

出國報告(出國類別：進修)

應用脂肪組織幹細胞於組織工程

服務機關：國立台灣大學醫學院附設醫院

姓名職稱：鄭乃禎 / 主治醫師

派赴國家：美國 / 杜克大學，外科，生物工程學實驗室

出國期間：96年9月1日~98年6月11日

報告日期：97年6月18日

單位主管核章：

目 錄

一、 摘要	-----	3
二、 目的	-----	4
三、 過程	-----	6
四、 心得	-----	9
五、 建議	-----	12

摘要

整形外科治療許多需要組織重建的病人，鑒於目前組織重建之方法均未臻理想，以組織工程的方法進行手術被視為未來最可行之解決方法。組織工程的主要的技術模式在於取得足夠數量的細胞，種植於三維的多孔性鷹架材料，在體外透過適當方法培養成組織或半成熟的組織，然後植入體內以修補受損的組織器官。幹細胞研究的開展更為組織工程的細胞來源打開了技術瓶頸，脂肪組織中具有豐富的間質幹細胞，十分適合應用於組織工程，此即為我遠赴美國杜克大學醫學中心研究的課題。我將軟骨組織以機械力量打碎並予以去細胞處理並重組製成一多孔狀鷹架材料，在體外實驗中證實可引導脂肪幹細胞朝軟骨細胞分化，這部分的實驗成果已被「組織工程」雜誌接受。我又將此軟骨作成海綿狀之組織基質以交聯方式進一步改良，另一方面並結合脂肪幹細胞進行軟骨修復之動物實驗。這次出國進修我受益良多，希望未來對國內幹細胞與組織工程方面的研究有更多貢獻，以期最終能施用於臨床上幫助病患。

目的

整形外科醫師在臨床上經常碰到組織缺憾需要修補的情況，例如因頭頸部癌症、乳癌術後或重大創傷而需要重建的病人。組織重建的方式可簡略區分成兩類：使用人工植入物的重建法，或是採用病患自體組織來進行重建。使用人工植入物重建，其手術較為簡易，術後的恢復期也較短，但須考慮各種填充材料之應用。外來填充物具有潛在之危險性，即感染、變形、斷裂、組織萎縮、植入物外露等問題，且有的植入物價格十分昂貴。故傳統上，組織器官功能或結構上的缺損須賴自體或異體移植來作為最終解決之道，異體移植需解決免疫排斥問題，使用自體組織，若為不帶血管之移植塊(graft)，則常碰到移植塊被部份吸收之問題。若為帶血管之組織瓣(flap)，則需有一組織供應處，甚至需用顯微手術作組織移植，工程較為浩大，手術時間較長，術後的恢復期也長。隨著科學發展之日新月異，近幾年來蓬勃發展的組織工程為此臨床困境提供新的治療方向。它的目標是應用工程學與生命科學的原理與方法，發展生物性的替代物，以便恢復、維持、或改善生物組織的功能。其主要的技術模式在於取得足夠數量的人體細胞，種植於三維的多孔性鷹架材料，在體外透過適當方法培養成組織或半成熟的組織，然後植入體內以修補受損的組織。

近年來廣受矚目的幹細胞(stem cell)亦被廣泛使用於組織工程的研究。幹細胞是生物體內尚未分化的原生細胞(progenitor cell)，具兩個特性：1.可長期自我更新複製(self-renewal)，2.能進一步分化成各種細胞(multiclonicity)。自從威斯康辛大學的Dr. James Thomson在1998年成為全世界第一位分離出胚胎幹細胞(embryonic stem cell)的科學家，這些全能細胞被發現具有無

限的分化潛能 (pluri-potency)，可轉換成身體的任何一種類型細胞，然而其取得牽涉到倫理、宗教等社會因素，能否臨床應用為一大問題。相對的，成體幹細胞(adult stem cell) 為存在於成熟人體組織中的幹細胞，因其取得不涉及上述法律、道德爭議，似乎更有機會應用於臨床範疇。來自骨髓的成體幹細胞 (bone marrow-derived stem cell) 可以分化成脂肪、軟骨、硬骨、肌肉、神經、甚至肝細胞，因此骨髓也是一個有潛力的幹細胞來源，然而骨髓的取得需要較具侵入性的手術程序，病人會感受到疼痛與不適。在2001年美國Zuk等人蒐集抽脂手術的脂肪抽取液，從中提取豐富的間質細胞，利用不同組合的生長因子誘導脂肪組織來源的間質細胞分化成脂肪細胞、硬骨細胞、軟骨細胞、肌肉細胞及神經細胞，符合幹細胞多功能 (multi-potent) 的定義。Zuk等人在「組織工程」期刊 (Tissue Engineering)中報導了這項研究成果後，引起了許多研究人員的興趣，因為脂肪是許多人眼中的累贅，每年有很多人接受抽脂手術，雕塑其身材。這些抽取自大腿、臀部和腹部的脂肪抽取液，一般都是當成醫療廢棄物丟棄，但予以適當處理成為脂肪幹細胞 (adipose-derived stem cell)後，卻發現了一個廢物利用，垃圾變黃金的機會。有鑑於脂肪幹細胞在再生醫學及組織修復上具極高之應用價值，我在升任主治醫師後即在醫學工程研究所楊台鴻教授的指導下進行相關研究。又幸得台大醫院整形外科湯月碧主任及當時外科李伯皇主任的支持，我得以通過院方審核，以脂肪幹細胞應用於組織工程的主題至國外進修。經與美國數間醫學中心聯繫，由湯月碧主任多方考量推薦下，最後決定以位於北卡羅萊納州 (North Carolina) 的杜克大學醫學中心 (Duke University Medical Center)為進修目的地啓程赴美。

過程

杜克大學所在的 Durham 市是一個僅有 15 萬居民的小城市，隨處可見翠綠的森林。然而山不在高，有仙則名；水不在深，有龍則靈，因杜克大學醫學中心座落於此，Durham 亦被稱為 City of Medicine。雖然杜克大學並非長春藤聯盟歷史悠久的名校，但是經營得有聲有色，各個學院在全美大學中都有不錯的排名，不僅是在美國享有盛名的一所大學，也是世界各地學者學術交流的地方，在國際上享有不少美譽。杜克大學醫學院成立於 1930 年，在 US News and World Report 每年公佈的全美醫學院及醫院排行中，杜克大學總是在前十名內。

前杜克大學醫學中心前外科部主任(1964-1994) David C. Sabiston 是享譽全球知名心臟外科權威，著有 Sabiston Textbook of Surgery 更是所有外科醫師的聖經教科書。他本身對冠狀動脈疾病不論在臨床治療、或實驗室研究都貢獻良多，杜克大學外科在他領導下形成一臨床與基礎研究並重的優良傳統。我加入的外科生物工程實驗室 (Bioengineering Lab) 所在大樓一樓即懸掛 Dr. Sabiston 的大幅照片以表彰其貢獻，每天經過時感受到畫中大師凝視的目光，不禁深自惕厲，不敢鬆懈。該實驗室主持人 Dr. Farshid Guilak 本身並非醫師，但以他傑出的研究表現獲聘為杜克大學醫學中心外科終身職教授，並且是工學院醫學工程系的合聘教授。實驗室中的大學部、博士班學生、博士後研究員、技術員等加起來共三十餘人，算是一規模頗大的實驗室。該實驗室在應用脂肪幹細胞於組織工程研究上進行過許多重要的研究，包括：1. 證實脂肪抽取液中提取的間質細胞雖具異質性，但稀釋至單一細胞層次後大多數仍符合幹細胞多功能的定義；2. 以三維編織法製造高強度之聚己

內酯多元醇 (Polycaprolactone, PCL) 鷹架材料，此研究成果刊登於 Nature Material 期刊，並獲選為封面圖片；3. 發現生長因子 bone morphogenic protein-6 (BMP-6) 會刺激脂肪幹細胞往軟骨細胞分化。

抵達 Durham 的第二天，仍在時差中的我即與 Dr. Guilak 安排會面，希望能把握時間，儘快對實驗方向理出頭緒。Dr. Guilak 之前於電子郵件中已建議我朝軟骨組織工程方面作研究，因為軟骨再生治療有很大的相關醫療需求，整形外科方面有墊高鼻子、鼻翼擴大術、小耳症手術等需要用軟骨的手術，骨科方面則包括年輕人運動傷害或外傷引起的關節軟骨缺損，以及老年人之退化性關節炎、關節骨缺血壞死等。另外就可行性而言，軟骨組織本身無血管、神經之分佈，使其進行組織工程的困難度較其他大多數有血管、神經之分佈的組織為低。於是我出國前亦特地向這方面的專家，台大醫院骨科江清泉主任及劉華昌教授請教，獲得許多寶貴的意見，因此對研究的進行已有腹案。

構成組織工程技術的三個基本元件為細胞、鷹架材料、及訊號。這些鷹架材料中有人工合成的亦有天然的聚合物，固然其中有報告指出不錯的脂肪組織生成，但長期結果仍不穩定，且常需要外加生長因子來刺激脂肪組織生成。外加生長因子因其有固定的半衰期，待鷹架植入體內後補充不易，且價格昂貴。有鑑於此，以藥物釋放技術緩慢釋放生長因子為一可行之解決方法，但鷹架材料不一定適合作藥物釋放。又有學者以基因工程的方式使細胞能自行產生生長因子，以達成長期供給生長因子促進細胞生長分化的目標，然而此舉有基因改造細胞的安全性疑慮。由此觀之，開發並尋找適合之鷹架材料，並同時提供適當的生物訊號誠為組織工程之重要關

鍵，而經處理的生物組織被視為極接近此條件之鷹架材料。1965年Marshall Urist在科學 (Science) 期刊上發表一篇的研究報告，指出去礦化植骨材 (demineralized bone matrix, DMB) 可於異位誘導骨頭之生成，此可謂這方面研究的濫觴。但軟骨組織因軟骨細胞被緻密的細胞外基質緊密包圍，十分困難予以去細胞處理，因此以軟骨組織基質製成組織工程所用的鷹架材料的研究報告一直付之闕如。

我假設將軟骨組織以機械力量打碎並予以去細胞處理並重組製成一多孔狀鷹架材料，此海綿狀材料應會提供脂肪幹細胞長入的孔道，同時釋放軟骨組織中所含的生物訊號使其朝軟骨細胞分化。Dr. Guilak亦認為這是很好的研究方向及實驗模式，於是我即著手設計、進行實驗。上班沒幾天我就發現該實驗室提供研究者相當好的環境，除了硬體設備齊全，各類人員的支援也相當豐富，除了實驗室中有經理人(manager)處理試劑訂購、儀器維護等事務外，另有好幾位學有專精的博士班學生、博士後研究員幫忙設計實驗流程，評估實驗之可行性，以利研究之進行。經多次嘗試及不斷的製程改良，我們終於以均質化 (homogenization)及低壓凍乾法 (lyophilization)來達到一方面保存軟骨組織本身可能有的生物訊號，另一方面增加鷹架的多孔性，使脂肪幹細胞可順利長入。以此方法，我們用豬軟骨作成海綿狀之組織基質，在體外實驗中已證實可引導脂肪幹細胞朝軟骨細胞分化，這部分的實驗成果已被「組織工程」雜誌接受。然而時光飛逝，轉眼一年的進修期間已到，我向台大醫院申請留職停薪延長進修，將此軟骨作成海綿狀之組織基質以交聯 (crosslinking)方式進一步改良，另一方面並結合脂肪幹細胞進行軟骨修復之動物實驗，以動物實驗進一步證實該鷹架材料應用於組織工程之價值。

此次出國進修以實驗室研究為主，爲了充分利用這難得的機會，幸得台大醫院整形外科湯月碧主任向杜克大學醫學中心整形外科主任 Dr. Scott Levin 請托，我得以參加一些杜克大學整形外科的臨床教學活動。杜克大學整形外科只有 6 名主治醫師，但皆各有所長且著作等身，如 Dr. Levin 是顯微手術及手外科知名學者，曾任美國重建顯微外科醫學會的會長，Dr. Zenn 則是乳房重建的專家，2008 年曾獲邀到台灣在中華民國整形外科醫學會年會發表演說。我例行性的參加每週一晚上的期刊研讀會，研讀會形式與國內十分不同，每位醫師人手一本當月期刊以口頭報告，速度快但內容卻深入詳實，尤其他們一定會對所報告的文章提出自己的見解，可見他們對討論會的事前準備相當充分。每週三一大早的晨會則一般會邀請整形外科相關領域的醫師、專家演講，或進行併發症及死亡病例討論會，討論中除有資深醫師之經驗談，更常見的是以舉證論述的方式呈現出令人信服的結論。

心得

初到杜克大學醫學中心時覺得每個實驗室都設備齊全、資源豐富，在這裡作研究真幸福，但工作一段時間後漸漸了解到幸福的背後其實是充滿競爭的殘酷舞台。杜克大學博士班學生年領獎學金 26000 美元、博士後研究員年薪 38000 美元起跳，技術員年資越高領的更多，這些錢並不是全由學校編列預算支付，許多都是實驗室主持人由研究經費中支付。甚至在拿到終身教職 (tenure) 前，實驗室主持人大部分的薪水也是由研究計畫主持費而來，所以取得研究計畫至爲重要。然而隨著美軍的戰爭花費節節升高，美國聯邦政府債台高築，自然也排擠政府的研究預算。美國國

家衛生研究院(National Health Institute, NIH) 的研究計畫通過率已降至 15%以下，若連其他來源或私人機構的研究計畫也拿不到，實驗室就會被收回給其他人使用，實驗室主持人請自行另謀高就。

另一方面，杜克大學之醫學教育系統十分注重研究，甚至要求所有第三年醫學生去全美國各大醫學院及醫學中心實驗室做一年研究。很多醫學生甚至會再休學一年專門從事研究工作或在繁忙課業之餘仍在實驗室工作到深夜。學生熱衷研究工作的原因之一是希望將來以此資歷進入好的醫院或熱門科系接受住院醫師的訓練，但這對於培養他們日後的研究能力確有莫大的助益。至於杜克大學醫學中心外科住院醫師的訓練過程中，除了五年的臨床訓練外，另有二年的時間要花在實驗室中，在主治醫師的指導下，自己搜尋文獻、進行實驗、分析成果，並將成果發表。杜克大學醫學中心的新進主治醫師則不一定在杜克本身接受訓練，而是廣羅人才且都獲聘為助理教授。醫學中心的三大要件即必須兼顧醫療服務、研究、與教學，但要面面俱到並均有傑出表現誠屬不易，故杜克大學醫學中心允許主治醫師自行決定要在醫療服務、研究上所花時間之百分比，年終時再依此百分比評估其醫療服務及研究的績效。若不喜歡實驗室研究，醫師專心醫療服務，發表臨床研究亦可獲得臨床教職。想多作實驗室研究，少看病人也行，但只要未在一定期間內發表足夠論文達到升等標準，就必須離職。由此可見，杜克大學醫學中心的制度十分有彈性，著眼於資源利用及產生效益的最大化，同時對不合格者也是無情地予以淘汰。

杜克大學醫學中心十分重視病人安全，開刀房中麻醉前總是不斷確認病人身份、手術部位等細節，這等小心其實是由痛苦的經驗中學來的。2003 年，杜克大學

醫學中心爆發一起嚴重醫療疏失，17 歲少女潔西卡等了 3 年才等到心臟和肺臟移植機會，手術結束後竟發現器官捐贈者血型是 A 型，潔西卡是 O 型，幾天後潔西卡就因強烈排斥反應而性命垂危，兩個星期之後，醫院終於等到血型符合的心肺進行第兩次心肺移植，但最後潔西卡仍不幸過世。這種醫療疏失發生在世界第一流的醫學中心委實不可思議，但也提醒我們攸關生命的病人安全事宜必須要建立嚴格的標準化作業程序，並切實遵守。但有些制度面的事是莫可奈何，因美國昂貴的醫療與國內無法相提並論。美國人民每年平均在醫療上的花費是很可觀的，占國內生產毛額（Gross Domestic Product, GDP）的 16%，等於每 6 塊錢就有 1 塊錢花在醫療費用上。這樣昂貴的醫療，才能造就具有優良品質的醫療服務，並刺激醫療技術的進展，也吸引優秀人才投入醫界。然而昂貴的醫療也造成窮人無力負擔醫療保險，形成醫療資源分配不均的景況。這些複雜的醫療照護議題非三言兩語能深入討論，令人憂心的是國內的醫療品質因過度壓抑醫療費用成長而無法提升，此誠非國人健康之福。

這次有機會出國進修，要感謝醫院及學校中許多師長的鼓勵與指導。出國進修對醫師成長有相當大的助益，不僅是專業上、生活上的增廣見聞，參考不同環境中的醫學研究環境及醫師養成制度，對長久以來在同一系統中訓練的我而言，的確是一個很大的刺激。除此之外，以醫學的背景接觸工程學方面的思考模式，也提供我許多另類思考的機會，許多想當然耳、習以為常的事，其實不見得如此。就一個臨床醫師而言，如何將臨床上遇到的問題轉成實驗的模型加以研究，進而使臨床與基礎結合，這是我輩需努力以赴的。

建議

成體幹細胞在再生醫學及組織修復上具極高之應用價值，在胚胎幹細胞爭議不止之際，值得加速發展成體幹細胞相關研究，以期能盡快應用於臨床範疇。

在美國的研究領域，非常重視團隊合作，杜克大學醫學中心聘用許多專司研究工作的 PhD 擔任臨床科系的教職，他們與臨床醫師合作，提升整體的研究水準，值得參考。反觀國內醫師許多研究都必須親自學習及執行，可能品質不佳且影響臨床工作。

總合看來，國內醫師就手術技術而言並不在國外醫師之下，但整體醫療品質相較杜克大學醫學中心就有些許差距。其實手術只是醫療的一部份，要有良好的整體成績，靠的是資源的整合及不同醫療專業之間的互相合作，故醫療團隊的建立至為重要。