

# Genetics in Stem Cell; From Discovery to Therapy

洪楨邦<sup>1,2</sup> 黃永鑫<sup>1,2</sup> 陳一心<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> 台大基因體醫學研究中心

<sup>2</sup> 台大醫學院臨床基因醫學研究所

<sup>3</sup> 台大醫學院臨床醫學研究所

**Allan Bradley**博士師承2007年諾貝爾獎得主 **Sir Martin Evans**，是胚胎幹細胞與基因工程領域的世界級領導人物，對幹細胞研究的發展貢獻卓越，有許多新的生物技術由他所創立或改良，他不僅曾任全世界最大之基因體中心**The Wellcome Trust Sanger Institute**的執行長 (2000-2010)，目前也是英國皇家科學院的院士。

**Allan Bradley**博士首先提到在24年內已經製作出超過6000隻的基因剔除(**Knockout**)小鼠，而這些小鼠提供了非常多的訊息，但是一次剔除一個老鼠的基因就是一個漫長的過程，要探知基因的功能需要更長久的時間。因此，**Allan Bradley**博士以小鼠胚胎幹細胞為材料來研究基因功能，並巧妙地利用**bloom(Blm) deficient**的方法來作功能性隱性基因篩選。

## (1)利用Blm-deficient小鼠胚胎幹細胞:

研究人員遇到最大的困難點在於，由於一個基因的兩個等位基因都有功能，如果只剔除或突變其中某一基因，另外一個基因仍然會有功能，因此無法拿來模擬此基因全剔除的情形。那麼，要如何在小鼠胚胎幹細胞剔除兩個等位基因呢？或者是說要如何得到同源剔除的胚胎幹細胞？Allan Bradley博士有Blm-deficient小鼠胚胎幹細胞，此種小鼠胚胎幹細胞和野生型(Wide Type)比較，Blm-deficient胚胎幹細胞具有較高的有絲分裂重組發生率，一旦發生有絲分裂重組，其子代細胞就有可能有基因由異型合子變成同型合子。舉例來說，當研究人員剔除兩等位基因之某一等位基因，因此形成異型合子，若是要等待野生型胚胎幹細胞從只帶一突變等位基因的異型合子，變成兩等位基因都帶突變的同型合子，自然發生的機率極低，約莫為 $10^{-5}$ ，但Blm-deficient胚胎幹細胞卻可以提高20倍的有絲分裂重組發生率，變成同型合子的機率為五千分之一，因此大大提高變成由異型合子同型合子的機會。

## (2)突變形成(Mutagenesis):

為了製造突變來研究基因功能，研究人員應用基因誘補載體(gene trapping vector)，來產生突變形成:

### (a) 反轉錄病毒(retrovirus)

為反轉錄病毒，可辨認特定序列，並將特定序列中的DNA片段插入染色體中，以DNA mismatch repair screen的例子來說，藉由反轉錄病毒插入的DNA片段並經過6-TG篩選後，並利用上述Blm-deficiency的概念，可得到同型合子的突變株，經過進一步分析後，發現Msh6和Dnmt1基因與DNA mismatch repair有關；然而retrovirus由於有插入位置的熱區，因此造成惟有特定區域的基因會被插入並產生突變，使得研究人員無法得到非插入熱區的基因訊息，為了解決此問題，Allan Bradley博士引進了第二種突變型成方法: PiggyBac transposase。

## (b) PiggyBac轉位酶(transposase):

**PiggyBac DNA 轉位酶**使用”複製及貼上”的方式插入DNA片段(跳躍子, **transposon**)，其好處在於**PiggyBac**轉位酶並沒有插入的熱區，因此可以隨機的插入染色體中，同時使插入片段跳出後，並不會在染色體留下任何DNA，因此不會造成DNA **frameshift**。同樣以DNA **mismatch repair**篩選為例，經6-TG篩選後，除**Msh6**可得到同型合子突變株之外，亦可以得到**Msh2, Mlh1, Pms2**的同型合子突變株(失去功能)，也就是說，比用反轉錄病毒多找到**Msh2, Mlh1, Pms2**基因也參與在DNA **mismatch repair**。總而言之，**PiggyBac DNA**轉位酶是一個產生突變形成(的合適工具)。

**Allan Bradley**亦介紹如何用基因標的(**gene targeting**)的方法，來矯正帶有基因突變的多能幹細胞(**iPS**)。**Allan Bradley**博士挑選了自體隱性遺傳的 **$\alpha$ 1-antitrypsin deficiency**這個疾病來作為矯正的對象， **$\alpha$ 1-antitrypsin deficiency**是歐洲發生率最高的肝臟遺傳性疾病之一，致病原因中常見的是 **$\alpha$ 1-antitrypsin gene**有一個點突變(**Glu342Lys**)，會使製造出來的蛋白形成多聚體而堆積在肝臟細胞的內質網中，進一步造成肝纖維化。由於是自體隱性遺傳疾病，也就是兩個等位基因都帶有突變，因此要治療就必需要將兩個等位基因都矯治。

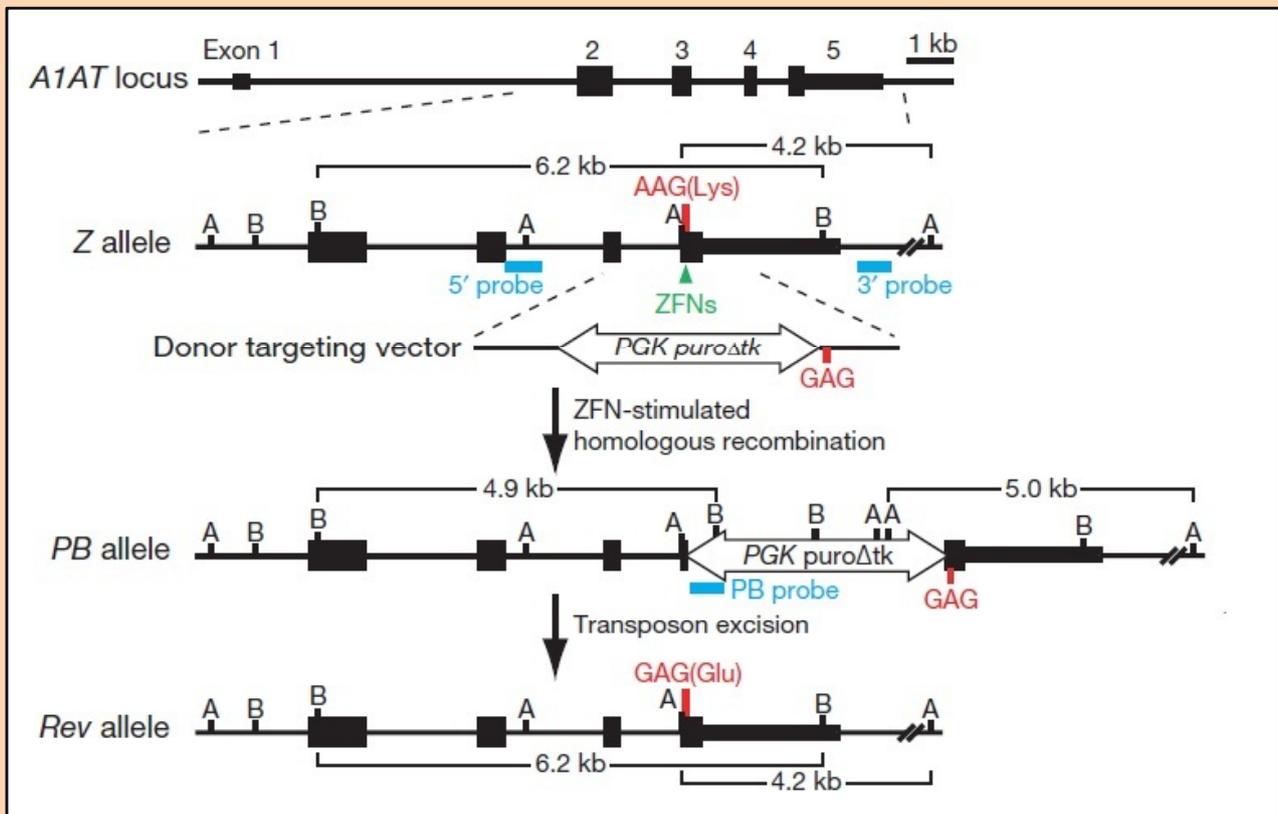
整體的策略是將帶點突變的體細胞再程序化(**reprogramming**)後形成多能幹細胞，矯正突變後，在體外分化成帶正常功能的體細胞，再進一步移植回病人的肝臟，以達到治療的目的。這個過程很關鍵的步驟是要矯治兩個等位基因，但過程中會遇到兩個問題：第一點，要矯正點突變，可以用同源置換(**homologous recombination**)的方法置換入正常基因，但效率不是很高；第二，同源置換的基因需插入一段抗藥基因才能做篩選，但是插入抗藥基因卻會有外來基因的疑慮。

對此，**Allan Bradley**博士採用鋅指核酸酶（**Zinc Finger Nuclease, ZFN**）的技術來高效率且準確地達成兩個等位基因的同源置換(見圖1.)，至於插入抗藥基因的問題，**Allan Bradley**博士很巧妙地在同源置換基因中擺入[TTAA<跳躍子帶有藥物篩選基因>TTAA](TTAA是指核酸序列，是跳躍子靠轉位酶跳入及跳出時辨認的序列)，使得成功藥物篩選後，可以將整個抗藥基因不留痕跡地跳出，只留下原本的TTAA的序列。非常聰明的一點是，**Allan Bradley**博士將這個留下的TTAA序列的位置，選擇在對這個基因而言是沉默突變的地方，也就是不會造成胺基酸的改變。還有一個問題是，由於是同時矯治兩個等位基因，因此兩個等位基因上的藥物篩選基因也必需都跳出才行，因此必需想辦法提高跳出的效率，而現在**Allan Bradley**博士也已經有了高功能性的轉位酶(**PiggyBac transposase**)來達成此一目的。

按照上述方法，**Allan Bradley**博士成功地做出矯治成功的多能幹細胞，並且證明這樣子的多能幹細胞在分化成似肝臟細胞時，是有功能，而且已經不會有多聚體的產生。在安全性的方面，**Allan Bradley**博士發現在再程序化(**reprogramming**)、鋅指核酸酶(**ZFN**)作用以及跳躍子跳出時，各可能造成少數的基因突變，但他認為在仔細挑選之後，可以找到突變最少，且突變位置皆不重要的細胞株，這樣子就有機會安全地用在病人身上。



左至右：  
洪楨邦、黃永鑫、  
陳一心



(圖1. 節錄自 Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, et al. Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* (2011), 478: pp. 391-394.)