

出國報告（出國類別：進修）

運用腸道微菌叢或生物標的協助監測 兒童慢性肝臟疾病的預後

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名職稱：張凱琪

派赴國家：美國

出國期間：111年9月1日至112年8月30日

報告日期：112年12月4日

摘要

職張凱琪於 2022 年 9 月 1 日至 2023 年 8 月 30 日，前往美國麻省總醫院 (Massachusetts General Hospital) 進修，學習利用腸道類器官等技術，用於研究腸道通黏膜通透性與監測腸滲漏(leaky gut)的發生。目的為延伸使用腸道類器官為平台，探討腸道微生物叢對於兒童相關腸胃肝膽疾病的影響。希望將眾多因子的相關路徑詳細釐清，對疾病的發生與治療提供更好的預測與治療。目前此技術在台灣有少數人員執行中，但不是非常普及；未來希望尋求團隊合作；繼續持續研究。

目次

壹. 目的	p.1
貳. 過程	p.1
參. 心得	p.3
肆. 建議事項	p.5
伍. 附件資料	p.6
陸. 參考資料	p.8

壹. 目的

學習腸道類器官的實驗方法，用於腸道微生物叢應用研究

貳. 過程

一、啟程

職張凱琪於 2021 年年底獲得教育部與醫院同意，贊助前往美國麻省總醫院 (Massachusetts General Hospital) 小兒部進修。預定的時間是 2022 年 9 月 1 日到 2023 年 8 月 30 日為止。由於先生也是台大醫師於同時期前往美國進修，地點也是麻省總醫院，因此全家包括兩個女兒也一起前往美國波士頓。2022 年 8 月中抵達當地後，安頓住宿處以及兩個小孩上學事宜後，於 9 月前往麻省總醫院報到。

二、實驗室介紹

我的實驗室主持人是 Alessio Fasano, MD，他是麻州總醫院小兒部肝膽腸胃與營養學次專科的主任，同時也是黏膜免疫和生物學研究中心 (Mucosal Immunology and Biology Research Center) 的負責人。他的專長是研究自體免疫影響腸道疾病的機轉，特別是麩質敏感性腸病 (celiac disease)，並且致力於研究各類疾病引發腸道黏膜脆弱並受損的機制，並探討其中相關的機轉；除了 celiac disease，其他可能誘發腸道黏膜發炎、破壞而演變成腸漏症 (leaky gut) 的疾病，例如發炎性腸道症候群 (inflammatory bowel disease, IBD)、新生兒壞死性腸炎 (necrotizing enterocolitis, NEC) 都是實驗室探索的目標。

我在台灣的研究，著重於探討腸道微生物叢影響兒童慢性肝病的相關議題，腸道微生物叢一旦出現變化，首當其衝第一接觸到的器官就是人類的腸道黏膜，因此，本次前往 Alessio Fasano 教授的實驗室，目的為學習腸道黏膜免疫相關機制與可以運用的技術，並且與相關人員多交流。

Fasano 教授的實驗室，有 2-3 位博士後研究員、數位研究助理，並且有許多合作的實驗室主持人 (principal investigator)。在臨床端也有多位研究護理師忙碌於門診與病房端、以及內視鏡室，協助病人收案與處理檢體。教授的研究範圍分兩端，一部分位於麻省總醫院的 Jackson building 14 樓，主要以臨床收案與業務為

主，並且有部分數據分析；另一部分為 Charlestown Navy yard 的黏膜免疫和生物學研究中心，位於波士頓另外遠離麻省總醫院、較邊陲一側，大部分基礎的研究皆集中在這裡。

我在台灣以臨床業務為主，過去較無實驗相關技術與背景，但經過面談，Fasano 教授了解我願意從基礎學起，因此讓我到 Navy yard 的研究大樓參與學習。

三、 研究項目

消化道的主要功能一般被認為侷限於營養素消化吸收，和穩定腸黏膜內外水分跟電解質的平衡。隨著越來越多人投入此領域研究與剖析，發現腸道有一個極重要的功能是調節環境(泛指腸腔內的物質)與宿主腸道細胞之間的分子物質傳遞。當與淋巴組織和神經內分泌系統合作，腸上皮屏障(intestinal epithelial barrier)利用它的細胞間緊密連結層(intercellular tight junction)控制著對於外來物的反應，無論是對於外來抗原保持耐受(tolerance)或是啟動免疫反應(immunity)，皆須維持在一定平衡內。Alessio 教授，是第一個闡述 zonulin 是參與物質傳遞與緊密連接層的一個重要生理調節器的學者。當個案發生 zonulin 功能失調，腸道的自體免疫疾病、發炎性疾病、甚至惡性腫瘤都可能發生。當 zonulin 出現功能受損，誘發病理狀況出現，我們稱之為腸滲漏(leaky gut)[1-3]。

過去為了研究 leaky gut，學者曾使用 animal model，但是在小動物身上發現的現象，無法全盤解釋人類個體可能出現的問題，畢竟為不同種類的生物。為了為了釐清腸道生理運作，與其誘發病理狀態下所出現的表現型，腸道類器官(intestinal organoid)被開發出來。

自從 2007 年在小鼠體內實驗證明帶有 Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) 的上皮細胞具有真正的腸道上皮幹細胞的特性後，腸道幹細胞的領域逐漸在這幾年在數個國家出現巨大的進步。其中一大突破為建立腸道外，類器官系統(Intestinal organoid)。

我加入的 Fasano 教授的子團隊，是運用建立兒童腸道類器官，研究益生菌對於維持腸道通透性與健全的影響。我合作與學習的博士後研究是來自義大利 San Gerardo 醫院的 Valentina Bozzetti MD, PhD. 她本人是一位新生兒科醫師，戮力於研究壞死性腸炎的治療方式，因此我加入她的研究團隊，學習建立兒童的腸道類器官系統。我們除了要從手術或從內視鏡取下的檢體，建立腸道類器官，我們也給予各種環境刺激(如益生菌過濾液、配方奶或母乳)，追蹤 organoid monolayer

的健全度(microscope 下有無 chicken wire 型態緊密生長)，以及各種 tight junction proteins 的基因表現(如 zonulin, occluding, claudin)，試圖探究其中影響因子。

我們發現早產兒的腸道比起足月新生兒，較不容易培養與建立起 intestinal organoid 系統。另外早產兒合併有壞死性腸炎的個案，要使用他們的手術檢體建立後續的體外的 intestinal organoid 系統又更加困難。在轉換為單層細胞(monolayer)後，會發現此類個案即使提供一樣的細胞所需介質(medium)，也無法成長成較緊密的結構。後續發現某項 tight junction protein 表現較弱有關，但此弱點在給予某特定配方後，似乎有所改善。

另外，嚴重疾病導致的腸炎，腸道幹細胞 (intestinal stem cell, ISC)是損傷的、並且缺乏的(ISC depletion)。研究發現特殊物質或營養成分的給予有助於腸道幹細胞的擴展增生。Wnt/ β -catenin signaling pathway 牽涉其中負責調控細胞的增生與穩定[4]，而這也是我們有興趣而加以研究的重點。Wnt ligands 由坐落在表皮細胞底層的 Paneth cell 與 stromal cell 分泌生成，一旦釋出後，Wnt ligands 會跟 low density lipoprotein receptor protein 5/6 (LRP 5/6) 結合，傳遞訊號到下游刺激 β -catenin 移動到細胞核中去啟動 transcription factor 4 (TCF 4)，進一步維持腸道幹細胞或表皮細胞的生成與維持。我們提出假說若外加 Wnt7 β 或許可以逆轉 Wnt/ β -catenin pathway 在受損腸道不足之處，有機會修補 intestinal epithelial cells，而我們測試的標的就是利用新生兒取下來的腸道衍生細胞，其中分為兩組，一組是取自嚴重腸炎的個案，並且外加 Wnt7 β (實驗組)，另一組則是取自同樣的個案，但未外加任何刺激物質(控制組)。我們發現當給予 Wnt7 β 於 monolayer basolateral side 持續 7 天，觀察到在 trans-epithelial electrical resistance (TEER)，一個量測 epithelial cell tight junction integrity 的測試，實驗組明顯高於控制組，證實 Wnt7 β 對於受損腸道的再生跟修補或許是有助益的。

由於我在台灣的研究，亦與腸道菌與腸黏膜變化相關。我希望未來應用我在麻州總醫院研究室所學習的技術，來增進與幫助我在台灣的研究。

參. 心得

在 Alessio Fasano 教授的實驗室一年，獲益良多。在黏膜免疫和生物學研究中心，很重視基礎的研究思考與邏輯，無論是實驗室安全或相關人員操作皆非常謹慎與嚴格。逐步逐步的操作中，讓我充分感受到想去回答一個問題、浸潤在研究中的投注與快樂。或許是因為暫時沒有臨床工作的負荷，可以全心無旁騖的投

入。

在麻省總醫院和實驗室，學術活動很多，每週四早上都有實驗室研討會，在 Navy yard 的研究大樓一樓舉行。每一周都會邀請黏膜免疫和生物學研究中心每個實驗室主持人部內的博士後研究員、博士生、或助理針對每個實驗室的研究做約一小時的演講。疫情後時代，會議的舉行，是親自參與(in person) 跟線上(online) 雙軌並行，因此可以讓更多人參與。在會議過程中，大家會提出疑問，做最即時的討論跟溝通。在分享聆聽其他人的研究創意跟成果同時，還可以創造合作機會。不同實驗室的研究人員，若對某項技術或平台有興趣，可以當下相互交流，促進接下來的合作。我覺得這個概念，在台灣學術界也慢慢有類似執行，共同成長共榮。

每個月，還有固定一週的週四，是由麻州總醫院小兒腸胃科臨床部門、與黏膜免疫和生物學研究中心的雙邊會議。本會議臨床醫師會報告臨床相關研究最新的論文、或是腸胃科總醫師們正在進行的研究，會後基礎實驗室的人員會提供意見或實驗室資源。目的亦是促進交流合作。

平日的時間，小組成員在每日午餐或下午 coffee break 討論實驗過程，商量如何更實驗更順利並有效率。每兩週到一個月的期刊讀書會(journal club)，更是大家補充新知，輪流報告與討論的好時機。雖然有時基礎艱深的論文讓我感受到壓力，但跳脫平常臨床繁忙的工作性質，回歸在追求知識藍海中的另一種生活型態，讓人十分難忘。

在美國麻省總醫院學習一年，是難忘的歷程。出國學習與交流，目的是習得相關技術與平台，來回答我們內心的疑問也提升醫療相關技術，值得建議繼續推廣辦理出國訪學的業務。對於拉近台灣與國外相關領域的學術交流與技術，也有一定程度上的幫忙，值得肯定也非常感謝。

在計畫前往美國麻州前半年，為了尋找住宿點花費不少時間，所幸透過以前鄉同去過波士頓的訪問學者幫忙，總算在出發前找尋到合適住宿；疫情後美國物價飛漲，美國當地的食物價位比過往上漲許多，開銷十分大，另外住宿租屋費用也耗費大筆資金，覺得吃不消，我們大多自行烹煮準備三餐盡量節省開銷。因此，除了台灣補助的各項經費外，建議未來的訪問學者還是需要先行自己準備一筆費用貼補。

回國後，因為臺大醫院醫學研究部的邀請，我在日前跟幾位醫師在一次會議分享出國進修心得。提供未來準備出國進修的其他同仁參考，我認為這是很有意義

的。許多細部生活上的細節若有前人的經驗輔佐，可以事半功倍盡快在異鄉安頓下來。若我進修前有參與類似的分享會，一定可以幫助我在前幾個月在異鄉盡快度過那段顛簸摸索期。未來建議這樣的分享會可以承傳繼續舉辦。

肆. 建議事項

一、建立臨床部門與基礎部門合作管道

根據在麻州總醫院黏膜免疫和生物學研究中心學習的心得，建議我們可以推廣台大醫院臨床部門，與台大醫學院或台灣大學的基礎研究部門定期規律的開會交流，讓臨床醫師學習一些基礎研究概念，也讓基礎研究人員了解臨床醫師日常業務，與相關的疾病。讓兩端的研究人員有彼此合作的機會。

另外，也可以尋求與台灣大學校本部合作，把相互的資源做最大的利用，創造一個互惠互利的平台。

二、推廣二次進修或其他在職進修機會

本次出國進修，認知到台灣的相關研究議題還有很大進步空間，投注相關研究的人很少，台灣整體給予的研究資源缺乏。若在美國學習到的技術沒有辦法回來繼續延續，實屬可惜。除了找尋合作對象，也希望我們在既定的基礎上，未來還可以接受補助返回美國原進修單位或許再做短期的進修，除了跟對方保持密切聯繫，有助於我們台灣跟上美國頂尖醫院的學術研究。

三、類器官用於開發新藥物

誠如上述所說，類器官比起動物實驗跟細胞實驗，更能充分反映真正人類組織接觸到藥物產生之反應。例如腸道類器官可以忠實反映出接觸到某類細菌後的變化。這個特點對於推進醫學的發展是重要的。若未來能成立國家級類器官中心，結合各科的研究與資源，能夠推進醫學的發展與新藥物的開發。

伍. 附件資料



腸道類器官在顯微鏡下表現

What may help to rescue damaged intestinal cell?

- Proliferation and maintenance of intestinal stem cells are controlled by the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Schuijers, J., et al. EMBO J. 2012, 31, 2685-96

A LRP 5/6 + Frizzled

B Frizzled

Wnt ligand activate LRP5/6 + Frizzled co-receptor
 → facilitate β -catenin to nucleus
 → interact with TCF4
 → proliferation and differentiation Silva-García O, et al. Front Immunol. 2019 Sep 27;10:2135

Human intestinal organoids

Cell Death & Disease
ARTICLE Open Access
 Impaired Wnt/ β -catenin pathway leads to dysfunction of intestinal regeneration during necrotizing enterocolitis

G Control Control+Wnt7b NEC NEC+Wnt7b

Surface area increase %

Wnt7b increased NEC injured organoid surface area, and may restore proliferation and differentiation.

Wnt/ β -catenin pathway 在腸道健全度的重要調節角色

NEC monolayer

Test 1
 NEC monolayer + Wnt-7b Basolateral media (1wk) → The monolayer was not confluent

Test 2
 NEC organoid + Wnt-7b media (1wk) → KL monolayer + Wnt-7b Basolateral media (1wk) → TEER? FITC?

TEER

FITC

外給 Wnt-7b 似乎可幫助修復腸炎受損細胞的腸滲漏



進修地點
黏膜免疫和生物學研究中心



與博士後研究員們(右一 右二)
以及另一位訪問學者 合照

陸. 參考文獻

1. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev.* 2011 Jan;91(1):151-75.
2. Fasano A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jul;1258(1):25-33.
3. Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000Res.* 2020 Jan 31;9:F1000 Faculty Rev-69.
4. Li B, Lee C, Cadete M, Zhu H, Koike Y, Hock A, Wu RY, Botts SR, Minich A, Alganabi M, Chi L, Zani-Ruttenstock E, Miyake H, Chen Y, Mutanen A, Ngan B, Johnson-Henry KC, De Coppi P, Eaton S, Määttänen P, Delgado-Olguin P, Sherman PM, Zani A, Pierro A. Impaired Wnt/ β -catenin pathway leads to dysfunction of intestinal regeneration during necrotizing enterocolitis. *Cell Death Dis.* 2019 Oct 3;10(10):743.