บทบรรณาธิการ

Acute Promyelocytic Leukemia: A Targeted Approach

จิรายุ เอื้อวรากุล

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

Acute promyelocytic leukemia (APL) เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดที่พบได้ไม่บ่อย โดยมีอุบัติการณ์คิดเป็นร้อยละ 10 ของมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute myeloid leukemia (AML) ทั้งหมด[1] ลักษณะจำเพาะของ APL คือการที่ไขกระดูกและเลือดมีเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อนชนิด promyelocytes เพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างผิดปกติ การตรวจโครโมโซมของเซลล์มะเร็งพบความผิดปกติของโครโมโซมคู่ที่ 15 และ 17[2] การเกิดภาวะผิดปกติอย่างรุนแรงของระบบการแข็งตัวของเลือด (life-threatening coagulopathy) และความสามารถของเซลล์มะเร็งในการตอบสนองอย่างดีต่อการรักษาด้วยยา all-trans retinoic acid (ATRA) และ arsenic trioxide[3]

Leif Hillestad เป็นคนแรกที่รายงาน clinical syndrome ของ APL ในปี 1957 โดยเป็นผู้ป่วยชาวสวีเดน 3 รายที่มีอาการหนักและเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว การตรวจเลือดพบ promyelocytes จำนวนมาก ร่วมกับมีภาวะเลือดออกอย่างรุนแรง จาก fibrinolysis และ thrombocytopenia[4] ในปี 1977 Rowley และคณะจากประเทศสหรัฐอเมริกาได้ค้นพบความผิดปกติระดับโครโมโซมเป็นครั้งแรกที่จำเพาะต่อ APL ได้แก่ t(15;17) ซึ่งเป็น balanced reciprocal chromosomal translocation[2] ซึ่งต่อมาในช่วงทศวรรษ 1990 พบว่า reciprocal translocation นี้ทำให้เกิดการเชื่อมต่อของยีน retinoic acid receptor-α (RARA) บน โครโมโซมคู่ที่ 17 และยีน promyelocytic leukaemia (PML) บนโครโมโซมคู่ที่ 15[5] หลังจากนั้นก็มีการค้นพบ reciprocal translocation อีกหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับยีน RARA ใน APL แสดงให้เห็นว่า ความผิดปกติของ RARA มีความสำคัญอย่างยิ่งในกลไกการเกิดโรค APL

Retinoic acid และ RAR/RXR[2,6]

Retinoic acid (RA) เป็น active vitamin A metabolite ที่มีความสำคัญต่อ cell development, differentiation และ homeostasis โดยออกฤทธิ์ผ่านการจับกับ specific nuclear receptor ที่ควบคุม gene transcription การทดลองในหนูที่ทำให้ขาดวิตามิน A พบว่ามี expansion ของ myeloid cells ในไขกระดูก ม้ามและเลือด ซึ่งอาจเกิดจากความผิดปกติของ spontaneous apoptosis ของ terminally differentiated granulocytes

Nuclear receptor ของ retinoic acid มีสองประเภท ได้แก่ Retinoic acid receptors (RARs) (α, β, γ) และ Retinoid X receptors (RXRs) (α, β, γ) ที่สามารถนำสัญญาณ โดย RARA เป็น ligand-dependent transcription factor ที่ถูกกระตุ้นด้วย ATRA ในขณะที่ RXR ตอบสนองต่อทั้ง ATRA หรือ 9-cis retinoic acid

Retinoic acid receptor จะอยู่ในรูป RAR/RXR heterodimers หรือ RXR homodimers ก็ได้ โดยมี DNA motifs เรียกว่า RA-response elements (RAREs) ซึ่งจะกระตุ้น transcription ของ RA target genes RXR ยังทำหน้าที่เป็น partner กับ nuclear receptor อื่นๆ เช่น thyroid hormone และ vitamin D3 แต่ใช้ signalling pathway ที่แตกต่างออกไป

RARs และ RXRs กระตุ้นหรือยับยั้ง gene transcription โดยผ่านการเกณฑ์ multiprotein co-activator หรือ co-repressor complexes ที่มี histone acetyltransferase (HAT) หรือ histone deacetylase (HDAC) activity RARA จะจับกับ co-repressor molecule ในสภาวะที่ไม่มี ligand แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วย ATRA จะเปลี่ยนจาก repressor ไปเป็น activator ของ gene transcription โดยการกระตุ้นให้มี conformational change ในตัว receptor เพื่อปล่อย co-repressor และดึง co-activator เข้ามาแทน ดังนั้น ถ้าไม่มี retinoic acid RARA จะเป็นตัวยับยั้งการแสดงออกของยีน (repressor of transcription) ในขณะที่ถ้ามี retinoic acid RARA จะกลายเป็น potent activator ของ transcription การแสดงออกที่มากเกินไปของ RARA หรือ truncated forms ของ RARA จะทำตัวเป็น dominant-negative receptor ซึ่งขัดขวาง granulocytic differentiation ที่ระยะ promyelocyte

ยีน PML และ PML-RARA[7,8]

ยีน PML อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 15 ประกอบด้วย 9 exon และครอบคลุม 35 กิโลเบสของ genomic DNA การมี alternative splicing ของ C-terminal exons ของยีน PML สามารถทำให้เกิด isoform ได้ถึง 20 ชนิด

ยีน PML สร้าง nuclear-matrix protein ที่ทำหน้าที่จัดระบบโครงสร้างของ PML nuclear bodies โดยสามารถจับกันเป็น homomultimers ลักษณะที่สำคัญของ PML คือการที่มีการรวมเป็นกลุ่มก้อน (speckled localization) ในลักษณะ discrete nucleardomains ที่เรียกว่า PODs (PML oncogenicdomains), ND10 (nuclear domain-10) หรือ nuclear bodies (NB) โดย NB จะเกี่ยวข้องกับการเดินทางของโมเลกุลต่างๆ และโครงสร้างของโครมาตินในนิวเคลียส[7]

PML จะถูกย้ายที่จาก NB กลายเป็น microspeckled nuclear pattern ในเซลล์มะเร็งที่มี t(15;17) และสามารถกลับมาเป็นปกติได้หลังการรักษาด้วยยา ATRA แสดงให้เห็นว่าการรบกวนการทำงานของ NB มีความสำคัญในกลไกการเกิด APL

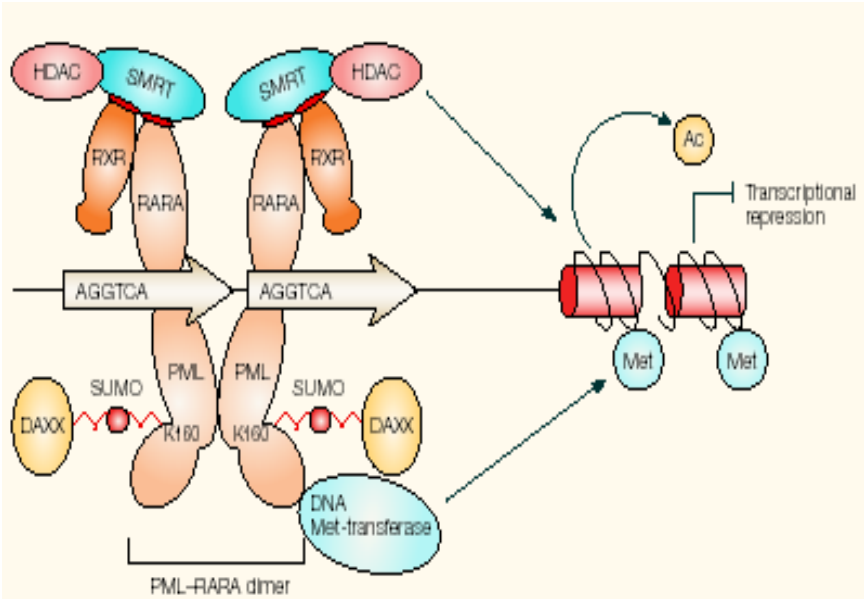
นอกจากนี้ การศึกษาใหม่ๆ ยังพบว่า ยีน PML เกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมให้เกิด apoptosis หรือ senescence โดยผ่านการปฏิสัมพันธ์กับ p53 tumor suppressor gene เซลล์จากหนูที่มี inactivated PML gene จะมี reduced apoptosis และเกิด chemically induced tumours ได้ง่ายขึ้น[9]

Transcription Repression โดย PML-RARA[9-10]

นอกจาก PML-RARA จะทำให้ intranuclear distribution ของ PML และ nuclear-body-associated proteins มีการเปลี่ยนแปลง แล้ว PML-RARA ยังเป็น potent transcriptional repressor ที่แรงกว่า RARA เนื่องจาก PML-RARA มี affinity ที่สูงกว่า RARA ต่อ SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) co-repressor และ PML-RARA ยังเป็น gain-of-function transcription factor ที่มี extended spectrum ของ DNA-binding site

ดังแสดงในรูปที่ 1 PML และ RARA จะ homodimerize และรวมเป็น complex กับ RXR nuclear receptor หลังจากนั้นจะจับกับ AGGTCA DNA sequences และดึง transcriptional co-repressor SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) เข้ามา นอกจากนี้ PML-RARA complex ยังเกณฑ์ให้ histone deacetylases (HDAC) and DNA methyltransferases ที่สามารถดัดแปลง histones และ DNA เข้ามาด้วยเพื่อยับยั้ง transcription ความผิดปกติของ PML ที่ถูกปรับเปลี่ยนที่ตำแหน่ง K160 ทำให้สามารถเรียกให้ transcriptional repressor อื่นๆ เช่น DAXX (death-associated protein 6) เข้ามาอีกด้วย โดยที่ complex ทั้งหมดสามารถยับยั้ง myeloid differentiation และทำให้เกิด APL[9]

นอกจากนี้ PML-RARA ยังมีฤทธิ์ anti-apoptotic



รูปที่ 1 Model of transcriptional repression by PML-RARA9

ชัดเจน และสามารถขัดขวาง p53-dependent apoptosis ซึ่งทำให้เกิด leukaemia initiation หรือ progression[10]

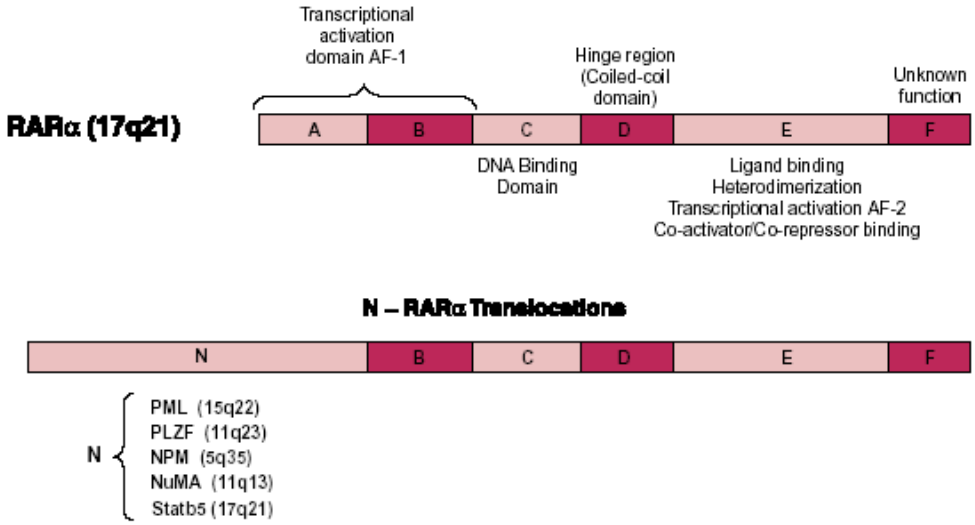
Translocation Partners ของ RARA[2]

ยีนที่พบว่ามาจับคู่กับยีน RARA โดยเป็นผลจาก chromosomal translocation มีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่

1. ยีน PML บน chromosome 15q22 (พบได้ 99%)
2. ยีน promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) บน chromosome 11q23 ซึ่งเป็น DNA-binding transcriptional repressor ในกลุ่ม BCL6 family (พบได้ 0.8%)
3. ยีน nucleophosmin (NPM) on chromosome5q35 (พบได้ <0.01%)
4. ยีน nuclear mitotic apparatus (NuMA) on chromosome11q13 (พบได้ <0.01%)
5. ยีน Stat5b on chromosome 17q11 (พบได้ <0.01%)

การเชื่อมต่อของยีน RARA กับยีนใดที่กล่าวมาข้างต้น (X) จะทำให้เกิด X-RARA และ RARA-X fusion gene ที่มีการแสดงออกใน leukaemic blasts ในทุก N-RARA fusion protein จะยังคง DNA และ ligand-binding domain จาก RARA gene (B through F regions) ส่วน N-terminal moieties จะได้จาก fusionpartner ซึ่งจะมีส่วนเพิ่มมาคือ dimerization motifs ดังรูปที่ 2

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ในการเชื่อมต่อของยีน PML หรือยีนอื่นๆ ที่กล่าวข้างต้น กับยีน RARA นั้น ส่วนที่คงที่ไม่ว่าจะเป็นผู้ป่วย APL คนใด คือส่วนของ RARA (B-F) ดังรูปที่ 2 ซึ่งมี nuclear receptor DNA and ligand-binding domains ในขณะที่ N-terminal sequence จะมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับตำแหน่งของ translocation breakpoint ภายใน fusion partner และ alternative exon splicing ในกรณีของยีน PML พบว่าตำแหน่งของ breakpoint cluster มี 3 แบบ ได้แก่ 1) ภายใน intron 3 (bcr3 or short form), 2) exon 6 (bcr2 or variable form) และ 3) intron 6 (bcr1 or long form) โดยกลไกในการเกิด t(15;17) translocation และการกำหนดตำแหน่งของ break-point ยังไม่ทราบแน่ชัด



รูปที่ 2 The PML-RARA fusion gene product[2]

ตารางที่ 1 เทคนิคในการตรวจวินิจฉัย APL[11]

ระดับการตรวจ	วิธีที่ใช้ตรวจ	เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)	ข้อดี
Chromosome	Karyotyping	16-48	Highly specific
	FISH	6-24	No need for dividing cells
DNA	Southern Blotting	>96	Highly specific
RNA	RT-PCR	4-8	Rapid, highly sensitive
Nucleus	Immunochemistry	2-3	Rapid, simple, low cost
	Immunofluorescence		

Genetic Diagnosis ของ APL[5,11]

การวินิจฉัย APL นอกจากจะอาศัยอาการทางคลินิกและการตรวจเลือดพบว่ามี promyelocyte จำนวนมากผิดปกติแล้ว การตรวจระดับโครโมโซมและยีนก็ถือว่ามีความสำคัญในด้านการวินิจฉัยและติดตามผลการรักษา ดังตารางที่ 1 การตรวจโครโมโซมโดยวิธี banding ถือเป็นมาตรฐานในการค้นหา t(15;17) และมีความจำเพาะสูงมาก แต่ต้องใช้เวลานานประมาณ 3 วันกว่าจะทราบผล และในบางครั้งถ้าเซลล์ไม่แบ่งตัว อาจตรวจไม่พบความผิดปกติได้ ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH) เข้าช่วย ซึ่งจะได้ผลค่อนข้างเร็ว สำหรับการตรวจหายีน PML-RARA มีได้หลายวิธี เช่น การตรวจระดับ DNA โดย Southern Blottingจะค่อนข้างช้า ตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป ทำให้ไม่นิยมใช้ การตรวจ RNA โดย reverse transcriptase -polymerasechain reaction (RT-PCR) สามารถได้ผลภายในไม่กี่ชั่วโมง และเหมาะในการใช้ติดตามผลหลังการรักษาเมื่อมีเซลล์มะเร็งจำนวนไม่มาก แต่ข้อด้อยคือ ในกรณีที่ได้ specimen ที่คุณภาพไม่ดี อาจไม่ได้ RNA ที่ดี รวมทั้งอาจมีปัญหาผลบวกลวงจาก contamination ในห้องปฏิบัติการ ในต่างประเทศขณะนี้ เริ่มมีการใช้การย้อมดู microspeckled pattern ของ PML ด้วยวิธี im-

munohistochemistry หรือ immunofluorescence ซึ่งสามารถทำได้ในไม่กี่ชั่วโมง แต่จะไม่ทราบรายละเอียดว่าชนิดของยีนเป็นอย่างไร และบางครั้งมีปัญหาจาก artifact ในการย้อม ทำให้แปลผลผิดได้

แนวทางในการดูแลรักษาผู้ป่วย APL[11]

ระยะ Preinduction[11]

เมื่อสงสัยว่าผู้ป่วยเป็น APL จากอาการทางคลินิกและการตรวจดูสเมียร์เลือด ให้ถือว่าเป็นภาวะฉุกเฉินทางการแพทย์ (medical emergency) และให้รีบปรึกษาโลหิตแพทย์เพื่อเจาะไขกระดูก โดยจำเป็นต้องตรวจดูลักษณะเซลล์ โครโมโซมและยีนทุกราย เพื่อยืนยันความผิดปกติที่จำเพาะของ APL

ในขณะที่รอผลการตรวจ ให้เริ่มการรักษาประคับประคอง เพื่อแก้ไขความผิดปกติของระบบการแข็งตัวของเลือด โดยควรรีบให้พลาสมาแช่แข็ง (fresh frozen plasma) ไฟบริโนเจนและเกร็ดเลือดเพื่อให้ระดับไฟบริโนเจนมากกว่า 1.5 g/L และระดับเกร็ดเลือดสูงกว่า 30-50 $x10^9$/L ในขณะเดียวกันให้ผู้ป่วยเริ่มรับประทานยา ATRA ไปได้เลยโดยไม่ต้องรอผลโครโมโซมและยีน โดยให้ร่วมกับเคมีบำบัดเลยถ้าระดับเม็ดเลือดขาวเริ่มต้นสูงกว่า $10x10^9$/L

การให้ heparin, tranexamic acid และ antifibrinolytic therapy อื่นๆ ยังไม่มีหลักฐานสนับสนุนอย่างชัดเจนว่าได้ประโยชน์

ระยะ Induction[3]

ประกอบด้วย การให้ ATRA และ anthracycline-based chemotherapy

การให้ Preemptive therapy ด้วย dexamethasone ให้เริ่มทันทีที่สงสัยว่ามี Retinoic acid syndrome (RAS)

การให้ ATRA จะให้ไปเรื่อยๆ จนกว่าจะมี terminal differentiation ของ blasts และมี complete remission (CR) จะหยุดยาก็ต่อเมื่อมี severe RAS

ไม่แนะนำให้ตรวจไขกระดูกระหว่างให้ยา ATRA ในระยะ induction เนื่องจากอาจแปลผลผิดพลาดว่าไม่มี CR ควรเว้นช่วงหลังให้ยาไปแล้วไม่น้อยกว่า 50 วัน รวมทั้งไม่แนะนำให้ทำการตรวจโครโมโซมและยีนเมื่อสิ้นสุดการให้ induction chemotherapy ใหม่ๆ และไม่ควรเปลี่ยนแปลงแนวทางการรักษาถ้ายังตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซมหรือยีนในเลือดหรือไขกระดูก

ระยะ Consolidation

แนะนำให้ใช้ anthracycline-based chemotherapy 2-3 ครั้งเพื่อเป็น consolidation therapy

การตรวจระดับยีนมีประโยชน์ในด้านการวินิจฉัยครั้งแรก แต่ยังไม่แนะนำให้ใช้ติดตามว่ามี CR หรือไม่ หลังได้ induction therapy ทั้งนี้มีผู้แนะนำให้ตรวจหลังได้ consolidation ครบแล้ว โดยให้ใช้วิธี standard low-sensitivity RT-PCR และไม่จำเป็นต้องทำ quantitative PCR ที่มีความไวสูง[11]

หากหลังได้ consolidation แล้วยังพบ PML-RARA ในไขกระดูก 2 ครั้งติดต่อกัน อาจพิจารณาการรักษาที่แรงขึ้น เช่น การปลูกถ่ายไขกระดูก หรือการให้ยาตัวอื่นๆ เช่น anti-CD33 antibody หรือแม้กระทั่ง arsenic trioxide เป็นต้น แต่ในขณะนี้ยังไม่มีข้อสรุปชัดเจน

ระยะ Maintenance

การใช้ ATRA ทุก 3 เดือนร่วมกับ low-dose chemotherapy ได้แก่ 6-mercaptopurine และ methotrexate ถือเป็น standard maintenance therapy ในปัจจุบัน[3]

การติดตามการรักษาระยะ maintenance ด้วยการตรวจระดับยีนแนะนำให้ทำเฉพาะในกรณีที่ผู้ป่วยมีระดับ WBC count เมื่อแรกวินิจฉัยมากกว่า $10x10^9$/L

เอกสารอ้างอิง

1. *Gilliland DG, Tallman MS. Focus on acute leukemias. Cancer Cell 2002;1:417-20.*
2. *Sirulnik A, Melnick A, Zelent A, Licht JD. Molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia and APL variants. Best Practice & Research Clinical Haematology. 2003;16:387-408.*
3. *Tallman MS, Nabhan CH, Feusner JH, Rowe JM. Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. Blood 2002;99:759-67.*
4. *Degos L. The history of acute promyelocytic leukaemia. Br J Haematol 2003;122:539-53.*
5. *Jing Y. The PML-RARA fusion protein and targeted therapy for acute promyelocytic leukemia. Leuk Lymphoma 2004;45:639-48.*
6. *Fazi F, Travaglini L, Carotti D, et al. Retinoic acid targets DNA-methyltransferases and histone deacetylases during APL blast differentiation in vitro and in vivo. Oncogene 2005;24:1820-30.*
7. *Salomoni P, Pandolfi PP. The role of PML in tumor suppression. Cell 2002;108:165-70.*
8. *Le Beau MM, Bitts S, Davis EM, Kogan SC. Recurring chromosomal abnormalities in leukemia in PML-RARA transgenic mice parallel human acute promyelocytic leukemia. Blood 2002;99:2985-91.*
9. *Lallemand-breitenbach V, Zhu J, Kogan S, Chen Z, de th? H. How patients have benefited from mouse models of acute promyelocytic leukaemia. Nature Reviews Cancer 2005;5:821-7.*
10. *Kogan SC, Hong SH, Shultz DB, Privalsky ML, Bishop JM. Leukemia initiated by PML-RARA: the PML domain plays a critical role while retinoic acid-mediated transactivation is dispensable. Blood 2000; 95:1541-50.*
11. *Sanz MA, Tallman MS, Lo-Coco F. Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Blood 2005;15:3019-23.*