

行政院所屬各機關因公出國人員出國報告書
(出國類別：參加會議)

第 14 屆歐洲基因治療學會年會
(XIV Annual Congress of the European
Society Gene Therapy) 出國報告

服務機關：行政院衛生署

姓名職稱：葉雅芬國家衛生研究院獎助學者

派赴國家：希臘雅典

出國期間：95 年 11 月 09 日到 95 年 11 月 13 日

報告日期：95 年 12 月 26 日

行政院及所屬各機關出國報告提要 系統辨識碼：C09501569

計畫名稱： 歐洲基因治療學會第 14 屆年會

報告名稱： 第 14 屆歐洲基因治療學會年會參加報告

計畫主辦機關： 行政院衛生署

出國人員：

姓名：葉雅芬

服務機關：行政院衛生署

服務單位職稱：科技發展組 國衛院獎助學者

E-MAIL 信箱：scyfan@doh.gov.tw

出國地區：希臘 雅典

參訪機關：無

出國類別：其他

出國期間：民國 95 年 11 月 08 日 至 民國 95 年 11 月 13 日

報告日期：民國 95 年 12 月 20 日

關鍵詞：基因治療，反轉錄病毒，歐洲，腺病毒

報告書頁數：17 頁

專責人員姓名：何麗霜

專責人員電話：02-23210151 分機 521

摘要：

第 14 屆歐洲基因治療學會年會於 95 年 11 月 9 日至 12 日於希臘雅典舉行，參與投稿的國家，計有 34 個國家，為一國際性之研討會。大會之演講含括了多項主題，包括癌症基因治療、基因治療之免疫調節機制、非病毒性載體的方法、基因毒性、載體學的進展、安全及法規議題及最新的臨床試驗經驗分享等。台灣之基因治療雖尚在起步，但由國際上的經驗分享，可以讓我們瞭解最新的技術與面臨的困難及可能的解決方法，以幫助衛生署在規劃相關議題時有更周全的思考。

目次

壹、	目的.....	5
貳、	行程.....	5
參、	內容與心得.....	6
	一、基因治療所用之基因轉殖的方法.....	6
	二、應用基因治療之疾病.....	11
	三、基因治療之法律、倫理面向.....	16
	四、結論.....	16
肆、	建議事項.....	17

壹、 目的

第 14 屆歐洲基因治療學會 (European Society Gene Therapy, ESGT) 年會於 95 年 11 月 9 日至 12 日於希臘雅典舉行，參與投稿的國家，計有 34 個國家，為一國際性之研討會。此協會自 1993 年起以基因分子生物學為基礎，進而開創新的醫療方向，以達成全人類健康為目標的宗旨，經過多年的努力，ESGT 持續的將最頂尖的學者齊聚一堂，藉此分享彼此的研究上創新的想法、文化上的交流、以及國際合作。為深入瞭解基因治療之最新發展及趨勢，故參與此年會，並藉此實地瞭解國外基因治療的最新科技進展、及倫理、法規等考量與討論，作為衛生署在規劃相關議題時有更周全的思考。

貳、 行程

日期	行程
95.11.08	從台北飛至希臘雅典
95.11.09	至雅典、參加會議 1. Vector systems 2. Disease Model System
95.11.10	參與會議 1. Stem Cells and Cell Therapy 2. Epigenetics and Chromatin Structure 3. Cancer Gene Therapy and Oncolytic Viruses 4. Gene Therapy of Genetic Diseases I
95.11.11	參與會議 1. Novel Candidate Diseases for Gene Therapy 2. Cardiovascular Gene Therapy 3. Immune Regulation Gene Therapy 4. Safety and Regulatory Issues
95.11.12	參與會議 1. RNA-Dependent Gene Therapy Technologies 2. Immunological Aspects of Tolerance and Regulatory T-Cells 3. Update on Ongoing Clinical Trial
95.11.13	從雅典飛回台北

參、內容與心得

基因科技的發展，為一些醫療問題，提供最佳的解決之道。在 1960-1970 之間，由於對一些會轉型(transformation)的病毒有了進一步的了解，開始有人嘗試以此類病毒作為一個載體，將外來的基因送入一個特定的細胞內。隨著這些技術的發展，以及我們對於某些疾病的逐漸認知，基因治療的觀念於是衍生。若是我們能夠利用這些技術，針對一些已知某個基因缺陷所引致的遺傳疾病進行治療，是否即可拯救這些具有遺傳疾病的千千萬萬的病人呢？這個想法固然非常簡單且值得，然而進一步的研究工作即發現了這個課題所存在的複雜性及多元性。事實上，基因治療必須綜合基礎科學的知識、臨床的經驗及診斷方能奏效。而一個成功的基因治療則必備二個充分條件，那就是要有好的基因轉殖及基因表現。以我們目前所具備的能力和知識，基因治療是無法達到矯正所有的遺傳疾病，但至少有些疾病，目前的確是可經由基因治療加以解決。除了技術上的問題之外，新的技術所面臨的法律、倫理等問題，也亟待面對與解決。

第 14 屆歐洲基因治療學會年會於 2006 年 11 月 9 日至 12 日於希臘雅典舉行，參與投稿的國家，計有 34 個國家。大會演講及海報內容含括了多項主題，包括癌症基因治療、基因治療之免疫調節機制、非病毒性載體的方法、基因毒性、載體學的進展、安全及法規議題及最新的臨床試驗經驗分享等，本報告將簡要介紹相關知識背景及最新進展於下。

一、基因治療所用之基因轉殖的方法

基因治療的目的在於攜帶一個（或一些）基因進入體內，達到治療或延緩病程的效果，以改善病人基因缺陷及生活品質。成功的基因治療需要有良好的基因轉殖技術。當基因體時代來臨，許多疾病相關的基因都被陸續發掘出來之後，接下來就是如何去利用這些基因，進行疾病的治療。但截至目前，要很有效率地攜帶基因進入個體，仍存在相當大的挑戰性。目前基因轉殖的技術大體可分為二大類，一是利用病毒作為載體（vector），另一類則是非病毒載體。

1. 病毒載體

病毒載體有些可將 DNA 序列帶入宿主的染色體上（例如反轉錄病毒載體，腺相關病毒載體），有些則存在染色體外（例如腺病毒載體）。每種病毒載體都有其優、缺點。但一個理想的病毒載體必須具備以下一些基本條件：

(1) 有效及容易製備；

- (2) 安全，無強烈的副作用；
- (3) 可長期，有調控性的表現基因；
- (4) 可準確地傳送基因至指定的標的細胞；
- (5) 具有感染分裂及不分裂細胞的能力；
- (6) 可準確地插在特定的染色體位置上。

當然這是理想中最好的病毒載體，然現今所用之病毒載體尚未有哪一個具備如此好的條件，也是病毒學家目前正在努力的方向。下面就目前較常用的幾種病毒載體作一介紹。

a. lentiviral vectors

lentiviral 載體所攜帶的基因物質能與細胞核基因組結合，使細胞能表現新基因帶有的蛋白質。此載體也能攜帶 RNA，透過 RNA 干擾作用阻止細胞的基因表現。此載體特殊處在於含有融合蛋白，具遙控功能。透過抗生素的添加，能關閉或開啟所需基因。此種具多功能性的工具，將能廣泛用於基因研究和臨床基因療法等方面；尤其是幹細胞、胚胎細胞和組織；器官等與基因轉換相關的層次。Lentiviral 載體的效率將使研發動物模型以研究如帕金森氏症、阿茲海默式症或 Huntington 症等更加容易。對動物使用抗生素將能開啟或關閉基因，能使研究人員更能研發新式療法。此工具也能用於腫瘤研究，分析腫瘤細胞的基因功能，並產生腫瘤模型以進行藥物篩選和運送等研究。

(b) 腺病毒載體 (adenoviral vector)

腺病毒是一個中等大小 (35 kb) 之 DNA 病毒。感染人體之後，體內多半會引發免疫反應 (T 及 B 細胞) 來清除病毒的感染。目前血清學檢查發現約有 40% ~ 60% 的小孩已有對抗血清型 1 型、2 型及 5 型病毒的抗體存在。而 Ad5 又是目前最常用於基因治療載體設計的一種，故也是腺病毒載體在臨床上應用碰到最大的困難。強烈的免疫反應，除了使轉殖基因只是短暫表現外，可能也會對病人產生極大的副作用，甚且休克。之前美國費城一位十九歲孩子利用腺病毒進行基因治療最後導致死亡，即是一個明顯、慘痛的例子。

腺病毒的複製史中，有早期 (E1A, E1B, E2, E3, 及 E4) 中期 (IX 及 IVa 2)，及晚期 (結構蛋白, ML) 三個階段。第一代腺病毒載體是將 E1 及 E3 剔除。E1 剔除是使重組腺病毒將來在標的細胞內不具有複製能力。E3 剔除是為了增加容納轉殖基因的空間。腺病毒的感染，並不要求細胞分裂，這些都是它優於反轉錄病毒之處。但相對的，腺病毒不嵌插在細胞染色體中，又不會在細胞內複製，故在一段時間後，經細胞分裂，病毒 DNA 可能就消失掉，表現亦告中

止。同時，如前述腺病毒載體在體內造成非常嚴重的免疫反應，這也是造成帶有腺病毒載體的標的細胞在體內很快就會被消滅的原因之一。

第二代腺病毒，為了更降低這些低量的病毒複製的機率及免疫反應的發生，進一步再將 E2a 基因 (DNA-binding protein) 及 E4 由載體上去除，而改由製備細胞株來提供。第三代病毒載體甚至將更長的病毒基因體完全去除而用 helper virus 來幫忙，以企圖完全斷絕病毒載體在標的細胞內的複製能力，如此一來即可大大降低宿主的免疫反應，以及增長載體基因的表現時間。

在一些情況下，只需要短期的基因表現即可產生療效，比如預防性疫苗，此時第一代腺病毒即為很好的選擇；若需長期表現則需選擇第三代的腺病毒，只是此種病毒的備製困難，產量也較少，故現在仍難以應用於臨床；具有複製能力的載體則在治療固體腫瘤有潛在發展的能力，但是現在在臨床上的結果尚未滿意。目前研究的趨勢主要以基因或化學方法改良蛋白衣 (capsid)，使腺病毒轉變為非 Ad5 血清行的腺病毒，或使用非人類來源的病毒構築載體，為將特定基因轉殖至目標細胞，及減少因已存的免疫反應造成基因轉殖的失敗結果。

(c) 腺相關病毒載體 (adeno-associated viral vector, AAV)

腺相關病毒是個非常小 (約 5 kb) 之單股 DNA 病毒。AAV 之感染宿主範圍亦廣，且 AAV 具有天然的複製缺陷，不會造成細胞分裂，故不具有人類致病性。但在 adenovirus 不存在時，AAV 會嵌插在染色體上，形成穩定持續性表現。目前認為它可能會特別選擇在 19 號染色體上。但是要有如此有效率、特異性的嵌插現象，是要有 rep 蛋白的存在，但它並不存在於一般的 AAV 載體中；故通常重組 AAV 載體嵌插在染色體上仍是隨機性的。以質體式的 AAV 載體在肌肉細胞或腦組織中表現，發現可長達九個月之久。

AAV 載體的缺點是基因體太小，故可用之基因大小受到相當大的限制。為了增加其容量，目前有設計為雙載體的方式。AAV 載體通常要藉由 helper virus (如腺病毒) 才能組裝成病毒顆粒，如此一來就會增加實驗步驟，需將 helper virus 去除。目前已知與組裝相關的基因主要就是腺病毒的 E2、VA 及 E4，故可單獨將這些基因放在一個質體，提供輔助包裹病毒的功能，而省去了 helper virus 的問題。且可進入多種不同的細胞。現在已有 100 多種 AAV 已經被分離出來，有些 AAV 在基因轉殖上的生物潛能及治療方式已經被研究。沒有嵌入基因的 AAV 載體在體內沒有毒性，也只會引發很弱的免疫性。根據在不同動物模式包括大鼠、狗、靈長類動物的研究結果顯示，AAV 載體在動物體內有穩定的基因轉殖，特別是在已完全分化之細胞，包括肌肉纖維、神經細胞、肝細胞、視網膜細胞

和其他多種細胞。肌肉和肝臟細胞是主要的疾病目標及全身性代謝疾病傳送缺損蛋白質的平台。很多研究已經建立以重組 AAV 來支援治療性的轉殖基因的表現，比如在小鼠及狗的血友病模式表現 9 號凝血因子（coagulation factor IX）、在肥胖大鼠表現肥胖荷爾蒙（Leptin）等等，且已經展開相關的臨床試驗。

(d) 其他病毒載體（Other viral vectors）

除了上述常用之病毒載體，目前也有一些其他病毒載體慢慢被開發出來。例如疹病毒（HSV）。這個病毒載體主要針對腦神經疾病。其在口腔上皮細胞經由感染及分解，可進入神經細胞並建立長效的潛伏感染。它的基因體很大，容得下又大、又多的外來基因，但也因為太大，在製備病毒載體時是比較複雜麻煩的。目前主要有複製子型（amplicon）、缺乏 IE 基因之複製缺陷型（replication defective）及減毒型（attenuated）等三種不同之 HSV 載體。不過這三種型載體目前都還有其製備、或使用上之問題。

另外也有一些具有複製能力之 RNA 病毒載體被開發使用，例如 Semliki Forest virus 等。這類正股 RNA 病毒會利用（+）股基因體複製出負股 RNA，再利用此負股 RNA 複製成（+）股 RNA 及做出較短之 subgenomic RNA，可表現大量的結構蛋白。利用其在細胞內具有複製的能力，若將我們的基因設計在結構蛋白基因的位置，就可獲得相當高量的表現。有人就利用如此之重組 RNA，不管是直接打入在體外做好之 RNA 分子或將之先包裹成為病毒顆粒再打入體內，都會因為其複製的特性而獲得比 DNA 疫苗方法更高量之蛋白表現，而有較佳之免疫效果。

2. 非病毒載體的方法

基於病毒載體具有一些危險性，一些研究學者故而發展一些非病毒載體方式，希望能提供較安全之基因傳送方式。這些非病毒載體的設計，無非都是朝向具有標的性、增加轉殖效率、或者是增加移動至核內及嵌插的機會等等方向來設計。而目前所有非病毒載體的共同最大瓶頸，仍在於如何使質體 DNA 能更快地脫離胞內體（endosome）以減少 DNA 被分解的命運。以下則是將幾種較常用之非病毒載體系統加以介紹。

(a) 微脂粒（liposome）

由於 DNA 帶極大負電，不可能直接穿過細胞膜而進入細胞內。有人發展利用一些磷脂類，具不同帶電性或極性者，以不同比例組合形成微脂粒，再將核酸與

這些微脂粒混合，將 DNA 包裹於其中，如此一來，DNA—微脂粒複合物就可直接通過細胞膜送入細胞內。這個方法可普遍用於各種不同細胞，且可直接 *in vivo* 使用。此法基因轉殖效率的高低依其磷脂的比例、種類成份而定。微脂粒有下列特性：可使 DNA 有較好的細胞穿透性和保護不受核酸酶分解；利用質體細胞膜加壓方式使 DNA 與細胞膜的結合更容易；同時促使 DNA 的核進入，這樣可以轉殖靜止狀態細胞。雖然在醫學上化學載體的使用已經有一段時間，但是在全身性注射及轉移性腫瘤組織方面尚未有決定性的優點，經由此法進去細胞內的 DNA，其表現均屬短暫性的，到目前為止，這個方法的效率普遍均不是特別高。

(b) 直接 DNA 注射肌肉 (DNA injection)

這是非常不尋常，但卻很獨特的方法，就是直接將 DNA 以針頭注射到動物四頭肌 (quadricep)，結果發現 DNA 可在肌胚細胞 (myoblast) 內存留一陣，且持續表現。但 DNA 並沒有嵌插到染色體上。當纖維母細胞融合形成多核的肌纖維管 (myotubule) 時，DNA 仍保存且表現。這種 DNA 進入細胞的詳細機制目前仍不是非常清楚，但相信與注射局部區域內有些組織受到傷害或注射時所增加的壓力有一些關聯性。也有一些其他組織內的細胞可利用直接 DNA 注射的方法而將基因傳送進去的，例如甲狀腺、有些腫瘤細胞、肝細胞、皮膚細胞，及心肌細胞。而其餘的大部份組織或細胞則普遍對此方法是無效的。這種直接注射 DNA 於肌肉細胞的方法，已證實的確會針對所帶進去之基因所表現的產物產生免疫能力，包括體液性免疫 (humoral immunity) 及細胞性免疫 (cellular immunity)。所以基於它的方便性及有效性，目前這種被稱為 DNA 疫苗 (DNA vaccine) 的方法，是大家所趨之若鶩的。

(c) 基因槍或電穿孔法 (gene gun or electroporation)

基因槍能將 DNA 分子所塗布的金粉粒子以高壓加速的方法，穿過細胞膜而送達至細胞內，進行表現。利用這種機械式的方式，比較沒有特殊細胞條件的要求。故這種方法可應用在多種不同的細胞、組織，甚且器官。其所用的 DNA 量亦遠比微脂粒的方法來得少。利用這種方法，已有多篇例子成功地將 DNA 送達至肝、皮膚、或肌肉等器官內，並觀察到 DNA 在 *in vivo* 內的表現。而最近也有人發展電擊的方法將 DNA 送入細胞內。這個方法是利用高電壓將細胞膜上的脂質結構造成暫時性重新排列 (也許只有千分之一秒或千分之一分)，故而造成細胞膜上有洞，讓 DNA 有機會進入細胞質內。只要細胞膜電壓被提升至幾百個 mV 以上，這種現象在所有的細胞都會發生，故它可普遍用於各種不同組織或

細胞。這種物理性的方法將 DNA 送入細胞內是較為簡單且沒有副作用，所使用 DNA 量，也遠比微脂粒法來得少。可惜其傳送之 DNA 量仍然非常有限，且表現也多為短暫性的。

二、應用基因治療之疾病

將治療性基因轉殖至個體以進行人類疾病之治療，最初重點都放在矯正基因缺陷的遺傳性疾病。然而由於目前轉殖技術能力的有限，以及對某些基因表現的調控並未能充分了解，故對複雜的疾病或由多個基因所引起的疾病，都還不是目前基因治療技術所能勝任的。相對地，若是只有一個基因問題的疾病，以及對基因產物量的需求較不嚴格限制者，則是目前基因治療最好的對象。

除了遺傳性疾病，一些後天性疾病若能藉由某些基因的轉殖而改善其症狀者，亦屬基因治療的範圍。例如癌症腫瘤、心臟血管疾病，及腦神經疾病等。事實上，由於疾病種類較多、影響人口族群較為龐大，且許多情形是不要求基因具有長期表現的特性，目前基因治療應用於後天性疾病的治療可能更勝於應用於遺傳性疾病。截至目前為止，基因治療已有不少例子進入人體試驗，其中包括有遺傳性疾病者（如高氏症、嚴重性免疫不全症、血友病，及囊性纖維化症等）及後天性疾病者（如多種癌症腫瘤、愛滋病，心臟血管疾病等）。現階段主要仍在觀察各式載體逐升用量之安全性評估。以下則就一些疾病治療之原理作一簡單介紹。

1. 遺傳性疾病

(a) Adenosine deaminase (ADA) 缺乏所引起之嚴重性免疫不全症 (severe combined immunodeficiency, SCID) 若缺乏好的 ADA 基因，deoxyinosine 或 deoxyadenosine 將無法轉變為 inosine 及 adenosine。這個疾病造成 SCID 的原因是因為 T 細胞對體內累積之 adenosine 極端敏感，故會造成 T 淋巴球會嚴重失去功能。利用反轉錄病毒載體，人們嘗試將好的 ADA 基因送入病人的骨髓細胞，或自體周邊淋巴球細胞，二年之後，在病人體內之 T 及 B 淋巴球細胞中仍可測得到 ADA 基因的表現，甚至部份恢復其免疫功能。繼而有人嘗試以 CD34+ 之骨髓幹細胞進行基因轉殖，希望能維持終身性的治療效果。不過 CD34+ 細胞之基因轉殖及表現是較困難的。針對 CD34 細胞，目前有許多載體改良及轉殖技術改善仍在積極進行中。

(b) SCID— γ c cytokine receptor 缺乏嚴重性免疫不全症另一個發生原因是因為 γ c cytokine receptor 基因缺陷，造成 T 或 NK 細胞在早期分化過程中即受

到阻礙。利用反轉錄病毒載體將此基因送入病人之 CD34+細胞，的確可恢復 T、B，及 NK 細胞之正常數目而得到正常的免疫功能。這個結果是目前為止利用基因治療為主而得到良好治療效果之最具代表性例子。英國倫敦報告以 gibbon ape leukaemia virus (GALV)-pseudotyped retroviral vector 轉殖適當的基因，並植入 CD34+細胞，以其治療 10 位 X-SCID 的病童的試驗結果顯示沒有嚴重副作用事件，且全部都發展持續的免疫能力，有多樣性的 T 細胞 repertoire，並有良好的居家生活。但是以同樣方法治療一位小時患有 SCID-XI 的病人，並沒有發展適當的免疫系統，顯示此種治療方法有年紀上的限制。

2. 癌症腫瘤

癌症的發生，其實是經過一系列基因的突變所造成的。基因治療可以藉由先進的基因轉殖技術，攜入某些基因到腫瘤細胞內，徹底改變其細胞型態及生長特性，達到清除腫瘤的目的。目前用以治療腫瘤的策略大約可分為下列幾種：引入抑癌或細胞凋亡基因、引入自殺基因、使用抗血管生成因子、使用免疫調控基因或利用複製型 oncolytic 病毒等等。

(a) 引入抑癌 (tumor suppressor) 或細胞凋亡 (apoptosis) 基因

腫瘤細胞最常見抑癌基因表現缺失的如 p53, RB1, BRCA1 等。實驗中證實將野生型 (wild-type) 的這些基因送回這類的腫瘤細胞中，確實會造成腫瘤細胞停滯在細胞週期的某一點或產生凋亡；或迫使細胞對傳統之化療或放射線療法更為敏感。臨床試驗利用腺病毒載體進行 p53 基因治療例子中，的確在幾位患有非小細胞肺癌 (non-small-cell lung cancer) 病患中看到有部份反應或保持病情在穩定的階段，證明這個策略是可行的。

(b) 引入自殺基因

這個觀念是將自殺基因 (suicide gene) 特別地引入腫瘤細胞內，而不進入正常的細胞內，然後再處以特殊藥物。這些藥物經由自殺基因產物的作用而成為有毒的代謝物，故會將表現自殺基因產物的腫瘤細胞殺死。最典型的例子就是一些疹病毒之 thymidine kinase (HSV-tk) 基因。這些病毒 tk 酵素會將一些核酸類似物，例如 ganciclovir (GCV) 或 acyclovir (ACV) 進行磷酸化，導致這類產物得以被用為合成 DNA，造成 DNA 複製的終止，細胞於是死亡。但一般哺乳動物細胞內的 tk 酵素則不具此能力，故不受 GCV 或 ACV 處理的影響。若是我們能將此 HSV-tk 只帶入腫瘤細胞內，而不到正常細胞內，則 GCV 的處理當然只會殺死腫瘤細胞。至於如何只將 tk 基因帶入腫瘤細胞而非正常細胞，則

視腫瘤種類、基因轉殖方式而定。最有名的例子是利用反轉錄病毒載體攜帶 HSV-tk 基因進入腦瘤細胞。由於腫瘤細胞會不斷分裂，而一般腦細胞均屬不分裂狀態，以反轉錄病毒只能感染分裂細胞的特性，是故腦瘤細胞可被選擇性地消滅，而且由於有所謂的旁觀者效應 (bystander effect)，事實上，雖然未必每個腫瘤細胞都被帶入 HSV-tk 基因，但是腦瘤細胞被清除的效果卻出奇得好。在歐洲及美國的兩個臨床試驗顯示，自殺基因可以有效的減少 TK 細胞及移植排斥反應。因此第 2 期多中心臨床試驗已開始進行，由 Molmed 贊助的 TK007 試驗顯示在急性白血病人接受骨髓幹細胞移植後，早期注射可以有效控制移植排斥反應。因為 TK 技術的治療方法有簡單操作及可接受的製造費用，故現在全球有超過 100 人接受此療法，著重在彈性、安全性、有效性目的的第 2 期隨機多中心研究將於 2007 年展開。

(c) 使用抗血管生成因子(anti-angiogenic factor)

大部分腫瘤的生長都需要靠大量新生的血管來提供養份，故攻擊血管的生成或許可成為一個治療腫瘤的良好方式。利用轉殖技術我們可以導入一些基因來抑制血管的新生，或者破壞既有的血管，而達到抑制腫瘤生長的效果。這種治療策略的例子包括利用反意 (anti-sense) RNA 分子來降低血管內皮細胞生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表現，或直接導入抗血管生成因子的基因，例如 angiostatin 或 endostatin。然而這種治療策略需有很好的轉殖技術或較長的表現時間，才能夠達到較佳的效果。

(d) 使用免疫調控基因

腫瘤之所以形成，就代表免疫系統無視於它的存在。利用基因療法企圖增強免疫機制，則是希望達到積極性的免疫刺激，使免疫系統能重新認識腫瘤的存在而加以清除。有人利用細胞激素 (cytokine, 如 IL-2, IL-12, GM-CSF 等)、輔助刺激分子 (co-stimulatory molecule, 如 B7)，或主要組織相容性 (major histocompatibility, MHC) 等的基因來改造腫瘤細胞，將之做成為腫瘤細胞疫苗，用以免疫宿主，期能重新刺激活化起宿主的免疫系統。不過目前實驗結果發現，這類免疫療法對小腫瘤效果非常良好，且往往在宿主體內產生全身性、長效型的免疫反應，可預防腫瘤再復發。但對於大的腫瘤，則完全沒有治療的效果。歸究其原因，可能是有些大腫瘤已失去 MHC 分子的表現，故不會被 T 細胞所辨識，或者這些大腫瘤可能會釋放一些免疫抑制因子 (immunosuppressive factors)，抑制了免疫反應作用。基於如此，這類策略在臨床上對較為末期的癌症病患而言，可能是無法發揮作用的。唯有將免疫基因療法與其他基因治療策

略或傳統療法合併使用，或許還可提供成為「佐劑」的效果，延長或增強其他類療法的治療效果及時效。另一則想辦法將免疫活化能力再提高，俾能打破大腫瘤在宿主體內所造成的免疫耐受性。樹狀突細胞（dendritic cells, DC）的研發或許可提供一個方向。目前 DC 在體外培養的技術已臻純熟，不少人即將腫瘤抗原直接交賦 DC 呈現，以增強 T 細胞的活化。同時並也引入一些細胞激素的基因（例如 IL-12 或 GM-CSF），希望發揮更強之免疫佐劑功能。這種作法遠比將細胞激素基因送入腫瘤細胞內更為有效。未來或許還可再研發一些其他類的免疫調控分子，適當地在樹狀突細胞內表現，使樹狀突細胞在吞噬腫瘤抗原後，能更有效地成熟，以及移動至淋巴器官去活化 T 細胞。

(e) 利用複製型 oncolytic 病毒殺死腫瘤

病毒在細胞內大量複製的結果可能就是造成細胞走向細胞凋亡，或產生裂解而釋放出大量的病毒。利用病毒這種特性來消滅腫瘤細胞，並不是什麼新的想法，但是如何有效地，選擇性地只殺死腫瘤細胞而不會殺死正常細胞，則是在最近基因治療載體開發過程中又重新被重視及研究。

最有名的例子即是最近一株 E1B 缺陷的腺病毒（ONYX-015/dl1520）被發現在 p53 缺失或 p53 訊息傳導有缺陷之腫瘤細胞內具有大量複製的能力，而在 p53 正常之細胞中則沒有複製的能力。利用這種特性，ONYX-015 被發現可以非常有效地消滅多種腫瘤，例如頭頸腫瘤、脾臟腫瘤，卵巢癌等。若再搭配傳統之化療（例如 cisplatin 及 5-FU），則治療效果更是奇佳。現在已經有兩種癌症治療產物在中國取得執照，是由 Genedecine 廠商製造的 P53-replacement adenovirus 及 oncolytic adenovirus (H101)，這兩者皆直接注射至頭頸部的腫瘤。

在歐洲有 75% 罹癌的病人死於轉移性腫瘤，因此發展可靜脈注射及對轉移性腫瘤有專一性之的基因治療載體為當務之急，然而病毒這種具有複製及裂解細胞的能力可能不太具有專一性，如此就會造成使用上安全性的疑慮。且 innate 免疫系統對靜脈內的病毒有很強的防禦機制，故有人在此類病毒載體上再加以改造，使其更具有腫瘤標的性的效果，與使用較少見的病毒型，減少免疫反應；也有人使其帶有自殺基因、免疫調控基因等，企圖綜合各種基因治療策略於一身。相信，如此一來，利用基因療法來治療腫瘤就會更有希望了。除了腺病毒外，也有一些其他病毒，如 herpes simplex virus, Newcastle disease virus, reovirus, 或 vesicular stomatitis virus (VSV) 可能也有類似的效果，只是其造成細胞死亡的機制可能是不一樣的。

3. 感染性疾病—愛滋病

基因治療對於愛滋病的治療目標，是希望將病患體內之 T 細胞改換成為具有抵抗愛滋病毒 (HIV) 感染能力之 T 細胞。其中最適合之標的細胞即為血液幹細胞，因為它可以分化出後面許多的 T 細胞、B 細胞、巨噬細胞……等。一旦將抗病毒基因送入此類血液幹細胞就比較能同時造就出一群具有抵抗 HIV 的下游細胞。至於要用什麼基因來阻礙 HIV 的繁殖呢？一是將 RRE (rev-responsive element) 片段序列大量表現於標的細胞內，做成一個餌，將 HIV 複製所需之一個重要蛋白質 rev 大量引開、耗盡，使其無法完成複製過程。另外則可引入某些特定 RNA 序列，使其與病毒某段基因序列形成一個 ribozyme 的結構。這樣結構就會自動切斷病毒 RNA。也有人引入變種之病毒蛋白基因。此變種蛋白具有強勢效果 (trans-dominant)，反而會干擾病毒正常蛋白的功能，如此一來也可抑制病毒的複製。

現在也發展基因工程的 HIV 疫苗，對 HIV 病毒專一的 CD4+ 及 CD8+ 的淋巴球是抑制 HIV 增生的重要細胞，因此設計 HIV 專一的 T 細胞以進入臨床前及第一期臨床試驗。兩個第一期臨床試驗共測試 40 位 HIV 陰性的自願者，結果顯示此疫苗為安全及免疫可接受性。有 50% 接受兩次注射 NYVAC-C 疫苗的人可在血液中測到 HIV 專一的 g-IFN+ T 細胞，在注射前有接受兩次 DNA-C 疫苗致敏的人，有大於 90% 的人可認識 HIV 的 CD4+ 及 CD8+ T 細胞量都增加。

4. 心臟血管疾病

動脈血管壁是一種由多細胞所組成的結構，血管之平滑肌細胞 (smooth muscle cell, SMC) 一般是不分裂的，它們控制著血流、血壓、血液凝固、栓塞等的問題。常在利用 balloon 進行血管造形術 (angioplasty) 之後，造成血管壁細胞創傷，而使 SMC 開始分裂增生；進而造成血管變細、動脈硬化、血壓升高等之心臟血管疾病。在了解這些成因之後，目前有人利用自殺基因，如 HSV-tk，來消除這些增生的細胞；也有人利用 Rb 基因來控制細胞的分裂；或利用 NO 合成酵素來控制血管細胞的分裂。這些方法都提供了對心臟血管疾病有進一層的控制作用。

另外在治療周邊靜脈區張的症狀，現在已有將基因轉殖可表現過量的 VEGF 及 fibulin 5 的內皮細胞直入人工合成的血管，可加強細胞增生及移動，fibulin 5 可抑制平滑肌細胞增生。在 18 名接受具有此兩種基因之轉殖血管，並追蹤 6 個月後，結果顯示，接受基因轉殖血管的病人較少發生栓塞。

三、基因治療之法律、倫理面向

基因治療在倫理上要考量的包括個案的自主性、受試者同意書、個人隱私權與利害衝突等問題。在招募受試者時疾病的嚴重範圍、危險性、補助的費用、及是否有足夠好的動物試驗結果，都是很難去判定的。怎樣的試驗前期結果是足夠的，以及怎樣的研究設計是足夠安全的，這些都是很難評估的，也沒有適當的評估模式。比如在英國執行的 TGN1412 藥物試驗，雖符合現有的知識及規範下，但仍造成 6 位健康受試者嚴重的器官衰竭的結果。因此科學界及法規方面也在思考，什麼才是最佳試驗設計，需要有多少的資料才足夠動物試驗結果，才能判定可以進行到人類臨床試驗，這些都具有不確定的因素。且在審查試驗設計時常面臨過往資料不足，以及資料不全，無法作最適當的判斷。

現在世界衛生組織 WHO 已經推行臨床試驗登記制度，希望可以將臨床試驗的資料包括贊助廠商、執行的研究員、試驗設計、副作用、主要的研究成果等資料公布於網路上供研究群資訊的互通，增加研究的安全性，並保障民眾知的權力。

四、結語

很明顯地，基因治療要成功，必須結合許多的技術。在這個領域中，它結合許多不同專長、背景的人來共同達成：病毒學家、細胞生物學家、分子遺傳學家、免疫學家及臨床醫師。唯有充分了解注意治療過程中的每一環節，才能避免再次發生類似在美國賓州費城的基因治療死亡及英國的 TGN1412 嚴重副作用事件。病毒學家應再研發更安全、有效的載體系統，而細胞生物學家應再努力研究如何培養幹細胞作為基因治療標的細胞，以減少病人治療的次數。免疫學家可再探討這麼多類的病毒載體對人類的免疫作用究竟如何以及如何避免，以增加治療的成功機會。遺傳分子學家應再探索基因與疾病之間的關係等等。雖然有太多的問題、知識仍待解決及尋求，但對一些垂危的病人而言，基因治療技術的運用已箭在弦上，無法等待了。故唯有藉著目前一邊進行中的臨床試驗的結果及經驗，配合各個實驗室內汲汲不斷的努力研究，才能將基因治療推向更易成功、更易執行的境界。

台灣基因治療雖尚在起步，但由國際上的經驗分享，可以讓我們瞭解最新的技術與面臨的困難及可能的解決方法，以幫助衛生署在規劃相關議題時有更周全的思考。

肆、 建議事項

本次年會共有 34 個國家投稿，顯示全球在基因治療的領域都投入相當的人力、物力。台灣在基因治療的領域尚屬起步階段，但是對於因應基因治療所可能面對的法規、倫理議題，宜續追蹤 WHO、美國及歐洲對基因治療臨床試驗管理規範，作為本署規劃的參考。