出國報告(出國類別:進修)

哈佛大學附設加斯林糖尿病中心 (Joslin Diabetes Center)之 學習報告

服務機關:國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱:吳文冬、上尉藥劑官

派赴國家/地區:美國/波士頓

出國期間:110 年10 月1 日至111 年3 月31 日

報告日期:111 年 4 月 6 日

摘要

職日常工作及任務為臨床藥學相關,研究所所學內容為健康資料分析,有感於 近期藥物研發及臨床應用飛快,實在想前往相關研究機構學習一探究竟。感謝 部內及新陳代謝科幫忙,聯繫上美國麻州波士頓哈佛大學附設加斯林糖尿病中 心(Joslin Diabetes Center)的曾玉華老師並在其同意之下於民國110 年10月1 日出國前往該研究中心。雖然於出國前就有多方了解該實驗室的研究內容,但 一到以後發現原來實驗室的研究廣度及深度已非我想像。在一邊大量閱讀及曾 老師指定博士後研究員帶我做相關實驗以後,逐漸了解脂肪這個「新內分泌器 官」的「宇宙」。令我訝異的是,基因編輯的應用居然已經應用到新陳代謝, 以及胰島素抗性對臨床疾病影響之深。加斯林每週五的實驗室聯合會議以及每 週二臨床報告,更是讓我收穫良多。從臨床走入實驗室,同時又從實驗室延伸 到臨床應用,讓我了解日新月異研發科技以及在臨床用不同角度看到疾病治療。

關鍵詞: 新陳代謝 胰島素抗性 基礎實驗 臨床醫療 數據分析

目錄

壹、	前言	. 4
貳、	研究目的	.5
參、	研究過程	.6
肆、	研究心得與建議	13

壹、 前言

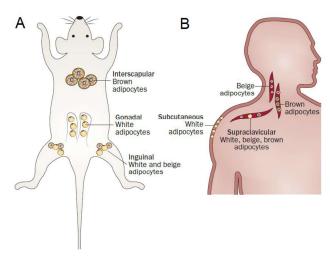
自職畢業後且於臨床任職以來,臨床治療的發展飛速,更甚者已經改變過去在大學時期所學已經臨床實習所接觸到的。像是抗病毒藥物的研發-過去病毒性肝炎的治療為干擾素為主,因冗長的治療時間以及難以忍受的副作用故治療效果僅約百分之七十,然近期相關口服抗病毒藥物可將治療成功率調升近百分之九十九,且治療期程相對快速。另外,在臨床上第二型糖尿病(以下簡稱糖尿病)的治療可謂重中之重,因為其後續併發症慢性腎臟病及腎衰竭之盛行率在台灣總是居高不下,近期藥事照顧給付亦首納慢性腎臟病。而糖尿病治療藥物發展亦是有劃時代的進展,過往治療除了Metformin以外,就是想辦法使多分泌一點胰島素或者直接注射胰島素,但這種治療就是隨著治療近行病人的體重上升而治療效果下降。直至近期一些SGLT2抑制劑及DPP4抑制劑的問世,除降血糖的效果以外同時可控制病人體重,更重要的是這些藥在臨床上還有其他對病人有益的效果,也許答案就是脂肪細胞,甚至被稱為新的內分泌器官,了解脂肪細胞和胰島素抗性之間的關係以及胰島素抗性與其他慢性疾病的關係可以讓我們在臨床上的藥物選擇上有更佳的選項。

貳、 研究目的

Adipose tissue 脂肪組織被稱為是新的內分泌器官,對新陳代謝的調節扮演著非常重要的角色,目前 Tseng lab 研究重點就是脂肪組織的對葡萄糖代謝、前驅細胞分化等。因為人體樣本需透過手術方可取得來之不易,發展更方便的無論是儀器測量或者生物標記,都是相當重要的課題。且目前激活棕色脂肪組織 (Brown adipose tissue)的手段為 cold exposed、基因編輯及某些特定藥物,希望可以將實驗室發現與脂肪組織激活相關標的應用到臨床上,也就是開發出相關治療途徑也是實驗室很重要的發展目標。

參、 研究過程

因為疫情的關係,加斯林糖尿病中心滾動式調整其防疫政策,雖然美國政府沒 有要求抵達美國後要做任何強制隔離,然加斯林糖尿病中心要求抵達後不可立 即報到需等待 5-6 天後自行完成快篩陰性以後方可報到。報到後,曾教授指派 一位巴西籍的 Henrique 博士後研究員指導我並且告知需在實驗室學術會議上報 告我自己的研究。一開始 Henrique 博士花了一點時間和我討論我的研究經驗以 及對哪個實驗比較有興趣,因為他手上有好幾個實驗要進行,於是我開始閱讀 Henrique 博士建議的相關文章。之前在台灣的研究經驗-生物統計這時後就派 上用場了,我發現某一篇文章的某一個 summary 似乎不是那麼正確,我和 Henrique 博士討論後請他提供原始數據給我(我才知道原來科學雜誌都會有 supplementary data),結果發現果然有出入,我想這個會有如此結果的原因是 受試者參加實驗,假設我們知道對像是糖尿病患,那個他有很大的可能性接受 過治療使用過藥物,這時候就不能單單以生化數值判定是否為糖尿病患,因為 生化數值已經因為治療而改變。雖然出發前就已經開始閱讀相關脂肪細胞與新 陳代謝的文章,了解棕色細胞(brown adipocyte,BAT)和白色細胞(White adipocyte, WAT)的差異,但是讀了文章以後感覺非常混亂,因為現今研究發展 已經到了白色細胞還要在細分-米色細胞(beige),其介於BAT和WAT之間。此 時我真的覺得理解困難,閱讀文章同時 Henrique 博士和另一位博士生會邀請我 去觀摩他們的實驗,當然也是看得一頭霧水,好在他們了解我的困惑以後立刻 提供一篇文章讓我閱讀,我才了解到原來 BAT 是負責產生能量相對應的老鼠解 剖位置為頸後方:WAT 是儲能的脂肪相對應老鼠解剖位置的地方為腹部臟器 外:Beige 是經低溫或者促產能的物值刺激後會轉化程 BAT 產生能量的脂肪,相 對應老鼠解剖位置為鼠蹊部,也是現在脂肪細胞相關研究一開始會拿來檢視。



(圖一 影響代謝的脂肪組織分布 Alexandra Paul et al,2018) 在我閱讀的過程,其中有一篇的主角令我相當感到有興趣-12,13-Dihome。這篇 文章是 Tseng lab 於 2019 年發表在權威期刊 Nature Medicine,首先此文章一

解我先前心中的疑惑「研究的起源」,此篇文章研究的起源是幾乎把全部已知的脂肪酸代謝物拿來比較,進而發現 12,13-Di home 可以促脂肪酸進入 BAT 而引發一系列的產能代謝反應。文章也提到如果把 12,13-Di home 再次注入實驗的老鼠體內,也可以促進血糖及血脂等代謝,這讓我聯想到臨床上已經被廣為應用的「高濃度血小板血漿」療法,一樣都是人體中原有的物質且具治療效果及極低的副作用。再者如圖一,人體的 BAT 取得相當不易(都要經由手術取得),如果有血液的生物檢驗值可以代表 BAT 的活性,那麼研究就可以更接進臨床應用。此文章發表後的隔年,立刻有其他學者發表關於 12,13-Di home 的大量人體樣本的報告,需知自願受試者取得不易,那為何該研究還有上千樣本?答案是來自某個生物人體資料庫,取得該資料庫之數據及檢體,現今台灣生物人體資料庫甫收案達 22 萬餘人,相關研究方興未艾。此外,因此啟發我開始針對生物人體資料庫閱讀,發現生物人體資料庫另一特點全基因資料及研究方法孟德爾分析,已經有許多心臟血管方面的文章。

石蠟組織切片

實驗室有許多實驗同步進行,和 Henrique 博士討論後也覺得應該一邊閱讀一邊實驗相輔相成。例如石蠟組織切片,這個實驗結果通常都是每一篇脂肪組織相關實驗文章的第一個結果,檢查 BAT 或 ingWAT 有沒有被激活(browning),通常是取得實驗鼠的組織並以液態氦急速冷凍後以石蠟包覆,而後切片進行觀察,而此實驗較簡易但耗時,所以實驗室的負責人及 Henrique 博士決定讓我由此實驗開始,此實驗讓我了解到如何了解相關文章作者想表達什麼,記得還沒開始接觸此實驗之前,實在有點難以理解文章中此部分。且此切片技術雖非很新的實驗技術,但需要累積實驗經驗,記得一開始第一次作整整花了兩個下午才完成所有切片,且組織樣本取得不易,若無法再有限的組織理完成切片,可能就白白犧牲老鼠了。



圖二、操作液體石蠟脂肪組織切片

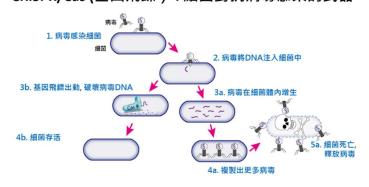


圖三、承上,清洗脂肪組織玻片製作樣本

CRIPSR 基因編輯技術

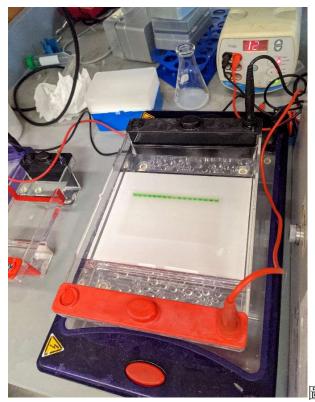
CRIPSR 為一種近年新興的基因編輯技術,不論在實驗室研究或者臨床治療上(已有成功治療罕見疾病的例子)都被很看好,甚至被稱為 2022 不可不瞭解的新興科技技術。實驗室先前就有使用 CRIPSR 技術來研究哪些基因序列可以控制前驅細胞分化成 BAT 或者 WAT,並且發表於轉譯醫學期刊 2020 至今已經有 30 餘次引用。Henrique 博士本身是遺傳學專家,他期中一項實驗就是利用 CRISPR技術來尋找如何催化某個實驗室發現的脂肪細胞控制因子,而他也決定讓我參與這一項研究。

CRISPR/Cas (基因飛鏢):細菌對抗病毒感染的武器

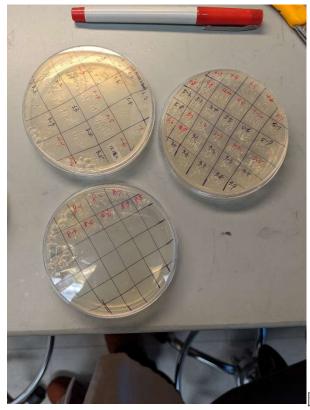


(圖四、CRIPSR 技術說明 資料來源:國家實驗研究院)

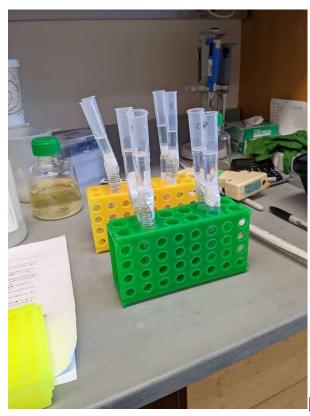
事實上在這之前,我幾乎是完全沒有相關實驗經驗的,真的很感謝 Henrique 博士相當相當有耐心的指導我,實驗過程相當冗長及辛苦,記得從借由病毒感染細菌來注入我們選擇的 DNA 到後段細胞培養來決定是哪一段序列具決定性,總共花了四個月的時間。過程中細菌培養、DNA 萃取及細胞培養,經由這些實驗步驟,一次比一次熟練,成果也不錯,更重要的是讓我更了解相關文章中各圖表作者所表達的意義,覺得對文獻的閱讀及得到的啟發更多。



圖五、DNA 電泳



圖六、利用細菌複製 DNA



圖七、破壞細菌取得 DNA

動物實驗

基本上動物實驗室老師實驗室的主力,當然還有搭配其他合作的研究人員的一些新穎的專長。加斯林糖尿病中心在 Dr. Kahn(2016 年 Wolf Prize in Medicine 得主)帶領下,已經有很成熟的糖尿病研究相關老鼠養殖及細胞培養技術。由於一開始研讀的資料很多都是沒實際操作過的實驗,導致有些地方無法理解作者想表達的意思,所以希望可以親自動手操作一次,因為 Henrique 博士要操作相關實驗的時候就會找我參與,例如老鼠血糖測定、藥物注射及氧氣消耗等。



圖八、麻醉老鼠準備注射藥物



(圖九、以熱能照像機測試基因鼠 BAT 活性) 每週研究室聯合學術會議及隔週研究室會議

每週學術聯合會議固定於週五上午舉辦,有兩位博士生或博士後研究員進行其研究報告並由多位人員進行單篇學術文章介紹。因為疫情的關係,3月前都是線上進行,這對剛到美國的我實在是一大福音,對於內容關鍵可以記錄後再行搜尋了解,同時可以對相關議題與藥物進一步地查詢相關文獻,對於專長是資料庫分析的我,有很大的啟發。同時這些議題和研究成果,對於我在臨床執業上,也是頗有助益。因為參與了幾週以後,發現其實實驗室的研究事實上也都是為了在臨床應用,從胰島素訊號傳遞、腸胃道菌叢及脂肪組織,其中脂肪組織被稱為新的內分泌器官(Novel endocrine organ),我開始思考為什麼?然後開始思考要如何激化他,再到激化它以後有何助益?然後很多博後都在講他的研就可以改善胰島素抗性,胰島素抗性的範圍這麼廣闊,臨床上用藥策略可以如何作調整?舉例來說,有一位博後分享一篇2021-2022間發表的文章指出新型降尿酸藥物-URAT1選擇性抑制劑可以有效抑制尿酸再回收並且降低胰島素抗性。這讓我思考到痛風也是代謝疾病的一種,如果抑制URAT1可以降低胰島素抗性,那麼降低胰島素抗性是否也可以降低痛風的風險?經查證果然有研究指出此關係為雙向性(Bidirectional),此結果與我早先健保資料庫所作結果亦符合。

實驗室亦安排了我兩次單篇文章報告及個人研究心得報告,第一篇報告主題為beta-3 促進劑與 rosigitazone 之間沒有加乘作用。第二篇主題是控制壽命長短的基因 GRHL1 與胰島素訊號傳遞有關,主要是因為 2022 實驗室第一場隔周會議討論到今年方向包含脂肪細胞與壽命及藥物篩選,我覺得此篇非常符合該方向且內容使用之篩選藥物方法非常值得學習,拜科學進步所賜基本上要找出可以活化某個蛋白質或基因的藥物已經不用自己製造一個新的化合物,可以從美國藥典裡面去作篩選,成本效益非常高。個人研究報告則是我報告了如何透過某些藥物活化 BAT 以後進而降低胰島素抗性來降低代謝疾病風險,用健保資料庫的資料來作一個風險測量。

肆、研究心得與建議

加斯林糖尿病研究中心事實上包含著廣泛的研究,其中更包含第一型糖尿病的 治療,過去在臨床上我本以為只有使用胰島素一途,然而當今研究方向為致力 於恢復胰島β細胞的功能,相信這是第一型糖尿病的曙光。而從在台灣準備出 發前往實驗室前,我就擬定方向為將相關概念結合到健保資料庫研究中。然而 一開始因為不熟悉該領域,制訂的目標和實驗設計都不對,導致無相關成果。 然而自從到了實驗室以後,在參與整個中心及實驗室的相關學術會議與 Henrique 博士的指導下,開始知道如何去正確找到自己設定的文章,並且經由 健保資料庫分析以後得到顯著結果。研究設計目的如下:事實上慢性疾病可視為 一種發炎反應,而胰島素抗性代表的就是發炎及氧化壓力(與許多慢性疾病相關 包括癌症),而激活 BAT 以後可以分泌一些脂聯素(adiponectin)可以藉由利 用游離脂肪酸來提升胰島素感受性(insulin sensitivity),同時降低心血管風 險。研究假設為如果可以藉由藥物激活 BAT 進而提升胰島素感受性,那就能降 低第二型糖尿病、痛風及心血管疾病等等。果然已有研究發現,某些臨床上面 常使用的藥物如某一種氫離子幫浦阳斷劑可促進 BAT 分化(激活的意思),與其 他種氫離子幫浦阻斷劑相比,確實有較低的慢性病風險且顯著(尚未發表),非 常符合現今臨床上努力的方向:個人化用藥。且經由閱讀其詳細機轉,其中有牽 涉到如骨質疏鬆症等風險(尚未發表)。先前的研究止步於例如某一種藥理作用 的藥物對某個疾病存在風險,但這代表全部的這類藥都該被禁止使用?我們應該 致力於找出最適合病人的藥物治療。

12.13-DHOME 與脂肪組織的關係是近年內實驗室一個很重大的發現,且此篇研 究係極少數包含人體試驗的實驗,因為人體組織取得不易導致相關研究多為動 物實驗。這篇文章讓我了解到此領域完整的研究包含動物實驗及人體試驗,其 中各組又細分為高度脂肪飲食及正常飲食(動物實驗)、代謝疾病患者與健康受 試者,尤其人體受試者的資料解讀更需小心。因為當我們收案代謝疾病患者 時,其應該都有接受過治療,所以單純作檢驗數值的分析是否會失真(文章中指 出 12.13-DHOME 與糖尿病狀態無關,但並未看到此關係的分析)?我將相關 12,13-DHOME 數值以收案時病人狀態是否為代謝疾病患者為區分作分析,似乎 得到與文章不同之答案,有趣的是在搜尋相關文獻後實驗室發表此結果以後立 刻有研究人員以生物資料庫作 12.13-DHOME 與代謝疾病的分析,是與代謝疾病 相關的。文章中有提到將 12,13-DHOME 注入實驗鼠中,亦可提升 BAT 的活性, 此結果立刻讓我聯想到近年新興的治療-高濃度而小板而漿(platelet-rich plasma, PRP), 極具臨床治療的潛力。其他學者近年亦指出 12,13-DHOME 對於 心血管疾病亦有相關下降風險的關係。這也激發了我一些研究的想法,此篇研 究一開始是用低溫環境去激活 BAT 然後測量 12,13-DHOME 的數值,那如果可以 激活 BAT 的藥物是否也可以提升 12.13-DHOME?藉以於臨床治療時找出嫡合有代 謝疾病或者相關風險病人最適合的藥物。

近期學者發現人體也有 Beta-3 receotor 先前很久的一段時間人體都被認為只有 Beta-1 及 Beta-2。實驗室亦有 beta-3 促進劑可以催化 BAT 活化的相關研究,只是當初使用的劑量遠大於臨床每日極量。但實驗中證明 Beta-3 與脂肪組織關係的方法不是使用藥物 Beta-blockers 來抑制 Beta receptor 而是使用 DNA 技術來關閉 Beta receptor,因為以前我們所稱的 Beta-blockers 有沒有包含 Beta-3 receotor?從 Beta receptors 的構造上來看是成分布狀而非聚合在一起,有可能不是每一個 Beta-blockers 都會抑制到三種受體,如果如此那以往困擾臨床的藥物治療問題-Beta-blockers 會提高第二型糖尿的的風險似乎有解,只要找出不會抑制 Beta-3 的藥物。另外近期有學者證明每日臨床劑量長期使用(約2個月)可以有效活化 BAT,同時其另一個研究卻與臨床上另一個活化BAT 的藥物無加乘作用,此現象與現在臨床糖尿病治療多為利用不同機轉的藥物有所出入。

最後感謝軍醫局及醫院長官能夠提供這個寶貴的機會讓我得以前往加斯林糖尿病研究中心進行六個月的學術之旅,這六個月中讓我了解到當今糖尿病最新的研究方向及獲得寶貴的相關實驗經驗。也感謝曾老師、Henrique博士及實驗室所有伙伴在如此忙碌的實驗生活中,依然非常有耐心地給予指導並且讓我真正動手參與相關實驗,獲益良多。也感謝部內安排於 4/21 日幹部會議與部內同仁分享相關研究心得。

建議在軍醫局及院內提供如此優渥之短修機會下,部內軍職同仁能夠善加利用此機會多多充實自我並尋求前往國外如哈佛大學醫學院這種世界頂尖的學術機構進修,亦不需局限於臨床藥學專業。如同剛報到時曾老師表示該實驗室講求的是國際化多樣化,接受多樣化的資訊洗禮可使單位多有助益。



圖十、獲頒結訓證明



圖十一、由實驗室主持人曾玉華教授頒發證書



圖十二、負責指導我的 Henrique 博士