

การผลิตและพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีเพื่อการวินิจฉัยและรักษา
Production and development of cholangiocarcinoma specific monoclonal antibody for diagnosis and treatment

1. คณะผู้วิจัย

ศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร. ชาญวิทย์ สีสายวัฒน์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร. ชัยศิริ วงศ์คำ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ที่ปรึกษา Associate Professor Dr. Kazuhiko Kuwahara, Department of Immunology,
Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

2. แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ-มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2555

3. แผนงานวิจัย การพัฒนาชุดวินิจฉัยมะเร็งตับในอีสาน

ประเภทของการวิจัย การพัฒนาทดลอง (Experimental development)

สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาที่ทำการวิจัย (ผนวก 4) วิทยาศาสตร์การแพทย์ ชีวเคมีและมะเร็ง

คำสำคัญ (keywords): cholangiocarcinoma, monoclonal antibody, tumor marker, MUC5AC, mucin

4. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งยังคงเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประชากรไทยคือ 78.9 ต่อแสนคน (<http://203.157.19.19/input-bps.htm>) ในจำนวนนี้มีเพียง 50% ที่สามารถใช้วิธีผ่าตัดในการรักษาได้ อีก 50% ต้องรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัด ซึ่งในจำนวนนี้มีเพียง 10% เท่านั้นที่ตอบสนองต่อยาที่รักษา อย่างไรก็ตามผู้ป่วยมะเร็งส่วนใหญ่เสียชีวิตในเวลาอันสั้น เนื่องจากมะเร็งเป็นโรคเรื้อรังและไม่ติดต่อเหมือนโรคติดเชื้อ ดังนั้นความสูญเสียทั้งชีวิตและทรัพย์สินของชาติต่อปัญหาสุขภาพนี้จึงไม่ปรากฏชัดแจ้งเหมือนโรคเอดส์หรือไข้หวัดนก และไม่เห็นผลกระทบโดยตรงต่อเศรษฐกิจของชาติในภาพรวม จึงไม่ได้รับความสนใจในการป้องกันรักษาและรับผิดชอบจากผู้บริหารประเทศเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามเราไม่สามารถปฏิเสธความจริงของการสูญเสียในชีวิตและทรัพย์สินของผู้ป่วยมะเร็งและครอบครัวที่เกิดขึ้นได้

ปัญหาของมะเร็งในประเทศไทยคือการขาดการติดตามเฝ้าระวังประชากรกลุ่มเสี่ยง และการขาดการวินิจฉัย มะเร็งให้ได้ในระยะแรกซึ่งการผ่าตัดยังให้ผลดี รวมทั้งขาดการติดตามการเกิดซ้ำของมะเร็งในผู้ป่วยที่ได้รับหรืออยู่ใน ระหว่างการบำบัดรักษา ทำให้อุบัติการณ์ของมะเร็งและความสูญเสียที่เกิดจากโรคนี้อย่างเป็นปัญหาอันดับแรกของประเทศ ปัญหาเหล่านี้แก้ไขได้หากมีตัววินิจฉัยที่มีความไว ความจำเพาะและความแม่นยำในการรายงานต่อแพทย์เพื่อหาวิธีการบำบัดรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสมมะเร็งตับเป็นสาเหตุการตายอันดับแรกของผู้ป่วยมะเร็งในประเทศไทย ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ มะเร็งตับ (hepatoma) และมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) สำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอุบัติการณ์ของมะเร็ง ท่อน้ำดีสูงที่สุดในประเทศและในโลก มะเร็งท่อน้ำดีท่อน้ำดีจึงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่จำเพาะและสำคัญของชาวอีสาน นับแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากมะเร็งชนิดนี้พบน้อยมากในชาวตะวันตกจึงทำให้การวิจัยและรายงานการศึกษาโรค มะเร็งท่อน้ำดีในระดับสากลมี

น้อยและมีผู้สนใจในวงจำกัด แม้ว่ารายงานระบาดวิทยาของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศตะวันตกเช่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย เพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา แต่มะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดขึ้นในคนไทยมีสมมุติฐานของโรคที่แตกต่างจากคนในประเทศตะวันตกและประเทศในแถบเอเชียตะวันออก ดังนั้นข้อมูลและองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในชนชาติอื่นจึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยได้โดยตรง จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่นักวิจัยไทยต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานและองค์ความรู้เกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยเอง เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่ไม่มีอาการแสดงในระยะเริ่มแรก และยังไม่มีการวินิจฉัยหรือการตรวจคัดกรองที่จำเพาะต่อโรคในระยะเริ่มแรก ผู้ป่วยจึงมักมาพบแพทย์เมื่ออาการหรือโรค ได้ดำเนินถึงระยะท้ายแล้ว ซึ่งในระยะดังกล่าวมักมีการกระจายของมะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะอื่นทั้งที่ใกล้เคียงหรือห่างไกล และเป็นเหตุสำคัญที่ทำให้การบำบัดรักษาและพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีไม่ได้ผลดีและทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต นอกจากนี้ปัญหาการเกิดซ้ำของมะเร็ง (Recurrence) เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตแม้ในรายที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด ดังนั้นการวินิจฉัยโรคให้ได้อย่างจำเพาะทั้งในระยะเริ่มแรก ระยะลุกลามและการเกิดซ้ำของมะเร็ง จึงเป็นแนวทางที่มีความเป็นไปได้สูง ในการลดความรุนแรงและความสูญเสียที่เกิดจากมะเร็งท่อน้ำดีในภูมิภาคนี้

ปัจจุบันยังไม่มี การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่มีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มแรก ระยะแพร่ลุกลามและ/หรือระยะเกิดซ้ำ การวิจัยเพื่อพัฒนาตัวตรวจวินิจฉัยมะเร็งตับโดยเฉพาะมะเร็งท่อน้ำดีจึงมีความสำคัญและจำเป็นต่อการแก้ปัญหาสุขภาพที่เรื้อรังของภูมิภาคนี้

5. เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของแผนงานวิจัย

แผนงานวิจัยนี้ตอบสนองโดยตรงต่อยุทธศาสตร์การพัฒนาศักยภาพคนและสังคมที่มีคุณภาพการเสริมสุขภาพ ของประชาชนให้มีคุณภาพมาตรฐาน และการเสริมสร้างความมั่นคงของชีวิตและสังคมเนื่องจากสังคมที่มั่นคงและมีสุข ย่อมเกิดจาสมานชิกของสังคมที่เป็นสุขปราศจากโรคร้ายที่มีผลกระทบต่อการดำรงชีพและชีวิต ทั้งต่อตนเองหรือสมาชิกในครอบครัว การสูญเสียประชากรก่อนวัยอันควร โดยเฉพาะบุคคลที่เป็นกำลังสำคัญของครอบครัวย่อมมีผลกระทบต่อรายได้ประชาชาติและความปกติสุขของประชากร ซึ่งไม่สามารถประมาณค่าเป็นตัวเลขหรือมูลค่าทางเศรษฐกิจได้

ข้อมูลจากสถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศไทย 2542 แสดงว่าร้อยละ 35 ของประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นคนจนและส่วนใหญ่อยู่ในภาคเกษตรกรรม (10.45 ล้านคน) (www.thaieconwatch.com/ecdata/poverty/povreg-t.him) รายได้ประชาชาติของประชากรกลุ่มนี้คิดเป็น 940 บาท/คน/เดือน หากมีสมาชิกในครอบครัวป่วยเป็นมะเร็งและทำให้ไม่สามารถประกอบอาชีพได้ ย่อมหมายถึงภัยคุกคามอย่างหนักต่อเศรษฐกิจของประชากรในกลุ่มนี้ ข้อมูลผู้ป่วยในที่ป่วยด้วยมะเร็งตับและเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในช่วง พ.ศ. 2538-2545 เฉลี่ยปีละ 1,100 ราย เป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับหนึ่ง และไม่มีแนวโน้มว่าจะลดลง (ดังรูป, Tumor registry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 2002) ประมาณร้อยละ 10 ของผู้ป่วยเท่านั้นที่สามารถรักษาด้วยการผ่าตัด ซึ่งค่าใช้จ่ายเฉพาะในโรงพยาบาล 40,000-260,000 บาท หรือเฉลี่ย 60,000 บาทต่อราย (ข้อมูลโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ม.ค.-มี.ค. 2548 จำนวน 23 ราย) และร้อยละ 90 ของผู้ป่วยเสียชีวิตภายใน 1 ปี ผู้ป่วยอีกส่วนหนึ่งได้รับการรักษาโดยยาเคมีบำบัดซึ่งมีค่าใช้จ่ายเฉลี่ย 60,000 บาทต่อราย และส่วนใหญ่ไม่สามารถบำบัดรักษาได้ จากการคำนวณประมาณการได้ว่า ความสูญเสียจากการ

รักษามะเร็งท่อน้ำดีเฉลี่ย 66 ล้านบาท/จังหวัด และ 1,254 ล้านบาทใน 19 จังหวัดของภาคอีสาน ซึ่งยังไม่รวมถึงความสูญเสียที่เกิดกับสมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วย ดังนั้น การวิจัยเพื่อพัฒนาตัวตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีให้ได้ในระยะเริ่มต้น ซึ่งการผ่าตัดให้ผลดี และการ วินิจฉัยเพื่อติดตามการแพร่ลุกลาม และการเกิดซ้ำของมะเร็งจึงเป็นแนวทางที่จะช่วยรักษาชีวิตของ ผู้ป่วยและเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา รวมทั้งลดการสูญเสียทั้งทรัพย์สิน ชีวิตและจิตใจของ ประชาชนที่ถูกคุกคามจากมะเร็งชนิดนี้ ทำให้ประชาชนมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น สังคมเข้มแข็งและ ประเทศที่แข็งแกร่งในอนาคต

6. วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

วิจัยและพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีของคนไทย เพื่อการตรวจคัดกรองผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงให้ได้ในระยะแรกของมะเร็ง ผู้ป่วยที่มีการแพร่ลุกลามและการเกิดซ้ำของมะเร็ง เพื่อการรักษาที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

การก่อตัวและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง จะมีการแสดงออกของจีน เพื่อสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ การมีชีวิตของเซลล์ การเคลื่อนที่ และการเจริญลุกลามอวัยวะอื่นๆ โปรตีนจำเพาะเหล่านี้ถูกสร้างและหลั่งจากเซลล์มะเร็ง ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในกระแสโลหิต และ/หรือ น้ำคั่งหลังของร่างกาย การศึกษานี้จึงเป็นกลยุทธ์หนึ่งที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งแบบ Noninvasive โดยการตรวจโปรตีน จำเพาะเหล่านี้ในน้ำคั่งหลัง เช่น ซีรัม, ปัสสาวะหรือน้ำดีของผู้ป่วย ซึ่งมีหลายวิธีเช่น การตรวจคุณสมบัติจำเพาะของ โปรตีนนั้น หรือใช้แอนติบอดีซึ่งจับจำเพาะกับโปรตีนนั้น เป็นต้น ดังนั้นกลยุทธ์หนึ่งของแผนงานนี้คือการสร้าง โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนของมะเร็งแต่ไม่จับกับโปรตีนของเซลล์ปกติ โดยมีวัตถุประสงค์โครงการ ดังนี้

1. ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้หนู Balb/c-gamp-Tg mice ซึ่งเป็นหนูที่พัฒนาให้มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง
2. คัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเฉพาะกับเนื้อเยื่อมะเร็งหรือซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
3. พัฒนาการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีจากซีรัมผู้ป่วยโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี ELISA

7. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยและพัฒนาจากการศึกษานี้ จะช่วยแก้ปัญหาของการขาดการตรวจวินิจฉัยที่มีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อมดังนี้

1. ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องและทำให้ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและรวดเร็ว รวมทั้งการใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดซ้ำของมะเร็งท่อน้ำดี
2. แพทย์และบุคลากรด้านการแพทย์และสาธารณสุข ในโรงพยาบาลต่าง ๆ ที่จะใช้ผลงานที่พัฒนาแล้วในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีและใช้ในการติดตามการรักษา
3. ประชาชนกลุ่มเสี่ยง ในการเฝ้าระวังต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี
4. ผลการวิจัยนี้สามารถนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ โดยการพัฒนาวีธีการตรวจให้สะดวกและราคาถูกลง ซึ่งสามารถจดสิทธิบัตรและผลิตเชิงพาณิชย์ได้

8. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่จำเพาะและ สำคัญของชาวอีสาน นับแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจาก มะเร็งชนิดนี้พบน้อยมากในชาวตะวันตกจึงทำให้การวิจัยและรายงานการศึกษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระดับสากลมีน้อยและมีผู้สนใจในวงจำกัด แม้ว่า รายงานระบาดวิทยาของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศตะวันตก เช่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย เพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา แต่มะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดขึ้นในคนไทยมีสมมุติฐานของโรคแตกต่างจากคนในประเทศตะวันตกและประเทศในแถบเอเชียตะวันออก ดังนั้นข้อมูลและองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในชนชาติอื่น จึงไม่สามารถนำมาประยุกต์ ใช้กับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยได้โดยตรง จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่นักวิจัยไทยต้อง ศึกษาข้อมูลพื้นฐานและองค์ความรู้เกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยเอง เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ส่วนใหญ่ไม่มีอาการ แสดงในระยะเริ่มแรก และยังไม่มีการวินิจฉัยหรือการตรวจกรองที่จำเพาะต่อโรคในระยะเริ่มแรก ผู้ป่วยจึงมักมาพบแพทย์เมื่ออาการหรือโรคได้ดำเนินถึงระยะท้ายแล้ว ซึ่งในระยะดังกล่าวมักมีการ กระจายของมะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะอื่น ทั้งที่ใกล้เคียงหรือห่างไกลและเป็น เหตุสำคัญที่ทำให้ การบำบัดรักษาและพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีไม่ได้ผลดี และทำให้ผู้ป่วย เสียชีวิต ดังนั้นการ การวินิจฉัย โรคให้ได้อย่างจำเพาะในระยะเริ่มแรกและการป้องกันการแพร่ลุกลาม ของมะเร็ง จึงเป็นแนวทางที่มีความเป็นไปได้สูง ในการลดความรุนแรงและความสูญเสียที่เกิดจาก มะเร็งท่อน้ำดีในภูมิภาคนี้

ปัจจุบันยังไม่มี การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่มีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มแรก และ/หรือ ระยะแพร่ลุกลาม คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจหา mivsin MUC5AC ซึ่งเป็น ชีวโมเลกุลที่สร้างและหลั่งจาก เนื้อเยื่อมะเร็งและตรวจพบได้ในซีรัมผู้ป่วยด้วยวิธี Electrophoresis ร่วมกับ immunoblotting วิธีดังกล่าว สามารถใช้เป็นวิธีตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีได้ดี เนื่องจากสามารถจำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีออกจากมะเร็งตับและ มะเร็งในระบบทางเดินอาหารได้ สูงถึง 97% แต่วิธีดังกล่าวต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ mivsin MUC5AC ทำให้มีต้นทุน การตรวจวิเคราะห์สูง ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความ จำเพาะต่อ mivsin MUC5AC และ/หรือ แอนติเจนอื่นที่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งคาดว่าจะได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยและ รักษา มะเร็งท่อน้ำดีอย่างจำเพาะในอนาคต

Tumor marker หรือตัวบ่งชี้ชีวภาพของภาวะมะเร็ง มีประโยชน์ในการตรวจคัดกรอง (screening) ผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งหรือผู้ที่สงสัยว่าเป็นมะเร็ง และใช้เป็นตัวสนับสนุนหรือเสริมการวินิจฉัย ช่วยทำนายหรือพยากรณ์การดำเนินโรค รวมทั้งช่วยในการตัดสินใจเลือกวิธีการรักษาที่เหมาะสมกับการดำเนินโรคของผู้ป่วย แม้ว่า ปัจจุบันการศึกษาวินิจฉัยเพื่อค้นหา tumor marker จะก้าวรุดหน้าอย่างมาก แต่ tumor marker ส่วนใหญ่ยังไม่สามารถใช้ในการตรวจ คัดกรองหรือบ่งชี้การเป็นมะเร็งในระยะแรกได้ อย่างไรก็ตาม tumor marker ก็ยังมีประโยชน์ อย่างมากทางคลินิก โดยเฉพาะในการเฝ้าระวังการเกิดซ้ำและบ่งชี้การแพร่กระจายของมะเร็ง รวมทั้งใช้เป็นข้อมูล ประกอบสำหรับแพทย์ในการเลือกการรักษาเฉพาะราย

การวิจัย tumor marker ในระยะหลังจากทราบรายละเอียดของจีโนมมนุษย์ (post-genome era) มีความก้าวหน้าอย่างมาก โดยเฉพาะการใช้เทคนิค high throughput ซึ่งสามารถ ให้ข้อมูลจำนวนมากในหลัก พันถึงหมื่นในการศึกษาแต่ละครั้ง มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบ การ

แสดงออกของจีนในมะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้เทคนิค Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>) และ cDNA Microarray¹ เพื่อค้นหาจีนที่เกี่ยวข้องหรือมีบทบาทสำคัญในการก่อมะเร็ง หรือมีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีเพื่อนำมาใช้เป็น tumor marker ต่อไป แม้ว่ามะเร็งท่อน้ำดีจะมีอุบัติการณ์สูงในประเทศแถบเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบ น้อยมากในประเทศตะวันตก แต่ในระยะสิบปีที่ผ่านมาพบว่าอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดี ในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกมี แนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเป็นลำดับยกเว้นประเทศญี่ปุ่น² และรายงานการศึกษา มะเร็งท่อน้ำดีในวารสารนานาชาติก็เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน อย่างไรก็ตามจากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับ tumor marker ของมะเร็งท่อน้ำดี พบว่า มีข้อมูลใหม่น้อยมาก ดังนั้นข้อมูลส่วนใหญ่ในรายงานนี้จึงมาจากการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยและ เน้นเฉพาะ tumor marker ที่ตรวจพบได้ในซีรัมเท่านั้น

Carcinoembryonic antigen (CEA) และ carbohydrate antigen (CA) 19-9 เป็น tumor marker ที่ใช้มากในการเสริมการวินิจฉัย ติดตาม และพยากรณ์การดำเนินโรคของมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี แต่ tumor marker ทั้งสองไม่ใช่ marker ที่จำเพาะต่อ มะเร็งท่อน้ำดี เพราะนอกจากสามารถตรวจพบได้ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งชนิดอื่นแล้ว ยังพบมากใน ผู้ป่วยอื่นที่มีภาวะอักเสบหรือพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดี ท่อน้ำดี และตับอ่อน

CEA เป็นไกลโคโปรตีนขนาด 200 กิโลดาลตัน ตรวจพบได้ในซีรัมของผู้ป่วยที่มีการอักเสบของท่อน้ำดี ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งตับอ่อนและมะเร็งท่อน้ำดี ส่วน CA19-9 เป็น Lewis blood group epitope ของ glycosphingolipid ในเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะเซลล์เยื่อบุ ของระบบทางเดินอาหาร แต่ในซีรัมพบ epitope นี้ในโมเลกุลของมิวซินซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน ของเยื่อเมือก CA19-9 ไม่ใช่แอนติเจนของมะเร็งแต่เป็นแอนติเจนที่สัมพันธ์ กับการเกิดมะเร็ง เนื่องจากพบได้ในเซลล์ปกติของเซลล์เยื่อบุหลายชนิด เช่น กระเพาะอาหาร ลำไส้ใหญ่ ท่อน้ำดี ตับอ่อนและต่อมน้ำลาย เนื้อเยื่อเหล่านี้มีการสร้าง epitope นี้มากขึ้นเมื่อเป็นมะเร็ง จึงนิยมใช้ CA19-9 เป็น marker ของมะเร็งกระเพาะอาหาร-ลำไส้ มะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับอ่อน

สำหรับมะเร็งท่อน้ำดี CEA และ CA19-9 เป็น tumor marker ที่มีการศึกษามากที่สุด การใช้ระดับซีรัม CA19-9 ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี ให้ค่าความไวแตกต่างกันในแต่ละรายงาน ตั้งแต่ 57.1%³, 73%⁴, และ 86%⁵ เนื่องจากระดับ CA19-9 ในเลือดจะสูงขึ้นในผู้ป่วย ที่มีพยาธิสภาพของตับอ่อน ตับและท่อน้ำดี เช่น นิ่วในท่อน้ำดี (CA1), ท่อน้ำดีอักเสบ⁶ และภาวะท่อน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน⁷ ดังนั้นการใช้ CA19-9 เป็นตัวบ่งชี้ภาวะมะเร็งท่อน้ำดี จึงมี ความจำเพาะค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามในรายที่ผู้ป่วยมีระดับ CA19-9 ในซีรัมสูงมากและเป็นระยะ เวลานาน ร่วมกับประวัติ และลักษณะทางคลินิกที่บ่งชี้การเป็นมะเร็งท่อน้ำดี CA19-9 ก็ยังคงเป็น marker ที่ดีในการสนับสนุน การวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีได้

รายงานวิจัยการใช้ CEA และ CA19-9 ในการวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศจีน จำนวน 35 ราย เปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดี 92 รายและคนปกติ 15 ราย พบว่า ระดับซีรัม CEA และ CA19-9 สามารถใช้จำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยให้ค่าความไว 68% และ 66% ค่าความจำเพาะ 81% และ 88% ตามลำดับ และถ้าใช้ marker ทั้งสองร่วมกัน จะให้ค่าความไว 62% และค่าความจำเพาะ 86%⁸

Pungpak และคณะ³ รายงานการใช้ซีรัม CA19-9 ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยไทย พบว่า 57% ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีระดับซีรัม CA19-9 สูงกว่า 3SD ของค่าปกติ การศึกษา

CA19-9 ในเนื้อเยื่อมะเร็งโดยวิธี immunohistochemistry พบว่า 60% ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมี CA19-9 เพิ่มขึ้นและสัมพันธ์กับ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งทางหลอดเลือดและสามารถ ใช้พยากรณ์โรคได้⁹

คณะผู้วิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น ได้วิจัยเพื่อหา tumor marker ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย โดยใช้หลักการที่แตกต่างกันดังนี้

Soybean agglutinin specific biliary glycoprotein (SBG) เป็นไกลโคโปรตีนที่ตรวจพบได้ในซีรัม มีน้ำหนักโมเลกุล 57 กิโลดาลตัน มีหมู่น้ำตาล galactose และ N-acetylgalactosamine เป็นองค์ประกอบ ทำให้สามารถจับจำเพาะกับ soybean agglutinin (SBA) ได้ การใช้วิธี western blotting ร่วมกับ SBA ในตรวจสอบ SBG ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับซีรัมคนปกติและกลุ่มควบคุมอื่น ๆ พบว่าการใช้ SBG เป็น marker ให้ค่าความจำเพาะต่อการเกิดพยาธิสภาพของท่อน้ำดีถึง 100%¹⁰ โดยให้ค่าความไวในการบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดี สูงถึง 93% อย่างไรก็ตาม SBG ไม่ใช่ marker ที่ดีของมะเร็งท่อน้ำดีเพราะสามารถตรวจพบ ในซีรัมผู้ป่วย ที่มีการอักเสบของท่อน้ำดีถึง 84% ดังนั้น จึงอาจพิจารณาการใช้ marker นี้ ในการคัดกรองเพื่อหากลุ่มคนที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดีซึ่งเป็น กลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้

Total sialic acid sialic acid เป็นหมู่น้ำตาลที่พบในส่วนปลายของสายโมเลกุล มีรายงาน การเพิ่มสูงขึ้นของ ระดับ sialic acid ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งหลายชนิด การวัดปริมาณ sialic acid โดยวิธีเคมีในซีรัมผู้ป่วยมะเร็ง ท่อน้ำดีเปรียบเทียบกับซีรัมคนปกติและกลุ่มควบคุมอื่น ๆ โดยใช้ค่า cut-off ที่ 2.33 mmol/L สามารถจำแนกผู้ป่วย มะเร็งท่อน้ำดีออกจากคนปกติและผู้ป่วย ที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดีได้ด้วยควมไว 71.9% และค่าทำนายผลบวกสูงถึง 89%¹¹ ค่าระดับ Total sialic acid ในซีรัมมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับมิวซินชนิด MUC5AC, alkaline phosphatase และ CA19-9 ในซีรัมของผู้ป่วย¹² Kongtawelert และคณะ¹³ ใช้ระดับ total sialic acid ในซีรัม (1.75 mmol/L) ในการแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วยมะเร็งตับ และผู้ป่วยโรคตับอื่น ๆ โดยให้ค่าความไวและ ความจำเพาะ 82% และ 83% ตามลำดับ การวัดระดับ sialic acid ในซีรัมเป็นวิธีเคมีง่าย ๆ ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือ หรือน้ำยาที่มีราคาแพง จึงอาจใช้เป็นตัวคัดกรองเบื้องต้นในสถานพยาบาลที่ยังไม่มีเครื่องมือหรืองบประมาณรองรับ

มิวซิน (mucin) MUC5AC มิวซินเป็นไกลโคโปรตีนที่พบในเมือก (mucous) ซึ่งสร้างจากเซลล์เยื่อบุของระบบหายใจ ระบบย่อยอาหาร และระบบท่อน้ำดี มิวซินมีหลายชนิด ชนิดที่สัมพันธ์กับมะเร็งท่อน้ำดีคือ MUC1 และ MUC5AC การศึกษามิวซินชนิด MUC5AC โดย immunohistochemistry ไม่พบมิวซินชนิดนี้ในเยื่อบุท่อน้ำดีปกติ แต่พบปริมาณมากในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี การตรวจหามิวซิน MUC5AC โดยวิธี agarose gel electrophoresis และ immunoblotting ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เปรียบเทียบกับซีรัมคนปกติและกลุ่มควบคุมอื่น ๆ บ่งชี้ว่า การตรวจมิวซินดังกล่าวสามารถใช้เป็น marker ของมะเร็งท่อน้ำดีได้ โดยให้ค่าความจำเพาะสูงถึง 97% และค่าความไว 63% ตรวจพบมิวซินชนิดนี้ในผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของท่อน้ำดี และผู้ป่วยมะเร็งอื่นเพียง 6% และตรวจไม่พบเลยในคนปกติและคนที่ติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับ¹⁴ นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจพบมิวซิน MUC5AC ในซีรัมมีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็ง ระยะท้ายของมะเร็งและใช้พยากรณ์โรคได้¹⁵ ดังนั้นซีรัม MUC5AC จึงเป็น marker ของมะเร็ง ท่อน้ำดีที่เป็นความหวังใหม่ในการเสริมการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีได้เป็นอย่างดี

Biliary alkaline phosphatase ผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพที่ตับและท่อน้ำดีมักมี alkaline phosphatase ในซีรัมสูงกว่าปกติ แต่ระดับของเอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถใช้วินิจฉัยแยกกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองได้ การตรวจ isoform ของเอนไซม์ดังกล่าวโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis¹⁶ พบว่า isoform ที่มีขนาดใหญ่และเคลื่อนที่ได้ไกลกว่า liver isoform ที่เรียกว่า Biliary alkaline phosphatase พบมากในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีถึง 65% โดยไม่ขึ้นกับระดับบิลิรูบิน และให้ค่าความไวในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มีภาวะเหลืองถึง 85% ความจำเพาะ 79% การวิเคราะห์ทำได้ง่าย และราคาถูกกว่าการตรวจ CEA หรือ CA19-9 การตรวจ Biliary alkaline phosphatase จึงเป็น marker ที่น่าสนใจในการใช้สนับสนุนการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีเช่นกัน

โดยสรุป tumor marker ที่ใช้สนับสนุนการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในปัจจุบัน ให้ค่าความไวที่ใกล้เคียงกัน คือประมาณ 55-70% และความจำเพาะ 70-95% โดยการตรวจระดับซีรัม MUC5AC ให้ค่าความจำเพาะสูงที่สุด อย่างไรก็ตามการตรวจหาซีรัม MUC5AC ในรายงาน วิจัยดังกล่าวใช้ antibody ที่จัดซื้อจากบริษัทต่างชาติและใช้วิธี western blotting ร่วมกับ electrochemiluminescence ซึ่งมีวิธีที่ยุ่งยากและมีหลายขั้นตอน ไม่เหมาะที่จะใช้เป็นวิธีตรวจวัดในห้องปฏิบัติการสูตรในโรงพยาบาลทั่วไป การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อมิวซิน MUC5AC หรือโมเลกุลที่สร้างและจำเพาะ ต่อมะเร็งท่อน้ำดีจะช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัย มะเร็งท่อน้ำดีในซีรัมได้ ซึ่งหากมีการพัฒนาต่อไปเป็นวิธี ELISA หรือวิธีอื่นที่สามารถดำเนินการได้ง่าย สะดวก และราคาถูก จะทำให้การตรวจซีรัม MUC5AC หรือโมเลกุลที่สร้างและจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดี เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีที่มีศักยภาพมากในอนาคตอันใกล้ โดยเฉพาะในสถานพยาบาลที่ยังขาดเครื่องมือหรืออุปกรณ์ราคาแพง ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี

9. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะคัดเลือกเฉพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีโดยไม่มีหรือมีผลต่อเนื้อเยื่อปกติต่ำ และสามารถจำแนกซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จากซีรัมคนปกติได้ เพื่อพัฒนาเป็นตัวตรวจวินิจฉัยโดยวิธี ELISA ต่อไป

10. ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

ระยะเวลาทำการวิจัยตลอดโครงการ 5 ปีโดยแบ่งเป็น 2 Phase

Phase 1 ใช้เวลา 2 ปี

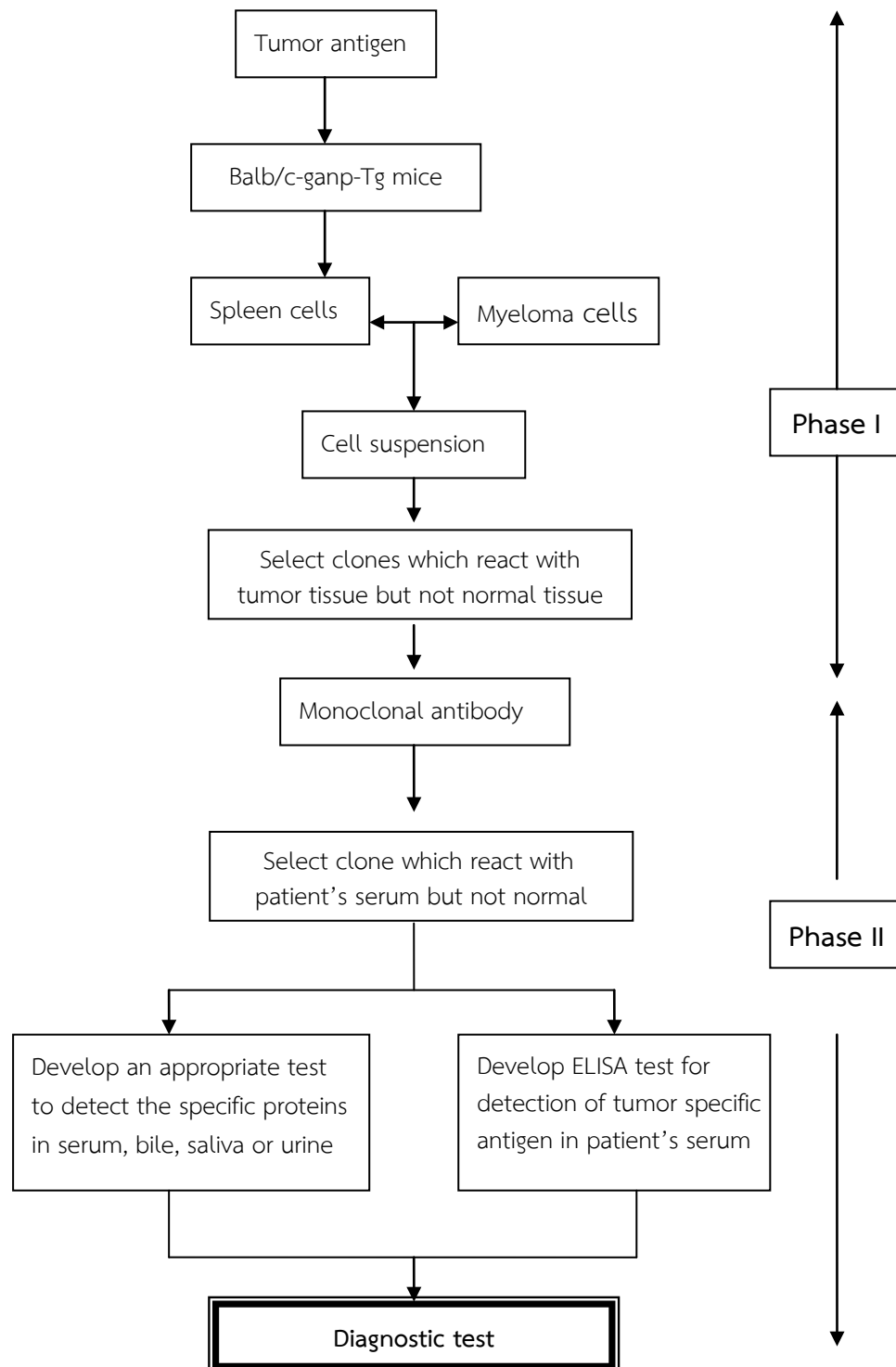
ปีที่ 1-2 (2551-2552) ผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี และคัดเลือกโคลนให้บริสุทธิ์

Phase 2 ใช้เวลา 3 ปี

ปีที่ 3 (2553) ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีและแอนติเจน

ปีที่ 4-5 (2554-55) พัฒนาการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในซีรัมผู้ป่วยโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

11. ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



12. วัตถุประสงค์ของโครงการในปีงบประมาณ 2555

ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพต่าง ๆ ของแอนติเจนที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดได้ ดังนี้

- ศึกษาการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 และ S121 ระหว่างการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ในชิ้นเนื้อตับที่ได้จากสัตว์ทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี
- ศึกษาบทบาทของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 และ S121 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

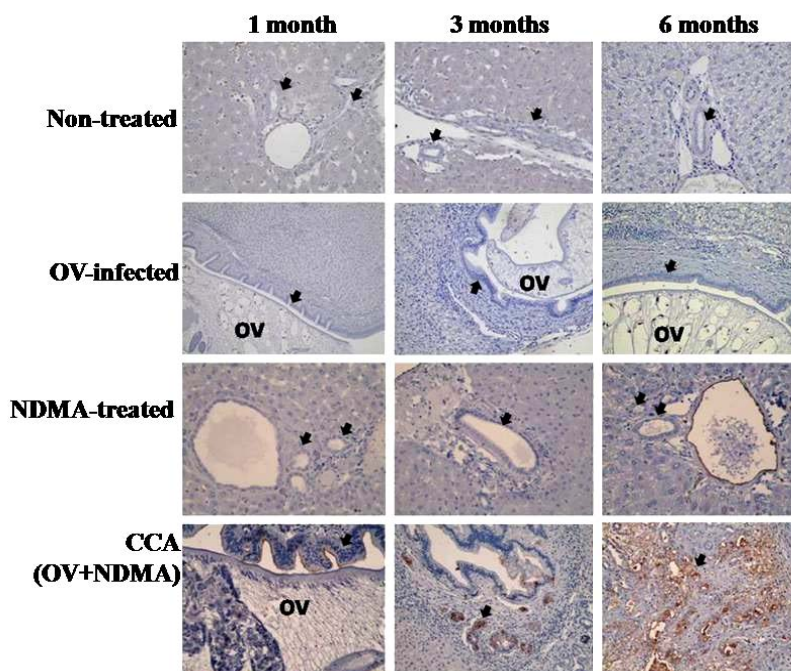
13. วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

13.1 การแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ระหว่างการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี

การศึกษาในปี ได้ทำการศึกษาการแสดงของแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2555S27 (แอนติเจน S27) ระหว่างการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้เนื้อเยื่อตับจากหนูแฮมสเตอร์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของแอนติเจน S27 และการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์จาก รองศาสตราจารย์สมชาย ปิ่นละออ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยการศึกษา แบ่งหนูออกเป็น (1) กลุ่มได้แก่ 4 กลุ่มปกติ กลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิ (2) *Opisthorchis viverrini* (OV) เพียงอย่างเดียว (3) หนูกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็ง nitoso-dimethylamine (NDMA) เพียงอย่างเดียว และ ดื้อพยาธิหนูกลุ่มที่ (4) OV ร่วมกับการได้รับสารก่อมะเร็ง NDMA (CCA, OV+NDMA) โดยมีการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อตับหนูทุกกลุ่มที่ระยะเวลา 1,3 , และ หรือ ได้รับสารก่อมะเร็ง/เดือนหลังการติดเชื้อ และ 6NDMA เข้าไปจากการศึกษาเนื้อเยื่อตับของหนูทุกกลุ่มพบว่า เฉพาะหนูกลุ่ม OV+NDMA ที่ระยะเวลา 6 และ 3 เดือนหลังการติดเชื้อพยาธิและ ได้รับสารก่อมะเร็ง NDMA เท่านั้น ที่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ทั้งหมด ส่วนหนูกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ กลุ่มปกติ กลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิ OV เพียงอย่างเดียว และหนูกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็ง NDMA เพียงอย่างเดียว ยังไม่มีการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ภายในระยะเวลา 6 เดือนของการติดเชื้อพยาธิ หรือ ได้รับสารก่อมะเร็ง NDMA

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของแอนติเจน S27 ในเนื้อเยื่อหนูดังกล่าวข้างต้น พบว่า ที่ระยะเวลา เดือน ในหนูกลุ่ม 1OV + NDMA (N = 5) แม้ท่อน้ำดีจะยังไม่มีการพัฒนา ไปเป็นมะเร็ง แต่เริ่มมีการแบ่งตัวที่ผิดปกติบ้างเล็กน้อย พร้อมกับพบการแสดงออกของ S27 ในเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีบ้าง และที่ระยะเวลา) เดือน 3N = 5) และ เดือน 6(N = 10) พบว่าหนู ทุกตัวมีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งท่อน้ำดี และพบการแสดงออกของ S27 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ในหนูทุกตัวเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 1 ส่วนหนูกลุ่มควบคุมอื่นๆ ไม่พบการแสดงออกของ S27 ในท่อน้ำดีในทุกๆ ระยะเวลาที่ทำการศึกษา

ดังนั้นจากการศึกษาการแสดงของแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ระหว่างการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ชี้ให้เห็นว่า การแสดงออกของแอนติเจน S27 มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยสามารถตรวจพบได้ในระยะแรกของการพัฒนา จึงมีแนวโน้มว่า จะสามารถใช้แอนติเจน S27 เป็น early marker สำหรับการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไปได้



รูปที่ 1 การแสดงออกของแอนติเจน S27 ในเนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์โดยวิธี immunohistochemistry จากการศึกษาพบว่า ไม่มีการแสดงออกของแอนติเจน S27 ในเยื่อบุท่อทางเดินน้ำดีของหนูกลุ่มควบคุมทั้ง กลุ่ม 3[กลุ่มปกติ n)on-treated) กลุ่มติดพยาธิ *Opisthorchis viverrini* (OV-infected) และกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็ง nitroso-dimethylamine (NDMA-treated) เพียงอย่างเดียว ในทุกระยะเวลาที่ทำการศึกษา ทั้งนี้พบการแสดงออกของแอนติเจน S27 ในหนูกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิ OV และได้รับสารก่อมะเร็ง NDMA ,CCA)OV + NDMA)] ในทุกระยะเวลา ตั้งแต่ เดือน โดย 6 ถึง 1 พบว่าที่ระยะ 1 เดือนมีการแสดงออกเล็กน้อย และมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อหนูพัฒนา เป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยที่ระยะ เดือน หนูมีการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดีร่วม 6 เดือน และ 3กับมีการแสดงออกของแอนติเจน S27 ในเยื่อบุท่อทางเดินน้ำดีทุกตัว

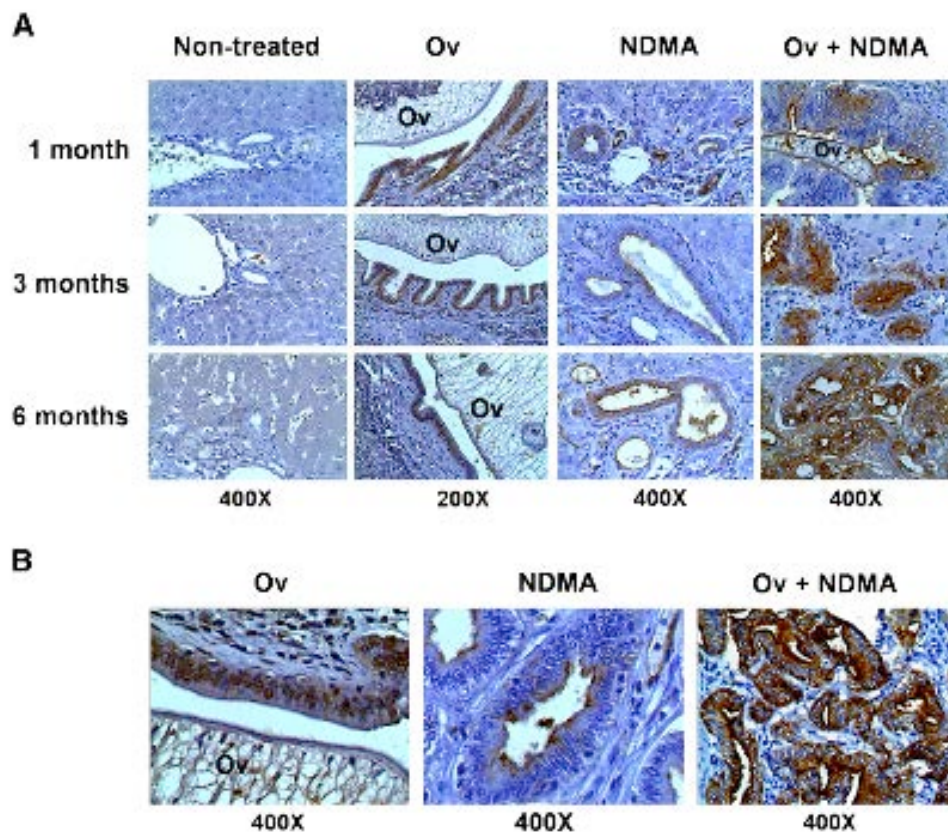
13.2 การแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ระหว่างการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี

ได้ศึกษาการแสดงของแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 (แอนติเจน121) ระหว่างการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้เนื้อเยื่อตับจากหนูแฮมสเตอร์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของแอนติเจน S121 และการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์จาก รองศาสตราจารย์สมชาย ปิ่นละออ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีรายละเอียดเช่นเดียวกับที่กล่าวใน 13.2

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของ แอนติเจน S121 ในเนื้อเยื่อหนูดังกล่าวข้างต้น พบว่า ที่ระยะเวลา เดือน ในหนูกลุ่ม 1ที่มีความผิดปกติของตับและท่อทางเดินน้ำดี ทั้งกลุ่ม) CCAOV + NDMA), และกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิ OV หรือได้รับสารก่อมะเร็ง NDMA เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง แม้ท่อทางเดินจะยังไม่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็ง แต่เริ่มมีการแบ่งตัวที่ผิดปกติบ้างเล็กน้อย พร้อมกับพบการแสดงออกของ S121 ในเซลล์เยื่อบุท่อทางเดินน้ำดีบ้าง และพบสูงขึ้นเมื่อมีความผิดปกติ มากขึ้น โดยในกลุ่ม (OV+NDMA) CCAที่ระยะเวลา เดือน 3และ เดือน พบว่าหนูทุกตัวมี 6การพัฒนาไปเป็น

มะเร็งท่อน้ำดี และพบการแสดงออกของ S121 ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ในหนูทุกตัวเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 2 ส่วนหนูกลุ่มควบคุมอื่นๆ ไม่พบการแสดงออกของ S121 ในท่อ ทางเดินน้ำดีในทุกระยะเวลาที่ทำการศึกษา

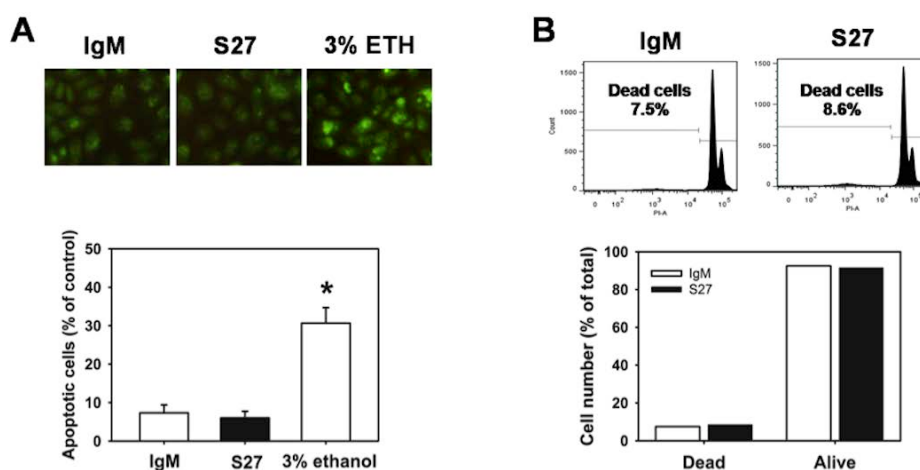
จากการศึกษานี้ พบว่าการแสดงออกของแอนติเจน S121 มีความสัมพันธ์กับการพัฒนา เป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยสามารถตรวจพบได้ในระยะแรกของการพัฒนา จึงมีแนวโน้มว่า จะสามารถใช้แอนติเจน S121 เป็น early marker สำหรับการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไปได้



รูปที่ 2 การแสดงออกของแอนติเจน S121 ในเนื้อเยื่อตับหนูแฮมสเตอร์โดยวิธี immunohistochemistry จากการศึกษพบว่า (A)ไม่มีการแสดงออกของแอนติเจน S121 ในเยื่อบุท่อทางเดินน้ำดี ของหนู กลุ่มปกติ (non-treated) สามารถพบได้ในหนูที่มีโอกาสเกิดพยาธิสภาพของตับและท่อทางเดินน้ำดี กลุ่ม 3[กลุ่มติดเชื้อพยาธิ *Opisthorchis viverrini* (OV-infected) กลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็ง nitroso-dimethylamine (NDMA-treated) และหนูกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดีโดยการติดเชื้อพยาธิ OV ร่วมกับการได้รับสารก่อมะเร็ง NDMA (OV + NDMA)] ทั้งนี้พบการแสดง ออกของแอนติเจน S121 ในหนูกลุ่ม OV+NDMA ในทุกระยะเวลา ตั้งแต่ เดือน โดยพบว่า 6 ถึง 1 ที่ระยะ 1 แสดงออกเล็กน้อย และมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อหนูพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยที่เดือนมีการ ระยะ เดือน หนูมีการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดีร่วมกับการแสดงออกของ 6 เดือน และ 3งแอนติเจน S121 ในเยื่อบุท่อทางเดินน้ำดีทุกตัว (B) ทั้งนี้พบว่า การแสดงออกของแอนติเจน S121ในหนูกลุ่ม OV มีความแตกต่างจากกลุ่ม OV+NDMA โดยแอนติเจน S121 จะแสดงออกในนิวเคลียสของเซลล์ ท่อทางเดินน้ำดีของหนูกลุ่ม OV แต่จะแสดงออกบริเวณผิวเซลล์และไซโตพลาสซึมในหนูกลุ่ม OV+NDMA

13.3 ศึกษาบทบาทของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

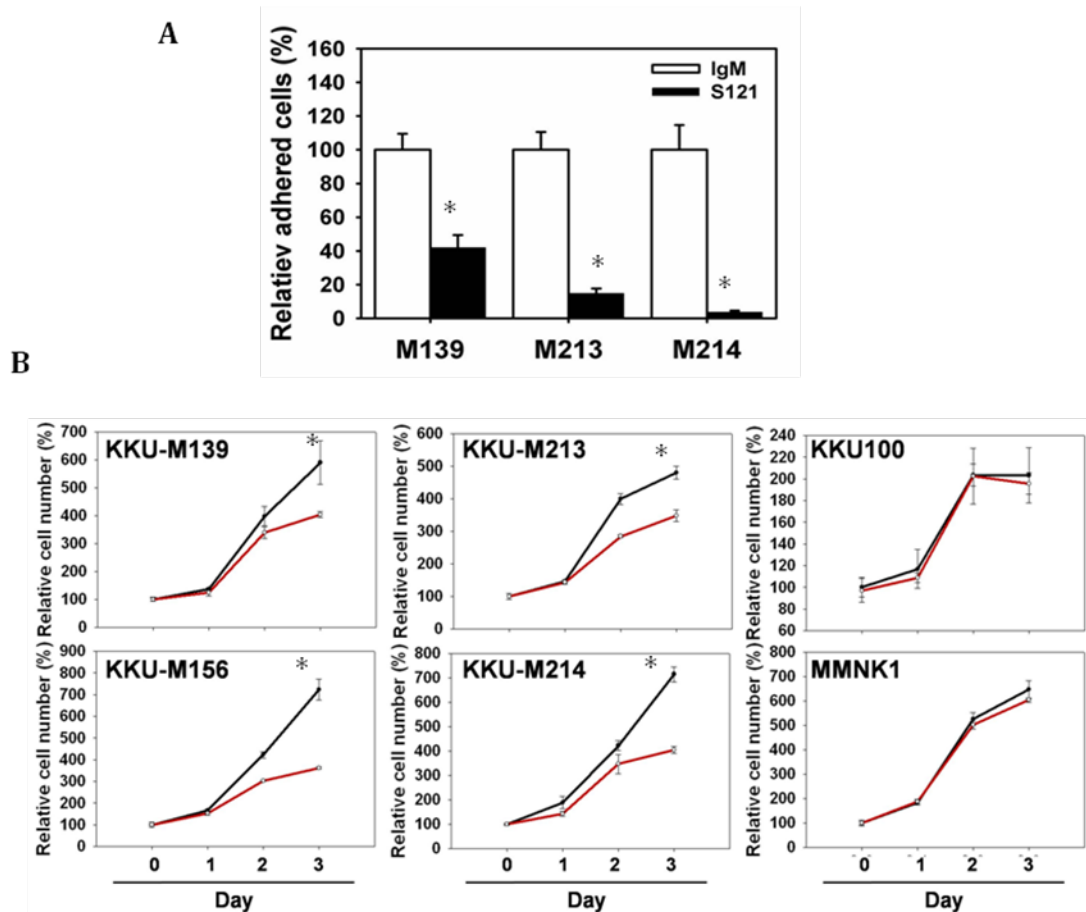
การศึกษารายละเอียดของแอนติเจน S27 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ในปี 2555 นี้ได้ศึกษา กลไกการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยศึกษาว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ยับยั้งการแบ่งเซลล์ผ่านการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis หรือยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) หรือไม่ ผลจากการศึกษาพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ยับยั้งการแบ่งเซลล์ได้ โดยไม่ผ่านกระบวนการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis หรือยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 ต่อการตายแบบ apoptosis และวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) การศึกษาผลกลไกการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (KKU-M139) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 โดย apoptosis assay (acridine orange staining) และ cell cycle analysis (flow cytometry) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ โดยไม่ผ่านกระบวนการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis หรือยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle)

13.4 ศึกษาบทบาทของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

ได้ทำการศึกษารายละเอียดของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีในหลอดทดลอง โดยทำการทดสอบการทำงานของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 แล้วศึกษาผลต่อการยึดเกาะ (adhesion assay) กับ extra cellular matrix (ECM, Matrigel) และการแบ่งตัว (proliferation assay, MTT) พบว่า การยับยั้งการทำงานของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 สามารถยับยั้งความสามารถของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในการยึดเกาะ และการแบ่งตัวได้ ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ต่อการยึดเกาะ และการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี พบว่า การยับยั้งการทำงานของแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 โดยการยับยั้งการทำงานของแอนติเจนบนผิวเซลล์ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 เป็นผลให้ความสามารถใน (A) การยึดเกาะของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKKU-M139 KKKU-M213 และ KKKU-M214 กับ extracellular matrix และ (B) แบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKKU-M139 KKKU-M156 KKKU-M213 และ KKKU-M214 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ IgM control ($P < 0.05$) โดยไม่กระทบต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKKU-100 และเซลล์เพาะเลี้ยงท่อน้ำดีปกติ MMNK1

14. อภิปรายผล/วิจารณ์

จากการผลิตและคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีศักยภาพในการจำแนกซีรั่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับซีรั่มคนปกติได้ 2 โคลน คือ S27 และ S121 โดยได้การศึกษาข้อมูลเชิงลึกเพื่อวิเคราะห์ และจำแนกชนิดของแอนติเจนที่จับจำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองไปแล้วนั้น ในปัจจุบันนี้ ได้ทำการศึกษการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 และ S121 ระหว่างการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยทำการย้อมชิ้นเนื้อตับที่ได้จากหนูแฮมสเตอร์ที่ถูก กระตุ้นให้มะเร็งท่อน้ำดีด้วยการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* (OV) ร่วมกับการ รับประทานก่อมะเร็ง Nitroso-dimethylamine (NDMA) ที่ระยะเวลา 1, 3, และ 6 เดือน หลังการกระตุ้น พบว่าแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 และ S121 มีระดับสูงขึ้นในท่อน้ำดีที่มี ความผิดปกติในหนูกลุ่ม CCA (OV+ NDMA) ตั้งแต่วันที่หนึ่งเดือนหลังการกระตุ้น โดย

แอนติเจนต่อ โมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 พบสูงขึ้นเฉพาะกลุ่ม CCA เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเพียง OV หรือ NDMA เพียงอย่างเดียว และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับทั้ง OV และ NDMA (non-treated) ส่วนแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 พบสูงขึ้นในกลุ่มที่มีความผิดปกติของท่อทางเดินน้ำดีทั้ง กลุ่ม CCA, OV, NDMA เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับทั้ง OV และ NDMA (non-treated) และจากการศึกษาบทบาทของแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 และ S121 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีพบว่า แอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 มีบทบาทสำคัญต่อการแบ่งตัว (proliferation) การเคลื่อนที่ (migration) และการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) โดยโมโน โคลนอลแอนติบอดี S27 และ S121 สามารถยับยั้งบทบาทดังกล่าวในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้ การศึกษาในปิงปประมานนี้ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวได้โดยไม่ ได้กระตุ้นการตายแบบ apoptosis และยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) ของเซลล์

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการรักษาผู้ป่วยที่มีคุณภาพต่อไปในอนาคต

15. เอกสารอ้างอิง

1. Hansel DE, Rahman A, Hidalgo M, Thuluvath PJ, Lillemoe KD, Shulick R, Ku JL, Park JG, Miyazaki K, Ashfaq R, Wistuba, II, Varma R, Hawthorne L, Geradts J, Argani P, Maitra A: Identification of novel cellular targets in biliary tract cancers using global gene expression technology. *Am J Pathol* 2003;163:217-229.
2. Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Beck A, Elliott P, Thomas HC: Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *J Hepatol* 2002;37:806-813.
3. Pungpak S, Akai PS, Longenecker BM, Ho M, Befus AD, Bunnag D: Tumour markers in the detection of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:277-279.
4. Jalanko H, Kuusela P, Roberts P, Sipponen P, Haglund CA, Makela O: Comparison of a new tumour marker, CA 19-9, with alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in patients with upper gastrointestinal diseases. *J Clin Pathol* 1984;37:218-222.
5. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Haglund C: CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 2002;22:2311-2316.
6. Katsanos KH, Kitsanou M, Christodoulou DK, Tsianos EV: High CA 19-9 levels in benign biliary tract diseases. Report of four cases and review of the literature. 2002;13:132-135.
7. Albert MB, Steinberg WM, Henry JP: Elevated serum levels of tumor marker CA19-9 in acute cholangitis. *Dig Dis Sci* 1988;33:1223-1225.

8. Qin XL, Wang ZR, Shi JS, Lu M, Wang L, He QR: Utility of serum CA19-9 in diagnosis of cholangiocarcinoma: in comparison with CEA. *World J Gastroenterol* 2004;10:427-432.
9. Juntavee A, Sripa B, Pugkhem A, Khuntikeo N, Wongkham S: Expression of sialyl Lewis(a) relates to poor prognosis in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:249-254.
10. Luengpailin S, Wongkham S, Wongkham C, Sripa B, Sirijaichingkul S, Chauin S, Proungvitaya T, Chokkanapitak J: Demonstration of a biliary-associated glycoprotein in human serum. *Clin Chim Acta* 1996;244:237-240.
11. Wongkham S, Boonla C, Kongkham S, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Sripa B: Serum total sialic acid in cholangiocarcinoma patients: an ROC curve analysis. *Clin Biochem* 2001;34:537-541.
12. Wongkham S, Bhudhisawasdi V, Chau-in S, Boonla C, Muisuk K, Kongkham S, Wongkham C, Boonsiri P, Thuwajit P: Clinical significance of serum total sialic acid in cholangiocarcinoma. *Clin Chim Acta* 2003;327:139-147.
13. Kongtawelert P, Tangkijvanich P, Ong-Chai S, Poovorawan Y: Role of serum total sialic acid in differentiating cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2178-2181.
14. Wongkham S, Sheehan JK, Boonla C, Patrakitkomjorn S, Howard M, Kirkham S, Sripa B, Wongkham C, Bhudhisawasdi V: Serum MUC5AC mucin as a potential marker for cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 2003;195:93-99.
15. Boonla C, Wongkham S, Sheehan JK, Wongkham C, Bhudhisawasdi V, Tepsiri N, Pairojkul C: Prognostic value of serum MUC5AC mucin in patients with cholangiocarcinoma. *Cancer* 2003;98:1438-1443.
16. Bhudhisawasdi V, Muisuk K, Areejitranusorn P, Kularbkaew C, Khampitak T, Saeseow OT, Wongkham S: Clinical value of biliary alkaline phosphatase in non-jaundiced cholangiocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:87-92.

ภาคผนวก