



246854



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาเพื่อหาสาเหตุทางพันธุกรรมของผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษที่มีอาการ
กล้ามเนื้ออ่อนแรงและระดับโพแทสเซียมในเลือดต่ำ
ด้วยวิธีการตรวจทั้งจีโนมด้วยไมโครอาร์เรย์

**Microarray based whole genome scan for genetic susceptibility
of thyrotoxic periodic paralysis.**

โดย

รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง วลัยยา จงเจริญประเสริฐ และคณะ

เมษายน 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์



โครงการ

การศึกษาเพื่อหาสาเหตุทางพันธุกรรมของผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษที่มีอาการ
กล้ามเนื้ออ่อนแรงและระดับโพแทสเซียมในเลือดต่ำด้วยวิธีการตรวจทั้งจีโนมด้วยไม
โครอาร์เรย์

**Microarray based whole genome scan for genetic susceptibility of thyrotoxic
periodic paralysis**

คณะผู้วิจัย



- | | |
|---|---|
| 1. รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวัลยา จงเจริญประเสริฐ | หน่วยต่อมไร้ท่อ ภาควิชาอายุรศาสตร์
โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. ศาสตราจารย์นายแพทย์บุญส่ง องค์กรพัฒน์กุล | หน่วยต่อมไร้ท่อ ภาควิชาอายุรศาสตร์
โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. นางสาวสุวรรณี ชื่นประเสริฐโยธิน | หน่วยต่อมไร้ท่อ ภาควิชาอายุรศาสตร์
โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 4. นายธีรวุฒิ ภูสันติสัมพันธ์ | สถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ
เทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเพื่อหาสาเหตุทางพันธุกรรมของโรค Thyrotoxic periodic paralysis ใช้ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย 3.5 ปี ซึ่งล่วงเลยจากระยะเวลาที่ได้ลงนามสัญญาไปเป็นเวลา 6 เดือน อันเกิดจากข้อจำกัดของผู้วิจัยในด้านการหาผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการ เนื่องจากวิจัยดังกล่าวนี้เป็นการวิจัยหาสาเหตุทางพันธุกรรมในกลุ่มโรค complex genetic diseases และใช้วิธี Genome wide association study ซึ่งต้องใช้ประชากรในการศึกษาถึง 2 กลุ่ม ผู้ป่วยของโรคนี้โดยมากมักอยู่ต่างจังหวัด ผู้ป่วยหลายรายเมื่อรักษาหายแล้วก็ไม่กลับมาพบแพทย์อีก ประกอบกับการวิจัยนี้เป็นการวิจัยที่ต้องใช้ทุนในการศึกษาสูงมากเพื่อให้ได้ผลการวิจัยที่น่าเชื่อถือ เป็นที่ยอมรับในระดับสากล อย่างไรก็ตาม รายงานชิ้นนี้สำเร็จได้ ด้วยความร่วมมือและเอื้อเฟื้อจากบุคลากรหลายฝ่าย จากหลายโรงพยาบาล ได้แก่ โรงพยาบาลวชิรพยาบาล โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลเทพธารินทร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์ โรงพยาบาลราชบุรี โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาและโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งความช่วยเหลือจาก Riken Center for genomic medicine ที่เล็งเห็นถึงปัญหาโรค THPP ที่เป็นโรคที่พบบ่อยในแถบเอเชียและให้การสนับสนุนทั้งในด้านการชี้แนะ วิเคราะห์ข้อมูล เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ ทรัพยากรทำวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายแพทย์สุรศักดิ์ เมธการศิริมงคล Professor Yusuki Nakamura, และ Professor Taisei Mushiroda จาก RIKEN Center for Genomic Medicine ที่ให้โอกาสในการร่วมงาน ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยทางอณูพันธุศาสตร์ ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์บุญส่ง องค์พิพัฒน์กุล ที่ช่วยให้คำปรึกษา แนะนำและเปิดมุมมองในการทำงานด้านการวิจัย ขอขอบคุณลูกศิษย์ เพื่อนแพทย์ และอาจารย์แพทย์ ในโรงพยาบาลต่างๆ ที่อำนวยความสะดวกและช่วยประสานงานการเข้าสัมภาษณ์ การเก็บเลือดผู้ป่วย ขอขอบคุณ คุณพ่อคุณแม่ สามิอันเป็นที่รัก และเพื่อนๆ ที่ได้ให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการทำงาน และให้การสนับสนุนในการทำงานวิจัยชิ้นนี้ให้เสร็จลุล่วง

สุดท้ายงานวิจัยนี้จะไม่สำเร็จได้ หากปราศจากผู้ป่วยโรคไทรอยด์เป็นพิษทุกคนจากหลายจังหวัดที่ให้ความร่วมมือเข้าร่วมวิจัย เพื่อหาสาเหตุการเกิดโรค เพื่อนำไปสู่การตรวจคัดกรองโรค และเป็นพื้นฐานในการศึกษากลไกการเกิดโรคใหม่ๆ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการแก้ไขปัญหาที่เหมาะสมต่อไป คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ทั้งในด้านเป็นต้นแบบในการหาสาเหตุทางพันธุกรรมของโรคที่มีลักษณะ complex genetic diseases เป็นต้นแบบในการทำการศึกษาชนิด Genome wide association และผลการวิจัยจะเป็นประโยชน์ที่จะทำให้เราเข้าใจโรค Thyrotoxic periodic paralysis และนำไปสู่การรักษาและป้องกันต่อไป

รศ พญ. วัลยา จงเจริญประเสริฐ

หัวหน้าโครงการ

เมษายน 2554

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	5
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	6
บทนำ	7
วัตถุประสงค์โครงการ	13
วิธีการศึกษา	15
1. การเซ็นยินยอมของผู้ป่วย	15
2. การเก็บข้อมูล	15
3. เกณฑ์การคัดผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย	15
4. ขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	15
5. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ	
การวิจัยแบบ GWAS-Pooled DNA approach	16
การวิจัยแบบ GWAS for individual DNA	19
การยืนยันผลการศึกษาที่ได้ใน replication cohort	19
การตรวจสอบ Functional study	20
6. สถิติที่ใช้	
ผลการศึกษา	22
1. ประชากรที่ทำการศึกษา	23
2.. ผลการศึกษา GWAS pooled DNA analysis	24
3. สรุปผลการศึกษา GWAS-Pooled DNA study	31
4. ผลการศึกษา GWAS individual study	42
5. สรุปผลการศึกษา GWAS individual study	48
6. ผลการศึกษา Functional study บน เซลล์ C2C12	49
บทวิจารณ์	
1. กลุ่มอาการและอาการแสดง Thyrotoxic hypokalemia periodic paralysis	50
2. ผลการศึกษา genetic association study ของยีนด้วยวิธี candidate ion channel	51
genes	
3. ผลการศึกษา Fine mapping ด้วย SNPs ที่ใกล้ intron3 ของ GABRA3 โดย	52
genetic association study	
4. ผลการศึกษา genetic association study ของโรค THPP ด้วยวิธี GWAS	52
5. ผลการศึกษา functional study บนเซลล์ C2C12	53

เอกสารอ้างอิง	55
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจากสกว.	63
ภาคผนวก	64

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5080059

ชื่อโครงการ: การศึกษาเพื่อหาสาเหตุทางพันธุกรรมของผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษที่มีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรงและระดับโพแทสเซียมในเลือดต่ำด้วยวิธีการตรวจทั้งจีโนมด้วยไมโครอาร์เรย์

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวัลยา จงเจริญประเสริฐ
สังกัดหน่วยต่อมไร้ท่อ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : wallayaj@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

246854

Thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis (THPP) เป็นโรคที่มีอาการอ่อนแรงและระดับโพแทสเซียมต่ำในผู้ป่วยที่มีภาวะไทรอยด์เป็นพิษ พบบ่อยในชาวเอเชีย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสาเหตุทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค ตลอดจนการศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค THPP ในเซลล์ทดลอง ประชากรที่นำมาศึกษาประกอบด้วย 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มทดสอบประกอบด้วยผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษ THPP ทั้งสิ้น 81 และ ผู้ป่วยกลุ่มควบคุม 74 คน และกลุ่มยีนยีนประกอบด้วย THPP 28 คนและ กลุ่มควบคุม 48 คน โดยวิธีการศึกษาประกอบด้วย 4 รูปแบบได้แก่ 1 genome-wide association study (GWAS) ร่วมกับ Pooled DNA โดย ตรวจ Whole genome genotyping ด้วย 500K DNA GeneChip microarrays 2. GWAS เป็นการตรวจ individual genotyping บน Illumina Human-Hap610 Genotyping BeadChip 3 Individual genotyping ของ Haplotype tagging SNPs (htSNPs) ของยีน *GABRA3*, *CACNA1S*, *SCN4A*, *DPP6*, และ *GLRA1* 4. การทดสอบผลของฮอร์โมนไทรอยด์และอินซูลินต่อการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อลาย ผลการศึกษา GWAS-Pooled DNA เบื้องต้นพบความสัมพันธ์ของ rs749120 ใกล้ยีน *DPP6* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีน ที่ทำหน้าที่เป็น subunit ของ Kv4.2 potassium channel กับโรค THPP ($p=0.02$) แต่เมื่อผู้วิจัยได้ขยายการ genotyping ไปอีก 4 SNPs ใกล้ rs749120 ผลที่ได้ไม่ยืนยันความสัมพันธ์กับโรค ผลการวิจัย GWAS ทำให้เราพบ rs623011 ซึ่งตั้งอยู่ที่ 75-kb ห่างจาก 3'UTR ของ *KCNJ2* สัมพันธ์กับการเกิดโรคมามากที่สุด ($P=3.23 \times 10^{-8}$, $OR=6.72$; 95%CI=3.11-14.5) และเมื่อทำการทดสอบยีนยีนในกลุ่มประชากรที่ 2 ผลการศึกษายืนยันความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P=3.44 \times 10^{-5}$, $OR=5.13$; 95% CI=1.87-14.1) งานวิจัยนี้ยังพบความสัมพันธ์ของ 25 htSNPs ที่อยู่ใกล้ *GABRA3* กับโรค THPP ($P=2.23 \times 10^{-4}$, $OR=7.87$; 95%CI=2.23-27.76) และพบว่าการให้ ฮอร์โมนไทรอยด์ T4 และอินซูลิน ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลง รูปร่างและการหดตัวของ C2C12

สรุป งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงข้อดีของการศึกษาแบบ GWAS-pooled DNA และเป็นการศึกษาแรกในโลกที่ทำการตรวจ GWAS ในโรค THPP และพบความสัมพันธ์ของ SNP rs623011 ที่อยู่ใกล้ ยีน *KCNJ2* กับโรค THPP ในคนไทย และหากมีการทดสอบเพิ่มเติมในประชากรอื่นจะเป็นการยืนยันผลที่ได้

คำหลัก: Genome-wide association study, Hyperthyroidism, Hypokalemic Periodic Paralysis

Abstract

Project Code: RMU5080059
Project Title: Microarray based whole genome scan for genetic susceptibility of thyrotoxic periodic paralysis
Investigator: Associate Professor Wallaya Jongjaroenprasert, MD
Endocrine Unit, Department of Medicine
Ramathibodi Hospital, Mahidol University
E-mail Address: wallayaj@gmail.com
Project Period: 3 years

246854

In this study, for the first time we performed genome-wide association study (GWAS) to find the susceptible loci to THPP in Thais both individual genotyping and DNA pooling approaches. We also performed candidate gene association study by genotyping haplotype tagging SNPs (htSNP) and start set up functional study by using C2C12 cell. For GWAS-pooled DNA analysis, we quantified equal amount of DNA from 50 THPP cases and 50 hyperthyroid male without hypokalemia as controls and pooled into 2 groups. We genotyped with 500K DNA GeneChip microarrays. There are more than 100 SNPs found significant difference in estimated allele frequencies comparing between case and control pools. Among them, SNP rs749120 near *DPP6* was selected for individual genotyping. However, we could not confirm the association after we extended genotyping 4 htSNPs closed to rs749120 of *DPP6*. For candidate gene approach, we examined the association of htSNPs of *GABRA3*, *CACNA1S*, *SCN4A* (have previously been demonstrated associated with THPP), *DPP6*, and *GLRA1* with THPP. Totally 116 htSNPs was successfully genotyped using multiplex-PCR-based method on the Invader assay. Only 25 htSNPs located in the intron 3 of *GABRA3* were strongly associated with THPP ($P = 2.23 \times 10^{-4}$, OR 7.87, (95%CI; 2.23-27.76)). However, no mutation was found in the adjacent exons of *GABRA3* (exon2-4) by direct sequencing method. For GWAS, we genotyped 78 THPP cases and 74 controls with Illumina Human-Hap610 Genotyping BeadChip. Among the SNPs analyzed in the GWAS, rs312729 at chromosome 17 revealed the lowest P-value for association ($P = 2.09 \times 10^{-7}$). After fine mapping, we found rs623011; located at about 75-kb downstream of *KCNJ2* gene, was the most significant among the ten associated SNPs even after adjustment for multiple comparison ($P = 3.23 \times 10^{-8}$, OR = 6.72; 95% CI= 3.11-14.5). The association of rs623011 was replicated both in replication cohort and combined-analysis ($P = 3.44 \times 10^{-5}$, OR=5.13; 95% CI=1.87-14.1; combined-analysis $P = 3.71 \times 10^{-12}$, OR=5.46; 95% CI=3.04-9.83).

In summary: Our study demonstrates for the first time the association between rs623011 and THPP in Thais. Further study in different ethnic group will confirm these findings.

Keywords: Genome-wide association study, Hyperthyroidism, Hypokalemic Periodic Paralysis