

出國報告(出國類別：進修)

英國博士學位進修心得報告  
研究主題：人體體脂肪分布 HOXC13 基因位  
典功能性分析

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：郭俸志、主治醫師

派赴國家/地區：英國/牛津

出國期間：103年9月28日至107年9月19日

報告日期：107年9月21日

## 摘要

人體脂肪於腹部及臀部的分佈是影響代謝症候群發生的重要風險因子，目前已知體脂肪的分佈具有高度的遺傳特性，且全基因組關聯性研究分析(GWAS)中已發現有 49 個基因位點與腹圍和臀圍的比例有顯著相關，但針對這些基因位點中的功能性研究分析仍是相當缺乏的。職為三軍總醫院新陳代謝科醫師，於專科訓練期間對於脂肪組織及脂肪細胞的功能產生研究的興趣，並在師長們的支持下獲得國防部 4 年國外博士進修補助，於 103 年順利申請到英國牛津大學雷德克里夫醫學部糖尿病、內分泌及代謝中心博士課程，在 Fredrik Karpe 教授及 Katherine Pinnick 博士共同指導下針對 GWAS 鑑定的體脂肪分佈 *HOXC13* 基因位點中的 *HOTAIR (HOX Transcript Antisense RNA)* 基因進行研究，期能了解局部脂肪組織的功能性調控以改善肥胖相關的代謝疾病。

## 目次

摘要 .....	2
目的 .....	4
過程 .....	5
心得與建議 .....	9
致謝 .....	9

# 本文

## 目的

肥胖是造成糖尿病、心血管疾病發生的重要原因，而在討論到肥胖相關的代謝症候群風險時，人體的體脂肪分佈是獨立於肥胖之外不可忽略的風險因子，許多大型流行病學的研究指出人體腹圍和臀圍的比例(WHR)相對於身體質量指數(BMI)甚至與糖尿病和心血管疾病有更強的關聯性，在人體不同部位脂肪組織的研究，現有的資料大部份是針對腹部皮下和內臟脂肪作分析，而腹部皮下脂肪和臀部皮下脂肪之間功能性的研究則是相對缺乏的。目前已知腹部皮下脂肪與臀部皮下脂肪在許多生長發育相關的基因表現有顯著的不同，而在脂肪組織的代謝功能上也有顯著的差異，臀部脂肪組織能長期並適當的儲存脂肪於下半身，而腹部脂肪組織則容易因飲食攝取、運動或生活習慣的改變在短時間產生增加或減少，因此臀部脂肪組織被認為是人體內穩定的脂肪儲存槽，當體內脂肪能適當地儲存在臀部，相對來說可減少異位性脂肪堆積於內臟或肌肉造成的胰島素抗性。Fredrik Karpe 教授領導的團隊利用 Oxford biobank 資料庫分析的結果已證實了臀部脂肪組織對於代謝症候群的發生是具有保護的作用，並透過全基因轉錄組的分析發現 *HOTAIR (HOX Transcript Antisense RNA)* 這個 *long non-coding RNA* 是這兩個脂肪組織中表現差異最大的基因（只在臀部脂肪能測到 *HOTAIR* 的表現），加上 *HOTAIR* 基因也位於 GWAS 體脂肪分佈 *HOXC13* 基因位點內，因此 *HOTAIR* 基因很有可能在局部脂肪組織生長發育及代謝功能上扮演重要的角色，目前 *HOTAIR* 基因於人體臀部脂肪的功能性研究仍是缺乏的，了解其作用機轉將可能有助於改善局部脂肪功能並提供肥胖代謝疾病的全新治療方向。

## 過程

### 第一年

1. 剛到英國很快的會面臨不同的生活與語言環境，於剛開始的前 1-2 個月首先安置好全家的住宿，銀行的開戶，申請小朋友的學校註冊，並參予學校學院及研究部門的相關活動，逐漸地適應環境並持續加強自我語言的溝通表達能力。
2. 針對基礎研究的知識上，可透過線上學習系統或者主動報名學校舉辦的學習課程充實自我不足的部分。
3. 於實驗室的實際技術操作上，很幸運地我的共同指導老師 Katherine Pinnick 博士帶領我從人體脂肪前驅細胞萃取，前驅脂肪細胞的培養及脂肪分化，RNA 的萃取及 real-time qPCR 等相關技術逐步上手並很快能熟稔地自我進行分析研究。
4. 在臨床研究護士的協助下，收取人體臀部及腹部皮下脂肪組織進行細胞萃取培養，並根據現有文獻進行人體成熟脂肪細胞去分化為脂肪前驅細胞的細胞培養實驗，同時嘗試進行細胞純化及去分化過程中的細胞追蹤，雖然這部分的實驗最後並沒有放到我的博士論文，但在剛開始的前半年奠定了我良好的細胞培養操作技術，且在研究團隊之後的分析中證實這樣的去分化培養是可以取得更好的脂肪前驅細胞模型來做局部脂肪組織的功能性分析。
5. 於第一年下半年開始，我的研究主題開始針對 *HOTAIR* 這個基因，首先利用 Oxford biobank 內共 204 subjects 配對的臀部及腹部脂肪組織進行 *HOTAIR* mRNA real-time qPCR 的分析研究，這部分的實驗證實了研究團隊之前的發現：*HOTAIR* 基因很專一性地只在臀部脂肪組織表達，而在腹部皮下脂肪組織是偵測

不到表現量的，且另外發現 *HOTAIR* 基因在臀部的表現量有顯著的性別差異並具有很大的個體差異性。

## 第二年

1. 針對 *HOTAIR* 基因在臀部脂肪組織的表現量與 WHR, BMI, 血脂肪等生化數值進行關聯性分析，同時也利用體外培養分化脂肪前驅細胞的方式來分析 *HOTAIR* 基因表現量在脂肪分化中的動態變化及是否受到女性荷爾蒙或糖皮質激素的影響，相關初步結果於 2016 年 1 月份順利通過第一階段的 transfer of status。
2. 另外也進行 *HOTAIR* 基因位點內 SNP genotype 的分析，在團隊裡 Matthew Neville 博士的幫忙下利用現有的 HAPMAP 及 1000 Genome database 分析 *HOTAIR* 基因位點內 SNP LD (linkage disequilibrium) maps 及 haplotypes 的組成，來挑選出 9 個主要的 *HOTAIR* SNPs 進行 Oxford biobank 約 7000 人的 SNP genotyping，並根據得到的 genotyping data 分析是否與臀部脂肪組織內 *HOTAIR* 基因表達量有相關性，同時進一步利用 oxford biobank 內 DXA scan 體脂肪分佈的資料庫分析是否 SNP genotypes 與局部脂肪組織分佈有關聯性，這部分的研究很幸運的找出兩個 *HOTAIR* SNPs 會影響臀部 *HOTAIR* 基因表現量，其中一個 SNP 進一步也與人體臀腹部的脂肪分佈有相對應的關聯，這部分的研究成果順利地於 2016 年 9 月德國慕尼黑舉辦的歐洲糖尿病年會上進行了口頭報告。
3. 與此同時利用團隊內已建立的人體臀部脂肪前驅細胞株進行 *HOTAIR* 基因的 knockdown 實驗，在確認 *HOTAIR* 基因是否被抑制的實驗上遇到了許多技術上的困難，最後利用 chromatin immunoprecipitation (ChIP) 實驗證實了 *HOTAIR* 的表觀基因調控功能受到了抑制並且造成 *HOTAIR* 下游基因表現量相對應的改變

；接著進一步分析 *HOTAIR* knockdown 之後對細胞功能的影響，發現臀部脂肪前驅細胞在 *HOTAIR* 基因功能被抑制後，其細胞生長速率及脂肪分化能力都明顯的受到抑制。

4. 除了在臀部脂肪前驅細胞進行 *HOTAIR* 基因 knockdown 的實驗，也利用臀部及腹部脂肪前驅細胞株進行 *HOTAIR* 基因過度表現(overexpression)的實驗，這部分的實驗一開始希望能使用可誘導性病毒載體以產生可誘導性 *HOTAIR* 基因過度表現的脂肪前驅細胞株，然後在多次實驗測試後證實該病毒載體在脂肪前驅細胞內並無法很成功的轉導。

### 第三年

1. 在 *HOTAIR* 基因過度表達的實驗部分，最後改用持續過度表現的載體來產生 *HOTAIR* 基因穩定過度表現(constitutive overexpression)的脂肪前驅細胞株，並在細胞功能的評估上，發現 *HOTAIR* 過度表現會同時促進臀部和腹部脂肪前驅細胞的生長速率，但在脂肪分化部分，很特別地，專一性的抑制了腹部脂肪前驅細胞的分化，而臀部細胞並沒有受到顯著的影響。
2. 在 *in vivo* 的研究部分，進一步針對帶有特定基因型的自願者進行臀部及腹部脂肪組織的 RNA 及 DNA 萃取，並做脂肪組織切片來分析脂肪細胞的大小。
3. 為了系統性的分析 *HOTAIR* 基因在臀部脂肪組織的可能分子作用機轉，收取 *HOTAIR* Knockdown 及 scramble control 臀部脂肪前驅細胞 *in vitro* 脂肪分化中三個時間點 (D0, D4 and D14)的 RNA 檢體作 RNA-sequencing，這部分的分析發現在 D0 時 *HOTAIR* KD 明顯了影響了許多 extracellular matrix 相關基因的表現，同時利用 Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)

的分析方式發現有 135 個基因在 *HOTAIR* KD 之後於臀部脂肪前驅細胞分化過程持續維持增加的表現量。

4. 相關研究結果於 2016 年 12 月份在牛津莫頓學院第 43 屆脂肪組織研究討論會議上進行口頭報告，並於 2017 年 5 月份順利通過博士學程的 confirmation of status。

#### 第四年

1. 針對 RNA-seq 顯示的 135 個基因作功能性的分析，發現 *PCDH10* 基因很可能是 *HOTAIR* 其中一個下游基因，進一步利用 ChIP 及 bisulfite pyrosequencing 的方法證實 *PCDH10* 基因在臀部脂肪前驅細胞內受到 *HOTAIR* 的表觀基因調控機轉所抑制。
2. 2017 年 9 月份與指導教授 Fredrik Karpe 及 Katherine Pinnick 博士一同前往挪威與 Philippe Collas 教授帶領的團隊進行討論並奠定了之後的共同合作。
3. 在特定基因型與 DXA scan 體脂肪分佈的關聯分析部分，除了之前的 Oxford biobank 的資料庫之外，額外再增加了 Cambridge 的資料庫（總共約 25,200 人）並做重覆的確認，然而之前發現與體脂肪分佈相關的 *HOTAIR* SNP 基因型在 25,200 人的數據內卻沒有看到與體脂肪分佈有顯著的相關，於是轉而分析之前 GWAS 鑑定的 *HOXC13* 位點內的 lead SNPs，並發現其中一個 lead SNP (rs1443512) 顯著的造成臀部皮下脂肪的減少及腹部皮下脂肪的增加。
4. 為了探討是否 rs1443512 基因型會影響臀部脂肪組織內 *HOTAIR* 基因的表現，進一步利用 allele specific qPCR 的分析方法，證實了帶有 minor allele (A) of rs1443512 會造成臀部脂肪組織內 *HOTAIR* 基因的表現量減少。



5. 於 2018 年 6 月完成博士論文的撰寫，並於 2018 年 9 月接受博士學位口試答辯，與此同時也把研究結果投稿到相關科學期刊。

## 心得與建議

1. 於國外研讀博士除了研究進度的壓力之外，同時也面對著完全不同的語言環境，很常見的會無法很快的適應團隊內的研究討論及活動，但只要抱持著虛心學習的態度，並於所進行的研究領域持續的專注學習，慢慢的就能跟上並適應博士的研究生生活，在研究過程中也常常會遇到瓶頸，而這也是博士學程中最重要並最困難的訓練過程，透過反覆的實驗測試和驗證及與指導老師或同事的討論，逐漸的會找出比較可行的研究方式或方向，並在現有的知識及技術基礎上嘗試做出突破。
2. 在每次與指導教授進行會議討論前，記得把已有的實驗結果及自己的想法都做好充分的準備，因為經由會議的討論，教授常常會點出研究的核心問題並逐漸架構出後續的研究方向。
3. 在這四年博士學位的學習過程中最大的收穫是了解了國外研究團隊如何針對一個看似簡單的問題，透過大數據的科學研究方法做客觀的分析探討，並且進一步在臨床上做嚴格的驗證及相關的運用，希望未來回到國內後能運用同樣的研究態度及方法對國內醫療研究領域做出一己之貢獻。

## 致謝

能有幸於國外知名大學接受博士學位的訓練歸功於國防醫學院，三軍總醫院，軍醫局及國防部各位師長及長官的支持與幫助，當然也感謝我的指導老師 Fredrik Karpe 教授及 Katherine Pinnick 博士的指導及研究團隊內所有成員對我在生活及實驗上的協

助，在這四年除了讓我學習到了許多研究方法及技術，也讓我有機會體驗到多樣的國外生活文化，更重要的是奠定了我對科學研究札實的思考辯證，希望未來持續秉持對研究的熱忱，並運用所學為三軍總醫院醫療研究做出貢獻。

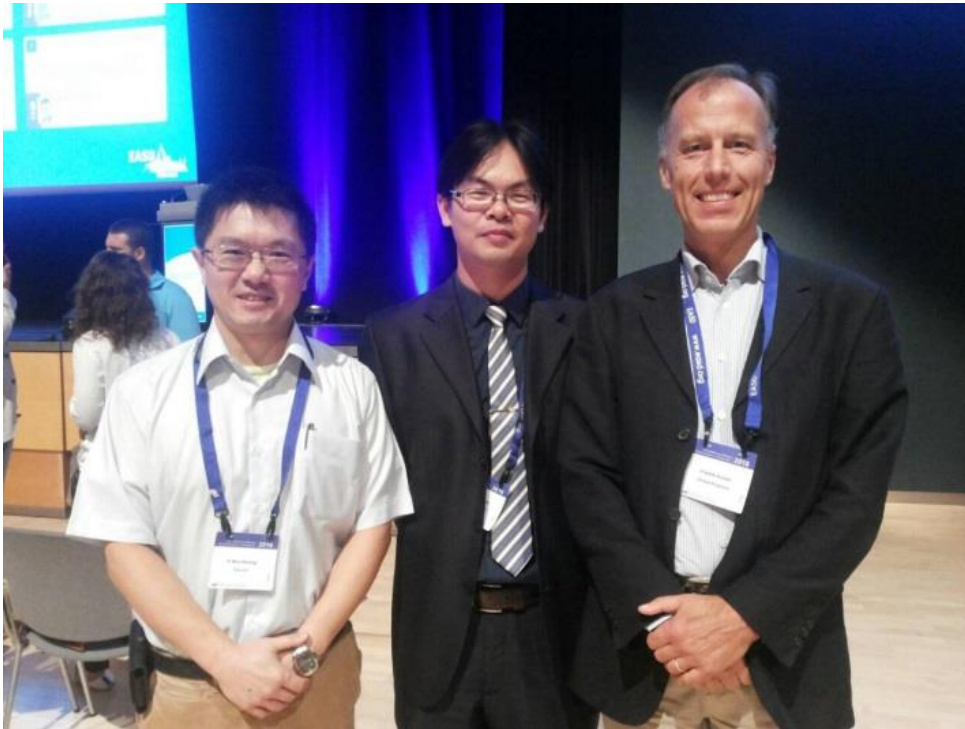


Fig1. 於慕尼黑歐洲糖尿病年會與洪院長及指導教授合影(2016年9月)



Fig 2. 與 Prof. Fredrik Karpe 及 Dr. Katherine Pinnick 前往挪威 Oslo 討論後續實驗室合作方向並體驗人體染色體的 3D 虛擬實境 (2017年9月)

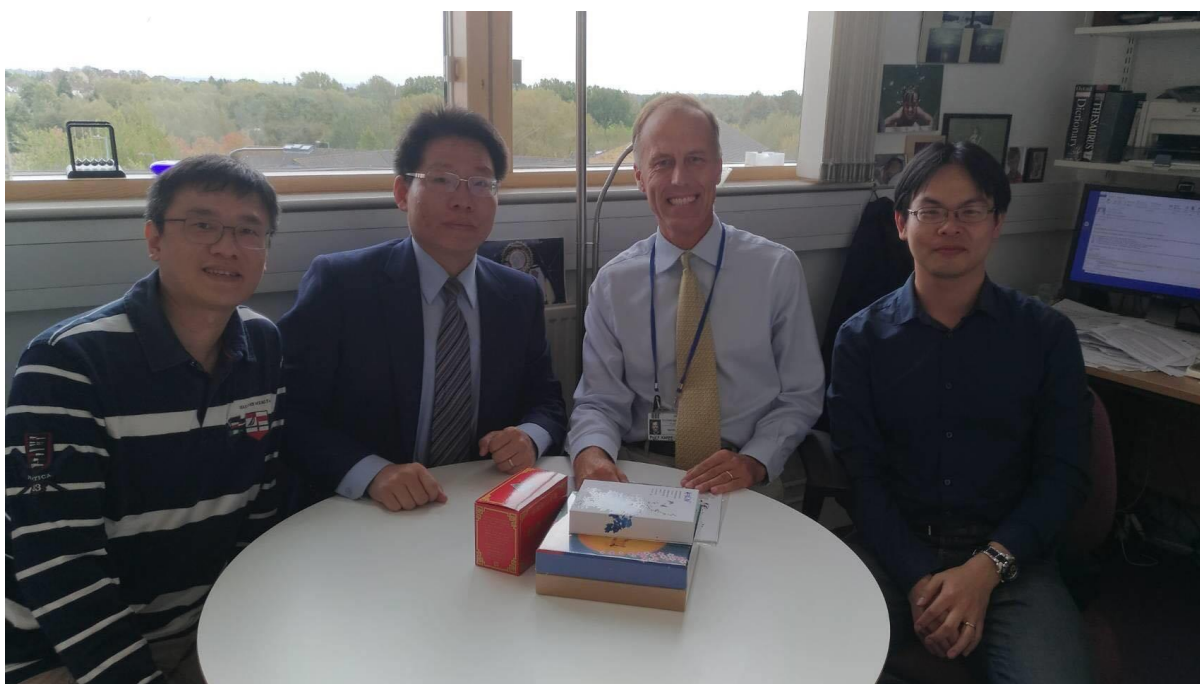


Fig 3. 林院長和許主任至倫敦慰勞學員並特地抽空至牛津拜訪本人指導教授 (2017年10月)



Fig4. 實驗室團隊 punting party 活動 (2018年)