

出國報告（出國類別：進修）

免疫風濕疾病基因與致病機轉之研究

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名職稱：俞欣慧醫師

派赴國家：美國

出國期間：106年8月7日至107年8月6日

報告日期：107年9月6日

摘要

我於2017年8月7日到2018年8月6日在Dr. Luigi Notarangelo的實驗室進修，隸屬於美國國家衛生研究院National Institutes of Health (NIH)，國家過敏與感染研究院 National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)，臨床免疫與微生物實驗室 Laboratory Clinical immunology and Microbiology (LCIM)，NIH Clinical Center臨床中心的特色為結合基礎免疫學家、研究醫師、流行病學家，造就以基礎免疫學為基礎之臨床試驗，致力於免疫疾病之基礎、轉譯與臨床研究。我這一年來臨床上熟悉原發性免疫不全症與自體發炎症候群病人之診斷與治療，學習診斷性免疫功能測試、學習細胞培養、分子生物、基因與免疫學領域的實驗技術，並學習免疫不全症與自體發炎症候群之最新研究，我從全基因組分析到免疫功能的研究探討*POMP*基因突變造成免疫功能異常，我利用CRISPR/Cas9基因編輯技術產生*POMP*基因突變小鼠，用於免疫致病機轉之探討，並且建立國際合作關係。我在思考與研究方法上有很大的啟發，我受益良多。

目次

一、	美國國家衛生研究院介紹	p.1
二、	研究與進修目的	p.2
三、	研究過程	p.2
四、	心得	p.3
五、	建議事項	p.4
六、	照片	p.5

一. 美國國家衛生研究院介紹

我於2017年8月7日到2018年8月6日在Dr. Luigi Notarangelo的實驗室工作，該實驗室隸屬於美國國家衛生研究院National Institutes of Health (NIH)，國家過敏與感染研究院National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)，臨床免疫與微生物實驗室Laboratory Clinical immunology and Microbiology (LCIM)之原發性免疫不全部門Immune Deficiency Genetics Section。

美國國家衛生研究院隸屬於美國衛生與公共服務部Department of Health and Human Services (HHS)，位於馬里蘭州Bethesda市，靠近首都華盛頓DC，NIH成立宗旨是以國家醫學研究促進健康。我上班的是10號建築物NIH Clinical Center，提供病患照顧與臨床研究，Clinical Center有新舊兩棟大樓聯合而成，舊棟1953年成立的Warren Grant Magnuson Clinical Center，新棟臨床研究中心The Mark O. Hatfield Clinical Research Center (CRC)成立於2005年，Clinical Center為校園內最大的建築物，擁有240間住院病房、82個日間病房、門診區、檢查室、和1600個實驗室。每年有上千個臨床研究在Clinical Center進行，病患來自世界各地，約有一半的臨床研究為觀察性研究，一半的研究為臨床試驗，尤其是phase I和II之臨床試驗，為首次在人體使用測試安全性與治療效果之臨床研究，2017年有4500個住院，92,000門診次及9700個新病人。

很讓兒科醫師注意的是Clinical Center附近有兒童旅館The Children's Inn，自1990年起營運，擁有59間房，經費完全來自私人捐款，提供來自世界各地的兒童病患和家人的住宿服務，目前為止已有超過13,000個病童家庭在此住宿，NIH中15個國家級研究中心提供兒童的臨床試驗（癌症、眼科、心臟肺臟血液、基因體、過敏與感染、關節骨骼與皮膚疾病、兒童健康與發育、聽障與溝通異常、牙齒與頭顏面、糖尿病消化與腎臟、環境健康科學、心智健康、神經疾病、護理研究及NIH臨床中心Clinical Center），兒童臨床試驗之重要是因為無法用成人與動物實驗取代，兒童的存活這幾十年來有顯著進步，臨床試驗功不可沒。

NIH對外是世界上最大的研究經費提供單位，NIH內部研究計劃Intramural Research Program (IRP)，在生醫領域不同實驗室之間有良好的合作與分工，其中NIH Clinical Center為全世界最大的臨床研究醫院，將基礎研究的發現轉譯到疾病的診斷、治療與預防，臨床試驗為IRP之主軸。IRP的22個研究領域中，我進修的免疫(Immunology)領域，國家過敏與感染研究院NIAID與基因與基因體(Genetics and Genomics)研究中心National Human Genome Research Institute有密切關係，NIH擁有200多個免疫研究室致力於免疫疾病之基礎、轉譯與臨床研究，針對過敏疾病、感染疾病、原發與次發免疫不全症、癌症、移植醫學和自體免疫。過去免疫研究的重大突破包括疫苗與佐劑、細胞激素與趨化激素、免疫不全病毒、原發性免疫不全症與自體發炎症候群、免疫疾病新治療的研發，尤其是單株抗體生物製

劑和基因治療以及HIV治療與疫苗的研究，其特色為結合基礎免疫學家、醫師、流行病學家，造就以基礎免疫學為基礎之臨床試驗。

二. 研究與進修目的

- (一). 臨床熟悉原發性免疫不全症與自體發炎症候群病人之診斷與治療
- (二). 診斷性免疫功能測試之學習
- (三). 學習免疫不全症與自體發炎症候群之最新研究
- (四). 免疫致病機轉之探討：證實基因突變造成免疫功能異常之假說
- (五). 建立國際合作關係

三. 研究過程

Notarangelo教授之實驗室位於NIH Clinical Center，他以外的研究人員編制有兩位正職科學家、一位正職研究型醫師、一位技術員、一位博士後研究、兩位博士班學生、一位學士後助理、四位不同層級之訪問學者(包括我)，我每週固定參與2小時實驗室進度會議、2小時LCIM研究會議、1小時NIH clinical center之grand round 臨床會議)、其餘不定期之學術或臨床研討會，每週病房查房(內科與兒科病房)學習了40種不同的原發性免疫不全之罕見疾病，另外我到免疫診斷醫學部學習免疫功能測試，在Dr. Notarangelo的研究室我學習實驗技術，包括在小鼠與細胞株進行基因編輯(gene editing)、微滴式數位核酸偵測digital droplet PCR、細胞株篩選、流式細胞儀分析表面分子標記、T細胞受體分析、細胞培養及T細胞活化與分裂實驗。

我分析臺灣已收案病人之全基因組次世代定序(whole exome sequencing)，在我與臺大醫院與NIH的基因分析專家們合作，兩方利用不同的分析平台與流程進行全基因組分析，我們發現一位2歲男童為de novo heterozygous *proteasome maturation protein (POMP, 蛋白酶體成熟蛋白)*基因突變TA deletion，產生frameshift mutation (c.334_335delTA p.I112Wfs*3) (病人父母為正常wild type)，病人表現為免疫缺損(flow cytometry顯示CD8 T細胞、B細胞、NK細胞下降，且病史為反覆感染)，免疫失調(中樞神經、腸胃、皮膚軟組織發炎)與自體免疫(血小板低下)，病人血清IP-10/CXCL10顯著上升，表示第一型干擾素interferon type I 活化的指標，我已完成申請血液製品輸出許可，將病人全血檢體寄到NIH實驗室，目前病人的T細胞受體TCR repertoire分析在進行中。

這一年來世界各國陸續有5例類似的個案，皆為POMP gene heterozygous mutation，我們的假說認為POMP基因homozygous mutation造成胚胎內死亡，而POMP heterozygous mutation可能有haploinsufficiency效果，蛋白酶體proteasome功能

不足，影響胸線T細胞成熟與發育positive and negative selection異常，活化異常，且NK與B細胞發育受影響。

我們設計實驗，目標在產生CRISPR/Cas9 *pomp*基因編輯小鼠，我們設計guide RNA和repair template，利用CRISPR/Cas9系統在C57BL/6小鼠產生與病人相同之*pomp*基因突變(小鼠*pomp* heterozygous CA deletion, p.I112Wfs*)，由於小鼠之POMP基因有不同於人類的基因轉錄(transcription)，此突變只存在於POMP-201 transcript，不存在於POMP-202或POMP-203 transcript，因此和人類之POMP mRNA transcript不同。此基因轉殖小鼠已獲得NIH委員會同意進行基因轉殖與動物實驗，我們第一次採用對胚胎注射CRISPR/Cas9之gRNA，但母鼠只有生產基因正常之wild type小鼠，我們重新修正實驗條件，已進行第二次利用核電擊方式electroporation將CRISPR/Cas9與gRNA transfect小鼠胚胎，目前將對新生小鼠進行基因型檢測，未來將利用基因轉殖小鼠評估免疫缺損之影響(胸線成熟、T細胞受體變化度、T、B、NK細胞數目與功能變化)、自體免疫與發炎的機轉，本研究將提供世界第一個對於proteasome maturation protein缺乏之動物模式，對於proteasome參與胸線發育與T細胞成熟分化的過程能直接觀察，並可模擬適當的治療方式，本研究將提供創新之研究結果，並可貢獻於病人之醫療照顧。

此外，我們也利用CRISPR/Cas9將人類pre-B細胞株NALM6進行*RAG2* gene剔除實驗，我利用核電擊方式electroporation將CRISPR/Cas9、gRNA、綠螢光GFP plasmid transfect NALM6細胞株，用FACS sorting GFP的方式分出單細胞株single cell clones，再用TA cloning確認基因序列，我在50個單細胞株中找出2個*RAG2*基因剔除的細胞株，之後將確認B細胞受體repertoire及B細胞功能，此*RAG2*基因剔除之單細胞株將用於確認*RAG2*基因突變之病毒載體對於B細胞功能影響，用於確認compound heterozygous mutation複合型基因突變對B細胞功能之影響。

四. 心得

我在研究的過程中，學習到提出假說，運用適當的研究方法檢測與分析全基因組，利用血球上之免疫細胞表面分子表現(immunophenotyping)、T細胞分裂測試、干擾素標記(IFN signature)與T細胞受體分析來了解病人的免疫缺損影響之範圍，並利用CRISPR/Cas9基因編輯技術，快速建立細胞株與小鼠模式研究免疫及基因突變之致病機轉，對於新興基因缺損疾病為重要必經的探索過程。

在NIH的研究生涯，我見識到Notarangelo和其他各年齡的實驗室主持人(50歲到80歲都有)追求醫學研究，追求未知領域的高度熱情與智慧，頂尖研究室成員的高效率與研究能量，發表論文的超高速度，與美國各實驗室明確的合作，我也體會世界各國研究人員的努力與高度競爭，臺灣科學家在以日本、中國、印度、韓國為主的亞洲研究人員中，算是人口稀少力量分散的族群，但我能與各國的研

究人員共事，在思考與研究方法上有很大啟發，我受益良多。另外我們與兩位孩子體驗美國人口密度低的自然環境與自由鼓勵的美式教育，全家收穫與啟發很大，期待自己珍惜臺灣的現有資源，並將出國進修所學貢獻於國內的臨床病人與研究領域，也可傳遞出國進修的經驗給未來的年輕醫師。

五. 建議事項

原發性免疫缺損與基因體研究的領域廣又深，我希望自己未來能在文獻瀏覽更新知識與臨床行醫過程中互相驗證思考，產生好的研究主題，並提升研究方法與效率，我也需要多多學習理性邏輯思考的方式，努力不懈的精神克服研究的挫折與失敗，好的研究環境與風氣需要多實驗室合作和研究人員彼此刺激，找到同領域的研究夥伴互相討論十分重要，此外研究經費的來源來自計畫撰寫，我也須加強自己的深度與創新，另外美國的研究計畫和倫理委員會的申請文件與流程簡明扼要不繁複，使得研究速度可以更快速確實，期待國內研究大環境能持續改善，才能讓整體與個人研究表現更上一層樓。

六. 照片



NIH Clinical Center南邊入口 (舊棟Warren Grant Magnuson Clinical Center)



NIH Clinical Center北棟與南棟建築物



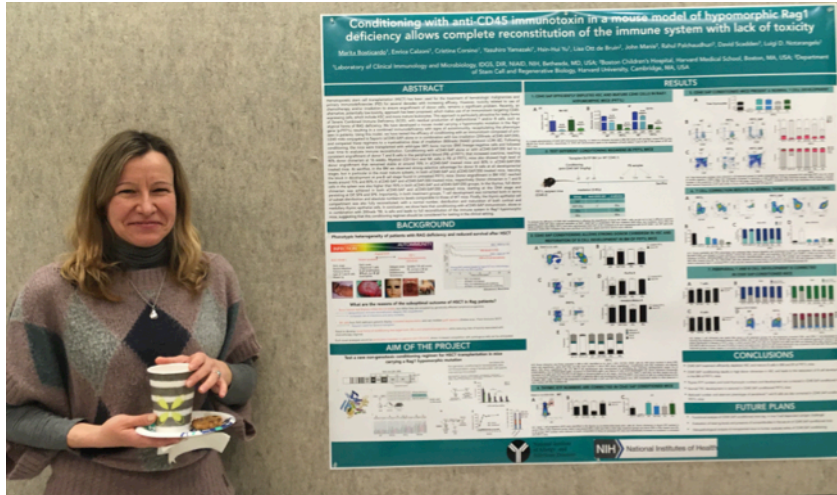
NIH Children's Inn 位於校園北方



Lab meeting實驗室全體同仁合影(中央為Dr. Notarangelo)



LCIM免疫大會 Immunologic Retreat, March 15, 2018



Staff scientist Marita Bosticardo at Immunologic retreat, 我為poster之共同作者



我參與NIH Clinical Center LCIM之病房教學



Take Your Child to Work Day 2018 親職日在實驗室與孩子合照, 培養小小科學家