

出國報告(出國類別：進修)

美國博士學位進修心得報告
研究主題：慢性炎症反應與肺癌之相關
性

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：劉佳鑫、主治醫師

派赴國家/地區：美國/匹茲堡

出國期間：104年8月01日至108年7月25日

報告日期：108年7月31日

摘要

癌症是國人十大死因之首，且肺癌是主要的癌症相關死因。慢性阻塞性肺病是常見的慢性呼吸道發炎疾病，流行病學研究證實，慢性阻塞性肺病是增加罹患肺癌的危險因子，意味著慢性的炎症與罹患肺癌相關，且綠膿桿菌是慢性阻塞性病患呼吸道常見的細菌，增加呼吸道及肺部的發炎反應以及急性發作，但是細菌性相關的慢性炎症反應與肺癌的相關性仍然不是很清楚。職為三軍總醫院胸腔內科醫師，於專科訓練期間對於慢性呼吸道炎症反應與肺癌相關性產生研究的興趣，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104年順利申請到美國匹茲堡大學環境與職業醫學博士課程，在Dr. YuanPu Di指導下建立慢性發炎相關之肺癌小鼠模型進行研究，期能了解慢性呼吸道炎症反應如何增加肺癌進展的機制以及對於免疫治療的效果。

目次

摘要	2
目的	4
過程	6
心得與建議	10
致謝	11

本文

目的

吸煙是肺癌的主要危險因素，也是COPD的主要原因。COPD的特徵是慢性肺部炎症，COPD患者控制吸煙後患肺癌的風險增加。這表明COPD是肺癌的獨立危險因素，並提供炎症與肺癌之間的進一步聯繫。綠膿桿菌常見於COPD病人呼吸道，並與炎症和急性加重相關。腫瘤微環境中的炎症具有促進腫瘤的作用，包括增強的腫瘤細胞遷移，侵襲，轉移，上皮-間質轉化和血管生成。此外，慢性炎症還誘導與髓源性抑制細胞（MDSCs）和調節性T細胞（Tregs）和相關細胞因子介質（例如IL10和TGF β ）的免疫抑制相關。然而，細菌相關的慢性炎症對肺腫瘤發生的影響仍不清楚。局部免疫反應和系統性炎症可能會影響腫瘤的進展，從而改變治療效果。免疫療法，如檢查點抑製劑（checkpoint inhibitors），已成為肺癌的一種新的治療方式，產生持久的臨床反應。然而，非小細胞肺癌（NSCLC）的整體治療反應率約為15-20%，並且只有少數患者從治療中獲益，由於缺乏明確的生物標誌物來評估是否病患對於治療的反應。在患有COPD的NSCLC患者中PD-1阻斷受體的存活增加，表明COPD相關的失調的炎症影響功效。然而，有效免疫治療的機制仍然未知，目前所使用的生物標誌物僅部分預測對PD-1阻斷受體治療有效果的病人。這使得當前診斷與免疫治療下肺癌患者的預後之間存在顯著差異。

為了研究慢性炎症對肺腫瘤發生的影響，我們開發了一種兩階段肺癌小鼠模型，該模型模擬吸煙致癌物誘導的和COPD相關的氣道炎症促進的患者肺癌。我們使用香煙煙霧致癌物4-（甲基亞硝基氨基）-1-（3-吡啶基）-1-丁酮（NNK）產生遺傳不穩定性並平行提供重複LPS以誘導慢性肺部炎症。這種暴露範例產生了有利於腫瘤進展的免疫抑制微環境，類似

於炎症相關的肺腫瘤發生。該模型用於評估抗PD-1免疫療法的功效。我們的研究提供了臨床相關的肺癌動物模型，闡明了慢性炎症對肺腫瘤發生和治療效果的影響。

過程

第一年

1. 剛到美國很快的會面臨不同的生活與語言環境，於剛開始的前1個月首先安置好全家的住宿，銀行的開戶，以及學校的註冊，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，逐步完成系所規定的核心課程以及選修課程，學習從事基礎研究所需要的技術與方法。其中的統計學分析、分子生物學、NGS課程以及免疫學課程等，為後續基礎研究的基礎知識店重要的基礎。
3. 於研究方法上，首先學習分析mRNA microarray分析方法以及訊息傳導路徑分析，對於後續主要論文肺癌生物標記研究有很大的助益。此外，學員也開始學習mouse breeding 以及動物實驗相關技術如genotyping、IHC staining 等等。
4. 學員也學習細胞培養相關技術以及存活分析，用來評估癌細胞在不同條件下，對於生長的影響。

第二年

1. 著手探討BPIF family對於肺癌細胞株的影響。利用加入SPLUNC1、LPLUNC1 recombinant protein於肺癌細胞株，分析炎症相關之基因表達以及對於存活影響。結果顯示H292肺癌細胞株明顯與其他細胞株對於SPLUNC1蛋白有不同的感受性，但是機轉不是很清楚。之後學員嘗試利用肺癌TCGA資料庫進行分析，但是結果與細胞實驗以及目前的文獻資料並不一致，於是沒有繼續往此主題探討。
2. 學習IHC staining 及 western blot 實驗技術，分析小鼠及人肺部檢體。學員特別對細胞程序死亡-配體1感興趣，因此利用Kras-mutant mouse lung tumor 做IHC staining，結果發現Kras-mutant lung tumor PD-L1 IHC staining 並不顯著。
3. 學員利用實驗室抗菌肽（antimicrobial peptide）治療肺癌細胞株，結果發現部分抗菌肽具備抗癌功能，但是治療於肺癌小鼠模型時沒有治療的效果，而且在高劑量有細胞毒性，於是於是沒有繼續往此主題探討。
4. 2017年10月以題目 The role of TLR2 in KRAS-mutant lung adenocarcinoma 順利完成博士資格考試 (Qualifying exam) 。

第三年

1. 學員使用香煙煙霧致癌物4-（甲基亞硝基氨基）-1-（3-吡啶基）-1-丁酮（NNK）產生遺傳不穩定性並平行提供重複LPS以誘導慢性肺部炎症來建立慢性炎相關之肺癌小鼠模型。
2. 我們發現慢性炎症誘發之肺癌小鼠明顯增加腫瘤數目、腫瘤發生率以及腫瘤面積等。此外，小鼠慢性暴露於LPS引發之慢性癌症顯著增加免疫抑制細胞像是MDSCs and Tregs，進一步抑制T細胞以及NK細胞功能。
3. 我們利用mRNA microarray 進一步分析小鼠肺部微環境，結果顯示慢性炎症反應造成T細胞衰竭（T-cell exhaustion）。此外，IHC staining and mIHC staining 顯示慢性炎症反應增加PD-1/PD-L1表達。
4. 2018年1月參加Translational Research Cancer Centers Consortium，並有oral presentation。
5. 2018年4月參加美國癌症醫學會，並有poster presentation。
6. 2018年10月以題目Inflammation and lung cancer 順利通過博士候選人資格考試 (Comprehensive exam)。

第四年

1. 因PD-1/PDL-1明顯表達於我們的肺癌小鼠模型，我們施予anti-PD-1 治療，結果顯示炎症相關之肺癌小鼠明顯對anti-PD-1治療有較佳的治療效果。此外，持續給與LPS會增加MDSCs進而減低anti-PD-1 治療效果，合併MDSCs depletion 以及 anti-PD-1治療顯著增加治療效果。此結果運用於肺癌病人合併有慢性阻塞性肺病可以接受MDSCs depletion併用 anti-PD-1治療來增加治療果效。

2.學員在 NIH Dr. Chen 的指導下找出免疫基因標記，可以用來預測anti-PD-1治療的效果及存活，更進一步分析TCGA肺腺癌資料庫，結果顯示免疫基因標記可以用來肺癌病患預測接受傳統治療例如手術、放射治療、化學治療等以及預後。

3. 2019年4月參加美國癌症醫學會，並有poster presentation。

4. 於2019年6月將研究結果投稿到相關科學期刊，於2019年7月完成博士論文的撰寫，並於2019年7月通過博士學位口試答辯。

心得與建議

1. 於美國研讀博士除了研究進度的壓力之外，同時在前兩年需要修課完成核心課程學分，很常見可能無在四年準時取得博士學位，建議於美國博士班進修時間應該可以依狀況延長至五年比照美國各系所修業時間。
2. 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，找出可行的研究方向，並在現有的知識及技術基礎上做出突破。在每次與指導教授進行會議討論前，先整理實驗數據並且先設可能進行的方案，與指導老師討論後逐漸釐清後續的研究方向。
3. 在這四年博士學位的學習過程中最大的收穫是如何利用實驗室有限的資源，結合自己的擅長的研究優勢例如對於臨床應用性的敏感度以及與指導教授保持良好的溝通，在有限的時間內完成研究。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Dr. YuanPu Di及Dr. Zhong Chen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。



Fig1. 於匹茲堡與何景良部長合影(2016年6月)

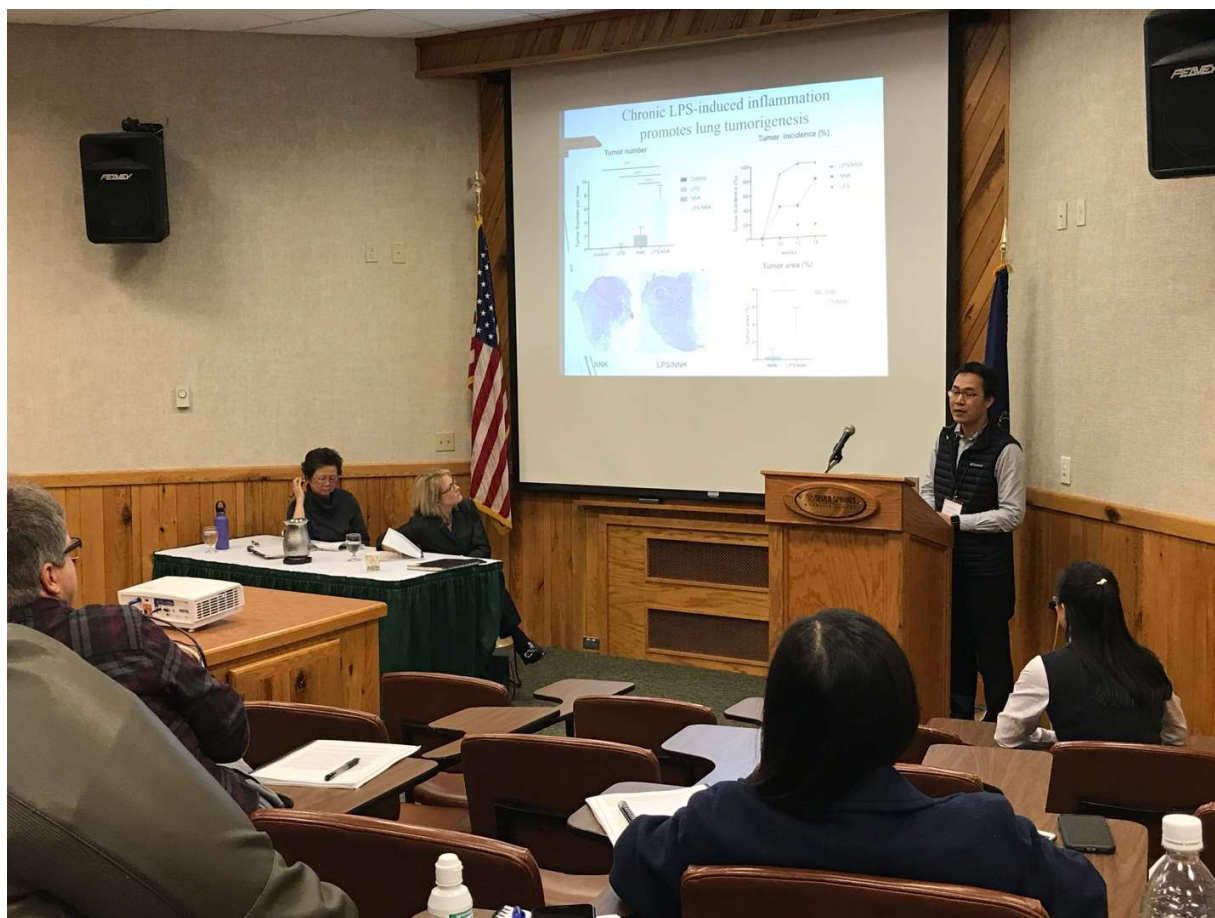


Fig 2. 於Translational Research Cancer Centers Consortium 口頭報告研究成果(2018年1月)



Fig 3. 於芝加哥美國癌症學會年與指導教授 Dr. YuanPu Di 合影(2018 年 4 月)