

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีนโปรแกรมเซลล์เดธ-1 ลิแกนด์  
ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิดที่มีการกลายพันธุ์ของอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์  
สัมพันธ์กับการรักษาด้วยยายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ไทโรซีนไคเนส



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHANGE OF PROGRAMMED CELL DEATH 1 LIGAND (PD-L1) EXPRESSION  
IN NON SMALL CELL LUNG CARCINOMA HARBORING SOMATIC  
EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) MUTATIONS  
CORRELATED WITH EGFR TYROSINE KINASE INHIBITORS EXPOSURE

Mr. Siwat Sakdejayont



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

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีน  
โปรแกรมเซลล์เดธ-1 ลิแกนด์ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิดที่  
มีการกลายพันธุ์ของอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซป  
เตอร์สัมพันธ์กับการรักษาด้วยยายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรท  
แฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ไทโรซีนไคเนส

โดย

นายศิวัช ศักดิ์เดชยนต์

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงปิวิณา สุสันธิ์พิชญ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

..... กรรมการ  
(นายแพทย์จักษพัฒน์ วนิชานันท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(นายแพทย์ธัช อธิวิทวัส)

ศิวัช ศักดิ์เดชยนต์ : การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีนโปรแกรมเซลล์เดธ-1 ลิแกนด์ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิดที่มีการกลายพันธุ์ของอีพีดีเออร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์สัมพันธ์กับการรักษาด้วยยายับยั้งอีพีดีเออร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ไทโรซีนไคเนส (CHANGE OF PROGRAMMED CELL DEATH 1 LIGAND (PD-L1) EXPRESSION IN NON SMALL CELL LUNG CARCINOMA HARBORING SOMATICEPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) MUTATIONS CORRELATED WITH EGFR TYROSINE KINASE INHIBITORS EXPOSURE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, 46 หน้า.

ที่มา: ยาภูมิคุ้มกันบำบัดกลุ่มยับยั้งโปรแกรมเซลล์เดธ-1 และโปรแกรมเซลล์เดธ-1 ลิแกนด์มีบทบาทสำคัญในการรักษามะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก อย่างไรก็ตามประโยชน์ของยาภูมิคุ้มกันยังไม่แน่ชัดในมะเร็งปอดชนิดที่มีการกลายพันธุ์ของอีพีดีเออร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ มีหลายการศึกษาที่ตรวจการแสดงผลของโปรตีนโปรแกรมเซลล์เดธ-1 ลิแกนด์ (พีดีแอล-1) ในเนื้อเยื่ออกกลุ่มนี้ แต่กลุ่มประชากรและแอนติบอดีที่ใช้มีความหลากหลาย การศึกษานี้มุ่งที่จะตรวจการแสดงผลของพีดีแอล-1 ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอด เปรียบเทียบก่อนและหลังการรักษาด้วยยายับยั้งอีพีดีเออร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ไทโรซีนไคเนส โดยใช้แอนติบอดีที่ได้รับการรับรองโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา

วิธีการศึกษา: เป็นการศึกษาย้อนหลังจากกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์อีพีดีเออร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ที่ได้รับการรักษาด้วยยายับยั้งอีพีดีเออร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ไทโรซีนไคเนส ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างช่วงปี พ.ศ. 2550-2559 และเลือกผู้ป่วยที่มีการเก็บชิ้นเนื้อทั้งก่อนและหลังการตัดยา มาตรวจพีดีแอล-1 ด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียูเอแอนติบอดีชนิด 22C3 และวัดระดับการแสดงออกโดย ทุเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ และ เอชสกออร์

ผลการศึกษา: จากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 38 คน พบเนื้ออกที่มีการกลายพันธุ์อีพีดีเออร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ชนิดเอกซอน 19 del 20 คน (52.6%) , ชนิดเอกซอน 21 L858R 15 คน (39.5%) และอีก 2 คนเป็นชนิดที่พบน้อย ได้แก่ G719X และ L861Q หลังจากตัดยายับยั้งไทโรซีนไคเนส พบการกลายพันธุ์ชนิดเอกซอน 20 T790M 21 ใน 33 คน (61.5%) พบผู้ป่วยที่มีการแสดงผลของพีดีแอล-1 ทุเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์  $\geq 1\%$  ก่อนการรักษาจำนวน 8 จาก 38 คน (21.1%) และมี 1 คนที่มีค่าทุเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์  $\geq 50\%$  (2.63%) ค่าเฉลี่ยทุเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ ก่อนการรักษาอยู่ที่ 4.57% และ เอชสกออร์ 7.9 ตามลำดับ ในชิ้นเนื้อตัวอย่างที่เก็บหลังจากตัดยาพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ค่าเฉลี่ยของทุเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์เพิ่มจาก 4.57% เป็น 14.91% ( $p=0.019$ ) และ เอชสกออร์เพิ่มจาก 7.9 เป็น 33.22 ( $p=0.015$ ) ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่พบการแสดงผลของพีดีแอล-1 ก่อนการรักษา 30 คน (ทุเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์  $< 1\%$ ) 27 คน (90%) ยังคงไม่พบการแสดงผลของพีดีแอล-1 นอกจากนี้ผู้วิจัยไม่พบความแตกต่างของระยะเวลาปราศจากการดำเนินโรคของการรักษาด้วยยายับยั้งอีพีดีเออร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ไทโรซีนไคเนสระหว่างกลุ่มคนไข้ที่มีและไม่มีการการแสดงผลของพีดีแอล-1

สรุปผล: โดยการตรวจด้วยวิธีการตรวจด้วยแอนติบอดี 22C3 พบความชุกของการแสดงผลของพีดีแอล-1 บนเซลล์เนื้ออกก่อนการรักษาด้วยยายับยั้งอีพีดีเออร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ไทโรซีนไคเนส 23.6% และระดับการแสดงผลเพิ่มสูงขึ้นหลังจากได้รับการรักษา จนกระทั่งมีการตัดยายับยั้งไทโรซีนไคเนสโดยเฉพาะกลุ่มที่มีการแสดงผลออกอยู่เดิม ข้อมูลนี้ช่วยประกอบการพิจารณาเลือกการตรวจและเลือกใช้การรักษาด้วยยาภูมิคุ้มกันบำบัดกลุ่มยับยั้งเชคพอยต์ในโรคมะเร็งปอดชนิดที่มีการกลายพันธุ์ของอีพีดีเออร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์

ภาควิชา อายุรศาสตร์ .....ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ .....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2559

# # 5874071930 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: PD-L1 EXPRESSION/NON SMALL CELL LUNG CANCER/EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR MUTATION/EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR TYROSINE KINASE INHIBITORS

SIWAT SAKDEJAYONT: CHANGE OF PROGRAMMED CELL DEATH 1 LIGAND (PD-L1) EXPRESSION IN NON SMALL CELL LUNG CARCINOMA HARBORING SOMATIC EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) MUTATIONS CORRELATED WITH EGFR TYROSINE KINASE INHIBITORS EXPOSURE. ADVISOR: ASSOC. PROF. VIROTE SRIURANPONG, M.D., Ph.D., 46 pp.

Background: Checkpoint inhibitor anti-PD1/PD-L1 immunotherapy has played a critical role in treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC), however, the benefit of using these agents in EGFR mutation (mEGFR) NSCLC remain uncertain. Several studies have investigated these issues with different population and detection antibodies. We aimed to determine the changes of PD-L1 expression in mEGFR harboring NSCLC tissues before and after the exposure to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) by using a FDA-approved PD-L1 assay.

Methods: We retrospectively analyzed paired tumor specimens from 38 NSCLC patients having mEGFR who were treated with an EGFR-TKI. Tumor had been collected at baseline and after an acquired resistance to a TKI prior to additional treatment. We used a FDA-approved anti-PD-L1, 22C3, to detect the level of PD-L1 expression which were analyzed using tumor proportion score (TPS) and H-score.

Results: There were 20 patients having exon 19 deletion (52.6%) and 15 patients having exon 21 L858R (39.5%), and 2 cases having uncommon mutations including G719X and L861Q. We found secondary EGFR mutation exon 20 T790M in 21 of 33 (61.5%) tissue analyzed. Baseline expression of PD-L1 was detected in 8 out of 38 (21.1%) with TPS  $\geq$ 1%, and one having TPS  $\geq$ 50%. The pre-exposure to TKI mean TPS and H-score were 4.57% and 7.9 respectively. We found a significant increase in PD-L1 expression upon acquired resistance to TKI with mean TPS rising from 4.57 to 14.91 ( $p = 0.019$ ) and H-score from 7.9 to 33.22 ( $p = 0.015$ ). There were 27 of 30 patients whose tumor had negative TPS and H-score at baseline and they remained negative regardless of TKI exposure. Additionally, the TTP from treatment with TKI or chemotherapy were similar in both PD-L1 positive and negative subgroups.

Conclusions: With the FDA approved anti-PD-L1, 22C3, assay, our data demonstrated a moderate prevalence, 23.6%, of PD-L1 expression prior to treatment with TKI in mEGFR NSCLC. Expression of PD-L1 significantly increased after exposure and being resistance to TKIs especially in those with initially positive expression. These data may implicate the selection of investigations and treatments related to applying checkpoint inhibitors in mEGFR NSCLC.

Department: Medicine

Student's Signature .....

Field of Study: Medicine

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2016

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ที่ได้ช่วยเหลือให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

1. อาจารย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยชี้แนะแนวทางในการทำวิจัยและให้ข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย ตลอดมา
2. อาจารย์ปัญญาวิชฐ์ จันทรานูวัฒน์ อาจารย์แผนกพยาธิวิทยา ผู้เชี่ยวชาญด้านพยาธิวิทยาเนื้องอกช่องอกที่ให้ความร่วมมือแปลผลชิ้นเนื้อ และช่วยในการประสานงานเกี่ยวกับงานทางด้านพยาธิวิทยาทุกอย่าง
3. คณะกรรมการวิทยานิพนธ์ทุกท่าน อันประกอบด้วย อาจารย์ปวีณา สุสันฐิตพงษ์, อาจารย์รัช อธิวิทวัส, อาจารย์จกกพัฒน์ วนิชานันท์ รวมถึงอาจารย์ธัญญาพงษ์ ณ นครที่ช่วยให้คำแนะนำในการปรับปรุงระเบียบวิธีวิจัย
4. อาจารย์วัฒน์ พันแสง ที่ช่วยให้คำปรึกษาเรื่องกรวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
5. อาจารย์แพทย์หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์
6. เจ้าหน้าที่หน่วยมะเร็งวิทยา
7. แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์มะเร็งวิทยา
8. อาสาสมัครและญาติของอาสาสมัครทุกท่าน ที่ให้ข้อมูลต่างๆ สำหรับงานวิจัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฏ
สารบัญกราฟ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale) .....	1
1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question).....	4
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	5
1.4 สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis).....	5
1.5 กรอบความคิดในงานวิจัย (Conceptual framework) .....	6
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption).....	6
1.7 คำสำคัญ (Key words).....	6
1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definition) .....	7
บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม .....	8
2.1 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of related literatures).....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย .....	17
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design).....	17
3.2 ระเบียบการวิจัย (Research methodology).....	17

3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง .....	18
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน .....	19
3.5 การรวบรวมข้อมูล (Data collection) .....	21
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) .....	22
3.7 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical considerations).....	23
3.8 ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitation).....	23
3.9 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefits and application) ..	24
3.10 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem) .....	24
3.11 การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and Time schedule) ..	24
3.12 งบประมาณ (Budgets) .....	25
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	26
4.1 ข้อมูลพื้นฐาน .....	26
4.2 การเปลี่ยนแปลงของพีดีแอล-1หลังฉีดต่อยาตัวยับยั้งไทโรซีนไคเนส.....	27
4.3 ผลการรักษาและการรอดชีวิต .....	28
4.4 การกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์และการกลายพันธุ์ชนิด T790M .....	28
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา .....	35
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ .....	39
6.1 ข้อสรุปผลการศึกษาและการประยุกต์ผลการวิจัย.....	39
6.2 ข้อเสนอแนะ .....	39
รายการอ้างอิง .....	40
ภาคผนวก.....	45
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	46



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานและการแสดงออกพีดีแอล-1 .....	30
ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของพีดีแอล-1 ในชิ้นเนื้อก่อนการรักษาและหลังจากมีการดื้อยา .	31
ตารางที่ 3 แสดงการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ในตัวอย่างก่อนและหลัง ยายับยั้งไทโรซีนไคเนส .....	34



## สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1 ภาพผลลัพธ์ของการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี .....	29
--	----



## สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย.....	6
แผนภูมิที่ 2 แสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	21
แผนภูมิที่ 3 แผนผังแสดงการคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย .....	30



## สารบัญกราฟ

กราฟที่ 1 กราฟแสดงรูปแบบการเปลี่ยนการแสดงออกของพีดีแอล-1 ของผู้ป่วยแต่ละราย .....	32
กราฟที่ 2 กราฟแสดงการรอดชีวิตแบบแคบแลน-ไมเออร์ p-value วิเคราะห์โดย log-rank test.	33
กราฟที่ 3 กราฟแสดงจำนวนการตรวจการกลายพันธุ์ซ้ำในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์อีพิเดอร์มอล โกรทแฟกเตอร์ .....	34



### คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

NSCLC	Non-small cell lung cancer	มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก
PD-1	Programmed cell death-1	โปรแกรมเซลล์เดธ-1, พีดี-1
PD-L1	Programmed cell death-1 ligand	โปรแกรมเซลล์เดธ-1 ลิแกนด์, พีดีแอล-1
EGFR	Epidermal growth factor receptor	อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	อะนาพลาสติกลิมโฟมาไคเนส
TKI	Tyrosine kinase inhibitor	ยายับยั้งไทโรซีนไคเนส
TPS	Tumor proportional score	ทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกอร์
H-score	H-score	เอชสกอร์
PFS	Progression free survival	ระยะเวลาปลอดการดำเนินโรค
OS	Overall survival	ระยะเวลารอดชีวิต (โดยรวม)
TTP	Time to progression	ระยะเวลาดำเนินโรค
DCR	Disease control rate	อัตราการควบคุมโรค
ORR	Overall response rate	อัตราการตอบสนอง
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumours	
CR	Complete response	ตอบสนองทั้งหมด
PR	Partial response	ตอบสนองบางส่วน
SD	Stable disease	โรคคงที่
PD	Progressive disease	มีการดำเนินโรค
SP	Surgical pathology	ศัลยพยาธิวิทยา
CP	Cytopathology	เซลล์พยาธิวิทยา

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

มะเร็งปอดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ เป็นสาเหตุการตายจากโรคมะเร็งที่มากที่สุดในโลกและเป็นอันดับสองในประเทศไทยรองจากมะเร็งตับ เดิมมะเร็งปอดถูกแบ่งใหญ่ๆ ตามลักษณะรูปร่างของเซลล์ออกเป็นชนิดเซลล์เล็กและชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก ประมาณ 80% ของผู้ป่วยเป็นมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก โดยส่วนใหญ่ของผู้ป่วยชนิดนี้เป็นระยะที่สี่หรือระยะแพร่กระจายตั้งแต่การวินิจฉัย และมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า 5% ที่ 5 ปี<sup>(1-3)</sup>

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา กรอบการรักษามะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็กมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว สืบเนื่องมาจากการพัฒนาเทคโนโลยีในการทำความเข้าใจการกำเนิดเซลล์มะเร็งระดับโมเลกุล (molecular carcinogenesis), สภาวะระดับจุลภาคของเนื้องอก (tumor-microenvironment) และกลไกการหลบหลีกภูมิคุ้มกัน (immune evasion mechanism) ส่งผลให้เกิดการรักษาแบบใหม่นอกเหนือจากการใช้ยาเคมีบำบัด ได้แก่การรักษาแบบมุ่งเป้าและการรักษาด้วยภูมิคุ้มกันบำบัด ดังนั้นแนวทางการแบ่งชนิดของเนื้องอกมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็กจึงได้ปรับเปลี่ยนไป โดยไม่เพียงแต่อาศัย ลักษณะสัญญาณทางพยาธิวิทยา แต่ยังรวมถึงการใช้การเปลี่ยนแปลงในระดับยีนที่เป็นยีนไดรเวอร์ก่อมะเร็ง (oncogenic driver gene) เช่น ชนิดที่มีการกลายพันธุ์ของยีนอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ (epidermal growth factor receptor(EGFR) mutation) ชนิดที่มีการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนอะนาพลาสติกทิกลิโมโฟมาไคเนส (anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement) เป็นต้น ซึ่งจากผลการศึกษาที่ผ่านมาการรักษามุ่งเป้ายีนเหล่านี้ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ สามารถยืดระยะเวลาปลอดการดำเนินโรคประมาณ 2-3 เท่าของการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด อย่างไรก็ตามจะเกิดการต้านทานขึ้นและต้องยารักษามุ่งเป้าในที่สุด<sup>(4, 5)</sup>

การรักษามะเร็งปอดชนิดที่มีการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ยาที่ใช้รักษาที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ยามุ่งเป้ายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส (EGFR-TKI) ซึ่งแบ่งเป็นรุ่นที่ 1 ได้แก่ เออโลทินิบ (erlotinib) และเจฟีทินิบ (gefitinib) หรือรุ่นที่ 2 ได้แก่ อะฟาทินิบ (afatinib) ซึ่งมีการตอบสนองดีและระยะเวลาควบคุมโรคอยู่ที่ประมาณ 9-13 เดือน

โดยเฉพาะการกลายพันธุ์ชนิดเอกซอน 19 deletion หรือ เอกซอน 21 L858R ซึ่งพบมากที่สุด (6) หลังจากควบคุมโรคได้ระยะเวลาหนึ่งโรคจะมีการดื้อต่อยาและมีการดำเนินโรคต่อ โดยกลไกที่เป็นสาเหตุหลักของการดื้อยาคือการกลายพันธุ์ T790M บนเอกซอน 20 ของอีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ซึ่งพบประมาณ 50%-70% ในผู้ป่วยที่มีการดื้อยาด้วยอีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส ยาที่ถูกสร้างเพื่อใช้ในมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ T790M ได้แก่ ยามุ่งเป้ายับยั้งอีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ รุ่นที่ 3 ได้แก่ โอลิเมอร์ทินิบ จากการศึกษาในผู้ป่วยกลุ่มนี้พบว่ามีการตอบสนองที่ดีและได้รับการรับรองโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้ใช้ในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ T790M หลังจากการดื้อยารุ่นที่ 1 และ 2 แล้ว<sup>(6, 7)</sup> ดังนั้นในปัจจุบันการเก็บตัวอย่างซ้ำอีกครั้งเพื่อตรวจการกลายพันธุ์อีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์หลังจากมีการดื้อยามุ่งเป้ายับยั้งอีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ รุ่นที่ 1 และ 2 จึงมีความจำเป็นเพื่อใช้เลือกผู้ป่วยที่สามารถใช้ยารุ่นที่ 3

นอกเหนือจากการรักษาแบบมุ่งเป้า ได้มีการพัฒนาการรักษาในกลุ่มภูมิคุ้มกันบำบัด (immunotherapy) การรักษาที่ถูกพัฒนามามากที่สุดในกลุ่มนี้ในโรคมะเร็งปอด ได้แก่ยายับยั้งอิมมูนเชกพอยต์ (immune checkpoint inhibitor) โดยเฉพาะยามุ่งเป้าที่โปรแกรมเซลล์เดธ-1 หรือ พีดี-1 (PD-1) และโปรแกรมเซลล์เดธ-1 ลิแกนด์ หรือพีดีแอล-1 (PD-L1)

พีดี-1 (PD-1) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งบนเยื่อหุ้มเซลล์ในกลุ่มอิมมูโนโกลบูลิน พบได้บนผิวเซลล์ภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น ทีลิมโฟไซต์ บีลิมโฟไซต์ เนเชอรัลคิลเลอร์เซลล์ เดนไดรติเซลล์ และแมคโครฟาจ โดยจะจับกับลิแกนด์ในกลุ่ม B7 คือ โปรแกรมเซลล์เดธ-1 ลิแกนด์ (PD-L1) โปรแกรมเซลล์เดธ-2 ลิแกนด์ (PD-L2) ซึ่งสามารถพบได้บนเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันรวมถึงเซลล์เยื่อ ภูมิคุ้มกันระหว่าง พีดี-1/พีดีแอล-1 ส่งผลยับยั้งการทำงานและการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวชนิดไซโตท็อกซิก ลิมโฟไซต์ และยังกระตุ้นให้เกิดการอะพอโทซิสของเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ เป็นที่เชื่อว่าเป็นสภาวะปกติ กลไกนี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมจำกัดการทำงานของภูมิคุ้มกัน และลดการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายในตำแหน่งที่มีการอักเสบ หรือเรียกหน้าที่นี้ว่าอิมมูนเชกพอยต์ (immune checkpoint) ทั้งนี้มะเร็งบางชนิดรวมถึงมะเร็งปอดสามารถเพิ่มการทำงานของกลไกดังกล่าว ด้วยการสร้างพีดีแอล-1 ลดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (cell-mediated immunity) เพื่อให้เนื้อเยื่อมะเร็งรอดพ้นจากการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกัน และส่งผลให้มะเร็งสามารถอยู่รอดและเติบโตในร่างกายมนุษย์ได้ในที่สุด<sup>(8-11)</sup> ยาในกลุ่มนี้ที่มีงานวิจัยระยะที่ 3 ในโรคมะเร็งปอด เช่น เพมโบรลิซูลู

แมบ (pembrolizumab) และ นิโวลูแมบ (nivolumab) ได้แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของการรอดชีวิตโดยรวมเมื่อเทียบกับยาเคมีบำบัดโดซิแทกเซล จากการศึกษาเหล่านี้พบว่าสัดส่วนของเซลล์เนื้องอกที่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 บนเนื้อเยื่อของเนื้องอกมีความเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดและการตอบสนองที่ดีขึ้น<sup>(12-15)</sup> นอกจากนี้ในกรณีที่เป็นการศึกษาของการนำมาใช้เป็นรักษาสูตรแรก เพมโบรลิซูแมบเหนือกว่ายาเคมีบำบัดสูตรแพลททินัม ทั้งในแง่อัตราการตอบสนอง ระยะเวลาปลอดการดำเนินโรคและระยะเวลารอดชีวิตโดยรวม โดยเกณฑ์การเลือกเข้าของการศึกษานี้เลือกเฉพาะผู้ป่วยที่เนื้องอกมีสัดส่วนการแสดงออกของพีดีแอล-1 บนเซลล์เนื้องอก โดยการตรวจอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียูเอแอนติบอดีชนิด 22C3 และการนับทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกอร์ (Tumor proportional score, TPS) มากกว่า 50% เท่านั้น<sup>(16)</sup> ในขณะที่อีกการศึกษาของยานิโวลูแมบ ซึ่งใช้เกณฑ์การแสดงออกของพีดีแอล-1 มากกว่าเท่ากับ 1% ไม่สามารถแสดงประสิทธิผลเหนือกว่ายาเคมีบำบัดมาตรฐานในรักษาสูตรแรก<sup>(17)</sup> การค้นพบเหล่านี้เน้นย้ำถึงการใช้การแสดงผลของโปรตีนพีดีแอล-1 โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียูเอแอนติบอดีชนิด 22C3 ในการพยากรณ์การตอบสนองต่อยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้แอนติบอดี 22C3

ในทวีปเอเชียรวมถึงประเทศไทยพบมะเร็งปอดชนิดที่มีการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ได้บ่อยและเป็นปัญหาสำคัญของประเทศ การรักษาหลักคือยามุ่งเป้ายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสดังที่กล่าวมาแล้ว แต่หลังจากมีการดื้อยายับยั้งไทโรซีนไคเนส แนวทางการรักษาที่แนะนำในปัจจุบันก็จะเหมือนกับมะเร็งปอดชนิดไม่มีการกลายพันธุ์ รวมถึงการใช้ภูมิคุ้มกันบำบัด ถึงแม้ว่าข้อมูลของประสิทธิผลของยาดังกล่าวในผู้ป่วยกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ยังมีน้อย เนื่องจากถูกรวมในการศึกษาที่ผ่านมาเพียง 8-15%<sup>(12, 15)</sup>

กลไกความสัมพันธ์ระหว่างอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์และอีพีดี-1/พีดีแอล-1 จึงเป็นที่สนใจมากขึ้น มีการศึกษาพรีคลินิกและคลินิกที่พยายามจะศึกษาความสัมพันธ์นี้ การศึกษาในหนูทดลองแสดงให้เห็นว่าการส่งสัญญาณของอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์กระตุ้นการแสดงออกของพีดีแอล-1 และการให้ยาต้านพีดี-1 ทำให้หนูที่มีมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์สามารถรอดชีวิตนานขึ้น<sup>(18)</sup> นอกจากนี้ในเซลล์เพาะเลี้ยงการให้ยามุ่งเป้ายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสทำให้การแสดงออกของพีดีแอล-1 ลดลง<sup>(19, 20)</sup> ในขณะที่ข้อมูลทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งปอดยังไม่ชัดเจน มีทั้งการศึกษาที่แสดง



ความสัมพันธ์เชิงบวกว่า พีดีแอล-1 จะพบได้บ่อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ตัวรับอีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์<sup>(19, 21-23)</sup> และการศึกษาที่พบการแสดงออกพีดีแอล-1 น้อย รวมถึงการรักษาด้วยยาที่ยัง พีดี-1/พีดีแอล-1 ได้ผลไม่ดีในผู้ป่วยกลุ่มนี้<sup>(24-26)</sup> ทั้งนี้งานวิจัยเหล่านี้มีลักษณะกลุ่มตัวอย่างที่หลากหลาย ความต่างในการตรวจพีดีแอล-1 ทั้งแอนติบอดีที่ใช้ และวิธีการแปลผล ผลการศึกษาจึงไม่สอดคล้องกัน

ในช่วงหนึ่งปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาสองชิ้นที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของพีดีแอล-1 หลังจากได้รับยาที่ยังอีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส พบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่วิธีการตรวจที่ใช้เป็นการตรวจโดยแอนติบอดี E1L3N ซึ่งยังไม่มีการศึกษารับรองในทางคลินิก<sup>(24, 25)</sup>

งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของพีดีแอล-1 ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ทั้งก่อนและหลังการรักษาจนกระทั่งมีการดื้อยาที่ยังไทโรซีนไคเนส ด้วยแอนติบอดี 22C3 ที่ได้รับการรับรองโดยองค์การอาหารและยา และสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิก ความรู้นี้จะช่วยเพิ่มความกระจ่างในกลไกดื้อยาของมะเร็งปอด รวมถึงพยากรณ์การตอบสนองต่อยาต้านวิถีพีดี-1/พีดีแอล-1 หลังจากได้รับยากลับยับยั้งอีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส เพื่อใช้ช่วยในการกำหนดลำดับการใช้ยาต้านมะเร็งปอดในอนาคต

## 1.2 คำถามของการวิจัย (Research Question)

### คำถามหลัก (Primary research question)

มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 เป็นบวก (ทูเมโอพรอพอร์ชันนัลสกออร์กว่าเท่ากับ 50%) ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็กที่มีการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนและหลังการดื้อยาอีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส หรือไม่

### คำถามรอง (Secondary research question)

1. ความชุกการแสดงออกของพีดีแอล-1 เป็นบวก โดยนิยามทูเมโอพรอพอร์ชันนัลสกออร์กว่าเท่ากับ 1% และ 50% ตามลำดับ ในมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอล

โกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ก่อนและหลังการดื้อยาอีพิเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์  
ไทโรซีนไคเนส

2. การเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณของระดับการแสดงออกพีดีแอล-1 วัดโดย ทูเมอร์โปรพอร์  
ซินนัลสเกอร์และเอสสเกอร์
3. ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางคลินิก, ชนิดของการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแพก  
เตอร์รีเซปเตอร์และการแสดงออกของพีดีแอล-1
4. ผลการรักษาด้วยยาอีพิเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสและยาเคมี  
บำบัดในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1
5. ลักษณะการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ก่อนและหลังการดื้อยาใน  
โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

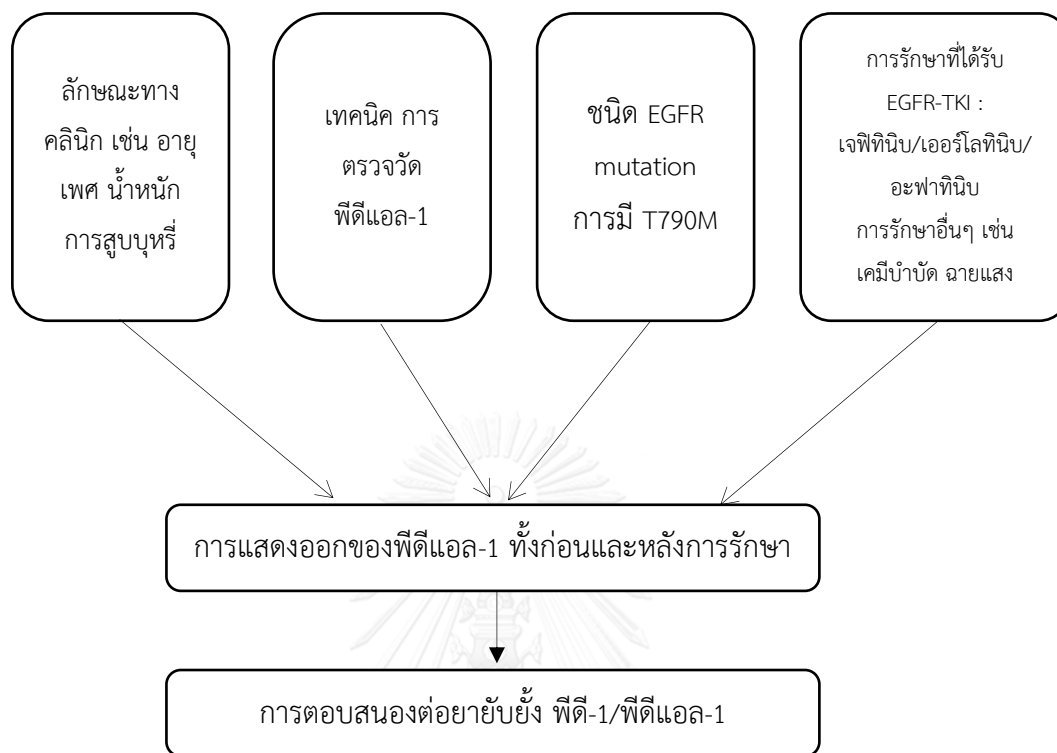
### 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของพีดีแอล-1 ในเซลล์เนื้องอกมะเร็งปอดชนิด  
ที่ไม่ใช่เซลล์เล็กที่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ หลังได้รับการรักษาด้วยยา  
แบบมุ่งเป้ายับยั้งอีพิเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส จนกระทั่งมีการดื้อยา

### 1.4 สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis)

- $H_0$  : จำนวนผู้ป่วยของการแสดงออกของพีดีแอล-1 ทูเมอร์โปรพอร์ซินนัลสเกอร์มากกว่า  
เท่ากับ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการรักษามีจำนวนไม่มากกว่าเดิม
- $H_1$  : จำนวนผู้ป่วยของการแสดงออกของพีดีแอล-1 ทูเมอร์โปรพอร์ซินนัลสเกอร์มากกว่า  
เท่ากับ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการรักษามีจำนวนไม่มากขึ้น

### 1.5 กรอบความคิดในงานวิจัย (Conceptual framework)



แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย

### 1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

- 1.6.1 การแสดงออกของพีดีแอล-1 บนผิวเซลล์มะเร็งปอดไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลา หากไม่มีการให้ยาต้านเนื้องอกได้แก่ ยาเคมีบำบัด ยายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส
- 1.6.2 ตัวอย่างที่นำมาตรวจเพื่อแปลผลต้องมีเซลล์มะเร็งเรียงอยู่มากกว่า 100 เซลล์โดยการประเมินโดยพยาธิแพทย์

### 1.7 คำสำคัญ (Key words)

PD-L1 expression, advanced/metastatic non-small cell lung cancer, epidermal growth factor receptor mutation, epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, tumor proportional score

## 1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definition)

1.8.1 มะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก คือ เนื้อเยื่อพยาธิวิทยาเป็นชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดโดยลักษณะอาการทางคลินิก

1.8.2 วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ใช้น้ำยಾಯ้อม พีดีแอล-1 แอนติบอดี ชนิด 22C3 (Dako) เก็บข้อมูลทูเมอร์พรอพอร์ชันนัลสกออร์ แสดงผลเป็นร้อยละการติดบนผิวเซลล์เนื่องจากการย้อมติดบางส่วนและติดทั้งหมด ต่อจำนวนเซลล์เนื้องอก วิเคราะห์โดยถือว่าแปลผลเป็นบวก ที่สองจุดตัด คือเมื่อมีการแสดงออกของพีดีแอล-1 มากกว่าหรือเท่ากับ 50% และ 1% <sup>(13, 15)</sup> การวัดค่า พีดีแอล-1 เอชสกออร์ โดยมีการให้ค่าความเข้มในการติดสี เป็นสี่ระดับคือ 0(absent), 1(mild), 2(moderate), 3(high) ร่วมกับการนับเป็นอัตราส่วนการย้อมติดเป็นเปอร์เซ็นต์และนำมาคูณกันเป็น คะแนนตั้งแต่ 0-300 (รูปภาพที่ 1)

1.8.3 การแปลผลภาพรังสี เพื่อบอกการดำเนินของโรคหรือการตอบสนองของการรักษา ใช้คำนิยามตาม RECIST criteria 1.1

## บทที่ 2

### ปริทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of related literatures)

1. การศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของพีดีแอล-1 ก่อนและหลังการรักษาด้วยยาอีพีเดอร์มอลโกรท แพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสมีการศึกษาสองการศึกษาที่ตีพิมพ์ โดยทั้งสองการศึกษาแสดงแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของ พีดีแอล-1 หลังจากมีการดื้อยาโดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 การศึกษาของ Han และคณะ<sup>(25)</sup> ในเดือนพฤศจิกายน 2015 เป็นการศึกษาย้อนหลังจากประเทศเกาหลีใต้ โดยศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของพีดีแอล-1 เปรียบเทียบก่อนและหลังการได้รับยาเจพิทินิบ ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปอดจากกลุ่มตัวอย่าง 18 คน

- การย้อม ใช้ชุดตรวจ พีดีแอล-1 ชนิด E1L3N (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) นับบนนิวเคลียสหรือ cytoplasm ของเซลล์เนื้องอก โดยแปลผลดังนี้ 0(absent), 1(mild), 2(moderate), 3(high) ร่วมกับการนับเป็นอัตราส่วนการย้อมติดเป็นเปอร์เซ็นต์และนำมาคูณกันเป็นคะแนน พีดีแอล-1 เอชสกออร์ 0-300
- จากผู้ป่วย 19 คนมีการกลายพันธุ์เอกซอน 19 deletion 11 คน การกลายพันธุ์แบบ L858R คน และ 1 คน มีการกลายพันธุ์ทั้งสองแบบ
- จากตัวอย่างชิ้นเนื้อ 36 ชิ้นทั้งก่อนและหลังการรักษาด้วยยาเจพิทินิบพบการแสดงออกของพีดีแอล-1 บนนิวเคลียส 19 ตัวอย่าง(52.8%) และไซโตพลาสซึม 3 ตัวอย่าง (8.3%). และไม่พบการแสดงออกเลย(เอชสกออร์ = 0) 14 ตัวอย่าง(38.9%)
- เปรียบเทียบการแสดงออกของพีดีแอล-1 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อก่อนและหลังการรักษา พบความสัมพันธ์ในทางบวกอย่างมีนัยสำคัญ (Spearman's test;  $Z = 0.717$ ,  $p = 0.001$ )
- การแสดงออกของพีดีแอล-1 แนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยค่า มัชยฐานเอชสกออร์ เพิ่มขึ้นจาก 25 เป็น 40 (paired Wilcoxon signed rank test,  $P = 0.067$ )
- และการแสดงออกของพีดีแอล-1 บนนิวเคลียสสัมพันธ์กันกับเนื้องอกพบว่ามี การแสดงออก

เพิ่มขึ้นจาก 2/18 ตัวอย่างขึ้นเนื่อก่อนการรักษาเป็น 7/18 หลังการรักษา

- จากการสังเกต ผู้วิจัยแบ่งผู้ป่วยเป็นสองกลุ่ม โดยทางผู้วิจัยถือว่าหากเอชสกออร์ เพิ่มขึ้นมากกว่า 100 เป็นจุดตัด พบว่าผู้ป่วย (กลุ่ม A) 7 ใน 18 คน (38.9%) มีการเพิ่มขึ้นตามเกณฑ์ดังกล่าว (มัธยฐานเอชสกออร์ เพิ่มจาก 80 เป็น 180) และในผู้ป่วย 11 คนที่เหลือ (กลุ่ม B), ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าเอชสกออร์ (ไม่มีการเปลี่ยนแปลง, 0 เป็น 0)
- พยายามหาปัจจัยทางคลินิกและพยาธิวิทยาที่มีความสัมพันธ์กับตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม พบว่า มีเพียง MET เป็นบวกเท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงพีดีแอล-1 มากขึ้น (กลุ่ม A) ส่วนอายุ เพศ การสูบบุหรี่ การตอบสนองต่อเจฟิทีนิบ ชนิดของการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์รวมถึงตำแหน่งการเก็บชิ้นเนื้อไม่พบความแตกต่างกันระหว่างสองกลุ่ม
- นอกจากนี้พบว่าในผู้ป่วย 18 คนผู้ป่วยกลุ่ม A พบมีเนื้องอก ค่ำมัธยฐานของระยะเวลารอดชีวิตดีกว่า กลุ่ม B แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ระยะเวลาการรอดชีวิต not reached vs 38 months,  $P = 0.073$ ). PFS ของเจฟิทีนิบ ไม่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่ม (13 months versus 12 months,  $P=0.594$ )

1.2 การศึกษา Gainor และคณะ<sup>(24)</sup> ในเดือนกันยายน 2016 ศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นการศึกษาเกี่ยวกับอัตราการตอบสนองของยายับยั้ง พีดี-1/พีดีแอล-1 ในมะเร็งปอดชนิดที่มีการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์และอะนาพลาสติกลิมโฟมาไคเนส รวมถึงศึกษาเกี่ยวกับการตรวจการแสดงออกของ พีดีแอล-1 ในเนื้องอกมะเร็งปอดก่อนและหลังการรักษาด้วยยายับยั้งไทโรซีนไคเนส

- อัตราการตอบสนองของยากลุ่มยับยั้ง พีดี-1 และ พีดีแอล-1 3.6% (1/28) ในกลุ่มผู้ป่วยกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ และ ALK เปรียบเทียบกับ 23.3% (7/30) ใน อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ wild-type และ ALK-negative/unknown ( $P = 0.053$ ).
- ชุดผู้ป่วยศึกษาเกี่ยวกับการเปรียบเทียบการแสดงออกของ พีดีแอล-1 ก่อนและหลังการรักษาด้วยยายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส, ยายับยั้งอะนาพลาสติกลิมโฟมาไคเนสโดยการตรวจ พีดีแอล-1 ใช้แอนติบอดี E1L3N, Cell

Signaling Technology นับอัตราส่วนการติดบนผิวเซลล์เนื้องอก รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์

- ในกลุ่มกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ 68 ราย ก่อนการรักษาด้วยยาไทโรซีนไคเนส พบ พีดีแอล-1 24%/16%/11% ที่จุดตัดที่มากกว่าเท่ากับ 1%, 5% และ 50% ตามลำดับ
- ในผู้ป่วยที่มีคู่ตัวอย่างขึ้นเนื้องอกก่อนการรักษาและหลังตัดยายับยั้งอีพิเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส 57 ราย พบการเปลี่ยนแปลงของพีดีแอล-1 ใน 16 ราย (28%) โดยส่วนใหญ่มีแนวโน้มมากขึ้น (13/16 ราย)

## 2. การศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนพีดีแอล-1 และ การกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์

2.1 การศึกษาของ Yang และคณะ<sup>(27)</sup> เป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง ในประเทศไต้หวันโดยการรวบรวมตัวอย่างจากผู้ป่วยเนื้องอกมะเร็งปอดระยะที่ 1 ที่ได้รับการผ่าตัดจำนวน 163 คน

- การย้อมพีดีแอล-1 ใช้ชุดตรวจของ Proteintech Group Inc., Chicago, IL, USA แปลผลบวกเมื่อมีการย้อมติดบนผิวเซลล์เนื้องอกมากกว่าร้อยละ 5
- ในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ 97 คน พบว่า มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 บนผิวเซลล์เป็นบวก 43 คน เป็นลบ 54 คน ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 เป็นบวกมี Recurrent free survival นานกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกเป็นลบ

2.2 การศึกษาของ Azuma และคณะ<sup>(19)</sup> เป็นการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็กระยะต้นที่ได้รับการผ่าตัดจำนวน 164 คน

- การย้อม ใช้ชุดตรวจพีดีแอล-1 ของ Lifespan Biosciences, Seattle, WA นับบนผิวเซลล์หรือ ไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้องอก และลิมโฟไซต์ โดยแปลผลดังนี้ 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate), 3 (high) ร่วมกับการนับเป็นอัตราส่วนการย้อมติดเป็นร้อยละ

และนำมาคูณกันเป็น คะแนน พีดีแอล-1 เอชสเกอร์ ตั้งแต่ 0-300

- จากการตรวจ การกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์พบชนิดไม่มีการกลายพันธุ์ (wild-type) 107 คน มีการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ 57 คนแบ่งเป็นชนิดเอกซอน 19 del 30 คน และ เอกซอน 20 L858R 27 คน
- วิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis) พบว่ามีความสัมพันธ์ของ อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์กับการแสดงออก พีดีแอล-1 (Coefficient 25.4 (2.9 to 47.9, 95% CI; p = 0.027))
- นอกจากนี้ วิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis) ในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ พีดีแอล-1 มากมีระยะเวลารอดชีวิตที่แยกว่า และมีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำมากกว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกหรือมีน้อยโดยไม่ขึ้นกับปัจจัยอื่น
- ในการศึกษาเดียวกันมีการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์และกลุ่มไม่มีการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ (wild-type) พบว่ามีการพบการแสดงออกของ พีดีแอล-1 ในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.023) และในกลุ่มกลายพันธุ์ที่ไวต่อยาเออโลทินิบ การให้ยาดังกล่าวจะทำให้การแสดงออกของพีดีแอล-1 ลดลง

### 2.3 การศึกษาของ Akbay และคณะ<sup>(18)</sup> เป็นการศึกษาในระดับพรีคลินิกในหนูทดลองและเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งจากผู้ป่วย

- ในหนูที่มีมะเร็งปอดมีการแสดงออกของ พีดี-1/พีดีแอล-1 มากขึ้นในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ อย่างมีนัยสำคัญ (p =  $3 \times 10^{-20}$ ) เปรียบเทียบกับ EGFR wild-type จากการตรวจโดย microarray โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างชนิดของการกลายพันธุ์ EGFR (L858R, L858R/T790M, เอกซอน 19 del/T790M)
- ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยมะเร็งปอด เปรียบเทียบระหว่างชนิดที่มีการกลายพันธุ์ อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์และการกลายพันธุ์ KRAS พบว่าการแสดงออก



ของ อีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ รวมถึงตัวบ่งชี้การทำงานของวิถีอีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์ มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันระหว่างการแสดงออกพีดีแอล-1 โดยการตรวจ PCR, Flow cytometry ( $p < 10^{-15}$ ) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวใน KRAS

- นอกจากนี้มีการตัดต่อพันธุกรรม ให้เซลล์เพาะเลี้ยงเยื่อหุ้หลอดลม (BEAS2B) มีการแสดงออกของยีนกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์ พบว่าสามารถกระตุ้นการเกิดพีดีแอล-1 โดยการตรวจ PCR, Flow cytometry แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในการกลายพันธุ์ KRAS
- ในการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับยายับยั้งอีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส พบว่า ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการกลายพันธุ์ การให้ยาเจพิทินิบขนาดต่ำที่ไม่ทำให้เซลล์ตาย ทำให้การแสดงออกของพีดีแอล-1 ลดลง และในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มี การกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ชนิดต่อยาเจพิทินิบ (T790M mutation) จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว แต่หากเปลี่ยนเป็นยา WZ4002 (ยายับยั้งอีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสที่ไวต่อ T790M) ก็จะมีการลดลงของพีดีแอล-1 เช่นเดียวกัน จึงเป็นการยืนยันว่าการแสดงออกของพีดีแอล-1 เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์และการรักษาด้วย ยายับยั้งอีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสสามารถลดการแสดงออกของพีดีแอล-1
- มีการทดลองย้อมเนื้อเยื่อมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ อีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ พบว่า 9 ใน 12 ตัวอย่างมีการเพิ่มขึ้นของพีดีแอล-1

2.4 การศึกษาของ D'Incecco และคณะ<sup>(21)</sup> เป็นการศึกษาในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก 125 คนในประเทศอิตาลี เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ EGFR KRAS และALK translocation กับการแสดงออกของ พีดี-1/พีดีแอล-1 โดยการตรวจย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

- การย้อม ใช้ชุดตรวจ พีดีแอล-1 ab58810 (Abcam, Cambridge, UK) โดยแปลผลดังนี้ 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate), และ 3 (high) ผลบวกเมื่อมีการย้อมติดมากกว่า

หรือเท่ากับ 2 ในเซลล์เนื้องอกมากกว่าร้อยละ 5 ของเซลล์ทั้งหมด

- จากตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ 56 ตัวอย่าง พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการแสดงออกของพีดีแอล-1 (40 ใน 56 (ร้อยละ 71.4) เปรียบเทียบกับ 16 ใน 56 (ร้อยละ 28.6),  $p = 0.001$ ) และการวิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis) ก็ไปในทางเดียวกัน ( $p = 0.002$ )
- ในการศึกษากลุ่มย่อย ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา ยายับยั้งอีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส (N=99) พบว่าในกลุ่มที่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 (N=46) เป็นบวกมี ระยะเวลาถึงการดำเนินโรค (time to progression, TTP) นานกว่า (11.7 เดือน vs 5.7 เดือน,  $p < 0.0001$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ระยะเวลารอดชีวิตโดยรวม (overall survival, OS) นานกว่า (21.9 เดือน vs 12.5 เดือน,  $p = 0.009$ )
- ในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ (N=54) และได้รับการรักษาด้วย ยายับยั้งอีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส กลุ่มที่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 เป็นบวก (N=38) มีระยะเวลาถึงการดำเนินโรค นานกว่ากลุ่มที่เป็นลบอย่างมีนัยสำคัญ (13.1 เดือน vs 8.5 เดือน,  $p = 0.01$ ) แต่ระยะเวลารอดชีวิตมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

2.5 การศึกษาของ Chen และคณะ<sup>(20)</sup> ตีพิมพ์ในเดือนมิถุนายนปี 2015 เป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง ของเซลล์มะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็กและเซลล์เยื่อหุ้มหลอดลม เพื่อตอบคำถามเกี่ยวกับวิถีการส่งสัญญาณของอีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ การเพิ่มการแสดงออกของพีดีแอล-1 และการยับยั้งวิถี พีดี-1/พีดีแอล-1 ส่งผลอย่างไรในเนื้องอกที่มี การกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ทั้งชนิดที่ไวและดื้อต่อยายับยั้งอีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส

- จากการตรวจ Western-blot เพื่อตรวจโปรตีน และ RT-PCR เพื่อตรวจ mRNA พบว่ามีการแสดงออกของพีดีแอล-1 ในเซลล์มะเร็งปอดเพาะเลี้ยงที่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ (PC-9, HCC827, H1975) มากกว่าในเซลล์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ (A549, H1993) รวมถึงเซลล์

เพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มหลอดลมปกติอย่างชัดเจนในเซลล์มะเร็งปอดที่ไม่มีการกลายพันธุ์ อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ (EGFR-wild type) เมื่อมีการใส่อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์เพื่อกระตุ้นการทำงานของวิถีดังกล่าว พบว่ามีการสร้าง พีดีแอล-1 มากขึ้น และแปรผันตามขนาดของอีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ที่ให้ตั้งแต่ 0-40 ng/mL นอกจากนี้พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดลมอีกด้วย การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกพีดีแอล-1 นี้คงทนอยู่มากกว่า 48 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นวิถี EGFR

- ในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดลมปกติ เมื่อมีการใส่พลาสมิดที่มียีนอีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ ชนิดกลายพันธุ์เอกซอน 19 deletion ร่วมกับ promoter ชนิดส่งเสริมมากและน้อย ตามลำดับพบว่าระดับของพีดีแอล-1 เป็นไปตามขนาดของ p-EGFR เช่นเดียวกับในกลุ่มที่ใส่ plasmid มีการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ชนิด L858R แบบที่สามารถกระตุ้นมากน้อยได้ด้วยขนาดของ doxycycline ก็พบว่า ระดับพีดีแอล-1 แปรผันตาม p-EGFR ที่ถูกกระตุ้นเช่นกัน สามารถยืนยันได้ด้วยการย้อมสารเรืองแสง สรุปว่าไม่ว่าจะกระตุ้นวิถีอีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ด้วยวิธีใดก็มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 มากขึ้น
- ในทางกลับกันเมื่อมีการยับยั้งอีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ด้วยยาเจฟิทินิบ ในเซลล์ที่มียีนกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ทั้งชนิดเอกซอน 19 del หรือ L858R พบว่ามีการลดการแสดงออกของพีดีแอล-1 แต่ในเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ ชนิด T790M ซึ่งดื้อต่อยาดังกล่าวก็จะมีระดับพีดีแอล-1 เท่าเดิม หากเปลี่ยนเป็น ยา CO-1686 ซึ่งสามารถยับยั้งการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ชนิด T790M ได้ก็จะลดพีดีแอล-1 ได้อีกครั้ง สรุปได้ว่าการยับยั้งวิถีอีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ ก็จะลดระดับพีดีแอล-1
- วิธีการส่งสัญญาณอีพีเคอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ที่สัมพันธ์กับพีดีแอล-1 คือ ERK 1/2/c-jun แต่ไม่พบในวิถี AKT โดยการใช้ยาที่ยับยั้ง ERK pathway และพบว่าการลดลงของ p-ERK และ p-c-jun ส่งผลให้มีการลด พีดีแอล-1 แต่ไม่พบการลดเช่นนี้เมื่อใช้ยายับยั้งวิถี AKT

- มีการทดสอบการทำงานของ พีดีแอล-1 โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่บังคับให้มีการสร้าง พีดีแอล-1เพิ่มขึ้น โดยการใส่พลาสมิด (plasmid) ที่มีพีดีแอล-1 ยีนและเลี้ยงร่วมกับ Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) พบว่าในเซลล์ที่มี พีดีแอล-1 มากจะมีการอะพอพโทซิส ของ CD3+ ทีลิมโฟไซต์ มากกว่าเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม และยับยั้งพีดี-1 และยาเจพิทินิบลดการอะพอพโทซิสของทีลิมโฟไซต์ได้
- ทดสอบเพื่อดูความไวต่อยาชนิดต่างๆโดยเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้องอกทั้งชนิดเอกซอน 19 deletion (HCC827) และ T790M (H1975) ร่วมกับ PBMC และให้สารยับยั้ง ERK1/2 , AKT, EGFR,PD-1 , EGFR-TKI + PD-1พบว่ายาต้าน PD-1 สามารถทำให้เซลล์ เพาะเลี้ยง HCC827 ลดลงเหลือร้อยละ  $67.90 \pm 2.39$  ( $p < 0.0001$ ), H1975 ลดลง เหลือร้อยละ  $67.23 \pm 4.59$  ( $p = 0.0003$ ) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบว่า เมื่อเปรียบเทียบ EGFR wild-type เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกพีดีแอล-1 น้อย (A549) กับการกลายพันธุ์อีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ชนิดเอกซอน 19 del (HCC827) พบว่าฤทธิ์ของการฆ่าเซลล์มะเร็งแปรผันตามการแสดงออกของ พีดีแอล-1
- ไม่พบว่าการให้ ยายับยั้งอีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสรวมกับ ยาต้านพีดี-1เสริมฤทธิ์กัน

2.6 การศึกษาของ Tang และคณะ<sup>(23)</sup> ในเดือนมกราคม ปี 2015 เป็น retrospective, single center จากประเทศจีน โดยการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งปอดไม่ใช้เซลล์เดี่ยวระยะ IIIB/IV ที่ได้รับการรักษาด้วยยายับยั้งอีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส (N = 170) เพื่อการตอบสนอง ในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1

- การย้อม ใช้ชุดตรวจ rabbit monoclonal anti-human PD-L1 antibody (E1L3NTM, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) นับบนผิวเซลล์หรือ cytoplasm ของ เซลล์เนื้องอก โดยแปลผลดังนี้ 0 (absent), 1 (mild), 2 (moderate), และ 3 (high) ร่วมกับการนับเป็นอัตราส่วนการย้อมติดเป็นร้อยละและนำมาคูณกันเป็น คะแนน PD-L-score ตั้งแต่ 0-300 แปลผลบวกเมื่อมีการย้อมติดมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ในเซลล์ เนื้องอกมากกว่าร้อยละ 5 ของเซลล์ทั้งหมด

- จากตัวอย่าง 170 คน พบการแสดงออกของพีดีแอล-1 112 คน (ร้อยละ 65.9) และพบว่ามีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ 99 คน โดย 40 คน เป็นชนิดเอกซอน 19 deletion 47 คน เป็นชนิดเอกซอน 21 L858R และ 12 คน เป็นชนิดที่พบน้อย
- ความสัมพันธ์การแสดงออกของพีดีแอล-1 และปัจจัยพื้นฐานต่างๆของผู้ป่วย ได้แก่ อายุ เพศ ชนิดของเซลล์ การสูบบุหรี่ ระยะของโรค ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ การแสดงออกของพีดีแอล-1กับการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ก็อบจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญดังนี้ wild-type 32/56 คน (ร้อยละ 57.1) และ ชนิดมีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ 64/89 (ร้อยละ 71.9),  $p = 0.067$
- ในผู้ป่วยทั้งหมดที่ได้รับยายับยั้งอีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสไม่พบว่ามี อัตราตอบสนอง (overall response rate), อัตราการควบคุมโรค (disease control rate), ระยะปลอดการดำเนินโรค (progression free survival), หรือระยะเวลารอดชีวิตโดยรวม (overall survival) แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1
- ในการศึกษากลุ่มย่อยพบว่าในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ กลุ่มที่มีการแสดงออกพีดีแอล-1เป็นบวกมีแนวโน้มจะมี PFS และ OS ดีกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกเป็นลบ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
- และในกลุ่มอีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ wild-type กลุ่มที่พีดีแอล-1เป็นบวกเป็นปัจจัยพยากรณ์โรคที่ไม่ดี มีแนวโน้ม OS แย่กว่ากลุ่มที่เป็นลบ การวิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis) ก็ไปในทางเดียวกัน (HR, 3.738; 95% CI, 1.341-10.419;  $p = 0.012$ )

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยเชิงพรรณนา แบบ Retrospective study

#### 3.2 ระเบียบการวิจัย (Research methodology)

3.2.1 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample)

ประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะแพร่กระจายที่มีการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study Population)

ผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็กระยะ III B/IV ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2550 ถึง 31 ธันวาคม 2559 ตรวจพบการกลายพันธุ์ของอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ รีเซปเตอร์ และได้รับการรักษาด้วยยามุ่งเป้ายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ไทโรซีนไคเนส และมีการเก็บชิ้นเนื้อก่อนการรักษาและหลังจากดื้อยาไทโรซีนไคเนส

3.2.2 เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมการศึกษา (Inclusion criteria)

- 1 มีผลชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยายืนยันว่าเป็นมะเร็งชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก
- 2 ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกเป็นมะเร็งปอดระยะ III B หรือ IV
- 3 มีการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ชนิดที่ไวต่อยายับยั้งไทโรซีนไคเนส (เอกซอน 19 deletion, L858R, G719X, L861Q)
- 4 หากไม่ทราบผลการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ใช้เกณฑ์การตอบสนองเมื่อได้รับการรักษาด้วยยามุ่งเป้ายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส และมีการตอบสนองต่อยาโดย เคยได้รับการตอบสนองเป็นตอบสนองบางส่วน (partial response) หรือ ตอบสนองทั้งหมด (complete response) หรือได้โรคงที่ (stable disease) นานกว่า 6 เดือนโดย RECIST criteria version 1.1

- 5 ได้รับการวินิจฉัยทางคลินิกกว่ามีการดื้อยามุงเป้ายับยั้งอีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส
- 6 มีการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อก่อนการได้รับยา และหลังจากดื้อต่อยา

### 3.2.3 เกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

- 1 ตัวอย่างชิ้นเนื้อไม่สามารถนำมาแยกพิเศษเพิ่มเติมได้เมื่อประเมินโดยพยาธิแพทย์
- 2 ไม่มีข้อมูลจากแฟ้มเวชระเบียนหรือไม่สามารถเก็บข้อมูลได้
- 3 เคยได้รับการรักษาด้วยยาต้าน พีดี-1/พีดีแอล-1

### 3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

จากการทบทวนวรรณกรรมก่อนหน้านี้ ไม่พบข้อมูลของการใช้การแสดงผลของทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ (TPS) ทางผู้วิจัยจึงใช้ข้อมูลจากการศึกษาของ Han และคณะ<sup>(25)</sup> พบว่าจำนวนตัวอย่างที่มีการแสดงผลของ พีดีแอล-1 เป็นบวกโดยใช้นิยาม พีดีแอล-1 เอชสกออร์ มากกว่าเท่ากับ 100 โดยพบในตัวอย่างก่อนการรักษา 1/18 (5.56%) และหลังการรักษา 7/18 (38.89%) ดังนั้น ในการศึกษาคั้งนี้จึงใช้ค่าสถิติแทนค่าในสูตรดังนี้

$$\varphi = \frac{\pi_A(1 - \pi_B)}{\pi_B(1 - \pi_A)}$$

$$\pi_{Discordant} = \pi_A(1 - \pi_B) + \pi_B(1 - \pi_A)$$

$$n_{pair} \geq \frac{\left( Z_{1-\alpha/2}(\varphi+1) + Z_{1-\beta} \sqrt{(\varphi+1)^2 - (\varphi-1)^2 \pi_{Discordant}} \right)^2}{(\varphi-1)^2 \pi_{Discordant}}$$

จากสูตร

โดยกำหนดให้  $n$  = ขนาดตัวอย่าง

$\pi_A$  คือ ก่อนรักษาพบอัตราส่วนผู้ป่วยที่มีการแสดงผลออกพีดีแอล-1 เป็นบวก 5.56%

$\pi_B$  คือ หลังการดื้อยาพบอัตราส่วนผู้ป่วยที่มีการแสดงผลออกพีดีแอล-1 เป็นบวก 38.89%

$\alpha = 0.05$   $Z \alpha = 1.96$

$\beta = 0.2$  (Power 80%)  $Z \beta = 0.84$

จึงต้องใช้จำนวนตัวอย่าง 26 ราย เป็นอย่างน้อยในการศึกษาคั้งนี้ประมาณเพื่อ 10% ของข้อมูลจึงเก็บผู้ป่วยจำนวนอย่างน้อย 29 ราย

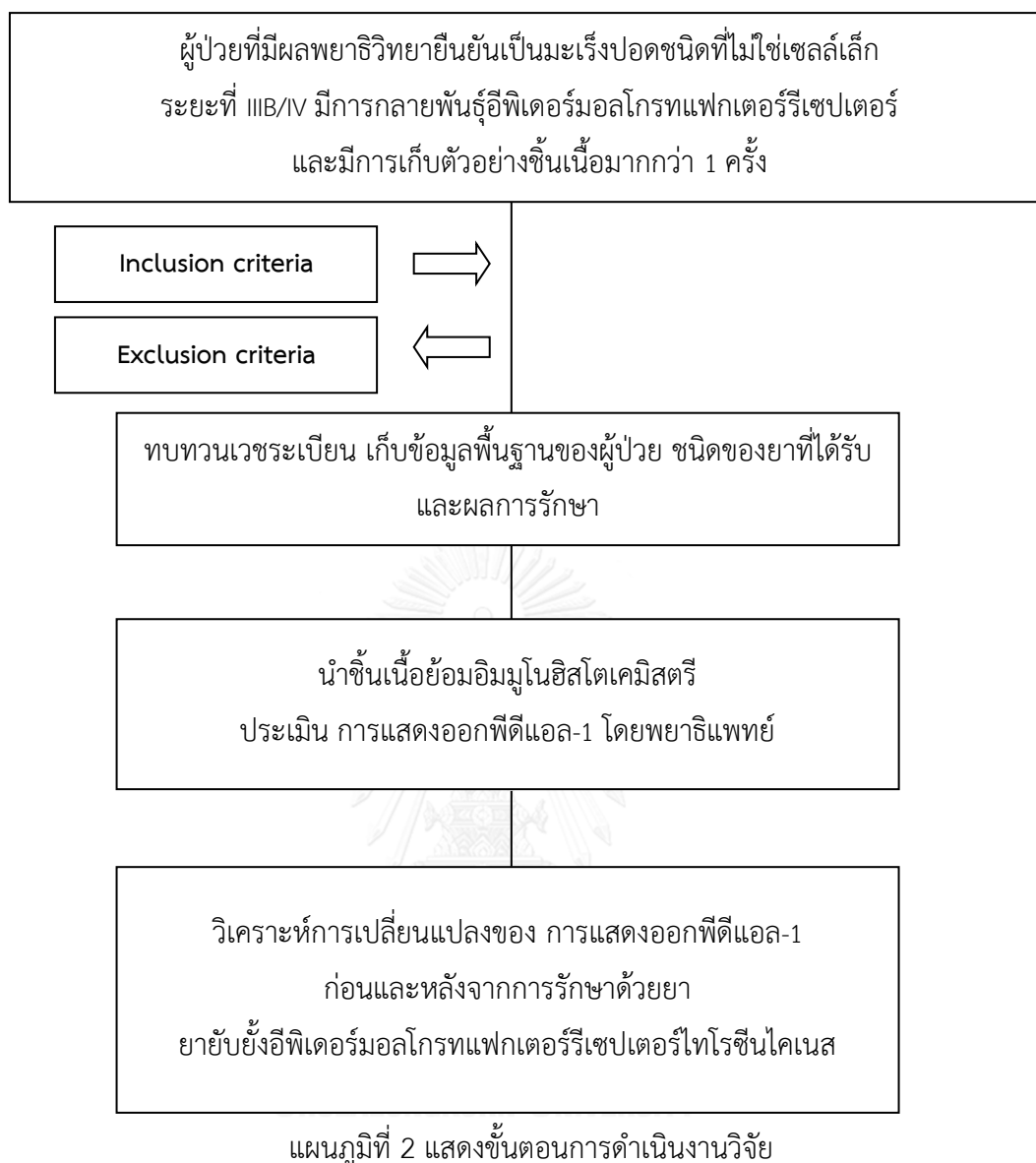
### 3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

- 3.4.1 ค้นหาผู้ป่วยจากฐานข้อมูลของหน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์และแผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยเลือกผู้ป่วยเชื้อชาติไทยที่อายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคมะเร็งปอดระยะลุกลามชนิดที่มีการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ โดยจะดำเนินการหลังจากโครงร่างการวิจัยได้รับการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยแล้ว
- 3.4.2 ทบทวนประวัติการได้รับยาต้านเนื้องอกของผู้ป่วยและเลือกเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยามุ่งเป้ายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ รีเซปเตอร์ ไทโรซีนไคเนส ได้แก่ เจฟทีนิบ เออร์โลทีนิบ หรืออะฟาทีนิบ และมีการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อก่อนการรักษา และหลังจากมีการตัดยาแล้ว
- 3.4.3 ตรวจสอบคุณภาพของชิ้นเนื้อโดยพยาธิแพทย์ผู้วิจัยร่วม
- 3.4.3 ตรวจสอบเกณฑ์ในการคัดเลือกการเข้าและออกจากการศึกษา
- 3.4.4 ในกรณีที่เป็คนไข้ที่ยังมาตรวจติดตามที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จะมีการให้ข้อมูลการวิจัยแก่ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย โดย ทีมผู้ทำวิจัยจะดำเนินการขอความยินยอม โดยจะเป็นทั้งผู้ให้ข้อมูลคำอธิบายวัตถุประสงค์ วิธีการที่จะปฏิบัติต่ออาสาสมัคร ประโยชน์และความเสี่ยง รวมถึงตอบข้อสงสัยจน ผู้ที่ได้รับเชิญให้เข้าร่วมการวิจัยเข้าใจ และจะใช้เวลาตัดสินใจโดยอิสระ ก่อนลงนามให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย
- 3.4.5 บันทึกข้อมูลจากเวชระเบียนของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย เช่น เพศ, อายุ, รายละเอียดของโรค และการรักษาที่ได้รับ
- 3.4.6 ตรวจสอบการดำเนินของโรคจากเวชระเบียนและภาพถ่ายทางรังสีวิทยา
- 3.4.7 นำชิ้นเนื้อของผู้ป่วยทั้งก่อนและหลังการรักษาด้วยยามุ่งเป้ายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ไทโรซีนไคเนส
- ตัดชิ้นเนื้อจากบล็อกพาราฟิน วางบนแผ่นสไลด์ และใช้เนื้อเยื่อทอนซิลเป็นกลุ่มควบคุมแบบบวก (positive control)



- ย้อมด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ตรวจพีดีแอล-1 ด้วย PD-L1 IHC 22C3 pharmDx® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) บนเครื่องย้อม Dako's Autostainer Link 48®
- แปลผลโดยใช้วิธีวัดคะแนนทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกอร์ (Tumor proportional score, TPS) ซึ่งนับจำนวนเซลล์เนื้องอกที่ย้อมติดทั้งแบบบางส่วนและติดทั้งหมด ทหารด้วยจำนวนเซลล์เนื้องอกทั้งหมด นับอย่างน้อย 100 เซลล์ และมากที่สุด 200 เซลล์ต่อหนึ่งตัวอย่าง รายงานผลเป็นร้อยละ
- เฮชสกอร์ (H-score) เป็นการวัดโดยนำความเข้มในการติดสีเป็นสี่ระดับมาคูณด้วยร้อยละของการย้อมติดความเข้มนั้นๆ และนำมารวมกันคะแนนอยู่ระหว่าง 0-300

มีพยาธิแพทย์ผู้ร่วมวิจัยซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยาเนื้องอกในช่องอกและได้รับการอบรมเรื่องการแปลผลทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกอร์ เป็นผู้แปลผล



### 3.5 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

มีการเก็บข้อมูลและโครงการวิจัยที่เข้ากับเกณฑ์ในการคัดเลือกการเข้าและออกจาก  
การศึกษา โดยทำการทบทวนประวัติพื้นฐานของผู้ป่วย เช่น เพศ อายุ สืบบุหรี ระยะเวลาของโรคที่เป็น  
และสูตรยาและการรักษาทั้งหมดรวมถึงวันที่เริ่มและหยุดยา ลงในแบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วย โดยผู้วิจัย  
เป็นผู้รวบรวมบันทึกใน case record form (ภาคผนวก)

### 3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

#### 3.6.1 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ข้อมูลเชิงคุณภาพโดยใช้สถิติพรรณนา (Descriptive) แสดงค่าความถี่ และร้อยละ

ข้อมูลเชิงปริมาณแสดงค่ากลางด้วยค่าเฉลี่ย มัธยฐาน และพิสัย

ในลำดับของการวิเคราะห์หอนุมานทางสถิติ โดยค่าสถิติทั้งหมดจะกำหนดค่าระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p\text{-value} < 0.05$

ใช้สถิติวิเคราะห์ในแต่ละวัตถุประสงค์ของผลการศึกษาดังต่อไปนี้

1. วิเคราะห์เปรียบเทียบผลการศึกษาสำหรับข้อมูลเชิงปริมาณระหว่างก่อนและหลังการได้รับยาบัยบั้งอีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสได้แก่ ร้อยละของการแสดงออกของโปรตีนพีดีแอล-1 ว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ ด้วยสถิติ paired t-test
2. วิเคราะห์เปรียบเทียบผลการศึกษาสำหรับข้อมูลเชิงกลุ่มระหว่างกลุ่มผลการศึกษาสำหรับข้อมูลเชิงปริมาณระหว่างก่อนและหลังการได้รับยาบัยบั้งอีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสได้แก่ การแปลผลการแสดงออกพีดีแอล-1 เป็นบวกหรือลบ ว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ ด้วยสถิติ McNemar Test
3. ใช้ Spearman's correlation coefficient ในการหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกพีดีแอล-1 ก่อนและหลังการได้รับยาบัยบั้งอีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส
4. วิเคราะห์การอยู่รอด (survival analysis) โดยรายงานด้วย Kaplan Meier curve และวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย log-rank test
5. วิเคราะห์ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกด้วยการวิเคราะห์ถดถอยแบบคอกซ์ (Cox proportional hazards model) เพื่อหาปัจจัยที่มีผล เช่น ตัวแปร การสูบบุหรี่ อายุ ชนิดการกลายพันธุ์อีพีเคอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์เป็นต้น
6. ใช้โปรแกรม SPSS version 22.0 (IBM Corp., Chicago, IL, USA.) ในการวิเคราะห์ข้อมูล

### 3.7 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical considerations)

ครอบคลุมหลักจริยธรรมการวิจัยในคน 3 ข้อได้แก่

- 3.7.1 หลักความเคารพในบุคคล (Respect of person) คือไม่มีการเปิดเผยชื่อหรือเลขที่โรงพยาบาลของผู้ป่วย รวมถึงรักษาความลับของผู้ป่วยเป็นสำคัญ ข้อมูลทั้งหมดในการศึกษาไม่สามารถย้อนกลับไปสู่การระบุตัวผู้ป่วยได้
- 3.7.2 มีการขอคำยินยอมจากผู้ป่วยก่อนการขอตรวจชิ้นเนื้อเพิ่มเติม
- 3.7.3 หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการศึกษาในชิ้นเนื้อเนื้องอกที่มีอยู่แล้ว ไม่มีความเสี่ยงต่อผู้ป่วย
- 3.7.4 หลักความยุติธรรม (Justice) คือมีเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยในโครงการชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน

### 3.8 ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitation)

- 3.8.1 การวิจัยเป็นแบบการวิจัยแบบย้อนหลังที่ต้องมีการเก็บชิ้นเนื้อมากกว่าหนึ่งครั้ง ซึ่งผู้ป่วยเช่นนี้มีจำนวนไม่มาก การวิเคราะห์เชิงอนุมาน multivariate analysis เพื่อหาปัจจัยเกี่ยวข้องอื่นๆจึงไม่สามารถทำได้
- 3.8.2 เนื่องจากในตัวอย่างบางรายอาจมีระยะเวลาการเก็บชิ้นเนื้อที่นานแล้ว อาจจะมีการเสียคุณภาพในการย้อมติดสีบางส่วนได้
- 3.8.3 ข้อมูลจากเวชระเบียนอาจไม่ครบถ้วน และไม่สามารถควบคุมปัจจัยกวนได้ เช่นผู้ป่วยไม่ได้ตรวจโดยแพทย์คนเดียว การนัดตรวจติดตามเป็นระยะเวลาต่างกัน อาจทำให้การประเมินการกลับเป็นโรครุนแรงแตกต่างกัน



### 3.12 งบประมาณ (Budgets)

จากหน่วยมะเร็งวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)
<b>หมวดค่าวัสดุ ได้แก่ ค่าวัสดุสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ค่าวัสดุสำนักงาน</b> <b>ค่าตรวจทางห้องปฏิบัติการ</b> ค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อแอนติบอดี ต่อ พีดี-1/พีดีแอล-1 เจ้าหน้าที่พยาธิวิทยาที่ทำการเตรียมการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ รวมค่าใช้จ่ายประมาณ	200,000
<b>หมวดค่าครุภัณฑ์</b> - ค่าเอกสารและวัสดุงานธุรการ	1,500
<b>รวมจำนวนเงินทั้งสิ้น</b>	<b>201,500</b>



## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

#### 4.1 ข้อมูลพื้นฐาน

จากผู้ป่วยที่มาตรวจในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พุทธศักราช 2550 จนถึง 31 ธันวาคม พุทธศักราช 2559 มีผู้ป่วยทั้งหมด 47 คนที่ตรงกับเกณฑ์ในการคัดเลือก (Inclusion criteria) มี 9 รายถูกคัดออกจากการศึกษา โดย 8 ราย เป็นเพราะตัวอย่างชิ้นเนื้อไม่เหมาะสม และอีก 1 ราย เป็นเพราะไม่สามารถตามประวัติการรักษา ไม่มีผู้ป่วยคนใดที่เคยได้รับยาในกลุ่มยับยั้งพีดี-1/พีดีแอล-1 ดังนั้นมีผู้ป่วยทั้งหมด 38 รายที่สามารถนำตัวอย่างชิ้นเนื้อมาจับคู่และนำไปตรวจการเปลี่ยนแปลงของพีดีแอล-1 ได้ แผนผังแสดงการคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัยแสดงในแผนภูมิที่ 3

ข้อมูลพื้นฐานและการแสดงออกของ พีดีแอล-1 ดังแสดงในตารางที่ 1 อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาคือ 63.3 ปี (พิสัย 38-87 ปี) เป็นผู้หญิง 29 ราย คิดเป็นร้อยละ 76.3% ผู้ป่วยที่เข้าร่วมไม่เคยสูบบุหรี่ 32 จาก 38 ราย คิดเป็น 84.2% มี 13 คนที่มีน้ำหนักลดเกินกว่า 5% ของน้ำหนักตัว ส่วนใหญ่ของผู้ป่วยมีสภาวะร่างกายอยู่ในระดับที่ 1 เมื่อประเมินด้วยอีสเทิร์น โคโอเปอร์เรทีฟ อองโคโลจี กรุป สกอร์ (Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) score) ข้อมูลพื้นฐานของชนิดเนื้องอกมะเร็งเป็นดังนี้ 35 รายเนื้องอกมะเร็งเป็นชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (adenocarcinoma) อีก 3 รายเป็นมะเร็งชนิดเซลล์ไม่เล็กที่ไม่ได้ระบุเป็นอย่างอื่น (NSCLC, not otherwise specified) จากการตรวจการกลายพันธุ์อีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ก่อนการรักษา ผู้ป่วย 20 รายมีการกลายพันธุ์ชนิดเอกซอน 19 del, 15 รายมีการกลายพันธุ์ชนิดเอกซอน 21 L858R และอีก 2 รายเป็นชนิดที่พบน้อย ประกอบด้วย L861Q 1 ราย และ G719X 1 ราย มีผู้ป่วย 1 ราย ที่ไม่ได้ตรวจการกลายพันธุ์อีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ แต่สามารถเข้าการศึกษาได้เนื่องจากตอบสนองต่อยายับยั้งอีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนสถึงระดับตอบสนองบางส่วน (partial response) และมีระยะเวลาปลอดการดำเนินโรคที่ 7.29 เดือน มีผู้ป่วย 3 ราย ที่ได้รับยาเคมีบำบัดก่อนการเก็บชิ้นเนื้อครั้งแรก ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดแบบรักษาเสริมหลังการผ่าตัด ในช่วงระหว่างการเก็บชิ้นเนื้อ 2 ครั้ง ผู้ป่วย 17 รายได้รับเฉพาะยายับยั้งอีพิเดอร์

มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส และอีก 21 รายที่เหลือมีการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดร่วมด้วยระหว่างช่วงเวลาดังกล่าว ค่าเฉลี่ยและค่ามัธยฐานของช่วงเวลาตั้งแต่มีการดำเนินโรคจนกระทั่งเก็บชิ้นเนื้อซ้ำเท่ากับ 67.2 วันและ 13.5 วันตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของพีดีแอล-1 ที่ทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ที่จุดตัด 1%, 50% และข้อมูลพื้นฐานทางคลินิก ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อ อายุ เพศ ประวัติการสูบบุหรี่ ระยะของโรคและชนิดการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ มีเพียงน้ำหนักตัวที่ลดลงมากกว่า 5% ที่สัมพันธ์กับพีดีแอล-1 ที่มากกว่า 1% ( $p=0.012$ )

#### 4.2 การเปลี่ยนแปลงของพีดีแอล-1 หลังตัดอวัยวะรับยั้งไทโรซีนไคเนส

คำถามหลักของงานวิจัยคือการเพิ่มขึ้นจำนวนของผู้ที่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 มากกว่า 50% ผลเป็นดังนี้ ในชิ้นเนื้อตัวอย่างก่อนการรักษาด้วยยายับยั้งอีพีเดอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคเนส 38 ตัวอย่าง มี 1 ตัวอย่างที่พบการแสดงออกของโปรตีนพีดีแอล-1 มากกว่า 50% และจำนวนเพิ่มเป็น 6 ใน 38 ตัวอย่าง ที่เก็บหลังจากมีการตัดอวัยวะรับยั้ง ซึ่งไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p\text{-value} = 0.063$ ) และที่จุดตัดมากกว่าเท่ากับ 1% จำนวนผู้ป่วยที่ผลการแสดงออกเป็นบวกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 8 เป็น 9 ใน 38 ราย ( $p=1.0$ ) มีผู้ป่วย 11 รายที่มีการเปลี่ยนแปลงของพีดีแอล-1, 9 รายมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และอีก 2 รายมีค่า พีดีแอล-1 ลดลง มีผู้ป่วยที่ไม่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 (ทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ <1%) ในชิ้นเนื้อก่อนการรักษา 30 ราย ในจำนวนนี้ 27 ราย (90%) จะยังคงไม่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 รายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงของพีดีแอล-1 แสดงในตารางจำแนก ตารางที่ 2

มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ จาก 4.57 เป็น 14.91 ( $p=0.019$ ) และ เอชสกออร์ จาก 7.90 เป็น 33.22 ( $p=0.015$ ) โดยการวิเคราะห์ด้วย paired t-test และหากวิเคราะห์เฉพาะกลุ่มที่มีค่าทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ก่อนการรักษามากกว่าหรือเท่ากับ 1% ( $N=8$ ) ทั้งค่าเฉลี่ยค่าทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์และเอชสกออร์มีแนวโน้มมากขึ้น เพิ่มขึ้นจาก 21.7% เป็น 45.6% ( $p=0.07$ ) และ 37.5 เป็น 112.2 ( $p=0.067$ ) รูปแบบการเปลี่ยนแปลงดังแสดงในกราฟที่ 1



### 4.3 ผลการรักษาและการรอดชีวิต

ในช่วงเวลาที่วิเคราะห์ผลการรักษา ระยะเวลาเฉลี่ยที่ตรวจติดตามคือ 30.2 เดือน ข้อมูลของการรอดชีวิตโดยรวม (overall survival) ยังไม่สามารถวิเคราะห์ได้เนื่องจากมีผู้ป่วยเพียง 10 รายที่เสียชีวิต อย่างไรก็ตามผู้ป่วยทุกคนมีการดำเนินโรคจากยาไทโรซีนไคนเนส และมีค่ามัธยฐานระยะเวลาปลอดการดำเนินโรค (progression free survival) 10.09 เดือน, 95% CI 6.67-13.5 ผู้วิจัยวิเคราะห์ระยะเวลาปลอดการดำเนินโรคของยายับยั้งอีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ไทโรซีนไคนเนส และยาเคมีบำบัดกลุ่มแพลตตินัม จำแนกตามกลุ่มที่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 ทั้งจุดตัดที่ 1% และ 50% ไม่มีกลุ่มไหนที่แสดงถึงการแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กราฟการรอดชีวิตแคบแลน-ไมเออร์ดังแสดงในกราฟที่ 2

การตอบสนองที่ดีที่สุดต่อยาไทโรซีนไคนเนสจากการประเมินโดยใช้ภาพรังสีวินิจฉัย และใช้เกณฑ์ RECIST 1.1 (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) พบว่าผู้ป่วย 32 ราย (84.2%) ได้ถึงระดับตอบสนองบางส่วน (partial response) มี 1 ราย ที่มีการดำเนินโรค (progressive disease) ซึ่งผู้ป่วยรายนี้มีการกลายพันธุ์ชนิดเอกซอน 19 ได้รับยาเจฟีทินิบ และที่เหลืออีก 5 คนได้ระดับโรคคงที่ (stable disease) ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองและการแสดงออกของพีดีแอล-1 ก่อนการรักษา ( $p=0.587$ )

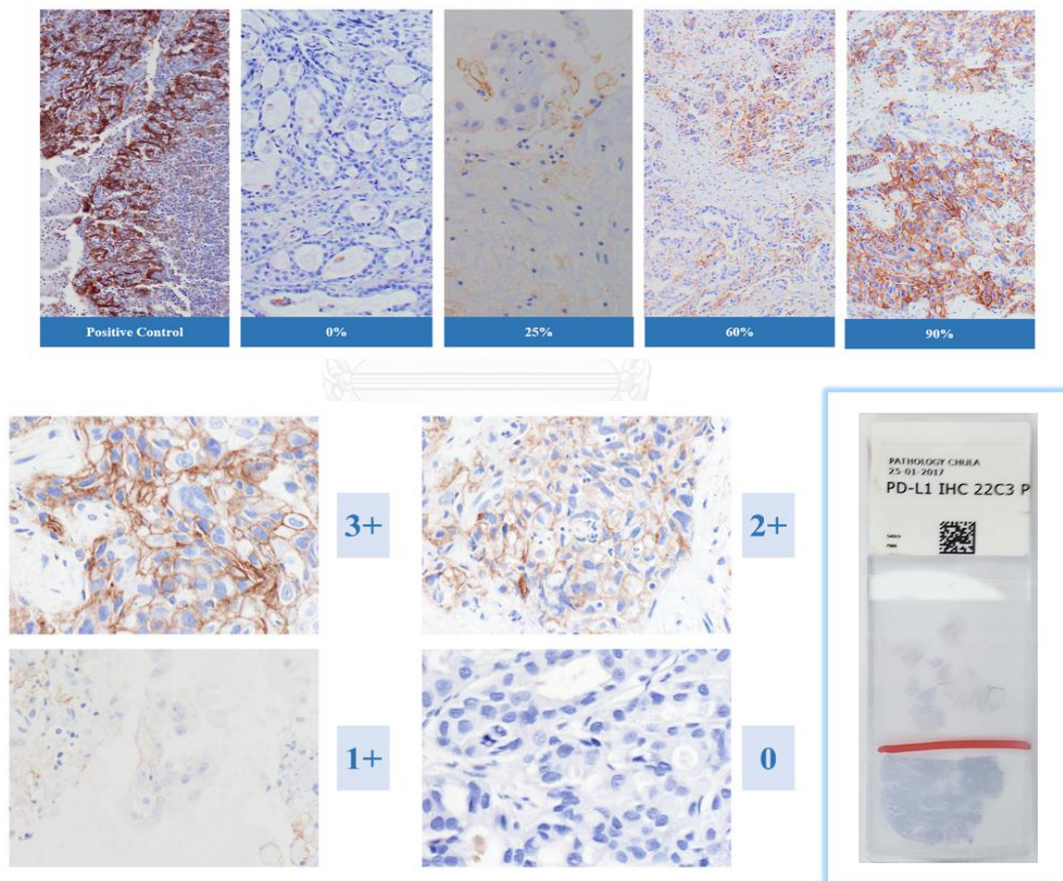
### 4.4 การกลายพันธุ์อีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์และการกลายพันธุ์ชนิด T790M

ใน 38 รายมี 33 รายที่มีการตรวจการกลายพันธุ์อีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ซ้ำ หลังจากมีการดื้อยา 21 จาก 33 ราย (63.6%) ตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิดเอกซอน 20 T790M เพิ่มไปจากตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่มีอยู่เดิม โดยมีรายละเอียดดังนี้ ในผู้ป่วยที่มีเอกซอน 19 del ก่อนการรักษา 20 ราย 18 รายได้รับการตรวจซ้ำ และพบการกลายพันธุ์เอกซอน 19 del + T790M 13/20 ราย (65%) อีก 5 รายยังคงเป็นเอกซอน 19 del เพียงอย่างเดียว และ 2 รายไม่ได้รับการตรวจ ในกลุ่มที่มีเอกซอน L858R 15 ราย, 8/15 ราย(53.3%) มีการกลายพันธุ์ T790M เพิ่ม, 5 รายยังเป็น L858R เพียงอย่างเดียว และอีก 2 รายไม่ได้ตรวจ ในกลุ่มที่เป็นการกลายพันธุ์ที่พบน้อย ทั้ง 2 ราย ไม่พบการกลายพันธุ์ T790M ทั้งนี้ในการตรวจการกลายพันธุ์อีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์หลังดื้อยามี 4 รายที่ใช้วิธีการตรวจจากเลือด รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

นอกจากนี้การที่ไม่มีการกลายพันธุ์ T790M หลังการดื้อยามีนานัว่มที่จะมีการแสดงออก พีดีแอล-1 มากกว่าเดิม หลังการดื้อยา ค่าเฉลี่ยทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ T790M 7.4% เปรียบเทียบกับ 24.2% ในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ T790M ( $p=0.109$ ) เอชสกออร์เท่ากับ 12.6 และ 58.6 ในกลุ่มที่ในกลุ่มที่มี T790M และ ไม่มี T790M ตามลำดับ ( $p=0.066$ )

ทางผู้นิพนธ์ได้แสดงข้อมูลจำนวนการเก็บตัวอย่างซ้ำ ในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิดกลายพันธุ์อีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างปีพุทธศักราช 2554-2559 จะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงปี พุทธศักราช 2558-2559 ดังแสดงในกราฟที่ 3

รูปภาพที่ 1 ภาพผลลัพธ์ของการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้

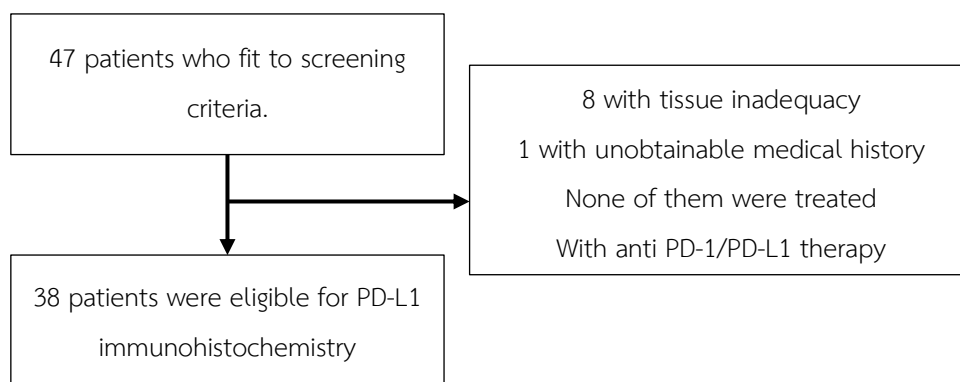


รูปภาพ 3A (บน) ภาพขยาย 200 เท่าของรอยละการย้อมติด โดยไม่นับเรื่องความเข้มเป็นคะแนนทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์

รูปภาพ 3B (ล่างซ้าย) ภาพขยาย 600 เท่า แสดงความเข้มในการติดสีเป็นสี่ระดับ (3+ strong, 2+: intermediate, 1+: weak, 0: none).

รูปภาพ 3C (ล่างขวา) ภาพสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อทอนซิลเป็นตัวควบคุมบวก

แผนภูมิที่ 3 แผนผังแสดงการคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย



ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานและการแสดงออกพีดีแอล-1

ข้อมูล	รวม	TPS $\geq$ 1%	TPS $\geq$ 50%
ผู้ป่วยทุกราย	38 (100%)	8 (21.1%)	1 (2.6%)
อายุ	< 60	16 (42.1%)	5
	$\geq$ 60	22 (57.9%)	3
เพศ	ชาย	9 (23.7%)	2
	หญิง	29 (76.3%)	6
สภาวะร่างกาย	0	7 (18.4%)	2
	1	24 (63.2%)	6
	$\geq$ 2	7 (18.4%)	0
ประวัติการสูบบุหรี่	ไม่เคย	32 (84.2%)	6
	เคย	4 (10.5%)	2
	ปัจจุบัน	2 (5.3%)	0
น้ำหนักลด	$\leq$ 5%	25 (65.8%)	2
	> 5%	13 (34.2%)	6*
ชนิดการกลายพันธุ์ EGFR	Exon 19 del	20 (52.6%)	3
	L858R	15 (39.5%)	3
	อื่นๆ**	2 (5.3%)	2
	ไม่ได้ตรวจ	1 (2.6%)*	0

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ข้อมูล	รวม	TPS $\geq$ 1%	TPS $\geq$ 50%	
จำนวนของสูตรยาระหว่างการ เก็บชิ้นเนื้อ	1 (TKI) 2 > 2	17 (44.7%) 14 (36.8%) 7 (18.4%)	4 4 0	0 1 0
ยาอีพิเดอร์มอลโทโรซีนโคเนส	เจฟิทินิบ เออโลทินิบ อะฟาทินิบ	21 (55.3%) 16 (42.1%) 1 (2.6%)	7 1 0	1 0 0
ระยะเวลาปลอดการดำเนินโรค	$\geq$ 12 เดือน < 12 เดือน	20 (52.6%) 18 (47.4%)	4 4	1 0
การตอบสนอง	PR SD PD****	32 (84.2%) 5 (13.2%) 1 (2.6%)	6 1 1	1 0 0

\* p&lt;0.05

\*\* 1 รายมี L861Q mutation, 1 ราย G719X mutation

\*\*\* ผู้ป่วยที่ไม่ได้ตรวจ EGFR มีการตอบสนองแบบ partial response และ PFS 7.3 เดือนด้วยเจฟิทินิบ

\*\*\*\* ผู้ป่วยที่ PD เป็น exon 19 del ได้รับยาเจฟิทินิบ

TPS: tumor proportional score, EGFR: epidermal growth factor receptor,

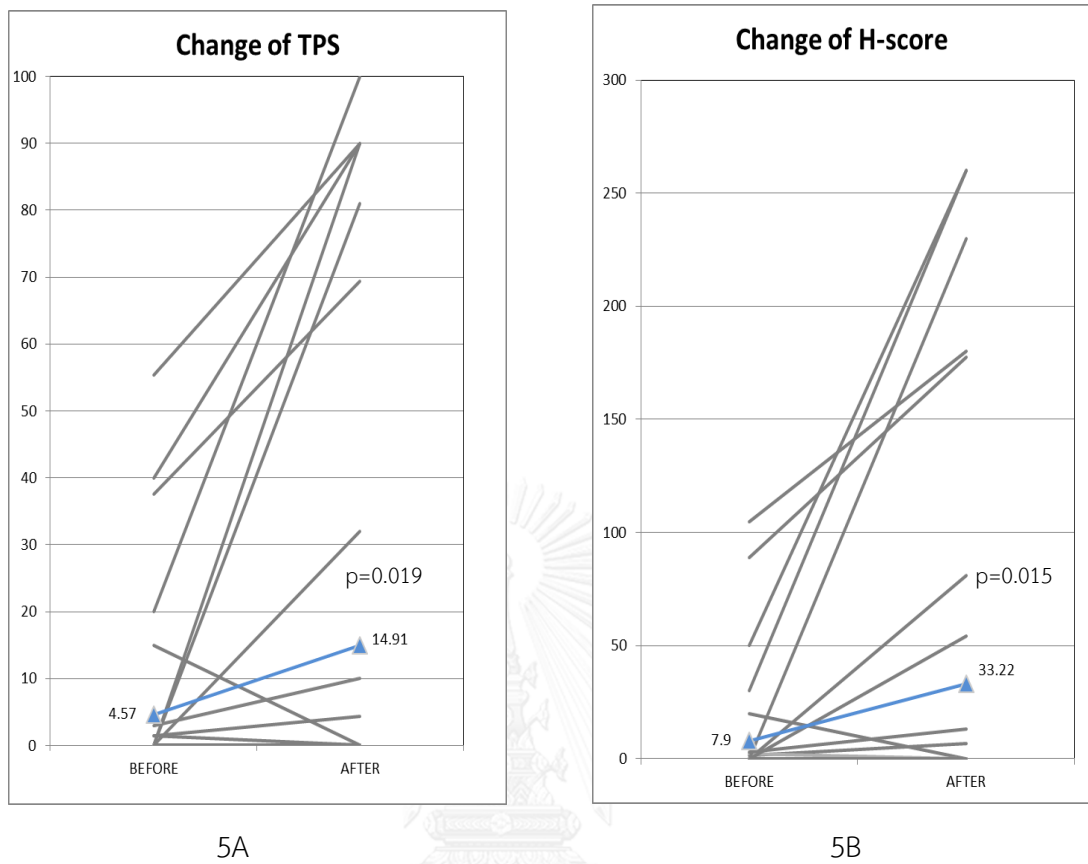
PR: partial response, SD: stable disease, PD: progressive disease

ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของพีดีแอล-1 ในชิ้นเนื้อก่อนการรักษาและหลังจากมีการดื้อยา

		หลังดื้อยา ยายับยั้งอีพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์โทโรซีนโคเนส					รวม
		TPS < 1	TPS 1-5	TPS 5-10	TPS 10-50	TPS >50	
ก่อนรักษา	TPS < 1	27 (71.1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.6%)	2 (5.3%)	30 (78.9%)
	TPS 1-5	1 (2.6%)	1 (2.6%)	0 (0%)	1 (2.6%)	0 (0%)	3 (7.9%)
	TPS 5-10	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	TPS 10-50	1 (2.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (7.9%)	4 (10.5%)
	TPS >50	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.6%)	1 (2.6%)
	รวม	29 (76.3%)	1 (2.6%)	0 (0%)	2 (5.3%)	6 (15.8%)	38 (100%)

TPS: tumor proportional score

กราฟที่ 1 กราฟแสดงรูปแบบการเปลี่ยนการแสดงผลของพีดีแอล-1 ของผู้ป่วยแต่ละราย

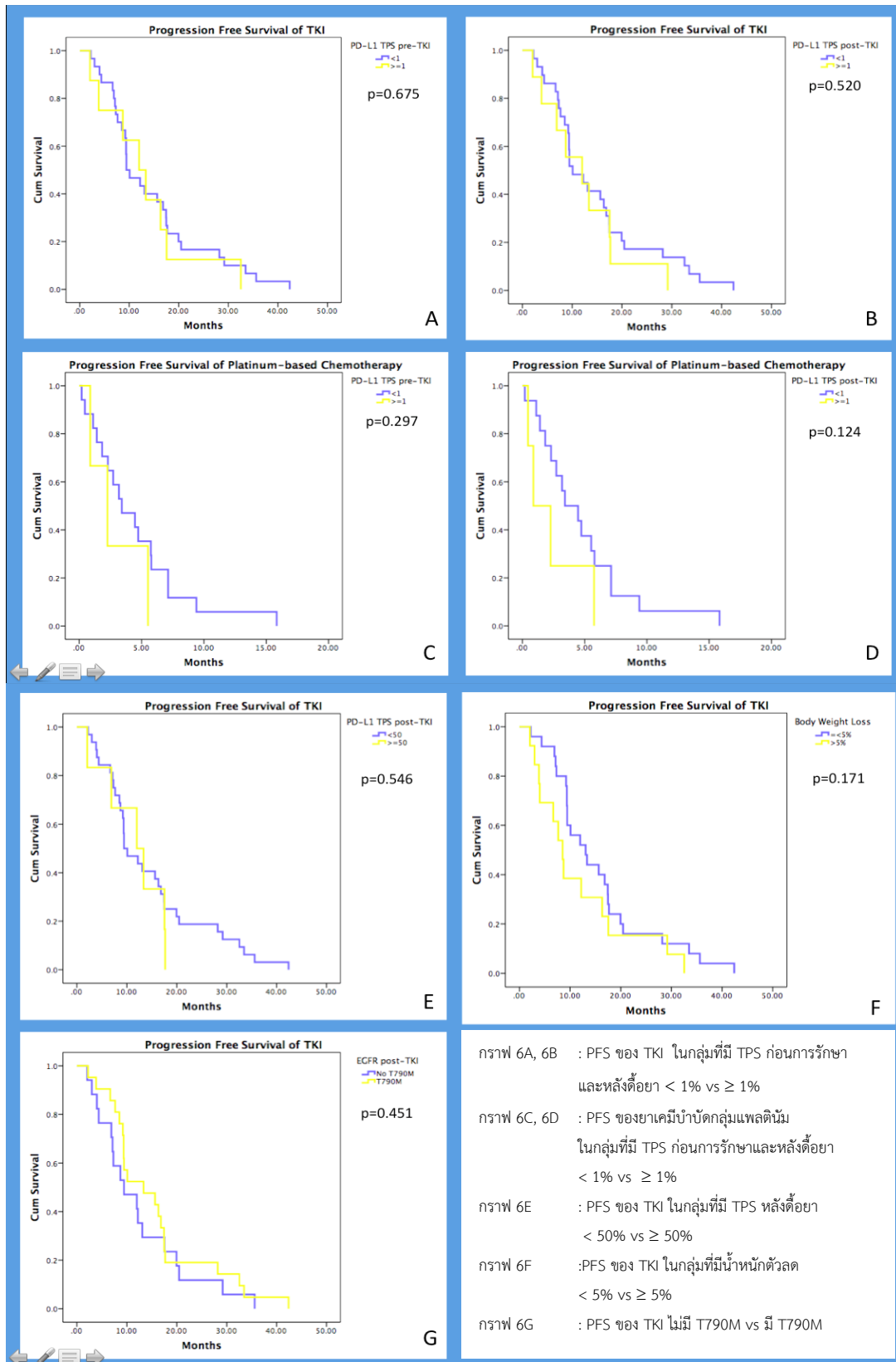


เส้นค่าเฉลี่ยรวม แสดงด้วย ▲ (เส้นสีฟ้า)

กราฟที่ 5A (ซ้าย) กราฟ TPS, กราฟที่ 5B (ขวา) H-score,

p-value แสดงผลวิเคราะห์ด้วย paired t-test

กราฟที่ 2 กราฟแสดงการรอดชีวิตแบบแคบแลน-ไมเออร์ p-value วิเคราะห์โดย log-rank test



PFS: progression free survival, TKI: tyrosine kinase inhibitors, TPS: tumor proportional score

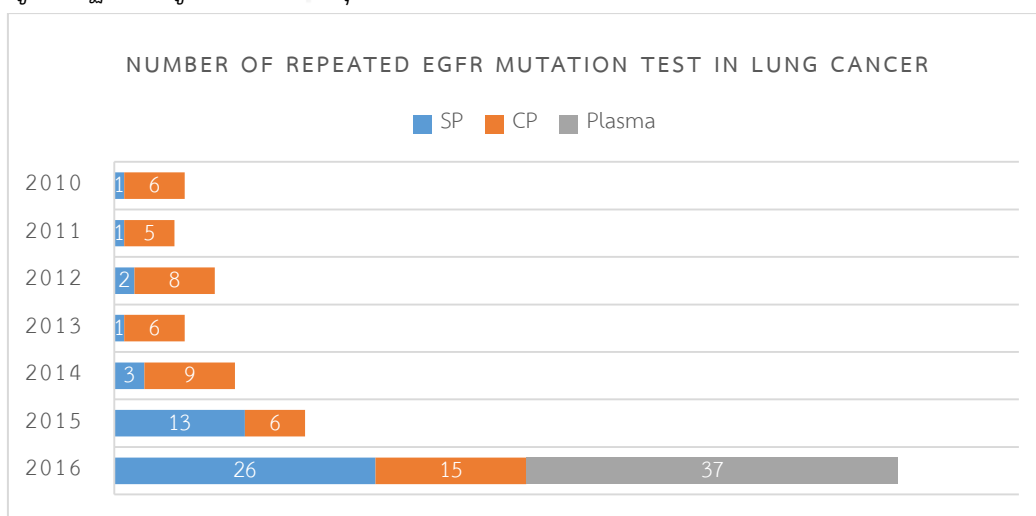
ตารางที่ 3 แสดงการกลายพันธุ์อีพีเตอร์มอลโทรพแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ในตัวอย่างก่อนและหลัง  
ยายับยั้งไทโรซีนไคเนส

ก่อน	หลัง	
19 del (N=20/38)	19 del+T790M	(13/20, 65%)
	19 del	(5/20, 25%)
	ไม่ได้ตรวจ	(2/20, 10%)
L858R (N=15/38)	L858R + T790M	(8/15, 53.3%)
	L858R **,	(5/15, 33.3%)
	ไม่ได้ตรวจ	(2/15, 5.3%)
L861Q (N=1/18)	L861Q*	(1/1, 100%)
G719X (N=1/18)	G719X*	(1/1, 100%)
ไม่ได้ตรวจ (N=1/18)	ไม่ได้ตรวจ	(1/1, 100%)

\* 4 การตรวจเป็นการตรวจจากเลือด

กราฟที่ 3 กราฟแสดงจำนวนการตรวจการกลายพันธุ์ซ้ำในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์อีพีเตอร์มอลโทรพแฟกเตอร์

(ข้อมูลจากฐานข้อมูลโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปี 2010-2016 ไม่ใช่ตัวอย่างในการศึกษานี้)



SP: surgical pathology, CP cytopathology

## บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา

งานวิจัยชิ้นนี้พบว่าในเนื้อตัวอย่างหลังจากการดื้อยา ยับยั้งไทโรซีนไคเนสเทียบกับก่อนการรักษา จำนวนผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 มากกว่า 50% มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จาก 1 ราย (2.63%) เป็น 6 รายในกลุ่มตัวอย่าง 38 คน (15.7%) ( $p$ -value = 0.063 วิเคราะห์ด้วย McNemar test) ซึ่งถือว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนถึงแม้ยังไม่ถึงเกณฑ์การเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจจะเป็นได้จากความชุกของการแสดงออกของพีดีแอล-1 น้อยกว่าที่ใช้ในการคำนวณจำนวนตัวอย่าง เนื่องจากการศึกษานี้ซึ่งใช้แอนติบอดีและเกณฑ์การนับแตกต่างจากการศึกษาที่นำมาอ้างอิง ที่พบการแสดงออกเป็นบวก 5.56% ในชุดตัวอย่างก่อนการรักษาและ 38.89% ในชุดตัวอย่างหลังการรักษาตามลำดับ นอกจากนี้ทางผู้วิจัยพบว่าคุณค่าเฉลี่ยทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ (TPS) และ เอชสกออร์ (H-score) หลังการรักษาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (TPS  $p=0.019$ , H-score  $p=0.015$  วิเคราะห์ด้วย paired t-test) ผลการศึกษานี้ไปในทางเดียวกันกับสองการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งรายงานโดย Han และคณะ และ Gainor และคณะ<sup>(24, 25)</sup> แม้ว่าจะมีการใช้แอนติบอดีในการศึกษาที่แตกต่างกัน การศึกษานี้จึงชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ พีดีแอล-1 ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังจากการดื้อยา ยับยั้งไทโรซีนไคเนส ซึ่งจะอภิปรายต่อไป

ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์อู้อีพีเคเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์และการแสดงออกของโปรตีนพีดีแอล-1 ยังคลุมเครือ ข้อมูลก่อนหน้านี้มีหลายการศึกษารายงานความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างสองภาวะดังกล่าว การศึกษาพรีคลินิก Akbay และคณะศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงและในหนูทดลองพบว่าการทำงานของอู้อีพีเคเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ทำให้เกิดการสร้างโปรตีนในกลุ่มอิมมูโนเชคพอยต์มากขึ้นได้แก่ โปรตีนพีดี-1, พีดีแอล-1 รวมถึงซีทีแอลเอ-4<sup>(18)</sup> การศึกษาของ Chen และคณะพบว่าการกระตุ้นอู้อีพีเคเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ในเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มการแสดงออกของพีดีแอล-1 โดยผ่าน p-ERK1/2/p-c-jun และยา ยับยั้งไทโรซีนไคเนสส่งผลทั้งการหยุดการแบ่งตัว กลไกการอยู่รอด รวมถึงส่งผลโดยอ้อมโดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันผ่านการลดการทำงานของพีดีแอล-1.<sup>(20)</sup> ในขณะที่การศึกษาทางคลินิกของ D'Incecco และคณะ Azuma และคณะ สังเกตพบการแสดงออกของพีดีแอล-1 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์อู้อีพีเคเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ<sup>(19, 21)</sup> ซึ่งบ่งชี้ว่าพีดี



แอล-1 จะแสดงออกมากขึ้นไม่ใช่เพียงแต่การตอบสนองต่อการอักเสบแต่ยังสามารถถูกควบคุมจากวิถีสัญญาณที่ก่อให้เกิดมะเร็งอย่างเช่น การกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามอย่างไรก็ตามข้อมูลที่มีมากขึ้นบ่งชี้ว่ามะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ตอบสนองต่อยาภูมิคุ้มกันบำบัดกลุ่มยับยั้งพีดี-1/พีดีแอล-1 ไม่ดีนัก ในการวิเคราะห์กลุ่มย่อยของการศึกษาที่สำคัญของยากลุ่มนี้ คือ การศึกษาของ Borghaei และคณะ และ Herbst และคณะ<sup>(12, 15)</sup> ของยานิโวลูแมบ และเพมโบริซิซูแมบ ในมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก พบว่ายากลุ่มนี้มีอัตราการตอบสนองน้อยในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของอีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ และการศึกษาแบบย้อนหลังของ Gainor และคณะก็พบในลักษณะเดียวกัน ซึ่งลักษณะเช่นนี้อาจจะอธิบายจากทฤษฎีที่ว่ามะเร็งปอดชนิดที่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ถือว่าเป็นเนื้องอกที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันน้อย โดยมีข้อสนับสนุนทางชีววิทยาจากการศึกษา Govindan และคณะเคยพบว่าปริมาณยีนกลายพันธุ์ในมะเร็งปอดของคนไข้ที่ไม่สูบบุหรือน้อยกว่าผู้ที่สูบบุหรี่ถึงสิบเท่า ซึ่งการไม่สูบบุหรี่เป็นลักษณะทางคลินิกที่สำคัญของกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์<sup>(28)</sup> และจากการศึกษาของ Rizvi และคณะ พบว่าการที่เนื้องอกที่มีปริมาณยีนกลายพันธุ์มากจะไวต่อยากลุ่มพีดี-1 และพีดีแอล-1 มากกว่า<sup>(29)</sup> ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในเนื้องอกชนิดนี้กระตุ้นภูมิคุ้มกันน้อย ทำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบในเนื้อเยื่อมะเร็งน้อย ส่งผลให้เนื้องอกอาศัยฟังกโลกพีดี-1/พีดีแอล-1 ในการหลบเลี่ยงภูมิคุ้มกันน้อยกว่าเนื้องอกที่ไม่มีการกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังพบว่าตัวบ่งชี้การอักเสบเช่นการมีน้ำหนัลดสัมพันธ์กับการมีการแสดงออกของพีดีแอล-1 อีกการศึกษาที่เกี่ยวข้องได้แก่การศึกษาโดย Bria และคณะ<sup>(30)</sup> ศึกษาปริมาณยีนกลายพันธุ์ตรวจโดย next generation sequencing ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดกลายพันธุ์อีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ระยะแพร่กระจายที่ได้รับเจฟิทินิบ พบว่าการมีปริมาณการกลายพันธุ์ชนิดอื่นร่วมด้วยนอกเหนือจากการกลายพันธุ์ก่อมะเร็งหลัก จะมีพยากรณ์โรคที่แย่กว่าและได้รับประโยชน์จากการรักษาด้วยยาเจฟิทินิบน้อยกว่า นอกจากนี้ในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ชนิด T790M หลังการดื้อยา มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นของพีดีแอล-1 น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่มี T790M (ทูเมอร์โปรพอร์ชันนัลสกออร์ 7.4% เปรียบเทียบกับ 24.2% (p=0.109) และ H-score 12.6 เปรียบเทียบกับ 58.6 (p=0.066)) ถึงแม้ว่าผลวิเคราะห์ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีสัญญาณบ่งชี้ถึงข้อสันนิษฐานว่าในกลุ่มเนื้องอกที่มีการดื้อยายับยั้งอีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ เซลล์เนื้องอกมีการปรับตัวโดยการสร้างพีดีแอล-1 มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างการที่เนื้องอกเลี้ยงไปใช้วิถีส่งสัญญาณอื่นนอกเหนือจากอีพิเตอร์มอลโกรทแฟกเตอร์

ซึ่งจากรายงานของ Han และคณะก็พบการเพิ่มขึ้นของพีดีแอล-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงหลังจากดื้อยา เจทีทีบีโดยเกิดจากวิถีสัญญาณ MET และไม่มี T790M<sup>(25)</sup>

จะเห็นได้ว่าในภาพรวมมีหลักฐานชี้ถึงการมีปริมาณยีนกลายพันธุ์มากสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยาภูมิคุ้มกันบำบัดที่ดีกว่า แต่มะเร็งที่อาศัยมีการกลายพันธุ์ก่อมะเร็ง (oncogene addicted) ปริมาณยีนกลายพันธุ์มากบ่งชี้ถึงการมีความหลากหลายของยีนในเนื้ออกนั้น และอาจนำไปสู่การใช้วิธีเลี้ยงอื่นได้ง่ายกว่า จึงได้ผลจากยารักษาพุ่งเป้าน้อยกว่า การศึกษาเกี่ยวเรื่องนี้ยังมีน้อยและเรายังมีความเข้าใจในเรื่องการกระตุ้นภูมิคุ้มกันไม่มากนัก อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาในภาพรวมในเนื้ออกที่อาศัยวิถีก่อมะเร็งใดวิธีหนึ่งอย่างมาก เช่นมะเร็งปอดที่การกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ ที่หลังจากการดื้อยาสูตรแรกก็ยังคงใช้การปรับเปลี่ยนวิถีเดิมเช่นการกลายพันธุ์เพิ่มเติมชนิด T790M จะยังมีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและก่อให้เกิดการอักเสบน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ใช่ T790M จึงทำให้อาศัยวิถีพีดี-1/พีดีแอล-1 น้อยกว่า ดังที่พบแนวโน้มว่ามีการเพิ่มขึ้นของพีดีแอล-1 บนผิวเซลล์น้อยกว่า

จากผลของงานวิจัยชิ้นนี้พบความชุกการแสดงออกของพีดีแอล-1 น้อยกว่าก่อนหน้านี้ เช่นการศึกษาของ D'Incecco ซึ่งศึกษาในประเทศยุโรป รวบรวมเนื้อเยื่อมะเร็งปอดระยะแพร่กระจาย ที่เคยสูบบุหรี่ประมาณ 75% ใช้เกณฑ์คือมีการติดบนเซลล์เนื้ออกมากกว่า 5% พบการแสดงออกเป็นบวกในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ถึง 71.4% มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีมีการกลายพันธุ์ที่พบเพียง 41.7%<sup>(21)</sup> ในการศึกษาของ Azuma และคณะ ทำในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดระยะต้นจากการผ่าตัดในประเทศญี่ปุ่น 164 คน สูบบุหรี่ประมาณ 42% จากการศึกษาพบการแสดงออกพีดีแอล-1 ในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีมีการกลายพันธุ์<sup>(19)</sup> เป็นต้น ในขณะที่การศึกษานี้พบการแสดงออกเป็นบวกเพียง 2.6% ที่ ทุเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์  $\geq 50\%$  และ 22.7% หากใช้ ทุเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์  $\geq 1\%$  ซึ่ง เป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาของ Gainor และคณะซึ่งพบ 16% หากให้พีดีแอล-1 มากกว่าเท่ากับ 5%, 12.2% หากใช้ จุดตัดมากกว่าเท่ากับ 50%<sup>(24)</sup> รวมถึงการศึกษาล่าสุดของ Rangachari และคณะที่ใช้แอนติบอดีชนิด 22C3 เช่นเดียวกันกับการศึกษานี้พบความชุก 5.2% หากใช้จุดตัดที่ 50%<sup>(26)</sup> ซึ่งผลที่แตกต่างกันอย่างมากระบุได้จากความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่าง นิยามของการแสดงออกของพีดีแอล-1 รวมถึงแอนติบอดีที่ใช้

ทางผู้วิจัยยังพบว่า 90% ของผู้ป่วยที่ไม่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 ตั้งแต่ก่อนการรักษา จะยังคงไม่มีการแสดงออกดังกล่าว ซึ่งผลนี้ไปในทางเดียวกับการศึกษาโดย Gainor และคณะ (64.9% โดยใช้ค่าพีดีแอล-1 <5%). ดังนั้นชี้ให้เห็นว่าในกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 ตอนเริ่มต้น การตรวจซ้ำอาจไม่ช่วยมากนักและการเลือกใช้ยับยั้งพีดี-1/พีดีแอล-1 หลังการดื้อยาไทโรซีนไคเนส อาจให้ผลที่ไม่ดีเท่าการใช้ยาเคมีบำบัด

จากการตรวจการกลายพันธุ์ของอีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ซ้ำหลังดื้อต่อ ยาไทโรซีนไคเนสในการศึกษานี้ซึ่งเป็นการศึกษาในประเทศไทยพบการกลายพันธุ์ T790M 63.6% ใกล้เคียงกับการศึกษาเดิมหลายการศึกษาที่พบตั้งแต่ 55%-100%<sup>(31-33)</sup> ซึ่งรายงานส่วนใหญ่มาจาก ประเทศในแถบเอเชียที่อุบัติการณ์ของมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์อีพีเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์ รีเซปเตอร์สูง

ถึงแม้ว่าการตรวจพีดีแอล-1 อิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียังมีข้อบกพร่องในการพยากรณ์การรักษา แต่จนถึงปัจจุบันก็เป็นการตรวจที่ถูกศึกษาวิจัยและถูกนำไปใช้ในทางคลินิกมากที่สุด การศึกษานี้ เลือกใช้การตรวจพีดีแอล-1 โดยแอนติบอดีที่มีการวิจัยรองรับ ใช้ตรวจวินิจฉัยที่ได้การรับรองจาก องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา และวัดการแสดงออกโดยใช้ทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ ใน โรคมะเร็งปอดที่มีการดื้อยาไทโรซีนไคเนสซึ่งเป็นกลุ่มที่ยังไม่มีข้อมูลแน่ชัดเกี่ยวกับบทบาทของยา กลุ่ม ภูมิคุ้มกันบำบัด การศึกษานี้ช่วยทำให้เห็นภาพและช่วยในการแนะนำแนวทางการรักษาในอนาคต

## บทที่ 6

### สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

#### 6.1 ข้อสรุปผลการศึกษาและการประยุกต์ผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของอีพีดีเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์รีเซปเตอร์มีการแสดงของโปรตีนพีดีแอล-1 เป็นบวกในระดับจุดตัดทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ ที่ 1% เป็นจำนวน 8 จาก 38 คน คิดเป็น 21.1% จำนวนผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของพีดีแอล-1 เป็นบวกโดยใช้เกณฑ์จุดตัดทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ ที่ 50% มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากการดื้อยาอีพีดีเตอร์มอลโกรทแพกเตอร์ไทโรซีนไคเนส ค่าเฉลี่ยของทูเมอร์โพรพอร์ชันนัลสกออร์ และ เอชสกออร์ H-score เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะระดับการเพิ่มขึ้นมากกว่าในกลุ่มที่มีการแสดงออกพีดีแอล-1 ก่อนการรักษามากกว่า 1% และกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ T790M ในกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกตั้งแต่แรก 90% ของผู้ป่วยจะไม่มี การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกพีดีแอล-1

หลังการดื้อยาเซลล์มะเร็งจะมีแนวโน้มที่จะมีการแสดงออกพีดีแอล-1 มากกว่าเดิม การตรวจอาจจะพิจารณาในกรณีผู้ป่วยที่เดิมมีการแสดงออกมากกว่า 1% หรือไม่มี T790M เพื่อเลือกผู้ป่วยที่อาจคัดเลือกมาพิจารณาใช้ยากลุ่มยับยั้งพีดี-1/พีดีแอล-1 ได้ดียิ่งขึ้น

#### 6.2 ข้อเสนอแนะ

เพิ่มจำนวนของกลุ่มตัวอย่าง โดยอาจทำซ้ำเพื่อเพิ่มจำนวน รวมถึงการเก็บข้อมูลไปข้างหน้าแบบ prospective ร่วมด้วย งานวิจัยนี้คำถามหลักผลการแสดงออกพีดีแอล-1 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่ถึงเกณฑ์นัยสำคัญทางสถิติอาจเนื่องความชุกของผู้ป่วยที่พีดีแอล-1 มากกว่า 50% น้อยกว่าที่คาด เนื่องจากการเทคนิคมีความแตกต่างกัน และความชุกของแต่ละวิธีการตรวจไม่เท่ากัน เนื่องจำนวนตัวอย่างที่คำนวณได้จึงน้อยกว่าที่ต้องการเล็กน้อย นอกจากนี้การแสดงออกพีดีแอล-1 โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรีมีข้อจำกัด จากการศึกษาที่ผ่านมาผู้ป่วยบางคนที่ยังมีการตอบสนองต่อยา ยับยั้งพีดี-1/พีดีแอล-1 ถึงแม้ไม่มี การแสดงออกดังกล่าว ดังนั้นหากในอนาคตมีการตรวจที่สามารถพยากรณ์การตอบสนองได้ดีกว่า ก็ควรนำมาตรวจเพิ่มเติมผู้ป่วยกลุ่มนี้ ในแง่ของความเข้าใจกลไกการดื้อยาการตรวจปัจจัยบ่งชี้การอักเสบหรือการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเพิ่ม เพื่อสนับสนุนทฤษฎีดังกล่าวไปแล้ว

## รายการอ้างอิง

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians. 2013;63(1):11-30.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer. 2015;136(5):E359-86.
3. GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CcncerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013 [cited 2016 Oct 13]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
4. Passaro A, Lazzari C, Karachaliou N, Spitaleri G, Pochesci A, Catania C, et al. Personalized treatment in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer: from bench to clinical practice. OncoTargets and therapy. 2016;9:6361-76.
5. Mok TS. Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. Nature reviews Clinical oncology. 2011;8(11):661-8.
6. Engelman JA, Janne PA. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14(10):2895-9.
7. Janne PA, Yang JC, Kim DW, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. The New England journal of medicine. 2015;372(18):1689-99.
8. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annual review of immunology. 2008;26:677-704.
9. Zou W, Chen L. Inhibitory B7 - family molecules in the tumour microenvironment. Nature reviews Immunology. 2008;8(6):467-77.

10. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1 , a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*. 1992;11(11):3887-95.
11. Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *Journal of leukocyte biology*. 2013;94(1):25-39.
12. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;373(17):1627-39.
13. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;372(21):2018-28.
14. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;373(2):123-35.
15. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10027):1540-50.
16. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Czoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*. 2016;375(19):1823-33.
17. Gettinger S, Rizvi NA, Chow LQ, Borghaei H, Brahmer J, Ready N, et al. Nivolumab Monotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(25):2980-7.

18. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, Altabef A, Tchaicha JH, Christensen CL, et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer discovery*. 2013;3(12):1355-63.
19. Azuma K, Ota K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Harada T, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014;25(10):1935-40.
20. Chen N, Fang W, Zhan J, Hong S, Tang Y, Kang S, et al. Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC: Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015;10(6):910-23.
21. D'Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, Rossi E, Capodanno A, Landi L, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *British journal of cancer*. 2015;112(1):95-102.
22. Lin C, Chen X, Li M, Liu J, Qi X, Yang W, et al. Programmed Death-Ligand 1 Expression Predicts Tyrosine Kinase Inhibitor Response and Better Prognosis in a Cohort of Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma. *Clinical lung cancer*. 2015;16(5):e25-35.
23. Tang Y, Fang W, Zhang Y, Hong S, Kang S, Yan Y, et al. The association between PD-L1 and EGFR status and the prognostic value of PD-L1 in advanced non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *Oncotarget*. 2015;6(16):14209-19.
24. Gainor JF, Shaw AT, Sequist LV, Fu X, Azzoli CG, Piotrowska Z, et al. EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(18):4585-93.

25. Han JJ, Kim DW, Koh J, Keam B, Kim TM, Jeon YK, et al. Change in PD-L1 Expression After Acquiring Resistance to Gefitinib in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clinical lung cancer*. 2016;17(4):263-70.e2.
26. Rangachari D, VanderLaan PA, Shea M, Le X, Huberman MS, Kobayashi SS, et al. Correlation between Classic Driver Oncogene Mutations in EGFR, ALK, or ROS1 and 22C3-PD-L1  $\geq 50\%$  Expression in Lung Adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2017.
27. Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2014;50(7):1361-9.
28. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, et al. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell*. 2012;150(6):1121-34.
29. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (New York, NY)*. 2015;348(6230):124-8.
30. Bria E, Pilotto S, Amato E, Fassan M, Novello S, Peretti U, et al. Molecular heterogeneity assessment by next-generation sequencing and response to gefitinib of EGFR mutant advanced lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(14):12783-95.
31. Matsuo N, Azuma K, Sakai K, Hattori S, Kawahara A, Ishii H, et al. Association of EGFR Exon 19 Deletion and EGFR-TKI Treatment Duration with Frequency of T790M Mutation in EGFR-Mutant Lung Cancer Patients. *Scientific reports*. 2016;6:36458.
32. Ko R, Kenmotsu H, Serizawa M, Koh Y, Wakuda K, Ono A, et al. Frequency of EGFR T790M mutation and multimutational profiles of rebiopsy samples from non-small cell lung cancer developing acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in Japanese patients. *BMC cancer*. 2016;16(1):864.



33. Ma C, Wei S, Song Y. T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *Journal of thoracic disease*. 2011;3(1):10-8.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นายศิวัช ศักดิ์เดชยนต์

วันเดือนปีเกิด วันที่ 6 มิถุนายน พุทธศักราช 2529 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร

การศึกษา

พ.ศ. 2547 - 2553 แพทยศาสตร์บัณฑิตจากคณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2554 – 2557 แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พ.ศ. 2558 - 2560 แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขามะเร็งวิทยา

ภาควิชาอายุรศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ

นิติตหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ (มะเร็งวิทยา)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย