

การวิเคราะห์การกลายพันธุ์บริเวณไทโรซีนไคเนสโดเมนของยีนอีจีเอฟอาร์ ของผู้ป่วยมะเร็งปอดในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

Mutation Analysis at Tyrosine Kinase Domain of *EGFR* Gene of Lung Cancer Patients in The Upper Northern Thailand

เอกพงศ์ รุ้ทำนอง (Ekkapong Roothumnong)* นิรุชร์ เลิศประเสริฐสุข (Nirush Lertprasertsuke)**
สมเจริญ แซ่เต็ง (Somcharoen Saeteng)*** ดร.กนกกาญจน์ บำรุงกิจ (Dr.Kanokkan Bumroongkit)****
สุมิตรา ทองประเสริฐ (Sumitra Thongprasert)***** ดร.ดาวรุ่ง กังวานพงศ์ (Dr.Daorong Kangwanpong)*****

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* บริเวณ tyrosine kinase domain ที่เอ็กซอน 18, 19 และ 21 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดในเขตภาคเหนือตอนบนของไทย โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิด non-small-cell lung cancer จำนวน 68 ราย และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเอ็กซอนทั้งสามด้วยวิธี PCR ก่อนนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส ผลการศึกษาพบการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* รวม 10 ชนิด ในผู้ป่วย 18 ราย (ร้อยละ 26.47) ซึ่งการกลายพันธุ์ 6 ชนิดเคยมีรายงานมาก่อนแล้วคือ delE746 - A750, delL747 - S752insQ, A839T, V851I, E868G และ L858R ส่วนอีก 4 ชนิด เป็นการกลายพันธุ์ที่ค้นพบใหม่ ได้แก่ L688F, A722T, G724D และ P848S การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* มีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยเพศหญิง ($P=0.0038$) หรือพยาธิสภาพขึ้นเนื้อแบบ adenocarcinoma ($P=0.0343$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดในเขตภาคเหนือของไทย

ABSTRACT

The objective of this study is to investigate the incidence of *EGFR* mutation at tyrosine kinase domain in exon 18, 19 and 21 among the upper northern Thai lung cancer patients. Cancerous tissues obtained from 68 non-small cell lung cancer patients were subjected to DNA extraction, amplification of DNA regions encompassing the three *EGFR* exons of interest by polymerase chain reaction, and followed by direct sequencing. Ten *EGFR* mutations were found in 18 out of 68 patients (26.47%). Six of which, delE746 - A750, delL747 - S752insQ, A839T, V851I, E868G and L858R, were previously reported mutations. The other four, L688F, A722T, G724D and P848S, were novel mutations. *EGFR* mutation

* มหบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

***** ศาสตราจารย์ พญ. ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

***** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

status was statistic significant associated with female ($P=0.0038$) or adenocarcinoma ($P=0.0343$) subtype. This study reports the incidence of *EGFR* gene mutations in the upper northern Thai lung cancer patients.

คำสำคัญ : ยีนอีจีเอฟอาร์ มะเร็งปอด ภาคเหนือตอนบนของไทย

Key Words : *EGFR*, Lung cancer, Upper northern Thailand

บทนำ

มะเร็งปอด จัดเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทย โดยเฉพาะในประชากรที่อาศัยอยู่ทางภาคเหนือ ซึ่งพบอุบัติการณ์ของโรคโดยเฉลี่ยสูงกว่าประชากรที่อาศัยอยู่ในภูมิภาคอื่นๆ เป็นอย่างมาก (Khuhaprema, 2007; Cancer Unit: Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, 2007) จากสถิติผู้ป่วยมะเร็งปอดที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ผ่านมา พบมะเร็งปอดชนิด non-small-cell lung cancer (NSCLC) มากที่สุด ประกอบด้วย adenocarcinoma ร้อยละ 42.6 รองลงมาคือ squamous cell carcinoma ร้อยละ 33.0 และ large cell carcinoma ร้อยละ 2.9 ส่วนมะเร็งปอดชนิด small-cell lung cancer (SCLC) พบได้ร้อยละ 12.4 นอกจากนี้ยังพบมะเร็งปอดที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ อีกร้อยละ 9.1 ผู้ป่วยมากกว่าร้อยละ 80 ที่มาพบแพทย์มักมีการแพร่กระจายของโรคแล้ว (Deesomchok *et al.*, 2005) การรักษาใช้ยาเคมีบำบัดมาตรฐานเป็นหลัก ในปัจจุบันนอกจากการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดมาตรฐานแล้ว ยาที่ใช้รักษาแบบมุ่งเป้า (targeted therapy) เช่น gefitinib หรือ erlotinib ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม epidermal growth factor receptor - tyrosine kinase inhibitors (*EGFR*-TKIs) ได้เข้ามามีบทบาทในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอดมากขึ้น ยากลุ่มนี้ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน *EGFR* (Hynes and Lane, 2005) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม receptor tyrosine kinase ที่แปลรหัสมาจากยีน *EGFR* ยีน *EGFR* อยู่ที่แขนสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 7 ตำแหน่ง 12 (7p12) มีขนาด 188 Kb (NC 000007.12) ประกอบด้วย 28 เอ็กซอน สามารถถอดและแปลรหัสให้โปรตีนขนาด 170 กิโลดัลตัน ซึ่งมี 1,210 กรดอะมิโน (Reiter *et al.*, 2001) ในเซลล์มะเร็งหลาย ๆ ชนิดที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์

เยื่อบุผิว เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งศีรษะและคอ รวมถึงมะเร็งปอดชนิด NSCLC มักมีการแสดงออกของยีน *EGFR* หรือมีการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน *EGFR* ในระดับที่สูงกว่าปกติ ส่งผลให้เซลล์เพิ่มการแบ่งตัว ด้านท้านการตายของเซลล์แบบ apoptosis เพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์เนื่องจาก รวมถึงส่งเสริมการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Arteaga, 2002) กลไกเหล่านี้จะส่งเสริมกระบวนการ พัฒนาและการดำรงชีวิตของเซลล์มะเร็ง จึงทำให้เกิดแนวคิดผลิตภัณฑ์รักษามะเร็งที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน *EGFR* ขึ้น

ยา gefitinib (Iressa®) เป็นยาในกลุ่ม *EGFR*-TKIs ตัวแรกที่เข้ามามีบทบาทในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอด (Cohen *et al.*, 2003) จากการศึกษาวิจัยคลินิกในระยะที่ 2 ของโครงการ IDEAL-1 และ IDEAL-2 พบว่ายา gefitinib ให้ผลด้านเนื้ออกมะเร็งปอด ในผู้ป่วยประมาณร้อยละ 12-19 (Fukuoka *et al.*, 2003; Kris *et al.*, 2003) จากผลดังกล่าว ทำให้องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) ให้การรับรองแบบเร่งด่วนแก่ยา gefitinib ในเดือนพฤษภาคม ปี ค.ศ. 2003 (Cohen *et al.*, 2003) จากนั้นยา gefitinib ก็เข้าสู่การวิจัยคลินิกในระยะที่ 3 อีกหลายๆ โครงการ ซึ่งพบว่าผู้ป่วยเชื้อชาติเอเชียมีการตอบสนองดีกว่าผู้ป่วยเชื้อชาติอื่นๆ และกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา gefitinib มักเป็นชนิด adenocarcinoma หรือเป็นเพศหญิง หรือไม่มีประวัติการสูบบุหรี่ (Ciardiello and Tortora, 2008; Toschi and Cappuzzo, 2007)

การแสดงออกของโปรตีน *EGFR* เป็นเป้าหมายชีวโมเลกุลอย่างแรก ซึ่งใช้ศึกษาการตอบสนองต่อยา แต่กลับพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองของผู้ป่วยที่รักษาด้วยยา gefitinib (Bailey *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงกลไกในระดับ

ความผิดปกติของยีน และพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* หลายๆ ชนิดในเซลล์มะเร็งที่เอ็กซอน 18, 19 และ 21 ซึ่งอยู่ใน tyrosine kinase domain มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองที่ดีต่อการรักษาด้วยยา gefitinib (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004) และล่าสุด งานวิจัยคลินิกระยะที่ 3 โครงการ IPASS ซึ่งศึกษาโดยใช้ยา gefitinib รักษาตั้งแต่เริ่มแรก (first-line) เปรียบเทียบกับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดมาตรฐาน carboplatin/paclitaxel โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกเฉพาะผู้ป่วยชาวเอเชียที่เป็นมะเร็งชนิด NSCLC แบบ adenocarcinoma ซึ่งมีอาการอยู่ในขั้น III B หรือ IV ไม่มีประวัติการสูบบุหรี่ และยังไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดใดๆ ผลการศึกษาพบการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* สูงถึงร้อยละ 59.7 และผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอัตราการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา gefitinib มากกว่าร้อยละ 70 เมื่อวิเคราะห์ระยะเวลาการรอดชีวิตโดยโรคไม่ก้าวหน้าต่อ (progression-free survival) ของกลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยา gefitinib มีระยะเวลานานกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) (Mok *et al.*, 2009)

ยาในกลุ่ม *EGFR*-TKIs อีกชนิดหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งปอดก็คือ ยา erlotinib (Tarceva®) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน *EGFR* เช่นเดียวกันกับยา gefitinib การวิจัยทางคลินิกของยา erlotinib ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่มีอาการอยู่ในขั้นก้าวหน้า พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยา มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้ยา erlotinib ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาเมื่อเดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 2004 และเมื่อวิเคราะห์การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา erlotinib กับลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิก พบว่ามีความสัมพันธ์ต่อกันเช่นเดียวกับผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา gefitinib กล่าวคือ เป็นผู้ป่วยเชื้อชาติเอเชีย หรือผู้ป่วยเพศหญิง หรือไม่มีประวัติการสูบบุหรี่ หรือมีพยาธิสภาพแบบ adenocarcinoma

(Cohen *et al.*, 2005; Shepherd *et al.*, 2005) นอกจากนี้ Pao *et al.* (2004) ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* บริเวณเอ็กซอน 18 – 24 ซึ่งเป็น tyrosine kinase domain พบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* บริเวณเอ็กซอน 19 และ 21 มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา erlotinib

จากหลักฐานอ้างอิงที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* บริเวณ tyrosine kinase domain มีความสำคัญ ทั้งในด้านการคัดเลือกผู้ป่วยเข้ารับการรักษาด้วยยาในกลุ่ม *EGFR*-TKIs และการพยากรณ์โรค ดังนั้นงานวิจัยเพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่อาศัยอยู่ทางภาคเหนือของไทย ซึ่งเป็นบริเวณที่พบอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งปอดสูงที่สุด จะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการรักษาผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* บริเวณ tyrosine kinase domain ที่เอ็กซอน 18, 19 และ 21 จากเนื้อเยื่อปอดมะเร็งปอด ในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่อาศัยอยู่ในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อวันที่ 16 กรกฎาคม 2552

1. ตัวอย่างวิจัย

ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งปอด (cancerous tissue) ที่เก็บรักษาสภาพในพาราฟิน (formalin fixed and paraffin embedded: FFPE) จำนวน 68 ราย จากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเนื้อเยื่อดังกล่าวได้ผ่านการวินิจฉัยจากพยาธิแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แล้ว

2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่าง FFPE มาตัดด้วยเครื่อง microtome ให้ได้ความหนา 10 ไมครอน จากนั้นปรับสภาพชิ้นเนื้อด้วยการให้ความร้อนในสาละลาย

เบส (heat-induced retrieval in alkaline solution) (Shi *et al.*, 2004) แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐาน phenol-chloroform

3. การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR*

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณของยีน *EGFR* ที่เอ็กซอน 18, 19 และ 21 ของ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะดังนี้

EGFR-18F:5'-CCATGTCTGGCACTGCTTTC-3'

EGFR-18R:5'-TGCAAGGACTCTGGGCTCC-3'

EGFR-19F:5'-AGATCACTGGGCAGCATGTG-3'

EGFR-19R:5'-CCAGACATGGAAAAGGTGGG-3'

EGFR-21F:5'-GAACATGACCCTGAATTCGGA-3'

EGFR-21R:5'-TACAGCTAGTGGGAAGGCAGC-3'

จากนั้นวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีนโดยการหาลำดับเบสทั้ง sense และ antisense strands ของแต่ละเอ็กซอน ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ MegaBACE™ 1000 (Amersham Bioscience, USA)

4. การแยกอัลลีลเพื่อวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR*

นำตัวอย่างผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะมีการกลายพันธุ์ชนิด small deletion/insertion โดยดูจากผลลำดับเบสที่มีการซ้อนกันของ chromatogram มาแยกเก็บ fraction ของอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค denaturing high - performance liquid chromatography (DHPLC) โดยใช้เครื่อง Transgenomic WAVE® nucleic acid fragment analysis system (Transgenomic, Omaha, USA) รุ่น 3500HT นำตัวอย่างที่แยกเก็บ fraction ได้ไปประเหย buffer ออกโดยใช้เครื่อง SpeedVac (Thermo Scientific, USA) แล้วนำไปหาลำดับเบสเพื่อวิเคราะห์การกลายพันธุ์ต่อไป

5. การวิเคราะห์ผล

นำลำดับเบสของดีเอ็นเอมาวิเคราะห์การกลายพันธุ์โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงของยีน *EGFR* จาก GenBank (NC 000007.12) ด้วยโปรแกรม Mutation Surveyor® 3.25 (SoftGenetics LLC, USA) ส่วนการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ที่เคยมีรายงานแล้วใช้วิธีเทียบกับฐานข้อมูล

SM-EGFR-DB (Murray *et al.*, 2008) และ COSMIC (Bamford *et al.*, 2004) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* กับลักษณะพยาธิวิทยาคลินิก ด้วย chi-square test

ผลการวิจัย

ตัวอย่างวิจัยจากผู้ป่วย 68 ราย เป็นผู้ป่วยเพศชายร้อยละ 61.8 (42/68) ผู้ป่วยเพศหญิงร้อยละ 38.2 (26/68) มีลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิกเป็น adenocarcinoma ร้อยละ 69.1 (47/68) squamous cell carcinoma ร้อยละ 25 (17/68) และ large cell carcinoma ร้อยละ 5.9 (4/68)

ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ที่เอ็กซอน 18, 19 และ 21 พบการกลายพันธุ์ 10 ชนิด ในผู้ป่วย 18 ราย (ร้อยละ 26.47) ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยเป็นการกลายพันธุ์ที่มีรายงานมาก่อน 6 ชนิด 2 ชนิดพบถึงร้อยละ 50 ได้แก่ delE746-A750, L858R ซึ่งพบในผู้ป่วย 4 และ 5 รายตามลำดับ อีก 4 ชนิด พบในผู้ป่วยอย่างละ 1 ราย ได้แก่ delL747 - S752insQ, A839T, V851I และ E868G นอกนี้ยังตรวจพบการกลายพันธุ์ชนิดใหม่ อีก 4 ชนิด ได้แก่ L688F, A722T และ G724D ในผู้ป่วยอย่างละ 1 ราย และ P848S ในผู้ป่วย 2 ราย

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* กับลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิก พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผู้ป่วยที่เป็นเพศหญิง ($P=0.0038$) หรือมีพยาธิสภาพขั้นเนื้องอกแบบ adenocarcinoma ($P=0.0343$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* กับลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิก

ตัวแปร	การกลายพันธุ์ของยีน <i>EGFR</i>		
	พบ	ไม่พบ	<i>P</i> value
เพศ			
ชาย	6	36	0.0038
หญิง	12	14	
พยาธิสภาพของชิ้นเนื้อ			
Adenocarcinoma	16	31	0.0343 ^a
Squamous cell carcinoma	2	15	
Large cell carcinoma	0	4	

^a เปรียบเทียบพยาธิสภาพแบบ adenocarcinoma กับแบบอื่นๆ

อภิปรายผลการวิจัย

อุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่อาศัยในเขตภาคเหนือของไทย (ร้อยละ 26.47) มีอัตราใกล้เคียงกับฐานข้อมูล SM-*EGFR*-DB ซึ่งพบร้อยละ 27.61 (Murray *et al.*, 2008) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยชาวเอเชียด้วยกัน ซึ่งพบได้ราวร้อยละ 45 (Hsieh *et al.*, 2006; Sakurada *et al.*, 2006) กลับพบว่า มีอุบัติการณ์ต่ำกว่า และยังแตกต่างกับการศึกษาของ Sriuranpong *et al.* (2006) Shigematsu *et al.* (2005) และ Kosaka *et al.* (2004) ซึ่งพบอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ร้อยละ 57.4 (35/61) และประมาณร้อยละ 50 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma ที่เป็นชาวไทยและเอเชีย ตามลำดับ การพบอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ค่อนข้างต่ำในงานวิจัยนี้ คาดว่าเกิดจากความแตกต่างด้านปัจจัยทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร ดังจะเห็นได้จากอัตราส่วนมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma ซึ่งมีอยู่ถึงร้อยละ 69 แต่พบการกลายพันธุ์ในอัตราต่ำ ขณะที่พบการกลายพันธุ์ในมะเร็งปอดชนิด squamous cell carcinoma ในอัตราที่สูงกว่า (ร้อยละ 13) ที่เคยมีรายงานไว้ว่าพบการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ในมะเร็งปอดชนิดนี้ (น้อยกว่าร้อยละ 1) (Wiwanitkit, 2006)

ลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิกที่สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ในการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษามาก่อนหน้านี้ ซึ่งมักพบในผู้ป่วยเพศหญิงหรือในชั้นเนื้อที่มีพยาธิสภาพแบบ adenocarcinoma (Toschi and Cappuzzo, 2007)

การกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อย (common mutation) 2 ชนิด คือ delE746-A750 (c.2235 – 2249del GGAATTAAGAG AAGC หรือ c.2235 – 2249del115) และ L858R (c.2573T>G หรือ p.Leu858Arg) มีรายงานว่า การกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดข้างต้นมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองที่ดีต่อการรักษาด้วยยาในกลุ่ม *EGFR*-TKIs โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ดังกล่าว มีอัตราการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา gefitinib หรือ erlotinib มากกว่าร้อยละ 70 (Yamamoto *et al.*, 2009)

<i>EGFR</i> exon 19: reported delE746 – A750 : c.2235 – 2249del115 (Lynch <i>et al.</i> , 2004)	
<i>EGFR</i> exon 19: reported L858R : c.2573T>G (Lynch <i>et al.</i> , 2004)	
<i>EGFR</i> exon 19 : reported delL747 – S752insQ c.2238-2256del19ins4 (Okami <i>et al.</i> , 2007)	
<i>EGFR</i> exon 21 : reported A839T : c.2515G>A (Huang <i>et al.</i> , 2004)	
<i>EGFR</i> exon 21 : reported V851I : c.2551G>A (Cappuzzo <i>et al.</i> , 2005)	
<i>EGFR</i> exon 21 : reported E868G : c.2603A>G (Hsieh <i>et al.</i> , 2006)	
<i>EGFR</i> exon 18 : novel L688F : c.2062C>T	
<i>EGFR</i> exon 18 : novel G724D : c.2171G>A	
<i>EGFR</i> exon 18 : novel A722T : c.2164G>A	
<i>EGFR</i> exon 21 : novel P848S : c.2542C>T	

ภาพที่ 1 การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR*

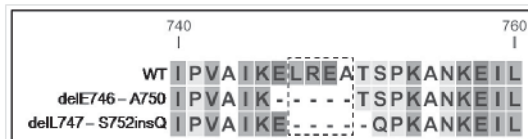
การกลายพันธุ์ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ อีก 4 ชนิด คือ การกลายพันธุ์ชนิด c.2238-2257 del19ins4 (delL747 - S752insQ) เป็นการกลายพันธุ์แบบ indels ซึ่งเบส 19 ตัวขาดหายไปตำแหน่ง 2,238 - 2,256 (ATTAAGAGAAGCAACATCT) และมีการแทรกเบส GCAA ทำให้เกิด in-frame deletion/ insertion เมื่อแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีน ซึ่งจะให้การถอดมิโนที่ตำแหน่ง 747-752 (LREATS) ขาดหายไป และมีการแทรกกรดอะมิโน glutamine (Q) เข้ามา 1 ตัว Okami *et al.* (2007) พบการกลายพันธุ์ดังกล่าวในผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา gefitinib

Pao *et al.* (2004) ได้รายงานผลการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนแบบ delL747 - S752insQ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอที่ต่างกัน คือ c.2239-2256del18insCAA ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์แบบนี้ก็ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา gefitinib ด้วยเช่นกัน เกือบทั้งหมดของการกลายพันธุ์แบบ in-frame deletion/insertion ซึ่งพบได้มากกว่าร้อยละ 45 ของการกลายพันธุ์ทั้งหมดเกิดक्रमบริเวณ LREA motif (Sharma and Settleman, 2009) ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์บริเวณเอ็กซอน 19 มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาในกลุ่ม EGFR-TKIs มากถึงประมาณร้อยละ 86.21 (Murray *et al.*, 2008)

การกลายพันธุ์ชนิด A839T (c.2164G>A หรือ p.Ala839Thr) พบในผู้ป่วย 1 ราย มีการแทนที่เบส G ที่ตำแหน่ง 2,164 ด้วยเบส A (GCA → ACA) ทำให้กรดอะมิโน alanine (A) ที่ codon 839 เปลี่ยนเป็น threonine (T) การกลายพันธุ์แบบ A839T รายงานครั้งแรกโดย Huang *et al.* (2004) และพบในผู้ป่วยที่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา gefitinib

การกลายพันธุ์ชนิด V851I (c.2551G>A หรือ p.Val851Ile) พบว่ามีรายงานการวิจัยของการกลายพันธุ์ชนิดนี้ที่ไม่เกี่ยวข้องกัน 2 ชิ้น ซึ่งพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์แบบ V851I ไม่ตอบสนอง

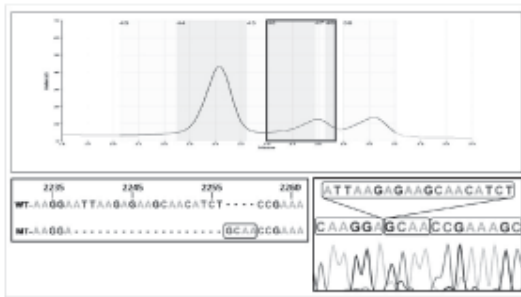
ต่อการรักษาด้วยยา gefitinib (Cappuzzo *et al.*, 2005; Gow *et al.*, 2008) คาดว่าน่าจะเกิดจากการที่กรดอะมิโนทั้งสองชนิดอยู่ในกลุ่ม hydrophobic เหมือนกัน และมีโครงสร้างของ side chain ใกล้เคียงกันโครงสร้างของโปรตีนจึงไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก



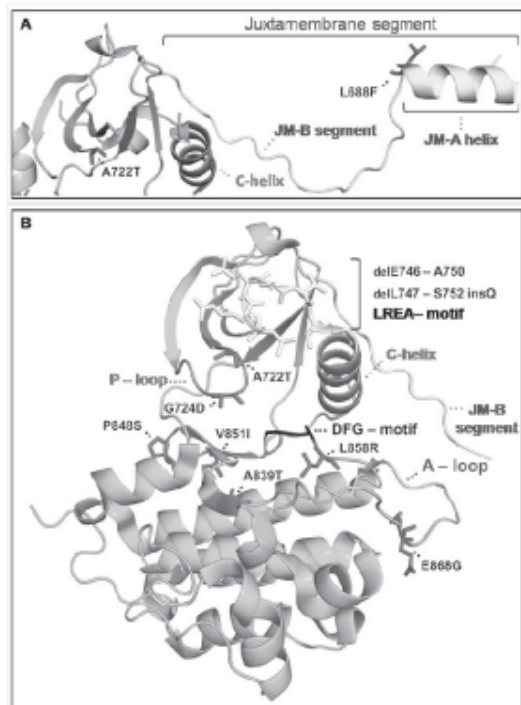
ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบโปรตีน EGFR ปกติ กับโปรตีน EGFR ที่มีการกลายพันธุ์แบบ in-frame deletion/insertion กรอบเส้นประแสดงตำแหน่ง LREA motif

การกลายพันธุ์ชนิด E868G (c.2603A>G หรือ p.Glu868Gly) พบว่าตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์อยู่ในส่วน activation loop (A-loop) ของ tyrosine kinase ที่มีความสำคัญในกระบวนการ phosphorylation โดย Hsieh *et al.*, (2006) ได้รายงานการกลายพันธุ์ชนิดนี้ร่วมกับการกลายพันธุ์ชนิดอื่นในผู้ป่วย 2 ราย ผู้ป่วยรายที่มีพยาธิสภาพแบบ adenocarcinoma ตอบสนองแบบ partial respond แต่ในผู้ป่วยรายที่มีพยาธิสภาพแบบ squamous cell carcinoma กลับพบว่าไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา gefitinib

การกลายพันธุ์ชนิด small deletion หรือ insertion ที่อยู่ในสถานะ heterozygous เมื่อนำไปหาลำดับเบสจะมีการซ้อนกันของ chromatogram ระหว่างอัลลีลปกติกับอัลลีลที่กลายพันธุ์ ทำให้มีความยุ่งยากในการระบุชนิดของการกลายพันธุ์ งานวิจัยนี้จึงแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยใช้เทคนิคการแยกอัลลีลด้วยเครื่อง DHPLC โดยใช้ sizing mode ซึ่งทำให้สามารถแยกอัลลีลที่กลายพันธุ์ออกจากอัลลีลปกติด้วยขนาดที่แตกต่างกันได้ จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปหาลำดับเบส (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็วกว่าการแยกอัลลีลโดยใช้เทคนิค TA cloning เป็นอย่างมาก



ภาพที่ 3 Elution profile จากเครื่อง DHPLC ในการทำ fraction collection เพื่อแยกอัลลีลโดยการเก็บ peak ที่ 2 (กรอบสีแดงด้านบน) และผลการหาลำดับเบสที่ได้ (ด้านล่าง)



ภาพที่ 4 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* บริเวณ tyrosine kinase domain ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ รูปโครงสร้างสามมิติและตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์แสดงโดยใช้โปรแกรม PyMOL (DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA) สร้างจากไฟล์ฐานข้อมูลโครงสร้างโปรตีน (PDB) 3GOP และ 1M17

นอกจากการกลายพันธุ์ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ในการวิจัยครั้งนี้ยังพบการกลายพันธุ์แบบ missense ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อน (novel mutation) อีก 4 ชนิดได้แก่ การกลายพันธุ์ชนิด L688F (c.2062C>T หรือ p.Leu688Phe) การกลายพันธุ์ดังกล่าวนี้อยู่ที่บริเวณ juxtamembrane segment (ภาพที่ 4A) ซึ่งทำหน้าที่เพิ่มความเสถียรของโมเลกุลโปรตีน *EGFR* ที่เข้าคู่กัน ในขณะที่เกิด dimerization โดยกรดอะมิโน leucine ที่ codon 688 เป็น 1 ใน 3 ของ hydrophobic residues (Leu 688, Val 669, Leu 692) ที่มีความจำเป็นในกระบวนการกระตุ้นให้โปรตีน *EGFR* อยู่ในสถานะ active (Jura *et al.*, 2009)

การกลายพันธุ์ชนิด A722T (c.2164G>A หรือ p.Ala722Thr) และ G724D (c.2171G>A หรือ p.Gly724Asp) เกิดขึ้นที่บริเวณ ATP-binding motif หรือ P-loop (ภาพที่ 4B) ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนในกลุ่ม receptor tyrosine kinase มีลำดับกรดอะมิโนแบบ GXGXXG โดย glycine ตัวแรกจะอยู่ที่ codon 719 เช่นเดียวกับที่มีรายงานการกลายพันธุ์แบบ G719X และมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาในกลุ่ม *EGFR*-TKIs ด้วย (Paez *et al.*, 2004)

การกลายพันธุ์แบบสุดท้าย คือ P848S (c.2542G>A หรือ p.Pro848Ser) พบว่าคุณสมบัติของโปรตีนเปลี่ยนจาก hydrophobic เป็น hydrophilic การกลายพันธุ์ดังกล่าวเกิดขึ้นที่บริเวณ catalytic cleft ของ tyrosine kinase ใกล้กับบริเวณ ATP-binding pocket ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ยาในกลุ่ม *EGFR*-TKIs เช่น gefitinib หรือ erlotinib เข้ามาเกาะเพื่อยับยั้งการทำงานของโปรตีน *EGFR* การเปลี่ยนคุณสมบัติของโปรตีนดังกล่าวอาจมีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาในกลุ่ม *EGFR*-TKIs

ในงานวิจัยครั้งนี้ไม่พบการกลายพันธุ์แบบ G719X และ L861Q ที่พบได้ร้อยละ 1-3 (Murray *et al.*, 2008) โดยมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาในกลุ่ม *EGFR*-TKIs ด้วยเหมือนกัน (Mitsudomi and Yatabe, 2007; Lynch *et al.*, 2004) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่าง

ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ยังมีไม่มากพอ หรืออาจมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรก็เป็นได้

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดที่อาศัยในเขตภาคเหนือของไทย ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาในกลุ่ม *EGFR*-TKIs หรือการพยากรณ์ของโรค

ข้อเสนอแนะ

อุบัติการณ์การกลายพันธุ์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้น ยังคงมีความจำเป็นในอนาคตที่จะต้องศึกษาในตัวอย่างประชากรเพิ่มขึ้นเพื่อให้สามารถใช้เป็นข้อมูลอุบัติการณ์ของประชากรทั่วไปในภาคเหนือของไทยได้

เอกสารอ้างอิง

Arteaga, CL. 2002. Epidermal Growth Factor Receptor Dependence in Human Tumors: More Than Just Expression?. *Oncologist*. Vol. 7. Page(s):31-39.

Bailey, R., Kris, M., Wolf, M., Kay, A., Averbuch, S., Askaa, J., Janas, M., Schmidt, K., and Fukuoka, M. 2003. O-242 Gefitinib ('Iressa', ZD1839) Monotherapy for Pretreated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer in IDEAL 1 and 2: Tumor Response is not Clinically Relevantly Predictable from Tumor EGFR Membrane Staining Alone. *Lung Cancer*. Vol.41. S71.

Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A., Flanagan, A., Teague, J., Futreal, P A., Stratton, M R., et al. 2004. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br. J. Cancer*. Vol. 91. Page(s):355-358.

Cancer Unit: Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital 2007. *Chiangmai Cancer Registry 2007* (Chaing Mai, Thailand: Faculty of Medicine, Chaing Mai University).

Cappuzzo, F., Hirsch, FR., Rossi, E., Bartolini, S., Ceresoli, G. L., Bemis, L., Haney, J., Witta, S., Danenberg, K., Domenichini, I., et al. 2005. Epidermal Growth Factor Receptor Gene and Protein and Gefitinib Sensitivity in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* Vol.97. Page(s):643-655.

Ciardiello, F., and Tortora, G. 2008. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*. Vol.358. Page(s):1160-1174.

Cohen, MH., Johnson, JR., Chen, Y., Sridhara, R., and Pazdur, R. 2005. FDA Drug Approval Summary: Erlotinib (Tarceva(R)) Tablets. *Oncologist*. Vol.10. Page(s):461-466.

Cohen, MH., Williams, GA., Sridhara, R., Chen, G., and Pazdur, R. 2003. FDA Drug Approval Summary: Gefitinib (ZD1839) (Iressa(R)) Tablets. *Oncologist*. Vol.8. Page(s):303-306.

Deesomchok, A., Dechayonbancha, N., and Thongprasert, S. 2005. Lung cancer in Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital: comparison of the clinical manifestations between the young and old age groups. *J Med Assoc Thai*. Vol.88. Page(s):1236-1241.

Fukuoka, M., Yano, S., Giaccone, G., Tamura, T., Nakagawa, K., Douillard, J., Nishiwaki, Y., Vansteenkiste, J., Kudoh, S., Rischin, D., et al. 2003. Multi-Institutional Randomized Phase II Trial of Gefitinib for Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Onco*. Vol.1 21. Page(s):2237-2246.

- Gow, C., Chien, C., Chang, Y., Chiu, Y., Kuo, S., Shih, J., Chang, Y., Yu, C., Yang, C., and Yang, P. 2008. Radiotherapy in Lung Adenocarcinoma with Brain Metastases: Effects of Activating Epidermal Growth Factor Receptor Mutations on Clinical Response. *Clinical Cancer Research*. Vol.14. Page(s):162-168.
- Hsieh, M., Fang, Y., Chang, W., Kuo, H., Lin, S., Liu, H., Liu, C., Chen, H., Ku, Y., Chen, Y., *et al.* 2006. Complex mutation patterns of epidermal growth factor receptor gene associated with variable responses to gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. Vol.53. Page(s):311-322.
- Huang, S., Liu, H., Li, L., Ku, Y., Fu, Y., Tsai, H., Chen, Y., Lin, Y., Chang, W., Kuo, H., *et al.* 2004. High Frequency of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations with Complex Patterns in Non-Small Cell Lung Cancers Related to Gefitinib Responsiveness in Taiwan". *Clin Cancer Res*. Vol.10. Page(s):8195-8203.
- Hynes, NE., and Lane, HA. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. Vol.5. Page(s): 341-354.
- Jura, N., Endres, NF., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, MH., Wemmer, DE., Zhang, X., and Kuriyan, J. 2009. Mechanism for Activation of the EGF Receptor Catalytic Domain by the Juxtamembrane Segment. *Cell* 137, 1293-1307.
- Khuahaprema, T., Srivatanakul, P., Sriplung, H., Wiangnon, S., and Sumitsawan, Y. eds. 2007. *Cancer in Thailand Vol. IV, 1998-2000*. (Bangkok: Bangkok Medical Publisher).
- Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Kuwano, H., Takahashi, T., and Mitsudomi, T. 2004. Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications. *Cancer Res*. Vol.64. Page(s):8919-8923.
- Kris, MG., Natale, RB., Herbst, RS., Lynch, TJ., Prager, D., Belani, CP., Schiller, JH., Kelly, K., Spiridonidis, H., Sandler, A., *et al.* 2003. Efficacy of Gefitinib, an Inhibitor of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase, in Symptomatic Patients With Non-Small Cell Lung Cancer: A Randomized Trial. *JAMA*. Vol.290. Page(s):2149-2158.
- Lynch, TJ., Bell, DW., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, RA., Brannigan, BW., Harris, PL., Haserlat, SM., Supko, JG., Haluska, FG., *et al.* 2004. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med*. Vol.350. Page(s):2129-219.
- Mitsudomi, T., and Yatabe, Y. 2007. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci*. Vol.98. Page(s): 1817-24.
- Mok, TS., Wu, Y., Thongprasert, S., Yang, C., Chu, D., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., *et al.* 2009. Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N Engl J Med*, NEJMoa0810699.

- Murray, S., Dahabreh, IJ., Linardou, H., Manoloukos, M., Bafaloukos, D., and Kosmidis, P. 2008. Somatic mutations of the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor and tyrosine kinase inhibitor response to TKIs in non-small cell lung cancer: an analytical database. *J Thorac Oncol.* Vol.3. Page(s):832-839.
- Okami, J., Taniguchi, K., Higashiyama, M., Maeda, J., Oda, K., Orita, N., Koizumi, K., Kodama, K., and Kato, K. 2007. Prognostic factors for gefitinib-treated postoperative recurrence in non-small cell lung cancer. *Oncology.* Vol.72. Page(s): 234-242.
- Paez, JG., Janne, PA., Lee, JC., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, FJ., Lindeman, N., Boggon, TJ., *et al.* 2004. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science.* Vol.304. Page(s):1497-1500.
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., *et al.* 2004. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol.101. Page(s): 13306-13311.
- Reiter, JL., Threadgill, DW., Eley, GD., Strunk, KE., Danielsen, AJ., Colleen Schehl Sinclair, Pearsall, RS., Green, PJ., Yee, D., Lampland, AL., *et al.* 2001. Comparative Genomic Sequence Analysis and Isolation of Human and Mouse Alternative EGFR Transcripts Encoding Truncated Receptor Isoforms. *Genomics.* Vol.71. Page(s):1-20.
- Sakurada, A., Shepherd, F., and Tsao, M. 2006. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer: Impact of Primary or Secondary Mutations. *Clinical Lung Cancer.* Vol.7. Page(s):S138-S144.
- Sharma, SV., and Settleman, J. 2009. ErbBs in lung cancer. *Experimental Cell Research.* Vol.315. Page(s): 557-571.
- Shepherd, FA., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, EH., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., *et al.* 2005. Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* Vol.353. Page(s): 123-132.
- Shi, S., Datar, R., Liu, C., Wu, L., Zhang, Z., Cote, R. J., and Taylor, C. R. 2004. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochemistry and Cell Biology.* Vol.122. Page(s): 211-218.
- Shigematsu, H., Lin, L., Takahashi, T., Nomura, M., Suzuki, M., Wistuba, I. I., Fong, K. M., Lee, H., Toyooka, S., Shimizu, N., *et al.* 2005. Clinical and Biological Features Associated With Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* Vol.97. Page(s):339-346.
- Sriuranpong, V., Chanturanuwat, C., Huapai, N., Chalermchai, T., Leungtaweewoon, K., Lertsanguansinchai, P., Voravud, N., and Mutirangura, A. 2006. High frequency of mutation of epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinoma in Thailand. *Cancer Letters.* Vol.239. Page(s):292-297.

- Toschi, L., and Cappuzzo, F. 2007. Understanding the New Genetics of Responsiveness to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *Oncologist*. Vol.12. Page(s):211-220.
- Wiwanitkit, V. 2006. Squamous Cell Carcinoma of the Lung: Pattern of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Distribution in Different Populations: A Summary. *Lung*. Vol.184. Page(s):301-302.
- Yamamoto, H., Toyooka, S., and Mitsudomi, T. 2009. Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. Vol.63. Page(s): 315-321.