

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการอนุเคราะห์ตัวอย่างมะเร็งท่อน้ำดีและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นในการสนับสนุนผู้ช่วยวิจัยสำหรับนักศึกษาปริญญาโท โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2555 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น (รหัสโครงการ 551805)

บทคัดย่อ

มะเร็งท่อน้ำดีคือมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อผนังของท่อน้ำดีซึ่งยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกระบวนการควบคุมเหนือพันธุกรรมที่ในปัจจุบันมีการศึกษากันมากที่สุดในการศึกษาเกี่ยวกับโรคมะเร็งและรวมถึงมะเร็งท่อน้ำดี การเกิดเมทิลเลชันบริเวณ CpG island ส่งผลให้มีการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีนและเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของมะเร็ง วิธี methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) เป็นวิธีใหม่ที่สามารถตรวจหาระดับเมทิลเลชันได้อย่างรวดเร็วในขั้นตอนเดียว ซึ่งปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้วิธีนี้ในงานวิจัยเกี่ยวกับมะเร็งเพิ่มมากขึ้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้วิธี MS-HRM ในการตรวจหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *OPCML*, *SFRP1*, *HIC1*, *PTEN* และ *DcR1* ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา เพื่อประเมินความสามารถของดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนดังกล่าวในการเป็นตัวบ่งชี้ทำนายการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยตรวจหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในตัวอย่างมะเร็งท่อน้ำดี 73 ตัวอย่าง และเนื้อเยื่อท่อน้ำดีปกติบริเวณข้างเคียง 10 ตัวอย่างโดยวิธี MS-HRM จากการศึกษาพบว่ายีน *OPCML*, *SFRP1* และ *HIC1* เกิดภาวะไฮเปอร์เมทิลเลชันร้อยละ 89.0, 83.6 และ 28.8 ตามลำดับ และพบการเกิดไฮโปเมทิลเลชันของยีน *DcR1* ร้อยละ 68.5 ขณะที่การศึกษานี้ไม่พบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *PTEN* และเมื่อพิจารณาระดับเมทิลเลชันพบว่า ยีน *OPCML* และ *SFRP1* ในตัวอย่างมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับเมทิลเลชันสูงกว่าที่พบในตัวอย่างท่อน้ำดีปกติบริเวณข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และยีน *DcR1* มีระดับเมทิลเลชันในตัวอย่างมะเร็งท่อน้ำดีต่ำกว่าในตัวอย่างท่อน้ำดีปกติบริเวณข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.001$) แม้ว่าการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนและการตอบสนองต่อการรักษา อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าภาวะไฮเปอร์เมทิลเลชันของยีน *OPCML* และ *SFRP1* เป็นความผิดปกติทางกระบวนการควบคุมเหนือพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในมะเร็งท่อน้ำดีและอาจจะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดีได้ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังเป็นการศึกษาแรกที่ประยุกต์ใช้วิธี MS-HRM เพื่อตรวจหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่ง MS-HRM เป็นวิธีที่สามารถทำซ้ำได้โดยให้ผลเหมือนเดิม อีกทั้งยังราคาไม่แพงและผลที่ได้สามารถเทียบได้กับวิธี pyrosequencing ดังนั้น MS-HRM จึงเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาระดับเมทิลเลชันของยีนที่สนใจในตัวอย่างชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is a malignancy of cholangiocytes which remains a major public health problem in Thailand. DNA methylation of CpG dinucleotides is one of the most widely studied epigenetic changes in cancers including CCA. CpG island methylation of important cancer-related genes leads to transcriptional silencing which is involved in tumorigenesis and pathogenesis. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) is a novel close-tube assay for high throughput assessment of methylation level in which the method has been increasing epigenetic application in cancer researches for the past few years. We aimed to establish MS-HRM assay for the detection of DNA methylation levels of *OPCML*, *SFRP1*, *HIC1*, *PTEN*, and *DCR1* in CCA patients with response and nonresponse to therapy and evaluated their potential as a predictive marker for response to therapy. DNA methylation levels of these genes were analyzed using established MS-HRM assays in 73 CCA and 10 adjacent normal samples. In CCA, hypermethylation frequency of *OPCML*, *SFRP1*, and *HIC* was 89.0, 83.6, and 28.8%, respectively and hypomethylation frequency of *DcR1* was 68.5%, whereas that of *PTEN* was null. Methylation level of *OPCML* and *SFRP1* in CCA was higher than that in adjacent normal tissues ($P<0.001$), while in *DcR1* was lower than that in adjacent normal tissues ($P=0.001$). Nevertheless, there is no significant correlation of DNA methylation of candidate genes and therapeutic responsiveness of CCA patients. However, our study clearly illustrated that *OPCML* and *SFRP1* hypermethylation are a common epigenetic change in CCA and might serve as the potential candidate diagnostic biomarkers for this fatal cancer. To our knowledge, this is the first report demonstrating the applicability of MS-HRM to detect DNA methylation in CCA. Due to its reproducibility, cost-effectiveness and comparability to sophisticated bisulfite pyrosequencing, MS-HRM could be potentially facilitated for quantifying DNA methylation at specific loci in clinical samples including CCA.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญภาพ	vi
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	3
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	5
วัสดุและวิธีการ	6
ผลการศึกษา	10
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	20
เอกสารอ้างอิง	22
ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ที่ได้จากงานวิจัย	25

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	6
ตารางที่ 2	ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับ MS-HRM และสภาวะสำหรับ PCR	8
ตารางที่ 3	การศึกษาความแม่นยำของวิธี MS-HRM	12
ตารางที่ 4	ค่า cut-off และความถี่ของความผิดปกติของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	14
ตารางที่ 5	การประเมินเมทิลเลชันของยีน <i>OPCML</i> และ <i>SFRP1</i> ในการเป็นตัวบ่งชี้วินิจฉัย	16
ตารางที่ 6	ความถี่ของความผิดปกติของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในกลุ่มผู้ป่วย มะเร็งท่อน้ำดีที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา	18

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การหาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน <i>OPCML</i> ด้วยวิธี MS-HRM	11
รูปที่ 2 ระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และในตัวอย่างชิ้นเนื้อปกติบริเวณใกล้เคียง	13
รูปที่ 3 Scatter plot ของระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน	15
รูปที่ 4 Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis	16
รูปที่ 5 ระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี	17
รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอเมทิลเลชันและอัตราการรอดชีวิต	19