



รายงานฉบับสมบูรณ์

การตรวจคัดยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดี
Screening of drug resistant genes in cholangiocarcinoma stem cells

คณะผู้วิจัย

ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์

รศ. ดร. โสพิศ วงศ์คำ

ผศ. ดร. วชิรินทร์ ลอยลม

ผศ. ดร. วิไลรัตน์ ลื่อนันต์ศักดิ์ศิริ

น.ส. กุลธิดา กุลบุตร

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

คำนำและกิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการย่อยในชุดวิจัยภายใต้แผน การพัฒนาชุดวินิจัยมะเร็งตับในอีสาน ซึ่งโครงการย่อยนี้เป็นโครงการต่อเนื่อง 3 ปี โดยปีงบประมาณ 2554 เป็นปีที่ 2 ของโครงการวิจัย โครงการได้ดำเนินการวิจัยในปีที่ 2 เป็นไปตามเป้าหมาย ผู้วิจัยได้ดำเนินการเผยแพร่ผลงานจากโครงการวิจัยนี้ในการประชุมวิชาการนานาชาติ 1 ครั้ง และขณะนี้อยู่ระหว่างการรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเตรียมผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิจัยนานาชาติต่อไป

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนทุนวิจัยแก่โครงการนี้ ขอขอบคุณ รศ. ดร. ขวลิต ไพโรจน์กุล ภาควิชาพยาธิวิทยาที่ให้การสนับสนุนในการคัดเลือกตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษา และร่วมวิเคราะห์ผลทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย stem cell markers รศ. ดร. บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยาและศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี ที่ให้การสนับสนุนเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษานี้ และท้ายที่สุด ขอขอบคุณ Prof. Dr. Seiji Okada ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการค้นหาและตรวจสอบเซลล์ที่แสดงออก Stem cell markers และการทดสอบคุณสมบัติเซลล์ในสัตว์ทดลอง

ดร. พญ. กุลธิดา เวทีวุฒาจารย์

หัวหน้าคณะวิจัย

27 กรกฎาคม 2555

บทคัดย่อภาษาไทย

เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (Cancer stem cells) เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติสามารถจำลองตัวเองได้ สามารถพัฒนาเป็นเซลล์หลายชนิดในก้อนมะเร็งและสามารถเพิ่มจำนวนไม่มีที่สิ้นสุด ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พบในเซลล์ต้นกำเนิดทั่วไป (stem cells) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งสามารถทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองและมีกลไกในการดื้อต่อยาเคมีบำบัด ทำให้ไม่ถูกทำลายด้วยยาเคมีบำบัด ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีสมมุติฐานที่เชื่อว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งเป็นสาเหตุของการเกิดซ้ำของมะเร็งและการกระจายตัวของมะเร็ง หลังการผ่าตัดก้อนมะเร็งออกหรือหลังได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด ดังนั้นการกำจัดหรือทำลายเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจึงอาจจะเป็นการรักษาที่ส่งผลสัมฤทธิ์สูงสุด

การศึกษาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็วเนื่องจากถือเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษาโรคมะเร็ง แต่ข้อมูลเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งในมะเร็งท่อน้ำดีนั้นยังมีจำกัด ในการศึกษาขั้นนี้ผู้วิจัยมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาเพื่อหาการแสดงออกของ markers ที่สามารถใช้ในการตรวจหาเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งท่อน้ำดีในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อคัดแยกเซลล์ที่แสดงออก marker ดังกล่าว (CD133) และศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ที่แสดงออก CD133 ทั้งในระดับ in vitro และ in vivo ในปี 1 คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการแสดงออกของ stem cell markers 6 ชนิด (CD29, CD34, CD44, CD90, CD117 and CD133) ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและพบว่ามีเพียง CD133 เท่านั้นที่มีการแสดงออกที่หลากหลายในเซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของ CD133 ในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยบน tissue arrays พบว่าการแสดงออกในตัวอย่าง 8.64% ของตัวอย่างทั้งหมด (34 ตัวอย่างจาก 428 ตัวอย่าง) และขณะนี้ผู้วิจัยกำลังอยู่ระหว่างการประเมินและวิเคราะห์ผลการแสดงออกร่วมของ CD133 และ stem cell markers อื่นๆ ทั้งนี้เพื่อทดสอบคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของ CD133 เซลล์ KKKU-M214 ซึ่งพบการแสดงออกของ CD133 ต่ำที่สุดได้ถูกคัดเลือกมาใช้ในการทดลอง เมื่อแยกเซลล์ที่แสดงออก CD133 และเซลล์ที่ไม่แสดงออก CD133 พบว่าตลอดการศึกษาเซลล์สามารถรักษาระดับการแสดงออกได้ในระดับปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในการเจริญเติบโตของเซลล์ ไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตและการกระจายของเซลล์ในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์ระหว่างเซลล์ที่แสดงออก CD133 และเซลล์ที่ไม่แสดงออก CD133 อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์ที่แสดงออก CD133 มี side population cells มากกว่าเซลล์ที่ไม่แสดงออก CD133 เมื่อเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มที่สกัดได้ถูกนำไปฉีดที่ชั้นใต้ผิวหนังของหนู NOD/SCID Jak3 deficient ซึ่งพร้อมภูมิคุ้มกันพบว่าเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มสามารถสร้างก้อนมะเร็งที่ชั้นใต้ผิวหนังของหนูได้ แต่ก้อนมะเร็งที่เกิดจากเซลล์ที่แสดงออก CD133 มีขนาดใหญ่กว่าก้อนมะเร็งที่เกิดจากเซลล์ที่ไม่แสดงออก CD133

ผลจากการศึกษานี้บ่งชี้ว่าการแสดงออกของ CD133 ในมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับนั้นอาจจะเป็นตัวบ่งชี้ของ cancer stem cells การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติของเซลล์ในอนาคตจึงมีความจำเป็นเพื่อที่จะใช้ CD133 ในการพยากรณ์โรคและทำนายผลการรักษาต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Cancer stem cell is a specialized cell with properties of self renewal, potential to differentiate into various cell types in tumor mass and indefinite cell division. Several studies have shown that small number of cancer stem cell could form tumor in animal model and these cells have developed the drug resistant mechanisms to ensure that cancer stem cells could survive from anticancer drug action. Altogether, cancer stem cell has been proposed to be causes of cancer relapse and cancer metastasis after surgery and chemotherapy. Therefore, eradication of cancer stem cell might be the most effective way to cure cancer.

While cancer stem cell (CSC) is rapidly progressed, the information regarding CSC in cholangiocarcinoma (CCA), cancer of bile duct, is limited. In this study, we aimed to identify the expressions of cancer stem cell markers in CCA tissues and CCA cell line and characterize cells with particular marker; CD133, *in vitro* and *in vivo*. Previously, six markers (CD29, CD34, CD44, CD90, CD117 and CD133) that have been successfully detected in CCA cell lines developed from Thai patients. Among 6 markers, CD133 were differentially expressed in cell lines. In CCA tissues from tissue array data, we detected CD133 expression in 8.64% of samples (34/428 samples) and the co-expression of CD133 and other stem cell markers are now being verified. This evidence prompted us to isolate CD133-expressed CCA cell lines and test cell properties *in vitro* and *in vivo*. KKU-M214 cell lines, cell line with lowest percentage of CD133 expressed cells, were selected for further studies. Isolated CD133-positive (CD133+) and CD133-negative (CD133-) KKU-M214 could fairly maintain the percentage of CD133 expression all the period of experiments. When the proliferative properties of CD133+ and CD133- KKU-M214 were compared, we found that CD133+ and CD133- KKU-M214 were grown at comparable growth rate and there were no significant differences in cell cycle distribution between 2 populations. However, higher numbers of side population cells were detected in CD133+ KKU-M214. When CD133+ and CD133- KKU-M214 were injected subcutaneously into NOD/SCID Jak3 deficient mice, tumors were detected from both CD133+ M214L5 and CD133- M214L5 injected groups. However, tumors derived from mice injected with CD133+ M214L5 were larger than tumor derived from CD133- counterpart. These results indicated that CD133 in liver fluke associated CCA might be a potential stem cell marker. Further characterizations are required for potential uses of this marker as prognostic and theranostic marker for CCA in near future.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	
บทคัดย่อภาษาไทย	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	
คณะผู้วิจัย	1
แหล่งทุน	1
แผนงานวิจัย	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์โครงการ (ต่อเนื่อง 3 ปี)	2
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย	4
ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	5
วัตถุประสงค์โครงการในปีงบประมาณ 2554	5
วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	5
อภิปรายผลและวิจารณ์	11
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	12
การถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	13
ภาคผนวก	14