

การศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคิท ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน
ระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ในผู้ป่วยไทย

นางสาว นภา ปริญญานิติกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE OF KIT GENE MUTATION IN GASTROINTESTINAL-STROMAL TUMOR
(GIST) IN THAI PATIENTS

Miss Napa Parinyanitikul

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 2008

Copyright of Chulalongkorn University

นภา ปริญญานิติกุล : การศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคิท ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ ในผู้ป่วยไทย (PREVALENCE OF KIT GENE MUTATION IN GASTROINTESTINAL-STROMAL TUMOR (GIST) IN THAI PATIENTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.นพ.นรินทร์ วรฤทธิ, 84 หน้า.

ที่มา การทำงานที่มากกว่าปกติของยีนคิทพบว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ และยังเป็นเป้าหมายต่อการรักษาด้วยยาอิมาทินิบ การกลายพันธุ์ของยีนคิทที่ต่างกันสามารถทำนายการตอบสนองต่อยาอิมาทินิบ ผู้วิจัยต้องการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีนคิทเป็นครั้งแรกในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ในประเทศไทยและศึกษาหาปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของยาอิมาทินิบ

ผู้ป่วยและวิธีการ ผู้ป่วย 36 รายที่วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ และมีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2551 นำมาสกัดสารพันธุกรรม และทำการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ด้วยวิธี พีซีอาร์ และตรวจดีเอ็นเอซีเควนท์ทุกราย จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับการตอบสนองของยาระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรค และระยะเวลาการรอดชีวิต

ผลการวิจัย สามารถสกัดสารพันธุกรรมและตรวจเพิ่มเติมได้ 24 ราย ,15 รายใน 24 ราย (62.5%) พบการกลายพันธุ์ของยีนคิทเฮคซอน 11 , 4 ราย (16.7%) พบการกลายพันธุ์ ของยีนคิทเฮคซอน 9 ลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนคิทเฮคซอน 11 พบว่า 66.7% เป็น Deletion, 20% เป็น Complex mutation, 13.3% เป็น Substitution ในขณะที่ทั้งหมด 4 รายของการกลายพันธุ์ของยีนคิทเฮคซอน 9 เป็น Duplication หลังจากติดตามผู้ป่วยนาน เฉลี่ย 22.5 เดือน พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ ระยะกระจายที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนคิทเฮคซอน 11 มีแนวโน้มในการตอบสนองการรักษาดีกว่าในกลุ่มที่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนคิทเฮคซอน 11 โดยมีอัตราการตอบสนองร้อยละ 62.5 เทียบกับร้อยละ 37.5, p=.74 , ระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรค 33.06 เดือน เทียบกับ 21.6 เดือน, p=.08 และระยะเวลาการรอดชีวิต 41.7 เดือน เทียบกับ 31.3 เดือน , p=.26

สรุปผลการวิจัย ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคิท ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ ในผู้ป่วยไทยเหมือนกับประเทศอื่นๆ ลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนคิทที่ต่างกัน เป็นปัจจัยที่ทำนายการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาอิมาทินิบ ระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรค และระยะเวลาการรอดชีวิต โดยการกลายพันธุ์ของยีนคิทเฮคซอน 11 มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยาอิมาทินิบ, ระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรค และระยะเวลาการรอดชีวิตที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ลักษณะดังกล่าว

ภาควิชา.....อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....อายุรศาสตร์ ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา2551..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##5074787930: MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: KIT GENE/ GASTROINTESTINAL-STROMAL TUMOR (GIST)

NAPA PARINYANITIKUL: PREVALENCE OF KIT GENE MUTATION IN GASTROINTESTINAL-STROMAL TUMOR (GIST) IN THAI PATIENTS. ADVISOR: ASST.PROF.VIROTE

SRIURANPONG, M.D. CO-ADVISOR: ASSOC.PROF.NARIN VORAVUD, M.D.,84 pp.

Background Activating mutations of *KIT* have been described to be the crucial molecular pathogenesis of gastrointestinal-stromal tumor (GIST). Individual *KIT* mutations show different prognosis and differential response to the treatment with imatinib. We investigated the prevalence and pattern of *KIT* mutation in GIST in Thai patients.

Methods Thirty six GIST patients diagnosed and treated at the King Chulalongkorn Memorial Hospital during 2002-2008 who had adequate archival paraffin-embedded tumor tissue were identified. DNA was extracted from tumor tissue and then amplified by PCR with primers for *KIT* exon 11 and exon 9. All PCR products were subjected to direct sequencing. The associations between *KIT* mutation and tumor response to treatment, time to progression (TTP), and overall survival (OS) were analyzed.

Results We successfully amplified 24 out of 36 tumor materials. Mutations of *KIT* exon 11 were detected in 15 out of 24 tumors (62.5%) and mutations of *KIT* exon 9 were demonstrated in 4 tumors (16.7%). Most of *KIT* exon 11 mutations were deletion (10/15:66.7%), complex mutation (3/15: 20%) and substitutions (2/15: 13.3%). Mutations of *KIT* exon 9 were all gene duplication (4/4: 100%). The median follow-up time was 22.5 months. There was a trend toward better treatment outcomes in advanced GIST with *KIT* exon 11 mutations than non-*KIT* exon 11 mutations. The objective response were 62.5% vs 37.5% (p=0.74), TTP were 33.1 months vs 21.6 months (p=0.08) and OS were 41.7 months vs 31.3 months (p=0.26) for *KIT* exon11 mutation vs non-*KIT* exon11 mutation respectively.

Conclusion Our study shows similar prevalence of *KIT* mutations in Thai GIST patients consistent with the other previous reports. Mutation of exon 11 associates with better imatinib response, time to progression, and overall survival.

Department:.....Medicine..... Student's Signature.....
 Field of Study:.....Medicine Advisor's Signature.....
 Academic Year:.... 2008..... Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย ขอขอบคุณ รศ.พญ. นฤมล คล้ายแก้ว พยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญระบบทางเดินอาหารผู้คัดกรองตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็ง เนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ และพญ. ชนิดา วจิณยานุวัตติคุณ ผู้วิเคราะห์การกลายพันธุ์ทางห้องปฏิบัติการ ควบคุมการสกัดสารพันธุกรรม ,การทำ Polymerase chain reaction ของ KIT exon 11 และ 9, การทำ DNA sequencing จนได้ข้อมูลที่สำคัญในงานวิจัยนี้

และขอขอบคุณนางปัทมา อังสพัทธ์ พยาบาลประจำหน่วยเคมีบำบัด ว่องวานิช ชั้น 4 และนายเชาวลิต แซ่ลื้อ เจ้าหน้าที่หน่วยเคมีบำบัด ว่องวานิช 4 ที่ช่วยรวบรวมข้อมูล รายละเอียด ของผู้ป่วย มะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ เจ้าหน้าที่หน่วยพยาธิวิทยาที่ช่วยเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อนำไปดำเนินการวิเคราะห์ต่อเนื่อง ขอขอบคุณ นางสาวศิริรัตน์ สีขุนทด นักวิทยาศาสตร์การแพทย์3 และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพันธุกรรมที่ช่วยดำเนินการวิเคราะห์การกลายพันธุ์

ท้ายที่สุด ขอขอบคุณบิดา มารดาและครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้กำลังในการทำงานวิจัยนี้จน ลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย	1
1.2 คำถามการวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	3
1.6 การดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	4
1.7 ผลประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากการวิจัย.....	4
2. มะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์.....	5
3. ยีน <i>KIT</i>	17
4. ยีน <i>KIT</i> และมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์.....	24
5. ปรีทรรศน์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	31
6. วัสดุและวิธีการ.....	36
6.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง.....	36
6.2 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	36
6.3 การสังเกตและการวัด.....	37
6.4 ขั้นตอนและวิธีการตรวจการกลายพันธุ์.....	39
6.5 การรวบรวมข้อมูล.....	43
6.6 การวิเคราะห์ข้อมูล	44
7. ผลการวิจัย.....	45

8. อภิปรายผลการวิจัย.....	58
9. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	61
รายการอ้างอิง	63
ภาคผนวก.....	77
ภาคผนวก ก.....	78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์หลัก.....	84

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	ลักษณะการย้อมพิเศษด้วยวิธีทางอิมมูโนที่ช่วยวินิจฉัยแยกโรคที่มีผลการตรวจพยาธิวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์เป็นแบบ Spindle cell	8
ตารางที่ 2.2	ตารางประเมินโอกาสกลับเป็นซ้ำของโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์หลังจากที่ได้รับรักษาด้วยวิธีการผ่าตัด.....	9
ตารางที่ 2.3	ข้อมูลสรุปผลการกลับเป็นซ้ำและการกระจายหลังจากที่เฝ้าติดตามผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ตำแหน่งกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ส่วนต้น กลางและปลาย และลำไส้ใหญ่ ก่อนการฉายาเฉพาะ อีมาทีนิบ....	10
ตารางที่ 5.1	แสดงการศึกษาต่างประเทศเกี่ยวกับอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนคิท.....	32
ตารางที่ 6.1	แสดง Primer sequences ที่ใช้ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนคิท และค่าของ PCR Annealing conditions.....	41
ตารางที่ 7.1	ตารางแสดงข้อมูลพื้นฐานในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์	46-47
ตารางที่ 7.2	แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีนคิท ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ในไทย.....	50
ตารางที่ 7.3	แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์ที่ได้จากการทำ DNA Sequencing.....	52
ตารางที่ 7.4	ข้อมูลพื้นฐานและปัจจัยทางคลินิกที่พบในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ โดยแบ่งตามลักษณะของการกลายพันธุ์ที่มีหรือไม่มีการกลายพันธุ์ของคิท exon 11.....	55
ตารางที่ 8.1	แสดงข้อมูลอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีนคิทในผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ในการศึกษาต่างๆ เทียบกับการศึกษานี้.....	59

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย.....3

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์..7

รูปที่ 2.2 แสดงระยะเวลาการรอดชีวิตหลังจากรักษาด้วยยาอิมาทีนิบ ขนาด 400 และ 800 มิลลิกรัมต่อวัน เทียบกับการรักษาดั้งเดิม จากการศึกษา EORTC 62005.....12

รูปที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบของตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโตคิท.....18

รูปที่ 3.2 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนคิท ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์, germ cell tumor และ mast cell neoplasm.....20

รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 ที่พบบ่อย.....26

รูปที่ 5.1 แสดงระยะเวลาการรอดชีวิตหลังจากรักษาด้วยยาอิมาทีนิบ เมื่อพิจารณาจากตำแหน่งการกลายพันธุ์ ของยีนคิท.....33

รูปที่ 5.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของการกลายพันธุ์ และ ระยะเวลาที่โรคจะลุกลาม และระยะเวลาการรอดชีวิต.....34

รูปที่ 7.1 แผนผังแสดงการรวบรวมชิ้นเนื้อมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ที่นำมาศึกษา.....45

รูปที่ 7.2 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ conventional PCR สำหรับ KIT exon 11.....51

รูปที่ 7.3 แสดงตัวอย่างการกลายพันธุ์ของ KIT exon 11 แบบ complex mutation52-53

รูปที่ 7.4 แสดงกราฟของ นิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing มีการเปลี่ยนแปลงของ Base codon53

รูปที่ 7.5 แสดงระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรคในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 หลังจากการรักษาด้วยยาเฉพาะอิมาทีนิบ56

รูปที่ 7.6 แสดงระยะเวลาการรอดชีวิต ในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 หลังจากการรักษาด้วยยาเฉพาะ อิมาทีนิบ57

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย (Background and Rationale)

มะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ถึงแม้ว่าจะมีอุบัติการณ์ไม่มาก คือ ประมาณ 0.1- 3% ของ มะเร็งระบบทางเดินอาหารทั้งหมด แต่จัดเป็นมะเร็งของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่พบบ่อยที่สุดในระบบทางเดินอาหาร การวินิจฉัยก่อนหน้าปี 2000 ใช้การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาช่วย ซึ่งมีโครงสร้างบางส่วนคล้ายเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และบางส่วนคล้ายเซลล์ระบบประสาททำให้อ่อนหน้านี้โรคดังกล่าวได้รับการวินิจฉัยผิดเป็น Leiomyomas, Leiomyosarcomas, Leiomyoblastomas , Schwannomas หรือ gastrointestinal autonomic nerve tumors แต่จากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์พบว่า มะเร็งชนิดนี้จะมีการแสดงออกของตัวรับการเจริญเติบโตคิท (type III receptor tyrosine kinase KIT) มากถึงประมาณ 90% โดยตัวที่กำหนดบทบาทการทำงานของตัวรับดังกล่าวคือ *KIT* proto-oncogene เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวจะทำให้ตัวรับการเจริญเติบโตทำงานได้เองโดยไม่ต้องมีตัวกระตุ้น จึงเกิดการเจริญเติบโตที่มากกว่าปกติจนกลายเป็นมะเร็งดังกล่าวนี้เอง

จากการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *KIT* มีหลายตำแหน่งและแต่ละตำแหน่งพบเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้การที่พบการกลายพันธุ์ตำแหน่งที่ต่างกันมีผลต่อการพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาที่จำเพาะต่อ ตัวรับ KIT คือ imatinib (Glivec) ที่แตกต่างกัน และการกลายพันธุ์บางตำแหน่งอาจไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย imatinib ซึ่งมีการศึกษามากมายในต่างประเทศที่พิสูจน์ข้อมูลนี้ ในรายที่ผลการตรวจสงสัยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์แต่ผลทางพยาธิวิทยา ไม่มีการแสดงออกของตัวรับการเจริญเติบโตคิท พบว่าบางส่วนมีการกลายพันธุ์ที่ตัวรับตำแหน่งอื่นเช่น Platelet derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) ซึ่งยังมีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งในสามที่ตอบสนองต่อยา imatinib เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาทางโมเลกุลเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ดังกล่าวเลย อาจพบว่ามีกรกลายพันธุ์ที่แตกต่างจากการศึกษาในต่างประเทศและมีผลต่อการตอบสนองการรักษาด้วยยา imatinib ประกอบกับยาที่รักษาโรคนี้นั้นเป็นยาที่มีราคาสูง ในประเทศกำลังพัฒนาอย่างประเทศไทยการศึกษากการกลายพันธุ์นี้อาจสามารถช่วยในแง่

การใช้ยาให้เกิดประโยชน์สูงสุด และถ้ามีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ไม่ตอบสนองต่อยา imatinib อาจพิจารณาเปลี่ยนแปลงวิธีการรักษา เช่น ใช้ยากลุ่มอื่นทดแทน

2. คำถามการวิจัย (Research question)

คำถามหลัก (Primary Research Question)

ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคิท ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ในผู้ป่วยไทยแตกต่างจากการศึกษาอื่นๆหรือไม่

คำถามรอง (Secondary Research Question)

การกลายพันธุ์ของยีนคิท ตำแหน่งที่แตกต่างกัน สัมพันธ์กับการดำเนินโรค การพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib รวมทั้งอัตราการรอดชีวิต ในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ที่แตกต่างกันหรือไม่

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

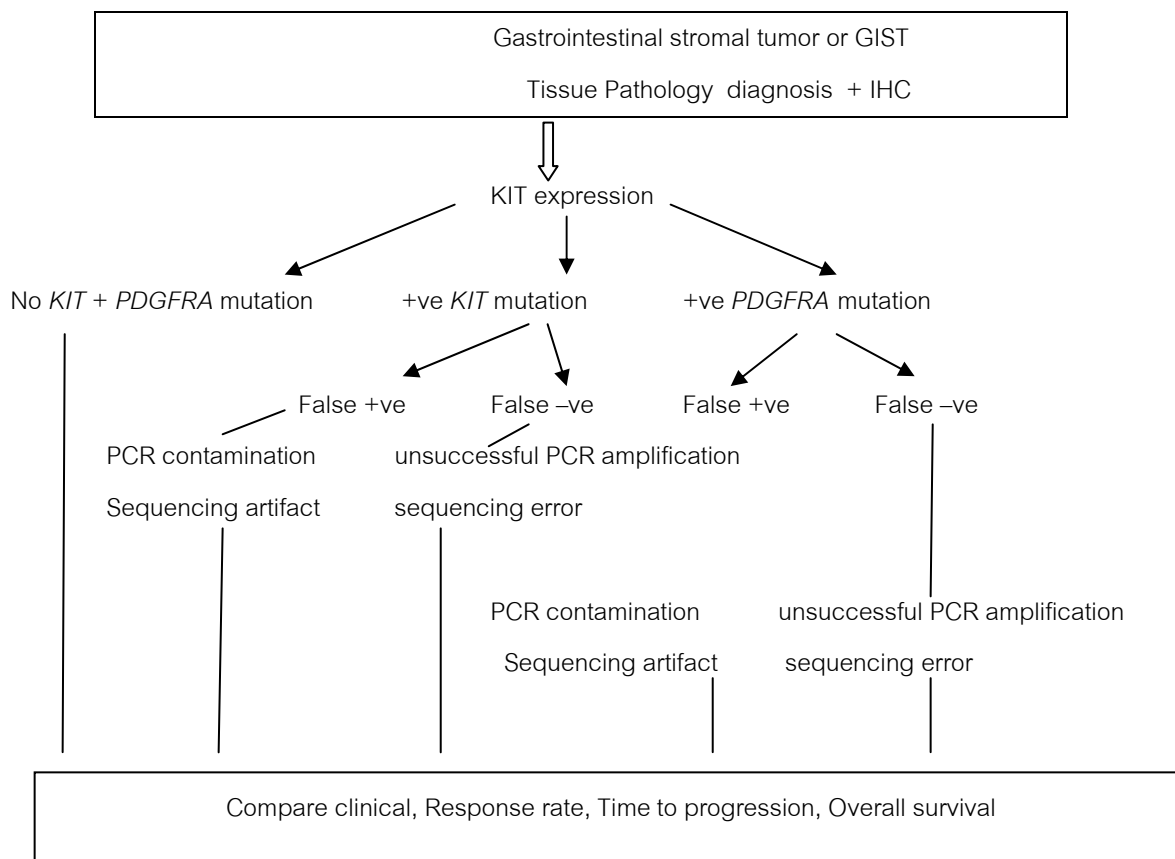
1. ศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของตัวรับการเจริญเติบโตคิท ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ในผู้ป่วยไทย
2. เปรียบเทียบการกลายพันธุ์กับการดำเนินโรค การพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib รวมทั้งอัตราการรอดชีวิตในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์
3. ศึกษาการกลายพันธุ์ของตัวรับการเจริญเติบโตคิทในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ด้วยวิธีเดิม คือ PCR และ DNA sequencing กับการตรวจคัดกรองการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคใหม่ ด้วยวิธี high resolution melts PCR

4. สมมติฐานของการวิจัย (Hypothesis)

H0 : ความชุกของการเกิดการกลายพันธุ์ของตัวรับการเจริญเติบโต คิท ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ในผู้ป่วยไทยไม่มีความแตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ

Ha : ความชุกของการเกิดการกลายพันธุ์ของตัวรับการเจริญเติบโต คิท ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ในผู้ป่วยไทยแตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ

5. กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



รูปที่ 1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย

ปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจการกลายพันธุ์ Mutation analysis

1. ชนิดและตำแหน่งของการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมต่างตำแหน่ง ต่างชนิด และการเลือกใช้ Primer มีผลต่อการตรวจmutation analysis โดยวิธี PCR และ DNA sequencing

2. ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

ขึ้นกับปริมาณชิ้นเนื้อ ขั้นตอนวิธีการ อุปกรณ์ และความชำนาญของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทางชีวโมเลกุล

6. การดำเนินการวิจัยโดยย่อ

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนาแบบย้อนหลัง ศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคิทในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ในผู้ป่วยไทยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการกลายพันธุ์กับการดำเนินโรค การพยากรณ์โรคและการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib รวมทั้งระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรคและระยะเวลาการรอดชีวิตเก็บข้อมูลแบบไปข้างหน้า

7. ผลประโยชน์ที่คาดว่าจะได้จากการวิจัย (Expected Benefits and Application)

1. ทำให้ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยไทย และผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib และเป็นการวางแผนการรักษา รวมทั้งสูตรยาที่เลือกใช้ในผู้ป่วยในอนาคต
2. เป็นข้อมูลสำหรับใช้วางแผนในการศึกษาต่อไป เช่น การศึกษาแบบไปข้างหน้า (prospective study)

บทที่ 2

มะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ (Gastrointestinal Stromal Tumor or GIST)

มะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ เป็นมะเร็งของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่พบมากที่สุดในระบบทางเดินอาหาร ในสหรัฐอเมริกาพบอุบัติการณ์ของผู้ป่วยรายใหม่ 4,000-6,000 รายต่อปี คิดเป็นจำนวน 11-14.5 รายต่อประชากรล้านคนต่อปี [1] มีความแตกต่างกันระหว่างอุบัติการณ์ในสหรัฐอเมริกาและในยุโรป สำหรับในประเทศไทยยังไม่ทราบอุบัติการณ์การเกิดโรคเนื่องจากเป็นโรคที่พบน้อยและก่อนหน้านี้อาจจัดไว้ในกลุ่มของมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทางเดินอาหารประเภทอื่น เช่น leiomyoma , leiomyosarcoma โดยทั่วไปอุบัติการณ์พบน้อยกว่ามะเร็งทางเดินอาหารชนิดอื่นๆ คือ ประมาณ 0.1- 3% ของ มะเร็งระบบทางเดินอาหารทั้งหมด ก่อนหน้านี้การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดให้ผลการรักษาที่ไม่ดีเนื่องจากมะเร็งชนิดนี้มักดื้อยา แต่ในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาอย่างมากเกี่ยวกับพันธุกรรมและ โมเลกุล ทำให้ทราบพยาธิกำเนิดของโรคมกขึ้นว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนคิท ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโตที่ผิวเซลล์มะเร็ง (KIT receptor) และนำไปสู่การวินิจฉัย และการรักษาด้วยยาที่เฉพาะต่อโรคคือ imatinib ซึ่งเป็นยาที่เฉพาะต่อเซลล์มะเร็งตัวแรกๆที่ค้นพบ หลังจากที่ได้รับยาในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ ระยะแพร่กระจายพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตได้นานขึ้น และในปัจจุบันนี้มีการศึกษาวิจัยต่อเนื่องตามมาอีกมากมาย

ปัจจัยเสี่ยงและสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งยังไม่มีความชัดเจน แต่พบว่าผู้ที่ป่วยเป็นโรค Neurofibromatosis type I มีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะเกิดโรคนี้ โดยจากการศึกษาของประเทศสวีเดน รวบรวมข้อมูลผู้ป่วย Neurofibromatosis type I 70 รายพบอุบัติการณ์ 7% [2] ส่วนมากการย้อมพิเศษด้วยวิธีทางอิมมูโน ต่อ KIT พบการติดสีที่เข้ม หรือเป็นแบบ Multifocal [3, 4] รวมทั้งโรค Carney triad ซึ่งเป็นกลุ่มโรคที่มีอาการของ Gastrointestinal-Stromal Tumor, Paraganglioma และ Pulmonary Chondroma มักเกิดในผู้ป่วยเด็ก หรือผู้หญิงอายุน้อย [5] ส่วนมากไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *KIT* และ *PDGFRA* [6]

อาการและอาการแสดงของโรค

โรคนี้อาจมีความแตกต่างกันในเพศหญิงและชาย แต่มีบางรายงานพบโรคในเพศชายมากกว่า [7] 75% พบในผู้ที่อายุมากกว่า 50 ปี (อายุเฉลี่ย 58 ปี) ประมาณ 3% ที่พบในผู้ที่อายุน้อยกว่า 21 ปี โดยเฉพาะในเด็กพบน้อยมาก [6] สามารถพบได้ตลอดทางเดินอาหาร แต่ตำแหน่งที่

พบมาก คือ กระเพาะอาหาร 50% , ลำไส้เล็ก 25%, 10% พบที่ลำไส้ใหญ่และลำไส้ตรง [6, 8] นอกจากนี้ยังพบได้ที่หลอดอาหาร, Mesentery , Omentum , Retroperitoneum และ Pelvis แต่เป็นส่วนน้อย [9] อาการที่นำมาโรงพยาบาล มักไม่มีความเฉพาะเจาะจง ซึ่งขึ้นกับตำแหน่งของก้อน อาจมีอาการแน่นท้อง อาหารไม่ย่อย อ่อนเพลียจากภาวะซีด เลือดออกจากทางเดินอาหาร ลำไส้อุดตัน หรือ ในก้อนขนาดเล็กอาจไม่มีอาการแต่ตรวจพบด้วยความบังเอิญจากการส่องกล้อง แล้วพบว่ามีย้อนมะเร็งเติบโตเข้ามาใน mucosa ซึ่งพบประมาณ 20% นอกนั้น 10% ตรวจพบจากการผ่าตัดพิสูจน์ศพ [10] แต่ถ้าก้อนมีขนาดใหญ่อาจพบว่าเป็นแผลที่กระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็ก ทำให้มาตรวจด้วยอาการซีด เลือดออกจากทางเดินอาหาร โดยลักษณะดังกล่าวต้องแยกจากโรคแผลในกระเพาะ และมะเร็งกระเพาะอาหาร [11] บางครั้งก้อนโตออกทางด้านนอกผนังลำไส้ก็จะมาด้วยคลำได้ก้อนที่ในช่องท้อง ในรายที่ก้อนมีการเติบโตอย่างรวดเร็วจะกระจายไปที่ตับ หรือ ในช่องท้องได้ ส่วนมากมักไม่ค่อยกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลือง อาจพบการกระจายไปที่แผลผ่าตัดหน้าท้องหรือตามแนวรอยเข็มหลังจากเจาะ ตัดชิ้นเนื้อเพื่อวินิจฉัยโรค นอกจากนี้การกระจายไปนอกช่องท้อง เช่น ปอด , กระดูก ก็พบน้อยมากเช่นกัน แต่อาจพบได้ถ้าเป็น advance GIST [12, 13] แต่พบว่า ประมาณ 10-25% ของผู้ป่วยที่จะมาด้วยอาการของโรคลูกลาม [10] การวินิจฉัยอาศัยประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจทางรังสี เช่น Ultrasound, CT scan whole abdomenซึ่งมีลักษณะเฉพาะที่ช่วยวินิจฉัยแยกโรคได้ แต่การวินิจฉัยหลักที่สำคัญที่สุด คือ การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา และการติดสีย้อมพิเศษด้วยวิธีทางอิมมูโน KIT เนื่องจากในผู้ป่วยโรคนี้ เกือบ 90% มีการแสดงออกของตัวรับการเจริญเติบโต KIT

การวินิจฉัย

อาศัยประวัติ ตรวจร่างกาย และการตรวจทางรังสีวินิจฉัย เช่น เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ในช่องท้อง ช่องเชิงกราน โดยเฉพาะในรายที่มาด้วยก้อนในท้อง นอกจากนี้ยังสามารถบอกถึงการกระจายของก้อนมะเร็งได้ เนื่องจากการกระจายไปที่ปอดพบน้อยจึงไม่ได้แนะนำให้ทำเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ปอดทุกราย การใช้การตรวจด้วยคลื่นแม่เหล็กในช่องท้องให้รายละเอียดการกระจายของโรคในตับและเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ดีกว่าเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ สำหรับ Functional imaging FDG-PET scans ไม่แนะนำให้ตรวจในรายที่เป็นมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ระยะแรกและสามารถผ่าตัดได้แต่อาจมีประโยชน์ในการประเมินการตอบสนองการรักษา imatinib ต้องรอข้อมูลที่มากพอในการสนับสนุนการตรวจประเมินด้วยวิธีดังกล่าว เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายที่สูง [14]

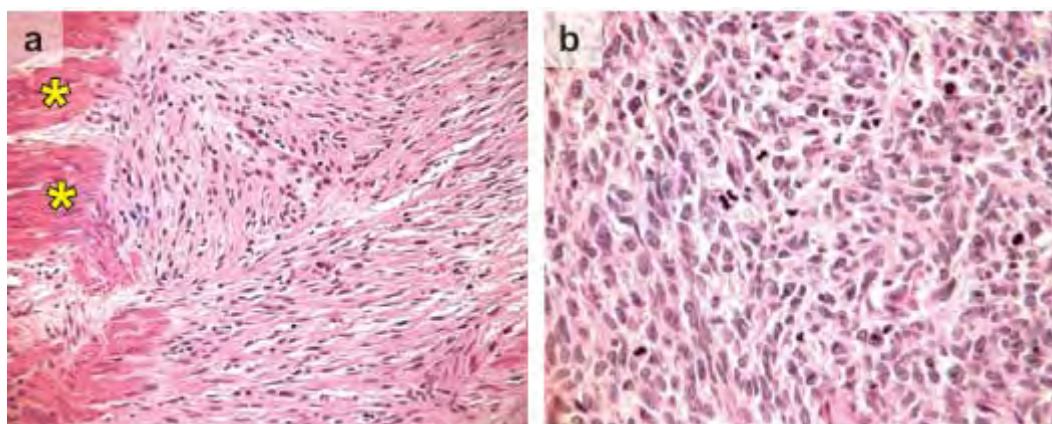
การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาก่อนการผ่าตัด ในรายที่เป็นผู้ป่วยระยะแรกสามารถผ่าตัดได้ ไม่แนะนำให้ทำเนื่องจากอาจทำให้ก้อนแตก หรือ เกิดการกระจายไปตามรอยเข็มที่ใช้ในการทำ

หัตถการได้ แต่ในรายที่เป็นระยะกระจายหรือผ่าตัดไม่ได้ การตัดชิ้นเนื้อตรวจ (FNA fine-needle aspiration และ Biopsy) ถือว่าเป็นการวินิจฉัยที่สำคัญก่อนเริ่มรักษาด้วยยาที่เฉพาะต่อโรค โดยเฉพาะการตัดชิ้นเนื้อ (Biopsy) และนำไปตรวจย้อมพิเศษทาง IHC เนื่องจากได้ปริมาณชิ้นเนื้อที่มากพอในการทำการตรวจพิเศษเพิ่ม

พยาธิวิทยา และพยาธิกำเนิด (Histopathology)

ขนาดของก้อนมะเร็งที่มีขนาดแตกต่างกัน อาจพบตั้งแต่ขนาดเล็ก 1-2 เซนติเมตร จนถึงขนาดใหญ่มากกว่า 20 เซนติเมตร ส่วนมากจะพบว่าก้อนมักมีขนาดประมาณ 5-8 เซนติเมตร [15] กลไกการเกิดโรคเกิดจากความผิดปกติของเซลล์คาฮาล (Interstitial cell of Cajal) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สำคัญในการควบคุมการบีบตัวของทางเดินอาหาร มักพบมากในชั้นกล้ามเนื้อตลอดทั้งทางเดินอาหาร ทำให้เกิดก้อนของมะเร็งได้ตลอดทั้งทางเดินอาหาร [16-18]

ลักษณะของก้อนมะเร็งเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า พบก้อนขอบเขตชัดเจน มีหลายสีตั้งแต่ สีชมพู, น้ำตาลแดง หรือเทาขาวขึ้นกับระดับการเกิดเลือดออกหรือเนื้อตาย บางครั้งอาจพบตำแหน่งเลือดออก, เนื้อตาย และ cystic degeneration ได้โดยเฉพาะในก้อนที่มีขนาดใหญ่ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สามารถแบ่งลักษณะที่พบ เป็น 3 แบบ คือ spindle cell ประมาณ 60-70%, epithelioid cell ประมาณ 20-30% และ mixed cell ประมาณ 10% [19, 20] ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสต์

a) Spindle cell

b) A Mixture of short spindle cell and Epithelioid cell

ก่อนหน้านี้จัดโรคนี้เป็นกลุ่มมะเร็งของกล้ามเนื้อเรียบของระบบทางเดินอาหาร เช่น Leiomyoma, Leiomyoblastoma เนื่องจากตรวจพบลักษณะทางพยาธิวิทยา และการติดสีที่แสดงต้นกำเนิดของกล้ามเนื้อเรียบ [21] ต่อมาตรวจพบว่าก้อนเนื้ออกติดสีเซลล์ต้นกำเนิดของระบบประสาทอัตโนมัติด้วยเช่นกัน ในระยะต่อมา ในปี 1990 พบว่าโรคนี้เซลล์ต้นกำเนิดคือ Cajal cell

(Interstitial cell of Cajal) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เป็นตัวควบคุมการบีบตัวของกระเพาะ และลำไส้ ที่อยู่ในชั้นผนังกล้ามเนื้อลำไส้ เซลล์นี้เป็นเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) สามารถเจริญเติบโตไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อเรียบและเซลล์ของระบบประสาทอัตโนมัติได้เมื่อย้อมพิเศษด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันด้วย KIT หรือ CD117 พบการติดสีภายในเซลล์หรือบริเวณผนังเซลล์ ได้ถึงเกือบ 95% [7, 10] นอกจากนี้ยังพบการติดสี CD34 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) ประมาณ 60-70% ,smooth muscle actin ประมาณ 30-40% ,S100 ประมาณ 5% มากกว่า 95% ที่พบผลเป็นลบ และ Desmin ประมาณ 1-2% [22, 23] การย้อมพิเศษวิธีทางภูมิคุ้มกันช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคมะเร็งของกล้ามเนื้อเรียบในระบบทางเดินอาหาร และ มะเร็งของประสาทอัตโนมัติในระบบทางเดินอาหารออกจากมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

	Histology	KIT	SMA	Desmin	S-100	CD34
GIST	Spindle cell or Epithelioid or mixed	+	+(30-40%)	+(1-2%)	+(5%)	+(60-70%)
Smooth muscle neoplasm	Spindle cell	-	+(most)	-	-	+(10-15%)
GI tract Schwannoma	Spindle cell	-	-	-	+	+
Desmoid fibromatosis	Spindle cell	-	+	+(rare)	+(rare)	+(few)

ตารางที่ 2.1 ลักษณะการย้อมพิเศษด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกัน ที่ช่วยวินิจฉัยแยกโรคที่มีผลการตรวจพยาธิวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์เป็นแบบ Spindle cell

ส่วนน้อยประมาณ 5% ของมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ที่จะตรวจไม่พบการย้อมติดสีของ KIT กลุ่มนี้มักจะเป็นกลุ่มที่ตรวจพบความผิดปกติที่ตำแหน่งอื่น เช่น PDGFRA ซึ่งยังมีการตอบสนองเมื่อรักษาด้วยยา imatinib [19] นอกจากนี้ยังอาจพบการติดสีของ protein kinase C-theta [24] ซึ่งมีการศึกษามากมายในระยะหลังเกี่ยวกับการใช้ยาที่เฉพาะต่อโรคนี้

ปัจจัยที่มีผลต่อการกลับเป็นซ้ำของโรค การลุกลาม การกระจายของโรค (Prognosis Factors)

ปัจจุบันนี้จัดว่าเนื้องอกของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์เป็นมะเร็ง ไม่ว่าจะขนาดหรือลักษณะทางพยาธิวิทยาที่แสดงออกของ Mitotic rate เป็นอย่างไร เนื่องจากส่วนมากหลังจากที่ผ่าตัดออกแล้ว มักมีการกลับเป็นซ้ำของโรคอีก Fletcher และคณะได้จัดความรุนแรงของ

โรคตามขนาดของก้อน และ Mitotic rate ออกเป็น 4 ระยะ [19] ดังแสดงในตารางที่ 2.2 พบว่ามากกว่า 50% ของผู้ป่วยในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงมีโอกาสกลับเป็นซ้ำในช่วง 10 ปีหลังจากที่เริ่มวินิจฉัยซึ่งส่วนมากกลับเป็นซ้ำใน 3 ปี เมื่อเทียบกับผู้ป่วยในกลุ่มที่มีความเสี่ยงน้อยและน้อยมาก มีโอกาสกลับเป็นซ้ำน้อยมาก คือ ประมาณน้อยกว่า 5% [11, 19]

Risk Category	Size	Mitotic count
Very low risk	< 2 cm.	<5/50 HPF
Low risk	2-5 cm.	<5/50 HPF
Intermediate risk	< 5 cm.	6-10/50 HPF
	5-10 cm.	<5/50 HPF
High risk	>10 cm.	Any Mitotic rate
	Any size	>10/50 HPF
	>5 cm.	>5/50 HPF

ตารางที่ 2.2 ตารางประเมินโอกาสกลับเป็นซ้ำของโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ หลังจากที่ได้รับรักษาด้วยวิธีการผ่าตัด (ปรับปรุงมาจากการศึกษาของ Flecher และคณะ ปี 2002) HPF = high power field.

มีการศึกษาอื่นหลังอีกมากมายที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยเรื่องก้อนและพยาธิวิทยาที่แสดงออกของ Mitotic rate กับการกลับเป็นซ้ำของโรคและเป็นที่มาของการรักษาเสริมหลังจากที่ผ่าตัดแล้ว (Adjuvant therapy) ก่อนหน้านี้มีวิจัยในประเทศสวีเดนโดย Nilsson และคณะ ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ในยุคก่อนที่จะมียารักษาเฉพาะ คือ imatinib จำนวน 1,500 ราย ติดตามผู้ป่วย 17 ปี พบว่าปัจจัยที่มีผลกับการพยากรณ์โรคคือ ขนาดของก้อนเนื้องอก และค่าพยาธิวิทยาที่แสดงออกของ Mitotic rate ซึ่งสัมพันธ์กับค่า Ki-67 (proliferative index) ที่บอกการแบ่งตัวของมะเร็ง โดยที่ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง, เพศ และลักษณะของชิ้นเนื้อพยาธิวิทยาที่ตรวจพบ เช่น spindle cell หรือ epithelioid cell ไม่มีผลต่อการพยากรณ์โรคเลย [10] แต่การศึกษาต่อมาพบว่าตำแหน่งของก้อนเนื้องอกก็มีผลต่อลักษณะความรุนแรงของโรคเช่นกัน โดยมะเร็งที่ตำแหน่งลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่, ลำไส้ตรง, mesentery และหลอดอาหาร มีการพยากรณ์โรคที่แยกว่าโรคที่กระเพาะอาหาร [11, 25, 26] ซึ่งได้จากการเก็บรวบรวมข้อมูลของ Miettinen และคณะ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 การแตกของก้อนทั้งก่อนในระหว่างการผ่าตัดก็เป็นอีก

ปัจจัยเสี่ยงหนึ่งที่ทำให้โรคกลับเป็นซ้ำ ซึ่งศัลยแพทย์มีบทบาทที่สำคัญในการช่วยทำให้โอกาสเกิดโรคซ้ำลดลง [27] นอกจากนี้ยังมีปัจจัยของลักษณะทางพยาธิวิทยาอื่นๆ เช่น ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของยีนคิท ,การพบการตายของเนื้องอก ฯลฯ ก็มีการศึกษาอย่างมากในการกลับเป็นซ้ำของโรครวมทั้งตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของยีนคิทที่ต่างกันมีผลต่อการตอบสนองของการรักษาด้วยยา imatinib ที่ต่างกัน เช่น การกลายพันธุ์แบบ deletion codon 557-558 ที่ exon 11 และการกลายพันธุ์ที่ exon 9 มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ซึ่งผู้วิจัยรวบรวมข้อมูลข้างต้นไว้ในบทที่ 4 และบทที่ 5

การเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม ก็มีการศึกษาอย่างมากถึงการพยากรณ์โรค โดยพบว่ากลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงจะพบลักษณะโครโมโซมที่ผิดปกติมากกว่า เช่น มีการเพิ่มขึ้นของโครโมโซม 5p, 8q, 17p, 20q และมีการหายไปของโครโมโซม 9p และ 13q [28-30] โรคที่เป็นระยะกระจายพบว่ามี ความผิดปกติของโครโมโซมมากกว่าโรคระยะแรกที่มีความเสี่ยงสูง การตรวจคัดกรองด้วยโครโมโซม อาจใช้เป็นตัวแบ่งกลุ่มของผู้ป่วยในงานวิจัยต่อไป

	Size	Risk of progressive disease (%)			
		Gastric	Duodenum	Jejunum or ileum	Rectum
Mitotic Index ≤ 5/50 HPF	≤2 cm.	0%	0%	0%	0%
	2-5 cm.	1.9%(very low)	4.3%(low)	8.3%(low)	8.5%(low)
	5-10 cm.	3.6%(low)	24%(moderate)	insig data	insig data
	>10 cm.	10%(moderate)	52%(high)	34%(high)	57%(high)
Mitotic index >5/50 HPF	≤2 cm.	None	None(high)	None	54%(high)
	2-5 cm.	16%(moderate)	73%(high)	50%(high)	52%(high)
	5-10 cm.	55%(high)	85%(high)	insig data	insig data
	>10 cm.	86%(high)	90%(high)	86%(high)	71%(high)

ตารางที่ 2.3 ข้อมูลสรุปผลการกลับเป็นซ้ำ และการกระจายหลังจากที่เฝ้าติดตามผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ ตำแหน่งกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น ส่วนกลาง และปลาย และลำไส้ใหญ่ ก่อนที่จะมีการใช้ยาเฉพาะต่อโรค imatinib, Insig data: Insignificant data

การรักษา

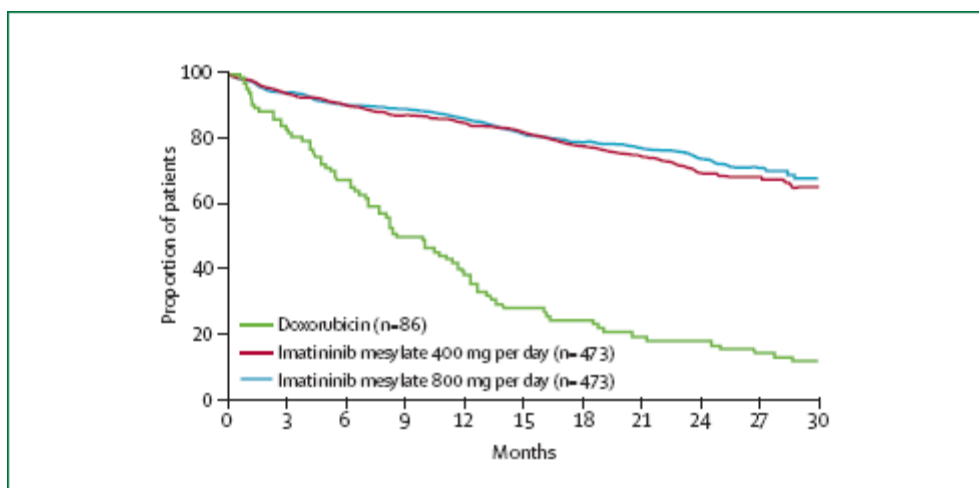
แบ่งมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ เป็น 3 ระยะดังนี้

1. ระยะแรกสามารถผ่าตัดได้ (localized resectable disease)
2. ระยะที่ยังไม่ลุกลามแต่ผ่าตัดไม่ได้ (localized unresectable disease)
3. ระยะที่มีการกระจาย (metastasis disease)

การรักษาหลักคือ การผ่าตัด โดยเฉพาะในรายที่เป็นระยะแรกสามารถผ่าตัดได้ (localized resectable disease) หลังผ่าตัดมีโอกาสหายขาดได้ในกลุ่ม low หรือ intermediate เทคนิคของการผ่าตัด คือ ต้องผ่าตัดก้อนออกให้หมด ระวังการแตกของก้อนทั้งก่อนและระหว่างการผ่าตัด ต้องตรวจเยื่อหุ้มช่องท้องและตับเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการกระจายได้บ่อย การรักษาด้วยการผ่าตัดพบว่าอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีในผู้ป่วยโรคนี้นี้ ประมาณ 28-80% [31-34] ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่โรคกลับเป็นซ้ำ ประมาณ 2 ปี จากการศึกษาพบว่าถ้าผ่าตัดหมดมีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีดีกว่าการผ่าตัดไม่หมด และการที่มีการแตกของก้อนมะเร็ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [27] ดังนั้นแพทย์ศัลยกรรมจึงมีบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย GIST ซึ่งแนวทางการรักษาด้วยการผ่าตัดตาม National Comprehensive Cancer Network (NCCN) แนะนำว่า ควรผ่าตัดก้อนออกให้หมด (complete gross resection), Enbloc resection มักทำในกรณีที่เกิดโรคกลับเป็นซ้ำ , ผ่าตัดจนไม่มีขอบที่มีชิ้นเนื้อมะเร็งเหลืออยู่, ไม่จำเป็นต้องเลาะต่อมน้ำเหลือง ปัจจุบันการผ่าตัดแบบใช้กล้อง (laparoscopic surgery) เป็นที่นิยม เนื่องจากภาวะแทรกซ้อนหลังผ่าตัดน้อยกว่า National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ได้แนะนำว่าการผ่าตัดดังกล่าวใช้ใน GIST ได้โดยเฉพาะก้อนที่มีขนาดเล็ก น้อยกว่า 5 เซนติเมตร และศัลยแพทย์ประเมินแล้วว่าสามารถผ่าตัดออกได้หมด แต่จำเป็นต้องใช้ extraction bag ระหว่างการผ่าตัดเพื่อป้องกันการแตกของก้อนเนื้องอกและช่วยลดโอกาสกลับเป็นซ้ำตำแหน่งที่เอาก้อนมะเร็งออกร่วมด้วย [11, 35] แม้ว่าจะในปัจจุบันยังไม่มีผลการศึกษาในระยะยาวที่สรุปถึงข้อดีของการผ่าตัดโดยใช้กล้องก็ตาม นอกจากนี้การผ่าตัดยังมีประโยชน์ในรายที่มีภาวะแทรกซ้อน เช่น เลือดออกจากทางเดินอาหาร การติดเชื้อ ทั้งก่อนการรักษาและหลังการรักษาด้วยยาเฉพาะ imatinib

สำหรับโรคระยะที่มีการกระจาย (metastasis disease) 10 ปีก่อนหน้าที่จะมีการค้นพบยารักษาเฉพาะ อัตราการอยู่รอดน้อยมาก มีค่ามัธยฐานประมาณ 19 เดือน เนื่องจากการโรคนี้มักไม่ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดและการฉายแสงซึ่งเป็นการรักษาหลักในระยะกระจายในช่วงนั้น แต่หลังจากที่มีการใช้ยา imatinib ซึ่งเริ่มแรกศึกษาและนำมาใช้อย่างแพร่หลายในโรค chronic myeloid leukemia เพราะยาสามารถยับยั้ง Bcr- Abl ได้ [36-38] พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอัตราอยู่รอดนานถึง 57 เดือน จากผลการศึกษา B2222 ของ Demetri และคณะ ซึ่งเป็นการศึกษาแรก

Phase II โดยเปรียบเทียบการใช้ยา imatinib 400 มิลลิกรัมต่อวัน ใน Metastasis หรือ unresectable GIST ประสิทธิภาพของยา imatinib ในขนาดมาตรฐาน 400 มิลลิกรัมต่อวัน สามารถให้ผลการตอบสนองประมาณ 60-70 % และมีระยะเวลาที่การรักษาคงประสิทธิภาพ (time to treatment failure, TTF) ประมาณ 84 สัปดาห์ ซึ่งนับเป็นจุดเปลี่ยนอันหนึ่งของยุคการรักษา มะเร็งต่าง ๆ ด้วย targeted therapy [39] จากข้อมูลนี้จึงมีการรับรองใช้ยานี้ในอเมริกาตั้งแต่ กุมภาพันธ์ ปี พ.ศ.2545 นอกจากนี้ยังมีการศึกษา Phase III ของ EORTC 62005 และ US Intergroup S0033 ซึ่งเปรียบเทียบการใช้ยา imatinib ขนาด 400 และ 800 มิลลิกรัมต่อวันใน Metastasis หรือ unresectable GIST พบว่าทั้งสองกลุ่ม ให้ผลการตอบสนองประมาณ 50%, การกลับเป็นซ้ำของโรค 18 และ 20 เดือน และค่ามัธยฐานอัตราการรอดชีวิต 55 และ 51 เดือน ใกล้เคียงกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในกลุ่มที่โรคลุกลามหลังจากที่ได้ imatinib 400 มิลลิกรัมต่อวัน เมื่อเพิ่มขนาดยาเป็น 800 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่าประมาณ 30% ยังสามารถควบคุมโรคได้ โดยมีระยะเวลาที่การรักษาคงประสิทธิภาพ (time to treatment failure, TTF) ประมาณ 3 เดือน [40-42] ในกลุ่มที่ได้ยาขนาด 400 มิลลิกรัมต่อวัน มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ในระหว่างการใช้ยา (secondary resistance) มากกว่า [43] ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดง ระยะเวลาการรอดชีวิตหลังจากรักษาด้วยยา imatinib ขนาด 400 และ 800 มิลลิกรัมต่อวัน เทียบกับการรักษาดั้งเดิม จากการศึกษา EORTC 62005

ผลข้างเคียงของยา imatinib พบได้น้อย และอยู่ในระดับที่ไม่รุนแรง เช่น บวม คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยตามตัว ผื่นคัน และยังทำให้เม็ดเลือดขาวต่ำ ซีดีได้ ซึ่งผลข้างเคียงดังกล่าวจะพบมากในการใช้ยาที่มีขนาดสูง 600 หรือ 800 มิลลิกรัมต่อวัน เปรียบเทียบกับขนาด 400 มิลลิกรัมต่อวัน

มีการศึกษาต่อเนื่องว่าเราควรจะใช้ยาไประยะเวลาานานเท่าใด มีการศึกษาของฝรั่งเศส โดย Le Cesne และคณะ หลังจากที่ได้ยา imatinib นาน 1 ปีแล้วเทียบระหว่างการให้ยาต่อเนื่องกับการหยุดยา พบว่า ในกลุ่มที่หยุดยามีโรคกลับมา 65% เทียบกับ 15% และเมื่อกลับมาเริ่มให้ยาอีกครั้ง พบว่ายังมีการตอบสนองต่อการรักษาอยู่ [44] นอกจากนี้ Blay และคณะ ก็ทำการ ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้ยาต่อเนื่อง, กลุ่มที่ได้ยานาน 12 เดือนแล้วหยุดยา และกลุ่มที่ได้ยานาน 36 เดือนแล้วหยุดยาโดยผู้ป่วยต้องตอบสนองดีต่อยา imatinib ในการศึกษา BFR14 พบว่ากลุ่มที่หยุดยาทั้งสองกลุ่ม มีอัตราการกลับเป็นซ้ำของโรคที่เร็วกว่ากลุ่มที่ได้ยาต่อเนื่อง คือ 6 เดือนเทียบกับ 18 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ โดยทั้งสองกลุ่มที่หยุดยาไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องอัตราการกลับเป็นซ้ำของโรคสำหรับอัตราการรอดชีวิต หลังจากติดตาม 2 ปีพบว่าทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกัน คงต้องรอดติดตามผลการรักษาต่อไป [45]

จากประสิทธิภาพของ imatinib ในการรักษา GIST ระยะลุกลามหรือแพร่กระจาย ทำให้เกิดความคิดที่จะนำเอา imatinib มาใช้เพื่อการรักษาเสริมสำหรับ GIST ที่ได้รับการผ่าตัดออกแล้ว จากข้อมูลผลการรักษาในอดีตพบว่า แม้ว่าจะได้รับการผ่าตัดที่เหมาะสมแล้ว ผู้ป่วย GIST ยังมีโรคกลับมาได้สูง โดยมีค่ามัธยฐานของเวลาที่กลับมาเป็นซ้ำของโรค (median time to recurrence) ที่ประมาณ 1.5-2 ปี [46] ในผู้ป่วยบางรายที่ความเสี่ยงในการกลับเป็นซ้ำ การให้ยาเพื่อรักษาเสริม อาจเป็นทางเลือกสำหรับผู้ป่วย ปัจจุบันมีรายงานผลการรักษาทางคลินิกเกี่ยวกับการให้ยา imatinib ในการรักษาเสริม GIST หลังการผ่าตัด รายงาน The American College of Surgeons and Oncology Group (ACOSOG) ได้ทำการศึกษา phase II ACOSOG Z9000 โดยคัดเลือกเฉพาะผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการกลับเป็นซ้ำสูง (high risk for recurrence) ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนใหญ่กว่าหรือเท่ากับ 10 ซม. มีการแตกของก้อน หรือมีการกระจายไปที่เยื่อช่องท้องไม่เกิน 5 จุด โดยผู้ป่วยต้องได้รับการผ่าตัดเอาก่อนที่มองเห็นด้วยตาเปล่าได้หมด จำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษานี้รวม 106 ราย ผู้เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับ imatinib ในขนาด 400 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นระยะเวลา 1 ปีภายหลังจากการผ่าตัด และทั้งหมดเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น GIST ที่มีผลการตรวจหา KIT เป็นบวก De Matteo ได้รายงานผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า อัตราการรอดชีวิตที่ 1, 2, และ 3 ปี คือ 99%, 97%, และ 97% ตามลำดับ และมีอัตราปลอดการกลับเป็นซ้ำของโรค (relapse free survival, RFS) เท่ากับ 94%, 73%, และ 61% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่ารายงานผู้ป่วยในอดีตที่ผ่านมา และการให้ยา imatinib เพื่อรักษาเสริมมีความปลอดภัยสูง มีเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ (adverse event) ระดับ III น้อยกว่า 20% [47]

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาใน Phase III โดย ACOSOG เช่นเดียวกัน ที่มีชื่อย่อว่า ACOSOG Z9001 โดยคัดเลือกผู้ป่วย GIST ที่มีก้อนขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ซม. และได้รับการ

ผ่าตัดเอาก้อนออกหมดเท่าที่เห็นด้วยตาเปล่า นำมาสุ่มเลือกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกจะได้รับ imatinib ในขนาด 400 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นระยะเวลา 1 ปี เทียบกับกลุ่มที่สองที่ได้รับ placebo มีจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาจำนวน 708 ราย และการศึกษามีเป้าหมายหลักเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของ RFS ระหว่างกลุ่ม imatinib กับกลุ่มควบคุม การศึกษาเริ่มต้นในปี 2002 หลังจากการศึกษาผ่านไปได้ระยะแรก โดยคำมีฤษฎฐานของเวลาที่ติดตามผู้ป่วยเป็นเวลา 1.2 ปี การศึกษาได้ถูกแนะนำให้หยุดการศึกษาในเดือนเมษายน 2007 เนื่องจากผลการศึกษาค่อนข้างชัดเจนว่าการให้ imatinib รักษาเสริม สามารถเพิ่ม relapse free survival (RFS) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในระยะยาวโดยเฉพาะผลต่ออัตราการรอดชีวิต (overall survival, OS) ยังคงต้องติดตามต่อไป [48] แม้ว่าประสิทธิภาพในการเพิ่ม RFS ของการรักษาเสริมด้วย imatinib จะมีความชัดเจน แต่การที่จะนำการรักษาเสริมมาใช้ในทางคลินิกยังไม่มี ความชัดเจนว่าควรจะใช้ได้หรือไม่ และควรเลือกใช้ในกลุ่มใด ปัญหาที่สำคัญคือ การที่มี RFS ที่ดีกว่า ไม่ได้หมายความว่าผู้ป่วยเหล่านั้นจะมี overall survival ที่ดีกว่า ในเบื้องต้นนี้จะเห็นว่าผู้ป่วยทั้งที่ได้รับการรักษาเสริมหรือได้รับ imatinib หลังจากที่มีโรคกลับเป็นซ้ำแล้ว อาจไม่มีความแตกต่างของ overall survival ดังเห็นได้จากผลเบื้องต้นของการศึกษา Z9001 ข้อพิจารณาอีกประการหนึ่งที่สำคัญคือ เนื่องจากยาที่ใช้ในการรักษามีราคาสูง ในทางปฏิบัติแพทย์คงไม่สามารถให้การรักษาเสริมให้กับผู้ป่วยทุกรายเท่าเทียมกันได้

ในผู้ป่วยระยะที่มีการกระจาย (metastasis disease) ที่หลังจากรักษาด้วยยา imatinib แล้วก่อนมีขนาดโตกว่าเดิม (progressive disease) แบ่งการดื้อยาเป็น 2 แบบคือ ดื้อตั้งแต่ให้ยาก่อน 6 เดือน (primary resistance) ไม่พบการตอบสนองของการรักษาด้วยยา imatinib เลย และการดื้อหลังจากที่รักษาด้วยยามากกว่า 6 เดือน (secondary resistance) มีการตอบสนองของการรักษาด้วยยาในช่วงแรกต่อมาโรคลุกลามมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นเฉพาะบางตำแหน่ง (limited progression disease) หรือลุกลามทั่วๆ (generalized progression disease) แนวทางการรักษาทั่วไปคือ ประเมินทั้งตัวโรคและสภาพของผู้ป่วยก่อนว่าสามารถผ่าตัดก้อนมะเร็งทั้งหมดหรือผ่าตัดเฉพาะตำแหน่งที่สงสัยว่ามีการดื้อยาได้หรือไม่ ถ้าผ่าตัดได้แนะนำให้ทำก่อนโดยเฉพาะในรายที่เป็น limited progression disease เนื่องจากพบว่า การผ่าตัดในกลุ่มดังกล่าวสามารถช่วยเพิ่มระยะเวลาการรอดชีวิตได้ แต่จะเห็นผลน้อยในรายที่เป็น generalized progression disease ในกรณีนี้ มีทางในการพิจารณาการรักษาหลายแนวทาง ในรายที่โรคดื้อการรักษาด้วย imatinib และลุกลามไม่มากอาจคงการรักษาด้วยยาขนาดเท่าเดิมก่อนแล้วประเมินซ้ำภายในเวลา 2-3 เดือน , อาจเพิ่มขนาดยา imatinib เป็น 800 มิลลิกรัมต่อวัน หรือเปลี่ยนไปใช้ยาตัวที่สองคือ sunitinib malate ซึ่งเป็นยาที่เฉพาะต่อตัวรับการเจริญเติบโต KIT และยังคงเฉพาะต่อตัวรับการเจริญเติบโตของหลอดเลือด

VEGF ด้วย จากการศึกษาระยะ Phase III ในผู้ป่วยที่โรคคุดกามหลังจากที่ได้รับยา imatinib เปรียบเทียบระหว่างการใช้ยา sunitinib 50 มิลลิกรัมต่อวัน เทียบกับยาหลอก พบว่าสามารถเพิ่มค่ามัธยฐานของระยะเวลาที่โรคคุดกามจาก 6.4 อาทิตย์ เป็น 27.3 อาทิตย์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีผลการตอบสนองของโรค 6.8% (partial response) ส่วนมากจะควบคุมโรคให้ไม่โตมากขึ้น 17.4% (stable disease) [49] จากข้อมูลดังกล่าวในมกราคม ปี พ.ศ. 2549 จึงมีการรับรองการใช้ยาตัวดังกล่าวในอเมริกาในผู้ป่วยที่มีการคุดกามหลังจากที่ได้รับยา imatinib หรือ ไม่สามารถทนต่อผลข้างเคียงของ imatinib ได้

ในกลุ่มที่เป็นโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ แต่ไม่มีการแสดงออกของ KIT พบว่า 33% เป็นกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน PDGFRA ซึ่งการรักษาด้วยยา imatinib ยังพบการตอบสนองที่ดี [50] ดังนั้นในผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นโรคนี้แต่ไม่มีการแสดงออกของ KIT จึงแนะนำว่าควรทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ยีนดังกล่าวร่วมด้วยเพื่อประโยชน์ในการรักษา

การประเมินผลการรักษา

หลังจากที่รักษาด้วยยา imatinib จะพบว่ามีการตอบสนองอาการทั่วไปดีขึ้นเป็นลำดับแรก แต่ถ้าประเมินจาก PET/CT scan จะพบว่ามีการลดลงของความหนาแน่นของก้อน (functional activity) อย่างรวดเร็วภายในเวลา 8 วัน [51] ซึ่งแสดงผลเร็วกว่าเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถประเมินได้ทั้งขนาดของก้อนและ functional activity จากการศึกษาระยะเปรียบเทียบการตอบสนองของยาโดยใช้ PET/CT เทียบกับ เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ปกติ พบว่า การใช้ PET/CT สามารถบอกการตอบสนองของเนื้องอกที่ 1 เดือนหลังจากรักษาได้ 95% เทียบกับ 44% ถ้าประเมินด้วยการทำ เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ปกติ [52] อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการประเมินด้วย PET/CT มีค่าใช้จ่ายที่สูง และไม่ได้มีบริการในทุกสถานที่ จึงยังไม่แนะนำให้ใช้ในการติดตามการรักษา

โดยทั่วไปแพทย์มักรอประมาณ 2-3 เดือนหลังการรักษา จึงจะทำการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ในช่องท้องซ้ำ ประเมินโดยดูที่ขนาดของก้อน ตาม RECIST criteria จากหลายการศึกษาพบว่าในรายที่รักษาด้วยยา imatinib อาจมีขนาดของก้อนโตขึ้นแต่ก้อนเนื้อเปลี่ยนเป็นก้อนที่มีน้ำมากกว่าเดิมก็ถือได้ว่าการตอบสนองต่อการรักษา ดังนั้นจึงมีการปรับเปลี่ยนการประเมินใหม่เป็น Choi Response Criteria ซึ่งจะประเมินทั้งขนาดของก้อนมะเร็งและความหนาแน่นของก้อนมะเร็ง (tumor density) ร่วมกัน แตกต่างจาก RECIST Criteria ที่จะประเมินแต่ขนาดของก้อนอย่างเดียว โดยถือว่าการรักษาที่มีการตอบสนองบางส่วน (partial response) เมื่อความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางก้อนลดลงอย่างน้อย 10% ร่วมกับมีการลดลงของความหนาแน่นของก้อนอย่างน้อย 15% เนื่องจากมีการนำข้อมูลของทั้งสองวิธีมาเทียบกันแล้วพบว่า การใช้ Choi

Response Criteria มีค่าที่สัมพันธ์กับการใช้ PET/CT ในการประเมินการตอบสนองของยา มากกว่าการใช้ RECIST Criteria และยังมีค่าสัมพันธ์กับระยะเวลาที่โรคลุกลามและระยะเวลาการรอดชีวิต วิธีนี้สามารถประเมินโรคที่ลุกลามได้ดีกว่าวิธีเดิม ประมาณ 5 เดือน [53] ระยะต่อมาจึงนำไปใช้ในการประเมินการตอบสนองในงานวิจัยของโรคนี้มากขึ้น สำหรับการประเมินว่าโรคลุกลามเพิ่มขึ้น ข้อมูลที่สำคัญ คือ การพบก้อนเนื้ออกในบริเวณของก้อนเนื้ออกเดิมที่เคยรักษาด้วยยา imatinib แล้วหายไป ซึ่งมักพบในผู้ป่วยที่มีโรคลุกลามมากกว่า 50%

การประเมินด้วยวิธี Choi Response Criteria

1. complete response คือ มีการหายไปของรอยโรคทั้งหมดที่เคยมีอยู่ และไม่มีรอยโรคใหม่เกิดขึ้น
2. partial response คือ มีการลดลงของขนาดของรอยโรคที่วัดการตอบสนองได้ (measurable lesions) ทั้งหมดรวมกันมากกว่าร้อยละ 10 โดยใช้ความกว้างของเนื้ออกในแกนที่ยาวที่สุด (longest diameter) หรือ มีการลดลงของความหนาแน่นของก้อน (Hounsfield unit, HU) มากกว่าร้อยละ 15 โดยประเมินจากเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ และไม่มีรอยโรคใหม่เกิดขึ้น รวมทั้งไม่มีการโตขึ้นของรอยโรคที่ไม่สามารถวัดการตอบสนองได้
3. stable disease คือ กรณีที่ไม่เข้ากับเกณฑ์ของ partial response และ progressive disease
4. progressive disease คือ มีการเพิ่มขึ้นของขนาดของรอยโรคที่วัดการตอบสนองได้ (measurable lesions) ทั้งหมดรวมกันมากกว่าร้อยละ 10 และ เข้าไม่ได้กับเกณฑ์ partial response ในการวัดความหนาแน่นของก้อน (Hounsfield unit, HU) หรือมีรอยโรคใหม่เกิดขึ้น หรือ การพบก้อนเนื้ออกในบริเวณของก้อนเนื้ออกเดิมที่เคยรักษาด้วยยา imatinib แล้วหายไป

บทที่ 3 ยีนคิท

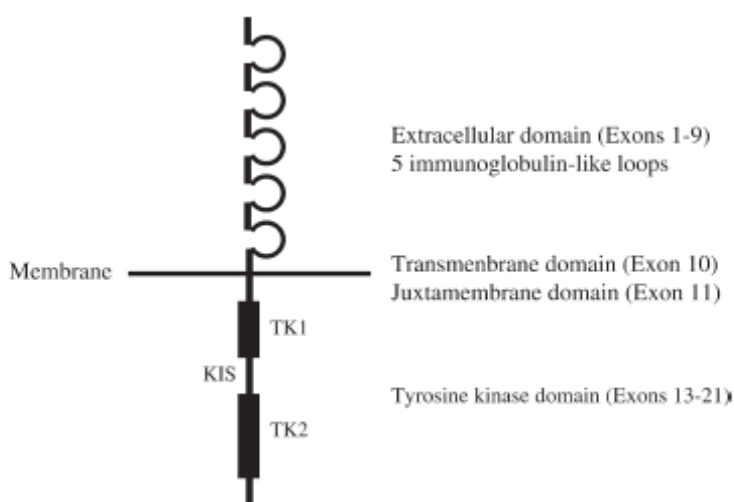
KIT เป็นตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโตที่ผิวเซลล์ (Receptor Tyrosine Kinase, RTK) พบได้ในเซลล์หลายประเภททั้งเซลล์คาฮาล (Cajal cell) ที่พบในทางเดินอาหาร, mast cell และเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือด, germ cell และ melanocyte การกลายพันธุ์ของยีนคิทมีผลให้เกิดความผิดปกติมากมาย ถ้าการกลายพันธุ์นั้นทำให้การทำงานของยีนคิทลดลงจะทำให้เซลล์ที่กล่าวมาทำหน้าที่ลดลง เช่น เกิดภาวะซีดจาก macrocytic anemia, ภาวะเป็นหมัน (Sterility), การทำงานของเซลล์สีผิวลดลง ในกรณีกลับกันถ้าการกลายพันธุ์นั้นทำให้การทำงานของยีนมากขึ้นจะเกิดเป็นเนื้องอกของเซลล์ดังกล่าวได้ เช่น มะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์, เนื้องอกของ mast cell และ germ cell การค้นพบยาที่ออกฤทธิ์ต้านการทำงานของ KIT receptor จัดเป็นการศึกษาแรกในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ในระยะกระจายที่พบว่ายาดังกล่าวมีประสิทธิภาพที่ดีมาก จึงได้มีการวิจัยนำยาไปทดลองใช้ในโรคอื่นๆที่มีพยาธิกำเนิดจากความผิดปกติของการยีนคิทมากมาย ซึ่งผลการวิจัยที่ได้แตกต่างกัน

ประวัติและที่มา

KIT ค้นพบครั้งแรกในปีค.ศ.1986 โดย Besmer และคณะ ซึ่งแยกยีนก่อนมะเร็งจาก Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma virus เราเรียกยีนนี้ว่า *v-KIT* [54] ส่วน *c-KIT* พบจากสารพันธุกรรมในแมวที่เป็นโรค fibrosarcoma ซึ่งเป็นยีนที่มีลักษณะคล้ายกับที่พบโดย Besmer สำหรับ KIT ที่เรียกนั้นมาจาก *c-KIT* โดยเป็นทั้งชื่อของยีนคิท และโปรตีนคิท stem cell factor หรือ mast cell growth factor เป็นสัญญาณที่มากกระตุ้นบริเวณผิวเซลล์ (KIT ligand) โดยสร้างมาจาก fibroblast และ mast cell

ในมนุษย์ ยีนคิท อยู่บนโครโมโซมแขนยาวคู่ที่ 4 (4q12) ตำแหน่งใกล้เคียงกับ ยีน *PDGFRA* แต่สำหรับใน mouse พบว่ายีนคิทอยู่บน โครโมโซมคู่ที่ 5 เป็นตำแหน่งของ white-spotting (W) locus, ยีนคิทมีสารพันธุกรรมประมาณ 89 kB ทั้งหมด 21 exon, [55, 56] มี KIT cDNA 3.5 kB ส่วน KIT protein มีขนาด 145 kD จัดเป็นตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโตที่ผิวเซลล์ชนิดที่ 3 อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *PDGFRA/B*, *FLT3* และ *GM-CSF* ประกอบด้วย ตัวรับสัญญาณนอกเซลล์ (extracellular domain) และส่วนภายในเซลล์ tyrosine kinase domain ตัวรับสัญญาณนอกเซลล์ประกอบด้วย 5 immunoglobulin-like loops เป็นตำแหน่งของ exon 1-9, ส่วนที่อยู่ที่เซลล์เมมเบรน (transmembrane domain) เป็นตำแหน่งของ exon 10, ส่วนในเซลล์ที่ต่อมาจากเซลล์เมมเบรน (juxtamembrane domain) เป็นตำแหน่งของ exon

11, และภายในเซลล์ tyrosine kinase domain โดยแบ่งเป็นสองส่วน เป็นตำแหน่งของ exon 13-21 , ตำแหน่งที่ 2 ของ immunoglobulin-like loops เป็นบริเวณที่จับกับสัญญาณที่มากระตุ้นบริเวณผิวเซลล์ได้ดีที่สุด ตำแหน่งของ juxtamembrane domain เป็นบริเวณที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของกระบวนการ tyrosine phosphorylation [57] โดยทั่วไปเมื่อมีสัญญาณ คือ stem cell factor มากระตุ้นบริเวณผิวเซลล์จะเกิดการจับคู่ของตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโตที่ผิวเซลล์ (dimerization) แล้วส่งสัญญาณต่อไปภายในเซลล์เป็นลำดับขั้น ผลสุดท้ายทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเจริญเติบโต การเคลื่อนไหว ควบคุมกลไกการตายของเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบของตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโต KIT

การกลายพันธุ์ของยีนคิทที่ทำงานมากขึ้น (*KIT* activating Mutation)

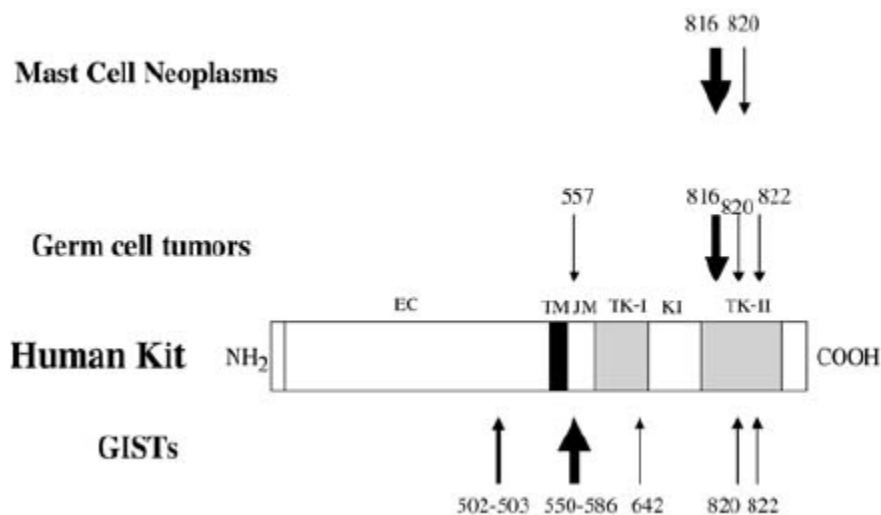
เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีนคิท ที่เป็นแบบที่ทำให้การทำงานของยีนมากขึ้น ส่วนมากเกิดจากการที่ตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโตที่ผิวเซลล์ทำงานส่งต่อสัญญาณเองโดยไม่ต้องมีสัญญาณมากระตุ้น (Autophosphorylation) ส่วนมากจะพบการกลายพันธุ์แบบ point mutation, in-frame deletion, internal tandem duplication หรือการกลายพันธุ์รวมกันหลายแบบ โดยมักจะพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง juxtamembrane domain exon 11, tyrosine kinase domain2 exon 17 ส่วนน้อยพบการกลายพันธุ์ที่ extracellular domain exon 2,8,9 และ tyrosine kinase domain I exon 13,14 มักพบว่าโรคแต่ละชนิดจะมีการกลายพันธุ์ของยีนคิทเพียงแบบเดียวโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ยังไม่เคยได้รับการรักษา มีการศึกษาบางรายงานที่พบว่าอาจเกิดการกลายพันธุ์ของยีนคิทหลายแบบ [58]

การแสดงออกของคิท และ เซลล์ต่างๆ

จากการศึกษาพบว่าเราสามารถพบการแสดงออกของคิทจากการย้อมพิเศษทางอิมมูโนได้ ในเซลล์หลายชนิด เช่น mast cell, germ cell, melanocyte, Cajal cell, เซลล์เยื่อบุผิวของท่ออาหาร, เซลล์เยื่อบุผิวของต่อมเหงื่อ, เซลล์ประสาทโดยเฉพาะสมองเล็ก (cerebellum) แต่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบและ lymphoid cell จะย้อมไม่ติดสี KIT [59-61]

การแสดงออกของคิทและเซลล์ประสาทในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์

เซลล์ประสาท เป็นเซลล์ของกล้ามเนื้อเกี่ยวพันที่มีลักษณะรูปร่าง (spindle cell) พบมากที่ชั้นกล้ามเนื้อบริเวณ myenteric plexus ตั้งแต่หลอดอาหารไปจนถึงทวารหนัก เซลล์นี้พบครั้งแรกโดยชาวสเปน Ramon Y Cajal จากการย้อมสีด้วย silver การขาด KIT ในสัตว์ทดลองพบว่าทำให้เกิดการบีบตัวที่ผิดปกติของลำไส้ สำหรับในโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ส่วนมากจะตรวจพบที่มีการแสดงออกของคิทโดยไม่ขึ้นกับตำแหน่งของก้อนมะเร็ง พบว่าถ้าลักษณะทางพยาธิวิทยาเป็นแบบ spindle cell มักจะพบการติดสีทั่วๆไปในเซลล์หรือติดที่ผิวเซลล์ ซึ่งแตกต่างจากแบบ epithelioid cell ที่จะติดเป็นจุดๆ ไม่ทั่วทั้งเซลล์ ในมะเร็งชนิดนี้พบว่ามีส่วนน้อยประมาณ 5-7% ที่ไม่พบการแสดงออกของคิท การกลายพันธุ์ของคิทในโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ส่วนมาก 60-70% เป็นการกลายพันธุ์ของยีนคิทที่ทำงานมากขึ้น (KIT activating mutation) โดยเฉพาะการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง exon 11 ลักษณะที่พบคือ in-frame deletion ตำแหน่ง codon 557-560, point mutation และ internal tandem duplication [62, 63] โดยพบว่าการกลายพันธุ์แบบ deletion มีการดำเนินโรคที่รุนแรงกว่าแบบ point mutation สำหรับการกลายพันธุ์ที่ exon 9 มักเป็นแบบ insertion, duplication [63, 64] การกลายพันธุ์ที่ exon 13 และ 17 ก็พบได้แต่ไม่บ่อย ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนคิทในมะเร็งจีสท์, germ cell tumor และ mast cell neoplasm , EC= extracellular domain, TM= transmembrane domain, JM=juxtamembrane domain, TK=tyrosine kinase domain, ตัวเลข แสดง codon ที่มีการกลายพันธุ์ , ความเข้มของลูกศร คือ ความถี่ที่ตรวจพบว่ามี การกลายพันธุ์

ยา imatinib เป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโตของผิวเซลล์ KIT receptor และ PDGFRA/B ซึ่งเป็นกลไกการเกิดโรคที่พบในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ จากการศึกษามากมายพบว่าการตอบสนองของยาดีที่สุดในแง่ของอัตรามีการกลายพันธุ์ที่ exon 11 ตอบสนองปานกลางถ้าเกิดกลายพันธุ์ที่ exon 9 และตอบสนองน้อยถ้าเกิดการกลายพันธุ์ที่ exon 17 เนื่องจากจะพบการดื้อยาแบบปฐมภูมิ ที่ตำแหน่งดังกล่าว [65] สำหรับการดื้อยาแบบทุติยภูมิมักพบเป็นปีหลังจากที่ได้รับยา เกิดได้จากหลายกลไก

การแสดงออกของคิทและมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันประเภทอื่น

รายงานที่พบว่า KITเป็นบวก ส่วนมากเป็นรายงานของ angiosarcoma และ Ewing sarcoma ส่วนโรคอื่นๆเช่น synovial sarcoma, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma มักมีรายงานแตกต่างกัน [66-69] และพบว่าไม่ค่อยตอบสนองด้วยการรักษาด้วยยา imatinib เนื่องจากไม่ค่อยพบการกลายพันธุ์ในมะเร็งดังกล่าว

การแสดงออกของคิทในเซลล์ melanocyte และ malignant melanoma

การแสดงออกของคิทในเซลล์ melanocyte สำคัญในการเจริญเติบโต การทำงานที่น้อยกว่าปกติของยีนคิท ในมนุษย์ทำให้เกิดสีผิวที่ผิดปกติ จากการรวบรวมข้อมูลพบว่า มี 3 รายงานขนาดใหญ่ที่พบ KIT เป็นบวกในมะเร็งผิวหนังชนิด melanoma ประเภท uveal type ประมาณ 64-88% โดยเฉพาะตำแหน่งที่มีการกระจายจะพบการติดสีคิทมากกว่าปกติ [70-72] มีการทดลองการใช้ยาใน melanoma cell line บางการศึกษาพบว่าได้ผลดี แต่การใช้ยา imatinib ในการรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้พบว่าข้อมูลไม่แน่ชัด

การแสดงออกของคิทใน Germ cell และ Germ cell tumor

ในสัตว์ทดลองพบว่าคิทมีความสำคัญในการพัฒนา การย้ายที่ การเจริญเติบโตของ germ cell และภาวะเป็นหมันจะพบในสัตว์ที่มีการทำงานของยีนคิทน้อยลง ในมนุษย์พบว่าในผู้ชายการแสดงออกของคิทมีความสำคัญในหลายขั้นตอนของการสร้างสเปิร์ม spermatogonia ใน germ cell tumor มากกว่า 90% พบการแสดงออกของคิท ในมะเร็งชนิด seminoma ที่เกิดทั้งที่อวัยวะเพศและนอกอวัยวะเพศ (gonadal และ extragonadal germ cell tumor) แต่ไม่พบการแสดงออกของคิทใน non-seminomatous germ cell tumor [73]

การกลายพันธุ์ของยีนคิท พบได้ประมาณ 30% ในผู้ป่วย seminoma โดยเป็นชนิด point mutation ตำแหน่ง exon 17 codon 816 และ 823 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ codon 816 เป็นปัจจัยที่ทำนายการกลับเป็นซ้ำอีกข้างของ testicular germ cell tumor [74] ในบางรายงานตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนคิท อาจเนื่องจากขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมมาตรวจและการทำให้บริสุทธิ์ใช้วิธีต่างกัน ไม่ค่อยพบการแสดงออกของคิท และการกลายพันธุ์ของยีนคิท ในรายที่เป็น non-seminomatous germ cell tumor [75] นอกจากนี้การติดสีของคิทใน KIT เป็นบวก ก็มีลักษณะที่แตกต่างจาก ผู้ป่วย seminoma มีรายงานการตรวจพบ KIT เป็นบวกในเด็กที่เป็น non-seminomatous germ cell tumor ได้ 9 ราย ใน 15 ราย [76]

การแสดงออกของคิทในเซลล์ระบบเลือดและมะเร็งของระบบเลือด

ในกลไกการเกิดมะเร็งของ mast cell เช่น cutaneous mastocytosis, systemic mastocytosis, mast cell leukemia มักพบการทำงานที่มากกว่าปกติของยีนคิท ชนิด point mutation ที่ตำแหน่ง tyrosine kinase II domain exon 17 (D816V) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไม่ค่อยตอบสนองต่อยา Imatinib [77] การแสดงออกของคิทมีความสำคัญในเซลล์ต้นกำเนิดเลือดที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเม็ดเลือดแดง ดังนั้นในสัตว์ทดลองที่ KIT เป็นลบ จึงเกิดภาวะ macrocytic anemia

นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของคิทในมะเร็งเม็ดเลือดขาว (acute myeloid leukemia) รายงานประมาณ 60-90% [78] ในรายที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ประเภท myelomonocytic และ monocytic พบการติดสีของคิทน้อย [79] ซึ่งตรวจพบการกลายพันธุ์ได้บ้างซึ่งเป็นตำแหน่งคล้ายๆ มะเร็งของ mast cell, มะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ และ seminoma มีการศึกษา phase II ที่ประเมินการตอบสนองการรักษาด้วยยา imatinib ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (acute myeloid leukemia) พบว่ามีการตอบสนอง 20% [80] ในรายที่เป็นมะเร็งของต่อมน้ำเหลืองส่วนมากตรวจพบการแสดงออกของยีนคิท น้อย โดยเฉพาะมะเร็งของต่อมน้ำเหลืองชนิด B cell [81]

การแสดงออกของคิทในมะเร็งอื่นๆ

- **มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก**

จากข้อมูล 9 รายงานพบว่าการแสดงออกของคิท ในมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก ประมาณ 28-88% การติดสีของคิทไม่ได้เป็นปัจจัยที่ช่วยบอกพยากรณ์โรค [81-89] นอกจากนี้การศึกษาใช้ยา imatinib ทางห้องปฏิบัติการพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของตัวรับสัญญาณ KIT และการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ [90] แต่เมื่อนำมาวิจัยใช้ในผู้ป่วยจริงได้ผลตอบสนองน้อย ซึ่งผู้ป่วยในงานวิจัยนี้ตรวจพบการแสดงออกของคิท ประมาณ 21% เท่านั้น [91]

- **มะเร็งเต้านม**

ในเซลล์ผิวของท่อน้ำนมปกติพบว่าการแสดงออกของคิท แต่จะพบการแสดงออกน้อยถ้าเป็นมะเร็งเต้านม ซึ่งการที่หายไปของการแสดงออกดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เป็นมะเร็ง [61] ส่วนมากเป็นมะเร็งเต้านมชนิดที่มีการแสดงของลักษณะเซลล์ไมโออีพิทีเลียม (myoepithelium cell/ basal cell) ตรวจพบการแสดงของเฮอรัททูเป็นบวก (HER-2), ไม่พบการแสดง ของตัวรับฮอร์โมน ER/PR, ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่มีการแบ่งตัวมาก (high grade tumor) และมักจะตรวจพบการแสดงของเซลล์ไมโออีพิทีเลียม ซึ่งพบการแสดงของคิทได้ประมาณ 30% [92, 93] ในรายที่เป็นมะเร็งเต้านมและมีการแบ่งตัวมาก (high-grade ductal carcinoma) อาจพบการติดสีของคิท ได้ถึง 82% ในบางรายงาน [94]

- **มะเร็งของต่อมน้ำลายชนิด Adenoid cystic**

จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของคิท 90-100% ในมะเร็งต่อมน้ำลายชนิด Adenoid cystic แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนคิท [95] โดยที่ไม่พบการแสดงของคิทในมะเร็งต่อมน้ำลายชนิดอื่น ๆ การศึกษาต่อมาเกี่ยวกับการใช้ยา imatinib รักษาในผู้ป่วยกลุ่มนี้พบว่าได้ผลไม่ดี [96]

การแสดงออกของคิทในเซลล์ระบบประสาท

พบการแสดงออกของคิทมากที่เซลล์สมองส่วนหลัง และ พบการติดสีที่แตกต่างกันในโรค neuroblastoma และ medulloblastoma

ใน neuroblastoma มีรายงานพบการแสดงออกของคิท ประมาณ 27% ขึ้นกับลักษณะของเซลล์ที่มีการแบ่งตัว และการแสดงของคิทในมะเร็งชนิดนี้ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงการพยากรณ์โรคด้วย [97] การใช้ยารักษาด้วย imatinib ยังอยู่ในการศึกษาวิจัยในคน เนื่องจากการทดลองใช้ยาในเซลล์เลี้ยง ที่เป็นโรคให้ผลการตอบสนองที่ดี [98] ปัจจุบันนี้ยังมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้ยา imatinib ในการรักษา มะเร็งที่มีการแสดงออกของคิทและพบการกลายพันธุ์ของยีนคิทมากมาย ซึ่งส่วนมากพบว่า ประสิทธิภาพในการรักษาด้วยยาดังกล่าวได้ผลไม่น่าพอใจ ไม่เหมือนกับการใช้ยาในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็ง เนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ระยะกระจาย

บทที่ 4

ยีนคิท และ มะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์

ยีนคิทและกลไกการเกิดโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์

KIT เป็นตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโตที่ผิวเซลล์ (Receptor Tyrosine Kinase) พบได้ในเซลล์หลายประเภท การกลายพันธุ์ของยีนคิททำให้เกิดการทำงานที่มากกว่าปกติของยีน และพบว่าเป็นกลไกการเกิดโรคที่สำคัญของมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ซึ่งพบตั้งแต่ ปี ค.ศ.1998 โดย Hirota และคณะ [99] จากการรวบรวมข้อมูลพบว่าในผู้ป่วยกลุ่มนี้มีการแสดงออกของคิท หลังจากการย้อมพิเศษด้วยวิธีอิมมูโน 46 รายในทั้งหมด 49 ราย(94%) เมื่อตรวจการกลายพันธุ์ ของยีนคิท พบ 5 รายใน 6 ราย (83.3%) นอกจากยีนคิทแล้ว การกลายพันธุ์ของยีน *PDGFRA* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกันและเป็นตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโต receptor tyrosine kinase เหมือนกัน type III ก็เป็นอีกกลไกหนึ่งของการเกิดโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ย้อมไม่ติดการแสดงออกของคิท ในบทนี้จะรวบรวมข้อมูลการกลายพันธุ์ประเภทต่างๆของทั้งสองยีนที่พบ

การกลายพันธุ์แบ่งเป็น สองแบบ คือ การกลายพันธุ์แบบปฐมภูมิซึ่งเกิดขึ้นก่อนที่จะได้รับการรักษาด้วยยา imatinib ซึ่งจะเป็นตัวบอกลไกการเกิดโรค (Primary *KIT* and *PDGFRA* mutation) และการกลายพันธุ์แบบทุติยภูมิที่พบภายหลังการรักษาด้วยยา imatinib (Secondary *KIT* and *PDGFRA* mutation) ซึ่งอาจเป็นกลไกการดื้อยาของมะเร็งจีสท์ ซึ่งพบว่าการกลายพันธุ์ทั้งสองแบบนี้จะเกิดตำแหน่งอื่น ๆ แต่ยังพบการกลายพันธุ์แบบปฐมภูมิดังอยู่ [28]

ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์มักเกิดบริเวณที่ควบคุมตัวรับสัญญาณเช่น นอกเซลล์ (Extracellular domain) และส่วนในเซลล์ที่ต่อมาจากเซลล์เมมเบรน (juxtamembrane domain) และ บริเวณที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสในเซลล์ (tyrosine kinase domain I and II) ในโรคนี้การกลายพันธุ์ของยีนคิทที่พบบ่อยที่สุดคือ ในเซลล์ที่ต่อมาจากเซลล์เมมเบรน (exon11) และ ตัวรับสัญญาณนอกเซลล์ (exon9) ตามลำดับ การกลายพันธุ์ของ juxtamembrane domain ทำให้เกิดการกระตุ้นตัวรับสัญญาณอัตโนมัติ และกระตุ้นการส่งต่อสัญญาณของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสเข้าในเซลล์โดยไม่ต้องอาศัยสัญญาณจากภายนอกมากระตุ้น (autophosphorylation) ส่วนการกลายพันธุ์ของ extracellular domain จะรบกวนการทำงานของส่วนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิด dimerization ทำให้ตัวรับสัญญาณเกิดการส่งต่อสัญญาณเข้าไปในเซลล์ตลอดเวลา ในส่วนของยีน *PDGFRA* ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์มักเป็นบริเวณที่

ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสในเซลล์ (Tyrosine kinase domain II: exon 18) การกลายพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของบริเวณที่ออกฤทธิ์ของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงทั้งหมดที่กล่าวนี้ทำให้โปรตีนคิททำงานมากขึ้นผิดปกติ เกิดการกระตุ้นการเจริญเติบโต และเซลล์ของมะเร็ง जिसที่มีชีวิตที่ยืนยาวขึ้น จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าการยับยั้งการทำงานของตัวรับสัญญาณการเจริญเติบโต KIT ทำให้หยุดการเติบโตของคิทเซลล์และก้อนมะเร็งเล็กลงได้ [51, 100]

การกลายพันธุ์ก่อนการรักษาด้วยยาของยีนคิท มักเป็นที่บริเวณ exon 9,11,13,17 ส่วนในยีน *PDGFRA* มักเป็นที่บริเวณ exon 12,14,18 แต่การกลายพันธุ์ที่พบระหว่างการรักษาด้วยยา imatinib ของยีนคิท มักเป็นที่บริเวณ exon 13,14,17 และ exon 15,16 ส่วนในยีน *PDGFRA* มักเป็นที่บริเวณ exon 18 ก่อนหน้านี้มักไม่พบการเกิดการกลายพันธุ์ร่วมกันระหว่างยีนคิทและยีน *PDGFRA* ในกลไกการเกิดโรค แต่มีบางรายงานพบว่าอาจพบการกลายพันธุ์ทั้งสองยีนได้ในผู้ป่วยคนเดียวกัน [101]

การกลายพันธุ์ก่อนการรักษาด้วยยาของยีนคิท (Primary KIT mutations)

1. Deletions

ส่วนมากพบการเกิด in-frame deletion ในตำแหน่งของ exon 11 มักพบว่ามี การหายไปของนิวคลีโอไทด์ ประมาณ 3-30 นิวคลีโอไทด์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน ระดับของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลง มักพบที่ตำแหน่ง codon 550-561 โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำแหน่ง codon 557-558 พบบ่อยที่สุด [102]

2. Single Nucleotide Substitutions

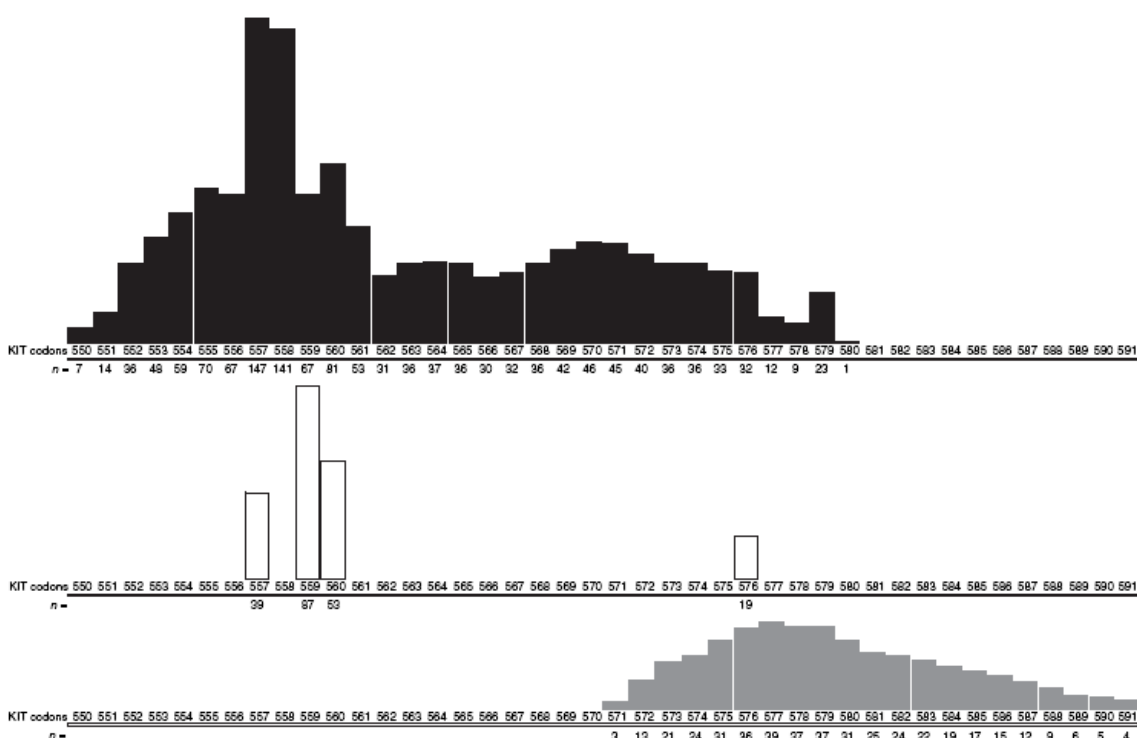
พบการกลายพันธุ์ลักษณะนี้บ่อยรองจากแบบ deletion ส่วนมากพบที่ตำแหน่ง exon 11 4 codons คือ Trp557, Val559, Val560 และ Leu576 เป็นลักษณะที่พบบ่อย การกลายพันธุ์แบบ missense mutation ที่พบบ่อย เช่น Val559Asp, Val560Asp, Trp557Arg, Val559Ala, Val559Gly และ Leu576Pro ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนมากนัก สามารถพบการกลายพันธุ์ที่ exon 13 และ exon 17 ตำแหน่ง exon 17 พบการเปลี่ยนโปรตีนจาก Asn822Lys การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้พบได้ในโรค germ cell tumor (seminoma) และ NK T cell lymphoma [102, 103]

3. Duplication

เป็นการกลายพันธุ์ที่พบเป็นอันดับสามในผู้ป่วย जिसท์ พบที่ตำแหน่ง exon 9 และ exon 11 exon 9 ลักษณะที่พบ คือ 1525_1530dupGCCTAT ทำให้เปลี่ยนแปลงโปรตีน Ala502_Tyr503dup ในส่วนของ exon 11 ที่พบคือ การเพิ่มจำนวนกรดอะมิโน ตั้งแต่ 1-18 codon [102]

4. Insertion

พบน้อยมาก อาจพบได้ในตำแหน่ง Exon11 โดยเฉพาะ codon 558 [102]
การกลายพันธุ์ทั้ง 3 แบบที่พบใน ยีนคิท แสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 ที่พบบ่อย กราฟแท่งสีดำแสดงการกลายพันธุ์แบบ deletion, กราฟแท่งใส แสดงการกลายพันธุ์แบบ substitution และกราฟแท่งสีเทาแสดงการกลายพันธุ์แบบ duplication, n = จำนวนครั้งที่ตรวจพบการกลายพันธุ์มาจากเอกสารอ้างอิง ลำดับที่ 108

5. Complex Mutation

อาจเป็นแบบ deletion-insertions หรือ duplication-insertions ส่วนมากมักพบที่ exon 11 มีหลายแบบ ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนตามมา

มีความแตกต่างกัน ในอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 ตั้งแต่ 25 ถึง 92% ขึ้นกับประชากรตัวอย่าง เทคนิคที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ ส่วนมากในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหาร หรือจีสท์ 68% พบว่ามีกรการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11, 10% พบการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 9

และส่วนน้อยประมาณ 2% พบการกลายพันธุ์ของ exon 13 และ 17 และ 8-15% เป็น wild-type *KIT* คือ ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์เลย ซึ่งมักจะเป็นโรคที่มีการดำเนินโรครุนแรง [104]

ส่วนอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีน *PDGFRA* นั้น พบได้ตั้งแต่ 5-14% ขึ้นกับลักษณะของประชากร

การกลายพันธุ์ก่อนการรักษาด้วยยาของยีน *PDGFRA* (Primary *PDGFRA* mutations)

1. Single Nucleotide Substitutions

เป็นลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนนี้ที่พบมากที่สุด โดยเฉพาะตำแหน่ง exon 18 ส่วนมากจะมีการเปลี่ยนแปลง 2664A → T เปลี่ยนโปรตีนจาก Asp842Val จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า การกลายพันธุ์ดังกล่าวมีผลต่อการทำงานที่มากขึ้นของยีน *PDGFRA* [105] หรืออาจเปลี่ยนเป็น Asp842Tyr และ Asp842Ile ตำแหน่งที่สองที่พบ คือ exon 12 เปลี่ยนจาก 1821T → A ทำให้โปรตีนเปลี่ยนแปลง Val561Asp การกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้ก็มีการศึกษาว่ามีผลต่อการทำงานของยีนที่มากขึ้นเช่นกัน

2. Deletions

เป็นลักษณะที่พบบ่อยเป็นอันดับที่สอง โดยเฉพาะ in-frame deletion ที่ตำแหน่ง exon 18 และ 12 มีการหายของนิวคลีโอไทด์ ตั้งแต่ 3 ตัวขึ้นไป การกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้ก็มีการศึกษาว่ามีผลต่อการทำงานของยีนที่มากขึ้น

3. Duplication and Insertions

พบน้อยมาก บริเวณที่ตำแหน่ง exon 12

4. Complex mutation

พบที่ตำแหน่ง exon 18 ระหว่าง codon 840_849 ส่วนมากเป็นแบบ deletion-insertion

การกลายพันธุ์ที่พบระหว่างการรักษาดด้วยยา Imatinib (Secondary *KIT* and *PDGFRA* mutation)

ลักษณะที่พบส่วนมากเป็นแบบ Single Nucleotide Substitutions ที่ตำแหน่ง exon 13-17 ส่วนมากเป็นตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์ก่อนการรักษาด้วยยาอยู่แล้ว มีบางตำแหน่งเช่น บริเวณที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสโดเมน I (tyrosine kinase domain I) ที่เป็นการกลายพันธุ์แบบนี้เลยตั้งแต่แรก (Secondary *KIT* mutation) [102] บางครั้งในตำแหน่ง exon เดียวกันอาจพบการกลายพันธุ์ได้หลายแบบ

ยีนคิท ตำแหน่งของก้อนมะเร็งและลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์

จากการศึกษาในช่วง 10 ปี พบว่าตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ มีความสัมพันธ์กับอาการ อาการแสดง ลักษณะทางพยาธิวิทยาและตำแหน่งของก้อนมะเร็ง ดังนี้

การกลายพันธุ์ ที่ exon 11 แบบ duplication จากข้อมูลพบว่า มากกว่า 80% มีรอยโรคที่กระเพาะอาหาร [106] จากข้อมูลพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างแบบของการกลายพันธุ์ exon 11 และลักษณะทางพยาธิวิทยา แต่พบว่าการกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้จะมีลักษณะของเนื้องอกเป็นแบบ spindle cell มากกว่า ส่วนการกลายพันธุ์แบบ duplication ที่ตำแหน่ง exon 9 จะพบโรคที่ลำไส้ มากกว่ากระเพาะอาหาร เช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ที่ exon 13 และ 17 จะพบที่โรคลำไส้มากกว่า [107] นอกจากนี้การกลายพันธุ์ที่ exon 9,13,17 จะพบลักษณะของเนื้องอกเป็นแบบ spindle cell มากกว่า อย่างไรก็ตามอาจพบลักษณะของชิ้นเนื้อเป็นแบบ epithelioid cell ได้เช่นกันและพบว่ามักสัมพันธ์กับการที่โรคมีความรุนแรงมากกว่า ในส่วนของ การกลายพันธุ์ของยีน *PDGFRA* พบรอยโรคได้บ่อยที่กระเพาะอาหารและ omentum ลักษณะของชิ้นเนื้อเป็นแบบ epithelioid cell และ mixed cell [108]

สำหรับเพศ อายุและลักษณะของการกลายพันธุ์ จากการรวบรวมข้อมูลพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน [101] แต่ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ที่พบมากในเด็ก (Pediatric GISTs) หรือ Carney triad GISTs เจอรายงานในผู้หญิงมากกว่า รอยโรคมักเป็นที่กระเพาะอาหาร และลักษณะของชิ้นเนื้อเป็นแบบ epithelioid cell

เชื้อชาติและการกลายพันธุ์ของยีนเนื่องจากข้อมูลยังน้อยทำให้ยังสรุปความสัมพันธ์ไม่ได้ แต่การกลายพันธุ์ Ala502_Tyr503dup จะพบน้อยในจีสท์ที่กระเพาะอาหารในผู้ป่วยทางตะวันตก (6.6%) เทียบกับคนเอเชีย (32%) [101]

ยีนคิท การวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์

จากการศึกษาพบข้อมูลที่ยังสรุปไม่ได้เกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของคิท exon 11 ก่อนหน้านั้นคิดว่าการกลายพันธุ์ชนิดนี้มักพบในก้อนมะเร็งขนาดใหญ่ มีการแบ่งตัวมากและสัมพันธ์กับโรคที่มีลักษณะรุนแรง แต่จากข้อมูลปัจจุบันนี้เชื่อว่าการกลายพันธุ์ของยีนคิท เป็นกลไกการเกิดโรคที่สำคัญแม้ว่าก้อนจะมีขนาดเล็กก็ตาม ต่อมาพบว่า ลักษณะของการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 ในจีสท์ที่กระเพาะอาหาร มีผลต่อการพยากรณ์โรค กล่าวคือ การกลายพันธุ์แบบ deletion สัมพันธ์กับโรค

ที่รุนแรงมากกว่าแบบ single nucleotide substitution [62, 106] ในการกลายพันธุ์แบบ deletion ของ exon11 ในจีستที่ลำไส้เล็ก ไม่ได้มีความรุนแรงของโรคมากกว่าการกลายพันธุ์แบบ single nucleotide substitution [109] ส่วนการกลายพันธุ์แบบ duplication ในจีستที่กระเพาะอาหารมักมีการดำเนินโรคไม่รุนแรง

สำหรับการกลายพันธุ์ของคิท exon 9 ก่อนหน้านี้มีรายงานว่า ถ้าเป็นแบบ duplication มักจะเป็นโรคที่รุนแรง แต่จากการศึกษาต่อมาในผู้ป่วยจีสที่เฉพาะที่ลำไส้เล็ก 145 ราย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในการดำเนินโรคระหว่างการกลายพันธุ์ที่ exon 11 และ exon 9 ทางผู้วิจัยจึงให้ความเห็นว่า อาจเป็นเพราะการศึกษาก่อนหน้านี้พบอัตราการตายที่มากในผู้ป่วยที่มีรอยโรคที่ลำไส้เล็กเทียบกับกระเพาะอาหาร

ถึงแม้ว่าการกลายพันธุ์ของคิทที่ exon 13 และ exon 17 จะพบน้อย แต่จากข้อมูลพบว่า การกลายพันธุ์ *KIT* exon 13 มีการดำเนินโรคที่รุนแรงในผู้ป่วยจีสที่กระเพาะอาหาร ในขณะที่ การกลายพันธุ์ของคิทที่ exon17 ไม่มีผลต่อการดำเนินโรค เมื่อดูข้อมูลในจีสที่ลำไส้เล็ก พบว่าการกลายพันธุ์ทั้งสองตำแหน่ง ไม่มีความแตกต่างกันในแง่ความรุนแรงของโรค [107]

การกลายพันธุ์ของยีน *PDGFRA* มักพบในก้อนมะเร็งที่มีการแบ่งตัวน้อย มีการพยากรณ์โรคที่ดีมากกว่า [101]

ยีนคิท และการรักษาด้วยยาเฉพาะ imatinib ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์

การรักษาด้วยยา imatinib ที่ออกฤทธิ์โดยตรงที่การกลายพันธุ์ของยีนคิท ให้ผลการตอบสนองที่ดีแตกต่างกันตามตำแหน่งการกลายพันธุ์ของทั้งยีนคิท และยีน *PDGFRA* การศึกษาส่วนมากพบว่า ในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่ง exon 11 มีการตอบสนองการรักษาด้วยยาที่ดีกว่า ที่ตำแหน่ง exon 9 และกลุ่มที่ไม่มีกลายพันธุ์ (wild-type) [109] การรักษาด้วยยา imatinib ในผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ที่ exon 9 ต้องใช้ยาขนาดที่สูงกว่า

ในการกลายพันธุ์ของยีน *PDGFRA* ที่ตำแหน่ง Asp842Val พบว่ามักไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib [50] ซึ่งลักษณะเช่นนี้เหมือนกับการกลายพันธุ์ที่ Asp816Val ในผู้ป่วยที่เป็น mastocytosis ที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib

ยาตัวที่สองที่มีการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ระยะกระจายและไม่ตอบสนองต่อการรักษาหลัก คือ sunitinib malate ซึ่งกลไกการทำงานออกฤทธิ์ยับยั้ง

ตัวรับสัญญาณหลายชนิด เช่น KIT, PDGFRA, VEGFR, FLT3 และ RET receptor มีการศึกษา มากมายทั้งในหลอดทดลองและในคน พบว่าได้ผลการรักษาดี โดยไม่ขึ้นกับลักษณะของการกลายพันธุ์ พบการตอบสนองที่มากในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ที่ exon 9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [110] เมื่อมี ภาวะการกลายพันธุ์หลังจากใช้ imatinib ที่ตำแหน่งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสในเซลล์ (tyrosine kinase domain I) การรักษาด้วยยาตัวนี้ยังให้การตอบสนองที่ดี แต่ถ้าเป็นการกลายพันธุ์ที่ ตำแหน่งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนสในเซลล์ (Tyrosine kinase domain II) พบว่าผลการ ตอบสนองต่อยาไม่ดี [110] ซึ่งต้องการการศึกษาต่อเนื่องในการรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้

ขณะนี้มีการศึกษาวิจัยมากมายในการยับยั้งการทำงานของสัญญาณในเซลล์ที่เป็นกลไกในการ เกิดโรคจิต นอกเหนือจาก KIT และ PDGFR เช่น Akt และ โปรตีน mTOR โดยใช้ยา everolimus [111] ทั้งที่ใช้เป็นยาตัวเดียวและใช้ร่วมกับการรักษามาตรฐาน นอกเหนือจากนั้นทฤษฎีเรื่องการลดการ แสดงออกของคิท ตัวรับสัญญาณที่ผิวเซลล์ ก็เป็นอีกการศึกษาหนึ่งที่กำลังทำการวิจัยอย่างกว้างขวาง ทั้ง การยับยั้งการทำงานของ heat-shock protein 90 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยให้คิทโปรตีนไม่ถูกทำลายจาก กระบวนการตายของเซลล์ การใช้ยาดังกล่าวจึงทำให้มีการย่อย และการตายของคิทส่งผลให้ ก้อนมะเร็งตายในที่สุด หรือการใช้ยาที่ยับยั้งการเปลี่ยนจากคิท DNA เป็น RNA (Transcription inhibitor) เช่น ยา flavopiridol ทำให้การแสดงออกของคิทลดลง ทำให้ก้อนมะเร็งมีขนาดลงด้วย [112] ก็ยังอยู่ในขั้นทดลองคงต้องรอการศึกษาต่อไป

บทที่ 5

ปริทรรศน์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ความผิดปกติของยีนคิทที่มีการกลายพันธุ์เป็นกลไกการเกิดโรคของมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ และเป็นเป้าหมายหลักของยา imatinib ที่ยับยั้งการทำงานของกรดตัวรับสัญญาณคิทที่ผิวเซลล์ การแสดงออกของคิทในโรคนี้เป็นตัวที่แสดงว่ามีการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในมะเร็งชนิดอื่นๆ แต่ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่ต่างกันมีการศึกษาพบว่าเป็นปัจจัยที่ใช้ช่วยในการประเมินการตอบสนองของยาได้ การตรวจการกลายพันธุ์ก่อนเริ่มรักษาอาจใช้เป็นตัวช่วยในการเลือกยา ขนาดของยาที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละราย ถึงแม้ว่าการตรวจการกลายพันธุ์ยังไม่ได้แนะนำให้ทำในทุกๆรายที่เป็นโรคนี้ ตาม National Comprehensive Cancer Network (NCCN) แนะนำว่าในสถานที่ที่สามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ ถ้าพบว่าเป็นการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 9 แนะนำให้เริ่มการรักษาด้วย imatinib ขนาด 800 มิลลิกรัมต่อวัน แทนขนาดปกติ 400 มิลลิกรัมต่อวัน

อุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีนคิทและ ยีน *PDGFRA*

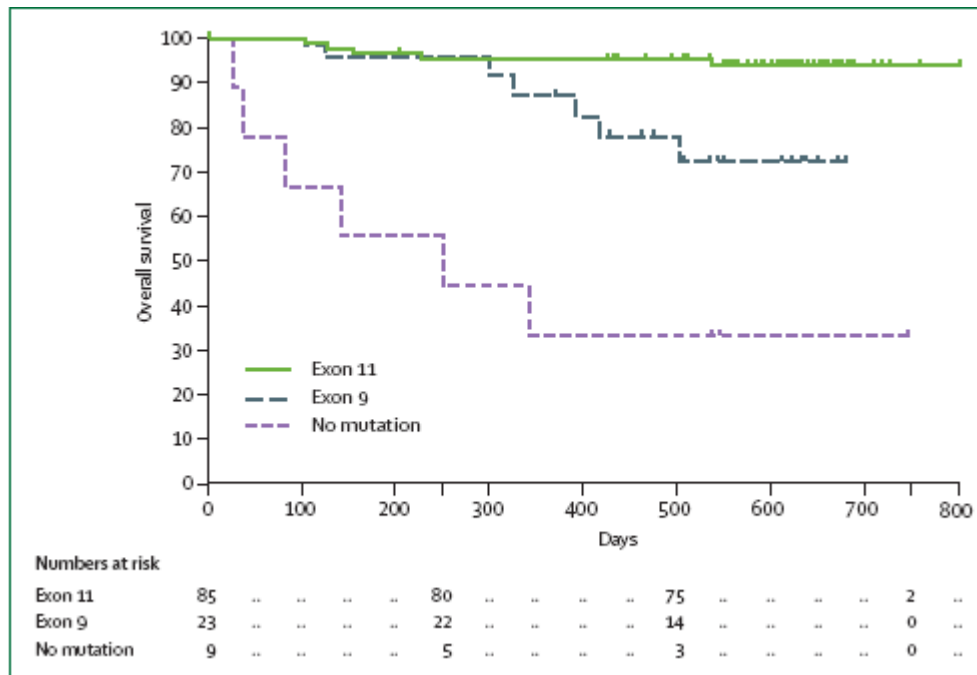
จากข้อมูลในต่างประเทศ ตรวจพบการกลายพันธุ์ในแต่ละตำแหน่งแตกต่างกัน ขึ้นกับประชากรตัวอย่างที่ต่างกัน ตำแหน่งของก้อนมะเร็งที่ต่างกัน เทคนิคและวิธีการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ การศึกษาแรกๆ ของ Heinrich และคณะ พบการกลายพันธุ์ของยีนคิทประมาณ 80% ซึ่งพบการกลายพันธุ์ที่ exon 11 พบ 68% , exon 9 พบ 10% และที่ตำแหน่ง exon 13 และ exon 17 ที่ละ 1% [104] การศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวกับอุบัติการณ์ของ *KIT* mutation แสดงในตารางที่ 5.1

การศึกษา	<i>KIT</i> mutation	Exon11 mutation	Exon 9 mutation	Other/ Wild-type
Heinrich 2002	80%	68%	10%	2%/15%
Rubin 2001	92%	71%	13.6%	9%
Rankin 2003	80%	67%	10%	3%
Penzel R 2005	69.6%	56.5%	11.6%	NA
Debiec-Rychter	83.6%	65.8%	15.4%	NA
Andersson 2006	65%	57%	3.4%	0.6%/ 35.6%
Tae Won Kim 2004	74%	70.1%	3.5%	NA
Chun-NanYeh 2006	90.7%	74%	16.7%	9.3%

ตารางที่ 5.1 แสดงการศึกษาต่างประเทศ เกี่ยวกับอุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีนคิท

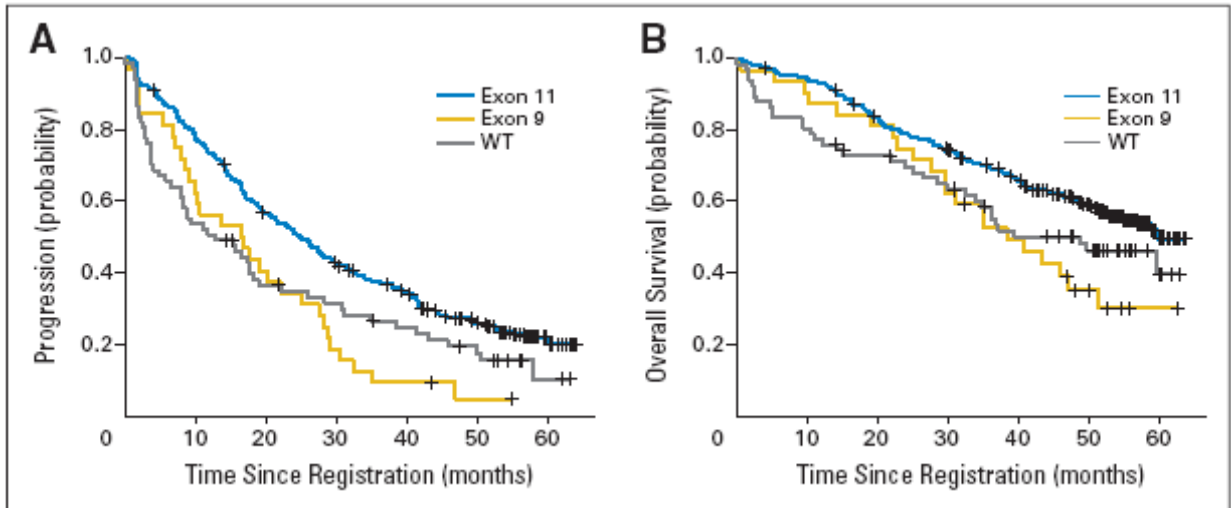
การกลายพันธุ์ของยีนคิท และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib

จากการศึกษาของ EORTC 62005 และ SWOG ในอเมริกา ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ระยะกระจายที่รับประทาน imatinib ขนาด 400 และ 800 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่า มีผลการตอบสนองเท่ากันทั้งสองการศึกษา ประมาณ 60-70% แต่อย่างไรก็ตามใน EORTC พบว่า imatinib ขนาด 800 มิลลิกรัมต่อวัน มีระยะเวลาที่โรคจะไม่ลุกลามนานกว่า (HR=0.82 ,p=0.026) ผลการรักษาเป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากผู้ป่วยในการศึกษา EORTC มีการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 9 ซึ่งจะตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยาขนาดสูง คือ 800 มิลลิกรัมต่อวัน มากกว่า เมื่อพิจารณาเรื่องระยะเวลาการรอดชีวิต พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในขนาดยาทั้งสอง การตอบสนองต่อการรักษาขึ้นกับลักษณะของก้อนมะเร็ง โดยพบว่าการกลายพันธุ์ที่ *KIT* exon 11 มีการตอบสนองที่ดีที่สุด มีระยะเวลาที่โรคลุกลามและระยะเวลาการรอดชีวิตที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และ การกลายพันธุ์ที่ *KIT* exon 9 ในส่วนของ การกลายพันธุ์ที่ยีน *PDGFRA* ตำแหน่ง exon 18 (D842V) ก็ตอบสนองไม่ดีต่อยา imatinib [40-42] แสดงดังรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 แสดง ระยะเวลาการรอดชีวิตหลังจากรักษาด้วยยา imatinib เมื่อ พิจารณาจากตำแหน่งการกลายพันธุ์ ของยีนคิท

ในข้อมูลการศึกษาของอเมริกา SWOG S0033 พบว่า การกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 73.1%, exon 9 8.4% และ wild-type 15.2% หลังจากรักษาด้วยยา imatinib ขนาด 400 หรือ 800 มิลลิกรัมต่อวัน พบการตอบสนอง (objective response) ของการกลายพันธุ์ที่ exon 11 , exon 9 และ wild-type เป็น 71.7% ,44.4% และ 44.6% ตามลำดับ ซึ่งสองกลุ่มหลัง มีความแตกต่างกับกลุ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.007, p=0.0002$ ตามลำดับ) ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่โรคจะลุกลามของทั้งสามกลุ่ม คือ 24.7 เดือน เทียบกับ 16.7 เดือน และ 12.8 เดือน และค่าเฉลี่ยของระยะเวลาการรอดชีวิต คือ 60 เดือน เทียบกับ 38.4 เดือน และ 49 เดือน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาระหว่างการกลายพันธุ์ *KIT* exon 9 และ *KIT* wild-type พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในค่าเฉลี่ยระยะเวลาการรอดชีวิต [113] ดังแสดงในรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของการกลายพันธุ์ และ ระยะเวลาที่โรคจะลุกลาม และ ระยะเวลาการรอดชีวิต

อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยทั้งสามไม่ได้ขึ้นกับขนาดของยา imatinib คือ กลุ่มการกลายพันธุ์ *KIT* exon 11 มีระยะเวลาการรอดชีวิต มากกว่า 60 เดือนเนื่องจากติดตามผู้ป่วยไม่นานพอ เทียบกับ 60 เดือน ถ้าได้ยาขนาด 800 มิลลิกรัมต่อวัน เทียบกับ 400 มิลลิกรัมต่อวัน ($p=0.99$) ส่วนระยะเวลาที่โรคจะลุกลาม ในรายที่ได้รับยาขนาดสูง คือ 23.9 เดือน เทียบกับ 27.2 เดือน ได้ยาขนาดต่ำกว่า ($p=NS$)

ในกลุ่มการกลายพันธุ์ *KIT* exon 9 การรักษาด้วยยาขนาด 800 มิลลิกรัมต่อวัน มีระยะเวลาการรอดชีวิต 38.4 เดือน เทียบกับ 38.6 เดือน ถ้าได้ยาขนาด 400 มิลลิกรัมต่อวัน ($p=0.91$) ส่วนระยะเวลาที่โรคจะลุกลาม ในรายที่ได้รับยาขนาดสูง คือ 18 เดือน เทียบกับ 9.4 เดือน ถ้าได้ยาขนาดต่ำกว่า มีความแตกต่างกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.97$) เช่นกัน แต่พบว่า การใช้ยาขนาดสูง 800 มิลลิกรัมต่อวัน ในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 9 มีการตอบสนองต่อการรักษาที่ดีกว่าการใช้ยาขนาด 400 มิลลิกรัมต่อวัน คือ 67% เทียบกับ 17% และมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.02$) ซึ่งการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษา EORTC 62005 ที่บอกว่า การใช้ยาขนาดสูงในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 9 มีระยะเวลา ที่โรคจะลุกลามดีกว่า กลุ่มที่ได้รับยาขนาดน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อรวมการศึกษา phase III ทั้งสองการศึกษาเป็น meta-analysis พบว่า ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 9 เมื่อรักษาด้วยยาขนาดสูง มีระยะเวลาที่โรคจะไม่ลุกลาม มากกว่าใช้ยาขนาดต่ำ

คือ 19 เดือน เทียบกับ 6 เดือน ($p=0.017$) มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระยะเวลาการรอดชีวิตของทั้งสองกลุ่มไม่ต่างกัน

สำหรับยาตัวที่สองที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือ จีสต์ระยะกระจายที่ดื้อต่อยา imatinib คือ ยา sunitinib เกี่ยวกับการตอบสนองของยาและลักษณะของการกลายพันธุ์ มีรายงานข้อมูลย้อนหลังพบว่า การใช้ยา sunitinib มีการตอบสนองที่ดีในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 9 มากกว่า *KIT* exon 11 [49] แต่ยังไม่มีความชัดเจนในผลของการกลายพันธุ์และการตอบสนองต่อยานี้ คงต้องรอการศึกษา phase III ที่ดีต่อไป

จากข้อมูลดังกล่าว พบว่าตำแหน่งของการกลายพันธุ์ เป็นปัจจัยที่ใช้ในการบอกการพยากรณ์โรคทั้งในแง่ ระยะเวลาการรอดชีวิตและระยะเวลาที่โรคจะลุกลาม นอกจากนี้ยังสามารถช่วยบอกถึงการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib ในที่ที่สามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ ควรทำการตรวจ การกลายพันธุ์ในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสต์ระยะกระจายทุกราย เนื่องจากมีผลต่อการเลือกยา และขนาดยาที่ใช้ ในกรณีถ้ามีการกลายพันธุ์ของยีน *kit* exon 9 แนะนำว่าควรเริ่มรักษาด้วยยาขนาด 800 มิลลิกรัมต่อวันตั้งแต่วินิจฉัย

บทที่ 6 วัสดุและวิธีการ

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง (population and sample)

ประชากรเป้าหมาย หมายถึง ผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ประชากรตัวอย่าง หมายถึง ผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ที่เข้ารับการรักษาใน โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตั้งแต่ เดือนมกราคม พ.ศ. 2545 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2551

เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าการศึกษา (Inclusion criteria)

1. เป็นผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์
2. ได้รับการตรวจวินิจฉัยยืนยันโดยการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา และการย้อมพิเศษด้วยวิธีทางอิมมูน (Immunohistochemistry)
3. ยังมีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่สามารถนำมาตรวจเพิ่มเติมเกี่ยวกับ molecular genetic ได้
4. มีรอยโรคที่สามารถใช้วัดหรือประเมินการตอบสนองต่อยา imatinib ได้ (measurable lesion or evaluable disease)
5. ได้รับการตรวจติดตามประเมินการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib

เกณฑ์ในการคัดเลือกรอกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ชิ้นเนื้อที่มีอยู่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจทาง molecular genetic ได้
2. ไม่มีหรือไม่สามารถสืบค้นข้อมูลการประเมินการตอบสนองต่อการรักษา

2. การคำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size)

เนื่องจากการศึกษาเชิงพรรณนาในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ กลายเนื่องจากยังไม่มีการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *KIT* ในประเทศไทยมาก่อน จึงอาศัยข้อมูลการศึกษาในต่างประเทศซึ่งพบว่า อุบัติการณ์ของ GIST ในต่างประเทศ ประมาณ 50-150 ราย/ ประชากร 1,000,000 คนต่อปี มีการเกิดการกลายพันธุ์ของ ทั้ง *KIT* และ *PDGFRA* ประมาณ 85-90 % จึงใช้ค่าดังกล่าวแทน $P = 0.9$, $1-P = Q = 0.1$ และกำหนดให้ความเชื่อมั่นที่ 95% ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ประมาณ $\pm 10\%$ (d)

คำนวณหาขนาดตัวอย่างจากสูตร

$$N = [Z_{\alpha}^2 P Q] / d^2$$

$$\approx 34.57$$

ได้ขนาดตัวอย่างประมาณ 35 คน ทางผู้วิจัยคิดว่าจะเก็บข้อมูล โดยวางแผนรวบรวมผู้ป่วย GIST ประมาณ 40 คน

3. การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

1. ตัวแปรการวิจัย

1) การกลายพันธุ์ของยีน *KIT* (*KIT* mutation)

เก็บรวบรวมชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาของโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ โดยอาศัยข้อมูลการวินิจฉัยจากประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจวินิจฉัยทางรังสีวิทยาและการย้อมพิเศษด้วยวิธีทางอิมมูน (immunohistochemistry) ดูว่ามีการแสดงออกของตัวรับการเจริญเติบโต *KIT* (*KIT* expression) ต่อมานำชิ้นเนื้อที่รวบรวมได้มาอ่านผลซ้ำเพื่อค้นหาตำแหน่งของก้อนเนื้ออกโดยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางระบบทางเดินอาหารหนึ่งราย แล้วทำการตัดแยกก้อนเนื้อออกออกจากเนื้อเยื่อปกติ ต่อจากนั้นทำการสกัดสารพันธุกรรมจากชิ้นเนื้อด้วยวิธี paraffin-embedded extraction DNA เมื่อได้สารพันธุกรรมที่ต้องการนำมาวิเคราะห์การกลายพันธุ์ (mutation analysis) ศึกษาตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์ เช่น *KIT* exon 11, 9 โดยอาศัยวิธี polymerase chain reaction และตรวจซ้ำด้วยวิธี DNA sequencing เพื่อดูลักษณะการกลายที่พบว่าเป็น deletion, substitution, duplication หรือ complex mutation สำหรับการตรวจกลายพันธุ์ *KIT* exon 9 ใช้การตรวจด้วยวิธี DNA sequencing

2) การตอบสนองต่อการรักษาของมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์

ผลเป็น การมีหรือไม่มีการตอบสนอง โดยอาศัยเกณฑ์ของ The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Group (RECIST) ซึ่งแบ่งการตอบสนองต่อการรักษาเป็น 4 แบบ ได้แก่

- Complete response คือ มีการหายไปของรอยโรคทั้งหมดที่เคยมีอยู่

- Partial response คือ มีการลดลงของขนาดของรอยโรคที่วัดการตอบสนองได้ (measurable lesions) ทั้งหมดรวมกันมากกว่าร้อยละ 30 โดยใช้ความกว้างของเนื้องอกในแกนที่ยาวที่สุด (longest diameter)

- Stable disease คือ กรณีที่ไม่เข้ากับเกณฑ์ของ partial response และ progressive disease

- Progressive disease คือ มีการเพิ่มขึ้นของขนาดของรอยโรคที่วัดการตอบสนองได้ (measurable lesions) ทั้งหมดรวมกันมากกว่าร้อยละ 20 หรือมีรอยโรคใหม่เกิดขึ้น

การประเมินการตอบสนองจะใช้ผลการประเมินโดยแพทย์ผู้รักษาจากเวชระเบียนและนำผลการตรวจทางรังสีวินิจฉัยมาให้แพทย์รังสีวินิจฉัยอีกหนึ่งท่านซึ่งไม่ทราบข้อมูลทางคลินิกอื่น ๆ ประเมินซ้ำอีกครั้ง โดย) ต่อการรักษาด้วยยา imatinib เมื่อการประเมินผลการรักษาจะถือว่าการตอบสนอง (Objective response เป็น complete response หรือ partial response

3) ระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรค (time to progression)

ผลเป็นจำนวนวันตั้งแต่เริ่มยา imatinib จนถึงวันที่มีหลักฐานว่ามีการลุกลามของโรคเพิ่มขึ้น (Disease progression) หรือผู้ป่วยเสียชีวิต หรือวันที่ผู้วิจัยกำหนดให้เป็นวันสิ้นสุดการเก็บข้อมูลเพื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูล

4) ระยะเวลาการรอดชีวิต (overall survival)

ผลเป็นจำนวนวันตั้งแต่เริ่มได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์หรือเริ่มรักษาด้วยยา imatinib จนถึงวันที่ผู้ป่วยเสียชีวิตไม่ว่าจากสาเหตุใดก็ตามหรือวันที่ผู้วิจัยกำหนดเป็นวันสิ้นสุดการเก็บข้อมูลเพื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูล

5) ปัจจัยที่มีผลต่อการพยากรณ์โรค

อาศัยข้อมูลจากเวชระเบียน เพื่อค้นหาข้อมูลทางคลินิกซึ่งอาจมีผลต่อพยากรณ์โรค ได้แก่

- a) ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง เช่น กระเพาะอาหาร, ลำไส้เล็ก, ลำไส้ใหญ่
- b) ขนาดของก้อนมะเร็ง เช่น น้อยกว่า 5 cm. 5-10 cm. มากกว่า 10 cm.
- c) Mitotic index เช่น น้อยกว่า 5/50 high power field, มากกว่าเท่ากับ 5/50 high power field
- d) ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของก้อนมะเร็ง เช่น *KIT* exon 11 mutation หรือ Non-*KIT* exon 11 mutation

4. ขั้นตอนและวิธีการตรวจการกลายพันธุ์ (Molecular genetic analysis)

- 4.1 การสกัดสารพันธุกรรมจากชิ้นเนื้อ ด้วยวิธี Paraffin-embedded extraction DNA
- 4.2 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของ *KIT* gene exon 11 ด้วยวิธี Polymerase chain reaction
- 4.3 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของ *KIT* gene exon 11 และ 9 ด้วยวิธี DNA sequencing

การสกัดสารพันธุกรรมจากชิ้นเนื้อ ด้วยวิธี Paraffin-embedded extraction DNA ด้วย Phenol Chloroform

1. นำชิ้นเนื้อที่รวบรวมได้มาอ่านผลซ้ำเพื่อค้นหาตำแหน่งของก้อนเนื้อออกโดยพยาธิแพทย์ที่เชี่ยวชาญทางระบบทางเดินอาหารหนึ่งราย แล้วทำการตัดแยกก้อนเนื้อออกออกจากเนื้อเยื่อปกติ นำเฉพาะชิ้นเนื้อมะเร็งมาทำการแยกเซลล์ลงหลอดทดลอง 1.5 cc
2. เติม lysis buffer II (950:50) ผสมกับ 10% sodium dodecyl sulphate 200-400 μ L เพื่อย่อยสลายเซลล์เมมเบรน ต่อมาใส่ 20 mg/ml Proteinase K 5-10 μ L incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่งัวข้ามคืน (ถ้ายังไม่ยอมให้เต็ม Proteinase K ลงไปอีก)
3. เติม Phenol Chloroform (Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol = 25:24:1) ปริมาตรสองเท่าของชิ้นเนื้อ (ประมาณ 500 μ L) นำไปปั่นตกด้วย Vortex
4. นำไปปั่นให้ตกตะกอน ที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารข้างล่างทิ้งให้ได้มากที่สุด แล้วนำไปปั่นอีกครั้งที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที
5. ดูดสารข้างบนซึ่งเป็นสารพันธุกรรม ใส่ลงในหลอดทดลอง 1.5 cc. ในปริมาณ 300 μ L.
6. เติม 100% ethyl alcohol 600 μ L ผสมกับ 10% sodium acetate 150 μ L ปั่นให้เข้ากันเพื่อเป็นการตกตะกอน DNA
7. นำไปปั่นให้ตกตะกอน ที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้นเทส่วนของเหลวด้านบนทิ้ง (supernatant)
8. เติม 70% ethyl alcohol 500 μ L แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ต่อจากนั้นเทส่วนของเหลวด้านบนทิ้ง และดูดออกให้หมด แล้วจึงปล่อยให้แห้ง (Air dry)

9. ละลายส่วนของสารพันธุกรรมใน distilled water (dH₂O) หรืออาจใช้ Tris EDTA buffer 20-50 μ L incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะได้สารพันธุกรรมของชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่พร้อมในการตรวจ polymerase chain reaction ต่อไป

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม *KIT* gene ด้วยวิธี polymerase chain reaction

หลักการทำ Polymerase chain reaction เพื่อเพิ่มปริมาณยีนคิทที่เราต้องการศึกษา ในแต่ละรอบ

1. **Denaturation** คือ ขั้นตอนที่แยก DNA เส้นคู่ให้ออกเป็นเส้นเดี่ยว โดยการให้ความร้อน อุณหภูมิที่ใช้อยู่ระหว่าง 94-95 องศาเซลเซียส
2. **Annealing** คือ ขั้นตอนที่ primer จับกับลำดับเบสจำเพาะบน DNA แม่แบบ โดย forward primer จับบน DNA คนละเส้นกับ reverse primer อุณหภูมิที่ใช้อยู่ระหว่าง 50-65 องศาเซลเซียส ขึ้นกับค่า T_m (melting temperature) ของ primer
3. **Extension** คือ ขั้นตอนที่ DNA polymerase ทำการต่อนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว (dNTP) เข้ากับไพรเมอร์โดยมีดีเอ็นเอแม่แบบ การสร้าง DNA หรือการต่อ primer จะดำเนินจนสุดปลายของสารพันธุกรรมที่เราต้องการ อุณหภูมิที่ใช้คือ 72 องศาเซลเซียส

เมื่อครบทั้งสามขั้นตอนจะได้ DNA เพิ่มขึ้นหลายเท่าตัว แล้วจึงเข้าสู่ขั้นตอนเดิมรอบใหม่

ส่วนประกอบของการทำ Polymerase chain reaction amplification

- สารพันธุกรรมของชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่เราได้จากการสกัดแล้วข้างต้น
- Oligonucleotide : forward primer + reverse primer
- Taq DNA polymerase
- Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)
- Mg⁺⁺ (Cofactor of DNA polymerase) และ buffer ที่เหมาะสม

Primer	Sequence	Product size(bp)	Annealing temperature (° C)
Primer exon 11(a) -Left primer -Right primer	GAGACAATAATTATTAAGGTG GTTTCCATTTATCTCCTCAAC	100	47.4
Primer exon 11(b) -Left primer -Right primer	TTATTTGTTCTCTCTCCAGAGTGC GGTGACATGGAAAGCCCCTG	242	52.3
Primer exon 9 -Left primer -Right primer	CAAGCACAATGGCACGGTTG CAAGCACAATGGCACGGTTG	108	48.4

ตารางที่ 6.1 แสดง Primer sequences ที่ใช้ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนคิท และค่าของ PCR Annealing conditions

ขั้นตอนการทำ PCR for *KIT* exon 11 (a) และ *KIT* exon 11 (b): PCR condition

- เตรียมอัตราส่วนสารที่ใช้ในการทำ PCR ตามอัตราส่วนดังนี้ 1Xbuffer, dNTP 0.2mMOL, Taq Hotstart 0.5 U, forward และ reverse primer อย่างละ 0.2 uM
 - ขั้นตอนการทำ PCR
 - เพิ่มอุณหภูมิเป็น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกระตุ้นให้ Taq Hotstart ทำงาน (activated Taq enzyme)
 - เริ่มดำเนินการทำ Denaturation ของสารพันธุกรรม ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที และต่อด้วยการทำ Annealing ลดอุณหภูมิลง 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อทำการต่อนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว (dNTP) เข้ากับ primer โดยมี DNAแม่แบบ (extension) ดำเนินการทำทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ทั้งหมด 50 รอบ
 - หลังจากนั้นต่อด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที
- หลังจากที่ได้สารพันธุกรรมที่เพิ่มปริมาณตามที่เราต้องการแล้ว (PCR product) นำมาแยก

โดยวิธีการ Gel Electrophoresis ด้วย 8-12% Polyacrylamide gel เพื่อตรวจสอบว่าการขยายปริมาณ DNA ได้ผล

การตรวจหาการกลายพันธุ์ ของ *KIT* gene exon 11 และ 9 ด้วยวิธี DNA Sequencing

หลังจากได้ PCR product ที่เราต้องการนำมาทำให้บริสุทธิ์ (Purification) แล้วเข้าสู่กระบวนการ DNA sequencing ต่อไปด้วยเครื่อง 3130 Genetic Analyzer ในกรณีที่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนคิต exon 11 หลังจากที่ทำ DNA sequencing จึงนำตัวอย่างนั้นเข้าสู่กระบวนการ PCR for *KIT* exon 9 ทั้งการทำคัดกรองด้วย high resolution melts และการทำ DNA sequencing สำหรับ *KIT* exon 9 ต่อไป เนื่องจากข้อมูลการศึกษาของต่างประเทศพบว่าการกลายพันธุ์ของยีนคิต มักเป็นที่ตำแหน่งเดียวโดยเฉพาะ และพบการกลายพันธุ์ของ exon 11 มากกว่าตำแหน่งอื่นๆ

ขั้นตอนการทำ DNA Sequencing

1. เตรียมสารพันธุกรรมที่สกัดได้เพื่อเข้าสู่กระบวนการ PCR ปริมาณสารที่ใช้ตั้งต้น ขึ้นกับปริมาณ PCR ที่เราต้องการ (template preparation)
2. เงื่อนไขในการเตรียมสารพันธุกรรมก่อนเข้าสู่กระบวนการ DNA Sequencing
 - 2.1 เตรียมสารผสมก่อนเริ่มกระบวนการ PCR ด้วยอัตราส่วน Terminator Ready Reaction Mix 2 mcl , Sequencing Buffer (5X) 3 mcl, Primer total 3.2 pmol, Template, Water 20 mcl รวมปริมาตร 20 mcl
 - 2.2 ขั้นตอนการทำ PCR

โดยเริ่มจากใส่สารที่เตรียมจากขั้นตอนที่ 2 ในเครื่อง thermal cycler และตั้งเป็นปริมาตร 20 mcl ต่อมาทำการแยกสารดีเอ็นเอ ปรับอุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Taq แล้วจึงเข้าสู่การขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยเปลี่ยนเป็นอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิ เป็น 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที ทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังกล่าวเป็นรอบๆ ทั้งหมด 25 รอบ แล้วจึงลดอุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส จนได้สารพันธุกรรมที่บริสุทธิ์ และนำสารที่ได้ใส่ใน microcentrifuge

3. ขั้นตอนการทำ Precipitation Method เพื่อกำจัด Unincorporated Dye Terminators โดยใช้ Ethanol/Sodium Acetate Precipitation มีวิธีการทำ ดังนี้

3.1 ผสม 2 mcl 3M sodium acetate + 56 mcl 95% ethanol : In tube 1.5 ml โดยเติม sodium acetate 3M 1 ใน 10 เท่าของ ปริมาณของสารพันธุกรรม PCR ที่ได้ และต่อมาเติม 95% ethanol 2.5 เท่าของปริมาณของสารพันธุกรรม PCR ที่ได้

3.2 เติมสารพันธุกรรม PCR 20 mcl แล้ว ปั่นด้วยเครื่องความเร็วต่ำ

3.3 ทิ้งหลอดทดลองไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเป็นการตกตะกอน สารพันธุกรรม

3.4 ปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ความเร็วสูงเป็นเวลา 25 นาที

3.5 ดูดสารข้างบนออก แล้วเติม 70% ethanol ปริมาณ 250 mcl ในหลอดทดลองและ mix

3.6 ปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ความเร็วสูงเป็นเวลา 8 นาที อีกครั้ง แล้วดูดสารข้างบนออก

3.7 ทำตามขั้นตอนที่ 3.5-3.6 อีกครั้งแล้ว จึงทำให้แห้งโดยเครื่องอบ 90 องศาเซลเซียส 2 นาที

4. การเตรียมและใส่สารตัวอย่างลงใน Capillary Electrophoresis

4.1 เติม 15 mcl ของ HiDi-formamide ลงไปใน สารพันธุกรรมที่ตกตะกอน (pellets)

4.2 ผสมให้เข้ากันและปั่นตก

4.3 ย้ายสารที่ได้ในข้อ 4.2 ไปที่ 10 mcl แผ่นตัวอย่าง และปิดด้วยแผ่นปิด

4.4 นำไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วจึงทำให้เย็นลงแล้วจึงนำไปตรวจ ด้วยเครื่อง Automate Sequencer (3130 Genetic Analyzer)

หลังจากนั้นจึงอ่านผลของการกลายพันธุ์เทียบกับสารพันธุกรรมตั้งต้น ด้วยโปรแกรม Sequencher 4.7 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของคิต exon 11 ที่ควรสนใจ คือ บริเวณ codon 550-560, และตำแหน่งการกลายพันธุ์ของคิต exon 9 คือ codon 503-503

5. การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

เก็บข้อมูลจากเวชระเบียน ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา การย้อมพิเศษวิธี IHC และผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ โดยใช้แบบบันทึกข้อมูล (record form) ตามตัวแปรและข้อมูลที่ต้องการ โดยผู้วิจัยเป็นผู้บันทึกแล้วนำไปบันทึกในคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for Social Sciences เวอร์ชัน 16.0

6. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

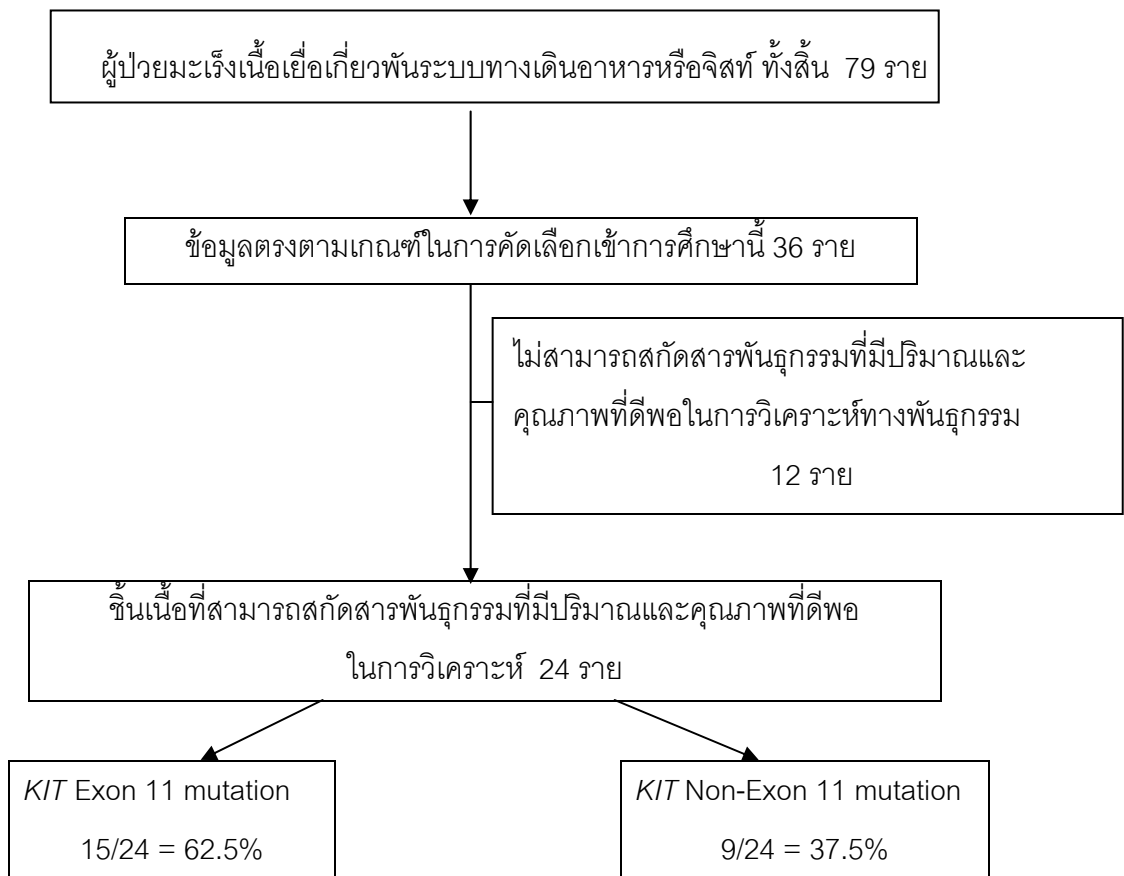
Primary endpoint คือ ความชุกของการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *KIT* ในมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ในผู้ป่วยไทยแตกต่างจากการศึกษาอื่น ๆ หรือไม่

Secondary endpoint คือ เปรียบเทียบการตอบสนองต่อยา *imatinib* ระยะเวลาที่ไม่มีอาการลุกลามของโรค (time to progression) และระยะเวลาการรอดชีวิต (overall survival) ในการกลายพันธุ์ของยีน *KIT* ตำแหน่งที่แตกต่างกัน ในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ ระยะกระจายที่ได้รับการรักษาด้วยยาเฉพาะ *imatinib*

ข้อมูลที่ทำการศึกษาเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ คือ การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *KIT* ในแต่ละตำแหน่ง สรุปข้อมูลเป็นร้อยละ ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์กับการมีหรือไม่มี การตอบสนองต่อการรักษา จะใช้ Chi-square test (ยกเว้นในกรณีที่มีจำนวนตัวอย่างน้อยอาจต้องใช้ Fisher's exact test แทน) ข้อมูลที่เป็นระยะเวลาที่จะเกิดเหตุการณ์ (time to event) ได้แก่ ระยะเวลาที่จะมีการลุกลามของโรค (time to progression) และระยะเวลาการรอดชีวิต (overall survival) จะใช้วิธี Kaplan-Meier ในการวิเคราะห์เพื่อดูความแตกต่างระหว่างการกลายพันธุ์ตำแหน่งที่ต่างกัน และใช้ multiple cox regression model ในการวิเคราะห์ผลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อระยะเวลาที่จะมีการลุกลามของโรคและระยะเวลาการรอดชีวิต การวิเคราะห์ใช้ค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ส่วนความแตกต่างของปัจจัยทางคลินิกอื่น ๆ ระหว่างผู้ป่วยใน 2 กลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งที่ต่างกันจะเปรียบเทียบโดยใช้วิธีทางสถิติตามลักษณะข้อมูลนั้น โดยใช้ Chi-square test สำหรับข้อมูลเชิงคุณภาพ เช่น เพศ, ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง ขนาดก้อนมะเร็ง ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่แสดงออกของ mitotic rate เป็นต้น และใช้ Student T's test สำหรับข้อมูลเชิงปริมาณ เช่น อายุ

บทที่ 7 ผลการศึกษา

ผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ และได้รับการตรวจวินิจฉัยยืนยันโดยการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา และการย้อมพิเศษวิธีทางอิมมูน ที่เข้ารับการรักษาใน โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตั้งแต่ เดือนมกราคม พ.ศ. 2545 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2551 มีจำนวนทั้งสิ้น 79 ราย เมื่อพิจารณาจากเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าการศึกษาพบว่า มีคนไข้ทั้งหมด 36 ราย ส่วนมากที่ไม่สามารถเข้ามาในการศึกษาได้เนื่องจาก ไม่มีชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาหรือมีปริมาณไม่เพียงพอในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ ไม่มีรอยโรคที่สามารถใช้วัดหรือประเมินการตอบสนองต่อยาและไม่สามารถตรวจติดตามประเมินการตอบสนองต่อการรักษาได้ ดังแสดงในรูปที่ 7.1



รูปที่ 7.1 แผนผังแสดงการรวบรวมชิ้นเนื้อมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ ที่นำมาศึกษา

ข้อมูลพื้นฐาน	ผู้ป่วยทั้งหมด (N=79)
Age of diagnosis (mean : years)	55.46 ± 13.99 (15-85 years)
Gender = Female: Male	43 (54.4%): 36 (45.6%)
PS = 0-1: 2 or more	78 (98.7%): 1 (1.3%)
Clinical manifestation	
● GI bleeding	37 (46.8%)
● Abdominal mass	35 (44.3%)
● Abdominal pain	29 (36.7%)
● Weight loss	16 (20.3%)
Primary tumor	
● Stomach	33 (41.8%)
● Duodenum	15 (19%)
● Jejunum and ileum	13 (16.4%)
● Rectum	7 (8.9%)
● Other : retroperitoneum	11 (14%)
Stage of disease (ตั้งแต่เริ่มวินิจฉัย)	
● Localized resectable disease	45 (57%)
● Localized unresectable disease	5 (6.3%)
● Metastasis disease	29 (36.7%)
Metastasis = Liver: Peritoneum: lung	27: 11: 1 (34.2%: 13.9%: 1.3%)
Tumor size	
	N=67
● < 5cm.	11 (16.4%)
● 5-10 cm.	20 (29.9%)
● > 10 cm.	36 (53.7%)
Mitotic rate	
	N=63
● < 5/50 HPF	29 (46%)
● >= 5/50 HPF	34 (54%)

ตารางที่ 7.1 ตารางแสดงข้อมูลพื้นฐานในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์

ข้อมูลพื้นฐาน	ผู้ป่วยทั้งหมด (N=79)
Surgical Margin	
● Positive : Negative	14 (23%):46 (75.4%)
Histopathology	
Spindle : Epithelioid : mixed cell	67 (84.8%): 3 (3.8%): 9 (11.4%)
IHC : KIT	76 (98.7%)
Risk Classification for prognosis	N=67
● Low	8 (10.1%)
● Intermediate	10 (12.7%)
● High	49 (62%)
Treatment	
● Surgery	72 (91.1%)
● Imatinib	51 (64.6%)
● Sunitinib	3
● Rx.= Adjuvant : neoadjuvant : metastasis	8 (15.7%):7 (13.7%):36 (70.6%)

ตารางที่ 7.1 (ต่อ) ตารางแสดงข้อมูลพื้นฐานในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์

ผู้ป่วยที่รวบรวมข้อมูลทั้งหมด 79 ราย อายุที่เริ่มวินิจฉัยเฉลี่ย 55.46 ปี เป็นผู้ชายมากกว่าผู้หญิง 43 รายเทียบกับ 36 ราย (54.4% vs 45.6%) ส่วนมากสภาพผู้ป่วย (Performance status) คือ 0-1 (98.7%) อาการที่นำมารพ. ส่วนมากคือ เลือดออกจากรูทางเดินอาหาร 46.8% คลำพบก้อนในท้อง 44.3% ปวดท้อง 36.7% น้ำหนักลดลง 20.3% เบื่ออาหาร 7.6%และไม่มีอาการแสดง 6.3% ตำแหน่งที่พบก้อนเนื้อออกที่มากที่สุดเรียงตามลำดับ คือ กระเพาะอาหาร 41.8%, ลำไส้เล็กส่วนต้น 19%, ลำไส้เล็กส่วนกลางและปลาย 16.4%, ลำไส้ใหญ่ 8.9%และอื่นๆ14% เมื่อแบ่งตามระยะของโรค พบว่าเป็นโรคในระยะแรกสามารถผ่าตัดได้ (localized respectable disease) 45/79 (57%), ระยะที่ยังไม่ลุกลามแต่ผ่าตัดไม่ได้ (localized unresectable disease) 5/79 (6.3%) สำหรับระยะที่มีการกระจายในการศึกษานี้พบ 29/79 (36.7%) ซึ่งมากกว่าการศึกษาอื่นๆ อาจเนื่องมาจากข้อมูลที่ได้เก็บรวบรวมมา

การวินิจฉัยส่วนมากได้จากการตัดชิ้นเนื้อ biopsy 77/79 (97.5%) ที่เหลือตรวจด้วยวิธีเจาะด้วยเข็ม (fine-needle aspiration) 2/79 (2.5%) จากการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา พบลักษณะ แบบ Spindle cell 67/79 (84.8%), Epithelia cell 3/79 (3.8%) และ Mixed cell 9/79 (11.4%) จากการรวบรวมข้อมูลพบว่า มีการวินิจฉัยผิดก่อนหน้านี้ 6 รายใน 79 ราย (7.6%) ซึ่งส่วนมากจะวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารอื่นๆ และมักเป็นการวินิจฉัยในช่วงก่อนหน้าปี พ.ศ. 2545 เมื่อตรวจการย้อมพิเศษด้วยวิธีทางอิมมูน พบ KIT เป็นบวก 76/77 (98.7%) ส่วนมากการติดสีของ KIT จะกระจายทั่วทั้งเซลล์ 72/76 (94.74%) ในกลุ่มนี้มีการติดสีของ KIT น้อยและไม่สม่ำเสมอ 4/76 (5.26%) ในรายที่ไม่มีการติดสีของ KIT วินิจฉัยโรคนี้ได้จากการติดสีของ CD34 แทน ส่วนการติดสีอื่นๆ เช่น CD34 เป็นบวก 34/45 (75.56%), SMA (smooth muscle actin) เป็นบวก 21/52 (40%), S-100 เป็นบวก 29/52 (55.8%) แต่ติดสีไม่สม่ำเสมอ และกระจายมากกว่า ซึ่งจากการศึกษาอื่นส่วนมากตรวจพบเป็นลบ ประมาณ มากกว่า 95% , Vimentin เป็นบวก 20/21 (95.2%), Desmin เป็นบวก 4/28 (14.3%) เทียบกับการศึกษาอื่นพบว่าตรวจพบเป็นลบมากกว่า 95% และ Ki-67 เป็นบวก 8/10 (80%)

ขนาดของก้อนมะเร็งที่เริ่มวินิจฉัย ส่วนมากมีขนาดมากกว่า 10 เซนติเมตร 36/67 (53.7%) ส่วนค่าของการแบ่งตัวของเนื้องอก mitotic rate พบว่า 34/63 ราย (54%) มีค่ามากกว่าเท่ากับ 5/50 HPF (high power field) ตรวจชิ้นเนื้อหลังจากผ่าตัดพบว่า ส่วนมากสามารถผ่าตัดก้อนได้หมด 46/61 ราย (75.4%) ภาวะแทรกซ้อนที่พบได้ คือ การแตกของก้อน, เลือดออกในก้อนและมีการติดเชื้อที่ก้อน พบ 5 รายใน 79 ราย (6.3%) การรักษาที่ให้ คือ การผ่าตัดก้อนเนื้องอก 72/79 ราย (91.1%) อาจเป็นการรักษาแรกในกรณีที่ผ่าตัดได้ หรือ ผ่าตัดหลังจากที่ให้ยา imatinib ไประยะเวลาหนึ่งแล้วก้อนมีขนาดเล็ก ผลการผ่าตัดพบว่าสามารถผ่าตัดก้อนออกได้หมด (R0 resection) 48/76 ราย (66.7%) , ผ่าตัดก้อนออกหมดแต่เมื่อตรวจทางพยาธิวิทยาแล้วยังเหลือมะเร็งอยู่ (R1 resection) 5/76 ราย (6.9%) และ ผ่าตัดก้อนออกแต่เหลือเนื้องอกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (R2 resection) 19/76 ราย (26.4%) มีผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา imatinib 51/79 ราย (64.6%) ในผู้ที่ได้รับยาพบว่าเป็นการรักษาในระยะที่มีการกระจาย 36 รายใน 51 ราย (70.6%), เป็นการรักษาเพื่อลดขนาดก้อนในรายที่เป็นระยะที่ยังไม่ลุกลาม

เมื่อศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการกลับเป็นซ้ำของโรคในระยะแรกที่สามารถผ่าตัดได้ (localized respectable disease) พบว่า ขนาดก้อนมะเร็งที่มากกว่า 10 เซนติเมตร มีการกลับเป็นโรคซ้ำ 7 ราย ใน 14 ราย (50%) เทียบกับขนาดก้อนน้อยกว่า 5 เซนติเมตร มีการกลับเป็นโรคซ้ำ 2 รายใน 11 ราย (18.2%) ก้อนที่ขนาดใหญ่มีโอกาสกลับเป็นซ้ำมากกว่าแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.164$) ส่วนลักษณะทางพยาธิวิทยา mitotic rate ของชิ้นเนื้อ พบว่า ค่ามากกว่าและเท่ากับ 5/50 HPF (high power field) มีการกลับเป็นโรคซ้ำ 6 ราย ใน 16 ราย (37.5%) เทียบกับ ค่าที่น้อยกว่า 5/50 HPF (high power field) มีการกลับเป็นโรคซ้ำ 3 รายใน 18 ราย (16.7%) ค่าของการแบ่งตัวของเนื้องอกที่มากมีผลต่อการกลับเป็นซ้ำของโรคที่มากกว่าเช่นกัน แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.163$) ถ้าเราจัดแบ่งผู้ป่วยออกเป็นกลุ่มความเสี่ยงในการกลับเป็นซ้ำ โดยพิจารณาจากขนาดก้อนและลักษณะทางพยาธิวิทยา mitotic rate ของชิ้นเนื้อ แบ่งเป็น 4 ประเภท คือ ความเสี่ยงน้อยมาก (very low risk), ความเสี่ยงน้อย (low risk), ความเสี่ยงปานกลาง (Intermediate risk) และความเสี่ยงมาก (high risk) ซึ่งอ้างอิงจากตารางที่ 2.2 ของ Fletcher และคณะ จากการศึกษาพบว่า กลุ่มที่มีความเสี่ยงมาก (high risk) มีการกลับเป็นโรคซ้ำ 10 รายใน 22 ราย (45.45%) ซึ่งมากกว่ากลุ่มที่มีความเสี่ยงปานกลาง (intermediate risk) ที่มีการกลับเป็นโรคซ้ำ 1 รายใน 5 ราย (20%) และกลุ่มที่มีความเสี่ยงน้อย (low risk) มีการกลับเป็นโรคซ้ำ 1 รายใน 8 ราย (12.5%) แต่ทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.23$) สำหรับผลของการผ่าตัดกับการกลับเป็นซ้ำของโรค พบว่า ในกรณีที่ผ่าตัดไม่หมด (positive margin) มีการกลับเป็น

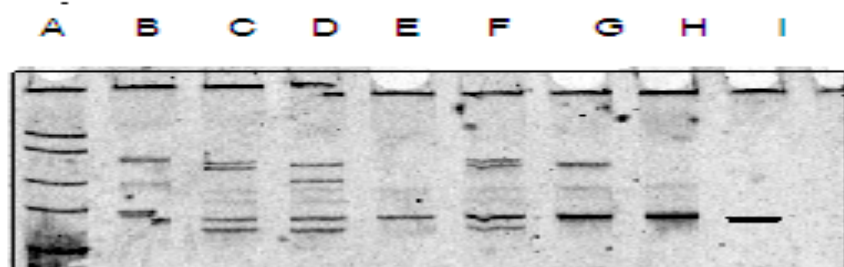
จากข้อมูลคนไข้ที่อยู่ในการศึกษาทั้งหมด 36 ราย ที่นำมาสกัดสารพันธุกรรมจากชิ้นเนื้อ paraffin-embedded พบว่าสามารถสกัดสารพันธุกรรมที่มีคุณภาพและปริมาณมากพอที่จะนำไปทำการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม คือ polymerase chain reaction และ DNA sequencing ต่อ *KIT* exon 11 และ exon 9 ทั้งสิ้น 24 ราย พบว่ามีการกลายพันธุ์ทั้งสองตำแหน่งทั้งหมด 19 ใน 24 ราย คิดเป็น 79.17% สรุปผลการกลายพันธุ์แสดงดังตารางที่ 7.2

<i>KIT</i> mutation (PCR and Sequencing)	ผู้ป่วยทั้งหมด (N=24)
<i>KIT</i> exon 11 mutation	15/24 (62.5%)
● Deletion	10/15 (66.7%)
● Complex mutation	3/15 (20%)
● Substitution	2/15 (13.3%)
<i>KIT</i> exon 9 mutation	4/24 (16.7%)
● Duplication	4/4 (100%)
Not found <i>KIT</i> exon 11 and 9 mutation	5/24 (20.8%)

ตารางที่ 7.2 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีนคิท ในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิตใน การศึกษา

ตัวอย่างข้อมูลที่ได้จากการทดสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธี PCR ของ *KIT* exon 11 แสดงดังรูปที่

7.3



Ladder +ve +ve +ve -ve +ve +ve -ve control

+ve = *KIT* mutation

รูปที่ 7.2 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ conventional PCR สำหรับ *KIT* exon 11

A= Ladder, B= sample1 +ve PCR, C= sample2 +ve PCR, D= sample3 +ve PCR,

E= sample4 -ve PCR, F= sample5 +ve PCR, G= sample6 +ve PCR, H= sample7 -ve PCR,

I= baseline

** Sample H ผลตรวจ PCR for exon 11 mutation เป็นลบ แต่เมื่อทำการตรวจด้วยวิธี DNA sequencing → พบการกลายพันธุ์แบบ base substitution

หลังจากนั้นนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้ทั้งหมด เข้าสู่กระบวนการทำ DNA sequencing ต่อไป การกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 11 ที่พบบ่อย คือ deletion (in-frame Deletion) ตำแหน่ง codon 550-560 มีการหายไปของนิวคลีโอไทด์ จำนวนตั้งแต่ 6-60 นิวคลีโอไทด์ พบว่า 9 ใน 10 ราย (90%) มีการกลายพันธุ์ที่บริเวณดังกล่าว โดยตำแหน่งที่พบมาก คือ codon 556-558 ดังตารางที่ 7.3

Case 2

Codon 550

560

570

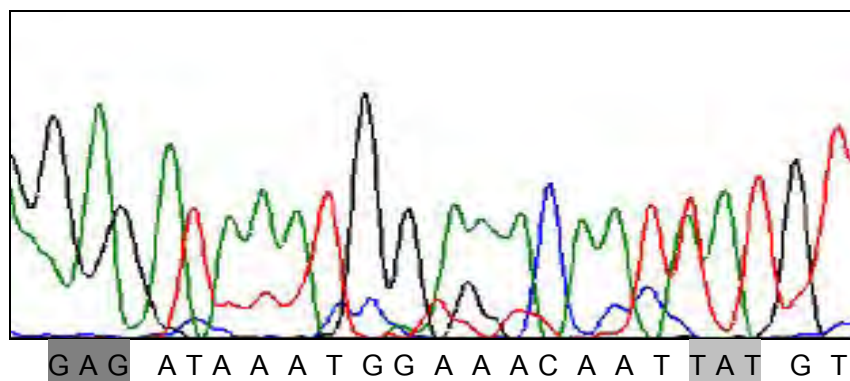
AAACCCATGTATGAAGTACAGTGGGAAGGTTGTTGAGGAGATAAATGGAAACAATTATGTTTACATAGACC
 GTAAACCCAACAC

Complex mutation, Deletion 60 base, codon 551-570

Base substitution = ATAG>GTAA

รูปที่ 7.3 แสดงตัวอย่างการกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 11 แบบ complex mutation

สำหรับการกลายพันธุ์แบบ Base substitution ซึ่งตรวจไม่ได้จากการทำวิธี PCR แต่พบว่ามี การกลายพันธุ์ เมื่อทำ DNA sequencing ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์ในงานวิจัยนี้ คือ codon 557 (TGG557AGG เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Tryptophan เป็น Arginine) และ codon 568 (TAT568AAT เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Tyrosine เป็น Asparagine) ดังรูปที่ 7.4



Codon 562

T → A = AAT

รูปที่ 7.4 แสดงกราฟของ นิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing มีการเปลี่ยนแปลงของ Base codon 568 TAT → AAT (เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Tyrosine เป็น Asparagine)

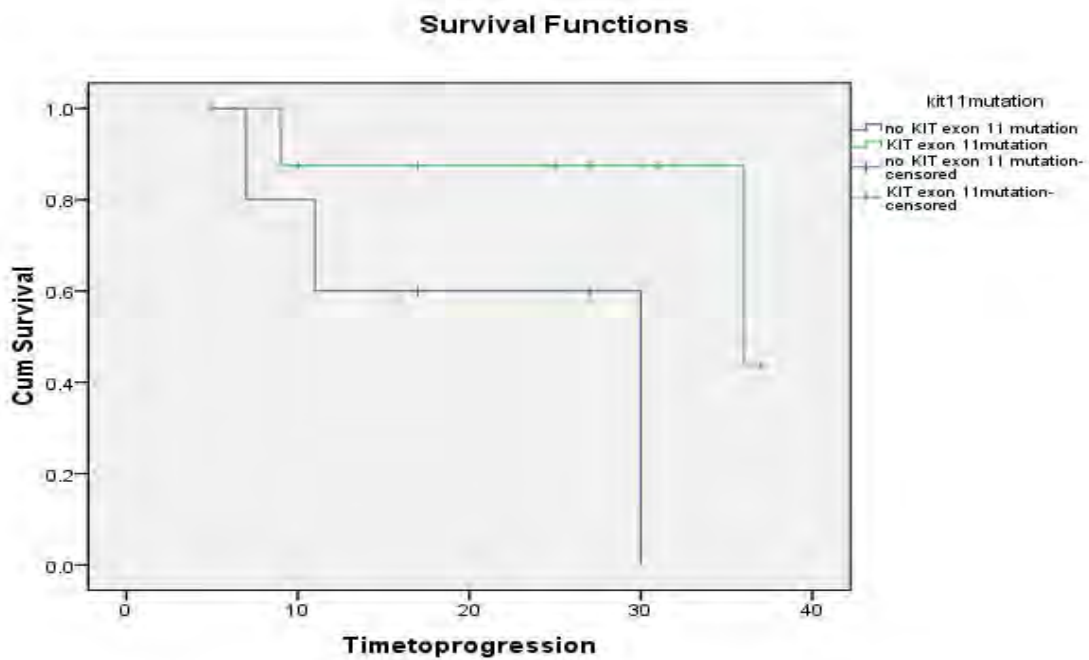
สำหรับการกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 9 ตรวจด้วยการทำ DNA sequencing จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาทั้งหมด 9 ราย พบการกลายพันธุ์ 4 ราย ทั้งหมดเป็นแบบ duplication ที่ตำแหน่ง codon 502dupGCCTAT

จากการติดตามผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ระยะกระจาย ที่ได้รับการรักษาด้วยยา imatinib และมีชิ้นเนื้อที่สามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ 14 ราย พบว่าข้อมูลเกี่ยวกับผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา ระยะเวลาที่ไม่มีอาการลุกลามของโรค และระยะเวลาการรอดชีวิตเมื่อแบ่งตามการกลายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ดังแสดงตารางที่ 7.4 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในเรื่องของอายุเฉลี่ยที่เริ่มวินิจฉัย ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง ลักษณะทางชิ้นเนื้อพยาธิวิทยา ขนาดของก้อนมะเร็งและ mitotic rate ในกลุ่มที่มีและไม่มีอาการกลายพันธุ์ของคิท exon 11 แต่พบว่ากลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของคิท exon 11 มีรอยโรคที่กระเพาะอาหารมากกว่าอีกกลุ่ม (66.7%) ส่วนกลุ่มที่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของคิท exon 11 มีรอยโรคที่ลำไส้เล็กมากกว่า (55.6%) แต่ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

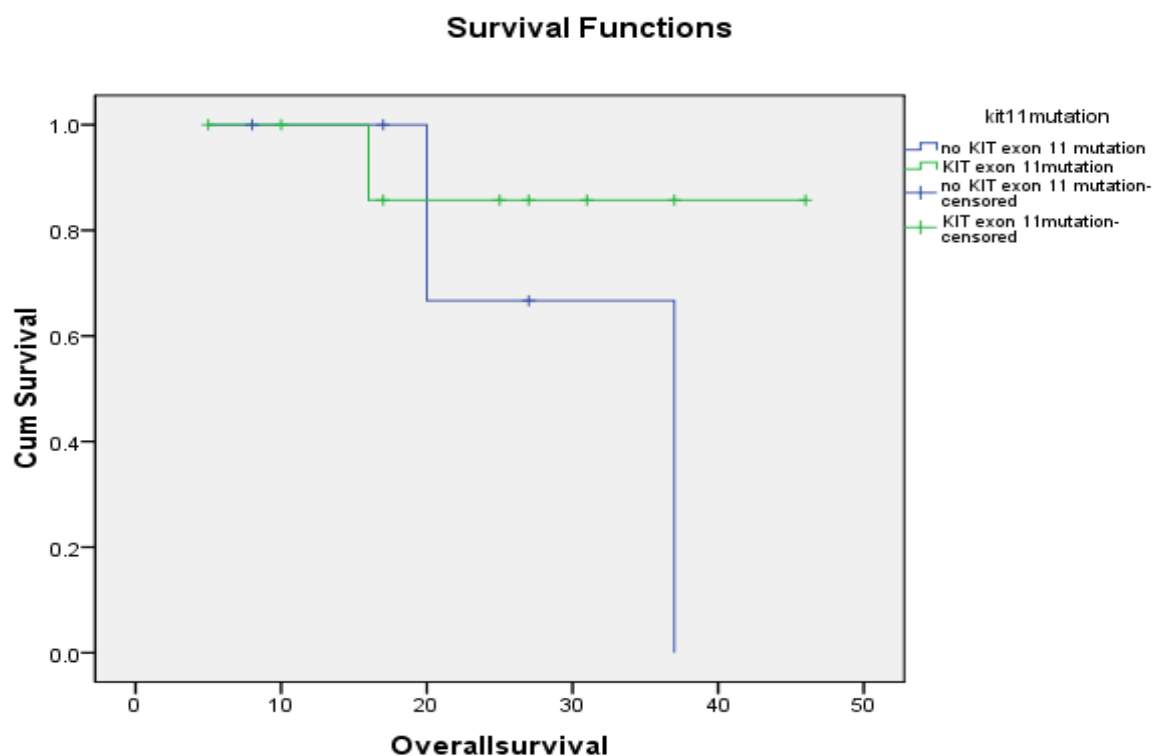
สำหรับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib นั้น พบว่ากลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของคิท exon 11 มีการตอบสนองแบบบางส่วน (partial response) 62.5% เทียบกับ 37.5% ในอีกกลุ่มที่ไม่มีอาการกลายพันธุ์ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.685$) ส่วนการตอบสนองแบบ stable disease พบในกลุ่มที่กลายพันธุ์ 3 ราย (60%) เทียบกับ 2 ราย (40%) ในกลุ่มที่ไม่มีอาการกลายพันธุ์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน หลังจากติดตามผู้ป่วยเฉลี่ย 22.5 เดือน (5-46 เดือน) ค่ามัชฌิมของระยะเวลาที่ไม่มีอาการลุกลามของโรค (time to progression) ของผู้ป่วยระยะที่มีการกระจายโดยรวม คือ 28.72 เดือน [95%CI, 22.3-35.2] ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ทั้ง EORTC 62005 และ US Intergroup S0033 และเมื่อดูในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ พบว่าค่ามัชฌิมของระยะเวลาที่ไม่มีอาการลุกลามของโรคในผู้ป่วยที่มีและไม่มีอาการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 หลังจากการรักษาด้วยยา imatinib คือ 33.06 เดือน [95%CI, 26.7-39.4] เทียบกับ 25.4 เดือน [95%CI, 10.5-32.7] ($p=0.083$) สำหรับค่ามัชฌิมของระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยระยะที่มีการกระจายโดยรวม คือ 37.9 เดือน [95%CI, 30.6-45.3] เมื่อเทียบกับผลการศึกษาแรก B2222 ของ Demetri และคณะที่พบว่ามีมัชฌิมของระยะเวลาการรอดชีวิต คือ 57 เดือน ส่วนค่ามัชฌิมของระยะเวลาการรอดชีวิตในผู้ป่วยที่มีและไม่มีอาการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 หลังจากการรักษาด้วยยา imatinib คือ 41.71 เดือน [95%CI, 33.9-49.5] เทียบกับ 31.33 เดือน [95%CI, 18.5-44.2] ($p=0.263$) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน ดังแสดงดังรูปที่ 7.5 และ 7.6 ตามลำดับ ค่าระยะเวลาการรอดชีวิตดังกล่าวน้อยกว่าการศึกษานี้ อาจเนื่องมาจากการติดตามการรักษาไม่นานพอ

ข้อมูลพื้นฐาน	<i>KIT</i> exon11 mutation (N=15)	Non- <i>KIT</i> exon11 mutation (N=9)	P value
1. Age (mean :years)	59.7 ±10.55	58.78 ± 14.5	P=0.854
2. primary tumor			P=0.084
● Stomach	10 (66.7%)	2 (22.2%)	
● Duodenum	2 (13.3%)	5 (55.6%)	
● Jejunum+ileum	1 (6.7%)	1 (11.1%)	
● Other	2 (13.3%)	1 (11.1%)	
3. Histopathology			P=0.822
● Spindle cell	12 (80%)	8 (88.9%)	
● Epithelioid cell	1 (6.7%)	0	
● Mixed cell	2 (13.3%)	1 (11.1%)	
4. mass size			P=0.498
● < 5 cm.	2 (13.3%)	1 (12.5%)	
● 5-10 cm.	6 (40%)	1 (12.5%)	
● > 10 cm.	7 (46.7%)	6 (75%)	
5. mitotic figure			P=0.613
● < 5/50 HPF	3 (21.4%)	2 (33.3%)	
● ≥ 5/50 HPF	11 (78.6%)	4 (66.7%)	
6. Treat with Glivec (N=14)	9/24	5/24	
7. Tumor Response (N=14)			P=0.685
● Partial response	5 (62.5%)	3 (37.5%)	
● Stable disease	3 (60%)	2 (40%)	
8. TTP (months)	33.06	25.4	P=0.083
9. Death (N=11)	2	3	
9.Overall survival (months)	41.71	31.33	P=0.263

ตารางที่ 7.4 ข้อมูลพื้นฐานและปัจจัยทางคลินิกที่พบในผู้ป่วยมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจีสท์ โดยแบ่งตามลักษณะของการกลายพันธุ์ที่มีหรือไม่มีการกลายพันธุ์ของคิท exon 11



รูปที่ 7.5 แสดงระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรคในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนคิต exon 11 หลังจากการรักษาด้วยยาเฉพาะ imatinib



รูปที่ 7.6 แสดงระยะเวลาการรอดชีวิต ในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 หลังจากการรักษาด้วยยาเฉพาะ imatinib

เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาน้อยร่วมกับทางห้องปฏิบัติการสามารถแยกสกัดสารพันธุกรรมจากชิ้นเนื้อได้น้อย ประกอบกับคำถามหลักของงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของยีนคิท ทำให้งานวิจัยนี้ไม่สามารถบอกได้ถึงความแตกต่างของผลตอบสนองการรักษาด้วยยา ระยะเวลาที่ไม่มีอาการลุกลามของโรคและระยะเวลาการรอดชีวิตในกลุ่มที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 ได้

บทที่ 8 อภิปรายผลการวิจัย

โรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ เป็นโรคที่รู้จักมากขึ้นกว่าในอดีต และจากการที่ค้นพบกลไกการเกิดโรคที่สำคัญ คือ การกลายพันธุ์ที่ทำงานมากกว่าปกติของยีนคิท และยีน *PDGFR* การรักษาด้วยยาเฉพาะ imatinib ที่ออกฤทธิ์ตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ทำให้ผู้ป่วยโรคนี้มีอัตราการรอดชีวิตที่ดีขึ้นมากเมื่อเทียบกับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด และการฉายแสงเช่นในอดีต 80-90% ของโรคนี้มีความผิดปกติของยีนคิท และส่วนน้อยที่มีความผิดปกติของยีน *PDGFRA* อุบัติการณ์การตรวจพบการกลายพันธุ์ในแต่ละการศึกษามีความแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วย ตำแหน่งของก้อนมะเร็งที่ต่างกันก็มีอุบัติการณ์การตรวจพบการกลายพันธุ์ก็จะต่างด้วย รวมทั้งเทคนิค วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่ต่างกันในแต่ละการศึกษา

จากข้อมูลส่วนมาก พบการกลายพันธุ์ของยีนคิทประมาณ 70-80% ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่มากที่สุด คือ exon 11 ประมาณ 60-70% สำหรับในการศึกษานี้พบการกลายพันธุ์ของยีนคิท 79.17% เป็นการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง exon 11 62.5% ซึ่งมีอุบัติการณ์ใกล้เคียงกับการศึกษาอื่นๆ ในต่างประเทศ แต่ที่ตรวจการกลายพันธุ์ได้น้อยกว่าอาจเป็นเพราะตัวอย่างชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่รวบรวมได้มีปริมาณน้อย ประกอบกับการสกัดสารพันธุกรรมในชิ้นเนื้อ paraffin-embedded section ได้ปริมาณสารพันธุกรรมคุณภาพไม่ค่อยดีและไม่สามารถดำเนินการขั้นตอน PCR ได้ แม้จะใช้วิธีการสกัดสารด้วยชุดเฉพาะที่มีประสิทธิภาพแล้วก็ตาม ยังพบว่ามี 12 ราย คิดเป็น 33.3% ที่ไม่สามารถสกัดสารพันธุกรรมได้ ผู้วิจัยคิดว่าสาเหตุอาจเป็นจากชิ้นเนื้อส่วนมากเป็นชิ้นเนื้อที่เก็บมาแล้วตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 สารพันธุกรรมบางส่วนไม่สมบูรณ์พอที่จะตรวจหาการกลายพันธุ์ ส่วนลักษณะของการกลายพันธุ์ *KIT* exon 11 ที่พบบ่อย คือ deletion (in-frame Deletion) พบ 10 ใน 15 ราย (66.7%) ตำแหน่ง codon 550-560 ซึ่งมีการหายไปของนิวคลีโอไทด์ จำนวนตั้งแต่ 6-60 นิวคลีโอไทด์ ข้อมูลที่ได้เหมือนกับการศึกษาอื่นๆก่อนหน้านี้ ส่วนการกลายพันธุ์ แบบ Base substitution การศึกษาอื่นๆมักพบที่ตำแหน่ง codon 557,559,560 และ 576 แต่จากการศึกษานี้พบที่ตำแหน่ง codon 557 และ codon 568 ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนด้วย ข้อมูลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ ดังนั้นเชื่อชาติอาจมีผลต่อข้อมูลดังกล่าวคงต้องมีการเก็บรวบรวมข้อมูลที่มากขึ้นต่อไป

สำหรับการกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 9 จากการศึกษานี้พบ 16.7% มากกว่าการศึกษาอื่นๆ แต่เมื่อพิจารณาข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยพบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษานี้มีมะเร็งจิสท์ที่มีรอยโรคจากลำไส้เล็ก

อยู่เป็นจำนวนมาก (9/24 ราย) จึงทำให้พบการกลายพันธุ์ของ exon 9 ได้มากกว่ารายงานอื่น และเป็นอีกเหตุผลที่ทำให้ตรวจพบการกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 11 น้อยกว่าการศึกษาอื่น ข้อมูลอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีนคิทในผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ในการศึกษาต่างๆ เทียบกับการศึกษานี้ แสดงในตารางที่ 8.1

การศึกษา		Number	<i>KIT</i> mutation	Exon 11 mutation	Exon 9 mutation	Other/Wild-type
Heinrich 2002	USA	127	88.2%	85/127 (66.9%)	10%	2%/15%
Rubin 2001	USA	48	92%	34/48 (71%)	13.6%	9%
Rankin 2003	Europe		80%	67%	10%	3%
Penzel R 2005	Germany		69.6%	56.5%	11.6%	NA
Debiec-Rychter	Europe	377	83.6%	248/377 (65.8%)	15.4%	NA
Andersson	Sweden/Norway	177	65%	101/177 (57%)	3.4%	0.6%/35.6%
Tae Won Kim	Korea	86	74%	61/86 (70.1%)	3.5%	NA
Chun-NanYeh	Taiwan	54	90.7%	40/54 (74%)	16.7%	9.3
Napa 2008	Thailand	24		62.5%	16.7%	20.8%

ตารางที่ 8.1 แสดงข้อมูลอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีนคิทในผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ในการศึกษาต่างๆ เทียบกับการศึกษานี้

สำหรับการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 9 จากการศึกษาพบว่า 100% มีลักษณะการกลายพันธุ์แบบ duplication ตำแหน่ง codon 502-503 จำนวน 6 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเหมือนกับการศึกษาวิจัยอื่นๆ

เนื่องจากการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจการกลายพันธุ์ตำแหน่งอื่น เช่น การกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 13, 17 ซึ่งจากข้อมูลในการศึกษาก่อนนี้พบว่าตำแหน่งดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์ได้น้อยประมาณ 5% และ การกลายพันธุ์ของยีน *PDGFR* exon 12,14 และ 18 พบประมาณ 5-8 % ทำให้

ไม่ทราบอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ทั้งหมดในผู้ป่วยไทยจึงควรทำการตรวจเพิ่มเติมต่อไปโดยเฉพาะในกลุ่มที่ตรวจการกลายพันธุ์ด้วย *KIT* exon 11 และ exon 9 แล้วไม่พบความผิดปกติ

ในข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่พิจารณาเรื่อง อายุ ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง ลักษณะทางพยาธิวิทยา และ mitotic rate ขนาดของก้อนมะเร็ง เมื่อเทียบกับลักษณะการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของคิท exon 11 มีรอยโรคที่กระเพาะอาหารมากกว่าอีกกลุ่ม (66.7%) ส่วนกลุ่มที่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของคิท exon 11 มีรอยโรคที่ลำไส้เล็กมากกว่า (55.6%) ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา imatinib พบว่า กลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของคิท exon 11 มีการตอบสนองแบบ partial response 62.5% เทียบกับ 37.5% ในอีกกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ซึ่งไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.685$) ในเรื่องของระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรคหลังการรักษาด้วยยา imatinib พบว่าค่ามัชฌิมของระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรค ในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 คือ 33.06 เดือน [95%CI, 26.7-39.4] เทียบกับ 25.4 เดือน [95%CI, 10.5-32.7] ($p=0.083$) ส่วนค่ามัชฌิมของระยะเวลาการรอดชีวิตในผู้ป่วยที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 11 หลังจากการรักษาด้วยยา imatinib คือ 41.71 เดือน [95%CI, 33.9-49.5] เทียบกับ 31.33 เดือน [95%CI, 18.5-44.2] ($p=0.263$) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน แต่เมื่อดูรายละเอียดในเรื่องของระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรค แล้วพบว่า มีแนวโน้มที่การกลายพันธุ์ของ *KIT* exon 11 มีระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรค นานกว่าในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนตำแหน่งดังกล่าวเหมือนการศึกษาอื่นๆ เพราะค่า $P=0.083$ อาจเนื่องมาจากข้อมูลที่วิเคราะห์น้อยและระยะเวลาในการติดตามผู้ป่วยไม่นานพอคงต้องเก็บรวบรวมข้อมูลต่อไป

บทที่ 9

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาวิเคราะห์ย้อนหลัง โดยต้องการศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ของ ยีนคิท ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญในการเกิดโรคมะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระบบทางเดินอาหารหรือจิสท์ ในผู้ป่วย ไทย โดยเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆที่ทำมาก่อนหน้านี้ และ ต้องการเปรียบเทียบผลของการรักษา ด้วยยา imatinib กับการกลายพันธุ์ของยีนคิทตำแหน่งต่างๆ รวมทั้งศึกษาระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลาม ของโรคและระยะเวลาการรอดชีวิต

ข้อมูลที่สำคัญ คือ ความชุกของการกลายพันธุ์ ซึ่งขึ้นกับขั้นตอนการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ใน ห้องปฏิบัติการ เริ่มจากการเก็บรวบรวมชิ้นเนื้อที่มีอยู่มาอ่านซ้ำและสกัดสารพันธุกรรมจากชิ้นเนื้อ paraffin-embedded section สารพันธุกรรมที่สกัดได้ออกมาจะมีคุณภาพและปริมาณที่เพียงพอหรือไม่ ขึ้นกับ หลายสาเหตุ ในการศึกษาพบว่าสามารถสกัดสารพันธุกรรมที่ดี เพียง 66.7% (24/35) ไม่เท่ากับ ขนาดตัวอย่างที่คำนวณไว้ตั้งแต่แรก คือ 35 ราย เป็นผลให้ได้ข้อมูลที่ไม่เพียงพอ และจากข้อมูลพบว่า ชิ้นเนื้อที่ได้มักเป็นชิ้นเนื้อในช่วงปี พ.ศ. 2549-2551 ทำให้ระยะเวลาที่ใช้ติดตามการรักษาไม่นาน พอที่จะบอกถึงระยะเวลาที่ไม่มีการลุกลามของโรคและระยะเวลาการรอดชีวิตได้ นอกจากนี้การศึกษามี จำนวนตัวอย่างค่อนข้างน้อยและเป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง ทำให้ไม่สามารถสรุปผลได้มากกว่านี้

การใช้การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนคิท exon 9 ด้วยวิธี DNA sequencing เป็นวิธีมาตรฐานที่ ใช้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ แต่เนื่องจากใช้เวลานานในการตรวจ จึงน่าจะมีการประยุกต์ด้วยวิธีการใหม่ เช่น high resolution melts polymerase chain reaction ซึ่งสามารถลดระยะเวลาการทำ PCR มาตรฐาน และ DNA sequencing ได้ ซึ่งการตรวจวิธีดังกล่าวนี้เริ่มมีการนำไปใช้ในงานวิจัยของโรคอื่น ๆ มากมาย ในการศึกษานี้ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจดังกล่าวแต่เนื่องจากข้อมูลที่ได้ยังมีข้อผิดพลาดที่ ต้องปรับปรุงอีกมากจึงไม่ได้นำเสนอในผลการวิจัยนี้

ข้อเสนอแนะ

- ควรมีติดตามการรักษาต่อเนื่องประมาณ 5-6 ปี แล้วจึงรวบรวมข้อมูลอีกครั้ง เนื่องจาก การศึกษา phase III ก่อนนี้พบว่าผู้ป่วยระยะกระจายหลังจากรักษาด้วยยา imatinib มี ค่ากลางของระยะเวลาการรอดชีวิตที่ยาวนานถึง 57 เดือน
- ควรมีการเก็บชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยามาทำการตรวจเพิ่มเติม เก็บข้อมูลมากขึ้นและ ทำการศึกษาแบบไปข้างหน้าในอนาคต เนื่องจากการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจหาการ

กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นๆของยีนคิท เช่น exon 13, exon 17 และยีน *PDGFRA* จะได้เป็นข้อมูลทั้งหมด เนื่องจากมีข้อมูลจำนวนมากกล่าวว่าการกลายพันธุ์ของยีนคิทมักเป็นที่ยีนเดียวและตำแหน่งเดียวทำให้การศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจการกลายพันธุ์ทั้งหมดในทุกๆชั้นเนื้อ แต่จากผลของการศึกษาใหม่ที่มีมากขึ้นพบว่าอาจพบอุบัติการณ์การกลายพันธุ์มากกว่า 1 ตำแหน่งได้ ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาต่อเนื่องโดยทำการตรวจการกลายพันธุ์เพิ่มเติมในทุกๆชั้นเนื้อตัวอย่าง

- จากข้อมูลปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่ดีในการบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งการกลายพันธุ์และการตอบสนองต่อยาตัวที่สอง คือ sunitinib ดังนั้น ควรมีการศึกษาต่อเนื่องเรื่องดังกล่าวต่อไป

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แบบบันทึกการเก็บข้อมูล (Record form)

ID No. HN.....

1. Base line characteristics

Date of birth (dd/mm/yyyy).....

Gender male femalePerformance status 0 1 2 3 4 NA

Clinical presentation:

Abdominal pain yes noMass yes noGI bleeding yes nowt.loss yes noLoss of appetite yes noAsymptomatic yes no

Primary tumor Location:

 Stomach Duodenum jejunum ileum Colon rectum Esophagus retroperitoneum Other

Stage of disease

 1. localized respectable 2. localized unresectable 3. Metastatic disease

Site of metastasis

Liver yes noPeritoneum yes noLung yes noBone yes noOther yes no

specify.....

Complication : 1. Bleeding 2.perforation 3.infection 4. Mixed 5. No

Diagnosis:

Date (dd/mm/yyyy) (via pathology)

Method 1. Cytology 2. HistologyHistopathology 1. Spindle cell tumor 2. Epithelium tumor 3. Mixed type

IHC : CD117 yes no : Vimentin yes no
 : CD34 yes no : Desmin yes no
 : SMA yes no
 : Ki67 yes no
 : S-100 yes no

Prognosis factor:

1.1 mass size 1. < 5 cms. 2. 5-10 cms. 3. > 10 cms.1.2 mitotic figure 1. < 5/50 HPF 2. > 5/50 HPF1.3 margin : positive negative2. c-KIT expression (via IHC) yes no

3. Mutation Analysis

KIT mutation yes no mutation

- exon 11 mutation yes location no
- exon 9 mutation yes location no
- exon 13 mutation yes location no
- other mutation yes location no

PDGFRA mutation yes specify..... no

4. Recurrence

First recurrence Date (mm/dd/yyyy)

Site of recurrence: Local yes no
 Liver yes no
 Peritoneum yes no
 Lung yes no
 Bone yes no
 Other yes no

specify.....

Second recurrence Date (mm/dd/yyyy)

Site of recurrence: Local yes no
 Liver yes no
 Peritoneum yes no

Lung yes no
 Bone yes no
 Other yes no

specify.....

5. Treatment

5.1 First Surgery no

yes date (dd/mm/yyyy).....

Procedure

Result complete resection

Microscopic residual tumor

Gross residual tumor

Surgeon

Second Surgery no

Yes date (dd/mm/yyyy).....

Procedure

Result complete resection

Microscopic residual tumor

Gross residual tumor

Surgeon

Third Surgery no

Yes date (dd/mm/yyyy).....

Procedure

Result complete resection

Microscopic residual tumor

Gross residual tumor

Surgeon

5.2 Systemic treatment

5.2.1 First line

Imatinib Sunitinib Sorafenib Everolimus

Other.....

Date start (dd/mm/yyyy).....

Dose.....

SE of drug.....

Maximum response (RECIST)

CR PR SD PD Unable to assess

Maximum response (Clinical)

CR PR SD PD Unable to assess
 Dose reduction yes no
 Date 1st dose reduction (dd/mm/yyyy).....
 Dose change to
 Date 2nd dose reduction (dd/mm/yyyy).....
 Dose change to
 Date Stop (dd/mm/yyyy).....
 Reason for stopping
 Progressive Disease
 Death
 Adverse Events: please specify
 Other

5.2.2

Second line
 Imatinib Sunitinib Sorafenib Everolimus
 Other.....
 Date start (dd/mm/yyyy).....
 Dose.....
 Maximum response (RECIST)
 CR PR SD PD Unable to assess
 Maximum response (Choi)
 CR PR SD PD Unable to assess
 Dose reduction yes no
 Date 1st dose reduction (dd/mm/yyyy).....
 Dose change to
 Date 2nd dose reduction (dd/mm/yyyy).....
 Dose change to
 Date Stop (dd/mm/yyyy).....
 Reason for stopping
 Progressive Disease
 Death
 Adverse Events: please specify
 Other

5.2.3

Third line
 Imatinib Sunitinib Sorafenib Everolimus
 Other.....
 Date start (dd/mm/yyyy).....
 Dose.....

Maximum response (RECIST)

CR PR SD PD Unable to assess

Maximum response (Choi)

CR PR SD PD Unable to assess

Dose reduction yes no

Date 1st dose reduction (dd/mm/yyyy).....

Dose change to

Date 2nd dose reduction (dd/mm/yyyy).....

Dose change to

Date Stop (dd/mm/yyyy).....

Reason for stopping

Progressive Disease

Death

Adverse Events: please specify

Other

6. Last follow up

6.1 Date (dd/mm/yyyy).....

Status Alive without disease

Alive with disease

Death

Loss to follow up

Physician or nurse.....

6.2 Date (dd/mm/yyyy).....

Status Alive without disease

Alive with disease

Death

Loss to follow up

Physician or nurse.....

6.3 Date (dd/mm/yyyy).....

Status Alive without disease

Alive with disease

Death

Loss to follow up

Physician or nurse.....

6.4 Date (dd/mm/yyyy).....

Status Alive without disease

Alive with disease

Death

Loss to follow up

Physician or nurse.....

PREVALENCE OF KIT GENE MUTATION IN GASTROINTESTINAL-STROMAL TUMOR (GIST) IN THAI PATIENTS.

Napa Parinyanitikul*, Chanida Vinayanuwattikuni*, Narumon Klaikaew**, Suebpong Tanasanwimon*, Narin Voravud*, Virote Sriuranpong*

*Medical Oncology Unit, Department of Medicine, ** Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and the King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok 10330, Thailand

Background Activating mutations of *KIT* have been described to be the crucial molecular pathogenesis of gastrointestinal-stromal tumor (GIST). Individual *KIT* mutations show different prognosis and differential response to the treatment with imatinib. We investigated the prevalence and pattern of *KIT* mutation in GIST in Thai patients.

Methods Thirty six GIST patients diagnosed and treated at the King Chulalongkorn Memorial Hospital during 2002-2008 who had adequate archival paraffin-embedded tumor tissue were identified. DNA was extracted from tumor tissue and then amplified by PCR with primers for *KIT* exon 11 and exon 9. All PCR products were subjected to direct sequencing. The associations between *KIT* mutation and tumor response to treatment, time to progression (TTP), and overall survival (OS) were analyzed.

Results We successfully amplified 24 out of 36 tumor materials. Mutations of *KIT* exon 11 were detected in 15 out of 24 tumors (62.5%) and mutations of *KIT* exon 9 were demonstrated in 4 tumors (16.7%). Most of *KIT* exon 11 mutations were deletion (10/15:66.7%), complex mutation (3/15: 20%) and substitutions (2/15: 13.3%). Mutations of *KIT* exon 9 were all gene duplication (4/4: 100%). The median follow-up time was 22.5 months. There was a trend toward better treatment outcomes in advanced GIST with *KIT* exon 11 mutations than non-*KIT* exon 11 mutations. The objective response were 62.5% vs 37.5% ($p=0.74$), TTP were 33.1 months vs 21.6 months ($p=0.08$) and OS were 41.7 months vs 31.3 months ($p=0.26$) for *KIT* exon11 mutation vs non-*KIT* exon11 mutation respectively.

Conclusion Our study shows similar prevalence of *KIT* mutations in Thai GIST patients to the other previous reports. Mutation of exon 11 associates with better imatinib response, time to progression, and overall survival.

KEYWORDS : KIT GENE/ GASTROINTESTINAL-STROMAL TUMOR (GIST)

Introduction

Gastrointestinal-Stromal tumors are the most common type of mesenchymal tumor in digestive tract. In previously, GISTs frequently misdiagnosed as smooth muscle tumors, as Leiomyomas, Leiomyosarcomas, Leiomyblastomas, Schwannomas or gastrointestinal autonomic nerve tumors. (1) Immunohistochemistry results proved that most of these tumors lacked evidence of smooth muscle differentiation but arised from mesenchymal stem cells that differentiated toward the interstitial cell of Cajal. Most GISTs express the KIT protein by immunohistochemistry which was distinguished from other sarcoma. The *c-kit* proto-oncogene encodes a type III receptor tyrosine Kinase. Activating mutations of *KIT* gene have been described to be the crucial molecular pathogenesis of gastrointestinal-stromal tumor (GIST) in approximately 80% of these tumors. (2-3) Individual *KIT* mutations show different prognosis and differential response to the treatment with imatinib in several studies. Imatinib (Glivec) targets several oncogenic tyrosine kinases, including KIT and platelet –derived growth factor alpha. In many clinical studies, patients with advanced GISTs treated with imatinib showed a clinical benefit compared to historical studies. (4-8)

In this study we investigated the prevalence, pattern of *KIT* mutation in GIST in Thai patients compared to previously trials and correlated with the clinical response rate, time to progression and overall survival in advanced GISTs treated with Imatinib.

Patients and Methods

Patient Matherials

All seventy nine Thai patients diagnosed GISTs between January 2002 and December 2008 in The King Chulalongkorn Memorial Hospital were reviewed. Patients eligible for this retrospective analysis had histologically confirmed GISTs by immunohistochemistry, measurable disease, frequently follow-up and adequate archival pathology specimens. Patients were excluded from the study if they didn't have adequate tumor tissue for further investigation or they can't be evaluated treatment response. Thirty six GIST patients had adequate archival paraffin-embedded tumor tissue were identified.

The medical records of all patients were reviewed. Demographic and baseline data that were taken into consideration were age, sex, performance status, primary tumor location, primary histopathology, organs involved in metastatic disease, initial stage of disease and treatment option. In advanced GISTs, we reviewed the tumor response with clinical and CT scan every 3 months by using the Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST) by one radiologist. . Objective responses were defined if patients had complete and partial response. Time to progression and overall survival were measured from the beginning of Imatinib treatment until disease progression or death. Respectively the survival curves were calculated using the Kaplan-Meier method. Toxicity was

evaluated and recorded every visit using the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria version 2.0. The follow-up period started at the day of Imatinib treatment to December 2008.

Mutation Analysis

Formalin-fixed Paraffin-embedded tumor tissue was marked on slide stained with hematoxylin and eosin and dissected from serial sections (10 um) by one pathologist. Total DNA was extracted by manual method. *KIT* exon 11 mutation was analyzed by using PCR technique first then DNA sequencing with Automate Sequencer (3130 Genetic Analyzer). After this process, non -*KIT* exon 11 mutation tissues were amplified and sequenced for *KIT* exon 9 mutations again. These primers for exon 11, exon 9 and annealing temperature were defined in table 1.

Primer	Sequence	Product size(bp)	Annealing temperature (°C)
Primer exon 11(a) -Left primer -Right primer	GAGACAATAATTATTAAGGTG GTTCCATTATCTCCTCAAC	100	47.4
Primer exon 11(b) -Left primer -Right primer	TTATTTGTTCTCTCCAGAGTGC GGTGACATGGAAAGCCCCTG	242	52.3
Primer exon 9 -Left primer -Right primer	CAAGCACAATGGCACGGTTG CAAGCACAATGGCACGGTTG	108	48.4

Table 1: PCR Primer Sequences, expected product sizes and the annealing temperatures used for *KIT* mutation analysis.

Statistical Analysis

Primary end point is the prevalence of *KIT* gene mutation in Thai GIST patients. The relationship between individual *KIT* mutation and demographic data, response rate, time to progression and overall survival are secondary end point. All qualitative datas were presented as percentage of patients. Correlation between individual *KIT* mutation and response rate were analyzed by using Chi-square test or Fisher's exact tests. All variable factors were compared by using multiple cox regression models. Time to progression and overall survival was calculated by using Kaplan-Meier method. All statistical analyses were performed using SPSS computer software package (Version 16.0). A P-value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Between January 2002 and December 2008, 36 GIST patients had adequate archival paraffin-embedded tumor tissue were identified. 24 DNA products were amplification and sequence for *KIT* exon 11 first. Finally we found *KIT* exon 11 and exon 9 mutations in 62.5 % (15/24) and 16.7%

(4/24) respectively. Most common exon 11 mutations are deletion 66.7 % (10/15) in contrast with duplication (4/4) in exon 9 mutations. All *KIT* mutations identified in this trial showed in table 2.

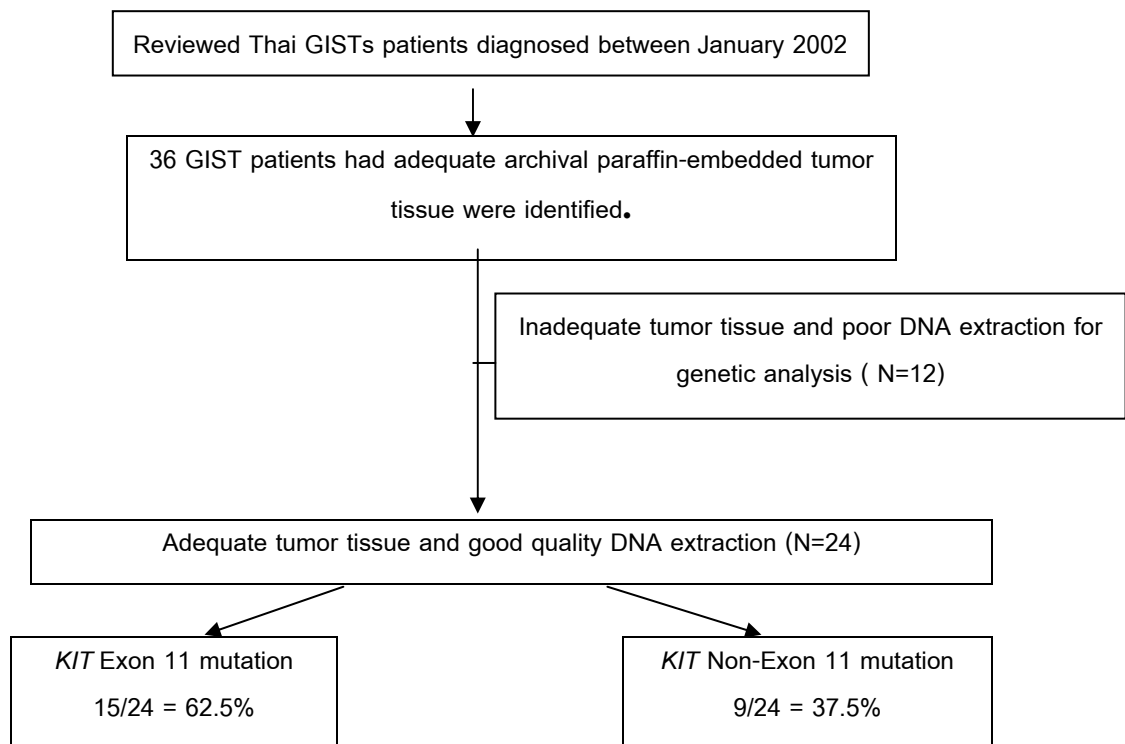


Figure 1 : All corrected GIST tissues in this trial

<i>KIT</i> mutation (PCR and Sequencing)	Total (N=24)
<i>KIT</i> exon 11 mutation	15(62.5%)
• Deletion	10/15(66.7%)
• Complex mutation	3/15(20%)
• Substitution	2/15(13.3%)
<i>KIT</i> exon 9 mutation	4/24(16.7%)
• Duplication	4/4(100%)
Not found <i>KIT</i> exon 11 and 9 mutation	5

Table 2 : Distribution of *KIT* mutations in gastrointestinal-stromal tumors.

Final results of conventional PCR for *KIT* exon 11, DNA sequencing were identified in figure 2 and table 3. In-frame deletions at codon 550-560 were found in 90% (9/10), especially codon 556-558.

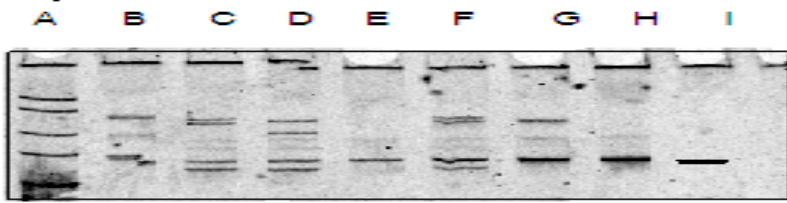


Figure 2 : Results of Conventional PCR for *KIT* exon 11

A= Ladder, B=sample1 +ve PCR, C=sample2 +ve PCR, D=sample3 +ve PCR, E=sample4 -ve PCR, F=sample5 +ve PCR, G=sample6 +ve PCR, H=sample7 -ve PCR, I=baseline +ve PCR

* Sample 7 = PCR for exon 11 mutation -ve but further DNA sequencing → +ve (base substitution)

Sample	Intron 10	Exon 11			
		Codon 550	556	558	560
Case 1	tctcttttccctttctccccacag	AAACCCATGTATGAAGTACAGT	GGAAGGTTGTTGAGGAG		
Case 2	tctcttttccctttctccccacag	AAACCCATGTATGAAGTACAGT	GGAAGGTTGTTGAGGAG		
Case 3	tctcttttccctttctccccacag	AAACCCATGTATGAAGTACAGT	GGAAGGTTGTTGAGGAG		
Case 4	tctcttttccctttctccccacag	AAACCCATGTATGAAGTACAGT	GGAAGGTTGTTGAGGAG		
Case 5	tctcttttccctttctccccacag	AAACCCATGTATGAAGTACAGT	GGAAGGTTGTTGAGGAG		
Case 6	tctcttttccctttctccccacag	AAACCCATGTATGAAGTACAGT	GGAAGGTTGTTGAGGAG		
Case 7	tctcttttccctttctccccacag	AAACCCATGTATGAAGTACAGT	GGAAGGTTGTTGAGGAG		
Case 8	tctcttttccctttctccccacag	AAACCCATGTATGAAGTACAGT	GGAAGGTTGTTGAGGAG		
Case 9	tctcttttccctttctccccacag	AAACCCATGTATGAAGTACAGT	GGAAGGTTGTTGAGGAG		
Case 10*	tctcttttccctttctccccacag	AAACCCATGTATGAAGTACAGT	GGAAGGTTGTTGAGGAG		

Table 3 : DNA Sequencing Results for *KIT* exon 11

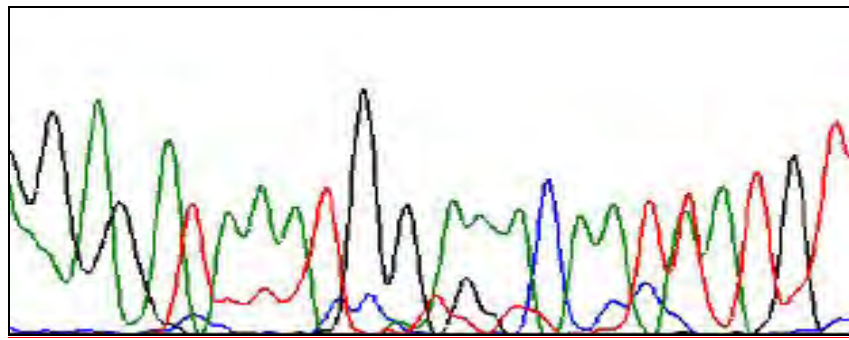
Base pair in grey boxes showed the location and deletion number of DNA in each oligonucleotides.

AAA = codon 550, GTT = codon 560

**Case 10: Deletion 21 base pair codon 570-576

Deletion Base pair =TACATAGACCCAACACA ACTT

In this trial we found base substitution at codon 557 (TGG557AGG) and codon 568 (TAT568AAT).



G A G A T A A A T G G A A A C A A T T A T G T
 Codon 562 T → A = AAT

Figure 3: DNA sequencing detected base substitution codon 568 TAT → AAT

Case 1

Codon 550 560 570
 AAACCCATGTATGAAGTACAGTGGAAAGTTGTTGAGGAGATAAATGGAAACAATTATGTTTAC
 C → G

Deletion 27 base, codon 557-565, codon 556 CAG → CGA

Base substitution codon 566 AAC → AAG

Case 2

Codon 550 560 570
 AAACCCATGTATGAAGTACAGTGGAAAGTTGTTGAGGAGATAAATGGAAACAATTATGTTTACATAG
 GTAAACCCAACAC

Complex mutation, Deletion 60 base, codon 551-570, Base substitution = ATAG>GTA

Figure 4: *KIT* exon 11 mutation → complex mutation

In nine non-*KIT* exon 11 mutations were amplified by PCR and four patients were found in *KIT* exon 9 mutation. All duplication codon 502 dupGCCTAT were analyzed.

14 advanced GIST patients treated with Imatinib were followed and analyzed. In *KIT* exon11 and non-*KIT* exon11 mutation, no statistical differences in tumor response, TTP and overall survival were identified. We found primary tumors at stomach in *KIT* exon 11 more than non-*KIT* exon 11 mutation (66.7% vs 22.2%) in contrary primary tumor at duodenums were found in non-*KIT* exon11 more than the other (55.6% vs 13.3%). After treatment with Imatinib , we found partial tumor response and stable disease in 62.5% and 60% in *KIT* exon 11 groups compared with 37.5% and 40% in non-*KIT* exon 11 groups, respectively. Because of small sample sizes we didn't identified statistical significances. After we followed up patients (mean= 22.5 months, 5-46 months), median TTP and median overall survival are 28.72 months [95%CI, 22.3-35.2] and 37.9 months [95%CI,

30.6-45.3] ,respectively. Compared between two groups of *KIT* mutation, median TTP and median overall survival are 33.06 months [95%CI, 26.7-39.4] versus 25.4 months [95%CI, 10.5-32.7] ($p=0.083$) and 41.71 months [95%CI, 33.9-49.5] versus 31.33 months [95%CI, 18.5-44.2] ($p=0.263$) in *KIT* exon 11 and non-*KIT* exon11 groups, respectively. (Figure 5 and 6) Because of small sample sizes in this trial, we can't conclude that individual *KIT* mutations don't correlate with tumor response, TTP and overall survival.

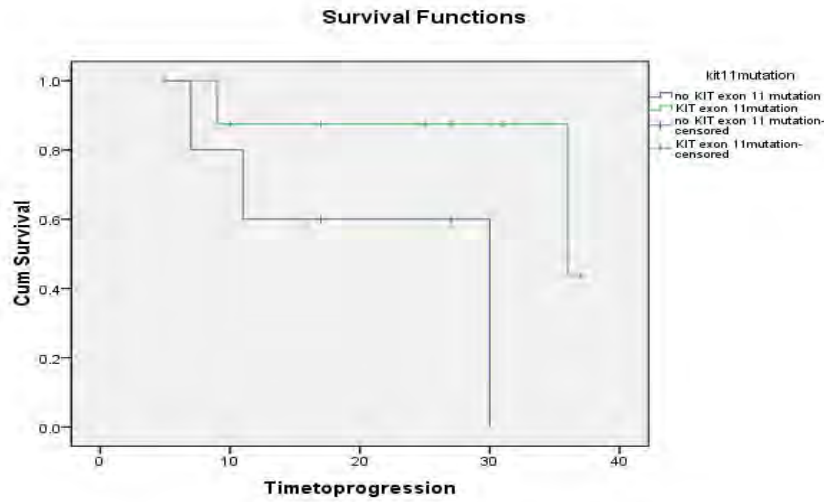


Figure 5 : Time to progression compare in *KIT* exon 11 and non-*KIT* exon 11 mutations in Advanced GISTs treated with Imatinib.

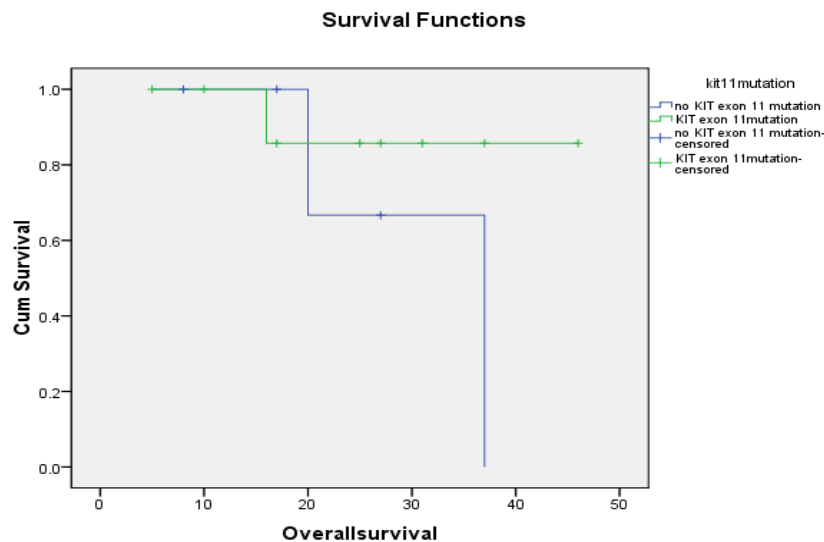


Figure 6 : Overall survival compare in *KIT* exon 11 and non-*KIT* exon 11 mutations in Advanced GISTs treated with Imatinib.

Demographic data	<i>KIT</i> exon11 mutation (N=15)	Non- <i>KIT</i> exon11 mutation (N=9)	P value
1. Age (mean :years)	59.7 ±10.55	58.78 ± 14.5	P=0.854
2. primary tumor			P=0.084
● Stomach	10 (66.7%)	2 (22.2%)	
● Duodenum	2 (13.3%)	5 (55.6%)	
● Jejunum+ileum	1 (6.7%)	1 (11.1%)	
● Other	2 (13.3%)	1 (11.1%)	
3. Histopathology			P=0.822
● Spindle cell	12 (80%)	8 (88.9%)	
● Epithelioid cell	1 (6.7%)	0	
● Mixed cell	2 (13.3%)	1 (11.1%)	
4. mass size			P=0.498
● < 5cm.	2 (13.3%)	1 (12.5%)	
● 5-10 cm.	6 (40%)	1 (12.5%)	
● > 10 cm.	7 (46.7%)	6 (75%)	
5. mitotic figure			P=0.613
● < 5/50 HPF	3 (21.4%)	2 (33.3%)	
● >= 5/50 HPF	11 (78.6%)	4 (66.7%)	
6. Treat with Imatinib	9/24	5/24	
7. Tumor Response(N=14)			P=0.685
● Partial response	5 (62.5%)	3 (37.5%)	
● Stable disease	3 (60%)	2 (40%)	
8. TTP (months)	33.06	25.4	P=0.083
9. Death (N=11)	2	3	
9.Overall survival (months)	41.71	31.33	P=0.263

Table 4 : Demographic datas and variable clinical factors in Gastrointestinal-Stromal tumor compared between *KIT* exon 11 and non-*KIT* exon 11 mutation patients.

Discussions

Activating mutations of *KIT* and *PDGFRA* have been described to be the crucial molecular pathogenesis of gastrointestinal-stromal tumor (GIST) in approximately 80% of these tumors. Imatinibs which improving overall survival compare with prior chemotherapy and radiotherapy are the standard treatment in GISTs. Different in *KIT* mutation prevalences were investigated because of different in demographic datas and technique in mutation analysis. Most of mutations are exon 11 approximately 60-70% like 62.5% in this trial. Lower prevalence in this trial may be due to small number of tumor specimens and small quality DNA extractions even though we use kit for DNA extraction. 33.3% (12/36) didn't success in extraction probably due to long lasting tissue collection. In trial we found in-frame deletion in codon 550-580 which loss 6-60 nucleotides in 66.7%. Several studies base substitution codon 557,559,560 and 576 were identified (9) but in our trial we found this mutation in codon 557 and 568. In *KIT* exon 9 mutaion, we found this prevalence more than other trials (16.7Most of exon 9 mutation, primary tumors were located at duodenum more than stomach (55.6 vs 13.3%). Duplication at codon 502-503 were almost identified in our studies same as previous studies. (9) Our study shows similar prevalence of *KIT* mutations in Thai GIST patients to the other previous reports. The prevalence of *KIT* mutation in GISTs in previously several reports was showed in table 5. (10-16) Beside these two common mutations, 5% *KIT* exon 13, 17 and 5-8% *PDGRFA* exon 12, 14 and 18 mutations were identified. Further all mutation studies are analyzed and investigated especially in non-*KIT* exon 11 and 9 mutation patients.

Study		Number of patients	<i>KIT</i> mutation	Exon 11 mutation	Exon 9 mutation	Other/ Wild-type
Heinrich 2002	USA	127	88.2%	85/127(66.9%)	10%	2%/15%
Rubin 2001	USA	48	92%	34/48 (71%)	13.6%	9%
Rankin 2003	Europe		80%	67%	10%	3%
Penzel R 2005	Germany		69.6%	56.5%	11.6%	NA
Debiec-Rychter	Europe	377	83.6%	248/377 (65.8%)	15.4%	NA
Andersson	Sweden/Norway	177	65%	101/177(57%)	3.4%	0.6%/ 35.6%
Tae Won Kim	Korea	86	74%	61/86(70.1%)	3.5%	NA
Chun-NanYeh	Taiwan	54	90.7%	40/54(74%)	16.7%	9.3
Napa 2008	Thailand	24		62.5%	16.7%	20.8%

Table 5: The prevalence of *KIT* mutation in GISTs in previously several clinical trials.

In demographic data, we found that only the primary tumor location trends to be different in two groups of mutation. In case of primary tumors at stomach, we found in *KIT* exon 11 more than non-*KIT* exon 11 mutations (66.7% vs 22.2%). But primary tumors at duodenum we found in non-*KIT* exon 11 more than the other (55.6% vs 13.3%). After treatment with Imatinib, we found partial tumor response in 62.5% in *KIT* exon 11 groups compared with 37.5% in non-*KIT* exon 11 groups, respectively. Compared between two groups of *KIT* mutation, median TTP and median overall survival are 33.06 months [95%CI, 26.7-39.4] versus 25.4 months [95%CI, 10.5-32.7] ($p=0.083$) and 41.71 months [95%CI, 33.9-49.5] versus 31.33 months [95%CI, 18.5-44.2] ($p=0.263$) in *KIT* exon 11 and non-*KIT* exon 11 groups, respectively. Because of small sample sizes we didn't identify statistical significances. Mutation of *KIT* exon 11 associates with better imatinib response, time to progression, and overall survival. In early pilot study and two phase III trials showed the median overall survival were approximately 57 months (5-7) so at least five years follow up may be important because of the short period follow up of our trial. Nevertheless further other *KIT* and *PDGFRA* mutation are investigated.

Reference

1. Miettinen M, Lasota J. *KIT* (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**. 13(3) (Sep 2005):205-20.
2. Tran T, Davila JA, El-Serag HB. The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000. **Am J Gastroenterol**. 100(1) (Jan 2005):162-8.
3. Nilsson B, Bumming P, Meis-Kindblom JM, Oden A, Dortok A, Gustavsson B, et al. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden. **Cancer**. 103 (4) (Feb 2005):821-9.
4. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. **N Engl J Med**. 347(7) (Aug 2002):472-80.
5. Benjamin R, C R, C F. Phase III dose-randomized study of imatinib mesylate (ST1571) for GIST: Intergroup S0033 early results. **Proc Am Soc Clin Oncol** .22 (2003):814.
6. Rankin C, M vM, C B. Collaborating Investigators of the North American Sarcoma Intergroup. Dose effect of imatinib (IM) in patients (pts) with metastatic GIST-Phase III Sarcoma Group Study S0033. **Proc Am Soc Clin Oncol** . 23 (2004):815.

7. Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. **Lancet**. 364(9440) (Sep 2004):1127-34.
8. Van Glabbeke M, Verweij J, Casali PG, et al. Initial and late resistance to imatinib in advanced gastrointestinal stromal tumors is predicted by different prognostic factors: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Italian Sarcoma Group-Australasian Gastrointestinal Trials Group study. **J Clin Oncol**. 23(24) (Aug 2005):5795-804.
9. Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. **Histopathology**. 53(3) (Sep 2008):245-66.
10. Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. **Hum Pathol**. 33(5) (May 2002):484-95.
11. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Res**. 61(22) (Nov 2001):8118-21.
12. Rankin C, M vM, C B. Collaborating Investigators of the North American Sarcoma Intergroup. Dose effect of imatinib (IM) in patients (pts) with metastatic GIST-Phase III Sarcoma Group Study S0033. **Proc Am Soc Clin Oncol** . 23 (2004):815.
13. Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechttersheimer G. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. **J Clin Pathol**. 58(6) (Jun 2005):634-9
14. Debiec-Rychter M, Sciort R, Le Cesne A, Schlemmer M, Hohenberger P, et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. **Eur J Cancer**. 42(8) (May 2006):1093-103.
15. Chun-Nan Yeh, MD, Tsung-Wen Chen, MD, Hsiang-Lin Lee, MD, Yu-Yin Liu, MD, Tzu-Chieh Chao, MD, PhD , et al. Kinase Mutations and Imatinib Mesylate Response for 64 Taiwanese with Advanced GIST: Preliminary Experience from Chang Gung Memorial Hospital. **Ann Surg Onco**. 14(3) (Dec 2006) :1123–1128.
16. Tae Won Kim, Hyoungnam Lee, Yoon-Koo Kang, Mi Sun Choe, Min-Hee Ryu, et al. Prognostic Significance of *c-kit* Mutation in Localized Gastrointestinal Stromal Tumors. **Clin Can Res**. Vol. 10 (May 2004): 3076–30

รายการอ้างอิง

- [1] Blanke C, Eisenberg BL, Heinrich M. Epidemiology of GIST. **Am J Gastroenterol.** 100(10) (Oct 2005):2366.
- [2] Zoller ME, Rembeck B, Oden A, Samuelsson M, Angervall L. Malignant and benign tumors in patients with neurofibromatosis type 1 in a defined Swedish population. **Cancer.** 79(11) (Jun1997):2125-31.
- [3] Takazawa Y, Sakurai S, Sakuma Y, Ikeda T, Yamaguchi J, Hashizume Y, et al. Gastrointestinal stromal tumors of neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease). **Am J Surg Pathol.** 29(6)(Jun 2005):755-63.
- [4] Yantiss RK, Rosenberg AE, Sarran L, Besmer P, Antonescu CR. Multiple gastrointestinal stromal tumors in type I neurofibromatosis: a pathologic and molecular study. **Mod Pathol.** 18(4)(Apr 2005):475-84.
- [5] Carney JA. Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney Triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. **Mayo Clin Proc.** 74(6) (Jun 1999):543-52.
- [6] Miettinen M, Lasota J, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. **Am J Surg Pathol.** 29(10) (Oct 2005):1373-81.
- [7] Tran T, Davila JA, El-Serag HB. The epidemiology of malignant gastrointestinal stromal tumors: an analysis of 1,458 cases from 1992 to 2000. **Am J Gastroenterol.** 100(1) (Jan 2005):162-8.
- [8] Tworek JA, Goldblum JR, Weiss SW, Greenson JK, Appelman HD. Stromal tumors of the anorectum: a clinicopathologic study of 22 cases. **Am J Surg Pathol.** 23(8) (Aug 1999): 946-54.
- [9] Rubin BP. Gastrointestinal stromal tumours: an update. **Histopathology.** 48(1) (Jan 2006):83-96.

- [10] Nilsson B, Bumming P, Meis-Kindblom JM, Oden A, Dortok A, Gustavsson B, et al. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden. **Cancer**.103(4)(Feb2005):821-9.
- [11] Demetri GD, Benjamin RS, Blanke CD, Blay JY, Casali P, Choi H, et al. NCCN Task Force report: management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST)--update of the NCCN clinical practice guidelines. **J Natl Compr Canc Netw**. 5 Suppl 2:S1-29(Jul 2007); quiz S30.
- [12] Miettinen M, Furlong M, Sarlomo-Rikala M, Burke A, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the rectum and anus: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 144 cases. **Am J Surg Pathol**. 25(9) (Sep 2001):1121-33.
- [13] Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics. **Pol J Pathol**. 54(1) (2003): 3-24.
- [14] Choi H. Critical issues in response evaluation on computed tomography: lessons from the gastrointestinal stromal tumor model. **Curr Oncol Rep**. 7(4) (Jul 2005):307-11.
- [15] Tryggvason G, Gislason HG, Magnusson MK, Jonasson JG. Gastrointestinal stromal tumors in Iceland, 1990-2003: the icelandic GIST study, a population-based incidence and pathologic risk stratification study. **Int J Cancer**. 117(2) (Nov 2005):289-93.
- [16] Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. **Am J Pathol**. 152(5) (May 1998):1259-69.
- [17] Kluppel M, Huizinga JD, Malysz J, Bernstein A. Developmental origin and Kit-dependent development of the interstitial cells of cajal in the mammalian small intestine. **Dev Dyn**. 211(1) (Jan 1998):60-71.

- [18] Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**. 111(2) (Aug 1996):492-515.
- [19] Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. **Hum Pathol**. 33(5) (May 2002):459-65.
- [20] Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. **Mod Pathol**. 11(8) (Aug 1998):728-34.
- [21] Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic issues, and mutations and their clinicopathologic correlation. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**. 13(3) (Sep 2005):205-20.
- [22] Hirota S, Isozaki K. Pathology of gastrointestinal stromal tumors. **Pathol Int**. 56(1) (Jan 2006):1-9.
- [23] Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. **Arch Pathol Lab Med**. 130(10) (Oct 2006):1466-78.
- [24] Motegi A, Sakurai S, Nakayama H, Sano T, Oyama T, Nakajima T. PKC theta, a novel immunohistochemical marker for gastrointestinal stromal tumors (GIST), especially useful for identifying KIT-negative tumors. **Pathol Int**. 55(3) (Mar 2005):106-12.
- [25] Emory TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH, O'Leary TJ. Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. **Am J Surg Pathol**. 23(1) (Jan 1999): 82-7.
- [26] Miettinen M, Makhoul H, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before imatinib with long-term follow-up. **Am J Surg Pathol**. 30(4) (Apr 2006):477-89.

- [27] Crosby JA, Catton CN, Davis A, Couture J, O'Sullivan B, Kandel R, et al. Malignant gastrointestinal stromal tumors of the small intestine: a review of 50 cases from a prospective database. **Ann Surg Oncol.** 8(1) (Jan-Feb 2001):50-9.
- [28] Chen LL, Trent JC, Wu EF, Fuller GN, Ramdas L, Zhang W, et al. A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Res.** 64(17) (Sep 2004):5913-9.
- [29] El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Knuutila S, Miettinen M. DNA sequence copy number changes in gastrointestinal stromal tumors: tumor progression and prognostic significance. **Cancer Res.** 60(14) (Jul 2000):3899-903.
- [30] Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. **Hum Pathol.** 33(5) (May 2002):484-95.
- [31] Besana-Ciani I, Boni L, Dionigi G, Benevento A, Dionigi R. Outcome and long term results of surgical resection for gastrointestinal stromal tumors (GIST). **Scand J Surg.** 92(3) (2003):195-9.
- [32] Carboni F, Carlini M, Scardamaglia F, Santoro E, Boschetto A, Castelli M, et al. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach. A ten-year surgical experience. **J Exp Clin Cancer Res.** 22(3) (Sep 2003):379-84.
- [33] Pierie JP, Choudry U, Muzikansky A, Yeap BY, Souba WW, Ott MJ. The effect of surgery and grade on outcome of gastrointestinal stromal tumors. **Arch Surg.** 136(4) (Apr 2001):383-9.
- [34] Samiian L, Weaver M, Velanovich V. Evaluation of gastrointestinal stromal tumors for recurrence rates and patterns of long-term follow-up. **Am Surg.** 70(3) (Mar 2004):187-91; discussion 91-2.

- [35] Blay JY, Bonvalot S, Casali P, Choi H, Debiec-Richter M, Dei Tos AP, et al. Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of 20-21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Ann Oncol*. 16(4) (Apr 2005):566-78.
- [36] Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 344(14) (Apr 2001):1031-7.
- [37] Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 2(5) (May 1996):561-6.
- [38] Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood*. 96(3) (Aug 2000):925-32.
- [39] Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*. 347(7) (Aug 2002):472-80.
- [40] Benjamin R, C R, C F. Phase III dose-randomized study of imatinib mesylate (ST1571) for GIST: Intergroup S0033 early results. *Proc Am Soc Clin Oncol* .22 (2003):814.
- [41] Rankin C, M vM, C B. Collaborating Investigators of the North American Sarcoma Intergroup. Dose effect of imatinib (IM) in patients (pts) with metastatic GIST-Phase III Sarcoma Group Study S0033. *Proc Am Soc Clin Oncol* . 23 (2004):815.
- [42] Verweij J, Casali PG, Zalcborg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet*. 364(9440) (Sep 2004):1127-34.

- [43] Van Glabbeke M, Verweij J, Casali PG, et al. Initial and late resistance to imatinib in advanced gastrointestinal stromal tumors is predicted by different prognostic factors: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Italian Sarcoma Group-Australasian Gastrointestinal Trials Group study. *J Clin Oncol*. 23(24) (Aug 2005):5795-804.
- [44] LeCesne A, D P, I R-C. Interruption of imatinib (IM) in GIST patients with advanced disease: updated results of the prospective French Sarcoma Group randomized phase III trial on survival and quality of life. *J Clin Oncol*. 23 (823s) (2005).
- [45] Blay J-Y B, D P, I R-C. Continuous vs intermittent imatinib treatment in advanced GIST after one year: a prospective randomized phase III trial of the French Sarcoma Group. *Proc Am Soc Clin Oncol* . 23 (815) (2004).
- [46] DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg*. 231(1) (Jan 2000):51-8.
- [47] DeMatteo R. Efficacy of adjuvant imatinib mesylate following complete resection of localized, primary gastrointestinal stromal tumor (GIST) at high risk of recurrence: The U.S. Intergroup phase II trial ACOSOG Z9000. *American Society of Clinical Oncology-The Gastrointestinal Cancers Symposium Meeting* .Abstract 8 (2008).
- [48] Dematteo R, K O, R M, . Adjuvant Imatinib mesylate increases recurrence free survival (RFS) in patients with completely resected localized primary gastrointestinal stromal tumor(GIST): North American Intergroup Phase III trial ACOSOG Z9001. *ASCO abstract 10079*(2005).
- [49] Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet*. 368(9544) (Oct 2006):1329-38.

- [50] Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol*. 23(23) (Aug 2005):5357-64.
- [51] Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med*. 344(14) (Apr 2001):1052-6.
- [52] Choi H, Charnsangavej C, de Castro Faria S, Tamm EP, Benjamin RS, Johnson MM, et al. CT evaluation of the response of gastrointestinal stromal tumors after imatinib mesylate treatment: a quantitative analysis correlated with FDG PET findings. *AJR Am J Roentgenol*. 183(6) (Dec 2004):1619-28.
- [53] Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, et al. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol*. 25(13) (May 2007):1753-9.
- [54] Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, et al. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*. 320(6061) (Apr 1986):415-21.
- [55] Giebel LB, Strunk KM, Holmes SA, Spritz RA. Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene*. 7(11) (Nov 1992):2207-17.
- [56] Vandenbark GR, deCastro CM, Taylor H, Dew-Knight S, Kaufman RE. Cloning and structural analysis of the human c-kit gene. *Oncogene*. 7(7) (Jul 1992):1259-66.
- [57] Yarden Y, Kuang WJ, T YF. An interspecies molecular chimera of kit helps define the binding site of the stem cell factor. *Mol Cell Biol*. 13 (1993):2224-34.
- [58] Kitamura Y, Hirotab S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci*. 61(23) (Dec 2004):2924-31.

- [59] Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, Saad A, Cote R, Cordon-Cardo C. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 42(11) (Nov 1994):1417-25.
- [60] Matsuda R, Takahashi T, Nakamura S, Sekido Y, Nishida K, Seto M, et al. Expression of the c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol.* 142(1) (Jan 1993):339-46.
- [61] Natali PG, Nicotra MR, Sures I, Mottolese M, Botti C, Ullrich A. Breast cancer is associated with loss of the c-kit oncogene product. *Int J Cancer.* 52(5) (Nov 1992):713-7.
- [62] Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol.* 154(1) (Jan 1999): 53-60.
- [63] Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, et al. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol.* 156(3) (Mar 2000):791-5.
- [64] Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Kordek R, Nassar A, et al. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol.* 157(4) (Oct 2000):1091-5.
- [65] Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 22(18) (Sep 2004):3813-25.
- [66] Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. KIT expression in angiosarcomas and fetal endothelial cells: lack of mutations of exon 11 and exon 17 of C-kit. *Mod Pathol.* 13(5) (May 2000):536-41.
- [67] Scotlandi K, Manara MC, Strammiello R, Landuzzi L, Benini S, Perdichizzi S, et al. C-kit receptor expression in Ewing's sarcoma: lack of prognostic value but therapeutic targeting opportunities in appropriate conditions. *J Clin Oncol.* 21(10) (May 2003):1952-60.

- [68] Smithey BE, Pappo AS, Hill DA. C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. **Am J Surg Pathol.** 26(4) (Apr 2002):486-92.
- [69] Tamborini E, Bonadiman L, Negri T, Greco A, Staurengo S, Bidoli P, et al. Detection of overexpressed and phosphorylated wild-type kit receptor in surgical specimens of small cell lung cancer. **Clin Cancer Res.** 10(24) (Dec 2004):8214-9.
- [70] All-Ericsson C, Girnita L, Muller-Brunotte A, Brodin B, Seregard S, Ostman A, et al. c-Kit-dependent growth of uveal melanoma cells: a potential therapeutic target? **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 45(7) (Jul 2004):2075-82
- [71] Mouriaux F, Kherrouche Z, Maurage CA, Demailly FX, Labalette P, Saule S. Expression of the c-kit receptor in choroidal melanomas. **Melanoma Res.** 13(2) (Apr 2003):161-6.
- [72] Pache M, Glatz K, Bosch D, Dirnhofer S, Mirlacher M, Simon R, et al. Sequence analysis and high-throughput immunohistochemical profiling of KIT (CD 117) expression in uveal melanoma using tissue microarrays. **Virchows Arch.** 443(6) (Dec 2003):741-4.
- [73] Tickoo SK, Hutchinson B, Bacik J, Mazumdar M, Motzer RJ, Bajorin DF, et al. Testicular seminoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 cases with special reference to seminomas with atypical features. **Int J Surg Pathol.** 10(1) (Jan 2002):23-32.
- [74] Looijenga LH, de Leeuw H, van Oorschot M, van Gurp RJ, Stoop H, Gillis AJ, et al. Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. **Cancer Res.** 63(22) (Nov 2003):7674-8.
- [75] Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Saito K. Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. **Cancer Sci.** 94(6) (Jun 2003):486-91.
- [76] Chou PM, Barquin N, Guinan P, Ridaura Sanz C, Gonzalez-Crussi F. Differential expression of p53, c-kit, and CD34 in prepubertal and postpubertal testicular germ cell tumors. **Cancer.** 79(12) (Jun 1997):2430-4.

- [77] Longley BJ, Metcalfe DD. A proposed classification of mastocytosis incorporating molecular genetics. **Hematol Oncol Clin North Am.** 14(3) (Jun 2000):697-701, viii.
- [78] Schwartz S, Heinecke A, Zimmermann M, Creutzig U, Schoch C, Harbott J, et al. Expression of the C-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance. **Leuk Lymphoma.** 34(1-2) (Jun 1999):85-94.
- [79] Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM, Manzo C, Vacca C, Ferrara F, et al. Stem cell factor receptor (c-kit, CD117) is expressed on blast cells from most immature types of acute myeloid malignancies but is also a characteristic of a subset of acute promyelocytic leukaemia. **Br J Haematol.** 92(3) (Mar 1996):562-4.
- [80] Kindler T, Breitenbuecher F, Marx A, Beck J, Hess G, Weinkauff B, et al. Efficacy and safety of imatinib in adult patients with c-kit-positive acute myeloid leukemia. **Blood.** 103(10) (May 2004):3644-54.
- [81] Sykora KW, Tomeczkowski J, Reiter A. C-kit receptors in childhood malignant lymphoblastic cells. **Leuk Lymphoma.** 25(3-4) (Apr 1997):201-16.
- [82] Blackhall FH, Pintilie M, Michael M, Leighl N, Feld R, Tsao MS, et al. Expression and prognostic significance of kit, protein kinase B, and mitogen-activated protein kinase in patients with small cell lung cancer. **Clin Cancer Res.** 9(6) (Jun 2003):2241-7.
- [83] Boldrini L, Ursino S, Gisfredi S, Faviana P, Donati V, Camacci T, et al. Expression and mutational status of c-kit in small-cell lung cancer: prognostic relevance. **Clin Cancer Res.** 10(12 Pt 1) (Jun 2004):4101-8.
- [84] Burger H, den Bakker MA, Stoter G, Verweij J, Nooter K. Lack of c-kit exon 11 activating mutations in c-KIT/CD117-positive SCLC tumour specimens. **Eur J Cancer.** 39(6) (Apr 2003):793-9.

- [85] Lonardo F, Pass HI, Lucas DR. Immunohistochemistry frequently detects c-Kit expression in pulmonary small cell carcinoma and may help select clinical subsets for a novel form of chemotherapy. **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** 11(1) (Mar 2003):51-5.
- [86] Micke P, Basrai M, Faldum A, Bittinger F, Ronnstrand L, Blaukat A, et al. Characterization of c-kit expression in small cell lung cancer: prognostic and therapeutic implications. **Clin Cancer Res.** 9(1) (Jan 2003):188-94.
- [87] Naeem M, Dahiya M, Clark JI, Creech SD, Alkan S. Analysis of c-kit protein expression in small-cell lung carcinoma and its implication for prognosis. **Hum Pathol.** 33(12) (Dec 2002):1182-7.
- [88] Pelosi G, Masullo M, Leon ME, Veronesi G, Spaggiari L, Pasini F, et al. CD117 immunoreactivity in high-grade neuroendocrine tumors of the lung: a comparative study of 39 large-cell neuroendocrine carcinomas and 27 surgically resected small-cell carcinomas. **Virchows Arch.** 445(5) (Nov 2004):449-55.
- [89] Rohr UP, Rehfeld N, Pflugfelder L, Geddert H, Muller W, Steidl U, et al. Expression of the tyrosine kinase c-kit is an independent prognostic factor in patients with small cell lung cancer. **Int J Cancer.** 111(2) (Aug 2004):259-63.
- [90] Krystal GW, Honsawek S, Litz J, Buchdunger E. The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. **Clin Cancer Res.** 6(8) (Aug 2000):3319-26.
- [91] Johnson BE, Fischer T, Fischer B, Dunlop D, Rischin D, Silberman S, et al. Phase II study of imatinib in patients with small cell lung cancer. **Clin Cancer Res.** (16 Pt 1) (Dec 2003):5880-7.
- [92] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res.** 10(16) (Aug 2004):5367-74.

- [93] Tsuda H, Morita D, Kimura M, Shinto E, Ohtsuka Y, Matsubara O, et al. Correlation of KIT and EGFR overexpression with invasive ductal breast carcinoma of the solid-tubular subtype, nuclear grade 3, and mesenchymal or myoepithelial differentiation. **Cancer Sci.** 96(1) (Jan 2005):48-53.
- [94] Palmu S, Soderstrom KO, Quazi K, Isola J, Salminen E. Expression of C-KIT and HER-2 tyrosine kinase receptors in poor-prognosis breast cancer. **Anticancer Res.** 22(1A) (Feb 2002):411-4.
- [95] Holst VA, Marshall CE, Moskaluk CA, Frierson HF, Jr. KIT protein expression and analysis of c-kit gene mutation in adenoid cystic carcinoma. **Mod Pathol.** 12(10) (Oct 1999):956-60.
- [96] Hotte SJ, Winkvist EW, Lamont E, MacKenzie M, Vokes E, Chen EX, et al. Imatinib mesylate in patients with adenoid cystic cancers of the salivary glands expressing c-kit: a Princess Margaret Hospital phase II consortium study. **J Clin Oncol.** 23(3) (Jan 2005):585-90.
- [97] Krams M, Parwaresch R, Sipos B, Heidorn K, Harms D, Rudolph P. Expression of the c-kit receptor characterizes a subset of neuroblastomas with favorable prognosis. **Oncogene.** 23(2) (Jan 2004):588-95.
- [98] Vitali R, Cesi V, Nicotra MR, McDowell HP, Donfrancesco A, Mannarino O, et al. c-Kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferation is inhibited in vitro by STI-571. **Int J Cancer.** 106(2) (Aug 2003):147-52.
- [99] Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. **Science.** 279(5350) (Jan 1998):577-80.
- [100] Demetri GD. Identification and treatment of chemoresistant inoperable or metastatic GIST: experience with the selective tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (STI571). **Eur J Cancer.** 38 Suppl 5 (Sep 2002):S52-9.

- [101] Lasota J, Miettinen M. KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). **Semin Diagn Pathol.** 23(2) (May 2006):91-102.
- [102] Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. **Histopathology.** 53(3) (Sep 2008):245-66.
- [103] Hongyo T, Li T, Syaifudin M, Baskar R, Ikeda H, Kanakura Y, et al. Specific c-kit mutations in sinonasal natural killer/T-cell lymphoma in China and Japan. **Cancer Res.** 60(9) (May 2000):2345-7.
- [104] Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. **J Clin Oncol.** 21(23) (Dec 2003):4342-9.
- [105] Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. **Science.** 299(5607) (Jan 2003):708-10.
- [106] Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Res.** 61(22) (Nov 2001):8118-21.
- [107] Lasota J, Corless CL, Heinrich MC, Debiec-Rychter M, Sciot R, Wardelmann E, et al. Clinicopathologic profile of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with primary KIT exon 13 or exon 17 mutations: a multicenter study on 54 cases. **Mod Pathol.** 21(4) (Apr 2008):476-84.
- [108] Penzel R, Aulmann S, Moock M, Schwarzbach M, Rieker RJ, Mechttersheimer G. The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. **J Clin Pathol.** 58(6) (Jun 2005):634-9.
- [109] Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, Schlemmer M, Hohenberger P, et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. **Eur J Cancer.** 42(8) (May 2006):1093-103.

- [110] Heinrich M, Corless CL, B L. Mechanisms of sunitinib malate (SU) resistance in gastrointestinal stromal tumors(GISTs). 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. **J Clin Oncol.** 25(10006) (2007)
- [111] von Mehren M. Beyond imatinib: second generation c-KIT inhibitors for the management of gastrointestinal stromal tumors. **Clin Colorectal Cancer.** 6 Suppl 1 (Nov 2006):S30-4.
- [112] Sambol EB, Ambrosini G, Geha RC, Kennealey PT, Decarolis P, O'Connor R, et al. Flavopiridol targets c-KIT transcription and induces apoptosis in gastrointestinal stromal tumor cells. **Cancer Res.** 66(11) (Jun 2006):5858-66.
- [113] Heinrich MC, Owzar K, Corless CL, Hollis D, Borden EC, Fletcher CD, et al. Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group. **J Clin Oncol.** 26(33) (Nov 2008):5360-7.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ พญ. นภา ปริญญานิติกุล

วันเดือนปีเกิด 22 พฤศจิกายน พ.ศ. 2520 จังหวัดชลบุรี

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นิสิตคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2538-2544
แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลพระปกเกล้า จันทบุรี	2544-2545
แพทย์ประจำโรงพยาบาลเขาคิชฌกูฏ จันทบุรี	2545-2547
แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	2547-2550

ปริญญาและประกาศนียบัตร

แพทยศาสตรบัณฑิต(เกียรตินิยมอันดับ1)	2544
ประกาศนียบัตรวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์คลินิก	2548
วุฒิปัตถแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์	2550

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย