



E47297

ยวดยาน N-cadherin ที่มีการแสดงออกบน osteoblast ที่สร้างจาก stromal cell ที่อุดมไปด้วย
Hematopoietic stem cell.

นางสาวพรพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

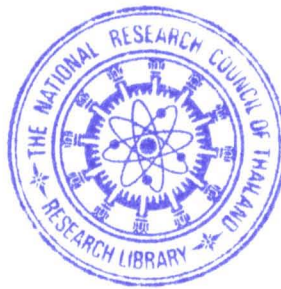
600254290

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E47297

ผลของ N-cadherin ที่มีการแสดงออกบน osteoblast ที่สร้างจาก stromal cell ต่อคุณสมบัติของ Hematopoietic stem cell.



นางสาวแพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 9 7 4 7 6 1 0 3 0

THE EFFECT OF N-CADHERIN EXPRESSED IN STROMAL CELL DERIVED OSTEOBLAST
ON HEMATOPOIETIC STEM CELL PROPERTIES.

Miss Praewphan Ingrungruangleert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences Program in Medical Science

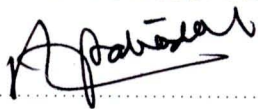
Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

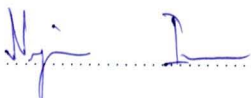
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title THE EFFECT OF N-CADHERIN EXPRESSED IN STROMAL
CELL DERIVED OSTEOBLAST ON HEMATOPOIETIC STEM
CELL PROPERTIES
By Miss Praewphan Ingrungruanglert
Field of Study Medical Science
Thesis Advisor Assistant Professor Nipan Israsena, M.D., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Medicine
(Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Nipan Israsena, M.D., Ph.D.)

.....Examiner
(Assistant Professor Thanyaphong Na Nakorn, M.D., Ph.D.)

.....External Examiner
(Associate Professor Chirayu Auewarakul, MD., Ph.D.)

แพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ : ผลของ N-cadherin ที่มีการแสดงออกบน osteoblast ที่สร้างจาก stromal cell ต่อคุณสมบัติของ Hematopoietic stem cell. (THE EFFECT OF N-CADHERIN EXPRESSED IN STROMAL CELL DERIVED OSTEOBLAST ON HEMATOPOIETIC STEM CELL PROPERTIES) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร.นพ.นิพัชญ์ อิศรเสนา 62 หน้า

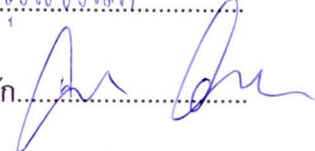
E47297

การเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (Hematopoietic Stem Cells; HSC) โดยการเพาะเลี้ยง ภายนอกร่างกาย นับว่าเป็นวิธีการหนึ่งในการเอาชนะข้อจำกัดของจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในการทำ การปลูกถ่ายทางด้านคลินิก อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีระบบในการเพาะเลี้ยงที่ช่วยในการเพิ่มจำนวนอย่าง รวดเร็วของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดพร้อมกับการรักษาสภาพของเซลล์ไว้ ในการศึกษาครั้งนี้ เราได้สร้าง ระบบการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายโดยใช้ เซลล์ตัวอ่อนของกระดูกที่สร้างจากเซลล์ stromal (mouse marrow stromal cell-derived osteoblast; MOB) รวมกับเซลล์ stromal (3T3 noggin) ที่มีการแสดงออก อย่างมาก ของ noggin (เป็นการยับยั้งการส่งสัญญาณของ BMP; BMP antagonist) เรียกว่า M3B feeder โดย feeder นี้จะมีคุณสมบัติในการช่วยการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์เม็ดเลือด โดยการเพิ่มจำนวน เซลล์ชนิด CD45⁺ ได้มากกว่า 20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์ตัวอ่อนของกระดูกที่สร้างจากเซลล์ stromal (MOB) เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ เรายังพบว่าเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์บน M3B feeder จะมี long-term culture initiating cell (LTC-IC) ใกล้เคียงกับการใช้เซลล์ตัวอ่อนของกระดูกที่สร้างจากเซลล์ stromal (MOB) ที่น่าสนใจก็คือชนิดของ colony forming cell (CFC) ที่มี LTC-IC จะมีการเปลี่ยนโคโลนีชนิด จาก CFU-M (colony forming unit macrophage) ไปเป็น CFU-GEMM (colony forming unit granulocyte, erythrocyte, macrophage and megakaryocyte) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ LSK บน M3B feeder จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าการรวมกันของเซลล์สองชนิดสามารถสร้างสภาพแวดล้อมขนาดเล็กที่ เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดพร้อมกับการรักษาสภาพของเซลล์ ไว้ได้อีกด้วย นอกจากนี้เราได้ใช้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบใหม่เพื่อศึกษาบทบาทของ N-cadherin ใน osteoblast niche เราพบว่าการแสดงออกของ N-cadherin ใน osteoblast ไปจำกัดจำนวนการสร้างของ CD45⁺ จาก M3B feeder และเพิ่มจำนวนของ CFC ในสัปดาห์ที่สองของการเพาะเลี้ยง จากผลการศึกษา ครั้งนี้ เป็นการสนับสนุนบทบาทที่สำคัญของ N-cadherin ในการรักษาสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต: แพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ

ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่ออ.ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: 

4974761030 : MAJOR MOLECULAR BIOLOGY

KEYWORDS : HEMATOPOIETIC STEM CELL / EX VIVO EXPANSION / OSTEOBLAST

PRAEWPHAN INGRUNGRUANGLERT: THE EFFECT OF N-CADHERIN

EXPRESSED IN STROMAL CELL DERIVED OSTEOBLAST ON

HEMATOPOIETIC STEM CELL PROPERTIES. ADVISOR: ASST. PROF. NIPAN
ISRASENA M.D. Ph.D., 62 pp.

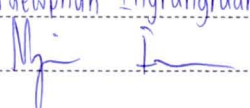
E47297

Ex vivo expansion of Hematopoietic stem cells (HSCs) has been suggested as a way to overcome the limitation of hematopoietic cell number for clinical transplantation. However, there is no culture system that could promote both HSCs proliferation and maintenance. Here, we generate the ex vivo culture system using mouse marrow stromal cell-derived osteoblasts (MOBs) combine with noggin (BMP antagonist) overexpressed stromal cells (3T3 noggin), so called M3B feeder. This feeder system shows their ability to promote hematopoietic cell proliferation by increasing CD45⁺ cell more than 20 fold compared with MOBs alone. Moreover, we found that the LTC-IC number of cells derived from cell cultured on M3B feeder was comparable to MOBs. Interestingly, type of CFC of LTC-IC was changed from CFU-M (colony forming unit macrophage) to CFU-GEMM (colony forming unit granulocyte, erythrocyte, macrophage and megakaryocyte) when cultured LSK cells on M3B feeder. This study proposes that combination of two cell types could generate proper microenvironments which both promote HSC maintenance and proliferation. We also used this new culture system to investigate the role of N-cadherin in osteoblastic niche. We found that overexpression of N-cadherin in osteoblasts limits number of CD45⁺ produced from M3B feeder and increases the number of CFC at week 2 of culture. This finding supports the important role of N-cadherin in HSC maintenance.

Field of Study: Medical science

Student's Signature Praewphan Ingrungruanglert

Academic Year: 2009

Advisor's Signature 

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Assistant Professor Nipan Israsena, her advisor, who not only originated this work, but also gave her continuous support, good suggestion, intensive recommendation and for the help, patience, encouragement he has shown during her three years in his research group.

I wish to thank my thesis committee Professor Apiwat Mutirangura, Assitant Professor Thanyaphong Na Nakorn and Associate Professor Chirayu Auewarakul for their sugguestions and invaluable guidance.

My thanks are also to all Stem cell laboratory's members for their help, good suggestions, friendship and all the good memories.

My special thanks to Mr.Ruttachuk Rungsiwiat for his assistance in all animal experiments.

I wish to express my sincere thanks to Miss Supranee Buranapraditkun and Mr. Navapon Techakriengkai for helping in all flow cytometry experiments.

Last, but not least, I thank my family for giving my life, for educating me and unconditional support to pursue my interests and also for their love and encouragement.

CONTENTS

	Page
Abstract (Thai)	IV
Abstract (English)	V
Acknowledgements	VI
Contents	VII
List of Tables	IX
List of Figures	X
List of Abbreviations	XII
Chapter	
I. Introduction	1
1. Background and rationale	1
2. Research Questions	3
3. Objectives	3
4. Hypothesis	3
II. Background and Related Literatures	4
1. Hematopoietic stem cells (HSCs)	4
1.1. HSCs isolation	5
1.2. HSCs niche	6
1.2.1. Osteoblastic niche	7
1.2.2. Vascular niche	8
1.3. HSCs niche	9
1.3.1. Notch pathway	10
1.3.2. Wnt pathway	11
1.3.3. BMP pathway	12
1.3.4. N-cadherin	13
2. Marrow stromal cells (MSCs)	15

III. Materials and Methods	16
1. Hematopoietic stem cells (HSCs) isolation	16
2. Marrow stromal cells (MSCs) isolation	17
3. Osteoblastic differentiation	17
4. Alizarin Red staining	17
5. N-cadherin overexpression	18
6. Cell culture	18
7. Long-term culture initiating cell assay (LTC-IC)	19
8. Colony forming cell (CFC) assay	19
9. CD45 ⁺ cells analysis	20
10. RNA extraction	20
11. Complementary DNA (cDNA) synthesis.....	21
12. Quantitative Real-Time PCR Analysis.....	21
13. Immunofluorescence staining.....	21
14. Western blotting	22
15. Wright-Giemsa staining.....	23
16. Statistical analysis.....	23
IV. Results	24
V. Discussion and Conclusion	44
References	49
Appendices	58
Appendix A Primer sequences	59
Appendix B Reagents.....	60
Biography.....	62

LIST OF TABLE

Table		Page
1	Expression profile of mMSC and mMSC-derived osteoblast	32
2	Primer sequences.....	58

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	The hematopoietic hierarchy	5
2	Bone-marrow HSC niches.....	7
3	A model of the endosteal niche–stem-cell synapse	10
4	Morphology of isolated mouse marrow stromal cells (mMSCs).....	25
5	Morphology of mMSC-derived osteoblasts (MOBs).....	26
6	Osteoblastic gene expression of MOBs.....	27
7	Growth phenotype of LSK cells cultured on MOBs and mMSCs.....	28
8	Effect of MOBs on the output of colony forming cell (CFC).....	28
9	Effect of MOBs on the output of long-term culture initiating cell (LTC-IC)....	29
10	Quantitative RT-PCR analysis of CXCL12, Wnt1 and Wnt3a expression in MOBs and mMSCs	29
11	Quantitative RT-PCR analysis of Jagged1 and Angiopoietin1 (Ang1) expression in MOBs and mMSCs.....	30
12	Quantitative RT-PCR analysis of Noggin and Gremlin expression in MOBs and mMSCs.....	30
13	Quantitative RT-PCR analysis of BMP4 and Chordin expression in MOBs and mMSCs.....	31
14	Effect of BMP2 and noggin treatment in HSCs.....	34
15	Western blot analysis of noggin protein in 3T3 noggin cells.....	34
16	Morphology of M3B feeder	35
17	The effect of M3B feeder on LSK growth phenotype.....	35
18	Effect of M3B feeder on the expansion of CD45 ⁺ cell	36
19	Effect of M3B feeder on the output of long-term culture initiating cell (LTC-IC).....	36
20	Wright-Giemsa stains of cytopsin preparations of LTC-IC derived colonies.	37

21	The effect of N-cadherin on the growth phenotype of LSK cells	38
22	Effect of N-cadherin overexpressed M3B feeder on the expansion of CD45 ⁺ cell.....	39
23	Effect of N-cadherin overexpressed mMSCs on the output of colony forming cell (CFC).....	40
24	Effect of N-cadherin overexpressed MOBs on the output of colony forming cell (CFC).....	41
25	Effect of N-cadherin overexpressed M3B feeder on the output of colony forming cell (CFC).....	41
26	The effect of IFN-alpha 4 treatment on Wnt1, Wnt3a and Dkk1 expression in mMSCs.....	43
27	The effect of IFN-alpha 4 treatment on Wnt1, Wnt3a and Dkk1 expression in MOBs.....	43

LIST OF ABBREVIATIONS

HSCs	=	Hematopoietic stem cells
MSCs	=	Marrow stromal cells
MOBs	=	Marrow stromal cell-derived osteoblasts
CFC	=	Colony forming cell
LTC-IC	=	Long term culture initiating cell
BMP	=	Bone Morphogenic Protein