

## 訂製人類疾病小鼠--近觀諾貝爾獎得主：奧利弗·史密西斯

蔡曜聲，成功大學臨床醫學研究所

蔡佩珍，財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心

張程翔，成功大學基礎醫學研究所

江滿津，成功大學心血管疾病中心

*1980 年代的兩項重要發明，變動了整個生物醫學領域！*

*結合了哺乳類細胞基因標定以及胚胎幹細胞培養兩項技術，使得科學家們能夠創造出「基因剔除小鼠」以針對特定基因進行研究。藉由標定和移除特定基因，研究者能夠知道，一旦失去某特定基因所會發生的影響。筆者於2000~2006年美國留學期間，加入Oliver Smithies及Nobuyo Maeda夫婦所創立的實驗室，實際參與了建立人類代謝性疾病的小鼠模式。筆者對此美國科學研究的旅程不僅感到充實，且深深感受到Oliver Smithies對科學的熱愛，及其身為科學家的風範。*

### 訂製人類疾病小鼠

小鼠基因標定技術，為熟知的基因剔除技術，在2007年獲得了諾貝爾生理與醫學獎的青睞。利用小鼠的胚胎幹細胞，科學家能夠針對特定基因進行修飾作用(圖一)。而發展出此項技術的三位科學家：猶他大學(University of Utah)的馬里歐·卡佩奇(Mario R. Capecchi)、英國加地夫大學(Cardiff University in United Kingdom)的馬丁·埃文斯(Martin J. Evans)，以及北卡羅來納大學教堂山分校(University of North Carolina at Chapel Hill)的奧利弗·史密西斯(Oliver Smithies)，則共享了這份榮耀。

隨著基因標定技術的發展，科學家幾乎可以針對小鼠基因體進行任何DNA修飾動作，如此便能夠釐清某一基因在人類健康與疾病上所扮演的角色。迄今，已有超過一萬個小鼠基因，利用了基因標定技術進行研究，而這樣的基因數目，已將近哺乳類動物基因總數的一半！這項技術目前已被利用在許多人類疾病的研究上，像是心血管疾病、神經退化性疾病、糖尿病以及癌症……等。對於未來，國際間也已經有了合作計畫，預計在2010以前於小鼠達成約兩萬個基因剔除之目標！

### 1980 年代的研究：創新、合諧及美妙的三重奏

有許多方法能夠運用來進行基因修飾動作。同源重組是發生在兩個序列極度相似的DNA片段上，彼此重新排列而進行互換。運用同源重組的原理，我們能將特定的DNA片段放置在預定的位置。事實上，在1958年Joshua Lederberg正是利用細菌的研究，發現了同源重組的現象，而獲頒了諾貝爾獎。然而，哺乳類細胞的同源重組效率並不是很高。在1980年代初期，Smithies試圖利用修補突變基

因的方式，治療遺傳性疾病，即現今所謂的基因治療。在這樣的目標之下，Smithies 發現哺乳類細胞內的基因確實能夠被標記並置換。他將這項重大的發現發表在 1985 年的 Nature 雜誌當中(1)，證實他是如何成功地在紅白血病細胞當中，利用同源重組的方式，將一個質體插入染色體上面的  $\beta$ -globin 基因。

在同一時期，Capecchi 在 1982 年也獨立的觀察到在哺乳類細胞中，被轉入的 DNA 能夠與染色體上的親源序列進行同源重組(2)。隨後在 1986 年，Capecchi 更證實了藉由特殊篩選機制，同源重組的發生頻率，應足以直接應用在哺乳類的基因操作上(3)。

因此在 1986 年以前，Smithies 與 Capecchi 所發展的技術已經能夠應用在哺乳類細胞層級，但卻還不足以能夠製造出基因改造的實驗動物。若要能夠順利製作出基因改造的實驗動物，仍有待另一項關鍵的突破：胚胎幹細胞，一種具有潛力，能夠發展成為個體的細胞。

早在 1981 年，另一位科學家 Evans 即成功地從小鼠胚胎中分離出小鼠胚胎幹細胞(4)。1984 年，Evans 與其團隊更在 Nature 雜誌中發表，證明經過分離以及培養的胚胎幹細胞，能夠藉由注射方式送回小鼠的囊胚，並且移回代理孕母，進而產生含有由胚胎幹細胞繁衍的嵌合小鼠(5)。緊接著在 1986 年，Evans 試著將病毒基因轉入胚胎幹細胞中進行基因修飾，結果也顯示病毒的 DNA 確實送入了胚胎幹細胞，經過了嵌合小鼠，最後出現在小鼠的生殖細胞(6)。

1985 年 Smithies 便與 Evans 電話連絡，並且討論合作的可能。Evans 隨即停止他的實驗，帶著胚胎幹細胞樣本立刻飛往美國。Evans 剛回到英國不久，Capecchi 也立刻去英國拜訪了 Evans，並且向他請教了胚胎幹細胞的相關技術。兩年過後，1987 年 Smithies 首度的利用培養的胚胎幹細胞，利用同源重組的原理，成功的修正了 HPRT 突變基因(一個造成萊施-耐恩二氏症候群的關鍵性遺傳性突變基因)(7)。同年，Capecchi 也在胚胎幹細胞中，利用了 neomycin 抗生素耐受基因終止了正常的 HPRT 基因的功能(8)。置入抗生素耐受基因的策略，使得基因重組的過程當中能夠進行正負篩選動作(圖二)，而這樣的設計則納入了現今大部分的基因剔除固定流程之中。

1987 年 Smithies 以及 Capecchi 兩個團隊，各自將他們在胚胎幹細胞所進行的基因操作技術，發表在兩篇重要的文獻之後，1989 年，HPRT 基因修正小鼠以及其他基因剔除小鼠分別誕生於 Smithies(9)以及其他研究群的實驗室。這些基因改造及剔除小鼠的誕生，開啟了基因遺傳研究的新紀元。

### 在生物醫學研究的重要性

在基因標定技術發展以前，我們只能透過人類或是動物體上自然出現的基因突變，了解某個特定基因的功能角色，使得科學家們的研究處於被動。並且，由於只能利用遺傳法則的關聯分析，以及統計學的關係計算，部分的特定基因也只能曖昧的牽扯進某種疾病。儘管過去也可以利用添加方式調整基因產量來了解基因功能，但是卻無法解決基因與疾病之間的因果關係。憑藉著剔除特定基因進而了解基因功能，便可以區分基因與疾病之間的因果關係，或是相互的作用。這使得科學家能夠利用實驗方法主動的去測試基因功能，並且驗證他們建立的假說。Capecchi、Evans 以及 Smithies 的重大發展，徹底改變了當代的生物醫學研究，也因為他們建立了小鼠的基因改造模式，後續其他研究群更產生了相當多的基因改造小鼠，使得越來越多的研究者捨棄了大鼠，轉而利用小鼠作為研究模式。這項技術的運用在生物醫學領域也飛快成長。而對於解決人類疾病的問題，新的治療機制將被建立在基因標定小鼠模式的基礎上。毫無疑問的，「訂製小鼠」將引領生物醫學研究的進步(圖三)，潤澤了整個生物醫學界，提供了轉譯醫學的豐富平台，並且點亮你我的未來。

### 近觀諾貝爾獎得主：Oliver Smithies

1996 年，筆者在吳華林與施桂月教授的指導下，畢業於成功大學醫學院生物化學研究所。當我進行到碩士論文的最後部分時，面臨了一個難解的問題：我要如何將我已研究出的基因工程蛋白質，實際的應用在治療人類疾病？這是一個很實際的問題，也是我們作生物醫學研究的終極目標。在真正應用到人類試驗之前，須先建立一個動物實驗模式，針對研究出的物質進行測試。這是我開始認真思考關於動物實驗的可能。

經過幾分考慮，在 2000 年我決定投身於美國北卡羅來納大學教堂山分校病理學系參予研究計畫。基於針對動物實驗的熱誠及喜愛，我的第一選擇就是 Nobuyo Maeda 博士所屬的實驗室，因為我了解 Nobuyo Maeda 博士所建立的脂蛋白元-E (apolipoprotein E) 基因剔除小鼠，正被廣泛的利用在動脈粥狀硬化的研究上。然而，開始的幾個月我並不快樂，原因很簡單--課堂壓力、語言不通以及對於動物實驗的陌生。實驗室裡的儀器以及整體的環境都和我原本所想像的不同，遠遠的超出最早我對於美國科學夢的預期。「放棄」兩個字停留在我的腦海好一陣子，揮之不去.....直到有天我想通了!為什麼這個實驗室的成員都喜歡待在這裡?一定是有它的好，卻只是我沒有注意到而已。

2001 年初的冬天，當時仍是我未婚妻的蔡佩珍博士來到北卡大學找我，也因此我們與 Nobuyo Maeda 博士以及她的丈夫-也就是 Oliver Smithies 有了一次的餐敘經驗。在聊天的過程中，我發現 Oliver 竟是如此的謙虛而平易近人!他也說起了過去所發生的故事，而那彷彿像是我們在生物醫學課本裡面看到的一切!

## 從蛋白質化學到蛋白質遺傳學的轉變

在 1925 年 Oliver 出生於英國，並且從小就想當個發明家。1950 年他在加拿大的多倫多大學接下了第一份工作，並且開始他人生中第一個重大的發明。他最早的計畫是關於胰島素的研究，他相信胰島素是來自於一個前驅物質，而為了驗證他的想法，他必須找出可以將胰島素和胰島素前驅物質區分的方法。有一天，Oliver 總算是想出了解決方法，他利用煮過的馬鈴薯澱粉形成的膠體，放入胰島素於膠體中，經由電流使其達到分離的效果，因此發展出了高解析度膠體電泳的技術。這個點子在 1955 年公佈，並且成為日後最常被引用的生物科學文獻。高解析度膠體電泳技術的開發，也使得 Oliver 獲得了著名的 Gairdner Foundation International Award 獎項。

憑藉著好用的研究工具，Oliver 開始觀察是否蛋白質會受到遺傳因子的影響而出現變異。在膠體電泳中，他發現血液裡肝球蛋白(hepatoglobin)出現的對偶基因變異性，是因為染色體重組互換所造成的結果。他利用自己製作的簡易聚合酶鏈鎖反應儀(PCR)(圖四)，選殖出第二個人類基因--胎兒球蛋白基因(fetal globin gene)。他提出證據指出，胎兒球蛋白的對偶基因變異，是由於同源重組現象所造成。這個現象使得他從一個蛋白質化學家變成了蛋白質遺傳學家，也使得他開始致力於同源重組的研究。

那次餐敘過後，Oliver 給我的印象就不單純只是指導老師 Nobuyo 的先生而已，也因此我時常觀察著他，並向他學習。那年九月的某一天，實驗室裡有個大型的慶祝，北卡大學的校長、醫學院院長和病理系主任都跑來了實驗室，隨後我才知道是 Oliver 獲得了 Albert Lasker Medical Research Award 獎項，通稱是美國的諾貝爾獎。突然間，我明白到 Oliver 有多麼不平凡，儘管他平常是那樣的平易近人。

## 對科學的熱誠

Oliver 在實驗桌上的態度讓我得到很大的啟發，至今已 82 歲高齡的他，仍然每天親自做實驗。他依然使用著過去他發明的乾式膠體電泳，並且還使用著他開發製作的溫度循環水槽進行聚合酶鏈鎖反應(圖四)，那是在聚合酶鏈鎖反應自動機器還沒有被發展出來前就已架好，歷經 20 年的古董。他就只是熱愛在工作當中，並且渴望了解現象是如何發生的。「並不是成就感」，Oliver 解釋：「好奇心是讓我想這樣的工作態度，嘗試去解決問題，並且獲得解答」。他接著說：「當你置身在研究工作當中，每一天都有件事物能讓你享樂其中，那麼科學研究一點也不會無聊，因為每天都有的新發現在等著你」。

Oliver 分享著他最愛的三樣興趣：做科學、和太太 Nobuyo 一起吃午餐以及開著他的小飛機在天空翱翔。不過大家都不太敢領教他的飛航功力，包括他的太太 Nobuyo 也是，但是 Oliver 還是常常找我們陪他一起飛行。Oliver 說：「當你飛翔

在雲層之中，卻只能完全依靠簡單的儀表找出你現在所在的位置，那種感覺就好像是在伸手不見五指的暗房裡，透過顯影劑等待著實驗結果在底片出現一樣。」 Oliver 以撥雲見日來形容他看到重要實驗結果的那一刻。透過這件事情也可以知道，Oliver 內心是急切的想看到問題的結果，並且想得到真正的解答。

### 真正的科學家

Oliver 教導我論文寫作的方式也是讓我印象深刻。某個星期六，他花了整個下午的時間，從我的原稿上將不恰當的單字一一改正出來，並且立刻翻出字典找出每個單字，告訴我它們的正確定義。自從那個下午之後，我知道了如何更正確地使用英文單字。Oliver 的耐心也能在我們實驗室的例行會議中顯現。關於腎小球過濾速度的觀念我們已經聽了快要上千遍了，然而他還是很仔細的敘述清楚，他盡其所能的讓會議室裡的每個人都清楚現在所討論的癥結，特別是那些剛來實驗室的新鮮人。

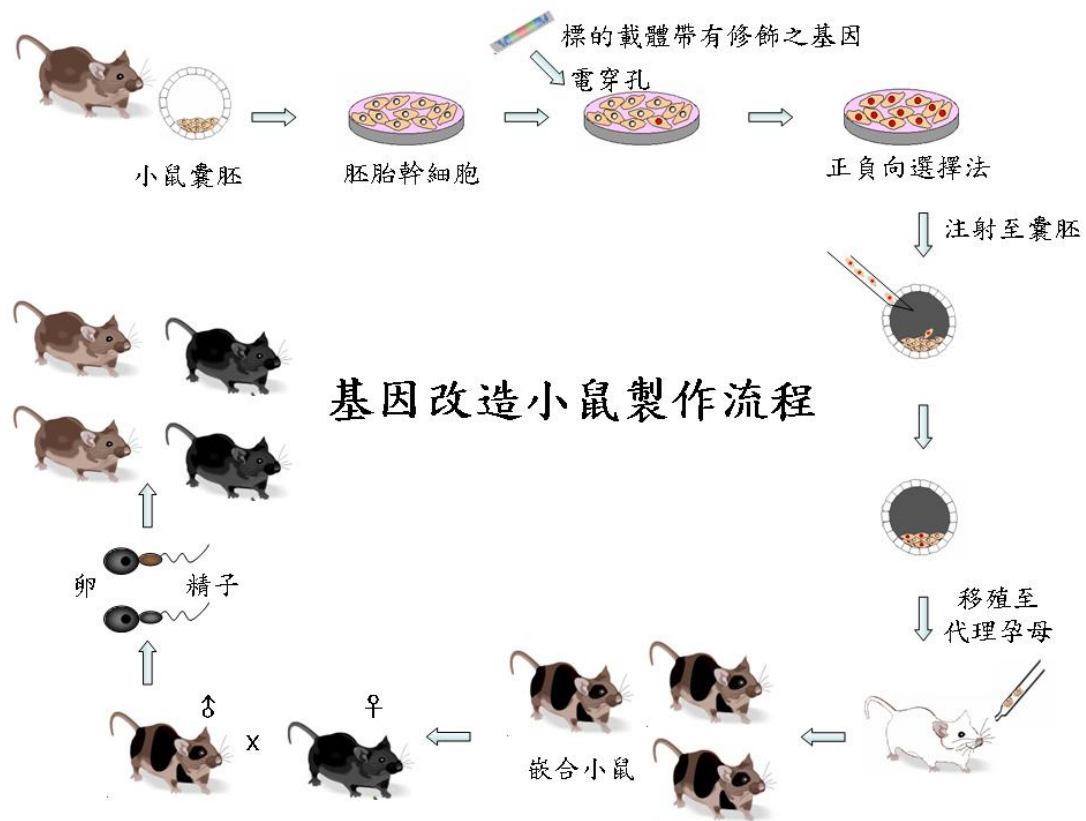
在這一次諾貝爾獎慶祝派對上，實驗室的成員對於 Oliver 的成功找出了三個關鍵：努力工作、熱愛科學以及擁有一個好賢內助(Oliver 立即更正為美好的賢內助)。一路走來，Oliver 不斷地找出關鍵的問題，並靠著雙手實作的找到答案，他提出了創新的解決方法，並且製造影響深遠的重要發明與發現，幫助了生命科學研究上的突破。他是我所見過最紳士而慷慨無私的人，並且不愛自吹自擂。若沒有遇到 Oliver，我的美國科學研究旅程也許就得不到那麼多的收穫。從 Oliver 身上，我明白一個諾貝爾獎得主也能夠如此的謙虛、仁慈以及平易近人。Oliver 以及 Nobuyo 所教導我的不只是在研究實務上，更讓我知道科學家應有的態度及作法。我會謹記如此的科學精神，並且貫徹在我日後的專業研究上。

### 附註

圖五、六、七、八為 Oliver 的一些生活紀念留影

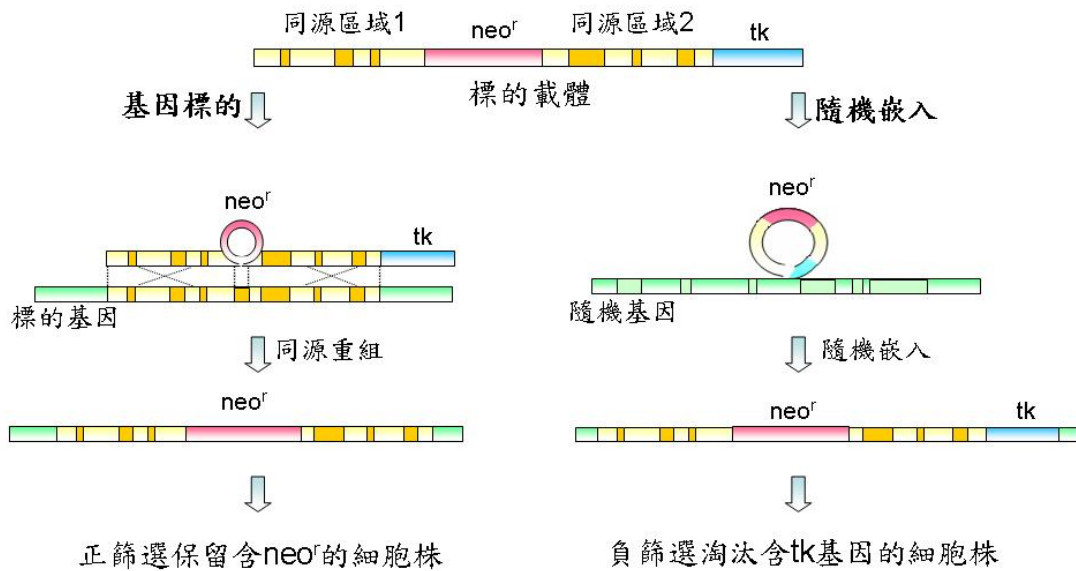
## 参考文献

1. Smithies, O., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Koralewski, M.A., and Kucherlapati, R.S. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317:230-234.
2. Folger, K.R., Wong, E.A., Wahl, G., and Capecchi, M.R. 1982. Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol Cell Biol* 2:1372-1387.
3. Thomas, K.R., Folger, K.R., and Capecchi, M.R. 1986. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 44:419-428.
4. Evans, M.J., and Kaufman, M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
5. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-256.
6. Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., and Evans, M. 1986. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323:445-448.
7. Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S., and Smithies, O. 1987. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330:576-578.
8. Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
9. Koller, B.H., Hagemann, L.J., Doetschman, T., Hageman, J.R., Huang, S., Williams, P.J., First, N.L., Maeda, N., and Smithies, O. 1989. Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8927-8931.



圖一、基因改造小鼠製作流程。操作這項技術，科學家們必須先將變異的基因片段送入小鼠胚胎幹細胞中。經過適當的篩選以及培養(圖二)，基因修飾過的胚胎幹細胞會利用微注射技術送到小鼠囊胚中，並進一步的植入代理孕母。代理孕母所產下的小鼠，被稱之為嵌合小鼠，而已經被修飾過的基因則可以利用遺傳的方式，透過繁殖方法傳遞給子代。

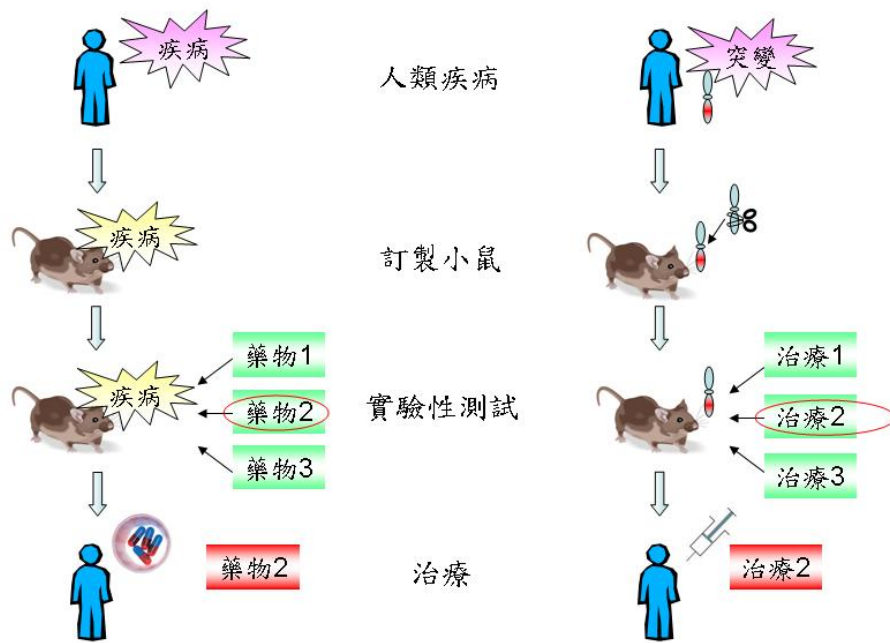
## 正負向篩選法



圖二、正負向篩選法。Capecchi 在 1988 年發展出一種現今普遍運用於基因標的技術的"正負向篩選法"，來增加篩選具改造基因之胚胎幹細胞的機率。利用對 neomycin (neo<sup>r</sup>) 產生耐受性的 DNA 片段取代並中斷標的基因的 exon，並將胸腺嘧啶核苷酶(thymidine kinase; tk)的 DNA 片段置於尾端。若與標的基因進行同源重組後，會產生只具 neo<sup>r</sup> 基因的 DNA 片段，而與隨機基因進行隨機嵌入則會產生含 neo<sup>r</sup> 和 tk 基因的 DNA 片段。



## 訂製人類疾病小鼠



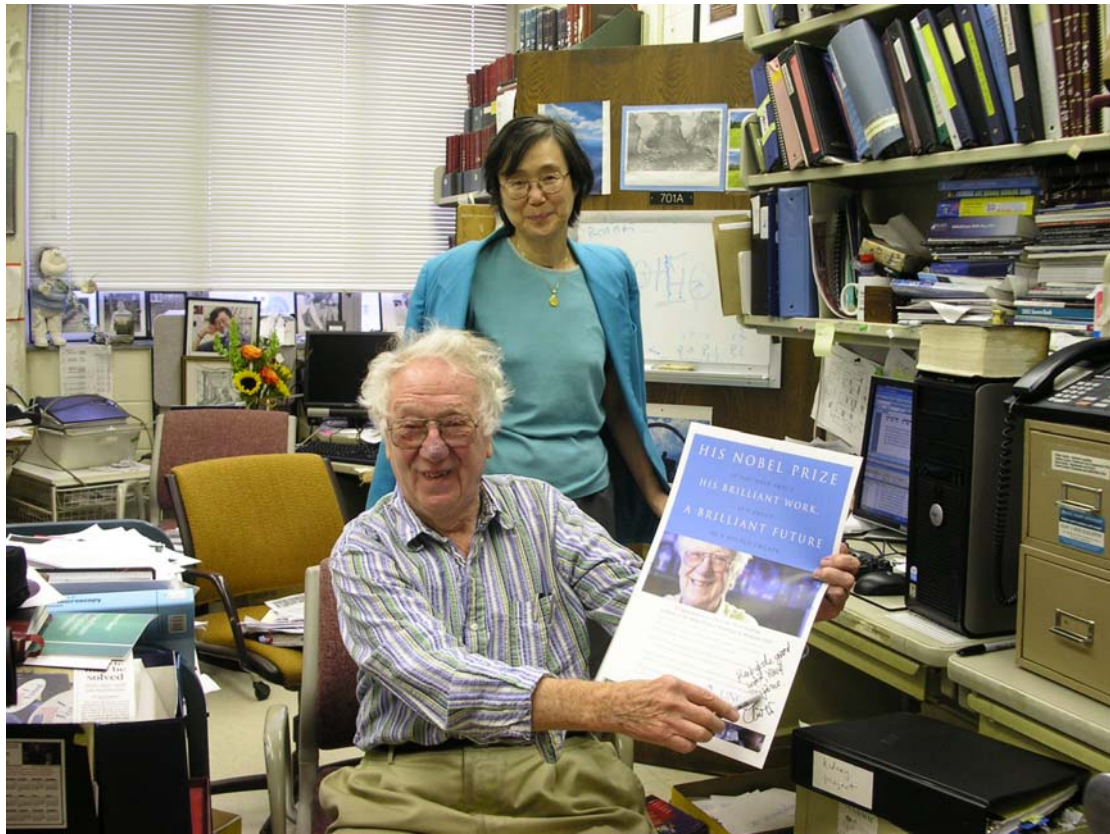
**圖三、訂製人類疾病小鼠。** 假設科學家能夠訂製一個客製化的實驗動物，來進行測試並且尋找合適的治療方式，那麼對於人類疾病的治療將會有重大的進展。此外，人類疾病中發現的特定基因突變，我們也可以置入小鼠模式，進一步測試各種不同的治療方法。在 1980 年代的一連串重要技術發展，使得生物醫學研究得到了一個無往不利的神兵利器。



圖四、在實驗室由 Oliver 製作的聚合酶鏈鎖反應儀。



圖五、美國北卡大學在宣佈諾貝爾獎的星期一下午召開記者招待會。

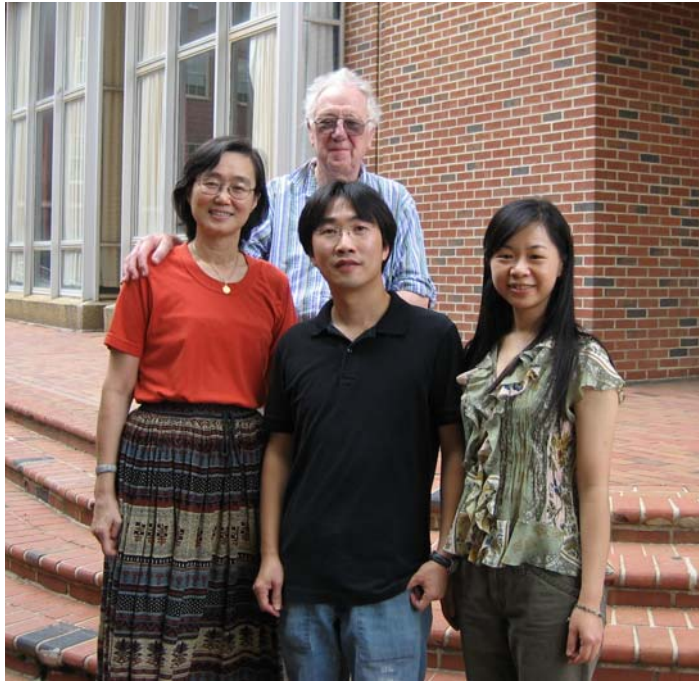


圖六、2007 年 Nobuyo 和 Oliver 與他的慶祝海報合照。





圖七、2000 年 Oliver Smithies/Nobuyo Maeda 實驗室大家族。



圖八、2006年 Nobuyo、Oliver、佩珍和我拍攝於我的送別會後。