การรายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3 มิติ โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำในการสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาการพัฒนาการของกระดูกปกติในมนุษย์และพยาธิกลไกของโรคกระดูก

Development of three-dimensional tissue culture technique from Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) as a model to study normal human bone development and pathomechanism of bone diseases

หัวหน้าโครงการ อาจารย์ ดร.สุพรรษา ยอดเมือง
ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์
ตุลาคม 2560 ถึงเดือน กันยายน 2561

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้สร้างแบบจำลองนอกร่างกายเพื่อให้ได้เนื้อเยื่อที่ใกล้เคียงกับมนุษย์และลดการใช้สัตว์ทดลองในการวิจัยทางการแพทย์ การใช้สัตว์ทดลองยังมีข้อจำกัดในการเลียนแบบสรีรวิทยาของมนุษย์ กลไกระดับอณูชีววิทยา กลไกการเกิดโรค และผลการตอบสนองทางเภสัชจลศาสตร์ จุดประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์กระดูกที่ได้รับการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์มีเซ็นไคม์ (iMSCs) โดยเซลล์มีเซ็นไคม์นี้ได้มาจากเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับการเหนี่ยวนำจากผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะ (Osteogenetic Imperfecta) เซลล์มีเซ็นไคม์ได้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์โดยแยกการทดลองเป็น 2 สภาวะ คือสภาวะ 2 มิติในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสภาวะ 3 มิติในโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีรูพรุน จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real-time PCR พบว่ายีน *RUNX2*, *SP7* และ *COL1A1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะ 3 มิติ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะ 2 มิติ ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่างสิ่งแวดล้อมขนาดไมครอนในโครงเลี้ยงเซลล์มีอิทธิพลต่อการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงของเซลล์มีเซ็นไคม์ให้ไปเป็นเซลล์กระดูก งานวิจัยนี้ได้นำเทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ในการสร้างแบบจำลองเนื้อเยื่อนอกร่างกายและได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการนำเทคโนโลยีนี้มาใช้ในการค้นหาตัวชี้วัดทางชีวภาพของโรคกระดูกเปราะ ซึ่งตัวชี้วัดทางชีวภาพบางตัวอาจไม่ปรากฏในการเลี้ยงเซลล์แบบปกติบนจานเพาะเลี้ยง การนำเทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อผนวกเข้ากับการศึกษาการแสดงออกของยีนสามารถนำไปสู่ข้อมูลกลไกการเกิดโรคและทำให้ทราบถึงโมเลกุลเป้าหมาย เพื่อใช้ในการออกแบบการรักษาที่เฉพาะเจาะจงแก่ผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะต่อไป

Abstract

Tissue engineering is the alternative approach for creating *in vitro* models that hold promise for mimicking human tissues and reducing of the employment of animals in medical research. The use of animal models often shows limits in recapitulation of human conditions due to differences between human and animal physiology, molecular mechanisms, pathomechanism, and pharmacokinetic responses. The objective of this study was to investigate gene expression profiles of iPSC-derived mesenchymal stromal cells (iMSCs) from Osteogenetic Imperfecta patients during osteogenic differentiation. Osteogenic differentiation of iMSCs was performed for 4 weeks in 2 different culture systems, which are 2-dimensional (2D) culture in well-plates and 3-dimensional (3D) culture in porous scaffolds. Real-time PCR results showed higher expression of *RUNX2, SP7* and *COL1A1* in 3D culture system compared to 2D culture system, indicating an influence of scaffold's microenvironment on osteogenic differentiation of iMSCs. We demonstrated the use of tissue engineering to create 3D *in vitro* models and its potential use in discovery of Osteogenetic Imperfecta biomarkers that do not express in 2D culture system. Taken together, *in vitro* tissue models and gene expression profiling can provide valuable information of pathomechanism and candidate molecular targets to design a specific treatment plan of OI patients.

สารบัญ
(Table of Contents)

บทนำ 1

แบบจำลองทางชีววิทยา 1

โรคกระดูกเปราะ (Osteogenesis Imperfecta) 2

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย 3

Specific Aim 1 ศึกษาความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ในการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสิ่งแวดล้อมขนาดไมครอน 3

Specific Aim 2 เปรียบเทียบความแตกต่างของเนื้อเยื่อกระดูกปกติและเนื้อเยื่อกระดูกภาวะกระดูกเปราะ เนื้อเยื่อกระดูกจาก Specific Aim 1 3

ระเบียบวิธีวิจัย 5

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์: 5

2. การพัฒนาของเนื้อเยื่อกระดูก: 5

3. ความสามารถในการเพิ่มจำนวนและการอยู่รอดของเซลล์: 5

4. การวิเคราะห์หาปริมาณ extracellular matrix (ECM): 5

5. การประเมินความแข็งแรงเชิงกล (mechanical properties): 5

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ: 5

ผลการทดลอง 6

1. Development of bone 3D-culture system (กำลังอยู่ระหว่างร่างสิทธิบัตรวิธีการเลี้ยงเซลล์กระดูกแบบ 3 มิติ) 6

2. การแสดงออกของยีนระดับ RNA 7

3. Immunohistochemistry of collage type I 8

อภิปรายผลการวิจัย 9

เอกสารอ้างอิง 10

สารบัญภาพ

(List of Illustration)

ภาพที่ 1 การใช้เทคนิควิศวกรรมเนื้อเยื่อในการออกแบบจำลองภาวะปกติและภาวะพยาธิสภาพ 2

ภาพที่ 2 องค์ประกอบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) ซึ่งนำไปสู่การสร้างแบบจำลองโรคกระดูกเปราะ 3

ภาพที่ 3 องค์ความรู้ที่ได้จากการทำวิจัยในปีที่ 1 นำไปสู่งานวิจัยในปีที่ 2 4

ภาพที่ 4 สรุปวิธีการดำเนินงานในปีที่ 1 6

ภาพที่ 5 การพัฒนาแบบจำลองกระดูก แบบ 3 มิติ 7

ภาพที่ 6 ตัวอย่างของผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR 7

ภาพที่ 7 Immunohistochemistry of collagen type I ของผู้ป่วยรายที่ 1 8

บทนำ

ความเจริญก้าวหน้าทางการแพทย์มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาคุณภาพชีวิต เห็นได้จากอายุคาดเฉลี่ย (life expectancy) ที่เพิ่มขึ้นของประชากร และผลกระทบที่ประเทศไทยกำลังเผชิญอยู่ในขณะนี้คือการก้าวสู่สังคมผู้สูงอายุ โดยสมบูรณ์ จากรายงานของสถาบันวิจัยประชากรและสังคม, มหาวิทยาลัยมหิดล ชี้ให้เห็นว่าประชากรอายุตั้งแต่ 60 ขึ้นไป ได้เพิ่มขึ้นจาก 10.6% ของประชากรทั้งหมด ในปี 2550 ไปเป็น 16.5% ในปี 2559 ซึ่งมีแนวโน้มว่ากลุ่มประชากรเหล่านั้นกำลังจะเผชิญกับปัญหาโรคเสื่อมถอย (degenerative diseases) ของเนื้อเยื่อ อวัยวะ และโครงสร้างต่างๆ ในร่างกายอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ โรคเสื่อมถอย เช่น กระดูกพรุน และข้อเข่าเสื่อม ซึ่งพบมากในผู้สูงอายุและสตรีวัยหมดประจำเดือน เป็นเหตุให้การเคลื่อนไหวของร่างกายทำได้อย่างจำกัด ผู้ป่วยต้องอาศัยอุปกรณ์ช่วยพยุง และทานยาเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับกระดูก จะเห็นได้ว่าโรคเสื่อมถอยทาง musculoskeleton ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและครอบครัวอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ นอกจากนี้รัฐบาลและหน่วยงานที่ให้บริการสาธารสุขต้องแบกรับภาระค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาพยาบาลผู้ป่วยเป็นระยะเวลาที่ยาวนาน เนื่องจากเป็นปัญหาสุขภาพเรื้อรัง

เพื่อให้เข้าใจพยาธิกลไลของโรคผู้วิจัยจึงวางแผนที่จะพัฒนาแบบจำลองโรคกระดูกโดยคำนึงถึงสภาพแวดล้อมขนาดไมครอน (microenvironment) ที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกทั้งในภาวะปกติและภาวะเกิดโรค แทนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้จานเพาะเลี้ยงซึ่งไม่สามารถจำลองสภาพแวดล้อมในการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูกได้อย่างแท้จริง การศึกษาครั้งนี้จะทำการสร้างแบบจำลองกระดูกในภาวะปกติก่อนเพื่อทดสอบวิธีการและลำดับขั้นตอนก่อนที่จะนำไปใช้กับกระดูกในภาวะเกิดโรคในลำดับต่อไป จากนั้นจะทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างกระดูกในภาวะปกติและภาวะเกิดโรคทั้งในระดับ transcription และ translation และจะทำการศึกษาเครื่องหมายทางชีววิทยาที่แตกต่างกันระหว่างกระดูกภาวะปกติและภาวะเกิดโรค เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจกลไกการเกิดโรคได้ในลำดับต่อไป

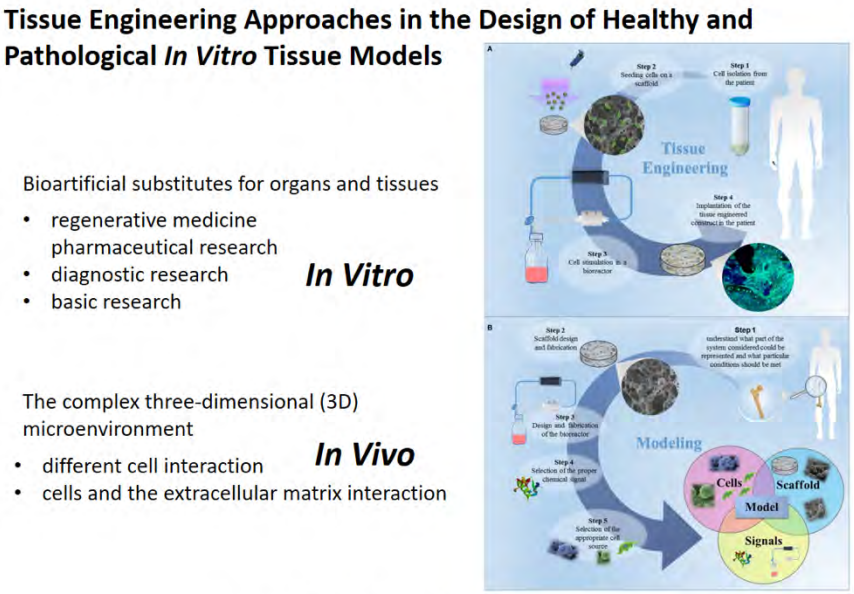
พยาธิกลไกที่ต้องการจะศึกษาในการวิจัยนี้คือพยาธิกลไกของโรคกระดูกเปราะ Osteogenesis Imperfecta (OI) เนื่องจากกลุ่มผู้วิจัยมีความรู้และความชำนาญ ในเรื่องการแสดงออกของยีนกลายพันธุ์ที่ก่อโรคให้เกิดโรคกระดูกเปราะเป็นอย่างดี สิ่งเป็นจุดเด่นของงานวิจัยนี้คือการใช้เซลล์ชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stromal cells, MSCs) จากผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะมาสร้างแบบจำลองการเกิดโรค ซึ่งถือเป็นข้อได้เปรียบในการพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยเนื่องจากเป็นการใช้เซลล์ของผู้ป่วยเอง และแบบจำลองที่ได้จะมีความสอดคล้องกับปัญหาทางคลินิก (clinically relevant problem) และเป็นที่ทราบกันดีว่าผลของการตอบสนองต่อยาที่ใช้รักษาระหว่างมนุษย์กับสัตว์อาจแตกต่างกัน ดังนั้นหากใช้สัตว์ทดลอง (animal models) เพื่อการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้

แบบจำลองภาวะเกิดโรคที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะช่วยพัฒนาการวินิจฉัยและรักษาโรคกระดูกเปราะได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผู้ป่วยเข้าถึงการรักษาได้อย่างทันท่วงทีก่อนที่อาการของโรคจะทวีความรุนแรงขึ้น และเป้าหมายสูงสุดของการวิจัยนี้เพื่อให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีและใช้ชีวิตอยู่ในสังคมได้อย่างปกติสุข

แบบจำลองทางชีววิทยา

แบบจำลองทางชีววิทยามีความสำคัญต่อการพัฒนาการรักษาโรคต่างๆ ในมนุษย์ แบบจำลองทางชีววิทยาที่เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือการใช้สัตว์ทดลองขนาดเล็ก เช่น หนู กระต่าย หรือที่มีขนาดใหญ่และเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ ลิง การใช้สัตว์ทดลองจากสัตว์ เพื่อศึกษากลไกการเกิดโรคของมนุษย์มีข้อจำกัดเช่น ยาหรือสารเคมีบางตัวสามารถออกฤทธิ์ได้ดีในเซลล์สัตว์ แต่กลับไม่ออกฤทธิ์ในเซลล์มนุษย์ รวมไปถึงกลไกการเกิดโรคบางอย่างในมนุษย์มีความแตกต่างจากสัตว์อย่างสิ้นเชิง อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการดูแลสัตว์ทดลองมีราคาสูง หากพิจารณาด้านจริยธรรมในการใช้สัตว์ทดลองเพื่อการวิจัยทางการแพทย์จะเห็นว่าเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ และกลุ่มนักวิจัยได้เสนอแนวทางที่เรียกว่า The principle of 3Rs (Replacement, Reduction, and Refinement) เพื่อให้เกิดการตระหนักถึงสวัสดิภาพของสัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ โครงการวิจัยนี้จึงพยายามพัฒนาแบบจำลองทางชีววิทยาเพื่อศึกษากลไกการเกิดโรคในมนุษย์ และหลีกเลี่ยงการใช้สัตว์ทดลอง

แบบจำลองทางวิทยาเพื่อศึกษากลไกการเกิดโรค เพื่อพัฒนายา การคัดกรองสารออกฤทธิ์ เพื่อใช้ในการรักษา ส่วนใหญ่เซลล์ที่ใช้ไม่ว่าจะเป็นเซลล์คนหรือเซลล์สัตว์จะทำการเพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นรูปแบบ 2 มิติ จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบดังกล่าวยังห่างไกลจากภาวะปกติของเซลล์ในร่างกายที่มีการปฏิสัมพันธ์ 1) ระหว่างเซลล์ด้วยกันเอง และ 2)ระหว่างเซลล์และเมทริกส์นอกเซลล์ ซึ่งปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นรูปแบบ 3 มิติ โครงการวิจัยนี้จึงพัฒนาแบบจำลองทางชีววิทยาโดยคำนึงถึงภาวะแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกในห้องปฏิบัติการให้ใกล้เคียงกับกระดูกมนุษย์มากที่สุด (**ภาพที่** 1)



Caddeo S, Boffito M, Sartori S. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2017

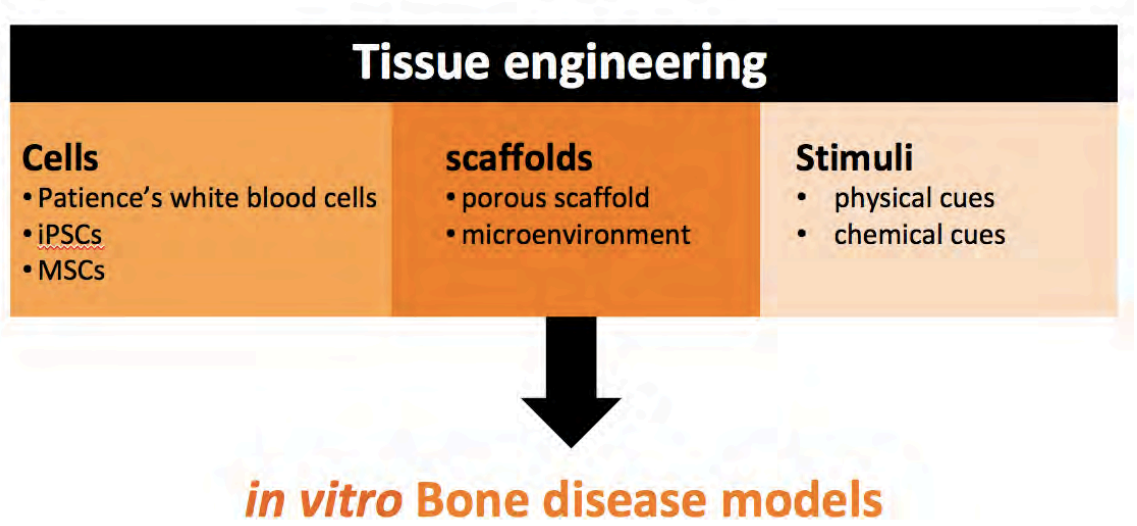
ภาพที่ 1 **การใช้เทคนิควิศวกรรมเนื้อเยื่อในการออกแบบจำลองภาวะปกติและภาวะพยาธิสภาพ**

ภาพบนคือการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนโดยการนำเซลล์จากผู้ป่วยออกมาเพาะเลี้ยงนอกร่างกายในห้องปฏิบัติการด้วยสภาพวะที่เหมาะสม แล้วนำเนื้อเยื่อที่เต็มวัย กลับไปปลูกถ่ายในผู้ป่วย ภาพด้านล่างคือการสร้างแบบจำลองการเกิดโรค โดยนำเซลล์จากผู้ป่วยออกมาเพาะเลี้ยงนอกร่างกายในห้องปฏิบัติการด้วยสภาพวะที่เหมาะสม แบบจำลองที่ได้สามารถนำมาคัดกรองยาและศึกษากลไกการเกิดโรคโดยไม่มีการนำกลับเข้าไปในร่างกายผู้ป่วย

โรคกระดูกเปราะ (Osteogenesis Imperfecta)

โรคกระดูกเปราะเป็นโรคถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนอย่างน้อย 17 ยีน โดย 90% ของผู้ป่วยเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *COL1A1* หรือ *COL1A2* และมีการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมแบบยีนเด่น (autosomal dominant) โดยผู้ป่วยจะผลิตคอลลาเจนลดลงหรือคอลลาเจนที่ได้มีโครงสร้างไม่สมบูรณ์ผิดรูปไป จึงเป็นสาเหตุให้กระดูกเปราะบางและแตกหักง่าย หากผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยโรคแต่เนิ่นๆ แพทย์จะสามารถปรับการรักษาและบรรเทาความรุนแรงของโรคได้ ปัจจุบันการหาลำดับยีนเพื่อตรวจหาตำแหน่งที่ผิดปกติถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรคกระดูกเปราะร่วมกับการตรวจลักษณะฟีโนไทป์ที่ผิดปกติต่างๆ เช่น การหัก งอ ผิดรูปของแขน ขา และ ฟัน เพื่อให้การรักษาเป็นไปอย่างถูกต้องและรวดเร็วขึ้น การมีแบบจำลองโรคกระดูกเปราะของผู้ป่วยเฉพาะรายจะช่วยให้การตรวจวินิจฉัย คัดกรอง วางแผนการรักษา ให้ยา ทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถย่นระยะเวลาการสังเกตเห็นการตอบสนองต่อการ

รักษาได้ อีกทั้งสามารถนำไปสู่ความเข้าใจของกลไกการเกิดโรคได้ การสร้างแบบจำลองของโรคกระดูกเปราะอาศัยหลักการคล้ายคลึงกับการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกภาวะปกติ โดยการใช้ความรู้ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนหลักคือ
i) เซลล์ (Cells) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่เก็บข้อมูลทางชีววิทยาของสิ่งมีชีวิต
ii) โครงสร้างเลี้ยงเซลล์ (scaffolds) เพื่อให้เซลล์เข้ายึดเกาะและเจริญเติบโต และ
iii) สิ่งกระตุ้น (Stimuli) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์จนกลายเป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ได้ (**ภาพที่** 2)



ภาพที่ 2 **องค์ประกอบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ** (Tissue engineering) **นำไปสู่การสร้างแบบจำลองโรคกระดูกเปราะ**

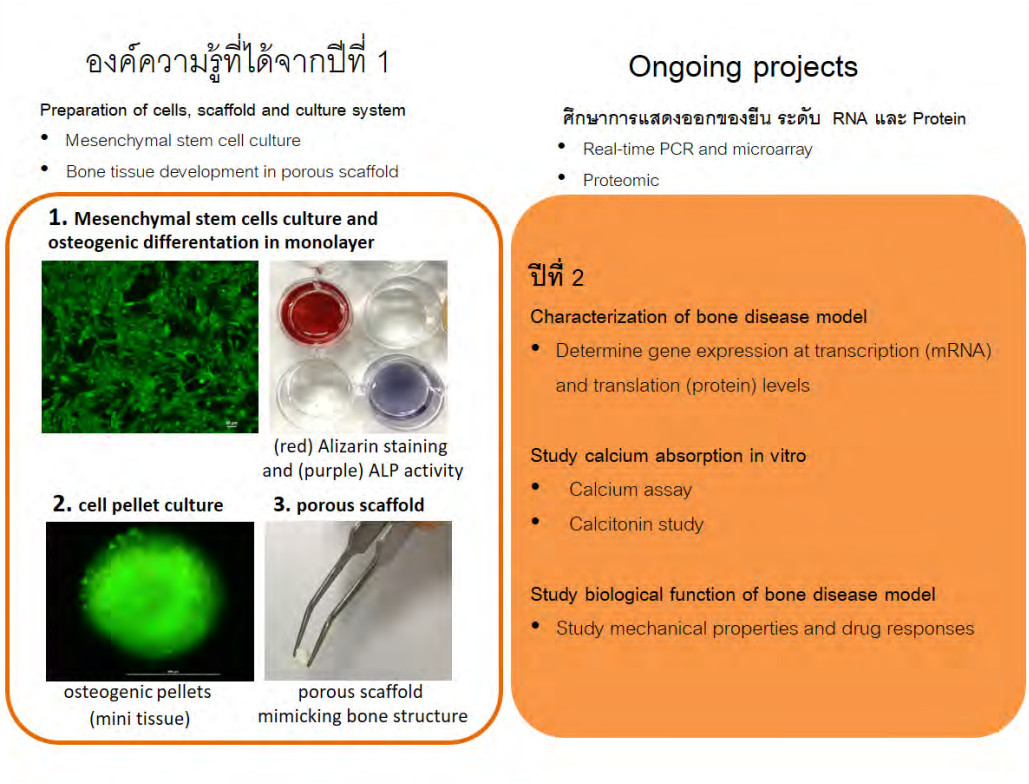
วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

Specific Aim 1 **ศึกษาความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ในการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสิ่งแวดล้อมขนาดไมครอน** โดยนำความรู้ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาสร้างเป็นแบบจำลอง โครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนและอาหารจำเพาะจะถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ภาวะปกติและเซลล์จากผู้ป่วยเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูก

Specific Aim 2 **เปรียบเทียบความแตกต่างของเนื้อเยื่อกระดูกปกติและเนื้อเยื่อกระดูกภาวะกระดูกเปราะ เนื้อเยื่อกระดูกจาก** Specific Aim 1 ทั้งเซลล์ภาวะปกติและเซลล์จากผู้ป่วยจะนำมาศึกษาการแสดงออกของยีน และความสามารถในการสร้าง extracellular matrix

การสร้างแบบจำลองโรคกระดูกเปราะในห้องปฏิบัติการเริ่มจากการนำเซลล์ต้นกำเนิดของผู้ป่วยชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal Stromal Cells, MSCs) มาเพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนซึ่งทำหน้าที่เป็นสิ่งแวดล้อมขนาดไมครอน (microenvironment) ให้กับเซลล์ ร่วมกับการให้อาหารเลี้ยง osteogenic media เพื่อเหนี่ยวนำให้ MSCs กลายเป็นเซลล์กระดูก (osteoblasts)

ในเบื้องต้นได้ทำการศึกษาความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะ ในการเจริญและพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกในจานเพาะเลี้ยง พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงไป 28 วัน เซลล์ดังกล่าวมีการแสดงลักษณะของเซลล์กระดูกได้ ลักษณะที่พบ เช่น การผลิตแคลเซียม (red staining) และการมีอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส activity (purple staining) จนได้ระเบียบวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์และวิธีเพาะเหยี่ยวเซลล์แบบ 3 มิติ เพื่อนำไปสู่การวิเคราะห์ผลและศึกษาการแสดงออกของยีนในปีที่ 2 **(ภาพที่ 3)**



ภาพที่ 3 องค์ความรู้ที่ได้จากการทำวิจัยในปีที่ 1 นำไปสู่งานวิจัยในปีที่ 2

ในปีแรกได้เพิ่มจำนวนเซลล์ และคิดค้นวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 3 มิติให้ได้ micro-bone tissue ของผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะ และในปีที่ 2 จะเป็นการศึกษาการสดงออกของยีน และ characterize biological function

อย่างไรก็ตามที่ผ่านมาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในจานเพาะเลี้ยงไม่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมระดับไมครอน (microenvironment) ที่อยู่รอบๆ เซลล์อย่างแท้จริง ซึ่งอาจทำให้เนื้อเยื่อกระดูกที่ได้อาจสูญเสียลักษณะทางชีววิทยาที่สำคัญระหว่างการพัฒนาและเปลี่ยนแปลง จากนั้นจึงมีการปรับวิธีการเพาะเลี้ยงโดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เป็นทรงกลม หรือ osteogenic pellets **(ภาพที่ 3 cell pellet สีเขียว)** อย่างไรก็ตามการเก็บข้อมูลและการ handling ทำได้ค่อนข้างลำบากเนื่องจาก osteogenic pellets มีขนาดเล็ก (0.5 mm) ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะเปลี่ยนระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบใหม่โดยอาศัยโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนที่มีส่วนประกอบของ medical grade hydroxyapatite **(แผนภาพที่ 3 porous scaffold)** ซึ่งมีโครงสร้างและส่วนประกอบคล้ายกับกระดูกมาก โดยโครง

เลี้ยงเซลล์ดังกล่าวจะเป็นที่ยึดเกาะของเซลล์ชนิดมีเซ็นไคม์เพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป และนำไปสู่จุดประสงค์ที่ 1 ของโครงการวิจัยนี้ *:* Specific Aim 1 "ศึกษาความสามารถของเซลล์ชนิดมีเซนไคม์ในการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเป็นเนื้อเยื่อกระดูกในสิ่งแวดล้อมขนาดไมครอน" โดยจะดำเนินการในช่วงปีแรกของโครงการ จากนั้นแบบจำลองโรคกระดูกเปราะที่ได้จะถูกนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับแบบจำลองกระดูกในภาวะปกติ ทั้งในระดับ RNA และโปรตีน ว่ามีการเพิ่ม ลด ขาดหาย หรือไม่ ซึ่งจะดำเนินการในปีที่ 2 ของโครงการ ซึ่งจะสอดคล้องกับ Specific Aim 2 "เปรียบเทียบความแตกต่างของเนื้อเยื่อกระดูกปกติและเนื้อเยื่อกระดูกภาวะกระดูกเปราะ"

การตรวจวิเคราะห์ RNA และโปรตีน และbiomarkers ต่างๆ สามารถนำไปสู่การรักษาผู้ป่วยอย่างจำเพาะเจาะจง เพื่อให้แพทย์เลือกวิธีการรักษา ชนิดและขนาดของยาที่เหมาะสมกับผู้ป่วยในแต่ละรายได้ นอกจากโครงการวิจัยนี้จะนำไปสู่การวินิจฉัย รักษา ผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะเฉพาะรายแล้ว ความรู้ที่ได้มีศักยภาพที่จะนำมาเป็นต้นแบบในการสร้างแบบจำลองโรคระบบอื่นๆ เช่น ระบบประสาท ระบบย่อยอาหาร ระบบไหลเวียนเลือด เพื่อป้องกันและรักษาโรคเสื่อมถอย (degenerative diseases) ชนิดต่างๆ ที่ประเทศไทยกำลังเผชิญอยู่ในขณะนี้

ระเบียบวิธีวิจัย

1. **การเพาะเลี้ยงเซลล์**: เพิ่มจำนวน MSCs เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์เพียงพอตลอดการทดลอง ทั้งเซลล์ภาวะปกติและเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยในอาหารเลี้ยง growth medium (α-MEM supplemented with 10%FBS, 1% antibiotic/antimycotic, 1% HEPES, 5 ng/ml bFGF) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนอาหาร 2 ครั้งต่อสัปดาห์

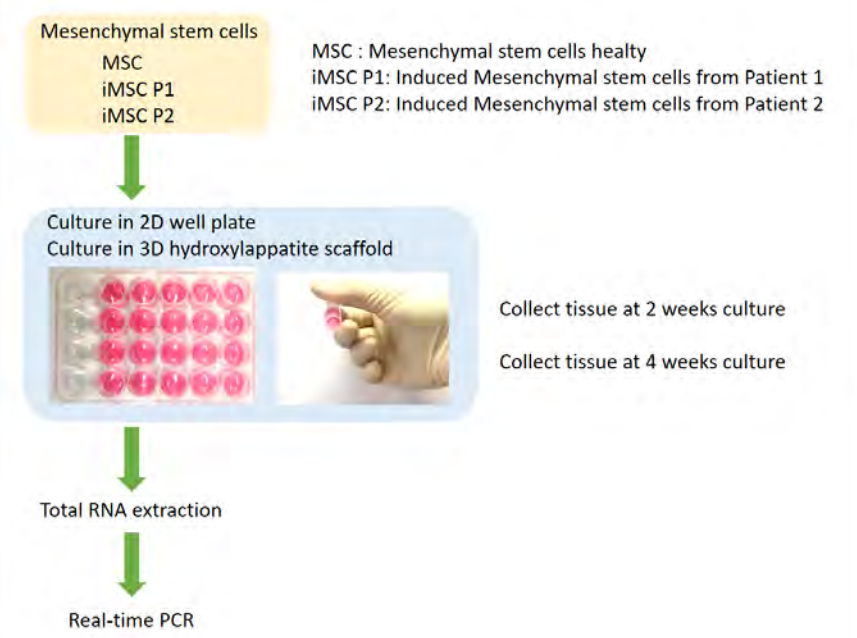
2. **การพัฒนาของเนื้อเยื่อกระดูก**: เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (2 x 105 cells) ทั้งเซลล์ภาวะปกติและเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยจะถูกเหนี่ยวนำและพัฒนาให้เป็นเนื้อเยื่อกระดูกในโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหาร osteogenic medium (high glucose DMEM, 10% FBS, 1% Antibiotic/antimycotic, 1% HEPES, 10 mM β-glycerolphophate, 50 μM ascorbic acid, 1 μM dexamethasone) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนอาหาร 2 ครั้งต่อสัปดาห์

3. **ความสามารถในการเพิ่มจำนวนและการอยู่รอดของเซลล์**: เนื้อเยื่อกระดูกภาวะปกติและภาวะเกิดโรคจะถูกนำมาวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการอยู่รอดของเซลล์ ทุกๆ สัปดาห์ เป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ (n=6) โดยวิธีวัดปริมาณ DNA ควบคู่ไปกับการวัด KI-67 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ รวมทั้งวิธี Live/Dead assay

4. **การวิเคราะห์หาปริมาณ extracellular matrix (ECM)**: เนื้อเยื่อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงจะถูกนำมาตรวจสอบ การสร้าง osteogenic markers ทั้งการวิเคราะห์ทางชีวเคมี และ immunohistology chemistry และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง

5. **การประเมินความแข็งแรงเชิงกล (mechanical properties)**: โดยใช้เครื่อง instron เพื่อคำนวนหา Young's modulus ของเนื้อเยื่อกระดูกที่สร้างขึ้น (n=6) โดยจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

6. **การวิเคราะห์ทางสถิติ**: จะดำเนินการโดย GraphPad Prism software (La Jolla, CA) Dependent variables ในการวิเคราะห์ Two-way ANOVA คือ ปริมาณ ECM และค่า Young's modulus ส่วน Independent variables คือ ชนิดของเซลล์ในการทดลอง Bonferroni post-test จะถูกนำมาใช้วิเคราะห์ที่ α = 0.05 เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ การรายงานผลจะอยู่ในรูป mean ± SEM (n = 6)



ภาพที่ 4 สรุปวิธีการดำเนินงานในปีที่ 1

เซลล์ชนิดมีเซ็นไคม์ของคนปกติ และจากผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะ 2 ราย ถูกนำมาเพิ่มจำนวนให้มีจำนวนมากพอตลอดการทดลอง และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นจะมีการเลี้ยงเซลล์ 2 รูปแบบ คือแบบ 2D ใน well plate และ แบบ 3D ในหลอดทดลอง low attachment เมื่อครบกำหนด 2 และ 4 สัปดาห์ จะทำการเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัด RNA และนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real-time PCR

ผลการทดลอง

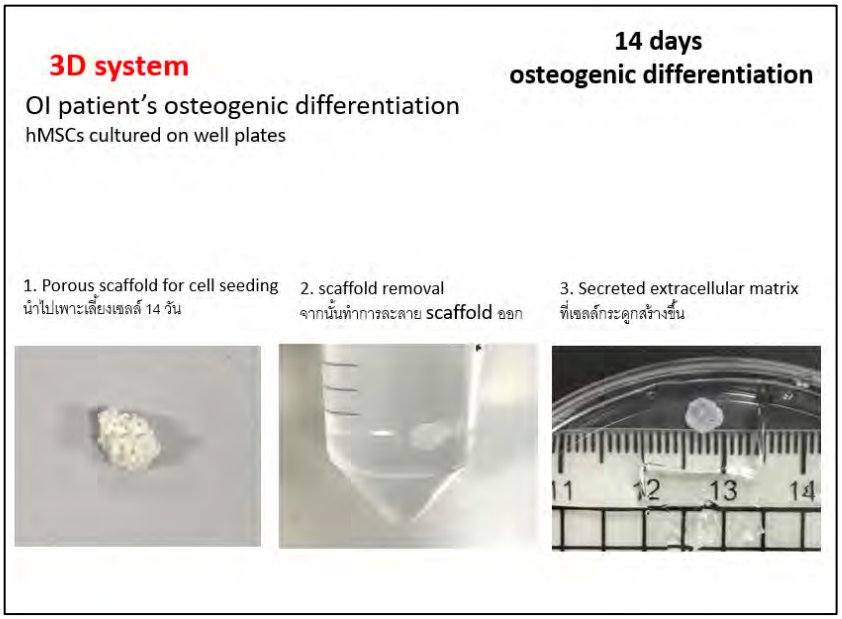
1. Development of bone 3D-culture system (**กำลังอยู่ระหว่างร่างสิทธิบัตรวิธีการเลี้ยงเซลล์กระดูกแบบ 3 มิติ**)

1.1 เซลล์ชนิดมีเซ็นไคม์ของผู้ป่วยถูกนำมาเพิ่มจำนวนให้เพียงพอแก่การทดลอง และนำมาเพาะเลี้ยงในโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนเป็นเวลา 14 หรือ 28 วัน **(ภาพที่ 5.1)** เพื่อให้เกิดการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก osteoblasts

1.2 เนื้อเยื่อกระดูกที่ทำการเพาะเลี้ยงจนครบกำหนดเวลา สามารถนำมาสกัด total RNA ออกมาได้ โดยปริมาณที่ได้จะอยู่ที่ 100 ng/ul ในสัปดาห์ที่ 2 และ 400 ng/ul ในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งมีปริมาณเพียงพอต่อการศึกษาการแสดงออกของยีนในขั้นตอนต่อไป

1.3 การทำ histology เนื้อเยื่อกระดูก พบว่า ยังติดปัญหาการตัด section เพราะโครงเลี้ยงเซลล์จาก hydroxyapatite จนไม่สามารถตัดให้ขาดด้วยเครื่อง microtome หลังจากนำไปฝังใน paraffin ดังนั้นจึงนำเนื้อเยื่อกระดูกที่เพาะเลี้ยงจนครบ 14 หรือ 28 วัน มาทำการย่อยส่วนประกอบ inorganic ด้วย 5% formic acid ในการทำ scaffold removal จนเหลือแค่เมทริกซ์นอกเซลล์ที่อ่อนนุ่ม **(ภาพที่ 5.2)**

1.4 นำเมทริกซ์นอกเซลล์ที่ได้มาแช่ไว้ใน 1% agarose เพื่อใช้เป็นวัสดุค้ำจุน ไม่ให้เมทริกซ์เสียรูป ดัง**ภาพที่ 5.3**

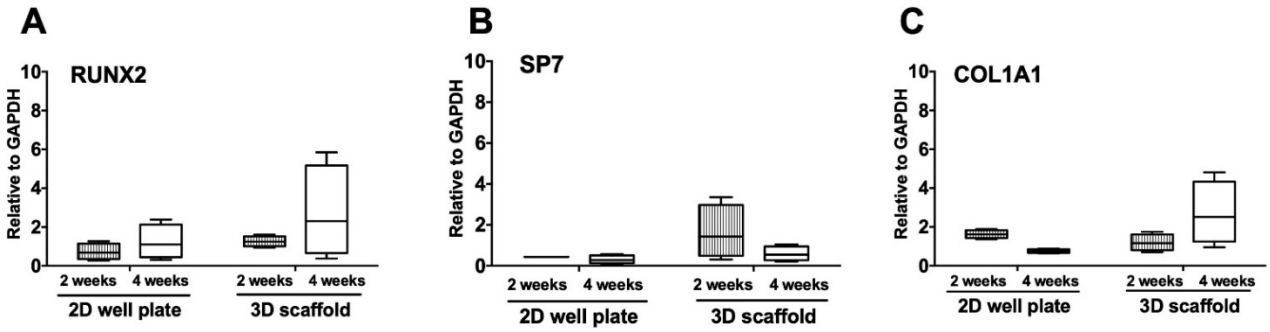


ภาพที่ 5 การพัฒนาแบบจำลองกระดูก แบบ 3 มิติ

โครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนที่ใช้มีส่วนประกอบหลักคือ hydroxyapatite และสามารถกำจัดออกไปได้ด้วย 5 % formic acid เนื้อเยื่อกระดูกรวมไปถึงเมทริกซ์นอกเซลล์จะนำมาแช่ไว้ใน 1% agarose ซึ่งทำหน้าที่เป็นวัสดุค้ำจุน

2. การแสดงออกของยีนระดับ RNA

2.1 ผลการแสดงออกของยีนเกี่ยวกับการพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์มีเซ็นไคม์ที่ได้จากผู้ป่วยคนที่ 1 (iMSC P1) แสดงให้เห็นดังภาพด้านล่าง ยีนที่ทำการตรวจสอบ คือ ยีนที่ encode เป็น osteogenic transcription factors จำนวน 2 ยีน คือ *RUNX2* และ *SP7* ซึ่งเป็น bone early markers รวมทั้งยีนที่ encode โปรตีน collagen type I คือ *COL1A1* ซึ่งเป็น bone late marker



ภาพที่ 6 ตัวอย่างของผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Real-time PCR
โดยยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์ทางสถิติอย่างละเอียด A) *RUNX2* B) *SP7* C) *COL1A1*

2.2 พบการแสดงออกของยีน *RUNX2* สูงในเซลล์ที่เลี้ยงในรูปแบบ 3D culture เมื่อเทียบกับแบบ 2D well plate **(ภาพที่** 6A) และการแสดงออกของยีน *RUNX2* มีการเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 2

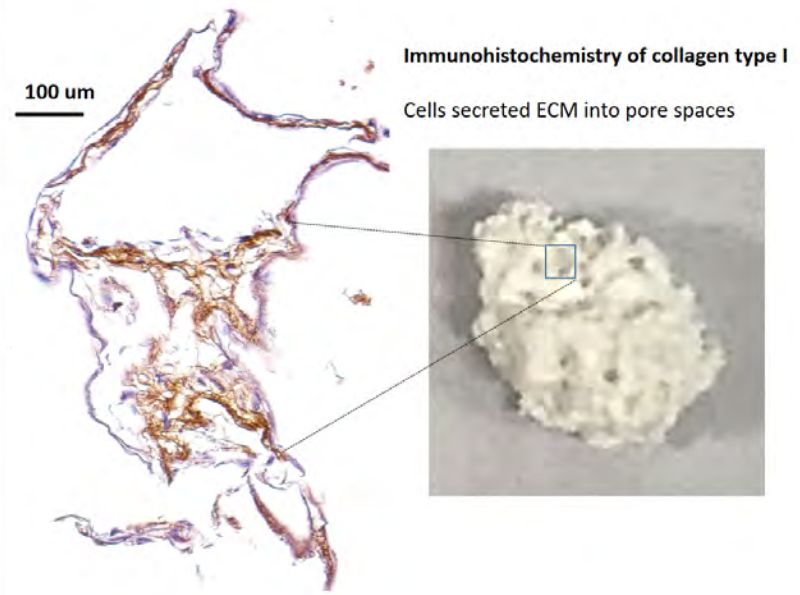
2.3 การแสดงออก *SP7* มีแนวโน้มคล้ายคลึงกับยีน *RUNX2* โดยในกลุ่ม 3D culture มีปริมาณสูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยงใน 2D well plate **(ภาพที่** 6B) สิ่งที่น่าสนใจคือ SP7 มีแนวโน้มในการแสดงออกของยีนสูงในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งต่างจากยีน *RUNX2* ที่แสดงออกสูงในสัปดาห์ที่ 4

2.4 ยีน *COL1A1* ถูก encode ได้โปรตีน collagen type I ซึ่งเป็นหนึ่งใน extracellular matrix ที่สำคัญของกระดูก พบว่ามีการแสดงออกในกลุ่ม 3D culture สูงกว่ากลุ่ม 2D well plate **(ภาพที่** 6C)

อย่างไรก็ตาม ความแปรปรวนในการแสดงออกของยีนยังมีค่าไม่แน่นอนในกลุ่ม 3D culture อาจเนื่องมาจากคุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้ จึงต้องทำการทดลองซ้ำ และเพิ่มจำนวน n สูงขึ้น จากเดิมที่ n = 4

3. Immunohistochemistry of collage type I

เซลล์กระดูก osteoblast ได้เพิ่มจำนวนขึ้นและได้เข้าไปเจริญเติบโตในรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ พบการติดสีของนิวเคลียส (สีม่วงเข้ม) และจากการทำ immunohistochemistry สามารถตรวจพบ collagen type II (สีน้ำตาล) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อโครงสร้างกระดูกทั้งในกระดูกจำลองของคนปกติและของผู้ป่วย



ภาพที่ 7 Immunohistochemistry of collagen type I **ของผู้ป่วยรายที่** 1

เซลล์ได้เข้าไปอาศัยและเจริญเติบโตในช่องว่างของ porous scaffold และสามารถผลิต collagen type I

อภิปรายผลการวิจัย

สร้างแบบจำลองนอกร่างกายเพื่อใช้ในการวิจัยทางการแพทย์ช่วยให้นักวิจัยทราบถึงกลไกในการควบคุมการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการวางแผนการรักษา การหาโมเลกุลเป้าหมายเพื่อออกแบบยารักษาโรคต่างๆ รวมไปถึงการทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ก่อนที่จะนำมาใช้กับมนุษย์ ส่วนใหญ่การศึกษาการทำงานของเซลล์ในแบบจำลองนอกร่างกายยังคงทำโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเนื่องจากทำได้ง่าย ได้ผลเร็ว และเป็นการคัดกรองผลการทดลองในเบื้องต้น แต่ข้อด้อยของการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีนี้คือเซลล์ที่ได้ยังมีความแตกต่างกับเซลล์ที่อยู่ในร่างกายมนุษย์ซึ่งถูกแวดล้อมด้วยเมทริกซ์นอกเซลล์ แบบจำลองอีกชนิดที่นิยมใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์คือการใช้สัตว์ทดลองเพื่อใช้จำลองสภาวะในร่างกายของมนุษย์ แต่บ่อยครั้งสัตว์ทดลองยังมีข้อจำกัดในการเลียนแบบสรีรวิทยาของมนุษย์ กลไกระดับอณูชีววิทยา กลไกการเกิดโรค และผลการตอบสนองทางเภสัชจลศาสตร์ และต้องใช้เงินจำนวนมากในการดูแลสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ทั้งยังมีข้อถกเถียงด้านจริยธรรม และการกระทำต่อสัตว์อย่างมีมนุษยธรรม เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาจากการเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงที่ให้เซลล์ซึ่งมีคุณลักษณะที่ยังห่างไกลจากสภาวะจริงในร่างกาย รวมทั้งลดการใช้สัตว์ทดลองซึ่งไม่สามารถเป็นตัวแทนการทำงานของร่างกายมนุษย์อย่างสมบูรณ์ โครงการวิจัยนี้จึงต้องการเสนอทางเลือกในการสร้างแบบจำลองนอกร่างกายเพื่อใช้ในการวิจัยทางการแพทย์ด้วยการสร้างเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการโดยใช้เทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

สมมุติฐานของการทดลองนี้คือเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นนี้จะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระดูกทั้งในด้านชนิดของยีนที่เพิ่มขึ้น และปริมาณการแสดงออกยีนที่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงแบบปกติ แบบจำลองนอกร่างกายที่สร้างขึ้นถูกนำมาใช้เพื่อการศึกษากลไกการเกิดโรคกระดูกเปราะ โดยเซลล์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้คือเซลล์กระดูกชนิดออสติโอบลาสต์ที่ได้รับการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์มีเซ็นไคม์ (iMSCs) โดยเซลล์มีเซ็นไคม์นี้ได้มาจากเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับการเหนี่ยวนำจากผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะ (Osteogenetic Imperfecta) อีกต่อหนึ่ง ปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะยังคงรักษาตามอาการและการให้ยาในกลุ่ม bisphosphonates ซึ่งจะเข้าไปยับยั้งไม่ให้เซลล์ออสติโอคลาสต์ (osteoclasts) สลายกระดูก จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าบ่อยครั้งที่ผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาชนิดนี้ จึงเป็นเป็นเหตุจูงใจให้มีการค้นหาวิธีในการรักษาด้วยวิธีอื่น โรคกระดูกเปราะเป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนหลายชนิดซึ่งมีทั้งยีนที่อยู่บนโครโมโซมร่างกายซึ่งมีลักษณะการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบยีนเด่น (autosomal dominant) รวมถึงการกลายพันธุ์ของยีน *MBTPS2* ซึ่งมีการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยบนโครโมโซม X ความหลากหลายของการกลายพันธุ์เหล่านี้อาจเป็นที่มาของประสิทธิภาพที่ไม่เท่ากันในการรักษาผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะแม้ว่าจะให้ยาชนิดเดียวกัน มีความเป็นไปได้ว่าหากทราบตัวชี้วัดทางชีวภาพของโรคกระดูกเปราะเพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการเสริมสร้างกระดูกให้แข็งแรงหรือตัวชี้วัดทางชีวภาพที่ต้องยับยั้งไม่ให้แสดงออก ซึ่งการทราบข้อมูลดังกล่าวจะเป็นการสร้างทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะแต่ละรายอย่างจำเพาะเจาะจง

การสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในห้องปฏิบัติการโดยเทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีจุดประสงค์หลักคือเพื่อทดแทนกระดูกที่สูญเสียไปจากอุบัติเหตุ ความเสื่อมถอยของร่างกาย หรือโรคมะเร็ง โดยทำการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกให้มีโครงสร้างและหน้าที่คล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อเดิม ภายในห้องปฏิบัติการจะมีการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมือนกับสภาวะแวดล้อมในร่างกายมนุษย์มากที่สุด ไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และตัวกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

ด้วยหลักการดังกล่าวผู้วิจัยจึงได้สร้างแบบจำลองเนื้อเยื่อกระดูกของผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะ เพื่อใช้เนื้อเยื่อนี้เป็นตัวแทนของผู้ป่วยในการค้นหาตัวชี้วัดทางชีวภาพ และศึกษากลไกการเกิดโรค ในช่วงแรกของการวิจัยจะเป็นการทดสอบแบบจำลองที่สร้างขึ้นว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างจากเนื้อเยื่อกระดูกมากน้อยเพียงใด โดยการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระดูก ได้แก่ยีน *RUNX2*, *SP7* และ *COL1A1* ซึ่งทั้ง 3 ยีนสามารถแสดงออกในเนื้อเยื่อกระดูกของผู้ป่วยโรคกระดูกเปราะ และเนื้อเยื่อกระดูกที่ได้มาจากเซลล์มีเซ็นไคม์ของคนปกติ ชี้ให้เห็นว่าสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มีความเหมาะสมต่อการสร้างกระดูกได้เป็นอย่างดี สิ่งที่น่าสนใจคือปริมาณการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะ 2 มิติ บนจานเลี้ยงเซลล์มีค่าน้อยกว่า การเลี้ยงเซลล์ในสภาวะ 3 มิติในโครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนได้อย่างชัดเจน อีกประเด็นหนึ่งคือ การแสดงออกของยีน SP7 มีค่าสูงในสัปดาห์ที่ 2 มากกว่าสัปดาห์ที่ 4 นั้นแสดงให้เห็นว่า *SP7* เป็นยีนที่แสดงออกในช่วงแรกของการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ต่างกับ *COL1A1* ที่จะมีค่าสูงในสัปดาห์ที่ 4

โครงเลี้ยงเซลล์แบบรูพรุนที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้เป็นชนิด medical grade ซึ่งมี hydroxyapatite ส่วนประกอบหลัก hydroxyapatite เป็นสารอนินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบหลักของกระดูก และถูกนำมาใช้ในการซ่อมสร้างกระดูกอย่างแพร่หลาย ก่อนหน้านั้นกลุ่มผู้วิจัยได้ใช้ decellularized bone แต่เกรงว่าจะไม่สามารถแยกได้ว่า collagen type II ที่ตรวจพบในกระดูกที่สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการ ว่ามาจากเซลล์กระดูกที่เพาะเลี้ยงหรือเป็น collagen type II ที่ยังตกค้างใน decellularized bone ผลจาก immunohistochemistry ชี้ให้เห็นว่าเซลล์กระดูกของผู้ป่วยได้แทรกตัวอยู่ในรูพรุนอย่างทั่วถึงและสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ได้

ข้อจำกัดของแบบจำลองที่ได้สร้างขึ้นนี้คือ การมีเพียงเซลล์ชนิดเดียว เพาะเลี้ยงเซลล์เพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจยังไม่สมจริงและยังซับซ้อนเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งอาจขาดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่นเซลล์ออสติโอคลาส ข้อจำกัดอีกประการคือ กลุ่มควบคุมควรจะมี genetic back ground อย่างเดียวกัน คือ เซลล์ของผู้ป่วยที่ทำการแก้ไขการกลายพันธุ์ แล้วแปรสภาพมาเป็นเซลล์มีเซ็นไคม์ แต่เราใช้กลุ่มควบคุมคือ MSCs ที่ได้มาจากคนปกติ ดังนั้นการวิเคราะห์ข้อมูลหรือเปรียบเทียบจะเน้นเป็นการศึกษาระหว่าง 2D เปรียบเทียบกับ 3D culture system แทนที่จะเป็น ผู้ป่วยเปรียบเทียบกับคนปกติ อีกวิธีที่จะดำเนินการศึกษาในช่วงที่ 2 คือ การเพิ่มจำนวน biological samples ของเซลล์มีเซ็นไคม์ของคนปกติ จากนั้นนำมาพัฒนาและเปลี่ยนแปลงให้ได้เซลล์กระดูก osteogenic differentiation เพื่อให้ได้แนวโน้มและแบบแผนของการแสดงออกยีนจากเซลล์กระดูกอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในระดับ RNA และ ในระดับโปรตีน ทั้งในด้านจำนวนของยีนที่ต้องการศึกษา

ท้ายที่สุดแล้ว ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัยนี้คือ การเข้าใจกลไกการเกิดโรคกระดูกเปราะเพื่อสามารถวางแผนการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพและทันท่วงทีก่อนที่อาการของโรคจะรุนแรงขึ้น อีกทั้งเป็นการพัฒนาแบบจำลองโรคชนิดอื่น เช่น โรคในระบบประสาท ระบบทางเดินอาหาร หรือระบบไหลเวียนเลือด โดยการใช้เทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

เอกสารอ้างอิง

1. Festing S, Wilkinson R, The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research. EMBO Rep. 2007; 8(6):526-530.

2. Russell WMS and Burch RL. The priciples of Humane Experimental Technique 1959. Potters Bar: Universities Federation for Animal Welfare

3. Lindert U, Cabral WA, Ausavarat S, Tongkobpetch S, Ludin K, Barnes AM, et al. MBTPS2 mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta. Nat Commun. 2016;7:11920.

4. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science. 1993;260(5110):920-6.

5. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. Eur Cell Mater. 2013;26:120-32.

6. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. Eur Spine J. 2008;17 Suppl 4:467-79.

7. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. J Anat. 2008;213(1):66-72.

8. Ge Z, Goh JC, Lee EH. Selection of cell source for ligament tissue engineering. Cell Transplant. 2005;14(8):573-83.

9. Zakrzewski JL, van den Brink MRM, Hubbell JA. Overcoming immunological barriers in regenerative medicine. Nat Biotechnol. 2014;32(8):786-94.

10. Ko JY, Park S, Im GI. Osteogenesis from human induced pluripotent stem cells: an in vitro and in vivo comparison with mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2014;23(15):1788-97.

11. Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(9):4335-40.

12. Yu T, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, et al. In vivo differentiation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Circ J. 2013;77(5):1297-306.