การศึกษาความถี่ของ Missing KIR ligand ในคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวและ KIR genotype ในผู้บริจาคพี่น้องของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

The Frequencies of Patient Lack HLA-Ligand and Donor KIR Genotypes for Hematological Malignancies Treatment in King Chulalongkorn Memorial Hospital.

ศรีประไพ ขนุนทอง (Sriprapai Khanuntong)* ภาวิณี คุปตวินทุ (Pawinee Kupatawintu)**
ดร.ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์ (Dr.Nattiya Hirankarn)***

บทคัดย่อ

โมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของเอนเคเซลล์ ซึ่งโมเลกุลที่จับจำเพาะกับโมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์ส่วนใหญ่คือโมเลกุลชนิดเอชเอลเอบนเนื้อเยื่อ โดยมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเซลล์มะเร็ง ซึ่งเซลล์มะเร็งจะไม่มีหรือการแสดงออกน้อยของโมเลกุลชนิดเอชเอลเอค ทำให้ไม่มีการจับกันเรียกว่าการขาดโมเลกุลจับจำเพาะกับโมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์ ส่งผลให้ผลรวมของสัญญาณในเอนเคเซลล์เป็นสัญญาณกระตุ้น ให้เอนเคเซลล์ทำลายเซลล์มะเร็งได้ จากการตรวจหาโมเลกุลชนิดเอชเอลเอบนเนื้อเยื่อและโมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์บนเม็ดเลือดขาว ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวจำนวน 52 รายที่ได้รับบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคพี่น้องที่มีโมเลกุลชนิดเอชเอลเอบนเนื้อเยื่อตรงกัน พบว่าคนไข้ส่วนใหญ่ไม่มีโมเลกุลชนิดเอชเอลเอจับจำเพาะกับโมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์ของผู้บริจาคพี่น้องจำนวน 90.4% โดยแบ่งตามชนิดการขาดโมเลกุลจับจำเพาะกับโมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์ พบว่า คนไข้ที่มีการขาดโมเลกุลจับจำเพาะกับโมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์ชนิดเอชเอลเอซีกลุ่ม2 มี 61.5%, คนไข้ที่มีการขาดโมเลกุลจับจำเพาะกับโมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์ชนิดเอชเอลเอเอสิบเอ็ด 51.9% และคนไข้ที่มีการขาดโมเลกุลจับจำเพาะกับโมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์ชนิดเอชเอลเอบีดับบิวสี่ 44.2% ในขณะที่ไม่มีคนไข้ที่ขาดโมเลกุลจับจำเพาะกับโมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์ชนิดเอชเอลเอซีกลุ่ม1เลย จากข้อมูลข้างต้นสามารถนำไปใช้พัฒนาความรู้เพื่อการรักษาคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในอนาคตได้

ABSTRACT

Killer cell Immunoglobulin-like receptors (KIRs) is important in the regulation of NK cell activity. The ligand for majority of KIR is HLA class I. The lack of HLA ligand for KIR receptor as known as missing KIR ligand involve elimination of malignant cell through a graft-versus leukemia(GVL). We investigate 52 patients and their HLA-identical sibling donors in King Chulalongkorn Memorial hospital. The KIR genes and HLA ligand were typed by polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO). The results show the high lack HLA ligand in patients (90.4%) interact with donor KIR receptor. The most frequencies of specific lack HLA ligand were HLA-C group2 (61.5%), HLA-A11 (51.9%) and HLA-Bw4 (44.2%) while the lack of HLA-C1 was no frequent. These data of HLA ligands, donor KIR genotypes and high lack of HLA ligand in patients with hematological malignancies might be benefit to further studies in stem cell transplant for hematological malignancies treatment.

คำสำคัญ : โมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์ โมเลกุลชนิดเอชเอลเอบนเนื้อเยื่อ การขาดโมเลกุลจับจำเพาะกับโมเลกุลรับสัญญาณชนิดเกียร์

Key Words : Killer cell Immunoglobulin-like receptors (KIRs), HLA ligand, Missing KIR ligand

** นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*
*** หัวหน้าฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย*
**** ศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

บทนำ

Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) เป็น receptor ชนิดหนึ่งบนผิวเซลล์ของ NK cell ซึ่ง ligand ของ KIR ก็คือ HLA class I เป็นการจับกันแบบจำเพาะเพื่อส่งสัญญาณยับยั้งการกำจัดเซลล์ตนเองของ NK cell ซึ่งสามารถบอกความจำเพาะได้ชัดเจนในบาง inhibitory KIR receptor โดยจัดกลุ่มตาม HLA-C allele ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่80 เป็น asparagine จะจัดอยู่ในกลุ่ม HLA-C1 group ได้แก่ HLA-Cw1, HLA-Cw3, HLA-Cw7, HLA-Cw8, HLA-Cw12, HLA-Cw13, HLA-Cw14 และ HLA-C*16:01 จับกับ inhibitor KIR Receptor คือ KIR2DL2, KIR2DL3 แต่หากกรดอะมิโนตำแหน่งที่80 เป็น lysine จะจัดในกลุ่ม HLA-C2 group ได้แก่ HLA-Cw2, HLA-Cw4, HLA-Cw5, HLA-Cw6, HLA-Cw15, HLA-C*16:02, HLA-Cw17 และ HLA-Cw18 จับกับ inhibitor KIR receptor คือ KIR2DL1 (Dupont et al.,2004) ส่วน inhibitory KIR receptor ที่จำเพาะกับ Bw4 คือ KIR3DL1 (Foley et al., 2008) สำหรับ HLA-A3 และ HLA-A11 มีความจำเพาะกับ KIR3DL2 (Dupont et al.,2004) นอกจากนี้ยังมี activating KIR ที่ยังมีการศึกษาอยู่น้อย เนื่องจากการจับกันระหว่าง activating KIR และ ligand ไม่คงที่ มี affinity ต่ำ (Fisher et al.,2012) การเรียกชื่อของ KIR จะเรียกตามจำนวนของ extracellular domain ประกอบด้วย 2 หรือ 3 domain และความยาวของ cytoplasmic domain ซึ่งแบ่งเป็น สายสั้น (short cytoplasmic domain) กับ สายยาว (long cytoplasmic domain) เช่น KIR2DL1 หมายถึง 2D คือ มี 2 extracellular domain ส่วน L1 คือ long cytoplasmic domain ที่ค้นพบเป็นลำดับที่ 1 (Bashirova et al.,2006) การควบคุมการทำงานของ NK cell ด้วยผลสัญญาณรวมของ 2 สัญญาณ คือ inhibitory signal และ activating signal (Ljunggren et al.,1990) ขึ้นอยู่กับชนิดของ NK receptor ถ้าเป็นการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มี MHC Class I น้อยหรือไม่มีการแสดงออกให้มาจับกับ inhibitory KIR receptor ทำให้ NK cell ถูกกระตุ้นให้ทำงานเพื่อกำจัดเซลล์ดังกล่าว การเกิด NK alloreactivity (Ruggeri et al.,2002) ระหว่างคนไข้และผู้บริจาคนั้น ให้พิจารณาว่า inhibitory KIR receptor ในผู้บริจาคมี missing กับ HLA ligand ในคนไข้ ซึ่งแสดงถึง graft-versus leukemia (GVL) หรือการที่ผู้รับไม่มี ligand จับกับ KIR receptor จึงทำให้เกิด NK alloreactivity ไปทำลายเซลล์เป้าหมายของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว

จากประโยชน์ของ การที่คนไข้ไม่มี ligand จับกับ inhibitory KIR receptor จึงทำให้เกิด NK alloreactivity ไปทำลายเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาหาความถี่ของHLA ligand, Killer cell Immunoglobulin-like receptors (KIRs) และ Missing KIR ligand ในคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวหลังจากการได้รับบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคพี่น้องที่มี HLA ตรงกัน ซึ่งอาจจะนำไปสู่การพัฒนาความรู้เพื่อรักษาคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.เพื่อศึกษาความถี่ของ HLA ligand ในคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาว, inhibitory KIR receptor และ Activating KIRในผู้บริจาคพี่น้อง

2.เพื่อศึกษาความถี่ของ missing KIR ligand ในคนไข้มะเร็งเม็งเลือดขาวที่ได้รับบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคพี่น้องที่มี HLA ตรงกัน

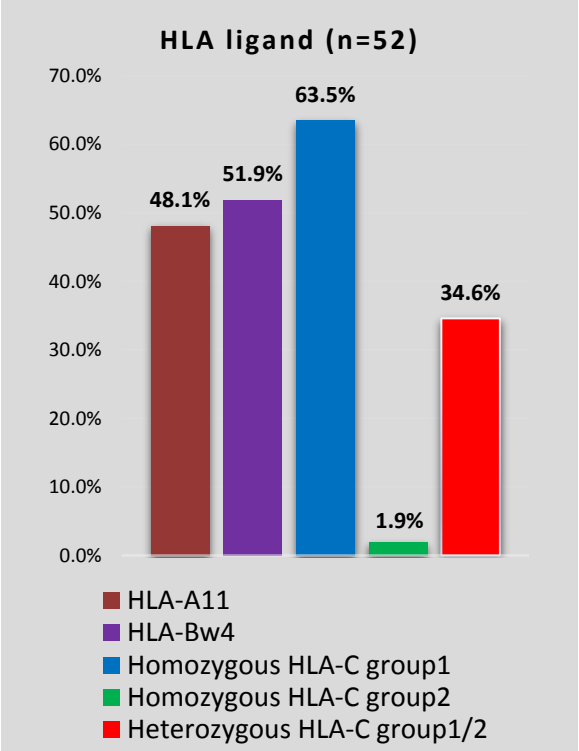
วิธีการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีผลทางคลินิกและได้รับการบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มี HLA identical matched ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2549 ถึง กรกฎาคม พ.ศ. 2556 จำนวน 52 ราย และมีผล HLA-

A,-B,-DR,-DQ อยู่แล้ว นำมาตรวจหา HLA-C เพิ่มเติม โดยใช้สารพันธุกรรม (DNA)ก่อนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตมาตรวจหา HLA-C ด้วยเทคนิค PCR-SSO (LABType, One Lambda Inc., California, USA) และผู้บริจาคพี่น้องที่เคยบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตให้กับคนไข้จำนวน 52 ราย มาตรวจหา KIR receptor บน NK cell ด้วยเทคนิค PCR-SSO (LABType, One Lambda Inc., California, USA) ทั้งคนไข้และผู้บริจาคจะใช้ PCR reaction ในการตรวจแต่ละราย รายละ 20 ul ประกอบด้วย สารพันธุกรรม (DNA) 0.2 ug, สารละลาย master mix buffer 13.8 ul, Taq DNA polymerase จำนวน 1 U (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega, USA) และ สารผสม primer 4 ul จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA) ด้วยเครื่อง thermalcycler (Gene Amp PCR System 9600, Applied Biosystems, California, USA) ภายใต้อุณหภูมิและเวลาดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 96^0C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2 กำหนดให้ทำ PCR ซ้ำจำนวน 5 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 96^0C นาน 20 วินาที, 60^0C นาน 20 วินาที, 72^0C นาน 20 วินาที ขั้นตอนที่ 3 กำหนดให้ทำ PCR ซ้ำจำนวน 30 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 96^0C นาน 10 นาที, 60^0C นาน 15 วินาที, 72^0C นาน 20 วินาที และ ขั้นตอนที่ 4 ใช้อุณหภูมิ 72^0C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นสามารถเก็บรักษา PCR product ที่ 4^0C จนกว่าจะทำการตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นด้วย gel electrophoresis ส่วนขั้นตอนถัดจากนี้คือ hybridization ซึ่งจะเริ่มจากการแยกสาย DNAให้เป็นสายเดี่ยวด้วยสารเคมีและนำไปผสมกับ oligonucleotide probes ที่จับกับสารเรืองแสงบน microsphere bead หลังจากนั้นทำการล้าง probe ที่ไม่ได้จับกับ PCR product ออก แล้วทำการวัดความเข้มของสารเรืองแสงที่จับบน probe และ gene ที่สนใจด้วยเครื่อง flow analyzer LABScan™ 100 (One Lambda Inc., California, USA) แล้วนำผลการตรวจทั้งหมดมาวิเคราะห์หาความถี่ของ HLA ligand, Killer cell Immunoglobulin-like receptors (KIRs) และ Missing KIR ligand

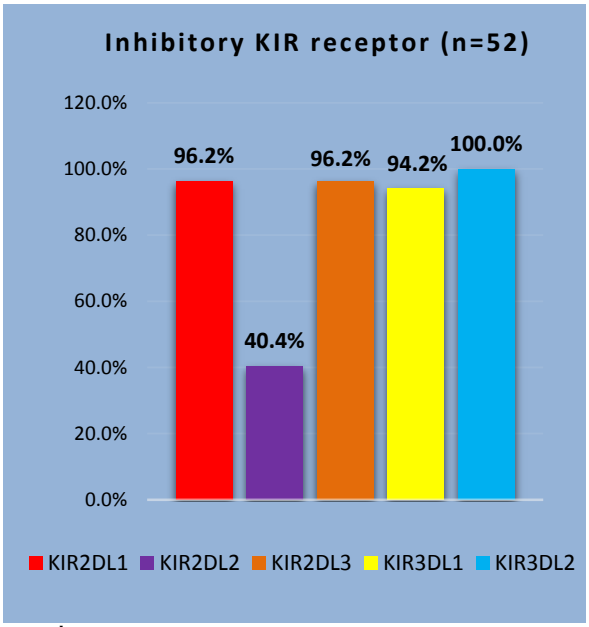
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการศึกษา HLA gene ในคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาว 52 รายประกอบด้วย HLA-A11 มี 25 ราย (48.1%), HLA-Bw4 มี 27 ราย (51.9%), HLA-C กลุ่ม 1 มี 33 ราย (63.5%), HLA-C กลุ่ม 2 มี 1 ราย (1.9%) และ heterozygous HLA-C กลุ่ม1 และ กลุ่ม2 มี 18 ราย (34.6%) แสดงกราฟแท่งเปรียบเทียบตามภาพที่ 1



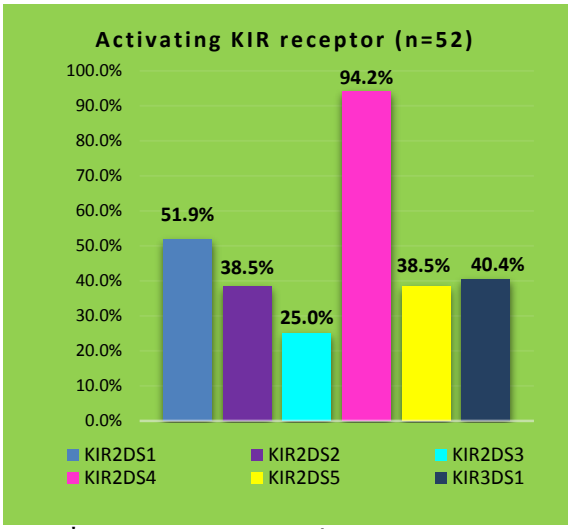
ภาพที่ 1 กราฟแท่งแสดงความถี่ของ HLA ligand ในคนไข้ 52 ราย

การตรวจหา KIR genotype ในผู้บริจาคพี่น้องแบ่งเป็น inhibitory KIR gene ที่พบในผู้บริจาคพี่น้องทุกคนคือ KIR3DL2 รองลงมาคือ KIR2DL1 และ KIR2DL3 ในผู้บริจาค 50 ราย (96.2%), KIR3DL1 ในผู้บริจาค 49 ราย(94.2%) และ KIR2DL2ในผู้บริจาค 21 ราย (40.4%) แสดงกราฟแท่งเปรียบเทียบตามภาพที่ 2



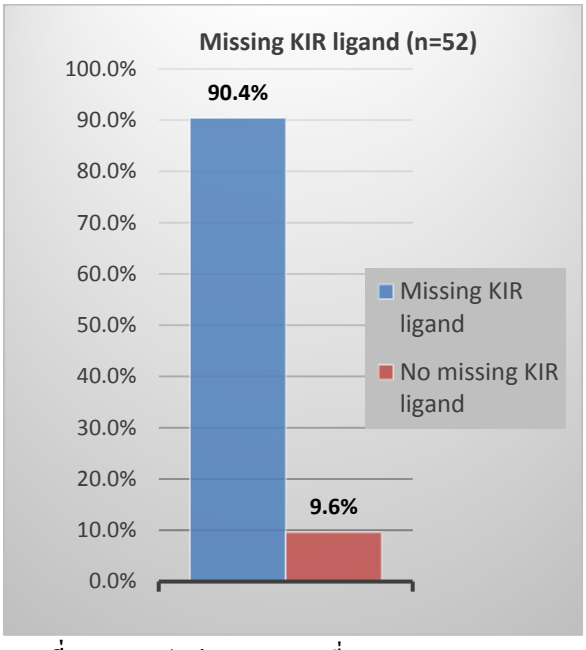
ภาพที่ 2 กราฟแท่งแสดงความถี่ของ inhibitory KIR receptor ในผู้บริจาคพี่น้อง 52 ราย

ส่วน activating KIR ที่พบผู้บริจาคพี่น้องมากกว่า 50% ได้แก่ KIR2DS4 มี 49 ราย (94.2%) และ KIR2DS1 มี 27 ราย (51.9%) รองลงมาที่เหลือจะเป็น KIR3DS1 มี 21 ราย(40.4%), KIR2DS2 มี 20 ราย (38.5%) และ KIR2DS5 มี 20 ราย (38.5%) พบน้อยที่สุดคือ KIR2DS3 มี 13 ราย (25%) แสดงกราฟแท่งเปรียบเทียบตามภาพที่ 3

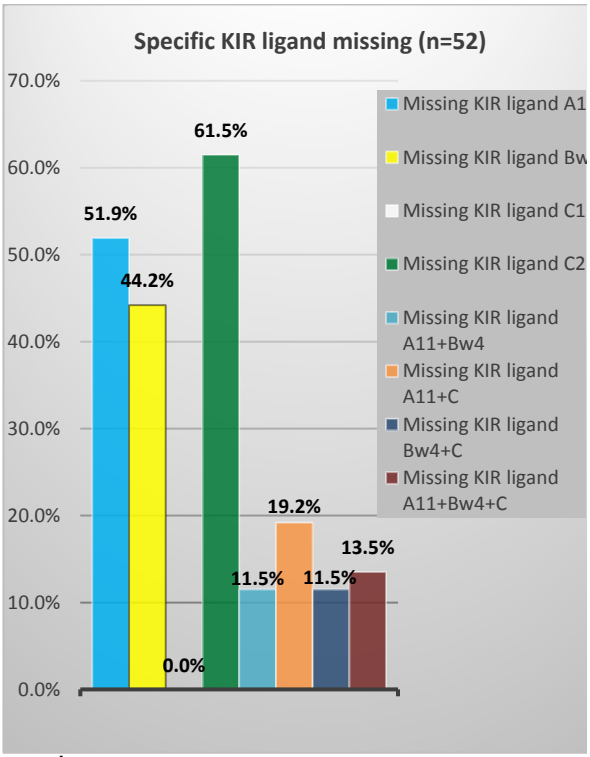


ภาพที่ 3 กราฟแท่งแสดงความถี่ของ activating KIR receptor ในผู้บริจาคพี่น้อง 52 ราย

การศึกษา Missing KIR ligand ที่ผู้รับไม่มี ligand จับกับ KIR receptor พบว่า 90.4% ของคนไข้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตด้วย Missing KIR ligand ดังที่แสดงกราฟแท่งภาพที่4 นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งชนิดตามความจำเพาะ HLA ligand ที่ไม่มีในคนไข้สำหรับจับกับ KIR receptor ในผู้บริจาคที่มีมากกว่า 50% คือ Missing KIR ligand ของ HLA-C กลุ่ม 1 มี 32 ราย (61.5 %), Missing KIR ligand ของ HLA-A11 มี 27 ราย (51.9%) และพบคนไข้ที่มี Missing KIR ligand น้อยกว่า 50% คือ Missing KIR ligand ของ HLA-Bw4 มี 23 ราย (44.2%) คนไข้จำนวนน้อยกว่า 20% ที่มี Missing KIR ligand ของ HLA-A11 ร่วมกับ HLA-C มี 10 ราย (19.2%), Missing KIR ligand ของ HLA-A11 ร่วมกับ HLA-Bw4 มี 6 ราย (11.5%), Missing KIR ligand ของ HLA-Bw4ร่วมกับ HLA-C มี 6 ราย (11.5%) และ Missing KIR ligand ของ HLA-A11 , Bw4 และ C มี 7 ราย (13.5%) ดังที่แสดงกราฟแท่งภาพที่ 5



ภาพที่ 4 กราฟแท่งแสดงความถี่ของ Missing KIR ligand ในคนไข้ 52 ราย



ภาพที่ 5 กราฟแท่งแสดงความถี่ของ Specific missing KIR ligand ในคนไข้ 52 ราย

สรุปผลการวิจัย

จากข้อมูลความถี่ของ HLA ligand, Killer cell Immunoglobulin-like receptors (KIRs) และ Missing KIR ligand พบว่าคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวจำนวนมากมี Missing KIR ligand ซึ่งข้อมูลดังกล่าวอาจจะนำไปสู่ความรู้ที่สำคัญที่จะมาต่อยอดในการพัฒนาเพื่อประโยชน์ในรักษาคนไข้มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตต่อไป เช่นการพิจารณาคัดเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสม การนำผลไปพยากรณ์ผลทางคลินิกของคนไข้หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต การพิจารณา NK alloreactivity ระหว่างผู้บริจาคและผู้ป่วย หรือหาความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคบางชนิด

เอกสารอ้างอิง

Bashirova, A.A., Martin, M.P., McVicar, D.W., Carrington, M. 2006 . The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense. *Annual review of genomics and human genetics* 7, 277-300.

Dupont, B. & Hsu, K.C. 2004. Inhibitory killer Ig-like receptor genes and human leukocyte antigen class I ligands in haematopoietic stem cell transplantation. *Current opinion in immunology* 16, 634-43.

Foley, B.A. *et al.* 2008 . The reactivity of Bw4+ HLA-B and HLA-A alleles with KIR3DL1: implications for patient and donor suitability for haploidentical stem cell transplantations. *Blood* 112, 435-43 .

Fischer, J.C. , Uhrberg, M. 2012 . Prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *The New England journal of medicine* 367, 2054-5; author reply 2055.

Ljunggren, H.G., Karre, K. 1990 . In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today* 11, 237-44.

Ruggeri, L. *et al.* 2002 . Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097-100.