

出國報告（出國類別：進修）

## 青光眼研修計畫

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名：蘇乾嘉

派赴國家：美國

出國期間：111年12月26日至113年8月26日

報告日期：113年11月5日

## 摘要

臺灣過去較缺乏從事青光眼小樑細胞基礎研究的師資及資源，青光眼小樑細胞的基礎研究在目前仍是了解眼壓調控機轉與青光眼藥物研究重要的領域。本人此次出國進修，主要在杜克大學青光眼的基礎實驗室進行基礎研究，學習小樑細胞自噬溶小體系統的機轉和眼壓的調控，將所學的青光眼基礎研究方法和適合的研究模式帶回臺灣，為臺灣青光眼的基礎研究提供一個友善的研究環境。在臨床部份，參與臨床門診及手術，學習目前臺灣尚未引進的新技術，並評估適合引進臺灣用於我們的青光眼病患的技術。參與青光眼流病與臨床研究，學習主持大規模研究的方法，建立與杜克大學眼科及其他學術機構建立良好學術合作網路。

## 目次

壹、目的.....1

貳、過程.....3

參、心得.....10

肆、建議事項.....12

## 壹、目的

青光眼是造成全球失明的第二大眼疾病，主要由於眼前房水排出阻力上升，造成視神經萎縮。根據健保署統計國內約有 43 萬人罹患青光眼，青光眼是不可逆的視神經疾病，約有四分之一患者有失明風險，在治療上著重眼壓的調控，長期保護病患視覺機能、維持病患視覺品質。房水的調控主要在傳統小樑網排輸通道，可以主要分成三項壓力的來源，包括前房液中活性氧類造成的氧化壓力 (oxidative stress)、在清除虹膜色素及細胞殘骸造成的吞噬壓力 (phagocytic stress)、在眼壓及房水流動造成的機械應力 (mechanical stress)。由於小樑細胞是分化後細胞，無法增生，面對上述壓力會有不同的保護及修復機制，其中自噬溶小體系統 (autophagy lysosomal system) 被認為是其中一種重要的機轉，會影響房水平衡。自噬作用的調節失能也被認為與青光眼的致病機轉相關。

在目前青光眼降壓藥物的選擇上，大部份的降壓機轉著重在抑制睫狀體房水的生成，前列腺素為近年來新一代的藥物，藥效較長所以可以一天使用一次，提高患者用藥的方便性，並且降壓效果良好。然而前列腺素作用的機轉為促進葡萄膜鞏膜通路 (uveoscleral outflow) 的引流，而忽略針對病態的小樑組織做調節。ROCK 抑制劑為新一代促進小樑通道的藥物，其經由調節細胞骨架造成小樑通道房水阻力的下降。然而 ROCK 抑制劑在疾病較嚴重的病患，眼壓下降的幅度有限。在傳統小樑網排輸通道上一些致病的機轉尚未完全明瞭，這些致病機轉對於未來青光眼藥物的研發非常重要，尤其是如何在早期就能針對致病的小樑組織進行治療將是重要的研究方向。

Albert Eye Research Institute (AERI) 為杜克大學眼科研究中心，於 2005 落成。杜克大學眼科學在青光眼的基礎研究歷史優久。Aerie Pharmaceuticals 為 Duke 的 Start ups 新育成公司，進行新藥的臨床試驗。Netarsudil ophthalmic solution 為青光眼新一代 ROCK 抑制劑藥物，在杜克大學實驗室發現 ROCK 抑制劑在小樑通道房水調節的角色，由 Aerie Pharmaceuticals 進行新藥的臨床試驗。Duke 眼科青光眼的全體教員共 16 位。有許多有名的小樑基礎研究的科學家，如 Ponugoti Vasantha Rao (Richard and Kit Barkhouser Distinguished Professor)、W Daniel Stamer (Joseph A.C. Wadsworth Distinguished Professor of Ophthalmology)、Paloma Borrajo Liton 等。也有許多知名的青光眼臨床醫師，如 Sanjay Girdhari Asrani、Pratap Challa、Henry Tseng 等。

本研修計畫將分成基礎及臨床兩大部份，在基礎部份，主要在 Albert Eye Research Institute 中 Paloma Borraro Liton 教授的實驗室，進行自噬作用在小樑致病機轉的相關研究。在臨床部份會至 Duke eye center，向 Henry Tseng 教授學習青光眼臨床新技術與臨床研究。Paloma Liton 教授在 autophagy 的領域研究幾十年，過去有一系列 autophagy 與 glaucoma 研究發表在國際知名期刊，如 autophagy, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Progress in Retinal and Eye Research 等。Henry Tseng 教授為青光眼臨床醫師，同時有與實驗室合作相關臨床的研究，在手術部份，亦有執行臺灣尚未引進的一些青光眼微創手術(Minimally Invasive Glaucoma Surgeries, MIGS)、Trabectome、內視鏡睫狀體雷射手術(Endocyclophotocoagulation, ECP)等。我期許透過此次出國進修，在基礎研究部份，在基礎部份，預計進修學習小樑細胞自噬溶小體系統在房水平衡的機轉，針對並將相關機轉運用在可能的青光眼疾病上，將所學的青光眼基礎研究方法和適合的研究模式帶回，為臺灣青光眼的基礎研究提供一個友善的研究環境。在臨床部份，參與臨床門診及手術，學習目前臺灣尚未引進的新技術，並評估這些技術是否適合引進臺灣用於我們的青光眼病患。參與青光眼流病與臨床研究，學習主持大規模研究的方法，建立與杜克大學眼科及其他學術機構建立良好學術合作網路。



圖一、Duke Eye Center 旁邊有多個大型的研究中心 Medical Sciences Research Building (MSRB)，Vivarium 為動物中心，進行 Surgical Teaching 和 Research。

## 貳、過程

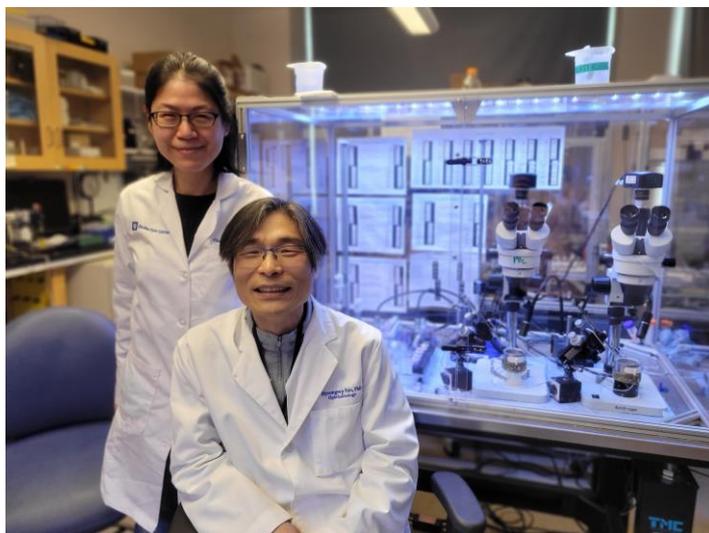
在 Duke eye center 進修一年八個月的時間，第一年的身份為訪問學者，有教育部給的計畫經費。第二年的身份則為杜克大學眼科研究室的博士後研究員，由 Duke 大學支付薪水。我們一家在 111 年 12 月的寒冬抵達北卡。我們很幸運能碰到一個非常好的房東，將裝潢和地毯更新，讓我們一踏入在北卡的家就非常舒適。由於承接先前同事留下來的家俱，我們很快地能夠步上新的軌道。然而目前恰逢聖誕新年假期，因而臨床作業將等假期結束開始執行。而在新年假期後就正式開始研究室的生活，由於 visiting research scholar 及 faculty 的身份，Duke 有許多的資源，有專人一對一的介紹這些資源的使用，包括撰寫 research grant 及今年度符合身份可以申請的單位，統計資源、實驗室的 core facility 及各實驗室 PI 的專長媒合等。實驗室的儀器都在身邊，只要學會操作，晚上或假日來使用都很方便。Duke eye center 為臨床看診及手術的大樓，Albert Eye Research Institute 為研究大樓，地下室為眼科小鼠實驗動物中心，兩個建築物相連，醫師及研究人員的溝通連繫非常好。



圖二、Duke eye center 和 Albert Eye Research Institute 為兩棟先後時期蓋成的大樓，研究中心的入口為小兒眼科的檢查室，由電梯上至三樓到五樓為整層的實驗室。

在實驗室部份，迅速完成進行實驗前需要完成的 Duke Occupational & Environmental Safety Office 所規定需要完成的實驗安全職前訓練以及 Duke Institutional Animal Care and Use Committee 規定在進行動物實驗前所需完成的課程。與指導教授 Paloma Liton 討論未來進行的實驗方向，給研究方法主要包括 human trabecular meshwork cell culture 以及 mice/ rat (rodent) animal models。雖然過去也有養過細胞、也曾在周祖述教授的研究室進行短期的觀察訓練，臨床眼科醫師在實驗技術上是比較生疏的，所使用的實驗技術、實驗室指南 (Protocol) 也都與 Liton 實驗室的所使用的有所差異。Liton 教授指訂資深學術研究員 (senior scientist) Myoung Sup Shim 博士指導我，確立我的實驗技術符合該實驗室水平後開始獨立操作實驗。在 Liton 教授的實驗室，主要是執行 The role

of tubulin acetylation and primary cilia in regulation of IOP 的研究。



圖三、本人與 Liton 實驗室 Myoung Sup Shim 博士合影，Dr. Shim 為韓國人，他的 PhD 在韓國首爾大學唸的是 Molecular biology and Genetics，之後到 Hamilton Glaucoma Center in University of California, San Diego 做網膜神經結的博士後研究約五年。他於 2017 年到 Duke，在 Dr. Liton 的實驗室，與 Dr. Liton 發表了非常多關於小樑細胞初級纖毛控調眼壓的論文。Dr. Shim 在我進修期間帶我熟識實驗室的環境和各個儀器的使用，常和我討論應如何詮釋實驗的結果，對我的研究成果有非常重要的影響。

在臨床部份，臨床指導教授 Henry Tseng 每週二會有手術的進行，週五會有門診。Duke 青光眼病患為美國東岸中部地區較複雜病患的大型轉診中心，疾病較為複雜。由於 Duke eye center 有許多衛星分院，病患常在各個分院間進行手術之後的檢查。一些青光眼的手術，例如小樑切除手術、Glaucoma drainage implant 等在術後已不住院點藥追蹤，改成麻醉恢復後就回家，隔日再到門診追蹤。在門診檢查的設備和儀器與我們醫院使用的十分類似，然而眼壓的測量仍維持使用 Goldmann Applanation Tonometer。先前因為疫情的關係，tonometer 的 prism 改用 disposable 的材質。曾教授本身為 clinician scientist，他主要研究的方向為青光眼的早期診斷和 Optineurin 神經退化的病生理機轉。我在實驗室的空檔時間，則會安排去觀摩曾教授的手術及門診跟診。他同時也指導我關於 optineurin 的研究，也因此我在進修期間有兩個研究主題，一個青光眼的前節小樑組織眼壓的調控，另一個是青光眼的後節 optineurin 在正常眼壓性青光眼視神經萎縮的機轉。



圖四、Albert Eye Research Institute 的研究環境，青光眼基礎研究室在 4 樓，在實驗室中間為細胞培養室，有設置多個各 PI 的細胞培養箱和四個生物操作櫃。有解剖顯微鏡用於做剩餘角膜的分離和初代細胞培養。有一區 4°C 的冷房，將所有存放在 4°C 的實驗材和試劑等放置於此。

我的計畫是一個新的題目，主要探討在 tubulin acetylation 在 trabecular meshwork cell 及 schlemm canal 細胞中與致病機轉的角色。在研究題目進行的同時，我同時學習如何進行 Mouse breeding 和 genotyping 分析，包括 ATG4BKO, ATG5 flox-MGP Cre, ATG5 flox-Prox1-CreERT2, IFT88 flox-MGP Cre, IFT88 flox-Prox1CreERT2..，並了解如何確認 breeding pair 是否合適以及動物中心是否有正確育種。所有眼科相關的動物實驗都在同一棟單位，包括小鼠 OCT, 固定式眼壓計、前房灌注等的測量設備，加上多種 transgenic mice，讓自己重新思考過去所做的實驗可以再如何改善。自己操作的技能也在一次次練習中變熟悉，包括 genotyping, primary cell culture, Western blot, PCR, cyclic mechanical stretch 和 shear stress 的操作等等，Mouse IOP 測量及藥物投藥測試，開顱鼠眼視神經與眼球固定、組織切片染色以及量化的分析。每個實驗及分析都讓我重新檢視過去 PhD program 所欠缺不足的地方。



圖五、Albert Eye Research Institute 地下一樓為眼科專屬的小鼠房，各個 PI 會將需自行配種的小鼠或是進行實驗的小鼠從 Duke's Division of Laboratory Animal Resources (DLAR) 轉移至此。在此有三個房間可以進行動物實驗的手術和檢查。在小鼠的眼壓測量上使用 isoflurance 進行氣麻。在氣麻箱差不多麻倒後迅速轉至平台上接著麻醉管進行眼壓的測量。在動物實驗前會有訓練，如訓練經由開顱取含有保存完整視神經的眼球。



CELENA® X High Content Imaging System



Jess ProteinSimple - Automated Western Western Blot

圖六、實驗室中 CELENA X 自動化高內涵影像系統和 Jess Simple Western 全自動定量蛋白質表現分析系統。在實驗前期使用傳統的 SDS page 進行 Western blot 並與實驗室同仁共同接受 Simple Western 抗體優化 (antibody optimization) 的訓練。

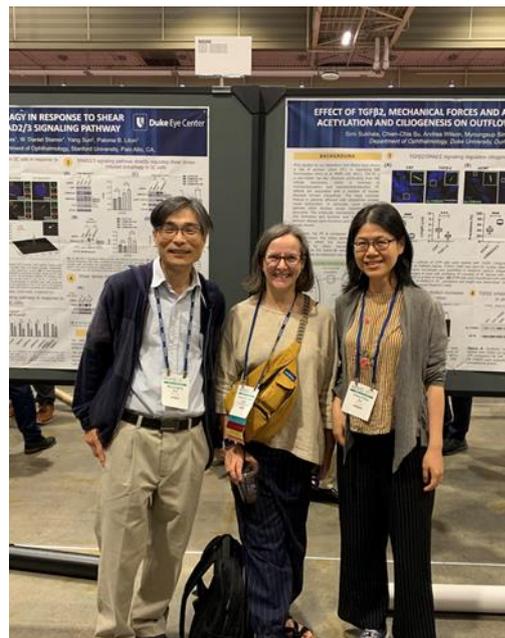
在進修已經待滿一年左右，所有的實驗技術也都上手。繼代小樑細胞的培養是我們實驗的基礎工作之一，小樑細胞的來源主要是角膜捐贈的剩餘角膜，經過一個月的培養，進行類固醇刺激並確認其表現。通過多次傳代，可以獲得穩定且高質量的小樑細胞株。在這個過程中，我學會了細胞培養的基本技巧，如無菌操作、培養基的製備與更換、細胞的傳代和凍存。特別是在細胞傳代過程中，我逐漸掌握如何準確地判斷細胞的生長狀態和傳代時機。還記得開始時只是做一株細胞的週期性牽引實驗，只是收細胞完再做蛋白質定量和 Western 就花了一個月的時間。等一個細胞株做完，再補足 n=3，三個月就過去了。對於三個月只完成證明圖表中的一個小論述，其實常常很焦急。不知不覺隨著技術的進步，我可以在同一次實驗中完成十株不同的細胞株進行實驗，並且一次實驗就達到統計學上的顯著確認假設。在這個實驗中，我們研究週期性牽引實驗某蛋白表現的差異，物理力學環境在細胞行為調控中扮演著重要角色，並且這種調控可能在青光眼的發病機制中具有重要意義。



圖七、Flexcell system 為小樑細胞進行週期性伸張（mechanical stretch）的實驗模型，在實驗擺設為伸張機器與特別連接於伸張使用的細胞培養箱。在實驗技術成熟之後，可一次進行 10 個不同細胞株的伸張試驗，在熟稔實驗技術後，一次多個實驗細胞株反而可讓實驗的條件更一致化，更容易達到實驗顯著的結果。

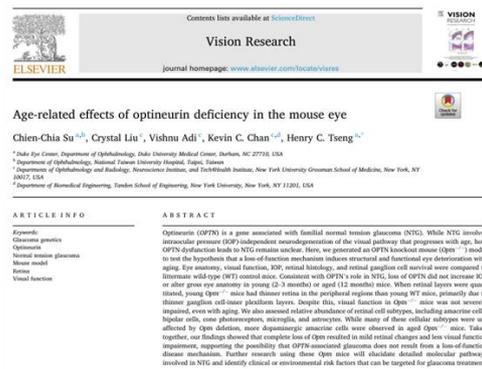
siRNA 技術是一種基因沉默工具，在我們的研究中，用於特異性地抑制目標基因的表達。2024 年的諾貝爾生理醫學獎剛好就是頒給兩位研究 microRNA 的學者-Victor Ambros 和 Gary Ruvkun，研究 microRNA 及其在轉錄後基因調控（post-transcriptional gene regulation）中的作用，以表彰他們發現了微型核糖核酸。在實驗中，我們抑制了特定基因的表達，並通過 qPCR 和 Western Blot 確認了基因沉默的效果。如何設計適合的 primer 去驗證 knockdown 的效果、如何和 siRNA 廠商詢問所購買的序列、利用 knockdown 的樣本去檢驗抗體等。siRNA 的技術雖簡單只要約 30 分鐘便能完成，然而這個過程讓我深刻理解了基因表達調控的機制及其在研究中的應用價值。通過參與這些實驗，我不僅掌握了多種分子生物學和細胞生物學技術，也讓我對青光眼病理機制有更好的理解。在實驗過程中，我遇到了許多挑戰，如實驗條件的優化、數據的分析與解釋等，我要感謝實驗室的導師和同事們在實驗過程中給予我的指導和幫助。

實驗的成果連續兩年在 Association for Research in Vision and Ophthalmology（ARVO）報告。ARVO 是認識該領域的研究學者，進行交流的最好會議。在過去常是單獨一人參與會議進行報告。在這兩次進修期間的會議，我跟著指導教授一同認識許多該領域的研究學者。包括 4/23-4/27 在 New Orleans 的 ARVO 2023 和 5/5-5/9 在 Seattle 的 ARVO 2024。這兩次難得沒有時差的 ARVO，能更深入地和做類似實驗來自不同機構的朋友進行討論，獲得許多非常寶貴的意見。也在會議結束後，也有機會跟著老師去參加做小樑細胞女性研究者的聚會。



圖八、2023/4/23-4/27 ARVO 會議與 Dr Liton 和 Dr. Shim 合影。

在臨床的部份，很幸運能夠挑自己感興趣的手術，在實驗的空檔過去開刀房觀摩。刀房的影像設備十分清晰並同步，一些臺灣比較少做的 tube surgery 及 MIGS，能夠有機會學習並選擇適合的手術器械未來帶回臺灣使用。在青光眼臨床的學習，與 Henry Tseng 教授同時執行 Micropulse Transscleral Cyclophotocoagulation 的研究，比較 traditional 和 micropulse 兩種術式之效果及併發症。並與曾教授共同完成關於 optineurin 的基礎論文「Age-related effects of optineurin deficiency in the mouse eye」發表於 Vision Research 的期刊。



圖九、杜克大學眼科 Henry Tseng 教授與臺大眼科一直保持友好的關係，於 2023 年 7 月至眼科進行演講。曾教授本身為 MD, PhD.的身份，在臨床和基礎研究部份都指導我很多。有幸能與曾教授共同發表 Optineurin 的基礎文章。



圖十、杜克大學中 Medical Sciences Research Building 前四季不同的景象。

## 參、心得

非常感謝院方給予這個機會到杜克大學學習並有機會接受青光眼完整基礎和臨床的訓練，也感謝過去在臺大眼科部和臺灣大學臨床所博士的訓練，讓我在新的環境中能快速的適應並達成進修的目標。然而我們有許多不足的地方，在未來可以努力的方向：

一、由於過去臺灣一直較缺乏青光眼小樑細胞基礎研究的環境和師資。包括在實驗材料的選擇也較不理想。過去在小樑細胞的選擇上是選擇生技公司製造的 Human Trabecular Meshwork Cells (HTMCs)，雖然在培養上方便好養，卻無法表現一些重要的小樑細胞特性，例如、在接受 dexamethasone 刺激後會表現 myocilin。在國外已達成小樑細胞材料選擇共識是使用 primary HTMC，在剩餘的角膜環分離後培養並繼代。在細胞的驗證上目前也一致是以接受到 myocilin test 有所表現為認可的小樑細胞株。回國後首要任務就是進行人體小樑細胞的分離與培養，並建立起適合做為小樑基礎實驗的環境，其中包括實驗的設備 (Flexcell system, Ibidi pump system 等)。

二、另外一個重要的部份為實驗室的管理與資料的保存，在過去資料的保存和記錄雖然有實驗記錄本，但一直缺乏完整的平台。在國外許多單位的實驗室採用 LabArchives: The Modern Electronic Lab Notebook 做為實驗室數據管理和協作平台，它可以方便地創建、儲存和瀏覽實驗室數據，與 Word, Excel, Powerpoint 等基本的檔案做整理，線上可以查看和編輯數據。也有留言的位置，讓不同實驗室的成員能夠針對某特定的實驗數據進行留言、並可提供版本控制功能，可追蹤筆記本中的更改，方便追溯和比較不同版本之間的差異。然而一些較大的檔案，例如 confocal 原始影像檔等，會儲存在實驗室中共享的硬碟空間，在這個共享空間中可以看過過去 10 年實驗室成員們所留下來的實驗記錄和數據。

三、在實驗室成員要離開時，實驗樣本和檔案的整理，讓之後的實驗室團隊成員能接續先前的實驗結果持續進行下去。包括在 -80 樣本的整理和編號，在編碼時將樣本放在乾冰上做編排，避免因溫度造成分解變化。在整理完 inventory list 的編排後，再將該檢體及樣本與之前實驗 powerpoint 的檔案做超連結。在我的部份實驗中，同樣地有使用到過去實驗室同仁所留存下來的小樑組織蛋白。再重新蛋白定量後，再做蛋白質分析的實驗。

四、動物實驗的設備及訓練，在臺灣的實驗動物中心也會有相關的設備動物實驗操作訓練。然而比較沒有針對眼科的部份做訓練，例如包括如果進行小鼠的前房注射和玻璃體內注射。操作不同收集眼球檢體的方式。由於小鼠模型已被認為是研究青光眼非常好的模型，除了房水引流的方式類似於人類，在眼壓的測量上也有 TonoLab rebound tonometer 等工具，如何測量出準確的小鼠眼壓也較有共識。比較有趣的是，過去幫許多病患進行眼壓 Icare rebound tomometer 的測量，打過幾百次人眼的前房注射和玻璃體注射，一開始做小鼠的實驗還是會碰到許多挫折。包括麻醉太久後白內障就生成出來、有一次甚至因為沒有注意點的麻醉眼藥塞到小鼠的鼻子，在注射之後小鼠就不幸死亡。然而也因為眼科醫師的經驗讓我能很快地上手、不斷地調整適合的注射角度和手部姿勢，並且增加注射速度減少一些麻醉時間過長造成的問題。

五、機構間的合作非常重要，在 Dr. Liton 實驗室，我們和 Oregon Health & Science University 的 Dr. Kate Keller 合作，使用她所給予的青光眼小樑細胞株，並有很好的結果。和 University of Wisconsin-Madison 的 Dr. Colleen McDowell 合作，修正我們小鼠實驗測量眼壓的設備和裝置。和 Stanford University 的 Dr. Yang Sun 合作，進修 primary cilia 在眼壓調控的實驗。在 Dr. Tseng 也和 NYU Grossman School of Medicine 的 Dr. Kevin Chan 合作，進行小鼠 visual acuity, contrast sensitivity, OCT, functional MRI 等研究。這些合作往往加速實驗的進行，並且減少不必要的錯誤嘗試。合作如何能有效率，不論在 virtual meeting 或往來現場指導上，還是在計畫完成後文章的 Authorship 貢獻分配上，也需要有很好的智慧來達到兩造都歡喜的結果。



圖十一、其他機構與實驗室合作的研究人員，包括研究小樑細胞的 Kate Keller 和 Colleen McDowell；從事小鼠視覺功能和影像分析的 Kevin Chan。

## 肆、建議事項

基礎實驗的部份：

1. 若共研有機會購入 Jess Simple Western 全自動定量蛋白質表現分析系統：前期的抗體測量和使用者的訓練，會需要在多個使用者之間整合。如何優化抗體並建立適合各種不同細胞的 antibody database 及 optimization，本人在國外的經驗非常樂意能幫忙前期優化的條件和使用者的訓練。
2. 在杜克大學生物統計分析軟體 GraphPad Prism 由機構簽約，每人每一年固定一裝置使用費用約 50 美元，由計畫支付，軟體可授權於個人筆電或機構桌上型電腦使用，並在一年內可有轉移一次的權限。由於基礎研究的人員對於 GraphPad Prism 的依賴，目前官網個人購買學生每年 142 美元、學術單位個人每年 230 美元，不知臺灣大學或者是臺大醫院否也有機會能有較好的簽約方案。讓更多的研究人員能有機會使用此分析軟體。
3. 建立適合的實驗室管理平台，例如 LabArchives，此平台為 NIH 稽核美國各機構實驗室人員重要的平台。此平台對於實驗室的 PI 和各成員之間不論是溝通和資料保存等有效率的管理，讓實驗的紀錄更完整、更簡單。

臨床的部份：

1. 在眼壓的測量部份，Goldmann applanation tonometer 雖然麻煩與需接觸病患的眼睛，在繁忙的臨床工作中常被氣壓式眼壓計所取代。然而在青光眼的研究上，只要是與眼壓相關的研究或是藥物的臨床試驗上，Goldmann applanation tonometer 仍然是 standard，少了這部份的資料眼壓的測量常會被質詢正確性。我們目前許多診的裂隙燈是無法架置 Goldmann applanation tonometer，住院醫師也不熟悉操作。未來研究的需求，還是要保持相關的設備和訓練。
2. 眼科醫生們能有機會與許多不同領域的 PhD 研究人員合作，不論在醫學工程領域、AI 技術等方面。並有該領域學程的學生至眼科進行臨床見實習，讓更多不同背景的人了解臨床眼科的需求等，也創造較多的機會開發可能的軟硬體和設備裝置等。
3. 臨床醫師科學家(clinician scientist)的制度，讓較多的年輕主治醫師在剛開始看診時，能夠有足夠的時間進行基礎的學術研究。減少看診的節數，部份的薪水由研究經費支付，建立研究的基礎。