

Abstract

Project Code : TRG5780180

Project Title : High efficiency derivation of human embryonic stem cell lines using culture system with minimizing trophoblast cell proliferation

Investigator : Chuti Laowtammathron (Ph.D.)

E-mail Address : chutila@gmail.com, chuti.lao@mahidol.ac.th

Project Period : June 2014 – May 2016

บทคัดย่อ:

ความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัด และสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่จำเพาะได้อย่างหลากหลายทำให้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (Human embryonic stem cells; hESCs) มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาโรคเพื่อมุ่งสู่การรักษาด้วยวิธีเซลล์บำบัด hESCs ถูกสร้างขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1998 โดยการแยก Inner cell mass (ICM) ออกจากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์โดยวิธี Immunosurgery แล้วนำออกมาเลี้ยงในหลอดแก้ว หลังจากนั้นมีการรายงานการสร้าง hESCs ด้วยวิธีต่างๆ หลายวิธี อาทิเช่น การแยก ICM ออกจากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์โดยวิธีเชิงกล (Mechanical ICM isolation), การแยก ICM ออกจากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์โดยใช้เลเซอร์ และการสร้าง hESCs โดยการนำตัวอ่อนมาเลี้ยงโดยไม่มีการแยกเซลล์ ICM (Whole embryo culture) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการสร้าง hESC ยังอยู่ในระดับต่ำ (<50%) ส่งผลให้ใช้ตัวอ่อนปริมาณมากเพื่อให้ได้จำนวน hESCs เพียงพอสำหรับการศึกษา ปัญหาปริมาณตัวอ่อนมีปริมาณน้อยร่วมกับข้อจำกัดในการนำตัวอ่อนมาใช้ในการศึกษาวิจัยส่งผลให้ต้องพัฒนาวิธีการใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อใช้ในการผลิต hESC จากตัวอ่อนซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณตัวอ่อนที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาลดลง ในการทดลองนี้มีสมมติฐานว่าสาเหตุที่ทำให้อัตราความสำเร็จในการผลิต hESCs ต่ำนั้นอาจเกิดจากการเจริญเติบโตที่มากเกินไปของเซลล์โทรโฟบลาส (Trophoblast cell; TE) ส่งผลให้เซลล์ ICM ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการผลิต hESC วิธีใหม่เพื่อลดการเจริญเติบโตของเซลล์ TE (Minimized trophoblast cell proliferation; MTP) โดยเลี้ยงเซลล์ ICM ในระบบปราศจากเซลล์ที่เลี้ยง (Feeder-free system) นาน 3 วัน ก่อนที่จะย้ายไปเลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยง การผลิต hESCs ด้วยวิธี MTP สามารถผลิต hESCs ได้ทั้งจากตัวอ่อนปกติ, ตัวอ่อนผิดปกติ และตัวอ่อนแช่แข็ง โดยมีอัตราความสำเร็จมากกว่า 50% (อัตราความสำเร็จอยู่ระหว่าง 50-100%; เฉลี่ย 70%) การสร้าง hESCs ด้วยวิธีนี้จะช่วยให้สามารถผลิต hESC lines แบบ Clinical-grade มีความเป็นไปได้มากขึ้นเพราะจำนวนตัวอ่อนที่ต้องการใช้น้อยลง

คำสำคัญ : human embryonic stem cell, Blastocyst, trophoblast

1. Abstract

Due to their extensive self-renewal and multi-lineage differentiation capacity, human embryonic stem cells (hESCs) have great potentials for studying developmental biology, disease modeling, and developing cell replacement therapy. The first hESC line was generated in 1998 by culturing inner cell mass (ICM) cells isolated from human blastocysts using an immunosurgery technique. Since then, many techniques including mechanical ICM isolation, laser dissection and whole embryo culture have been used to derive hESC lines. However, the hESCs derivation efficiency remains low, usually less than 50%, and it requires large number of human embryos for deriving significant number of hESC lines. Due to a shortage and restricted access to human embryos, a novel approach with better hESCs derivation efficiency is badly needed to decrease the number of embryos used. We hypothesized that the low hESCs derivation efficiency might be due to extensive proliferation of trophoblast (TE) cells which could interfere with ICM proliferation. We therefore developed a methodology to minimize TE cell proliferation by culturing ICM in feeder-free system for 3 days before transferring them onto feeder cells. This minimized trophoblast cell proliferation (MTP) technique could be successfully used to derive hESCs from normal, abnormal and frozen-thawed embryos with better derivation efficiency of more than 50% (range 50 - 100%; median 70%). With this methodology, large scale production of clinical-grade hESCs is feasible.

Keywords : human embryonic stem cell, Blastocyst, trophoblast