

出國報告（出國類別：進修）

骨骼代謝異常疾病之細胞及基因治療

服務機關：國立台灣大學醫學院附設醫院基因醫學部

姓名職稱：李妮鍾 / 主治醫師

派赴國家：美國 / 佛羅里達大學鮑威爾基因診療中心（Powell Gene
Therapy Center at the University of Florida）

出國期間：99年08月16日至100年07月15日

報告日期：100年10月1日

單位主管核章：

目錄

1. 摘要.....	p3
2. 前言.....	p4
3. 目的.....	p7
4. 過程.....	p7
5. 心得.....	p9
6. 建議事項.....	p9

摘要

基因治療的原理是將想要表現的基因利用各種不同方法送入細胞中。最常用的病毒載體是 retrovirus, adenovirus, lentivirus, 以及 adeno-associated virus (AAV)。自從 1989 年開始基因治療的臨床試驗，約 1708 個人體試驗已在世界各地展開。一半以上(63.9%) 是在美國進行，而 79% 是屬於第 I/II 期。人類的基因治療的挑戰是如何能成功地將足夠的病毒在體送入體內，而且讓他們到達要治療的細胞長久表現，並且無嚴重的免疫反應或其他副作用。對於如何讓病毒到達想要的組織是研究者長期努力的目標，也是基因治療成功的關鍵之一。為了達到此目標，許多研究者嘗試改變 AAV 病毒的外殼蛋白，希望能改變 AAV 病毒的趨向性。

美國佛羅里達大學是研究 AAV 病毒基因治療的重鎮，亦有長久研究骨關節疾病的歷史。本人有幸奉派至美國佛羅里達大學，觀摩人類基因治療進展，以及學習如何進行骨骼代謝異常疾病之細胞及基因治療。在 Dr. Barry Byrne、Dr. Steve Ghivizzani 的幫助下，我嘗試修改 AAV serotype 2 外殼，並以小鼠實驗觀察病毒載體趨向性的改變。並在張隆基教授的指導下，學習如何以 Lentivirus 修改間質幹細胞，以改變間質幹細胞的趨向性。

感謝醫院提供出國進修機會，使本人獲益良多，當以此次所學協助科內、院方朝更完善之目標努力。

前言

一、人類基因治療簡介

基因治療的原理是將想要表現的基因利用各種不同方法送入細胞中。目標細胞可以是生殖細胞或是體細胞。送入的基因可以取代、補充、或是抑制細胞內原有基因功能，或是直接殺死細胞來作用。治療的方法可以利用病毒或是其他載體，甚至直接注射裸露的 DNA。若是利用病毒當載體，需要考慮的狀況為此載體需要能進入目標細胞，成功地到達細胞核，並起能夠表現基因一段時間，而且沒有毒性。目前較常用的病毒載體為 Adenovirus, Adeno-associated virus, Retrovirus/Lentivirus, 或是 Herpesvirus。在這些病毒當中，只有 Retrovirus/Lentivirus 為 RNA 病毒，也只有它會嵌入細胞 DNA 中，而且只感染分裂中的細胞。AAV 的病毒最小，能夠攜帶的基因亦最小。

自 1990 年第一例人類基因治療以來，基因治療的研究已將近 20 年的歷史。第一個進行的人類基因治療是在 1990/9/14 日進行，醫師在患有 Adenosine deaminase 缺乏症的小女孩體內打入攜帶 ADA 基因的 Retrovirus。雖然患者體內的 Adenosine deaminase 酵素活性暫時獲得改善，但是目前仍需持續以酵素補充治療補充 Adenosine deaminase。1999 年有一位 Ornithine Transcarbamylase 缺乏症的患者在施打攜帶 OTC 基因的 adenovirus 載體後四天因嚴重免疫反應而死亡，讓研究者更致力於病毒載體修飾的研究。2002 年 X-SCID 患者在接受 Retrovirus 作為載體的基因治療後，有 4 位患者產生白血病。雖然此疾病的臨床試驗因此暫停一段時間，但是由於這些患者對傳統的化學治療反應良好，因此此項臨床試驗又繼續進行。2008 年基因治療有了令人興奮的進展，研究者利用 AAV 病毒補充 Leber's Congenital Amourosis 患者缺乏地 REP65 基因，讓患者得以重見光明，且幾乎無不良反應。這一年，FDA 亦核准了第一個基因治療的藥物 Advexom (Ad-p53)上市，以治療食道癌。2009 年法國的研究者成功在 Adrenoleukodystrophy 的患者注入以 Lentivirus 為載體修飾過的 ABCD1 基因，結果顯示可以延緩病人腦部白質的變化。一路走來，基因治療漸露曙光。

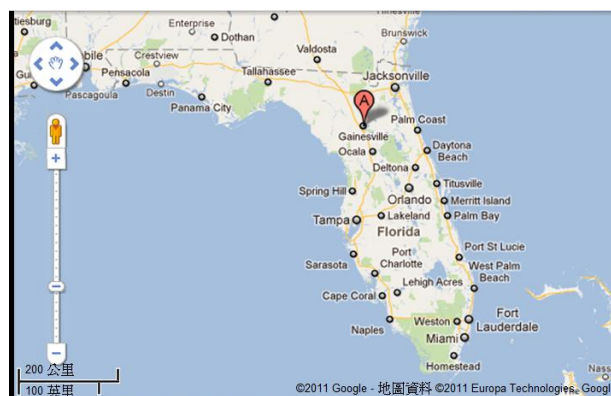
人類基因治療的研究重心，主要還是以歐美為主，尤其是美國，占了全世界基因治療臨床試驗的 63%左右。目前的研究，還是以 Adenovirus 及 Retrovirus 累積的臨床試驗為最多，而新興的載體如 AAV 及 Lentivirus 臨床試驗的數目則在增加當中。治療目標還是以癌症為大宗，心血管疾病及單基因疾病則緊追在後。在一千七百多個臨床試驗中，只有約 4%可以進入第三期臨床試驗，而且僅有小於 1%能夠成功上

市。有越來越多的臨床試驗以 AAV 做為病毒載體。它的優點包括在動物模式看到長久的表現以及相對來說較不會引起免疫反應，而且持續可以發展新的血清型。目前包括 Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Arthritis, Hemophilia, Leber congenital amaurosis, Pompe disease, Batten disease, Duchenne muscular dystrophy, Epilepsy, Cystic fibrosis, alpha-1 antitrypsin deficiency 等疾病皆在進行臨床試驗中。而 University of Florida 是目前研究 AAV 基因治療的重鎮。

二、University of Florida 簡介

University of Florida (簡稱UF)位於美國Florida的Gainesville, 主要為一大學城, 人口約124,354人。坐落於一望無際, 平坦的Florida中北部, 緊鄰Jacksonville與Orlando。氣候與台灣類似, 周圍有多個國家自然生態保護區。UF建教合作的Shands Hospital 的小兒科Shands Hospital for Children at the University of Florida 有六個次專科被選為全北最優的醫院之一(2011-12)。在基因治療方面, Shands Hospital亦是美國活躍於基因治療的研究機構。除了基礎研究外, 1996年在此開始進行Cystic fibrosis基因治療的臨床試驗, 2007年進行Leber's Congenital Amaurosis基因治療的臨床試驗, 今年亦首次進行Pompe Disease的基因治療臨床試驗。在基因治療的領域經驗豐富。我所在的實驗室位在Academic Research Building, 緊鄰Shands hospital, 方便臨床醫師與基礎研究人員活動。我進行研究的實驗室是Dr. Barry Byrne的研究室, 隸屬於小兒科及Powell Gene Therapy Center (PGTC)。指導教授是Barry Byrne, 期間並與骨科基因治療專家Dr. Steve Ghivizzani及Lentivirus與mesenchymal stem cell治療專家Dr. Lung-Ji Chang進行合作。Powell Gene Therapy Center唯一結合GLP與GMP的實驗室, 負責進行adenoassociated virus的病毒生產、純化、確認, pre-clinical study與clinical study的研究設計與進行, 是一個完整的基因治療機構。

Gainesville 位置圖



Shands Hospital at University of Florida 一隅



Academic Research Building 遠眺



與 Powell Gene Therapy Center GMP Lab Director Brian Cleaver 於 GMP Lab 合影



目的

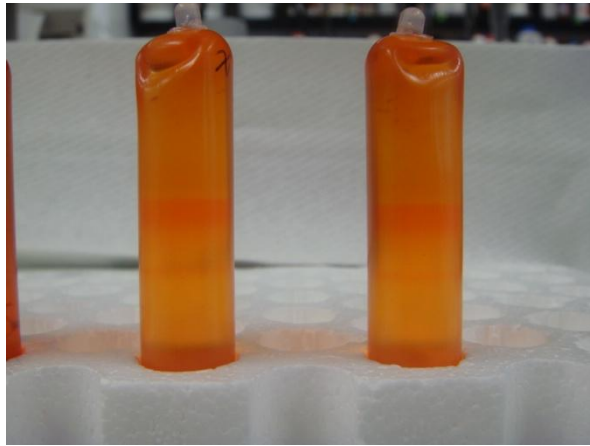
這一兩年細胞及基因治療有很大的進步，目前有不少研究都已經進入臨床試驗的階段。我們的病人大多為單基因遺傳疾病，因此我們想要將這些先進的治療應用在先天代謝異常的疾病。在罕見疾病中，黏多醣是一群緩慢進展但是全身器官都會被影響的疾病，目前治療的方式為定期施打患者所缺乏的酵素(Enzyme replacement therapy)。然而，在近幾年的酵素治療之下，我們發現患者的骨骼症狀，並無法經由酵素補充療法而改善。因此，我們希望能嘗試不同的治療方式，研究是否有方式能改善黏多醣的骨骼症狀的治療。University of Florida 那裏有 Steven C. Ghivizzani 在關節及骨骼疾病的基因治療上為世界的權威；Dr. Barry Byrne 為 adenoassociated virus (AAV) 的專家，因此我們希望能結合 University of Florida 專家的經驗，嘗試新的治療發展，以期能夠幫助黏多醣的患者。

過程

2010 年 8 月中，我獨自一人拎著行囊，搭上前往 Los Angeles 的飛機。經過約 24 小時的飛行及轉機，終於抵達了位於 Florida 中北部的 Gainesville。到的第一天，剛好遇上 FDA 要求 Dr. Barry Byrne 的團隊提供其他 Pompe disease 臨床前試驗的實驗資料，研究團隊正在解剖 AAV1 病毒治療後的兔子。所以有幸在還沒有到駐所前便可以一探 AAV1 治療兔子橫膈膜的神奇效果。在 Dr. Byrne 的幫忙下，我迅速的安頓了住所(尤其是 Internet!)，讓生活能快速上軌道。隔天花了一些時間到學校報到，上課，以取得在 UF 進行動物實驗的證明。在課堂中才見識到有如此多的海外醫師及研究人員選擇來此接受訓練、學習，深覺自己的選擇正確。

進修前三個月主要是熟悉該院各部門之工作、例行會議、討論等，並對 UF 健康照護體系、環境有概括的認識。在 Dr. Byrne 及 Dr. Ghivizzani 指導下，規劃研究設計，並且撰寫 UF 的 IACUC，及申請 IACUC。在 Dr. Clement 的協助下，學習 AAV vector packaging 的過程，了解 vector purification 的步驟以及如何 titrating viral vector。在對環境熟悉後，與團隊互動加強，在他們已熟悉及信任我的技術後，正式進修的生活開始繁忙，步調也加快許多。並開始準備實驗需要使用的病毒載體。

病毒質體(plasmid)純化過程



在規律的生活下，時間飛快的轉動，IACUC 終於在 2010 年底通過。於是在 2011 年初正式開始進行 AAV 載體趨向骨骼的小鼠實驗。在 Dr. Falk 的幫忙下，對於剛出生的小鼠施打 AAV 病毒，並學習如何照顧小鼠。四周後進行活體影像照相，觀察 AAV 病毒的生物分布。並將小鼠犧牲，進行病毒 DNA 的萃取及病理分析，以更了解病毒的趨向性。並在 Dr. Watson 的指導下學習如何進行小鼠組織的病理處理、脫鈣、切片及染色。除了 AAV 病毒之外，我亦 2011 年四月開始在 Dr. Lung-Ji Chang 的指導下，學習如何利用修飾 mesenchymal stem cell(MSC)來嘗試增加 MSC 對於骨骼的趨向性，學習如何做 cloning 及施打 MSC 入小鼠體內。此外，由於 2011 年四月正好有龐貝氏症患者進行橫膈膜注射的基因治療人體試驗，我有幸能夠觀摩，印象深刻。

日子過得很快，11 個月轉眼即到。在這短暫而充實的日子中，每天都有新的學習與發現，深覺獲益良多。然而天下沒有不散的筵席，時間到了，我收拾行囊，帶著滿滿的回憶，回到溫暖的家。回家後，將在 UF 的所學嚐試撰寫成文章，目前正在投稿當中。

心得

感謝醫院讓我有機會能夠出來看看外面不同的世界，深深覺得獲益良多。在這十一個月的日子裡，是人生中寶貴的經驗。放下繁忙的醫院生活，回歸實驗室單純的步調，專心探索面對的問題，實為難得的機會。很感謝一開始 Dr. Barry Byrne 的照顧，讓我很快能搞定生活上的瑣事，找到離實驗室很近的住所，以方便就近上班。除此之外，也藉由這次的機會進行學術交流，參訪了 University of Florida 內許多基因治療的實驗室，並認識美國其他大學研究基因治療的優秀學者。佛大一行，讓我深深覺得國外的研究步調、實驗進行、研究方法與學術討論的風氣，與台灣有很大的差異。希望能夠擷取他人之所長，彌補自己的不足，亦希望能將所見所聞帶回，以利國內研究。

除了專些學習相關領域知識之外，我發現在 UF 的醫師需要兼顧臨床、教學與服務，十分忙碌。與台灣不同處，他們的臨床試驗病房，並沒有住院醫師，主治醫師需要負責較多的環節，而且專科護理師的腳色增加，這是跟我們這邊比較不同的。當然，每個制度都有它的優缺點，並不一定看到別人怎麼做就全盤接收。

建議事項

在美國進修學習這 11 個月，難免有思鄉之情，然而把握難得機會，努力汲取專業技術及學習知識成長，亦是新的人生體驗。在國際交流頻仍的現代，把握進修機會對年輕醫師來說是很重要的歷練。以下為幾點建議：

一、資源整合

基因治療目前在美國正蓬勃發展，這一兩年許多疾病的基因治療在國外已正式進入臨床試驗。目前我國的基因治療病毒載體，僅有少數老師可以製作出大量且品質精純的產物，但是仍不足以進行臨床試驗。若醫院同意基因治療將是未來對於疾病可能的治療，希望醫院能整合各個研究機構，成立基因治療中心，提供研究者精良的病毒載體，並且協助生產臨床試驗之病毒載體與試驗的進行，以造福國內病人。

二、便利的基礎研究

在美國可以看到各個大學醫學院對於基礎研究的重視，UF 有著 AAV 研究的悠

久歷史，研究 AAV 的元老 Dr. Nicholas Muzyczka 亦是在 UF 任教。另外觀察到一點是 UF 的動物中心有好幾個地方，依照各個幾乎在需要動物研究的機構內便有一個動物中心的分支，這大大增加了研究者的方便性。這可以讓醫師在臨床服務之餘可以兼顧研究。