

ดีเอ็นเอวงกลมนอกโครโมโซม: จุดกำเนิด กระบวนการสร้าง และบทบาทหน้าที่ในมะเร็ง

สุจิตราภรณ์ สุขถาวร¹ และ ศุภรัตน์ แดงชัยภูมิ²

¹กลุ่มงานวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10400

²ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ ดีเอ็นเอวงกลมนอกโครโมโซม (extrachromosomal circular DNA; eccDNA) เป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีโครงสร้างเป็นวงกลม เกิดขึ้นจากความไม่เสถียรของจีโนม และดำรงอยู่แยกจากโครโมโซมอย่างอิสระ eccDNA มีขนาดที่หลากหลาย และมีจุดกำเนิดที่กระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนมสามารถตรวจพบได้ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าปริมาณของ eccDNA ในเซลล์มะเร็งนั้นสูงกว่าเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ และที่น่าสนใจคือ ระดับ eccDNA ที่เพิ่มขึ้นสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้พยากรณ์ของโรคมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยได้รายงานการเพิ่มจำนวนของยีนก่อมะเร็งและยีนดีเอ็นเอที่อยู่ในโครงสร้างของ eccDNA นั้น เป็นปัจจัยสำคัญในการขับเคลื่อนวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อมะเร็ง รวมทั้งมีความสัมพันธ์กับภาวะดีเอ็นเอและผลลัพธ์การพยากรณ์โรคที่ไม่ดี นอกจากนี้การศึกษาล่าสุดพบว่า eccDNA สามารถหลั่งออกนอกเซลล์เข้าสู่กระแสเลือด (cell-free eccDNA) และมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์แตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ รวมทั้งระดับการแสดงออกของยีนบน eccDNA ยังสัมพันธ์กับสถานะของโรคและอัตราการรอดชีพของผู้ป่วยอีกด้วย ดังนั้น eccDNA จึงมีแนวโน้มเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีศักยภาพสำหรับการติดตามผลการรักษาและการพยากรณ์โรคมะเร็ง บทความนี้จะจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเสนอความรู้ปัจจุบันเกี่ยวกับ eccDNA ที่ตรวจพบได้ทั้งในเนื้อเยื่อและกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็ง ตลอดจนแหล่งที่มา กลไกการเกิด และบทบาททางชีววิทยาที่สำคัญที่อาจนำไปสู่แนวทางการวินิจฉัยโรคที่แม่นยำและการรักษาโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอวงกลมนอกโครโมโซม, ยีนก่อมะเร็ง, ยีนดีเอ็นเอ, ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ

Corresponding author E-mail: suchi2522@gmail.com

Received: 1 September 2025

Revised: 3 November 2025

Accepted: 28 November 2025

บทนำ

ดีเอ็นเอวงกลมนอกโครโมโซม (extrachromosomal circular DNA; eccDNA) เป็นดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างเป็นวงกลมและถูกสร้างขึ้นภายนอกโครโมโซม eccDNA ตรวจพบได้ในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตหลายชนิด เช่น แมลงหวี่⁽¹⁾ ยีสต์⁽²⁾ และมนุษย์⁽³⁾ มีบทบาทสำคัญทั้งในกระบวนการทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยา เช่น การแปรผันทางพันธุกรรม การต่อสู้ยารักษา และกระบวนการเกิดเนื้องอก (tumorigenesis)

eccDNA มีขนาดโมเลกุลที่มีความหลากหลายสามารถจำแนกออกเป็น eccDNA ขนาดใหญ่ที่รู้จักกันดี ได้แก่ ดับเบิลมินิต (Double Minutes; DM) และ eccDNA ขนาดเล็ก เช่น small polydispersed DNA (spcDNA), telomeric circle (t-circle) และไมโครดีเอ็นเอ (microDNA) บทบาทของ eccDNA ขนาดใหญ่มีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็ง เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนสำเนาและส่งเสริมการแสดงออกของยีนก่อมะเร็งและ/หรือยีนดีอียา โดยผู้ป่วยมะเร็งที่ตรวจพบ eccDNA ขนาดใหญ่มักมีความรุนแรงของโรคมะเร็ง มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และมีแนวโน้มการตอบสนองต่อการรักษาที่ลดลง^(4,5) ขณะที่ eccDNA ขนาดเล็กเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กเกินกว่าจะประกอบด้วยลำดับเบสของยีนที่สมบูรณ์ รายงานล่าสุดแสดงให้เห็นถึงบทบาทของ eccDNA ขนาดเล็กในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งในระยะเริ่มต้นและการติดตามผลการรักษา^(6,7) ปัจจุบันมีการศึกษาจำนวนมากที่มุ่งเน้นถึงบทบาทของ eccDNA ที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง บทความนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมองค์ความรู้เกี่ยวกับ eccDNA โดยเน้นถึงแหล่งกำเนิด กลไกการเกิด และหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคมะเร็ง รวมถึงการนำเสนอศักยภาพของ eccDNA ในการเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพรูปแบบใหม่สำหรับการวินิจฉัยโรคมะเร็ง

วิธีการสืบค้นข้อมูล

การสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ eccDNA มีรายละเอียดการกำหนดคำสำคัญ (keywords) การสืบค้นครั้งนี้ กรณีเอกสารภาษาอังกฤษใช้คำว่า “extrachromosomal circular DNA” โดยใช้ตัวย่อว่า “eccDNA” และกรณีเอกสารภาษาไทยใช้คำว่า “ดีเอ็นเอวงกลมนอกโครโมโซม” บทความนี้ได้ทำการสืบค้นรวบรวม และนำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับโมเลกุล eccDNA โดยเน้นถึงจุดกำเนิด กลไกการสร้าง และบทบาทที่สำคัญในโรคมะเร็ง ซึ่งสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ (electronic database) และบทความวิจัยจากต่างประเทศ ได้แก่ ฐานข้อมูล PubMed และเว็บไซต์ Google Scholar

เนื้อหา

การค้นพบและการจำแนก eccDNA ในยูคาริโอต

eccDNA ในเซลล์ยูคาริโอตถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1964 โดย Hoota Y และ Bassel A ได้สังเกตเห็นดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวงกลมและมีขนาดที่หลากหลายในเซลล์สุจิของหมูดผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน⁽⁸⁾ ในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน Cox D และคณะ ได้รายงานการค้นพบโครมาตินบอดีขนาดเล็กที่ปรากฏเป็นคู่ในเซลล์มะเร็งของมนุษย์ ซึ่งต่อมาโครงสร้างเหล่านี้ถูกเรียกว่า ดับเบิลมินิต หรือ DM เนื่องจากมักพบเป็นคู่ภายในเซลล์ ซึ่ง DM มีสัดส่วนเพียงเล็กน้อย (ประมาณร้อยละ 30) ของอนุภาคดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกโครโมโซมทั้งหมดในเซลล์มะเร็ง⁽⁹⁾ โมเลกุล DM เปรียบเสมือนพาหะของดีเอ็นเอในรูปแบบวงกลมที่สามารถเพิ่มจำนวนของยีนที่อยู่ภายนอกโครโมโซม โครงสร้างของ DM ประกอบด้วยลำดับเบสของยีนก่อมะเร็งและ/หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการดีอียาเป็นองค์ประกอบหลัก ยีนที่พบบ่อย เช่น *MDM2*, *MYC* และ *EGFR*^(4,5) eccDNA อีกชนิดหนึ่งที่มีขนาดตั้งแต่ 0.2–3.5 ไมครอน ถูกค้นพบครั้งแรกในเซลล์ Hela เรียกว่า small polydisperse circular DNA (spcDNA) โดยมีความยาวตั้งแต่หลายร้อยคู่เบส

ไปจนถึงระดับกิโลเบส⁽¹⁰⁾ โดยทั่วไป spcDNA มักมีจุดกำเนิดมาจากบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำๆ บนจีโนม และพบมีปริมาณต่ำมากในเซลล์ปกติ spcDNA มีหน้าที่ในกระบวนการทางสรีรวิทยา เช่น การเจริญเติบโต ความแก่ชรา และพัฒนาการของเซลล์^(11,12) นอกจากนี้มีรายงานว่า spcDNA มักพบมีการสะสมมากในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีความไม่เสถียรทางพันธุกรรม เช่น เซลล์ที่ได้รับสารก่อมะเร็งหรือเซลล์เนื้องอก^(13,14) spcDNA ที่พบบ่อย ได้แก่ spcDNA ที่ประกอบด้วย ลำดับเบสของ Alu element หรือ long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) ซึ่งตรวจพบได้บ่อยในเนื้องอกร้าย (malignant tumor)⁽¹⁵⁾ จึงอาจบ่งชี้ได้ว่า spcDNA น่าจะมีความเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับความไม่เสถียรของจีโนม ในช่วงระหว่างทศวรรษ 1980-1990 มีรายงานการตรวจพบ spcDNA ที่มีลำดับเบสซ้ำจากหลายบริเวณบนจีโนม เช่น บริเวณลำดับเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ทรานสโพซอน (transposon) ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA; rDNA) และเทโลเมียร์ดีเอ็นเอ (telomere DNA) ต่อมา spcDNA ที่ประกอบด้วย ลำดับเบสของ rDNA และ telomere DNA เรียกว่า extrachromosomal rDNA circle (ERC) และ telomeric circle (t-circle) ตามลำดับ⁽¹⁶⁻¹⁹⁾ โมเลกุล ERC เกิดจากกระบวนการ homologous recombination และทำหน้าที่เป็นต้นแบบในการถอดรหัสเพื่อสร้าง ribosomal RNA (rRNA) โมเลกุล ERC มีความสามารถในการจำลองตัวเองและเพิ่มจำนวนได้ เนื่องจากมีลำดับดีเอ็นเอที่สามารถจำลองตัวเองได้อย่างอิสระ (autonomously replicating sequences) โดยทั่วไปมักพบการสะสมของ ERC ในเซลล์ที่มีอายุมากขึ้น ตัวอย่างเช่น ในกระบวนการชราภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในปอดของมนุษย์ พบขนาดและจำนวนสำเนาของ ERC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นกลไกการปรับตัวของเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม โดยเพิ่มจำนวนยีนที่มีความจำเพาะผ่านการเพิ่มสำเนาของโมเลกุล ERC⁽²⁰⁾ ส่วนโมเลกุล telomeric circle เป็น eccDNA ที่อาจอยู่ในรูปแบบสายคู่ (t-circle) หรือสายเดี่ยว

(c-circle) ประกอบด้วย ลำดับเบสซ้ำๆ ของบริเวณเทโลเมียร์ โมเลกุล t-circle/c-circle มีบทบาทสำคัญในกลไกการยืดความยาวของเทโลเมียร์ (alternative lengthening of telomeres; ALT) ซึ่งส่งเสริมการแบ่งตัวและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง⁽¹⁹⁾ eccDNA อีกชนิดหนึ่งที่เพิ่งได้รับการจำแนกและศึกษาถึงจุดกำเนิดอย่างชัดเจน เรียกว่า ไมโครดีเอ็นเอ (microDNA) ไมโครดีเอ็นเอถูกค้นพบครั้งแรกในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดย Dillon LW และคณะพบมีจุดกำเนิดมาจากบริเวณโครโมโซมก่อนที่จะถูกตัดออกและแยกตัวอยู่ภายนอกในรูปแบบโครงสร้างที่เป็นวงกลม ไมโครดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลวงกลมที่มีขนาดเล็กกว่า eccDNA ชนิดอื่น โดยมีขนาดความยาวประมาณ 100-400 คู่เบส⁽²¹⁾ และมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์หรือชนิดของเซลล์ในมนุษย์ การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอด้วยเทคโนโลยี Next-generation sequencing สามารถระบุตำแหน่งของไมโครดีเอ็นเอว่าส่วนใหญ่มีต้นกำเนิดจากตำแหน่งเฉพาะที่มีลำดับเบสไม่ซ้ำกันหรือบริเวณยีน ไมโครดีเอ็นเอสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนได้โดยผ่านกระบวนการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่มีบทบาทในการควบคุมการทำงานของยีน (small regulatory RNA) รวมถึงไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA; miRNA) และอาร์เอ็นเอที่ทำงานคล้าย small interfering RNA (siRNA-like)⁽²²⁾ งานวิจัยที่ผ่านมานั้นชี้ให้เห็นว่าการเกิดขึ้นของไมโครดีเอ็นเอ นั้น อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับความแปรผันของจำนวนสำเนายีนเฉพาะบุคคล ซึ่งจะเกิดขึ้นในบริเวณส่วนเล็กๆ ของจีโนม^(21,23) จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่า eccDNA มีการกระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์ยูคาริโอตและสามารถตรวจพบได้ในตำแหน่งต่างๆ ทั่วทั้งจีโนม eccDNA นั้น มีหลายชนิด มีขนาดตั้งแต่ประมาณ 100 คู่เบส ไปจนถึงระดับหลายเมกะเบส และมีหน้าที่ที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของ eccDNA บทความนี้ได้ทำการรวบรวมข้อมูลของ eccDNA ซึ่งจำแนกตามขนาดและบทบาทหน้าที่ในมะเร็ง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจำแนกชนิดของ eccDNA

ชนิดของ eccDNA	ขนาดความยาว	หน้าที่ทางชีววิทยาของมะเร็ง
DM	100 กิโลเบส ถึง 3 เมกะเบส	เป็นพาหะในการเพิ่มจำนวนของยีนก่อมะเร็งและ/หรือยีนดื้อยา ส่งเสริมให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของเนื้องอก รวมถึงภาวะดื้อต่อยา ^(4,5,24)
spcDNA	100 คู่เบส ถึง 10 กิโลเบส	เป็นตัวบ่งชี้และตัวเร่งความไม่เสถียรของจีโนม พบได้ในเซลล์ที่มีความไม่เสถียรทางพันธุกรรม ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ⁽¹⁴⁾
ERC	19.3 ถึง 40.4 กิโลเบส	เป็นแม่แบบสำหรับการถอดรหัสพันธุกรรมไปเป็นสาย rRNA มักพบสะสมในเซลล์ที่มีอายุมากขึ้น ⁽²⁰⁾
t-circle/c-circle	0.3 ถึง 30 กิโลเบส	เกี่ยวข้องกับกลไก ALT ในการฟื้นฟูความยาวของเทโลเมียร์ และสามารถใช้เป็น biomarker ที่จำแนกกลุ่มมะเร็งนิวโรblastoma ที่มีการทำงานของ ALT (ALT-positive) ได้อย่างชัดเจน รวมถึงช่วยในการวินิจฉัยและรักษามะเร็งที่ตรวจพบ ALT-positive ^(25,26)
microDNA	100 ถึง 400 คู่เบส	ผลิต microRNA หรือ siRNA-like สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนและยังใช้เป็น biomarker สำหรับการวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคมะเร็ง ^(7,22,27)

กระบวนการสร้างและเพิ่มจำนวนของ eccDNA ในเซลล์มะเร็ง

แม้จะมีรายงานการศึกษาจำนวนมากที่กล่าวถึงกลไกการสร้าง eccDNA แต่ปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปกลไกที่แท้จริงได้อย่างชัดเจน มีรายงานว่าความเสียหายของดีเอ็นเอและกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการรักษาเสถียรภาพของจีโนม โดยเฉพาะในกระบวนการเกิดเนื้องอกนั้น อาจมีบทบาทสำคัญที่ก่อให้เกิดการสร้าง eccDNA ขึ้น ทั้งนี้จึงมีการเสนอแบบจำลองที่เป็นไปได้ของกระบวนการสร้าง eccDNA จำนวน 4 รูปแบบ ดังแสดงในภาพที่ 1

รูปแบบ Breakage-fusion-bridge (BFB)

รูปแบบ BFB เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสะพานโครโมโซมในระยะแอนาเฟส (anaphase bridge) โดยเริ่มต้นจากการสูญเสียเทโลเมียร์ (telomere) ที่ปลายของโครโมโซมระหว่างกระบวนการแบ่งเซลล์และเกิดการทำสำเนาตัวเองขึ้น จากนั้นปลายที่หักของซิสเตอร์โครมาทิดทั้งสองจะหลอมรวมกันกลายเป็นโครโมโซมที่ผิดปกติที่มีเซนโทรเมียร์สองตำแหน่ง (dicentric chromosomes) เมื่อมีสิ่งกระตุ้นจะทำให้เกิดการแตกหักของสะพานในระยะแอนาเฟส และก่อให้เกิดความผิด

ปกติของโครโมโซมรวมทั้งเกิดการสร้าง eccDNA ขึ้น⁽²⁸⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1(ก)

รูปแบบ Chromothripsis

รูปแบบ Chromothripsis เป็นเหตุการณ์ที่ดีเอ็นเอได้รับความเสียหายอย่างรุนแรง ส่งผลให้โครโมโซมเกิดการแตกหักและหลอมรวมกันใหม่แบบปลายต่อปลาย ก่อให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอในบริเวณเฉพาะและนำไปสู่การสร้าง eccDNA ดังแสดงในภาพที่ 1(ข) ตัวอย่างปัจจัยที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเออย่างรุนแรง ได้แก่ การใช้ยาเคมีบำบัดในเซลล์ lymphoblastoid ที่กระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis)⁽²⁹⁾ หรือการสัมผัสกับสารก่อมะเร็ง เช่น 7,1-dimethylbenz[a]anthracene, hydroxyurea และ cycloheximide⁽³⁰⁾ ในด้านของกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอมีรายงานว่า การสูญเสียยีน *MSH3* ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการตรวจสอบและซ่อมแซมคู่เบสที่จับกันผิด (mismatch repair) ส่งผลให้ระดับของ eccDNA ลดลงมากถึงร้อยละ 80⁽²¹⁾ นอกจากนี้โปรตีนในกลุ่ม CTC1/STN1/TEN1 ซึ่งทำหน้าที่ในการรักษาความยาวของเทโลเมียร์ พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการสร้าง eccDNA ชนิด t-circle⁽³¹⁾

ที่น่าสนใจ คือ เทคโนโลยี CRISPR/Cas พบว่ามีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้าง eccDNA โดยส่งเสริมกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น⁽³²⁾ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ากลไกการแตกหักและการซ่อมแซมดีเอ็นเอมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการสร้าง eccDNA

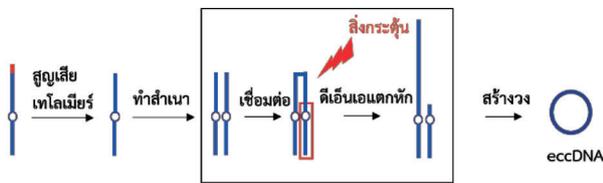
รูปแบบ translocation-deletion-amplification

กลไก translocation-deletion-amplification เป็นอีกหนึ่งกลไกที่สามารถนำไปสู่การสร้าง eccDNA กลไกนี้เกิดขึ้นเพื่อเป็นการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม โดยเซลล์จะซ่อมแซมความเสียหายของดีเอ็นเอที่แตกหักโดยการตัดส่วนของดีเอ็นเอที่เสียหายออก ซึ่งหลังจากกระบวนการดังกล่าว ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กที่เหลืออยู่จะรวมตัวกันเป็น eccDNA⁽³³⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1(ค)

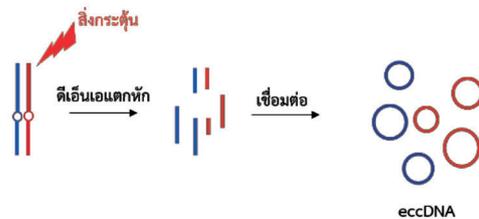
รูปแบบ Episome

รูปแบบ episome เป็นกลไกการสร้าง eccDNA อีกรูปแบบหนึ่ง โดยที่ eccDNA เกิดจากการเลื่อนของสายดีเอ็นเอ (DNA slippage) และเกิดการก่อตัวของโครงสร้าง R-loop ในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จากนั้นบริเวณเหล่านี้จะถูกตัดออกและเชื่อมต่อกันที่ปลายเกิดเป็น eccDNA ที่มีขนาดเล็กหรือเรียกอีกชื่อว่า episome โดย episome มีความสามารถในการจำลองตัวเองและสามารถขยายขนาดได้โดยการรวมชิ้นส่วนกับดีเอ็นเออื่นๆ เช่น ดีเอ็นเอที่เคลื่อนย้ายได้ (transposable element; TE)⁽³⁴⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1(ง) รูปแบบ episome เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของโมเลกุล eccDNA งานวิจัยของ Storlazzi CT และคณะ แสดงให้เห็นว่า DM ที่มียีน MYC ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) เกิดขึ้นจากการตัดออกและการขยายขนาดของดีเอ็นเอ ซึ่งสนับสนุนแบบจำลอง episome เช่นเดียวกับการสร้างโมเลกุล DM ที่มียีน EGFR ที่ส่งผลให้เกิดวงดีเอ็นเอที่มีการขยายจำนวนของยีน EGFR และเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการก่อมะเร็ง (oncogenic activation)⁽³⁵⁾

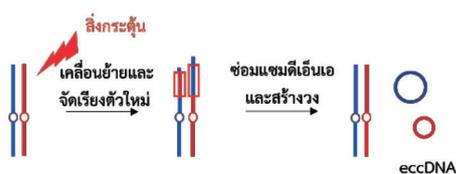
(ก) BFB



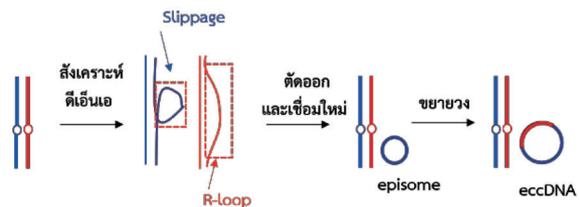
(ข) Chromothripsis



(ค) Translocation-deletion-amplification



(ง) Episome

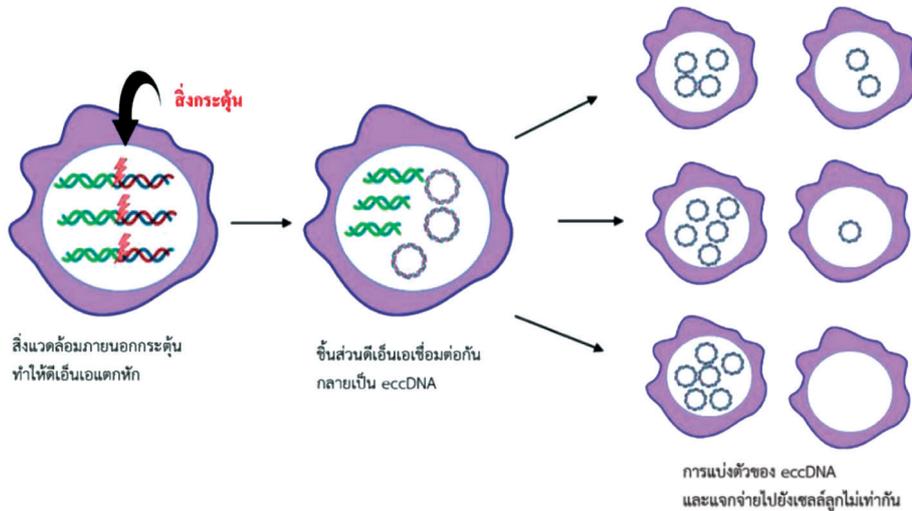


ภาพที่ 1 กลไกการสร้าง eccDNA ในรูปแบบต่างๆ (ก) รูปแบบ Breakage-fusion-bridge (BFB) (ข) รูปแบบ Chromothripsis (ค) รูปแบบ Translocation-deletion-amplification และ (ง) รูปแบบ Episome (ดัดแปลงจาก Ling X และคณะ)⁽³⁶⁾

สำหรับกลไกการเพิ่มจำนวนของ eccDNA ยังคงเป็นประเด็นที่ถกเถียง บางรายงานระบุว่า การเพิ่มจำนวนของ eccDNA ต้องอาศัยกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) และกระบวนการไมโทซิส (mitosis)⁽³⁷⁾ ขณะที่งานวิจัยอื่นๆ พบว่าระดับของ eccDNA ยังคงเพิ่มขึ้นได้แม้จะมีการยับยั้งกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ⁽³⁰⁾ หรืออยู่ในสถานะที่ไม่มีกระบวนการจำลองดีเอ็นเอเกิดขึ้นเลย⁽³⁸⁾ จึงเชื่อว่า eccDNA น่าจะเพิ่มจำนวนได้โดยไม่ขึ้นกับกระบวนการไมโทซิส เนื่องจาก eccDNA หลายชนิดไม่มีตำแหน่งเริ่มต้นของการจำลองตัวเอง (origin of replication) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญต่อการจำลองดีเอ็นเอทั่วไป ปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่า กลไกใดเป็นกลไกหลักในการเพิ่มจำนวนของ eccDNA จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมอย่างลึกซึ้งเพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงกลไกดังกล่าวอย่างชัดเจนยิ่งขึ้น

บทบาทของ eccDNA กับการขับเคลื่อนวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อมะเร็ง การศึกษาทางอณูพยาธิวิทยาของมะเร็งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของเซลล์ในเนื้อเยื่อมะเร็งหรือที่เรียกว่า tumor heterogeneity ทั้งในระดับโมเลกุล จีโนม และเอพิเจเนติกส์ พบว่าการคงอยู่ของ eccDNA เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความหลากหลายดังกล่าว เนื่องจาก eccDNA ไม่มีเซนโทรเมียร์จึงสามารถสูญหายไประหว่างกระบวนการไมโทซิส และไม่ปฏิบัติตามกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของเมนเดล eccDNA ที่เหลือรอดจะถูกแจกจ่ายแบบสุ่มไปยังเซลล์ลูก ส่งผลให้เซลล์ลูกบางเซลล์อาจได้รับสำเนาชิ้นก่อนมะเร็งจาก eccDNA หลายชุดในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้ง ทำให้เกิดความได้เปรียบในการเพิ่มจำนวน⁽²⁴⁾ ดังแสดงในภาพที่ 2

ซึ่งความผิดปกติของจำนวนชุดโครโมโซม (ploidy) และการเพิ่มจำนวนยีนเป็นลักษณะที่พบได้บ่อยในเซลล์มะเร็ง การกระจายตัวของ eccDNA ที่แตกต่างกันในแต่ละเซลล์ส่งผลให้มีการทำงานที่แตกต่างจากดีเอ็นเอบนโครโมโซมปกติ การเพิ่มจำนวนของ eccDNA จึงเป็นกลไกสำคัญที่สร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมและส่งเสริม tumor heterogeneity อีกทั้ง eccDNA สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและคงอยู่ได้นาน ถือเป็นกระบวนการทางพันธุกรรมเฉพาะตัวที่ช่วยเร่งวิวัฒนาการของเซลล์มะเร็ง^(24,39) การใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH) ในการศึกษา มะเร็งสมองชนิด glioblastoma พบการเพิ่มจำนวนของยีนทั้งหมด 34 ยีนบน eccDNA เช่น epidermal growth factor receptor (*EGFR*), MYC Proto-oncogene (*MYC*), cyclin-dependent kinase 4 (*CDK4*), MET proto-oncogene (*MET*), mouse double minute 2 homolog (*MDM2*) และ platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFR*) ทั้งในระยะอินเตอร์เฟสและในช่วงกลางของการแบ่งเซลล์ ในระยะอินเตอร์เฟสตรวจพบสัญญาณเรืองแสงในนิวเคลียสที่แตกต่างกันอย่างมากในแต่ละเซลล์ โดยมีตั้งแต่ 2-100 สัญญาณ แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายอย่างชัดเจนของจำนวนสำเนายีนเป้าหมาย ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนของ eccDNA⁽⁴⁰⁾ นอกจากนี้พบว่ายีน *EGFR* เป็นยีนที่พบการเพิ่มจำนวนมากที่สุดใน glioblastoma คิดเป็นประมาณร้อยละ 40 ของยีนที่เพิ่มจำนวนทั้งหมด และการเพิ่มจำนวนของยีน *EGFR* ยังมีความจำเพาะอย่างมีนัยสำคัญต่อเนื้องอกชนิดนี้⁽⁴¹⁾ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของ eccDNA กับรูปแบบการเพิ่มจำนวนของยีนก่อนมะเร็งในมะเร็งแต่ละชนิดยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 2 การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของ eccDNA ที่ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล เนื่องจาก eccDNA ขาดเซนโทรเมียร์ทำให้เกิดการถ่ายทอดทางพันธุกรรมระหว่างเซลล์ลูกไม่เท่ากัน ส่งผลให้เกิด tumor heterogeneity

eccDNA ไม่เพียงเป็นแรงขับเคลื่อนสำคัญที่ก่อให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนมในยูคาริโอตเท่านั้น แต่ยังเป็นผลผลิตจากกระบวนการจัดเรียงจีโนมแบบมีแบบแผน (programmed genome rearrangement) งานวิจัยของ Nguyen ND และคณะ รายงานว่าการจัดเรียงจีโนมมีความเกี่ยวข้องกับการแทรกตัวของไวรัสเข้าสู่ eccDNA และก่อให้เกิดโครงสร้างวงกลมขนาดเล็กประกอบด้วย ดีเอ็นเอของไวรัสและมนุษย์รวมกันซึ่งมีบทบาทต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัส Human papillomavirus (HPV) โดย eccDNA ดังกล่าว อาจส่งเสริมการถอดรหัสพันธุกรรมขององค์ประกอบจีโนมที่อยู่ใกล้เคียงโดยไม่เฉพาะเจาะจง จึงมีความเป็นไปได้ว่า eccDNA ทำหน้าที่เป็นกลไกเสริมที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ของมะเร็งที่มีสาเหตุจากไวรัสบางชนิด⁽⁴²⁾ การศึกษาของ Deshpande V และคณะ ยืนยันการมีอยู่ของดีเอ็นเอมนุษย์และไวรัสที่รวมตัวกันภายนอกโครโมโซมโดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AmpliconArchitect แสดงให้เห็นว่า eccDNA มีบทบาทสำคัญในการสร้างการจัดเรียงจีโนมที่ซับซ้อน รวมทั้งการเพิ่มจำนวนของยีนก่อมะเร็งเฉพาะตำแหน่ง ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด⁽⁴³⁾ หนึ่งในรูปแบบที่พบบ่อย คือ การเพิ่มจำนวนของยีน *PVT1* (plasmacytoma variant

translocation 1) ในโมลกุล DM ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของ DM และการเกิดขึ้นลูกผสม (fusion gene) ส่งผลให้ยีน *PVT1* มีการแสดงออกในระดับสูงในเนื้อเยื่อมะเร็ง⁽⁴⁴⁾ ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน (Acute Myeloid Leukemia; AML) มีรายงานการค้นพบอาร์เอ็นเอลูกผสมใหม่ เช่น *PVT1*-non-smc element 2 (*NSMCE2*) และ coiled-coil domain-containing protein 26-*NSMCE2* ซึ่งสัมพันธ์กับ DM ที่มีต้นกำเนิดมาจากโครโมโซมคู่ที่ 8 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของยีนลูกผสมในตำแหน่งเฉพาะบนโครโมโซม 8q24 มีบทบาทต่อการก่อมะเร็งของชิ้นส่วนโครโมโซมดังกล่าวและมีความเชื่อมโยงอย่างใกล้ชิดกับ DM⁽⁴⁵⁾

การศึกษาในวารสาร Nature Genetics รายงานถึงบทบาทของ eccDNA ในการจัดโครงสร้างจีโนมของมะเร็งเนื้อเยื่อประสาท (Neuroblastoma) โดยใช้การบูรณาการข้อมูลจีโนมและทรานสคริปโตม (transcriptome) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า eccDNA เป็นแหล่งสำคัญของการจัดเรียงจีโนมในเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ส่งเสริมการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนก่อมะเร็งผ่านกระบวนการหลอมรวมของดีเอ็นเอแบบวงกลม (chimeric circular DNA) และการนำ eccDNA กลับเข้าไปสู่จีโนมแบบเส้นตรง eccDNA ที่เกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่นี้สามารถก่อให้เกิดรอยโรคที่มีศักยภาพ

ในการก่อมะเร็ง และนำไปสู่การแสดงออกที่ผิดปกติของยีนยับยั้งมะเร็ง (tumor suppressor gene) รวมทั้งโปรโตออนโคยีน (proto-oncogenes)⁽⁴⁶⁾ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อฟีโนไทป์ของเซลล์มะเร็ง

จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า จำนวนโมเลกุล eccDNA ตลอดจนปริมาณและจำนวนของยีนก่อมะเร็งที่ถูกขยายจำนวนล้วนส่งผลทำให้เซลล์มะเร็งมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น โดยส่งเสริมให้เซลล์แบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่อง ลดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) และสนับสนุนกระบวนการวิวัฒนาการเชิงปรับตัวของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ eccDNA มีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์หลายรูปแบบ รวมถึงกระบวนการที่กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งเชื่อมโยงกับการดำเนินโรคที่รวดเร็วและการรอดชีวิตที่สั้นลงของผู้ป่วย⁽⁴⁷⁾ ดังนั้น eccDNA จึงถือเป็นลักษณะที่สำคัญทางจีโนมในเซลล์มะเร็ง เนื่องจากสามารถเปลี่ยนแปลงรูปแบบการกระจายและการจัดเรียงของยีนก่อมะเร็ง ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของเซลล์มะเร็งอย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังเป็นปัจจัยที่เร่งกระบวนการวิวัฒนาการของเซลล์มะเร็งในมนุษย์อีกด้วย

eccDNA เกี่ยวข้องกับการดื้อยาและการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี

ในช่วงศตวรรษที่ผ่านมา มีรายงานการตรวจพบ eccDNA ชนิด DM ในเซลล์ไขกระดูกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลันที่ดื้อต่อยา cytarabine และ daunorubicin hydrochloride โดยผู้ป่วยจะเสียชีวิตภายใน 3 สัปดาห์หลังจากเริ่มแสดงอาการ จึงทำให้เกิดข้อสงสัยถึงความสัมพันธ์ระหว่าง eccDNA กับภาวะดื้อยาหรือการลุกลาม (metastasis) ของโรคมะเร็ง⁽⁴⁸⁾ การเพิ่มจำนวนของยีนก่อมะเร็ง เช่น *C-MYC* บน eccDNA ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว ทั้งยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการรอดชีวิตที่สั้นลงและการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดที่ไม่มีประสิทธิภาพ⁽⁴⁹⁾ ผลการศึกษามะเร็งสมองชนิด glioblastoma ได้ข้อสรุปที่สอดคล้องกัน โดยพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของ eccDNA ช่วยเหลือเซลล์มะเร็งรอดพ้นจากการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดหรือรังสีรักษา⁽⁴⁰⁾ ในกรณีการรักษาด้วยยา

methotrexate พบภาวะดื้อยามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของยีน dihydrofolate reductase (*DHFR*) บน DM โดยพบยีน *DHFR* มีการเพิ่มจำนวนสูงขึ้นหลังการรักษา และการแสดงออกของยีนที่มากเกินไปยังส่งผลต่อต้านฤทธิ์ยับยั้งยา methotrexate ต่อการเผาผลาญโฟเลต รวมทั้งยังคงกระบวนการสังเคราะห์ตีเอ็นเอในเซลล์มะเร็งส่งผลให้เกิดภาวะดื้อยา⁽⁵⁰⁾ อีกด้วย ขณะที่ Nathanson DA และคณะ ได้รายงานผลการวิเคราะห์เซลล์เนื้องอกในผู้ป่วย glioblastoma ที่ได้รับการรักษาด้วยยายับยั้งการทำงานของ EGFR tyrosine kinase (EGFR-TKIs) พบว่าเซลล์มะเร็งสามารถปรับระดับการแสดงออกของยีน epidermal growth factor receptor variant (*EGFRvIII*) บน eccDNA ได้แบบผันกลับ ส่งผลให้เกิดฟีโนไทป์ของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเพื่อปรับตัวในการเจริญเติบโต ซึ่งการสูญเสียยีน *EGFRvIII* บน eccDNA นับเป็นกลไกการดื้อต่อยา EGFR-TKIs ที่พบบ่อยและมีความสำคัญทางคลินิกในผู้ป่วย glioblastoma⁽⁵¹⁾ นอกจากนี้ Xu K และคณะ รายงานถึงวิวัฒนาการของ DM ว่ามีความสัมพันธ์กับภาวะดื้อยาในผู้ป่วย glioblastoma โดยในผู้ป่วยเด็กพบว่าปริมาณของยีน *EGFR* บน DM มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง และมีการเปลี่ยนแปลงทั้งในระยะการวินิจฉัยและระยะการกลับมาเป็นซ้ำ ทั้งนี้ DM ทุกชุดที่ตรวจพบในผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำหลังการรักษาด้วยยา erlotinib พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *EGFR* อย่างไรก็ดีตามความถี่ของการกลายพันธุ์ในระยะวินิจฉัยพบว่าต่ำมาก ซึ่งบ่งชี้ถึงศักยภาพของการดื้อยาด้าน *EGFR* ที่แตกต่างกันในแต่ละระยะ นักวิจัยยังรายงานรูปแบบที่คล้ายกันของการเปลี่ยนแปลงจำนวนสำเนาของ DM เมื่อเวลาผ่านไป ในผู้ป่วย glioblastoma ของผู้ใหญ่ จำนวน 4 ราย (เปรียบเทียบระหว่างระยะวินิจฉัยและระยะกลับมาเป็นซ้ำ) โดยแม้ว่ายีนก่อมะเร็งที่ถูกเพิ่มจำนวนจะเป็นชนิดเดียวกันทั้งสองระยะ แต่กลับพบการเพิ่มจำนวนของยีน *EGFR* บน DM ที่แตกต่างกัน⁽⁵²⁾ งานวิจัยของ Koduru P และคณะ รายงานว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านมบางรายสามารถพัฒนาเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเฉียบพลันได้ภายใน 18 เดือน หลังได้รับการ

รักษาด้วยยาหลายชนิดร่วมกัน ได้แก่ trastuzumab, pertuzumab, docetaxel, carboplatin และยาอื่น ๆ ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการเพิ่มจำนวนของยีน *MYC* และ *KMT2A* บนโมเลกุล DM ขณะเดียวกัน การสูญเสียการทำงานของโปรตีน p53 ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของยีนต่าง ๆ ในระดับที่แตกต่างกันบน DM ที่หลากหลายนำไปสู่ความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เรียกว่า “ความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของ double minutes” (double-minute heterogeneity) ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ดังนั้น มะเร็งที่กลับมาเป็นซ้ำจึงมักมีความผิดปกติทางจีโนมที่ซับซ้อน มีการกลายพันธุ์อย่างกว้างขวาง และมีความแปรปรวนของจำนวนสำเนายีนบน DM⁽⁵³⁾ นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของยีนนอกโครโมโซมที่สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวน (amplification-linked extrachromosomal mutations) ยังมีบทบาทสำคัญในการช่วยให้เซลล์มะเร็งสามารถปรับตัวได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง⁽⁵⁴⁾ เนื้อเยื่อมะเร็งที่มีการเพิ่มจำนวน eccDNA มักมีความรุนแรงและมีพยากรณ์โรคที่เลวร้ายลงอย่างมีนัยสำคัญ จากข้อมูลการวิเคราะห์จีโนมในผู้ป่วยจำนวน 3,212 ราย พบว่าเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีการเพิ่มจำนวนของ eccDNA มีลักษณะการแพร่กระจายที่ลุกลามมากขึ้น โดยมีแนวโน้มการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองตั้งแต่วะระยะเริ่มต้นของการวินิจฉัย และผู้ป่วยกลุ่มนี้มักมีอัตราการรอดชีวิตใน 5 ปี ต่ำกว่าผู้ที่ไม่มีการเพิ่มจำนวนของ eccDNA⁽⁴⁾ ข้อมูลเหล่านี้จึงสะท้อนให้เห็นว่า eccDNA มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการตอบสนองต่อการรักษา โดยส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของจำนวนของยีนก่อมะเร็งในเนื้องอก และเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาและการพยากรณ์โรคที่เลวร้ายลงในมะเร็งบางชนิด

บทบาทของ eccDNA ในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคมะเร็ง

บทบาทของ eccDNA ในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) ของโรคมะเร็งกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะ eccDNA ขนาดเล็กที่มี

ลักษณะเป็นโมเลกุลอิสระ มีความเสถียรสูง และตรวจพบได้ทั้งในเนื้อเยื่อและกระแสเลือด งานวิจัยทางคลินิกมีการตรวจพบ eccDNA ทั้งในพลาสมาและซีรัมของผู้ป่วยโรคมะเร็ง^(6,7,27) ซึ่งส่วนใหญ่พบเป็น eccDNA ขนาดเล็กที่มีจุดกำเนิดมาจากบริเวณยีน ตัวอย่างเช่น การตรวจพบ eccDNA ขนาดเล็กที่มีจุดกำเนิดจากบริเวณยีน *DOCK1*, *PPIC*, *TBC1D16* และ *RP11-370A5.1* ที่พบได้เฉพาะผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma ทำให้ eccDNA เหล่านี้มีแนวโน้มในการนำมาพัฒนาสำหรับการตรวจคัดกรองผู้ป่วยระยะเริ่มต้น (early diagnosis) นอกจากนี้ eccDNA บางชนิดสามารถตรวจพบได้ทั้งในผู้ป่วยโรคมะเร็งและคนสุขภาพดี แต่พบระดับการแสดงออกของยีนบน eccDNA สูงกว่าอย่างชัดเจนในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็ง เมื่อทำการตรวจสอบเพิ่มเติมพบว่าระดับการแสดงออกของยีนมีความแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละรายซึ่งสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีพ⁽⁶⁾ บ่งชี้ว่า eccDNA ขนาดเล็กเหล่านี้อาจนำมาใช้ในการพยากรณ์โรค (prognosis) ได้อีกด้วย eccDNA ขนาดเล็กที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก ได้แก่ ไมโครดีเอ็นเอจัดเป็น eccDNA ขนาดเล็กที่พบมากที่สุด โดยพบสัดส่วนสูงถึงประมาณร้อยละ 84 ของดีเอ็นเอวงกลมทั้งหมด ไมโครดีเอ็นเอส่วนใหญ่ยังมีจุดกำเนิดมาจากบริเวณยีน มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดเนื้อเยื่อ⁽²¹⁾ และมีโครงสร้างที่เป็นเอกลักษณ์แตกต่างกันในแต่ละชนิดเซลล์ มีรายงานการเปรียบเทียบความยาวของไมโครดีเอ็นเอที่สกัดจากพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอดและมะเร็งรังไข่ก่อนและหลังการผ่าตัด พบว่าไมโครดีเอ็นเอมีความยาวเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการผ่าตัด⁽⁷⁾ แสดงว่าไมโครดีเอ็นเอ น่าจะมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเซลล์แต่ละชนิด และน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโมเลกุลตามสถานะของโรคด้วย ไมโครดีเอ็นเอจึงอาจเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีศักยภาพสูงสำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยและการติดตามการรักษาโรค นอกจากนี้ไมโครดีเอ็นเอยังมี eccDNA ขนาดเล็กชนิดอื่นที่น่าสนใจ เช่น spcDNA ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความไม่เสถียรของจีโนม โดยมีรายงานการตรวจพบ spcDNA ปริมาณสูงในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูก เนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ของผู้ป่วยโรค Fanconi anemia⁽¹⁴⁾ ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่นำ spcDNA มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยหรือการพยากรณ์โรคมะเร็ง แม้ว่าในทางคลินิกจะยังไม่มีรายงานการประยุกต์ใช้ spcDNA เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยโรคมะเร็ง แต่จากความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับโรคซึ่งเกิดจากความไม่เสถียรของจีโนม ทำให้ spcDNA เป็น eccDNA อีกกลุ่มหนึ่งที่มีแนวโน้มในการพัฒนาและประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งได้ในอนาคต

เทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์หาโมเลกุล eccDNA

การศึกษาวិเคราะห์โครงสร้างของโมเลกุล eccDNA ในช่วงแรกอาศัยการสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน⁽⁸⁾ ซึ่งให้ข้อมูลโครงสร้างของโมเลกุล eccDNA ในระดับที่จำกัด ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคในการแยกและสกัด eccDNA ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น การปั่นเหวี่ยงแบบเดนซิทีเกรเดียนต์โดยใช้สารซีเซียมคลอไรด์ (Caesium chloride) เป็นตัวกลาง⁽¹⁴⁾ และการย่อยสลายดีเอ็นเอเส้นตรงด้วยเอนไซม์เอกโซนิวคลีเอส (exonuclease) เพื่อให้ได้เฉพาะดีเอ็นเอวงกลม^(2,3) รวมทั้งการแยกด้วยวิธี 2D เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส^(15,17) นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคอื่นๆ เช่น เทคนิค Southern blot⁽¹⁵⁾, inverse PCR⁽⁵⁵⁾ และ Fluorescence in situ hybridization (FISH)^(5,55) ซึ่งช่วยให้สามารถตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้แม้อยู่ในระดับที่ไม่ละเอียดมาก นอกจากกระบวนการสกัดแยกและทำให้ eccDNA บริสุทธิ์แล้ว การศึกษาวิเคราะห์ eccDNA ยังครอบคลุมถึงการหาลำดับเบสแบบความละเอียดสูงในระดับกลุ่มเซลล์ (bulk high-throughput sequencing) ปัจจุบันมีเทคนิคการหาลำดับเบสหลายวิธีที่สามารถใช้ในจำแนก eccDNA แบบ bulk high-throughput ได้อย่างเป็นระบบ ได้แก่ whole-genome sequencing (WGS), genome-scale enrichment and detection method for eccDNA (Circle-seq), circular DNA enrichment sequencing (CIDER-seq), assay for transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC-seq) และ circulome sequencing (Circulome-seq) จากวิธีดังกล่าว WGS และ

Circle-seq เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมและถูกใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยปัจจุบัน เทคนิค WGS เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมทั้งหมด รวมถึง eccDNA ได้จากการหาลำดับเบสของจีโนมทั้งชุด ซึ่งให้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ครอบคลุมและสามารถตรวจหาความแปรผันทางพันธุกรรมในรูปแบบอื่นๆ ได้ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีข้อจำกัดในการตรวจจับ eccDNA ที่มีขนาดเล็ก ทำให้ eccDNA บางส่วนอาจไม่ถูกตรวจพบหรือไม่สามารถระบุลักษณะได้อย่างครบถ้วน^(5,24,56) เทคนิค Circle-seq เป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มความแม่นยำในการตรวจหา eccDNA โดยแยก eccDNA ที่มีโครงสร้างเป็นวงกลมออกจากดีเอ็นเอเส้นตรง (linear DNA) ทำให้สามารถระบุ eccDNA ได้อย่างถูกต้องและจำเพาะมากกว่า WGS แต่มีข้อเสียคือ มีต้นทุนสูงและไม่สามารถตรวจหาความแปรผันทางพันธุกรรมประเภทอื่นได้^(2,21) เทคนิค CIDER-seq เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ใช้หลักการคล้ายคลึงกัน โดยอาศัยโครงสร้างวงกลมของ eccDNA เพื่อเพิ่มปริมาณและจำแนกข้อมูล ทำให้สามารถตรวจสอบ eccDNA ได้อย่างแม่นยำในระดับโมเลกุลเดี่ยว⁽⁵⁷⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี WGS และ Circle-seq เทคนิคนี้มีกระบวนการที่ซับซ้อนกว่าและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางในการดำเนินการ สำหรับเทคนิค ATAC-seq ได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ระบุหา eccDNA โดยใช้เอนไซม์ Tn5 transposase ตัดดีเอ็นเอบริเวณ open chromatin รวมถึง eccDNA ที่มีการอัดแน่นของโครมาตินน้อย พร้อมติดแท็กด้วยอะแดปเตอร์ จากนั้นข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับเบสจะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Circle_finder เพื่อทำนายการมีอยู่ของ eccDNA โดยอ้างอิงจากลักษณะของการอ่านลำดับที่ครอบคลุมบริเวณจุดเชื่อมต่อของโมเลกุลดีเอ็นเอวงกลม⁽⁵⁵⁾ ส่วนเทคนิค Circulome-seq เป็นวิธีแบบบูรณาการที่ผสมกระบวนการย่อยสลายดีเอ็นเอเส้นตรงด้วยเอนไซม์ exonuclease การแยกโมเลกุลด้วยการปั่นเหวี่ยงแบบเดนซิทีเกรเดียนต์ โดยใช้สารซีเซียมคลอไรด์หรือเอทีดีเอ็มโบรไมด์เป็นตัวกลาง และการหาลำดับเบสโดยอาศัยเอนไซม์ Tn5 transposase ซึ่งวิธีเหล่านี้เป็นการเพิ่มปริมาณและจำแนกลักษณะของ eccDNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽²³⁾

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคโนโลยี high-throughput sequencing แบบเซลล์เดี่ยว (single-cell-based high-throughput sequencing) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ช่วยในการวิเคราะห์หาลำดับเบสจากเซลล์แต่ละเซลล์ได้อย่างจำเพาะ ให้ข้อมูลที่มีความละเอียดสูง และสามารถตรวจจับความแตกต่างระหว่างเซลล์ภายในเนื้อเยื่อหรือกลุ่มตัวอย่างเดียวกันได้อย่างแม่นยำ ตัวอย่างเทคโนโลยีดังกล่าว ได้แก่ single-cell Circle-seq (scCircle-seq), single-cell ATAC-seq (scATAC-seq), single-cell WGS (scWGS) และ single-cell paralleled genome and transcriptome sequencing on a third-generation platform (scGTP-seq) เทคนิคเหล่านี้ได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการศึกษา eccDNA อย่างละเอียดมากขึ้น เช่น การระบุบริเวณเอนแฮนเซอร์ (enhancer) ของ eccDNA การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของจำนวนสำเนา (copy number variation) และการตรวจหาความแปรผันของโครงสร้าง (structural variation) eccDNA⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾ นอกจากนี้เทคนิค sequencing of enzyme-accessible chromatin in circular DNA (CCDA-seq) ซึ่งสามารถหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เข้าถึงได้ในโครมาตินของ eccDNA ในระดับโมเลกุลเดี่ยว⁽⁶¹⁾ และเทคนิค Mobilome-seq สามารถระบุหา eccDNA ที่ได้จาก TE (TE-derived eccDNA)⁽⁶²⁾ เทคโนโลยีการหาลำดับเบสในระดับเซลล์เดี่ยวยังรวมถึงเทคนิค single-cell extrachromosomal circular DNA and transcriptome sequencing (scEC&T-seq) ซึ่งสามารถหาลำดับเบสของ eccDNA และทรานสคริปโตม

ในเซลล์เดี่ยวได้พร้อมกัน เทคนิคนี้ถือเป็นเครื่องมือสำคัญเนื่องจากสามารถวิเคราะห์ eccDNA และการแสดงออกของยีนทั้งหมดได้แบบขนานกันในระดับเซลล์เดี่ยว ทำให้สามารถเข้าใจถึงบทบาทของ eccDNA ที่สัมพันธ์กับฟีโนไทป์ของเซลล์ และการควบคุมการแสดงออกของยีนได้อย่างครอบคลุม⁽⁶³⁾ อีกหนึ่งเทคนิคที่สำคัญคือ single-molecule real-time sequencing of long fragments amplified through transposon insertion (SMOOTH-seq) ซึ่งเป็นวิธีการหาลำดับเบสแบบเรียลไทม์สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายยาวที่ผ่านการขยายด้วยทรานสโพซอน⁽⁶⁴⁾ กล่าวโดยสรุปเทคโนโลยีการหาลำดับเบสแบบ single-cell sequencing เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาความแตกต่างระหว่างเซลล์ให้ข้อมูลเชิงลึกและมีความละเอียดสูง ทำให้เข้าใจบทบาทของ eccDNA ในกระบวนการทางชีววิทยาของเซลล์ได้อย่างชัดเจน การพัฒนาอัลกอริทึมทางชีวสารสนเทศที่ออกแบบเฉพาะสำหรับการจำแนกและวิเคราะห์ eccDNA ยังเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ความถูกต้อง และความสะดวกในการประมวลผลข้อมูลของ eccDNA ซึ่งมีความซับซ้อนสูง จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อช่วยในการตรวจวิเคราะห์และจำแนก eccDNA อย่างกว้างขวาง แต่เทคนิคแต่ละวิธียังคงมีข้อจำกัดเฉพาะที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ eccDNA ที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการได้มาซึ่งผลลัพธ์ที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ บทความนี้จึงได้สรุปข้อดี ข้อเสีย และข้อจำกัดของเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ eccDNA ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ eccDNA

เทคนิค	รายละเอียด	ข้อดี/ข้อเสีย
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ⁽⁶⁾	บอกตำแหน่ง จำแนกชนิด และตรวจสอบปริมาณของ eccDNA	ขาดข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์
Density gradient centrifugation ⁽¹⁴⁾	ใช้สกัดแยกและทำให้ eccDNA บริสุทธิ์	ยุ่งยากและใช้เวลานาน
2D เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ^(15,17)	จำแนกชนิดของ eccDNA	ขาดข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์
Southern blot ⁽¹⁵⁾	ตรวจสอบปริมาณของ eccDNA	ได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 2 เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ eccDNA (ต่อ)

เทคนิค	รายละเอียด	ข้อดี/ข้อเสีย
Inverse PCR ⁽⁵⁵⁾	ตรวจสอบปริมาณและจำแนกชนิดของ eccDNA	ได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงเล็กน้อย
FISH ^(5,55)	บอกตำแหน่ง จำแนกชนิด และตรวจสอบปริมาณของ eccDNA	ได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงเล็กน้อย
Bulk high-throughput sequencing ^(2,5,21,23,24,55-57)	จำแนกชนิด บอกจำนวน และขนาดของ eccDNA ได้อย่างครอบคลุม โดยให้ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยหรือภาพรวมของ eccDNA ทั้งหมดในกลุ่มเซลล์	ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้น ให้ข้อมูลเชิงลึกและครอบคลุมในระดับจีโนม แต่ไม่สามารถตรวจจับความแตกต่างระหว่างเซลล์แต่ละเซลล์ได้
Single-cell-based high-throughput sequencing ⁽⁵⁸⁻⁶⁴⁾	ให้ข้อมูลของ eccDNA ถึงในระดับเซลล์เดี่ยว	ให้ข้อมูลเชิงลึกในระดับจีโนมที่มีความละเอียดสูง สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ได้อย่างแม่นยำ แต่เทคนิคนี้มีความไวต่ำ เนื่องจากปริมาณ eccDNA ในแต่ละเซลล์มีน้อย กระบวนการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ข้อมูลมีความซับซ้อน รวมทั้งมีค่าใช้จ่ายสูง

วิจารณ์

eccDNA และดีเอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซมมีความแตกต่างกันอย่างมากในหลายด้านที่สำคัญ เช่น จุดกำเนิด โครงสร้าง และบทบาททางชีววิทยา ด้วยความเป็นเอกลักษณ์ของ eccDNA การศึกษาถึงความแตกต่างและลักษณะเฉพาะของ eccDNA ที่ตรวจพบในผู้ป่วยโรคมะเร็งเปรียบเทียบกับผู้ที่มีสุขภาพดี จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งได้ งานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า eccDNA มีความหลากหลายทั้งในด้านขนาดและตำแหน่งกำเนิดบนจีโนม โดย eccDNA ขนาดใหญ่มักนำพายีนก่อมะเร็งและ/หรือยีนดีออกมานอกโครโมโซม จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนสำเนาและส่งเสริมการแสดงออกของยีน ซึ่งสัมพันธ์กับความรุนแรง และการลุกลามของโรคมะเร็ง^(4,5) ขณะที่ eccDNA ขนาดเล็ก (น้อยกว่า 1 กิโลเบส) สามารถหลุดออกจากเซลล์ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งในรูปแบบของดีเอ็นเออิสระภายนอกเซลล์ (extracellular free DNA) ซึ่งตรวจพบได้ในของเหลวจากร่างกาย จึงมีแนวโน้มในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับ

การตรวจคัดกรองโรคมะเร็งระยะเริ่มต้น การพยากรณ์โรค และการติดตามผลการรักษา ปัจจุบันมีรายงานจำนวนมากที่สนับสนุนศักยภาพของ eccDNA ที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ (cell-free eccDNA) ที่สามารถตรวจพบได้จากตัวอย่างเลือด^(6,7,27) ทำให้น่าสนใจอย่างยิ่งในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพแบบไม่รุกราน (non-invasive biomarker) อย่างไรก็ตามยังมีประเด็นที่ต้องได้รับการวิจัยและพัฒนาเพิ่มเติม ประการแรก ความเข้าใจในองค์ประกอบของ eccDNA ในเซลล์มะเร็งหลายชนิดยังมีข้อจำกัด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของ eccDNA ที่มีความจำเพาะและเหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัย ประการที่สอง มาตรฐานในกระบวนการแยก การวิเคราะห์ และการเพิ่มปริมาณ eccDNA เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่แม่นยำและสามารถทำซ้ำได้ และประการสุดท้าย แม้ว่าจะมีรายงานที่แสดงระดับของ eccDNA มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคมะเร็ง แต่การนำ eccDNA มาใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยและพยากรณ์โรคในทางคลินิกนั้นยังอยู่ในระยะเริ่มต้น จึงต้องมีการศึกษาทางคลินิกเพิ่มเติมเพื่อประเมินความแม่นยำ ความไว และความจำเพาะของ eccDNA

ในการใช้งานจริง ดังนั้นการพัฒนาเครื่องมือและเทคโนโลยีใหม่ๆ ทั้งในด้านกระบวนการสกัดแยก การวิเคราะห์ และเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อเพิ่มศักยภาพในการนำ eccDNA ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างกว้างขวางในอนาคต

นอกจากการใช้ eccDNA เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยและการพยากรณ์โรคแล้ว eccDNA ยังเป็นเป้าหมายสำคัญสำหรับการพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งอีกด้วย เนื่องจากความสามารถของ eccDNA ในการเพิ่มจำนวนและส่งเสริมการแสดงออกของยีนก่อมะเร็ง ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่สนับสนุนการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเซลล์มะเร็ง การกำจัด eccDNA จึงอาจเป็นกลยุทธ์การรักษาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ลดภาวะดื้อยา และป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำของโรค ตัวอย่างเช่น การใช้ยา hydroxyurea ในขนาดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สามารถลดจำนวนของ DM และยับยั้งการแพร่กระจายระยะกลางของเซลล์มะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ระยะลุกลามได้⁽⁶⁵⁾ อีกทั้งยังช่วยเร่งการสูญเสียของยีนดื้อยาที่เพิ่มจำนวนอยู่นอกโครโมโซม ส่งผลให้เซลล์มีความไวต่อยาเพิ่มขึ้น⁽⁶⁶⁾ ในเซลล์มะเร็งรังไข่ ยา gemcitabine สามารถกำจัด eccDNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้การเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งช้าลง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sanchez AM และคณะ พบว่าการฉายรังสีไอออนไนซ์แบบค่อยเป็นค่อยไปสามารถเร่งการสูญเสียของการเพิ่มจำนวนยีน *MDR1* บน eccDNA ที่เกี่ยวข้องกับภาวะดื้อต่อยาหลายชนิด ส่งผลให้ประสิทธิภาพการรักษาของมะเร็งบางชนิดดีขึ้น⁽⁶⁷⁾ ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่การยับยั้งการแสดงออกของยีน *BRCA1* สามารถยับยั้งกระบวนการ homologous recombination ลดการเพิ่มจำนวน eccDNA ที่ประกอบด้วยยีนดื้อต่อยา Methotrexate และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด⁽⁶⁵⁾ เช่นเดียวกับในเนื้องอกสมองชนิด glioblastoma การใช้ยาในกลุ่ม Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) สามารถกำจัด eccDNA ที่มียีนกลายพันธุ์ใน Glioblastomas และ Low-grade gliomas ได้⁽⁶⁸⁾ ดังนั้นในอนาคต eccDNA อาจถูกพัฒนาเป็นเป้าหมายใหม่ในการรักษามะเร็งหรืออาจถูกนำมาใช้ร่วมกับการรักษาแบบมาตรฐาน เช่น การฉายรังสี เคมีบำบัด

หรือการใช้ยาต้านมะเร็ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและเสริมฤทธิ์ร่วมกัน

สรุป

eccDNA พบได้อย่างแพร่หลายในมะเร็งหลายชนิดของมนุษย์และมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนสำเนาและกระตุ้นการแสดงออกของยีนก่อมะเร็ง ส่งผลให้เกิดการก่อมะเร็งและการปรับตัวเชิงวิวัฒนาการของเซลล์มะเร็ง อีกทั้ง eccDNA มีส่วนช่วยในการกระตุ้นการปรับโครงสร้างและการเปลี่ยนรูปแบบการแสดงออกของยีนก่อมะเร็ง eccDNA จึงถือเป็นแรงขับเคลื่อนสำคัญของภาวะดื้อยาและสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ดังนั้นการทราบถึงโครงสร้างและหน้าที่ของ eccDNA จะช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของมะเร็ง และให้ข้อมูลเชิงลึกสำหรับกลยุทธ์การรักษาและการประยุกต์ใช้ทางคลินิก นอกจากนี้การค้นพบ eccDNA ในกระแสเลือดนับเป็นก้าวสำคัญต่อการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพแบบไม่รุกราน สำหรับการตรวจวินิจฉัย การพยากรณ์ และติดตามผลการรักษาแบบเรียลไทม์ การพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการตรวจวิเคราะห์ eccDNA จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรวจคัดกรองและการวินิจฉัยมะเร็งชนิดต่างๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

บทความฉบับนี้จัดทำขึ้นโดยผู้เขียนทั้งหมด ไม่มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ในการช่วยจัดทำ แก๊ซหรือจัดการต้นฉบับแต่อย่างใด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์และผู้ทรงคุณวุฒิ ด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและชีววิทยามะเร็ง ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ต่อการเรียบเรียงบทความปริทัศน์ฉบับนี้เป็นอย่างยิ่ง ขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยเกี่ยวกับ

eccDNA อันเป็นพื้นฐานความรู้และความเข้าใจ ซึ่งช่วยให้การจัดทำบทความปริทัศน์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบคุณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่เอื้อเฟื้อ และสนับสนุนการเข้าถึงเอกสารทางวิชาการที่สำคัญ

เอกสารอ้างอิง

1. Stanfield SW, Lengyel JA. Small circular DNA of *Drosophila melanogaster*: chromosomal homology and kinetic complexity. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76(12): 6142-6.
2. Møller HD, Parsons L, Jørgensen TS, Botstein D, Regenberg B. Extrachromosomal circular DNA is common in yeast. Proc Natl Acad Sci USA 2015; 112(24): E3114-22.
3. Møller HD, Mohiyuddin M, Prada-Luengo I, Sailani MR, Halling JF, Plomgaard P, et al. Circular DNA elements of chromosomal origin are common in healthy human somatic tissue. Nat Commun 2018; 9(1): 1069. (12 pages).
4. Kim H, Nguyen N-P, Turner K, Wu S, Gujar AD, Luebeck J, et al. Extrachromosomal DNA is associated with oncogene amplification and poor outcome across multiple cancers. Nat Genet 2020; 52(9): 891-7.
5. Wu S, Turner KM, Nguyen N, Raviram R, Erb M, Santini J, et al. Circular ecDNA promotes accessible chromatin and high oncogene expression. Nature 2019; 575(7784): 699-703.
6. Wu X, Li P, Yimiti M, Ye Z, Fang X, Chen P, et al. Identification and characterization of extrachromosomal circular DNA in plasma of lung adenocarcinoma patients. Int J Gen Med 2022; 15: 4781-91.
7. Kumar P, Dillon LW, Shibata Y, Jazaeri AA, Jones DR, Dutta A. Normal and cancerous tissues release extrachromosomal circular DNA (eccDNA) into the circulation. Mol Cancer Res 2017; 15(9): 1197-205.
8. Hoota Y, Bassel A. Molecular size and circularity of DNA in cells of mammals and higher plants. Proc Natl Acad Sci USA 1965; 53(2): 356-62.
9. Cox D, Yuncken C, Spriggs AI. Minute chromatin bodies in malignant tumours of childhood. Lancet 1965; 1(7402): 55-8.
10. Radloff R, Bauer W, Vinograd J. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. Proc Natl Acad Sci USA 1967; 57(5): 1514-21.
11. Cohen S, Menut S, Méchali M. Regulated formation of extrachromosomal circular DNA molecules during development in *Xenopus laevis*. Mol Cell Biol 1999; 19(10): 6682-9.
12. Kunisada T, Yamagishi H, Ogita Z, Kirakawa T, Mitsui Y. Appearance of extrachromosomal circular DNAs during *in vivo* and *in vitro* ageing of mammalian cells. Mech Ageing Dev 1985; 29(1): 89-99.
13. Cohen S, Lavi S. Induction of circles of heterogeneous sizes in carcinogen-treated cells: two-dimensional gel analysis of circular DNA molecules. Mol Cell Biol 1996; 16(5): 2002-14.
14. Cohen S, Regev A, Lavi S. Small polydispersed circular DNA (spcDNA) in human cells: association with genomic instability. Oncogene 1997; 14(8): 977-85.
15. Schmidt H, Taubert H, Lange H, Kriese K, Schmitt WD, Hoffmann S, et al. Small polydispersed circular DNA contains strains of mobile genetic elements and occurs more frequently in permanent cell lines of malignant tumors than in normal lymphocytes. Oncol Rep 2009; 22(2): 393-400.
16. Kunisada T, Yamagishi H. Sequence organization of repetitive sequences enriched in small

- polydisperse circular DNAs from HeLa cells. *J Mol Biol* 1987; 198(4): 557-65.
17. Cohen S, Agmon N, Sobol O, Segal D. Extrachromosomal circles of satellite repeats and 5S ribosomal DNA in human cells. *Mob DNA* 2010; 1(1): 11. (11 pages).
 18. Misra R, Matera AG, Schmid CW, Rush MG. Recombination mediates production of an extrachromosomal circular DNA containing a transposon-like human element, THE-1. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(20): 8327-41.
 19. Tomaska L, Nosek J, Kramara J, Griffith JD. Telomeric circles: universal players in telomere maintenance? *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(10): 1010-5.
 20. Hull RM, Houseley J. The adaptive potential of circular DNA accumulation in ageing cells. *Curr Genet* 2020; 66(5): 889-94.
 21. Dillon LW, Kumar P, Shibata Y, Wang YH, Willcox S, Griffith JD, et al. Production of extrachromosomal microDNAs is linked to mismatch repair pathways and transcriptional activity. *Cell Rep* 2015; 11(11): 1749-59.
 22. Paulsen T, Shibata Y, Kumar P, Dillon L, Dutta A. Small extrachromosomal circular DNAs, microDNA, produce short regulatory RNAs that suppress gene expression independent of canonical promoters. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(9): 4586-96.
 23. Shoura MJ, Gabdank I, Hansen L, Merker J, Gotlib J, Levene SD, et al. Intricate and cell type-specific populations of endogenous circular DNA (eccDNA) in *Caenorhabditis elegans* and *Homo sapiens*. *G3: Genes Genomes Genet* 2017; 7(10): 3295-303.
 24. Turner KM, Deshpande V, Beyter D, Koga T, Rusert J, Lee C, et al. Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature* 2017; 543(7643): 122-5.
 25. Chen YY, Dagg R, Zhang Y, Lee JHY, Lu R, Martin La Rotta N, et al. The C-Circle biomarker is secreted by alternative-lengthening-of-telomeres positive cancer cells inside exosomes and provides a blood-based diagnostic for ALT Activity. *Cancers (Basel)* 2021; 13(21). 5369. (24 pages).
 26. Henson JD, Cao Y, Huschtscha LI, Chang AC, Au AYM, Pickett HA, et al. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat Biotechnol* 2009; 27(12): 1181-5.
 27. Luo X, Zhang L, Cui J, An Q, Li H, Zhang Z, et al. Small extrachromosomal circular DNAs as biomarkers for multi-cancer diagnosis and monitoring. *Clin Transl Med* 2023; 13(9): e1393. (16 pages).
 28. Zakov S, Kinsella M, Bafna V. An algorithmic approach for breakage-fusion-bridge detection in tumor genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(14): 5546-51.
 29. Mehanna P, Gagné V, Lajoie M, Spinella JF, St-Onge P, Sinnett D, et al. Characterization of the microDNA through the response to chemotherapeutics in lymphoblastoid cell lines. *PloS one* 2017; 12(9): e0184365. (14 pages).
 30. Sunnerhagen P, Sjöberg RM, Karlsson AL, Lundh L, Bjursell G. Molecular cloning and characterization of small polydisperse circular DNA from mouse 3T6 cells. *Nucleic Acids Res* 1986; 14(20): 7823-38.
 31. Huang C, Jia P, Chastain M, Shiva O, Chai W. The human CTC1/STN1/TEN1 complex regulates telomere maintenance in ALT cancer cells. *Exp Cell Res* 2017; 355(2): 95-104.
 32. Shoshani O, Brunner SF, Yaeger R, Ly P, Nechemia-Arbely Y, Kim DH, et al. Chromo-

- thripsis drives the evolution of gene amplification in cancer. *Nature* 2021; 591(7848): 137–41.
33. Van Roy N, Vandesompele J, Menten B, Nilsson H, De Smet E, Rocchi M, et al. Translocation–excision–deletion–amplification mechanism leading to nonsyntenic coamplification of *MYC* and *ATBF1*. *Genes Chromosom Cancer* 2006; 45(2): 107–17.
 34. Møller HD, Larsen CE, Parsons L, Hansen AJ, Regenbreg B, Mourier T. Formation of extra-chromosomal circular DNA from long terminal repeats of retrotransposons in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes Genomes Genet* 2015; 6(2): 453–62.
 35. Storlazzi CT, Lonoce A, Guastadisegni MC, Trombetta D, D’Addabbo P, Daniele G, et al. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: origin and structure. *Genome Res* 2010; 20(9): 1198–206.
 36. Ling X, Han Y, Meng J, Zhong B, Chen J, Zhang H, et al. Small extrachromosomal circular DNA (eccDNA): major functions in evolution and cancer. *Mol Cancer* 2021; 20(1): 113. (15 pages).
 37. Baker SP, Grant PA. The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene* 2007; 26(37): 5329–40.
 38. Cohen Z, Lavi S. Replication independent formation of extrachromosomal circular DNA in mammalian cell-free system. *PLoS One* 2009; 4(7): e6126. (8 pages).
 39. Bailey C, Shoura MJ, Mischel PS, Swanton C. Extrachromosomal DNA-relieving heredity constraints, accelerating tumour evolution. *Ann Oncol* 2020; 31(7): 884–93.
 40. deCarvalho AC, Kim H, Poisson LM, Winn ME, Mueller C, Cherba D, et al. Discordant inheritance of chromosomal and extrachromosomal DNA elements contributes to dynamic disease evolution in glioblastoma. *Nat Genet* 2018; 50(5): 708–17.
 41. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J, et al. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol* 2010; 23(6): 856–65.
 42. Nguyen ND, Deshpande V, Luebeck J, Mischel PS, Bafna V. ViFi: accurate detection of viral integration and mRNA fusion reveals indiscriminate and unregulated transcription in proximal genomic regions in cervical cancer. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(7): 3309–25.
 43. Deshpande V, Luebeck J, Nguyen N-PD, Bakhtiari M, Turner KM, Schwab R, et al. Exploring the landscape of focal amplifications in cancer using AmpliconArchitect. *Nat Commun* 2019; 10(1): 392. (14 pages).
 44. Jin K, Wang S, Zhang Y, Xia M, Mo Y, Li X, et al. Long non-coding RNA PVT1 interacts with MYC and its downstream molecules to synergistically promote tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76(21): 4275–89.
 45. Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Maegawa S, Tatekawa S, et al. 8q24 amplified segments involve novel fusion genes between *NSMCE2* and long noncoding RNAs in acute myelogenous leukemia. *J Hematol Oncol* 2014; 7: 68. (5 pages).
 46. Koche RP, Rodriguez-Fos E, Helmsauer K, Burkert M, MacArthur IC, Maag J, et al. Extrachromosomal circular DNA drives oncogenic genome remodeling in neuroblastoma. *Nat Genet* 2020; 52(1): 29–34.
 47. Del Rey J, Prat E, Ponsa I, Lloreta J, Gelabert A, Algaba F, et al. Centrosome clustering and cyclin D1 gene amplification in double minutes are common events in chromosomal unstable bladder tumors. *BMC Cancer* 2010; 10: 280. (11 pages).

48. Cooperman BS, Klinger HP. Double minute chromosomes in a case of acute myelogenous leukemia resistant to chemotherapy. *Cytogenet Cell Genet* 1981; 30(1): 25-30.
49. Amin AJ, Shaw M, Tadros J, Benn H, Maroules M. Double minute chromosome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 108(11): 4428.
50. Huennekens FM. The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. *Adv Enzyme Regul* 1994; 34: 397-419.
51. Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, Visnyei K, Koga T, Gomez G, et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science* 2014; 343(6166): 72-6.
52. Xu K, Ding L, Chang TC, Shao Y, Chiang J, Mulder H, et al. Structure and evolution of double minutes in diagnosis and relapse brain tumors. *Acta Neuropathol* 2019; 137(1): 123-37.
53. Koduru P, Chen W, Haley B, Ho K, Oliver D, Wilson K. Cytogenomic characterization of double minute heterogeneity in therapy related acute myeloid leukemia. *Cancer Genet* 2019; 238: 69-75.
54. Xue Y, Martelotto L, Baslan T, Vides A, Solomon M, Mai TT, et al. An approach to suppress the evolution of resistance in BRAFV600E-mutant cancer. *Nat Med* 2017; 23(8): 929-37.
55. Su Z, Saha S, Paulsen T, Kumar P, Dutta A. ATAC-Seq-based Identification of extrachromosomal circular DNA in mammalian cells and its validation using inverse PCR and FISH. *Bio Protoc* 2021; 11(9): e4003. (21 pages).
56. Luebeck J, Ng AWT, Galipeau PC, Li X, Sanchez CA, Katz-Summercorn AC, et al. Extrachromosomal DNA in the cancerous transformation of Barrett's oesophagus. *Nature* 2023; 616(7958): 798-805.
57. Mehta D, Cornet L, Hirsch-Hoffmann M, Zaidi SS-e-A, Vanderschuren H. Full-length sequencing of circular DNA viruses and extrachromosomal circular DNA using CIDER-Seq. *Nat Protoc* 2020; 15(5): 1673-89.
58. Chen JP, Diekmann C, Wu H, Chen C, Della Chiara G, Berrino E, et al. scCircle-seq unveils the diversity and complexity of extrachromosomal circular DNAs in single cells. *Nat Commun* 2024; 15(1): 1768. (14 pages).
59. Spain L, Coulton A, Lobon I, Rowan A, Schnidrig D, Shepherd STC, et al. Late-stage metastatic melanoma emerges through a diversity of evolutionary pathways. *Cancer Discov* 2023; 13(6): 1364-85.
60. Chang L, Deng E, Wang J, Zhou W, Ao J, Liu R, et al. Single-cell third-generation sequencing-based multi-omics uncovers gene expression changes governed by ecDNA and structural variants in cancer cells. *Clin Transl Med* 2023; 13(8): e1351. (23 pages).
61. Chen W, Weng Z, Xie Z, Xie Y, Zhang C, Chen Z, et al. Sequencing of methylase-accessible regions in integral circular extrachromosomal DNA reveals differences in chromatin structure. *Epigenetics Chromatin* 2021; 14: 40. (11 pages).
62. Lanciano S, Zhang P, Llauro C, Mirouze M. Identification of extrachromosomal circular forms of active transposable elements using mobilome-seq. *Methods Mol Biol* 2021; 2250: 87-93.
63. Chamorro González R, Conrad T, Stöber MC, Xu R, Giurgiu M, Rodriguez-Fos E, et al. Parallel sequencing of extrachromosomal circular DNAs and transcriptomes in single cancer cells. *Nat Genet* 2023; 55(5): 880-90.
64. Fan X, Yang C, Li W, Bai X, Zhou X, Xie H, et al. SMOOTH-seq: single-cell genome

- sequencing of human cells on a third-generation sequencing platform. *Genome Biol* 2021; 22(1): 195. (19 pages).
65. Raymond E, Faivre S, Weiss G, McGill J, Davidson K, Izbicka E, et al. Effects of hydroxyurea on extrachromosomal DNA in patients with advanced ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7(5): 1171-80.
66. Von Hoff DD, Waddelow T, Forseth B, Davidson K, Scott J, Wahl G. Hydroxyurea accelerates loss of extrachromosomally amplified genes from tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51(23 Pt 1): 6273-9.
67. Sanchez AM, Barrett JT, Schoenlein PV. Fractionated ionizing radiation accelerates loss of amplified MDR1 genes harbored by extrachromosomal DNA in tumor cells. *Cancer Res.* 1998; 58(17): 3845-54.
68. Barreto SC, Uppalapati M, Ray A. Small circular DNAs in human pathology. *Malays J Med Sci* 2014; 21(3): 4-18.
-

Extrachromosomal Circular DNA: Origins, Biogenesis, and Functional Roles in Cancer

Suchitraporn Sukthaworn¹ and Suparat Tangchaiyaphum²

¹*Division of Research and Technology Assessment, National Cancer Institute, Bangkok 10400, Thailand*

²*National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Bangkok 10400, Thailand*

ABSTRACT Extrachromosomal circular DNA (eccDNA) is a form of double-stranded circular DNA that arises from genomic instability and exists independently of chromosomes. EccDNAs vary in size and originate from loci distributed throughout the genome. Notably, several studies have reported that eccDNA levels are significantly higher in cancer cells than in normal cells, and elevated eccDNA levels have been shown to serve as effective indicators of cancer pathogenesis. Numerous studies have demonstrated that the amplification of oncogenes and drug resistance genes located on eccDNA plays a critical role in driving tumor evolution and heterogeneity, as well as being associated with drug resistance and poor prognosis. Recent studies have also revealed that eccDNA can be released into the circulation as cell-free DNA, exhibiting distinct genetic features that vary depending on the cell type. The expression levels of genes on eccDNA have been associated with disease status and patient survival. Thus, eccDNA has emerged as a promising biomarker for treatment monitoring and cancer prognosis. This review highlights current knowledge of eccDNA detected in both tumor tissues and blood samples from cancer patients, focusing on its origins, biogenesis, and functional roles in cancer, which may lead to more accurate diagnostic approaches and more effective therapeutic strategies.

Keywords: Extrachromosomal circular DNA, Oncogene, Drug resistance gene, Biomarker