

出國報告（出國類別：進修）

單細胞組學技術在臨床研究中的應用

服務機關：臺中榮民總醫院血液腫瘤科

姓名職稱：陳聰智 主治醫師

派赴國家/地區：美國/紐希文

出國期間：2023年8月1日至2024年7月31日

報告日期：2024年8月26日

摘要

隨著精準醫療時代的來臨，單細胞多組學的研究領域正在不斷推動癌症研究、代謝組學、發育生物學、免疫學及神經科學多個領域向前發展，逐漸成為生物醫學領域研究的焦點。與批量(bulk)多組學/跨組學不同，單細胞多組學/跨組學提供了多維和全面的瞭解，可以定位更精確的目標分子細胞類型，定義細胞間功能的作用，闡明細胞間的特異性和細胞器間目標主導的信號。經過為期一年的訓練，學習並執行了臨床樣本處理、無菌細胞培養、單細胞 RNAseq、生物信息學分析、分子克隆等分子生物學實驗，單細胞多組學已可以實際應用到特定血癌或淋巴瘤病人的血液或骨髓檢體中，進一步探討與免疫細胞相關的致病機轉與可能的治療契機。

關鍵字：單細胞多組學，血癌，淋巴瘤。

目 次

一、 目的.....	1
二、 過程.....	2
三、 心得.....	10
四、 建議事項	11

一、 目的

隨著單細胞測序和多組學/跨組學的快速發展，臨床單細胞生物醫學是整合單細胞分子和臨床現象，並發現新的疾病特異性診斷和治療的新興學科。與批量(bulk)多組學/跨組學不同，單細胞多組學/跨組學提供了多維和全面的瞭解，可以定位更精確的目標分子細胞類型，定義細胞間功能的作用，闡明細胞間的特異性和細胞器間目標主導的信號。更多最近的研究證明了在心臟病重塑的過程中，單細胞多組學在檢測微環境心臟細胞狀態、空間化、與其他細胞相互作用的各種變化方面的價值和影響，突出了多層分子網絡、細胞類型或現象組學。單細胞測序和多/跨組學，將提供新的機會來識別新的細胞類型和亞群，生成有關免疫功能評估的綜合信息，定義疾病或治療特異性異質性和細胞間相互作用，並開發針對疾病性質的生物標誌物和靶點、嚴重程度和結果。我們期待通過建立臨床單細胞動態監測和早期預測系統，改善診斷和治療，造福人類健康。

目前在腫瘤醫學中，腫瘤細胞與免疫細胞之間的相互關係與致病機轉，是很熱門的研究題目，何雅琦博士實驗室中，擅長應用單細胞多組學來研究免疫功能障礙和 HIV-1 感染細胞的克隆擴增動力學之間的關係，此方法也可以應用到特定血癌或淋巴癌病人的血液或骨髓檢體中，進一步探討與免疫細胞相關的致病機轉與可能的治療契機。期待能學習何博士實驗室的研究方法和經驗，將單細胞多組學應用在未來的研究當中。

在何雅琦博士的實驗室中，我的職責是了解 HIV 的持久性、免疫力功能障礙，以及使用單細胞多組學方法探討 T 細胞克隆擴增動力學。我將會學習並執行臨床樣本處理、無菌細胞培養、單細胞 RNAseq、生物信息學分析、分子克隆等分子生物學實驗。我也為將參與實驗設計，實驗結果手稿撰寫，及在科學會議中報告成果。經過為期兩年的訓練，預期能針對臨床未解決之問題，例如：異體骨髓移植後，免疫重建的過程，有哪些重要的淋巴細胞的變化？及有哪些免疫細胞參與宿主排斥反應（Graft versus host disease）？如何利用這些精細的免疫學知識，發展對嚴重型宿主排斥反應的有效治療方法？設計實驗，應用臨床樣本，並使用單細胞多組學的方法，撰寫研究計畫，爭取研究資源。

二、 過程

(一) 加入研究團隊

1. 參與實驗室例行研究會議

實驗室每週都有安排由實驗室成員報告的例行會議，內容為研究及目的進度報告及文獻得分享與探討，可經由進度報告，彼此學習研究的經驗及方法，並透過文獻分享，學習最新的知識與研究技術，精進研究。在每年暑假期間，會進行分子生物學、免疫學、愛滋病病毒傳染的機制與治療的新方法、基本實驗技術的回顧與分享，讓實驗室的同儕，都能夠在相同知識的背景上，互相討論相關的研究題目。

2023 Summer Ho Lab Meeting v2

Version date: 7/31/2023

Time: 12:30 pm – 2:30 pm, Fridays
Venue: BCMM 344

Date	Long talk – data or mini-review	Short talk – data or journal club	Single cell
8/4/2023	State of the lab (Ya-Chi)		8/7 2:30 Dogmaseq Yulong
8/11/2023	ECCITEseq- Michelle		8/16 Spatial transcriptome – Amare (date change)
8/18/2023	Kristen – spatial ATAC, RNAseq, and multiome		8/21 HIV cure: Ya-Chi
8/25/2023	Katherine (project)	Timmy (project)	8/28 HIV life cycle: Ya-Chi
9/1/2023	Molecular Biology: all		9/4 – Labor day
9/8/2023	Lentiviral transduction: all		9/11 Illumina/Nanopore/ library prep/sequencing (All)
9/15/2023	Micro retreat		9/18 Seurat – Yulong
9/22/2023	Immunology review: all		9/25 – Bioinformatics review - Yulong
9/29/2023	Ya-Chi traveling		10/3 Writing guide – Ya-Chi
10/6/2023	HIV cure groups preview - all		10/9 Grant and academia – Ya-Chi
10/13/2023	NIH Cure meeting		

If you have scheduling conflicts, please ask lab members and see if someone can swap with you

Long talks can be research progress or mini-review (review the work of an HIV research PI or a topic)

Short talks can be an experimental finding or journal club.

Discuss with Ya-Chi if you don't know what to talk about.

9/1 Molecular biology review (10 min, chalk talk, handouts ok)

Eukaryotic transcriptional regulation: epigenetics, transcription factor, enhancer, promoter - Yulong

Eukaryotic transcription (https://en.wikipedia.org/wiki/Eukaryotic_transcription) - Amare

Messenger RNA (https://en.wikipedia.org/wiki/Messenger_RNA) - Kristen

Protein localization and sorting (https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_targeting) - Ya-Chi

9/8 Lentiviral transduction (5 min, chalk talk, handouts ok)

Lentiviral systems: <https://www.addgene.org/guides/lentivirus/> - Michelle

The elements on a lentiviral map en.vectorbuilder.com/resources/vector-system/pLV_Exp.html - Timmy

Cloning: restriction enzyme, Gibson, Golden gate - Katherine

Bacterial transformation, miniprep, maxiprep - Tsung-Chih

Transfection, Transduction - Lisa

9/11 Illumina/nanopore/library prep/sequencing (10 min, chalk talk, handouts ok)

Dead cell removal - Tsung-Chih

ATACseq, 5' RNA, 3' RNA, CITEseq - Yulong

10x Genomics (GEM beads, adaptor) - Katherine

Size selection with SPRI beads - Michelle

Library quantification/QC: tape station, bioanalyzer, QBit - Kristen

Illumina sequencing chips - Amare

Oxford nanopore - Lisa

TCR library amplification - Timmy

2. 通過 BSL2+實驗室操作訓練



(<https://ehs.yale.edu/biological-trainings>)

- (1) 完成實驗室工作批准要求，並確保所有工作均按照耶魯大學、NIH、CDC、OSHA 和其他適用法規、指南和標準進行。這包括完成適用的 EHS 培訓並接受 PI 或 PI 指定人員的實驗室特定培訓。
- (2) 遵循耶魯大學生物安全手冊中提供的建議和要求，除非被 BL3 手冊或血液病原體訓練手冊取代。
- (3) 了解實驗室的操作程序、所用材料的潛在危險以及發生事件（例如暴露、溢出）時應遵循的緊急程序。
- (4) 向首席研究員報告任何醫療限制、可報告疾病以及任何可能暴露或導致潛在危險的事件。報告所有異常情況。
- (5) 如果在處理人類病原體或組織培養方面缺乏經驗，請接受首席研究員的培訓並證明其對標準微生物學實踐的熟練程度。
- (6) 完成所有醫療監測要求。
- (7) 履行指定的職責。設施的運作是使用者的責任，需要所有設施使用者的合作。
- (8) 高壓滅菌器和廢棄物：在生物醫學廢棄物容器裝滿之前將其丟棄。
- (9) 冰櫃：定期為冰櫃除霜。現在是審查冷藏設備內容以識別未知材料並與 PI 討論這些材料的處置的好時機。
- (10) 清潔：定期清潔和整理個人工作區域和公共使用區域。
- (11) 真空收集器和過濾器維護：安排真空收集瓶的清潔，並確保收集瓶上貼有其所含消毒劑的標籤，並且每個真空收集器設定中都有一個在線真空過濾器。
- (12) 物資維護，包括個人防護裝備 (PPE)。
- (13) 傳染性病原體的安全；即將傳染性病原體儲存在上鎖的實驗室的上鎖冰箱中。

3. 每週一對一研究討論

每週例行與何博士進行一對一討論，解決研究上遇到的難題，並在研究一對一的討論當中，與何博士充分討論研究內容與實際執行的方向，有助於研究計劃的進展。

4. 參加免疫所舉辦的講座 (<https://medicine.yale.edu/immuno/events/seminar/>)

Immunobiology Seminar Series 2023-2024

Thursdays from 10:30-11:30 AM in TAC Auditorium, unless otherwise noted

Louis Staudt, National Cancer Institute, NIH	Markus Müschen	September 14
Faculty Meeting Day/Postdoc RIP	(See RIP Schedule)	September 21
David Braun, Yale		September 28
Evelyn Vazquez, University of California, Riverside – DEI speaker (virtual)	Paula Kavathas	October 5
Katia Georgopoulos, Harvard University	Markus Müschen	October 12
Faculty Meeting Day/Postdoc RIP	(See RIP Schedule)	October 19
		October 26
Rachel Gottschalk, University of Pittsburgh	IBIO Students	November 2
		November 9
Faculty Meeting Day/Postdoc RIP	(See RIP Schedule)	November 16
Yale Holiday – No Seminar		November 23
Margaret Ackerman, Dartmouth College	John Tsang	November 30
Mikala Egeblad, Johns Hopkins University	Andrés Hidalgo	December 7
Fernando Camargo, Harvard University	Andrés Hidalgo	December 14
Faculty Meeting Day/ Postdoc RIP	(See RIP Schedule)	December 21
Yale Holiday – No Seminar		December 28
		January 4
Matthew (Max) Krummel, University of California, San Francisco	Jordan Pober	January 11
Faculty Meeting Day/Postdoc RIP	(See RIP Schedule)	January 18
David Masopust, University of Minnesota	Carla Rothlin	January 25
Dusan Bogunovic, Icahn School of Medicine at Mount Sinai	Carrie Lucas	February 1
Dana Pe'er, Memorial Sloan Kettering Cancer Center	Noah Palm	February 8
Faculty Meeting Day/Postdoc RIP	(See RIP Schedule)	February 15
Amy Moran, Oregon Health & Science University	Nikhil Joshi	February 22
Kate Fitzgerald, University of Massachusetts	Grace Chen	February 29
Chrysothemis Brown, Memorial Sloan Kettering Cancer Center	Carolina Lucas	March 7
Ellen Rothenberg, Caltech – GERSHON LECTURE	David Schatz	March 14
Faculty Meeting Day/Postdoc RIP	(See RIP Schedule)	March 21
Kole Roybal, University of California, San Francisco	Wei Hu	March 28
Thorsten Mempel, Harvard University	Nikhil Joshi	April 4
Jane Buckner, Benaroya Research Institute	Joseph Craft	April 11
Faculty Meeting Day/Postdoc RIP	(See RIP Schedule)	April 18
Catherine Blish, Stanford University	IBIO Postdocs	April 25
AAI Meeting – No Seminar		May 2
Pamela Bjorkman, Caltech – JANEWAY LECTURE	Ruslan Medzhitov	May 9
Faculty Meeting Day/Postdoc RIP	(See RIP Schedule)	May 16
Bill Robinson, Stanford University	Kevin O'Connor	May 23
Amanda Poholek, University of Pittsburgh	David Shatz	May 30
Mark N. Lee, Yale (in Brady Auditorium due to YSM Med Day)	Paula Kavathas	June 6
Ivan Zanoni, Harvard University	Ellen Foxman	June 13
Faculty Meeting Day/Postdoc RIP	(See RIP Schedule)	June 20
		June 27

5. 參加醫學院所舉辦的免疫學講座(<https://medicine.yale.edu/immuno/hti/>)
HTI 研討會系列重點關注人類疾病的研究，並邀請了全國公認的內部和外部演講者。計劃提供培訓補助金，以發展具有人類轉化免疫學專業知識的新研究人員的職業生涯，並支持這些人員在 HTI 教師實驗室的工作。

Human and Translational Immunology Seminar Series 2023-2024		
Tuesdays from 4:00-5:00 PM in Brady Auditorium BML 131, unless otherwise noted		
September 5	NO SEMINAR	
September 12	Menna Clatworthy, University of Cambridge, UK	
September 19	Carolina Lucas, Yale	
September 26	Perry Wilson, Yale	Madhav Menon
October 3	YCIO speaker - TBD	
October 10	William Damsky, Yale (in TAC Auditorium)	Joseph Craft
October 17	Tentative company/industry presentation	
October 24	Aleixo Muise, University of Toronto	Carrie Lucas
October 31	Jason Crawford, Yale	
November 7	Ye Oo, University of Birmingham, UK	David Assis
November 14	Andres Hidalgo, Yale	
November 21	NO SEMINAR - THANKSGIVING WEEK	
November 28	Kristine Kuhn, University of Colorado	Kevin O'Connor
December 5	YCIO speaker - TBD	
December 12	Ellen Foxman, Yale	
December 19		
December 26	NO SEMINAR - HOLIDAY BREAK	
January 2	YCIO speaker - TBD	
January 9	Dennis Moledina, Yale	Jordan Pober
January 16	Mariana Kaplan, NIH	Ellen Foxman
January 23	Tentative company/industry presentation	
January 30	Monique Hinchcliff, Yale	Joseph Craft
February 6	YCIO speaker - TBD	
February 13	Maria-Luisa Alegre, University of Chicago	Madhav Menon
February 20	Junghee Shin, Yale	
February 27	Tomokazu Sumida, Yale	
March 5	YCIO speaker - TBD	
March 12	Yang Liu, Yale	
March 19	Tentative company/industry presentation	
March 26	Caroline Sokol, Harvard University	Nikhil Joshi
April 2	NO SEMINAR - HTI RETREAT	
April 9	Nir Hacohen, Harvard University	Carrie Lucas
April 16	Mancy Tong, Yale	
April 23	NO SEMINAR - PASSOVER	
April 30	NO SEMINAR - PASSOVER	
May 7	NO SEMINAR - AAI MEETING	
May 14	David Martinez, Yale	Jordan Pober
May 21	Soumya Raychaudhuri, Harvard University	David Hafler
May 28	Andrew Martins, Yale	Jordan Pober
June 4	YCIO speaker - TBD	
June 11		
June 18	NO SEMINAR - FOCIS MEETING	
June 25		

盛行率也很高(27.4%)，在控制年齡後，CD8+ T 細胞和最低值 CD4+數與 CH 密切相關。在對 35 歲及以上患者進行的亞組分析中，IRIS 病史與 CH 相關。與非攜帶者相比，CH 攜帶者的發炎生物標記物更高，支持免疫狀態失調。這些發現表明 PWH CD4+ 最低值較低和/或發炎併發症的患者無論年齡如何，都可能處於 CH 的高風險中，並且是可以從風險降低和潛在靶向免疫調節中受益的高風險群體。

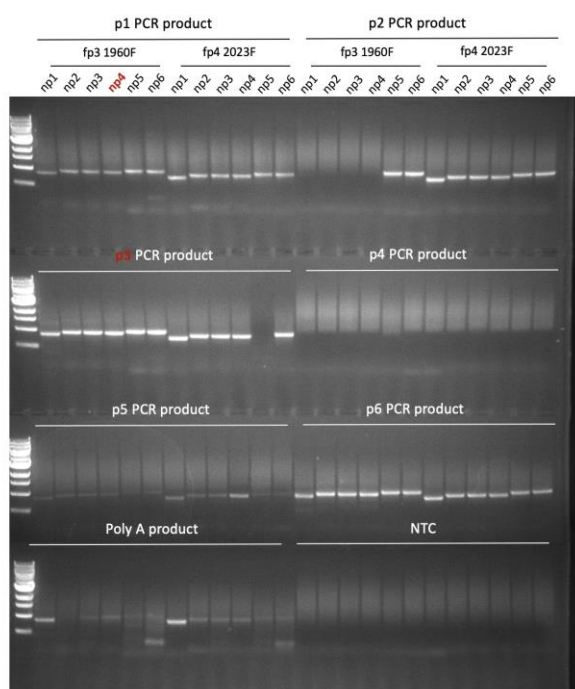
在經過充分的討論之後，我的研究題目就聚焦在“愛滋病病毒感染者相關的骨髓幹細胞突變與克隆造血(Clonal Hematopoiesis)”。

(三) 構思研究計畫

1. 與 NIH 合作取得愛滋病感染者的 PBMC 檢體，其中部分包含有克隆增生突變的檢體。
2. 與耶魯大學的臨床實驗研究單位合作，取得非愛滋病感染者的 PBMC 檢體作為對照組。
3. 此研究選擇使用 ECCITEseq 的單細胞做多組學技術，可以同時偵測血液克隆增生細胞及 T 細胞克隆增生細胞，藉由此技術，可以剖析血液中的克隆增生細胞是否會影響愛滋病病毒所感染的 T 細胞在克隆增生和免疫功能上的狀態是否有影響，以及其中的可能機轉。
4. 單細胞多組學實驗設計與實驗步驟的撰寫。
5. 在使用愛滋病感染者檢體之前，先應用愛滋病病毒感染之細胞株及愛滋病病毒感染之健康 CD4+T 細胞，進行條件測試，找出最適合的研究條件與實驗步驟。
6. 預估實驗耗材及定序所需的預算。

(四) 執行單細胞多組學實驗

1. 設計並測試 DNMT3A 基因及 HIV-1 的引子(Primer)。



JAK2_spike_in_primer (5' kit)(27nt)
 5'- GTT TGA TGA AAG GAG GAT TTC CTG TCT -3'
 Tm_IDT_RNA : 50.9°C
 Tm_IDT_DNA : 57°C

RT: 53 °C for 45mins

	Tm(NCBI)	Tm(IDT_RNA)	Tm(IDT_DNA)
p1	57.38	58.2	54
p2	58.13	52.7	54.1
p3	59.05	58.6	55.4
p4	62.74	68.6	59.7
p5	65.27	71.7	61.9
p6	65.94	66.1	61.5

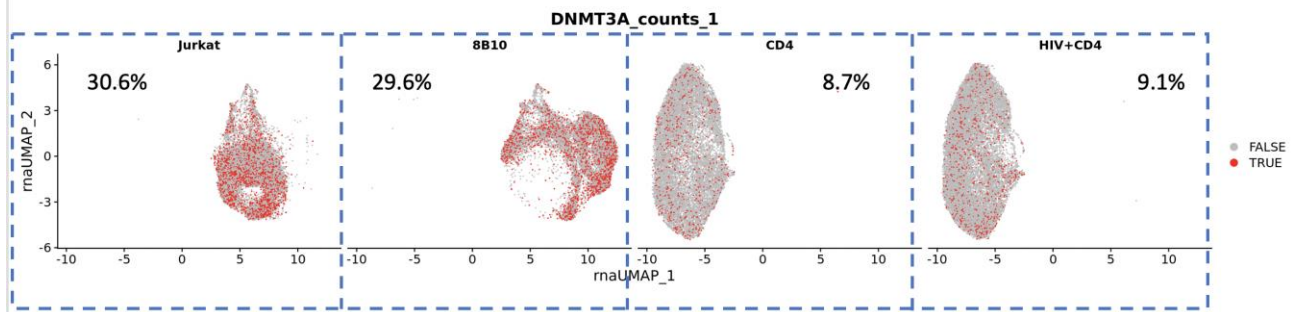
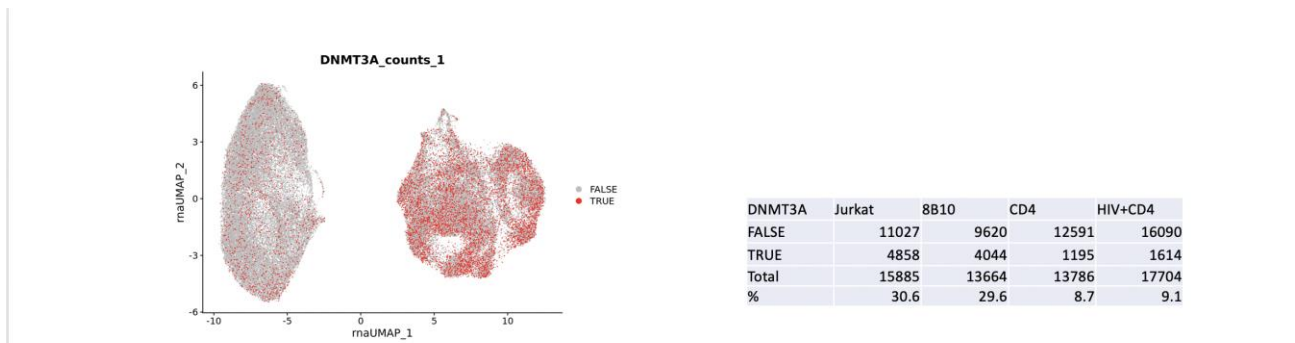
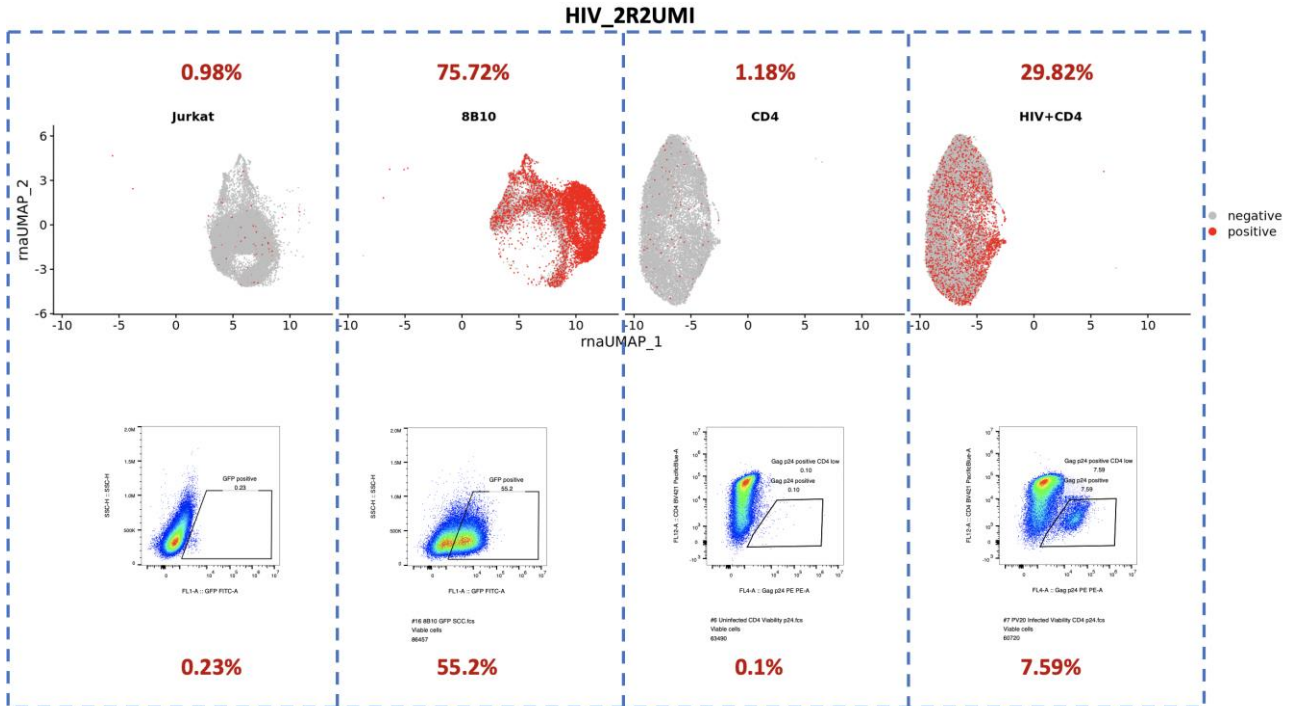
PCR: 98-63-72°C

	Tm(NCBI)	Tm(IDT_DNA)
np1	56.35	53.7
np2	57.24	53.9
np3	60.16	56.6
np4	60.35	56.7
np5	67.52	64.9
np6	68.23	65.2

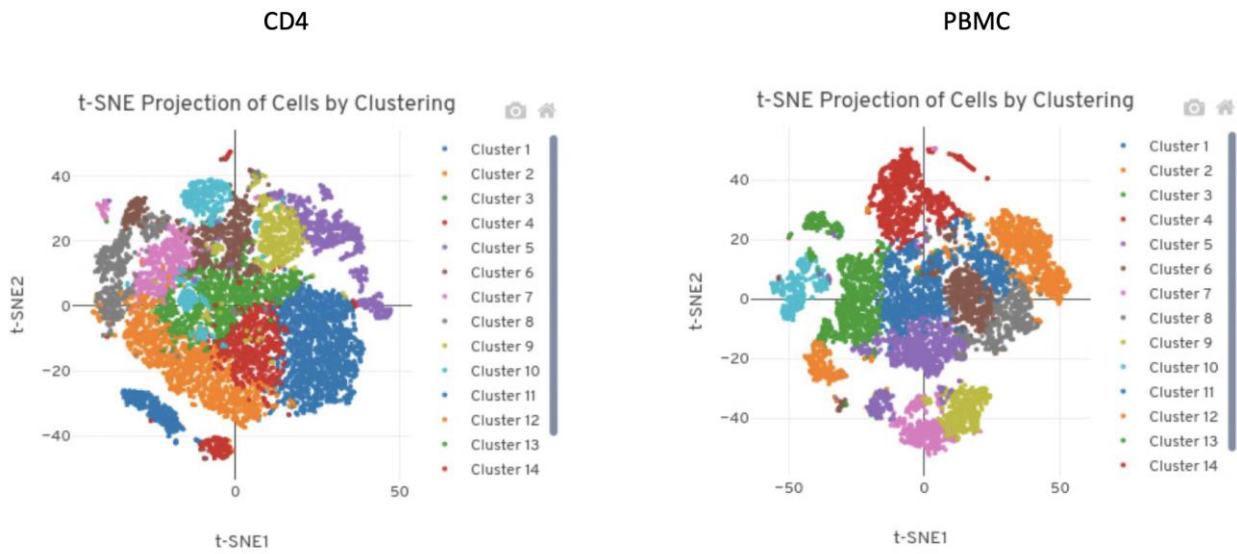
	Tm(NCBI)	Tm(IDT_DNA)
fp3	63.36	61.9
fp4	64.98	62.7

Partial read1
 IDT_Tm_DNA : 58.3°C

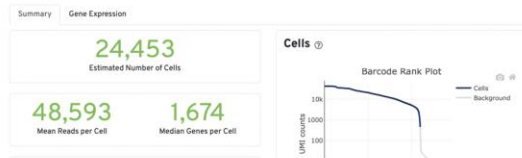
2. 使用細胞株及人工感染細胞作為測試 Primer 濃度的先行試驗。



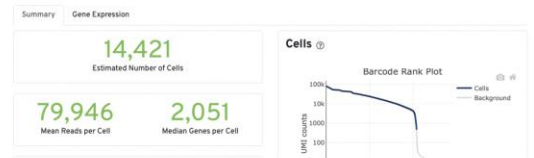
3. 執行愛滋病病毒感染者，PBMC 檢體的單細胞多組學定序實驗。



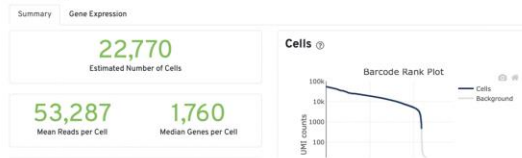
C6361_HHT



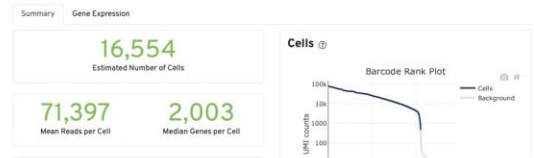
P6361_HHT



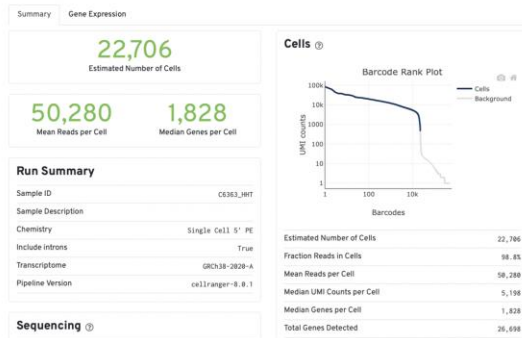
C6362_HHT



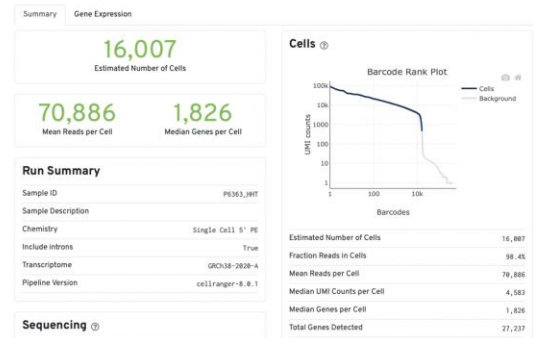
P6362_HHT



C6363_HHT



P6363_HHT



4. 執行健康捐贈者的 PBMC 檢體的單細胞多組學定序實驗。(待執行中)

三、心得

首先非常感謝院部長官與科部同仁的協助，讓我有機會得到這一個出國進修的機會，在這一年的出國進修當中，從一開始到紐希文尋找住宿落腳地點，很感謝有家人的幫助與陪同，讓我很快地找到了一個很好的居住的公寓，接著緊接著在 8 月 1 號即投入實驗室的例行會議及研究活動當中，並和何博士積極的討論相關的研究題目，而且考慮到我的臨床專業與興趣，專注於研究愛滋病病毒感染者的淋巴惡性腫瘤以及骨髓幹細胞

克隆性增生的問題，並且從中找到我們之間可以共同有興趣，且可以執行的題目，在實驗設計與整個預算考量之後，感謝何博士投入大量的實驗資源，支持我進行目前的研究工作，希望能夠持續在這一個題目上，把資料分析的部分也可以執行完成，最後可以綜合臨床資料與分析的結果，回答目前在這一個領域當中，是否骨髓幹細胞的克隆性增生會影響到周邊血中成熟免疫細胞的免疫功能，以致於影響在愛滋病感染者當中造成早發性的克隆性增生，與其在在臨床上的意義。

在研究之外，同時也可以觀察到在耶魯大學的研究室運作的過程。在這邊大部分的研究工作者都是專職的，包括，博士生、畢業後的研究助理、博士後研究員，實驗室的主持人何博士，雖然同時有感染科醫師的資格，但他仍然專注於研究，並沒有從事臨床相關的工作，全力以赴做愛滋病基礎相關的研究工作，每每能夠發表在愛滋病相關領域當中，非常重要的文章，整個研究團隊也致力於學習發展新的研究技術，以期能夠解決目前愛滋病病毒，尚未能夠在人體中被完全清除的困境。何博士也樂於資助我們參加相關的研討會，發表研究結果，並在研討會中，也能和其他研究團隊交流合作。這一年的過程讓我體驗到在美國實驗室的經營管理的實務，以及在美国豐富的生醫研究資源與動能。

對於未來的展望，跟美國的研究環境比較起來，在台灣的研究資源仍然相當有限，目前要執行單細胞多組學的研究，會面臨的挑戰，除了技術、耗材與分析能力的問題之外，另外一個因素可能就是需投入的價格太高及需要有專人進行資料分析，所以未來我應該要思考，如何利用單細胞多組學的技術，應用在特定的研究題目的探討或是驗證上，設計可以執行的實驗設計，把單細胞多組學的價值能提升到最高。

四、 建議事項

(一) 持續發展單細胞多組學並應用在臨床研究中。

近年來，隨著精準醫學治療時代的到來，單細胞多組學的研究領域正在不斷推動人類癌症研究、代謝組學、發育生物學、免疫學及神經科學多個領域向前發展，逐漸成為生物醫學領域研究的焦點。另外，空間轉錄體學 (Spatial transcriptomics) 是一門新興的技術領域，它能夠在組織切片上原位分析多種基因的表達和位置，揭示細胞的空間組織和功能，目前已可以達到小於 10 μ m 的解析度了，對於理解細胞的多樣性、相互作用和命運具有重要的價值。隨著多組學的蓬勃發展，我們可以以新的研究的切入點，研究尚待解決的臨床問題。

(二) 跨科研究合作，整合院內資源。

目前，執行單細胞多組學及空間轉錄體學，即使在美国，實驗耗材仍然是十分昂貴的，院內也有越來越多的醫師或研究員，持續在國內或國外，學習單細胞多組學或空間轉錄體學這項新興的研究技術，我們也許能夠透過跨科的研究合作，找出新的研究題材，分工合作執行研究方案，整合院內的資源，以期能在有限的研究資源下，仍然可以執行及完成研究目的，甚至能夠將結果發表到頂尖的期刊。

(三) 建立研究夥伴。

要執行一個好的臨床或是基礎的研究，往往需要投入許多的人力物力，許多在研究上，很有成就的人，也都把研究的興趣，當成是自己的最大興趣，有時甚至是沒日沒夜的工作，卻樂此不疲。如果我能夠找到一些志同道合的夥伴，有著相同的興趣和夢想，在研究遇到瓶頸時，可以互相討論，有好的研究發現時，也可以分享喜悅，透過合作的方式達到實驗的成功，期待自己能持續與耶魯大學的實驗室聯絡，回台灣之後，也可以跟院內或是院外其他單位執行相關研究的醫師，或研究員進一步的交流，也許會有一些意想不到的合作契機，就像我目前執行的題目，也是在某一天星期六的下午，突然有 NIH 的學者，寄了一封 email 給實驗室主持人何博士，尋求合作一樣，剛好我們實驗室就有一個血液科的專科醫師，很樂意的接受這個挑戰，可以很順利地承接這一個研究題目。

(四) 撰寫研究計畫，尋求研究資源。

在實驗室訓練的期間，何博士也鼓勵我，撰寫研究計畫，雖然計畫常常沒有如願被接受，但在撰寫的過程，何博士給了很多寶貴的意見和指導，未來回國後，將持續積極爭取研究經費，尋求合作的大學實驗室，聘請研究助理，持續臨床研究的精進。