



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ปีที่ 1

เรื่อง

“การวิเคราะห์ระดับโมเลกุลเพื่อหากลไกการหลบหนีระบบภูมิคุ้มกันของเชื้อ HPV ในมะเร็งปากมดลูก”

“Molecular analysis of Immune evasion mechanism of HPV in cervical cancer”

คณะผู้วิจัย

รศ.พญ. ทิพย์ เอกลักษณ์นันท์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รศ.ดร.พญ. แจ่มใส เพียรทอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รศ.นพ. บัณฑิต ชุมวรฐายี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รศ.ดร. บุญเกิด คงยิ่งยศ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “การพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาและนาโนเทคโนโลยีเพื่อ
การป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก”

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “การพัฒนาเทคนิคทางอนุชีววิทยา และนาโนเทคโนโลยีเพื่อการป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก” ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยประเภท อุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนทำให้การทำวิจัยสำเร็จได้ตาม วัตถุประสงค์

รศ.ทิพย์ เอกลักษณานันท์

(หัวหน้าโครงการวิจัย)

บทคัดย่อ

การติดเชื้อ high risk human papillomavirus (HR-HPV) แบบยึดเยื้อเป็นระยะเวลานาน (persistent infection) โดยเฉพาะการติดเชื้อ HPV16 เชื่อว่ามีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของสตรี ในช่วงชีวิตของสตรีที่มีเพศสัมพันธ์พบว่าการติดเชื้อ HPV ประมาณร้อยละ 80 การติดเชื้อไวรัสส่วนใหญ่จะหายได้เองในเวลา 1-2 ปี ซึ่งเป็นผลจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามพบว่าระบบภูมิคุ้มกันในสตรีบางรายไม่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ HPV แสดงว่า HR-HPV มีกลไกในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน

จากหลักฐานการวิจัยพบว่า HPV มีกลไกในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากโปรตีนบางชนิดของไวรัส เช่น ถ้ามีการแสดงออกมากเกินไปของโปรตีน E6 และ E7 แล้วโปรตีนดังกล่าวจะเปลี่ยนแปลงกลไกภายในเซลล์ที่ติดเชื้อโดยขัดขวางกลไกของ tumor suppressor protein p53 และเพิ่ม cell cycle ตามลำดับ นอกจากนี้ E6/E7 ดังกล่าวยังขัดขวางการทำงานของ interferon regulatory factor (IRF) ทำให้เกิดการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามกลไกดังกล่าวเกิดขึ้นในระยะท้ายๆที่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เกิดขึ้นแล้ว ดังนั้นจึงยังไม่สามารถอธิบายสาเหตุที่แท้จริงของการเกิด persistent หรือ latent infection ในช่วงแรกของการติดเชื้อ ซึ่งเป็นจุดสำคัญที่จะนำไปสู่การหาวิธีการป้องกันไม่ให้เกิดมะเร็งปากมดลูกต่อไป

เพื่อศึกษาหาโปรตีนหรือจีนเป้าหมายของ HPV16 E2 protein ซึ่งแสดงออกในระยะแรกของการติดเชื้อ ในการตอบสนองหรือหลบหลีกระบบ innate immunity ที่จะนำไปสู่การเกิดภาวะ persistent infection การดำเนินการวิจัยในปีที่ 1 จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ของ HPV16 E2 ต่อการแสดงออกของ cytokines ในตัวอย่างเนื้อเยื่อปากมดลูกจากผู้ป่วยที่มีรอยโรคบริเวณปากมดลูกหรือเป็นมะเร็ง และหาความสัมพันธ์ของ HPV16 E2 ต่อการแสดงออกของ host genes ในเซลล์ human primary keratinocyte เพื่อคัดเลือกจีนที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบ innate immunity เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นนำไปสู่การทำ *in vitro* study ของ HPV16 E2 protein ที่มีปฏิกิริยาต่อจีนที่เกี่ยวข้องในระบบ innate immunity สำหรับการศึกษาในปีต่อไป

โครงการวิจัยนี้ได้ตรวจหาการแสดงออกของ HPV16 E2 และการแสดงออกของ cytokines ชนิด MIF และ TNF alpha ในตัวอย่างเนื้อเยื่อปากมดลูกจากผู้ป่วยที่มีรอยโรคบริเวณปากมดลูกหรือเป็นมะเร็ง โดยวิธี real time PCR และตรวจหาการแสดงออกของ host genes ในเซลล์ human primary keratinocyte โดยการทำให้ microarray ของเซลล์ human primary keratinocyte ที่ถูก transduce ด้วย virus vector ที่มี HPV16 E2

ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ MIF ใน clinical specimens จะเพิ่มขึ้นตามระดับความรุนแรงของโรค เมื่อเทียบกับ No-SIL cases และการแสดงออกของ MIF ใน No-SIL cases พบว่าใน No-SIL HPV positive มีการแสดงออกของ MIF gene สูงกว่า No-SIL HPV negative ประมาณ 2 เท่า และ

พบว่าใน LSIL HPV positive การแสดงออกของ MIF ก็สูงกว่า LSIL HPV negative อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การแสดงออกของ TNF-alpha ใน clinical specimens พบว่าไม่เป็นไปตามระดับความรุนแรงของโรค และการแสดงออกของ TNF-alpha ใน LSIL cases พบว่าใน HPV positive cases นั้น TNF-alpha มีการแสดงออกของ gene แบบ up-regulate เมื่อเทียบกับ HPV negative cases อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลจาก microarray พบว่า HPV16E2 มีผลในการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของจีนใน keratinocyte cell โดยพบ 779 จีนที่มีการเปลี่ยนแปลง และพบว่ามีจีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันจำนวน 92 จีน

ผลการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ และได้ผลการแสดงออกของจีนโดยวิธี microarray ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาหน้าที่ของ HPV E2 ต่อ host cell ได้หลากหลายแนวทาง ซึ่งสามารถนำไปสู่การดำเนินการวิจัยต่อในปีที่ 2 ที่ 3 นอกจากนั้นผลการวิจัยนี้ยังนำไปสู่การค้นพบกลไกใหม่ของ HPV16 E2 ต่อการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย

สารบัญ

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์	3
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีดำเนินการวิจัย	16
ผลการวิจัย	19
อภิปรายผล/วิจารณ์	27
สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ	27
บรรณานุกรม	28

1. บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การติดเชื้อ high risk human papillomavirus (HR-HPV) แบบยืดเยื้อเป็นระยะเวลานาน (persistent infection) โดยเฉพาะการติดเชื้อ HPV16 เชื่อว่ามีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของสตรี ในช่วงชีวิตของสตรีที่มีเพศสัมพันธ์พบว่าการติดเชื้อ HPV ประมาณร้อยละ 80 การติดเชื้อไวรัสส่วนใหญ่จะหายได้เองในเวลา 1-2 ปี ซึ่งเป็นผลจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามพบว่าระบบภูมิคุ้มกันในสตรีบางรายไม่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ HPV แสดงว่า HR-HPV มีกลไกในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน

จากหลักฐานการวิจัยพบว่า HPV มีกลไกในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากโปรตีนบางชนิดของไวรัส เช่น ถ้ามีการแสดงออกมากเกินไปของโปรตีน E6 และ E7 แล้วโปรตีนดังกล่าวจะเปลี่ยนแปลงกลไกภายในเซลล์ที่ติดเชื้อโดยขัดขวางกลไกของ tumor suppressor protein p53 และเพิ่ม cell cycle ตามลำดับ นอกจากนี้ E6/E7 ดังกล่าวยังขัดขวางการทำงานของ interferon regulatory factor (IRF) ทำให้เกิดการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามกลไกดังกล่าวเกิดขึ้นในระยะท้ายๆที่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เกิดขึ้นแล้ว ดังนั้นจึงยังไม่สามารถอธิบายสาเหตุที่แท้จริงของการเกิด persistent หรือ latent infection ในช่วงแรกของการติดเชื้อ ซึ่งเป็นจุดสำคัญที่จะนำไปสู่การหาวิธีการป้องกันไม่ให้เกิดมะเร็งปากมดลูกต่อไป

HPV E2 protein เป็นโปรตีนชนิดแรกๆ ที่มีการแสดงออก ใน basal cell ที่ติดเชื้อ HPV มีบทบาทใน viral DNA replication อีกทั้ง HPV E2 protein ยังมีบทบาทในการเป็น transcriptional regulatory protein ที่กระตุ้นและยับยั้งการแสดงออกของ early gene เช่น E1, E5, E6 และ E7 โดยขึ้นกับตำแหน่งของการจับที่ binding site บริเวณ promoter พบว่าส่วนใหญ่แล้ว E2 protein จะทำหน้าที่โดยการจับกับ cellular protein หลายชนิดในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ เช่น การจับกันของ E2 protein ฝั่ง N-terminus กับ cellular bromodomain protein 4 (Brd4) แล้วใช้ c-terminus จับกับ active promoters บนเส้น chromatin และทำให้ viral genome สามารถแบ่งตัวไปตามการแบ่งตัวของเซลล์ นอกจากนั้นการศึกษาใน bovine papillomavirus (BPV) ยังพบว่า BPV1 E2 protein สามารถจับกับ cellular transcriptional active promoter และควบคุมการแสดงออกของ gene นั้นๆ ได้ และพบว่า HPV8 E2 protein ยับยั้งการแสดงออกของ β 4-integrin gene ใน normal human keratinocyte โดยการแย่งจับบริเวณ binding site ของ cellular transcription factor ที่ β 4-integrin gene promoter จากคุณสมบัติของ E2 protein ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ host cell protein และ host cell promoter ของ active gene ใน papillomavirus (PV) หลายชนิด และเป็นโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกันใน HPV แต่ละ genotype โดยถูกสร้างขึ้นมาในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ ดังนั้น E2

protein จึงน่าจะมียับยั้งในการควบคุมการแสดงออกของ active gene ที่ถูกกระตุ้นในระยะเริ่มแรกเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยเฉพาะ gene ในระบบ innate immunity อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มียับยั้งของ HPV16 E2 ในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของไวรัส

TNF-alpha เป็น growth suppressor cytokine ชนิดหนึ่งที่จะถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ มีคุณสมบัติเป็น proinflammatory cytokine และส่งผลให้เกิด cell apoptosis ได้ แต่อย่างไรก็ตามในการติดเชื้อ HPV ในเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปพบว่าการแสดงออกของ TNF-alpha gene ลดลงในมะเร็งปากมดลูก ซึ่งการลดลงของ TNF-alpha พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับการขาดหายไปของโครโมโซมที่ 6p21.3 การเกิด mutation หรือการ methylation ที่บริเวณ promoter ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของ TNF-alpha กับการมีปฏิกิริยากับโปรตีนของ HPV ยังไม่มีข้อมูลเพียงพอเช่นเดียวกับการเพิ่มของระดับการแสดงออกของ macrophage migration inhibitory factor (MIF) ที่พบได้ในมะเร็งหลายชนิด รวมทั้งในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นมะเร็งปากมดลูก การแสดงออกของ MIF ที่สูงในเซลล์ที่เป็นมะเร็งนั้นอาจเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันและส่งเสริมการเป็นมะเร็งได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของ HPV ที่มีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ MIF ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV

การติดเชื้อ HPV นั้นเกิดขึ้นบริเวณ basal epithelium ซึ่งเมื่อเกิดการติดเชื้อ ในทางทฤษฎีแล้วจะต้องมีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน รวมถึงการ recruitment ของ immune cells เช่น dendritic cells, Langerhans cells, macrophage, NK cells เป็นต้น แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์เหล่านี้มีจำนวนน้อยในบริเวณที่ติดเชื้อ นอกจากนั้นยังพบว่ามีเซลล์ regulatory T cells และ tumor associated macrophage เพิ่มขึ้น อันส่งผลให้เกิดภาวะ suppressive immune response ในบริเวณที่ติดเชื้อ จึงอาจเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อ HPV รวมถึงโปรตีนของ HPV มีบทบาทในการส่งเสริมให้เกิดภาวะนี้ขึ้น

เพื่อศึกษาหาโปรตีนหรือยีนเป้าหมายของ HPV16 E2 protein ในการตอบสนองหรือหลบหลีก ระบบ innate immunity ของการติดเชื้อ HPV ที่จะนำไปสู่การเกิดภาวะ persistent infection ใน การศึกษานี้จึงศึกษาหาการแสดงออกของยีนโดยการทำ microarray ของเซลล์ human primary keratinocyte ที่มี HPV16 E2 จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลและคัดเลือกยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบ innate immunity อันได้แก่ interferon gene, DNA sensor pathway เพื่อทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ของยีนเหล่านี้ และบทบาทของ HPV16 E2 โดยศึกษาในตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของปากมดลูกในระดับต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของ HPV16 E2 และยีนเป้าหมายเพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นนำไปสู่การทำ *in vitro* study ของ HPV16 E2 protein ที่มีปฏิกิริยาต่อยีนที่เกี่ยวข้องในระบบ innate immunity โดยวิธี relative quantitative real time-PCR สำหรับการยืนยันผลของ HPV16 E2 protein ที่มีปฏิกิริยาต่อยีนเป้าหมายที่ได้จากการทำ *in vitro* study ดังกล่าว โดยทำการทดสอบด้วยวิธี HPV16 E2 infection, silencing gene ด้วย siRNA, real-time

การศึกษาผลของ HPV16 E2 protein ต่อ microenvironment ที่บริเวณที่ติดเชื้อ จะทำการศึกษาทั้งระบบ in vitro และ in vivo โดยการศึกษาว่า HPV16 E2 มีความสำคัญในการส่งเสริมให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity อย่างไร โดยจะดูความสามารถของ NK cells ที่ในหนูทดลองที่ได้ inoculate HPV16E2 expressing cells ว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร รวมทั้งศึกษาการศึกษา cytotoxic function ของ NK cells ต่อ เซลล์ที่เป็นเป้าหมายของ NK cells ว่ามีความแตกต่างอย่างไรในกลุ่มของ NK cells ที่ได้จากหนูทดลองที่มี HPV16E2 expressing cells กับกลุ่มของหนูทดลองที่มี cells control นอกจากนั้นยังศึกษาการ secrete ของ IFN-gamma โดย NK cells เพื่อดูว่า HPV16E2 มีบทบาทต่อการตอบสนองของ NK cells และในชั้นเนื้อที่ได้จากบริเวณ inoculated site ในหนูทดลอง จะทำการศึกษาการ localization ของ immune cells โดยวิธี immunohistochemistry

ความสำเร็จของงานวิจัยนี้จะได้อรรถประโยชน์ใหม่ ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูก เช่น พัฒนาวิธี immunotherapy เพื่อป้องกันและ/หรือการจัดการติดเชื้อ HPV แบบยืดหยุ่น เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อหาความสัมพันธ์ของ HPV16 E2 ต่อการแสดงออกของ cytokines ในตัวอย่างเนื้อเยื่อปากมดลูกจากผู้ป่วยที่มีรอยโรคบริเวณปากมดลูกหรือมะเร็ง
2. เพื่อหาความสัมพันธ์ของ HPV16 E2 ต่อการแสดงออกของ host genes ในเซลล์ human primary keratinocyte
3. เพื่อศึกษาบทบาทของ HPV16 E2 ที่มีปฏิกริยาต่อ host cell ที่เกี่ยวข้องในระบบ innate immunity
4. เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง HPV16 E2 กับ immune microenvironment
5. เพื่อประเมิน NK activity ที่มีผลจาก HPV16 E2

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย ปีที่ 1

1. เพื่อหาความสัมพันธ์ของ HPV16 E2 ต่อการแสดงออกของ cytokines ในตัวอย่างเนื้อเยื่อปากมดลูกจากผู้ป่วยที่มีรอยโรคบริเวณปากมดลูกหรือมะเร็ง
2. เพื่อหาความสัมพันธ์ของ HPV16 E2 ต่อการแสดงออกของ host genes ในเซลล์ human primary keratinocyte

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

มะเร็งปากมดลูกยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจากเป็นสาเหตุการตายของสตรีทั่วโลกสูงถึง 274,000 รายต่อปี พบว่าอย่างน้อยร้อยละ 80 ของสตรีที่เสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูกนั้นอยู่ในประเทศกำลังพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่ยากจนในแถบเอเชียใต้ แอฟริกาและทะเลทรายซาฮารา และบางส่วนของละตินอเมริกา [1] จากการศึกษาระบาดวิทยาของมะเร็งปากมดลูกในอินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย และเวียดนาม พบว่ามะเร็งปากมดลูกจัดเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 1 ในสตรีไทยและเวียดนาม อีกทั้งยังเป็นสาเหตุการตายของสตรีเป็นอันดับ 1 ในเวียดนาม อันดับ 2 ในอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ อันดับ 3 ในไทย และอันดับ 4 ในมาเลเซียอีกด้วย [2] การศึกษาในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี incidence ของมะเร็งปากมดลูก (age-standardized rate, ASR) ในอินโดนีเซียและมาเลเซียเท่ากับ 15.7 ต่อ 100,000 ในขณะที่พบค่า ASR สูงขึ้นใน ไทย (ASR = 19.8) เวียดนาม (ASR = 20.2) และฟิลิปปินส์ (ASR = 20.9) ตามลำดับ ในไทยพบว่าอายุของสตรีที่สามารถตรวจพบมะเร็งปากมดลูกจะเริ่มจาก 20 ปีเป็นต้นไป และพบสูงสุดในสตรีที่มีอายุ 45-50 ปี โดยส่วนใหญ่แล้วจะตรวจพบในระยะท้ายๆ ของการเกิดโรค โดยเป็น International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage II (ร้อยละ 5) และ stage III (31%) อีกทั้งยังพบว่า overall 5-year survival ในเชียงใหม่ เป็นร้อยละ 68.2 และในขอนแก่นร้อยละ 54.5 [2]

มะเร็งปากมดลูกสามารถป้องกันและรักษาให้หายได้ด้วยวิธีที่มีอยู่ในปัจจุบันหากตรวจพบเซลล์ผิดปกติตั้งแต่ระยะแรกๆ อย่างไรก็ตามในประเทศกำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทยจำนวนสตรีที่เข้าสู่ระบบตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกยังต่ำ (ร้อยละ 5) และถึงแม้จะได้รับการตรวจอย่างสม่ำเสมอก็ตาม สตรีจำนวนไม่น้อยก็ยังเป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลามได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการตรวจวิธีใดวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงพอ หรือแม้แต่การใช้การตรวจมากกว่า 1 วิธีร่วมกันก็ไม่ได้ทำให้มีความไวและความจำเพาะสูงเป็นที่น่าพอใจ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนาวิธีการตรวจหาความผิดปกติก่อนที่จะเป็นมะเร็งให้มีประสิทธิภาพสูง ในขณะเดียวกันต้องมีการวิจัยพื้นฐานให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ๆ เกี่ยวกับกลไกการเกิด persistent การก่อมะเร็งปากมดลูก ปฏิกิริยาของโฮสต์ต่อปัจจัยก่อโรค เพื่อนำไปสู่การวิจัยประยุกต์ที่ศึกษาหาวิธีการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกที่มีประสิทธิภาพสูง วิธีการป้องกันไม่ให้เกิดโรคมะเร็ง และวิธีการรักษาโรคมะเร็งในกรณีที่เกิดโรคขึ้นแล้ว

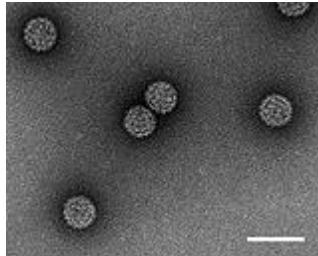
Human papillomavirus: สาเหตุของมะเร็งปากมดลูก

จากการศึกษาพบว่าประมาณร้อยละ 99.7 ของมะเร็งปากมดลูกจะตรวจพบ DNA ของ human papillomavirus (HPV) อย่างน้อยที่สุด 1 type ของ high risk HPV [3] และประมาณร้อยละ 70 เป็น HPV16 และ HPV18 [3, 4] ดังนั้นจึงเชื่อว่าสาเหตุหลักของมะเร็งปากมดลูกเกิดจากเชื้อ HPV ซึ่งเป็นเชื้อที่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์ โดยมีปัจจัยร่วมอื่นๆ ได้แก่ การสูบบุหรี่ การมีคู่นอนหลายคน การมีเพศสัมพันธ์ครั้งแรกเมื่ออายุน้อย การใช้ยาคุมกำเนิดเป็นเวลานาน เป็นต้น

HPV จัดอยู่ใน family *Papillomaviridae* เป็น non-envelope virus ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 55 นาโนเมตร มีจีโนมเป็นวงกลม สายคู่ (double stranded DNA) พันกันเป็นเกลียวซับซ้อน ขนาด 8000 คู่เบส แคปซิดมีการเรียงตัวแบบ icosahedral symmetry ประกอบด้วยแคปโซเมอร์ 72 หน่วย (รูปที่ 1)

HPV มีการติดเชื้อเป็นแบบ species-specific แต่มีความสามารถในการปรับเปลี่ยนไปตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ [5] HPV genome แบ่งเป็น ส่วนที่เรียกว่า non-coding upstream regulatory region (URR) หรือเรียก long control region (LCR) มีขนาดประมาณ 1 kb ส่วนนี้ไม่ encode โปรตีนแต่จะมี cis-element ที่จำเป็นใน viral replication และควบคุมการแสดงออกของจีน และส่วนที่ encode โปรตีนแบ่งเป็น early region open reading

frames (ORFs) สำหรับ encode E6, E7, E1, E2,E4 และ E5 ซึ่งจำเป็นในการ replication, transcription และการประกอบเป็นอนุภาค และ late region สำหรับ encode 2 genes คือ L1 ซึ่งเป็น major capsid protein และ L2 เป็น minor capsid protein [6]



รูปที่ 1. ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ HPV16

(<http://cals.arizona.edu/research/fane/honorswebpage.html>)

HPV มีมากกว่า 100 จีโนไทป์ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามลักษณะของเยื่อผิวที่ไวรัสชอบติดเชื้อ (epitheliotropism) ได้แก่ skin หรือ cutaneous HPV type ซึ่งชอบติดเชื้อบริเวณผิวหนัง และ mucosal HPV type ซึ่งชอบติดเชื้อบริเวณเยื่อเมือกเช่น ปากมดลูก [7-9] ไวรัสกลุ่ม mucosal HPV type แต่ละ type มีความสามารถในการก่อมะเร็งปากมดลูกได้แตกต่างกัน จึงแบ่งกลุ่มย่อยได้อีกเป็น high risk (HR) HPV type ซึ่งมีความสามารถสูงในการก่อมะเร็ง และกลุ่ม low risk (LR) HPV type ซึ่งมีความสามารถในการก่อมะเร็งต่ำกว่า[10] นอกจากนี้บางคนยังจัดบาง type เป็น intermediate type ไวรัสที่จัดเป็น LR-HPV type ได้แก่ HPV6, 11, 26, 30, 34, 40, 42-44, 53, 55, 57, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 73, 74, 79, 81-84 ส่วน HR-HPV type ได้แก่ HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 66, 68 และ 69 [11]

HPV life cycle และความสามารถในการก่อมะเร็ง

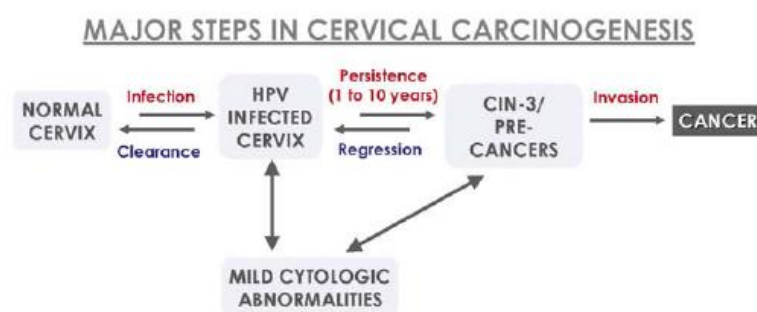
HPV เข้าสู่เซลล์บริเวณเยื่อปากมดลูกที่ถูกลอกหรือฉีกขาด และเข้าไปติดเชื้อในเซลล์ basal ของเยื่อซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ ไวรัสที่เข้าไปในเซลล์จะเกิดกระบวนการ replication และ transcription ในนิวเคลียสทำให้มีปริมาณ viral DNA ในระยะเริ่มต้นประมาณ 50-100 genome copies ต่อ 1 เซลล์ ในเซลล์นี้จะไม่มีการสร้างอนุภาคของไวรัส (non productive infection) แต่จะมีโปรตีนบางตัว (early protein) ถูกสร้างขึ้นเช่นโปรตีน E1, E2, E6 และ E7 โดยมีการแสดงออกในระดับต่ำๆ [12] โปรตีนเหล่านี้มีบทบาทในการเพิ่มจำนวนเช่น E1 จับกับโปรตีน E2 แล้วไปยังบริเวณ origin of replication ทำให้เกิดการ replication ของ viral genomeได้โดยโปรตีน E1 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ helicase ซึ่งมีหน้าที่แยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว ส่วน E6 และ E7 ทำให้เซลล์ proliferation และโปรตีน E2 มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของ gene อื่นๆโดยไปจับที่ E2 binding site (E2BS) บน LCR เมื่อเซลล์ basal ที่ติดเชื้อมีการแบ่งตัวและเคลื่อนตัวขึ้นสู่ suprabasal layer ของชั้นเยื่อเพื่อเกิดการ differentiation จะมีการเพิ่มจำนวนของ viral genome ตามการแบ่งตัวของเซลล์ และเมื่อเซลล์เคลื่อนขึ้นสู่ชั้นผิว จะมีการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ late gene ที่สร้างโปรตีน แคปซิดมาหุ้ม genome ของเชื้อไวรัสรวมทั้งการสร้างโปรตีน E4 และ E5 เกิดขึ้นในระยะนี้ ทำให้ได้อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์เมื่อเซลล์เคลื่อนขึ้นสู่ชั้นผิวแล้ว ลักษณะการเพิ่มจำนวนของไวรัสเป็นแบบ non-lytic life cycle ผลของ E6 และ E7 ทำให้ host cell สามารถสนับสนุนการเพิ่มจำนวนไวรัสได้ และจากการที่มีคุณสมบัติเป็น oncoproteins ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจึงมีผลทำให้การควบคุมการแสดงออกของ host genes เปลี่ยนแปลงไป มี genetic instability เกิดขึ้น และยังมีคุณสมบัติทำให้เกิด malignant transformation และ cell immortalization ได้ [13] ซึ่งคุณสมบัตินี้พบได้ในเฉพาะ E6/E7 ของ HR-HPV โดย E7 สามารถจับกับ pRb ซึ่งจะถูกทำลายไปแล้วทำให้ E2F(transcriptional factor)ที่จับอยู่กับ pRb เป็นอิสระสามารถไปกระตุ้นการแสดงออก gene อื่นๆได้โปรตีนที่มีความจำเป็นในการ replication ของเซลล์[14]

ขณะที่เซลล์ถูกกระตุ้นเข้า S phase เป็นภาวะผิดปกติ ตามปกติจะต้องถูกควบคุมด้วย p53 เพื่อให้เซลล์เกิด apoptosis แต่ในภาวะที่มี E6 จะลบล้างหน้าที่นี้ได้โดย E6 สามารถจับ E6AP และ p53 ทำให้เกิดการทำลาย p53 [15] ไม่เกิด apoptosis เป็นผลให้เซลล์ติดเชื้อไม่ differentiation แต่จะคงอยู่ในวงจรการเพิ่มจำนวนของไวรัส และเมื่อมีภาวะที่มีการแสดงออกของ oncogenes E6/E7 ที่มากเกินไปอย่างต่อเนื่องซึ่งมีคุณสมบัติทำให้ cell transformation เกิด clonal cell proliferation และ cell immortalization ต่อไป

ความสำคัญของการติดเชื้อ HPV แบบ persistent และกลไกการเกิดมะเร็งปากมดลูก

การติดเชื้อ LR- และ HR-HPV ที่เซลล์เยื่อปากมดลูกบริเวณ transformation zone ก่อให้เกิดเซลล์ผิดปกติ (เรียก koilocyte atypia) สามารถตรวจพบได้โดยวิธี Pap test ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก ส่วนใหญ่ของผู้ติดเชื้อดังกล่าวจะสามารถกำจัดเชื้อและกลับคืนสู่ภาวะเซลล์ปกติ (spontaneous regression) เนื่องจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะผู้ที่ยังมีอายุน้อยเชื้อจะหายไปหมดภายใน 2 ปี เป็นผลจากระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น แต่มีบางกลุ่มโดยเฉพาะผู้ที่ติดเชื้อกลุ่ม HR-HPV และกลุ่มอายุสูงขึ้น (>35 ปี) อาจพบการติดเชื้ออยู่ยาวนาน เรียก การติดเชื้อแบบยืดเยื้อ (persistent infection) [16] ซึ่งถือว่าเป็นจุดกำเนิดของมะเร็งปากมดลูกได้ถ้าเซลล์ติดเชื้อนี้เพิ่มจำนวน (clonal progression) และเปลี่ยนแปลงไปเป็น cervical intraepithelial neoplasia CIN3/true-precancer เมื่อมีปัจจัยอื่นๆส่งเสริมและยังเกี่ยวกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่วมด้วย ดังแสดงในรูปที่ 2 [17]

การติดเชื้อ HPV แต่ละ type จะทำให้เกิด koilocyte atypia ได้ไม่แตกต่างกัน แต่ความสำคัญจะขึ้นกับ HPV type ที่มีผลต่อระยะเวลาในการเกิด persistent และ cervical lesion outcome เป็นสำคัญ โดยพบว่าชนิดของไวรัส HR-HPV group จะเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคได้ในระดับต่างกัน จากการศึกษาโดยกลุ่มวิจัยนี้ในผู้หญิงภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีภาวะมะเร็งปากมดลูกพบค่าความเสี่ยงในการเกิดโรค(OR) ประมาณ 130.6 (ร้อยละ 95 CI 11.7–1457.0) เมื่อมีการติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV และมีรายงานว่า ค่า ORs ของการติดเชื้อ HPV 16, 18 and 16/18 กับการมีภาวะมะเร็งปากมดลูกคือ 12.3, 3.2 and 15.7 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV [18] อย่างไรก็ตาม ปริมาณของไวรัส (viral load) อาจจะมีผลในการตรวจวินิจฉัยได้ เช่นใน ระยะที่มี low viral load จะไม่พบหลักฐานการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แต่ในระยะที่มี high viral load จะมีผลที่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ภาวะดังกล่าวนี้จะอธิบายผลการตรวจพบ HPV DNA ในเซลล์ปกติได้ ซึ่งเซลล์ที่มี low viral load ดังกล่าวนี้อุบัติการณ์การตรวจพบภาวะของเซลล์ผิดปกติได้ (accumurate risk) ร้อยละ 25-40 ที่ 1-3 ปีหลังการตรวจพบ HPV DNA จึงเป็นอีกภาวะหนึ่งของการเกิด persistent infection[18]



รูปที่ 2 ขั้นตอนการเกิดมะเร็งปากมดลูก

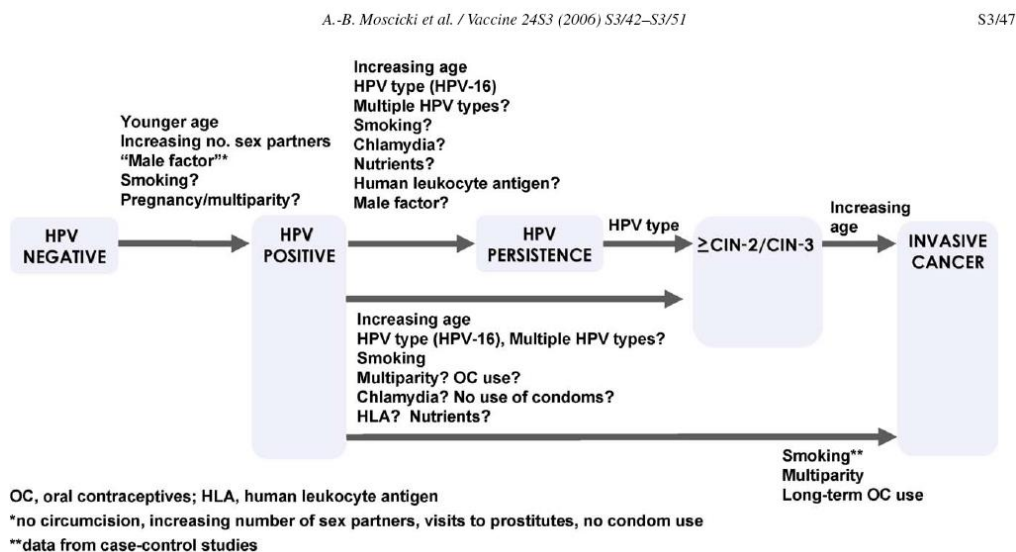
Persistent HPV infection หมายถึงการพบ HPV DNA ชนิดเดียวกันในการตรวจ 2 ครั้งหรือมากกว่า [17, 19] และอาจจำแนกตามระยะเวลาของการกำจัดโรค (clearance duration) [20-22] หรือ จำแนกตามระยะเวลาที่มีการติด

เชื้อ HPV [23, 24] โดยการให้คำจำกัดความของคำว่า persistent HPV infection นั้นขึ้นกับวิธีการตรวจวินิจฉัย, testing intervals และ HPV categorization-status for analysis (type-specific; non-type-specific HPV persistence) ที่แตกต่างกัน

จากผลการศึกษาในปัจจุบันพบว่า HPV persistent infection จะเป็นกลุ่มเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากผลของโปรตีน E6/E7 (oncoproteins) ที่ไวรัสสร้างขึ้นในระหว่างดำรงชีวิต (viral life cycle) และมีภาวะที่สร้างขึ้นผิดปกติ จะทำให้เซลล์โฮสต์เกิดมี chromosome instability ขึ้น ซึ่งอาจเป็นปัจจัยส่งเสริมการแทรกตัวของ viral genome เข้าสู่ DNA ของโฮสต์ (viral integration) การติดเชื้อ HPV จึงอาจพบได้สองรูปแบบคือ episomal และ integrated form ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่มี และมีการแทรก genome (viral integration) ของไวรัสเข้าไปในโฮสต์โครโมโซมตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่มีการติดเชื้อ HPV ที่มีภาวะการติดเชื้อเป็น episomal form เป็นกลุ่มที่สามารถเกิด spontaneous regression ได้เป็นส่วนใหญ่ อาจพบภาวะ mixed form (episomal and integrated form) ได้บ้างในการติดเชื้อ HPV

จากรายงานการศึกษาพบว่า ในทุกรายที่เกิดมะเร็งจะมี HPV persistent infection ชนิดใดชนิดหนึ่งจากกลุ่ม HR-HPV จึงได้รับการยอมรับว่า กระบวนการติดเชื้อและการพัฒนาไปเป็นเซลล์ผิดปกติและเกิดโรคมะเร็ง มีอยู่ 4 ระยะดังรูปที่ 1 คือ 1) infection of metaplastic epithelium at the cervical transformation zone 2) viral persistence 3) progression of persistently infected epithelium to cervical precancer และ 4) invasion through basement membrane เนื่องจากการเกิดภาวะ persistent infection พบได้นาน 1-10 ปี จึงเชื่อว่าการพัฒนาไปเป็นมะเร็งจะเกิดขึ้นได้ในช่วงระยะเวลาดังกล่าวในกลุ่มที่มี precancer คือในช่วงอายุ 25-30 ปี โดยพบว่าหลังจากการติดเชื้อ HPV จะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผิดปกติในระดับ CIN3 ในช่วงเวลา 7-15 ปี แต่ก็อาจจะพบเซลล์ผิดปกติชนิด CIN2 และ CIN 3 ได้รวดเร็วภายในระยะเวลาเป็นเดือนได้ [25]

เมื่อเกิดภาวะเซลล์ผิดปกติในระยะ CIN3 หรือ precancer โอกาสที่จะหายได้เองจะน้อยลงพอๆกับการที่เซลล์ดังกล่าวจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งได้ การที่จะทำให้เซลล์ติดเชื้อมีภาวะ persistent infection และ การเปลี่ยนแปลงเพื่อพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์มะเร็งพบว่าต้องอาศัยปัจจัยร่วมมากมายซึ่งบางชนิดยังไม่สามารถอธิบายกระบวนการได้ดังรูปที่ 3 [26]



รูปที่ 3 ปัจจัยร่วมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะ persistent infection และมะเร็งปากมดลูก

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ HPV

การตอบสนองต่อการติดเชื้อเป็นการร่วมมือกันระหว่าง innate immunity ได้แก่ phagocytes และ soluble proteins (cytokines, chemokines, complement และ epithelial barriers) และ adaptive immunity ได้แก่ antibody และ cytotoxic effector cells) โดย Innate immune system เป็นด่านแรกของการป้องกันการติดเชื้อ ลักษณะการตอบสนองจะเป็นแบบไม่จำเพาะต่อ antigen (Ag) แต่จำเพาะต่อรูปแบบของ Ag [27] เพื่อทำลายเชื้อโรค การตอบสนองของระบบ innate immune จะไม่มี memory แต่จะทำหน้าที่กระตุ้นระบบ adaptive immune ซึ่งจะมีการตอบสนองอย่างจำเพาะต่อ Ag รวมถึงการมี memory ต่อการติดเชื้อด้วย การตอบสนอง adaptive immunity มี 2 ด้านด้วยกัน คือ Antibody-mediated humoral immunity จะทำลายไวรัสที่อยู่ในกระแสเลือดและป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้ ในขณะที่อีกด้านคือ cell-mediated immunity นั้นมีความสำคัญต่อการกำจัดเซลล์ที่มีการติดเชื้อ โดย adaptive immunity ยังมีการสร้าง memory cells เพื่อให้สามารถตอบสนองต่อการติดเชื้อซ้ำได้อีกด้วย

Innate immunity จะถูกกระตุ้นจาก cell injury cell death และ inflammation ในระหว่างที่มีการติดเชื้อ ทั้ง soluble และ cellular innate immune จะถูกเรียกมายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ โดย phagocyte ที่มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อจะถูกกระตุ้นให้มีการหลั่ง inflammatory cytokine และสารอื่นๆ เพื่อต่อต้านการติดเชื้อ ซึ่งเซลล์สำคัญคือ dendritic cell ซึ่งเป็น antigen-presenting cells (APC) ชนิดเดียวที่สามารถกระตุ้น naïve T lymphocyte ได้จะมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น adaptive immunity ต่อไป

Innate immunity แสดงออกของ gene จาก germ line เพื่อตอบสนองต่อสิ่งที่เป็นอันตราย แต่ adaptive immunity นั้นตรงกันข้ามคือ มีพื้นฐานเป็น T และ B lymphocyte receptors ซึ่งสร้างจาก somatic gene และเกิดการ rearrangement ในระหว่างการพัฒนาการเจริญ การตอบสนองของ innate immunity จะเกิดสัญญาณที่บ่งบอกว่า เป็น Ag ชนิดใดเพื่อให้เกิดการตอบสนองต่อไป เช่น receptor ที่สร้างจาก germ line ของ innate immunity จัดจำลักษณะพื้นฐานที่ conserve ของ pathogen ซึ่งเป็นส่วนของ microbial physiology และปัจจัยที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต โดย Ag ที่ innate immunity จัดจำได้รวมเรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) มีความคล้ายคลึงกันในแต่ละกลุ่มของ Ag ซึ่งจะถูกจดจำโดย pattern recognition receptors (PRRs) เช่น Toll-like receptor ในระบบ innate immunity ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน รวมถึงกระตุ้น adaptive immunity อีกด้วย [28]

T lymphocytes เป็นส่วนประกอบของ adaptive immunity มีบทบาททั้งใน cell-mediated และ humoral immunity การจดจำ Ag ของ T cell จะจดจำในลักษณะ peptides สายสั้นๆ ที่จับอยู่กับ major histocompatibility complex (MHC) ซึ่งเป็น membrane-bound receptor บนผิวเซลล์ T cell แบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามประเภทของ surface marker ได้แก่ CD4 และ CD8 โดย CD4+ T cells จะจับกับ Ag ที่ถูกนำเสนอผ่าน MHC II ส่วน CD8+ T cells จะจับ Ag ที่ถูกนำเสนอผ่าน MHC I โดย MHC I จะทำหน้าที่นำเสนอ endogenous Ag หรือในบางครั้งอาจนำเสนอ intracellular synthesis จากการย่อยโปรตีนใน proteasome แล้ว peptides สายสั้นๆ นั้นจะถูกนำเสนอที่ผิวเซลล์โดย MHC/peptide complex อีกด้านคือ MHC II จะนำเสนอ exogenous Ag ที่ได้รับจากภายนอก โดย APC จะกิน Ag เข้าไปอยู่ใน endosome จากนั้นจะผ่านกระบวนการ แล้วจับกับ MHC II แล้วนำเสนอที่ผิวเซลล์ การปฏิสัมพันธ์ระหว่าง T cell และ APC นั้นมีความซับซ้อน เริ่มจาก naïve T cell ไปจับกับ MHC/peptide complex แล้วกระตุ้นให้ T cell activation และการแบ่งตัวของ effector T cells

ผลจากการกระตุ้น CD4+ T cell ทำให้มีการหลั่ง cytokine หลายชนิดซึ่งมีบทบาทในการช่วยและควบคุมเซลล์ชนิดอื่น โดย CD4+ T cell สามารถแบ่งตามการหลั่ง cytokine ได้ 2 ชนิด คือ Th1 และ Th2 cell

Th2 cells หลัง IL-4 และ IL-10 (และ cytokine อื่นๆ) และส่งเสริมให้ B lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นด้วย Ag เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น plasma cell และหลั่ง Antibodies (Ab) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองด้านสารน้ำ

Th1 cells หลัง IFN- γ ซึ่งส่งเสริมการตอบสนองด้านเซลล์ macrophage natural killer cells (NK) และ CD8+ T cells

T cells ชนิดที่ 3 คือ regulatory T cells (Tregs) ซึ่งมี phenotype แบบ CD4+CD25+ จากมีการแสดงออกของ transcription factor Foxp3 และหลั่ง IL-10 และ TGF- β โดย T cell เซลล์ชนิดนี้จะจดจำ self-Ag และทำหน้าที่ในการป้องกัน autoimmune อย่างไรก็ตาม Treg ยังสามารถควบคุมการตอบสนองต่อ exogenous Ag และทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสแบบเรื้อรังได้ [29]

APC นั้นจะแสดง receptor และหลั่ง cytokines ในบริเวณที่ติดเชื้อ ซึ่งจะมามีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงของ T cells ว่าจะเปลี่ยนไปเป็น Th2 Th1 หรือ Treg โดย APC จะต้องถูกกระตุ้นโดย receptor-ligands interaction ระหว่าง APC และ pathogens และจะหลั่ง cytokines ออกมากระตุ้นเซลล์อื่นๆ cytokines ที่หลั่งโดย APC กล่าวได้ว่าเป็นตัวเชื่อมระหว่าง innate กับ adaptive immunity ซึ่งจะมีปฏิสัมพันธ์กับ T cells และส่งเสริมการตอบสนองต่อการติดเชื้อให้เหมาะสม

B cells พัฒนามาจาก bone marrow ในรูปของ naïve B cells ส่วน mature B cells จะไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด ต่อมาน้ำเหลือง และ secondary lymphoid organ เพื่อตอบสนองต่อ Ag แต่ละ mature B cells จะมี B cell receptor (BCR) ที่ผิวเซลล์แตกต่างกันไป และมี immunoglobulin หรือ Ab ที่จำเพาะกับ Ag เมื่อ naïve B cell ตรวจพบและกระตุ้นด้วย Ag แล้วจะทำให้เกิดการ proliferation และ differentiation ไปเป็น Ag-specific memory B cells และ effector plasma cells โดย plasma cells จะหลั่ง Ab ออกมาเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีความจำเพาะกับ Ag และเมื่อมีการติดเชื้ออีกครั้งการตอบสนองโดยการสร้าง Ab จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูง รวมถึง Ab นั้นยังมี binding affinity สูงต่อการจับกับ Ag อีกด้วย ซึ่งเป็นหลักการสำคัญของการพัฒนา prophylactic vaccine อีกทั้ง B cell ยังมีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก T cells คือ B cells สามารถจดจำ Ag ในลักษณะ natural conformation แต่มีเพียง Ag บางชนิดเท่านั้นที่สามารถกระตุ้น B cells ได้โดยตรง หลังจาก Ag จับกับ BCR แล้วจะเกิดการกระตุ้น B cells จากนั้นจะต้องมี Th2 มาช่วยในการเปลี่ยนแปลงของ B cells ไปเป็น plasma cells โดยอาศัยโครงสร้างของ receptor-ligand interactions และ cytokines ซึ่ง T cells มีบทบาทสำคัญในการเกิด class switching เพื่อสร้าง Ab หลายหลาย class และ isotype รวมถึงการพัฒนาการของ antigen-specific memory B cells [30, 31]

Papillomaviruses มีลักษณะการติดเชื้อแบบจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิตและจำเพาะต่อเนื้อเยื่อ โดย การติดเชื้อและการสร้างอนุภาคไวรัสจะขึ้นกับการ differentiate ของ keratinocyte ไวรัสติดเชื้อครั้งแรกที่ basal epithelium ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอยู่ จากนั้นไวรัสจะมีการแสดงออกของ viral protein และ เกิด assembly ใน upper layers ของ stratum spinosum และ granulosum ของ squamous epithelium [32-34] ช่วงเวลาของการติดเชื้อถึงการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ ซึ่งตรงกับระยะเวลาที่เซลล์จากชั้น basal cell เคลื่อนตัวและเปลี่ยนแปลงไปเป็น keratinocyte ที่ชั้นบนสุดของ epithelium ช่วงเวลาการติดเชืื่อนั้นอาจแตกต่างกันได้ตั้งแต่เป็นหลายสัปดาห์ถึงหลายเดือน เป็นการบ่งบอกว่าไวรัสนั้นไม่ถูกกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกัน และมีการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้เนื่องจากการติดเชื้อ HPV นั้นไม่ก่อให้เกิด cytolysis ในช่วงที่เกิดการ replication อีกทั้งการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสนั้นยังอยู่ที่ชั้นบนสุดของ epithelium ซึ่ง keratinocyte ตายและหลุดลอกออกไป รวมถึงอนุภาคไวรัสอยู่ห่างไกลจาก immune surveillance ทำให้การติดเชื้อ HPV ไม่ก่อให้เกิด inflammation จากคุณสมบัติเบื้องต้นนี้ทำให้เกิดเป็น persistent infection ได้ [31]

กลไกการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน

ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายประกอบด้วย innate immune system ซึ่งจะเป็นด่านตรวจจับไวรัส กำจัด และ กระตุ้น active immune system เพื่อมีหน้าที่สร้าง antibody และ cell mediated immune ที่จำเพาะขึ้นเพื่อกำจัด free virus ป้องกันการติดเชื้อ และกำจัดเซลล์ติดเชื้อ และกระตุ้น memory cells แต่เนื่องจากลักษณะการเพิ่มจำนวน ของ HPV เป็นแบบ non-lytic life cycle (no cytolytic death) จะมีภาวะการอักเสบน้อยจึงเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้ HPV หลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันได้

จากหลักฐานทางคลินิกพบว่า innate immunity จะมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการติดเชื้อ HPV โดยพบว่า ในผู้ที่มี transient HPV infection จะพบ antibody response และ cell mediated response น้อยหรือในระดับต่ำ เมื่อเทียบกับผู้ที่มีภาวะ persistent infection (32) แสดงให้เห็นว่า innate immune system มีประสิทธิภาพในการ กำจัดเชื้อได้เร็วมากและเกิดปฏิกิริยาได้ก่อนที่จะมีผลกระตุ้น specific immune response

ในปัจจุบันพบว่า innate immunity มีองค์ประกอบหลายส่วนดังนี้คือ pattern of pathogen recognition (เช่น Toll-like receptor), innate effector mechanism (เช่น inflammation, chemotaxis and chemokines) จึง เป็นหลักฐานทำให้เชื่อว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบดังกล่าวจะสัมพันธ์กับภาวะ persistent HPV infection ที่เกิดขึ้น กลุ่มการวิจัยนี้มีความสนใจศึกษาเพื่อหากลไกของการติดเชื้อไวรัสที่สามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันในระบบ innate และเชื่อว่าเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิด persistent HPV infection ที่สำคัญ

ภาวะ HPV persistent infection มีรายงานว่าส่วนหนึ่งเป็นผลจากการที่ไวรัสสามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน ของโฮสต์ได้ มีหลายวิธีเช่น [35]

- จากภาวะที่เป็น non-lytic life cycle ทำให้เกิดความบกพร่องในการสร้างและ processing ของ Ag ให้กับ effector cells และ มีผลลดการกระตุ้น adaptive immune response
- HPV มีการสร้างโปรตีนที่เป็น non-secreted proteins ได้แก่ early proteins: E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 ในระดับต่ำและพบโปรตีนดังกล่าวในบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อเป็นส่วนใหญ่ [36-38]
- Early protein ของ HPV ที่สร้างขึ้นในระหว่างเซลล์ติดเชื้อมีบทบาทในการทำให้เกิดการหลบหลีกระบบ ภูมิคุ้มกันได้ เช่น

E5 protein สามารถขัดขวางการนำส่งของโมเลกุล MHC class I โดยการทำให้เกิดสภาวะเป็นเบสใน Golgi apparatus และ endosome มีผลลดการแสดงออกของ HLA-A และ HLA-B ที่ผิวเซลล์ซึ่งจะส่งผลต่อการนำเสนอ Ag ให้กับ cytotoxic T lymphocyte (CTL) [39]

E7 [40] และ E6 [41] proteins ลดการนำเสนอ HLA class I, proteasome subunits low molecular mass protein (LMP) 2 and 7 และ the transporters of antigenic peptides (TAP) 1 และ 2 ใน cervical carcinoma cell lines [41] และยังรบกวนการสร้างและการทำงานของ IFN type I [42]

E7 protein รบกวนไม่ให้เกิดการ transcription ของ IFN-beta ด้วยการ recruitment histone deacetylase ไปยัง บริเวณ promoter [43] การศึกษา *in vivo* ยังพบว่า HPV18 E7 ลดการ expression ของ IRF-1 target genes เช่น TAP-1, IFN-beta และ monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1) โดยผ่านการยับยั้ง trans-activation function ของ IRF-1 [44] E7 protein ยังสามารถยับยั้ง NF- κ B DNA binding activity และมีผลต่อ NF- κ B-induced gene expression ได้ [45]

E6 protein สามารถจับกับ IRF-3 [46] ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้ง trans-activation function ของ IRF-3 และมีผลยับยั้ง การ transcription ของ IFN- β mRNA [47] E6 ยังสามารถจับกับ Tyk2 ขัดขวางการจับของ Tyk2 กับ cytoplasmic

portion ของ IFN- α receptor 1 และยับยั้งการ phosphorylation ของ Tyk2, STAT-1 และ STAT-2 ทำให้เกิดความบกพร่องของ Jak-STAT activation ซึ่งไปรบกวน IFN- α mediated signaling ได้ [48]

ทั้ง HPV16 E6 และ E7 protein ยังสามารถยับยั้งการสร้าง cytokine และ chemokine ที่มีความสำคัญในการ recruitment ของ immune cell เช่น Langerhans cell (LC) ให้มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ เช่น การยับยั้งการสร้าง CCL20 ซึ่งเป็น chemokine สร้างจาก infected cell โดยผ่าน NF- κ B pathway [49] การ recruitment ของ LC มายังบริเวณ lesion นั้นต้องใช้ทั้ง chemokine และ adhesion molecules ในสภาวะปกติพบว่า LC มีการแสดงออกของ adhesion molecules like E-cadherin [50], ICAM-1, VCAM-1 [51] และ LFA-3 [52] เป็นต้น แต่ไม่พบการแสดงออกของ adhesion หรือ co-stimulation molecule โดย epithelial LC ใน pre-malignant หรือ malignant cervical biopsy specimens [53]

ความบกพร่องในหน้าที่ของเซลล์ในระบบ immunity

ในสภาวะปกติแล้วเนื้อเยื่อปากมดลูกจะมี DC และ LC อยู่ เมื่อเกิดสภาวะ inflammation แล้ว DC จะมีการแสดงออกของ MHC I และ II molecules co-stimulatory molecules CD80 และ CD86 และ chemokine receptor 7 (CCR7) และหลัง IL-12 IL-12p70 ซึ่งทั้งหมดที่กล่าวมามีส่วนสำคัญในการ priming naïve CD4+ และ CD8+ T cells ที่ lymph node [54]

ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่า DC มีบทบาทในการจดจำ Ag และตอบสนองต่อการติดเชื้อ HPV ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกพบว่าเซลล์ที่ตายจากสภาวะปกติของ epithelium จะถูกกินโดย LC จากนั้นเซลล์นี้จะหลั่ง immunosuppressive cytokines ได้แก่ TGF- β IL-10 และ IL-13 [55-57]

HPV E7 protein สามารถยับยั้งการทำงานของ IFN- α โดยการยับยั้งการแสดงออกของ inducible target gene ของ interferon (IFN) regulatory factors (IRF)-1 ได้แก่ transporter for antigen presentation (TAP-1) IFN- β monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อ cellular immunity ทำให้ไม่มีการ inflammation ในบริเวณที่ติดเชื้อ [44] ซึ่งส่งผลให้ไม่มีการสร้าง inflammatory cytokines ด้วย โดยปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นทำให้ไปยับยั้งการ maturation ของ DC ซึ่งส่งผลต่อการกระตุ้น cytotoxic lymphocyte (CTL) ทำให้ไม่มี CTL มากำจัดเซลล์ที่มีการติดเชื้อได้ นอกจากนั้นการติดเชื้อ HPV ยังยับยั้งการกระตุ้น LC อีกด้วย ทำให้เกิดการติดเชื้อแบบ persistent และ latent infections [58]

ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกพบว่าการลดลงหรือไม่พบว่ามี LC ในบริเวณรอยโรคที่ผิวหนังและ mucous membrane นอกจากนั้น ยังพบว่า epidermal LC และ dermal DC มีการเปลี่ยนแปลง morphology, การกระจายตัว และ immunophenotypes โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับ DC นี้ อาจเกิดเนื่องมาจากไวรัส อีกทั้งยังมีรายงานการไม่พบ human leukocyte antigen DQ (HLA-DQ) และพบ HLA-DR น้อยใน keratinocyte ที่บริเวณรอยโรคด้วย [59] การเปลี่ยนแปลงไปของ mucosal immunity ที่บริเวณปากมดลูกมีผลต่อการพัฒนาของระดับ CIN ในมะเร็งปากมดลูก ในรอยโรคระดับ CIN I ซึ่งอาจหาเจอได้นั้นพบว่ามี CD4+ T cells มากในบริเวณ stroma และมี CD4/CD8 ratio สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ progressive CIN I CIN 3 และ invasive carcinoma พบว่า CD8+ และ CD45RO+ cells นั้นอยู่ไกลออกไปมากกว่า CD4+ cells ใน invasive cancer [60] การเกิด regression ของ low-risk HPV-induced genital warts นั้นเกิดจาก CD4+ T cells ในบริเวณรอยโรค โดยการตอบสนองต่อ E6 และ E7 นั้นพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับ IFN- γ และ IL-5 ที่สร้างโดย CD4+ cells ในสตรีปกติ [61]

ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกนั้น พบว่ามีการขาดหายไปของ HLA I ใน tumor cells อีกทั้งยังพบว่าการลดลงของ E6 และ E7 HPV specific T cell เมื่อไม่มีการตอบสนองของ T cell แล้วทำให้เกิดภาวะที่เหมาะสมต่อการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของไวรัสในบริเวณรอยโรค [62]

Chemokines และ chemokine recptore มีบทบาทสำคัญในการเรียก lymphocytes มายังบริเวณที่ติดเชื้อ ซึ่ง CCR ที่สำคัญได้แก่ CCR7 ที่ทำหน้าที่ในการเรียก T cells จาก peripheral tissue ไปยัง lymph node การแสดงออกของ CD45RA บน T cells เกี่ยวข้องกับการเป็น marker ของการ differentiation ที่สมบูรณ์ของ T cells และการเป็น effector memory cell [63]

HPV16 E6 จะไปกระตุ้น CD8+ T cells โดยเฉพาะในกลุ่ม suppopulation CD45RA+CCR7+ T cells ซึ่งเป็น tumor-infiltrating lymphocyte (TIL), peripheral blood lymphocyte (PBL) และ T cells ที่มาจาก lymph nodes ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก HPV antigen-reactive T cells ที่เป็น CD45RA+ CCR7+ นั้นเป็น T cells ที่สูญเสีย function ไป แม้ว่าจะมีการสร้าง IFN- γ เพื่อตอบสนองต่อ HPV Ag ก็ตาม [63]

จากการศึกษาหา T cells ที่อยู่ในบริเวณปากมดลูกและจาก lymph node พบว่ามี HPV16 หรือ HPV18-specific E6 และ E7 CD4+ และ CD8+ T cells อยู่ อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่ของ CD4+ T cell epitope จะถูกนำเสนอโดย HLA-DQ และ HLA-DP ซึ่งไม่มีการแสดงออกที่ผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ [64]

NK cells และ CTL มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสและเซลล์มะเร็ง โดยผ่านทางกระบวนการ NKG2D receptor ส่งผลให้เกิดการ lysis ของเซลล์ที่จับกับ MHC class I-related chain A (MICA) proteins เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดของ lymphocytes ที่ได้จากเนื้อเยื่อของมะเร็งปากมดลูก ก็พบว่าจำนวนของ NK cell มีน้อยเมื่อเทียบกับสตรีปกติ [65] การมี MICA ในซีรัมเพิ่มขึ้นนั้นสามารถลดการทำงานของ NK และ DC cells [66] โดยพบว่าในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกและกลุ่ม precancerous lesion จะมีปริมาณของ soluble MICA ในซีรัมสูงเมื่อเทียบกับสตรีปกติเช่นกัน การลดลงของ NKG2D-expressing NK และ T cells พบได้ทั้งในกลุ่มของมะเร็งปากมดลูกและกลุ่ม CIN [67] การที่ไม่มีการแสดงออกของ MHC I ร่วมกับ activating NK cell receptor ligands ทำให้ tumor cells มีความ susceptible ต่อการจับของ NK cells และทำให้ NK cells สามารถทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อได้ [68, 69]

อย่างไรก็ตามผลของการติดเชื้อ HPV ต่อการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงระดับ cytokines และ chemokines โดยโปรตีนชนิดต่างๆของไวรัสในเซลล์ติดเชื้อมีผลต่อการ recruitment ของ LC และ DC และกระตุ้นเซลล์ในระบบ adaptive ยังมีรายงานน้อย

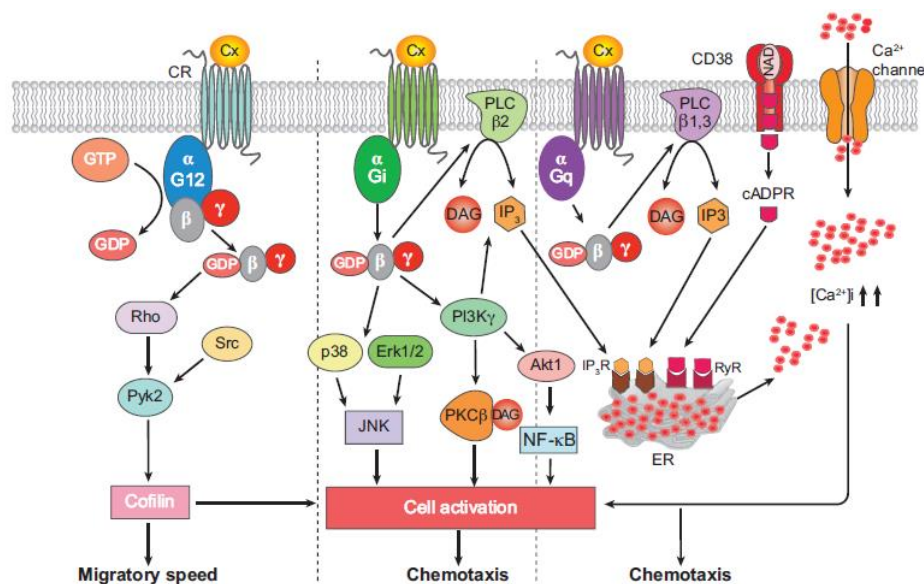
การ recruitment ของ DC และ LC

เมื่อเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน DC จะมีการเดินทางไปยัง secondary lymphoid organs (spleen และ lymph nodes) จึงเกิดเป็นคำถามว่าการเดินทางของ DC เกิดขึ้นได้อย่างไร แม้ว่า spleen นั้นเป็นอวัยวะที่มีการศึกษากันกว้างขวางในสัตว์ทดลอง แต่กลไกในการเดินทางของ precursor DC ไปยัง spleen ยังไม่สามารถระบุแน่ชัดได้ โดย spleen นั้นมีลักษณะทาง anatomy ที่เหมาะสมในการเป็นแหล่งของ DC [70] แต่กลับพบว่า DC precursure นั้นมักมาจากกระแสเลือด แล้วเข้าไปยัง spleen ที่บริเวณ marginal zone เพื่อพัฒนาไปเป็น conventional immature DCs (CD8a- และ CD8a+ DC subpopulations) [71] DC ไม่ได้มาจาก monocytes ที่อยู่ใน spleen แต่มาจาก blood precursure อื่นๆ ที่ยากต่อการตรวจพบเพราะมีจำนวนน้อย แล้วจากนั้น เมื่อ DC precursure เข้าไปใน spleen แล้วก็ยังไม่มียารายงานรายละเอียด โดยทราบเพียงว่า immature DC นั้นจะอยู่ในบริเวณ marginal zone ในระหว่างที่เกิดการ maturation/terminal activation แล้ว DC จะเคลื่อนที่จาก marginal zone ไปยัง T cell zone ของ splenic white pulp ซึ่งเกิดจากการ upregulate ของ CCR7 เพื่อตอบสนองต่อ CCR7 ligands (CCL19 และ CCL21) ที่อยู่ในบริเวณนั้น [72-74] ในกรณีที่ไม่มี receptor-ligand interaction จะพบ DC กระจายอยู่นอก white pulp หรือที่ marginal zone

[73, 74] การเคลื่อนที่ของเซลล์มีลักษณะคล้ายกันในเซลล์แต่ละชนิด โดยจะตอบสนองต่อ chemokine ที่ภายนอกในการเรียกให้เซลล์เคลื่อนตัวไป [75] มีการศึกษาเกี่ยวกับ intracellular pathway และ signaling molecule ที่อยู่ downstream ของ CCR ใน DC [76] ก่อนถูกกระตุ้น conventional myeloid DC จะอยู่ที่ peripheral organs และมีการแสดงออกของ CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 และ CXCR4 ซึ่งการแสดงออกของ CCR บนผิวเซลล์อาจแตกต่างกันในแต่ละ subset ของ DC เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Ag จาก pathogen หรือ endogenous danger-associated signaling molecules จะทำให้ DC เปลี่ยนแปลงไปมีคุณสมบัติเป็น migratory phenotype คือมีการ upregulate ของ CCR7 และมีการแสดงออกของ receptor ที่เกี่ยวข้องกับการ maturation ได้แก่ CD40, CD80, CD86 และ MHC II และจากที่กล่าวมาพบว่า G protein-coupled receptor CCR7 นั้นมีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนที่ของ DC ไปยัง lymphoid organ ซึ่งเป็นที่อยู่ของ T cells [77] แต่การแสดงออกของ CCR7 เพียงอย่างเดียวก็ไม่เพียงพอต่อการเคลื่อนที่ของ DC ไปยัง lymphoid organ จึงต้องมีปัจจัยอื่นในการส่งเสริมการเคลื่อนที่ของ DC เมื่อเกิดการตอบสนองต่อการติดเชื้อด้วย [76]

Signaling pathway ที่เกี่ยวกับการ migration ของ DC

การเคลื่อนที่ของ DC จะเกิดการส่งสัญญาณผ่านทาง CCR7 และทำให้มีการควบคุมการเคลื่อนที่ (chemotaxis) โดย CCR7 จะมีหน้าที่เป็น polyfunctional signal transduction โดยมี signaling pathway ที่ควบคุมการเคลื่อนที่ โดย chemokine ligand ที่จะมาจับกับ CCR7 ได้แก่ CCL19 และ CCL21 แล้วเกิดการกระตุ้น G protein-coupled receptors ที่จับอยู่กับ CCR7 แล้วเกิดการส่งผ่าน intracellular signals โดย classical G protein-dependent mechanism จะเกี่ยวข้องกับ alpha (α) subunit และ heterotrimeric G protein ของ beta และ gamma dimer ($\beta\gamma$) [78, 79] โดย alpha subunit นั้นมี 4 families คือ $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ และ $G\alpha_{12}$ แต่ละ family ประกอบด้วยสมาชิกที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดความหลากหลายของ chemokine receptor-mediated signaling [80] chemotaxis นั้นถูกควบคุมโดย $G\alpha_i$ subfamily ซึ่งประกอบด้วย $G\alpha_{12}$, β และ γ ซึ่งการกระตุ้น $G\alpha_i$ นั้นจะเกิดจากการที่ GTP ไปจับที่ $G\alpha_{12}$ แล้วทำให้ปล่อย $\beta\gamma$ ออกมา จากนั้นจึงเริ่มการส่งสัญญาณของ chemokine receptor signaling cascade [75] ดังรูปที่ 4 [81]



รูปที่ 4 signaling pathway ของ chemokine receptor-mediated signaling [81]

จากนั้น $\beta\gamma$ ที่ปล่อยออกมาจะไปกระตุ้น PI3K ซึ่งจะควบคุมใน Akt pathway และมีบทบาทสำคัญในการควบคุม chemotaxis ของ leukocytes เช่น DC เป็นต้น [82, 83] PI3K/Akt และ transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B) จะไปควบคุม CCR7-independent DC survival ด้วย [84, 85] ใน model นี้ยังพบว่า $\beta\gamma$ ที่มาจาก G α i ยังไป trigger signal transduction ผ่านทาง mitogen-activated protein kinase (MAPK) family member p38, ERK1/2 และ JNK ในขณะที่ Cdc42 และ Rac จะไปเกี่ยวข้องกับการเกิด cytoskeletal rearrangement ทำให้เกิด cell motility [83, 84, 86]

การศึกษาบทบาทของ chemokines ต่อการกำจัดเซลล์มะเร็ง

Organ-specific homing ของ leukocytes ถูกควบคุมโดย small cytokine-like soluble proteins เรียกว่า chemokines ภายใต้สภาวะ homeostatic และ inflammation [87] เมื่อไม่นานได้มีการพบ skin-associated chemokine CCL27/CTACK ซึ่งสร้างจาก epidermal keratinocytes และมีบทบาทในการ recruitment ของ skin-homing CCR10 memory T cells ไปยัง cutaneous sites [88] นอกจากนั้น CCL27 ยังสัมพันธ์กับการ recruitment ของ กลุ่มของ specific T cell ไปยัง skin ในระหว่าง immune surveillance [89, 90] อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาพบว่า human skin tumors สามารถหลบหลีก T cell-mediated antitumor immune responses ได้โดย down-regulate การ expression skin-specific homeostatic chemokine CCL27 ผ่านการกระตุ้น epidermal growth factor receptor (EGFR) และ Ras signaling pathways [91]

Dendritic cells (DCs) เป็น professional antigen-presenting cells ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการนำเสนอ antigens ให้กับ T cells ให้กลายเป็น activated-T cells โดย immature DCs มีความสามารถในการ uptake antigen และ processing antigen สูง แต่มีความสามารถในการ priming T cells ต่ำ ในทางตรงกันข้าม mature DCs จะ express HLA และ co-stimulating molecules ในระดับสูง จึงทำให้สามารถนำเสนอ antigens และกระตุ้น T cells ได้อีกหนึ่งคุณสมบัติของการ maturation ของ DCs คือ การเพิ่มความสามารถในการ migrate ไปยัง lymphoid organ [92] โดยความสามารถในการเดินทางไปยัง lymphoid organs ของ DCs นั้นจะขึ้นอยู่กับ chemokine-chemokine receptor และมี chemokines มากกว่า 20 ชนิดใน CCL family เช่น CCL19 และ CCL21 ที่มีผลต่อการ recruitment เฉพาะ mature DCs, monocytes และ lymphocytes แต่ไม่มีผลต่อการ recruitment ของ immature DCs ที่มาจาก monocyte หรือ CD34+ precursors [93, 94]

นอกจาก chemokines ที่กล่าวมาแล้วยังมีการศึกษาการแสดงออกของ macrophage migration inhibitory factor (MIF) ในมะเร็งหลายชนิด ซึ่ง MIF มีบทบาทสำคัญในการเป็น proinflammatory cytokine และส่งเสริมการเจริญของเซลล์มะเร็ง (review in [95]) โดยพบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MIF กับ cox2 ซึ่งเมื่อ block cox2 expression แล้วการแสดงออกของ MIF จะลดลงด้วยในขณะที่การแสดงออกของ cox2 ซึ่งเป็น enzyme ที่มีความสำคัญในการสร้าง PGE2 นั้นจะสร้างเมื่อถูกกระตุ้นด้วย MIF ใน ectopic endometrial cells ผ่านทาง p38 kinase [96] นอกจากนั้นมีการศึกษาการแสดงออกของ MIF ในมะเร็งเต้านมพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ EGFR และ MEK pathway โดยพบว่าการกระตุ้น EGFR จะทำให้ MIF มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น [97] และในมะเร็งปากมดลูกพบว่าระดับการแสดงออกของ MIF เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์กลายเป็นมะเร็ง [98] ซึ่งการแสดงออกของ MIF ที่สูงในเซลล์ที่เป็นมะเร็งนั้นอาจเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน และส่งเสริมการเป็นมะเร็งได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของ HPV ที่มีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของ MIF ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบกลไกของการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของไวรัสต่อไป

CCL27 และ TNF-alpha

นอกจาก chemokines ที่กล่าวมาแล้ว ยังมี CCL27 ซึ่งเป็น chemokine ที่เพิ่งค้นพบได้ไม่นาน โดย CCL27 จะสร้างจาก keratinocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF-alpha โดยผ่าน activity ของ transcription factor NF- κ B มีหน้าที่ในการ recruitment immune cell หลายชนิด ได้แก่ natural killer cells และ cutaneous-T lymphocytes มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ [99, 100] CCL27 นั้นจัดเป็น proinflammatory mediators ซึ่งมี CCR10 เป็น chemokine receptor [101] นอกจากนี้ยังพบว่า CCL27 มีบทบาทในการ recruitment DCs ซึ่งเป็น professional antigen presenting cells ซึ่ง CCR10 นั้นจะมีการ express ระดับต่ำๆ ใน immature DCs แต่จะพบว่าการ expression จะเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LIGHT ซึ่งอยู่ในกลุ่ม TNF family ส่งผลให้เกิดการ migration ของ DCs มายังบริเวณที่เกิดการติดเชื้อได้ [102]

ได้มีการศึกษาใน cervical carcinoma พบว่าการแสดงออกของ TNF-alpha ลดลงสัมพันธ์กับภาวะความรุนแรงของโรค ซึ่งการแสดงออกของยีนที่ลดลงนี้ไม่สัมพันธ์กับการ inactivating mutations หรือ promoter methylation[103] ดังนั้นแนวทางการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง TNF-alpha down-regulation ใน cervical cancer ที่ส่งผลต่อการ expression ของ CCL27 และ HPV persistent infection จึงยังคงต้องศึกษาต่อไป

จากข้อมูลดังกล่าวกลุ่มการศึกษานี้ได้สนใจในบทบาทของ HPV16E2 protein ซึ่งในปัจจุบันพบมีคุณสมบัติสามารถจับกับ promoter ของ transcriptional active cell รวมถึงความสามารถในการแย่งจับกับ promoter โดยการแทนที่ cellular transcription factor ทำให้ suppress การ expression ของ host gene

ความสำคัญของ HPV E2 protein (E2 regulate host gene expressin, protein interaction)

E2 protein เป็นโปรตีนที่มีการสร้างได้ในทุกช่วงของ HPV life cycle มีขนาด 300 amino acids ประกอบด้วย N-terminal transactivation domain (TAD) และ C-terminal dimerization DNA binding domain (DBD) คั่นกลางด้วย proline-rich hinge region ในแต่ละส่วนมีหน้าที่ต่างกันโดย TAD จะทำปฏิกิริยากับ viral protein E1 และ transcription factors protein ของโฮสต์เช่น Brd4, AP1, TFIIB เป็นต้น มีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ E6/E7 ส่วน DBD จะ form dimer และจับกับ DNA ที่ DNA binding site บน LCR ส่วน hinge region จะเป็นส่วนที่ทำให้เกิดภาวะเสถียรและนำโปรตีนเข้าในนิวเคลียส E2 จึงเป็น key regulator ของ viral DNA replication, viral gene expression, และ viral genome maintenance

ความสำคัญของ E2 protein ต่อ viral replication ได้มีการศึกษาและทราบหน้าที่ชัดเจนแล้วว่า E2 จะไปจับที่ promoter-proximal sites และ recruit E1 มาที่ตำแหน่ง original of replication (ori) ขณะที่ความสำคัญในการควบคุม transcription ยังมีข้ออธิบายได้น้อย พบว่า E2-DBD สามารถจับที่ E2-responsive elements ซึ่งเป็น specific palindromic sequences (ACCN₆GGT) ที่บริเวณ LCR ของ viral genome ซึ่งมี 4 ตำแหน่ง [104] เมื่อ E2 protein ไปจับที่ E2-responsive element จะเกิดการกระตุ้นหรือยับยั้งการเกิด gene transcription จาก viral early และ late promoters ขึ้นกับตำแหน่งในการจับ [105] จะสามารถควบคุมและส่งเสริมการ transcription การแสดงออกของ E6/E7 ซึ่งกลไกดังกล่าวยังไม่ชัดเจน

พบว่า E2 protein ของ papillomaviruses แต่ละ type จะมีโครงสร้างและหน้าที่เหมือนกัน การศึกษาในปัจจุบันพบว่า N-terminal TAD ของ E2 protein มีความสำคัญในการจับกับโปรตีนของไวรัสและของเซลล์ได้หลากหลายมากขึ้น การจับกับโปรตีนของไวรัสได้แก่ E1, L2, E6, E7 และจับกับโปรตีนโฮสต์เช่น TBP, Sp1, p53, TFIIB, GPS2/AMF-1, MKlp2, CHIR1, Brd4, Brahma, NAP-1, p300/CBP และ p/CAF [106-114]

ผลของ E2 protein ใน HPV-transformed cells พบการจับกันระหว่าง p53 (tumor suppressor protein) และ E2 จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง viral replication และ transcriptional activity ของ E2 เช่นเดียวกับถ้า E2 จับกับ

topoisomerase II binding protein 1(TopBP1) จะส่งผลต่อการควบคุม replication และ transcription ได้ และ E2 ยังสามารถกระตุ้น cell apoptosis ได้หลาย pathway มีรายงานว่า HPV18 E2 สามารถจับกับ Tax1BP1 และป้องกันการเกิด proteasome degradation ของ E2 protein ทำให้ E2 protein มี half-life ที่ยาวนานขึ้น [115]

ผลของ E2 protein ในเซลล์ที่ติดเชื้อและเซลล์มะเร็ง พบว่าในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV และกลายเป็นมะเร็ง พบการ interaction ระหว่าง E2 protein กับ cellular proteins หลายชนิด เช่น cellular bromodomain protein Brd4 เพื่อทำหน้าที่ แบ่งแยก viral genome ไปตามการแบ่งเซลล์จับกับ chromatin และ promotor ของ active gene ในนิวเคลียส [116] E2-DBD จับกับ E6 จะยับยั้งการย่อยสลาย PDZ protein แต่ไม่ยับยั้งการย่อยสลาย p53 โดย E2 มีผลขัดขวาง transformation activity ของ E6 ได้ [117] เช่นเดียวกับที่ E2 hing region จับกับ E7 จะมีผลเพิ่ม stability E7 แต่ลด transformation activity ของ E7 แสดงว่าถ้าไม่มี E2 จะทำให้มีการเกิดมะเร็งมากขึ้น [118] โดยเฉพาะผลของ E2 ที่สามารถกระตุ้นเซลล์ apoptosis เกิดขึ้นได้หลายทาง และการที่ E2 protein สามารถจับกับโฮสต์โปรตีน Cdh1 และ Cdc20 อาจส่งผลให้ viral genome integration เกิดขึ้นซึ่งขบวนการดังกล่าวยังไม่สามารถอธิบายได้ในปัจจุบัน [119]

เมื่อไม่นานนี้มีรายงานการควบคุมการแสดงออกของ cellular gene โดย HPV E2 protein เป็นครั้งแรก โดยพบว่า HPV8 E2 protein สามารถ down-regulate β 4-integrin expression ใน normal human keratinocytes โดยการ displacement AP-1 cellular transcriptional factor จาก β 4-integrin promoter [120]

นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบว่า E8⁺E2C ประกอบด้วย HPV31 E2 ส่วนปลาย c-terminal ที่เกิด alternative splicing ไปรวมกับส่วนของ E1 มีความสามารถในการจับกับ cellular chromodomain helicase DNA binding domain 6 (CHD6) protein แล้วทำให้เกิดการ repression ของ HPV E6/E7 promoter ได้ [121]

จากความสามารถของ E2 protein ในการจับโปรตีนและ promoter ของ gene ดังที่กล่าวมาแล้ว จึงคาดว่า E2 protein อาจมีบทบาทสำคัญในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของไวรัสโดยการยับยั้งการแสดงออกของ gene ในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ไม่เกิดการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อ และเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิด persistent infection ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้

3. วิธีดำเนินงานวิจัย (Methods)

3.1 ตัวอย่างในการศึกษา

Clinical specimens เป็น cervical fresh tissue biopsy ได้รับมาจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยแบ่งเป็น normal 10 cases, LSIL 30 cases, HSIL 30 cases และ SCC 10 cases โดยส่วนหนึ่งของ clinical specimens ได้มาจากการศึกษาในโครงการวิจัยเรื่อง “ความสำคัญของการแทรกตัวของ Human papillomavirus DNA ในจีโนมของโฮสต์ และผลทางชีววิทยาที่เกิดขึ้น” ของนายอาคม ไชยวงศ์คต ซึ่งได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์แล้ว

3.2 การสกัด DNA และ RNA

สกัด DNA/RNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อชนิด fresh tissue biopsy โดยใช้ AllPrep DNA/RNA mini kit ตามวิธีการดังนี้ Lyse และ homogenize biopsies ใน highly denaturing guanidine-

isothiocyanate-containing buffer ซึ่งจะ inactivates DNases และ RNases นำ cell lysate ใส่ใน AllPrep DNA spin column ซึ่งประกอบด้วย high-salt buffer เพื่อแยก genomic DNA จากนั้นล้าง และ elute DNA เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบหาการติดเชื้อ HPV

หลังจากได้ DNA แล้วนำไปสกัด RNA แล้วเติม ethanol แล้วใส่ลงใน RNeasy spin column เมื่อ total RNA จับที่ membrane จากนั้นล้างและ elute RNA เก็บ extracted DNA และ extracted RNA ไว้ที่ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้เพื่อตรวจการแสดงออกของ TNF-alpha และ MIF

3.3 การตรวจหาการติดเชื้อ HPV ใน extracted DNA จาก clinical specimens

ตรวจหา HPV DNA ด้วยวิธี PCR- based method โดยใช้ general GP5+/6+ primers[123] เพื่อ amplify HPV DNA ซึ่ง reaction ประกอบด้วย PCR buffer, MgCl_2 , dNTP, GP5+ primer, GP6+ primer, Taq DNA polymerase, DW, Sample หรือ HeLa DNA เป็น positive control หรือ DW เป็น negative control ปริมาตรรวม 25 μl โดยใช้ Condition ดังนี้ Pre- denature 94°C 4 นาที 1 รอบ, denature step 94°C 1 นาที, annealing step 42°C 1 นาที, extension 72°C 0.30 นาที 40 รอบ และ complete extension 72°C 4 นาที 1 รอบ และเก็บที่ 4°C [124] Run gel 2 % 100 V 27 นาที ขนาดของ PCR product คือ 150 bps และตรวจหาการมีอยู่ของ human genomic DNA เพื่อเป็น control ของการสกัด DNA จาก samples FFPE ด้วยวิธี PCR based method โดยใช้ human *B-globin* gene consensus PCO4/GH2O primer ซึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วย PCR buffer, MgCl_2 , dNTP, PCO4 primer, GH2O primer, Taq DNA polymerase, DW และ sample ปริมาตรรวม 25 μl โดยใช้ condition คือ Pre-denature 95°C 5 นาที 1 รอบ, denature step 95°C 1 นาที, annealing step 55°C 1 min, extension 72°C 1 นาที 40 รอบ และ complete extension 72°C 10 นาที 1 รอบ และเก็บที่ 4°C Run gel 1.5 % 100 V 27 นาที

นำ DNA ของตัวอย่างที่ตรวจพบ HPV DNA มาตรวจ genotype โดยวิธี reverse line blot hybridization (RLBH) โดยเตรียม membrane bio-dye C และเตรียม load probe สำหรับ HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45b, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 71 CP8106, 72, 73, 81 CP3804, 82 MM4, 82 IS39, 83 MM7, 84 MM8, CP 6108 ลงใน mini blotter จากนั้นเตรียม PCR product label biotin โดยนำ samples ที่ HPV positive โดยวิธี PCR มาทำการ typing โดยทำการติดฉลาก PCR product ด้วย biotin โดยใช้ GP6+biotin primer เพิ่มจำนวน HPV DNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และใช้ PCR product label biotin ของ plasmid HPV เพื่อเป็น positive control ในการทำ RLBH ของ HPV แต่ละ type จากนั้น dilute PCR product label biotin ของ plasmid control ของ RLBH เติม 2XSSPE 0.1%SDS, ต้มในน้ำเดือดและ แช่น้ำแข็งทันที โหลด sample, positive, Negative PCR product, buffer (negative control ของ RLBH), plasmid control (positive control ของ RLBH) บ่ม แล้วล้าง จากนั้น Detection of hybridization signal โดยใช้ enzyme SA-POD (SA-HRP) และ substrate จากนั้น

ประกบฟิล์ม แล้วล้างฟิล์ม ถ้าเกิดการ hybridize ของ PCR product label biotin กับ probe ของ HPV แต่ละ type Streptavidin peroxidase จะสามารถจับกับ biotin และ peroxidase จะสามารถย่อย hydrogen peroxide และ luminol ทำให้เกิด product และ producing light ซึ่งจะมองเห็นเป็นจุดสีเหลืองสีดำบนฟิล์ม[125]

3.4 การตรวจหาระดับการแสดงออกของ TNF-alpha และ MIF และการแสดงออกของ HPV16E2 gene

ใน extracted RNA จาก fresh tissue biopsy โดย relative quantitative real time PCR [100]

นำ total RNA ที่ได้จากการสกัดจากชิ้นเนื้อมาทำ reverse transcriptase PCR (RT-PCR) เพื่อให้ได้ cDNA โดยใช้ SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR ซึ่งใช้ oligo(dT) primer

นำ cDNA ที่ได้มาทำ real-time PCR โดยใช้ SYBR® Green qPCR SuperMix Universal เพื่อหา MIF และ TNF alpha และการแสดงออกของ HPV16E2 gene โดยใช้ beta-actin RNA เป็น housekeeping gene

Positive control ของ MIF ได้จากการสกัด RNA จาก SiHa cell line จากนั้นสกัด RNA โดยใช้ TRIZOL RNA isolation method และทำ real time -PCR ทำการทดลองเพื่อสร้าง standard curve เพื่อตรวจหาปริมาณของการแสดงออกของ gene MIF

Positive control ของ TNF-alpha ได้จากการสกัด RNA จาก PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย phytohemagglutinin (PHA) จากนั้นสกัด RNA โดยใช้ TRIZOL RNA isolation method และทำ real time -PCR ทำการทดลองเพื่อสร้าง standard curve เพื่อตรวจหาปริมาณของการแสดงออกของ gene TNF-alpha

Positive control ของ HPV16E2 gene ได้จากการสกัด RNA จาก CaSki cell lines (HPV16 genome positive cell line) จากนั้นสกัด RNA โดยใช้ TRIZOL RNA isolation method และทำ real time PCR ทำการทดลองเพื่อสร้าง standard curve เพื่อตรวจหาปริมาณของการแสดงออกของ HPV16E2 gene

3.5 การเตรียม human primary keratinocyte และการ transduction

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ human primary keratinocyte ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Cn-T 57 (Clontech) จากนั้นทำการ transduction โดยการ infect เซลล์ด้วย adenovirus ที่มี GFP, GFP-HPV16E2, GFP-HPV18E2, GFP-HPV18E2TAD, และ GFP-HPV18E2DBD ที่ MOI = 50 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์เพื่อนำไปสกัด RNA และ โปรตีน เพื่อการทดลองต่อไป

โดย human primary keratinocyte ที่ใช้ในการทดลอง มี 3 ชนิด คือ neonatal keratinocyte ได้แก่ HPK และ adult keratinocyte คือ TB3 และ NUH49

เซลล์ immortalized keratinocyte N-tert ได้เพาะเลี้ยงใน Keratinocyte serum-free media (KSFM) (Invitrogen)

เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มี genome ของ HPV18 HeLa ได้เพาะเลี้ยงใน DMEM 10% fetal bovine serum

3.6 เตรียม RNA เพื่อการทำ microarray

ทำการ transduction โดยการ infect adenoviruses เข้าสู่ HPK cells ที่ MOI = 50 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสังเกตการแสดงออกของ GFP โดย fluorescence microscope จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการขูดเซลล์ด้วย cell scraper และทำการสกัด RNA โดย RNeasy mini kit (QIAGEN) วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA โดย Nanodrop spectrophotometer ND-100

3.7 วิเคราะห์หา RNA integrity number (RIN)

ทำการวิเคราะห์หา ค่า RIN ใน RNA ตัวอย่าง โดยใช้ Eukaryote Total RNA Nano 2.6 (Agilent Technology) โดยใช้ RNA ที่มีค่า RIN ตั้งแต่ 7-10 เพื่อการทำ microarray

การทำ microarray เริ่มโดยทำการเลเบล RNA จากตัวอย่างด้วย Illumina TotalPrep-96 RNA Amplification kit (Lot 1108030 – Aambion) จากนั้น cRNA ที่เลเบลแล้ว จำนวน 750 ng จะถูกนำไป hybridize กับ Human HT-12 v4.0 BeadChip และ incubate ที่ 58 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลา BeadChip ที่ถูก hybridize จะถูกนำมาล้างและย้อมตาม Illumina protocol และสแกนโดย iScan (Illumina)

4. ผลการวิจัย (Results)

4.1 การเตรียม DNA และ RNA จาก clinical specimens

Clinical specimens เป็น cervical fresh tissue biopsy ที่เก็บจากผู้ป่วยจำนวน 74 รายที่มารับการตรวจที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยแบ่งเป็น normal 18 ราย, LSIL 49 ราย และ HSIL-CA 7 ราย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลผู้ป่วยทั้ง 74 ราย พบว่ามีอายุเฉลี่ย 41 ปี โดยเมื่อจำแนกในกลุ่ม normal, LSIL, และ HSIL-CA มีอายุเฉลี่ย 41, 39, และ 45 ปี ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 1

นำตัวอย่าง cervical fresh tissue biopsy มาทำการสกัด DNA และ RNA โดย DNA ใช้สำหรับการตรวจ HPV DNA และ HPV genotype ส่วน RNA ใช้สำหรับตรวจหาการแสดงออกของยีนที่สนใจ โดยตรวจหาระดับการแสดงออกของ TNF-alpha, MIF และ HPV16E2 gene โดยวิธี relative quantitative real time PCR

ตารางที่ 1 อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยจำแนกตามรอยโรค

ระดับรอยโรค	อายุเฉลี่ย (ปี)	จำนวน
Normal	41	18
LSIL	39	49
HSIL-CA	45	7
Total	41	74

4.2 การตรวจ HPV DNA และ HPV genotype

การตรวจ HPV DNA และ HPV genotype ใช้วิธี PCR และ reverse line blot hybridization ตามลำดับ เมื่อได้ผล HPV genotype ตัวอย่างที่ตรวจพบ HPV16 มีทั้งหมด 49 ราย จัดกลุ่มตามระดับความรุนแรงของรอยโรคเป็น กลุ่ม normal, LSIL และ HSIL-CA ที่มี HPV16 positive จำนวน 11, 31 และ 7 รายตามลำดับ และ HPV16 negative ในกลุ่ม normal และ LSIL มี 7 และ 18 ราย ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การจำแนกกลุ่มผู้ป่วยตามรอยโรคและการตรวจพบ HPV16

ระดับรอยโรค	HPV16 positive	HPV16 negative	Total
Normal	11	7	18
LSIL	31	18	49
HSIL-CA	7	0	7

4.3 การตรวจระดับการแสดงออกของ MIF, TNF alpha และ HPV16 E2 gene

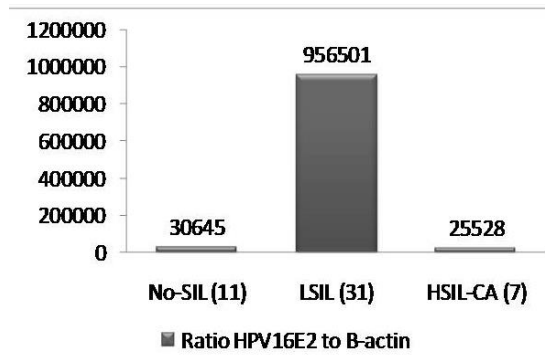
4.3.1 HPV16 E2 gene expression

การแสดงออกของ HPV16 E2 gene ในตัวอย่างผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPV16 แสดงในรูปที่ 1 พบว่าการแสดงออกของจีนระดับสูงในกลุ่ม LSIL ซึ่งเป็นระยะแรกของการติดเชื้อ HPV จึงเป็นการยืนยันการแสดงออกของ HPV16 E2 ซึ่งเป็น early gene ของ HPV

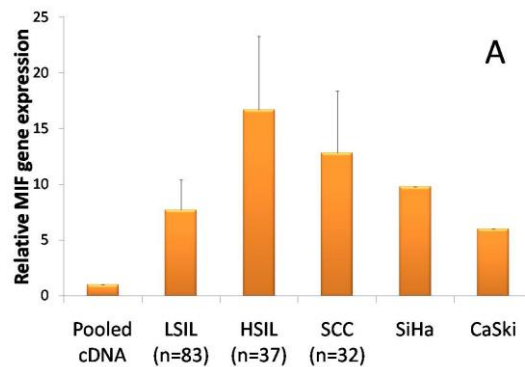
4.3.2 MIF gene expression

การตรวจวัดระดับการแสดงออกของ MIF gene ในตัวอย่างผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPV16 ได้ใช้จำนวนตัวอย่าง LSIL, HSIL และ SCC เพิ่มขึ้นคือ 83, 37 และ 32 รายตามลำดับ และใช้ pooled cDNA ของ No-SIL case เป็น calibrator

ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ MIF ใน LSIL, HSIL และ SCC มีการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อเทียบกับ No-SIL cases (รูปที่ 2)

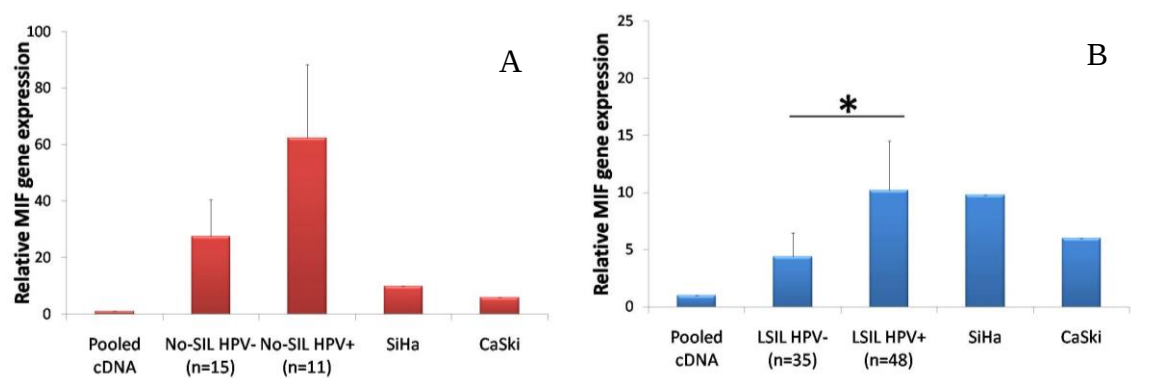


รูปที่ 1 การแสดงออกของ HPV16 E2 gene ในแต่ละรอยโรคที่มี HPV positive



รูปที่ 2 การแสดงออกของจีน MIF ใน clinical specimens ชนิด LSIL, HSIL และ SCC

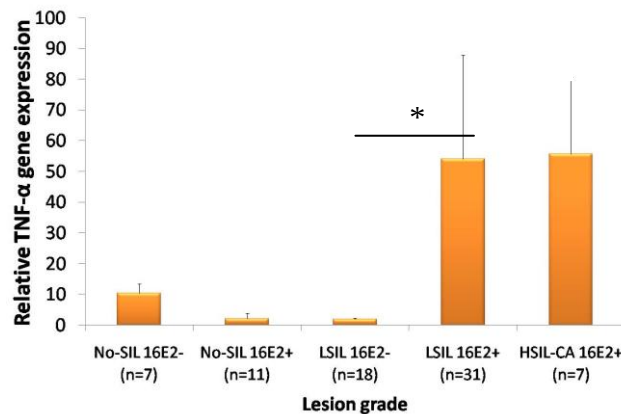
เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ MIF ใน HPV positive และ HPV negative cases พบว่าใน No-SIL HPV positive มีการแสดงออกของ MIF gene สูงกว่า No-SIL HPV negative ประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 3A) และพบว่าใน LSIL HPV positive การแสดงออกของ MIF ก็สูงกว่า LSIL HPV negative อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3B)



รูปที่ 3 การแสดงออกของจีน MIF ใน clinical specimens

4.3.3 TNF-alpha gene expression

ผลการศึกษาการแสดงออกของ TNF-alpha ใน clinical specimens พบว่าไม่เป็นไปตามระดับความรุนแรงของโรค และการแสดงออกของ TNF-alpha ใน LSIL cases พบว่าใน HPV positive cases นั้น TNF-alpha มีการแสดงออกของ gene แบบ up-regulate เมื่อเทียบกับ HPV negative cases อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4)



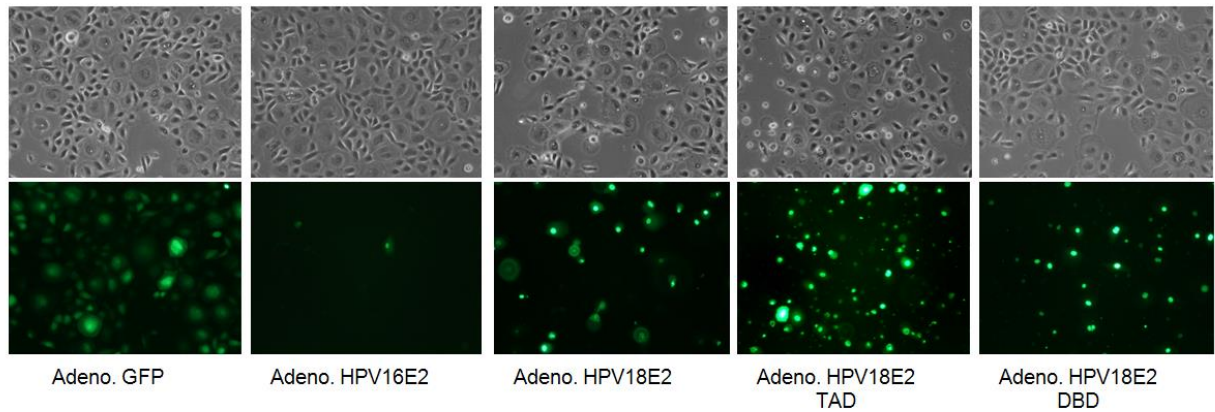
รูปที่ 4 การแสดงออกของ TNF-alpha ใน clinical specimens

4.4 การเพาะเลี้ยง human primary keratinocyte และการนำ HPV16E2 เข้าสู่เซลล์ human primary keratinocyte โดยใช้ recombinant adenovirus-HPV16E2 ที่มี GFP gene

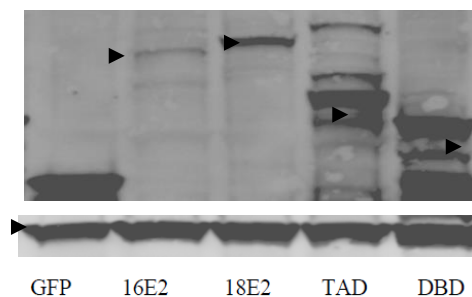
จากการศึกษาใน clinical specimen ทำให้ทราบว่า HPV16 E2 น่าจะมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ MIF และ TNF alpha จึงทำการศึกษาดังกล่าวในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูก transduced ให้มีการแสดงออกของ HPV16 E2 โดยการ transduction เซลล์เพาะเลี้ยง human primary keratinocytes (HPK) ด้วย recombinant adenovirus-HPV16 E2 ซึ่งมีจีน green fluorescence protein (GFP) สำหรับตรวจสอบว่ามี recombinant adenovirus-HPV16 E2 อยู่ภายในเซลล์

จากการ transduction ด้วย recombinant adenovirus, adenovirus-HPV16 E2, adenovirus-HPV18 E2, adenovirus-HPV18 E2-TAD และ adenovirus-HPV18 E2-DBD พบว่าระดับการแสดงออกของ GFP นั้นมีความใกล้เคียงกัน ยกเว้น adenovirus-HPV16E2 มีการแสดงออกของ GFP น้อยกว่า (รูปที่ 5)

การพิสูจน์ว่ามีเซลล์ที่มี recombinant adenovirus-HPV16 E2 อยู่ภายในเซลล์นั้นมีการแสดงออกของโปรตีน HPV E2 จริง ได้สกัดโปรตีนจากเซลล์ดังกล่าวมาตรวจสอบโดยวิธี western blot ดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่า adenovirus-HPV16E2 มีการแสดงออกของ E2 น้อยกว่า เช่นเดียวกับ GFP ในรูปที่ 5 แสดงว่าอาจจะมีปริมาณของ adenovirus ที่เข้าไปภายในเซลล์น้อยกว่าชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นผลจากปริมาณ adenovirus ที่ใช้ในการทดลองมีน้อยตั้งแต่ต้น

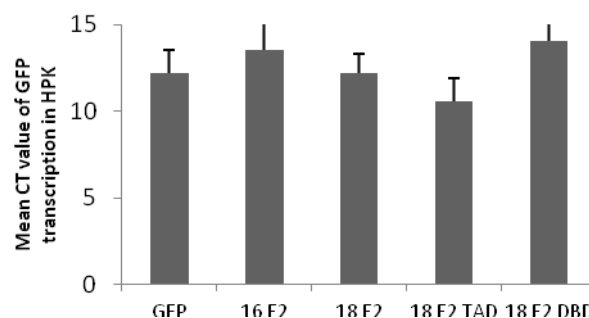


รูปที่ 5 HPK cells infected with recombinant adenovirus



รูปที่ 6 ผล western blotting ของ HPV E2 ใน HPK

อย่างไรก็ตามเมื่อสกัด RNA เพื่อตรวจดูการแสดงออกของ mRNA โดยการทำ real time PCR เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับของ mRNA พบว่าค่า CT value มีความใกล้เคียงกัน (รูปที่ 7) จึงได้ทำการศึกษาต่อไป

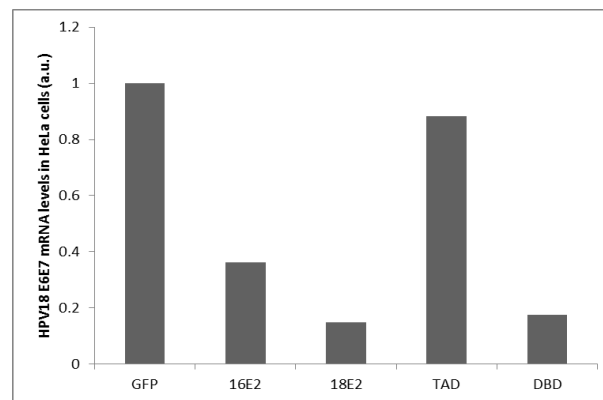


รูปที่ 7 ผลการแสดงออกของ GFP ซึ่งสัมพันธ์กับการแสดงออกของ HPV E2 ในรูปแบบต่างๆ ใน HPK

4.5 การประเมินการทำงานของ HPV E2 ที่ transduction สู่ HeLa cells

จากการศึกษาหน้าที่ของ HPV E2 ว่ายังคงมีการทำงานในการ suppress การแสดงออกของ HPV E6E7 หรือไม่ใน HeLa cells พบว่า HPV16E2, 18E2 และ 18E2DBD มีผลในการ suppress การแสดงออกของ HPV18 E6E7 ในขณะที่ HPV18E2TAD ไม่มีผล (รูปที่ 8) จึงสรุปได้ว่าการ transduction

HPV E2 ในรูปแบบต่างๆ นั้น HPV E2 ยังคงสามารถทำหน้าที่ได้อยู่ จึงได้นำ condition การ transduction ไปใช้ต่อไป



รูปที่ 8 การแสดงออกของจีน HPV18 E6E7 ใน HeLa cells ที่มี HPV E2

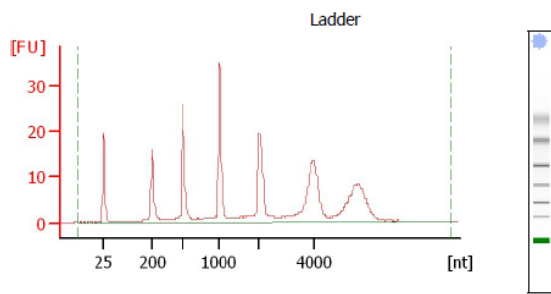
4.6 Microarray analysis

นำ RNA ที่สกัดได้จาก HPK ในการทดลองมาตรวจสอบคุณภาพได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 จากการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของ RNA ก่อนทำ microarray พบว่า RNA ที่ได้นั้นมีคุณภาพที่ดี โดย RIN score ที่เหมาะสมต่อการทำ microarray คือ 7-10 จึงได้ทำ microarray ต่อไป

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ค่า RNA integrity number (RIN score)

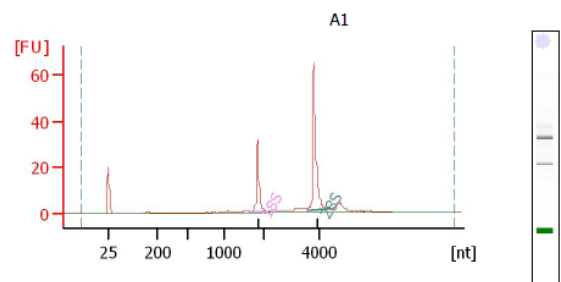
Sample	ng/ul	260/280	260/230	RIN score
HPK GFP 1	607.08	2.12	2.21	9.80
HPK GFP 2	586.72	2.10	2.21	10.00
HPK GFP 3	454.71	2.06	1.36	10.00
HPK GFP 4	562.07	2.12	2.19	9.70
HPK 16E2 1	400.02	2.05	2.15	9.50
HPK 16E2 2	585.03	2.10	2.19	9.40
HPK 16E2 3	418.77	2.08	1.21	10.00
HPK 16E2 4	382.06	2.06	2.15	9.50
HPK 18E2 1	389.90	2.06	1.83	9.60
HPK 18E2 2	412.33	2.06	2.07	10.00
HPK 18E2 3	386.50	2.07	1.75	10.00
HPK 18E2 4	460.72	2.06	1.99	9.80

Electropherogram Summary



Overall Results for Ladder

RNA Area: 263.5
 RNA Concentration: 150 ng/μl
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: All Other Samples



Overall Results for sample 1 : **A1**

RNA Area: 142.0
 RNA Concentration: 81 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.4
 RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (8.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.80

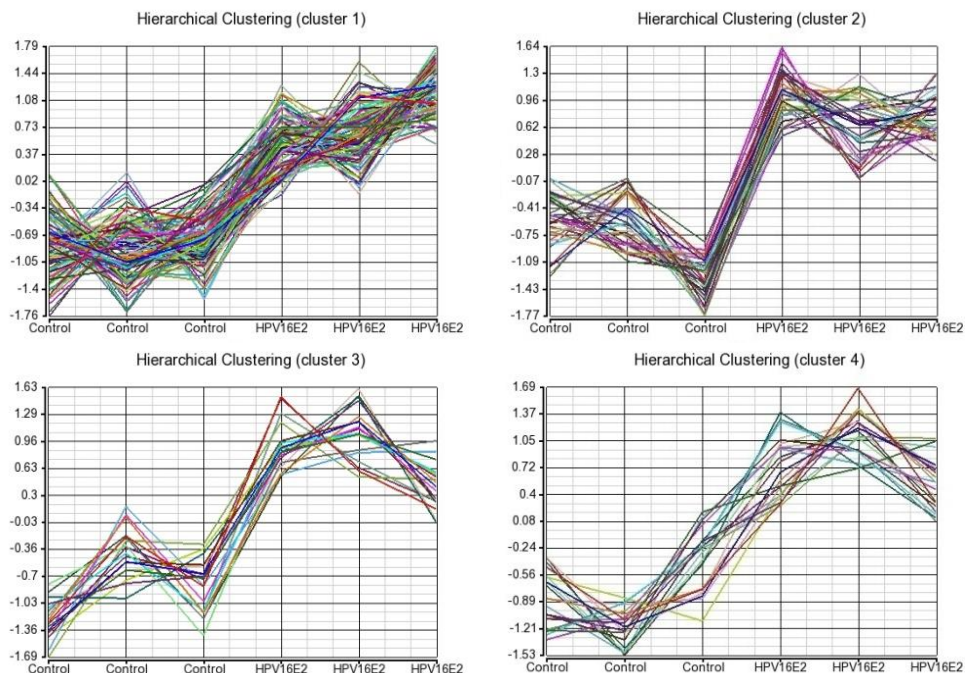
Fragment table for sample 1 : **A1**

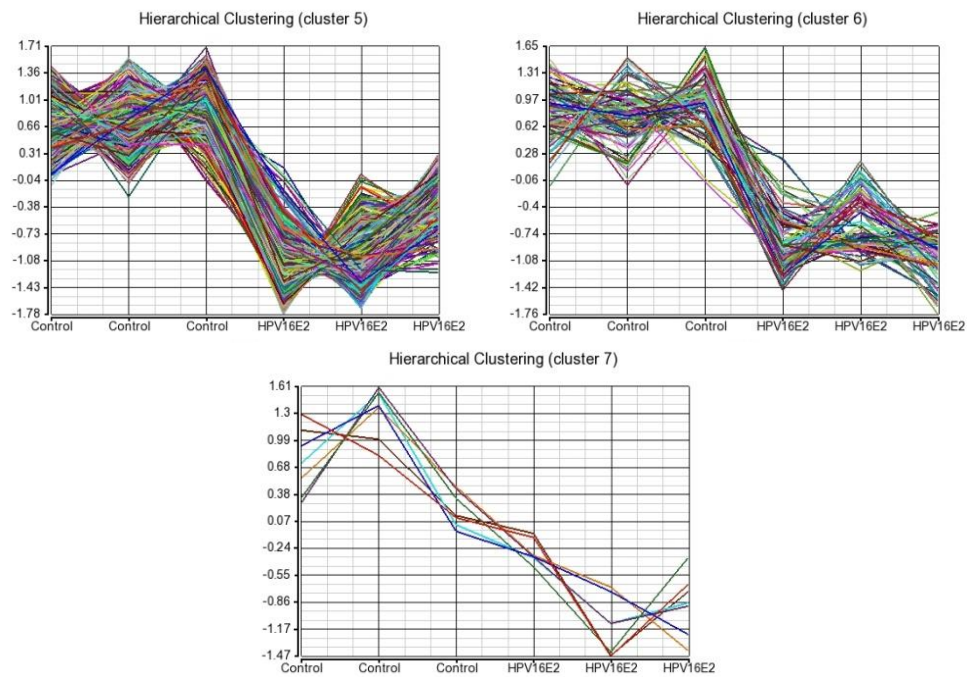
Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,679	2,112	29.1	20.5
28S	3,582	4,433	70.2	49.4

รูปที่ 9 ตัวอย่างของ Electropherogram ในการวิเคราะห์หาค่า RIN score

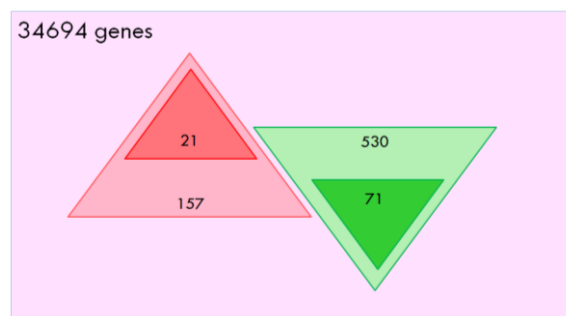
ผลการวิเคราะห์ microarray

เมื่อทำการวิเคราะห์ผล microarray ใน HPV16E2 เปรียบเทียบกับ GFP control โดยใช้ค่า cut-off คือ ± 1.5 แสดงเป็นแผนภูมิ one-directional hierarchical clustering พบว่ามีจีนทั้งหมด 779 จีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ HPK ที่มี HPV16E2 โดยได้ทำการแบ่งออกเป็น 7 cluster ดังแสดงในรูปที่ 10 โดยใน cluster ที่ 1-4 เป็นจีนในกลุ่ม up-regulated genes และใน cluster ที่ 5-7 เป็นจีนในกลุ่ม down-regulated genes จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ gene ontology เพื่อดูหน้าที่ของจีนและได้ทำการคัดเลือกจีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังแสดงในรูปที่ 11





รูปที่ 10 Profile plot ของแต่ละ cluster ที่ได้จากแผนภูมิ one-directional hierarchical clustering



รูปที่ 11 แผนภูมิแสดง up-regulated genes และ down-regulated genes ใน HPV16E2 vs GFP control

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย gene ontology พบว่ามี 21 up-regulated และ 71 down-regulated genes ที่เป็นจีนในกลุ่ม immune response associated genes

5. อภิปรายผล/วิจารณ์ (Discussion/Comment)

การแสดงออกของ MIF ใน Clinical specimens มีการแสดงออกสูงขึ้นเมื่อเทียบกับ No-SIL cases ซึ่งการแสดงออกของ MIF จะเพิ่มขึ้นตามระดับความรุนแรงของโรค

การแสดงออกของ MIF ใน No-SIL cases พบว่าใน No-SIL HPV positive มีการแสดงออกของ MIF gene สูงกว่า No-SIL HPV negative ประมาณ 2 เท่า และพบว่าใน LSIL HPV positive การแสดงออกของ MIF ก็สูงกว่า LSIL HPV negative อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การแสดงออกของ TNF-alpha ใน clinical specimens พบว่าไม่เป็นไปตามระดับความรุนแรงของโรค และการแสดงออกของ TNF-alpha ใน LSIL cases พบว่าใน HPV positive cases นั้น TNF-alpha มีการแสดงออกของ gene แบบ up-regulate เมื่อเทียบกับ HPV negative cases อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลจาก microarray พบว่า HPV16E2 มีผลในการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของจีนใน keratinocyte cell โดยพบ 779 จีนที่มีการเปลี่ยนแปลง และพบว่ามีจีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันจำนวน 92 จีน

6. สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ (Conclusion/Suggestion)

ผลการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ และได้ผลการแสดงออกของจีนโดยวิธี microarray ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาหน้าที่ของ HPV E2 ต่อ host cell ได้หลากหลายแนวทาง ซึ่งสามารถนำไปสู่การดำเนินการวิจัยต่อในปีที่ 2 ที่ 3 นอกจากนั้นผลการวิจัยนี้ยังนำไปสู่การค้นพบกลไกใหม่ของ HPV16 E2 ต่อการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay JPisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
2. Domingo EJ, Noviani R, Noor MR, Ngelangel CA, Limpaphayom KK, Thuan TV, et al. Epidemiology and prevention of cervical cancer in Indonesia, Malaysia, the Philippines, Thailand and Vietnam. *Vaccine* 2008; 26 Suppl 12: M71-9.
3. Keegan H, Mc Inerney J, Pilkington L, Gronn P, Silva I, Karlsen F, et al. Comparison of HPV detection technologies: Hybrid capture 2, PreTect HPV-Proofer and analysis of HPV DNA viral load in HPV16, HPV18 and HPV33 E6/E7 mRNA positive specimens. *J Virol Methods* 2009; 155(1): 61-6.
4. Hamid NA, Brown CGaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(10): 1700-17.
5. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HUzur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324(1): 17-27.
6. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1: S7-15.
7. Pfister HTer Schegget J. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol* 1997; 15(3): 335-47.
8. Wieland UPfister H, *Papillomavirus in human pathology: epidemiology, pathogenesis and oncogenic role*, in *Human papillomavirus infection. A clinical atlas*, G. GrossR. Barrasso, Editors. 1997, Ullstein-Mosby: Wiesbaden. 1-18.
9. zur Hausen Hde Villiers EM. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 427-47.
10. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(5): 342-50.
11. Gross GPfister H. Role of human papillomavirus in penile cancer, penile intraepithelial squamous cell neoplasias and in genital warts. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193(1): 35-44.
12. De Geest K, Turyk ME, Hosken MI, Hudson JB, Laimins LAWilbanks GD. Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol* 1993; 49(3): 303-10.
13. Zhao W, Noya F, Chen WY, Townes TM, Chow LTBroker TR. Trichostatin A up-regulates human papillomavirus type 11 upstream regulatory region-E6 promoter activity in undifferentiated primary human keratinocytes. *J Virol* 1999; 73(6): 5026-33.
14. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78(21): 11451-60.
15. Thomas M, Pim DBanks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999; 18(53): 7690-700.
16. Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(17): 1336-43.
17. Schiffman MKjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003(31): 14-9.
18. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *Jama* 2001; 285(23): 2995-3002.
19. Woodman CBCollins S. A critique of cohort studies examining the role of human papillomavirus infection in cervical neoplasia. *Bjog* 2002; 109(12): 1311-8.
20. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, Baldwin S, Roe D, Papenfuss MR, et al. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study. *J Infect Dis* 2002; 186(4): 462-9.
21. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 2003; 158(5): 486-94.
22. Moscicki AB, Ellenberg JH, Crowley-Nowick P, Darragh TM, Xu JFahrat S. Risk of high-grade squamous intraepithelial lesion in HIV-infected adolescents. *J Infect Dis* 2004; 190(8): 1413-21.
23. Ahdieh L, Klein RS, Burk R, Cu-Uvin S, Schuman P, Duerr A, et al. Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women. *J Infect Dis* 2001; 184(6): 682-90.
24. Paraskevaidis E, Kaponis A, Malamou-Mitsi V, Davidson EJ, Hirsch PM, Koliopoulos G, et al. The natural history of HPV infection of the uterine cervix. Long-term observational and histological data. *Anticancer Res* 2002; 22(2B): 1177-81.
25. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis* 2005; 191(5): 731-8.
26. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer SVilla LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 3: S3/42-51.
27. Woodworth CD. HPV innate immunity. *Front Biosci* 2002; 7: d2058-71.
28. Medzhitov RJaneway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296(5566): 298-300.

29. Rouse BTSuvas S. Regulatory cells and infectious agents: detentes cordiale and contraire. *J Immunol* 2004; 173(4): 2211-5.
30. McHeyzer-Williams LJMHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 487-513.
31. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Rev Med Virol* 2006; 16(3): 139-49.
32. Sterling JC, Skepper JNStanley MA. Immunoelectron microscopical localization of human papillomavirus type 16 L1 and E4 proteins in cervical keratinocytes cultured in vivo. *J Invest Dermatol* 1993; 100(2): 154-8.
33. Stanley MA. Replication of human papillomaviruses in cell culture. *Antiviral Res* 1994; 24(1): 1-15.
34. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* 2003; 77(19): 10186-201.
35. Kanodia S, Fahey LMKast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7(1): 79-89.
36. Crum CP, Nagai N, Levine RUSilverstein S. In situ hybridization analysis of HPV 16 DNA sequences in early cervical neoplasia. *Am J Pathol* 1986; 123(1): 174-82.
37. Greenfield LJ, Tauscher JRM Marx MV. Evaluation of a new percutaneous stainless steel Greenfield filter by intravascular ultrasonography. *Surgery* 1991; 109(6): 722-9.
38. Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LTBroker TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 1992; 23(2): 117-28.
39. Ashrafi GH, Haghsheenas MR, Marchetti B, O'Brien PMCampo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer* 2005; 113(2): 276-83.
40. Bauer M, Wagner HLIpford GB. HPV type 16 protein E7 HLA-A2 binding peptides are immunogenic but not processed and presented. *Immunol Lett* 2000; 71(1): 55-9.
41. Evans M, Borysiewicz LK, Evans AS, Rowe M, Jones M, Gileadi U, et al. Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J Immunol* 2001; 167(9): 5420-8.
42. Arany I, Goel ATyring SK. Interferon response depends on viral transcription in human papillomavirus-containing lesions. *Anticancer Res* 1995; 15(6B): 2865-9.
43. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SEUm SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275(10): 6764-9.
44. Um SJ, Rhyu JW, Kim EJ, Jeon KC, Hwang ESPark JS. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. *Cancer Lett* 2002; 179(2): 205-12.
45. Perea SE, Massimi PBanks L. Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor-1. *Int J Mol Med* 2000; 5(6): 661-6.
46. Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YTPitha PM. Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(25): 11657-61.
47. Ronco LV, Karpova AY, Vidal MHHowley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 1998; 12(13): 2061-72.
48. Li S, Labrecque S, Gauzzi MC, Cuddihy AR, Wong AH, Pellegrini S, et al. The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene* 1999; 18(42): 5727-37.
49. Caberg JH, Hubert P, Herman L, Herfs M, Roncarati P, Boniver J, et al. Increased migration of Langerhans cells in response to HPV16 E6 and E7 oncogene silencing: role of CCL20. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58(1): 39-47.
50. Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JRUdey MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 1993; 361(6407): 82-5.
51. Walton LJ, Thornhill MHFarthing PM. VCAM-1 and ICAM-1 are expressed by Langerhans cells, macrophages and endothelial cells in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; 23(6): 262-8.
52. Griffiths CE, Railan D, Gallatin WMCooper KD. The ICAM-3/LFA-1 interaction is critical for epidermal Langerhans cell alloantigen presentation to CD4+ T cells. *Br J Dermatol* 1995; 133(6): 823-9.
53. Mota F, Rayment N, Chong S, Singer AChain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol* 1999; 116(1): 33-40.
54. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
55. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1): 59-65.
56. Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J, et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 1998; 113(2): 183-9.

57. Giannini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver JDelvenne P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer* 2002; 97(5): 654-9.
58. Fausch SC, Da Silva DM, Rudolf MPKast WM. Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J Immunol* 2002; 169(6): 3242-9.
59. Drijkoningen M, De Wolf-Peeters C, Degreef HDesmet V. Epidermal Langerhans cells, dermal dendritic cells, and keratinocytes in viral lesions of skin and mucous membranes: an immunohistochemical study. *Arch Dermatol Res* 1988; 280(4): 220-7.
60. Monnier-Benoit S, Mauny F, Riethmuller D, Guerrini JS, Capilna M, Felix S, et al. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2006; 102(1): 22-31.
61. de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ, et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res* 2004; 64(15): 5449-55.
62. de Boer MA, Jordanova ES, van Poelgeest MI, van den Akker BE, van der Burg SH, Kenter GG, et al. Circulating human papillomavirus type 16 specific T-cells are associated with HLA Class I expression on tumor cells, but not related to the amount of viral oncogene transcripts. *Int J Cancer* 2007; 121(12): 2711-5.
63. Zehbe I, Kaufmann AM, Schmidt M, Hohn HMaeurer MJ. Human papillomavirus 16 E6-specific CD45RA+ CCR7+ high avidity CD8+ T cells fail to control tumor growth despite interferon-gamma production in patients with cervical cancer. *J Immunother* 2007; 30(5): 523-32.
64. Piersma SJ, Welters MJ, van der Hulst JM, Klothe JN, Kwappenberg KM, Trimboos BJ, et al. Human papilloma virus specific T cells infiltrating cervical cancer and draining lymph nodes show remarkably frequent use of HLA-DQ and -DP as a restriction element. *Int J Cancer* 2008; 122(3): 486-94.
65. Sheu BC, Lin RH, Ho HNHuang SC. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. *Hum Immunol* 1997; 56(1-2): 39-48.
66. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Sakamori R, Yamaguchi S, et al. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 2005; 43(6): 1013-20.
67. Arreygue-Garcia NA, Daneri-Navarro A, del Toro-Areola A, Cid-Arregui A, Gonzalez-Ramella O, Jave-Suarez LF, et al. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* 2008; 8: 16.
68. Textor S, Durst M, Jansen L, Accardi R, Tommasino M, Trunk MJ, et al. Activating NK cell receptor ligands are differentially expressed during progression to cervical cancer. *Int J Cancer* 2008; 123(10): 2343-53.
69. Patel SChiplunkar S. Host immune responses to cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21(1): 54-9.
70. Mebius REKraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(8): 606-16.
71. Shortman KNaik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(1): 19-30.
72. Reis e Sousa C, Hieny S, Scharton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 1997; 186(11): 1819-29.
73. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 1999; 189(3): 451-60.
74. Ato M, Stager S, Engwerda CRKaye PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol* 2002; 3(12): 1185-91.
75. Van Haastert PJDevreotes PN. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(8): 626-34.
76. Sanchez-Sanchez N, Riolo-Blanco LRodriguez-Fernandez JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 2006; 176(9): 5153-9.
77. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99(1): 23-33.
78. Bourne HR. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(2): 134-42.
79. Kuang Y, Wu Y, Jiang HWu D. Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors. *J Biol Chem* 1996; 271(8): 3975-8.
80. Wu D. Signaling mechanisms for regulation of chemotaxis. *Cell Res* 2005; 15(1): 52-6.
81. Randolph GJ, Ochando JPartida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 293-316.
82. Del Prete A, Vermi W, Dander E, Otero K, Barberis L, Luini W, et al. Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *Embo J* 2004; 23(17): 3505-15.
83. Shin EH, Lee HYBae YS. Leukotriene B4 stimulates human monocyte-derived dendritic cell chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(2): 606-11.

84. Riol-Blanco L, Sanchez-Sanchez N, Torres A, Tejedor A, Narumiya S, Corbi AL, et al. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol* 2005; 174(7): 4070-80.
85. Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, de la Rosa G, Puig-Kroger A, Garcia-Bordas J, Martin D, et al. Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood* 2004; 104(3): 619-25.
86. Iijima N, Yanagawa Y, Clingan J, Monoe K. CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells. *Int Immunol* 2005; 17(9): 1201-12.
87. Rossi DZ, Lotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-42.
88. Homey B, Wang W, Soto H, Buchanan ME, Wiesenborn A, Catron D, et al. Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *J Immunol* 2000; 164(7): 3465-70.
89. Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, et al. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(25): 14470-5.
90. Hudak S, Hagen M, Liu Y, Catron D, Oldham E, McEvoy LM, et al. Immune surveillance and effector functions of CCR10(+) skin homing T cells. *J Immunol* 2002; 169(3): 1189-96.
91. Pivarcsi A, Muller A, Hippe A, Rieker J, van Lierop A, Steinhoff M, et al. Tumor immune escape by the loss of homeostatic chemokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(48): 19055-60.
92. Whiteside TL, Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53(3): 240-8.
93. Rossi DL, Vicari AP, Franz-Bacon K, McClanahan TK, Lotnik A. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3 α and MIP-3 β . *J Immunol* 1997; 158(3): 1033-6.
94. Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J Biol Chem* 1997; 272(21): 13803-9.
95. Bach JP, Rinn B, Meyer B, Dodel RB, Bacher M. Role of MIF in inflammation and tumorigenesis. *Oncology* 2008; 75(3-4): 127-33.
96. Carli C, Metz CN, Al-Abed Y, Naccache PH, Akoum A. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic cells by macrophage migration inhibitory factor: involvement of novel kinase signaling pathways. *Endocrinology* 2009; 150(7): 3128-37.
97. Lim S, Choong LY, Kuan CP, Yunhao CL, Lim YP. Regulation of macrophage inhibitory factor (MIF) by epidermal growth factor receptor (EGFR) in the MCF10AT model of breast cancer progression. *J Proteome Res* 2009; 8(8): 4062-76.
98. Krockenberger M, Engel JB, Kolb J, Dombrowsky Y, Hausler SF, Kohrenhagen N, et al. Macrophage migration inhibitory factor expression in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*; 136(5): 651-7.
99. Vestergaard C, Johansen C, Otkjaer K, Deleuran ML, Versen L. Tumor necrosis factor- α -induced CTACK/CCL27 (cutaneous T-cell-attracting chemokine) production in keratinocytes is controlled by nuclear factor κ B. *Cytokine* 2005; 29(2): 49-55.
100. Kanda N, Mitsui H, Watanabe S. Prostaglandin E(2) suppresses CCL27 production through EP2 and EP3 receptors in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(6): 1403-9.
101. Gortz A, Nibbs RJ, McLean P, Jarmin D, Lambie W, Baird JW, et al. The chemokine ESkin/CCL27 displays novel modes of intracrine and paracrine function. *J Immunol* 2002; 169(3): 1387-94.
102. Zou GM, Hu WY, Wu W. TNF family molecule LIGHT regulates chemokine CCL27 expression on mouse embryonic stem cell-derived dendritic cells through NF- κ B activation. *Cell Signal* 2007; 19(1): 87-92.
103. Kloth JN, Gorter A, ter Haar N, Corver WE, Jordanova ES, Kenter GG, et al. Lack of TNF α mRNA expression in cervical cancer is not associated with loss of heterozygosity at 6p21.3, inactivating mutations or promoter methylation. *Mol Immunol* 2008; 45(1): 152-9.
104. Androphy EJ, Lowy DR, Schiller JT. Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 1987; 325(6099): 70-3.
105. Lambert PF, Spalholz BA, Howley PM. A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* 1987; 50(1): 69-78.
106. Kumar RA, Naidu SR, Wang X, Imbalzano AN, Androphy EJ. Interaction of papillomavirus E2 protein with the Brm chromatin remodeling complex leads to enhanced transcriptional activation. *J Virol* 2007; 81(5): 2213-20.
107. Lee D, Hwang SG, Kim J, Choe J. Functional interaction between pCAF and human papillomavirus E2 protein. *J Biol Chem* 2002; 277(8): 6483-9.
108. Lee D, Lee B, Kim J, Kim DW, Choe J. cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J Biol Chem* 2000; 275(10): 7045-51.
109. Lusky M, Fontane E. Formation of the complex of bovine papillomavirus E1 and E2 proteins is modulated by E2 phosphorylation and depends upon sequences within the carboxyl terminus of E1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(14): 6363-7.
110. Muller A, Ritzkowski A, Steger G. Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J Virol* 2002; 76(21): 11042-53.

111. Peng YC, Breiding DE, Sverdrup F, Richard J, Androphy EJ. AMF-1/Gps2 binds p300 and enhances its interaction with papillomavirus E2 proteins. *J Virol* 2000; 74(13): 5872-9.
112. Rehtanz M, Schmidt HM, Warthorst U, Steger G. Direct interaction between nucleosome assembly protein 1 and the papillomavirus E2 proteins involved in activation of transcription. *Mol Cell Biol* 2004; 24(5): 2153-68.
113. Yao JM, Breiding DE, Androphy EJ. Functional interaction of the bovine papillomavirus E2 transactivation domain with TFIIIB. *J Virol* 1998; 72(2): 1013-9.
114. You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 2004; 117(3): 349-60.
115. Wang X, Naidu SR, Sverdrup F, Androphy EJ. Tax1BP1 interacts with papillomavirus E2 and regulates E2-dependent transcription and stability. *J Virol* 2009; 83(5): 2274-84.
116. Jang MK, Kwon DM, McBride AA. Papillomavirus E2 proteins and the host BRD4 protein associate with transcriptionally active cellular chromatin. *J Virol* 2009; 83(6): 2592-600.
117. Grm HS, Massimi P, Gammoh N, Banks L. Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. *Oncogene* 2005; 24(33): 5149-64.
118. Gammoh N, Grm HS, Massimi P, Banks L. Regulation of human papillomavirus type 16 E7 activity through direct protein interaction with the E2 transcriptional activator. *J Virol* 2006; 80(4): 1787-97.
119. Bellanger S, Blachon S, Mechali F, Bonne-Andrea C, Thierry F. High-risk but not low-risk HPV E2 proteins bind to the APC activators Cdh1 and Cdc20 and cause genomic instability. *Cell Cycle* 2005; 4(11): 1608-15.
120. Oldak M, Maksym RB, Sperling T, Yaniv M, Smola H, Pfister HJ, et al. Human papillomavirus type 8 E2 protein unravels JunB/Fra-1 as an activator of the beta4-integrin gene in human keratinocytes. *J Virol* 84(3): 1376-86.
121. Fertey J, Ammermann I, Winkler M, Stoger R, Iftner T, Stubenrauch F. Interaction of the papillomavirus E8-E2C protein with the cellular CHD6 protein contributes to transcriptional repression. *J Virol* 2010; 84(18): 9505-15.
122. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76 (Pt 4): 1057-62.
123. Ana-Maria de Roda Husman JMMW, Adriaan J. C. van den Brule, Snijders CJLMMaPJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology* 1995; 76: 1057-106.
124. van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 779-87.
125. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179(4): 1109-18.
126. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1962; 115: 453-66.