

出國報告（出國類別：國際會議）

參加美國癌症學會第 101 屆年會
心得報告書

服務機關：台北榮民總醫院

姓名職稱：戚謹文 研究員

派赴國家：美國

出國期間：99.4.15-99.4.28

報告日期：99 年 5 月 17 日

摘要

1. 基因工程製造的小鼠模式是做癌症研究很好的模式，不管在基因工程癌症小鼠發現甚麼重要的結果，最後一定要再回到臨床去驗證是否真的與人的癌症有關。2. 在微核糖核酸與癌症的研究利用 mutation、knockout、deletion 等分子生物學的技术，證明了 miRNA 17-92 這個 cluster miRNA 各個成員的角色功能。3. 檢測腫瘤代謝體(cancer metabolome)利用 GC/MS、LC/MS 或是 NMR 等方法各有優缺點，必須要特別注重 QA/QC。4. 在癌症基因體研究方面已知在人類約 30,000 個基因中，癌細胞所影響的其實只有 3,000 個基因及 12 個 signaling pathways，因此未來癌症研究的方向與趨勢將越來越明確。5. 美國癌症醫學會在經驗傳承上努力，由年輕學者提出的研究計畫中，評選出最有潛力的十多位學者，提供他們經費，並讓他們有機會跟癌症各領域的研究大師們一起做研究以提攜優秀後進。這種培育未來精英的制度值得參考。

關鍵字：基因工程小鼠，腫瘤代謝體，QA/QC，培育未來癌症研究精英

目次

- 一、 目的
- 二、 過程
- 三、 心得
- 四、 建議事項（包括改進作法）

附錄

一、 目的

美國癌症學會每年的年會有來自於世界各地的癌症研究學者與會，每年的年會不但是癌症研究學者交換研究心得的最佳場所，也是吸取科技新知的最好機會，今年的美國癌症醫學會 101 次年會在美國華盛頓市中心的 convention center 舉行，會議時間是由 4/17~/4/21 日，總計約有 17,000 人報名，發表將近 6,000 篇壁報論文。

二、 過程

4 月 17 日的教育訓練課程由早上 8 點開始，有許多不同的主題，包括“以化學預防癌症的動物模式”，“人類癌症發生的原因”，“基質纖維細胞的多樣性及其在癌症中扮演的角色”，“由化學到臨床”，“癌症轉移過程的顯影研究”，“微核醣核酸的新藥物及標靶與表基因架構”，“營養、肥胖及癌症”，“RANK 鏈結物抑制劑用來治療癌症的骨骼副作用”，“癌症的生物網路及系統”，“非免疫學者的腫瘤免疫學”，“建構及分析三度空間表皮細胞癌模式”，及兩個方法研究主題分別是“個人化醫療的臨床實驗設計”及“基因體與微核醣核酸”。

我挑了以化學預防癌症的的動物模式去聽講。Dr. Cory Abate-Shen 是紐約哥倫比亞大學教授，她介紹了基因工程製造的小鼠模式。小鼠雖然是做癌症研究很好的模式，但仍有許多方面與人有差異，例如存活期，身體的代謝速率，解剖學上組織的差異，疾病的發生與歷程，和對藥物的反應等都是需要考量的重點。基因工程製造出來的癌症小鼠模式的好處是癌症在一個完整的活體系統中發生，有免疫系統但變異性不大。這些小鼠包括基因轉殖小鼠、germline 剷除小鼠、Cre-loxp 調控小鼠，TET-調控小鼠及病毒感染小鼠等。以病毒基因感染的小鼠模式，例如 KRAS gene 作肺癌模式，其好處是不

只一種細胞被感染，因此反而可以看到腫瘤細胞的多樣性。而利用上述的小鼠作研究，可以設法分析如何可預防癌症發生 (initiation)，找到新的生物標誌，以及可以測試及發展新的藥物。Cory 博士舉了一個攝護腺癌將 NKX3.1 基因剔除後會引發氧化性傷害的例子，但在小鼠要一年後才會長癌，結果發現一年時另一個基因 PTEN 也同時有變化，利用微序列基因分析也確認 NKX3.1 剔除後有 902 個基因變化，而老化的基因有 629 個基因變化，二者的交集中有 70 個基因，其中就包括了 PTEN 及抗凋亡基因等。Cory 博士說不管在基因工程癌症小鼠發現甚麼重要的結果，最後一定要再回到臨床去驗證，這樣的發現是否真的與人的癌症有關。

Dr. Tony A.N. Kong 是紐澤西州大學教授，她介紹了她在攝護腺癌方面的研究。在美國一年約有 192,000 位攝護腺癌患者，而流行病學調查發現番茄或其衍生性食物、維他命 E、selenium 等食品添加物均可降低攝護腺癌的發生率。可是 selenium 加上維他命 C 合併使用 5 年卻又無效，其中作用機轉不明。除食品外， 5α -reductase 抑制劑如 Proscar 的大規模實驗，高危險攝護腺肥大者 18,882 人每天吃 5 mg 的 Proscar 吃了 7 年的確降低了 24.8% 的攝護腺癌發生率；而另一個藥物 dutasteride 給高危險攝護腺肥大者 6729 人每天吃 0.5 mg，吃了 4 年也減少了 22.8% 的攝護腺癌發生率。目前有學者認為癌症的發生與各種壓力有關，這些包括氧化壓力、細胞分裂壓力、化學品產生的壓力、身體代謝物質的壓力等，都會影響細胞而產生癌化。發炎也是一種重要的壓力，例如 macrophage 會釋放 TNF- α 、IL-1 β 等，而化學預防的方式就是以食品或其他添加物來降低這些壓力，進而抑制細胞週期的進行，促進癌細胞的凋亡等作用。目前發現很多基因的變化都在表基因被甲基化，例如 Nrf2，HO-1 等，而維他命 C 等

添加物可以反轉表基因的甲基化，其詳細的作用機轉值得深入研究。

Ohio State University 的 Gary Stoner 博士則介紹了消化道癌症，主要以大腸癌為主，大腸癌是美國男性第二位、女性第三位的癌症，五年的存活率約在 65% 左右。目前了解的訊息傳導途徑中 Wnt 的訊息傳導很重要，其下游的 APC 及 β -Catenin 基因一旦發生突變，會導致 β -Catenin 不能被磷酸化而分解，如此將引發 β -Catenin 在細胞中堆積而進入細胞核調控下游將近 200 個基因表現上升引發癌症。在以大鼠作大腸癌研究模式可以用 F344 大鼠，餵食 azoxymethane 及高脂飼料就可引發大鼠的大腸癌，也有人用 Sprague Dawley 大鼠作同樣的實驗。此種大腸癌大鼠模式不會產生癌症轉移，而分析的標的則包括生長的指標，PCNA 病理變化，凋亡的指標以及基因表現的異常及其甲基化程度等。除了藥物治療研究外，食物中的黑莓 (Black Raspberry) 及 Resveratrol 等成分也有抑制大腸癌生長的作用，而主要的作用方式也是抑制血管新生、細胞分裂、降低發炎，引發癌細胞凋亡及抑制 Wnt 的訊息傳導途徑。

在微核糖核酸與癌症發生的小組討論中，耶魯大學的 Joanne B. Weidhaas，紐約史隆克特因的 Andrea Ventura，加州柏克萊大學的 Virginie Olive，和德州貝勒醫學院的 Joel R. Neilson 等人針對 miRNA 17-92 作了詳細的研究，他們利用 mutation、knockout、deletion 等分子生物學的技术，證明了 miRNA 17-92 這個 cluster miRNA 各個成員的角色功能。miRNA19 調控的 900 個基因中有 PTEN，而 miRNA17、miRNA19 也和 c-myc 互動調控腫瘤細胞的凋亡。當 miRNA19 表現上升時會減少 PTEN 的表現，增加 AKT 的磷酸化，進而影響 mTOR 及 S6 的磷酸化。他們更用青蛙卵作實驗證明 miRNA 能拮抗 PTEN 的功能，使青蛙卵在有 PTEN 過度表現時仍能存活，miRNA 17-92 也調控

p21 及 p27 的表現，影響細胞週期及存活，更有趣的發現是在很多癌症的細胞中其 mRNA 的 3' UTR 部分都縮減，使得 miRNA 17-92 無法作用，進而增加該 mRNA 的 translation，而這些蛋白的表現是主要的 target 蛋白。

David R. Parkinson (Nodality, South San Francisco 公司的 CEO) 指出在 whole genome 分析已經看到 12 到 15 個 pathway，而由臨床來看則是如何將問題簡化成 cancer pathophysiology，如抗血管新生、抗轉移、抑制生成，或是如何逃避 apoptosis。而抗癌藥物發展的過程中，在 1980 年是找化療藥物，1990 年用 NCI 的 60 個癌症 cell line 找到一些 target，例如 HER2 可以用 Herceptin 來做治療，2000 年已經發展成 multi-targeted (Kinases 例如 Lapatinib, Sorafenib 等)，2010 年的 novel target，是 cytotoxic、cytostatic、mTOR 等。以 gleevec 的發展而言，首先是找到 c-Kit，利用 PK/PD 的方式找出那類病人會反應，再去看抗藥性發生時如何處理。因為給了藥物一陣子之後，腫瘤可能會再 progress 而有 drug resistance 出現，此時不能只看 biomarker，更要了解的是腫瘤的 biology，才能真正幫助醫師去治療病患。而我們現在做的實驗是從 DNA、RNA、protein 到 function of protein，去看細胞的訊息傳導。但其實 single cell level 是有不同意義的，因為腫瘤細胞裡面會有不同的 population，而腫瘤長大或縮小時對於藥物產生抗藥性的 profile 可能也不同，因此，若要把抗藥性的機轉搞清楚，必須去了解藥物如何 transport、是否因 DNA damage 造成 apoptosis、訊息如何傳導讓細胞分裂或分化。以 gleevec 為例，有 c-Kit 的藥物可以用，但細胞表面的多重抗藥性幫浦會把 gleevec 排出去，讓藥物無法進入細胞作用，造成抗藥性。因此，只找到 marker 是不夠的，還必需要知道哪

些 pathway 會變化，這樣才是真正了解治療 decision 的 cancer biology，才能進到臨床真的對病人有益。以史丹佛大學的研究為例，他們利用流式細胞儀的技術，在 AML 的病童的身上發現有 Stat 3 及 Stat 5 兩種 markers 的細胞群，針對 AML 進行化學治療後不久病童即復發 AML。進一步分析發現以 GM-CSF 刺激這些細胞時，有這兩種 markers 的群體細胞對 GM-CSF 有不同反應。復發後 AML 的細胞多半是 GM-CSF 刺激會生長的群體細胞。因此，若在一開始就得知病童有這些不同的群體細胞來做治療，就可以避免或減少發生 recurrence 或是 resistance 的機會。

針對檢測腫瘤代謝體(cancer metabolome)技術的討論，普林斯頓大學 Rabinowitz 教授首先指出，所有的 metabolite 在進行 quench 時，很重要的一點就是不能用 PBS 去洗，因為 metabolite 很可能就因此被洗掉，因此，一定要把每一步都要做好才會有 reproducible 的結果。而檢測時通常可利用 GC/MS、LC/MS 或是 NMR 等技術，這些方法各有優缺點，其中 NMR 的優點是可定量、無 bias、不用 chromatography 且不會破壞分子。而 LC/MS/MS 則可以利用 triple quadrupole 和 TOF (time-of-flight) 兩種偵測器作串聯來收集 data，然後以 XCMS 分析軟體將 raw data 運算出結果。而在 mouse 4T1 breast tumor model 中，取正常細胞和癌細胞檢測其 metabolites，結果發現在癌症細胞裡面，較低的 glycolysis 以及 TCA cycle compounds 和 metastasis 相關，而其中 α -ketoglutarate 和 2-hydroxyglutarate 則被認為可能是 oncometabolite。然而，要以 metabolomic 的技術做為早期癌症的診斷可能不太容易，因為病患吃的東西就會影響這些 metabolites。

加州大學的 Fiehn 教授是運用 GC-MS 在 cancer metabolome 領域

的先驅，他舉例說明歐盟目前正執行一個大型計畫，是從 estrogen receptor、progesterone receptor 及 HER-2 receptor 三者呈現 triple negative 的腫瘤中，發現其代謝體裡面 salicylic acid 和 4-hydroxybenzoate 這兩種 compound 會有變化，而他們會再進一步去做基因、蛋白質或是免疫染色等分析來確認，這樣才真正了解整個基因及其影響的 pathway。因此，只是看到 chemistry 有變化還不夠，還應該去看 biology 的影響。而在做這些分析時，收集到的標本可能會有組織、血液、cancer tissue 和 normal tissue 混在一起，因此在做 prolife 的過程至少需要包含兩個 parameters，例如分子量和滯留時間，才能真正確認一個 compound。他舉了一個分析的例子：取 10 mg 的乳癌組織 → homogenize → cold extraction (with acetonitrile or water) → dry down → deionize 加氣化 → 以 GC/MS 分析 → database → 統計分析 → deconvolution or mapping。而做 mapping 時可以使用一些免費軟體，例如 source code free.fiehnlab.ucdavis.edu 或是 MIT 的 free ware。而在檢驗步驟中，有一個原則是不能使用 formalin 去 fix 組織，因為很多 metabolite 會因此而受到干擾。此外，hot injection system 是分析過程中最困難也最需要去掌握的技術，因為這個部分沒有做好的話就不會有 reproducible 的結果，因此在人員訓練的過程中必須密切注意 QC 的部分。而在注射樣品時，injection volume 越多其實檢測到的訊號不會更好，因為 solvent 的量相對提升後干擾也會變多。另外，column liner 則建議每天要更換，這樣可避免上次實驗殘留的物質造成干擾。

密西根大學的 Beecher 教授指出，LC/MS 必須要有很好的 QA/QC 才能進行，且不管做任何東西，應該先要有 standard 在自己的系統

中測試過，建立起 chemical library，才能將 unknown samples 放到同一個系統來做分析，而大部分的專家都會寫自己的 informatics。進行 sample preparation 及 experimental design 要很小心，不要經過太多步驟才進行步驟，也不要急著分析一大堆標本，否則會浪費人力物力。切記 MS chromatogram 是 3D 的，包含 m/z，retention time 和 amplitudes，而不是只看 peak。在檢體處理過程，為避免人為疏失，則可以採用 barcode 或是 robotics 來協助。舉一個 LC/MS 應用的實例，他們取 normal、non-metastatic 及 metastatic 的 tumor tissue 做 1,265 個 metabolites 的分析，在這些組織中發現有 600 多個 compounds 出現，而其中有 515 個是相同的。而在 array 分析中，針對 metastatic sample 出現差異的 compounds 進行 principle component analysis (PCA)，找出這些 compounds 和哪一些生化的 pathway 有相關，並進一步去做 cell line 來驗證。後來，他們發現在 metastatic tissue 中有一個叫 "sarcosine" 的 compound 會增加，並且會去影響癌症細胞 methylation 的 pathway，而這個結果透過其他團隊的研究，以不同的方式在同一套標本上也得到相同的結果，證實了這是一項重要的發現。

三、心得

此次參加癌症學會年會獲益良多，癌症的治療及研究已經趨向特定標的(target specific) 以及多標的合併治療 (multiple target therapy)，癌症的治療及預防的研發亦有大幅進步。而在基因體研究方面，Johns Hopkins University 的 Vogelstein 教授特別指出在人類約 30,000 個基因中，癌細胞所影響的其實只有 3,000 個基因及 12 個 signaling pathways，而裡面又只有約 320 個基因是 driver gene，其他只是屬於 passenger 的角色，因此未來癌症研究的方向與趨勢將

越來越明確，也期待能有更多的年輕優秀學者參與投入。

四、 建議事項

本院此次亦有多位臨床及基礎研究人員如顏厥全,楊慕華,劉俊煌,邱士華,洪士杰等參加與會，未來是否可由“建置癌症卓越研究體系計畫”中編列經費鼓勵本院優秀癌症研究者帶領其博士生一起參加此會將有助於提昇本院癌症研究水準。此外，美國癌症醫學會也不斷在經驗傳承上努力，他們由 90 多個年輕學者提出的 letter of intent 及研究計畫中，評選出最有潛力的十多位學者，提供他們 10 萬美金的 grant，並讓他們有機會跟癌症各領域的研究大師們一起做研究以提攜優秀後進。這種培育未來精英的制度值得參考。最後，此行蒙國科會補助機票及註冊費，謹此致謝。

附錄

Annual meeting of the American Association for Cancer Research,
Program and proceeding。