

出國報告〔出國類別：進修〕

# 病毒性肝炎、肝硬化、肝癌免疫治療之研究

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名：蘇東弘

派赴國家：美國

出國期間：106年7月1日至108年6月30日

報告日期：108年8月30日

## 摘要

這次去美國史丹佛大學微生物免疫研究所 Garry Nolan 教授實驗室進修，主要目的是學習幾種在系統免疫學及單一細胞分析方法的新技術，包括高維度質譜流式細胞儀、高維度質子束影像(Multiplex Ion Beam Imaging, MIBI)及高維度螢光影像系統(CO-Detection by indexing, CODEX)來分析單一細胞，取得高維度的數據資料，包括有細胞在組織中的空間關係資訊。這些新穎的研究平台可以研究及建立疾病的免疫型態表型，以研究複雜的腫瘤微環境。利用這些新穎的研究工具進行慢性 B、C 型肝炎、肝硬化及肝癌患者檢體的免疫顯型與及臨床資料的關聯性研究。此外，進修期間擴展視野，認識各領域的新朋友，也開始進行一項利用身體徵象影像資料預測健康狀態的研究計畫。出國進修學習到的這些新知與新技術，目前已經帶回臺大醫院，正在開始研究平台的建立及繼續執行。

整體來說，出國進修的兩年時間，給予我歸零且重新思考，重新出發的機會，那裏的生活、文化及研究衝擊，相信會幫助我調整在臺大醫院的生涯規劃及研究方向。

# 目次

## 內容

壹、目的.....	1
貳、過程.....	1
一、Garry Nolan 教授實驗室介紹.....	1
二、細胞免疫染色技術.....	2
三、質譜流式細胞儀(Cytometry by Time-Of-Flight, CyTOF) .....	2
四、高維度質子束影像(Multiplex Ion Beam Imaging, MIBI) .....	3
五、高維度螢光影像(CO-Detection by indexing, CODEX)系統 .....	4
六、多重化信號放大系統.....	5
七、精準醫療及生醫創新學習.....	5
參、心得.....	5
肆、建議事項.....	7

# 壹、目的

肝炎、肝硬化、肝癌一直是臺灣重要的疾病。目前針對 B 型肝炎已有有效控制病毒複製的抗病毒藥物，但仍無法有效治癒此疾病。關於肝癌目前有 sorafenib 為主要的標靶治療，但治療效果有限。對於肝硬化，目前除了換肝以外，並沒有任何治療的方式。由於 B 型肝炎的發作與免疫細胞活化很有關係，肝纖維化至肝硬化的過程，主要的誘發因子是發炎，亦有很多免疫細胞參與其中，因此若能調控免疫細胞的功能，可能可以有效清除 B 型肝炎病毒，減緩肝纖維化的進展。肝癌的發展有許多腫瘤的訊息傳導路徑參與其中，但標靶治療的效果不彰。最近的臨床試驗利用免疫治療的方式，利用 PD-1 的抗體治療末期肝癌的病人，發現有不錯的效果。由於目前免疫治療的基礎研究在臺灣仍缺乏，因此希望藉由此次進修的機會，學習臨床免疫學的研究理論及方法學，見習國外最新的研究進展，及新的研究工具，並與相關研究人員交流以擴展國際視野，增加後續合作研究的機會。

美國史丹佛大學是目前癌症免疫學研究的重鎮，其中的 Garry Nolan 教授的實驗室專精於研究免疫系統訊號傳遞與癌化關係的相關研究。他們利用高維度質譜流式細胞儀分析單一細胞，研究造血過程，癌症，血癌，自體免疫疾病及發炎。他們發展各種統計模型進行分析系統免疫學的數據，另一方面開始研究高維度病理影像分析。這些新穎的研究平台可以研究及建立疾病的免疫型態表型，以研究複雜的腫瘤微環境。因此本次進修研究，就是去美國史丹佛大學 Garry Nolan 教授的實驗室進行學習。

# 貳、過程

## 一、Garry Nolan 教授實驗室介紹

這次進修在 2017 年 7 月 1 日抵達美國，很順利的在前兩周就確定好住宿及安頓生活。同時家人也隨後抵達美國，開始新的生活體驗與文化衝擊。Garry Nolan 教授的實驗室非常有名，與傳統免疫學實驗室不同，這個實驗室主要是技術研發的實驗室，Garry 最擅長的是整合其他領域(如工程)的技術及設備，研發新的技術來研究及解決生物醫學的問題。有趣的是，發現新技術後，會反過來看看是否能應用在何種生物醫學的問題，補強目前研究技術的不足。研發了新的技術後，他們會申請專利及技轉或成立新的新創公司，將技術實際運用及進行後續開發。這樣的模式是我之前所沒有接觸過的過程，因此也想來這裡學習這種「學以致用」的過程。

實驗室主要分成三大研究領域：質譜流式細胞儀(Cytometry by Time-Of-Flight, CyTOF)，高

維度質子束影像(Multiplex Ion Beam Imaging, MIBI)，及高維度螢光影像(CO-Detection by indexing, CODEX)。這些研究的技術都會得到大量單細胞的訊息，是另一種生醫的大數據研究。

Garry 實驗室的成員很多，且包含各領域(電腦、化學、數學、醫工、分生、病毒及醫學)的專家。我們實驗室有 3 位資深研究員，9-10 位博士後研究員，3 位博士班研究生，還有 6 位研究助理及實驗室經理大概約 20 幾人。每周有一次固定實驗室的討論會，由實驗室成員輪流報告進度及討論，每個人約 4-6 個月會報告一次。Garry 讓各個研究人員有自由發揮的空間，通常只注重研究的大方向，很鼓勵大家多思考、討論及勇於嘗試自己的想法。

出國前一年，我已經先去拜訪 Garry，討論進修時的研究題目。本來想學習 CyTOF，但他覺得 CyTOF 已經是個成熟的技術，反而建議我跨前一步去研究最新關於組織染色的新平台(MIBI)，這種要我直接挑戰最新穎的領域，著實讓我在出國前就很興奮將來的研究工作。我在出國進修前，向醫院申請了一些研究用的病理切片，準備探討慢性 B 或 C 型肝炎及相關肝癌的免疫細胞組成及其腫瘤微環境。到了實驗室，由於已經有初步研究的構想，所以 Garry 讓我自由的安排自己研究的方向與進度。

實驗室裡有一位陳世濟醫師，他在臺大醫學系畢業後就到美國 UC Davis 攻讀博士學位，隨後即進入 Garry 實驗室擔任博士後研究員及資深研究員，他的研究主題是關於 CyTOF 的應用，及利用新的抗體工程技術，進行超高解析度細胞影像及應用的研究。由於我們生涯的背景相近且語言溝通最容易，所以一開始許多的實驗及免疫相關的知識都向他學習及請教。

## 二、細胞免疫染色技術

由於實驗室的研究方向在於探討高維度(high dimensional)多參數(multiparameter)組織染色及分析，因此找尋合適的抗體，進行組織染色及確認抗體染色效果成為我一開始主要的研究工作。當時實驗室並沒有固定的染色步驟，也才剛買好新的儀器，包括進行自動脫蠟及復水的自動染色機，「抗原修復」(antigen retrieval)的 PT module，所以我花了一些時間研讀免疫組織染色的文獻及建立好免疫組織染色的步驟，供大家使用。免疫組織染色雖然是個很成熟的技術，但是許多步驟還是有些操作上的技巧會影響染色的結果。很多抗體公司在網頁上提供技術資料說明該抗體可以用在組織染色，但實際上還是需要親自染色測試條件，且需要比對 Human protein atlas 的資料確認抗體的專一性。這些實驗雖然很基本及繁瑣，但親自經歷過所有的過程對於將來回臺灣建立 CODEX 系統相信很有幫助。

## 三、質譜流式細胞儀(Cytometry by Time-Of-

# Flight, CyTOF)

由於 Garry 之前博士班就是進行流式細胞儀相關研究，因此實驗室 5-8 年前的研究方向就是改良流式細胞儀技術。流式細胞儀目前最大的問題是螢光呈色時會有光譜重疊的情形，這會導致訊號分析需要進行很多數學演算調整補償值，因此目前可以同時偵測螢光的上限約為 20 個抗體左右。CyTOF 技術是將抗體接上帶有鏷系元素(自然界生物體中不存在)的聚合物，進行細胞染色後，將檢體送入質譜流式細胞儀，由質譜儀偵測每顆細胞上帶有的所有的金屬訊號。這個技術可以同時染 40 種抗體，且達到單一細胞的多參數染色資料，提供研究上單一細胞的大數據資料。這種資料的分析模式很複雜，需要利用一些降維分析的方法，包括主成分分析(principal components analysis)，t 分佈隨機嵌入降維分析 (t-distributed stochastic neighbor embedding, t-SNE)，等多參數分析方法。最早 Garry 實驗室的博士後研究員 Sean C. Bendall 將這個技術運用在血液癌症的新分類，開展了這個技術在生醫領域的應用。相關的技術研究，當時有技轉給 Fluidigm 公司，繼續在生醫領域上擴展此一技術的運用。

由於中研院已經有這項儀器，因此我也很有興趣學習此一技術，在美國的時候，我先是跟陳世濟醫師學習這個技術，我們也一起建立一個慢性 B 型肝炎周邊血球的免疫抗體組合，這個部分在陳醫師 2018 年底回臺灣中研院服務之後，我們正準備開始利用這個技術來分析在臺大醫院慢性 B 型肝炎患者的檢體。

由於質譜流式細胞儀目前僅可同時偵測 40 幾種抗體，實驗室的一位博士後研究員韓國軍博士(來自北京清大)設計一種新穎的檢體編碼技術，將所有接近 300 個 CD marker 的抗體分成 17 組，每組抗體會有 25 個核心抗體組合(細胞種類的標記)及另外 16 個其他 CD marker 的抗體。這個方法可以同時檢測好幾支檢體，可以同時偵測細胞的所有約 300 種的 CD markers。這是個很大膽的系統免疫學篩檢方法，我在實驗室的第二年有參與這項研究計畫，包括抗體組合的建立及 CyTOF 染色實驗，目前已經累積很多數據資料正在進行最後的分析。

## 四、高維度質子束影像(Multiplex Ion Beam

### Imaging, MIBI)

在實驗室中，我主要參與的是 MIBI 的研究工作。這個技術起源於工程或是地質學的研究儀器- 奈米級二次離子質譜儀(NanoSIMS)，利用一個用銫(Caesium)金屬的離子射源，將離子束打在樣本上，激發出來的二次離子再由 magnetic sector 質譜儀接收及分析其金屬的成分。幾年前 Garry 實驗室的博士後研究員且也是病理科醫師 Michael Angelo 將這個技術運用在乳癌患者的研究。跟 CyTOF 相同的概念，他將抗體接合帶有鏷系元素的聚合物，利用離子射源打在樣本上，再分析組織上的金屬訊號並還原為抗體的資訊。相較質譜流式細胞儀，這個技術可以提供細胞間的空間關係，又提高了單一細胞的訊息量。NanoSIMS 的限制是只能同時偵測七種

金屬訊號，Michael 利用他工程方面的背景，將這個原理自行組成另一台以金為射源的機器，且利用 Time of Flight 的質譜儀來偵測訊號，這個新的機器就是 MIBI，可以像 CyTOF 一樣同時偵測約 40 種的抗體組合。同時這個技術也已經技轉成立一家新創公司 Ionpath (Menlo Park, CA)。

在臺大醫院我主要進行肝炎、肝硬化及肝癌相關的轉譯研究。最近幾年免疫療法的上市，肝細胞癌免疫發病機制的詳細研究，特別是腫瘤浸潤性白血球的免疫表型和腫瘤微環境非常重要。為了研究肝細胞癌的複雜腫瘤微環境，需要深入單細胞層次的系統性和多參數分析。利用這個 MIBI 研究平台，可以研究指標細胞及其鄰域細胞的空間關係。因此這是我出國進修最主要的研究題目。

雖然進修前已經在實驗室看到 MIBI 的原型機，本來想帶檢體過來就可以很順利的上機，在一年內取得數據資料，回臺灣繼續分析結果。但是這個技術實在是非常新，所以這台原型機沒有想像中的穩定，每周都有工程師來調整與測試，且很多元件都需要再重新更換及調校。我在實驗室的前一年花很多時間準備及測試，建立抗體組合，然而機器一直不穩定，歷經許多調整之後，過了一年半才逐漸可以比較穩定的產生數據。我的檢體才做完初步的測試，目前還在我合作研究的博士後研究員 Sizun Jiang 那裏等待他上機分析。

## 五、高維度螢光影像(CO-Detection by indexing, CODEX)系統

實驗室的另外一個研究方向是發展 CODEX 技術。這個技術是另一種抗體工程的應用。每個抗體會接上一小片段的寡核苷酸。而互補的寡核苷酸上則帶有 Alexa 488, Atto 550 或 Alexa 647 的螢光。將約 30-40 種接上特異寡核苷酸的抗體組合染色在組織上後，每個循環會注入 3 種帶有不同螢光的互補寡核苷酸進行雜交(hybridization)，由倒立螢光顯微鏡照相後，加入試劑進行去雜交，然後進到下一個循環。就這樣經過 15 個循環左右，可以把這 30-40 種抗體組合全部呈影及照相完畢，這樣的影像經過處理過後，也可以像 MIBI 一樣達到單一細胞解析度的高維度病理影像。這個新穎的技術也已經技轉成立一家 Akoya Bioscience(Menlo Park, CA)，正在繼續優化及推廣此一技術，甚至在史丹佛大學已經成立了 CODEX 核心實驗室提供服務。

由於 MIBI 研究不太順利，因此在實驗室的第二年我開始學習 CODEX 染色系統，也正在建立抗體組合及進行測試。CODEX 的平台需要一台螢光顯微鏡及另一台自動呈色儀，價錢相對於 MIBI 系統便宜很多，目前希望能在臺大醫院建立此一新穎的病理影像系統，我也已經帶回在美國已經測試好的抗體繼續進行後續的實驗。

## 六、多重化信號放大系統

這些抗體染色很關鍵的一步是訊號放大的步驟。某些低表現量的蛋白，或是抗體較弱的情況之下，組織免疫染色變得非常困難。在進修的過程中，我跟陳世涓醫師一起進行利用寡核苷酸結合過氧化酶再配合酪胺(Tyramide)將訊號放大的系統。同時，另一組研究人員也利用類似的概念將金屬的訊號放大。相信這樣的技術可以協助包括 CODEX 及 MIBI 平台後續的研究使用。

## 七、精準醫療及生醫創新學習

史丹佛大學位於矽谷的中心，旁邊有非常多的新創公司。新創是這裡的核心價值，也有許多學習機會。在進修的兩年間，我認識了很多 STB (Stanford Taiwan Biomedical) fellow，BTB (Berkeley Taiwan Biomedical) fellow，LEAP program 的研究學者及新創公司人員，且定期參與他們的聚會(駐舊金山台北經濟文化辦事處科技組，工研院北美公司)及討論，學習醫療生技新創知識及拓展人脈。

我認識一位仁寶電腦公司在灣區拓展人工智慧運用的陳善青博士。在多次討論之後，我們發想了一個利用身體徵象影像資料預測健康狀態的研究計畫。我們一起設計一個新穎的影像系統，且找尋好臨床運用的場景及模式。這個計畫已經申請了一個美國的臨時性專利，且正準備回臺大進行倫委會審核及開始臨床收案。

## 參、心得

兩年的進修過程，讓我學習及體驗很多新的東西，也大大的擴展了我的視野。另外在文化上有很大的衝擊，這些都是需要親自長住在當地才會有深刻的體驗。

美國人很重視自我介紹及社交聯絡，很多會議的場合都會安排一個 networking 的時段讓參與者自由討論及認識新的朋友。可能是從小訓練的關係，他們大多有很好的表達能力，很容易能在大家面前侃侃而談。研究人員很注重自己本身及研究內容的 visibility。例如坐我旁邊的博士後研究員 Ahmet F. Coskun 除了在經營自己的網站(說明研究內容及發表)外，他也利用 Twitter 來表達很多研究上的想法。關於自我及實驗室網站的介紹，很多臺灣的學者並沒有注意這個方面，也是可以加強之處。

剛到美國，看到 Garry Nolan 教授都稱他為 Professor Nolan，但周邊所有的人都叫他 Garry。後來才知道他們從小就教導大家稱呼名字，教授是一個帶有階級的稱謂，在科學研究上，若有階級之分可能會影響自由討論的空間，因此他們喜歡以平等的身分進行討論，也鼓勵挑戰權威，勇於表達自己的意見。

實驗室及所處的灣區中，是個非常國際化的地方，像是我們實驗室就有來自美國、俄羅斯、臺灣、中國、日本、瑞典、西班牙、瑞士、加拿大、土耳其及英國等各地來的研究人員。所以英文以外還可以聽到好幾國的語言在交談。就像地球村一樣，大家對彼此的文化都很尊重，所以並不會太有隔閡感。美國實驗室很鼓勵合作研究，一個研究計畫並不需要所有部分都要親力親為，而是可以與跟該領域最傑出的研究人員合作，由他們協助研究中的某些步驟。我覺得這樣的研究過程對雙方都有利，且節省資源，更有效率。史丹佛大學很鼓勵跨領域的研究，因為各領域的「語言」及專長都不一樣，很可能在一些困難的問題上反而有突破性的新想法及解決方式。我們實驗室的博士後研究員很多都還有跟其他實驗室的合作研究計畫(跨實驗室，跨部門，跨州，甚至跨國)，因此不斷參加新的會議及討論，實驗之餘也非常忙碌。開始選擇研究主題時，他們會跟實驗室所有人聊聊及討論，收集完整資料後才開始行動，且非常注重研究主題的新穎性及創新性，不願意做 Me too 的研究。我覺得他們這種目標及氣魄，很值得我們學習。

實驗室的研究人員都是各方面的佼佼者，且申請到史丹佛大學的過程並不容易，所以大家都有很高的學習動機。最令我驚訝的是很多人都具備簡單寫程式的能力，可以幫助他們進行資料分析。由於這裡博士後研究員的薪水部分會從自己寫的計畫經費來支付，Ahmet 就寫了近 10 個左右的計畫。他除了研究工作外，也主動參加其他學院的課程，學習新創公司及商業模式。因此來實驗室後很快就找到 Georgia Tech 的教職，最近開始了自己的新實驗室。另外就連實驗室的助理也很有能力及動機，其中有一位會自己找論文學習新的實驗及分析方法，甚至也主動投稿會議發表海報。當然一方面他們可能需要保持傑出的表現才能繼續拿到簽證留在美國，但他們只要是自己的工作就全力以赴的態度，實在非常令人佩服。

史丹佛大學的組織架構非常靈活，似乎只要幾個研究人員對於同一個主題有興趣就可以成立一個跨領域、功能性的中心。這些中心可以辦理自己的研討會，甚至開立新的課程邀請相關人士定期來演講。很多的中心都是探討最新且熱門的研究主題，也比較容易能向業界或特定的慈善研究機構(如 Gates Foundation)募款。很多的演講都開放給大家參加，只要加入該中心的 mailing list，系統會自動定期將新的會議資訊寄到你的信箱中，且常會加上各種個人行事曆的連結，只要一點行事曆的連結該次演講自動就會加上行事曆中，非常方便且有條理。

整體來說，出國進修的兩年時間，由於沒有臨床工作及業務的壓力，提供很多重新思考及嘗試的機會，周末課餘時間也可以好好陪伴家人，體驗新的文化及生活。出國進修需要走出舒適圈及從零開始，這需要一些勇氣。但跨出第一步後，就發現這是個很棒的決定。兩年的進修之後，深深體會到整個過程讓我有重新學習了很多，有時間可以從事自己想做的事情，沒有論文發表壓力下快樂的學習實驗室的技術。到美國建立許多新的 connections 及人脈，相信這對自己的生涯規劃有許多幫助。很珍惜有這次出國的機會，我也會鼓勵醫院同仁好好把握及爭取出國進修的機會。

## 肆、建議事項

1. 在史丹佛大學及矽谷的進修研究有非常大的收穫，但是醫院經費補助有限，實在不夠基本的生活開銷。在「中央政府各機關派赴國外各地區出差人員生活費日支數額修正對照表」可能需要重新更新史丹佛的生活費，那裏的開銷其實跟舊金山差不多，也高於洛杉磯。建議醫院可以提高進修生活津貼補助，相信可以鼓勵更多的優秀醫院同仁出國進修。
2. 出國進修後開展了大家的視野，或許可以在院內組成一些群組，聯繫我們這些曾出國進修過的同仁，以便提供及分享經驗給即將要出國進修同仁，縮短他們在美國安頓下來的時間。這些群組也可以將學到的經驗分享及改善我們醫院的軟硬體及研究環境。
3. 希望醫院將來仍可以再提供短期進修的機會，讓這些出國進修的同仁再去國外維持之前建立的 connections。
4. 史丹佛大學非常鼓勵教授將研究的結果進行新創運用，進行技轉或成立新創公司。我們醫院有非常好的資源及人才，建議也可以將美國的新創氛圍引進及鼓勵大家朝多元化的發展及應用。