

การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ codon 542, 545 และ 1047 ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

อดิศร เจษฎาปิยะวงศ์¹
วิชัย ปุริสา¹
อาทิตย์ ทิมอ่วม⁴

สิทธิรักษ์ รอยตระกูล²
อนันท์นุช ศักดิ์อภิบุญนันท์³
สมชาย ธนะสิทธิชัย¹

บทคัดย่อ จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่า การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA อาจช่วยในการพยากรณ์โรคและทำนายการตอบสนองต่อการรักษาด้วย anti-EGFR ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA กับผลทางพยากรณ์คลินิกของผู้ป่วย (อายุของผู้ป่วยขณะวินิจฉัย เพศ ขนาดก้อนมะเร็ง ระยะโรค ความรุนแรงของโรค ผลจุลพยาธิวิทยา และการกระจายเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง) การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ใช้วิธี PNA-mediated real-time PCR clamping โดยศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่ได้รับการผ่าตัดที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 206 ราย ผลการศึกษาพบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA จำนวน 5 ราย (ร้อยละ 3) เป็นการกลายพันธุ์ใน exon 9 ซึ่งแปลรหัสได้ helical domain โดยพบเป็นการกลายพันธุ์ที่ codon 542 จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40) และพบที่ codon 545/546 จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 60) แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 1047 ใน exon 20 (kinase domain) นอกจากนี้ยังพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ codon 542 พบมากในผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนมะเร็งมากกว่า 5 ซม. และส่วนใหญ่เป็นชนิด mucinous ($P=0.029$ และ 0.004 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ codon 545/546 และ exon 9 กับผลทางพยากรณ์คลินิกของผู้ป่วย (วารสารโรคมะเร็ง 2561;38:154-164)

คำสำคัญ: การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ลักษณะทางพยากรณ์คลินิก

¹กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ²ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

³กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ⁴สาขาชีวเคมีและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา

PIK3CA Mutation at Codons 542, 545, and 1047 in Colorectal Cancer Patients

by **Adisorn Jedpiyawongse¹, Sittiruk Roytrakul², Wichai Purisa¹,
Anantnuch Sakapiboonnan³, Arthid Thim-uam⁴, Somchai Thanasitthichai**

¹Research Division, National Cancer Institute, ²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, ³Pathology Division, National Cancer Institute, ⁴Division of Biochemistry and Nutrition, School of Medical Sciences, University of Phayao

Abstract Previous studies have suggested that PIK3CA mutations might help predict the prognosis and anti-EGFR drug response of colorectal cancer patients. This study aimed to detect PIK3CA mutations and compare the relationship between these mutations and the clinical characteristics of the patients (age at diagnosis, sex, tumor size, stage, histological grade, histological type, and lymph-node metastasis). PIK3CA mutations were examined by PNA-mediated real-time PCR clamping among 206 colorectal cancer patients who had undergone operations at the National Cancer Institute. PIK3CA mutations were detected in five samples (3%), of which mutations were found in exon 9 that translated the helical domain. From these five samples, two (40%) showed mutation at codon 542 and the other three (60%) showed mutation at codon 545/546. However, no mutation was found at codon 1047 in exon 20 (kinase domain). In addition, PIK3CA mutation at codon 542 was found mostly in tumor sizes > 5 cm. and mainly in the mucinous type ($P = 0.029$ and 0.004 , respectively). No correlation between PIK3CA mutation at codon 542 and exon 9 and the clinical characteristics of the patients, was found. (*Thai Cancer J* 2018;38:154-164)

Keywords: PIK3CA mutation, colorectal cancer, clinicopathological characteristics

บทนำ

จากสถิติโรคมะเร็งปี พ.ศ. 2553-2555 พบมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงมากเป็นอันดับสามในเพศชาย และเป็นอันดับสี่ในเพศหญิง¹ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง สาเหตุการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ปัจจัยเสี่ยงที่อาจทำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงได้แก่ พันธุกรรม การรับประทานอาหารไขมันสูงหรืออาหารที่ขาดใยอาหาร การดื่มสุรา การสูบบุหรี่ การขาดสารอาหารบางชนิด และการขาดการออกกำลังกาย มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงระยะแรก (early stage) สามารถรักษาได้ แต่ในระยะลุกลาม (advance stage) ที่มีการแพร่กระจาย (metastasis) พบว่ามีอัตราการรอดชีพและระยะเวลาการอยู่รอดต่ำ² การรักษาแบบมุ่งเป้าโดยใช้ antibody ที่ต้าน

epidermal growth factor receptor (anti-EGFR) เป็นความหวังใหม่สำหรับการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่มีการลุกลาม มีรายงานพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มียีน KRAS wild-type เป็นกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย anti-EGFR^{3,4} แต่พบว่ามีผู้ป่วยที่มียีน KRAS wild-type บางรายไม่ตอบสนองต่อการรักษาดังกล่าว ดังนั้นยีน KRAS เพียงอย่างเดียวยังไม่เพียงพอในการทำนายการตอบสนองต่อการรักษา อาจต้องใช้ยีนอื่นร่วมด้วย ยีน PIK3CA ที่กลายพันธุ์พบได้ในโรคมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง และยังมีรายงานพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA อาจเป็นตัวบ่งชี้ช่วยทำนายการรักษาด้วย anti-EGFR ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง⁵⁻⁷

Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks)

เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การยึดเกาะของเซลล์ การมีชีวิต และการตายของเซลล์ PI3K จัดเป็น lipid serine/ threonine kinase มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP_2) เป็น phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP_3) PIP_3 เป็น second messenger ส่งสัญญาณต่อไปที่ AKT pathway ไปควบคุมการทำงานต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น การแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การมีชีวิตรอด และการตายของเซลล์⁸⁻¹⁰

เมื่อยีน PIK3CA เกิดการกลายพันธุ์จะกลายเป็น oncogene ทำให้มีการเพิ่มการทำงานของ kinase activity ในส่วนของ p110 catalytic subunit¹⁰⁻¹⁴ ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA อาจเกิดจาก amplification, deletion, somatic missense และอื่น ๆ มีรายงานพบยีน PIK3CA ที่กลายพันธุ์ในโรคมะเร็งหลายชนิดได้แก่ มะเร็งของลำไส้ใหญ่และไส้ตรง ตับ กระเพาะอาหาร เต้านม รังไข่ ปอด และเม็ดเลือดขาว การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ทำให้เอนไซม์ PI3K ทำงานเพิ่มขึ้น มีผลทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง ความผิดปกติของยีนชนิดนี้ในส่วนของ helical domain อาจมีผลต่อ regulatory protein (p85) ส่วนความผิดปกติของ kinase domain อาจมีผลต่อความจำเพาะของ p110 catalytic subunit ต่อ phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP_2) การกลายพันธุ์แบบ somatic missense ของ PIK3CA มักเกิดที่ codon 542 (ทำให้ glutamic acid เปลี่ยนเป็น

lysine) และที่ codon 545 (ทำให้ glutamic acid เปลี่ยนเป็น lysine) ใน exon 9 ซึ่งเป็นบริเวณ helical domain และที่ codon 1047 (ทำให้ histidine เปลี่ยนเป็น arginine) ใน exon 20 ซึ่งเป็นบริเวณ kinase domain^{9,15} การกลายพันธุ์บริเวณ exon 20 ที่ codon 1047 มักเกี่ยวข้องกับส่วน p85 α -regulatory subunit ในขณะที่การกลายพันธุ์ของ exon 9 ที่ codon 542 และ codon 545 เกี่ยวข้องกับส่วนของ RAS binding domain¹⁶⁻¹⁸ ปัจจุบันยังพบการกลายพันธุ์ที่ codon อื่น เช่น codon 546 และ codon 1046¹⁹ ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA มักมีการพยากรณ์โรคไม่ดีและมีอัตราการรอดชีพลดลงด้วย²⁰⁻²³ จากการสืบค้นข้อมูลยังไม่พบรายงานการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในผู้ป่วยไทย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ตรวจพบกับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วย

วัสดุและวิธีการ ผู้ป่วยและตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงได้รับการผ่าตัดที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวน 206 ราย อายุระหว่าง 27-92 ปี ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นชิ้นเนื้อฝังพาราฟิน (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue) ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงที่ได้รับการผ่าตัดระหว่างปี พ.ศ. 2548-2555 จำนวน 206 ตัวอย่าง ผลการตรวจวินิจฉัยลักษณะทางพยาธิคลินิก

ของผู้ป่วยได้จากกลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ การศึกษาที่ได้รับอนุมัติให้ดำเนินโครงการวิจัยจากคณะกรรมการวิจัย และคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เลขรับรองที่ 016/2557

วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

ผู้วิจัยนำบล็อกชิ้นเนื้อฝังพาราฟิน (formalin-fixed, paraffin-embedded tissue) ของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงมาตัด section ขนาด 10 μm จำนวน 4 แผ่น แผลงบนสไลด์แก้ว ชูดเนื้อส่วนที่เป็นมะเร็งใส่ในหลอด 1.5 ml เติม xylene 300 μl แล้วเขย่าหลอดเป็นเวลา 30 นาที นำหลอดไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที แยกส่วนบนออกจากหลอด ล้าง pellet ที่ได้ด้วย absolute ethanol 1 ml แล้วเขย่าหลอด นำไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที แล้วล้างด้วย ethanol อีกครั้ง นำตัวอย่างที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา NucleoSpin® Tissue XS kit (MACHERY-NAGEL MN, Germany) ตามวิธีการที่แนบมา กับชุดน้ำยา หาปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้เครื่อง spectrophotometer แล้วนำดีเอ็นเอไปเก็บที่ตู้อุณหภูมิ -80 °ซ

วิธีการทดสอบหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA

การทดสอบหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ใช้ชุดน้ำยา PNA Clamp™ PIK3CA Mutation Detection (Panagene Inc, Daejeon, Korea) โดยปริมาตรสุดท้ายที่จะนำไปทดสอบคือ 20 μl

ประกอบด้วย template DNA, primer PNA probe set และ SYBR Green PCR master mix เข้มข้น 10-25 ng ตามวิธีการที่แนบมากับชุดน้ำยา ชุดน้ำยานี้ใช้หลักการ peptide nucleic acid (PNA)-mediated real-time PCR clamping โดย PCR cycling condition เริ่มจากอุณหภูมิ 94°ซ 5 นาที และตามด้วยขั้นตอนต่างๆ ในแต่ละรอบ (cycle) ซึ่งประกอบด้วย denaturation ที่ 94°ซ 30 วินาที PCR clamping ที่ 70°ซ 20 วินาที annealing ที่ 63°ซ 30 วินาที และ extension ที่ 72°ซ 30 วินาที จำนวน 40 รอบ ผลการทดลองอ่านได้จากเครื่องวัด real-time PCR CFX 96 (Bio-Rad, USA) ซึ่งมีโปรแกรมสำเร็จรูปในการคำนวณหาการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ทั้งหมด 13 ตำแหน่งที่ exon 9 (10 ตำแหน่ง: E542K, E542G, E542V, E545K, E545G, E545D, Q546E, Q546K, Q546P และ Q546R) และ exon 20 (3 ตำแหน่ง: H1047Y, H1047L และ H1047R) โดยอาศัยหลักการนำค่า threshold cycle (ct) ของ control และ mutation assays ที่ได้จาก SYBR Green amplification แล้ว plot ค่า $\Delta\text{ct} = (\text{standard ct}) - (\text{sample ct})$

การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA กับอายุของผู้ป่วยขณะวินิจฉัย เพศ ขนาดก้อนมะเร็ง ระยะโรค ความรุนแรงของโรค (grade) ผลจุลพยาธิวิทยา และการกระจายเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง ด้วยวิธี chi-square และกำหนดให้ข้อมูลมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ exon 9 codon 542 กับผลทางพยากรณ์คลินิกของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

ผลพยาธิตคลินิก	จำนวน	PIK3CA mutation exon9 codon542		P
		mutate	non-mutate	
		จำนวน (ร้อยละ)	จำนวน (ร้อยละ)	
อายุ (ปี)				
<50	20	0 (0.0)	20 (100.0)	1.000
≥50	151	2 (1.3)	149 (98.7)	
เพศ				
หญิง	81	1 (1.2)	80 (98.8)	0.940
ชาย	90	1 (1.1)	89 (99.9)	
ขนาดก้อนมะเร็ง (ซม.)				
≤5.0	118	0 (0.0)	118 (100.0)	0.029
>5.0	50	2 (4.0)	48 (96.0)	
ระยะโรค				
I-II	78	0 (0.0)	78 (100.0)	0.497
III-IV	83	2 (2.4)	81 (97.6)	
Histological grade				
Well differentiated	51	1 (2.0)	50 (98.0)	0.904
Moderately differentiated	96	1 (1.0)	95 (99.0)	
Poorly differentiated	7	0 (0.0)	7 (100.0)	
Histological type				
Non-mucinous	162	1 (0.62)	161 (99.4)	0.004
Mucinous	9	1 (11.0)	8 (88.9)	
Lymph node				
Negative	85	0 (0.0)	85 (100.0)	0.497
Positive	86	2 (2.3)	84 (97.7)	

ผลการศึกษา

การศึกษานี้ตรวจพบยีน PIK3CA ชนิดปกติ (wild type) 166 ตัวอย่างจากจำนวน 171 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 97.1 พบมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA

จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3 เป็นการกลายพันธุ์ที่ exon 9 ซึ่งเป็นส่วน helical domain โดยพบเป็นการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 542 จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40) และ PIK3CA codon 545/546

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ exon 9 codon 545/546 กับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

ผลพยาธิคลินิก	จำนวน	PIK3CA mutation exon9 codon545/546		P
		mutate	non-mutate	
		จำนวน (ร้อยละ)	จำนวน (ร้อยละ)	
อายุ (ปี)				
<50	20	0 (0.0)	20 (100.0)	1.000
≥50	151	3 (2.0)	148 (98.0)	
เพศ				
หญิง	81	2 (2.5)	79 (97.5)	0.499
ชาย	90	1 (1.1)	89 (99.9)	
ขนาดก้อนมะเร็ง (ซม.)				
≤5.0	118	2 (1.7)	116 (98.3)	0.891
>5.0	50	1 (2.0)	49 (98.0)	
ระยะโรค				
I-II	78	1 (1.3)	77 (98.7)	1.000
III-IV	83	2 (2.4)	81 (97.6)	
Histological grade				
Well differentiated	51	2 (3.9)	49 (96.1)	0.549
Moderately differentiated	96	1 (1.0)	95 (99.0)	
Poorly differentiated	7	0 (0.0)	7 (100.0)	
Histological type				
Non-mucinous	162	3 (1.9)	159 (98.1)	0.680
Mucinous	9	0 (0.0)	9 (100.0)	
Lymph node				
Negative	85	1 (1.2)	84 (98.8)	1.000
Positive	86	2 (2.3)	84 (97.7)	

จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 60) แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 1047 ใน exon 20 ซึ่งเป็น kinase domain

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มี

ขนาดก้อนมะเร็งมากกว่า 5 ซม. มีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 542 มากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนมะเร็งน้อยกว่า 5 ซม. ($P=0.029$) และยังพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon

ผลพยาธิตติคณก	จํานวน	PIK3CA mutation exon9		P
		mutate	non-mutate	
		จํานวน (ร้อยละ)	จํานวน (ร้อยละ)	
อายุ (ปี)				
<50	20	0 (0.0)	20 (100.0)	1.000
≥50	151	5 (3.3)	146 (96.7)	
เพศ				
หญง	81	3 (3.7)	78 (96.3)	0.566
ชาย	90	2 (2.2)	88 (97.8)	
ขนาดก้อนมะเร็ง (ซม.)				
≤5.0	118	2 (1.7)	116 (98.3)	0.133
>5.0	50	3 (6.0)	47 (94.0)	
ระยะโรค				
I-II	78	1 (1.3)	77 (98.7)	0.368
III-IV	83	4 (4.8)	79 (95.2)	
Histological grade				
Well differentiated	51	3 (5.9)	48 (94.1)	0.511
Moderately differentiated	96	2 (2.1)	94 (97.9)	
Poorly differentiated	7	0 (0.0)	7 (100.0)	
Histological type				
Non-mucinous	162	4 (2.5)	158 (97.5)	0.134
Mucinous	9	1 (11.1)	8 (88.9)	
Lymph node				
Negative	85	1 (1.2)	84 (98.8)	0.368
Positive	86	4 (4.7)	82 (95.3)	

542 มีผลทางจุลพยาธิวิทยาเป็นชนิด mucinous ยังไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีนมากกว่ากลุ่ม non-mucinous ($P=0.004$) แต่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ codon 542 ไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ เพศ ระยะโรค histological grade และการกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลือง นอกจากนี้ ผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วย (ตารางที่ 2) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ exon 9 กับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วย (ตารางที่ 3)

วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษานี้พบว่าการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ด้วยวิธี PNA-mediated real-time PCR clamping จากจำนวนตัวอย่าง 206 ตัวอย่าง ไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA จำนวน 35 ตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะบล็อกขึ้นเนื้อฝักรพารพินเก็บไว้เป็นเวลานานทำให้เซลล์ในชิ้นเนื้อบางบล็อกมีการเสื่อมสลายไป จึงไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอที่มีคุณภาพที่จะนำมาวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีนได้ ผลจากการศึกษานี้พบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3 เป็นการกลายพันธุ์ที่ exon 9 ซึ่งเป็น helical domain โดยพบมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 542 จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40 และมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 545/546 จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 60 แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 1047 ใน exon 20 ซึ่งเป็นส่วนของ kinase domain แต่จากรายงานการศึกษาอื่นพบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ร้อยละ 7-18^{6,15,19,21,22,24-26} ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษานี้อาจเนื่องจากวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่แตกต่างกัน และกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกันในเรื่องเผ่าพันธุ์ โดยการศึกษาที่ใช้วิธี PNA-mediated real-time PCR clamping ซึ่งการศึกษาของ Orum H และคณะ²⁷ พบว่าวิธี PNA-mediated PCR clamping เป็นวิธีตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่มีประสิทธิภาพ และเป็นวิธีที่มีความไวสูงเหมาะในการนำมาใช้ในงานประจำในการวินิจฉัยผู้ป่วยจากการศึกษาของ Kwon MJ และคณะ²⁸ ได้เปรียบเทียบวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ด้วยวิธี PNA-mediated PCR clamping กับ

วิธี direct sequence จากบล็อกชิ้นเนื้อฝักรพารพินของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงพบว่า วิธี PNA-mediated real-time PCR clamping ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ร้อยละ 6.5 ส่วนวิธี direct sequence ตรวจพบร้อยละ 1.1 Molinari F และคณะ²⁹ พบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ร้อยละ 10 (11/109) เป็นการกลายพันธุ์ที่ exon 9 จำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 73 โดยมีรูปแบบการกลายพันธุ์เป็น E545K จำนวน 6 ราย E545G จำนวน 1 ราย และ E542K จำนวน 1 ราย และพบการกลายพันธุ์ที่ exon 20 จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 27 โดยมีรูปแบบการกลายพันธุ์เป็น H1047R²⁹ Eklöf V และคณะ³⁰ ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA exon 20 ร้อยละ 2.2 Nosh K และคณะ¹⁵ ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA exons 9 และ 20 โดยพบมีการกลายพันธุ์ร้อยละ 15 รูปแบบของการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่พบในการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาอื่น^{20,31-36} โดยพบมีการกลายพันธุ์มากที่สุดที่ codon 545 รองลงมาเป็น codon 542 และ 1047¹⁵ ในขณะที่การศึกษาของ Samuels Y และคณะ³¹ พบมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงร้อยละ 31.6 โดยพบเป็นการกลายพันธุ์ที่ exon 1, 2, 4, 7, 9, 18 และ 20

จากการศึกษานี้พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ codon 542 พบมากในผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนมะเร็งมากกว่า 5 ซม. และเป็นชนิด mucinous แต่ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับผลทางพยาธิคลินิกอื่น อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ codon 545/546 และ exon 9 กับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วย จากการ

ศึกษาอื่นก็พบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 542 มักเป็นชนิด mucinous มากกว่า non-mucinous^{15,37,38} Noshok K และคณะ¹⁵ พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ไม่มีความสัมพันธ์กับอายุ เพศ ระยะโรค แต่จากการศึกษาของ Naguib A และคณะ¹⁹ พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA มักพบในผู้ป่วยเพศหญิงซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Benvenuti S และคณะ³³ ที่ศึกษาในกลุ่มประชากร caucasian และ european ที่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA มักพบในผู้ป่วยเพศหญิงเช่นกัน อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Naguib A และคณะ¹⁹ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA กับ histological grade แต่มีบางรายงานพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA มักพบในชั้นเนื้อมะเร็งชนิด well-differentiate มากกว่า moderately หรือ poorly differentiate^{15,37,38}

โดยสรุปการศึกษานี้พบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ในมะเร็งมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงร้อยละ 3 เป็นการกลายพันธุ์ที่ exon 9 ซึ่งเป็น helical domain โดยพบมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 542 จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40 และมีการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 545/546 จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 60 แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA codon 1047 ใน exon 20 (kinase domain) และพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ codon 542 พบมากในผู้ป่วยที่มีขนาดก้อนมะเร็งมากกว่า 5 ซม. และเป็นชนิด mucinous แต่ไม่พบว่ามีสัมพันธ์กับผลทางพยาธิคลินิกอื่น นอกจากนี้การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง

การกลายพันธุ์ของยีน PIK3CA ที่ codon 545/546 และ exon 9 กับผลทางพยาธิคลินิกของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามรายงานนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นซึ่งต้องติดตามผลการรักษาผู้ป่วยในระยะยาว เพื่อจะได้นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาอัตราการรอดชีพและระยะเวลาการอยู่รอดของผู้ป่วยต่อไป อันจะเป็นประโยชน์ต่อการนำยีนชนิดนี้มาช่วยพยากรณ์โรคในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559-2560

เอกสารอ้างอิง

1. Imsamran W, Chaiwerawattana A, Wiangnon S, Pongnikorn D, Suwanrungrung K, Sangrajang S, Buasom R. Cancer In Thailand vol VIII 2010-2012 Ministry of Public Health. Bangkok, 2015.
2. Sargent DJ, Wieand HS, Haller DG, Gray R, Benedetti JK, Buyse M, et al. Disease-free survival versus overall survival as a primary end point for adjuvant colon cancer studies: individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 2005;23:8664-70.
3. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1626-34.
4. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009;27:2091-6.
5. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009;69:1851-7.

6. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, DiBartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2009;20:84-90.
7. Sood A, McClain D, Maitra R, Basu-Mallick A, Seetharam R, Kaubisch A, et al. PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2012;11:143-50.
8. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998;67:481-507.
9. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *BJC* 2006; 94:455-9.
10. Volinia S, Hiles I, Ormondroyd E, Nizetic D, Antonacci R, Rocchi M, et al. Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 alpha (PIK3CA) gene. *Genomics* 1994;24:472-7.
11. Bader AG, Kang S, Vogt PK. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *PNAS* 2006; 103:1475-9.
12. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 2000;19:2739-44.
13. Migozuchi M, Nutt CL, Mohapatra G, Louis DN. Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol* 2004;14:372-7.
14. Pedrero JMG, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2005;114:242-8.
15. Noshok K, Kawasaki T, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Zepf D, et al. PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia* 2008;10:534-41.
16. Markman B, Atzori F, Pérez-García J, Tabernero J and Baselga J, et al. Status of PI3K inhibition and biomarker development in cancer therapeutics. *Ann Onco* 2009;21:683-91.
17. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 2008;27:5486-96.
18. Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, et al. The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science* 2007;318:1744-8.
19. Naguib A, Cooke JC, Happerfield L, Kerr L, Gay LJ, Luben R, et al. Alterations in PTEN and PIK3CA in colorectal cancers in the EPIC Norfolk study: associations with clinicopathological and dietary factors. *BMC Cancer* 2011;11:123.
20. Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM, et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer* 2008; 122:2255-9.
21. Ogino S, Noshok K, Kirkner GJ, Shima K, Irahara N, Kure S, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:1477-84.
22. Iida S, Kato S, Ishiguro M, Matsuyama T, Ishikawa T, Kobayashi H, et al. PIK3CA mutation and methylation influences the outcome of colorectal cancer. *Oncol Lett* 2012;3:565-70.
23. Phipps AI, Makar KW, Newcomb PA. Descriptive profile of PIK3CA-mutated colorectal cancer in postmenopausal women. *Int J Colorectal Dis* 2013;28: 1637-42.
24. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med* 2012;367:1596-606.
25. Hsieh LL, Er TK, Chen CC, Hsieh JS, Chang JG, Liu TC. Characteristics and prevalence of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis in Taiwanese population. *Clin Chim Acta* 2012;413:1605-11. doi:10.1016/j.cca.2012.04.029
26. Mouradov D, Domingo E, Gibbs P, Jorissen RN, Li S, Soo PY, et al. Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1785-93.

27. Orum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 1993;25:5332-6.
28. Kwon MJ, Lee SE, Kang SY, Choi YL. Frequency of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancers: comparison of peptide nucleic acid-mediated PCR clamping and direct sequencing in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Pathol Res Pract* 2011;207:762-8.
29. Molinari F, Felicioni L, Buscarino M, De Dosso S, Buttita F, Malatesta S, et al. Increased Detection Sensitivity for KRAS Mutations Enhances the Prediction of Anti-EGFR Monoclonal Antibody Resistance in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:4901-14.
30. Eklöf V, Wikberg ML, SEdin S, Dahlin AM, Jonsson B-A, Öberg Å, et al. The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer. *BJC* 2013; 108:2153-63.
31. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304:554.
32. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, Ferreira AC, Suriano G, Schwartz J, et al. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:1649-54.
33. Benvenuti S, Frattini M, Arena S, Zanon C, Cappelletti V, Coradini D, et al. PIK3CA cancer mutations display gender and tissue specificity patterns. *Hum Mutat* 2008;29:284-8.
34. Velho S, Moutinho C, Cirnes L, Albuquerque C, Hamelin R, Schmitt F, et al. BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: Primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer* 2008;8:255.
35. Kato S, Iida S, Higuchi T, Ishikawa T, Takagi Y, Yasuno M, et al. PIK3CA mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2007;121:1771-8.
36. Abubaker J, Bavi P, Al-Harbi S, Ibrahim M, Siraj AK, Al-Sanea N, et al. Clinicopathological analysis of colorectal cancers with PIK3CA mutations in Middle Eastern population. *Oncogene* 2008;27:3539-45.
37. Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, Walters RJ, et al. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PLoSOne* 2013;8:e65479.doi:10.1371/journal.pone. 0065479
38. Day FL, Jorissen RN, Lipton L, Mouradov D, Sakthianandeswaren A, Christie M, et al. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:3285-96.