

出國報告（出國類別：短期進修）

美國威克弗斯特大學附設醫學院 癌症生物學部門進修心得報告

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：賴學緯、主治醫師

派赴國家/地區：美國/北卡羅萊納州

出國期間：106 年 7 月 29 日 至 107 年 7 月 28 日

報告日期：107 年 8 月 6 日

第 1 頁，共 9 頁

摘要

癌症已經連續數十年蟬聯國人十大死因之首，而標靶治療的發現似乎帶來一線曙光，但也發現更多問題是難以克服的，其中癌細胞突變造成抗藥性的產生是一大主因。因此更深入地了解及發現癌症發生的分子生物學相關機制，才能有效治療靶心，避免 off-target 的情況發生。

Skp2 E3 連接酶在許多人類癌症中都有過度表達的現象，並在細胞週期中細胞進展、衰老、代謝、癌細胞進展和轉移中起關鍵作用。在本研究中，我們經由電腦模擬進行高通量篩選的方法，在經過篩選大型多樣的化學結構式資料庫後，找出專一性高的 Skp2 抑制劑。這抑制劑可以直接抑制 Skp2 E3 連接酶活性，而不會影響 Skp1-Cullin-1-F-Box ubiquitin E3 ligase 複合物的其他成分活性，此外抑制的效果與癌細胞 Skp2 缺陷的表現相似，例如存活率下降，Akt 調節的醣解作用以及觸發不須 p53 介入的細胞衰老現象。此外通過遺傳和藥理學方法，發現 Skp2 可以調節癌症幹細胞群和自我更新能力的重要功能。值得注意的是，Skp2 抑制劑在多種動物模型中均可有效降低抗腫瘤活性，並與化學治療劑合併使用可以減少癌細胞存活率。因此，我們的研究提供了藥理學上的證據，說明 Skp2 是一種有前景的標靶，可以限制癌症幹細胞和癌症惡化的現象。

目次

摘要	2
目的	4
過程	5-7
心得	8
建議	9

本文

目的

本次赴美進修的研習目標是希冀學習藉由更深入的分子生物學研究基礎，尋找更適合治療癌症的標靶，並精進研究腫瘤生物學的方法與技術，找出更適合人類使用且專一性強的標靶藥物。

過程

申請出國進修開拓視野及擴張人脈相信是很多行醫者的人生重要規劃，承蒙國防部、軍醫局、三軍總醫院、內科部、血液腫瘤科等各級長官的協助與支持，才得以有機會放下臨床工作得以出國學習。

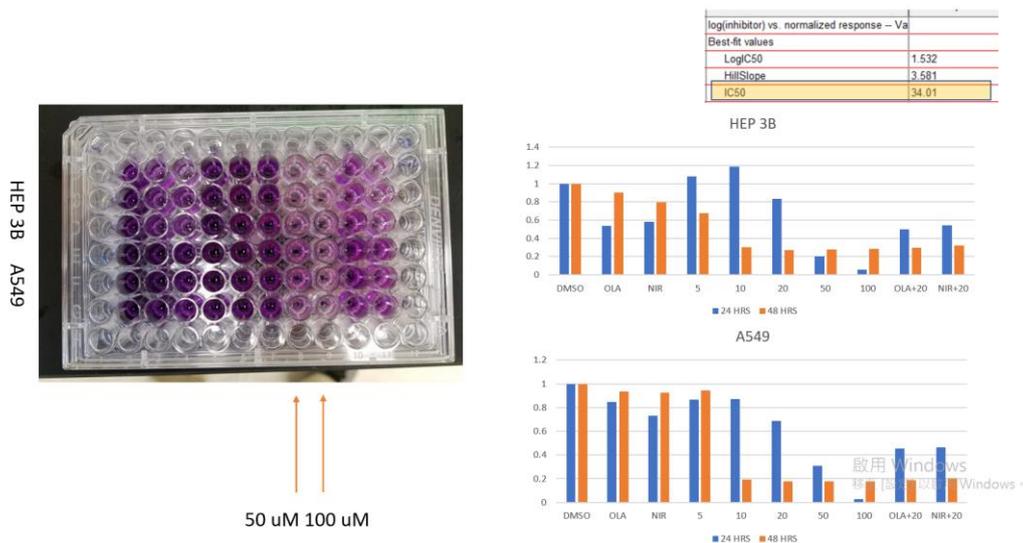
職等考量臨床專注於癌症病人治療，希望經由基礎研究的成果發現，找到其他發展抗癌新藥的曙光。而這次訪學所找尋的林慧觀教授即是職等認為相當適合的人選。林慧觀教授畢業於台大藥學系及藥理學研究所，博士班赴美國羅徹斯特大學 (University of Rochester) 專攻癌症生物學 (cancer biology)，畢業後至紐約史隆基達靈紀念癌症中心 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) Pier Paolo Pandolfi 教授的實驗室擔任博士後研究員，並於美國德州大學安德森癌症中心 (The University of Texas: MD Anderson Cancer Center) 擔任教職，在以第一作者身分發表Nature、Science等重量級國際期刊後，更加奠定林教授的國際學術地位。而由於教授被挖角到美國威克弗斯特大學附設醫學院癌症生物學部門擔任指導教授後，職等因此申請到此部門希望可以學習到本身所欠缺的部分。

在106年07月29日抵達美國，經由指導教授的博士後研究員的協助，而快速地完成職前訓練及操作動物實驗相關訓練後，正式進到癌症生物學部門和林教授討論我未來的研究方向，由於林教授實驗室的研究成果主題是以Akt ubiquitination為主，而在過去研究中我們可以知道，Akt在有氧醱解(Aerobic glycolysis)的過程中，需通過其膜轉位和隨後的磷酸化過程，才能成功活化有

醣解的生理作用 (Elstrom等人, 2004; Robey和Hay, 2009)。另外林教授團隊過去發現不同的E3連接酶可用於誘發精氨酸K63連結的非蛋白水解性Akt ubiquitination反應 (Chan等人, 2012; Yang等人, 2009)。因此針對Akt的E3連接酶發展標靶藥物, 進而抑制癌細胞醣解反應, 可能是抑制癌症的有效策略。

而在完成實驗目標前, 學習一連串的細胞操作技術及測定技術是不可或缺的。舉凡細胞培養技術、蛋白質及 RNA 萃取技術及定量偵測、西方點墨法(Western blots)、基因敲除(gene knockdown)、基因剪輯(clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats, CRISPR)等, 雖文獻上均可找到相關參考資料, 但實際操作起來, 才發現裡面大有學問在, 幸好同事均熱心傳授他們的經驗, 才能漸漸拿捏實驗條件, 增加實驗結果的一致性及可靠性。而在轉譯醫學最後發展成功與否的關鍵, 常在於有無專一性的藥物可供使用, 因此藥物篩選的過程、藥效測試的方法及活體老鼠的實驗都是一連串且重要的研究過程。而一般在體外所進行的細胞存活率測試, 乃是採用細胞培養的方式(cellular event); 而常用的分析方法大約可分為cell proliferation assay、metabolic assay及microtitration assay (MTT-based)等。雖然目前已有商用實驗kit可使用, 但有經驗的前輩仍推崇此較傳統的方法: microtitration assay (MTT-based cytotoxicity test), 其原理是因為活細胞粒線體中的琥珀還原酶 (succinate reductase) 可將水溶性的MTT (黃色) 代謝還原成脂溶性的結晶產物 formazan's product (藍紫色), 將此產物以有機溶劑從細胞中溶出後, 利用 spectrophotometry方法測定在550 nm之吸光值, 並與控制組對照, 即可決定此產

物的量。因為只有活細胞中的succinate reductase才會與MTT相互反應；所以此分析法可以用來區分出存活細胞與死細胞的比例，可作為藥品對細胞所具有的毒性指標。雖然實驗過程常常費時耗神，但能得到的結果較精準且具重複性，因此在實驗室內仍常用此方法。以下圖示意：



而在實驗室同仁的協助完成下，得到以下結論：

Skp2抑制劑可以阻止Skp2-SCF複合物的形成，導致細胞衰老、細胞週期進行受阻、癌細胞原生分化受影響及醣酵解作用中斷，而產生最終抑制腫瘤的效果。

心得

在美國威克弗斯特大學附設醫學院癌症生物學部門進修期間，感謝林慧觀教授所給予的機會，讓我能見識到美國對基礎醫學研究的注重，在廣納來自全世界的菁英博士後研究生為實驗室最重要的資源後，輔以一流的實驗儀器設備及充沛的研究經費，均可讓研究計畫進行得更暢通無阻，最後每周的研究團隊會議上，因為教授題材夠多、夠新穎，各個研究生不容易有結果上的競爭關係，因此大家更可無私地分享看法及建議，而希望彼此同事的結果能早期發表，也從中體會要領導一個優秀實驗室是有多麼的不容易！現今科技發展一日千里，從而帶動實驗技術及影像科技的快速進步，而使實驗結果呈現能更生動表達生理或藥理上的影響，藉此突破陳舊技術結果的盲點，則可避免後續更大量不必要的研究經費支出，這在身為一個從事轉譯醫學科學人員是不得不體認的，因此汲汲營營吸取新知並執行、篩選適合自己實驗室設備跟能力的部分，是讓科學實驗室能永續經營的不二法門。而腫瘤分子生物學的研究是瞭解癌症的基礎，唯有不斷地溫故知新，才能領導新藥的開發研究、且帶領加速藥物的篩選和評估治療的效果。感謝國防部、軍醫局、三軍總醫院、內科部、血液腫瘤科等各級長官讓我能在美國的研究環境學習一年，除了在學術研究上得到許多寶貴的經驗外，對美國的社會環境及風俗民情能有更深刻的體會，與家人也更多相處的時間，相信這段在美國進修的時光會成為一生之中難得的經歷與寶藏，最重要的是與美國的教授與同事保持聯絡，讓研究結果能持續經營發展下去。

建議

現代醫學的發展跟基礎醫學息息相關，但變動之快速，可能讓大多專注在臨床工作的醫師們所忽略，若無相關實驗技能基礎，短期進修容易造成無形的時間成本耗費，而能讓研究主題做的深入且發表在排名前段的國際期刊，至少兩年以上的時間是相當常見且需要的，甚至若能鼓勵有科學研究熱情的醫師出國接受博士班訓練並有充分經費支援，使他們無後顧之憂，相信對人才培育且未來回饋學校及醫院的影響是無可限量的。