

出國報告(出國類別：進修)

腸道移生大腸桿菌引發之移生阻力抵抗黏 膜沙門氏菌感染

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：盧俊吉、主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：101 年 8 月 31 日至 105 年 7 月 29 日

報告日期：105 年 10 月 17 日

摘要：

沙門氏菌感染是世界上食物中毒主要致病菌之一。在沙門氏菌感染腸道黏膜過程中，細菌鞭毛及第三型分泌蛋白可被宿主的Caspase-1發炎體辨認並引發免疫反應。宿主腸道的吞噬細胞可被沙門氏菌感染，並分泌發炎激素及活化Caspase-1發炎體引發遭感染的細胞產生細胞凋亡。宿主利用發炎激素及細胞凋亡來限制沙門氏菌生長。移生阻力(colonization resistance)定義為正常腸道寄生菌預防腸道致病菌感染之能力。實驗已知抗生素可以破壞小鼠正常腸道寄生菌提供的移生阻力並使小鼠被沙門氏菌感染。文獻已知正常腸道移生菌可藉由直接或間接機轉提供移生阻力保護腸道。腸道寄生菌可以直接分泌抑菌素或是競爭腸道營養物質來抑制致病菌生長。腸道移生菌亦可間接調節宿主免疫反應來提供移生阻力。已知文獻顯示腸道寄生菌針對沙門氏菌提供的移生阻力的研究貧乏。我們發現一隻大腸桿菌(E. coli XZ)具有保護小鼠腸道上皮細胞免於沙門氏菌感染。我們的初步發現顯示這個大腸桿菌提供的移生阻力不需經由TLR5 受體、MyD88、Caspase-1 發炎體、後天免疫細胞或是其他正常腸道菌的交互作用。本計畫將釐清大腸桿菌E. coli XZ如何利用直接或間接移生阻力保護腸道，並討論沙門氏菌與正常腸道菌及宿主先天免疫系統的複雜關係。

關鍵字：沙門氏菌、益生菌、大腸桿菌、腸道免疫

目次：	頁次
封面	1
摘要	2
本文	4-11
目的	4
過程	4
心得建議	7
附件	9-11

目的：

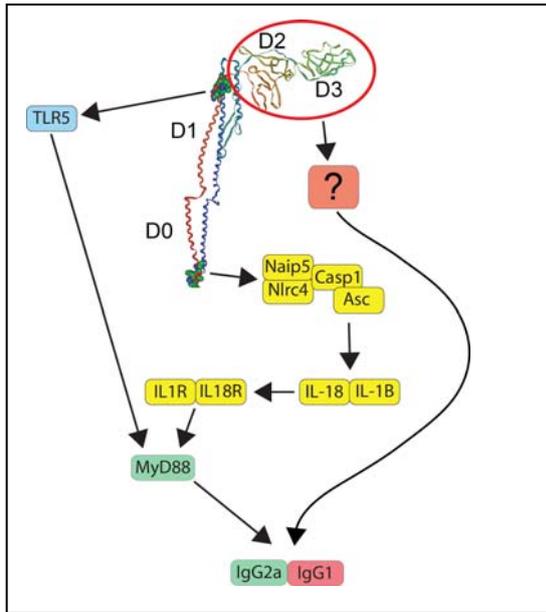
職本職學能為三軍總醫院風濕免疫過敏科軍醫，於 2012 年 8 月 31 日出國今修全職博士班，目的在於增強國防醫學院及三軍總醫院基礎免疫學研究，藉由博士班訓練，培養設計實驗及獨立研究的能力，博士論文主要為研究沙門氏菌致病機轉，同時藉此題目專研益生菌及腸道免疫與感染性疾病及自體免疫疾病病理機轉之相關性，藉此研究促進軍陣醫學發展預防醫學及減低戰爭時或平時備戰狀態所發生之感染性戰傷，增強全軍戰力。

過程：

職有幸在許多老師支持協助下到著名的美國西雅圖華盛頓大學(University of Washington, 簡稱 UW) 病理部攻讀疾病分子醫學博士班。華盛頓大學在 2016 年剛出爐的上海世界大學學術排名世界第 15 位，2015 年全美醫學院排名第 10 名，同時在臨床醫療類評比連續數年蟬聯全美第 1。11 位華大的校友或是教師曾獲得諾貝爾獎。華大主要校區在西雅圖大學區，然而醫學院院區及建教合作研究機構卻遍及大西雅圖地區，包括在大學區，景色優美的 south lake union，及繁榮的西雅圖市中心。很多華大醫學院的實驗室也位於非常出名的私人醫學研究機構如 Fred Hutchinson cancer research center, Institute for Systemic biology 及 Seattle Biomed 等等，這些私人實驗室的計畫主持人不僅能從豐厚的私募基金如微軟創辦人比爾蓋茲及保羅艾倫的基金會獲得研究資助，同時藉由華大醫學院學術合作提升自我教職與提攜研究生及博士後研究員，研究面向遍及感染性疾病，癌症，自體免疫疾病，神經退化性疾病，幹細胞生長與人造器官發明等等，華盛頓大學醫學院同時經由此固定的產、學、私募基金合作模式開發許多新藥，進一步藉由臨床試驗造福人類。

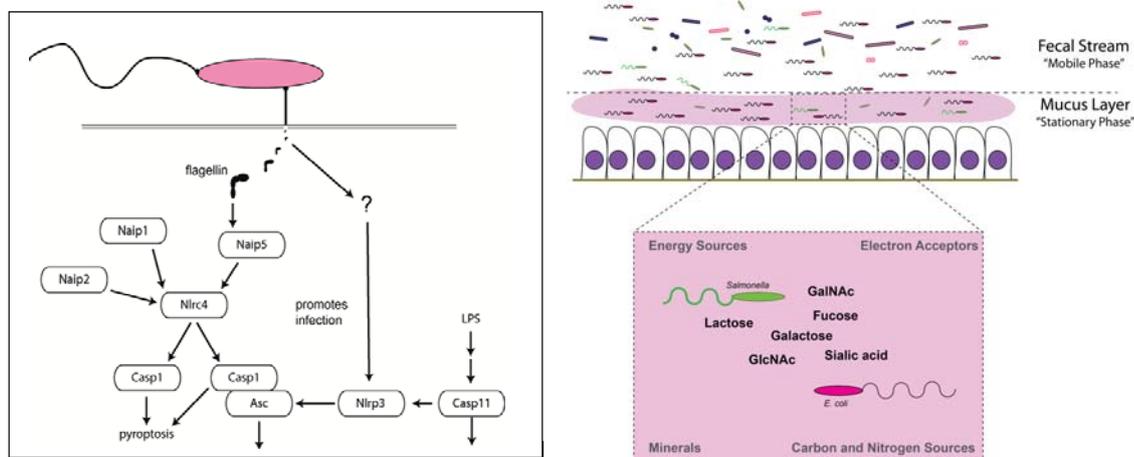
職於華盛頓大學攻讀博士學位，主要研究沙門氏菌(Salmonella)的致病機轉，職第一個博士論文題目為藉由分子生物學的研究設計預防沙門氏菌感染的疫苗（機轉如下圖）。過去幾年我們對於瞭解抗原的構造及抗原與抗體如何結合以引發免疫反應有長足的進步，這對於利用新型抗原來研發未來疫苗有很大的幫助。佐劑可以讓疫苗更有效，然而同時間我們對疫苗佐劑研發卻沒有同樣大的進展，目前大多數疫苗皆使用鋁鹽當佐劑。因此我們急需加強研究佐劑以利疫苗研發。如果我們能對佐劑引起宿主之免疫機轉有更深的了解，就能善用佐劑的抗原

生成性及生物特性來研發疫苗。細菌鞭毛具有很強的抗原生成性，因此被拿來研發作為人類疫苗的新型佐劑。鞭毛擁有很多生物特性讓它很適合用來當作疫苗佐劑。首先最重要的原因在於鞭毛本身是個很穩定的蛋白質，所以很適合作為疫苗佐劑研發所必須之生物工程使用。第二點原因是鞭毛能活化所有動物身上Toll like receptor 5 (TLR5) 引發的先天免疫反應,鞭毛也能引起齧齒類動物身上inflammation引發的先天免疫反應。第三點原因是鞭毛引發的免疫反應不會活化腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor)，如果佐劑會引發腫瘤壞死因子，將會使疫苗產生毒性而不易使用。第四點特色是鞭毛會聚集成多體長絲(filament)，這點可以活化不須T細胞協助之B細胞免疫反應。最後一點是鞭毛可以直接進入淋巴結中的淋巴濾泡，與淋巴濾泡內樹突狀細胞長期結合，對於活化記憶型B細胞有很大幫助。因此徹底瞭解鞭毛的生物特性與抗原生成性及宿主如何辨認鞭毛並產生先天免疫反應及抗體生成,對於疫苗的研發有很大的幫助。我們過去的實驗結果與發表的文章顯示我們已經建立很好的鞭毛引發免疫反應的動物研究模式，我們將會繼續運用這個模式在這個申請計畫。根據我們的結果,鞭毛會藉由結合Toll like receptor 5 或是inflammation這兩個受體而引發小鼠先天免疫反應及抗體生成。Toll like receptor 5可以結合鞭毛蛋白的D1構造，inflammation可以結合鞭毛蛋白的D0構造，然而 Toll like receptor 5或是 inflammation這兩種受體在小鼠產生的鞭毛專一性抗體生成都不是絕對必要的，因此還有一些未知的機轉參與鞭毛專一性免疫反應。根據我們的初步報告，鞭毛蛋白上的D2及D3構造足夠引發鞭毛專一性免疫反應，而且這個免疫反應並不是以 Toll like receptor 5及inflammation當受體，因此我們相信鞭毛蛋白的D2或D3構造可以跟D0或D1構造共同作用使小鼠可以產生鞭毛專一性抗體，同時我們初步發現鞭毛的D2/3構造具有類似完整鞭毛蛋白的疫苗佐劑效果，目前我們已經運用完整鞭毛蛋白作為佐劑在瘧疾疫苗的研究，獲得初步結果。人類對細菌鞭毛蛋白D2及D3構造的免疫生成性尚未明白，因此釐清這些構造的免疫作用機轉有助於未來運用細菌鞭毛作為佐劑及相關文類疫苗研發。本論文題目因指導教授研究經費受限因素，於2014年4月終止，但職仍奮力完成實驗初步成果，並於2015年美國免疫醫學會年會發表壁報張貼並獲得研究生獎學金，此研究計畫同時獲得2015年亞太風濕醫學會年輕醫師獎學金，實屬不易，需歸功於指導教授及三軍總醫院及國防醫學院諸多老師支持。



職於 2015 年 5 月再度更換研究題目，主要研究腸道的移生菌如何與沙門氏菌及宿主免疫細胞交互作用來預防腸道沙門氏菌感染（詳如下圖）。沙門氏菌感染是世界上食物中毒主要致病菌之一。人類如果誤食含沙門氏菌的食物如牛奶，肉類，雞蛋及蔬果，可能產生上吐下瀉，發燒，甚至敗血症嚴重致命的後果。在沙門氏菌感染腸道黏膜過程中，細菌鞭毛及第三型分泌蛋白可被宿主的 Caspase-1 發炎體辨認並引發免疫反應。宿主腸道的吞噬細胞可被沙門氏菌感染，並分泌發炎激素及活化 Caspase-1 發炎體引發遭感染的細胞產生細胞凋亡。宿主利用發炎激素及細胞凋亡來限制沙門氏菌生長。移生阻力(colonization resistance)定義為正常腸道移生菌預防腸道致病菌感染之能力。由過去實驗結果已知抗生素可以破壞小鼠正常腸道移生菌提供的移生阻力並使小鼠被沙門氏菌感染。文獻亦顯示正常腸道移生菌可藉由直接或間接機轉提供移生阻力保護腸道。腸道移生菌可以直接分泌抑菌素或是競爭腸道營養物質來抑制致病菌生長。腸道移生菌亦可間接調節宿主免疫反應來提供移生阻力。已知文獻顯示腸道移生菌針對沙門氏菌提供的移生阻力的研究貧乏。筆者的研究發現一隻小鼠腸道共生的大腸桿菌 (*E. coli* XZ)具有保護小鼠腸道上皮細胞免於沙門氏菌感染。我們的初步發現顯示這個大腸桿菌提供的移生阻力不需經由 TLR5 受體、MyD88、Caspase-1 發炎體、後天免疫細胞或是其他正常腸道菌的交互作用。職目前未來將試圖釐清大腸桿菌 *E. coli* XZ 如何利用直接或間接移生阻力保護腸道，並討論沙門氏菌與正常腸道菌及宿主先天免疫系統的複雜關係。職於 2016 年時獲得研究生論文獎學金赴美國免疫醫學會發表口頭論文報告及壁報展示，並同時於 2016 年

九月於柏林召開的美國微生物醫學會沙門氏菌醫學大會發表一篇口頭報告及兩篇壁報，職有幸於此兩個重要的美國醫學會同時獲得研究生論文獎學金。



華大醫學院位於市中心有間著名的港景醫學中(Harborview medical center), 職於動物實驗閒暇之餘會抽空參加每週四中午舉辦的重症醫學部病例研討會。這是一個相當有趣的病例研討會，由華大聯盟的各家醫院提供病例，住院醫師僅簡單報告病情摘要，胸腔科主任當場抽考非負責照顧該病患的主治醫師上台負責回答問題，判讀檢驗及檢查報告，並提供鑑別診斷，有點類似住院醫師的病例病理討論會或是專科醫師口試，這樣的討論會讓所有主治醫師隨時精進自我，以做為住院醫師的模範即達到教學相長之效。來美國進修是自己的夢想，首先感謝國防部各級長官支持，也要感謝家人支持及三軍總醫院風濕免疫過敏科及國防醫學院各科師長以及工作同仁們的幫忙讓我圓夢，沒有這些長官的幫忙，美國進修無法達成。

心得建議

職於 2016 年 7 月 29 返台，並於 8 月 1 日返院報到，有幸於師長指導之下獲得 2016 年科技部補助研究專題計畫，內容為討論腸道益生菌與沙門氏菌及腸道免疫之相關性。職預計利用美國進修所學之腸道免疫學及微生物學專長，發展益生菌應用於軍陣醫學，預計利用動物模式研發複合益生菌配方減低戰場及平時備戰訓練隻感染機率，期望能應用至國軍備戰準備。同時協助建立國防醫學院腸道免疫及腸道移生菌中心，目前已與國家動物中心合作，建議國內首座醫學中心無菌小鼠飼養環境，預計 2017 年春季可完成。

職有幸在許多老師支持協助下到世界著名的美國西雅圖華盛頓大學病理部攻讀疾病分子醫學博士班。華盛頓大學在 2015 年全美醫學院排名第 10 名，同時在臨床醫療類評比連續數年蟬聯全美第一。因此在華盛頓大學平均醫學博士畢業時間為 6 年，建請國防部長官考量各專業官科如醫學院因專業因素，延長公費全時攻讀博士學位的修業年限，否則因年限因素會縮限醫學系官科博士班學生出國進修的選擇性，也因此縮限國軍培養多方面專業人才的機會。

美國醫學院的博士班學生進入博士班就讀基礎醫學研究所之前幾乎都會先就讀生物醫學或是生物化學相關基礎科系，同時大學期間已在實驗室從事基礎醫學研究數年，大學畢業後從事基礎實驗工作數年經歷後才會申請博士班就讀。這些學生入學時比起職及本醫院送訓博士班學生程度高出甚多。簡而言之美國頂尖學校研究生均經過至少 6 年以上時間準備各項英文及入學考試方得足夠能力進修博士課程，職建請以後派訓學員送訓美國大學時，需提早數年時間準備方可具備與美國學生競爭並趕上功課進度。

依據國防部規定，申請美國博士班進修須就讀排名前 50 大學校，同時於第三年結束內獲得博士候選人資格，然各個學校規定不同。以華大醫學院為例，幾乎大多數學生都在第三年底或第四年方獲得資格參加博士候選人資格考，因此容易無法達成國防部規定，建議學員申請學校時須考量此規定量力而為。

附件

2015 年美國免疫醫學會研究生論文獎得獎信件

Dear AAI Trainee Member **Chunchi Lu**:

I am pleased to inform you that since your abstract selected for poster-only presentation at IMMUNOLOGY 2015TM was found to be exceptional by the AAI Abstract Programming Chairs, and you are an AAI Trainee Member in good standing, you will receive a ***2015 AAI Trainee Poster Award***.

This award will provide up to \$300 of reimbursement for registration and travel expenses associated with attending the AAI Annual Meeting – IMMUNOLOGY 2015TM – held May 8-12, in New Orleans, LA. The award reimbursement policy and the travel expenses claim form can be found at http://aai.org/temporaryFiles/2015_Award_Applications/Reimbursement/2015_AAI_Trainee_Poster_Award_Reimbursement_Policy_Final.pdf.

Congratulations and we look forward to seeing you in New Orleans!

Sincerely,

Mary T. Litzinger, Ph.D.

AAI Manager of Educational and Career Development Programs

2016 年美國免疫醫學會研究生論文獎得獎信件

Dear AAI Trainee Member **Chunchi Lu**, M.D.:

I am pleased to inform you that since your abstract was selected for oral presentation in a Block Symposium at IMMUNOLOGY 2016™, and you are an AAI Trainee Member in good standing, you will receive a ***2016 AAI Trainee Abstract Award***.

AAI offers the Trainee Abstract Award as a tiered award that will provide a higher reimbursement award amount for members with multiple consecutive years of membership. As an AAI member in good standing for two consecutive years, you are eligible for up to \$625 of reimbursement for registration and travel expenses associated with attending the AAI Annual Meeting – IMMUNOLOGY 2016™ – held May 13-17, in Seattle, WA. The award reimbursement policy and the travel expenses claim form can be found at

Congratulations and we look forward to seeing you in Seattle!

Sincerely,

Mary T. Litzinger, Ph.D.

AAI Manager of Educational and Career Development Programs

2016 年美國微生物醫學會沙門氏菌年會研究生論文獎得獎信件

Dear Dr. **Chunchi Lu**:

Congratulations! You have been selected to receive an **ASM Student/Postdoc Travel Grant to attend the ASM Conference on Salmonella**, to be held in Potsdam, Germany, August 29 – September 1, 2016. To receive the award, please fill out the attached form and return it to me by email by Thursday, July 21, 2016, with all requested information. Due to ASM financial record-keeping policies, you must include your home address on the form. Your application cannot be processed if any of this information is missing.

Travel grants are limited to one per person and one per abstract (i.e. a non-presenting author on an abstract cannot receive a travel grant). Travel grants are \$500. Payment will be issued by check (in US dollars, drawn on a US bank) or by bank wire transfer, and will be issued after confirmation of your presentation at the conference. US-based awardees automatically will receive a check by mail after the conference concludes. Travel grants provided by wire transfer will be released for payment after the conference. It may take up to two weeks after the conference for a transfer to go through.

Please let me know if you have any questions.

Thank you,

Lisa

Lisa Nalker | Program Manager, ASM Conferences □ American Society for Microbiology □ 1752 N Street, NW | Washington, DC 20036