สภาวะสำหรับเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดของเลือดจากสายสะดือรกของเด็กแรกเกิด

นางสาวนิดา พรประเสริฐสุด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2931-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONDITION FOR EX VIVO EXPANSION OF CORD BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Miss Nida Pornprasertsud

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-53-2931-2

Thesis Title	CONDITION FOR EX VIVO EXPANSION OF CORD BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELLS
By	Miss Nida Pornprasertsud
Field of Study	Medical Science
Thesis advisor	Professor Navapun Charuruks, M.D.
Thesis C0-advisor	Associated Professor Suradej Hongeng, M.D.

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

.....Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

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

.....Thesis Advisor

(Professor Navapun Charuruks, M.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Associate Professor Suradej Hongeng, M.D.)

.....Member

(Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D. Ph.D.)

นิดา พรประเสริฐสุด : สภาวะสำหรับเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดของเลือดจากสายสะดือรกของเด็กแรกเกิด. (CONDITION FOR EX VIVO EXPANSION OF CORD BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELLS) อ. ที่ปรึกษา : ศ.พญ.นวพรรณ จารุรักษ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.นพ.สุรเดช หงส์อิง 63หน้า. ISBN 974-53-2931-2.

การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดด้วยเลือดจากสายสะดือรกถูกจำกัดสำหรับผู้รับที่เป็นผู้ใหญ่ด้วยจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดที่น้อย ปัจจุบันจึงได้มีการนำเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดมาเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นภายนอกร่างกายเพื่อใช้แก้ปัญหานี้ นักวิจัยจำนวนมากได้นำ stromal cell จากสัตว์โดยเฉพาะจากหนูและซีรั่มจากลูกวัวมาใช้ซึ่งอาจทำให้เกิดการติดเชื้อจากสัตว์เหล่านี้ได้ เพื่อหลีกเลี่ยงจากการติดเชื้อนี้จึงใช้ mesenchymal stem cell จากไขกระดูกมนุษย์ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากซีรั่มจากสัตว์ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด โดยแยกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งที่ไม่มีและมีการเติมไซโตไคน์ เช่น อินเตอลูคิน-1 แอลฟา (IL-1α) หรือ เอฟแอล (FL) และ ธรอมโปโพอิติน (TPO) ในสภาวะที่มีหรือไม่มี mesenchymal stem cell เป็นเวลา 28 วัน เพื่อวิเคราะห์การเพิ่มจำนวน ลักษณะที่แสดงออก และความสามารถในการสร้างโคโลนี ผลที่ได้คือ มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีนิวเคลียสอย่างมีนัยสำคัญในสภาวะที่มี mesenchymal stem cell และไซโตไคน์ และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดมากที่สุดในสภาวะที่มี FL และ TPO ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดที่เลี้ยงในสภาวะที่มี mesenchymal stem cell นี้จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ในสายไมอีลอยด์แต่ในขณะเดียวกันก็ยังประกอบไปด้วยเซลล์ในสายลิมฟอยด์ นอกจากนี้ก็มีการเพิ่มจำนวนของโคโลนีมากขึ้นด้วย ผลการทดลองนี้ใช้เห็นว่าสภาวะที่มี mesenchymal stem cell ประกอบกับไซโตไคน์ที่เหมาะสมสามารถใช้เพิ่มและรักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดทั้งในสายไมอีลอยด์และลิมฟอยด์ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดของเลือดจากสายสะดือได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต นิดา พรประเสริฐสุด

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4575228830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD CORD BLOOD / HSCs / EX VIVO EXPANSION / MSCs

NIDA PORNRASERTSUD : CONDITION FOR EX VIVO EXPSNSION OF CORD BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELLS. THESIS ADVISOR : PROF. NAVAPUN CHARURUKS, THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. SURADEJ HONGENG, M.D., 63 pp. ISBN 974-53-2931-2.

Allogeneic transplantation with umbilical cord blood (UCB) is limited in adult recipients by a low stem cell dose. The ex vivo expansion of cord blood (CB) hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) is the current strategy to overcome this problem. Many inverstigators have used xenogenic, especially murine, stromal cells and fetal calf serum. Because of the possible transmission of infectious diseases, we using primary human mesenchymal stem cells (MSCs) to established a novel serum-free culture system to expand human CB HSPCs. CB $CD133^+$ -enriched cells were culture for 28 days in serum-free medium supplement with interleukin (IL)-1α or with flt3/flk2 ligand (FL) and thrombopoietin (TPO) in presence or absence of MSCs and analyzed for proliferation, phenotype, and clonogenic potential. Significant expansion of CB nucleated cells were achieved in the presence of human MSCs, while CB HSPCs were achieved in MSCs treated with FL and TPO condition. The differentiative potential of CB $CD133^+$-enriched cells cocultured with human MSCs was primirily shifted toward the myeloid lineage, while maintaining/expanding lymphoid population. Clonogenic analysis of the expanded cells showed increases in colony-forming unit-granulocyte, macrophage (CFU-GM) and colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte (CFU-GEMM). These results indicate that adult human MSCs in the presence of approprite cytokines can be used to efficienty expand/maintatin myeloid and lymphoid cell populations from human CB HSPCs.

Field of study Medical Science

Academic year 2005

Student's signature Nida Pornrasertsud

Advisor's signature

Co-advisor's signature

ACKNOWLEDGEMENTS

I really would like to express my gratitude to all those who participated in the success of this work. First of all, I am deeply indepted to my advisor, Prof. Navapun Charuruks and co-advisor, Assoc. Prof. Suradej Hongeng for their help, interest, suggest and encouragements help me all the time I have worked on this thesis. I also greatly express my heartfelt thanks to Professor Dr. Ratchanee Udomsangpetch and other committee members, Prof. Dr. Apiwat Mutirangura, Assoc. Prof. Dr.Issarang Nuchprayoon for their helpful suggestion and corrections during my study.

I am so grateful to my colleagues, Ms. Tasanee Panichakul, Mr. Jakrit Opasnavakul, and Miss Pranee Komkumkul for their helps, supports since the first time I started my laboratory practice and inspired me. Furthermore, I would like to thank Mr. Chokdee Wongborisuth, Miss Thivaratana Sinthuwiwat and Miss. Siraprapa Thongkorbpetch for encouragement help me all the time I have worked on this thesis. This thesis would have been impossible to accomplish without their helps.

Finally, I would like to express my deeplest gratitude my dear parents for their loves and understandings to have brought me today's success.

This work was supported by Chulalongkorn University

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai).....iv

Abstract (English).....v

Acknowledgments.....vi

Table of contents.....vii

List of Tables.....viii

List of Figures.....ix

List of Abbreviation.....x

Chapter

I. Introduction.....1

II. Review of Related Literatures.....5

III. Materials and Methods.....18

IV. Results.....25

V. Discussion and Conclusion.....45

References.....48

Appendices.....60

Biography.....63

LIST OF TABLE

Table Page

1 Immunophenotyping of human hematopoietic stem / progenitor cells.....8

2 Ex vivo generation of cord blood primitive hematopoietic / stem cells from human $CD34^-$ cells 11

3 Main characteristic of bone marrow-derived mesenchymal progenitors: Expression of specific antigens, cytokine receptors, adhesion molecules, and production of cytokines and matrix molecules 16

4 The collection volume, MNC number, enriched $CD133^+$ cells number and purity of $CD133^+$ fraction.....25

5 Fold increase of total cell number.....28

6 Percentage and fold increase of $CD133^+CD34^+$ antigen 30

7 Percentage and fold increase of $CD34^+CD38^-$antigen 31

8 Percentage and fold increase of $CD34^+$ antigen.....32

9 Percentage of $HLA\text{-}DR^+$ antigen 36

10 Percentage of $CD7^+$ antigen 37

11 Percentage of $CD15^+$ antigen 37

12 Percentage of $CD33^+$ antigen 38

13 CFU-GM number per 10^4 cell and fold increase in culture of CB cells 40

14 CFU-GEMM number per 10^4 cell and fold increase in culture of CB cells.....41

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Hematopoietic cells hierarchy.....5

2. Flt-3 ligand (FL)-mediated interations in the bone marrow microenvironment...12

3. Mesenchymal stem cell differentiation.....14

4. Representative photomicrographs of MSCs and growing hematopoietic cells in culture.....27

5. Total cell expansion of $CD133^+$-enriched cells culture in three conditions.....28

6. Fold increase of $CD133^+CD34^+$ cells, $CD34^+CD38^-$ cells and $CD34^+$ cells.....33

7. Coexpression of CD34 and other CD surface antigens on MACS-selected $CD133^+$ Cell.....35

8. Photomicrographs of CFC of CB cells cultured.....39

9. Giemsa staining of MNCs, $CD133^+$-enriched cells and expanded cells.....42

LIST OF ABBREVIATIONS

HSPCs	=	Hematopoietic stem / progenitor cells
MSCs	=	Mesenchymal stem cells
BM	=	Bone marrow
UCB	=	Umbilical cord blood
PB	=	Peripheral blood
GVHD	=	Graft-versus-host disease
MNCs	=	Mononuclear cells
LTC-ICs	=	Long-term culture-initiating cells
NOD/SCID	=	nonobese diabetic/severe combined immunodeficient
SRC	=	SCID-repopulating cells
IL-1α	=	Interleukin-1 alpha
FL	=	Flt3 ligand
TPO	=	Thrombopoietin
CFCs	=	Colony-forming cells
CFU-GM	=	Colony-forming unit of granulocyte and macrophage
CFU-GEMM	=	Colony-forming unit of granulocyte, erythrocyte, macrophage and monocyte
DMEM-HG	=	Dulbecco's Modified Eagles Medium-High Glucose