

บทกวี

ระบบ CRISPR-Cas: กรรไกรโมเลกุล

มานพ พิทักษ์ภากร*, สมชัย บวรกิตติ**

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) คือ ส่วน DNA ที่มีลำดับเบสสั้นเรียงตัวซ้ำๆ และมีลำดับเหมือนกันเมื่ออ่านจากทั้งสองทิศทาง (palindrome) พบในกลุ่มสิ่งมีชีวิตไร้นิวเคลียสจริงและไร้แผ่นเยื่อหุ้มนิวเคลียส (กลุ่ม prokaryote) เช่น แบคทีเรีย พบครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. ๒๕๓๐ โดย Yoshizumi Ishino นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นที่มหาวิทยาลัยโอซะคา ต่อมาในปี พ.ศ. ๒๕๔๓ การศึกษาโดย Francisco Mojica นักวิทยาศาสตร์ชาวสเปน ทำให้ทราบว่าลำดับเบสพิเศษนี้มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอต เช่น แบคทีเรียกว่า ๒๐ ชนิดพันธุ์ และเป็นผู้ตั้งชื่อว่า CRISPR (คริสเปอร์) ต่อมาได้พบว่ามันมีหน่วยพันธุกรรมกลุ่มหนึ่งซึ่งอยู่ใกล้กับ CRISPR ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ที่คลายเกลียวสายดีเอ็นเอ (helicase) และตัดสายดีเอ็นเอ (endonuclease) ได้ จึงตั้งชื่อว่า CRISPR-associated system (Cas) ซึ่งมีหลายชนิดแตกต่างกันไปตามชนิดพันธุ์ของแบคทีเรียที่ต่างกัน

ในระยะแรกของการค้นพบนั้น ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า CRISPR-Cas มีหน้าที่เฉพาะใดในแบคทีเรีย ในเวลาต่อมา Francisco Mojica พบว่าในจีโนมของแบคทีเรานั้น ส่วนของดีเอ็นเอที่กระจายอยู่ระหว่าง CRISPR (spacer DNA) มีลำดับคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นโดยเฉพาะไวรัส ข้อสังเกตนี้ทำให้เชื่อว่า CRISPR นั้นอาจมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการกำจัดสิ่งบุกรุกแปลกปลอม การศึกษาระยะถัดมาจึงทราบว่า CRISPR-Cas มีบทบาทสำคัญมากต่อกระบวนการป้องกันการบุกรุกของไวรัส เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสของเซลล์สิ่งมีชีวิตต่างๆ นั้น ไวรัสจะฉีดดีเอ็นเอของตนเองเข้าสู่เซลล์นั้นเพื่อผนวกกับดีเอ็นเอของเซลล์ จากนั้นจึงกระตุ้นให้เซลล์สร้างไวรัสขึ้นภายในเซลล์ที่ติดเชื่อนั้น ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่น สัตว์หรือมนุษย์จะมีระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เม็ดเลือดขาวและโปรตีนคุ้มกัน

(immunoglobulins) ชนิดต่างๆ ซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติบอดีต่อต้านไวรัส แต่กลุ่มโปรคาริโอต ซึ่งเป็นสัตว์เซลล์เดียวแบบแบคทีเรียที่ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันซับซ้อนเช่นนี้ การป้องกันตนเองจึงอาศัย CRISPR ในการค้นหาตำแหน่งดีเอ็นเอแปลกปลอมที่ตรงกับไวรัสที่ติดเชื้อ จากนั้นจึงทำการตัดดีเอ็นเอแปลกปลอมนั้นด้วยเอนไซม์ Cas ถือเป็นระบบภูมิคุ้มกันอย่างง่ายของแบคทีเรีย

ด้วยกลไกการทำงานของ CRISPR-Cas ทำให้นักวิทยาศาสตร์ประยุกต์ระบบการค้นหาตำแหน่งดีเอ็นเอที่จำเพาะและตัดสายดีเอ็นเอได้ตามต้องการในเซลล์ชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีเอนไซม์ Cas แตกต่างกันไป ระบบที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือ CRISPR-Cas9 ซึ่งถูกพัฒนาโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกัน Jennifer Doudna และคณะในปี พ.ศ. ๒๕๕๕ โดยดัดแปลง Cas9 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบใน *Streptococcus pyogenes* ขึ้นใหม่ให้ใช้ร่วมกับสายอาร์เอ็นเอซึ่งทำหน้าที่เป็นลำดับเบสเปรียบเทียบกับตำแหน่งที่ต้องการตัดสายดีเอ็นเอ เรียกสายอาร์เอ็นเอนี้ว่า single-guided RNA ทำให้เอนไซม์ Cas9 สามารถค้นหาลำดับเบสในสายดีเอ็นเอที่ตรงกับ single-guided RNA และตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นได้ ด้วย CRISPR-Cas9 นี้ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถออกแบบ single-guided RNA ที่จำเพาะต่อส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการตัด ทำให้การตัดต่อดีเอ็นเอสามารถทำได้ด้วยความแม่นยำ และเนื่องจาก CRISPR-Cas9 มีขนาดเล็กและมีความจำเพาะสูง นักวิทยาศาสตร์จึงสามารถดัดแปลงดีเอ็นเอได้พร้อมกันหลายตำแหน่ง และในตำแหน่งใดก็ได้ทั่วทั้งจีโนม โดยใช้ CRISPR-Cas9 นอกจากนี้ นักวิทยาศาสตร์ยังค้นพบ endonuclease อื่นซึ่งมีขนาดเล็กและทำงานง่ายกว่า Cas9 เช่น Cpf1 ทำให้การออกแบบ single-guided RNA ทำได้ง่ายขึ้นไปอีก

* คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

** สำนักวิทยาศาสตร์ ราชบัณฑิตยสภา

ในปัจจุบัน CRISPR-Cas9 ได้รับการประยุกต์ในการวิจัยหลากหลายสาขาทั้งในด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคพันธุกรรม โรคเมะเร็ง โรคติดเชื้อ การพัฒนาสัตว์ทดลองที่ดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic animal) ด้านการเกษตรในการศึกษาและดัดแปลงพันธุ์พืชและสัตว์ และศึกษาหน่วยพันธุกรรมที่จำเพาะต่อลักษณะต่างๆ ของสายพันธุ์พืชและสัตว์ต่างๆ

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ CRISPR-Cas ในวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้แก่

๑. การศึกษาหน้าที่ของหน่วยพันธุกรรมโดยการคัดกรองทั้งจีโนม (genome-wide screening) เนื่องจากเซลล์ของมนุษย์มีความซับซ้อน และประกอบด้วยหน่วยพันธุกรรมซึ่งทำหน้าที่กว่า ๒ หมื่นตัว การศึกษาการทำงานของหน่วยพันธุกรรมในเซลล์มนุษย์ที่ผ่านมา โดยอาศัยการตัดต่อหน่วยพันธุกรรมหรือกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ของหน่วยพันธุกรรมนั้นทำได้ทีละหน่วย เนื่องจากเป็นข้อจำกัดทางเทคนิคในการตัดต่อหน่วยพันธุกรรม หรือการกระตุ้นการกลายพันธุ์เอง ทำให้การศึกษางานของหน่วยพันธุกรรมสามารถใช้ได้กับโรคพันธุกรรมหน่วยพันธุกรรมเดียว (single gene disorders) แต่ไม่สะท้อนภาพรวมการเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับหน่วยพันธุกรรมหลายหน่วย เช่น โรคพหุปัจจัย (multifactorial disorders) โรคเรื้อรังที่พบบ่อย เช่น โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง มะเร็ง กลุ่มโรคออโตอิมมูน แต่ความสามารถของ CRISPR-Cas ที่ตัดต่อหน่วยพันธุกรรมได้หลายหน่วยพร้อมกัน และมีความแม่นยำ ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถเลือกศึกษาหน้าที่หน่วยพันธุกรรมต่างๆ ที่จำเพาะได้พร้อมกันในคราวเดียว เทคนิคการใช้ CRISPR-Cas ในการยับยั้งหรือกระตุ้นการทำงานของหน่วยพันธุกรรมพร้อมกันหลายหน่วย (CRISPR interference หรือ CRISPRi และ CRISPR activation หรือ CRISPRa) ได้รับความนิยมแพร่หลายในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์มะเร็ง ทำให้นักวิทยาศาสตร์เข้าใจบทบาทของหน่วยพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง รวมถึงกลไกการทำงานของวิถีเซลล์ (cellular pathway) ต่างๆ ของเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น

๒. การสร้างแบบจำลองสัตว์ของโรคต่างๆ ในอดีตที่ผ่านมา การจำลองรูปแบบที่ดีที่สุดในการศึกษาโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม หรือโรคที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของหน่วยพันธุกรรมซึ่งไม่ถ่ายทอด (somatic mutation) เช่น มะเร็ง อาศัยการสร้างสัตว์ทดลองที่มีการกลายพันธุ์ของ

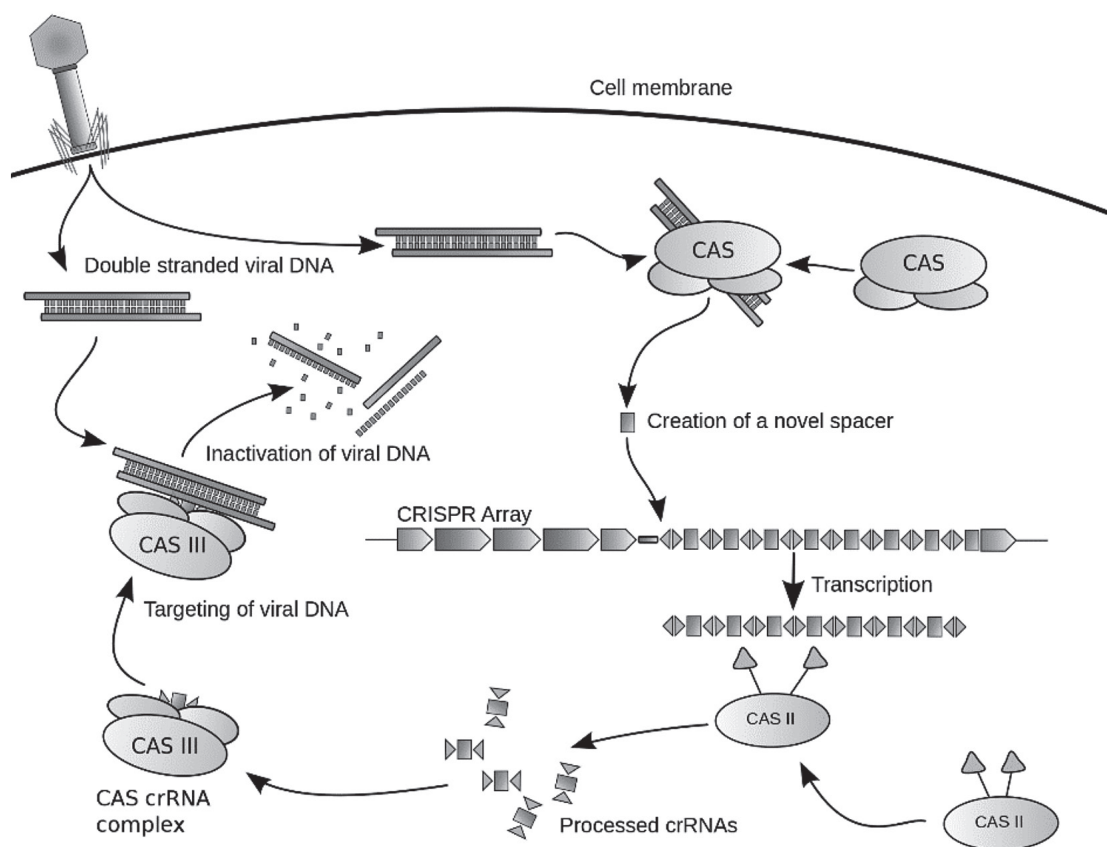
หน่วยพันธุกรรมที่ต้องการศึกษา (transgenic animal) สัตว์ทดลองที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ได้แก่ หนู และปลาม้าลาย การสร้าง transgenic animal ที่ผ่านมาอาศัยกระบวนการตัดต่อหน่วยพันธุกรรมและใส่ในไวรัส จากนั้นจึงใช้ไวรัสในการนำส่งส่วนของหน่วยพันธุกรรมไปยังเซลล์สืบพันธุ์เป้าหมายหรือตัวอ่อน การสร้างชิ้นส่วนหน่วยพันธุกรรมและดีเอ็นเอในไวรัสนั้นทำได้ยาก และมีข้อจำกัดมาก ทำให้การสร้าง transgenic animal ทำได้ยาก แต่การใช้ CRISPR-Cas ทำให้การตัดต่อหน่วยพันธุกรรมที่ต้องการมีความยุ่งยากน้อยลง การสร้างแบบจำลองสัตว์ที่ต้องการศึกษาโรคต่างๆ ทำได้ง่ายขึ้น และสามารถสร้างแบบจำลองสัตว์ชนิดใหม่ๆ ที่ไม่สามารถทำได้ด้วยวิธีเดิมได้อีกมาก

๓. การรักษาผู้ป่วยโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมและโรคอื่นๆ ด้วยวิธีเซลล์บำบัด หรือหน่วยพันธุกรรมบำบัด การรักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมที่อาจจะตรงจุดที่สุด คือ การทดแทนหน่วยพันธุกรรมที่เสียหายด้วยหน่วยพันธุกรรมปกติ แต่การรักษาด้วยวิธีนี้มีความซับซ้อนมากเช่นเดียวกับการสร้างแบบจำลองสัตว์ นอกจากนี้ยังมีความเสี่ยงของการใช้ไวรัสที่ทำหน้าที่เป็นพาหะนำส่งหน่วยพันธุกรรม (viral vector) ซึ่งอาจผนวกจีโนมในตำแหน่งที่อาจกระตุ้นให้เกิดมะเร็งดังในอดีตที่มีการใช้หน่วยพันธุกรรมบำบัดในการรักษาผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องรุนแรง (severe combined immunodeficiency: SCID) ซึ่งมีผลให้ผู้ป่วยเกิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวในภายหลัง การใช้ CRISPR-Cas สามารถตัดต่อหน่วยพันธุกรรมที่ต้องการและในตำแหน่งที่จำเพาะ ทำให้เสี่ยงความเสี่ยงข้างต้นได้ นอกจากนี้การรักษาด้วยเซลล์บำบัด สามารถทำได้ง่ายขึ้นโดยการใช้เซลล์ของผู้ป่วยเองมาทำการตัดต่อแก้ไขหน่วยพันธุกรรมด้วย CRISPR-Cas ในห้องปฏิบัติการแล้วเพาะเลี้ยงจนมีจำนวนมากพอ จากนั้นจึงนำเซลล์เหล่านั้นให้กลับสู่ผู้ป่วยรายเดิมต่อไป เทคนิคเหล่านี้ยังได้รับการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคเมะเร็ง ในรูปแบบเซลล์ภูมิคุ้มกันบำบัดอีกด้วย

๔. การประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจุลชีพ เนื่องจากคุณสมบัติพื้นฐานของ CRISPR-Cas ในการต่อต้านการติดเชื้อแปลกปลอม ทำให้มีแนวคิดการใช้ระบบนี้ในการกำจัดเชื้อจุลชีพก่อโรค เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา หรือไวรัส โดยการสร้าง single-guided RNA ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของจุลชีพก่อโรคที่ต้องการเพื่อให้ทำงานร่วมกับเอนไซม์ Cas ในการทำลายเชื้อจุลชีพโดยที่เซลล์มนุษย์ไม่ได้รับผลดังกล่าว ซึ่งถือเป็นวิธีต้านจุลชีพที่จำเพาะต่อเชื้อ และใช้ได้แม้กับเชื้อดื้อยาหรือเชื้อที่ไม่มียารักษาด้วย

๕. การควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ โดยเฉพาะการติดเชื้อจุลชีพกลุ่มที่อาศัยแมลงเป็นพาหะ เช่น เชื้อมาลาเรียหรือเชื้อไวรัสเด็งกี โดยใช้ CRISPR-Cas ในการตัดต่อหน่วยพันธุกรรมของยุง Anopheles หรือ Aedes ให้มีความสามารถในการแพร่เชื้อจุลชีพน้อยลง หรือทำให้ยุงเป็นหมันและลดการแพร่พันธุ์ของยุงพาหะเหล่านี้ได้

โดยสรุป CRISPR-Cas เป็นการค้นพบกระบวนการเอาตัวรอดทางธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต ซึ่งนักวิทยาศาสตร์นำมาปรับปรุงและประยุกต์ใช้กับวงการวิทยาศาสตร์แขนงต่างๆ รวมถึงวิทยาศาสตร์การแพทย์อย่างแพร่หลายในช่วงเวลาไม่กี่ปีมานี้ ทำให้เกิดความก้าวหน้าใหม่ๆ ในการศึกษาวิจัย ค้นคว้าวิธีป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ทั้งกลุ่มโรคติดต่อและโรคไม่ติดต่อ และคาดว่าจะการพัฒนาเกี่ยวกับระบบนี้จะมีความก้าวหน้าอีกมากในอนาคตอันใกล้



รูปที่ ๑ กระบวนการทำงานของ CRISPR-Cas ในแบคทีเรียเพื่อกำจัด genome แปลกปลอมจากการติดเชื้อไวรัส

(ที่มา: Wikipedia <https://en.wikipedia.org/wiki/CRISPR>)

เอกสารอ้างอิง

๑. Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol* 2016;34:933-41.
๒. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys* 2017;46:505-29.
๓. Schmid-Burgk JL. Disruptive non-disruptive applications of CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol* 2017;48:203-9.
๔. Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet* 2015;16:299-311.

Abstract

CRISPR/Cas: The molecular scissors

Manop Pitukpakorn*, Somchai Bovornkitti**

* Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

** The Academy of Science, The Royal Society of Thailand

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) is a DNA sequence commonly found in prokaryotes such as archaea and bacteria. Together with CRISPR-associated system (Cas) enzyme, the CRISPR/Cas system provides basic immunity to foreign genetic materials, including those from viral infection, by detecting and cleaving foreign DNA sequence from the host genome.

The discovery of the CRISPR/Cas system, with some modifications, creates the basis of the first genome editing technology, known as CRISPR/Cas9, allowing scientists to modify any genes within various organisms. The CRISPR/Cas genome editing technology has numerous potential applications, especially in biomedical researches such as: genome-wide gene function study; animal model generation; cell and gene therapy of various diseases; microbial manipulation for infectious disease study; and treatment, as well as disease control. With further improvement and better understanding of disease models, we can expect many scientific breakthroughs in the near future from this gene editing technology.