



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจหา Single nucleotide polymorphism (SNP) ของยีน folylpolyglutamate synthetase (FPGS) และผลของ SNP ของยีน FPGS ต่อประสิทธิภาพของยา methotrexate ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวलिपोblasชนิดเฉียบพลัน

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค

มกราคม 2554

สัญญาเลขที่ RMU 5180024

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจหา Single nucleotide polymorphism (SNP) ของยีน folylpolyglutamate synthetase (FPGS) และผลของ SNP ของยีน FPGS ต่อประสิทธิภาพของยา methotrexate ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวलिपोblasชนิดเฉียบพลัน

รองศาสตราจารย์ ดร. นุชบา ฤกษ์อำนวยโชค
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือและได้รับการสนับสนุนจากหลายฝ่าย คณะผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่งและขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

Professor Gail E. Tomlinson และ Assistant Professor Joke Beuten, Greehey Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas USA ในความร่วมมือในงานวิจัย ตลอดจนเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในงานวิจัย

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สามารถ ภคกษมา จากภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี สำหรับตัวอย่างเลือด DNA และไขกระดูก

นางสาวดวงใจ ผิวคำ และเจ้าหน้าที่หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้การสนับสนุนเงินทุน “ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา” เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

Abstract

Project Code: RMU 5180024

Project Title: Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of human folypolyglutamate synthetase (FPGS) gene and effect of FPGS SNPs on methotrexate efficacy in acute lymphoblastic leukemia

Investigator : Associate Professor Dr. Budsaba RERKAMNUAYCHOKE

E-mail address : rabrk@mahidol.ac.th

Project Period: 15 May 2008 - 14 May 2010

Folypolyglutamate synthetase (FPGS), an important enzyme in the folate metabolic pathway, plays a central role in intracellular accumulation of folate and antifolate in the cell. Loss of FPGS activity results in decreased cellular levels of antifolates and consequent drug resistance in leukemia. We performed a mutation analysis of the coding regions of the FPGS gene and investigated the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) within FPGS in a case-control sample of Thai children. Seven SNPs were indentified from mutation analysis, 3 of which, IVS13+55C>T, g.1297T>G and g.1508C>T were novel SNPs not previously reported. Association analysis of 6 SNPs covering FPGS showed a significant increase in ALL risk for SNPs rs7039798 ($p= 0.014$, OR=2.14), rs1544105 ($p=0.010$, OR= 2.24) and rs10106 ($p=0.026$, OR= 1.99) in our samples. In conclusion, our finding suggested that common genetic variants within FPGS were significantly associated with ALL risk in Thai children.

Keywords: folypolyglutamate synthetase (FPGS), association study, acute lymphoblastic leukemia, single nucleotide polymorphism, folate metabolizing gene

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU 5180024

ชื่อโครงการ : การตรวจหา Single nucleotide polymorphism (SNP) ของยีน folypolyglutamate synthetase (FPGS) และผลของ SNP ของยีน FPGS ต่อประสิทธิภาพของยา methotrexate ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวलिपोblastชนิดเฉียบพลัน

ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: rabrk@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 พฤษภาคม 2551 ถึง 14 พฤษภาคม 2553

Folypolyglutamate synthetase (FPGS) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในขบวนการโฟเลตเมตาโบลิซึม ทำหน้าที่หลักในการเติมหมู่ glutamic acid ให้แก่ folate หรือยาในกลุ่ม anti-folate ทำให้สารเหล่านี้อยู่ในเซลล์ได้นานและทำหน้าที่ได้ดีขึ้น ซึ่งเซลล์ leukemia ที่มีการดื้อยาพบว่าในเซลล์มี activity ของเอนไซม์ FPGS ลดลง จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษา mutation analysis ในส่วนของ coding region ของยีน FPGS และยังได้ศึกษา association study ระหว่าง single nucleotide polymorphism ของยีน FPGS และความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันในตัวอย่างคนไทย ผลการศึกษาในขั้นตอนการตรวจหาตำแหน่ง SNP ของยีน FPGS พบว่ามี SNP 7 ตำแหน่ง โดยมี SNP จำนวน 3 ตำแหน่ง เป็น SNP ใหม่ไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อน ได้แก่ SNP ตำแหน่ง IVS13+55C>T, g.1297T>G และ g.1508C>T นอกจากนี้จากการศึกษา association study ของ SNP 6 ตำแหน่ง ที่ครอบคลุม FPGS ทั้งยีน พบว่า SNP 3 ตำแหน่ง มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน ได้แก่ SNPs rs7039798 ($p=0.014$, $OR=2.14$), rs1544105 ($p=0.010$, $OR=2.24$) และ rs10106 ($p=0.026$, $OR=1.99$) จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า common genetic variant ของยีน FPGS มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันในตัวอย่างประชากรไทย

คำหลัก : folylpolyglutamate synthetase (FPGS), association study, มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน,
single nucleotide polymorphism, folate metabolizing gene

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ชื่อโครงการ : การตรวจหา Single nucleotide polymorphism (SNP) ของยีน folylpolyglutamate synthetase (FPGS) และผลของ SNP ของยีน FPGS ต่อประสิทธิภาพของยา methotrexate ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวलिपोblasชนิดเฉียบพลัน

ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: rabrkr@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 พฤษภาคม 2551 ถึง 14 พฤษภาคม 2553

1. ได้เสนอโครงการนี้ หรือโครงการที่มีส่วนเหมือนกับเรื่องนี้บางส่วน เพื่อขอทุนต่อแหล่งทุนอื่นที่ใดบ้าง
- ☐ ไม่ได้เสนอต่อแหล่งทุนอื่น

☒ เสนอต่อ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

โดย นางสาวดวงใจ ผิวคำ นักศึกษาปริญญาเอก ที่ช่วยทำวิจัยในโครงการนี้ ได้สมัครทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา เพื่อไปเรียนรู้เทคนิคใหม่เพิ่มเติม และทำการวิจัยในส่วนที่ต้องใช้เทคโนโลยีใหม่ ที่ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ที่โรงพยาบาลรามาธิบดีไม่มี โดยไปที่ Department of Pediatrics, University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas, USA และอยู่ในความดูแลของ Professor Dr. Gail E. Tomlinson เป็นเวลา 10 เดือน ระหว่างเดือนกันยายน 2551 - เดือนกรกฎาคม 2552

2. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

ในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือ เอเชีย ยุโรปตะวันออก และออสเตรเลีย มีอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็ง ในเด็กอายุระหว่าง 0 ถึง 14 ปี เป็น 1 ใน 7,000 สำหรับประเทศไทยเท่ากับ 74.5 คน ต่อเด็กหนึ่งล้านคน โรคมะเร็งในเด็กที่พบบ่อยที่สุดคือ มะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาซชนิดเฉียบพลัน (Acute lymphoblastic leukemia, ALL) จากสถิติของประเทศไทยพบ ALL ประมาณร้อยละ 40 ของมะเร็งในเด็กทั้งหมด และในช่วง 40 ปีที่ผ่านมาอัตราการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL ให้หายขาดมีสูงถึงร้อยละ 80 ดังนั้นจะมีผู้ป่วย ALL อีกประมาณร้อยละ 20 ที่รักษาไม่หายขาด และมีการกลับมาเป็นโรซ้ำอีก ทั้งที่แพทย์ได้มีการปรับเปลี่ยนสูตรยาที่ใช้รักษาให้ดีขึ้นแล้วก็ตาม สาเหตุหนึ่งที่ทำให้การรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ไม่ได้ผลอาจเนื่องจากมี polymorphism ของยีนที่แปลรหัสเป็น drug-metabolizing enzyme, drug transporter หรือ drug target ของยาชนิดต่างๆ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีความสนใจยีน Folylpolyglutamate synthetase (FPGS) ซึ่งเป็นรหัสของการสร้างเอนไซม์ FPGS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ folate metabolism โดยจะเติมหมู่กลูตาเมต (glutamate) ให้แก่ folate และยาในกลุ่ม antifolate เช่น methotrexate (MTX) ให้เป็น folate polyglutamate หรือ methotrexate polyglutamate (MTXPG) ซึ่งจะช่วยให้สารเหล่านี้สามารถอยู่ในเซลล์ได้นานขึ้น และทำหน้าที่ได้ดีขึ้น โดย MTXPG จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR) ทำให้เซลล์เกิด cytotoxicity ซึ่งถ้ายีน FPGS เกิด polymorphism ก็อาจจะทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนหรือเอนไซม์มีความผิดปกติ อาจมีผลทำให้หน้าที่ของเอนไซม์เสียไปทำให้การรักษาโดยใช้ยา MTX หรือยาในกลุ่ม antifolate อื่นๆไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร

ปัจจุบันยา MTX เป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วย ALL ดังนั้นถ้าทราบถึงตำแหน่งของการเกิด polymorphism เช่น SNP ตำแหน่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ FPGS ซึ่งอาจมีผลต่อการรักษาผู้ป่วยด้วยยา MTX ก็จะทำให้แพทย์ใช้ยาอื่นในการรักษาผู้ป่วยเพื่อจะได้ผลที่ดีที่สุด

3. วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาตำแหน่งของ single nucleotide polymorphism (SNP) ของยีน Folylpolyglutamate synthetase (FPGS) ที่อาจจะมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ FPGS ในตัวอย่างประชากรไทย
2. เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ SNP ของยีน FPGS กับความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันในตัวอย่างประชากรไทย

3. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของสาเหตุหรือหน้าที่ของ SNP ของยีน FPGS ในตำแหน่งที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว

4. ระเบียบวิธีวิจัย

ขั้นตอนและวิธีการ

●เสนอโครงการวิจัยเพื่อขออนุมัติการทดลองในมนุษย์ โดยยื่นต่อคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี และได้รับเอกสารรับรองโครงการฯ เลขที่ ID 09-48-40 แล้ว

●การตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ มี 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. ขั้นตอนการตรวจคัดกรองหาตำแหน่ง SNP ของยีน FPGS

1.1 DNA extraction

1.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA (polymerase chain reaction, PCR)

1.3 ขั้นตอนการตรวจคัดกรองหา polymorphism โดยวิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

1.4 DNA sequencing โดยใช้เครื่อง ABI Prism 3130 Genetic Analyzer

2. ขั้นตอนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของยีน FPGS และความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (case-control association study)

2.1 ตัวอย่าง DNA จากผู้ป่วย ALL จำนวน 95 ราย และจากคนปกติ จำนวน 98 ราย

2.2 การคัดเลือก SNP ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ ได้จากการตรวจคัดกรองในขั้นตอนที่ 1 (ได้ SNP rs10106, SNP g.732C>T และ SNP IVS13+55C>T) และจากฐานข้อมูล (ได้ SNP rs7039798, rs7033913 และ rs1544105)

2.3 Genotyping โดยใช้วิธี Golden Gate Assay of the VeraCode technology, TaqMan® allelic discrimination assay และ PCR-RFLP

2.4 Statistical analysis เพื่อศึกษาความถี่ของ allele (allele frequency) ระหว่าง case และ control โดยใช้ Chi-square test (χ^2) คำนวณด้วยโปรแกรม Haploview ในการหาค่า odds ratio (OR) และ 95% confidence interval (CI) คำนวณโดยใช้ logistic regression ด้วย R statistical software

3. ขั้นตอนการศึกษาความเป็นไปได้ของสาเหตุหรือหน้าที่ของ SNP rs10106

3.1 ตัวอย่าง RNA จากผู้ป่วย ALL จำนวน 65 ราย

3.2 RNA reverse transcription และ genotyping ของ SNP rs10106 ของยีน FPGS
เปลี่ยน RNA เป็น cDNA และทำ genotyping โดยวิธี DNA sequencing

3.3 mRNA expression study

วัดระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน FPGS ซึ่งมี genotype ของ
SNP rs10106 ที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธี Taqman Real-Time qRT-PCR

3.4 Statistic analysis เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ FPGS/GAPDH mRNA
expression ของ SNP rs10106 แต่ละ genotype โดย Mann-Whitney Test โดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0

●สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า polymorphism ของยีน FPGS มีความสัมพันธ์กับความ
เสี่ยงในการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันในประเทศไทย ซึ่งเป็นรายงานฉบับ
แรกที่มีการรายงานถึงเรื่องนี้ ดังนั้นผลการวิจัยครั้งนี้อาจนำมาประยุกต์และพัฒนวิธีการ
ตรวจหาความเสี่ยงต่อการเกิด ALL ของแต่ละบุคคลได้ หรือสามารถอธิบายกลไกการเกิด
มะเร็งเม็ดเลือดขาวในระดับประชากรได้

ข้อจำกัดของการศึกษานี้คือ มีจำนวนตัวอย่างไม่มาก ถ้าเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้
มากขึ้นจะทำให้ผลการทดลองถูกต้องมากยิ่งขึ้น

5. ความเชื่อมโยงกับต่างประเทศ

มีการสร้าง connection กับ Professor Dr. Gail E. Tomlinson สังกัด Greehey
Children's Cancer Research Institute, the University of Texas Health Science Center at San
Antonio, USA

รหัสโครงการ : RMU 5180024

ชื่อโครงการ : การตรวจหา Single nucleotide polymorphism (SNP) ของยีน folylpolyglutamate synthetase (FPGS) และผลของ SNP ของยีน FPGS ต่อประสิทธิภาพของยา methotrexate ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสชนิดเฉียบพลัน

ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: rabrak@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 พฤษภาคม 2551 ถึง 14 พฤษภาคม 2553

บทนำ

ในประเทศแถบทวีปอเมริกาเหนือ เอเชีย ยุโรปตะวันออก และออสเตรเลีย มีอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็ง ในเด็กอายุระหว่าง 0 ถึง 14 ปี เป็น 1 ใน 7,000 (1) สำหรับประเทศไทย เท่ากับ 74.5 คน ต่อเด็กหนึ่งล้านคน (2) โดยโรคมะเร็งในเด็กที่พบได้บ่อยที่สุดคือ มะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสชนิดเฉียบพลัน (Acute lymphoblastic leukemia, ALL) ในประเทศไทยพบประมาณร้อยละ 40 ของมะเร็งในเด็กทั้งหมด (2) มะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟบลาสติกชนิดเฉียบพลันชนิด หรือ ALL เป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยในเด็กซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคนี้อย่างไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรมและการสัมผัสสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษต่อยีน โดยเฉพาะในช่วงที่ร่างกายเจริญเติบโต อาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคนี้ นอกจากนี้ polymorphism ของยีนที่เกี่ยวข้องในขบวนการ folate metabolism อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ เนื่องจากขบวนการ folate metabolism มีความสำคัญในขบวนการสร้าง purine และ pyrimidine ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้าง RNA และ DNA (3) ซึ่งถ้าภายในเซลล์มีความเข้มข้นของโฟเลตต่ำ อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดมะเร็งได้ โดยผ่านขบวนการสร้าง DNA ไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดการแตกหักของสาย DNA หรือเกิด chromosome damage (3) มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ของยีนใน

กระบวนการ folate metabolism กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน เช่น ในยีน methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) มี SNP 2 ตำแหน่ง คือ MTHFR 677C>T (rs1801133) และ MTHFR 1298A>C (rs1801131) มีความสัมพันธ์กับการป้องกันการเกิด ALL ในเด็ก (4) นอกจากนั้น แล้ว polymorphism ของยีน serine hydroxymethyl transferase (SHMT1 1420 allele) (5) และ ยีน thymidylate synthase gene (TS 3R variant) มีความเสี่ยงต่อการเกิด ALL (3, 5)

Folypolyglutamate synthetase (FPGS) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่หลักในกระบวนการ folate metabolism โดยจะเติมหมู่กลูตาเมต (glutamate) ให้แก่ folate และยาในกลุ่ม antifolate เช่น Methotrexate (MTX) ให้เป็น folate polyglutamate หรือ methotrexate polyglutamate (MTXPG) ซึ่งจะช่วยให้สารเหล่านี้สามารถที่จะอยู่ในเซลล์ได้นานขึ้นและทำหน้าที่ได้ดีขึ้น (6) FPGS gene อยู่บนโครโมโซม 9q 34.1 มีขนาด 11.2 kb ประกอบด้วย 15 exons 14 introns (7, 8) เอนไซม์ FPGS พบได้ในเนื้อเยื่อปกติหลายชนิด รวมไปถึง ไชกระดูก ตับ ตับ และพบได้ในปริมาณสูงในเซลล์มะเร็ง (9, 10) เซลล์ที่มี FPGS activity เพิ่มขึ้นก็จะทำให้เซลล์นั้นมีความไวต่อยาในกลุ่ม antifolate เพิ่มขึ้นเช่นกัน ในขณะที่ถ้าเซลล์มี FPGS activity ลดลง ก็จะทำให้เซลล์นั้นดื้อต่อยาในกลุ่ม antifolate (7) อย่างไรก็ตาม การที่เซลล์มี FPGS activity ที่ลดลงก็ไม่ได้สัมพันธ์กับปริมาณ mRNA ที่ลดลงเสมอไป มีรายงานเกี่ยวกับ polymorphism ของ ยีน FPGS Ex15-263T>C (rs10106) พบว่า มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของการเกิด non-Hodgkin lymphoma (11,12) อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ของยีน FPGS ต่อการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาตำแหน่งของ single nucleotide polymorphism (SNP) ของยีน Folypolyglutamate synthetase (FPGS) ที่อาจจะมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ FPGS ในตัวอย่างประชากรไทย
2. เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ SNP ของยีน FPGS กับความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันในตัวอย่างประชากรไทย
3. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของสาเหตุหรือหน้าที่ของ SNP ของยีน FPGS ในตำแหน่งที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว

วิธีทดลอง

1. ขั้นตอนการตรวจคัดกรองหาตำแหน่ง SNP ของยีน FPGS

1.1 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง DNA จากผู้ป่วย ALL จำนวน 39 ราย และคนปกติ จำนวน 33 ราย

1.2 วิธีทดลอง

1.2.1 DNA extraction

สกัดตัวอย่างเลือดหรือไขกระดูกของผู้ป่วยหรือคนปกติด้วย QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) โดยทำตาม manufacturer's protocol

1.2.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA (polymerase chain reaction, PCR)

- ผู้ทำวิจัยได้ทำการออกแบบ primer จำนวน 13 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ให้ครอบคลุมยีน FPGS ทั้งหมดซึ่งรวมถึง intron/exon boundaries, 5'untranslated (5'-UTR) และ 3'-UTR regions โดยใช้ลำดับเบสอ้างอิงจาก Genbank NC_000009.11
- เพิ่มปริมาณ DNA ปริมาณรวมต่อปฏิกิริยา 1 หลอดเท่ากับ 25 μ l ประกอบด้วย genomic DNA เข้มข้น 0.5-1 μ g, primer แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 0.4 pmol of, dNTPs แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 200 pmol และเอนไซม์ AmpliTaq gold polymerase ความเข้มข้น 1 unit
- ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ 2% agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide

1.2.3 ขั้นตอนการตรวจคัดกรองหา polymorphism โดยวิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

ตรวจคัดกรองหา mutation โดยใช้วิธี SSCP มีดังนี้ ผสม PCR product 1 μ l และ SSCP gel loading dye 2 μ l นำไป heat ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 3 นาทีแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที แล้วจึง load ลงใน 12 % polyacrylamide gel (19 acrylamide: 1 bisacrylamide) run โดยใช้ความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลานาน 2 ถึง 4 ชั่วโมง แล้วย้อม polyacrylamide gel ด้วย silver stain solution

1.2.4 DNA sequencing

การทำ DNA sequencing ใช้น้ำยาของ ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit โดยทำตามขั้นตอนของ manufacturer's protocol และอ่านผลโดยใช้เครื่อง ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบส ความยาวของ PCR product และ annealing temperature ที่ใช้ในขั้นตอนการทำ PCR ของ primer แต่ละคู่

Primer	Length (bp)	Annealing Temperature (°C)
Ex1-F 5'-CTGATACCTGGTACTCCATGCTC-3'	564	63
Ex1-R 5'-GCTGTTTAGAGGTGTCCACCA-3'		
Ex2-F 5'-GAGCCTTAACCTACTATCTGG-3'	219	57
Ex2-R 5'-CTACGGGAATCACAAATGGG-3'		
Ex3-4-F 5'-CCCATTGTGATTCCCGT-3'	285	59
Ex3-4-R 5'-ACACAGACACCACATCCC-3'		
Ex5-F 5'-GGGAAGGGAGTCCTGATGAC-3'	211	59
Ex5-R 5'-GTGCTGGAACACGTAGCAC-3'		
Ex6-F 5'-CTGACATGTCCCTGTGCCA-3'	134	59
Ex6-R 5'-CCTCAGATGCAGGGTTCTAGG-3'		
Ex7-8-F 5'-CTCTGGGCACCCTCATATCC-3'	368	57
Ex7-8-R 5'-AAACGTAGACTCCCAGGC-3'		
Ex9-F 5'-CCAGAGATAGGAGTGTGGAGGA-3'	189	59
Ex9-R 5'-CAGGAGGGACACAAACCCA-3'		
Ex10-11-F 5'-AGAGATGCAAGGGCTGAC-3'	420	58
Ex10-11-R 5'-TGGGCAGGAAGGTCTAACTC-3'		
Ex12-F 5'-GTTGCCTGAAAGATTCCACCAG-3'	579	65
Ex12-R 5'-TGAAGAGCAAGACTCGAACC-3'		
Ex13-F 5'-CCTTTGACCCAGCTCCTCAC-3'	231	62
Ex13-R 5'-GGCACCTTGTACATCTAATCC-3'		
Ex14-F 5'-GGAAGTTGGTGACATCCTTTG-3'	142	61
Ex14-R 5'-TGCCTGTCACCTCTCAACC-3'		
Ex15.1F 5'-TGTCCCTTACTCCCTCTCCC-3'	467	60
Ex15.1R 5'-CCTTGGCTACTGGGACAGTG-3'		
Ex15.2F 5'-TGGTGTCTGAAGCTGCTG-3'	478	63
Ex15.2R 5'-GCTTTAATTCACTCCAGCCACC-3'		

2. ขั้นตอนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของยีน FPGS และความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (case-control association study)

2.1.1 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง DNA จากผู้ป่วย ALL จำนวน 95 ราย และคนปกติ จำนวน 98 ราย
จากภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

2.1.2 SNP selection

SNP ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มาจาก 2 แหล่ง ดังนี้

1. จากการตรวจคัดกรองหา SNP โดยเลือก SNP ที่มี minor allele frequency ≥ 0.05 ซึ่ง SNP ที่ได้จากขั้นตอนนี้คือ SNP rs10106, SNP g.732C>T และ SNP IVS13+55C>T

2. จาก dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) and SNPper (<http://snpper.chip.org/>) และใช้โปรแกรม Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) ในการหา Tag SNP ซึ่ง SNP ที่ได้จากขั้นตอนนี้คือ SNP rs7039798, rs7033913 และ rs1544105

2.1.3 Genotyping

ในขั้นตอนการทำ genotyping มีหลายวิธี ดังนี้

1. The Golden Gate Assay of the VeraCode technology โดยใช้ BeadXpress reader System (Illumina, San Diego, CA) สำหรับ SNP rs7039798, rs7033913, rs1544105

และ rs10106 โดยทำตาม manufacturer's protocol

2. TaqMan® allelic discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, USA) สำหรับ SNP g.732C>T โดยทำตาม manufacturer's protocol

3. PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยใช้เอนไซม์ restriction endonuclease *Acil* (New England BioLabs, Beverly, MA) สำหรับ SNP IVS13+55C>T โดยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR หลังจากนั้นตัด DNA โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะคือ *Acil* แล้ว run electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel และดูผล

ด้วยการย้อม ethidium bromide

2.1.4 Statistical analysis

ความถี่ของ allele (allele frequency) ระหว่าง case และ control ใช้ Chi-square test

(χ^2) โดยใช้โปรแกรม Haploview ในการคำนวณ ค่า odds ratio (OR) และ 95% confidence interval (CI) คำนวณโดยใช้ logistic regression โดยใช้ R statistical software

3. ขั้นตอนการศึกษาถึงความเป็นไปได้ถึงสาเหตุหรือหน้าที่ของ SNP rs10106

3.1 RNA sample

ตัวอย่าง RNA จากผู้ป่วย ALL จำนวน 65 ราย จากภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

3.2 RNA reverse transcription และ genotyping ของ SNP rs10106 ของยีน FPGS

ใช้ SuperScript™ II Reverse Transcriptase ในการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยทำตาม manufacturer's protocol ส่วนการทำ genotyping ใช้วิธี DNA sequencing วิธีทำดังข้อที่ 1.2.4

3.3 mRNA expression study

การวัดระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน FPGS ซึ่งมี genotype ของ SNP rs10106 ที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธี Taqman Real-Time qRT-PCR วิธีทำดังอธิบายในการศึกษาของ Guy J. Leclerc และคณะ (13) โดยมี GAPDH เป็น endogenous control และอ่านผลโดยใช้เครื่อง ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA)

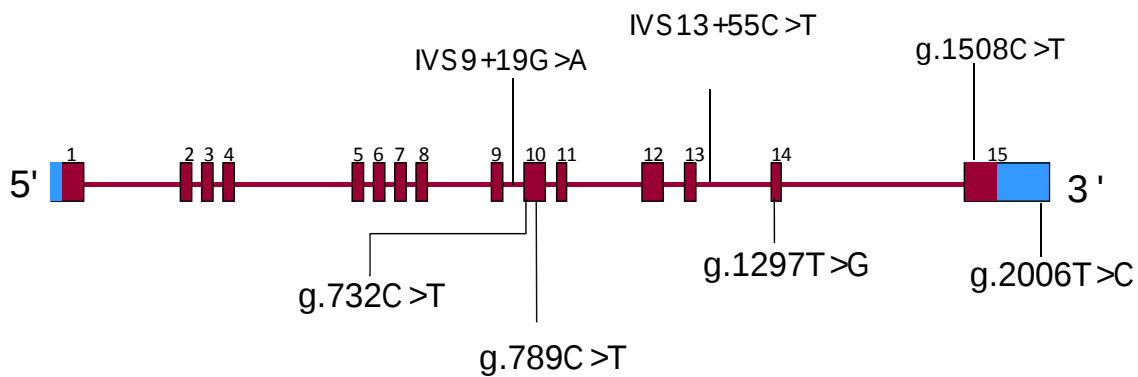
3.4 statistic analysis

เปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยของ FPGS/GAPDH mRNA expression ของ SNP rs10106 แต่ละ genotype โดย Mann-Whitney Test โดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0

ผลการทดลอง

1. ขั้นตอนการตรวจหาตำแหน่ง SNP ของยีน FPGS

- จากการตรวจหา SNP ของยีน FPGS ครอบคลุมทั้ง 15 exon, intron/exon boundaries, 5'UTR และ 3'UTR ในตัวอย่าง DNA ของผู้ป่วย ALL และคนปกติ พบ SNP 7 ตำแหน่ง (ดังแสดงในรูปที่ 1)
- จาก SNP ทั้ง 7 ตำแหน่ง พบว่า มี SNP อยู่ 3 ตำแหน่ง เป็น SNP ที่พบใหม่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน ได้แก่
 - SNP IVS13+55C>T
 - SNP g.1297T>G และ
 - SNP g.1508C>T
- ตำแหน่งและความถี่ของ SNP ทั้ง 7 ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ แสดงในตารางที่ 2
 - มี SNP 5 ตำแหน่ง อยู่ในตำแหน่ง coding region ได้แก่
 - exon 10 (g.732C>T และ g.789C>T)
 - exon 14 (g.1297T>G)
 - exon 15 (g.1508C>T และ g.2006C>T)
 - มี SNP 2 ตำแหน่ง อยู่ในส่วนของ intron boundaries ได้แก่
 - IVS9+19G>A
 - IVS13+55C>T
- โดย SNP 2 ตำแหน่ง ที่พบใน coding region มีผลต่อการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน คือ
 - SNP ที่พบใน exon 14 (g.1297T>G) ซึ่งมีผลทำให้ Phenylalanine เป็น Valine และ
 - SNP ที่พบใน exon 15 (g.1508C>T) กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Alanine เป็น Valine
- และนอกจากนี้ยังมี SNP อีก 2 ตำแหน่งใน exon 10 (g.732C>T และ g.789C>T) เป็น synonymous SNP คือ ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ human FPGS gene และ ตำแหน่งที่พบ SNP จากการศึกษาวัยครั้งนี้

ตารางที่ 2 แสดงตำแหน่งและความถี่ของ SNP ที่พบในการศึกษาเพื่อหา SNP ของยีน FPGS จากการศึกษาวัยครั้งนี้

Name of SNP	Location	Nucleotide position	Nucleotide change	Amino acid change/Function	Frequency of variant allele	
					Case	Control
IVS9+19G>A	IVS 9	19	G>A	-	0.031	0.000
g.732C>T	Exon 10	732	C>T	Gly (synonymous SNP)	0.077	0.060
g.789C>T	Exon 10	789	C>T	Asn (synonymous SNP)	0.013	0.000
IVS13+55C>T	IVS 13	55	C>T	-	0.051	0.015
g.1297T>G	Exon 14	1297	T>G	Phe>Val	0.000	0.015
g.1508C>T	Exon 15	1508	C>T	Ala>Val	0.013	0.000
g.2006T>C	Exon 15	2006	T>C	3'UTR	0.661	0.543

2. ขั้นตอนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของยีน FPGS และความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (case-control association study)

SNP 6 ตำแหน่ง ของยีน FPGS ถูกนำมาใช้ในการศึกษา association study กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน โดย SNP 3 ตำแหน่ง มาจากขั้นตอนการตรวจหา SNP ของ FPGS gene และ SNP อีก 3 ตำแหน่ง มาจากการหา tag SNP ของทั้ง whole gene โดยใช้ข้อมูล จาก HapMap (www.hapmap.org) และใช้โปรแกรม Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) ในการเลือก tag SNP

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเปรียบเทียบค่า allele frequency ระหว่าง case และ control พบว่าไม่มีความแตกต่างของ allele frequency ระหว่าง case และ control ของ SNP ทั้ง 6 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP ทั้ง 6 ตำแหน่ง และความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด ALL พบว่ามี SNP 3 ตำแหน่ง มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิด ALL คือ AG genotype ของ SNP rs7039798 ($p=0.014$, $OR=2.14$, $95\%CI\ 1.16-3.94$), AG genotype และ G allele ของ SNP rs1544105 ($p=0.010$, $OR=2.24$, $95\%C=1.22-4.12$ และ $p=0.038$, $OR=1.83$, $95\%CI=1.03-3.24$, ตามลำดับ) และ AG genotype ของ SNP rs10106 ($p=0.026$, $OR=1.99$, $95\%CI=1.08-3.64$) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 แสดง Minor allele frequency ของ FPGS polymorphism หลังจากการทำ genotyping

SNP Name	Minor allele	Minor Allele Frequency		P value
		Case	Control	
rs7039798	G	0.305	0.260	0.3255
rs7033913	G	0.063	0.082	0.4842
rs1544105	G	0.311	0.260	0.2735
g.732C>T	A	0.053	0.020	0.0905
IVS 13+55C>T	T	0.011	0.020	0.4327
rs10106	A	0.311	0.281	0.5195

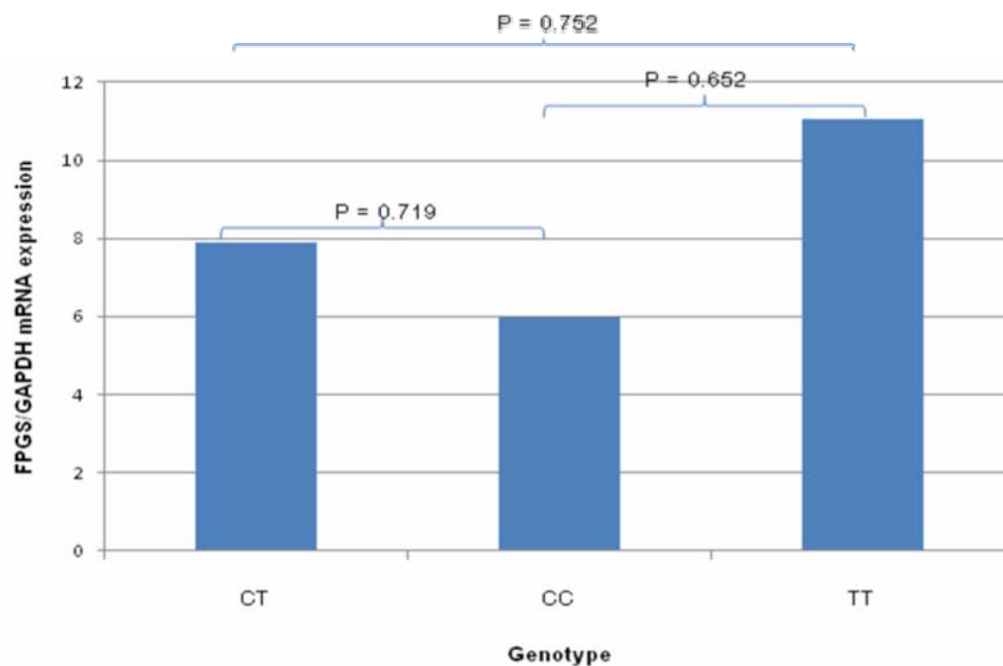
ตารางที่ 4 แสดงผล SNP effect ของ FPGS polymorphism ต่อ ความเสี่ยงของการเกิด ALL

SNP	Genotype	Control (N)	Case (N)	OR	95 %CI	P Value
rs7039798	AA	58	43	Ref	-	-
	GG	11	6	0.74	0.25-2.15	0.574
	AG	29	46	2.14	1.16-3.94	0.014
	GG/AG V.S. AA	40	52	1.75	0.99-3.10	0.054
rs7033913	AA	83	83	Ref	-	-
	GG	1	0	0.00	0.00	0.987
	AG	14	12	0.86	0.37-1.96	0.715
	GG/AG V.S. AA	15	12	0.80	0.35-1.81	0.593
rs1544105	AA	58	42	Ref	-	-
	GG	11	6	0.75	0.26-2.20	0.604
	AG	29	47	2.24	1.22-4.12	0.010
	GG/AG V.S. AA	40	53	1.83	1.03-3.24	0.038
g.732C>T	GG	94	85	Ref	-	-
	AA	0	0	ND	ND	ND
	AG	4	10	ND	ND	ND
	AA/AG V.S. GG	4	10	2.76	0.84-9.14	0.096
IVS 13+55C>T	CC	94	93	Ref	-	-
	TT	0	0	ND	ND	ND
	CT	4	2	ND	ND	ND
	TT/CT V.S. CC	4	2	0.51	0.09-2.83	0.437
rs10106	GG	55	42	Ref	-	-
	AA	12	6	0.65	0.23-1.89	0.433
	AG	31	47	1.99	1.08-3.64	0.026
	AA/AG V.S. GG	43	53	1.61	0.91-2.85	0.099

ND = not determined

3. ขั้นตอนการศึกษาความเป็นไปได้ของสาเหตุหรือหน้าที่ของ SNP rs10106

เนื่องจาก SNP rs10106 ของยีน FPGS อยู่ในตำแหน่ง 3'UTR ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออก (expression) ของยีน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่จะศึกษาการแสดงออก mRNA ของยีน FPGS ของ SNP แต่ละ genotype ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ค่าเฉลี่ยของ FPGS/GAPDH mRNA expression ของ CT genotype เท่ากับ 7.89 ± 12.02 , CC genotype เท่ากับ 5.98 ± 5.48 และ TT genotype เท่ากับ 11.07 ± 12.55 ซึ่งพบว่าค่า FPGS/GAPDH mRNA expression ของแต่ละ genotype มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงระดับการแสดงออกของ FPGS expression โดย normalized ด้วย GAPDH เปรียบเทียบกันแต่ละ genotype ของ SNP rs10106 ของยีน FPGS

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Polyglutamate synthetase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการ folate metabolism ทำหน้าที่เติมหมู่กลูตาเมต (glutamate) ให้แก่โฟเลตและยาในกลุ่ม anti-folate ซึ่งทำให้สารเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการทำงานดีขึ้น ซึ่งถ้าเซลล์มี FPGS activity ต่ำก็จะทำให้เซลล์นั้นดื้อต่อยาในกลุ่ม anti-folate ได้ (14)

จากการศึกษาหา polymorphism ของยีน FPGS ในประชากรไทยครั้งนี้พบ SNP ใหม่ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน คือ SNP IVS13+55C>T, g.1297T>G และ g.1508c>T แต่อย่างไรก็ตาม ก็พบความถี่ที่ต่ำ ยกเว้น SNP IVS13+55C>T และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ของยีน FPGS และความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน พบว่า มี SNP ถึง 3 ตำแหน่ง ที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงที่สูงขึ้นของการเป็น ALL คือ SNP rs7039798 ($p=0.014$, $OR=2.14$), rs1544105 ($p=0.010$, $OR=2.24$) และ rs10106 ($p=0.026$, $OR=1.99$)

จาก SNP ทั้ง 3 ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิด ALL พบว่า SNP rs10106 อยู่ใน ส่วน 3'UTR ของยีน FPGS ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการจับของ miRNA ซึ่งเป็น non-coding RNA ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน และยังเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งด้วย (15) แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การแสดงออกของยีน FPGS ไม่แตกต่างกันในแต่ละ genotype ของ SNP rs10106 ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากการแสดงออกของยีน FPGS นั้นถูกควบคุมด้วยอย่างน้อย 2 กลไก ได้แก่ 1) ระยะเวลาแบ่งตัวของเซลล์หรือการแก่ตัวของเซลล์ และ 2) ขึ้นกับเนื้อเยื่อแต่ละชนิด (16)

นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นเกี่ยวกับ polymorphism ของยีน FPGS กับความสัมพันธ์ของการเกิดมะเร็งด้วย เช่น การศึกษาจากคณะของ Lim (11) และ คณะของ Lee (12) พบว่า SNP rs10106 มีความสัมพันธ์กับการมีความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของการเกิด non-Hodgkin lymphoma ใน Caucasian นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในผู้ป่วย rheumatoid arthritis ในอินเดียตอนเหนือ พบว่า SNP rs1544105 AA และ AG genotype มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองที่ไม่ดีต่อการรักษาด้วยยา methotrexate (17) อย่างไรก็ตามก็มีรายงานที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ของยีน FPGS ในมะเร็ง (18) ด้วยเช่นกัน

จากการศึกษาครั้งนี้ ทางผู้วิจัยได้รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ของยีน FPGS และความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดเรื่อง จำนวนตัวอย่างซึ่งมีขนาดเล็ก ถ้าเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นก็จะทำให้ผลการทดลองถูกต้องมากขึ้นด้วยเช่นกัน

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า polymorphism ของยีน FPGS มีความสัมพันธ์กับความ
เสี่ยงในการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันในประเทศไทย ซึ่งเป็นรายงานฉบับแรกที่มีการรายงาน
ถึง polymorphism ของยีน FPGS กับความเสี่ยงของการเกิด ALL การค้นพบในครั้งนี้อาจช่วยในการ
พัฒนาการตรวจหาความเสี่ยงต่อการเกิด ALL ของแต่ละบุคคลได้ หรือสามารถอธิบายกลไกการเกิดมะเร็ง
เม็ดเลือดขาวในระดับประชากรได้

References

1. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2006;6:117-29.
2. เทียนสิวกุลและคณะ พ. โลหิตวิทยาคลินิกชั้นสูง. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2547;2.
3. de Jonge R, Tissing WJ, Hooijberg JH, Jansen G, Kaspers GJ, Lindemans J, et al. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2284-9.
4. Koppen IJ, Hermans FJ, Kaspers GJ. Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. Jan;148(1):3-14.
5. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3786-91.
6. Turner FB, Taylor SM, Moran RG. Expression patterns of the multiple transcripts from the folypolyglutamate synthetase gene in human leukemias and normal differentiated tissues. *J Biol Chem*. 2000 Nov 17;275(46):35960-8.
7. Chen L, Qi H, Korenberg J, Garrow TA, Choi YJ, Shane B. Purification and properties of human cytosolic folypoly-gamma-glutamate synthetase and organization, localization, and differential splicing of its gene. *J Biol Chem*. 1996 May 31;271(22):13077-87.
8. Taylor SM, Freemantle SJ, Moran RG. Structural organization of the human folypoly-gamma-glutamate synthetase gene: evidence for a single genomic locus. *Cancer Res*. 1995 Dec 15;55(24):6030-4.
9. Moran RG, Colman PD. Measurement of folypolyglutamate synthetase in mammalian tissues. *Anal Biochem*. 1984 Aug 1;140(2):326-42.
10. Barredo J, Moran RG. Determinants of antifolate cytotoxicity: folypolyglutamate synthetase activity during cellular proliferation and development. *Mol Pharmacol*. 1992 Oct;42(4):687-94.
11. Lim U, Wang SS, Hartge P, Cozen W, Kelemen LE, Chanock S, et al. Gene-nutrient interactions among determinants of folate and one-carbon metabolism on the risk of non-Hodgkin lymphoma: NCI-SEER case-control study. *Blood*. 2007 Apr 1;109(7):3050-9.

12. Lee KM, Lan Q, Kricker A, Purdue MP, Grulich AE, Vajdic CM, et al. One-carbon metabolism gene polymorphisms and risk of non-Hodgkin lymphoma in Australia. *Hum Genet.* 2007 Dec;122(5):525-33.
13. Leclerc GJ, Mou C, Leclerc GM, Mian AM, Barredo JC. Histone deacetylase inhibitors induce FPGS mRNA expression and intracellular accumulation of long-chain methotrexate polyglutamates in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for combination therapy. *Leukemia.* Mar;24(3):552-62.
14. Stark M, Wichman C, Avivi I, Assaraf YG. Aberrant splicing of folypolyglutamate synthetase as a novel mechanism of antifolate resistance in leukemia. *Blood.* 2009 Apr 30;113(18):4362-9.
15. Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, le Sage C, et al. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell.* 2007 Dec 28;131(7):1273-86.
16. Leclerc GJ, York TA, Hsieh-Kinser T, Barredo JC. Molecular basis for decreased folypolygamma-glutamate synthetase expression in a methotrexate resistant CCRF-CEM mutant cell line. *Leuk Res.* 2007 Mar;31(3):293-9.
17. Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P, et al. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics.* 2009 Oct;19(10):823-8.
18. Figueiredo JC, Levine AJ, Lee WH, Conti DV, Poynter JN, Campbell PT, et al. Genes involved with folate uptake and distribution and their association with colorectal cancer risk. *Cancer Causes Control.* Apr;21(4):597-608.

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

- จากผลการศึกษา case-control association study ในครั้งนี้ พบว่า มี SNP ถึง 3 ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน แต่เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนตัวอย่างซึ่งมีจำนวนไม่มาก โดยในงานวิจัยนี้มีจำนวนตัวอย่างของ case เพียง 95 ราย และ 98 รายใน control ดังนั้นหากในอนาคตมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาให้มากขึ้นก็จะทำให้ผลการศึกษามีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น
- เนื่องจากเอนไซม์ FPGS มีความสำคัญในกระบวนการ folate metabolism โดยจะเติมหมู่กลูตาเมต (glutamate) ให้แก่ folate และยาในกลุ่ม antifolate เช่น Methotrexate (MTX) ให้เป็น folate polyglutamate หรือ methotrexate polyglutamate (MTXPG) ซึ่งจะทำให้สารเหล่านี้สามารถที่จะอยู่ภายในเซลล์ได้นานขึ้นและทำหน้าที่ได้ดีขึ้น เช่น MTXPG จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR) ทำให้ cell เกิด cytotoxicity ดังนั้นการศึกษความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ของยีน FPGS และ methotrexate toxicity ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการบริหารจัดการด้านการรักษาผู้ป่วยที่ใช้ยา methotrexate ในอนาคตได้

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ พร้อมแจ้งสถานะของการตีพิมพ์

อยู่ในระหว่างการทบทวน และจะส่ง submit for publication (แสดงบทความในภาคผนวก)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- **เชิงสาธารณะ** มีเครือข่ายความร่วมมือกับนักวิจัยคือ Professor Dr. Jonathan A.L. Gelfond สังกัด Greehey Children's Cancer Research Institute, the University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA ซึ่งมีความสนใจในเรื่องมะเร็งในเด็กเช่นเดียวกัน
- **เชิงวิชาการ** เป็นการวิจัยเพื่อพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับสาเหตุของการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่พบได้บ่อยที่สุดในเด็ก เพื่อนำมาพัฒนาวิธีการตรวจในห้องปฏิบัติการ หรือ ใช้เป็นแนวทางในการหามาตรการป้องกันการเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน นอกจากนี้เมื่อนำมาวิจัยต่อเนื่อง เกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ polymorphism ของยีน FPGS กับการรักษาผู้ป่วยด้วยยาในกลุ่ม antifolate ก็จะทำให้การรักษาผู้ป่วยด้วยยาในกลุ่มนี้ได้ผลมากขึ้น

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

3.1. Duangjai Piwkham, Jonathan A.L. Gelfond, **Budsaba Rerkamnuaychoke**, Samart Pakakasama, Gail E. Tomlinson, Joke Beuten. Association of FPGS and MLL variants with childhood acute lymphoblastic leukemia in different ethnicities. Cohort and Consortia: From Biotechnology to Populations at The Rimrock Resort Hotel, in Banff Alberta, Canada. June 17-19, 2009 (Poster Presentation)

3.2. Duangjai Piwkham, Jonathan A.L. Gelfond, **Budsaba Rerkamnuaychoke**, Samart Pakakasama, Gail E. Tomlinson, Joke Beuten. Association of FPGS and MLL variants with childhood acute lymphoblastic leukemia in different ethnicities. The American Societies of Human Genetics (ASHG) 59th Annual meeting, at Hawaii Convention Center, Exhibition Hall II, in Honolulu Hawaii, USA. October 20-24, 2009 (Poster Presentation)

3.3. **Rerkamnuaychoke, B., Piwkham, D.**, Pakakasama, S., Tomlinson, G. and Beuten, J.
Mutation Screening of Folate Metabolizing Gene, Folylpolyglutamate Synthetase (*FPGS*), in
Childhood Acute Lymphoblastic leukemia ในการประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่ ... พบ ... เมธีวิจัยอาวุโส
สกว.” วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 ณ โรงแรมฮอติเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
(Poster Presentation)

ภาคผนวก

**Mutation screening and association study in the Folylpolyglutamate synthetase (*FPGS*) gene
with susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia**

Duangjai Piwkham^{1, 4}, Jonathan A.L. Gelfond², Samart Pakakasama³, Karan Paisooksantiwattana⁴,

Gail E. Tomlinson¹, Joke Beuten¹ and Budsaba Rerkamnuaychoke^{4,*}

¹Department of Pediatrics, ²Department of Epidemiology and Biostatistics, University of Texas
Health Science Center at San Antonio, TX, USA ; ³Department of Pediatrics, ⁴Department of
Pathology, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

* Corresponding author

Abstract

Folypolyglutamate synthetase (*FPGS*), an important enzyme in the folate metabolic pathway, plays a central role in intracellular accumulation of folate and antifolate in the cell. Loss of *FPGS* activity results in decreased cellular levels of antifolates and consequent drug resistance in leukemia. We performed a mutation analysis of the coding regions of the *FPGS* gene and investigated the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) within *FPGS* in a case-control sample of Thai children. Seven SNPs were identified from mutation analysis, 3 of which, IVS13+55C>T, g.1297T>G and g.1508C>T were novel SNPs not previously reported. Association analysis of 6 SNPs covering *FPGS* showed a significant increase in ALL risk for SNPs rs7039798 ($p=0.014$, OR=2.14), rs1544105 ($p=0.010$, OR=2.24) and rs10106 ($p=0.026$, OR=1.99) in our samples. In conclusion, our finding suggested that common genetic variants within *FPGS* were significantly associated with ALL risk in Thai children.