

4. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง (DISCUSSION AND CONCLUSION)

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่า cancer-associated fibroblasts มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดและพัฒนาของมะเร็งกลุ่มมะเร็งเยื่อหุ้ม (carcinoma) [2,20] มะเร็งเยื่อหุ้มท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma: CCA) ซึ่งเป็นมะเร็งของเยื่อท่อน้ำดี (bile duct) นั้น มีรายงานจากหลายกลุ่มวิจัยแสดงให้เห็นถึงการเกิด desmoplastic stroma [16] รวมกับการตรวจพบ activated fibroblast [21] ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่จำเพาะของ cancer-associated fibroblast อย่างไรก็ตามบทบาทที่แน่ชัดและกลไกที่ cancer-associated fibroblasts ใช้ในการเหนี่ยวนำการพัฒนาของ CCA นั้น ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อนหน้านี้ กลุ่มของผู้วิจัยได้รายงานเมื่อไม่นานมานี้เกี่ยวกับบทบาทของ CCA-associated fibroblast ซึ่งเป็น fibroblast ที่เพาะเลี้ยงแบบ primary culture จากการคัดแยกโดยตรงจากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีของผู้ป่วย ผลการศึกษาบ่งชี้ว่า CCA-associated fibroblast สร้างสารที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (CCA cells) มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น โดยทำให้เซลล์เข้าสู่ active stage ของ cell cycle ได้มากขึ้น [21] การศึกษาในโครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากผลการศึกษาดังกล่าว โดยผู้วิจัยได้ศึกษาในระดับการแสดงออกของยีนใน CCA-associated fibroblast เพื่ออธิบายยืนยันบทบาทของเซลล์ fibroblast ในการเหนี่ยวนำ tumorigenic function ของ CCA cells โดยนำ CCA-associated fibroblast มาศึกษา gene expression profile เปรียบเทียบกับ normal liver fibroblast ที่สกัดแยกจากเนื้อเยื่อตับส่วนที่เป็นปกติ และคัดเลือกยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ CCA-associated fibroblast มาศึกษายืนยันบทบาทและกลไกที่โปรตีนผลผลิตจากยีนดังกล่าวนั้นเกี่ยวข้องในกระบวนการพัฒนาของมะเร็ง (cancer progression) นอกจากนี้ยังได้แสดงแนวทางในการใช้ fibroblast เป็นเป้าหมายในการรักษามะเร็ง นอกเหนือไปจากการมุ่งเป้ากำจัดเซลล์มะเร็งแต่เพียงอย่างเดียว โดยยับยั้งที่เซลล์ fibroblast หรือสารจากเซลล์ fibroblast เหนี่ยวนำ tumorigenic function ของเซลล์มะเร็ง

การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้เซลล์ CCA-associated fibroblast ซึ่งในที่นี้เรียกว่าเซลล์ Cf และ เซลล์ normal liver fibroblast ซึ่งในที่นี้เรียกว่าเซลล์ Lf จากผู้ป่วยรายเดียวกันซึ่งจะไม่มี genetic variation นอกจากนี้ยังได้เพิ่ม Lf ที่คัดแยกจากผู้ป่วยอีก 1 ราย มาใช้เป็นตัวแทนของ normal fibroblast ทั้งนี้เพื่อลดความแตกต่างทาง genetic ที่เกิดขึ้นในแต่ละคน ผลการศึกษา gene expression profile ในเซลล์ Cf เปรียบเทียบเซลล์ Lf จำนวน 2 เซลล์ดังกล่าว ได้ยีนที่มี up-regulation ในเซลล์ Cf มากกว่าใน Lf ทั้ง 2 ชนิด ตั้งแต่ 1.5 เท่าขึ้นไป เรียกว่า common up-regulated genes และที่มีการแสดงออกลดลงมากกว่า 0.5 เท่า เรียกว่า common down-regulated genes พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม cellular metabolism มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ neuropeptide Y receptor Y1 ซึ่งมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการรับสัญญาณและเหนี่ยวนำให้เกิด neuroproliferation [22] ยีน doublecortin-like kinase 1 ซึ่งเป็น microtubule-associated active protein kinase ชนิดหนึ่งที่พบใน post-mitotic neuron cells ซึ่งการเพิ่มการแสดงออกของยีนในกลุ่มนี้สนับสนุนการที่เซลล์ fibroblast ใน CCA มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ osteonectin (SPARC) ซึ่งเคยมีรายงานการสร้างเพิ่มขึ้นมาแล้วในเซลล์ UV-induced squamous cell carcinoma [23] อย่างไรก็ตามพบว่าการแสดงออกของยีนบางตัวมีความต่างใน CCA เมื่อเทียบกับมะเร็งชนิดอื่น เช่น ยีน stromal-derive factor 1 (SDF-1) มีการสร้างเพิ่มมากขึ้นใน Cf หากมีระดับที่น้อยลงกว่าเซลล์ fibroblast ปกติ ใน fibroblast ของ colon cancer ที่แพร่กระจาย (metastasis) ไปที่ตับ [11] ดังนั้นอาจกล่าวโดยสรุปได้ว่าเซลล์ fibroblast ใน CCA มีการแสดงออกของยีนกลุ่มหนึ่งที่เป็นรูปแบบทั่วๆ ไปที่พบใน activated fibroblast ในมะเร็งเยื่อหุ้มชนิดอื่นๆ และที่เป็นรูปแบบจำเพาะที่พบในเซลล์ fibroblast จาก CCA

ในกลุ่ม up-regulated genes พบมีจีนหลายชนิดที่น่าจะมีบทบาทในกระบวนการพัฒนาของมะเร็ง ได้แก่ serpin peptidase inhibitor, clade B member 2 (*SERPINE2*) หรือ plasminogen activator inhibitor type 2 (*PAI2*) มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ cancer invasion และ metastasis โดยระดับของ *PAI2* สัมพันธ์ได้ทั้งกับการกระตุ้นและยับยั้ง cancer progression ขึ้นอยู่กับว่าเป็นมะเร็งชนิดใด พบว่า *PAI2* ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับ prolonged disease-free survival [24] ในมะเร็งเต้านม ในทางตรงข้ามพบว่าเกี่ยวข้องกับ invasion ของ endometrial cancer [25] นอกจากนี้ยังพบจีนที่มีการสร้างเพิ่มขึ้นในเซลล์ Cf และมีรายงานเกี่ยวกับ cancer progression ในมะเร็งอื่นๆ เช่น จีน S100 calcium binding protein A4 (*S100A4*) พบว่าเป็น metastasis-inducing protein [26] จีน procollagen C-endopeptidase enhancer 2 (*PCPE2*) เกี่ยวข้องกับ collagen synthesis [27] ซึ่งยังช่วยสนับสนุนการเกิด desmoplastic reaction ที่พบได้บ่อยใน CCA อีกด้วย

ในกลุ่ม down-regulated genes พบการเปลี่ยนแปลงของจีน bone morphogenetic protein 2 (*BMP2A*) ในแบบที่สร้างได้น้อยกว่าใน normal fibroblast ซึ่งสอดคล้องกับที่พบใน breast cancer-derived fibroblasts [28] นอกจากนี้การที่ *BMP2A* มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ การเกิด hypophosphorylation ของ retinoblastoma protein และเหนี่ยวนำให้เกิด cell cycle arrest [29] บ่งชี้ว่าการที่ Cf มี *BMP2A* ลดลง น่าจะมีส่วนทำให้เซลล์ Cf เข้าสู่ cell cycle และแบ่งตัวได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ยังพบระดับของ interleukin 24 (*IL-24*) ลดลง ซึ่งปกติทำหน้าที่เป็น apoptotic-inducible cytokine [30] ดังนั้นการมีระดับการสร้างลดลงในเซลล์ Cf อาจยับยั้งการเกิด apoptosis ของเซลล์ fibroblast ได้ ในทำนองเดียวกับการมีระดับของ response gene to complement 32 (*RGC32*) และ bradykinin receptor B1 (*BRADYB1*) ลดลงในเซลล์ Cf ซึ่งเป็น intracellular protein ที่เกี่ยวข้องกับการ inhibit cell proliferation [31,32] ทั้งหมดจะเห็นได้ว่าเซลล์ Cf มีการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องกับ anti-proliferation และ pro-apoptosis ลดลง ซึ่งน่าจะส่งผลให้เซลล์ Cf มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น มีโอกาสในการสร้าง pro-tumorigenic proteins ต่างๆ มากขึ้น และมีบทบาทสำคัญในการสร้าง tumor microenvironment ที่เหนี่ยวนำ cancer progression ได้

อย่างไรก็ตาม พบว่า cancer fibroblast มีรายงานบทบาททั้งในส่วนที่เป็น pro-tumorigenic และ anti-tumorigenic [33] ซึ่งผลการศึกษา gene expression profile ของเซลล์ Cf ในการศึกษาครั้งนี้ยืนยันข้อมูลดังกล่าว เนื่องจากจะเห็นว่า *ADAMTS-like 1* (*ADAMTSR1*) ซึ่งมีบทบาทเป็น enhancers ของ ADAMTS proteases [34] ซึ่งบางชนิดมีรายงานว่า เป็น anti-angiogenic factors [35] มีการสร้างเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ Cf น่าจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ angiogenesis ใน CCA ได้ นอกจากนี้การมี *stromelysin-1* หรือ *MMP-3* ลดลง น่าจะลดความสามารถที่เซลล์จะย่อย extracellular matrix (ECM) และ invade ไปในที่อื่นๆ

กล่าวโดยทฤษฎีเกี่ยวกับโปรตีนที่สร้างจาก cancer-associated fibroblast นั้น โปรตีนในกลุ่มที่สามารถหลั่งออกมานอกเซลล์ จะมีบทบาทต่อเซลล์มะเร็งในรูปแบบที่เป็น paracrine effect และสามารถพบใน ECM ของเนื้อเยื่อมะเร็ง ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับ cell invasion และ metastasis เป็นสำคัญ ดังนั้นในกลุ่ม common up-regulated gene ที่ได้จากการศึกษาในเซลล์ Cf นั้น ผู้วิจัยได้เลือกรายชื่อของจีนที่สามารถกำหนดโปรตีนผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว และมีรายงานจากการทบทวนวรรณกรรมว่าเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำ tumorigenic property ของเซลล์มะเร็ง มายืนยันระดับการแสดงออกที่แม่นยำกว่าการทำ microarray ได้รายชื่อจีนทั้งหมดคือ *ADAM12*, *AREG*, *AGN2*, *ER*, *JAGL1*, *LAMA5*, *NOV*, *PDGF-A*, *PN*, *RL*, และ *SCG2* พบว่า *AREG*, *ER*, *JAGL1*, และ *LAMA5* มีรายงานเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำ cancer cell proliferation [36,37,38,39] ส่วน *PDGF-A*, *NOV*, *AGN2*, และ *SCG2* เกี่ยวข้องกับ angiogenesis [40,41,42,43] ในขณะที่ *ADAM12* และ *RL* ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ cell motility, invasion และ metastasis [44,45] และเป็นที่น่าสังเกตว่า *PN* มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับทั้ง cell proliferation, invasion, metastasis และ angiogenesis ในมะเร็งรายชนิด [46,47,48,49,50] ผลการศึกษาโดย real time RT-PCR พบว่าเฉพาะ *ADAM12*, *AREG*, *ER*, *JAGL1*, *PDGF-A*, *PN* และ *SCG2* มีระดับการ

แสดงออกที่เพิ่มขึ้นจริงในเซลล์ fibroblast และโปรตีนผลิตภัณฑ์ของจีนเหล่านี้จะมีส่วนในการทำงานแบบ paracrine ต่อ CCA cells เห็นยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการพัฒนามากขึ้น ผ่านกลไกการเพิ่มขึ้นของ cell proliferation, cell growth, invasion และ angiogenesis

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกศึกษากลไกการเห็นยวนำ cancer progression ของโปรตีน PN เนื่องจากเป็น secreted protein ที่ยังไม่เคยมีผู้รายงานมาก่อนใน CCA หากมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ tumorigenic function ของมะเร็งหลายชนิด ผลการศึกษายืนยันว่า PN มีการสร้างเพิ่มมากขึ้นใน Cf ทั้งจากการศึกษาในระดับ mRNA โดย real time PCR และในระดับโปรตีน โดยเทคนิค western blot นอกจากนี้ยังพบอีกว่าโปรตีน PN มีการสร้างในระดับสูงในเนื้อเยื่อผู้ป่วย CCA ทั้งนี้สร้างจากเซลล์ fibroblast เท่านั้น โดยเซลล์ fibroblast ดังกล่าวมีลักษณะเป็น activated fibroblast สังเกตจากการที่มีการสร้างของ α -SMA ในเซลล์ fibroblast และเป็นที่น่าสนใจว่า CCA cell และ stromal cell อื่นๆ ไม่สามารถสร้าง PN ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานการศึกษาในลักษณะเดียวกันนี้ในมะเร็งอื่น [51,52,53] นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการสร้างของ PN ในเนื้อเยื่อ CCA นั้น จากการวิเคราะห์พบว่าสัมพันธ์กับ survival time ของผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั่นคือผู้ป่วยที่มีระดับการสร้าง PN สูงจะมี survival time สั้นกว่าผู้ป่วยที่มีระดับการสร้าง PN ต่ำกว่า และพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อ benign liver tissues และ hepatocellular carcinoma พบว่ามีระดับ PN ต่ำกว่าเนื้อเยื่อ CCA ดังนั้นอาจกล่าวโดยสรุปได้ว่าเซลล์ fibroblast เป็นแหล่งสร้างโปรตีน PN ระดับการสร้าง PN ในเนื้อเยื่อ CCA สามารถใช้เป็น prognostic marker และ differential marker จาก hepatocellular carcinoma ได้ นอกจากนี้ PN ที่สร้างเข้าสู่ microenvironment ของ CCA น่าจะมีบทบาทในการเห็นยวนำ CCA cells แบบ paracrine mode และน่าจะมีความเป็นไปได้ที่ PN ที่สร้างออกมาสามารถแพร่เข้าไปใน blood circulation และสามารถตรวจพบได้ใน serum ของผู้ป่วย CCA เช่นเดียวกับรายงานในมะเร็งชนิดอื่นๆ ที่พบว่า serum PN ใช้เป็น prognostic or predictive marker [51,54]

การที่ PN จะออกฤทธิ์เห็นยวนำ tumorigenic function ของ cell นั้น พบว่าตัวรับบนผิวเซลล์ (membrane receptor) ที่สำคัญได้แก่ integrins (ITGs) ซึ่งเป็น transmembranous glycoproteins ค้นพบครั้งแรกโดยทำหน้าที่เป็น cation-dependent receptors ของโปรตีนใน ECM [55,56] ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างเซลล์กับ ECM การทำงานของ ITG จะเกิดขึ้นในรูปที่เป็น heterodimer ของ α -subunits และ β -subunits รายงานใน ovarian cancer cell พบว่า PN สามารถจับกับ ITGs $\alpha v \beta 3$ และ $\alpha v \beta 5$ และเห็นยวนำ cell motility [47] พบว่า PN หลังจากจับกับ ITG receptor แล้วสามารถส่งสัญญาณเข้าไปในเซลล์ผ่าน signaling pathway ได้แตกต่างกันในเซลล์แต่ละชนิด เช่น AKT/PKB pathway [57] ใน colon cancer cell ส่วนใน pancreatic cancer cells นั้น PN สามารถจับกับ ITG $\beta 4$ ผ่าน PI3K pathway [58] ในขณะที่ใน vascular smooth muscle cells นั้น PN กระตุ้น cell migration ผ่าน ITGs $\alpha v \beta 3$ และ $\alpha v \beta 5$ and focal adhesion kinase (FAK) pathway [59] ใน breast cancer พบว่า PN สามารถเห็นยวนำ angiogenesis ผ่านการเพิ่มของ vascular endothelial growth factor ผ่าน ITG $\alpha v \beta 3$ [50] ยังมีรายงานการศึกษาในกระบวนการ epithelial-mesenchymal transition (EMT) นั้น PN กระตุ้น ITG $\alpha v \beta 5$ และ EGFR signaling pathways ส่งผลให้เกิด cell metastasis [60]

ผลการศึกษา ITG expression profile ใน CCA cells พบว่าเกือบทุกชนิดมีการแสดงออกของ ITG $\alpha 6$ รองลงมาคือ ITG $\alpha 5$ โดยเฉพาะในเซลล์ KLU-M213 ซึ่งสามารถถูกเห็นยวนำให้มี cell proliferation ได้ดีกว่า CCA cell ชนิดอื่นๆ สำหรับ β -subunit ITGs ผลการศึกษาพบว่า CCA cell เกือบทุกชนิดมีการสร้าง ITGs $\beta 1$ and $\beta 4$ เช่นเดียวกับที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ [61,62] การที่ CCA cell มีการสร้าง ITG $\beta 4$ ในระดับสูงในเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อที่มี differentiation สูง ได้แก่ KLU-M213, KLU-M214, และ KLU-OCA17 แต่ไม่พบในเซลล์ KLU-100 ที่มี poorly differentiation ซึ่งสอดคล้องกับที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ [62] จากความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับ ITG heterodimer ที่ว่า ITG $\alpha 5$ สามารถจับเป็น heterodimer กับ ITG $\beta 1$ [63] และ ITG $\beta 4$ สามารถจับกับ ITG $\alpha 6$ เป็น ITG $\alpha 6 \beta 4$ ข้อมูลดังกล่าวประกอบกับผลการศึกษาใน CCA cell lines นี้บ่งชี้ว่า CCA cell น่าจะมีการสร้าง

ITG α 5 β 1 และ ITG α 6 β 4 ในระดับสูง ซึ่งยืนยันได้จากผล immunofluorescence staining ที่แสดงการย้อมติดสีของ membrane ITGs ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว

การทดสอบการจับของเซลล์บนพื้นผิวที่มี rPN พบว่าเซลล์สามารถจับกับ PN โดยใช้ ITG α 5 β 1 มากกว่าการใช้ ITG α 6 β 4 เมื่อทำการยับยั้งการสร้าง ITG α 5 โดย RNAi พบว่าเซลล์ลดความสามารถในการเกิด cell proliferation และ invasion เมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีระดับการสร้าง ITG α 5 ในระดับปกติ บ่งชี้ความเป็นไปได้ที่ CCA cell สามารถถูกเหนี่ยวนำ tumorigenic property ผ่าน ITG α 5 β 1 เมื่อนำเซลล์ที่มีการสร้าง ITG α 5 β 1 ลดลงดังกล่าวไปรับการตอบสนองด้วย PN พบว่า ปริมาณ pAKT มีการเปลี่ยนแปลงในทิศทางที่บ่งชี้ว่า PN-activated cell invasion ผ่าน AKT-dependent signaling pathway

อย่างไรก็ตามบทบาทของ fibroblast-derived proteins ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก PN ในการเหนี่ยวนำ tumor progression นั้น ยังคงต้องมีการศึกษาอีกต่อไป เช่น บทบาทในการเหนี่ยวนำการสร้าง matrix metalloproteinase บทบาทในการเหนี่ยวนำ angiogenesis และการเหนี่ยวนำ tumor metastasis ทั้งการศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้มีรายงานวิจัยที่บ่งชี้ว่าความผิดปกติของ gene expression ใน cancer-associated fibroblast นั้นไม่ได้เกิดจาก mutation ของจีโนมในเซลล์ fibroblast หากเกิดจากการควบคุม gene expression ที่ผิดปกติ ที่สำคัญได้แก่ความผิดปกติของการควบคุมเหนือจีน (epigenetic control) และกลไกของ microRNAs (miRNAs) ดังนั้นการศึกษากลไกการควบคุม gene expression ดังกล่าวอาจสามารถบ่งชี้ตัวควบคุมที่สำคัญในการลดคุณสมบัติของ fibroblast ในการกระตุ้น tumor progression

CONCLUSIONS

กล่าวโดยสรุปการศึกษาในโครงการนี้แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของ cancer-associated fibroblast ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ในระดับของ gene expression โดยพบว่า differential genes ที่พบเมื่อเทียบกับ normal fibroblast มีทั้งแบบที่มี up-regulation และ down-regulation และควบคุม tumor progression ทั้งในทิศทางที่กระตุ้นและยับยั้ง ในที่นี้ fibroblast-derived PN เป็นตัวอย่างที่สำคัญของโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ fibroblast ที่อาจสามารถใช้ช่วยในการวินิจฉัยและใช้เป็น prognostic marker ในมะเร็งท่อน้ำดี และบทบาทของ PN ในการเหนี่ยวนำ tumor progression อันได้แก่ cell proliferation, cell growth และ invasion แบบ paracrine mode นั้น เป็นตัวอย่างหนึ่งในการอธิบายบทบาทของ fibroblast ในการสร้างโปรตีนองค์ประกอบของ tumor microenvironment ให้มีผลต่อการกระตุ้น tumor progression ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกและเส้นทางในเซลล์มะเร็งที่ถูกกระตุ้นโดย PN และ fibroblast-derived protein ชนิดอื่นๆ รวมทั้งกลไกการควบคุม gene expression ที่ผิดปกติในเซลล์ fibroblast ที่สำคัญคือ epigenetic control และ miRNAs ซึ่งทั้งหมดดังกล่าวนี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาต่อไป โดยหวังว่าองค์ความรู้ที่ได้นี้จะสามารถนำมาประยุกต์ในการใช้ fibroblast และ fibroblast-derived substances เป็นเป้าหมายในการยับยั้ง tumor progression โดยใช้ตัวยับยั้งที่เหมาะสมและจำเพาะ (targeted therapy) ได้ในอนาคต