

出國報告（出國類別：進修）

# 研究頭頸癌的異常醣基化 對免疫治療的影響

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名職稱：林玫君醫師

派赴國家：瑞士、洛桑大學

出國期間：112年7月1日至113年6月30日

報告日期：113年8月26日

## 摘要

這次在洛桑大學進行的進修是一段非常豐富且充滿啟發的經歷。我的主要研究集中在使用 CRISPRa 技術篩選出與頭頸癌轉移相關的關鍵基因。在此期間，我深入學習並掌握了多種先進的實驗技術，從建立穩定的 CRISPRa 系統到進行複雜的數據分析，每個階段都充滿挑戰但也收穫頗豐。這些技術不僅提升了我的實驗操作能力，還加深了我對基因功能和癌症生物學的理解。

在這段時間裡，我也親身體驗了國際頂尖實驗室的研究氛圍，特別是在何老師的實驗室中，與來自不同文化背景的研究者密切合作，促進了思維的碰撞與創新。這段經歷不僅拓展了我的學術視野，也增強了我在國際合作中的信心。

總的來說，這次進修為我未來的研究工作打下了堅實的基礎，並讓我對於癌症研究的前沿領域有了更深入的認識。我期待將在洛桑大學學到的知識和技能應用到我的後續研究中，並為頭頸癌治療的進展貢獻力量。

## 目次

壹、	目的	-----	1
貳、	過程	-----	2
參、	心得	-----	7
肆、	建議事項	-----	8
伍、	參考資料	-----	9

## 壹、目的

頭頸癌是臺灣十大常見癌症之一，特別是在男性中發病率較高。根據臺灣癌症登記資料，2021 年頭頸癌的年齡調整發病率為每十萬人 20.03 例，約 50% 的患者在診斷時已屬於晚期。這些患者中，癌細胞常已擴散至頸部淋巴結，這對治療構成了重大挑戰。

目前針對頸部淋巴結轉移的治療策略主要包括手術切除腫瘤引流淋巴結，並輔以化學放射治療。然而，即便進行了徹底治療，復發率仍然高達 50%。需要注意的是，完全切除腫瘤引流淋巴結雖然有助於控制癌症擴散，但也可能削弱免疫檢查點抑制療法的效果，因為這些淋巴結在啟動和維持抗腫瘤免疫反應中起著至關重要的作用。

腫瘤引流淋巴結是抗腫瘤免疫發展的主要場所，它們在捕捉腫瘤抗原、啟動免疫反應及促進癌細胞靶向消除方面發揮著核心作用。抗原透過單向淋巴管到達淋巴結，這些淋巴管收集外周組織中的液體、細胞及可溶性因子。這些抗原在淋巴結中被免疫細胞過濾並處理，然後淋巴液返回血液循環。初生及記憶性 T 細胞和 B 細胞會定向至淋巴結，以監控外來、病理性及自身抗原。在這樣的免疫微環境中，細胞間的最佳相互作用對於促進有效的免疫反應至關重要。

因此，儘管清除腫瘤引流淋巴結對於控制頭頸癌擴散至關重要，但同時也必須考慮這些淋巴結對於免疫治療的效果至關重要。如何平衡這兩者，是未來頭頸癌治療的重要課題。

本次出國研究的主要目的是深入了解頭頸癌細胞與淋巴結中免疫細胞之間的相互作用，特別是研究腫瘤細胞如何藉由改變自身的代謝路徑，以成功轉移至淋巴結。希望能找到偵測並進一步阻斷腫瘤細胞轉移的標的。

## 貳、過程

**7-8 月：** 我首先在一位資深博士後研究員的指導下，學習分離和培養 T 細胞以及分離腫瘤中的腫瘤浸潤免疫細胞。這一階段的主要目的是熟悉基礎技術，為後續實驗做好準備。同時將臺灣建立的小鼠頭頸癌細胞株寄送至洛桑大學的實驗室，並進行了 20 小時的線上課程，及三天由瑞士政府提供的動物實驗實作訓練。瑞士政府提供的動物實驗訓練計劃涵蓋了多個關鍵領域，旨在提高動物實驗的質量，確保動物福利，並促進符合倫理的研究實踐。以下是該訓練計劃的主要內容：**基礎知識與法規：** 訓練的首要部分是介紹動物實驗相關的法律和倫理規範。這包括瑞士國內及國際的動物保護標準，以確保所有實驗都符合既定的法律和倫理要求。通過了解這些規範，研究人員可以在進行實驗時遵循最基本的法律和道德指導原則。**動物福利：** 在實驗中，確保動物的福利和適當照護是至關重要的。訓練內容包括如何減少動物的痛苦和壓力，並提供適當的生活條件。這不僅有助於提高實驗數據的可靠性，還體現了對動物的尊重和關懷。**實驗技術：** 訓練還包括掌握各種動物處理和安置技巧，例如注射、取樣和手術等常見實驗程序。這些技術的掌握可以幫助研究人員更有效地進行實驗，並確保過程中的安全性和準確性。**替代方法：** 瑞士政府鼓勵使用替代動物實驗的方法，如體外模型和計算機模擬。訓練中強調 3Rs 原則（減少、替代、精煉），以推動研究人員探索能夠減少或替代動物使用的研究方法。**實驗後處理：** 在實驗完成後，正確的安樂死技術和動物處理是訓練的一部分。此外，還包括實驗後的清理與消毒，確保實驗環境的衛生與安全。

**9-10 月：** 細胞跟質體到達後，我在這段時間內成功建立穩定表現 ddCas9 的細胞株。建立細胞株並使其穩定表 dCas9 是一個涉及多步驟的過程。以下是建立這類細胞株的基本步驟：

### 一. 選擇合適的細胞株

首先，我選擇 MOC1 做為觀察小鼠淋巴轉移的細胞株<sup>1</sup>，因為一般狀態下，打入小鼠舌下的 MOC1 並無法自行轉移至淋巴結，我們使用了 CRISPRa 活化代謝相關之 17,031 個基因表現，如其中有能促進轉移的基因，我們可以在淋巴結中的腫瘤細胞發現他們。此外，MOC1 也十分適合於轉染和篩選。

### 二. 準備 dCas9 表達載體並轉殖入細胞株

我選擇的載體名稱為 PiggyBac dCas9-VPR，通過 PiggyPac Transposase (PiggyBac 轉座酶)送入 MOC1 細胞之中，PiggyBac 轉座酶是一種來自昆蟲的 DNA 轉座元件，最初發現於鱗翅目昆蟲（如夜蛾）的基因組中。PiggyBac 轉座

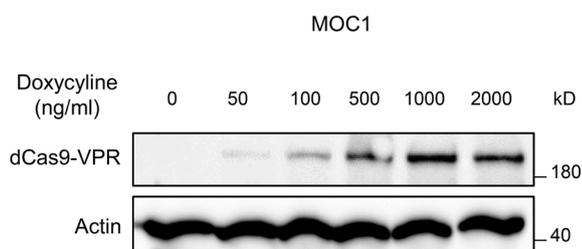
酶能夠將攜帶目標基因的 DNA 片段插入宿主基因組的 TTAA 位點，這使它成為一種強大的基因轉移工具。

### 三. 篩選穩定表達的細胞

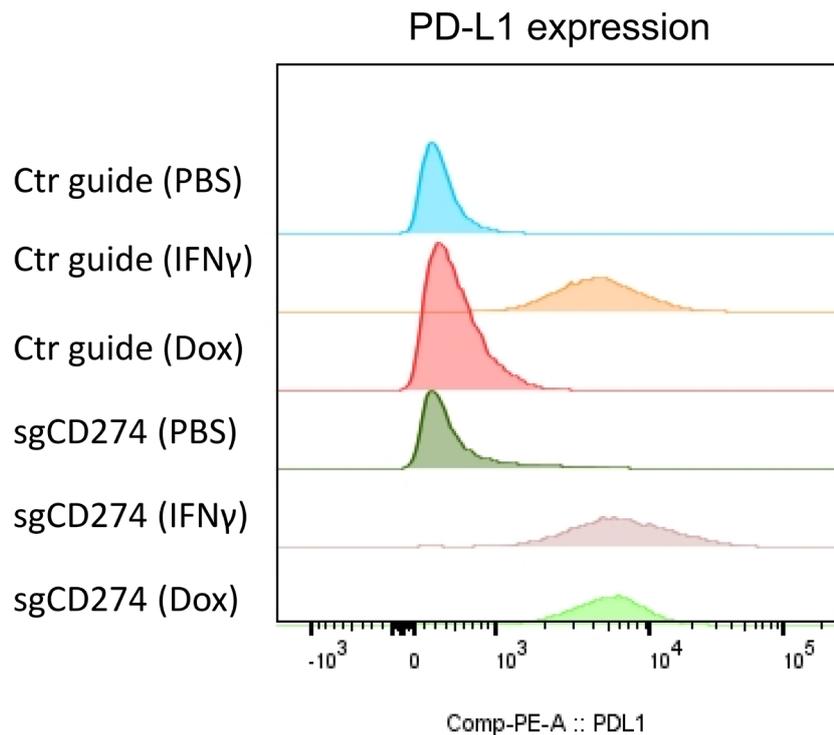
將轉染後的細胞接種到含有 Hygromycin 抗生素的培養液中。只有那些成功整合載體的細胞才能存活並繁殖。這一過程通常需要兩週時間。

### 四. 驗證 dCas9 表達

使用 Western blot 或免疫螢光等技術來確認 Cas9 蛋白的表達。轉殖結果如附圖一。並檢測 Cas9 的功能性，通過靶向 CD274 進行基因編輯，並驗證是否能夠有效地產生預期的效果。dCas9 功能測試結果如附圖二。



附圖一、dCas9 基因轉殖至 MOC1 細胞後，用西方墨點法檢查 dCas9 蛋白表現量。



IFN $\gamma$  100ng/ml, Doxycycline 1 $\mu$ g/ml, 48h

附圖二、於 dCas9-MOC1 細胞轉殖 CD274 (PD-L1)的 sgRNA 後，用 Doxycycline 誘導 dCas9 表現，成功用流式細胞儀偵測在細胞表面的 PD-L1 增加。

## 五. 維持和擴增細胞株

將篩選成功的 dCas9-MOC1 細胞培養基，培養在有 hygromycin 抗生素的培養液中，確保細胞株的穩定性。

以上這些步驟概述了建立穩定表達 dCas9 的細胞株的過程。於此同時，我還建立了帶有 Thy1.1 標記的細胞，為後續的實驗做好準備。

11 月：於 Addgene (<https://www.addgene.org>) 購入小鼠代謝基因 CRISPRa sgRNA 文庫，這是一種專門設計用於在小鼠細胞中激活基因表達的基因工具。該文庫包含針對代謝基因的單導向 RNA (sgRNA)，使我們能夠進行高通量篩選，以鑑定並研究特定基因在代謝過程中的作用。我於這段時間完成了小鼠代謝基因 CRISPRa sgRNA 的擴增，並成功測試了其最適當的文庫覆蓋率。這一步驟為之後篩選和分析調控轉移的代謝基因奠定了基礎。

**12-2 月：** 在這段時間內，我成功建立了小鼠頭頸腫瘤的原位注射模式，具體方法如下：在全身麻醉下，將腫瘤細胞直接注射或植入小鼠的舌頭或口腔，以模擬人類癌症在自然生長環境中的進展。為了追蹤腫瘤在原位的生長情況，我定期對小鼠進行檢查，並進行腫瘤的成長監測。

為了尋找出偵測早期淋巴轉移的最佳時間點，我測試了腫瘤重植於小鼠舌下後不同天數的情況，並在這些時間點上犧牲小鼠取樣淋巴結。同時，我進行了多次原位腫瘤的動物實驗，著重分析腫瘤轉移至淋巴結後免疫細胞的變化，並成功分離出原位腫瘤及淋巴轉移的癌細胞。這些不同微環境中的細胞在代謝路徑及上皮-間質轉化（EMT）相關基因的變化也被系統性地研究，為理解癌細胞在不同環境中的適應與變化提供了新的見解。

**3-5 月：** 在前期實驗中，我成功在小鼠的淋巴結中收集到了帶有 CRISPR gRNA 的腫瘤細胞，並通過 PCR 和定序技術精確地確認了這些 gRNA 序列。這一階段的工作為後續的基因功能分析奠定了重要的基礎，提供了關鍵數據。

在確認腫瘤細胞能夠攜帶 sgRNA 遷移至淋巴結後，我開始規劃更大規模的實驗。考慮到 Cas9 老鼠的出生周期，我安排每兩週施打 5 隻小鼠，並在 4 月至 5 月期間完成了 20 隻小鼠的實驗。

此外，在 3 月，我有機會陪同何教授及實驗室同仁參加了 Keystone Symposia 的「Microbiota and Cancer Immunity」會議，這次會議吸引了眾多免疫學和微生物菌群研究的領軍人物。能夠聆聽到這些大師的演講，令我受益匪淺。同月，我還參加了三校免疫聯合會議，在會議中，我見識到許多年輕碩士生和博士生對於學術研究的熱情與專注，這激勵了我在科研道路上繼續前行。

**6 月：** 完成了 20 隻小鼠的淋巴結收集，並進行了基因組 DNA 的提取、PCR 擴增、PCR 產物純化及定序工作。這些數據將為腫瘤轉移的分子機制研究提供進一步的證據。之前與何老師實驗室的徐博士共同完成關於 T 細胞耗竭的文章，目前在 Nature 期刊審稿中。

**初步結果：** 結果顯示，具有淋巴結轉移的腫瘤中，氧化磷酸化（OXPHOS）基因的表達水平顯著下調。在小鼠模型中，淋巴結中的轉移性癌細胞表現出較低的線粒體 ATP 產生和較高的糖酵解。此外，代謝質體學分析揭示了轉移性癌細胞中乳酸產生的增加以及三羧酸循環的幹擾。這些細胞的谷胱甘肽水平降低，導致活性氧和 DNA 損傷增加。這些轉移性癌細胞表現出上調的 EMT 指標和增強的細胞幹源性。我們的實驗還表明，從小鼠體內分離的轉移性癌細胞在再植後能夠更迅速地發展出淋巴結轉移。此外，轉移性癌細胞中的組蛋白甲基化增加，暗示這些細胞中的表型變化來自於表觀遺傳的調控。我

們正在分析 CRISPRa sgRNA 文庫篩選出來的結果，期望可以找到代謝路徑如何調控頭頸癌細胞淋巴轉移。

## 參、心得

這一年的 CRISPRa 篩選實驗是一段充滿挑戰但令人振奮的旅程。在這個過程中，我不僅精進了實驗技術，還加深了對基因功能的理解。

首先，建立一個穩定可靠的 CRISPRa 系統本身就是一項巨大的挑戰。從設計和篩選合適的 sgRNA 到選擇理想的載體，再到成功將這些元件轉染進細胞中，每一步都需要細心的計劃和精確的執行。我學會了根據不同細胞的特性來優化轉染條件，這對於成功篩選至關重要。

篩選完成後，數據分析和解釋是另一個關鍵階段。CRISPRa 篩選產生了大量數據，這些數據需要使用生物信息學工具來進行篩選和分析。在這個過程中，我學會了如何處理和篩選這些數據，並找到可能與癌症轉移相關的關鍵基因。當某些意料之外的基因被鑑定出來時，我感到既驚喜又興奮，這激發了我去探索新的研究方向。

此次的 CRISPRa 篩選工作也讓我深刻體會到團隊合作的重要性。從實驗設計到數據分析，每個環節都需要與團隊成員密切合作。不同背景的成員為我們的研究提供了多樣化的見解，這幫助我們克服了實驗中的諸多挑戰，並推動了研究的進展。

未來我期待能夠深入研究篩選出的關鍵基因，探索它們在癌症轉移中的具體機制。我相信，這些研究不僅能幫助我們揭示癌症生物學的基本原理，還可能為癌症治療提供新的靶點。

在洛桑大學的實驗室工作期間，我深切感受到這裡擁有世界頂尖的免疫學研究人才和先進的實驗設備，尤其是何老師的實驗室，以創新的研究思路和積極的學術氛圍著稱。在這裡工作，我不僅得到了寶貴的技術指導，還融入了一個充滿活力和合作精神的研究環境。特別值得一提的是，實驗室成員來自不同的文化背景，其中一半是亞洲人，另一半是歐洲人。這樣的多元文化環境讓我得以觀察和學習東西方的工作模式，並從中學到如何更好地平衡工作與生活。

總的來說，這一年的 CRISPRa 篩選經驗不僅豐富了我的技術能力，也拓寬了我的科研視野，為未來的研究奠定了堅實的基礎。

## 肆、建議事項

在這次進修期間，我不僅提升了個人的實驗技術和研究能力，還積極思考如何將所學應用於本院的臨床實踐及未來發展。基於在洛桑大學的學術經驗，我認為有幾個具潛力的領域可以在本院進行推廣和深化。

首先，CRISPRa 技術在基因功能研究中的應用，可以進一步探索頭頸癌轉移的分子機制。這些發現將有助於我們開發新的分子標靶，從而提高個體化治療的效果。未來可以考慮在本院內建立一個專門的基因編輯技術平臺，推動更多相關研究並加快成果轉化。

其次，通過對淋巴結免疫微環境的深入研究，我們可以更精確地評估頭頸癌患者對免疫治療的反應。這些研究結果將有助於優化臨床治療方案，尤其是在免疫治療與傳統治療相結合的情況下，提供更具個體化的治療選擇。

總的來說，我計劃將在洛桑大學所獲得的知識和經驗，融入到本院的臨床和研究中，推動醫療質量的提升和科研的創新，為頭頸癌患者提供更好的診療服務。

另外給其他即將前往瑞士進修的同事一些生活上的建議：

- 一、 **提前準備簽證及文書資料**：出國前應提前至少半年準備簽證，瑞士的簽證申請過程可能需要較長時間，因此建議至少在出發前六個月開始準備相關文件。此外，與瑞士的聯絡機構保持密切溝通，確保所有必要的文書工作都能順利完成。
- 二、 **熟悉當地文化及語言**：瑞士的官方語言包括德語、法語、意大利語和羅曼什語，不同地區使用的語言有所不同。雖然在學術界多數人都能講英語，但了解一些基本的當地語言表達，能夠幫助你更好地融入日常生活與當地文化。
- 三、 **充分利用先進的研究資源**：瑞士的大學和研究機構擁有先進的設備和技術，進修期間要積極學習和利用這些資源。與當地的研究人員保持良好的合作關係，將有助於你在研究上取得更大進展。
- 四、 **調整工作與生活的平衡**：歐洲人普遍重視工作與生活的平衡。你可能會發現這裡的工作模式與亞洲不同，不妨嘗試適應這種節奏，這將有助於身心健康。
- 五、 **準備好適應當地生活**：瑞士的生活成本相對較高，特別是在大城市。建議在出發前了解當地的生活費用，並做好預算規劃。此外，當地的氣候和飲食習慣與臺灣有較大差異，華人較少，日用品不如臺灣容易購買，建議攜帶隨身藥品和常用的個人衛生用品，例如藥品或特殊食品，以便更好地適應當地生活。

- 六、 **保持開放心態，積極參與學術活動**：瑞士的學術氛圍非常活躍，經常會有各類學術講座、研討會及工作坊。建議積極參加這些活動，這不僅能夠拓展你的學術視野，還有助於建立國際學術人脈。
- 七、 **善用空閒時間探索瑞士及周邊國家**：瑞士風景如畫，交通便利。進修期間，利用週末和假期探索瑞士的自然美景和文化遺產，還可以方便地前往其他歐洲國家，拓展視野並獲得豐富的生活體驗。

## 伍、參考資料

- 1 Kono, M., Saito, S., Egloff, A. M., Allen, C. T. & Uppaluri, R. The mouse oral carcinoma (MOC) model: A 10-year retrospective on model development and head and neck cancer investigations. *Oral Oncol* **132**, 106012 (2022).  
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2022.106012>