

出國報告（出國類別：進修）

# 腎臟內皮細胞於兒童腎病症候群引起蛋白 尿的角色與機轉

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名職稱：蔡宜蓉醫師

派赴國家：美國

出國期間：105年9月1日至106年8月31日

報告日期：106年10月26日

## 摘要

原發性腎病症候群為兒童常見的腎臟方面的疾病，針對原發性腎病症候群中的微小型變化，其致病的機轉至今仍未明。在之前的一系列的研究計畫中，我們探討了兒童原發性腎病症候群是否因為細胞性的免疫失調所造成的細胞激素的變化程度不同，因而導致對於治療上的反應有所不同，進一步探討蛋白尿產生的分子致病機轉的效應，並釐清分子層次的機制與未來在疾病治療的發展。

此次進修內容主要著重於次世代定序的方法學習，使用全外顯子體定序(**whole exome sequence**)的方式，尋找可能的目標基因，了解蛋白的表現與分子致病機轉。

本次進修單位選擇位於麻塞諸塞州的哈佛醫學院波士頓兒童醫院 (**Boston Children's Hospital**)，此次所獲得的臨床基礎醫學研究方面的知識與經驗，以協助疾病的診斷，並結合目前大數據與生物資訊，了解疾病的致病基因與機轉，探索新的治療方式，進一步以精準醫療促進病人的照護。

## 目次

一、前言 .....	1
二、目的	
(一) 背景介紹 .....	2
(二) 研究機構介紹 .....	3
三、過程	
(一) 目標 .....	5
(二) 進修內容研究與分析結果	
(1) 臨床收集病人 .....	5
(2) 設立基因檢測流程 .....	7
(3) 結果分析 .....	8
(4) 實驗室基礎研究的進行 .....	9
(5) 其他 .....	10
四、心得 .....	13
五、建議事項 .....	13

## 一、 前言

原發性腎病症候群為兒童常見的腎臟方面的疾病，針對原發性腎病症候群中的微小型變化，在我們之前的一系列的計畫中，探討兒童原發性腎病症候群是否因為細胞性的免疫失調所造成的細胞激素的變化，因而導致對於治療上的反應有所不同。因此，在之前的研究中，我們探討蛋白尿產生的分子致病機轉的效應，瞭解腎絲球內皮細胞與足細胞間造成之互相影響的關係與其在兒童蛋白尿中的角色，進一步了解分子層次的機制與未來在疾病治療的新發展。

不過，在此次進修內容主要著重於次世代定序的方法學習，由於兒童原發性腎病症候群，有大部分是因為基因的突變而導致蛋白尿的產生，因此探索兒童原發性腎病症候群目前仍未發現的基因，了解可能的致病機制與分子機轉，使用全外顯子體定序(whole exome sequence)的方式，尋找可能的目標基因，進一步了解蛋白的表現與分子致病機轉。次世代定序的方法，不單只適用於兒童腎臟病的基因探索，更可以進一步運用至其他兒童先天的疾病，或者目前未知罕見疾病的診斷與功能上的探討，以期推廣於不同領域的疾病應用與新基因的研究。

本次進修單位選擇位於麻塞諸塞州的哈佛醫學院 (Harvard Medical School) 附屬波士頓兒童醫院 (Boston Children's Hospital)，是世界最具影響力和代表世界最高醫療水準的醫療機構之一。2017年6月27日，《美國新聞與世界報導》(U.S. News & World Report) 最新發布了2017-2018年美國最佳醫院排行榜，波士頓兒童醫院位居全美最佳兒童醫院第一名。

此行所獲得的臨床基礎醫學研究方面的知識與經驗，深信回國後對於兒童腎臟病與相關先天性異常的疾病，能夠有不同的觀點切入，並進一步與之前的研究做結合，也期待有機會協助不同領域疾病的診斷，結合目前大數據與生物資訊 (Bioinformatics)，了解疾病的致病基因與機轉。探索可能的新的治療方式，利用精準醫療的技術與個人化的團隊照顧，來符合整個國家社會對臺大醫院兒童醫院的期待。

## 二、 目的

### (一) 背景介紹

隨這少子化時代的來臨，兒童的健康也日益受到重視。在臺灣，慢性腎臟病與末期腎臟病的盛行率相當高，病患的罹病率與死亡率較一般民眾為高，同時也造成國家醫療財政的負擔，因此，早期發現早期治療，甚至已經延伸至兒童族群。兒童腎臟病的照顧在最近這幾年已經由一般的兒科照護，逐漸轉變成重難症的科別。而精準醫療的發展，也對於照顧品質的進步中，逐漸占有一席之地。兒童腎臟學在目前兒科醫學中，隨著醫療科技的進步、救治病童疾病的能力與疾病本身嚴重程度上升的情況下，兒童腎臟病與醫療團隊的照顧以及新的知識與治療方式的研究就愈顯重要。

原發性腎病症候群為兒童常見的腎臟方面的疾病，在我們之前的一系列的研究計畫中，已經對於兒童原發性腎病症候群中的細胞激素的變化，導致對於治療上的反應有所不同進行詳細的探討。因此，在之前的研究中，進一步了解蛋白尿產生的分子致病機轉與效應，並深入了解瞭解腎絲球內皮細胞與足細胞間在兒童蛋白尿中所造成之互相影響的角色，了解分子層次的機制與未來在疾病治療的新發展。然而，兒童原發性腎病症候群，有大部分是因為基因的突變而導致蛋白尿的產生。所以，結合目前次世代定序的方法，進一步探索兒童原發性腎病症候群目前仍未發現的基因，了解可能的致病機制與分子機轉，使用全外顯子體定序(whole exome sequence)的方式，尋找可能的目標基因，了解蛋白的表現與基因功能的研究。

目前次世代定序系統應用在物種全基因體的定序上已經越發成熟的階段。在過去，如果基因體的某特定區域有興趣時，往往只能利用聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction) 動於特定的 DNA 片段進行分析。以人類基因體而言，只有不到 2%的基因體屬外顯子，而其中大約 85%的疾病是與 exon 變異有關聯。目前，由於結合外顯子體接合的技術逐漸成熟以及生物資訊的發展，因此利用全外顯子體定序找出關鍵性變異外顯子 (Exome)，進一步以動物模型與細胞實驗進行功能上的釐清與印證，為精準醫療的研究方式，也為目前的潮流。而次世代定序的方法，不單只適用於兒童腎臟病的基因探索，更可以進一步運用至其他兒童先天的疾病，或者目前未知罕見疾病的診斷與功能上

的探討，以期推廣於不同領域的疾病應用與新基因的研究。

因此，此次有機會前往世界第一的波士頓兒童醫院，學習有關兒童疾病全外顯子體定序的方法與應用，進一步熟悉新的研究方法，並尋求與國外團隊合作的機會，回國後能有機會將此部分運用到兒童腎臟病與其他先天的疾病，或者目前未知罕見疾病的診斷，將來能有機會將研究成果運用在病人身上，運用精準醫療提升照護的品質。

## (二) 研究機構介紹

波士頓兒童醫院（Boston Children's Hospital）是美國麻塞諸塞州波士頓一所擁有 415 張病床的兒童醫院，位於波士頓市內醫療院所林立的長木醫學區（Longwood Medical Area）。它是哈佛醫學院與丹那-法博癌症研究所（Dana-Faber Cancer Institute）的教學醫院之一，並與這兩個醫學研究機構相鄰。2017 年 6 月 27 日，《美國新聞與世界報導》（U.S. News & World Report）最新發布了 2017-2018 年美國最佳醫院排行榜，波士頓兒童醫院位居全美最佳兒童醫院第一名。



波士頓兒童醫院新正門



波士頓兒童醫院新大樓一角



波士頓兒童醫院新大樓-感應的有聲樓梯

波士頓兒童醫院舊正門



波士頓兒童醫院舊大廳



本次所前往進修的是基因醫學部 (Division of Genetics and Genomics) Dr. Olaf Bodamer 的實驗室。波士頓兒童醫院的基因醫學部將臨床照護與研究與創新的領域進行結合，利用新的診斷工具，包括次世代定序、染色體與 DNA 微陣列分析與基因表現與功能的研究。在波士頓兒童醫院基因醫學部的目標之一，由於目前對於未診斷的疾病 (Undiagnosed Diseases) 仍有許多的未知，因此美國國家衛生院擴編 Undiagnosed Disease Network (UDN)，而波士頓兒童醫院為設立網絡的其中之一。The Manton Center for Orphan Disease Research 為波士頓兒童醫院中負責此部分的重要中心，包括有遺傳諮詢員協助收案與解釋，聯絡相關檢查與檢體的收集，範圍包含美國本土與國外相關機構的聯繫，而此中心跟我後來的研究收案有十分密切的關係。

### 三、 過程

#### (一)目標

由於此次進修內容主要著重於次世代定序的方法學習，並使用全外顯子體定序(whole exome sequence)的方式，尋找可能的目標基因。因此，我的指導教授，也是基因醫學部的副主任 Dr. Olaf Bodamer，他的實驗室是利用全外顯子體定序去尋找病人目前在基因診斷上仍未知的病 (<http://bodamerlab.org/home/>)。而 Dr. Bodamer 建議我從 Megacystis-Microcolon-Intestinal hypoperistalsis syndrome, MMIHS 這一個罕見疾病的研究開始，協助實驗室建立此疾病診斷的流程與提供相關的基因檢測，並進一步學習利用全外顯子體定序去尋找發掘新基因與可能的致病分子機轉。

此外，波士頓兒童醫院是哈佛的教學醫院，能有機會身處世界尖端的哈佛醫學院裡，參與大大小小的研討會，不論是基礎研究，或者是臨床相關的演講，這是真的很難得也是很難忘的經驗。

#### (二)進修內容研究與分析結果

##### 1. 臨床收集病人

由於 Dr. Bodamer 的研究室是屬於臨床的實驗室，因此，真正進行人類檢體的收集處理與進行基礎研究室的實驗工作之前，實驗室安全訓練與人體試驗的相關課程，是必須在真正進行研究開始前必須要完成的。所以，一報到之後就有一連串緊密的訓練課程必須完成後，才能正式開始研究與實驗室的工作。

另外，實驗室安全的部分是一直被要求的，因此進到實驗室就必須要穿著長褲與包腳的鞋子，進行實驗時必須著實驗服，而裙子、短褲與涼鞋是完全不被允許出現在實驗室工作的研究員身上的。這規定雖然老套，不過，為了保護研究者在實驗室工作的安全，研究室夥伴們倒是從來沒有違反過相關的規定。

在今年的研究主題中，收集病人也是另一個大的議題。因為這些病人是屬於罕見的疾

病，再加上多半會合併有腸胃道的症狀，會長期使用全靜脈營養支持，因此，我們也與腸胃科醫師 Dr. Samuel Nurko 有合作，當他有病人到門診時，我與 Manton Center 的遺傳諮詢師就會到門診去收案，而 Manton Center 個案管理師便會負責後續包括同意書的簽署、檢體完整度的追蹤與收集，進一步與病人或病人家屬的聯繫收集相關的資料。另外，我們也經由 Manton Center 收集連繫全美其他醫院的醫師與病人，因為是罕見疾病，所以需要多中心的協助幫忙，才能夠在短時間內收集一定數量的 Cohort 進行分析。



新進員工訓練

新進員工與研究室安全訓練



Orphan Diseases Foundation-  
Manton Center



兒科門診的診間-  
預約的病人與時間一目了然

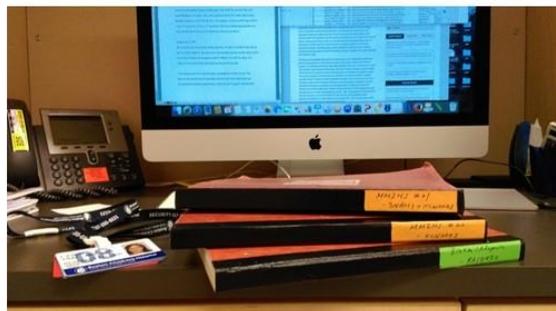
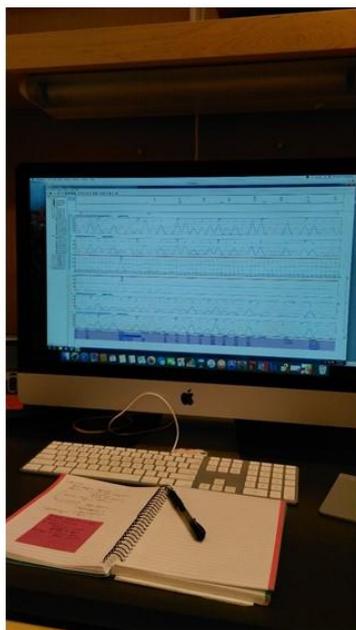
兒科門診-  
醫師處理病歷的地方



## 2. 設立基因檢測流程

在一開始收案之後，我們即設計出診斷的流程。在文獻回顧與資料分析之後，確定先篩檢最常見的基因-*ACTG2*，如果篩檢此基因的結果為陰性，再進一步送出全外顯子體定序去檢驗可能造成此病相關的基因。此外，由於基因部分通常會牽涉到是從父母親遺傳來的，或是自行突變的，所以，我們也將整個家族，包括父母親與兄弟姊妹也一起做檢驗。

而篩檢 *ACTG2* 基因，就從最基本的工作-設計引子 (*primer*) 開始。因此，我在實驗室另一位博士後研究員的幫忙之下，將涵蓋整段基因的 8 段外顯子設計之後，經過一系列的試驗與重新設計，終於在計畫開始 1 個月左右完成，正式進入檢驗病人檢體的階段。



實驗室工作的小天地

### 3. 結果分析

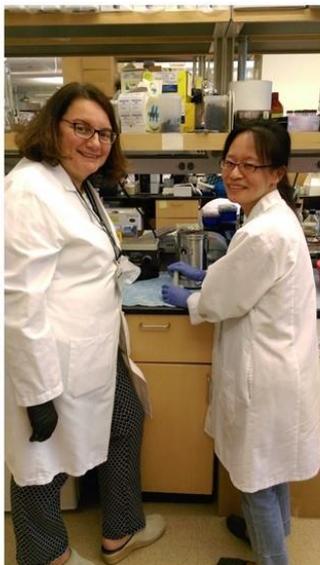
接續之前基因篩檢的過程，我們也利用桑格定序 (Sanger sequencing) 先判讀聚合酶連鎖反應 (PCR) 後初步結果，並且比對目前文獻中的變異點，也因此我們發現有一位小女孩在 *ACTG2* 上的變異點是在目前文獻中未被報告過的突變點。

不過，由於 Dr. Bodamer 的實驗室是利用全外顯子體定序去尋找病人目前在基因診斷上仍未知的病，因此我們也將此基因篩檢為陰性的病人家族，送全外顯子體定序。這部分的學習則需要熟悉判讀軟體的操作與連結其他資料庫的使用，所以著實花了好幾個月的時間去學習相關軟體、判讀平臺以及各個資料庫的連結與使用。目前實驗室平臺為與德州貝勒醫學院 (Baylor College of Medicine) 所研發出的平臺 (<http://codifiedgenomics.com/>)，此平臺主要以研究目的為出發點所建立，因此，很多最新的資料會隨時被更新，而我們也在這一個過程中發現了之前未被報告過的基因，目前此部分已經寫成個案報告準備投稿。

#### 4. 實驗室基礎研究的進行

由於新基因發現，還需要功能部份的驗證，因此基本的生化技術的研究能力，包括聚合酶連鎖反應、西方點墨法、細胞培養與轉移感染 (transfection) 等，此部分因為之前研究的關係，在臺灣時已經非常熟練這些技術，因此，在實驗室第一線操作，僅需要熟悉藥品機器位置相關的方法後，很快就可以自行上線操作。而我們實驗室的隔壁，是另一位非常資深基礎研究的博士 Dr. Emanuela Gussoni，當實驗部分有問題時，她非常歡迎隨時跟她討論，她往往可以在技術部分給予深入的討論與建議，而我在這一段時間受到她相當多的幫忙與照顧，也從她的身上學到許多生化實驗解決問題的方法，收穫非常豐富。

另一部分，例如抗體的採購，也可以根據自己的需要去訂購，當然，跟廠商要測試的樣品，打電話與技術支援的部門討論等，老闆給我極大的空間自行處理，所以，在這部分獨立選用需要的試劑與抗體，可以完全根據需要進行購買。而在波士頓兒童醫院，它們有集中管理這些實驗室耗材採購的部門，因此，收發與報帳等事，是有專門的部門來進行處理，研究員只需要專心在研究的進行，這部分是印象十分深刻的。



實驗室工作的夥伴們



## 5. 其他

### (1) 其他研究主題的參與

由於實驗室還有進行其他研究主題，因此，Dr. Bodamer 每天早上 8 點會先與實驗室同事進行討論，針對我們遇到問題與進度的追蹤，老闆會隨時掌握進度。此外，也藉由彼此討論，我們也會各自提出自己的意見與看法去解決問題。一方面了解自己需要補強的部分，另一方面也可以了解別的研究主題，互相進行意見討論。

另外，我們因為是利用全外顯子體定序去尋找病人目前在基因診斷上仍未知的病，因此，每個星期整個團隊會一起進行全外顯子體定序結果的判讀與討論，這時團隊的生物資訊專家與臨床的遺傳諮詢師會一起參與，我們的生物資訊專家 Dr. Ivana Mihalek 會議用電腦的分析與蛋白的結構，去分析出突變點是否為可能造成功能商的變化。而 Dr. Mihalek 也用了一些時間，一對一教導我如何使用這些蛋白質分析軟體 (PyMol)，因此，這對於後來新基因的功能分析上，有很多的幫忙。

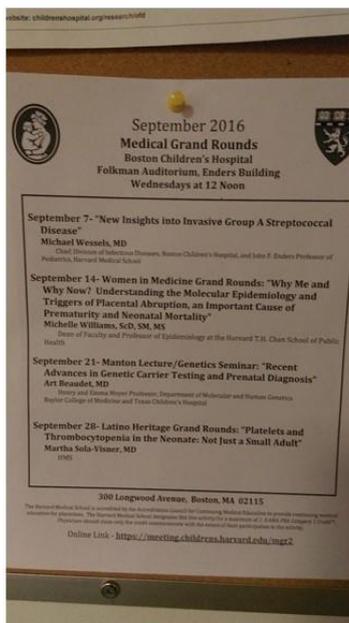
在我們實驗室，由於人力比較少，因此我除了自己負責的研究主題之外，也幫忙實驗室其他研究主題的部分，包括老闆對於早產兒的研究，這部分包括檢體的處理、保存與細胞的分離，以及收案的紀錄部分，在這一段時間我也協助實驗室建立了管理檢體的方式。

### (2) 臨床活動的參與

每個星期三中午的大兒童內科的會議，是一定會參加的。從醫學問題到倫理議題，還有住院醫師的研究報告，以及許多在這裡知名學者的演講，是一點都不想也捨不得錯過的活動。尤其有好幾個知名大師的演講，多半是與年輕醫師分享他們在醫學領域的心路歷程，這部份對於年輕醫師的收穫很多，能夠有這樣的經驗分享，在醫學臨床或研究的過程，也是非常重要的經驗傳承。

另外，還有各式各樣大大小小的研討會，在不影響研究進度的前提下，老闆是非常慷慨讓我去參加許多的活動，也因此有機會做到哈佛醫學院與學生們上課，沉浸於

聽眾/學生們認真的聽講與熱烈的討論，在在都感受到大家對於新知的熱情與研究的執著。這樣的態度令我非常感動，也鞭策自己在醫學殿堂與未來的研究路上，能持續自己這樣的熱情，繼續專注於醫學研究與臨床的工作。



每星期固定的兒童內科  
Grand Round

身在哈佛醫學院，幸運的有各式各樣的研討會可以參加- 10th Annual Symposium on Polycystic Kidney Disease



最後，在回國之前的一個月，我有幸到布萊根婦女醫院與 Dr. Julian Seifter 學習電解質的門診。Dr. Seifter 曾到臺灣講學數次，而此次主要是與他學習關於電解質的一些門診病人的問題。而 Dr. Seifter 曾經獲得數次哈佛醫學院所頒發的教學優良獎，也許多腎臟學教科書的作者。另外，他在新英格蘭醫學雜誌也曾寫過好幾篇電解質相關的文獻回顧。因此，我非常榮幸能與他有直接面對面接觸的機會。他對於病人與實驗室數據鉅細靡遺的觀察，在門診結束後也與我們有 1-2 小時仔細討論每個病人的情況，並同時跟診的總醫師也會準備相關參考文獻供大家參考討論。因此，這部分的門診（電解質）的經驗在臺灣是比較少的，



布萊根婦女醫院 (Brigham and Woman's Hospital) 與 Dr. Julian Lawrence Seifter



### (3) 病人安全與品質管理相關參訪

在臺灣時，除了臨床與研究工作之外，行政部分也有參與臺大醫院/臺大兒童醫院病安與品質管理工作。而在波士頓這一段期間，因為臺大醫院的品管中心欲前往波士頓進行考察，因此，我也幫忙了波士頓兒童醫院部分的行程安排，也有機會與兒童醫院品管中心的主任 Dr. Jonathan Finkelstein 有了面談的機會，並且交換了一些作法與意見，也在 Dr. Finkelstein 的介紹之下，分別跟不同部門的主管有訪談的機會，也希望之後帶回的資訊，能與我們的品管中心參訪行程做結合，進一步在病安與品官方面，能夠帶回更多的新資訊與觀念，提升醫療的照護品質。

## 四、 心得

非常幸運我能夠在波士頓哈佛醫學院與波士兒童醫院進行一年的研究。在這一段時間除了實驗室研究部分的進行學習之外，對於臨床見習與相關的行政參訪，都能夠有機會能親自參與。研究部分，主要是針對次世代定序的學習與外顯子體定序的判讀，資料庫的應用，並結合生物資訊 (Bioinformatics) 的使用與熟悉不同分析平臺的操作，也充分利用在新基因的探索，也在這一段時間完成了兩篇個案報告的分析。

經過這一年，對於我們所擁有的優點以及不足之處以及該努力的方向其實有更清楚的了解。而在這一次進修過程中，也有許多機會認識不同實驗室的專家與研究者，也與許多在當地努力的臺灣學者與醫師保持密切的聯繫與關係。另外，在臨床行政方面，也有機會與品管相關的行政單位進行交流。這部分也期待之後，能夠有進一步與波士頓的專家學者們能夠開啟並進行跨國的合作關係。

因此，希望在這一段期間的學習，能夠運用於之後兒童原發性腎病症候群的基因研究，也可以延伸至其他腎臟先天異常的相關基因檢測。另外，期待這部分的學習與經驗，可以幫助之後建立臺大兒童醫院關於基因診斷相關實驗室的設立，也進一步對於目前未知的先天性異常，結合生物資訊，進行新基因的探索，並且能有機會尋找可能的致病機轉，尋求新的治療，以期提升醫療的照護品質，對於未來兒童健康能有更多的幫忙。

## 五、 建議事項

### (一) 研究環境

不可諱言的，身處於波士頓，結合哈佛大學、麻省理工學院等學術界，以及所有長木醫療區 (Longwood Medical Area) 世界頂尖的醫院、以及藥廠的研發，波士頓目前發展生醫的企圖心十分的旺盛，結合了全世界一流的人才與頂級的設備，這中間所集結的能

量，確實進步的速度是十分的快速。而在停留的這一段時間，也遇到好幾位臺灣來的博士後研究員，他們在這樣的環境中，也逐漸有不錯的成果，紛紛有機會拿到研究經費開始設立自己研究室。因此我們在這樣的環境下，確實應該需要去思考，如何讓臺大醫院的研究的資源進行整合共享，並且與臺灣大學與臺灣最聞名世界的 IT 產業進行結合，一起創造出生醫產學合作的環境，讓這些優秀的人才能有發揮的舞臺，我想這是改善研究環境上我們可以進行思考的方向。

## (二) 研究人員

在這裡，集結了全世界優秀的人才在這裡進行研究，在與這些研究員與這些頂尖大學生的交流，旺盛的企圖心與對於研究的熱情，絕對是從事醫學研究最重要的要素之一。在一些研討會或演講的場合，整場的聽眾都非常專注聆聽，也可以與演講者適時地進行提問與交流。這部分在我們的學習過程中，學生一向是比較被動的角色，這部分是臺灣學生與國外學生最大不同的地方。因此，身為醫學院的教師，我們也應該去思考，該如何讓我們的學生重拾對知識追求的熱忱，有機會讓臺灣這些優秀的人才，能帶領臺灣往前邁進，這是我們這一代責無旁貸的責任。