

新興生技在異種移植之應用及進展

撰文/杜清富

前言

由於移植醫學進步，人類器官衰竭患者可藉由成功器官移植而延續生命，不過器官捐贈數不足，導致患者常於等待移植器官時往生。美國一年約有 12.4 萬人等待器官移植，獲得移植治療僅 2.8 萬人，我國每年約有 8,600 人等待器官移植，約 200 人獲得捐贈移植。因嚴重器官短缺，使學界尋求異種動物之器官來源，在動物中除了非人靈長類之外，豬隻組織器官在解剖構造及生理功能與人類最為近似，其器官、組織或細胞一直被認為是人類異種移植最佳來源。然而，移植人體之豬隻異種移植體 (xenograft)，將遭遇複雜排斥反應，包括半乳糖 / 非半乳糖之自然抗體及補體活化反應等超急性排斥、人類血液在移植器官血管內產生栓塞與微血管病變、免疫系統之急性排斥及慢性排斥等。此等排斥問題除了藉由抗排斥藥物抑制之外，需藉由基因工程之相關技術克服。

過去已藉由基因轉殖技術成功開發抑制補體活化、血管栓篩及免疫排斥反應之基因轉殖豬。另藉由 DNA 同質重組作用 (homologous recombination, HR) 及複製技術，產製半乳糖轉移酶 (alpha 1, 3Galactosyl transferase, α GT) 基因剔除 (knockout, KO) 豬，以克服自然抗體超急性排斥反應。目前學界陸續使用多基因轉殖及 Gal KO 組合豬隻之腎臟、心臟、胰島細胞及眼角膜，已在馬來猴或狒狒進行異種移植試驗，配合蛋白質藥物 (CTLA4-Ig/

belatacept) 及 / 或抗體 (anti-CD40 及 antiCD154)，及其他抗排斥藥物複方處理之下，最佳移植成績在腎臟原位維生 (life-supporting) 移植存活達 136 天 (Iwase *et al.*, 2015)、心臟異位移植存活達 945 天 (Mohiuddin *et al.*, 2016)、胰島細胞存活達 950 天 (Shin *et al.*, 2015) 及眼角膜存活達 933 天 (Choi *et al.*, 2015)。本文將介紹新興基因編輯 (gene editing) 技術與誘導型全能幹細胞 (inductive pluripotent stem cells, iPSCs) 囊胚替補作用 (blastocyte complementation, BCC) 兩新興技術在異種移植應用及進展，前者可做多基因修飾克服異種排斥反應，後者將來可配合人類 iPSCs 發展與 KO 豬囊胚替補作用生產客製化人類器官。

新興基因編輯技術

基因工程技術在異種移植之應用發展如表一所述，早期應用基因轉殖技術產製基因轉殖豬，包含克服補體活化反應之超急性排斥作用、血管栓塞及微血管病變之急性排斥作用、調節免疫反應之急性排斥反應，以及克服炎症反應及細胞凋亡之排斥反應 (杜等, 2012)；各類基因轉殖及抗排斥功能如表二所述，現今至少 40 種基因曾用於產製基因轉殖豬以克服排斥反應，功效不彰或已被取代者未列在表內，甚至有些轉殖基因表現會影響豬隻健康 (Cooper *et al.*, 2016)。而針對豬隻血管內皮細胞表面之半乳糖 (α Gal) 或非半乳糖 (non-Gal) 抗

表一 應用在異種移植豬隻基因體修飾之基因工程技术

年	技術及內容	標竿成果
1992	顯微注射轉殖基因逢機整合至基因體內	hDAF基因轉殖豬
2000	體細胞核移置/複製技術	複製豬
2002	同質性重組作用及複製技術	GGTA1*基因剔除豬
2011	鋅指核酸酶 (Zinc finger nucleases, ZFNs)	GGTA1基因剔除豬
2013	轉錄活化態作用因子核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)	GGTA1基因剔除豬
2014	CRISPR/Cas9**	GGTA1基因剔除豬細胞
2015	CRISPR/Cas9	GGTA1基因剔除豬

* 半乳糖轉移酶(α 1, 3 galactosyl transferase)基因。

**CRISPR/Cas9, clustered regularly interspaced short palindromic repeats and the associated protein 9.

(修改自Cooper *et al.*, 2016; J Pathol 238:288-299)

表二 基因轉殖類型及其抗排斥功能

排斥種類	排斥反應成因	基因種類	說明
超急性排斥	補體活化反應	CD46、CD55、CD59	CD46及CD55為主
	自然抗體	α 1,3Gal、non-Gal	須將豬GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2基因剔除
急性凝血反應	大血管栓塞及微血管病變	TBM、TFPI、EPCR、CD39、CD73	豬抗凝血因子無法抑制人類血液凝固，多項組合效果較佳
細胞免疫排斥	自然殺手細胞	HLA-E、-G、-Cw3	胎兒主要組織免疫抗原
		Tc細胞	CIITA-DN
		CTLA4-Ig	抑制免疫T-細胞活化
		CD47	抑制巨噬細胞吞噬作用
		HLA-DP、DQ、DR	降低抗原呈現細胞反應
慢性炎症反應及細胞凋亡		TRAIL、TNFRI-Fc	降低TNF α 引起炎症反應
		HO-1、A20	抗氧化、炎症及凋亡作用
PERV	非排斥反應	siRNA	降低豬內源性反轉錄病毒風險

CIITA-DN: human mutant MHC class II transactivator; EPCR: endothelial protein C receptor; HLA: human leucocyte antigen; HO-1: hemoxygenase-1; PERV: porcine endogenous retrovirus; SLA: swine leucocyte antigen; TBM: thrombomodulin; TFPI: tissue factor pathway inhibitor; TNF: tumor necrosis factor; TRAIL: TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand.

(作者整理)

原，引起人類體內自然抗體之超急性排斥反應，則須針對添加糖分子之轉移酶基因進行基因剔除。早期應用同質性重組作用進行基因 KO，除基因構築困難、須有胚幹細胞 (embryonic stem cells, ESCs)

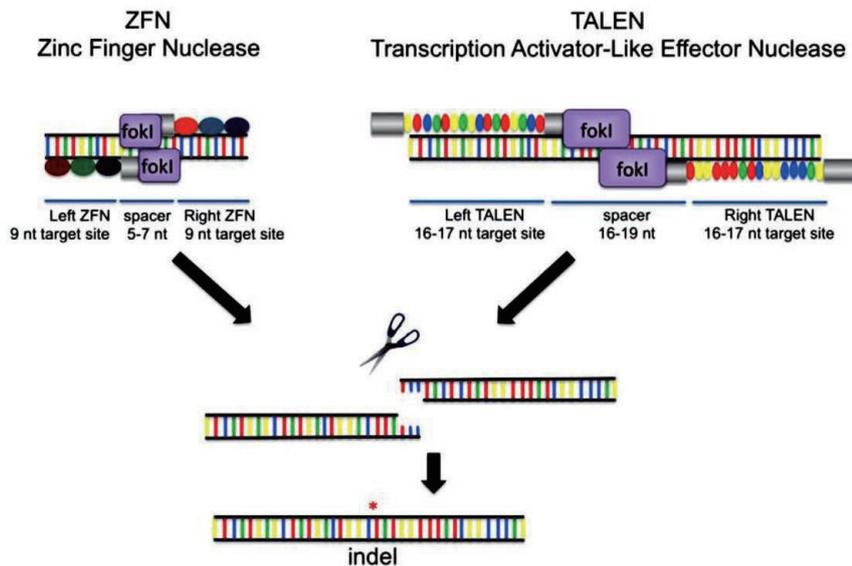
及 KO 效率差等因素之外，學界一直無法成功建立豬 ESCs，因此無法應用 HR 及 ESCs 產製 α GT 基因 KO 豬；直至學界成功建立家畜複製技術，2002 年始應用早期豬胎成纖維細胞及 HR 技術成功產

製 α GT KO 豬。新興基因編輯技術 (gene editing) 包含鋅指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN)、轉錄活化態作用核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 及 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats and the associated protein 9)，此三技術 KO 成功率高甚至可超過 50%，除 KO 效率大幅提升之外，均可直接對家畜胚進行基因編輯，可以精準修改基因之核酸密碼，並且無任何外源 DNA 片段嵌插至豬隻基因體 (genome) 內，無基因改造之對生態環境衝擊風險之疑慮。

過去 HR 剔除技術，係藉由剔除載體兩側均具有長片段與標的基因相同序列，經由其間產生 DNA 重組作用，將外源具功能性基因、標記或抗生素耐受基因進行 DNAs 間替換，達成基因定位轉殖或特定基因剔除，其 KO 機率僅十萬至百萬分之一，因此需藉由胚幹細胞進行。鋅指 (zinc finger, ZF) 為細胞核內蛋白質，為調控 DNA 轉錄之因子，其每一指頭形狀構造可與三個核酸密碼配對，藉此現象構築一組左右各有串聯 3 至 5 個 ZFs 蛋白質，並各自結合源自細菌第二型核酸酶之 FokI 核酸酶區 (FokI nuclease domain, FoKI)，即構成 ZFN，當鋅指蛋白質在標的基因左右兩側進行與 DNA 序列產生特異性雜合時，兩 ZFs 蛋白質間 FokI 形成雙倍體組合方具有核酸水解酶功能，進而將標的基因 DNA 切斷並引起 DNA 錯誤修復，結果造成標的基因產生突變而喪失功能。ZFN 應用甚為廣泛，可進行植物細胞、果蠅、斑馬魚、小鼠及大鼠、人類細胞及家畜等多種基因剔除及修正 (Urnov *et al.*, 2010)，甚至應用此技術成功產製雙股染色體基因剔除之複製豬 (Hauschild *et al.*, 2011) 及複製牛 (Yu *et al.*, 2011)。此外，基因轉錄活化因子 (transcription activator-like effector, TALE) 蛋白質為植物黃單胞菌屬 (*Xanthomonas*) 之轉錄因子，其蛋白質結構之重複性區塊在與 DNA 作用時，可進行每一重複區塊對應一核酸密碼子的配對，類似 ZFN 作法，構築一

組 TALE 及 FokI 組合成 TALEN，即可成為基因剔除載體工具 (圖一) (杜等, 2015)。

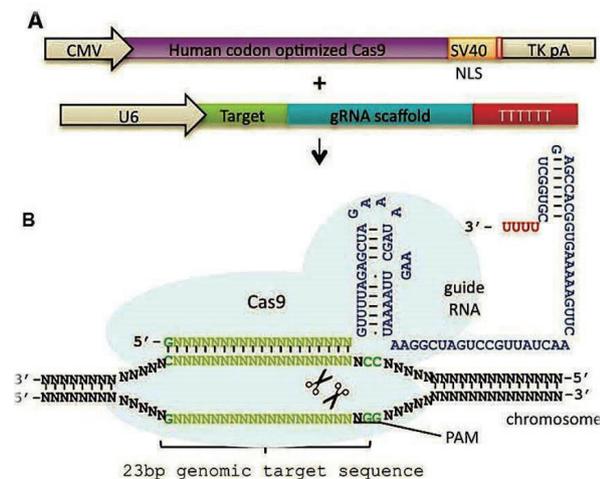
科學家應用細菌對抗病毒感染之免疫機制，發展出 CRISPR/Cas9 技術已可進行基因剔除目的 (Wiedenheft *et al.*, 2012)。細菌在首次感染病毒時，能將病毒核酸序列嵌插至細菌基因體內，形成群聚規則多重複小片段 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 的病毒序列，當病毒再次感染時，細菌即重新表現此 CRISPR 序列，可與二次感染之病毒序列進行雜合反應，並引導 CRISPR 相關核酸分解酶 (CRISPR-associated (Cas) endonucleases，以 Cas9 最普遍應用) 與該等重複小片段核酸雜合，進而引導 Cas9 將二次感染病毒核酸分解，避免病毒的危害。應用此一機制作為基因剔除工具，在技術層面為分別構築 CRISPR RNA (crRNA) 及 Cas9 載體 (圖二) (杜等, 2015)，可放在獨立或相同載體內，如為各自獨立之載體，則 Cas9 為泛用酵素，不必重新構築。甚至在成功構築此二基因剔除載體後，當需再變更任何剔除標的時，僅需更替 crRNA (或稱 guide RNA, gRNA) 之剔除位點核酸序列即可，惟預計變更剔除標的基因對應載體中標的位置之 23 bp 序列，在 5' 端須是一個 G 核酸且 3' 端需有特定三個 NGG 核酸，因此在變更 gRNA 序列尋求 KO 標的點機率較 ZFN 與 TALEN 低，不過其構築工作還是遠比構築 ZFN 與 TALEN 載體更簡易。此外，Cas9 為泛用型酵素之優勢，使 CRISPR/Cas9 技術可使用同一個 Cas9 進行多點或多基因操作，達到同時單一基因多點或多基因之剔除結果。目前此三種新興 KO 技術，ZFN 及 TALEN 由於載體構築步驟限制，CRISPR/Cas9 已成為主流，並廣泛應用於各領域之研發，在異種移植可同時進行多基因剔除，產製 GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2(Gal/nonGals) 三基因 KO 豬 (Estrada *et al.*, 2015) 及豬一型白血球表面抗原 (swine leucocyte antigen-1, SLA-I) 基因剔除 (Reyes *et al.*, 2014)，甚至美國哈佛學者 Church 教授團隊 (Yang *et al.*, 2015)



註：每一個ZF domain辨識DNA之3個核苷酸序列，將3-5個ZFs連結在一起，即可構成辨識標的基因之特異性序列；在TALE每一重複domain可辨識DNA之單一核苷酸，將TALE多個重複序列連結在一起，即可辨識待編輯基因之特定DNA序列。左右兩條ZFs或TALEs再分別結合（攜帶）一個核酸酶(FokI)，當左右兩側蛋白質載體與標的基因產生雜合反應時，FokI形成雙單元體，始可剪斷標的序列中間之DNA片段，此時細胞核內啟動DNA修復及除錯之機制，進行DNA斷裂端非同源端粘接(non-homologous end joining, NHEJ)，結果產生插入或刪除型突變(insertion or deletion, indels)，導致基因喪失功能達到基因剔除目的。

資料來源：引用自Moore *et al.*, PLoS One. 2012; 7(5):e37877.

圖一 利用ZFN及TALEN進行基因編輯



註：引導RNA (guide RNA, gRNA) 與標的基因雜合時，同時引導Cas9對標的基因進行剪切，誘發細胞核產生修補反應，造成序列錯誤產生突變。

資料來源：引用自Mali *et al.*, 2013, SCIENCE, 339:823-826。

圖二 利用CRISPR/Cas9進行基因剔除

藉此技術將豬基因體內 62 套豬內源性反轉錄病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 基因序列進行剔除。

異種移植最近進展

國際胰臟胰島移植學會 (International Pancreas Islet Transplantation Association, IPITA)、細胞移植學會 (Cell Transplantation Society, CTS) 及國際異種移植學會 (International Xenotransplantation Association, IXA) 在 2015 年 11 月 15 至 19 日於澳洲墨爾本舉行聯合會議，學者發表豬隻相關實體器官之異種移植動物試驗，已組合多種轉殖基因及基因剔除之豬隻，由 Revivicor 公司、馬里蘭大學及匹茲堡大學醫學中心團隊進行六種 (GGTA1KO/CD46/CD55/EPCR/TBM/CD39) 基因修飾，解決自然抗體 (GGTA1 KO)、補體 (CD46/CD55) 及凝血

(EPCR/TBM/CD39)之排斥反應，在非人靈長類移植最佳結果為心臟達 945 天、腎臟達 310 天，肝臟及肺臟則仍停留在體外灌流試驗。因 CRISPR/Cas9 基因剔除技術發展，加速異種移植進展，匹茲堡醫學中心研究員戴一凡博士（為南京醫科大學特聘教授 / 郎哥 (Lung Biotechnology) 公司負責人，亦為美國 Revivicor 公司相關研究人員）團隊發表應用基因體研究，尋找重要器官（如肺臟及肝臟）發育之關鍵基因，應用 CRISPR/Cas9 基因剔除技術，已產製無肺臟豬胎（75 天取出剖檢），未來可應用人類 iPSC 進行 KO 豬囊胚替補，以人類 iPSC 對無肺臟豬胚胎進行替補作用，理論上可由豬製造出人類肺臟，未來以相同方法可藉由器官缺損豬胚製造人類肝臟及胰臟，甚至可能製造腎臟及心臟。目前在 Revivicor 公司名下已產製 SLA-I 及 IgM 基因剔除豬，SLA-I KO 可降低人類免疫細胞對豬隻抗原產生排斥反應，後者未來可產製人類醫療用抗體。CRISPR/Cas9 基因剔除技術除進行基因剔除，同時可進行基因定位轉殖 (knock in, KI)，意即進行豬隻免疫球蛋白基因剔除時，可同時將人類免疫球蛋白基因 KI。目前諸多異種器官移植試驗，證實使用 CD154 抗體在抑制細胞免疫排斥效果非常好，不過 CD154 抗體會產生血栓栓塞併發症，尚未如 CD40 抗體已在器官移植臨床使用，未來如何改善人類 CD154 抗體是重要目標；事實上，該公司曾經研提產製生產人類抗體之免疫豬及免疫牛計畫，藉由當今 CRISPR/Cas9 基因剔除技術，將更容易獲得基因剔除同時 KI，此方面未來在人類醫療用抗體製造將極具潛力。

本次會議 IPITA 及 CTS 在胰島移植方面之報告，數量及品質方面均有非常大的進展。此議題為三個學會最熱門共同議題，大會安排一段非常精彩論壇議程，先由兩位胰島移植學者專家進行引言，再由基礎試驗至臨床試驗研究發表報告，並在每一位報告後立即有一位資深研究人員進行評論，之後再由 IXA 前主席 E. Cozzi 檢視國際在異種移

植方面法規進展，除說明自 2004 年世界衛生組織 (WHO) 提出呼籲條文，乃至 2008 年世界衛生大會 (World Health Assembly, WHA) 發布長沙公報，2009 年 IXA 已將胰島移植規範彙整成冊（2016 年 IXA 會誌已發表改版）供各國參考；目前紐西蘭已進行立法核准包埋（避免免疫排斥）豬胰島細胞進行人體試驗，日本、韓國及中國大陸等三個亞洲國家，均有相關規範進行立法中，顯示正為進入臨床試驗做準備；論壇最後，由匹茲堡醫學中心重量級學者 D. Cooper 教授進行總評論，Cooper 教授認為目前學界尚缺試驗結果一致性及臨床可接受的免疫療程，他個人認為：人類同種移植胰島量不可能足夠、包埋不可能成功、門脈及其他適合移植位置需決定、基因修飾豬胰島較適合、新生仔豬較成熟豬更適合、可用成體間葉幹細胞共同移植（促進血管新生降低炎症反應及有益免疫抑制藥物作用）、需要阻斷免疫細胞輔助信號之抗排斥藥、豬對醣代謝比猴子更接近人類，因此未來臨床結果會比猴子試驗更好等。整體而言，紐西蘭 LCT 公司已分別在紐西蘭及阿根廷進行臨床試驗，雖然效果不一致，但已初步確認細胞過多效果反而不佳，該公司正持續改善細胞回收量及品質，而有關細胞多效果不佳，其他研究認為是供氧量問題，增加氧供應可改善胰島素分泌的效果。Cooper 教授認為在補助研究經費充足下，胰島移植應可在 2 至 3 年內普遍進入臨床試驗，至於目前包埋反而引起炎症反應且效果不佳，未來臨床移植試驗應直接使用基因修飾 (GGTA1 KO/CD46/CD55/CD39/TMB/EPCR) 豬之胰島，而不須包埋進行移植。另外，將豬隻管理、胰島回收技術及醫療成本納入考量，他建議使用新生仔豬較佳；在胰島移植位置，除目前習知之腎臟莢膜下外，腹腔、腸系膜 (omental pouch)、胃壁下及經肝門脈植入肝臟等位置皆比較確切。此外，韓國首爾大學發表豬胰島之猴子移植試驗，已達穩定超過六個月不用補充胰島素，甚至最佳成績在本次會議報告已超過 950 天（在 Shin *et al.*, 2015 報告已達 603 天）。

另在人畜共同傳染疾病風險方面，細胞或器官之來源動物 (source animal, SA) 須飼養在 DPF (designated pathogen free) 豬舍，較重要之疾病清除清單包括：腺病毒 (adenovirus)、牛病毒性腹瀉病毒 (bovine viral diarrhea virus)、環狀病毒 (circovirus, PWMS; type II)、腦心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus)、血凝性腦脊髓炎病毒 (hemagglutinating encephalomyocarditis virus)、人類流感病毒 (human influenza virus)、豬肺炎黴漿菌 (mycoplasma hyopneumoniae)、副粘病毒 (paramyxovirus)、豬腸道病毒 (porcine enterovirus)、豬戊型肝炎病毒 (porcine hepatitis E virus)、豬副流感病毒 (porcine parainfluenza virus)、豬細小病毒 (porcine parvovirus)、豬巨細胞病毒 (porcine cytomegalovirus)、豬內源性反轉錄病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 及豬流感病毒 (swine influenza virus) 等，有關異種移植之病原考量可參考 Denner and Mueller (2015) 綜評一文。目前最具爭議的是 PERV，PERV 分 A、B 及 C 三型，在豬之基因體內 PERV 病毒核酸 A 型約有 50 套、B 型有 6 套、C 型有 2 套，紐西蘭 LCT 公司所使用紐西蘭外島之迷你豬，檢測為全球僅存未被感染無 PERV 之豬種，過去學者在體外試驗使 A 型與 C 型病毒產生重組時，重組病毒對人類細胞具感染能力，不過對過去使用過豬組織之移植患者追蹤，並無 PERV 病毒核酸及抗體被檢測出，因此是否須將 PERV 列為規範要求，迄今仍有爭議；至少豬隻表現 A 及 B 型套數須儘量少，最好檢出無 C 型 PERV 表現 (非無基因體 DNA)。目前湖南湘雅醫院王維教授團隊也宣稱在雲南找到無 C 型 PERV 迷你豬，前述 Yang et al. (2015) 應用 CRISPR/Cas9 技術將豬隻基因體內 62 套 PERV 基因全部剔除，均尋求降低病原風險。不過就目前研究報告顯示在使用過豬相關醫材之患者及試驗動物，均無抗體產生及病毒被檢出，而對屠宰場執業人員進行篩檢也證實無人有抗體反應或被檢出 PERV。

在藉由調控 iPSCs 定向分化的研究，已由大鼠 iPSCs 生產胰島細胞進行移植試驗，由於 iPSCs 進展，CTS 已重組為 cell transplantation and regenerative medicine society (CTRMS)，配合幹細胞於再生醫學之應用，在器官尚處於部分細胞缺損時即可進行治療，此部分進展預期會較快進行臨床試驗，以人類 iPSCs 進行細胞治療除有癌化疑慮外，將與豬隻異種移植有很好的良性競爭。

客製化訂製器官

在 iPSCs 之研發，Takahashi and Yamanaka (2006) 發現於分化細胞中提高少數轉錄因子 (即 Oct4、Sox2、Klf4 及 c-Myc; 合稱為 Yamanaka 因子) 即可成功建立小鼠 iPSCs，其在生物醫學潛在應用極為廣泛，可藉由誘導型幹細胞進行基因剔除豬胚替補作用。由於前述基因剔除技術快速發展，在了解組織及器官發育之分化關鍵步驟及調控基因後，如 Pdx1 基因為胰臟胚胎發育最關鍵基因，將此基因以基因編輯技術進行 KO，如為雙股染色體之 Pdx1 基因均被剔除，則懷孕胚胎無法形成胰臟，不過當將 iPSCs 注射至其囊胚，則 iPSCs 將參與囊胚發育並產生 BCC 現象形成胰臟 (Kobayashi et al., 2010; Matsunari et al., 2013)，此概念可發展至量身訂製特定器官。Kabayashi et al. (2010) 以大鼠誘發幹細胞 (rat iPSCs, riPSCs) 注射至 Pdx-1 基因剔除 (*Pdx-1^{-/-}*) 小鼠囊胚試驗，證實純合子 *Pdx-1^{-/-}* 小鼠胎在無 riPSCs 替補，出生旋即因無胰臟而死亡，反之以 riPSCs 注射至 *Pdx-1^{-/-}* 小鼠囊胚，則該等 *Pdx-1^{-/-}* 小鼠不僅可存活，且其胰臟全數由 riPSCs 所形成，該研究群 (Matsunari et al., 2013) 進一步以 *Pdx-1* 啟動子表現 *Hes1* (hairy and enhancer of split1; 抑制發育或腫瘤之轉錄因子)，此 *Pdx-1-Hes1* 基因所產製之基因轉殖豬胎，於懷孕第 74 天取出，確認發育為無胰臟之豬胎，並由一個雄性豬胎建立成纖維細胞，再以此細胞進行體細胞核移置 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 複製豬胚，並在桑葚期複製豬胚注射攜帶橘色螢光且基因正常之複製桑葚胚分溝細胞

(blastomeres)，此等嵌合胚經胚移置完成懷孕後，可出生為具橘色螢光胰臟之正常仔豬。此等研究證實可藉由基因剔除豬隻客製化產製特定人類臟器之可能性，前述戴一凡博士團隊已獲得懷孕 75 天之無肺臟豬胎，未來如法規核准，以及克服其他組織會有殘留嵌合現象，訂製移植患者的肺臟，將可避開豬隻肺臟異種移植排斥反應之艱難障礙。Nakauchi 教授研究團隊接續 *Pdx-1^{-/-}* 囊胚代償研究，以 *Sall1^{-/-}* 小鼠囊胚注射綠色螢光 iPSCs 進行腎臟發育替補研究，對由 iPSCs 形成之腎臟進行組織顯微觀察中，發現極少數集尿管上皮細胞及腎臟髓部內血管與神經組織，由 *Sall1^{-/-}* 細胞和綠色螢光 iPSCs 所嵌合組成 (Usui *et al.*, 2012)，顯示腎臟為複雜器官，由三胚層分化而成，*Sall1* 非調控所有腎臟形成之初使基因，仍需再往前探尋，否則未來所客製化之腎臟將帶有豬細胞之血管，則仍會產生異種移植之排斥問題。此外，嵌合現象亦引發倫理道德議題，有待更精準掌控器官發育步驟克服之。

結語

新興 ZFN、TALEN 及 CRISPR/Cas9 等工具所使用的 DNA 或 RNA 可視為核酸突變劑，在細胞或胚內轉譯成蛋白質，具一定半生期 (half life) 且最終分解消失，由此等蛋白質工具或配合 gRNA 引導進行標的基因剔除，將無任何外源 DNA 嵌插入宿主基因體內，因此該等 DNA 或 RNA 剔除載體之屬性有如化學試劑、紫外光或輻射誘發物種突變，產生基因變異；再者目前剔除結果僅達成基因功能喪失，而不引入新轉殖基因，更不會造成物種變異，極具產業應用潛力及價值。在異種移植應用此等技術，可以非常有效率地編輯豬隻基因體，以降低異種移植各種排斥反應，未來配合 GGTA1/CMAH KO 及 CD46/CD55/EPCR/TBM/CD39 之基因轉殖背景，再配合免疫調節基因之基因轉殖或合適抗排斥藥物處方，使用豬隻器官、組織及細胞將在近年即可進入臨床試驗，尤其豬隻胰島及眼角膜異種移植，將在 2 至 3 年內普遍進入臨床試驗；未來在 iPSCs 及基

因剔除豬囊胚替補現象之研發，可藉由豬隻快速生長病患客製化器官作為器官移植物，將有機會避免諸多排斥反應。

後記

感謝國科會在異種移植經費補助，並以此文紀念台大前外科李俊仁教授，李教授不僅是執行我國首例器官移植之先鋒，自 1994 年更開啟我國異種移植之研究，目前我國已有 CD55/hHO-1 雙基因轉殖豬、GGTA1/CMAH KO 豬及 HLA-DP、DQ 和 DR 基因轉殖豬。在 2005 年之瑞典 IXA 會議中，大陸學者投研究成果進行海報發表，但無人張貼，大會場內也在討論大陸使用死刑犯器官進行移植問題，同年湖南湘雅醫院王維教授團隊在國際期刊發表使用豬胰島細胞移植人之臨床試驗（沒有動物試驗）；2015 年在墨爾本 IXA 會議，會場內非常多大陸學者，年輕研究人員發表成果並獲得優秀論文上台領獎，會場有王維教授互動的賽諾生技公司之展攤介紹 DPF 豬舍及豬胰島回收 GMP 設施，會場外有法輪功團體抗議訴求大陸使用死刑犯器官進行移植，會場內國際學者已無人再討論此議題，10 年轉變極大。

AgBIO

杜清富 財團法人農業科技研究院動物科技研究所
動物科技組 正研究員

參考文獻

1. 杜清富、楊天樹、戴浩志 (2012) 藉基因轉殖及複製技術產製基因修飾豬降低異種移植之排斥反應。中畜會誌, 41: 237-260。
2. 杜清富、莊景凱、陳建宏、顏重河、李孟寰、周佑吉、楊平政 (2015) 家畜基因改造科技進展及應用與風險評估。應用生技產業年鑑2015, DCB-104-T201, pp.213-226 (ISBN-978-986-6123-29-0)。
3. Choi H. J., Lee J. J., Kim D. H., Kim M. K., Lee H. J., Ko A. Y., Kang H. J., Park C., Wee W. R. (2015) *Blockade of CD40-CD154 costimulatory pathway promotes long-term survival of full-thickness porcine corneal grafts in nonhuman primates: clinically applicable xenocorneal transplantation*. Am J Transplant. 15(3):628-641.
4. Cooper D. K., Eksler B., Ramsoondar J., Phelps C., Ayares D. (2016) *The role of genetically engineered pigs in xenotransplantation research*. J Pathol. 238(2):288-99.
5. Denner J., Mueller N. J. (2015) *Preventing transfer of infectious agents*. Int J Surg. 23(Pt B):306-311.
6. Estrada J. L., Martens G., Li P., Adams A., Newell K. A., Ford M. L., Butler J. R., Sidner R., Tector M., Tector J. (2015) *Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2 genes*. Xenotransplantation. 22(3):194-202.
7. Hauschild J., Petersen B., Santiago Y., Queisser A. L., Carnwath J. W., Lucas-Hahn A., Zhang L., Meng X., Gregory P. D., Schwinzer R., Cost G. J., Niemann H. (2011) *Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases*. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(29):12013-12017. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 108(29):15010.
8. Iwase H., Liu H., Wijkstrom M., Zhou H., Singh J., Hara H., Ezzelarab M., Long C., Klein E., Wagner R., Phelps C., Ayares D., Shapiro R., Humar A., Cooper D. K. (2015) *Pig kidney graft survival in a baboon for 136 days: longest life-supporting organ graft survival to date*. Xenotransplantation. 22(4):302-309.
9. Kobayashi T., Yamaguchi T., Hamanaka S., Kato-Itoh M., Yamazaki Y., Iбата M., Sato H., Lee Y. S., Usui J., Knisely A. S., Hirabayashi M., and Nakauchi H. (2010) *Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells*. Cell. 142(5):787-799.
10. Matsunari, H., Nagashima H., Watanabe M., Umeyama K., Nakano K., Nagaya M., Kobayashi T., Yamaguchi T., Sumazaki R., Herzenberg L. A., and Nakauchi H. (2013) *Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs*. Proc Natl Acad Sci U S A. 110(12):4557-4562.
11. Mohiuddin M. M., Singh A. K., Corcoran P. C., Thomas Iii M. L., Clark T., Lewis B. G., Hoyt R. F., Eckhaus M., Pierson Iii R. N., Belli A. J., Wolf E., Klymiuk N., Phelps C., Reimann K. A., Ayares D., Horvath K. A. (2016) *Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft*. Nat Commun. 7:11138.
12. Reyes L. M., Estrada J. L., Wang Z. Y., Blosser R. J., Smith R. F., Sidner R. A., Paris L. L., Blankenship R. L., Ray C. N., Miner A. C., Tector M., Tector A. J. (2014) *Creating class I MHC-null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease*. J Immunol 193(11): 5751-5757.
13. Shin J. S., Kim J. M., Kim J. S., Min B. H., Kim Y. H., Kim H. J., Jang J. Y., Yoon I. H., Kang H. J., Kim J., Hwang E. S., Lim D. G., Lee W. W., Ha J., Jung K. C., Park S. H., Kim S. J., Park C. G. (2015) *Long-term control of diabetes in immunosuppressed nonhuman primates (NHP) by the transplantation of adult porcine islets*. Am J Transplant. 15(11):2837-2850.
14. Takahashi K., Yamanaka S. (2006) *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell 126(4): 663-676.
15. Usui J., Kobayashi T., Yamaguchi T., Knisely A. S., Nishinakamura R., Nakauchi H. (2012) *Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation*. Am. J. Pathol. 80(6):2417-26.
16. Urnov F. D., Rebar E. J., Holmes M. C., Zhang H. S., Gregory P. D. (2010) *Genome editing with engineered zinc finger nucleases*. Nat. Rev. Genet. 11(9): 636-646.
17. Wiedenheft B., Sternberg S. H., Doudna J. A. (2012) *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*. Nature. 482(7385):331-338.

參考文獻

18. Yang L., Güell M., Niu D., George H., Lesha E., Grishin D., Aach J., Shrock E., Xu W., Poci J., Cortazio R., Wilkinson R. A., Fishman J. A., Church G. (2015) *Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)*. *Science* 350(6264):1101-1104.
19. Yu S., Luo J., Song Z., Ding F., Dai Y., Li N. (2011) *Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle*. *Cell Res.* 21(11): 1638-1640.