ทางเลือกสำหรับผู้ป่วยด้วยโรคทางกรรมพันธุ์

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ*

*ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป และหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 114 ถนนสุขุมวิท แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110 โทรศัพท์ 02-649-5000 ต่อ 8660; email: Lsurasak2005@yahoo.com

"โรคทางกรรมพันธุ์" เกิดจากการกลาย (mutation) ในระดับยีนที่อยู่ในโครโมโซม การแสดงออกของความผิดปกติขึ้นอยู่การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ส่งผลต่อการแปลรหัสเป็นโปรตีนเช่น รหัสพันธุกรรมหรือโคดอน (codon) ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่ข้างเป็นประจุลบได้แก่ กลูตาเมต (glutamate) แต่เมื่อมีการกลายและเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับเบสทำให้แปลรหัสเป็นแอสพาเตต (aspartate) ระดับความผิดปกติอาจจะไม่มากแต่ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงมากเช่น เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนที่หมู่ข้างเป็นประจุบวกได้แก่ ไลซีน ระดับความผิดปกติอาจจะมากเพราะการเปลี่ยนแปลงของประจุทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไป การกลายในธรรมชาติเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลาโดยมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างช้าๆ หรืออาจถูกชักนำด้วยปัจจัยต่างๆ โรคทางกรรมพันธุ์เกิดจากความผิดปกติของสารพันธุกรรม การรักษาจึงทำได้ยาก และการรักษาโดยทั่วไปจะรักษาตามอาการของโรคที่แสดงออก

ปัจจุบันมีโครงการจีโนมมนุษย์ (human genome project) ทำให้ทราบข้อมูลอย่างมากมายที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของมนุษย์ ว่ามีสาเหตุมาจากความผิดปกติของยีนใดที่อยู่บนโครโมโซม ทำให้ทราบเป้าหมายที่ควบคุมยีนที่แสดงออกของโรคอย่างถูกต้อง (ตารางที่ 1) ทั้งนี้เพราะความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ ด้วยการอาศัยเทคนิคการตัดต่อและการจัดการกับยีนหรือพันธุวิศวกรรม ทำให้ทราบกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยการควบคุมที่ขั้นตอนการถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) และการแปลรหัสเป็นโปรตีน โดยถ้าควบคุมทั้งสองขั้นตอนนี้ได้จะทำให้ควบคุมความผิดปกติได้ เรียกการรักษาแบบนี้ว่าการทำยีนบำบัด (gene therapy)

ยุคทองของยีนบำบัด

ความก้าวหน้าทางวิทยาการใหม่ๆ อาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ทำให้สามารถสกัดและตัดต่อยีนจนได้ยีนคุณภาพดี ซึ่งใน ค.ศ. 1990 Michael และคณะ ได้นำยีน ADA มาใช้รักษาผู้ป่วยโรคทางกรรมพันธุ์ SCID เป็นครั้งแรก ทำให้เด็กที่ได้รับยีน ADA นี้มีระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายปกติ นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ยังพยายามใช้ยีนบำบัดเพื่อรักษาโรคอื่นๆ การยอมรับในการบำบัดด้วยยีนได้รับการยอมรับจากหน่วยงานและสถาบันมากมายเพื่อใช้รักษาโรคต่างๆ ดังตัวอย่างในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1. ยีนเป้าหมายที่มีผลใช้บำบัดโรคต่างๆ

Disease	**Defective gene**
Immunodeficiency	Adenosine deaminase
Hypercholesterolaemia	LDL receptor
Haemophilia	Factor IX
	Factor VIII
Gaucher's disease	Glucocerebrosidase
Mucopolysaccharidosis	β-glucuronidase
Emphysema	α-1-antitrypsin
Cystic fibrosis	Cystic fibrosis transmembrane regulator
Phenylketonuria	Phynylalanine hydroxylase
Hyperammonaemia	Ornithine transcarbamylase
Citrulinaemia	Arginosuccinate synthetase
Muscular dystrophy	Dystrophin
Thalassaemia	β-globin
Sickle cell anaemia	β-glucuronidase
Leukocyte adhesion deficiency	CD-18

ที่มา : (Miller, 1992)

ตารางที่ 2. การทดลองยืนยันการบำบัดด้วยยีนที่ได้รับการยอมรับจากหน่วยงานต่างๆ

Experiment type	Description	Principal investigator	US Institution
Cell marking	*neo* marker transfer to tumour-infiltrating lymphocytes	S.A. Rosenberg	National Institutes of Health (NIH)
		M.T.Lotze	University of Pittsburgh
		J.S.Econemu	University of California, Los Angeles
	neo transfer to hepatocytes used to treat acute hepatic failure	F.D.Ledley	Baylor College of Medicine, Houston
	Hph-tk marker transfer to HIV antigen-specific T cells used for treatment of AIDS	P.D.Greenberg	Fred Hutchinson Cancer Research Center, University of Washington
	neo marker transfer to leukaemic cells that may be present in autologous marrow used for treatment of leukaemia	M.K.Brenner	St Jude Children's Research Hospital, Memphis
		A.B.Deisseroth	M.D. Anderson Cancer Center, University of Taxas
		K.Cornetta	Indiana University, Indianapolis
	neo marker transfer to neuroblastoma cells that may be present in analogous marrow used for treatment of neuroblastoma	M.K.Brenner	St Jude Children's Research Hospital, Memphis
Gene therapy	ADA gene transfer to lymphocytes from ADA-deficient patients	R.M. Blaese	NIH
	LDL receptor gene transfer to hepatocytes from LDL receptor-deficient patients	J.M. Wilson	University of Michigan
	Tumour necrosis factor gene transfer to tumour-infiltating lymphocytes	S.A. Rosenberg	NIH
	Tumour necrosis factor gene transfer to tumour cells	S.A. Rosenberg	NIH
	IL-2 gene transfer to tumour cells	S.A. Rosenberg	NIH
	Antigen transfer to tumour cells *in situ* to stimulate immune rejection	G.J. Nabel	University of Michigan, Ann Arbor
	Toxin gene transfer to ovarian carcinoma cells for treatment of ovarian cancer	S.M. Freeman	University of Rochester
	ADA gene transfer to peripheral blood stem cells from ADA-defient patients	R.M. Blaese	NIH

ที่มา : (Miller, 1992)

การนำยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย

การบำบัดด้วยยีนในช่วงแรกเน้นการบำบัดยีนเข้าสู่ทั้งเซลล์ร่างกาย (somatic cell : 2n) หรือเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell : n) แต่สุดท้ายต้องเลือกทำเฉพาะกับเซลล์ร่างกาย ซึ่งเป็นการควบคุมไม่ให้ยีนถ่ายทอดไปยังรุ่นถัดไป เนื่องจากช่วงชีวิตของคนยาวจึงยังไม่มีการศึกษาและติดตามผลของยีนที่ใส่เข้าไปว่าจะมีผลต่อรุ่นลูกหลานอย่างไร ปัจจุบันการศึกษายังคงเป็นการควบคุมยีนเดียวโดยติดตามโปรตีนที่เป็นผลผลิตจากยีนที่เซลล์สร้างขึ้น โดยยีนที่ใส่เข้าไปต้องสามารถสอดแทรกเข้าสู่โครโมโซมเป้าหมาย เรียกกระบวนการนี้ว่าการเกิดลูกผสม (recombination) ความสำเร็จของการทำยีนบำบัดขึ้นอยู่กับวิธีการนำยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ซึ่งมีอยู่ 3 วิธี ได้แก่

1. การใช้สารเคมี เช่น แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate: $CaPO_4$) DEAE-dextran หรือลิพิด (lipid) มาผสมกับยีนที่จะส่งเข้าไป โดยอาศัยคุณสมบัติของสารเคมีเหล่านี้ช่วยลดประจุบน DNA ทำให้ผ่านเซลล์เมมเบรนของเซลล์เป้าหมายเข้าไปได้ โอกาสที่จะนำยีนเข้าไปเป็นผลสำเร็จด้วยวิธีนี้มีเพียง 1 ใน 1,000 – 1 ใน 10,000 เท่านั้น เนื่องจากเซลล์มีระบบป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์

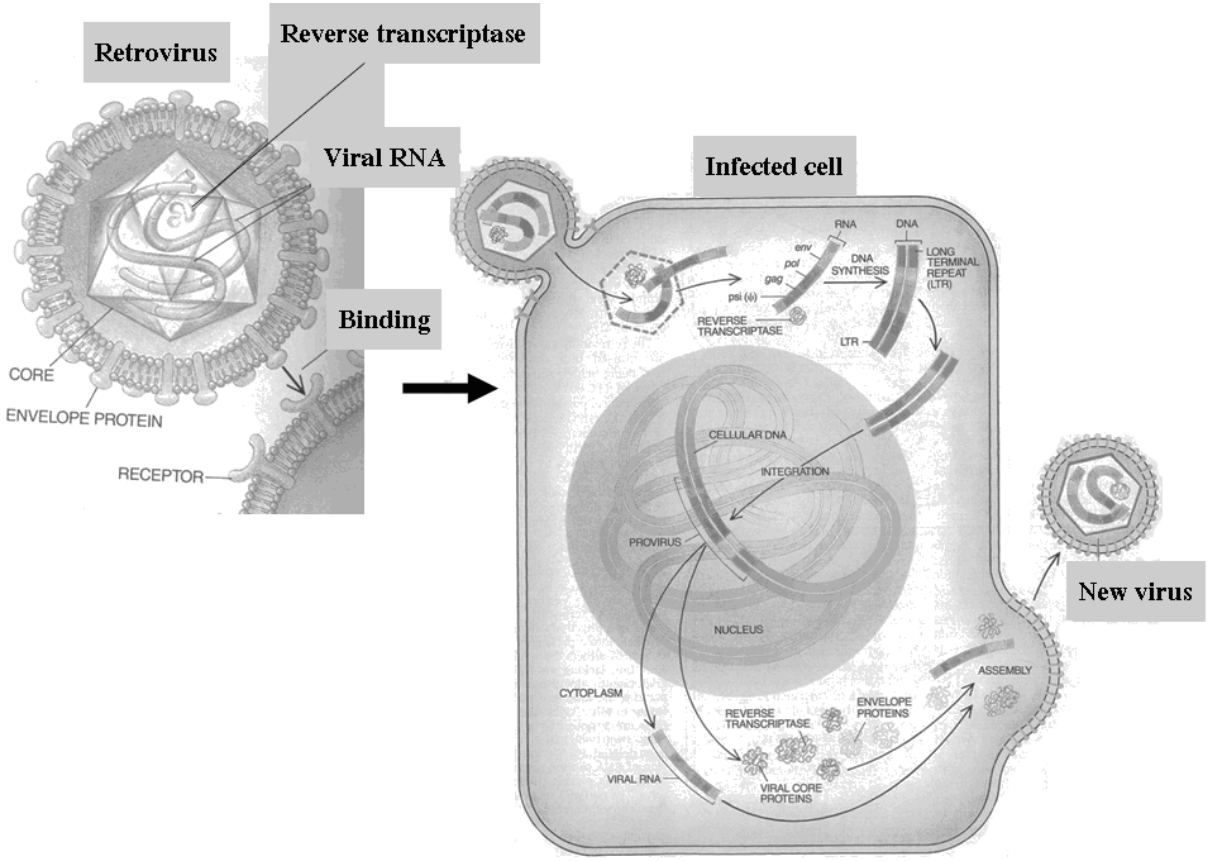
2. วิธีทางกายภาพ เช่น การฉีดยีนเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์โดยตรงด้วยเข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microinjection) โอกาสที่จะนำยีนเข้าไปเป็นผลสำเร็จด้วยวิธีนี้มีถึง 1 ใน 5 และการนำยีนเข้าเซลล์ด้วยการใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) โอกาสที่จะสำเร็จนั้นมีน้อยมาก เนื่องจากความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าที่สูงอาจทำลาย DNA ได้ง่าย

3. ใช้ไวรัส เป็นตัวพาเข้าเซลล์ในรูปของดีเอ็นเอพาหะ (DNA vector) ไวรัสเป็นพาราสิตของเซลล์ที่มีขนาดเล็ก มีองค์ประกอบของเซลล์ที่สำคัญคือสารพันธุกรรมซึ่งอาจจะเป็น DNA หรือ RNA ทั้งสายเดี่ยวและสายคู่ ไวรัสชนิดหนึ่งๆ จะมีสารพันธุกรรมเพียงชนิดเดียวเท่านั้น แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ดีเอ็นเอไวรัส (DNA virus) และ อาร์เอ็นเอไวรัส (RNA virus) ไวรัสทุกชนิดอาศัยการจำลองสารพันธุกรรมและสร้างอนุภาคจากการทำงานของโครงสร้างต่างๆ ของเซลล์เจ้าบ้านที่ถูกบุกรุกเข้าไป จึงทำให้ยีนที่ใส่เข้าไปสามารถมาเพิ่มจำนวนและบำบัดโรคได้

รีโทรไวรัสคือทางเลือกสุดท้าย

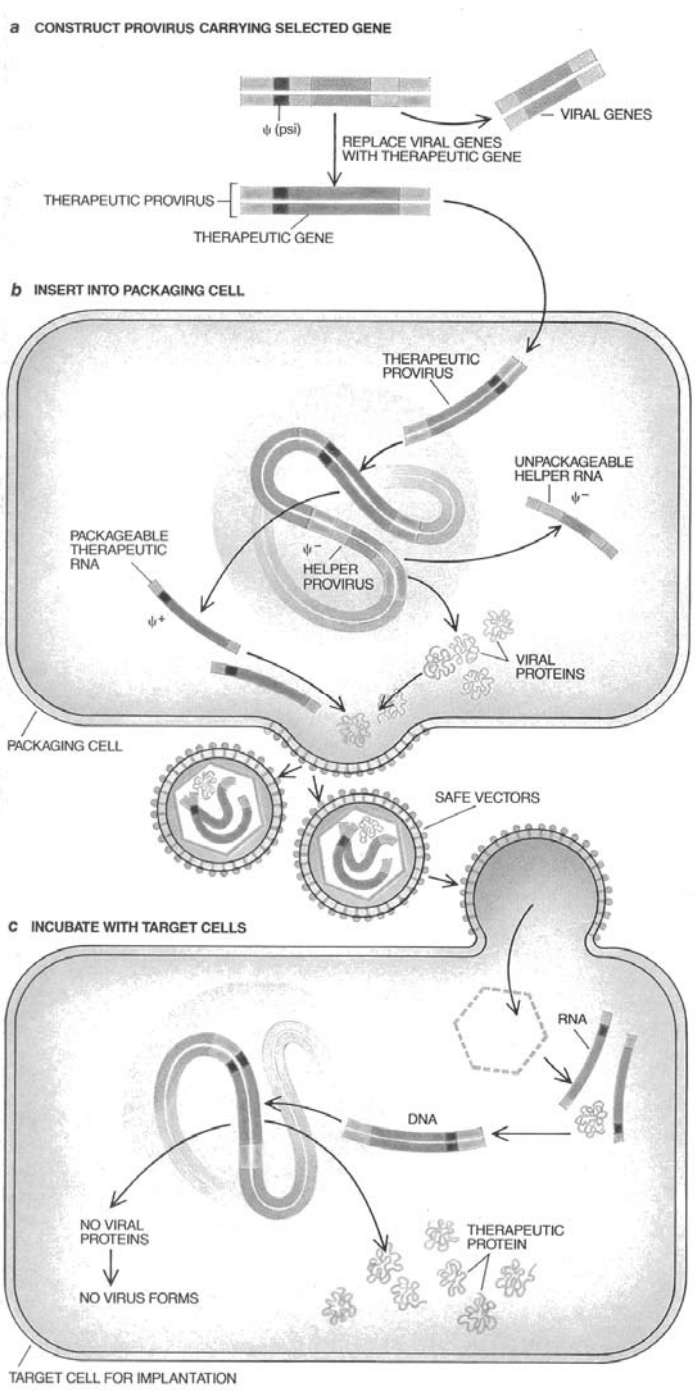
การใช้ดีเอ็นเอไวรัสในการทำยีนบำบัดมีข้อบกพร่อง ซึ่งดีเอ็นเอไวรัสสามารถเข้าเซลล์เจ้าบ้านได้แต่ไม่สามารถแทรกตัวเข้าไปในสารพันธุกรรมของเซลล์เจ้าบ้านได้ เนื่องจากเซลล์เจ้าบ้านไม่ยอมรับดีเอ็นเอแปลกปลอมเข้าสู่โครโมโซม โดยยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์อธิบายได้ และไม่สามารถใช้อาร์เอ็นเอไวรัสฝากยีนเข้าไปในโครโมโซมของคนได้ เนื่องจาก RNA ดังกล่าวไม่สามารถแทรกเข้าไปในโครโมโซมของคนได้เช่นเดียวกับดีเอ็นเอไวรัส ดังนั้นจึงเลือกใช้รีโทรไวรัสแทน รีโทรไวรัสเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสที่เมื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านแล้วสามารถเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของตัวเองเป็น DNA ภายในเซลล์เจ้าบ้าน โดยอาศัยเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส ทำให้เซลล์เจ้าบ้านยังคงจดจำว่า DNA ที่สร้างใหม่นี้เป็นดีเอ็นเอของเซลล์เองและยังคงทำ

จากคุณสมบัติของรีโทรไวรัสดังกล่าว ทำให้สามารถนำยีนของไวรัสนี้มาดัดแปลงเป็นพาหะสำหรับฝากยีนที่ต้องการเข้าไปในเซลล์เป้าหมายดังในภาพที่ 2 แต่การใช้รีโทรไวรัสยังมีอันตรายเนื่องจากหากชิ้นส่วนของไวรัสไม่สามารถเชื่อมเข้ากับยีนเป้าหมาย อาจเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วโดยระบบการทำงานของร่างกายที่ไม่สามารถควบคุมได้ ทำให้เกิดเป็นเนื้องอกและเจริญต่อไปเป็นมะเร็งได้ ดังนั้นเซลล์ที่รับยีนเข้าไปต้องแข็งแรงพอที่จะต่อสู้กับไวรัสดังกล่าวได้จึงจะทำให้ผู้ป่วยมีอายุยืนยาวขึ้น



ภาพที่ 1. วัฏจักรชีวิตของรีโทรไวรัส เริ่มจากไวรัสบุกรุกเข้าเซลล์เจ้าบ้านโดยยึดติดกับผิวเซลล์และหลอมรวมตัวกับเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นฉีดโปรตีนส่วนแกนที่หุ้มรอบสาย RNA เข้าไปภายในเซลล์ RNA ของรีโทรไวรัสถูกถ่ายแบบเป็น DNA โดยรีเวอร์สทรานสคริปเทสและเข้าไปแทรกกับ DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน โดยอาจแฝงตัวไม่แสดงออกหรือถ่ายทอดรหัสพันธุกรรมเป็น RNA และรวมกับโปรตีนส่วนแกน ทำให้ได้ไวรัสอนุภาคใหม่โดยมียีน *gag*, *pol* และ *env* ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับส่วนต่างๆ ในการเกิดไวรัสโดย ยีน *gag* ทำให้เกิดโปรตีนแกน ยีน *pol* ทำให้เกิด DNA polymerase และยีน *env* ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน

ที่มา : (ดัดแปลงจาก Verma, 1990)



ภาพที่ 2 . การดัดแปลงยีนของรีโทรไวรัสเป็นดีเอ็นเอพาหะโดย (a) ตัดส่วนยีนของไวรัสที่ทำให้เกิดโรคออกไป ใส่ยีนที่ดีเข้าในดีเอ็นเอพาหะ (b) นำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อให้ได้ไวรัสตัวใหม่ที่ไม่ทำให้เกิดโรคและมียีนคุณภาพ และ (c) นำไวรัสที่ได้ใส่ให้กับผู้ป่วยโดยไม่เกิดไวรัสใหม่ขึ้นและมียีนที่ต้องการบำบัดเข้าสู่เซลล์

ที่มา : (Verma, 1990)

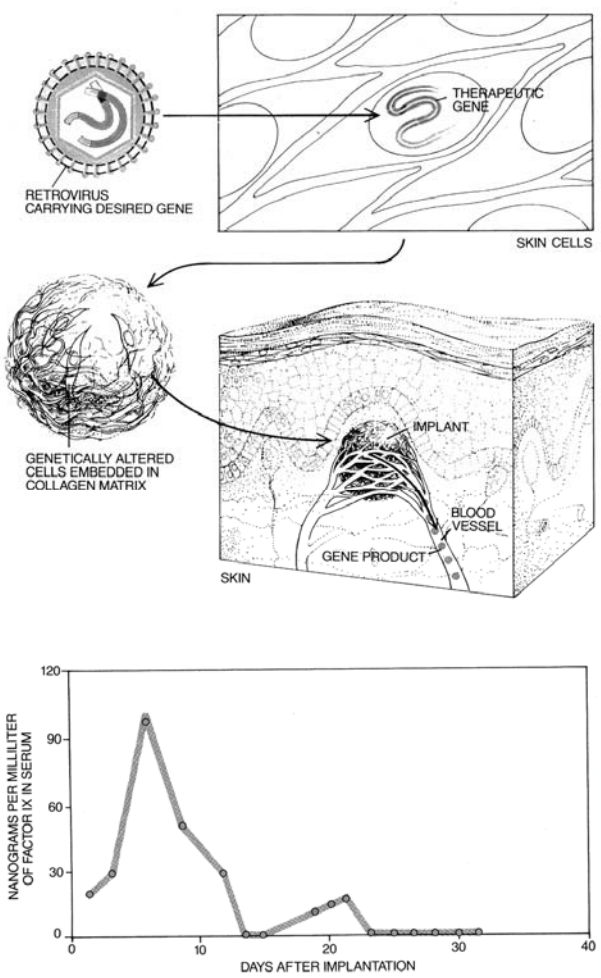
เนื้อเยื่อที่เป็นเป้าหมายของการทำยีนบำบัด

เนื้อเยื่อเป้าหมายที่นำใช้ในการยีนบำบัดได้แก่ ไขกระดูก เนื่องจากทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดแดงเพื่อใช้ลำเลียงออกซิเจนและเม็ดเลือดขาวที่สร้างภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย ในคนปกติเซลล์เม็ดเลือดขาวประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดได้แก่ แอลฟาและบีตา-โกลบิน (α and β-globin) ซึ่งมีเหล็กเป็นองค์ประกอบทำหน้าที่ลำเลียงออกซิเจนไปกับกระแสเลือดเพื่อเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกาย สำหรับผู้ป่วยโรคบีตาทาลัสซีเมียเกิดขึ้นจากไขกระดูกผลิตเม็ดเลือดแดงผิดปกติ ทำให้โปรตีนบีตา-โกลบินลำเลียงออกซิเจนได้น้อยลง และเป็นสาเหตุของโรคโลหิตจาง นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามนำยีนที่มีคุณภาพเข้าสู่ไขกระดูกของผู้ป่วยเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีประสิทธิภาพดี โดยถ่ายยีนผลิตบีตา-โกลบินเข้าไปเซลล์ไขกระดูกของหนูโดยใช้รีโทรไวรัสเป็นพาหะ หลังจากนั้นสกัดดีเอ็นเอขนาด 100 นิวคลีโอไทด์จากยีนที่ผลิตบีตา-โกลบินปกติและนำมาสังเคราะห์ mRNA การทดลองดังกล่าวทำในหลอดทดลอง (*in vitro*) แต่ผลการทดลองยังไม่ดี

สำหรับโรค SCID เป็นโรคที่เกิดจากการขาดโปรตีนบางอย่าง ซึ่งแตกต่างจากแอลฟาและบีตา-โกลบิน คือ ADA ที่ผลิตได้จากเม็ดเลือดขาวชนิดที แนวคิดในการบำบัดด้วยยีน ADA นี้ทำได้โดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol: PEG) ช่วยและฉีดเข้าไปในเด็กในรูป PEG - ADA – ADA สาร PEG นี้ช่วยเพิ่มครึ่งชีวิตของ ดีเอ็นเอดังกล่าวให้อยู่ในเซลล์ของเด็กที่ป่วยด้วยโรค SCID ได้นานขึ้น และพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการบำบัดไม่มีอาการของโรคเกิดขึ้นอีก

สำหรับผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลีย ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการขาดปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด และมีความสัมพันธ์กับฮอร์โมนควบคุมการเติบโต (growth hormone : GH) การรักษาโดยวิธีนี้ทำได้โดยเปลี่ยนโปรตีนในเลือดที่เซลล์ผิวหนังชั้นล่าง ดังนั้นไฟโบรบลาสต์ที่ผิวหนัง (skin fibroblast) จึงเป็นเป้าหมายสำคัญของการรักษาโรคนี้ Miller, Brownlee และ Ansen พยายามรักษาโรคฮีโมฟีเลียที่เกิดจากการขาดแฟกเตอร์ IX (factor IX) โดยทำให้เซลล์ผิวหนังหลั่งโปรตีนที่มีสมบัติคล้ายแฟกเตอร์ IX ได้ ต่อมา Louise, Jonathan และ Raphael สามารถทำให้หนูผลิตแฟกเตอร์ IX เข้าสู่กระแสโลหิตได้ และตรวจพบว่าเซลล์หนูไม่กำจัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมาจากยีนที่ใส่เข้าไป (ภาพที่ 3) จากนั้น Kenneth ได้ถ่ายยีนดังกล่าวเข้าไปในสุนัขและคนเพื่อรักษาโรคฮีโมฟีเลีย

ปัจจุบันมีแนวความคิดสำหรับการถ่ายทอดยีนเกี่ยวกับระบบประสาทเข้าในสมอง แต่ยังเป็นไปได้ยาก เนื่องจากกลไกในสมองมีความซับซ้อนและควบคุมระบบต่างๆ ของร่างกายมากมาย ดังนั้นการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทจึงทำได้โดยการปลูกถ่ายที่ผิวหนังและให้เกิดการแพร่เข้าสู่กระแสประสาทอีกทีหนึ่งเช่น สำหรับการรักษาโรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) Fred สามารถปลูกถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างปัจจัยการเติบโตของสมอง (nerve growth factor) เพื่อรักษาการขาดปัจจัยดังกล่าวสำหรับการเติบโตของสมองหนูได้ หรือในการรักษาโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ทำได้โดยถ่ายยีน levodopa (L-dopa) ซึ่งเป็นสารตัวกลางหนึ่งของ neurotransmitter dopamine ให้กับผู้ป่วยโรคพาร์กินสันเข้าที่เซลล์ผิวหนัง ดังนั้นการรักษาโรคเกี่ยวกับสมองในปัจจุบันจึงใช้วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ผิวหนัง



ภาพที่ 3. การถ่ายยีนแฟกเตอร์ IX เข้าสู่เซลล์ผิวหนังของหนูด้วยรีโทรไวรัส สามารถทำให้เซลล์สร้างแฟกเตอร์ IX เข้าสู่กระแสเลือดได้ แต่ยีนดังกล่าวสามารถผลิตแฟกเตอร์ IX ได้เพียง 2 สัปดาห์

ที่มา : (Miller, 1990)

นอกจากการถ่ายยีนในเซลล์ไขกระดูกและเซลล์ผิวหนังแล้ว Muligan และคณะ สามารถสกัดและแยกยีนตัวรับ LDL (Low Density Lipoprotein receptor) จากนั้นนำเข้าสู่เซลล์ตับของกระต่ายสามารถทำให้กระต่ายผลิตโปรตีนดังกล่าวได้ ซึ่งเป็นแนวทางสำหรับรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคปริมาณคอเลสเทอรอลสูงตามกรรมพันธุ์ (familial hypercholesterolemia) ซึ่งขาดตัวรับ LDL

จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าเซลล์ไขกระดูก เซลล์ผิวหนัง และเซลล์ตับ สามารถใช้เป็นเซลล์เป้าหมายของการส่งถ่ายยีน เนื่องจากรีโทรไวรัสสามารถนำยีนที่มีคุณภาพเข้าไปในเซลล์ดังกล่าวและสามารถทำให้เซลล์เหล่านี้ผลิตโปรตีนเข้าสู่เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (endothelial cell) และกระแสเลือดตามลำดับ ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นสามารถทำงานได้ปกติ เป้าหมายของเนื้อเยื่อที่ใช้สำหรับการปลูกถ่ายยีนแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. เนื้อเยื่อเป้าหมายที่สามารถถ่ายทอดยีนสำหรับรักษาความผิดปกติของโรคต่างๆ

DISODRER	INCIDENCE	NORMAL PRODUCT OF DEFECTIVE GENE	TARGET CELLS	STATUS
Hemoglobinopathies (thalassemias)	1 in 600 in certain ethnic groups	Constituents of hemoglobin	Bone marrow cells (which give rise to circulating blood)	Globin production in animals receiving gene needs to be improved
Severe combined immunodeficiency (SCID)	Rare	Adenine deaminase (ADA) in about a quarter of SCID patients	Bone marrow cells or *T* lymphocytes	Clinical trial of lymphocyte therapy for ADA deficiency is under way
Hemophilia A Hemophilia B	1 in 10,000 males 1 in 30,000 males	Blood-clotting factor VIII Blood-clotting factor IX	Liver cells or fibroblasts	Good chance for clinical trials (with fibroblasts) in next five years
Familial hyper-cholesterolemia	1 in 500	Liver receptor for low-density lipoprotein (LDL)	Liver cells	Animal studies are in early stages
Inherited emphysema	1 in 3,500	Alpha1-antitrypsin (liver product that protect lungs from enzymatic degradation)	Lung or liver cells	Work very preliminary
Cystic fibrosis	1 in 2,500 Caucasians	Substance important for keeping air tubes in lungs free of mucus	Lung cells	Aerosol delivery of gene directly to lung is a theoretical possibility
Duchenne's muscular dystrophy	1 in 10,000 males	Dystropin (structural component of muscles)	Muscle cells (particularly embryonic ones that develop into muscle fibers)	Work is preliminary. Nondystropin genes injected into muscle have directed synthesis of the encoded proteins
Lysosomal storage diseases	1 in 1,500 acquires some form	Enzymes that degrade complex molecules in intracellular compartments known as lysosomes	Vary, depending on disorder	Most disease would required delivery of gene into brain cells (a difficult task) as well as into other cell types

ที่มา : (Verma, 1990)

การบำบัดด้วยยีนไม่ใช่เป็นการสร้างโปรตีนที่ขาดหายไปเท่านั้น แต่ยังต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการต้านทานโรคต่างๆ ด้วยเช่น Resenberg และคณะ สามารถนำยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่หลั่งสาร Interleukin II (IL - II) ไปกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดที ทำให้สามารถทำลายเนื้องอกและมะเร็งได้ และได้ใส่ยีนแฟกเตอร์การตายเนื้องอก (tumor necrosis factor) สำหรับป้องกันไม่เกิดมะเร็งด้วย นอกจากนี้ยังมีความพยายามที่จะผลิต CD4 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที เพื่อจับกับโปรตีนของไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคภูมิคุ้นกันบกพร่อง (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) แต่การบำบัดด้วยยีนต้องมีการพิสูจน์ถึงผลกระทบต่อผู้ป่วยที่ได้รับยีนต่างๆ ตามชนิดของโรคต่อไป

กลยุทธ์ใหม่สำหรับการทำยีนบำบัด

จากความพยายามของนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มที่จะบำบัดโรคต่างๆ ทำให้มีการออกแบบยารักษาโรคที่ไม่มีผลข้างเคียง ในช่วงก่อนศตวรรษที่ 20 ซึ่งเป็นยุคแรกของการทำยีนบำบัด เป็นการพยายามหายาที่มีสมบัติจับกับบริเวณเร่งของโปรตีนที่เป็นสาเหตุโรคอย่างจำเพาะ และทำให้โปรตีนดังกล่าวไม่แสดงผลกับโปรตีนตัวอื่นๆ ต่อไป ความผิดปกติที่โปรตีนเกิดจากความผิดพลาดของลำดับเบสในยีน นักวิทยาศาตร์จึงเปลี่ยนแนวคิดโดยออกแบบยาที่สามารถจับลำดับเบสที่ผิดปกติ ซึ่งยานี้จะจับกับ mRNA และ DNA เพื่อยับยั้งกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสของสิ่งมีชีวิต แนวคิดนี้ทำได้โดยออกแบบยาเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ (oligomer) ซึ่งอาจเป็นดีเด็นเอหรืออาร์เอ็นเอขึ้นอยู่กับขั้นตอนที่ต้องการยับยั้งว่าเป็นขั้นตอนการถอดรหัสหรือการแปลรหัส เนื่องจากยาที่ออกแบบใหม่มีลักษณะเป็นสารพันธุกรรมชิ้นเล็กๆ จึงเรียกวิธีดังกล่าวนี้ว่าเป็นการบำบัดด้วยนิวคลีโอไทด์สายสั้น สำหรับการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสจะทำให้เกิดเกลียวของ ดีเอ็นเอเป็นสามสาย (triplex helix) เนื่องจากดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปใหม่จับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่เป็นเป้าหมายของการรักษา ส่วนการยับยั้งการแปลรหัสเป็นการเข้าไปจับกับ mRNA เรียกสายที่เข้าไปนี้ว่าแอนติเซนต์ (antisense)

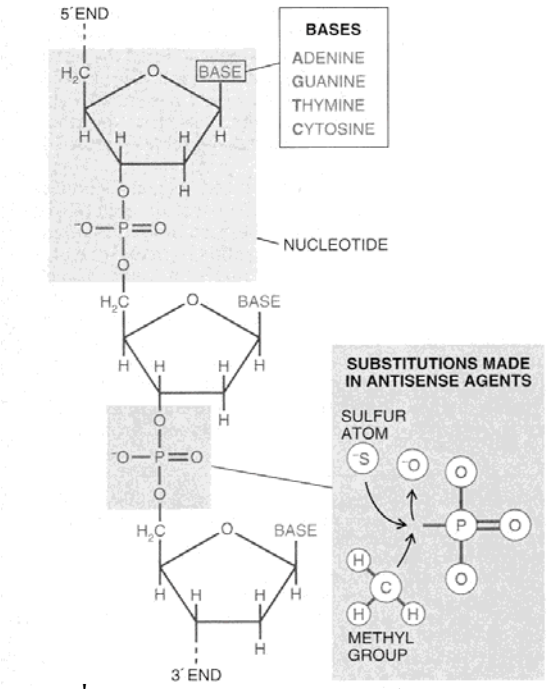
กลยุทธ์แอนติเซนต์

แอนติเซนต์พบครั้งแรกใน ค.ศ. 1980 ในพวกจุลินทรีย์โดยทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ผลิตโปรตีนจำเพาะ แอนติเซนต์นี้มี RNA เป็นองค์ประกอบจึงเรียกว่าแอนติเซนต์อาร์เอ็นเอ (antisense RNA) ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับ mRNA ที่จะเข้าไปจับ และเป็นการควบคุมในขั้นตอนการแปลรหัสเป็นโปรตีน ลักษณะกลไกดังกล่าวพบเช่นเดียวกันทั้งพืชและสัตว์ ด้วยความก้าวหน้าของเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมทำให้สามารถทราบลำดับเบสที่จำเพาะต่อการสร้างโปรตีนแต่ละชนิดได้ ดังนั้นจึงเน้นออกแบบ นิวคลีโอไทด์สายสั้นเพื่อสร้างเป็นแอนติเซนต์สำหรับควบคุมการแปลรหัสเป็นโปรตีน แต่ความยาวของ นิวคลีโอไทด์สายสั้นนี้เป็นปัญหาสำหรับการออกแบบแอนติเซนต์เพื่อให้มีความจำเพาะ mRNA เป้าหมาย และปัญหาอีกประการหนึ่งคือวิธีการใดเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการส่งยาชนิดนี้เข้าสู่เซลล์เพื่อมีประสิทธิภาพในการบำบัดสูงสุด

ใน ค.ศ. 1978 Paul และ Mary สร้างแอนติเซนต์ที่มีความยาว 13 เบส (13-mer) ออกแบบจดจำลำดับเบสใน mRNA ของ Rous sacroma virus และเมื่อส่งเข้าสู่เซลล์สามารถลดการจำลองตัวเองของไวรัสได้ แสดงว่ามีการยับยั้งโปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้มไวรัสได้ แต่ปัญหาคือวิธีการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์นั้นทำให้ประสิทธิภาพการในการบำบัดลดลง เนื่องจากแอนติเซนต์เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้น ทำให้มีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟตในโมเลกุลจำนวนมาก และผ่านเซลล์เยื่อหุ้มเซลล์ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำได้ไม่ดี นอกจากนี้ภายในไซโทพลาซึมของเซลล์มีระบบเอนไซม์ที่สามารถทำลาย DNA หรือ RNA ที่แปลกปลอมได้ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงพยายามดัดแปลงแอนติเซนต์ให้มีประสิทธิภาพในการรักษาดีขึ้นและไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้รับ โดยมีแนวความคิด 2 แบบคือแบบของ Paul และ Miller โดยการเปลี่ยนออกซิเจนที่จับกับหมู่ฟอสเฟตเป็นหมู่เมทิลเพื่อให้แอนติเซนต์ไม่มี

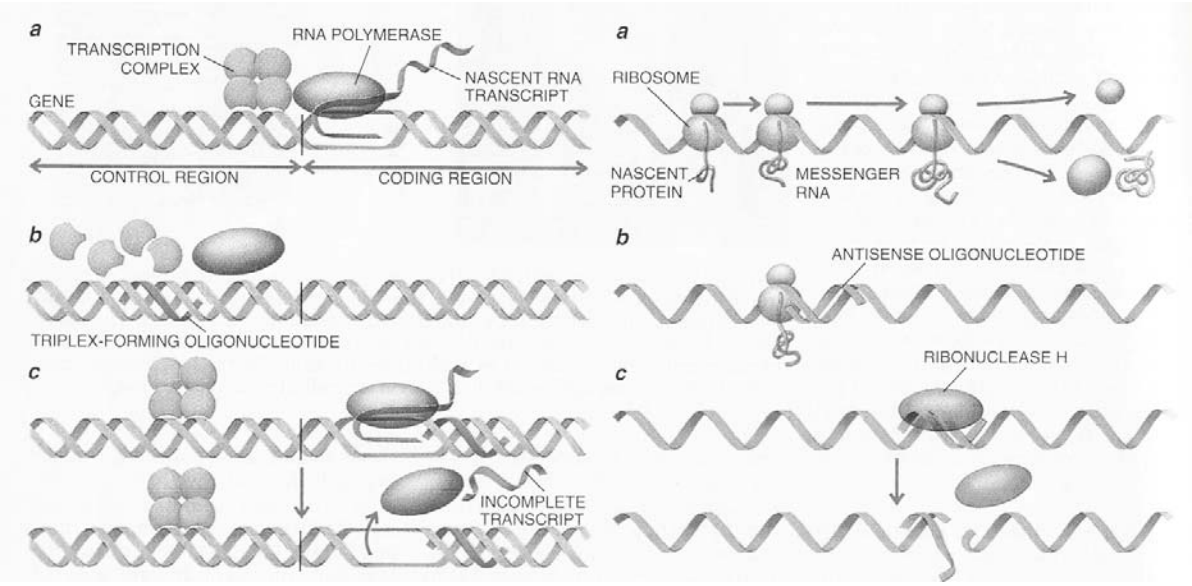
ปัญหาอีกประการหนึ่งคือเรื่องจำนวนเบสในนิวคลีโอไทด์สั้น มีแนวคิดในการแก้ปัญหาโดยกำหนดให้นิวคลีโอไทด์สายสั้นที่ใช้เป็นแอนติเซนต์ต้องมีจำนวนเบสอย่างน้อย 15 เบส เพื่อให้เกิดความจำเพาะต่อสาย mRNA ที่จะไปจับมากขึ้น และไม่จับกับบริเวณอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับโรค กลไลการทำงานของแอนติเซนต์เพื่อควบคุมการแปลรหัสมีแนวคิด 2 แบบ ได้แก่ (1) ทำให้ rRNA ที่ใช้แปลรหัส mRNA ของโรคไม่ทำงาน ทำให้ได้โปรตีนที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์และไม่ก่อโรค และ (2) กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสชนิด H (ribonuclease H) ให้ตัดสาย mRNA จึงไม่เกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีนก่อโรคที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 5)

ผลจากการใช้แอนติเซนต์ในการทำยีนบำบัดในผู้ป่วยโดยใช้ S-oligos พบว่ายาสามารถจับกับ mRNA อย่างจำเพาะและมีผลข้างเคียงเล็กน้อย ซึ่งแอนติเซนต์ทั้งหมดเป็นยาที่ออกแบบเพื่อยับยั้งการแปลรหัสอย่างเดียวเท่านั้น แอนติเซนต์ชนิดแรกที่ผลิตเพื่อการค้าได้แก่ ชนิดที่ใช้กำจัดโรคที่ติดเชื้อด้วยไวรัส human papilomavirus ที่ทำให้เกิดปุ่มตามผิวหนัง (genital warts) เมื่อบำบัดด้วยแอนติเซนต์ ปุ่มเหล่านั้นจะมีขนาดเล็กลงหรือหายไป นอกจากนี้ยังพยายามออกแบบยารักษาผู้ป่วยโรคเอดส์โดยใช้แอนติเซนต์จับกับ RNA ที่เกี่ยวข้องกับยีน *gag* ของไวรัสเอดส์ ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญในการจำลองตัวเองของไวรัสเพื่อรักษาโรคมะเร็ง



ภาพที่ 4. การดัดแปลงแอนติเซนต์ในรูปแบบต่างๆ

ที่มา : (Cohen and Hogan, 1994)



ภาพที่ 5. กลไกการควบคุมการทำงานของแอนติเซนต์และเกลียวที่สาม

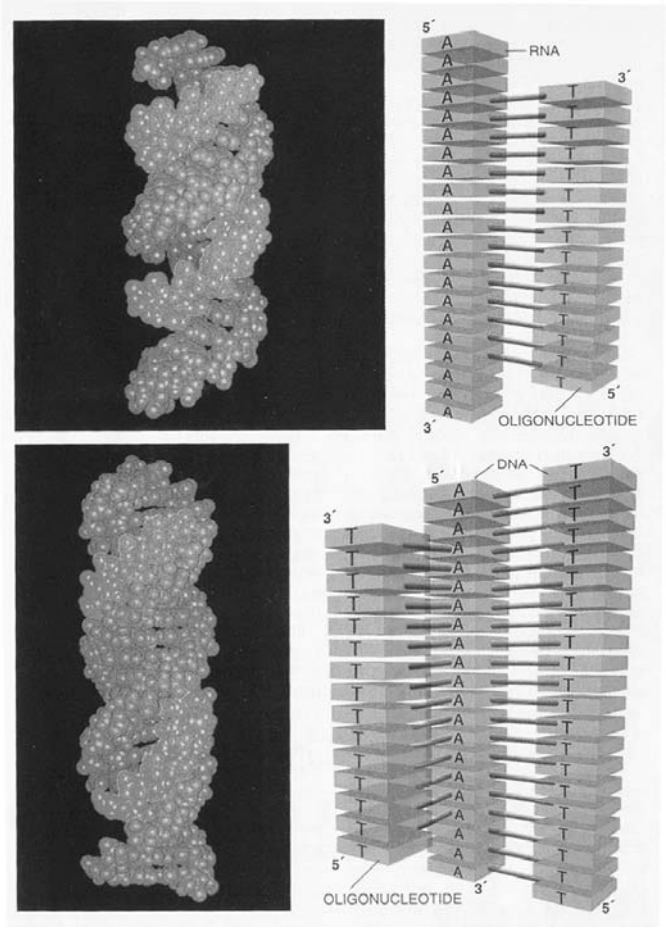
ที่มา : (Cohen and Hogan, 1994)

จากการทดลองบำบัดมะเร็งเม็ดเลือด myelogenous leukemia ด้วยแอนติเซนต์สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ โดยทำ *ex vivo* bone marrow purging ซึ่งเป็นการบำบัดไขกระดูกของผู้ป่วยด้วยแอนติเซนต์ที่มีความสัมพันธ์กับยีน *p53* ซึ่งทำให้ควบคุมการเกิดเนื้องอกและถ่ายกลับคืนให้กับผู้ป่วยเพื่อรักษาโรคต่อไป นอกจากนี้ Lynx และ Alan พบว่าแอนติเซนต์ที่ใช้บำบัดโรค chronic myelogenous leukemia สามารถควบคุมยีน *c-myb* บนสาย mRNA โดยทำ *ex vivo* bone marrow purging เพื่อยืดอายุของเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวและโรคอื่นๆ ได้

สำหรับยานี้ส่วนใหญ่เป็นยาต้านไวรัส (antiviral drug) และยาต้านมะเร็ง (anticancer) ปัจจุบันการใช้แอนติเซนต์ในการทำยีนบำบัดนั้นยังมีน้อย เนื่องจากการสังเคราะห์แอนติเซนต์มีราคาแพงและยังไม่ทราบความเสถียรของยาหรืออายุของการใช้งาน จากเหตุผลทั้ง 2 ข้อนี้จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์มีแนวคิดในการสร้างไรโบไซม์ (ribozyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มี RNA องค์ประกอบ สามารถจดจำเบสของ mRNA ที่ผิดปกติและทำลาย mRNA นั้นไม่ให้เกิดโปรตีนผิดปกติขึ้น ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงให้เกิดเป็นสายผสมของอาร์เอ็นเอ-ดีเอ็นเอ (RNA-DNA duplex) เพื่อช่วยยับยั้งการจำลองตัวเอง

กลยุทธ์การสร้างเกลียวที่สาม

หลังจาก Watson และ Crick เสนอโครงสร้างของ DNA จากนั้นสี่ปีต่อมา Gary และ Alexander พยายามสร้างสายพอลิไรโบนิวคลีโอไทด์ที่มีองค์ประกอบเป็นยูราซิลทั้งหมด (polyurasil : p-U) และผสมกับสาย RNA คู่สมที่มีอะดีนีนเป็นองค์ประกอบทั้งหมด (polyadenine : p-A) เพื่อให้เกิด RNA สายคู่ที่จับกันในรูปของ A-U แต่จากการทดลองพบว่ามีการจับ

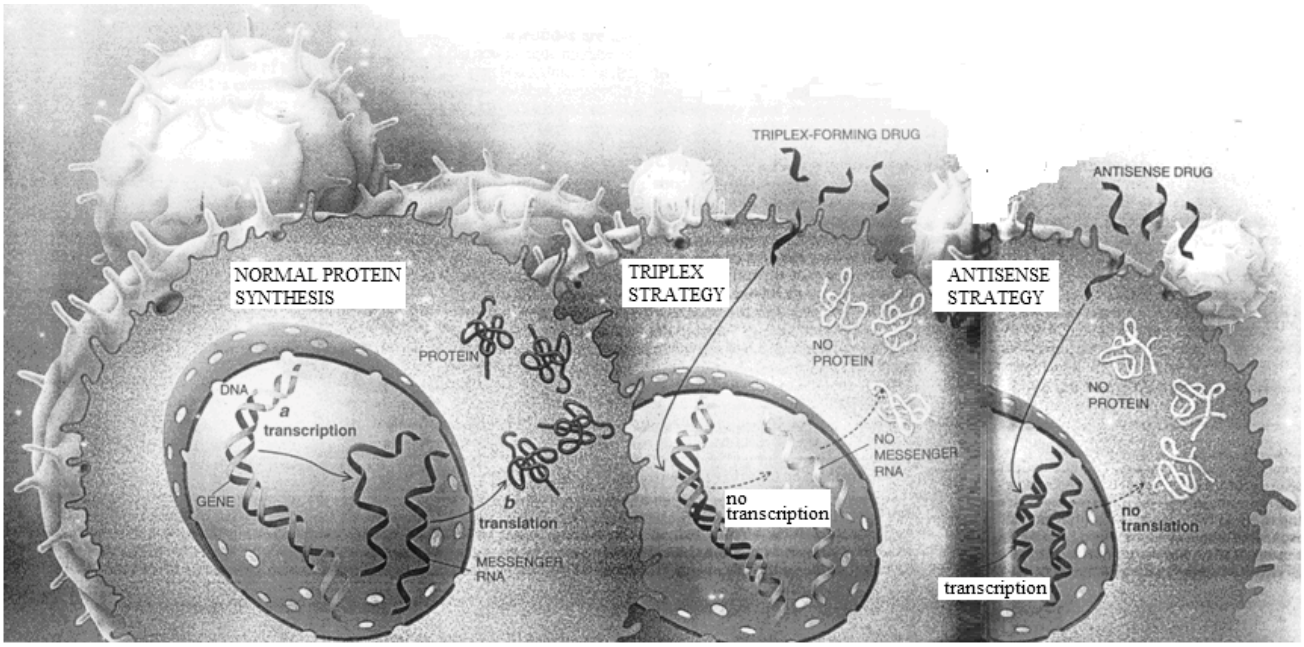


ภาพที่ 6. การเกิด DNA เกลียวสามสาย

ที่มา : (Cohen and Hogan, 1994)

ใน ค.ศ. 1960 Morgan และ Wells สามารถสร้างสาย DNA ที่มี TAT หรือ $C^{+}GC$ ซ้ำกัน และสามารถจับกับ DNA เกลียวคู่ที่มีลำดับเบส T และ C แต่ในขณะนั้นเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมยังไม่ก้าวหน้าจึงยังไม่มีการสังเคราะห์ DNA และการโคลนยีน (gene cloning) และเมื่อทราบกลไกของการควบคุมการถอดรหัสใน ค.ศ. 1980 โดยควบคุมอัตราเร็วในการถอดรหัสและยีนโครงสร้าง จึงสามารถออกแบบยาเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวได้โดยให้ยาไปจับกับยีนที่ทำให้เกิดโรค ดังนั้นการใช้เกลียวสามนี้จึงเป็นการควบคุมในขั้นตอนการถอดรหัส (ภาพที่ 7)

ใน ค.ศ. 1988 Edith และ Michael สามารถสร้างยาที่สามารถควบคุมยีน cancer-related *c-myc* ไม่ให้สร้าง mRNA ได้ ด้วยการตรวจสอบการถอดรหัสนอกเซลล์ (cell-free transcription assay) โดยผสมยีนและยาที่ออกแบบในหลอดทดลอง พบว่าสามารถทำให้ตัวยาป้องกันการถอดรหัสจากยีนของไวรัสได้ จากนั้น Helence ได้ทดลองจนทราบลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการสร้าง interleukin-2 receptor นอกจากนี้ Postel และคณะได้รายงานลำดับของ *c-myc* ในคน ที่สามารถยับยั้ง tumor-cell line ในคนได้ และยังมีการทดลองอื่นๆ ที่พิสูจน์การลดการเกิดมะเร็งและการติดเชื้อโดยไวรัสได้



ภาพที่ 7. ภาพรวมของการควบคุมกระบวนการต่างๆ ในเซลล์ด้วยแอนติเซนต์และเกลียวที่สาม
ที่มา : (ดัดแปลงจาก Cohen and Hogan, 1994)

บทสรุป

การทำยีนบำบัดให้แก่ผู้ป่วยด้วยโรคทางกรรมพันธุ์นั้นยังเป็นไปได้ยาก เพราะสาเหตุเกิดจากความผิดปกติในระดับยีน ดังนั้นการบำบัดต้องขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของยาที่ถูกออกแบบมาให้ตรงกับโรคที่ต้องการรักษา ด้วยเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าทำให้ทราบถึงการควบคุมการแสดงออกของยีนอยู่ขั้นตอนการถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ และการแปลรหัสเป็นโปรตีนที่แสดงออกมา ด้วยโครงการจีโนมมนุษย์ทำให้ทราบลำดับเบสของยีนที่ควบคุมการแสดงออก ดังนั้นจึงทำให้เกิดการรักษาที่ระดับยีนได้เรียกว่ายีนบำบัด โดยมีการออกแบบเป็นแอนติเซนต์ หรือเกลียวที่สาม เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ขั้นตอนการถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ และการแปลรหัสเป็นโปรตีนที่แสดงออกมาตามลำดับ การใช้แอนติเซนต์หรือเกลียวที่สามสามารถยืดอายุผู้ป่วยได้ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พยายามทดลองเพื่อให้ได้ตัวยาดีที่สุดสำหรับบำบัดโรคโดยไม่ให้เกิดผลข้างเคียงแก่ผู้ป่วย และหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการนำยีนที่มีคุณภาพดีเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ยังปรับปรุงแอนติเซนต์และเกลียวที่สามให้มีประสิทธิภาพเพื่อให้สามารถจดจำบริเวณจำเพาะต่อโรคมากขึ้น ซึ่งเพิ่มทางเลือกใหม่ๆ สำหรับโรคทางกรรมพันธุ์ที่ยังหาวิธีรักษาไม่ได้

เอกสารอ้างอิง

Cohen, J.S., and Hogan, M.E. (1994). The New Genetic Medicine. **Scientific American** December: 50-55.

Dusty, A.M. (1992). Human Gene Therapy Comes of Age. **Nature** 357: 455-460.

Friedmann, T. (1989). Progress Toward Human Gene Therapy. **Science** 224: 1275-1281.

Lehninger, A.L., Dovid L.N., and Michael, M.C. (1993) **Principles of Biochemistry** (2nd ed.) New York: Worth Publishers.

Lewin, B. (1990). **Gene IV** Oxford: Oxford University press.

Singer, M., and Berg, P. (1991). **Genes and Genomes** Oxford: Blackwell Scientific.

Stryer, L.W.H. (1988). **Biochemistry** (3rd ed.) New York: Freeman.

Verma, I.M. (1990). Gene Therapy. **Scientific American** November: 34-41.

http://amazingbeauty.org/nature/AE-nucleotide2.gif

http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/replication.jpg

http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations

http://porpax.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.17.7b.transcription.jpg

http://web.siumed.edu/~bbartholomew/images/Lehninger/img012.gif

http://www.biologycorner.com/resources/translation3.gif

http://www.nicksnowden.net/images/Nucleic%20acid%20structure%20components.jpg

http://www.science.uva.nl/~seop/entries/information-biological/GeneticCode.png

http://library.thinkquest.org/C0123260/basic%20knowledge/images/basic%20knowledge/RNA/translation%20steps.jpg

http://www.web-books.com/MoBio/Free/images

/Ch7F6.gif