

พัทธวรรณ กุลกาญจนารวรรณ : ผลของ LPS และ Yhhu-3792 ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค จากเลือดสายสะดือมนุษย์ (EFFECTS OF LPS AND YHHU-3792 ON THE EXPANSION OF NATURAL KILLER CELLS DERIVED FROM HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 58 หน้า.

คำสำคัญ : ภูมิคุ้มกันบำบัดรักษามะเร็ง/เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค/เลือดสายสะดือ/เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค จากเลือดสายสะดือ

การปลูกถ่ายเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนแล้วถือเป็นความหวังสำคัญของภูมิคุ้มกันบำบัดรักษามะเร็ง อย่างไรก็ตามยังมีหลายปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงเมื่อต้องการใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค ในการรักษามะเร็ง เช่น แหล่งที่มาของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค สภาพะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ จำนวนและความบริสุทธิ์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค ภายหลังการเพาะเลี้ยง และ ความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งของเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง เพื่อสร้างแหล่งที่มาที่ยั่งยืนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค เพื่อการใช้ประโยชน์ทางคลินิก การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธี feeder-free และ cell-sorting-free เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค จากเลือดสายสะดือ โดยเมื่อกระตุ้นเซลล์ชนิด mononuclear ที่คัดแยกได้จากเลือดจากสายสะดือ (cord blood derived mononuclear cells) ด้วย Lipopolysaccharide (LPS ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในช่วงสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเติม LPS สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ทั้งนี้เมื่อขยายระดับการผลิตขึ้นพบว่าวิธีการที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เฉลี่ย $1.68 \pm 2.92 \times 10^{10}$ เซลล์จากเลือดสายสะดือ 1 ยูนิต โดยพบว่าร้อยละ 92.09 \pm 3.47 ของเซลล์ที่เพิ่มจำนวนได้คือเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flow cytometry แสดงให้เห็นว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค ที่เพาะเลี้ยงได้มีการแสดงออกร่วมของ marker ต่าง ๆ ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค ได้แก่ CD16 (ร้อยละ 83.63 \pm 8.2), NKG2D (ร้อยละ 98.33 \pm 1.55), NKp30 (ร้อยละ 73.42 \pm 17.55), NKp44 (ร้อยละ 36.74 \pm 11.12) และ NKG2A (ร้อยละ 73.92 \pm 12.09) นอกจากนั้นการทดสอบฤทธิ์การทำลายเซลล์มะเร็งของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค ที่เพิ่มจำนวนได้ในแบบจำลองเซลล์มะเร็ง ชนิด K562 (chronic myeloid leukemia cells), MIA PaCa-2 (pancreatic carcinoma cells) และ SKOV3 (ovarian carcinoma cells) แสดงให้เห็นอัตราการตายของเซลล์มะเร็งมากกว่าร้อยละ 50 ในทุกๆ ชนิดของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ (ณ อัตราส่วน effector ต่อ target ที่ 3.125 ต่อ 1)

การทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ feeder-free และ cell-sorting-free ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค จากเลือดสายสะดือได้

อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้จากวิธีการดังกล่าวมีความบริสุทธิ์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด เอ็น เค, มีจำนวนเซลล์ที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ทางคลินิก และยังคงไว้ซึ่งการทำงานที่สมบูรณ์ของเซลล์



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2566

ลายมือชื่อนักศึกษา Ht.
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Ch. Ht.

HATAIWAN KUNKANJANAWAN : EFFECTS OF LPS AND YHHU-3792 ON THE
EXPANSION OF NATURAL KILLER CELLS DERIVED FROM HUMAN UMBILICAL CORD
BLOOD. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 58 PP.

Keyword: CANCER IMMUNOTHERAPY/NATURAL KILLER CELLS/UMBILICAL CORD BLOOD/
CORD BLOOD-DERIVED NATURAL KILLER CELLS

Adoptive cell transfer of *ex vivo* expanded natural killer (NK) cells holds significant hope in cancer immunotherapy. However, some points of using NK cells in cancer treatment include source of NK cells, conditions for their expansion, resulting number and purity of NK cells after culturing, and anti-cancer activity of the expanded cells need to be considered. To establish a sustainable supply of NK cells for clinical applications, this study has developed a feeder-free and cell sorting-free method for expanding cord blood-derived NK (CBNK) cells. By stimulating cord blood derived mononuclear cells (CB-MNCs) with Lipopolysaccharide (LPS, 1 ug/mL) during the first week of expansion, this study demonstrates that the presence of LPS triggered a significant increase in CBNK cell proportions ($P<0.01$). Further upscaling of the expansion reveals that, from a single cord blood unit, the proposed procedure results in an average of $1.68\pm 2.92\times 10^{10}$ total nucleated cells (TNCs), of which $92.09\pm 3.47\%$ of the expanded cells are NK cells. Results from flow cytometry analysis showed that the expanded CBNK cells were co-positive with various NK cell markers: CD16 ($83.63\pm 8.27\%$), NKG2D ($98.33\pm 1.55\%$), NKp30 ($73.42\pm 17.55\%$), NKp44 ($36.74\pm 11.12\%$), and NKG2A ($73.92\pm 12.09\%$). Moreover, the anti-cancer activities of the expanded CBNK cells were investigated in K562, MIA PaCa-2, and SKOV3 cells; each serving as a representative cancer cell model for chronic myeloid leukemia, pancreatic carcinoma, and ovarian carcinoma, respectively. After 4 hours of co-incubation, more than 50% specific lysis was observed at effector to target cell ratios as low as 3.125:1 in all tested models. Collectively, these results illustrate that the proposed feeder-free and cell-sorting-free expansion method can effectively yield clinically relevant doses of purified CBNK cells with intact functions.

School of Biotechnology
Academic Year 2023

Student's Signature Hat.
Advisor's Signature Assoc. Prof. Rangsun Parnpai