

遺傳病的一線曙光

基因治療

撰文：陳哲文
許聰政
劉柏煌

指導教授：李宏謨主任

前言

久居死亡率排行榜第一的惡性腫瘤，將有新的治療方法—基因療法 (gene therapy) 這種以完好基因取代細胞中有缺陷基因的新療法，將為癌症病患帶來一線曙光；此外基因療法尚可針對遺傳性疾疾病達到改善病情的療效；甚至對於世紀黑死病—愛滋病，也有機會從中獲得治療的方法。

基本觀念與歷史

所謂基因療法即如前言，是把有缺陷的基因以完好基因來代替。要達到這個目的，先要得到純基因序列 (pure gene sequence)，這需要 DNA 的剪接技術 (recombinant technology)；其次要把這基因序列導入 (transduce) 標的細胞 target cell 中，這需要發展載體

(vector) 技術，最後還得把標的細胞移植 (transplant) 到病人體內的適當位置，這種移植的技術也需要長期的研究。

最早想到要以基因療法來治療的病是「血紅蛋白疾病」(hemoglobinopathy) — 例如「貝它型地中海型貧血症」(β -thalassemia) 而所用的標的細胞是骨髓幹細胞 (bone marrow stem cell)，然而在重新評估目前的醫學技術及可行性後，發現「重度免疫缺陷疾病」(severe immune deficiency disease) 其基因表現的調節需求較少，比較適合作為初步研究，而且標的細胞也改為分化後的白血球。

前面提到，要把基因導入細胞內，需要一種載體；這種載體是什麼呢？科學家們發現：某些病毒會把自己的基因插入 (integrate) 標的細胞的 DNA 序列中，造成細胞之癌性變性 (oncogenic transformation)，所以第一個使用的載體，就是反轉錄病毒 (retrovirus)，同時基於可行性及安全性，在導入基

因時，採體外模式 (ex vivo) 而後再把細胞移植到病人體內。

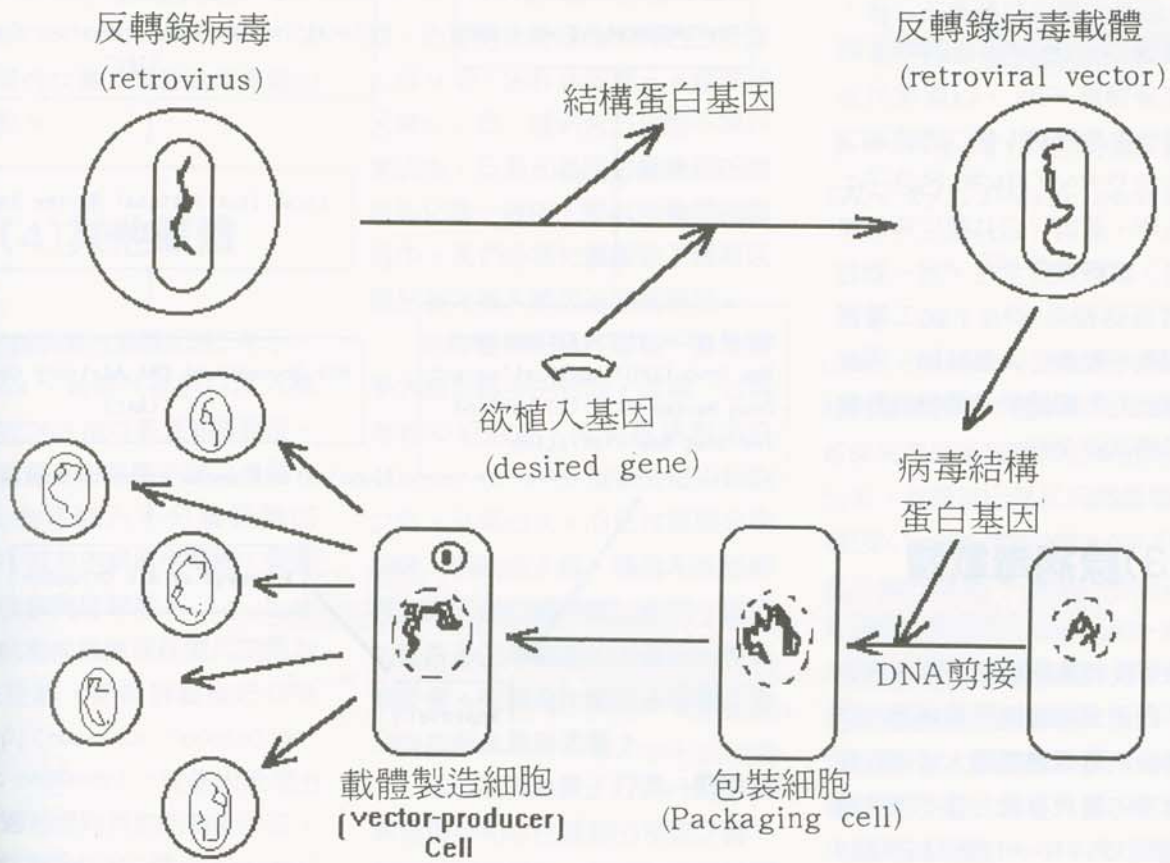
用於基因療法的

媒介

(1) 反轉錄病毒載體

反轉錄病毒的特性是：遺傳基因由 RNA 攜帶，進入宿主細胞 (host cell) 後，利用本身的反轉錄酶，(reverse transcriptase) 把 RNA 變成雙股 DNA，嵌入 (integrate) 宿主細胞的 DNA 後再進行複製……。我們可利用 DNA 剪接技術，把反轉錄病毒內有關於生產病毒結構蛋白的基因除去，加入欲植入的基因，這樣就變成一隻既具備所需要的基因，又不會複製的病毒載體了；但是，如何大量製造這種病毒載體呢？我們可利用包裝細胞 (packaging cell) 來達成這個任務。

包裝細胞是利用 DNA 剪接技術



圖一：利用包裝細胞來大量製造反轉錄病毒載體的機制

所產生的一種專門大量生產前述病毒載體的細胞，在包裝細胞的基因中，加入了複製反轉錄病毒所需要的結構蛋白基因，如此當前述病毒載體進入包裝細胞後此時這種細胞稱為載體製造細胞 (vector-producer cell)，便可在包裝細胞所提供的環境下，大量產出無複製能力的病毒顆粒，可用來感染標的細胞，達到基因植入的目的。(圖一) 利用包裝細胞來大量製造反轉錄病毒載體的機制

反轉錄病毒載體有利也有弊，好處在於反轉錄病毒進入細胞的效率 (efficiency of transfer to cells) 很高，而且一旦 DNA 嵌入標的細胞的基因，完好基因的表現 (express) 就可以持續很久，如果此細胞分裂，完好的基因會傳給子細胞 (progeny)；然而此種載體

的缺點在於反轉錄病毒未必能進入每一種細胞，因為病毒只感染具有特殊病毒受器 (viral receptor) 的細胞，而且只有具分裂能力的細胞，DNA 才能嵌入來表現效果；另外一個缺點則是安全上的顧慮，因為 DNA 嵌入時完全是隨機地 (randomly) 選取嵌入部位，所以也有可能產生意想不到的壞處。

基於前述的安全理由，治療計劃必須經過動物實驗，有關機構的審核後方能進行人體試驗。

(2) 反轉錄病毒載體的安全顧慮及安全性監督系統

前述的反轉錄病毒載體在使用之初，曾有三種安全顧慮：

(1) 在包裝細胞內經過自動剪接，

恢復複製能力，或是有野生型病毒 (wild-type virus) 的污染。這層顧慮由於發生機率甚低，而且利用隔離各個病毒複製基因的方法降低自動剪接的形成，並加強避免野生型病毒污染，可消去此顧慮。

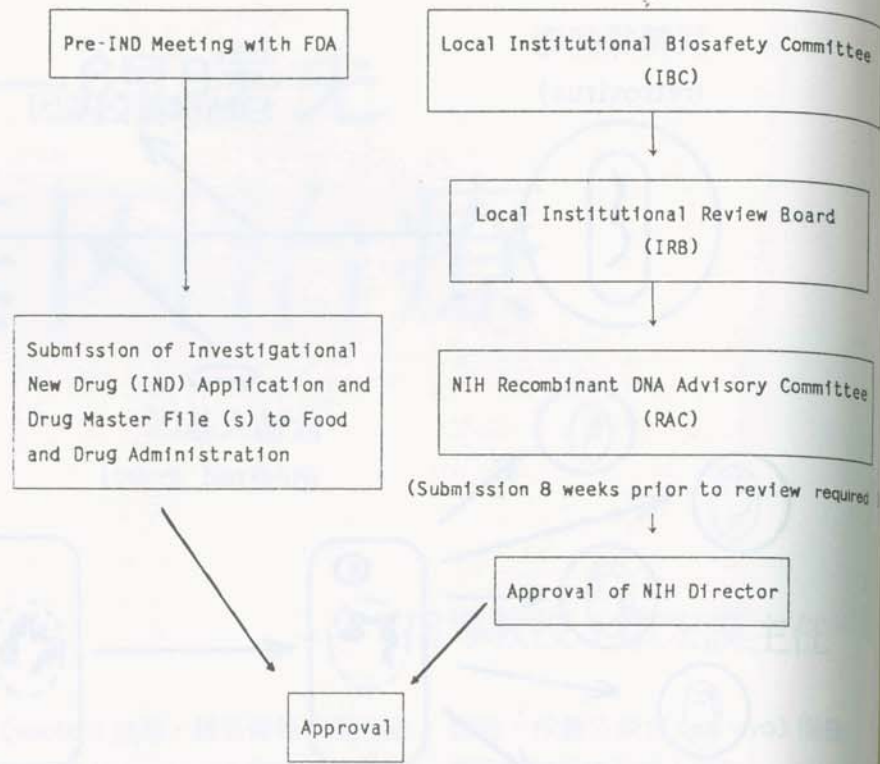
(2) DNA 隨機嵌入所產生之活化致癌基因 (oncogenic gene activation) 問題。不過經過無數次齧齒動物 (rodents) 的安全試驗以及現在所採行的臨床試驗都未曾出現腫瘤的情形下，此層顧慮也可暫時除去。

(3) 替代基因產物 (gene product) 的毒性問題。目前所知，僅有部分的分泌型產物才具有毒性，如淋巴激素 (lymphokine)、細胞激素等 (cytokine)。

由於基因療法的安全性仍有許多顧慮，在美國基因療法的實施有

一個監督系統（如表一）：

一個基因療法計劃產生之後，首先要送交 IBCs，以檢測安全問題；而後轉給 IRBs，以處理所涉及的醫學倫理問題；這二者通過之後，再送交 RAC（由 25 名分子生物，法律、環境、公共衛生等專家所組成）審核其安全性。另一個並行的審查路徑是 FDA；此二種審查通過後才能進行人體試驗，因此整個療法的計劃是受到嚴密的監督而可信賴其安全性。



(3) 腺病毒載體

除了反轉錄病毒載體外，另外一種不同形式的載體是腺病毒，它與反轉錄病毒載體的最大差別在於其所攜帶的替代基因，並不嵌入標的細胞的 DNA 中，也因此它可以使不分裂的細胞表現 (express) 出替代基因，但是表現的時間不長（因為送入標的細胞的替代基因在一段時間後會被代謝掉）。另一個與反轉錄病毒載體不同的是：大部分的腺病毒載體是採體內模式 (in vivo) 來進行治療計畫的。（如表二）

關於治療計畫中腺病毒載體的複製方法有點類似反轉錄病毒載體的方法：Shenk 發現某些缺乏複製能力的腺病毒在其基因中缺乏了 E1 region（不過兩者間的關係並不如反轉錄病毒中的那麼明確），因此把這些不能自行複製的腺病毒送到經 DNA 剪接而含有 E1 region 的細胞內，便可製出一大堆相同的病毒（病毒內已放入替代基因）。但是腺病毒載體有時卻會因標的細胞特殊的基因產物或處於特殊的細胞循環下，恢復了其複製能力，開始產生屬於病毒本身的蛋白質，這些

表二：基因療法中所用的載體 (vector)

載體 (vector)	採用模式 (model)		短暫性 (Transient) 穩定性 (Stable) 的基因表現 (expression)
	體外 (ex vivo)	體內 (in vivo)	
病毒性：			
反轉錄病毒 (retrovirus)	+	?	S
腺病毒 (adenovirus)	+/-	+	T
Adeno-associated virus (AAV)	+	?	S
疱疹病毒 (herpes virus)	+/-	+	?
牛痘病毒 (vaccina virus)	+/-	+	T
小兒麻痺病毒 (polio virus)	+/-	+	T
Sindbis and other RNA viruses	+/-	+	T
非病毒性：			
Ligand-DNA conjugates	-	+	T
Adenovirus-ligand-DNA conjugates	-	+	T
Lipofection	+/-	+	T
Direct injection of DNA	-	+	T
CaPO4 precipitation	+/-	-	S

註：+ 表示主要使用模式，+/- 表示較少的使用模式
- 表示幾乎不使用的模式

蛋白質可能會引起細胞的癌性變化 (oncogenic transformation) 或者產生毒性反應，是腺病毒載體的極大缺點。

(4)其他載體

其他的病毒性載體如表二所示，尚有 AAV，其替代基因可嵌入標的細胞的 DNA 故可表現期間較長，它與反轉錄病毒載體不同之處是，其 DNA 也可嵌入不分裂細胞的 DNA 中，其餘的病毒性載體，使用方法類似腺病毒載體。

非病毒性載體現在常用的是利用特殊受器，使細胞直接把 DNA 攝入胞內 (receptor mediated endocytic pathway)，使基因表現出來；不過若沒有其他的輔助方法，DNA 常常被送往溶小體 (lysosome) 而分解。解決之道由 Brinstiel 提出，可用腺病毒或用感冒病毒之 HA 基因產物使 endosome 破裂，防止 DNA (在 endosome 中) 被溶小體分解。然而此法的缺點有二：第一是持續時間短，第二是使用了腺病毒後可能產生的副作用。

人類基因療法的現況

最早得到批准用於臨床實驗的計畫於 1989 年 5 月 22 日開始，但所轉移的基因只是在某一類淋巴球上作出標記以研究癌症的免疫療法。而基因轉移真正用於治療目的始於 1990 年 9 月 14 日，對象為腺嘌呤去胺基胸缺乏症 (adenosine Deaminase deficiency, ADAD) 的患者。全球目前正進行的基因治療 (Gene therapy) 和基因標記

(Gene marking) 臨床計畫共有 11 項，而獲得批准但尚未開始的計畫也有 9 項，皆詳列於表三。雖然基因標記只是一種研究方法並不具治療功能，但最初基因治療應用的觀念和它是一致的，所以在後面的詳述中，我們必須先讓讀者了解基因標記後才進入基因治療的領域。

病毒感染和惡性腫瘤一直是醫學界感到棘手的問題，因為一旦病毒感染細胞後，唯有靠細胞免疫 (Cellular immunity) 摧毀受感染細胞之外，別無他法。而惡性腫瘤分裂快速，即使採手術、藥物和放射線等治療方法也經常難以控制，更糟的是許多正常細胞也因這些治療無辜受害。究竟有什麼方法可更安全有效地解決這些困難？

如今基因治療正打開一扇對抗病毒感染和惡性腫瘤的希望之窗。利用基因治療法，我們在受感染細胞內植入一段可生產拮抗病毒複製的蛋白質基因，提供一道遏止病毒肆虐的防線，這種方法又稱為細胞內免疫 (intracellular immunization)，有別於過去我們所認知的體外抗原抗體間的免疫作用。目前研究對象著重於純疹和愛滋病。

基因治療用於抗癌的構想更是日新月異，最初人們想到植入可製出傷害腫瘤細胞物質的基因到淋巴球內，再藉由淋巴球的免疫特性毒殺癌細胞。此想法已在 1991 年 1 月由 NIH 付諸實際的臨床實驗。但現在有一種嶄新的抗癌基因治療更具革命性。我們將某種病毒的基因植入惡性細胞中，再餵以抗該種病毒的藥來殺死癌細胞，動物實驗結果也證實其可行性。

以下將以四個單元：A. 基因標記 B. 基因治療 C. 細胞內免疫 D. 以腦瘤為例的基因治療新策略來介紹人類基因治療概況。

A. 基因標記

第一個基因標記的臨床實驗 (Neo R/TIL Gene marking)

a. TIL therapy

在 1986 年 NIH (National Institutes of Health) 針對惡性黑色素細胞瘤發展了一種新的免疫療法。將原先浸潤於腫瘤間的淋巴球分離出來，此類淋巴球又稱為腫瘤浸潤淋巴球 (Tumor infiltrating cell, TIL)。這些淋巴球是 T 細胞，所以利用 T 細胞生長因子 (Interleukin-2, IL-2) 培養可以迅速增殖。當培養到相當數目後，每次取大約 2×10^8 個 TIL 伴隨高劑量 IL-2 以靜脈注射方式治療 (見圖 2)。臨床結果統計為 35-40% 的患者有效，但即使有效也僅能維持 6 到 12 個月。如果想知道 TIL 療法成效不佳的真正原因，可以設法在 TIL 上標記以追蹤其注射入病人體內後究竟到何處？及存活多久？

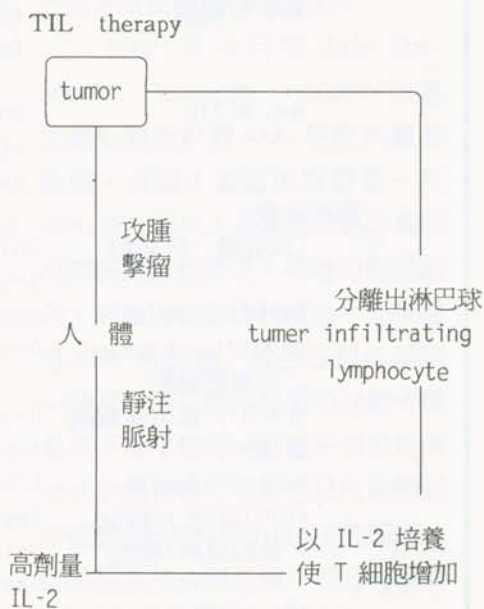


圖 2

表三 內容	研究機構	疾病	開始日期
獲得USA/RAC批准且開始者。			
基因標記			
Neo R/TIL	NIH, Bethesda, MD	惡性黑色素細胞瘤 (Malignant Melanoma)	89/5/22
Neo R/骨髓	St. Jude children's Research Hospital, Memphis, TN	小兒急性骨髓性白血病 (Pediatric AML)	91/9/9
Neo R/骨髓	St. Jude children's Research Hospital, Memphis, TN	神經母細胞瘤 (Neuroblastoma)	92/1/16
Neo R/TIL	University of Pittsburgh Pittsburgh, PA	惡性、黑色素 細胞瘤	92/3/3
基因治療			
ADA/周邊血液T細胞	NIH, Bethesda, MD	ADA缺乏之嚴重免疫缺 乏症 (ADA deficient SCID)	90/9/14
TNF/TIL	NIH, Bethesda, MD	惡性黑色素細胞瘤	92/1/29
TNG/腫瘤細胞	NIH, Bethesda, MD	惡性腫瘤	92/10/8
IL-2/腫瘤細胞	NIH, Bethesda, MD	惡性腫瘤	92/3/12
其他國際上正進行的			
基因標記			
Neo R/TIL	Centre Leon Berard, Lyon, France	惡性黑色素 細胞瘤	91/12/12
基因治療			
Factor區/自體皮膚 纖維母細 胞	中國上海復旦大學	B型血友病	91/12/3
ADA/周邊血液T細胞	Scientific Institute, San Diego, CA	ADA缺乏SCID	92/3/9
其他國際上正進行的			
Neo R/骨髓	University of Texas, M.D Anderson Cancer Center, Houston, Tx	慢性骨髓性 白血病	
Neo R/肝細胞	Baylor Cancer of Medicine Houston, Tx	肝臟衰竭	
Neo R/骨髓	Indiana University, Indianapolis, IN	成人急性骨髓性 白血病和急性淋巴性 白血病	
Neo R/TIL	University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA	惡性黑色素細胞瘤 腎細胞癌	
基因治療			
LDL受體/肝細胞	University of Michigan, Ann Arbor, MI	家族性高膽固醇血症	
Herpes Simplex thymidine kinase / 卵巢癌細胞	University of Rochester Rochester, NY	卵巢癌	
HLA-B7/黑色素細胞 瘤(體內)	University of Michigan, Ann Arbor, MI	惡性黑色素 細胞瘤	
Herpes simplex thymidine kinase / 細胞毒殺T細胞	Fred Hutchinson Cancer Research Center and the University of Washington, Seattle, WA	後天免疫不 全徵候群	
ADA/骨髓	Institute for Applied Radiobiology and Immunology(TNO)with University of Leiden, Leiden, the Netherlands	ADA缺乏SCID	

b. Neo R/TIL

所以有人利用同位素 ^{125}I 作為 TIL 的標記，可惜 ^{125}I 的半衰期僅 2.8 天，可得到的資料極為有限。基因轉移的應用在此刻就派上用場了。1989 年 5 月，NIH Bethesda, MD 從 TIL 培養早期取出一些細胞利用反轉錄病毒載體把標記基因 (the Neomycin resistance gene, NeoR from *E. coli*) 送入。這些淋巴球從此可表現 Neo R 這個標記，所以定期的血液篩檢可以知道 TIL 在血流中存活多久？而定期的腫瘤組織檢驗更可了解究有多少 TIL 回到腫瘤組織中？(見圖 3)

c. 結果

接受治療的十個病人之中前五個的數據已經發表用 PCR (Polymerase chain reaction) 技術加上 Neo R 探針 (Probe) 可以持續 21 天在全部病人血流中發現有標記的 TIL，在第 51 天從第 3 號病人及第 60 天從第 5 號病人的血流中也可發現。其中 3 號病人在第 94 天

接受第二次 TIL 注射，此病人於第 189 天時仍可找到有標記的 TIL (見圖 4)。除此之外，五個病人之中有三個做了切片，皆可在腫瘤組織中找到標記的 TIL，甚至 3 號病人在第 64 天的切片中仍可見到。

雖然因為數據太少而無法證明在腫瘤處發現的標記 TIL 和臨床效果是否有相關，但我們至少有三大收穫：(1) 外來基因是可以安全地植入病患中。(2) 從血流和腫瘤組織裡可找到有標記的細胞，證明經基因轉移後的細胞注入人體後可再被檢測出來。(3) 知道 TIL 確實可回到腫瘤組織中。

和傳統的標記方法 (如加上述的 ^{125}I) 比起來，基因標記的確優點不少。包括轉移基因有高穩定性，不怕代謝或衰減可終此細胞一生存在，甚至細胞分裂後仍可傳給子代。另外若轉移基因是具有可選擇性 (如 Neo R)，更容易使標記細胞從組織中篩選出來。最後可利用 PCR 分析靈敏地偵測也是標記基因

的一大好處。

後續的基因標記臨床實驗

隨著利用 Neo R 基因研究 TIL 療法之後，又有一些基因標記臨床實驗陸續推出，大致可分為下列兩大類：

a. 基因標記和骨髓移植

自體骨髓移植目前用來治療白血病和神經母細胞瘤，但移植後有時仍會復發的機制一直未能明瞭，尤其是佔了小兒癌症約五分之一的急性骨髓性白血病 (AML) 的易復發性更是困擾著醫學界。究竟復發緣故是因為植入的自體骨髓中惡性細胞未被清除乾淨？還是病人經過放射和化學治療後殘留於體內的惡性細胞所致？這個問題的答案關係著未來骨髓移植應該努力的方向。如果腫瘤細胞來自於移植骨髓，則必須研究在不傷害健康骨髓的條件下能徹底清理骨髓的技術；倘若是因治療後體內仍有殘存惡性細胞所致，那麼如何使副作用最低且更完全除去身體中殘留疾病細胞的治療方法才是我們迫切需要的。

1991 年 9 月 St. Jude Children's Research Hospital 以基因標記開始針對 AML 研究其復發機制，而臨床實驗的對象是一批 AML 童。研究人員將標記基因利用反轉錄病毒載體送入移植骨髓細胞內，然後再從事骨髓移植。如果患者 AML 再復發，並且在惡性細胞中發現，即可證明移植的身體骨髓參與了復發機制。但如果復發後無法找到帶有標記基因的惡性細胞並不能證明移植骨髓不是復發的原因，因為目前技術僅能讓一部分骨髓細胞接受標記基因 (見圖 5)。

到目前為止，接受該項實驗並

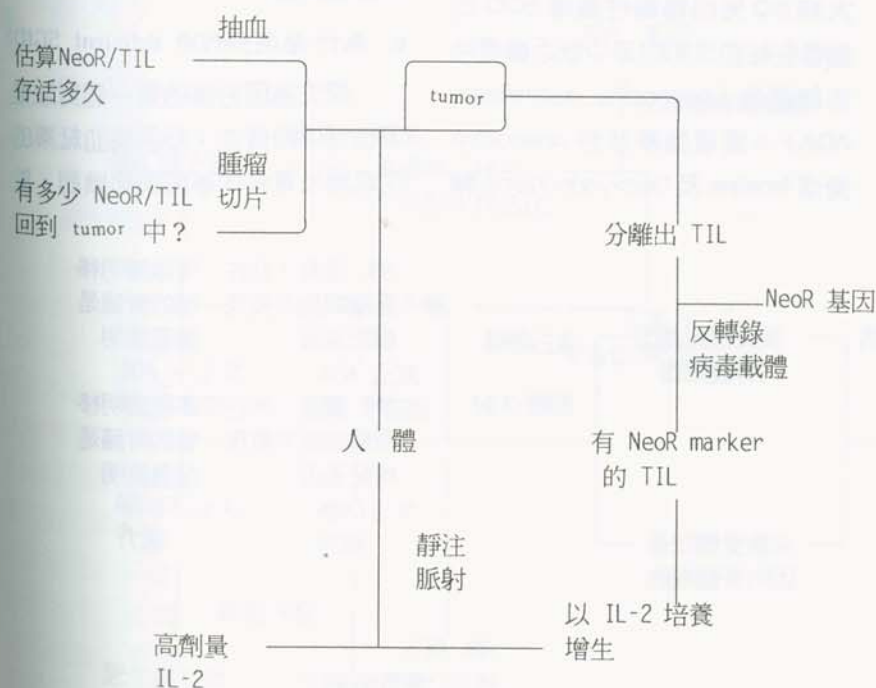


圖 3 NeoR/TIL 基因標記

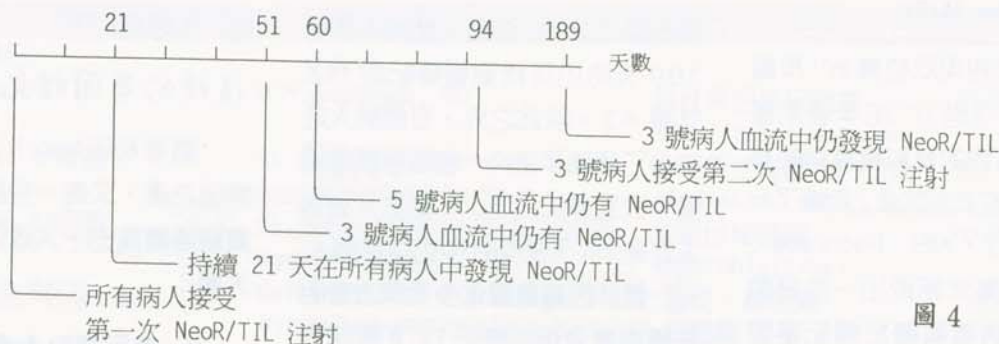


圖 4

且最先復發的兩個病人之白血病惡性細胞中都可以找到基因標記的存在，這項結果給我們極大鼓舞，提示自體骨髓移植必須在骨髓清理技術上再作改善。類似的骨髓基因標記研究疾病的觸角也延伸到神經母細胞瘤，成人急性骨髓性白血病和急性淋巴性白血病（ALL），慢性骨髓性白血病（CML）、甚至於乳癌和多發性骨髓瘤（Multiple myeloma）。

b. 基因標記和肝細胞移植

(Hepaticellular transplantation; HGT)

Baylor college of Medicine 對只能等待換肝手術的急性肝衰竭兒童提出一套肝細胞移植的構想。將捐贈的肝臟中分離出肝細胞，也利用反轉錄病毒載體送入 Reo R 標記基因，然後將這些肝細胞注入患者的肝臟內，評估肝細胞移植法

的效用。在動物實驗上已證實其可行性，而真正的臨床實驗才進行不久。

B. 基因治療

第一個基因治療的臨床實驗 (ADA Gene therapy)

a. ADA-deficient SCID 的原理

Severe Combined Immunodeficiency(SCID) 是一種細胞免疫和體液免疫缺陷的遺傳性免疫不全病，所表現的症狀與遺傳的型式和 T 細胞及 B 細胞的缺陷的遺傳兩種。而大約 50 % 自體隱性遺傳 SCID 的患者在紅血球和白球中缺乏腺嘌呤去胺基酶 (Adenosine deaminase, ADA)。這種酶牽涉到 Adenosine 變成 inosine 及 Deoxyadenosine 轉

為 2'-inosine 的代謝。一旦 ADA 缺乏將使 Deoxyadenosine 和它的衍生物（如：Deoxy ATP）在胞內累積，對白血球產生毒性而導致免疫力不足。

雖然所有病人的 B 細胞和 T 細胞都異常，但一般而言 T 細胞免疫喪失最多，大多數病人血液中嚴重地淋巴球不足並缺少成熟 T 細胞。過去以骨髓移植或帶有 ADA 的正常紅血球注入人體來治療 ADA 缺乏的 SCID 雖然有顯著效果，但移植對抗宿主的反應 (Graft versus Host Reaction) 一直是個困擾的問題。如今利用基因治療可避免上述缺點。

b. 為什麼選擇 ADA deficient SCID?

原先基因治療的第一個對象是 β 型地中海貧血，但因為血紅素的生成涉及複雜的基因調節機制，於

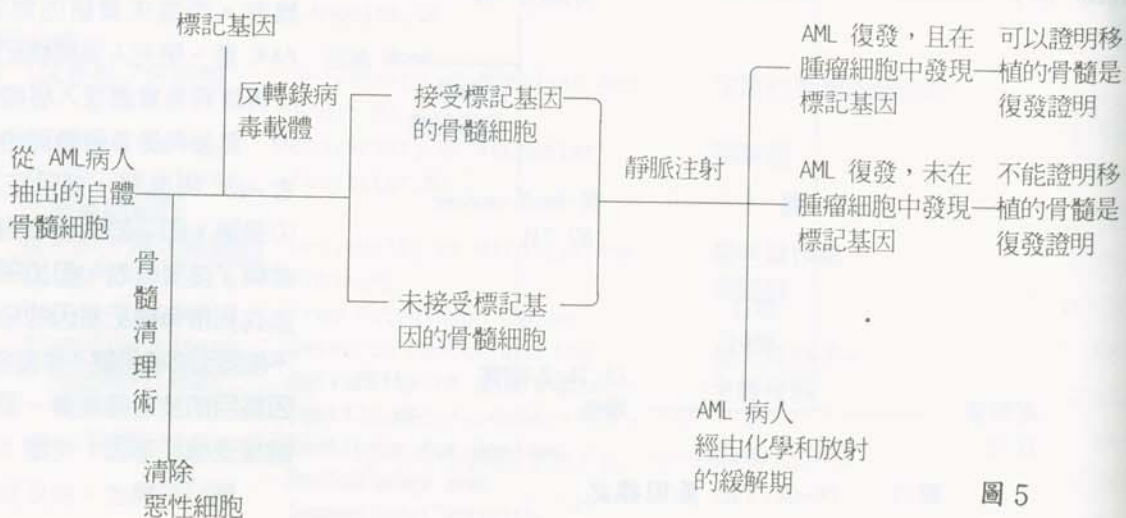


圖 5

是研究目標轉向一類利用基因轉移獲得原先缺失基因的細胞可在病人體內佔極大生長優勢的基因性疾病。換句話說，若突變牽涉到DNA的代謝而讓細胞分裂難以進行，一旦某些細胞之缺失獲得修補，其細胞分裂速度將會遠快於未修補的細胞。符合上述條件的有三個病：1. ADA 缺乏，2. PNP(Purine nucleoside phosphorylase) 缺乏，3. HGPRT (Hypoxanthine - guanine phosphoribosyl transferase 缺乏。這三個病中 ADA 缺乏可用組織配對的骨髓移植治療，但接受移植的病人在移植後一年作血液分析，發現除了T細胞全是外來者之外，其他種類皆能保有自己的血球。於是改以單獨輸入 ADA 正常的 T 細胞竟也可治癒，並且生長情形遠好過病人原有的 T 細胞。基於上述理由 ADA 缺乏成爲第一宗基因治療對象（見圖 6）。

c. 目的及方法

這項 ADA 基因治療計畫有兩大目的，其一在臨床上評估將接受基因轉移的自體淋巴球注入病人體內後對細胞免疫和體液免疫有何影響？療效如何？其二爲觀察移植的自體 T 細胞能存活多久和基因表現情形。

實驗人員從 ADA 缺乏患者取出周邊淋巴球，刺激 T 細胞活化和生長，再用反轉錄病毒載體攜帶正常 ADA 基因進入這些 T 細胞，經過一段時間的培養後再經由注射打入人體。並且必須經常性抽血培養和注射才能有更佳免疫能力，因爲這些 T 細胞所能應付的抗原種類是隨著個體暴露於何種抗原而定，僅僅抽一次血做 T 細胞的培養可能會造成僅有少數幾株 T 細胞特別多而產生免疫能力不足。

d. 成果

1990 年 9 月 NIH, Bethesda MD 首次用靜脈注射把接受過 ADA 基因的自體 T 細胞打回一位 4 歲

小女孩體內，這個女孩曾接受過兩年的 polyethylene glycol (PEG)-ADA 的酵素治療。但是 T 細胞數目仍持續減少的情形下使她反覆受到感染。接受基因治療後的十個半月平均每 1 到 2 個月接受一次注射。因爲免疫能力獲得極大改善且循環中的白血球 ADA 活性也提升至正常人的 20 至 25 % 左右，於是中止基因治療長達 6 個半月，隨後再每 5 個月接受治療。第二個接受治療的病人是一個 9 歲小女孩。從這兩個病人身上獲得資料未發現任何因轉移 ADA 基因造成的副作用。

在第一位病人發病初期尚未接受治療時，檢測其循環 T 細胞數目的衰減可估算 ADA 缺乏的 T 細胞群在體內的半衰期大約爲 30 到 35 天。利用 PCR 和 ADA 活性分析可證明經過基因轉移過的 T 細胞群的半衰期足足有前者的 3 到 5 倍。最初的 10 個半月療程內，ADA 活性從正常人的 1 % 提升到 25 %，而且往後停止治療的 6 個半月中也一直維持這個水平，證明帶有 ADA 基因的 T 細胞有極佳生存優勢而且 ADA 基因是可以持續表現的。

e. 展望

雖然利用成熟 T 細胞作爲基因治療的成果已由上述兩位病人身上獲得肯定，但畢竟不是幹細胞 (Stem cell)，不可避免地某些免疫功能上不足。爲了解決這個問題而產生下述構想：將周邊血液幹細胞（即富含 CD34 的細胞群）和成熟的 T 細胞以不同的載體置入 ADA 基因以用於追蹤這些細胞在身體中的命運，其結果將解開兩個謎團，1. 接受 ADA 基因的周邊幹細胞是否能活得比接受 ADA 基因成熟 T 細胞久？2. 接受 ADA 基因



圖 6 ADA 缺乏的基因治療

的周邊幹細胞是否帶來更完備的免疫能力？上述構想已成為NIH的一個實驗計畫並等待批准。但是1992年3月在義大利米蘭已開始直接利用骨髓的幹細胞從事類似的臨床實驗。

後續的基因治療臨床實驗

a. 癌症的基因治療

1991年1月NIH開始以惡性黑色素細胞瘤從事第一個癌症基因治療，其想法衍生於Neo R/TIL基因標記實驗，只是將轉移的基因改成腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor, TNF)的基因，讓TIL更能對抗惡性細胞。

在老鼠實驗中得知TNF是一種非常有效的抗癌劑，有效劑量約 $400 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，但是在人體只要 $8 \mu\text{g}/\text{kg}$ 就有顯著的毒性作用，利用TIL會回到腫瘤組織中的特性是有可能在防止副作用發生的情形下達到抗癌效果。另外TIL容易陷於肝，脾，胃之中以及TNF的生成是由其他基因調節機制的促進子(promoter)所控制，這些全成了安全上的顧慮。

從接受治療的第一個病人和後續者中，目前仍未發現有因TNF分泌造成的器官中毒或轉移基因而起

的副作用，但基因治療的成效現今仍未有定論。在其他型式癌症基因治療的動物實驗上則有重大發現：取出一些腫瘤細胞將lymphokine基因送入後再重新移植回體內可以消滅腫瘤細胞形成腫瘤的能力，而且許多Lymphokine皆可獲得相同結果，包括Interleukin2, Interleukin4, Interferon α , TNF和Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)。其機制尚未明朗，但有人認為局部TNF表現可有效地抑制腫瘤新血管的生成。更驚奇的是許多腫瘤得以消退的實驗中見到動物體可對抗未經基因轉移的惡性細胞，說明免疫對腫瘤是具有記憶，「腫瘤免疫(tumor vaccine)」是可行的。

總之上述動物實驗指出利用修飾後的腫瘤細胞可以加強人體對抗癌症的免疫反應。所以目前癌症基因治療的過程是先把TNF基因或IL-2基因修飾過的腫瘤細胞重新用皮下注射和肌肉注射的手段植回患者體內，經過21天後從注射地點取出淋巴球作體外培養，促進T細胞增生，再將這些T細胞伴隨高劑量IL-2打回體內(見圖7)。

b. HLA-B7的癌症基因療法

1992年初University of Michigan, Ann Arbor開始了一項不同於前者之癌症基因療法，相異點有二：1. 不使用反轉錄病毒載體，2. 載體的移入是在體內進行而非體外。其目的在轉移一種第一類MHC抗原基因(HLA-B7)進入腫瘤細胞中，而這個基因在腫瘤中並不能正常表現。載體是一種由liposome包裹著內含轉移基因及其調節基因的物體，直接以注射方式進入腫瘤組織中，所以如何讓載體都進入惡性細胞內而非健康細胞中(尤其是生殖細胞)是努力的方向。

c. 家族性高膽固醇血症的基因治療

家族性高膽固醇血症(Familial Hypercholesterolemia)是一種表現低密度脂蛋白受體(receptor for low density lipoprotein, LDL)的基因突變所致，而LDL受體和膽固醇的運輸及代謝有關，一旦發生異常將無法對血中膽固醇的升高作出回饋控制，所以患者早年就易得粥狀動脈硬化，大幅增加心肌梗塞的機會。

人體中大約93%的膽固醇貯存於細胞內，剩下的7%大多在血漿中利用LDL的型式運輸。膽固醇代謝的第一步是由肝臟釋放Very



圖7 癌症的基因療法

low density lipoprotein(VLDL)到血流中，VLDL 富含三酸甘油酯而形成另一種粒子稱為 Intermediate-density lipoprotein(IDL)。帶著更高量膽固醇的IDL 從微血管內皮離開後不久就有50%被肝臟由LDL 受體吸收，剩下的IDL 則進一步代謝除去更多的三酸甘油酯形成膽固醇量更高的LDL，最後約70%的LDL 也是經由肝細胞的LDL 受體回到肝臟，其餘則用其他方式消除。一旦LDL 受體缺損，不僅LDL 清除受阻，也會讓血中LDL 量提高，因為先前曾提及IDL 有一部分用肝細胞的LDL 受體代謝，如今這條途徑受阻，只得逼IDL 往LDL 的代謝途徑邁進，最終結果即是血中膽固醇過高。

對於家族性高膽固醇血症的基因治療是先取出患者一部分的肝組織，利用反轉錄病毒載體使LDL 受體基因的缺損得以修正，再將這些肝細胞送回原先取出之處。這個實驗計畫在動物實驗上成果令人振奮，所以1992年夏季也開始進行人體臨床實驗。對於這個實驗計畫的爭論焦點是技術上的複雜性和修補後的肝細胞究竟能有多久的效用。

d. B型血友病的基因治療

B型血友病(Hemophilia B)是一種凝血因子Factor IX不足或缺少形成的血液凝集疾病。目前中國的上海復旦大學已成功地在體外用反轉錄病毒載體把Factor IX的基因轉移至兩個B型血友病患者的自體纖維母細胞中，並移回人體。目前成果尚未明瞭，但期待這實驗可以提出下列問題的答案：1. 在纖維母細胞中的Factor IX基因可表現多久？2. 移植回人體的自體纖維母細胞可存活多久？

C. 細胞內免疫

(Intracellular Immunization)

一、實例一、疱疹病毒

Herpes virus

(Herpesvirus) 疱疹病毒是一種DNA 病毒，它的複製與表現需要它本身的立即早期基因(immediate early gene) 先被活化，而這個基因的活化又和transactivator 有關，例如細胞DNA 結合蛋白質(cellular DNA binding protein) 與VP16(virus protein 16; 病毒蛋白16)。

病毒蛋白16 是疱疹病毒的結構之一，與細胞DNA 結合蛋白質結合形成複合體之後，便可以啟動立即早期基因，而使病毒的複製順利地進行下去。

藉由gene transfer 的幫忙，科學家把encoding "a fragment of VP 16" 的基因植入細胞。這個VP16 的fragment，仍具有與cellular DNA binding protein 結合本身就可以和HIV 的DNA 競爭調節蛋白(Ex tat transcriptional activator) 而中斷病毒的複製。

經過以上步驟處理過的骨髓芽細胞，在注入病人體內回到骨髓之前，為了使這些植回去的細胞有生存的空間，必須以化療或放射線的方式先處理骨髓。如果上述的策略均能奏效，則這些受到保護的細胞(protected cell lineage) 將逐漸佔有優勢，而且能夠抵抗HIV 的感染。

二、實例二、人類免疫不全病毒(Human immunodeficiency virus)

把前面所說的體外實驗(in

vitro) 之概念延伸到體內實驗(in vivo) 時，所遭遇到的第一個問題就是：有那些細胞可以用這種方式加以保護呢？基本上，時常更新的細胞，只要我們能夠將基因植入其先驅者(precursor)，便可以達到保護的目的。而血球細胞(blood cell) 便符合這個條件。因為它們不斷地由骨髓芽細胞(bone marrow stem cell) 衍生出來，而這些芽細胞至少就老鼠而言，已經可以達到純化的地步。再加上令人聞之色變的HIV，主要感染的對象也是血球(包括T 淋巴球、單核球、巨噬細胞)。因此，只要我們利用反轉錄病毒(retrovirus) 將基因植入骨髓芽細胞內，便可以「師夷之長技以制夷」(make a retrovirus fight a retrovirus) 細胞，使細胞能夠對抗HIV。

首先，從受HIV 感染的病人體內抽出骨髓細胞，其中包含了所有重要的造血芽細胞(haematopoietic stem cells)。接下來，利用病毒或DNA 萃取物將基因植入芽細胞內，而這些基因所記載(encode) 的RNA 或蛋白質可以干擾HIV 在細胞內的生長。例如：1. RNA 與調節蛋白(regulatory protein) 結合，使控制HIV 複製的調節蛋白失去作用。2. 利用anti-sense RNA 阻礙HIV 的表現。3. 利用失去調節功能的DNA 結合蛋白(DNA-binding protein) 來取代正常的調節蛋白而與HIV 的DNA 結合。4. 植入的基因的能力，但卻無法啟動疱疹病毒的表現。理論上，細胞內產生的病毒蛋白質16 片段會和因為感染到疱疹病毒而帶進細胞內的野生型病毒蛋白質16(wild-type VP16) 競爭細胞DNA 結合蛋白質，達到防止疱疹病毒表現的效果。

D. 基因治療新策略

——腦瘤

一、腦瘤(Brain tumor)的特性

由於腦瘤有下列的性質，使他們特別適合這種原位性的基因治療(“in situ” gene therapy)：

1. 腦中的神經元(neurons)或其他正常的細胞，是處於穩定的狀態，並不會一直合成 DNA。2. 腦血管內皮細胞雖然會進行替換(cycling)，但比率並不高，且其中大部分是在腫瘤周圍，受其訊號所影響而進行血管新生作用(angiogenesis)的內皮細胞。3. 腦瘤通常是局限於某一部位，但因為鄰近重要結構的緣故，不易開刀。4. 腦具 immunologically privileged的特性，可以讓 histoincompatible 反轉錄病毒載體製造細胞(retroviral vector-producer cell) 長期存在，不會有排斥(rejection)的現象。由以上四點可以發現，腦中活躍地進行有絲分裂的細胞，均是腫瘤細胞或腫瘤生長所必須的構造。

二、基因治療的概念

讓我們再回頭看看反轉錄病毒載體(retroviral vectors)，以往它的「缺點」之一是只能傳送基因到正在合成 DNA 的細胞，至於不處於分裂時期的細胞就沒有辦法了。然而對腦而言，這項「缺點」卻成為殺死分裂的腫瘤細胞，並保護不分裂的神經組織的有利條件。因此，我們的想法是在有腫瘤的地方注入反轉錄病毒載體製造細胞(Retroviral vector-producer cells)，如此一來，只要腫瘤細胞進行 DNA 的合成，就能藉由載體，把基因送進細胞。例如腫瘤抑制基因(tu-

mor suppressor gene)、可以引起腫瘤細胞崩解(apoptosis)的基因，提高腫瘤免疫性的基因(藉由局部 cytokine 的產生或促進腫瘤細胞，MHC 抗原的表現)；甚至可以用本文將要介紹的方法，把“suicide gene”植入腫瘤細胞內，使他們對於某種藥物敏感(sensitive)，而這種藥物對其他正常的組織並不會有任何傷害。

三、實例的成果

首先，我們要觀察在體內實驗(in vivo)的環境下，利用反轉錄病毒載體將基因送入細胞內(retroviral-mediated gene transfer)的可行性如何。分成2組來做實驗，一個是 fibrosarcoma cell 與 control fibroblast 會表現出 neomycin resistance gene; Neo R，但是不會產生反轉錄病毒載體(retroviral vectors)；另一個是 fibrosarcoma cell 與 fibroblast(可以產生 NeoR retroviral vector)，兩者分別以皮下注射的方式送入老鼠體內。4個星期後，將腫瘤切下培養，並且以 neomyein 的相似物 G418 來看看 NeoR gene 的表現。如表4的結果，在 control fibroblast 的那一組，並沒有長出具有 G418 抗

藥性的腫瘤細胞菌落(G418-resistant tumor colonies)；相反地，含有反轉錄病毒載體製造細胞的(retroviral vector-producing fibroblast)那一組卻有 $63 \pm 9\%$ (mean \pm SEM) 的腫瘤細胞成為 G418-resistant colonies。然後，我們以 Southern(DNA)blot 及酵素分析(enzyme assay)的方法來分析具有 G418 抗藥性的腫瘤細胞(G418-resistant tumor cells)，結果 Neo R vector 與 neomycin phosphotransferase 分別呈現陽性反應。以上的實驗明白地指出，我們可以利用反轉錄病毒載體製造細胞，在體內實驗的環境下，將基因轉送到正在分裂的腫瘤細胞內。

接著，我們要看看 HS-tk (herpes simplex thymidine kinase) 基因傳遞系統，是否真的可以消除腫瘤。於是如圖8，設計了四種情況：將腫瘤細胞分別與① control fibroblast ② fibroblast(只會產生 NeoR vector) ③ fibroblast HS-tk cells ④ fibroblast(可以產生 HS-tk retroviral vectors) 混合之後，以皮下注射的方式送入老鼠體內。經過三天長出小腫瘤之後，以 GCV (ganciclovir) 每天兩次加以治療。結果，在①、②這兩種組合下，

inoculation	Mouse	colonies	
		無 G418	G418 (1.0mg/ml)
Tumor+control fibblast	907	82	0
	908	78	0
	909	84	0
Tumor+Vector-Producing cells	438	100	79
	441	42	25
	442	34	41

表4 clonogenic assay of tumors regrown from mice 4 weeks after inoculation.

GCV 沒有治療效果；在⊙種情況下，有 mild antitumor effect；而最令人出乎意料之外的是Ⓔ種情況，在 GCV 的治療下，腫瘤迅速地消退，並且在實驗結束後 29 天，仍無腫瘤。然而根據前一次實驗的結果，在體內實驗的環境下，gene transfer 的效率 (efficiency) 並非 100%，為何此處腫瘤會完全消失呢？

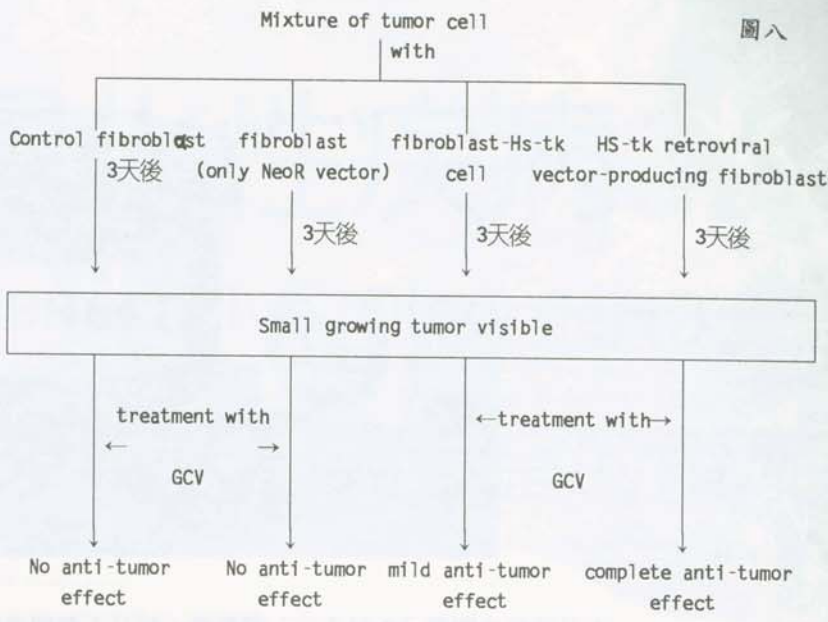
四、旁觀者效應

為了探討這種現象，我們又設計了另一次實驗，先利用上述的方法，將 HS-tk gene 轉送到腫瘤細胞內，然後以不同的比率與野生型腫瘤細胞 (wild-type tumor cells) 混合，再以 GCV 來治療。結果如表 5 所示，以 50 : 50 的比率混合者，幾乎所有的動物，腫瘤完全消失；而含有 10 % HS-tk-expressing cells 者，只有部分的動物腫瘤完全消失。至於在 tumor 上方的皮膚及下方的肌肉等正常的組織，並不受這種旁觀者效應 (bystander effect) 的影響。儘管這種機制並不清楚，但卻透露出一個訊息：當我們要殺掉某處的腫瘤時，並非全部的腫瘤都需要被 transduced，經由這種 "bystander effect" 也可以殺死鄰近的 untransduced tumor cells。

HS-tk tumor cells(%)	palpable 2 wks	tumors 5wks
100	0/15	2/15
50	0/15	1/15
10	3/15	6/15
0	12/15	15/15

The effect of GCV on the incidence of tumor growth in mice injected with mixtures of tumor cells transduced with the HS-tk gene and wild-type tumor cells.

表五



利用 "bystander effect"，我們將能夠產生帶有 herpes simplex-thymidine kinase gene 載體的纖維母細胞 (HS-tk retroviral vector-producing fibroblast) 以原位注入 (in situ injection) 的方式，注入腫瘤的地方，使 HS-tk 基因的傳送達到一定的比例來消滅已經存在的腫瘤。結果顯示，14 隻原本有 glioma 的老鼠，經過這種方式治療之後，有 11 隻在巨觀及微觀下腫瘤均消失，剩下的三隻在顯微鏡下發現由 viable and necrotic malignant cell 所組成的殘餘腫瘤，而載體製造細胞 (vector-producer cells) 已消失無蹤。至於周圍正常的腦組織仍然不受傷害。

五、可能的副作用

如果體內其他處於分裂狀態的細胞也吸收了 HS-tk 載體，在稍後的 GCV 治療中不就會受到傷害了嗎？的確，這是一個可能發生的副作用。然而，在以這種方式治療的 30 天當中，並沒有發現這種 systemic toxicity。例如小腸上皮細胞、胸腺、骨髓等均不受影響。

結語

目前載體 (vector) 技術的發展有一些困難尚待克服：例如體外模式的載體不易成功地將細胞重新植回病人體內，而體內模式的載體大多表現時間過短，亦不夠完美；其他的問題還有病毒可感染的細胞種類有限制，DNA 嵌入的隨機問題等。這些都有待更進一步的發展。而在癌症實際治療上，基因標記 (gene marking) 已經廣泛地使用於許多癌症的自體骨髓移植的追蹤，藉由傳遞傷害癌細胞物質的基因治療法也已從 lymphokines 和 cytokines 基因成功地轉移到淋巴球上而有了開端。遺傳性病如家族性高膽固醇血症和 B 型血友病等更是極需進一步擴展的實驗領域。在愛滋病的治療方面，細胞內免疫似乎是一個可行的方法，不過尚有一些困難需要克服：例如扎出具有最佳效果的 inhibitory product，受到保護的細胞是否能逐漸壯大而佔有優勢。如果這些問題能一一克服，則愛滋病將不再是世紀黑死病！

醫學新知