ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47297

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

นางสาวนพรวรรณ อิงรุ่งรื่องลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47297
b20254240

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

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

นางสาวแพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4974761030

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

Miss Praewphan Ingrungruanglert

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.นิพัญจน์ อิศรเสนา, 62 หน้า.

E 47297

การเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (Hematopoietic Stem Cells; HSC) โดยการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย นับว่าเป็นวิธีการหนึ่งในการเอาชนะข้อจำกัดของจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในการทำการปลูกถ่ายทางด้านคลินิก อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีระบบในการเพาะเลี้ยงที่ช่วยในการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดพร้อมกับการรักษาสภาพของเซลล์ไว้ ในการศึกษาครั้งนี้ เราได้สร้างระบบการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายโดยการใช้ เซลล์ตัวอ่อนของกระดูกที่สร้างจากเซลล์ stromal (mouse marrow stromal cell-derived osteoblast; MOB) รวมกับเซลล์ stromal (3T3 noggin) ที่มีการแสดงออกอย่างมาก ของ noggin (เป็นการยับยั้งการส่งสัญญาณของ BMP; BMP antagonist) เรียกว่า M3B feeder โดย feeder นี้จะมีคุณสมบัติในการช่วยการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์เม็ดเลือด โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ชนิด $CD45^{+}$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 จะมีการเปลี่ยนโคโลนีชนิดจาก CFU-M (colony forming unit macrophage) ไปเป็น CFU-GEMM (colony forming unit granulocyte, erythrocyte, macrophage and megakaryocyte) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ LSK บน M3B feeder จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการรวมกันของเซลล์สองชนิดสามารถสร้างสภาพแวดล้อมขนาดเล็กที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดพร้อมกับการรักษาสภาพของเซลล์ไว้ได้อีกด้วย นอกจากนี้เราได้ใช้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบใหม่เพื่อศึกษาบทบาทของ N-cadherin ใน osteoblast niche เราพบว่าการแสดงออกของ N-cadherin ใน osteoblast ไปจำกัดจำนวนการสร้างของ $CD45^{+}$ จาก M3B feeder และเพิ่มจำนวนของ CFC ในสัปดาห์ที่สองของการเพาะเลี้ยง จากผลการศึกษาครั้งนี้ 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, Asssitant 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 Rungsiwiwat 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 cytospin 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