

出國報告(出國類別：開會)

2010 神經醫學研討會報告

服務機關：國防醫學院生命科學研究所

姓名職稱：劉惠君 博士生

派赴國家：美國

報告日期：99/12/13

出國時間：99/11/11~21

摘要:

在美國舉辦的 Neuroscience 2010 是神經界最大規模的一場研討會。今年於 11 月 13 日到 17 日在美國聖地牙哥舉行。其目的主要在幫助各個不同方面的神經學者進行研究交流，以促進神經醫學創新及基礎研究的發展。本次會議是在聖地牙哥的國際會議中心舉辦。本次因為論文之需要前往日本東京與此方面的先進們一起討論分享自己的研究成果「The effect of sodium vanadate in SMA-like mouse model」，我主要是研究脊髓肌肉萎縮症而其是一種神經退化的疾病，再加上此次會議有多個國家同樣研究脊髓肌肉萎縮症的團隊會參加，所以前往參與並且希望可以藉此獲得一些實驗的靈感並且有機會與這些團隊進行交流。

目次：

摘要	-----1
本文	
目的	-----2
過程	-----2
心得	-----5
建議事項	-----6

本文：

目的：

在美國舉辦的 Neuroscience 2010 是神經界最大規模的一場研討會。每年都會有超過 3 萬人以上的各國研究人員參與，而會場的海報展示更是達到 1 萬篇以上。包含的領域十分廣闊，演講者更是萬中之選，可說是神經界的一大盛事。今年於 11 月 13 日到 17 日在美國聖地牙哥舉行。其目的主要在幫助各個不同方面的神經學者進行研究交流，以促進神經醫學創新及基礎研究的發展。本次會議是在聖地牙哥的國際會議中心舉辦。

過程：

11/12 抵達美國並於聖地牙哥的 Days Inn Hotel 稍做休息過夜。11/13 上午抵達會場報到並領取相關資料。之後開始聽取相關的海報：「In vitro models of conditional a-SMN expression: A tool to investigate cellular modification induced by a-SMN protein」，a-SMN: axonic SMN，近年來被發現，是一種 SMN alternative splicing form，具有 exogenous properties。作者主要是利用 transfected tetracycline-dependent a-SMN 到 NSC34 細胞中藉此研究 a-SMN 的功用。其發現會增加擁有較長 neurite 的細胞數目以及 cytoskeletal marker 的表現。此外，作者也藉由 CHX test 發現 a-SMN 蛋白質的穩定度較全長 SMN 來的差且其主要分布於 extra cellular membrane。a-SMN 主要的降解路徑是藉由 proteasome 的作用。「SMN, the spinal muscular atrophy (SMA) disease protein, interacts with the mRNA binding proteins ZBP1 and HuD in motor neurons」，其假說為 SMN 可能可以幫助其他 RNA binding protein 到達其目標 (target) RNA 的位置，作者利用 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 的方式研究 SMN 與其他 RNA binding protein 的相關關係，其發現 HuD, ZBP1 和 SMN 會在 neurite 的位置有 colocalize 的現象。但是其是否為直接鍵結以及其鍵結的目的仍在進行研究當中。「uPA signaling of gene expression required for spinal cord synaptic plasticity」，當初會想要看這篇海報的原因是因為所研究的藥物 sodium vanadate 會調控 uPA mRNA 的穩定性，因此想要知道 uPA 相關的訊息。uPA 會影響 costal ventral respiratory group，且 uPA 鍵結到 uPAR 需要 crossed phrenic phenomena (CPP)。

11/14 上午抵達會場並開始聽取相關海報：「Selective vulnerability of neuromuscular junction in SMN Δ 7 mouse model of spinal muscular atrophy」，其主要是研究在 SMA 小鼠模式中其肌肉以及 neuromuscular junction (NMJ) 有何缺陷，作者依據近遠端取了多塊肌肉，其發現在美國的 SMN Δ 7 病鼠模式上面，其近端的肌肉缺陷的嚴重性較遠端明顯。而其中又以 SPI 以及 FDB-2 這兩塊肌肉最為明顯，其在老鼠出生後四天會在其 NMJ 的地方有 innervation 缺陷的發生。其證明在此老鼠上面 NMJ denervation 主要是發生在近端的肌肉。「Phenotypic characterization of a new mouse model (C/C line) of spinal muscular atrophy」，C/C line 的 SMA 老鼠模式是去年 Jackson 實驗室發表新的老鼠模式，其主要是將老鼠的 smn 的 exon 7-8 置換成爲人類 SMN2 的 exon 7-8。作者主要是針對這種新的老鼠模式進行其肌肉與表現型進行研

究，其發現此種老鼠的生命週期大約是一年，其有類似於典型SMA老鼠的特徵：耳朵和尾巴會有爛掉的情形。此種老鼠在出生後約兩週時候尾巴會開始有爛掉，大約五到六週的時候耳朵也會開始有爛掉的情形。根據作者的研究發現其在出生後8-14天之間其肌肉的innervation是正常的，但發現到了90天之後innervation的數量就會開始下降，因此發現此種老鼠會有較差的grip strength。「Identification of a common critical developmental time point between SMN Δ 7 neonatal and novel adult mouse models for spinal muscular atrophy」，作者研究SMN Δ 7 mouse model發現大約有20%老鼠會在出生後第8-11天死亡，60%的老鼠會在出生後14-17天死亡。然而在新的老鼠模式(C/C line)，一種比較輕微的老鼠模式，其發現約在出生後20天之前其體重就會有差別。而若是SMN Δ 7老鼠則是在出生後20天之後開始有體重下降的現象(在出生後3天有給予營養支持)。之後作者將C/C line的老鼠回配到另外兩個品系的老鼠FVB、B6的老鼠，其發現配到B6的老鼠會有較嚴重的體重減輕現象，因為品系也是會影響疾病的嚴重性。「Gene therapy in vivo by application of AAV2/6 vector on SMA type III mouse model」，幾年前發現了a-SMN，是一種SMN alternative splicing form，主要包含exon 1,2a,2b,3以及一部分的intron 3，但是其詳細的功能仍不清楚。作者主要是想利用lentivirus (AAV2/6) 攜帶a-SMN的方式進而研究a-SMN的功能。由老鼠模式之中發現，a-SMN可以刺激axon growth，並且發現其與FL-SMN有類似的分布。其也會分布在細胞核與細胞質中，因此推測其可能功能類似於FL-SMN。「Mitochondrial functions and dynamics underlie axon outgrowth ability」，作者主要是想要研究mitochondrial組成是否與neurite outgrowth以及growth cone有相關，其利用胚胎期第20天以及出生後第四天的retinal ganglion cell進行研究並預測胚胎期第20天與出生後4天的細胞相比會有較好的regenerative axon生長。之前的報導指出outgrowth的能力主要與兩個基因有關：Kruppel-like factor (KLF-4)以及KLF-6。在作者的研究中發現不論是全部或是polarized mitochondria在胚胎期第20天會較出生後第四天融合成爲較大的mitochondria網路。此外，作者發現KLF-4主要是調控mitochondria DNA的複製而KLF-6主要是調控mitochondrial的組成。

11/15主要是參觀相關的廠商，會場有許多的廠商參展，而與我們比較相關的是有關於動物motor function相關的儀器。近年來隨著科技的發達，open field這種偵測老鼠移動與行爲的儀器也越來越複雜化，在會場當中有看到許多新的open field機器，從傳統的XY軸偵測老鼠行爲模式，轉變成爲可偵測XYZ三方向的機器。此外，有些更新的儀器在培養籠中還加裝有類似rotarod的機器，同時可以監測老鼠的跑步情形、有些機種則是增加可以同時偵測老鼠進食量、喝水量的感測器。會場隻中也有看到一台新的機器是專屬於小鼠的紋身機器，之前在做小鼠實驗時都會遇到一個很頭痛的情形，剛出生的小鼠因爲手跟腳指頭都還沒有分開，所以無法進行標記，在加上耳朵還沒有發育完成所以無法打耳標或剪洞，而那台紋身的機種號稱可以從出生後一天就可以使用，無痛且可以持續到長大。對於做幼鼠實驗的人幫助很大。晚上則是參加美國SMA基金會所舉辦的SMA專題演講

「SMA疾病的新基因治療antisense oligonucleotide, a new gene therapy for SMA」，主要是請今年在JN發表的作者來演講，作者利用antisense oligonucleotide (ASO) 將影響SMN2 exon7 inclusion的一段基因silence，藉此增加SMN2 exon7 inclusion，進而增加SMN蛋白質的表現量。作者利用Intracerebroventricular (ICV) 的方式將特殊的ASO從腦脊液將其注入老鼠體內，其發現ASO可以增加SMN mRNA以及蛋白質的表現且增加SMN在細胞核內形成gems的數量上升。分析老鼠的肌肉發現其在胸部以及lumbar的SMN表現量都有明顯的改善。且作者發現修飾過後的ASO並不會引起免疫反應。因此，其適合用來做基因治療。之後作者拿ASO來治療我們實驗室的老鼠模式，發現ASO可以有效的改善老鼠耳朵和尾巴爛掉的情形。而最近幾個月作者將實驗的對象從老鼠變成恆河猴，發現在非人類的靈長類中，將ASO從腦脊液將其注入仍舊可以順利的傳送到脊髓之中，並且增加恆河猴SMN的表現量。其他的實驗仍在進行中，在非人類的靈長類中是否可以達到相同的效果仍在確認當中。不過這證明ASO確實是一種有潛力的SMA藥物。

11/16上午抵達會場並開始聽取相關海報：「Cell specific ablation of pten signaling alters gabaergic circuitry」，因為我所研究的藥物根據之前的報導顯示其會調控pten的表現，因此聽取相關的研究希望找出之間的關聯性。作者發現PTEN主要表現於發育中的神經，其為GABAergic circuitry所需要但是並非必要的條件。若在發育中的GABAergic neuron降低PTEN的表現量會增加細胞之間的互動在cortex之中。因此PTEN主要是會影響發育中GABAergic neuron。之後則去參觀SMA基金會的攤位，SMA基金會是一個專屬於美國SMA疾病的基金會，其每年都會舉辦許多學術或非學術的演講與研討會，主要致力於改善SMA病人的生活並尋求治療的方式。SMA基金會算是一個資金充足的基金會，都會編列預算支持SMA相關的學術研究。此外，在SMA相關海報展示的會場，不時可以看到他們的人員來聽取演講並提供一些相關的資訊，算是對SMA研究非常關切的基金會。

11/17上午抵達會場並開始聽取相關海報：「An orally bioavailable compound increases survival and function in a mouse model of spinal muscular atrophy」，作者之前發現在NSC34的細胞中， β -lactamase receptor assay發現到quinazoline衍生物可以促進SMN promotor的表現。因此作者與藥廠合作利用quinazoline衍生物 (D157495) 來治療2B/-老鼠模式 (是一種將splicing factor, Tra2 β 1結合位置GGA \rightarrow TTT產生的SMA老鼠模式)。作者發現D157495其可以造成DcpS抑制的IC₅₀劑量為20nM。作者利用20mg/kg的D157495從出生後第4-20天給予治療發現其可以改善老鼠的生存率與增加其體重。目前作者發現此D157495的半衰期約為60小時，但是治療後5天仍可以在老鼠的腦中偵測到，但脊髓中仍不清楚可以存在多久，這部分仍在進行中。所以這是一種新的具有潛力的SMA藥物。「Physiological analysis of zebrafish neuromuscular junctions as an approach to study motoneuron disease」，早期有許多科學家嘗試要做出SMA的zebrafish動物模式，但是因為影響了大部分的SMN功能，所以導致無法做出生命週期較長的zebrafish動物模式。作者是利用Smn Y262stop (mutant) 類似於smn Δ 7模式。而此zebrafish可以被生出來並且發現其在pre-synaptic

的地方有缺陷，到後發病末期幾乎不會游動、活動力很差。在加上魚的生命週期快速，因此是一個新的研究SMA疾病的動物模式。「The survival of motoneuron (SMN) protein is molecularly linked with the rho-kinase(ROCK) pathway」，作者主要是研究profilin2 phosphorylation與神經分化之間的關係，其利用Trans-SUMOylation system (S1-SMN-EGFP、pEGFP-SUMO、UBC9-profilin 2) 發現profilin 2會和SMN相互作用。此外，作者發現knockdown SMN會導致profilin 2的hyper-phosphorylation，而profilin 2 phosphorylation會促進neurite outgrowth。並且發現profilin 2會和SMN相互作用的主要位子是在exon 5。若將在病人上面發現的mutation (689C>T S230L) 在SMN上面進行突變，則會破壞profilin 2和SMN的相互作用。

心得：

此次會議算是收穫良多，因為在國內同樣是做 SMA 小鼠的實驗室很少，再加上我們實驗室又有進行一些藥物的篩選，所以遇到很多的困難都不知道要找那些人尋求幫助。而這次的會議來自世界各地同樣是做 SMA 研究的實驗室，所以在討論問題的時候，很容易就能夠抓到重點提出合適的建議。像我主要是做 SMA 老鼠的藥物治療部分，因為藥物本身的毒性比較強，雖然在老鼠身上可以改善 survival of motoneuron (SMN)這各主要影響疾病的蛋白表現量，但是因為所用的藥物在高劑量之下會造成體重下滑、骨骼及血液發育有問題等…問題，進而導致老鼠的死亡。而在海報展示期間剛好有遇到一個美國的 PI，她的實驗室所採用的藥物與小鼠模式也有類似的情形，因此她提供了不少不錯的建議，包括：1.採用固定劑量給藥，不要依照之前別人的 paper 是依重量給藥。2.不一定要一直持續吃藥，根據她們的經驗有些小鼠模式只要度過了一個發育的時期，其就可以生存，因此她建議我們可以參考她們海報的餵藥時間，用我們的藥物與小鼠試試看。3.收集老鼠樣品的時候，可以調整時間點。因為根據之前的 paper 都收集病鼠發病快要死亡前的組織樣品，病鼠之所以會死亡可能就是 SMN 蛋白質的表現量不足，因此，在這個時間點收到的樣品可能會和沒有治療前的差不多。所以可以考慮收較早的時間點，較能比較出之間的差異。

除此之外，也去聽取了 Jackson Lab 新的 SMA 老鼠模式，其算是一種很新的老鼠模式，其可以有不同的 copy 數的種鼠，藉由不同 copy 數的老鼠互配可以獲得不同研究程度的 SMA 病鼠。此老鼠模式是利用老鼠的 smn 的 exon7-8 置換成爲人類 SMN2 的 exon7-8 而產生的 SMA 老鼠，雖然沒有像我們實驗室的 SMA 老鼠那樣接近人類的基因組成，但是因為其可以有效的藉由控制 copy 數量來繁殖出所要嚴重程度的老鼠。因此，今年有許多實驗室開始有相關的研究出來，將來也是熱門的老鼠模式之一。而且其老鼠模式也有許多 SMA 老鼠的疾病特徵且發病的年紀較大，算是近年來疾病嚴重程度比較輕微的老鼠，對於篩選藥物是一種不錯的模式。

此行也見識到 SMA 基金會對於 SMA 這個疾病的重視，以往在國內貼海報的時候很少會看到疾病基金會的人會來參觀海報，也很少看到相關的病患會來參加

這樣的研討會。但是在這個會議中會發現 SMA 基金會的人會去觀看相關領域的海報並且提出一些建議以及詢問其治療的可行性，有些很厲害的甚至還會提供不錯的意見與實驗，算是國內很少見到的情形。也可以看到她們對於這些研究的重視與關心。此外，每天在會場都會看到許多坐著輪椅的人在會場穿梭，其中不乏 SMA 疾病的病人，她們也會去聆聽許多與她們疾病相關的海報，因此，在會場就會讓人感受到要去努力找出可治療疾病的方式，也讓人感覺到自己研究的重要性，也算是另類的鼓勵。這方面大概是我們國內所缺少的，因為在國內的感覺一直是覺得基礎研究與臨床有一大段的距離，病人並不會去關心一些基礎的研討會，但在這完全展現出不一樣的感覺，這點是值得我們效法的一點。

最後我很感謝國科會提供經費讓我有機會可以去見識到不同的國際性研討會，也聽取到不少有意義的建議，經過這次的活動幫助我們能夠有更寬廣的視野以及了解到許多新的資訊，也與許多國外的學者互動切磋，希望經過這場盛大的研討會之後能夠讓我們的研究更好。

建議事項：

1. 出國開會的手續是否可以簡便一些，說實在的光是跑公文就要兩個月，出國去參加國際性的研討會如果經費有限，的話會降低出國去的意願，畢竟是出國去與國外的學者互動是一件好事，卻會因為手續複雜又很不方便影響出國率。
2. 國內的感覺一直是覺得基礎研究與臨床有一大段的距離，病人並不會去關心一些基礎的研討會，但在這完全展現出不一樣的感覺，這點是值得我們效法的一點。

