ADA
adenosine deaminase

基因治療的展望

台大醫學院醫技所　林淑華

基因治療或基因療法是近十幾年來所發展出最具革命性的醫療技術。有別於目前多數醫療，基因療法是針對疾病的根源而不是表現的症狀來治療。最簡單的想法是當基因壞掉時，如能修復它或補給正常的基因，則理論上就可治療疾病。因此，基因療法可定義為"利用遺傳工程技術將基因送入病人體內以治療疾病的醫療行為"。從遺傳性疾病、癌症，到感染性疾病、心血管疾病，以至於風濕性關節炎均可用基因治療的概念。雖然科學界早已有基因治療的想法，但仍須經過層層的研究及動物實驗，第一個正式被批准的基因治療病例是先天性嚴重免疫不全症。在 1990 年美國 Blaese 博士及其團隊成功地將正常的 ADA (adenosine deaminase) 基因殖入病人的淋巴球，完成基因治療的首例 1。自此以後在過去十年的發展，主要在測試及改進治療的策略，使殖入的基因能發揮最大的功能，而病人能完全治癒。此外，基因殖入的安全性是最大的挑戰，所有的科學都是為了增進人類的幸福為目標，而向自然挑戰的科技，如基因療法般地改造與生俱來的遺傳物質，相信只能限制於病人的體細胞而不能意外地殖入生殖細胞，因此，各種療法皆須有完善的安全檢測系統。在臨床上，目前大約已有 3500 位病人接受測試性基因治療，雖然大多為小型(人數較少)的第 I/II 期試驗，主要評估相關的治療策略之安全性，可喜的是已有不少成功的例子，所以許多基因轉殖的治療方式在安全性上已獲得認可(如獲美國國家衛生院授權組成的核准機構:Recombinant DAN Advisory Committee 即 "RAC")。然而，失敗的例子也喚起社會對基因治療的把關更加嚴謹。尤其去年 (1999) 美國亞歷桑那州一位病患在基因治療時期內死亡，引起大眾的關切 2，美國國會更因此舉行聽證會。提昇基因療法的成功率有賴於更多更深入的研究。最近人類的基因圖譜已公布完成了 90%，此成果再次掀起了對基因治療的熱烈討論，台灣許多科學家正致力於研究基因治療在癌症(如腦瘤)及慢性疾病(如 B 肝)的可行性，科學家們期望很快能進行臨床試驗 3。

基因治療所採用的方式，歸納起來可分為 "Ex vivo" 與 "in vivo" 兩種。"Ex vivo"指的是從病人身上取出特定的細胞(如骨髓細胞，但已壞了)，施以基因工程技術改造病症，舉例來說，放入血友病人缺乏的正常基因，再選出會製造血友病人需要的血液蛋白質的細胞。接著採用移植的觀念將改造成功的細胞植入病人體內，如果成功的話，病人將不再常常依靠施打血友病蛋白以止血。達到這個目標則必需 (1) 細胞不會受到排斥(所以用病人自己的細胞)，而且永遠製造血液蛋白質，(2) 製造的血液蛋白質量足以治療出血，(3) 植入的細胞不會變成惡性細胞為害病人。最近在"世界血友病聯盟組織"的學術大會中 4，Selden 博士報告他的合作團對已能利用 "Ex vivo" 治療遺傳疾病如血友病。"in vivo" 的方式是將要治療病人的基因經由遺傳工程技術處理後，直接注射入病人身體內，人類對注射疫苗最有經驗，因此許多基因療法的策略是肌肉注射，肌細胞如忠實的"吞入或感染了"打入的基因且發揮功能如長期製造足量所需的蛋白質，則為成功的治療，此法不需擔心排斥的問題，但是要防止打入的基因到處亂竄，萬一竄入生殖細胞，可能破壞染色體危及子代。Manno, Hurst 及 Walsh 三位博士在同一會議中指出他們的團對已能

利用肌肉注射及靜脈注射成功的改善嚴重型血友病人的治療。而且利用超靈敏的聚合?鏈反應，在病人的精液內沒有測到注入的基因，可說相當成功。相較於直接將基因轉殖到病人體內，"Ex vivo" 方式操作上較容易且基因轉殖較有效率，並可得到較大量的改造細胞。但此法卻需針對各個病人作專一治療，花費比 in vivo 的操作昂貴。另外，基因療法也被用於治療癌症，想法是如果癌細胞本來可被身體的免疫系統清除，但是病人因狀況不好所以無法發揮免疫力，則如供給可以增強免疫力的基因，或供給可以吸引具毒殺力的"自然殺手細胞"的基因，那麼癌細胞可以被清除。或者，如施以能抑制癌細胞活動力的基因，則也可控制癌症。癌細胞強烈的繁殖力會利用血管與正常組織搶奪養份，如能阻塞通到癌細胞的血管使癌細胞吸收不到養份而死，也可以達到治療。癌症的基因療法最大的挑戰是 (1) 送入的基因是否只針對癌細胞而放過體內的正常細胞，(2) 吸引的毒殺作用是否可被調控，而不瀰漫致無法收拾，(3) 癌細胞是否已全部被清除。由於許多癌症病人無法利用開刀、放射線或化學療法治愈，基因療法提供了另一個選擇，因此癌症佔基因治療臨床試驗的最大比例。抗癌細胞的成功首先要克服非專一性的瓶頸，最近一篇報導指出，應用組織特異的"轉錄因子"可能可達成，要能控制毒殺的時效，有一些調控機制可應用，譬如抗生素或賀爾蒙可引導或壓抑基因的活力，最困難的是達到"斬草除根"，目前可能很難證明"無癌細胞"，然而若能使腫瘤消失就是成功的治療。

如何把基因送入身體的細胞內呢?上述的"打針"只把基因送入體內，科學家仍需費很大的工夫才能讓基因進入細胞(簡稱為"基因轉殖")而且發揮功能，如製造蛋白質。一段(裸露的)基因很難進入細胞，人類由經驗知道，病毒可經由感染方式進入人體細胞(如流行性感冒)，因此病毒可當作媒介(稱為"載體")將基因轉殖入細胞內，當然，所選用的病毒是人類自然狀況下經常接觸的，而且不造成嚴重疾病的，例如腺病毒，從小孩時期到成人的呼吸道或腸胃道感染，皆可能是腺病毒引起的。病毒經過遺傳工程改造去除致病的基因後，就成為可用的載體。總括而論，基因轉殖系統所用的方法基本上可分?三類：病毒載體系統、非病毒系統與物理性方法。現今最常用的病毒載體系統除了腺病毒 (Ad) 還有腺病毒相關病毒稱為 "AAV"，以及反轉錄病毒 (Rv)如 HIV; 非病毒系統可分?單純裸露的 DNA 、DNA 結合陽性脂質與 DNA 和陽性多聚體的濃縮微粒。而物理方法則有無針注射與電擊法。目前使用上最多且臨床成效最顯著的?病毒載體系統。各系統的優缺點大致介紹如下(詳細導讀可參見文獻 5)。

病毒載體系統

腺病毒 (Ad) 為基因轉殖效率最高，細胞種類最多的病毒載體，但由於轉殖的基因進入細胞到達細胞核後無法插入染色體，且病毒的複製能力已被改造，因此只能暫時存在細胞內，故初期腺病毒系統的發展僅適用於殺死細胞(如癌細胞)而不能用於遺傳疾病的治療。目前已發展可在體外利用適當的細胞表面蛋白質將 Ad 感染至特定細胞且大量表現。 Ad 可說是目前臨床發展上最具規模的載體系統，但最大的限制是會造成免疫與發炎反應。有 55% 的成人已有抗腺病毒抗體，限制了 Ad 載體的使用性。載體所能攜帶的基因長度限制為所有病毒載體系統的共同問題，Av 目前僅能裝入 7.5 Kb 的基因長度。臨床上，腺病毒載體系統的發展成果最為豐碩，其中多以殺死癌細胞為主。目前已有部份進入第 II 期臨床試驗。 AAV (腺病毒相關病毒)系統為較長效的載體系統，可從數月至數年之久。AAV 可插入染色體。Manno 博士 4 即利用 AAV 將

第九因子作單次注射來治療血友病，AAV 系統十分被看好。研究指出有 32% 的成人有潛在抗 AAV 抗體，重複注射時抗體可能會降低 AAV 的感染力。此外，AAV 最大的缺點是攜帶的基因長度大約只有 4.5 kb，而且製做過程困難，成本將大為提高。但 AAV 最大的優點是幾乎不產生細胞免疫反應，而且小鼠實驗中發現 AAV 可感染各種細胞。更好的是許多細胞性專一的啓動子仍可保留特異性。目前已發展出簡易的製作方式，相信以 AAV 為主的基因治療將大量出現。反轉錄病毒(Rv)系統與腺病毒最大的不同點在於可插入染色體中，因此理論上基因可長效的表現，但此優點也可能為缺點，因為 Rv 有可能插入染色體中重要的位置而破壞細胞甚至導致癌症的發生。Rv 可攜帶的基因長度上限為 8 kb。另外 Rv 在表現量上較腺病毒為少，且大多只感染分裂中的細胞，是 Rv 最大的限制。另一種反轉錄病毒 "HIV" 則可感染不分裂的細胞。在 in vivo 試驗顯示 Rv 的轉殖效率不理想因此多朝體外系統發展。

非病毒系統及物理方法

此系統中不論裸露 DNA、DNA 結合陽性脂質或 DNA 和陽性多聚體的濃縮微粒其共同優點為在製作、儲存與品管上都比病毒系統容易，且僅造成少量免疫反應，但相對的在 in vivo 中都未能達到有效率的轉染(轉殖)與蛋白質表現。裸露 DNA 目前成功的應用例子有二：注射含癌疾病原蟲基因的載體可產生對病原蟲的細胞免疫，這是目前最成功的基因工程疫苗，此疫苗已進入第 I 期試驗；另一例是肌肉注射含血管生長因子 (angiogenic factor) 的基因用以治療心肌梗塞。另外，將 DNA 結合陽性脂質不但可保護 DNA，更可增加轉染效率，但基因轉殖與表現量仍未達到臨床意義，而且陽性脂質的不穩定性也是一項缺點。雖然如此，仍有三個以 DNA 結合陽性脂質為基礎的基因治療已進入第 II 期試驗，其方式均以暫時性表現轉殖基因來達到直接或免疫性殺死癌細胞。另外 DNA 與陽性多聚體的濃縮微粒(利用靜電引力聚合陽性多聚體與 DNA)，不但可保護 DNA，也可利用細胞吞噬作用增加 DNA 進入細胞的效率。但因為聚合物在生理環境下會相互聚合，且進入細胞後需加入破壞劑以釋出 DNA。目前已成功的小鼠試驗是經由尾巴注入此 DNA 經血液循環後轉染肺血管，但仍無任何臨床試驗。物理方式，目前所發展的儀器有幾種可利用無針系統將 DNA 直接注入細胞，一是基因槍:利用高壓氦氣將包覆黃金的 DNA 注入細胞，為取代直接注射裸露 DNA 的好方法；另一種稱為 Intraject 或 Jetgun: 是利用高壓將液體注射入細胞間隙。兩者在基因轉殖效率均不錯但未使用於臨床治療。

自 1996 年以來，載體系統所應改進與發展的方向已建立如下：1. 改進基因轉殖的專一性與效率，2. 增加基因表現(製造蛋白質)的專一性、強度與時間長度，3. 避免免疫反應，4. 製作過程的改進。近兩年來，載體的製作上已經有十分可觀的進步，然而若希望製造單一萬用的載體系統並符合各種細胞與表現時間的需要似乎是不太可能。可以預期的是，若需短暫表現或單次表現即可達到治療效果仍會以 Ad 為發展重心，而 AAV 為需長效性表現基因的最佳載體。另一方面，臨床基因治療因多功能幹細胞的培養與分離技術越來越進步，因此新發展的如 HIV 載體因可感染靜止期的幹細胞將成為發展 ex vivo 的目標，但其安全問題仍處於評估狀態。幾乎所有病毒載體系統所面臨的最大挑

戰是當插入染色體後蛋白質的表現在短期內即會停止，其原因可能是因為被高密度染色質所覆蓋。現在可能可克服此障礙，主要加入特殊的 DNA 片段。非病毒系統雖還未能在 in vivo 達到如病毒系統基因轉殖的效率，但它在商業上的高度價值是刺激發展的主要關鍵。此外，最新的發展趨勢為整合各種載體系統的優點。最好的例子為整合 AAV 的定點插入特性加上非病毒系統可攜入較長的基因片段的優點。另一個例子是利用 Ad 製造方便與傳送基因較有效率的優勢，整合 Rv 穩定表現蛋白質的優點。值得提出的是，在治療的方式上除加入正常基因外，基因的剔除與修改也將成為基因治療未來發展的方向 6 。雖然操作上遠比加入治療基因困難，目前已有利用 AAV 經重組同位重組互換取代部分基因，初步的結果受到相當的肯定。也有實驗使用 DNA-RNA 雜交的寡核酸，利用 RNA 標的有單一鹼基突變的 DNA 片段，經由細胞內核酸配對錯誤修復系統的修復達到基因修改的目的，效果證實遠優於利用同位重組互換。基因的增入與修改才剛起步，預計將來當此一技術發展更為成熟，取代或修改基因在疾病的治療上將比加入基因更適當。

結　語

自 1980 年科學家得以將遺傳工程技術用於人類開始，同年美國最高法院判定一家私人公司擁有一經由遺傳工程改造的"吃油細菌"的專利權，造成許多公司基於利益大量投資於基因工程的研究，甚至發生加州的某科學家希望申請利用基因技術治療地中海貧血在未獲得當地研究機構的核准時決定移師海外 7 ，後續許許多多的基因研究消除了大家對基因用於人類的恐懼，也確實幫助人類提昇了生活的品質，目前人類基因解碼已近完成，加上以基因轉殖及基因剔除技術已可得到許多人類疾病的動物模型，相信可加速對基因治療的研究和臨床試驗，而今在遺傳疾病及癌症方面皆有利用基因療法見效的成功病例，然而離完全康復仍有一段距離，接續的努力是找到強效的啓動子及轉殖的方法，使殖入的基因或細胞能長期有效率地表達相關的基因。而失敗的例子提醒了大家，我們會不會跑得太快了？安全措施是否仍有漏洞，譬如生殖細胞是否遭到殖入的病毒載體意外的侵入，植入的細胞會不會變相成癌細胞。所有研究及臨床實驗是推展基因療法最重要的因素，雖然人不是老鼠，但對於治療無望的病人及其家屬可以選擇基因療法是提供一個希望。我們都期盼這個希望終能成真。此外，由於許多疾病若能從生殖細胞加以治療，將遠優於治療體細胞，而且已有利用基因剔除技術在子宮內成功治療小鼠的疾病(如 cystic fibrosis)。但因為危險性未明和道德上的問題因此尚未被核可。倫理與政治方面的考量將決定此治療方式的發展。總之，目前各種技術在臨床上成功的例子，將帶給投資者更大的信心，社會大眾也將更為重視。

~~~~~~~~~~~~ 參考文獻 ~~~~~~~~~~~~

1. Blaese RM (1990). Treatment of severe combined immune deficiency (SCID) due to adenosine deaminase (ADA) deficiency with autologous lymphocytes transduced with the human ADA gene. Office of Recombinant DNA Activities, protocol 9007-002.
2. Wade N. (1999) The New York Times, 30 September p.22.
3. 源自"自由時報" 2000 年 6 月 27 日第 7 版。
4. Hemophilia 2000 World Congress, organized by the XXIV International Congress of the World Federation of Hemophilia, on July 15-21, 2000, in Montreal, Canada.
5. 黃麗華 (1998)。第 19 章.基因治療，出自"進階版生物技術(台大醫學院主編)" pp.343-360，教育部生物技術科技教育改進計劃補助。
6. 林淑華 (1998)。第 18 章.基因轉殖與基因剔除技術，出處同上。 pp.319-342 。
7. National Institute of Health (1981) "The Cline affair" 見於 Report of the NIH Ad Hoc Committee on the UCLA Report Concerning Certain Research Activities of Dr. Martin J Cline 。
~~~~~~~~~~~~