บทคัดย่อ

รหัสโครงการ DBG5380036

ชื่อโครงการ **การสร้าง induced pluripotent stem cells (iPSCs) จากเซลล์ของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินอี**

ชื่อนักวิจัย ศ.นพ. สุรเดช หงส์อิง
ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address suradej.hon@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

เซลล์ที่ถูกชักนำให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิด หรือ iPS cells (induced pluripotent stem cells) กำลังเป็นที่คาดหวังอย่างสูงในการวิจัยด้านการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เพื่อเป็นแบบจำลองของโรคในมนุษย์,การตรวจคัดกรองยา,และการปลูกถ่ายยีนและเซลล์เพื่อการรักษา โรคบีตาธาลัสซีเมียซึ่งเป็นหนึ่งในโรคติดต่อทางพันธุกรรมซึ่งพบได้ทั่วไปในประชากรที่อาศัยอยู่ในภูมิภาคเอเชียอาคเนย์ สาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนและส่งผลกระทบต่อกระบวนการตัดต่อลำดับเบสบนสายเอ็มอาร์เอ็นเอ ส่งผลให้ไม่มีการผลิตสายโกลบินชนิดเบตาหรือผลิตได้น้อยลงทำให้ผู้ป่วยมีฮีโมโกลบินอยู่ในระดับต่ำ เนื่องจากปัจจุบันยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการสร้าง iPS cells จากคนไข้hemoglobin (Hb) E-β(IVS2-654)-thalassemia. ดังนั้นจุดประสงค์หลักของการศึกษาครั้งนี้คือการสร้างiPS cells จากผู้ป่วยเบตาธาลัสซีเมียชนิดนี้ ซึ่งสามารถพบได้ในประชากรไทย ธาลัสซีเมียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีการกลายพันธุ์ของลำดับเบสเฉพาะที่(point mutation) 2 จุด คือ ที่ตำแหน่ง IVS2-654 ในยีนของสายโกลบินชนิด เบตาซึ่งก่อให้เกิดความผิดปกติในจุดตัดของเบสทางด้าน 5´ และทำให้เกิดความคลุมเครือของจุดตัดของเบสด้าน 3´ทำให้ยังคงมีลำดับเบสของส่วนอินทรอนค้างอยู่ในเอ็มอาร์เอ็นเอของโกลบินสายเบตา อีกจุดคือมีการกลายพันธุ์จากเบสG เป็น A ในโคดอนลำดับที่ 26 ของยีนHBB (ยีนโกลบินชนิดเบตา) ส่งผลให้เกิดการความคลุมเครือของจุดตัดของเบส ในโคดอนลำดับที่ 25 ทำให้ฮีโมโกลบิน อี ที่ปกติลดลง ในการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการสร้างiPS cells จากผู้ป่วยเบตาธาลัสซีเมียซึ่งมีการกลายพันธ์แบบ IVS-2 654/β^Eและได้ผ่านการทดสอบคุณลักษณะจำเพาะของ iPS cells โดยการย้อมเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส, ย้อมโปรตีนบ่งชี้ ของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ Nanog, Sox 2, SSEA4, Oct4, TRA-1-60, TRA-1-81, และทดสอบการแสดงออกของยีนบ่งชี้ ของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด ได้แก่ *OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, REX1,GDF3, DNM3TB, UTF1* ผลวิเคราะห์ระดับการเ ติมหมู่ Methyl ที่ลำดับเบส CpG ที่โปรโมเตอร์ของยีน OCT4 ด้วยวิธี bisulfite sequencing พบว่าใน iPS cells มีระดับการเกิดเติม Methyl ที่ต่ำกว่าในเซลล์ที่เป็นต้นแบบก่อนการชักนำให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งแสดงว่าโปรโมเตอร์ของยีน OCT4 ถูกกระตุ้นภายหลังจากการ reprogramming นอกจากนี้ iPS cells ที่สร้างขึ้นสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาท, เซลล์ตับ, และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเมื่อทำการทำสอบในระดับจานเพาะเลี้ยง เมื่อนำไปฉีดให้หนู ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ(NUDE mice) พบว่าเซลล์สามารถก่อรูปเป็นก้อนเนื้อที่ประกอบด้วยเซลล์ของเนื้อเยื่อของตัวอ่อนทั้ง 3 ชนิด ดังนั้นจึงสามารถใช้iPS cells ที่สร้างขึ้นจากผู้ป่วยธาลัส

ซีเมียเพื่อการศึกษากลไก, พยาธิสภาพ, และการคัดกรองยาสำหรับรักษาผู้ป่วยโรค เบตาธาลัสซีเมียซึ่งเกิดจากความผิดปกติแบบ IVS-2 654/β^{E} ไต้

Abstract

Project Code: DBG5380036

Project Title: Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from beta-thalassmia hemoglobin E patients

Investigator: Prof. Suradej Hongeng, M.D.
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,
Mahidol University

E-mail Address: suredej.hon@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years

Induced pluripotent stem cells(iPSCs) are promising tools in medical research exclusively with human disease modeling, drug screening, gene and cell replacement therapy. One such genetic disorder is β thalassemia, one of the most common genetic diseases among the people living in Southeast Asia. A large number of mutations affecting splicing consequently cause the decrease or absence in production of β-globin chain, resulting in low level of hemoglobin. At the present, there are no report about generating iPS cells from hemoglobin (Hb) E-β (IVS2-654)-thalassemia. In this study, we focus on establishment of iPS cells from a HbE-β-thalassemia patient carrying two specific point mutations observed in Thai population. The first one is the point mutation at position IVS2-654 in β-globin gene which creates the aberrant 5′ splice site and in turn activates a cryptic 3′ splice site, generating the inclusion of intronic sequences in spliced β-globin mRNA. Another one is G to A mutation in codon 26 of *HBB* (β-globin gene), resulting in activation of a cryptic 5′ splice site in codon 25 and decreasing of correctly spliced β^E-globin. Here, we report successful generation of iPSCs derived from a β-thalassemic patient carrying IVS-2 654/β^E mutations. The patient specific iPS cells were fully characterized by Alkaline Phosphatase staining, immunofluorescent staining of pluripotent markers; Nanog, Sox 2, SSEA4, Oct4, TRA-1-60, TRA-1-81, gene expressions of pluripotent markers; OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, REX1,GDF3, DNM3TB, UTF1. Methylation status of OCT4 promoter in the iPS cells was lower than parental cells analyzed by

bisulfite sequencing which indicated that re-activation of OCT4 promoter was occurred after reprogramming. Moreover, the established iPSCs were capable of in vitro differentiation into neuron, hepatocyte and smooth muscle cells. The iPSCs were formed teratoma comprising of three-germ layer cell type after injection into immunosuppressive NUDE mice. Therefore, we can use the patient specific thalassemic iPSCs to study mechanisms, pathologies, drug screening, gene and cell therapy for β-thalassemic patient carrying IVS-2 654/β^E mutations.

Keywords: beta-thalassemia, IVS-2 654, hemoglobin E, induced pluripotent stem cells, disease modeling