

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาวิจัย

ข้อมูลปัจจุบันบ่งชี้ว่าโรคภูมิแพ้และภาวะความเจ็บป่วยจากโรคภูมิแพ้มีอุบัติการณ์ที่เพิ่มขึ้นทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทย นอกจากนี้ความรุนแรงของอาการเจ็บป่วยของภาวะภูมิแพ้ก็เพิ่มขึ้นด้วย เช่นอาการหอบหืดในเด็กที่ทำให้ต้องไปรับการรักษาอย่างฉุกเฉิน โรคภูมิแพ้เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ส่วนหนึ่งเนื่องมาจากพันธุกรรม และส่วนใหญ่เกิดจากการสัมผัสสารก่อภูมิแพ้ (allergen exposure) และระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้น (allergen sensitization) อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน การสัมผัสสารก่อภูมิแพ้ (allergen) ตั้งแต่วัยเด็กทารก (infancy) ส่งผลให้เกิดอาการแพ้ต่อสารนั้นๆในเวลาต่อมา ซึ่งอาการแพ้เมื่อเริ่มเป็นอาจมีอาการเพียงเล็กน้อย เช่น คันที่ผิวหนัง คันในลำคอ คันตาและจมูก น้ำมูกน้ำตาไหล ไอ จามแต่เมื่อสัมผัสสารก่อภูมิแพ้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน อาการอาจเพิ่มขึ้นจนถึงขั้นหอบหืด หายใจไม่ออก และต้องได้รับการรักษาในหน่วยผู้ป่วยฉุกเฉิน หรือต้องเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล โรคภูมิแพ้มิผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมอย่างมาก เพราะนอกจากผู้ป่วยต้องได้รับการรักษาเยี่ยงยาอย่างต่อเนื่องเพราะยังไม่มีการรักษาให้หายขาด แล้ว ยังทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตลดลงและมีประสิทธิภาพในการทำกิจวัตรประจำวัน การทำงานและ/หรือการศึกษาเล่าเรียนด้วยประสิทธิภาพต่ำกว่าคนปกติ

จากการศึกษากลไกการเกิดการตอบสนองของร่างกายในสภาวะภูมิแพ้ พบว่าอาการของโรคภูมิแพ้มีผลจากการที่เซลล์ชนิด T helper 2 (Th2 cells) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อภูมิแพ้ผ่านทาง Dendritic cells (DCs) หลั่ง interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-9 และ IL-13 ซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้น allergen specific B cells ให้มีการสร้าง allergen specific IgE โดย IgE ที่สร้างขึ้นนี้จะไปจับกับ high affinity IgE receptors บนผิวของ mast cells/basophils ในเนื้อเยื่อเช่นในผิวหนัง ในทางเดินหายใจ เมื่อร่างกายได้รับสารก่อภูมิแพ้ชนิดเดิมอีกครั้ง สารก่อภูมิแพ้นี้จะไปจับกับ IgE บนผิวของ mast cells และเชื่อมโยง IgE สองโมเลกุลที่อยู่ใกล้กัน ส่งผลทำให้เกิดสัญญาณกระตุ้นให้ mast cells นั้นหลั่ง mediators ต่างๆออกมาทำให้มีพยาธิสภาพเช่นเส้นเลือดขยายตัวและมี permeability เพิ่มขึ้น มีการขับสารเมือกและสารคัดหลั่งมากขึ้น มีเซลล์อักเสบเข้ามาในผิวหนังหรือในทางเดินหายใจ กล้ามเนื้อเรียบหดตัว หลอดลมตีบ เป็นต้น และเกิดอาการของโรคภูมิแพ้ เช่น คันผิวหนัง ผิวหนังอักเสบ หรือคัดจมูก จาม คันที่ตา จนถึง หายใจลำบาก หอบหืด ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ airway epithelial cells ซึ่งเป็นด่านป้องกันของร่างกายด่านแรก ที่สัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ที่เข้ามาในทางเดินหายใจ พบว่า airway epithelial cells ที่ถูกกระตุ้นโดยสารก่อภูมิแพ้จะมีการหลั่ง cytokines และ chemokines ต่างๆ เช่น IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α , IFN- α , IFN- β , RANTES และ eotaxin ซึ่งส่งผลให้ immune cells ต่างๆถูกกระตุ้น และเซลล์อักเสบจำนวนมาก เข้ามาในบริเวณที่มีสารก่อภูมิแพ้ (inflammatory cell infiltration)

การดูแลรักษาผู้ป่วยด้วยโรคภูมิแพ้นั้น มีหลักการรักษาใหญ่ๆสามประการคือ 1) การหลีกเลี่ยงไม่ให้ผู้ป่วยสัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ (intervention of morbidity) 2) รักษาโดยใช้ยา ซึ่งเป็นการรักษาตามอาการ (symptomatic treatment) และไม่หายขาด รวมทั้งยาบางอย่างมี

ผลข้างเคียงต่อสุขภาพและกระบบภูมิคุ้มกัน และ 3) รักษาโดยใช้กรรมวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) โดยการให้วัคซีนรักษาภูมิแพ้ (therapeutic allergen vaccine) แก่ผู้ป่วย ซึ่งผู้ป่วยบางรายอาจไม่ตอบสนองต่อวัคซีน นอกจากนี้ก็มีการใช้ anti-IgE ในการรักษา พบว่าการใช้ anti-IgE ในการรักษาเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอในการยับยั้งการเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อที่ส่งผลให้เยื่อเมือกของทางเดินหายใจมีความไวเป็นอย่างมากยิ่งต่อสิ่งที่เข้ามาในทางเดินหายใจ กล่าวคือแม้จะไม่ใช้สารก่อภูมิแพ้ก็อาจเกิดอาการภูมิแพ้รุนแรงเช่นหอบหืดได้ เรียกว่าเกิดสภาวะ “Airway hyper-responsiveness (AHR)” ดังนั้นการพัฒนาวิธีการรักษาแบบใหม่ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการรักษาโรคภูมิแพ้

ในปัจจุบันมีการศึกษาและทำให้ทราบถึงกลไกการเกิดการตอบสนองของร่างกายในสภาวะภูมิแพ้มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานเกี่ยวกับบทบาทของโปรตีน Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) หรือ interleukin 50 (IL-50) ซึ่งพบว่าเมื่อได้รับสารก่อภูมิแพ้เข้ามาในทางเดินหายใจมีการสร้าง TSLP จาก epithelial cells บริเวณทางเดินหายใจ (ซึ่งเป็นที่แรกที่เซลล์มีการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้) และจากเซลล์อื่นๆ ได้แก่ keratinocytes และ stromal cells โดย TSLP สามารถกระตุ้นให้เซลล์ในร่างกาย เช่น Dendritic cells (DCs), T cells, mast cells, NKT cells และ เซลล์อื่น ๆ ให้หลั่ง T helper 2 (Th2) cytokines เช่น IL-5, IL-6, IL-10 และ IL-13 เป็นต้น รวมถึง mediators ต่างๆ มีผลการกระตุ้นให้เกิด airway hyper-responsiveness (AHR) มีการอักเสบ และ atopic dermatitis ในผู้ป่วย มีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าเมื่อยับยั้งการทำงานของ TSLP ในหนูทดลองก็สามารถยับยั้งไม่ให้เซลล์อักเสบชนิดโอซิโนฟิลเข้าไปในทางเดินหายใจ และสามารถป้องกันการเกิดการอักเสบในทางเดินหายใจได้

ดังนั้นการพัฒนาวิธีการยับยั้งการทำงานของโปรตีน TSLP จึงมีประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ที่ระบบทางเดินหายใจ รวมทั้งโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) ที่มีสมมติฐานของการเกิดอาการที่ผิวหนังเช่นเดียวกับโรคภูมิแพ้ที่ระบบทางเดินหายใจ จากการมีการสร้างโปรตีน TSLP มาก คณะผู้วิจัยจึงเสนอโครงการวิจัยในการเตรียม fully human monoclonal antibody จาก human antibody phage library ที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน TSLP

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อผลิตแอนติบอดีชนิดโนโนโคลนาลที่เป็นโปรตีนของมนุษย์โดยสมบูรณ์สำหรับนำไปพัฒนาต่อเพื่อรักษาโรคภูมิแพ้โดยขัดขวางการทำงานของโปรตีน Thymic stromal lymphopoietin ที่ผลิตจากเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง epithelial cells ในทางเดินหายใจ

2. วัตถุประสงค์เฉพาะ

- เพื่อเตรียม recombinant thymic stromal lymphopoietin (TSLP) จากยีนที่มาจาก human lung epithelial cells
- ผลิต fully human monoclonal antibodies ในรูปแบบของแอนติบอดีสายเดี่ยว (human single chain antibody; HuScFv) ต่อ TSLP โดยใช้ human antibody phage display library ที่ ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภาได้สร้างเอาไว้แล้ว
- ทดสอบความจำเพาะของ human monoclonal antibodies ที่ผลิตขึ้น ต่อ TSLP โปรตีน

- ทดสอบประสิทธิภาพของ human monoclonal antibodies ที่ผลิตขึ้นในการยับยั้งการทำงานของ TSLP ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด human lung epithelial cells

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของการวิจัย ครอบคลุมถึงการโคลนยีนที่เป็นรหัสของ TSLP ของมนุษย์เข้าใน expression vector นำ recombinant vector เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสม ทำการ induce ให้ transformed *E. coli* ผลิต recombinant TSLP แล้วทำการ purify recombinant TSLP ออกจากโปรตีนอื่นๆของแบคทีเรีย ทำการเตรียม human phage display library จาก stock โดยการทำ phage rescue จากนั้นนำ recombinant TSLP ไปใช้เป็นแอนติเจนเพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display HuScFv ที่จับกับ TSLP จาก human antibody phage display library ด้วยกระบวนการ bio-panning ทดสอบการจับแบบเฉพาะระหว่าง HuScFv จาก phage clones กับ TSLP เพื่อคัดเลือก phage clones ที่ display HuScFv ที่จับแน่นกับ TSLP ทำการ clone *huscfv*-phagemids เข้าสู่ suppressor *E. coli* เพื่อผลิต soluble HuScFv ทำการ purify HuScFv และทำการเตรียม HuScFv ในปริมาณมากพอสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพ การทำ neutralization assay เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ HuScFv ในการยับยั้งการทำงานของ TSLP ใน cell culture

ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

การสร้าง thymic stromal lymphopoietin (TSLP) จาก epithelial cells บริเวณทางเดินหายใจ keratinocytes และ stromal cells เมื่อได้รับสารก่อภูมิแพ้เข้ามา สามารถกระตุ้นให้เซลล์ในร่างกาย เช่น dendritic cells, T cells, mast cells และ NKT cells หลั่ง Th2 cytokines เช่น IL-5, IL-6, IL-10 และ IL-13 เป็นต้น รวมถึง mediators ต่าง ๆ ทำให้เกิด airway hyper-responsiveness (AHR), airway inflammation และ atopic dermatitis ในผู้ป่วย ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของโปรตีน TSLP จะสามารถยับยั้งการสร้าง Th2 cytokines รวมถึง mediators ต่างๆ ส่งผลให้ผู้ป่วยซึ่งมีอาการของโรคภูมิแพ้มีอาการรุนแรงลดลงหรือไม่มีอาการแพ้

ประโยชน์ที่ได้รับ

- มี therapeutic fully human antibodies ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ human thymic stromal lymphopoietin (neutralize TSLP activities)
- มีองค์ความรู้และประสบการณ์ เกี่ยวกับ molecular cloning, recombinant protein production and purification, cell culture และ การยับยั้งการหลั่งของสารที่เป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดการแพ้ในระดับโมเลกุล คือ TSLP
- มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติจำนวน 1 เรื่อง
- มีนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาเข้าร่วมโครงการ
- ส่งเสริมและพัฒนาศักยภาพของนักวิทยาศาสตร์และ มาตรฐานการวิจัยไทยที่สามารถนำ ผลงานมาใช้ได้จริง และก่อให้เกิดความสำคัญเชิงพาณิชย์อันเป็นเป้าหมายหนึ่งของการพัฒนาประเทศ

ปัจจัยที่เอื้อต่อการวิจัยที่มีอยู่ (ระบุรายละเอียด)

อุปกรณ์การวิจัยที่มีอยู่แล้ว

- Automatic pipettes of various sizes
- Centrifuges
- ELISA reader
- 37°C incubator, shaking incubator (biohazard safety)
- Autoclave
- Lyophilizer
- SDS-PAGE module และ immunoblotting facility
- Thermocycler
- Agarose electrophoresis facility
- Gel Documentation system
- Facilities สำหรับ tissue culture (Laminar flow hood, CO₂ incubator, Inverted microscope, etc.)
- Facilities สำหรับการวิจัยทาง molecular biology
- อื่นๆ

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมายเมื่อสิ้นสุดการวิจัย

องค์ความรู้ในการพัฒนาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีที่ได้จากกิจกรรมการวิจัยนี้และประสบการณ์การวิจัย รวมทั้งการเขียน Manuscript เพื่อเผยแพร่ผลงานของทีมนักวิจัยทั้งที่มีมาก่อนและที่จะเพิ่มพูนจากการวิจัยนี้ สามารถถ่ายทอดให้แก่นักศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้องได้ เช่น วิทยาภูมิคุ้มกัน อนุชีววิทยา สาขาจุลชีววิทยา สาขาเวชศาสตร์เขตร้อน ซึ่งทีมงานรับผิดชอบการสอนโดยตรงอยู่แล้ว และสามารถให้บริการวิชาการ ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่นักวิจัยและนักวิชาการทั้งภายในและต่างประเทศได้

ผลผลิตต่างๆที่ทีมงานจะผลิตจากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปดำเนินการวิจัยต่อยอดให้ถึงการใช้งานจริง เช่น ใช้เป็น TSLP inhibitor เพื่อยับยั้งหรือบรรเทาอาการแพ้ ซึ่งจะมีทั้งศักยภาพเชิงพาณิชย์และเพิ่มศักยภาพด้านการบริการทางการแพทย์