ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246744

RMU5080069 ผศ.พญ.ดร. ชนิตรา ธุวจิตต์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี: จีนและโปรตีนเป้าหมายในการรักษา

(Role of fibroblasts in cholangiocarcinogenesis: candidate genes and proteins as new therapeutic targets)

โดย นางชนิตรา ธุวจิตต์ และคณะ

ธันวาคม พ.ศ. 2553

b0025157z

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246744

สัญญาเลขท RMU5080069

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

บทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี: จีนและโปรตีนเป้าหมายในการรักษา

Role of fibroblasts in cholangiocarcinogenesis: candidate genes and proteins as new therapeutic targets

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร.ชนิตรา ธุวจิตต์ และคณะ
ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ร่วมกับ

ภาควิชาชีวเคมี และศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือจากนักวิจัยในหลากหลายสาขาวิชา ซึ่งเป็นทั้งผู้ร่วมวิจัยและผู้สนับสนุน ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์โสพิศ วงศ์คำ อาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี ภาควิชาชีวเคมี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ศิริ เชื้ออินทร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับการจัดหาเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ นพ.ชวลิต ไรโรจน์กุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.อนุชา พัวไพโรจน์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อาจารย์ นพ.คมกริช จ่างแก้ว ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการอ่านผลและการย้อมโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ขอขอบคุณ Professor Yoshimitsu Abiko สำหรับการดูแลนักศึกษาปริญญาเอกที่ไปทำวิจัย ณ ประเทศญี่ปุ่น และคำแนะนำที่มีค่ายิ่งสำหรับเทคนิค Microarray และ Protein chip assay ขอขอบคุณ นางสาวฌาณิศา ช่วยศรี และ นางสาวกุสุมาวดี อุทิศพันธ์ นักศึกษาปริญญาโทและเอกตามลำดับ สำหรับการทำงานวิจัยในโครงการนี้ ขอขอบคุณ ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน หน่วยอณูชีววิทยาการแพทย์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในการสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ทำวิจัย เจ้าหน้าที่เพื่อนร่วมงานทุกท่านในการสนับสนุนการทำวิจัย ทั้งทางตรงและทางอ้อม ขอขอบพระคุณ Professor James A. Will (University of Wisconsin-Madison) ในการช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับงานวิจัย (manuscript) ขอขอบคุณ ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่เอื้อให้การดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามเป้าหมายที่วางไว้ ท้ายสุดนี้ งานวิจัยจะไม่สามารถสำเร็จลงได้หากไม่ได้รับแรงผลักดันจากความทุกข์ของผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดี ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าองค์ความรู้จากงานวิจัยนี้ จะเป็นงานชิ้นเล็กๆ ชิ้นหนึ่งในการพัฒนาแนวทางการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี อันจะเป็นการเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้ต่อไป

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร.ชนิตรา ธุวจิตต์
หัวหน้าโครงการวิจัย
ธันวาคม 2553

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ RMU5080069

ชื่อโครงการ บทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี: จีนและโปรตีนเป้าหมายในการรักษา

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร.ชนิตรา ธุวจิตต์
ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์สิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address cthuwajit@yahoo.com, sichanitra@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ มิถุนายน 2550 - พฤษภาคม 2553

246744

บทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในมะเร็งกลุ่มที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์เยื่อบุนั้นเป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน กลุ่มผู้วิจัยได้รายงานบทบาทของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่คัดแยกจากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ในการเหนี่ยวนำการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีในหลอดทดลอง การศึกษาในโครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษากลไกที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ใช้ในการเหนี่ยวนำคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งและการพัฒนาของโรค โดยเน้นที่การเปลี่ยนแปลงของแบบแผนการแสดงออกของจีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อมะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติ ผลการศึกษาโดยเทคนิค microarray บ่งชี้รายชื่อของจีนที่มีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมะเร็ง และน่าจะมีบทบาทในกระบวนการพัฒนาของโรค โดยมีทั้งกลุ่มที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลง ในการศึกษานี้ periostin (PN) ซึ่งมีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ทั้งในระดับของ mRNA และโปรตีน ได้ถูกเลือกมาศึกษาผลต่อเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีและเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง การศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีสามารถพบ PN เฉพาะในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เท่านั้น ในขณะที่ในเซลล์มะเร็งและเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันไม่มีการสร้างโปรตีน PN และเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อตับที่ไม่เป็นมะเร็งหากมีการอักเสบเรื้อรังของท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma พบว่า PN ในเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวมีระดับต่ำกว่าเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีระดับ PN สูงนั้นจะมีระยะเวลาการมีชีพที่สั้นกว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มี PN ในระดับต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.029$) ผลการวิเคราะห์แบบตัวแปรหลายชนิดพบว่าระดับ PN ที่สูงและระยะของโรคเป็นตัวพยากรณ์โรคที่ไม่ขึ้นต่อกันอย่างมีความสำคัญทางสถิติ ($P = 0.039$ และ 0.036 ตามลำดับ) ผลการศึกษาบทบาทของ PN ในหลอดทดลองพบว่า recombinant PN สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการเติบโตและการลุกลามได้ โดยระหว่างตัวรับ integrins (ITGs) ชนิด $\alpha5\beta1$ และ $\alpha6\beta4$ ซึ่งมีมากในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผลการศึกษาโดย adhesion assay พบว่า PN สามารถจับกับตัวรับ ITG$\alpha5\beta1$ นอกจากนี้เซลล์ที่ถูกยับยั้งการสร้าง ITG$\alpha5$ จะมีความสามารถในการลุกลามจากการเหนี่ยวนำโดย PN ลดลงสัมพันธ์กับระดับ pAKT ที่ลดลง ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีถูกกระตุ้นโดย PN ให้การลุกลามมากขึ้นผ่าน ITG$\alpha5\beta1$ และเส้นทางการส่งสัญญาณของ AKT โดยสรุปผลการศึกษาจากโครงการวิจัยนี้เป็นการรายงานกลุ่มของจีนที่เปลี่ยนแปลงในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมะเร็งท่อน้ำดี ที่มีบทบาทในการพัฒนาของโรค บทบาทของ PN จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นข้อมูลสำคัญในการอธิบายกลไกที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ใช้ในการกระตุ้นคุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้บทบาทของโปรตีนอื่นๆ ที่สร้างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์และความรู้ความเข้าใจถึงกลไกในเซลล์มะเร็งที่ถูกกระตุ้น จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นเป้าหมายในยับยั้งการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดีต่อไปในอนาคต

Keywords: Cholangiocarcinoma; Cancer-associated fibroblast; Microarray; Periostin; Integrin; AKT signaling pathway

ABSTRACT

Project Code : RMU5080069

Project Title : Role of fibroblasts in cholangiocarcinogenesis: candidate genes and proteins as new therapeutic targets

Investigator : Assistant Professor Dr. Chanitra Thuwajit M.D.
Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital
Mahidol University

E-mail Address : cthuwajit@yahoo.com, sichanitra@mahidol.ac.th

Project Period : June 2007 - May 2010

246744

Fibroblasts play important roles in several carcinomas. The proliferative effect of secreted substances from cholangiocarcinoma (CCA)-associated fibroblasts has been recently reported. This study aims to investigate the molecular mechansim underlying fibroblast-induced tumorigenic effects. The gene expression profile of fibroblasts isolated from CCA tissues was performed using oligonucleotide microarrays. The differentially expressed genes and the promising roles in cancer promotion and progression were listed. Periostin (PN) was markedly over-expressed in cancer fibroblasts confirmed by real time RT-PCR and western blot analysis. Patients with intrahepatic CCA showed the expression of PN solely in stromal fibroblasts, but was expressed neither in cancer cells nor immune cells. Low to no expression of PN was observed in tissues of benign liver disease and hepatocellular carcinoma. CCA patients with high levels of PN had significantly shorter survival time than those with low levels (P = 0.029). Multivariate analysis revealed high levels of PN (P = 0.039) and tumor staging (P = 0.036) as independent prognostic factors. The *in vitro* study revealed that recombinant PN induced CCA cell proliferation and invasion. Integrins (ITGs) as receptors of PN were explored their expressions in CCA cell lines and revealed high level of ITGs $\alpha5\beta1$ and $\alpha6\beta4$ in CCA cells. Cell adhesion assay revealed that cells favored to bind PN with ITG$\alpha5\beta1$. Cells with ITG$\alpha5\beta1$ knockdown had reduced PN-induced invasion in corresponding to the decreased level of pAKT level. It is suggested that PN-activated CCA cell invasion via ITG$\alpha5\beta1$ and AKT-dependent signaling pathway. In conclusion, the gene expression profile of fibroblasts in CCA is apparently explored and has determined the genes involving in cancer progression. Though PN is explored and determined as a poor prognostic factor, other fibroblast-derived proteins are of great interest to explore their tumorigenic roles and mechanisms of action. Regulation of fibroblast-derived substances in CCA progression may be considered as an alternative therapeutic approach.

Keywords: Cholangiocarcinoma; Cancer-associated fibroblast; Microarray; Periostin; Integrin; AKT signaling pathway

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
ABSTRACT	iii
สารบัญ	6
LIST OF FIGURES	7
LIST OF TABLES	8
EXECUTIVE SUMMARY	9
เนื้อหางานวิจัย	
1. บทนำ (INTRODUCTION)	11
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (OBJECTIVES)	13
3. วิธีการทดลอง (METHODS)	14
4. ผลการทดลอง (RESULTS)	22
5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง (DISCUSSION AND CONCLUSION)	62
6. เอกสารอ้างอิง (REFERENCES)	66
OUTPUT ของโครงการ	
1. Poster presentation	71
2. Oral presentation	72
3. Publications	72
4. Awards	73
ภาคผนวก	
1. Publication ที่ 1 (Reprint)	75
2. Publication ที่ 2 (Reprint)	76
3. Publication ที่ 3 (Manuscript in preparation)	77
4. Publication ที่ 4 (Tentative title)	78

LIST OF FIGURES

		หน้า
รูปที่ 1	ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ Cf1, Lf1 และ Lf2	22
รูปที่ 2	คุณสมบัติการเป็น activated fibroblast และผลของ Cf-CM ต่อเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีชนิดต่างๆ	23
รูปที่ 3	การวิเคราะห์คุณภาพของ total RNA ที่สกัดจากเซลล์ primary culture fibroblasts	24
รูปที่ 4	จำนวน common up-regulated และ down-regulated genes ในเซลล์ Cf	25
รูปที่ 5	ผลการยืนยันการแสดงออกของจีนต่างๆ ในเซลล์ Cf เปรียบเทียบกับเซลล์ Lf ด้วยเทคนิค real time RT- PCR และ microarray	34
รูปที่ 6	ผลการวัดระดับโปรตีน periostin ในเซลล์ Cf เปรียบเทียบกับเซลล์ Lf ด้วยเทคนิค western blot	35
รูปที่ 7	การย้อมติดโปรตีน PN โดยเทคนิค immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่มี histopathology ต่างๆ	37
รูปที่ 8	ความสัมพันธ์ทางสถิติของระดับโปรตีน PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี และระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ (survival time) ของผู้ป่วย โดย Kaplan-Meier Log Rank test	38
รูปที่ 9	การแสดงออกของจีน PN ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่างๆ และเซลล์ fibroblast	42
รูปที่ 10	การแสดงออกของจีน *ITG* ชนิด α- และ β-subunit ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่างๆ	43
รูปที่ 11	Flow cytometry analysis ของ membrnae ITGs $\alpha5\beta1$และ $\alpha6\beta4$ (B) ใน CCA cell lines แต่ละชนิด และ immunofluorescence staining ของ ITGs ในเซลล์ KKU-M213	45
รูปที่ 12	ผลของ ITG$\alpha5\beta1$ หรือ $\alpha6\beta4$ ต่อ PN-binding และ PN-induced invasion	46
รูปที่ 13	ผลการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วย recombinant PN	47
รูปที่ 14	การแบ่งตัวเพิ่มขึ้นของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156, KKU-M213 และ KKU-M055 เมื่อกระตุ้นด้วย recombinant PN แบบ time dependent	48
รูปที่ 15	ผลของ PN ต่อ cell growth ของ CCA cells วัดโดย Colony formation assay	49
รูปที่ 16	Cell cycle analysis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อถูกกระตุ้นด้วย recombinant PN	50
รูปที่ 17	การเพิ่มขึ้นของการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 และ KKU-M156 จากการ เหนี่ยวนำโดย recombinant PN	51
รูปที่ 18	การยับยั้งการแสดงออกของจีน *ITG*α_v ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-M213 และ KKU-M156 โดยใช้ si*ITG*α_v และการตอบสนองต่อ recombinant PN	52
รูปที่ 19	Western blot analysis แสดงปริมาณ pAKT ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 จากการกระตุ้นโดย recombinant PN ที่เวลาต่าง ๆ	53
รูปที่ 20	PN เหนี่ยวนำ invasion ผ่าน ITG$\alpha5\beta1$ receptor และ AKT dependent pathway	54
รูปที่ 21	Immunohistochemical staining ต่อ PDGF-A และ PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่มีพยาธิสภาพต่างกัน	61

LIST OF TABLES

		หน้า
ตารางที่ 1	จีนที่ถูกคัดเลือกเพื่อยืนยันการแสดงออกด้วยเทคนิค real time RT- PCR	15
ตารางที่ 2	รายละเอียดของ primer ในการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของตัวรับ integrins บนเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี	18
ตารางที่ 3	ตัวอย่าง common up-regulated genes แบ่งตาม biological function	26
ตารางที่ 4	ตัวอย่าง common down-regulated genes แบ่งตาม biological function	30
ตารางที่ 5	แสดง tumorigenic function ของจีน 7 ชนิด ที่มีรายงานการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในเซลล์ Cf	35
ตารางที่ 6	การแสดงออกของ PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ไม่เป็นมะเร็งและมะเร็งตับ	39
ตารางที่ 7	แสดงปัจจัยพยากรณ์โรค (prognostic factor) ของระดับ PN ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีด้วย Multivariate analysis โดย Cox proportional hazard	40
ตารางที่ 8	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ PN เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและข้อมูลทางคลินิก	41
ตารางที่ 9	Up-regulated proteins ในเซลล์ Cf เรียงตามลำดับที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากมากไปน้อย	56
ตารางที่ 10	Down-regulated proteins ในเซลล์ Cf เรียงตามลำดับที่มีการแสดงออกลดลงจากมากไปน้อย	58
ตารางที่ 11	Up-regulated proteins ที่มีระดับเพิ่มขึ้นในเซลล์ Cf มากกว่า 3 เท่า เทียบกับเซลล์ Lf จัดแบ่งกลุ่มตาม biological function	59

EXECUTIVE SUMMARY

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะในภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากมะเร็งท่อน้ำดีจัดอยู่ในกลุ่มมะเร็งชนิด carcinoma ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เยื่อบุ (epithelium) ความรู้ส่วนมากในการอธิบายกลไกการเกิดมะเร็งในกลุ่มนี้มุ่งเน้นกระบวนการที่เกิดขึ้นในเซลล์ epithelium ซึ่งมักจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในระดับจีนเป็นสำคัญ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการเกิดมะเร็งกลุ่ม carcinoma ไม่ได้เกิดจากความผิดปกติที่เซลล์ epithelium แต่เพียงอย่างเดียว แต่เกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์อันซับซ้อนของเซลล์ในกลุ่ม stromal และเซลล์ epithelium โดยที่เซลล์กลุ่ม stroma มีองค์ประกอบหลักคือเซลล์ fibroblast

ในกระบวนการเกิดมะเร็งชนิด carcinoma นั้นเมื่อเซลล์ epithelium เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งในระยะต้น จะส่งสัญญาณที่ผิดปกติไปยังเซลล์ fibroblast ส่งผลให้เซลล์ดังกล่าวส่งสัญญาณที่ผิดปกติออกมา สัญญาณนี้อาจไปมีผลในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุที่มีความผิดปกติในระยะต้นพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง สมมุติฐานนี้ได้รับการพิสูจน์ในผู้ป่วยมะเร็งชนิด bladder, lung, prostate และ breast โดยพบว่าเมื่อนำเซลล์ fibroblast จากเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ epithelium จะเกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์ epithelium มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นและเกิดกระบวนการ transformation ได้ นอกจากนี้มีรายงานว่าเซลล์ fibroblast ที่คัดแยกมาจากเนื้อเยื่อมะเร็ง prostrate cancer (prostate cancer-associated fibroblast) สามารถกระตุ้นเซลล์ non-tumorigenic prostrate epithelium ให้เป็นเซลล์มะเร็งขึ้นได้ นอกจากนี้การศึกษาใน breast cancer พบว่าเมื่อนำเซลล์ fibroblast ปกติ (normal fibroblast: NF) และที่ได้จากเนื้อเยื่อ breast cancer (cancer-associated fibroblast: CAF) ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ breast epithelium แบบไม่แยกเซลล์ (contact co-culture) พบว่าเซลล์ CAF สามารถยับยั้ง breast cancer cell proliferation ได้น้อยกว่าเซลล์ NF จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าเซลล์ CAF มีรูปร่างและคุณสมบัติที่แตกต่างจากเซลล์ NF โดยพบว่าเซลล์ CAF คุณสมบัติที่คล้ายกับเซลล์ myofibroblast ที่สำคัญคือมีการแสดงออกของโปรตีน α-smooth muscle actin (α-SMA) และ fibroblast-activating protein (FAP) มากขึ้น คาดว่าคุณสมบัตินี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดและแพร่กระจายของมะเร็ง

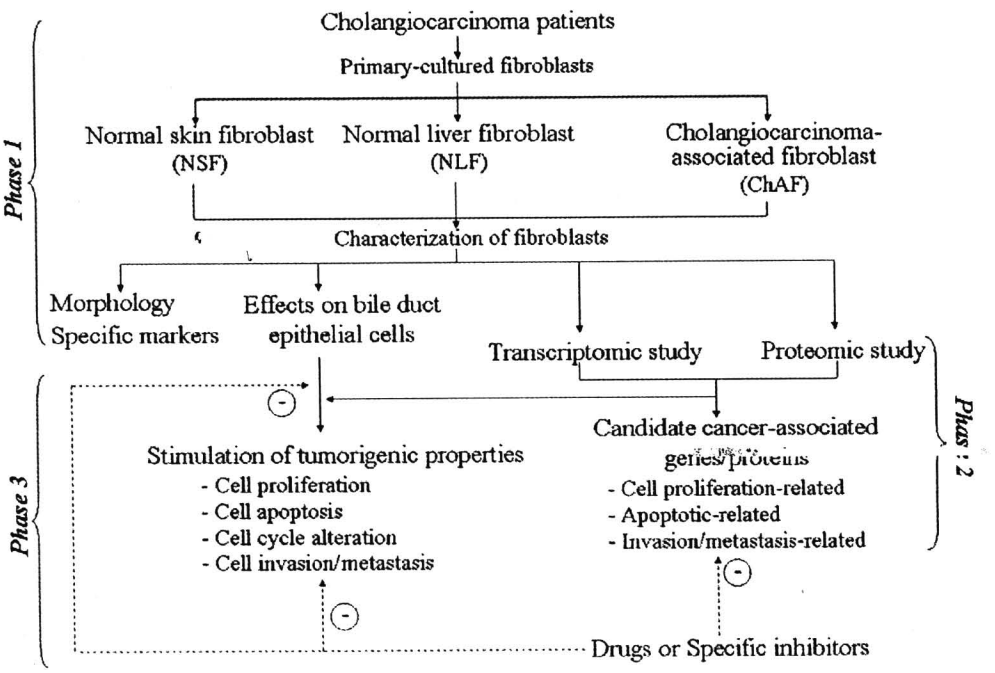
นอกจากนี้การศึกษาบทบาทของเซลล์ fibroblast ในสัตว์ทดลองพบว่า เมื่อผสมเซลล์ CAF และเซลล์ bladder epithelium เข้าด้วยกันแล้วฉีดเข้าทางเส้นเลือดให้กับสัตว์ทดลอง สามารถทำให้ athymic mice เกิด bladder cancer ได้เร็วกว่าเมื่อใช้ NF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินอกจากนี้พบว่าเมื่อนำ CAF ผสมกับเซลล์เยื่อบุที่เป็นมะเร็งระยะต่างๆ ทั้งที่คัดแยกจากเนื้อเยื่อมะเร็งในมนุษย์และจากสัตว์ทดลอง พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ โดยใช้จำนวนเซลล์มะเร็งจำนวนน้อยกว่าการฉีดเซลล์มะเร็งเพียงอย่างเดียว ทั้งหมดนี้ยืนยันสมมุติฐานที่ว่า CAF เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตาม ณ ปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับบทบาทของเซลล์ fibroblast ต่อกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาบทบาทของเซลล์ fibroblast ในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี โดยมีสมมุติฐานว่าเซลล์ fibroblast ที่ได้จากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (**cholangiocarcinoma-associated fibroblast: Cf**) มีผลต่อกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อทดสอบสมมุติฐานนี้เซลล์ Cf จะนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ epithelium ในหลอดทดลองและทดสอบคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงในเซลล์ epithelium โดยเน้นที่คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง (tumorigenic properties) เช่น cell morphology, cell proliferation, cell apoptosis, cell invasion/apoptosis การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของจีนและโปรตีนในเซลล์ Cf เทียบกับเซลล์ fibroblast จากเนื้อเยื่อตับส่วนที่ปกติ (**non-tumorigenic liver fibroblasts: Lf**) สามารถบ่งชี้จีนที่กำหนดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกลไกที่เซลล์ fibroblast เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุไปเป็นเซลล์มะเร็งและ/หรือ กระบวนการพัฒนาของมะเร็ง (tumor progression) ได้ นอกจากนี้ผลการยับยั้งจีนและ/หรือโปรตีนที่มี

ระดับการแสดงออกที่ผิดปกติอาจสามารถใช้เป็นเป้าหมายในการยับยั้งกระบวนการเกิดและพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี การศึกษาทั้งหมดสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ

1. **ระยะที่ 1** คัดแยกเซลล์ Cf วิเคราะห์คุณสมบัติและศึกษาบทบาทต่อเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี (bile duct epithelium)
2. **ระยะที่ 2** ศึกษาแบบแผนการแสดงของจีนและโปรตีนในเซลล์ Cf และวิเคราะห์บ่งชี้จีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดมะเร็ง
3. **ระยะที่ 3** ศึกษาบทบาทและผลการยับยั้งจีนและ/หรือโปรตีนในเซลล์ Cf ต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง

ภาพรวมของโครงการทั้ง 3 ระยะ สรุปได้ดังนี้



ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าสารคัดหลั่งจากเซลล์ Cf มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมากกว่าสารคัดหลั่งจากเซลล์ Nf อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบมีการแสดงออกของจีน α-SMA มากขึ้นในเซลล์ Cf สอดคล้องกับผลที่ได้จากการย้อมเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี บ่งชี้ความเป็นไปได้เกี่ยวกับบทบาทของเซลล์ fibroblast ในกระบวนการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี และยังบ่งชี้ว่าเซลล์ fibroblast ที่ผ่านกระบวนการ primary culture มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเซลล์ fibroblast ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการใช้ primary culture fibroblast เป็นแบบในการศึกษาบทบาทของเซลล์ fibroblast ในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในมนุษย์

โครงการนี้ครอบคลุมการศึกษาในระยะที่ 2 และ 3 ในส่วนการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของจีน (transcriptomic study) และแบบแผนการแสดงออกของโปรตีน (proteomic study) ในเซลล์ Cf เพื่อบ่งชี้จีนและโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออก, และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง (tumorigenic properties) เช่น cell proliferation, cell growth, cell cycle alteration, cell invasion/metastasis การศึกษาบทบาทและผลการยับยั้งจีนและ/หรือโปรตีนในเซลล์ Cf ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดมะเร็ง เพื่อเป็นข้อมูลบ่งชี้จีนและ/หรือโปรตีนที่สำคัญ และมีความเป็นไปได้ในการเป็นเป้าหมายยับยั้งกระบวนการเกิด และยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งท่อน้ำดี อันจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ยาหรือตัวยับยั้งดังกล่าว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัดในรูปแบบ combined regimen ร่วมกับยาที่ออกฤทธิ์ที่เซลล์มะเร็งโดยตรง