

出國報告(出國類別：進修)

基因染色質體研究

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：馮安捷、主治醫師

派赴國家/地區：美國加州

出國期間：105年9月7日至110年3月7日

報告日期：110年4月14日

摘要

基因體研究乃是近年來生物醫學最具有發展潛力的領域，其中表觀基因學方面更是在近二十年取得相當驚人的成果。學生於民國 105 年 9 月至 110 年 3 月，至美國加州大學洛杉磯分校分子生物研究所進修，研究內容為染色質結構的改變對於免疫反應之影響，標的細胞為小鼠之骨髓細胞分化巨噬細胞，著重於非特異性之免疫激活，核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子 (NF- κ B) 以及 IRF3 訊息傳遞鏈。

目次

1. 目的	-----4
2. 過程	-----4
3. 心得與建議	-----11

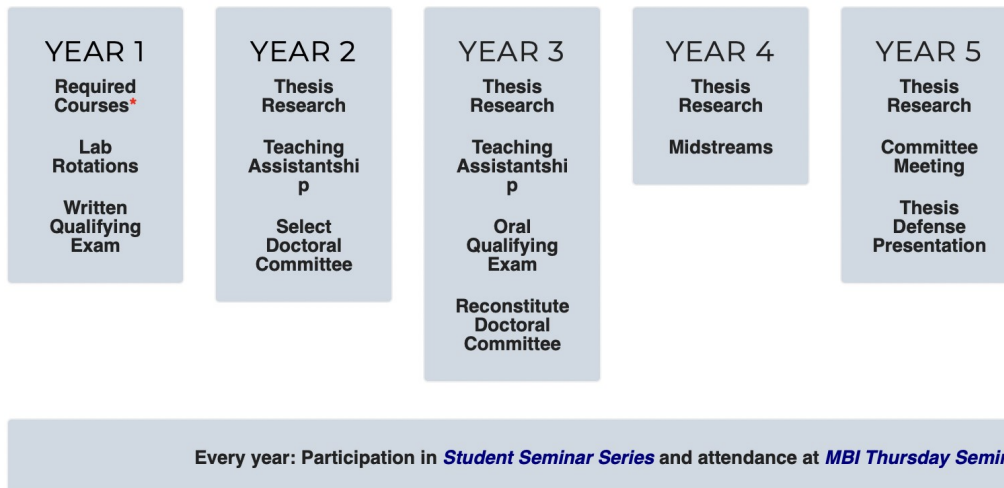
目的

本次出國進修之目的為學習基因體研究，幫助科內基礎研究之進展，表基因遺傳學為近 20 年之新興研究領域，亦有相當之臨床應用，實為醫學中心及醫學院近期積極布局之前瞻研究。

過程

加州大學洛杉磯分校分子生物研究所之平均學程為期六年，第一年必須修習課程完成必修學分，同時每一季都要進行實驗室實習（共三季），最後一季決定實驗室及教授，完成筆試。第二年及第三年必須擔任課程助教完成教學學分，同時必須完成第一階段口試，取得博士候選人資格。其後每年必須跟答辯委員會進行報告，決定是否可以進行最後答辯。

TIMELINE AND GENERAL REQUIREMENTS



*See the *Student Handbook* for more details about specific course requirements per Home Area

研究所第一年修習必修學分，包括表觀基因遺傳學，演化學，細胞骨骼學，蛋白質結構。修習學分的同時，進行實驗室實習，總共三個，包括 Professor Alex Hoffmann（系統生物



學及 Machine learning), Professor Stephen Smale (免疫基因調控) and Professor Dino De Carlo (醫學工程) 的實驗室。最後選擇 Professor Stephen Smale 的實驗室學習高通量定序的分析研究，以期能將當前最新的研究技術及方法帶回醫院，提升研究實力。第二年開始著重在本身的主軸研究，分析染色質結構的改變對於基因表現的影響，同時完成教育學分的要求，擔任病毒學助教共兩季。最後一年，專心致力完成

自身的研究，包括資料的分析及實驗部分。學生於每個階段都完成要求，於實驗室的學習，主要分成實驗及生物資訊分析。實驗的部分著重於高通量定序樣本之處理及準備，其中包括 RNA-seq, ChIP-seq, ATAC-seq, HiC and capture HiC。生物資訊分析則是進行電腦編程，分析高通量定序的原始資料。除了主要的研究計畫，同時與 RNA 實驗室，代謝實驗室以及生物醫學工程實驗室進行合作，增進研究多樣及全面性。

Dr. Smale 的實驗室主要是專注於巨噬細胞之發炎反應的研究，藉由全基因定序發炎刺激所造成染色質結構改變的區域 (使用序列測定轉座酶可及染色質, ATAC-seq)，我們希望能更加了解巨噬細胞的基因調控。我們發現此種技術比單純使用組蛋白修飾更可以提高基因位點的解析度，同時也可增加敏感度。我們使用其他實驗室所發表之定序資料進行比對，發現

染色質結構改變之基因區域（基因間區域）無法完整的被組蛋白修飾或是其他轉錄因子所結合（染色質免疫沈澱測序, CHIP-seq），而且核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子（NF- κ B）蛋白質基序在高改變度的區域出現的比例增加，我們想了解造成這些染色質結構改變的機轉。此研究可以提供此領域對於染色質結構於免疫基因調控的了解，同時我也可以學習生物資訊的研究方法，以期能幫助國防醫學院相關領域之研究。

所謂表觀基因學研究在不改變 DNA 序列的前提下，亦即在相同的 DNA 序列下，透過調控基因活性的機制，所引發具有遺傳性且穩定、長期的基因表達或細胞表現型的變化，就是「表觀遺傳學（epigenetics）」。表觀遺傳學是 1980 年代才逐漸發展興起的一門科學，又稱為「表遺傳學」、「外遺傳學」、「擬遺傳學」或是「後遺傳學」，英文為 epigenetics，其中「epi-」源自希臘文，有「在…之上」或「除…之外」的意思，「-genetics」就是遺傳學。因此，表觀遺傳學的特徵是在傳統的分子遺傳學之上或之外的遺傳學。而表觀遺傳學也能這樣解釋：在不涉及核苷酸序列改變的前提下，功能性相關的染色體改變。此種染色體改變的機制包括了「DNA 甲基化（DNA methylation）」和「組織蛋白修飾（histone modification）」等，這樣的調控機制皆能在不影響 DNA 序列的前提下，造成基因表達的不同。另外，藉由抑制蛋白結合在 DNA 的沉默基因區域，也能調控基因的表達。這些表觀遺傳學上的變化，也就是表觀遺傳現象，可能可以通過細胞的有絲分裂或減數分裂保留下來，並可能持續遺傳好幾代，而這些變化都僅僅是在非基因因素的層次上，導致生物體基因表達的不同。

傳統的遺傳學主要在研究基因序列如何影響功能，相較之下，表觀遺傳學主要是在研究表觀遺傳現象的形成與維持的機制，其研究的主要內容有兩大類，分別為

（一）、基因選擇性轉錄表達的調控，包括 DNA 甲基化、組織蛋白修飾、基因體印記

(genomic imprinting) 以及染色質構形重塑 (chromatin remodeling) 等。

(二)、基因轉錄後的調控，包括基因序列中非編碼 RNA (ncRNA)、反義 RNA (asRNA)、微小 RNA (miRNA)、內含子 (intron) 以及核糖開關 (riboswitches) 等。

表觀遺傳學主要在探討真核生物中細胞分化的過程，其中，在胚胎形態形成的過程中，全能幹細胞將逐漸分化成完全不同且具有不同功能的細胞，也就是說在一個受精卵進行細胞分化，分化出各種不同類型的細胞，並透過抑制其他細胞和活化與其相關的基因而進行持續的細胞分裂。表觀遺傳學曾經登上 2010 年 6 月 18 日發行的時代雜誌 (TIME) 的封面，標題為「DNA 無法決定命運 (Why Your DNA Isn't Your Destiny)」，其在生物科學領域的重要性可見一斑。

NGS(Next Generation Sequencing, NGS)，又稱為第二代定序或基因高通量分析，以第一代定序方法為基礎而開發出的新技術。因第一代定序方法通量低、成本高與耗時長，對大規模之應用造成影響，因此有 NGS 技術的發展。NGS 降低單一鹼基定序所需的成本，也讓當前的定序檢測不再受限於基因的大小或多寡。因此，NGS 近年來在臨床上被廣泛地應用，包含偵測血液中游離的 DNA，以做為腫瘤基因突變的檢測方法，以及孕婦產前遺傳篩檢的診斷技術，加速了精準醫學的實現。隨著次世代定序技術的問世，大幅縮短了相關研究的解序時間，同時拓展了基因體研究的廣度與深度，亦可應用於臨床診斷上，目前已有儀器與試劑通過美國 FDA 認證。NGS 定序平台之基本原理及操作流程，主要可分為樣本庫製備(library preparation)、樣本庫擴增(library amplification)、定序反應(sequencing reaction)及數據分析(data analysis)等四大步驟。

1. 樣本庫製備(library preparation)

將待測之樣品經核酸萃取後，利用物理性方法（如超音波震盪法）或酵素裁切等方式，將基因序列進行核酸片斷化(fragmentation)，再將其末端接上轉接子(adaptor)，以作為樣品庫。

2. 樣本庫擴增(library amplification)

藉由基因片段上的轉接子會與微磁珠(micro-beads)或晶片上的互補序列相結合，而固定於固相介質上，進行乳化聚合酶鏈鎖反應(emulsion PCR)或橋式聚合酶鏈鎖反應(bridge PCR)。乳化聚合酶鏈鎖反應係指欲放大之模板 DNA 均勻分散至油滴中，每個油滴中含有球狀微粒，藉由球狀微粒中的引子及聚合酶酵素及試劑進行聚合反應。而橋式聚合酶連鎖反應藉由將擴增之 DNA 片段聚集於晶片表面，以快速擴增單一 DNA 片段。

3. 定序反應(sequencing reaction)

次世代定序法依不同的定序平台，而有不同的定序原理。Roche 454 定序平台是透過焦磷酸定序法(pyrosequencing)來定序的，過程中依序置入帶有 4 個不同鹼基的去氧核苷酸，當核酸聚合酶將去氧核苷酸接合時，釋出焦磷酸根離子(pyrophosphate)，釋出的焦磷酸根因 ATP 硫酸酶(ATP sulfurylase)轉換產生 ATP，再藉由冷光酶(luciferase)接收 ATP 能量將冷光素(luciferin)進行氧化，最後由感測器測得訊號，透過反覆的試劑置換與偵測，得到大量定序的結果。

4. 數據分析(data analysis)

將定序後的大量資訊與現有的資料庫進行比對(mapping)及計數(counting)分析，設法還原原始待測基因片段序列。

次世代定序技術對兒童的遺傳疾病診斷，目前已有優異的表現。相關研究資料顯示，相較於傳統使用染色體晶片分析和選擇性定序只能獲得 13% 的正確率，全基因體定序可獲得高達 34% 的正確診斷。而在罕見疾病中，有 80% 屬於遺傳性疾病，次世代定序技術的應用更有其不可或缺的重要性。

但是，診斷疾病的次世代定序資料分析並非易事。研究數據顯示，將 99 個遺傳性疾病交給 9 個分子診斷實驗室進行分析，只有 33 個病例能獲得一致的診斷；即使經過重複的討論，也只有 71% 病例能獲得一致的診斷。雖然已得知病人的 DNA 序列，但每一個基因體都帶著太多的序列差異（DNA 突變），導致要診斷出一致的疾病仍然非常困難。

次世代定序技術對癌症治療成果上，除卻小細胞肺癌、大腸直腸癌，乳癌，卵巢癌，黑色素瘤，及慢性骨髓性白血病，在其他方面已有具體成效。但因腫瘤基因發生變異的程度有極大且複雜的變化，光靠單一藥物就立見療效的機會有限。未來大多數癌症治療仍須整合基因檢測、新治療策略或藥物的發展、及前瞻性臨床試驗以獲得較有說服力的證據來提升精準醫學對癌症治療的效能。人類不可因目前的成效無法擴及大多數癌症患者，或是單就成本效益的問題，而放棄人類於癌症治療邁向進步的動力。因為癌病對各種治療的反應差異大，多數的醫師還是認為精準醫學對癌症治療是必然該走的有效路徑。

此外，在國外進修期間學生亦積極訓練個人語文能力，參加研究所舉辦之大滿貫比賽全科系研究院校大滿貫比賽



的選手來自各科系研究學院，選手需在限時三分鐘內，用 Ted Talk 簡顯易懂的方式，將複雜難懂的研究解說給觀眾。經過兩輪初賽，最終有十位選手晉級決賽，優勝者將代表校方 5 月前進舊金山加大（UCSF）與其他九所加州大學優勝者比拼。花了兩個月時間準備比賽，最終賽以「基因體研究跟肝臟移植排斥」為主題演講，過程戰戰兢兢。「基因體研究跟肝臟移植排斥」主題結合了在校研究及過往外科經驗，這讓學生對題目研究瞭解透徹，才有望脫穎而出。基因體研究由美國最先開始，國家願意花上龐大資金培養傑出人才持續研發。再者，基因體研究其實對臨床醫療上有巨大幫助，相信基因治療將是未來趨勢。由於台灣目前欠缺基因體研究方面的人才，希望學成後回到台灣，將所學貢獻給軍方與醫療體系，讓台灣在基因體研究上更上一層樓。

心得及建議

基因體研究為目前基礎研究所必須，雖臨床應用日漸增加，國內仍缺乏相關醫師具有此方面專長，希望所學能對於醫院未來發展能有貢獻及助益。另外，於國外進修期間，因多方合作，建立起良好的連結，期能提供有進修意願的同仁相關的協助。唯目前國防部給予國外博士班進修期限為四年（可延半年），著實不足，實在是有很大的壓力，若能稍微延長年限將是很大的助力，對於國軍醫院未來的發展上會有很大的幫助。

110 年 4 月 21 日下午 2 時於三軍總醫院一般外科科務會議中分享進修心得。

