

出國報告(出國類別：進修)

MANF 促進神經幹細胞分化及遷移與腦中風 後神經再生之治療

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：曾冠穎、主治醫師

派赴國家：芬蘭

出國期間：102 年 7 月 8 日至 106 年 7 月 7 日

報告日期：106 年 7 月 24 日

摘要:

MANF (星形膠質細胞衍生神經生長因子) 是一個新類型的神經生長因子, 不同於傳統的神經生長因子有固定的細胞受器, 此新一類型的神經生長因子主要存在於內質網上, 有幫助蛋白質修飾之功能, 也在內質網受刺激的情況下, 分泌出細胞並調控後續基因的表現, 目前已發現此神經生長因子有助於延緩神經退化性的疾病所造成神經細胞的凋亡, 並且改善其症狀. 此進修的研究方向在於觀察星形膠質細胞衍生神經生長因子(MANF)藉著調控內質網功能來影響神經幹細胞的生長, 且利用基因調控的方法觀察在大腦皮質發育過程中, MANF 如何控制神經幹細胞的分化及遷移, 之後進一步利用病毒載體或是直接注射此生長因子增強此蛋白的活性並且增強內生性神經幹細胞遷移及分化去治療腦中風的老鼠!

目次:

1. 本文.....	4
A. 動機與目的.....	4
B. 過程.....	5
C. 心得.....	5
D. 建議.....	8
2. 附件	

本文

A. 動機與目的：本人在進修之前，於三軍總醫院神經外科部接受六年的神經外科專科訓練，在這六年中，面對許多神經退化性疾病，比如說是巴金森氏症或是腦中風所以引起的腦部功能退化。在面對這些病人時，雖然可以給予藥物延緩病情發展，但卻不能有效地改善神經學的病症，只能眼睜睜的看著病人的自主功能逐漸喪失，最後只能長期臥病在床。因此，如何改善神經退化性疾病所造成的的症狀一直是臨床醫師想去努力的地方。在神經科學的領域中，神經生長因子對大腦功能及神經細胞的生長是一個很重要的角色，從 NGF, GDNF, 到 BDNF 對各類型的神經細胞都有特定的功能。在體外的實驗，這些神經生長因子都可以促進神經細胞生長及存活，但在體內實驗中，其效果卻有限，甚至有些神經生長因子會導致不良的後遺症。近幾年來，幹細胞的研究改變原有對神經退化性疾病的治療模式，越來越多研究嘗試刺激內生性的幹細胞增生或是移植體外的幹細胞去彌補原本喪失的神經細胞並且改善其症狀。但這治療方式卻有許多限制和需要改進的地方。本人在神外訓練期間，有幸能與 Professor Barry Hoffer 討論自己對未來的理想及規劃，也藉由他的引薦，認識了 Professor Mart Saarma, Professor Saarma 在神經生長因子的應用是非常的卓越，除此之外在 2008 年，他也發現了新型的神經生長因子 (Cerebral dopamine neurotrophic factor; CDNF) 並且和 MANF (midbrain associated neurotrophic factor) 同屬新一代的神經生長因子，不同於傳統的神經生長因子，新一代的神經生長因子作用於內質網上，負責蛋白質的加工及調控，並且與內質網功能穩定有密切的關係。此外，他也藉由調控內質網上的訊號因子去影響其他下游的細胞生長訊號。這樣的模式不僅影響神經細胞，更對一些高活性的細胞有密切的影響，比如腦部內分泌細胞，免疫造血細胞，胰臟內分泌細胞，以及原始的幹細胞。目前為止，我們已知這一類新型的神經生長因子對於多巴胺細胞，與胰島素分泌細胞有保護的功能，對於免疫細胞功能上的轉化也有特定的效果，但對於神經幹細胞的作用卻還不是很清。此次進修的課題是研究新型神經生長因子(MANF)對於神經幹細胞及大腦皮質發育之影響，與促進內生性幹細胞於缺血性腦中風後的治療。

B. 過程：本人於芬蘭赫爾辛基大學藥理系及生物科技院所攻讀博士學位，在這段時間主要在 Professor Mart Saarma 的研究室從事博士研究計劃，並且由 Dr. Mikko Airavaara 作為本人的指

導教授。

第一年博士學程：主要修習博士學分課程 (lecture in laboratory animal science, neurobiophysics, stem cell and organogenesis, introduction of neurobiology 等關於動物行為與神經生理學)與參與實驗室的各項會議 (每周一次的 lab meeting 與隔周一次的 journal meeting). 並且學習實驗技術 (冷凍切片的製作, 蠟塊組織切片的製作, 免疫螢光染色及細胞量化分析,活體細胞培養, 腦中風動物行為評量)及協助已在進行的實驗計畫。

第二年博士學程：主要完成博士班藥理學學程考試。在實驗室工作方面,建立神經幹細胞的培養技術及流式細胞儀的幹細胞定量分析, 與小老鼠腦中風之動物模組,並確定自己的博士研究計畫與研擬實驗流程。

第三年博士學程：開始積極參與大型的國內和國際科研會議, 比如芬蘭神經藥理學會,歐洲神經再生學會,與美國神經學會.在這些會議中,本人藉由口頭報告或是海報方式發表自己的研究結果, 在這過程中也認識許多與此領域相關的研究人員, 並且獲取重要的科研新知及本身研究計畫的寶貴建議。

第四年博士學程：完成所有博士學程學分。開始撰寫文章並且完成博士計畫的口頭報告, 在後半年已將研究結果投稿於 *Journal of neuroscience* 及 *Molecular therapy*, 並且遞交博士論文於藥理系博士評鑑委員會,預計今年年底完成博士學位。

C.心得：在修習博士學位期間,主要研讀神經藥理相關知識,比如抗巴金森藥物的作用機轉,及新型藥物的研發與應用。在實驗室工作方面,學習分子生物相關實驗的操作並建立幹細胞的培養及病毒製造,這方面對於臨床醫師而言,是一個全新的挑戰,但也讓我從原本只對神經退化性疾病的臨床認知擴展到分子生物層面,此外更對神經細胞的生長及突觸的再生有更全面的了解;比如說藉由操控基因表現來調控某些蛋白的含量,進而增加在缺氧或是有毒物質的環境下神經細胞的存活率。在這之後更應用在缺血性腦中風的動物模組上,實際了解腦中風的病理機轉及內生性神經幹細胞活化的機制。因此藉由體內與體外的實驗操作,提供一個研究平台讓我

能更詳細研究神經細胞的發育與腦中風後神經再生機轉。

關於四年的博士研究,主要可以分成兩個部分: 第一部分,主要觀察星形膠質細胞衍生神經生長因子(MANF)對於大腦皮質發育的功用,由於大腦皮質細胞是由神經幹細胞分化而來。因此我們先單獨培養胚胎幹細胞,並藉由基因剔除的方式,比較正常與 MANF 缺失的神經幹細胞之生理特性。在細胞培養過程中,我們並沒有發現變異的幹細胞有明顯型態上或是功能上的改變。但當幹細胞分化成神經細胞時,MANF 缺失造成神經軸突生長的停滯,與減少軸突所需要的結構蛋白,進而造成由幹細胞分化的神經細胞數量上和形態上的改變。因為在之前的研究發現,內生性的 MANF 與內質網的功能有密切的關係,因此我們進一步檢測變異細胞中內質網的功能。在細胞分化的過程中,MANF 的缺失造成內質網壓力的增加,進而造成新生蛋白合成的減少。這樣的發現也說明了為什麼 MANF 的缺乏會造成神經幹細胞分化及神經軸突生長的減少。除此之外,我們也在大腦皮質發育的過程中發現 MANF 的缺失造成神經前驅細胞遷移的遲緩,造成大腦皮質細胞排列的混亂。雖然隨著老鼠成長,皮質的神經細胞會移至最終的位置,但緊密的排列方式及軸突的生長仍受到影響。這樣的發現與在體外的結果是相符合,更證明 MANF 此新型的神經生長因子利用與傳統生長因子不同的方式,去調節內質網的功能進而影響神經細胞的發育。

第二部分,在了解內生性 MANF 對神經細胞發育的機轉後,我們進一步想知道若是加強其表現會對神經幹細胞有什麼影響。因此我們利用已建立好的胚胎細胞模組觀察高表達 MANF 後細胞形態上或功能上的改變。再給予 MANF 或是利用病毒載體去轉載 *Manf* 基因去高表達其訊號,我們並沒有發現幹細胞有增生速度的改變,相反的,神經幹細胞產生形態上的改變,呈現出不對稱細胞型態及長出類似軸突的細胞突起,利用 Western blot 去量化某些特定的蛋白含量時,發現在 MANF 治療後的細胞含有大量的神經細胞與膠原細胞特定的結構蛋白。這樣的結果說明外生性 MANF 可以加強神經幹細胞的分化但卻不影響幹細胞增生與其他特性。因此,藉著這樣顯著的改變,我們嘗試找出 MANF 影響幹細胞下游訊號的途徑,在分析不同的分子訊號實驗中,我們發現 MANF 與 STAT3 的活化有密切的關係。當給予 MANF 於細胞培養液中一小時內,STAT3 的磷酸化會有明顯的增加,暗示外生性的 MANF 可藉由 STAT3 去影響幹細胞分化及之後其細胞型態。另外,在單獨培養 SVZ explants 的實驗中,我們也發現給予 MANF 或是利用病毒載體去高度表達內生性 MANF 都可加強神經前驅細胞的遷移。在了解外生性 MANF 對神經幹細胞的影

響後,我們利用已建立好的缺血性腦中風動物模組來測試給予 MANF 可否刺激內生性幹細胞的活化。再給予 MANF 後的兩周,我們發顯有明顯的神經前驅細胞聚集在腦缺血的區域,並且改善其腦中風後的行為缺失。這樣的結果暗示 MANF 不但可以影響神經幹細胞的分化及遷移速度,而且還具有加強內生性神經幹細胞修復的能力。

至於在參與各項研討會的過程中,神經幹細胞發育的課程(圖一)使我對幹細胞增生與分化有更深的了解,並且具備基本的概念對於內生性或是移植幹細胞在神經退化性疾病的治療。除此之外,歐洲神經再生學會更擴展我對神經再生領域的認知,不單是幹細胞的治療方針,神經突觸的再生以及神經修復的新型治療也是目前大家關注的焦點。在學會上,藉由口頭發表”利用新型神經生長因子去誘導內生性幹細胞的遷移至中風的區域”,(圖二)獲得許多寶貴的意見。最重要的是,也認識許多相同領域的研究人員,彼此交換心得及新的概念,讓我收穫良多。去年年底的美國神經學會更聆聽到許多卓越的科研報告,例如運用病毒載體加強某特定的幹細胞基因表達,促使體內膠質細胞直接轉化成有功能的神經細胞在脊髓受傷的老鼠,或是利用 RNA sequence 找到許多與神經退化性疾病相關的表達基因,還有近年來相當熱門的 α -synuclein related Parkinson's disease model, 這些主題正帶領著我們慢慢解開神經退化性疾病的致病機轉,我也相信再過不久,臨床醫師將會擁有更多治療的方式去改善過往大家束手無策的病症!

在博士學程的四年中,我從一個對分子生物領域完全陌生的臨床醫師,重新拿起了 pipette, 學習做細胞染色, 組織切片, Western blot, RT-qPCR, flow cytometry, 設計特定的基因片段,製作病毒載體,培養神經幹細胞,建立中風動物模組及行為監控,得到許多寶貴的經驗,尤其是養成科學邏輯的思維及對任何事物抱有強烈的好奇心,藉著閱讀相關的科研新知,然後大膽的提出假設,並謹慎的設計實驗流程,去證明自己的理論,雖然過程中會面對許多挫折及不順利,但也因經過這樣的歷練,讓我一窺神經再生醫學的奧妙之處!

在之後研究道路上,我期許自己能繼續在基礎醫學上更精益求精,更重要的是,如何連結到臨床醫學是我之後一個很重要的課題。首先,在前兩年的時間裡,能擴展自己的研究平台,與自己相關的研究的實驗室能一起合作甚至連結赫爾辛基研究室做一個跨過國的研究項目。在這之後,慢慢建立自己的實驗室,並且從臨床上無法解決的問題轉譯到基礎的角度去切入,並且走出自己新的研究方向。長期計畫,找到新的治療方式對於腦中風的病患,實現轉譯醫學的目標。

D. 建議: 隨著生物科學的突飛猛進,對一個想踏入此領域的臨床醫師而言,是一個很難得的機會也是一個很艱鉅的挑戰,因為當你能重新了解生命的起源及細胞分子層面的機轉時,你對臨床疾病會有更深入的見解!但四年的博士學程似乎是短了一點,因為建立一個穩定的實驗平台或是動物模組大概需要一到兩年的時間,再加上實驗的結果是需要不斷的測試及檢測,因此在芬蘭或是瑞典而言,一個完整的博士生養成教育大概是要 5-6 年!如果未來能放寬修業時間,我想這對未來想全職進修的臨床醫師而言,會有更充裕的時間去完成博士學程的計畫!

圖一:Neuroscience school of Advanced studies: neural stem cells development and brain repair



圖二:9th Internatiaonal symposium on Neuroprotection and neurorepair

