การถ่ายโอนยีนในโรคไต

สมพร วงศ์อมรธรรม พบ.*

บทคัดย่อ ความก้าวหน้าในด้านอณูชีววิทยาและพันธุวิศวกรรมทำให้เกิดการพัฒนาทางการแพทย์ในการศึกษาวิจัยกลไกการเกิดโรคและการรักษาโดยยีนบำบัดในอวัยวะต่างๆ การศึกษาการถ่ายโอนยีนในโรคไตเริ่มมีมากขึ้นทั้งการวิจัยกลไกขบวนการทำให้เกิดโรคและโอกาสที่จะนำมาใช้รักษาโรคไตที่ยังไม่มีวิธีรักษาหรือการรักษาในปัจจุบันยังไม่ได้ผลดีเช่นโรคไตจากความผิดปกติทางพันธุกรรม มะเร็งไต การเกิดพังผืดในไตจากสาเหตุต่างๆที่นำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรัง และการปฏิเสธไตจากการปลูกถ่าย แม้ว่าการถ่ายโอนยีนในไตยังมีปัญหาและอุปสรรคทั้งในด้านการขาดพาหะนำยีนที่เหมาะสมไปสู่เซลล์ไตที่เป็นเป้าหมาย การขาดขบวนการที่จะควบคุมหรือหยุดการแสดงออกของยีนเมื่อไม่ต้องการแต่การพัฒนาความรู้การวิจัยในการถ่ายโอนยีนและยีนบำบัดที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้การศึกษาและประยุกต์ใช้ในโรคไตมีโอกาสเป็นไปได้มากในอนาคตอันใกล้นี้

Abstract **Gene transfer in the kidney**

Somporn Wongamorntham, M.D.*

Advances in molecular biological intervention and genetic engineering develop new approaches in dissecting molecular aspects of diseases and possibly in gene therapy. In the field of nephrology, there is growing research in gene transfer technology in identifying pathophysiology and gene therapy of renal diseases. The benefit of gene therapy is in the groups of renal diseases that have no appropriate treatments or the present treatments are not satisfied such as hereditary diseases, malignancy, progressive sclerotic renal diseases, and transplant rejection. Although there are many hurdles in developing efficient gene transfer vectors to the specific renal cell targets and in controlling expression of transferred gene, the rapid spread of knowledge in molecular technology will make gene therapy in nephrology realistic and useful in the near future.

(MJS 2000 ; 1 : 44 – 51)

บทนำ

ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีการแพทย์ด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) และพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงก้าวหน้าในด้านการวิจัย วินิจฉัยและการรักษาโดยยีนบำบัด (gene therapy) เพื่อพัฒนาความรู้และการรักษาโรคต่างๆ ให้ดีกว่าในปัจจุบัน การศึกษาด้านการ

* หน่วยโรคไต, ภาควิชาอายุรศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
* Division of Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

ถ่ายโอนยีน (gene transfer) ในมนุษย์มีมากกว่า 200 โครงการ[1] เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง โรคพันธุกรรม โรคติดเชื้อไวรัสภูมิคุ้มกันบกพร่องและโรคอื่นๆ โรคไต ซึ่งเกิดจากสาเหตุต่างๆทั้งจากความผิดปกติทางด้านพันธุกรรม จากความผิดปกติของภาวะเมทาบอลิซึม จากการทำลายโดยภาวะภูมิคุ้มกัน หรือการทำลายเนื้อไตจากการติดเชื้อและดำเนินโรคไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรัง มีกลไกการเกิดโรคซับซ้อนและบางส่วนยังไม่ทราบแน่ชัด ได้มีการพัฒนาใช้ความรู้ด้านการถ่ายโอนยีนเพื่อศึกษาวิจัยความผิดปกติและกลไกการดำเนินโรคในโรคไตทั้งในห้องทดลองและในสัตว์เพื่อนำไปรักษาแก้ไขหรือชะลอความผิดปกติอันนำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรัง แม้จะมีปัญหาและอุปสรรคในการถ่ายโอนยีนแต่ความก้าวหน้าในวิทยาการถ่ายโอนยีนที่จะพัฒนาวิธีการและคิดค้นพาหะนำยีน (vectors) ประเภทใหม่ๆที่เจาะจงต่อเซลล์ไตจะทำให้ยีนบำบัดเป็นวิธีรักษาโรคไตที่ยังไม่มีการรักษาที่ได้ผลหรือการรักษาในปัจจุบันยังไม่ได้ผลดี รวมทั้งการใช้ในการป้องกันการปฏิเสธไตในการปลูกถ่ายไต โรคถุงน้ำในไตจากพันธุกรรมโรคมะเร็งในไต โรคภูมิคุ้มกันและโรคที่มีการอักเสบของไตอย่างเฉียบพลันและเรื้อรัง บทความนี้จะกล่าวถึงความรู้พื้นฐานด้านการถ่ายโอนยีนและการใช้ในโรคไต

การถ่ายโอนยีน (gene transfer)

การถ่ายโอนยีน[2] คือการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรม (genetic material) ไปสู่เซลล์ต่างๆ ที่เป็นเป้าหมาย (target cells) และทำให้มีการแสดงออกของสารพันธุกรรมนั้นในเซลล์เป้าหมาย เซลล์เป้าหมายส่วนมากมักเป็นเซลล์ร่างกาย (somatic cells) ที่ปกติไม่สามารถถ่ายทอดพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกได้ การศึกษาวิจัยการถ่ายโอนยีนไปยังเซลล์สืบพันธุ์ (germ-line cells) ยังมีข้อจำกัดทางด้านจริยธรรม[3] การถ่ายโอนยีนทำให้สามารถศึกษาและเข้าใจการทำหน้าที่ของยีนนั้นในขบวนการกลไกการเกิดโรค การทดแทนยีนที่ขาดหรือผิดปกติไป หรือให้ทำหน้าที่ยับยั้งหรือกดการทำงานของยีนที่ทำให้เกิดโรค การใช้ยีนบำบัด (gene therapy) เพื่อรักษาโรคในมนุษย์จะมีหลักการเบื้องต้นคล้ายการปลูกถ่ายอวัยวะที่นำยีนจากภายนอกใส่เข้าสู่ร่างกายเพื่อทำหน้าที่ในร่างกายนั้น

การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ (gene delivery into cells)

วิธีการที่จะถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายให้ได้ผลตามที่ประสงค์ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คือ

– *ยีนหรือส่วนประกอบของสารพันธุกรรม (cloned gene)*

สารพันธุกรรมที่จะใช้ในการถ่ายโอนอาจอยู่ในรูปของยีนเดี่ยว (single gene) หลายยีน (multiple genes), cDNA, doble stranded DNA, antisense-oligionucleotides หรือ decoys ซึ่งความรู้ด้านอณูชีววิทยาและพันธุวิศวกรรมสามารถแยกและสังเคราะห์สารพันธุกรรมเหล่านี้ได้

– *พาหะนำสารพันธุกรรม (vectors)*

การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์โดยการสัมผัสระหว่างสารพันธุกรรมและเซลล์เป้าหมายโดยตรงมีโอกาสประสบความสำเร็จน้อย มีการศึกษาและคิดค้นพาหะเพื่อช่วยนำสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ ให้ได้ผลสำเร็จมากขึ้น พาหะนำสารพันธุกรรมที่นิยมใช้ได้แก่

1. **พาหะประเภทเชื้อไวรัส (viral vectors)**

พาหะประเภทนี้คือเชื้อไวรัสที่มีคุณสมบัติสามารถยึดจับกับผนังเซลล์และถ่ายโอนสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ได้โดยที่เชื้อไวรัสนั้นไม่สามารถแบ่งตัวเป็นอันตรายต่อเซลล์และร่างกาย พาหะประเภทไวรัสเป็นที่นิยมเนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงให้มีปริมาณมากได้ง่าย ไวรัสที่นิยมใช้เป็นพาหะได้แก่

1.1 Retroviral vector

Retro viruses ประกอบด้วย single stranded ribonucleic acid genome ขนาด 7–10 kb ล้อมรอบด้วย nucleocapsid core และ glycoprotein envelope[4] ไวรัสนี้ทำหน้าที่เป็นพาหะโดยที่ envelope protein[5] สามารถยึดจับกับตัวรับ (receptor)[6,7] เฉพาะบนผิวผนังเซลล์เป้าหมายแล้วไวรัสเข้าสู่เซลล์โดยวิธี receptor-mediated endocytosis หลังจากนั้นไวรัสจะปลดปล่อย nucleocapsid เข้าสู่ cytoplasmของเซลล์เป้าหมายและมีการสร้าง double stranded DNA จาก single stranded RNA โดยขบวนการ reverse transcriptase แล้วเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์และเข้ายึดติด (intragration) เป็นส่วนหนึ่งของ genome ของเซลล์นั้นอย่างสุ่ม (random) ในขณะที่เซลล์มีการ

แบ่งตัว ทำให้มีการแสดงออกอย่างถาวร (permanent expression) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้

Retro viruses แม้มีข้อดีที่ทำให้มีการแสดงออกอย่างถาวรแต่มีข้อด้อยที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณน้อย (10^6-10^7 infected unit/ml)[8] ซึ่งอาจไม่พอเพียงในการใช้ถ่ายโอนยีนในเซลล์จำนวนมากและยังใช้ได้ดีเฉพาะในเซลล์ที่มีการแบ่งตัว[9,10] แต่เซลล์ส่วนมากในร่างกายอยู่ในสภาพไม่แบ่งตัวรวมทั้งอาจเกิดการผ่าเหล่า (insertional mutagenesis) เนื่องจากเข้ายึดจับกับ genome แบบสุ่ม และอาจก่อให้เกิดก้อนทูมได้ถ้าเกิดการยึดจับกับส่วน proto oncogene ไวรัสที่นิยมใช้ได้แก่ Moloney murine leukemic viruses (MmLv)[11,12]

Lentiviruses เป็นไวรัสอีกชนิดหนึ่งในกลุ่มนี้แต่มีคุณสมบัติต่างกันที่สามารถใช้ได้ในเซลล์ที่ไม่มีการแบ่งตัว[13]

1.2 Adenoviral vectors

เป็นไวรัสที่มีลักษณะเป็น icosahedral capsid ขนาดประมาณ 70 nm ประกอบด้วยโปรตีนและ linear double stranded DNA ขนาด 36 kb[14] ไวรัสนี้มีข้อเด่นที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมาก ($10^{10}-10^{12}$ infected unit/ml) ไม่ต้องเข้ายึดจับกับ genome ของเซลล์เป้าหมาย[15] จึงใช้ได้กับเซลล์ที่ไม่แบ่งตัวแต่มีข้อด้อยที่ทำให้ไม่มีการแสดงออกอย่างถาวรและอาจกระตุ้นเซลล์ให้เกิดภูมิคุ้มกันต้านโปรตีนของไวรัสทั้งชนิด humoral และ cytotoxic T lymphocyte รวมทั้งอาจเกิดพิษได้เมื่อใช้ในขนาดสูง[15,16] ไวรัสนี้เข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยจับกับ coxsackie and adenoviral receptor(CAR)[17] ที่ผิวของผนังเซลล์และเข้าสู่เซลล์ทาง integrin receptors[18] แล้วถูกจับไว้ใน lysosome ทำให้ lysosome แตกออกปลดปล่อย DNA เข้าสู่ cytoplasm ของเซลล์เป้าหมายจากนั้นเคลื่อนเข้าไปอยู่ในรูป episome ภายในนิวเคลียส

1.3 Adeno associated virus(AAV)

เป็นกลุ่ม parvoviruses ที่มี single stranded DNA มีคุณสมบัติจำเพาะที่สามารถเข้ายึดติดกับ genome ของเซลล์เป้าหมายโดยเฉพาะบริเวณโครโมโซม 19q13.4 ของมนุษย์ ไวรัสนี้ต้องอาศัยไวรัสอื่น (unrelated helper virus) เช่น adeno viruses ในการแสดงออกและใช้ได้ในเซลล์ที่ไม่แบ่งตัวแต่มีข้อด้อยที่เพาะเลี้ยงได้ในปริมาณน้อยและมักปนเปื้อนจาก adenovirus helper[16]

2. พาหะที่ไม่ใช่เชื้อไวรัส(non viral vectors)

เป็นการถ่ายโอนยีนโดยอาศัยพาหะที่เป็นสารเคมีหรือวิธีการที่ไม่ได้ใช้เชื้อไวรัสมักเป็นวิธีการที่ง่ายไม่ก่อให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันและไม่มีปัญหาการแบ่งตัวของพาหะเช่นในไวรัสแต่มักให้ผลต่ำและแสดงออกอย่างชั่วคราว ภายหลังความสำเร็จในการใช้ calcium–phosphate เป็นพาหะในการถ่ายโอนยีนในเซลล์เป็นครั้งแรกได้มีการคิดค้นพาหะต่างๆ เช่น

2.1 Cationic lipids

ไขมันที่มีประจุบวก (cationic lipids) เช่น N[1–(2,3–dioleyloxy)propyl]–N,N,N–trimethyl–ammonium chloride(DOTMA) และ dioleoyl phosphatidylethalonamine (DOPE) สามารถรวมกับ DNA และจับยึดกับผนังเซลล์ด้วยปฏิกิริยาทางอณุภาคไฟฟ้าทำให้ DNA สามารถเข้าสู่เซลล์ได้[19] โดยขบวนการ endocytosis แต่มักถูกทำลายภายใน endosome หรือ lysosome

2.3 Cationic liposomes

วิธีการนี้ใช้คุณสมบัติของสารไขมันที่สามารถทำให้เกิดการเรียงตัวเป็นผนัง 2 ชั้นล้อมรอบ DNA คล้ายกับลักษณะของ liposomes และสามารถยึดจับและเชื่อมเข้ากับผนังเซลล์แล้วปลดปล่อย DNA ให้เข้าสู่ cytoplasm โดยตรงแต่บางส่วนอาจถูกทำลายใน endosome หรือ lysosome[20,21]

2.4 HVJ–liposome method

Kaneda และคณะ[22] ได้ใช้ envelope ของ hemagglutinating virus of Japan (HVJ) ซึ่งเป็น Sendai virus ที่มีคุณสมบัติเชื่อมเข้ากับผนังเซลล์ได้ (fusogenic activity) ร่วมกับไขมันรวมเป็น HVJ–liposome ใช้เป็นพาหะในการถ่ายโอนยีนและใช้ nonhistone chromosomal protein high mobility group 1(HMG–1) ผสมร่วมกับ DNA ทำให้สามารถส่งผ่าน DNA จาก cytoplasm เข้าสู่นิวเคลียสได้มากขึ้นและทำให้การแสดงออกดีขึ้น

2.5 Electroporation

โดยการใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์และผลักดันให้ยีนเคลื่อนเข้าสู่

เซลล์เป้าหมายได้ วิธีการนี้ง่ายแต่มักไม่สามารถทำให้ยีนเข้ายึดจับกับ genome ของเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ภายนอกร่างกายเท่านั้น วิธีการนี้สามารถใช้ได้กับเซลล์หลายชนิดรวมทั้ง hemopoietic cells[23]

2.6 Gene gun or particle bombardment

โดยอาศัยอณุภาคของโลหะหนัก เช่น ทองหรือทังสเตนเป็นพาหะนำยีนหรือ DNA เข้าสู่เซลล์ โดยการเร่งความเร็วของอณุภาคโลหะหนักให้พุ่งชนเซลล์เป้าหมายและสามารถทะลุทะลวงเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ วิธีการนี้ทำให้มีการแสดงออกได้อย่างชั่วคราวและผลสำเร็จมักต่ำ[24]

วิธีการถ่ายโอนยีน (method of gene transfer)

การถ่ายโอนยีนและพาหะให้เข้าสู่เซลล์เป้าหมายสามารถกระทำได้ทั้งภายนอกและภายในร่างกายขึ้นอยู่กับลักษณะจำเพาะและการตอบสนองของเซลล์เป้าหมาย

– *การถ่ายโอนยีนนอกร่างกาย (ex-vivo gene transfer)*

เป็นการถ่ายโอนยีนที่กระทำภายนอกร่างกาย ต้องอาศัยการตัดชิ้นเนื้อ (biopsy) หรือนำเซลล์เป้าหมายออกจากร่างกายและนำมาเพาะเลี้ยงไว้ หลังผ่านขบวนการถ่ายโอนยีนแล้วจึงนำกลับเข้าสู่ร่างกายซึ่งอาจบริหารโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดหรือฝังกลับเข้าอวัยวะที่ต้องการโดยตรง วิธีการนี้มักเหมาะสมกับการถ่ายโอนยีนในระบบโลหิต (hemopoietic cells) ที่สามารถนำออกจากร่างกายและคืนกลับเข้าสู่ร่างกายได้โดยสะดวก

– *การถ่ายโอนยีนในร่างกาย (in-vivo gene transfer)*

เป็นการถ่ายโอนยีนที่เกิดขึ้นในร่างกายโดยการบริหารส่วนผสมของยีนและพาหะเข้าสู่ร่างกายแล้วเกิดการถ่ายโอนยีนในเซลล์เป้าหมายที่ต้องการ การบริหารเข้าสู่ร่างกายอาจกระทำโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ หลอดเลือดแดง ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ฉีดเข้าช่องท้องหรือสูดดมเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ

วิธีการบริหารการถ่ายโอนยีนไปที่ไต (gene delivery into the kidney)

เนื่องจากไตประกอบด้วยโครงสร้างที่ซับซ้อน *การบริหารการถ่ายโอนยีนไปที่ไตด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งไม่สามารถทำให้เกิดการถ่ายโอนยีนไปยังเซลล์ทุกประเภท* ของไตได้อาจต้องใช้หลายวิธีร่วมกันโดยคำนึงถึงประเภทของเซลล์เป้าหมาย ประเภทของพาหะนำยีนที่ใช้ รวมทั้งภาวะการแบ่งตัวของเซลล์เป้าหมายจึงจะทำให้การถ่ายโอนยีนไปสู่เซลล์ไตได้สำเร็จ สามารถบริหารการถ่ายโอนยีนไปที่ไตได้หลายวิธีคือ

– *การฉีดเข้าหลอดเลือดแดงไต (intrarenal arterial injection)*

โดยการฉีดส่วนผสมของยีนและพาหะเข้าทางหลอดเลือดแดงไต ซึ่งจะทำให้สัมผัสกับบริเวณ glomeruli ของไตได้มากทำให้เกิดการถ่ายโอนยีนในเซลล์ของ glomeruli และแสดงออกในเซลล์นั้นได้ Tomita ได้แสดงให้เห็นว่าการบริหาร HVJ–liposome ทางหลอดเลือดแดงไตสามารถพบการถ่ายโอนยีนได้ในเซลล์ของไตบริเวณ glomeruli[25]

Kitamura ใช้การถ่ายโอนยีนภายนอกร่างกายเข้าสู่ mesangial cells และใช้เป็นเซลล์พาหะนำยีน (cell vector) ฉีดกลับเข้าสู่ร่างกายทางหลอดเลือดแดงไต สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้ในบริเวณ glomeruli[26]

– การบริหารเข้าสู่ไตโดยตรง

การบริหารเข้าสู่ไตโดยตรงกระทำได้โดยการฉีดเข้าบริเวณใต้ผนังหุ้มไต (renal subcapsular injection)โดยฉีดยีนและพาหะหรือเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนภายนอกร่างกายแล้วเข้าใต้ผนังหุ้มไต จะเกิดการถ่ายโอนยีนและเซลล์เจริญเติบโตมีการแสดงออกของยีนได้เช่น Koseki และคณะได้ใช้การถ่ายโอนยีนใน metanephric mesanchyme ของหนูภายนอกร่างกายและฝังกลับเข้าสู่ไตในบริเวณใต้ผนังหุ้มไตพบมีการแสดงออกของยีนได้[27] อีกวิธีหนึ่งสามารถบริหารโดยการฉีดเข้าเนื้อไต (renal parenchymal injection) โดยตรงเช่น Bosch และคณะใช้สารที่เป็นพิษต่อไต (nephrotoxic agent) กระตุ้นให้เซลล์ tubule แบ่งตัวและฉีดยีน β–galactosidase (LacZ) ร่วมกับ retroviral vector เข้าโดยตรงที่ขั้วไตพบมีการแสดงออกของยีนได้ในบริเวณ tubule[28]

– *การฉีดย้อนขึ้นทางท่อไต (retrograde from ureteric injection)*

การถ่ายโอนยีนในส่วน tubule จะประสบความสำเร็จน้อยกว่าในบริเวณ glomeruli โดยเฉพาะเมื่อฉีดเข้าทางหลอดเลือดแดงไต ยีนและพาหะจะต้องเคลื่อนผ่านเซลล์และส่วนประกอบต่างๆ คือ epithelial cells, glomerular และ tubular basement membrane ก่อนผ่านเข้าสู่ tubular cells จึงได้ผลสำเร็จน้อย การฉีดย้อนขึ้นทาง pelvicalycial system สามารถทำให้เกิดการถ่ายโอนยีนใน tubular cells ได้ Moullier ได้ศึกษาวิธีนี้และพบการแสดงออกของยีนที่ tubular epithelium ในบริเวณ papillae[29] Lai ได้ถ่ายโอนยีน carbonic anhydrase II ในหนูโดยฉีดย้อนขึ้นทางท่อไตและสามารถพบการแสดงออกของยีนที่ tubule และแก้ไขภาวะกรดจากความผิดปกติของ tubule ได้[30]

– *การฉีดเข้าหลอดเลือดส่วนปลาย (peripheral circulation route)*

Pasqualini และ Ruoslahti ได้ศึกษาการใช้ phage display library เพื่อสังเคราะห์และใช้ sequence ของยีนที่สามารถยึดจับกับส่วนจำเพาะพิเศษ (unique marker molecule) ที่หลอดเลือดไตและฉีดทางหลอดเลือดส่วนปลายพบว่าเกิดการจับยึดและถ่ายโอนยีนขึ้น[31]

– *การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection)*

ในกรณีที่จุดประสงค์การถ่ายโอนยีนคือผลผลิตโปรตีนที่สามารถออกฤทธิ์ที่ไตได้โดยไม่จำเป็นที่จะต้องสร้างที่ไต การบริหารการถ่ายโอนยีนโดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตของยีนนั้นแล้วกระจายทางกระแสโลหิตไปสู่ไตจะเป็นวิธีการที่ง่ายและสามารถให้การบริหารซ้ำๆ ได้ Isaka ใช้การถ่ายโอนยีน decorin ที่กล้ามเนื้อและสามารถตรวจพบผลผลิต decorin ได้ที่ไตและสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิดพังผืดได้[32]

การควบคุมการทำงานของยีนที่ถ่ายโอน (control of transferred gene)

ปัญหาในการถ่ายโอนยีนที่สำคัญประการหนึ่งคือการควบคุมให้ยีนที่ถ่ายโอนแสดงออกและหยุดการทำงานเมื่อหมดภาวะที่ต้องการ มีการศึกษาและพัฒนาโดยอาศัยส่วนประกอบต่างๆ ภายในยีนที่ถ่ายโอนเป็นส่วนควบคุมเช่น Kitamura ได้ใช้ tetracycline responsive promotor ในการควบคุมการทำงานหรือหยุดการทำงานของยีน β–galactosidase ใน mesangial cells[33] และใช้ cAMP-responsive element (regulatory sequence) ของ β–smooth muscle promotor ที่แสดงออกใน mesangial cells ในภาวะที่มีการอักเสบเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน β–galactosidase ในลักษณะ cytosensor ในร่างกาย[34] และได้ทดสอบในหนู เมื่อถ่ายโอนยีนที่ถูกกระตุ้นในหนูปกติพบว่ายีนที่ถูกกระตุ้นหยุดการทำงาน และเมื่อถ่ายโอนยีนที่ไม่ได้กระตุ้นใน anti–Thy1–nephritic rat ที่มีภาวะการอักเสบพบว่ายีนถูกกระตุ้นให้แสดงออกได้[34] การศึกษานี้เป็นการแสดงว่ายีนที่ถ่ายโอนสามารถถูกควบคุมได้โดยยีนอื่นที่แสดงออกเฉพาะที่เมื่อมีภาวะผิดปกติและหยุดการทำงานเมื่อภาวะผิดปกติหายไป

การใช้ยีนบำบัดในโรคไต (gene therapy in kidney diseases)

การใช้ยีนบำบัดในโรคไตสามารถใช้ประโยชน์และเป็นไปได้ในกลุ่มโรคไตประเภทต่างๆ โดยเฉพาะในกลุ่มโรคทางพันธุกรรมที่สามารถใช้ยีนบำบัดทดแทนความผิดปกติของยีนในโรคเหล่านี้ รวมทั้งโรคไตที่เกิดขึ้นโดยไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงและนำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรังโดยที่การรักษาในปัจจุบันยังไม่สามารถแก้ไขที่สาเหตุโดยตรงได้ การใช้ยีนบำบัดเพื่อยับยั้งการเกิดพังผืดจะเป็นวิธีการที่น่าจะให้ผลดีกว่าการรักษาในปัจจุบัน ตัวอย่างกลุ่มโรคไตที่มีความเป็นไปได้ในการใช้ยีนบำบัดได้แก่

โรคไตจากพันธุกรรม (genetic diseases)

โรคไตที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมที่การรักษาโดยยีนบำบัดอาจเป็นการรักษาในอนาคตเช่น

– *Autosomal dominant polycystic kidney diseases (ADPKD)*

การค้นพบยีน PKD1 และ PKD2[35,36] และการหาวิธีแก้ไขความผิดปกติอาจเป็นวิธีการที่ทำให้ยีนบำบัดประสบความสำเร็จในการรักษา ADPKD แต่ยังมีปัญหาว่าการแสดงออกที่ผิดปกติของยีนดังกล่าวเป็นกลไกเนื่องจากผลผลิตของยีนไม่เพียงพอ (haplotype insufficiency) หรือเป็นจากการผลิตสารที่เป็นอันตรายต่อการทำงานของโปรตีนปกติ (dominant negative) การรักษาในอีกแนวทางหนึ่งโดยมุ่งไปที่กลไกต้านการ

อักเสบ การลดการแบ่งตัวของ epithelium หรือการลดพังผืดในถุงน้ำอาจเป็นวิธีการใช้ยีนบำบัดที่เป็นไปได้ Zhu ได้ศึกษาโดยฉีดยีน β-galactosidase ทางหลอดเลือดแดงไตในหนูที่เป็นโรคถุงน้ำในไตพบมีการแสดงออกของยีนในถุงน้ำได้[37]

- *Alport syndrome*

เป็นโรคที่ถ่ายทอดแบบ X-linked โดยมีความผิดปกติของยีนที่ผลิต type IV collagen ที่เป็นส่วนประกอบของ basement membrane[38] ทำให้เกิดความผิดปกติมีอาการแสดงทางคลินิคโดยถ่ายปัสสาวะเป็นเลือด สูญเสียการได้ยินและดำเนินไปสู่ภาวะไตวาย การทดแทนยีนที่ผิดปกติจะทำให้การผลิต collagen มีโอกาสกลับเป็นปกติได้[39]

- *X-linked nephrogenic diabetes insipidus*

เกิดจากการผ่าเหล่าของ vasopressin V2 receptor (AVPR2)[40] ซึ่งอยู่บน basolateral ของเซลล์ใน collecting tubule และ medullary thick ascending limb ทำให้ไม่ตอบสนองต่อ ADH การทดแทนยีนดังกล่าวน่าจะเป็นการแก้ไขความผิดปกติที่เกิดขึ้น

โรคมะเร็งของไต (renal cancer)

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าการรักษาที่ดีที่สุดของมะเร็งไตคือการผ่าตัดนำก้อนมะเร็งออก การรักษาร่วมโดยยีนบำบัดจะเกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยมากขึ้นโดยเฉพาะถ้ามีการกระจายของมะเร็ง การใช้ยีนบำบัดอาจใช้ในด้านการแก้ไขส่วนผิดปกติของ tumor suppressor ในด้านการทำให้เกิด cell differentiation ในด้านการทำให้เกิดสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเช่น การใช้ herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) ในด้านการทำให้เกิดสารต้านการสร้างหลอดเลือด (antiangiogenic agent) ทำให้หลอดเลือดที่เลี้ยงก้อนมะเร็งลดลงหรือการใช้ยีนบำบัดที่ทำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเซลล์มะเร็ง (immunotherapy)[41]

โรคไตอักเสบ (acute and chronic glomerulonephritis)

การอักเสบของไตจากสาเหตุต่างๆ ทำให้เกิดการกระตุ้นสารไซโตไคน์ เช่น transforming growth factor-β (TGF-β) ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์และมีการผลิตสารนอกเซลล์ (extracellular matrix) ที่ทำให้เกิดพังผืดในไต[42] กลไกการเกิดภาวะดังกล่าวได้รับการศึกษามากขึ้นโดยการใช้การถ่ายโอนยีนเพื่อหาแนวทางในการรักษาเนื่องจากการรักษาโรคไตอักเสบในปัจจุบันแม้จะสามารถลดความรุนแรงของโรคไตได้แต่ยังได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจโดยเฉพาะกลุ่มไตอักเสบที่เกิดการทำลายไตอย่างรวดเร็ว (rapidly progressive glomerulonephritis) การศึกษาการถ่ายโอนยีน TGF-β และ platelet derived growth factor (PDGF) เพื่อศึกษากลไกการทำลายไต[43] และการถ่ายโอนยีนที่สามารถต้านสารไซโตไคน์ดังกล่าว[44] จะเป็นแนวทางที่ใช้รักษาไตอักเสบและป้องกันการเกิดพังผืดจนนำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรังได้

การปลูกถ่ายไต (kidney transplantation)

การปฏิเสธไตยังเป็นปัญหาสำคัญของการปลูกถ่ายไต มีการศึกษาเพื่อค้นหากลไกการปฏิเสธไตในระดับยีนและหาวิธีการป้องกันการปฏิเสธไต[45] การใช้ยีนบำบัดเพื่อป้องกันการปฏิเสธไตเป็นแนวทางที่มีประโยชน์โดยเฉพาะสามารถบริหารเฉพาะที่ในไตที่จะนำมาปลูกถ่ายได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องบริหารทางระบบ (systemic administration) และลดผลแทรกซ้อนที่จะเกิดขึ้นจากการถ่ายโอนยีนได้ Swenson ได้ทดลองถ่ายโอนยีน Fas ligand เพื่อทำลาย activated T-cells พบว่าสามารถยืดอายุของไตที่ปลูกถ่ายในหนูได้[46]

บทสรุป

การรักษาโรคไตด้วยยีนบำบัดได้รับการศึกษาวิจัยมากขึ้นเพื่อหาวิธีการรักษาที่ดีกว่าในปัจจุบันแต่ยังต้องอาศัยการวิจัยและความรู้ด้านอณูชีววิทยาในการเกิดโรคให้ชัดเจนรวมทั้งการคิดค้นพาหะที่เหมาะสมให้ผลสูงไม่เกิดโทษต่อร่างกายและมีส่วนควบคุมการทำงานของยีนที่ถ่ายโอนที่สามารถหยุดการทำงานเมื่อไม่ต้องการได้ แม้ว่าในปัจจุบันยังมีอุปสรรคดังกล่าวแต่ความรู้ด้านการถ่ายโอนยีนที่ก้าวหน้าอย่างรวดเร็วทำให้การใช้ยีนบำบัดในโรคไตจะมีประโยชน์และใช้อย่างแพร่หลายในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Smith AE. Gene therapy-where are we? Lacet 1999;354 (suppl 1):1-4.
2. Prince HM. Gene transfer: A review of methods and applications. Pathology 1998;30:335-47.
3. Wivel NA, Walters L. Germ-line gene modification and disease prevention: Some medical and ethical perspective. Science 1993;262:533-7.
4. Temim HM. The retroviradae : Origin and general nature of retrovirus. New York Plenum Press 1992.
5. Coffin JM. Virology : Retro viradae and their replication. New York Rave Press Ltd 1990.
6. Weiss A, Chetankumar ST. Retrovirus receptors. Cell 1995;2: 531-3.
7. Friedmann T, Yee JK. Pseudotyped retroviral vectors for studies of human gene therapy. Nature Med 1995;1:225-7.
8. Ory DS, Neugenboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packing cell line for production of high titer retrovirus/ vesicular stomatitis virus G pseudotypes. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:11400-6.
9. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectrs occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. Mo Cell Biol 1990;4239-42.
10. Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of non dividing cells by a lentiviral vector. Science 1996;272:263-7.
11. Danos O, Mulligan RC. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ectropic host ranges. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:6460-4.
12. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. Science 1993;260:926-32.
13. Naldini L, Blomer U, Gally P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of non dividing cells by a lentiviral vector. Science 1996;272:263-7.
14. Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT. A new adenoviral vector: replacement of all viral coding sequnces with 28 kb of DNA independent by expressing both full length dystrophin and β-galactosidase. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:5731-6.
15. Trapnell BC, Gorziglia M. Gene therapy using adenoviral vectors. Curr Opin Biotechnol 1994;5:617-25.
16. Kremer EJ, Perricaudet M. Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer. Br Med Bull 1995;51:31-44.
17. Borgelson J, Cunningham J, Drogutt G, et al. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science 1997;275:1320-3.
18. Huang S, Kamata T, Takada Y, Ruggeri Z, Nemerow G. Adenovirus interaction with distinct integrins mediated separate events.in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. J Virol 1996;70:4502-8.
19. Zhu N, Liggi HD, Liu y, et al. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. Science 1993;261: 209-11.
20. Felgner PL, Gadex TR, Holm M, et al Lipofection, a highly efficient lipid-mediated DNA- tranfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:7413-7.
21. Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes and containg lipopoly lysin: characterization and mechanism of action. Biochem Biophys Acta 1994;1189: 1295-303.
22. Kaneda Y, Iwai K, Uchida T. Increased expression of DNA co introduced with nuclear protein in adult liver. Science 189;243:375-8.
23. Toneguzzo F, Keating A. Stable expression of selectable genes into human hematopoietic stem cells by electric field mediated DNA transfer. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84: 8463-7.
24. Mathews KE, Keating A. Gene therapy with physical methods of gene transfer. Transfusin Sci 1996;17:29-34.
25. Tomita N, Higaki J, Morishita R, et al. Direct in vivo gene introduction into rat kidney. Biochem Biophys Res Commun 1992;186:129-34.
26. Kitamura M, Taylor S, Unwin R, Burton S, Shimizu F, Fine LG. Gene transfer into the rat renal glomerulus via a mesangial cell vector: site -specific delivery, in situ amplification, and sustained expression of an exogenous gene in vivo. J Clin Invest 1994;94:497-505.
27. Koseki C, Herzlinger D, Al-Awaqati. Intregation of embryonic nephrogenic cells carrying a reporter gene into functioning nephron. Am J Physiol 1991; 261:C550-4.
28. Bosch RJ, Woolf AS, Fine LG. Gene transfer into the mammalian kidney: Direct retrovirus transduction of regenerating tubular epithelial-cells. Exp Nephrol 1993;1:49-59.
29. Moullier P, Friedlander G, Calise D, Ronco P, Perricaudet M, Ferry N. Adenoviral-mediated gene transfer to renal tubule cells in vivo. Kidney Int 1994;45:1220-5.
30. Lai LW, Chan DM, Erickson RP, Hsu SJ, Lien YH. Correction of renal tubular acidosis in carbonic anhydrase II-deficient mice with gene therapy. J Clin Invest 1998;101:1320-5.
31. Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libralies. Nature 1996;380 (6752):364-6.
32. Isaka Y, Bress DK, Ikegaya K, Imai E, Noble NA, Border WA. Gene therapy by skeleton muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. Nat Med. 1996;2: 418-23.
33. Kitamura M. Creation of a reversible on/off system for site specific in vivo control of exogenous gene activity in the renal

glomerulus. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:7387-91.

34. Kitamura M, Hqwachi H. Creation of an in vivo cytosensor using engeneered mesangial cells. Autonomic sensing of glomerular inflammation controls transgene activity. J Clin Invest 1997;100:1394-9.
35. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. Cell 1994;77:881-94.
36. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. Polycystic kidney disease:the complete structure of the PKD1 gene and its protein. Cell 1995;81:289-98.
37. Zhu G, Nicolson AG, Cowley B, Rosen S, Sukhatme VP. In vivo adenovirus-mediated gene transfer into normal and cystic rat kidneys. Gene Ther 1996;3:298-304.
38. Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoyhtya M, Shows TB, Tryggvason K. Identification of a distinct Type IV collagen? chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:1606-10.
39. Tryggvason K, Heikkila KP, Pettersson E, Tibell A, Thorner P. Can Alport syndrome be treated by gene therapy? Kidney Int 1997;51:1493-9.
40. Van Den Oweland AMW, Dreesen JCFM, Verdijk M, et al . Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus. Nature Genet 1992;2:99-102.
41. Simons JW, Jattee EM, Weber CE, et al. Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccine generated by ex vivo granulocyte macrophage colony-stimulating factor gene transfer. Cancer Res. 1997;57:1537-46.
42. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor-β in tissue fibrosis. N Engl J Med 1994;331:1286-92.
43. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. Glomeulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-β or platelet-derived growth factor gene into the rat kdney. J Clin Invest 1993;92:2597-601.
44. Akagi Y, Isaka Y, Arai K, et al. Inhibition of TGF-β1 expression by antisense oligonucleotides supressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. Kidney Int 1996;50:148-55.
45. Mannon RB, Coffman TM. Gene targeting: applications in transplantation research. Kidney Int 1999;56:18-27.
46. Swenson KM, Ke B, Wang T, et al. Fas ligand gene transfer to renal allografts in rats: effects on allograft survival. Transplantation 1998;65:155-60.