression profiles and *in vitro* development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Mol Reprod Dev.* 2006;73:700–708.
- Park SY, Kim EY, Cui XS, et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote.* 2011;14:125–131.
- Dowling-Lacey D, Mayer JF, Jones E, et al. Live birth from a frozen-thawed pronuclear stage embryo almost 20 years after its cryopreservation. *Fertil Steril.* 2011;95:1120e1–1120e3.
- Riggs R, Mayer J, Dowling-Lacey D, et al. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. *Fertil Steril.* 2010;93:109–115.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell line from human blastocysts. *Science.* 2008;282:1145–1147.
- Fraga AM, Souza de Araujo ES, Stabellini R, et al. A survey of parameters involved in the establishment of new lines of human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2011;7:775–781.
- Fan Y, Luo Y, Chen X, et al. A modified culture medium increase blastocyst formation and the efficiency of human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. *J Reprod Dev.* 2010;56:533–539.
- Cortes JL, Sanchez L, Ligero G, et al. Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. *Hum Reprod.* 2009;24:1844–1851.
- Strom S, Rodriguez-Wallberg K, Holm F, et al. No relationship between embryo morphology and successful derivation of human embryonic stem cell lines. *PLoS One.* 2010;5:e15329.
- Pruksananonda K, Rungsiwut R, Numchaisri P, et al. Development of human embryonic stem cells. *J Med Assoc Thai.* 2009;92:443–450.
- Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007;25:681–686.
- Koyanagi M, Takahashi J, Arakawa Y, et al. Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *J Neurosci Res.* 2008;86:270–280.
- Zhang L, Valdez JM, Zhang B, et al. ROCK inhibitor Y-27632 suppresses dissociation-induced apoptosis of murine prostate stem/progenitor cells and increase their cloning efficiency. *PLoS ONE.* 2011;6:e18271.
- Liu W, Yin Y, Long X, et al. Derivation and characterization of human embryonic stem cell lines from poor quality embryos. *J Genet Genomics.* 2009;36:229–239.
- Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, et al. Derivation of human embryonic stem cells from day 8 blastocysts recovered after three-step *in vitro* culture. *Stem Cells.* 2004;22:790–797.
- Kim HS, Oh SK, Park YB, et al. Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2005;23:1228–1233.
- Strom S, Inzunza J, Grinnemo KH, et al. Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod.* 2007;22:3015–3018.
- Ellerström C, Strehl R, Moya K, et al. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells.* 2006;24:2170–2176.
- Li C, Yang Y, Lu X, et al. Efficiency derivation of Chinese human embryonic stem cell lines from frozen embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010;46:186–191.
- Revazova ES, Turovets NA, Kochetkova OD, et al. HLA homozygous stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells.* 2008;10:11–24.
- Inzunza J, Gertow K, Stromberg MA, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells.* 2005;23:544–549.
- Heng BC, Liu H, Cao T. Feeder cell density—a key parameter in human embryonic stem cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2004;40:255–257.
- Anisimov SV, Christophersen NS, Correia AS, et al. Identification of molecules derived from human fibroblast feeder cells that support the proliferation of human embryonic stem cells. *Cell Mol Bio Lett.* 2011;16:79–88.
- Inamdar MS, Venu P, Srinivas MS, et al. Derivation and characterization of two sibling human embryonic stem cell lines from discarded grade III embryos. *Stem Cell Dev.* 2009;18:423–433.
- Chavez SL, Meneses JJ, Nguyen HN, et al. Characterization of six new human embryonic stem cell lines (HSF7, -8, -9, -10, -12, and -13) derived under minimal-animal component conditions. *Stem Cells Dev.* 2008;17:535–546.

Address correspondence to:
Kamthorn Pruksananonda, MD
Reproductive Medicine Unit
Department of Obstetrics and Gynecology
Faculty of Medicine
Human Embryonic Stem Cell Research Center
Chulalongkorn University
1873 Rama 4 Road
Wangmai, Pathumwan
Bangkok 10330
Thailand

E-mail: pkamthorn@yahoo.com

ภาคผนวก



เอกสารแนบท้าย ฉบับที่ ๕

หนังสือชี้แจงและหนังสือแสดงความยินยอมบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด สถาบันพยาบาล/สถาบัน

คำอธิบาย

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เป็นเซลล์ตั้งต้นระยะแรกของชีวิต มีคุณสมบัติพิเศษ สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัดจำนวน และสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆในร่างกายได้ทุกชนิด ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมีศักยภาพสูงที่จะนำมาศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อใช้ทดแทน และรักษาโรคเรื้อรังหลายชนิดให้หายได้ จึงมีประโยชน์อย่างมากในเบื้องต้นต่อการศึกษาวิจัยจะเป็นการพัฒนาความรู้ความเข้าใจทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และนำมาประยุกต์ใช้ทางเวชปฏิบัติ

ปัจจุบัน เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนสร้างและพัฒนาขึ้นจากตัวอ่อนและ/หรือเซลล์ไข่ที่ได้รับการบริจาคภายหลังสิ้นสุดกระบวนการรักษาภาวะมีบุตรยาก หรืออาจได้รับการบริจาคระหว่างขั้นตอนการรักษาหากมีปริมาณเซลล์ไข่มากเกินไปสำหรับการรักษาภาวะมีบุตรยาก

ข้าพเจ้าและสามีทราบดีว่า คณะแพทย์ผู้รักษาและทีมงานคำนึงถึงเป้าหมายและประโยชน์สูงสุดในการรักษาภาวะมีบุตรยากเป็นหลักสำคัญ อันดับแรก การขอรับบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด จะพิจารณาเมื่อสิ้นสุดการรักษาภาวะมีบุตรยากแล้ว หรือต่อเมื่อเซลล์ไข่ที่ได้มีปริมาณมากเกินไปสำหรับการใช้เพื่อการรักษาทางคลินิก โดยจะต้องมีการแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบและขอความยินยอมจากข้าพเจ้าอีกครั้ง ทั้งนี้การบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด จะไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงหรืออันตรายต่อข้าพเจ้าเพิ่มขึ้น จากการรักษาภาวะมีบุตรยากตามปกติ

ข้าพเจ้าทราบว่า การบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด จะดำเนินการโดยรักษาความลับของผู้ป่วยอย่างเคร่งครัด ทั้งนี้ข้าพเจ้าสามารถตัดสินใจขอยกเลิกการบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดได้ในภายหลังได้ โดยการตัดสินใจบริจาคหรือขอยกเลิกการบริจาคมิจะมีผลกระทบต่อการรักษาภาวะมีบุตรยากของข้าพเจ้า ทั้งนี้ข้าพเจ้ายินดีที่จะทำการบริจาคเพื่อประโยชน์ของการรักษาโรค และการศึกษาวิจัย โดยไม่มุ่งหวังสิ่งตอบแทนใดๆและจะไม่เรียกร้องความเป็นเจ้าของชีวิตผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นจากเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน ของข้าพเจ้า ในภายภาคหน้า

ข้าพเจ้ามีโอกาสได้ซักถามและได้รับคำอธิบายจนกระทั่งเกิดความเข้าใจถึงขั้นตอนกระบวนการบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด และมีความประสงค์ที่จะบริจาคเซลล์ไข่ และ/หรือ ตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดภายใต้การดำเนินงานของ.....และคณะ จึงขอยืนยันการบริจาคตามนี้

☐ บริจาคเซลล์ไข่

☐ บริจาคตัวอ่อน

☐ บริจาคทั้งเซลล์ไข่และตัวอ่อน

ลงนาม

(.....)

(ภรรยา)

ลงนาม

(.....)

(สามี)

ลงนาม

(.....)

(พยาน)

ลงนาม

(.....)

(แพทย์ผู้รักษาและให้คำอธิบาย)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....



COA No. 488/2011
IRB No. 096/49

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4455 ext 14, 15

Certificate of Approval

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study which is to be carried out in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

Study Title : Embryonic Stem Cell

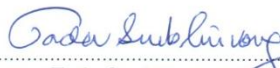
Study Code : -

Study Center : Department of Obstetrics & Gynecology,
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Principal Investigator : Assoc.Prof.Kamthorn Pruksananonda, M.D.

Document Reviewed :

1. Protocol date: 11 Jan 08
2. Consent form
3. Continuing review report (CR) for research ethics committee

Signature: 
(Professor Tada Sueblinvong MD)
Chairperson of
The Institutional Review Board

Signature: 
(Associate Professor Sopit Thamaree)
Committee and Secretary of
The Institutional Review Board

Date of Approval : April 30, 2011

Approval Expire Date : April 29, 2012

Approval is granted subject to the following conditions: (see back of this Certificate)



COA No. 472/2012
IRB No. 096/54

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4455 ext 14, 15

Certificate of Approval

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study which is to be carried out in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

Study Title : Embryonic Stem Cell.

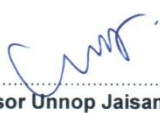
Study Code : -

Principal Investigator : Assoc.Prof.Kamthorn Pruksananonda, M.D.

Study Center : Department of Obstetrics & Gynecology,
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Document Reviewed :

1. Protocol date: 11 Jan 08
2. Consent form
3. Continuing review report (CR) for research ethics committee

Signature:  Signature: 
(Associate Professor Unnop Jaisamrarn MD, MHS) (Assistant Professor Prapapan Rajatapiti MD, PhD)
Vice-Chairman, Acting Chairman Member and Assistant Secretary, Acting
The Institutional Review Board Secretary The Institutional Review Board

Date of Approval : April 30, 2012 (Sixth Extension)

Approval Expire Date : April 29, 2013

Approval granted is subject to the following conditions: (see back of this Certificate)

ประวัตินักวิจัยและคณะ

๑. หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)



รองศาสตราจารย์นายแพทย์กำธร พุกษานานนท์

Kamthorn PRUKSANANONDA, M.D.

Associate Professor of Obstetrics and Gynecology

Director of Chula IVF Program

ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

■ ๓ ๑๐๐๘ ๐๐๒๕๑ ๕๗๕

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

■ รองศาสตราจารย์ ระดับ ๙

■ หัวหน้าหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

■ หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๕ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐

โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๙, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙

E-mail: pkamthorn@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

■ พ.ศ. ๒๕๒๓ วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

■ พ.ศ. ๒๕๒๕ แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

■ พ.ศ. ๒๕๓๑ อนุมัติบัตร สูติ-นรีเวช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

■ อนุมัติบัตรเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์

■ Certificate in Reproductive Biology and Infertility, University of Pennsylvania, Philadelphia, U.S.A.

เกียรติประวัติในอดีต

■ แพทย์ฝึกหัดดีเด่น และแพทย์ประจำบ้านดีเด่น โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

■ Best Research Paper - ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย

■ Young Gynaecologist Award – Asia Oceania Federation of Obstetrics and Gynaecology

■ Rockefeller Fellowship Award

■ เป็น Co author ใน chapter หนึ่งของหนังสือ Uterine and Embryonic Factors in Early

pregnancy: Editor, JF Strauss, Plenum Press, U.S.A.

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย คนที่ ๑

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.รัฐจักร รังสิวิวัฒน์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Ruttachuk Rungsiwut

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

■ ๓ ๓๐๑๒ ๐๐๗๘๗ ๔๑ ๔

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

■ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๕

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

■ หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐
โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๙, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙
■ Email : ruttachuk.r@chula.ac.th

๕. ประวัติการศึกษา

■ ๒๕๔๒ - สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
■ ๒๕๕๑ - วิทยาศาสตร์ดุขบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุนสาขาวิชาการ

■ mouse and human embryonic stem cell derivation and culture
■ somatic nuclear transfer in laboratory animal
■ embryo manipulation

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ ๒

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวปรานี นำชัยศรีคำ
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms. Pranee Numchaisrika

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

■ ๓ ๑๐๐๑ ๐๐๒๙๘ ๘๓ ๘

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

■ นักวิทยาศาสตร์ ๖

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

■ หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐
โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๙, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙
■ Email : pnumchaisrika@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

■ พ.ศ.๒๕๒๙ วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุนสาขาวิชาการ

■ Cell Culture, Collect and Culture Embryo in Animal Model

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ ๓

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)

นางวิชชุดา อานนท์กิจพานิช

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)

Mrs. Vichuda Ahnonkitpanit

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

■ ๓ ๑๐๑๔ ๐๐๙๒๘ ๕๕ ๒

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

■ นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์(ชำนาญการ) ๘

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

■ หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐

โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๔๒๘, ๐ ๒๒๕๖-๔๔๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๔๒๙

■ Email : avichuda@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

■ พ.ศ. ๒๕๒๖ วิทยาศาสตร์บัณฑิต(ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

■ พ.ศ. ๒๕๓๐ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(สัตววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย(In vitro fertilization) เป็นเวลา ๑๖ ปี เช่น การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน การเตรียมอสุจิ การเลี้ยงตัวอ่อนในระยะต่างๆ การแช่แข็งและละลายตัวอ่อน การใส่ตัวอ่อน การช่วยการปฏิสนธิ(ICSI) การช่วยการฝังตัวของตัวอ่อน(Assisted hatching) การดึงเซลล์ตัวอ่อน(Embryo biopsy) การควบคุมคุณภาพในห้องปฏิบัติการให้ได้มาตรฐาน การวิเคราะห์ข้อมูล การฝึกอบรมบุคลากรจากสถาบันอื่นทั้งในและต่างประเทศ เป็นที่ปรึกษาในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการด้านการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนให้กับสถาบันภายในประเทศ

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ ๔

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)

นายแพทย์ประมวล วีรุตมเสน

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)

Mr.Pramuan Virutamasen

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

■ ๓ ๑๐๑๔ ๐๑๑๓๕ ๒๓ ๘

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

■ ศาสตราจารย์กิตติคุณ ๑๑

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

■ หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐

โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๔๒๘, ๐ ๒๒๕๖-๔๔๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๔๒๙

■ Email : pvirutamasen@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

■ พ.ศ. ๒๕๐๑ อนุปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

■ พ.ศ. ๒๕๐๕ แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยแพทยศาสตร์ กรุงเทพฯ

■ พ.ศ. ๒๕๑๖ Master of Science , University of Pennsylvania , USA

■ พ.ศ. ๒๕๑๖ อนุมัติบัตรสูตินรีเวชวิทยา แพทยสภา

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

■ Physiology, Reproductive Biology, Specialty in Reproductive Endocrinology