



Final Report

Project Title

Investigation of vasculogenic mimicry in pancreatic ductal adenocarcinoma

By

Associate Professor Thaned Kangsamaksin

May / 2020

Final Report

Project Title

Investigation of vasculogenic mimicry in pancreatic ductal adenocarcinoma

Researchers

1. Associate Professor Dr. Thaned Kangsamaksin
2. Dr. Nontawat Benjakul
3. Dr. Komgrid Charngkaew
4. Ms. Nattapa Prakobphol
5. Emeritus Professor M.R. Jisnuson Svasti

Institutes

Department of Biochemistry, Faculty of
Science, Mahidol University
Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
Mahidol University
Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
Mahidol University
Department of Biochemistry, Faculty of
Science, Mahidol University
Department of Biochemistry, Faculty of
Science, Mahidol University
Laboratory of Biochemistry, Chulabhorn
Research Institute

This project is granted by the Thailand Research Fund

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG6180090

ชื่อโครงการ: การศึกษาการเลียนแบบหลอดเลือดใหม่ในมะเร็งตับอ่อนชนิดต่อม

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร.ธเนศ กังสัณครศิลป์

อีเมล: thaned.kan@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: May 2, 2018 – May 1, 2020

บทคัดย่อ:

โรคมะเร็งตับอ่อนชนิดต่อม (PDAC) เป็นมะเร็งที่ร้ายแรงที่สุดชนิดหนึ่งในมนุษย์และมักพบว่ามี ความต้านทานต่อยาเคมีบำบัดเนื่องจากมีภาวะหลอดเลือดน้อย กระบวนการเลียนแบบหลอดเลือด (vasculogenic mimicry; VM) คือการก่อตัวของเครือข่ายคล้ายหลอดเลือดนำโดยเซลล์มะเร็งเพื่อให้ออกซิเจนและสารอาหาร มีการรายงานในมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งผิวหนังและมะเร็งเต้านม เรามีเป้าหมายที่จะประเมินอุบัติการณ์ของการเลียนแบบหลอดเลือดใหม่ในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนชนิดต่อมของคนไทย งานวิจัยนี้ใช้เซลล์มะเร็งตับอ่อนชนิดต่อม 2 ชนิดเพื่อการศึกษา ได้แก่ PANC-1 และ MIA-PaCa-2 โดยพบว่าเซลล์มะเร็งเมื่อถูกกระตุ้นโดย EGF หรือ VEGF ได้เปลี่ยนแปลงรูปร่างและมีการเรียงตัวเป็นเครือข่ายคล้ายหลอดเลือดในจานทดลอง และการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่าเซลล์มะเร็งตับอ่อนมีการเพิ่มการแสดงออกของตัวบ่งชี้ของกระบวนการ epithelial-mesenchymal transition (EMT) นอกจากนี้ เนื้อเยื่อ PDAC ของ 122 กรณี ในช่วง 2008–2016 ถูกย้อมด้วย H&E, PAS, และ CD31 เพื่อประเมินหลอดเลือดและ VM ตรวจพบโครงสร้างคล้าย VM ใน 91 ราย (74.6%) และสัมพันธ์กับขนาดของเนื้องอก ($p < 0.021$) VM สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน T2 (> 2 และ < 4 ซม.) (66/82, 80.5%) กว่าใน T3 (> 4 ซม.) (15/25, 72.0%) และ T1 (≤ 2 ซม.) (7/15, 46.7%) บทบาทของการส่งสัญญาณ Notch ได้รับการยอมรับอย่างดีในการเกิดเนื้องอกและการสร้างหลอดเลือดใหม่และข้อมูลของเราแสดงให้เห็นว่า VM มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มและพื้นที่ของการแปล NOTCH1 ($p < 0.001$) แสดงถึงบทบาทในการสร้าง VM โดยสรุป VM ที่พบในมะเร็งตับอ่อนมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ EMT, ขนาดของก้อนมะเร็ง และการทำงานของ NOTCH1

คำสำคัญ: vasculogenic mimicry, pancreatic cancer, angiogenesis

Abstract

Project Code: MRG6180090

Project Title: Investigation of vasculogenic mimicry in pancreatic ductal adenocarcinoma

Investigator: Associate Professor Dr. Thaned Kangsamaksin

E-mail Address: thaned.kan@mahidol.ac.th

Project Period: May 2, 2018 – May 1, 2020

Abstract:

Pancreatic ductal carcinoma (PDAC) is among the most lethal human cancer and often found to be resistant to chemotherapy likely due to its hypovascularized nature. Vasculogenic mimicry (VM) is the formation of a fluid-conducting vessel-like network by tumor cells to provide oxygen and nutrients. It has been reported in many types of cancer including melanoma and breast cancer. In this study, we aim to evaluate the incidence of VM in Thai pancreatic adenocarcinoma patients. We investigated the pancreatic cancer cell lines, PANC-1 and MIA-PaCa-2, and found that they underwent cell morphogenesis into vessel-like structures in the presence of EGF and VEGF in vitro. Epithelial-mesenchymal transition markers were also upregulated in these cells, suggesting that EMT may play a role in the network formation. Next, tissue sections of 122 PDAC cases during 2008–2016 were stained with H&E, PAS, and CD31 to assess blood vessels and VM. VM-like structures were detected in 91 cases (74.6%) and correlated with tumor size ($p < 0.021$). VM was significantly higher in T2 (> 2 and < 4 cm) (66/82, 80.5%) than in T3 (> 4 cm) (15/25, 72.0%) and T1 (≤ 2 cm) (7/15, 46.7%). The role of Notch signaling has been well established in tumorigenesis and angiogenesis, and our data showed that VM is significantly correlated with the intensity and the area of NOTCH1 localization ($p < 0.001$), implicating its role in VM formation. In conclusion, VM found in pancreatic cancer is significantly correlated to EMT, tumor size, and NOTCH1 activity.

Keywords: vasculogenic mimicry, pancreatic cancer, angiogenesis

2. Executive Summary

Project Title

Investigation of vasculogenic mimicry in pancreatic ductal adenocarcinoma

Principal Investigator

Associate Professor Dr. Thaned Kangsamaksin

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

272 Rama VI Road, Ratchathewi, Bangkok, 10400

Objectives

- To investigate the abilities of cell morphogenesis into vasculogenic mimicry-like structures in pancreatic cancer cells
- To determine signaling pathways that play an important role in vasculogenic mimicry formation in vitro
- To investigate the presence of vasculogenic mimicry in pancreatic adenocarcinoma patients and compare VM levels and characteristics in different grades of pancreatic adenocarcinoma

Methodology

1. Investigate pancreatic cell morphogenesis into VM-like structures
2. Determine signaling pathways that are necessary for formation of VM-like structures in pancreatic ductal adenocarcinoma
3. Investigate the presence of VM in pancreatic adenocarcinoma patients
4. Data and statistical analyses
5. Manuscript preparation and submission

Project Summary

Action Plans	Year 1		Year 2	
	1-6	7-12	1-6	7-12
1. Investigate pancreatic cell morphogenesis into VM-like structures	xxx	xxx		
2. Determine signaling pathways that are necessary for formation of VM-like structures in pancreatic ductal adenocarcinoma	xxx	xxx		
3. Investigate the presence of VM in pancreatic adenocarcinoma patients		xxx	xxx	xxx
4. Data and statistical analyses			xxx	xxx

5. Manuscript preparation and submission				xxx
--	--	--	--	-----

Output

Output	Number
1. International conference abstracts and posters	1
2. Graduate student ● M.Sc. student: Ms. Nattapa Prakobphol 6137429 SCBC/M	1
3. International journal publication	1 (published) 1 (pending)

Literature review

Pancreatic cancer

Pancreatic ductal carcinoma (PDA) is one of the most lethal cancer types worldwide as it is rarely detected early and is resistant to cancer therapy (11,12). It arises at the pancreatic ductal epithelium, as shown in Figure 1, which represents less than 10% of the pancreas by volume. PDA can be described by its invasiveness and rapid progression. Signs and symptoms of the disease may include jaundice, abdominal and back pain, unexpected weight loss, light-colored stools, dark urine, and loss of appetite (12); however, these symptoms do not develop until the cancer has reached an advanced stage. Disease prognosis is extremely poor, and conventional cancer therapeutic strategies have little impact on disease course. The risk factors associated with pancreatic cancer are shown in Table 1. Approximately 5-10% of PDA patients have hereditary genetic factors, which cannot be identified in most cases, suggesting that effective screening tools or individualized treatment strategies still remain elusive.

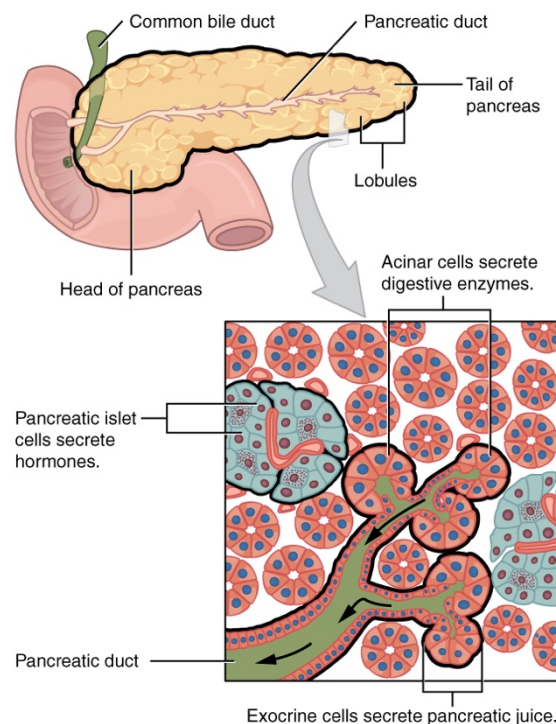


Figure 1. The pancreas and its components (modified from 13)

Advances in molecular biology have greatly improved the understanding of the pathogenesis of pancreatic cancer. Genetic studies have identified a signature molecular profile, which include *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, and *SMAD4/DPC4*. More than 90% of PDA contains a very high rate of activating mutations in *KRAS* for both primary tumor and distant metastatic lesions. Genetic studies in mice also support the role of *KRAS* and *TP53* in the development of progression of pancreatic adenocarcinoma. The *Kras^{LSL.G12D/+}; p53^{R172H/+}; PdxCretg/+* (or KPC) model, a well-validated, clinically relevant model of PDA, which conditionally expresses endogenous mutant *Kras* and *p53* in

pancreatic cells, develop pancreatic tumors with similar pathophysiological features to those in humans (14). In addition, several lines of evidence have established that PDA upregulates a wide range of cytokines, growth factors, and their receptors, such as epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), and transforming growth factor-beta (TGF-beta). These factors are known to promote growth and invasion of tumor cells as well as evasion of programmed cell death and angiogenesis (2).

Table 1. Risk Factors and Inherited Syndromes Associated with Pancreatic Cancer.*	
Variable	Approximate Risk
Risk factor	
Smoking ³	2–3
Long-standing diabetes mellitus ⁴	2
Nonhereditary and chronic pancreatitis ⁵	2–6
Obesity, inactivity, or both ⁶	2
Non-O blood group ⁷	1–2
Genetic syndrome and associated gene or genes — %	
Hereditary pancreatitis (<i>PRSS1</i> , <i>SPINK1</i>) ⁸	50
Familial atypical multiple mole and melanoma syndrome (<i>p16</i>) ⁹	10–20
Hereditary breast and ovarian cancer syndromes (<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>PALB2</i>) ^{10,11}	1–2
Peutz–Jeghers syndrome (<i>STK11</i> [<i>LKB1</i>]) ¹²	30–40
Hereditary nonpolyposis colon cancer (Lynch syndrome) (<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i>) ¹³	4
Ataxia–telangiectasia (<i>ATM</i>) ¹⁴	Unknown
Li–Fraumeni syndrome (<i>P53</i>) ¹⁵	Unknown

* Values associated with risk factors are expressed as relative risks, and values associated with genetic syndromes are expressed as lifetime risks, as compared with the risk in the general population.

Table 1. Risk factors and inherited syndromes associated with pancreatic cancer (12)

The microenvironment of PDA also plays an important and complex role in tumor growth, metastasis, and response to treatment (15). Pancreatic cancer has been characterized by a dense stroma (desmoplastic) that is composed of, type I collagen, hyaluronic acid, and other extracellular matrix components. Moreover, infiltrating stromal cells, such as myofibroblasts, macrophages, mast cells, and lymphocytes are abundant in PDA. Such components may directly or indirectly contribute to the growth and survival of tumor cells as it is well established that PDA has low density and leaky vasculature. However, a complete understanding of the role of PDA stroma in promoting or restraining tumor growth and metastasis, is still lacking.

Tumor angiogenesis and vasculogenic mimicry

The growth of solid tumors requires a continuous supply of oxygen and nutrients and also a route to remove waste products. One of the most important factors and characteristic hallmarks for

cancer is the formation of new blood vessels from pre-existing vessels, or angiogenesis. The process of angiogenesis is essential for both normal embryonic and adult development as well as pathological conditions, such as cancer and ophthalmic diseases (16). Briefly, angiogenesis can be described by a series of cellular processes, including endothelial cell activation, proliferation, migration, tube formation, vessel maturation by the recruitment of perivascular or supporting cells, as shown in Figure 2. Even though angiogenic processes in development and cancer are mostly similar, vessels in a solid tumor mass is often defective in structure and function, and the blood flow into and from the tumor is significantly disrupted (17,18). Bevacizumab (Avastin) has been approved by the US FDA and used to treat patients with various types of cancer by blocking the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. However, increasing evidence indicates tumor resistance to the VEGF inhibitor, and therefore, confirms that the benefits of anti-VEGF therapy are at best transitory and followed by a restoration of tumor growth and progression. Also, several types of cancer have been characterized as hypovascularized and desmoplastic, indicating that the growth and survival of tumor cells may depend on other mechanisms than tumor angiogenesis. There are several proposed mechanisms of how a tumor can invade angiogenesis inhibition, including upregulation of alternative pro-angiogenic signaling pathways, increased protection of tumor vasculature from anti-angiogenic drugs, and changes in tumor cell behavior and characteristics to mimic blood vessels, also known as vasculogenic mimicry.

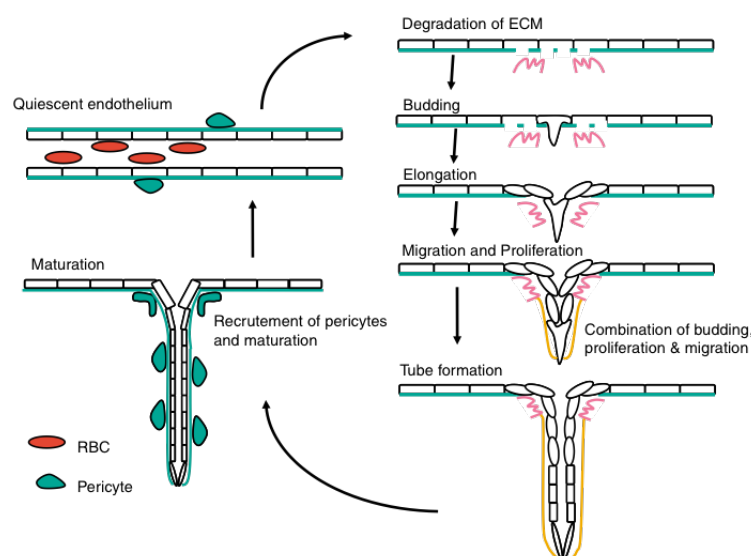


Figure 2. Steps in angiogenesis (modified from 19)

Vasculogenic mimicry (VM) describes the ability of aggressive cancer cells to express endothelium-associated genes and form extracellular matrix (ECM)-rich vessel-like networks, which recapitulate embryonic vasculogenesis (Figure 3). This process has been associated with aggressive behaviors of cancer. Recent evidence has demonstrated the presence of VM first in melanoma and, subsequently, in many other cancer types. VM processes involves several signaling pathways that play important roles in embryonic vasculogenesis and angiogenesis, including vascular endothelial

(VE)-cadherin, erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma-A2 (EPHA2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), and focal adhesion kinase (FAK). It has been demonstrated that there may be some non-overlapping mechanisms of VM as endostatin, an angiogenesis inhibitor, which suppresses endothelial-driven angiogenesis, does not affect VM in melanoma (20). However, the signaling cascades that regulate the VM process still remain elusive.

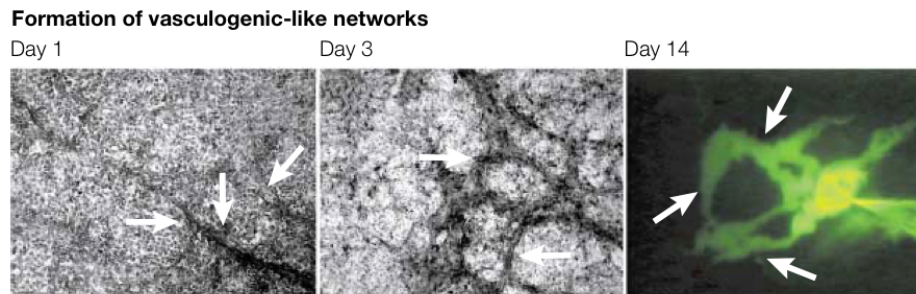


Figure 3. Formation of vasculogenic-like structures of melanoma cells in three-dimensional collagen gel (modified from 20)

Therefore, this project focuses the characterization of pancreatic cancer cell morphogenesis and abilities to form VM or VM-like structures as well as the roles of classical angiogenic pathways such as VEGF and FGF on the process of VM formation. In addition, we aim to investigate the clinical relevance and significance by examining the presence and characteristics of VM structures in PDA patient samples.

References

1. Saif M, Lee Y and Kim R: Harnessing gemcitabine metabolism: a step towards personalized medicine for pancreatic cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2012;4:341–346.
2. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2004;363(9414):1049-57.
3. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1:27–31.
4. Bergers G and Benjamin LE: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:401–410.
5. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):592-603.
6. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(5):391-400.
7. Qi L, Song W, Liu Z, Zhao X, Cao W, Sun B. Wnt3a Promotes the Vasculogenic Mimicry Formation of Colon Cancer via Wnt/beta-Catenin Signaling. *International journal of molecular sciences.* 2015;16(8):18564-79.
8. Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2012;18(10):2726-32.

9. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, et al: Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155:739–752.
10. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science.* 2009;324(5933):1457-61.
11. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(12),897–909.
12. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2014;371(11):1039–1049.
13. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>
14. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell.* 2005;7(5):469–483.
15. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clini Cancer Res.* 2012;18(16):4266–4276.
16. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 1987;235(4787):442-7. Review.
17. Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:563–584.
18. Nagy JA, Chang S-H, Shih S-C, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Sem Thromb Hemost.* 2010;36(3):321–331.
19. Dufraine J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene.* 2008;27(38):5132–5137.
20. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Angiogenesis: Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):411–421.

3. Objectives

- To investigate the abilities of cell morphogenesis into vasculogenic mimicry-like structures in pancreatic cancer cells
- To determine signaling pathways that play an important role in vasculogenic mimicry formation in vitro
- To investigate the presence of vasculogenic mimicry in pancreatic adenocarcinoma patients and compare VM levels and characteristics in different grades of pancreatic adenocarcinoma

4. Research Methodology

Part 1: Investigation of cell morphogenesis into VM-like structures

1. Culture of pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines, PANC-1 and MIA-PaCa-2

PANC-1 and MIA-PaCa-2 are selected for our studies because both cell lines are cancer cell lines of pancreatic ductal carcinoma origin. Both cell lines have been extensively used as cellular models in a number of research studies, and therefore the information related to these cells are readily available in online databases. will be obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), USA and cultured in DMEM with high glucose, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 ug/ml streptomycin. The cells will be maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2. Examination of cell morphology in two- and three-dimensional culture systems

PANC-1 and MIA-PaCa-2 will be cultured, and cell morphology and characteristics will be observed and compared between the two cell lines as background data that may be important in the process of subsequent data interpretation. The characteristics include:

- Cell proliferation rate/doubling time
- Cell adhesion/migration
- Cell shape and morphology with or without collagen coating

VM structures of cancer cells can be assessed by the Matrigel tube formation assay as previously described (Lirdprapamongkol K, 2012) and the network formation assay (Kangsamaksin et al, 2012). For the Matrigel tube formation assay, each well of a 96-well plate was pre-coated with 50 ul of Matrigel. After Matrigel solidifies, PANC-1 or MIA-PaCa-2 cells in complete culture media are seeded into each well and incubated for 4 hours. For the network formation assay, each cell line will be seeded between two collagen gel layers and incubated for 4 days. Then, the culture is visualized via phase-contrast, inverted light microscopy and photographed for further analysis. Length of tube-like structures and number of processes formed will be counted and measured.

3. Effects of angiogenic factors on VM formation

Previous reports demonstrated that some angiogenic factors, such as HGF and VEGF, promoted the formation of VM structures in 3D cultures of breast cancer cells

(Lirdprapamongkol et al). Therefore, we would also like to test in our pancreatic cancer cell culture systems whether these factors have any impact on cell morphogenesis. The Matrigel tube formation assay will be performed as described in 2. The growth factors will be added into the wells immediately after the cells are seeded, to a final concentration of 50 ng/ml.

Expected results

For Part 1, we expect that the two pancreatic cancer cell lines will undergo cell morphogenesis and rearrange to form tube-like structures in Matrigel. The degree of cell morphogenesis may vary within the two cells, which could lead to future experiments to compare and contrast the difference in molecular pathways each cell line employs in cell morphogenesis. And, addition of angiogenic factors is expected to increase the level of VM structure formation in Matrigel.

Part 2: Determine signaling pathways that are necessary for VM formation in pancreatic ductal carcinoma cells

Expression profiles of angiogenic and growth factors will be investigated in both PANC-1 and MIA-PaCa-2 cell lines by means of quantitative RT-PCR and Western blot analysis. The conditions to be analyzed are:

- 2D culture
- 2D culture with angiogenic factors (VEGF or HGF)
- 3D culture
- 3D culture with angiogenic factors (VEGF or HGF)

And, the angiogenic factors and pathways that will be investigated are:

- VEGF/VEGFR
- PIGF
- PDGF/PDGFR
- FGF
- Notch
- Angiopoietin/TIE

The expression levels of these angiogenic molecules and receptors will be analyzed in different conditions of pancreatic cell culture. We will select molecules or receptors that are significantly upregulated or downregulated during the process of VM formation, that is in 3D culture. Also, whether those pathways can respond to the addition of VEGF or HGF or not.

Next, after the signaling pathways are identified, we will use specific inhibition via molecular techniques to block individual pathways to determine the effect on VM morphogenesis of both cell lines.

- siRNA or shRNA
- Chemical inhibitors

Expected results

We expect to see some signaling pathways, ligands or receptors, are associated with VM cell morphogenesis of pancreatic cancer cells. And, when those signaling pathways are disrupted or inhibited, the process of VM formation should be compromised.

Part 3: Investigate the presence and nature of VM in pancreatic ductal carcinoma patients

Experiments in Part 3 will be performed with the collaboration of Dr. Komgrid Charngkaew and Dr. Nontawat Benjakul from the Department of Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University. The proposal for the studies of pancreatic ductal carcinoma patient samples has been submitted and approved from the Siriraj Institutional Review Board (SiRB) (Certificate of Approval No. Si 014/2017).

1. Patient sample selection: inclusion and exclusion criteria

Inclusion: Paraffin-embedded tissue samples of pancreatic ductal adenocarcinoma from 2007 to 2017 will be used in this study.

Exclusion: Paraffin-embedded tissue samples that are insufficient for slide preparation will be excluded.

2. Immunohistochemistry

In order to determine the presence of VM structures, tissue sections will be stained with the following:

- Hematoxylin/eosin
 - To observe the architecture of tumor samples
- Periodic acid Schiff (PAS)
 - To stain for stromal components and the arrangement of cancer cells and stromal cells, which is a common method to observe VM-like structures that are formed as channels within the tumor.
- Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) or CD31
 - To identify endothelial components in tumor samples. We need to differentiate between endothelial/vascular channels and VM channels, so we will use the immunostaining data from both CD31 and PAS to identify VM structures.
- Angiogenic molecules or factors that are indicated by the data from Part 2
 - To confirm and validate the significance of experimental results that we get from cell and molecular analyses in Part 2.

Characterization and quantification of VM structures will be performed at 100x magnification and analyzed. Positive controls for all experiments will be immunohistochemical data of melanoma samples, and negative controls are those from normal pancreatic tissues.

Expected results

As it is well established that pancreatic cancer is hypovascularized and desmoplastic, we expect to see VM-like structures in the tumor samples, with the higher levels or numbers in the higher-grade tumors. However, the association between VM and tumor grades may not be as expected, the results that we will obtain from our studies will be very important in understanding the nature of pancreatic ductal carcinoma and alternative pathways that tumor cells employ in the conditions where tumor angiogenesis is rare.

5. Results

Part 1: Investigation of cell morphogenesis into VM-like structures

The human melanoma cell line MDA-MB-435 and the mouse melanoma cell line B16-F10, and two human pancreatic cancer cell lines, PANC-1 and MIA-PaCa-2, were obtained from the ATCC and cultured in DMEM with 10% FBS. The morphology in culture can be observed below.

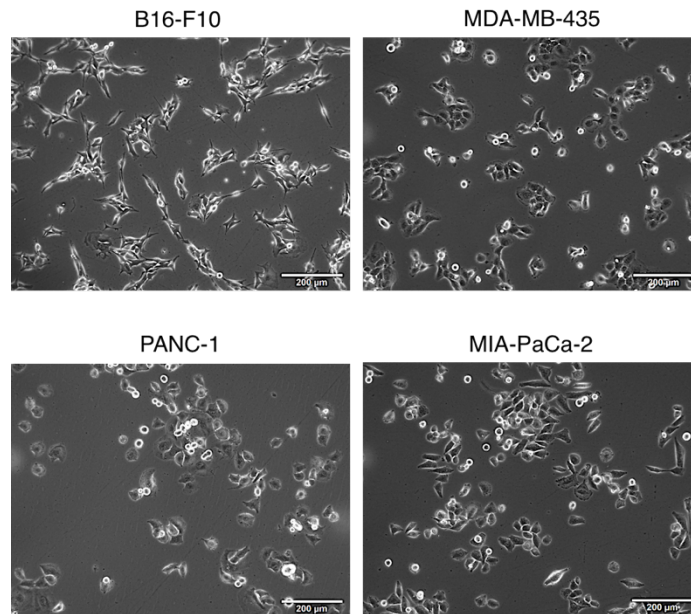


Figure 1. Cell cultures of melanoma cell lines, B16-F10 and MDA-MB-435 and pancreatic cancer cell lines PANC-1 and MIA-PaCa-2

HUVEC, PANC-1, and MIA-PaCa-2 cell proliferation was determined by the MTT assay at 24, 48 and 72 hours. Cells are cultured by using Dulbecco's Modified Eagles Medium with 10% FBS. The doubling times of HUVEC, PANC-1, and MIA-PaCa-2 are approximately 26 h, 18 h and 26 h, respectively as shown in Figure 2. Next, we investigated cell morphogenesis under angiogenic conditions. PANC-1 cells were seeded in a culture plate and treated with EGF or VEGF. When compared with control cells, both EGF and VEGF were able to induce PANC-1 cell protrusions as shown in Figure 3. Additionally, we further determined the effects of angiogenic factors in a 3-dimensional condition and found that PANC-1, but not MIA-PaCa-2, developed a network-like structure

under angiogenic condition in the Matrigel. These results indicated that EGF and VEGF can induce vessel-like morphogenesis of some pancreatic cancer cells in vitro.

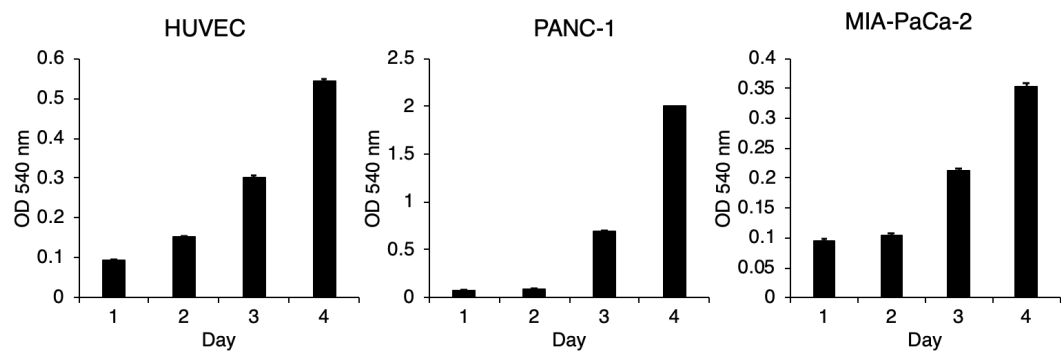


Figure 2. HUVEC and pancreatic cancer cell proliferation

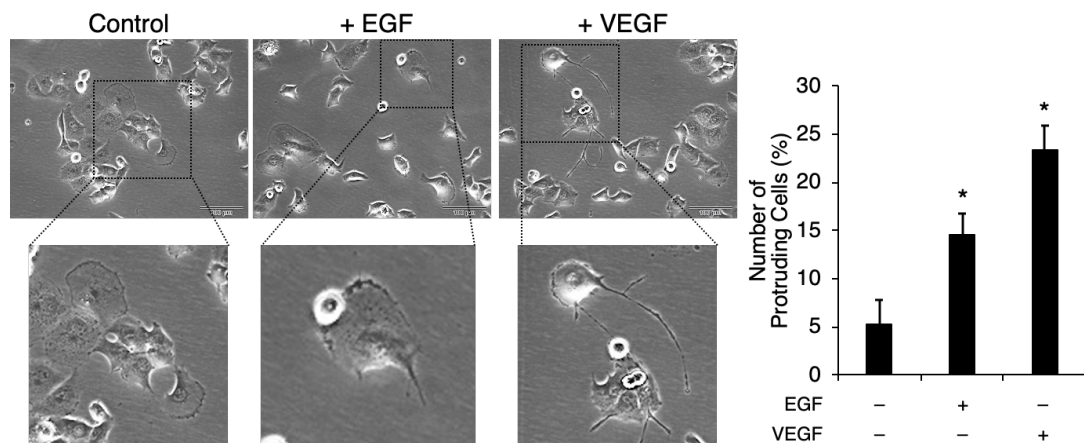


Figure 3. VEGF induces pancreatic cancer cell protrusion

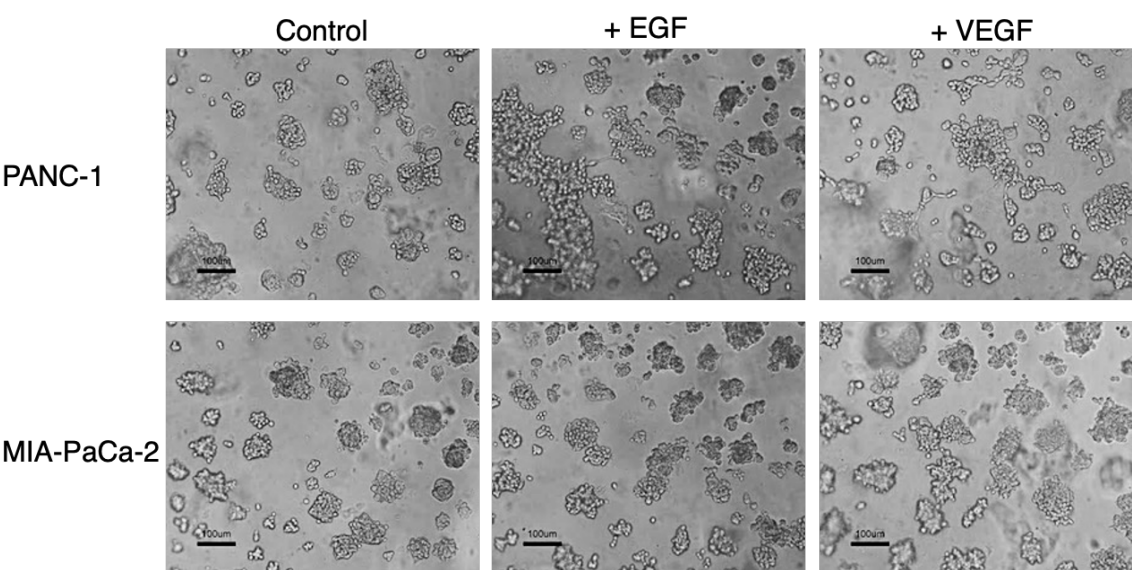


Figure 4. VEGF induces VM-like structures in PANC-1

Next, we examined cell morphogenesis in 2-dimensional culture by the network formation assay in order to test whether or not pancreatic cancer cells can adopt the endothelial cell characteristics of branching and network formation in a pro-angiogenic environment. HUVECs and two pancreatic cancer cell lines were seeded between two collagen gel layers and incubated for 4 days. Then, the culture is visualized via phase-contrast, inverted light microscopy and photographed for further analysis. Length of tube-like structures and number of processes formed will be counted and measured. As shown below, HUVECs formed network-like structures with endothelial cell connection. One endothelial cell can change its morphology and form cell protrusions to connect with neighboring cells, leading to branching structures. The melanoma cell lines B16-F10 and MDA-MB-435 were used as positive controls in our network formation study, and they demonstrated the ability to form network-like structures in our assay. For pancreatic cancer cells, PANC-1 showed the ability to form cellular connections with neighboring cells in the network formation assay as shown in the figure below. In contrast, MIA-PaCa-2 attached to the collagen gel but did not undergo any noticeable change in morphology.

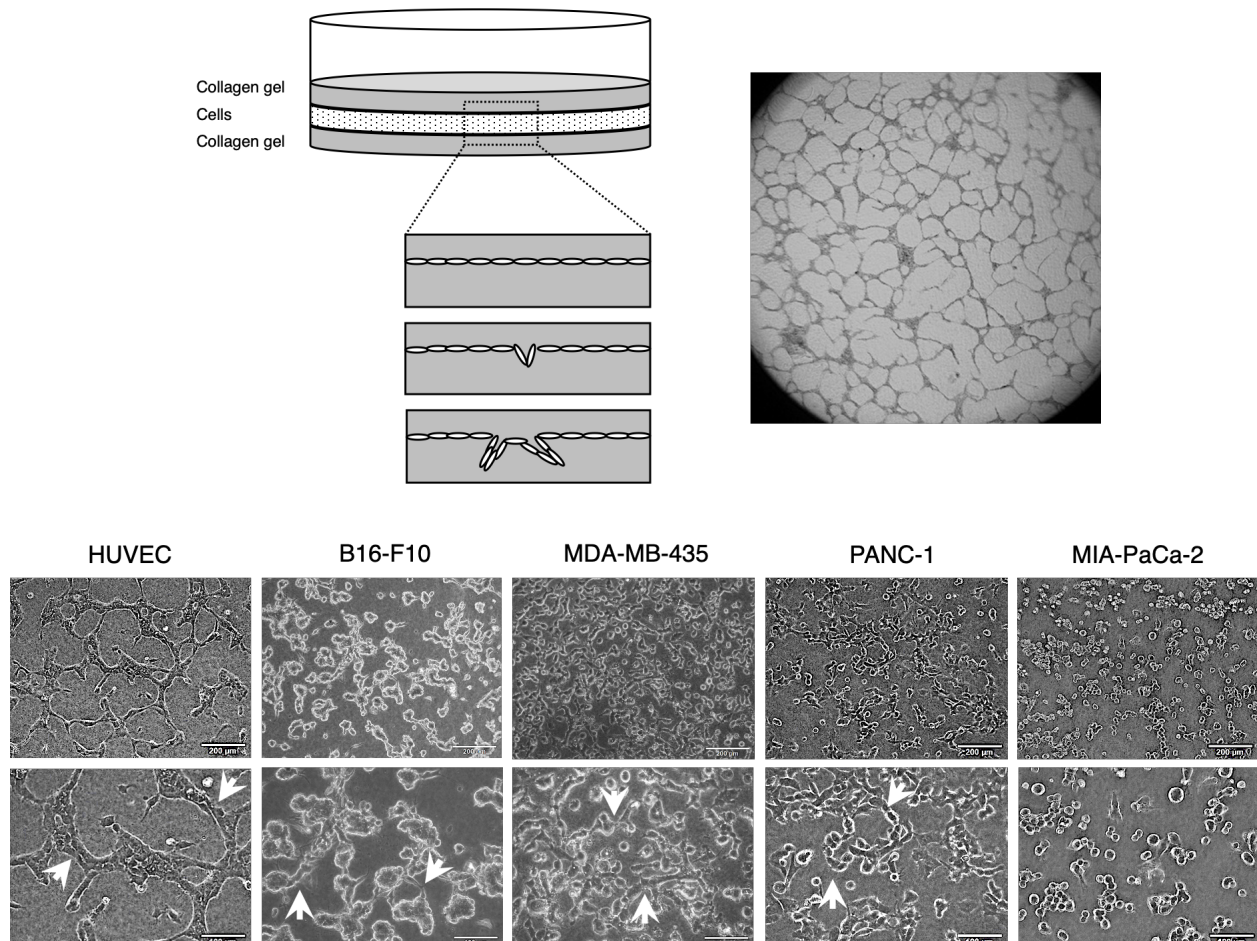


Figure 5. The network formation assay of HUVEC, B16-F10, MDA-MB-435, PANC-1, and MIA-PaCa-2

Part 2: Determine signaling pathways that are necessary for VM formation in pancreatic ductal carcinoma cells

Then, the cells were isolated and analyzed for the expression profiles of angiogenic factors as shown by semi-quantitative RT-PCR and gel electrophoresis. Our results show that these cells express VEGF-A and VEGF-C but not VEGF receptors. Also, both melanoma and pancreatic cancer cell lines similarly express PDGF-B, NOTCH1, NOTCH2, and NOTCH3. These data suggest that pancreatic cancer cell lines that we use in this project exhibit similar expression profiles of angiogenic factors to melanoma cell lines. The expression profiles of PIGF and FGF are to be determined.

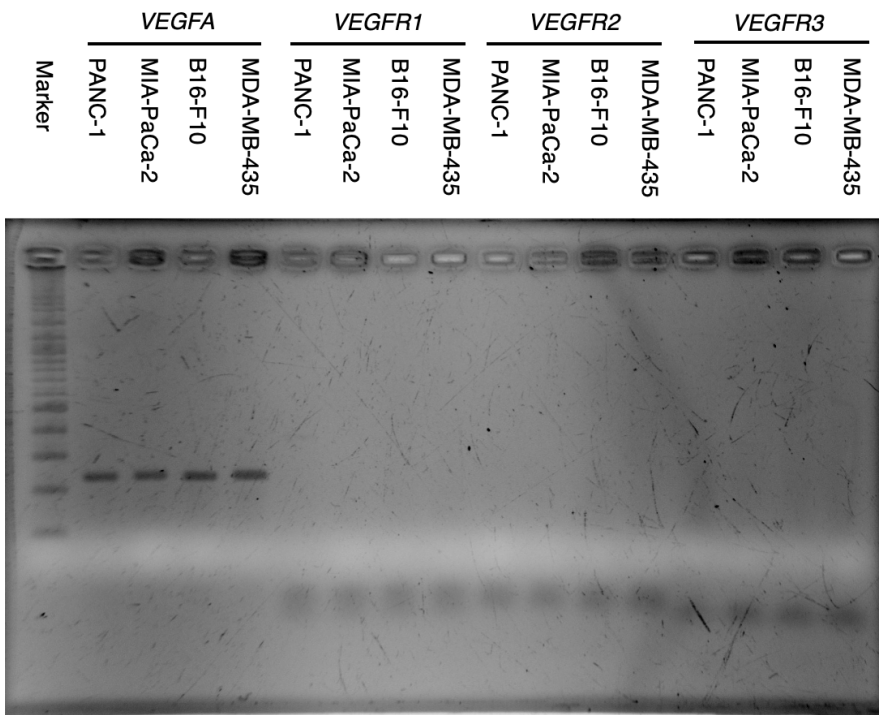


Figure 6. Expression profiles of VEGFA, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 in melanoma and pancreatic cancer cells

As our results in Part 1 demonstrated that EGF and VEGF can induce pancreatic cell morphogenesis, we next investigated whether this phenomenon results from cell transdifferentiation into endothelial cells. We determined the expression levels of EC-specific genes, VE-cadherin, VEGFR-2, and CD31 by quantitative RT-PCR and found that EGF and VEGF did not have any impact on the expression levels of these genes (Figure 9). Next, it is also likely that the network-forming ability of pancreatic cancer cells was triggered when cancer cells become more invasive due to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. Our data demonstrated that an epithelial marker, E-caherin, was downregulated while several mesenchymal markers, including N-Cadherin, Vimentin, Snail1, and Twist, were significantly upregulated in PANC-1 under the treatment of EGF and VEGF as shown in Figure 10. This suggests that EMT may play an important role in VM cell morphogenesis in pancreatic cancer.

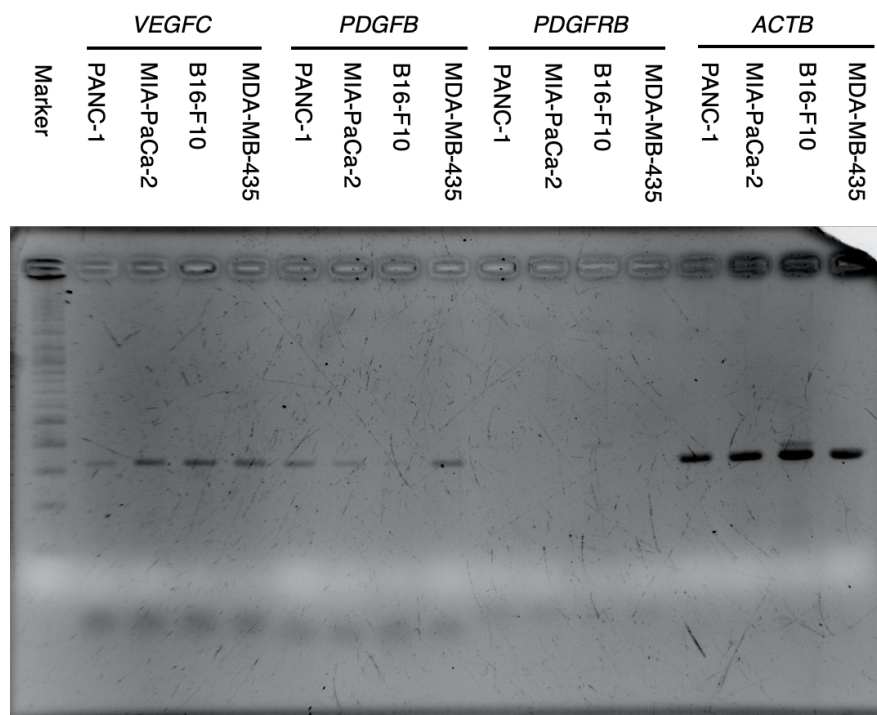


Figure 7. Expression profiles of VEGFC, PDGFB, PDGFRB, ACTB in melanoma and pancreatic cancer cells

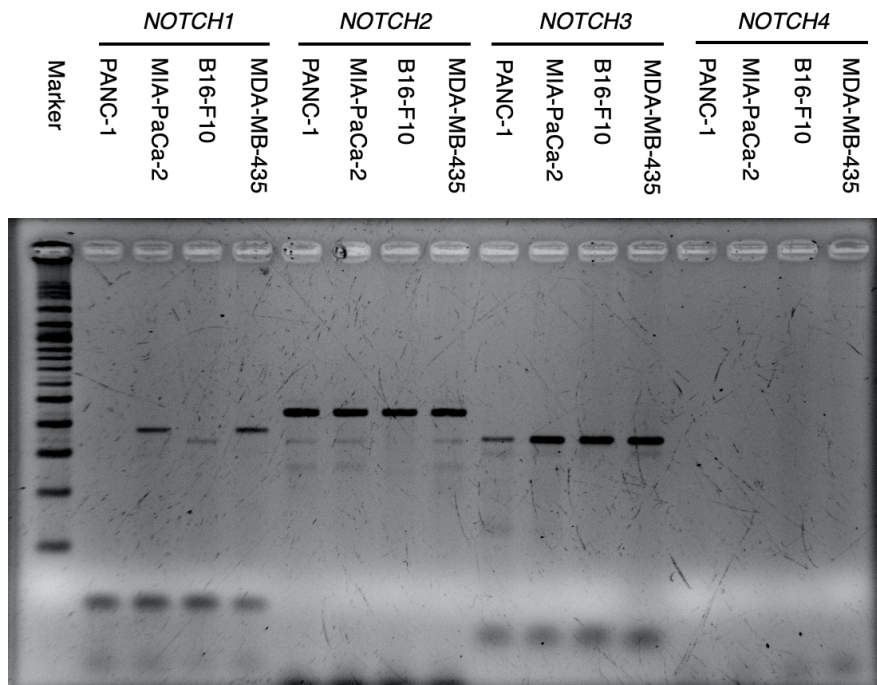


Figure 8. Expression profiles of NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4 in melanoma and pancreatic cancer cells

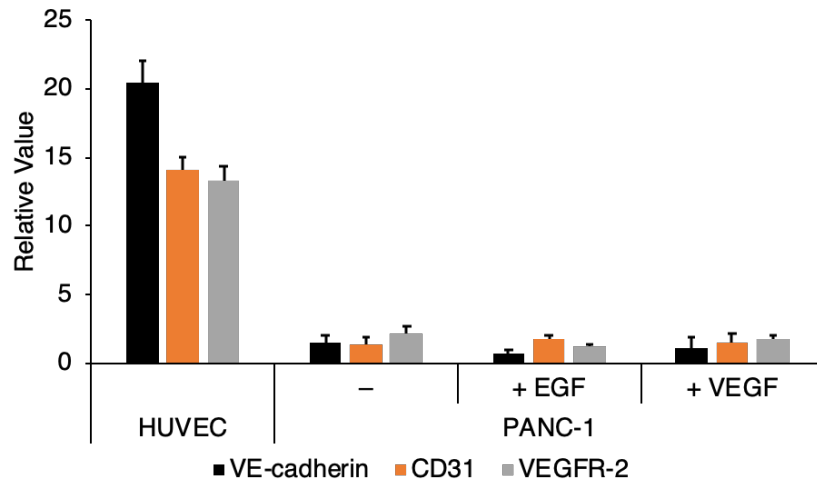


Figure 9. Endothelial cell-specific genes are not upregulated in PANC-1 treated with EGF or VEGF

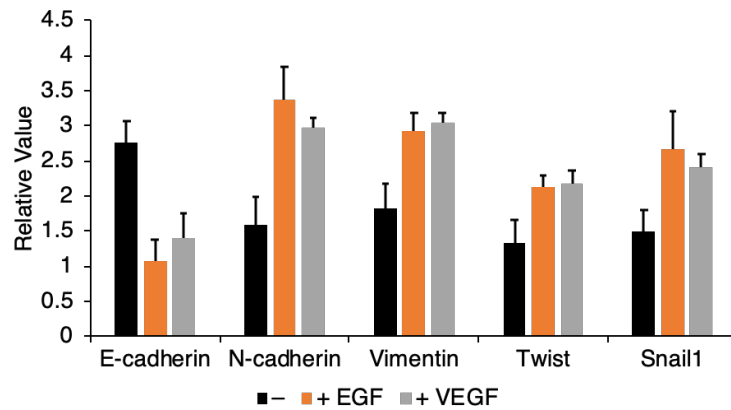


Figure 10. EGF and VEGF induce EMT markers in PANC-1 cells

Part 3: Investigate the presence and nature of VM in pancreatic ductal carcinoma patients

We gathered 122 paraffin-embedded PDAC samples from 2008 to 2016 at the Department of Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital. Then, we prepared sections to determine VM and vascular structures by H&E, PAS, and CD31 immunohistochemistry. We also performed NOTCH1 immunostaining to observe the expression level and localization of NOTCH1 protein.

The anatomy of the pancreas is depicted as shown in Figure 11. The data from pancreatic cancer patients were analyzed based on anatomical presentation, stage, and invasion characteristics. The cases are divided into 59 males and 63 females, and the age range is 27–83 years as shown in Figure 12.

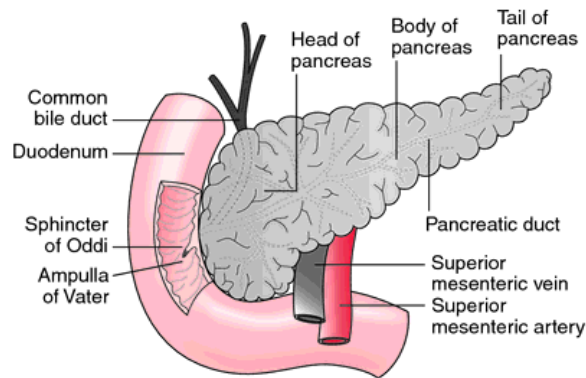


Figure 11. The anatomy of the pancreas

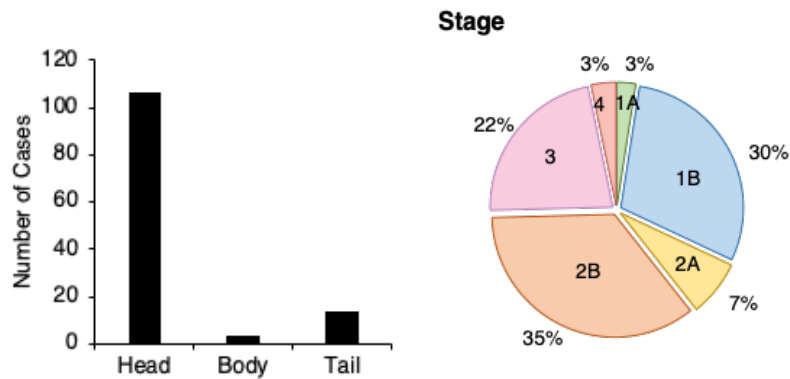


Figure 12. Anatomical presentation and staging of PDAC

VM-like structures were detected in 91 cases (74.6%) and correlated with tumor size ($p < 0.021$). VM was significantly higher in T2 (> 2 and < 4 cm) (66/82, 80.5%) than in T3 (> 4 cm) (15/25, 72.0%) and T1 (≤ 2 cm) (7/15, 46.7%) as shown in the table below.

Parameters	Total (%)	Tissue Samples		<i>p</i> Value
		VM (%)	Non VM (%)	
Age				
< 60	39 (32)	28 (71.8)	11 (28.2)	0.627
≥ 60	83 (68)	63 (75.9)	20 (24.1)	
Gender				
Male	59 (48.4)	46 (78)	13 (22)	0.407
Female	63 (51.6)	45 (71.4)	18 (28.6)	
Tumor Size (cm)				
≤ 2 [T1]	15 (12.3)	7 (46.7)	8 (53.3)	0.021*
> 2 and ≤ 4 [T2]	82 (67.2)	66 (80.5)	16 (19.5)	
> 4 [T3]	25 (20.5)	18 (72.0)	7 (28.0)	
Histological Differentiation				
Well differentiated	8 (6.6)	4 (50.0)	4 (50.0)	0.085
Moderately differentiated	107 (87.7)	80 (74.8)	27 (25.2)	
Poorly differentiated	7 (5.7)	7 (100)	0 (0)	

Peri-Neural Invasion				
Negative	15 (12.3)	9 (60.0)	6 (40.0)	0.206
Positive	107 (87.7)	82 (76.6)	25 (23.4)	
Angio-Lymphatic Invasion				
Negative	66 (54.1)	48 (72.7)	18 (27.3)	0.608
Positive	56 (45.9)	43 (76.8)	13 (23.2)	
AJCC Prognostic Stage				
1A	3 (2.5)	1 (33.3)	2 (66.7)	0.229
1B	36 (29.5)	27 (75.0)	9 (25.0)	
2A	9 (7.4)	5 (55.6)	4 (44.4)	
2B	43 (35.2)	35 (81.4)	8 (18.6)	
3	27 (22.1)	21 (77.8)	6 (22.2)	
4	4 (3.3)	2 (50.0)	2 (50.0)	
Intensity of NOTCH1 Expression				
Unstained	1 (0.8)	1 (100)	0 (0)	< 0.01*
Weak	27 (22.2)	5 (18.5)	22 (81.5)	
Moderate	93 (76.2)	84 (90.3)	9 (9.7)	
Strong	1 (0.8)	1 (100)	0 (0)	
Areas of NOTCH1 Expression				
Only Cytoplasm	26 (21.3)	5 (19.2)	21 (80.8)	< 0.01*
Cytoplasm > Nucleus	76 (62.3)	67 (88.2)	9 (11.8)	
Nucleus > Cytoplasm	20 (16.4)	19 (95.0)	1 (5.0)	
Only Nucleus	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

The role of Notch signaling has been well established in tumorigenesis and angiogenesis, and our data showed that VM is significantly correlated with the intensity and the area of NOTCH1 localization ($p < 0.001$), implicating its role in VM formation. In conclusion, VM found in pancreatic cancer is significantly correlated to tumor size and NOTCH1 activity.

6. Conclusion and Discussion

This study used the pancreatic cancer cell lines, PANC-1 and MIA-PaCa-2, as models for pancreatic ductal adenocarcinoma and found that these cancer cells were able to undergo cell morphogenesis into vessel-like structures in the presence of growth and angiogenic factors in vitro. PANC-1 exhibited a greater ability to form cell network than MIA-PaCa-2 in response to EGF and VEGF treatment, implicating that the VM-forming ability may vary depending on the nature and aggressiveness of different pancreatic cancer cells. The results from in vitro studies were also reflected in the immunohistochemical data from PDAC patient samples. VM-like structures, which were identified by the presence of PAS-positive, vessel-like structures and the absence of CD31, were found in PDAC patients in correlation to tumor size. The correlation of VM and histological differentiation was not significant ($p = 0.085$) possibly due to the small sample size and uneven group distribution. Data from clinical samples suggested that VM may play an important role in tumor growth and cell differentiation in a hypovascularized tumor. Possible mechanisms of the VM process in pancreatic cancer are EMT as shown in vitro and Notch signaling in PDAC samples. Our results open up research questions to further explore whether these signaling pathways in fact play a role in pancreatic cancer cell morphogenesis, growth, and metastasis and may represent molecular targets for future PDAC treatment.

7. Output

Graduate student

- Miss Nattapa Prakobphol 6137429 SCBC/M
M.Sc. student in Biochemistry (International Program), Mahidol University

International publications

- Chaithongyot S, Duangrat R, Wootthichairangsan C, Hanchaina R, Udomprasert A*, **Kangsamaksin T***. Selective delivery of doxorubicin using the biomarker-specific, aptamer-functionalized DNA nanosphere. *Mater Lett.* 260:126952.
doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126952.
- Benjakul N, Prakobpol N, Svasti J, Charngkaew K, **Kangsamaksin T***. Incidence of vasculogenic mimicry in human pancreatic ductal adenocarcinoma in Thai patients. *Manuscript in preparation.*

International conference

- **Kangsamaksin T***, Benjakul N, Prakobphol N, Svasti J, Charngkaew K. Incidence of vasculogenic mimicry in human pancreatic ductal adenocarcinoma in Thai patients. The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. September 26–28, 2019. Kyoto, Japan. (Poster presentation)

8. Appendix

- Chaithongyot S, Duangrat R, Wootthichairangsan C, Hanchaina R, Udomprasert A*, **Kangsamaksin T***. Selective delivery of doxorubicin using the biomarker-specific, aptamer-functionalized DNA nanosphere. *Mater Lett.* 260:126952.
doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126952.
- **Kangsamaksin T***, Benjakul N, Prakobphol N, Svasti J, Charngkaew K. Incidence of vasculogenic mimicry in human pancreatic ductal adenocarcinoma in Thai patients. The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. September 26–28, 2019. Kyoto, Japan. (Poster presentation)

Research Article

Chaithongyot S, Duangrat R, Wootthichairangsan C, Hanchaina R, Udomprasert A*, **Kangsamaksin T***. Selective delivery of doxorubicin using the biomarker-specific, aptamer-functionalized DNA nanosphere. *Mater Lett.* 260:126952. doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126952.



Selective delivery of doxorubicin using the biomarker-specific, aptamer-functionalized DNA nanosphere

Supattra Chaithongyot^{a,1}, Ratchanee Duangrat^{a,1}, Chanida Wootthichairangsan^a, Rattanavinan Hanchaina^a, Anuttara Udomprasert^{b,*}, Thaned Kangsamaksin^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^b Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2019

Received in revised form 15 October 2019

Accepted 4 November 2019

Available online 4 November 2019

Keywords:

DNA origami
Targeted drug delivery
Nanostructure
Doxorubicin
Breast cancer
MUC1

ABSTRACT

Targeted drug delivery systems have attracted much attention as they can enhance treatment efficiency and minimize cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. Several nanomaterials with biological advantages have been explored for novel drug carrier invention. Here, a DNA origami nanosphere modified with a specific aptamer was developed for selective doxorubicin delivery. The specificity of the targeted nanocarrier was investigated against three cell lines with different levels of Mucin 1 (*MUC1*) expression. Our data showed that the doxorubicin-loaded, *MUC1* aptamer-functionalized nanosphere (Dox-Apt-sphere) preferentially delivered drugs and exhibited cytotoxic effects at low Dox concentration in *MUC1*-high MCF-7 cells. These results also proved that the aptamer-modified DNA nanostructure may serve as a promising candidate for targeted drug delivery.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chemotherapy suffers from adverse side effects as anti-cancer drugs non-selectively distribute throughout the body and harm normal cells. Previous evidence has shown that Dox exerts some toxic effects on cardiomyocytes [1–4]. To reduce cytotoxicity and increase treatment efficacy, a targeted drug delivery system has been developed. Many biomolecules have been utilized as targeting ligands, including peptides [5,6], transferrin [7], folate [8], antibodies [9], and aptamers [10,11]. DNA aptamers, single-stranded nucleic acids that specifically bind to target molecules [12], offer superior properties to antibodies due to their smaller size, lower production costs, and higher temperature stability. Specific aptamers with high affinity to a variety of cancer biomarkers have been investigated [11,13]. *MUC1* is a cell-surface glycoprotein which is upregulated in several types of cancer and often used as a biomarker [14]. Various DNA nanostructures have been functionalized with a *MUC1* aptamer [15] for targeted delivery purposes such as icosahedron [16], tetrahedron [17,18], and triangular DNA origami [19,20].

Here, we aimed to investigate the selective Dox delivery of the *MUC1* aptamer-functionalized DNA origami nanosphere (Apt-sphere) (Fig. 1(a)) against three cell lines with different levels of *MUC1* expression to demonstrate the specificity of the nanostructure for future use in targeted drug delivery.

2. Experimental section

Three cell lines MCF-7, HaCaT, and MDA-MB-231 cells were used in this study. *MUC1* expression was determined by quantitative RT-PCR, Western blot, and immunocytochemistry. The sphere and Apt-sphere were prepared in the TAE/Mg²⁺ buffer as previously described [10], and the annealed nanostructures were purified using the PEG purification method [21] and verified by atomic force microscopy (AFM). For Dox loading and releasing efficiency, different concentrations of Dox were incubated with the nanosphere at 37 °C for 24 h and centrifuged at 15,000 rpm at 4 °C for 30 min. The pellet was resuspended and measured for 480-nm absorbance for loading and releasing efficiency. To evaluate selective delivery of Dox-loaded Apt-sphere, cellular internalization and cytotoxicity effects were examined. The sphere was fluorescently labeled with a quantum dot (QD). After incubation for six hours, cells were visualized by confocal fluorescence microscopy. For cytotoxicity effects, Apt-sphere containing different concentrations of Dox were incubated with each cell line. The MTT assay was performed after 48-hour incubation.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: anuttara@go.buu.ac.th (A. Udomprasert), thaned.kan@mahidol.edu (T. Kangsamaksin).

¹ These authors contributed equally to this work.

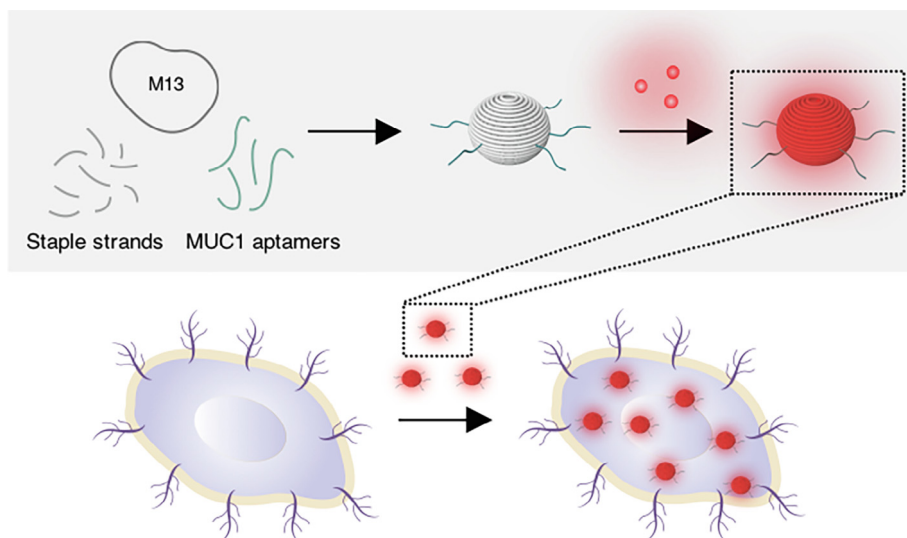


Fig. 1. The diagram illustrates the annealing process of Apt-sphere from M13, staple strands, and MUC1 aptamer strands and the loading process of Dox into Apt-sphere. Dox-Apt-sphere is more likely to bind cancer cells with MUC1 upregulation and be internalized.

3. Result and discussion

As previous studies reported that *MUC1* is upregulated in certain breast cancer subtypes; therefore, we first determined *MUC1* expression levels in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines, and immortalized keratinocytes, HaCaT, as control. We found that all cell lines differentially expressed *MUC1* at both mRNA and protein levels (Fig. S1 (a) and (b)). *MUC1* expression is highest in MCF-7 and lowest in MDA-MB-231. Immunocytochemical analysis demonstrated that *MUC1* protein was localized on the plasma membrane (Fig. S1 (C)). So, we selected *MUC1* as a target molecule to investigate the specificity of the DNA nanosphere. Next, Apt-sphere was prepared as previously described, and verified by AFM (Fig. 2 (a)). Our data showed that the nanosphere was

successfully and homogeneously constructed with the diameter of approximately 50 nm, which is consistent with our previous report [10]. However, we noted that the closed spheres were not stable enough to resist the tip force in the AFM scanning process, resulting in connected hemispheres. Apt-sphere was relatively stable in various conditions (Fig. S2). Dox was added at various concentrations (62.5–500 μM) and centrifuged to remove remaining Dox in the supernatant. Dox-loaded Apt-sphere (Dox-Apt-sphere) pellets were subsequently resuspended for Dox measurement. Our results demonstrated that Dox loading efficiency increases when the concentration of Dox was increased up to 250 μM (Fig. 2(b)), implicating that the Dox/Apt-sphere ratio reached its saturation point. The calculated number of Dox molecules per structure was approximately 10^4 . We found that

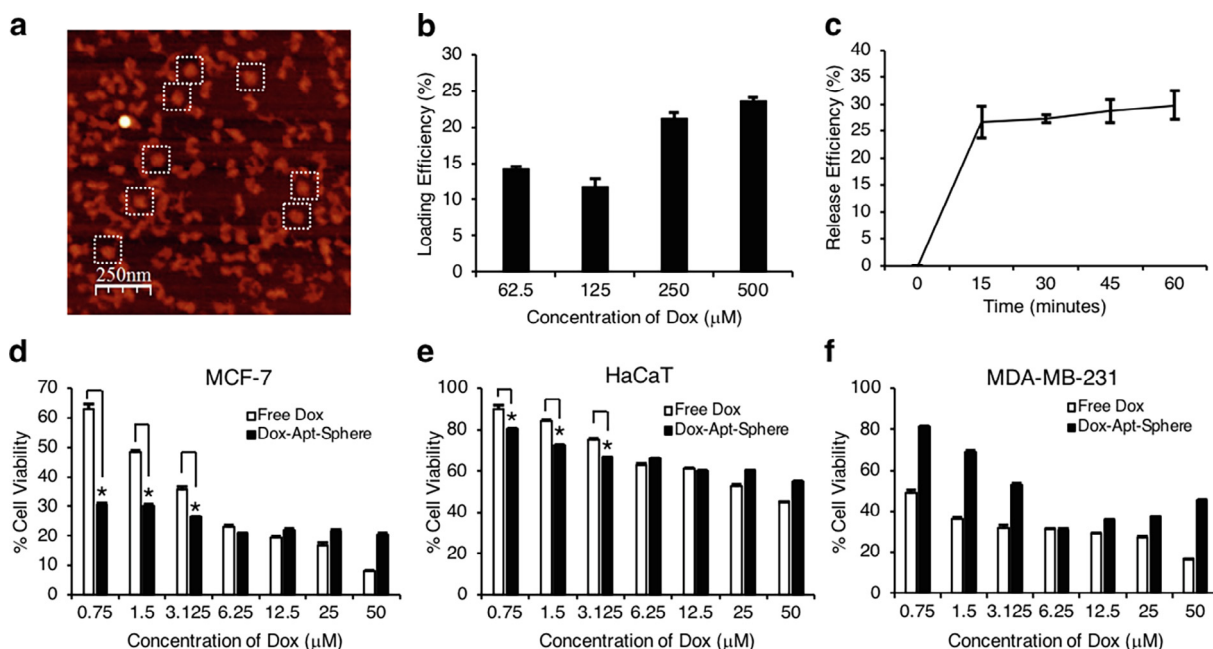


Fig. 2. The structure of the DNA nanosphere was verified by AFM; dotted boxes indicate closed spheres (a). Dox loading efficiency into the DNA nanostructure was determined at the concentration range between 62.5 and 500 μM (b). Dox releasing efficiency of the DNA nanostructure was measured up to 60 min after resuspension (c). Cytotoxicity of free Dox and Dox-Apt-sphere was determined in MCF-7 (d), HaCaT (e), and MDA-MB-231 (f). * P value < 0.05.

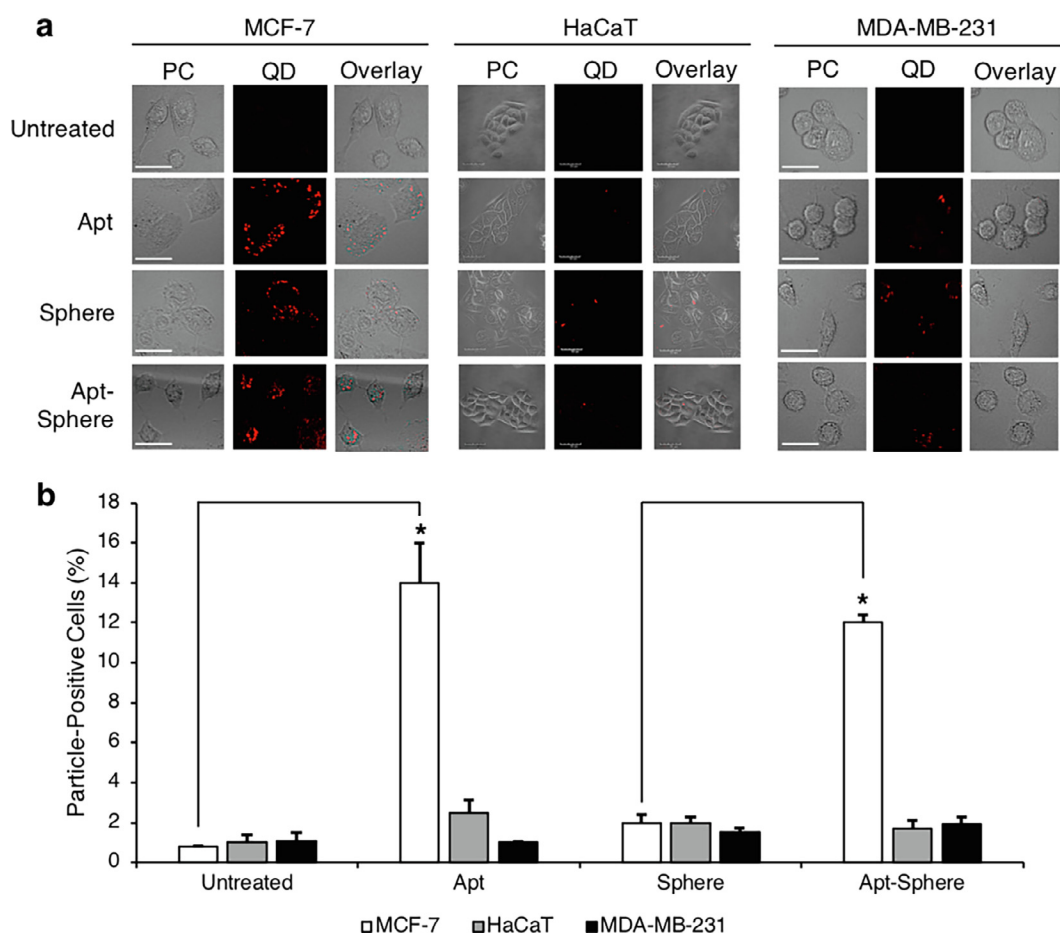


Fig. 3. The level of DNA nanostructure uptake was investigated via confocal microscopy of QD-labeled MUC1 aptamer, empty sphere, or Apt-sphere (a) and quantitated (b). * P value < 0.05.

the nanosphere loaded with high concentrations of Dox could not run into the gel (Fig. S3), likely due to its positive charge. In addition, it is also important that we understand the nature of the free Dox/Dox-Apt-sphere equilibrium; thus, we investigated Dox releasing efficiency by resuspending Dox-Apt-sphere pellets in the buffer for 0–60 min and then separating remaining Dox-Apt-sphere by centrifugation. The amount of released Dox was then determined by measuring 480-nm absorbance from the supernatant. Our results showed that our Dox-Apt-sphere had the maximum releasing efficiency of about 25% as early as 15 min after incubation (Fig. 2 (c)). After that, there is no significant change in Dox release. These data suggested that to calculate the actual amount of Dox in the structure we need to consider not only loading efficiency but also releasing efficiency in any given buffer used in the solution.

Next, we showed that the free nanosphere was not cytotoxic in all cell lines tested (Fig. S4). Then, we continued to determine the cytotoxic effects of the Dox-Apt-sphere when compared with those of free Dox in our cell line models with different levels of MUC1 expression. It has been shown that MUC1-modified DNA nanocarriers were internalized into cells via endocytosis and degraded in the lysosome, resulting in Dox release [16]. We found that in MCF-7 cells, free Dox showed a cytotoxic effect in a dose-dependent manner with the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 1.5 μ M. Interestingly, Dox-Apt-sphere increased the cytotoxicity on MCF-7 cells by 50%, 40%, and 25% at 0.75, 1.5, and 3.125 μ M of Dox, respectively (Fig. 2 (d)). These results indicate that our DNA nanostructure may serve as promising nanocarrier helps to enhance therapeutic effects of Dox at very low concentrations

leading to less side effects. According to previous reports, the nanosphere enhanced the uptake of Dox or maintained its level inside the cell by interfering with efflux processes [22]. In HaCaT cells, Dox-Apt-sphere showed increased cytotoxicity by approximately 10% at the same range of Dox concentration (Fig. 2 (e)). This is likely due to the nature of HaCaT cells, which have a poor response to Dox treatment as the IC_{50} is about 50 μ M, more than 30-fold higher than that in MCF-7 cells. In contrast, MDA-MB-231 cells treated with Dox-Apt-sphere, had a significantly higher cell viability than those treated with free Dox (Fig. 2 (f)), implicating that MDA-MB-231 cells are less likely to uptake Dox-loaded Apt-sphere as efficiently as MCF-7, possibly due to lower levels of MUC1 on their surface.

In order to test our hypothesis, we determined the fate of QD-labeled Apt-sphere via confocal microscopy. Our data demonstrated that MUC1 aptamer, sphere, and Apt-sphere showed highest signals in MCF-7 cells (Fig. 3 (a) and (b)). These signals are localized intracellularly, indicating that Apt-sphere was internalized and that the internalization process is dependent on the presence of the MUC1 aptamer. Additionally, we observed the fate of Dox-Apt-sphere by visualizing Dox fluorescence signals (Fig. S5); however, there is no clear difference between Dox-Apt-sphere and Dox-sphere due to low intensity of the signals in culture media.

4. Conclusion

In summary, the modification of the DNA origami nanosphere with the MUC1 aptamer offers a promising targeted drug delivery

vehicle. These results demonstrated that Apt-sphere could differentially deliver Dox into cells depending on levels of MUC1 expression. In addition, with Apt-sphere as the targeted carrier, low concentrations of Dox can only exhibit cytotoxic effects in MFC-7 cells. We have shown that not only do they enhance therapeutic efficiency, but DNA origami nanocarriers along with specific aptamers could also reduce side effects of drugs.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was financially supported by Burapha University (A.U.), Mahidol University (T.K.), and the Thailand Research Fund, Grant No. MRG6080033 (A.U.) and MRG6180090 (T.K.). The authors thank the Central Instrument Facility and the Center of Nanoimaging, Faculty of Science, Mahidol University for technical assistance and Sarawut Cheunkar for AFM assistance and Jarinee Kongtrub for graphics.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126952>.

References

- [1] C.F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T.E. Klein, et al., *Pharmacogenet Genomics*. 21 (2011) 440–446.
- [2] J.J. Bartlett, P.C. Trivedi, P. Yeung, P.C. Kienesberger, T. Pulnikunnil, *Biochem. J.* 473 (2016) 3769–3789.
- [3] D.L. Li, Z.V. Wang, G. Ding, W. Tan, X. Luo, A. Criollo, et al., *Circulation* 133 (2016) 1668–1687.
- [4] N. Koleini, E. Kardami, *Oncotarget*. 8 (2017) 46663–46680.
- [5] N. Zhao, Y. Qin, H. Liu, Z. Cheng, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 18 (2018) 74–86.
- [6] Z. Jiang, J. Guan, J. Qian, C. Zhan, *Biomater. Sci.* 7 (2019) 461–471.
- [7] D.H. Schaffert, A.H. Okholm, R.S. Sorensen, J.S. Nielsen, T. Torring, C.B. Rosen, et al., *Small*. 12 (2016) 2634–2640.
- [8] G. Zhang, Z. Zhang, J. Yang, *Nanoscale Res. Lett.* 12 (2017) 495.
- [9] D.A. Richards, A. Maruani, V. Chudasama, *Chem. Sci.* 8 (2017) 63.
- [10] S. Chaithongyot, N. Chomane, K. Charngkaew, A. Udomprasert, T. Kangsamaksin, *Mater. Lett.* 214 (2018) 72–75.
- [11] M. Kim, D.-M. Kim, K.-S. Kim, W. Jung, D.-E. Kim, *Molecules* 23 (2018) 830.
- [12] A.D. Ellington, J.W. Szostak, *Nature* 346 (1990) 818–822.
- [13] G. Zhou, O. Latchoumanin, L. Hebbard, W. Duan, C. Liddle, J. George, et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 134 (2018) 107–121.
- [14] M.S. Nabavinia, A. Gholoobi, F. Charbgo, M. Nabavinia, M. Ramezani, K. Abnous, *Med. Res. Rev.* 37 (2017) 1518–1539.
- [15] C.D. Pieve, E. Blackshaw, S. Missailidis, A.C. Perkins, *Bioconjugate Chem.* 23 (2012) 1377–1381.
- [16] M. Chang, C.-S. Yang, D.-M. Huang, *ACS Nano* 5 (2011) 6156–6163.
- [17] B. Dai, Y. Hu, J. Duan, X.-D. Yang, *Oncotarget*. 7 (2016) 38257–38269.
- [18] X. Han, Y. Jiang, S. Li, Y. Zhang, X. Ma, Z. Wu, et al., *Nanoscale*. 11 (2019) 339–347.
- [19] L. Song, Q. Jiang, J. Liu, N. Li, Q. Liu, L. Dai, et al., *Nanoscale*. 9 (2017) 7750–7754.
- [20] J. Liu, L. Song, S. Liu, S. Zhao, Q. Jiang, B. Ding, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57 (2018) 15486–15490.
- [21] E. Stahl, T.G. Martin, F. Praetorius, H. Dietz, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 12735–12740.
- [22] Q. Jiang, C. Song, J. Nangreave, X. Liu, L. Lin, D. Qiu, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 13396–13403.

Poster

The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
September 26–28, 2019
Kyoto, Japan



Incidence of vasculogenic mimicry in human pancreatic ductal adenocarcinoma in Thai patients

Thaned Kangsamaksin¹, Nontawat Benjakul², Nattapa Prakobpol¹, Jisnusun Svasti^{1,3}, Komgrid Charnkaew²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

²Department of Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³Laboratory of Biochemistry, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand

INTRODUCTION

Pancreatic ductal carcinoma (PDAC) is among the most lethal human cancer and often found to be resistant to chemotherapy and anti-angiogenic-therapy likely due to its hypovascularized nature. Vasculogenic mimicry (VM) is the formation of a fluid-conducting vasculogenic-like network by tumor cells to provide oxygen and nutrition. It can be found in many types of cancer including pancreatic cancer. Notch signaling plays an important role in the endothelium during vascular development and crosstalks with VEGF signals. However, the role of Notch and VEGF signaling pathways in VM formation is still not understood.

OBJECTIVES

- To evaluate the incidence of VM in human pancreatic ductal adenocarcinoma

MATERIALS AND METHODS

Materials

PDAC lines

- PANC-1, MIA-PaCa-2

Melanoma cell line:

- B16-F10 as control for VM

Primary endothelial cells

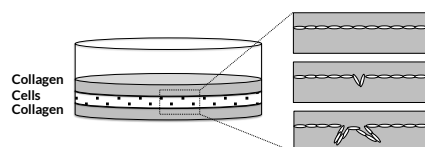
- Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

Human PDAC tissues:

- Tissue sections of 164 PDAC cases between 2008 and 2016 at Siriraj Hospital

Methods

Endothelial network formation:



Immunohistochemistry:

- H&E (VM assessment) and NOTCH1 (NOTCH1 expression and activity)

FUNDING

This work was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF) (Grant No. MRG6180090) and the Faculty of Science, Mahidol University.

COI Disclosure Information

Lead presenter/responsible researcher

Thaned Kangsamaksin

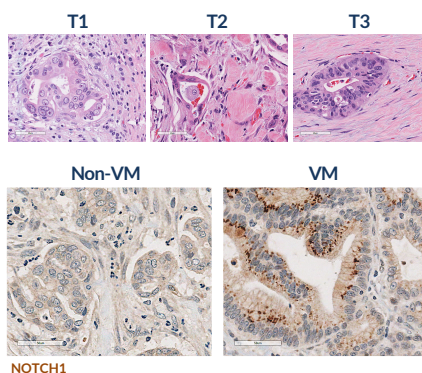
I have no financial relationships to disclose.

RESULTS

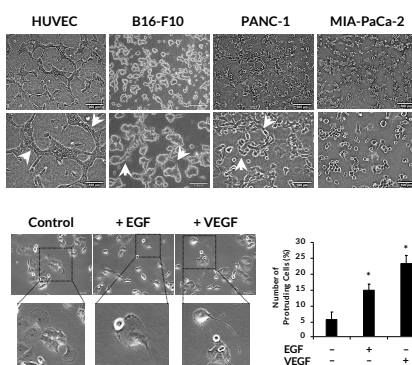
1. Association of VM frequency with clinicopathological features of human PDAC cases

Parameters	Total (%)	Tissue Samples		P Value
		VM (%)	Non VM (%)	
Tumor Size (cm)				
≤ 2 [T1]	15 (12.3)	7 (46.7)	8 (53.3)	0.021*
> 2 and ≤ 4 [T2]	82 (67.2)	66 (80.5)	16 (19.5)	
> 4 [T3]	25 (20.5)	18 (72.0)	7 (28.0)	
Histological Differentiation				
Well differentiated	8 (6.6)	4 (50.0)	4 (50.0)	0.085
Moderately differentiated	107 (87.7)	80 (74.8)	27 (25.2)	
Poorly differentiated	7 (5.7)	7 (100)	0 (0)	
AJCC Prognostic Stage				
1A	3 (2.5)	1 (33.3)	2 (66.7)	0.229
1B	36 (29.5)	27 (75.0)	9 (25.0)	
2A	9 (7.4)	5 (55.6)	4 (44.4)	
2B	43 (35.2)	35 (81.4)	8 (18.6)	
3	27 (22.1)	21 (77.8)	6 (22.2)	
4	4 (3.3)	2 (50.0)	2 (50.0)	
Intensity of NOTCH1 Expression				
Unstained	1 (0.8)	1 (100)	0 (0)	< 0.01*
Weak	27 (22.2)	5 (18.5)	22 (81.5)	
Moderate	93 (76.2)	84 (90.3)	9 (9.7)	
Strong	1 (0.8)	1 (100)	0 (0)	
Areas of NOTCH1 Expression				
Only Cytoplasm	26 (21.3)	5 (19.2)	21 (80.8)	< 0.01*
Cytoplasm > Nucleus	76 (62.3)	67 (88.2)	9 (11.8)	
Nucleus > Cytoplasm	20 (16.4)	19 (95.0)	1 (5.0)	
Only Nucleus	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

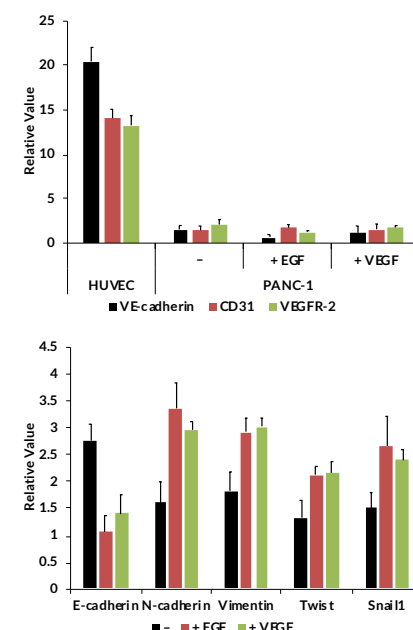
2. VM incidence was associated with tumor size and NOTCH1 expression



3. The pancreatic cancer cell line, PANC-1, forms network-like structures in vitro, and vessel-like morphology is induced by EGF and VEGF



4. PANC-1 did not exhibit endothelial marker expression, and EGF and VEGF induces expression of epithelial-mesenchymal transition genes



CONCLUSIONS

- VM in pancreatic cancer is significantly correlated to tumor size and NOTCH1 activity.
- VM morphology in PANC-1 is likely driven by EMT process and induced by VEGF.

สัญญาเลขที่ MRG6180090
โครงการ: การศึกษาการเลียนแบบหลอดเลือดในมะเร็งตับอ่อนชนิดต่อม
รายงานสรุปการเงินในรอบ 2 ปี

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน รองศาสตราจารย์ ดร.ธเนศ กังสุมครศิลป์
รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 2 พฤษภาคม 2561 ถึงวันที่ 1 พฤษภาคม 2563

รายจ่าย

หมวด (ตามสัญญา)	รายจ่ายสะสม จากรายงาน ครั้งก่อน	ค่าใช้จ่าย งวดปัจจุบัน	รวมรายจ่าย สะสมจนถึง งวดปัจจุบัน	งบประมาณ รวมทั้งโครงการ	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน.	234,000.00	—	234,000.00	312,000.00	78,000.00
2. ค่าจ้าง	—	—	—	—	—
3. ค่าวัสดุ	34,784.50	254,707.68	289,492.18	288,000.00	-1,492.18
4. ค่าใช้สอย	—	—	—	—	—
5. ค่าครุภัณฑ์	—	—	—	—	—
รวม	268,784.50	253,215.50	522,000.00	600,000.00	76,507.82

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ		
งวดที่ 1	200,000.00	บาท เมื่อ 25/6/2561
งวดที่ 2	100,000.00	บาท เมื่อ 25/6/2561
งวดที่ 3	221,976.00	บาท เมื่อ 30/4/2562
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 1	370.03	บาท เมื่อ 25/12/2561
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 2	475.23	บาท เมื่อ 25/6/2562
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 3	670.92	บาท เมื่อ 25/12/2562
รวม	523,492.18	บาท ①

ค่าใช้จ่าย

งวดที่ 1	เป็นเงิน	156,000.00	บาท
งวดที่ 2	เป็นเงิน	3,531.00	บาท
งวดที่ 3	เป็นเงิน	1,090.00	บาท
งวดที่ 4	เป็นเงิน	2,675.00	บาท
งวดที่ 5	เป็นเงิน	1,337.50	บาท
งวดที่ 6	เป็นเงิน	1,123.50	บาท
งวดที่ 7	เป็นเงิน	78,000.00	บาท
งวดที่ 8	เป็นเงิน	1,337.50	บาท
งวดที่ 9	เป็นเงิน	2,461.00	บาท
งวดที่ 10	เป็นเงิน	3,531.00	บาท
งวดที่ 11	เป็นเงิน	15,998.00	บาท

งวดที่ 12	เป็นเงิน	1,700.00	บาท
งวดที่ 13	เป็นเงิน	108,156.00	บาท
งวดที่ 14	เป็นเงิน	50,000.00	บาท
งวดที่ 15	เป็นเงิน	45,000.00	บาท
งวดที่ 16	เป็นเงิน	51,551.68	บาท
		รวม	523,492.18 บาท ②
จำนวนเงินคงเหลือ ① - ②		0.....	บาท

.....
รองศาสตราจารย์ ดร.ชนศ กังสมศรีศิลป์
หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

.....
นางสาวอรชุนิภา แก้วไชซ่า
เจ้าหน้าที่การเงิน

รายงานสรุปการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สัญญาเลขที่ MRG6180090 ชื่อโครงการ การศึกษาการเลียนแบบหลอดเลือดในมะเร็งตับอ่อนชนิดต่อม
หัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.ธเนศ กังสมศรีศิลป์ หน่วยงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-201-5600 โทรสาร 02-354-7174 อีเมลล์ thaned.kan@mahidol.edu
สถานะผลงาน ☒ ปกปิด ☐ ไม่ปกปิด

ความสำคัญ / ความจำเป็น

โรคมะเร็งตับอ่อนเป็นหนึ่งในมะเร็งที่อันตรายถึงตายมากที่สุด โดยมีอัตราการรอดตายเฉลี่ย 5 ปีน้อยกว่า 5% มะเร็งตับอ่อนชนิดต่อมพบบ่อยที่สุดคือประมาณ 85% ของผู้ป่วยทั้งหมด ผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนส่วนใหญ่มักได้รับการวินิจฉัยในระยะลุกลามซึ่งทำให้การผ่าตัดรักษาไม่สามารถทำได้ นอกจากนี้มะเร็งตับอ่อนมีความไวต่อยาเคมีบำบัดหลายชนิด และการรักษาแบบมาตรฐานในการดูแลปัจจุบันช่วยเพิ่มความอยู่รอดของผู้ป่วยโดยใช้เวลาเพียงไม่กี่สัปดาห์

หนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่สุดและลักษณะเด่นของการพัฒนา และความก้าวหน้าของโรคมะเร็งคือการสร้างหลอดเลือดใหม่ ดังนั้นการดัดแปลงพันธุกรรมและการก่อตัวของหลอดเลือดของกระบวนการนี้จึงได้รับการตรวจสอบอย่างกว้างขวางและข้อมูลจากการศึกษาหลายสายได้นำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งจำนวนมากที่มีเป้าหมายในการสร้างหลอดเลือดใหม่ bevacizumab หนึ่งในตัวยับยั้ง angiogenesis ที่ได้รับการรับรองทางคลินิกได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะลุกลามปอดไตและมะเร็งรังไข่ โดยการปิดกั้นเส้นทางการเติบโตของหลอดเลือด endothelial (VEGF) อย่างไรก็ตามหลังจากการตอบสนองเริ่มต้นจากการรักษาโดยการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ เนื้อเยื่อมักจะเริ่มที่จะฟื้นคืนชีพและดำเนินการต่อความก้าวหน้าของโรค หลักฐานที่เพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งพัฒนาการตอบสนองแบบปรับตัวและทนต่อการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ มีกลไกที่เสนอหลายวิธีในการที่เนื้องอกสามารถหลบเลี่ยงการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่รวมถึงการควบคุมเส้นทางการส่งสัญญาณทางเลือก การป้องกันที่เพิ่มขึ้นของเนื้องอกในหลอดเลือดจากตัวยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ และ การเลียนแบบหลอดเลือด (vasculogenic mimicry; VM) เซลล์มะเร็งเพื่อแสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ และสร้างเมทริกซ์ (ECM) - เครือข่ายหลอดเลือดที่อุดมไปด้วย VM ถูกพบในมะเร็งชนิดอื่น

โรคมะเร็งตับอ่อนชนิดต่อมมีรายงานว่าไม่ไวต่อยา gemcitabine ที่ใช้ในการแพทย์และเนื้องอกปรากฏว่ามีการกระจายตัวต่ำและมีหลอดเลือดน้อย คุณสมบัติหลอดเลือดต่ำ เหล่านี้ยังถูกพบในรูปแบบของมะเร็งตับอ่อน, หนู KPC ซึ่งแสดงการกลายพันธุ์ภายนอกของ Kras และ p53 ในเซลล์ตับอ่อน เนื้องอกในตับอ่อนจากหนูเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าหลอดเลือดผิดปกติ นอกจากนี้การส่งยาไปยังมะเร็งตับอ่อนของ KPC นั้นไม่มีประสิทธิภาพอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่อยู่ติดกันหรือเนื้องอกที่ปลูกถ่ายอื่น ๆ ข้อมูลเหล่านี้ยืนยันว่าการสร้างหลอดเลือดใหม่อาจไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมการเติบโตของมะเร็งตับอ่อนและอาจมีกลไกทางเลือกอื่นสำหรับเซลล์มะเร็งตับอ่อนที่จะได้รับออกซิเจนและสารอาหารเพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายที่ไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้นในโครงการนี้เราเสนอเพื่อตรวจสอบการปรากฏตัวของ VM ในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนความสัมพันธ์กับระดับเนื้องอกและหน้าที่ของมันในเซลล์มะเร็งตับอ่อนในหลอดทดลอง

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาความสามารถของการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์เป็นโครงสร้างที่คล้ายการเลียนแบบหลอดเลือดของเซลล์มะเร็งตับอ่อนชนิดต่อม
2. ระบุถึงสัญญาณที่มีบทบาทสำคัญต่อการเลียนแบบหลอดเลือดในเซลล์ทดลอง
3. ศึกษาวิจัยการเลียนแบบหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับอ่อนชนิดต่อมและเปรียบเทียบระดับและลักษณะการเลียนแบบหลอดเลือดในมะเร็งตับอ่อนชนิดต่อมระยะและระดับต่าง ๆ

ผลการวิจัย (สั้น ๆ ที่บ่งชี้ประเด็นข้อค้นพบ กระบวนการ ผลผลิต และการเรียนรู้)

การศึกษาครั้งนี้ใช้เซลล์มะเร็งตับอ่อน PANC-1 และ MIA-PaCa-2 เป็นแบบจำลองสำหรับมะเร็งตับอ่อนชนิดต่อมและพบว่าเซลล์มะเร็งเหล่านี้สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างของให้คล้ายกับโครงสร้างเหมือนหลอดเลือดในการเจริญเติบโตและปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคในหลอดทดลอง PANC-1 แสดงความสามารถในการสร้างเครือข่ายเซลล์ได้ดีกว่า MIA-PaCa-2 ในการตอบสนองต่อการรักษา EGF และ VEGF โดยนัยว่าความสามารถในการขึ้นรูป VM อาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับลักษณะและความรุนแรงของเซลล์มะเร็งตับอ่อน ผลจากการศึกษาในหลอดทดลองยังสะท้อนให้เห็นในข้อมูลภูมิโนมฮิสโตเคมีจากตัวอย่างผู้ป่วย PDAC โครงสร้างคล้าย VM ซึ่งระบุโดยการปรากฏตัวของ PAS-positive โครงสร้างเหมือนเรือและการขาด CD31 ถูกพบในผู้ป่วย PDAC ในความสัมพันธ์กับขนาดของเนื้องอก ความสัมพันธ์ของ VM และความแตกต่างทางเนื้อเยื่อวิทยาไม่มีนัยสำคัญ ($p = 0.085$) อาจเป็นเพราะขนาดตัวอย่างเล็กและการกระจายกลุ่มที่ไม่สม่ำเสมอ ข้อมูลจากตัวอย่างทางคลินิกชี้ให้เห็นว่า VM อาจมีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของเนื้องอกและการแยกเซลล์ในเนื้องอกที่มีหลอดเลือดต่ำ กลไกที่เป็นไปได้ของกระบวนการ VM ในมะเร็งตับอ่อนคือ EMT ดังที่แสดงในหลอดทดลองและการส่ง

สัญญาณ Notch ในตัวอย่าง PDAC ผลลัพธ์ของเราเปิดคำถามการวิจัยเพื่อสำรวจเพิ่มเติมว่าเส้นทางการส่งสัญญาณเหล่านี้ในความเป็นจริงมีบทบาทในการสร้าง morphogenesis ของเซลล์มะเร็งตับอ่อนการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายและอาจแสดงถึงเป้าหมายระดับโมเลกุลสำหรับการรักษา PDAC ในอนาคต

คำสืบค้น (Keywords)

การเลียนแบบหลอดเลือดใหม่ การสร้างหลอดเลือดใหม่ มะเร็งตับอ่อนชนิดต่อม โรคมะเร็ง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (ดูคำจำกัดความ และตัวอย่างด้านหลังแบบฟอร์ม)

☐ ด้านนโยบาย โดยใคร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง).....
มีการนำไปใช้อย่างไร

☐ ด้านสาธารณะ โดยใคร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง)
มีการนำไปใช้อย่างไร

☐ ด้านชุมชนและพื้นที่ โดยใคร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง)
มีการนำไปใช้อย่างไร

☐ ด้านพาณิชย์ โดยใคร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง)
มีการนำไปใช้อย่างไร

☐ ด้านวิชาการ โดยใคร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง)
มีการนำไปใช้อย่างไร (กรุณาให้ข้อมูลเจาะจง)

☒ ยังไม่มีการนำไปใช้ (โปรดกรอกในกรอบถัดไป)

(กรณีที่ยังไม่มีการใช้ประโยชน์) ผลงานวิจัยมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์

☐ ด้านนโยบาย ☐ ด้านสาธารณะ ☐ ด้านชุมชนและพื้นที่ ☐ ด้านพาณิชย์ ☒ ด้านวิชาการ
ข้อเสนอแนะเพื่อให้ผลงานถูกนำไปใช้ประโยชน์

การเผยแพร่/ประชาสัมพันธ์ (กรุณาให้รายละเอียด พร้อมแนบหลักฐาน)

1. สิ่งพิมพ์ หรือสื่อทั่วไป

☐ หนังสือพิมพ์ ☐ วารสาร ☐ โทรทัศน์ ☐ วิทยุ ☐ เว็บไซต์ ☐ คู่มือ/แผ่นพับ ☐ จัดประชุม/อบรม ☐ อื่น ๆ

2. สิ่งพิมพ์ทางวิชาการ (วารสาร, การประชุม ให้ระบุรายละเอียดแบบการเขียนเอกสารอ้างอิง เพื่อการค้นหาซึ่งควรประกอบด้วย
ชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง แหล่งพิมพ์ ปี พ.ศ. (ค.ศ.) ฉบับที่ หน้า)

International publications

- Chaithongyot S, Duangrat R, Wootthichairangsan C, Hanchaina R, Udomprasert A*, **Kangsamaksin T***. Selective delivery of doxorubicin using the biomarker-specific, aptamer-functionalized DNA nanosphere. *Mater Lett*. 260:126952. doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126952.
- Benjakul N, Prakobpol N, Svasti J, Charnkaew K, **Kangsamaksin T***. Incidence of vasculogenic mimicry in human pancreatic ductal adenocarcinoma in Thai patients. *Manuscript in preparation*.

International conference

- **Kangsamaksin T***, Benjakul N, Prakobphol N, Svasti J, Charngkaew K. Incidence of vasculogenic mimicry in human pancreatic ductal adenocarcinoma in Thai patients. The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. September 26–28, 2019. Kyoto, Japan. (Poster presentation)

คำอธิบายและตัวอย่างการนำไปใช้ประโยชน์ในแต่ละด้าน

1. การใช้ประโยชน์ด้านนโยบาย

คำจำกัดความ : การนำความรู้จากงานวิจัยไปใช้ในกระบวนการกำหนดนโยบาย ซึ่งนโยบายหมายถึง หลักการแนวทาง กลยุทธ์ ในการดำเนินงานเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ อาจเป็นนโยบายระดับประเทศ ระดับภูมิภาค ระดับจังหวัด ระดับท้องถิ่น หรือระดับหน่วยงาน นโยบายที่ดีจะต้องประกอบด้วย วัตถุประสงค์ แนวทาง และกลไกในการดำเนินงานที่ชัดเจน สอดคล้องกับปัญหาและความต้องการ การใช้ประโยชน์ด้านนโยบายจะรวมทั้งการนำองค์ความรู้ไปสังเคราะห์เป็นนโยบายหรือทางเลือกเชิงนโยบาย (policy options) แล้วนำนโยบายนั้นไปสู่ผู้ใช้ประโยชน์

2. การใช้ประโยชน์ด้านสาธารณะ

คำจำกัดความ : การดำเนินงานเพื่อนำผลงานวิจัยและนวัตกรรม ไปใช้ในวงกว้างเพื่อประโยชน์ของสังคม และประชาชนทั่วไป ให้มีความรู้ความเข้าใจ เกิดความตระหนัก รู้เท่าทันการเปลี่ยนแปลง ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนวิธีคิด พฤติกรรม เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของประชาชน สร้างสังคมคุณภาพ และส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม

3. การใช้ประโยชน์ด้านพาณิชย์

คำจำกัดความ : การนำนวัตกรรม เทคโนโลยี ผลิตภัณฑ์ใหม่ พันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ ไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ การสร้างมูลค่าเพิ่มของผลิตภัณฑ์ การแปรรูป การสร้างตราสินค้า การเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิต และการลดต้นทุนการผลิต การสร้างอาชีพ และทางเลือกให้กับผู้ประกอบการ เกษตรกรหรือผู้ประกอบการอาชีพอื่น ๆ

4. การใช้ประโยชน์ด้านชุมชนและพื้นที่

คำจำกัดความ : การนำกระบวนการ วิธีการ องค์ความรู้ การเปลี่ยนแปลง การเสริมพลัง อันเป็นผลกระทบที่เกิดจากการวิจัยและพัฒนาชุมชน ท้องถิ่น พื้นที่ ไปใช้ให้เกิดประโยชน์การขยายผลต่อชุมชน ท้องถิ่นและสังคมอื่น

5. การใช้ประโยชน์ด้านวิชาการ

คำจำกัดความ : การนำองค์ความรู้จากผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ระดับชาติ หนังสือ ตำรา บทเรียน ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้ การเรียนการสอน ในวงนันทนาการและผู้นำด้านวิชาการ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอด หรือการนำไปสู่ product และ process ไปใช้ในการเสริมสร้างนวัตกรรม และเทคโนโลยี