

行政院國軍退除役官兵輔導委員會高雄榮民總醫院  
因公出國人員出國報告書  
(出國類別:研究)

赴美國麻州波士頓哈佛大學醫學院  
附屬教學醫院-波士頓兒童醫院  
進行腎臟再生醫學研究心得報告

服務機關：高雄榮民總醫院內科部腎臟科  
姓名職稱：主治醫師李柏蒼  
派赴國家：美國麻州波士頓  
出國時間：100 年 12 月 12 日  
至 101 年 12 月 11 日止  
報告日期：102 年 1 月 28 日

## 摘要

波士頓兒童醫院是哈佛大學的附屬醫院之一，去年評比為美國兒科醫院榜首；波士頓也是醫學的研究重鎮。我們在過往的研究中，使用Myh9螢光轉殖鼠，成功得到發螢光的腎臟幹細胞。在急性缺血性腎衰竭模式中，腎臟幹細胞可以降低腎臟傷害並提高存活率。波士頓兒童醫院腎臟科Jordan Kreidberg教授的研究由腎臟發育的觀點出發探討培育誘導性腎臟幹細胞的可能，是我們進一步學習的課題。在這一年進修中，完成WT-1回報基因轉殖鼠的設計及整個cloning。除了實驗室內相關技術及研究理念的增長，哈佛附屬醫院多樣的學術活動及新英格蘭地區的人文薈萃都豐富我這次的進修，感謝院方長官的大力支持，讓職得以在這一年中學習到許多寶貴的人生經驗，也對於研究的領域與方法，有了全新的眼界。希望在未來，可以依循這些歷練，回饋本院並在研究上有所創新。

## 目次

目的	-----	3
過程	-----	3
心得及建議	-----	5

## 目的

臺灣末期腎病變接受長期透析病人的盛行率一直高居世界之冠。不論慢性腎衰竭的原因為何，其共同的結果為間質纖維化、腎絲球及血管硬化。目前的治療策略只有控制血壓，低蛋白飲食以及使用血管收縮轉換酶抑制劑或血管收縮素受體阻斷劑。臨床上阻止慢性腎衰竭進展的功效並不顯著。因此，伴隨疾病的進展，最後都可能導致末期腎病變。然而目前對於慢性尿毒症的治療只有血液透析、腹膜透析以及腎臟移植。受限於器官之短缺，大多數病人只能靠長期透析維持生命。找尋新的治療方法讓受傷的腎臟恢復功能甚至再生腎臟一直是迫切解決的課題。

運用幹細胞於治療腎衰竭是一新的策略。有別於單一藥物的治療，幹細胞可於受傷組織分泌細胞激素、改善血管功能或直接分化為需要的細胞來幫忙腎臟再生。隨著諾貝爾生理醫學獎得主 Dr. Yamanaka 誘導性多功能幹細胞的成功研發，是否能由皮膚誘導出腎臟幹細胞仍不清楚。波士頓兒童醫院 Jordan Kreidberg 教授正著手進行這個研究主題，因此申請前往 Jordan Kreidberg 教授的實驗室進修。

## 過程

經過慎密的哈佛醫學院申請手續及將近二十四小時的飛行我們於十二月抵達波士頓。當天戶外攝氏零度，十點和 Kreidberg 教授約在他的辦公室見面，環境介紹後教授先告訴我實驗室各個研究主題內容，包括腎絲球腎炎、多囊腎及腎臟幹細胞研究，經過討論我選擇較有興趣的誘導性幹細胞作為我的研究主題。誘導性多功能幹細胞就是藉著加入數個基因轉譯因子將來自於皮膚的纖維母細胞轉型為具胚胎幹細胞功能的細胞。這是今年諾貝爾生理醫學獎得主 Dr. Yamanaka 的主要發現也是目前很熱門的研究主題。要將纖維母細胞誘導為腎臟幹細胞須要哪些轉譯因子組合及培養環境仍不清楚，但 Kreidberg 教授認為 WT-1 是腎臟幹細胞的必要因子，因此最重要的便是先要設計出 WT-1 回報基因轉殖鼠。這個轉殖鼠的細胞表現 WT-1 時也同時會表現對新黴素(neomycin)的抗藥性，在篩選誘導細胞時將較容易。由其它實驗室取得三個原始質粒載體(plasmid vector)

後便開始設計如何將 WT-1 基因接上新黴素(neomycin)和潮霉素(hygromycin)的抗藥基因。之前並沒有作過相關的實驗且是實驗室的新手，第一個月總是作不出預期結果，有點擔心。隨著實驗技巧的純熟與同儕及教授的討論，實驗開始上軌道。Cloning 的過程有五大步驟，每一步驟包括 PCR、基因片段酶切位點的作用、鏈接、純化、合成基因的轉移感染(transfection)、挑選確認菌落、DNA sequencing 以及 miniprep/maxiprep 放大新的合成基因等，經過幾個月的努力終於完成整個 cloning，隨即將基因片段送至轉殖中心作胚胎幹細胞的轉移感染。在等待結果時，也同時著手基因型鑑定(genotyping) 工具 PCR 及 Southern blot 的設計。由於須於整個老鼠基因體中偵測到 WT-1 回報基因片段，須要將工具靈敏度提高到  $10^6$ 。其中包括由老鼠尾巴提煉基因型 DNA、positive plasmid 的設計、不同系統 PCR 及 Southern blot 測試。在回國前一天接到 384 株轉移感染的胚胎幹細胞，只能由另一位博士後研究員接手最後的篩選工作。在這一年的實驗室工作，我學到了許多的實驗技巧與工具使用，更重要的是學會設計基因轉殖鼠的原則及方法。

Kreidberg 教授是波士頓兒童醫院及哈佛大學幹細胞學院的腎臟科副教授，從約翰霍普金斯醫學院取得醫學士及博士學位並在波士頓兒童醫院完成住院醫師訓練後，就不作臨床服務只專注於基礎研究。他平時話不多但對於實驗結果常提出關鍵的問題，在每週一次的 Lab. meeting，報告的人都戰戰兢兢的回答每一個質疑，經由這樣的討論每次都能刺激我們的想像。另外，當實驗遇到瓶頸時，和其他同事的討論所學到的東西更是我進步的來源。由於周圍有許多哈佛大學的附屬醫院及研究大樓，在實驗室老闆鼓勵支持下，常有機會聽到許多院內或跨院區的專家演講。例如在腎臟幹細胞研討會(HSCI Kidney Program Think Tank)中幾乎可以聽到大部分目前研究上最活躍學者的演講。在一些講座也有機會可以親自感受大師的智慧。例如在第二十屆 John F. Enders 講座邀請到 Harvey Lodish 教授，他是 MIT 終身教授、教科書 Molecular Cell Biology 的主編與 Whitehead 學院的創始人之一。雖然已七十多歲但仍充滿活力且回答聽眾提問相當犀利，令我印象深刻。

因為波士頓兒童醫院是哈佛大學的附屬醫院之一，擁有波士頓兒童醫院訪問學者的身分，也同時取得哈佛大學的教職員通行證，可以自由進出哈佛大學的各個圖書館。哈佛大學的主校園，由許多古色古香的歷史建築所組成，連同麻州理工學院及其它大學，

將整個波士頓地區形成一個大學城，是個文風相當鼎盛的地區。波士頓的公共圖書館，也是全美第一所公共圖書館，本身的館藏資源相當豐富。加上其他圖書分館，所有的資訊幾乎都可以在第一時間取得。這些世界一流大學研究學者所接受的研究補助金額幾乎是台灣的數十倍，加上世界各國人才聚集及周邊實驗室的緊密合作，研究上較容易挑戰具前瞻性的問題，然而競爭也相當激烈。我也曾參加附屬醫院中成人腎臟科的一些會議，臨床醫師對於新的治療方法較勇於嘗試使用。而較高的醫療給付使得臨床醫師的服務量遠低於台灣的醫師，所以可以分配給病人更多的看診時間。不禁感慨台灣的醫師要在繁重的門診量中利用緊縮的看診時間精準的完成診斷、治療與衛教。

## 心得及建議

整個進修過程都是很好的學習功課。雖然只有一年不長的時間，但也因為每一天都只能經歷一次，很珍惜的過每一天。每天與工作夥伴及每週實驗室會議中和教授的討論都能增長基礎研究的能力。藉著參與哈佛附屬醫院之演講及研討會，常有機會和專門領域裡的頂尖大師交流，開拓人生的視野。除了專業的學習，在這一年當中也認識許許多多的人並體驗美國文化及社會的進步。很感謝院方長官的大力支持，讓筆者得以在這一年中學習到許多寶貴的人生經驗，也對於研究的領域與方法，有了全新的眼界。希望在未來，可以依循這些歷練，回饋本院並在研究上有所創新。

若要完成一完整的研究主題並發表論文一年的時間略嫌不足，往往在熟悉實驗環境後沒多久，就必須準備返國。建議往後醫院若有培訓計畫時，可以在現有一年計畫之外，考慮結合其他經費來源，對於有發表潛力的研究將進修時間延長半年或一年，相信可以使未來進修的醫師獲得更多的研究突破。