

การปรับปรุงการเพิ่มจำนวน Cytokine-induced killer (CIKs) cell โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงแบบ Gas-permeable เพื่อนำมาใช้ในการรักษาด้วยเซลล์บำบัด



นางสาวสุภารัตน์ ทัดสำราญ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMPROVING CYTOKINE-INDUCED KILLER CELLS (CIKs) EXPANSION FOR ADOPTIVE CELL
IMMUNOTHERAPY USING GAS-PERMEABLE CULTURE METHOD

Miss Suparat Tudsamran



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงการเพิ่มจำนวน Cytokine-induced killer (CIKs) cell โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงแบบ Gas-permeable เพื่อนำมาใช้ในการรักษาด้วยเซลล์บำบัด
โดย	นางสาวสุภารัตน์ ทัดสำราญ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ นิพัชญ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ นายแพทย์ กรมิษฐ์ ศุภพิพัฒน์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ นิพัชญ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ นายแพทย์ กรมิษฐ์ ศุภพิพัฒน์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ปิยะ รุจกิจยานนท์)

สุภารัตน์ ทัดสำราญ : การปรับปรุงการเพิ่มจำนวน Cytokine-induced killer (CIKs) cell โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงแบบ Gas-permeable เพื่อนำมาใช้ในการรักษาด้วยเซลล์บำบัด (IMPROVING CYTOKINE-INDUCED KILLER CELLS (CIKs) EXPANSION FOR ADOPTIVE CELL IMMUNOTHERAPY USING GAS-PERMEABLE CULTURE METHOD) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. นพ. นิพัชญ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. นพ. กรมิษฐ์ ศุภพิพัฒน์, 77 หน้า.

การรักษามะเร็งด้วยเซลล์บำบัด (Adoptive cellular therapy) เป็นวิธีการรักษามะเร็งทางเลือกหนึ่ง โดยอาศัยความสามารถของเซลล์ภูมิคุ้มกันในการทำลายเซลล์มะเร็งที่กำลังมีการวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิดที่ไม่ตอบสนองหรือกลับมาเป็นซ้ำจากการรักษามาตรฐาน โดยมีรายงานวิจัยและการศึกษาทางคลินิกแสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการรักษาด้วยวิธีนี้โดยใช้เซลล์ภูมิคุ้มกันชนิด Cytokine-induced killer cells (CIK cells) ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดหรือมะเร็งชนิดที่เป็นก้อน ซึ่ง CIK cells สามารถกระตุ้นและเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการจาก Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ด้วยส่วนผสมของไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์บำบัดทางคลินิกนั้นจำเป็นต้องใช้ปริมาณของ CIK cells เป็นจำนวนมากในแต่ละครั้ง ในงานวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการปรับปรุงการเพิ่มจำนวนของ CIK cells โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบ Gas-permeable ซึ่งจากการทดลองพบว่าการเพิ่มจำนวนของ CIK cell โดยวิธี Gas-permeable มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยมีอัตราการเพิ่มจำนวนเฉลี่ยของ CIK cells อยู่ที่ประมาณ $110(\pm 9.38)$ เท่า ในขณะที่อัตราเพิ่มจำนวนเฉลี่ยของวิธีมาตรฐานอยู่ที่ประมาณ $73.8(\pm 10.92)$ เท่า นอกจากนี้การเพาะเลี้ยง CIK cells โดยใช้วิธี Gas-permeable ยังคงประสิทธิภาพการเกิด Cytotoxicity กับเซลล์มะเร็ง และการแสดงออก Activating marker ไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐาน และสามารถเพิ่มจำนวน CIK cells ทางคลินิกได้สูงถึง $5.13(\pm 1.45) \times 10^9$ เซลล์ ด้วยผลการทดลองข้างต้นนี้สามารถสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้วิธี Gas-permeable สามารถช่วยปรับปรุงการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ CIK cells ได้ และมีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นวิธีผลิตเซลล์ เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งด้วยเซลล์บำบัดซึ่งมีความจำเป็นต้องใช้เซลล์ในปริมาณมาก แต่ทั้งนี้การเพาะเลี้ยง CIK cells โดยใช้วิธี Gas permeable ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ในระดับที่มากขึ้นต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5774103230 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: IMMUNOTHERAPY, ADOPTIVE CELL THERAPY, CYTOKINE INDUCED KILLER CELLS, GAS PERMEABLE CULTURE

SUPARAT TUDSAMRAN: IMPROVING CYTOKINE-INDUCED KILLER CELLS (CIKS) EXPANSION FOR ADOPTIVE CELL IMMUNOTHERAPY USING GAS-PERMEABLE CULTURE METHOD. ADVISOR: ASST. PROF. NIPAN ISRASENA, M.D.Ph.D., CO-ADVISOR: KORAMIT SUPPIPAT, M.D., 77 pp.

Adoptive cellular therapy is one of immunotherapy that has currently been studied as a novel treatment approach in many cancers that resistant to conventional therapy. Several researches and clinical studies have showed safety and efficacy of adoptive therapy using Cytokine Induced Killer (CIK) cells for treating relapse or refractory hematological and solid cancers. CIK cells can be ex-vivo activated and expanded from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using several cytokines. However, very high numbers of CIK cells are needed to use in real clinical setting. In this study, we have successfully improved a method for ex-vivo expansion of CIK cells using gas permeable culture system which led to significantly higher number and fold expansion of CIK cells comparing to conventional culture method. Fold of expansion in Gas permeable culture are $110(\pm 9.38)$, while in conventional culture are $73.8(\pm 10.92)$. Moreover, CIK cells cultured with Gas-permeable culture method still had excellent cytotoxicity toward tumor cells with similar immunophenotype and activation marker expression as CIK cells cultured with conventional method. In clinical scale study, we found that Gas-permeable culture increased CIK cells up to $5.13(\pm 1.45) \times 10^9$ cells. In conclusion, Gas permeable culture method can help improve ex-vivo expansion of CIK cells. It can potentially be use in CIK cells production for cancer immunotherapy clinical trial that needs large number of CIK cells. Further study is needed to evaluate the feasibility of this method in large scale expansion of CIK cells.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากผศ. ดร. นพ.นิพัทธ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา และ อ. นพ. กรมิษฐ์ ศุภพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาของวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือ แนะนำ ให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง นิสิตขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ตลอดจนบุคคลทุกคนในครอบครัว ที่คอยให้คำปรึกษาคอยช่วยส่งเสริมกิจกรรมและปัจจัยต่าง ๆ และคอยเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณดร.แพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ และนายรัฐภูมิ ไทยวงษ์ นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด ผู้คอยช่วยอบรมให้ความรู้ในเรื่องการทำงานและเทคนิคต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนคอยรับฟังปัญหา ให้คำแนะนำที่ดี และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณบุคลากร นิสิต และเพื่อน ๆ ทุกท่านในศูนย์ความเป็นเลิศด้านเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด สำหรับความช่วยเหลือทั้งหมด และเอื้อเฟื้อสถานที่รวมถึงอุปกรณ์ที่ช่วยส่งเสริมให้งานวิจัยนี้สำเร็จผลไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณท่านคณะกรรมการของวิทยานิพนธ์นี้ ศ. ดร. วิไล อโนมะศิริ ผศ. นพ. อุดมศักดิ์ บุญวราเศรษฐ์ ผศ. ดร. นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ และ อ.นพ. ปิยะ รุจกิจยานนท์ ที่ได้สละเวลาพิจารณาและให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมในงานวิจัยนี้ทุกท่าน และศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยที่ได้เอื้อเฟื้อตัวอย่างการทดลอง ขอขอบคุณที่เป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้งานวิจัยนี้เกิดขึ้นและประสบผลสำเร็จได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	1
สารบัญตาราง.....	5
บทที่ 1.....	6
บทนำ.....	6
บทที่ 2.....	9
ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
การรักษาโรคมะเร็งด้วยการใช้ภูมิคุ้มกันบำบัด (Cancer Immunotherapy).....	9
การรักษาด้วยเซลล์บำบัด (Adoptive cell therapy).....	10
Cytokine-induced killer (CIKs) cells.....	10
การพัฒนาการเพาะเลี้ยง CIK cells เพื่อนำมาใช้ทางคลินิก.....	17
ข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional culture method).....	19
วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเพิ่มการแลกเปลี่ยนก๊าซ (Gas permeable culture method).....	20
บทที่ 3.....	23
วิธีดำเนินการ.....	23
คำถามการวิจัย (Research Questions).....	23
วัตถุประสงค์ของโครงการ (Objective).....	23
สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis).....	23
อาสาสมัครและการเก็บตัวอย่างเลือด.....	24

การแยก Peripheral blood mononuclear cell และการเหนี่ยวนำให้เป็น CIK cells.....	25
การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture (Optimizing condition).....	26
การเปรียบเทียบการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน (Experimental study)	27
การเปรียบเทียบการเลี้ยง CIK cells โดยการเลี้ยงเซลล์ในอุปกรณ์ Gas-permeable culture ตั้งแต่ขั้นตอนการเริ่มเหนี่ยวนำและเลี้ยงต่อเนื่องไปในอุปกรณ์ Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน.....	29
การทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ในปริมาณที่สามารถใช้ได้กับการวิจัยทางคลินิก (Clinical scale expansion).....	30
บทที่ 4	36
ผลการทดลอง	36
บทที่ 5	60
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	60
รายการอ้างอิง	68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	77

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 แสดงแผนภาพการกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells	11
ภาพที่ 2 แสดงตัวอย่างผลวิเคราะห์จากเครื่อง Flow cytometer เมื่อย้อมด้วย anti-CD3 และ anti-CD56 ที่ระยะเวลาต่างกัน จะเห็นว่าเซลล์มีลักษณะแยกกันเป็นกลุ่ม มีการแสดง Phenotype แตกต่างกัน และแบ่งเป็น 3 กลุ่มหลักคือ $CD3^+CD56^+$, $CD3^+CD56^-$ และ $CD3^-CD56^+$ ซึ่งจะเห็นว่ากลุ่ม $CD3^+CD56^+$ นั้น derived มาจากกลุ่ม $CD3^+CD56^-$ มากกว่า(22)	12
ภาพที่ 3 แสดงการอธิบายลักษณะการทำงานของ CIK cells โดยรูปแบบทางด้านซ้ายเป็นการทำงานแบบ Restriction killing ที่อาศัยการทำงานผ่าน TCR และมีความจำเป็นต้องนำเสนอแอนติเจนให้กับ MHC ด้านขวามือเป็นการทำงานแบบ non MHC-restriction ที่ไม่ต้องมีการนำเสนอแอนติเจนให้กับ MHC อาศัยการทำงานผ่านการส่งสัญญาณของ Receptor บนผิวเซลล์(32).....	14
ภาพที่ 4 แสดงตารางการศึกษาทางคลินิกโดยการปลูกถ่าย CIK cells ด้วยวิธีแตกต่างกันให้กับคนไข้โรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ(51).....	17
ภาพที่ 5 แสดงตารางปริมาณ CIK cells ที่ใช้ในการปลูกถ่ายให้กับคนไข้โรคมะเร็งชนิด Solid tumor(52).....	18
ภาพที่ 6 ด้านซ้ายแสดงการเลี้ยงเซลล์ด้วยอุปกรณ์ที่ใช้เทคโนโลยี Gas-permeable รูปด้านขวาแสดงการเลี้ยงเซลล์ด้วยอุปกรณ์ที่ใช้ในวิธีมาตรฐาน(62)	20
ภาพที่ 7 รูปด้านซ้ายแสดงลักษณะภายในของอุปกรณ์ที่ใช้เทคโนโลยี Gas-permeable รูปด้านขวาแสดงลักษณะภายในของอุปกรณ์ที่ใช้ในวิธีมาตรฐาน(66).....	21
ภาพที่ 8 แสดงส่วนของถุงที่แยกเอาเม็ดเลือดขาวออกจากเครื่อง Pheresis ที่ทำการขอจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย	25
ภาพที่ 9 A: แผนภาพแสดงการเปลี่ยนอาหาร การกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells ในระยะเวลา 14 วันของการทดลองขั้น Optimizing condition B: ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์	27
ภาพที่ 10 A: แผนภาพแสดงการเปลี่ยนอาหาร การกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells ในระยะเวลา 14 วัน ของการทดลองขั้น Experimental study B: ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์	28

ภาพที่ 11 A: แผนภาพแสดงการเปลี่ยนอาหาร การกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells ในระยะเวลา 14 วันของการทดลองการเลี้ยง CIK cells ต่อเนื่องในอุปกรณ์ Gas-permeable culture B: ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์.....	30
ภาพที่ 12 A: แผนภาพแสดงการเปลี่ยนอาหาร การกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells ในระยะเวลา 14 วันของการเพิ่มจำนวนเซลล์ในปริมาณที่สามารถใช้ได้กับการวิจัยทางคลินิก B: ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์.....	31
ภาพที่ 13 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์การหลังไซโตไคน์ด้วยวิธี Cytometric Bead Array(70)	34
ภาพที่ 14 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ติดตามร้อยละการแสดงออกของ CIK cells (CD3 ⁺ CD56 ⁺) ในวันที่ 0, 7 และวันที่ 14 จากเครื่อง Flow cytometer (n=1); T cells (CD3 ⁺ CD56 ⁻), NK cells (CD3 ⁻ CD56 ⁺), CIK cells (CD3 ⁺ CD56 ⁺) และ Other cells (CD3 ⁻ CD56 ⁻).....	36
ภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่เซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ชม. ² , 250,000 เซลล์/ชม. ² , 500,000 เซลล์/ชม. ² , 1,000,000 เซลล์/ชม. ² และ 2,000,000 เซลล์/ชม. ² (n=3).....	37
ภาพที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบร้อยละของสัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์ ที่เซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ชม. ² , 250,000 เซลล์/ชม. ² , 500,000 เซลล์/ชม. ² , 1,000,000 เซลล์/ชม. ² และ 2,000,000 เซลล์/ชม. ² (n=3).....	38
ภาพที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ Effector CIK cells ที่เซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ชม. ² , 250,000 เซลล์/ชม. ² , 500,000 เซลล์/ชม. ² , 1,000,000 เซลล์/ชม. ² และ 2,000,000 เซลล์/ชม. ² (n=3).....	39
ภาพที่ 18 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ในวันที่ 14 ที่ปริมาณเซลล์ตั้งต้นแตกต่างกัน (n=4) ของ A: แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมด B: แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells	40
ภาพที่ 19 แสดงตัวอย่างการ Gating ผลวิเคราะห์เซลล์จาก Flow cytometer ในวันที่ 0, 7 และ 14 โดยผลร้อยละที่แสดงในภาพคือ Effector CIK cells (CD3 ⁺ CD56 ⁺) (n=1)	41
ภาพที่ 20 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน (n=10).....	42

ภาพที่ 21 แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบร้อยละองค์ประกอบของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานทั้ง 3 กลุ่มในวันที่ 14 (n=10).....	43
ภาพที่ 22 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน (n=10).....	43
ภาพที่ 23 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน A: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดของทั้ง 3 กลุ่ม (n=10) B: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells ของ 3 กลุ่ม (n=10).....	44
ภาพที่ 24 แสดงแผนภูมิเส้นการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงของทั้ง 3 กลุ่มการทดลองตั้งแต่วันที่ 7, 11 และ 14 (n=10).....	47
ภาพที่ 25 แสดงตัวอย่างการ Gating ผลวิเคราะห์เซลล์จาก Flow cytometer เพื่อสังเกตการเกิด Cytotoxic ที่อัตราส่วน 100:1 โดยผลร้อยละที่แสดงในภาพคือเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่มีการแสดงออกร่วมกันของ CFSE และ PI (n=1).....	48
ภาพที่ 26 แสดงร้อยละ Specific lysis ของเซลล์ทั้ง 3 กลุ่มกับเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่อัตราส่วน Effector:Target = 5:1, 10:1, 50:1 และ 100:1 โดย A: เซลล์ K562 และ B: เซลล์ KASUMI (n=10).....	48
ภาพที่ 27 แสดงตัวอย่างผลวิเคราะห์เซลล์จาก Flow cytometer เพื่อสังเกตการแสดงออกของ Activating marker ที่พบบนผิวเซลล์ของ CIK cells ทั้ง 3 กลุ่ม (n=1).....	49
ภาพที่ 28 แสดงค่า MFI ของ Activating markers บนผิว CIK cells ในเซลล์ทั้ง 3 กลุ่ม (n=10) .	50
ภาพที่ 29 แสดงผลการวิเคราะห์การหลั่งไซโตไคน์ของ CIK cells ในเซลล์ทั้ง 3 กลุ่ม A: IFN- γ B: IL-2 C: IL-10 (n=9).....	51
ภาพที่ 30 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานก่อนการทดลองทางคลินิก A: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ทั้งหมด B: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบจำนวน CIK cells (n=3).....	52
ภาพที่ 31 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานก่อนการทดลองทางคลินิก A: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมด B: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells (n=3).....	53

- ภาพที่ 32** แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานก่อนการทดลองทางคลินิก A: แสดงกราฟแท่งเปรียบเทียบร้อยละของแต่ละเซลล์ B: แสดงค่า MFI ของ Activating markers บนผิว CIK cells..... 54
- ภาพที่ 33** แสดง %Specific lysis ของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานก่อนการทดลองทางคลินิกกับเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่อัตราส่วน E:T= 5:1, 10:1, 50:1 และ 100:1 โดย A: เซลล์ K562 และ B: เซลล์ KASUMI (n=3)..... 54
- ภาพที่ 34** แสดงผลการวิเคราะห์การหลั่งไซโตไคน์ของ CIK cells ในที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานก่อนการทดลองทางคลินิก A: IFN- γ B: IL-2 C: IL-10 (n=3)..... 55
- ภาพที่ 35** A: แสดงตัวอย่างผลวิเคราะห์ร้อยละการแสดงออกของ Treg (CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺) จาก Flow cytometer ในวันที่ 0 และ 14 ของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานและกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วันและ 7 วัน (n=1) B: แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบร้อยละการแสดงออกของ Treg ในวันที่ 0 และ 14 ของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วันและ 7 วัน กับวิธีมาตรฐาน (n=5) C: แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบร้อยละการแสดงออกของ Treg ในวันที่ 0 และ 14 ของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานจากการทดลองก่อนการทดลองทางคลินิก (n=3)..... 56
- ภาพที่ 36** A: แสดงแผนภูมิแท่งปริมาณเซลล์ทั้งหมดตามวันที่เลี้ยงเซลล์ในการทดลองทางคลินิก B: แสดงแผนภูมิแท่งปริมาณ CIK cells ในการทดลองทางคลินิก C: แสดงแผนภูมิเส้นอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมด D: แสดงแผนภูมิเส้นอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells..... 58
- ภาพที่ 37** แสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับปริมาณเซลล์ทั้งหมด/ชม.² ของ A: CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐาน B: CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture เปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน C: CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture เปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะแสดงผลในรูปแบบแผนภูมิเส้น และปริมาณเซลล์ทั้งหมด/ชม.² จะแสดงผลในรูปแบบแผนภูมิแท่ง (n=10)..... 63

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงวิธีที่ใช้พัฒนาการเพิ่มจำนวน CIK cells	19
ตารางที่ 2 แสดงการพัฒนาการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture ในเซลล์ที่ใช้ ในเซลล์บำบัดแตกต่างกัน	22
ตารางที่ 3 แสดงการตรวจการควบคุมคุณภาพสำหรับเซลล์ที่จะนำไปใช้ทางคลินิก	31
ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบสัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์ที่เซลล์ตั้งต้นแตกต่างกัน	38
ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดและ CIK cell ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เซลล์ตั้งต้นแตกต่างกัน	40
ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบองค์ประกอบของเซลล์ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน ...	42
ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมด ปริมาณ CIK cells อัตราการเพิ่มจำนวน เซลล์ทั้งหมด และอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells ต่อพื้นที่ผิวอุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกันในวันที่ 14	45
ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของ Activating markers ที่พบบนผิว CIK cells ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน	49
ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ CIK cells ที่ถูก เลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน	51
ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของ Activating markers ที่พบบนผิว CIK cells ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน	53
ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ CIK cells ที่ ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน	55
ตารางที่ 12 แสดงการตรวจการควบคุมคุณภาพสำหรับเซลล์ที่จะนำไปใช้ทางคลินิก	58

บทที่ 1

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในผู้ป่วยทั่วโลก รวมถึงผู้ป่วยในประเทศไทย วิธีการรักษาหลักของโรคมะเร็งหลายชนิดที่ใช้ในปัจจุบันคือ การให้ยาเคมีบำบัด การผ่าตัด และการฉายรังสี การให้การรักษาวินิจฉัยเหล่านี้ร่วมกันนั้นทำให้อัตราการเสียชีวิตในโรคมะเร็งหลายชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ(1, 2) อย่างไรก็ตามแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการพัฒนาของวิธีดังกล่าวมากขึ้น และมีการคิดค้นวิธีการรักษาใหม่ ๆ เช่นการรักษาพุ่งเป้า (Targeted therapy) ออกมาเพื่อนำมาช่วยในการรักษาคนไข้ให้อัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น แต่กลับพบว่าในโรคมะเร็งหลายชนิดยังมีการตอบสนองต่อการรักษามาตรฐานดังกล่าวเหล่านั้นในระดับต่ำ และอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งยังคงอยู่ในระดับสูง ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการรักษาที่นำมาใช้ร่วมกับการรักษาหลักที่กำลังได้รับความสนใจในวงกว้างเกี่ยวกับการรักษาโรคมะเร็ง คือใช้ประโยชน์จากระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยหรือผู้บริจาคมาร่วมในการรักษาโรคมะเร็ง หรือเรียกอีกอย่างว่าการรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัด (Cancer immunotherapy)(1, 3) หนึ่งในวิธีการรักษาที่มีการศึกษาอย่างมากคือการใช้เซลล์บำบัด (Adoptive cell therapy) โดยวิธีนี้เป็นวิธีการรักษาที่กำลังมีการวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องในการรักษาโรคมะเร็งหลาย ๆ ชนิดที่ไม่ตอบสนองหรือกลับเป็นซ้ำจากการรักษามาตรฐาน ขั้นตอนการรักษาคือจะนำเซลล์ภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยหรือผู้บริจาคมาร่วมมาทำการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นภายนอกในร่างกายในห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็ง เมื่อกระตุ้นและเพิ่มจำนวนได้ในระยะหนึ่งจะปลูกถ่ายกลับเข้าไปในผู้ป่วยอีกครั้ง โดยมุ่งหวังให้เซลล์ดังกล่าวกลับเข้าไปทำลายเซลล์มะเร็งที่ยังหลงเหลืออยู่ในร่างกายของผู้ป่วย(3)

Cytokine-induced killer cells หรือ CIK cells เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดหนึ่งที่ถูกวิจัยและพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในการรักษามะเร็งด้วยวิธีเซลล์บำบัด ค้นพบครั้งแรกเมื่อปีค.ศ. 1991 โดย Schmidt-wolf และคณะ(4) จากการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกจากเลือด หรือที่เรียกว่า Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) ด้วยไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ ลักษณะของ CIK cells เป็นกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีการแสดงออกของ CD3 และ CD56 ที่ผิวเซลล์แตกต่างกัน โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้ เซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD3⁺CD56⁺, CD3⁺CD56⁻ และ CD3⁻CD56⁺ โดยเซลล์ที่ออกฤทธิ์ในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะเป็นเซลล์กลุ่มที่มีการแสดงออกแบบ CD3⁺CD56⁺ เป็นหลัก การกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells ทำได้จากการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์ interferon gamma (IFN- γ), anti-CD3 monoclonal antibody (OKT3) และ Interleukin 2 (IL-2) เป็นเวลา 14-21 วัน เพื่อให้ได้ปริมาณเพียงพอต่อการนำไปปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยโดยทาง International

Registry on CIK Cells (IRCC) แนะนำว่ามีความจำเป็นต้องใช้ปริมาณ CIK cells อย่างน้อย 1×10^9 เซลล์ในแต่ละครั้ง หรือมีปริมาณ CIK cells ($CD3^+CD56^+$) อยู่ที่ 20-30% จึงจะมีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการทำลายเซลล์มะเร็งได้(5) ในปัจจุบันวิธีการเพิ่มจำนวนของ CIK cells เมื่อเทียบกับ NK cells หรือ $\gamma\delta T$ cell ด้วยวิธีมาตรฐานนั้นยังทำได้ไม่ดีเท่าที่ควร(6) ซึ่งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของวิธีมาตรฐานนั้นมีข้อจำกัดในเรื่องของการจำกัดปริมาณของสารอาหารและการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจน (O_2) รวมไปถึงการสะสมของของเสียที่เกิดขึ้นในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และกรดแลคติก (Lactic acid)(7) ทำให้เซลล์มีการเจริญโดยได้รับการแลกเปลี่ยนก๊าซอยู่แค่บริเวณผิวและปริมาณที่จำกัดของอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น จึงเป็นเหตุผลที่ว่าในวิธีมาตรฐานจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อย เพื่อให้เซลล์มีการเจริญต่อไปได้ แต่การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อยนี้มาซึ่งการใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์เพิ่มมากขึ้น การผลิตเซลล์ในแต่ละครั้งมีมูลค่าที่ต้องเสียเพิ่มสูงขึ้น และขั้นตอนการทำงานที่มากขึ้นนี้ส่งเสริมให้อาจเกิดการปนเปื้อนในเพิ่มมากขึ้นและอาจไม่ปลอดภัยต่อการนำไปใช้ปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยได้

เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าวและช่วยส่งเสริมให้ CIK cells มีการเพิ่มจำนวนได้ดียิ่งขึ้นจึงเป็นที่มาสำคัญของงานวิจัยในครั้งนี้ โดยมุ่งหวังจะช่วยปรับปรุงการเพิ่มจำนวน CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture เพื่อนำไปใช้ในการรักษาด้วยเซลล์บำบัด ซึ่งวิธีนี้มีหลักการสำคัญคือเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีนี้จะได้รับการแลกเปลี่ยนก๊าซและปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ดีขึ้น วิธีนี้ถูกคิดค้นโดยอาศัยแนวคิดที่ว่า การแลกเปลี่ยนก๊าซนั้นมีความสำคัญต่อทุกเซลล์เพื่อทำไปใช้ในกลไกต่าง ๆ เช่นในกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยนำก๊าซออกซิเจน (O_2) มาสร้าง ATP เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานแก่เซลล์(8) โดยอุปกรณ์ที่ใช้เทคโนโลยีนี้จะแตกต่างกับอุปกรณ์ที่ใช้ในวิธีมาตรฐานคือ ใต้อุปกรณ์จะมี Gas-permeable membrane ที่มีลักษณะเป็นรูพรุนทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ตลอดทั่วทั้งบริเวณที่เซลล์อยู่ และสามารถใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ได้ในปริมาณที่มากกว่า และไม่จำเป็นต้องควบคุมปริมาณอาหารหรือเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อยเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน

โดยในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงการเพิ่มจำนวน CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture โดยพบว่าการเลี้ยง CIK cells ต่อเนื่องด้วยวิธี Gas-permeable culture เป็นเวลา 14 วันนั้นมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีกว่าวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ยอยู่ที่ $110.90(\pm 9.38)$ เท่า และอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells ($CD3^+CD56^+$) เฉลี่ยอยู่ที่ $982.90(\pm 296.00)$ เท่า ในขณะที่วิธีมาตรฐานนั้นมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดและจำนวน CIK cells เฉลี่ยอยู่ที่ $73.80(\pm 10.92)$ เท่าและ $445.8(\pm 42.19)$ เท่าตามลำดับเท่านั้น นอกจากนี้เมื่อใช้วิธีนี้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์ทางคลินิกยังพบว่า วิธีนี้สามารถเพิ่ม

ปริมาณเซลล์ทั้งหมดได้สูงถึง $5.13(\pm 1.45) \times 10^9$ เซลล์โดยใช้เซลล์เริ่มต้นเพียง 30×10^6 เซลล์เท่านั้น ซึ่งเป็นปริมาณที่มากในการปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยในแต่ละครั้ง โดย CIK cells ที่ได้จากการเลี้ยงด้วยวิธี Gas permeable culture นั้นมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยผ่านเกณฑ์มาตรฐานการควบคุมคุณภาพสำหรับเซลล์ที่ใช้ในทางคลินิก วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพช่วยยับยั้งข้อจำกัดในการเลี้ยงเซลล์ในวิธีมาตรฐาน อีกทั้งการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี gas permeable culture นี้สามารถปรับเข้ากับกระบวนการผลิตตามมาตรฐาน Good Manufacturing Practice (GMP) ซึ่งจะสามารถนำมาใช้เพื่อผลิต CIK cells ให้กับสำหรับการวิจัยทางคลินิกหรือการรักษาผู้ป่วยทางคลินิกได้ในอนาคต



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การรักษาโรคมะเร็งด้วยการใช้ภูมิคุ้มกันบำบัด (Cancer Immunotherapy)

การรักษาโรคมะเร็งด้วยการใช้ภูมิคุ้มกันบำบัด (Cancer Immunotherapy) เป็นวิธีการรักษาอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการรักษามะเร็งที่ได้มีการวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา การรักษามะเร็งด้วยภูมิคุ้มกันบำบัดคือการรักษาโดยใช้กรรมวิธีต่าง ๆ ในการช่วยเตรียมความพร้อมและเพิ่มความสามารถของเซลล์ภูมิคุ้มกันเพื่อการทำลายเซลล์มะเร็งในร่างกายของคนไข้ ซึ่งเซลล์ภูมิคุ้มกันนั้นเปรียบเสมือนเป็นคลังอาวุธที่สำคัญในการต่อสู้กับโรคมะเร็ง วิธีการรักษามะเร็งด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัดนี้มีจุดประสงค์หลักในการใช้กลไกต่าง ๆ ของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อช่วยทำลายเซลล์มะเร็งภายในร่างกายที่ที่กลับเป็นซ้ำและไม่ตอบสนองต่อการรักษามาตรฐาน หรือช่วยลดโอกาสการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่อาจเกิดขึ้นในอวัยวะต่าง ๆ และในกระแสเลือด ซึ่งจะพบได้บ่อยในคนไข้ที่เป็นทั้งมะเร็งชนิดเป็นก้อน (Solid tumor) และมะเร็งเม็ดเลือด (Hematological malignancies) ในหลายชนิด หลักการสำคัญของการใช้ภูมิคุ้มกันบำบัดสำหรับการรักษามะเร็งคือการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เพื่อควบคุมให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายกลับมาทำงานได้ในสภาวะปกติ (Immune surveillance) เพื่อช่วยป้องกันและยับยั้งการการลุกลามไปยังอวัยวะต่าง ๆ และเจริญเพิ่มขึ้นของเซลล์มะเร็ง เพราะในคนไข้โรคมะเร็งมักมีการสูญเสีย Immune surveillance ของระบบภูมิคุ้มกันไปจากสาเหตุต่าง ๆ เช่น เซลล์มะเร็งมีการพัฒนาการหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจากการกลายพันธุ์ของเซลล์มะเร็ง การลดหรือเพิ่มการแสดงออกของ ligand ต่าง ๆ ที่ทำให้การทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันลดลง หรือมีผลทำให้การเจริญของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันลดลง จุดประสงค์สำคัญของการรักษามะเร็งด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัดคือการที่ทำให้ร่างกายของคนไข้เองมีความพร้อมในการต่อสู้กับเซลล์มะเร็งด้วยระบบภูมิคุ้มกันของคนไข้หรือภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาจากผู้อื่น(2, 9, 10) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น เช่นการใช้เคมีบำบัด หรือการฉายรังสี การรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัดจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นการรักษาที่ส่งผลในระยะยาวและมีความจำเพาะต่อการทำลายเซลล์มะเร็ง โดยเกิดผลกระทบต่อเซลล์ปกติของคนไข้น้อยกว่า(11) ดังนั้นการรักษามะเร็งด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัดนี้จึงเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจในวงกว้าง และมีการศึกษาวิจัยพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ในปัจจุบันสามารถแบ่งการรักษาโรคมะเร็งด้วยการใช้ภูมิคุ้มกันบำบัดเป็นประเภท 3 หลัก ได้แก่ 1) การรักษาด้วยเซลล์บำบัด (Adoptive cell therapy) 2) การรักษาด้วยแอนติบอดี (Therapeutic antibody) และ 3) การรักษาด้วยวัคซีนมะเร็ง (Cancer vaccine)

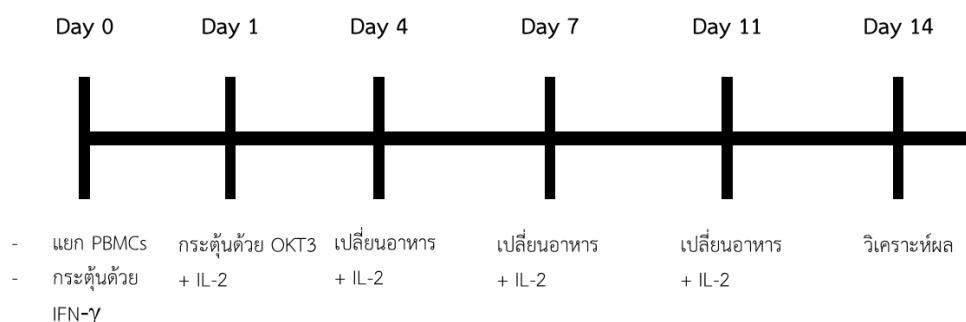
การรักษาด้วยเซลล์บำบัด (Adoptive cell therapy)

Adoptive cell therapy (ACT) เป็นวิธีการรักษาแบบ Passive immunotherapy โดยการนำเอาเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีความสามารถในการเป็น anti-tumor ของตัวคนไข้หรือผู้บริจาคมากระตุ้นและเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการด้วยไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ โดยไม่ทำให้สูญเสียความสามารถการเป็น effector cells ก่อนจะปลูกถ่ายกลับไปให้กับคนไข้ ในทางการแพทย์พบว่าการใช้วิธีเซลล์บำบัดนี้มีประโยชน์อย่างมากในการช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของตัวคนไข้เองเพื่อต่อสู้กับโรคมะเร็ง หรือ ส่งเสริมให้ระบบภูมิคุ้มกันอยู่ในสภาวะปกติโดยไม่ทำลายเซลล์ปกติของตนเอง (Tolerance) การรักษาด้วยวิธีเซลล์บำบัดเริ่มต้นจากงานวิจัยการใช้ Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) ในการรักษาผู้ป่วย metastatic melanoma ซึ่งพบว่าการรักษาดังกล่าวมีสามารถควบคุมโรค metastatic melanoma ซึ่งเป็นโรคมะเร็งที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษามาตรฐานได้อย่างเป็นที่น่าพอใจ จึงเริ่มมีการนำการรักษาด้วยวิธีเซลล์บำบัดมาศึกษาวิจัยและประยุกต์ใช้กับมะเร็งชนิดอื่นๆ เป็นจำนวนมาก โดยหวังว่าจะเป็นการรักษาที่สามารถช่วยควบคุมโรคของผู้ป่วยได้ในระยะยาว หรือ สามารถใช้ร่วมกับการรักษามะเร็งแบบมาตรฐานอื่น ๆ ในโรคมะเร็งที่กลับเป็นซ้ำ(3, 12) ในปัจจุบันมีการนำเซลล์ภูมิคุ้มกันหลายชนิดมาใช้ในศึกษาวิจัยหรือให้การรักษาด้วยเซลล์บำบัดสำหรับโรคมะเร็งได้แก่ Natural killer (NK) cells, Cytotoxic T lymphocyte (CTL) cells, Tumor-infiltrate lymphocyte (TIL) cells, Chimeric Antigen Receptor T-cell (CAR T cell) และ Cytokine-induced killer (CIKs) cells(13)

Cytokine-induced killer (CIKs) cells

ประวัติความเป็นมาและวิธีเหนี่ยวนำและเพิ่มจำนวน CIK cells

Cytokine-induced killer cells หรือ CIK cells เป็นเซลล์ที่ถูกพัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการในปี 1991 โดย Schmidt-Woelfl และคณะ จากการกระตุ้นและเหนี่ยวนำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากเลือดหรือที่เรียกว่า Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ด้วยไซโตไคน์ Interferon (IFN)- γ , anti-CD3 monoclonal antibody (OKT3) และ Interleukin-2 (IL-2)(14, 15) ในวันที่ 0 จะทำการกระตุ้น PBMCs ด้วย IFN- γ จากนั้นในวันต่อมาจะกระตุ้นอีกครั้งด้วย OKT3 และ IL-2 และกระตุ้นซ้ำด้วย IL-2 ตลอดการทดลอง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงแผนภาพการกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells

IFN- γ เป็นไซโตไคน์ชนิดแรกที่ใช้กระตุ้น PMBCs ใช้เวลาในการกระตุ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยหน้าที่หลักของ *IFN- γ* นั้นไม่ได้ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการเกิด Cytotoxicity ของ CIK cells โดยตรง แต่มีหน้าที่ Recruitment และเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับ IL-2 เป็นหลัก ในระหว่างที่มีการ priming PBMCs ด้วย *IFN- γ* เซลล์จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ IL-2 receptor เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เมื่อได้รับ IL-2 ในเวลาต่อมาจึงมีการตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น(16) นอกจากนี้แล้ว *IFN- γ* ยังช่วยกระตุ้น Monocyte ที่ปนอยู่ใน PBMCs ในช่วงแรกอีกทางโดยส่งสัญญาณ 2 ชนิดด้วยกัน ชนิดแรกคือสัญญาณกระตุ้น contact-dependent ของ LFA-3 ให้จับกับ CD2 (แสดงออกบนผิว T cell) ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมการตอบสนองของ IL-12 ตามมา(17) สัญญาณชนิดที่สองคือ IL-12 นี้เป็น Immunomodulatory ที่มีผลต่อ T cells และ NK cells ในการสร้าง *IFN- γ* เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ยังไม่ได้รับการกระตุ้นอีกทาง(18) สองสัญญาณนี้จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวน CIK cells

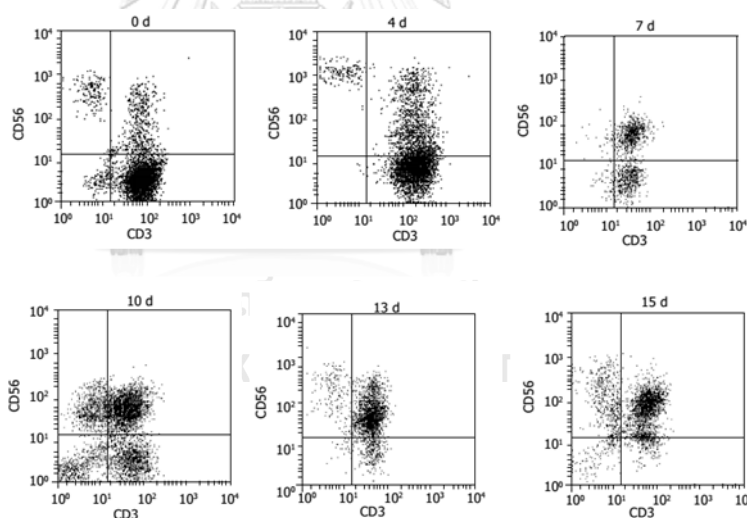
Anti-CD3 mAb (OKT3) เป็น Antibody ที่จับกับ CD3 ที่บริเวณ TCR ในการกระตุ้นด้วย OKT3 ให้กับ PBMCs นั้นเพื่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ผ่านกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ IL-2 ซึ่งเป้าหมายสำคัญของ OKT3 จะเป็นการกระตุ้นสัญญาณ downstream จาก IL-2 และ receptor ของ IL-2 มากกว่า(19) และการกระตุ้นนี้จะทำให้ T cell ตอบสนองต่อ IL-2 ได้ดียิ่งขึ้น

IL-2 เป็นหนึ่งในไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญมากต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด โดยมีหน้าที่หลักในการช่วยเพิ่มปริมาณ CIK cells ดังจะเห็นว่าต้องมีการกระตุ้นด้วย IL-2 ตลอดช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่ *IFN- γ* และ OKT3 จะกระตุ้นแค่ช่วงเริ่มต้นการเลี้ยงเซลล์เท่านั้น อีกทั้ง *IL-2* ยังช่วยส่งเสริมให้เกิด Cytolytic activity ที่ดียิ่งขึ้น(19, 20) นอกจากนี้ *IL-2* ยังมีผลส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของ IL-2R α (CD25) บนผิวของ T cells เพิ่มขึ้นอีกทางหนึ่ง ซึ่งมีงานวิจัยยังพบว่าการกระตุ้นด้วย *IL-2* ร่วมกับ OKT3 ส่งผลให้เกิดการเพิ่มการแสดงออกของ Regulatory T cells อีกด้วย(D-8) *IL-2* จึงมีความสำคัญอย่างมากในการกระตุ้นและเหนี่ยวนำให้เกิดเป็น CIK cells ให้

สามารถเป็น effector ในการทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยไม่ต้องมีการฉีด IL-2 ให้กับคนไข้ (Exogenous IL-2 administration) ไม่เหมือนกับในการปลูกถ่าย LAK cells อีกด้วย(4, 21) ซึ่งความสามารถนี้ช่วยให้สามารถลดความเป็นพิษจาก IL-2 ที่มากเกินไปจากการฉีดเพิ่มเติมให้กับคนไข้ อีกด้วย(22) ด้วยความสามารถที่ไม่ขึ้นกับ Exogenous IL-2 จึงเป็นที่มาสำคัญในการนำ CIK cells มาใช้ปลูกถ่ายให้กับคนไข้เพื่อลดผลข้างเคียงที่จะเกิดขึ้นต่อผู้ป่วยในทางคลินิกอีกด้วย

ลักษณะสำคัญและการแสดงออกของ CIK cells

CIK cells เป็นกลุ่มเซลล์ (Heterogeneous population) และมีลักษณะแตกต่างกันตามการแสดงออกของ CD3 และ CD56 ที่ผิวเซลล์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้คือ เซลล์มีการแสดงออกของ $CD3^+CD56^+$, $CD3^+CD56^-$ และ $CD3^-CD56^+$ ซึ่งเซลล์ที่มีหน้าที่ในการออกฤทธิ์ทำลายเซลล์เป้าหมายจะเป็นเซลล์กลุ่มที่มีการแสดงออกแบบ $CD3^+CD56^+$ เป็นหลัก(14) โดยมีรายงานวิจัยว่า เซลล์กลุ่มนี้เป็นกลุ่มเซลล์ที่เกิดการพัฒนาจากเซลล์ที่แสดงออกแบบ $CD3^+CD56^-$ มากกว่ามาจาก $CD3^-CD56^+$ ดังแสดงในภาพที่ 2(23) จึงสามารถกล่าวได้ว่า CIK cells นั้นเป็น T cells ที่มีลักษณะการทำงานคล้ายกับ NK cells



ภาพที่ 2 แสดงตัวอย่างผลวิเคราะห์จากเครื่อง Flow cytometer เมื่อย้อมด้วย anti-CD3 และ anti-CD56 ที่ระยะเวลาต่างกัน จะเห็นว่าเซลล์มีลักษณะแยกกันเป็นกลุ่ม มีการแสดง Phenotype ต่างกัน และแบ่งเป็น 3 กลุ่มหลักคือ $CD3^+CD56^+$, $CD3^+CD56^-$ และ $CD3^-CD56^+$ ซึ่งจะเห็นว่ากลุ่ม $CD3^+CD56^+$ นั้น derived มาจากกลุ่ม $CD3^+CD56^-$ มากกว่า(22)

การทำงานของ CIK cells

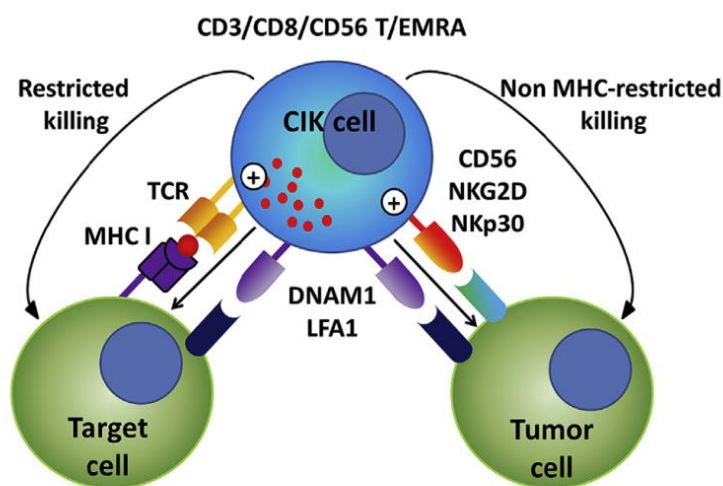
CIK cells เป็นเซลล์มีลักษณะสำคัญร่วมกันของทั้ง T cells และ NK cells กล่าวคือเมื่อเพาะเลี้ยง CIK cells ในห้องปฏิบัติการนั้น CIK cells สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วคล้ายกับ T

cells แต่การทำงานของ CIK cells นั้นไม่จำเป็นต้องรับรู้และทำลายเซลล์มะเร็งบางชนิดผ่านทาง T-cell receptor (TCR) ซึ่งลักษณะนี้จะคล้ายคลึงกับการทำงานของ NK cells มากกว่า(24, 25) กลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็น Effector หลักในการทำลายเซลล์มะเร็งจะเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการแสดงออกแบบ CD3⁺CD56⁺ มากกว่า เนื่องจากเซลล์ในกลุ่มนี้มีสัดส่วนของ CD8⁺ ที่มากกว่า และสามารถหลั่งสารที่ย่อยทำลายเซลล์มะเร็งชื่อว่า Granzyme ได้มากกว่า(26) การแสดงออกแบบ CD3⁺CD56⁺ นั้นมีลักษณะคล้ายกับ Natural killer T (NKT) cells ที่พบในร่างกายมนุษย์ โดย NKT cells นั้นมีหน้าที่สำคัญในการเป็น Immunoregulation และ Anti-tumor immunity สิ่งที่แตกต่างกันระหว่าง CIK cells กับ NKT cells คือ CIK cells มีการแสดงออกของ TCR ที่ไม่มี V α 24 ligand บนผิวเซลล์ ส่งผลให้ CIK cells ออกฤทธิ์ในการทำลายเซลล์เป้าหมายโดยไม่ต้องอาศัยการนำเสนอแอนติเจนให้กับ Major histocompatibility complex (MHC) หรือที่เรียกว่า non MHC-restriction(24) ซึ่งเป็นการออกฤทธิ์ลักษณะเดียวกับ NK cells โดยกลไกหลักที่ CIK cells ใช้ทำลายเซลล์มะเร็งนั้นจะผ่านทาง NKG2D pathway เป็นหลัก การส่งสัญญาณจะเกิดขึ้นเมื่อเกิดการจับกันของ NKG2D receptor บนผิวเซลล์ของ CIK cells กับ NKG2D ligand บนเซลล์เป้าหมาย และมีงานวิจัยพบว่าการทำงานของ NKG2D จะดีขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย IL-2 ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์อีกด้วย

Receptors ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ CIK cells

CIK cells นั้นมีการแสดงของ Activating receptor คล้ายกับที่พบใน NK cells ได้แก่ NKG2D, DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) และ NKp30(24, 25) เพื่อยืนยันรูปแบบการทำงานของ CIK cells ได้มีการทดลองยับยั้ง Antibody (Blocking Assay) ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ MHC คือ Antibody ต่อ CD2, CD3, CD8, CD28, CD56, very late antigen 4 (VLA-4), TCR $\alpha\beta$ และ MHC class I และ II molecules พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเกิดกระบวนการ Cytotoxic activity ของ CIK cells ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งหมายความว่า CIK cells มีการทำงานแบบที่ไม่ต้องอาศัย MHC หรือที่เรียกว่า non MHC-restriction มากกว่าการนำเสนอแอนติเจนทาง TCR นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการยับยั้ง lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1) and intracellular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1) นั้นสามารถยับยั้ง Cytotoxic activity ของ CIK cells ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสามารถสรุปได้ว่าการเกิด Cytolytic ของ CIK cells มีลักษณะเป็น Cell-to-cell contact และ non MHC-restriction มากกว่า(27-29) (ภาพที่ 3) นอกจากนี้ Linn และคณะได้ใช้ oligonucleotide arrays เพื่อทำการศึกษากลไกของ CIK cells ในขณะที่ทำลายเซลล์มะเร็งชนิด AML และ ALL พบว่า CIK cells มีการแสดงออกของ NK cell receptor ซึ่งส่วนมากจะเป็น NKG2D และสาร Perforin เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และใน CIK cells ที่ถูกกระตุ้น

แล้วยังมีการแสดงออกของ NKG2D เพิ่มขึ้นอีกด้วย(30) ในการทดลอง NKG2D molecules antibodies blocking ยังส่งผลให้เกิด Cytolysis ลดลง แสดงช่วยยืนยันว่าการทำงานของ CIK cells นั้นจะเกิดขึ้นผ่าน NKG2D มากกว่า TCR engagement(14, 31)



Adapted by Pievani et al, Blood, 2011

ภาพที่ 3 แสดงการอธิบายลักษณะการทำงานของ CIK cells โดยรูปแบบทางด้านซ้ายเป็นการทำงานแบบ Restriction killing ที่อาศัยการทำงานผ่าน TCR และมีความจำเป็นต้องนำเสนอแอนติเจนให้กับ MHC ด้านขวามือเป็นการทำงานแบบ non MHC-restriction ที่ไม่ต้องการการนำเสนอแอนติเจนให้กับ MHC อาศัยการทำงานผ่านการส่งสัญญาณของ Receptor บนผิวเซลล์(32)

การศึกษา Preclinical ของ CIK cells

สิ่งสำคัญที่ทำให้นักวิจัยเริ่มให้ความสนใจในการนำ CIK cells มาปลูกถ่ายให้กับคนไข้คือ การที่ช่วยลดความเสี่ยงจากการเกิด Graft-versus-host disease (GVHD) ในการศึกษาทาง *in vitro* นั้นพบว่า CIK cells มีประสิทธิภาพการทำลายเซลล์มะเร็ง (Tumor-killing) ได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ LAK cells (28) และยังมีประสิทธิภาพที่ดีในการทำลาย Cell line ของมะเร็งชนิด Lymphoma และ Leukemia(15) การทดลองโมเดลของ Bone sarcoma พบว่าในหนูที่รับการปลูกถ่าย Autologous CIK cells นั้น CIK cells สามารถแทรกซึมเข้าไปในมะเร็ง ทำให้ทำลายมะเร็งที่ต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัด อีกทั้งช่วยยับยั้งการเจริญของ Tumor cell ได้อีกด้วย(33) และการศึกษาเปรียบถ่ายการปลูกถ่าย CIK cells กับ Lymphocyte ในหนูทดลองพบว่า CIK cells มีอัตราการเกิด GVHD ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ(34) ซึ่งในการศึกษาอื่นพบว่าการเกิด GVHD ที่ต่ำกว่าของ CIK cells เป็นผลมาจากการที่ CIK cells นั้นมีการหลั่ง IFN- γ ออกมาในปริมาณมาก โดย IFN- γ มีหน้าที่สำคัญในการเป็น GVHD Protective effect จากการศึกษาที่พบว่าหนูที่ได้รับ CIK cells จากหนูบริจาคที่

ถูกทำการ knock-out IFN- γ นั้นมีโอกาสเสียชีวิตด้วย GVHD มากกว่าหนูที่ได้รับ CIK cells จากหนู wild type อีกด้วย(35) หรือในการทดลองปลูกถ่าย CD8⁺ CIK cells ให้กับหนูทดลอง พบว่าไม่เกิดความผิดปกติ ใดๆ แม้ปลูกถ่ายให้ในปริมาณที่สูงถึง 50×10^6 เซลล์(31) ในการทดลองต่อมา มีการนำเอา CD8⁺ CIK cells จากหนู C57BL/6 (H2b) มาเพิ่มจำนวนแล้วทดสอบการเกิด Cytotoxicity กับ Autologous bone marrow เปรียบเทียบกับ BCL-1 lymphoma cell นั้นพบว่า CD8⁺ CIK cells เกิด Cytotoxicity จำเพาะกับ BCL-1 lymphoma cell มากกว่าในการทดลองของ Autologous bone marrow ซึ่งเกิดขึ้นน้อยมากหรือแทบไม่เกิดเลย(34) นอกจากนี้ยังพบว่าในการทดลองแบบ Allogenic นั้นมีผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกับ Autologous เช่นกัน(36) จากผลการทดลองทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า CIK cells นั้นมีความจำเพาะต่อการทำลายเซลล์มะเร็งมากกว่าจะทำลายเซลล์ปกติในร่างกายของหนูทดลอง จึงมีความปลอดภัยที่จะนำมาใช้ศึกษาวิจัยในมนุษย์ต่อไป อีกทั้งเมื่อทำการศึกษาการเกิด GVHD ในหนูทดลองที่ได้รับ Hematopoietic stem cells (HSCs) ร่วมกับ CIK cells นั้นไม่มี GVHD เกิดขึ้น ขณะที่หนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับ naïve splenocytes นั้นตายจาก GVHD ตั้งแต่สองสัปดาห์แรกของการทดลอง(37)

การศึกษาวิจัยทางคลินิกในมนุษย์

ในปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาทางคลินิกในการนำ CIK cells มาใช้กับมนุษย์แล้ว โดยจากรายงานวิจัยของ International registry on CIK Cells (www.cik-info.org) มีการศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วยที่เข้าร่วมลงทะเบียนแล้วกว่า 1,800 ราย โดยปริมาณทั้งหมดที่ใช้ในการปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยอยู่ในช่วง 21.9×10^6 เซลล์ ถึง 5.2×10^{10} เซลล์ หรือคิดเป็น 7.2×10^6 เซลล์ ถึง 2.1×10^{10} เซลล์ในการปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยในแต่ละครั้ง(5, 38) จากการศึกษาทั้งหมดมีผลกระทบบ (side effect) จากการปลูกถ่าย CIK cells เพียงการเกิด Hypotention เล็กน้อย มีไข้ต่ำ ๆ ปวดหัว และอาเจียนเท่านั้น นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของผู้ป่วยใน 384 รายที่ตอบสนองต่อการรักษา มี 24 รายที่ตอบสนองต่อการรักษาอยู่ในเกณฑ์ Complete response (CR), 27 รายที่ตอบสนองต่อการรักษาอยู่ในเกณฑ์ Patial response (CR), 40 รายที่ตอบสนองต่อการรักษาเพียงเล็กน้อย และ 161 รายที่ไม่มีการดำเนินโรคเพิ่มขึ้นจากเดิมก่อนได้รับ CIK cells(38)

การศึกษาทางคลินิกของ CIK cells นั้นมีทั้งปลูกถ่ายให้กับคนไข้แบบ Autologous และ Allogenic โดยในช่วงแรกของการศึกษานั้นพบว่า มี 10 จาก 11 การศึกษาทางคลินิกเป็นการปลูกถ่ายให้กับคนไข้แบบ Autologous(5) โดยส่วนมากจะเป็นคนไข้โรคมะเร็งชนิด Hematopoietic neoplasma จากการศึกษาในผู้ป่วย 9 ราย (แบ่งเป็นผู้ป่วยโรค Hodgkin's disease (HD) จำนวน 7 ราย และ B Non-Hodgkin's lymphomas (NHL) จำนวน 2 ราย) มี Toxicity จาก CIK cells ในอัตราที่ต่ำ มีผู้ป่วยเพียง 1 รายที่เกิด mild hypertension และมี 2 รายเกิดไข้ต่ำ แต่ทั้งนี้ก็มีผู้ป่วย 2

รายที่มีการตอบสนองที่ดี มี 1 รายที่คงความเสถียรของโรค (stabilization of disease) ได้นานถึง 18 เดือน(39) และการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML จำนวน 13 ราย ไม่มีการดำเนินโรคเพิ่มขึ้นหลังได้รับการปลูกถ่าย CIK cells อีกด้วย(40)

หลายปีต่อมาเมื่อมีการศึกษาพัฒนาเพิ่มเติม พบว่าเมื่อให้การรักษาด้วย Allogenic CIK cells นั้นมีผลดีขึ้นและมีอัตราการเกิด GVHD ที่ต่ำ ไม่เพียงแต่ในคนไข้โรคมะเร็งชนิด Hematologic malignancy แต่ยักรวมถึง Solid tumor อีกด้วย เมื่อทำการศึกษาในผู้ป่วย AML จำนวน 18 ราย มี Acute GVHD grade I-II เกิดขึ้นเพียงแค่ 2 ราย และมี Chronic GVHD เพียงแค่ 1 รายเท่านั้น(41) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma (HCC) ในการศึกษา Phase III Randomized Controlled Trial; RCT จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า การให้ CIK cells มีประโยชน์ในการช่วยส่งเสริมการเพิ่มภูมิคุ้มกัน และลดการกลับมาเป็นซ้ำของโรคได้(42) และในการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอด ชนิด non-small cell lung cancer เป็นการศึกษา Phase III Randomized Controlled Trial; RCT จากการศึกษาี้สรุปได้ว่าการให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับ CIK cells มีประโยชน์ต่อผู้ป่วยมากกว่าผู้ป่วยที่ได้ยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว(43) ยังมีการทดลองทางคลินิกอื่น ๆ ดังแสดงในภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่า CIK cells นั้นมีความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการรักษาเป็นอย่างดี

สำหรับการปลูกถ่าย CIK cells แบบ Haploidentical นั้นส่วนมากยังอยู่ในการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งชนิด Hematologic malignancy มากกว่า โดยพบว่าในผู้ป่วยโรค Multiple myeloma 2 รายนั้น มี 1 รายที่ตอบสนองต่อการรักษาอยู่ในเกณฑ์ Complete response นานถึง 12 เดือน โดยไม่พบการเกิด GVHD ขึ้น(44)

การพัฒนา CIK cells ในอนาคต

นอกจากประโยชน์ของการที่นำ CIK cells มาใช้ในด้านเซลล์บำบัดแล้วนั้น ปัจจุบันเริ่มมีการพัฒนาในด้านอื่นเพิ่มเติม เช่น การพัฒนา CIK cells ร่วมกับการยับยั้ง Immune checkpoint inhibitors ต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็น PD-1, KIR, TIM-3, และ LAG-3 บนผิว CIK cells ช่วยส่งเสริมให้ CIK cells มีประสิทธิภาพการเกิด Cytotoxicity ที่ดีขึ้น หรือการเพิ่มประสิทธิภาพในการรับรู้ (Recognition) เซลล์เป้าหมายของ CIK cells ให้ดียิ่งขึ้นด้วยการนำ CIK cells มาทำการตัดต่อทางพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) สร้างเป็น Chimeric-Antigen-Receptor (CAR)(45-48) หรือนำ CIK cells มา co-culture ร่วมกับ Dendritic cell (DC) เพื่อพัฒนาเป็น DC vaccine ในอนาคต (49, 50)

TABLE 1 | Clinical studies on cytokine-induced killer (CIK) cells.

Trial	Phases	Experimental design	Target disease	Recruitment	Enrollment
NCT01533727	II	CIK + chemotherapy	Non-small-cell lung cancer (NSCLC)	Withdrawn	0
NCT02539017	II	Dendritic cell (DC)/CIK + chemotherapy	Triple-negative breast neoplasms	Withdrawn	0
NCT01871480	II	CIK + gefitinib	NSCLC	Terminated	50
NCT01655628	II	CIK + chemotherapy	Nasopharyngeal carcinoma	Recruiting	40
NCT01902875	Undefined	CIK + chemotherapy	NSCLC	Recruiting	100
NCT01914263	I	CIK	Solid tumor	Recruiting	40
NCT01868490	II/III	CIK	Cholangiocarcinoma	Recruiting	13
NCT01186809	II	CIK	Hematologic malignancies	Recruiting	50
NCT01839539	II	DC-CIK	Colorectal cancer	Recruiting	60
NCT01799083	II/III	Decitabine + CIK	Solid tumors/B cell lymphoma	Recruiting	100
NCT00862303	II/III	DC-CIK	Renal cell carcinoma	Recruiting	100
NCT02621333	II	CIK + chemotherapy	Lung adenocarcinoma	Recruiting	280
NCT02280278	III	Radical surgery/adjunct chemotherapy + CIK	Colon cancer	Recruiting	550
NCT01592422	II	CIK	Small-cell lung cancer	Recruiting	60
NCT01498055	II/III	CIK	Lung cancer	Recruiting	120
NCT01481259	II/III	CIK	NSCLC	Recruiting	120
NCT02752243	II/III	CIK	Myelodysplastic syndromes (MDS)/acute leukemia	Recruiting	40
NCT02651441	II/III	DC-CIK + chemotherapy	NSCLC	Recruiting	60
NCT02568748	III	CIK	Advanced HCC	Recruiting	20
NCT02487017	II	DC-CIK + TACE	Hepatocellular carcinoma (HCC)	Recruiting	60
NCT02644863	II	DC-CIK + chemotherapy	Esophageal cancer	Recruiting	60
NCT01691625	Undefined	DC-CIK	Esophageal cancer	Recruiting	50
NCT01758679	IV	Licartin + CIK	HCC	Recruiting	120
NCT01783951	II/III	S-1 + DC-CIK	Gastric cancer	Recruiting	30
NCT01781520	II/III	S-1 + DC-CIK	Pancreatic cancer	Recruiting	30
NCT02504229	II	DC-CIK + chemotherapy	Gastric cancer	Recruiting	80
NCT01691664	Undefined	Radiation therapy + DC-CIK	Esophageal cancer	Recruiting	40
NCT01884168	Undefined	DC-CIK	Malignant tumor	Recruiting	30
NCT01898793	I	Chemotherapy + CIK	Leukemia, myeloid, acute	Recruiting	24
NCT01906632	Undefined	DC-CIK	Malignant tumor	Recruiting	50
NCT02851784	II/III	Microwave ablation + CIK	HCC	Recruiting	50
NCT01929499	II	CIK	Colonic neoplasms	Not yet recruiting	210
NCT01821495	II	DC-CIK to treat NPC	Nasopharyngeal carcinoma	Not yet recruiting	100
NCT02498988	IV	Temozolomide + CIK	Advanced malignant gliomas	Not yet recruiting	120
NCT02494804	II/III	Temozolomide + CIK	Malignant gliomas	Not yet recruiting	80
NCT02490735	II	CIK	Esophageal squamous cell carcinoma	Not yet recruiting	2,000
NCT01631357	II/III	CIK + chemotherapy	Lung cancer	Not yet recruiting	200
NCT01821482	II	DC-CIK	HCC	Not yet recruiting	100
NCT02497898	II	CIK	Lymphoma, non-Hodgkin	Not yet recruiting	1,000
NCT02487550	II	DC-CIK	Renal neoplasia	Not yet recruiting	1,200
NCT01235845	II/III	DC-activated CIK + DC	Malignant glioma	Not yet recruiting	30
NCT02415699	II/III	DC-CIK + chemotherapy	Colorectal cancer	Not yet recruiting	100
NCT01240005	II/III	DC-CIK	Renal cell carcinoma	Not yet recruiting	30
NCT01828008	Undefined	CD20 antibody + CIK	Lymphomas	Not yet recruiting	20
NCT02688686	II/III	Genetically modified DC + CIK	NSCLC with bone metastases	Not yet recruiting	30
NCT02498756	II	CIK + ipilimumab	Melanoma	Not yet recruiting	300
NCT02585908	II/III	CIK + $\gamma\delta$ T	Gastric cancer	Not yet recruiting	120
NCT02856815	II	CIK	Hepatocellular	Not yet recruiting	78
NCT02782546	II	CIK NK cell	Acute myeloid leukemia	Not yet recruiting	60
NCT00769106	III	CIK	HCC	Completed	200
NCT02419677	II/III	Radiofrequency ablation + CIK	Colorectal cancer	Completed	60
NCT00815321	II	CIK	Chronic myeloid leukemia	Completed	11
NCT00394381	II/III	CIK	Acute myeloid leukemia/MDS	Completed	17
NCT01749865	III	CIK	Carcinoma, hepatocellular	Completed	200
NCT00460694	II/III	CIK	Hematological malignancies	Completed	24
NCT00477035	II/III	CIK	Hematologic malignancies	Completed	22
NCT01232062	Undefined	DC-CIK + chemotherapy	Triple-negative breast cancer	Completed	46
NCT02406846	Undefined	DC-CIK + cryosurgery	Neoplastic cells, circulating	Completed	80
NCT02412384	Undefined	DC-CIK + cryosurgery	Neoplastic cells, circulating	Completed	120
NCT02450448	Undefined	DC-CIK + cryosurgery	Neoplastic cells, circulating	Completed	60
NCT02416635	Undefined	DC-CIK + cryosurgery	Neoplastic cells, circulating	Completed	60
NCT02450357	Undefined	DC-CIK + cryosurgery	Neoplastic cells, circulating	Completed	60

(Continued)

ภาพที่ 4 แสดงตารางการศึกษาทางคลินิกโดยการปลูกถ่าย CIK cells ด้วยวิธีแตกต่างกันให้กับคนไข้โรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ(51)

การพัฒนาการเพาะเลี้ยง CIK cells เพื่อนำมาใช้ทางคลินิก

จากในภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่าในการรักษาด้วยเซลล์บำบัดโดยใช้ CIK cells นั้นมีความจำเป็นต้องใช้ CIK cells ในปริมาณมากสำหรับการปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยในแต่ละครั้ง อีกทั้งทาง

International Registry on CIK cells (IRCC) ได้แนะนำว่าเพื่อประสิทธิภาพที่ดีในการทำลาย เซลล์มะเร็งมีความจำเป็นต้องใช้ปริมาณ Total CIK cells ที่อย่างน้อย 1×10^9 เซลล์ในแต่ละครั้ง หรือต้องมีปริมาณ $CD3^+CD56^+$ อย่างน้อยที่ 20-30% และต้องปลูกถ่าย CIK cells ซ้ำอย่างน้อยทุก 2-4 สัปดาห์ (ข้อมูลเมื่อปี 2015 จากเว็บไซต์ของ IRCC)(24) เพื่อผลิตเซลล์ให้ได้ถึงปริมาณดังกล่าว จึงมีการพัฒนาการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

Table 1. Clinical trials of adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for the treatment of solid tumors.

Clinical setting	Patients	Types of CIKs	Dose of CIKs	Toxicity	Clinical responses
Metastatic CRC and RCC; NHL	10	Autologous	Total 35×10^8 ($2.2 - 125 \times 10^8$) (2 courses)	Fever (3)	CR (1); SD (3)
Metastatic RCC; HCC Advanced NSCLC	12 59 (randomized)	Autologous Autologous + chemotherapy (docetaxel + cisplatin)	Total 28×10^9 ($6 - 61 \times 10^9$) (3 courses) 1×10^9 /course (5 courses)	Fever (2) None relevant	CR(3); SD (2) Improved PFS and OS
HCC (adjuvant treatment)	127 (randomized)	Autologous	$1 - 2 \times 10^{10}$ /course (3 - 6 courses)	Fever (5)	Improved DFS
HCC (adjuvant treatment)	85 (randomized)	Autologous	$1 - 1.5 \times 10^{10}$ /course (8 - 10 courses)	None relevant	Reduced recurrence rate; Improved symptoms
Gastric cancer (stage IV)	57 (randomized)	Autologous + chemotherapy (FOLFOX4)	1×10^9 /course (5 courses)	Fever (14), Chills (3)	Reduced tumor markers; improved QOL; improved survival
HCC	13	Autologous	$3 - 5 \times 10^9$ /course (3 courses)	Transient fever	Reduced tumor volume (3); improved symptoms; decreased HBV-DNA load
Various (NSCLC; gastrointestinal)	40 (randomized)	Allogeneic (CB derived) + chemotherapy	9×10^9 /course (3 courses)	Fever and flu-like symptoms (5)	Improved PFS and OS
Gastric cancer	156 (randomized)	Autologous + chemotherapy (FOLFOX)	1×10^9 /course (1 courses)	None relevant	Improved survival
Metastatic RCC	148 (randomized)	Autologous	$76 - 114 \times 10^8$ /course (2 - 35 courses)	Fever (21), Fatigue (19)	CR (13); SD (26); improved PFS and OS

CB: Cord blood; CR: Complete response; DFS: Disease-free survival; HBV: Hepatitis B virus; HCC: Hepatocellular carcinoma; NHL: Non-Hodgkin lymphoma; NSCLC: Non-small cell lung cancer; OS: Overall survival; PFS: Progression-free survival; QOL: Quality of life; SD: Stable disease.

ภาพที่ 5 แสดงตารางปริมาณ CIK cells ที่ใช้ในการปลูกถ่ายให้กับคนไข้โรคมะเร็งชนิด Solid tumor(52)

จากตารางที่ 1 นั้นจะเห็นว่าในการเพิ่มจำนวน CIK cells ให้ได้ถึงปริมาณที่ต้องการมีการพัฒนาและศึกษาวิจัยมาอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่า การเพิ่มจำนวน CIK cells นั้นจำเป็นต้องใช้ไซโตไคน์ชนิดอื่นเข้าร่วมกระตุ้น หรือต้องมีการนำเซลล์อื่น ๆ มาเลี้ยงร่วมเป็นเซลล์พี่เลี้ยง (feeder cells) และในบางงานวิจัยต้องทำการตัดต่อพันธุกรรมของเซลล์พี่เลี้ยงเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้น CIK cells อีกด้วย ซึ่งกระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ล้วนมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ราคาที่สูงขึ้น และต้องใช้เซลล์ตั้งต้นปริมาณมาก รวมถึงต้องใช้ระยะเวลาที่มากขึ้นตามมาด้วย แต่ในงานวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยต้องการนำเสนอวิธีการปรับปรุงการเพิ่มจำนวน CIK cells โดยใช้วิธี Gas-permeable culture ซึ่งเป็นเพียงวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ตามมาตรฐานแต่สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 1 แสดงวิธีที่ใช้พัฒนาการเพิ่มจำนวน CIK cells

เซลล์ตั้ง ต้น (เซลล์)	วิธีการทดลอง	การเพิ่มจำนวน/ร้อยละ ของ CD3 ⁺ CD56 ⁺	ระยะเวลา (วัน)	Ref.
1 × 10 ⁶	CIK + IL-1 α	1000 เท่า	30	(23)
-	CIK + IL-6	8.25(±4.09)%	14	(53)
5 × 10 ⁶	CIK + IL-15	~ 40%	28	(54)
1 × 10 ⁶	CIK + engineered K562	1000 เท่า	21	(55)
2 × 10 ⁶	CIK + allogeneic- irradiated PBMC	2243 เท่า	28	(56)
2 × 10 ⁶	CIK + Thymoglobulin	46.08 เท่า	21	(57)
-	shCTLA-4 lentivirus- transduced CIK cells	3.18(±0.19) เท่า	14	(58)
-	CIK + DC	2.44 เท่า	13	(59)
5 × 10 ⁶	CIK + DC	~ 28-30%	28	(50)

ข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional culture method)

ตามปกติแล้วสิ่งที่เซลล์ต้องการเพื่อนำไปใช้ในการเจริญของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้นประกอบไปด้วยปัจจัยหลัก 4 ประการด้วยกัน คือ 1) ปริมาณสารอาหารที่ได้รับจากอาหารเลี้ยงเซลล์ 2) ไฮโดรโค่นที่ใช้ในการกระตุ้นและเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ 3) การแลกเปลี่ยนก๊าซทั้งก๊าซออกซิเจน (O₂) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และ 4) การควบคุม pH ที่เกิดขึ้นจากการสะสมของเสียที่เกิดขึ้นในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐานนั้นจะมีข้อจำกัดในเรื่องการควบคุมปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์และการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจน (O₂) รวมไปถึงการสะสมของเสียที่เกิดขึ้นในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และกรดแลคติก (Lactic acid)(7) ทำให้เซลล์ได้รับการแลกเปลี่ยนก๊าซอยู่แค่บริเวณผิวเท่านั้น และปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จำกัด ด้วยเหตุผลดังกล่าวเพื่อให้เซลล์มีการเจริญต่อไปได้ การเลี้ยงเซลล์ในวิธีมาตรฐานจึงมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อยขึ้น แต่การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อยนี้เองนำมาซึ่งการใช้ระยะเวลาทำงานเพิ่มมากขึ้น การผลิตเซลล์ในแต่ละครั้งมีมูลค่าที่ต้องเสียเพิ่มสูงขึ้น และขั้นตอนการทำงานที่มากขึ้นนี้ยังส่งเสริมให้อาจเกิดการปนเปื้อนของเซลล์เพิ่มมากขึ้นอีกทางด้วย

ในระบบการเลี้ยงเซลล์ทั่วไปนั้นเซลล์จะเจริญอยู่บริเวณด้านล่างของอุปกรณ์ การแลกเปลี่ยนก๊าซจะเกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลของ O_2 จะถูกถ่ายเทจากสภาวะแวดล้อมในบรรยากาศรอบเซลล์หรือในบริเวณตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ (O_2 มีสถานะเป็นก๊าซ) เข้าสู่บริเวณอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ (บริเวณที่เป็นของเหลว) ผ่านลงไปยังบริเวณที่เซลล์เจริญอยู่ด้านล่าง ในวิธีมาตรฐานนั้นเพื่อให้การแลกเปลี่ยนก๊าซสามารถเข้าสู่บริเวณที่เซลล์กำลังเจริญอยู่ด้านล่างและสามารถเจริญต่อไปได้โดยไม่มีผลกระทบ ต้องควบคุมปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อความเข้มข้นของเซลล์ ทำให้สามารถใส่ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ได้สูงสุดเพียงแค่ 0.2-0.3 เซนติเมตร หรือ 0.2-0.3 มิลลิเมตรต่อพื้นที่ผิว 1 ซม.² เท่านั้น หากใช้อาหารเลี้ยงเซลล์มากเกินไปจะทำให้การแลกเปลี่ยนก๊าซลงไปไม่ถึงเซลล์ที่เจริญอยู่ด้านล่าง ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่ว่าในการแลกเปลี่ยนก๊าซในการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐานนั้นเกิดขึ้นได้อย่างจำกัด(60) (ภาพที่ 6) ด้วยข้อจำกัดนี้หากควบคุมปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่เหมาะสมอาจส่งผลกระทบต่อเซลล์บางชนิดได้ เช่น ในเซลล์ Renal tubular epithelial นั้นได้รับผลกระทบจากการที่ใส่ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์มากเกินไปที่กำหนด ทำให้ได้รับปริมาณ O_2 ลดลง ผลที่ตามมาคือเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง Oxidative metabolism เพื่อเพิ่มอัตราการเกิด glycolysis ในกระบวนการและส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (61) จากเหตุผลทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าการควบคุมปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์นั้นเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญมากในการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐาน ทำให้จำเป็นต้องควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่เสมอ และต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อยขึ้นเพื่อควบคุมปริมาณ pH ของเซลล์ให้เหมาะสมอีกด้วย

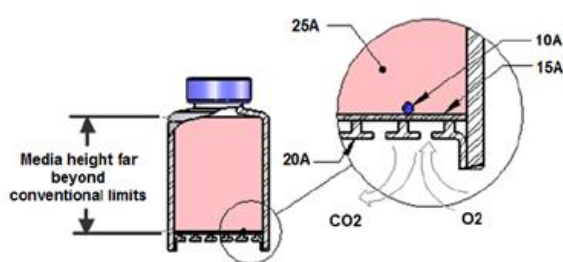


Figure 1A: Novel device

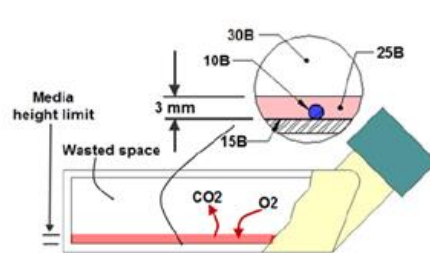


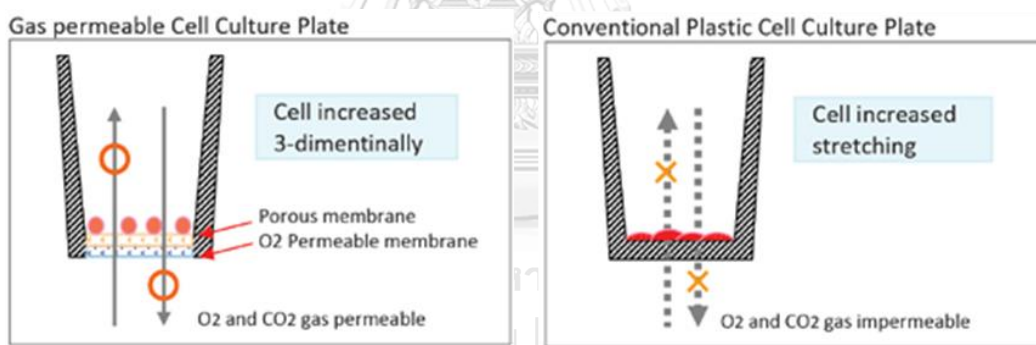
Figure 1B: Conventional flask

ภาพที่ 6 ด้านซ้ายแสดงการเลี้ยงเซลล์ด้วยอุปกรณ์ที่ใช้เทคโนโลยี Gas-permeable รูปด้านขวาแสดงการเลี้ยงเซลล์ด้วยอุปกรณ์ที่ใช้ในวิธีมาตรฐาน(62)

วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเพิ่มการแลกเปลี่ยนก๊าซ (Gas permeable culture method)

จากข้อจำกัดในเรื่องการแลกเปลี่ยนก๊าซและปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เพื่อลดผลกระทบดังกล่าวนำมาสู่การพัฒนาวิธีที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่เรียกว่า วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเพิ่มการแลกเปลี่ยนก๊าซ หรือ Gas-permeable culture วิธีนี้เป็นเทคโนโลยีที่อาศัยหลักการการเพิ่มการแลกเปลี่ยนก๊าซ

มากกว่าในวิธีมาตรฐานจาก Gas-permeable membrane บริเวณด้านล่างของอุปกรณ์ (ภาพที่ 7) โดยจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนก๊าซทั้ง O_2 และ CO_2 ให้เกิดขึ้นที่บริเวณ Gas-permeable membrane นี้อีกทางหนึ่ง ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ทั่วทั้งอุปกรณ์ ส่งเสริมให้เซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีนี้สามารถใส่ปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ได้มากกว่าการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐาน(62-64) ซึ่งตามโครงสร้างของอุปกรณ์ในวิธี Gas-permeable culture ที่พื้นที่ผิว Gas-permeable membrane 2 ซม.² สามารถใส่ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ได้สูงถึง 4 เซนติเมตร(65) และนอกจากช่วยส่งเสริมให้เกิดพื้นที่การแลกเปลี่ยนก๊าซเพิ่มขึ้นแล้ว ยังช่วยให้สามารถเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ได้มากถึง 8 มิลลิลิตร ในขณะที่วิธีมาตรฐานที่พื้นที่ผิว 2 ซม.² เท่ากัน ทั้ง 24 well plate และถาดที่ใช้เลี้ยงเซลล์สามารถใส่ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ได้สูงสุดเพียงแค่ 0.6 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ(63) นอกจากนี้ปกติการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในวิธีแบบมาตรฐานเซลล์จะลงไปเกาะอยู่ที่บริเวณด้านล่างของอุปกรณ์ และจะมีลักษณะการเจริญแบบสองมิติหรือถูกเหยียดออก (Stretching) ตามพื้นที่ผิวของอุปกรณ์ ทำให้เซลล์สูญเสียรูปร่างเดิมไปและเกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ แต่ในอุปกรณ์ Gas-permeable เซลล์จะเจริญในลักษณะแบบสามมิติคือมีลักษณะใกล้เคียงกับสภาพปกติมากกว่าสามารถคงสภาพที่เหมาะสมของเซลล์ได้ดีกว่า (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 รูปด้านซ้ายแสดงลักษณะภายในของอุปกรณ์ที่ใช้เทคโนโลยี Gas-permeable รูปด้านขวาแสดงลักษณะภายในของอุปกรณ์ที่ใช้ในวิธีมาตรฐาน(66)

เซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นี้จึงได้รับทั้งการแลกเปลี่ยนก๊าซและสารอาหารที่เพิ่มขึ้นมากกว่าในวิธีมาตรฐาน ซึ่งปริมาณอาหารที่มากเกินไปยังส่งผลทางอ้อมช่วยให้เกิดการเจือจางของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ แต่สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงในการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีนี้คือจำนวนเซลล์เริ่มต้นต่อพื้นที่ผิว Gas-permeable membrane โดยไม่จำเป็นต้องควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์เหมือนในวิธีมาตรฐาน และไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อย เซลล์จึงสามารถเจริญได้โดยถูกรบกวนจากขั้นตอนการทำงานที่น้อยที่สุด

Gas-permeable Rapid Expansion device หรือ GREX เป็นอุปกรณ์เลี้ยงเซลล์ชนิดหนึ่งที่ใช้หลักการ Gas-permeable ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยมี Gas-permeable membrane บริเวณด้านล่างของตัวอุปกรณ์ รูปแบบของอุปกรณ์ GREX นั้นมีลักษณะและการใช้งานไม่แตกต่างจากเลี้ยงเซลล์ในวิธีมาตรฐานมากนัก จึงง่ายต่อการใช้งานและการนำมาเปรียบเทียบ แต่ทั้งนี้ด้วยคุณสมบัติของ Gas-permeable membrane นี้เองจึงเป็นข้อจำกัดสำคัญของ GREX ที่ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้เฉพาะเซลล์แขวนลอยหรือ non-adherent cells เท่านั้น ไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้กับเซลล์ที่ต้องใช้พื้นผิวอุปกรณ์เพื่อยึดเกาะในการเจริญ

การเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture นี้ได้เคยถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์ภูมิคุ้มกันอื่น ๆ เพื่อใช้ในการรักษาด้วยเซลล์บำบัดแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 2 แต่ทั้งนี้ยังไม่เคยมีการทดลองกับ CIK cells มาก่อน

ตารางที่ 2 แสดงการพัฒนาการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture ในเซลล์ที่ใช้ในเซลล์บำบัดแตกต่างกัน

ชนิดของเซลล์	เซลล์ตั้งต้น (เซลล์)	อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ (เท่า)	ระยะเวลา (วัน)	Ref.
NK cell	2×10^6	208	7	(63)
TCR transduced T-cells	10×10^6	1890(\pm 138)	14	(65)
Cytotoxic T lymphocytes (CTLs)	1×10^6	มากกว่าวิธีมาตรฐาน 20 เท่า	16	(64)
Tumor infiltrating lymphocytes (TILs)	5×10^6	2000	14	(67)
Tumor infiltrating lymphocytes (TILs)	5×10^6	~ 2000	21	(68)
NK-92 cell line	-	200	21	(69)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการ

คำถามการวิจัย (Research Questions)

- Cytokine Induced Killer (CIK) cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture จะมีอัตราการเพิ่มจำนวนได้ดีกว่า CIK cell ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานหรือไม่
- Cytokine Induced Killer (CIK) cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture จะมีคุณลักษณะการแสดงออกของสัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์ และการทำงาน แตกต่างกับ CIK cell ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานหรือไม่

วัตถุประสงค์ของโครงการ (Objective)

- 1) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture โดยใช้ Gas-permeable chamber device (GREX)
- 2) เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวน ลักษณะ phenotype และการทำงานของ CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน
- 3) ทดสอบการเพิ่มปริมาณของ CIK cells ในระดับที่พอเพียงต่อการใช้จริงทางคลินิก (clinical scale expansion) ด้วยวิธี Gas-permeable culture

สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

สมมติฐานหลัก

หากการเพิ่มจำนวน CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable ดีกว่าวิธีมาตรฐานแล้วนั้น จะมีอัตราการเพิ่มจำนวนของ CIK cells มากกว่าวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สมมติฐานรอง

CIK cells ที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Gas-permeable จะมีคุณลักษณะของ CIK cells เช่น Immunophenotype และประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็ง ไม่แตกต่างจาก CIK cells ที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยวิธีมาตรฐาน

อาสาสมัครและการเก็บตัวอย่างเลือด

การกระตุ้น PBMCs เพื่อให้เป็น CIK cells นั้นทำได้จากการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดเท่านั้นไม่สามารถทำได้จาก Cell line หรือเซลล์ต้นทางชนิดอื่น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครในการดำเนินการทดลอง โดยจะแบ่งขนาดตัวอย่างการทดลองออกเป็น 3 ชั้นด้วยกันคือ

- | | | |
|-----------------------------|----|----------|
| 1. Optimizing condition | 3 | คน |
| 2. Experimental study | 10 | คน |
| 3. Clinical scale expansion | 3 | ตัวอย่าง |

งานวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาและและอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่อนุมัติ 413/59 ซึ่งจะคัดเลือกอาสาสมัครจำนวนทั้งหมด 13 คน แบ่งเป็นในชั้น Optimizing condition จำนวน 3 คน และชั้น experimental จำนวน 10 คน โดยมีเกณฑ์ดังนี้

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

- อาสาสมัครสุขภาพดีอายุ 18-40 ปี

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria)

- มีโรคทางระบบเลือดที่เกี่ยวข้องกับเม็ดเลือดขาวหรือมีโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องจากสาเหตุต่างๆ

อาสาสมัครจะถูกเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ ที่หน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด โดยนักเทคนิคการแพทย์ที่มีใบประกอบวิชาชีพหรือแพทย์ผู้ทำการวิจัยเป็นผู้เจาะในปริมาณ 5-10 มิลลิลิตรต่อคน ในหลอดที่บรรจุสารกันเลือดแข็งชนิด Heparin แล้วแยกเอาเฉพาะ PBMCs มาเพื่อทำการกระตุ้นและเหนี่ยวนำให้เป็น CIK cells ในขั้นต่อไปต่อไป

สำหรับการทดสอบ Clinical scale expansion นั้นได้รับการพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รหัสเลขที่โครงการ 17/2560 โดยจะทำการขอสาย Pheresis ส่วนที่แยกเม็ดเลือดขาวออกจากกระบวนการบริจาคเกล็ดเลือดจำนวน 3 ตัวอย่าง มาแยกเอาเฉพาะ PBMCs มากระตุ้นและเหนี่ยวนำให้เป็น CIK cells โดยเม็ดเลือดขาวนี้จะเหลือติดอยู่ในสาย Pheresis ในส่วน Segment ที่แสดงในภาพที่ 8 ซึ่งตามปกติโดยทั่วไปจะถูกทิ้งไปพร้อมกับสาย Pheresis อยู่แล้ว



ภาพที่ 8 แสดงส่วนของถุงที่แยกเอาเม็ดเลือดขาวออกจากเครื่อง Pheresis ที่ทำการขอจาก ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

การแยก Peripheral blood mononuclear cell และการเหนี่ยวนำให้เป็น CIK cells

เมื่อได้ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครมาแล้วจะทำการเจือจางด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่อัตราส่วน 1:1 จากนั้นจะทำการแยก PBMCs ออกมาด้วยวิธี Gradient separation โดยใช้ Ficoll-histopaque (GE Healthcare life Sciences, ค่าความถ่วงจำเพาะที่ 1.077) ปั่นที่ความเร็วรอบ 400g เป็นเวลา 25 นาที PBMCs จะถูกแยกอยู่กึ่งกลางระหว่าง Plasma ของอาสาสมัคร กับ Ficoll-histopaque และเม็ดเลือดแดงจะถูกแยกไปอยู่บริเวณก้นหลอดหลังจากการปั่น ต่อมาจะทำการเก็บ PBMCs มาและทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium (GE Healthcare life Sciences) ที่มี Fetal bovine serum (FBS) (Gibco by life technologies) 10% ในวันที่ PBMCs ออกมาจะนับวันที่แยกนี้เป็นวันที่ 0 ในวันที่ PBMCs จะถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ (Miltenyi Biotech) 1000 ยูนิต/มิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นต่อมาในวันที่ 1 เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย anti-CD3 monoclonal antibody หรือ OKT3 (Biolegend) 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ IL-2 (R&D Systems) 500 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่และทำการเติม IL-2 500 ยูนิต/มิลลิลิตร ทุก 3-4 วัน โดยรักษาความเข้มข้นของเซลล์ไว้ที่ 1×10^6 เซลล์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรเมื่อมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ใช้เวลาทั้งหมดเป็นเวลา 7 วันเพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนและเหนี่ยวนำให้เกิด CIK cells ก่อนนำมาแยกทดสอบในอุปกรณ์ที่แตกต่างกันต่อไป

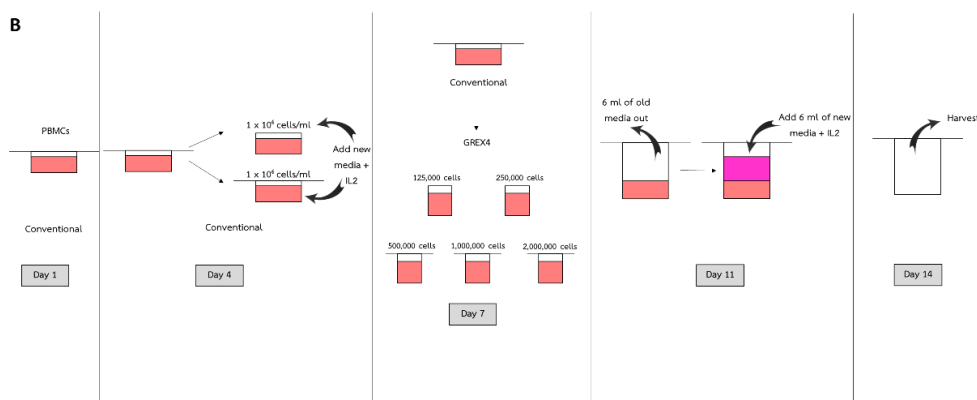
การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture (Optimizing condition)

ก่อนทำการเปรียบเทียบการเลี้ยง CIK cells ในสถานะที่แตกต่างกันนั้นจำเป็นต้องหาปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมกับพื้นที่ของอุปกรณ์ G-REX (Wilson wolf) ที่ใช้เลี้ยง CIK cells ก่อน เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีการเจริญสูงสุด โดยจะทำการทดสอบโดยการเลี้ยงเซลล์ตั้งต้นที่ปริมาณแตกต่างกันควบคุมสถานะการเพาะเลี้ยงเดียวกันภายในอุปกรณ์ G-REX 24 well plate ที่มีขนาดพื้นที่ผิว Gas-permeable membrane 2 ซม.² เกณฑ์ในการคัดเลือกปริมาณที่เหมาะสมในการทดลองนี้คือ Minimal seeding concentration ซึ่งคือปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการทดลองนี้จะใช้เลือดอาสาสมัครจำนวน 3 คนมาแยก PBMCs ทำการกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells จนครบเวลา 7 วันด้วยวิธีมาตรฐาน จากนั้นจะทำการแบ่งเซลล์มาเลี้ยงใน G-REX 24 well plate ที่ปริมาณเซลล์ตั้งต้นแตกต่างกันในจำนวน 125,000 เซลล์/ซม.², 250,000 เซลล์/ซม.², 500,000 เซลล์/ซม.², 1,000,000 เซลล์/ซม.² และ 2,000,000 เซลล์/ซม.² โดยจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และกระตุ้นด้วย IL-2 500 ยูนิต/มิลลิตรทุก 4 วัน ใช้เวลาเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเป็นเวลาทั้งสิ้น 14 วัน (รวมระยะเวลากระตุ้น PBMCs ให้เป็น CIK cells) ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และ ระดับ CO₂ 5% (ภาพที่ 9 A, B)

A



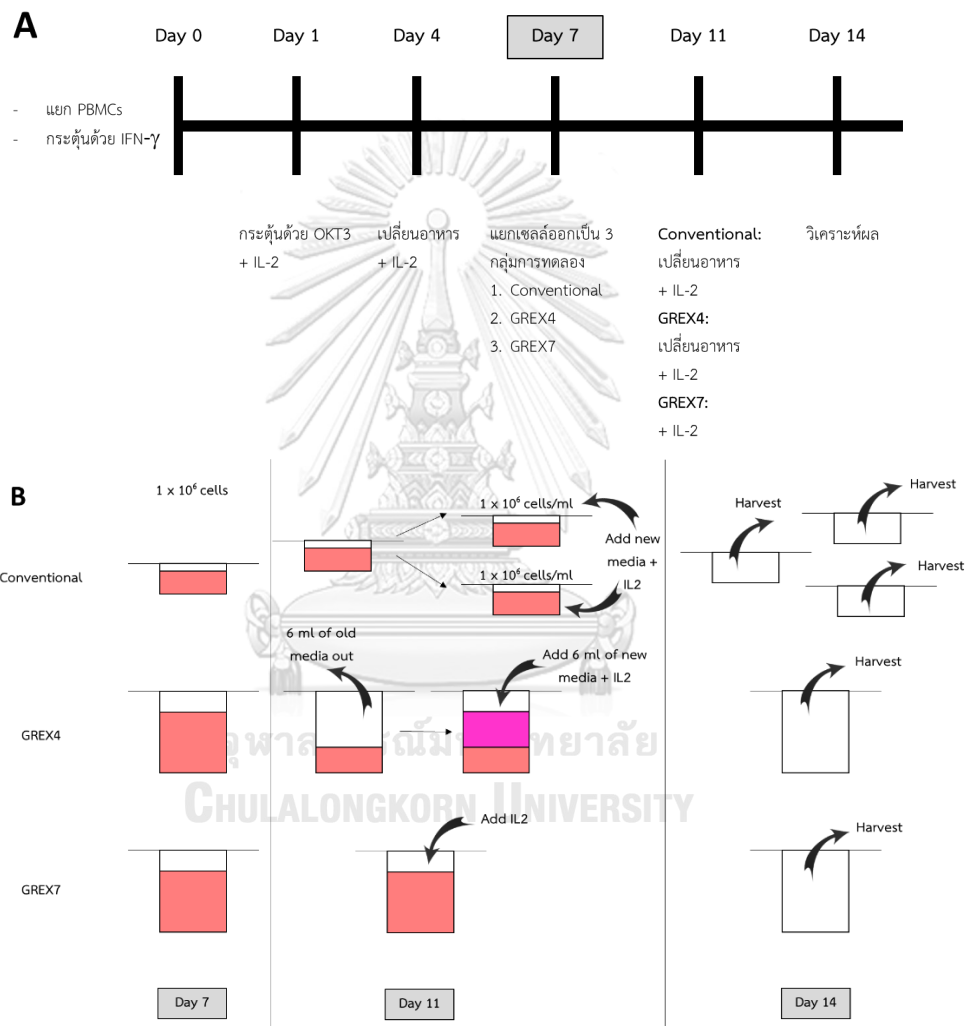


ภาพที่ 9 A: แผนภาพแสดงการเปลี่ยนอาหาร การกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells ในระยะเวลา 14 วันของการทดลองขั้น Optimizing condition B: ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์

การเปรียบเทียบการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน (Experimental study)

ในการทดลองนี้จะใช้เลือดอาสาสมัครจำนวน 10 คน มาแยกเป็น PBMCs ทำการกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells จนครบ 7 วันด้วยวิธีมาตรฐาน แล้วจึงทำการแบ่งเซลล์ที่เลี้ยงไว้ ออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional) โดยใช้อุปกรณ์ 24 well plate พื้นที่ผิว 2 ซม.² กลุ่มที่ 2 คือการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture โดยใช้อุปกรณ์ 24 well G-REX พื้นที่ผิว 2 ซม.² และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน (GREX4) และกลุ่มที่ 3 คือการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture โดยใช้อุปกรณ์ 24 well G-REX พื้นที่ผิว 2 ซม.² และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน (GREX7) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 กลุ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และระดับ CO₂ 5% ใช้เวลาเลี้ยงเซลล์รวมทั้งสิ้นเป็นเวลา 14 วัน โดยทั้ง 3 กลุ่มจะเริ่มเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ตั้งต้น 1 × 10⁶ เซลล์ (0.5 × 10⁶ เซลล์ต่อพื้นที่ผิว 1 ซม.²) เท่ากัน ซึ่งปริมาณนี้เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ สำหรับขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นจะแตกต่างกันไปตามแต่ละกลุ่ม โดยในกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐานนั้นจะเปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน ซึ่งปริมาณอาหารใหม่จะถูกเพิ่มเติมจนได้ระดับความเข้มข้นของเซลล์อยู่ที่ 1 × 10⁶ เซลล์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร แต่สำหรับการเปลี่ยนอาหารในกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture จะแบ่งการเปลี่ยนอาหารเป็น 2 แบบ คือกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 กับ 7 วัน โดยวิธีการจะแตกต่างจากวิธีมาตรฐาน คือต้องคงอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมไว้ในอุปกรณ์ในปริมาตร 25% ของอุปกรณ์ (2 มิลลิลิตร) หรืออีกนัยหนึ่งคือจะนำอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกในปริมาณ 75% (6 มิลลิลิตร) ของปริมาตรอาหารทั้งหมด (8 มิลลิลิตร) โดยไม่

รบกวนเซลล์ที่อยู่บริเวณพื้นผิว Gas-permeable membrane ด้านล่าง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ปริมาณ 6 มิลลิลิตรโดยไม่ต้องควบคุมปริมาตรอาหารต่อจำนวนเซลล์เหมือนในวิธีมาตรฐาน และเซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย IL-2 500 ยูนิต/มิลลิลิตรทุก 4 วันในทุกกลุ่มการทดลอง (ภาพที่ 10 A, B) โดยการทดลองนี้จะทำการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น องค์ประกอบของเซลล์ อัตราการเพิ่มจำนวน ระดับการแสดงออกของ Activating markers และความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็ง (Cytotoxicity) ของ CIK cells แต่ละกลุ่ม

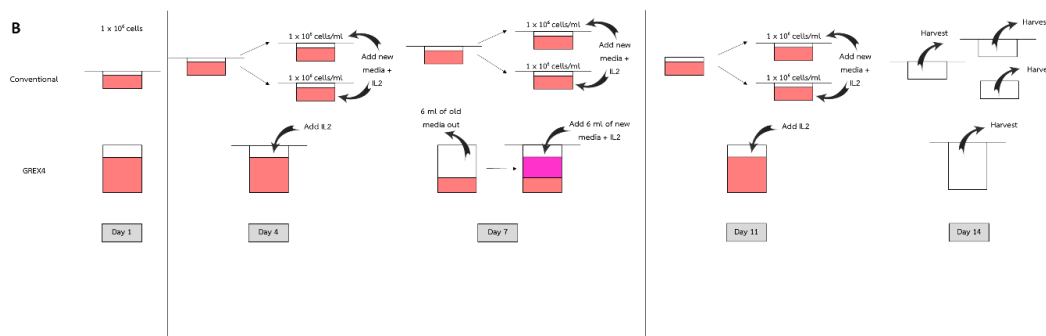


ภาพที่ 10 A: แผนภาพแสดงการเปลี่ยนอาหาร การกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells ในระยะเวลา 14 วัน ของการทดลองขั้น Experimental study B: ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์

การเปรียบเทียบการเลี้ยง CIK cells โดยการเลี้ยงเซลล์ในอุปกรณ์ Gas-permeable culture ตั้งแต่ขั้นตอนการเริ่มเหนี่ยวนำและเลี้ยงต่อเนื่องไปในอุปกรณ์ Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน

ในการทดลองนี้จะทำการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture ในอุปกรณ์ GREX ตั้งแต่การกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells (วันที่ 0) และเลี้ยงต่อเนื่องในอุปกรณ์นี้จนสิ้นสุดการทดลอง โดยจะเริ่มเลี้ยงที่ PBMCs ตั้งต้น 1×10^6 เซลล์ (0.5×10^6 เซลล์ต่อพื้นที่ผิว 1 ซม.²) ทั้งในวิธี Gas-permeable culture และวิธีมาตรฐานเปรียบเทียบกัน ในวันที่ 0 เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ 1000 ยูนิต/มิลลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นในวันที่ 1 จะกระตุ้นเซลล์ด้วย OKT3 50 นาโนกรัม/มิลลิตรและ IL-2 500 ยูนิต/มิลลิตร โดยในวิธี Gas-permeable culture จะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 7 วันและในวันที่ 7 ทำการปรับจำนวนเซลล์ให้เหลือเพียง 1×10^6 เซลล์ต่อหลุม (0.5×10^6 เซลล์ต่อพื้นที่ผิว 1 ซม.²) และเลี้ยงต่อไปใช้ระยะเวลาทั้งหมด 14 วัน แต่ในวิธีมาตรฐานจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และปรับระดับความเข้มข้นของเซลล์ให้อยู่ที่ 1×10^6 เซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิตรทุกๆ 4 วันตามวิธีปกติและใช้ระยะเวลาทั้งหมด 14 วันและกระตุ้นด้วย IL-2 500 ยูนิต/มิลลิตรทุก 4 วันทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง โดยจะทำการเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และระดับ CO₂ 5% (ภาพที่ 11 A, B) โดยการทดลองนี้จะทำการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น องค์ประกอบของเซลล์ อัตราการเพิ่มจำนวน ระดับการแสดงออกของ Activating markers และความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็ง (Cytotoxicity) ของ CIK cells แต่ละกลุ่ม





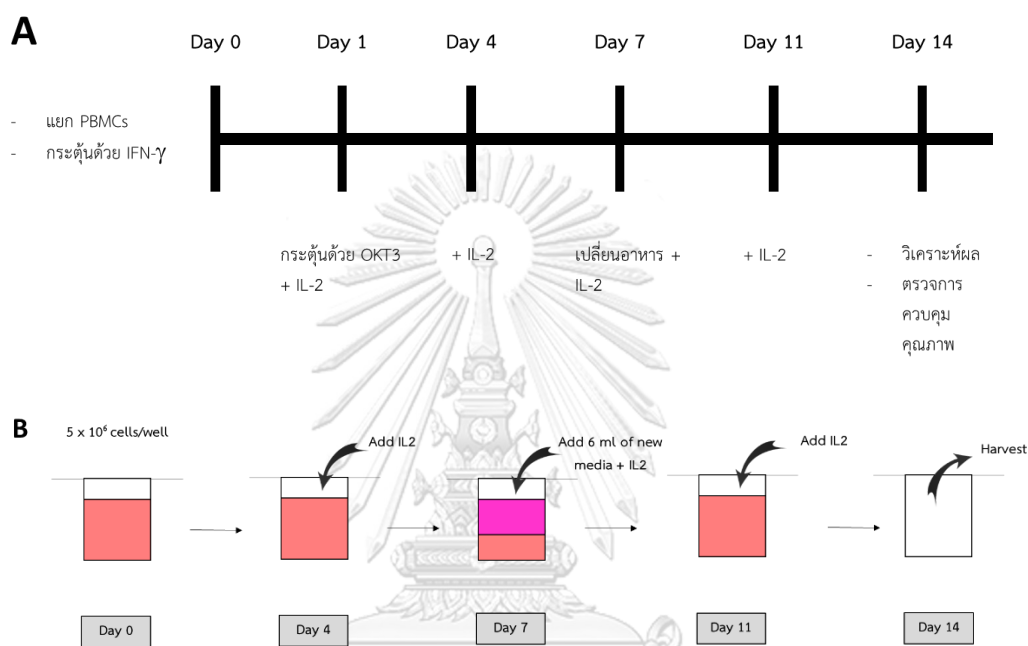
ภาพที่ 11 A: แผนภาพแสดงการเปลี่ยนอาหาร การกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells ในระยะเวลา 14 วันของการทดลองการเลี้ยง CIK cells ต่อเนื่องในอุปกรณ์ Gas-permeable culture B: ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์

การทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ในปริมาณที่สามารถใช้ได้กับการวิจัยทางคลินิก (Clinical scale expansion)

ในการวิจัยทางคลินิกนั้นจำเป็นต้องใช้ CIK cells ในปริมาณอย่างน้อย $1-5 \times 10^9$ เซลล์ต่อการปลูกถ่ายเซลล์แต่ละครั้งเพื่อผลการตอบสนองทางคลินิก การเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เซลล์ตั้งต้นในปริมาณมาก โดยต้องมีปริมาณอย่างน้อย $3-5 \times 10^7$ เซลล์เนื่องจากความจำเป็นต้องใช้เซลล์ตั้งต้นปริมาณมากในการทดสอบนี้ การเจาะเลือดจากอาสาสมัครเพื่อให้ได้เซลล์จำนวนที่เพียงพอต่อจำนวนดังกล่าวต้องใช้เลือดอาสาสมัครในปริมาณมากถึง 30-60 มิลลิลิตรต่อคน ซึ่งไม่เหมาะสมตามจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ด้วยเหตุนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องใช้เม็ดเลือดขาวที่เหลือจากกระบวนการ Pheresis ในการบริจาคเกล็ดเลือดที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย มาแยกเป็น PBMCs ทดแทนการเจาะเลือดอาสาสมัคร ซึ่งโดยทั่วไปส่วนนี้จะถูกทิ้งไปพร้อมกับสาย Pheresis หลังจากกระบวนการบริจาคเกล็ดเลือดอยู่แล้ว และเม็ดเลือดขาวที่เหลือติดอยู่ในสาย Pheresis นั้นมีปริมาณมากเพียงพอต่อการทดลอง จึงเป็นทางเลือกของแหล่งเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมจะนำมาใช้ในการทดสอบการเพิ่มปริมาณ CIK cells เพื่อจุดประสงค์ทางคลินิก

การทดลองนี้จะเริ่มเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture ตั้งแต่วันที่ 0 ของการทดลอง โดยไม่ย้ายเซลล์ออกจากอุปกรณ์และใช้ GMP grade reagents ทั้งหมด โดยจะเริ่มเลี้ยงเซลล์ด้วย PBMCs ตั้งต้น 5×10^6 เซลล์ ใน GREX 6 well plate พื้นที่ผิว 10 ซม.^2 ต่อหลุม (0.5×10^6 เซลล์ต่อพื้นที่ผิว 1 ซม.^2) จำนวน 6 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง (รวมปริมาณเซลล์เริ่มต้นทั้งหมดคือ 30×10^6 เซลล์) ในวันที่ 0 เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ 1000 ยูนิต/มิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นในวันที่ 1 จะกระตุ้นเซลล์ด้วย OKT3 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตรและ IL-2 500 ยูนิต/มิลลิลิตร เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 7 และทำการกระตุ้นซ้ำด้วย IL-2 ทุก ๆ 4 วัน โดยในวันที่ 7 นั้นจะทำการ

ปรับจำนวนเซลล์ให้เหลือเพียง 5×10^6 เซลล์ต่อหลุม (0.5×10^6 เซลล์ต่อพื้นที่ผิว 1 ซม.^2) ใช้เวลาเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด 14 วันในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และระดับ CO_2 5% (ภาพที่ 12) โดยการทดลองนี้จะทำการวัดปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น สัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์ และอัตราการเพิ่มจำนวน และทำการตรวจการควบคุมคุณภาพสำหรับเซลล์ที่จะนำไปใช้ทางคลินิกดังแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 12 A: แผนภาพแสดงการเปลี่ยนอาหาร การกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells ในระยะเวลา 14 วันของการเพิ่มจำนวนเซลล์ในปริมาณที่สามารถใช้ได้กับการวิจัยทางคลินิก B: ขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และการกระตุ้นด้วยไซโตไคน์

ตารางที่ 3 แสดงการตรวจการควบคุมคุณภาพสำหรับเซลล์ที่จะนำไปใช้ทางคลินิก

Test	Method	Specification
Cell numbers	Hemocytometry	$\geq 1 \times 10^9$ cells
Cell viability	Tryphan blue staining	$\geq 80\%$ viable cells
Cytotoxicity	Cytotoxicity assay	$\geq 20\%$ lysis to K-562
Gram stain	Gram staining	No organism

Aerobic and Anaerobic culture	Bactec	No growth at least 7 days
Mycoplasma	PCR for <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	No detection
Fungal culture	Fungus culture	No growth at least 30 days
Endotoxin level	LAL	< 5 IU/ml

การนับจำนวนเซลล์

ทำการนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 0, 7 และ 14 ของการทดลอง โดยเซลล์จะถูกนับจำนวนด้วยอุปกรณ์ Hemocytometer counting chamber และทำการย้อมเซลล์ด้วย Trypan blue (Biolegend) ก่อนเพื่อแยกนับเฉพาะเซลล์ที่ยังมีชีวิตโดยเซลล์จะไม่ติดสีน้ำเงินของ Trypan

การวิเคราะห์ Immunophenotype ของ CIK cells

ในวันที่ 0, 7 และ 14 จะแบ่งเซลล์ในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 5×10^5 เซลล์มาเจือจางใน PBS 100 ไมโครลิตร และย้อมด้วย anti-CD3-PE และ anti-CD56-PerCPCy5.5 (Biolegend) และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Flow Cytometer เพื่อติดตามองค์ประกอบและปริมาณเซลล์ได้แก่ T cells ($CD3^+CD56^-$), NK cells ($CD3^-CD56^+$), CIK cells ($CD3^+CD56^+$) และ Other cells ($CD3^-CD56^-$)

นอกจากนี้ในวันที่ 14 ยังทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ Activating marker บนผิวของ CIK cells หลังจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่ง Activating marker เหล่านี้ได้แก่ NKG2D, DNAM-1, NKp30, และ LFA-1 ด้วยการย้อมด้วย Antibody ต่อ Activating marker ดังกล่าว คือ anti-NKG2D-FITC, anti-DNAM-1-FITC, anti-NKp30-PE และ anti-LFA-1-APC (Biolegend) และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Flow Cytometer เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออก Activating marker ด้วยการเปรียบเทียบระดับ Mean Florescence Intensity (MFI)

ในวันที่ 0 และ 14 ยังทำการวัดปริมาณของ Regulatory T cell (Treg) ใน CIK cells เพิ่มเติมด้วยการย้อม Intracellular FoxP3 (Biolegend) ควบคู่กับ CD4 (Biolegend) และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Flow Cytometer เพื่อเปรียบเทียบจำนวน Treg ระหว่างวิธีเลี้ยงแบบต่าง ๆ

การเพาะเลี้ยง cell line เพื่อใช้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการเกิด Cytotoxicity

K562 (chronic myeloid leukemia cell line: positive control) และ KASUMI (Acute Myeloid Leukemia cell line) (ATCC) เป็น Cell line ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดมัยอีลอยด์ซึ่ง เป็นเซลล์เป้าหมาย (Target cells) ที่ใช้เพื่อการทดสอบประสิทธิภาพการเกิด Cytotoxicity ของ CIK cells โดยจะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่มี FBS 10% และ penicillin 100 ยูนิต/มิลลิลิตร streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (GE Healthcare life Sciences) ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และระดับ CO₂ 5%

การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Cytotoxicity assay

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำลายเซลล์มะเร็งของ CIK cells นั้นจะทดสอบโดยการการเลี้ยง CIK cells (Effector cells) ร่วมกับเซลล์มะเร็งเป้าหมาย (Target cells) ได้แก่เซลล์ K562 และ KASUMI ที่ถูกติดฉลากก่อนด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ Carboxyfluorescein succinimidyl ester หรือ CFSE (Biolegend) ที่อัตราส่วนของ Effector cells ต่อ Target cells (E:T ratio) 5:1, 10:1, 50:1 และ 100:1 ใน 96 well U bottom plate ทำซ้ำจำนวน 3 หลุมในแต่ละอัตราส่วน ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และระดับ CO₂ 5% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบเวลาจะตรวจสอบการตายของเซลล์มะเร็งเป้าหมายด้วยการย้อม Propidium Iodide หรือ PI (Biolegend) และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยวัดปริมาณเซลล์เป้าหมายที่ตายจากการแสดงผลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกร่วมกันของสี CFSE และ PI นำมาคำนวณหาร้อยละ Specific lysis ของเซลล์มะเร็งเป้าหมายจากสูตรด้านล่าง โดยค่า Spontaneous lysis คือร้อยละของเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่ตายเองโดยไม่มี CIK cells และค่า Experimental lysis คือร้อยละของเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่ตายจากการเลี้ยงร่วมกับ CIK cells

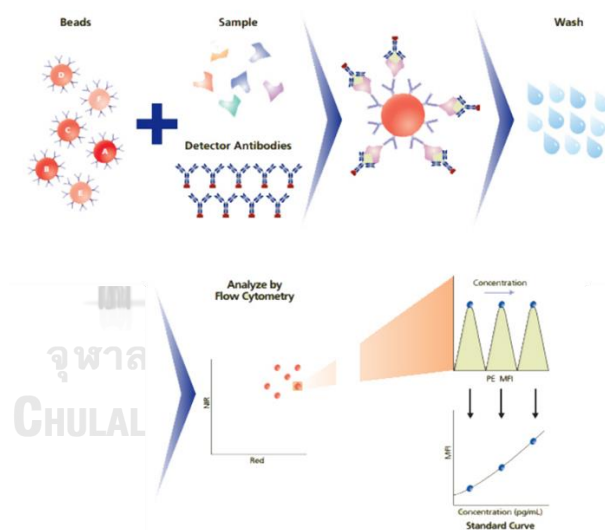
$$\% \text{Specific lysis} = \frac{(\% \text{experimental lysis} - \% \text{spontaneous lysis}) \times 100}{(100 - \% \text{spontaneous lysis})}$$

การวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเซลล์

ในการเปรียบเทียบสารอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน ในวันที่ 7, 11 และ 14 จะนำเอาเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ออกมาในปริมาณ 2-10 ไมโครลิตร เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง ACCu-Chek (Roche) เปรียบเทียบระดับน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเซลล์ของวิธีการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 วิธี

การวิเคราะห์ไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์

ในวันที่ 14 จะทำการปั่นตกตะกอนเพื่อแยกเอาเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงทั้งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานและวิธี Gas-permeable culture มาวัดปริมาณไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาโดยใช้วิธี Cytometric Bead Array (BD bioscience) ซึ่งไซโตไคน์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ทำการวัดปริมาณประกอบไปด้วย IFN- γ , IL-2 และ IL-10 โดยหลักการของวิธีนี้จะนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทดสอบมาผสมร่วมกับ Antibody ต่อไซโตไคน์ที่ถูก conjugate อยู่กับ Capture Bead ที่มีความเข้ม (intensity) ของฟลูออเรสเซนส์แตกต่างกันตามชนิดไซโตไคน์ จากนั้นจะใส่ Phycoerythrin (PE)-conjugated antibody เป็นตัว Detection บ่มในที่มืดและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้ Capture Bead อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการทดสอบ และ Detection มารวมตัวกันในลักษณะ Sandwich complex วิเคราะห์ผลโดยใช้ Flow cytometer และคำนวณปริมาณไซโตไคน์ออกมาในหน่วย pg/ml ด้วยโปรแกรม FCAP Array™



ภาพที่ 13 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์การหลั่งไซโตไคน์ด้วยวิธี Cytometric Bead Array(70)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่น่ามาศึกษาความสัมพันธ์ทั้งหมดจะเก็บรวบรวมข้อมูล และนำเสนอ ในรูปแบบกราฟ และตาราง สำหรับข้อมูลที่เป็นจำนวนเซลล์ทั้งหมด ปริมาณ CIK cells อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการแสดงออกของ Activating marker จะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) สำหรับข้อมูลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำลายเซลล์มะเร็งของ CIK cells จะแสดงผลแบบร้อยละ ในส่วนของ

การศึกษาความสัมพันธ์จะใช้สถิติแบบ *unpaired-student t-test* เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในการทดสอบ และวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5.0 โดยค่าที่ยอมรับได้จะมีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

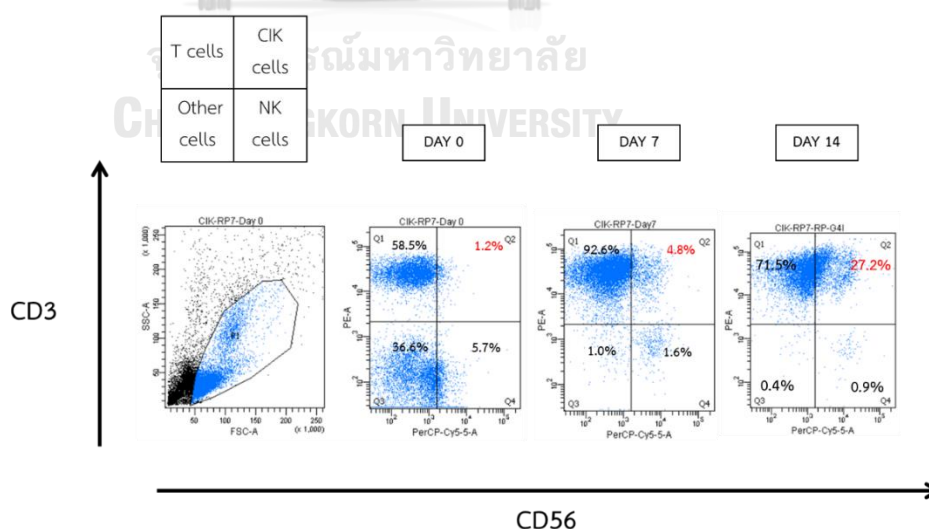


บทที่ 4

ผลการทดลอง

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture ในอุปกรณ์ G-REX

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงเมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture ในอุปกรณ์ G-REX คือ จำนวนเซลล์ตั้งต้นต่อพื้นที่ผิวของอุปกรณ์ ซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานที่จะคำนึงถึง ปริมาณเซลล์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นหลัก ก่อนทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนของ CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน จึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง CIK cells ในอุปกรณ์ G-REX ก่อน โดยสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวคือปริมาณ เซลล์ตั้งต้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้เกิดการเพิ่มจำนวน CIK cells ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะวิเคราะห์ผลจากการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด (Total CIK cells) ในวันที่ 7 มาเปรียบเทียบกับวันที่ 14 และย้อมเซลล์ด้วย anti-CD3 ร่วมกับ anti-CD56 เพื่อติดตามปริมาณเซลล์ที่มีการแสดงออก ร่วมกันของ CD3⁺CD56⁺ (ภาพที่ 14) ซึ่งเซลล์ที่มีการแสดงออกดังกล่าวนี้เป็นองค์ประกอบ (Cell subset) หนึ่งของ CIK cells ที่มีความสำคัญต่อการเกิด Cytotoxicity โดยต่อจากนี้จะขอกกล่าวถึง เซลล์ที่มีการแสดงออกร่วมกันของ CD3⁺CD56⁺ ว่า Effector CIK cells เพื่อความชัดเจนในการ เปรียบเทียบต่อไป

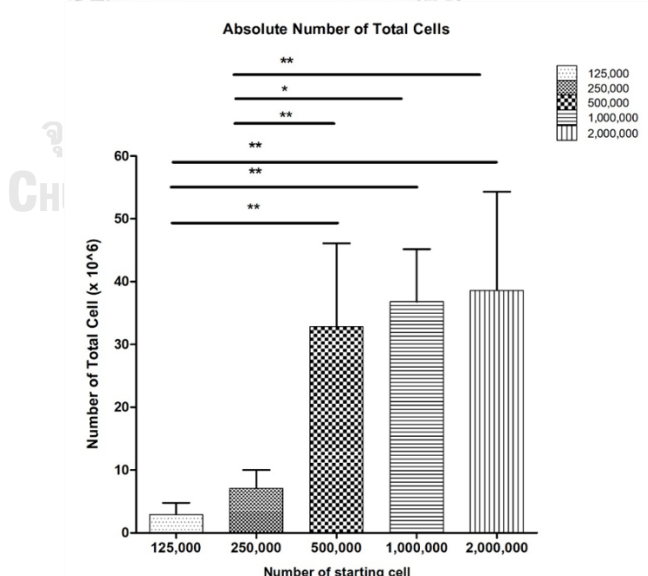


ภาพที่ 14 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ติดตามร้อยละการแสดงออกของ CIK cells (CD3⁺CD56⁺) ในวันที่ 0, 7 และวันที่ 14 จากเครื่อง Flow cytometer (n=1); T cells

(CD3⁺CD56⁻), NK cells (CD3⁺CD56⁺), CIK cells (CD3⁺CD56⁺) และ Other cells (CD3⁻CD56⁻)

หลังจากที่กระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells มาเป็นเวลา 7 วันเซลล์ได้ถูกย้าย เซลล์ลงในอุปกรณ์ 24-well G-REX (พื้นที่ผิว 2 ซม.²) ที่ปริมาณเซลล์ตั้งต้นแตกต่างกันตั้งแต่ 125,000 เซลล์/ซม.², 250,000 เซลล์/ซม.², 500,000 เซลล์/ซม.², 1,000,000 เซลล์/ซม.² ถึง 2,000,000 เซลล์/ซม.² เมื่อครบเวลา 14 วันจะพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมด ปริมาณ CIK cells อัตราการเพิ่มจำนวน (fold-change) ของเซลล์ทั้งหมด และอัตราการเพิ่มจำนวนของ CIK cells เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสม

จากผลการทดลองการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมดพบว่าที่เซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ซม.², 250,000 เซลล์/ซม.², 500,000 เซลล์/ซม.², 1,000,000 เซลล์/ซม.² และ 2,000,000 เซลล์/ซม.² มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ยอยู่ที่ $2.91(\pm 1.86) \times 10^6$ เซลล์, $7.10(\pm 2.90) \times 10^6$ เซลล์, $32.85(\pm 13.25) \times 10^6$ เซลล์, $36.80(\pm 16.74) \times 10^6$ เซลล์ และ $38.63(\pm 15.70) \times 10^6$ เซลล์ตามลำดับ โดยที่เซลล์ตั้งต้น 500,000 เซลล์/ซม.², 1,000,000 เซลล์/ซม.² และ 2,000,000 เซลล์/ซม.² มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ยมากกว่าเซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ซม.² (p -value = 0.0369, 0.0079, 0.0009) และ 1,000,000 เซลล์/ซม.² และ 2,000,000 เซลล์/ซม.² มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ยมากกว่าเซลล์ตั้งต้น 250,000 เซลล์/ซม.² (p -value = 0.0118, 0.0015) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 15)

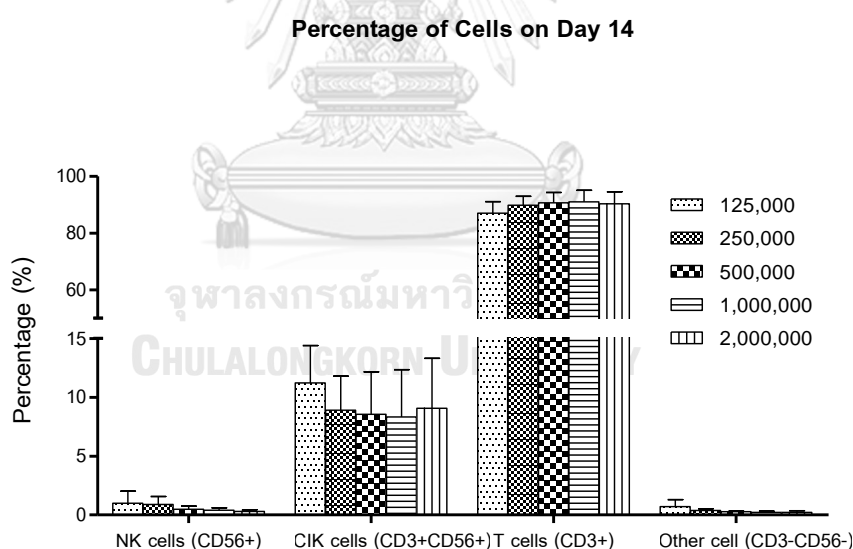


ภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่เซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ซม.², 250,000 เซลล์/ซม.², 500,000 เซลล์/ซม.², 1,000,000 เซลล์/ซม.² และ 2,000,000 เซลล์/ซม.² (n=3)

เมื่อทำการวัดองค์ประกอบของเซลล์ (Immunophenotype) และนำร้อยละการแสดงออกของสัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์ (Cell subset) มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบในเซลล์ตั้งต้นที่ต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4 จะเห็นว่าสัดส่วนของ NK cells, CIK cells, T cells และ Other cells นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติในแต่ละเซลล์ตั้งต้น (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบสัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์ที่เซลล์ตั้งต้นแตกต่างกัน

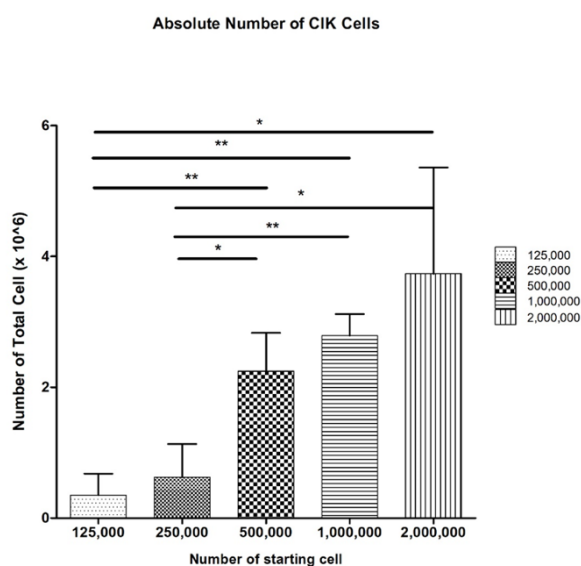
ปริมาณ เซลล์ตั้งต้น (เซลล์/ชม. ²)	%NK cells (CD3 ⁻ CD56 ⁺)	%CIK cells (CD3 ⁺ CD56 ⁺)	%T cells (CD3 ⁺ CD56 ⁻)	%Other cells (CD3 ⁻ CD56 ⁻)
125,000	1.00(±1.01)	11.23(±3.16)	87.05(±4.03)	0.70(±0.61)
250,000	0.90(±0.67)	8.90(±2.90)	89.85(±3.15)	0.38(±0.15)
500,000	0.48(±0.28)	8.55(±3.61)	90.65(±3.67)	0.28(±0.50)
1,000,000	0.40(±0.20)	8.33(±2.02)	91.03(±4.12)	0.23(±0.10)
2,000,000	0.30(±0.14)	9.08(±4.24)	90.35(±4.22)	0.23(±0.13)



ภาพที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบร้อยละของสัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์ ที่เซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ชม.², 250,000 เซลล์/ชม.², 500,000 เซลล์/ชม.², 1,000,000 เซลล์/ชม.² และ 2,000,000 เซลล์/ชม.² (n=3)

เมื่อนำร้อยละการแสดงออกของ Effector CIK cells (CD3⁺CD56⁺) มาคำนวณเป็นปริมาณ CIK cells จากปริมาณเซลล์ทั้งหมด แล้วเปรียบเทียบกันในแต่ละเซลล์ตั้งต้นที่เซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ชม.², 250,000 เซลล์/ชม.², 500,000 เซลล์/ชม.², 1,000,000 เซลล์/ชม.² และ 2,000,000

เซลล์/ชม.² พบว่ามีปริมาณ CIK cells เฉลี่ยอยู่ที่ $0.35(\pm 0.27) \times 10^6$ เซลล์, $0.63(\pm 0.51) \times 10^6$ เซลล์, $2.25(\pm 0.59) \times 10^6$ เซลล์, $2.79(\pm 0.57) \times 10^6$ เซลล์ และ $3.74(\pm 1.63) \times 10^6$ เซลล์ ตามลำดับ โดยที่เซลล์ตั้งต้น 500,000 เซลล์/ชม.², 1,000,000 เซลล์/ชม.² และ 2,000,000 เซลล์/ชม.² มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ยมากกว่าเซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ชม.² (p -value = 0.0081, 0.0030, 0.0241) และ 250,000 เซลล์/ชม.² (p -value = 0.0223, 0.0079, 0.0340) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 17)

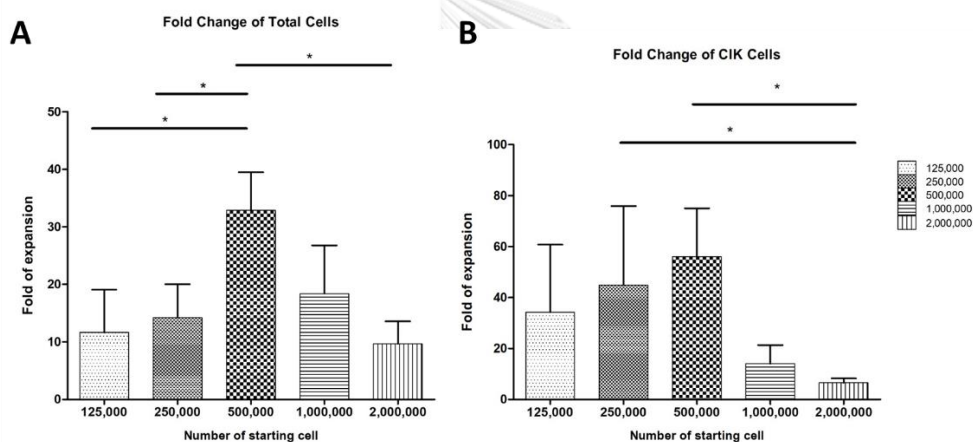


ภาพที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ Effector CIK cells ที่เซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ชม.², 250,000 เซลล์/ชม.², 500,000 เซลล์/ชม.², 1,000,000 เซลล์/ชม.² และ 2,000,000 เซลล์/ชม.² (n=3)

จากตารางการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนของปริมาณเซลล์ทั้งหมดและ CIK cells (ตารางที่ 5) จะเห็นว่าที่เซลล์ตั้งต้น 500,000 เซลล์/ชม.² มีอัตราการเพิ่มปริมาณที่สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตั้งต้นอื่น โดยอัตราการเพิ่มจำนวนของปริมาณเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ยอยู่ที่ $32.85(\pm 13.25)$ เท่า และอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells เฉลี่ยอยู่ที่ $56.04(\pm 37.94)$ นอกจากนี้ที่เซลล์ตั้งต้น 500,000 เซลล์/ชม.² ยังมีอัตราการเพิ่มปริมาณทั้งหมดมากกว่าเซลล์ตั้งต้น 125,000 เซลล์/ชม.² (p -value = 0.00315), 250,000 เซลล์/ชม.² (p -value = 0.0419) และ 2,000,000 เซลล์/ชม.² (p -value = 0.0153) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 18A) นอกจากนี้เซลล์ตั้งต้น 500,000 เซลล์/ชม.² ยังมีอัตราการเพิ่มปริมาณ CIK cells มากกว่าเซลล์ตั้งต้น 2,000,000 เซลล์/ชม.² อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย (p -value = 0.0403) (ภาพที่ 18B)

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดและ CIK cell ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เซลล์ตั้งต้นแตกต่างกัน

ปริมาณเซลล์ตั้งต้น (เซลล์/ชม. ²)	อัตราการเพิ่มจำนวน เซลล์ทั้งหมด	อัตราการเพิ่มจำนวน CIK CELLS
125,000	11.65 (±7.42)	34.25(±26.49)
250,000	14.22(±5.80)	44.89(±31.00)
500,000	32.85(±13.25)	56.04(±37.94)
1,000,000	18.40(±8.37)	14.07(±7.26)
2,000,000	9.66(±3.93)	6.54(±1.73)

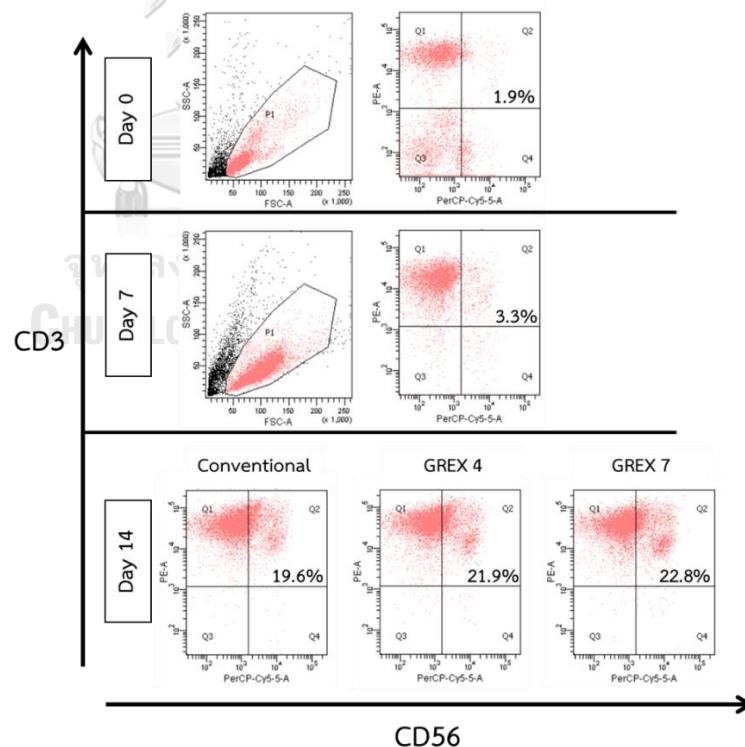


ภาพที่ 18 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ในวันที่ 14 ที่ปริมาณเซลล์ตั้งต้นแตกต่างกัน (n=4) ของ A: แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมด B: แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells

จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นว่าที่เซลล์ตั้งต้น 500,000 เซลล์/ชม.² คือปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture ในอุปกรณ์ G-REX 24 well ขนาดพื้นที่ผิว 2 ชม.² เนื่องจากเป็นปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์เกิดการเพิ่มจำนวนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Minimal seeding concentration) คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ตั้งต้นที่ 500,000 เซลล์/ชม.² ในการเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของ CIK cells กับวิธีมาตรฐานในการทดลองขั้นต่อไป

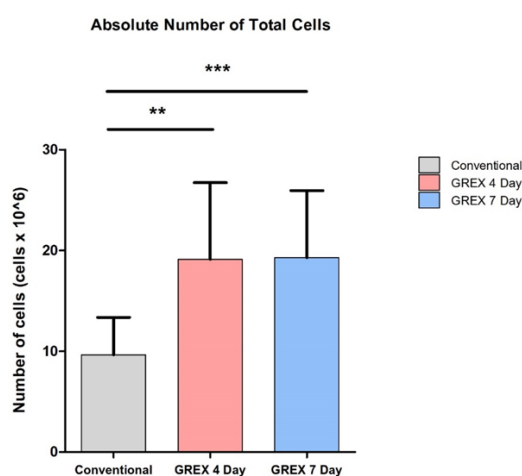
การเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วันและ 7 วัน กับวิธีมาตรฐาน

เมื่อได้ปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมคือที่เซลล์ตั้งต้น 500,000 เซลล์/ชม.² ผู้วิจัยจึงทำการทดลองต่อมาเพื่อเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของ CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน โดยหลังจากกระตุ้น PBMCs เพื่อให้เป็น CIK cells เป็นเวลา 7 วันด้วยวิธีมาตรฐานแล้ว จึงทำการแบ่งเซลล์ที่ถูกกระตุ้นออกเป็น 3 กลุ่มโดยเริ่มเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นกลุ่มละ 500,000 เซลล์/ชม.² (1,000,000 เซลล์ต่อหลุม) ในแต่ละกลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 เลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานใน 24-well plate (พื้นที่ผิว 2 ซม.²) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 4 วัน กลุ่มที่ 2 เลี้ยงใน 24-well G-REX (พื้นที่ผิว 2 ซม.²) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 4 วัน และกลุ่มที่ 3 เลี้ยงใน 24-well G-REX เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 7 วัน ในวันที่ 7 และ 14 จะนับจำนวนเซลล์ และทำการย้อมเซลล์ด้วย anti-CD-3 และ anti-CD56 ในการติดตามปริมาณ Effector CIK cells (CD3⁺CD56⁺) (ภาพที่ 19) เพื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมด ปริมาณ CIK cells อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ทั้งหมด และอัตราการเพิ่มจำนวนของ CIK cells นอกจากนี้จะทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวันทั้ง 7, 11 และ 14 เปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่ม



ภาพที่ 19 แสดงตัวอย่างการ Gating ผลวิเคราะห์เซลล์จาก Flow cytometer ในวันที่ 0, 7 และ 14 โดยผลร้อยละที่แสดงในภาพคือ Effector CIK cells (CD3⁺CD56⁺) (n=1)

เมื่อครบ 14 วัน พบว่าปริมาณเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ยในกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้งที่กลุ่มเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 4 วันและกลุ่ม 7 วัน คือ $19.10(\pm 7.62) \times 10^6$ เซลล์ และ $19.28(\pm 6.66) \times 10^6$ เซลล์ตามลำดับ และวิธีมาตรฐานคือ $9.64(\pm 3.72) \times 10^6$ เซลล์ โดยพบว่าปริมาณเซลล์ทั้งหมดในกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทั้งกลุ่ม 4 วันและกลุ่ม 7 วัน เซลล์มีจำนวนมากกว่าวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.0024 และ 0.0008) ในขณะที่ปริมาณเซลล์ทั้งหมดในกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งกลุ่ม 4 วันและกลุ่ม 7 วันมีปริมาณไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 20)

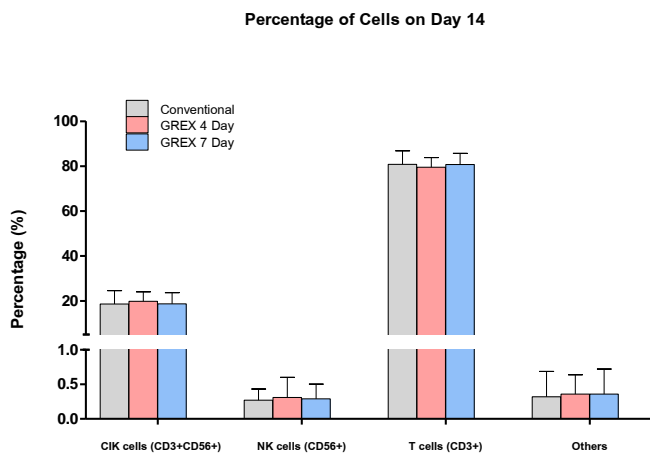


ภาพที่ 20 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน (n=10)

เมื่อทำการเปรียบเทียบสัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์ตามตารางที่ 6 พบว่ามีร้อยละขององค์ประกอบ CIK cells ของแต่ละกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันทั้ง 3 กลุ่ม (ภาพที่ 21)

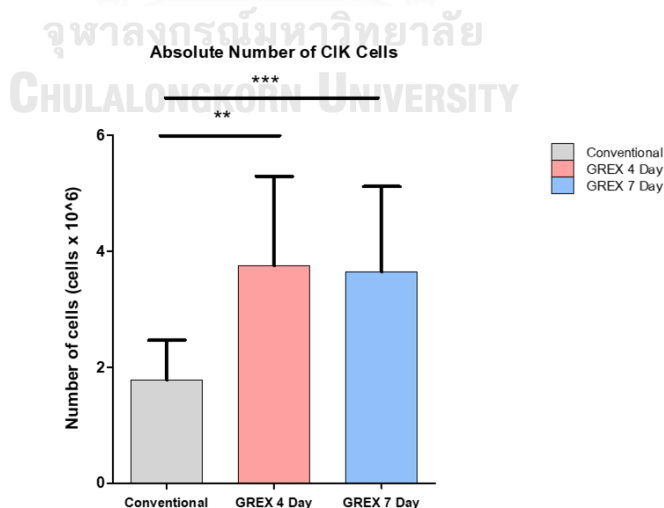
ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบองค์ประกอบของเซลล์ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน

วิธีที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์	%NK cells (CD3 ⁻ CD56 ⁺)	%CIK cells (CD3 ⁺ CD56 ⁺)	%T cells (CD3 ⁺ CD56 ⁻)	%Other cells (CD3 ⁻ CD56 ⁻)
วิธีมาตรฐาน	1.00(±1.01)	18.59(±5.94)	87.05(±4.03)	0.70(±0.61)
G-REX เปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน	0.90(±0.67)	19.83(±4.18)	89.85(±3.15)	0.38(±0.15)
G-REX เปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน	0.48(±0.28)	18.66(±4.99)	90.65(±3.67)	0.28(±0.50)



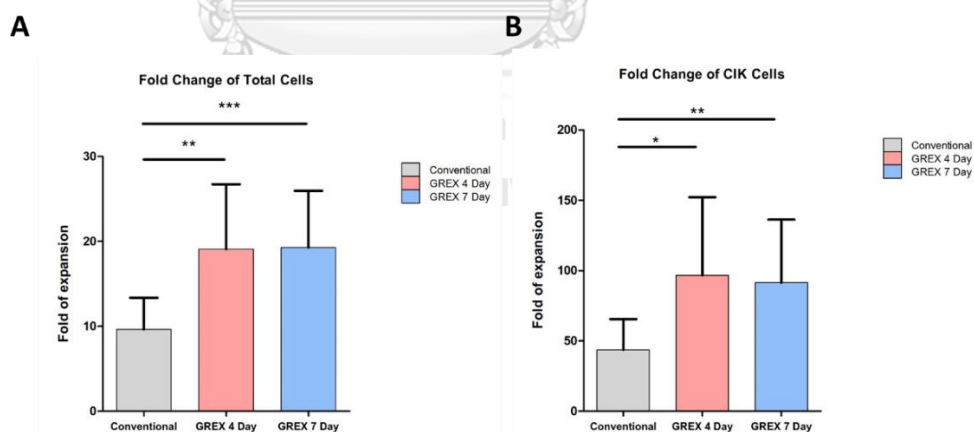
ภาพที่ 21 แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบร้อยละประกอบของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานทั้ง 3 กลุ่มในวันที่ 14 (n=10)

และเมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวน CIK cells พบว่าปริมาณ CIK cells ในกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งกลุ่ม 4 วันและกลุ่ม 7 วัน คือ $3.75(\pm 1.55) \times 10^6$ เซลล์ และ $3.65(\pm 1.47) \times 10^6$ เซลล์ตามลำดับ และวิธีมาตรฐานคือ $1.78(\pm 0.69) \times 10^6$ เซลล์ ซึ่งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งกลุ่ม 4 วันและกลุ่ม 7 วันมีปริมาณ CIK cells มากกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.0017 และ 0.0018) แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ CIK cells ระหว่างกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก 4 วันและ ทุก 7 โด (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน (n=10)

จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้ง 2 กลุ่มยังมีอัตราการเพิ่มจำนวนของปริมาณเซลล์ทั้งหมด และอัตราการเพิ่มจำนวนของ CIK cells สูงกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐาน โดยอัตราการเพิ่มจำนวนของปริมาณเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ยของกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ในกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 4 วันและ 7 วันคือ $19.10(\pm 7.62)$ เท่า และ $19.28(\pm 6.66)$ เท่า ตามลำดับ ส่วนวิธีมาตรฐานคือ $9.64(\pm 3.72)$ เท่า ซึ่งกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้ง 2 กลุ่มสูงกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.0024 และ 0.0008) (ภาพที่ 23A) สำหรับอัตราการเพิ่มปริมาณ CIK cells เฉลี่ยที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ในกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 4 วันและ 7 วันคือ $96.67(\pm 55.60)$ และ $91.44(\pm 44.82)$ ตามลำดับ ส่วนวิธีมาตรฐานคือ $43.75(\pm 21.74)$ เท่า ซึ่งกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้งกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน และ 7 วัน นั้นสูงกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.0118 และ 0.0072) (ภาพที่ 23B) โดยอัตราการเพิ่มจำนวนของ CIK cells สูงสุดกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 4 วันและ 7 วันมีอัตราการเพิ่มขึ้นสูงถึง 204.5 เท่า และ 149.5 เท่า ตามลำดับ แต่ในวิธีมาตรฐานนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุดเพียง 91.34 เท่า แต่ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์ทั้งหมดและ CIK cells ระหว่างกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้งเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 4 วันและ 7 วัน นั้นไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 23 A, B)



ภาพที่ 23 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน A: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดของทั้ง 3 กลุ่ม (n=10) B: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells ของ 3 กลุ่ม (n=10)

ในเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานเพื่อคงความเข้มข้นของเซลล์ที่ 1×10^6 เซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาเปลี่ยนไปเมื่อมีปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มมากขึ้นเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนหลุมที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เนื่องจากในอุปกรณ์เลี้ยงเซลล์ของวิธีมาตรฐานสามารถใส่ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ได้สูงสุดที่ 2 มิลลิลิตรเท่านั้น ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้พื้นที่ผิวเป็นเกณฑ์ดังแสดงในตารางที่ 7 ยังพบว่าในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้งกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 4 วันและ 7 วัน มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดอยู่ที่ $9.55(\pm 3.80) \times 10^6$ เซลล์ กับ $9.64(\pm 3.32) \times 10^6$ เซลล์ตามลำดับ ขณะที่วิธีมาตรฐานมีปริมาณเซลล์ทั้งหมดอยู่ที่ $0.96(\pm 0.67) \times 10^6$ เซลล์ และในปริมาณ CIK cells ของกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กลุ่มที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 4 วันและ 7 วัน อยู่ที่ $1.89(\pm 0.83) \times 10^6$ เซลล์ กับ $1.82(\pm 0.73) \times 10^6$ เซลล์ตามลำดับ ขณะที่วิธีมาตรฐานมีปริมาณ CIK cells อยู่ที่ $0.17(\pm 0.11) \times 10^6$ เซลล์ ซึ่งกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างจากกลุ่มวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.0001) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดของทั้งสองกลุ่มจะเห็นว่าค่ามากกว่าวิธีมาตรฐานอยู่ 8.71 เท่าในอัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์ทั้งหมด และมากกว่าอยู่ 48.77 เท่าในอัตราการเพิ่มปริมาณ CIK cells แต่เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์ระหว่างกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้งเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 4 วันและ 7 วันนั้นไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมด ปริมาณ CIK cells อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมด และอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells ต่อพื้นที่ผิวอุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกันในวันที่ 14

วิธีที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์	ปริมาณ	ปริมาณ	อัตราการเพิ่ม	อัตราการเพิ่มจำนวน
	เซลล์ทั้งหมดต่อพื้นที่ผิว 1 ซม. ² ($\times 10^6$ เซลล์)	CIK cells ต่อพื้นที่ผิว 1 ซม. ² ($\times 10^6$ เซลล์)	จำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อพื้นที่ผิว 1 ซม. ²	อัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells ต่อพื้นที่ผิว 1 ซม. ²
วิธีมาตรฐาน (พื้นที่ผิว 2 ซม. ² x 4 หลุม)	0.96(± 0.67)	0.17(± 0.11)	0.96(± 0.67)	3.87(± 2.19)

G-REX เปลี่ยน				
อาหารทุก 4				
วัน	9.55(±3.80)	1.89(±0.83)	9.55(±3.80)	48.33(±27.80)
(พื้นที่ผิว 2 ซม. 2)				
G-REX เปลี่ยน				
อาหารทุก 7				
วัน	9.64(±3.32)	1.82(±0.73)	9.64(±3.32)	48.77(±27.01)
(พื้นที่ผิว 2 ซม. 2)				

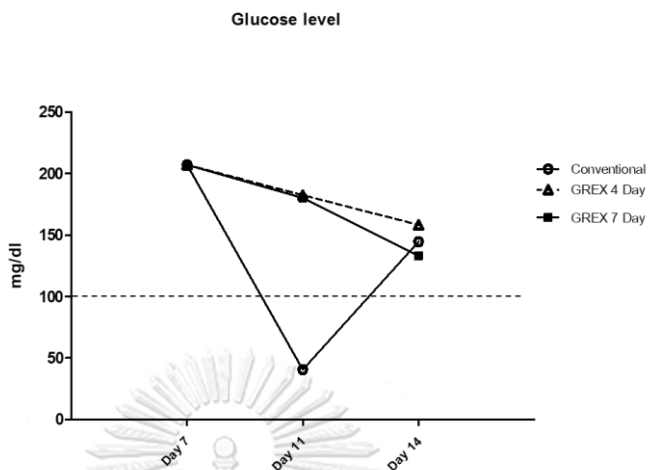
จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่า CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้งกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน และกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่าและมีอัตราการเพิ่มจำนวนที่ดีกว่าการเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ร้อยละการแสดงออกของขององค์ประกอบของเซลล์นั้นนั้นไม่แตกต่างกัน

การวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในช่วงเวลาการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

ในการเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไปหากระดับน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเซลล์น้อยกว่า 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรนั้นจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จึงมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อทดสอบปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงเซลล์ของทั้ง 3 กลุ่ม จึงทำการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 กลุ่มเปรียบเทียบกันควบคู่ไปด้วย โดยเริ่มต้นวัดในวันที่ 7 เป็นพื้นฐาน และวัดซ้ำทุก 4 วัน จากการทดลองพบว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐาน ในช่วงเวลาหลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ไป 4 วัน (วันที่ 11) นั้นมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ยอยู่ที่ 40.60(±18.73) มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรซึ่งลดลงต่ำกว่า 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ในขณะที่ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้งกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน และ 7 วัน มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ยอยู่ที่ 182.40(±18.09) มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรและ 179.30(±7.76) มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ลดลงแต่ไม่ถึง 100 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (ภาพที่ 24)

จากผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture มีปริมาณสารอาหารที่มากกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐาน และสามารถคงระยะเวลาในการเปลี่ยน

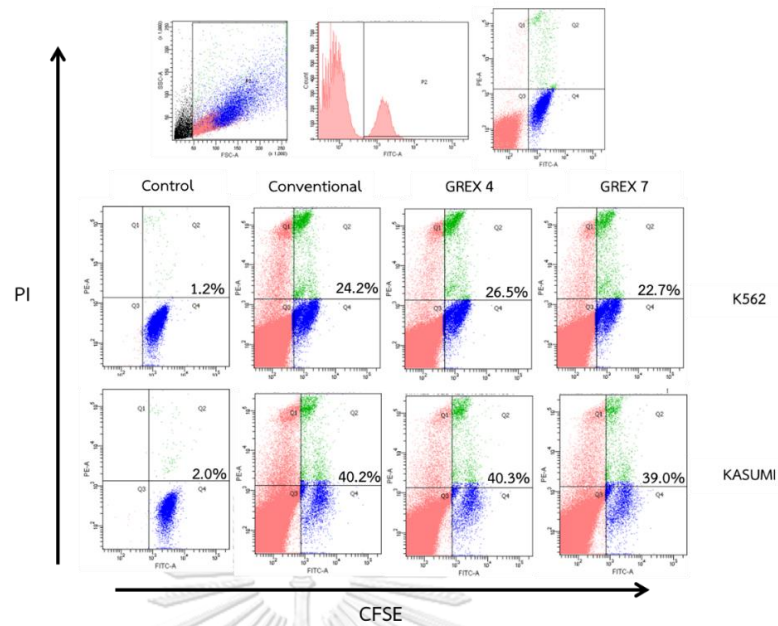
อาหารเลี้ยงเซลล์ได้สูงถึง 7 วัน ซึ่งแตกต่างกับวิธีมาตรฐานที่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในทุก 4 วัน



ภาพที่ 24 แสดงแผนภูมิเส้นการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงของทั้ง 3 กลุ่ม การทดลองตั้งแต่วันที่ 7, 11 และ 14 (n=10)

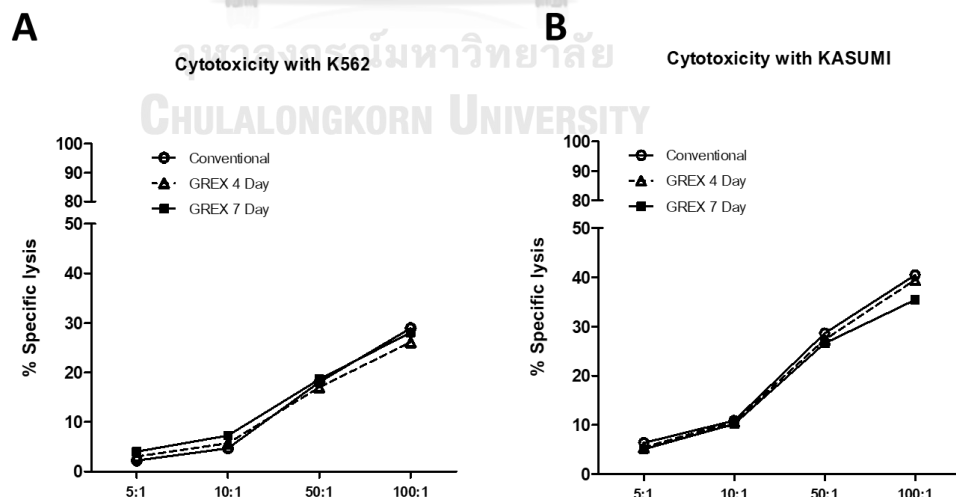
การทดสอบประสิทธิภาพการเกิด Cytotoxicity ของ CIK cells

เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของ CIK cells ทั้ง 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่ม จะถูกทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเซลล์มะเร็งเป้าหมายโดยใช้วิธี Cytotoxicity assay ด้วยการ นำเซลล์ทั้งหมดจากแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงร่วม (co-culture) กับเซลล์มะเร็งเป้าหมาย (Target cell) ซึ่งเป็น Leukemic cell line 2 ชนิด คือ K562 (chronic myeloid leukemia cell line: positive control) และ KASUMI (Acute Myeloid Leukemia cell line) ที่ถูกติดตามไว้ด้วยสี CFSE เมื่อ ครบเวลานำมาวิเคราะห์ด้วย Flow cytometer โดยเลือกเฉพาะเซลล์มะเร็งเป้าหมายบริเวณที่มีการ แสดงออกร่วมกันของ CFSE และ PI มาคำนวณร้อยละของ Specific lysis (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 แสดงตัวอย่างการ Gating ผลวิเคราะห์เซลล์จาก Flow cytometer เพื่อสังเกตการเกิด Cytotoxic ที่อัตราส่วน 100:1 โดยผลร้อยละที่แสดงในภาพคือเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่มีการแสดงออกร่วมกันของ CFSE และ PI (n=1)

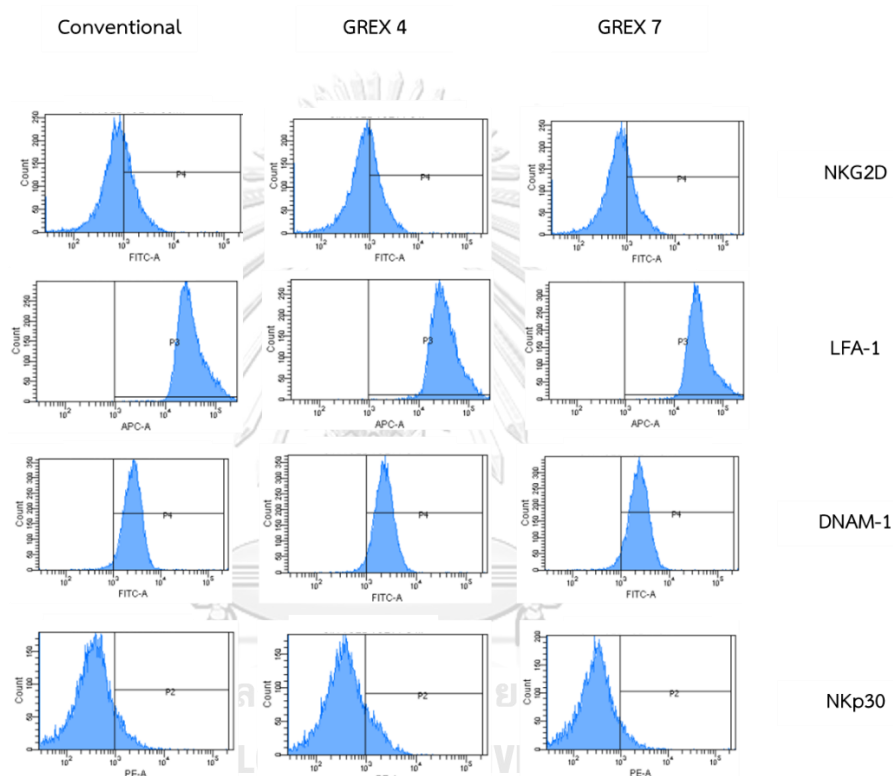
จากการทดลองเมื่อนำมาคำนวณร้อยละของ Specific lysis แล้ว พบว่าทั้ง 3 กลุ่มมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งเป้าหมายไม่แตกต่างกันทั้งในเซลล์ K562 และ KASUMI และมีการทำลายเซลล์มะเร็งเป้าหมายเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีสัดส่วนของ CIK cell สูงขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 แสดงร้อยละ Specific lysis ของเซลล์ทั้ง 3 กลุ่มกับเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่อัตราส่วน Effector:Target = 5:1, 10:1, 50:1 และ 100:1 โดย A: เซลล์ K562 และ B: เซลล์ KASUMI (n=10)

การเปรียบเทียบคุณลักษณะการแสดงออก Activating marker ของ CIK cells

เพื่อทดสอบความแตกต่างของคุณลักษณะ (Immunophenotype) CIK cells ที่ถูกเลี้ยงในแต่ละกลุ่ม เมื่อครบ 14 วัน เซลล์ทุกกลุ่มจะถูกย้อมด้วย anti-NKG2D, anti-DNAM-1, anti-NKp30 และ anti-LFA-1 แล้ววิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Flow Cytometer เพื่อดูการแสดงออกของ Activating marker ที่สำคัญต่อการทำงานของ CIK cells คือ NKG2D, DNAM-1, NKp30 และ LFA-1 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบจากระดับการแสดงออกของ Mean Florescence Intensity (MFI) (ภาพที่ 27)

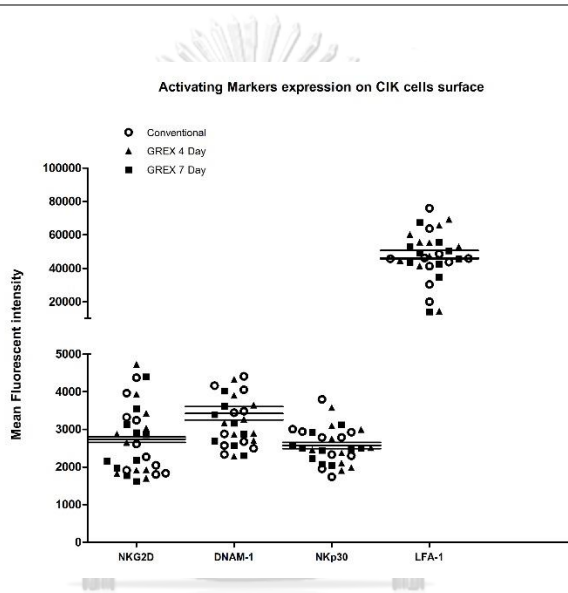


ภาพที่ 27 แสดงตัวอย่างผลวิเคราะห์เซลล์จาก Flow cytometer เพื่อสังเกตการแสดงออกของ Activating marker ที่พบบนผิวเซลล์ของ CIK cells ทั้ง 3 กลุ่ม (n=1)

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าเซลล์ทั้ง 3 กลุ่มมีระดับการแสดงออกของ MFI ในแต่ละ Activating marker ใกล้เคียงกันทั้ง 3 กลุ่ม และไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีระดับการแสดงออกของ Activating marker LFA-1 สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ Activating marker อื่น (ภาพที่ 28)

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของ Activating markers ที่พบบนผิว CIK cells ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน

Activating Marker (MFI)	วิธีมาตรฐาน	G-REX เปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน	G-REX เปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน
NKG2D	2,737.90(±934.99)	2,800.20(±1010.11)	2,656.20(±880.83)
DNAM-1	3,249.90(±764.02)	3,421.60(±855.07)	3,602.80(±1,227.66)
NKp30	2,655.20(±595.77)	2,575.30(±533.40)	2,486.60(±338.44)
LFA-1	46,130.90(±15,509.61)	50,665.50(±15,512.46)	45,599.70(±14,103.14)



ภาพที่ 28 แสดงค่า MFI ของ Activating markers บนผิว CIK cells ในเซลล์ทั้ง 3 กลุ่ม (n=10)

การเปรียบเทียบไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ทั้งสามกลุ่ม

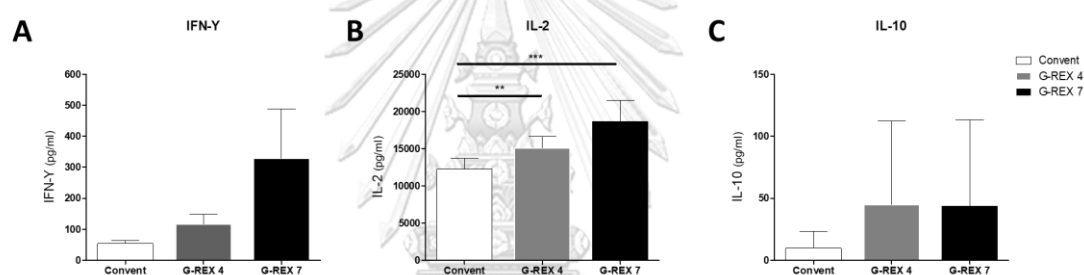
เพื่อทดสอบปริมาณไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อาจส่งเสริมให้เกิดการเจริญของ CIK cells เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ได้ทำการวิเคราะห์ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องดังนี้ คือ IFN- γ , IL-2 และ IL-10 ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ในวันที่ 14 ของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง

จากการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่ามีการหลั่งไซโตไคน์ออกมา 3 ชนิดด้วยกันคือ IFN- γ , IL-2 และ IL-10 โดยกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้งกลุ่มที่เปลี่ยนอาหาร

ทุก 4 วัน และ 7 วัน มีการหลั่งไซโตไคน์ทั้ง 3 ชนิดข้างต้นมากกว่าวิธีมาตรฐาน แต่มีเพียง IL-2 เท่านั้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.0015 และ <0.0001) (ภาพที่ 29)

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน

ชนิดของไซโตไคน์	วิธีมาตรฐาน	G-REX เปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน	G-REX เปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน
pg/ml			
IFN- γ	54.39(\pm 28.43)	116.70(\pm 99.08)	329.10(\pm 478.70)
IL-2	12,237(\pm 1,494)	15,052(\pm 1,638)	18,660(\pm 12,858)
IL-10	9.84(\pm 13.39)	44.86(\pm 67.54)	43.72(\pm 69.58)



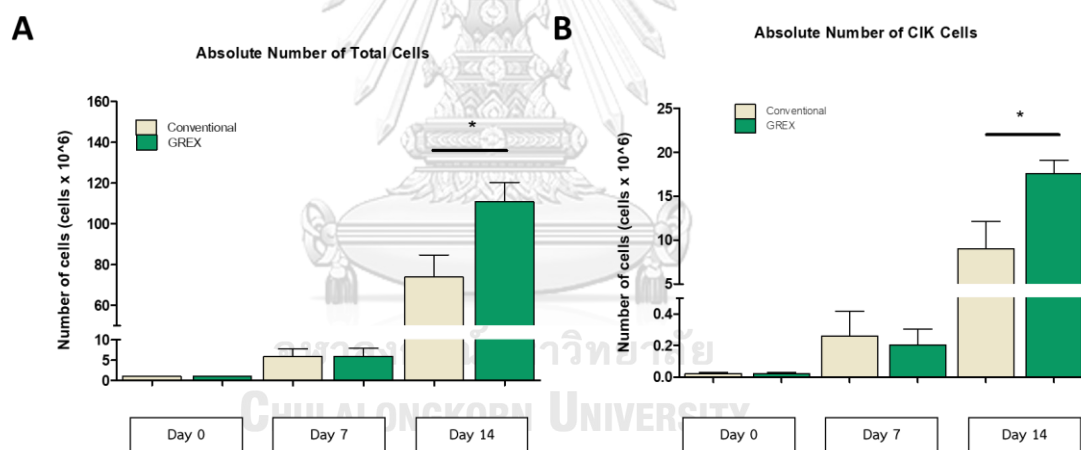
ภาพที่ 29 แสดงผลการวิเคราะห์การหลั่งไซโตไคน์ของ CIK cells ในเซลล์ทั้ง 3 กลุ่ม A: IFN- γ B: IL-2 C: IL-10 (n=9)

การเปรียบเทียบการเลี้ยง CIK cells โดยการเลี้ยงเซลล์ในอุปกรณ์ Gas-permeable culture ตั้งแต่ขั้นตอนการเริ่มเหนี่ยวนำและเลี้ยงต่อเนื่องไปในอุปกรณ์ Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน

จากผลการทดลองเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานพบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture มีประสิทธิภาพการเจริญของเซลล์ได้ดีกว่าวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถคงอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ได้นานถึง 7 วันโดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ และมีสัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์ ประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกของ Activating markers ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐาน เพื่อยืนยันประสิทธิภาพและทดสอบว่าวิธีนี้สามารถนำไปใช้ทดแทนการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐานเพื่อเพิ่มจำนวนทางคลินิกได้จริง ผู้วิจัยจึงทำการทดลอง

เปรียบเทียบเพิ่มเติม โดยจะเริ่มเปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์ตั้งแต่ขั้นตอนการกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMC ให้เป็น CIK cells (วันที่ 0) ที่เซลล์ตั้งต้น 1×10^6 เซลล์ ทั้งในวิธี Gas-permeable culture และวิธีมาตรฐาน โดยในวิธี Gas-permeable culture จะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 7 วัน แต่ในวิธีมาตรฐานจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 4 วัน และใช้ระยะเวลาทั้งหมด 14 วัน เมื่อครบเวลาจะเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ทั้งหมด ปริมาณ CIK cells อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ทั้งหมด อัตราการเพิ่มจำนวนของ CIK cells ส่วนประกอบและการแสดงออกของ Activating marker ประสิทธิภาพการเกิด Cytotoxicity และไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ของวันที่ 14

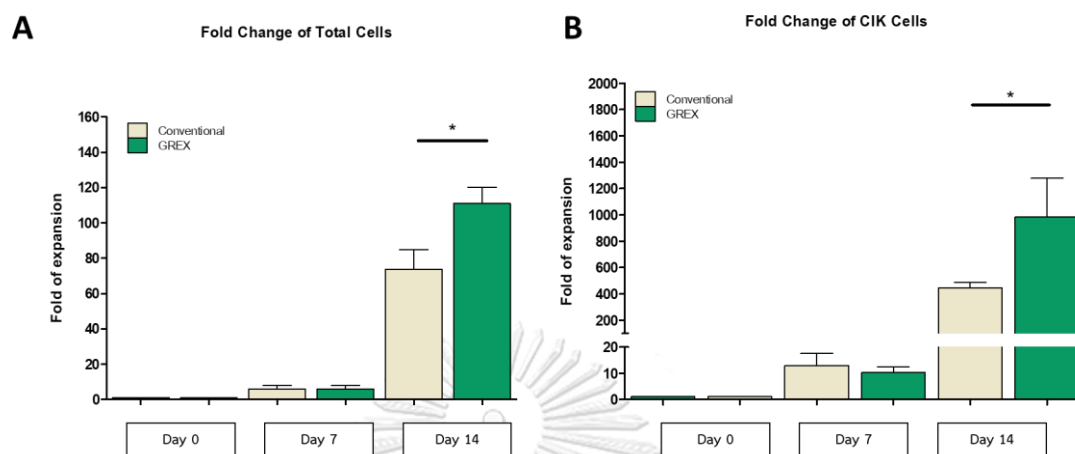
จากการทดลองพบว่าในวันที่ 14 เซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture และวิธีมาตรฐานมีปริมาณเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ยอยู่ที่ $110.90(\pm 9.38) \times 10^6$ เซลล์ และ $73.80(\pm 10.92) \times 10^6$ เซลล์ตามลำดับ และมีปริมาณ CIK cells เฉลี่ยอยู่ที่ $17.56(\pm 1.52) \times 10^6$ เซลล์และ $9.03(\pm 3.07) \times 10^6$ เซลล์ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติจำนวนเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นมีปริมาณมากกว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในปริมาณเซลล์ทั้งหมด ($p\text{-value} = 0.0111$) และปริมาณ CIK cells ($p\text{-value} = 0.0125$) (ภาพที่ 30 A, B)



ภาพที่ 30 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานก่อนการทดลองทางคลินิก A: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ทั้งหมด B: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบจำนวน CIK cells (n=3)

ในการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดพบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture และวิธีมาตรฐานมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดอยู่ที่ $110.90(\pm 9.38)$ เท่า และ $73.80(\pm 10.92)$ เท่าตามลำดับ ส่วนอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells อยู่ที่ $982.90(\pm 296.00)$ เท่าและ $445.8(\pm 42.19)$ เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติยังพบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture มีปริมาณเซลล์มากกว่าวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในอัตรา

การเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมด (p -value = 0.0111) และอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells (p -value = 0.0358) (ภาพที่ 31)



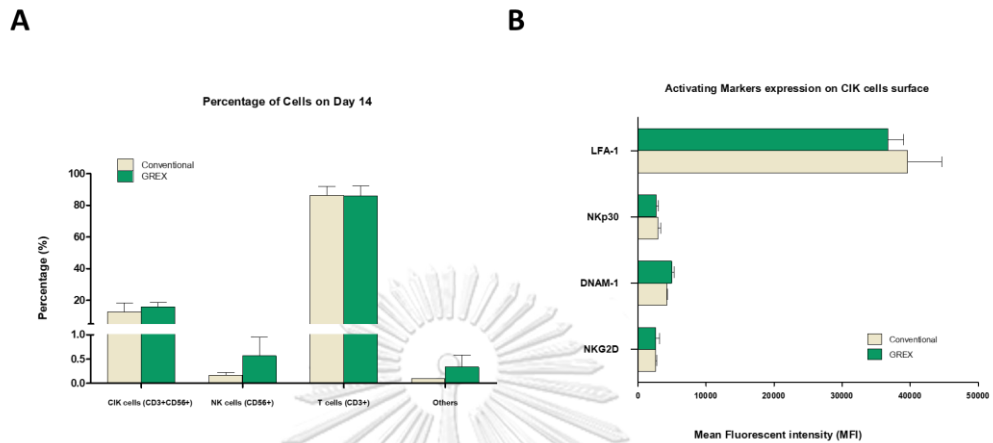
ภาพที่ 31 แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานก่อนการทดลองทางคลินิก A: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมด B: แสดงแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells (n=3)

เมื่อทำการเปรียบเทียบส่วนประกอบของเซลล์พบว่า มีร้อยละของ Effector CIK cells ($CD3^+CD56^+$) ในวันที่ 7 อยู่ที่ $3.43(\pm 1.27)\%$ กับ $4.30(\pm 2.17)\%$ และในวันที่ 14 อยู่ที่ $15.97(\pm 2.55)\%$ กับ $12.70(\pm 5.46)\%$ ในวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของเซลล์ในวันที่ 14 ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้ง NK cells, CIK cells, T cells และ Other cells (ภาพที่ 32A) และการเปรียบเทียบการแสดงออกของ Activating marker ตามตารางที่ 10 ยังพบว่าทั้งสองกลุ่มมีการแสดงออกของ Activating marker ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และมีระดับการแสดงออกของ LFA-1 สูงสุด (ภาพที่ 32B)

ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบการแสดงออกของ Activating markers ที่พบบนผิว CIK cells ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน

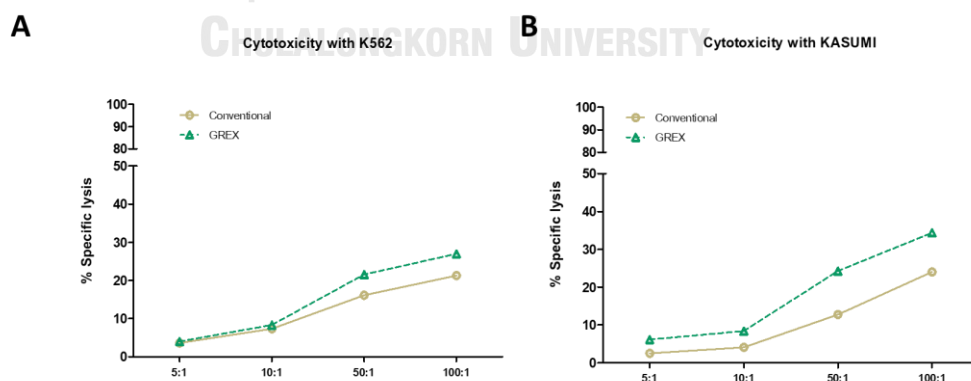
Activating Marker (MFI)	วิธีมาตรฐาน	Gas-permeable culture
NKG2D	2,605.67(\pm 200.24)	2,568.34(\pm 585.14)
DNAM-1	4,247(\pm 70.15)	4,958.34(\pm 379.90)

NKp30	2,958.00(±360.92)	2,681.34(±295.92)
LFA-1	39,600.00(±5,065.38)	36,683.67(±2,358.03)



ภาพที่ 32 แสดงการเปรียบเทียบคุณลักษณะของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานก่อนการทดลองทางคลินิก A: แสดงกราฟแท่งเปรียบเทียบร้อยละของแต่ละเซลล์ B: แสดงค่า MFI ของ Activating markers บนผิว CIK cells

นอกจากนี้ในการทดสอบประสิทธิภาพการเกิด Cytotoxicity พบว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture มีร้อยละของ Specific lysis สูงกว่าวิธีมาตรฐานเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างกันทั้งในเซลล์ K562 และ KASUMI โดยมีการทำลายเซลล์มะเร็งเป้าหมายเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีสัดส่วนของ CIK cell สูงขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 33)

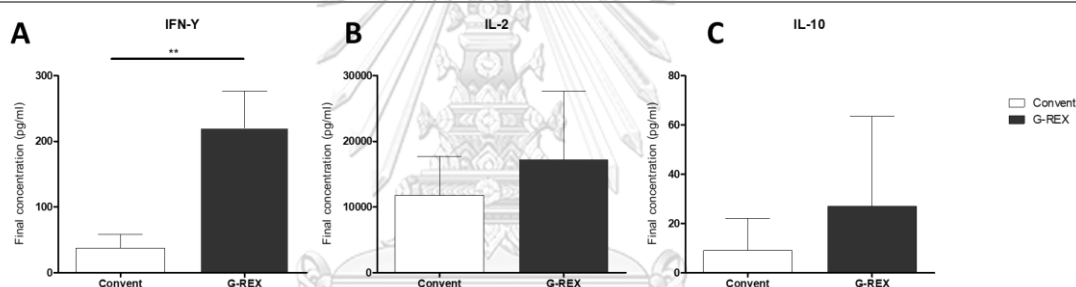


ภาพที่ 33 แสดง % Specific lysis ของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานก่อนการทดลองทางคลินิกกับเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่อัตราส่วน E:T= 5:1, 10:1, 50:1 และ 100:1 โดย A: เซลล์ K562 และ B: เซลล์ KASUMI (n=3)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ทั้งสองกลุ่มจะเห็นว่ามีการหลั่ง IFN- γ ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture สูงกว่าวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.0062) และมีการหลั่งไซโตไคน์ IL-2 กับ IL-10 มากกว่าวิธีมาตรฐานด้วยเช่นกันแต่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 34)

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีต่างกัน

ชนิดของไซโตไคน์ pg/ml	วิธีมาตรฐาน	Gas-permeable culture
IFN- γ	37.82(\pm 12.16)	220.30(\pm 32.43)
IL-2	11,780(\pm 3,390)	17,220(\pm 6,006)
IL-10	8.95(\pm 7.55)	27.08(\pm 21.03)

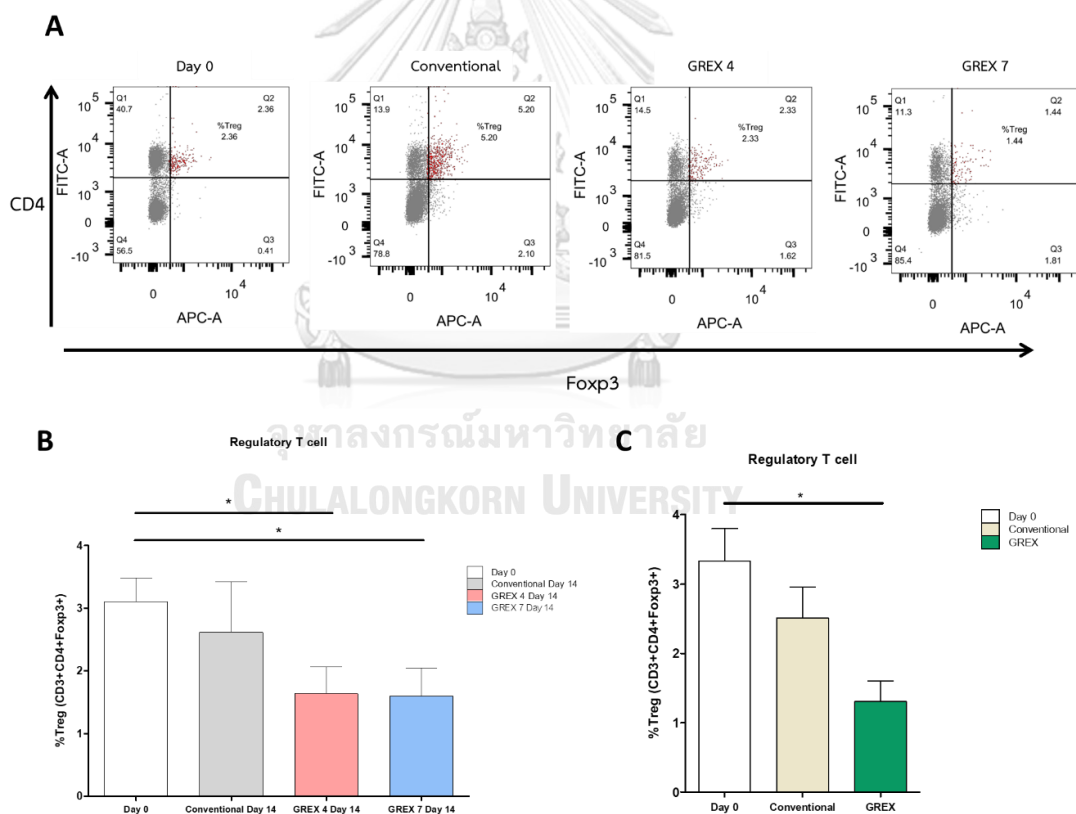


ภาพที่ 34 แสดงผลการวิเคราะห์การหลั่งไซโตไคน์ของ CIK cells ในที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานก่อนการทดลองทางคลินิก A: IFN- γ B: IL-2 C: IL-10 (n=3)

การทดลองเพื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ Regulatory T cell (Treg) ของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน

เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ Regulatory T cell (Treg) ที่ปนเปื้อนมาจากการกระตุ้นและเพิ่มจำนวน CIK cell ของเซลล์เลี้ยงทั้งวิธี Gas-permeable culture และวิธีมาตรฐาน เมื่อครบเวลา 14 วันจะทำการแบ่งเซลล์ทั้งหมดมาในปริมาณ 2×10^6 เซลล์เท่ากัน จากนั้นจะย้อมด้วย anti-CD3, anti-CD4 และ anti-Foxp3 เพื่อเปรียบเทียบกับ PBMCs ที่แยกออกมาได้ในวันที่ 0 และวิเคราะห์ผลด้วย Flow cytometer โดยการเลือกเฉพาะที่มีการแสดงออกของ CD3 มาวิเคราะห์การแสดงออกร่วมกันของ CD4 และ Foxp3 อีกครั้ง (ภาพที่ 35A)

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อผ่านไป 14 วัน เซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน 7 วัน และวิธีมาตรฐาน มีร้อยละการแสดงออกของ Treg ($CD3^+CD4^+Foxp3^+$) เฉลี่ยอยู่ที่ $1.64(\pm 0.95)\%$, $1.60(\pm 0.99)\%$ และ $2.62(\pm 1.80)\%$ ตามลำดับ ในขณะที่ PBMCs ในวันที่ 0 มีร้อยละการแสดงออกของ Treg เฉลี่ยอยู่ที่ $3.10(\pm 0.86)\%$ โดยกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน และ 7 วัน มีปริมาณ Treg ลดลงจากวันที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.00336 และ 0.00332) (ภาพที่ 35B) นอกจากนี้ CIK cells ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture อย่างต่อเนื่องนั้นก็ยังมีปริมาณ Treg ลดลงจากวันที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน (p -value = 0.0222) โดยมีปริมาณ Treg ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture เฉลี่ยอยู่ที่ $1.31(\pm 0.52)\%$ และวิธีมาตรฐานมีปริมาณ Treg เฉลี่ยอยู่ที่ $2.51(\pm 0.77)\%$ ในขณะที่วันที่ 0 มีปริมาณ Treg เฉลี่ยอยู่ที่ $3.33(\pm 0.81)\%$ (ภาพที่ 35C)



ภาพที่ 35 A: แสดงตัวอย่างผลวิเคราะห์ร้อยละการแสดงออกของ Treg ($CD3^+CD4^+Foxp3^+$) จาก Flow cytometer ในวันที่ 0 และ 14 ของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานและกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วันและ 7 วัน (n=1) B: แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบร้อยละการแสดงออกของ Treg ในวันที่ 0 และ 14 ของ

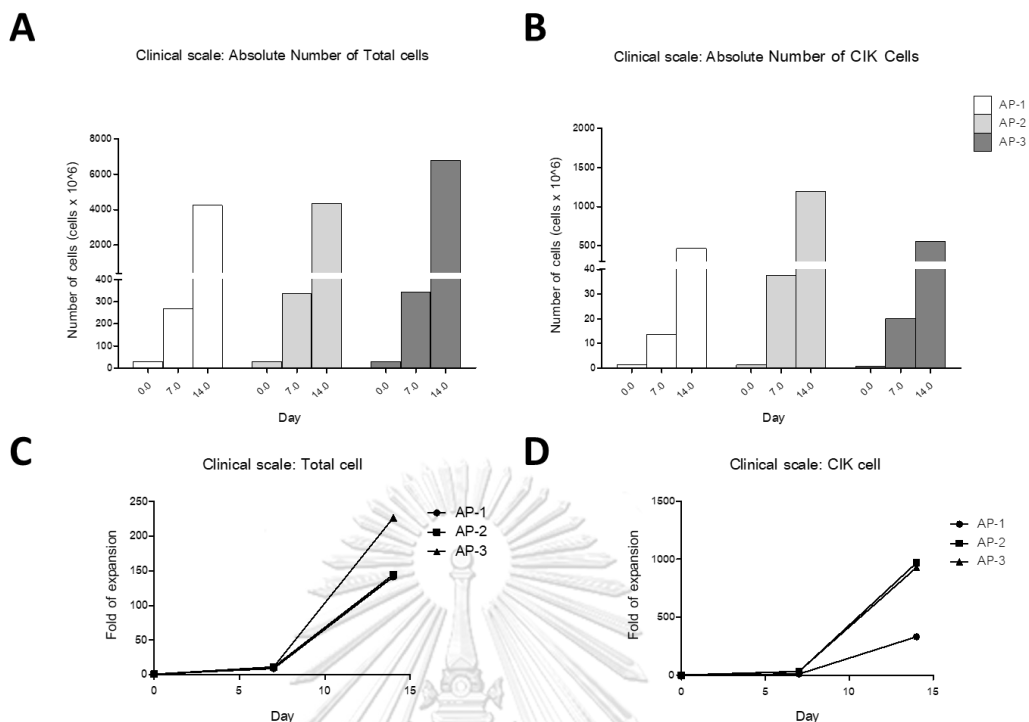
เซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วันและ 7 วัน กับวิธีมาตรฐาน (n=5) C: แสดงแผนภูมิแท่งการเปรียบเทียบร้อยละการแสดงออกของ Treg ในวันที่ 0 และ 14 ของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐานจากการทดลองก่อนการทดลองทางคลินิก (n=3)

การทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ในปริมาณที่สามารถใช้ได้กับการวิจัยทางคลินิก (clinical scale expansion)

ในทางคลินิกมีความจำเป็นต้องใช้ปริมาณเซลล์ทั้งหมดในแต่ละครั้งในปริมาณสูงถึง 1×10^9 เซลล์เป็นอย่างน้อย ดังนั้นเพื่อทดสอบว่าวิธี Gas-permeable culture สามารถเพิ่มจำนวน CIK cells ได้จนถึงปริมาณที่กล่าวไว้ข้างต้นจริง จึงทำการทดลองการเลี้ยงเซลล์ในปริมาณที่สามารถใช้ได้ ในทางคลินิก ซึ่งในการทดลองนี้จะนำเม็ดเลือดขาวที่เหลือจากกระบวนการ Pheresis จากการบริจาคเกล็ดเลือดจำนวน 3 ตัวอย่าง (AP-1, AP-2 และ AP-3) มาแยกเป็น PBMCs และเลี้ยงในอุปกรณ์ GREX 6 well plate พื้นที่ผิว 10 ซม.² ที่เซลล์ตั้งต้น 5×10^6 เซลล์ต่อหลุม (5×10^5 เซลล์ต่อ 1 ซม.²) ตั้งแต่วันที่ 0 และใช้เวลาเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด 14 วัน

จากการทดลองจะเห็นว่าเซลล์ทั้งหมดที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture สามารถเพิ่มจำนวน CIK cells ได้ทั้ง 3 ตัวอย่างการทดลอง และสูงกว่า 1×10^9 เซลล์ในทุกตัวอย่างการทดลอง ซึ่งมีปริมาณเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ย คือ $5.13(\pm 1.45) \times 10^9$ เซลล์ และปริมาณ CIK cells เฉลี่ย คือ $0.74(\pm 0.39) \times 10^9$ เซลล์ (ภาพที่ 36 A, B) โดยมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดเฉลี่ย และอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells เฉลี่ยอยู่ที่ $170.95(\pm 48.18)$ เท่า และ $742.57(\pm 356.81)$ เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 36 C, D) และผลการตรวจการควบคุมคุณภาพสำหรับเซลล์ที่จะนำไปใช้ทางคลินิกตามตารางที่ 12 จะเห็นว่า CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยผ่านเกณฑ์มาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสำหรับเซลล์ที่ใช้ในทางคลินิก

จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่าวิธี Gas-permeable culture นั้นมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการนำมาใช้ผลิต CIK cells เพื่อปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยในทางคลินิกได้ในอนาคต



ภาพที่ 36 A: แสดงแผนภูมิแท่งปริมาณเซลล์ทั้งหมดตามวันที่เลี้ยงเซลล์ในการทดลองทางคลินิก B: แสดงแผนภูมิแท่งปริมาณ CIK cells ในการทดลองทางคลินิก C: แสดงแผนภูมิเส้นอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมด D: แสดงแผนภูมิเส้นอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells

ตารางที่ 12 แสดงการตรวจการควบคุมคุณภาพสำหรับเซลล์ที่จะนำไปใช้ทางคลินิก

Test	Specification	AP-1	AP-2	AP-3
Cell numbers	$\geq 1 \times 10^9$ cells	4.25×10^9 cells	4.34×10^9 cells	6.80×10^9 cells
Cell viability	$\geq 80\%$ viable cells	99%	97%	99%
Cytotoxicity	$\geq 20\%$ lysis to K-562	20%	20%	21%
Gram stain	No organism	No organism	No organism	No organism

Aerobic and Anaerobic culture	No growth at least 7 days	No growth	No growth	No growth
Mycoplasma	No detection	No detection	No detection	No detection
Fungal culture	No growth at least 30 days	No growth	No growth	No growth
Endotoxin level	< 5 IU/ml	< 5 IU/ml	< 5 IU/ml	< 5 IU/ml



บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าทางผู้วิจัยสามารถปรับปรุงวิธีการเพิ่มจำนวน CIK cells ด้วยการใช่วิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ Gas-permeable culture ได้อย่างมีประสิทธิภาพและผ่านมาตรฐานความปลอดภัยสำหรับการนำมาปรับใช้ในการผลิต CIK cells เพื่อใช้ทางคลินิกต่อไปในอนาคต ซึ่งการใช้ CIK cells สำหรับการวิจัยหรือการรักษาโรคมะเร็งด้วยเซลล์บำบัดนั้นมีความจำเป็นต้องใช้เซลล์ในปริมาณสูงมากในแต่ละครั้ง เซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีการดังกล่าวนี้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาเพียงแค่ 7-14 วัน จากอุปกรณ์ที่ช่วยส่งเสริมให้เซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีนี้ได้รับการแลกเปลี่ยนก๊าซทั้ง O_2 และ CO_2 เพิ่มมากขึ้น รวมถึงการที่เซลล์ได้รับปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์และไซโตไคน์ในปริมาณที่มากเกินไปได้ตั้งแต่วันแรกที่เลี้ยงเซลล์ โดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อยเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน และมีขั้นตอนการทำงานที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน

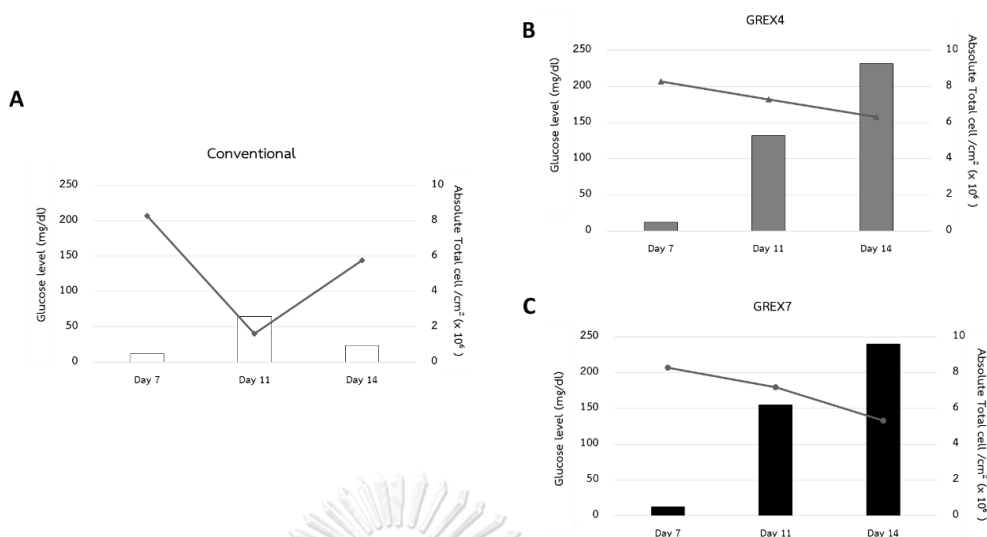
จากผลการทดลองในขั้นแรกจะเห็นได้ว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ทั้งกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วันและ 7 วันมีปริมาณเซลล์ทั้งหมด ปริมาณ CIK cells อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมด และอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells มากกว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่คุณภาพของ CIK cells ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีดังกล่าวได้แก่ ร้อยละการแสดงออกของสัดส่วนองค์ประกอบของเซลล์ และการแสดงออกของ Activating marker ที่สำคัญใน CIK cells นั้นไม่แตกต่างจากการเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐาน อีกทั้งประสิทธิภาพการทำลายเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Cytotoxicity ก็ยังไม่แตกต่างกับวิธีมาตรฐาน โดยที่ไม่พบความแตกต่างของคุณสมบัติของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ในระหว่างกลุ่มที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วันและ 7 วัน จากข้อสังเกตนี้จึงนำไปสู่การทดลองขั้นต่อมาในการเปรียบเทียบการเลี้ยง CIK cells ตั้งแต่การเริ่มเหนี่ยวนำและเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่องด้วยวิธี Gas-permeable culture โดยที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ในทุก 7 วัน จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อครบเวลา 14 วัน CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นมีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีกว่าวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่คุณภาพของ CIK cells ไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐาน ทำให้สามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า เราสามารถใช้วิธี Gas-permeable culture ในการเพิ่มจำนวน CIK cells ทดแทนวิธีมาตรฐานที่ใช้ทั่วไปในปัจจุบันได้ และสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในระยะเวลาเท่ากัน

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ทำทดลองการเพิ่มจำนวน CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture โดยใช้อุปกรณ์ Gas permeable rapid expansion (GREX) เพื่อมุ่งหวังจะพัฒนาการเพิ่ม

จำนวน CIK cells สำหรับใช้ในการวิจัยทางทางคลินิกหรือการรักษาผู้ป่วยมะเร็งด้วยการใช้เซลล์บำบัดด้วย CIK cells ในอนาคต ซึ่งวิธี Gas-permeable culture นี้อาศัยหลักการของการเพิ่มการแลกเปลี่ยนก๊าซภายในอุปกรณ์จาก Gas-permeable membrane บริเวณด้านล่างของอุปกรณ์ ซึ่งโดยปกติแล้วเมื่อเลี้ยงเซลล์ไปไ้ระยะหนึ่งเซลล์จะมีการเจริญอยู่บริเวณด้านล่างของอุปกรณ์ และการแลกเปลี่ยนก๊าซภายในอุปกรณ์จะเกิดขึ้นเมื่อเกิดการเคลื่อนที่ของก๊าซผ่านอาหารเลี้ยงเซลล์ไปยังเซลล์ที่เจริญอยู่ด้านล่าง(60) ซึ่งตามโครงสร้างของอุปกรณ์ในวิธี Gas-permeable culture นี้สามารถใส่ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ได้สูงกว่า และมีปริมาตรมากถึง 8 มิลลิลิตร ด้วยเหตุนี้จึงช่วยส่งเสริมให้เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซเพิ่มขึ้น และเซลล์ได้รับสารอาหารมากกว่าในวิธีมาตรฐาน เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ต่อพื้นที่ผิวขงพบว่าในวิธี Gas permeable culture สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์จากเซลล์ตั้งต้น 1×10^6 เซลล์/พื้นที่ผิว 2 ซม² ได้ถึง 80×10^6 เซลล์/พื้นที่ผิว 2 ซม² ในหลุมเดิมโดยที่ไม่จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนหลุมที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน จากงานวิจัยนี้ในการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธีมาตรฐานพบว่าที่เซลล์ตั้งต้น 1×10^6 เซลล์/พื้นที่ผิว 2 ซม² เซลล์จะเจริญได้สูงสุด $5.17(\pm 0.88) \times 10^6$ เซลล์/พื้นที่ผิว 2 ซม² เท่านั้น (จากการทดลองการเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วันและ 7 วัน กับวิธีมาตรฐาน) ด้วยปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วแต่มีการแลกเปลี่ยนก๊าซและปริมาณสารอาหารจำกัดทำให้การเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐานจำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์และเพิ่มจำนวนหลุม (พื้นที่) ที่ใช้เลี้ยงเซลล์เพื่อคงความเข้มข้นของเซลล์ (cell concentration) ไว้ไม่ให้นหนาแน่นจนเกินไปจนเซลล์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้และเกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) ส่วนการเลี้ยงเซลล์ในวิธี Gas-permeable culture ที่สามารถใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ในปริมาณมากได้ในพื้นที่จำกัดเพียงแค่ 2 ซม² ซึ่งตามปกติอาจส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ได้ ในงานวิจัยนี้จึงนำเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบอัตราการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) โดยย้อมด้วยสี Tryphan blue เพื่อทดสอบ Viability ของเซลล์ พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture มี Viability ของเซลล์สูงถึง 90-100% ในขณะที่วิธีมาตรฐานอยู่ที่ 60-80% (ไม่มีการแสดงผลข้อมูลในผลการทดลอง) แสดงให้เห็นว่าการแลกเปลี่ยนก๊าซที่มากกว่าช่วยให้เซลล์เกิดการเจริญต่อไปได้แม้ว่าจะมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นก็ตาม นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Juan F. Vera และคณะได้ทดลองเปรียบเทียบการเลี้ยง Cytotoxic T lymphocytes (CTL) ด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เซลล์ตั้งต้นเท่ากันในอุปกรณ์ที่มีปริมาตรต่างกัน พบว่าเซลล์ยังสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่เกิด Exhaustion หมายความว่าความเข้มข้นของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นจะถูกควบคุมด้วยการแลกเปลี่ยนก๊าซเป็นหลัก จนทำให้ปริมาณอาหารที่มากเกินไปนั้นไม่มีผลทำให้เซลล์เกิด Exhaustion(64) จึงไม่จำเป็นต้องควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์เหมือนในวิธีมาตรฐาน

การเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นนอกจากจะช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ที่มากกว่าการเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีมาตรฐานแล้ว ยังช่วยลดความถี่และระยะเวลาการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ได้สูงถึง 7 วัน ซึ่งการเลี้ยง CIK cells ในวิธีมาตรฐานนั้นจำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3-4 วัน ทำให้เซลล์ที่กำลังเจริญอยู่จะถูกรบกวนจากการขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์น้อยมาก กล่าวคือจากขั้นตอนเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในวิธี Gas-permeable culture อาหารเลี้ยงเซลล์เดิมจะถูกนำออกโดยที่ยังมีปริมาณอาหารเดิมอยู่ในปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร (20%) โดยไม่จำเป็นต้องยุ่งเกี่ยวกับเซลล์ที่เจริญเติบโตอยู่ในอุปกรณ์ ซึ่งต่างจากการเลี้ยงแบบมาตรฐานซึ่งมีความจำเป็นต้อง Resuspend เซลล์เพื่อทำการนับจำนวนเซลล์เพื่อประเมินความเข้มข้นของเซลล์เพื่อหารปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม จึงทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ดีโดยไม่ถูกรบกวนจากปัจจัยภายนอกอื่น ๆ นอกจากนี้การเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture ยังช่วยลดระยะเวลาการทำงาน ลดโอกาสการปนเปื้อนอันเนื่องมาจากขั้นตอนการเปลี่ยนอาหารที่ต้องทำบ่อยกว่าในการเลี้ยงในวิธีมาตรฐาน

เพื่อยืนยันประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนของ CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture ทางผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง ปริมาณไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ และสัดส่วนของ Regulatory T cell (Treg) ในเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture และวิธีมาตรฐาน จากผลการทดลองการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 4 วันน้ำตาลกลูโคสในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานนั้นลดลงต่ำกว่าระดับ 100 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ในขณะที่กลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นสามารถคงปริมาณน้ำตาลได้มากกว่า 100 มิลลิกรัม/เดซิลิตรไปตลอดระยะเวลา 7 วัน โดยจะเห็นได้ว่าในช่วง 4 แรกซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตต่อพื้นที่สูงสุดในการเลี้ยงแบบวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ต้องอาศัยกลูโคสมากแต่ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกจำกัดเนื่องด้วยระดับความเข้มข้นของเซลล์นั้นจึงทำให้ปริมาณกลูโคสอาจไม่เพียงพอและทำให้ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับปริมาณกลูโคสที่มากเกินไปในการเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture (ภาพที่ 37) จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ในระยะเวลาเท่ากันนั้นเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture จะมีปริมาณสารอาหารที่มากกว่าวิธีมาตรฐาน ช่วยส่งเสริมให้เซลล์เกิดการเจริญได้ดีกว่าและมีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญได้สูงถึง 7 วันโดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อยเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน



ภาพที่ 37 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับปริมาณเซลล์ทั้งหมด/ชม.² ของ A: CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐาน B: CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture เปลี่ยนอาหารทุก 4 วัน C: CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture เปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะแสดงผลในรูปแบบแผนภูมิเส้น และปริมาณเซลล์ทั้งหมด/ชม.² จะแสดงผลในรูปแบบแผนภูมิแท่ง (n=10)

ประการต่อมาจากผลการวิเคราะห์ผลไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นมีแนวโน้มที่เซลล์จะหลั่งไซโตไคน์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตได้มากกว่าวิธีมาตรฐานอีกด้วย ซึ่งไซโตไคน์สำคัญที่สามารถส่งผลการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของ CIK cells นั้นได้แก่ IFN- γ , IL-2 และ IL-10 โดยความสำคัญของ IFN- γ นั้นเป็นไซโตไคน์ที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวน CIK cells(14) มีประโยชน์ในการทำลายเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการ Cytotoxicity(71) นอกจากนี้ IFN- γ ยังช่วยส่งเสริมการกระตุ้นและเพิ่มปริมาณการแสดงออกของ IL-2 receptor ช่วยส่งเสริมให้เซลล์ตอบสนองต่อการกระตุ้นของ IL-2 ได้เพิ่มมากยิ่งขึ้น จึงมีการเจริญได้ดียิ่งขึ้น(16, 71) จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการหลั่ง IFN- γ ของกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ในการทดลองขั้นแรก (การเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของ CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ที่เปลี่ยนอาหารทุก 4 วันและ 7 วัน กับวิธีมาตรฐาน) กับขั้นต่อมา (การเปรียบเทียบการเลี้ยง CIK cells โดยการเลี้ยงเซลล์ในอุปกรณ์ Gas-permeable culture ตั้งแต่ขั้นตอนการเริ่มเหนี่ยวนำและเลี้ยงต่อเนื่องไปในอุปกรณ์ Gas-permeable culture กับวิธีมาตรฐาน) จะเห็นว่าเมื่อทำการเลี้ยง CIK cells ตั้งแต่เริ่มกระตุ้นและเหนี่ยวนำให้เป็น CIK cells และเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่องด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นมีแนวโน้มการหลั่ง IFN- γ เพิ่มสูงขึ้น และมากกว่าวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า

ปริมาณการแลกเปลี่ยนก๊าซที่เพิ่มขึ้นนั้นช่วยส่งเสริมให้เกิดการหลั่ง IFN- γ ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของ CIK cells จากคุณสมบัติที่กล่าวข้างต้น ทำให้เซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture จึงมีการเพิ่มจำนวนมากกว่าวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไฮโดรโคโรนชนิดต่อมาคือ IL-2 ซึ่งเป็นไฮโดรโคโรนที่มีบทบาทสำคัญต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์และ Cytolytic activity ของ CIK cells(72) ซึ่งจะเห็นว่าในเซลล์กลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นมีแนวโน้มการหลั่งไฮโดรโคโรนนี้สูงกว่าวิธีมาตรฐานเช่นเดียวกัน(71) เป็นสาเหตุให้เซลล์ในกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture มีการเพิ่มจำนวนที่ต่ำกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐาน และไฮโดรโคโรนชนิดสุดท้ายคือ IL-10 ซึ่งเป็นไฮโดรโคโรนที่หลั่งมาจาก Helper T cell เป็นหลัก โดยปกติแล้วจะทำหน้าที่เป็น inhibitory cytokines หากมีการหลั่งไฮโดรโคโรนชนิดนี้ออกมาในระบบจะไปยับยั้งการหลั่งไฮโดรโคโรน IFN- γ และ IL-2(73) แต่ในงานวิจัยนี้จะเห็นว่าการหลั่งไฮโดรโคโรน IFN- γ และ IL-2 ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture ยังสามารถหลั่งได้ตามปกติและมากกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐานแม้จะมีแนวโน้มการหลั่ง IL-10 ในปริมาณมากกว่าก็ตาม แสดงให้เห็นว่าในวิธี Gas-permeable culture มีความสมดุลในการควบคุมไฮโดรโคโรนที่หลั่งออกมาได้อย่างเหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามอาจมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลให้มีการหลั่ง IL-10 ซึ่งควรมีการทดสอบต่อไปในอนาคต และสุดท้ายเมื่อวิเคราะห์ยืนยันปริมาณสัดส่วนของ Regulatory T cell ซึ่งโดยปกติแล้ว Regulatory T cell จะทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการทำหน้าที่ของเซลล์ภูมิคุ้มกัน จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ในกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นมีแนวโน้มการแสดงออกของปริมาณของ Regulatory T cell น้อยกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธีมาตรฐาน และเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่เริ่มต้นกระตุ้นและเหนี่ยวนำ PBMCs ให้เป็น CIK cells (วันที่ 0) กลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นยังมีปริมาณ Regulatory T cell ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการที่มี Regulatory T cell ลดลงนี้อาจเป็นผลมาจากการที่มีปริมาณ IFN- γ ที่หลั่งออกมาสูงในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture เป็นเหตุผลสำคัญ ด้วยเคยมีรายงานวิจัยพบว่า IFN- γ นั้นสามารถมีผลยับยั้งการทำงานของ Regulatory T cell ได้(74, 75) แต่ทั้งนี้ควรมีการวัดปริมาณไฮโดรโคโรนอื่นที่เกี่ยวข้องกับ Regulatory T cell เพิ่มเติม เช่น TGF- β หรือ IL-35(50, 76-78) เพื่อยืนยันผลการทดลองนี้ต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ Regulatory T cell นั้นมีบทบาทสำคัญในการรบกวนการเพิ่มจำนวนของ CIK cells แล้ว ยังมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำลายเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Cytotoxicity ของ CIK cells ลดลงอีกด้วย(79, 80) มีงานวิจัยยืนยันผลกระทบของ Treg ต่อ CIK cells โดยมีการทดลองเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการทำลายเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Cytotoxicity ของ CIK cells ให้สูงขึ้นด้วยการลดปริมาณ Regulatory T cell ลงเช่น การ Co-culture CIK cells ด้วย Dendritic cells(50) หรือการให้ IL-6 ร่วมกับไฮโดรโคโรนที่ใช่เลี้ยง CIK cells(53) เป็นต้น

จากข้อมูลข้างต้นทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งหมด ไม่ว่าจะเป็นการได้รับปริมาณสารอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มากกว่า ปริมาณไซโตไคน์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ CIK cells ที่หลังออกมามากกว่า อีกทั้งปริมาณ Regulatory T cell ที่ลดลง เป็นสาเหตุสำคัญที่ช่วยส่งเสริมให้เซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture มีการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่า เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน

สำหรับการรักษาด้วยเซลล์บำบัดนั้นปริมาณเซลล์ที่จะใช้ปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยในแต่ละครั้ง เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงเป็นอันดับต้น ๆ ในการรักษาด้วยเซลล์บำบัดโดยใช้ CIK cells มีผลจากการศึกษาทางคลินิกพบว่าผู้ป่วยควรได้รับเซลล์ทั้งหมดปริมาณอย่างน้อย 1×10^9 เซลล์จึงจะส่งผลทางคลินิกจากการให้ CIK cells ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการทดลองการเพิ่มจำนวน CIK cells ด้วยการเลี้ยงอย่างต่อเนื่องด้วยวิธี Gas-permeable culture ตั้งแต่ขั้นตอนเหนี่ยวนำ จะเห็นว่า CIK cells ที่เลี้ยงอย่างต่อเนื่องด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดอยู่ที่ $110.90(\pm 9.38)$ เท่า และอัตราการเพิ่มจำนวน CIK cells อยู่ที่ $982.90(\pm 296.00)$ เท่า ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มากเพียงพอพอในระดับที่สามารถใช้ในทางคลินิก โดยพบว่าเมื่อทำการทดลองเพิ่มปริมาณเซลล์เพื่อใช้ทางคลินิก ด้วยวิธี Gas-permeable culture ประสบผลสำเร็จในการเพิ่มปริมาณเซลล์ได้มากเพียงพอสำหรับการใช้ในงานวิจัยทางคลินิกหรือการรักษาด้วยเซลล์บำบัด สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ทั้งหมดได้สูงถึง $5.13(\pm 1.45) \times 10^9$ เซลล์ จากเซลล์ตั้งต้นเพียง 3×10^7 เซลล์ และมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ทั้งหมดและอัตราการเพิ่มจำนวนของ CIK cells เฉลี่ยอยู่ที่ $170.95(\pm 48.18)$ เท่า และ $742.57(\pm 356.81)$ เท่าตามลำดับ ซึ่งมีอัตราการเพิ่มจำนวนเทียบเท่าได้กับการทดสอบการเลี้ยง CIK cells ต่อเนื่องด้วยวิธี Gas-permeable culture และเมื่อทำการตรวจสอบตามมาตรฐานการควบคุมคุณภาพสำหรับเซลล์ที่จะนำไปใช้ทางคลินิกตามตารางที่ 9 จะเห็นว่า CIK cells ที่ถูกเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture นั้นมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยผ่านเกณฑ์มาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสำหรับเซลล์ที่ใช้ในทางคลินิกอีกด้วย การเลี้ยง CIK ด้วยวิธี Gas-permeable culture นี้จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งที่จะนำมาใช้เป็นวิธีการเพิ่มจำนวน CIK cells สำหรับใช้ในการรักษาด้วยเซลล์บำบัด ทั้งยังเป็นวิธีที่ช่วยลดขั้นตอนที่ยุ่งยากลงจากผลิตเซลล์จำนวนมาก แต่ทั้งนี้ในการเลี้ยงด้วยวิธี Gas-permeable culture โดยใช้อุปกรณ์ GREX ที่มีขนาดพื้นที่ผิว Gas-permeable membrane แตกต่างจากในงานวิจัยนี้ควรมีการทดสอบหาปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมกับอุปกรณ์ก่อนใช้ในการเพิ่มจำนวน

จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่า การเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture โดยใช้อุปกรณ์ G-REX เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยมากเพียงพอซึ่งสามารถนำมาปรับใช้เพื่อการผลิต CIK cells สำหรับช้กับงานวิจัยทางคลินิกหรือการรักษาผู้ป่วยด้วยวิธีเซลล์

บำบัดได้ในอนาคต การเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture นี้ได้เคยถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์เซลล์ภูมิคุ้มกันอื่น ๆ เพื่อนำมาใช้ในวิจัยทางคลินิกหรือการรักษาด้วยวิธีเซลล์ภูมิคุ้มกันบำบัดบำบัดแล้ว ไม่ว่าจะเป็น NK cell(63) จำนวน TCR transduced T-cells(65) Cytotoxic T lymphocytes (CTLs)(64) และในการทดลองเลี้ยง Tumor infiltrating lymphocytes (TILs)(67) เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพิ่มจำนวน CIK cells ในอุปกรณ์อื่นที่ใช้หลักการ Gas-permeable culture เหมือนกัน เช่น Gas-permeable bag นั้นพบว่า Gas-permeable bag ยังมีข้อจำกัดของปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์และรูปร่างของถุง ซึ่งข้อจำกัดนี้ส่งผลต่อปริมาณสารอาหารที่เซลล์จะได้รับนั้นไม่เพียงพอต่อเซลล์ที่กำลังมีการเจริญอย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังมีการสะสมของเสียและทำให้ pH ที่เป็นกรด จึงมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวัน อีกทั้งเซลล์ต้องมีการ Rolling อยู่ตลอดเวลาทำให้ต้องมีการนำอุปกรณ์อื่นมาใช้ในการเลี้ยงเซลล์เพิ่มเติม หรือในอุปกรณ์ WAVE bioreactor ที่ถึงแม้ว่าอุปกรณ์นี้จะเป็วิธีที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เพิ่มจำนวนเซลล์เป็นจำนวนมาก แต่ก็มีลักษณะของอุปกรณ์ที่มีขนาดใหญ่ มีความจำเป็นต้องใช้พื้นที่ในห้องปฏิบัติการเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังมีราคาที่สูงกว่า และขั้นตอนการใช้งานยังยุ่งยากกว่าการใช้อุปกรณ์ GREX อีกด้วย อีกทั้งปริมาณ CIK cells ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในระยะเวลา 14 วันนั้นมีปริมาณอยู่ในช่วง $10-15 \times 10^6$ เซลล์เท่านั้น(81) ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าการเพิ่มปริมาณเซลล์ด้วยอุปกรณ์ GREX ในการทดลองนี้

ถึงแม้ว่าวิธีการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Gas-permeable culture จะมีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตามการเลี้ยง CIK cells ด้วยวิธี Gas-permeable culture ยังมีข้อจำกัดสำคัญจากความแตกต่างของเซลล์ในอาสาสมัครแต่ละคน ซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดจากตัวบุคคลเป็นสำคัญ ซึ่งทำให้ยากต่อการควบคุมในห้องปฏิบัติการ ดังเห็นได้จากผลการทดลองในบางการทดลองจะพบว่าที่มีค่า Standard deviation (SD) ที่สูงมากเป็นผลมาจากความแตกต่างดังกล่าวข้างต้นนี้ นอกจากนี้ข้อจำกัดดังกล่าวแล้ว การเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีนี้ยังมีข้อจำกัดอื่นจากตัวอุปกรณ์ได้แก่ บริเวณพื้นที่ผิว Gas-permeable membrane นั้นสามารถใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ลอย (Suspension cell) หรือเซลล์ที่ไม่เกาะผิว (non-adherent cell) เท่านั้น หากเป็นเซลล์ที่ต้องอาศัยการเกาะพื้นที่ของอุปกรณ์ในการเจริญของเซลล์ อาจจะไปรบกวนการซึมผ่านของก๊าซบริเวณพื้นที่ผิว Gas-permeable membrane ในอุปกรณ์ได้ และอีกประการคือ ด้วยลักษณะของอุปกรณ์ที่มีความสูงกว่าอุปกรณ์ที่ใช้ในวิธีมาตรฐาน จึงไม่สามารถตรวจดูจำนวนเซลล์คร่าว ๆ ในอุปกรณ์ได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ แต่ทั้งนี้ยังสามารถติดตามปริมาณเซลล์ได้จากการวัดปริมาณน้ำตาลที่ลดลงเป็นหลักได้แทน

การปรับปรุงการเพิ่มจำนวน CIK cells ให้ได้ปริมาณสูงขึ้นนั้นเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจอย่างมากสำหรับกระบวนการการผลิตเซลล์เพื่อใช้ในการรักษาด้วยเซลล์บำบัด มีการศึกษาวิจัยในอดีตที่พยายามปรับปรุงการเพิ่มจำนวน CIK cells ด้วยวิธีต่างๆได้แก่ การใช้ Antigen presenting

cell (APC) มาร่วมกระตุ้น การใช้ไซโตไคน์ชนิดอื่นมาช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์(50, 53) หรือ การเลี้ยง CIK cells ในอุปกรณ์พิเศษเช่น Gas-permeable bag หรือ Bioreactor ซึ่งการใช้วิธีดังกล่าวในการช่วยเพิ่มจำนวน CIK cells นั้นอาจมีขั้นตอนที่ซับซ้อนและใช้เวลานานในการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในงานวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการปรับปรุงการเพิ่มจำนวน CIK cells โดยการใช้วิธี Gas permeable culture ในอุปกรณ์ GREX ซึ่งเป็นอุปกรณ์เลี้ยงเซลล์ที่มีความคล้ายคลึงกับการเลี้ยงเซลล์แบบมาตรฐานที่มีขั้นตอนการทำงานที่ไม่ซับซ้อน โดยการเพิ่มจำนวน CIK cells ด้วยวิธีดังกล่าวนอกจากสามารถช่วยเพิ่มจำนวน CIK cells ได้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแล้ว ยังสามารถช่วยลดปริมาณเซลล์ตั้งต้นในการเลี้ยงเซลล์ ระยะเวลาเลี้ยงเซลล์ ปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ขั้นตอนการทำงานและโอกาสเกิดการปนเปื้อนลง ซึ่งสามารถนำมาปรับใช้ในการผลิต CIK cells ภายใต้มาตรฐานการผลิตแบบ Good Manufacturing Practice (GMP) เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยสำหรับการใช้ในการวิจัยทางคลินิกหรือการรักษาผู้ป่วยมะเร็งด้วยวิธีเซลล์บำบัดต่อไปในอนาคต



รายการอ้างอิง

1. Samara P, Kotsakis A, Tsitsilonis O, Georgoulas V, Pawelec G, Baxevanis CN. 2nd Symposium on Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy, December 15-17, 2016, Athens, Greece. *Cancer Immunol Immunother.* 2017.
2. Schuster M, Nechansky A, Kircheis R. Cancer immunotherapy. *Biotechnol J.* 2006;1(2):138-47.
3. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(4):299-308.
4. Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med.* 1991;174(1):139-49.
5. Hontscha C, Borck Y, Zhou H, Messmer D, Schmidt-Wolf IG. Clinical trials on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC). *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(2):305-10.
6. Niu C, Jin H, Li M, Xu J, Xu D, Hu J, et al. In vitro analysis of the proliferative capacity and cytotoxic effects of ex vivo induced natural killer cells, cytokine-induced killer cells, and gamma-delta T cells. *BMC Immunol.* 2015;16:61.
7. Kirouac DC, Zandstra PW. The systematic production of cells for cell therapies. *Cell Stem Cell.* 2008;3(4):369-81.
8. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med.* 2011;15(6):1239-53.
9. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol.* 2013;10(3):230-52.
10. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science.* 1994;264(5161):961-5.
11. Cells and materials in immunotherapy. *Nat Mater.* 2018;17(6):471.

12. Feldman SA, Assadipour Y, Kriley I, Goff SL, Rosenberg SA. Adoptive Cell Therapy--Tumor-Infiltrating Lymphocytes, T-Cell Receptors, and Chimeric Antigen Receptors. *Semin Oncol.* 2015;42(4):626-39.
13. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity and haplo-identical hematopoietic transplantation. *Cytotherapy.* 2006;8(6):554-8.
14. Yang XY, Zeng H, Chen FP. Cytokine-induced killer cells: A novel immunotherapy strategy for leukemia. *Oncol Lett.* 2015;9(2):535-41.
15. Hoyle C, Bangs CD, Chang P, Kamel O, Mehta B, Negrin RS. Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3(+)CD56(+) cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: in vitro and in vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice. *Blood.* 1998;92(9):3318-27.
16. Itoh K, Shiiba K, Shimizu Y, Suzuki R, Kumagai K. Generation of activated killer (AK) cells by recombinant interleukin 2 (rIL 2) in collaboration with interferon-gamma (IFN-gamma). *J Immunol.* 1985;134(5):3124-9.
17. Gollob JA, Li J, Reinherz EL, Ritz J. CD2 regulates responsiveness of activated T cells to interleukin 12. *J Exp Med.* 1995;182(3):721-31.
18. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood.* 1994;84(12):4008-27.
19. Van Wauwe JP, Goossens JG, Beverley PC. Human T lymphocyte activation by monoclonal antibodies; OKT3, but not UCHT1, triggers mitogenesis via an interleukin 2-dependent mechanism. *J Immunol.* 1984;133(1):129-32.
20. Depper JM, Leonard WJ, Drogula C, Kronke M, Waldmann TA, Greene WC. Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(12):4230-4.
21. Nishimura R, Baker J, Beilhack A, Zeiser R, Olson JA, Segal EI, et al. In vivo trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity. *Blood.* 2008;112(6):2563-74.

22. Shi M, Zhang B, Tang ZR, Lei ZY, Wang HF, Feng YY, et al. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004;10(8):1146-51.
23. Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*. 1994;153(4):1687-96.
24. Pittari G, Filippini P, Gentilcore G, Grivel JC, Rutella S. Revving up Natural Killer Cells and Cytokine-Induced Killer Cells Against Hematological Malignancies. *Front Immunol*. 2015;6:230.
25. Jiang J, Wu C, Lu B. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity. *J Transl Med*. 2013;11:83.
26. Linn YC, Lau SK, Liu BH, Ng LH, Yong HX, Hui KM. Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell. *Immunology*. 2009;126(3):423-35.
27. Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, et al. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol*. 1993;21(13):1673-9.
28. Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Johnston V, Scheffold C, Csipai M, Mehta BA, et al. Sensitivity of multidrug-resistant tumor cell lines to immunologic effector cells. *Cell Immunol*. 1996;169(1):85-90.
29. Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, Vago L, Fleischhauer K, Golay J, et al. Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes. *Exp Hematol*. 2009;37(5):616-28 e2.
30. Linn YC, Wang SM, Hui KM. Comparative gene expression profiling of cytokine-induced killer cells in response to acute myeloid leukemic and acute lymphoblastic leukemic stimulators using oligonucleotide arrays. *Exp Hematol*. 2005;33(6):671-81.
31. Verneris MR, Karimi M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood*. 2004;103(8):3065-72.
32. Introna M. CIK as therapeutic agents against tumors. *J Autoimmun*. 2017;85:32-44.

33. Sangiolo D, Mesiano G, Gammaitoni L, Leuci V, Todorovic M, Giraudo L, et al. Cytokine-induced killer cells eradicate bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Res.* 2014;74(1):119-29.
34. Verneris MR, Ito M, Baker J, Arshi A, Negrin RS, Shizuru JA. Engineering hematopoietic grafts: purified allogeneic hematopoietic stem cells plus expanded CD8+ NK-T cells in the treatment of lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7(10):532-42.
35. Baker J, Verneris MR, Ito M, Shizuru JA, Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8(+) natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production. *Blood.* 2001;97(10):2923-31.
36. Karimi M, Cao TM, Baker JA, Verneris MR, Soares L, Negrin RS. Silencing human NKG2D, DAP10, and DAP12 reduces cytotoxicity of activated CD8+ T cells and NK cells. *J Immunol.* 2005;175(12):7819-28.
37. Edinger M, Cao YA, Verneris MR, Bachmann MH, Contag CH, Negrin RS. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood.* 2003;101(2):640-8.
38. Introna M, Correnti F. Innovative Clinical Perspectives for CIK Cells in Cancer Patients. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
39. Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, Edinger M, Negrin RS. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(3):181-7.
40. Linn YC, Yong HX, Niam M, Lim TJ, Chu S, Choong A, et al. A phase I/II clinical trial of autologous cytokine-induced killer cells as adjuvant immunotherapy for acute and chronic myeloid leukemia in clinical remission. *Cytotherapy.* 2012;14(7):851-9.
41. Laport GG, Sheehan K, Baker J, Armstrong R, Wong RM, Lowsky R, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(11):1679-87.
42. Weng DS, Zhou J, Zhou QM, Zhao M, Wang QJ, Huang LX, et al. Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the

short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas. *J Immunother.* 2008;31(1):63-71.

43. Wu C, Jiang J, Shi L, Xu N. Prospective study of chemotherapy in combination with cytokine-induced killer cells in patients suffering from advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2008;28(6B):3997-4002.

44. Zhou X, Zhu J, Sun H, Shao L, Xu M, Guo H. Family haploidentical donor-derived cytokine-induced killer cell biotherapy combined with bortezomib in two patients with relapsed multiple myeloma in a non-allogeneic transplant setting. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(1):209-11.

45. Oelsner S, Wagner J, Friede ME, Pfirrmann V, Genssler S, Rettinger E, et al. Chimeric antigen receptor-engineered cytokine-induced killer cells overcome treatment resistance of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and enhance survival. *Int J Cancer.* 2016;139(8):1799-809.

46. Marin V, Kakuda H, Dander E, Imai C, Campana D, Biondi A, et al. Enhancement of the anti-leukemic activity of cytokine induced killer cells with an anti-CD19 chimeric receptor delivering a 4-1BB-zeta activating signal. *Exp Hematol.* 2007;35(9):1388-97.

47. Bohnenkamp H, Hilbert U, Noll T. Bioprocess development for the cultivation of human T-lymphocytes in a clinical scale. *Cytotechnology.* 2002;38(1-3):135-45.

48. Marin V, Dander E, Biagi E, Introna M, Fazio G, Biondi A, et al. Characterization of in vitro migratory properties of anti-CD19 chimeric receptor-redirectioned CIK cells for their potential use in B-ALL immunotherapy. *Exp Hematol.* 2006;34(9):1219-29.

49. Zhang L, Yang X, Sun Z, Li J, Zhu H, Li J, et al. Dendritic cell vaccine and cytokine-induced killer cell therapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(4):2605-10.

50. Pan Y, Tao Q, Wang H, Xiong S, Zhang R, Chen T, et al. Dendritic cells decreased the concomitant expanded Tregs and Tregs related IL-35 in cytokine-induced killer cells and increased their cytotoxicity against leukemia cells. *PLoS One.* 2014;9(4):e93591.

51. Gao X, Mi Y, Guo N, Xu H, Xu L, Gou X, et al. Cytokine-Induced Killer Cells As Pharmacological Tools for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2017;8:774.

52. Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, Leuci V, Giraudo Diego L, Carnevale-Schianca F, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(6):673-84.
53. Lin G, Wang J, Lao X, Wang J, Li L, Li S, et al. Interleukin-6 inhibits regulatory T cells and improves the proliferation and cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells. *J Immunother.* 2012;35(4):337-43.
54. Tao Q, Chen T, Tao L, Wang H, Pan Y, Xiong S, et al. IL-15 improves the cytotoxicity of cytokine-induced killer cells against leukemia cells by upregulating CD3+CD56+ cells and downregulating regulatory T cells as well as IL-35. *J Immunother.* 2013;36(9):462-7.
55. Wang L, Yi Y, Yin D, Zhou Z, Fan J, Ye W, et al. Augmented CD3(+)CD8(+) and CD3(+)CD56(-) cells in cytokine-induced killer cells cultured with engineered cells for costimulatory enhancement from heavily pretreated patients with solid tumor. *Cytotherapy.* 2016;18(4):581-9.
56. Todorovic M, Mesiano G, Gammaitoni L, Leuci V, Giraudo Diego L, Cammarata C, et al. Ex vivo allogeneic stimulation significantly improves expansion of cytokine-induced killer cells without increasing their alloreactivity across HLA barriers. *J Immunother.* 2012;35(7):579-86.
57. Bonanno G, Iudicone P, Mariotti A, Procoli A, Pandolfi A, Fioravanti D, et al. Thymoglobulin, interferon-gamma and interleukin-2 efficiently expand cytokine-induced killer (CIK) cells in clinical-grade cultures. *J Transl Med.* 2010;8:129.
58. Rui T, Cheng X, Wu H, Wang F, Ye Z, Wu G. Lentiviral delivery of CTLA-4 shRNA improves the expansion of cytokine-induced killer cells and enhances cytotoxic activity in vitro. *Oncol Lett.* 2018;15(1):741-6.
59. Cao J, Chen C, Wang Y, Chen X, Chen Z, Luo X. Influence of autologous dendritic cells on cytokine-induced killer cell proliferation, cell phenotype and antitumor activity in vitro. *Oncol Lett.* 2016;12(3):2033-7.
60. Yazdani M. Technical aspects of oxygen level regulation in primary cell cultures: A review. *Interdiscip Toxicol.* 2016;9(3-4):85-9.

61. Gstraunthaler G, Seppi T, Pfaller W. Impact of culture conditions, culture media volumes, and glucose content on metabolic properties of renal epithelial cell cultures. Are renal cells in tissue culture hypoxic? *Cell Physiol Biochem*. 1999;9(3):150-72.
62. Wolf W. G-Rex Instructions for Use. 2013:3.
63. Lapteva N, Durett AG, Sun J, Rollins LA, Huye LL, Fang J, et al. Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy*. 2012;14(9):1131-43.
64. Vera JF, Brenner LJ, Gerdemann U, Ngo MC, Sili U, Liu H, et al. Accelerated production of antigen-specific T cells for preclinical and clinical applications using gas-permeable rapid expansion cultureware (G-Rex). *J Immunother*. 2010;33(3):305-15.
65. Jin J, Gkitsas N, Fellowes VS, Ren J, Feldman SA, Hinrichs CS, et al. Enhanced clinical-scale manufacturing of TCR transduced T-cells using closed culture system modules. *J Transl Med*. 2018;16(1):13.
66. Gas-Permeable VECCELL 96 - well Plate [Available from: <http://www.nacalaiusa.com/products/view/210/gas-permeable-vecell-96-well-plate>.
67. Jin J, Sabatino M, Somerville R, Wilson JR, Dudley ME, Stroncek DF, et al. Simplified method of the growth of human tumor infiltrating lymphocytes in gas-permeable flasks to numbers needed for patient treatment. *J Immunother*. 2012;35(3):283-92.
68. Forget MA, Haymaker C, Dennison JB, Toth C, Maiti S, Fulbright OJ, et al. The beneficial effects of a gas-permeable flask for expansion of Tumor-Infiltrating lymphocytes as reflected in their mitochondrial function and respiration capacity. *Oncoimmunology*. 2016;5(2):e1057386.
69. Lapteva N, Szmania SM, van Rhee F, Rooney CM. Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. *Crit Rev Oncog*. 2014;19(1-2):121-32.
70. BD Cytometric Bead Array: Multiplexed Bead-Based Immunoassays. p. 4.
71. Cappuzzello E, Sommaggio R, Zanovello P, Rosato A. Cytokines for the induction of antitumor effectors: The paradigm of Cytokine-Induced Killer (CIK) cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017;36:99-105.
72. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*. 2013;38(1):13-25.

73. Zhang Q, Wang L, Luo C, Shi Z, Cheng X, Zhang Z, et al. Phenotypic and functional characterization of cytokine-induced killer cells derived from preterm and term infant cord blood. *Oncol Rep.* 2014;32(5):2244-52.
74. Molins B, Mesquida M, Lee RW, Llorenc V, Pelegrin L, Adan A. Regulatory T cell levels and cytokine production in active non-infectious uveitis: in-vitro effects of pharmacological treatment. *Clin Exp Immunol.* 2015;179(3):529-38.
75. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol.* 2009;21(10):1105-11.
76. Cretney E, Kallies A, Nutt SL. Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2013;34(2):74-80.
77. Hashimoto H, Ueda R, Narumi K, Heike Y, Yoshida T, Aoki K. Type I IFN gene delivery suppresses regulatory T cells within tumors. *Cancer Gene Ther.* 2014;21(12):532-41.
78. Goldstein JD, Perol L, Zaragoza B, Baeyens A, Marodon G, Piaggio E. Role of cytokines in thymus- versus peripherally derived-regulatory T cell differentiation and function. *Front Immunol.* 2013;4:155.
79. Wang YF, Kunda PE, Lin JW, Wang H, Chen XM, Liu QL, et al. Cytokine-induced killer cells co-cultured with complete tumor antigen-loaded dendritic cells, have enhanced selective cytotoxicity on carboplatin-resistant retinoblastoma cells. *Oncol Rep.* 2013;29(5):1841-50.
80. Tao Q, Wang H, Zhai Z. Targeting regulatory T cells in cytokine-induced killer cell cultures (Review). *Biomed Rep.* 2014;2(3):317-20.
81. Meng Y, Sun J, Hu T, Ma Y, Du T, Kong C, et al. Rapid expansion in the WAVE bioreactor of clinical scale cells for tumor immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2018:1-28.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-สกุล: สุภารัตน์ ทัดสำราญ

วันเกิด: 18 สิงหาคม 2533

ที่อยู่: 36/49 ม.7 ซ.อยู่สุข 20 ถ.สุขุมวิท ต.บางเมือง อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 10270

เบอร์ติดต่อ: 080-251-5511

อีเมล: ink_su@hotmail.com

ประวัติการศึกษา:

2557-ปัจจุบัน สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

2553-2557 ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิค
การแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY