รายงานการวิจัย

การแยกศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์เยื่อบุเพื่อหาเป้าหมายยารักษาใหม่และโมเลกุลในการตรวจคัดกรอง

(The isolation and study of epithelial cancer stem cells for novel drug targets and biomarkers)

ผศ.นพ.ดร. นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง "การแยกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งของเซลล์เยื่อบุเพื่อหาเป้าหมายยารักษาใหม่ และโมเลกุลในการตรวจคัดกรอง" เป็นโครงการซึ่งได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๗ เพื่อต่อยอดงานวิจัยทางด้านเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง และการนำไปใช้เพื่อการรักษา

งานวิจัยนี้จะสำ เร็จ ลุล่วงไปไม่ได้ ถ้าไม่ได้รับการสนับสนุนจาก
ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล อธิการบดี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพุ รองอธิการบดี ด้านการวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์นายแพทย์โศภณ นภาธร คณบดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศาสตราจารย์นายแพทย์อนันต์ ศรีเกียรติขจร รองคณบดีฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ขอขอบคุณบุคลากรหน่วยวิจัยเซลล์ต้นกาเนิด และเซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ช่วยสนับสนุน ทางด้านงานวิจัย

คณะผู้วิจัย

เลขหมู่
เลขทะเบียน 017633
วัน, เดือน, ปี 8 มี.ค. 61

i21894599

บทคัดย่อ

จากงานวิจัยในที่ผ่านมาพบว่า การที่ก้อนเนื้องอก หรือมะเร็ง สามารถเจริญได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุดเกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ต้นกำเนิด หรือที่เรียกว่า เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง โดยเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการกลับมาของมะเร็ง และการลุมลามของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆ เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเกิดจากการกลายพันธุ์ของเซลล์ต้นกำเนิดที่ทำให้ความสามารถในการควบคุมการแบ่งตัว เพิ่มจำนวนเสียไป การระบุ และการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นวิธีที่ทำให้เราสามารถที่จะค้นพบ Biomarker ใหม่ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งแต่ละชนิด รวมไปถึงการพัฒนาวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ

ในการศึกษาครั้งนี้ ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจากมะเร็งของเซลล์ผิวเยื่อบุ, Breast cancer, Urinary bladder cancer และ liver cancer และทำการดัดแปลงให้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมีการแสดงออกของยีนจำเพาะ รวมไปถึง reporter gene เพื่อนำเซลล์เหล่านี้ไปใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษา พัฒนายาสำหรับ มาใช้ในการรักษาต่อไป นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยยังได้พัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ Organoid สำหรับใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงลึกระหว่างเซลล์มะเร็ง และ stromal cell

Abstract

During the last few years evidence suggested that many tumor tissues are sustained in their long-term growth by a subset of cancer cells with stem cell properties. These cancer stem cells (CSCs) are thought to be responsible for relapse and metastasis in patient with poor clinical outcome. Cancer stem cells frequently arise from mutated population of stem cells, in which normal homeostatic control of cell growth and proliferation have been disturbed. Identification and isolation of novel subpopulation of cancer stem cells with aggressive behavior provides an opportunity for the discovery of novel prognostic biomarkers and for design the effective therapy. In this study, we isolated new CSC lines from primary epithelial cancer including breast, urinary bladder, and liver and engineered them with gene reporter/overexpression vectors in order to obtain unique tools for cancer drug development. Furthermore, we developed organoid culture system for in-depth analysis of tumor and stromal interaction.

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ 1

บทคัดย่อ 2

Abstract 3

สารบัญเรื่อง 4

สารบัญภาพ 5

คำอธิบายสัญญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย 6

บทนำ 7

วิธีดำเนินการวิจัย 10

ผลการวิจัย 11

การจัดเก็บและแยก Cancer stem cells 11

Bladder cancer cells 11

Breast cancer cells 13

การทดสอบคุณสมบัติ cancer cells ด้วยเทคนิค Flow cytometry และ Immnofluorescence 14

การคัดเลือก Cancer stem cells โดยการใช้ TGF-B และ BMP reporter 15

อภิปรายผลการวิจัย 17

บรรณานุกรม 18

ประวัตินักวิจัย 22

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ลักษณะของ Bladder cancer cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเกาะ 11
ภาพที่ 2 ลักษณะของ Bladder cancer cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ Sphere 12
ภาพที่ 3 ลักษณะของ Bladder cancer cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ Organoid 13
ภาพที่ 4 ลักษณะของ Breast cancer cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง 14
ภาพที่ 5 การทดสอบคุณสมบัติ Bladder cancer cells ด้วยเทคนิค Flow cytometry 15
ภาพที่ 6 การทดสอบคุณสมบัติ Bladder cancer cells ด้วยเทคนิค Immunofluorescence staining 15
ภาพที่ 7 แสดงลักษณะ Bladder cancer cell ที่มีการแสดงออกของ TGF-B reporter 16
ภาพที่ 8 แสดงลักษณะ Bladder cancer cell ที่มีการแสดงออกของ BMP reporter 16

คำอธิบายสัญญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

CSC	Cancer stem cells

บทนำ

มีหลายทฤษฎีที่ใช้อธิบายกลไกการเกิดมะเร็ง ในอดีตส่วนใหญ่เชื่อว่าเซลล์ใดก็ตามที่มีการผิดปกติทางพันธุกรรมหลายๆครั้งก็สามารถเกิดเนื้องอกได้ ในระยะต่อมาเนื่องจากความคล้ายกันของมะเร็งกับ stem cells ทำให้มีผู้เชื่อว่าเซลล์ที่มีความสามารถจะกลายเป็นมะเร็งน่าจะมาจากstem cell แทนที่จะเป็นเซลล์ทั่วๆไป อย่างไรก็ดีไม่ว่ามะเร็งจะเกิดจาก stem cells หรือเกิดจากเซลล์ทั่วไปที่ mutation ทำให้มีการกระตุ้นทำงานของยีนที่โดยปกติพบใน stem cells เท่านั้น สำหรับทฤษฎีของ cancer stem cell แล้วเชื่อว่ามีเซลล์เพียงบางส่วนซึ่งมีจำนวนน้อยในก้อนมะเร็งเท่านั้นที่มีคุณสมบัติสามารถทำให้เกิดก้อนเนื้องอกและจำเป็นในการคงสภาพก้อนมะเร็ง เซลล์ดังกล่าวเรียกว่า tumor-initiating cells หรือ cancer stem cells ผลงานวิจัยที่สนับสนุนแนวทางนี้เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1961 Southam และ Brunschwig ซึ่งได้นำมะเร็งที่กลับเป็นซ้ำจากผู้ป่วยแล้วนำไปปลูกถ่ายในตำแหน่งอื่น พบว่าการจะทำให้เกิดก้อนมะเร็งในที่ใหม่ต้องใช้เซลล์อย่างน้อย 1,000,000 cells และไม่ใช่ได้ผลทุกครั้ง แสดงให้เห็นว่าเซลล์จำนวนน้อยเท่านั้นที่เป็น tumor-initiating cells ต่อมาในปี 1994 Lapidot และคณะแสดงให้เห็นจากการศึกษาโรค leukemia ว่าเซลล์ที่มี $CD34^+$ $CD38^-$ จากเลือดผู้ป่วยเมื่อฉีดไปในสัตว์ทดลอง หนู NOD/SCID สามารถทำให้เกิดมะเร็งในหนูในลักษณะที่เหมือนในผู้ป่วยได้ ในขณะที่เมื่อใช้ CD34+CD38+ ซึ่งdifferentiate มากกว่า แม้ใช้มากกว่าหลายเท่าก็ไม่สามารถทำให้เกิดเนื้องอกได้ ยืนยันให้เห็นถึง hierarchy ของเซลล์มะเร็ง ในปี 2003 Al-Haji และคณะได้พบเซลล์ที่เป็น tumor-initiating cells ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม แสดงให้เห็นว่าใน solid tumor ก็พบCSCs ได้ หลังจากนั้นเริ่มมีผู้ศึกษาและแยกเซลล์ที่มีคุณสมบัติของ CSC จากมะเร็งชนิดอื่นๆอีกมาก รวมถึง prostate (Collins et al.,2005), melanoma (Fang et al., 2005), brain (Singh et al., 2004), pancreas (Li et al.,2007), lung (Eramo et al., 2008), colorectal (Ricci-Viitiani et al., 2007) และอื่นๆ

แม้ว่าจะไม่มี marker ชนิดใดที่ specific ต่อ cancer stem cells การใช้ combination ของ surface marker หลายชนิดที่มักพบใน CSC ชนิดอื่นๆ อาทิ $CD\ 133^+$ $CD44^+$ $CD24^-$ ESA^+ พบว่ามัก enrich tumor initiating cell ได้หลายเท่า นอกจากนี้ยังมี test เช่น Aldeflour ซึ่งตรวจ enzyme ALDH1 ที่สัมพันธ์กับความ invasive ของมะเร็ง (Ginestier et al., 2007) การแยก side population ซึ่งอาศัยการที่CSC มักมี drug transporter ABCG2สูง (Goodell 2005) หรือการนำไปเพาะเลี้ยงในรูป sphere ที่ไม่เกาะติดกับภาชนะเพาะเลี้ยง (Liao et al., 2007) ตามวิธีเพาะเลี้ยง neural stem cell ที่ถูกค้นพบโดย Reynolds และ Weiss ในปี ค.ศ. 1992 และสุดท้ายนำไปปลูกถ่ายพิสูจน์ในหนูที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในระยะหลังการศึกษา CSC พบว่าเมื่อ

ใช้ร่วมกับ gene reporter ซึ่งเปลี่ยนแปลงตาม promoter activity ของยีนที่จำเพาะต่อ stem cell ของเนื้อเยื่อนั้นๆ ในระยะต่างๆของdifferentiation สามารถติดตามผลและแยกกลุ่มเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น เช่น brain cancer stem cell Parada และคณะพบว่าเมื่อใช้ nestin promoter ในการ label glioblastoma CSC ก่อนปลูกถ่ายเซลล์ที่เกิดใหม่มาจาก nestin positiveทั้งหมด และเมื่อใช้ยาทำลายเฉพาะ nestin positive cell เนื้องอกกลับสู่ภาวะไม่รุนแรง(Chen et al., 2012) ทั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการใช้ reporter gene ในการศึกษา และแยก CSCs ที่มีคุณสมบัติจำเพาะยิ่งขึ้น

Breast cancer stem cell

จากการรายงานของ Al-Haji ในปี 2003 พบว่า ใช้ เซลล์ $CD44^+$ $CD24^-$ ESA^+ 100 cells สามารถทำให้เกิดเนื้องอกได้ในสัตว์ทดลองได้ 1ใน 6 ครั้ง ในขณะที่ในเนื้องอกมักมี population ของ $CD44^-CD24^+ESA^-$ ร่วมด้วย (Liao et al., 2007) โดย $CD44^+$ $CD24^-$ ESA^+ เป็นเซลล์ให้กำเนิด $CD\ 44^-CD24^+ESA^-$ การศึกษาต่อมาพบว่า subpopulation ของ CSC มีส่วนสำคัญต่อการเกิด metastasis (Malanchi et al., 2012) และการแสดงออกของยีน periostin ใน stroma cell ก็มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อการสร้าง niche ที่เหมาะสมของ CSC ของ breast เนื่องจาก interaction ของ epithelium และ stroma มีส่วนสำคัญต่อการเกิดมะเร็งหลายชนิด (Arwert et al., 2012) การศึกษาเพื่อ target niche โมเลกุลที่จำเป็นต่อ CSC จึงเป็น target ที่น่าสนใจที่จะนำไปพัฒนาเป็นการรักษาต่อไป

Bladder cancer

Bladder cancer เป็นมะเร็งที่พบบ่อยในประเทศไทยและการรักษาปัจจุบันยังไม่น่าพอใจ และยังมีผู้ศึกษาไม่มาก มีรายงานการแยก cancer stem cell จาก bladder cancer โดยใช้ CD 44 และ 47 (Chan et al ., 2009, 2010) ร่วมกับ cytokeratin 5 marker สามารถแยก tumor initiating cell ได้ที่ enrich มากกว่า 100 เท่าได้ อย่างไรก็ดีการที่พบ heterogenicity ของ CSC ใน bladder CSCs ทำให้มีความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม (Bryan 2011; Ho et al., 2012) ในทางตรงข้ามกันมีการค้นพบ pathway ที่มีผลต่อการเกิด cancer มากขึ้นเรื่อยๆ เช่น stat3 pathway (Ho et al., 2012), Wnt (Shin et al., 2011) CD24 ในการเกิด metastasis ของ bladder ca (Overdest et al 2011) การศึกษาความสัมพันธ์ของ subpopulation ของ bladder CSC กับการตอบสนองต่อ small molecules inhibitors ของ pathway ต่างๆ น่าจะนำสู่การรักษาที่จำเพาะและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

การหาการรักษาใหม่โดยมุ่งเป้าที่ CSC

แม้ว่าไม่ใช่มะเร็งทุกชนิดที่มีหลักฐานสนับสนุนทฤษฎี CSC (Shakelton et al., 2011) การรักษาที่พัฒนาเพื่อ target csc ที่มีหลักฐานชัดเจนมีโอกาสที่จะรักษามะเร็งให้หายขาด และลดการกลับเป็นซ้ำ (Wang et al., 2007) ตลอดจนลด metastasis (Croker et al., 2008) target signal ที่สำคัญต่อ stem cell self-renewal เช่น Wnt(Barker et al., 2006), TGF-B(Guasch et al., 2007) ตลอดจน miRNA เป็นแนวทางการวิจัยที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ซึ่งเริ่มมียาที่ใช้ในclinic แล้วเช่น ในกลุ่ม leukemia การวิจัยการใช้ natural product ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เช่น curcumin พบว่าลดการเพิ่มจำนวนของ CD 44^{+}head&neck CSCs และ colon CSCs (Lin et al., 2011) ได้ ในขณะที่ cucurbitacin มีผลต่อ $CD133^{+}$ brain CSCs (Chang et al., 2012) แสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้ CSC ทดสอบหาสารที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งจากสมุนไพรในประเทศแทนการใช้ cancer cell line ทั่วไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยง Cancer stem cells จากชิ้นเนื้องอกของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

การใช้ชิ้นเนื้องอก (tumor) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ได้จากการผ่าตัดจะมีการขอความยินยอมการใช้ชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย และดำเนินการขอรับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชิ้นเนื้อที่ได้จะถูกนำมาย่อยเป็นเซลล์เดี่ยวโดยเอนไซม์ collagenase, dipase และ trypsin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำการปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที เซลล์ที่ได้จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ ซึ่งจะมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ และนำไปทดสอบคุณสมบัติต่อไป

การคัดแยก Cancer stem cells ด้วย Flow cytometry

เซลล์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจะถูกนำมาคัดแยกเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น Cancer stem cell โดยอาศัยการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะบนผิวเซลล์ CD24 และ CD44 และการแสดงออกของเอนไซม์จำเพาะ aldehyde dehydrogenase (ALDH) โดยใช้ CD24, CD44-antibody ที่ติดอยู่กับสารเรืองแสง (Biolegend) และ ALDEFLUOR kit (StemCell Technologies) จากนั้นทำการคัดแยกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD44+CD24- และ ALDH+ ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของกลุ่มเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น Cancer stem cell โดยใช้ Cell sorting (FACS Araill, Becton Dickinson, BD)

การสร้าง reporter construct และ lentivirus สำหรับใช้ในการติดตาม Cancer stem cell

ในการติดตาม Cancer stem cell ทั้งในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลอง Cancer stem cell จะถูก transduce ด้วย lentivirus ที่สร้างจาก Lentiviral BMP-reporter (BRE-ZsGreen) (Oshimori N. et.al., 2012), Lentiviral TGF-B-reporter (TBRE-NLS-mRFP) (Oshimori N. et.al., 2012), pLenti-CMV-GFP, pLenti-CMV-luciferase และ Lentiviral-p63 reporter สำหรับใช้ในการระบุความจำเพาะของ Cancer stem cell และการติดตามเซลล์เมื่อทำการปลูกถ่าย สำหรับการสร้าง Lentivirus จะสร้างจาก 293FT cell ที่ถูก transfect ด้วย Lentiviral construct แล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง viral supernate ที่ได้จะถูกนำมาปั่นที่ 25000 rpm เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของไวรัส ก่อนนำไปใช้กับ Cancer stem cell

ผลการวิจัย

การจัดเก็บและแยก Cancer stem cells

Bladder cancer cells

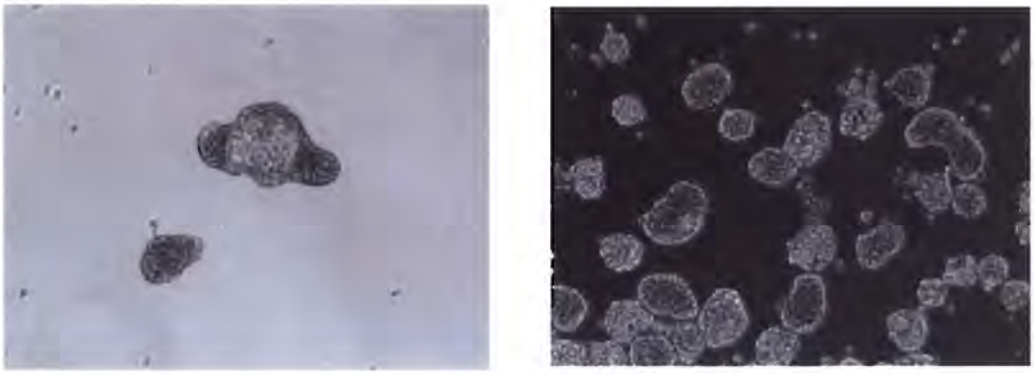
การเพาะเลี้ยงแบบเกาะ

1. ทำการย่อยชิ้นเนื้อ Bladder cancer โดยใช้เอนไซม์ Dipase ทำการย่อยที่ 37 องศาสเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ปั่นล้างชิ้นเนื้อด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วทำการย่อยชิ้นเนื้อเพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวโดยใช้ 0.25% Trypsin-EDTA ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาของ Trypsin โดยการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี FBS เป็นส่วนประกอบ
3. ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ย่อยได้ด้วยความเร็ว 1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที
4. นำเซลล์ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อ Bladder cancer เพาะเลี้ยงบน Matrigel coated plate ในอาหารจำเพาะสำหรับการเพาะเลี้ยง Bladder cancer cells

ภาพที่ 1 *ลักษณะของ Bladder cancer cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเกาะ*

การเพาะเลี้ยงแบบ Sphere

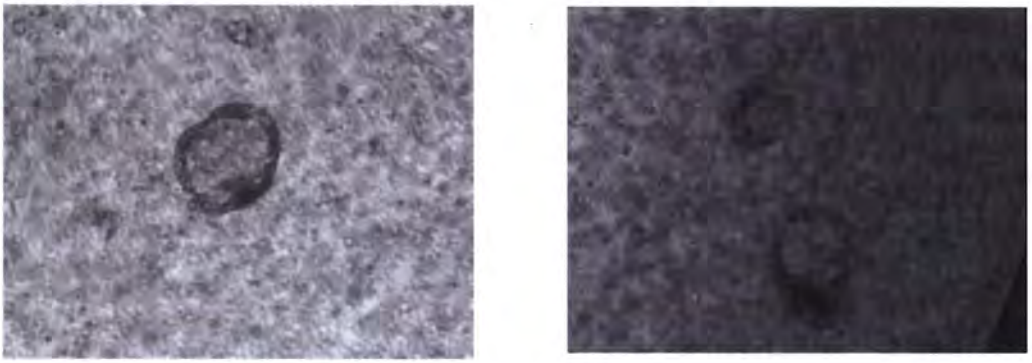
1. ทำการย่อยชิ้นเนื้อ Bladder cancer โดยใช้เอนไซม์ Collagenase/Dipase ทำการย่อยที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ทำการ vortex และกรองเซลล์ที่ผ่านการย่อยโดยใช้ Cell strainer ขนาด 40 ไมครอน
3. ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ย่อยได้ด้วยความเร็ว 1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที
4. นำเซลล์ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อ Bladder cancer เพาะเลี้ยงในอาหารจำเพาะสำหรับการเพาะเลี้ยง Bladder cancer cells



ภาพที่ 2 *ลักษณะของ Bladder cancer cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ Sphere*

การเพาะเลี้ยงแบบ Organoid

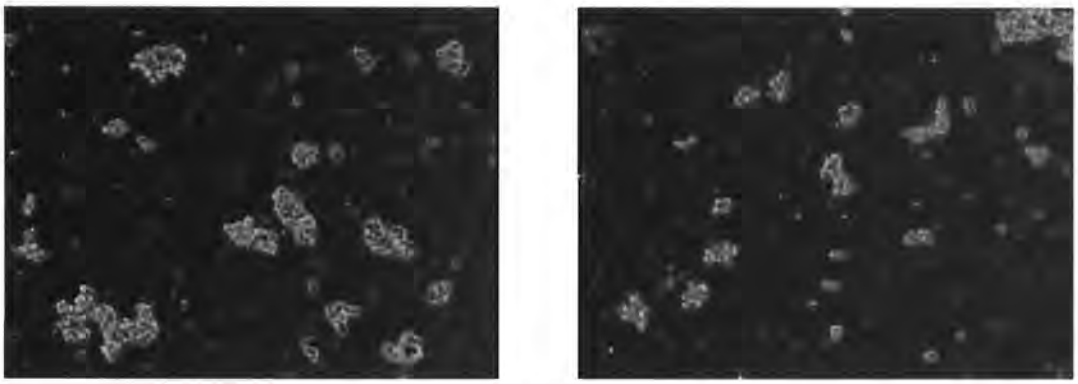
1. ทำการย่อยชิ้นเนื้อ Bladder cancer โดยใช้เอนไซม์ Collagenase/Dipase ทำการย่อยที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ทำการ vortex และกรองเซลล์ที่ผ่านการย่อยโดยใช้ Cell strainer ขนาด 40 ไมครอน
3. ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ย่อยได้ด้วยความเร็ว 1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที
4. นำเซลล์ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อ Bladder cancer ผสมกับ Matrigel และทำการเพาะเลี้ยงบน cell insert ในอาหารจำเพาะสำหรับการเพาะเลี้ยง Bladder cancer cells



ภาพที่ 3 *ลักษณะของ Bladder cancer cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบ Organoid*

Breast cancer cells

1. ทำการย่อยชิ้นเนื้อ Breast cancer ด้วยอนไซม์ CollagenaseIV และ hyaluronidase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง
2. ปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 80xg เป็นเวลา 4 นาที แล้วทำการปั่นล้างตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ครั้ง
3. นำเซลล์ที่ได้จากการย่อยชิ้นเนื้อ Breast cancer มาทำการเพาะเลี้ยงใน low attachment plate ในอาหารเลี้ยงจำเพาะสำหรับ Breast cancer cells

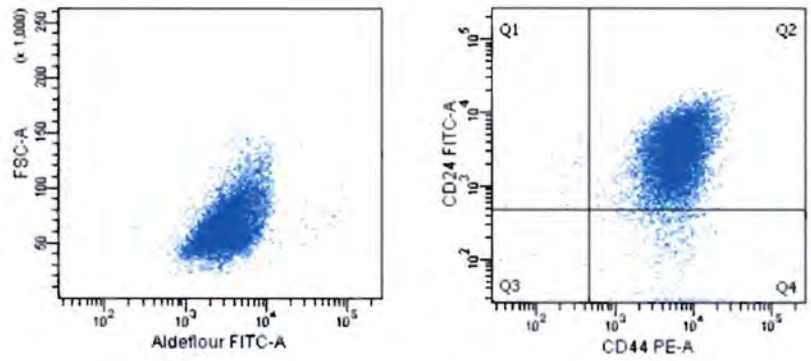


ภาพที่ 4 *ลักษณะของ Breast cancer cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง*

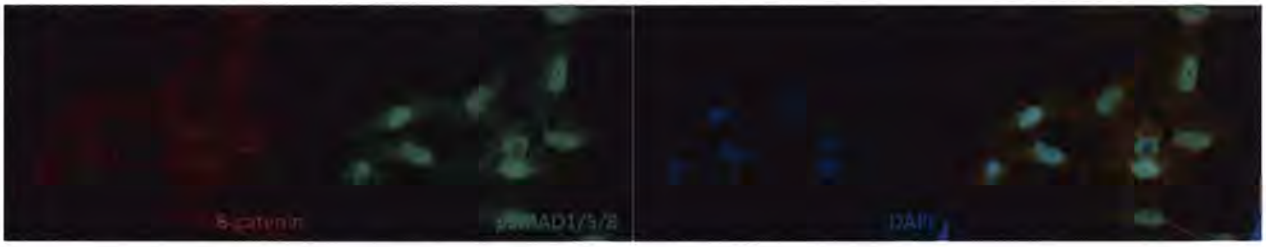
การทดสอบคุณสมบัติ cancer cells ด้วยเทคนิค Flow cytometry และ Immnofluorescence

หลังจากทำการเพาะเลี้ยง Cancer cell ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อ เซลล์จะถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติจำเพาะของ Cancer cell แต่ละชนิด ด้วยเทคนิค Flow cytometry และ Immnofluorescence

จากการทดสอบพบว่า Bladder cancer cell ที่ทำการเพาะเลี้ยงมีการแสดงออกของ CD24 และ CD44 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค Flow cytometry ซึ่งเป็นโปรตีนจำเพาะที่มีการแสดงออกใน Bladder cancer cell (ภาพที่ 5) นอกจากนี้ เซลล์ยังมีการแสดงออกของ pSMAD 1/5/8 และ B-catenin เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค immunofluorescence ซึ่งโปรตีนทั้งสองชนิดนี้เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการเกิด Cancer cell (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 *การทดสอบคุณสมบัติ Bladder cancer cells ด้วยเทคนิค Flow cytometry*

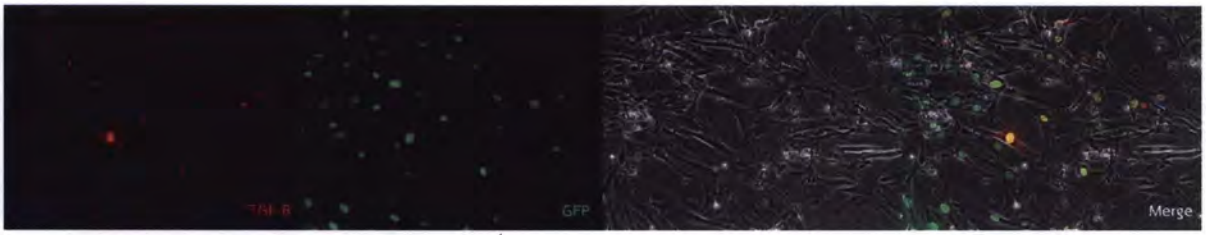


ภาพที่ 6 *การทดสอบคุณสมบัติ Bladder cancer cells ด้วยเทคนิค Immunofluorescence staining*

การคัดเลือก Cancer stem cells โดยการใช้ TGF-B และ BMP reporter

Bladder cancer stem cell line ที่แยกได้จะนำมาทำการคัดเลือกตามการแสดงออกของ TGF-B และ BMP โดยการใช้ TGF-B (ภาพที่ 7) และ BMP reporter (ภาพที่ 8) เพื่อคัดแยกเซลล์ไปทดสอบคุณสมบัติทาง gene expression profile, Epigenetic และทดสอบหายาที่ใช้สำหรับยับยั้งการเจริญของ cancer stem cell ดังกล่าวต่อไป

i27894599



ภาพที่ 7 *แสดงลักษณะ Bladder cancer cell ที่มีการแสดงออกของ TGF-B reporter*

ภาพที่ 8 *แสดงลักษณะ Bladder cancer cell ที่มีการแสดงออกของ BMP reporter*

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการวิจัยเบื้องต้น สามารถทำการเพาะเลี้ยง และคัดแยก Cancer stem cell จากชิ้นเนื้อ Bladder cancer ได้ทั้งหมด 5 lines และ Breast cancer จำนวน 1 line โดยได้ทำการศึกษาคัดแยก Cancer stem cell ตามการแสดงออกของโมเลกุลที่สำคัญคือ TGF-B และ BMP Signaling ซึ่งอยู่ในระหว่างการนำไปทดสอบเพื่อหายาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ และการฆ่า Cancer stem cell ต่อไป

บรรณานุกรม

Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A 100(7): 3983-3988.

Arwert, E. N., E. Hoste, et al. (2012). "Epithelial stem cells, wound healing and cancer." Nat Rev Cancer 12(3): 170-180.

Barker, N. and H. Clevers (2006). "Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics." Nat Rev Drug Discov 5(12): 997-1014.

Bryan, R. T. (2011). "Bladder cancer and cancer stem cells: basic science and implications for therapy." ScientificWorldJournal 11: 1187-1194.

Castillo-Martin, M., J. Domingo-Domenech, et al. (2010). "Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis." Urol Oncol 28(4): 401-408.

Chan, K. S., I. Espinosa, et al. (2009). "Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells." Proc Natl Acad Sci U S A 106(33): 14016-14021.

Chan, K. S., J. P. Volkmer, et al. (2010). "Cancer stem cells in bladder cancer: a revisited and evolving concept." Curr Opin Urol 20(5): 393-397.

Chang, C. J., C. H. Chiang, et al. (2012). "Inhibition of phosphorylated STAT3 by cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells." Childs Nerv Syst 28(3): 363-373.

Chen, J., Y. Li, et al. (2012). "A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy." Nature 488(7412): 522-526.

Collins, A. T., P. A. Berry, et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." Cancer Res 65(23): 10946-10951.

Croker, A. K. and A. L. Allan (2008). "Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease." J Cell Mol Med 12(2): 374-390.

Driessens, G., B. Beck, et al. (2012). "Defining the mode of tumour growth by clonal analysis." Nature 488(7412): 527-530.

Eramo, A., F. Lotti, et al. (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." Cell Death Differ 15(3): 504-514.

Fang, D., T. K. Nguyen, et al. (2005). "A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas." Cancer Res 65(20): 9328-9337.

Ginestier, C., M. H. Hur, et al. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." Cell Stem Cell 1(5): 555-567.

Goodell, M. A. (2005). "Stem cell identification and sorting using the Hoechst 33342 side population (SP)." Curr Protoc Cytom Chapter 9: Unit9 18.

Guasch, G., M. Schober, et al. (2007). "Loss of TGFbeta signaling destabilizes homeostasis and promotes squamous cell carcinomas in stratified epithelia." Cancer Cell 12(4): 313-327.

Hermann, P. C., S. L. Huber, et al. (2007). "Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer." Cell Stem Cell 1(3): 313-323.

Ho, P. L., A. Kurtova, et al. (2012). "Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem." Nat Rev Urol.

Ho, P. L., E. J. Lay, et al. (2012). "Stat3 activation in urothelial stem cells leads to direct progression to invasive bladder cancer." Cancer Res 72(13): 3135-3142.

Izrailit, J. and M. Reedijk (2012). "Developmental pathways in breast cancer and breast tumor-initiating cells: therapeutic implications." Cancer Lett 317(2): 115-126.

Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature 367(6464): 645-648.

Lee, E., R. Iskow, et al. (2012). "Landscape of somatic retrotransposition in human cancers." Science 337(6097): 967-971.

Li, F., B. Tiede, et al. (2007). "Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis." Cell Res 17(1): 3-14.

Liao, M. J., C. C. Zhang, et al. (2007). "Enrichment of a population of mammary gland cells that form mammospheres and have in vivo repopulating activity." Cancer Res 67(17): 8131-8138.

Lin, L., Y. Liu, et al. (2011). "Targeting colon cancer stem cells using a new curcumin analogue, GO-Y030." Br J Cancer 105(2): 212-220.

Malanchi, I., A. Santamaria-Martinez, et al. (2012). "Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization." Nature 481(7379): 85-89.

Overdevest, J. B., S. Thomas, et al. (2011). "CD24 offers a therapeutic target for control of bladder cancer metastasis based on a requirement for lung colonization." Cancer Res 71(11): 3802-3811.

Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science 255(5052): 1707-1710.

Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature 445(7123): 111-115.

Shackleton, M., E. Quintana, et al. (2009). "Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution." Cell 138(5): 822-829.

Shin, K., J. Lee, et al. (2011). "Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder." Nature 472(7341): 110-114.

Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature 432(7015): 396-401.

Vira, D., S. K. Basak, et al. (2012). "Cancer stem cells, microRNAs, and therapeutic strategies including natural products." Cancer Metastasis Rev.

Wang, J. C. (2007). "Evaluating therapeutic efficacy against cancer stem cells: new challenges posed by a new paradigm." Cell Stem Cell 1(5): 497-501.

Wei, W., M. S. Chua, et al. (2010). "Small molecule antagonists of Tcf4/beta-catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo." Int J Cancer 126(10): 2426-2436.

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผศ.นพ.ดร. นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Nipan Israsena MD., Ph.D.

2. เลขหมายบัตรประจาตัวประชาชน 3 1008 00589 93 2

3. ตาแหน่งปัจจุบันผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

หน่วยวิจัยเซลล์ต้นกาเนิดและเซลล์บาบัด

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคาร อ.ป.ร. ชั้น 9

ถนน ราชดาริ ลุมพินี ปทุมวัน กรุงเทพ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4000 ต่อ 3590

โทรสาร 02-251-1965

Email nipan.i@chula.ac.th, inipan@gmail.com

3. ประวัติการศึกษา

1989- 1995 MD ChulalongkornUniversityHospital, Bangkok, Thailand

1995- 1996 Neurology Fellow ChulalongkornUniversityHospital, Bangkok, Thailand

1997- 2003 PhD Neuroscience, AlbertEinsteinCollege of Medicine New York, USA

Northwestern University, Chicago, USA (research fellow)

4. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Neuroscience – Neural and embryonic stem cell biology

5. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

a. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-

b. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

1: Israsena N, Mahavihakanont A, Hemachudha T. Rabies virus infection and microRNAs. Adv Virus Res. 2011;79:329-44. Review. PubMed PMID: 21601053.

2: Jalali A, Bassuk AG, Kan L, Israsena N, Mukhopadhyay A, McGuire T, Kessler JA. HeyL promotes neuronal differentiation of neural progenitor cells. J Neurosci Res. 2011 Mar;89(3):299-309. doi: 10.1002/jnr.22562. Epub 2011 Jan 5. PubMed PMID: 21259317; PubMed Central PMCID: PMC3079914.

3: Israsena N, Supavonwong P, Ratanasetyuth N, Khawplod P, Hemachudha T. Inhibition of rabies virus replication by multiple artificial microRNAs. Antiviral Res. 2009 Oct;84(1):76-83. Epub 2009 Jul 29. PubMed PMID: 19646485.

4: Laothamatas J, Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Ampawong S, Tepsumethanon V, Shuangshoti S, Phumesin P, Asavaphatiboon S, Worapruekjaru L, Avihingsanon Y, Israsena N, Lafon M, Wilde H, Hemachudha T. Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. J Neurovirol. 2008 Apr;14(2):119-29. PubMed PMID: 18444083.

5: Kan L, Israsena N, Zhang Z, Hu M, Zhao LR, Jalali A, Sahni V, Kessler JA. Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis. Dev Biol.

2004 May 15;269(2):580-94. PubMed PMID: 15110721.

6: Israsena N, Hu M, Fu W, Kan L, Kessler JA. The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. Dev Biol. 2004 Apr 1;268(1):220-31. PubMed PMID: 15031118.

7: Israsena N, Kessler JA. Msx2 and p21(CIP1/WAF1) mediate the proapoptotic effects of bone morphogenetic protein-4 on ventricular zone progenitor cells. J Neurosci Res. 2002 Sep 15;69(6):803-9. PubMed PMID: 12205674.

8: Israsena N, Phanthumchinda K, Sinsawaiwong S, Lerdlum S. Spontaneous carotid dissection. J Med Assoc Thai. 1997 Jun:80(6):406-10. PubMed PMID: 9240017.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. **ชื่อ-นามสกุล** **(ภาษาไทย)** นางสุทธิลักษณ์ ปทุมราช

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Suthiluk Patumraj

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** -

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน (วิชาการ)** รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

ตำแหน่งปัจจุบัน (บริหาร) ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายบัณฑิตศึกษา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail**

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

โทรศัพท์ (02) 252-7584 (02) 256-4267 โทรสาร. (02) 252-7854

E-mail Address: suthilukp@yahoo.com

5. **ประวัติการศึกษา**

ปริญญาตรี สาขาชีวเคมี ปีที่จบ พ.ศ. 2524

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาโท สาขา Biomedical Engineering ปีที่จบ พ.ศ. 2528

New Jersey Institute of Technology, USA

ปริญญาเอก สาขาสรีรวิทยา ปีที่จบ พ.ศ. 2533

University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA.

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**

- Microcirculation and Endothelial cell function
- Computer-assisted image analysis

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 **หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการวิจัย** (Research Unit) แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : ชื่อ หน่วย ปฏิบัติการวิจัยหลอดเลือดจุลภาค (Microcirculation Research Unit)

- Executive Members of Asian Union for Micorciruclation (AUM)
- Secretary General of Physiological Society of Thailand
- Secretary General of Thai Society for Microcirculation

Awards

- American Heart Fellowship, New Jersey, USA. 1987-1989.
- Young Investigator Award. The First Asian Congress for Microcirculation, 1993. Osaka, Japan.
- Outstanding Presentation Award. The 7th Asian Congress for Microcirculation, 2008, Tai-An China.

7.2.หัวหน้าโครงการวิจัย

7.2.1. ผลของเหงือกปลาหมอดอกขาวต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ และต่อการ เติบโตของ เซลล์มะเร็งปากมดลูก ที่ปลูกบนผิวหนังของหนูนู๊ดไมส์

7.3. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว ชื่อผลงาน ปีที่ตีพิมพ์ การตีพิมพ์เผยแพร่ และ แหล่งทุน

ชื่อโครงการวิจัย	คณะผู้วิจัย	แหล่งทุน	ปีที่เริ่ม	ปีที่เสร็จ	ดัชนีวัดความสำเร็จ
7.3.1. การพัฒนาเคอคูมินแพ็ทเพื่อใช้ในการยับยั้งการเติบโตของ เซลล์มะเร็งตับที่ ปลูกบนผิวหนังของหนูนู๊ดไมส์	รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช อ. โศรดา กนกพานนท์	ทุน วช 2550	ต.ค.49	ก.ย.50	• นำเสนอการประชุมระดับชาติ 1 ครั้ง NCBME • รายงานฉบับสมบูรณ์ •กำลังเสนอตีพิมพ์
7.3.2. Curcumin is effective as the anti-inflammatory, anti-infection in Helicobacter pyroli infected rats, and anti-cancer in Hepatoma- cell implanted BALB/c-nude mice model	รศ. พญ. ดวงพร ทองงาม ผศ.พญ. นฤมล วิเศษโอภาส ผศ.พญ. ดร.อรอนงค์ กุละพัฒน์ รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช	ทุน เพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางสกว.	ก.ค. 49	เม.ย. 51	• ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 5 เรื่อง (publication number 41-45) • นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 3 ครั้ง
7.3.3. ผลของเจนิสตีนต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่กระดูกในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทั้งสองข้าง	รศ.นพ. ประสงค์ ศิริวิริยะกุล	ทุน วช 2550-51 และ ทุนรัชดาภิเษก	ต.ค. 49	ก.ย.51	• ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 3 เรื่อง (publication

	รศ. ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช นส. อัจฉรียา ชนาวิรัตน์	สมโภช คณะแพทยศาสตร์จุฬาฯ			number 47, 52,56) ● นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 3 ครั้ง ●นำเสนอการประชุมระดับชาติ 2 ครั้ง
7.3.4. Studies on the effects of Ya-hom and herbal medicine on regional cerebral blood flow การศึกษาผลของยาหอมและสารสกัดสมุนไพรต่ออัตราการไหลเวียนเลือดในสมอง	ผศ. ดร.อัมพร จาริยะพงศ์สกุล รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช	ทุนสภาวิจัยฯ	ต.ค.47	ก.ย.49	● ตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 1 เรื่อง (publication number 48) ● นำเสนอการประชุมระดับนานาชาติ 2 ครั้ง (ภาคผนวก)