



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตและพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดี
เพื่อการวินิจฉัยและรักษา

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

คณะผู้วิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. โสพิศ วงศ์คำ

รองศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ สีสายวัฒน์

รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยศิริ วงศ์คำ

ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์

ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จาก
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มิถุนายน 2556

คำนำและกิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้วิจัยได้ดำเนินการเผยแพร่ผลงานจากโครงการวิจัยนี้ โดยการตีพิมพ์เป็น บทความวิจัยในวารสารวิชาการนานาชาติ ทั้งสิ้น 2 เรื่อง ได้แก่ (1) A novel carbohydrate antigen expression during development of *Opisthokchs viverrini*-associated cholangiocarcinoma in golden hamster: A potential marker for early diagnosis ในวารสาร *Parasitology International* ปี 2012 และ (2) CA-S27: A novel Lewis A associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma ในวารสาร *Cancer Science* ปี 2013

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนทุนวิจัยแก่โครงการนี้ Professor Dr. Nobuo Sakaguchi และ Associate Professor Dr. Kuzuhiko Kuwahara จาก Kumamoto University ประเทศญี่ปุ่น ที่อนุเคราะห์หนู Ganp-trangenic mice สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี Associate Professor Dr. Norie Araki และ Professor Seiji Okada จาก Kumamoto University และ Professor Dr. Hisashi Narimatsu จาก AIST ประเทศญี่ปุ่น ที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์คุณสมบัติและบทบาทของ แอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ ที่อนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี รองศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ปิ่นละออ และรองศาสตราจารย์ ดร. อธิรัตน์ บุญมาศ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ที่อนุเคราะห์เนื้อเยื่อหนูแฮมสเตอร์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัย และขอขอบคุณอาจารย์และนักศึกษบัณฑิตศึกษา ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัยในโครงการ

ศาสตราจารย์โสพิศ วงศ์คำ

หัวหน้าโครงการวิจัย

28 มิถุนายน 2556

บทคัดย่อภาษาไทย

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย การศึกษาในปัจจุบันพบอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีเพิ่มสูงขึ้นในหลายประเทศทั่วโลก ข้อจำกัดในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี คือ การตรวจพบผู้ป่วยในระยะที่มะเร็งมีการแพร่กระจายลุกลามไปยังอวัยวะอื่นแล้ว ทำให้การรักษาไม่ได้ประสิทธิภาพเท่าที่ควร ดังนั้นการวินิจฉัยผู้ป่วยตั้งแต่เป็นมะเร็งระยะแรกจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วย การศึกษาค้นคว้านี้ได้ทำการตรวจการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อ โมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 และ S121 ในเนื้อเยื่อตับของหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งท่อน้ำดี ด้วยการติดเชื้อพยาธิ *Opisthorchis viverrini* (OV) ร่วมกับการได้รับสารก่อมะเร็ง nitroso-dimethylamine (NDMA) ด้วยวิธี immunohistochemistry เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ และกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิ OV หรือกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็ง NDMA เพียงอย่างเดียว ที่ระยะเวลา 1, 3, และ 6 เดือนหลังการกระตุ้น โดยพบการแสดงออกของแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 และ S121 มีระดับสูงขึ้นในท่อน้ำดีที่มีความผิดปกติในหนูกลุ่ม CCA (OV+ NDMA) ตั้งแต่หนึ่งเดือนหลังการกระตุ้น โดยพบแอนติเจนต่อ โมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 สูงขึ้นเฉพาะกลุ่ม CCA เปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ส่วนแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 พบสูงขึ้นในหนูกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้เป็น CCA กลุ่มที่ติดเชื้อ พยาธิ OV และกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็ง NDMA เพียงอย่างเดียว โดยไม่พบการแสดงออกในหนูกลุ่มปกติ และจากการศึกษาบทบาทของแอนติเจนต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 และ S121 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีพบว่าแอนติเจน ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S27 มีบทบาทสำคัญต่อการแบ่ง ตัว (proliferation) การเคลื่อนที่ (migration) และการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) โดยโมโนโคลนอล แอนติบอดี S27 และ S121 สามารถยับยั้ง บทบาทดังกล่าวในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีได้

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Cholangiocarcinoma (CCA) is a major health problem in Thailand and the incidence of CCA is now increasing worldwide. A lot of knowledge on CCA has been extensively revealed in the past decades, however the effectiveness of CCA treatment is still very low. This is due to the fact that most of CCA patients are diagnosed at the late stage when tumors have been metastasized. Treating patients at the early stage is the only curative therapy at present, however there is no early marker available for CCA. Our study is aimed to investigate whether the S27 and S121 monoclonal antibody (mAb) can be used for early detection of CCA in hamster model. Liver tissue sections from hamsters with CCA and those infected by *Opisthorchis viverrini* (OV) and those treated with nitrosodimethylamine (NDMA), were analyzed for the expression of S27 or S121 antigens. The expression of antigens recognized by S27-mAb and S121-mAb were elevated in bile duct of CCA developing hamsters as early as 1 month and gradually increased until 6 months after treatment. The antigen for S27-mAb was not detected in bile duct of non-treated, OV-infected, and NDMA-treated hamsters. Antigen for S121-mAb was undetectable in bile duct of non-treated hamster, but was elevated in bile duct of OV-infected and NDMA-treated groups. These evidences suggested the possibility of using antigens of S27-mAb and S121-mAb for the early detection of CCA. In addition, the functional analysis revealed that antigens of S27-mAb and S121-mAb played important roles in CCA cell proliferation, migration, and invasion. This information suggested the potential of using antigens recognized by S27-mAb and S121-mAb as the target for CCA treatment in the future.

สารบัญ

	หน้า
คำนำและกิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญภาพ	vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vii
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของแผนงานวิจัย	2
วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
ขอบเขตของโครงการวิจัย	7
ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย	7
ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	8
วัตถุประสงค์ของโครงการในปีงบประมาณ 2555	9
วิธีการดำเนินการและผลการวิจัย	9
อภิปราย/วิจารณ์ผลการศึกษา	13
เอกสารอ้างอิง	14
ภาคผนวก	15

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การแสดงออกของแอนติเจน S27 ในเนื้อเยื่อตับหนูแฮมเตอร์โดยวิธี immunohistochemistry	10
รูปที่ 2 การแสดงออกของแอนติเจน S121 ในเนื้อเยื่อตับหนูแฮมเตอร์โดยวิธี immunohistochemistry	11
รูปที่ 3 ผลของโมนโคลอนอลแอนติบอดี S27 ต่อการตายแบบ apoptosis และวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle)	12
รูปที่ 4 ผลของโมนโคลอนอลแอนติบอดี S121 ต่อการยึดเกาะ และการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี	13

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

CA19-9	Carbohydrate antigen 19-9
CCA	Cholangiocarcinoma
CEA	Carcinoembryonic antigen
cDNA	Complementary DNA
ECM	Extracellular matrix
ELISA	Enzyme-linked immnosorbent assay
ETH	Ethanol
Ganp	Germinal center associated nuclear protein
HCC	Hepatacellular carcinoma
IHC	Immunohistochemistry
mAb	Monoclonal antibody
mmol	Milliliter
MUC	Mucin
NDMA	Nitroso-dimethylamine
OV	<i>Opisthorchis viverrini</i>
SBA	Soy bean agglutinin
SBG	SBA binding glycoprotein's
SD	Standard deviation
Tg	Transgenic