

出國報告（出國類別：短期進修）

美國國家衛生研究院  
腎臟病研究部門進修心得報告

服務機關：國軍花蓮總醫院

姓名職稱：吳宗勸、主治醫師

派赴國家/地區：美國/馬里蘭州

出國期間：106 年 11 月 27 日 至 107 年 11 月 26 日

報告日期：107 年 12 月 13 日

## 摘要

多囊腎病為腎臟科最為著名的單基因遺傳性疾病終致末期腎病之一，雖然致病基因以及單核苷酸多態性一一被發表，從單倍體不足 (Haploinsufficiency) 到明顯多囊性疾病 (cystic disease) 的分子生物機轉仍不明，雖然日前減緩惡化新藥上市為多囊腎病的研究帶來新的希望，期已知的可能副作用仍是臨床醫師最重要的考量。因此更深入地了解及發現疾症發生的分子生物學相關機制，才能有效治療靶心，延緩疾病進程。

為找出加重多囊腎病病發的機轉，在本研究主題中，我們經由系統性生物學研究 (system biology)，在經過篩選大型多樣的基因轉譯資料庫後，找出候選基因 (candidate gene)，透過免疫共沉墊法 (co-immunoprecipitation) 發現 LAD1 基因可能與 PKD1 結合。近一步針對 LAD1 基因做過度表現 (over-expression)、基因敲落 (knockdown) 以及免疫螢光顯影技術觀察 LAD1 在細胞生物學領域所扮演的角色。值得注意的是，LAD1 基因可能在穩定細胞骨架 (cytoskeleton) 以及影響細胞遷移 (cell migration)。因此，我們的研究提供了分子生物學上的證據，說明 LAD1 可能在 PKD1 基因不足時扮演了加速囊腫形成 (cystogenesis) 的角色。

## 目次

摘要	2
目的	4
過程	5-11
心得	12
建議	13

# 本文

## 目的

本次赴美進修的研習目標是希冀藉由更深入的基因分子生物學研究，以多囊腎病為模型，精進研究分子生物學的方法與技術，驗證一個新蛋白質在已知的單基因遺傳性疾病致病機轉中可能扮演的角色。

## 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、國軍花蓮總醫院、醫療部、內科部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。

鑑於國內腎臟學研究在於電解質、糖尿病腎病變、腎性骨病變、腎性貧血、急性腎損傷等等領域已有廣泛且深入的發展，惟多囊腎病較少有前輩學者投入，而此種單基因遺傳性疾病之模型，對於吾人欲研究由基因型至表現型的病生理機轉有其優勢，特別是尋求其治療新藥的研究至為重要。而這次訪學所找尋的Gregory G. Germino教授所領導的實驗室即是職等認為相當適合的場所。Germino教授畢業於芝加哥大學醫學系（University of Chicago Pritzker School of Medicine），在耶魯大學附設醫院（Yale–New Haven Hospital）完成內科住院醫師以及腎臟科專科醫師訓練，後至英國牛津大學完成實驗室博士後研究員訓練後（Research Post-Doctoral Fellow, Nuffield Department of Medicine, Oxford University），先後於美國耶魯大學（Yale University School of Medicine）、約翰霍普金斯大學（Johns Hopkins University School of Medicine）擔任教職（助理教授、副教授、教授），於2009年起進入美國國家衛生研究院（National Institutes of Health）的糖尿病、消化性疾病腎臟病研究所（National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIDDK）擔任副所長（Institute Deputy Director），Germino教授致力於

多囊腎病的研究除了在許多重要期刊發表文章，也在2005年獲頒 Lillian Jean Kaplan International Prize for the Advancement in the Understanding of Polycystic Kidney Disease 彰顯其對於多囊腎病的研究的貢獻，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。

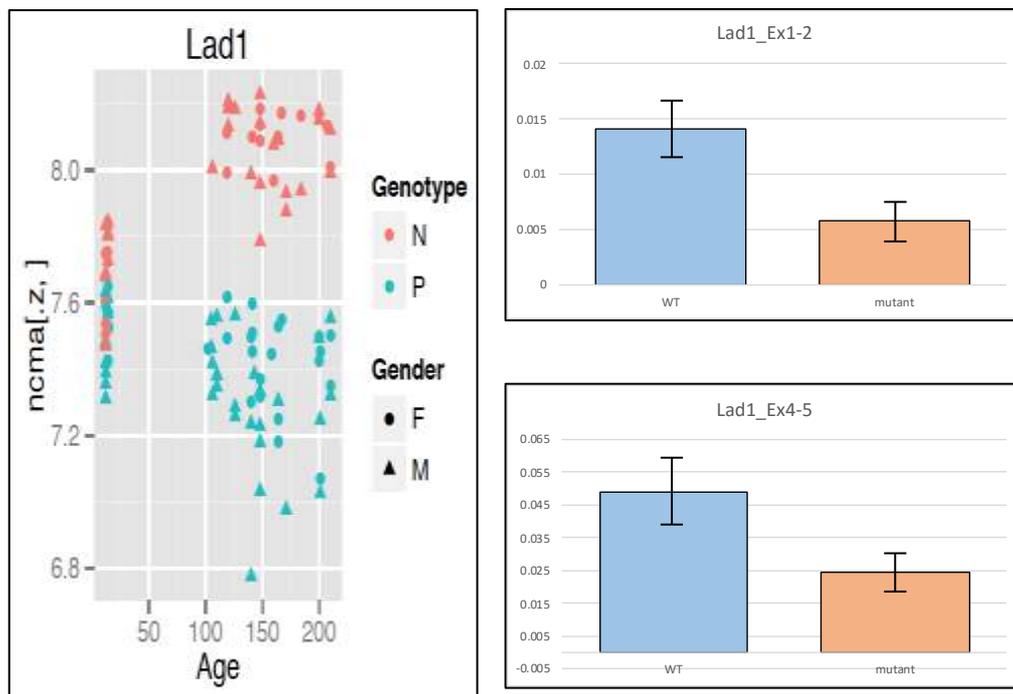
在 106 年 11 月 24 日抵達美國，經由指導教授的博士後研究員的協助，而快速地完成職前訓練及操作細胞實驗相關訓練後，正式進到多囊腎病實驗室和 Germino 教授討論我未來的研究方向，在過去研究中我們可以知道，有數個基因的突變，會導致成人罹患多囊性腎臟病，分別是 PKD1 基因（位於第 16 對染色體短臂）以及 PKD2 基因（位於第 4 對染色體長臂），而幼兒發病型多囊性腎臟病則是因為 PKHD1 基因（位於第 6 對染色體短臂）發生突變的緣故，本實驗室利用 PKD1 條件式基因剔除（conditional gene knockout）來產生後天喪失 PKD1 基因的小鼠，進行系統性生物學（systemic biology）研究，包含轉譯表現量（transcriptomics）、代謝（metabolomics）、脂肪（lipidomics）等分析，找出可能在 PKD1 基因單倍不足（haploinsufficiency）的前提下加重囊腫形成（cystogenesis）的基因/蛋白質，並驗證之。

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、DNA、RNA 萃取技術及定量偵測、西方點墨法 (Western blots)、基因過度表現（gene overexpress）、利用共軛顯微鏡及免疫螢光染色技術（immunofluorescence）使目標蛋白質在福馬林固定（formalin-fixed

cell) 或活細胞成像 (live cell imaging) 能被觀察、基因敲除 (gene knockdown)、基因剪輯 (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats, CRISPR) 等技術，雖可透過文獻搜尋得到操作流程，但實作時才發現裡面大有學問，有賴同事們均熱心分享他們的經驗，才能漸漸掌握實驗技巧與優化實驗條件，增加結果的一致性及其可靠性。

以下圖示為初步結果：

Figure 1. 在PKD突變與否、早期誘發或晚期誘發突變之間均可發現基因LAD1有明顯的區別，即PKD缺損的小鼠帶有較低的LAD1表現量。



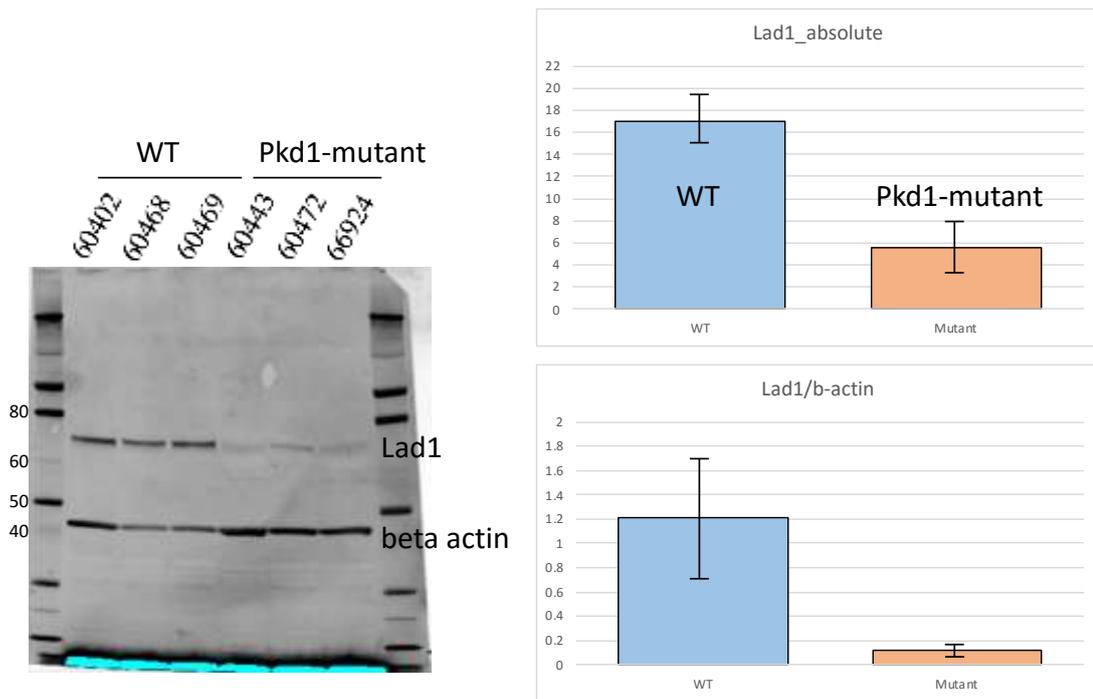


Figure 2.藉由免疫共沈澱法合併西方墨點法可證實PKD1與LAD1有交互作用。

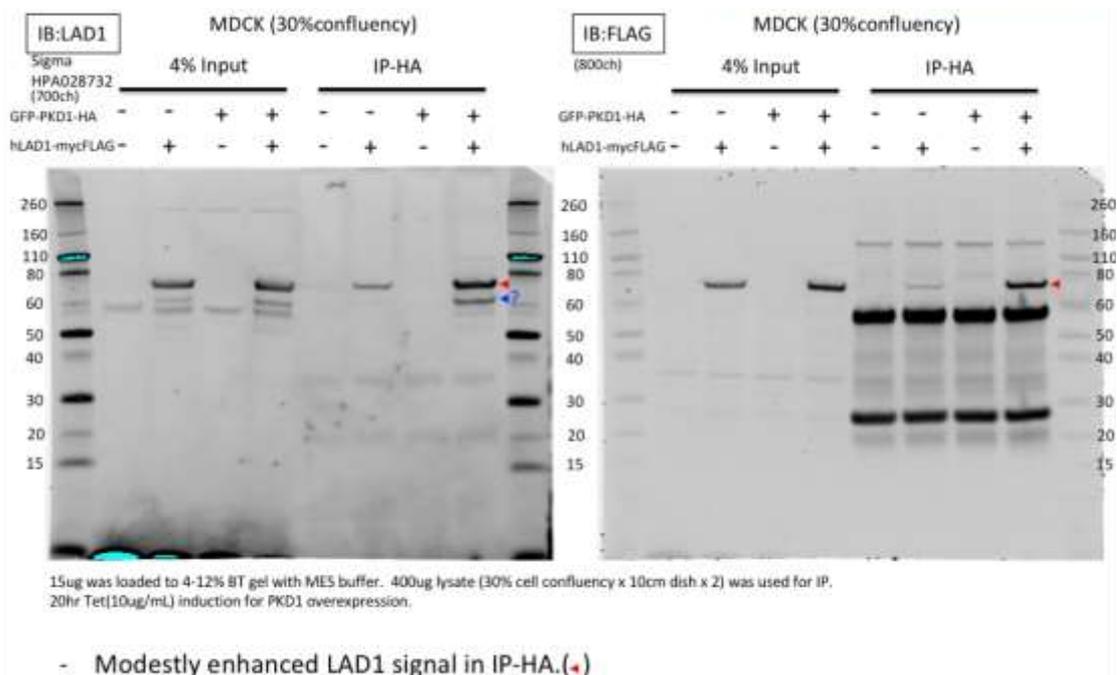


Figure3. LAD1較容易聚積在細胞的邊緣(free edge)，而非細胞與細胞間(cell-cell junction).

**LAD1, Lad1 subcellular localization by IF**

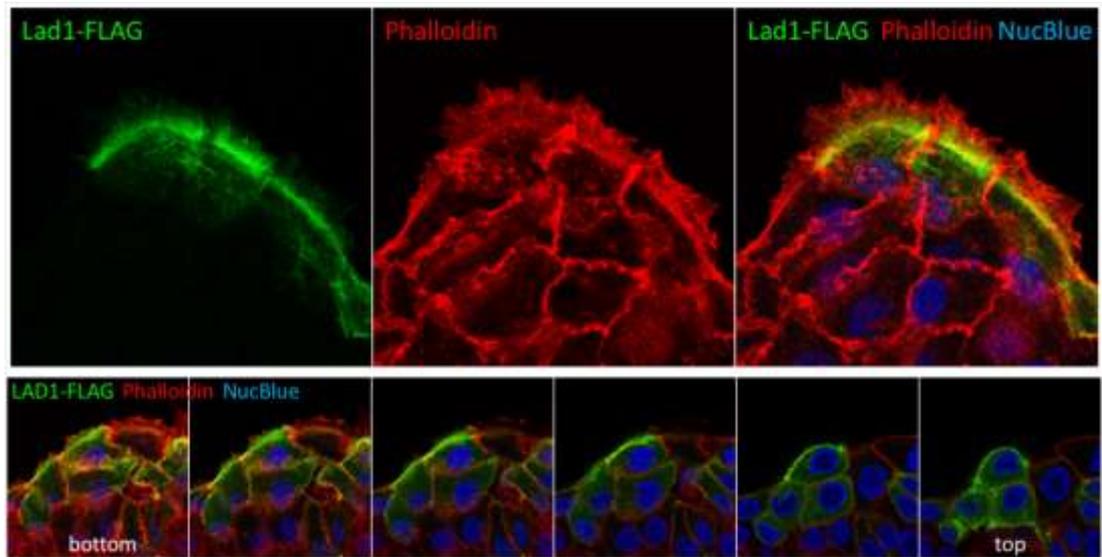
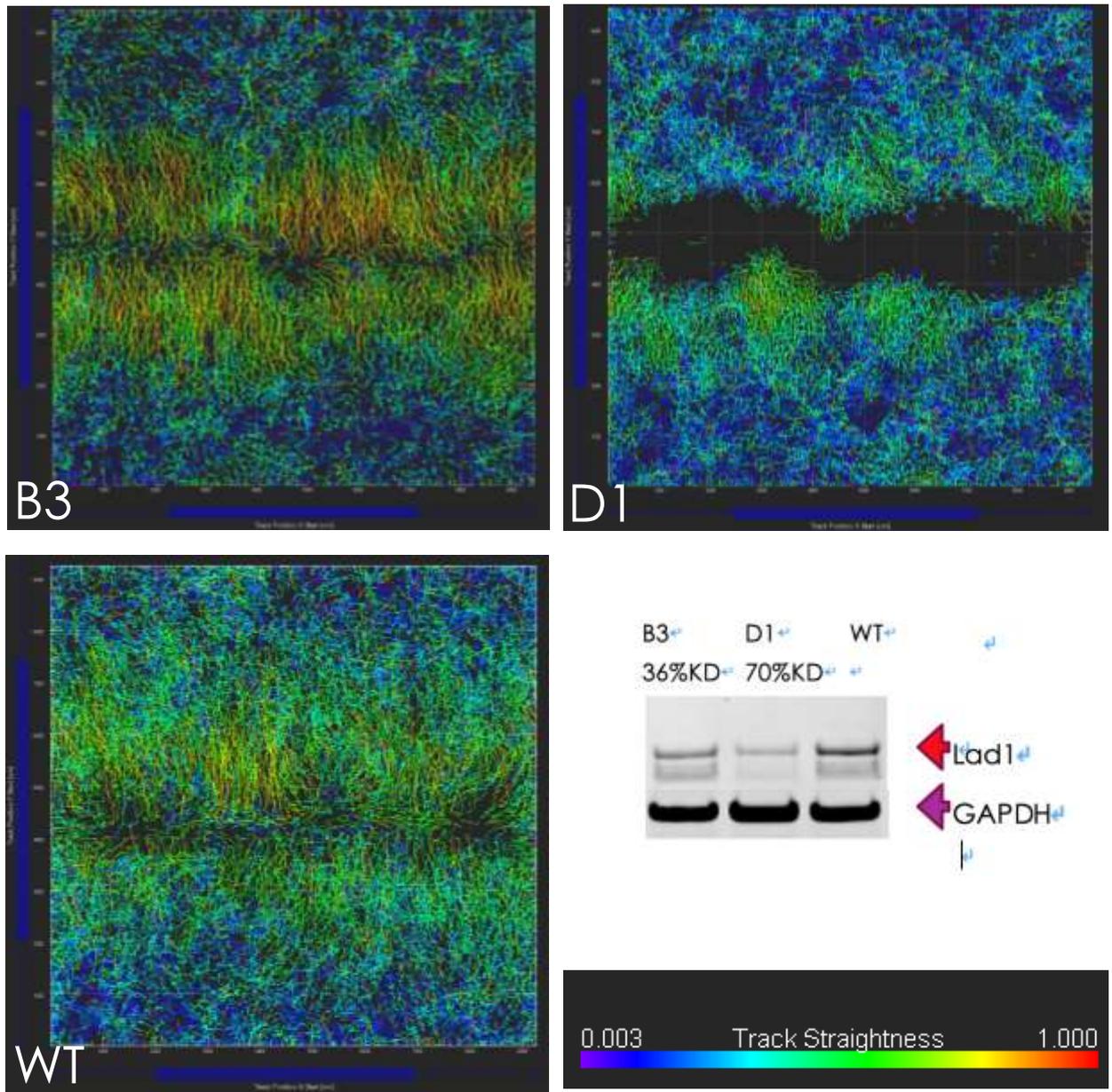


Figure4. 針對LAD1基因進行小髮夾干擾核糖核酸敲落(short-hairpin RNA knockdown), 在不等程度的基因敲落的細胞株可觀察到不同的細胞遷移型態(cell migration pattern).



而在實驗室同仁的協助完成下，得到以下結論：

在誘發PKD1基因缺損的早期、雖然囊腫還未大量形成即可觀察到LAD1表現量已明顯下降，進一步藉由小鼠腎臟組織進行逆轉錄聚合酶即時鏈式反應（reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction）、多種細胞株的西方墨點法均可證實其轉錄、轉譯量均下降，LAD1仍是一個鮮為人知認識的蛋白質，在共軛顯微鏡下可觀察到LAD1與肌動蛋白絲（actin filament）共同呈現（co-localization），暗示其在細胞骨架的角色，且不論是內生性或過度表現（endogenous or over-express）的LAD1均較易沈積在細胞邊緣而非細胞交界處。經過LAD1基因敲落（knockdown）的細胞株可觀察到異於原生型細胞株的細胞遷移型態。

## 心得

在美國國立衛生院腎臟病部門多囊腎實驗室進修期間，感謝Germino教授所給予的機會，讓我能見識到美國對基礎醫學研究的深度與廣度，來自全世界的菁英博士後研究生輔以一流的實驗儀器設備，以及扎實的判讀數據、相互詰問、思辨探討等訓練，方可對各種實驗結果有恰如其分的解讀，最後定期的實驗室會議上，大家無私地分享看法及建議，讓我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，然而，如何問一個好的問題、設計適當的實驗試圖回答之，依舊科學研究的基礎，在吸取新知並執行、篩選適合自己實驗室設備跟能力的部分，則是讓實驗室能永續經營的不二法門。感謝國防部、軍醫局、國軍花蓮總醫院、醫療部、內科部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科研文化能有更深刻的體會，與家人也更多相處的時間，這段時光將會是一生之中難得的經歷與寶藏，最重要的是維持與美國的教授與同事的聯系與合作，讓研究結果能持續成長茁壯。

## 建議

醫學的發展絕對奠基於基礎醫學研究，但其變動之快速，對於專注在臨床工作的醫師們無法短時間掌握，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，若想讓研究主題做的深入且發表在排名前段的國際期刊，往往需要兩年以上的時間，對於回國之後仍對科學研究有熱情的醫師若能有給予充分支援使其持續發展，相信對人才培育且未來回饋醫院乃至全軍的影響是無可計量的。