

出國報告（出國類別：進修）

經腦血管障蔽之特異性藥物傳輸

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名：蕭名彥

派赴國家：美國

出國期間：108年9月1日至109年8月31日

報告日期：109年9月8日

摘要

我出國進修原定期間為 108 年 9 月 1 日至 109 年 8 月 31 日，後因新冠肺炎疫情因素，提前於 109 年 8 月 3 日返臺，於杜克大學期間亦因疫情衝擊，實驗室暫時關閉而致部分計畫進度未能如期完成。我主要於杜克大學杜克大學機械工程學暨材料科學部(Mechanical Engineering and Materials Science, Duke University)進行研究，主要參與計畫如下：

1. 探討超音波活化 Piezo1 離子通道並引發胞內鈣離子反應(intracellular calcium response)之最佳脈衝長度(此為專業領域，僅以英文表示)
2. 超音波引發內皮細胞胞內鈣離子反應並改變細胞間通透度之研究
3. 利用 sonogenetics 進行非侵入性特異性神經迴路調控

本次進修借助杜克大學機械工程學暨材料科學部在工程基礎研究的專長，以細胞膜組實驗解構超音波與離子通道、細胞膜以至胞內訊息傳遞的交互作用，最大的價值在於釐清部分作用機轉，並找出超音波引發生物作用的最佳刺激參數。此研究成果開啟了以超音波選擇性調控中樞神經的可能性，未來將可能利用不同超音波刺激參數，特異性的活化或抑制某些神經迴路，達到更精準的治療目標。

目次

一、目的	1
二、過程	3
三、心得	11
四、建議事項	12

一、 目的

近年來愈來愈多研究指出非侵入性腦部刺激對於多種中樞神經疾病之療效。例如經顱磁刺激及電刺激可以改變腦神經的興奮性、調節神經重塑，進而促進腦中風或腦傷後之功能回復。經顱聚焦式超音波亦為非侵入式物理因子，並有更好的穿透力和空間解析度，具有局部腦部刺激的應用潛力，目前在神經醫學領域的兩大應用一為利用經顱聚焦式超音波打開腦血管屏障(blood – brain barrier, BBB)，二為以經顱聚焦式超音波做神經調控(Neuromodulation)，此技術將可能廣泛應用於許多重要的神經疾病的治療及病生理機轉研究。

腦血管屏障區隔了體循環及腦組織，對進入腦內的物質進行高度選擇性調控、保護腦部組織不受外來毒素傷害、維護組織恆定性，卻也因而使許多治療藥物不易進到腦組織，影響中樞神經疾病治療療效。以巴金森氏症為例，此疾病為最常見的神經退化性疾病之一，其核心的病理表現為中腦黑質緻密部(substantia nigra pars compacta)的神經元凋亡，造成紋狀體(striatum)多巴胺不足，進而造成黑質紋狀體多巴胺路徑(nigrostriatal dopaminergic pathway)功能不全而引發動作障礙。目前主要藥物治療是口服多巴胺類藥物，但口服多巴胺能穿透腦血管屏障比例極低，不僅限制了療效、也容易引發週邊的副作用。

因此，如何調控腦血管屏障開啟、以達到對許多中樞神經疾病更好的藥物治療效果，一直是重要醫學研究目標。目前將藥物送達中樞神經、並達到局部高濃度的方法有腦部局部注射以及腦血管局部注射高張溶液等；而較不具傷害性及具未來應用性的作法為使用超音波等非侵入性工具來開啟腦血管屏障。超音波同時具有局部精準調控及可逆性之優點，以巴金森氏症為例，多巴胺在不同的腦部區

塊也扮演不同的作用角色，治療時多巴胺濃度提高亦可能產生其他問題，因而理想的治療目標並非是讓整個腦區多巴胺濃度提高，而是希望可以選擇性的作用在缺乏多巴胺之病灶處。

再者，從神經調控的觀點出發，與巴金森氏症相關的基底核直接路徑(direct pathway) 的 D1 多巴胺受體和間接路徑(indirect pathway)的 D2 多巴胺受體分別扮演興奮性和抑制性的功能，而正常的動作調控須仰賴此兩路徑的調控及平衡，換言之，在未來的腦刺激或藥物治療考量上，也必須能特異性調控不同路徑的神經元以期能達到理想治療效果。

儘管已有許多研究證實超音波對中樞神經有局部興奮或抑制的效果，目前關於超音波是透過什麼機轉與中樞神經發生作用，以及超音波最佳刺激參數仍有待釐清。而過去以超音波開啟腦血管屏障之研究多合併超音波微氣泡顯影劑之使用，一般認為是超音波引起微氣泡之空穴效應(cavitation effect)而直接打開細胞間連結，然而近來的研究也指出超音波的機械力本身就可以引發細胞內訊息傳遞，進而調控內皮細胞收縮或減少細胞間緊密連接蛋白（Tight junction protein）表現。因此，本次進修目標為一、探索超音波如何與細胞膜上的機械力感應離子通道(Mechanosensitive ion channel)交互作用而引發後續鈣離子訊號傳遞，並找出已超音波引發細胞鈣離子訊號之最佳刺激參數。二、以腦血管障蔽細胞膜組探討超音波之機械力是否可以直接造成血管內皮細胞通透性下降。

本次進修成果有助熟悉未來研究中樞神經相關治療藥物的實驗模組，應用此技術於開發不具侵入性的中樞神經調控或給藥方法。在未來結合本部對物理因子的了解，發展理想的神經醫學新治療策略。

二、 過程

出國進修期間為 108 年 9 月 1 日至 109 年 8 月 3 日。原定期間為 108 年 9 月 1 日至 109 年 8 月 31 日，為提前準備熟悉環境並及時開始研究計畫，於 108 年 8 月 13 日抵達美國，於 8 月 23 日提前於杜克大學報到。後因新冠肺炎疫情因素，提前於 109 年 8 月 3 日返臺，以進行居家檢疫及自主健康管理。於杜克大學期間亦因疫情衝擊，實驗室暫時關閉而致部分計畫進度未能如期完成。

杜克大學建立於 1924 年，是世界頂尖大學之一，在 2020 全美大學排名第 10，其工程領域及商學院尤其知名。學校分為東西校區，東校區為大學部，西校區則主要為研究生。學風自由開放，校務運作靈活，跨領域合作蓬勃發展。我主要於杜克大學杜克大學機械工程學暨材料科學部(Mechanical Engineering and Materials Science, Duke University)進行研究，所屬實驗室(Pei Zhong's lab)主要專長領域有：

1. 超音波基因轉殖
2. 超音波空穴作用 (cavitation effect) 之機械及生物效應
3. 高能量聚焦超音波及免疫療法於癌症治療之應用
4. 震波碎石(shock wave lithotripsy)技術研發

實驗室近年主要研究為探討超音波及震波與生物體的交互作用，我主要參與計畫如下：

4. 探討超音波活化 Piezo1 離子通道並引發胞內鈣離子反應(intracellular calcium response)之最佳脈衝長度(此為專業領域，僅以英文表示)
5. 超音波引發內皮細胞胞內鈣離子反應並改變細胞間通透度之研究
6. 利用 sonogenetics 進行非侵入性特異性神經迴路調控(此為專業領域，僅以

英文表示)

各研究計畫及成果分述如下：

1. 探討超音波活化 Piezo1 離子通道並引發胞內鈣離子反應(intracellular calcium response)之最佳脈衝長度(此為專業領域，僅以英文表示)

Piezo1 是廣部於人體各組織的機械力感應離子通道，主要功能為偵測剪應力 (shear stress)，於神經、心血管、骨關節等系統之生長分化及訊息傳遞有關。對於機械力之感應有高等異性及敏感性。

我們的研究以 interdigital transducer(IDT)為架構，利用垂直放置 IDT 產生表面波 (surface acoustic wave)，稱之為 vertically deployed surface acoustic wave (VD-SAW)。研究發現，VD-SAW 所引發的胞內鈣離子反應及細胞反應率與 VD-SAW 的剪應力強度有關，剪應力強度愈強引發的鈣離子反應也愈強，但超過 $50(\text{dyne}/\text{cm}^2)$ 會顯著增加細胞穿孔或脫附的機會(圖 1)。此外，VD-SAW 脈衝長度也顯著影響胞內鈣離子反應及細胞反應率，尤其在脈衝長度=20ms 能引發最明顯的反應(圖 2)。這兩個現象在 Piezo1 knockout 的細胞中明顯減少，顯示其機轉與 Piezo1 相關(此為專業領域，僅以英文表示)。

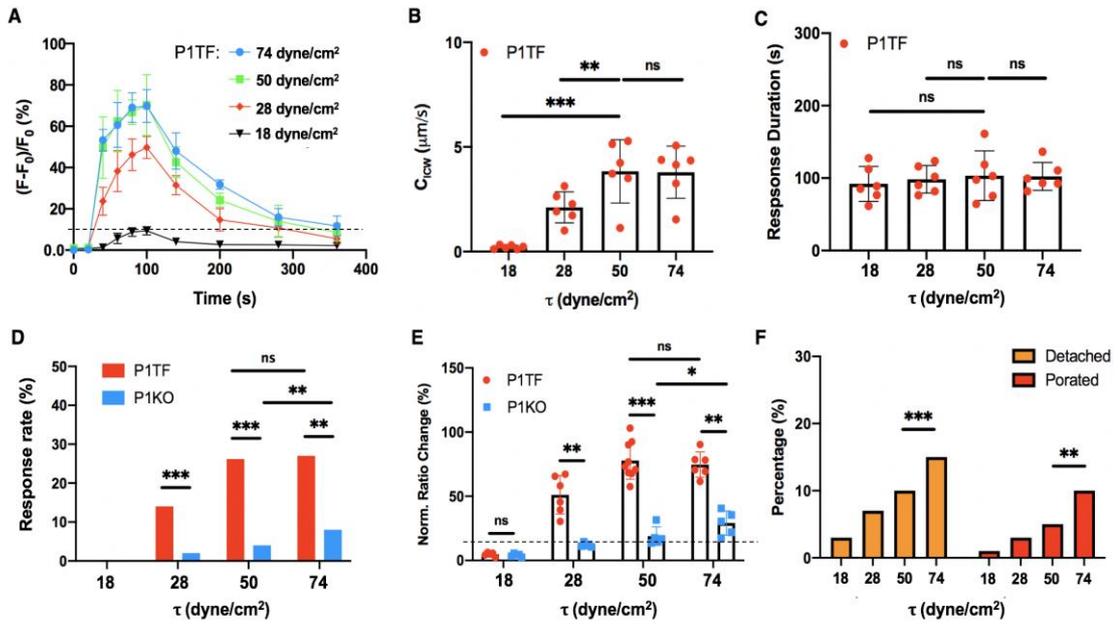


圖 1 胞內鈣離子反應及細胞反應率與超音波的剪應力之關係。

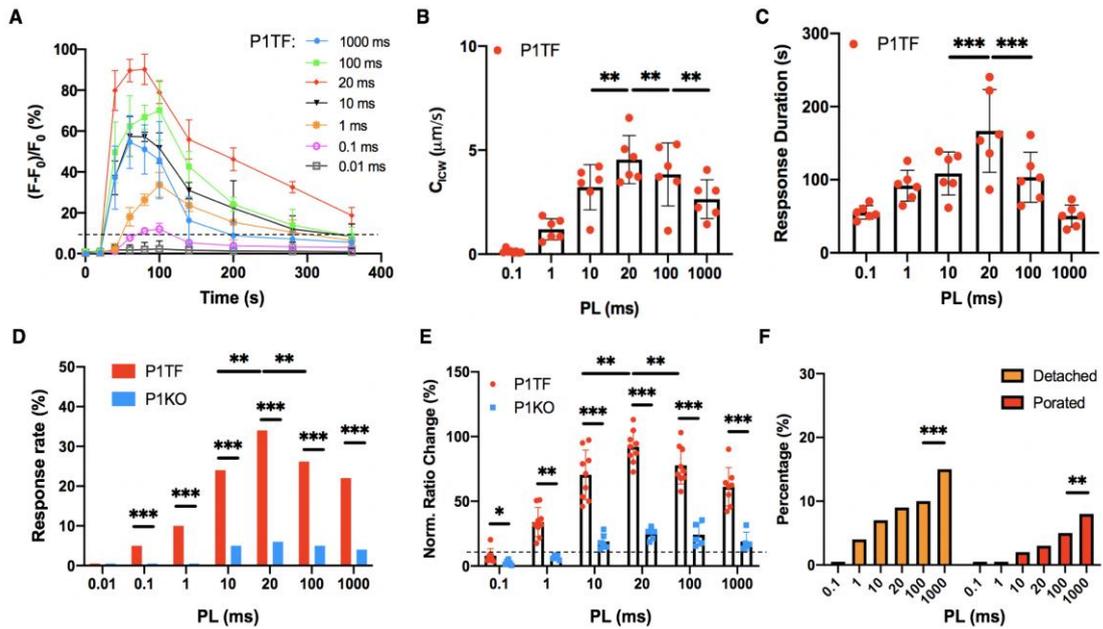


圖 2 胞內鈣離子反應及細胞反應率與超音波脈衝長度之關係。

進一步探討此現象機轉，我們發現 VD-SAW 剪應力引發細胞位移，在脈衝長

度=20ms 累積的細胞位移最大 (圖 3)。並且以位移對時間作積分得到的參數和脈衝長度有最佳關聯性 (圖 4)，因此細胞位移對時間作積分可能是一個評估超音波引發生物效應的指標。

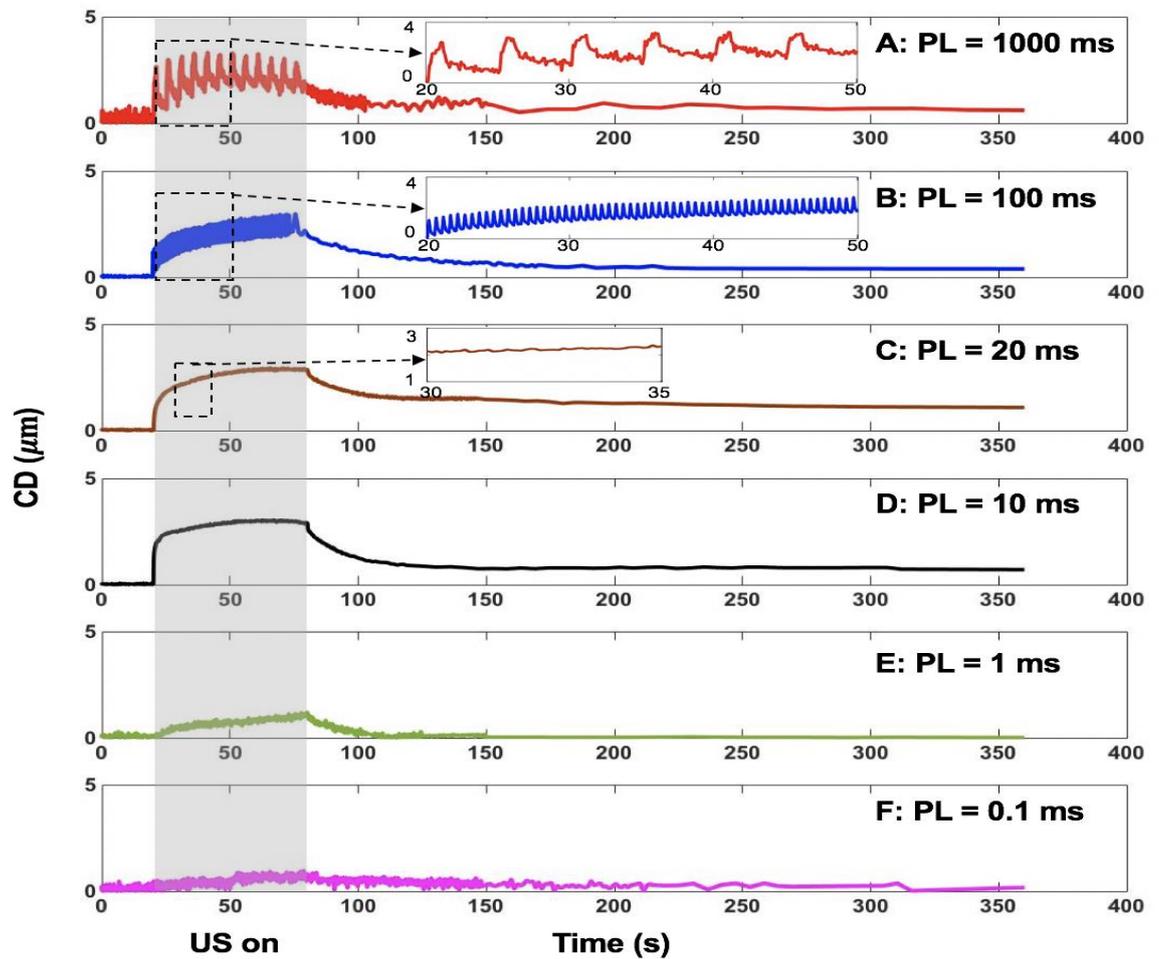


圖 3 細胞位移量與與超音波脈衝長度之關係。

最後我們以數學模擬證實對於脈衝長度的反應性與 Piezo1 離子通道特性相關，主要影響 Piezo1 由開放狀態進入不活化狀態的機率，而造成胞內鈣離子反應與脈衝長度相關之現象。

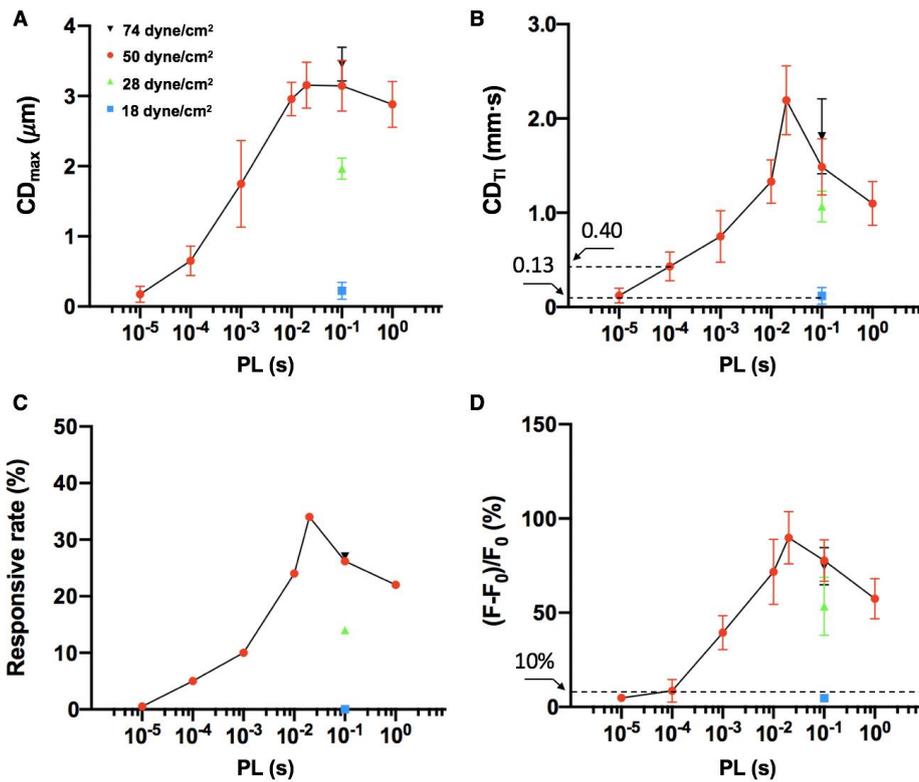


圖 4 脈衝長度與細胞瞬間最大位移量、時間積分位移量、反應率及鈣離子強度之關係。

2. 超音波引發內皮細胞胞內鈣離子反應並改變細胞間通透度之研究

以 VD-SAW 刺激培養的 hCMEC/D3 內皮細胞細胞株，觀察內皮細胞鈣離子反應以及細胞間鈣波的傳遞，並將內皮細胞培養於通透模培養盤(Transwell)，以觀察超音波刺激後電阻的變化 (圖 5)。

VD-SAW 刺激後可見胞內鈣離子反應經由細胞接觸面向周圍傳遞，逐漸形成線狀或網狀呈列細胞 (圖 6)。細胞膜吸附 RGD beads 可增加 VD-SAW 在細胞膜上的剪應力作用，實驗發現增加 VD-SAW 刺激強度或加入 RGD beads 的細胞有較多的細胞呈現胞內鈣離子反應，並有較多鈣波向外傳遞 (圖 7)。最後，以

通透模培養盤可測得內皮細胞在 VD-SAW 刺激後通透度明顯下降，且由刺激參數可歸因於超音波之機械效應（圖 8）。

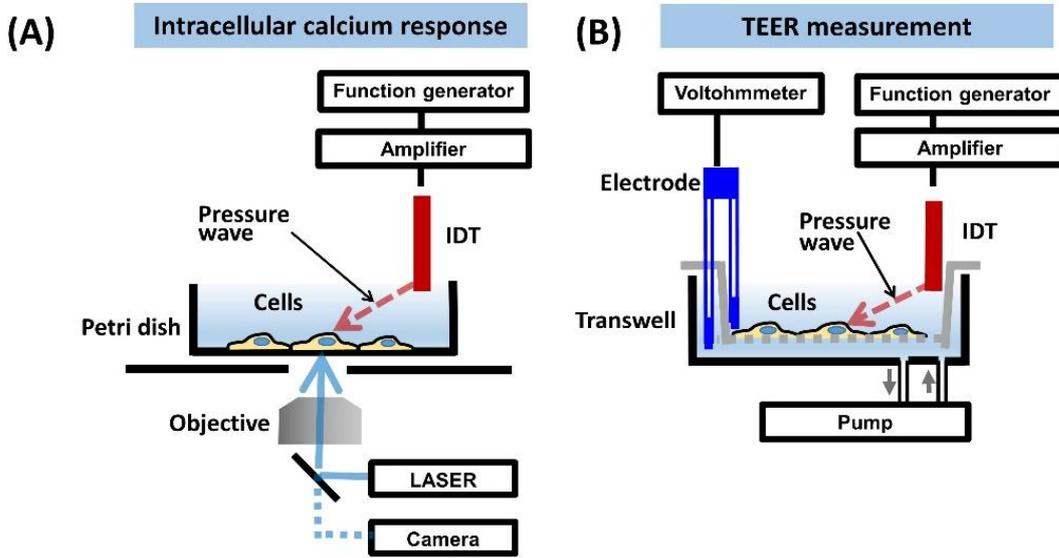


圖 5 量測超音波引發之內皮細胞胞內鈣離子反應及細胞間通透度變化。

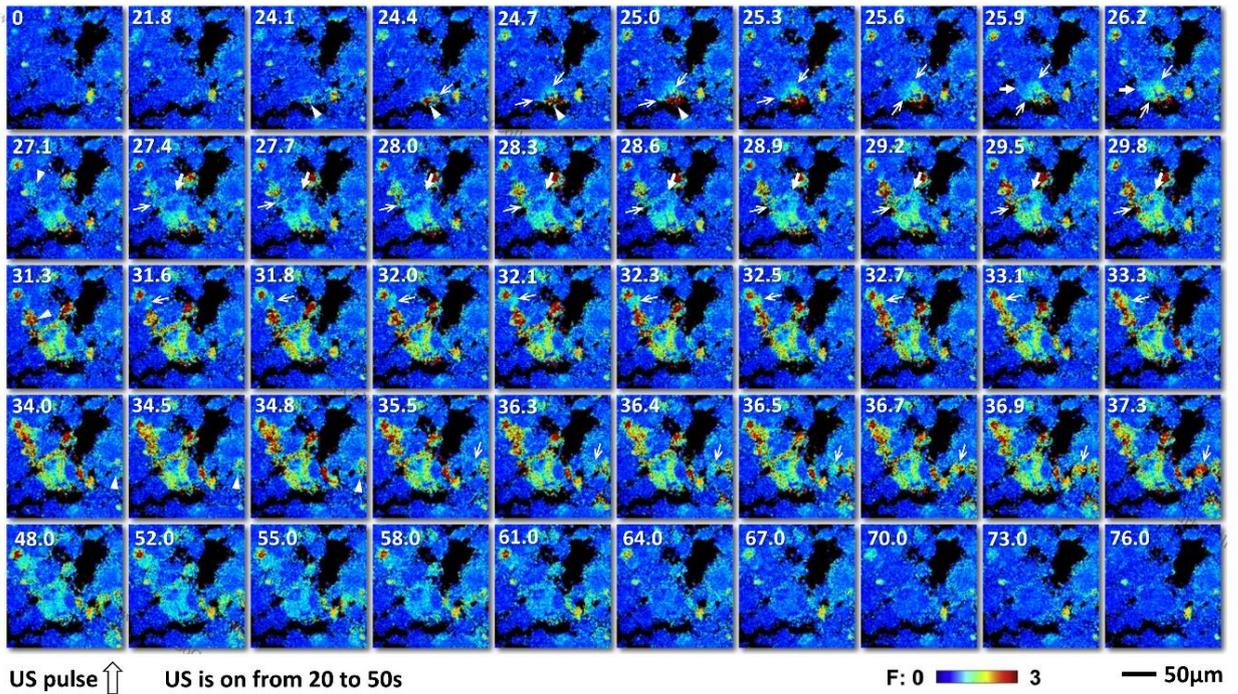


圖 6 超音波引發內皮細胞細胞間鈣波傳遞。

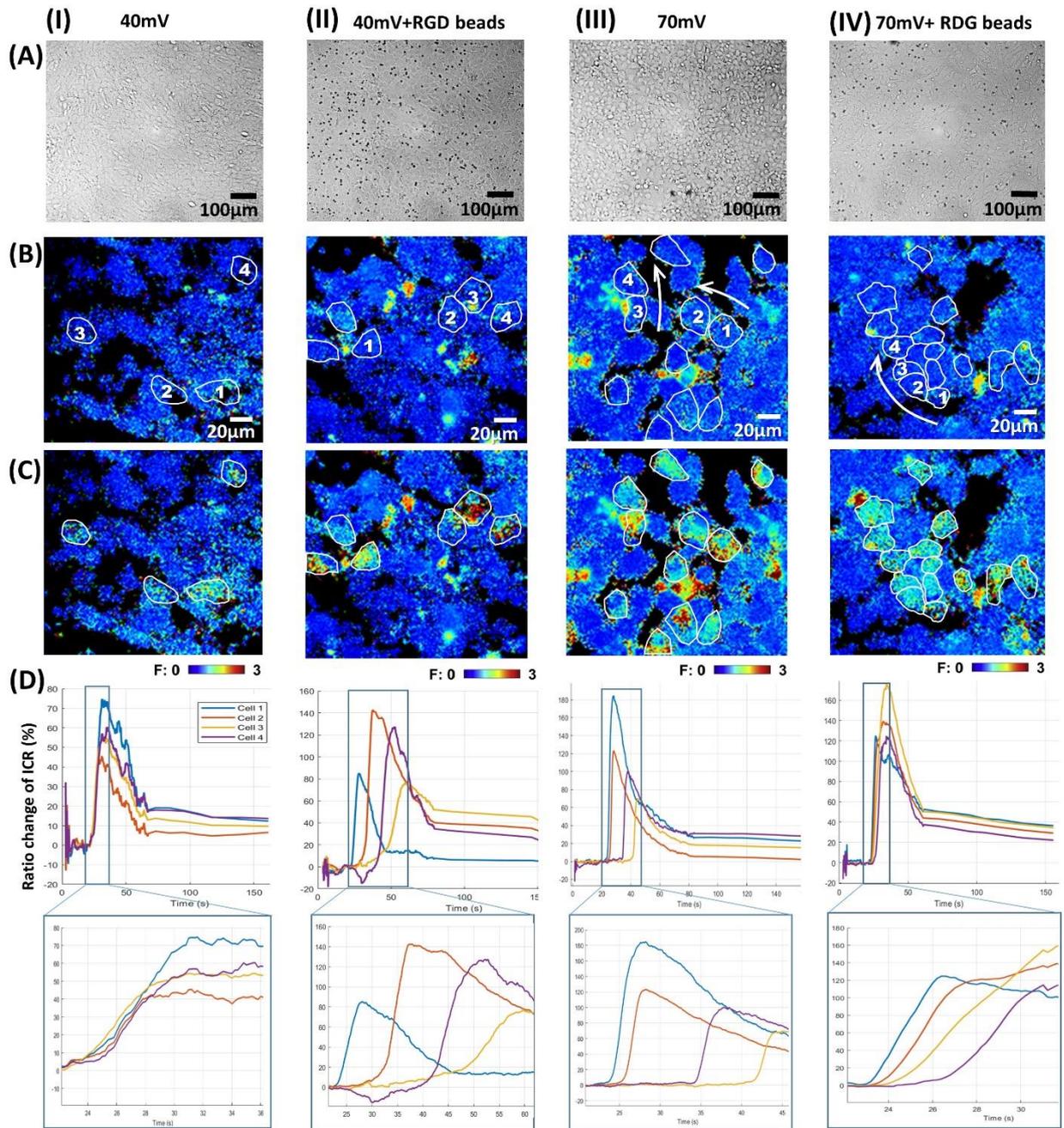


圖 7 不同超音波刺激強度以及使用細胞膜吸附 RGD beads 下，內皮細胞鈣離子反應(此為專業領域，僅以英文表示)。

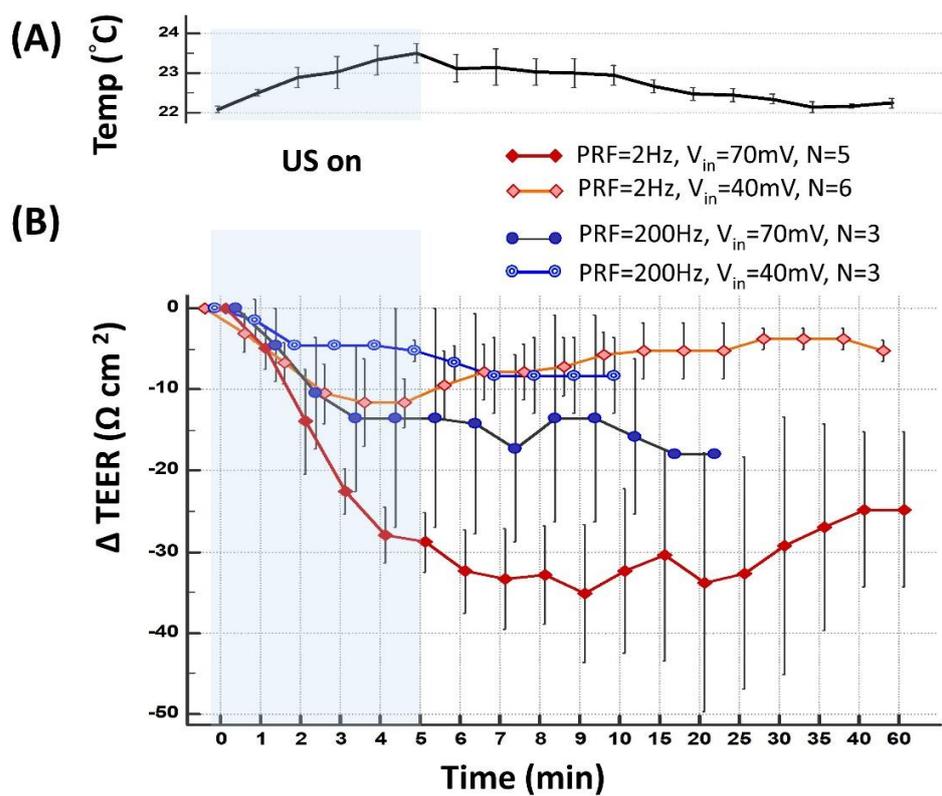


圖 8 超音波引發內皮細胞間通透度下降。

3. 利用 sonogenetics 進行非侵入性特異性神經迴路調控

由先前的研究計畫證實了以特殊超音波參數引發特定細胞反應的可能性，也開啟了用超音波進行特異性神經迴路調控的可能。原計畫以 Piezo1 病毒載體轉染紋狀體神經迴路，再以超音波進行選擇性神經調控。由於疫情影響，杜克大學研究室和病毒中心關閉，影響病毒載體製作進度，最終無法在進修期間完成。

三、心得

神經復健雖為復健領域發展歷史最久、也影響最深遠的領域，近年來復健醫學領域的神經疾病的治療上並無重大突破。雖有新的醫療科技諸如機器人輔助復健、穿顱磁刺激等的發展，大多的角色仍停留在研究階段，或僅能輔助傳統復健的進行。

治療用超音波過去幾年由骨關節系統疼痛治療轉向基因轉殖及神經刺激的相關應用，包含利用治療用超音波刺激組織產生增加細胞膜通透性及增加胞飲作用等影響，以輔助藥物遞送。近來研究超音波對中樞神經的刺激及調控成為顯學，各種動物實驗及人體實驗都在蓬勃進行。本部實驗室在基礎研究上探討物理因子如超音波輔助藥物遞送及基因轉殖已有一定基礎，並踏入以超音波及震波打開腦血管障蔽之相關領域，但在超音波/震波對中樞神經的作用以及在疾病模組的應用研究上仍顯不足，關鍵原因在於究竟超音波是透過什麼機轉與中樞神經發生作用，以及超音波對中樞神經的最佳刺激參數目前仍未明朗。

本次進修借助杜克大學機械工程學暨材料科學部在工程基礎研究的專長，以細胞膜組實驗解構超音波與離子通道、細胞膜以至胞內訊息傳遞的交互作用，最大的價值在於釐清部分作用機轉，並找出超音波引發生物作用的最佳刺激參數。此研究成果開啟了以超音波選擇性調控中樞神經的可能性，未來將可能利用不同超音波刺激參數，特異性的活化或抑制某些神經迴路，達到更精準的治療目標。加以超音波具備全腦穿透力及優良空間解析度，是非侵入式腦刺激的首選，未來在神經醫學深具潛力。

四、 建議事項

臨床上神經復健的領域包含急性中樞神經損傷(如中風、腦外傷及多發性硬化症等)、急慢性周邊神經病變、慢性退化性神經病變(如巴金森氏症及阿茲海默症)、原發性腦瘤或中樞神經腫瘤轉移、腦部感染等疾病。這些神經疾病大多在目前並無有效的治療方法，僅能做症狀控制，或延緩疾病進程。以常見的中風或腦外傷為例，神經損傷固然在發病之初期短時間內便決定，次發的傷害例如缺血-再灌注傷害 (ischemia-reperfusion injury)、神經興奮性毒性(excitotoxicity)及病灶水腫產生周邊壓迫等問題，卻可能經由神經調控或藥物治療得到改善。在退化性中樞神經病變(如巴金森氏症及阿茲海默症)目前也缺乏理想治療藥物，僅能做症狀控制、延緩病情惡化。腦瘤雖有不少具療效的潛在藥物，許多都面臨腦血管障蔽穿透不佳，或是選擇性不夠的問題。這些治療上的問題，共同的挑戰便是如何進行有效的中樞神經調控或經腦血管障蔽藥物傳輸，並能選擇性的作用在特定標的細胞。

為了深化超音波神經調控的研究，將來應先由巨觀至微觀，從受體、離子通道、細胞膜、細胞骨架等次單元著手來深入了解超音波物理特性及所引發之生物效應。瞭解作用機轉並確認超音波調控神經的關鍵因子後，下一步是思考神經醫學臨床需求，建立疾病模型，以探索中樞神經疾病的之藥物治療或神經調控，開發不具侵入性的專一性治療方法。本部下一階段的發展重點，應著重神經疾病神經調控或藥物治療之轉譯研究，先建立基礎研究工具及平臺，進而應用於新治療方式的開發。