

การรักษามะเร็งส่วนใหญ่เกือบทั้งหมดในปัจจุบัน ใช้วิธีการรักษาโดย ยาเคมีบำบัด การผ่าตัด และการฉายแสง โดยจากวิธีการดังกล่าวสามารถรักษาให้ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งให้หายขาดได้เพียง 70 % ในเด็ก และ 30-40% ในผู้ใหญ่ สาเหตุที่รักษาไม่หายขาด เป็นผลมาจากการที่เซลล์มะเร็งเหล่านี้ดื้อต่อการรักษาที่กล่าวมา รวมทั้งสามารถหลีกเลี่ยงหนีจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune escape) โดยเฉพาะระบบภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (cellular immune mediated function) ซึ่งได้แก่ T lymphocyte (CD3+CD8+) และ natural killer cell (CD3-CD56+)

โดยผู้วิจัยมีความสนใจที่จะพัฒนา cytokine induced killer cells (CIK cells) ซึ่งมี marker ทั้ง T lymphocyte และ natural killer cell รวมกัน นั่นคือ CD3+CD56+ โดยการนำ lymphocyte มากระตุ้นด้วย anti CD3+ interleukin (IL) -2 และ  $\gamma$  interferon ตามปกติในร่างกายมีเซลล์ประเภทนี้อยู่ประมาณ 1-5% ผู้วิจัยสามารถกระตุ้นให้ได้ CIK มากถึง 50-80% หรือเพิ่มประมาณ 1000 เท่าภายใน 3-4 อาทิตย์ในหลอดทดลอง (in vitro) นอกจากนี้ผู้วิจัยสามารถพัฒนา CIK cells ให้ทำลายเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆทั้งใน in vitro และ in vivo (SCID mouse model)

Dendritic cell (DC) เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น antigen presenting cell (APC) ที่ดี โดยสามารถกระตุ้นให้ cytotoxic T cell มี cytotoxicity มากขึ้นและมีความจำเพาะมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการที่มี MHC molecule ทั้ง class I และ II และพร้อมกับมี co-stimulatory molecule ร่วมด้วย

เนื่องจาก CIK cells นี้มี CD3+ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการ CIK cells coculturing กับ DC ซึ่งผลการวิจัยพบว่าทำให้มี cytotoxicity ของ CIK cells ต่อเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย ในทางคลินิก CIK cells นับว่ามีประโยชน์อย่างมากในการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง โดยเฉพาะการใช้ CIK cells ที่ co-culturing กับ DC เพื่อทำให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

#### Abstract

218395

Almost 80% of pediatric and 30-40% of adult cancer patients can be cured with conventional treatment which encompasses chemotherapy, radiation, and surgery. After treatment with these modalities, 20% of the pediatric and 60-70% of adult patients succumb to relapse. One of the mechanisms of relapse is escape from immunity. Difficulties in combating tumor cells by the immune system include defects in antigen presentation. Nevertheless, in recent years, advance has been made in the generation of an effective immune response against tumor cells.

A significant progress toward successful application of adoptive cellular immunotherapy for human has been the identification and expansion of appropriate effector cells. One such effector cell type, namely natural killer (NK) cell, has been shown to possess in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic cancer cells. However, its usefulness has been hampered by several limitations which include the following: 1) NK cells do not expand well in vitro and need exogenous interleukin-2 (IL-2) for maximum activity in vivo, 2) IL-2 activated NK cells are inherently low in vivo

antitumor activity upon adoptive transfer, 3) it is difficult to generate sufficient number of NK cells, especially in patients who have undergone chemotherapy, 4) IL-2 required to augment antitumor activity is often toxic in patients following bone marrow transplantation

CD3+CD56+ cells appear to be a promising cytotoxic effector cell type. These cells co-express both the T cell marker CD3 and the NK cell marker CD56, but do not express CD16. Expanded human CD3+CD56+ cells are capable of recognizing a broad range of tumor cell lines, multidrug-resistant cell lines, and fresh autologous tumor cells through a non-MHC restricted mechanism but not through antibody dependent cell cytotoxicity, yet have minimal cytotoxicity against normal hematopoietic cells and do not suppress bone marrow progenitor cell activity. Under specific culture conditions, the CD3+CD56+ cells expand dramatically to 1000-fold after 3 to 4 weeks in culture. We are able to demonstrate that CIK cells show cytotoxicity to several types of pediatric and adult cancers in both in vitro and in vivo (SCID mouse model).

Dendritic cell (DC) is a good antigen presenting cell. This cell contains of all necessary molecules for generating cytotoxic T cells such as MHC class I and II, complete adhesion molecules, and costimulatory molecules. Since, CIK cells demonstrate CD3+, we are able to demonstrate that DC can enhance the cytotoxicity of CIK cells after co-culturing with DC. Therefore, we plan to develop CIK cells co-culturing with DC for clinical setting of adoptive immunotherapy in the future.

### Executive Summary

#### ปัญหาที่ทำการวิจัยและความสำคัญของปัญหา

การรักษามะเร็งในเด็กโดยส่วนใหญ่ใช้วิธีการรักษาโดยยาเคมีบำบัด การผ่าตัด และการฉายแสง ทั้งนี้จากวิธีการทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว ยังมีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งที่มีโรคกลับ (ประมาณ 20-30%) สาเหตุหนึ่งของโรคกลับคือ ภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้

adoptive cellular immunotherapy โดยอาศัย effector cell ต่างๆ นับว่ามีบทบาทเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน effector cells ที่น่าสนใจคือ natural killer cell (NK cell), cytotoxic T cell (CTL) และ cytokine induced killer cell (CIK) สำหรับ effector cell ที่คณะวิจัยสนใจคือ CTL และ CIK

**ข้อดี CTL** คือ specific ต่อ tumor cells (MHC restricted pattern) โดยใช้วิธีการพัฒนาจาก pulsed dendritic cell ด้วย tumor lysate หรือ RNA ของ tumor cell ที่เป็น specific transcript ของ specific tumor cell ชนิดต่างๆ เช่น t (2;13) [PAX 3 /FKHR] ใน alveolar rhabdomyosarcoma, t (11;22) [EWS/FLI 1] ใน Ewing's sarcoma เป็นต้น จากนั้นทำการ generate CTL จาก T lymphocyte โดย coculture ร่วมกับ pulsed dendritic cell ขณะนี้ผู้วิจัยได้พัฒนา pulsed dendritic cell โดยใช้ tumor lysate เป็น tumor antigen และพัฒนา CTL โดยทดสอบ cytotoxic assay ในหลอดทดลองแล้วต่อ glioblastoma และ neuroblastoma

**ข้อดี CIK cell** คือทำลาย tumor cell แบบ non-specific (non-MHC restricted) โดยที่ไม่ทำลายเซลล์ปกติ เช่น bone marrow progenitor cell ในขณะนี้นักวิจัยได้ทำการพัฒนา CIK และ ทำ cytotoxic assay ต่อ pediatric cancer cells หลายชนิดในหลอดทดลองแล้ว

หลังจากทำในหลอดทดลองแล้วจะทำการทดลองใน animal model โดยจะทำการทดสอบใน NOD mice ชนิด NOD /LT $\alpha$ SZ-PRK $\Delta$ <sup>SCID</sup> ซึ่งเป็น severe combined immune deficiency โดย mice ชนิดนี้มี NK cell activity ต่ำ ไม่มี complement และมี impairment ของ macrophage และ antigen presenting cell