

บทความทั่วไป

Gene Therapy

รัชชัย ตะยาภิวัดนา*

หลังจากที่ความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมได้มีการพัฒนาไปจนถึงระดับที่สามารถทำการผลิตโปรตีนของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งได้แล้ว นักพันธุวิศวกรรมจึงมีแนวคิดที่จะนำเอาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะบกพร่องของกระบวนการต่างๆ ในร่างกายซึ่งมีผลมาจากความบกพร่องของยีนส์ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สำคัญ เช่นกระบวนการเมตาบอลิซึม และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น โดยมีขั้นตอนของการปรับปรุงลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความบกพร่อง หรือสูญเสียของยีนส์ ควบคุมภายในเซลล์ ให้สามารถทำงานได้เหมือนเดิม วิธีการนี้เรียกว่าการทำ gene therapy เนื่องจากวิธีการนี้จำเป็นต้องใช้พาหะนำยีนส์ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Host cells) ทำให้ต้องมีการควบคุมวิธีการรักษาอย่างดี เพราะหากยีนส์แปลกปลอมนี้แทรกเข้าสู่โครโมโซมในตำแหน่งสำคัญก็อาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์และมะเร็งได้ ดังนั้นการใช้เทคนิค gene therapy จึงต้องดำเนินการตามหลักจริยธรรม (Ethics) อย่างเคร่งครัด

การทำ gene therapy แบ่งได้เป็น 2 ลักษณะตามชนิดของเซลล์ที่ถูกเปลี่ยนแปลง ลักษณะทางพันธุกรรม คือ somatic cells gene

therapy และ germ cells gene therapy ในที่นี้จะขอกล่าวเฉพาะ somatic cells gene therapy เท่านั้น เนื่องจากเทคนิคต่างๆ ได้รับการยอมรับและสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้ว นอกจากนี้ยังได้รับการยอมรับในเชิงจริยธรรมมากกว่า germ cells gene therapy เพราะไม่เป็นการทำลายสิทธิของทารกในการเลือกวิธีการรักษา และไม่มีผลกระทบต่อลักษณะทางพันธุกรรมของมนุษยชาติที่อาจคาดไม่ถึง ชนิดของ gene therapy ยังอาจแบ่งตามวิธีการนำยีนส์เข้าสู่เซลล์ได้ 3 ลักษณะ คือการใช้ไวรัส, สารเคมี และ liposome ในที่นี้จะขอกล่าวในส่วนของการใช้ไวรัสเท่านั้น เนื่องจากการใช้สารเคมี และ liposome ยังมีประสิทธิภาพในการส่งยีนส์เข้าสู่เซลล์ต่ำ และยังไม่มียูวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับ

Method for Introducing Foreign DNA into Somatic Cells

โดยทั่วไปการทำ gene therapy นั้นต้องการผลผลิตที่ได้จากยีนส์ภายนอก (Exogenously introduced gene) ที่นำเข้าสู่เซลล์เป็นสำคัญ พาหะ (Vector) ที่เป็นไวรัสและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการนำยีนเข้าสู่เซลล์ คือ retroviruses (RNA virus) และ adenoviruses (DNA virus) การใช้

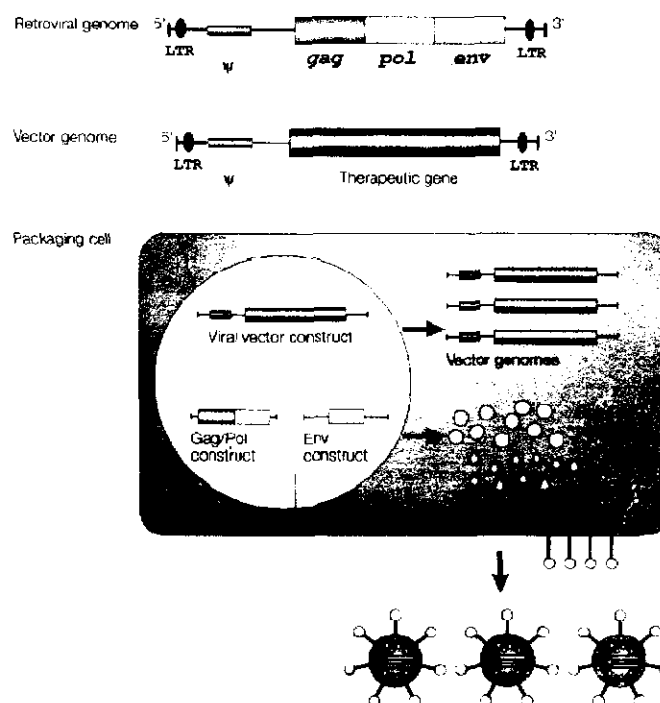
* ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พาหะทั้งสองชนิดนี้มีทั้งข้อดีและข้อเสียซึ่งจะได้อีกต่อไป

Retroviruses System (รูปที่ 1)

พาหะที่ใช้ในการทำ gene therapy ในยุคแรกคือ retrovirus ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการค้นพบเรื่อง oncogenes โดยไวรัสจะทำการ integrate gene เข้าสู่ chromosomal DNA ของ host cells เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็ง ตำแหน่งที่สำคัญของ viral genome ที่ทำหน้าที่นี้คือ long-terminal repeat (LTR) ภายในยีนส์ของ retrovirus (Viral genes) มีส่วนควบคุมสำคัญที่กำหนดการสร้างองค์ประกอบเป็นไวรัสที่สมบูรณ์คือ *gag*, *pol* และ *env* อยู่ระหว่าง LTR ทั้งสอง เมื่อจะนำมาประยุกต์ใช้ ต้องมีการตัดเอายีนส์ควบคุมเหล่านี้ทิ้งไป และทำการแทรกยีนส์ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนซึ่งสามารถแก้ไขความบกพร่องของเซลล์ผู้ป่วยได้ (Therapeutic gene) เข้าไปแทนที่ ทั้งนี้ viral DNA

ที่ได้รับการปรับปรุงนี้เรียกว่า gene therapy vector genome ขั้นตอนต่อมาในการทำ gene therapy คือเตรียม packaging cells ซึ่งเป็น stable cell line ที่มีสายของ viral genome ที่มีการปรับปรุงให้เป็น helper virus โดยทำการทำลาย packaging signal (Ψ) ทำให้ไวรัสไม่สามารถประกอบ (Package) ตัวเองออกจาก packaging cells จากนั้นทำการ transfect ชิ้นส่วนของ gene therapy vector genome ที่เตรียมไว้ในตอนแรกเข้าสู่ packaging cells ส่วน chromosomal DNA ของ packaging cell จะถูก integrate ด้วย gene therapy vector genome เพื่อให้มีการจำลองสาย gene therapy RNA ออกมาใน cytoplasm เพื่อเตรียม package เป็น complete virion (gene therapy vector stock) เตรียมที่จะออกจาก producer cell เพื่อปลูกกรูเข้าเซลล์อื่นต่อไป ภายใน packaging cells นี้ helper virus DNA จะทำหน้าที่เพียงการสร้าง components ต่างๆ ที่จำเป็นในการ package แต่สาย RNA ของ



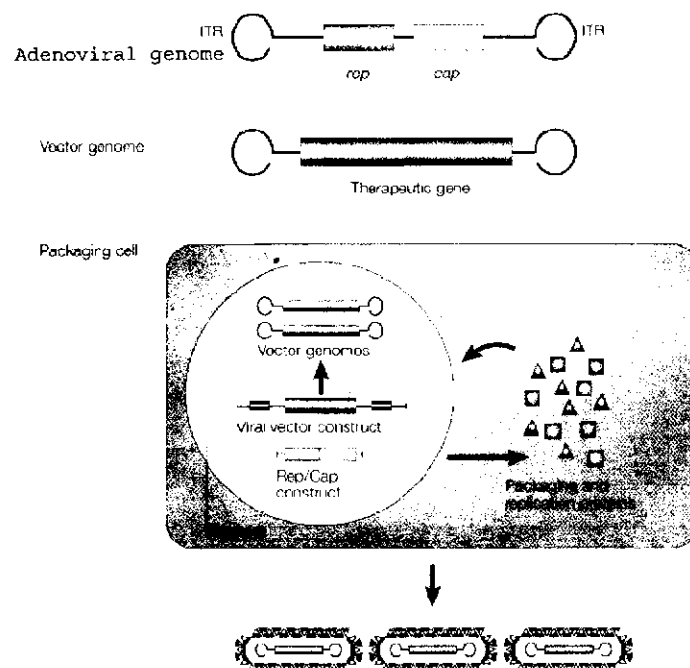
รูปที่ 1. แสดงการเตรียม retroviral particle สำหรับการทำ gene therapy

helper virus จะไม่สามารถ package ตัวเองได้ เนื่องจากเหตุผลที่กล่าวมาในข้างต้น ทำให้ไม่เกิดอันตรายในการติดเชื้อ virulent strain ภายใน target patient cells

หลังจากที่ทำการ infect target patient cells ด้วย gene therapy vector stock จะมีการจำลองสาย DNA จาก RNA จากนั้นภายในส่วนของ chromosomal DNA จะถูก integrate ด้วย DNA ของ gene therapy vector ทำให้มีการสร้างโปรตีน (Therapeutic product) ที่ควบคุมด้วย therapeutic gene แต่ไม่มีการสร้าง complete virion ขึ้นมาใหม่เนื่องจากไม่มีโปรตีนสำคัญที่ใช้ในการ packaging ดังนั้นจึงสามารถควบคุมอันตรายจากการติดเชื้อใน patient cells อื่นๆได้ ข้อจำกัดที่สำคัญในการใช้ retrovirus ในการทำ gene therapy คือ target patient cells นั้นต้องเป็น active dividing cells จึงจะทำให้กระบวนการ integrate gene therapy vector เข้าสู่ chromosomal DNA ของ host cells มีประสิทธิภาพ

Adenoviruses System (รูปที่ 2)

การใช้ retrovirus นั้นมีความเสี่ยงต่อการเกิดการกลายพันธุ์ของ host cells ได้ง่ายเพราะมีการ integrate สาย viral DNA เข้าสู่ chromosomal DNA ของ host cells ซึ่งหากผิดตำแหน่งอาจนำไปสู่การเป็นมะเร็งได้จึงได้มีการนำ adenovirus มาประยุกต์ใช้ ขั้นตอนต่างๆจะแตกต่างกับการใช้ retrovirus เล็กน้อย ขั้นตอนแรกคือการเตรียม complementing cell line ซึ่งมี adenovirus DNA อยู่แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนสาย viral DNA ได้ มีเพียง essential viral genes ที่กำหนดการสร้างโปรตีนสำคัญเพื่อใช้ในการ packaging เท่านั้น จากนั้นทำการ transfect complementing cell line ด้วย adenoviral vector DNA ซึ่งได้จากการปรับปรุง adenovirus DNA โดยตัดเอาบางส่วนของ essential viral genes ที่เกี่ยวข้องกับ virulence ออกแล้วแทนที่ด้วย therapeutic gene เมื่อ adenoviral vector DNA เข้าสู่ complementing cell line จะถูก package โดยอาศัยปัจจัยสำคัญที่สร้างจาก essential viral genes



รูปที่ 2. แสดงการเตรียม adenoviral particle สำหรับการทำ gene therapy

และออกจาก complementing cell line จากนั้นทำการ infect target patient cells ด้วย viral particles ซึ่งจะนำ adenoviral vector DNA เข้าสู่ nucleus ของ target patient cells แต่ไม่มีการ integrate เข้าสู่ chromosomal DNA ของ host ทำให้ไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิดการกลายพันธุ์ของ host cells หลังจากนั้นภายใน nucleus จะมีการเพิ่มจำนวนของ adenoviral vector DNA เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง mRNA และ therapeutic product นอกจากนี้สายของ adenoviral vector DNA ที่สร้างขึ้นจะไม่ถูก packaging เนื่องจากไม่มี essential viral genes ทำให้สามารถควบคุมการ infect เฉพาะเซลล์ที่ต้องการได้

จากข้อดีที่กล่าวมาทำให้ปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่จึงนิยมใช้ adenovirus ในการทำ gene therapy มากกว่า retrovirus อีกทั้ง target cells ที่ใช้ยังสามารถเลือกได้มากกว่าด้วย อย่างไรก็ตามการใช้ retrovirus ก็มีข้อดีกว่าการใช้ adenovirus ตรงที่สามารถให้ผลผลิตของ therapeutic product ได้เป็นเวลานานกว่าเนื่องจากเป็นการ integrate therapeutic gene เข้าสู่ chromosomal DNA ซึ่งมีความเสถียรมากกว่า

รูปแบบการทำ gene therapy

การเลือกชนิดของ target patient cells ที่ดีที่สุดเพื่อทำ gene therapy ควรเป็นเซลล์จากอวัยวะที่มีหน้าที่ในการควบคุมคุณสมบัติจำเพาะโดยตรง อย่างไรก็ตามในบางกรณีอาจใช้เซลล์อื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับอวัยวะนั้นก็ได้หากเซลล์ที่มีหน้าที่โดยตรงเตรียมในปริมาณมากได้ยากหรือความสามารถในการแบ่งเซลล์ต่ำ วิธีการรักษาผู้ป่วยด้วยการทำ gene therapy แบ่งเป็น 2 รูปแบบตามลักษณะของการส่ง therapeutic gene เข้าสู่ target cells ของผู้ป่วย คือ ทำการเตรียม thera-

peutic gene เข้าสู่ target cells ภายนอกร่างกาย เรียกว่า *ex vivo* gene therapy แล้วให้เซลล์กลับสู่ร่างกายผู้ป่วยหรืออาจทำการส่งผ่านยีนส์เข้าสู่ target cells ของผู้ป่วยโดยตรงคือ *in vivo* gene therapy (รูปที่ 3) ก็ได้ เช่นการฉีด therapeutic gene vector เข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular), ทางการหายใจ (Aerosol), หรือทางกระแสโลหิต

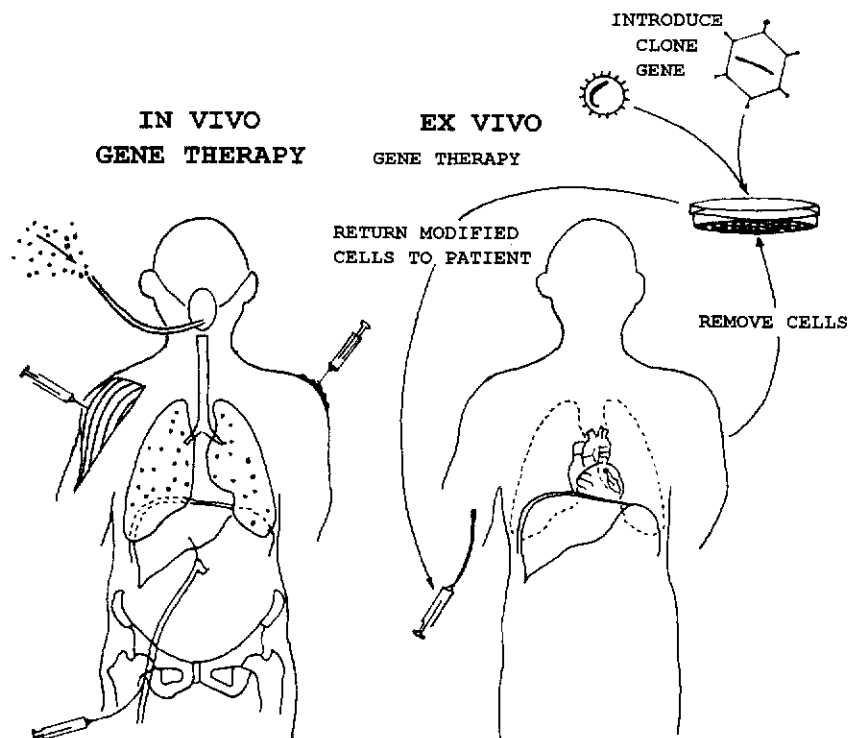
1. *Ex vivo* gene therapy Adenosine deaminase (ADA) deficiency เป็นภาวะความบกพร่องทางพันธุกรรมของยีนส์ (Inactivation mutation) ควบคุมที่ปรากฏอยู่บนโครโมโซมที่ 20 ของมนุษย์ ผู้ป่วยจะมีภาวะติดเชื้อง่าย เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถทำหน้าที่ได้สมบูรณ์ (Severe combined immune deficiency, SCID) เพราะเซลล์ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน คือ T-lymphocyte ถูกทำลาย กลไกการเกิดโรคเป็นผลมาจากการสะสมของสารพิษในกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ไม่สามารถกำจัดได้ภายใน T-lymphocyte เนื่องจากผู้ป่วยขาด enzyme ADA ซึ่งทำหน้าที่หลักในกระบวนการ deoxyadenosine metabolism ผลจากความบกพร่องของยีนส์นี้จะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตตั้งแต่ยังเด็ก การรักษาผู้ป่วยในระยะแรกเป็นการทำ bone marrow transplantation จากผู้ที่มีระบบ HLA เข้ากันได้กับผู้ป่วย แต่เนื่องจากการหาผู้บริจาคไขกระดูกที่มีระบบ HLA ตรงกับผู้ป่วยทำได้ยาก ดังนั้นการศึกษาเรื่อง gene therapy จึงเริ่มต้นที่โรคนี้ โดยการนำเซลล์ไขกระดูกของผู้ป่วยออกมาทำ *ex vivo* gene therapy ด้วย retrovirus gene therapy vector ที่มี ADA gene อยู่ แล้วนำกลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย ปัจจุบันนี้ผู้ป่วยในกลุ่มนี้อยู่ในระหว่างการติดตามการรักษาอย่างน้อย 5 ปี ผลจากการรักษาพบว่าผู้ป่วยมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากตัวอย่างผู้ป่วยที่ทำมาทดสอบการรักษา

ยังไม่มากพอ และไม่มีข้อมูลเปรียบเทียบของผู้ป่วย ADA ที่ได้รับการศึกษาด้วยวิธีอื่น ดังนั้นจึงยังไม่อาจมีข้อสรุปที่ชัดเจน

ภาวะ familial hypercholesterolemia (FH) เป็นตัวอย่างของโรคที่เกิดจากความบกพร่องทางพันธุกรรมอีกโรคหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในการรักษาด้วยวิธี gene therapy เช่นกัน ความผิดปกติเกิดจากเซลล์ตับของผู้ป่วยไม่สามารถสร้าง LDL receptor ได้ ทำให้กระบวนการเมตาโบลิซึมของ cholesterol ผิดปกติไป หากความผิดปกตินี้เกิดขึ้นบนโครโมโซมทั้งสองข้างผู้ป่วยจะมีโอกาสเสียชีวิตได้สูงตั้งแต่อายุไม่เกิน 1 ปี การรักษาที่ผ่านมาสามารถทำได้ประการเดียวคือการเปลี่ยนตับ (Liver transplantation) ซึ่งมีโอกาสที่จะได้รับอวัยวะที่เหมาะสมกับผู้ป่วยได้น้อย ดังนั้นจึงมีการนำ gene therapy มาประยุกต์ใช้ โดยทำการเลี้ยงเซลล์ hepatocyte จากผู้ป่วยที่กระตุ้นให้มีการแบ่งตัวเพื่อเตรียมรับการ infect ด้วย retrovirus gene

therapy vector ที่มี LDL receptor gene อยู่ จากนั้นนำ modified cells เหล่านี้กลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยอีกครั้งหนึ่งผ่านทาง portal vein ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีนี้พบว่าระดับของ LDL cholesterol ลดลง อย่างไรก็ตามปริมาณของเซลล์ตับที่ให้กลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยยังมีประสิทธิภาพต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีของการให้ไขกระดูกกลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยในกรณีของ ADA ทำให้การรักษาภาวะ FH ด้วยวิธี gene therapy ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรถึงแม้จะพบว่ามี การสร้าง LDL receptor มากขึ้นบนผิวของ hepatocyte จากเซลล์ผู้ป่วยที่ถูก modified จริง

2. In vivo gene therapy การรักษาผู้ป่วย metastatic malignant melanoma เป็นตัวอย่างแรกปีการศึกษา เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถเห็นและทำลายเซลล์ที่กลายเป็นมะเร็งได้ เมื่อฉีด plasmid DNA ที่มี HLA class I gene B7 (ซึ่งเป็น HLA ชนิดที่แตกต่างจาก HLA ของผู้ป่วย)



รูปที่ 3. เปรียบเทียบการรักษาผู้ป่วยโดยวิธี in vivo และ ex vivo gene therapy

เข้าบริเวณเซลล์ผิวหนังที่เป็นมะเร็งโดยตรง เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยตรวจพบว่าเซลล์มะเร็งที่ถูก modified และ express B7 เป็นเซลล์แปลกปลอมและกำจัดทิ้งไป วิธีการนี้มีข้อดีคือไม่ต้องเกี่ยวข้องกับการใช้ไวรัสซึ่งอาจเกิดอันตรายได้ แต่ก็มีข้อเสียคือส่งผ่านยีนส์เข้าสู่เซลล์มีประสิทธิภาพต่ำ ในกรณีที่ใช้ไวรัสนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ใช้วิธี *in vivo* gene therapy มักเลือกใช้ adenoviruses system เนื่องจากสามารถ infect target cells ได้หลายชนิด และไม่มีการ insert gene แปลกปลอมเข้าสู่ host chromosome ตัวอย่างที่สำคัญคือการรักษาโรค cystic fibrosis ผู้ป่วยจะได้รับ adenoviral vector ที่มี normal CFTR therapeutic gene เข้าสู่ร่างกายโดยผ่านระบบหายใจ (Aerosol) เพื่อให้มีการ infect target cells ในปอด อย่างไรก็ตามวิธีการรักษานี้ยังมีประสิทธิภาพที่ไม่ดีนักยังต้องทำการปรับปรุงต่อไป

นอกจากการนำยีนส์เข้าสู่เซลล์ผู้ป่วยเพื่อวัตถุประสงค์ในการผลิต therapeutic products ที่ขาดหายไปแล้ว ยังมีงานวิจัยอีกส่วนหนึ่งที่มีได้นำ modified cells กลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยโดยตรง หรือทำให้เกิด modified cells ในร่างกายผู้ป่วย

โดยตรง หากแต่เป็นการนำ modified cells ที่ได้จากการทำ *ex vivo* gene therapy โดยมี tissue plasminogen activator (t-PA) ทำหน้าที่เป็น therapeutic gene และมี normal blood vein epithelial cells เป็น target cell มาเลี้ยงบนวัตถุเทียม เช่น เส้นเลือดเทียม (Prosthetic venule) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดเล็กไม่เกิน 4 มม. ก่อนที่จะทำการ transplant วัตถุเทียมเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย เพื่อวัตถุประสงค์ที่จะให้ modified epithelial cells เหล่านี้สร้าง t-PA เพื่อลดการอุดตันภายในเส้นเลือดเทียม ผลคือมีโอกาสประสบความสำเร็จจากการทำ transplant สูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. Nat Rev Genet 2000; 1: 91-9.
2. Stone D, David A, Bolognani F, Lowenstein PR, Castro MG. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. J Endocrinol 2000; 164: 103-18.