

出國報告（出國類別：進修）

美國德州休士頓貝勒醫學院遺傳診斷技術與 結果評估及癌症基因體資料學習

服務機關：台北榮民總醫院 婦產部

姓名職稱：宋碧琳 主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：101.12.26-102.6.26

報告日期：102.7.23

摘要

美國德州休士頓貝勒醫學院遺傳學科為全美排名第一，其臨床遺傳診斷實驗室也是規模盛大，也是首家應用次世代定序系統於臨床診斷。本次進修主要是到其中的粒線體遺傳實驗室，觀摩臨床遺傳疾病診斷技術，特別是次世代定序系統，了解其應用於臨床疾病檢測與如何評估其結果是否為致病。同時也針對全基因體定序晶片如何判讀與基因缺損確認有更全面性的學習。期間也參與臨床醫師與基因學家對特殊病例的討論與研究。除了遺傳疾病外，也學習美國 The cancer genome atlas (TCGA)大規模基因體資料庫分析與應用，有助於癌症分析與基礎實驗的臨床驗證。

關鍵字: 貝勒醫學院、次世代定序系統、遺傳診斷、TCGA

目次

摘要	2
目次	3
本文	
一、目的	4
二、過程	4
三、心得	11
四、建議事項	12
附錄照片	13

一、目的

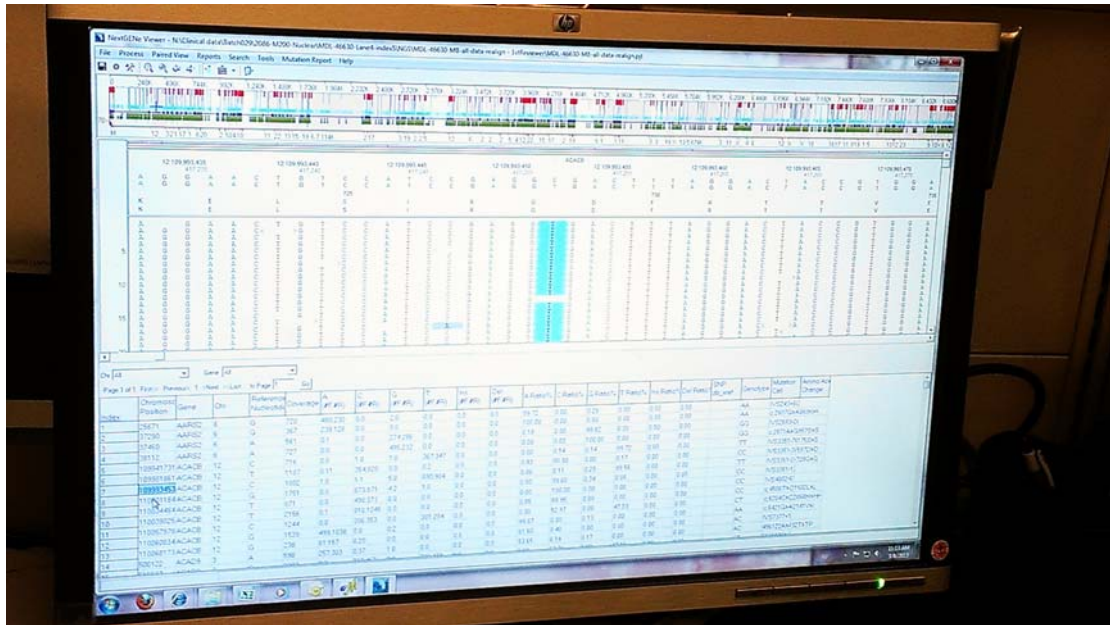
遺傳疾病千變萬化，人類染色體的發現與遺傳技術的發展，讓染色體疾病與單基因疾病、粒線體疾病能得到有效的診斷。當人類全基因體定序的計畫在 2003 年宣告完成，解析基因的費用也因為更新的定序方式『次世代定序 next generation sequencing, NGS』而下降，但是如何應用這種定序方式於臨床檢體上，產生的資料如何分析，怎麼樣的基因變化值得註記與致病原因，這些都是令人思考的問題。美國德州休士頓貝勒醫學院遺傳實驗室是美國著名的臨床實驗室，每年收取樣本數十分可觀，而其中粒線體實驗室也是全球第一個利用 NGS 進行粒線體疾病遺傳診斷，其他實驗室如全基因體實驗室也有進行臨床用之『全外顯子定序』(whole exome sequence)。貝勒醫學院在臨床遺傳學上和遺傳研究部份也是頗富盛名，此次進修希望能夠透過在具規模的實驗室學習如何運行遺傳實驗室，並且觀摩 NGS 和全基因體晶片流程、實驗結果判讀與癌症基因體資料庫應用，能回國應用於臨床與研究上。

二、過程

粒線體實驗室

貝勒醫學院粒線體實驗室主要診斷粒線體疾病，包含核基因的診斷與粒線體 DNA 基因診斷。此外還有粒線體功能性診斷，如電子傳遞鏈(ETC)等。粒線體基因異常包含核基因異常與粒線體 DNA 異常。核基因異常造成之粒線體疾病，通常為早發且進展嚴重，而粒線體 DNA 異常則是母系遺傳，其症狀千變萬化，可能有神經、肌肉、腸胃道等症狀。而引起粒線體疾病的基因非常多，因此如果單一基因去做診斷，可能會耗費大量金錢與人力。而若是使用次世代定序系統，則可使用基因群組(panels)，一次大規模篩選所設定的基因。以粒線體實驗室為例，有設定幾組基因群組，如專做粒線體核基因(共 189 個基因) 或是含粒線體 DNA (500 個基因)、視網膜病變基因、骨骼基因群組等，利用 HiSeq2000 機型進行次定序分析，而後利用 NextGen 軟體進行重組與分析，若有分析片段較不準確部

分，則使用傳統定序方式補足；接著使用 Alamut 軟體進行基因變異點初次篩檢與進入資料庫做比對，確定何者基因變異可能為良性或是疑似病態基因。Alamut 軟體主要是整合資料庫做比對，如 dbSNP、SIFT、polyphen 和一些 splicing analysis 資料庫，也可以從網路資料庫取得這方面資料。根據這些資料庫與文獻的分析，再配合美國遺傳學會所制定之標準，將基因變異做分類，分成 category 1-7，其中 1-2 為確定病態基因，3-4 為未報導過但可能是病態基因，5-7 為應為良性基因。若有不確定者，則公開討論定義或是取得父母或其他親屬結果做最後報告。

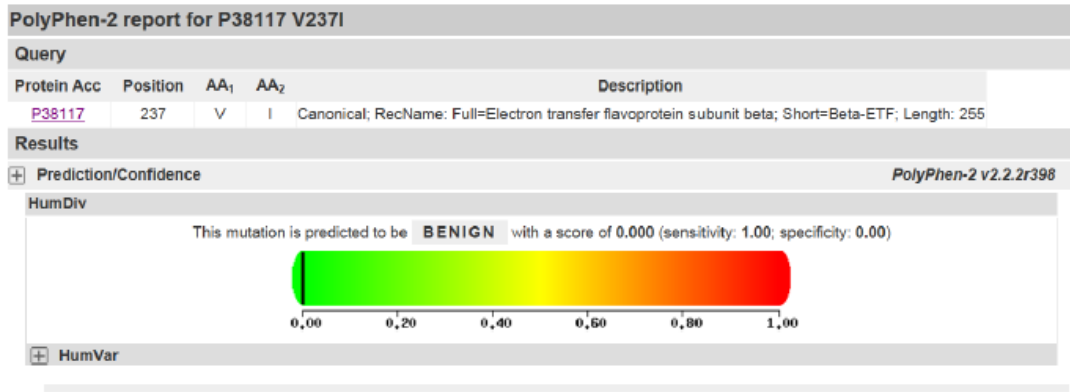


圖一：病人資料分析畫面

CPT1A:c.1806G>AG; 602T>TT;
ACMG:4

- 4) Sequence variation is **not previously reported** and is probably not causative
 - a) Silent changes (do not change amino acid) [according to ACMG criteria], **not in dbSNP**
 - b) Missense changes of regions that are clearly unconserved (this is ACMG statement, for us, it would likely be a cat 3 regardless!)
 - c) Intronic changes outside of 10 basepairs of exon

圖二：病人分析報告



圖三: polyphen-2 網路版 (prediction of functional effects of human nsSNPs)

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000370023,Q621Q	ENSP00000370023	621	Q	Q	TOLERATED	0.61	2.54	174

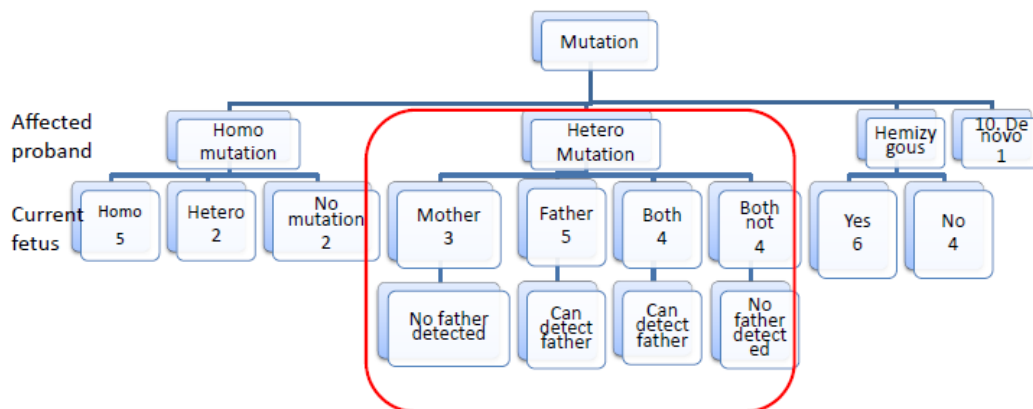
圖四: SIFT 網路(amino acid substitution affects protein function)

產前非侵入性診斷研究與應用

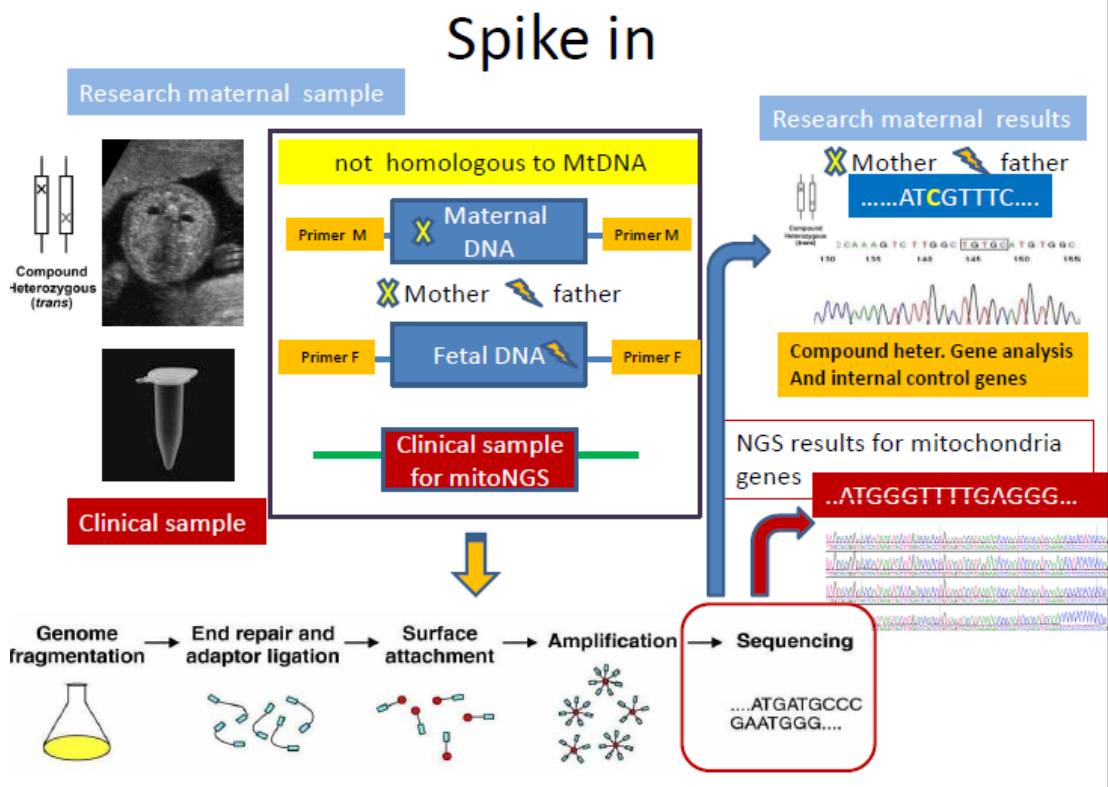
產前抽取母血清中之胎兒 DNA 做進一步的分析為現在熱門的話題。在粒線體疾病中若是核 DNA 基因異常，有機會利用次世代分析高深度分析來得知是否帶有變異，特別是異常來自父親。實驗流程見下二圖。

Prenatal cases (KFM) in Mito Lab

36 pregnant maternal and fetal DNA in Total 120 families



圖五 粒線體實驗室產前診斷



圖六 利用 spike in 方式進行深度定序流程

在當地實驗室先進行了部分實驗，但因無法取得新鮮母血來萃取胎兒 DNA，故將回國持續進行。

全基因體晶片 (array comparative genomic hybridization)

全基因體晶片主要是偵測基因片段的缺失或是增幅，與定序概念不同，但也是產生基因疾病的一種。主要參與兩部分：

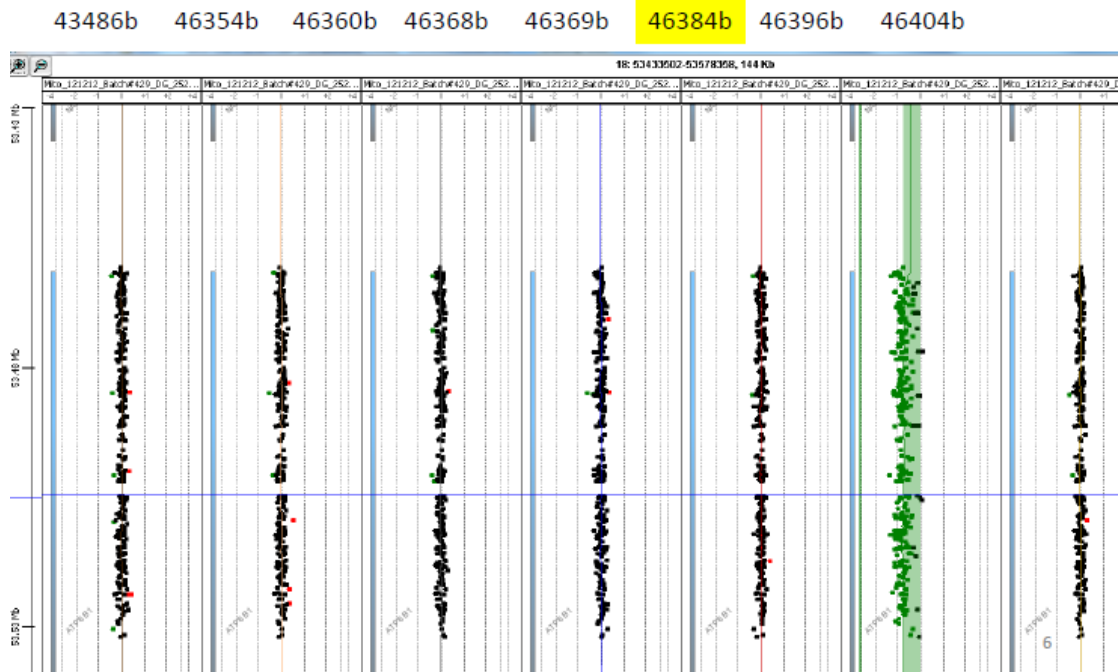
(1) 客製化粒線體基因全基因體晶片與後測：

該實驗室有專屬粒線體基因的客製化晶片，主要是晶片經過特殊設計與加強所需基因的探針，以期提高增測率；實驗流程與本院晶片相同，因此帶回相關基因設計，可做為將來開發所用。

若是發現有異常，通常可以評估缺損或是增幅範圍，然後設計斷端前後引子來進行檢測，之後進行定序來確定斷點。

(2) 全基因體晶片判讀會議

應用於產前或是先天異常之全基因體晶片則是使用 array CGH+SNP，除了看到缺損或增幅之外，也可以藉由 SNP 看到 Absent of heterozygosity (AOH or LOH)，此種基因缺損也會造成部分遺傳疾病。在研修期間，參與每兩週一次的報告會議，貝勒晶片實驗室會提出這兩星期的實驗人數、運轉率與重做率。接著報告特殊案例，每次會議約 15-20 案例，討論如何簽署報告、該變化是否有異常，因為貝勒有資訊工程建立專屬的資料庫，因此可以將每個病患做內部資料的比對與用網路資料庫做相關比對，以確定該片斷是否有臨床意義。同時也可以設計新一代晶片，調整晶片訊號與基因密度。



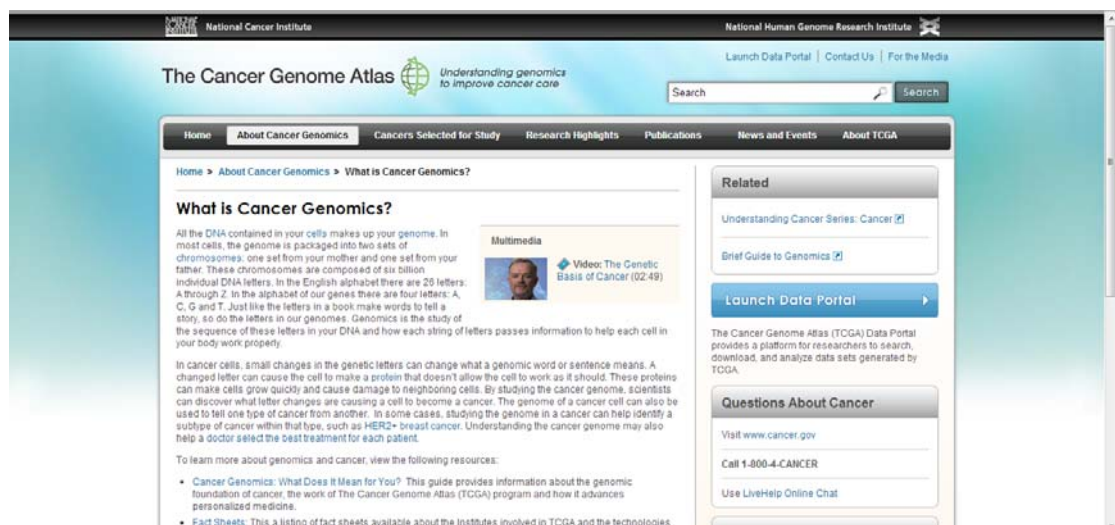
圖七 客製化粒線體晶片結果

臨床遺傳病例討論

由於貝勒醫學院並無醫院，所以主要與德州兒童醫院合作培訓遺傳專科醫師。同時也提供訓練課程訓練實驗室主持人資格(ABMG fellow)，為期兩年，訓練完後可以參加 board certification. 成為實驗主持人。每一份遺傳報告簽出都需要合格主持人與合格遺傳醫師共同簽屬送出，保險公司才會給付相關費用。因此專科醫師與 fellows 都需要臨床病例討論經驗累積，故每週皆會有一次臨床病例(10-15cases)討論，一次特殊案例與討論，各個實驗室也有自己的會議，研修期間皆有參加會議。

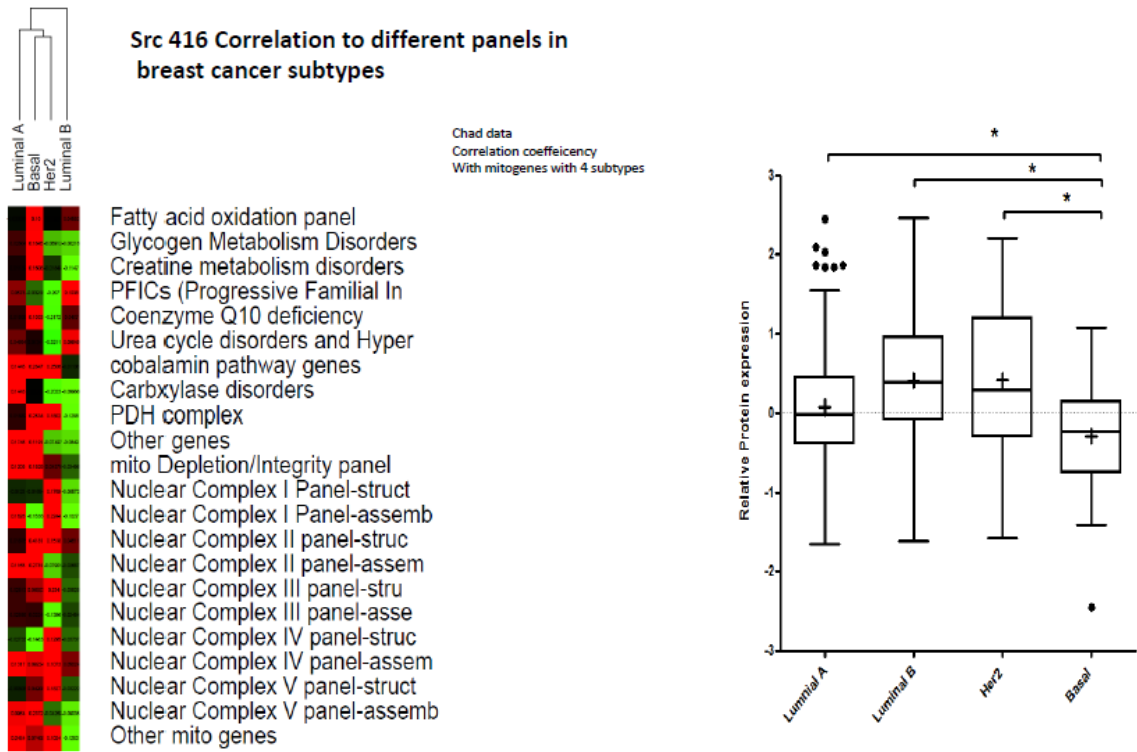
美國癌症基因圖譜 (TCGA) 資料分析

美國國家癌症中心成立 The cancer genome atlas (TCGA) 收集各種腫瘤樣本，進行不同平台的基因分析，包含 mRNA、DNA somatic mutation、methylation and protein，配合病人臨床資料做全方面的基因分析且部分公開資料使用。目前可供下載的癌症有 20 幾種，不同癌症釋出的病人資料數不同，下載後可做整合。此次也有進入基礎實驗室合作，學習將乳癌與卵巢癌資料做整合，依照研究需求進行統計分析。



The screenshot shows the homepage of The Cancer Genome Atlas (TCGA) website. The header includes the National Cancer Institute and National Human Genome Research Institute logos. The main navigation bar contains links for Home, About Cancer Genomics, Cancers Selected for Study, Research Highlights, Publications, News and Events, and About TCGA. The page title is "The Cancer Genome Atlas" with the tagline "Understanding genomics to improve cancer care". A search bar is located in the top right. The main content area is titled "What is Cancer Genomics?" and contains introductory text about the genome, a multimedia section with a video thumbnail titled "Video: The Genetic Basis of Cancer (02:49)", and a "Related" sidebar with links to "Understanding Cancer Series: Cancer" and "Brief Guide to Genomics". A "Launch Data Portal" button is also present. The footer includes "Questions About Cancer" with links to the website and a phone number.

圖八 TCGA 網站



圖九 利用 TCGA 資料處理乳癌資料圖示



基礎實驗室聚餐

三、心得

(1) 貝勒醫學院有七十年的歷史，也是美南頂尖的醫學院，其遺傳部門更是全世界有名。臨床遺傳實驗室每年收取檢體的量也是可觀。在這次見習期間見識了如何運行實驗室，人員的安排與調度，檢體的收取與流程，實驗室認證的準備，都讓我對於遺傳實驗室的建立與維持有更深的印象，特別是主持人與醫師充分分工合作，實在令人稱羨。

(2) 貝勒研究部份，承襲過往實力，對於新的技術更是走在領先，此次學習，剛好遇到次世代定序儀在臨床的應用，大開眼界，也學習到怎麼去評估結果。但是美國和台灣環境可能不同，若想要應用，還要回來與台灣相關人士做進一步的了解，看看怎麼在本院做應用。

(3) 由於出國前已經做過晶片分析，此次去也是將這一段判讀的部分做加強，特別是後續確診的部分，這個部分將來若有經費，會將本院有趣的案例做更進一步剖析，讓臨床醫師和病人都能得到滿意的診斷。同時也期許自己創立客製化的晶片和更新為新一代的晶片，不管以研究或是臨床角度，持續往前邁進。

(4) 癌症大規模基因體的研究已成世界潮流，台灣也應該整合資源，做這方面的資料庫實驗，成立本土的資料庫。

(5) 遺傳學科是一個特殊的學科，國內尚未整合，還是以兒童遺傳為主。其實在病例討論會中，也看到很多成人案例，症狀可能在心臟、腦部等常見症狀，但是由於有美國有專門評估遺傳疾病的醫師，便能進一步診斷，因此將來希望朝這個方向發展，培訓這方面的專長，做成人遺傳會診或是遺傳癌症會診。

(6) 謝謝台北榮總提供這個機會，也謝謝貝勒醫學院 Dr Wong 提供這個機會讓我過去學習，這期間，也聽了很多大師級的演講，收穫良多。當地有很多兩岸優秀人才，大家相處融洽，我也與接受訓練的 fellow 打好關係，將來可進一步合作。

四、建議事項

遺傳疾病雖然發生機率並不高，但是加總起來生病的人數也是不少。同時遺傳疾病臨床症狀多變，不見得有家族群聚的狀態，因此需要專門的醫師來加以判定，台灣遺傳診斷部分分散於各科，如兒童醫學科、神經科等，並沒有專屬遺傳醫師來進行整體性的評估。不同的疾病診斷需要耗費許多人力與費用，診斷方式又日新月異，技術也是一日千里，因此身為台灣主要的教學中心，可能要多方合作以跟進國際腳步。下面是一些想法與建議：

臨床面：

- (1) 全國僅台大醫院與彰化基督教醫院有專門遺傳醫學部，建議北榮應整合原有各科遺傳醫師與診斷工具，集中且單一化來服務病患，同時可以廣納其他榮總醫院與榮院此類病患的照顧。
- (2) 若考量基因檢驗受測人數與成本壓力，可透過院方國際單位，與國外幾個大型遺傳實驗室簽署遺傳檢測臨床合作計畫。病患若有經濟壓力可透過罕病基金會補助，若有經濟能力，便可直接經由院方轉送國外遺傳實驗室進行檢測，方便病人也能增加院方收入，同時也可以累積受測人數，進而開發適合本國之遺傳檢驗項目。
- (3) 與陽明大學或是合宜生技公司共同開發 NGS 平台為主的臨床檢測
- (4) 提升本院婦產部基因晶片的能力，轉入 aCGH+SNP 平台，提供更多資訊。

研究面

- (1) 持續進行非侵入性母血胎兒 DNA 實驗，以開發單基因疾病研究為主
- (2) 利用帶回的資料，持續開發婦產部可做粒線體疾病檢測
- (3) 持續利用與整理 TCGA 資料應用在婦癌基礎研究



自費參加 ACMG 會議



與發現 BRCA1/2 基因的
Mary-Claire King 教授合照