

# CRISPR-Cas : จากการศึกษาการค้นพบสู่การรักษา

มานพ พิทักษ์ภากร<sup>๑,๒</sup>

<sup>๑</sup> ศูนย์จีโนมิกส์ศิริราช และภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

<sup>๒</sup> ภาควิชาศัลยกรรม สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ประสาทวิทยาแพทยศาสตร์และทันตแพทยศาสตร์ สำนักวิทยาศาสตร์ ราชบัณฑิตยสภา, manop.pit@mahidol.ac.th

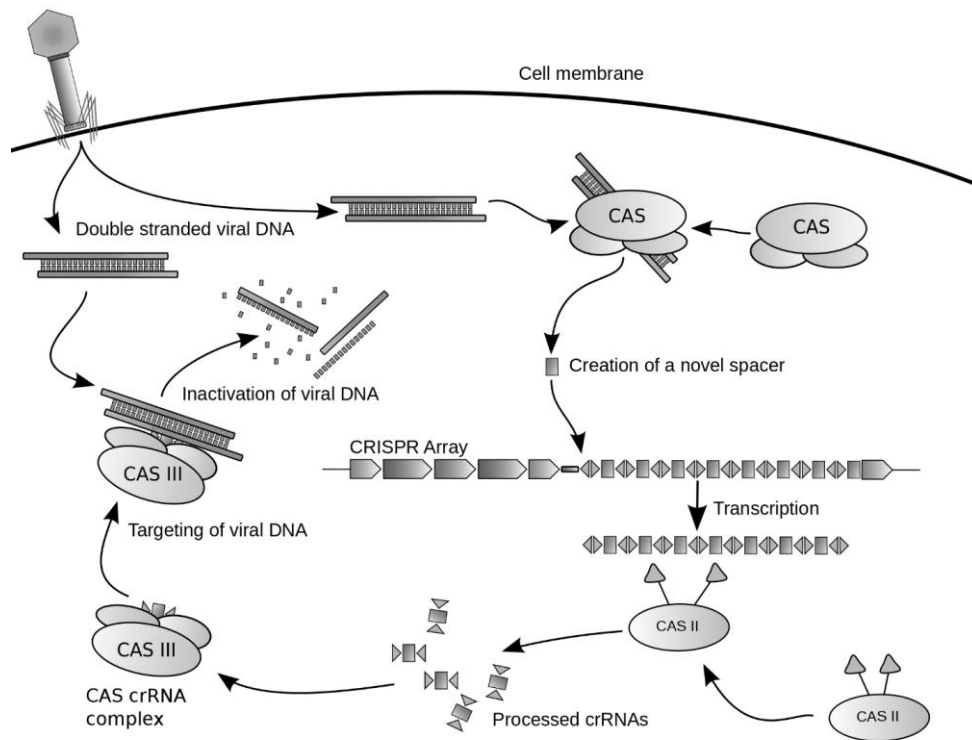
## บทนำ

CRISPR ย่อมาจาก clustered regularly interspaced palindromic repeats ซึ่งหมายถึงกลุ่มลำดับเบสในสายดีเอ็นเอที่มีลักษณะเรียงตัวเป็นลำดับซ้ำ (palindromic repeats) แทรกด้วยลำดับเบสอื่นที่เรียกว่า spacers เมื่อค้นพบครั้งแรกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ยังไม่ทราบหน้าที่และความสำคัญของลำดับเบสกลุ่มนี้ แต่เมื่อศึกษาต่อมาจึงทราบว่า ส่วนลำดับเบสใน spacers คือส่วนจีโนมที่เหลืออยู่ของไวรัสที่เคยติดเชื่อในแบคทีเรีย และค้นพบยีนที่อยู่ใกล้เคียง ซึ่งเรียกว่า CRISPR-associated system หรือ Cas โดยที่ Cas จะสร้างเอนไซม์ที่ตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะได้ โดยอาศัยลำดับเบสอาร์เอ็นเอที่เป็นคู่สม (complimentary) เป็นตัวเปรียบเทียบ (RNA-guided DNA endonuclease) จากการศึกษาในระยะถัดมาจึงทราบว่า CRISPR-Cas เป็นเครื่องมือในสิ่งมีชีวิตกลุ่มแบคทีเรีย ซึ่งทำหน้าที่เป็นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านการรุกรานจากไวรัสที่ติดเชื่อ และพยายามผนวกรวมจีโนมของตนเข้าสู่จีโนมของแบคทีเรียเจ้าบ้าน โดยมีหลักการง่าย ๆ กล่าวคือ ลำดับเบสใน spacers ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของไวรัสที่รุกราน ทำหน้าที่เป็นต้นแบบเพื่อสร้างอาร์เอ็นเอที่เป็นตัวเปรียบเทียบ (guided RNA: gRNA) และนำไปให้ Cas ไปตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่เป็นลำดับเบสของไวรัสที่รุกรานนั้นได้อย่างแม่นยำ ส่งผลให้ไวรัสหมดฤทธิ์ (ภาพที่ ๑)

ลักษณะพิเศษของระบบ CRISPR-Cas ที่มีขนาดเล็ก และสามารถตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการได้อย่างแม่นยำ ทำให้การตัดต่อสายดีเอ็นเอทำได้ง่ายขึ้น ต่อมานักวิทยาศาสตร์ ๒ ท่าน ได้แก่ Jennifer Doudna และ Emmanuelle Charpentier ได้พัฒนาระบบ CRISPR-Cas ให้ดียิ่งขึ้นจนสามารถใช้ guided RNA ซึ่งสร้างได้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อกำหนดตำแหน่งที่ต้องการให้เกิดการตัดสายดีเอ็นเอได้ง่ายและหลากหลาย ทำให้ทั้งคู่ได้รับรางวัลโนเบลสาขาเคมี ใน พ.ศ. ๒๕๖๓ ด้วยสมบัติของระบบ CRISPR-Cas ในการตัดสายดีเอ็นเอที่แม่นยำ และกระบวนการสร้าง guided RNA ที่ต้องการทำได้ง่าย จึงมีผู้ประยุกต์ใช้ระบบนี้อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะทางวิทยาศาสตร์การแพทย์

## บทบาทของ CRISPR-Cas ในการศึกษาการทำงานของยีนในโรคต่าง ๆ

โรคของมนุษย์จำนวนมากเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรม ความผิดปกติในการทำงานของยีนก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้หลากหลาย ตั้งแต่โรคหายากที่ถ่ายทอดในครอบครัว ไปจนถึงโรคที่พบบ่อยในประชากรทั่วไป เช่น โรคมะเร็ง, โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ/กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ความเข้าใจการทำงานของยีนในระบบต่าง ๆ และบทบาทของยีนต่าง ๆ ในกลไกการเกิดโรค จะช่วยให้ทราบสาเหตุและพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ ๆ สำหรับโรคแต่ละโรคได้



ภาพที่ ๑ หลักการทำงานของ CRISPR-Cas ของแบคทีเรีย

(ที่มา: Wikipedia Creative Common License CC-BY-SA3.0; <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5f/Crispr.png>)

การศึกษาบทบาทของยีนในการก่อโรคด้วย CRISPR-Cas ที่เห็นชัดเจนได้แก่การศึกษากลุ่มโรคพันธุกรรมที่เกิดจากยีนเดี่ยว (monogenic diseases) โรคกลุ่มนี้มีแบบแผนการถ่ายทอดชัดเจน ความผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นเกือบทั้งหมดเกิดจากการทำหน้าที่ผิดปกติของยีน อย่างไรก็ตาม โรคกลุ่มนี้มีจำนวนมากหลายพันโรค ส่วนใหญ่เป็นโรคหายาก พบน้อย แม้พบยีนก่อโรคแต่ยีนส่วนใหญ่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน และไม่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ ทำให้ความเข้าใจในบทบาทของยีนก่อโรคต่าง ๆ กับความผิดปกติที่เกิดขึ้นทำได้ยากมาก แต่ CRISPR-Cas ทำให้กระบวนการศึกษาทำได้ง่ายขึ้นมาก เช่น การใช้ CRISPR-Cas เพื่อปิดการทำงานของยีนที่สนใจ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ หรือการสร้างสัตว์ทดลองที่ปรับเปลี่ยนยีน (transgenic animal) เพื่อศึกษาโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะทำได้ง่ายด้วยการใช้ CRISPR-Cas

ตัวอย่างการศึกษาในโรคอื่นที่ไม่ได้ถ่ายทอดทางพันธุกรรม ได้แก่การศึกษายีนก่อโรคมะเร็ง เนื่องจากปัจจุบันทราบกันว่า มะเร็งเกิดจากการกลายพันธุ์ของกลุ่มยีนก่อมะเร็ง ผลของการทำงานที่ผิดปกติของยีนเหล่านี้ ทำให้เซลล์มีสมบัติเปลี่ยนไปจากปกติ เช่น มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนไม่จำกัด, มีความสามารถในการแพร่กระจายและเบียดบังเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ อย่างไรก็ตาม นักวิทยาศาสตร์ยังไม่ทราบว่า ยีนก่อมะเร็งจำนวนมากที่พบการกลายพันธุ์ในเซลล์มะเร็งนั้นทำงานหรือมีหน้าที่แท้จริงอย่างไร เนื่องจากเซลล์หรือสัตว์ทดลองปกติไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนก่อมะเร็ง การศึกษาความผิดปกติและบทบาทของยีนก่อมะเร็งจึงทำได้ยาก การใช้ CRISPR-Cas สามารถตัดยีนก่อมะเร็งให้เกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ต้องการได้ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถศึกษาการทำงานและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายหลังเกิดการกลายพันธุ์ได้อย่างใกล้ชิด นอกจากนี้ ยังสามารถใช้วิธีนี้ในการทดสอบยาต้านมะเร็งได้ โดยใช้คัดกรองยาที่ออกฤทธิ์จำเพาะ

ต่อยืนด้านมะเร็งที่กลายพันธุ์ด้วย CRISPR-Cas ในเซลล์เพาะเลี้ยง รวมถึงการใช้ปรับแต่งเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อใช้ในภูมิคุ้มกันบำบัดสำหรับโรคมะเร็งด้วย

### การพัฒนา CRISPR-Cas เพื่อใช้วินิจฉัยโรค

มีผู้วินิจฉัยโรคด้วยการตรวจหาลำดับพันธุกรรมจำเพาะในสายดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเออย่างแพร่หลาย ในเวชปฏิบัติ ตั้งแต่การวินิจฉัยโรคพันธุกรรมต่าง ๆ เช่น โรคโลหิตจางทาลัสซีเมีย, โรคมะเร็งที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม การตรวจหายีนแพ้ยาบางชนิด เช่น ยาแก้อักเสบ ยาลดกรดยุงริก รวมถึงการวินิจฉัยโรคติดเชื้อโดยอาศัย การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจุลชีพก่อโรค เช่น เชื้อแบคทีเรีย วัณโรค และไวรัสหลายชนิด การประยุกต์ใช้ CRISPR-Cas เพื่อค้นหาตำแหน่งลำดับพันธุกรรมและตัดในตำแหน่งที่จำเพาะ สามารถพัฒนาเพื่อวินิจฉัยโรคด้วยการตรวจหายีนที่ต้องการได้ ตัวอย่างที่มีการใช้ในวงการแพร่ระบาดของไวรัสก่อโรคโควิด-19 ได้แก่การพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสก่อโรคโควิด-19 แบบรวดเร็ว สามารถใช้ทดแทนการตรวจด้วย RT-PCR ซึ่งใช้เวลานานกว่า ต้องทำในห้องปฏิบัติการ อีกทั้งใช้เครื่องมือขนาดใหญ่และซับซ้อน

### การพัฒนา CRISPR-Cas เพื่อใช้รักษาโรค

นอกจากนักวิทยาศาสตร์จะสามารถใช้ประโยชน์ของ CRISPR-Cas ในการศึกษาวิจัยต่าง ๆ แล้ว การประยุกต์ใช้ CRISPR-Cas ในการรักษาโรคมายังเป็นจุดมุ่งหมายสำคัญอย่างหนึ่งของการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ด้วยสมบัติพิเศษที่ทำให้การตัดต่อยีนเป็นเรื่องที่ง่ายกว่าเดิม การรักษาโรคพันธุกรรมด้วยการบำบัดด้วยยีน (gene therapy) ซึ่งมุ่งเน้นแก้ไขความผิดปกติที่เป็นต้นเหตุของโรค เป็นแนวทางการรักษาที่เป็นไปได้มากขึ้น การรักษาโรคพันธุกรรมที่เกิดจากยีนกลายพันธุ์ผิดปกติด้วย CRISPR-Cas มีประเด็นที่ต้องพิจารณา ดังนี้

๑. โรคดังกล่าวควรเป็นโรคที่เกิดจากยีนเดี่ยว (monogenic disease) หรือการรักษาสามารถทำได้ด้วยการตัดต่อยีนเพียงยีนเดียว เนื่องจากโรคกลุ่มนี้มีโอกาสที่จะเกิดจากปัจจัยแวดล้อมอื่นได้ยาก มีผลต่อความสำเร็จในการรักษา

๒. โรคควรมีกลไกจากการทำหน้าที่เกินปกติของยีน (gain-of-function) หรือยีนนั้นสร้างโปรตีนผิดปกติที่ก่อโรคด้วยสาเหตุจาก CRISPR-Cas ซึ่งทำหน้าที่ตัดต่อยีนและส่งผลให้ยีนสูญเสียหน้าที่ (loss-of-function) เป็นหลัก

๓. โรคดังกล่าวมีความรุนแรงสูง ไม่มีวิธีการรักษาอื่นที่ได้ผลดี หรือมีวิธีการรักษาแต่มีข้อจำกัดสูง เช่น ต้องรักษาด้วยการปลูกถ่ายอวัยวะ หรือล้มเหลวจากการรักษาที่มีอยู่

ปัจจุบันการรักษาด้วย CRISPR-Cas สำหรับโรคพันธุกรรมอยู่ในการวิจัยทางคลินิกหลายโรค เช่น โรค hereditary amyloidosis ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน TTR ทำหน้าที่ผลิตโปรตีน transthyretin จากตับ ยีนที่กลายพันธุ์ส่งผลให้โปรตีนมีโครงสร้างผิดปกติและไม่สามารถย่อยสลายหรือถูกกำจัดได้ เกิดการตกตะกอนสะสมของโปรตีนนี้ในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อหัวใจและเส้นประสาท การสะสมโปรตีนที่กล้ามเนื้อหัวใจส่งผลให้กล้ามเนื้อหัวใจหนาตัวผิดปกติ (hypertrophic cardiomyopathy) จนทำให้การบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจผิดปกติ เกิดภาวะหัวใจวายได้ นอกจากนี้ การสะสมของโปรตีนที่เส้นประสาทส่งผลให้การนำกระแสประสาทผิดปกติ กล้ามเนื้ออ่อนแรง และการรับรู้สื่อกบพร่อง ผู้ป่วยโรคนี้ที่เกิดความผิดปกติของกล้ามเนื้อหัวใจและเกิดอาการทางหัวใจแล้วไม่ได้รับการรักษา มักเสียชีวิตในเวลาเฉลี่ย ๒ ปี ๖ เดือน การรักษาในปัจจุบันคือการปลูกถ่ายตับ เพื่อกำจัดแหล่งกำเนิด transthyretin ที่ผิดปกติ หรือการให้ยา tafamidis เพื่อคงโครงสร้างของ transthyretin ให้เสถียร ไม่ตกตะกอน ผู้ป่วยจำเป็นต้องใช้ยา

ไปตลอดชีวิต การวิจัยทางคลินิกโดยใช้ CRISPR-Cas เพื่อตัดยีน TTR ให้สูญเสียหน้าที่ ส่งผลให้ตับหยุดผลิต transthyretin ที่ผิดปกติ และป้องกันการตกตะกอนสะสมของโปรตีนได้ การวิจัยทางคลินิกในผู้ป่วยพบว่าการรักษาด้วย CRISPR-Cas เพียงครั้งเดียวสามารถลดการสร้างโปรตีนผิดปกติได้ต่อเนื่องยาวนาน นับเป็นทางเลือกการรักษาที่ดีและมีความปลอดภัยสูง

### ความท้าทายของการใช้ CRISPR-Cas ทางทางการแพทย์

แม้ว่า CRISPR-Cas จะเป็นเทคโนโลยีสำคัญที่ช่วยให้การตัดต่อยีนทำได้ง่ายขึ้น และมีผู้นำมาใช้ในทางการแพทย์หลายระดับ นับจากการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ไปจนถึงการใช้ในเวชปฏิบัติเพื่อวินิจฉัยและรักษาโรคก็ตาม ยังมีข้อพิจารณาในการนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาใช้กับมนุษย์อย่างแพร่หลายดังนี้

๑. CRISPR-Cas เป็นเทคโนโลยีใหม่ จึงขาดข้อมูลระยะยาว ทั้งในด้านประสิทธิภาพของการใช้งาน และผลแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นในอนาคต

๒. การรักษาโรคด้วยการตัดต่อยีน อาจช่วยแก้ไขความผิดปกติที่ทำให้เกิดโรคได้ แต่ยังคงขาดองค์ความรู้ในด้านการทำงานของยีนนั้นที่บกพร่องไปในระยะยาวว่าก่อให้เกิดปัญหาอื่นตามมาหรือไม่

๓. ประเด็นทางจริยธรรมของการตัดต่อยีนเพื่อแก้ไขความผิดปกติแบบถาวรตั้งแต่เกิดโดยตัดต่อยีนในตัวอ่อนของมนุษย์ด้วย CRISPR-Cas เป็นสิ่งที่วงการวิทยาศาสตร์และการแพทย์ไม่สนับสนุน เนื่องจากการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมเกิดขึ้นแก่เซลล์ทุกเซลล์ในร่างกาย และถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ โดยที่เด็กที่ถูกตัดต่อยีนจะไม่ได้รับข้อมูลและไม่มีส่วนร่วมในกระบวนการตัดสินใจ กรณีตัวอย่างคือรายงานการตัดต่อยีนในตัวอ่อนมนุษย์ที่คลอดเป็นทารกแฝดเพศหญิงชาวจีนใน พ.ศ. ๒๕๖๑ ก่อให้เกิดข้อถกเถียงถึงความเหมาะสมและการกระทำที่ผิดจริยธรรมการวิจัย มีผลให้นักวิทยาศาสตร์ชาวจีนถูกดำเนินคดีและถูกจำคุกจากกรณีดังกล่าว

### บทสรุป

CRISPR-Cas เป็นเทคโนโลยีใหม่ที่เปลี่ยนโฉมหน้าการศึกษาทางพันธุกรรมอย่างมากในช่วง ๑๐ ปีที่ผ่านมา การประยุกต์ใช้ CRISPR-Cas ช่วยให้นักวิทยาศาสตร์ศึกษาและเข้าใจบทบาทของยีนในโรคต่าง ๆ พัฒนาวิธีการตัดต่อยีน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ทั้งด้านการวิจัย การวินิจฉัย และการรักษาโรค คาดกันว่าจะมีการใช้เทคโนโลยีดังกล่าวแพร่หลายขึ้นอีกมากในอนาคต อย่างไรก็ตาม การใช้เทคโนโลยีดังกล่าวยังต้องคำนึงถึงผลระยะยาวที่ต้องอาศัยการติดตามและประเด็นทางจริยธรรมของการนำเทคโนโลยีใหม่มาใช้กับมนุษย์อีกด้วย

### บรรณานุกรม

- Cyranoski D, Ledford H. Genome-edited baby claim provokes international outcry. *Nature*. 2018;563(7733):607–608. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07545-0>
- Gillmore JD, Gane E, Taubel J, et al. CRISPR-Cas9 In vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*. 2021;385(6):493–502. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107454>
- Katti A, Diaz BJ, Caragine CM, Sanjana NE, Dow LE. CRISPR in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2022;22(5):259–279. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00441-w>
- Ledford H, Callaway E. Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel. *Nature*. 2020;86(7829):346–347. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02765-9>

Patchesung M, Jantarug K, Pattama A, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nat Biomed Eng.* 2020;4(12):1140–1149. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00603-x>

Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18:2401–2415. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>