

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคมะเร็งที่คร่าชีวิตคนทั่วโลกโดยเฉพาะคนไทยเป็นจำนวนมากแต่ละปี โดยพบว่าโรคนี้อุบัติการณ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทั่วโลก และเป็นที่น่ากังวลอย่างมากเนื่องจากโรคนี้นี้มีทางเลือกในการรักษาไม่มากนัก การผ่าตัดนับเป็นทางเลือกในการรักษาลำดับแรก แต่อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยจำนวนมากที่ไม่สามารถรับการผ่าตัดได้เนื่องจากโรคได้ลุกลามแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ แล้ว หรือเนื่องด้วยปัญหาสุขภาพที่ไม่แข็งแรงของตัวผู้ป่วยเองพบว่าอัตราการรอดชีวิตนั้นไม่สูงแม้ว่าผู้ป่วยจะได้รับการผ่าตัดแล้วก็ตาม เนื่องมาจากอัตราการเกิดซ้ำของโรคนั้นสูงและเป็นปัจจัยหลักในการเสียชีวิตของผู้ป่วย การให้ยาเคมีบำบัดหรือการฉายแสงนั้นนับเป็นอีกทางเลือกในการรักษา แต่พบว่ามะเร็งท่อน้ำดีนี้ไม่ค่อยตอบสนองต่อการให้ยาเคมีบำบัดที่มีในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็น cisplatin, gemcitabine, หรือ 5-FU ดังนั้นการค้นหาวิธีการให้ยาร่วมกันหลายชนิด หรือการหาเป้าหมายของยาใหม่ ๆ จึงเป็นเรื่องที่สำคัญมากสำหรับผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีนี้

โปรตีน CK2 เป็นหนึ่งในเป้าหมายของยาในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด รวมถึงมะเร็งท่อน้ำดีด้วย ตัวยับยั้ง CK2 ได้แก่ CX-4945 ได้รับการสนใจในการศึกษาอย่างมากในระยะหลัง โดยได้มีการทดสอบในมนุษย์ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัดอื่นๆ ได้แก่ cisplatin และ gemcitabine (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02128282) คณะผู้วิจัยของเราได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน CK2 เป็นโปรตีนสำคัญตัวหนึ่งในการกระตุ้นการเจริญ และพฤติกรรมการรุกรานของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเต้านม และมะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิด โดยพบว่ากลไกการกระตุ้นจากโปรตีน CK2 นี้ผ่านทางการยับยั้งโปรตีน Proline-Rich Homeodomain protein (PRH/HHEX) เป็นที่น่าสนใจว่าโปรตีน PRH/HHEX นี้กลับเป็นโปรตีนที่ส่งเสริมการเกิด และการเจริญของมะเร็งท่อน้ำดี (oncoprotein) แทนที่จะเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดังที่มีรายงานในมะเร็งชนิดอื่นๆ ดังนั้นการศึกษาถึงบทบาทของ โปรตีน CK2 และ PRH/HHEX ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจึงจำเป็นอย่างยิ่ง

ในการศึกษาครั้งนี้ทีมวิจัยของเราพบว่าโปรตีน PRH/HHEX เป็นโปรตีนที่ส่งเสริมการเจริญของมะเร็งท่อน้ำดี การทำให้โปรตีน PRH/HHEX แสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และเซลล์ท่อน้ำดีจากผู้ป่วยพบว่าทำให้เซลล์ดังกล่าวเจริญเร็วขึ้น และมีการแสดงออกคล้ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมากขึ้น นอกจากนี้พบว่าเมื่อทำให้การแสดงออกของโปรตีน PRH/HHEX ลดลงในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ส่งผลให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีการเจริญลดลง และการรุกรานลดลงเช่นกัน และพบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี CCLP-1 ลดการเจริญ หรือไม่สามารถสร้างก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองได้เมื่อมีโปรตีน PRH/HHEX ลดลง คณะผู้วิจัยได้ศึกษาต่อเนื่องเพื่อหากลไกการทำงานระดับโมเลกุลของโปรตีน PRH/HHEX พบว่า โปรตีนดังกล่าวสามารถสร้างการกระตุ้นเชิงบวกแบบย้อนกลับ ร่วมกับระบบส่งสัญญาณหลัก 2 ระบบ ได้แก่ ระบบส่งสัญญาณ Notch-3 และ NF- κ B ซึ่งเป็นระบบส่งสัญญาณหลักในกลไกการอักเสบ และการตอบสนองต่อไซโตไคน์ (cytokine) และเป็นกลไกในการกระตุ้นการเจริญ และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี การศึกษาทั้งในระดับโปรตีน และระดับยีนยืนยันถึงการกระตุ้นเชิงบวกแบบย้อนกลับของการส่งสัญญาณผ่าน PRH/HHEX และ Notch-3 และ NF- κ B

นอกเหนือจากนี้คณะผู้วิจัยเรายังรายงานถึงผลการเปลี่ยนแปลง 2 ขั้นตอน (biphasic effect) ของสาร CX-4945 ต่อการเจริญและการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี สาร CX-4945 นี้ได้รับรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญและการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และยังสามารถกระตุ้นการตายแบบเอพอพโทซิส (apoptosis) ได้ด้วย โดยคณะผู้วิจัยพบและรายงานเช่นเดียวกันเมื่อให้สาร CX-4945 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์หรือมากกว่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือมากกว่า แต่พบว่าที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์หรือน้อยกว่านั้นสาร CX-4945 นี้กลับมีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญ และการรุกรานของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี การค้นพบนี้ถือเป็นเรื่องสำคัญอย่างยิ่งในการใช้สารดังกล่าวในการรักษาผู้ป่วย นอกจากนี้คณะผู้วิจัยเรายังพบว่าสาร CX-4945 สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบพิเศษที่เรียกว่า เมธูโอซิส (methuosis) ในเซลล์หลากหลายชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เซลล์ท่อน้ำดีปกติ และเซลล์ไตจากคัพภะมนุษย์ การค้นพบนี้ได้รับการยืนยันจากคณะผู้วิจัยอื่นๆ โดยมีรายงานตามมามีการพบการเกิดเมธูโอซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่จากการกระตุ้นของสาร CX-4945

ฤทธิ์การกระตุ้นการตายแบบเมธูโอซิสของสาร CX-4945 นี้ทำให้คณะผู้วิจัยเกิดความสนใจถึงประสิทธิภาพในการใช้สาร CX-4945 ร่วมกับยาเคมีบำบัดอื่น ๆ คณะผู้วิจัยได้ศึกษาถึงลำดับการให้สาร CX-4945 ร่วมกับยาเคมีบำบัด cisplatin พบว่าการให้ยาเคมีบำบัด cisplatin ก่อนเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแล้วตามด้วยสาร CX-4945 นั้นได้ผลดีกว่าการให้สาร CX-4945 ก่อนถึง 50-95% การค้นพบนี้จะทำให้การใช้สาร CX-4945 นั้นมีทิศทางที่ดีขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาเพื่อเข้าใจถึงกลไกทางโมเลกุลที่แน่ชัดนั้นเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องศึกษาต่อไป

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยเรายังได้ศึกษาถึงปัจจัย และสารที่สามารถลดระดับ หรือลดการทำงานของโปรตีน PRH/HHEX ลงได้เนื่องจากเป็นที่ทราบแล้วว่าโปรตีน PRH/HHEX นี้เป็นตัวขับเคลื่อนให้มะเร็งท่อน้ำดีมีการเจริญและการรุกรานเพิ่มขึ้น คณะผู้วิจัยเรารายงานว่าสารสกัดจากฟ้าทะลายโจร (andrographolide: AP1) และอะดีโนซีน ซึ่งมีมากในเนื้อลำไย สามารถลดระดับของโปรตีน PRH/HHEX และลดการทำงานของโปรตีน PRH/HHEX ได้ตามลำดับ สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรลดระดับโปรตีน PRH ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ แต่กลไกการทำงานยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดยคณะผู้วิจัยเราคาดการณ์ว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการส่งสัญญาณในระบบ NF-KB นอกจากนี้ อะดีโนซีนสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน PRH/HHEX โดยการเพิ่มการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน PRH/HHEX ผ่านทางการส่งสัญญาณระบบ AMPK โดยคณะผู้วิจัยเราคาดการณ์ว่าการเติมหมู่ฟอสเฟตบนโปรตีน PRH/HHEX นั้นเกี่ยวข้องกับโปรตีน AMPK แต่ไม่เกี่ยวข้องกับกลุ่มโปรตีน mTORC1 ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่อยู่ภายใต้การส่งสัญญาณของระบบส่งสัญญาณ AMPK

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is one of the lethal cancers for people around the world, particularly for Thai people. The incident is increasing worldwide and treatment option is limited. Surgery is the standard practice in curing this disease. However, many CCA patients are not suitable to undergo surgery due to the metastatic CCA or other health problems. The survival rate is not high even though the patients have received surgery. A recurrence is high and has become a major life threatening problem for CCA patient. Chemotherapy and radiation are the second line treatment for patients who has received surgery or the first line for ones who has non resectable tumor. However, CCA is not very responsive to current chemotherapeutic drugs such as cisplatin, gemcitabine, or 5-FU. A resistance is not uncommon. Therefore, new drug combination or novel compounds and drug targets are in greatest needed for CCA patients.

Protein kinase CK2 is one of the drug targets proposed for many cancers, including CCA. A CK2 inhibitors, CX-4945, is being intensively studied. A combination of CX-4945 and cisplatin/gemcitabine is currently in clinical trial phase I/II (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02128282). We have demonstrated that CK2 is one of the key kinase positively regulating the growth and metastatic behavior of some cancers including, prostate cancer, breast cancer, and some types of leukemia. The mechanism that CK2 promotes the growth and invasiveness of these cancers was identified through an inhibition of Proline-Rich Homeodomain protein (PRH/HHEX). In contrast, we have preliminary data showing that PRH/HHEX protein plays as an oncogene in CCA cells instead of tumor suppressor protein as shown in other cancers. Therefore, the role of CK2, its inhibitors, and PRH/HHEX in CCA cells was examined.

Herein, we reported that PRH/HHEX was an oncoprotein in CCA cells. The overexpression of this protein in primary CCA cells and normal cholangiocytes from CCA patients showed that the growth rate and invasiveness was increased. Furthermore, a PRH/HHEX knockdown in CCA cell lines, both Thai and European ones, showed that growth rate and invasiveness was decreased *in vitro*. *In vivo* study of CCLP-1 cells confirmed these data. CCLP-1 with PRH/HHEX knockdown failed to form tumor xenograft in nude mice. We further investigated the molecular mechanism of PRH/HHEX and found that PRH/HHEX form a positive loop with at least 2 major pathways, Notch-3 and NF- κ B pathways, in CCA cells. These are 2 major pathways in inflammation and cytokine response contributing in cell growth and invasion. The positive loop was confirmed in transcription and protein levels.

Furthermore, we have reported the biphasic effect of CX-4945 on CCA cells. Although CX-4945 had inhibitory effect on cell growth and invasion and induces apoptosis when treated over 24 hours at 10 μ M or higher, it enhanced CCA cell growth and invasion when low doses at 1 μ M or less was received. These data is critical in clinical settings and should be aware. In addition, CX-4945 also induced a non-canonical cell death called methuosis in wide range of cell types, including breast cancer cell lines, prostate cancer cell lines, CCA cell lines, immortalized cholangiocyte cell lines, and human embryonic kidney (HEK) cells. These data was supported by more recent publication from other research groups worldwide reporting the same phenomenon in other cell types such as colorectal cancer cell lines.

Methuosis inducing effect of CX-4945 has brought our attention to the effective of its combination with other chemotherapeutic drugs. We investigated the sequences of the combination of CX-4945 and cisplatin treatment and found that treatment starting with cisplatin following by CX-4945 6 hours apart was 50-95% more effective on CCA cell lines than the treatment starting with CX-4945. These data will critically shape the way this combination is used in clinical settings. Further studies on precise mechanism of the combination with other drugs is needed.

In addition, we examined the factors or compounds that could reduce PRH/HHEX level or its activity since we have shown that it is a driver for CCA cell growth and invasion. We have demonstrated that andrographolide (AP1), which is a natural compound extracted from Thai herb (*Andrographis paniculata*), and adenosine, which is abundant in longan, which is Thai fruit (*Dimocarpus longan*; Lumyai in Thai), were able to reduce PRH/HHEX level or inhibit PRH/HHEX activity, respectively. AP1 reduced PRH/HHEX level in CCA cell lines with an unelucidated mechanism. We hypothesized that the action of AP1 might be via an inhibition of NF- κ B subunits. Further studies are being performed. Moreover, adenosine was able to inhibit PRH/HHEX activity by increasing a phosphorylation of PRH/HHEX via AMPK pathway. We proposed that the kinase that phosphorylated PRH/HHEX in the adenosine treated cells might involve AMPK but not mTORC1, which is another pathway downstream of AMPK pathway.