

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

第三名

052009

探索腫瘤新抗原及發展多功能幹細胞疫苗對抗
大腸直腸癌

學校名稱： 國立臺灣師範大學附屬高級中學

作者： 高二 王淮捷	指導老師： 林峻緯
-------------------	------------------

關鍵詞： 新抗原、大腸直腸癌疫苗、多功能幹細胞

摘要

大腸直腸癌(Colorectal cancer)是發生率高且較易導致死亡的癌症類型，因此本研究透過篩選誘導性多功能幹細胞(iPSC)中表現的新生抗原來進行對 Colorectal cancer 免疫作用，以利找出最適合作為「大腸直腸癌疫苗」的抗原/佐劑組合。本研究先使用 DTU Health Tech 的 NetMHCcons 大數據分析與西方墨點法來篩選出小鼠 iPSC 中的新生抗原 TTW4 為最有可能作為大腸直腸癌疫苗的候選抗原後接續以下實驗。首先藉由流式細胞儀觀測樹突細胞(DC)活化的實驗，結果推測出 TTW4 可以幫助毒殺性 T 細胞(CD8+T)活化。然後使用 TLR 受體家族不同的疫苗佐劑搭配 TTW4 來進行細胞螢光影像法，發現 TTW4 確實可以活化 CD8+T，且對於小鼠的 Colorectal cancer cell 也有顯著的抗癌效果。所以實驗結果證明 TTW4/Poly(I:C)的確可做為大腸直腸癌疫苗的最佳組合候選。

壹、動機與研究背景

一、大腸直腸癌(colorectal cancer)的傳統治療與新型態的疫苗治療比較

在眾多癌症之中，大腸直腸癌是好發率高且進展較慢的癌症，根據世界衛生組織(WHO)在 2020 年的資料顯示，大腸直腸癌是全球發生率第三高、死亡率第二高的癌症，而在本國是發生率的第二名，死亡率的第三名。

目前臨床上較常見的大腸直腸癌治療方式有手術切除、化學治療、標靶藥物治療和放療等等，但都有不可忽視的副作用和風險。執行手術切除時，因為腫瘤位置在大腸直腸，尤其是附近血管複雜的低位直腸癌，需先將該區域的淋巴結清除乾淨，否則可能導致大量出血。在手術後未追蹤病情也有案例導致肛門、陰部出血，腫瘤也變得不易切除。而標靶藥物治療分別是針對抗表皮生長因子受體(Epidermal growth factor receptor; EGFR)的單株抗體，以及針對血管內皮生長因子(Vascular endothelial growth factor; VEGF)或 VEGF 受體的單株抗體。這類標靶藥物使用後可能會有血管栓塞、高血壓、蛋白尿及影響傷口癒合等副作用，且手足皮膚紅腫水泡反應、腹瀉及紅疹的發生機率超過 50%。目前在國內的臨床應用只能使用在晚期大腸直腸癌且接受標準治療失敗的病人，其存活期僅能多 2.8 個月。如能開發出大腸直腸癌症疫苗，則可以利用提升自身免疫活性，來達到預防或治療的效果，可免除現今治療方式的副作用與風險。

癌症疫苗可以刺激免疫系統來對抗癌症，而目前常見的癌症疫苗有兩種，分別是預防性疫苗(preventive vaccines)和治療性疫苗(therapeutic vaccines)。前者是預防健康的人產生癌細胞病變，例如 HPV 疫苗、B 型肝炎疫苗等；後者則是藉由增強人體的免疫防禦機制達成治療癌症的目的。其作用機制是藉由讓免疫系統辨識腫瘤抗原，來增進免疫細胞對抗癌細胞的能力。故相較於其他傳統的治療方式，大腸直腸癌疫苗開發是一個新穎且有潛力的研究標的。

二、iPSC 作為癌症疫苗新生抗原來源之潛力

在先前 Nigel G. Kooreman 等人的實驗中發現，人工誘導性多功能幹細胞(Induced pluripotent stem cell, iPSC)在經過輻射處理後，其所含的抗原能幫助免疫系統辨識出腫瘤細胞，結果確認這樣可以用於預防小鼠的乳癌、肺癌和皮膚癌。此外，由 iPSC 所衍生的疫苗能夠重新激活免疫系統，強化對腫瘤細胞的攻擊進而達到抗癌的效果(Nigel G. Kooreman et al. 2018)。

另外 Xiaoming Ouyang 等人研究證明自體 iPSC 疫苗可活化毒殺型 T 細胞和記憶反應，並減少抑制性的免疫調節細胞，結果顯示這樣可阻止大部分小鼠的胰腺導管腺癌(PDAC)腫瘤形成。所以顯示 iPSC 對於低突變負擔的癌症也有研發疫苗的潛力。(Xiaoming Ouyang et al. 2021)

以上兩篇論文皆顯示癌症疫苗的開發，iPSC 的確佔有重要的地位。所以本實驗就是要利用 iPSC 來進行大腸直腸癌疫苗的研究。

三、先前尋找 iPSC 中具潛力之新生抗原研究

本實驗室先前判斷 iPSC 可能會增進 C57BL/6 小鼠樹突細胞 MHC I 的表現，這代表 iPSC 可能使毒殺型 T 細胞更加活化。一般可採用液向質譜儀、大數據篩選和西方墨點(western blot)等方法從 iPSC 中尋找出有潛力的抗原，例如本實驗室所探討的「TTW1」、「TTW2」、「TTW3」、「TTW4」都是存在於 iPSC 的抗原。先前已證明「TTW2」、「TTW3」在正常細胞有高度表現，不具抗原特異性，因而確定不列入後續的抗原篩選。而透過操作 GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) 網站結果顯示 TTW1 與 TTW4 的基因在人類大腸直腸癌組織的表現較人類正常組織為高。所以為本次實驗的主要探索目標。

四、癌症疫苗佐劑

在開發疫苗時通常會搭配佐劑使用。佐劑又稱免疫增強劑，其主要功能為誘發、延長或提升對目標抗原的特異性免疫反應。佐劑對於疫苗成效有一定程度的影響，因此選擇適合的佐劑也是開發疫苗時的重要步驟。常見的佐劑類型有疫苗傳輸系統之佐劑和免

疫促進作用之佐劑，前者藉由增加抗原遞送至淋巴結的能力或保護抗原不被破壞達成增加抗原免疫原性或延長抗原作用時間的目的。後者則是藉由數種不同的免疫機制來增強疫苗效果，像是刺激抗原呈現細胞的成熟、增加免疫調節劑和直接活化免疫細胞等方式。

癌症疫苗在配置時一定需要搭配免疫佐劑以增強效用。大部分癌症疫苗研究皆使用 CpG ODN 1080 作為疫苗佐劑，其對應受體為 TLR9。所以本實驗選擇 CpG ODN 1080 作用機制有關的 TLR 受體家族(TLR family)為實驗材料，與篩選出的抗原搭配來進行免疫活化測試與抗癌的研究。

五、本研究動機

為了改善大腸直腸癌傳統治療方式所造成的副作用與風險，本篇研究主旨在探討腫瘤新抗原以及大腸直腸癌疫苗的開發。透過多種的篩選方式，從 iPSC 中選出有潛力的新生抗原並搭配最佳的佐劑作為初階疫苗模型，成為有潛力可進入人體臨床試驗的大腸直腸癌疫苗的候選組合。

貳、研究目的

- 一、在 iPSC 中找出具開發大腸直腸癌疫苗潛力的蛋白新生抗原。
- 二、觀察篩選出的新生抗原其對於 C57BL/6 小鼠的樹突細胞活化效果。
- 三、使用篩選出的新生抗原搭配不同的 TLR 受體佐劑，在小鼠大腸直腸癌細胞觀察毒殺性 T 細胞的活化反應與對抗大腸直腸癌的效果。

參、研究設備及器材

一、本研究所使用的細胞株：(本研究所使用之小鼠皆為 C57BL/6)

小鼠誘導性多功能幹細胞株(Mouse iPSCs cell line(iPSC))

小鼠胚胎成纖維細胞株(Mouse Embryonic Fibroblasts line(MEF))

小鼠大腸直腸癌細胞株(Mouse Cancer 38 line(MC38))

小鼠大腸直腸癌細胞株(CT26)

小鼠骨髓 (Mouse Bone Marrow)

小鼠毒殺性 T 細胞(Mouse cytotoxic T cell(CD8+T))

CHO-K1(CHO cell clone K1)

二、材料：

DMEM 培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium , 12800-017)

RPMI 培養基(RPMI Media 1640 , 25030-081)

DMEM 培養基營養混合物 F-12(DMEM/F12 , 12400-024)

胎牛血清(FBS , 26140-079)

胰蛋白酵素(EDTA , 25300-062)

鏈黴素(Penicillin-streptomycin(P/S) , 15140)

Mice Flt-3 Ligand (FLT3L, Prospec)

β -mercaptoethanol(β -ME, Gibco)

超細胰島素注射器(Ultra-Fine™ insulin syringe, BD)

2-巰基乙醇(2-Mercaptoethanol,BIO-RAD)

十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE, BIO-RAD)

硝化纖維素(閃光棉)(Nitrocellulose membranes, BIO-RAD)

基質膠(Matrigel, Corning)

StemFlex Media, Gibco

細胞解離試劑(StemPro™ Accutase™ Cell Dissociation Reagent, Gibco)

Rho 激酶抑制劑(Rock inhibitor Y-27632, Invitrogen™)

氯化銨鉀裂解緩衝液(ACK lysis buffer, Panion& BF Biotech, Taiwan)

shRNA

Polybrene (Targetmol)

佐劑：CpG ODN 1080 (Integrated DNA Technologies)

LPS (MCE)

Pam3cyssk4-k5 (InvivoGen)

Poly(I:C) (InvivoGen)

抗體：FVS620(BD) (excitation: 596 nm, emission: 620 nm)

MHCI-BUV395 (BD) (excitation: 355 nm, emission: 395 nm)

MHCII-BUV650 (BD) (excitation: 355 nm, emission: 650 nm)

CD11c-PE-Cy7 (BD) (excitation: 496 or 561 nm, emission: 785 nm)

CD86-BV421 (BD) (excitation: 407 nm, emission: 421 nm)

其他：Brilliant Staining Buffer (BD)

Fc blocker(Biolegend)

TransFix buffer

CellTracker™ Orange CRMA

三、本研究所使用之儀器：

流式細胞儀(FACS , Fluorescence Activated Cell Sorter)

細胞計數器(Cells counter)

迷你濕式轉漬槽(Mini Trans-Blot Cell)

倒立式顯微鏡(Inverted microscope)

恆溫培養箱(Incubator)

無菌操作台(biosafety cabinet)

離心機(Centrifuge)

UVP 冷光照射儀

肆、研究過程或方法及進行步驟

一、細胞培養

(一) iPSC 株培養

參考製造商推薦的基質濃度預先在培養盤上進行 coating 一個小時，將 iPSC 培養在有基質塗層的 six-well plates。在培養 iPSC 的介質，將 8cc 的 StemFlex Media 添加至 500cc 的 DMEM-F12 培養液，需要每天換並觀察培養基。當細胞飽滿度到達 70% 需要重新貼盤，使用 StemPro™ Accutase™ Cell Dissociation Reagent (Gibco) 當貼盤試劑。當細胞培養在培養皿時，添加 10 μ M 的 Rho 激酶抑制劑[Rock inhibitor Y-27632 (Invitrogen)]幫助細胞貼盤。經過一天之後，不需要再次加入 Rho 激酶抑制劑[Rock inhibitor Y-27632 (Invitrogen)]。本研究中所使用 iPSC 皆介於第十到第三十代之間。培養 iPSC 的環境應由恆溫箱控制在溫度 37°C、二氧化碳濃度 5%、環境濕度 95%。

(二) MC38、CT26、MEF 與 CHO-K1 培養

本研究使用的大腸直腸癌細胞(MC38, CT26)是來自 C57BL/6 小鼠。將細胞培養在 10cm 的培養皿中，每兩天觀察並繼代且更換 10%FBS DMEM culture medium (CT26 使用 RPMI 培養)。培養環境藉由恆溫箱控制在溫度 37°C、二氧化碳濃度 5%、環境濕度 95%。小鼠纖維母細胞(MEF)與中國倉鼠卵巢上皮細胞(CHO-K1)的培養方法與上述相同。

(三) 小鼠骨髓細胞分化成樹突細胞與培養

將小鼠骨髓細胞收集入 PBS 進行離心，並使用 ACK 1cc, 30sec 將紅血球裂解再離心，最後的沉澱的細胞就是骨髓細胞 (BM)。我們使用的培養基是 RPMI+10%FBS+1%P/S+45.45 μ L β -ME+1 μ L/mL Flt3 共同培養約 6 天。分化 6 天后，將 2 \times 10⁶ 個樹突狀細胞播種到 24 個孔中，在含有 10%FBS 的 RPMI 培養基中培養。我們將各組細胞裂解液或佐劑加入到細胞中，共同培養 24 小時。

二、細胞裂解物的樣本收集

(一) iPSC 與 CHO-K1 裂解物

本研究所使用之抗原樣本是將培養的細胞分為 2×10^6 一份在離心管中。細胞會重新懸浮在 100 μ L 的 PBS 中，然後冷凍在 -80°C 放 35 分鐘，接著在溫度 37°C 的環境放 35 分鐘解凍。在此過程中反覆執行以上動作三次，並確保沒有細胞畸胎瘤形成的風險。

(二) 收集細胞裂解物

將細胞打下來(可使用例如 Trypsin)，然後用 PBS 使細胞重新懸浮並數細胞。把細胞分為 2×10^6 一個 Eppendorf 並放在冰上再離心(1000rpm, 4°C, 10 分鐘)結束後去除上清液。用 1cc 的 PBS 重新懸浮細胞，接著在液態氮桶放 10 秒左右再放入 -80°C 冰箱 10 分鐘，之後去 37°C 水域槽放十分鐘，以上兩個動作重複三次，最後儲存於 -80°C 冰箱中。

三、TTW4 Overexpression

將 CHO-K1 種在 6 well dish 一晚。質體(pEGFP-TTW4)和 lipofectamine 2000 分別加入至 Opti-MEM 放在室溫 5 分鐘，再將兩者混合 20 分鐘。接下來將混合液加入細胞中在 37°C 等待 6 小時，並在 6 小時候換新的 medium。在 48 小時候收細胞並用 fluorescence-activated cell sorting (FACS)篩選，高表現 GFP 的細胞將用含有 G418 的 medium 培養。

四、流式細胞儀

(一) 實驗操作

將活化完成的樹突細胞(DC)吸取入離心管中，在 1300rpm, 5min 離心後抽取上清。接著用 FVS620 在室溫染色 15min，再用 wash buffer(0.2%BSA+PBS)洗兩次，之後離心抽取上清後加入 FC blocker 染色 10min，並把細胞移至尖形底的 96well 中，以 500xg, 5min 離心並清洗，再要染色的組別加入 BV staining buffer 50 μ L/well 和 surface staining Antibody 放在避光處冰上 20min，其餘組別加入 wash buffer。清洗兩次後用 TransFix buffer 固定，再用 200 μ L/well 的方式回溶。最後，我們使用

FACSCalibur 流式細胞儀 (BD Biosciences) 來分析細胞。然後用 FlowJO 來進一步分析數據。所有的抗體都是從 BD Biosciences 購買的，所用的抗體量為每 10^6 個細胞 0.1 微克。在細胞分群部分，我們透過正向和側向散射來區分死細胞，進而選出 Double positive 的細胞群。使用 one-way ANOVA 和 two-way ANOVA 分析。

(二) 佐劑和細胞裂解物添加量

CpG ODN 1080:0.075ng/mL, LPS:0.1 μ g/mL, Poly(I:C):25 μ g/ml,
Pam3CSK4:300ng/ml, cell lysate 加入目標細胞 3 倍細胞數的量。

五、西方墨點法

(一) 細胞蛋白萃取

癌細胞和 iPSC 在液氮中快速冷凍，然後製備含有蛋白酶抑制劑和磷酸酶抑制劑的混合物，然後將細胞裂解液浸泡在這 1mL 裂解緩衝液中並研磨。所有細胞裂解液研磨後，在 4°C 下以 12,000 轉/分的速度離心 20 分鐘。接下來，用的牛血清白蛋白 (BSA) 製作標準曲線，進行蛋白質定量。在對蛋白質濃度進行量化後，使用 3 : 1 比例的 Laemmli 樣品緩衝液 (BIO-RAD)+2-巰基乙醇 (BIO-RAD)，在 95°C 下加熱 10 分鐘。我們需要的蛋白質濃度是 50 μ g/30 μ l。

(二) 跑膠、轉印、上抗體與照膠(SDS-PAGE)

我們使用 Running buffer 來讓蛋白質分離到不同分子量的位置。接下來我們在 70 伏特下進行 1.5 小時的條件下利用 Tris-glycine SDS 轉移緩衝液將蛋白質轉移到硝酸纖維素膜上。一旦蛋白質成功轉移到硝酸纖維素膜上，我們利用溶劑 TBST 中添加 5% 脫質牛乳—浸泡 1 小時，然後加入一級抗體來反應 16-20 小時。隔天再用 TBST 洗 3 次，然後加入相對的二級抗體浸泡 1 小時。最後，我們使用 Clarity 和 Clarity Max ECL Western Blotting Substrates (BIO-RAD) 進行照明。使用 one-way ANOVA 分析。

六、細胞螢光反應法前期配置(取 C57BL/6 小鼠 CD8+T 細胞)

(一) 取細胞

將小鼠脾臟用研磨棒磨碎。使用 40 μ m falcon filter 架在一個新的 50ml 離心管上過濾，之後加入 4ml DMEM 10%FBS medium 並離心(500rcf = 1200rpm，4°C，5 鐘)去除上清液加入 1ml ACK buffer 將細胞緩緩打散(去除紅血球)在冰上靜置 1-2 分鐘，加入 10ml DMEM 10%FBS medium 稀釋。離心(500rcf = 1200rpm，4°C，5 分鐘)去除上清液並加入 10ml PBS 將細胞緩緩打散，再以相同條件離心一次並去除上清液。

(二) 配 MACS buffer 和抗體 labeling

取 100ml MACS BSA 加入 2L MACS buffer 中(1 : 20) 放在 4°C 冷房。加入 400 μ l MACS sorting buffer，再加入 100 μ l biotin-antibody cocktail 並在 4°C 冰箱靜置 5 分鐘。接著加入 300 μ l cold MACS sorting buffer 將細胞打散，而後加入 200 μ l anti-biotin microbeads 去 4°C 冰箱靜置 10 分鐘。

(三) MACS column sorting

將作用完的 microbeads cell mixture 加入 column 中，收集 unlabeled flow-through cell 至離心管中，保存留下來的細胞。滴完後，column 加入 3ml buffer wash，收集剩餘 unlabeled flow-through cell 至離心管中。之後離心(rcf 500 = 1200rpm，4°C，5 分鐘)，suction 掉上清液，再 pellet 即可回溶至 PBS。

七、細胞螢光反應法

(一) 毒殺性 T 細胞活化測試與小鼠大腸直腸癌細胞(MC38) 抗癌測試

在分化完成的樹突細胞中先依組別加入 CpG、LPS、Poly(I:C)和 Pam3CSK4 等佐劑和 CHO-K1 TTW4 Overexpression 的 cell lysate 或是 CHO-K1 GFP control 的 cell lysate。6 小時後將經由 CellTracker™ Orange CRMA 染色的未活化 CD8+T 和成熟樹突細胞共培養。在第 24 小時用 Transwell 將 CD8+T 和自帶 tdTomato(紅螢光蛋白)的 MC38 共培養。最後在第 48 小時開始量化分析。將 Transwell 上層之細胞去除，統計下側的遷移 CD8+T 細胞數來作為判斷該疫苗模型對於 CD8+T 活化效果的指標。接著將 well 中懸浮的 CD8+T 移除。藉由統計存活之 MC38 表現出的 tdTomato(紅螢光蛋白) RFU 值探討 TTW4 搭配不同 TLR 佐劑的抗大腸直腸癌效果。使用 two-way ANOVA 分析。

八、利用大數據預測進行新生抗原篩選

(一) 網站來源：Danmarks Tekniske Universitet Health Tech

NetMHCcons 統合了三個 MHCI 親和力預測工具，分別是基於人工神經網路(ANN)的等位基因特異性方法(allele-specific method) NetMHC、全泛型的人工神經網路方法 (pan-specific ANN method) NetMHCpan 和基於矩陣的演算法(matrix-based) PickPocket。NetMHCcons 所使用的版本分別為 3.4、2.8、1.1。

(二) NetMHCcons 預測 Strong binding 之基準

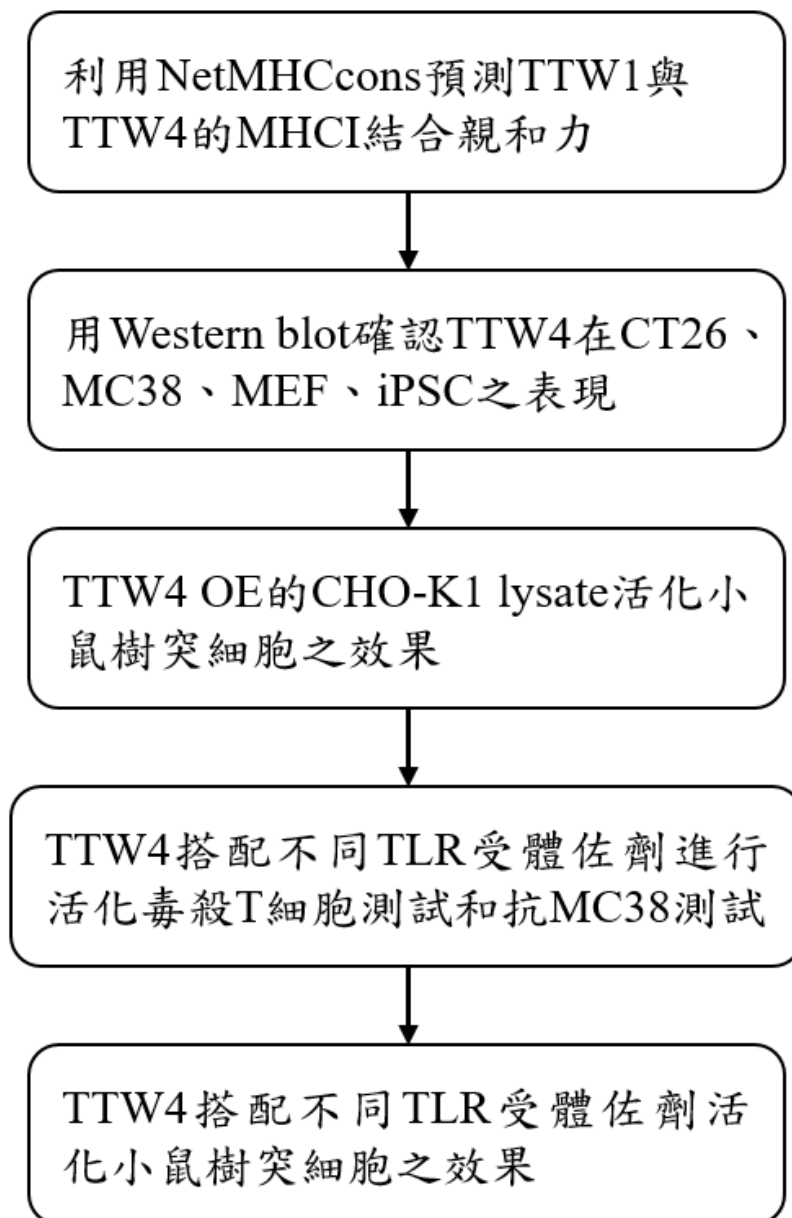
Threshold for Strong binding peptides (IC50): 50.000 nM

Threshold for Strong binding peptides (%Rank): 0.5%

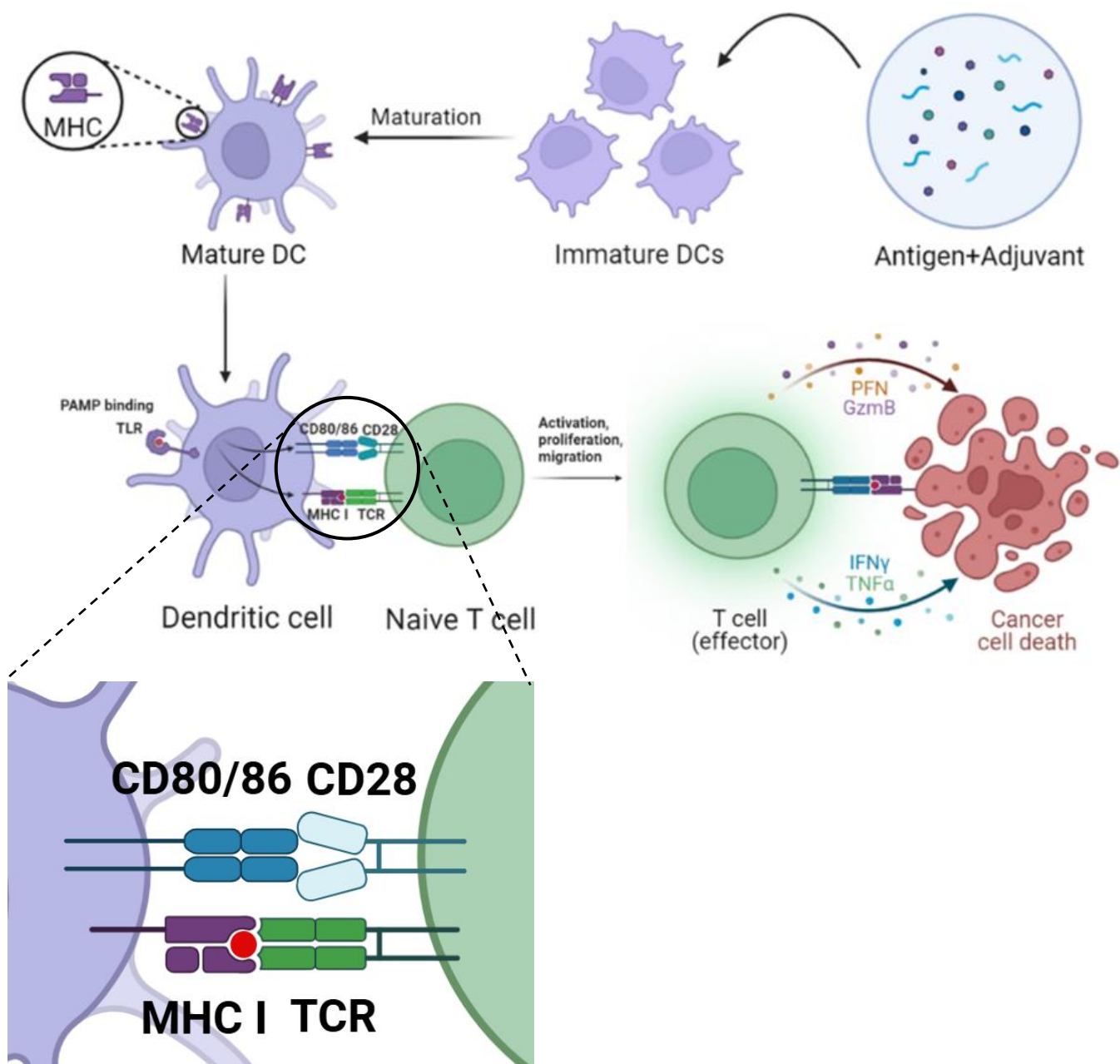
九、量化和統計分析

所有數值均以平均值 \pm s.d. 或平均值 \pm s.e.m. 表示，並在圖下註明：* $p<0.05$ ； ** $p<0.01$ ； *** $p<0.001$ ； **** $p<0.0001$ 。

十、本研究實驗設計與流程圖



圖一、實驗設計脈絡圖。(本圖片由作者親自製作)



圖二、本研究發想之新生抗原/佐劑(初步疫苗模型)概念圖。(本圖片由作者親自製作)

伍、研究結果

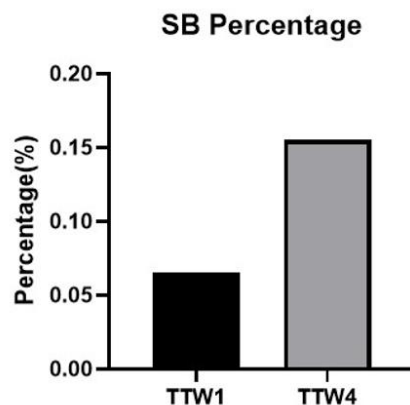
一、NetMHCcons 預測後選蛋白 8mer 到 11mer peptides 和小鼠 MHC I 結合率

本研究首先使用 NetMHCcons 網站(來自 DTU Health Tech)，來預測候選蛋白的 8mer 到 11mer 胜肽片段和小鼠 MHC I 的結合率(共有六種不同等位基因，分別是 H-2-Kb, H-2-Kd, H-2-Kk, H-2-Ld, H-2-Dd, H-2-Db)。其中三種基因 H2-K1, H2-D1 分別位於 Chr17:34214986-34219316 bp, Chr17:35482070-35486473 bp，H2-L 在 Chr17 但無詳細序列位置)，根據網站設定的 Strong Binding 門檻，計算 Strong Binding 胜肽片段佔總胜肽片段多少百分比進行比較。本研究預測 TTW1 與 TTW4 的 MHC I 結合親和力，發現 TTW4 相較 TTW1 具有高結合親和力，因此決定更深入探討 TTW4。

A

	Allele	Identity	Peptide	Length	Affinity(nM)
1	H-2-Kk	TTW4	MEIEGRTI	8	9.09
2	H-2-Kd	TTW4	SYSATKETL	9	12.78
3	H-2-Kk	TTW4	FEGSVRARI	9	20.69
4	H-2-Kk	TTW4	SEEEVMEI	8	23.30
5	H-2-Kk	TTW4	EEKQGAEI	8	37.11
6	H-2-Kk	TTW1	QEAEAKGEV	9	34.21
7	H-2-Ld	TTW1	KPFKLSGLSF	10	247.81
8	H-2-Kb	TTW1	FSFKKPFKL	8	251.87
9	H-2-Ld	TTW1	TPKKKKKFSF	10	1062.03
10	H-2-Kk	TTW1	EEEQEQGEM	9	1477.25

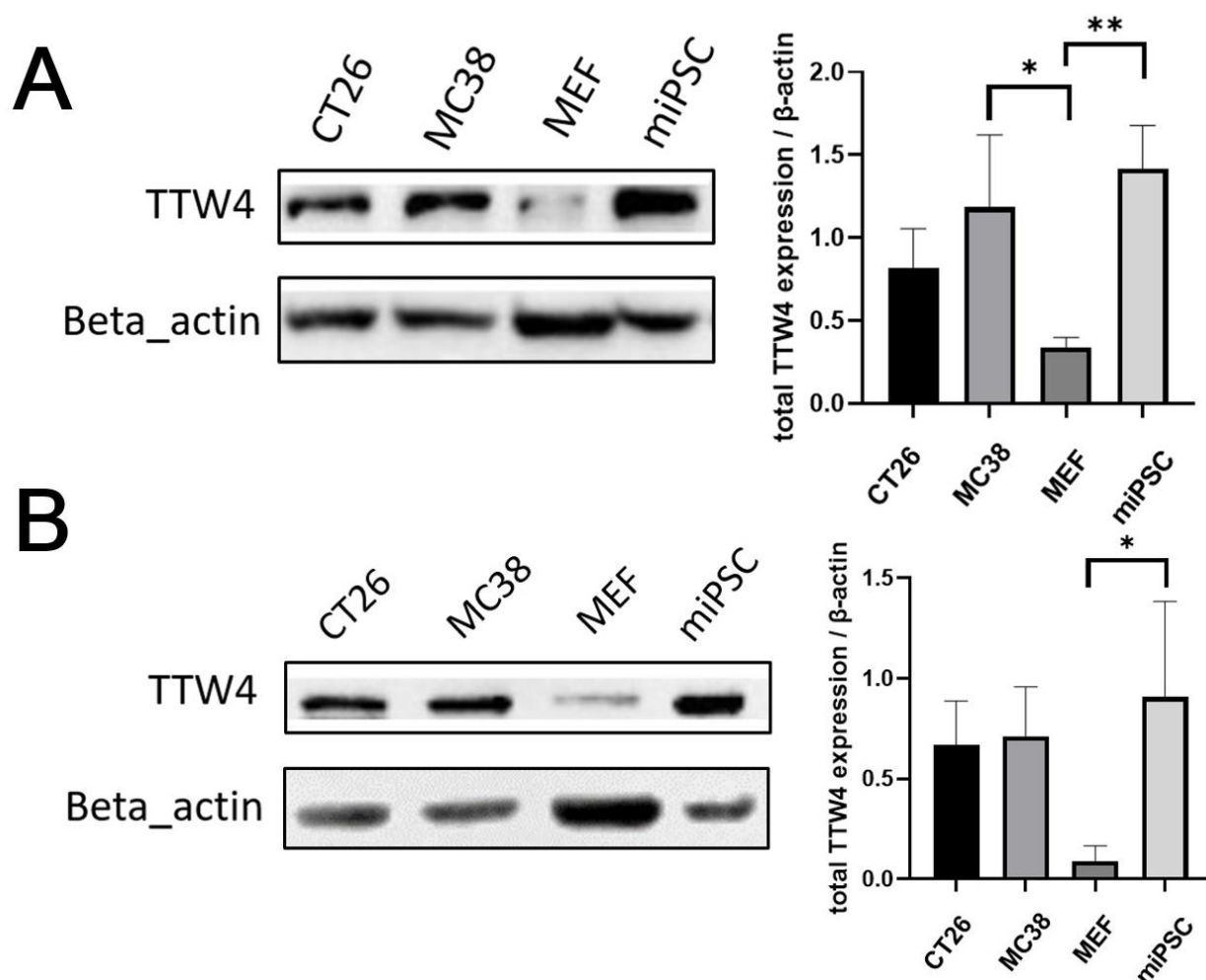
B



圖三、(A)TTW1, TTW4 預測結合率最高的各五個胜肽片段。(B)TTW1 和 TTW4 預測 Strong Binding 百分比圖。(本圖片由作者親自製作)

二、西方墨點法分析 TTW4 在 CT26、MC38、MEF、iPSC 之含量

利用西方墨點法分離出細胞中的不同蛋白，並透過 marker 切出目標蛋白所在位置判定其含量。圖中細胞分別為 BALB/c 小鼠的大腸直腸癌細胞(CT26)、C57BL/6 小鼠的大腸直腸癌細胞(MC38)、小鼠纖維母細胞(MEF)和小鼠誘導性多功能幹細胞(miPSC)。本實驗室先前用大數據與質譜儀分析發現 iPSC 與 MC38 具有許多共同蛋白質抗原，其中根據圖(四-A,B)的結果我們發現 TTW4 僅在 CT26、MC38 與 iPSC 中表現，而在 MEF 中表現極低。

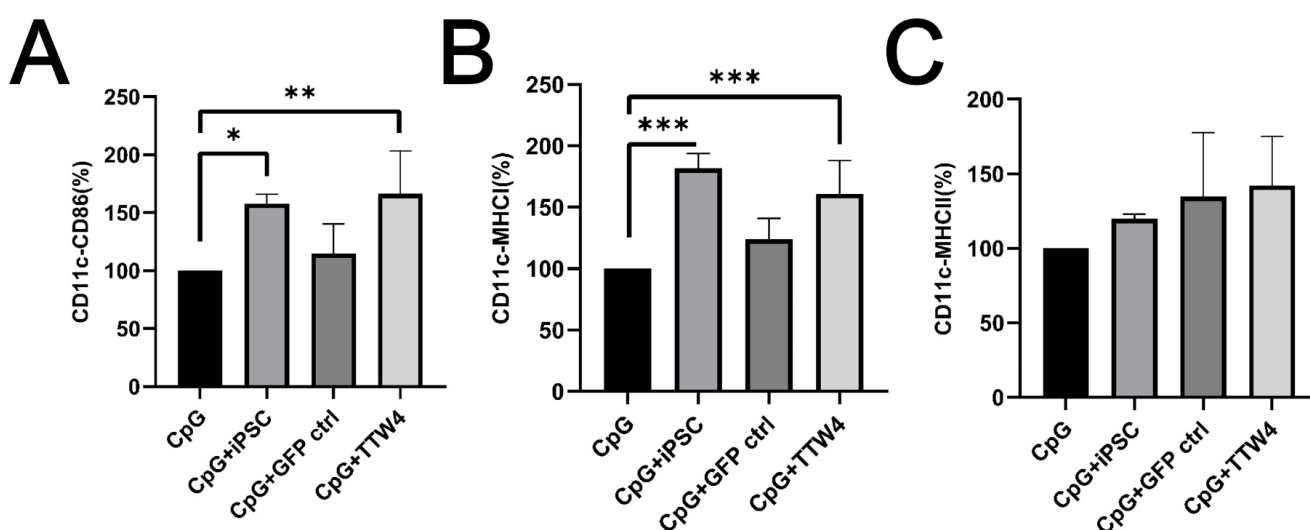


圖四、(A)、(B)兩次 Western blot 實驗代表圖將可代表正常組織細胞的 MEF 設為對照。

β -actin 為本次實驗的 Internal control。圖表中的數值來自 Image J 的分析，以三次實驗的 TTW4 expression / β -actin expression 平均值 \pm s.d 表示，其中* p<0.05； ** p<0.01，n=3。(本圖片由作者親自拍攝或製作)

三、Overexpression TTW4 的 CHO-K1 lysate 活化 C57BL/6 小鼠樹突細胞

本實驗使用不同標記物 CD86、MHCI、MHCII 利用流式細胞儀進行 TTW4 活化樹突細胞的分析。根據圖(五-A, B, C) 結果顯示 CpG+iPSC 組與 CpG+TTW4 組在 CD86 和 MHCI 的表現皆比 CpG 組和 CpG+GFP ctrl 組高，且都有顯著差異。這代表 iPSC 與 TTW4 皆具有增進樹突細胞活化的效果，並能增強樹突細胞活化 CD8⁺T。而在 MHCII 無顯著差異，顯示 iPSC 或 TTW4 對於提升樹突細胞活化 CD4⁺T 效果有限。研究結果可推斷在 iPSC 內的 TTW4 可明顯讓 C57BL/6 小鼠的免疫系統活化，所以 TTW4 非常具有作為疫苗抗原候選的潛力。



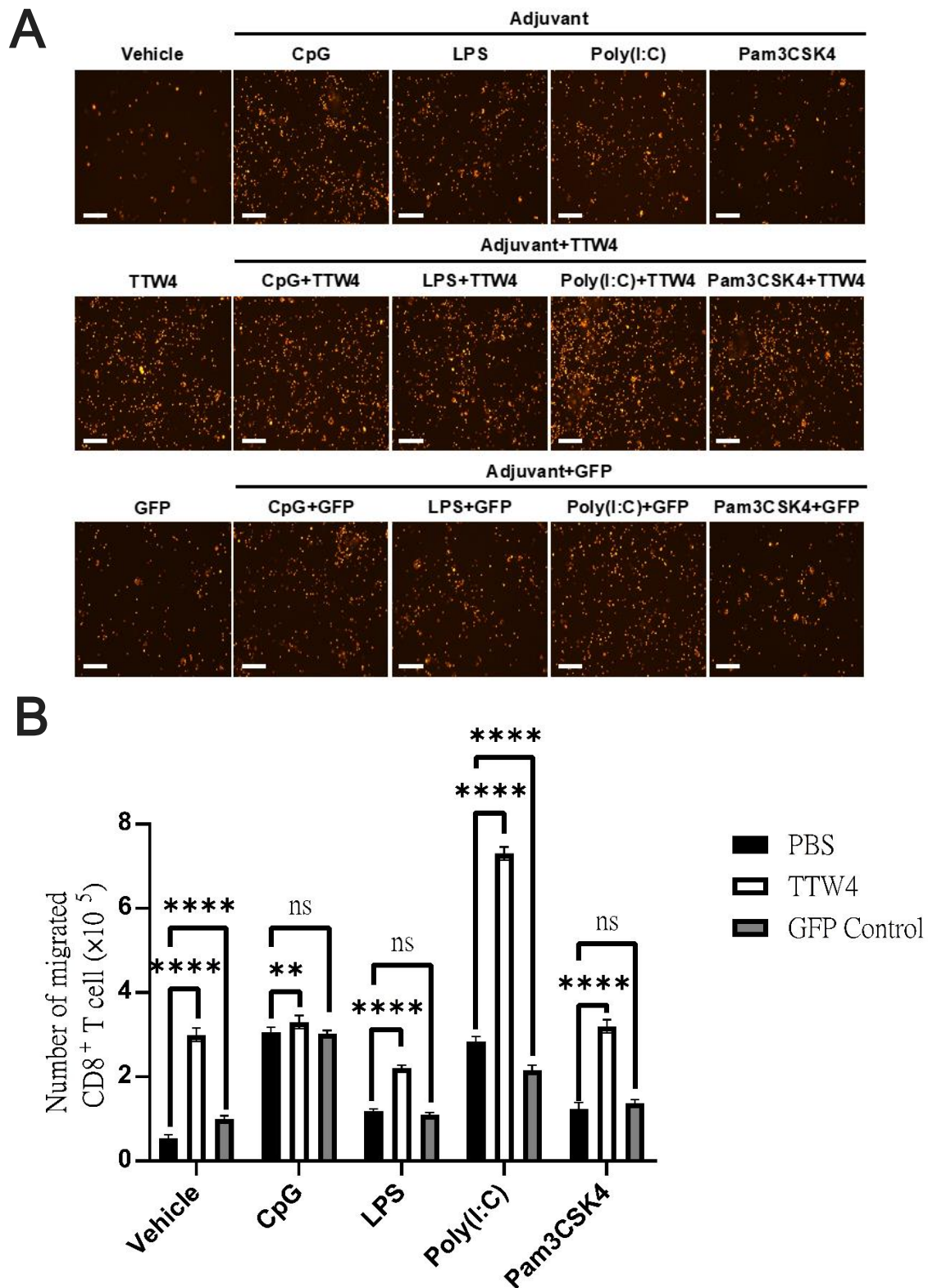
圖五、(A)(B)(C)三種標記物 CD86、MHCI、MHCII 量化結果圖，縱軸為百分比，將 PBS 組設為 100 後的數據，以平均值 \pm s.d 表示，n=5。(本圖片由作者親自製作)

四、毒殺性 T 細胞(CD8+T)活化測試

本實驗探討 TTW4 搭配上不同的 TLR 佐劑後 (初階疫苗模型)，利用細胞螢光反應法來比較 CD8+T 的活化效果和大腸直腸癌的抗癌效果。(所選用之佐劑都和 TLR 受體有關，分別是 CpG ODN 1080(CpG)、LPS、Poly(I:C)、Pam3CSK4)。

結果如圖(六-A)與圖(六-B)顯示在未加入任何佐劑的情形下，TTW4 較對照組有活化 CD8+T 的能力。而在有加入佐劑的組別中，加入 TTW4 的組別均有高於對照組(GFP)的表現。另外比較所有的 CONTROL 組和佐劑+GFP 對照組發現兩者皆差異不大，因此可得知 TTW4 確實具有增加 CD8+T 活化的能力。

TTW4 在與不同的佐劑組合的實驗中，發現 Poly(I:C)+TTW4 組遷移的 CD8+T 細胞數遠遠超過其他所有組別，因此我們認為 Poly(I:C)最能大幅增加 TTW4 活化 CD8+T 的效果。

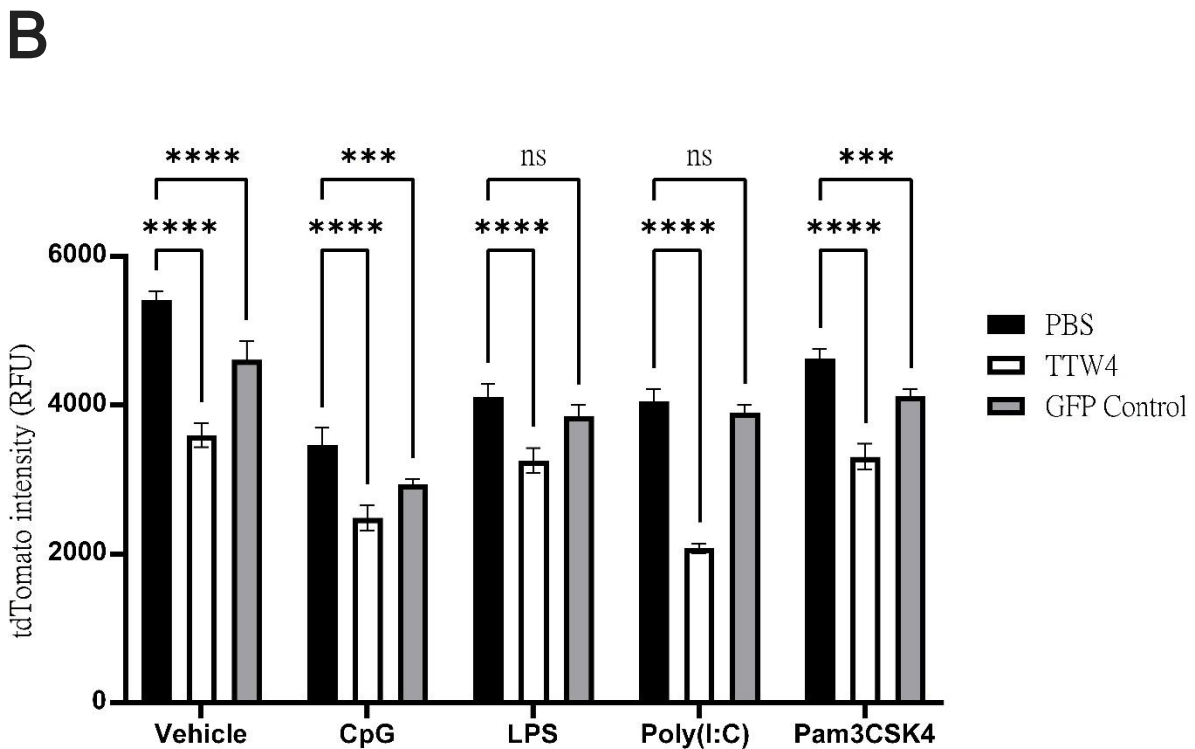
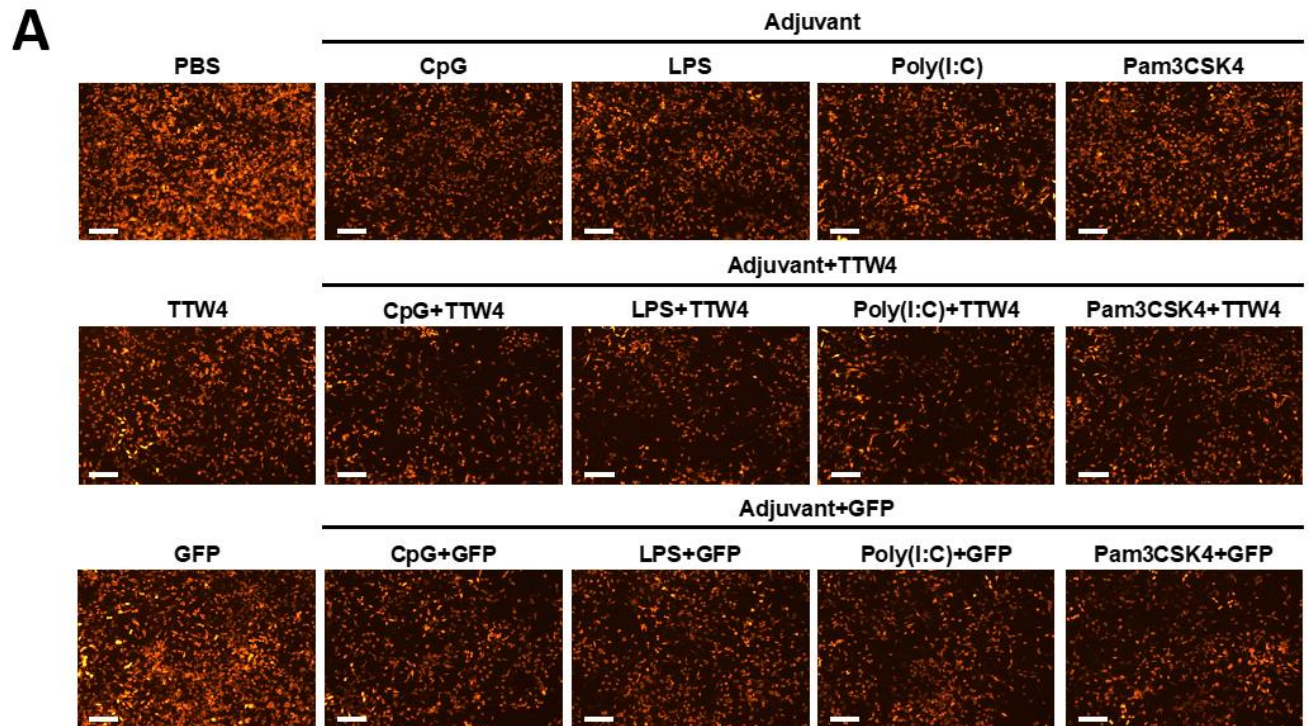


圖六·(A)各組 CD8⁺T 遷移後螢光顯微鏡拍攝照片，其中紅色螢光是代表被 CellTrackerTM Orange CMRA 染色處裡的 CD8⁺T，scale bar 是 100μm。(B)遷移之 CD8⁺T 細胞數比較圖。數值以平均值±s.d 表示，其中* p<0.05；** p<0.01；**** p<0.000，n=3。(本圖片由作者親自拍攝或製作)

五、抗大腸直腸癌細胞(MC38)測試

拍攝結果如圖(七-A)。RFU 值越低代表存活之 MC38 越少，抗癌效果越高。在圖(七-B)中將 PBS 控制組、TTW4 實驗組、GFP 對照組比較時發現 TTW4 組的 RFU 值明顯低於其他兩組，顯示其有明顯的抗癌效果。在其他有添加不同佐劑的組別中，佐劑+TTW4 組的 RFU 值也都是最低的。這代表 TTW4 在 CD8+T 毒殺 MC38 的效果上半扮演著重要的角色，證明 TTW4 的確具有成為大腸直腸癌疫苗抗原的潛力。

在 TTW4 搭配不同佐劑的效果，皆可以發現 TTW4+佐劑組與對照組都有顯著差異，而其中 Poly(I:C)組的實驗組與對照組之間 RFU 的差值明顯比其餘佐劑組別多，這表示 TTW4 搭配 Poly(I:C)時會有最佳的抗癌效果。

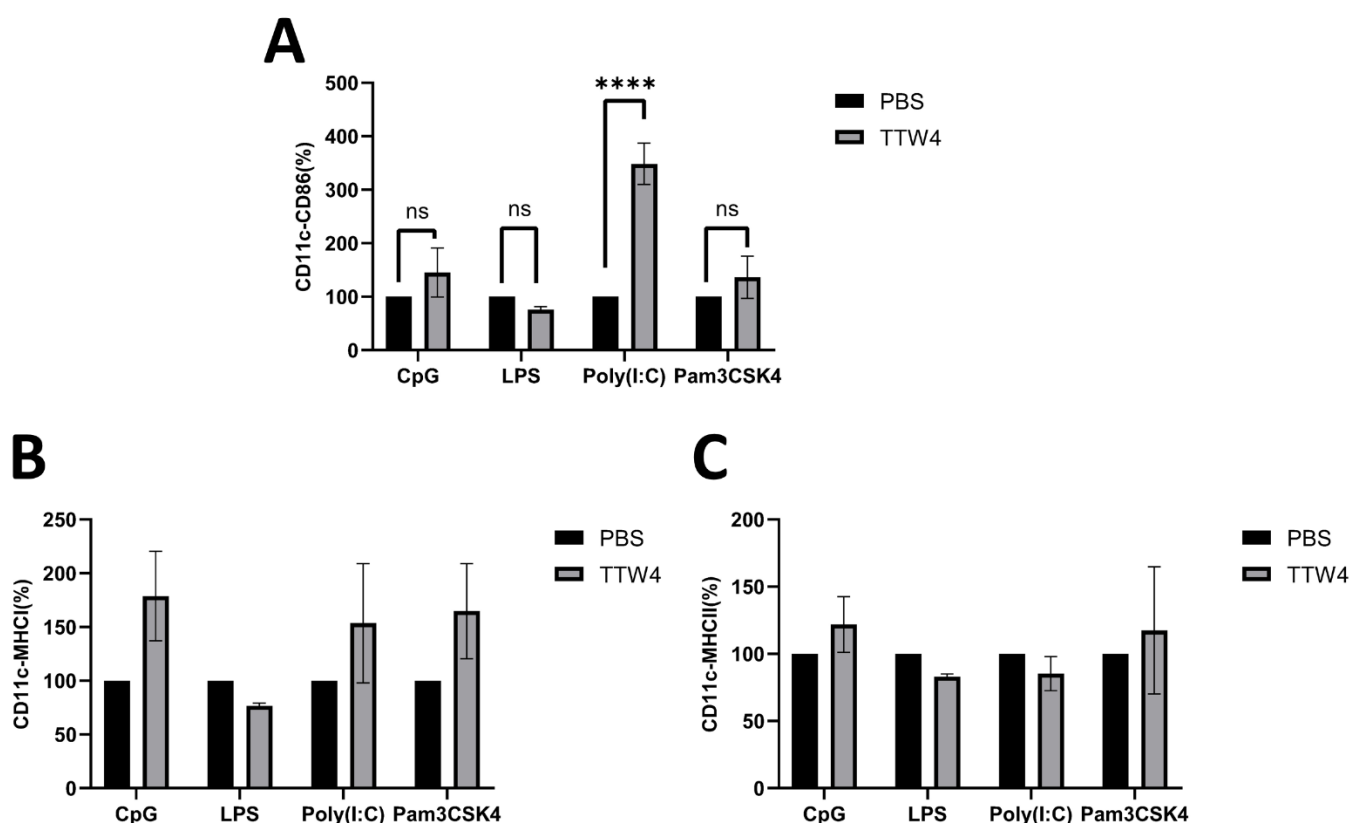


圖七、(A)經 CD8+T 毒殺後留存之 MC38 螢光顯微鏡拍攝照片其中紅色螢光是代表表達出 tdTomato 的 MC38，scale bar 是 100 μ m。(B)經 CD8+T 毒殺後留存之 MC38 RFU (Relative Fluorescence Units)值比較圖，數值以平均值 \pm s.d 表示，其中*** p<0.001；**** p<0.0001，n=3。(本圖片由作者親自拍攝或製作)

六、針對 TTW4 搭配不同佐劑活化 C57BL/6 小鼠樹突細胞效果判讀

本實驗利用流式細胞儀來觀測以 TTW4 搭配不同佐劑來活化 C57BL/6 小鼠樹突細胞的活化效果作為判斷大腸直腸癌疫苗最佳組合之依據。使用不同標記物 CD86、MHCI、MHCII 等分子的表現量來觀察 TTW4 搭配佐劑後和單純佐劑活化樹突細胞效果之差異。由圖(八-D)中紅、綠螢光 migration 的情形可知樹突細胞有成功抓住抗原。根據圖(八-A)我們可以發現 Poly(I:C)在 CD86 的表現量上明顯高於其餘組別。而 CpG 和 Pam3CSK4 搭配 TTW4 後的 CD86 表現量都有相較純加佐劑提高，但 LPS 反而下降。

比較 MHCI 和 MHCII 表現量時雖然在統計分析上看不出顯著差異，但從圖(八-B, C)可以發現 CpG、Poly(I:C)和 Pam3CSK4 在 MHCI 表現上都比純佐劑高出一定數值。而在 MHCII 表現量上各組之間並無明顯差異，不過 CpG 和 Pam3CSK4 表現量稍高。LPS 則是在 MHCI、MHCII 的表現量都較原本純佐劑的效果低。



圖八、(A) (B) (C)三種標記物 CD86、MHCI、MHCII 量化結果圖，縱軸為百分比，將各個純佐劑組設為 100 後的數據，以平均值 \pm s.d 表示，其中**** $p < 0.0001$ ， $n=3$ 。
(本圖片由作者親自製作)

陸、本研究之創建性、討論及其未來應用

大腸直腸癌是癌症中好發性高又不易發覺的癌症，確診時常常早已步入難以根治的境地，但現今還沒有一個副作用小又有一定效果的治療方案，因此在治療過程中病患除了疾病帶來的傷痛可能還要承受治療方法帶來的各式副作用。而癌症疫苗的研發可以減少傳統療法帶來的副作用與風險，所以本研究致力於篩選最適合大腸直腸癌疫苗之抗原/佐劑組合。

從一些文獻已證明 iPSC 內有許多新生抗原可做為各式癌症疫苗的候選，其中針對大腸直腸癌，本實驗室先前已藉由多種篩選方法選出四種候選蛋白：「TTW1」、「TTW2」、「TTW3」、「TTW4」，但 TTW2、TTW3 因在小鼠纖維母細胞(代表正常細胞)中有高度表現而被排除。之後藉由 NetMHCcons 網站預測 TTW1 和 TTW4 對於小鼠六種亞型的 MHC1 親和力表現後，TTW1 沒有優秀的親和力表示其可能對於樹突活化的能力較差而被排除，因此後續研究只探討 TTW4。首先經由 Western 確認 TTW4 只高度表現於大腸直腸癌細胞與 iPSC 後，接著利用流式細胞儀觀測三種標記物 CD86、MHCI、MHCII 表現量得知 iPSC 與 TTW4 皆明顯具有增強小鼠樹突細胞活化的效果，由此間接推測 iPSC 中的 TTW4 即為能提高樹突細胞活化效果的新生抗原。接著為了建立以 TTW4 為主成分的初階疫苗模型，將 TTW4 搭配不同的 TLR 佐劑進行細胞螢光觀測來檢視是否確實能活化 CD8+T 與抗 MC38 之功效，由 CD8+T 遷移的細胞數和 MC38 的 RFU 值發現 TTW4/Poly(I:C)的組合效果最佳，有明顯活化免疫反應與抗大腸直腸癌細胞的作用。最後利用流式細胞儀觀測 TTW4 搭配不同 TLR 佐劑活化小鼠樹突細胞的效果。觀察到同樣的結果，即 TTW4/Poly(I:C)組合在 CD86 的表現上極高，代表該組合能大幅提升樹突細胞的活化數量，而其在 MHCI 的表現上也明顯高於對照組，這代表其能提升樹突細胞活化 CD8+T 的能力，雖然在 MHCII 上的表現不高，但由於 MHCII 是和 CD4+T 有關，不影響其成為大腸直腸癌疫苗的潛力候選。

TTW4 除了有開發成大腸直腸癌疫苗之潛力外，根據 GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) 網站的資訊，我們認為 TTW4 也有作為標靶蛋白藥物來治療大腸直腸癌或檢測 Marker 的可能性。因此就算在開發疫苗過程中不如預期，仍可以把 TTW4 後續進行大腸直腸癌的標靶蛋白藥物的研發或是大腸直腸癌的癌症的檢測指標之一來進行後續研究跟應用。

雖然目前在本研究中已完成對於大腸直腸癌細胞疫苗模型之初步相關實驗完成，並利用活化 C57BL/6 小鼠樹突細胞的狀況去對抗原/佐劑組合的機制做初步的推估。但還缺乏直觀性證據，未來我們將繼續用細胞斷層掃描分析儀 Nanolive CX-96 Focus 直接觀察對於免疫細胞的活化與抗大腸直腸癌的直觀效果，還有利用 ELISA 去檢測活化後的樹突細胞與 CD8+T 所產生的 cytokine 做機轉探索，不同亞型的樹突細胞也可以用 XCR1、CD11b 等標記物去區分 cDC1 和 cDC2 來做更深入的探討。最後希望能將 TTW4/ Poly(I:C)組合製成疫苗製劑來進入人體臨床實驗，期許對於大腸直腸癌的預防與治療進入新的里程碑。

柒、結論

一、TTW4 的表現與 MHCI 結合親和力

- (一) NetMHCcons 預測 TTW4 的胜肽與小鼠 MHCI 的結合率顯著高於其他候選抗原。
- (二) 西方墨點法確認 TTW4 高表現於大腸直腸癌細胞株 CT26、MC38 和多功能幹細胞 iPSC，而在小鼠纖維母細胞 MEF(正常細胞)中表現極低。

二、TTW4 對於小鼠樹突細胞活化效果

TTW4 對於三種標記物：CD86、MHCI、MHCII 皆在樹突細胞中有顯著的表現量，這間接證明 TTW4 具有活化免疫系統並誘發下游免疫反應的能力。

三、疫苗候選的最具潛力組合

在 TTW4 搭配不同 TLR 家族佐劑實驗中，TTW4/Poly(I:C)的組合在細胞螢光反應實驗顯示讓 CD8+ T 細胞有顯著的活化反應和優異的抗 MC38 能力，顯示其作為疫苗製劑的潛力。

四、潛力疫苗組合對於免疫活化的機轉探索

TTW4/Poly(I:C)組合在 CD86 和 MHCI 有非常明顯的表現，顯示該組合的抗癌機轉為透過活化樹突細胞啟動 CD8+T 之免疫反應。

五、未來研究方向

- (一) 利用細胞斷層掃描技術拍攝直接觀察 TTW4/Poly(I:C)組合對於活化免疫系統與抗大腸直腸癌的功效。
- (二) 將進一步研究 TTW4/Poly(I:C)的後續機轉，進行 ELISA 實驗探索 CYTOKINE 的後續反應。
- (三) 建立純化 human TTW4 蛋白製成，並以人類樹突細胞進行大腸直腸癌疫苗活性測試，為未來人類試驗鋪路。

捌、參考資料及其他

1. 王淮誥、賴守義 (2023)。癌不住，你誘導我 (由誘導性多功能幹細胞篩選新生抗原用於大腸直腸癌之抗癌應用)。新北市中小學科學展覽會。個人通訊。
2. 王淮誥、賴守義 (2023)。由誘導性多功能幹細胞篩選新生抗原用於大腸直腸癌之抗癌應用。台灣國際科展。個人通訊。
3. 李建智 (2020)。淺論誘導性多功能幹細胞 (iPS 細胞)。個人通訊。
4. 臺灣癌症基金會 (n.d.)。大腸直腸癌 - Colorectal Cancer。臺灣癌症基金會。
5. Becton, Dickinson, & Company. (2002). Introduction to flow cytometry: A learning guide (p. 158). USA: Becton, Dickinson and Company.
6. Chen, H., Li, Z., Qiu, L., Dong, X., Chen, G., Shi, Y., ... & Liu, X. (2022). Personalized neoantigen vaccine combined with PD-1 blockade increases CD8⁺ tissue-resident memory T-cell infiltration in preclinical hepatocellular carcinoma models. *J Immunother Cancer*, 10(9), e004389.
7. Farkona, S., Diamandis, E. P., & Blasutig, I. M. (2016). Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer? *BMC Medicine*, 14, 73.
8. Klarisa. (2000). A guide to successful western blotting.
9. Kooreman, N. G., Kim, Y., de Almeida, P. E., Termglinchan, V., Diecke, S., Shao, N. Y., ... & Wu, J. C. (2018). Autologous iPSC-based vaccines elicit anti-tumor responses in vivo. *Cell Stem Cell*, 22, 501-513.
10. Lebedeva, E., Bagaev, A., & Pichugin, A. (2018). The differences in immunoadjuvant mechanisms of TLR3 and TLR4 agonists on the level of antigen-presenting cells during immunization with recombinant adenovirus vector. *BMC Immunology*, 19, 26.
11. Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodriguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Molecular Classification of Human Cancer: Diagnosis and Treatment*, 18(1), 197.
12. Marriott, M., Post, B., & Chablani, L. (2023). A comparison of cancer vaccine adjuvants in

clinical trials. *Cancer Treatment and Research Communications*, 34, 100667.

13. National Geographic. (2018). Cancer 101 | National Geographic [影片]。
14. Neek, M., Kim, T. I., & Wang, S. W. (2019). Protein-based nanoparticles in cancer vaccine development. *Nanomedicine*, 15(1), 164-174.
15. NetMHCcons. (n.d.).
16. Ouyang, X.,, & Ding, Q. (2021). Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer. *Stem Cell Reports*, 16(6), 1468–1477
17. Schneider, R. (2015). Clinical diagnosis and therapy of colorectal cancer (pp. 1-14). Foster City, CA: OMICS Group eBooks.
18. Shin, M. H., Kim, J., Lim, S. A., Kim, J., Kim, S. J., & Lee, K. M. (2020). NK cell-based immunotherapies in cancer. *Immune Netw.*, 20(2), e14.
19. Stieglmaier, J., Benjamin, J., & Nagorsen, D. (n.d.). Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer. *Immunotherapy*, 15(8).
20. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 26(4), 663-676.
21. The Human Protein Atlas. (n.d.). Colon cancer.
22. van Galen, P. M., & Feiters, M. C. (2016). Mass spectrometry: Part of the instrumental analysis in (bio)molecular chemistry course (pp. 1-65). Nijmegen, Netherlands: Radboud University.
23. Yaddanapudi, K., Li, C., & Eaton, J. W. (2018). Vaccination with induced pluripotent stem cells confers protection against cancer. *Cell Stem Cell*, 22, 501-513.
24. Zhao, T., Cai, Y., Jiang, Y., & others. (2023). Vaccine adjuvants: Mechanisms and platforms. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 283.

【評語】 052009

本作品「探索腫瘤新抗原及發展多功能幹細胞疫苗對抗大腸直腸癌」聚焦於以誘導性多功能幹細胞(iPSC)所篩選出的新生抗原 TTW4，結合 TLR 家族佐劑（特別是 Poly(I:C)），開發針對大腸直腸癌之細胞疫苗初階模型。研究結合了生物資訊學大數據分析工具（如 DTU Health Tech 的 NetMHCcons）與多種實驗室驗證方法（如西方墨點法、流式細胞儀、細胞螢光影像法），使得候選抗原的篩選過程更有潛力。實驗結果明確指出 TTW4/Poly(I:C)是作為大腸直腸癌疫苗的最佳候選組合，為後續的疫苗開發提供了可能的方向。

有關本研究的建議如下：

1. 本研究的成果主要基於小鼠模型和細胞實驗層面，這些結果在推及與應用至複雜的人體生理環境時，其有效性和安全性仍需大量且嚴謹的人體臨床試驗來進一步驗證，例如：研究顯示 TTW4 能活化 CD8+ T 細胞，但在實際的腫瘤微環境中，存在多種免疫抑制機制，這些機制可能會影響疫苗的實際效果和持久性。

2. 抗原原理與人類適用性待釐清：TTW4 在人類大腸直腸癌組織內特異性與免疫原性、序列保守性等未經實驗直接驗證，未來如要推動臨床需補強。
3. 雖然本研究篩選出 TTW4 作為最佳候選抗原，但腫瘤疫苗的成功往往需要針對多種抗原的組合才能提供更廣泛且持久的免疫保護。僅依賴單一抗原可能導致腫瘤細胞產生免疫逃逸。

作品海報



探索腫瘤新抗原及發展多功能幹細胞疫苗對抗大腸直腸癌

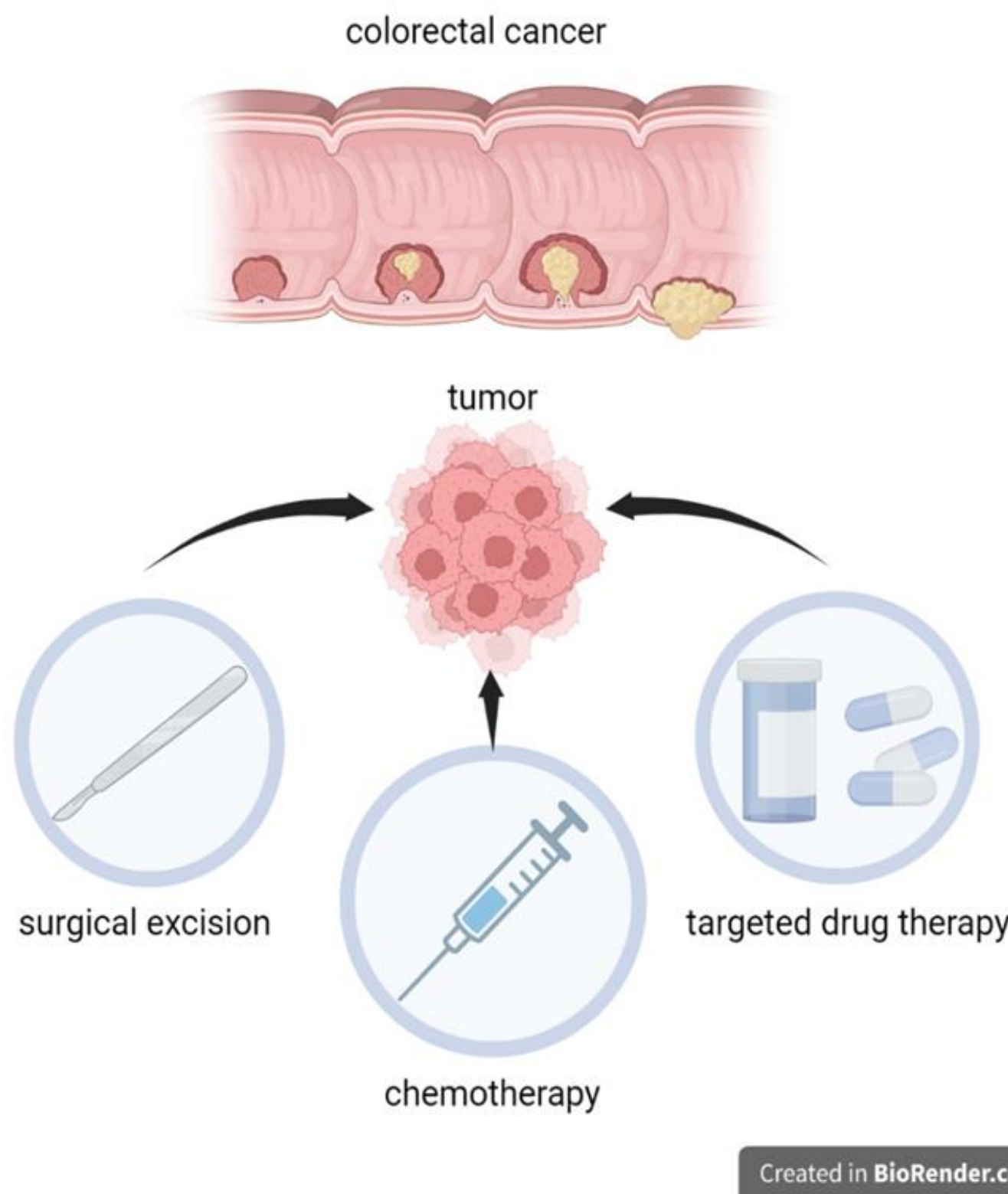
摘要

大腸直腸癌 (Colorectal cancer) 是發生率高且較易導致死亡的癌症類型，因此本研究透過篩選誘導性多功能幹細胞 (iPSC) 中表現的新生抗原來進行對 Colorectal cancer 免疫作用，以利找出最適合作為「大腸直腸癌疫苗」的抗原/佐劑組合。

本研究首先使用 DTU Health Tech的NetMHCcons 大數據分析與西方墨點法，篩選出小鼠iPSC中之新生抗原TTW4為最有可能作為大腸直腸癌疫苗的候選抗原，接著藉由流式細胞儀觀測樹突細胞(DC)活化的實驗，推測出TTW4可以幫助殺手T細胞(CD8⁺T)活化。再使用TLR受體家族不同的疫苗佐劑搭配TTW4來進行細胞螢光影像法，發現TTW4確實可以活化CD8⁺T，且對於小鼠的Colorectal cancer cell也有顯著的抗癌效果，其中TTW4/Poly(I:C)組合的效果最好。最後利用細胞斷層掃描分析儀Nanolive CX-96 Focus觀察TTW4/Poly(I:C)的抗癌效果，確認TTW4/Poly(I:C)具有開發大腸直腸癌疫苗的潛力。

動機與研究背景

在眾多癌症之中，大腸直腸癌(Colorectal cancer)是好發率高且進展較慢的癌症，是全球發生率第三高、死亡率第二高的癌症。確診時往往已邁入晚期，並會帶給病患莫大的不方便。如能開發出大腸直腸癌疫苗，則可以利用提升自身免疫活性來達到預防或治療的效果，可免除現今治療方式的副作用。經由文獻的查找後^{1, 2}，發現人工誘導性多功能幹細胞(iPSC)有作為疫苗抗原的潛力。因此本篇研究旨在探討腫瘤新抗原以及大腸直腸癌疫苗的開發。透過多種的篩選方式，從iPSC中選出有潛力的新生抗原並搭配最佳的佐劑作為初階疫苗模型，成為有潛力可進入人體臨床試驗的大腸直腸癌疫苗的候選組合。



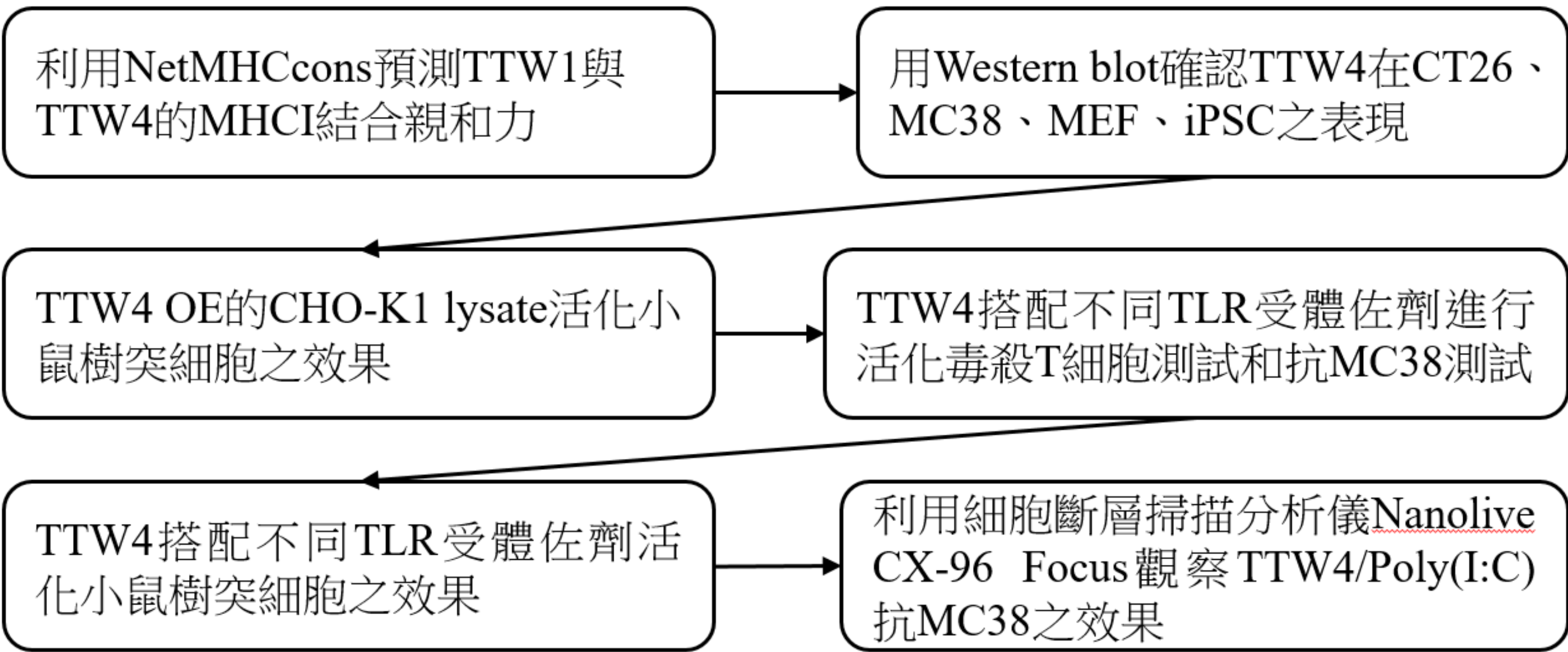
圖一: 關於大腸直腸癌(Colorectal cancer)(作者繪製)

研究目的

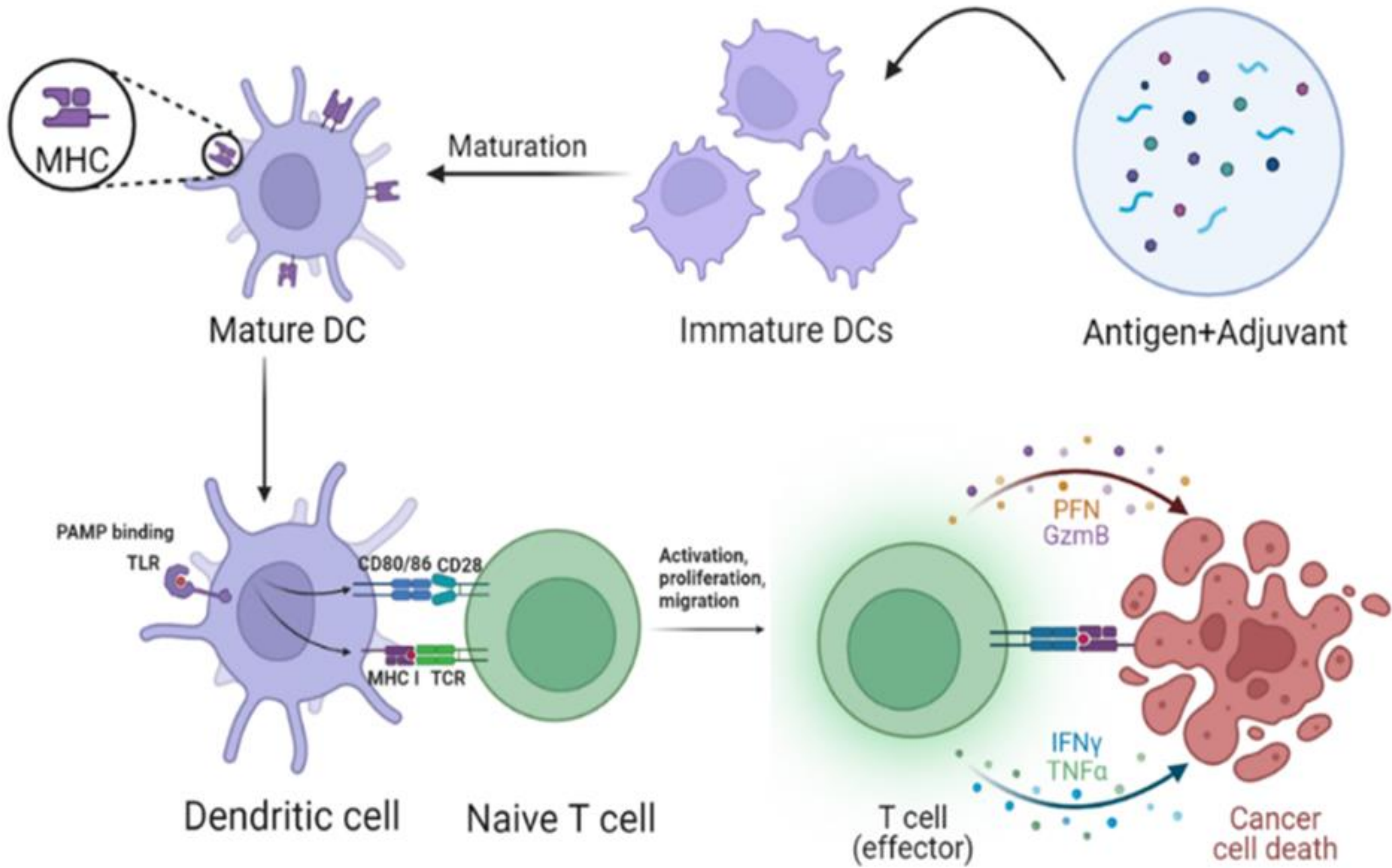
- 一、在iPSC中找出具開發大腸直腸癌疫苗潛力的蛋白新生抗原。
- 二、觀察篩選出的新生抗原其對於C57BL/6小鼠的樹突細胞活化效果。
- 三、使用篩選出的新生抗原搭配不同的TLR受體佐劑，在小鼠大腸直腸癌細胞觀察毒殺性T細胞的活化反應與對抗大腸直腸癌的效果。
- 四、利用細胞斷層掃描分析儀Nanolive CX-96 Focus觀察初步疫苗模型對抗小鼠大腸直腸癌之效果。

研究設計與方法

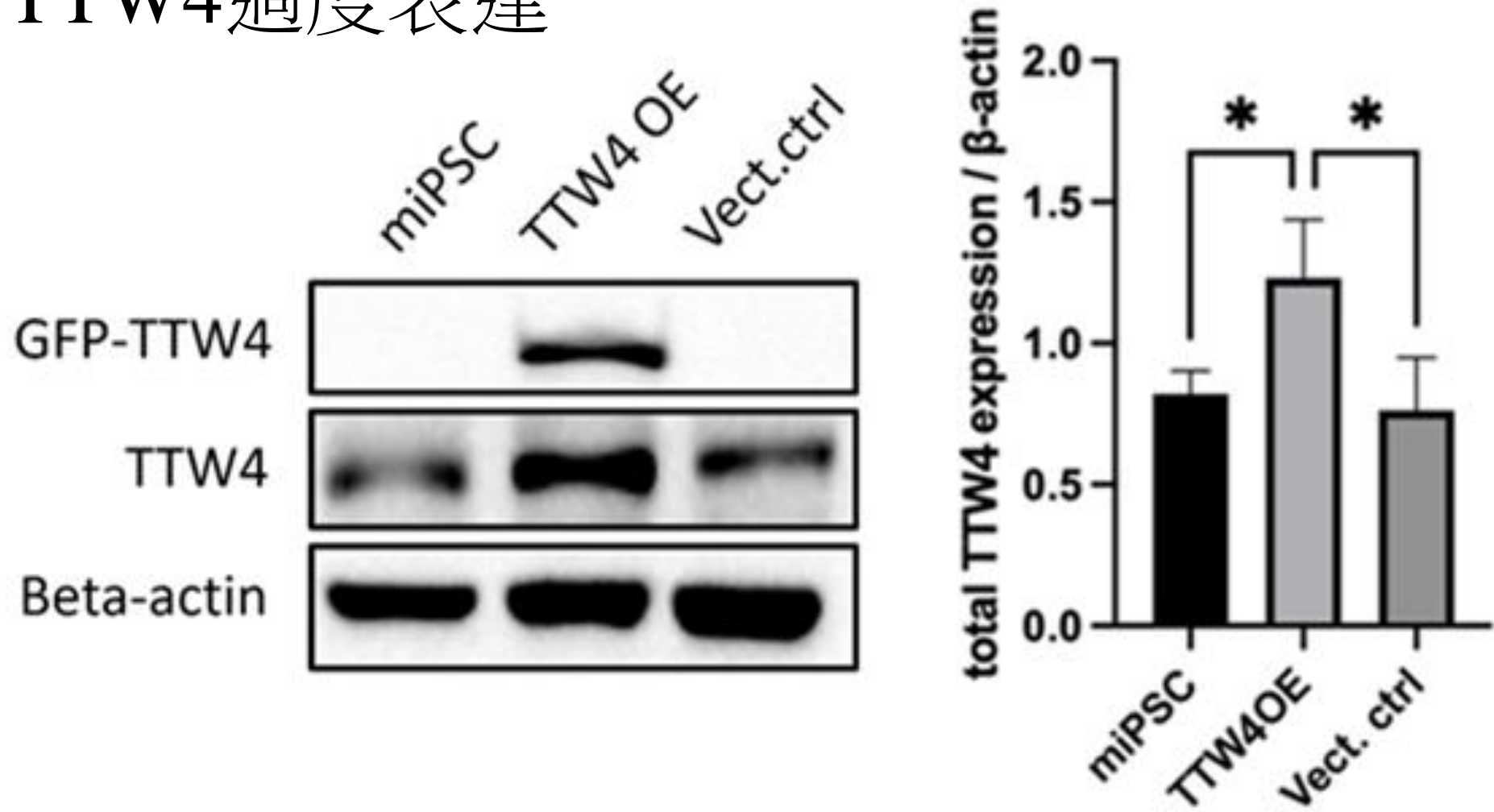
1.實驗設計脈絡圖



圖二: 實驗設計脈絡(作者繪製)

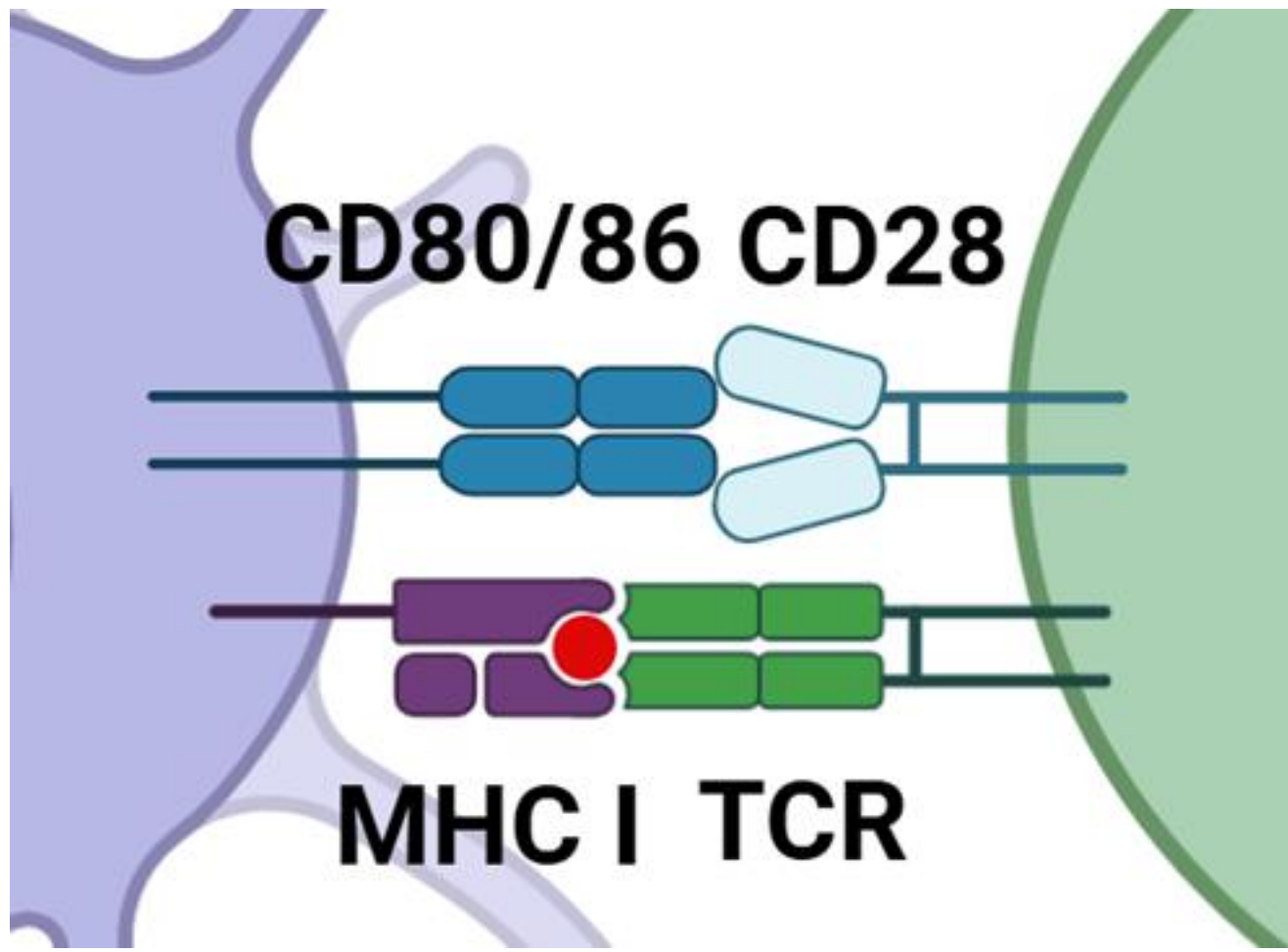


2.TTW4過度表達



圖三:TTW4有被CHO-K1過度表達的 Western blot代表圖，n=3(作者繪製)

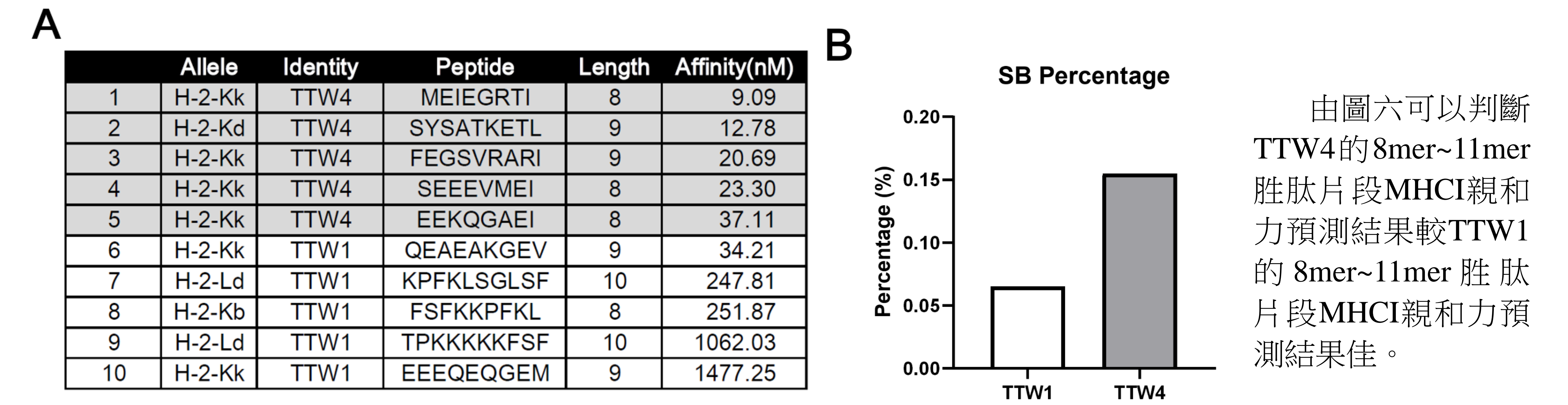
MEF：小鼠纖維母細胞
MC38: C57BL/6小鼠大腸直腸癌細胞
CT26：BALB/c小鼠大腸直腸癌細胞



圖四: 本研究發想之新生抗原/佐劑概念圖 (作者繪製)

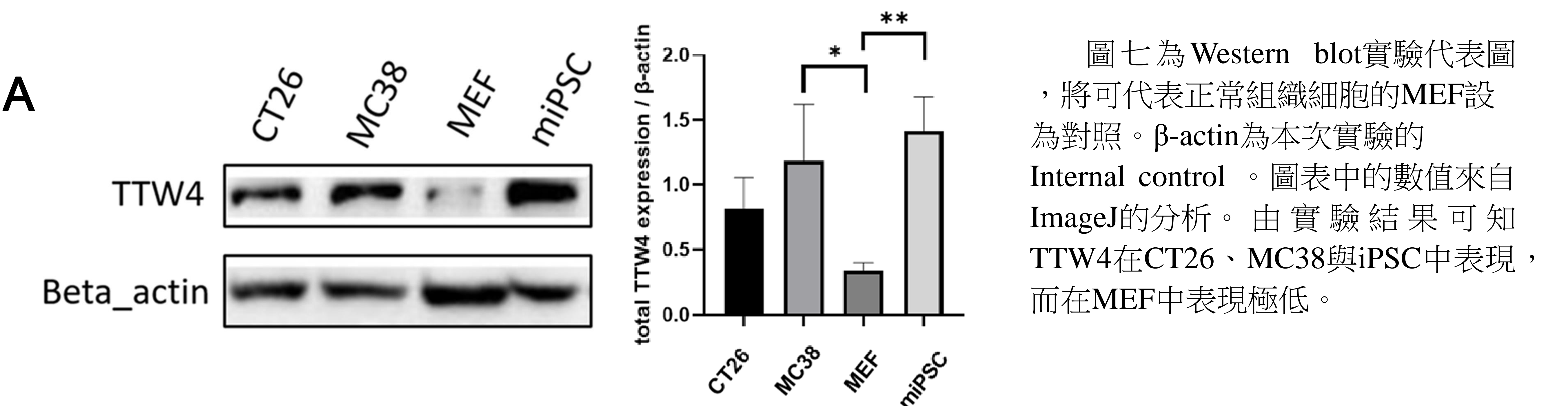
研究結果

一、NetMHCcons預測後選蛋白8mer到11mer peptides和小鼠MHCI結合率



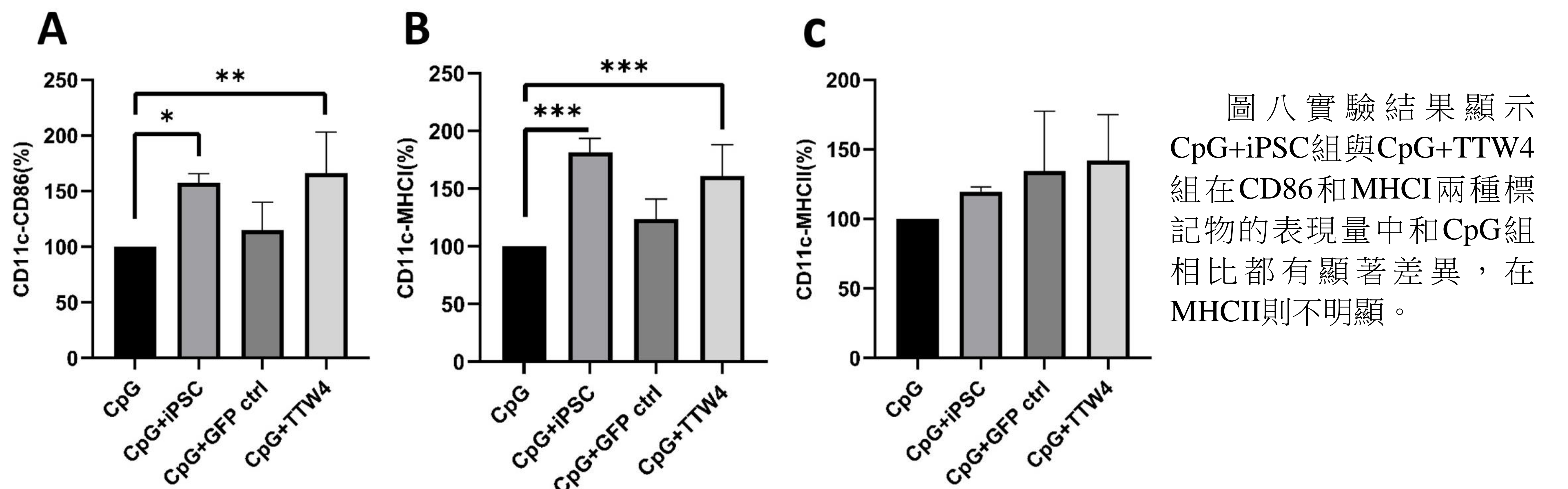
圖六: (A) TTW1, TTW4預測結合率最高的各五個胜肽片段(作者繪製)。(B) TTW1和TTW4預測Strong Binding百分比圖(作者繪製)。

二、西方墨點法分析TTW4在CT26、MC38、MEF、iPSC之含量



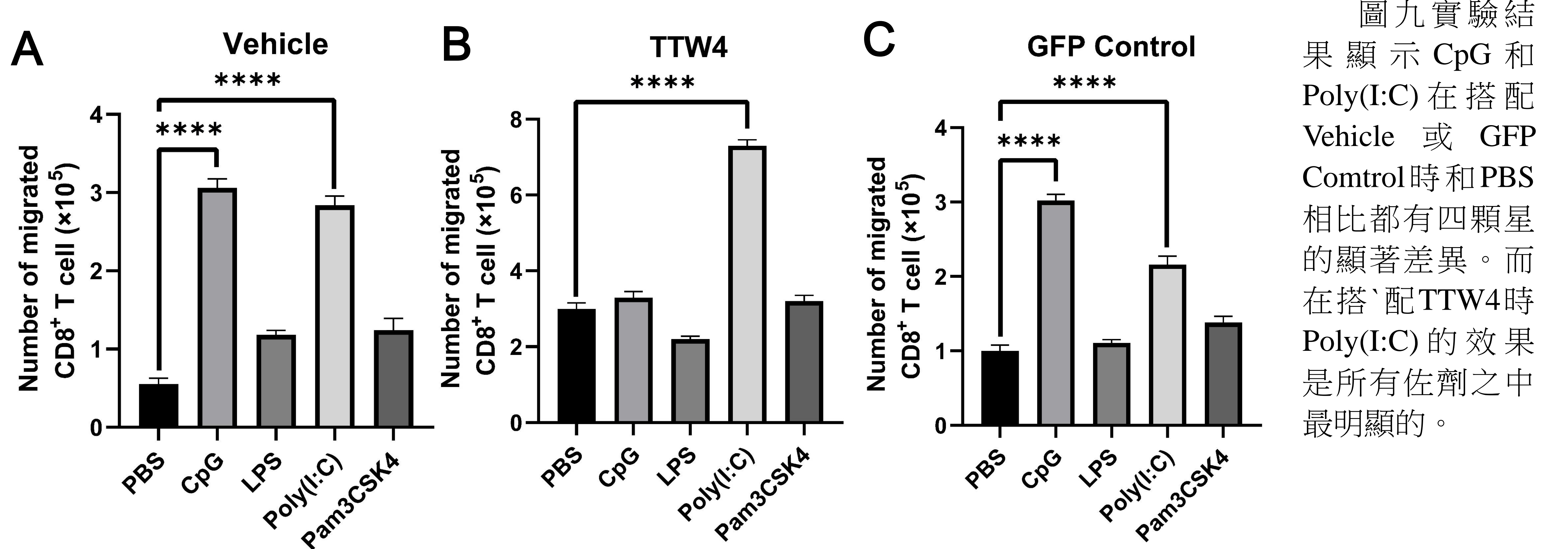
圖七: (A)Western blot實驗代表圖，結果以平均值 \pm s.d表示，其中* $p<0.05$ ；** $p<0.01$ ，n=3 (作者繪製)。

三、過度表現TTW4的CHO-K1 lysate活化C57BL/6小鼠樹突細胞



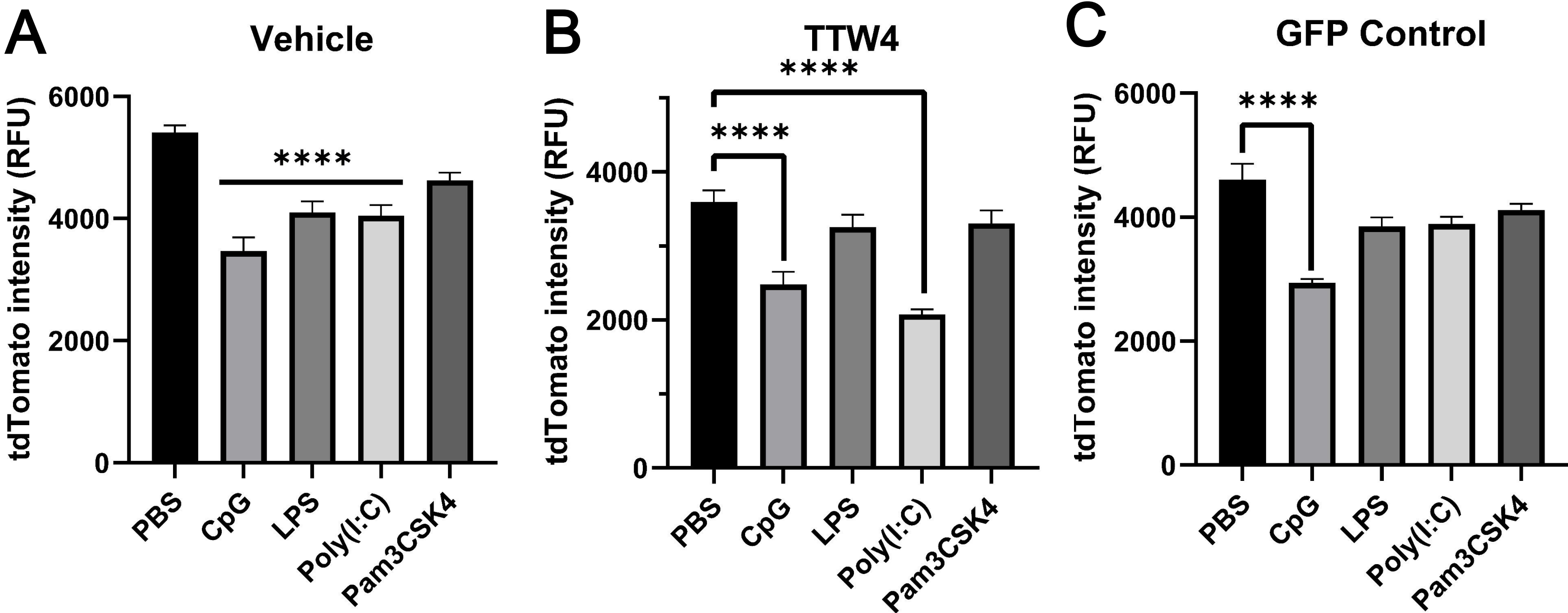
圖八: (A) (B) (C)三種標記物CD86、MHCI、MHCII量化結果圖，以平均值 \pm s.d表示，其中* $p<0.05$ ；** $p<0.01$ ；*** $p<0.001$ ，n=5 (作者繪製)。

四、毒殺性T細胞(CD8+T)活化測試



圖九: (A) (B) (C)三種組別Vehicle、TTW4、GFP Control搭配TLR相關佐劑之遷移CD8+T細胞數比較圖。數值以平均值 \pm s.d表示，其中**** $p<0.0001$ ，n=3(作者繪製)。

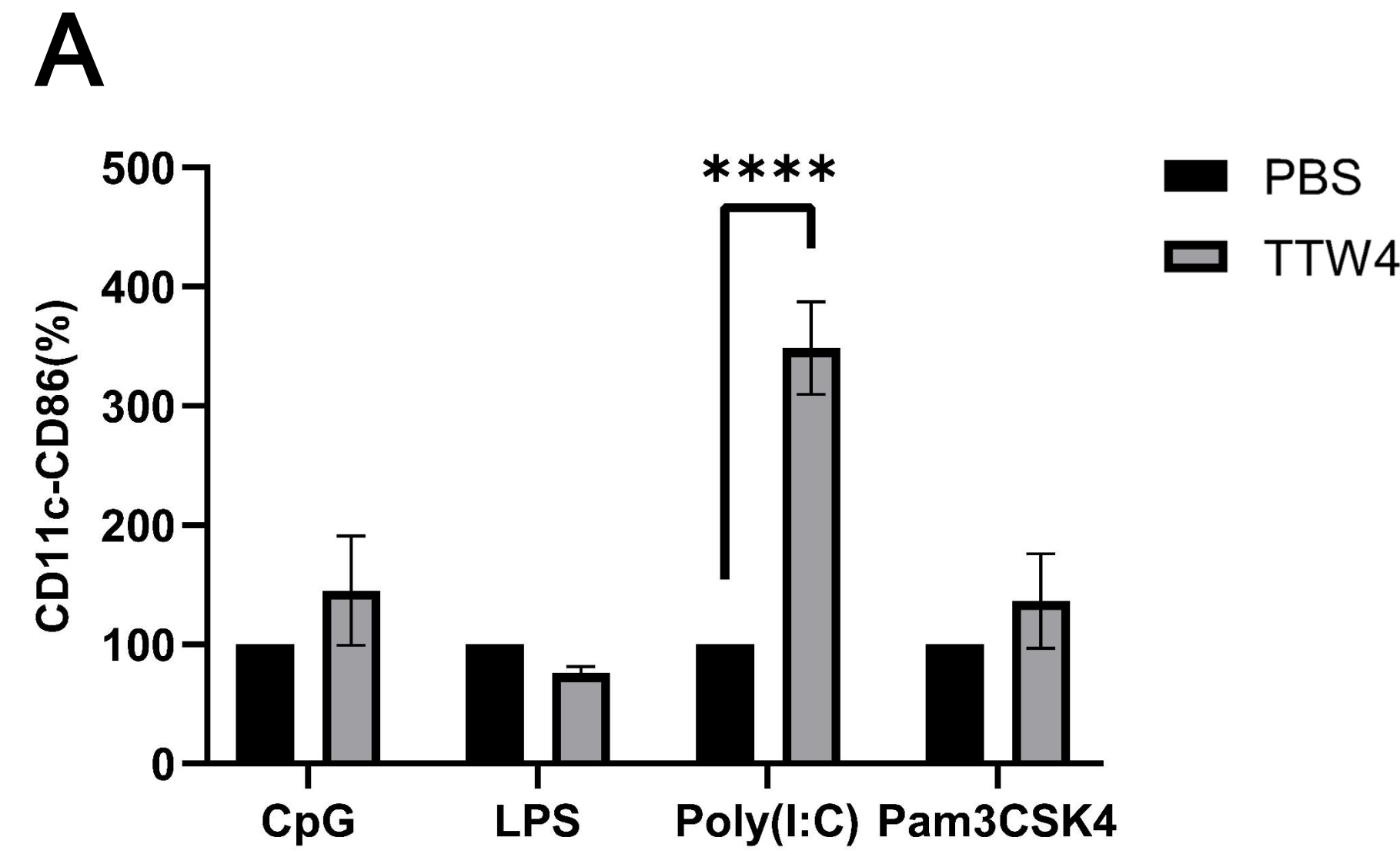
五、抗大腸直腸癌細胞(MC38)測試



從結果可知CpG和 Poly(I:C) 在 搭 配 TTW4時都有四顆星的顯著差異。

圖九: (A) (B) (C)三種組別Vehicle、TTW4、GFP Control搭配TLR相關佐劑留存之MC38 RFU 值比較圖，數值以平均值±s.d表示，其中**** p<0.0001 (作者繪製)。

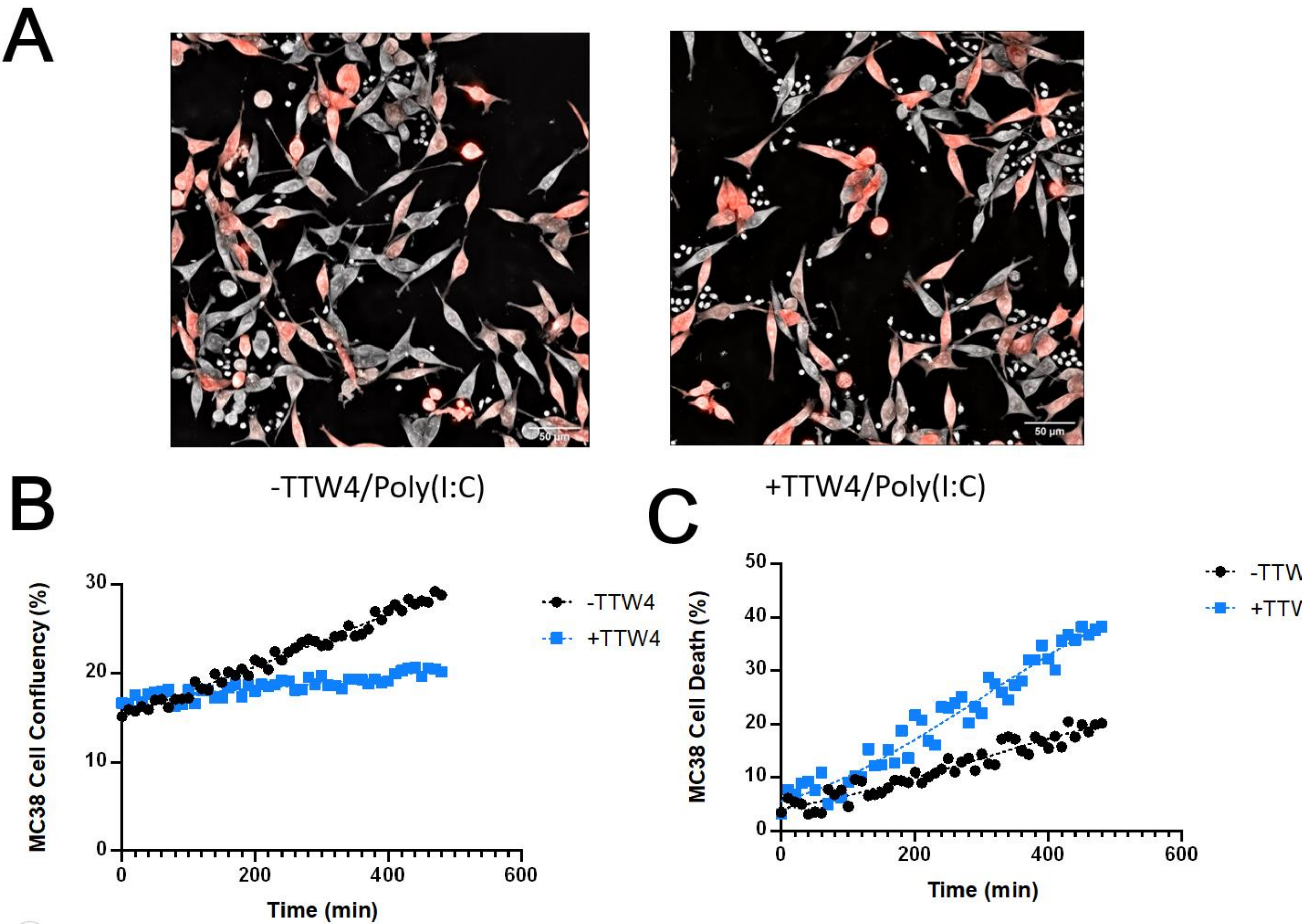
六、針對TTW4搭配不同佐劑活化 C57BL/6小鼠樹突細胞效果判讀



圖十: 標記物CD86量化結果圖，縱軸為百分比，將各個純佐劑組設為100後的數據，以平均值±s.d表示，其中**** p<0.0001(作者繪製)。

由實驗結果可知TTW4/Poly(I:C)在CD86標記物上的表現量有四顆星的顯著差異。

七、利用細胞斷層掃描分析儀Nanolive CX-96 Focus觀察 TTW4/Poly(I:C)抗大腸直腸癌細胞(MC38)



圖十一: (A)為第八小時錄影影片截圖，左邊是對照組、右邊是 TTW4/Poly(I:C)。(B)縱軸為MC38細胞滿度，橫軸為單位時間(min)。(C)縱軸為MC38死亡比例(%), 橫軸為單位時間(min)。

討論與未來展望

大腸直腸癌是癌症中好發性高又不易發覺的癌症，確診時常常早已步入難以根治的境地，但現今還沒有一個副作用小又有一定效果的治療方案，因此在治療過程中病患除了疾病帶來的傷痛可能還要承受治療方法帶來的各式副作用。而癌症疫苗的研發可以減少傳統療法帶來的副作用與風險，所以本研究致力於篩選最適合大腸直腸癌疫苗之抗原/佐劑組合。

TTW4除了有開發成大腸直腸癌疫苗之潛力外，根據GEPIA(Gene Expression Profiling Interactive Analysis)網站的資訊，我們認為TTW4也有作為標靶蛋白藥物來治療大腸直腸癌或檢測Marker的可能性。所以可以針對TTW4進行大腸直腸癌的標靶蛋白藥物的研發或是大腸直腸癌的癌症的檢測指標之一來進行後續研究跟應用。

雖然目前本研究已完成對於大腸直腸癌疫苗模型之初步相關實驗，並利用活化C57BL/6小鼠樹突細胞的狀況去對抗原/佐劑組合的機制做初步的推估。但還缺乏直觀性證據，未來我們將繼續用細胞斷層掃描分析儀Nanolive CX-96 Focus直接觀察其他疫苗初步模型對於免疫細胞的活化與抗大腸直腸癌的直觀效果，並增加實驗次數，還有利用ELISA去檢測活化後的樹突細胞與CD8+T所產生的cytokine做機轉探索，不同亞型的樹突細胞也可以用XCR1、CD11b等標記物去區分cDC1和cDC2來做更深入的探討。最後希望能將 TTW4/ Poly(I:C) 組合製成疫苗製劑來進入人體臨床實驗，期許對於大腸直腸癌的預防與治療進入新的里程碑。

結論

- 一、NetMHCcons預測TTW4的胜肽與小鼠MHCI的結合率顯著高於其他候選抗原。
- 二、西方墨點法確認TTW4高表現於大腸直腸癌細胞株CT26、MC38和多功能幹細胞iPSC，而在小鼠纖維母細胞MEF(正常細胞)中表現極低。
- 三、TTW4對於三種標記物:CD86、MHCI、MHCII皆在樹突細胞中有顯著的表現量，這間接證明TTW4具有活化免疫系統並誘發下游免疫反應的能力。
- 四、在TTW4搭配不同TLR家族佐劑實驗中，TTW4/Poly(I:C)的組合在細胞螢光反應實驗顯示讓CD8+ T細胞有顯著的活化反應和優異的抗MC38能力，顯示其作為疫苗製劑的潛力。
- 五、TTW4/Poly(I:C)組合在CD86和MHCI有非常明顯的表現，顯示該組合的抗癌機轉為透過活化樹突細胞啟動CD8+T之免疫反應。
- 六、經由細胞斷層掃描分析儀Nanolive CX-96 Focus觀察到TTW4/Poly(I:C)組合可以抑制MC38的生長。

參考資料

一、Kooreman et al., & Wu, J. C. (2018). Autologous iPSC-based vaccines elicit anti-tumor responses in vivo. Cell Stem Cell, 22(4), 501 - 513.
二、Ouyang et al., & Ding, Q. (2021). Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer. Stem Cell Reports, 16(6), 1468 - 1477.