

การตรวจคัดยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดี Screening of drug resistant genes in cholangiocarcinoma stem cells

1. คณะผู้วิจัย

ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 รศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 ผศ. ดร. วชิรินทร์ ลอยลม ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 ผศ. ดร. วิไลรัตน์ ลื่อนันต์ศักดิ์ศิริ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
 นส. กุลธิดา กุลบุตร ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. แหล่งทุน ทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น โครงการต่อเนื่อง 3 ปี ปี 2554 เป็นปีที่ 2

3. แผนงานวิจัย การพัฒนาชุดวินิจฉัยมะเร็งตับในอีสาน

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์ (applied research)

สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาที่ทำการวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชีวเคมี มะเร็ง

คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย Cholangiocarcinoma stem cells, Cancer stem cell, CD133, Cholangiocarcinoma, Cancer, Chemotherapeutic drugs, Drug resistant screening

4. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) เป็นเซลล์ที่สามารถพัฒนา (differentiation) เป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่มีหน้าที่จำเพาะ ปัจจุบันการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว โดยหวังว่าจะสามารถพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อทดแทนเซลล์ที่สูญเสียในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะได้ นอกจากนี้ได้มีการค้นพบเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Cancer stem cells) ในมะเร็งหลายชนิด เซลล์ดังกล่าวมีคุณสมบัติคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดหลายประการ กล่าวคือ สามารถจำลองตัวเองได้ (self renewal) สามารถพัฒนาเป็นเซลล์หลายชนิดในก้อนมะเร็ง (potential to develop into any cell in the overall tumor population) และสามารถเพิ่มจำนวนไม่มีที่สิ้นสุด (capacity to proliferate extensively) [1] การศึกษาในรายละเอียดพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมีการแสดงออกของโมเลกุลหลายชนิดที่ต่างจากเซลล์ต้นกำเนิดปกติ เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสามารถทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง [3] สามารถอยู่รอดจากยาเคมีบำบัด (chemotherapy) โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาเคมีบำบัด [4] การที่เซลล์ต้นกำเนิดมักอยู่ในสภาพที่ไม่แบ่งตัว (quiescent state) [5] จึงไม่ถูกทำลายด้วยยาเคมีบำบัดหรือรังสีรักษา (radiotherapy) ซึ่งมักทำลายเซลล์ที่แบ่งตัวเร็ว ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีสมมุติฐานที่เชื่อว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นสาเหตุของการเกิดซ้ำของมะเร็ง (relapse) และการกระจายตัวของมะเร็ง (metastasis) หลังการผ่าตัดก้อนมะเร็งออกหรือหลังได้รับการรักษา ดังนั้นการกำจัดหรือทำลายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจึงเป็นการรักษามะเร็งที่ได้ผลสัมฤทธิ์สูงสุด

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากพบอุบัติการณ์ของโรคสูงที่สุดในประเทศและในโลก [6] ปัจจัยเสี่ยงที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย คือการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ ซึ่งแตกต่างจากประเทศตะวันตกที่มีสาเหตุจากการอักเสบเรื้อรังที่เกิดจาก sclerosing cholangitis, การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ [7] หรือการอักเสบจากสารเคมีบางชนิด การรักษาที่ได้ผลดีที่สุดคือการผ่าตัดเอามะเร็งทั้งหมดออก ซึ่งจะได้ผลดีเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งในระยะแรกที่ยังไม่มีการแพร่ลุกลามไปยังอวัยวะอื่น อย่างไรก็ตามพบว่า

อัตราการเกิดมะเร็งซ้ำ (Recurrence) หลังได้รับการผ่าตัดในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีค่อนข้างสูง และมักเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต โดยพบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอัตราการอยู่รอด 5 ปีเพียง 17-40% ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma), 9-27% ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนต้น (Perihilar cholangiocarcinoma) และ 20-37% ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีนอกตับส่วนปลาย (Distal cholangiocarcinoma) [8] เนื่องจากธรรมชาติของมะเร็งท่อน้ำดีมักไม่มีอาการแสดงที่ชัดเจนในระยะแรก ดังนั้นผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงมารับการรักษาเมื่อมะเร็งได้พัฒนาสู่ระยะท้ายของโรค ซึ่งไม่สามารถรักษาด้วยการผ่าตัดได้ นอกจากนี้การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดและหรือรังสีรักษายังให้ผลไม่เป็นที่พอใจ [9] และยังไม่มีแผนการรักษามาตรฐานที่ได้ผลดี ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งท่อน้ำดีให้ได้ผลดีจึงมีความจำเป็นและสำคัญต่อการดูแลผู้ป่วยกลุ่มนี้

ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์สามารถคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดตับ (Human liver stem cells; HLSCs) ที่สามารถพัฒนาเป็นเซลล์ตับ (hepatocyte) และเซลล์ท่อน้ำดี (cholangiocyte) ได้เมื่ออยู่ในภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม [10, 11] โดยเซลล์ต้นกำเนิดเหล่านี้จะมีการแสดงออกของโมเลกุลที่พบจำเพาะในเซลล์ตับและเซลล์ท่อน้ำดี รวมทั้งโมเลกุลที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด เช่น CD34, CD133, C-kit เป็นต้น โมเลกุลจำเพาะเหล่านี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ของเซลล์ต้นกำเนิด โดยเฉพาะ CD133 มีการใช้เพื่อบ่งชี้และค้นหาเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็งตับด้วย [12]

ด้วยข้อมูลต่าง ๆ และความสำคัญของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในการก่อโรคมะเร็งท่อน้ำดี การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดีในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ศึกษาความสัมพันธ์ของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดีและความรุนแรงของโรค และคัดเลือกเซลล์ดังกล่าวจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (cell line) ที่พัฒนามาจากผู้ป่วยไทย เพื่อศึกษาคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาเคมีบำบัด ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการพัฒนาการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

5. วัตถุประสงค์โครงการ (ต่อเนื่อง 3 ปี)

- ศึกษาการแสดงออกของตัวบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิด CD133 ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก CD133 กับความรุนแรงของโรค
- คัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของ CD133 จากเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากผู้ป่วยไทย
- ศึกษาคุณสมบัติและยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาเคมีบำบัดในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดี

6. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- กระบวนการและองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับวิธีและตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดี
- Prognostic marker ใหม่ของมะเร็งท่อน้ำดีหากพบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งกับความรุนแรงของโรค
- สามารถใช้ข้อมูลของยีนดื้อยาที่ตรวจพบในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดีเพื่อพัฒนาการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีประสิทธิภาพต่อไป ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อแพทย์ผู้ให้การรักษาและตัวผู้ป่วยเอง
- ตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารวิชาการนานาชาติ และนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ อย่างน้อย 1 ครั้ง เมื่อสิ้นสุดโครงการ

7. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) เป็นเซลล์ที่สามารถพัฒนา (differentiation) เป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่มีหน้าที่จำเพาะ ปัจจุบันการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว โดยหวังว่าจะสามารถพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อทดแทนเซลล์ที่สูญเสียในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะได้ ได้มีการศึกษาเพื่อคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดตับเพื่อใช้ในการรักษาโรคตับเรื้อรังหลายชนิด ผลการศึกษาในสัตว์ทดลองชี้แนะว่าแหล่งที่พบเซลล์ต้นกำเนิดตับมีอย่างน้อย 4 แห่งด้วยกัน คือ เซลล์ตับ (hepatocyte), เซลล์ท่อน้ำดีส่วนปลายทั้ง interlobular bile ductule และ canal of Hering (เรียกเซลล์ต้นกำเนิดบริเวณนี้ว่า oval cells) และจากเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งเซลล์ทั้ง 4 แห่งจะมีการตอบสนองต่อสารเคมีแตกต่างกัน [11] พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดตับมีการแสดงออกทั้งของโมเลกุลที่พบจำเพาะในเซลล์ตับและที่พบจำเพาะในเซลล์ท่อน้ำดี ร่วมกับโมเลกุลที่มักพบในเซลล์ต้นกำเนิดอื่น ๆ รวมถึงเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดด้วย คุณสมบัติเหล่านี้บ่งชี้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดตับน่าจะพัฒนาเป็นเซลล์ตับและเซลล์ท่อน้ำดีได้ (bi-potential stem cells) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ดังกล่าวปลูกถ่ายเข้าไปในหนูที่ตับถูกตัดออกบางส่วน พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีผลต่อการฟื้นตัวของตับ [10, 13]

การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชี้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งและเป็นสาเหตุของการกลับเป็นซ้ำหรือการแพร่กระจายของมะเร็งหลังได้รับการรักษา มีความพยายามที่จะอธิบายที่มาของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งหลายชนิด สำหรับมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดี การศึกษาในสัตว์ทดลองที่เหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งตับโดยสารเคมี (chemical induced carcinogenesis) พบว่า มะเร็งตับที่เกิดในแต่ละวัยของหนู เป็นมะเร็งคนละชนิดกัน กล่าวคือ มะเร็งตับที่เกิดขึ้นเมื่อให้สารเคมีในสัตว์ทดลองตัวอ่อน เป็นชนิด Hepatoblastoma ซึ่งไม่พบเมื่อให้สารเคมีชนิดเดียวกันในสัตว์ทดลองตัวเต็มวัย และเมื่อสัตว์ทดลองมีอายุมากขึ้นลักษณะของเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นก็จะต่างกันไป เมื่อศึกษาถึงแหล่งที่มาของเซลล์มะเร็งก็พบว่ามะเร็งแต่ละชนิดมีแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน [13, 14] และเป็นที่มาของทฤษฎี Maturation Arrest ซึ่งเชื่อว่ามะเร็งตับเกิดจากความผิดปกติในกระบวนการพัฒนาของเซลล์ตัวอ่อน ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงคุณลักษณะและคุณสมบัติไป และเชื่อว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งตับนั้นมีที่มาจากเซลล์เดียวกันคือ เซลล์ Periductular oval cells และ Adult ductal liver progenitor cells [15] ซึ่งการพัฒนาเป็นมะเร็งท่อน้ำดีหรือมะเร็งตับนั้น ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมและตัวกระตุ้น

โมเลกุลจำเพาะหลายชนิดของเซลล์ต้นกำเนิดได้ถูกนำมาใช้เพื่อค้นหาและคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็งหลายชนิด (ดังตารางที่ 1) โมเลกุลที่ได้มีการใช้อย่างแพร่หลายและมีการนำมาประยุกต์ใช้กับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งตับ คือ CD133 หรือ Cluster designation (CD) 133 หรือ Prominin-1 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ผิวเซลล์มีขนาดประมาณ 120 kD มีคุณสมบัติเป็น five transmembrane glycoprotein โมเลกุลดังกล่าวมีการค้นพบครั้งแรกในเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดที่มีการแสดงออกของ CD34 (CD34+ hematopoietic stem cells) [16, 17] จึงมีการใช้โมเลกุลดังกล่าวในการค้นหาและคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดจากอวัยวะต่าง ๆ และเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งอย่างแพร่หลาย [18] สำหรับเซลล์ต้นกำเนิดตับซึ่งสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ตับและเซลล์ท่อน้ำดีก็พบการแสดงออกของโมเลกุลดังกล่าวเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบ CD133 ในเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีบางชนิดด้วย และสามารถใช้ CD133 ในการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้ [12, 19, 20] ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้ CD133 เป็นโมเลกุลเป้าหมายในการค้นหาและคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดี

ผลการศึกษาในมะเร็งตับพบว่า สามารถตรวจพบเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 ในชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วย [12] และเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลานาน [20] นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีเซลล์ที่แสดงออก CD133 จำนวนมากในเนื้อมะเร็งจะมีระยะรอดชีพโดยรวม (overall survival)

และระยะปลอดโรค (disease-free survival) น้อยกว่าผู้ป่วยที่มีเซลล์ดังกล่าวน้อย ประมาณ 2.4 เท่า [12] และเมื่อศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับพบว่าเซลล์แต่ละชนิดมีการแสดงออกของ CD133 ไม่เท่ากัน โดยจำนวนเซลล์ที่แสดงออก CD133 สัมพันธ์กับความสามารถในการสร้างก้อนเนื้องอกในสัตว์ทดลอง [20] ได้มีการใช้ CD133 ในการค้นหาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดีเช่นเดียวกัน พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่คัดได้จากมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดซีเรื้อรัง มีการแสดงออกของ Cytokeratin 14 ซึ่งพบการแสดงออกในเซลล์ต้นกำเนิดของตับ, และ Cytokeratin 7 และ Hepatocyte paraffin 1 ซึ่งพบการแสดงออกได้ในเซลล์ท่อน้ำดีและเซลล์ตับตามลำดับ ข้อมูลนี้แสดงว่าเซลล์ต้นกำเนิดที่คัดได้จากมะเร็งท่อน้ำดีก็มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ต้นกำเนิดของตับเช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็งตับ [19]

สำหรับโครงการวิจัยที่เสนอนี้นอกจากใช้ CD133 ในการค้นหาและคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดในชิ้นเนื้อมะเร็งจากผู้ป่วยและในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีแล้ว จะมีการตรวจคุณลักษณะของเซลล์ดังกล่าว โดยใช้ Antibody ต่อ Oval cell (ov6 พบการแสดงออกใน oval cells), Cytokeratin 18 และ albumin (พบการแสดงออกใน hepatocyte), Cytokeratin 19 (พบการแสดงออกใน cholangiocyte), และ Glypican-3 (พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในมะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับ) ซึ่งเป็นคุณลักษณะจำเพาะของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับ [19, 21, 22]

ปัญหาใหญ่ที่พบในการรักษามะเร็งด้วยยาเคมีบำบัด คือการดื้อต่อยา ซึ่งมีกลไกหลายอย่าง เช่น การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยา การเปลี่ยนแปลงไม่ให้ยาสามารถทำงานได้ การทำให้ยาคงอยู่ภายในเซลล์น้อยลงโดยการเพิ่มการขับยาออกจากเซลล์ การลดการนำยาเข้าเซลล์หรือการเก็บยาในส่วนต่างๆของเซลล์ หรือแม้แต่การเปลี่ยนแปลงที่กลไกการตายของเซลล์ [23] พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมีกลไกการดื้อยาเคมีหลายกลไก เช่น การเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำยาออกจากเซลล์ การเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ เป็นต้น [4, 24] สำหรับการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาเคมีของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดี โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำยาเข้า-ออกจากเซลล์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตาย ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลสำคัญในการปรับปรุงและพัฒนาแนวทางการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัดต่อไป

8. ขอบเขตของโครงการวิจัย

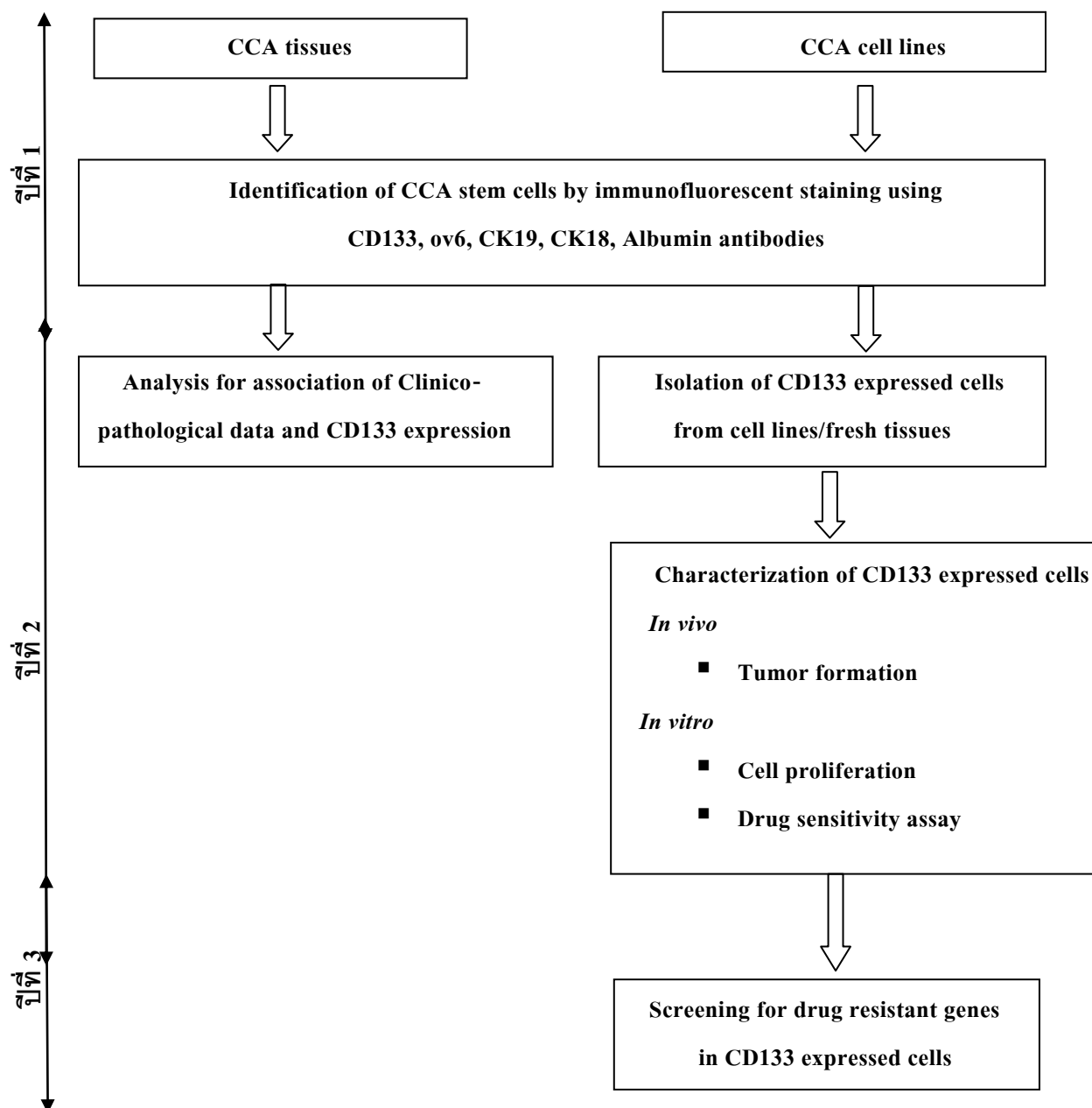
การศึกษานี้ใช้ CD133 ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะของเซลล์ท่อน้ำดีเป็นตัวบ่งชี้เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดี โดยศึกษาใน Paraffin embedded tissues ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เข้ารับการรักษาโดยการผ่าตัด ณ รพ. ศรียาตรา ศณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งระเบียบวิธีวิจัยและการจัดเก็บเนื้อเยื่อชีวภาพได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นแล้ว (HE450525) ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีเป็นเซลล์ที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีไทย โดย รศ. บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยาและศุนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

9. ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

ระยะเวลาทำการวิจัยตลอดโครงการ 3 ปี

- ปีที่ 1 (2553) ศึกษาการแสดงออกของ stem cell marker ใน CCA cell lines และ CCA tissues
- ปีที่ 2 (2554) ศึกษาคุณสมบัติของ CD133+ CCA cell lines ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* และศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ stem cell marker ในเนื้อเยื่อ CCA และพยาธิสภาพของผู้ป่วย
- ปีที่ 3 (2555) ศึกษาการแสดงออกของยีนดื้อยาใน CD133+ CCA cell lines

10. ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



11. วัตถุประสงค์โครงการในปีงบประมาณ 2554

เพื่อศึกษาการแสดงออกของ stem cell marker ใน CCA cell lines และ ศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ที่แสดงออก stem cell marker; CD133 ทั้ง *in vitro* และ *in vivo*

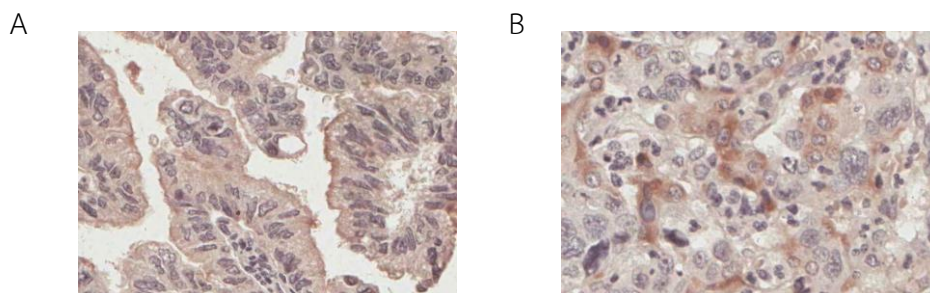
12. วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

12.1 ศึกษาการแสดงออกของ stem cell markers ใน CCA tissues

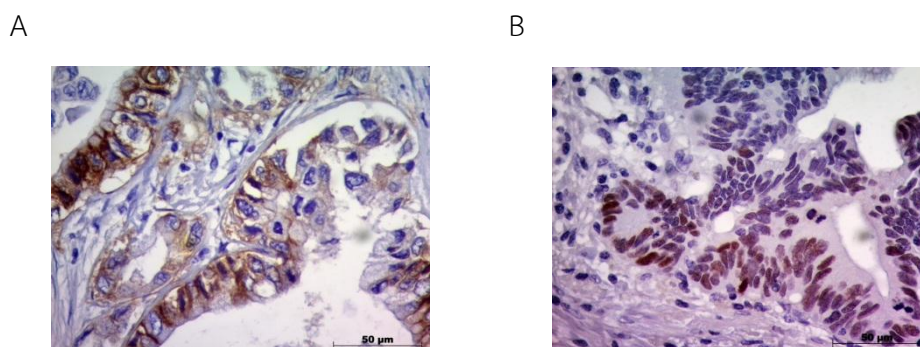
ผู้วิจัยได้ติดตามสัญญาณการแสดงออกของ CD133 ใน tissue array จำนวน 6 slides (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ขวลิต ไพโรจน์กุลและรศ. บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์) ซึ่งมีขึ้นเนื่องจากผู้ป่วยทั้งสิ้น 428 spots ได้ผลโดยสรุปดังนี้

จากทั้งหมด 428 spots พบว่ามีสามารถตรวจพบสัญญาณ CD133 ได้ทั้งหมด 37 spots คิดเป็น 8.64% โดยพบว่าสามารถตรวจพบการแสดงออกของ CD133 ที่เยื่อหุ้มเซลล์และในไซโตซอลของ

เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (ดังแสดงในรูปที่ 1A, 1B ตามลำดับ) หลังจากนั้นได้คัดเลือกชิ้นเนื้อที่มีการแสดงออกของ CD133 จำนวน 30 ราย เพื่อตรวจสอบหาการแสดงออกของ stem cell marker อื่นๆ เช่น EpCAM, SOX2 เพื่อการแสดงออกร่วมกันของ stem cell marker ต่างๆ (ดังแสดงในรูปที่ 2)



รูปที่ 1 การแสดงออกของ CD133 ในชิ้นเนื้อ Paraffin embedded tissues จากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ใน tissue arrays พบการแสดงออกของ CD133 ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (A) และ ในไซโตซอล (B) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (ภาพแสดงกำลังขยาย 400x)

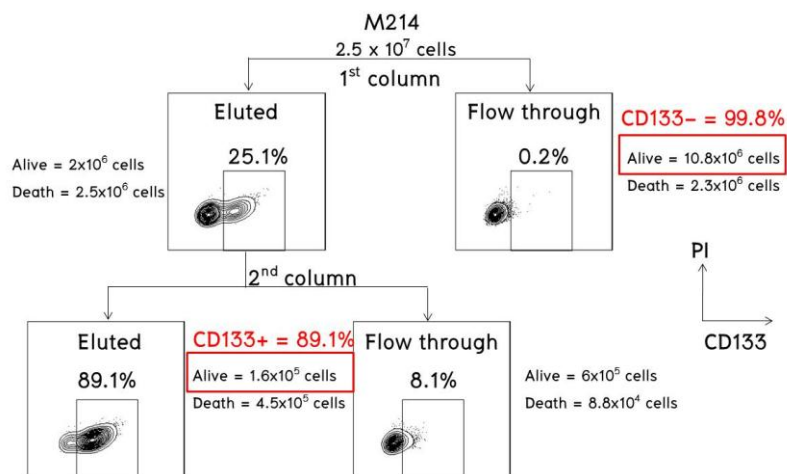


รูปที่ 2 การแสดงออกของ EpCAM (A) และ SOX2 (B) ในชิ้นเนื้อ Paraffin embedded tissues จากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตรวจพบการแสดงออกของ CD133 (ภาพแสดงกำลังขยาย 400x)

ขณะนี้อยู่ระหว่างการรวบรวมผลการศึกษาดังวิธี immunohistochemistry staining โดยพยาธิแพทย์ เพื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของการแสดงออกของ CD133 และ stem cell marker อื่นๆ ในเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ marker ต่างๆ และพยาธิวิทยาคลินิกต่อไป

12.2 การคัดแยกเซลล์ที่มีแสดงออกของ CD133 จากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

จากการศึกษาในปีที่ 1 ผู้วิจัยพบความหลากหลายของการแสดงออกของ CD133 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้พัฒนามาจากผู้ป่วยไทย จึงได้ทำการคัดแยกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 จากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี Cell sorter (M213) และ CD133 (M214) microbead kits พบว่าสามารถแยกเซลล์ที่มี CD133 ที่ผิวเซลล์ได้มีความบริสุทธิ์ 89.1% ในกลุ่มที่เป็น CD133 positive cell และพบว่ามีเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์ในกลุ่มที่เป็น CD133 negative cell น้อยกว่า 1% (ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 3)

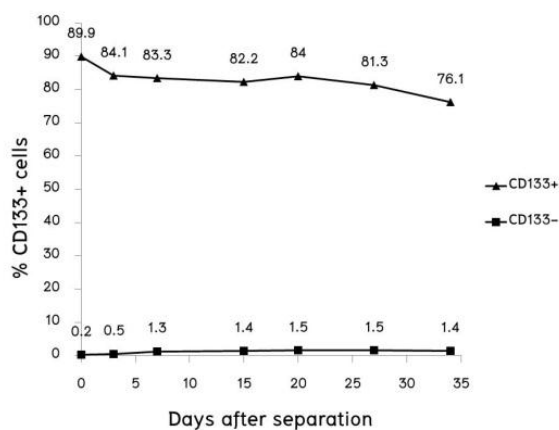


รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงการคัดแยก CD133 positive cells โดยแสดงการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยง M214 เมื่อผ่านการคัดแยกโดยใช้ CD133 microbead kit หลังการคัดแยกด้วย magnetic column ครั้งที่ 1 (CD133 positive cells = 25.1%) และเมื่อผ่าน magnetic column ครั้งที่ 2 (CD133 positive cells = 89.1%) และเรียกเซลล์ดังกล่าวว่า CD133 positive cell และเซลล์ที่ได้จาก flow through ครั้งที่ 1 ซึ่งมีการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์ 0.2% ว่า CD133 negative cells (แกนนอนแสดงความเข้มของการติดสีของ CD133 และแกนตั้งแสดงการติดสี propidium iodide)

12.3 การศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133

12.3.1 ความสามารถในการรักษาคุณสมบัติการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์

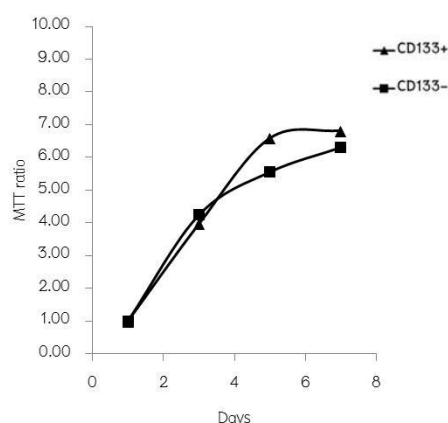
หลังจากการคัดแยกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์ออกจากเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์ ผู้วิจัยได้ทำสอบคุณสมบัติในการรักษาคุณสมบัติการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์ของเซลล์มะเร็ง ผู้วิจัยได้ติดตามการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์ M214 เป็นเวลา 35 วันพบว่าเซลล์คงคุณสมบัติในการแสดงออก CD133 ที่ผิวเซลล์ได้ปานกลาง โดยในวันที่ 35 พบว่าที่การแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์กลุ่ม CD133 positive cells 76.1% และมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์กลุ่ม CD133 negative cells จาก 0.2% เป็น 1.4% (ดังแสดงในรูปที่ 4) ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถนำเซลล์ดังกล่าวไปปลูกถ่ายในสัตว์ทดลอง ได้เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วันโดยคาดว่าเซลล์หลังการปลูกถ่ายน่าจะยังคงคุณสมบัติในการแสดงออก CD133 ที่ผิวเซลล์



รูปที่ 4 กราฟแสดงการติดตามการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์ M214 ที่ได้รับการคัดแยกแบ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์ (CD133+) และเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์ (CD133-)

12.3.2 คุณสมบัติในการเจริญเติบโต

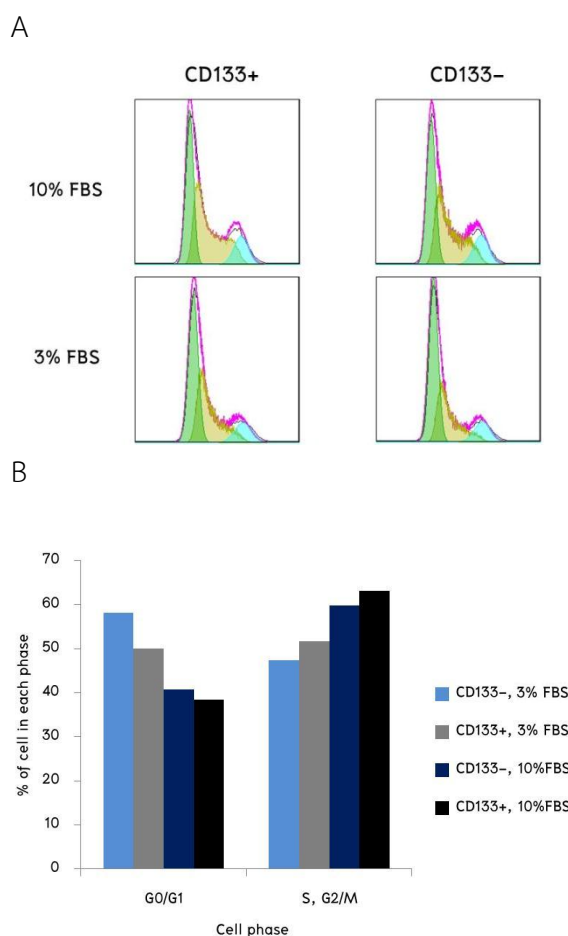
เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์ M214 ที่มีการแสดงออกของ CD133 และเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในระบบ in vitro โดยวิธี MTT Cell proliferation viability assay พบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 และเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 ไม่มีความแตกต่างของการเจริญเติบโตในระบบ in vitro (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ M214 ที่มีการแสดงออกของ CD133 (CD133+) และเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 (CD133-) โดยวิธี MTT cell proliferation/viability assay เซลล์ทั้ง 2 กลุ่มจำนวน 3000 เซลล์ได้ถูกเลี้ยงใน 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ fetal bovine serum 10% และเซลล์จะถูกวัดการเปลี่ยนแปลงสาร tetrazolium ที่มีสีเหลืองเป็น formazan ที่มีสีม่วงโดยวัด OD595 โดยเครื่อง microplate reader ผลการทดลองไม่พบว่ามีมีความแตกต่างของการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

12.3.3 การกระจายของเซลล์ในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์

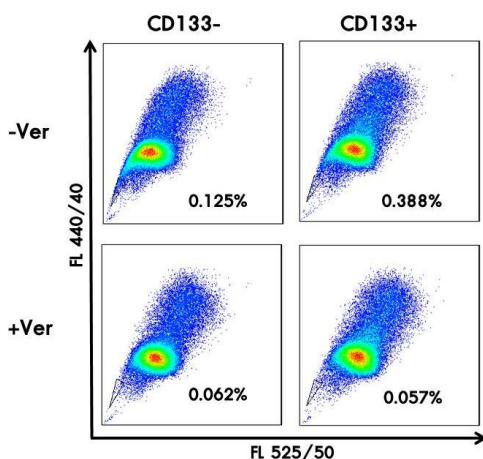
ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบการกระจายของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ เพื่อบ่งบอกถึงความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 กลุ่ม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ fetal bovine serum ที่ 3% และ 10% พบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 ที่ผิวเซลล์มีการกระจายตัวอยู่ในวัฏจักรเซลล์ในระยะ S และ G2M มากกว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 ปรากฏการณ์ดังกล่าวพบเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ fetal bovine serum ทั้ง 2 ความเข้มข้น (3% และ 10% FBS)



รูปที่ 6 การกระจายตัวของเซลล์ในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์ A. Histogram แสดงการกระจายของเซลล์ในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์ B. กราฟแสดงการกระจายตัวของเซลล์ในระยะ G0/G1 และ S/G2/M ของวัฏจักรเซลล์ เซลล์ M214 ที่มีการแสดงออกของ CD133 (CD133+) และเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 (CD133-) ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของ fetal bovine serum 3% (3% FBS) และ 10% (10%FBS) เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงได้ถูก fix ด้วย 70% ethanol เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมงและย้อมด้วย propidium iodide ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ DNA content ด้วยเครื่อง flow cytometry

12.3.4 ความสามารถในการขับยาออกจากเซลล์

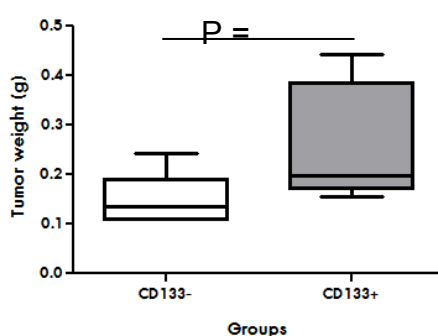
Side population เป็นคุณสมบัติหนึ่งซึ่งสามารถใช้ในการคัดเลือก cancer stem cells โดยในปี 2006, Chiba และคณะได้อาศัยคุณสมบัติการขับสารหรือยาออกจากเซลล์ที่เรียกว่า side population เพื่อใช้ในการคัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยง hepatocellular carcinoma ที่มีคุณสมบัติคล้าย cancer stem cells [25] ผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 น่าจะมีเซลล์กลุ่ม side population มากกว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์ M214 ที่มีการแสดงออกของ CD133 มี side population cells = 0.388% ซึ่งมากกว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 ที่มี side population cells = 0.125%



รูปที่ 7 dot plot แสดงการตรวจวัดปริมาณ side population cells ในเซลล์ M214 ที่มีการแสดงออกของ CD133 (CD133+) และไม่มีการแสดงออกของ CD133 (CD133-) เซลล์จะถูกย้อมด้วยสี DyeCycle Violet (DCV) ตามวิธีที่เคยมีการรายงานมาก่อน [26] ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่และเซลล์จะถูกตรวจวัดการคงอยู่ของ DCV ในเซลล์โดย flow cytometry โดยใช้ filter 440/40 และ 525/50 nm เซลล์บางส่วนขณะถูกย้อมด้วย DCV จะได้รับ verapamil (+Ver) เพื่อยับยั้งการทำงานของตัวขนส่ง และเซลล์ที่การติดสีเปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับการตรวจวัดดังกล่าวจะถูกเรียกว่า side population cells (แสดงในกรอบสามเหลี่ยม) ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 มี side population cells มากกว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133

12.3.5 ความสามารถในการพัฒนาเป็นก้อนมะเร็งในหนู

เพื่อทดสอบคุณสมบัติในก่อมะเร็ง (tumorigenicity) ได้ทดสอบโดยฉีดเซลล์ M214 ที่มีการแสดงออกของ CD133 และไม่มีการแสดงออกของ CD133 เข้าที่ชั้นใต้ผิวหนังของหนู NOD/SCID/Jak^{-/-} (NOJ) [27] ซึ่งพร้อมภูมิคุ้มกัน พบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 มีการเจริญเติบโตเร็วกว่าเซลล์ที่ไม่แสดงออกของ CD133 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักของก้อนมะเร็งที่ได้จากการปลูกถ่ายเซลล์ M214 ที่มีการแสดงออกของ CD133 (CD133+) และไม่มีการแสดงออกของ CD133 (CD133-) โดยเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มได้รับการปลูกถ่าย โดยฉีดเซลล์จำนวน 100,000 เซลล์เข้าที่ชั้นใต้ผิวหนังบริเวณสีข้างของหนู โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 ฉีดเข้าที่ข้างขวาและเซลล์ที่ไม่แสดงออกของ CD133 ฉีดเข้าที่ซ้าย หลังจากรัน 2 สัปดาห์ก้อนมะเร็งได้ถูกนำออกมาเพื่อชั่งน้ำหนัก ผลการศึกษาพบว่าก้อนมะเร็งที่ได้จากการฉีดเซลล์ที่มีการ

แสดงออกของ CD133 มีการเจริญเติบโตมากกว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0313$)

13. อภิปรายผลและวิจารณ์

ผลการศึกษาการแสดงออกของ stem cell markers ในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีพบว่า มีการแสดงออกของ stem cell marker; CD133 จำนวน 8.64% ซึ่งแตกต่างจากที่เคยมีการรายงานการแสดงออกของ CD133 ในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เคยมีมาก่อน โดย Leelawat K. [28] เคยรายงานว่าในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 34 ตัวอย่าง ตรวจพบการแสดงออกของ CD133 จำนวน 23 ตัวอย่าง คิดเป็น 67.6% ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดจากการติดตาม CD133 โดยใช้ antibody ที่จดจำ epitope ที่แตกต่างกัน ซึ่งได้เคยมีรายงานว่าติดตาม CD133 โดยติดตามการแสดงออกของ AC133 epitope นั้นเป็นการติดตาม cancer stem cell differentiation [29] ซึ่งการศึกษาปัจจุบันนี้ผู้วิจัยได้ติดตามการแสดงออกของ CD133 โดยติดตามการแสดงออกของ AC133 epitope นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ติดตามการแสดงออกของ stem cell markers อื่นๆ เช่น EpCAM และ SOX2 ด้วย เพื่อดูการแสดงออกร่วมกัน และกำลังอยู่ในระหว่างการแปลผลโดยพยาธิแพทย์และรวบรวมผลเพื่อการวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาศักยภาพการแสดงออกของ CD133 ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและได้เลือกเซลล์ M214 ซึ่งมีการแสดงออกของ CD133 ในระดับต่ำที่สุด เพื่อนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษา โดยผู้วิจัยได้ใช้การคัดแยกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 ออกจากเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 โดยอาศัย magnetic column และ CD133 microbead kit พบว่าสามารถคัดแยกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 ได้บริสุทธิ์ 89.1% และเรียกเซลล์ดังกล่าวว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 (CD133+) และเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 ได้บริสุทธิ์ 99.8% และเรียกเซลล์ดังกล่าวว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 (CD133-) เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 และเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Leelawat K. ที่เคยมีรายงานมาก่อนว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 และเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 ไม่มีความแตกต่างกันของการเจริญเติบโต เมื่อวัดในระบบ in vitro และเมื่อเปรียบเทียบจำนวน side population cells ซึ่งเป็นคุณลักษณะของ cancer stem cells พบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 มี side population cells มากกว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 เล็กน้อย และเมื่อเปรียบเทียบการก่อมะเร็งของเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มในหนูที่พร่องภูมิคุ้มกันพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD133 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าการแสดงออกของ CD133 ในมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออกที่หลากหลายและมีการแสดงออกในบางส่วนของตัวอย่างมะเร็งเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของ CD133 บนผิวเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD133 แต่ไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตเมื่อเปรียบเทียบในหลอดทดลอง (in vitro) ดังนั้นการแสดงออกของ CD133 อาจจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเจริญเติบโตของมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีบางกลุ่มได้

การศึกษาเชิงลึกถึงคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออก CD133 เกี่ยวกับการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การแพร่กระจายและการดื้อยาเคมีบำบัด ในอนาคตจะมีประโยชน์ในการรักษาแบบมุ่งเป้าที่มีประสิทธิภาพต่อไป

14. เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Jordan, C.T., M.L. Guzman, and M. Noble, *Cancer stem cells*. N Engl J Med, 2006. 355(12): p. 1253-61.
2. Jordan, C.T., *Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells*. Leukemia, 2002. 16(4): p. 559-62.
3. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. 432(7015): p. 396-401.
4. Dean, M., T. Fojo, and S. Bates, *Tumour stem cells and drug resistance*. Nat Rev Cancer, 2005. 5(4): p. 275-84.
5. Holyoake, T., et al., *Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia*. Blood, 1999. 94(6): p. 2056-64.
6. Green, A., et al., *Cholangiocarcinoma in north east Thailand. A hospital-based study*. Trop Geogr Med, 1991. 43(1-2): p. 193-8.
7. Sripa, B. and C. Pairojku, *Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand*. Curr Opin Gastroenterol, 2008. 24(3): p. 349-56.
8. DeOliveira, M.L., et al., *Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution*. Ann Surg, 2007. 245(5): p. 755-62.
9. Khan, S.A., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document*. Gut, 2002. 51 Suppl 6: p. VI1-9.
10. Herrera, M.B., et al., *Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver*. Stem Cells, 2006. 24(12): p. 2840-50.
11. Roskams, T., *Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma*. Oncogene, 2006. 25(27): p. 3818-22.
12. Song, W., et al., *Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma*. Int J Clin Pract, 2008.
13. Weiss, T.S., et al., *Hepatic progenitor cells from adult human livers for cell transplantation*. Gut, 2008. 57(8): p. 1129-38.
14. Alison, M.R. and M.J. Lovell, *Liver cancer: the role of stem cells*. Cell Prolif, 2005. 38(6): p. 407-21.
15. Sell, S. and H.L. Leffert, *Liver cancer stem cells*. J Clin Oncol, 2008. 26(17): p. 2800-5.
16. Miraglia, S., et al., *A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning*. Blood, 1997. 90(12): p. 5013-21.
17. Yin, A.H., et al., *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 1997. 90(12): p. 5002-12.
18. Boman, B.M. and M.S. Wicha, *Cancer stem cells: a step toward the cure*. J Clin Oncol, 2008. 26(17): p. 2795-9.

19. Ishikawa, K., et al., *A case of an alpha-fetoprotein-producing intrahepatic cholangiocarcinoma suggests probable cancer stem cell origin*. *Oncologist*, 2007. 12(3): p. 320-4.
20. Ma, S., et al., *Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells*. *Gastroenterology*, 2007. 132(7): p. 2542-56.
21. Zhang, F., et al., *Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence*. *Histopathology*, 2008. 52(2): p. 224-32.
22. Komuta, M., et al., *Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin*. *Hepatology*, 2008. 47(5): p. 1544-56.
23. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(1): p. 48-58.
24. Shervington, A. and C. Lu, *Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells*. *Cancer Invest*, 2008. 26(5): p. 535-42.
25. Chiba T., et. al., *Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell like properties*. *Hepatology*, 2006. 44(1): p. 240-51.
26. Telford W., et. al., *Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye*. *Stem cells*, 2007. 25(4): p. 1029-36.
27. Okada S., et. al., *Early development of human hematopoietic and acquired immune systems in new born NOD/Scid /Jak3null mice intrahepatic engrafted with cord blood-derived CD34+ cells*. *Int J Hematol*, 2008. 88(5): p. 476-82.
28. Leelawat K. et. al., *Strong expression of CD133 is associated with increased cholangiocarcinoma progression*. *World J Gastroenterol*, 2011. 17(9): p. 1192-1198.
29. Kemper K. et. al., *The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation*. *Cancer Res*, 2010. 70(2): p. 719-29.

15. การถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย (รายละเอียดตามเอกสารแนบ)

1. นำเสนอผลงานรูปแบบ Poster presentation ชื่อเรื่อง “*In vivo* liver and lung metastasis cholangiocarcinoma model” ในการประชุมวิชาการนานาชาติ The 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver: “Enlightening the future” ณ กรุงเทพฯ ประเทศไทย ระหว่างวันที่ 17 ถึง 20 กุมภาพันธ์ 2554
2. คาดว่าจะตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง “AC133 expression in cholangiocarcinoma cell lines confers proliferative potential in vivo but not in vitro” ในวารสาร Anticancer Research (Impact factor: 1.725) (in preparation)