出國報告（出國類別：研究）

單胺氧化酶在攝護腺癌的角色

服務機關：台北榮總泌尿部
姓名職稱：林子平 醫師
派赴國家：美國
出國期間：101 年 4 月~103 年 4 月
報告日期：

摘要（含關鍵字）

本人於民國 101 年 4 月至民國 102 年 4 月年度進修至南加大陳景虹院士實驗室研究，並奉准延長進修一年，在兩年期間，與美國及臺灣多位學者合作從不同面向研究單胺氧化酶(Monoamine oxidase, MAO)在攝護腺癌及大腸癌的角色。包括：合成新的 MAO 抑制劑以期能提升藥物作用並減低副作用；以基因剃除鼠的攝護腺癌模型來研究 MAO 再生體中攝護腺癌發生及進展過程中所扮演的角色；以及探討 MAO 與癌症對於缺氧的反應中所扮演的角色，並持續進行及追蹤相關之研究。

關鍵字：單胺氧化酶(Monoamine oxidase, MAO)，攝護腺癌，基因剃除鼠，缺氧誘發因子(Hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)

一、 目的

本次出國進修緣起為民國 101 年度報准，原定前往美國波士頓，適逢中研院陳景虹院士(同時也是南加大(USC)教授)於臺、美合作論壇演講單胺氧化酶(Monoamine oxidase, MAO)在攝護腺癌的新發現並進一步至本院演講表達與本院合作的意願，而有此次轉赴南加大進修的契機。經報准核可後(發文字號: 輔人字第 1010023063 號)轉至南加大進修並按照陳院士的建議申請第二年留職停薪延長進修一年。目的在於研究 MAO 在攝護腺癌所扮演的角色以及癌症生理學。

二、 過程

陳院士一直致力於單胺氧化酶 MAO 在各種疾病的研究，近兩年著重與台灣各大學及研究機構(包括陽明大學及台北榮總)合作，努力推動 Taiwan-USC center 作為合作的平台。職本次出國可以說是此平台的第一個體現，所以除了本身在陳院士實驗室的實驗之外，也參與陽明大學林奇宏教授實驗室 MAO 在大腸癌研究的相關討論。近年來，MAO 被發現在攝護腺癌的進展可能扮演重要的角色，陳院士的實驗室與另一位攝護腺癌專家-鍾維國教授也開始從事 MAO 在攝護腺癌的研究，並有了初步成果。

職於民國 101 年 4 月抵達南加大後，就藉著參與陳院士與鍾教授的合作研究，學習癌症生理及 MAO 相關研究的方法學，陳院士及鍾教授以 MAO 在攝護腺癌的研究為題，獲得美國國防部補助(Dod grant)進行研究，職所參與的部分主要為其中的一個子題: 將 MAO 抑制劑 (MAO I)-clorgyline 與近紅外線染料-MHI-148(在過去的研究中已被證明能聚集在多種腫瘤中[1])合成一個新的小分子化合物，以提升藥物治療的療效及減少副作用。結果發現，此化合物的確比原有之 MAO I 對腫瘤組織有更好的特異性，而在老鼠的 xenograft model 中也有更好的療效，是一個很有前景的治療策略。有關此化合物的相關研究正在繼續進行中，並且應用於不同的癌症，包括腦癌。從此次經驗中，職學習到了基本實驗室操作，

包括細胞培養，xenograft 腫瘤模型的建立，藥物療效評估，qRT-PCR 的操作及結果判讀。

在第一年進修期間，除了上述新小分子的新藥研究，職也參與了陳院士實驗室其他 MAO 與攝護腺癌的相關研究。其中之一是與南加大另一實驗室 Dr. Roy Burman's group 合作，從 Dr. Burman's 實驗室得到攝護腺特異的 Pten 基因剃除鼠(prostate specific Pten knock out)，此基因剃除鼠會自發性地在出生後逐步產生攝護腺肥大，原位癌乃至於侵犯性攝護腺癌，以及後續產生遠處轉移，可以在老鼠身上重現人類攝護腺癌的自然病程以及對於治療的反應，可以做為攝護腺癌之癌病產生(carcinogenesis)以及疾病進展(disease progression)相關基因研究的平台[2]。所以，此專題研究就是建基於此攝護腺特異的 Pten 基因剃除鼠上，將 MAOA 基因剃除(MAO type A gene knock out)，藉以比較 Pten 基因剃除鼠與 Pten 及 MAOA 雙基因剃除鼠身上攝護腺癌的產生時程以及疾病侵犯程度，我們可以得知 MAOA 基因對於攝護腺癌的癌病產生或疾病進展產生何種影響。基於過去陳院士及其他學者的研究，我們預期 Pten 及 MAOA 雙基因剃除鼠的攝護腺癌產生時間會比 Pten 基因剃除鼠較晚或其侵犯程度較小。

此外，陳院士實驗室過去的研究顯示，MAOA 在攝護腺癌細胞中的表現會增高缺氧因子(Hypoxia inducible factor 1 α, HIF-1 α) 的量，從而提高癌細胞對於缺氧環境的適應力，包括增生血管、無氧呼吸、以及轉移侵犯的能力。基於此一發現，職另外與南加大另一位教授(Dr. Bogdan Olenyuk)合作，利用 Dr. Olenyuk's 實驗室合成可以抑制 HIF-1 α 下游基因表現的新藥-EPT2 or LS72，來研究攝護腺癌中 MAOA 與缺氧的交互作用。

第三，陳院士實驗室過去發現一個基因及其轉譯而成的蛋白質，稱為 R1 (又稱為 CDCA7L，JPO2 及 RAM2)可以抑制 MAOA 的表現，是 MAOA 的抑制因子(repressor)，卻發現 R1 會與另一個重要的致癌蛋白質(oncoprotein)-CMYC 共位(colocalization)，進而加強了 CMYC 使細胞癌化的能力[3]。近來，R1

被發現在男性病人腦癌(glioblastoma multiforme,GBM)中會影響腦癌的致病性[4]。基於以上發現，職與 Cedars Sinai Medical Center 鍾維國教授實驗室合作發現，在高度惡性的攝護腺癌的組織與細胞株中，R1 的表現量均較良性組織及細胞株高。故在陳院士指導下，職也與鍾教授團隊合作研究 R1 在攝護腺癌所扮演的角色。

基於上述三個研究專案，職於民國 102 年 3 月份，也就是第一年進修結束的時候，返國於泌尿外科內報告，並在陽明大學臨床醫學研究所林奇宏教授及職的學位委員會(包括林奇宏教授、陳光國教授、李光申教授、潘競成教授及楊智勇助理教授)的指導下完成博士學位的資格考。

於第一年結束之後，職以留職停薪方式返回陳院士實驗室與上述幾位合作學者及其團隊繼續進行研究。在 Pten 及 MAOA 雙基因剃除鼠以研究 MAOA 在攝護腺癌的分子機轉方面，經過長達近一年的繁殖以及基因鑑定的程序之後，計畫中用以研究的四種基因型老鼠，包括 wild type control、MAOA 基因剃除鼠、Pten 基因剃除鼠、以及 Pten 及 MAOA 雙基因剃除鼠於 102 年 7 月起陸續達到計畫犧牲的年紀 (4 個月、6 個月、9 個月及 12 個月)。在收取上述研究用鼠的攝護腺後，以 Hematoxyline and Eosin 染色(H&E staining)判讀實驗用鼠於不同時間點，原位癌及侵犯性癌出現與否和侵犯程度。結果發現，Pten 及 MAOA 雙基因剃除鼠在 6 個月、9 個月的時間點較諸 Pten 基因剃除鼠之侵犯性癌出現的比例及程度都較低。此一結果證實我們在此研究專題提出時的假設，即 MAOA 基因在攝護腺的疾病進展方面扮演了重要的角色，當 MAOA 基因在 Pten 基因剃除鼠的攝護腺上被剃除時，攝護腺癌疾病的進展減慢了，此一效應一直延續到 12 個月都很顯著。更有甚者，Pten 及 MAOA 雙基因剃除鼠的攝護腺上皮的細胞，處於不增生的狀態較為顯著，顯示 MAOA 可能影響到了細胞增生或者是攝護腺上皮的細胞分化的程度，此分析正由陳院士實驗室進行當中，職持續與陳院士實驗室保持聯繫，撰寫此一研究的論文分析當中。

在 MAOA 與缺氧的交互作用研究方面，我們第一次發現在兩種研究常用的細胞株中(PC3 and DU145)，MAOA 會被缺氧誘發而升高；而在另一個細胞株(C42B)中，MAOA 在有氧環境就相當的高，在被缺氧條件誘發而升高的現象不明顯，但是 HIF-1α 的抑制劑(LS72)可以抑制 MAOA 的基因轉錄，並且此基因轉錄的抑制與 LS72 的劑量成正比，這兩個發現都顯示在攝護腺癌中，MAOA 可能受到缺氧而誘發。當我們並用 MAOA inhibitor (clorgyline)及 LS72 時 (此兩種藥都分別在動物實驗中被證實可以抑制攝護腺癌的生長)，MAOA 及 HIF-1α 下游基因(像是 lysyl oxidase, LOX)受到這兩種藥劑以加成作用(synergistically)的方式抑制。這些結果進一步顯示了 clorgyline 及 LS72 在攝護腺癌患者合併用藥的潛力，值得進一步研究。

在第二年中，職也探索了 R1 在攝護腺癌中可能扮演的角色，進一步發現當 R1 在攝護腺癌細胞株(PC3)中被 knock down 時，細胞打到老鼠之後腫瘤生長的速度有變慢的現象，但是進一步分析尚未發現可能的機轉以解釋此現象，此一專題仍待進一步研究。然而在從事此專題的研究過程中，職也獲得 mRNA 分析、西方點墨法蛋白質定量分析、流式細胞儀以分析 cell cycle、及癌病研究方法如 colony forming assay 等經驗。

三、 心得暨建議事項

此次出國在長官支持下延長至兩年，得以有機會參加多種面向的研究並與不同專長的實驗室合作，包括合成化學家及其團隊(synthetic chemist, like Dr. Bogdan Olenyuk)、生化學家及其團隊(biochemist，如陳院士本身)、腫瘤生理學家及其團隊(如鍾維國教授及 Dr. Roy Burman)，著實覺得獲益良多，對於基礎研究及轉譯醫學研究方面有較為深入的認識。除了在這兩年期間學得的經驗以及初步成果之外，也希望藉著此一平台(由陳院士主持的臺灣南加大轉譯研究中心)可以進一步深入研究暨促

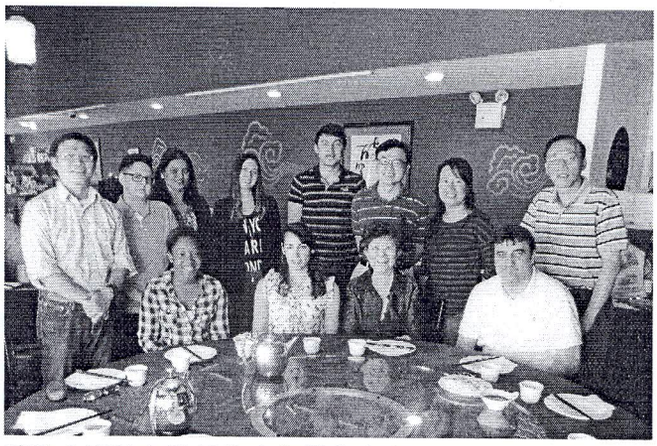
進雙方交流。

事實上，基礎或轉譯醫學研究往往具有延續性，職此次出國進修為臺、美合作研究計畫的一部分，故回國之後可以繼續參與臺灣方面林奇宏教授的研究，延續此一課題。我深信這樣的做法，對於個人或組織都有比較長遠的好處。

Reference:

1. Yang, X., et al., *Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging.* Clin Cancer Res, 2010. 16(10): p. 2833-44.
2. Wang, S., et al., *Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer.* Cancer Cell, 2003. 4(3): p. 209-21.
3. Ou, X.M., K. Chen, and J.C. Shih, *Monoamine oxidase A and repressor R1 are involved in apoptotic signaling pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(29): p. 10923-8.
4. Amlin-Van Schaick, J.C., et al., *Arlm1 is a male-specific modifier of astrocytoma resistance on mouse Chr 12.* Neuro Oncol, 2012. 14(2): p. 160-74.

附錄



陳院士實驗室及部分合作學者合照

前排右二: 陳景虹院士，前排右一: Dr. Olenyuk， 後排左一: 廖鈞芃博士 (Dr. Roy Burman 高足，為 Pten 及 MAOA 雙基因剃除鼠之主要合作同仁)，後排右三: 筆者。