รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยการศึกษาความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมของโรคที่เกิดจากพหุปัจจัย

Study of genetic association of diseases caused by multifactorial inheritance

โดย อาจารย ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ และคณะ

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยการศึกษาความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมของโรคที่เกิดจากพหุปัจจัย

Study of genetic association of diseases caused by multifactorial inheritance

โดย อาจารย ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ และคณะ

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

Acknowledgement

โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (CU-CLUSTER-FUND)

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยการศึกษาความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมของโรคที่เกิดจากพหุปัจจัย

สาเหตุของการเกิดโรคที่เกิดจากพหุปัจจัยมีความสัมพันธ์กับพันธุกรรมเป็นอย่างมาก แต่ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับโรคเหล่านี้ในชาวไทยไม่มากนัก งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่โรคพันธุกรรมที่เกิดจากพหุปัจจัย 2 กลุ่ม คือ โรคข้อเสื่อม และมะเร็งปากมดลูก

สำหรับโรคข้อเข่าเสื่อมนั้นเป็นโรคในกลุ่มอาการผิดปกติของข้อกระดูกที่พบได้บ่อยที่สุดในประชากรผู้สูงอายุทั่วไป ถึงแม้กลไกของการเกิดโรคนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าเกิดขึ้นจากหลายปัจจัยทั้งทางด้านพันธุกรรม และแรงกลที่กระทำต่อกระดูก นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุ เพศ และน้ำหนักก็มีส่วนเกี่ยวข้องด้วย งานวิจัยนี้ได้ศึกษาพอลิมอร์ฟิซึมชนิด single nucleotide polymorphism (SNP) ในยีน *DVWA GDF5 FRZB* และ *ADAMTS14* ที่ได้มีรายงานในชนชาติอื่นมาแล้วว่ามีความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม แต่ไม่พบว่าพอลิมอร์ฟิซึมตำแหน่งใดมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในชาวไทยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P<0.05$

สำหรับงานวิจัยเรื่องมะเร็งปากมดลูกซึ่งเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดของมะเร็งที่พบในสตรีไทยนั้น ได้มุ่งเน้นการศึกษากลไกการเกิดมะเร็งปากมดลูกจากการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) มีการพบว่าดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่บริเวณโพรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็ง เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก การศึกษาในครั้งนี้สนใจยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของเชื้อ HPV ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* แต่พบว่าลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อแบบ integrate มีผลอย่างมากต่อการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานเบื้องต้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในกรณีของการติดเชื้อแบบ episome นั้น ยีน *E2* ได้กดการถอดรหัสของยีน *E6* และ *E7* ในขณะที่การติดเชื้อแบบ integrate นั้น ยีน *E2* ถูกทำลายแล้วทำให้ *E6* และ *E7* มีการแสดงออกมากขึ้น และส่งผลให้เกิดเมทิลเลชันของยีนตามมา

Abstract

Study of genetic association of diseases caused by multifactorial inheritance

The cause of multifactorial diseases is highly associated with genetics. However, there have been a small number of reports on genetic association on multifactorial diseases in Thais. The aim of this project is to investigate the role of genetics in knee osteoarthritis susceptibility and cervical cancer.

Knee osteoarthritis is the most common form of bone malformation in the elders. Although the mechanism of the disease causation is not completely understood, it is associated with genetics and mechanical force on the bones, as well as other factors: age, sex and weight. This study analyzed single nucleotide polymorphism (SNP) in *DVWA*, *GDF5*, *FRZB* and *ADAMTS14*, which are genes reported to be associated with knee osteoarthritis in other populations. The results demonstrated that none of the SNP studied was statistically associated with the susceptibility of this disease in Thais, with the P value <0.05.

Cervical cancer is the most common form of cancer found in Thai women. We investigated mechanism of the cancer that is caused by Human papillomavirus (HPV) infection. Promoter methylation of tumor suppressor genes was reported to be a cause of cancers. This study was performed on *CCNA1*, a tumor suppressor gene. The results demonstrated that the physical state, but not the quantity of HPV, was associated with the methylation level. We detected a significantly higher percentage intensity of CCNA1 promoter methylation in cervical cancer tissues infected by the integrated rather than the episomal form of HPV. The results supported the hypothesis that in the episomal form, E2 suppresses E6 and E7 transcription, whereas in the integrated form, E2 is disrupted, leading to up-regulation of E6 and E7, and subsequent gene methylation.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1. บทนำ	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ	5
1.3. ขอบเขตการวิจัย	5
1.4. วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป	5
1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
2. วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพอลิมอร์ฟิซึมและความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม	7
2.2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อกับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1*	9
3. ผลการวิจัย	12
3.1. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพอลิมอร์ฟิซึมและความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม	
3.2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อกับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1*	
4. อภิปราย สรุปและเสนอแนะ	19
5. บรรณานุกรม	21
6. ภาคผนวก	25
7. ประวัตินักวิจัยและคณะ	26

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์พอลิมอร์ฟีซึมในยีนที่อาจเกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อม	8
ตารางที่ 2	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การติดเชื้อ และ type ของไวรัส HPV	10
ตารางที่ 3	ข้อมูลอาสาสมัครโครงการโรคข้อเข่าเสื่อม	12
ตารางที่ 4	จีโนไทป์ที่ตำแหน่ง rs11718863	13
ตารางที่ 5	จีโนไทป์ที่ตำแหน่ง rs7639618	13
ตารางที่ 6	จีโนไทป์ที่ตำแหน่ง rs11718863	14
ตารางที่ 7	จีโนไทป์ที่ตำแหน่ง rs474709	14
ตารางที่ 8	Quantitation, physical state of HPV and % *CCNA1* promoter methylation	18

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการทำ PCR-RFLP ของพอลิมอร์ฟีซึมตำแหน่ง rs7639618 บนยีน *DVWA*	12
รูปที่ 2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % methylation ของยีน *CCNA1* กับลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อ	15
รูปที่ 3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ HPV ในเซลล์มะเร็งกับระยะของมะเร็งและชนิดของเซลล์มะเร็ง	16
รูปที่ 4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % methylation ของยีน *CCNA1* กับระยะของมะเร็ง และชนิดของเซลล์มะเร็ง	17

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สาเหตุของการเกิดโรคที่เกิดจากพหุปัจจัยมีความสัมพันธ์กับพันธุกรรมเป็นอย่างมาก แต่ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับโรคเหล่านี้ในชาวไทยไม่มากนัก ซึ่งชาวไทยมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากชาติอื่นที่เคยทำวิจัยแล้ว

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่โรคพันธุกรรมที่เกิดจากพหุปัจจัย 2 กลุ่ม คือ โรคข้อเสื่อม และมะเร็งปากมดลูก

1. โรคข้อเข่าเสื่อม (Knee osteoarthritis)

เป็นโรคในกลุ่มอาการผิดปกติของข้อกระดูกที่พบได้บ่อยที่สุดในประชากรผู้สูงอายุทั่วไป เป็นสาเหตุของภาวะทุพพลภาพอันดับ 8 และพบในชาวอเมริกันประมาณ 20.7 ล้านคน (Kee, 2000) สำหรับในประเทศไทยพบโรคข้อเสื่อมประมาณ 2.1-3 ล้านคน ความผิดปกตินี้เกิดจากการเสื่อมของกระดูกอ่อนผิวข้อร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของกระดูกและเนื้อเยื่อรอบๆ ข้อ มีการทำลายของเซลล์กระดูกอ่อนจนเกิดการแตกหลุด และมีเศษกระดูกอ่อนลอยอยู่ในข้อ (Birchfield, 2001) ซึ่งจะกระตุ้นเซลล์เยื่อบุข้อหลั่งสารที่ทำให้เกิดการอักเสบส่งผลให้เกิดอาการปวด เมื่อมีการเคลื่อนไหวมีการเสียดสีทำให้เกิดการระคายเคืองเยื่อหุ้มข้อและเนื้อเยื่อรอบๆ เกิดมีเสียงในข้อ และจะพบการงอกของกระดูกอ่อนผิวข้อบริเวณขอบข้อและรอยต่อ ทำให้ขอบกระดูกไม่เรียบ ขรุขระและมีการหนาตัวขึ้น รอยต่อระหว่างข้อเข่าแคบลง พิสัยการเคลื่อนไหวข้อลดลง ถ้าไม่ได้รับการดูแลรักษาที่ถูกต้องก็จะเกิดการหลวมของข้อ หรือข้อผิดรูป เช่น มีลักษณะผิดรูปร่าง โก่งงอ บิดเบี้ยว เป็นต้น และอาจก่อให้เกิดความพิการตามมาได้ (Aspden. 2008; Kee, 2000; นิลกานุวงศ์, 2548)

ถึงแม้กลไกของการเกิดโรคนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าเกิดขึ้นจากหลายปัจจัยทั้งทางด้านพันธุกรรม และแรงกลที่กระทำต่อกระดูก (Spector and MacGregor, 2004) นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุ เพศ และน้ำหนัก ก็มีส่วนเกี่ยวข้องด้วย (Teichtahl, et al., 2005) โดยพบว่าค่า heritability ของการเกิดโรคข้อเสื่อมบริเวณหัวเข่า สะโพก และมือ มีค่าประมาณ 40% 60% และ65% ตามลำดับ (Spector and MacGregor. 2004) การศึกษาทางด้าน linkage regions และการหา candidate genes แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางพันธุกรรมมีความสำคัญต่อการพัฒนาของโรค (Loughlin, 2002) ปัจจุบันการตรวจสอบ single nucleotide polymorphism

(SNP) ทั้งจีโนมถูกนำมาใช้ในการศึกษาองค์ประกอบทางด้านพันธุกรรมของการเกิดโรค และพบว่าพอลิมอร์ฟิซึมในยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค เช่น *FRZB GDF5* และ *DVWA* มีความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Miyamoto, et al., 2008; Valdes, et al., 2006)

ปัจจุบันมียีนมากกว่า 20 ยีนที่มีตรวจพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม โดยบางยีนมีความสัมพันธ์เฉพาะกับโรค ข้อเข่าเสื่อม แต่ไม่เกี่ยวข้องกับข้อมือเสื่อม หรือข้อสะโพกเสื่อม บางยีนสัมพันธ์กับโรคข้อเสื่อมในเพศหญิง แต่ไม่เกี่ยวข้องในเพศชาย และบางยีนมีการศึกษาพบว่ามีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยชาวเอเชีย แต่ไม่พบในชาวคอเคเซียน เป็นต้น (Valdes, et al., 2007; Valdes and Spector, 2008; Valdes, et al., 2006) หากแบ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ, extracellular matrix, bone morphogenetic proteins, Wnt signaling และ protease (Tammachote, 2011; Valdes and Spector, 2009) โดยการวิจัยในขั้นต้นจะศึกษายีน *FRZB, GDF5, DVWA* และ *ADAMTS14* ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Wnt signaling และ bone morphogenetic proteins

ยีน *frizzled-related protein (FRZB)* อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 ตำแหน่ง 2q24.3-q31.1(Min, et al., 2005) ทำหน้าที่สร้างโปรตีนยับยั้งการทำงานของ wingless protein หรือ Wnt โดยมีผลงานวิจัยพบว่า polymorphism บางชนิดบนยีน *FRZB* ทำให้คนมีโอกาสเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมมากขึ้นในชาวยุโรป (Valdes, et al., 2007) Loughlin และคณะ (2004) พบการเปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ 2 แบบ (R200W และ R324G) ในยีน *FRZB* ซึ่งการเปลี่ยนแปลงแบบ R324G มีหน้าที่และความสัมพันธ์กับโรคข้อเข่าเสื่อมในผู้หญิง(Loughlin, et al., 2004) การทดลองในหลอดทดลองพบว่า polymorphism ที่ตรวจพบความสัมพันธ์ส่วนใหญ่ส่งผลให้เกิดการแทนที่จากอาร์จีนีนเป็นไกลซีนใน netrin domain ของ *FRZB* ส่งผลให้การจับกันของ Wnt กับ FRZB ลดลง ความสัมพันธ์ของ Polymorphism ของยีน *GDF5* ต่อความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้รับการยืนยันจากการศึกษาในประชากรหลายกลุ่ม รวมถึงชาวจีนฮั่น (Lane, et al., 2006; Lories, et al., 2006; Min, et al., 2005; Rodríguez-Lopez, et al., 2006; Valdes, et al., 2007)

ยีน *GDF5* เป็นยีนสำหรับการสร้างโปรตีน Growth differentiation factor 5 (GDF5) ซึ่งอยู่ในกลุ่มโปรตีน transforming growth factor β (TGF-β) มีบทบาทสำคัญร่วมกับ bone morphogenetic proteins หรือ BMPs ชนิดต่าง ๆ ในกระบวนการเจริญเติบโต ได้แก่ การสร้างกระดูกอ่อน การสร้างกระดูกโครงร่าง และการเจริญของข้อต่อ (Chang. et al., 1994; Vaes, et al., 2008) จากการศึกษาผลของยีน *GDF5* ต่อความเสี่ยงของตัวอย่างประชากรญี่ปุ่นวัยสูงอายุในการเกิดโรคข้อเสื่อม จำพวกโรคข้อเข่าเสื่อม และโรคข้อสะโพกเสื่อม พบว่าในประชากรที่พบความผิดปกติของยีน *GDF5* จะมีความเสี่ยงที่จะเกิดโรคข้อเสื่อมสูงกว่า

ประชากรที่มียีนปกติ (Miyamoto, et al., 2007) สอดคล้องกับการศึกษาในกลุ่มประชากรอังกฤษ (Chapman, et al., 2008)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าพอลิมอร์ฟีซึมที่ตำแหน่ง rs11718863 (Tyr169Asn) และ rs7639618 (Cys260Tyr) ของยีน *Double von Willebrand factor A* (*DVWA*) ซึ่งเป็นยีนที่ค้นพบใหม่ในปี 2008 และยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 3p24.3 มีความสัมพันธ์ต่อความไวของโรคข้อเข่าเสื่อมในชาวญี่ปุ่นและชาวจีนฮั่น (Miyamoto, et al., 2008) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในชาวสหราชอาณาจักร (Valdes, et al., 2008)

จะเห็นได้ว่าการศึกษาเหล่านี้ยังมีความไม่สอดคล้องกันในแต่ละเชื้อชาติ และเพศ นอกจากนี้ยังไม่เคยมีการศึกษาผลของพันธุกรรมที่มีต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในชาวไทย ซึ่งมีพันธุกรรมและพฤติกรรมที่แตกต่างจากชาวจีนฮั่น เกาหลี อินเดียและญี่ปุ่น ซึ่งเป็นประเทศในทวีปเอเชีย 4 ชาติที่ได้ทำการศึกษาในลักษณะนี้

2. มะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer)

งานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นการศึกษากลไกการเกิดมะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดของมะเร็งที่พบในสตรีไทย และพบมากในช่วงอายุ 35- 60 ปี มะเร็งชนิดนี้เป็นชนิดที่สามารถป้องกันได้จากการตรวจภายใน ซึ่งถ้าได้รับการตรวจแล้วแพทย์สงสัยว่าจะเป็นมะเร็งปากมดลูก แพทย์จะทำการตัดปลายชิ้นเนื้อส่วนนั้นออกมาเพื่อส่งไปวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาต่อไป แต่ในการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยานี้อาจเกิดความผิดพลาดได้ เนื่องจากในบางครั้งไม่สามารถแยกเซลล์มะเร็งกับเซลล์ปกติได้ในปัจจุบัน นอกจากการตรวจทางพยาธิวิทยาแล้ว ยังใช้การตรวจหาการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) มาร่วมด้วย เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกส่วนใหญ่มักจะมีสาเหตุจากการติดเชื้อ HPV (Psyrri and DiMaio, 2008) โดยชนิดที่พบบ่อยที่สุดคือ HPV 16 และ 18 การติดเชื้อไวรัส HPV นี้ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ภายในเซลล์อันเป็นผลจากโปรตีนของไวรัส ยกตัวอย่างเช่น เกิดการสลายตัวของโปรตีน P53 อันเนื่องมาจาก โปรตีน E6 หรือการแย่งจับกับโปรตีน pRB ของโปรตีน E7 ทำให้ E2F สามารถทำงานได้อย่างอิสระ

นอกจากนี้ สาเหตุของมะเร็งอาจเกิดจากความผิดปกติในการแสดงออกของยีนต้านมะเร็งหรือ tumor suppressor gene เป็นกลุ่มยีนยับยั้งเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง ขบวนการที่ทำให้ tumor suppressor gene เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งนั้น คือ การที่เกิดการกลายพันธุ์หรือยับยั้งการทำงานของยีนนั้นทั้ง 2 แอลลีลทำให้ไม่มียีนที่ป้องกันการเจริญเติบโตหรือการแบ่งตัวของเซลล์

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพอลิมอร์ฟิซึมในยีนบางชนิด กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในชาวไทย ซึ่งการทดลองในลักษณะนี้มีในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึง 4 ชาติในแถบเอเชีย แต่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อ กับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการหากลไกของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกจากการติดเชื้อไวรัส HPV ต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

1. สำหรับโรคข้อเข่าเสื่อม จะวิเคราะห์พอลิมอร์ฟิซึมในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Wnt signaling, bone morphogenetic proteins และ protease โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จำนวน 100 คน เปรียบเทียบกับคนปกติ 100 คน
2. สำหรับมะเร็งปากมดลูก จะศึกษาการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อไวรัส HPV โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อ HPV กับการเกิดเมทิลเลชัน และ ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อกับการเกิดเมทิลเลชัน

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

1 สำหรับโรคข้อเข่าเสื่อม

1.1 ขออนุมัติการทำวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

1.2 ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของพอลิมอร์ฟิซึมในยีน *FRZB GDF5 DVWA* และ *ADAMTS14* ที่จะนำมาศึกษา

1.3 สกัดดีเอ็นเอจากเลือดของผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 100 คน และคนปกติ 100 คน

1.4 วิเคราะห์พอลิมอร์ฟิซึมด้วยวิธี PCR-RFLP

1.5 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละพอลิมอร์ฟิซึม และอัตราการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

2 สำหรับโรคมะเร็งปากมดลูก

2.1 ขออนุมัติการทำวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ศึกษาการติดเชื้อ HPV ชนิดของเชื้อ และปริมาณเชื้อ ในตัวอย่างจำนวน 25 ตัวอย่าง

2.3 ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อของ HPV

2.4 ตรวจสอบระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1*

2.5 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อต่อการเกิดเมทิลเลชันของ *CCNA1* และความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของ HPV ต่อการเกิดเมทิลเลชันของ *CCNA1*

2.6 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อกับระยะของมะเร็ง (clinical stage) และชนิดของเซลล์มะเร็ง

2.7 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเมทิลเลชันของ *CCNA1* กับระยะของมะเร็ง (clinical stage) และชนิดของเซลล์มะเร็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลจากงานวิจัยนี้ อาจส่งผลต่อการวินิจฉัยและการรักษาของแพทย์ โดย

1. ข้อมูลทางพันธุกรรม อาจใช้ประกอบการวินิจฉัยโรค ให้คำปรึกษาและแนะนำผู้ป่วย หรือสมาชิกในครอบครัวได้ ในอนาคตอาจใช้ข้อมูลนี้ในด้านเภสัชพันธุศาสตร์
2. การตรวจพบโรคมะเร็งมักจะตรวจพบเมื่อผู้ป่วยเป็นมะเร็งในระยะที่มีอาการมากแล้วแล้ว เนื่องจากในระยะแรกเริ่มผู้ป่วยมักไม่มีอาการใด ๆ ปรากฏ หากอาศัยความรู้พื้นฐานที่ว่าการเกิดมะเร็งเกิดเนื่องจากความผิดปกติของสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์นั้น ๆ มีความผิดปกติไป เข้ามาช่วยในการวินิจฉัยก็จะทำให้สามารถรักษาได้ทัน ลดผู้ป่วยที่ต้องเสียชีวิตจากการเป็นมะเร็งได้

นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังได้ประโยชน์ในการผลิตบุคลากรทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ และพันธุศาสตร์ ทั้งในระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาบัณฑิต และดุษฎีบัณฑิต อันจะนำมาซึ่งความก้าวหน้าทางวิชาการและการวิจัยในศาสตร์นี้ต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

1. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพอลิมอร์ฟิซึมและความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม
2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อกับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1*

1. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพอลิมอร์ฟิซึมและความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

1.1 ขออนุมัติการทำวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

1.2 ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของพอลิมอร์ฟิซึมในยีน *FRZB GDF5* และ *ADAMTS14* ที่จะนำมาศึกษา

1.3 เก็บตัวอย่างเลือดและข้อมูลที่เกี่ยวข้องของผู้ป่วยที่ได้การวินิจฉัยจากแพทย์แล้วว่าเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม จำนวน 100 ราย อายุ 30 ปีขึ้นไป ทั้งเพศชายและหญิง และตัวอย่างเลือดของประชากรปกติ 100 คน อายุ 30 ปีขึ้นไป ทั้งเพศชายและหญิง ที่ได้รับการยืนยันจากแพทย์แล้วว่าไม่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม โดยทำการเก็บเลือด 1 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร โดยผู้ร่วมโครงการทั้งหมดมาจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

1.4 สกัดดีเอ็นเอจากเลือดของกลุ่มตัวอย่างประชากรปกติจำนวน และกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม ด้วย innuPREP Blood DNA Master Kit (Analytikjena, Germany) ตามวิธีที่บริษัทแนะนำ

1.5 วิเคราะห์ชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่แต่ละตำแหน่งพอลิมอร์ฟิซึมด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ในประชากรปกติ และประชากรที่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.5.1 ออกแบบ Primer คร่อมบริเวณตำแหน่งที่จะศึกษา และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกแยะชนิดของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งดังกล่าวได้ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์พอลิมอร์ฟิซึมในยีนที่อาจเกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อม

Gene	SNP	Primer (5' → 3')	Enzyme
DVWA	rs11718863	F = TTCTTTTCTGCGTTGGTT CC R = TTATCTTACCCTCCACTGCTGAG	*Bsr*I
DVWA	rs7639618	F = TGGCTGACCGGTTGAAAGAAGATGGAGTTG TTGTGTCAT R = TTATCTTACCCTCCACTGCTGAG	*Nde*I
FRZB	rs288326	F = TGTTCCATTCGTTGAATATC R = ACATCATGGCACTTAGTCTTTATCTCTTTAA CTTTAGCTC	*Taq*$^{\alpha}$I
FRZB	rs7775	F = TGGTGATATGTGCTTGTGAC R = AGTCCACTGTGTTACTTTTTGTATTTCGGG ATTTAGTCGC	*Bst*UI
GDF5	rs143383	F = CTTCAAGCCCTCAGTCAGTTGTGCAGGAGA AAGGGGGCGAT R = CAGCAGCAGTAGCAGCAGAA	*Pvu*I
ADAMTS14	rs4747096	F = GGAACTTGGGACGCCAGAGGGGCAGTGGG TG CCACAATCCG R = AGGGAGGTG AAGGTCACACA	*Bsp*EI

1.5.2 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยกระบวนการ PCR

1.5.3 ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ PCR product โดยการสุ่มตรวจ

1.5.4 ทดสอบการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในคนที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจากข้อ 1.5.3 เพื่อทดสอบความถูกต้อง

1.5.5 ใช้เทคนิค PCR และตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในประชากรปกติ 100 คน เพื่อศึกษาว่ามีนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ เทียบกับการตัดเอนไซม์ของ PCR product จากผู้ป่วย 100 คน

1.6 วิเคราะห์ผล หาค่าความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งพอลิมอร์ฟิซึมของแต่ละยีน ต่อความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม และวิเคราะห์ผลทางสถิติ ด้วยวิธี odds ratio (OR) และ 95% Confidence Interval (95% CI) ด้วยโปรแกรม Statcalc (AcaStat Software, Leesburge, VA, USA)

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อกับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1*

2.1 ขออนุมัติการทำวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 วิเคราะห์เนื้อเยื่อตัวอย่างว่าเป็นเนื้อเยื่อที่มาจากมะเร็งปากมดลูก โดยพยาธิแพทย์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และระบุระยะของมะเร็งตาม International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stages I-IIA

2.3 ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส HPV ในตัวอย่างทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง โดยตรวจสอบยีน L1 โดย PCR ตามวิธีการของ Mutirangura และคณะ (Mutirangura, et al., 1998) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 2

2.4 ตรวจสอบ type ของ HPV โดย dot blot hybridization ตามวิธีการของ Mutirangura และคณะ (Mutirangura, et al., 1998)

2.5 ตรวจสอบปริมาณของ HPV ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดย PCR โดยตรวจสอบยีน *histone acetyl transferase* (*HAT*) ซึ่งเป็น house-keeping gene ของมนุษย์ และยีน L1 ซึ่งเป็นยีนของ HPV จากนั้นนำมาเทียบอัตราส่วนความเข้มของแถบดีเอ็นเอจาก PCR ของยีน L1 ต่อยีน *HAT* ด้วย ImageQuaNT software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) จะทำให้ทราบปริมาณของ HPV ภายในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

1.1 ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อของ HPV ว่าเป็น episome หรือ integrate โดย PCR ยีน *E2* ของ HPV ซึ่งถ้าเป็นการติดเชื้อในรูปแบบ episome ซึ่ง E2 ไม่ถูกทำลาย จะเห็นแถบดีเอ็นเอของ *E2* แต่ถ้าเป็นการติดเชื้อในรูปแบบ integrate จะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *E2*

1.2 ตรวจสอบระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* โดย

1.2.1 นำดีเอ็นเอที่ได้ไปผ่านกระบวนการ bisulfate treatment (Sigma-Aldrich)

1.2.2 ผ่านกระบวนการ Duplex methylation-specific primer polymerase chain reactions ตามวิธีของ Kimkumthorn และ คณะ (Kitkumthorn, et al., 2006)

1.1 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อต่อการเกิดเมทิลเลชันของ *CCNA1* และความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของ HPV ต่อการเกิดเมทิลเลชันของ *CCNA1* โดยใช้สถิติ 2 ค่า คือ Pearson Correlation และ independent t-test

1.2 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อกับระยะของมะเร็ง (clinical stage) และชนิดของเซลล์มะเร็ง

1.3 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเมทิลเลชันของ *CCNA1* กับระยะของมะเร็ง (clinical stage) และชนิดของเซลล์มะเร็ง

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การติดเชื้อ และ type ของไวรัส HPV

Primer	Sequence (5' → 3')
MY 09	CGTCCMARRGGAWACTGATC
MY 11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG
WD 66	AGCATGCGGTATACTGTCTC
WD 67	WGCAWATGGAWWGCYGTCTC
WD 72	CGGTCGGGACCGAAAACGG
WD 76	CGGTTSAACCGAAAMCGG
WD 154	TCCGTGTGGTGTGTCGTCCC
WD 133	ACACCTAAAGGTCCTGTTTC
WD 134	ACACTCTGCAAATTCAGTGC
WD 103	CAACAGTTACTGCGACG
WD 170	GCAAGACATAGAAATAA

Primer	Sequence (5' → 3')
WD 132	GACAGTATTGGAACTTACAG
WD 165	AAATCCTGCAGAAAGACCTC
WD 166	AGCATGCGGTATACTGTCTC
RR 1	GTACTGCACGACTATGT
RR 2	ACCTTTGCAACGATCTG
Consensus primer for HPV 16/18	ATGAAAATGAYAGTAMAGAC
E2 Primer HPV-16	CCAGTAGACACTGTAATAG
E2 PRIMER HPV-18	CATTGTCATGTATCCCACC
HAT (F)	GGATGGTGAAAAATTGTCAT
HAT (R)	TTGGTAAACTTGAGGGATAT
PIGR (F)	TCAGCCAGGGTAAGGATCC
PIGR (R)	TGATGGTCACCGTTCTGCC

บทที่ 3

ผลการวิจัย

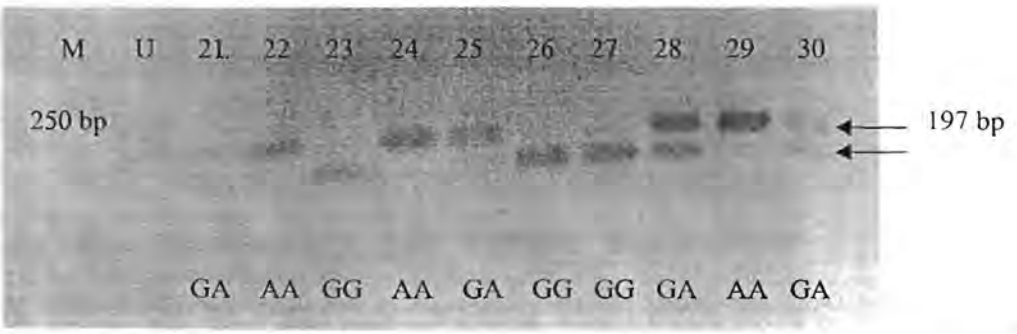
1. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพอลิมอร์ฟิซึมและความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากอาสาสมัคร ซึ่งมีข้อมูลตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อมูลอาสาสมัครโครงการโรคข้อเข่าเสื่อม

Parameters	Controls	OA patients
Male	9	20
Female	91	80
Age	54.34 ± 2.86	66.17 ± 9.85
Weight	61.1 ± 9.95	62.00 ± 9.31
Height	155.72 ± 5.06	156.27 ± 6.79
BMI	25.23 ± 4.22	25.37 ± 3.42

การศึกษาจีโนไทป์ที่ตำแหน่งพอลิมอร์ฟิซึมในยีนต่าง ๆ ด้วยวิธีการ PCR-RFLP ได้ผลดังตัวอย่างในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการทำ PCR-RFLP ของพอลิมอร์ฟิซึมตำแหน่ง rs7639618 บนยีน *DVWA* M คือ DNA marker, U คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 197 bp ที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I

โดยสามารถสรุปผลการศึกษาจีโนไทป์ที่ตำแหน่งพอลิมอร์ฟีซึมในยีนต่าง ๆ ได้ดังนี้

1.1 ยีน *DVWA* ตำแหน่ง SNP rs11718863 มีผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 จีโนไทป์ที่ตำแหน่ง rs11718863

Samples	Genotype			Total
	TT	TA	AA	
Knee OA	30	43	27	100
normal	21	55	24	100

1.2 ยีน *DVWA* ตำแหน่ง SNP rs11718863 มีผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จีโนไทป์ที่ตำแหน่ง rs7639618

Samples	Genotype			Total
	GG	GA	AA	
Knee OA	12	61	27	100
normal	24	56	20	100

1.3 ยีน *FRZB* ตำแหน่ง SNP rs288326 พบว่าทั้งในประชากรปกติ และผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมชาวไทย มีจีโนไทป์เพียง 1 แบบคือ CC

1.4 ยีน *FRZB* ตำแหน่ง SNP rs7775 พบว่าทั้งในประชากรปกติ และผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมชาวไทย มีจีโนไทป์เพียง 1 แบบคือ CC

1.5 ยีน *GDF5* ตำแหน่ง SNP rs11718863มีผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จีโนไทป์ที่ตำแหน่ง rs11718863

Samples	Genotype			Total
	T / T	T / C	C / C	
Knee OA	12	61	9	82
normal	21	25	6	52

1.6 ยีน *ADAMTS14* ตำแหน่ง SNP rs4747096 มีผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จีโนไทป์ที่ตำแหน่ง rs4747096

Samples	Genotype			Total
	A / A	A / G	G / G	
Knee OA	45	44	11	82
normal	39	38	23	52

ซึ่งเมื่อนำจีโนไทป์ใน SNP แต่ละตำแหน่งมาคำนวณหาความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดข้อเข่าเสื่อมในชาวไทย ด้วยโปรแกรม StatCalc แล้ว พบว่าไม่มี SNP ตำแหน่งใดที่มีความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดข้อเข่าเสื่อม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า $P < 0.05$

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อกับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1*

ผลการตรวจสอบ HPV ในตัวอย่างมะเร็งปากมดลูก

พบการติดเชื้อ HPV ใน 25 ตัวอย่าง โดย 23 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อ HPV type 16 และ 18 ส่วนอีก 2 ตัวอย่างพบว่าเป็น type อื่น ซึ่งไม่สามารถบอก type ได้ โดย 16 ตัวอย่างพบการติดเชื้อ HPV type 16 และ 7 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อ type 18

ผลการตรวจสอบปริมาณ HPV ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก

จาก 23 ตัวอย่างที่พบการติดเชื้อ HPV type 16 และ 18 พบปริมาณการติดเชื้อ HPV สูงในเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยต่ำสุดอยู่ที่ 58% และสูงสุดอยู่ที่ 94.5%

ผลการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อของ HPV

จาก 23 ตัวอย่าง พบว่า 13 ตัวอย่างมีลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อ เป็นแบบ integrate และ 10 ตัวอย่างเป็นแบบ episome ดังตารางที่ 8

ผลการตรวจสอบเมทิลเลชันของยีน *CCNA1*

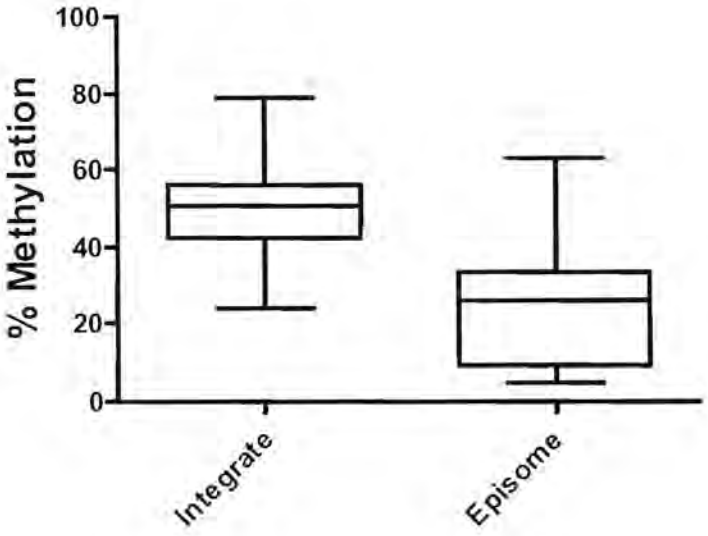
ทั้ง 23 ตัวอย่าง ตรวจพบเมทิลเลชันของ *CCNA1* โดยพบความเข้มของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันออกไปอยู่ในช่วงตั้งแต่ 5%-79%

ความสัมพันธ์ของปริมาณ HPV ภายในเซลล์กับการเกิดเมทิลเลชัน

ไม่พบความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อกับเมทิลเลชัน

ลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อกับเมทิลเลชันของ *CCNA1*

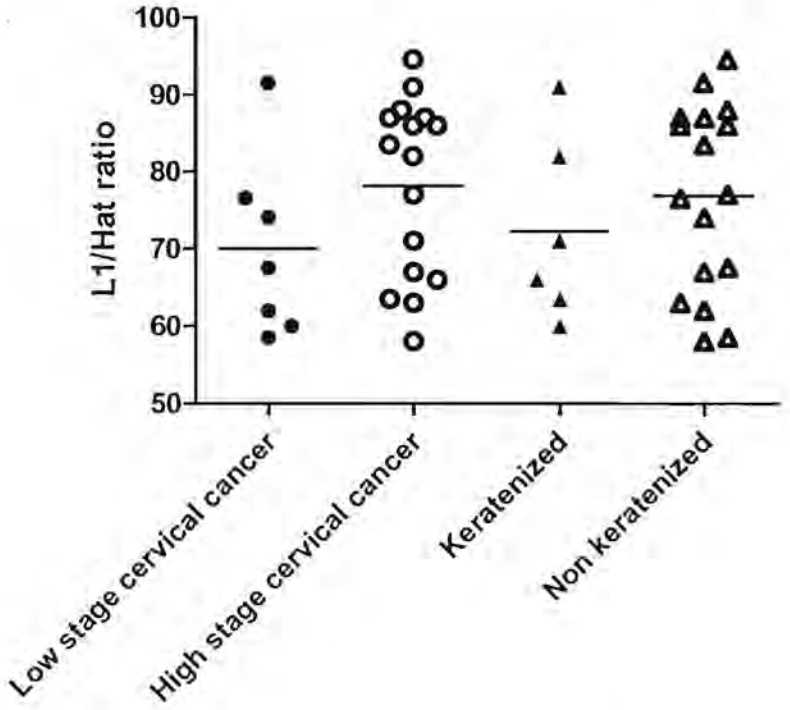
พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อแบบ integrate กับเมทิลเลชันของ *CCNA1* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.001, 95% CI= 11.96-38.44) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % methylation ของยีน *CCNA1* กับลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อ

ความสัมพันธ์ของปริมาณการติดเชื้อกับระยะของมะเร็ง (clinical stage) และชนิดของเซลล์มะเร็ง

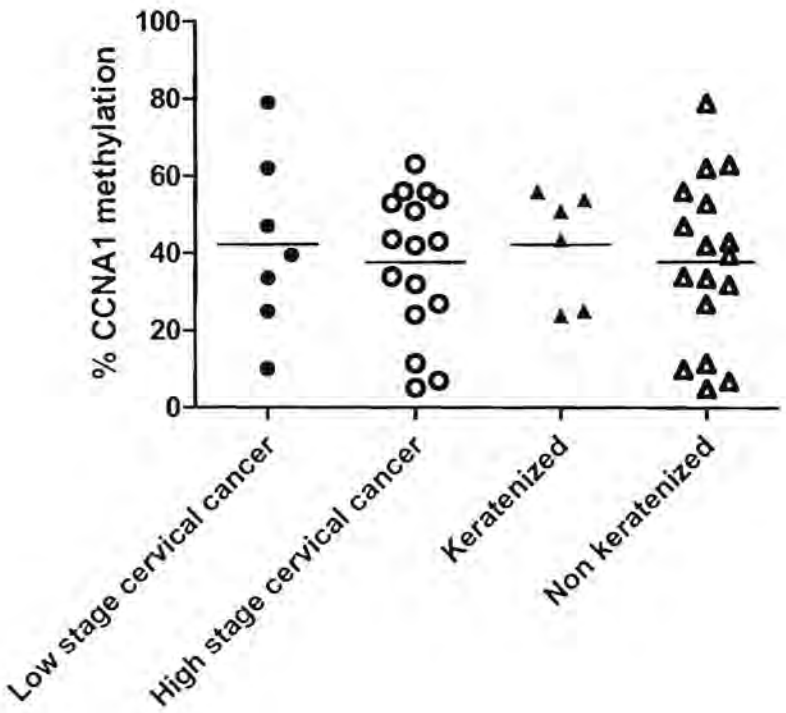
ได้ผลดังรูปที่ 3 ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ HPV ในเซลล์มะเร็งกับระยะของมะเร็งและชนิดของเซลล์มะเร็ง

ความสัมพันธ์ของเมทิลเลชันของ *CCNA1* กับระยะของมะเร็ง (clinical stage) และชนิดของเซลล์มะเร็ง

ได้ผลดังรูปที่ 4 และตารางที่ 8 ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % methylation ของยีน *CCNA1* กับ ระยะของมะเร็ง และชนิดของเซลล์มะเร็ง

ตารางที่ 8 Quantitation, physical state of HPV and % *CCNA1* promoter methylation

samples	L1/Hat	% methylation	Physical state
1	63.5	54	integrate
2	66	24	integrate
3	82	51	integrate
4	76.5	47	integrate
5	62	39.5	integrate
6	71	56	integrate
7	94.5	56	integrate
8	87	42	integrate
9	67	43	integrate
10	91	43.5	integrate
11	77	53	integrate
12	91.5	79	integrate
13	67.5	62	integrate
14	58.5	33.5	episome
15	58	32	episome
16	63	7	episome
17	60	25	episome
18	87	5	episome
19	88	34	episome
20	83.5	27	episome
21	86	11.5	episome
22	86	63	episome
23	74	10	episome

บทที่ 4

อภิปราย สรุป และ เสนอแนะ

1. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพอลิมอร์ฟิซึมและความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

จากผลการทดลอง ไม่พบว่าพอลิมอร์ฟิซึมในตำแหน่งที่ศึกษามีความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมที่พบในชาวไทย เนื่องจากโรคนี้ยังไม่มีการศึกษาในชาวไทย แต่ส่วนใหญ่แล้วเป็นการศึกษาในชาวคอเคเซียน (ทวีปยุโรป เช่น สหราชอาณาจักร และเยอรมนี ทวีปอเมริกา เช่น อเมริกา และแคนาดา (Loughlin, 2005; Loughlin, et al., 2006; Meulenbelt, et al., 2008; Rodriguez-Lopez, et al., 2006; Rodriguez-Lopez, et al., 2009; Vaes, et al., 2008; Valdes, et al., 2004; Valdes, et al., 2007)) และมีบางการศึกษาที่ทำในชาวเอเชีย เช่น จีน เกาหลี และ ญี่ปุ่น (Nakamura, et al., 2007; Park, et al., 2007; Shi, et al., 2007; Song, et al., 2008; Wakitani, et al., 2001) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปัจจัยเกี่ยวกับชาติพันธุ์ ทั้งพันธุกรรม อาหาร ลักษณะการดำเนินชีวิต จะมีผลต่อการแสดงออกของโรคได้ (Tammachote, 2011)

นอกจากนี้ ในไม่กี่ปีที่ผ่านมา ได้มีการพัฒนาเทคนิคที่สามารถตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึมได้ทั้งจีโนม เช่น SNP array หรือ Next Generation Sequencing ซึ่งอาจทำให้ได้ตำแหน่ง candidate gene ที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในชาวไทยได้

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อกับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1*

ในการทดลองนี้ ได้เลือกใช้เนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกที่ติดเชื้อ HPV ชนิดความเสี่ยงสูง คือ ชนิดที่ 16 และ 18

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของเชื้อ HPV ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดเมทิลเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* แต่พบว่าลักษณะทางกายภาพของการติดเชื้อแบบ integrate มีผลอย่างมากต่อการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานเบื้องต้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในกรณีของการติดเชื้อแบบ episome นั้น ยีน *E2* ได้กดการถอดรหัสของยีน *E6* และ *E7* ในขณะที่การติดเชื้อแบบ integrate นั้น ยีน *E2* ถูกทำลายแล้วทำให้ *E6* และ *E7* มีการแสดงออกมากขึ้น และส่งผลให้เกิดเมทิลเลชันของยีนตามมา

ดังนั้น จากการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นกลไกในการก่อมะเร็งของยีน E7 ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการจับตัวกับเอนไซม์ DNA methyltransferase ที่ตำแหน่งโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ซึ่งทำให้เกิดการเมทิลเลชันบน

ยีนนี้ และอาจก่อให้เกิดมะเร็งโดยการลดการผลิตโปรตีน cyclin A1 ที่สร้างจากยีน *CCNA1* และมีหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (Muller-Tidow, et al., 2004) ซึ่งการเกิดมะเร็งปากมดลูกจะมีสาเหตุมาจากกลไกใดนั้นยังต้องทำการพิสูจน์ต่อไป

บทที่ 5

บรรณานุกรม

สุรศักดิ์ นิลกานุวงศ์. 2548. โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis). ใน: ปรีชานนท์ สนแส. ตำราโรคข้อ. กรุงเทพฯ: เอส.พี.เอ็น. การพิมพ์. p 697-755.

Aspden RM. 2008. Osteoarthritis: a problem of growth not decay? Rheumatology (Oxford) 47:1452-60.

Birchfield PC. 2001. Osteoarthritis overview. Geriatr Nurs 22:124-30; quiz 130-1.

Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T, Fuks F. 2007. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. Oncogene 26:1650-5.

Chang SC, Hoang B, Thomas JT, Vukicevic S, Luyten FP, Ryba NJ, Kozak CA, Reddi AH, Moos M, Jr. 1994. Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. J Biol Chem 269:28227-34.

Chapman K, Takahashi A, Meulenbelt I, Watson C, Rodriguez-Lopez J, Egli R, Tsezou A, Malizos KN, Kloppenburg M, Shi D and others. 2008. A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis susceptibility. Hum Mol Genet 17:1497-504.

Chung CH, Gillison ML. 2009. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. Clin Cancer Res 15:6758-62.

Kee CC. 2000. Osteoarthritis: manageable scourge of aging. Nurs Clin North Am 35:199-208.

Kitkumthorn N, Yanatatsanajit P, Kiatpongsan S, Phokaew C, Triratanachat S, Trivijitsilp P, Termrungruanglert W, Tresukosol D, Niruthisard S, Mutirangura A. 2006. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. BMC Cancer 6:55.

Lane NE, Lian K, Nevitt MC, Zmuda JM, Lui L, Li J, Wang J, Fontecha M, Umblas N, Rosenbach M and others. 2006. Frizzled-related protein variants are risk factors for hip osteoarthritis. Arthritis Rheum 54:1246-54.

Laurson J, Khan S, Chung R, Cross K, Raj K. 2010. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. Carcinogenesis 31:918-26.

Lories RJ, Boonen S, Peeters J, de Vlam K, Luyten FP. 2006. Evidence for a differential association of the Arg200Trp single-nucleotide polymorphism in FRZB with hip osteoarthritis and osteoporosis. Rheumatology (Oxford) 45:113-4.

Loughlin J. 2002. Genome studies and linkage in primary osteoarthritis. Rheum Dis Clin North Am 28:95-109.

Loughlin J. 2005. Polymorphism in signal transduction is a major route through which osteoarthritis susceptibility is acting. Curr Opin Rheumatol 17:629-33.

Loughlin J, Dowling B, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, Ferreira A, Ciesielski C, Carson DA, Corr M. 2004. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. Proc Natl Acad Sci U S A 101:9757-62.

Loughlin J, Sinsheimer JS, Carr A, Chapman K. 2006. The CALM1 core promoter polymorphism is not associated with hip osteoarthritis in a United Kingdom Caucasian population. Osteoarthritis Cartilage 14:295-8.

Meulenbelt I, Min JL, Bos S, Riyazi N, Houwing-Duistermaat JJ, van der Wijk HJ, Kroon HM, Nakajima M, Ikegawa S, Uitterlinden AG and others. 2008. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. Hum Mol Genet 17:1867-75.

Min JL, Meulenbelt I, Riyazi N, Kloppenburg M, Houwing-Duistermaat JJ, Seymour AB, Pols HA, van Duijn CM, Slagboom PE. 2005. Association of the Frizzled-related protein gene with symptomatic osteoarthritis at multiple sites. Arthritis Rheum 52:1077-80.

Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, Fujioka M, Sudo A, Uchida A, Yamamoto S and others. 2007. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. Nat Genet 39:529-33.

Miyamoto Y, Shi D, Nakajima M, Ozaki K, Sudo A, Kotani A, Uchida A, Tanaka T, Fukui N, Tsunoda T and others. 2008. Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. Nat Genet 40:994-8.

Momparler RL, Bovenzi V. 2000. DNA methylation and cancer. J Cell Physiol 183:145-54.

Muller-Tidow C, Ji P, Diederichs S, Potratz J, Baumer N, Kohler G, Cauvet T, Choudary C, van der Meer T, Chan WY and others. 2004. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. Mol Cell Biol 24:8917-28.

Mutirangura A, Sriuranpong V, Termrunggraunglert W, Tresukosol D, Lertsaguansinchai P, Voravud N, Niruthisard S. 1998. Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and benign cervical lesions. Br J Cancer 78:933-9.

Nakamura T, Shi D, Tzetis M, Rodriguez-Lopez J, Miyamoto Y, Tsezou A, Gonzalez A, Jiang Q, Kamatani N, Loughlin J and others. 2007. Meta-analysis of association between the ASPN D-repeat and osteoarthritis. Hum Mol Genet 16:1676-81.

Park HJ, Yoon SH, Zheng LT, Lee KH, Kim JW, Chung JH, Lee YA, Hong SJ. 2007. Association of the -2510A/G chemokine (C-C motif) ligand 2 polymorphism with knee osteoarthritis in a Korean population. Scand J Rheumatol 36:299-306.

Psyrri A, DiMaio D. 2008. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. Nat Clin Pract Oncol 5:24-31.

Rodriguez-Lopez J, Pombo-Suarez M, Liz M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. 2006. Lack of association of a variable number of aspartic acid residues in the asporin gene with osteoarthritis susceptibility: case-control studies in Spanish Caucasians. Arthritis Res Ther 8:R55.

Rodriguez-Lopez J, Pombo-Suarez M, Loughlin J, Tsezou A, Blanco FJ, Meulenbelt I, Slagboom PE, Valdes AM, Spector TD, Gomez-Reino JJ and others. 2009. Association of a nsSNP in ADAMTS14 to some osteoarthritis phenotypes. Osteoarthritis Cartilage 17:321-7.

Shi D, Nakamura T, Dai J, Yi L, Qin J, Chen D, Xu Z, Wang Y, Ikegawa S, Jiang Q. 2007. Association of the aspartic acid-repeat polymorphism in the asporin gene with age at onset of knee osteoarthritis in Han Chinese population. J Hum Genet 52:664-7.

Song JH, Lee HS, Kim CJ, Cho YG, Park YG, Nam SW, Lee JY, Park WS. 2008. Aspartic acid repeat polymorphism of the asporin gene with susceptibility to osteoarthritis of the knee in a Korean population. Knee 15:191-5.

Spector TD, MacGregor AJ. 2004. Risk factors for osteoarthritis: genetics. Osteoarthritis Cartilage 12:S39-44.

Strachan T, Read AP. 1999. Human Molecular Genetics. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Tammachote R. 2011. Genetics behind osteoarthritis: Asian Focus. Asian Biomedicine 5:23-26.

Teichtahl AJ, Wluka AE, Proietto J, Cicuttini FM. 2005. Obesity and the female sex, risk factors for knee osteoarthritis that may be attributable to systemic or local leptin biosynthesis and its cellular effects. Med Hypotheses 65:312-5.

Vaes RB, Rivadeneira F, Kerkhof JM, Hofman A, Pols HA, Uitterlinden AG, van Meurs JB. 2008. Genetic variation in the GDF5 region is associated with osteoarthritis, height, hip axis length and fracture risk: the Rotterdam study. Ann Rheum Dis

Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, Schafer AJ, Spector TD. 2004. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. Arthritis Rheum 50:2497-507.

Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, Spector TD. 2007. Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. Arthritis Rheum 56:137-46.

Valdes AM, Spector TD. 2008. The contribution of genes to osteoarthritis. Rheum Dis Clin North Am 34:581-603.

Valdes AM, Spector TD. 2009. The contribution of genes to osteoarthritis. Med Clin North Am 93:45-66.

Valdes AM, Spector TD, Doherty S, Wheeler M, Hart DJ, Doherty M. 2008. Association of the DVWA and GDF5 polymorphisms with osteoarthritis in UK populations. Ann Rheum Dis

Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, Doherty M, Spector TD. 2006. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. Arthritis Rheum 54:533-9.

Wakitani S, Imoto K, Mazuka T, Kim S, Murata N, Yoneda M. 2001. Japanese generalised osteoarthritis was associated with HLA class I--a study of HLA-A, B, Cw, DQ, DR in 72 patients. Clin Rheumatol 20:417-9.

Yang N, Nijhuis ER, Volders HH, Eijsink JJ, Lendvai A, Zhang B, Hollema H, Schuuring E, Wisman GB, van der Zee AG. 2010. Gene promoter methylation patterns throughout the process of cervical carcinogenesis. Cell Oncol 32:131-43.

Yuan YF, Li JQ, Yang ZL, Wang JP. 2002. [The roles of DNA methylation in human neoplasms]. Ai Zheng 21:1267-77.

บทที่ 6

ภาคผนวก

การเผยแพร่ผลงาน

ผลงานตีพิมพ์

Pattamawadee Yanatatsaneejit, Apiwat Mutirangura and Nakarin Kitkumthorn. Human papillomavirus's physical state and cyclin A1 promoter methylation in cervical cancer. International Journal of Gynecological Cancer Vol. 21 No. 5 (2011) 902-906

Rachaneekorn Tammachote. The genetics behind osteoarthritis: Asian focus. Asian Biomedicine, Vol. 5 No.1 (2011) 23-36.

การเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ

Rachaneekorn Tammachote and Thitiya Poonpet. Association of genetic variations with knee osteoarthritis in Thais. Poster presentation ในการอบรมและประชุมวิชาการ Clinical and Molecular Genetics: From Basic to Advanced Applications. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 12 กรกฎาคม 2554

Thitiya Poonpet and Rachaneekorn Tammachote. Association study of *ADAMTS14* polymorphism with susceptibility to osteoarthritis in Thai population. Oral presentation ใน The 15th Biological Sciences Graduate Congress 2010 **by** Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia. 15th - 17th December 2010.

ชยุตม์ พานทองกชกร และ ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต. การตรวจหาเมทิเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *TNFRSF8* ในมะเร็งปากมดลูก. Poster presentation ในการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม. 10 กันยายน 2553.

ฐิติพร บุญสุวรรณ และ ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต. พอลิมอร์ฟิซึมที่โคดอน 399 ของยีน *XRCC1* ในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 17. โรงแรมอิมพิเรียล แม่ปิง เชียงใหม่. 7-9 เมษายน 2554.

บทที่ 7
ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ	Rachaneekorn Tammachote, Ph.D.
ตำแหน่ง	อาจารย์
คุณวุฒิ	Ph.D.
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ	Human Molecular Genetics, Cell Biology
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กทม. 10330
โทรศัพท์	02-2525485-6
โทรสาร	02-2528979

ทุนวิจัย

1. ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรื่องการตรวจหาการกลายพันธุ์ของผู้ป่วยโรค Primary Hyperoxaluria ชนิดที่ 1 ในผู้ป่วยชาวไทย (Mutation analysis in Thai patients with type I primary hyperoxaluria) พ.ศ. 2550-2553
2. ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เรื่องการศึกษาการทำงานและตำแหน่งภายในเซลล์ของเอนไซม์กลูโคเซเรโบรซิเดสที่กลายพันธุ์ (Functional and cellular analyses of mutant glucocerebrodisase) พ.ศ. 2551-2553
3. ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นกลาง สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เรื่องการวิเคราะห์การกลายและการทำงานของ *AGXT* ในผู้ป่วยโรคไพรมารีไฮเปอร์ออกซาลยูเรียชนิดที่ 1 ชาวไทย (Mutation and functional analyses of *AGXT* in Thai patients with primary hyperoxaluria type I) พ.ศ. 2554-2557

ประสบการณ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. Shotelersuk V, **Punyashthiti R**. A novel mutation of the COMP gene in a Thai family with pseudoachondroplasia. Int J Mol Med. 2002 Jan;9(1):81-4.
2. Shotelersuk V, **Punyashthiti R**, Srivuthana S, Wacharasindhu S. Kabuki syndrome: report of six Thai children and further phenotypic and genetic delineation. Am J Med Genet. 2002 Jul 15;110(4):384-90.
3. Masyuk TV, Huang BQ, Ward CJ, Masyuk AI, Yuan D, Splinter PL, et al. Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. Gastroenterology. 2003 Nov;125(5):1303-10.
4. Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, **Punyashthiti R**, Whelan S, et al. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. Hum Mol Genet. 2003 Oct 15;12(20):2703-10.
5. Smith UM, Consugar M, Tee LJ, McKee BM, Maina EN, Whelan S, et al. The transmembrane protein meckelin (*MKS3*) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat. Nat Genet. 2006 Feb;38(2):191-6.
6. Woollard JR, **Punyashthiti R**, Richardson S, Masyuk TV, Whelan S, Huang BQ, et al. A mouse model of autosomal recessive polycystic kidney disease with biliary duct and proximal tubule dilatation. Kidney Int. 2007 Aug;72(3):328-36.
7. Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, **Tammachote R**, et al. Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. J Am Soc Nephrol. 2009 Feb;20(2):278-88.
8. **Tammachote R**, Tongkobpetch S, Desudchit T, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Prenatal diagnosis of a novel mutation, c.529C>T (p.Q177X), in the *BCKDHA* gene in a family with maple syrup urine disease. J Inherit Metab Dis. 2009 Feb 24.
9. **Tammachote R**, Hommerding CJ, Sinders RM, Miller CA, Czarnecki PG, Leightner AC, et al. Ciliary and centrosomal defects associated with mutation and depletion of the Meckel syndrome genes *MKS1* and *MKS3*. Hum Mol Genet. 2009 Jun 10.

10. Tammachote, R., S. Janklat, et al. 2010. Holocarboxylase synthetase deficiency: novel clinical and molecular findings. Clin Genet **78**(1): 88-93.

11. Tammachote, R. 2011. Genetics behind osteoarthritis: Asian Focus. Asian Biomedicine **5**(1): 23-26.

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต	Pattamawadee Yanatatsaneejit, Ph.D.
ตำแหน่ง	อาจารย์ ดร.
คุณวุฒิ	Ph.D.
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ	Human Molecular Genetics, Cancer genetics
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กทม. 10330
โทรศัพท์	02-2525485-6
โทรสาร	02-2528979

ผู้ร่วมวิจัย

นายแพทย์ ณัฐพล ธรรมโชติ	Nattapol Tammachote, MD., MS.
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์
คุณวุฒิ	MD., MS.
สถานที่ติดต่อ	โครงการจัดตั้งภาควิชาศัลยศาสตร์ออโธปิดิกส์ ชั้น 7 อาคารคุณากร คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทรศัพท์	02-926-9775
โทรสาร	02-9269793