



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การพัฒนาทีเซลล์ที่มีตัวรับลูกผสมที่จำเพาะ latent membrane protein 2 ของ  
ไวรัสเอปสไตน์บาร์และทดสอบประสิทธิภาพในหลอดทดลอง

Development and *in vitro* efficacy testing of latent membrane protein  
2-specific chimeric antigen receptor T cell

**ชื่อนิสิต** นายเพชร บุญรัตน์

**เลขประจำตัว** 5932033223

**ภาควิชา** ชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาทีเซลล์ที่มีตัวรับลูกผสมที่จำเพาะ latent membrane protein 2 ของไวรัส  
เอปสไตน์บาร์และทดสอบประสิทธิภาพในหลอดทดลอง

Development and *in vitro* efficacy testing of latent membrane protein 2-  
specific chimeric antigen receptor T cell

นายเพชร บุญรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษา

ศาสตราจารย์ ดร.จันท์เพ็ญ จันท์เจ้า

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพ.ปกรัฐ หังสสุต

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

โครงการแผนพัฒนาวิชาการ จุฬาฯ สร้างเสริมพลังจุฬาฯ ก้าวสู่ศตวรรษที่ 2

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	: การพัฒนาทีเซลล์ที่มีตัวรับลูกผสมที่จำเพาะต่อ latent membrane protein 2 ของไวรัสเอปสไตน์บาร์และทดสอบประสิทธิภาพในหลอดทดลอง
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นายพชร บุญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพ.ปกรัฐ หังสสุต
ภาควิชา	: ชีววิทยา

---

### บทคัดย่อ

มะเร็งหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal carcinoma: NPC) เป็นสาเหตุหลักของการตายด้วยโรคมะเร็งในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยผู้ป่วยที่มีการกลับมาของโรคและได้รับการรักษาด้วยการฉายรังสีควบคู่กับการทำเคมีบำบัดมีอัตราการรอดชีวิตในระยะเวลา 5 ปี เพียง 20% ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งหลังโพรงจมูกที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสเอปสไตน์-บาร์ (Epstein-Barr virus, EBV) รูปแบบใหม่ เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของแอนติเจนของไวรัสบนผิวเซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ latent membrane protein 1 (LMP1) และ latent membrane protein 2 (LMP2) ทั้งนี้ LMP2 มีการแสดงออกบนผิวเซลล์มากกว่า LMP1 โดยมีการแสดงออกในผู้ป่วยถึง 50-90% ในขณะที่ LMP1 มีการแสดงออกเพียง 0-35% ผู้วิจัยจึงพัฒนา chimeric antigen receptor T cell (CAR T cell) ที่จำเพาะต่อ LMP2 ด้วยระบบ sleeping beauty (SB) transposon ซึ่งสามารถตัดต่อทีเซลล์ให้แสดงออก LMP2-specific CAR T cell อย่างถาวรและสามารถเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองด้วย autologous lymphoblastoid cell line (LCL) โดยพบว่า CAR T cell อยู่ในระยะ central memory และ effector memory นอกจากนี้ LMP2-specific CAR T cell สามารถกำจัดเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพในหลอดทดลอง จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงถึงความสามารถของ LMP2-specific CAR T cell ในการกำจัดเซลล์มะเร็งที่สามารถนำไปต่อยอดในการทดลองในสิ่งมีชีวิต

**คำสำคัญ:** ทีเซลล์, ภูมิคุ้มกันบำบัด, มะเร็งหลังโพรงจมูก, ไวรัสเอปสไตน์-บาร์

Research title : Development and *in vitro* efficacy testing of latent membrane protein 2-specific chimeric antigen receptor T cell

Student name : Potchara Boonrat

Advisor : Chanpen Chanchao, PhD

Co-advisor : Pokrath Hansasuta, MD, DPhil

Department : Biology

---

### Abstract

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is relatively common in Southeast Asia. Despite treatment with surgery, chemotherapy and radiation, the average 5-year overall survival rate is only about 20%. This implies that there must be an alternative treatment for Epstein-Barr (EBV) virus-associated NPC. The malignant cells express 2 types of viral surface antigen: latent membrane protein 1 (LMP1) and latent membrane protein 2 (LMP2). LMP2 was detected in 50-90% of NPC samples whereas LMP1 was expressed in only about 0-35% of NPC samples. In this report, we develop LMP2-specific chimeric antigen receptor (CAR) T cells using sleeping beauty (SB) transposon. LMP2-specific CAR T cells were successfully generated and expanded *ex vivo* with autologous lymphoblastoid cell lines (LCLs). The CAR T cells displayed a combination phenotype of central memory and effector memory T cell populations. In addition, LMP2-specific CAR T cells mediated potent cytotoxicity against tumor cells expressing LMP2 *in vitro*. These findings strongly support the feasibility of this therapeutic strategy.

**Keywords:** chimeric antigen receptor, Epstein-Barr virus, latent membrane protein 2, lymphoblastoid cell lines, nasopharyngeal carcinoma, sleeping beauty transposon, T cell

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ศาสตราจารย์ ดร.จันทรเพ็ญ จันทรเจ้า อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพ.ปกรัฐ หังสสุต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมสำหรับคำแนะนำในเรื่องการออกแบบการทดลอง การทำการทดลอง การจัดทำรูปเล่มและข้อมูลอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาคั้งนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านชีววิทยาศาสตร์ (องค์กรมหาชน) และศูนย์ความเป็นเลิศในเทคโนโลยีทางการแพทย์สำหรับเงินทุนสนับสนุนในการศึกษาคั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับเงินทุนสนับสนุนในการศึกษาคั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกทุกคนใน HIV and OIs research unit ที่คอยให้การสนับสนุนให้คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจในการทำโครงการในคั้งนี้

และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อน ๆ และ ศศิชา ทองเขาอ่อน สำหรับกำลังใจและคำปรึกษาตลอดโครงการนี้

พชร บุญรัตน์  
ผู้ดำเนินโครงการ

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	7
บทที่ 4 ผลการศึกษา	11
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผล	17
เอกสารอ้างอิง	19
ภาคผนวก	22

## สารบัญรูปภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 1ก จำนวนทีเซลล์ในระยะเวลา 42 วัน	12
ภาพที่ 1ข สัดส่วนเซลล์ที่แสดงออก chimeric antigen receptor (CAR)	12
ภาพที่ 1ค จำนวนของ CAR T cell ในระยะเวลา 42 วัน	12
ภาพที่ 2 กราฟการกำจัดเซลล์มะเร็งด้วยทีเซลล์ (%cytotoxicity) ที่อัตราส่วน effector: target เท่ากับ 10:1, 5:1 และ 1:1	13
ภาพที่ 3ก สัดส่วนทีเซลล์ชนิด CD4 ที่สร้างไซโตไคน์ชนิด IL-2, IFN- $\gamma$ และ TNF- $\alpha$ ภายในเซลล์	14
ภาพที่ 3ข สัดส่วนทีเซลล์ชนิด CD8 ที่สร้างไซโตไคน์ชนิด IL-2, IFN- $\gamma$ และ TNF- $\alpha$ ภายในเซลล์	14
ภาพที่ 4ก สัดส่วนทีเซลล์ชนิด CD4 ในระยะ $T_N$ , $T_{CM}$ , $T_{EM}$ และ $T_{TE}$	15
ภาพที่ 4ข สัดส่วนทีเซลล์ชนิด CD8 ในระยะ $T_N$ , $T_{CM}$ , $T_{EM}$ และ $T_{TE}$	15
ภาพที่ 5ก สัดส่วนทีเซลล์ชนิด CD4 ที่แสดงออก PD-1, TIM-3 และ LAG-3	16
ภาพที่ 5ข สัดส่วนทีเซลล์ชนิด CD8 ที่แสดงออก PD-1, TIM-3 และ LAG-3	16
ภาพที่ 5ค SPICE analysis ของทีเซลล์ชนิด CD4 และ CD8	16

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุแห่งใจในการเสนอโครงการ

โรคมะเร็งหลังโพรงจมูกเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งในประเทศไทยแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติระบุว่า ประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคมะเร็งหลังโพรงจมูกรายใหม่นับจากปี 2001 จนถึงปี 2015 เฉลี่ยปีละ 664 คนในเพศชาย และ 273 คนในเพศหญิง (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2552, 2555, 2556, 2558, 2561) ในปัจจุบันแนวทางการรักษาหลักของโรคมะเร็งชนิดนี้คือการฉายรังสีควบคู่ไปกับการทำเคมีบำบัดเนื่องจากบริเวณหลังโพรงจมูกเป็นบริเวณที่ยากต่อการเข้าถึง ส่งผลให้การผ่าตัดเป็นไปได้ยาก (Zhang et al., 2018) ทั้งนี้การฉายรังสีและเคมีบำบัดให้ผลข้างเคียงที่ค่อนข้างรุนแรง เช่น ความเป็นพิษต่อระบบการได้ยิน ชะลอการสร้างเม็ดเลือดขาว อาการเป็นพิษในเลือด และภาวะไฮโปไทรอยด์ (hypothyroidism) (Stone et al., 2003; Barnett et al., 2009; Ramirez et al., 2009) จากการสำรวจพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดควบคู่ไปกับวิธีฉายรังสีมีอัตราการรอดชีวิตในระยะเวลา 10 ปี แบ่งตามระยะของโรคดังนี้ ระยะที่ 1 66.7% ระยะที่ 2 46.5% ระยะที่ 3 28.0% และระยะที่ 4 18.6% โดยมีผู้ป่วยถึง 82.3% ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคตอนอยู่ในระยะที่ 3 และ 4 (Zhan et al., 1989) นอกจากนี้ในคนไข้ 15-58% เกิดการกลับมาของโรค โดยอัตราการการรอดชีวิตในระยะเวลา 5 ปีของผู้ป่วยที่มีการกลับมาของโรคและได้รับการบำบัดด้วยการฉายรังสีและเคมีบำบัดเท่ากับ 20% (Xu et al., 2013) แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยในกลุ่มที่มีการกลับมาของโรคมียุทธศาสตร์รอดชีวิตต่ำถึงแม้จะรักษาด้วยวิธีการรักษาตามแบบปกติ ส่งผลให้มีความจำเป็นอย่างสูงในการพัฒนาวิธีการรักษาแบบใหม่ที่สามารถใช้ในการรักษาผู้ป่วยในกลุ่มนี้ได้ โดยวิธีดังกล่าวต้องเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและให้ผลข้างเคียงที่ต่ำ ในปี 2016 ได้มีผลสำเร็จของการรักษาโดยวิธีการใช้เซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดทีเซลล์ที่ได้รับการดัดต่อยีนให้มีการแสดงออกของตัวรับลูกผสม (chimeric antigen receptor T cell: CAR-T cell) ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดรีอัยในเด็ก (relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: r/r ALL) ซึ่งต้องการรักษากว่า 90% (Maude et al., 2014) หลักการทำงานนั้นคือการปลูกถ่ายทีเซลล์ที่ถูกดัดต่อพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของ chimeric antigen receptor: CAR ซึ่งเป็นตัวรับลูกผสมระหว่างแอนติบอดี (antibody) และตัวรับของทีเซลล์ (T-cell receptor) ส่งผลให้ CAR-T cell สามารถจับกับแอนติเจนบนผิวเซลล์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่าน major histocompatibility complex: MHC (Kuwana et al., 1987; Gross et al., 1989) เนื่องจากโดยปกติแล้ว ทีเซลล์จะสามารถจดจำแอนติเจน (antigen) ซึ่งถูกดัดแปลงรูปเพื่อมาอยู่บน MHC เท่านั้น (Zinkernagel and Doherty,



1974, 1975) ส่งผลให้ทีเซลล์ไม่สามารถกำจัดเซลล์มะเร็งให้หมดไปได้เพราะเซลล์มะเร็งมักลดการแสดงออกของ MHC (Garrido et al., 2016) โดยองค์ประกอบของ CAR-T cell ประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ ส่วนที่ตัดต่อมาจากแอนติบอดีโดยจะทำหน้าที่จับกับแอนติเจน และส่วนส่งสัญญาณที่ตัดต่อมาจากตัวรับของทีเซลล์เพื่อใช้ในการกระตุ้นทีเซลล์ให้เกิดการทำงานและกำจัดเซลล์เป้าหมาย (June et al., 2018)

ในปัจจุบันการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration: FDA) จากผลสำรวจผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดดื้อยาพบว่าอัตราการไม่มีอาการของโรคแบบสมบูรณ์ (complete remission) ในผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับการรักษาโดยใช้ CAR-T cell เท่ากับ 90% ในขณะที่ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดมีอัตราการไม่มีอาการของโรคแบบสมบูรณ์เพียง 30% (Davila and Brentjens, 2016)

ในการพัฒนา CAR-T cell นักวิจัยมักออกแบบให้ตัวรับลูกผสมสามารถจับกับโปรตีนที่แสดงออกบนผิวเซลล์มะเร็งได้ในปริมาณมากและเป็นโปรตีนที่ไม่พบในเซลล์ปกติ เช่น แอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็ง เพื่อป้องกันอันตรายที่เกิดจากผลข้างเคียงในการทำลายเซลล์ปกติ ในโรคมะเร็งที่มีความเกี่ยวข้องกับไวรัส ผู้วิจัยสามารถใช้แอนติเจนของไวรัสเป็นเป้าหมายสำหรับ CAR-T cell ได้เช่นกัน โดยในโรคมะเร็งหลังโพรงจมูกมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสเอปสไตน์-บาร์ หรือ อีบีวี (Epstein-Barr virus: EBV) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสามารถใช้แอนติเจนจากไวรัสอีบีวีเป็นเป้าหมายได้ (Petersson, 2015)

ไวรัสเอปสไตน์-บาร์เป็นไวรัสในตระกูล Herpesviridae ไวรัสชนิดนี้เมื่อเกิดการติดต่อแล้วมักอยู่ในรูปโรคแอบแฝง (latent infection) แต่อาจเกิดการเพิ่มจำนวนได้ (reactivation) เมื่อภูมิคุ้มกันตกลง โดยมีเซลล์เป้าหมายเป็นเซลล์บุผิว (epithelium) และ บีเซลล์ (B cell) (Epstein et al., 1964) ไวรัสชนิดนี้มีการแสดงออกของโปรตีนกว่า 100 ชนิด แต่ในระยะแอบแฝงมีการแสดงออกของโปรตีนเพียงไม่เกิน 9 ชนิด ผู้วิจัยสามารถจำแนกลักษณะการติดเชื้อของไวรัสอีบีวีด้วยการจำแนกจากการแสดงออกของโปรตีนแอบแฝงได้เป็น 4 รูปแบบได้แก่ latency 0 ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน พบเฉพาะชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอของไวรัส (Epstein-Barr virus-encoded small RNAs: EBERs) latency 1 มีการแสดงออกของ EBNA1 latency 2 มีการแสดงออกของโปรตีน 3 ชนิด คือ EBNA1 LMP1 และ LMP2 latency 3 มีการแสดงออกของโปรตีนแอบแฝงทุกชนิด ได้แก่ EBNA1 EBNA2 EBNA3A EBNA3B EBNA3C EBNA-LP LMP1 และ LMP2 (Young et al., 2016) โรคมะเร็งหลังโพรงจมูกเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสอีบีวีในรูปแบบ latency 2 ส่งผลให้เซลล์มะเร็งจะมีการแสดงออกของโปรตีน 3 ชนิด คือ EBNA1 LMP1 และ LMP2 โดย EBNA1 เป็นโปรตีนซึ่งอยู่ในนิวเคลียสจึงทำให้ไม่สามารถใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายได้เพราะ CAR-T cell จำเป็นต้องอาศัยโปรตีนบนผิวเซลล์เท่านั้น ทั้งนี้ LMP2 มีการแสดงออกบนผิวเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก

มากกว่า LMP1 โดยแสดงออกถึง 50% ในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัส (Brooks et al., 1992) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือก LMP2 เป็นโปรตีนเป้าหมายหลักของ CAR-T cell ที่จะสร้างขึ้น

Latent membrane protein 2: LMP2 ประกอบด้วย 12 transmembrane domains และ C-terminus cytoplasmic tail ยาว 27 กรดอะมิโน โดยมีส่วนที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular domain) 6 loops (Young and Rickinson, 2004) ซึ่งสามารถใช้เป็นบริเวณที่แอนติบอดีจับได้ Cao et al. (2017) สามารถพัฒนาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ LMP2 ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดีนี้มาพัฒนาเพื่อสร้างดีเอ็นเอเวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของตัวรับลูกผสมที่มีความจำเพาะต่อ LMP2

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อออกแบบและสร้างพลาสมิดเวกเตอร์ที่มีการแสดงออกของตัวรับลูกผสม ทำการทรานส์เฟกชันพลาสมิดเวกเตอร์ที่มีการแสดงออกของตัวรับลูกผสมเข้าไปยังทีเซลล์ และทดสอบประสิทธิภาพเซลล์ที่มีตัวรับลูกผสมในการกำจัดเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 มะเร็งหลังโพรงจมูก

มะเร็งหลังโพรงจมูกเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสเอปสไตน์-บาร์ (Epstein-Barr virus) แบบ latency II โดยจะมีการแสดงออกโปรตีนของไวรัส 3 ชนิดคือ Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1), latent membrane protein 1 (LMP1) และ latent membrane protein 2 (LMP2) โดยมีเพียง LMP1 และ LMP2 ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ LMP2 มีการแสดงออก 2 รูปแบบคือ LMP2A และ LMP2B ซึ่งเกิดจาก alternative splicing ของยีน LMP2 ที่ตำแหน่ง exon 1 เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ LMP1, LMP2A และ LMP2B ในเซลล์ผู้ป่วยพบว่าการแสดงออกของ LMP2A mRNA และ protein เท่ากับ 95% และ 50% ของผู้ป่วยทั้งหมด (Busson et al., 1992 และ Brooks et al., 1992) ในขณะที่มีการแสดงออกของ LMP1 mRNA และ protein เท่ากับ 65% และ 35% (Niedobitek et al., 1992 และ Heussinger et al., 2004) ของผู้ป่วยทั้งหมดเนื่องจาก LMP2A มีบทบาทสำคัญในเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อผิวเป็นเซลล์มะเร็ง (epithelium mesenchyme transition: EMT) และอาจมีบทบาทอื่นในการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

#### 2.2 chimeric antigen receptor T cell

chimeric antigen receptor T cell (CAR T cell) คือทีเซลล์ที่ถูกตัดต่อพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของตัวรับลูกผสม (chimeric antigen receptor: CAR) ซึ่งสามารถจับกับแอนติเจนบนผิวเซลล์เป้าหมายได้โดยตรงและกระตุ้นการทำงานของทีเซลล์ได้โดยไม่ผ่าน major histocompatibility complex (MHC) ในปัจจุบันมีการพัฒนาโครงสร้างของ CAR ออกมาหลากหลายรูปแบบทั้งนี้องค์ประกอบหลักในโครงสร้างของ CAR ประกอบด้วย 4 ส่วนคือ

1. single-chain variable fragment (scFV) เป็นหน่วยย่อยของแอนติบอดีทำหน้าที่จับกับแอนติเจนบนผิวเซลล์เป้าหมายโดยประกอบจาก variable fragment ของ light chain ต่อกับ variable fragment ของ heavy chain ด้วย peptide linker
2. hinge region เป็นส่วนที่ให้ความยืดหยุ่นกับตัวรับในการจับกับแอนติเจนเป้าหมายโดยอาจมาความยาวแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปริมาณและลักษณะโครงสร้างของแอนติเจนบนผิวเซลล์เป้าหมาย
3. transmembrane region เป็นส่วนที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการส่งสัญญาณของทีเซลล์

4. signaling domain ทำหน้าที่ส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของทีเซลล์ ประกอบด้วย signaling domain ของ CD3 zeta chain และ costimulatory domain

การใช้ภูมิคุ้มกันบำบัดชนิด CAR T cell ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งมีการตอบสนองที่ดีต่อกลุ่มมะเร็งโรคลือด (hematologic malignancies) โดยในปัจจุบันองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. Food and Drug Administration: FDA) ได้รับรองการใช้ CAR T cell ในผู้ป่วยมะเร็งชนิด non-Hodgkin lymphomas และมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเด็ก (acute B cell lymphoblastic leukemia: B-ALL) (June et al., 2018) ทั้งนี้การใช้ CAR T cell ในกลุ่มมะเร็งชนิดเป็นก้อน (solid tumor) ยังมีการตอบสนองที่ไม่ดีเนื่องจากสภาพแวดล้อมของมะเร็ง (tumor microenvironment) การแสดงออกของ inhibitory ligands บนผิวเซลล์มะเร็งและการขาดโปรตีนเป้าหมายสำหรับ CAR T cell

### 2.3 การศึกษาเกี่ยวกับ chimeric antigen receptor T cell

ปี ค.ศ. 1993, Gross และคณะ ตัดต่อพันธุกรรมทีเซลล์ให้มีการแสดงออกโปรตีนลูกผสมระหว่าง scFV จากแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ tri-nitrophenyl ต่อกับ CD3 zeta chain หรือ gamma chain เพื่อทดสอบคุณสมบัติในหลังไซโตไคน์เมื่อถูกกระตุ้นและการทำลายเซลล์เป้าหมายพบว่าทีเซลล์ที่แสดงออกตัวรับลูกผสมสามารถหลั่ง interleukin-2 (IL-2) และกำจัดเซลล์เป้าหมายในหลอดทดลองได้

ปี ค.ศ. 1998, Krause และคณะ ตัดต่อพันธุกรรมทีเซลล์ให้มีการแสดงออกโปรตีนลูกผสมระหว่าง scFV จากแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ G<sub>D2</sub> และส่วนส่งสัญญาณของ CD28 ซึ่งทำหน้าที่เป็น costimulatory molecule พบว่าทีเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้ในขณะที่เซลล์เป้าหมายไม่มีการแสดงออก costimulatory ligand แสดงถึงความสำคัญของ costimulatory signal ในการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนของเซลล์

ปี ค.ศ. 2002 Maher และคณะ ตัดต่อพันธุกรรมทีเซลล์ให้มีการแสดงออกโปรตีนลูกผสมระหว่าง scFV จากแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ prostate-specific membrane antigen (PSMA) ซึ่งแสดงออกบนผิวเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากและส่วนส่งสัญญาณของ CD3 zeta chain กับ CD28 พบว่าทีเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง กำจัดเซลล์เป้าหมายและหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-2 ในปริมาณมาก

ปี ค.ศ. 2003, Brentjens และคณะ ตัดต่อพันธุกรรมทีเซลล์ให้มีการแสดงออกโปรตีนลูกผสมระหว่าง scFV จากแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CD19 ซึ่งแสดงออกบนผิว B cell ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวส่วนส่งสัญญาณของ CD3 zeta chain กับ CD28 พบว่าทีเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนทำลายเซลล์มะเร็ง และคงอยู่ในสัตว์ทดลองในระยะยาว

ปี ค.ศ. 2011, Cooper และคณะ ตัดต่อพันธุกรรมทีเซลล์ให้มีการแสดงออกของ anti-CD19 CAR ด้วยระบบ sleeping beauty (SB) transposon และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนทีเซลล์นอกหลอดทดลองด้วย artificial antigen presenting cell (aAPC) พบว่าทีเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนและกำจัดเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลองได้

ปี ค.ศ. 2011, Jin และคณะ ทดสอบการใช้ CAR T cell ต่อ CD19 ในผู้ป่วยโรค chronic lymphocytic leukemia (CLL) พบว่าผู้ป่วยไม่มีการกลับมาของโรคในระยะเวลา 6 เดือน

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงาน

#### 3.1 แผนการศึกษา

##### 1. ขั้นตอนการขอความยินยอมจากอาสาสมัคร

อาสาสมัครจำนวน 1 รายได้รับเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเพื่อลงนามเข้าร่วมโครงการ

##### 2. การแยกเลือดผู้ป่วยเพื่อสกัดทีเซลล์ (PBMC isolation and depletion)

เจาะเลือดจากผู้ป่วยด้วยวิธีเวนิพังก์เซอร์ (Venipuncture) จากนั้นนำเลือดมาล้างด้วย Roswell Park Institute: RPMI 1640 medium (ThermoFischer Scientific, USA) ด้วยอัตราส่วน 1:1 ถ่ายเลือดมายังหลอดฟลอคอนปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Ficoll-Paque density gradient solution (GE healthcare, USA) อยู่ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 30 นาที ที่ 1500 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายที่อยู่ระหว่างสารละลาย Ficoll-Paque density gradient solution และน้ำเลือด (plasma) มาล้างด้วย RPMI + 10% fetal bovine serum (FBS) (R10) ด้วยอัตราส่วน 1:3 ปั่นเหวี่ยง 10 นาทีด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ดูดของเหลวเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้นล้างด้วย R10 ด้วยอัตราส่วน 1:3 ปั่นเหวี่ยง 5 นาทีด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ดูดของเหลวเหนือตะกอนทิ้งและนับเซลล์ในกลุ่ม peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ด้วยวิธี trypan blue exclusion

##### 3. การสังเคราะห์พลาสมิดเวกเตอร์ (Plasmid vector synthesis)

ออกแบบพลาสมิดด้วยโปรแกรม SnapGene (version 4.2.11) จากนั้นสั่งสังเคราะห์พลาสมิดจากบริษัท Genscript ประเทศจีน

##### 4. การทำยีนโคลนนิ่ง (DNA cloning)

ละลายสารละลายเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ TOP10 จากตู้ -80 องศาเซลเซียส บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใส่ผลิตภัณฑ์สไลซ์ ลงในสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่แช่ไว้ บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แช่สารละลายในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที นำกลับมาบ่มบนน้ำแข็งอีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำ นำสารละลายไปบ่มในตู้เขย่าด้วยความเร็ว 2100 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์แบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB agar เป็นเวลา 1 คืน เลือกโคโลนีเพื่อสกัดพลาสมิดด้วย NucleoBond® Xtra Midi (Machery Nagel, German)

##### 5. การศึกษาลำดับเบสและการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing)

ส่งพลาสมิดที่สกัดออกมาให้แก่บริษัท MacroGen (South Korea) พร้อมกับไพรเมอร์ เพื่อตรวจสอบลำดับเบสว่าตรงกับลำดับที่ต้องการหรือไม่ โดยใช้เทคนิค normal automatic sequencing จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียง (align) โดยใช้โปรแกรม SnapGene (version 4.2.11)

#### 6. การนำดีเอ็นเอสายผสมใส่เข้าไปในทีเซลล์ (transfection)

นำพลาสมิด LMP2.28z ปริมาณ 11.5 ไมโครกรัมและ SB100X ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม (addgene, USA) มาผ่านกระบวนการ electroporation ร่วมกับ PBMC จำนวน  $2 \times 10^7$  เซลล์ ด้วยเครื่อง Amaxa™ Nucleofector™ II (Lonza, Switzerland) โปรแกรม U-014 จากนั้นนำมาเลี้ยงใน T-25 culture flask ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด R10 เป็นเวลาหนึ่งคืน นำเซลล์ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรมมาตรวจสอบการแสดงออกของตัวรับลูกผสม ด้วยวิธี fluorescent activated cell sorting analysis: FACS

#### 7. การคัดเซลล์ที่แสดงออก CD56 บนผิวเซลล์ออกจากสารละลายเซลล์ (CD56<sup>+</sup> cells depletion)

นำเซลล์ที่ผ่านกระบวนการ transfection มาปั่นเหวี่ยง 5 นาที ที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายเหนือตะกอนทิ้งและละลายตะกอนด้วย MACS washing buffer (Miltenyi biotech, USA) ปริมาตร 80 ไมโครลิตรต่อ  $1 \times 10^7$  เซลล์ จากนั้นย้อมด้วย CD56 microbeads (Miltenyi biotech, USA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อ  $1 \times 10^7$  เซลล์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วย MACS washing buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ  $1 \times 10^7$  เซลล์ ปั่นเหวี่ยง 5 นาที ที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายเหนือตะกอนทิ้งและละลายตะกอนด้วย MACS washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อ  $1 \times 10^8$  เซลล์ หยอดสารละลายเซลล์ลงใน MS column (Miltenyi biotech, USA) ล้างคอลัมน์ด้วย MACS washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 3 ครั้ง เก็บสารละลายเซลล์ที่ไหลผ่านคอลัมน์มาเลี้ยงด้วย R10 ใน T-25 culture flask ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์

#### 8. การเลี้ยงและกระตุ้นทีเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง

นำเซลล์ที่ผ่านกระบวนการ electroporation มากระตุ้นด้วย autologous lymphoblastoid cell line (LCL) ชนิด B95.8 ด้วยอัตราส่วน PBMC ต่อ LCL เท่ากับ 5:1 ทุก 7 วันและเติมไซโตไคน์ (cytokine) ชนิด Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-7 (IL-7) และ Interleukin-15 (IL-15) ที่ความเข้มข้น 50 IU/mL, 5 ng/mL และ 10 ng/mL ทุก 2-3 วัน ควบคุมความหนาแน่นเซลล์ใน T-25 culture flask ให้เท่ากับ  $0.5 \times 10^6$  เซลล์

### 9. การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดเซลล์มะเร็งด้วยทีเซลล์

นำทีเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 35 วัน มาบ่มร่วมกับ allogeneic LCLs ที่อัตราส่วน 10:1, 5:1 และ 1:1 ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายมาย้อมด้วย ฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีดังต่อไปนี้ Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit, anti-CD3-Pacific Blue (clone OKT3), anti-CD4-Alexa Fluor®700 (clone A161A1), anti-CD8-APC/Cyanine7 (clone SK1), anti-CD19-BV421 (clone HIB19) และ anti-CD20-APC (clone 2H7) (Biolegend, USA)

### 10. การวัดปริมาณไซโตไคน์ภายในเซลล์

นำทีเซลล์ในชุดควบคุม (mock) และชุดทดลอง (LMP2-specific CAR T cell) มาทำการทดลอง โดยแบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ทีเซลล์ในอาหารเลี้ยงชนิด R10 (negative control) ทีเซลล์ในอาหารเลี้ยงชนิด R10 + 0.5% phytohemagglutinin: PHA (positive control) และทีเซลล์กับ allogeneic lymphoblastoid cell line (LCL) ที่อัตราส่วน 10:1 ในอาหารเลี้ยงชนิด R10 จากนั้นเติม brefeldin A: BFA (5 mg/ml) anti-CD28 และ anti-CD49d บ่มในตู้บ่ม 6 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วยฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีดังต่อไปนี้ anti-CD3-Pacific Blue (clone OKT3), anti-CD4-Alexa Fluor®700 (clone A161A1), anti-CD8-APC/Cyanine7 (clone SK1) และ anti-EGFR- Alexa Fluor®647 (clone AY13) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บั่นล้างและตรึงเซลล์ด้วย BD Cytfix/Cytoperm™ (Becton Dickinson, USA) ที่ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นบั่นล้างและนำมาย้อมด้วยฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดีดังต่อไปนี้ anti-IL-2-PE (clone MQ1-17H2), anti-IFN- $\gamma$ -PE/Cy7 (clone 4S2B3), anti-TNF- $\alpha$ -FITC (clone Mab11) และ Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดผลด้วย flow cytometer

### 3.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลและสร้างกราฟจนผลศาสตร์ของเซลล์ด้วยโปรแกรม Prism (version 7.0) นำไฟล์จาก flow cytometer มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Flowjo (version 10.3) จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวน exhaustion marker บนผิวเซลล์ด้วยโปรแกรม SPICE (version 6.0)



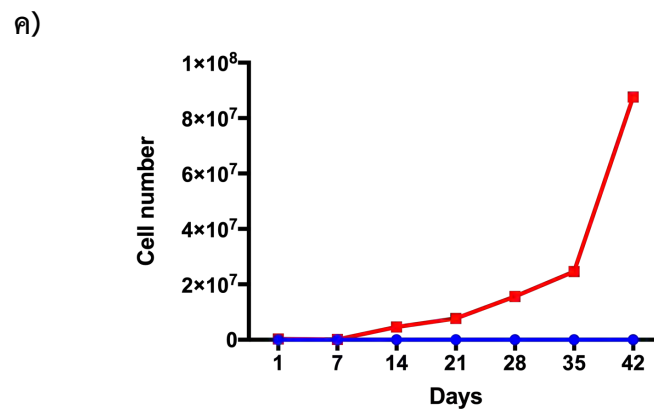
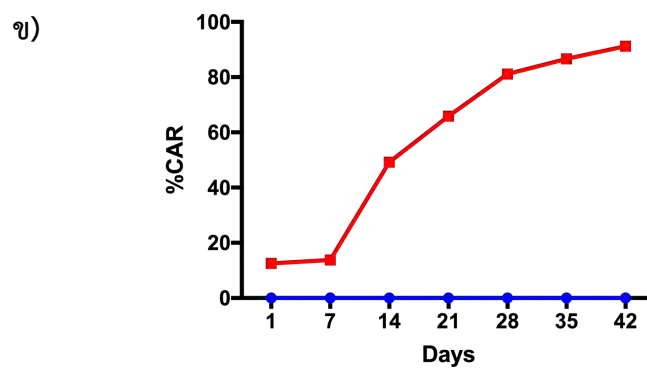
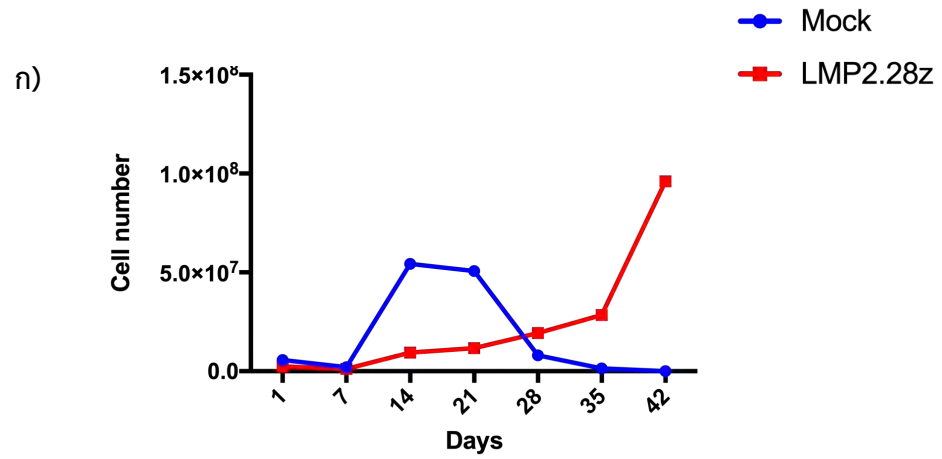
### 3.3 ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษา

ขั้นตอนการศึกษา	มกราคม 63	กุมภาพันธ์ 63	มีนาคม 63	เมษายน 63
1.เตรียมสารเคมีและเซลล์				
2.เตรียมดีเอ็นเอเวกเตอร์				
3.ทรานส์เฟกชัน K562 Cell lines				
4.ทรานส์เฟกชัน CAR-T cells				
5.เลี้ยงเซลล์				
6.ทดสอบประสิทธิภาพ CAR-T cells				

## บทที่ 4 ผลการศึกษา

### 4.1 จลนพลศาสตร์ของเซลล์

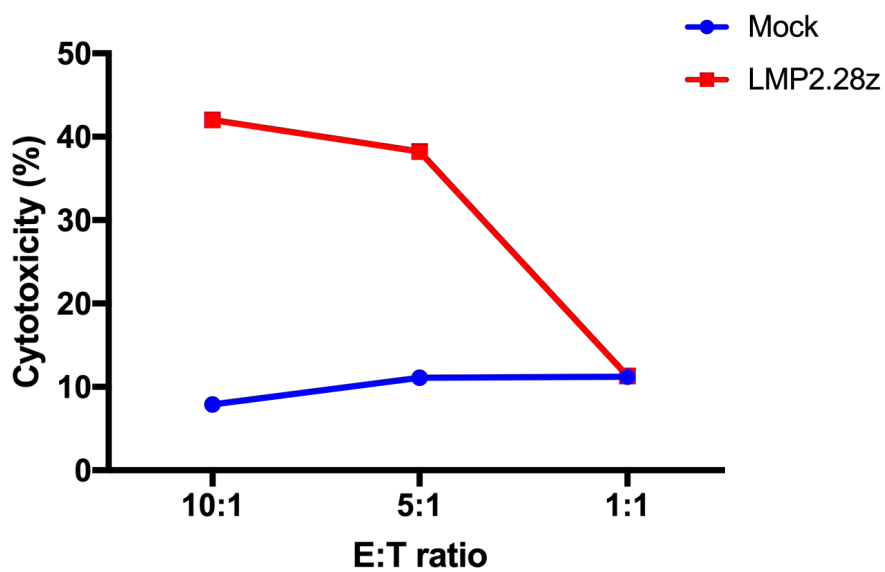
ผู้ทดลองตัดต่อพันธุกรรมที่เซลล์ให้มีการแสดงออกของตัวรับลูกผสมชนิด LMP2-specific CAR โดยขนส่งพลาสมิด LMP2 CAR และ SB100X เข้าสู่ PBMC ด้วยระบบ nucleofection จากนั้นนำเซลล์มากระตุ้นให้เพิ่มจำนวนด้วย autologous LCLs ในวันถัดมา โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดควบคุมที่ไม่เติมพลาสมิด (Mock) และ ชุดทดลองที่เติมพลาสมิดทั้งสองชนิด (LMP2 CAR และ SB100X) พบว่า nucleofection ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ใน 7 วันแรก ทั้งนี้ที่เซลล์ในชุดทดลองสามารถถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนด้วย autologous lymphoblastoid cell line (LCL) ได้หลังจากวันที่ 7 โดยมีจำนวนเซลล์วันที่ 14, 21, 28, 35 และ 42 เท่ากับ  $9.45 \times 10^6$ ,  $11.7 \times 10^6$ ,  $19.3 \times 10^6$ ,  $28.4 \times 10^6$  และ  $96.1 \times 10^6$  ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมีจำนวนเซลล์ที่ผันผวนโดยมีจำนวนเซลล์วันที่ 14, 21, 28, 35 และ 42 เท่ากับ  $5.43 \times 10^7$ ,  $5.07 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $1.43 \times 10^6$  และ 0 (ภาพที่ 1ก) การใช้ระบบ Sleeping Beauty (SB) Transposon ในการตัดต่อพันธุกรรมส่งเสริมการแสดงออกของตัวรับลูกผสมแบบถาวรในขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการแสดงออกของตัวรับลูกผสม โดยมีสัดส่วนเซลล์ที่แสดงออกตัวรับลูกผสมในวันที่ 1, 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 หลังผ่านกระบวนการ nucleofection เท่ากับ 12.5%, 13.8%, 49.2%, 65.9%, 81.1%, 86.6%, และ 91.2% ตามลำดับ (ภาพที่ 1ข) และจำนวนที่เซลล์ที่แสดงออกตัวรับลูกผสมเท่ากับ  $4.65 \times 10^6$ ,  $7.71 \times 10^6$ ,  $15.6 \times 10^6$ ,  $24.6 \times 10^6$  และ  $87.6 \times 10^6$  ตามลำดับ (ภาพที่ 1ค) แสดงถึงการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนแบบจำเพาะต่อ LMP2 บนผิว autologous LCLs โดย LMP2-specific CAR



ภาพที่ 1 ก) จำนวนที่เซลล์ในระยะเวลา 42 วัน ข) สัดส่วนเซลล์ที่แสดงออก chimeric antigen receptor (CAR) ค) จำนวนของ CAR T cell ในระยะเวลา 42 วัน

#### 4.2 การกำจัดเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

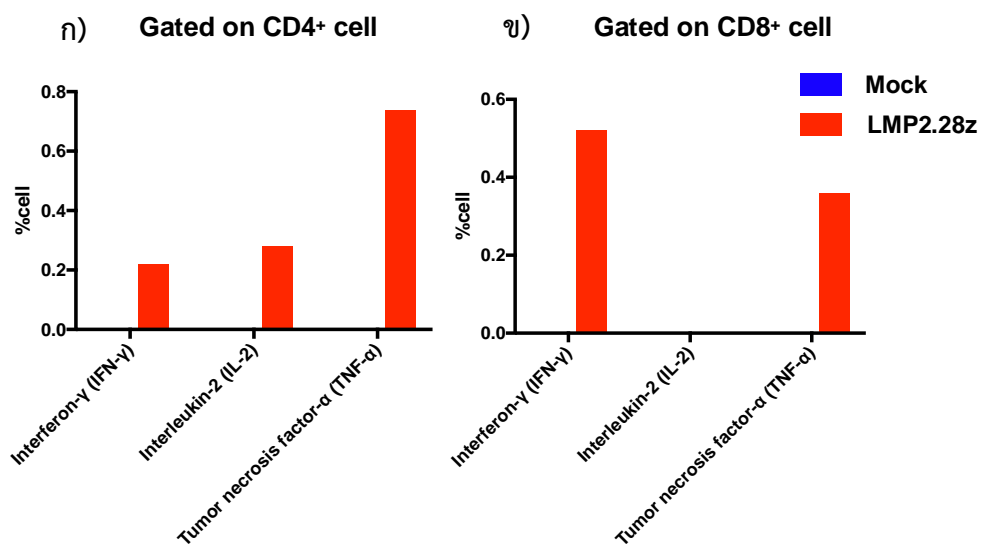
ผู้ทดลองทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองโดยนำทีเซลล์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน มาบ่มร่วมกับ allogeneic LCL ด้วยอัตราส่วนที่เซลล์ต่อเซลล์เป้าหมายเท่ากับ 10:1, 5:1 และ 1:1 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าทีเซลล์ในชุดทดลองสามารถกำจัดเซลล์เป้าหมายได้ โดยมี %cytotoxicity เท่ากับ 42%, 38.3% และ 11.4% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ในชุดควบคุมมี %cytotoxicity เท่ากับ 8%, 11.2% และ 11.3 ตามลำดับ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กราฟการกำจัดเซลล์มะเร็งด้วยทีเซลล์ (%cytotoxicity) ที่อัตราส่วน effector: target เท่ากับ 10:1, 5:1 และ 1:1

### 4.3 การวัดปริมาณเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ภายในเซลล์

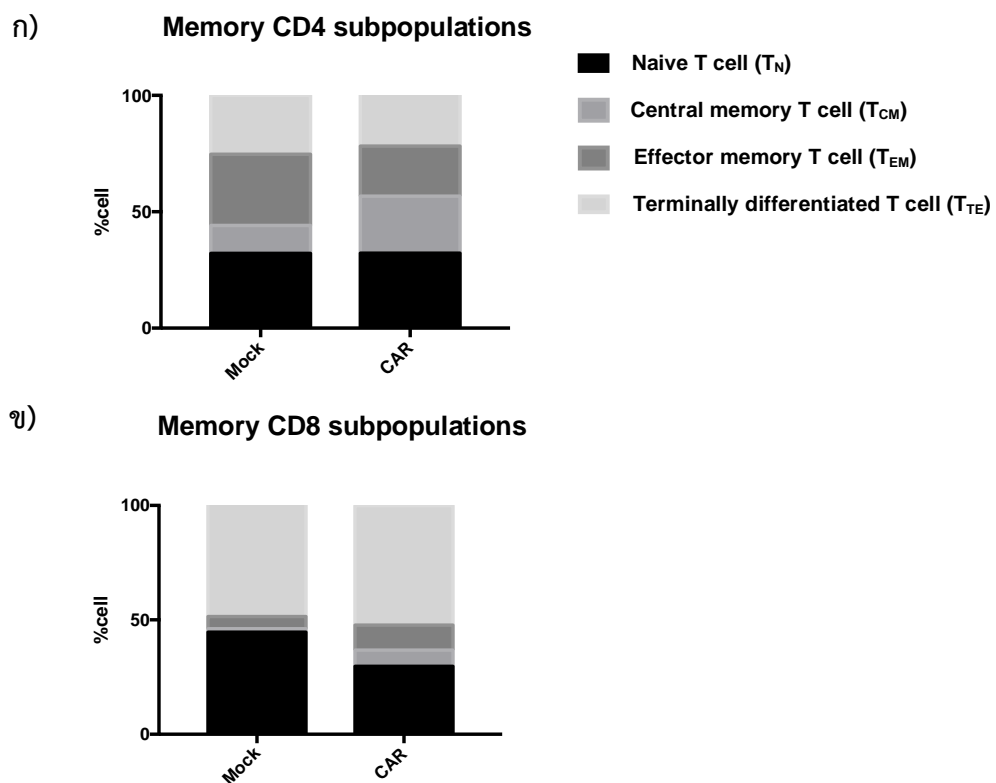
ผู้ทดลองวัดปริมาณเซลล์ที่มีการสร้างไซโตไคน์ภายในเซลล์ 3 ชนิดหลังจากบ่มร่วมกับ allogeneic LCL ที่อัตราส่วน 10:1 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้แก่ Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) และ Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) พบว่าทีเซลล์ในชุดทดลองสามารถสร้างไซโตไคน์ตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นด้วยเซลล์เป้าหมายโดยมีสัดส่วนที่เซลล์ชนิด CD4 ที่สร้าง IL-2, IFN- $\gamma$  และ TNF- $\alpha$  เท่ากับ 0.22%, 0.28% และ 0.74% (ภาพที่ 3ก) และสัดส่วนที่เซลล์ชนิด CD8 เท่ากับ 0%, 0.52% และ 0.36% (ภาพที่ 3ข) ในขณะที่ไม่พบการสร้างไซโตไคน์ในชุดควบคุม จากผลการทดลองแสดงถึงการถูกกระตุ้นอย่างจำเพาะระหว่าง CAR T cell กับเซลล์มะเร็ง



ภาพที่ 3 ก) และ ข) สัดส่วนที่เซลล์ชนิด CD4 และ CD8 ที่สร้างไซโตไคน์ชนิด Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) และ Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ภายในเซลล์

#### 4.4 การวิเคราะห์ระยะการเจริญของทีเซลล์

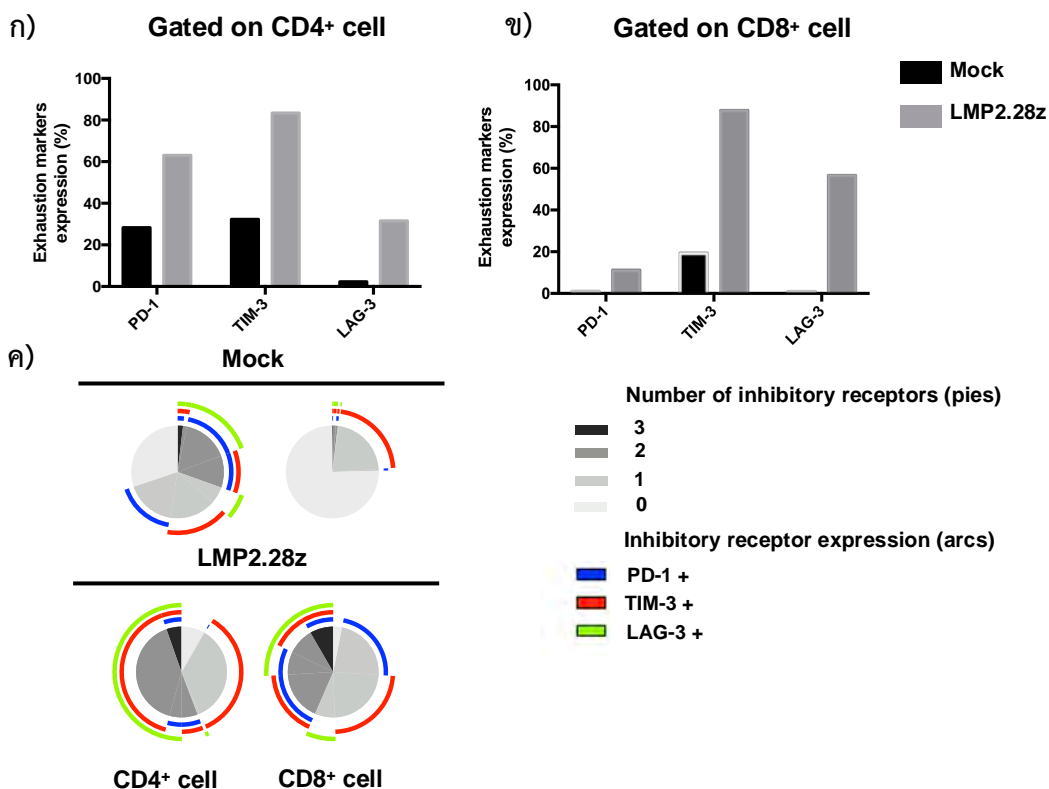
ผู้ทดลองวิเคราะห์ระยะการเจริญของทีเซลล์โดยวัดรูปแบบการแสดงออกโปรตีน 2 ชนิดคือ CD45RA และ CD62L โดยแบ่งระยะการเจริญออกเป็น 4 ระยะได้แก่ naive ( $T_N$ ) พบการแสดงออกของ CD45RA และ CD62L, central memory ( $T_{CM}$ ) พบการแสดงออกของ CD62L เพียงอย่างเดียว, effector memory ( $T_{EM}$ ) ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด และ terminally differentiated ( $T_{TE}$ ) พบการแสดงออกของ CD45RA เพียงอย่างเดียว หลังจากเลี้ยงทีเซลล์เป็นเวลา 35 วันพบว่าทีเซลล์ในชุดทดลองมีการเจริญจากระยะ  $T_N$  เข้าสู่ระยะอื่นมากกว่าชุดควบคุมโดยทีเซลล์ชนิด CD4 มีสัดส่วนทีเซลล์ในระยะ  $T_N$ ,  $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$  และ  $T_{TE}$  เท่ากับ 32.2%, 24.5%, 21.5% และ 21.9% (ภาพที่ 4ก) และทีเซลล์ชนิด CD8 มีสัดส่วนเซลล์ในระยะ  $T_N$ ,  $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$  และ  $T_{TE}$  เท่ากับ 29.7%, 7.07%, 10.9% และ 52.3% (ภาพที่ 4ข) ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมทีเซลล์ชนิด CD4 มีสัดส่วนทีเซลล์ในระยะ  $T_N$ ,  $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$  และ  $T_{TE}$  เท่ากับ 32.1%, 12%, 30.6% และ 25.3% และทีเซลล์ชนิด CD8 มีสัดส่วนเซลล์ในระยะ  $T_N$ ,  $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$  และ  $T_{TE}$  เท่ากับ 44.6%, 1.53%, 5.34% และ 48.6% (ภาพที่ ) ดังนั้นการแสดงออกของ LMP2-specific CAR บนผิวเซลล์ส่งเสริมการเกิดทีเซลล์ระยะ  $T_{EM}$  และ  $T_{TE}$



ภาพที่ 4 ก) และ ข) สัดส่วนทีเซลล์ชนิด CD4 และ CD8 ในระยะ naive T cell ( $T_N$ ), central memory T cell ( $T_{CM}$ ), effector memory T cell ( $T_{EM}$ ) และ terminally differentiated cell ( $T_{TE}$ )

#### 4.5 การวิเคราะห์การแสดงออกของ exhaustion markers บนผิวเซลล์

ผู้ทดลองวัดปริมาณการแสดงออกของ exhaustion markers บนผิวที่เซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ Programmed cell death protein 1 (PD-1), T-cell immunoglobulin mucin 3 (TIM-3) และ Lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) พบว่าหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน ชุดทดลองมีสัดส่วนเซลล์ที่แสดงออกตัวรับทั้ง 3 ชนิดมากกว่าชุดควบคุม (ภาพที่ 5ก และ 5ข) และเมื่อวิเคราะห์แบบ multi-component analysis (ภาพที่ 5ค) พบว่าที่เซลล์ชนิด CD4 ทั้งชุดทดลองและชุดควบคุมมีสัดส่วนเซลล์ที่แสดงออกตัวรับ 1 ชนิดมากที่สุดโดยในชุดทดลองมีสัดส่วนมากกว่าชุดควบคุม ส่วนที่เซลล์ชนิด CD8 ในชุดทดลองมีสัดส่วนเซลล์ที่แสดงออกตัวรับ 2 ชนิดมากที่สุดในขณะที่ชุดควบคุมมีสัดส่วนที่เซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของตัวรับทั้งสามชนิดบนผิวเซลล์เป็นสัดส่วนมากที่สุด เมื่อพิจารณาชนิดของตัวรับที่แสดงออก 2 ชนิดพร้อมกันพบว่าที่เซลล์ชนิด CD4 มีการแสดงออกของ PD-1 พร้อมกับ TIM-3 มากที่สุด และที่เซลล์ชนิด CD8 มีการแสดงออกของ LAG-3 พร้อมกับ TIM-3 มากที่สุด



ภาพที่ 5 ก) และ ข) สัดส่วนที่เซลล์ชนิด CD4 และ CD8 ที่แสดงออก program cell death-1 (PD-1), T-cell immunoglobulin and mucin domain containing-3 (TIM-3) และ lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3) ค) SPICE analysis ของที่เซลล์ชนิด CD4 และ CD8

## บทที่ 5

### วิจารณ์และสรุปผล

มะเร็งหลังโพรงจมูกเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งในประเทศไทย และประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การรักษาปัจจุบันนิยมใช้การฉายรังสีควบคู่กับการทำเคมีบำบัด ทั้งนี้วิธีดังกล่าวทำให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรงและมีประสิทธิภาพต่ำในการกำจัดเซลล์มะเร็งในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลับมาของโรค จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาวิธีการรักษาแบบใหม่ที่มีผลข้างเคียงต่ำและมีประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์มะเร็งในระยะยาวได้

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงพัฒนาการใช้ภูมิคุ้มกันบำบัดชนิด CAR-T cell ที่มีความจำเพาะต่อ LMP2 บนผิวเซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูกด้วยระบบ SB transposon พบว่าการตัดต่อพันธุกรรมด้วยวิธีนี้ทำให้เกิดการแสดงออกของ LMP2-specific CAR บนผิวเซลล์แบบถาวรโดยยีน LMP2-specific CAR ในพลาสมิด LMP2 CAR จะถูกตัดและนำเข้าสู่จีโนมของเซลล์ที่ตำแหน่ง TA dinucleotides แบบสุ่มด้วยเอนไซม์ SB transposase จากพลาสมิด SB100X

ทีเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย autologous lymphoblastoid cell line (LCL) สามารถเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยเพียงพอสำหรับการนำมาทดสอบประสิทธิภาพในหลอดทดลอง เนื่องจาก autologous LCL มีการแสดงออกของ CD80 และ CD86 ซึ่งทำหน้าที่เป็น costimulatory ligand โดยเฉพาะทีเซลล์ที่แสดงออก LMP2-specific CAR สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีกว่าชุดควบคุมเนื่องจาก autologous LCL มีการแสดงออกของ LMP2 ทำให้เกิดการกระตุ้นและเพิ่มจำนวนอย่างจำเพาะของเซลล์

เมื่อวิเคราะห์ระยะการเจริญของทีเซลล์ในวันที่ 35 พบว่าทีเซลล์ที่แสดงออก LMP2-specific CAR อยู่ในระยะ effector memory และ terminally differentiated cell เป็นส่วนใหญ่เนื่องจากการส่งสัญญาณ CD28 domain ใน LMP2-specific CAR และการถูกกระตุ้นเป็นจำนวนหลายครั้งส่งเสริมให้เซลล์เข้าสู่ระยะ effector memory ทั้งนี้จากการทดลองในสัตว์ทดลองพบว่าทีเซลล์ในระยะ central memory สามารถคงอยู่และกำจัดเซลล์มะเร็งตั้งในร่างกายได้ดีกว่าดังนั้นการทำการทดลองในสัตว์ทดลองหรือผู้ป่วยควรใช้ทีเซลล์ที่เลี้ยงในระยะเวลาที่สั้นกว่านี้มาทดสอบประสิทธิภาพเพื่อรักษาสัดส่วนของทีเซลล์ระยะ central memory ไว้

นอกจากนี้ทีเซลล์ที่แสดงออก LMP2-specific CAR ยังมีการแสดงออกของ exhaustion markers เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งสอดคล้องกับระยะการเจริญที่แก่กว่าในชุดควบคุม ทั้งนี้ทีเซลล์ยังคงสามารถสร้างไซโตไคน์และกำจัดเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้โดยอาศัย LMP2-specific CAR จับกับ LMP2 บนผิวเซลล์เป้าหมาย ในขณะที่



ที่ชุดควบคุมไม่มีการแสดงออกของ LMP2-specific CAR จึงไม่สามารถถูกกระตุ้นและกำจัดเซลล์เป้าหมายได้ ทั้งนี้ที่เซลล์ในชุดควบคุมอาจเกิด alloreactivity ระหว่าง T-cell receptor บนผิวเซลล์ และ HLA หรือ minor histocompatibility complex บนผิว allogeneic LCLs ได้จึงทำให้เกิดการทำลายเซลล์เป้าหมายได้เล็กน้อยดังที่ปรากฏในผลการทดลอง

LMP2-specific CAR T cell สามารถเพิ่มจำนวนและกำจัดเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง ทั้งนี้มีความจำเป็นในการทำการทดลองในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้นเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของ CAR T cell

## เอกสารอ้างอิง

### ภาษาไทย

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2552. Cancer in Thailand Vol. V, 2001–2003.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2555. Cancer in Thailand Vol. VI, 2004–2006.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2556. Cancer in Thailand Vol. VII, 2007–2009.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2558. Cancer in Thailand Vol. VIII, 2010–2012.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2561. Cancer in Thailand Vol. IX, 2013–2015.

### ภาษาอังกฤษ

Barnett, G.C., West, C.M., Dunning, A.M., Elliott, R.M., Coles, C.E., Pharoah, P.D. and Burnet, N.G. 2009. Normal tissue reactions to radiotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 9: 134–142.

Brooks, L., Yao, Q.Y., Rickinson, A.B. and Young, L.S. 1992. Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1 and LMP2 transcripts. *Journal of Virology*. 66: 2689–2697.

Busson, P., McCoy, R., Sadler, R., Gilligan, K., Tursz, T. and Raab–Traub. 1992. Consistent Transcription of the Epstein-Barr Virus LMP2 Gene in Nasopharyngeal Carcinoma. *Journal of Virology*. 66(5): 3257–3262.

Cao, Q., Zhang, D., Mao, Y., Meng, C., Zhu, J., Feng, Z. and Chen, R. 2017. A human Fab exclusively binding to the extracellular domain of LMP2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 482: 226–231.

Davila, M.L. and Brentjents, R.J. 2016. CD19-Targeted CAR T Cells as novel cancer immunotherapy for relapsed or refractory B-Cell acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 14(10): 802–808.

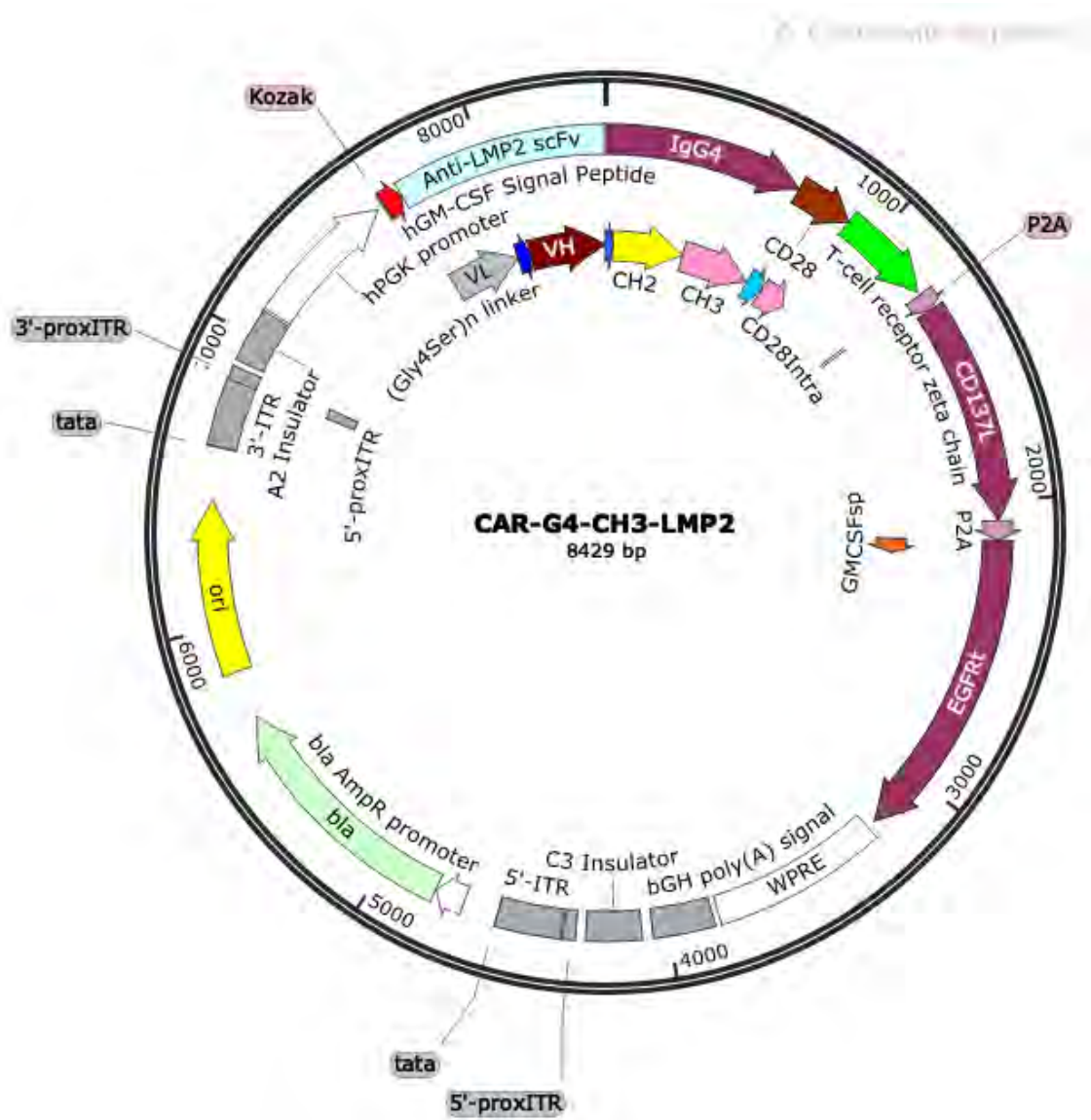
- Doherty, P.C. and Zinkernagel, R.M. 1975. A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet*. 1406–1409.
- Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M. 1964. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*. 1: 702–703.
- Garrido, F., Apatsiauri, N., Doorduyn, E.M., Garcia Lora, A.M. and van Hall, T. 2016. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*. 39: 44–51.
- Gross, G., Waks, T. and Eshhar, Z. 1989. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86: 10024–10028.
- Heussinger, N., Buttner, M., Ott, G., Brachtel, E., Pilch, B.Z., Kremmer, E. and Niedobitek, G. 2004. Expression of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Pathology*. 203: 696–699.
- Jin, Z., Maiti, S., Huls, H., Singh, H., Olivares, S., Mátés, L., Izsvák, Z., Ivics, Z., Lee, D.A., Champlin, R.E. and Cooper, L.J.N. 2001. The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor. *Gene Therapy*. 18: 849–856.
- June, C.H., O'Connor, R.S., Kawalekar, O.U., Ghassemi, S. and Milone, M.C. 2018. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 359(6382): 1361–1365.
- Krause, A., Guo, H.F., Latouche, J.B., Tan, C., Cheung, N.K.V. and Sadelain, M. 1998. Antigen-dependent CD28 Signaling Selectively Enhances Survival and Proliferation in Genetically Modified Activated Human Primary T Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 188(4): 619–626.
- Kuwana, Y., Asakura, Y., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Itoh, S., Nagase, F. and Kurosawa Y. 1987. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 149(3): 960–968.

- Maher, J., Brentjens, J.R., Gunset, G., Rivière, I. and Sadelain, M. 2002. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR $\zeta$ /CD28 receptor. *Nature Biotechnology*. 20: 70–75.
- Maude, S.L., Frey, N., Shaw, P.A., Aplenc, R., Barrett, D.M., Bunin, N.J., Chew, A., Gonzalez, V.E., Zheng, Z., Lacey, S.F., Mahnke, Y.D., Melenhorst, J.J., Rheeingold, S.R., Shen, A., Teachey, D.T., Levine, B.L., June, C.H., Porter, D.L. and Grupp S.A. 2014. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 371(16): 1507–1517.
- Niedobitek, G., Young, L.S., Sam, C.K., Brooks, L., Prasad, U. and Rickinson, A.B. 1992. Expression of Epstein–Barr virus genes and of lymphocytes activation molecule in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas. *American Journal of Pathology*. 140: 879–887.
- Petersson, F. 2015. Nasopharyngeal carcinoma: A review. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 32(1): 54–73.
- Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A. and June, C.H. 2011. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 365(8): 725–733.
- Ramirez, L.Y., Huestis, S.E., Yap, T.Y., Zyzanski, S., Drotar, D. and Kodish, E. 2009. Potential chemotherapy side effects. *Pediatric Blood & Cancer*. 4: 497–502.
- Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S. and McBride, W.H. 2003. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *The Lancet Oncology*. 9: 529–536.
- Renier, J.B., Latouche, J.B., Santos, E., Marti, F., Gong, M.C., Lyddane, C., King, P.D., Larson, S., Weiss, M. Rivière, I. and Sadelain, M. 2003. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nature Medicine*. 9(3): 279–286.
- Young, L.S. and Rickinson, A.B. 2004. Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer*. 4: 757–768.

- Young, L.S., Yap, L.F. And Murray, P.G. 2016. Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nature Reviews Cancer*. 16: 789–802.
- Xu, T., Tang, J., Gu, M., Liu, L., Wei, W. and Yang, H. 2013. Recurrent nasopharyngeal carcinoma: a clinical dilemma and challenge. *Current Oncology*. 20(5): 406–419.
- Zhan, C.W., Lan, Z.D. and Shen, L.K. 1989. Long-term observation after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma (NPC). *International Journal of Radiation Oncology\*Biological\*Physics*. 16(2): 311–314.
- Zhang, L., Chen, Q.Y., Liu, H., Tang, L.Q. and Mai, H.Q. 2013. Emerging treatment options for nasopharyngeal carcinoma. *Drug Design, Development and Therapy*. 7: 37–52.
- Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenic and semiallogeneic system. *Nature*. 248: 701–702.

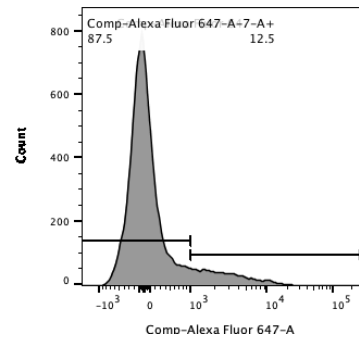
ภาคผนวก

ภาพที่ 1 โครงสร้างพลาสมิด LMP2-specific CAR

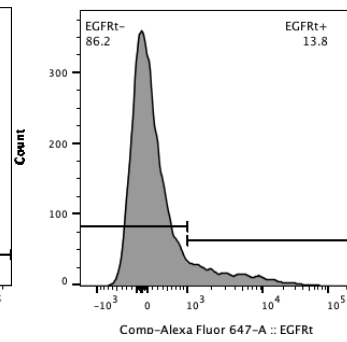


ภาพที่ 2 การแสดงออกของตัวรับลูคัสในเวลา 42 วัน

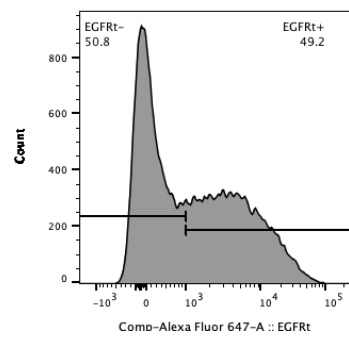
วันที่ 1



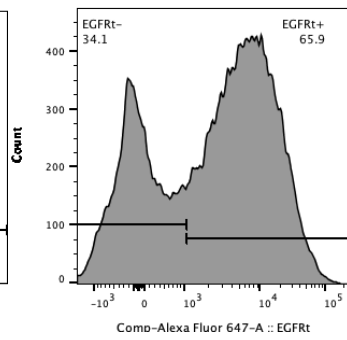
วันที่ 7



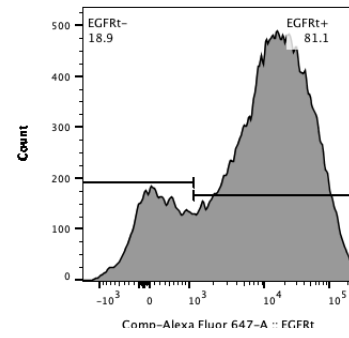
วันที่ 14



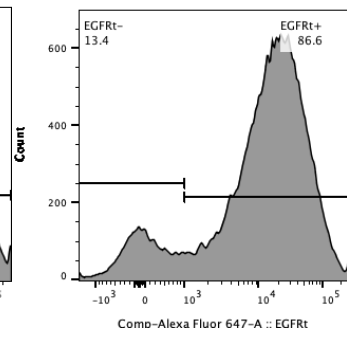
วันที่ 21



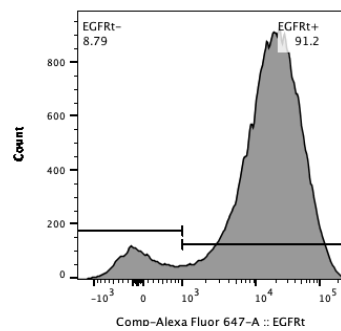
วันที่ 28



วันที่ 35



วันที่ 42



ภาพที่ 3 อัตราส่วนที่เซลล์ชนิด CD4 และ CD8 ในระยะเวลา 42 วัน

