บทความฟื้นวิชา

การกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน

ณรงค์ฤทธิ์ ศรีธนะ[1] และ จิรายุ เอื้อวรากุล[1,2]

[1]ศูนย์วิจัยศึกษาและบำบัดโรคมะเร็ง สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์; [2]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ในปัจจุบันเชื่อว่ากลไกการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันประกอบไปด้วยขั้นตอนมากกว่า 1 ขั้นตอน หรือเรียกอีกอย่างว่า Multistep leukemogenesis โดยขั้นตอนแรกเป็นผลจากการเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างควบคุมไม่ได้ของเซลล์มะเร็ง (uncontrolled proliferation) โดยมียีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการรับสัญญาณที่ผิวเซลล์ (receptor) และภายในเซลล์เป็นกลไกควบคุมหลัก ส่วนขั้นตอนถัดไปเกิดจากความผิดปกติในการเจริญแก่ตัว (differentiation defect หรือ maturation arrest) ซึ่งสัมพันธ์กับยีนที่ทำหน้าที่เป็น transcription factor โดยมีรายงานวิจัยในหนูทดลองที่สนับสนุนสมมติฐานดังกล่าว[1]

ยีน *FLT3* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม Receptor tyrosine kinase (RTK) ซึ่งมีความสำคัญต่อกลไกการเกิดโรคมะเร็งระบบโลหิต[2] โดยตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนนี้ได้บ่อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีลอยด์ชนิดเฉียบพลัน (Acute myeloid leukemia, AML) บทความนี้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับยีนดังกล่าวตั้งแต่การค้นพบ โครงสร้างโมเลกุล ลักษณะการกลายพันธุ์ บทบาทที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งเม็ดเลือดขาว การพัฒนาเทคนิคในการตรวจหาความผิดปกติของยีน รวมถึงการพัฒนาสารยับยั้งการทำงานของยีนดังกล่าวแบบจำเพาะ เพื่อเป็นแนวทางในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีลอยด์ชนิดเฉียบพลันในประเทศไทยอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

ได้รับต้นฉบับ 2 เมษายน 2550 ให้ลงตีพิมพ์ 6 มิถุนายน 2550
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ รศ.ดร.พญ. จิรายุ เอื้อวรากุล สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ ตึกเฉลิมพระเกียรติชั้น 12 โรงพยาบาลศิริราช ถนนพรานนก แขวงอรุณอมรินทร์ เขตบางกอกน้อย กทม.10700 โทร. 02-419-4418 email: chirayuaue@hotmail.com

โครงสร้างโมเลกุลและหน้าที่ของ FLT3[28]

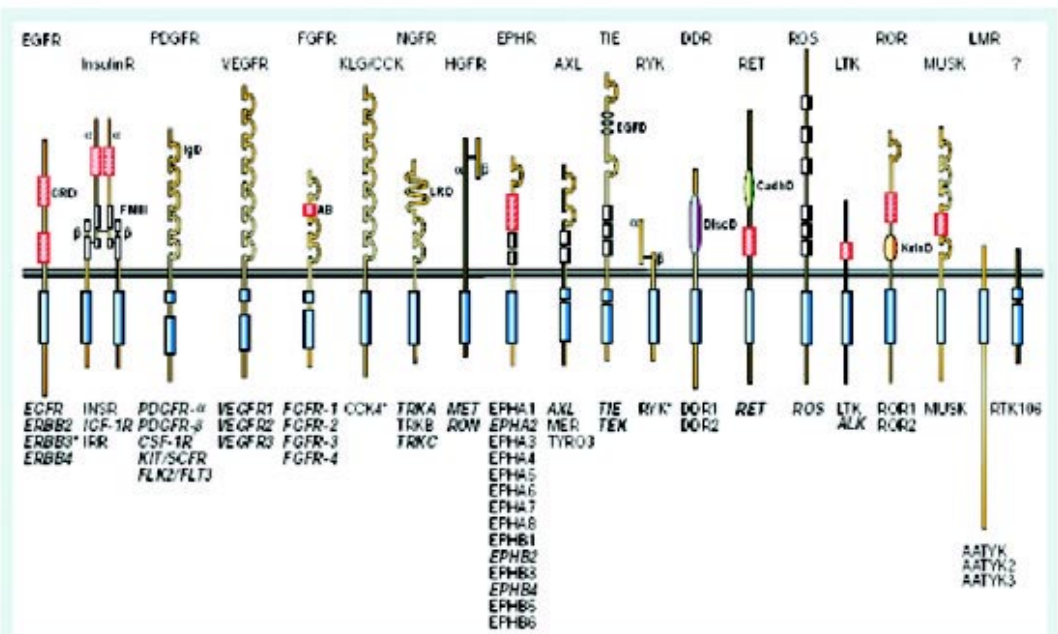
ในปี ค.ศ. 1991 มีการค้นพบ flt3 receptor ของหนูทดลองโดยทีมวิจัย 2 กลุ่มในประเทศฝรั่งเศสและสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1991 มีการค้นพบ flt3 receptor ของหนูทดลองโดยทีมวิจัย 2 กลุ่มในประเทศฝรั่งเศสและสหรัฐอเมริกา โดยกลุ่มแรกใช้ testis cDNA library และเทคนิค hybridization ด้วย probe ของยีน *c-fms*[3] ดังนั้นจึงตั้งชื่อยีนว่า *FMS*-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) ส่วนอีกกลุ่มใช้ cDNA library ของเซลล์ตับของตัวอ่อน (fetal liver) ในการวิจัย จึงให้ชื่อยีนที่พบว่า *fetal liver kinase 2* (*flk2*)[4] ต่อมาในปี ค.ศ. 1992 จึงมีการโคลนยีน FLT3 receptor ของคนได้สำเร็จ โดยพบว่า receptor ของคนที่ค้นพบนั้นมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับของหนูอยู่ประมาณร้อยละ 85 และตั้งชื่อยีนของคนที่ค้นพบว่า stem cell tyrosine kinase 1 (STK1) เนื่องจากใช้ CD34+ cDNA library ในการโคลน[5]

ยีน *FLT3* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 13 ตำแหน่ง q12 ประกอบด้วย 24 เอ็กซอน[6] โดยยีน *FLT3* จะแปลรหัสออกมาเป็น receptor ชนิด tyrosine kinase receptor

ที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับ receptor อื่นๆ เช่น KIT, FMS และ platelet-derived growth factor (PDGF) receptor โดย receptor เหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่ม (class) ที่สามของ RTK (ดังรูปที่ 1) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลที่สำคัญประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า immunoglobulin (Ig)-like domain 5 อันที่อยู่บริเวณด้านนอกของผิวเซลล์ ตามด้วยส่วนที่ผ่านระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ ถัดมาเป็นส่วนที่อยู่ติดผิวด้านในของเซลล์ (juxtamembrane (JM) domain) และส่วนที่เป็น tyrosine kinase(TK) domain ที่อยู่ในซัยโตพลาสซึมของเซลล์[7]

โปรตีน FLT3 นั้นมีอยู่ด้วยกัน 2 รูปแบบ คือ แบบแรกมีน้ำหนักโมเลกุล 158-160 กิโลดาลตัน อยู่บริเวณผิวเซลล์ โดยมีการเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) ที่ปลายด้าน N หรือด้านที่ยื่นออกไปนอกเซลล์ แบบที่สองมีน้ำหนักโมเลกุล 130-143 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนที่อยู่ในซัยโตพลาสซึม (cytoplasmic protein) โดยจะไม่มีการเติมหมู่น้ำตาลที่โมเลกุล[8]

โดยทั่วไปเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน FLT3 ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่อยู่ในไขกระดูก ต่อมธัยมัส และต่อมน้ำเหลือง นอกจากนั้นยังพบการแสดงออกของโปรตีน FLT3 ในรก และ gonad[9] การศึกษาบทบาทของ FLT3 ที่เกี่ยวกับกลไกการสร้างเม็ดเลือดโดยการยับยั้งการทำงานของยีน *FLT3* ในหนูทดลอง พบว่ามีการสร้างเซลล์สาย B lymphocyte ลดลง[10] เมื่อทำการทดลอง competitive repopulation assay เพื่อดูหน้าที่การทำงานของ *FLT3* โดยนำเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดสองแบบคือ แบบที่มี *FLT3* ปกติ และแบบที่ *FLT3* ถูกทำลายไปใส่เข้าไปในหนูทดลองที่ถูกทำลายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดไปหมดแล้ว โดยใส่เซลล์สองแบบไปพร้อมๆ กันเพื่อให้แข่งกันเพิ่มจำนวนในหนู



รูปที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ RTK class ต่างๆ โดยมีรายชื่อสมาชิกของแต่ละ class อยู่ใต้รูปโครงสร้างโมเลกุลดังกล่าว และมีชื่อของ prototype ของแต่ละ class อยู่เหนือรูปโครงสร้างของ class นั้นๆ ยกตัวอย่างเช่น class III RTK มี PDGFR เป็น prototype ของกลุ่ม มีโครงสร้างโมเลกุลที่ประกอบด้วย Ig-like domain 5 อันที่ยื่นออกไปนอกเซลล์ ต่อด้วยส่วนที่ผ่านระหว่างผิวเซลล์ ถัดมาเป็น JM domain และ TK domain ซึ่งอยู่ภายในเซลล์[7]

เมื่อเวลาผ่านไป ผลปรากฏว่าเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่ตรวจพบในหนูทดลองส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่มี *FLT3* ปกติ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ายีน *FLT3* มีบทบาทสำคัญในกลไกการสร้างและเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือด[11]

โมเลกุลจับจำเพาะของ FLT3 receptor หรือ FLT3 ligand (FL) มีอยู่ 2 รูปแบบ คือ รูปแบบที่จับอยู่บนผิวเซลล์ (membrane-bound form) และแบบที่ละลายได้ (soluble form)[8,12] ซึ่งเซลล์ที่พบมีการสร้าง FL ได้แก่ เซลล์ที่อยู่ในไขกระดูกและเซลล์ stroma ในอวัยวะต่างๆ เช่น ม้าม รังไข่ อัณฑะ ลำไส้ และไต การศึกษาในหนูทดลองโดยการยับยั้งการสร้าง FL พบว่าระบบภูมิต้านทานของหนูผิดปกติ โดยตรวจพบจำนวน pro-B cells, dendritic cells และ natural killer cells ลดลง[13]

เมื่อมีการจับกันระหว่าง FLT3 receptor และ FLT3 ligand จะทำให้เกิดผลที่ตามมาคือ FLT3 receptor จะจับกันเป็นคู่ (dimerization) เกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนหมู่ฟอสเฟตระหว่างกัน (autophosphorylation) และส่งต่อหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนต่างๆ ในซัยโตพลาสซึม ทำให้เกิดการส่งสัญญาณต่อไปภายในเซลล์จนถึงนิวเคลียส[7]

ชนิดของการกลายพันธุ์ของยีน FLT3[14-20]

การกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* มีอยู่ 2 ชนิดหลักๆ ได้แก่ *FLT3* internal tandem duplication (ITD) และ *FLT3* tyrosine kinase domain (TKD) mutation

1) การกลายพันธุ์ ชนิด FLT3 internal tandem duplication (ITD)

การกลายพันธุ์ ชนิด ITD เป็นการกลายพันธุ์ชนิดแรกที่ค้นพบจากการวิจัยหนึ่งในประเทศญี่ปุ่นที่พยายามศึกษาหาอุบัติการณ์และความแตกต่างของระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน *FLT3* ในผู้ป่วยที่เป็น AML และ acute lymphoid leukemia (ALL) โดยมีการตรวจพบชิ้นส่วน mRNA ที่ยาวกว่าปกติในตัวอย่าง 5 รายจากทั้งหมด 30 ราย[14] ซึ่งชิ้นส่วนที่ตรวจพบนี้จะแปลไปเป็นส่วน JM domain ของโปรตีน FLT3 และจากการศึกษาทดลองต่อมาก็พบความผิดปกติแบบเดียวกันในระดับ DNA ด้วย แสดงว่าความผิดปกติที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจาก splicing ที่ผิดปกติไป เมื่อทำการศึกษาวิเคราะห์ต่อไป ก็พบว่าชิ้นส่วนที่ยาวขึ้นนั้น เกิดจากมีการเพิ่มของชุดนิวคลีโอไทด์แบบซ้ำๆ (tandemly duplicated sequence) โดยที่ขนาดและตำแหน่งการเกิดของชุดนิวคลีโอไทด์อาจแตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่างตรวจ ตั้งแต่ 3 bp ถึงมากกว่า 400 bp โดยมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 300-400 bp[15] แต่ส่วนใหญ่จะยังคงอยู่ที่เอ็กซอน 14 และ 15 ซึ่งเป็นส่วนที่จะแปลไปเป็น JM domain ของโปรตีน FLT3 นอกจากนี้ ยังมีรายงานการค้นพบการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ตำแหน่ง JM domain เช่นกัน ทำให้มีการเรียกการกลายพันธุ์นี้ว่า *FLT3* length mutations (LM) ซึ่งหมายความรวมทั้ง ITD และ deletion mutations[2]

การกลายพันธุ์ชนิด ITD ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ FLT3 receptor ตลอดเวลา จากการศึกษาโครงสร้างของ FLT3 receptor ปกติ พบว่า JM domain มีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของ receptor เนื่องจากในภาวะปกติที่ receptor ยังไม่ทำงานหรือไม่ถูกกระตุ้น JM domain จะจัดเรียงตัวในลักษณะที่บดบังตำแหน่งที่จะมีการแลกเปลี่ยนหมู่ฟอสเฟตเอาไว้ แต่หลังจากที่ receptor ถูกกระตุ้น ส่วน JM domain นี้จะเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ทำให้ตำแหน่งที่จะเกิดการแลกเปลี่ยนหมู่ฟอสเฟตถูกเปิดออก และเกิดปฏิกริยาต่อเนื่องภายในเซลล์ต่อไป การเกิดการกลายพันธุ์ ชนิด ITD เชื่อว่าทำให้ส่วน JM domain ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ดังนั้น receptor จึงขาดกลไกยับยั้งการทำงาน จึงมีการทำงานแลกเปลี่ยนหมู่ฟอสเฟตอยู่ตลอดเวลา และทำให้เกิดความผิดปกติอื่นๆ ตามมา[7,16]

กระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Signaling

pathway) ของทั้งโปรตีน FLT3 ปกติ และ FLT3-ITD อาศัยการส่งสัญญาณผ่านหลายเส้นทาง[16-17] เช่น ผ่านทางโปรตีนกลุ่ม PI3-kinase และ AKT ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการยับยั้งการตายของเซลล์ (anti-apoptotic pathway) หรือผ่านทางโปรตีนกลุ่ม RAS และ MAP kinase ที่มีส่วนในกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation pathway) การศึกษาเพิ่มเติมยังพบว่าโปรตีน STAT5 เป็นโปรตีนอีกตัวหนึ่งที่ตรวจพบว่าถูกกระตุ้นอย่างตลอดเวลาในเซลล์ที่มี FLT3-ITD ในขณะที่เซลล์ที่มี FLT3 ปกติ STAT5 มีการทำงานเป็นปกติ[16] นอกจากนี้ ในเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย *FLT3*-ITD ยังพบว่า เอนไซม์ SHP-1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งในกลุ่ม phosphatase ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนหมู่ฟอสเฟตภายในเซลล์ถูกยับยั้งการทำงาน ในขณะที่เซลล์ที่ถูก transfect ด้วย FLT3 ปกติไม่เกิดเหตุการณ์ดังกล่าว[15]

2) การกลายพันธุ์ ในตำแหน่ง tyrosine kinase domain (TKD)

TKD mutation เป็นการกลายพันธุ์ ที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งกรดอะมิโน Aspartic 835 (D835) และกรดอะมิโน Isoleucine 836 (I836) ซึ่งทั้งสองตำแหน่งเป็นส่วนของเอ็กซอน 20 ของยีน FLT3 ที่จะแปลไปเป็นส่วน TK domain ของโปรตีน FLT3 โดยตำแหน่งนี้เป็นส่วนของโมเลกุลที่เรียกว่า activation loop domain ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแลกเปลี่ยนหมู่ฟอสเฟตระหว่างที่เกิดปฏิกริยาการกระตุ้นโมเลกุลให้ทำงาน การกลายพันธุ์ชนิดนี้ค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 2001[18-19] หลังจากนั้นก็มีรายงานพบการกลายพันธุ์ชนิดนี้ตามมาอีกหลายรายงาน[2,10] โดยการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง D835 นั้นมีอย่างน้อย 5 แบบ ที่พบบ่อยที่สุดคือกรดอะมิโนเปลี่ยนเป็น Tyrosine และ Histidine ส่วนที่พบรองลงมาคือเปลี่ยนเป็น Valine, Glutamate หรือ Asparagine สำหรับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง I836 ที่พบบ่อย ส่วนใหญ่เป็นการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Isoleucine เป็น Methionine ส่วนการกลายพันธุ์แบบอื่นๆ ที่ตำแหน่งนี้พบได้ไม่บ่อย สำหรับในประเทศไทย เพิ่งมีรายงานการพบการกลายพันธุ์ชนิดใหม่ในปี ค.ศ. 2005 โดย จิรายุ เอื้อวรากุล และคณะ โดยพบเป็น D835Del + I836V ซึ่งมีการขาดหายไปของกรดอะมิโนตำแหน่ง D835 และมีการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Isoleucine เป็น Valine ที่โคดอน 836[20]

รายงานการทดลองใส่การกลายพันธุ์ ชนิด D835Y เข้าไปในเซลล์ 32D และ Ba/F3 พบว่าเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้โดยไม่ต้องอาศัยสารกระตุ้นอย่าง IL-3[10] แสดงว่าการกลายพันธุ์ชนิด TKD ทำให้ FLT3 receptor ทำงานมากกว่าปกติเช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ชนิด ITD นอกจากนี้การศึกษาใน เซลล์ Cos7 ก็พบว่า การกลายพันธุ์ ชนิด TKD สามารถทำให้เกิดปฏิกริยาแลกเปลี่ยนหมู่ฟอสเฟตตลอดเวลาได้เช่นกัน[15,18]

บทบาทของยีน FLT3 กับการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML[2,10,15]

กลไกการเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเอง (self-renewal) และการแบ่งตัวโดยไม่อาศัยสารกระตุ้น (growth factor-independent proliferation) เป็นปัจจัยสำคัญที่เชื่อว่าทำให้เกิดโรคมะเร็งขึ้น การเกิด *FLT3*-ITD และ *FLT3*-TKD ทำให้มีการสร้างโปรตีน FLT3 ที่ผิดปกติ ส่งผลให้กลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านทาง FLT3 นั้นเกิดผิดปกติไป ทำให้เกิดการกระตุ้นอย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องอาศัยโมเลกุลกระตุ้นจากภายนอก จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วย AML ร้อยละ 70-100 และผู้ป่วย ALL ร้อยละ 81-100 มีการแสดงออกที่มากกว่าปกติ (overexpression) ของโปรตีน FLT3 และยังพบการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของทั้ง FLT3 และ FL ในเซลล์ไขกระดูกและเซลล์ไลน์ที่ได้มาจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว[10,15] จึงเชื่อว่า กลไกการหลั่งสารเพื่อกระตุ้นเซลล์ตัวเองและเซลล์ข้างเคียงให้เพิ่มจำนวนน่าจะมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรค

อย่างไรก็ตาม พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* เพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถทำให้หนูทดลองเกิดเป็น

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ การทดลองใส่เซลล์มะเร็งที่มี *FLT3*-ITD เข้าไปในหนูทดลองสามารถทำให้เซลล์สายมัยอีลอยด์เพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าปกติในไขกระดูกหนู แต่ไม่ถึงขั้นเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว[21] ดังนั้นเชื่อว่า อาจจำเป็นต้องมีความผิดปกติอย่างอื่นร่วมด้วย (additional genetic events) จึงจะกระตุ้นให้หนูทดลองเกิดเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวขึ้นได้ การทดลองนำเซลล์ต้นกำเนิดที่มี *FLT3*-ITD ใส่เข้าไปในหนูทดลองที่ทำให้มีความผิดปกติของยีนอื่นอยู่แล้ว เช่น มียีนลูกผสมระหว่างยีน *PML* กับยีน *RARa* พบว่าหนูดังกล่าวเกิดเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute promyelocytic leukemia ได้ในระยะเวลารวดเร็วกว่าหนูที่ไม่ได้ใส่เซลล์ที่มี *FLT3*-ITD เข้าไป[22] การทดลองใช้ *FLT3*-ITD ร่วมกับยีนลูกผสมอื่นๆ เช่น ยีน *NUP98-HOX*, ยีน *MLL-ENL*, หรือยีน *AML-ETO* เป็นต้น ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน คือทำให้หนูเกิดเป็น AML ได้เร็วขึ้น[2] นอกจากนี้ การกระตุ้น FLT3 receptor ปกติแบบซ้ำๆ ต่อเนื่องกันก็เป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ โดยการทดลองที่ใส่เซลล์ที่มีการแสดงออกของ FL ตลอดเวลาเข้าไปในหนูทดลอง เพื่อให้เกิดการกระตุ้น FLT3 receptor อย่างต่อเนื่อง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปหนูทดลองดังกล่าวก็เกิดเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวขึ้นได้เช่นกัน[23]

การศึกษาโดยใช้ gene expression profile พบว่ามียีนหลายตัวที่ถูกกระตุ้นจากการมีการกลายพันธุ์ของยีน FLT3 เช่น Pim-1, Pim-2, SOCS-2, SOCS-3, GP49B, PGE-R, p21, MYC, CCND3, DUSP6, and IL2R ในขณะเดียวกันมียีนอีกหลายตัวที่ถูกยับยั้งการทำงาน เช่น C/EBPa, Pu.1, Bim, p27kip, GADD45, BTG-2, AATYK, maf-B, RARa, MAID, RB2/p130, p16ink4A, Frat1, LSC, RGS2, Ga15, TISS11, Evi-2, Xbp1, and TNF2 แสดงว่าการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* มีการกระตุ้น signaling pathway ได้หลายเส้นทาง และมีโปรตีนและยีนที่เกี่ยวข้องจำนวนมาก[2,10]

อุบัติการณ์และพยากรณ์โรคของผู้ป่วย AML ที่มีการกลายพันธ์ของ *FLT3*[24-31]

อุบัติการณ์ของการกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* พบได้บ่อยที่สุดในผู้ป่วย AML โดยมีอุบัติการณ์ของทั้งชนิด ITD และ TKD รวมกันประมาณร้อยละ 30 นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ได้ในโรคอื่น เช่น myelodysplastic syndrome และ ALL แต่อุบัติการณ์ค่อนข้างต่ำมาก และยังไม่มีรายงานการตรวจพบการกลายพันธุ์ในโรคอื่นๆ เช่น chronic myeloid leukemia, chronic lymphoid leukemia, multiple myeloma, และ non-Hodgkin's Lymphoma[2,24,25] การกลายพันธุ์ของ *FLT3*-ITD พบได้บ่อยในผู้ใหญ่ที่เป็น AML แต่พบได้น้อยในเด็กอายุต่ำกว่า 10 ปี โดยร้อยละ 17-34 ของผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่เป็น AML และร้อยละ 5-17 ของผู้ป่วยเด็กที่เป็น AML จะสามารถตรวจพบ *FLT3*-

ตารางที่ 1 อุบัติการณ์ของการกลายพันธ์ชนิด *FLT3*-ITD และ TKD

การศึกษาจาก	จำนวนผู้ป่วย (ราย)	ร้อยละของผู้ป่วยที่ตรวจพบ *FLT3*-ITD	ร้อยละของผู้ป่วยที่ตรวจพบ *FLT3*-TKD
ยุโรป	80-1,003	10-27	3.6-7.7
อเมริกา	91-110	16.5-34	2.3-8
เอเชีย อื่นๆ	30-112	5.3-23	3.3-18.7
ประเทศไทย	256	24.6	3.1

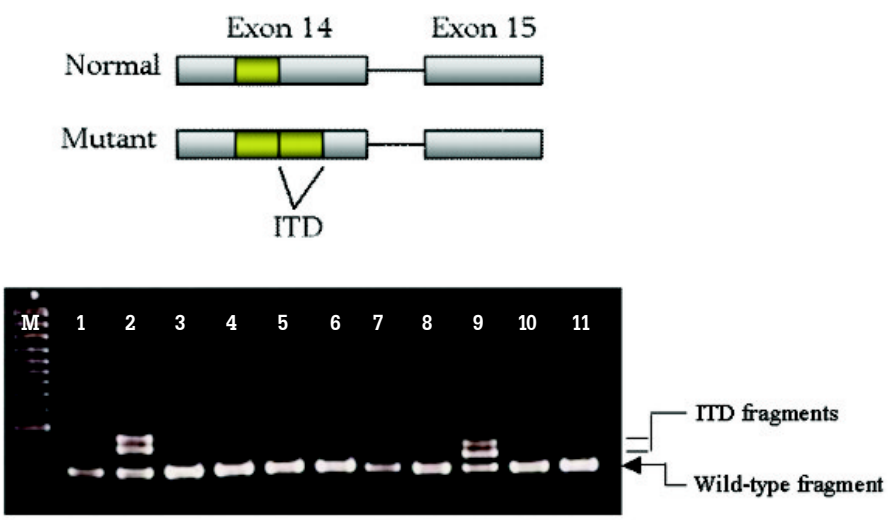
ข้อมูลจาก Small et al (2006)[2] และ Auewarakul et al (2005)[20]

ITD ได้ สำหรับ *FLT3*-TKD มีอุบัติการณ์ในผู้ป่วย AML ประมาณร้อยละ 6.4-7.7 โดยอุบัติการณ์ไม่แตกต่างกันระหว่างเด็กหรือผู้ใหญ่[2,15]

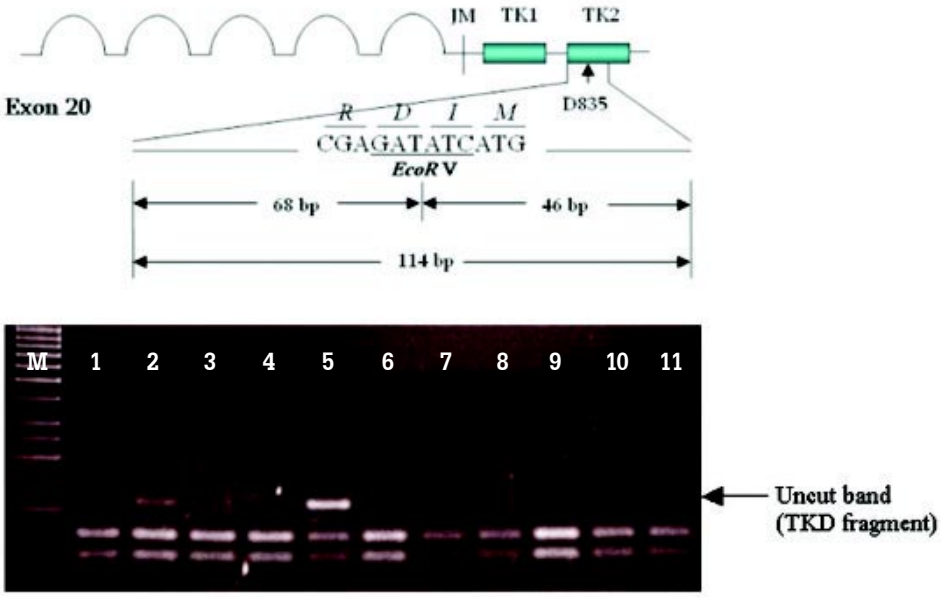
การกลายพันธุ์ชนิด *FLT3*-ITD มีความสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ทั้งในผู้ป่วยเด็กและผู้ใหญ่ ผู้ป่วยที่มี *FLT3*-ITD มักจะมีภาวะเม็ดเลือดขาวสูงในกระแสโลหิต[20] และระยะรอดชีวิตที่สั้นกว่าผู้ป่วยที่ไม่มี *FLT3*-ITD ขนาดของ ITD ยังมีผลต่อพยากรณ์โรคของผู้ป่วย โดยขนาดของ ITD ที่เพิ่มขึ้นจะแปรผกผันกับอัตรารอดชีวิตของผู้ป่วย โดยทำให้ overall survival และ event free survival สั้นลง[26] นอกจากนี้ ยังพบว่าหากผู้ป่วยมีการสูญเสีย wild-type *FLT3* ร่วมด้วยกับการกลายพันธุ์ชนิด *FLT3*-ITD จะยิ่งมีพยากรณ์โรคที่ไม่ดี โดยเราสามารถใช้อัตราส่วนของ mutant *FLT3* ต่อ wild-type *FLT3* หรือที่เรียกว่า Allelic ratio ซึ่งได้จากการตรวจด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ในการช่วยบอกพยากรณ์โรคของผู้ป่วย ถ้าค่า allelic ratio ต่ำแสดงว่าผู้ป่วยรายนั้นยังมี wild-type *FLT3* เหลืออยู่และจะมีโอกาสรอดชีวิตได้นานใกล้เคียงกับผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของ *FLT3*[2] สำหรับการกลายพันธุ์ชนิด TKD นั้น ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับพยากรณ์โรค

เทคนิคการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน FLT3[15-20,27-29]

เทคนิคเริ่มแรกที่ใช้ในการตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* คือ การทำ PCR แล้วตามด้วยเทคนิค gel electrophoresis เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิด ITD หรือการทำ PCR แล้วตามด้วยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยใช้เอนไซม์ EcoRV ที่จำเพาะกับตำแหน่ง D835 และ I836 ของยีน *FLT3* เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิด TKD นอกจากนั้นก็มีเทคนิคการตรวจอื่นๆ ที่ช่วยเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการตรวจด้วย เช่น single strand conformational polymorphism (SSCP), conformational sensitive gel electrophoresis (CSGE), denaturing high performance liquid chromatography (D-HPLC) เป็นต้น



รูปที่ 2 การตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* ชนิด ITD โดยใช้วิธี PCR เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ของยีน *FLT3* ในส่วน exon 14-15 ตามด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ในตัวอย่างที่เกิด ITD ขึ้นจะสามารถพบชิ้นส่วน product ที่ใหญ่กว่าปกติ (band บนของเลนที่ 2 และ 9)[20]



รูปที่ 3 การตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* ชนิด TKD mutation โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ในส่วน exon 20 ของยีน *FLT3* ตามด้วยเทคนิค RFLP จากรูป เอนไซม์ EcoRV จะจดจำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะคือ GATATC และตัดชิ้นส่วนเริ่มต้นคือ 114 base pairs ออกเป็น 2 ชิ้น ขนาด 68 และ 46 base pairs เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว จะทำให้เอนไซม์ตัดชิ้นส่วนนี้ไม่ได้ จึงตรวจพบชิ้นส่วนที่มีขนาดเท่าขนาดเริ่มต้น (band บนสุดของเลนที่ 2 และ 5)[20]

การใช้สารยับยั้งการทำงานของโปรตีน FLT3 (FLT3 inhibitor)[2,30-31]

วัตถุประสงค์ของการใช้สารรักษาโรคมะเร็งแบบมุ่งเป้า (targeted therapy) ที่เป็นที่นิยมอยู่ในปัจจุบันนั้นคือ การยับยั้งการทำงานของ tyrosine kinase หรือ tyrosine kinase receptor ในเซลล์มะเร็งแบบจำเพาะ ขณะเดียวกันต้องไม่มีหรือมีผลน้อยมากกับการทำงานของเซลล์ปกติ โปรตีน FLT3 ถือเป็นเป้าหมายหนึ่งที่สำคัญในการรักษาแบบมุ่งเป้าในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน เนื่องจากโปรตีน FLT3 มีการแสดงออกมากผิดปกติทั้งในผู้ป่วย AML และ ALL และการกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* เป็นความผิดปกติที่พบได้บ่อยในผู้ป่วย AML ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา ได้มีการพัฒนาสารที่มีคุณสมบัติเป็น FLT3 inhibitor หลายชนิด กลุ่มแรกที่มีการศึกษาในห้องทดลอง ได้แก่ สารกลุ่ม Quinoxaline เช่น สาร AG1295 และ AG1296 โดยพบว่าสารสองตัวนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเซลล์ที่มี FLT3-ITD ได้ดีในเซลล์ไลน์ แต่เนื่องจากสารทั้งสองตัวนี้มีคุณสมบัติละลายน้ำได้น้อย จึงทำให้ไม่สามารถนำมาทดสอบในระยะต่อไปได้[30] สารอีกกลุ่มที่ได้รับความสนใจได้แก่ สารประกอบในกลุ่ม 3-substituted Indolinone เช่น SU5416 และ SU11248 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ FLT3 ในห้องทดลองได้เป็นอย่างดี แต่การศึกษาระยะที่ 1 ในผู้ป่วย AML 55 รายพบว่า การใช้สาร SU5416 ยังได้ผลไม่ค่อยดีนัก โดยมีผู้ป่วยเพียง 4 รายที่ตอบสนองต่อยาอย่างมีนัยสำคัญ และมีอีก 10 รายที่ตอบสนองต่อยาบ้าง (partial response)[2,30]

สารกลุ่มที่สามได้แก่ สารกลุ่ม Piperrazinyl quinazoline ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่

มี FLT3-ITD ทั้งในหลอดทดลอง และการทดสอบในสัตว์ โดยการศึกษาระยะที่ 1 ที่ใช้ยา MLN518 หรืออีกชื่อหนึ่งคือ CT53518 ในผู้ป่วย AML ที่มีการกลับเป็นโรคซ้ำ พบว่าผู้ป่วย 2 รายจากทั้งหมด 6 ราย (ร้อยละ 33) มีปริมาณเซลล์มะเร็งในไขกระดูกลดลงมากกว่าร้อยละ 50 นอกจากนี้ ยังมียากลุ่ม Indolocarbazole ทั้ง CEP-701 และ PKC412 ซึ่งผ่านการทดสอบระยะที่ 1 และ 2 แล้ว พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ FLT3 receptor ได้ดี[2] และขณะนี้กำลังเข้าสู่การทดสอบระยะที่ 3

จากการศึกษาในห้องทดลองพบว่าการใช้ FLT3 inhibitor ร่วมกับยาเคมีบำบัดที่ใช้ในปัจจุบัน (conventional chemotherapy) จะช่วยเสริมฤทธิ์การทำลายเซลล์มะเร็งที่ทดสอบได้มากขึ้น[31] สาเหตุที่การใช้สาร FLT3 inhibitor เพียงตัวเดียวได้ผลไม่ดีนัก อาจเนื่องมาจากกลไกบางอย่างของเซลล์มะเร็งที่หลีกเลี่ยงการถูกทำลายโดยอาศัย alternative pathway อื่นๆ ดังนั้น เมื่อใช้ยาเคมีบำบัดร่วมกับ FLT3 inhibitor อาจช่วยกันยับยั้งกลไกหลายๆ ด้านที่เซลล์มะเร็งใช้ในการหลีกเลี่ยงการถูกทำลาย และอาจเป็นแนวทางการรักษาที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ขณะนี้ การใช้สาร CEP-701 ร่วมกับยาเคมีบำบัดกำลังอยู่ในการศึกษาระยะที่ 3 ในผู้ป่วย AML ที่มีการกลับเป็นของโรคในหลายสถาบันในต่างประเทศ โดยพบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัด ตามด้วยยา CEP-701 มีภาวะโรคสงบ จำนวน 10 ราย จากทั้งหมด 22 ราย (ร้อยละ 45) ขณะที่ผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียวพบภาวะโรคสงบเพียง 6 รายจากทั้งหมด 22 ราย (ร้อยละ 27) นอกจากนี้ ยังมีรายงานเบื้องต้นเกี่ยวกับการศึกษาการใช้ยา PKC412 ร่วมกับยาเคมีบำบัดเช่นกัน โดยพบว่าเมื่อใช้ยา PKC412 ร่วมกับยาเคมีบำบัดในผู้ป่วย AML 38 ราย สามารถทำให้มีภาวะโรคสงบจำนวน 27 ราย (ร้อยละ 71) ผู้ป่วยที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน FLT3 ทั้งหมดตอบสนองต่อยาเป็นอย่างดี คือมีภาวะโรคสงบทุกราย[31]

บทสรุป

มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML พบได้บ่อยในประเทศไทย และเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญในผู้ใหญ่ ถึงแม้ในปัจจุบันจะมีวิธีการรักษาหลายๆ อย่าง อาทิ การให้ยาเคมีบำบัด การเปลี่ยนถ่ายไขกระดูก แต่ก็ยังมีผู้ป่วยอีกไม่น้อยที่ตอบสนองต่อการรักษาไม่ดี หากมีการศึกษาลงลึกถึงกลไกการเกิดโรค หรือมีการค้นคว้าหาเครื่องมือในการช่วยวินิจฉัยระดับโมเลกุลที่ทันสมัยยิ่งขึ้น รวมทั้งมีการพัฒนาการรักษาที่จำเพาะกับยีนที่ผิดปกติในเซลล์มะเร็งที่ได้ผลดีกว่า และมีผลแทรกซ้อนน้อยกว่าการรักษาด้วยเคมีบำบัดแบบดั้งเดิม ย่อมจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวในประเทศไทย

ยีน *FLT3* มีบทบาทสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML ในคนไทยเช่นเดียวกับในต่างประเทศ โดยผู้ป่วยไทยร้อยละ 28 มีการกลายพันธุ์ของยีน *FLT3* โดยเป็นชนิด *FLT3*-ITD ประมาณร้อยละ 25 และชนิด *FLT3*-TKD ร้อยละ 3[20] การศึกษาเพื่อหายาหรือสารยับยั้งการทำงานที่จำเพาะกับยีน *FLT3* แม้จะยังอยู่ในขั้นเริ่มต้น และยังได้ผลไม่ดีนักในปัจจุบัน แต่คาดว่า การใช้ FLT3 inhibitor จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วย AML ให้ดียิ่งขึ้นในอนาคตอันใกล้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อใช้ FLT3 inhibitor ร่วมกับยาเคมีบำบัด หรือยาที่มุ่งเป้าแก้ไขความผิดปกติระดับยีนและโมเลกุลตัวอื่นๆ ในลักษณะ multiple drugs-multiple targets regimen

เอกสารอ้างอิง

1. *Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. Hematology. Am Soc Hematol Educ Program. 2004:80-97.*
2. *Small D. FLT3 Mutations: Biology and Treatment. Hematology. Am Soc Hematol Educ Program 2006: 178-84.*
3. *Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, Birnbaum D. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase*

receptor of the PDGFR/CSF1R family. Oncogene 1991;6:1641-50.

4. *Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. Cell 1991;65:1143-52.*
5. *Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, et al. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:459-63.*
6. *Agnes F, Shamoon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. Gene 1994;145:283-8.*
7. *Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. Nature 2001;411:355-65.*
8. *Lyman SD, Williams DE. Biology and potential clinical applications of flt3 ligand. Curr Opin Hematol 1995; 2:177-81.*
9. *Maroc N, Rottapel R, Rosnet O, Marchetto S, Lavezzi C, Mannoni P, et al. Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/ FLK2 receptor tyrosine kinase. Oncogene 1993;8: 909-18.*
10. *Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood 2002;100:1532-42.*
11. *Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/ flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. Immunity 1995;3:147-61.*
12. *Hannum C, Culpepper J, Campbell D, McClanahan T, Zurawski S, Bazan JF, et al. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. Nature 1994;368:643-8.*
13. *McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. Blood 2000;95:3489-97.*
14. *Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. Leukemia 1996;10:1911-8.*
15. *Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. Nat Rev Cancer 2003;3:650-65.*
16. *Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. Oncogene 2000;19:624-31.*
17. *Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. Blood 2000;96:3907-14.*
18. *Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood 2001;97:2434-9.*
19. *Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 2001;113:983-8.*
20. *Auewarakul CU, Sritana N, Limwongse C, Thongnoppakhun W, Yenchitsomanus PT. Mutations of the FLT3 gene in adult acute myeloid leukemia: determination of incidence and identification of a novel mutation in a Thai population. Cancer Genet Cytogenet 2005;162:127-34.*
21. *Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. Blood 2002;99: 310-8.*
22. *Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, et al. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:8283-8.*
23. *Hawley TS, Fong AZ, Griesser H, Lyman SD, Hawley*

RG. Leukemic predisposition of mice transplanted with gene-modified hematopoietic precursors expressing flt3 ligand. Blood 1998;92:2003-11.

24. *Xu F, Taki T, Yang HW, Hanada R, Hongo T, Ohnishi H, et al. Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. Br J Haematol 1999;105:155-62.*
25. *Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. Leukemia 1997;11:1605-9.*
26. *Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogosova-Agadjanyan EL, Linsley J, et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. Blood 2006;107:3724-6.*
27. *Parcells BW, Ikeda AK, Simms-Waldrip T, Moore TB, Sakamoto KM. FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. Stem Cells 2006;24:1174-84.*
28. *Bianchini M, Ottaviani E, Grafone T, Giannini B, Soverini S, Terragna C, et al. Rapid detection of Flt3 mutations in acute myeloid leukemia patients by denaturing HPLC. Clin Chem 2003;49:1642-50.*
29. *Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Geiger T, Cooper LC, Smith BD, et al. Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. J Mol Diagn 2003;5:96-102.*
30. *Brown P, Small D. FLT3 inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer. Eur J Cancer 2004;40:707-21.*
31. *Levis M, Pham R, Smith BD, Small D. In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. Blood 2004;104: 1145-50.*