

出國報告（出國類別：進修）

# 疾病專一性誘導型多能幹細胞之建立 鑑定，做為心臟疾病模式與藥物開發 之平台

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名職稱：吳卓錯主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：107年12月15日至108年12月14日

報告日期：109年02月14日

單位主管核章：

## 摘要

本計畫預定先學習幹細胞模式之建立(最新方法)，心臟細胞轉換之最佳平台模式，如何運用此平台解決未知之心臟疾病機轉，如何運用此模式測試藥物反應，如何運用誘導式幹細胞平台結合最新之 **next generation genetic study** 做研究。範圍廣大，在這一當中我學習了(1) 如何運用幹細胞轉化成心肌細胞以及內皮細胞，作為藥物測試的平台，(2)學習建置內皮細胞研究模式的方法。(3)學習如何利用 **CRISPR** 基因修改工程改變細胞的基因序列，找出可能的致病基因，同時作為將來醫療的可能方法。(4)更前往梅約診所學習了運動心肺功能測試最新的研究與進展，雙方交流，協定將來研究的方式，收穫豐富。

## 目次

封面	.....	1
摘要	.....	2
出國目的	.....	4-5
出國過程	.....	6-13
出國心得	.....	13-14
建議事項	.....	14-15

# 本文

## 1. 出國目的

本次研究希望前往史丹佛大學，Wu, Joseph C 教授位的誘導式幹細胞中心，利用博士後研究進修時間，

(1)學習如何將人類體細胞簡單有效率的培養成誘導式幹細胞，此技術在各個實驗室有不同的做法，史丹佛實驗室是世界上首屈一指將體細胞培養出誘導式幹細胞的研究中心，其研究有獨到之處，希望能學習到其培養的技巧，以回國發展。

(2) 研究合適的環境讓誘導式幹細胞成為心肌細胞，本實驗室著重在心肌細胞離子通道的研究與機轉，目前研究的平台主要為動物及細胞為主，缺乏人體的心肌細胞研究，人類心肌細胞取得不易，透過誘導式幹細胞的培養，可以得到真正近似人類組織之心肌細胞。

(3)研究客製化培養成功的心肌細胞之特性應用於基礎研究。此為本次出國研習最重要的目的，希望能結合誘導式幹細胞培養的技術，與目前本實驗室之發展，而可突破目前的瓶頸。希望能學習到：人類體細胞（包括最新以抽血的方式及可以完成）→誘導式幹細胞 →心臟血管細胞。整體的培養技巧及實驗方法。回國之後與本實驗室目前進行的實驗結合，取得特殊病患(如 Brugada syndrome, diastolic heart failure)之病患的皮膚檢體，培養為誘導式幹細胞後，再轉化為心肌細胞，研究特殊的離子通道改變，而能試驗新的藥物或者是治療方式對於離子通道的治療性及影響，同時更可以有所突破，進行臨床心臟衰竭嚴重病患之新治療方法的嘗試。

(4) 學習最新的誘導式幹細胞轉化成內皮細胞的方法，此類研究目前世界上著墨

不多，在本次研究的過程中也順離習得這樣新的技術，運用在臨床研究上。

(5) 利用機會前往 **Mayo Clinic**，美國梅約診所，進行雙邊合作及交流，學習 **iCPEX**，運動心肺功能及血行動力變化的相關研究，和 **Professor Borlaug** 交流，一方面學習梅約診所的技術，一方面也將我們在台灣所做的相關研究提出討論。

## 2. 出國過程

### (1) 誘導性心肌細胞與心血管疾病。

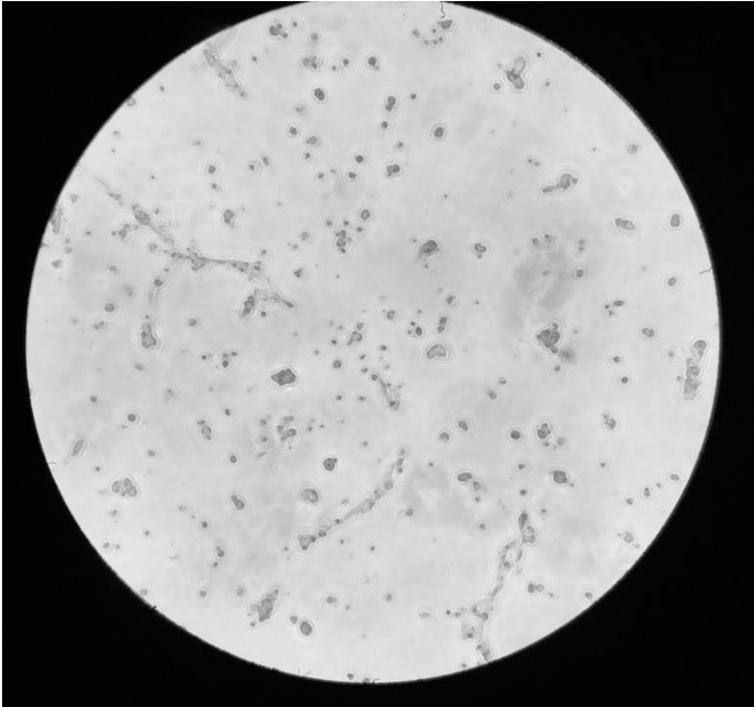
本研究是最早到實驗室所進行的研究，誘導性心肌細胞介紹如下，誘導式幹細胞: 幹細胞是一種具有自我增生及多重分化能力的細胞，身體中許多器官都有幹細胞的存在，例如骨髓、皮膚等。近年來隨著幹細胞研究的突飛猛進，幹細胞在各領域的應用也逐漸呈現。在生殖醫學方面，懷孕及生產時的羊水、臍帶血、臍帶間質及胎盤都可分離出幹細胞，這些幹細胞在體外培養時會自我增生，予以適當的誘導時可分化為心臟細胞，神經細胞、軟骨細胞、脂肪細胞及肝臟細胞等。幹細胞最早是從骨髓中分離出來的，其應用也最廣泛，最先是應用於血癌、地中海貧血症等血液疾病之救治，後來發現骨骼所分離出的間質幹細胞於體外除了可分化為血球細胞外，也能分化為神經細胞、心肌細胞、及肝臟細胞等。源自骨髓的間質幹細胞在許多動物疾病模式都有不錯的療效，例如脊髓損傷、腦中風、心肌梗塞、及糖尿病等，它也曾應用於臨床病人，發現在心肌梗塞病患予以植入間質，幹細胞可以將心肌梗塞區域減少。幹細胞移植的療效有兩種機轉，其一是移植的幹細胞可以分化為缺損的細胞，另一個機轉是移植的幹細胞會分泌生長激素及細胞激素，進而刺激在受損組織附近的內生性幹細胞增生與分化，進而加速組織的修復。近年來發現源自胎兒的細胞中富含幹細胞，臍帶血、臍帶間質、胎盤及羊水中都富含幹細胞，使這些原本將丟棄的組織能夠成為救人的利器。臍帶血的商業價值是眾所周知的，目前已能夠成功地利用臍帶血幹細胞治療地中海貧血症等血液疾病。源自胎兒的幹細胞中增生及分化能力最強的是從臍帶的結

締組織中分離出的間質幹細胞，此種幹細胞在脊髓損傷及巴金森式症的動物模式以被證實有療效，未來應用於臨床的潛力極佳。此外，從著床前胚胎也能取得的幹細胞，稱為胚胎幹細胞，它的增生及分化能力最佳；但是取得胚胎幹細胞須要犧牲著床前胚胎，所以在倫理上有爭議，而且胚胎幹細胞移植後的排斥與畸胎瘤形成也是限制其發展的障礙。誘導式多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells）為日本學者 Shinya Yamanaka 所發明，他成功地將四種基因轉入成年體細胞，而將此體細胞轉變為幹細胞，稱為誘導式多能性幹細胞。這種幹細胞的增生及分化能力和胚胎幹細胞幾乎完全相同，而且因為它可以為每個人量身訂做，所以不會有排斥問題，在倫理上也無爭議。誘導式多能性幹細胞是未來的希望所在，每個人都可以訂做自己的誘導式多能性幹細胞，只要接受簡單的皮膚切片或口腔黏膜抹片取得體細胞，再交給實驗室來製造誘導式多能性幹細胞即可。目前在臨床運用上最大的困難點在於誘導式幹細胞加入的基因中含有畸胎瘤的基因，因此實際應用於臨床疾病之治療仍有其限制性。誘導式幹細胞分化至心肌細胞，如前述，誘導式幹細胞可以如同幹細胞分化成各種不同的體細胞，在 Shinya Yamanaka 教授先前的研究可以由胚胎幹細胞成功的在體外分化成心血管細胞，經由培養出 FIK1 cell 後再成功的將此種心血管細胞的原型細胞培養分化各種新血細胞的體細胞。同樣的 Shinya Yamanaka 教授團隊利用四種基因的加入(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc)，可以讓老鼠的體細胞成功的分化成誘導式幹細胞。在 2008 年，此團隊也利用誘導式幹細胞，純化後利用二度空間的培養成功地先將誘導式幹細胞轉化為 FIK1 cell，然後再純化培養成各種的心肌細胞。同樣的，在世界上各個團隊，也成

功的由人類的表皮纖維細胞，可以利用相同的方式培養出誘導式幹細胞，經由相同的模式，而可以培養成心肌或者血管細胞，經研究證實培養出的心肌細胞具有原本宿主的特性，也可以針對培養出的心肌細胞做特定的藥物研究及發展。然而在台灣有關這方面的技術著墨仍然不夠，和臨床疾病的結合更是頗為不足。美國史丹佛幹細胞中心是世界首屈一指的研究中心，近年來在轉化心肌細胞研究上有重大的突破，臨床上發表許多重要的文章，更是世界研究心肌轉化幹細胞的先驅。誘導式幹細胞分化至心肌細胞後的臨床運用價值與重要性，目前此平台已廣為運用，但是仍在發展階段，臨床上可以測量電生理的反應，不用透過侵入性的技術，直接反應了病患體內心臟的電離子通道情況，在臨床上運用可以做為新藥開發的平台，唯在國內的發展仍有限，需要進一步的進修方能與國外接軌。

史丹佛的誘導性幹細胞中心由心血管中心主任 Joseph Wu 所領導，是世界首屈一指的誘導性幹細胞中心，實驗團隊完整，大約由 40~50 名 post-doctor 所組成，分成三部分實驗室，和國內的實驗室比起來規模大的許多，所以不同的實驗，比如電生理研究，動物實驗，基因修改重組技術，都有專門的博士後研究專精，可以輕易地找到研究上面可以指導的對象。我到實驗室以後所負責的實驗主要是接續之前博士後研究所未完成的研究，是使用誘導性幹細胞分化成內皮細胞，接著確定內皮細胞的生長順利後，再加上最新型的抗血糖藥物，證明這樣的藥物可以改善內皮細胞的功能，同時測定 RNA 基因的變化，找出可能影響的 RNA 基因，接著研究可能影響的機轉。之前的研究已經證明特定的 SGLT2 藥物可以改善誘導性幹細胞所分化的內皮細胞功能。我來到實驗室之後使用三株正常人的誘導性幹細

胞分別分化成內皮細胞，接著用此內皮細胞來確立高血糖的環境之下，藥物確實可以改善內皮細胞的功能



如圖，確立內皮細胞的生長受到藥物的改善，然後去定序內皮細胞影響的基因序列，跟實驗室的前輩討論，確立影響的基因是 Nostrin 基因，作為 target，這個基因主要是透過發炎反應的機轉去影響下游的 TNF-alpha system 來影響發炎反應的進行，合理的假說是透過抑制發炎，改善內皮細胞的功能，因此我們也研究加入這個藥物→ Nostrin 基因的活化→影響 eNOS 功能這樣的機轉，目前已有初步的結果，有待後續的研究進行，整理資料，發表當中。實驗室和台灣主要的差別在於不強調工作時間，比較自由，提供大家互相自由討論發揮的空間，因為規模遠較於台灣的實驗室大，各項器材資源充足，也有前輩可以提供合適的指導，腦力激盪下自然容易完成較完整的研究，史丹佛大學環境優美，校園寬廣，實驗室恰巧在醫院旁邊，比鄰購物中心，在優美的環境中學習，讓人工作效率反而出奇的高。

(1) 誘導性心肌細胞作為藥物開發的平台。

我同時間的計畫也進行了誘導性心肌細胞作為藥物測試平台的計畫，這個計畫是後來我逐步熟悉各項儀器操作，細胞的研究，培養之後才開始進行的，作為熟悉一個完整的實驗，了解為什麼可以發表在高分的雜誌上面是一個很好的案例，也透過這樣的學習，讓我了解了別人的長處，回國後可以設計更完整的實驗，同時繼續和原本的實驗室交流合作，以完成更進一步，更優秀的實驗，本實驗的理念大致如下。FDA 在 2019 年公布了訊息，停止 Amgen 公司對於旗下藥物 AMG176 的研究，這是一個 MCL 抑制劑，可以透過 MCL 受體的抑制，影響細胞的分裂，對於血液的癌症控制有顯著的療效，作為合併治療已成功地發表在自然期刊，證明特殊的效果，但是在初步的人體動物實驗上面，卻發現會引起胚胎，成鼠的心臟細胞受損，死亡。在人類的研究並沒有看到這樣的現象，可能實驗進行的時間不夠久。在本實驗室的好處就是可以透過這樣的資訊，大家腦力激盪，想出可以做出甚麼樣的研究幫助進一步醫療的發展，不只是進行基礎研究，同時間也直接想到日後如何在臨床上面接軌醫療。本研究的設計希望可以先將對照組的誘導性幹細胞培養成心肌細胞，接著分成兩組，加入藥物與不加入藥物比較，首先確立藥物的確會影響到心臟的收縮功能，接著進行保護機轉的研究，初步加入一些現行已知可以改善心衰竭的藥物比如 SGLT2 抑制劑，ACE 抑制劑等，觀察細胞改善的程度，進一步可以進行基因修正，改變基因的序列，觀察是否找到獨特保護的基因，這樣的研究正可以應用到臨床，可以改變病人臨床上可能因為使用藥物發生的併發症。

Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Sat	Sun
Day0	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6
Mesoderm Differentiation		Recovery	Cardiac Mesoderm Specification		Recovery	
Wash/CHIR		minus insulin	IWR		minus insulin	
2 ml		2 ml	2 ml		2 ml	
CHIR-99021 (GSK3 inhibitor, stock 10mM)			IWR1 (10 mM stock in DMSO)			
8 uM (4-10)			5 uM			
③minus ins		③minus ins	③minus ins		③minus ins	

Day7	Day8	Day9	Day10	Day11	Day12	Day13
Completion & Propagation					1st Purification	
plus insulin		plus insulin		plus insulin	minus Glucose	
2 ml		3 ml		3 ml	3 ml	
④plus ins		④plus ins		④plus ins	⑤minus Glu	

Day14	Day15	Day16	Day17	Day18	Day19	Day20
		Recovery		Replate	2nd Purification	
minus Glucose		plus insulin		plus insulin	minus Glucose	
3 ml		3 ml		3 ml	3 ml	
⑤minus Glu		④plus ins		④plus ins	④plus ins	

Day21	Day22	Day23	Day24	Day25	Day26	Day27
		Recovery		Replate	Recovery	
minus Glucose		plus insulin		plus insulin	plus insulin	
3 ml		3 ml		3 ml	3 ml	
⑤minus Glu		④plus ins		④plus ins	④plus ins	

以上是我們培養心肌細胞的流程，大約一個月會有一個世代的心肌細胞可以培養

出來，跳動的心肌細胞可供將來的實驗使用，所以三個月一個流程，大概可以測

試一批細胞，目前也仍在測試之中，回國以後將持續進行研究。

### (3) 運動性心肺功能與藥物研究 --- 梅約診所參訪

在國內的時候我們已經開始進行亞洲首例的隨機分派臨床試驗，研究藥物對於運動性心肺功能的影響，後來投稿也順利的投稿上，但深深感覺研究當中仍有許多需要加強補足的部分，因此利用這次的美國行，自行向美國梅約診所的 Professor Borlaug 教授提出申請，前往該診所參訪，梅約診所位於明尼蘇達州，距離雙子城約一個半小時車程的城市，我前往參訪一個禮拜，深深的被醫院的宏偉所吸引。



同時間我也學習了運動生理學方面如何進行標準，精準的研究



如上圖的機器，我們也在我們的實驗室設置了，同時也在我回國之後已經開始類似的研究進行了約十例。精益求精，可大幅的改善我們研究的精準度

### 3. 出國心得

#### 回國發展方向

(1)可以將人類體細胞簡單有效率的培養成誘導式幹細胞，此技術在各個實驗室有不同的做法，史丹佛實驗室是世界上首屈一指將體細胞培養出誘導式幹細胞的研究中心，其研究有獨到之處，已學習到其培養的技巧，將回國發展。(2)研究合適的環境讓誘導式幹細胞成為心肌細胞，本實驗室著重在心肌細胞離子通道的研究與機轉，目前研究的平台主要為動物及細胞為主，缺乏人體的心肌細胞研究，人類心肌細胞取得不易，透過誘導式幹細胞的培養，可以得到真正近似人類組織之心肌細胞。(3)研究客製化培養成功的心肌細胞之特性應用於基礎研究。此為本次出國研習最重要的目的，結合誘導式幹細胞培養的技術，與目前本實驗室之發展，而可突破目前的瓶頸。學習到：人類體細胞（包括最新以抽血的方式及可以完成）→誘導式幹細胞 →心臟血管細胞。整體的培養技巧及實驗方法。回國之後與本實驗室目前進行的實驗結合，取得特殊病患(如 Brugada syndrome，diastolic heart failure)之病患的皮膚檢體，培養為誘導式幹細胞後，再轉化為心肌細胞，研究特殊的離子通道改變，而能試驗新的藥物或者是治療方式對於離子通道的治療性及影響，同時更可以有所突破，進行臨床心臟衰竭嚴重病患之新治療方法的嘗試。

#### 個人研修所學與將來工作之關係。

目前臨床的照護病患以心律不整及心臟衰竭病患為主，在舒張性心衰竭之病患，

目前仍未有好的藥物與治療方式。本次進修研究，希望可以學習到的技術如下：人類體細胞(或者血液檢體) → 誘導式幹細胞 → 心臟血管細胞。整體的培養技巧及實驗方法。回國之後與本實驗室目前進行的實驗結合，取得特殊病患(如 Brugada syndrome, diastolic heart failure)之病患的皮膚檢體，血液檢體，培養為誘導式幹細胞後，再轉化為心肌細胞，研究特殊的離子通道改變，而能試驗新的藥物或者是治療方式對於離子通道的治療性及影響。不僅可以和基礎的研究相結合，更可以應用到臨床病患的治療與新技術的開發。同時前往國外首屈一指的幹細胞中心，學習後續的研究方法，可以提升整體研究的品質，期能更加在臨床的照護方面可以轉譯基礎研究，提升照護的品質。

#### 4. 建議事項

(1) 改善實驗室環境，加強誘導性幹細胞 bank 的可近性。目前國內已經有誘導性幹細胞的服務，但是從抽血到幹細胞的產出仍要一段時間，而且不保證此幹細胞可以分化成心肌細胞，建議可以由 bank 方面輔助產出心肌細胞，這樣可以加速研究的進行。

(2) 提高運動性心肺功能檢查的可近性。目前運動時的心肺功能檢查已經是國內外必要的檢查項目，目前各國都廣泛地在進行，台灣只有我們醫院第一家引進，目前除了研究之外，更拿來做為臨床上重要的指標與治療病人的依據，可惜臨床醫師轉診率仍然偏低，應想辦法改變大家的想法，加強大家轉診來做檢查的意願，本院買了這台機器也不便宜，應該提高使用率。而且我們都已經學習熟悉技術，也更想和大家討論這樣的檢查確實可以幫助到很多的病患，再者這樣的檢查目前

並沒有健保的給付碼，所以臨床上面都是白做工，雖然提供了很良善專業診斷技術，也解開了病人疾病的生理機轉，更可以作為病人該做甚麼治療的指標，我們也花了時間力氣前往國外學習，買了一樣的機器，做更為精準的 protocol，可惜的是這麼專業的技術，健保沒有給付的碼，應該可以透過學會向健保局申請。