

出國報告(出國類別：進修)

美國杜克大學醫學院病理所博士班

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：陳玉秀 資深住院醫師

派赴國家/地區：美國/德罕

出國期間：107年8月14日至111年8月11日

報告日期：111年8月11日

摘要

退化性關節炎是最常見的關節疾病，且隨著人口老化，其盛行率也越發的升高。常見的位置包含膝關節、髖關節、脊椎與手。退化性關節炎除了疼痛外，因其會影響行動能力而造成死亡率上升。造成退化性關節炎的風險因子包含老化，細胞衰老，受傷，女性，肥胖，環境及基因等。目前並沒有可以改善或抑制退化性關節炎惡化的藥物。因此透過研究退化性關節炎的發生機轉，希望能找到治療的方法。

目前有許多的文獻證實細胞衰老對於退化性關節炎的發生佔有一定的角色，包含發現許多的老化指標（senescence β -galactosidase activity、p16）出現在退化性關節炎的軟骨上面，而在動物研究上，在老鼠膝蓋注射老化細胞講使得退化性關節炎發生。本研究在於研究老化與退化性關節炎之關聯性，開發退化性關節炎的生物標誌，及尋找可能的抗老化治療。

關鍵字:退化性關節炎、老化

封面 第1頁

摘要 第2頁

目次 第3頁

目的 第4-5頁

過程 第 5-8頁

心得及建議事項 第 8-9頁

1. 目的

台灣已邁入高齡化社會，且據推估老年人口（65 歲以上）將於 115 年時超過總人口之 20% 進入超高齡社會，因老化所引起之相關疾病也逐年增加。退化性關節炎是最常見的關節疾病且與老化密切相關，退化性關節炎的盛行率約 15 %，但於 70 歲以上老人約有 7 成患症。推估國內至 115 年時約有 200 萬人將罹患退化性關節炎。常見的位置包含膝關節、髖關節、脊椎與手，退化性關節炎除了疼痛外，亦會影響行動能力而造成失能及死亡率上升。造成退化性關節炎的風險因子包含年紀、細胞衰老、受傷、女性、肥胖、環境及基因等，然而目前的治療多為控制症狀，並沒有可以改善或抑制退化性關節炎惡化的方法，因此面對快速的人口老化，此治療的開發有其急迫性。

細胞衰老（Cellular senescence）是當細胞受到傷害（包含機械性或氧化性的傷害）或因粒線體異常、年紀增長造成終端體減損，而造成細胞停止分裂。此現象短暫可以使得細胞修復，也避免 DNA 異常的細胞生長抑制細避免癌變的發生，在正常的情況下組織修復後衰老現象就會消失，但隨著年紀的增長或傷害太大就會造成細胞持續的衰老現象，除了無法細胞增生修復外還會釋放發炎的物质（senescence associated secretory phenotypes, SASPs）造成附近的細胞也衰老且發炎。目前文獻證實細胞衰老對於退化性關節炎的發生佔有一定的角色，包含發現許多的老化指標（Senescence β -galactosidase activity, p16, SASPs）出現在退化性關節炎的組織包含軟骨，硬骨及滑液囊。而在動物研究上，在老鼠膝蓋注射衰老細胞講使得退化性關節炎發生，衰老的細胞可以感染旁邊的細胞使其他細胞也老化，並且釋放發炎物質導致退化性關節炎的發生。

職前往美國杜克大學病理所博士班，於 Virginia Byers Kraus 教授之實驗室進行博士研究，主要研究領域為細胞老化之機轉，老化之生物標記之開發以及可能應用於退化性關節炎之抗衰老治療。

貳、過程

感謝醫院師長們的提攜與支持，職於2017年獲得 Osteoarthritis Research Society International (OARSI)國際骨關節研究協會 Dick Heinegard award 在2017年9月至11月前往知名學府杜克大學進行為期三個月的短期研究，開拓了對轉譯醫學研究的視野，故申請2018年秋季班入學杜克大學醫學院病理博士班進行更深入的研究，感謝醫院給予此進修的機會。

學習概況

1. 2018年8月份入學，於入學的第一年及第二年完成系上所規定的必修課，包括動物模型轉譯研究、轉譯病理醫學、疾病分子學、基礎免疫學、進階免疫學和英文學術學術寫作 I 和 II。由於畢業於醫學系，因此免修了組織學和病理學課程，轉而修習了基礎免疫學和進階免疫學。也於第三年，選修了兩門對研究設計以及研究主題相關的課程，“衰老與疾病”，“生物統計學和實驗設計”。
2. 於2018年10月份返台完成風濕及免疫兩專科醫師考試，並獲該屆風濕專科考試榜首
3. 獲選2019年4月OARSI骨關節炎研究學會國際年會海報展示。
4. 獲選2020年OARSI骨關節炎研究學會國際年會海報展示接受，然因疫情緣故會議取消。
5. 於2020年3月成立博士口試委員會，2020年11月完成第一次口試委員會議確認研究計劃。
6. 於2021年2月份完成博士資格考(Preliminary exam)，成為博士候選人(Ph.D. Candidate)

7. 2022年1月份第一作者研究文章 CBX4 Regulates Replicative Senescence of WI-38 Fibroblasts 被 Oxidative medicine and cellular longevity 接受。
8. 預計於2022年3月舉行年度口試委員會議，決議於2022年6-7月份進行口試。
9. 2022年4月參與OARSI骨關節炎研究學會國際年會海報展示
10. 2022年7月份完成論文口試並於八月返國

研究主題

研究主題為發展退化性關節炎的抗衰老治療，主要分為三項目標：1. 建立衰老與退化性關節炎之關聯性 2. 尋求退化性關節炎之衰老指標 3. 發展退化性關節炎之抗衰老治療

目標1. 建立老化與退化性關節炎之關聯性：藉由退化性膝關節炎患者接受關節置換術後之軟骨檢體，比較破壞側軟骨以及完好軟骨，發現破壞側軟骨有較高之老化標記：SA- β -galactosidase activity 及p16增加，且與退化性關節炎嚴重程度（OARSI score）呈正相關。

目標2：DPP4為退化性關節炎之衰老標記。DPP4 (也稱CD26)近期內被認為是在WI-38衰老模組細胞表面上高表現的蛋白，且在年長者的周邊單核球細胞與年輕人相比也有較高的DPP4表現。DPP4為細胞表面的蛋白，同時也可以單獨存在plasma或是體液中。DPP4已知功能包含免疫細胞調節，血糖的調控。目前常用之老化標誌如SA- β -gal及p16皆為胞內標誌，因此造成在篩選老化細胞的利用性或是直接治療上的不便。此研究發現DPP4表現之退化性關節炎軟骨細胞在有較低的軟骨基質（COL2A1, ACAN）表現，較高的老化相關基因及發炎物質分

泌。另外膝關節液的DPP4也與退化性關節炎的疾病進展，及其他相關發炎因子有正相關性，因此顯示DPP4為退化性膝關節炎之衰老標記。

目標 3. 發展可應用於退化性關節炎之衰老治療：衰老細胞滅除 (senolytics)，先前研究顯示在膝蓋受傷的老鼠給予殺害衰老細胞藥物(Senolytic treatment)後將可以避免退化性關節炎的發生。然而當組織中含有高量的衰老細胞及少量的健康年輕細胞，衰老細胞滅除治療也許是有害，因為剩餘的細胞也許無法支持原有的組織功能。因此我的研究主題著重於如何使用衰老細胞改善藥物 (senomorphic) 減緩細胞衰老的現象。

根據文獻, CBX4蛋白可以在幹細胞改善老化現象並發現在創傷性退化性關節炎 (前十字韌帶切斷) 的小鼠模型，局部注射CBX4 overexpression lentiviral particles可以減緩小鼠發生創傷性退化關節炎。然CBX4主要的研究都是在癌細胞或者是幹細胞。但是在已分化細胞並無完整的研究。相對於退化性關節炎較複雜的機轉及人體樣本取之不易，我們先使用WI-38自然衰老模組 (replicative senescence model) 探討了CBX4於的表現與衰老現象之關聯。於此研究中我們先將WI-38 細胞 (primary human fibroblast人類肺部纖維母細胞) 由年輕 (CPD 40) 培養至衰老 (CPD >55) 觀察其老化標記之變化，發現常見之標記如SA- β -galactosidase activity、p16、p21及DPP4皆增加且增生標誌EdU減少。同時觀察到CBX4蛋白在WI-38模組的表現隨著培養世代遞減。當我們使用病毒顆粒攜帶CBX4 shRNA減少CBX4蛋白，會導致WI-38細胞衰老，而使用dCas9 activation CBX4 lentiviral particles 會增加內生CBX4表現則減緩細胞老化。故CBX4調節已分化細胞的衰老。我們接著使用衰老相關的qPCR array 包含細胞週期，自體凋亡及DNA損壞路徑相關因子都有所改變(Oxidative Medicine & Cellular Longevity published)。接續使用變異結構的CBX4去測試是哪個功能影響較大結果顯示CBX4的Chromodoamin, SIMs及C-box皆與衰老調控有關，而chromodomain主要透過PRC1調節p16, SIMs的sumo蛋白質修飾功能則與DNA損壞路徑的修復,SASPs相

關及細胞增生，而C-box則與DPP4 及細胞增生調控相關。最後藉由退化性膝關節炎患者接受關節置換術後之軟骨檢體，將軟骨細胞分離出來，使用lentiviral overexpression CBX4於衰老軟骨細胞,發現CBX4蛋白能降低DPP4且增加細胞增生，有效減緩軟骨細胞老化。

叁、心得及建議事項

感謝師長們的支持協助，職有幸在完成專科醫師受訓後能直接出國進修。在進修期間，職的家人多次因疾病入院受到三總師長同仁們的盡心照顧，使職能無後顧之憂的在美國攻讀博士學位，職由衷的感謝。在疫情期間，指導老師 Virginia Kraus將我的課題列入該實驗室的必要研究，因此我在疫情中仍能持續的進行研究，在無法取得病人術後關節檢體時也提出相應的細胞株系統，並持續每週實行一小時的線上實驗進度報告，確保我的博士進度能夠在四年內如期完成。

準備出國的過程，包含體能測驗及基礎的英語能力及進階的GRE考試，及尋找學校，如已經確定自己有出國長期進修的打算建議於計劃年度的兩年前開始準備，如善用醫院或國防醫學院外賓演講可多方涉略相關研究領域，找尋適合自己的方向且建立人際關係。個別學校通常有其對國際學生之托福最低要求，GRE則可參考過去系所錄取之分數。由於提供四年之進修年限，因此可參考各系所網頁提供之平均取得學位時間及畢業所需條件。

赴美求學期間，不論在學業上，或是在實驗操作上，我都有長足的學習。在美國系統多數的博士班有必修課的要求。考試內容的問答題，需融會貫通回答。在進階課程，課堂表現評估就端看課堂參與（有無發言評論），探討文章的研究設計，或是如何設計實驗解決問題。因此培養了文獻評讀、實驗設計及評判結果的能力。杜克病理博士班有每週有一堂必修修研討會，開研討會由所內一員博士生展示其研究，由於系上的領域相當廣泛包涵癌症、關節炎、血液

疾病及感染症等等，因此除了展示的學生需要將其課題整成大家都能理解的內容，每個學生也都需給予回饋意見，藉此養成對不同課題有基礎的評判，而報告學生則會收到演講的錄影及其他同學的回饋單，藉此精進演說能力及了解實驗設計上是否有所不足。除此，學校也提供了academic writing class教導如何系統性撰寫學術文章，生物統計課程上，除了大堂課解釋觀念外，也透過每個學生實際操作個人的數據學習軟體以及各式各樣的實驗情境如何應用統計。實驗操作上，指導老師要求我每週將全部的實驗結果回報，不論是好的結果壞的結果，而且在解讀上一率需要客觀解讀，雖然一開始常常出現實驗失敗是由於技術原因，但因皆提出討論，因此可以有所進步。

因疫情緣故，職在第四年才有較快速的進展，故未能在返國前先預投研究計畫。由於研究執行計畫執行年度為投後的隔年，如2022年度投2023年計畫，故建議返國前一年，學員及科部可密切聯繫，了解各項研究計畫投稿時程，及未來返國後可能需要的實驗室器材儀器，如已找好適合課題，即能預先投研究計畫，以期能返國後即有研究經費能持續進行研究。

實驗室合影



系上合影



