รายงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาเชิงเปรียบเทียบลักษณะกายภาพและชีววิทยาโมเลกุลของเซลล์ต้นกำเนิด ที่สร้างจากตัวอ่อนและเซลล์ร่างกายเพื่อนำไปใช้ทางคลินิก

Comparative studies of anatomical and biomolecular levels of human stem cell derived from embryo and somatic cells for clinical application

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๖

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์นายแพทย์กำธร พฤกษานานนท์

ดร.รัฐจักร รังสิวิวัฒน์

นางสาวปราณี นำชัยศรีค้า

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพ.นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา

ศาสตราจารย์กิตติคุณนายแพทย์ประมวล วีรุตมเสน

หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัย เรื่อง "การศึกษาเชิงเปรียบเทียบลักษณะกายภาพและชีววิทยาโมเลกุลของเซลล์ต้นกำเนิด ที่สร้างจากตัวอ่อนและเซลล์ร่างกายเพื่อการนำไปใช้ในทางคลินิก" เป็นโครงการซึ่งได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี ๒๕๕๖ เพื่อต่อยอดการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน

ในขั้นตอนของการดำเนินโครงการวิจัยต่อเนื่องนี้ คณะผู้วิจัยได้รับสนับสนุนอย่างดียิ่ง ทำให้อุปสรรคต่างๆ ได้รับการแก้ไขและนำไปสู่ผลสำเร็จ ซึ่งขอขอบพระคุณ

ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล อธิการบดี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพุ รองอธิการบดี ด้านวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์นายแพทย์โศภณ นภาธร คณบดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์นายแพทย์ยาใจ ณ สงขลา อดีตคณบดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตลอดจนคณาจารย์จากสถาบันในต่างประเทศที่ช่วยสนับสนุนในการพัฒนาเทคโนโลยี

Professor Outi Hovatta, Karolinska Institute, Sweden
Professor András Dinnyés, Hungary
Professor Shinichi Nishikawa, Deputy Director of RIKEN Center for Developmental Biology and Group Director of the laboratory for Stem Cell, Japan
Professor Shin Kawamata, RIKEN Center for Developmental Biology, Japan
Dr. Doug Sipp, RIKEN Center for Developmental Biology, Japan

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงมนตกานต์ ตันสถิตย์ รองหัวหน้าภาควิชาฝ่ายบริหาร หัวหน้าหน่วย embryology ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บุคลากรหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ช่วยสนับสนุนทางเทคนิค

ท้ายที่สุดนี้งานวิจัยคงไม่สามารถสำเร็จลงได้หากปราศจากความช่วยเหลือของ คุณเสาวรัตน์ โพธิ์ประดิษฐ์ ซึ่งช่วยบริหารจัดการงบประมาณวิจัย และจัดเตรียม ต้นฉบับรายงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัย
กรกฎาคม ๒๕๕๗

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ (induced pluripotent stem cells; iPSCs) สามารถสร้างได้ จากการเหนี่ยวนำเซลล์ชนิดต่างๆของร่างกาย เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถแบ่งตัว ได้อย่างไม่จำกัด เมื่อเลี้ยงอยู่ในสภาวะ ที่เหมาะสม ในห้องปฏิบัติการ และ ยังสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ในร่างกายได้ทุกชนิด ดังนั้น เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำจึงเป็นเซลล์ที่มีลักษณะทางกายภาพ และ ชีววิทยาโมเลกุล ใกล้เคียง กับเซลล์ต้น กำเนิดที่แยกจากตัวอ่อน (embryonic stem cells; ESCs) ด้วยความสามารถดังกล่าว จึงมีความ พยายามในการศึกษา เพื่อจุดประสงค์ในการนำเซลล์ต้นกำเนิดทั้งจากตัวอ่อน และ จากการเหนี่ยวนำเซลล์ร่างกาย มาประยุกต์ใช้ ในทาง การแพทย์ เช่น การรักษาด้วยเซลล์ การทดสอบยา หรือ สารออกฤทธิ์ทางยา

ได้มีการรายงาน ถึงชนิดเซลล์ร่างกายที่นำมาใช้ในการเหนี่ยวนำ พบว่า สามารถใช้เซลล์ร่างกาย หลายชนิดไม่ว่าจะเป็น เซลล์ไฟโบรบลาส เซลล์จากเลือด หรือแม้แต่เซลล์ที่คัดแยกจากปัสสาวะ วิธีในการเหนี่ยวนำ ทำได้โดยใช้วิธีนำ ยีนจากภายนอก เช่น OCT-3/4, SOX2, Klf4 และ c-Myc เข้าสู่เซลล์ร่างกายโดยการใช้ไวรัส โปรตีน หรือ microRNA อย่างไรก็ดี ในการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้เซลล์ไฟโบรบลาส ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของแผลเป็น ที่เกิดจาก การผ่าตัดคลอด เนื่องจากง่ายต่อการจัดการ และยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน นอกจากนั้นคณะผู้วิจัยได้เลือกใช้ Sendai virus สายพันธุ์ TS7 ซึ่งเป็น RNA virus สายพันธุ์ที่มีความไวต่ออุณหภูมิที่สูง เป็นพาหะในการนำยีน จาก ภายนอกเข้าสู่เซลล์

คณะผู้วิจัยสามารถแยกเซลล์ไฟโบรบลาส จากเนื้อเยื่อแผลเป็น ที่เกิดจากการผ่าตัดคลอด จากชิ้นเนื้อ 4 ตัวอย่าง เมื่อทำการทดสอบ พบว่า เซลล์ที่แยกได้มีลักษณะทางกายภาพเป็นเซลล์ไฟโบรบลาส แสดงคุณสมบัติคล้ายกับ เซลล์ ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme เมื่อทำการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดพบว่า สามารถสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำได้มากกว่า 20 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิด จากการ เหนี่ยวนำที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียสต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน และทำการพิสูจน์การคงอยู่ของ Sendai virus พบว่าตรวจไม่พบการคงอยู่ของ Sendai virus ใน ระดับโปรตีน เมื่อทำการพิสูจน์คุณสมบัติ ของเซลล์ต้นกำเนิด ที่สร้างได้พบว่า เซลล์มีการแสดงออกของ pluripotent markers คือ OCT-3/4 และเมื่อทดสอบในระดับยีน พบว่ามีการแสดงออกของยีน *OCT-4, SOX2, NANOG, REX1, UTF* เมื่อทำการเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ พบว่า เซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อในร่างกาย

จากการการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า คณะผู้วิจัย สามารถสร้างเซลล์ต้นกำเนิด ด้วยการเหนี่ยวนำเซลล์ ไฟโบรบลาส ที่แยกจาก เนื้อเยื่อแผลเป็น ที่เกิดจากการผ่าตัดคลอด โดยใช้ Sendai virus

Derivation of human induced pluripotent stem cells from caesarean scar-derived fibroblasts

Abstract

The two major characteristics of induced pluripotent stem cells (iPSCs) are self-renewal and differentiation ability. The iPSCs share the similarity of phenotypes and molecular biology to the embryonic stem cells (ESCs). The application of iPSCs for medical and pharmaceutical purposes is progressively studied. It has been previously reported that several types of the somatic cells including fibroblasts, blood cells or cells that isolated from the urine can be used for generating the iPSCs. The introduction of exogenous genes, OCT-4, SOX2, Klf4 and c-Myc into the somatic cells can be managed through viruses, protein or microRNA. In the present study, we used cesarean scar-derived fibroblasts and Sendai virus temperature sensitive strain (TS7) carrying OCT-3/4, SOX2, Klf4 and c-Myc for generation of human iPSCs.

We isolated four fibroblast cell lines from four samples of cesarean tissues. Fibroblast cells exhibited the characteristic of mesenchymal stem cells. We enable to generate more than 20 hiPSC lines under feeder dependent conditions. After incubation of newly generated hiPSCs at 38.5 C for 5 days, it was unable to detect Sendai virus at the protein level. The results of characterization demonstrated that hiPSCs expressed protein markers, OCT-3/4, and pluripotent genes including, *OCT-3/4, SOX2, NANOG, REX1, UTF*. The *in vitro* differentiation test showed that hiPSCs enable to differentiate into three embryonic germ layers.

We demonstrated that fibroblasts derived from cesarean scar can be used for reprogramming. Temperature sensitive Sendai virus can be efficiently used for introducing the exogenous genes into the somatic cells.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	๑
บทคัดย่อภาษาไทย	๒
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	๓
สารบัญเรื่อง	๔
สารบัญภาพ	๕
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	๖
บทนำ (Introduction)	๗
เนื้อเรื่อง (Main Body)	
ขั้นตอนและวิธีดำเนินงาน (Materials & Methods)	๘
ผลการวิจัย	๑๑
อภิปรายผลการวิจัย	๑๗
สรุป	๑๙
บรรณานุกรม(Bibliography)	๑๙
ภาคผนวก(Appendix)	๒๒
ประวัตินักวิจัยและคณะ	๒๙

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ ๑ การแยกเซลล์ไฟโบรบลาสจากแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด ๑๑

ภาพที่ ๒ การทดสอบการแสดงออกของ markers ต่างๆของเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกได้จากแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด ๑๒

ภาพที่ ๓ การเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการใช้ Sendai virus ๑๓

ภาพที่ ๔ การตรวจสอบการคงอยู่ของSendai virus ในเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs ๑๔

ภาพที่ ๕ การแสดงออกของ Transcriptional factor OCT-3/4 ..... ๑๕

ภาพที่ ๖ การตรวจสอบแสดงออกของ pluripotent genes ๑๖

ภาพที่ ๗ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ ๑๗

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

iPSCs	induced pluripotent stem cells
ESCs	embryonic stem cells
DNA	deoxyribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
PBS	phosphase buffer saline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxide
PFA	paraformaldehyde
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
PE	phycoerythrin-E
KSR	Knockout serum replacement
bFGF	basic fibroblast growth factors
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EB	embryoid body
AFP	alfa-fetoprotein

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบัน เซลล์ต้นกำเนิด (Stem Cells) เป็นกลุ่มเซลล์ที่ได้รับความสนใจจากแพทย์ นักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ และ ประชาชนทั่วไปเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เพราะเซลล์ต้นกำเนิดมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ การแบ่งตัวอย่างไม่มีขีดจำกัด เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม เซลล์ต้นกำเนิดสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ เช่น เซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ หรือ เซลล์ที่สร้างเซลล์เม็ดสีในชั้น เรตินาของตา[1-4] ด้วยลักษณะพิเศษดังกล่าว ทำให้มีความคาดหวังในการที่จะนำเซลล์ต้นกำเนิดมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากสภาวะเสื่อมของอวัยวะ หรือของเซลล์ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการประยุกต์ใช้เซลล์ต้นกำเนิดในการรักษาที่เป็นที่ยอมรับในทางการแพทย์ และประสบความสำเร็จนั้น มีเพียงการรักษาโรคในระบบเลือด ซึ่งใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากไขกระดูก ส่วนการรักษาสภาวะเสื่อมของเซลล์ หรือ โรคอื่นๆโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดนั้น ยังอยู่ในขั้นตอนของการศึกษาและวิจัย[5-8]

โดยทั่วไปแล้วเซลล์ต้นกำเนิดนั้นมีหลายชนิด ขึ้นอยู่กับแหล่งที่แยกเซลล์ต้นกำเนิดออกมาได้ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก หรือ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อของฟัน [9] เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อของตาชั้น limbus หรือ cornea[10] ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้แยกมาจากเนื้อเยื่อของอวัยวะที่ได้รับการพัฒนาเต็มที่แล้ว การแบ่งตัวของเซลล์ต้นกำเนิดเมื่อนำมาเลี้ยงในห้องทดลองก่อนการปลูกถ่ายกลับเข้าสู่ผู้ป่วยจึงมีขีดจำกัด และมีความสามารถในการถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะได้น้อยกว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกได้จากตัวอ่อนในระยะก่อนการฝังตัว หรือที่เรียกว่า เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (embryonic stem cells; ESCs) เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนนี้ เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหนือกว่าเซลล์ต้นกำเนิด จากแหล่งอื่นๆ เพราะสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้ทุกชนิดของเซลล์ในร่างกายมนุษย์[11-14] ดังนั้น นักวิจัยจึงพยายามศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมาใช้ในการรักษาผู้ป่วย อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดที่สำคัญสองประการของการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมาใช้ในทางคลินิกก็คือ การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน จำเป็นต้องแยกกลุ่มเซลล์ออกมาจากตัวอ่อน ซึ่งในภาคสังคมเข้าใจว่าเป็นการทำลายตัวอ่อน และเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนนี้ จะมีลักษณะทางพันธุกรรมไม่ตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่จะได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด ดังนั้นเมื่อผู้ป่วยได้รับการปลูกถ่ายเซลล์จากเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน อาจจะเกิดปัญหาของการต่อต้านเซลล์ที่ปลูกถ่ายเข้าไปจากระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย[15]

จากความสำเร็จในการวิจัยของนักวิจัยชาวญี่ปุ่นที่สามารถสร้างเซลล์ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนโดยใช้เซลล์ผิดหนังของหนูและคนโดยเรียกเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ(induced pluripotent stem cells; iPScs)[16-17] ถือเป็นการค้นพบที่จุดประกายให้แพทย์ นักวิทยาศาสตร์ และนักวิจัยทั่วโลกมีความหวังในการประยุกต์ใช้เซลล์ต้นกำเนิดในการรักษาโรคต่างๆที่เกิดจากสภาวะเสื่อมของเซลล์ในร่างกายของผู้ป่วยเอง ดังนั้น ปัญหาการต่อต้านเซลล์ต้นกำเนิดนี้โดยระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย จึงน่าจะไม่เกิดขึ้นหลังจากปลูกถ่ายเข้าสู่ร่างกายของผู้ป่วย จึงน่าจะไม่เกิดขึ้นหลังจากการปลูกถ่ายเข้าสู่ร่างกายของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการค้นพบองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ ยังไม่สามารถพิสูจน์ถึงความปลอดภัยในการนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มารักษาผู้ป่วยเพราะเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำนี้ส่วนใหญ่สร้างได้จากการใช้ไวรัสเป็นตัวพายีนเข้าสู่เซลล์ร่างกายและเปลี่ยนเซลล์ร่างกายให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และมีลักษณะที่คล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน[17-20] ซึ่งการใช้ไวรัสนี้อาจเป็นอันตรายเมื่อนำเซลล์ที่สร้างได้ไปรักษาผู้ป่วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำที่ปลอดภัยต่อการนำมาใช้

ปัจจุบันพบว่าสามารถสร้าง เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำด้วยวิธีอื่นที่ไม่ต้องใช้ไวรัส โดยการใช้สารเคมี โปรตีน, microRNA, non-integrating episomal vectors, piggyBac transposon [21,22] แต่ประสิทธิภาพยังค่อนข้างต่ำ และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง Ban และคณะ (2011)[23] ได้นำเสนอทางเลือกในการใช้ Sendai virus TS7 ในการพายีนเข้าสู่ เซลล์ และเมื่อเซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดแล้ว สามารถทำลาย Sendai virus ได้โดยการใช้อุณหภูมิที่สูงเกิน 38 องศาเซลเซียส เพราะไวรัสสายพันธุ์นี้ไม่ทนต่อสภาพอุณหภูมิสูง

นอกเหนือจากต้องพิจารณา ถึงวิธีการที่จะนำยีนจากภายนอกเข้าไปสู่เซลล์ร่างกายเพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน เช่น Oct-3/4, Sox2, Nanog ซึ่งเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดแล้ว ชนิดของเซลล์ร่างกายที่นำมาเหนี่ยวนำ ก็มีผลต่อประสิทธิภาพ และ ความสำเร็จของการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ เซลล์ร่างกายหลายชนิด เช่น เซลล์ไฟโบรบลาส เซลล์ CD34+ หรือ เซลล์ ที่แยกได้จากอวัยวะภายในร่างกาย ก็สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ และยังสามารถเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะได้ อย่างไรก็ตาม จากผลงานวิจัย ส่วนใหญ่เลือกใช้เซลล์ไฟโบรบลาส ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อ หรือ อวัยวะต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจาก กระบวนการแยกเซลล์ไฟโบรบลาสสามารถทำได้ง่าย เซลล์สามารถเจริญเติบโต และแบ่งตัวในน้ำยาเลี้ยงที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อน และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดเหนี่ยวนำนี้ ด้วย วิธีต่างๆ เช่น การลดความเข้มข้นของซีรั่มที่เป็นส่วนประกอบของน้ำยาเลี้ยง เพื่อกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0 ก่อนทำการเหนี่ยวนำ หรือ การเติม histone deacethylation inhibitor [24].

ดังนั้น ในการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้เซลล์ไฟโบรบลาส ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อแผลเป็น ที่เกิดจากการผ่าตัดคลอด และใช้ Sendai virus temperature sensitive strain (TS) 7 ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดชนิดเหนี่ยวนำ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ สร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกได้จากแผลเป็นที่เกิดจากการผ่าตัดคลอด และใช้ Sendai virus เป็นพาหะในการนำ exogenous genes เข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาส

วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย เป็นการดำเนินการวิจัยแบบทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ ด้วยวิธีที่ปลอดภัย เพราะเป็น non-integrating method เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการสร้าง เซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเพื่อการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ในอนาคต

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย

การแยกและเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสจากแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด (Isolation and culture of fibroblast cells derived from human caesarean scar)

ชิ้นเนื้อแผลเป็นได้มาจากชิ้นเนื้อแผลเป็นที่ตัดออกระหว่างขั้นตอนการผ่าตัดคลอด โดยได้รับความยินยอมจากคนไข้ และได้รับพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เก็บชิ้นเนื้อผิวหนังจากหน้าท้อง บริเวณที่เป็นแผลเป็น (caesarean scar) จากหญิงตั้งครรภ์ที่เข้ารับการผ่าตัดทำคลอด แช่ชิ้นเนื้อใน phosphase buffer saline (PBS) ที่เติมยาปฏิชีวนะ (penicillin ขนาด 100

IU/ml และ streptomycin ขนาด 100 ug/ml) แล้วส่งไปยังห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิด แยกและเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส โดยวิธีที่รายงาน โดย Pruksananonda และคณะ(2009)[25] ล้างชิ้นเนื้อจำนวน 5 ครั้ง ด้วย PBS ที่เติมยาปฏิชีวนะ ตัดชั้นไขมันและแยกชั้น edidermis ออกจากเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆภายใต้กล้องสเตอริโอ (stereomicroscope) ตัดชิ้น dermis ให้ได้ขนาด 1-2 ตร.ซม. นำชิ้นเนื้อที่ตัดได้ วางบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มม. ปล่อยชิ้นเนื้ออยู่ภายในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 5-10 นาทีใน biosafety carbinet เติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส (DMEM high glucose, 10% fetal bovine serum, 1% Glutmax, 1% non-essential amino acid, 1% antibiotic) จำนวน 1 มล. หรือเพียงแค่ให้ท่วมชิ้นเนื้อ ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีชิ้นเนื้อติดอยู่ เลี้ยงในตู้เพาะบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C 5% CO2 นาน 24 ชม. หลังจากครบ 24 ชม. เติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสปริมาณ 1-2 มล. ลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีชิ้นเนื้อ และเลี้ยงในตู้เพาะบ่มเซลล์ต่อเนื่องอีกประมาณ 7-10 วัน เซลล์ไฟโบรบลาสจะเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อ ทำการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสโดยวิธีมาตรฐาน โดยใช้ TrypLE select และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เลี้ยงเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. เมื่อเซลล์เจริญ และเพิ่มจำนวน ประมาณ 80-90% confluent จึงทำการเก็บเซลล์เพื่อแช่แข็ง

การแช่แข็งเซลล์ไฟโบรบลาส (Freezing of fibroblasts)

เมื่อเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเจริญ และเพิ่มจำนวน ประมาณ 80-90% confluent ก็ทำการ trypsinized เซลล์ ด้วยการเติม TrypLE select 1 มล. สำหรับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม . (4 มล. สำหรับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มม.) เก็บที่ 37 °C 5% CO_2 เป็นเวลา 5 นาที แล้วตรวจดูการหลุดจากการเกาะของเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ดูดสารละลายพร้อมเซลล์ ใส่ใน conical tube ขนาด 15 มล. และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอา supernatant ทิ้ง resuspend เซลล์ด้วย น้ำยาแช่แข็งเซลล์ ที่มีส่วนประกอบของ dimethylsulfoxide (DMSO) 10% และน้ำยาเลี้ยงไฟโบรบลาส 80 % และ fetal bovine serum 10% เซลล์ไฟโบรบลาสจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิลบ 196 °C ในไนโตรเจนเหลว

การละลายเซลล์ไฟโบรบลาสที่ถูกแช่แข็ง (Thawing of fibroblasts)

นำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาละลายทันทีที่ 37 °C ดูดเซลล์ที่ละลายแล้วใส่ใน conical tube ขนาด 15 มล. และเติมน้ำยา DMEM+10 % fetal bovine serum ทีละหยด จนกระทั่งถึง 5 มล. นำไป centrifugeที่ 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอา supernatant ทิ้ง resuspend เซลล์ แล้วเติม DMEM+10 % fetal bovine serum 5 มล. แล้วนำมาเลี้ยงใน จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. นำไปเก็บเข้าตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ตั้งอุณหภูมิ 37 °C 5% CO_2 หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดทิ้งและเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำยา DMEM+10% fetal bovine serum เลี้ยงเซลล์จนกระทั่ง confluent แล้วเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การทดสอบความเป็น multipotency ของเซลล์ไฟโบรบลาส (Multipotency test of fibroblasts)

ทดสอบการแสดงออกของ surface markers โดยการย้อมสีทางอิมมูโน เลือกใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท Millipore เพื่อตรวจสอบหาการแสดงของโปรตีน ที่เกี่ยวข้องกับการเป็น mesenchymal stem cells ทำการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสบนจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม (four-well dish) เมื่อเซลล์เจริญจนมี confluent ประมาณ 80-90% ทำการ fix เซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างออกด้วย PBS ทำการ permeabillize ผิวของเซลล์ด้วย 0.2% TritonX-100 block เซลล์ด้วย 5% goat serum หรือ 5% rabbit serum เจือจางใน PBS โดยทำการ block non-specific antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการ incubate เซลล์กับ primary antibodies ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้น ล้าง primary antibodies ที่ conjugate กับ fluorescein isothiocyanate (FITC) หรือ phycoerythrin-E(PE) และสัมพันธ์กับ primary

antibodies ที่เลือกไว้จากนั้นล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBS และย้อมสีนิวเคลียสด้วย DAPI ตรวจสอบการแสดงออกของ markers ต่างๆด้วย กล้องที่มี fluorescence

การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาส

ย้ายฝาก Factors ทั้ง 4 ชนิดได้แก่ Oct 3/4, Sox2, Klf4 และ c-Myc เข้าสู่เซลล์ที่แยกได้จากเซลล์ไฟโบรบลาส ด้วยวิธีที่เคยรายงานโดย Ban และ คณะ (2011)[23] โดยการใช้ Sendai virus แทนการใช้retrovirus หรือ lenti virus เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสจำนวน 8 x10^5 เซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. ทำการย้ายฝากยีนด้วยการเติม virus vectors ที่มี Factor ทั้ง 4 ชนิด เลี้ยงเซลล์กับ vector ทำการ trypsinize เซลล์ 5 วันหลังจากเลี้ยงร่วมกับ vector แล้ว seed เซลล์ในลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. ที่มีเซลล์พี่เลี้ยงที่แยกได้จาก human foreskin ในน้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ที่เติม bFGF 8 ng/ml ทำการเปลี่ยนน้ำยา วันเว้นวัน ทำการแยกโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ประมาณ 21-30 วัน หลังจากที่เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสร่วมกับ Sendai virus ลงเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนถึง passage ที่ 2 ทำการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำที่สร้างได้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 38.5 องศาเซลเซียส 5% CO_2 ติดต่อกันเป็นเวลา 5-7 วัน ก่อนที่จะนำกลับมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C 5% CO_2

การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ

โครงการวิจัยนี้จะใช้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน สายพันธุ์ chula2.hES ที่สร้างโดยคณะผู้วิจัย และเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์เลือดจากสายสะดือที่ได้รับการสนับสนุนจากศาสตราจารย์ Shinichi Nishikawa (CDB, RIKEN ประเทศญี่ปุ่น) เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมและใช้เปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้ใหม่ วิธีการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดจะใช้วิธีเดียวกันคือการเลี้ยงโดยมีเซลล์พี่เลี้ยง จะใช้ human foreskin fibroblast เลี้ยงในน้ำยาที่ประกอบด้วย Knockout DMEM (Invitrogen) เติมด้วย 20% Knockout serum replacement (KSR), 0.55 mM 2-mercaptoethanol, 1% non-essential amino acid, 1% penicillin-streptpmycin, 1% Glutamax และ 8 ng/ml bFGF (ทั้งหมดจากบริษัท Invitrogen ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกวันและทำการ passage เซลล์ทุกๆ 5-7 วัน ด้วยการตัดโคโลนีเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยเข็มเบอร์ 23G และเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมใหม่

การพิสูจน์คุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของ human iPSCs (Characterization of induced pluripotent stem cells)

วิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ ในระดับ ยีน ด้วย การแสดงออกของ pluripotent genes ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction ทำการสกัด total RNA จากเซลล์โดยสกัด RNA สำเร็จรูป GeneJet (Fermentus, ThermoFisher Scientific Inc, Germany) สังเคราะห์ cDNA ด้วย ชุดสำเร็จรูปของ Fermentus ทำPCR โดยใช้ primers สำหรับ endogenous pluripotent genes ดังที่เคยมีการรายงานมาก่อน ตรวจหาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี gel electrophoresis

วิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ ในระดับโปรตีน ด้วยการแสดงออกของ pluripotent markers โดยใช้วิธี immunocytochemistry ตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent markers ในช่วงแรก ทำการตรวจสอบหา transcriptional factor Oct-3/4 ซึ่งเป็น markers ที่สำคัญของ undifferentiated human pluripotent stem cells วิธีการ fix, permeabilization, blocking และการย้อม primary, secondary antibodies ดำเนินการคล้ายกับที่ได้อธิบายไว้ในส่วนของการทดสอบความเป็น multipotency ของเซลล์ไฟโบรบลาส

การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะภายในจานเพาะเลี้ยงเซลล์

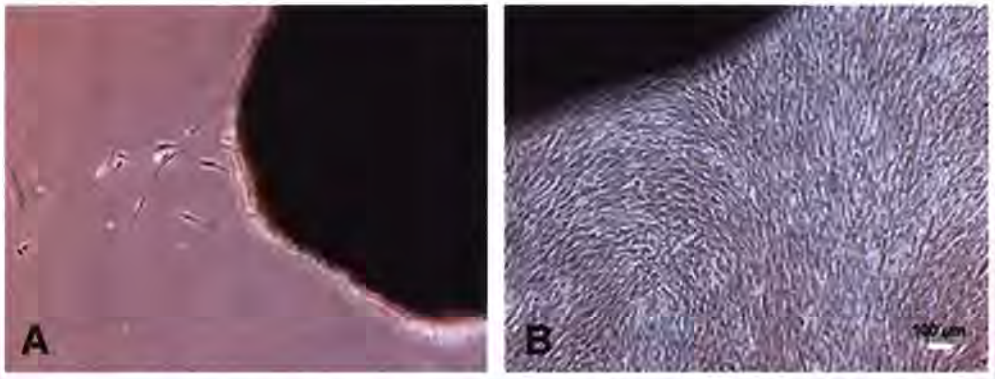
ทำการเก็บเซลล์ด้วยการใช้ collaginase type IV (Invitrogen) และเลี้ยงกลุ่มของเซลล์แบบแขวนลอย (suspension culture)ในจานเพาะเลี้ยงที่ป้องกันการเกาะติดของพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยง เลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเลี้ยง human iPSCs ที่ไม่มี bFGF หลังจากเลี้ยงแบบ suspension เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องอีก 7 วันบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่พื้นผิวของเซลล์ถูกเคลือบด้วยเจลาติน ทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะด้วยการย้อมสีทางอิมมูโนวิทยา ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนที่บ่งชี้ถึงเนื้อเยื่อที่ตรวจพบของตัวอ่อน ได้แก่ ectoderm (nestin) endoderm (alfa-fetoprotein; α- fetoprotein) และ mesoderm (brachyury) ด้วยวิธี immunocytochemistry คล้ายกับที่ได้กล่าวไว้ในส่วนของการทดสอบความเป็น multipotency ของเซลล์ไฟโบรบลาส

ผลการวิจัย

เซลล์ไฟโบรบลาสจากเนื่อเยื้อแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด

คณะผู้วิจัย ได้ รับตัวอย่างชิ้นเนื้อแผลเป็น จำนวนทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง ได้ทำการ แยกและเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส โดยวิธีที่ไม่ซับซ้อน ดังที่คณะผู้วิจัยเคยรายงานมาก่อน[25] คณะผู้วิจัยสามารถแยกเซลล์ไฟโบรบลาสได้

ภาพที่ 1



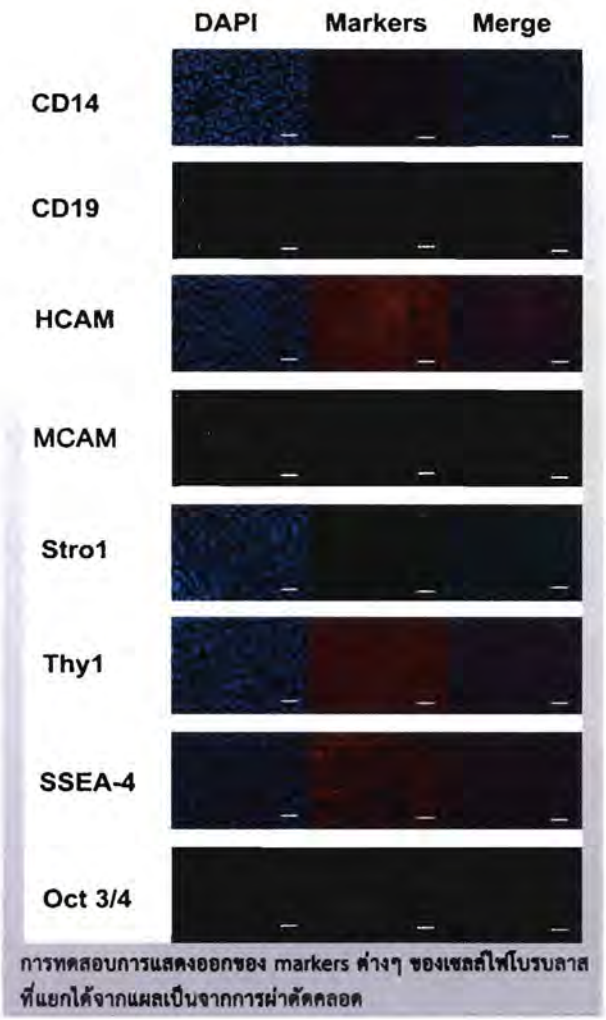
การแยกเซลล์ไฟโบรบลาสจากแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด

ชิ้นเนื้อแผลเป็นที่การแยกเอาชั้น epidermis, connective tissue และไขมันออกแล้ว ตัดแบ่งเอาเฉพาะชิ้นของ dermis ให้มีขนาดประมาณ กว้าง 1 มม. X ยาว 1 มม. X สูง 1 มม. เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์และในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสที่มี fetal bovine surum 10% ปล่อยให้มีการแบ่งเซลล์และพบว่าเซลล์เริ่มเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อ ประมาณ 7 วันหลังจากที่เริ่มแยกและเลี้ยงเซลล์ (A) และเมื่อเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน เซลล์มีการเจริญแบ่งตัวพร้อมที่จะถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ trypsin(B) Scale bar = 100 µm

จากชิ้นเนื้อทั้ง สี่ ตัวอย่าง โดยเซลล์ที่แยกได้มีลักษณะ ยาวรี คล้ายกระสวย (ภาพที่ 1) คณะผู้วิจัยได้ใช้สัญลักษณ์ HS (human scar fibroblasts) แทนเซลล์ไฟโบรบลาสจากเนื้อเยื้อแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด จากการศึกษาเบื้อต้นพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ หลังจากผ่านการแช่แข็ง และละลาย ภายใต้วิธีมาตรฐาน เซลล์ไฟโบรบลาส ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีอัตราการเจริญ และแบ่งตัว ที่ไม่แตกต่างกัน และนอกจากนั้นเซลล์ไฟโบรบลาสยังแสดงคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิด ชนิด มีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells) เมื่อตรวจสอบเบื้องต้นด้วยการย้อมทางอิมมูโน โดยเซลล์ให้ผลบวกต่อ HCAM, Stro1 และ Thy1 และ ผลลบต่อ CD14, CD19 และ MCAM เมื่อทดสอบการแสดงออกของยีน พบว่า เซลล์ไฟ

โบรบลาส มีการแสดงออกของ SSEA-4 และ Oct 3/4 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ คุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2



การทดสอบการแสดงออกของ markers ต่างๆ ของเซลล์ไฟโบรบลาส ที่แยกได้จากแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด

เซลล์ไฟโบรบลาสที่ passage number 4 ถูกทดสอบเบื้องต้นด้วยการแสดงออกของ marker ต่างๆด้วยวิธี immunocytochemistry พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของ HCAM, Stro1 และ Thy1 แต่ไม่มีการแสดงออกของ CD14, CD19 และ MCAM ซึ่งบ่งชี้ถึงคุณสมบัติของการเป็น mesenchymal stem cell อย่างไรก็ตามเซลล์มีการแสดงออกของ SSEA-4 และ Oct ¾ ซึ่งเป็น markers ของเซลล์ต้นกำเนิด หรือ pluripotent markers. Scarle bar=100μm

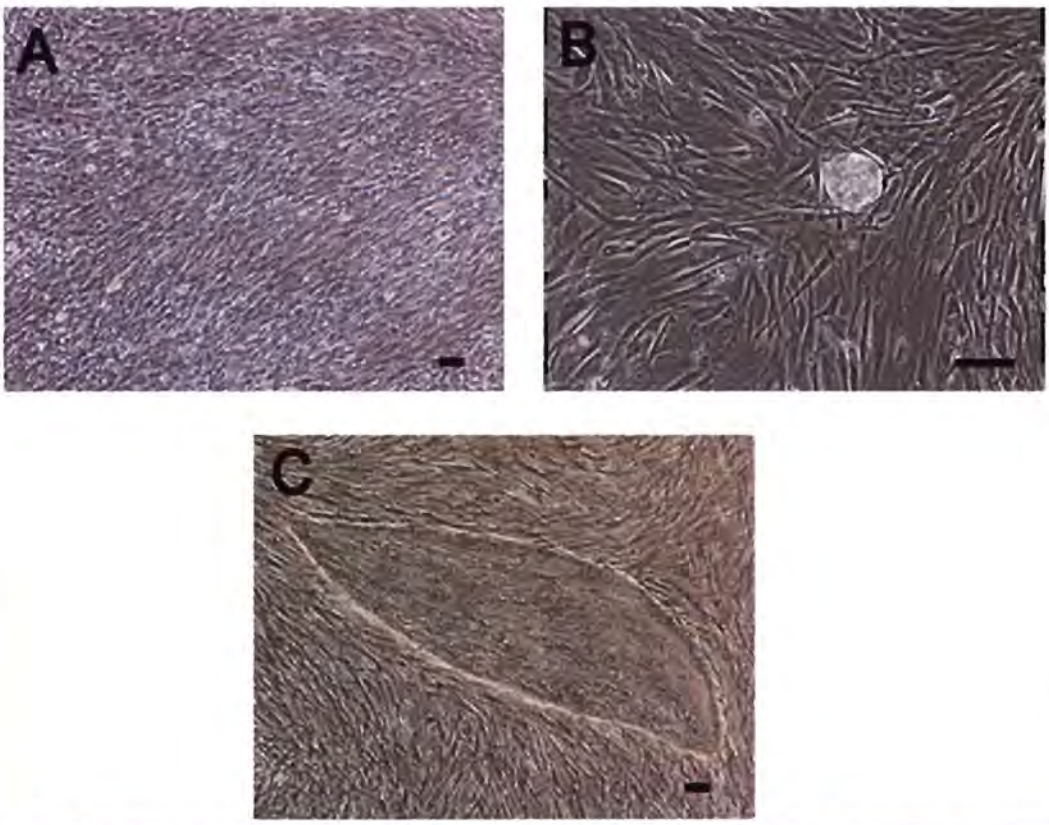
การเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาส ให้กลายเป็น เซลล์ต้นกำเนิดชนิด induced pluripotent stem cells (iPSCs)

คณะผู้วิจัยได้ เหนี่ยวนำให้เซลล์ไฟโบรบลาส สายพันธุ์ HS4 และ HS5 กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดโดยการใช้ Sendai virus TS7 ซึ่งไวรัส นำพา transgenes ที่ประกอบด้วย OCT-3/4, SOX2, Klf4 และ c-Myc เข้าสู่เซลล์ไฟโบรบลาส จากการทดลอง พบว่า ภายใน 7 วันแรกหลังจากที่เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส ร่วมกับ Sendai virus ในน้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส ลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสจะยังคงลักษณะของไฟโบรบลาส ยังไม่

สามารถสังเกตุ การเปลี่ยนแปลงทางรูปร่าง คล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิด ES เซลล์ อย่างไรก็ตาม เซลล์มีการแบ่งตัว และเจริญ จนเต็มแน่นพื้นที่ของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 3A) เมื่อทำการเปลี่ยนสภาพการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาส มาเลี้ยงในสภาพของการเลี้ยงเซลล์ iPSCs พบว่า ประมาณวันที่ 14-20 หลังจากที่เลี้ยงร่วมกับ Sendai virus จะพบกลุ่มของเซลล์ กระจายอยู่ทั่วไปในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 3B)

เมื่อกลุ่มของเซลล์เจริญจนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 200 ไมโครเมตร จึงทำการจัดแยกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยง ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ iPS (ภาพที 3C) ในขั้นตอนนี้ คณะผู้วิจัยได้เริ่มนับ passage number ของเซลล์ iPSCs ว่า passage ที่ 1 หรือ P1 โดย เซลล์ iPSCs ที่สร้างจาก HS4 และเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยง ทั้งหมด 30 clones ใช้รหัสเป็น iPSC HS4 #1,#2,#3 ถึง #30 โดยเซลล์ ทุก clones ถูกแช่แข็งเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว

ภาพที่ 3



การเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดด้วยการใช้ Sendai virus

เซลล์ไฟโบรบลาสจะถูกเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มี Sendai virus ซึ่งมี Yamamaka's factor ซึ่งประกอบด้วย Oct 3/4, Sox2, Klf4 และ c-Myc หลังจากที่เซลล์ไฟโบรบลาสถูก infect ด้วย Sendai virus และเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฟโบร บลาส เซลล์จะมีการแบ่งตัวจนแน่นเต็มพื้นที่ของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (A) เมื่อทำการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ และเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง ในน้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน จะเริ่มพบโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ประมาณวันที่ 14-20 วันหลังจากที่เซลล์ผ่านการ infect ด้วย Sendai virus (B) เมื่อทำการตัดแบ่งและเลี้ยงโคโลนีที่คล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ไปเรื่อยๆ เซลล์จะเริ่มปรับตัว มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมากขึ้น และพร้อมที่จะพิสูจน์คุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด iPSCs (C)

คุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด

หลังจากที่คณะผู้วิจัยได้ทำการแช่แข็ง สายพันธุ์ เซลล์ iPS คณะผู้วิจัย ได้ทำการพิสูจน์คุณสมบัติเบื้องต้นของเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้จากการเหนี่ยวนำ โดยทำการตรวจสอบ การคงอยู่ของ Sendai virus, การตรวจการแสดงออกของ pluripotent markers โดยวิธีการย้อมสีทาง อิมมูโน, การตรวจการแสดงออกของ pluripotent genes โดยวิธี RT-PCR, การทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนแปลง เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ เมื่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* differentiation)

จากการตรวจสอบหา Sendai virus ด้วยการย้อมสีอิมมูโน ตรวจหา antigen ของ Sendai virus พบว่าเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลลเซียส ติดต่อกันเป็นเวลา 5-7 วัน จะไม่มีการตรวจพบ antigen ของไวรัสเลย ซึ่งต่างจากเซลล์ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส สามารถตรวจพบการติดสี ของ antigen ของ Sendai virus (ภาพที่ 4) ผลการทดสอบนี้จึงสามารถยืนยันได้ในเบื้องต้นว่า สายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดชนิด iPSCs ที่สร้างด้วยการใช้ Sendai virus temperature sensitive strain ไม่มีการหลงเหลือของไวรัสหลังจากการเอาไวรัสออกจากเซลล์ โดยทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลลเซียส

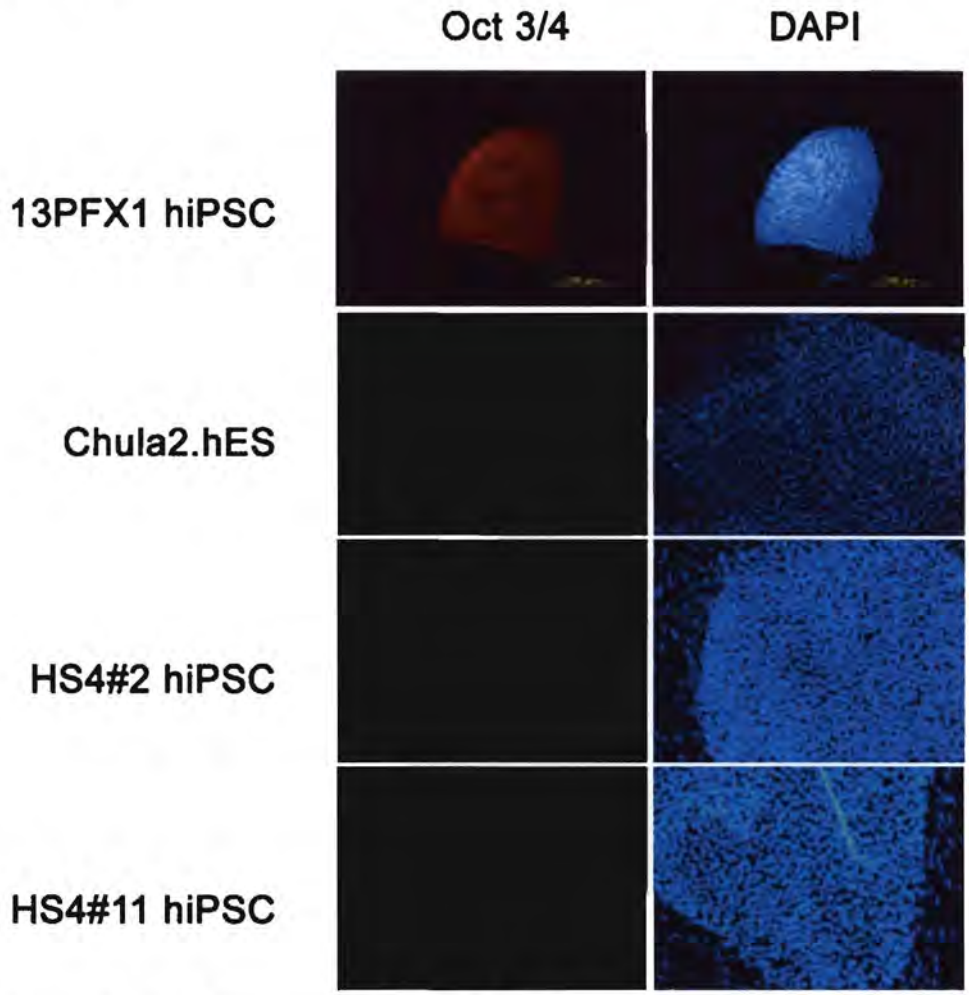
ภาพที่ 4

การตรวจสอบการคงอยู่ของ Sendai virus ในเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs

ทำการตรวจสอบเซลล์ต้นกำเนิดที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วย Sendai virus vectors โดยวิธีการย้อมสีทางอิมมูโน เพื่อตรวจสอบหาแอนติเจนของ Sendai virus ภายในเซลล์ ของเซลล์ต้นกำเนิด iPSC ที่สร้างได้ พบว่า สามารถตรวจพบ แอนติเจนของ Sendai virus ภายในเซลล์ต้นกำเนิด (สีแดง)iPSCs ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส (non-heated treatment) ในขณะที่เซลล์ที่ผ่านการเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส (heated treatment) จะตรวจไม่พบแอนติเจนของ Sendai virus จากรูปทำการย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI

เมื่อทำการตรวจหา pluripotent markers ด้วยการย้อมสีทางอิมมูโน เซลล์มีการแสดงออกของ intracellular marker Oct-3/4 ได้เช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน สายพันธุ์ Chula2.hES และ เซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างจากเซลล์ CD34+ (13PFX1 hiPSC) (ภาพที่ 5)

ภาพที่ 5

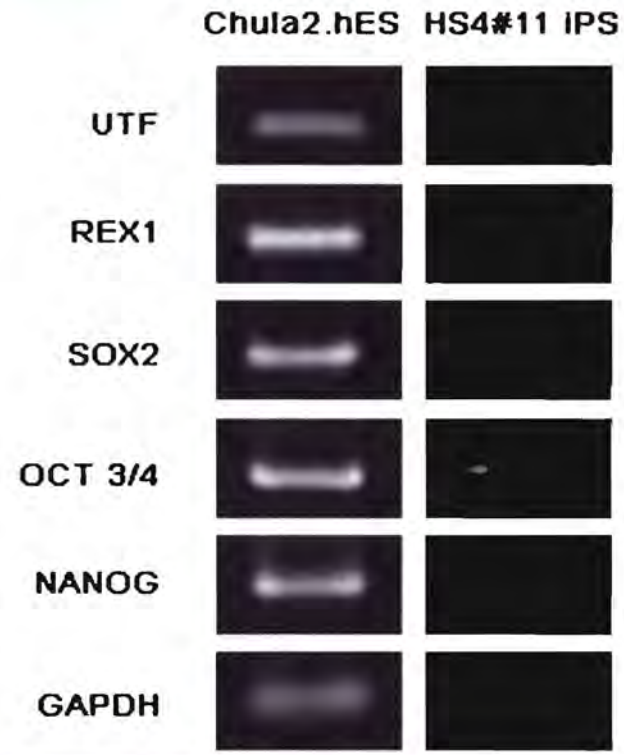


การแสดงออกของ Transcriptional factor OCT-3/4

ตรวจสอบการแสดงออกของ transcriptional factor OCT-3/4 ของเซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกจากแผลเป็นผ่าตัดคลอด คือ สายพันธุ์ HS# 2 hiPSC และ HS4# 11 hiPSC พบว่า มีการแสดงออกของ transcriptional factor OCT-3/4(สีเขียว) เช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน สายพันธุ์ Chula2.hES(สีเขียว)และเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างจากเซลล์ CD34+(13PFX1hiPSC; สีแดง)

ทำการตรวจหา pluripotent genes ด้วย RT-PCR เซลล์มีการแสดงออกของ ยีน OCT-3/4, NANOG, SOX2, REX1, UTF ได้เช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน สายพันธุ์ Chula2.hES (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6

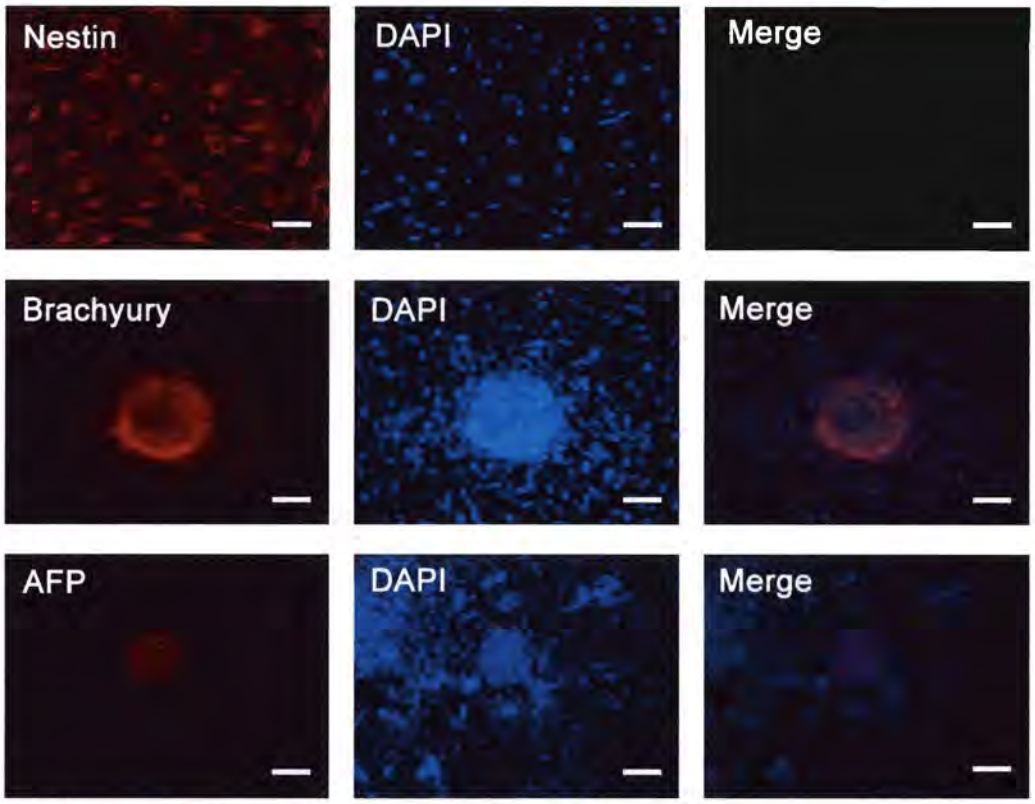


การตรวจสอบแสดงออกของ pluripotent genes

เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของ pluripotent genes ของเซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกจากแผลเป็นผ่าตัด พบว่ามีการแสดงออกของยีน NANOG, OCT 3/4, SOX2, REX1 และ UTF เช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนสายพันธุ์ Chula2.hES

เมื่อทำการให้เซลล์ iPSCs เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ ภายในห้องปฏิบัติการ พบว่าเซลล์ iPSCs มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า embryoid body (EB) และเมื่อเลี้ยง EB ต่อเนื่องอีกสามสัปดาห์ เพื่อปล่อยให้เซลล์ได้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ จากนั้นทำการตรวจสอบหารโปรตีน ในเซลล์พบว่า iPSCs สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ nestin (ectoderm), brachyury (mesoderm) และ APF (endoderm) ดังภาพที่ 7 จึงเป็นการยืนยันได้ว่า เซลล์ iPSCs ที่สร้างได้ มีคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด คล้ายกับที่แยกออกมาจากตัวอ่อน

ภาพที่ 7



การเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ

เมื่อทำการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะภายในห้องทดลองพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบบลาส สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบของ ectoderm(Nestin), mesoderm(Brachyury) endoderm (AFP) ได้ ทำการย้อมสีนิวเคลียสของเซลล์ DAPI Scale bar = 100 μm

อภิปรายผลการวิจัย

หลังจากที่มีการรายงานความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากตัวอ่อนของมนุษย์ และพิสูจน์ให้เห็นว่าเซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าว สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ ที่ทำหน้าที่จำเพาะ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ อวัยวะของมนุษย์ เช่น เซลล์ประสาท เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ หรือ เซลล์ในระบบเลือด [11,26] ทำให้มีความคาดหวังในการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน มาประยุกต์ใช้ ในการรักษาสภาพการเสื่อมของเนื้อเยื่อหรือ อวัยวะของมนุษย์ รวมถึงการค้นคว้า การค้นหายาตัวใหม่ และการทดสอบความเป็นพิษของยาตัวใหม่ๆ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้สร้างมาจาก ตัวอ่อนของมนุษย์ จึงทำให้กลายเป็นข้อโต้แย้งเกี่ยวกับจริยธรรม เพราะมีการทำลายตัวอ่อนของมนุษย์ จนกระทั่งในปี 2007 ได้มีการค้นพบ วิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ร่างกาย ให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มี คุณสมบัติหลายๆอย่าง คล้ายคลึงกับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน [17] จึงทำให้นักวิจัยทั่วโลก ต่างให้ความสนใจในการวิจัยเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ หรือที่เรียกว่า induced pluripotent stem cells (iPSCs) การเหนี่ยวนำเซลล์ร่างกายให้เป็นเซลล์ต้นกำเนิดนั้น สามารถทำได้โดยการเพิ่มการแสดงออก (over expression) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติ pluripotency ของเซลล์ ด้วยวิธีการนำยีนจากภายนอก (exogenous genes) ร่างกายเข้าสู่ DNA ของเซลล์ร่างกาย ยีน หรือ transcription

factors ที่ใช้ ได้แก่ OCT-3/4, NANOG, SOX2 , Klf4, c-Myc, Lin28 [16, 17, 27] ซึ่งวิธีการนำยีนจากภายนอกเข้าสู่ดีเอ็นเอ ของเซลล์ร่างกายสามารถทำได้โดยใช้ retrovirus, letivirus ซึ่งเป็น DNA-virus ที่อาจจะเกิดการ integrate ของ DNAไวรัส เข้าสู่ DNA ของเซลล์ร่างกาย ดังนั้น จึงมีวิธีการอื่นๆที่สามารถใช้ทดแทนการใช้ DNA ไวรัส คือ การใช้โปรตีน mRNA, microRNA, episomal vector และ การใช้ไวรัสในกลุ่ม RNA ไวรัสแต่ละวิธีจึงมีข้อด้อย ข้อดีที่ต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นประสิทธิภาพในการสร้าง เซลล์ต้นกำเนิด จากการเหนี่ยวนำ โดยจะพบว่าประสิทธิภาพของการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำโดยการใช้ virus จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้โปรตีน หรือ RNA [28] เนื่องจาก หนึ่งในจุดมุ่งหมายหลักในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำคือ การนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ ดังนั้น วิธีการในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ ที่สามารถเลี่ยงการใช้ไวรัส โดยเฉพาะไวรัสที่เป็น DNA ไวรัสจึงมีความเหมาะสม โดยทั่วไปแล้วเป็นที่ยอมรับว่า วิธีการใช้โปรตีน mRNA, microRNA หรือ episomal vectors จึงเป็นวิธีการที่น่าจะเป็นทางเลือกที่สำคัญ อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยได้ เลือกการใช้ Sendai virus ซึ่งจัดเป็น RNA virus เนื่องจากมีรายงานที่พิสูจน์แล้วว่าไวรัสชนิดนี้ จะมีการ replicate รหัสพันธุกรรมของไวรัสที่ไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ และไม่เกิดการ integration เข้ากับ DNA ของโฮสต์[23, 29]

การทดลองนี้ คณะผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์ที่แยกได้จาก เนื้อเยื่อแผลเป็นที่ได้จากการผ่าตัดคลอด ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงาน ก่อนหน้า ว่าสามารถแยกเซลล์ไฟโบรบลาสได้ จากแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด และเซลล์ไฟโบรบลาสดังกล่าว แสดงคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิด และสามารถกระตุ้นและเหนี่ยวนำให้ เปลี่ยนเป็นเซลล์ประสาท เซลล์ adipocyte และเซลล์กระดูกอ่อน[30] นอกจากนั้น ยังไม่เคยที่รายงาน ความสำเร็จในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิด จากการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกจากแผลผ่าตัดคลอด จากการทดลองนี้ คณะผู้วิจัยสามารถ แยกเซลล์ ไฟโบรบลาสได้ สี่เซลล์ไลน์ จากตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อแผลเป็นผ่าตัดคลอด สี่ตัวอย่าง ลักษณะทางกายภาพของ เซลล์ไฟโบรบลาส ทั้งสี่ตัวอย่าง มีลักษณะคล้ายกระสวย ไม่แตกต่างกัน เมื่อทำการทดสอบความเป็น mesenchymal stem cells ด้วยการย้อมสีทางอิมมูโน ของเซลล์ไลน์ HS4 พบว่า มีการแสดงออกของ markers ที่สำคัญ ได้แก่ HCAM, Stro1 และ Thy1 แต่ไม่มีการแสดงออกของ CD14, CD19 และ MCAM ซึ่งบ่งชี้ถึงคุณสมบัติของการเป็น mesenchymal stem cells อย่างไรก็ตาม เซลล์มีการแสดงออกของ SSEA-4 และ Oct 3/4 ซึ่งเป็น markers ของเซลล์ต้นกำเนิด หรือ pluripotent markersซึ่ง ผลการทดลองที่ได้ ใกล้เคียงกับการรายงานของ Yang และ คณะ (2010) [30] อย่างไรก็ตาม ในแผนการดำเนินการวิจัยในปีที่ หนึ่งนี้ คณะผู้วิจัย มีจุดประสงค์เพื่อสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำ ไม่ได้ทำการทดลองเพื่อทดสอบ คุณสมบัติต่างๆของ เซลล์ไฟโบรบลาส เมื่อทำการ reprogram เซลล์ไฟโบรบลาส ด้วย Sendai virus TS7 ที่มี transcription factor OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc ตามการรายงานของ Fusaki และคณะ (2009) และ Ban และคณะ (2011) [23, 29] คณะผู้วิจัย สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลง ทางกายภาพของเซลล์ไฟโบรบลาส เกิดขึ้นในช่วง สัปดาห์ที่สาม หลังจากการ reprogram ซึ่งการ เปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ ของเซลล์ร่างกาย หลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วยวิธีต่างๆ จะเกิดขึ้นช้า หรือ เร็ว ขึ้นกับวิธีการ สำหรับกรณีการ reprogram ด้วย Sendai virus นั้น คณะผู้วิจัย พบว่าระยะเวลาของการเกิด primary colony ในการทดลองนี้ ใกล้เคียงกับการรายงานของ Ban และคณะ (2011) [23] ทั้งนี้ ความสามารถในการเกิดกระบวนการ reprogram เซลล์ร่างกายนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น ชนิดของเซลล์ร่างกายที่ใช้ในการ reprogram จำนวนและชนิดของ exogenous genes หรือ วิธีที่ใช้ในการ reprogramming นอกจากนั้น ยังพบว่า หากมีการใช้ small molecule, epigenetic modifying agents จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ และ ทำให้กระบวนการ reprogramming ของเซลล์ร่างกายที่นำมาเหนี่ยวนำให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิด เกิดได้เร็วขึ้น อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัย เชื่อว่า คุณภาพของเซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ มีความสำคัญมากกว่า ประสิทธิภาพ ทั้งนี้เพราะ คุณภาพของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs มีส่วนสัมพันธ์กับ ความสามารถของเซลล์ในการเปลี่ยนแปลง ไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ และระยะเวลาของการเกิดการ reprogramming ที่สมบูรณ์ จะสัมพันธ์กับ การ maturation ของเซลล์ที่มีการ reprogramming[31]
หลังจากที่ เลี้ยงเซลล์ iPSCs ได้ 2-3 passages คณะผู้วิจัยได้ทำการเลี้ยงเซลล์ iPSCs ที่อุณหภูมิ 38.5 องศา

เซลลเซียส ติดต่อกัน 7 วัน เพื่อทำการเอา Sendai virus ออกจากเซลล์ iPS ที่สร้างได้ ทั้งนี้เพราะสายพันธุ์ของ Sendai virus ที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นสายพันธุ์ที่มีความไวต่ออุณหภูมิที่สูง และพบว่า เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลลเซียส ติดต่อกันอย่างน้อย 5- 7 วัน Sendai virus จะไม่มีการแบ่งตัว และสลายไป [23] เมื่อคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการ ดังที่กล่าว และทำการทดสอบการคงอยู่ของ Sendai virus พบว่า ตรวจไม่พบ Sendai virus ทั้งในระดับการแสดงออกของยีน และ โปรตีน ดังนั้น จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า เซลล์ iPS ที่สร้างได้นั้น ไม่มีการคงอยู่ของ Sendai virus ปัจจุบัน มีรายงานการใช้ Sendai virus สายพันธุ์เดียวกับที่คณะผู้วิจัยใช้ ในการสร้างเซลล์ iPSCs และมีการยอมรับว่า เป็นวิธีที่ปลอดภัย เพราะไม่เกิดการ integration ของ virus กับ DNA ของเซลล์ร่างกายที่นำมา reprogram

เมื่อทำการพิสูจน์คุณสมบัติเบื้องต้น ของเซลล์ iPSCs พบว่า ในระดับยีนเซลล์มีการแสดงออกของ endogenous genes ได้แก่ OCT-3/4, NANOG, SOX2, REX1,UTF นอกจากนั้น ในระดับโปรตีน พบว่าเซลล์ iPSCs มีการแสดงออกของโปรตีน OCT-3/4 คล้ายกับที่ตรวจพบในเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากตัวอ่อน สายพันธุ์ Chula2.hES [26] เมื่อทำการ เหนี่ยวนำให้เซลล์ iPSs เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ ภายในจากเพาะเลี้ยงเซลล์ เซลล์ iPS สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็น embryoid body ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ เทียบได้กับ ตัวอ่อนหลังการฝังตัว ซึ่งภายในจะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อ ectoderm endoderm และ mesoderm เมื่อทำการตรวจสอบในระดับโปรตีนของ embryoid body ตรวจพบการแสดงออกของ nestin (ectoderm), brachyury (mesoderm) และ alfa-fetoprotein (endoderm) จากการย้อมสีทางอิมมูโน ซึ่ง ผลดังกล่าว สามารถกล่าวได้ว่า เซลล์ iPS ที่สร้างได้จากการการทดลองนี้ แสดงคุณสมบัติ *in vitro* differentiation คล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกจากตัวอ่อน[26]

สรุปผลการวิจัย

โดยสรุป ในปีแรกของการดำเนินงานวิจัย คณะผู้วิจัยสามารถสร้างเซลล์ไฟโบรบลาส จำนวน สี่เซลล์ไลน์ จากตัวอย่างชิ้นเนื้อแผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด ทั้งหมด สี่ตัวอย่าง เซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกได้ แสดงคุณสมบัติเบื้องต้นคล้ายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchyme คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จ ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดชนิด iPSCs จากเซลล์ไฟโบรบลาส โดยการใช้ Sendai virus TS7 และทำการพิสูจน์ว่า ไม่มี Sendai virus เหลืออยู่ในเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs ที่สร้างและตรวจหา Sendai virus นอกจากนั้น ผลการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเซลล์ iPSCs พบว่า แสดงคุณสมบัติคล้ายกับเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างได้จากตัวอ่อน อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยจะได้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด iPSCs เพิ่มเติม ได้แก่ การตรวจ DNA finger print, การตรวจทางโครโมโซม, การตรวจความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด teratoma และรวมถึงการตรวจ epigenetic status ของเซลล์ต้นกำเนิด iPSCs ที่สร้างได้ ในปีที่สองของการดำเนินการวิจัย

บรรณานุกรม

1. Aggarwal R, Lu J, Pompili VJ, Das H. Hematopoietic stem cells: Transcriptional regulation, *Ex Vivo* expansion and clinical application. Curr Mol Med. 2012;12(1): 34-49.
2. Ban H, Nishishita N, Fusak N, et al. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108: 14234–14239.
3. Blum B and Benvenisty N. The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. Cell Cycle. 2009; 8:23: 3822-3830.
4. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. Cell Stem Cell. 2009; 5: 353–357.

5. Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. Cell Stem Cell. 2009; 5: 434–441.
6. Hanley PJ, Cruz CR, Shpall EJ, Bollard CM. Improving clinical outcomes using adoptively transferred immune cells from umbilical cord blood. Cytotherapy. 2010; 12: 713–720.
7. Hu K, Yu J,Suknuntha K, et al. Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. Blood. 2011; 117: e109-e119.
8. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissue vs. those from other sources, Their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res. 2009; 88(9): 792-806.
9. Kim JB, Greber B, Arauzo-Bravo MJ, et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. Nature. 2009; 461: 649–643.
10. Kim PG, Daley GQ. Application of induced pluripotent stem cells to hematologic disease. Cytotherapy. 2009; 11: 980–989.
11. Kuroda T,Yasuda S, Kusakawa S, et al. Highly Sensitive In Vitro Methods for Detection of Residual Undifferentiated Cells in Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Human iPS Cells. PLoS One. 2012; 7(5): e37342.
12. Lam MT, Longaker MT. Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med. 2012; Doi: 10.1002/term. 1499. [Epud ahead of print].
13. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 2883–2888.
14. Lu TY, Yang L. Uses of cardiomyocytes generated from induced pluripotent stem cells. Stem Cell Res Ther. 2011; 2(6): 44.
15. MacArthur CC, Fontes A, Ravinder N, et al. Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells by a Nonintegrating RNA Sendai Virus Vector in Feeder-Free or Xeno-Free Conditions. Stem Cells Int. 2012; 564612.
16. Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell. 2007; 1:55–70.
17. Menendez P, del Canizo MC, Orfao A. Immunophenotypic characteristics of PB-mobilised CD34+ hematopoietic progenitor cells. J Biol Regul Homeost Agents. 2001;15: 53–61.
18. Menendez P, Perez-Simon JA, Mateos MV, et al. Influence of the different CD34+ and CD342 cell subsets infused on clinical outcome after non-myeloablative allogeneic peripheral blood transplantation from human leucocyte antigen-identical sibling donors. Br J Haematol. 2002; 119: 135–143.
19. Nishishita N, Shikamura M, Takenaka C, Takada N, Fusak N, Kawamata S. Generation of Virus-Free Induced Pluripotent Stem Cell Clones on a Synthetic Matrix via a Single Cell Subcloning in the Nai¨ve State. PLoS One. 2012; 7(6): e38389.

20. Okita K, Nagata N, Yamanaka S. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. Circ Res. 2011; 109(7): 720-721.
21. Pruksananonda K, Rungsiwiwut R, Numchaisrika P, et al. Eighteen-year cryopreservation does not negatively affect the pluripotency of human embryos: evidence from embryonic stem cell derivation. Bioresearch Open Access. 2012; 1(4): 1-7.
22. Salvagiotto G, Burton S, Daigh CA, Rajesh D, Slukvin II, Seay NJ. A defined, feeder-free, serum-free system to generate in vitro hematopoietic progenitors and differentiated blood cells from hESCs and hiPSCs. PLoS One. 2011; 6(3): e17829.
23. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007; 131: 861–872.
24. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006; 126: 663–676.
25. Takenaka C, Nishishita N, Takada N, Jakt LM, Kawamata S. Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. Exp Hematol. 2010; 38: 154–162.
26. Thomsom JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cells line from human blastocysts. Science. 1998; 282:1145-1147.
27. Torrez LB, Perez Y, Yang J, Zur Nieden NI, Klassen H, Liew CG. Derivation of Neural Progenitors and Retinal Pigment Epithelium from Common Marmoset and Human Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Int. 2012; 417865. Epub 2012 Mar 20.
28. Ye Z, Zhan H, Mali P, et al. Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. Blood. 2009; 114: 5473–5480.
29. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science. 2009; 324:797–801.
30. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 2007; 318: 1917–1920.
31. Young HE, Steele TA, Bray RA, et al. Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56 and MHS class-I. Proc Soc Exp Biol Med. 1999; 221: 63-71.
32. Zhang Y, Li CX, Sun L. Investigation of immunogenecity of cryopreserved limbal stem cells. Int J Opthalmol. 2011; 4(6): 590-593

ภาคผนวก

COA No. 645/2013

IRB No. 301/55

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4493 ext 14, 15

Certificate of Approval

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study which is to be carried out in compliance with the international guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

Study Title	: Comparative studies of anatomical and biomolecular levels of human stem cells derived from embryo and somatic cells for clinical application.
Study Code	: -
Principal Investigator	: Assoc.Prof.Kamthorn Pruksananonda, M.D.
Affiliation of PI	: Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

Document Reviewed :

1. Protocol Version 1.0 Dated 14 June 2012
2. Protocol Synopsis Version 2.0 Dated 17 September 2012
3. Information sheet for research participant Version 2.0 Dated 17 September 2012
4. Consent Form Version 2.0 Dated 17 September 2012
5. Principal investigator's CV
6. Continuing Review Report

Signature:..... Signature:.....

(Emeritus Professor Tada Sueblinvong MD) (Assistant Professor Prapapan Rajatapiti MD, PhD)

Chairperson Member and Secretary

The Institutional Review Board The Institutional Review Board

Date of Approval : September 28, 2013 (First Extension)

Approval Expire Date : September 27, 2014

Approval granted is subject to the following conditions: (see back of this Certificate)

COA No. 645/2013

IRB No. 301/55

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4493 ต่อ 14, 15

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากลได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

ชื่อโครงการ : การศึกษาเชิงเปรียบเทียบลักษณะกายภาพและชีววิทยาโมเลกุลของเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างจากตัวอ่อนและเซลล์ร่างกายเพื่อการนำไปใช้ในทางคลินิก

เลขที่โครงการวิจัย : -

ผู้วิจัยหลัก : รศ.นพ.กำธร พฤกษานานนท์

สังกัดหน่วยงาน : ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารที่ได้รับการทบทวน :

1. โครงการวิจัย Version 1.0 Dated 14 June 2012
2. โครงการวิจัยฉบับย่อ Version 2.0 Dated 17 September 2012
3. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย Version 2.0 Dated 17 September 2012
4. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย Version 2.0 Dated 17 September 2012
5. Principal investigator's CV
6. Continuing Review Report

ลงนาม ..... ลงนาม .....

(ศาสตราจารย์กิตติคุณแพทย์หญิงธาดา สืบหลินวงศ์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พญ.ประภาพรรณ รัชตะปิติ)

ประธาน กรรมการและเลขานุการ

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

วันที่รับรอง : 28 กันยายน 2556 (First Extension)

วันหมดอายุ : 27 กันยายน 2557

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)

6.3.1

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	AF 04-10/4.0 เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาเชิงเปรียบเทียบลักษณะกายภาพและชีววิทยาโมเลกุลของเซลล์ต้นกำเนิดที่สร้างจากตัวอ่อนและเซลล์ร่างกายเพื่อการนำไปใช้ในทางคลินิก

แพทย์ผู้ทำวิจัย

ชื่อ รองศาสตราจารย์นายแพทย์กำธร พฤกษานานนท์

ที่อยู่ หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเลขโทรศัพท์ (ในเวลาราชการ) 02-256-4829 หมายเลขโทรศัพท์ (นอกเวลาราชการ) 081-847-7579

ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อ ดร.รัฐจักร รังสิวิวัฒน์
ผศ.ดร.นพ.นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา
นางสาวปราณี น้าชัยศรีค้า
ศ.นพ.ประมวล วีรุตมเสน

ที่อยู่ หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเลขโทรศัพท์ (ในเวลาราชการ) 02-256-4829 หมายเลขโทรศัพท์ (นอกเวลาราชการ) 081-847-7579

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ที่มีคุณสมบัติตรงตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ โดยขอให้ท่านร่วมในการบริจาคเนื้อเยื่อ บริเวณผิวหนังที่เป็นรอยผ่าตัดเดิมของท่าน ซึ่งโดยปกติจะถูกทิ้งไป เพื่อเข้าร่วมโครงการวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

เซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อน เป็นเซลล์เริ่มต้นของชีวิต มีคุณสมบัติพิเศษ สามารถแบ่งตัวเพิ่มได้โดยไม่จำกัดจำนวน และสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆ ของร่างกายได้ทุกชนิด ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมีศักยภาพสูงที่จะนำมาศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ ใช้ทดแทนเนื้อเยื่อและรักษาโรคเรื้อรังหลายชนิดให้หายได้ จึงยังประโยชน์อย่างมาก ในเบื้องต้นการศึกษาวิจัยจะเป็นการพัฒนาความรู้ความเข้าใจทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้ทางเวชปฏิบัติ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	AF 04-10/4.0 เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้ คือ สร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากเซลล์ร่างกายโดยการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกจากผิวหนังแผลเป็น จากการผ่าตัดคลอด (cesarean scar fibroblasts)

เปรียบเทียบคุณสมบัติของการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ที่สร้างได้จากเซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกจากผิวหนังแผลเป็น จากการผ่าตัดคลอด กับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน และเซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์เลือดจากสายสะดือ (cord blood derived induced pluripotent stem cells) เมื่อเลี้ยงอยู่ในสภาวะที่ปราศจากการปนเปื้อนผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เพื่อการนำไปใช้ในทางคลินิก

เปลี่ยนแปลงเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนัง แผลเป็นจากการผ่าตัดคลอด (cesarean scar fibroblasts) เป็นเซลล์ประสาท และเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ และชีววิทยาโมเลกุล กับเซลล์ประสาทที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน เซลล์ต้นกำเนิดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำเซลล์เลือดจากสายสะดือ และ เซลล์ไฟโบรบลาสที่แยกจากผิวหนังแผลเป็น จากการผ่าตัด

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

อาสาสมัคร

10 คน

การเก็บเนื้อเยื่อจากแผลเป็นเดิม

ในขั้นตอนและคลอดบุตรตามปกติ ผู้ป่วยที่มีแผลผ่าตัดทางหน้าท้องเดิมอยู่แล้ว และแพทย์ได้กำหนดที่จะผ่าตัดคลอดบุตรท่านตามข้อบ่งชี้ทางสูติศาสตร์ แนวทางการปฏิบัติทั่วไป แพทย์จะทำการตัดเนื้อเยื่อจากแผลเป็นเดิมทิ้งไป เพื่อทำการคลอดบุตรให้ท่านตามขั้นตอนของการคลอดบุตรโดยการผ่าตัดตามปกติ

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอรับบริจาคเนื้อเยื่อจากแผลเป็น ซึ่งโดยปกติจะถูกนำไปทิ้งนี้ มาใช้ประโยชน์เพื่อการศึกษาวิจัย โดยจะนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด การบริจาคนี้จะไม่ผลต่อกระบวนการรักษาตามปกติของท่าน

ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

เนื่องจากเนื้อเยื่อแผลเป็นเดิม หลังจากตัดออกก็จะถูกนำไปทิ้ง การบริจาคจึงไม่มีความเสี่ยงต่อผู้บริจาค

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากแผลเป็นนี้ จะเกิดประโยชน์ต่อการวิจัย ความก้าวหน้าทางวิชาการแพทย์ แต่ท่านจะไม่มีสิทธิ์ในการได้รับประโยชน์ใดใดที่อาจเกิดขึ้นในอนาคตจากการบริจาคเนื้อของท่าน

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ไม่มี

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
IRB No. 301 / 55
Date of Approval 28 ก.ย. 2565

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	AF 04-10/4.0 เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)

หากท่านมีคำถามเกี่ยวกับการศึกษานี้ท่านสามารถติดต่อใครได้บ้าง

ถ้าท่านมีคำถามเกี่ยวกับโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถติดต่อ

นักวิจัย นางสาวปราณี นำชัยศรีค้า

โทรศัพท์ในเวลาราชการ: 02-256-4829 โทรศัพท์นอกเวลาราชการ: 08-9122-7066

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การบริจาคเนื้อเยื่อแผลเป็น เพื่อการวิจัยนี้ขึ้นอยู่กับตัวท่าน ท่านมีสิทธิตัดสินใจไม่เข้าร่วมในโครงการนี้ได้ และหากเข้าร่วมโครงการแล้ว ท่านก็มีสิทธิที่จะถอนตัวเมื่อใดก็ได้ โดยทีมแพทย์ผู้ดูแลจะยังคงให้การดูแลท่านตามปกติ

ขอขอบพระคุณท่านที่เสียสละบริจาคเนื้อเยื่อนี้เพื่อประโยชน์และการวิจัยเพื่อความก้าวหน้าทางวิชาการแพทย์

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
6. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
7. ท่านจะได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยและสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
8. ท่านมีสิทธิ์ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิดลชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
IRB No. 301 / 55
Date of Approval 20 ก.ย. 2555

6.3.2

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	AF 05-10/4.0 เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การศึกษาเชิงเปรียบเทียบลักษณะกายภาพและชีววิทยาไมเลกุลของเซลล์ต้นกำเนิด ที่สร้างจากตัวอ่อนและเซลล์ร่างกายเพื่อการนำไปใช้ในทางคลินิก (Comparative studies of anatomical and biomolecular levels of human stem cells derived from embryo and somatic cells for clinical application)

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....ที่อยู่ .....ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่.....และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้าทราบถึงเจตนาและความตั้งใจของคณะแพทย์ผู้รักษาและทีมงานศึกษาวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดโดยคำนึงถึงจริยธรรมและสิทธิของความเป็นเจ้าของเนื้อเยื่อก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในกระบวนการทำศึกษาวิจัย ซึ่งจำเป็นต้องได้รับความยินยอมจากเจ้าของเนื้อเยื่อก่อน

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน อาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
IRB No. 301 / 55
Date of Approval 28 ก.ย. 2555

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	AF 05-10/4.0 เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า ☐ ยินยอม
☐ ไม่ยินยอม
บริจาคเนื้อเยื่อจากแผลเป็น(scar tissue) เพื่อการวิจัยในอนาคต

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
IRB No. 501/57
Date of Approval 28 ก.ย. 2555

ประวัตินักวิจัยและคณะ

๑. หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)

รองศาสตราจารย์นายแพทย์กำธร พฤกษานานนท์
Kamthorn PRUKSANANONDA, M.D.
Associate Professor of Obstetrics and Gynecology
Director of Chula IVF Program
ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

---

๒. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

๓ ๑๐๐๘ ๐๐๒๕๑ ๕๗๕

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์ ระดับ ๙
หัวหน้าหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

■ หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐
โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๙, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙
E-mail: pkamthorn@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

พ.ศ.๒๕๒๓ วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. ๒๕๒๕ แพทยศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. ๒๕๓๑ วุฒิบัตร สูติ-นรีเวช จุฬาลงกรณ์/แพทยสภา

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

วุฒิบัตรเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์
Certificate in Reproductive Biology and Infertility, University of Pennsylvania, Philadelphia, U.S.A.

<u>เกียรติประวัติในอดีต</u>

แพทย์ฝึกหัดดีเด่น และแพทย์ประจำบ้านดีเด่น โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
Best Research Paper - ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย
Young Gynaecologist Award – Asia Oceania Federation of Obstetrics and Gynaecology
Rockefeller Fellowship Award
เป็น Co author ใน chapter หนึ่งของหนังสือ Uterine and Embryonic Factors in Early pregnancy: Editor, JF Strauss, Plenum Press, U.S.A.

๒. ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย คนที่ ๑

๑. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. รัฐจักร รังสิวิวัฒน์
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Ruttachuk Rungsiwiwut

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- ๓ ๓๐๑๒ ๐๐๗๘๗ ๔๑ ๔

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

- นักวิจัยประจำโครงการ

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐ โทรศัพท์
  ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙, ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙
- Email : ruttachuk.r@chula.ac.th

๕. ประวัติการศึกษา

- ๒๕๔๒ สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ๒๕๕๑ วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต สาขาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- embryonic stem cell derivation and culture
- somatic nuclear transfer in laboratory animal
- embryo manipulation
-

๓. ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย คนที่ ๒

๑. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวปราณี นำชัยศรีค้า
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms. Pranee Numchaisrika

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- ๓ ๑๐๐๑ ๐๐๒๙๘ ๘๓ ๘

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

- นักวิทยาศาสตร์ ๖

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐ โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๘, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙
- Email : pnumchaisrika@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ.๒๕๒๙ วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Cell Culture, Collect and Culture Embryo in Animal Model

๔. ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย คนที่ ๓

๑. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายนิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr.Nipan Israsena

๒. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน

- ๓ ๑๐๐๘ ๐๐๕๘๙ ๙๓ ๒

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

- อาจารย์ ระดับ ๖

๔. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

- ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม.๑๐๓๓๐ โทรศัพท์ ๐๒-๒๕๑-๑๙๖๕,
- โทรสาร ๐๒-๒๕๑-๑๙๖๕
- Email : nipan.i@chula.ac.th

๕. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. ๒๕๓๘ ปริญญาตรี สาขาแพทยศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พ.ศ. ๒๕๓๙ Clinical Fellow สาขา Neurology จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พ.ศ. ๒๕๔๖ ปริญญาเอก สาขา Neuroscience Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva
  University, New York ,USA

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- Neural stem cell, neurodegenerative disease, stem cell biology

๕. ประวัติที่ปรึกษาและร่วมโครงการวิจัย คนที่ ๔

๑. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายประมวล วีรุตมเสน
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr.Pramuan Virutamasen

๒. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน

- ๓ ๑๐๑๔ ๐๑๑๓๕ ๒๓ ๘

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน

- ศาสตราจารย์กิตติคุณ ๑๑

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

- หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
  คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๘๗๓ ถนนพระราม ๔ ปทุมวัน กทม. ๑๐๓๓๐ โทรศัพท์ ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๘, ๐ ๒๒๕๖-๔๘๒๖ โทรสาร ๐ ๒ ๒๕๖-๔๘๒๙
- Email : pvirutamasen@yahoo.com

๕. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. ๒๕๐๑ อนุปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พ.ศ. ๒๕๐๕ แพทยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยแพทยศาสตร์ กรุงเทพฯ
- พ.ศ. ๒๕๑๖ Master of Science , University of Pennsylvania , USA
- พ.ศ. ๒๕๑๖ อนุมัติบัตรสูตินรีเวชวิทยา แพทยสภา

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Physiology, Reproductive Biology, Specialty in Reproductive Endocrinology