

出國報告（出國類別：開會）

第一型小窩蛋白缺陷降低早期腦受損
於實驗性腦溢血

Caveolin-1 Deletion Reduces Early
Brain Injury After Experimental
Intracerebral Hemorrhage

服務機關：國防醫學院生命科學研究所

姓名職稱：自費研究生 張哲逢

派赴國家：日本

出國期間：100.05.15-100.05.21

報告日期：100.06.01

摘要

實驗目的：

腦溢血為中風的一種有著高死亡率其特徵為血液滲入腦間質和形成血塊。雖然它有公眾的重要性，但醫學對於該疾病的治療仍不夠。第一型小窩蛋白是細胞膜小窩的主要組成，已被知道對於膽固醇的恆定和訊號傳遞有調節作用。在中樞神經系統，第一型小窩蛋白的生理病理角色已經被報導與維持神經架構和調節神經可塑性有關。過度表現第一型小窩蛋白與阿茲海默症有關，然而剔除第一型小窩蛋白會增加腦缺血的所造成的傷害。第一型小窩蛋白在腦溢血的角色還不知道。在這個實驗中，我們將探討第一型小窩蛋白在腦溢血疾病中的生理病理角色。

實驗方法：

利用微注射第七型膠原酶至野生型小鼠和第一型小窩蛋白剔除小鼠的紋狀體誘發腦溢血。初代培養神經細胞則是用來測試第一型小窩蛋白對腦溢血造成神經細胞傷害的貢獻。慢病毒載體傳導和小型干擾核甘核酸轉染則是用來探討抑制第一型小窩蛋白之後的機轉。

實驗結果：

第一型小窩蛋白在人類和小鼠出血邊緣區的神經細胞和內皮細胞的表現量增加，第一型小窩蛋白剔除小鼠在腦溢血發生一天之後相較於野生型小鼠有較小的受傷體積、較輕微的神經損傷、較不嚴重的腦水腫和神經細胞死亡。保護機轉源自於減少中性核球蛋白的浸潤、減少發炎介質、和趨化激素。第一型小窩蛋白剔除或抑制的神經細胞對於氧化血基質所造成的細胞死亡較有抗性。並漸少了動物體或細胞內的自由基生成和第一型血紅素氧化酶。

實驗結論：

這些實驗結果發現了第一型小窩蛋白在腦溢血中有著傷害性的角色，抑制第一型小窩蛋白或許能提供腦溢血疾病一個新的治療面向。

目次	
摘要	-----Page 2
本文	-----Page 4
目的	-----Page 4
過程	
2011.05.15	-----Page 4
2011.05.16	-----Page 5
2011.05.17	-----Page 6
2011.05.18	-----Page 6
2011.05.19~2011.05.20	-----Page 7
2011.05.21	-----Page 7
心得	-----Page 8
感言	-----Page 8

報告主文

目的

學生此次參加位於日本兵庫縣淡路島所舉行的第十三屆腫瘤壞死因子國際會議，該會議為期五天於 2011 年 5 月 15 日開始至 2011 年 5 月 18 日結束，今年的會議討論主軸為：腫瘤壞死因子和腫瘤壞死因子接受器家族、發炎反應相關細胞激素及其接受器家族、先天性免疫系統和後天性免疫系統相關之訊號傳遞分子、腫瘤壞死因子和發炎反應相關細胞激素在生理學上或病理學上之功能探討。會議所涵蓋的醫學研究領域包含：免疫、發育、細胞凋亡、自體免疫疾病、癌症、感染性疾病(包含細菌和病毒)、神經科學之生理病理學，會議中也對於跟腫瘤壞死因子有關的疾病治療策略和藥物設計方法學進行探討。在這個會議中共有十一場以口頭報告為主的小型研討會舉行，每個小型研討會皆設有專門的研究領域主題，並邀請二至四位專家學者進行口頭演講，而這些專家學者皆在許多具有高影響係數的國際期刊(nature, science, cell, nature medicine, nature reviews immunology, immunity...等等)中發表為數不少之研究論文，聆聽他們的演講及論述實在令人獲益良多，學生將專家學者報告的內容以及會議筆記彙整於如下節。學生此次也以壁報展示方式發表自己在就讀博士班期間針對腦溢血疾病的研究成果，以期能與來自世界各國的研究學者交換研究意見，因為在國內的研討會上較難碰到此領域的專家學者可以提供意見，因此本次第十三屆腫瘤壞死因子國際會議提供我一個很好的機會可以聽取國外在不同研究領域的頂尖學者對於我的研究的意見，讓我能有機會聽取建議以增進研究邏輯與能力，同時也積極尋找與不同研究領域結合探討醫學研究的可能性。

過程

2011.05.15 (星期日)

早上台北時間於台灣桃園國際機場(08:30)搭機(長榮 BR 2132)至日本大阪(12:10;日本時間)關西機場後，遂搭日本國鐵再轉乘公車過海至日本淡路島抵達國際會議場地。當天下午即向大會報到，並於晚間聆聽由 Dr. Frances Balkwill 主講的第一場 Keynote Lecture，講題為【Tumor necrosis factor or tumor promoting factor】，在這個講題當中她闡述了 TNF 在癌症的雙面角色，雖然大多數的研究論文認為 TNF 是一個治療癌症的標靶，但是她認為因為 TNF 下游調控太多不同的蛋白質而且，下游產物被誘發程度的不同往往會造成不同的反應，因此只是單純的去改變 TNF 的釋放量或者是接受器的活性，不見得能得到治療癌症的效果。她也提出了許多在人體的研究和目前她自己的 per-clinical study，希望能提供與會人士一些不同的思考面向以及激發大家的想法，對於癌症的治療有更進一步的革新。

2011.05.16 (星期一)

本日首先登場的第一、二場小型研討會的討論主旨為 "Signaling in inflammation"，專家學者們對於腫瘤壞死因子接受器活化之後下游所產生的 linear polyubiquitination 在細胞內所扮演的訊號傳遞功能有著熱烈的討論，在傳統的 polyubiquitination 一般被認為與賦予老化或結構錯誤的蛋白質一個訊號，使得它們能夠被特定的酵素辨識之後，送往 proteasome 被 degradation，藉由這個過程得以維持細胞原有的生理功能，而傳統在蛋白質上的 polyubiquitination 會在胺基酸序列上的七個位置 Lysine 有可能發生(6, 11, 27, 29, 35, 48, 63)，其中 48 和 63 就是發生傳統 polyubiquitination 的位置，但是最近發現在其他位置上發生的 polyubiquitination 會使得分子間的排列變成 linear form，而這樣的排列方式便與傳統的排列方式做出區隔，而且功能也由原本的促進蛋白質 degradation 變成活化 TNF receptor 所活化的細胞內訊號傳遞路徑。但是在這個研討會中的主講者對於活化細胞內訊號傳遞路徑的最終結果，以及有哪些分子參與 linear polyubiquitination 的過程有著極大的爭論，Dr. Kazuhiro Iwai 和 Dr. Henning Walczak 在各自的研究中都發現 SHARPIN 在 linear polyubiquitin chain generating ligase complex 有重要的功能，如果缺乏 SHARPIN 就無法執行正常的 ligase 功能，除此之外他們也發現在這個聚合體當中的其他參與分子，HOIL-1L 和 HOIP 都是 linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC)的一份子也與 linear polyubiquitin 有著密切的關係。在 TNF receptor 下游產生 linear polyubiquitin 之後所造成的最終結果方面，他們兩位學者卻有著不同的理論，一位認為當 linear polyubiquitin 產生之後會造成細胞質中的 NF- κ B 活化，之後 NF- κ B 活化會進入到細胞核中驅動與免疫功能相關的基因表現並製造出特定蛋白質，這些蛋白質皆被認為與造成發炎反應和細胞走向細胞凋亡有關，但是另一位學者卻利用基因改造小鼠證明在內皮細胞活化 NF- κ B 會使得細胞產生對抗死亡的訊號，兩造在會議場上有著大量的引述和爭論，十分令人激賞。另一方面，Dr. Shigeaki Kato 則是發現糖皮質素 (glucocorticoid)會透過糖皮質素接受器 (glucocorticoid receptor) 誘發細胞內訊號傳遞分子 c-Jun 產生 sumoylation，並再更進一步 recruit 特定蛋白質群體 PRC2 complex 到細胞核內藉由甲基去活化 (inactivating methylation) 轉錄因子 AP-1 的活性。而他也發現糖皮質素接受器扮演一個 scaffold protein 的功能去協助 Sumo E3 ligase 對 c-Jun 執行酵素功能，但是糖皮質素接受器對於 NF- κ B 的活化卻不具功能表現，這點是比較奇怪的部份。不過他指出 EZH2 對 H3K27 的甲基化對於 AP-1 的結合，確實是抑制了 AP-1 與促發炎反應基因序列的結合能力，因此來達到抗發炎的作用。Dr. Shigeaki Kato 明確的闡述了糖皮質素藉由何種方式達到抑制發炎的作用，除了找到細胞訊號傳遞過程之外，對於蛋白質與蛋白質間或是蛋白質與 DNA 之間的結合及其如何結合，都探討得相當清楚，在這個階段的演講中我學習到對於發炎反應訊號傳遞路徑，以及促發炎細胞激素和抗發炎細胞激素之間的調控方式的相關新知。

第三、四場小型研討會的討論主旨在【Cytokine family; Cytokine in development, and its evolution】，Dr. Yoshimura 利用發炎性腸病的動物模式發現來自 Treg 的 IL-10 對於維持腸道的免疫功能有著重要的角色，他發現 PGE2 和 SOCS1 可以增加 T 細胞對先天性免疫功能的耐受性，同時利用 Socs1/Rag2 基因剔除小鼠也發現自然誘導的嚴重性結腸癌可以經由來自 Treg 的 IL-10 來得到改善，之後利用 COX 抑制劑去降低 PGE2 的表現量的時候卻會增加由於 Socs1/Rag2 基因剔除誘導的嚴重性結腸癌的嚴重性，因此他認為 PGE2/SOCS1 系統和 Treg/IL-10 系統對於腸道自體免疫疾病有著重要的調控功能。Dr. Marcos Vidal 在利用果蠅系統進行研究中發現，TNF 與惡性腫瘤的發生與免疫功能的調控有著密切的關係，他認為 TNF 對惡性腫瘤有著抑制和促進的兩種作用，但是決定因素是和當時的免疫系統情況有關，他同時也發現在 TNF signaling 中新的調控癌症分子蛋白 Ras 和 hijacking 所具備的功能與角色。在這個階段的演講中我學習到如何利用不同的免疫疾病動物模式去找尋新的蛋白質調控機轉以及找尋新的細胞與細胞間交互作用功能。

2011.05.17 (星期二)

第五、六場小型研討會的討論主旨在【Inflammation and cell death; Inflammation and cancer】，講者們在這個階段的演講中主要在於討論 NF- κ B-including kinase (NIK) 對於 NF- κ B 的調控作用，以及 IKK alpha 和 NF- κ B2/100 的磷酸化對 NF- κ B 活性的影響。他們發現 NIK 在 TNF 接受器的下游並且透過 RIP1 的活化使得細胞產生死亡的情況，而當 NIK 被基因剔除之後不但預防了 RIP1 的活化，同時也減少了 c-IAP1/2 的 proteasome 分解作用，在結論中他們認為 NIK 不但具備促進發炎的功能也對於癌症和正常細胞的死亡有著正向的促進作用。Dr. Masaya Uno 在演講中則是提出 NIK 廣泛的表現在乳癌細胞株和初代培養乳癌細胞中，當把 NIK 基因剔除之後會抑制 p52 的表現量並且減少 NF- κ B 下游基因的活化因而降低了乳癌細胞的存活率，所以他認為 NIK 可以做為治療癌症的目標之一，但是仍需要更多的研究來證實。

在壁報展示時間中，有許多的研究專家到壁報前和我討論研究成果，感到十分高興，一位 Dr. Asikenazi 教授對於我所研究的 Caveolin-1 十分感興趣，但他同時也認為我的研究需要更多了分子生物學技術來支持立論基礎，另一位 Dr. Anna 則是建議我利用 conditional knockout 探討免疫細胞對於腦溢血的角色，或許能提供更多有用的訊息給大家。這些意見學生都有記下並且思考可行性，希望能在之後的研究中更加補強。

2011.05.18 (星期三)

在第七、八、九場小型研討會的討論主旨在【Inflammation and acquired immunity; Inflammation and innate immunity】，事實上學生對於這個階段的演講內容非常生疏，因為學生主要的研究領域是神經科學，所以對於免疫學研究

領域的基本概念較淺薄，不過我對於這個階段中 Dr. Alexander Chervonsky 的演講很感興趣，他利用 conditional knockout 將 antigen presenting cell (APCs) 的 Fas 剔除，研究當缺少 antigen presenting cell 的 Fas 生物體內，T 細胞的活化情況是否會有所改變，在他的研究結果中發現當 APCs 的 Fas 被剔除之後會使得 T 細胞無法殺死被外來抗原所活化後的 APC，除此之外活化後的 APC 會不斷的一直活化 T 細胞使得 T 細胞變得過度增生，進而產生自體免疫疾病。這樣的研究方式倒是十分有趣，而且在活體內做這樣的研究非常的困難但很扎實。

在第十、十一場小型研討會的討論主旨在【Drug design in inflammation; Therapeutic application】，Dr. Domagoj Vucic 設計了一段小型分子鏈可以直接的阻斷 IAPs 的活性，而這段小型分子鏈居然可以辨識到 IAPs 的 IAP repeat domain，使得 c-IAP 快速的 auto-ubiquitination 最後藉由 proteasome 被 degradation，達到減少 IAPs 蛋白質表現量的作用，因為 IAPs 是 TNF 下游活化 NF- κ B 重要的調控分子，因此他藉由這個小型分子鏈成功的在小鼠實驗中減少腫瘤的生長。而在 Dr. Kishimoto 的演講中則是指出 IL-6 是一個治療免疫疾病的優質指標，在臨床上已經使用的藥物 Tocilizumab 也有很好的效果，而他也更進一步的去深入了解在免疫疾病當中 IL-6 所活化的 IL-6 接受器下游更仔細的調控機轉。在這個階段的研究之中我學習到如何合理的去找尋治療疾病的標的分子和設計藥物的基本概念。

2011.05.18 (星期三)

結束會議之後遂搭公車離開淡路島再搭乘日本國鐵到京都轉搭新幹線到日本東京，當晚住宿東京準備明日參訪日本慶應大學醫學部免疫學科吉村昭彥教授。

2011.05.19-20 (星期四~五)

學術參訪位於東京都新宿區信濃町的慶應大學醫學部免疫學科吉村昭彥教授 (Professor Yoshimura)，此次參訪中觀察到吉村教授實驗室中居然有高達 26 名學生和研究助理(包含助理教授)，而他所管理的實驗室中所包含的儀器設備幾乎是一個醫學院單一學科所涵蓋的所有設施。和吉村教授討論之後學習到如何管理如此多人數的實驗室以及他在免疫科學的研究經驗，也體驗到這個實驗室一年可以發表五~七篇國際期刊的實力。

2011.05.21 (星期六)

日本時間於東京羽田(10:50)搭機(長榮 BR 0189)抵達台灣(13:30)松山機場，完成此次國際會議與學術參訪之行。

心得及建議事項

本次是我在博士班第一次參加國際會議，此次年會規模還算大，每天的議程相當緊鑼密鼓，因此沒事先作好準備前往參加的話就會像是霧裡看花，因此學生在前往參加前先查詢相關講者的資訊，主要是哪些著作，他們的演講或是海報是在何時開始，這樣子就可以更加有效率的前往聆聽參觀，並且與他們直接的溝通。另外一種方式是依照主題的分類挑選每天想要聽的主題議程，從中選取演講跟研究海報，如此一來對於參加會議將會相當有效率。而這次會議的主角 TNF 說實在話已經是一個被相當研究過的蛋白質，但是參加的講者讓我感到很驚訝的是，在這麼一個傳統的訊號傳遞路徑中，居然還有這麼多的細節可以探討，比起只會求新穎的研究風格，深入的真的去探討單一學門中單一分子的功能，實在更顯得有意義。