IN VITRO CHONDROGENESIS BY ADULT STEM CELL INDUCTION

NITAYA INDRAWATTANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005

ISBN 974-04-5731-2
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในห้องปฏิบัติจากเซลล์ต้นกำเนิดผู้ใหญ่ (IN VITRO CHONDROGENESIS BY ADULT STEM CELL INDUCTION)

นิตยา อินทราวัฒนา 4537344 MTMT/D

ปร.ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: อานนท์ บุณยะรัตเวช, ปร.ด., สมยศ คุณจักร, พบ., จำรัส พร้อมมาศ, ปร.ด.

บทคัดย่อ

วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนถือกำเนิดขึ้นเพื่อนำมารักษาผู้ป่วยที่เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนถูกทำลาย จากความรู้พื้นฐานด้านเซลล์ชีววิทยาและวิวัฒนาการของเทคโนโลยีทำให้มีการนำเซลล์มีเซนครายจากไขกระดูกซึ่งมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆมาประยุกต์ใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการชักจูงเซลล์มีเซนครายจากไขกระดูกเพื่อพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกอ่อนภายในห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาปริมาณและวิธีการให้สารกระตุ้นแก่เซลล์ รวมถึงมิติของการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์มีเซนครายจากไขกระดูกถึงรุ่นที่ 4 แล้วนำมาชักจูงเพื่อให้พัฒนาเป็นเซลล์กระดูกอ่อนโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งแบบ สองมิติ (monolayer) และสามมิติ (โครงร่าง และ pellet culture) ในการชักจูงนี้ได้เลือกใช้สารกระตุ้นที่มีความเหมาะสม 3 ชนิด คือ TGF-β3, BMP-6 และ IGF-1 โดยให้สารกระตุ้นแก่เซลล์ด้วยกันสามวิธี คือ การให้สารกระตุ้นชนิดเดียว, การให้สารกระตุ้นร่วมกัน และให้สารกระตุ้นแบบหมุนเวียน โดยการชักจูงเซลล์มีเซนครายนี้ใช้ระยะเวลา 21 วัน แล้ววิเคราะห์การแสดงออกของยีนและโปรตีนด้วยวิธีเนื้อเยื่อวิทยา, RT-PCR และ real-time PCR จากผลการวิเคราะห์พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์มีเซนครายจากไขกระดูก โดยให้สารกระตุ้น 10 ng/ml TGF-β3 ร่วมกับ 500 ng/ml BMP-6 ภายใต้การเพาะเลี้ยง pellet culture สามารถชักจูงเซลล์ดังกล่าวพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนเซลล์กระดูกอ่อนในธรรมชาติ โดยเซลล์ที่ถูกชักจูงมีการวางตัวอยู่ในช่องว่าง lacunae และจากผลการวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าเซลล์มีการสะสม extracellular matric ของเซลล์กระดูกอ่อน คือ collagen type II และ proteoglycan และจากผลวิเคราะห์การแสดงออกของยีน (mRNA) จากเทคนิค real-time PCR พบว่า เซลล์มีเซนครายที่ถูกชักจูงนี้มีการแสดงออกของยีน collagen type II, aggrecan และ sox 9 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์กระดูกอ่อน จากข้อมูลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการชักจูงเซลล์มีเซนครายให้พัฒนาเป็นเซลล์กระดูกอ่อนสามารถทำได้ภายในห้องปฏิบัติการ และการชักจูงนี้มีประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อใช้สารกระตุ้น TGF-β3 ร่วมกับ BMP-6 ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบ pellet culture

143 หน้า ISBN 974-04-5731-2

IN VITRO CHONDROGENESIS BY ADULT STEM CELL INDUCTION.

NITAYA INDRAWATTANA 4537344 MTMT/D

Ph.D. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: AHNOND BUNYARATVEJ, Ph.D., SOMYOS KUNACHAK, MD., CHAMRAS PROMPTMAS, Ph.D.

ABSTRACT

Cartilage tissue engineering has emerged as a promising therapy for patients whose cartilage tissue has been damaged. The progress of basic science and innovation of technology on stem cell research has revealed a great potential for the application of tissue engineering. Multi-potential bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), a member of the adult stem cell series, are useful for cartilage tissue engineering. This study aims to investigate the optimal culture condition for in vitro chondrogenic induction of hBMSCs, which includes applying patterns of growth factor.

hBMSCs were expanded up to passage four and then in vitro chondrogenesis induction was performed in both two-dimensional (monolayer) and three-dimensional (scaffold and pellet) cultures. Three kinds of growth factors (TGF-β3, BMP-6 and IGF-1) were applied in culture medium in three different giving patterns: single, combination and cycling patterns. After 21 days culture, gene and protein expression was investigated by using histology, immunohistology, RT-PCR and real-time PCR techniques.

Chondrogenic induction of hBMSCs were reached theirs highest level when the cells were treated with a combination of 10 ng/ml TGF-β3 and 500 ng/ml BMP-6 in pellet culture. Under these condition, the induced cells showed features like natural cartilage which presents the chondrocyte setting in lacunae and the accumulation of cartilage-like matrices including type II collagen and proteoglycans as shown in histology and immunohistology results. These correlated to the results from real-time PCR assay in which the strongest expression of gene encoding type II collagen, aggrecan and sox9 was found under the same condition. This finding suggests that the combination of TGF-β3 and BMP-6 in pellet culture is the optimal culture condition to induce chondrogenesis on hBMSCs in in vitro culture.

KEY WORDS: STEM CELLS / BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL / IN VITRO CHONDROGENESIS / GROWTH FACTORS / DIFFERENTIATION

143 P. ISBN 974-04-5731-2