

出國報告（出國類別：短期進修）

赴美國匹茲堡大學短期進修 心得報告

服務機關：國防醫學院公共衛生學系

姓名職稱：李孟璋助理教授

派赴國家/地區：美國/匹茲堡

出國期間：112/05/25-112/06/28

報告日期：112/07/25

摘要

此次至美國 The University of Pittsburgh, School of Public Health 之 Yuanpu Peter Di 老師實驗室中進行短期進修與學術交流，期間我分享了自己在流感病毒領域中的最新發現，同時 Di 老師亦給予回饋。此外，置重點於分析小鼠之大腦 RNA 次代定序資料及人類大腦之單細胞 RNA 次代定序資料，探討在某種情境下，其是否與阿茲海默症有關，並試圖找出其可能之分子作用機轉，以提供在研究阿茲海默症中，其可能之線索，為科學做出貢獻。期能透過此次之學習與研究交流，以建立長遠的合作基礎，共同為防制阿茲海默症努力。

目次

摘要.....	I
目次.....	II
一、目的.....	1
二、過程.....	3
三、心得及建議.....	10

一、目的

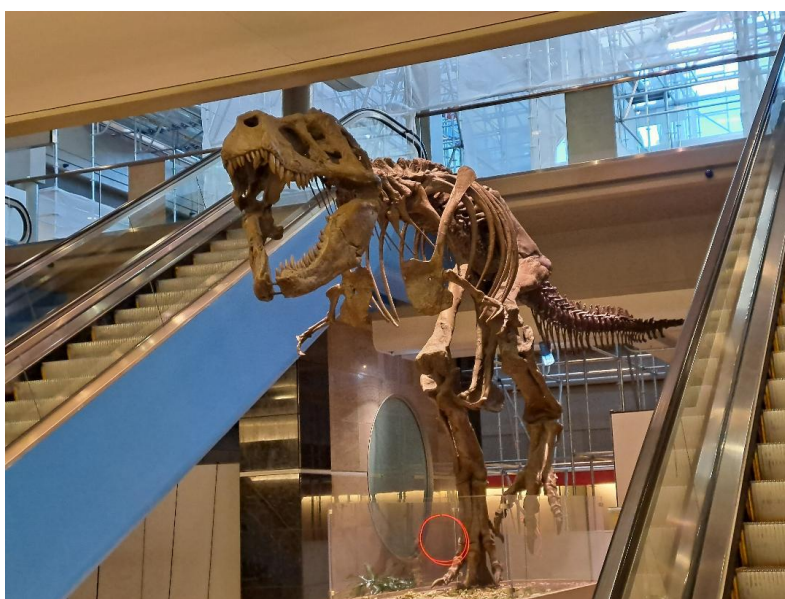
此次至美國 The University of Pittsburgh, School of Public Health 之 Yuanpu Peter Di 老師實驗室，學習了與阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)有關之分子作用機轉。阿茲海默症常被認為是與老化有關之疾病，屬於退化性失智症的一種。早期之臨床特徵常出現記憶力衰退，由於腦部神經細胞受到破壞，因此被認為是一種不可逆之疾病。臺灣在民國 107 年 3 月已超過聯合國定義之「高齡社會」門檻值 14.0% (65 歲以上人口佔總人口比率)，而截至民國 112 年 3 月，65 歲以上老年人口比率已提升至 17.56%，此數據顯示臺灣人口結構趨向老化，因此隨之而來與老化有關之慢性疾病發生率或盛行率亦悄然上升中，失智症就是其中之一種。依據臺灣失智症協會推估，至民國 111 年底，台灣 65 歲以上老人，約有 7.54% 患有失智症，另經換算結果顯示，約每 13 位 65 歲以上老人即有 1 位失智者，而在 80 歲以上老人，其失智比率更是驚人，約達每 5 位即有 1 人罹患失智。由於失智症是一群症狀的組合之疾病，而非正常老化，其不單純是只有記憶力衰退，更伴隨著認知、語言或空間感等之功能或能力退化，對於其個人乃至家庭、社會或國家，將面臨極其沉重之成本。因此，透過生物醫學之實驗或醫院端之阿

茲海默病人檢體之分析，將有助於推估其疾病之分子作用機轉或是找出潛在之生物標誌。另在今年(2023)7月，美國 FDA 通過了可延緩早期阿茲海默症病人惡化之新藥 Leqembi，儘管可能在診斷、治療及監測患者上，其配套措施仍有不足之處，但這對於病人而言仍是一大福音。透過此次的出國進修，除對於阿茲海默症有更進一步了解外，也以 RNA 次代定序分析其可能與該疾病有關之分子，期能為醫學進步貢獻一己之薄力。

二、過程

匹茲堡市坐落在賓夕法尼亞州，過去曾為鋼鐵大城，其市內之卡內基自然歷史博物館以其豐富多元之收藏著名於世，其中又以恐龍化石為其特色之一。在匹茲堡國際機場可見恐龍展示，令人印象深刻(圖一)。

圖一、匹茲堡國際機場之恐龍展示



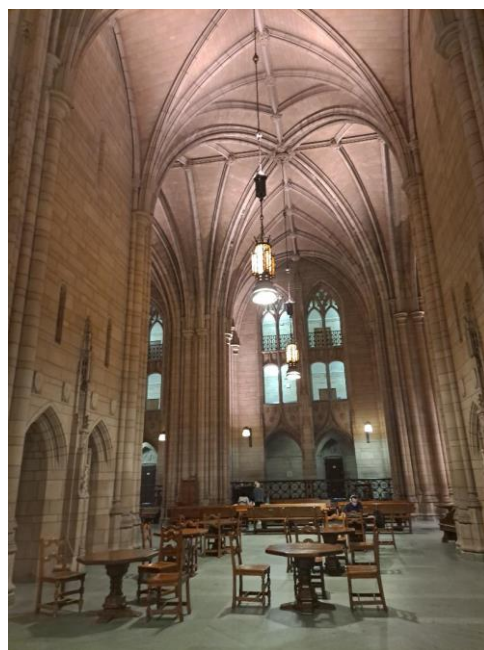
匹茲堡大學(圖二)坐落在匹茲堡市之奧克蘭區，成立於1787年，為全球排名前100名大學之一，曾出過多名諾貝爾醫學獎得主，教育資源豐厚，其中舉世聞名之沙克疫苗(Inactivated poliovirus vaccine)便是由Jonas Salk帶領當時匹茲堡大學研究團隊所研發，以醫學研究

著名於世。另外，學習大教堂 (Cathedral of Learning)，是其校園之一大特色，其高為 535 英尺，屬哥德復興式 (Gothic Revival) 建築(圖三)。

圖二、匹茲堡大學



圖三、學習大教堂(Cathedral of Learning)



匹茲堡大學之 School of Public Health 創建於 1948 年，而此年亦是 Jonas Salk 開始致力於研發 polio vaccine 之時。其目前包括七個 academic departments，而 Di 老師則在 Environmental and Occupational Health 下擔任 Associate Professor，是我此次短期進修學習之拜訪老師；Di 老師研究著重於環境暴露對於宿主之影響，例如促炎因子與癌症之關係探討，透過與 Di 老師學術討論，亦讓我從中受益良多。另圖四則為匹茲堡大學之 School of Public Health 建築，亦是我此次學習之處所。

圖四、匹茲堡大學之 School of Public Health 建築

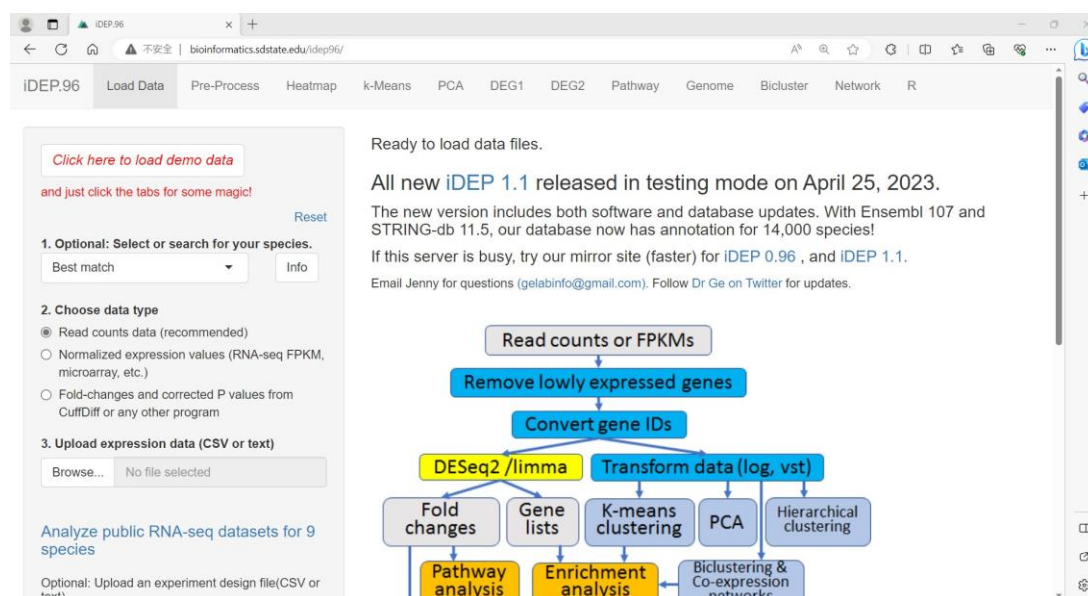


在 Di 老師實驗室期間，除閱讀有關阿茲海默症機轉文章外，主要以分析 Di 老師研究室，設計在某種條件下，所獲得之實驗動物大腦 RNA 次代定序之資料。由於次代定序乃至三代定序，早已成為現今基因體科學及探索精準醫療之顯學，因此透過，例如，分析 RNA 次代定序資料，將可獲得 mRNA(此次分析資料)之訊息。分析過程中，使用了 online 分析工具，例如 iDEP 網站 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep96/>)，找出差異表達基因及其在 Gene Ontology (GO)分析，其中包括 Cellular Component (CC)、Biological Process (BP)及 Molecular Function (MF)，生物途徑分析 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)；另比對大腦之基因表達之資料庫，以推估其可能發生之區域或功能變化差異。結合 Ingenuity Pathway Analysis(IPA)生物路徑分析軟體暨資料庫，進行生物路徑分析。以上均為 Bulk RNA 次代定序之分析，由於在 RNA 次代定序實驗及分析上，早已進入單細胞次代定序之時代，因此亦從公開資料庫 NCBI 中，下載阿茲海默症(AD)病人及對照組之腦部單細胞 RNA 次代定序資料，並以 Python 程式語言分析，其 Module 主要使用 Scanpy。分析結果顯示，在阿茲海默症病人與其對照組之差異表達基因上，與 Di 老師實驗室之資料，在交叉比對後，發現有重覆之基因，而這些基因是與免疫有關，因此可能可以初步

認為在某種條件下其所產生之病理機轉，與阿茲海默症有雷同之處，但仍需更多的實驗設計及實驗結果，才能進一步確認其關係。

圖五為 iDEP 網站介面，此網路分析工具，可協助研究人員，快速分析 Bulk RNA 次代定序資料，其中包括差異表達基因、CC、BP、MF 及 KEGG 等，另所比對之大腦基因表達資料庫亦是使用 iDEP 網站所提供之資料。

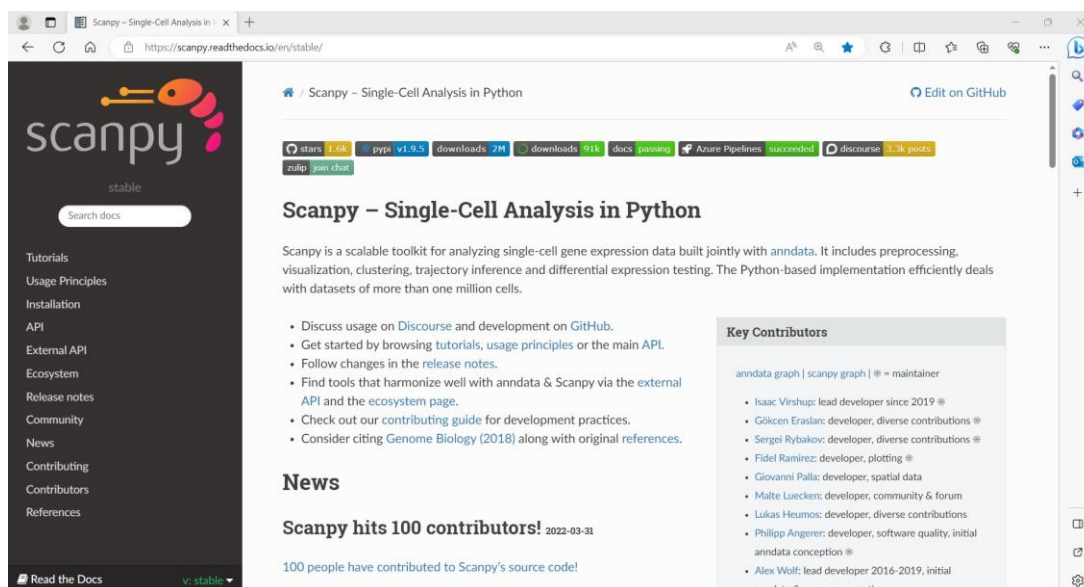
圖五、iDEP 網站介面



圖六為單細胞次代定序分析工具之 Scanpy 網站介面，分析過程均使用 Python 程式語言。此次分析流程如下，從 NCBI 下載 barcodes.tsv、features.tsv 及 matrix.mtx 檔案後，進行品質管控，包括剔除少於 200 個基因表達之細胞、基因表達少於三顆細胞之基因、

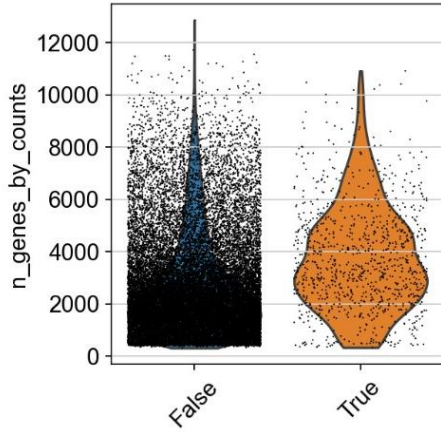
粒線體比例大於 20%之細胞及可能是雙顆之細胞。接著進行校正及高變異量表達基因之計算，並以高變異量表達基因為基礎進行主成分分析及 t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) 圖形計算，採 Louvain 演算法進行分群，並以 marker genes 對所分群之細胞，定義各群其可能所代表之細胞種類。最後，比較各群間及群內之差異表達基因及其可能參與之 CC、BP、MF 及 KEGG 等分析。

圖六、Scanpy 網站介面

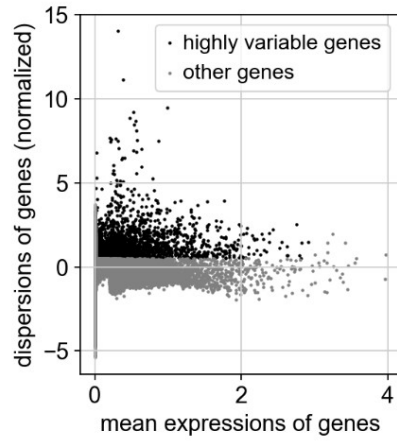


圖七、列舉部分單細胞次代定序分析結果

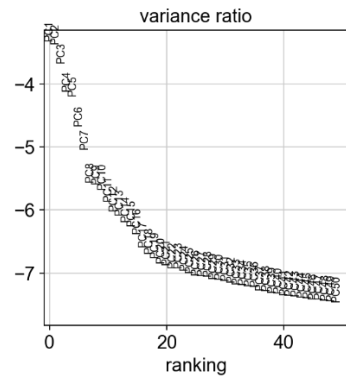
剔除可能是雙顆之細胞



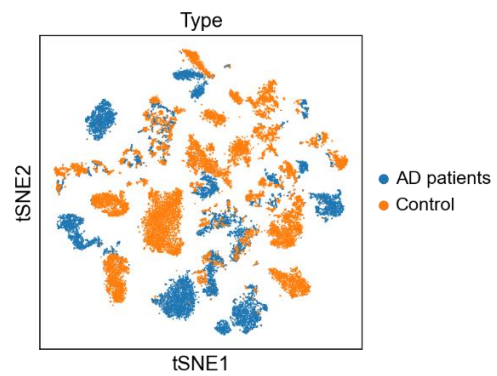
高變異量表達基因



主成分分析 variance ratio



AD 病人與對照組細胞分群



三、心得及建議

本次出國進修與學術交流，學習到有關阿茲海默症的分子機轉，並透過實際之次代定序分析，其中包括 Bulk RNA 及單細胞 RNA 次代定序資料，能進一步深入學習到其可能之分子機轉，讓我對阿茲海默症的認識，向前跨進了一步。非常感謝各級長官的支持與鼓勵，對於我個人而言，強化了對於該疾病的認識，也期許自己能持續探索該領域。另亦感謝 Di 老師的協助與分享，除讓當時在美國的我能盡速適應環境外，也從中獲得很多的知識，未來也會持續與 Di 老師進行學術交流、分享及合作，共同為醫學發展做出努力。