

出國報告（出國類別：進修）

骨骼肌肉腫瘤之基礎研究

服務機關：台北榮民總醫院骨科部

姓名職稱：主治醫師陳正豐

派赴國家：美國

出國期間：民國 101 年 12 月 17 日至 102 年 12 月 16 日

報告日期：民國 103 年 1 月 16 日

摘要

骨肉瘤是最常見骨骼原發性惡性肉瘤，腫瘤本身有較高的局部復發率及遠端轉移的傾向。即使目前採用跨專業團隊的治療方式，包括積極的術前及術後化學治療，加上手術的廣泛性切除，其 5 年存活率文獻報告只有 60-70%，尤其是合併肺轉移的病患，其存活率更低，只有 20%左右。因此，腫瘤復發轉移以及對化療藥物抗藥性的產生，仍是目前骨肉瘤治療上的一大阻礙。所以，釐清骨肉瘤致病機轉的分子生物基礎及機制，對於尋找及研發骨肉瘤治療標靶則相形更為重要。本院骨科部對於骨腫瘤的治療，在院方全力支持及骨腫瘤團隊共同的努力下，儼然已成為國內首屈一指的骨腫瘤治療中心，其臨床結果與國外各大醫學中心並駕其驅，然而對於骨骼肌肉系統腫瘤的基礎研究則付之闕如。有感於此，於 101 年 12 月負笈前往美國加州大學爾灣大學醫學中心骨腫瘤中心研究室，開始為其一年的骨腫瘤基礎研究。

研究的主題主要著重研究 Wnt 通路中重要的抑癌基因 Frzb/sFRP-3(分泌型捲曲蛋白-3)，對於其降低惡性骨肉瘤腫瘤生長及抑制肺部轉移的影響。實驗主要分為細胞系實驗、動物實驗以及臨床病理染色三大部分，藉以證實 Frzb/sFRP-3 在骨肉瘤細胞中的表現程度遠比正常細胞來的低，一旦將此段基因轉染進入骨肉瘤細胞中，則在動物實驗中可以發現其發生肺轉移的程度以及機會大大降低。經由此初步結果證實 Frzb/sFRP-3 確實為骨肉瘤的抑癌基因，初步研究結果並於 2013 年舉辦之第 18 屆結締組織腫瘤學會年會(Connective Tissue Oncology Society)

上發表。回國後希望建立骨腫瘤實驗室平台，延續在美的研究主題，希望能進一步找出此抑癌基因在骨肉瘤細胞中被抑制表達的分子機轉，以期將來可以找出其可能的成爲骨肉瘤的治療標靶。

關鍵詞: 骨肉瘤，肺轉移，Wnt 訊息通路，分泌型捲曲蛋白-3，加州大學爾灣分校醫學中心

目次

摘要-----第 2 頁

目的-----第 5 頁

過程-----第 7 頁

心得-----第 13 頁

目的

本院骨科部在歷任部主任的卓越領導下，各個次專科蓬勃發展，除了臨床工作成績斐然外，對於基礎研究方面更秉持鼓勵的態度，希望有興趣的同仁可投入研究領域。職自 1997 年進入骨科部，接受完整住院醫師訓練後，有幸得以加入骨科部團隊升任主治醫師，對於骨科腫瘤相關臨床及基礎研究甚感興趣。

過去研究方向主要著重於骨骼肌肉系統腫瘤的臨床部份，包括腫瘤切除及重建方式，並且進一步分析探討相關的預後因子，以期提高骨腫瘤的治療成果。原發性的骨腫瘤雖然其發生率不像肺癌或乳癌那麼樣的高，然而因其腫瘤本身特性好發於成長中的青少年，以骨肉瘤為例，在六零年代，對於肢體骨肉瘤的治療大多採取截肢手術，對成長中的青少年身心衝擊很大，家長也往往無法接受而轉而尋求其他另類治療，以致罹患骨肉瘤的病患之存活率偏低。

所幸在過去 30 年，隨著診斷影像學，化學治療及腫瘤切除重建手術的長足進步，除了小於 10% 的病人必須接受截肢手術外，九成以上的病人都可以在腫瘤廣泛性切除後，經由各式各樣的重建技術，將肢體保留下來。骨肉瘤的治療雖然在過去這幾十年有長足的進步，90% 的肢體骨肉瘤的病人都可以成功的將肢體保留下來。然而即使目前採用這種跨領域專業團隊的合作，骨肉瘤的 5 年存活率只有 60-70%，如果腫瘤復發或是發生遠端轉移，則存活率大幅下降到 20%。

有鑑於此，我們認為除了臨床手術及預後因子的探討研究之外，對於骨腫瘤致病機轉及相關調控機制的研究才是將來突破治療瓶頸的契機，然而目前對於骨

肉瘤的基礎研究仍然處於方興未艾的階段,文獻報告指出骨腫瘤的發生跟 cell cycle regulation 或是 DNA replication 有關,不過其真正的分子生物層次的機轉依然未明;因此如果能夠釐清調控局部復發、遠端轉移以及對化學治療抗藥性的分子機轉,對於骨肉瘤治療可以提供一個新的方向及標靶,因此在主任們的鼓勵及支持下,舉家前往美國進行為期一年的骨腫瘤基礎研究。

過程

誠如前言,骨腫瘤的發生率不像肺癌或乳癌那麼高,當然投入在這個領域研究的實驗室相對也不多,在請託美國同事打聽及搜尋 medline 相關文章作者,很幸運的找到加州大學爾灣分校醫學中心骨腫瘤中心主任 Dr. Bang H. Hoang 在骨肉瘤的基礎研究方面成就非凡,難能可貴的是 Dr.Hoang 本身雖然是骨科醫師,可是他卻是以其骨腫瘤的基礎研究聞名,在美國腫瘤研究領域佔有一席之地,他以及他的研究團隊更於 2011 年獲得美國骨科醫學會(AAOS)及骨科研究學會(ORS)大獎 Kappa Delta Ann Doner Vaughan Award 肯定,以表彰其對骨腫瘤基礎研究之成果.我深深覺得一個臨床工作繁忙的骨科醫師又能兼顧實驗室的研究著實不容易,如何去管理分配時間以及設定研究方向是我在進修的這一年裡最了解的課題。於是嘗試跟 Dr. Hoang 聯繫,表明我到其實驗室進修的強烈意願,所幸 Dr. Hoang 欣然同意,歡迎我加入他的研究團隊參與他進行計畫.

(一) 加州大學爾灣分校 (University of California, Irvine)及其醫學中心簡介

美國的名校如哈佛或耶魯多為私立學校,然而加州大學系統則被譽為世界上最好的公立大學系統,加州大學十個分校中有好幾所都在美國綜合大學排名,甚至世界大學排名中名列前茅。UC Irvine創立於 1965 年,在加州大學系統中較為年輕,但其成長與發展卻相當快速,擁有近 28000 名學生和 1400 多位的教師,在研究領域中卓越非凡,校園內有三位教授得到諾貝爾獎, Prof. Frank Sherwood Rowland-化學, Prof. Frederick Reines-物理, Prof. Irwin Rose-化學,也是第一所大學同年有兩位諾貝爾將得主(1995),使得UC Irvine聲名遠

播，更擠入全美最佳公立大學前 50 名，UCI 被評比為美國 公立研究型大學 前十名，2001 年更被譽為美國 30 所 公立常春藤 大學之一，雖然其創校較晚，夾在 UCLA 及 UCSD 這兩個明星學校之間，名氣不若它們響亮，這些年憑藉著其優秀教學及研究成果，也漸漸嶄露頭角。

UCI medical center 則座落在橘郡安納罕市，緊臨南加州 5 號高速公路旁，週邊有迪斯尼樂園及天使隊主場安納罕棒球場，UCI medical center 跟 UCI 主校園沒有相連，相隔大約 20 分鐘的車程。雖然名為醫學中心，然而它的總床數不到 500 床，卻擁有 3500 名員工，其照顧品質及員工的工作量可想而知。其中有一處趙氏綜合癌症治療中心是由台灣移民至美國成功的商人 Allen Chao 所其出資興建 Chao Family Comprehensive Cancer Center, 是加州地唯一的國家級癌症治療和癌症研究的中心，每年提供大量經費做為腫瘤基礎及臨床研究。

(二)個人研究主題及成果

對於一個完全沒有研究背景的骨科醫師而言，其實要踏入這個基礎研究的領域是滿辛苦的。

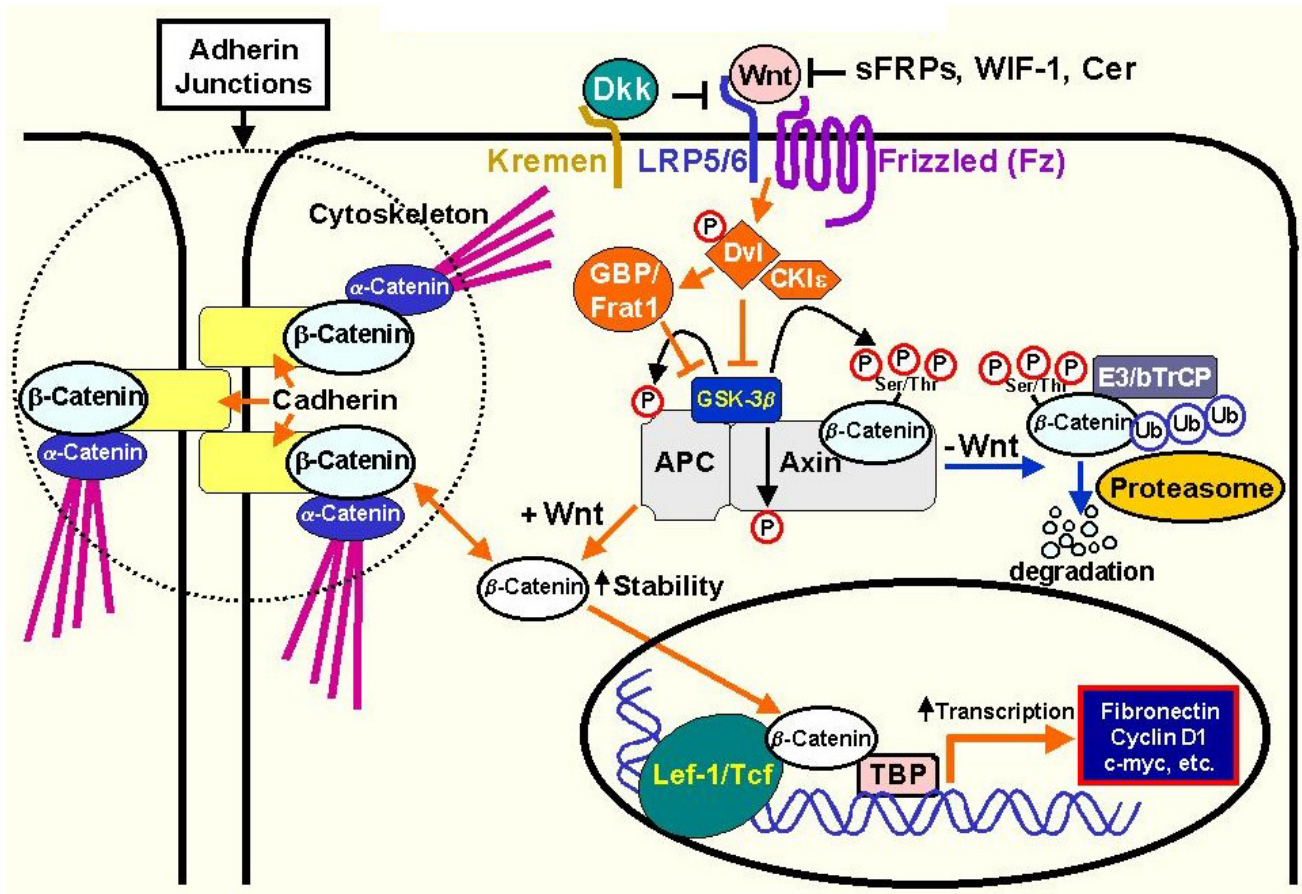
在與 Dr. Hoang 深談告訴他我進修的目的以及預定達成的任務之後，他認為一年的時間對於基礎研究其實不太夠，可能剛剛熟悉就要離開，原本他希望我能延長進修年限，不過考量到科部人力及經費問題，我只能在有限的時間內盡量學習，主要學習實驗的設計及邏輯推理，如何撰寫研究計劃申請經費以及管理實驗室。他指定給我一個題目” Frzb/sFRP-3, a Wnt Antagonist, Suppresses Lung

Metastasis in Osteosarcoma” (一種拮抗 Wnt 通路的分泌型蛋白,其抑制骨肉瘤肺轉移之研究) 希望我藉由做中學、學中做的方式達到學習的目標。前半年我幾乎都把時間花在研讀論文及熟稔實驗技巧,將一些過去覺得艱深生澀的基礎研究語言弄清楚,從培養細胞做 PCR 及 Western blot 到動物實驗、切片染色慢慢進入狀況。

我研究的主題是細胞上的一個叫 Wnt pathway 的通路,這個通路在胚胎發育、組織恆定及幹細胞新生方面扮演相當重要的角色,目前已知至少有 19 個以上的 Wnt 配體(ligands), 可以和 10 個捲曲型穿膜蛋白受體 (frizzled receptors) 以及其共同受體(co-receptors) low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6(LRP5/6)配對結合,往下啓動所謂經典 Wnt 通路(canonical Wnt pathway), 阻止 β -catenin 被細胞內的蛋白酶體(proteasome)降解,而這些穩定的 β -catenin 在細胞質內堆積到一定程度,則會進入細胞核內,藉由結合 transcription complex of TCF/LEF 來調節下游基因的表現,這些下游基因包括 matrix degradation, cell cycle regulation 以及 oncogenes。因此這個通路一旦發生突變,則可能造成癌症的發生。目前發現與 Wnt 通路有關的腫瘤很多,包含大腸癌、肺癌,乳癌以及攝護腺癌等等。(如下圖示)

而 Frzb/sFRP-3 則是第一個被發現的分泌型捲曲蛋白家族的成員(the secreted Frizzled-related protein, sFRP)。它跟 frizzled receptor 很像,擁有類似 Wnt frizzled receptor 的外部結構,但是本身不具有 frizzled receptor 的七次穿膜蛋白的構造,當

它跟 Wnt ligands 結合，阻礙正常情況下 Wnt 通路的 receptor-ligand 的結合，進而阻斷 Wnt 通路及其下游的反應。因此，Frzb 一般普遍認為是所謂的 tumor suppression gene。關於 Frzb 在 colon carcinoma, gastric carcinoma, medulloblastoma 及 melanoma 的腫瘤抑制基因的角色已獲得廣泛的研究證實，然而關於 Frzb 在骨肉瘤的研究則相對稀少。因此我們希望透過前驅研究找出 Wnt 通路及 Frzb 在骨肉瘤致病機轉的影響及其扮演的角色。



圖示為 Wnt 經典通路(Canonical Wnt signaling pathway)

前驅實驗及初步結果 (Pilot study and preliminary report)

於是本實驗室初步研究中證實，Frzb/sFRP3 在骨肉瘤細胞系及動物實驗中，確實可以經由抑制 S100A4 的表現來降低肺轉移的程度。茲將其結果分點敘述如下：

1. Frzb/sFRP3 Expression is Downregulated in OS Cell Lines (Frzb/sFRP3 在骨肉瘤細胞系中基因表達的程度比起正常骨母細胞要來的低)

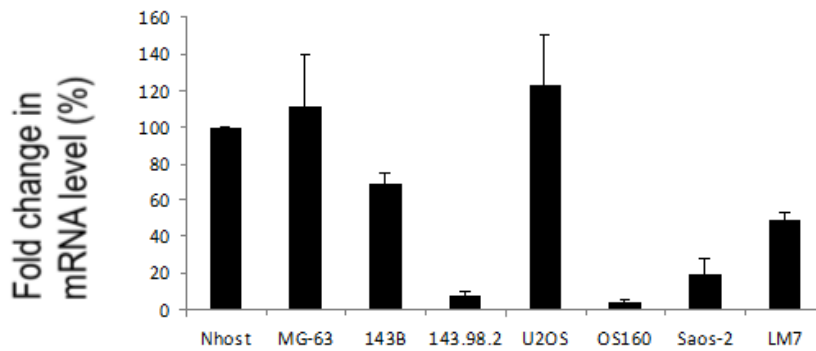


Fig1. The mRNA levels of Frzb in normal and OS cell lines were detected by real time PCR. The expression is down-regulated at 5 OS cell lines (OS160, 143.98.2, 143B, SaOS-2 and LM7)

2. Transfected Frzb/sFRP3 Inhibits in vivo Lung Metastasis (動物模式證實 Frzb/sFRP3 成功轉染可以抑制骨肉瘤肺轉移)

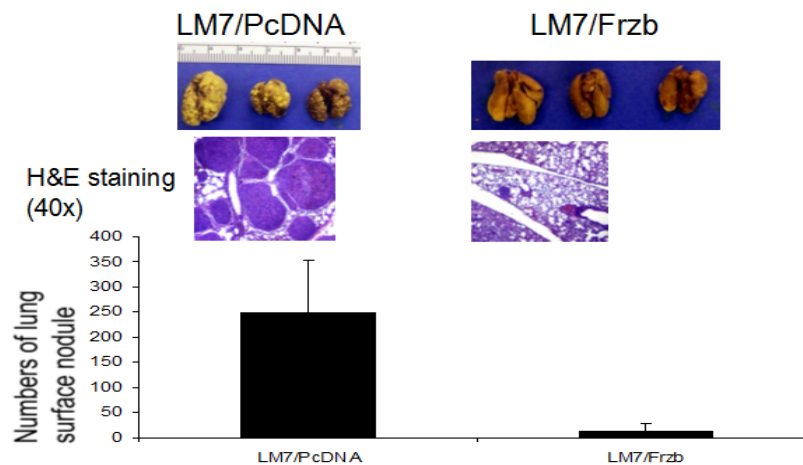


Fig 5. Stable Frzb transfected OS cells LM7/Frzb and empty control vector transfected OS cells LM7/PcDNA (1×10^6 cells/mouse) were injected into the tail vein of NCR nu-nu (nude) mice to establish lung metastasis model. On day 60 after injection, Lung surface metastatic nodules were counted after fixation in Bouin's solution and the lung nodules were biopsied with H&E staining.

3. Over expression of Frzb/sFRP3 downregulates the expression of S100A4 (過表達的

Frzb/sFRP3 主要透過降低 S100A4 表達來達到抑制肺轉移)

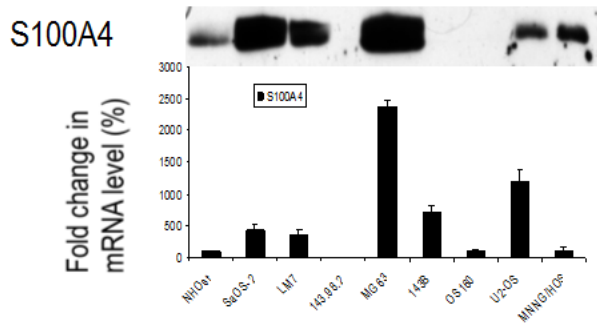


Fig 6. S100A4 has been reported to be highly involved in the formation of human cancer metastasis. To elucidate the expression of S100A4 in the progression of OS, the protein level and mRNA level were determined by western blot and real time PCR. Compared with Nhost, up-regulated S100A4 levels inwere found 5 out of 8 cell lines (MG63, U2-OS, 143B, SaOS-2 and LM7)

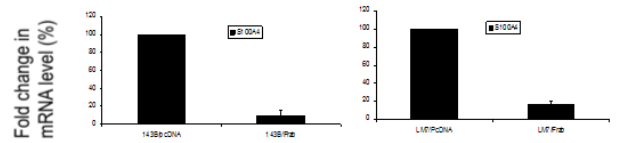


Fig 7. Over expression of Frzb down-regulated the expression of S100A4 in osteosarcoma cell line 143B and LM7. mRNA level of S100A4 (A) was determined by real time RT-PCR. S100A4 has been shown to promote cancer metastasis.

4. Over expression of Frzb/sFRP3 downregulates the expression of S100A4 (過表達的

Frzb/sFRP3 主要透過降低 S100A4 表達來達到抑制肺轉移)

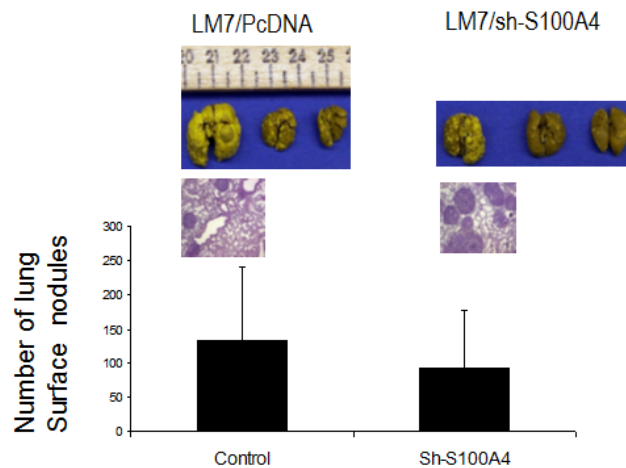


Fig. 9 To elucidate whether the anti-metastatic effect of Frzb on OS is through its inhibition of S100A4 expression, knockdown assay of S100A4 was performed in a nude mice model. It has been shown that silencing of S100A4 expression by Sh-S100A4 inhibited the lung metastasis of osteosarcoma. Stable transfectants (1×10^6 cells/mouse) were injected into the tail vein of NCR nu-nu (nude) mice to establish lung metastasis model. On day 62 after injection, Lung surface metastatic foci were counted after fixation in Bouin's solution and the lung nodules were biopsied with H&E staining.

心得

基於之前 preliminary report 的結果,我們很高興證實 Frzb/sFRP3 在骨肉瘤細胞上確實扮演著重要抑癌基因的角色,在徵得 Dr. Hoang 的同意及熱心的協助下,回國後我希望能延續在美國的計劃主題,進一步逐步釐清下列相關問題,:

(一) 除了抑制 lung metastasis, Frz/sFRP 3 是否可以同時抑制腫瘤的生長? 透過什麼機轉? 影響哪些下游基因?

在先驅實驗中,我們發現 Frzb/sFRP3 transfection decreases in vitro anchorage-independent growth of 143B Cells. The soft agar colony formation validated the ability of Frzb to inhibit anchorage-independent OS cellular growth (Fig.3). 因此我們希望進一步驗證 Frzb/sFRP3 轉染成功的 OS cell lines 在活體中是否能同時抑制腫瘤的生長.同時檢視 Wnt 通路哪些基因表現因為受到 Frzb 的調控.

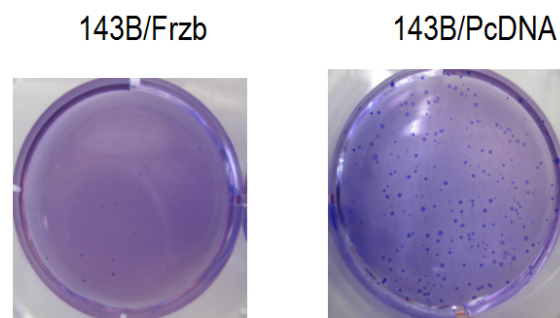


Fig 3. Anchorage-independent colony formation assay showed decreased number of colonies formed by Frzb transfection compared with vector control transfection of 143B cells.

(二) 骨肉瘤細胞內 Frzb gene 的表現遭到抑制,其調控的機制為何?與過度甲基化有關嗎?

CpG 雙核苷酸重複序列區域 (CpG island) 常出現在基因的啟動區

(promoter)，而C與G雙核苷酸重複序列區域不正常的甲基化已經被證實為促使抑癌基因不活化的機轉而導致癌症的生成。越來越多的證據顯示抑癌基因啟動區的高度甲基化是癌症發生的先期指標。sFRP這個抑癌基因家族裡有5個成員，Suzuki H. 等人於2002年在大腸癌的研究中發現，這5個 sFRP基因中的 sFRP-1, sFRP-2, sFRP4, 以及 FRP-5在其promoter區域都有一段very dense CpG island, 可以因為此區域的hypermethylation而造成epigenetic inactivation.是他們發現,唯獨sFRP-3這個位於 chromosome 2 上的gene沒有CpG island存在,因此認為hypermethylation不會發生在sFRP-3上,不是sFRP-3這個抑癌基因不活化的原因.非常有趣的之後所有關於sFRP gene 的研究盡皆引用此篇文獻,認為sFRP-3的inactivation跟 hypermethylation 無關,並且提出可能機轉為 (1) Gene translocates to a different chromosomal location, where it is transcriptionally inactive. (2) Inactivation of a cis-regulatory element important for transcription (enhancer) by methylation or other mechanism can cause transcriptional blockade. (3) The promoter itself may be a hot-spot of mutation. 然而,Ekstrom 等人於2011發現在malignant melanoma cell lines中證實sFRP3 gene 也有methylated CpG island. 因此我們想釐清是否在骨肉瘤的cell lines中, silencing of sFRP-3是否有可能也是與hypermethylation 有關.

(三) Frzb在細胞系及動物實驗的表現是否與人體內的表現相呼應?

收集骨肉瘤病患標本製作 tissue microarray,藉由免疫組織化學染色方法,驗證 Frzb,

S100A4 等基因在人類骨肉瘤的表現，輔以臨床資料可以評估是否 cell lines and animal study 所獲得的結果,在人體病理標本上的表現是否一致.

在國外的一年生活，收穫很多，與來自世界各地的研究人才相處，要去面對及適應不同文化背景帶來的衝突，這個過程十分有趣。因此也有許多的感想和建議:

(一) 出國年限應依進修的性質區分

本院臨床醫療水準已臻國際水準，再加上如今網路發達(YouTube 上都可以找到手術或是任何 procedures 的影片)，跟 20 年前相比進步得太多了，似乎沒有那種技術一定得到國外去學才行，尤其是本科領域的技術在很短時間內即可上手，一年來說應該足夠。然而對於基礎研究而言，除非是在國內已經相當熟悉實驗相關事務，到國外可以很快進入狀況，否則一年其實不夠，因為實驗跟臨床不一樣，它的不確定性太高，很難能有個好的結果可以發表。因此除了建議院方可以適度放寬基礎研究的年限外，對於將來計劃出國從事基礎研究的主治醫師，應該先到院內或大學部的相關實驗室做短期訓練，對於出國之後的實驗絕對有很大的幫助。

(二) 本院掛號網站應保留出國醫師燈號並加註出國進修起迄日期

職出國期間尚有不少治療過的病患來電骨科部，詢問網路掛號為何看不到職的燈號，也有病患透過電子郵件向職詢問，甚至有病患以為我是否已離職。因此，建議院方的掛號網站應保留出國醫師燈號並加註出國進修起迄日期，

避免病患流失或造成科部辦公室困擾。此外，我也建議即將出國進修的醫師可能的話，在出國前將病患資料建檔，尤其是有使用 E-mail 的病患或其家人，或許可以寄發 E-mail 給病患，除了告知出國回國的時間外，也可以告訴病患接下來的這一年如果要追蹤或是遇到問題時要找相關的主治醫師幫忙診治。

其實這次出國進修幾經波折，原定出國日子為101年7月，即將成行之前，卻因為我家人的健康問題讓我一度進退兩難，延宕出國計劃，在此我要感謝骨科部劉建麟主任、陳天雄副院長、陳威明主任以及骨科上上下下所有的同仁給我的鼓勵和支持，讓問題最終獲得圓滿的解決，我們也在101年的12月份順利出國度過這平安充實的一年。臨床醫師要兼顧研究之路是辛苦且困難的，然而身為全國最大的骨腫瘤治療及研究中心的一份子，我肩負使命及長官們的期望，開墾骨腫瘤基礎研究這一領域，以期開花結果。最後謹以美國詩人佛羅斯特 (Robert Frost) 最有名的一首詩「未走之路The Road Not Taken」中的詩句自勉，希望未來的路是對的

*Two roads diverged in a wood, and I—
I took the one less traveled by,
And that has made all the difference*
在樹林中有兩條分岔小路
我選了一條人跡稀少的行走，
結果後來的一切都截然不同

