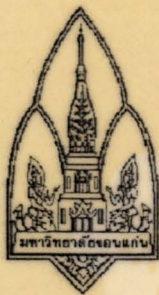


248976

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



248976



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

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

รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ
รศ. ขาญวิทย์ ลีลายวัฒน์
รศ. ชัยศิริ วงศ์คำ
ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิช

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553
มหาวิทยาลัยขอนแก่น



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

การผลิตและพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อมะเร็ง
ท่อน้ำดีเพื่อการวินิจฉัยและรักษา
**Production and development of
cholangiocarcinoma specific monoclonal antibody
for diagnosis and treatment**



รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ
รศ. ขาญวิทย์ ลีลาญวัฒน์
รศ. ชัยศิริ วงศ์คำ
ดร. อาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิช

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

คำนำและกิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการย่อยในชุดวิจัยภายใต้แผนงาน การพัฒนาชุดวินิจฉัยมะเร็งระดับโมเลกุล เป็นโครงการต่อเนื่อง 5 ปี และปีงบประมาณ 2553 เป็นปีที่ 4 ดังนั้นผลงานวิจัยบรรลุตามแผนที่วางไว้ในปีที่ 3 มีผลงานสมบูรณ์พอที่จะสรุปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติได้ 1 เรื่อง ในวารสาร CANCER ซึ่งมี impact factor ในปี 2510 = 5.13 และนายอาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิช ได้สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนทุนวิจัยของโครงการนี้ ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดีที่สนับสนุนตัวอย่างเนื้อเยื่อและซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ใช้ในการศึกษานี้ และ Prof. Nobuo Sakaguchi, และ Prof. Norie Araki, Kumamoto University ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการวิจัย บางส่วน

รศ.ดร. โสพิศ วงศ์คำ
หัวหน้าโครงการวิจัย

3 สิงหาคม 2554

โมเลกุลชีวภาพในซีรัมที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเป็นมะเร็งท่อน้ำดีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เช่น carcino-embryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen (CA) 19-9 และมิวซิน มักให้ค่าความไวและความจำเพาะที่ไม่สูงมากนัก เนื่องจากไม่มีตัวบ่งชี้ใดที่มีความจำเพาะโดยตรงต่อมะเร็งชนิดนี้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อมะเร็งท่อน้ำดีเพื่อพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป โดยเตรียมแอนติเจนจากเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดต่าง ๆ ($n=5$) และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก myeloma clone ตามวิธีมาตรฐาน ซึ่งเกิดจากการรวมเซลล์ myeloma กับเซลล์ม้ามของหนู Ganp-Tg Balb/c (ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนดังกล่าว การสนับสนุนจาก Prof. Sakaguchi, Kumamoto University)

ทำการคัดเลือก hybridoma clones ที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ตรวจพบได้ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีหรือเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่าซีรัมคนปกติหรือเซลล์ท่อน้ำดีปกติที่มีศักยภาพสูงสุด 2 โคลน คือ S27 และ S121 ทั้งสองโคลนผลิตแอนติบอดีชนิด IgM ที่จำเพาะกับ glycoproteins ที่มีน้ำหนักมากกว่า 500 KDa การแยกสกัดให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ affinity column และ Mass spectrometry แสดงว่า epitope ของ S121 พบได้บนโมเลกุลของมิวซินชนิด MUC5AC ผลการทดสอบการจับจำเพาะของแอนติเจนกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี KCU-S121 พบว่ามีความจำเพาะต่อหมู่น้ำตาลซึ่งยังไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างน้ำตาลได้ การใช้ประโยชน์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี KCU-S121 ต่อการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับเยื่อบุท่อน้ำดีที่เป็นมะเร็ง โดยไม่ทำปฏิกิริยากับเยื่อบุท่อน้ำดีที่ปกติเซลล์ระดับในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะอย่างยิ่งต่อมะเร็งท่อน้ำดีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 นอกจากนี้ยังได้ประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจหาสารบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดีในซีรัม โดยชุดตรวจที่พัฒนาได้สามารถจำแนกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีออกจากกลุ่มควบคุมได้เป็นอย่างดี โดยให้ความไวและความจำเพาะสูงในการวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับการตรวจ marker อื่นที่ใช้ในปัจจุบัน นอกจากนี้ระดับ S121 ในซีรัมสูงยังสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วย จึงสามารถใช้ตัวตรวจวัดนี้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีอีกด้วย

There are a number of serum markers used for diagnosis of cholangiocarcinoma (CCA), such as carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen (CA) 19-9, and serum mucin. However, none of these markers provide high specificity and sensitivity. It is the aim of this project to develop the high affinity monoclonal antibodies (mAbs) against CCA and investigate the possibility of using these mAbs for diagnosis of CCA. Crude extracted from various types of CCA tumor tissues (n=5) were used as antigens to immunize to the Ganp-Tg Balb/c mice provided by Prof. Sakaguchi, Kumamoto University. After complete immunization, the spleen cells were fused with myeloma cell lines according to the standard methods.

The hybridoma cells were screened for their reactivity against antigens in the pooled CCA patients' sera or CCA cell lines. Two clones-namely S27 and S121 which distinguish high molecular weight glycoproteins (>500KDa) were selected for further analysis. Both clones were found to be IgM. Partially purified monoclonal antibody and Mass spectrometry indicated that the epitope of S121 was on mucin MUC5AC. The immuno-reactivity of S121 monoclonal antibody was further proved to be on sugar moieties with unidentified structure. The application of S121 monoclonal antibody for diagnosis of cholangiocarcinoma was further investigated. Using SBA-S121 sandwich ELISA, we could identify CCA patients out of control subjects with higher specificity and sensitivity than the tests using in the hospitals. In addition, high level of serum S121 in CCA patients was associated with poor prognosis, hence serum S121 can be used as prognostic marker in CCA.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
คำสำคัญ สัญลักษณ์และคำย่อ	ฉ
1-2 คณะผู้วิจัย แหล่งทุน	1
3-4 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
5 เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของแผนงานวิจัย	2
6 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	3
7 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	4
8 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
9 ขอบเขตของโครงการวิจัย	7
10 ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย	8
11 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	8
12 วัตถุประสงค์	9
13 วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการทดลอง	12
14 อภิปรายผล/วิจารณ์	13
15 เอกสารอ้างอิง	13
ภาคผนวก	
ผลงานตีพิมพ์	
ประวัติคณะผู้วิจัย	

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1 แสดงการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดี S121	9
2 แสดงระดับ S121 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีและกลุ่มควบคุม และการวิเคราะห์ผล	10

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 Correlation of serum S121 and clinical data of CCA patients	11
2 Multivariate analysis of serum S121 antigen in CCA patients	12

คำสำคัญ (Keyword) Monoclonal antibody, bile duct cancer, cholangiocarcinoma, marker

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
°C	Degree Celsius
CCA	Cholangiocarcinoma
CEA	carcinoembryonic antigen
CA 19-9	carbohydrate antigen 19-9
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
KDa	Kilo Dalton
L	Litre
β-ME	β-Mercaptoethanol
mAb	monoclonal antibody
mmol	Milli molar
PBS	Phosphate buffer saline
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SBA	Soybean agglutinin
SDS	Sodium dodecyl sulphate
μL	microlitre