

出國報告（出國類別：訓練）

眼科相關之基因研究

服務機關： 國立臺灣大學附設醫院

姓名職稱：黃勁聞

派赴國家： 美國

出國期間：112年12月06日至113年01月05日

報告日期：113年01月31日

壹. 摘要

本篇出國報告記錄在美國紐約哥倫比亞大學 Edward S. Harkness Eye Institute 進行眼科實驗室的觀察、見聞與成果。本次訪問哥倫比亞大學王南凱教授的眼科實驗室，旨在深入了解當前眼科研究的最前沿進展。王教授的實驗室在眼科科學領域享有盛名，特別是在視網膜與視神經遺傳疾病、以及粒線體相關眼科疾病的研究上取得了顯著成就。

在此次訪問期間，我有機會深入觀察實驗室內部的工作流程，包括如何設計和進行實驗，以及實驗室如何利用最尖端的設備和技術來推動科學的邊界。參觀實驗室內各種先進的儀器設備，比如高解析度的共軛焦顯微鏡 (Confocal microscopy)、高解析度的 Envisu 光學相干斷層掃描 (Optical coherence tomography, OCT)，以及用於分子和遺傳學研究的生物技術設施。觀摩如何使用人工智慧加速科學研究的進展。

此外，我參與實驗室的學術會議，與領域內的專家學者進行交流，聽取他們對於眼科研究最新發展的見解和討論。這些會議不僅會讓我了解正在進行的研究項目，還會讓我見識到如何從實驗設計階段到數據分析階段，科學家們是如何攜手合作，共同推進科學的進步。

最後，我將有機會親自參與一項實驗的設計和操作。這將包括從實驗設計的理念出發，了解如何擬定科學問題，選擇合適的研究方法，設置實驗步驟與條件，到最終的數據收集和分析。這個過程不僅會加深我對眼科學研究方法的理解，還會讓我親身體驗科學研究工作的日常，瞭解一個成功實驗背後的辛勤付出和創新精神。

貳. 目次

封面

摘要

目次

本文

目的 P. 1

過程 P. 1

心得 P. 10

建議事項 P. 10

本文

一、目的

本次探訪哥倫比亞大學王南凱教授的實驗室，目的是獲取眼科研究的最新進展。了解實驗室的設備和研究流程，併參與學術會議，交流最前沿的眼科研究成果。此外，親身設計、參與實驗與討論結果將提供實際操作的經驗，讓我有對於科學研究有更近一步的認識。

二、過程

(一) 過程

在王南凱教授領導的先進實驗室中，我有榮幸深入參與日常研究工作，這包括學術交流會議、研究設計討論以及廣泛的實驗操作。我全面了解了實驗室當前正在進行的項目，從最初的研究概念、試驗設計，到實際操作、結果分析、方法修正、再次試驗，以及數據解讀等每一個細節。

目前，實驗室專注於 OPA1 和 SSBP1 這兩個基因的研究，這些基因與遺傳性視網膜萎縮 (DOA) 有關。通過建立的小鼠模型，我們能夠探究特定突變對視網膜或視神經的功能、結構以及細胞與分子層面的影響，視網膜電圖 (patternERG and ffERG)、免疫組織化學 (IHC)、光學相干斷層掃描 (OCT)、自發螢光、單細胞 RNA 測序、共軛焦顯微鏡技術、西方墨點法 (Western blotting) 和聚合酶鏈反應 (PCR)。

在這段時間裡，我親自參與了多項實驗技術的操作，如固定小鼠視網膜、組織準備、蛋白質萃取，並實施了分光光度計蛋白質定量和 Western blotting 等關鍵步驟。我還有機會觀摩一些高端技術操作，包括小鼠的 OCT、patternERG、autofluorescence，以及利用共軛焦顯微鏡捕捉粒線體影像和 AI 分析，甚至是單細胞 RNA 測序技術。

王醫師不僅向我傳授實驗技能，還開設了專題討論班，分享他豐富的臨床和研究經驗，涵蓋了從 Negative ERG 的解釋、高效論文寫作技巧，到 Optogenetics 應用以及視網膜色素變性症的前沿研究。

在王教授的指導下，我構思了一個新的小型實驗來進一步探究 SSBP1 的分子病理機制。從文獻回顧、設計實驗步驟、採購必要藥品到實際操作和結果解析，我經歷了從頭至尾的研究過程，這不僅鞏固了我的實驗技能，也加深了我的研究理解。

此外，我參加哥倫比亞大學的學術交流會議、Yannuzzi 會議以及 Atlantic Coast Retina Club/Macula 會議，這讓我有機會直接了解國際研究前沿的最新動態，並與領域內的專家直接交流。

(二) 見聞：

1. 王教授背景介紹與研究興趣

王南凱教授畢業於台大醫學系，並於台大解剖學暨細胞生物研究所拿到博士，在長庚醫院當視網膜主治醫師以及副教授，爾後到哥倫比亞大學進行研修醫師的訓練，目前在在哥倫比亞大學擔任眼科助理教授。在台灣時期，王教授就已經在視網膜遺傳疾病與視神經退化疾病聞名，在臨床以及基礎研究上都有極大的貢獻。王教授的研究興趣集中在粒線體的功能，這與細胞代謝和凋亡有關。也因為王教授有豐富的臨床經驗，找到許多新穎突變點位，並以此建立動物模型，進行功能、結構以及細胞分子層級的研究，希望通過粒線體重編程開發治療視網膜色素病變和視網膜神經細胞退化的療法。

2. 研究內容相關背景

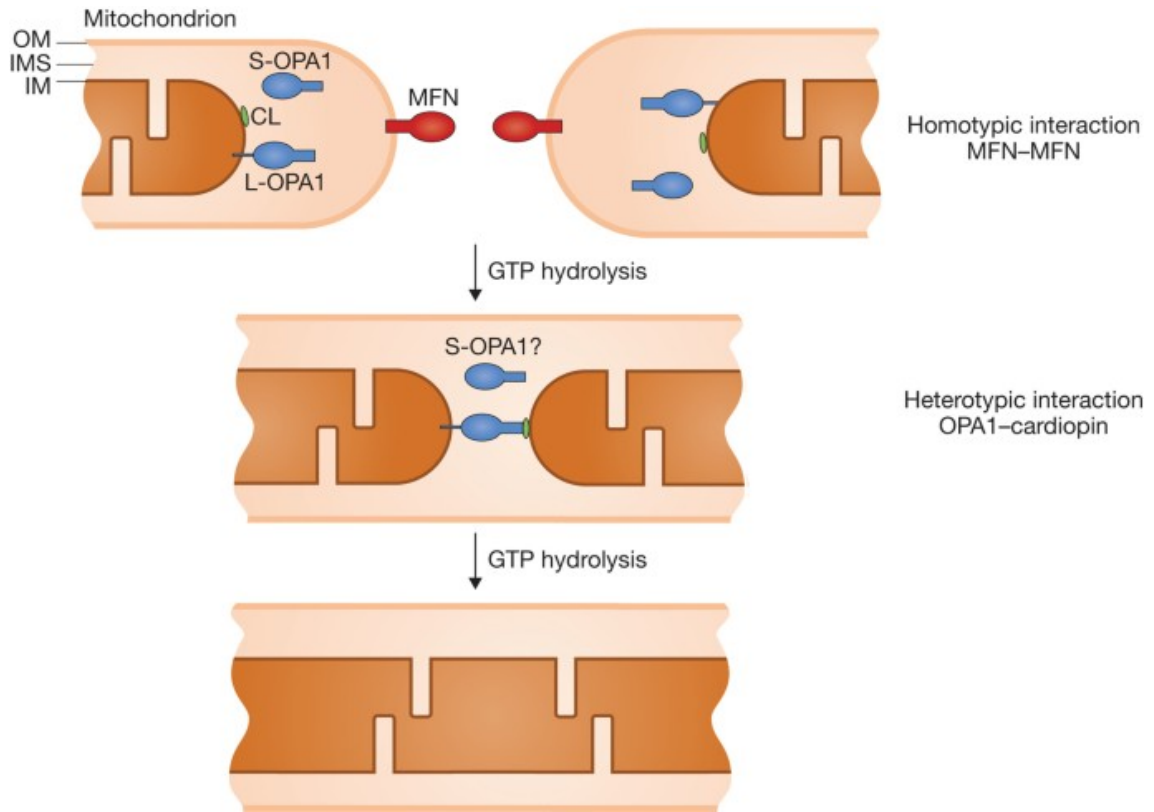
i. 粒線體在眼科研究的重要性：

粒線體在眼科研究中扮演著重要的角色。作為細胞的能量工廠，粒線體不僅提供必需的 ATP，支持眼睛中高度活躍細胞的能量需求，還參與調節細胞的生死存亡，以及在氧化壓力應對中的作用不可或缺，對於保護組織免受自由基損傷尤其重要。在視網膜疾病中，粒線體功能障礙經常與細胞死亡和視力損失有關。例如，老年性黃斑部變性（AMD）、遺傳性視網膜疾病與視神經退化疾病，都與粒線體的損傷有關。

ii. Dominant optic atrophy (DOA)

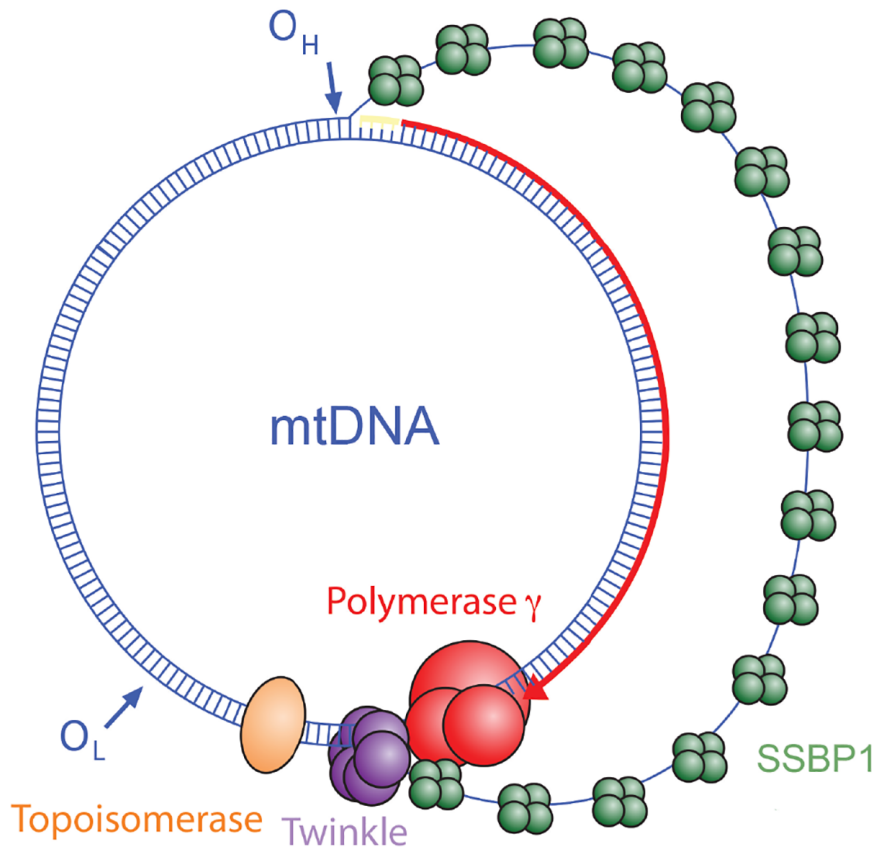
常染色體顯性視神經萎縮（Autosomal Dominant Optic Atrophy, ADOA）是最常見的遺傳性視神經病變之一，疾病盛行率估計在 1:12,000 至 1:50,000 之間。臨床診斷時，患者通常表現為從生命的十幾歲到二十幾歲開始的雙眼視力緩慢下降。視力下降通常是雙邊的且相對對稱，進展緩慢，超過 80% 的患者保持在 20/200 以上的視力。視盤萎縮通常呈現局部楔形的顯側視神經萎縮，中央、中心側和偏心側暗點是最常見的視野缺陷。目前尚無確立的 ADOA 醫學治療方法。建議的治療包括輔酶 Q-10 及營養補充劑，如維生素 B12、C 和葉黃素，以減輕視神經的氧化壓力。

ADOA 主要與位於第 3 號染色體的 OPA1 基因突變有關，OPA1 蛋白與粒線體內膜融合扮演著重要角色。OPA1 基因突變導致粒線體代謝異常和氧化磷酸化受損，進而增加活性氧物質水平，導致視網膜神經節細胞凋亡。



(Reference: <https://doi.org/10.1038/ncb3565>)

近年來，發現一個新的基因 SSBP1，其突變也會導致 ADOA。跟 OPA1 一樣，SSBP1 的基因也是位於體染色體，他會形成四聚體協助粒線體 DNA 的複製。



(Reference: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221829>)

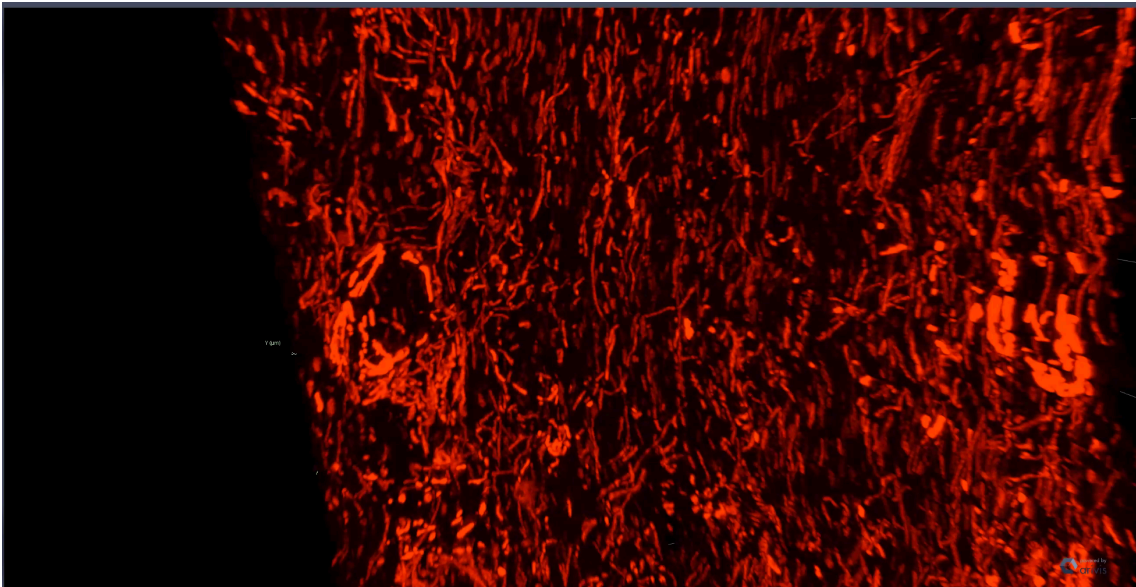
3. 研究相關技術

i. Confocal microscope 與 AI ():

王教授的實驗室專注於粒線體研究，特別著重於其融合與分裂的動態過程。為了深入觀察粒線體的結構變化，實驗室配備了先進的共軛焦顯微鏡。這種顯微鏡因其高解析度、精確的立體定位能力、低背景干擾和優異的光學切片技術而受到青睞。這對於視網膜和視神經組織的微觀研究尤其重要，因為它可以揭示目標物質在三維空間中的精確位置。

在下面的共軛焦顯微鏡圖像中，我們可以看到正常狀態下的粒線體呈現出一種典型的細長形態，這在圖像中以紅色表示。如果觀察到粒線體發生片段化或數量減少，這通常預示著細胞功能的異常，這種異常在視網膜疾病的背景下具有重要的病理學意義。

此外由於這類的圖像處理都極為複雜，目前 AI 技術輔助分析成為一大主流，可以自動標記粒線體位置，計算各式參數與統計分析，實屬便利。

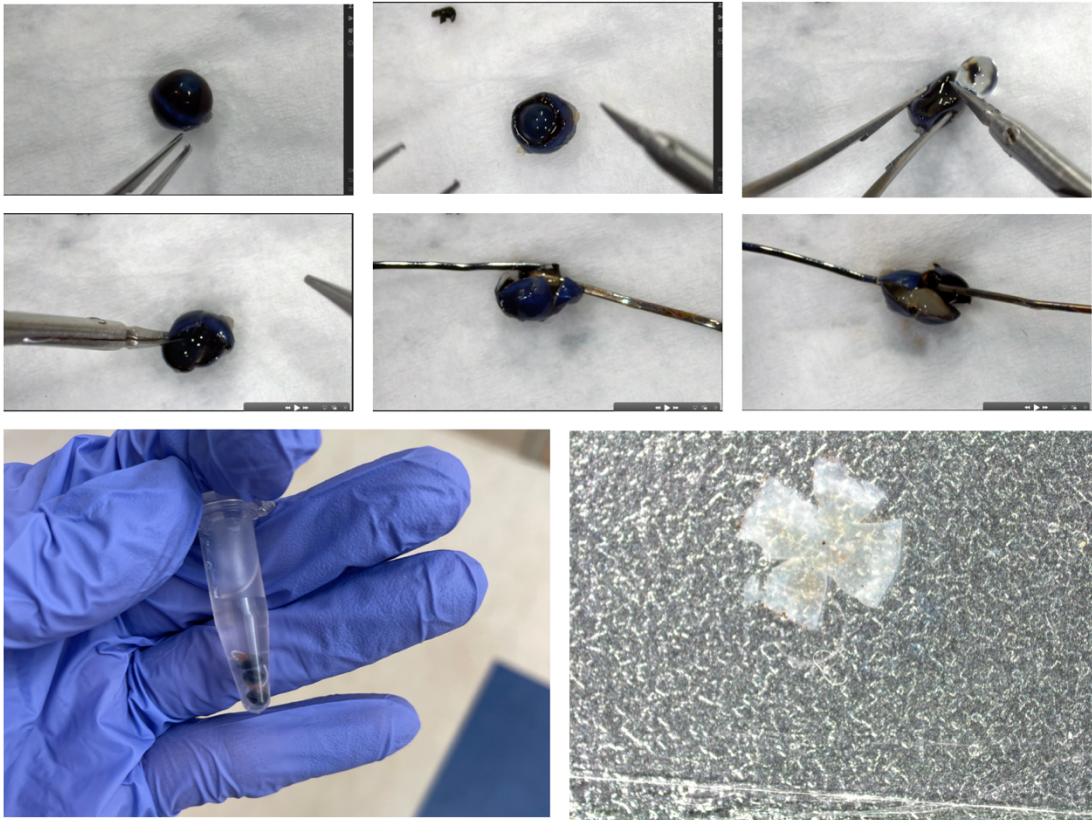


ii. 視網膜結構與功能之實驗

對視網膜結構研究，王醫師實驗室會使用高解析度的 OCT (品牌 Envisu)、自發眼底螢光等方式進行分析。在功能方面，會使用 patternERG (JORVEC)、ffERG 來檢測小鼠的視網膜、視神經功能。

iii. 組織層級之實驗

處理小鼠視網膜的固定或組織萃取工作是一項需要高度技術和精密操作的挑戰。小鼠的眼球僅與鮭魚卵相當，顯著小於人類眼球，使得內部組織更顯微小，這就要求操作者必須進行極為細膩的手法。在提供的圖片上半部分展示了小鼠視網膜固定的步驟：首先是環狀剪開角膜，接著是移除水晶體，然後將眼球剪成四瓣，最後謹慎地剝離視網膜。圖片右下部分揭示了固定在玻片上的視網膜，其外觀猶如微型的花朵。



iv. 細胞分子層級之實驗

除了執行基礎的 Western blotting、聚合酶鏈反應（PCR）以及其他分子生物學實驗之外，王醫師也與其他實驗室合作進行單細胞 RNA 測序分析。這種合作允許我們深入了解當特定基因發生突變時，單個細胞內的訊息 RNA（mRNA）的種類及含量如何變化，從而揭示細胞內發生的生理變化。這種資訊對於進一步理解該基因的功能至關重要，為未來的深入研究提供了寶貴的參考。通過這些高端技術的應用，我們能夠更精準地探索基因表達的細微差異，並對疾病的分子機制有更加全面的認識。

4. 專題研講

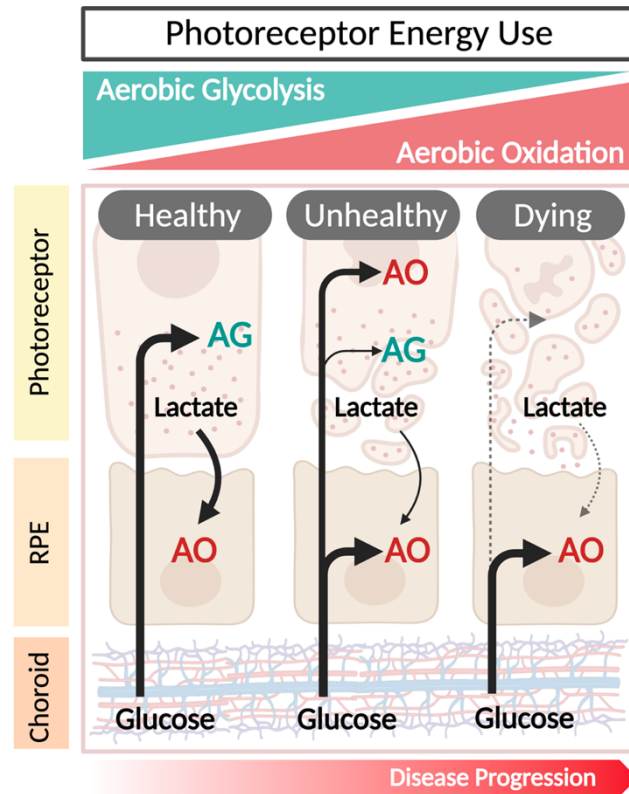
i. Negative electroretinogram (ERG)

王教授是一位電生理學的臨床權威。他詳細解釋了 negative electroretinogram (ERG) 在鑑別診斷上的重要性，這項檢查在識別各種遺傳性疾病（如 CSNB、XLR5、Oguchi 病、杜興氏肌肉營養不

良症) 以及後天性疾病 (如 CRAO, Birdshot chorioretinopathy, Quinine toxicity, MAR, Batten disease, Methanol) 中的作用。王教授亦介紹了台灣常見的 CSNB 基因型態, 以及一些過去國際文獻中未曾報導過的罕見基因變異。通過王教授深入淺出的教學方法, 從基本的電生理學原理到臨床實踐, 他使我對這類疾病有了更深刻的理解和認識。

ii. 視網膜色素層病變 (Retinitis Pigmentosa, RP) 的新觀念

視網膜色素性變性 (Retinitis Pigmentosa, RP) 的典型病程中, 桿細胞通常會比錐細胞更早地發生退化和死亡, 這一現象也是疾病名稱“桿-錐細胞萎縮” (rod-cone dystrophy) 的由來。長久以來, 這一過程背後的具體原因並不明確。但最新的研究逐漸揭示了更多細節: 當桿細胞死亡後, 原本由它們提供的乳酸 (lactate) 供給給色素上皮細胞 (RPE) 就會中斷, 導致 RPE 必須從葡萄糖中競爭能量來源。這種能量的重新分配最終會剝奪錐細胞所需的營養, 進而引起錐細胞的衰亡。這一發現不僅提升了我們對 RP 發病機理的理解, 也為開發新的治療方法提供了可能的方向。



(Reference : <https://doi.org/10.1038/s41433-021-01726-4>)

iii. Optogenetics :

Optogenetics 是一種創新的生物技術, 它通過使用光來控制神經元或其他細胞類型的活動。其工作原理是將特定的光敏離子通道、泵或酶引入目標細胞, 從而可以利用光線來調節這些細胞的功能。在眼科治療領域, Optogenetics 的應用前景極為廣闊。以視網膜色素性變性 (RP) 為例, 這是一種因感光細胞死亡導致的遺傳疾病, 以往的治療方法, 如基因修復或感光細胞再生, 面臨著諸多挑

戰。光遺傳學技術則提供了一種全新的治療途徑：通過將光敏蛋白導入到雙極細胞中，我們可以繞過損壞的感光細胞，使雙極細胞在光刺激下直接活化，從而引發視覺反應。這一方法為眼科治療開辟了新的可能，帶來了令人振奮的希望。

iv. 關於 Outer Retinal Tubulation (ORT) 的新知：

目前認為視網膜色素細胞為主的退化比較容易出現 ORT，然而以視網膜感光細胞為主的退化比較容易出現 intraretinal pigment migration。因此可以藉由 OCT 與眼底照就可以判斷可能是哪裡出現問題。

5. 會議

- i. Yannuzzi 會議：我有機會參加了每月一次的 Yannuzzi 討論會。Yannuzzi 教授是當代最著名的視網膜專家之一，他的許多著作在視網膜學界被視為經典。這次討論會匯聚了來自美國頂尖大學的一流醫師和學者，他們針對研修醫師和住院醫師報告的病例進行了深入的討論。我們從病史、影像檢查、實驗室檢查到基因檢查等各方面分析了可能的診斷和進一步的治療方法，很多時候專家只要聽完病史或是看完一張光學斷層掃描的影像就可以診斷，實屬令人驚嘆。討論會中提到了一些罕見病例，如 Didanosine 引起的視網膜毒性 (Didanosine retinal toxicity) 和亞急性硬化性全腦炎 (SSPE)，這些在台大醫院是極少見的案例。這次的經驗不僅豐富了我的知識，也提升了我的臨床診斷能力。
- ii. 哥倫比亞大學視網膜研究會議：我參加了由哥倫比亞大學舉辦的 Retina Council Meeting，由研究室的博士生報告關於 Metabolic Engineering of Microglia via Glycolysis。屬於非常基礎的題目，過往我們臨床醫師僅會知道有微膠細胞 (Microglia) 的存在，或是知道一些他的功能，但對於他也能作為一個治療潛在的目標卻沒有概念。藉由這次的討論，讓我進一步對此有新的認識。
- iii. 共軛焦顯微成像技術討論會：由於實驗室的研究需要共軛焦顯微成像技術來拍攝粒線體，所以我們與相關的核心實驗室進行雙方的討論會，旨在如何使用共軛焦顯微成像技術，並且了解如何使用人工智慧協助分析數據。
- iv. Atlantic Coast Retina Club/Macula 2023：這個會議是美國視網膜科的盛會，集結全美大師以及國際上知名大師。形式以 4-5 分鐘報告一個精彩案例，然後進行 2 分鐘的討論，可以見到大師們縝密的思考過程，十分令人讚嘆！

(三) 實驗發想、設計與結果：

1. 實驗發想：

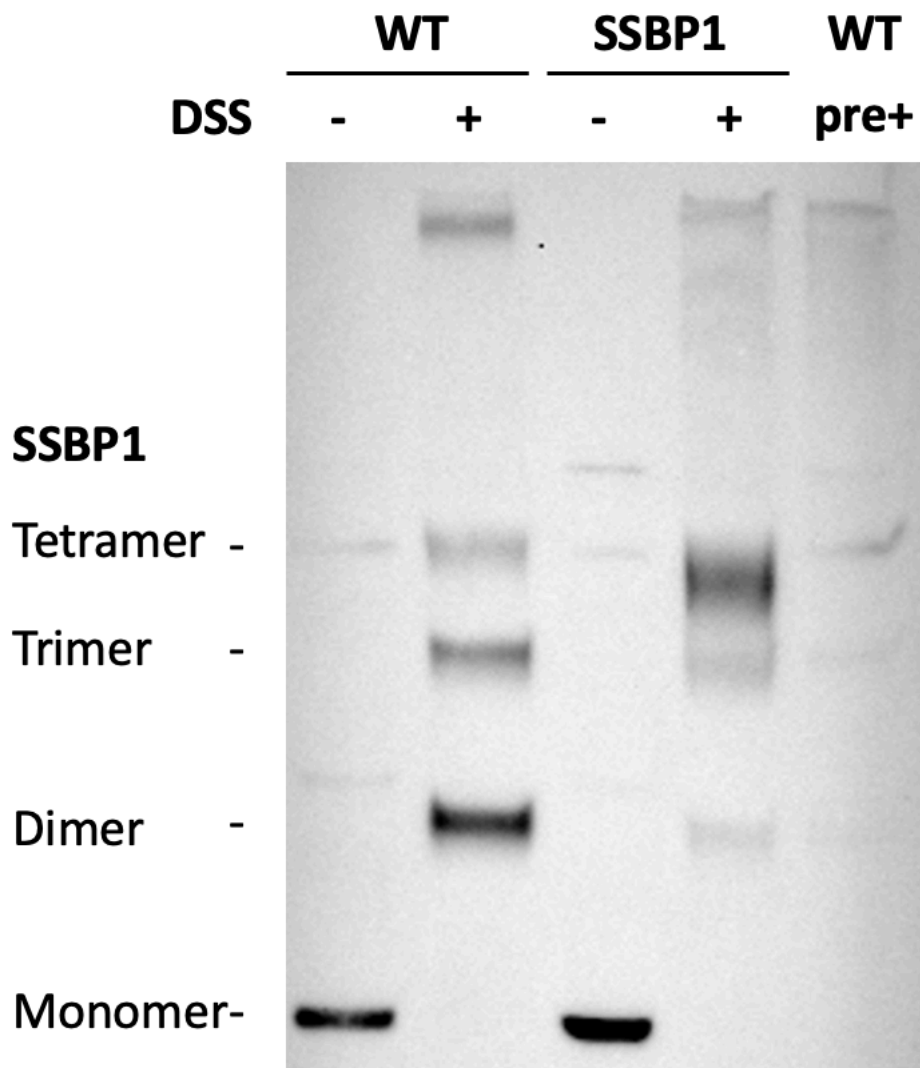
SSBP1 蛋白是一種四聚體形式存在的分子，我們猜測新發現的突變可能會影響其四聚體的形成。為了驗證這一假設，我們開始搜尋文獻，

以探討過往研究是否有使用類似的方法。我們發現，以往的研究多採用細胞模型進行檢測，而不是直接使用視網膜組織。然而，基於對腦組織等其他組織的研究結果，我們推測視網膜組織同樣適合進行這類實驗。於是，我們開始規劃後續實驗步驟，以期確證該突變是否真的會阻礙 SSBP1 四聚體的正常形成。

2. 實驗設計

在取下新鮮視網膜組織後，我們進行了 DSS 處理（這是一種能穿透細胞膜，促使相互作用蛋白質通過形成醯胺鍵結合的化學試劑）。這種處理方法為我們在後續的蛋白質純化及電泳分析中，觀察到蛋白質四聚體結構提供了可能。我們計劃將攜帶 SSBP1 突變的小鼠與野生型小鼠進行比較實驗，以期觀察突變體是否無法形成四聚體結構。

3. 實驗結果



上圖為 Western Blotting 的結果，圖中的前四排代表的是先完成蛋白質提取再進行 DSS 處理，而第五個排是先將視網膜組織直接浸入 DSS 處理，然後再進行蛋白質提取。後者的方法導致蛋白質濃度顯著降低。在沒有添加 DSS 的情況下，無論是 WT 還是 SSBP1 突變體，主要表現為單體形式。然而，在 WT 中加入 DSS 後，明顯形成了二聚體、三聚

體、四聚體。相比之下，當 SSBP1 突變體處理 DSS 時，只在分子量範圍 50kDa 到 70kDa 呈現模糊的帶狀，這與 WT 結果明顯不同。這可能顯示 SSBP1 突變體影響了聚合體的形成。

4. 討論

此結果讓我們非常振奮，更可以去說明 SSBP1 的可能機轉，他不單單是無法形成四聚體那樣單純，可能潛在其他的交互作用影響，而導致其無功能。也因為此發現，讓我們有新的研究方向。

三、心得

在哥倫比亞大學的短期學習和研究不僅豐富了我的專業知識，也拓寬了我的學術視野。王南凱教授的實驗室是一個高度專業化且友善的環境，在這裡，我親眼目睹了科學研究的前沿技術和創新思維的應用。從高端的設備操作到學術會議的深入討論，每一個環節都讓我感受到了科學研究的嚴謹與熱情。

特別是參與實驗設計與操作的經歷，讓我體會到了從理論到實踐的過程中所面臨的挑戰與成就。這段經歷不僅讓我對眼科學研究有了更深刻的了解，同時也鍛煉了我的實驗技能和問題解決能力。此外，與國際專家學者的交流也為我提供了新的研究視角，這對於我未來的學術發展無疑是一筆寶貴的資產。

最讓我印象深刻的是見證了王教授如何將科學家的精神與醫師的使命結合。他不僅是治病救人的醫師，更是钻研學問的科學家。王教授用他的行動告訴我，致力於科學研究可以讓我們成為更好的醫師，用知識去挑戰疾病，用研究成果提升治療效果。

總結這次經歷，我更加堅信科學研究需要持續的學習與合作。這次的出國學習不僅加強了我對眼科學的專業知識，也激勵我繼續在這一領域中尋求突破。展望未來，我期待將這段經歷轉化為推動科學進步的動力。

四、建議事項

- (一) 國際學術交流的重要性：在這次國際學術交流中，我體認到其對學術研究所帶來的寶貴影響。與世界級研究機構的互動讓我們得以直接獲得超出教科書的先端知識，例如光遺傳學與視網膜色素性變性等領域的創新概念。這啟示了我們可能建立姐妹醫院關係，以促進長期且深入的學術交流，從而豐富我們的研究視野並推動臨床與科研的進步。
- (二) 跨領域團隊合作的價值：醫學研究的複雜性要求我們超越傳統的團隊界限，我們應該建立與核心實驗室及其他專業團隊之間的合作機制。這種跨學科的合作不僅能夠加速研究項目的進展，還能增進各個團隊的專業知識和技術能力。我們可以考慮設立跨領域合作平台，鼓勵不同背景的研究人員共同參與大型研究項目，從而在科學研究與臨床實踐中取得突破。
- (三) 提高研究資金的策略：此次交流看到台灣與美國在研究金費的差距，以至於發展受到很多限制。面對研究經費的不足，臺大醫院需要開發多元化的資金來源，包括政府資助、產學合作以及國際研究基金。針對成本高昂的研究技術，醫院可以考慮建立專項基金，或與國際機構合作降低成本和提高效率。此外，醫院可以為想要進行創新研究的醫師和學者提供種子資金，激勵他們對於高風險但可能帶來高回報的研究項目進行探索。
- (四) 提早提供研究機會：應該為住院醫師提供更多接觸高端研究技術的機會，讓我們有機會在 **web lab** 或進行動物研究的環境中工作。這些經驗

對於提升我們的研究能力和臨床技能都是至關重要的。為此，醫院可以考慮設立專門的培訓計劃或者提供研究獎學金，以支持住院醫師的科學研究的工作。

- (五) 專家會議的多元與頻繁性：此次觀察到美國對於臨床分享的重視，例如每個月舉辦的 **Yannuzzi** 視網膜視訊會議。相比之下，台灣次專科學會多數以一年兩次的頻率，就顯的頻率較低。提倡舉辦更多元和頻繁的專家會議。透過定期的學術活動，如每月舉辦一次專業會議，可以使用線上進行，加強各個醫學中心與住院醫師之間的交流，對於醫療創新與知識分享有顯著助益。另外，形式上也可以多以分享精彩病例為主，也不僅限住院醫師報告，主治醫師分享病例，也會增加很多交流學習機會。
- (六) 高端儀器與技術人才培育：在此次的國際交流中，我認識到了其他醫院在人才培育上的前瞻性計劃，特別是對於高端儀器操作和實驗技術的培訓。這些經驗的分享啟發了一個想法：我們可以有系統地發展人才培養計畫，例如派遣人才到專門機構進行深造，這不僅能提升醫師的專業技能，還能為我們的醫院引進先進的知識和技術。