

第八章

基因轉殖動物模式在新藥測試之運用

Transgenic Models for Pharmaceutical Applications

錢宗良

台大醫學院 解剖學暨細胞生物學研究所 副教授

一、前言

由於後基因體時代的來臨，探討各種基因在生命個體的生理功能，已成為目前生物醫學研究的重點工作。人類許多疾病的病理機轉已藉由基因體學研究，找尋到許多相關的致病基因。而針對特定基因突變產生之疾病動物模式，在臨床藥物測試運用上也因此更為廣泛。近年來基因轉殖鼠技術的建立，更為藥廠的藥物研發開出一扇窗。何謂基因轉殖（transgenetics）？基本的定義即是將我們欲探討的基因不論正常或已產生突變，藉由生殖細胞傳遞到下一代生命個體中。而在哺乳類的實驗動物中，小鼠（mouse）因繁殖飼養容易，平均壽命約兩年，相對並不太長。因此，利用小鼠做為基因轉殖動物，研究的過程可兼顧時效性，而研究的成果亦較為貼切於人類發育及其遺傳疾病之模式。故從 1980 年代起，基因轉殖鼠技術逐漸成熟，而在 1990 年代以後，基因剔除轉殖技術進一步的推廣，基因在生命個體的生理功能更可具體驗證。至此 21 世紀之初，人類及小鼠所有的基因定序完成，更擴大基因轉殖鼠在生物醫學研究的運用層面。

二、實驗小鼠類型：基因轉殖及自然突變種

- 1、傳統基因轉殖：將欲探討的基因直接打入動物的受精卵。典型的例子即是將已知人類致病的基因打入小鼠受精卵，在小鼠體內表達人類的致病基因產物，進而在鼠體細胞或組織產生類似人類疾病的病理特徵。
- 2、基因剔除轉殖（knock out）：將欲探討的基因在胚胎幹細胞（embryonic stem cells）內先行破壞，再利用複雜的胚胎轉殖技術，獲得基因剔除轉殖動物。目前仍以小鼠為最普遍用於建立這類基因轉殖之動物，原因在於小鼠胚胎幹細胞最早建立，其細胞操作標準程序且相對較為容易⁽¹⁾。而小鼠基因庫定序也跟隨人類基因庫完成，在分子及細胞階層的功能研究也較完整。因此，目前已有許多生技公司投入並提供相關技術服務。

3、自然突變種 (nature mutants): 早在小鼠基因庫定序未完成前, 有許多實驗小鼠藉由固定的繁殖, 利用基本遺傳的定律篩選出而建立具有特殊表徵的品系。近年來經由陸續的研究, 許多自然突變種的特定基因均已被發現。尤其是再藉由基因剔除轉殖小鼠的表徵加以確認, 使這些過去偏重形態與病理特徵研究的自然突變種, 其基因功能得以在分子生物及細胞生物研究中獲得驗證。因此, 這類自然突變種仍可被廣泛運用在藥物測試實驗中。

三、神經疾病的小鼠動物模式

就基因轉殖動物模式而言, 所轉殖之致病基因大抵上均在人類病患上有初步的確認。因此, 在藥廠測試新藥時, 可迅速偵測動物的病理變化。例如老年痴呆症的小鼠模式動物腦中, 老年斑之形成與人類的神經組織切片所觀察到的病理形態具一致性。雖然小鼠的藥物測試的時程上, 仍需長達一年至兩年, 然而, 以實驗動物所得到的藥效評估, 比運用在人類病患測試而言, 其測試效能較快且具體。尤其針對慢性神經退化的疾病所研發的藥物而言, 過去有許多大國際藥廠研發部門如 Novartis Pharma Ltd, 投入研究老年痴呆症中典型的阿滋海默症 (Alzheimer's Disease), 利用研究人類澱粉樣前驅蛋白 (Amyloid beta Precursor Protein, APP) 的基因突變, 進而建立良好的基因轉殖小鼠模式供其測試相關藥物⁽²⁾。目前現有的動物模式, 可參考美國實驗動物最大機構 The Jackson Laboratory 所提供的網站 <http://jaxmice.jax.org/index.html> 往下查詢, 即可獲得許多不同品系的基因自然突變或基因轉殖小鼠 (<http://jaxmice.jax.org/library/models/ad.pdf>)。舉例而言, 由 Dr. David R. Borchelt (The Johns Hopkins University) 所捐贈的基因轉殖小鼠, 同時表達人類 presenilin 1 (A246E variant) 及 chimeric amyloid precursor protein (APPSwe), 在此基因轉殖小鼠 (B6C3-Tg (APP695) 3Dbo Tg (PSEN1) 5Dbo/J) 十到十二個月大時候, 腦中即會形成老年斑⁽³⁾。從 The Jackson Laboratory 獲得的部份特定基因轉殖小鼠, 仍需簽定物品轉移協定 (Material Transfer Agreement, MTA), 以規範研究專用, 不得再轉為商業用途。至於許多藥廠自行研發建立起的基因轉殖動物模式均有申請專利。因此, 一般學術研究所需的基因轉殖動物, 只能從 The Jackson Laboratory 查詢訂購獲得。

利用人類突變基因的特性, 製造出基因功能上缺陷的動物模式廣泛運用在神經性退化疾病研究與藥物測試中。例如基因轉殖小鼠攜帶人類 Superoxide dismutase one (SOD1) 突變基因 (glycine to arginine at amino acid position 93) 的過量表達, 導致運動神經元退化, 類似人類脊髓側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) 的典型動物模式 (http://jaxmice.jax.org/jaxmicedb/html/model_1595.shtml)⁽⁴⁾。此類型基因轉殖鼠的神經病理特徵非常類似 ALS 病患。因此, 廣泛運用在測試許多神經滋養因子或是藥物在實驗動物神經退化過程中的作用與效能。此種動物模式, 就如同 APP 基因轉殖鼠一般, 對於研發防止神經細胞退化, 或減緩神經細胞死亡等的新藥的功能測試, 均可提供良好的動物測試平台。

但是不可否認的, 利用基因轉殖動物模式來解釋或是測試人類疾病的病因, 仍有許多應

該注意的地方。畢竟，小鼠與人類的基因背景仍有許多不同之處。舉例而言，在睫神經滋養因子 (Ciliary Neuron Trophic Factor, CNTF) 之基因剔除小鼠，其運動神經元發育則受到嚴重影響，甚至導致動物死亡⁽⁵⁾。然而在人類，即使在遺傳基因上缺少或喪失表達睫神經滋養因子，這些人的運動神經元及其他神經功能均仍屬正常⁽⁶⁾。由此例可得知，並非所有基因剔除的小鼠，均適合用來解釋或代表人類的某些特定疾病。這可能是由於人類的基因庫中仍然存有許多小鼠沒有的功能性基因，可以補償已剔除之基因功能。

四、肥胖症的小鼠動物模式：

目前已有許多突變或是基因剔除的小鼠動物模式可用來研究肥胖症。而其中最典型且運用甚廣的是一種自然突變小鼠 (C57BL/6J-Lep^{ob})，這種小鼠在基因上是因 leptin 缺損，導致肥胖及糖尿病的症狀⁽⁷⁾。相對於 leptin receptor 的基因缺損，亦有另一種自然突變種 (B6.Cg-m Lep^{db}/++)，亦有呈現肥胖及高血糖 (hyperglycemia) 的症狀^(8,9)。此類小鼠均可運用在部分研究肥胖的實驗藥物或食物測試上。研究顯示 leptin 是正常脂肪細胞均會製造的一種激素。它可作用在許多組織中，尤其是腦中的下視丘，負責控管飲食區域的神經細胞。如果體內脂肪過多，正常的 leptin 可將訊息傳遞給腦，告知不需要再進食太多了。然而，如果脂肪細胞的 leptin 基因出了問題，或是下視丘的神經細胞 leptin receptor 出了問題，均有可能導致動物無法感受到飽意。而持續進食進而導致過量能量攝取引發肥胖的嚴重後果⁽¹⁰⁾。但在藥物研發上，減肥藥的作用運用在神經系統上，仍有許多副作用，需進一步考量。而 leptin 及 leptin receptor 基因缺陷的小鼠動物模式僅提供部分可能的藥物測試功能，畢竟肥胖的機轉在人類似乎比一般動物更加複雜許多。

五、癌症的小鼠動物模式：

許多人類疾病的病因並非單一基因出現問題，而是有許多基因，或甚至外在因子的影響才造成的，例如癌症的變化。因此，目前並沒有十全十美的動物模式適合運用在探討多重基因參與的疾病上，僅能就個別造成細胞變化的機制中，分別針對特定基因的產物變化，設計或尋求藥物之運用。換言之，嘗試治療多重因子參與的人類疾病，絕對沒有單一靈丹妙藥就可解決所有的問題。類似這種類型的疾病可分時段，分細胞類型，利用基因體等許多技術，個別找出致病機轉及其因子，才有可能以個個擊破的方式，找尋到完整治療的解決之道。

舉例而言，以抑癌基因 (tumor suppressor gene) p53 為典型例子，早期研究認為 p53 對於細胞繁殖週期影響非常大，然而，在 p53 基因剔除後的基因轉殖小鼠，不僅胚胎期發育正常，甚至可以發育成具有生殖力的成體動物⁽¹¹⁾。雖然，此項發現對於研究 p53 基因功能者打擊甚大，然而此 p53 基因剔除轉殖小鼠卻仍然廣泛地運用在癌症研究上，畢竟此品系小鼠仍有非常高的機率會產生腫瘤。目前 p53 基因剔除轉殖小鼠 (C.129S2 (B6) -Trp53^{tm1Tyj}/J)

(12) , 可從 The Jackson Laboratory 查詢訂購獲得。在 The Jackson Laboratory 仍有許多其他可以運用在癌症研究或是抗癌藥物測試的相關小鼠品系。或是可從美國國家癌症中心 (National Cancer Institute) 網站上網查詢適合的小鼠動物模式 (<http://cancermodels.nci.nih.gov/mmhcc/index.jsp>)。美國國家癌症中心在網站上建立了人類癌症的小鼠動物模式聯盟 (The Mouse Models of Human Cancers Consortium), 提供非常完整的資訊給癌症研究者。

六、小鼠動物模式資料庫：

在 The Jackson Laboratory 的網站上 (<http://jaxmice.jax.org/index.html>), 可以針對每一研究領域或是主題, 分別找到相關的小鼠動物模式及其研究資源與參考資料。至於其他實驗動物如大鼠 (rat)、兔子等, 利用藥物或手術所建立起來的人類疾病動物模式, 可參考教育部顧問室補助由醫藥基因生物技術教學資源中心主編之「後基因體時代之生物技術」一書中第九章, 由國家動物中心梁善居主任撰文「人類疾病之動物模式」查詢得知, 在此就不再贅述。

以下為 The Jackson Laboratory 的網站上所列之研究領域主題：

- 細胞凋亡研究 Apoptosis Research
- 癌症研究 Cancer Research
- 心血管研究 Cardiovascular Research
- 細胞生物學研究 Cell Biology Research
- 皮膚學研究 Dermatology Research
- 發育生物學研究 Developmental Biology Research
- 糖尿病及肥胖研究 Diabetes and Obesity Research
- 內分泌缺失研究 Endocrine Deficiency Research
- 血液學研究 Hematological Research
- 免疫及發炎研究 Immunology and Inflammation Research
- 內科/臟器研究 Internal/Organ Research
- 新陳代謝研究 Metabolism Research
- 小鼠/人類基因同源研究 Mouse/Human Gene Homologs
- 神經生物學研究 Neurobiology Research
- 生殖生物學研究 Reproductive Biology Research
- 研究工具 Research Tools
- 感覺神經研究 Sensorineural Research
- 病毒學研究 Virology Research

七、結語：

雖然目前仍以小鼠為最廣泛運用的基因轉殖動物模式，但人類的基因庫中仍然存有許多小鼠沒有的功能性基因，很可能可以補償剔除基因之功能。因此，在選擇藥物測試的基因轉殖動物模式上，除了確認基因產物有相同細胞功能外，原則上動物的病理結構變化仍須符合人類的疾病基本病徵，才適合運用及進一步分析藥物可能的成效。而如同本文論及多重因子參與的人類特殊疾病如癌症等，更須慎選動物模式並深入探討基因與藥物在生命個體內的交互作用，以期能為人類健康與永續發展找尋出一條康莊大道。

八、參考文獻

1. Evans, M.J. and Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**:154-6 (1981).
2. Calhoun, M.E., Wiederhold, K.H., Abramowski, D., Phinney, A.L., Probst, A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., and Jucker, M. Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* **395**:755-6 (1998).
3. Borchelt, D.R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M.K., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., and Sisodia, S.S. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **19**:939-45 (1997).
4. Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**:1772-5 (1994).
5. Masu, Y., Wolf, E., Holtmann, B., Sendtner, M., Brem, G., Thoenen, H. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* **365**:27-32 (1993).
6. Takahashi, R., Yokoji, H., Misawa, H., Hayashi, M., Hu, J., and Deguchi, T. A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat. Genet.* **7**:79-84 (1994).
7. Stoehr, J.P., Nadler, S.T., Schueler, K.L., Rabaglia, M.E., Yandell, B.S., Metz, S.A., and Attie, A.D. Genetic obesity unmasks nonlinear interactions between murine type 2 diabetes susceptibility loci. *Diabetes* **49**:1946-54 (2000).
8. Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I., and Morgenstern, J.P. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* **84**:491-5 (1996).
9. Chua, S.C. Jr, Chung, W.K., Wu-Peng, X.S., Zhang, Y., Liu, S.M., Tartaglia, L., and Leibel, R.L. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*

271:994-6 (1996).

10. Benoit, S.C., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog. Horm. Res.* **59**:267-85 (2004).
11. Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A. Jr, Butel, J.S., Bradley, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**:215-21 (1992).
12. Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T., and Weinberg, R.A. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* **4**:1-7 (1994).