

ความสัมพันธ์ระหว่างแฮปโพลไทป์ของยีน *PIGR* กับความเสี่ยงทางพันธุกรรมของการ  
เกิดมะเร็งโพรงหลังจมูก

นางสาว รุ่งนภา หิรัญสถิต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

หลักสูตรวิทยาศาสตรจารย์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1729-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE ASSOCIATION BETWEEN HAPLOTYPE OF *PIGR* AND GENETIC  
SUSCEPTIBILITY OF NASOPHARYNGEAL CARCINOGENESIS

Miss Rungnapa Hirunsatit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Science

Program of Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-1729-4

Thesis Title THE ASSOCIATION BETWEEN HAPLOTYPE OF *PIGR* AND  
GENETIC SUSCEPTIBILITY OF NASOPHARYNGEAL  
CARCINOGENESIS

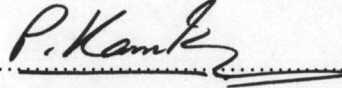
By Miss Rungnapa Hirunsatit

Field of Study Medical Science


Thesis Advisor Associate Professor Apiwat Mutirangura


---

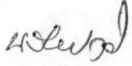
Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master Degree

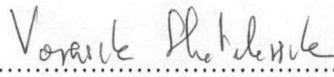
.....Dean of Faculty of Medicine  
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)


Thesis Committee

.....Chairman  
(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D. Ph.D.)

.....Thesis Advisor  
(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D. Ph.D.)

.....Member  
(Associate Professor Narin Voravud, M.D.)

.....Member  
(Vorasuk Shotelersuk, M.D.)

.....Member  
(Nattiya Pimtanothai, M.D. Ph.D.)

รุ่งนภา นีรัญญิต : ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพลไทป์ของยีน *PIGR* กับความเสี่ยงทางพันธุกรรมของการเกิดมะเร็งโพรงหลังจมูก (THE ASSOCIATION BETWEEN HAPLOTYPE OF *PIGR* AND GENETIC SUSCEPTIBILITY OF NASOPHARYNGEAL CARCINOGENESIS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, 93 หน้า. ISBN 974-03-1729-4

มะเร็งโพรงหลังจมูกเป็นมะเร็งที่พบได้น้อยในประเทศตะวันตกแต่มีอุบัติการณ์สูงในประชากรทางตอนใต้ของจีนและแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย คนจีนที่อพยพย้ายถิ่นฐานไปยังประเทศต่างๆยังคงมีอุบัติการณ์ของโรคนี้นี้สูงกว่าชนพื้นเมืองในประเทศนั้นๆ ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งโพรงหลังจมูก ปัจจัยแรกคือปัจจัยทางพันธุกรรมของตัวมนุษย์เองซึ่งมีส่วนสำคัญ โดยจากการศึกษาพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างยีน HLA และ *CYP2E1* กับการเกิดมะเร็งชนิดนี้ในประเทศกลุ่มเอเชียและจีนตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีรายงานเกี่ยวกับปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การบริโภคปลาเค็มหรือของหมักดอง ที่มีสารก่อมะเร็ง nitrosamine เจือปนอยู่ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมต่อการเกิดมะเร็งโพรงหลังจมูก ปัจจัยสุดท้ายคือการติดเชื้อ Epstein-Barr virus (EBV) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาไปสู่การเกิดมะเร็ง รายงานหลายรายงานได้เสนอว่า EBV อาศัย complement receptor type 2 (CR2) ในการเข้าสู่ B cell แต่อย่างไรก็ตามกลไกในการเข้าสู่เซลล์บุผิวยังไม่ชัดเจน การศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมของ receptor บนเซลล์บุผิว น่าจะมีส่วนสำคัญที่ทำให้เข้าใจกลไกดังกล่าว ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างมะเร็งโพรงหลังจมูกกับ polymorphism บริเวณ intron ของยีน polymeric immunoglobulin receptor (*PIGR*) สันนิษฐานได้ว่า *PIGR* น่าจะเป็น receptor สำหรับการเข้าสู่เซลล์บุผิว เพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ในผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูก 222 คน เปรียบเทียบกับคนปกติ 368 คน ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มผู้มีเชื้อสายไทย จีน และไทย-จีน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *PIGR* เป็นปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของมะเร็งชนิดนี้ ค่าของปัจจัยเสี่ยงในแต่ละกลุ่มของ 1739C→T แสดงความเที่ยงตรงสูงและอัลลีลทั้ง 2 อัลลีล ในกลุ่มผู้ป่วยมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR=2.04, 95%CI=1.62-2.58) และได้ค่า p value น้อยกว่า 0.00000001 ส่วนผลของ 1739C จะมีลักษณะคล้ายการถ่ายทอดแบบยีนด้อย ซึ่งก็คือ ต้องการทั้ง 2 อัลลีล ในการเพิ่มความเสี่ยง ซึ่งได้ค่าปัจจัยเสี่ยง (OR=2.52, 95%CI=1.91-3.31) การวิเคราะห์ haplotype ของ SNP ทั้ง 2 ตำแหน่ง 1093G→A และ 1739C→T ที่เปลี่ยนกรดอะมิโน ไม่เพียงแต่ยืนยันว่า *PIGR*1739C→T เป็นปัจจัยสำคัญเท่านั้นแต่ยังแสดงว่า 1093G→A ยังมีบทบาทในกลุ่ม 1739T บางส่วน ผลสรุปคือ การศึกษานี้เป็นหลักฐานที่สำคัญที่สนับสนุนว่า *PIGR* เป็น receptor ของ EBV และการมีผลของการเคลื่อนที่ของ *PIGR* ผ่าน IgA-EBV complex ทำให้ EBV ยังคงอยู่ภายในเซลล์ นอกจากนั้นความแตกต่างของ *PIGR* สามารถเปลี่ยนแปลงความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งโพรงหลังจมูกของประชาชนในกลุ่มที่มีอุบัติการณ์สูงได้

หลักสูตร วิทยาศาสตร์การแพทย์  
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์  
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต...รุ่งนภา นีรัญญิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อภิวัฒน์ มุทิรางกูร.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 427 52474 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: PIGR / NASOPHARYNGEAL CARCINOMA / SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM / HAPLOTYPE / ARMS

RUNGNAPA HIRUNSATIT: THE ASSOCIATION BETWEEN HAPLOTYPE OF *PIGR* AND GENETIC SUSCEPTIBILITY OF NASOPHARYNGEAL CARCINOGENESIS. THESIS

ADVISOR: ASSOC. PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D. Ph.D., 93 pp. ISBN 974-03-1729-4.

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a rare tumor in the Western world but occurs at high frequency in South China and Southeast Asia including Thailand. Emigrant Chinese population in several countries showed a higher incidence of NPC than the indigenous population. Moreover, numerous factors have been associated with the risk of NPC. To begin with genetics of the host also play a major role for NPC development. For example, unique alleles of human leukocyte antigen (HLA) and cytochrome P4502E1 (*CYP2E1*) showed the association with high relative from several Asia ethnic groups and Chinese in Taiwan, respectively. In addition, several reports regarding environmental factor indicated that consuming of salty fishes or preserved food with high concentration of chemical carcinogen such as nitrosamine, promoted the development of NPC. Finally, Epstein-Barr virus (EBV) was the most important factor to initiate NPC development. Many reports suggested that specific receptor for EBV infected into B cell was complement receptor type 2 (*CR2*). However, mechanism of EBV how to infect epithelium cell was not completely understood. To clarify how EBV enter into human cell, genetic susceptibility of candidate nasopharyngeal epithelium receptor was suggested. Our previous study reported on the association between NPC and polymeric immunoglobulin receptor (*PIGR*) intron polymorphism. Thus, *PIGR* was hypothesized to function as the receptor. To prove the hypothesis, the study was investigated *PIGR* SNPs in 222 cases and 368 controls, divided into Thai, Chinese and Thai-Chinese ethnic origins. The result indicated that *PIGR* was an NPC susceptible gene. The associated risk of each ethnic group was detected with high precision by *PIGR*1739C→T, and the significant OR (95%CI), 2.04 (1.62-2.58) between the two alleles of all cases of these three groups, was revealing,  $p < 0.00000001$ . The affect of *PIGR*1739C was similar to that of autosomal recessive gene, in which two homozygous alleles, but not heterozygous, were required to increase the relative risk, OR (95%CI) = 2.52 (1.91-3.31). Haplotype analysis of the two missense *PIGR*SNPs, 1093G→A and 1739 C→T, not only confirmed the role of *PIGR*1739C→T, but also suggested the function of 1093G→A within 1739T subset. In conclusion, there is substantial genetic evidences to support that *plgR* serves as EBV nasopharyngeal epithelium receptor via the failure of IgA-EBV complex transcytosis. In addition, variants of *PIGR* could alter susceptibility of the people from endemic areas to develop NPC

Field of study Medical Science

Academic year 2001

Student's signature *Rungnapa Hisunsatit*

Advisor's signature *Apiwat Mutirangura*

## ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my gratitude to all those who gave me the possibility to complete this thesis. I want to thank the committee of Medical Science Program for giving me permission to commence this thesis in the first instance, to do the necessary research work. I am deeply indebted to my advisor Associated Professor Dr.Apiwat Mutirangura, for his stimulating guidance and support. His expertise in genetics of the human improved my research skills and prepared me for future challenges. I thank my other committee members, Associate Professor Vilai Chentanez, Associate Professor Narin Voravud, Dr.Vorasuk Shotelersuk, and Dr.Nattiya Pimtanothai for their helpful suggestions and insightful comments during my study.

I am so grateful to my colleagues, Miss Narisorn, Mr. Wichai and Miss Sairung for their assistance. Specials thank to Mr. Chupong for inspiration and my friend for their help, encouragement. If I lacked them, this work would not be accomplished. Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents for their love and understanding. They has helped to understand the meaning of and old Chinese proverb: "Love is greater than truth"

This work was supported by the National Science and Technology Development Agency, the Ministry of University Affairs and Chulalongkorn University.

## TABLE OF CONTENTES

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgment.....	vi
Table of contents.....	vii
List of Tables.....	ix
List of Figures.....	x
List of Abbreviation.....	xi
<b>Chapter</b>	
I. Introduction.....	1
II. Review of Related Literatures.....	5
III. Materials and Methods.....	20
IV. Results.....	45
V. Discussion and Conclusion.....	58
References.....	60
Appendices.....	69
Appendix A.....	70
Appendix B.....	74
Appendix C.....	77

Appendix D.....78

Biography.....82



## LIST OF TABLE

Table	Page
1. The result of SNPs finding	46
2. Genotyped of SNP1093, 1739 and 1773 dividing by their ethnic.	47
3. P value, odds ratio, and 95%CI of SNP at <i>PIGR1093</i> , <i>PIGR1739</i> and <i>PIGR1773</i>	49
4. Haplotype frequencies of <i>PIGR1093-1739</i> from EH calculation	51
5. Haplotype frequencies of <i>PIGR1093-1739</i>	52
6. Haplotype <i>PIGR1093</i> and <i>PIGR1739</i> and excluding interference haplotype	53
7. Sex and age comparison of 1739C /1739T	55
8. Fifty two Caucasian controls haplotype frequencies	56

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. A model of the Epstein-Barr virus infection and disease development	8
2. Schematic representation of transported polymeric IgA by using pIgR.	10
3. Structure of polymeric immunoglobulin receptor (pIgR).	12
4. Model of direct causation	16
5. Model of population stratification	17
6. Model of linkage disequilibrium	18
7. ARMS primer design	36
8. SNPs analysis of <i>PIGR</i> were investigated by ARMS and PCR-RFLP	46

## LIST OF ABBREVIATIONS

NPC	=	Nasopharyngeal Carcinoma
NE	=	Nasopharyngeal epithelium
EBV	=	Epstein Barr Virus
OR	=	Odd ratio
95%CI	=	95% Confidence Interval
CYP2E1	=	Cytochrome P450 2E1
CR2	=	Complement receptor type 2
PIGR	=	Polymeric immunoglobulin receptor
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism