

出國報告（出國類別：進修）

研究急性腎損傷後
導致慢性腎臟病變的機轉
以改善急重症腎臟病患
的預後與治療

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名職稱：賴俊夫醫師

派赴國家：美國

出國期間：105年8月1日至107年7月27日

報告日期：107年8月13日

摘要

急性腎損傷與後續之慢性腎臟病是國家重要公衛議題，目前對此疾病的病生理機轉仍不清楚，亦無太多有效的治療選擇。本進修計畫目的是利用精準醫療相關先進研究技術，探究其病理機轉並能後續應用於臨床。職前往聖路易華盛頓大學醫學院 Humphreys 教授實驗室進修，學習染色質免疫沈澱合併 DNA 定序、譜系追蹤、親和性純化轉譯核糖體合併 RNA 定序、單細胞 RNA 定序等研究技術，以次世代基因定序與生物統計方法來探究疾病機轉與基因變化。此外，也觀察到美國扎實研究訓練、廣泛運用雲端科技、嚴格實驗室稽查、及研究型主治醫師制度等特色。日後將持續於本院應用此類先進研究技術、研究精神、雲端科技、與建立的國外合作對象，協助腎臟醫學與次世代定序相關的研究。

目次

一、	前言	
二、	目的	
	(一) 研究背景	----- 1
	(二) 研究機構	----- 1
三、	過程	
	(一) 目標	----- 3
	(二) 進修機構環境設置	----- 3
	(三) 進修內容	
	1. 染色質免疫沈澱合併 DNA 定序	----- 4
	2. 譜系追蹤	----- 4
	3. 親和性純化轉譯核糖體合併 RNA 定序	----- 5
	4. 單細胞 RNA 定序	----- 5
	5. 其他	----- 6
四、	心得	
	(一) 與現行本院之比較	----- 7
	(二) 建立國外合作聯絡網	----- 8
	(三) 進修研究成果將來之應用	----- 8
五、	建議事項	----- 10

前言

急性腎損傷是住院常見的併發症，造成病患相當高的住院死亡率，統計顯示近年來急性腎損傷的發生率仍持續增加。包括本院在內的全球許多研究團隊，都發表了報告顯示急性腎損傷不僅僅增加短期的死亡率和併發症而已，當病患出院後，還會造成腎臟功能逐漸惡化，增加慢性腎臟病、以及末期腎臟病需長期透析的風險，且增加長期死亡風險達到 10 年之久。在臺灣，慢性腎臟病與末期腎臟病的盛行率高，病患的罹病率與死亡率較一般民眾高出甚多，同時也造成國家醫療財政的負擔。因此，了解急性腎損傷導致慢性腎病變的病理機轉，並找出可能治療的因子，對腎臟學界與對我國醫療財政都是非常重要的。

急性腎損傷與慢性腎臟病，目前為止並沒有太多有效的治療選擇。其中一個很大的原因，是疾病異質性高 (heterogeneous)、充滿多樣性與複雜性，且當今生物醫學界對此疾病群的病生理機轉、分生途徑了解太少太淺。許多動物實驗都顯示急性腎損傷會造成腎臟細胞修復不完全，進而導致腎小管與間質組織的發炎反應、肌纖維母細胞增生、膠原蛋白在細胞基質過度沈積、微血管循環減損、長期組織缺氧、進而演變為慢性腎臟病變。在此病理過程中，有許多因子被報告出扮演重要角色，腎小管上皮細胞的傷害與再生、巨噬細胞的浸潤、以及肌纖維母細胞增生等等現象也被提出。然而，複雜的病理機轉仍未能全盤了解，目前也尚未找出急性腎損傷後預測腎功能能否恢復的指標，或者找到阻止急性腎損傷導致慢性腎病變的治療目標。

目的

(一) 研究背景

我過去的研究脈絡最初是基於急性腎損傷病患的臨床研究，觀察到急性病患即使康復出院，其腎臟功能仍有逐漸衰退的現象，日後造成長期慢性腎臟病的機會很高。此外，在基礎研究上也發現急性腎臟傷害的確會造成持續性的腎臟纖維化，亦從中找到 Cyr61 等一些可能參與的重要因子。然而，急性腎損傷後導致慢性腎臟病變的整體病生理機轉仍未完全明瞭，目前的也還沒找到可以預測腎臟恢復情形的生物標記，或能夠治療的有效目標，目前最好的臨床治療的方針只能在於長期密切追蹤腎臟功能，避免腎臟毒性藥物，以及對於進行性慢性腎臟病給予 renin-angiotensin-aldosterone system 阻斷。

本進修計畫的目的是希望能學習更先進的研究技術，進一步了解此種“急性腎臟傷害導致慢性腎臟疾病”的病理機轉，以及腎臟不同的細胞分化與組織恢復的機制，找出其中關鍵因子，可以作為預測的生物標誌或治療的目標。再經由轉譯醫學的方式，進一步地應用到臨床，診斷與評估病患的長期預後，並且能阻斷長期的腎臟病變，對急性腎損傷病患的長期醫療照護能有所貢獻。

(二) 研究機構

聖路易華盛頓大學（Washington University in St. Louis）成立於西元 1853 年，立校於美國中西部已有 165 年之久。其主校區位於密蘇里州聖路易郡的 Clayton 市，長期以來都是全美排名前 10 的私立研究型名校，截至目前為止已培養出 22 位諾貝爾獎得主，其商學院與社工系皆為全美排名第一。聖路易華盛頓大學醫學院（Washington University School of Medicine in St. Louis）位於主校區東方約 3 英里的密蘇里州聖路易市 Central West End 區，為全美醫學院排名前 5 之醫學院，研究風氣鼎盛，其中的 Division of Biology and Biomedical Sciences 在基因學門排名

全美第 1，腎臟學科排名全美前 10 名，與醫學院合作的 Barnes Jewish Hospital 亦為全美排名第 11 的醫學中心。

Benjamin D. Humphreys 教授是急性腎臟傷害導致慢性腎臟疾病之病理機轉研究的領導學者，他的實驗室是世界著名的急性腎損傷研究重鎮，已發表為數甚多的研究成果於國際重要醫學雜誌。依據其研究成果提出的機轉，已被全球許多專家確認。2015 年 Humphreys 教授自美國哈佛大學醫學院轉任至聖路易華盛頓大學醫學院，並擔任該院腎臟科主任。教授長期致力於研究急性腎臟細胞傷害與修復的機轉，以其 lineage tracing 的實驗技術，對於急性腎臟傷害後，腎臟組織中各種細胞的反應和變化、cell plasticity、cellular repair 等題目研究深入，居世界領先的地位。

過程

(一) 目標

鑑於精準醫療與個人化醫療的時代來臨，我們需要運用新的技術於特定細胞族群、乃至單一細胞的多面向分子生物層次研究，這類型的研究已經於免疫學、腫瘤醫學取得相好的進展，也對免疫疾病與癌症病患的治療造成明顯的進步。然而，此類新技術應用在腎臟醫學還處於相當初期的階段，某些走在前端的腎臟研究實驗室，也已經開始應用此類技術於腎臟基礎研究，甚至進展到初期的臨床應用階段。

本進修計畫之目標即是研習此類先進的研究技術與轉譯醫學的方法，期望能進一步了解急性腎臟傷害導致慢性腎臟疾病之病理機轉，找出關鍵的因子，可以作為預測的生物標誌或治療的目標，未來能增進臺大照護急重症急性腎損傷病患的醫療品質。

(二) 進修機構環境設置

Humphreys 教授實驗室位於醫學院校區的 Wohl Clinic 大樓 9 樓，同時有 10 ~15 位研究人員與學生。實驗室主要分三個研究群：第一個研究群利用各種 lineage tracing 與 Cre-loxP 的基因轉殖鼠，以動物模式來研究各種腎臟疾病的細胞譜系追蹤與致病機轉，其中以 proximal tubular epithelial cell plasticity and repair，和 Gli1+ pericyte 為主要研究對象。第二個研究群為幹細胞與腎臟類器官（organoid）的研究，包括幹細胞培養與分化，基因轉殖鼠培育，腎臟類器官的培養與模擬腎臟疾病機轉的研究。第三個研究群為次世代基因定序，主要利用單細胞 RNA 定序或單細胞核 RNA 定序，以先進的生物統計方法來研究腎臟疾病的基因表現變化。我被分派到第一個研究群，但研究計畫也牽涉到第二個與第三個研究群的實驗方法，因此能廣泛學習實驗室中大部分應用的研究方法。每週例行的研究室會

議，也能獲知同仁的最新研究進度。

Washington University in St. Louis 腎臟科除了 Humphreys 教授實驗室以外，其他著名的實驗室還包括研究 podocyte, glomerulus 的 Jeffrey H. Miner 實驗室；研究 proteolytic ligands/receptors 的 Andreas Herrlich 實驗室；研究 cilia 結構與功能的 Mohamed R. Mahjoub 實驗室；研究 tight junction 的 Jianghui Hou 實驗室；與研究腎臟發育與腎臟移植的 Sanjay Jain 實驗室等。透過每週定期的腎臟科內研究會議，可以了解其他研究室的最新研究方法和結果。

(三) 進修內容

1. 染色質免疫沈澱合併 DNA 定序

教授首先指派的計畫是利用染色質免疫沈澱合併 DNA 定序 (chromatin immunoprecipitation followed by DNA sequencing, ChIP-Seq) 的技術，研究急性腎損傷後，腎臟組織受到轉錄因子 Gli 1、Gli 2、Gli 3 所調控之基因，及其導致慢性腎臟纖維化的作用機轉。此技術為 Humphreys 實驗室新採用的研究方法，需自行摸索。我採用 *in vitro* flag-tag 細胞實驗，與 *in vivo* biotinylation-tag 的動物模式。在動物實驗方面，雖然成功繁殖出 Flag 標記於 Gli 2 基因與 Gli 3 基因的小鼠，但因腎臟中表現 Gli 2 或 Gli 3 基因的細胞數目太少，並無法免疫沈澱出 Gli2-Flag 或 Gli3-Flag 合成蛋白。在細胞實驗方面，利用 CRISPR/Cas9 技術將 Flag 標記於纖維母細胞株的 Gli 1 基因中，經實驗步驟優化後成功地免疫沈澱出 Gli1-Flag 合成蛋白，能抓下 Gli 1 蛋白相關連的 DNA 片段。但由於 anti-Flag 抗體的專一性不足，造成非特異性的 DNA 片段比例也很高，純化程度無法達到進行 DNA 定序的要求。鑑於進修時間有限，在教授建議下停止後續的定序步驟。

2. 譜系追蹤

譜系追蹤 (lineage tracing) 技術為 Humphreys 實驗室的成名技術，在教授指

導下，我們繁殖了 $Axin2^{CreERt2};Rosa26^{tdTomato}$ 基因轉殖小鼠，成功以 Tamoxifen pulse-chase labeling 標記腎臟中的 Wnt-responding cells，用以研究急性腎損傷後 Wnt signal responsive cells 的變化與 Wnt- β -catenin 之訊息傳導，並檢視其對腎臟纖維化的影響。我發現急性腎損傷後，主要的 Wnt signal responsive cells 是腎臟間質細胞，且與腎臟纖維化有關，並非如過去文獻中顯示的是腎小管上皮細胞。此研究計畫將繼續在臺大進行與完成。

3. 親和性純化轉譯核糖體合併 RNA 定序

親和性純化轉譯核糖體合併 RNA 定序 (translating ribosome affinity purification followed by RNA sequencing, TRAP-Seq) 是 Humphreys 實驗室開發的研究技術之一，我們利用此技術可以專一性地觀察某種特定細胞在正常與疾病狀態下的全基因表現。我利用繁殖 $Gli1^{CreERt2/wt}; Gli2^{ff}; GFPL10a^{f/wt}$ 的基因轉殖小鼠，以 TRAP-Seq 研究腎臟纖維化過程中 Gli 1+ pericyte 細胞中 Gli2 基因的作用標的 mRNA。另外，也利用繁殖 $Slc34a1^{eGFP-CreERt2/wt}; GFPL10a^{f/wt}$ 的基因轉殖小鼠，以 TRAP-Seq 研究進行性腎臟纖維化動物模式中近端腎小管細胞轉錄層級的反應，並將得到之 RNA 定序結果進行生物統計分析，找出腎臟傷害的關鍵因子，並以 *in situ* hybridization、免疫螢光染色等技術在活體中驗證。此部份研究計畫已初步完成，進入文章撰寫與投稿階段。

4. 單細胞 RNA 定序

腎臟由 15 種以上不同的細胞組成，各自的功能上有很大的差異，造成腎臟研究的困難。單細胞 RNA 定序 (single cell RNA-sequencing, scRNA-Seq) 發展了約莫 10 年，但直到因研究技術進步大幅減少了費用，並結合新發展的生物統計模式後，最近 2 年成為非常熱門的研究方法，可以將基因體的研究帶進單一細胞的層次，Humphreys 實驗室是其中發展快速的腎臟實驗室之一。進修期間雖未直

接負責相關研究，但有機會觀摩 DropSeq, InDrops, 10X Chromium 三種不同的 scRNA-Seq 操作方式，與幾位研究同事討論操作的實務與問題解決，學習統計分析的方法，並在例行實驗室討論會中，了解 scRNA-Seq 的研究目標、設計、結果判讀等。此研究方式能非偏差式 (unbiased) 探討單一細胞層次的基因表現變化，將對複雜結構、多種細胞的腎臟基礎研究有很大的幫助，業有助於臨床上將病人的疾病做更有效率、與治療預後更相關的分類。

5. 其他

由於實驗計畫所需，我也學習利用 CRISPR/Cas9 技術進行基因植入與基因替換的實驗，對以後研究基因研究有相當助益。另外，也與放射科 Sheng-Kwei Song 實驗室合作，以小鼠動物實驗模式製造腎臟發炎與纖維化，再進行磁共振造影，研究非侵入性偵測腎臟發炎與纖維化的方法，後續將繼續由 Song 實驗室完成動物實驗，未來也有機會能運用在人體試驗。與 Deborah J. Lenschow 實驗室的合作，則發現某個新的細胞死亡途徑相關蛋白，在急性腎損傷治病機轉中扮演重要角色，剔除此基因會導致動物實驗的病程明顯改變，未來可能可運用在臨床偵測急性腎臟疾病病患的預後。

心得

(一) 與現行本院之比較

兩年來在美國尖端實驗室研究的心得，除了發現美國好的實驗室申請到的研究經費充裕，實驗耗材成本較低，以及新穎研究技術之外，在非科學的面向上，觀察到許多與本院不同、且值得本院與國內學界學習之處，例如：

(1) 機構內 new staff orientation 以及 learning courses 訓練相當紮實，雖然與本院一樣以線上課程為主，但課程的測驗會穿插在課程中進行，並非在課程結束後才進行測驗，而且題目並不簡單，三次未達標準就無法在進行測驗，會讓受訓者真實的接受訓練。此外，部分訓練需要 hands-on practice 課程，也是馬虎不得。

(2) 實驗室中的各種庶務，例如申請購置耗材、實驗儀器登記使用、小鼠的繁殖紀錄等，都使用 online system 處理，方便快捷又能幫助 PI 掌握實驗室的概況。實驗室的共用物品例如抗體、primer、限制酶、protocol、冷凍細胞等等，也都用共用電子清單紀錄成檔案登記，並由最後的使用者隨時更新，大幅減少了尋找物品的時間，更大大降低了購置浪費。研究者與 PI 之間的報告和溝通，也都用商業版本 (DropBox) 或學校版本 (WashU Box) 的雲端儲存空間傳遞檔案。本院現已有先進的軟、硬體資訊環境，各實驗室應可學習利用。

(3) 實際參與實驗室稽查 (laboratory audit) 的過程，稽查單位對實驗的藥品的使用、保管、丟棄之規定非常嚴格，不容易通過。機構對於各實驗室的稽查頻率不同，表現良好的實驗室可以減少稽查頻率，然而不合格項目多的實驗室會被增加稽核頻率，甚至要求關閉。此彈性稽查頻率值得學習，可以降低稽核本身對正常運作實驗室的打擾，也可儘快輔導異常實驗室恢復正常運作。

(4) 醫院的主治醫師有分研究型與臨床型雙軌，臨床型的主治醫師有 80% 以上的工作時間在臨床服務，只有不到 20% 的工作時間進行基礎或臨床研究，

對其升等有不同評估方式，保障其辛苦臨床工作應有的升等權力，並不要求一定要有非常深入的基礎研究。而研究型的主治醫師，臨床工作大約只要負擔 20% 或以下，每週有超過 80% 的時間可以專心在基礎研究上，不致於被繁雜的臨床事務與行政工作切斷研究的連續性與效能，又能保有一些自己的臨床病人以供將基礎研究成果最後應用於臨床診斷或治療上。此種研究型主治醫師的比例大約佔 3 成以上，大幅高於本院研究型主治醫師的比例。

(二) 建立國外合作聯絡網

除了與指導之 Humphreys 教授建立合作研究關係以外，實驗室內有多位來自世界各地的研究者，以博士後研究員或研究助理的身分共同工作，建立了生活與研究的情誼。其中多位研究者，日後會各自回到日本、中國、德國等地繼續他們的研究事業，未來都是可以與臺大進行國際合作研究的對象。

此外，因生活與社交所需，進修期間亦參與聖路易臺灣學者協會、華盛頓大學臺灣研究生協會，了解到許多在聖路易華盛頓大學其他學院、其他部門的臺灣研究者的研究主題、專長、與可能合作的契機。例如與 Sheng-Kwei Song 實驗室、Deborah J. Lenschow 實驗室等，都因臺灣研究員的朋友關係而建立了合作性的研究。這些建立的合作研究聯絡網，對日後跨領域研究、國際合作研究都是重要的人脈與資源。

(三) 進修研究成果將來之應用

這次進修學習到的次世代基因定序與腎臟精準醫療相關研究技術，包括染色質免疫沈澱合併 DNA 定序、親和性純化轉譯核糖體合併 RNA 定序、單細胞 RNA 定序與單細胞核 RNA 定序等技術，在國內腎臟學界尚未普及，將會持續在本院繼續發展，期望能以此類技術帶動本院腎臟醫學與次世代定序相關的研究發展。目前已利用染色質免疫沈澱合併 DNA 定序、親和性純化轉譯核糖體合併 RNA 定

序、設計研究計畫並申請到未來三年的科技部研究經費補助。同時，譜系追蹤 Wnt signal responsive cells，及 CRISPR/Cas9 基因替除技術，未來也將持續進行在腎臟相關的研究。此外，與 Song 實驗室的合作研究，期望能在動物實驗得到初步研究成果後，將來能運用在本院的腎臟疾病病患臨床研究試驗。由於我復職後將繼續負責急性腎損傷的醫療業務，經由此計畫的研究成果，能應用在急性腎損傷病患的臨床治療。

建議事項

1. 前述在美國的實驗室中各種庶務、共用項目清單、檔案傳遞等都使用 online system，個人覺得使用上非常方便，增進研究效率甚多。本院現有先進的軟、硬體資訊設備，也有大醫雲的雲端空間，非常適合導入研究單位。在美國使用的 online system 多為付費軟體，然而，其中常用的實用功能只有數項，希望本資訊單位能開發公版通用的線上軟體供各研究單位、實驗室來客製使用。本院的大醫雲，目前每個帳號只有 51GB 左右的雲端儲存空間，對一個實驗室的運作並不夠用，卻對多數不常使用的個人而言又太多。建議能適度減少所有人的基本用量，增加的容量讓實驗室或各 PI 申請增加、或購買使用容量，至少到 500GB~1TB 左右的線上空間。

2. 本院每年皆有同仁赴國外進修或攻讀學位，若能在地互相聯繫幫忙，有助於異鄉生活上的適應、進修業務的學習、以及情感上的慰藉。但礙於進修同仁在醫院時分屬不同單位、不同職級，出國進修的起始點都不同，不一定能互相知道彼此的進修地點與時期，常常經過很長的時間以後才輾轉得知。建議能在不影響個資的條件下，院方能依進修者的意願，協助建立國外進修者的通訊方式或聯繫管道，讓旅外進修同仁能有聯繫、甚至合作研究的管道。

3. 非常感謝院方與醫學研究部設置進修返國計畫的研究經費申請，對於剛由國外返國者非常有助益。此計畫的申請在經費項目上，等同於一般型研究計畫之規定，經費不得編列人事費、儀器設備費及差旅費。然而，進修返國申請計畫者，可能會需要將新的技術帶回臺大繼續研究，有些儀器設備是院內甚至國內都尚未普遍使用的，因此會有添購儀器設備的需求。建議院方能考慮將此類申請計畫的申請經費項目增加一些彈性，在敘明詳細狀況並經由專家審核後，能開放儀器設備或其他彈性使用項目的經費申請。