

出國報告（出國類別：進修）

## 惡性骨肉瘤生物性重建之基礎研究

服務機關：台北榮民總醫院骨科部

姓名職稱：主治醫師吳博貴

派赴國家：美國

出國期間：民國 104 年 11 月 1 日至 105 年 9 月 30 日

報告日期：民國 106 年 12 月 26 日

## 摘要

骨肉瘤的手術包含『廣泛性切除術』與『肢體重建』兩個步驟。當進行廣泛性切除術後，因為同時將骨頭切下來，因此會造成相當大的骨缺損(bone defect)。這時骨科醫師便需要進行肢體重建手術，來恢復病患的肢體功能。肢體重建有許多種方法，一般分為兩大類：

第一類: 腫瘤型人工關節 (tumor prosthesis) 。

第二類: 生物性重建 (Biological reconstruction)。包括使用異體骨(allograft)、液態氮自體骨滅活 (frozen recycled autograft) 與體外高劑量放射線自體骨滅活 (irradiated autograft) 。

因為對於青少年使用腫瘤型人工關節常會導致爾後人工關節鬆脫與骨溶解等嚴重併發症，因此我們醫院多採用生物性重建 (Biological reconstruction)，包括使用液態氮自體骨滅活 (frozen recycled autograft) 與體外高劑量放射線自體骨滅活 (irradiated autograft)，以真實骨骼來重建病患之骨缺損。本院也因為此治療方法，而獲得 SNQ 銀牌。然而使用自體骨滅活來重建骨缺損時，目前臨床上面臨一個問題，就是因為腫瘤的侵犯多會破壞骨頭結構，而造成移植回體內之自體骨結構缺損。若沒有給予適當之結構修復，則會對於病患骨骼強度會造成相當大的影響，甚至導致手術後之移植骨斷裂 (graft fracture)。為了避免骨缺損所造成的併發症，目前全球均採用骨水泥，polymethyl methacrylate (以下簡稱 PMMA) 來作為蛀洞的填補。然而使用 PMMA 之缺點在於此種骨支架並非為生物活性

(bioactive)、生物可分解性 (bioresorbable)、血管新生性 (vascularization) 與骨引導性 (osteoconduction) 之材質。因此使用 PMMA 作為骨缺損處之填補，僅能提供結構支撐，並無法達到骨新生 (bone ingrowth) 的最終目的。病患使用多年後，會可能導骨水泥破裂、鬆脫之情況。因此，使用 PMMA 並非最理想解決之道。有感於此，於 104 年 11 月負笈前往美國梅約中心 (Mayo Clinic) 組織工程研究室，開始為其一年的組織工程基礎研究。

研究的主題主要著重研究聚富馬酸丙二醇酯 (poly(propylene fumarate), PPF) 在惡性骨腫瘤之生物性重建上之應用。藉由 PPF 之安全之生物可分解性 (bio-degradable) 與生物無毒性 (nontoxic)，來作為生物性重建之骨缺損之修復支架。希望藉由此技術，可以將惡性骨腫瘤之生物性重建技術，帶到更先進的領域之中。

**關鍵詞:** 骨肉瘤， 生物性重建，聚富馬酸丙二醇酯，梅約中心

## 目次

摘要	-----	第
	2 頁	
目的	-----	第
	5 頁	
過程	-----	第
	14 頁	
心得與建議事項	-----	第
	17 頁	
附錄	-----	第
	20 頁	

## 目的

### 骨肉瘤基本介紹

骨肉瘤（Osteosarcoma）是青少年最常見的原發性惡性骨腫瘤（primary bone sarcoma）。在 1970 年代之前，癒後相當的差，五年存活率僅 30%，且截肢率幾乎高達百分之百。然而自從 1976 年開始使用新輔助性化學治療（neoadjuvant chemotherapy）後，存活率已大為提高。目前以手術前給予新輔助性化學治療，手術腫瘤廣泛性切除（wide excision）與肢體重建（limb salvage），再加上手術後輔助性化學治療（adjuvant chemotherapy），已成為治療之標準方法。根據我們台北榮總骨骼肌肉腫瘤治療暨研究中心於 2014 年的研究，高度惡性骨肉瘤之平均五年存活率可以到達 74%。若病患無合併肺部轉移時，平均五年存活率更可以高於 90%。因此目前醫療可以達到相當高的治癒機會，加上病患又是活動度高的青少年，因此骨科醫師對於手術的技術，必須不停的進步！

### 骨肉瘤手術介紹

骨肉瘤的手術包含『廣泛性切除術（wide resection）』與『肢體重建（limb salvage）』兩個步驟。廣泛性切除術之定義是指沿著腫瘤的邊緣，並帶著二至三公分的正常組織，將腫瘤切除，以避免腫瘤復發。因此當進行廣泛性切除術後，會造成相當大的骨缺損（bone defect）。這時，骨科醫師便需要進行肢體重建手術，來恢復病患的肢體功能。肢體重建有許多種方法，一般分為兩大類：

第一類: 腫瘤型人工關節 (tumor prosthesis)。

第二類: 生物性重建 (Biological reconstruction)。包括使用異體骨 (allograft)、液態氮自體骨滅活 (frozen recycled autograft) 與體外高劑量放射線自體骨滅活 (irradiated autograft)。

### **骨肉瘤之生物性重建手術**

生物性重建與腫瘤型人工關節，兩者最大的差別在於生物性重建是使用『真正的骨頭』來填補骨缺損，而腫瘤型人工關節是使用非生物性的金屬，來替代腫瘤切除後的骨缺損。而正『真正的骨頭』來源包括使用異體骨 (allograft) 或是滅活自體骨 (recycled autograft)。

### **生物性重建手術之自體骨滅活重建**

所謂自體骨滅活就是我們可以將腫瘤與骨頭手術完整切除，將這塊帶著腫瘤的骨頭做一些特殊的處理將腫瘤殺死，而得到一塊乾淨的骨頭。(Figure1) 這有點像是資源回收一樣，所以稱之為『recycled』 autograft。這種方式最大的優點，在於取自於病患自己本身的骨頭，所以不用擔心骨頭的大小形狀會不同，也不用擔心會有疾病的傳染。而一般我們臨床上會使用來滅活的方法常見的有兩種，包括體外高劑量放射線治療 (extracorporeal irradiation) 與液態氮冷凍治療 (liquid nitrogen cryotherapy)。所謂的體外高劑量放射線治療，就是我們將帶著腫瘤的骨頭，放入

帶有高劑量的放射線的機器中（約 10000~30000 Rad），將腫瘤完全殺死。照射的時間隨腫瘤的大小形狀而不同，平均約 20~30 分鐘，。另一種方式為液態氮冷凍滅活，就是我們將帶著腫瘤的骨頭，置入於攝氏零下 - 196 度的液態氮中 20 分鐘，以確保腫瘤的中心溫度可以達到最低溫;接著將帶著腫瘤的骨頭放在室溫之下緩慢解凍約 15 分鐘。在急速冷凍與緩慢解凍的過程中，可以使得細胞內外水分子形成連續性冰晶，而藉由此冰晶來破壞掉腫瘤之細胞膜而殺死腫瘤。自從 1998 年到 2012 年期間，我們已累積數百例生物性重建之病例，病患也得到相當不錯的肢體功能。

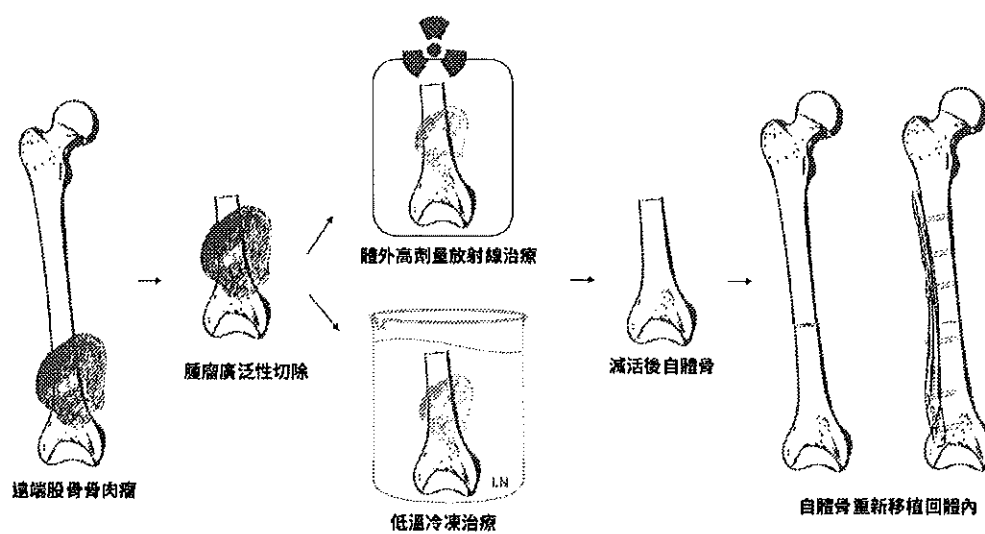


Figure 1 自體骨滅活生物性重建

### 生物性重建手術之優點

而這『真正的骨頭』擁有兩樣最重要的優點：

第一：重建病患的骨本（restore bone stock）。重建進去的骨頭，在初期為尚未活化的骨頭結構，但是在幾個月到幾年過後，會開始新生血管與骨細胞。一旦這些骨頭結構活化再生後，就如同正常的骨頭具有代謝、自我修復之功能。(Figure 2)

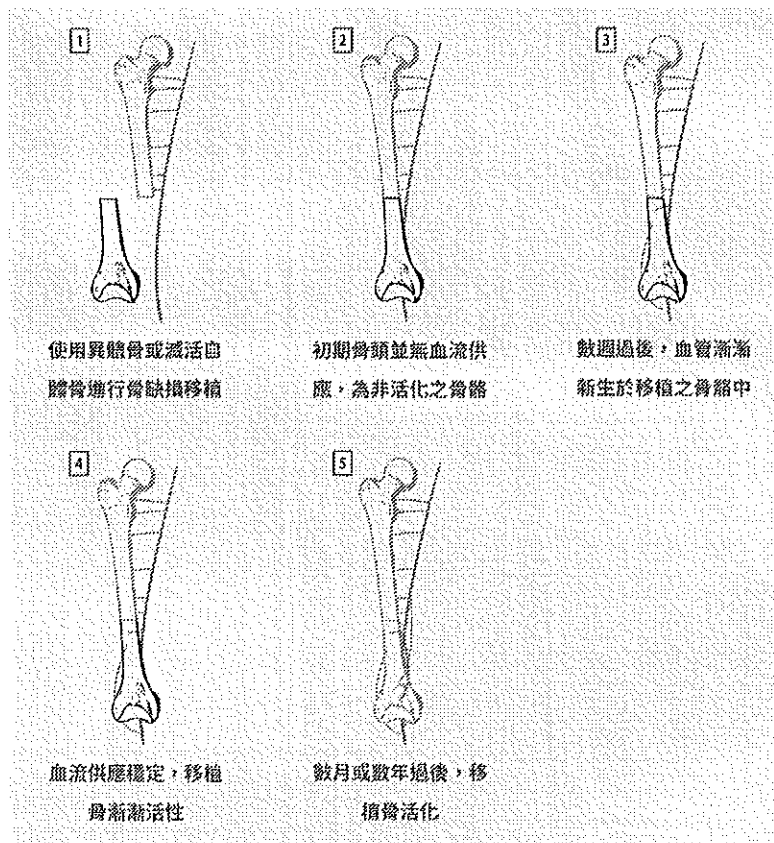


Figure 2 自體骨滅活重建病患的骨本

第二：生物性的癒合（biological union）。重建的骨頭和病患原本的骨頭，會在平均八個月至十二個月內達到生物性的癒合。所謂的生物性的癒合，便是像我們一般骨折後的骨癒合一般，藉由成骨細胞（osteoblast）、嗜骨細胞（osteoclast）等之作用，產生新生的骨頭。與腫瘤型人工關節相比起來，並非使用骨水泥（bone



cement) 做固定。所以一旦癒合後，這塊重建的骨頭便不會發生鬆脫 (loosening) 的情況。(Figure 3)

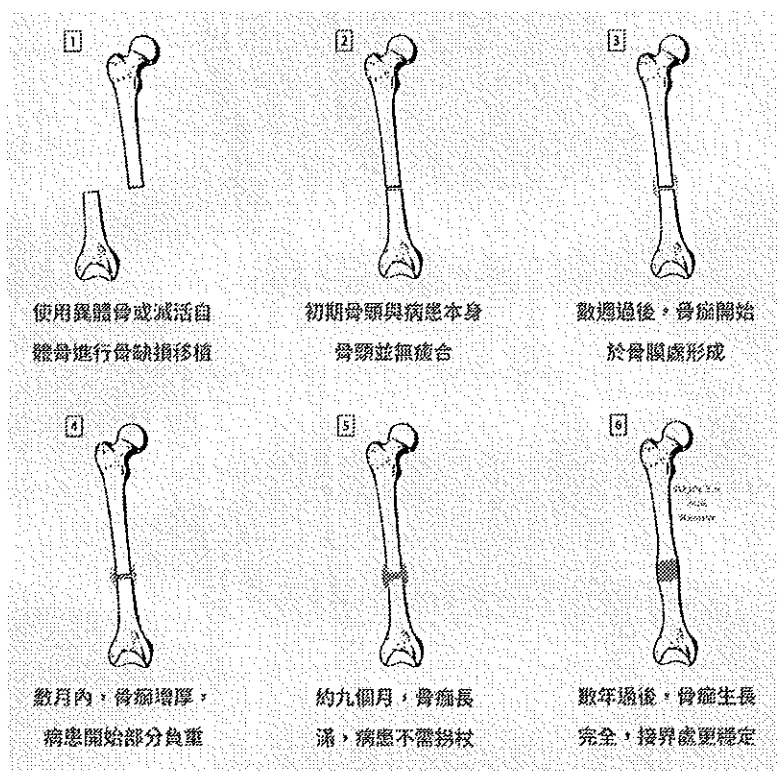


Figure 3 自體骨滅活達到生物性的癒合

根據我們中心於 2015 年的研究報告，我們使用生物性重建治療高度惡性骨肉瘤後，病患之滅活自體骨五年存活率可以達到 88% (Figure 4 左)，相對於上述腫瘤型人工關節僅能達到 75.9%，有相當程度的優勢。另外，使用滅活自體骨之整體肢體保留率五年可以達到 93% (Figure 4 中)，且病患生命之五年存活率可以 83% (Figure 4 右)，亦證明這種重建方式，不但成效相當佳，更是相當的安全！因此，這也是雖然生物性重建需要多花醫師一倍至兩倍的手術時間，更困難的手術技術，但卻一直是我們台北榮總骨骼肌肉腫瘤治療暨研究中心最常使用的肢體

重建方式。

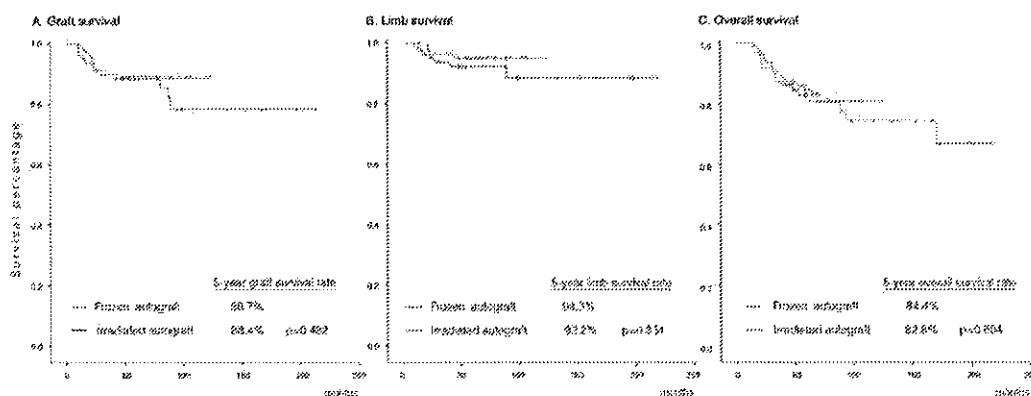


Figure 4 Kaplan meier 分析 (左)滅活自體骨存活率 (中)肢體存活率 (右)生命存活率

### 生物性重建手術之面臨之問題

我們骨骼肌肉腫瘤研究中心，目前欲解決的問題在於惡性骨腫瘤之生物性重建中，不論是最常見的骨肉瘤或是其他惡性骨腫瘤，多會造成骨頭的蛀洞、缺損。

(Figure 5) 若是骨頭破壞嚴重，因擔心結構不足以支撐，所以僅能拋棄這塊骨頭，而改用異體骨或是腫瘤行人工關節進行重建。倘若骨缺損較輕微，則我們則可以行滅活自體骨滅活來重建。但是手術重建過後，這些輕微的骨缺損仍然存在。雖然僅是輕微的骨缺損，但是若沒有給予適當之結構修復，則會對於病患骨骼強度會造成相當大的影響，甚至導致手術後之移植骨斷裂(graft fracture)(Figure 6)。

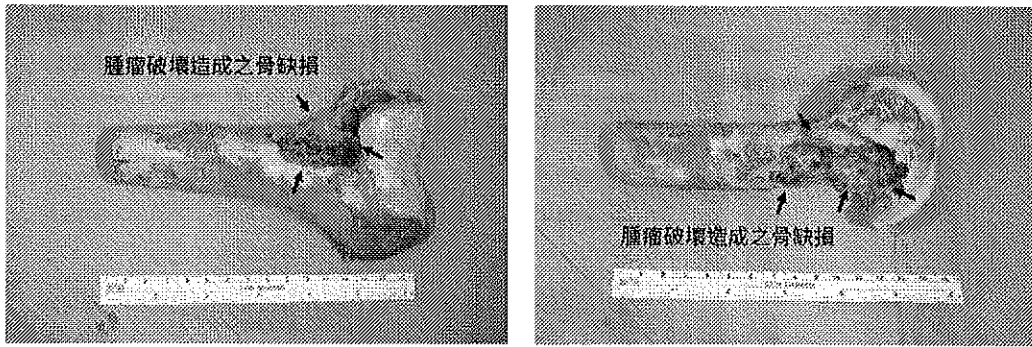


Figure 5 遠端股骨骨肉瘤，腫瘤破壞，造成產生較大的骨缺損

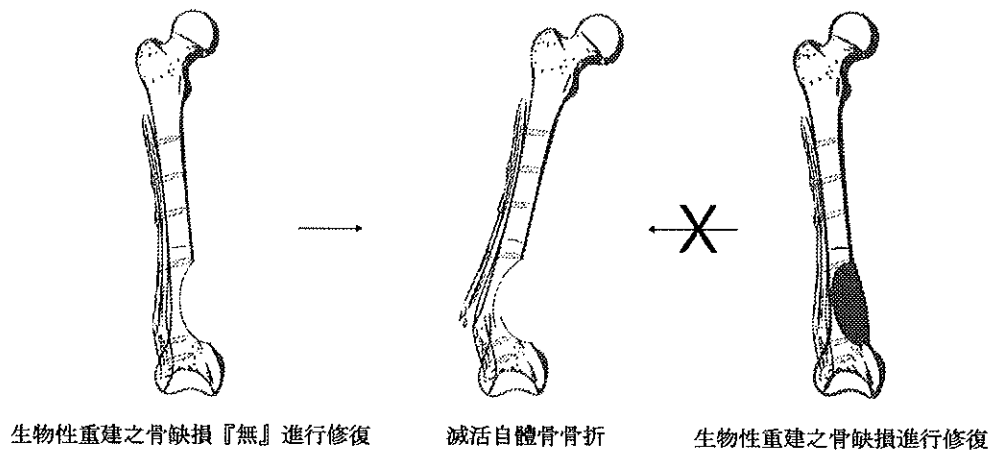


Figure 6 生物性重建之骨缺損，會造成滅活之自體骨骨折

### 目前對於生物性重建之骨缺損處理之權宜方法

為了避免骨缺損所造成的併發症，目前全球均採用骨水泥，polymethyl methacrylate（以下簡稱 PMMA）來作為蛀洞的填補。(Figure 7) PMMA 在組織工程中為第一代之骨支架（scaffold），其優點在於可以立即的將骨缺損填滿，並得到足夠的支撐力量。然而使用 PMMA 之缺點在於此第一代之骨支架並非生物活性(bioactive)、非生物可分解性(bioresorbable)、非血管新生性(vascularization)

與非骨引導性（osteoconduction）之材質。因此使用 PMMA 作為骨缺損處之填補，僅能提供結構支撐，並無法達到骨新生（bone ingrowth）的最終目的。病患使用多年後，會可能導骨水泥破裂、鬆脫之情況。(Figure 8,9) 因此，使用 PMMA 並非最理想解決之道。

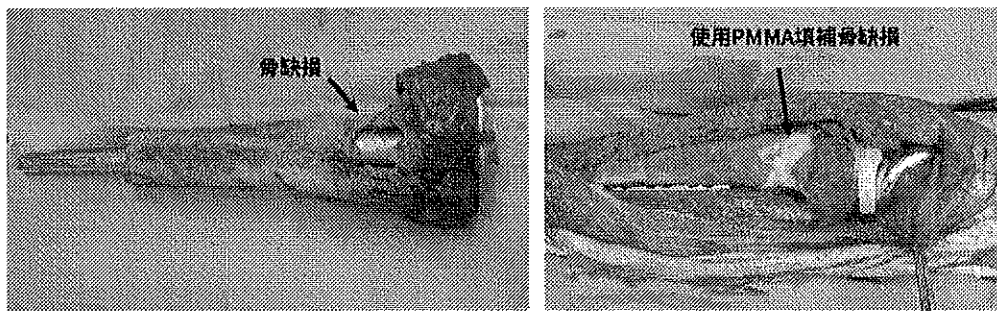


Figure 7 近端脛骨骨肉瘤骨缺損，使用 PMMA 作為填補

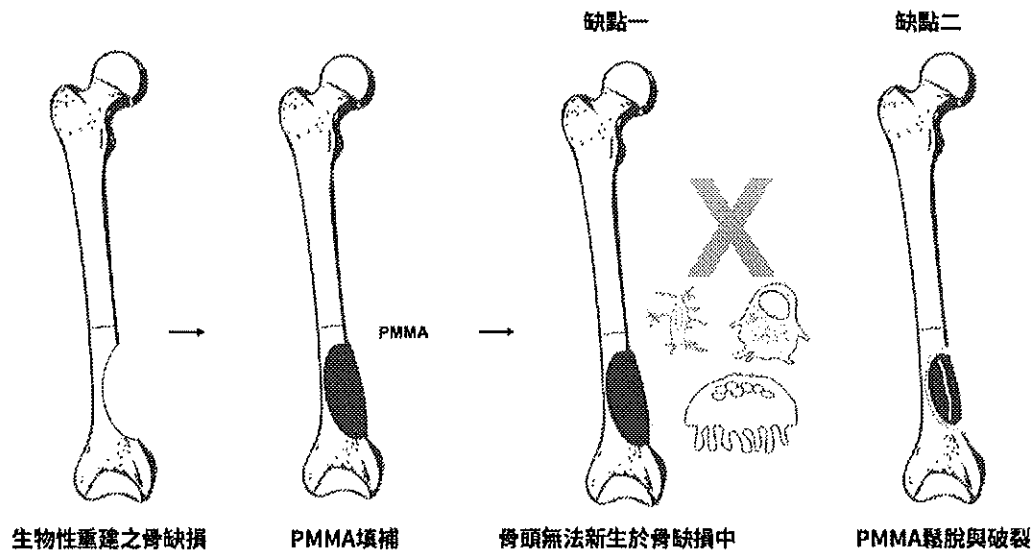
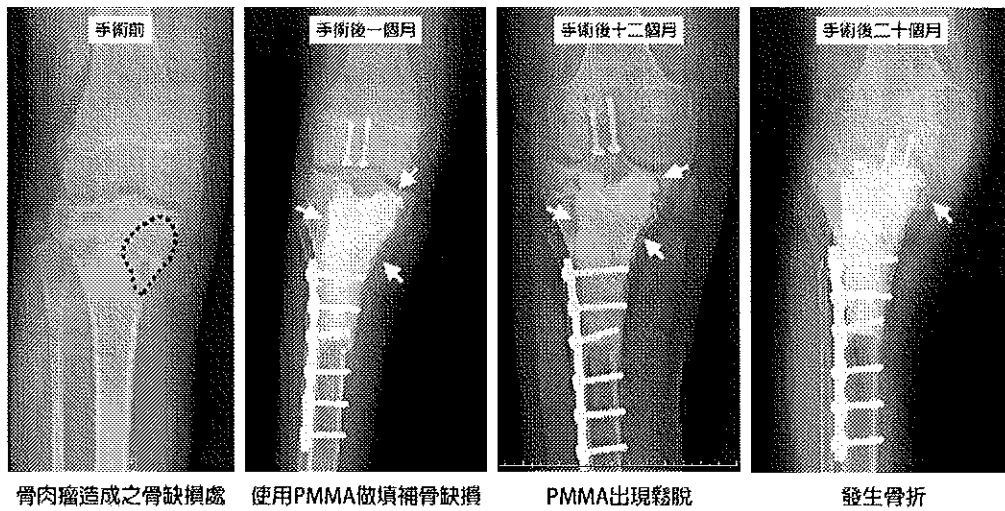


Figure 8 使用 PMMA 填補生物性重建之骨缺損之缺點



**Figure 9. 十二歲女性骨肉瘤病患，使用 PMMA 修復骨缺損之併發症**

為了希望解決臨床上此問題並且不段的進步，我們希望從組織醫學的角度著手，研發一個生物性重建骨缺損之黃金修復模組（Golden Reconstructor for Biological Recycle Autograft Bone Defect），來達到最佳的骨新生能力。因此在恩師陳威明教授的鼓勵及支持下，舉家前往美國進行為期一年的研究。

## 過程

在全球的骨腫瘤領域中，梅約中心（Mayo Clinic）可以說是鼻祖，並保持著領先的地位。其中的骨科醫師 Dr. Sim 更是許多的骨腫瘤醫師的導師，包括我們醫院的陳天雄副院長，陳威明部長均曾經接受過 Dr. Sim 的指導。很幸運的，在陳威明部長的推薦之下，我申請進入到 Mayo Clinic 的骨腫瘤團隊與組織工程實驗室進行參訪與學習。

### (一) 梅約中心 (Mayo Clinic) 簡介

梅約中心位於明尼蘇達州 (Minnesota) 的東南方的城市，羅徹斯特 (Rochester) 中，整個城市基本上就是以這家醫院為重心來作為建設與發展。此醫院為一非營利醫療機構。其中總共有 4500 名醫師與研究人員，每年約花費 660 百萬美金進行研究。根據 2014 年 7 月 15 日，《美國新聞與世界報導》(U.S. News & World Report) 發布之 2014 年~15 年美國最佳醫院排行榜排名顯示，位於羅徹斯特的梅約中心榮登榜首。

在梅約中心之組織工程實驗室中，從 2000 年初便與 Rice University 開始合作進行 PPF 合成，一路到目前可以使用積層製造 (Additive Manufacturing, AM) (慣稱三維列印) 之光固化成型法 (Stereolithography, SLA)，可以在巨觀方面製成預定大小形狀之 PPF 成品。更重要的。更可以藉由 SLA 之超高解析列印 (13,300,000 element/mm<sup>3</sup>, 50 $\mu$ m 精密度)，在微觀方面編織出不同大小、密度之孔洞結構 (porosity)。藉由 PPF 的醫材合併積層製造，梅約中心可以製作

出適合之大小、形狀之合成骨，移植入病患體內。目前此計畫預計於 2017 年通過 FDA 的臨床試驗，梅約中心也在 Rochester 市中心建設了一間合乎 Good Manufacturing Practice (GMP) 規範之場房，專屬給 PPF 之合成。可見梅約中心對此醫材知未來發展，著實有著相當的信心與憧憬。

## (二)個人研究主題及成果

因為職本身臨床上之工作，著重於骨骼肌肉腫瘤的治療以及人工關節的置換，尤其對於惡性骨瘤的生物性重建相當有興趣。因此在出國進修之前，便希望可以藉由梅約中心的既有的臨床制度與實驗室技術，來試圖進行骨骼肌肉腫瘤手術與生物性改良與研究。

臨床方面，主要是參與 Dr. Sim 的骨骼肌肉腫瘤與人工關節團隊的工作，包括手術、門診、會診與團隊會議等。實驗室方面，主要參與 Dr. Yaszemski 的醫學工程團隊，進行 PPF 的相關研究。在初進入實驗室時，職與醫學工程團隊主任 Dr. Yaszemski 與團隊成員 Professor Liu 報告預計的研究方向，希望藉由 PPF 來替換目前 PMMA，來填補骨腫瘤生物性重建之骨缺損。因為美國大多使用腫瘤型人工關節來重建惡性骨腫瘤之骨缺損，而較少使用生物性重建的經驗，因此對方聽完我的簡報後，對於我們的做法與成果感到相當的驚訝！並且認為這是一個相當新穎並且合乎科學的做法，因此相當的贊成這個研究，並希望我可以直接在美國申請專利。

在進行實驗之前，必須對整個計畫過程有相當的了解。因為職本身在台灣時，從事的基礎研究為人體幹細胞與骨肉瘤細胞相關，因此對於組織工程較無深入的了解，因此在實驗室學習同時，開始大量閱讀相關的 paper，並跟著其研究人員觀摩實驗的進行，包括 PPF 的化學結構設計、積層製造之結構繪圖、生長因子之混合與動物實驗之進行等。接著藉由與團隊的討論，我們一步步的開始設計出我們的研究目標與步驟。(詳見附錄)



## 心得與建議事項

在梅約中心的這一年中，觀察到許多美國醫療與我國相異之處，在這裡整理報告：

### 第一. 醫療分工方面

相異處：醫療制度與人力之應用。在梅約中心，因為保險的給付高，因此相對醫師的工作量較小，因此對於認真的醫師而言，可以有較多的時間仔細詳查與治療病患，並且進行研究。我們常常可以見到一台骨腫瘤的手術中，會有許多科之醫師在旁 standby，例如包括整形外科，放射腫瘤科與病理科醫師。所以常常可以在第一時間進行面對面的溝通，討論病患的下一步治療。甚至在手術中的冰凍切片室中，就會有六位的技師負責切片與染色之工作。所以病理科醫師可以有充分的時間檢閱每位病患的每份切片！

心得：在目前的健保制度下，我們國家的醫療並無法提供這樣人力充足的優渥的環境來進行醫療行為。但替代的，在我們的團隊目前採取手術前的跨科會議來進行討論，亦是有效且經濟的解決辦法，但是卻無法這麼的即時。另外在研究方面，我們的醫師因為臨床工作已經較重，所以常常進行研究多是在下班之後，或許醫院可以考慮增設類似「共同實驗室」，來幫助醫師進行實驗，應該可以大大減少醫師的負擔！

## 第二. 國際醫療方面

相異處：梅約中心的病患，有相當的部分是來自於海外，尤其是中東國家與大陸。甚至耳聞許多的醫療大樓是由海外病患之捐贈所蓋設而成。在台灣，國際醫療之病患可脫離健保體制的限制，醫師與醫院可以有較高的發展空間，或許院方可以考慮更加強這一塊領域。在發展國際醫療這一方面，職認為相對於梅約中心，有幾點是我們台北榮總更有優勢：

1. 有效率、高品質的醫療。外科手術方面，本是一種熟能生巧的技術。職在梅約中心的觀察，發現即使是相當知名的骨科醫師，往往一天手術的病患數最多僅有四到六台。長期下來，我們的手術量遠遠超過美國，合理的，平均我們的手術技術也會較為熟稔。例如像是人工關節的手術，梅約中心平均一台需要兩個小時的時間，而我們平均只需要一個小時之內便可以完成。同時相對於梅約中心傳統手術，我們僅需一半左右的傷口及可以完成。另外像是腫瘤手術，我們有全球知名的生物性重建方式，相對於其他國家的腫瘤型人工關節有更好的預後。

2. 平易近人的醫療費用。相對於梅約中心，我們的醫療費用即使在國際醫療的加成二點二倍後，仍相對於美國平價許多，可以說是醫療的天堂！

但是，即使在上述的優勢加持之下，我們目前的國際醫療成效，應該還是遠遠的落後梅約中心。這點，在硬體方面，我們應該可以前往泰國的『康民醫院』來取經。然而在網路方面，目前海外病患的來源，除了口耳相傳，最重要的就是網路。因此第一步我們必須讓海外的病患『搜尋』得到我們。另外，進入到我們網頁後，

病患最想知道的便是『治療的好不好？』與『治療需要多少錢？』，因此我們可以提供多種手術的成果（如 SNQ 的結果）與平均費用，來凸顯我們醫療之成效與費用之平易近人。最後，網頁中應該指導病患『如何辦理來台就醫』，包括醫療簽證需要的資料，病歷的拷貝與傳遞與協助病患尋找醫師與掛號之功能。這樣，一條龍的網頁資訊，才能真正的讓瀏覽網頁過後的海外病患，有動力踏上台灣的土地！

最後，相當感謝國家與院方能給予職這樣的機會於國外進修一年，獲益頗大！在吸取國外最新技術之同時，更同時了解，我們台灣目前的能力是不輸人的！因此，我們應該更有信心，繼續發展更新的醫療技術，更好的醫療產品，更貼近臨床應用的基礎研究，並將這些成果發展出去，讓全球看到我們台灣！

## 附錄

### 研究目標與步驟

(壹) 研究目標 I (Specific Aims I). 建立生物性重建骨缺損之動物模組。我們團隊的臨床經驗發現骨瘤病患之骨頭，均被造成部分骨骼結構破。此研究目標目的在於 1) 建立生物性重建後部分骨缺損之動物模組。2) 瞭解在此模組之動物發生之活動度下降、骨折等併發症之狀況。3) 了解此模組之動物，本身可自我修復之作中極限。此研究之分析結果可以讓我們建立並了解生物性重建骨缺損之動物模組，以利未來從事動物實驗時之根本依據。

(貳) 研究目標 II (Specific Aims II). 尋找最適合生物性重建骨缺損之 PPF 孔洞結構 (porosity)。為了達到骨引導性，PPF 之基本孔洞大小必須大於 100~150 $\mu\text{m}$ 。若大於 300 $\mu\text{m}$  則能達到較佳的氧氣養分與代謝物交換而達到較佳的骨引導性。但是相對付出的，PPF 的結構支撐力便會下降。因此在每種不同臨床應用，PPF 結構均不同。此研究目標目的在於 1) 確認最適合生物性重建骨缺損之 PPF 精密孔洞結構。2) 確認候選孔洞結構其力學表現。此研究之結果將可以讓我們得知最適合生物性重建骨缺損之 PPF 孔洞結構，奠立後續實驗之 PPF 標準模型。

(參) 研究目標 III (Specific Aims III). PPF 載入生物訊號 VEGF。生物性重建骨缺損模組模擬真實手術，為周遭環境與骨頭內部之血管均破壞，因此移植之 PPF

無法提供足夠之養份供應新生骨。因此在此環境之下，即使編織出最佳孔洞結構之 PPF，其骨誘導能力可能無法與一般骨缺損模組相比擬。此研究目標給予 Vascular endothelial growth factor (VEGF)，藉由其促進血管新生與促進骨母細胞分化之雙重能力，來增加 PPF 之骨誘導能力與骨引導能力 (osteinduction)。此研究之結果將可以讓我們了解，添加 VEGF 對於生物性重建骨缺損模組中，是否對於血管與骨新生有裨益？另外選擇出最適合此 PPF 之 VEGF 之載體與濃度？以期將 VEGF 融合入 PPF 模組，達到提升骨新生速率與品質的目的。

(肆) 研究目標 IV (Specific Aims IV). PPF 載入生物訊號 BMP-2。生物性重建骨缺損模組模擬真實手術，周遭骨頭環境中之活細胞均已在冷凍治療過程中全部死亡，因此移植之 PPF 周遭環境並無存活之細胞。因此在此環境之下，即使編織出最佳孔洞結構之 PPF，其骨誘導能力可能無法與一般骨缺損模組相比擬。此研究目標在於外加 BMP-2 於生物性重建骨缺損模組中。BMP-2 可以誘導 MSC 進行成骨細胞之分化 (osteoblastic differentiation)，促進新骨之增生 (osteogenesis)。此研究之結果將可以讓我們了解，添加 BMP-2 對於生物性重建骨缺損模組中，是否對於血管與骨新生有裨益？另外選擇出最適合此 PPF 之 BMP-2 之載體與濃度？以期將 BMP-2 融合入 PPF 模組，達到提升骨新生速率與品質的目的。

(伍) 研究目標 IV (Specific Aims IV). PPF 載入幹細胞。生物性重建骨缺損模組

模擬真實手術，周遭骨頭環境中之活細胞均已在冷凍治療過程中全部死亡，因此移植之 PPF 周遭環境並無存活之細胞。因此在此環境之下，即使編織出最佳孔洞結構之 PPF，其骨誘導能力可能無法與一般骨缺損模組相比擬。此研究目標在於外加幹細胞於生物性重建骨缺損模組中。幹細胞擁有高度骨細胞分化能力，可以促進新骨之增生（osteogenesis）。此研究之結果將可以讓我們了解，添加不同之幹細胞於 PPF 中，其幹細胞活性與功能之比較。藉此選擇出最適合之幹細胞種類，以期將其融合入 PPF 模組，達到提升骨新生速率與品質的目的。

## **總結**

本研究計畫，初期首先建立生物性重建骨缺損之動物模組，與 PPF 成品生產與建構三維列印。中期建構最適合之 PPF 微觀孔洞結構、並依適合之載體載入適量之 VEGF、BMP-2 與最佳幹細胞。後期建立出生物性重建骨缺損之黃金修復模組（Golden Reconstructor for Biological Recycle Autograft Bone Defect）。藉由此黃金修復模組之建構，我們期待將來能將此轉譯醫學研究結果帶入臨床，能在不久的將來嘉惠於病患！