

出國報告（出國類別：進修）

利用多體學研究模式剖析
熱帶念珠菌的致病機轉：
著重於抗藥性與耐受性的探討

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名職稱：陳抱宇主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：112年8月1日至113年7月31日

報告日期：113年10月15日

中文摘要

面對抗藥性熱帶念珠菌的威脅，我們近期研究已凸顯出熱帶念珠菌唑類抗藥性與高耐受性的分子調控差異，但唑類抗藥性與高耐受性熱帶念珠菌對於壓力反應調控機轉仍未明。本次進修至布朗大學(Brown University)分子微免所(Department of Molecular Microbiology and Immunology)，利用 Richard J Bennett 教授實驗室經驗，致力於分析念珠菌演化的基因體學調控、相對應轉錄體學變化，進而造成念珠菌的不同表現型。我們透過一連串實驗，搭配基因體生物資訊分析(bioinformatics)，確認唑類抗藥性與高耐受性菌株之間基因體結構差異，抗藥性是特定基因位點突變合併數量改變所致。

目次

| | | |
|------|--------------|---|
| I. | 目的..... | 1 |
| II. | 過程..... | 3 |
| III. | 心得、建議事項..... | 6 |

本文

I. 目的

抗藥性熱帶念珠菌(*Candida tropicalis*)的威脅

超過 600 種不同的黴菌病原體會導致各種人類疾病，其中念珠菌屬最具代表性，據估計，侵襲性念珠菌病每年影響全球超過 750,000 人，導致超過 350,000 人死亡。在台灣，根據疾病管制署所建置台灣院內感染監視系統的資料，白色念珠菌(*Candida albicans*)為醫學中心加護病房不分部位常見之院內感染菌，自 2011 年起長期佔據前五名，其他非白色念珠菌(non-*albicans Candida*)的比例則逐年上升，自 2018 年後其占比與白色念珠菌不分軒輊。如果將白色念珠菌和非白色念珠菌合併計算，念珠菌屬將為最常見的院內感染菌種。

鑑於黴菌和人類都屬於真核生物，抗黴菌藥物的作用範圍比針對細菌的藥物更為有限[1]。治療念珠菌症的藥物只有三類，包括棘白菌素類(echinocandin)、唑類(azole)和多烯類(polyene)。在美國疾病控制中心在 2019 年更新的抗微生物製劑抗藥性報告中，抗藥性念珠菌被列為醫療系統的嚴重威脅之一。亞洲近年的大規模監測數據顯示，自 2012 年以來，對唑類抗藥的熱帶念珠菌成為新興醫療威脅且具有挑戰性。在台灣，一項多中心研究發現三分之一的熱帶念珠菌血流分離株對唑類產生抗藥性。而且我們最近的研究發現，對唑類抗藥的熱帶念珠菌血流分離株呈上升趨勢，且集中於特定型別，稱為第三型(clonal complex 3, CC3)。

多體學(multi-omics)模式應用於念珠菌抗藥性(resistance)與耐受性(tolerance)研究

我們近期的研究，建立熱帶念珠菌培養條件，有效區分熱帶念珠菌的唑類抗藥性和高耐受性菌株，藉由不同的表現型，確認其基因型有所不同：唑類抗藥菌株屬於上述 CC3，且分子機轉是同步透過 *ERG11* 基因突變及過度表達，降低唑類結合力；而唑類高耐受性菌株的基因型別雖具多樣性，但超過一半集中於一特定型別(CC2)，且唑類高耐受性菌株產生機轉是透過特定排藥幫浦(*MDR1*)過量表現所致，與 *ERG11* 點突變或過量表現無關[10]。雖然本研究已凸顯出熱帶念珠菌唑類抗藥性與高耐受性的分子調控差異，但唑類抗藥性與高耐受性熱帶念珠菌對於壓力反應調控機轉仍未明，有待進一步深入探討。

念珠菌對抗黴菌的抗藥性，除了點突變外，基因組重排(rearrangement)或重組(recombination)會導致基因組結構變異(structure variations)，包括插入缺失(indels)、拷貝數變異(copy number variations, CNV)、雜合性丟失(loss of heterozygosity, LOH)和非整倍性(aneuploidy)。針對多重抗藥性耳念珠菌(*C. auris*)研究，使用基因體(genomic)和轉錄體(transcriptomic)分析，除發現 *ERG11* 出現拷貝數變異外，也發現細胞壁錨蛋白(GPI-anchored protein)與抗藥性的關聯。另有研究指出光滑念珠菌(*C. glabrata*)的碳水化合物、

氮和硫的代謝改變導致唑類抗藥性產生。上述研究證明多體學研究模式全面剖析念珠菌抗藥性的可行性，亦可發展對於耐受性的分析。

進修研究的假說及目的

面對抗藥性熱帶念珠菌的威脅，以及高耐受性熱帶念珠菌對臨床預後的潛在影響。我們的假說是抗藥性和高耐受性熱帶念珠菌，除原本已知的分子機轉，可能透過不同壓力反應調控這兩種特殊的表現型。我們希望透過多體學研究模式深入比較熱帶念珠菌抗藥性與高耐受性的生物機制，探索可能發展成為治療藥物的標的，提供未來臨床治療病人的可能應用。

布朗大學(Brown University)Richard J Bennett 教授所主持的實驗室，為世界研究念珠菌分子生物學的重鎮，致力於分析念珠菌演化的基因體學調控、相對應轉錄體學變化，進而造成念珠菌的不同表現形態。該實驗室與美國醫院合作，透過蒐集不同臨床重要表現型念珠菌，探索包含抗藥性等不同重要表現型的相關機轉及對於病人的影響，Richard J Bennett 實驗室有一系列高影響力的念珠菌研究及著作。該實驗室的研究方向與本人擬定進修主題契合，且已發展相關研究工具，因此規劃到該實驗室進行進修研究。

II. 過程

羅德島 (Rhode Island)

布朗大學(Brown University)位於美國羅德島州。羅德島州位於美國東北部新英格蘭區，北邊、東側相鄰麻薩諸塞州，西鄰康乃狄克州，是美國最小的州，其面積約 4000 平方公里，僅台灣總面積九分之一，人口數約一百萬人。儘管羅德島州面積小，卻擁有超過 400 英里的海岸線，整個州南面向納拉甘塞特海灣 (Narragansett bay)，所以羅德島州又稱「海洋之州」。羅德島州是由羅傑·威廉斯於 1636 年創立，他因倡導宗教自由和政教分離而被驅逐出麻薩諸塞州殖民地，當他穿越過靠近納拉甘塞特海灣的河流出口及山丘，羅傑·威廉斯向納拉甘塞特原住民部落購買土地，創立當地第一個永久性的白人定居點，及現今普羅維登斯(Providence)所在地(圖一)。他堅信宗教自由和政教分離，這主導了羅德島殖民地，成為並美國創始 13 州之一。在殖民時期，紐波特(Newport)是航運和貿易的重要樞紐，而在 19 世紀，羅德島州是工業革命和動力紡織廠的重鎮，現以醫療、觀光產業為主。布朗大學(Brown University)位於普羅維登斯，該城市是羅德島州的省會(state capitol)，也是新英格蘭區的第三大城。除布朗大學，該城市另有多所大學，屬於大學



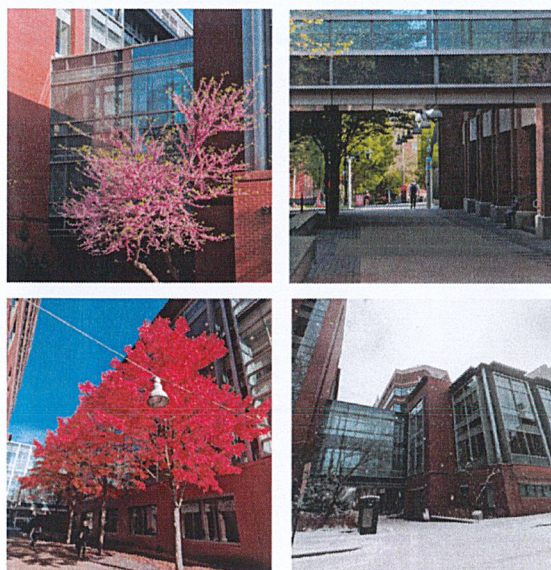
城。

圖一、普羅維登斯(Providence)河岸及天際線

布朗大學 (Brown University)

布朗大學成立於 1764 年，是美國殖民地的第七所學院，整體發展屬於中型大學，為常春藤盟學八所之一。布朗大學是第一所接受所有宗教信仰的學生的美國大學，反應羅德島州創建時典型的開放精神。布朗大學最初成立於羅德島州沃倫，當時名為羅德島學院 (College of Rhode Island)，於 1770 年遷至現址，位於普羅維登斯的學院山 (College Hill)，可俯瞰普羅維登斯市中心。於 1804 年更名為布朗學院 (Brown College)，以表彰著名商人兼校友尼古拉斯·布朗的贈款。於 1891 年，於校園北邊設立彭布羅克學院 (Pembroke College)，開始招收女性學生，直到 1971 年才合併至布朗大學。此次進修的實驗室位在生醫中心 (Bio-Med Center)，與彭布羅克校區相隔一街，可從實驗室往北俯瞰該校區。

布朗大學醫學院設立於 1811 年，但於 1827 年因校方政策終止招生，直到 150 年後，於 1972 年才重新招生，學生上課地點均在布朗大學主校區「學院山」。於 2007 年為表彰商人沃倫·阿爾伯特一億美元捐贈，更名為沃倫·阿爾伯特醫學院 (The Warren Alpert Medical School)。之後，為增進臨床學科與所屬教學醫院的互動，沃倫·阿爾伯特醫學院於普羅維登斯市中心新建大樓，在 2011 年搬至現址。依照布朗大學編制，沃倫·阿爾伯特醫學院和生物學程 (Program in Biology) 共同組成生物醫學學部 (Division of Biology and Medicine)。此次進修的部門，分子微免所 (Department of Molecular Microbiology and Immunology) 正是下轄於生物醫學學部，且因實驗室位於生醫中心 (圖二)，所以，平常生活圈主要在主校區「學院山」，僅少數機會才需下山到醫學校區。而布朗大學的「新課綱」 (New curriculum) 取消大學教育的共同核心課程，改成由各系所制定所需的集中課程，要求學生成為其學習課程的設計者，希望透過多元化思考和參與，激發學生具創造性及意想不到的學習經驗。也因為布朗大學鼓勵跨學科的研究探索，所以身為臨床醫師卻被接受成為基礎學科的研究員。



圖二、布朗大學生醫中心四季

班奈特教授實驗室 (Richard J Bennett's Lab)

班奈特教授(Professor Bennett)實驗室(圖三)專注於分析念珠菌的微生物特性、基因調控機轉，及在宿主體內由腸道菌相獲得致病力的機制之相關研究。例如：白色念珠菌，經常透過獲得或失去染色體而成為非整倍體，以適應環境條件。本實驗室發現我們評估原本為二倍體的白色念珠菌菌株，透過基因體定序，發現當白色念珠菌的第七對染色體變成三倍體時，利用體外和小鼠胃腸道模式，確認此三倍體菌株因絲狀化(filamentation)減少，更能增加宿主移生(colonization)能力。使用基因剪輯實驗，更進一步確認位於第七對染體的絲狀化負調控因子，*NRG1* 的基因數因劑量依賴(dose dependent)的方式抑制絲狀化，使白色念珠菌維持在酵母菌體(yeast form)，更能保持宿主腸胃道移生。

然而，白色念珠菌由酵母菌體轉變為菌絲體(hypha form)，對於念珠菌入侵宿主組織、感染很重要，成為念珠菌扮演人類重要病原菌的關鍵因素。鑑於菌絲體形成對腸道中的念珠菌適應力有負面影響，因此尚不清楚為何菌絲體形成仍被保留。班奈特教授實驗室以腸道菌相概念，設計一連串實驗，探討白色念珠菌菌絲體的生物意義。

首先，使用抗生素處理後的標準小鼠腸道模式，酵母體鎖定細胞腸道移生能力優於野生型白色念珠菌。然而，在未經抗生素處理的小鼠中，具有菌絲體形成能力的野生型細胞，其腸道移生能力勝過酵母鎖定和菌絲體鎖定突變體酵母體鎖定細胞。這代表白色念珠菌的形態轉換對於未經抗生素處理的宿主胃腸道移生是必要的。其次，從菌絲體與酵母菌體差異的基因庫挑選，發現踢除調控 candidalysin 的基因 *ECE1*，此突變型相較於野生型，在未經抗生素處理小鼠腸胃道其移生能力較差，但在經過抗生素處理或無菌小鼠中，腸道移生能力與野生型相當；若在無菌小鼠腸道預先植入大腸桿菌，則此突變型的腸道移生能力劣於野生型。此結果不僅代表 *ECE1* 基因影響白色念珠菌於宿主腸道移生能力，更代表腸道菌相可能會影響白色念珠菌在宿主腸道的移生。最後，更進一步探討 candidalysin 影響腸道共生的機制：candidalysin 不僅直接抑制大腸桿菌、肺炎克雷伯式菌和糞腸球菌的生長，更會降低上述細菌的代謝活性。代表 candidalysin 直接抑制了與白色念珠菌競爭資源的共生細菌物種的生長和代謝。

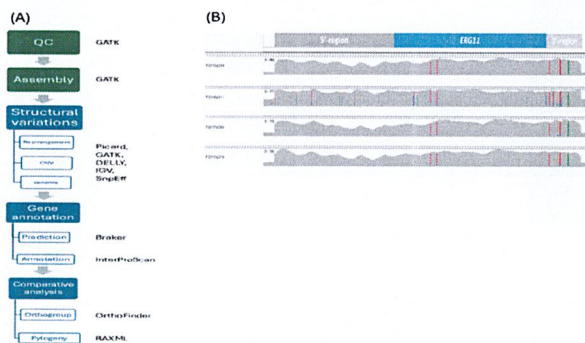


圖三、Prof. Bennett 實驗室會議及成員

III. 心得與建議

於美國進修期間，參與班奈特教授實驗室運作，利用已成功建立實驗模式分析熱帶念珠菌的基因體特性，探索抗藥和耐藥菌株調控機轉的基因數異同。進修期間，著重於學習基因體生物資訊分析(bioinformatics)。布朗大學校園設置高速運算中心，此高速運算中心的服務不僅止於生物科學領域，只要校內各研究領域人員，其研究方法需運程式設計(coding)或需電腦資源運算(如：MATLAB)等，依身份別提供免費的網路空間及運算資源，另依使用者自身需求，可付費加值擴增算力資源。此高速運算中心架設主機稱為 OSCAR (Ocean State Center for Advanced Research)，使用 Linux 系統提供軟硬體整合，提供校內教職員、研究人員及學生友善的運算環境。針對軟體操作，布朗大學高速運算中心每學期開立基礎 Linux 系統操作工作坊，提供環狀課程讓初學者能快速入門。此外，該中心每週提供固定時段，開放全校使用者進行個人化諮詢，解決自身研究遇到的問題。除上述資源外，高速運算中心另提供多元化服務管道，包括：使用網路申請單方式，研究者可申請專案計劃開發，或利用校園常用社交軟體「Slack」，成立專屬討論群組，即時解決問題。若以校層級規劃，透過研究者身份別提供基礎資源完成基本運算需求，減少各研究人員在研究或教學時，自行籌備、管理伺服器的成本。另提供收費機制，讓需要更多算力資源的研究，額外購買伺服器資源，加速完成特殊研究計畫。

除利用校方資源進行學習，因進修實驗室有部分基因體分析軟體尚未有使用經驗，需由我自行使用網路資源學習、試驗。透過班奈特教授介紹，認識分子微免所其他實驗室主持人，專精於黴菌基因體的科莫教授(Professor Cuomo)。藉由定期與科莫教授及其博後討論，學習他們的分析經驗，從眾多分析軟體選擇適合念珠菌基因體特性的分析軟體，以及了解眾多參數調整的細節，進而完成研究計畫的初步分析。有別於班奈特教授實驗室發現的白色念珠菌染色體出現多倍體，導致基因數目增加抑制絲狀化，保持在宿主腸胃道移生優勢。在熱帶念珠菌的抗藥基因 *ERG11* 出現串聯重複(tandem duplication) (圖四)，因此基因數目增加後產生唑類高抗藥性，但此一現象並未出現在高耐受性菌株，顯見高抗藥性極高耐受性菌株的基因體不同，暗示這兩種表現型具有不同生物意義。此一學習過程，讓我體會到在研究過程中，能透過人際關係與不同領域專家討論合作，可以突破研究方法的門檻，進而達到研究目標。



圖四、(A)研究流程；(B)研究成果

此外，在專業進修之餘，抽空參與美國感染症醫學會 2023 年會，不僅可獲取新知，也同時將一個念珠菌臨床研究投稿發表口頭摘要(圖五 A)，當場與各國感染症專家交流意見，藉此將該研究完成論文撰寫，順利投稿發表。同時，參與布朗大學台灣研究學生同學會舉辦活動，不僅能對當地生活充分了解，也透過同學會的協助讓進修生活快速進入正軌，並建立跨領域專業人士網絡。也因為參與布朗大學台灣研究學生同學會的契機，今年 4 月 11 日參與州議會舉辦之「台灣日」慶典，以表彰台灣關係法滿 45 週年，當天進入州議會觀禮，議場內不僅懸掛我們國家的國旗，議會開始前領唱台、美兩國國歌，當場通過並宣讀友台決議，並為 4 月 3 日花蓮大震祈福。駐波士頓台北經濟文化辦事處廖朝宏處長於會議中發表演說，感謝羅德島州與台灣的友好關係，是進修期間難忘且別具意義的活動(圖五 B)。

總之，出國進修從事基礎醫學研究，相較既有專業領域的學習門檻較高，但因暫時免除繁忙的臨床工作，得以靜心思考學習，實屬難能可貴的機會。建議鼓勵院內有志之士把握機會，努力爭取。



圖五、(A) IDWeek 2023 口頭報告；(B) 羅德島州議會「台灣日」與駐波士頓台北經濟文化辦事處廖朝宏處長合照



參考文獻

1. <https://rhodeisland250.org/ri-history/>
2. <https://250.brown.edu/browns-history.html>
3. <https://medical.brown.edu/about/history>
4. Kakade P, Sircaik S, Maufrais C, Ene IV, Bennett RJ. Aneuploidy and gene dosage regulate filamentation and host colonization by *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023 Mar 14;120(11):e2218163120. doi: 10.1073/pnas.2218163120.
5. Liang SH, Sircaik S, Dainis J, Kakade P, Penumutthu S, McDonough LD, Chen YH, Frazer C, Schille TB, Allert S, Elshafee O, Hänel M, Mogavero S, Vaishnava S, Cadwell K, Belenky P, Perez JC, Hube B, Ene IV, Bennett RJ. The hyphal-specific toxin candidalysin promotes fungal gut commensalism. Nature. 2024 Mar;627(8004):620-627. doi: 10.1038/s41586-024-07142-4.