

出國報告(出國類別：進修)

# 分子影像技術對於 早期診斷頭頸部癌症的應用 -從基礎到臨床

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院/耳鼻喉部

姓名職稱：林志峰/主治醫師

派赴國家：美國

分子影像計劃 (M I P S)

癌症醫學中心

史丹佛大學醫學院

出國期間：102年8月15日至103年8月14日

報告日期：103年10月14日

## 摘要

頭頸部癌症是耳鼻喉科臨床上相當常見的疾病。癌症的早期診斷，不只對於頭頸癌，乃是所有癌症診斷治療最重要的關鍵因素。然而，吾人縱使已知癌症的早期診斷，對後續治療扮演極為重要的角色，對於那些肉眼不易鑑別、觸診亦不易辨識的微小癌症細胞，在臨床上，並沒有一個很好的輔助工具，能夠幫助醫師進行快速篩檢診斷。史丹福大學癌症醫學中心分子影像醫學計劃 (Molecular Imaging Program at Stanford (MIPS))，其分子影像研究用於癌症診療在國際係處於翹楚之地位。個人透過本次進修計畫，深入學習對方基礎研究長處，經歷核心實驗室的實務訓練過程，更加瞭解臨床醫療運用上的創新價值，並且對於本人之學習及未來研究，助益極大。

本次進修的地點在史丹福 James H. Clark Center，也是著名 Bio-X 的基地。本人的指導教授為 Professor Gambhir，他是 MIPS 的總負責人，所領導的實驗室為 Multimodality Molecular Imaging Lab (MMIL)，研發利用各種分子影像工具，從最基本的細胞實驗，活體動物實驗，乃至最終的人體臨床試驗，由最基本的細胞分子角度，發掘多種轉譯醫學(translational medicine)的可能應用。本人積極參與數個研究計畫，包含 1. 研發以聚合物為主體之非病毒型基因轉殖載體應用於癌症之治療 2. 研發以分子影像及血液檢驗之 mini-circle 應用於早期癌症之診斷 3. 使用 Iron Oxide Nanoparticles (IONs) 去標記自然殺手細胞(NK cells)及細胞激素激活殺手(cytokine - induced killer cells)細胞用以追蹤監控免疫治療(immunotherapy)效果，收穫甚多。

感謝醫院給予本人出國進修的機會，也期勉自己為國人之相關領域研究，更盡棉薄之力。

## 目次

內容	頁碼
摘要	2
目次	3
本文	4
目的	4
過程	6
心得	16
建議事項	18
參考文獻	19

# 本文

## 一、 目的

頭頸部癌症是耳鼻喉科臨床上相當常見的疾病。過去的二十年，儘管在治療的方式及設備上，有不少的進展，但頭頸癌的五年存活率，並未顯著增加，最重要的原因，跟多數病人診斷時已為中晚期有關；因此，癌症的早期診斷，不只對於頭頸癌，乃是所有癌症診斷治療最為重要的關鍵因素。然而，吾人縱使已知癌症的早期診斷，對後續治療扮演極為重要的角色，對於那些肉眼不易鑑別、觸診亦不易辨識的微小癌症細胞，在臨床上，並沒有一個很好的輔助工具，能夠幫助醫師進行快速篩檢診斷。

分子影像學 (Molecular Imaging) 是近年新興的跨領域學門，旨在利用分子影像技術，達到臨床上輔助診斷及治療(theranostic)的目的。以史丹福大學癌症醫學中心分子影像醫學計劃 (Molecular Imaging Program at Stanford (MIPS)) 為例，其為美國 National Cancer Institute 所重點培植的數個分子影像醫學中心之一，整合包含化學，材料科學，腫瘤生物學，免疫學，臨床腫瘤學，放射學，臨床醫學，奈米技術，及電機工程等領域人才，以團隊研究的方式，致力於發展活體分子成像儀器，進行細胞及活體試驗 (動物模式)；合成放射性標記和螢光分子探針以作為分子成像的工具，並將細胞及動物模式改良，加速應用於

臨床試驗，而為世界第一流的分子影像醫學中心。

開發創新早期診斷技術，並能夠應用於臨床癌症篩檢，是晚近生物醫學界所致力發展的新興領域之一；蓋早期診斷癌症，對於病患後續治療之重要性，不言而喻；環顧國內，雖於臨床研究或基礎研究均有一些初步成果，惟若能透過出國進修等與國外交流的方式，不僅有助於學習新技術以提升研究水平，更能有機會與國外實驗室建立合作的平臺，強化我們在該領域的國際競爭力。

史丹福大學癌症醫學中心分子影像醫學計劃 (Molecular Imaging Program at Stanford (MIPS))，其分子影像研究用於癌症診療在國際係處於翹楚之地位。個人透過本次進修計畫，深入學習對方基礎研究長處，經歷核心實驗室的實務訓練過程，更加瞭解臨床醫療運用上的創新價值，並且對於本人之學習及未來研究，助益極大。

## 二、 過程

本次進修的地點在史丹福 James H. Clark Center, 也是著名 Bio-X 的基地。

Bio-X 的籌建, 是因當時史丹福校內各學院的教授們, 包含 Professors James Spudich, Bill Mobley, Channing Robertson, Steven Chu (朱棣文), 和 Lucy Shapiro 等人有感於生物醫學領域的發展與研究, 必須透過跨領域的整合, 才有事半功倍的效果, 於是倡議籌建; 隨後並獲得 Netscape 創辦人 James H. Clark 為主的慈善捐款, 遂于西元 1998 年開始籌建, 而於 2003 年完成。這樣一個前瞻整合性的做法在後來證明了其成功, 在生物工程, 生物醫學, 生命科學及相關的領域, 在世界上聞名遐邇, 並吸引各國人才競相前往學習, 絡繹於途。在鼓勵產學合作, 發展轉譯醫學的氛圍下, 以 Stanford Entrepreneurship Network (SEN) 為主幹的各式研究及創業資金亦不虞匱乏, 如 SPARK, bio-design, Start-X, eCorner, TRAM, SIP, Spectrum, FCTR 等等, 良性循環下助長史丹福大學連年蟬聯全美最佳創業大學第一名 (Forbes)<sup>1</sup>。

本次進修本人的指導教授為 Professor Gambhir, 他是 MIPS 的總負責人, 同時也是世界級的分子影像專家, 相關領域的論文數超過 500 篇, 擁有 40 多項專利, 獲獎無數<sup>2</sup>; 他所領導的實驗室為 Multimodality Molecular Imaging Lab (MMIL)<sup>3</sup>, 旨在利用各種分子影像工具, 從最基本的細胞實驗, 活體動物實驗, 乃至

最終的人體臨床試驗,由最基本的細胞分子角度,發掘多種轉譯醫學

(translational medicine)的可能應用;以晚近此實驗室所積極對外合作發展的研究計劃為例,包含和 Google X 合作的 Google's New Moonshot Project: the Human Body<sup>4,5</sup>,以及 Google contact lens<sup>6</sup>等等,不難發現此實驗室在此領域的世界級地位以及從基礎研究到實際臨床應用,連結學界與業界,戮力發展轉譯醫學的雄心。

在完成報到程序後,依規定必需確實完成史丹佛大學規範之相關之所有教育訓練課程後,才可以真正開始在實驗室工作。這些課程涵蓋範圍十分廣泛,因此本人進入實驗室後就開始這些訓練課程,並且接受相關線上測驗,同時也於實驗動物中心接受實地訓練課程。完成訓練課程後,便開始相關細胞及動物實驗。史丹佛大學Bio-X共用之非侵入式活體分子影像系統位於Clark center地下一樓,進入實驗中心後,放眼望去,配備有多項影像系統,包含PET-CT, SPECT, MRI,各一組, IVIS系統共4組,超音波設備3組,電腦及影像軟體分析室,以及數個小動物養育室。每年在此進行的小動物實驗,據說達到45000隻小動物之譜,顯見其涵括之巨量研究計劃,範圍之深與廣,為世界上最大之動物分子影像醫學研究中心之一;然此中心之運作,可以透過線上預約使用時間,雖儀器使用頻繁,管理卻

井然有序,少有為了預約影像設備而需延遲實驗進度的情況發生。

本人報到時為實驗室裡第 51 位成員,其他成員來自世界各國,至少擁有 M. D. 或 Ph. D 甚或兩者之學位,博士生只有兩位;成員背景除臨床醫師之外,涵括化學,生醫,材料,放射,物理,數學,電機及奈米等領域的專家,故研究之進行,能採團隊合作模式;實驗室會議每週一次,會後延續舉辦 affinity group meeting, 相關研究團隊成員,針對目前進度,困難,經費,實驗細節等再做一次全面檢討,並於兩日內回報實際進度。印象最深刻的是,討論時的原則為“bleed all over it”,鼓勵團隊成員勇於針對實驗細節及缺點發言,讓大家有機會互相學習幫忙。

本人積極參與下列各個研究計劃,收穫甚多,茲分述如下:

#### 1. 研發以聚合物為主體之非病毒型基因轉殖載體應用於癌症之治療

(Tumor-Specific Delivery of Non-Viral polymer-based Vectors for Cancer Therapy)

以基因當作藥物去治療疾病一直是科學界的一個偉大夢想。基因治療/基因轉殖的概念在於攜帶基因進入生物體內,達到治療或延緩病程的效果,並改善病人的生活品質。成功的基因治療需要有好的基因轉殖技術,在許多疾病相關的基因都被陸續發掘出來之後,接下來就是如何去利用這些資訊,開發可行的技術,進行

疾病的治療。實務上而言,要很有效率地攜帶基因進入個體,仍存在相當大的挑戰性。目前基因轉殖的技術大體可分為兩大類,一是利用病毒作為載體(vector),如反轉錄病毒(retroviruses)、lentiviruses、腺病毒(adenoviruses)、疱疹病毒(herpes simplex viruses)、腺病毒相關病毒(adeno-associated viruses)等等;另一類則是非病毒載體(non-viral),如微脂體(liposome)或聚合物(polymer)。過去在 Professor Gambhir 實驗室,發展以 lentivirus 為載體的癌症自殺基因治療<sup>7-9</sup>,主要原理,便是先將治療基因(therapeutic genes)輸送到癌症細胞中,此基因隨後表現出對應序列之蛋白酵素(enzyme),可將外加之無毒性前驅化合物轉變成有毒的化合物,藉以殺死癌症細胞;然而,理想的基因載體必須符合一些基本條件,包含安全,有效,易製備,可準確地傳送基因至指定的標的細胞,可準確地插在特定的染色體位置上並可長期有效調控表現基因等等,目前並無單一載體符合上述所有條件;再者,基於美國賓州費城的基因治療死亡事件,以及其他相伴於基因治療所產生的死亡案例,讓科學界對於病毒這類載體所伴隨的之風險,愈形卻步<sup>10</sup>;因此,近來 Professor Gambhir 實驗室乃轉而發展一些非病毒載體方式,希望能提供較安全之基因傳送方式,並且朝向具有腫瘤特异性、高轉殖效率、高生物相容性、低副作用以及 I V 劑形等等方向來設計,本人

即被指派負責此部分研究，學習從細胞實驗做到動物實驗(Fig. 1.)

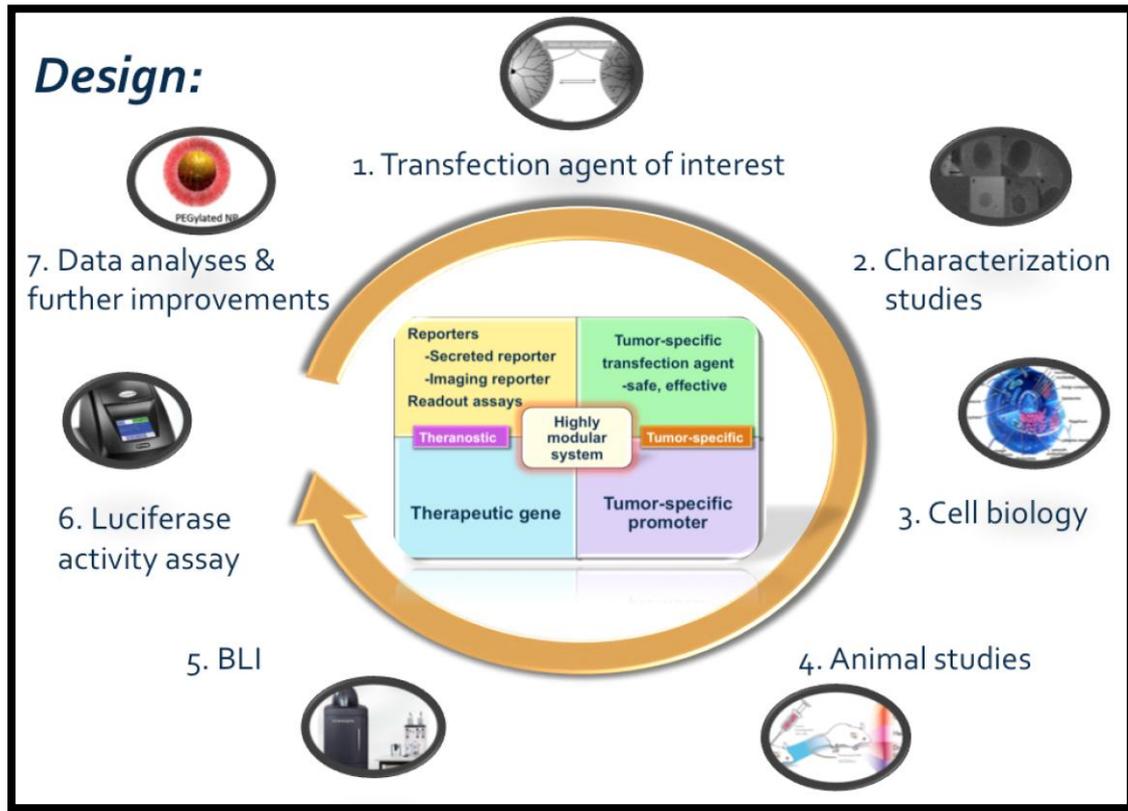


Fig.1 實驗設計：研發以聚合物（polymer）為主體之非病毒型基因轉殖載體應用於癌症之治療

在這個研究裡，我們使用了包含黑色素細胞癌，乳癌，子宮頸癌，卵巢癌等細胞株進行實驗，並在裸鼠之癌症轉移模式進行動物實驗，相關結果將於國際期刊發表。在這個研究裡，本人從無到有，學習了一連串實驗所需技能，包含各種細胞培養，基因製備轉殖，冷光及電子顯微鏡實驗，影像資料收集及分析，甚至以往視為畏途的動物實驗都能獨立完成上手，也從而領略了研究的樂趣，某些時點實驗有所進展，內心雀躍不已，甚能理解當年阿基里德在洗澡的時候，發現了浴缸滿出

來的水就是皇冠的體積的那一刻!Eureka! 惟美中不足者是當時遍尋實驗室裡甚至周圍實驗室竟無頭頸癌相關細胞株可供利用測試, 唯一問得到的鼻咽癌細胞株 C666-1 也被 HeLa 細胞污染, 殊為可惜, 日後尋此模式, 必將有助於吾人應用於頭頸癌及耳鼻喉相關疾病之基因治療。

## 2. 研發以分子影像及血液檢驗之 mini-circle 應用於早期癌症之診斷

(Tumor-Specific Minicircles as a Novel Safe Technology for Cancer Screening via Blood-Based and Molecular Imaging Assays)

眾所皆知, 癌症的早期診斷, 不止對於病程治療有影響, 對日後病人所剩的器官功能以及生活品質影響更為巨大。Gambhir 教授所領導的 Canary center for cancer early detection<sup>11</sup> 便以研發分子影像及血液檢驗以應用於早期癌症診斷而設立。此中心結合 molecular imaging, proteomics, chemistry, 以及 bioinformatics 致力於跨領域發展創新癌症檢測技術而成著名癌症早期偵測研發中心。

癌症的早期篩檢一直是一個重要但又不易達成的目標, 以頭頸癌為例, 多數病患就診時已為晚期, 可以想見其預後甚差; 以血液檢驗為主的癌症篩檢, 具有方便及可以大量篩檢的優勢, 然常受限於無理想之生物指標(biomarker), 原因即在

於此類抽血所檢驗的常是內生性(endogenous)分子, 如 PSA, 具有高的背景檢驗值, 而且特異度低; 因此近來在 Gambhir 教授實驗室, 嘗試以分子醫學及影像技術, 研發在活體內 (in vivo) 表現之外源性(exogenous), 腫瘤特異性, 非基因嵌入性 mini-circle, 去定量 reporter gene 在細胞治療(cell therapy)的表現<sup>12</sup>。

以此概念, 我亦被指派參與其中部分研究, 目的是研發以分子影像及血液檢驗為基礎之 mini-circle, 應用於早期癌症之診斷(Fig. 2)。目前之初步結果在動物研究, 經尾靜脈注射腫瘤特異性 mini-circle, 利用血液及影像學檢查, 可以區分出哪組動物是帶有肺腫瘤的實驗組, 而對照組之檢測背景值極低, 故特異度極高, 以區分臨床上良性或惡性的腫瘤。未來也將應用類似概念, 將 S E A P 此類 reporter 改為 miRNA, 並使用 qPCR 或 ddPCR 的方法偵測, 以求更高的靈敏度, 希望利用此方法偵測到臨床上更小更早期的腫瘤。

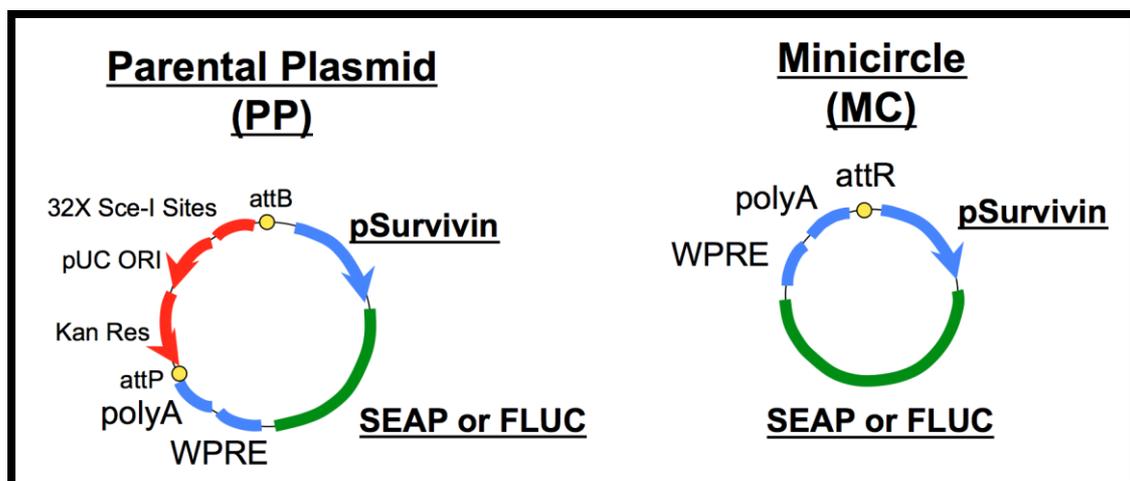


Fig.2 parental plasmid 和 mini-circle 示意圖

3.使用 Iron Oxide Nanoparticles (IONs)去標記自然殺手細胞(NK cells)及細胞激素激活殺手(cytokine - induced killer cells)細胞用以追蹤監控免疫治療(immunotherapy)效果。

Science 期刊在 2013 年公佈了科學界公認的 breakthrough of the year: immunotherapy<sup>13</sup>, 即便如此, 科學界對於免疫細胞在體內到底是如何運作或維持免疫反應仍一知半解。因此在 Gambhir 教授實驗室, 採用通過 F D A 認證之 Iron Oxide Nanoparticles (IONs)去標記自然殺手細胞(NK cells)及細胞激素激活殺手(cytokine - induced killer cells)細胞, 在 MR I 下確認這些受激活的免疫細胞的表現及特性, 本人在研究之餘亦努力習得此技術, 惟仍限於活體外(in vitro)實驗。步驟是分離病人週邊血球單核細胞(PBMC), 在體外培養, 以 IL-2 持續刺激維持 3 周後, 以 Miltenyi NK cell isolation kit 收集 Human NK cells(CD3-/CD56+);後以 trypan blue 確定 cell viability 並以 Ferumoxytol 及 Prussian blue 染色(Fig3.);以 TEM 檢查可以確定細胞完整性及確定 Iron Oxide Nanoparticles (IONs)在細胞內位置(非死亡細胞整片釋出濃染)並可在 MR I 下得此檢驗閾值和濃度-信號相關統計曲線。因 MR I 為頭頸部重要影像檢查, 日後對於發展免疫治療之療效監測將有其重要應用<sup>14</sup>。

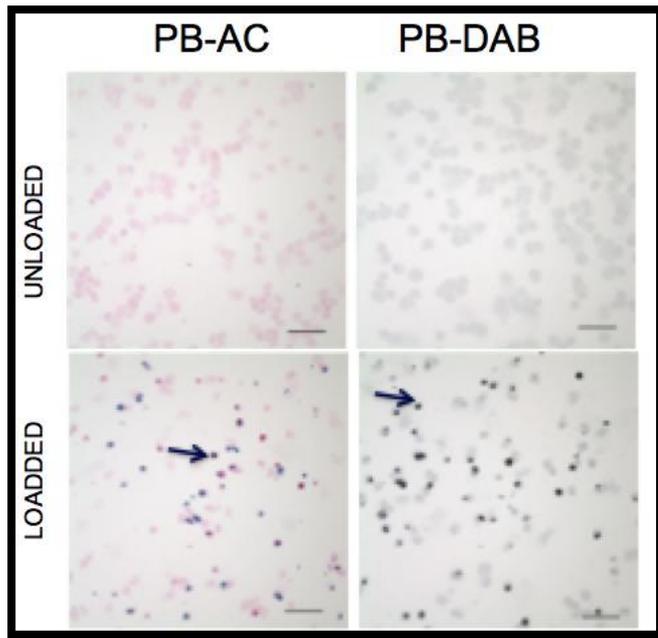


Fig3.經染色之 NK 細胞

#### 4. 參加課程及研究型會議

史丹佛大學資源豐沛，研究鼎盛，以醫學校區而言，設有 Biomedical seminar calendar: <http://med.stanford.edu/seminars/upcomingEvents.do>，時時都可以看到最新的研究及討論會，也可以訂電子郵件主動通知，是我工作實驗之餘最大的精神調劑。除此之外，M I P S 主辦的研討會，包含 MIPS Molecular Imaging Seminar Series, Nano-biotechnology Seminar Series, Cancer Early Detection Seminar Series, Molecular Imaging Journal Club 皆積極參與，不是懂得最多，但是本人出席率一定是最高。還有 BioE222 和 BioE325 課程，把自己當成研究生在修課學習。當然還有 E N T grand round 及 E N T 不定時舉辦的研習課程，在可能情形下皆盡力參與，值得一提的是

這些 ENT 課程還有線上版本 <http://med.stanford.edu/ohns/education>,

至今我仍持續學習。

接續先前所述，史丹福大學已連年蟬聯全美最佳創業大學第一名，承襲這樣一股創新創業精神與得天獨厚的矽谷環境，史丹佛大學臺灣同學會成員亦創辦饅頭灣 <http://mentowan.com>，旨在提供一個臺灣創業者與矽谷或國際業師連結的好橋樑，並定期舉辦研討會及經驗分享，本人獲益極多。我們也結合灣區幾所大學的臺灣留學生，以及 Stanford - Taiwan Biomedical Program (STB) fellows，和來自臺灣交大以及中研院訪問學者，舉辦數場小型研討會，希望透過腦力激盪，在未來彼此有更緊密的合作關係。此外，我也幸運得到機會，於北加州臺灣會館舉辦兩場演講，認識當地許多優秀的華人創業家；並有幸幫助 Taiwan FDA (TFDA) 臨床試驗種子人才培訓計畫進行灣區參訪。

### 三、 心得

首先感謝臺大醫院及臺大耳鼻喉部所有的老師同仁幫忙，讓我能夠心無旁騖順利前往如此頂尖的研究機構受訓。本次奉派出國，於史丹佛大學 Bio-X 進修一年，收穫甚豐。MIPS@Bio-X 這一年，我充分體會到科學家尤其是決策者做對決定開枝散葉影響深遠的道理，並蒙受其慧，正如國內知名創業家郭台銘先生所言：“阿里山神木成其大，四千年前種子掉到土裡就決定了！”

在史丹佛校園裡，到處都瀰漫著創新創業的氣氛，他們的名言是“Change the World!”，跨界合作並賦予決心及行動力。在 Gambhir 教授實驗室，除了學習基本的實驗技術，吸收最新科技新知之外，他們也提倡“Fail fast, Fail often, Fail cheaper, and Succeed sooner”的概念，決定大方向之後就傾全力決心去完成，能夠快速經歷失敗，找出不可行的各種方法，並積極檢討修正，不拖泥帶水，找到更接近成功的作法與方式；這種哲學，與英國著名企業維珍集團的執行長 Richard Branson 所言“You don't learn to walk by following rules. You learn by doing and falling over.”，不謀而合。平心而論，也是因為他們背後有廣大的人力物力資源，能夠支持他們專注在解決重大問題，獲致重大突破，回饋而來的資源形成正向循環，而使得科學研究可以長長久久，甚至以新創公司，能夠提供資源為榮，不至淪為 Me too 或炒短線，這些概念是十分值得學習的。在這

一年裡,也看到本校,本院或國內幾個團隊前來取經,相信在不久的將來,我們也可以承襲這樣的理念,在國內把創新創業精神發揚光大。

#### 四、建議事項

科學的發展突破需要長時間人力物力的投資才能獲得進展，在生醫領域更是如此。出國這一年，深深感到基礎研究與臨床研究密不可分，跨領域學習合作，以及發展轉譯醫學的重要；因為任何研究，最後如果無法有效應用，造福病人，使病人之疾病療程或生活品質獲得改善，也只徒具學術意義而已，史丹佛大學 Bio-design<sup>15</sup> 的成功運作模式，十分值得參考。在史丹佛大學 Bio-X，親眼見證產、官、學界的密切結合，各領域教授跨界合作，研究人員孜孜矻矻並能沈浸在研究的樂趣中，更加以外在得天獨厚，不斷循環正向累積的資源挹注，而成其偉大。當然也期盼國內能投注更多資源，選擇幾項重點領域疾病或項目，積極合作發展，開創屬於我們的一片天。惟以個人經驗而言，若要能更深入進行研究，獲致更堅實成果及更深入了解成功團隊如何運作，以一年的進修時間，經常是不夠的；因此，若在制度設計上能夠更加彈性，選派年輕研究人員進行長時間多年期研究，並給予進修期間及進修後相關資源挹注，相信對於國內相關領域發展及研究個人或團隊，都將有更積極正面的意義及長遠深刻的影響。

最後，再度感謝醫院給予本人出國進修的機會，也期勉自己為國人之相關領域研究，更盡棉薄之力。

## 參考文獻

1. Startup Schools: America's Most Entrepreneurial Universities. Forbes August 18, 2014  
<http://www.forbes.com/sites/liyanchen/2014/07/30/startup-schools-america-most-entrepreneurial-universities/>
2. Wikipedia : Sanjiv Sam Gambhir
3. <http://mips.stanford.edu/research/mmil.html>
4. <http://online.wsj.com/articles/google-to-collect-data-to-define-healthy-human-1406246214><https://biox.stanford.edu/highlight/stanford-work-duke-google-pilot-study>
5. <http://googleblog.blogspot.tw/2014/01/introducing-our-smart-contact-lens.html>
6. Noninvasive imaging of lentiviral-mediated reporter gene expression in living mice. De A, Lewis XZ, Gambhir SS. *Mol Ther*. 2003 May;7(5 Pt 1):681-91.
7. Noninvasive imaging of enhanced prostate-specific gene expression using a two-step transcriptional amplification-based lentivirus vector. Iyer M, Salazar FB, Lewis X, Zhang L, Carey M, Wu L, Gambhir SS. *Mol Ther*. 2004 Sep;10(3):545-52.
8. Bioluminescence imaging of systemic tumor targeting using a prostate-specific lentiviral vector. Iyer M, Salazar FB, Wu L, Carey M, Gambhir SS. *Hum Gene Ther*. 2006 Jan;17(1):125-32.
9. Applications of lentiviral vectors in noninvasive molecular imaging. De A, Yaghoubi SS, Gambhir SS. *Methods Mol Biol*. 2008; 433:177-202. doi:10.1007/978-1-59745-237-3\_11.
10. US gene therapy in crisis. Teichler Zallen D. *Trends Genet*. 2000 Jun;16(6):272-5.
11. <http://canarycenter.stanford.edu>
12. Development and Validation of Non-Integrative, Self-Limited, and Replicating Minicircles for Safe Reporter Gene Imaging of Cell-Based Therapies. Ronald JA, Cusso L, Chuang HY, Yan X, Dragulescu-Andrasi A, Gambhir SS. *PLoS One*. 2013 Aug 28;8(8):e73138
13. <http://news.sciencemag.org/breakthrough-of-the-year-2013>

14. The Efficacy of MRI with Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles (USPIO) in Head and Neck Cancers.

Baghi M, Mack MG, Hambek M, Rieger J, Vogl T, Gstoettner W, Knecht R.

Anticancer Res. 2005 Sep-Oct;25(5):3665-70.

15. <http://biodesign.stanford.edu/bdn/index.jsp>