CHARACTERIZATION OF CHOLANGIOCARCINOMA ASSOCIATED PERIPHERAL BLOOD LUEKOCYTES AND ITS APPLICATION

MISS CHUTIMA SUBIMERB

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY
2009

CHARACTERIZATION OF CHOLANGIOCARCINOMA ASSOCIATED PERIPHERAL BLOOD LUEKOCYTES AND ITS APPLICATION

MISS CHUTIMA SUBIMERB

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

KHON KAEN UNIVERSITY

2009

CHARACTERIZATION OF CHOLANGIOCARCINOMA ASSOCIATED PERIPHERAL BLOOD LUEKOCYTES AND ITS APPLICATION

MISS CHUTIMA SUBIMERB

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN MEDICAL BIOCHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY

2009

THESIS APPROVAL

KHON KAEN UNIVERSITY

FOR

DOCTOR OF PHILOSOPHY

IN MEDICAL BIOCHEMISTRY

Thesis Title: Characterization of cholangiocarcinoma associated peripheral blood leukocytes and its application

Author: Miss Chutima Subimerb

Thesis Examination Committee:

Assoc. Prof. Dr. Viraphong Lulitanond	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Sopit Wongkham	Member
Assoc. Prof. Dr. Chanvit Leelayuwat	Member
Assoc. Prof. Dr. Somchai Pinlaor	Member
Professor Dr. Seiji OKADA	Member

Thesis Advisors:

.....Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Sopit Wongkham)

.....Co-Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Chanvit Leelayuwat)

.....Co-Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Somchai Pinlaor)

.....
(Assoc.Prof. Dr.Lampang Manmart)
Dean, Graduate School

.....
(Prof. Dr. Wiroon Laupattarakasem)
Dean, Faculty of Medicine

ชุติมา ทรัพย์อิ่มเอิบ. 2552. ***คุณลักษณ์ของเม็ดเลือดขาวที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีและการประยุกต์ใช้***. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ, รศ.ดร.ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์, รศ.ดร.สมชาย ปิ่นละออ

บทคัดย่อ

เป็นที่ทราบกันดีว่าการอักเสบเรื้อรังที่เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ การอักเสบเรื้อรังร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของยีนภายในเซลล์ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการก่อมะเร็งได้ รายงานการศึกษาในมะเร็งหลายชนิดชี้ว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte และ macrophage ส่งเสริมการก่อมะเร็งโดยการสร้างสารที่มีผลต่อการเจริญพัฒนาและการอยู่รอดของมะเร็ง โดยการสนับสนุนกระบวนการสร้างหลอดเลือดและการพัฒนาของเซลล์

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่สัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบเรื้อรัง การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะและบทบาทของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte และ macrophage ในการสนับสนุนการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าระดับของเซลล์ชนิด $CD14^+CD16^+$monocyte ในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ $CD14^+CD16^+$ monocyte ที่ตรวจพบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดีและกลุ่มคนปกติ และระดับของ $CD14^+CD16^+$monocyte ที่สูงในเลือดจะลดลงสู่ระดับปกติเมื่อผู้ป่วยได้รับการผ่าตัดเอาเนื้อเยื่อมะเร็งออก การศึกษาความสัมพันธ์ของเซลล์กลุ่มดังกล่าวกับภาวะโรคพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับของ $CD14^+CD16^+$monocyte ในเลือดต่ำสัมพันธ์กับมะเร็งที่เป็นลักษณะ papillary type CCA ซึ่งโดยปกติแล้วจะมีพยากรณ์ของโรคที่ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า monocyte ชนิดนี้มีลักษณะการแสดงออกที่คล้าย macrophage โดยมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นของ adhesion molecules (CD11c, CD49d และ CD54) และ scavenger receptors (CD163) และพบว่า $CD14^+CD16^+$monocyte ที่เพิ่มสูงขึ้นในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี สัมพันธ์กับปริมาณ macrophage ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (Tumor associated macrophage; TAMs) ที่มี MAC387 +ve ซึ่งชี้แนะว่า $CD14^+CD16^+$monocyte ในเลือดอาจจะพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ของ TAMs ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

เม็ดเลือดขาวในระบบไหลเวียนโลหิตเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการทำหน้าที่ตรวจตราสิ่งแปลกปลอมโดยกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากการติดเชื้อการอักเสบ รวมไปถึงภาวะมะเร็งปัจจุบันพบว่า การแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวในเลือดเปลี่ยนแปลงและสัมพันธ์กับภาวะโรคของผู้ป่วย และสามารถนำมาใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้ภาวะของโรคและกระบวนการเกิดโรคได้ การศึกษา

ครั้งนี้พบว่าการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับคนปกติมีความแตกต่างกัน และสามารถใช้แยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากคนปกติได้ โดยพบว่ายีนของเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 177 ยีนมีการแสดงออกที่แตกต่างจากที่พบในคนปกติ โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 117 ยีนและมีการแสดงออกลดลง 60 ยีน คาดว่ากลุ่มยีนเหล่านี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย การส่งเสริมการเจริญและการลุกลามของมะเร็ง โดยส่งเสริมกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่และการทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียง ยีนที่พบว่ามีการแสดงออกเด่นชัดในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้แก่ growth factor และ angiogenic factor (EREG, TGF b1, CXCL2, CXCL3, IL-8 และ VEGFA), และ protease enzyme (PLAU, MMP9, CTLS, และ SSERPINB2) เป็นต้น นอกจากนี้ได้ทดสอบการใช้ระดับการแสดงออกของยีน PLAU, CTSL, และ SERPINB2 ในการคำนวณค่า risk score ซึ่งสามารถแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่มีค่า risk score สูงซึ่งมีพยากรณ์โรคไม่ดี และกลุ่มที่มีค่า risk score ต่ำซึ่งมีพยากรณ์โรคที่ดีกว่า นอกจากนี้ค่า risk score ยังเป็นตัวพยากรณ์โรคที่เป็นอิสระต่อปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีอีกด้วย จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบบแผนการแสดงออกของเม็ดเลือดขาวในเลือด สามารถนำมาใช้เป็นตัวแทนแบบแผนการแสดงออกของเนื้อเยื่อที่เกิดพยาธิสภาพได้ และใช้ในการทำนายหรือพยากรณ์ภาวะของโรคในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้

เพื่อศึกษาการส่งเสริมการพัฒนามะเร็งของเม็ดเลือดขาวในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ได้ทำการตรวจหา monocyte/macrophage ที่เพิ่งเคลื่อนย้ายจากเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อมะเร็งโดยใช้ MAC387 แอนติบอดี พบว่ามากกว่า 60% ของเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีปริมาณ TAMs ที่ย้อมติดด้วย MAC387 จำนวนมาก โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อระหว่างมะเร็งกับเนื้อเยื่อตับ และพบว่าปริมาณ TAMs จำนวนมากในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีแบบ non-papillary และ mass forming type CCA และการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่มี MAC387 มีการแสดงออกของ protease enzyme ได้แก่ PLAU และ MMP9 ด้วย แสดงให้เห็นว่า TAMs ในมะเร็งท่อน้ำดีมีบทบาทส่งเสริมการลุกลามของเซลล์มะเร็ง โดยการผลิตและหลั่งสารดังกล่าวเพื่อทำลายเนื้อเยื่อข้างเคียง

จากข้อมูลทั้งหมดในการศึกษานี้ สรุปได้ว่า $CD14^{+}CD16^{+}$monocyte ในเลือดสัมพันธ์กับ TAMs ในเนื้อเยื่อมะเร็งโดยมีบทบาทส่งเสริมการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี ดังนั้นการขัดขวางการสื่อสารระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์เม็ดเลือดขาวในบริเวณเนื้อเยื่อมะเร็ง อาจเป็นเป้าหมายและทางเลือกใหม่ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีในอนาคต นอกจากนี้ลักษณะการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาว สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สะท้อนพยาธิสภาพของมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้

Chutima Subimerb. 2009. **Characterization of Cholangiocarcinoma Associated Peripheral Blood Leukocytes and its Application.** Doctor of Philosophy Thesis in Medical Biochemistry, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Sopit Wongkham,
Assoc. Prof. Dr. Chanvit Leelayuwat,
Assoc. Prof. Dr. Somchai Pinlaor

ABSTRACT

It is well accepted that chronic inflammation which driven in part by inflammatory cells, may be one of the diving forces of transformation that together with other determinants, including the intrinsic properties of pre-malignant cells, support initiation of cancer. The pro-tumor actions of inflammatory cells especially monocyte/macrophages by releasing growth and survival factors, to promoting angiogenesis and cancer progression have been documented in many cancers.

The present study demonstrated the pro-tumor progression activity of monocyte/macrophages in cholangiocarcinoma (CCA), a known chronic inflammation related cancer. The expansion of minor monocyte subpopulation ($CD14^+ CD16^+$) in peripheral blood and the relationship between these monocytes and tumor associated macrophages (TAMs) in CCA tissues of the patients were evaluated. The level of $CD14^+CD16^+$ monocytes of patients with CCA were significantly increased comparing to those of benign biliary diseases or healthy subjects and the elevated levels reduced to near normal baseline after tumor resection. Low level of $CD14^+CD16^+$ monocytes was significantly associated with papillary type CCA, a tumor type having good prognosis. Phenotype with a macrophage like cells was shown in these monocytes with high expression of adhesion molecules (CD11c, CD49d, and CD54) and scavenger receptor (CD163). In addition, elevated $CD14^+CD16^+$ monocyte was also associated with TAM density (MAC387 +ve cells) in CCA tissues. These evidences indicate the $CD14^+CD16^+$ monocytes in blood may be a subpopulation of TAMs in CCA tissues.

Circulating leukocytes serve as a vigilant and comprehensive surveillance system that patrols the body for signs of infection, inflammation, and other threats, including cancer. Recently, a disease–specific gene expression signature in peripheral blood cells could constitute potential disease markers as well as genes involved in pathogenesis of the disease. The current study showed for the first time that an informative gene expression profile of peripheral blood leukocytes (PBLs) could reliably distinguish CCA patients from healthy subjects. Of the 177 differentially expressed genes, 117 were up regulated and 60 were down regulated in the PBLs from CCA patients. The expression profile of CCA-PBLs was postulated to involve in the host immune response-cellular growth, angiogenesis, and proteolysis. Growth and angiogenic factors (*EREG, TGF β1, CXCL2, CXCL3, IL-8,* and *VEGFA*), and protease enzyme *(PLAU, MMP9, CTSL* and *SERPINB2)* were found prominent in CCA-PBLs. Three candidate genes (*PLAU, CTSL* and *SERPINB2*) computed as "risk score" was innovated to discriminate between good and poor prognosis patients and had power to be independent predictors of survival for CCA. Therefore, PBLs may serve as a clinically accessible surrogate tissue for identifying gene expression pattern which reflect the disease and could be used as predictor for eventual outcome of the patient with CCA.

To assess the pro-tumor activity of tissue macrophages in CCA, the recent infiltrating monocyte/macrophage was monitored using MAC387 as a marker. More than 60% of CCA tissues had high densities of MAC387 positive cells which were found mostly at the lead-edge tumor. High density of MAC387 positivity was significantly associated with poor prognosis parameters (non-papillary and mass forming type CCA) and the worse overall survival of patients. This association may in part due to the pro-tumor activity of these macrophages evidenced by the finding that MAC387 positive cells co-expressed PLAU and MMP9, the critical proteins for degrading extracellular matrix and facilitating tumor metastasis.

Gather all evidences obtained from the present study, the pivotal role in pro-malignancy function of the inflammatory cells - namely $CD14^{+}CD16^{+}$ monocytes in blood and MAC387 positive cells in tissue were implicated in CCA. Blocking tumor microenvironment interaction especially between tumor and inflammatory cells that boost CCA progression may serve as an alternative target for specific adjuvant

treatment of CCA in the future. Moreover, determination of blood transcriptome with a set of potential candidate genes can be used as surrogate tissue marker which reflects the condition of tumor in CCA patients.

Goodness portion to the present dissertation is dedicated to my parents and entire teaching staff

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Sopit Wongkham, who were patient in instruction, guidance and strengthen me both knowledge and the management of my life as well as taking care me throughout my study. My deepest gratitude gives to her for providing me an RGJ-Ph.D. scholarship to study in Medical Biochemistry field and for providing me a chance to do research abroad and explore life. I wish to express my sincere gratitude to Associate Professor Dr. Chanvit leelayuwat, Associate Professor Somchai Pinlaor, Associate Professor Dr. Veelaphong Lulitranond who gave valuable suggestion and guidance in my thesis. I am very appreciate to Associate Prof. Chawalit Pairojkul and Assistant Prof. Narong Khuntikeo, and Associate Prof. Vatjarabhongs Bhudisawasdi who supported thr clinical information for my study.

My sincere thankfulness is expressed to Professor Michael S McGrath for precious advice, supervision, comments and financial support during my study at University of California, San Francisco (UCSF) and Pathologica LLC Company. The thankfulness is also extended to the laboratory members for their kindness and helpfulness my study at both places in USA. I also would like to express my sincere gratitude to Professor Seiji Okada who intended to instruct me for improving my specialty in flow cytometry analysis and provided financial support through Japan Student Services Organization (JASSO), as well as his care during my study at Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

I would like to express my gratitude to Thailand Research Fund for research grant and the RGJ-Ph.D. scholarship and to Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, for providing the specimens in this study. Grateful is expressed to all staffs of Department of Biochemistry and graduate students, especially members of Wongkham's laboratory, for their friendship and kindness throughout my study.

Finally, I wish to express my sincere gratitude to my family, who appreciate and understand my study career and their spiritual support with love throughout my life. Additionally, I also would like to express my gratitude to my dear brother who encouraged and powered me throughout my study.

Chutima Subimerb

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES (Cont.)

LIST OF ABBREVIATIONS

%	Percent
°C	Degree Celsius
BBD	Benigh Billiary tract disease
CBC	complete blood count
CCA	Cholangiocarcinoma
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
C_T	Cycle threshold
DAB	diaminobenzidine tetrahydrochloride
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
e.g.	exempli gratia (Latin), for example
et al.	et alii/alia (Latin), and other people or things
etc.	et cetera (Latin), and the rest
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
g	Gram
hr	Hour(s)
ICC	Intrahepatic cholangiocarcinoma
IPA	Ingenuity pathway analysis
kg	Kilogram
LFT	Liver Function Test
M	Molar
MFI	Mean fluorecent intensity
mg	Milligram
min	Minute(s)
ml	Microliter

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

mM	Micromolar
mRNA	Messenger ribonucleotic acid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OV	*Opisthorchis viverrini*
PB	Pacific Blue
PBL	Peripheral blood leukocytes
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PCA	Pinciple component analysis
RBC	Red blood cells
R-PE	R-Phycoerythrin
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
SAPE	Streptavidin Phycoerythrin
WBC	White blood cells
β	beta