รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) **การศึกษาการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมฟอยด์ที่รุกรานเข้าไปในก้อนมะเร็งด้วยวิธี mitogen stimulation เพื่อใช้ในการรักษาด้วยการให้เซลล์บำบัดในโรคมะเร็งรังไข่**

(ภาษาอังกฤษ) **Activation and expansion of tumor infiltrating lymphocyte using mitogen stimulation for adoptive cellular therapy in ovarian cancer**

หน่วยงาน: หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายชื่อผู้วิจัย: 1. อ.พญ.ดร. รังสิมา เหรียญตระกูล (ผู้วิจัยหลัก)
หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อ. นพ. กรมิษฐ์ ศุภพิพัฒน์ (ผู้วิจัยร่วม)
ศูนย์ความเป็นเลิศด้านภูมิคุ้มกันบำบัดมะเร็งและศูนย์วิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acknowledgement (กิตติกรรมประกาศ)

โครงการวิจัยในรายงานการวิจัยฉบับนี้ ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2561 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (This research is funded by Chulalongkorn University.)

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

มะเร็งรังไข่เป็นมะเร็งที่มีอัตราตายสูงที่สุดในกลุ่มมะเร็งทางนรีเวชวิทยา ผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ที่มีโรคกลับเป็นซ้ำหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษามาตรฐานมีทางเลือกในการรักษาอื่นๆค่อนข้างจำกัดมาก มีการวิจัยโดยการรักษาด้วยการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมฟอยด์ที่รุกรานเข้าไปในก้อนมะเร็งสำหรับการรักษาแบบเซลล์บำบัดในโรคมะเร็งรังไข่ อย่างไรก็ดีการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมฟอยด์ที่รุกรานเข้าไปในก้อนมะเร็งด้วยวิธีมาตรฐานมักได้จำนวนเซลล์ไม่เพียงพอต่อการใช้ทางคลินิก

ในการวิจัยนี้ทางผู้วิจัยทำการเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมฟอยด์ที่รุกรานเข้าไปในก้อนมะเร็งระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธี mitogen stimulation โดยการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ ชนิดของเซลล์ภูมิคุ้มกัน และ ปฏิกริยาต่อเซลล์มะเร็ง

จากการทดลองพบว่าการเพิ่มจำนวด้วยวิธี mitogen stimulation นั้นมีจำนวนเซลล์และอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ วิธีการเพิ่มจำนวนมีผลต่อชนิดของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมฟอยด์ที่รุกรานเข้าไปในก้อนมะเร็ง อย่างไรก็ดีเมื่อเปรียบเทียบปกิกริยาต่อเซลล์มะเร็งนั้น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมฟอยด์ที่รุกรานเข้าไปในก้อนมะเร็งที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogen stimulation นั้นมีปกิกริยาต่อเซลล์มะเร็งลดลงเมื่อเทียบกับการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐาน

การเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogen stimulation มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมฟอยด์ที่รุกรานเข้าไปในก้อนมะเร็ง การนำการเพิ่มจำนวนวิธีนี้ไปใช้ทางคลินิกยังคงต้องการการวิจัยเพิ่มเติม

Abstract

Ovarian cancer is one of the most lethal gynecologic malignancy. Patients with relapsed and refractory ovarian cancer have very limited option of treatment. Adoptive therapy with tumor infiltrate lymphocytes (TILs) has been explored as a potential therapy for relapsed and refractory ovarian cancer but standard method for TILs expansion is suboptimal for clinical application in solid tumor.

In this study, we evaluated expansion of TILs between standard method and mitogen stimulation method. We compared cell number, fold expansion, cell subset and tumor reactivity.

Mitogen stimulation method exhibited better cell numbers and fold expansion compared to standard method. Cell subsets were different with less percentage of natural killer cell when using mitogen stimulation method. Moreover, tumor reactivity is less in TILs expanded with mitogen stimulation method comparing with TILs expanded with standard method.

Mitogen stimulation method can improve expansion of TILs in term of increase cell number and fold expansion. Clinical application of mitogen stimulation TILs needed to be explored.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

Acknowledgement (กิตติกรรมประกาศ) 2

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) 3

Abstract 4

สารบัญภาพ (List of Illustrations) 6

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations) 7

บทนำ(Introduction) 8

เนื้อเรื่อง (Main Body) 14

วิธีการทดลอง (Materials and methods) 14

ผลการทดลอง (Results) 16

อภิปราย/วิจารณ์(Discussion) 21

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ เกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป (Conclusion and Further Directions) 22

Bibliography 23

สารบัญภาพ **(List of Illustrations)**

รูปที่ 1 (A) กราฟแสดง absolute number ของเซลล์ TILs ทั้งหมด ในวันที่ 1 วันที่ 7 และวันที่ 14. (B) กราฟแสดง fold expansion ของเซลล์ TILs ทั้งหมด ในวันที่ 1 วันที่ 7 และวันที่ 14. 17

รูปที่ 2 (A) ผลการวิเคราะห์สับเซตของ TILs โดยใช้ Flow cytometry. (B) กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของแต่ละสับเซตใน TILs หลังจากการ expansion. (C) กราฟแสดง absolute number ของแต่ละสับเซตใน TILs หลังจากการ expansion. (D) กราฟแสดง fold change ของแต่ละสับเซตใน TILs หลังจากการ expansion. T = เซลล์ที (T cells) , NKT = เซลล์เอ็นเคที (natural killer T cells), NK = เซลล์เอ็นเค (natural killer cell). 19

รูปที่ 3 (A) ผลการวิเคราะห์ cytobead ในการหลั่งไซโตไคน์โดยใช้ Flow cytometry. (B) กราฟแสดงระดับของอินเตอร์เฟียรอน-แกมมา (interferon gamma) ในแต่ละสภาวะ. IFN = อินเตอร์เฟียรอน-แกมมา (interferon). 20

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

CAR-T cells	:	Chimeric Antigen Receptor-T cells
CD3	:	Cluster of differentiation 3
CD4	:	Cluster of differentiation 4
CD56	:	Cluster of differentiation 56
CD8	:	Cluster of differentiation 8
CIK cells	:	Cytokine-induced killer cells
CO_2	:	Carbon dioxide
FACS	:	Fluorescence-activated cell sorting
HLA	:	Human leukocyte antigen
IFN	:	Interferon
IL-2	:	Interleukin-2
IU	:	International units
LAR	:	Lymphokine activated killer
ml	:	Milliliter
NK cells	:	Natural killer cells
NKT cells	:	Natural killer T cells
SD	:	Standard Deviation
TCR	:	T cell receptor
TILs	:	Tumor-infiltrating lymphocytes

บทนำ(Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งรังไข่นับเป็นมะเร็งที่ก่อปัญหาทางสาธารณสุขในระดับต้นๆของประเทศไทย มะเร็งรังไข่เป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 5 ในผู้ป่วยมะเร็งเพศหญิงและเป็นมะเร็งทางนรีเวชที่พบบ่อยเป็นอันดับสองรองจากมะเร็งปากมดลูกแต่กลับเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่พบมากที่สุดในผู้ป่วยมะเร็งทางนรีเวชในประเทศไทย มะเร็งรังไข่ในประเทศไทยมีอุบัติการณ์ประมาณ 5 รายต่อประชากร 100,000 รายต่อปี ซึ่งจะพบผู้ป่วยใหม่ประมาณ 1,700 รายต่อปีโดยมีแนวโน้วจะพบเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยโรคมะเร็งรังไข่ในประเทศไทยมักพบในช่วงอายุประมาณ 45-60 ปีและผู้ป่วยส่วนใหญ่มักมีการดำเนินโรคที่รุนแรง (advance stage) แล้วตั้งแต่ได้รับการวินิจฉัย สาเหตุสำคัญเนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการตรวจคัดกรองสำหรับโรคมะเร็งรังไข่ที่สามารถคัดกรองโรคมะเร็งรังไข่ตั้งแต่ระยะต้นอย่างมีประสิทธิภาพเหมือนการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นผลให้ผู้ป่วยมะเร็งรังไข่โดยส่วนใหญ่ซึ่งมักเป็นกลุ่ม advanced stage และถึงแม้ผู้ป่วยเหล่านี้จะได้รับการรักษาที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วยการผ่าตัดและการให้ยาเคมีบำบัดในกลุ่ม platinum ก็มีโอกาสตอบสนองต่อการรักษาเพียงร้อยละ 15-25% เท่านั้นและผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่ยังมีโอกาสเกิดโรคซ้ำหลังจากตอบสนองต่อการรักษาครั้งแรกแล้วมากถึง 90% นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาและกลุ่มที่เกิดโรคกลับเป็นซ้ำนั้นมีโอกาสตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดตัวอื่นๆหรือการรักษาอื่นๆที่มีอยู่ในปัจจุบันน้อยมาก ด้วยสาเหตุดังกล่าวจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการค้นคว้าหาวิธีการรักษาแบบใหม่เพื่อช่วยเพิ่มโอกาสการตอบสนองและลดโอกาสการกลับเป็นซ้ำของผู้ป่วยโรคมะเร็งรังไข่

การรักษาโดยการให้เซลล์บำบัดคือการรักษาโดยการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันของตัวผู้ป่วยหรือผู้บริจาคเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งที่หลงเหลืออยู่ในตัวผู้ป่วย ซึ่งเป็นการรักษาดังกล่าวถือว่าเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการรักษามะเร็งที่ได้มีการศึกษา วิจัยอย่างมากในยุคปัจจุบัน ด้วยสาเหตุข้างต้นทาง ศูนย์ความเป็นเลิศทางการแพทย์ด้านสเต็มเซลล์และเซลล์บำบัด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, ศูนย์วิจัยสเต็มเซลล์และเซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ หน่วยมะเร็งทางนรีเวช ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจึงได้มีความร่วมมือกันจัดตั้งโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งรังไข่โดยการให้เซลล์บำบัดด้วยเซลล์ชนิด Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) เพื่อเป็น

ทางเลือกสำหรับการรักษาผู้ป่วยมะเร็งรังไข่โดยเฉพาะในกลุ่มที่เป็น advance stage, กลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา หรือ กลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- พัฒนาวิธีการกระตุ้นและเพิ่มจำนวน TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ให้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการรักษาด้วยการให้เซลล์บำบัด (adoptive cell therapy)
- ศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะทางภูมิคุ้มกันของ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ทั้งก่อนและหลังการกระตุ้นและเพิ่มจำนวน

ทบทวนวรรณกรรม

มะเร็งรังไข่ (Epithelial Ovarian Cancer)

มะเร็งรังไข่เป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยเป็นอันดับสองของมะเร็งทางนรีเวชวิทยาแต่เป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของผู้ป่วยมะเร็งทางนรีเวชทั้งในผู้ป่วยชาวไทยและผู้ป่วยทั่วโลก โดยผู้ป่วยมีโอกาสเสียชีวิตจากโรคมะเร็งรังไข่สูงถึง 70% และมีโอกาสที่โรคกลับเป็นซ้ำสูงถึง 90% ในประเทศไทยมีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งรังไข่ประมาณ 1,700 รายต่อปีและมีแนวโน้มจะจะพบมากขึ้นเรื่อยๆ ผู้ป่วยโรคมะเร็งรังไข่ชาวไทยมักมีอายุอยู่ระหว่าง 45-60 ปีและพบว่าผู้ป่วยจะมีการดำเนินโรคอยู่ในขั้นสูง (advance stage) และมักมีการแพร่กระจายของมะเร็งไปสู่อวัยวะอื่นๆ (metastasis) แล้วตั้งแต่ได้รับการวินิจฉัย สาเหตุสำคัญเนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวิธีที่มีประสิทธิภาพมากพอสำหรับการตรวจคัดกรองโรคมะเร็งรังไข่ตั้งแต่ระยะต้นๆ ของโรค (1-3)

การรักษามาตรฐานของโรคมะเร็งรังไข่ในปัจจุบันคือการผ่าตัดและการให้ยาเคมีบำบัด (platinum based chemotherapy)ในรายที่จำเป็น ถึงแม้ว่าปัจจุบันเทคนิคการผ่าตัดในมะเร็งทางนรีเวชวิทยา และ ยาเคมีบำบัดสำหรับโรคมะเร็งรังไข่มีการพัฒนาไปอย่างมาก แต่ผู้ป่วยโรคมะเร็งรังไข่โดยส่วนใหญ่มักมีการดำเนินโรคอยู่ในขั้นสูง (advance stage) ตั้งแต่ได้รับการวินิจฉัยและมีโอกาสรอดชีวิตเพียง 18-47% เท่านั้นแม้ว่าจะได้รับการรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสมแล้ว (2) นอกจากนี้ผู้ป่วยโรคมะเร็งรังไข่ที่มีโรคกลับเป็นซ้ำภายใน 6 เดือนหลังจากได้รับการรักษาครั้งแรกจะมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีกล่าวคือจะมีโอกาสที่ตอบสนองกับยาเคมี

บำบัดที่ให้เป็นครั้งที่สอง (second line chemotherapy) เช่น liposomal doxorubicin, topotecan, etoposide, docetaxel, gemcitabine หรือ targeted therapy อื่นๆน้อยกว่า 20% (4)

จากเหตุผลข้างต้นจะเห็นได้ว่าเรายังมีความจำเป็นอย่างยิ่งยวดที่จะต้องทำการค้นคว้าวิจัยและค้นหาวิธีการรักษาแบบใหม่ๆ เพื่อเพิ่มโอกาสการรอดชีวิตและลดอัตราการป็นซ้ำให้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งรังไข่ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีการดำเนินโรคขั้นสูง (advance stage) และผู้ป่วยที่มีโรคกลับเป็นซ้ำ (relapse disease) ซึ่งมักจะไม่ตอบสนองต่อการรักษา second line therapy และ targeted therapy ที่มีอยู่ในปัจจุบัน (5)

การให้เซลล์บำบัดในการรักษามะเร็ง (Adoptive cellular therapy in cancer)

การรักษาด้วยการให้เซลล์บำบัด (adoptive cellular therapy) มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องในช่วง 10 ปีที่ผ่านมานี้และได้รับความสนใจอย่างมากสำหรับการใช้เป็นแนวทางการักษาใหม่ของโรคมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และ มะเร็งก้อนหลายชนิด (solid tumors) (6-8) การให้เซลล์บำบัดในการรักษาโรคมะเร็งมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้กล่าวคือเริ่มด้วยการเก็บเกี่ยว(harvest) เซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ (effector immune cells) จากตัวผู้ป่วยหรือผู้บริจาค แล้วจึงนำมาทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนภายนอกร่างกายของผู้ป่วยหรือผู้บริจาค (ex-vivo activation and expansion) เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีปริมาณมากเพียงพอ และ มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น เมื่อทำการเพิ่มจำนวนจนได้ปริมาณมากเพียงพอตามที่ต้องการแล้วจึงนำเอาเซลล์ดังกล่าวฉีดกลับเข้าไปในตัวผู้ป่วย โดยมุ่งหวังให้เซลล์ภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้นหรือเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งด้วยวิธีต่างๆแล้วนั้น เป็นตัวช่วยทำลายเซลล์มะเร็งที่หลงเหลืออยู่ในร่างกายโดยตรงหรือไปเหนี่ยวนำเซลล์ภูมิคุ้มกันอื่นๆในร่างกายให้มาช่วยทำลายเซลล์มะเร็งที่เหลืออยู่ (7, 8)

ในปัจจุบันมีการศึกษาและวิจัยเรื่องการใช้เซลล์บำบัดในโรคมะเร็งรังไข่อยู่อย่างกว้างขวางทั้งการวิจัยในหลอดทดลอง (in-vitro study) การวิจัยในสัตว์ทดลอง (in-vivo study) และการวิจัยในชั้นคลินิค (clinical trial) ซึ่งให้ผลการทดลองอยู่ในระดับที่น่าพอใจ (9, 10) โดยเซลล์ภูมิคุ้มกัน (immune effector cells) ที่ถูกนำมาศึกษาในการวิจัยการใช้เซลล์บำบัดในโรคมะเร็งรังไข่นั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักๆคือ

- HLA restricted effector cells คือเซลล์ภูมิคุ้มกันที่รับรู้ (recognize) antigenของเซลล์มะเร็งต่อเมื่อมีการนำเสนอผ่าน MHC molecule ซึ่งได้แก่เซลล์ TILs, cytotoxic T cells และ Chimeric Antigen Receptor T cells (CAR-T cells)

- HLA unrestricted effectors cells คือเซลล์ภูมิคุ้มกันที่รับรู้(recognize) antigenของเซลล์มะเร็ง โดยไม่จำเป็นต้องมีการนำเสนอผ่าน MHC molecule ซึ่งได้แก่เซลล์ Natural Killers (NK) cells, Lymphokine Activated Killer (LAK) cells และ Cytokine Induced Killer (CIK) cells

โดยทางกลุ่มผู้วิจัยให้ความสนใจกับการพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งรังไข่ด้วยการให้เซลล์ TILsเนื่องจาก เซลล์ TILs เป็นหนึ่งในเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเซลล์มะเร็งรังไข่, เซลล์ TILsสามารถรับรู้ทั้ง extracellular และ intracellular antigen ของมะเร็งรังไข่ได้โดยไม่จำเป็นต้องทำการดัดแปลงพันธุกรรมหมือนกับ CAR-T cells และ เซลล์ TILs สามารถให้ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างยาวนานหลังฉีดกลับเข้าไปในตัวคนไข้ (long term persistent immune response) (11, 12)

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมฟอยด์ที่รุกรานเข้าไปในก้อนมะเร็งในโรคมะเร็งรังไข่ (TILs in ovarian cancer)

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมฟอยด์ที่รุกรานเข้าไปในก้อนมะเร็ง (Tumor Infiltrating Lymphocytes) คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมฟอยด์เช่น T cells, B cells หรือ NK cells ที่ย้ายออกจากหลอดเลือดไปอาศัยบริเวณ tumor stroma หรือ intraepithelial space ของก้อนมะเร็ง (12) โดย TILs ในก้อนมะเร็งรังไข่นั้นมีความสำคัญทางคลินิคอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือมีการศึกษาและงานวิจัยหลายชิ้นพบตรงกันว่าในผู้ป่วยมะเร็งไข่ที่พบว่ามี CD3+ และ CD8+ TILs ในก้อนมะเร็งจะมีการพยากรณ์โรคที่ดีกว่า และมีอัตรารอดชีวิตสูงกว่าผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ที่ไม่พบ TILs ในก้อนมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ (13, 14) ซึ่งแสดงถึงความสำคัญของ tumor immune response ของเซลล์ TILs รวมถึงมีงานวิจัยในระดับก่อนคลินิค (preclinical study) หลายชิ้นที่แสดงว่า TILs มี tumor reactivity กับมะเร็งรังไข่ในหลอดทดลองและสามารถกำจัดมะเร็งรังไข่ได้จากการทดสอบในหนูทดลอง (15, 16) ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้เซลล์ TILs จึงได้รับความสนใจอย่างมากในการใช้เป็น effector immune cells ของการให้เซลล์บำบัดเพื่อการรักษาโรคมะเร็งรังไข่

ต้นแบบของการรักษาโดยการให้เซลล์ TILs ในการรักษาโรคมะเร็ง (TILs for cancer adoptive cell therapy) เริ่มต้นจาก การใช้เซลล์ TILs ในการรักษาโรคมะเร็งของผิวหนังชนิด melanoma (17-19) ซึ่งเป็นมะเร็งที่ไม่ตอบสนองกับยาเคมีบำบัดมาตรฐาน โดยการสกัด TILs จากเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยที่ถูกตัดออกมา และนำมาทำการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริม interleukin-2 (IL-2) ขนาดสูงตั้งแต่ 3,000-6,000 IU/ml ซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐานของการเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็ง ซึ่งการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานนี้สามารถเพิ่มจำนวน TILs จากชิ้นเนื้อมะmelanoma ได้มากถึง 1 x

1010 cells ต่อรอบการเพิ่มจำนวน แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้ฉีดกลับเข้าไปในตัวผู้ป่วย ซึ่งการวิจัยทางคลินิคพบว่าการให้เซลล์ TILs กับผู้ป่วย melanoma นั้นมีอัตราการตอบสนองสูงถึง 50-72% โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่มีมะเร็งแพร่กระจายไปที่อวัยวะอื่นๆแล้ว (metastasis) จึงทำให้ขณะนี้การรักษาด้วยการให้เซลล์ TILs เป็นการรักษาที่ได้ผลดีที่สุดในผู้ป่วย melanoma ที่ไม่ตอบสนองกับการรักษามาตรฐานหรือมีการแพร่กระจายของโรคแล้ว (17, 19)

แต่อย่างไรก็ดีผลการวิจัยทางคลินิคของการให้เซลล์ TILs ในการรักษาโรคมะเร็งรังไข่ และ มะเร็งก้อนชนิดอื่นๆเช่น มะเร็งไต (renal cell carcinoma) กลับให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจนักเมื่อเทียบกับการใช้ในโรคมะเร็งชนิด melanoma งานวิจัยทางคลินิคหลายงานวิจัยพบว่าการให้เซลล์ TILs ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ให้ผลการตอบสนองทางคลินิคไม่แตกต่างกับการให้ยาเคมีบำบัด และไม่ได้ลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคหรืออัตราการเกิดโรคเป็นซ้ำ (20-23) ซึ่งสาเหตุสำคัญของปัญหาดังกล่าวคือTILs จากเนื้อเยื่อมะเร็งรังไข่ไม่สามารถถูกเพิ่มจำนวนได้หรือถูกเพิ่มจำนวนได้ในระดับที่น้อยกว่า 1×10^9 cells จากการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนของเซลล์ TILs ด้วยวิธีมาตรฐานแบบที่ใช้ high dose IL-2 เพียงอย่างเดียวเหมือนกับที่ใช้กับ TILs จากเนื้อเยื่อมะเร็ง melanoma จึงทำให้ได้เซลล์ที่ไม่เพียงพอจะส่งผลต่อการรักษาทางคลินิค

เมื่อไม่นานมานี้มีการวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งไต โดยการใช้วิธี mitogenic stimulation ด้วย Dynabeads CD3/CD28 แทนการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานซึ่งส่งผลให้สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งไตได้มากเพียงพอสำหรับการใช้ในระดับคลินิค ($> 1 \times 10^{10}$ cells) (24) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้วิธี mitogenic stimulation ก็ยังสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs จากเนื้อเยื่อมะเร็งต่อมหมวกไต (neuroblastoma) จากผุ้ป่วยเด็กได้จำนวนมากเพียงพอสำหรับใช้ทางคลินิคอีกด้วย (unpublished data) ด้วยเหตุผลดังกล่าวทางคณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์จะทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ด้วยวิธี mitogenic stimulation เพื่อเป็นการพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งรังไข่ด้วยการให้เซลล์ TILs ในการวิจัยในระดับคลินิคเป็นลำดับต่อไป

สมมติฐาน

การใช้ mitogenic stimulation สามารถช่วยกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่เพื่อใช้สำหรับการรักษามะเร็งรังไข่ด้วยการใช้เซลล์บำบัดได้ดีกว่าการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐาน

กรอบแนวคิดโครงการวิจัย

- เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ที่ได้หลังจากถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐาน

- เปรียบเทียบลักษณะทางภูมิคุ้มกัน (immunophenotype) ของเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ที่ได้หลังจากถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐาน

- เปรียบเทียบปฏิกริยาต่อต้านเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (in vitro tumor reactivity) ของเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ที่ได้หลังจากถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ได้วิธีการกระตุ้นและเพิ่มจำนวน Tumor Infiltrating Lymphocyte ให้มีจำนวนมากเพียงพอและมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งสูงที่สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งรังไข่ด้วยวิธีการให้เซลล์บำบัดได้

- ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง

เนื้อเรื่อง (Main Body)

วิธีการทดลอง (Materials and methods)

1. **การเปรียบเทียบจำนวนเซลล์** TILs **จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ที่ได้หลังจากถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี** mitogenic stimulation **และ วิธีมาตรฐาน**

1.1 การกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs ด้วยวิธีมาตรฐาน

ทำการแยก TILs ออกจากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่โดยการย่อยชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ด้วยอุปกรณ์ Gentle MACS tissue dissociator (Miltenyi Biotec) หลังจากนั้นกรอง TILs ที่ได้ผ่านตัวกรองขนาด 100 µm และนำไปเลี้ยงต่อใน 24-well culture plate ที่ความเข้มข้น 0.5 x 10^6 cells/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย X-VIVO15 media (Lonza) + 5% heat inactivated human AB serum (Sigma Aldrich) + 1% Pen/Strep (Sigma Aldrich) และเสริมด้วย recombinant human IL-2 (Novartis) ที่ความเข้มข้น 3,000 IU/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาและระดับ CO_2 5% เป็นเวลา 7 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และ recombinant human IL-2 ทุก 2-4 วันโดยรักษาความเข้มข้นของเซลล์ที่ 0.5 x 10^6 cells/ml หลังจากวันที่ 7 ทำการเลี้ยง TILs ต่อที่ความเข้มข้น 1.0 x 10^6 cells/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยลดความเข้มข้นของ recombinant human IL-2 (Novartis) ลงเหลือ 1,000 IU/ml ต่อเนื่องอีก 7 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และ recombinant human IL-2 ทุก 2-4 วันโดยรักษาความเข้มข้นของเซลล์ไว้ที่ 1.0 x 10^6 cells/ml เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 14 วันแยกเซลล์ส่วนหนึ่งไปเพื่อทำการวิเคราะห์ และนำเซลล์ส่วนที่เหลือไปทำการเพิ่มจำนวนต่อในขั้นตอน rapid expansions หรือ นำไปเซลล์ไปเก็บด้วยวิธี live cell banking ใน liquid nitrogen tank เพื่อเก็บรักษาเซลล์ไว้เพื่อการเพิ่มจำนวนในภายหลัง

1.2 การกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs ด้วยวิธี mitogenic stimulation

ทำการแยก TILs ออกจากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่โดยการย่อยชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ด้วยอุปกรณ์ Gentle MACS tissue dissociator (Miltenyi Biotec) หลังจากนั้นกรอง TILs ที่ได้ผ่านตัวกรองขนาด 100 µm และนำไปเลี้ยงต่อใน 24-well culture plate ร่วมกับ Dynabeads Human T Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher) ในอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้น 0.5 x 10^6 cells/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย X-VIVO15 media (Lonza) + 5% heat inactivated human AB serum (Sigma Aldrich) + 1% Pen/Strep (Sigma Aldrich) และเสริมด้วย recombinant human IL-2 (Novartis) ที่ความเข้มข้น 3,000 IU/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาและระดับ CO_2 5% เป็นเวลา 7 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

และ recombinant human IL-2 ทุก 2-4 วันโดยรักษาความเข้มข้นของเซลล์ที่ 0.5 x 10^6 cells/ml

หลังจากวันที่ 7 ทำการเลี้ยง TILs ที่ความเข้มข้น 1.0 x 10^6 cells/ml ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยลดความเข้มข้นของ recombinant human IL-2 (Novartis) ลงเหลือ 1,000 IU/ml ต่ออีก 7 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และ recombinant human IL-2 ทุก 2-4 วันโดยรักษาความเข้มข้นของเซลล์ที่ 1.0 x 10^6 cells/ml เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 14 วัน แยก CD3/CD38 Dynabeads ออกจาก Tumor infiltrating lymphocyte ด้วย Dynal MPC-S magnet (Thermo Fisher) แยกเซลล์ TILs ส่วนหนึ่งไปเพื่อทำการวิเคราะห์ และนำเซลล์ส่วนที่เหลือไปทำการเพิ่มจำนวนต่อในขั้นตอน rapid expansions หรือ นำเซลล์ไปเก็บด้วยวิธี live cell banking ใน liquid nitrogen tank เพื่อเก็บรักษาเซลล์ไว้เพื่อการเพิ่มจำนวนในภายหลัง

1.3 การเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ระหว่างการกระตุ้นทั้ง 2 วิธี

นับจำนวนเซลล์ TILs ด้วย hemocytometer โดยใช้ trypan blue นับแยกเซลล์ตายออกจากเซลล์ที่มีชีวิต เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ (absolute cell number) และอัตราการเพิ่มจำนวน (fold change) ของ TILs ระหว่างการกระตุ้นทั้ง 2 วิธี หลังการเพิ่มจำนวนในขั้น initial expansion และ rapid expansion

2. **การเปรียบเทียบลักษณะทางภูมิคุ้มกัน (immunophenotype) ของเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ที่ได้หลังจากถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐาน**

2.1 การวิเคราะห์ลักษณะทางภูมิคุ้มกัน (immunophenotype) ของ TILs ด้วย flow cytometry

เซลล์ TILs ประมาณ 0.5x 10^6 เซลล์จะถูกนำมาย้อมด้วย fluorochrome antibody ต่างๆตามตารางข้างล่างเพื่อระบุชนิดของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่เป็นส่วนประกอบของ tumor infiltrating lymphocytes ซึ่งเซลล์ที่ถูกย้อมด้วย fluorochrome antibody: CD3, CD4, CD8, CD56 จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย BD-FACS Aria flow cytometer (BD Bioscience)

2.2 การเปรียบเทียบลักษณะทางภูมิคุ้มกันของ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ระหว่างการกระตุ้นทั้ง 2 วิธี

เปรียบเทียบสัดส่วนของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆที่ประกอบ TILs ได้แก่ cytotoxic T cells, T helper cells,, NKT cells, NK cell ระหว่างการกระตุ้นทั้ง 2 วิธี

3. **การเปรียบเทียบปฏิกริยาต่อต้านเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (in vitro tumor reactivity) ของเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ที่ได้หลังจากถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐาน**

3.1 ทดสอบปฏิกริยาต่อต้านเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (in vitro tumor reactivity) ด้วยวิธี Interferon gamma secretion assay

นำเซลล์ TILs ที่ได้หลังจากการกระตุ้นและเพิ่มจำนวน มาเลี้ยงร่วมกับ autologous ovarian tumor cells ในอัตราส่วน 1:1 (1 x10^5: 1 x 10^5 cells) ใน round bottom 96-well culture plate ความเข้มข้นของเซลล์ที่ 1.0 x 10^6 cells/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาและระดับ CO_2 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บ supernatant ที่ 4 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดปริมาณ interferon gamma ที่เซลล์ TILs หลั่งออกมาด้วย ELISA MAX deluxe (Biolegend) ปริมาณ interferon gamma เป็นตัวบ่งถึงระดับของปฏิกริยาการต่อต้านเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (in vitro tumor reactivity) ของเซลล์ TILs

3.2 การเปรียบเทียบปฏิกริยาต่อต้านเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง ของ Tumor Infiltrating Lymphocytes จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ระหว่างการกระตุ้นทั้ง 2 วิธี

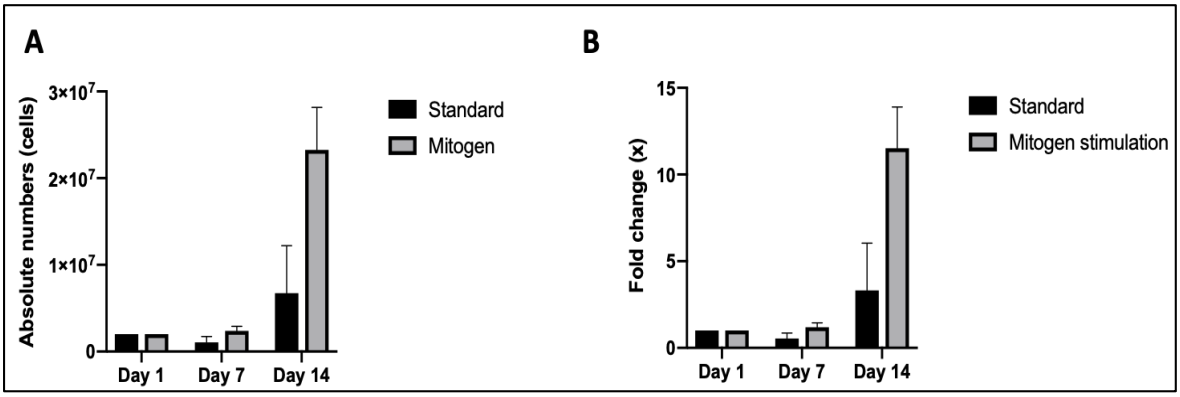
เปรียบเทียบปริมาณ interferon gamma ที่เซลล์ tumor infiltrating lymphocytes หลั่งออกมาหลังจากเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งระหว่างการกระตุ้นทั้ง 2 วิธี

ผลการทดลอง (Results)

การเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ที่ได้หลังจากถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐาน (N=5)

จากการทดลองพบว่าเมื่อนำเซลล์ TIL จำนวน 2,000,000 เซลล์ต่อกลุ่มมาทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐานนั้น เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานมีจำนวนเซลล์ TILs ทั้งหมดเฉลี่ย 1,072,000 เซลล์ (SD: 604,696) และ 6,728,000 เซลล์ (SD: 4,912,325) หลังจากทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 7 วันและ 14 วันตามลำดับ และ เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation มีจำนวนเซลล์

TILs ทั้งหมดเฉลี่ย 2,384,000 ± 470,302 และ 23,268,000 ± 4,387,265 เซลล์หลังจากทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 7 วันและ 14 วันตามลำดับซึ่งเมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ TILs ด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐานนั้นพบว่า เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานมีอัตราการเพิ่มจำนวนเฉลี่ยของเซลล์ TILs อยู่ที่ 0.5 ± 0.3 เท่า และ 3.3 ± 2.7 เท่า หลังจากทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 7 วันและ 14 วันตามลำดับ และ เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation อัตราการเพิ่มจำนวนเฉลี่ยของเซลล์ TILs อยู่ที่ 1.2 ± 0.2 เท่า และ 11.5 ± 2.4 เท่า หลังจากทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 7 วันและ 14 วันตามลำดับ



รูปที่ 1 (A) กราฟแสดง absolute number ของเซลล์ TILs ทั้งหมด ในวันที่ 1 วันที่ 7 และวันที่ 14. (B) กราฟแสดง fold expansion ของเซลล์ TILs ทั้งหมด ในวันที่ 1 วันที่ 7 และวันที่ 14.

การเปรียบเทียบลักษณะทางภูมิคุ้มกัน (immunophenotype) ของเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ที่ได้หลังจากถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐาน (N=5)

จากการทดลองพบว่าเซลล์ TILs ที่ถูกแยกออกจากก้อนมะเร็งรังไข่ในช่วงก่อนจะถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนนั้นมีส่วนประกอบด้วยเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆได้แก่ NK cells = 4 ± 1.7%, NK-T cells 3 ± 0.8%, T-cells 71 ± 4.8% และ เซลล์อื่นๆ 22 ± 3.0% เป็นส่วนประกอบพื้นฐาน

เมื่อทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs เป็นเวลา 7 วันพบว่า เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานนั้นมีส่วนประกอบของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆดังนี้ NK cells = 14 ± 4.9%, NK-T cells 6 ± 3.7%, T-cells 74 ± 6.7% และ เซลล์อื่นๆ 6 ± 1.7% และ เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่ม

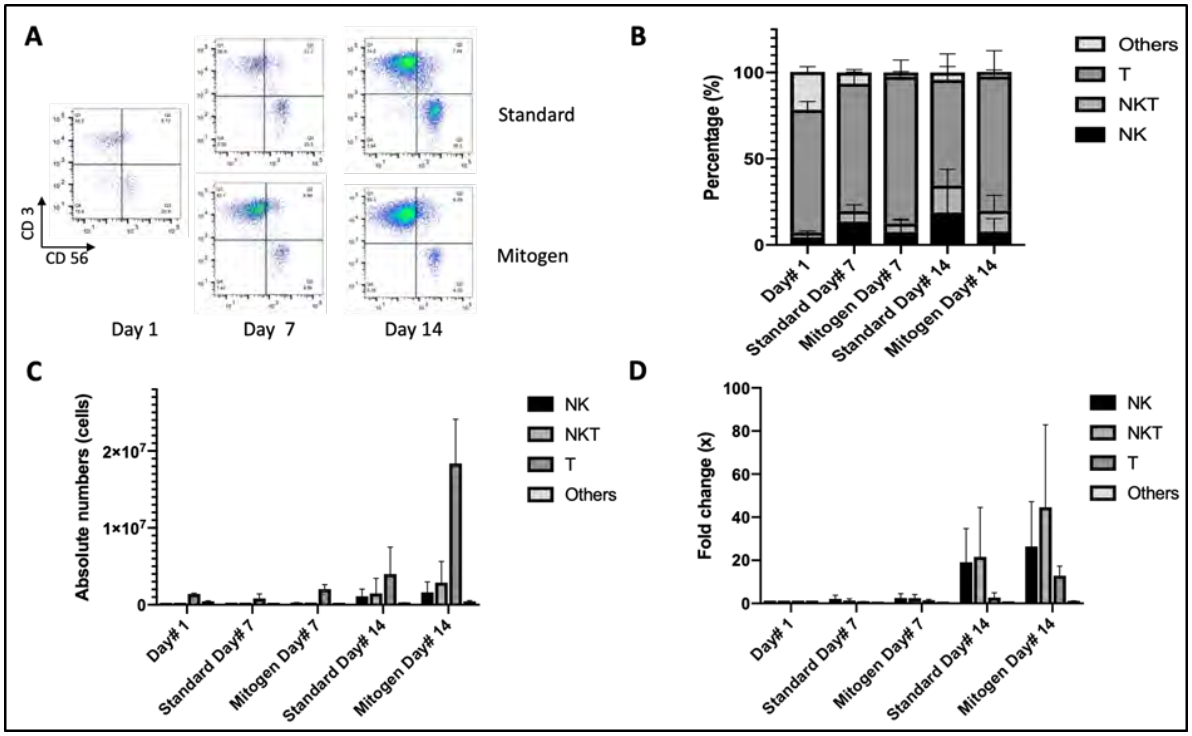
จำนวนด้วยวิธี Mitogenic stimulation นั้นมีส่วนประกอบของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆดังนี้ NK cells = 8 ± 6.8%, NK-T cells 5 ± 2.6%, T-cells 85 ± 9.6% และ เซลล์อื่นๆ 2 ± 0.5%

หลังจากทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs เป็นเวลา 14 วันพบว่า เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานนั้นมีส่วนประกอบของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆดังนี้ NK cells = 19 ± 14.8%, NK-T cells 16 ± 9.5%, T-cells 61 ± 15.0% และ เซลล์อื่นๆ 4 ± 3.5% และ เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Mitogenic stimulation นั้นมีส่วนประกอบของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆดังนี้ NK cells = 8 ± 7.5%, NK-T cells 12 ± 9.0%, T-cells 78 ± 14.9% และ เซลล์อื่นๆ 3 ± 1.1%

เมื่อนำสัดส่วนของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆที่มีอยู่ใน TILs มาคำนวณหาจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภูมิคุ้มกันแต่ละชนิดหลังจากทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs เป็นเวลา 7 วันพบว่า เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานนั้นมีจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆดังนี้ NK cells = 126,288 ± 21,859 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 2 ± 1.6 เท่า) , NK-T cells 72,656 ± 71,595 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 1 ± 0.9 เท่า), T-cells 816,840 ± 587,371 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 1 ± 0.4 เท่า) และ เซลล์อื่นๆ 56,216 ± 17,847 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 0.1 ± 0.1 เท่า) และ เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation นั้นมีจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆดังนี้ NK cells = 159,248 ± 124,151 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 2.6 ± 2.0 เท่า), NK-T cells 113,280 ± 65,930 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 2.4 ± 1.7 เท่า), T-cells 2,053,312 ± 578,060 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 1.5 ± 0.4 เท่า), และ เซลล์อื่นๆ 58,160 ± 14,534 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 0.1 ± 0.0 เท่า)

เมื่อนำสัดส่วนของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆที่มีอยู่ใน TILs มาคำนวณหาจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภูมิคุ้มกันแต่ละชนิดหลังจากทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs เป็นเวลา 14 วันพบว่า เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานนั้นมีจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆดังนี้ NK cells = 1,115,688 ± 921,491 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 19.1 ± 15.6 เท่า), NK-T cells 1,457,724 ± 1,962,655 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 21.6 ± 23 เท่า), T-cells 4,005,440 ± 3,505,038 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 2.7 ± 2.2 เท่า) และ เซลล์อื่นๆ 149,148 ± 78,615 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 0.3 ± 0.2 เท่า) และ เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation นั้นมีจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆดังนี้ NK cells = 1,627,712 ± 1,353,684 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 26.5 ± 20.8 เท่า), NK-T cells 2,865,284 ± 2,739,704 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 44.6

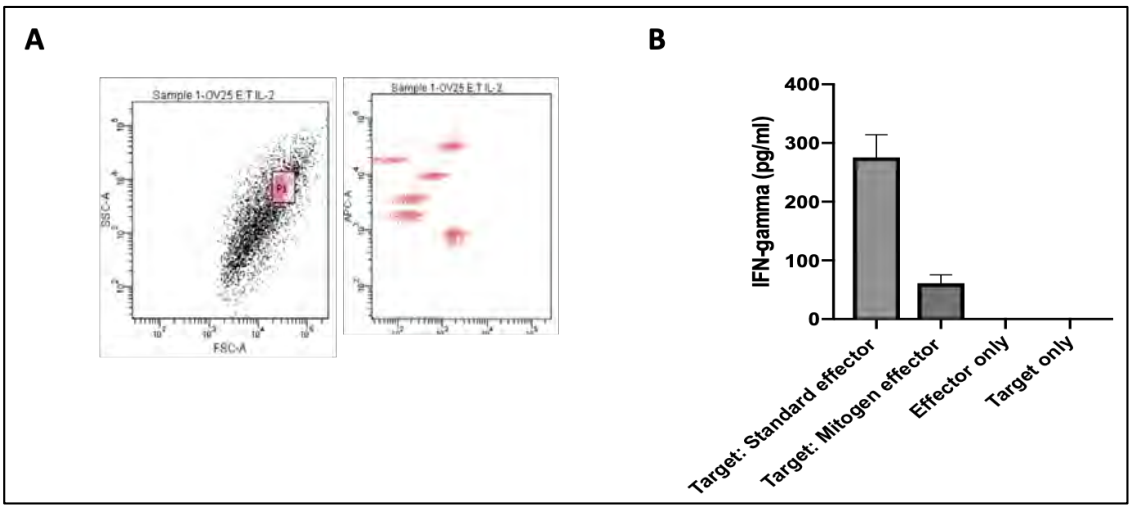
± 38.3 เท่า), T-cells 18,379,316 ± 5,745,353 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 12.9 ± 4.4 เท่า) และ เซลล์อื่นๆ 405,688 ± 127,136 เซลล์ (อัตราการเพิ่มจำนวน 0.9 ± 0.3 เท่า)



รูปที่ 2 (A) ผลการวิเคราะห์สับเซตของ TILs โดยใช้ Flow cytometry. (B) กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของแต่ละสับเซตใน TILs หลังจากการ expansion. (C) กราฟแสดงจำนวนเซลล์ของแต่ละสับเซตใน TILs หลังจากการ expansion. (D) กราฟแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของแต่ละสับเซตใน TILs หลังจากการ expansion. T = เซลล์ที (T cells) , NKT = เซลล์เอ็นเคที (natural killer T cells), NK = เซลล์เอ็นเค (natural killer cell).

การเปรียบเทียบปฏิกิริยาต่อต้านเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (in vitro tumor reactivity) ของเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ที่ได้หลังจากถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐาน (N=5)

เมื่อนำเซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นเป็นเวลา 14 วันมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งรังไข่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวัดปริมาณ interferon gamma ที่เซลล์ TILs หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นสิ่งแสดงปฏิกิริยาการต่อต้านเซลล์มะเร็งนั้นพบว่า ปริมาณ interferon gamma ที่วัดได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์จากการนำเซลล์มะเร็งรังไข่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐาน และ เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation มีปริมาณ 275 ± 38 pg/ml และ 61 ± 14 pg/ml (p =0.01) ตามลำดับ



รูปที่ 3 (A) ผลการวิเคราะห์ cytobead ในการหลั่งไซโตไคน์โดยใช้ Flow cytometry. (B) กราฟแสดงระดับของอินเตอร์เฟียรอน-แกมมา (interferon gamma) ในแต่ละสภาวะ. IFN = อินเตอร์เฟียรอน (interferon).

อภิปราย/วิจารณ์(Discussion)

การกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs ด้วยวิธี mitogenic stimulation นั้นสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกล่าวคือเมื่อทำการกระตุ้นและเพิ่มจำนวน TILs เป็นเวลาทั้งหมด 14 วันจากเซลล์ TILs เริ่มต้นประมาณ 2 ล้านเซลล์นั้นเซลล์ TILs ที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation นั้นมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 23 ล้านเซลล์ซึ่งมีจำนวนมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.001$) เปรียบเทียบกับเซลล์ TILs ที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานโดยการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานนั้นได้ปริมาณเซลล์เพียง 6 ล้านเซลล์ และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ TILs นั้นก็จะพบว่าการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs ด้วยวิธี mitogenic stimulation นั้นมีอัตราการเพิ่มจำนวนสูงถึง 12 เท่าซึ่งเป็นอัตราการเพิ่มจำนวนที่มากกว่าการเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs ด้วยวิธีมาตรฐาน (3 เท่า) อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.001$) ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์แยกชนิดของเซลล์ภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ TILs แล้วก็ยังพบว่าการกระตุ้นและเพิ่มจำนวน TILs ด้วยวิธี mitogenic stimulation นั้นทำให้ได้ปริมาณเซลล์และอัตราการเพิ่มจำนวนของ NK cells, NK-T cells และ T-cells มากกว่า การกระตุ้นและเพิ่มจำนวน TILs ด้วยวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญ

วิธีการกระตุ้นและเพิ่มจำนวน TILs นั้นส่งผลกระทบกับสัดส่วนของชนิดเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ ได้แก่ NK cells, NK-T cells และ T-cells ภายในเซลล์ TILs จะเห็นได้ว่าการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs ด้วยวิธี mitogenic stimulation นั้นจะมีสัดส่วนของ T-cells สูงกว่าการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs ด้วยวิธีมาตรฐาน (78% versus 61%, $p = 0.25$) และ การกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILsด้วยวิธีมาตรฐานนั้นจะมีสัดส่วนของ NK cells สูงกว่าการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนเซลล์ TILs ด้วยวิธี mitogenic stimulation (19% versus 8%, $p= 0.156$) แนวโน้มดังกล่าวยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติอาจเนื่องด้วยจำนวนตัวอย่างที่ยังไม่มากเพียงและการตอบสนองของเซลล์ TILs นั้นมีความหลากหลายสูงขึ้นกับเซลล์แต่ละบุคคล

อย่างไรก็ดีเมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยาต่อต้านเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (in vitro tumor reactivity) ของเซลล์ TILs จากชิ้นเนื้อมะเร็งรังไข่ที่ได้หลังจากถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐานนั้นกลับพบว่า เซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation นั้นมีการหลั่ง interferon gamma ออกมาน้อยกว่าเซลล์ TILs ที่ถูกกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี มาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญซึ่งบ่งชี้ถึงความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งที่ลดลง ผลการทดลองดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากสัดส่วนของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ต่างกันของวิธีการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนทั้ง 2 แบบซึ่งจะเห็นได้ว่าการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานนั้นมีสัดส่วนของ NK cells มากกว่าการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี

mitogenic stimulation ถึง 2 เท่า NK cell นี้เองก็มีหน้าที่สำคัญในด้าน MHC-non restricted cytotoxicity ต่อเซลล์มะเร็ง และในส่วนของ T cells ที่เพิ่มขึ้นนั้นในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการแยกชนิดของ alpha-beta T cells และ gamma-delta T cell ออกจากกันซึ่งเซลล์ gamma-delta T cell นั้นก้อเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันอีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อ MHC-non restricted cytotoxicity ต่อเซลล์มะเร็ง มีความเป็นไปได้ว่าการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐานนั้นจะทำให้เซลล์ในสัดส่วนของ NK และ gamma-delta T cell เพิ่มขึ้นส่วนการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วยวิธี mitogenic stimulation นั้นจะทำให้เซลล์มีแนวโน้มที่จะเพิ่มจำนวนในส่วนของ alpha-beta T cells เป็นหลัก

นอกจากนี้การใช้การกระตุ้นด้วย mitogenic stimulation อาจเป็นสิ่งกระตุ้นที่รุนแรงมากเกินไปซึ่งอาจมีผลกระทบให้เซลล์ที่ถูกเพิ่มจำนวนนั้นเกิดการ exhaustion และมีผลต่อ memory phenotype ของเซลล์ TILs ซึ่งอาจส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ TILs ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ การเปรียบเทียบ memory phenotype ของเซลล์ TILsที่ถูกระตุ้นและเพิ่มจำนวนด้วย mitogenic stimulation และ วิธีมาตรฐานอาจช่วยอธิบายการทำงานที่ลดลงของเซลล์ TILs ได้

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ เกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป (Conclusion and Further Directions)

การกระตุ้นและเพิ่มจำนวน TILs ด้วยวิธี mitogenic stimulation มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณเซลล์ TILs โดยจำนวนเซลล์และอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ได้ทดสอบจากการทดลองนี้ช่วยยืนยันได้ว่า การกระตุ้นและเพิ่มจำนวน TILs ด้วยวิธี mitogenic stimulation สามารถนำไปใช้กระตุ้นเซลล์ TILs ให้มีปริมาณเพียงพอกับการใช้ทางคลินิกได้ ซึ่งปริมาณที่มากจนเกินพอกัน อาจสามารถทดแทนการทำงานที่ลดลงของ TILs จากการกระตุ้นวิธีนี้ได้ ซึ่งยังมีความจำเป็นที่ต้องทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

เนื่องจากเซลล์ TILs สามารถนำไปใช้ในทางคลินิคได้ ทำให้มีความจำเป็นในการศึกษาเซลล์ในระดับโมเลกุล ซึ่งการทดลองโดยวิธี TCR sequencing เพื่อทดสอบ TCR repertoire จากเซลล์ของ TILs จะทำให้สามารถช่วยคาดการณ์ล่วงหน้าได้ว่าจะมีการใช้ TCRs ร่วมกันระหว่างแต่ละ donors หรือไม่

Bibliography

1. Suprasert P, Suwansirikul S, Charoenkwan K, Cheewakriangkrai C, Suwansirikul S. Outcome of the Gynecologic Oncology Patients Surveillance Network Program. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2015;16(12):4901-3.

2. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics. 2006;95 Suppl 1:S161-92.

3. Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Jr., Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. Nature reviews Cancer. 2011;11(10):719-25.

4. Giornelli GH. Management of relapsed ovarian cancer: a review. SpringerPlus. 2016;5(1):1197.

5. Narod S. Can advanced-stage ovarian cancer be cured? Nature reviews Clinical oncology. 2016;13(4):255-61.

6. Yang F, Jin H, Wang J, Sun Q, Yan C, Wei F, et al. Adoptive Cellular Therapy (ACT) for Cancer Treatment. Advances in experimental medicine and biology. 2016;909:169-239.

7. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? BMC medicine. 2016;14:73.

8. Spear TT, Nagato K, Nishimura MI. Strategies to genetically engineer T cells for cancer immunotherapy. Cancer immunology, immunotherapy : CII. 2016;65(6):631-49.

9. Mittica G, Capellero S, Genta S, Cagnazzo C, Aglietta M, Sangiolo D, et al. Adoptive immunotherapy against ovarian cancer. Journal of ovarian research. 2016;9(1):30.

10. Ojalvo LS, Nichols PE, Jelovac D, Emens LA. Emerging immunotherapies in ovarian cancer. Discovery medicine. 2015;20(109):97-109.

11. Santoiemma PP, Powell DJ, Jr. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. Cancer biology & therapy. 2015;16(6):807-20.

12. Andersen R, Donia M, Westergaard MC, Pedersen M, Hansen M, Svane IM. Tumor infiltrating lymphocyte therapy for ovarian cancer and renal cell carcinoma. Human vaccines & immunotherapeutics. 2015;11(12):2790-5.

13. Dadmarz RD, Ordoubadi A, Mixon A, Thompson CO, Barracchini KC, Hijazi YM, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes from human ovarian cancer patients recognize autologous tumor in an MHC class II-restricted fashion. The cancer journal from Scientific American. 1996;2(5):263-72.

14. Freedman RS, Ioannides CG, Mathioudakis G, Platsoucas CD. Novel immunologic strategies in ovarian carcinoma. American journal of obstetrics and gynecology. 1992;167(5):1470-8.

15. Freedman RS, Tomasovic B, Templin S, Atkinson EN, Kudelka A, Edwards CL, et al. Large-scale expansion in interleukin-2 of tumor-infiltrating lymphocytes from patients with ovarian carcinoma for adoptive immunotherapy. Journal of immunological methods. 1994;167(1-2):145-60.

16. Chiriva-Internati M, Weidanz JA, Yu Y, Frezza EE, Jenkins MR, Kennedy RC, et al. Sperm protein 17 is a suitable target for adoptive T-cell-based immunotherapy in human ovarian cancer. Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997). 2008;31(8):693-703.

17. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997). 2003;26(4):332-42.

18. Prieto PA, Durflinger KH, Wunderlich JR, Rosenberg SA, Dudley ME. Enrichment of CD8+ cells from melanoma tumor-infiltrating lymphocyte cultures reveals tumor reactivity for use in adoptive cell therapy. Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997). 2010;33(5):547-56.

19. Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, Langhan MM, Shelton TE, Wunderlich JR, et al. Minimally cultured tumor-infiltrating lymphocytes display optimal characteristics for adoptive cell therapy. Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997). 2008;31(8):742-51.

20. Freedman RS, Platsoucas CD. Immunotherapy for peritoneal ovarian carcinoma metastasis using ex vivo expanded tumor infiltrating lymphocytes. Cancer treatment and research. 1996;82:115-46.

21. Fujita K, Ikarashi H, Takakuwa K, Kodama S, Tokunaga A, Takahashi T, et al. Prolonged disease-free period in patients with advanced epithelial ovarian cancer after adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 1995;1(5):501-7.

22. Freedman RS, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Verschraegen C, Edwards CL, Nash M, et al. Clinical and biological effects of intraperitoneal injections of recombinant interferon-gamma and recombinant interleukin 2 with or without tumor-infiltrating lymphocytes in patients with ovarian or peritoneal carcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2000;6(6):2268-78.

23. Wright SE, Rewers-Felkins KA, Quinlin IS, Phillips CA, Townsend M, Philip R, et al. Cytotoxic T-lymphocyte immunotherapy for ovarian cancer: a pilot study. Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997). 2012;35(2):196-204.

24. Baldan V, Griffiths R, Hawkins RE, Gilham DE. Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma. British journal of cancer. 2015;112(9):1510-8.

ประวัตินักวิจัย

ผู้วิจัยหลัก

ชื่อ - นามสกุล **อ.พญ.ดร. รังสิมา เหรียญตระกูล**
ชื่อ - นามสกุล **Dr. RangsimaReantragoon, M.D., Ph.D.**

ตำแหน่งปัจจุบัน **อาจารย์ A-5 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

ภาควิชาจุลชีววิทยา ตึก อ.ป.ร. ชั้น 17
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หมายเลขโทรศัพท์ 02-256-4132 ต่อ 623
หมายเลขโทรสาร 02-252-5952
Email: **rangsima.reantragoon@gmail.com**, Rangsima.R@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2557 (6 เดือน) Postdoctoral training at Peter Doherty Institute of Infection and Immunity, Melbourne, Australia
พ.ศ. 2553-2557 PhD in Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Australia
พ.ศ. 2549-2555 Doctor of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
T cell immunology, MR1-MAIT TCR interaction, generation of tetramers, flow cytometry, cell culture

Publications:

Functional and T Cell Receptor Repertoire Analyses of Peripheral Blood and Infrapatellar Fat Pad T Cells in Knee Osteoarthritis.
Sae-Jung T, Sengprasert P, Apinun J, Ngarmukos S, Yuktanandana P, Tanavalee A, **Reantragoon R**.
J Rheumatol. 2018 Oct 15. pii: jrheum.170775. doi: 10.3899/jrheum.170775.

Monitoring Anti-*Pythium insidiosum* IgG Antibodies and (1->3)-β-D-Glucan in Vascular Pythiosis.

Worasilchai N, Permpalung N, Chongsathidkiet P, Leelahavanichkul A, Mendoza AL, Palaga T, **Reantragoon R**, Finkelman M, Sutcharitchan P, Chindamporn A.
J ClinMicrobiol. 2018 May 30. pii: JCM.00610-18. doi: 10.1128/JCM.00610-18.

Transcriptomic profiling in human mesangial cells using patient-derived lupus autoantibodies identified miR-10a as a potential regulator of IL8.
Tangtanatakul P, Thammasate B, Jacquet A, **Reantragoon R**, Pisitkun T, Avihingsanon Y, Leelahavanichkul A, Hirankarn N.
Sci Rep. 2017 Nov 6;7(1):14517. doi: 10.1038/s41598-017-15160-8.

Immune Mediators in Osteoarthritis: Infrapatellar Fat Pad-Infiltrating CD8+ T Cells Are Increased in Osteoarthritic Patients with Higher Clinical Radiographic Grading
Apinun J, Sengprasert P, Yuktanandana P,Ngarmukos S, Tanavalee A, **Reantragoon R**
International Journal of Rheumatology; Volume 2016 (2016), Article ID 9525724, 8 pages http://dx.doi.org/10.1155/2016/9525724

Mucosal-associated invariant T cells in clinical diseases.
Reantragoon R, Boonpattanaporn N, Corbett AJ, McCluskey J.
Asian Pac J Allergy Immunol. 2016 Mar;34(1):3-10. Review.

The frequency of mucosal-associated invariant T cells is selectively increased in dermatitis herpetiformis.
Li J, **Reantragoon R**, Kostenko L, Corbett AJ, Varigos G, Carbone FR.
Australas J Dermatol. 2016Mar 4. doi: 10.1111/ajd.12456.

A molecular basis underpinning the T cell receptor heterogeneity of mucosal-associated invariant T cells.
Eckle SB, Birkinshaw RW, Kostenko L, Corbett AJ, McWilliam HE, **Reantragoon R**, Chen Z, Gherardin NA, Beddoe T, Liu L, Patel O, Meehan B, Fairlie DP, Villadangos JA, Godfrey DI, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J. ***J Exp Med. 2014*** Jul 28;211(8):1585-600.

T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways.
Corbett AJ, Eckle SB, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, Chen Z, **Reantragoon R**, Meehan B, Cao H, Williamson NA, Strugnell RA, Van Sinderen D, Mak JY, Fairlie DP, Kjer-Nielsen L, Rossjohn J, McCluskey J. ***Nature. 2014*** May 15;509(7500):361-5.

Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells.
Reantragoon R, Corbett AJ, Sakala IG, Gherardin NA, Furness JB, Chen Z, Eckle SB, Uldrich AP, Birkinshaw RW, Patel O, Kostenko L, Meehan B, Kedzierska K, Liu L, Fairlie DP, Hansen TH, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J, Kjer-Nielsen L. ***J Exp Med. 2013*** Oct 21;210(11):2305-20.

Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells.
Patel O, Kjer-Nielsen L, Le Nours J, Eckle SB, Birkinshaw R, Beddoe T, Corbett AJ, Liu L, Miles JJ, Meehan B, **Reantragoon R**, Sandoval-Romero ML, Sullivan LC, Brooks AG, Chen Z, Fairlie DP, McCluskey J, Rossjohn J. ***Nat Commun. 2013***;4:2142.

MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells.
Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, Bhati M, Chen Z, Kostenko L, **Reantragoon R**, Williamson NA, Purcell AW, Dudek NL, McConville MJ, O'Hair RA, Khairallah GN, Godfrey DI, Fairlie DP, Rossjohn J, McCluskey J**.** ***Nature. 2012*** Nov 29;491(7426):717-23.

Structural insight into MR1-mediated recognition of the mucosal associated invariant T cell receptor.
Reantragoon R, Kjer-Nielsen L, Patel O, Chen Z, Illing PT, Bhati M, Kostenko L, Bharadwaj M, Meehan B, Hansen TH, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J. ***J Exp Med. 2012*** Apr 9;209(4):761-74.

Asthma research performance in Asia-Pacific: a bibliometric analysis by searching PubMed database.
Klaewsongkram J, **Reantragoon R**. ***J Asthma. 2009*** Dec;46(10):1013-20.

ผู้วิจัยร่วม

ชื่อ - นามสกุล **อ.นพ. กรมิษฐ์ ศุภพิพัฒน์**

ชื่อ - นามสกุล **Koramit Suppipat, M.D.**

ตำแหน่งปัจจุบัน **อาจารย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

หน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กทม 10330

โทรศัพท์	02-256-4000 ต่อ 80837
โทรศัพท์มือถือ	081-628-2068
โทรสาร	02-256-4000 ต่อ 80837
e-mail	koramiz@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2557 Fellowship at Pediatric Leukemia and Bone Marrow Transplantation of Baylor College of Medicine, TX USA

พ.ศ. 2556 Fellowship at Pediatric Hematology and Oncology of Baylor College of Medicine, TX USA

พ.ศ. 2553 Resident at Pediatrics of Cook County Children Hospital, IL USA

พ.ศ. 2545 ปริญญาตรี แพทยศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ, ประเทศไทย

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

โรคมะเร็งในเด็ก, โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งต่อมน้ำเหลืองในเด็ก วัยรุ่น และ ผู้ใหญ่ตอนต้น, การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในผู้ป่วยเด็ก วัยรุ่น และ ผู้ใหญ่ตอนต้น, การวิจัยด้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว, การวิจัยด้านเซลล์บำบัดในโรคมะเร็ง

Publications:

Inactivation of KLF4 promotes T-cell acute lymphoblastic leukemia and activates the MAP2K7 pathway.
Y Shen, C S Park, **K Suppipat**, T-A Mistretta, M Puppi, T M Horton, K Rabin, N S Gray, J P P Meijerink & H D Lacorazza.
Leukemia. 2017 Nov;1314–1324.

NUDT15 c415C>T increase risk of 6-mercaptopurine induced myelosuppression during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia.
K Chiengthong, C Ittiwut, S Muensri, J Sophonphan, D Sosothikul, P Seksan, **K Suppipat**, K Suphapeetiporn, V Shotelersuk.
Hematologica 2016 Jan;101(1): e24–e26.

Redefining clinical risk classification in children with precursor B cell acute lymphoblastic leukemia using pre-treatment absolute lymphocyte count.

Fungpipat P, Sophonphan J, Sosothikul D, **Suppipat K**.

Leukemia Lymphoma. 2016 Oct ;57(4):953-6.

Sulforaphane induces cell cycle arrest and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells.

K Suppipat, C S Park, Y Shen, X Zhu, H D Lacorazza.

PLos One. 2014 Dec 7(12): e51251. doi: 10.1371/journal.pone.0051251.