

出國報告(出國類別:進修)

醣科學以及癌症幹細胞在大腸直腸癌轉移之角色
Glycoscience and Cancer Stem Cell in
Metastasis of Colorectal cancer

服務機關:國立臺灣大學醫學院附設醫院外科

姓名職稱:黃約翰/主治醫師

派赴國家:美國/哈佛大學醫學院

出國期間:99年12月27日至101年12月26日

報告日期:102年2月26日

研究計畫中英文摘要：

計畫中文摘要

有越來越多的研究結果顯示，癌症由多種表現型的細胞族群組成。在這些異質性的細胞，有部份的細胞具有自我更新的能力，同時也有著更強的生成其他癌細胞能力。有著這樣類似生理學上幹細胞特質的細胞，我們稱之為腫瘤起始細胞，或者是是癌症幹細胞中。我們計畫利用幹細胞的慢循環（slow cycling）生長模式，找尋癌症細胞中的幹細胞。藉由細胞表面標誌以及微晶片的方法，我們試著區分能夠長成腫瘤的細胞以及無法長成腫瘤的細胞。我們從癌細胞分離出癌症幹細胞並發現新的辨識標誌。這些癌症幹細胞陸續地可以飄浮獨立的生長成細胞團塊，檢視這些新生的細胞團塊，在和原先的腫瘤細胞比較之下，發現了新的腫瘤幹細胞標誌，並且產生含有不同細胞功能標誌的新族群細胞。這樣的計畫，幫助前瞻性地發現新的癌症幹細胞標誌，並且可以了解癌症幹細胞在腫瘤增生，轉移的過程所扮演的角色。經由這樣的研究，我們將可以發展出有效的新策略，針對癌症幹細胞來做治療，以期達到更好的成效。

研究計畫中英文摘要：

計畫英文摘要

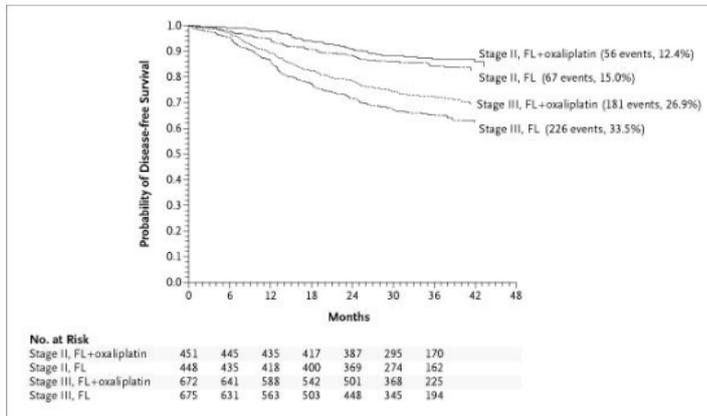
More and more evidence showed cancer cells are comprised of phenotypically diverse populations of cells. In these cells, we can identify subpopulations with self-renewing capacity and tumorigenesis that mimic the physiologic stem cell. These cells are so called tumor initiating cells or cancer stem cell. We identified which subset of cancer cells had the ability to form new tumors by using the idea of slow cycling from the normal stem cells. We distinguished the tumor initiating cells from the non tumor forming cancer cells based on cell surface marker expression and microarray. The tumorigenic subpopulation tested by in vitro spherogenic assay and cells within this population are capable to generate new tumors spheroid with cells with the same functional marker as well as the phenotypically diverse mixed populations of nontumorigenic cells present in the initial tumor. With the model to identify tumorigenic cancer cells prospectively will facilitate the elucidation of pathways that tumor progression and metastasis. Furthermore, because cells initiate tumor development, strategies designed to target this population may lead to more effective therapies.

目次

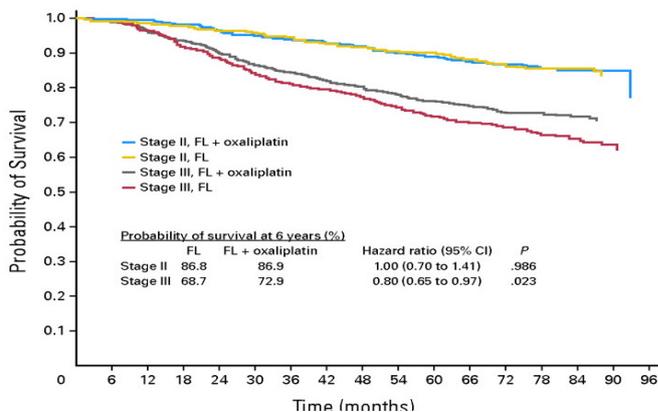
1. 目的.....	5
2. 過程.....	7
3. 心得.....	15
4. 建議事項.....	17

目的：

近十年內，在大腸直腸癌的治療方面，重大的進展之一，就是出現了利用 5FU 併用 oxalipatin 作為大腸直腸癌切除手術之後的輔助性療法。相較於傳統單用 5FU 來作為輔助性療法，併用 oxalipatin 的輔助性療法不但可以延後病人的復發時間，同時，也可以延長病人整體的存活時間。



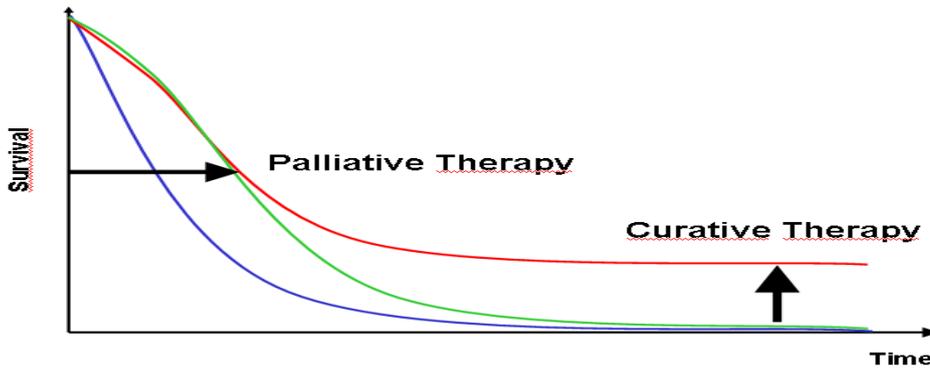
無復發存活率



整體存活率

如圖所示，5FU併用oxalipatin的輔助性療法，在大腸直腸癌第三期的病人治療上，不管在復發率或者市場其存活率的治療成績上，統計學上都有顯著的差異。不過，仔細探究這樣的資料，我們可以發現，在整體存活率上的進步差距，並沒有無復發存活率上的差距來的多。一個合理的猜測是，在某部分病人，在這樣的輔助性療法下，化學治療並沒有有效的殺死癌細胞，因為癌細胞產生了抗藥性。所以，化學治療只是延後了腫瘤復發的時間。一旦腫瘤復發時，病人最終的存活時間是延

長的。但是，病人的整體存活率就沒有辦法上升那麼多。



如圖所示，我們期待的治療成績，是不但延緩的病人復發的時間，同時也增加了整體病人的存活率。要解決這樣的問題，就要解決癌細胞抗藥性的問題。

在從醣類生物學角度來解析癌細胞的過程中，我們已經清楚的發現，有一種醣類轉移酵素，因著修飾細胞表面的醣類結構，可以改變大腸癌細胞對oxalipatin的抗藥性。在探索醣類修飾過癌細胞如何產生抗藥性機制的過程中，我們發現，癌細胞是藉由減緩細胞增生的速度來產生抗藥性。也就是說，癌細胞可以藉著減緩細胞循環的速度，"慢循環"來對抗化學治療藥物的作用。因為這些化學治療藥物的設計，是建構在癌細胞是種不受控制的快速分裂生長細胞的基礎上。可是當存在著慢循環幹細胞時，化學治療可能就會失去作用。而慢循環正是幹細胞的特質之一。假設存在著具有幹細胞特質的癌症細胞，而這樣的癌症幹細胞是導致化學治療失敗的原因之一，那表示，我們必須對癌症幹細胞多加研究認識，甚至重新思考化學治療的方向。

過程:

進修機構及指導教授介紹

哈佛大學為美國第一所大學。作為美國歷史最悠久的大學，哈佛大學的學術地位，不管是在學術論文的產生數，研究經費的申請，或者是各個不同單位的評比，哈佛大學名列前茅，這是無庸置疑的。而選擇哈佛大學作為研究進修的單位，正是想學習哈佛大學如何成就卓越的成功之道。

墨菲教授(Dr. Murphy)任職於布里根暨婦女醫院(Brigham and Women's Hospital)，同時也是哈佛醫學院病理學科的教授。他在皮膚病理學上的臨床研究上的成就早已備受肯定。不但相關的論文著作已達上百篇，同時也是多份期刊的編輯以及審稿委員。在和本研究相關的幹細胞研究上，墨菲教授也是處於領導地位。墨菲教授(Dr. Murphy)十分重要的成就之一，就是 2008 年發表在 Nature 的 **Identification of cells initiating human melanomas**。這篇文章同時成為當期的封面故事。墨菲教授(Dr. Murphy) 發現了 ABCB5 是黑色素癌症幹細胞重要標誌，這個標誌，同時也跟病人的臨床預後相關。同時，利用 Anti-ABCB5 的抗體，在老鼠模型上，可以得到令人驚訝的治療效果。只要針對癌症幹細胞治療，就可以有效的治療癌症。這對未來的治療模式有很大的啟發，可以說是重大的里程碑。之後，Dr. Murphy 也陸續發表了 CD133，Sox2，CD271，MITF 等和癌症幹細胞相關的標誌以及功能研究。在癌症幹細胞的研究上，墨菲教授(Dr. Murphy)可以說是著作等身，而且居於領導地位。在墨菲教授(Dr. Murphy)的指導下，得到了很大的啟發。

研究模式

具有自我更新(self-renewing)和分化能力(differentiation)的細胞被稱為幹細胞。幹細胞可以分為胚胎幹細胞(embryonic stem cell)，以及成年幹細胞(adult stem cell)。其分化成其他細胞的能力或許有差別而有全功能幹細胞(pluripotent stem cell)以及多功能幹細胞(multipotent stem cell)之差別。但是在概念上，自我更新以及分化這些核心價值還都是一樣的。

將這樣的概念，延伸應用在癌症細胞之上，我們就會發現，在癌細胞，有著少量的一群細胞，同樣具有自我更新以及分化長成腫瘤(tumorigenesis)的能力。從西元1960到1970年代，首先在血液腫瘤裡發現了具有自我更新以及形成腫瘤能力的小部份細胞。在概念上，這些細胞也都符合幹細胞的定義，所以也被稱為癌症幹細胞，或者是腫瘤起始細胞(tumor initiating cell)。

關於癌症幹細胞的研究，有許多想法是取材於幹細胞的研究。目前分離癌症幹細胞的方法中，有一大部分是根據細胞表面的標誌來完成。簡單來說，在癌細胞中，找尋和幹細胞表現同樣細胞表面標誌的癌細胞，再進一步研究這些和幹細胞表現相同標誌的癌細胞，是否也具有幹細胞的特性。藉由這種方法，不但可以在血液腫瘤內找到癌症幹細胞。在其他的腫瘤中，像是腦瘤，肺癌，乳癌，大腸癌中，都可以找到癌症幹細胞的蹤跡。

只是，利用這樣的標誌找尋法，只能找到既有已知的標誌。這樣的標誌的確提供了許多研究的方向。但是同樣的，這些標誌能否代表癌症幹細胞的全貌也同樣被質疑的。如果我們只用已知的標誌來找尋定義癌症幹細胞。那我們將失去找尋新的癌症標誌的機會。

所以，另一種找尋癌症幹細胞的方法，是利用側循環(side population)的方法，來找尋癌症幹細胞。幹細胞為了維持身體的的損耗修補，所以必須要有很強的抗毒能力，否則幹細胞一旦受到外來毒物的損傷，而失去的自我更新以及分化的能力，對身體將是很大的災難。所以，找尋有多重抗藥

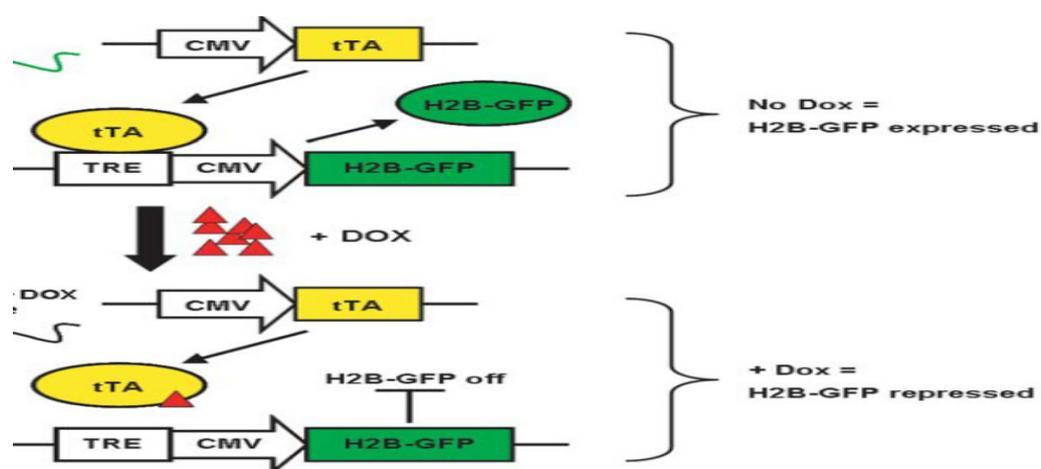
性基因(multidrug resistance)表現的細胞，成為找尋幹細胞的一種方法。不管是在正常幹細胞，或者是癌症幹細胞上，都發現了ABC運輸蛋白質(ABC transporter)的表現，是幹細胞標誌之一。

在這些方法之外，我們也嘗試從正常幹細胞的研究中得到啟發，找尋新的發現癌症幹細胞的方法。正常的幹細胞除了在胚胎時期要負起分化成人體三胚層以及各種組織器官的責任之外，也要維持生命一生中所有的損耗修補。為了維持這樣的機能，幹細胞是不應該隨便損耗的，同時也要保有較長的壽命。為了達到這樣的目的，幹細胞除了需要有比較強的排毒能力之外，也發展出一套特別的策略來應付這樣的需求。在維持自我更新的過程中，幹細胞會採取不平衡細胞分裂的方法。產生一個和原來母細胞一樣的子細胞，以及一個會快速分裂的暫時快速增長細胞(transit amplifying cell)，由快速增長細胞來大量分裂生長，可以減少DNA在複製過程中產生的錯誤遺留在幹細胞中。如果這樣的假設為真，那幹細胞就會採取較慢的細胞分裂速度，慢的細胞循環，也就是慢循環細胞是幹細胞的特色 (Sprading, 2001).

根據這樣的假設，利用DNA標誌藥物BrdU，在加上標定追蹤(pulse and chase)的研究方法，就可以找出慢循環的(slow cycling)的幹細胞。簡單來說，也就是將細胞先培養在含有BrdU的環境中，等到所有的DNA都標誌上BrdU之後，在將細胞移到不含BrdU的培養環境之中。細胞分裂速度快的細胞，因著DNA快速的複製，BrdU就會被稀釋。而慢循環的細胞，因為細胞分裂的速度慢，就會保有較高濃度的BrdU。藉由這種方法，我們就可以找到慢循環的細胞，並研究這樣的細胞是否具有幹細胞的功能。

但是BrdU是放射性物質，可能會因此增加DNA的突變機率，這也是這種研究方法最受批評的地方。所以，另外一種H2B-GFP標誌的方法就取代了BrdU的標誌方法。H2B是組蛋白質(Histone)構成的一部分，在H2B上加上螢光的GFP，同樣可以達到標誌DNA的作用。如下圖所示，加上利用

四環黴素調控系統(tet regulation system)，在四環黴素不存在的情況下，H2B-GFP可以表現，而在四環黴素存在的情況下，H2B-GFP就不會表現。使用標定追蹤的原理，先將細胞培養於不含四環黴素的環境，所有的細胞都會表現H2B-GFP，然後，在將細胞培養於含有四環黴素的環境下，快速分裂的細胞會將H2B-GFP稀釋掉，只有慢速分裂的細胞可以保留螢光。這樣的方法，一樣可以找到慢循環的細胞。利用這種找尋慢循環細胞的方法，在皮膚以及在血液，都成功的找到幹細胞並且可以找到幹細胞的標誌(Tumber, 2004)(Gallen, 2008)。

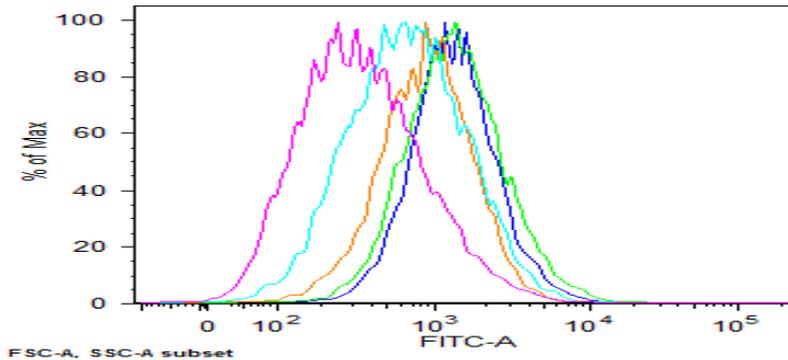


這樣的觀念，是否可以延伸到癌症幹細胞上，變成一個值得深入探索的課題。傳統認為，癌細胞的生長不受控制，而且生長速度快，這是癌細胞對人體造成威脅的主要原因。那慢循環的細胞，究竟在癌症生物學裡扮演怎樣的角角色，是否也是扮演著癌症幹細胞的功能，目前發表的相關研究十分有限，利用細胞膜染色的原理，同樣也可以在乳腺細胞中找到慢循環的細胞，而這些慢循環的細胞標誌，可以用來預估乳癌病人的預後(Pece, 2010)。也同樣利用這樣的方法，也在黑色素瘤中，發現調控細胞循環的JARID 1B。而JARID 1B，很有可能是調控幹細胞功能的重要分子。

研究步驟及結果

分離以及慢循環細胞的動力學 **Fraction and dynamics of slow cycling cells**

為了找尋慢循環細胞並且研究慢循環細胞的動力學，我們使用A2058細胞株，然後使用細胞染料PKH-67加以染色。在染色之後，我們連續五天都使用流式細胞儀分析這些細胞。我們發現，細胞染料的強度隨著每日細胞分裂而下降。如圖所示。



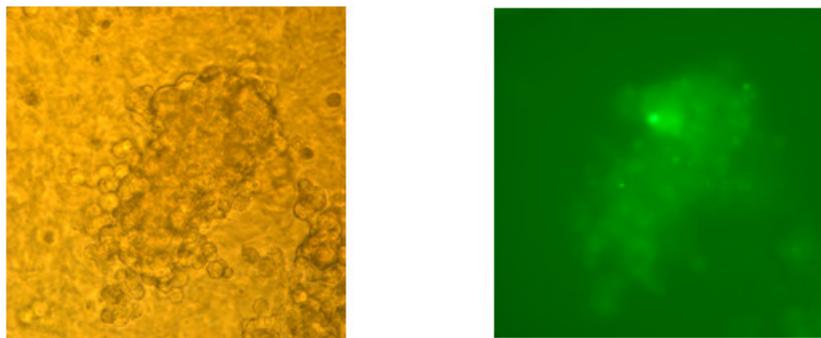
這些細胞染料強度降低的原因是因為細胞分裂，染料分配到兩個子細胞上，所以強度降低。但是，仔細觀察，會發現有部分細胞，即使到了第五天，依然維持在的一天的細胞染料強度。這樣的細胞，我們稱之為慢循環細胞。

無定錨細胞生長 **Anchorage independent cell growth**

在利用細胞染料標示的方法找到慢循環細胞之後，我們利用這些慢循環的細胞進行體外的試驗來進一步分析這些慢循環細胞，並且瞭解這些慢循環細胞的特性。我們利用正常生理幹細胞能夠進行無定錨細胞生長的特性，來分析這些慢循環細胞是否有幹細胞的特性，並且分析這些慢循環細胞是否有比較強的腫瘤生成能力。

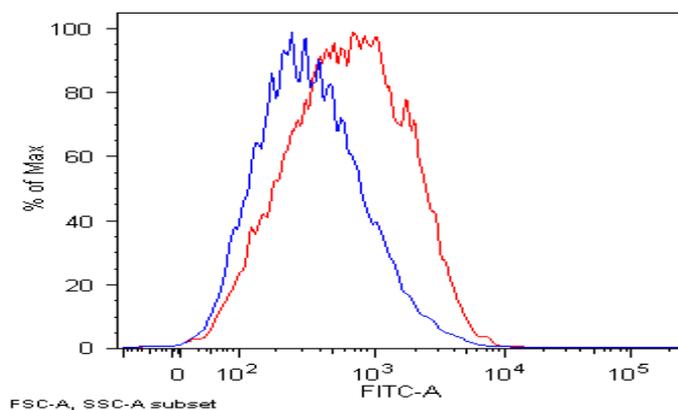
無定錨細胞生長就是讓原本需要定錨黏附培養皿壁的細胞，在懸浮的狀態下生長。一般非癌症

幹細胞的腫瘤細胞，一旦處於懸浮狀態，就可能死亡或者停止分裂。而癌症幹細胞，則是有在懸浮環境中生長的優勢，而能持續分裂生長，在懸浮的環境中生成細胞團塊 (Spheroid)。這樣的無定錨能力，和癌症幹細胞的自我更新能力有很大的關聯性 (Dontu et al., 2003).



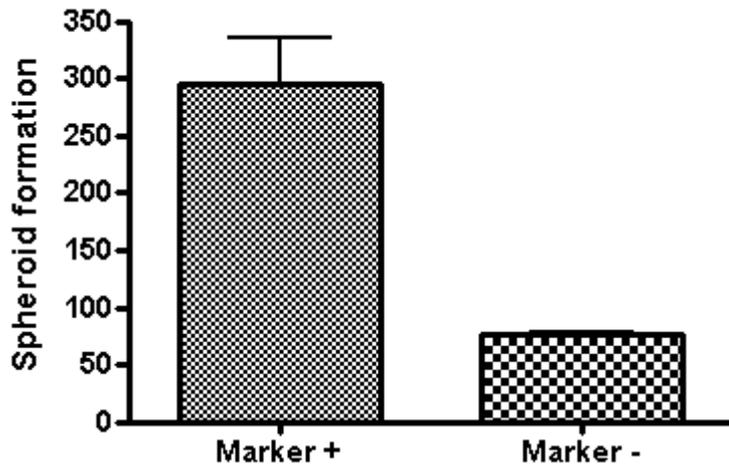
我們在螢光顯微鏡底下，觀察這些細胞團塊，我們可以發現細胞團塊是懸浮的無定錨生長。在細胞團塊的中央，我們可以發現一個螢光下的亮點。這個亮點，就是細胞染料標誌細胞，也就是慢循環細胞。這樣的發現，符合我們的假說，癌症幹細胞，也就是慢循環細胞，分化成暫時性快速分裂細胞。這些快速分裂細胞，就不會有細胞染料標誌，也就不會發出螢光。這樣的發現，暗示著細胞團塊，是由一個慢循環的細胞染料標誌細胞所分裂分化生長而來的。也就是說，相較於一般細胞，慢循環細胞有著比較高的細胞團塊生成能力。也就暗示我們，慢循環細胞就是癌症幹細胞

此外，我們同時也發現，能夠漂浮生長的細胞，也有比較高的細胞染料強度，也就是說，細胞染料標誌細胞，和漂浮細胞有著很強的相關性。



細胞團塊生長試驗

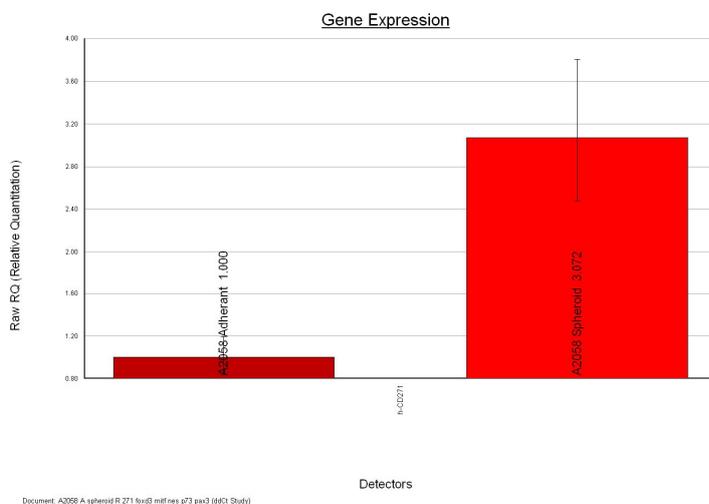
在分離出慢循環細胞之後，我們接著進行細胞團塊生長試驗。



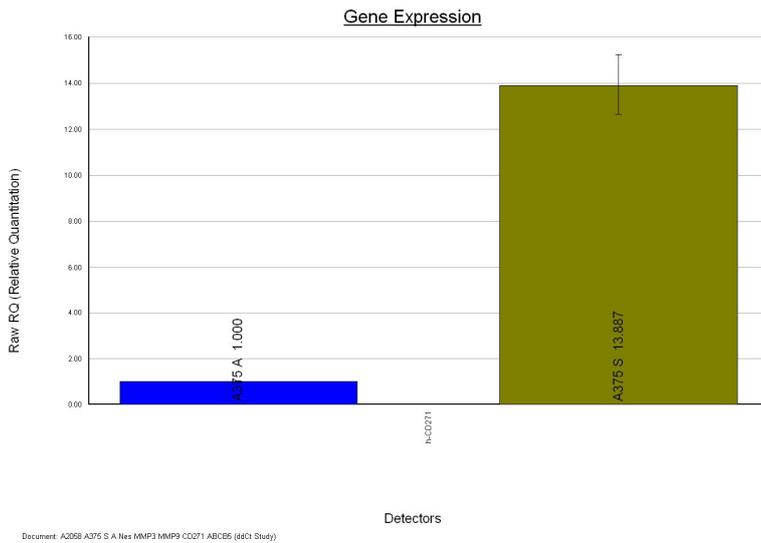
我們同時也發現，細胞染料標誌細胞，在細胞團塊的生成數目上，相較於沒有細胞染料標誌的細胞，有著比較高的細胞團塊生成數目。這樣的發現，更是在數字上證明了細胞標示細胞，就是癌症幹細胞。

細胞表面標誌表現 Cell Surface Marker Expression

在這樣的成果上，我們進一步的分析慢循環細胞的表面標誌，我們利用RT-PCR的方法，分析慢循環以及快循環細胞的幾種細胞表面標誌的RNA表現



Document: A2058 A spheroid R 271 luxG mif nes p73 pa3 (MCI Study)



我們發現，在兩種細胞株 A2058，還有 A375 的 RNA 分析結果，都發現癌症幹細胞的表面標誌 CD271 的表現量是增加的。不僅如此，我們也發現這些慢細胞所生成的細胞團塊中，CD271 的表現也是增加的。這表示，慢循環細胞有著腫瘤幹細胞的特性。同時，藉由慢循環細胞所生成的細胞團塊，我們可以得到比較多量的腫瘤幹細胞，來進行下一步的研究。

心得

重要的是，目前我們學習到使用慢循環細胞模型來找尋癌症幹細胞的方法，我們可以學習到的是一種方法，而不是只是學一個細胞標誌。學會研究的方法，遠比只是學會一個分子標誌重要。這樣的學習，對未來的工作有很大的啟發。藉由這樣的方法，我們有發現新標誌的能力，而不是只是追隨他人的腳步前行。

除此之外，在哈佛這段時間，我個人發現，美國人其實沒有比我們聰明，思考問題的深度與廣度其實也沒有比我們深刻。而做事的勤奮程度，更比不上東方人。他們往往一天只做一件事情，就準備下班，或者就準備下午茶，或者準備休假。從表面上，他們並沒有生產高品質研究的條件，從這樣表面懶散的環境，很難想像在哈佛怎麼有成就卓越的任何條件呢？

可是，不管如何，哈佛大學就是有許多高質量的研究成果，哈佛大學就是有卓越的學術地位。這樣的矛盾，更值得我們深入探究，我們可以發現，美國人做的事情雖然少，可是，他們做事情卻是很專注，因為專注，就容易專精。當每個人都專精於某件事情的時候，事情就容易做好。這就是一個高度分化社會的樣子。每個人做的事情不多，可是組合起來就是相當偉大的一件事情。就像組織裡頭，幹細胞的數目不多。占大多數的都是分化後的細胞。分化後的細胞只能專精於一個功能，這樣就夠了。

相較於美國，臺灣對人的要求，常常是需要每個人扮演不同的功能，而且每個角色都還要扮演得很好。這樣的結果，是讓臺灣人每件事情都會，可是卻沒有辦法做的好。如同幹細胞一樣，表面上幹細胞有多功能或者是全功能。但是，我們的身體其實並沒有任何一項功能是由幹細胞來完成的。我們身體的運作事實上是由分化後的細胞來維持機能的。一個都是由幹細胞組成的身體，事實上是沒有辦法運作的。事事通，事實上是事事鬆。我們反而沒有辦法把所有的事情做好，只是讓自己整天忙碌，工時長，效率卻低。臺灣的運作方式讓我們陷入空轉。也許，在思考成就卓越的過程中，我們該導入新的想法，而不是看到別人有什麼，我們也全部要什麼，結果，什麼都沒有得到。

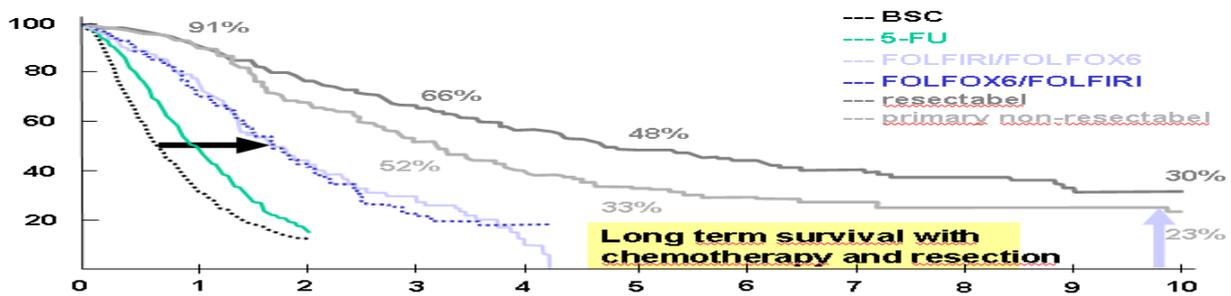
怎樣建構我們的單位，怎樣建構我們的研究團隊，甚至是怎樣建構我們的國家，怎樣的運作模式才是我們需要的？出國這兩年，也許因著文化上的衝擊，反而多了很多思考的空間，在比較遠的

地方看臺灣，反而可以看出不一樣的想法。

建議事項

目前在癌症的治療上，因著多科整療團隊的合作，治療的成效越來越好。

Survival with multidisciplinary approach



可是要突破瓶頸也越來越困難。癌症幹細胞的概念，也許提供另一個思考方向。在過去，大部分的化學治療藥物，都是針對快速分裂的細胞來做治療。這樣的治療，確實幫助了很多病人。可是，如果沒有導入癌症幹細胞的思考，沒有發現慢循環是癌症幹細胞的特性之一，我們的治療方向，就會有一個缺口，我們會有治療的盲點。藉由癌症幹細胞的思考方向，也許可以幫助我們在癌症的研究上，以及治療上，都能有更好的成績。

如何針對慢循環細胞來做治療，這成了目前很重要發展的課題。顯然，過去傳統的化學治療藥物，可能沒有辦法完全的清除慢循環細胞。所以，我們應該針對慢循環細胞做進一步的研究，如果們目前的研究顯示，慢循環細胞有著特別的表面細胞標誌，這樣的標誌，也許可以成為重要的標靶。同時，也因著慢循環細胞的研究，我們可以有效的培養慢循環細胞。所以，我們有機會可以進一步了解慢循環細胞的訊息傳遞路徑，調控機轉。在了解這些之後，我們可以發展出針對慢循環細胞的治療藥物。這應該就是轉譯醫學的精神，我們在實驗室進行的工作，能夠有機會啟發我們在臨床治療的想法，讓實驗室研究的成果，能夠落實在幫助病人上。

在這段研究過程中，我覺得個人所受到最大的幫助，就是思考的啟發以及想法上的激盪。臺灣目前的研究環境其實不比哈佛大學差，甚至有些設備比美國所用的機型還要新穎。可是研究並不只是靠設備，還是要靠思考想法的激盪。甚至是在實驗室中無目的的聊天來激盪想法。所以，我會建議應該有更多人出去進修，在同一個地方待久了，想法常常會僵化；同一群人互動久了，我們也容易陷入相同的思考框框。這樣的進修，確實也提供了往後研究的養分。

同時，我的指導教授，墨菲教授，在我一到實驗室的時候，就跟我提到，他並不會提供我想法，也不會指示我做怎樣的實驗。他只會跟我激盪，挑戰我的想法。讓我的思路更清晰。所以在激盪的同時，出國進修的人在出國之前，也應該要先建構自己的想法，這樣才有交流的空間。我們過去所學，學習要像海綿一樣，先放空自己來吸飽。可是，就我在這個實驗室所經歷的，放空自己，沒有想法，反而失去了激盪的機會。就美國人的角度來看，反而是不夠積極。也許是東西文化的差異。除了政府提供更多出國進修的機會，以後要出國進修的人可能也要預備文化上的衝擊，才會有更好的學習成果。