

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080004

參展科別 生物化學

作品名稱 激增殺手 T 細胞的水膠細胞平台於免疫療法的
應用

就讀學校 臺北市私立復興實驗高級中學

指導教師 馬瑪宣、胡哲銘

作者姓名 廖韋俐

關鍵詞 免疫療法(Immunotherapy)、
水膠細胞(Gelated cells)、
T 細胞激活(T cell activation)

作者簡介



我是廖韋俐，就讀台北市私立復興實驗高級中學二年級。從小學開始，在老師的帶領下走進了科學研究的世界。我很喜歡從事科學研究，在一次一次發掘未知的研究過程中，邏輯思維的討論及知識的學習，總能帶給我喜悅，也讓我學會謙卑。

摘要

本實驗研發新型水膠細胞優化技術，成功提供一個平台供應淋巴細胞激活信號（MHC-antigen complex）、共刺激配體及細胞因子刺激三大要素，能激增殺手 T 細胞。實驗中優化的水膠細胞能完整保留細胞膜的表面特性，經實驗證實無生物安全性的疑慮。另外本實驗也著重於探討人工合成抗原細胞強韌度對 T 細胞增生程度的影響。我們利用水膠細胞易改變細胞質強韌度且不影響生物相容性的優點，針對 T 細胞增生程度進行比較。本研究結果顯示，高細胞質強韌度(120kPa)的人工合成抗原細胞（aAPCs, Artificial antigen presenting cells）擁有高效率的 T 細胞激活潛力，相對於低細胞質強韌度(25kPa)的對照組可以提高約 51.2%，並達到顯著差異，推測其和收縮性及突出性絲狀肌動蛋白增加以致訊號增強有關。本實驗的新型水膠細胞優化技術提供臨床醫學免疫療法一個高潛力的新技術平台。

Abstract

This report proposes a novel platform that combines hydrogelated cellular system and the feature of the dendritic cell to modulate cytotoxic T cell expansion ability accurately and effectively, which can provide personalized immunotherapy and also create a versatile tool for investigating immune system mechanism and function.

In this report, we optimize the intracellular hydrogelation process to transform live dendritic cells into a highly specialized biomimicking material. Gelated dendritic cells (G-DCs) are capable of provoking anti-tumor responses through proliferating CD8⁺ T cell expansion and come with advantages such as easy storage, long durability, robust stability, and extraordinary immunocompatibility. Furthermore, the results of this study show that aAPCs with high cytoplasmic strength (120kPa) can heighten 51.2% of the T cell activation rate. By modifying the stiffness of this novel aAPC's cytoplasm, we can modulate T cell expansion ability precisely and effectively.

This report suggests that this innovative immunotherapy through techniques of hydrogelated cellular platform is a breakthrough and promising biomaterial tool for the research of DC-based immunotherapy, further emphasizes the potential of engineering T-cell activation by mechanical forces. This material even has potential in vivo application compared to others.

壹、前言

一、研究動機

癌症已經蟬聯 37 年國人十大死因的榜首，台灣每年有超過 4.8 萬人因為癌症而死亡，在醫學界也持續研究著癌症治療的方法。治療癌症的主要方法，從手術切除，放射線治療，及藥物治療一直演進到現今的免疫療法。免疫療法最大的優勢，是將治療癌症的概念，由只關注腫瘤本身，提升到整個免疫系統，增加腫瘤的動態性變化的適應力。

活體外 T 細胞增生，對於免疫治療非常重要

針對特定抗原的有效 T 細胞刺激和增生是現今針對傳染病和癌症的免疫療法的目標。藉由將 T 細胞以及樹突細胞在體外強化培養，培養具有專一性攻擊能力的 T 細胞，並且運用於 T 細胞輸入療法。其有極高的專一性，且能進行個體化調控，因此對於免疫治療非常重要。因此本實驗想結合自製的水膠細胞，提供活體外 T 細胞增殖一個新興的途徑。

優質的 T 細胞增生需要建立與 APC 間的良好作用程度

免疫系統的功能是為了保護身體受到病原體及傳染源的侵害。此系統由先天性防禦及後天性防禦機制。而宿主調控的機制主要是通過專一性的 APCs (i.e. dendritic cells (DCs), macrophages, and B cells)。在首要的免疫反應中 APCs 會呈現內在和外在的抗原，以利和 T 細胞進行作用，進而促使 T 細胞增生。良好的作用建立在三項絕對的要素：1) 足夠強度的刺激；2) 自然膜的流動與分子分佈；3) 生物相容安全性。

現今研究在人工抗原呈現細胞上的限制

先前的研究主要致力在如何有效放大 T 細胞以及如何增加其材料安全性，以利直接使用在活體內。也有許多的研究利用控制 APC 的硬度來調控 T 細胞的增生與分化，其方式大多是藉由製造不同材質的介面來調控其軟硬度，但若深入探討會發現很多技術可能會間接影響到細胞膜的流動性、細胞的立體結構、密度以及細胞膜上的配體接合狀態，因此導致學者針對 APC 的硬度提升究竟是增加或抑制 T 細胞的激活一直存在著不同的見解。

本研究提供新興的細胞模擬 aAPCs 的平台

因此本實驗首先想藉由提升水膠細胞的製程效率及方式，並運用其特點：1) 細胞膜的流動性; 2) 細胞的整體高度生物相容性; 3) 簡單調控內在硬度且不會影響整體構型; 4) 可長時間保存不影響特性，來建立起一套新興的調控樹突狀細胞 (DC) 免疫療法的技術。

二、研究背景

(一) 免疫治療法

免疫療法分為主動將腫瘤抗原 (TAAs) 刺激免疫系統，引發專一性免疫反應和活體外增強免疫系統兩種。活體外 T 細胞激活又分為 CAR-T 療法 (chimeric antigen receptor T cell therapy)、新生抗原疫苗 (Neoantigen Vaccine) 及樹突細胞的免疫療法 (Dendritic cell-based immunotherapy) 等。

(二) 樹突狀細胞 (DC) 免疫療法

樹突細胞 (Dendritic cell, DC) 是目前已知功能最強之抗原呈現細胞，扮演引發先天性及後天性免疫反應之重要角色。樹突細胞在細胞免疫反應建立的過程也扮演了重要角色。樹突狀細胞 (DC) 免疫療法是一種利用患者自身免疫系統消除難治性癌症腫瘤細胞的治療方式，目前許多研究針對更換 APC (抗原呈現細胞, antigen-presenting cell) 和 TCR (T 細胞受器, T cell receptor) 的接觸環境、時間、介質來提升 T 細胞的激活程度。

(三) 人工合成的 aAPCs 作為仿生平台來調節免疫反應

由於自然細胞 APC 的限制，包括難以被保存且有易變性的缺點，且這些自然細胞的 APC 可能會因為體外的微觀環境改變而失去特定的表現型。因此為了克服上述自然細胞 APC 的限制，已有許多研究利用生化手法來製作人工合成的 aAPCs，且成功的被證實出其對抗腫瘤細胞的反應，也間接表明了人工合成的 aAPCs 作為仿生平台來調節免疫反應的潛力。

(四) 人工合成細胞

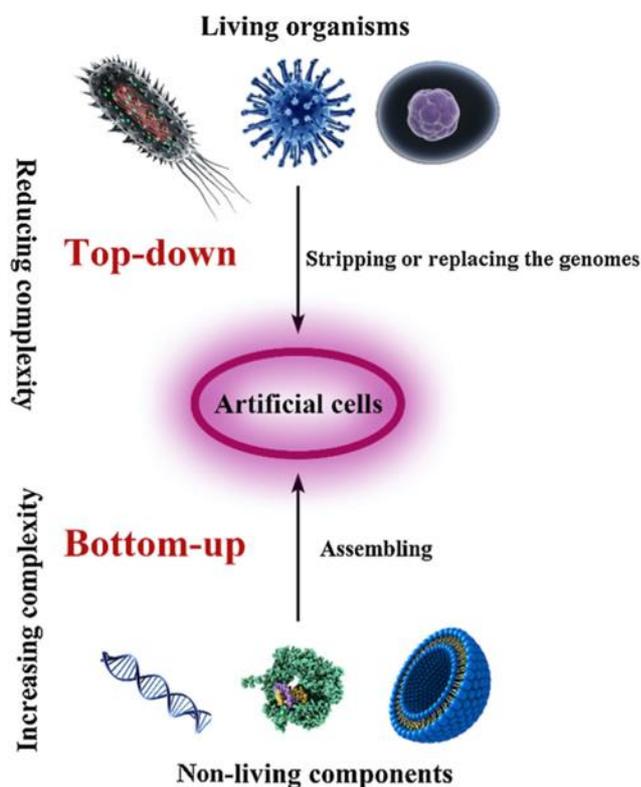


圖 1.圖為人造細胞的設計和構建方法，圖源自 Artificial cells: from basic science to applications : HHS Public Access (Can Xu et al., 2016) 人造細胞製成主要分兩種，一種是通過剝離或替換活生物體的基因組來創建的，另一組則是通過組裝非生物成分以形成可以復制天然細胞的基本特性的整體而構建的。

活細胞是極其複雜的化學系統，由一系列不同的化學物質（包括 DNA，蛋白質，脂質和代謝物）組成，它們通過巨大的相互作用網絡相互連接，這種複雜性使細胞生物學的研究須以定量和系統性進行。越來越多的人利用模擬細胞來解決這種艱難情況，進而推動了人造細胞的發展。細胞模擬物是簡化的細胞狀結構，理想情況下，典型的人造細胞應具有與活細胞相似的結構和基本特性。迄今，有兩種主要的基本方法來構建人造細胞，分別為 top-down approach 以及 bottom-up approach。top-down approach 是從一種活生物體開始，將基因組分解為維持細胞生命基本特性所需的最低數目的基因，或者用合成的基因組完全取代基因組。bottom-up approach 則是通過組裝生物或非生物分子來構建“活的”人造細胞。這

兩種方法不同但彼此互補，可製造從簡單的原始細胞到生化工程的各種人造細胞。有許多研究針對細胞膜的模擬、大分子蛋白質折疊、基因體電路等想提高人工細胞的生物相容性，然而其仍然存在著諸多的限制，例如會影響到細胞膜的流動性、細胞的立體結構、密度以及細胞膜上的配體接合狀態等等。

本實驗不使用以往調控細胞膜表面的方法，而是選擇了新興的細胞內水膠化系統，取代了現有的化學固定劑，直接調控細胞質的構成物濃度，並且意外的發現其也能間接的使 APC 反應增強。

(五) 軟硬度對 T 細胞增生強度的影響

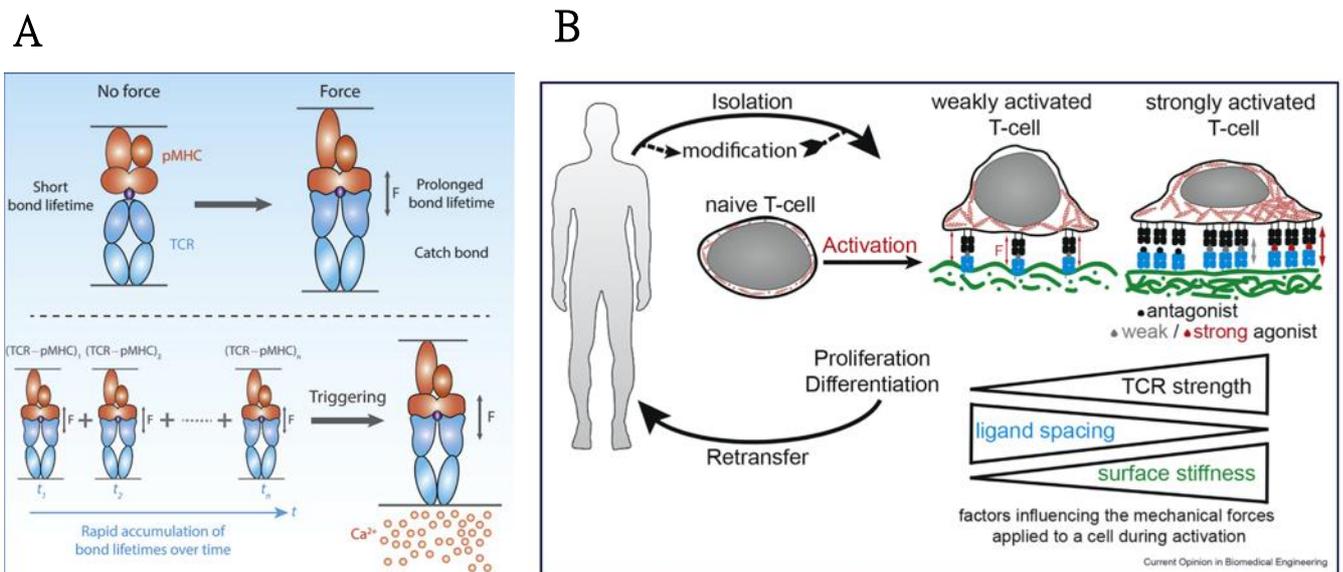


圖 2.(A)圖為 TCR 和 pMHC 在力的作用下鍵結壽命延長增加鈣鈣離子的示意圖，圖源自 Accumulation of Dynamic Catch Bonds between TCR and Agonist peptide-MHC Triggers T cell signaling: Cell (Baoyu Liu et al., 2014) (B) 圖為影響 T 細胞激活的三項主因：1)TCR 的鍵結強弱 2)配體的空間 3)表面的硬度，圖源自 Engineering T-cell activation for immunotherapy by mechanical forces: ELSEVIER(Morteza Aramesh et al., 2019)。

在 T 細胞激活的三項條件下，物理性的壓力可以藉由延長 TCR 和 APC 間的鍵結持久度，觸發鈣離子聚集，來大幅地提升 T 細胞的增生程度。免疫細胞的結構有著高度的可塑性，也就是說，當 APC 和 TCR 在接合時，不會形成強度高的焦點性附著位，且結構隨著受體的接合會形成動態的改變。因此免疫細胞只會形成短暫的接合位點作為物理壓力的傳導位點。T 細胞中動態收縮和突出的絲狀肌動蛋白絲 (F-actin) 對於上述所說的短暫接合位點相當重要。因為 F-actin 承受著大部分的物理壓力，並且藉由多種途徑將之轉換為化學訊號。

T 細胞的免疫突觸 (IS, immunological synapse) 被分為三個部分，由內到外為 cSMAC、pSMAC、dSMAC，近幾年來，有許多研究針對物理性的壓力如何影響 TCR 的訊號做探討，針對物理壓力的大小和作用範圍可藉由微米圓柱陣列、螢光顯微等方式被量測[參考文獻 15]，顯示在細胞邊界有著物理壓力的最大作用值，且整聯蛋白 (integrins) 和肌動蛋白絲 (F-actin) 會在 pSMAC、dSMAC 形成局部簇[參考文獻 16]，在細胞周邊聚集的 F-actin 可引起張力作用在細胞膜表面，進而形成快速的張力傳導通過整體細胞膜，再藉細胞骨架的重整進而改變基因表現。

三、研究目的

- (一) 細胞內水凝膠化保存細胞膜介面的流體狀態和功能
- (二) 水凝膠細胞吞噬作用試驗
- (三) 針對血液相容性對水凝膠細胞進行的血小板凝集試驗
- (四) 以水凝膠細胞激活細胞內的 T 細胞增生

貳、研究過程與方法

一、實驗流程圖

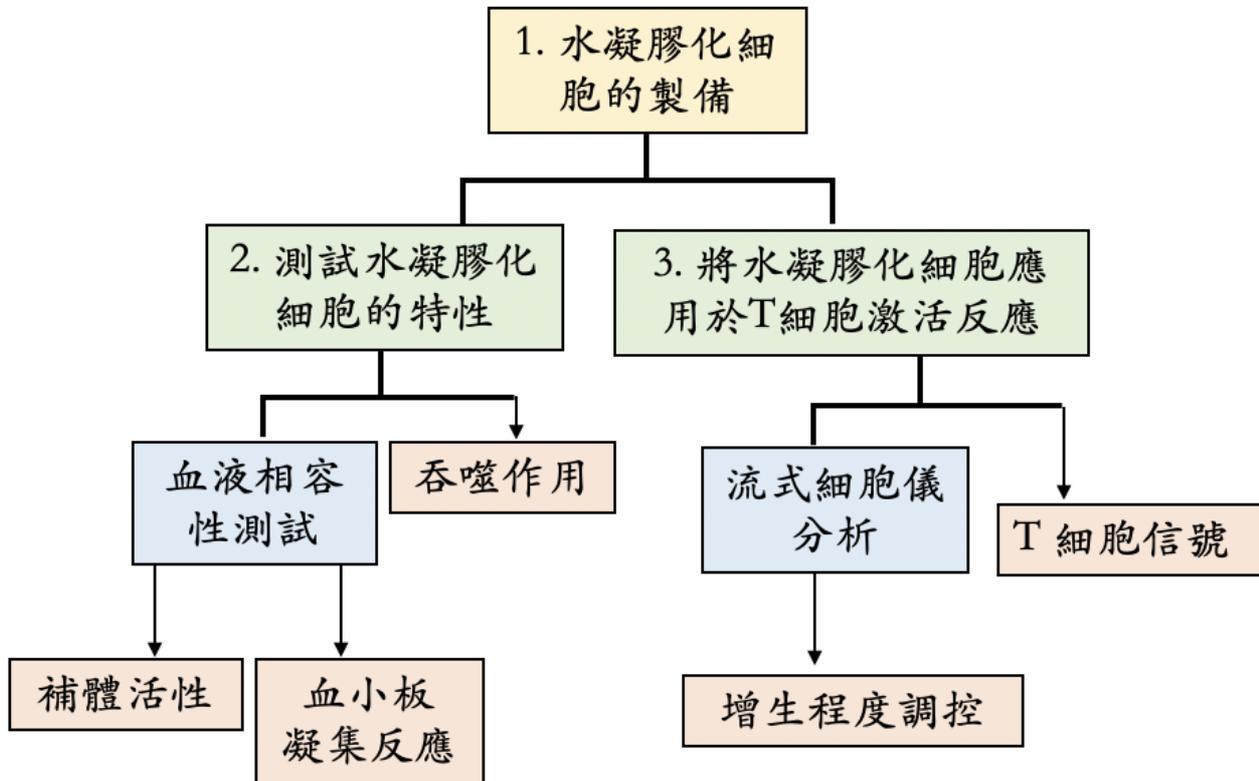


圖 3.本實驗總流程圖

二、研究藥品與設備

(一) 細胞與藥品

小鼠樹突細胞細胞株 JAWS II、MEM 培養基 (Minimum Essential Media)、[-] phenol red medium、DMSO 細胞抗凍劑 (Dimethyl Sulfoxide)、Trypsin、GM-CSF、PBS、PEG-DA、I2959、sodium citrate buffer、calcium chloride、LPS、CD8a antibody、CD47 antibody、CD47 isotype、Hoechst 33342 dye、CFSE

(二) 設備及器材

恆溫水槽、微量吸管分注器(pipette)、電動吸管(pipette aid)、培養箱、10 公分培養皿、微量吸管尖(pipette tip)、微量離心管、15mL 離心管、50mL 離心管、離心機、超音波洗淨機(Ultrasonic sonicator)、重複使用式細胞計數片、流式細胞儀、無菌操作台、24 孔盤、96 孔盤、eppendorf、4°C 冰箱、-80°C 冰箱、拭鏡紙、電腦、UV-crosslinker 照射儀

三、研究方法及步驟

(一)、細胞培養(Cell culture)

1. 細胞培養

將小鼠樹突細胞細胞株: JAWS II 培養於含 Ribonucleotides、Deoxyribonucleosides、4 mM-L-glutamine、1 mM sodium pyruvate、 5 ng ml^{-1} murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 及 20% FBS 的 Minimum Essential Media(MEM)，使上述細胞株附著於培養皿上，並放置在 5%CO₂、37°C 之細胞箱培養。

2. 細胞繼代培養

因為 JAWS II 的細胞只會有 60%至 80%服貼於培養皿底部，於是需將培養皿中的培養基取出並保留於 50 mL 離心管中，接著以清洗緩衝液 PBS(Phosphate buffered saline)清洗一次，確保清洗乾淨以防止殘留血清抑制胰蛋白酶的作用，將 PBS 以及雜質吸除，並加入 1.5 mL 的胰蛋白酶 (trypsin)，放入恆溫培養箱中約 3 分鐘。將放置於恆溫培養箱(Incubator)中的培養皿取出，吸取 50 mL 離心管中的培養液來終止胰蛋白酶反應，裝入 50 mL 離心管並將其離心(500 XG、5 分鐘)。將上清懸浮液除後，吸取 1 mL 的培養液來回打散細胞。準備培養皿並標明細胞名、細胞代數與日期並置入 8.5mL 的培養液及 0.5mL 的 GM-CSF，稍微搖晃使液體均勻後放入恆溫培養箱。

3. 種細胞

取 96 孔盤，將 JAWS II 種入孔內。將細胞分別標上細胞種以及日期，以八字均勻搖晃，放入 37°C，5%的 CO₂的培養箱中。

(二)、螢光染料標記活細胞細胞質 (Carboxyfluorescein succinimidyl ester staining)

將培養皿中的細胞取下，離心後移除上清液。將細胞均勻打散，以 1mL 的 PBS 回溶，接著將 50mL 的離心管斜躺，使 PBS 停留在底端。在管壁上方加入 100 μ L PBS 及 1.1 μ L CFSE，確認混合均勻後，再將管壁上方液與離心管底端的 PBS 旋轉混合均勻。避光放置十分鐘後，加入 20mL 的 PBS 終止反應，最後離心 (500 XG、5 分鐘) 並移除上清液。

(三)、赫斯特染色標記活細胞細胞核 (Hoechst 33342 dye efflux assay)

將細胞以 5×10^4 cells/well 種於 96well plate，經過一段時間後，以 0.1% Hoechst 33342 染色。在 37°C 避光靜置 30 分鐘後，去除培養液，並用 PBS 潤洗。

(四)、水凝膠細胞吞噬作用實驗

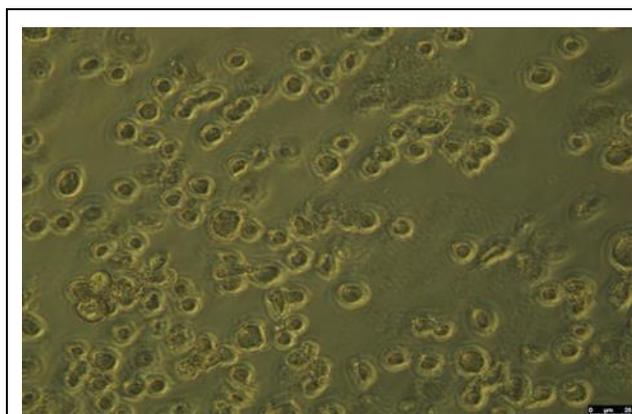


圖 4.水膠細胞和吞噬細胞疊加的影像圖

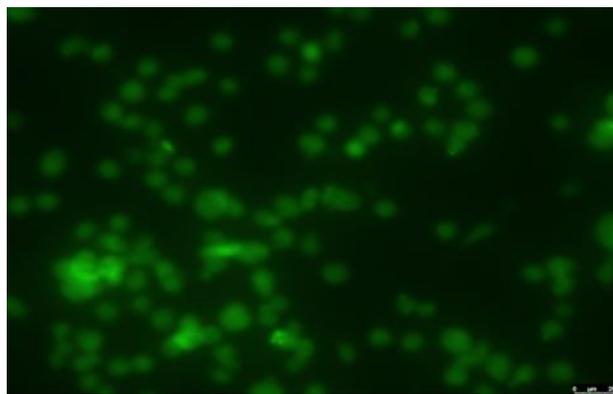
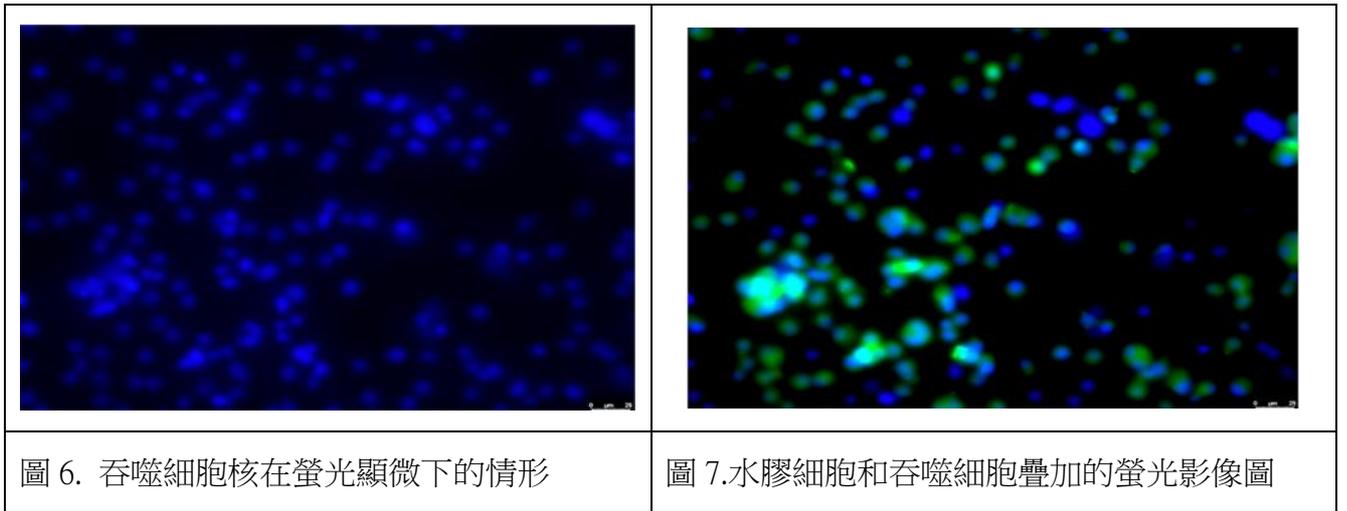


圖 5.CFSE 水膠細胞質在螢光顯微下的情形



1. 在製作水膠細胞前，會先加入 CFSE 將其細胞質染成綠色，確保其能被激發出螢光後，再接續做製成水膠細胞的實驗，以便後續實驗觀察。
2. 將吞噬細胞以 5×10^4 cells/well 種於 96 孔盤並放置八小時後，便可接續進行吞噬作用的實驗。在準備好水膠細胞的同時，會提前半小時在種有吞噬細胞的 96 孔盤，放入 Hoechst 33342 的染劑，將其細胞核染成藍色，以便後續實驗觀察。
3. 等待 Hoechst 33342 的染劑作用半小時完畢後，便可置入染有綠色螢光 CFSE 的水膠細胞，並於細胞培養室中避光靜置 3.5 個小時，等待吞噬作用的進行。
4. 待其作用完畢，便可將 96 孔盤置於顯微鏡下拍攝。首先會拍攝水膠細胞和吞噬細胞未被激發螢光的疊加影像圖，接著拍攝水膠細胞質在綠色螢光的顯微情形及吞噬細胞核在藍色螢光的顯微情形，最終將兩者疊加，並和第一張圖比對，即可觀察到吞噬作用。

(五) 血小板聚集測定 (Platelet Aggregation Assay)

配置 0.106mol/L(M) 檸檬酸鈉緩衝液、0.075mol/L(M) calcium chloride 以 50uLPBS 回溶、備好 6×10^6 個 GC、Glu-fixed cell、Live cell。準備以 1:20 的比例 activated zymosan。將 Eppendorf 放 100uL 的 citrate buffer, 針筒過了一遍 citrate buffer 再抽血。抽取血液後放置搖晃，確保不凝血後，再以 1000XG 離心 20min。Plasma 100uL 加入以 50uL PBS 回溶

的 GC、Glu-fixed cell、Live cell，300XG 離心後移除上清液。在 37°C 避光靜置 10 分鐘後，低速離心後抽取下層離心液體，置於玻片上拍照。

(六)、T 細胞體外激活實驗 (T proliferation assay ex vivo)

將 JAWS II 先以 LPS 活化 24 小時，加入 OT-I 胜肽後將其製作成不同比例的水凝膠細胞。將 CFSE 標記的 OT-1 細胞與活 DC，G-DC 或戊二醛固定的 DC 以不同比例共培養。將 96 孔 v 型底培養皿中的共培養細胞在 37°C 下培養指定的時間。收穫後，將細胞用綴有藻藍蛋白的大鼠抗小鼠 CD8a 抗體 (eBioscience，#100712，克隆 53-6.7，1:100) 染色，並通過流式細胞儀進行分析。

參、研究結果與討論

一、不同濃度水凝膠細胞的製備

1. 細胞外的水凝膠化實驗

- (1) 取 I2959 於 eppendorf 中，再加入 1.5 倍體積之 DMSO，sonicate 幫助溶解。混合均勻後加入 PEG-DA，並且放入超音波震盪槽確保混合均勻。

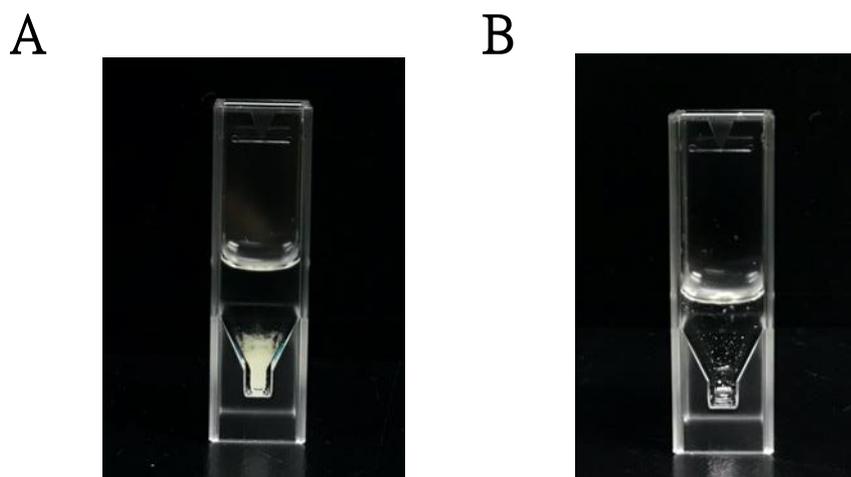


圖 8. DMSO 和 PEG-DA 震盪混合前後的比較。(A) 密度較大的 DMSO 沈積在底部，上方澄清膠體為 PEG-DA。(B) 透過超音波高速震盪，幫助水膠材料均勻混合。

- (2) 以 365 奈米的 UV 光進行光激化的化學反應。在紫外光的激發下使得光敏劑吸收一定波長能量，並且激發二丙烯酸乙酯單體，以形成共價鍵的水凝膠網路。二丙烯酸酯的性能受其主要單體二丙烯酸烷基酯中烷基碳原子數目的影響。其耐熱性較好，且因烷基碳原子數目的增多，對酯基極性基的屏蔽效應增大，因此使耐水性有所改善，同時由於屏蔽效應，減弱了橡膠分子間力，增大了內部塑性。若通過上述兩種單體並用，並且採用低蛋白反應性、最小化細胞外交聯的化學機制以建立無破壞性細胞固定方式。

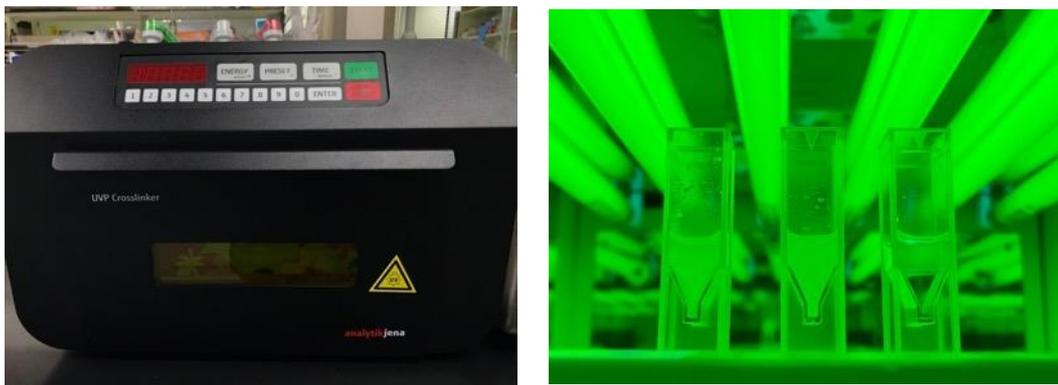


圖 9.為 UV 光照射儀，使用 365 奈米的紫外光去激發 I2959

- (3) 不同濃度的水膠材料經過光激發而形成不同硬度及狀態的固態水凝膠。可透過簡單的比例濃度調整，製作出專一化的凝膠硬度，本實驗使用的是低分子量的親水性交聯單體，有助於促進細胞質滲透。更可進一步進行細胞內的專一化硬度調控。

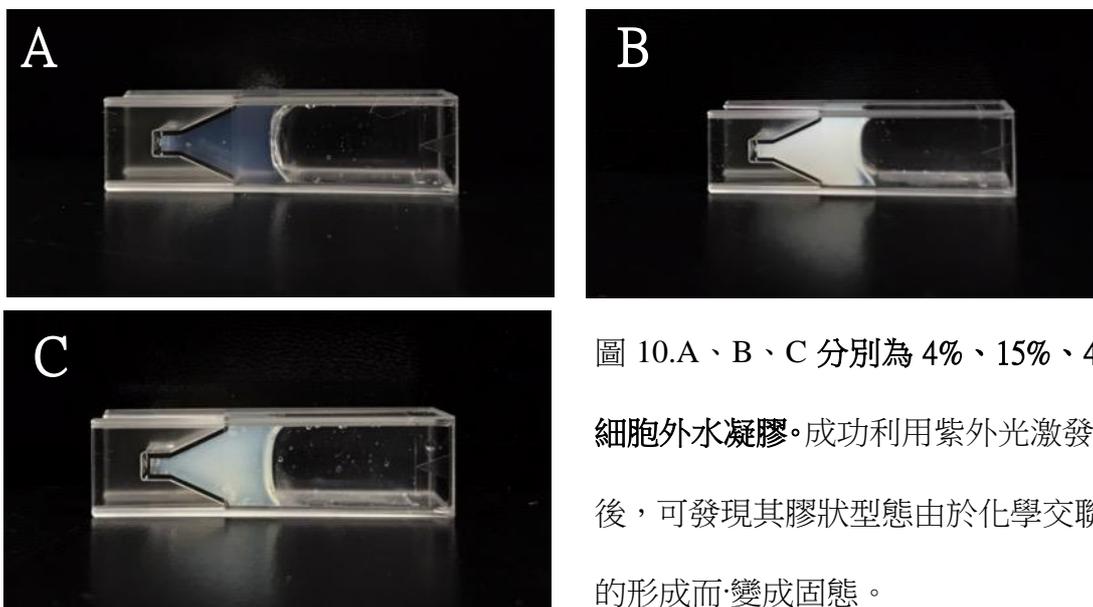


圖 10.A、B、C 分別為 4%、15%、40%的細胞外水凝膠。成功利用紫外光激發 I2959 後，可發現其膠狀型態由於化學交聯鍵結的形成而變成固態。

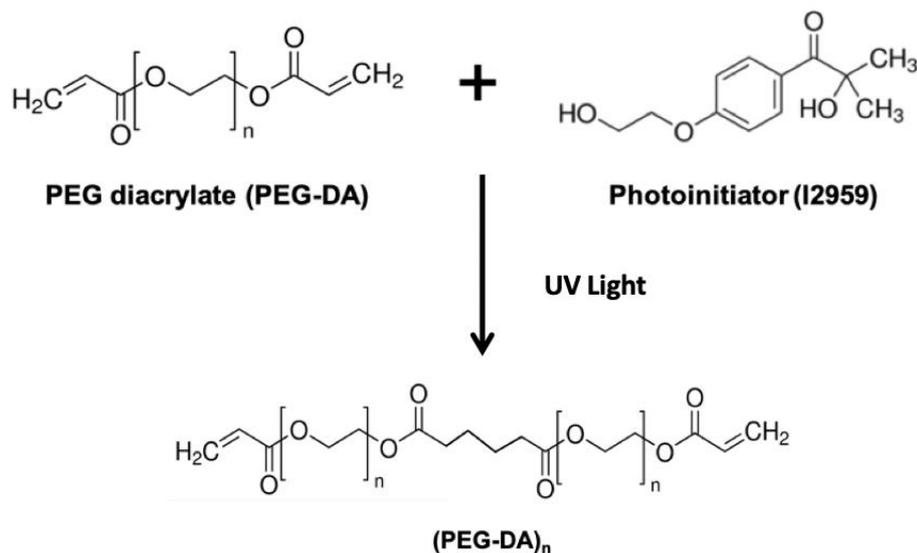


圖 11.水凝膠交聯化學反應式

2. 細胞內的水凝膠化實驗

- (1) 取 PEG-DA (MW 700) 4°C 為凝固狀，置於室溫或 37°C 水浴中，回溫至流動狀。秤取 30 mg 的 I2959，再加入 20 μL 的 DMSO (溶解後為很淡的黃色)。
- (2) 取 200 μL 的 PEG-DA (MW 700)，加入 20 μL I2959/DMSO，充分混合均勻。
- (3) 準備細胞：離心移除上清液，以 [-] phenol red medium 回溶 (由於一般使用的 MEM 培養基內成分含有苯的結構，在細胞照射紫外光時會產生共振現象進而影響細胞內的凝膠製成度，因此本實驗選用去酚的 medium)，移至 Eppendorf 中。
- (4) 將 PEG-DA + I2959 緩慢地沿著管壁加入 cell 中，充分混合均勻 (不可有分層)。

GC %	4%	15%	40%
PEG-DA + I2959	40 μL	150 μL	400 μL
Medium containing cells	800 μL	250 μL	600 μL
ddH ₂ O	160 μL	600 μL	0 μL
Total	1000 μL	1000 μL	1000 μL

※ Incubation 在 20% 以下時，加水以維持細胞正常滲透壓

- (5) 在室溫靜置反應 5 分鐘，避光 (關閉 hood 的照明燈)。
- (6) 離心 500 XG，5 分鐘



圖 12.於 Eppendorf 下方會沈降黃白色的塊狀物。此即細胞內已灌有水膠的細胞。

- (7) 取 500 μL 上清液為 positive control (load 在其中一個 well)，移除剩餘上清液。再以 500 μL 的 [-] phenol red medium 回溶 pellet，快速混合均勻，load 至 well 內。
- (8) 將 24 孔盤放置於含冰的鐵盤中，打開其蓋子，以 UV-crosslinker 照射
- ※ 4%，500 μL ：照射 8 分鐘凝固
 - ※ 15%，500 μL ：照射 2 分鐘凝固
 - ※ 40%，500 μL ：照射 0.5 分鐘凝固

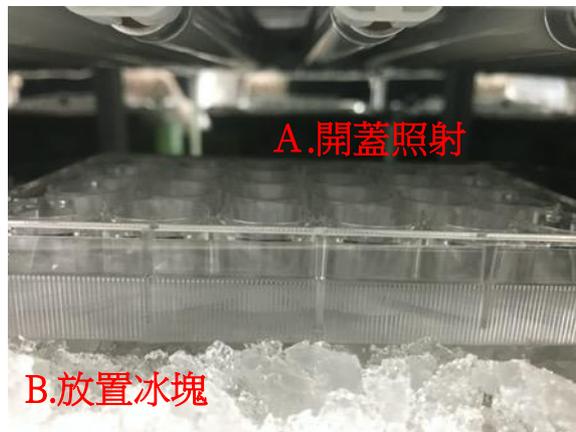


圖 13.細胞盤內照射紫外光的情形

- (A)開啟 24 孔盤的蓋子，是為了避免上方塑膠蓋影響雷射光的照射率及角度。
- (B)底下放置冰塊是為了降低雷射光所導致的高溫影響細胞。
- (9) 將 24 孔盤內細胞移至 eppendorf 內，離心 1000 XG，5 分鐘，移除上清液，以[-] phenol red medium 回溶。

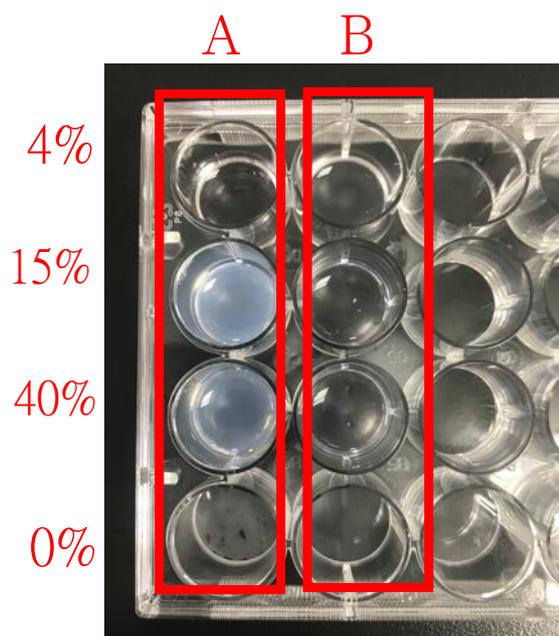


圖 14.利用 24 孔盤成功的製作出不同比例的水膠細胞，細胞盤內對照組及細胞照射紫外光後的情形。(A) 此行為細胞在水凝膠滲透後拿去離心的上清液，即不同濃度的水凝膠。作為對照組，以便判讀細胞內的水凝膠照射紫外光後是否已凝固。(B) 以 500 μL 的 [-] phenol red medium 回溶的水凝膠化細胞，照射完紫外光後，由於外部是 medium 不會固化，然而滲透在細胞內部的水膠已行程固狀結構。

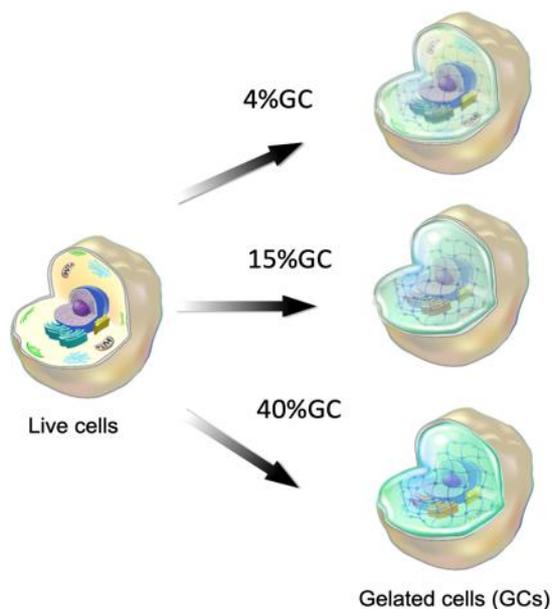


圖 15.不同濃度水凝膠細胞的製備圖

- 建立細胞內水凝膠化技術須考慮三個因素：（1）使用低分子量的親水性交聯單體來促進細胞質滲透。（2）採用低蛋白反應性的交聯化學機制以促進無破壞性細胞固定。（3）最小化細胞外交聯，防止細胞膜的表面抗原被掩蓋。
- 基於上述三個因素限制，本實驗參考先前論文，使用了由聚（乙二醇）二丙烯酸酯單體（PEG-DA； Mn 700）和 2-羥基-4'-（2-羥基乙氧基）-2-甲基苯乙酮光引髮劑（I2959）組成的光活化水凝膠體系。該材料由於與生物成分的反應性極低，因此被廣泛應用於生物醫學領域。使用超音波洗淨機均勻混合 PEG-DA 及 I2959 後，加入樹突細胞，利用細胞膜內外的滲透特性，使之滲透入樹突細胞的細胞質。離心洗滌除去細胞外單體和光引髮劑後，再利用 365nm 的紫外線（UV）照射細胞，即可完成細胞內水凝膠化。

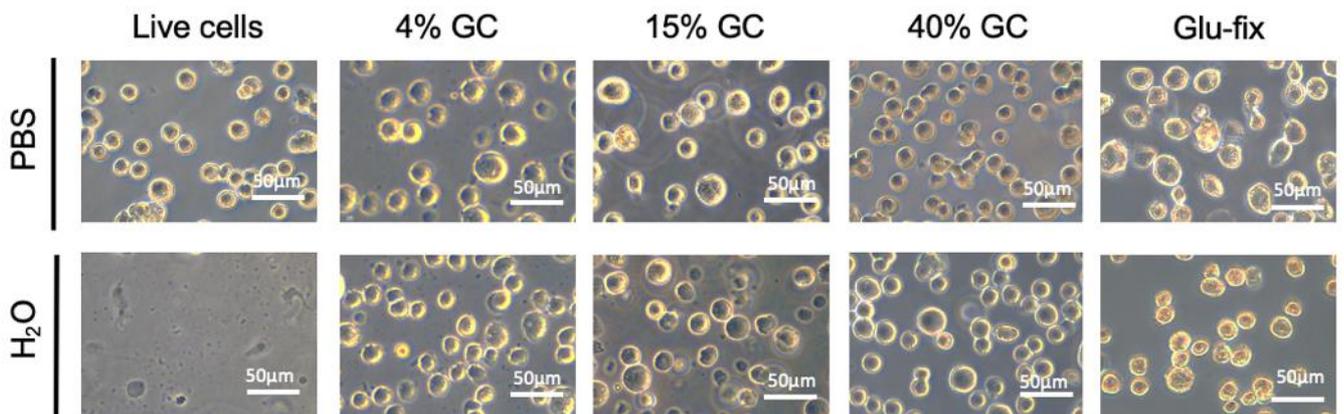


圖 16.不濃度水膠細胞和正常細胞在 PBS 和水中的細胞型態比較

- （圖 16）將水膠細胞和未經水凝膠處理的細胞分別放入水中及 PBS 中，可以發現正常細胞在五分鐘內即破損，然而 4%、15%、40%的水膠細胞卻能保留其細胞構造及形體，Glu-fixed 的細胞由於膜表面被固化，因此滲透壓的差異並不影響其型態表現。
- 此為驗證水膠細胞是否有做成的方法，由於水膠細胞的細胞內部結構在光激發後已維持凝固狀，因此可以克服外在的滲透壓環境，並不造成其細胞膜脹破。

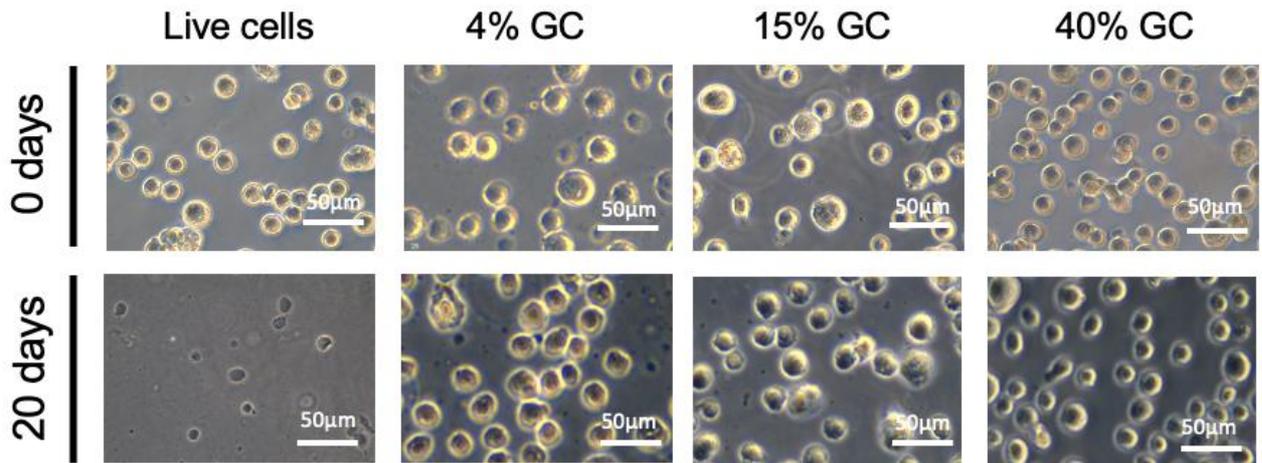


圖 17.水凝膠細胞和正常細胞在 PBS 中放置 20 天的前後比較

- 為了了解水膠細胞（GC）的穩定性，本實驗通過顯微鏡觀察，水凝膠化的細胞在 PBS 中放置在 4°C 冰箱 20 天後，並沒有觀察到結構或形態上的差異，而對照未進行水凝膠化的細胞，可發現明顯的崩解現象。

二、 水凝膠細胞吞噬作用實驗

（一）實驗原理

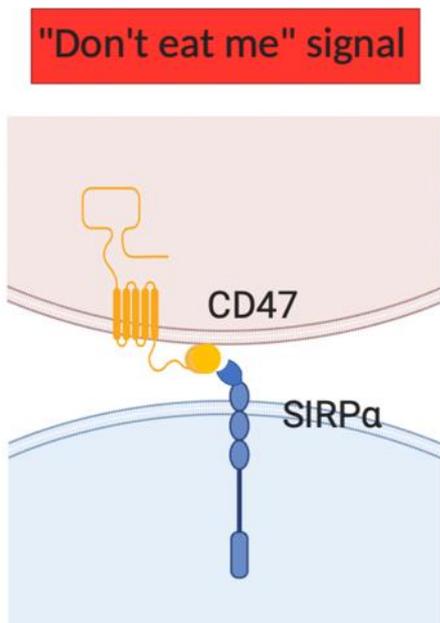


圖 18. CD47 為本實驗水凝膠細胞表面的免疫球蛋白，透過和吞噬細胞上的信號調節蛋白 SIRP α 結合的相互作用，傳遞信號，使自身不會被吞噬細胞清除。

圖片繪自 Created with BioRender.com

- 實驗的組別分為三組：
水膠細胞在 PBS 中、水膠細胞添加 isotype、水膠細胞添加 anti-CD47
- 由於本實驗的細胞株 JAWS II 本身為一種樹突細胞，具有吞噬作用且為重要的抗原呈現細胞。以 JAWS II 作為吞噬細胞，吞噬已水凝膠化的 JAWS II 細胞，藉此判斷水凝膠化技術是否能完整保留膜上的辨識蛋白。
- CD47 作為一種在細胞膜上的跨膜蛋白，是免疫球蛋白的超家族。簡單來說，它向細胞傳遞「不要吃我」的信號。藉由與信號調節蛋白 α (SIRP α) 相互作用，介導雙向的信號轉導，抑制吞噬作用的發生。本實驗想證實我們能用水凝膠化技術完整保留細胞上的蛋白及膜的流動性，因此選用 CD47 作為判讀。若細胞不會被吞噬則代表水凝膠化技術不會破壞細胞的訊號判讀及免疫機制。

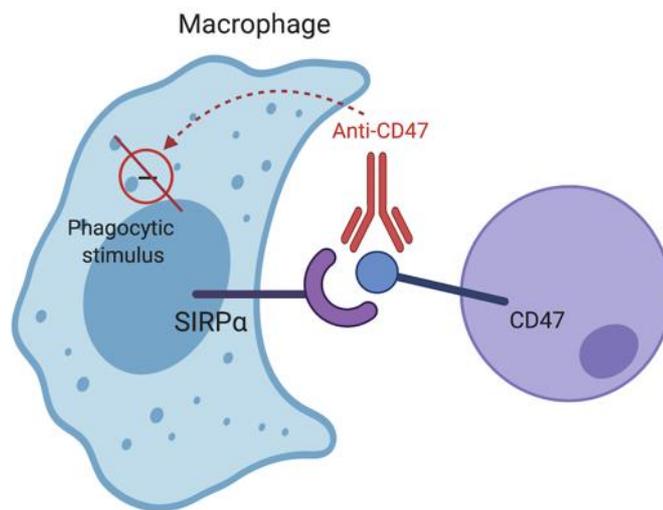


圖 19. anti-CD47 於吞噬作用所控制的訊號傳導情形示意圖

圖片繪自 Created with BioRender.com

- 實驗中的對照組，在水膠細胞製成後添加 anti-CD47，把 CD47 的訊號關起，以致其無法和 SIRP α 形成相互作用，導致吞噬作用發生。藉此驗證吞噬細胞能正常作用。

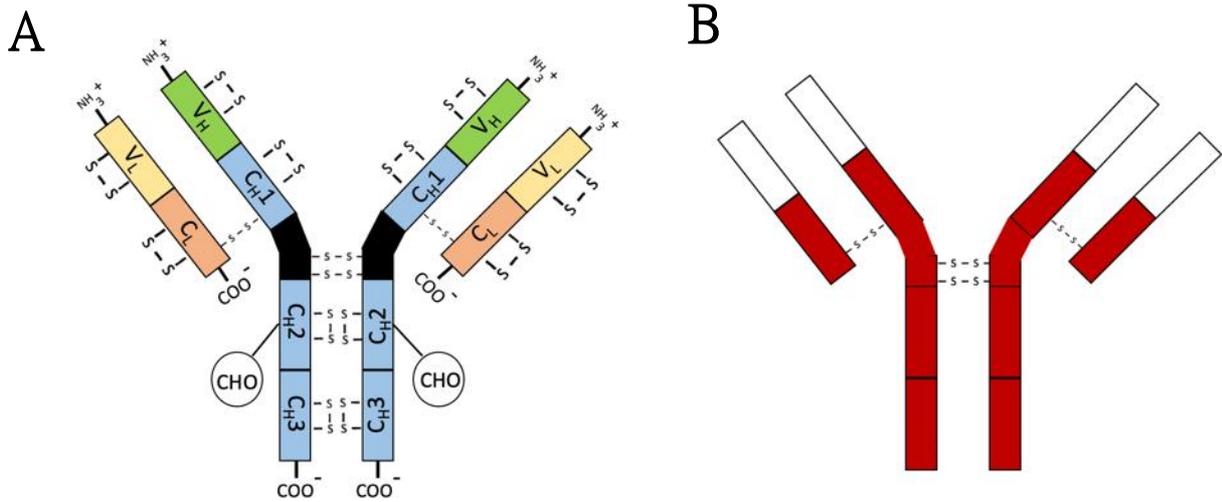


圖 20. 免疫球蛋白(Ig)及其同種型(isotype)示意圖

(A) anti-CD47 為一種免疫球蛋白(Ig)，它具有抗體的活性是一種與抗體結構類似的球蛋白，主要區分為重鏈和輕鏈，又囊括了可變區(V 端)及恒定區(C 端)。(B) 可變區(白色區域)即與抗原特異性結合的部位，恒定區(紅色區域)即某些同種型的標記區，**isotype** 和 anti-CD47 的氨基酸排列差異處即在可變區(白色區域)，因此無法和 SIRP α 形成相互作用。

- 本實驗所使用的 anti-CD47 Isotype 是指同一種屬所有個體的同類 Ig 分子共有的 Ag 特異性標誌，主要位於 Ig 的 C 區，可作為準確的負調控。吞噬作用與否的主要判斷依據則是在 Ig 的可變區(variable region)，其氨基酸組合和排列有較大的差異，並決定了抗體與抗原結合的特異性。而 anti-CD47 Isotype 在可變區的氨基酸排列和 anti-CD47 不同，然而恒定區則是相同的，因此實驗預測 anti-CD47 Isotype 少了上緣與抗原特異性結合的部位的特性，因此不會誘發吞噬作用。

(二) 實驗結果

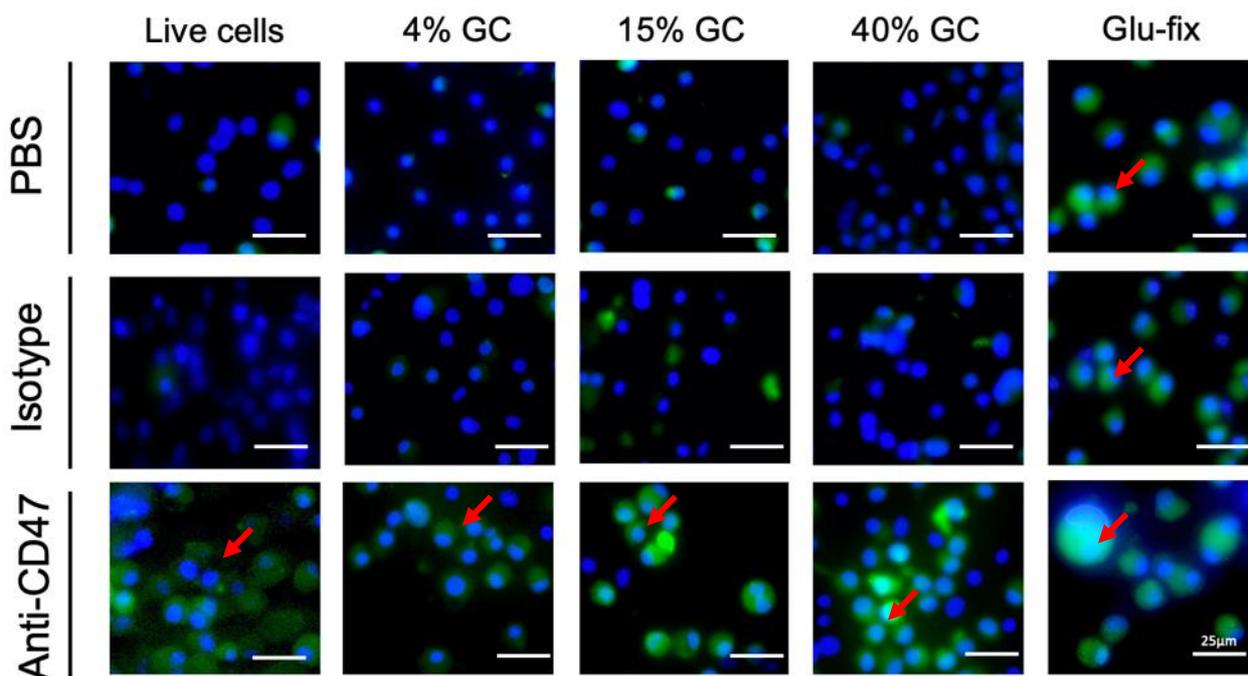
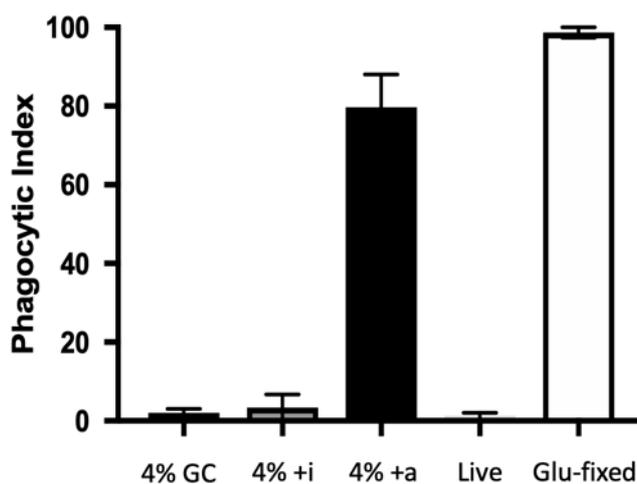


圖 21.吞嚥作用細胞在雷射光激發下的顯微影像疊加圖

- 顯微影像疊加圖中，藍色螢光的細胞為經赫斯特染色標記的 JAWS II 細胞核;綠色螢光則為經 CFSE 染色標記的水凝膠化 JAWS II 細胞質。
- 紅色箭頭所指的螢光疊加現象則表示吞嚥作用的吞嚥細胞和細胞相互作用。

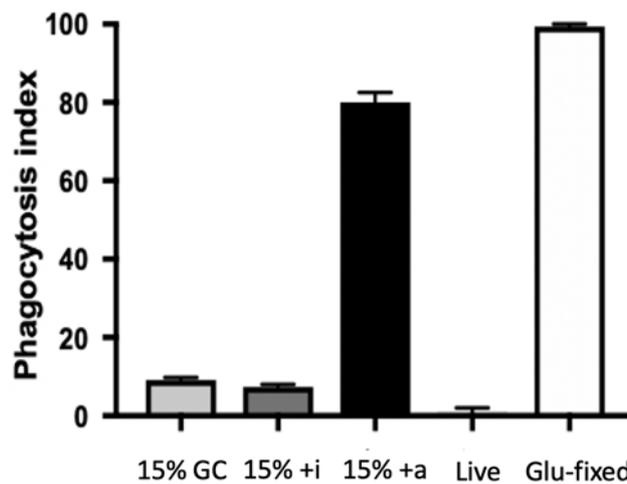
圖 22. 4%水膠細胞吞嚥作用結果



圖說：4%GC 表示 4%水膠細胞、4%+i 表示 4%水膠細胞加入 isotype、4%+a 表示 4%水膠細胞加入 anti-CD47、Live 表示活的 JAWS II、Glu-fixed 表示戊二醛話的細胞。

1. 4%水膠細胞在正常狀態下，造成吞噬作用反應佔全體細胞的 2%，此現象表示其細胞膜上的 CD47 蛋白保留完整，並且能正常地和 SIRP α 形成相互作用。
2. 4%水膠細胞添加 anti-CD47 Isotype 後被吞噬的比例佔全體細胞的 3%。表示 anti-CD47 主要是由可變區傳遞訊號，作為負調控組。
3. 4%水膠細胞添加 anti-CD47 後，吞噬程度來到 80%，是由於 anti-CD47 把膜表面 CD47 的訊號關起。

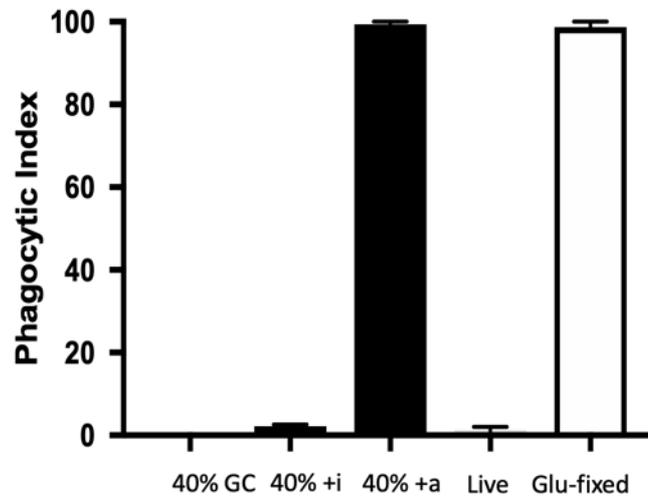
圖 23. 15%水膠細胞吞噬作用結果



圖說：15%GC 表示 15%水膠細胞、15%+i 表示 15%水膠細胞加入 isotype、15%+a 表示 15%水膠細胞加入 anti-CD47、Live 表示活的 JAWS II、Glu-fixed 表示戊二醛話的細胞。

1. 15%水膠細胞在正常狀態下，造成吞噬作用反應佔全體細胞的 10%，其細胞膜上的 CD47 蛋白保留完整，且能和 SIRP α 形成相互作用。然而其吞噬程度卻也是三個濃度中最高的，推測是因為細胞質的固化狀態處於兩者的中間值，細胞型態介於水膠固化未完全的狀態。
2. 15%水膠細胞添加 anti-CD47 Isotype 後被吞噬的比例佔全體細胞的 7%。
3. 15%水膠細胞添加 anti-CD47 後，吞噬程度來到 89%。

圖 24. 40%水膠細胞吞噬作用結果



圖說：40%GC 表示 40%水膠細胞、40%+i 表示 40%水膠細胞加入 isotype、40%+a 表示 40%水膠細胞加入 anti-CD47、Live 表示活的 JAWS II、Glu-fixed 表示戊二醛話的細胞。

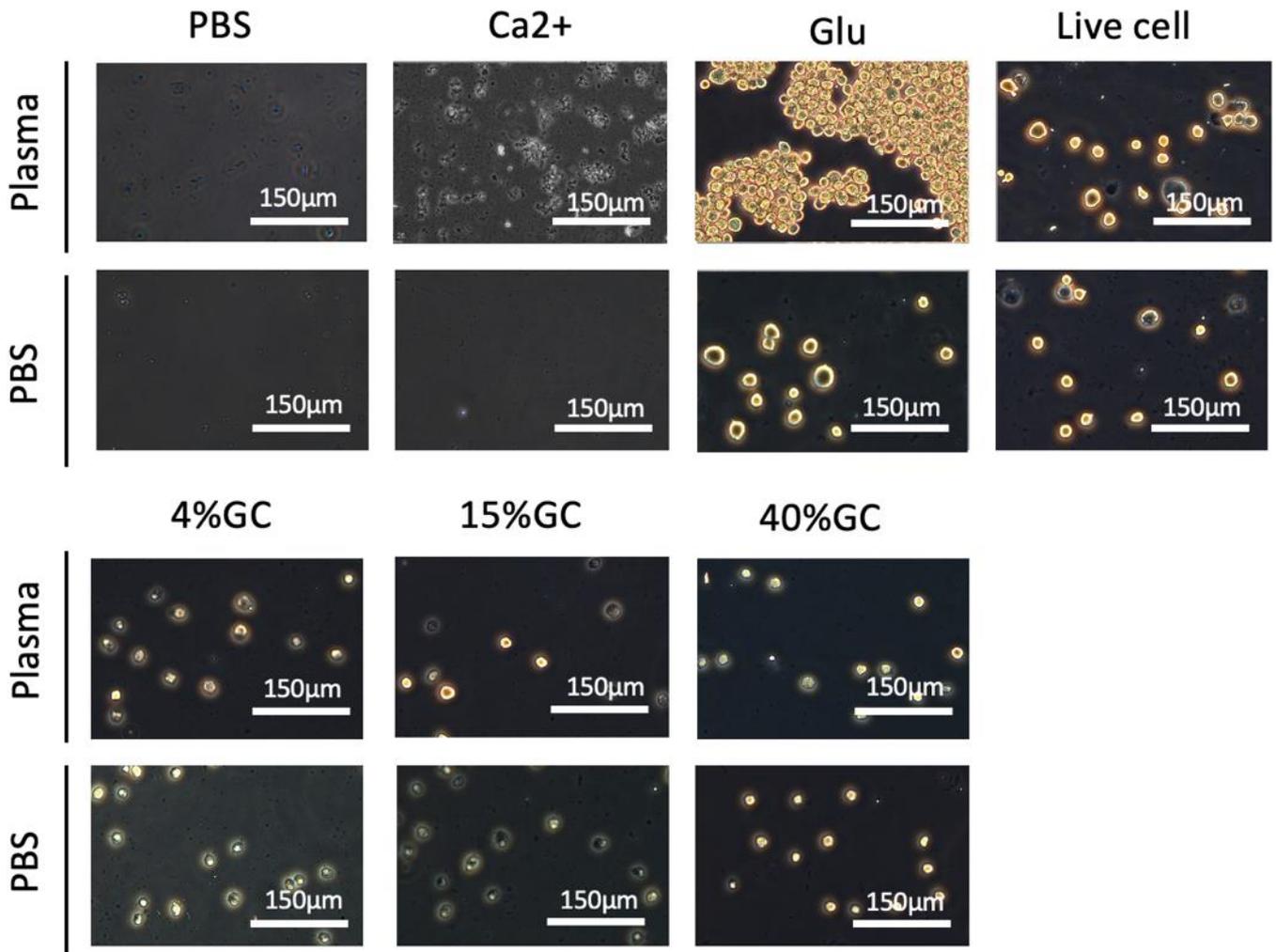
1. 40%水膠細胞在正常狀態下，造成吞噬作用反應佔全體細胞的 3%，表示其細胞膜上的 CD47 蛋白保留完整，且能和 SIRP α 形成相互作用。
2. 40%水膠細胞添加 anti-CD47 Isotype 後被吞噬的比例佔全體細胞的 2%。
3. 40%水膠細胞添加 anti-CD47 後，吞噬程度來到 100%。推測這和細胞質水凝膠程度高，傳遞訊號由於鍵結等化學因素而增強，因此吞噬程度來到三著濃度的最高值。

□ 比較活細胞、水凝膠細胞和戊二醛化細胞，膜的表面處理前後的不同吞噬作用程度：

1. 活細胞在正常狀態下由於表面有辨識蛋白酶，因此並不會引起吞噬作用反應。從實驗結果得知，isotype 的組別亦不會造成吞噬作用，證實 anti-CD47 的 V 端是決定吞噬差異的關鍵處。加入 anti-CD47，把 CD47 的訊號關起後，將干擾 CD47 和 SIRP α 的相互作用，導致吞噬作用發生，此組做為正調控。

2. 戊二醛化細胞由於細胞膜表面被固化，流動性損壞，膜表面的抗原呈現訊號被中斷，因此會引起吞噬反應。
3. 在三組的實驗數據中，可以發現添加 anti-CD47 的組別有隨著水膠細胞硬度增生，而吞噬作用隨之增生的趨勢。4%、15%、40%添加 anti-CD47 後的吞噬程度分別為 80%、89%、100%，推測是因為水膠細胞的硬度提升，進而強化 anti-CD47 和表面 CD47 的結合強弱，當細胞質越硬，結合構造越緊密，傳遞的吞噬作用訊號更強。而且此條件是建立在細胞質被固化，然而細胞膜可正常流動的狀態。
4. 此實驗證實水凝膠化細胞之所以不會造成吞噬作用，原因是細胞膜的流動性及抗原蛋白的保留程度佳，而主要的抗原呈現蛋白 CD47 作為吞噬作用的主要調控因子。
5. 從實驗結果得知，經由本實驗的水凝膠化細胞技術，使得我們能調控細胞內部的化學結構，進而影響到細胞本體傳遞訊號的強弱差異。另外，經由水凝膠化細胞技術所製備而成的細胞，擁有高度的生物相容性，不會誘發免疫反應，為一種新興的生化材料，日後能結合其特性運用在多種領域。

三、 針對血液相容性對水凝膠細胞進行的血小板凝集試驗



- 圖 25.中顯示鈣離子在 plasma 中有凝集的現象，說明 plasma 已經被成功活化。
- Glu-fixed 的細胞和 plasma 作用後，產生細胞聚集的現象，我們推測其和 Glu-fixed 的細胞與 platelet 之間的作用有關。由於 Glu-fixed 的細胞膜表面是被固化的，表面蛋白功能損壞，因此會導致血液相容性異常的狀況發生，若是在生物體體內，將有可能導致血管阻塞等問題。
- 4%、15%、40%的水凝膠化細胞在 plasma 中的細胞狀態和 Live cell 是相同的。此實驗結果證明了水凝膠化細胞在血液內的相容性，因此在富含凝血因子的 plasma 中不會出現凝集的現象。其中牽涉了諸多機制，間接的證明了水凝膠化細胞在保留細胞膜表面功能及維持細胞膜流動性的特點。

四、 以水凝膠細胞激活細胞內的 T 細胞增生

(一) 實驗原理

- 從文獻資料得知，LPS 通過提升 I-A 蛋白和 mRNA 基因表現量可增加 B 細胞的表面表達。因此本實驗使用 LPS 活化 JAWS II 細胞 24 小時。
- 在免疫學領域極經常使用諸如卵清蛋白 (OVA) 之類的典型抗原。從文獻資料得知小鼠的 CD8 + T 細胞對 OVA 肽的 257-264 位氨基酸 H-2K^b(SIINFEKL)具有特異性，因此此實驗在將 JAWS II 細胞以 LPS 活化後便會加入 OT-I 胜肽，使之反應 4 小時，再將其水凝膠化。
- 在 T 細胞激活的階段，已水凝膠化的 JAWS II 細胞表面的 MHC-I 會和 CD8+ T 細胞的 T 細胞受體相互作用，活化胞毒 T 細胞;在此同時，JAWS II 細胞表面的 CD80 會和 T 細胞上的協同刺激因子受器 CD28 相互作用提供促進 T 細胞活化的協同刺激訊號，此種協同受體不僅提高了 T 細胞受體在功能上的特異性，而且延長了 T 細胞與抗原呈遞細胞的作用時間。
- 本實驗以 4%、15%、40%等不同濃度比例的水凝膠化樹突細胞去激活 T 細胞，參考機械力影響 T 細胞激活的文獻，我們預期 4%的 GC 將有最好的激活效果。

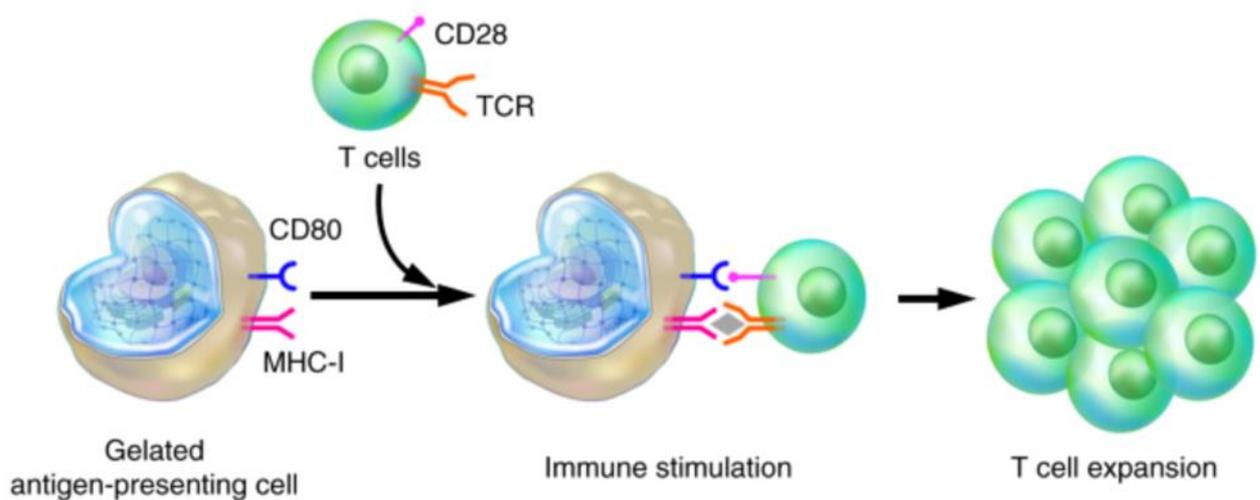


圖 26. 顯示 T 細胞和 G-DCs 之間相互作用的示意圖。圖源自 Intracellular hydrogelation preserves fluid and functional cell membrane interfaces for biological interactions: Nature Communications (Jung-chen Lin et al., 2019)。

(二) 實驗結果

T 細胞可以用作自身免疫性疾病的免疫療法的一種形式。複製抗原呈現蛋白以激活 T 細胞，是目前人工 APC 系統開發中的主要工程目標。為了突出水凝膠化細胞的潛在用途，以不同濃度水凝膠化的 DC (G-DC) 和戊二醛固定的 DC 進行使用 CFSE 標記的 CD8 + OT-I T 細胞的離體 T 細胞增殖測定，並評估其激活能力的差異。圖中 CFSE 標記的 T 細胞組 (灰色) 作為為負調控。

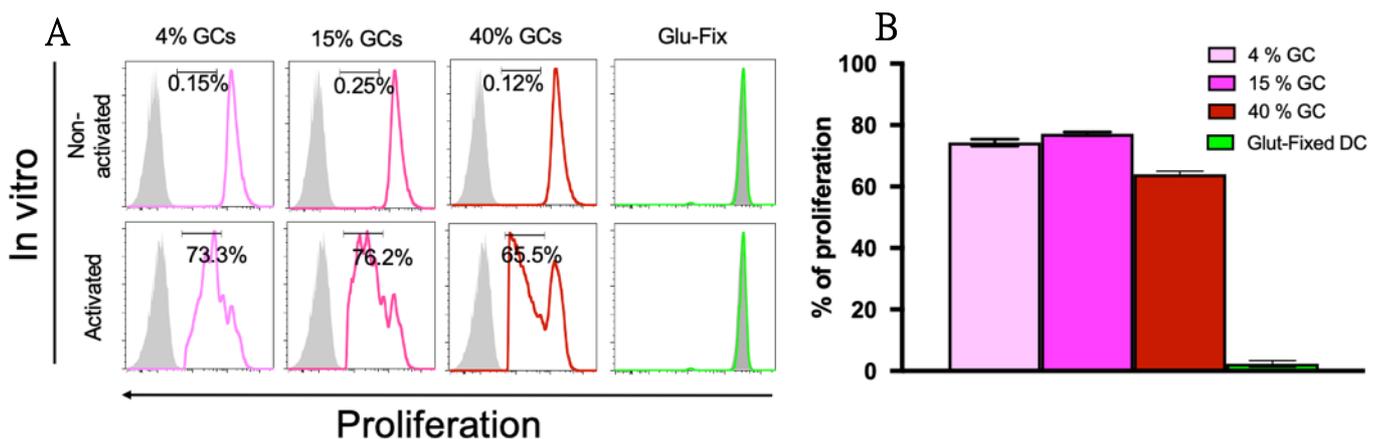


圖 27 .G-DC 體外擴增抗原特異性 T 細胞。(A)流式細胞儀的 T 細胞增生量化圖 (B) 不同硬度造成增生比例差異的柱狀圖：利用 CFSE 將 OT-1T 細胞染上螢光，並使用不同軟硬度的水膠細胞激活，觀測其增生能力。G-DCs: OT-I T cells= 4×10^4 : 12×10^4 = 0.3333:1, Day3。

實驗結果顯示，水膠細胞皆能有效激活 OT-I T 細胞。當 G-DCs: OT-I T cells=0.3333:1 時，4% 水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度是 73.3%，15%水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度來到最高 76.2%，而 40%水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度較前兩者來的弱，為 65.5%。此實驗為四組實驗當中水膠細胞占的比例最高的，而可以發現三個硬度的水膠細胞使 T 細胞增生的能

力皆在 65%以上，又以 15%的軟硬度促使 T 細胞增生效果最佳。然而三者的數據差異不大，因此本實驗決定調降水膠細胞在實驗中的占比。

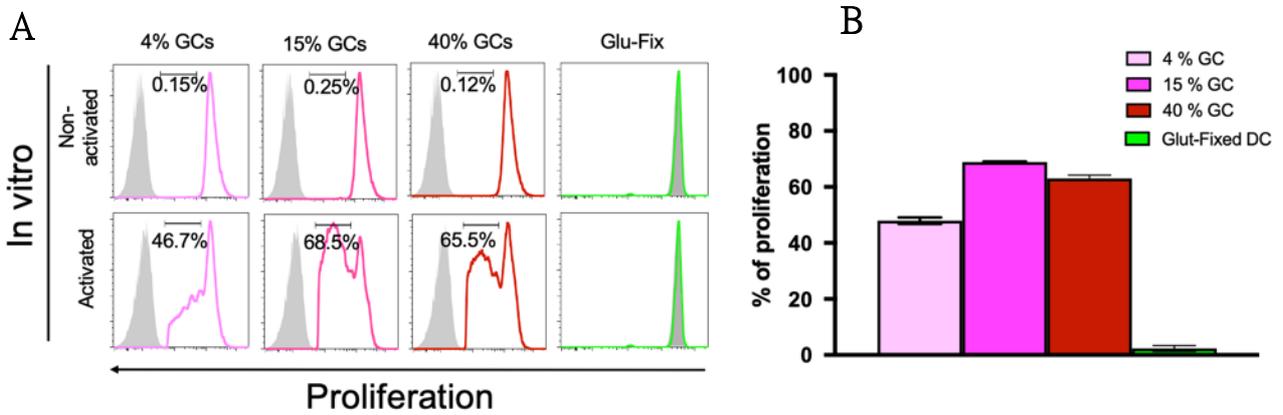


圖 28. G-DC 體外擴增抗原特异性 T 細胞。(A)流式細胞儀的 T 細胞增生量化圖 (B) 不同硬度造成增生比例差異的柱狀圖：利用 CFSE 將 OT-1T 細胞染上螢光，並使用不同軟硬度的水膠細胞激活，觀測其增生能力。G-DCs: OT-1 T cells= 2.66×10^4 : 12×10^4 = 0.221: 1; Day 3。

實驗結果顯示，水膠細胞皆能有效激活 OT-1 T 細胞。當 G-DCs: OT-1 T cells=0.221:1 時，令我們感到意外的是 4%水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度是 46.7%明顯較 G-DCs: OT-1 T cells=0.3333:1 時的增生程度降低了 26.6%，15%水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度則是下降了 7.7%，然而 40%水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度卻未下降，相對而言，有升高的趨勢。

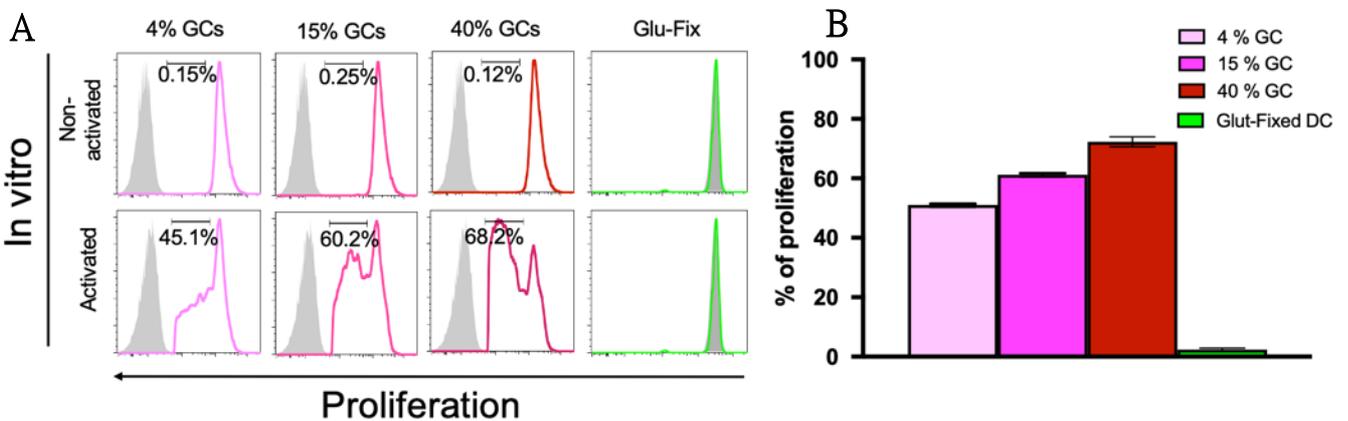


圖 29. G-DC 體外擴增抗原特异性 T 細胞。(A) 流式細胞儀的 T 細胞增生量化圖 (B) 不同硬度造成增生比例差異的柱狀圖：利用 CFSE 將 OT-1T 細胞染上螢光，並使用不同軟硬度的水膠細胞激活，觀測其增生能力。G-DCs: OT-I T cells = 1.33×10^4 : 12×10^4 = 0.11:1; Day 3。

實驗結果顯示，水膠細胞皆能有效激活 OT-I T 細胞。當 G-DCs: OT-I T cells = 0.11:1 時，4% 水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度是 45.1% 較前兩次的增生程度皆來得差，15% 水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度則又較 G-DCs: OT-I T cells = 0.221:1 時下降了 8.3%，40% 水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度來到三者中最高，為 68.2%。

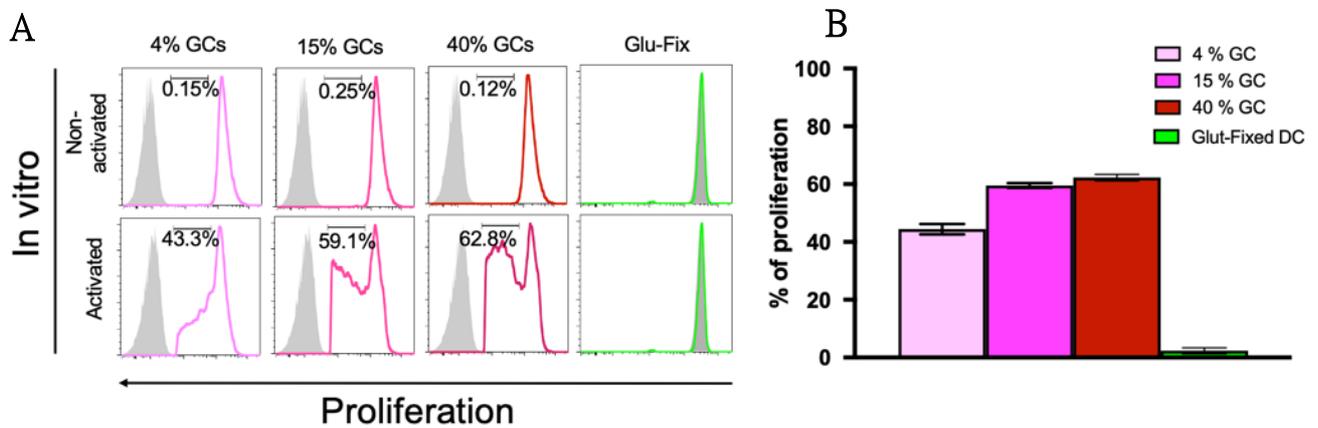
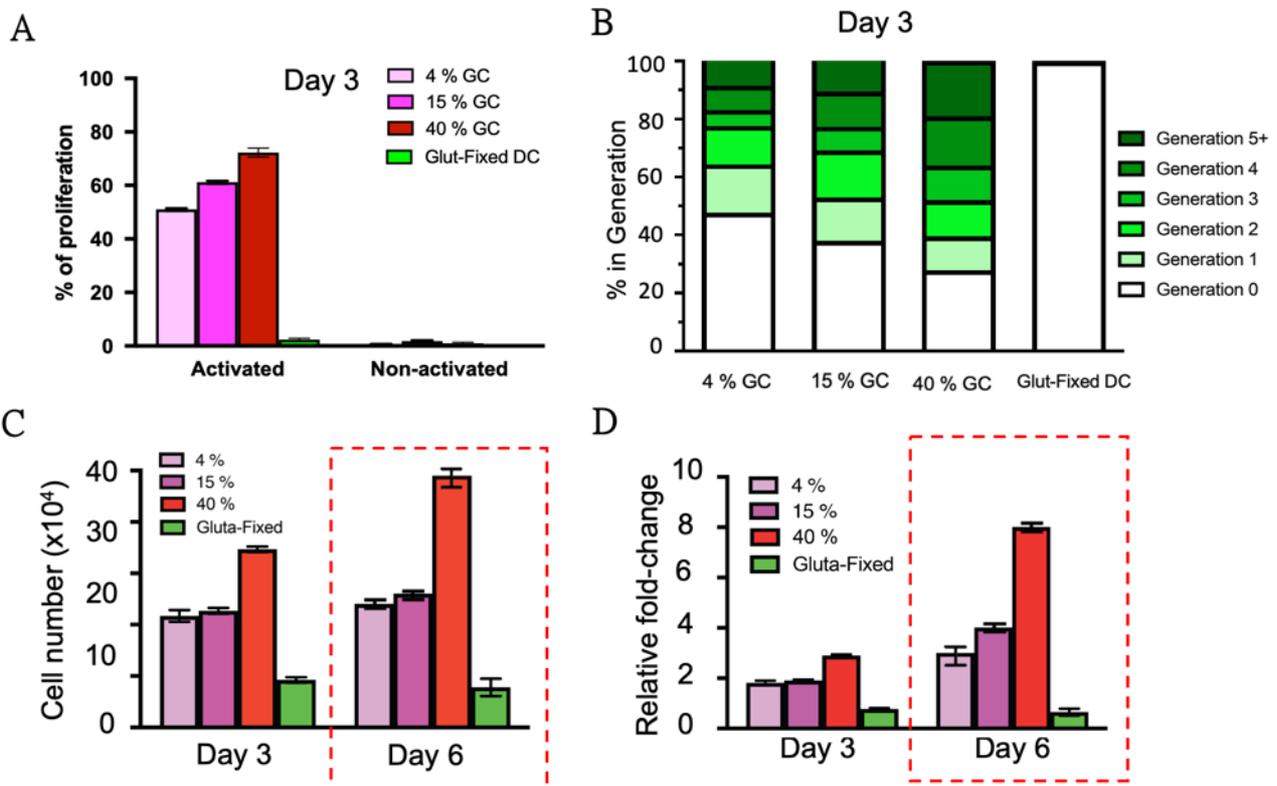


圖 30. G-DC 體外擴增抗原特异性 T 細胞。(A) 流式細胞儀的 T 細胞增生量化圖 (B) 不同硬度造成增生比例差異的柱狀圖：利用 CFSE 將 OT-1T 細胞染上螢光，並使用不同軟硬度的水膠細胞激活，觀測其增生能力。G-DCs: OT-I T cells = 0.66×10^4 : 12×10^4 = 0.0555:1; Day 3。

實驗結果顯示，水膠細胞皆能有效激活 OT-I T 細胞。當 G-DCs: OT-I T cells = 0.0555:1 時，4% 水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度是 43.3% 是為四組實驗中最差，15% 及 40% 水水膠樹突細胞使 T 細胞增生的程度亦減弱。三個硬度的水膠樹突細胞使 T 細胞增生的比例差異值減縮，推測水凝膠占比所能造成 T 細胞增生程度不同的影響已經到了極值。

- G-DC 注射後 3 天對脾細胞的流式細胞術分析表明，活化的 G-DC 能誘導 CD8 + T 細胞的擴增。而這種 T 細胞刺激是抗原特異性的，因為未激活的 G-DC 無法誘導 T 細胞分裂。而本實驗也進一步證實了水凝膠在維持質膜功能方面的功能。
- 從流式細胞儀的量化的數據可發現 4%、15%、40% 等不同硬度的水膠細胞，皆能有效地透過表面抗原呈現激活 T 細胞。實驗數據顯示在 G-DCs: OT-I T cells 的混合中，在水膠細胞占比高時，三個不同硬度的抗原呈現水膠細胞所使 T 細胞增生的比率是相近的。然而，隨著抗原呈現水膠細胞的占比下降，高硬度的抗原呈現水膠細胞使 T 細胞增生的比率也相對提升。原因是因為當抗原呈現細胞占比高時，激活 T 細胞的強度皆很大，因此看不出顯著差異。當抗原呈現細胞占比調低時，反而能將其差異突顯出來。而數據顯示以最硬的 40% 水膠樹突細胞能促發最好的 T 細胞增生能力。
- 過此種新興的合成技術結合生物相容性的膜蛋白特徵表現，在生物學、材料化學領域皆提供了新興的水膠細胞平台應用於免疫療法的體外專一性激增殺手 T 細胞增生技術。



N=3

圖 31. GC: T 細胞=0.221: 1 不同天數的激活程度差異。(A)不同硬度造成增生三天比例差異的柱狀圖 (B) T 細胞增生代數的比例圖 (C) 3 天和 6 天不同硬度 T 細胞增生細胞柱狀圖 (D) 3 天和 6 天不同硬度 T 細胞增生差異倍數柱狀圖：利用 CFSE 將 OT-1T 細胞染上螢光，並使用不同軟硬度的水膠細胞激活，觀測其增生能力。G-DCs: OT-1 T cells= 2.66×10^4 : 12×10^4 = 0.221: 1; Day 3。

□ 圖 31 顯示：

1. (圖 31B) 顯示 4%、15%、40%GC 水膠樹突細胞三天內的 T 細胞增生比例皆在第零代時最大，隨著 T 細胞增生代數的增加，T 細胞增生比例有下降的趨勢，又在第四代後有回升的趨勢。4%的水膠樹突細胞在第零代使 T 細胞增生的比例占全體增生比例的 48%，表現出水膠樹突細胞在激活 T 細胞的潛力極大。
2. 和 (圖 31A) 比對，可知在 GC:T 細胞數目=0.221: 1 時，40%GC 激活程度最佳。因此可知不同硬度造成 T 細胞數目增生程度差異主要在 T 細胞增生至第四、五代時。
3. 從 T 細胞三天增生的代數比例差異，本實驗決定將增生的天數拉長至六天。(圖 31C) 數據顯示當激活的天數拉長，不同硬度水膠細胞造成 T 細胞的數量增生的比例皆能提升，而其更放大了高硬度水膠樹突細胞 40%GC 在激活 T 細胞的優勢。
4. (圖 31D) 呈現出放置天數差異所導致的相對倍數變化，40%GC 放置六天的相對倍數約為放置三天的 3.2 倍，差異極大。4 約為 1.25 倍、15%GC 約為 2 倍。這和我們原先假設低硬度會使 T 細胞增生較好的實驗結果不同，高硬度水膠樹突細胞 40%GC 擁有最佳的激活 T 細胞及使 T 細胞增生的優勢。

5. 從實驗結果得知，不同硬度的水凝膠化的樹突細胞及放置天數，皆會影響到信號傳遞的強弱進而導致 T 細胞的增生程度差異。本實驗證實了水凝膠化細胞保留表面抗原程度完整，透過水凝膠化技術結合生物膜蛋白表面特性，提供體外 T 細胞增生的新興途徑。其不僅操作容易，更有極高的精準性，以此種簡單的方式調控 T 細胞將可應用於日後的個別化醫療。

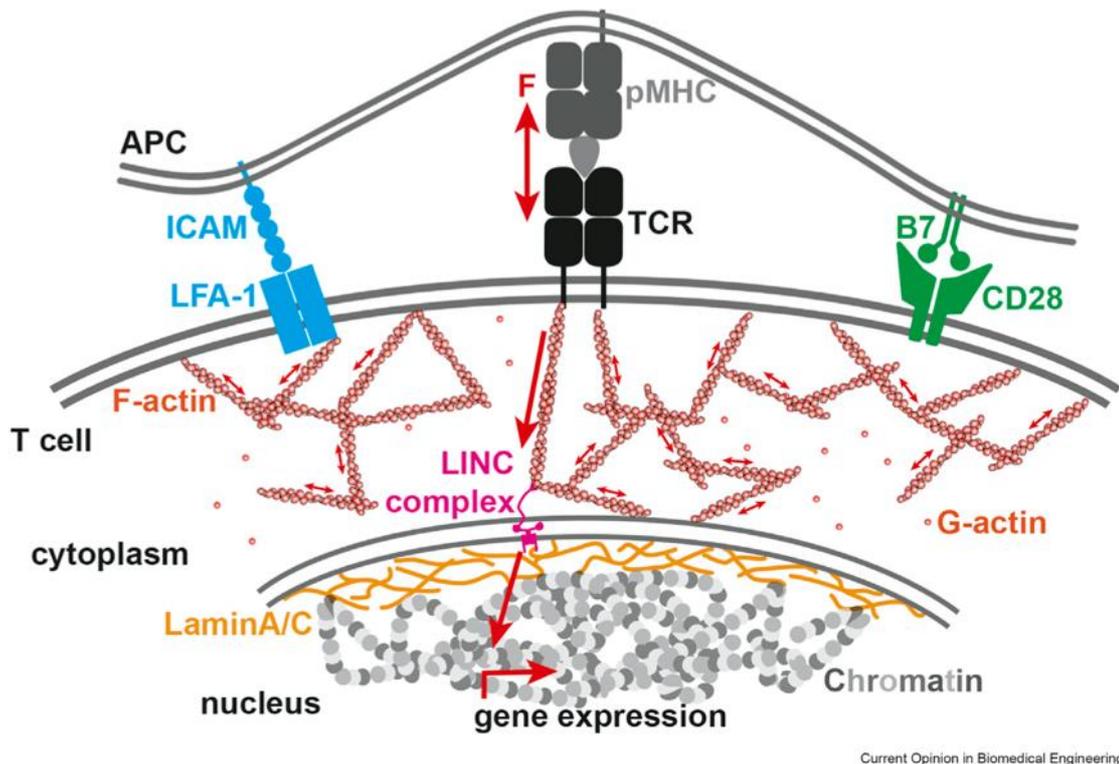


圖 32 . T 細胞訊號從表面到細胞核的示意圖。圖源自 Engineering T-cell activation for immunotherapy by mechanical forces: ELSEVIER(Morteza Aramesh et al., 2019)。

- 現今免疫細胞療法在治療感染性疾病及癌症方面，已發展成為相當有發展潛力的工具。它建立在分離、加工、激活以及對具抗原專一性的 T 細胞進行轉植。然而，癌細胞往往對自然生成的 T 細胞附著力較差。因此，有許多的研究者試著去強化其附著力以及抗原辨識度。針對 TCR 的加工或以化學機制改變其抗原受器，成為激活高量 T 細胞的首要方法。

- T 細胞的激活主要涵蓋三個要素：首先 T 細胞會透過 TCR 感應外來的刺激，接著膜上的共刺激分子 CD28 會傳遞重要信號激活 T 細胞，最後微環境中的細胞因子對於治療性 T 細胞的差異度發揮著至關重要的作用。另外除了共刺激訊號分子的信號，在 T 細胞中也擁有抑制性分子，例如 CTLA4 和 PD-1，它們會阻止 T 細胞活化。這些發現僅突出了理解和改善 T 細胞反應以發揮 ACT 的全部潛力的重要性。
- 除了在 T 細胞活化過程中描述的那三個信號外，有文獻指出物理機械力可通過延長 TCR 與激動劑的鍵的壽命，觸發 Ca^{2+} 分泌，極大地增強 T 細胞接收的活化信號。而免疫細胞是通過表面受體相互作用來調節其結構。因此，免疫細胞僅形成瞬時粘附點，其充當施力的定點。T 細胞中會形成收縮性和突出性絲狀肌動蛋白（F-actin）。F-肌動蛋白承載大部分機械力，並通過各種信號轉導途徑將其轉化為化學信號。該反應通常是在通過細胞骨架組織中的結構修飾而引起，接著在隨後的階段轉為基因表達的變化。總結來說，TCR 的強度、配體之間間距、細胞接觸面的剛硬程度都會影響 T 細胞的激活。本實驗不同濃度的水凝膠化細胞，即是調整了抗原呈遞細胞的剛硬程度和流動性，間接影響到以上三種因素，而在實驗中我們發現硬度越高的水膠細胞有越好的 T 細胞的激活能力，推測和細胞間物理機械力的作用有著高度的相關性。

肆、結論與應用

一、結論

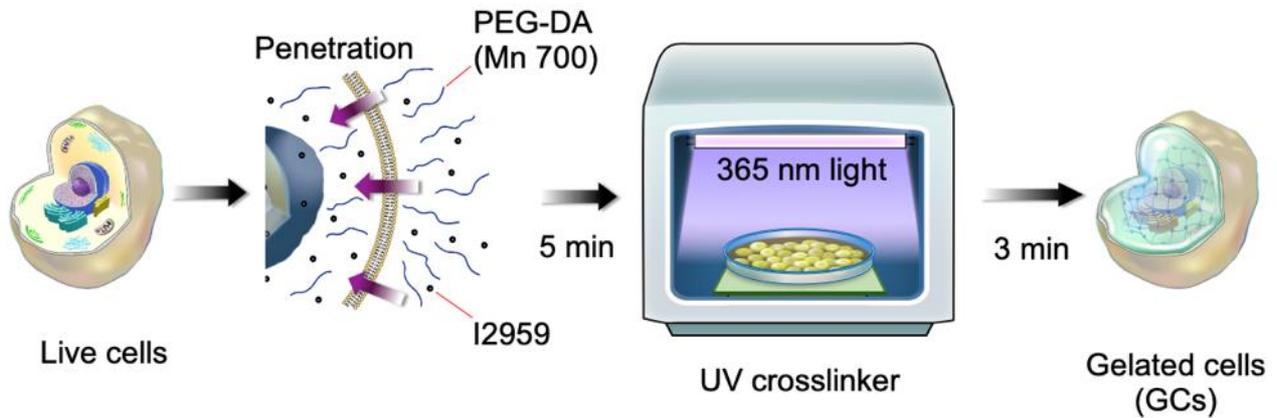


圖 33.成功製作並以滲透作用優化水膠細胞製成的示意圖 本實驗將新鮮的小鼠樹突細胞細胞 JAWS II 和 I2959 及分子量 700 的聚乙二醇二丙烯酸酯 (PEG-DA) 的混合凝膠體進行滲透作用，經 5 分鐘的時間，即可將凝膠體順利地滲透進細胞的細胞質中。接著利用 365nm 的紫外光進行光激化的化學反應，在細胞內部形成共價鍵的水凝膠網路。可透過簡單的比例濃度調整，製作出專一化的細胞內凝膠硬度。由於細胞質內的凝膠體已被建立，因此將細胞放在水中並不會因為滲透壓而導致漲破的情形，此外其保存結構的時間長達 20 天。

(一) 細胞內水凝膠化保留了流體和功能性細胞膜界面，以進行生物相互作用

先前的研究指出 Irgacure 2959 (I2959) 可以用在光交聯的化學機制和紫外光活化聚合與聚乙二醇形成水凝膠二丙烯酸酯 (PEGDA)。為了使這種交聯反應在細胞內進行，小鼠樹突細胞細胞 JAWS II 使用 I2959 和 PEGDA 混合進行交聯。利用顯微鏡觀察，顯示 JAWS II 細胞已成功凝膠化。有趣的是，圖像顯示出水凝膠網絡形成可以幫助細胞保持其形狀超過 30 天，表明 GC 擁有耐久性的優點。實驗數據顯示，本實驗優化了新興的細胞內水

膠化系統，取代了現有的化學固定劑，通過使用光啟動的交聯化學在細胞內部隔間內組裝合成水凝膠聚合物網路，可避免膜結合成交叉連結的結構，破壞細胞免疫辨識功能。

(二) 水膠細胞擁有高度的生物相容性

本實驗透過免疫反應及血液相容性兩個方向證實了水膠細胞擁有高度的生物相容性。在免疫反應的實驗中，本實驗針對 CD47 這個細胞膜上的跨膜蛋白來傳遞「不要吃我」的訊號給吞噬細胞。在過往的生物工程的領域，許多研究者嘗試利用改變細胞形狀、細胞大小、細胞硬度來降低細胞毒性、提高其生物相容性，然而本實驗的研究結果顯示，4%、15%、40%的水膠細胞皆能完整保留 CD47 和 SIRP α 相互作用的能力。其中 40%的水膠細胞擁有極高細胞質強韌度(120kPa)，而其抗吞噬能力卻是最好的，較 15%的水膠細胞提升的 10%的抗吞噬能力，這也和我們原先實驗的假設有所不同。另外在針對血液相容性對水凝膠細胞進行的血小板凝集試驗中也可已發現水膠細胞擁有優良的血液相容性。因此我們推翻了硬度導致生物相容性的不足的想法，發現只要能細胞膜構造完整保留，透過其表面蛋白的辨識，就不會產生細胞毒性。

(三) 水凝膠化樹突狀細胞能成功激活 T 細胞

起初為了探討 GC 是否可以保留活細胞的生物學功能，我們將水凝膠化 DC 用於體外 T 細胞增殖測定。首先從 OT-I 小鼠中分離 CD8 + T 細胞，並用 CFSE 標記，接著再將這些 T 細胞和保有抗原呈現能力的水膠細胞一同作用。從流式細胞儀的量化的數據可發現 4%、15%、40%等不同濃度比例的水凝膠化細胞，皆能有效地透過表面抗原呈現激活 T 細胞，且三天內激活的效果皆超過四成，又以 40%水凝膠化細胞的增生效果最佳，達到了近七成。本實驗結合了優化的水膠細胞，並滿足三項特點：足夠強度的刺激、自然膜的流動與分子分佈、高度生物相容性，在生物學、材料化學領域皆提供了新興的體外專一性 T 細胞增生技術。

(四) 不同硬度的水膠細胞可以精準調控 T 細胞增生程度

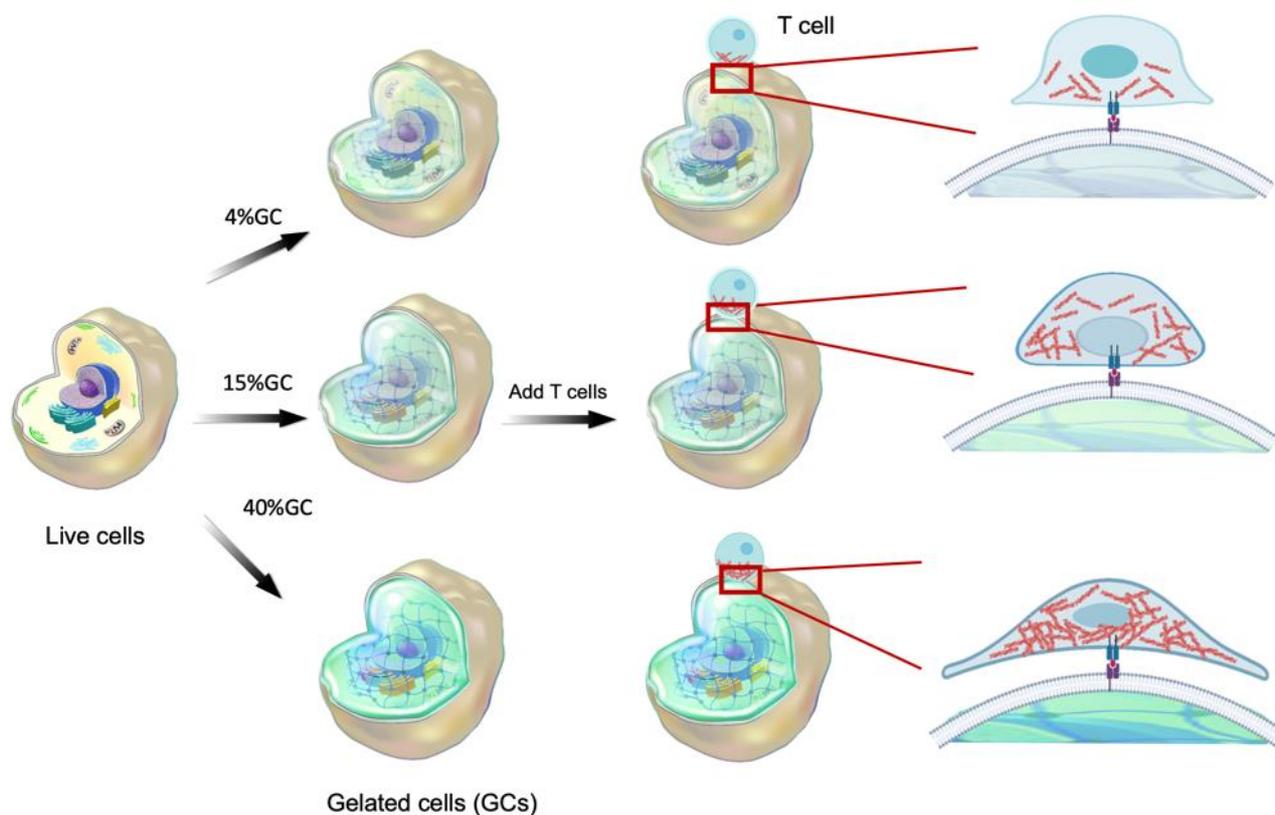


圖 34.將樹突細胞製成 4%、15%、40%三種不同硬度的水膠細胞，加入 OT-1 T 細胞後的增生微觀機制。通過本實驗新興的水膠化製程技術，可將樹突細胞的細胞質做任意比例硬度的調控，加入 T 細胞後，由於 APC 硬度差異所造成的訊號強弱差異，導致 F-actin 在 T 細胞中的聚集程度有所不同，此也是導致增生程度差異的關鍵。

在癌症治療中，免疫治療法是最新興的手法。其中透過從病人體內分離出純化的 T 細胞，再進行體外的 T 細胞增生能提供病人專一性的 T 細胞，以對抗癌症。然而在體外增生 T 細胞，APC 需要克服淋巴細胞激活信號 (MHC-antigen complex)、共刺激配體及細胞因子刺激三大要素才能成功。從文獻論文資料中[參考資料 6、12]可了解到許多生物化學工程領域的研究者皆認為 APC 的軟硬度會改變 T 細胞的激活，並嘗試藉由改變 APC 的表面化學結構、增添細胞

間材料等方式來增加 T 細胞的訊號感知強度，然而究竟是軟的 APC 激活程度較好，還是硬度高的 APC 激活程度較好，仍存在著爭議。我們推測可能是因為很多技術著重在生物化學結構的增強，未能考慮到細胞膜的特性，可能會因此間接影響到共刺激配體。本實驗的利用水膠細胞易改變細胞質強韌度、保留細胞膜特性且不影響生物相容性的優點，針對 T 細胞增生程度進行比較。本研究結果顯示，高細胞質強韌度(120kPa)的人工合成抗原細胞擁有高效率的 T 細胞激活潛力，相對於低細胞質強韌度(25kPa)的對照組可以提高約 51.2%，並達到顯著差異。

二、未來應用

- (一) 我們建立起的新興的免疫樹突細胞平台，可以成功激活 T 細胞，且隨著 APC 的硬度差異，可以簡單的調控 T 細胞的激活程度，未來可以應用在免疫新興療法的體外 T 細胞擴增效果。
- (二) 本實驗的水凝膠技術平台亦可應用於探測生物膜之間的相互作用，其保留細胞膜表面抗原和流動性的機制，可以應用於爾後生物化學的實驗探討。
- (三) 我們持續針對水膠細胞和 T 細胞激活的訊號作用進行實驗探討，在相容性方面也持續進行補體反應的實驗。

伍、參考文獻

- 一、Cristina Casals¹,Marta Barrachina,Maria Serra,Jorge Lloberas,Antonio Celada. (2007), Lipopolysaccharide up-regulates MHC class II expression on dendritic cells through an AP-1 enhancer without affecting the levels of CIITA. *J Immunol.* 178(10):6307-15.
- 二、Kristin A. HogquistStephen C. JamesonWilliam R. HeathJane L. HowardMichael J. BevanFrancis R. Carbone. (1994), T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell.*76:17-27.
- 三、Morteza Aramesh, Diana Stoycheva, Lion Raaz and Enrico Klotzsch. (2019), Engineering T-cell activation for immunotherapy by mechanical forces.*ELSEVIER.* 10:134 – 141.

- 四、Neha M. Nataraj, Alex P. Dang, Lance C. Kam, Jounghyun H. Lee. (2018), Ex vivo induction of regulatory T cells from conventional CD4⁺ T cells is sensitive to substrate rigidity. *Society for Biomaterials*.3001-3008
- 五、VARGA-SZABO, A. BRAUN, B. NIESWANDT. (2009), Calcium signaling in platelets . *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7: 1057 - 1066
- 六、Michael Saitakis, Ste ´ phanie Dogniaux, Christel Goudot, Nathalie Bui, Sophie Asnacios, Mathieu Maurin, Clotilde Randriamampita, Atef Asnacios, Claire Hivroz.(2017), Different TCR-induced T lymphocyte responses are potentiated by stiffness with variable sensitivity. *eLife*. 6: e23190.
- 七、Martin Kolev, Gaelle Le Friec and Claudia Kemper. (2014), Complement — tapping into new sites and effector systems. *perspectives*.811-820.
- 八、Peter F. Zipfel,Christine Skerka.(2009), Complement regulators and inhibitory proteins. *NATURE REVIEWS* .729-740.
- 九、Bernd Engelmann,Steffen Massberg .(2013), Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity . *NATURE REVIEWS* .34-45.
- 十、Jung-Chen Lin, Chen-Ying Chien, Chi-Long Lin, Bing-Yu Yao, Yuan-I Chen, Yu-Han Liu, Zih-Syun Fang, Jui-Yi Chen, Wei-ya Chen, No-No Lee, Hui-Wen Chen , Che-Ming J. Hu .(2019), Intracellular hydrogelation preserves fluid and functional cell membrane interfaces for biological interactions. *Nature communications*. 1057.
- 十一、 Marjolein Schluck, Roel Hammink,Carl G. Figdor, Martijn Verdoes, and Jorieke Weiden.(2019), Biomaterial-Based Activation and Expansion of Tumor-Specific T Cells. *Front Immunol*. 2019; 10: 931.
- 十二、 David K. Y. Zhang,Alexander S. Cheung&David J. Mooney. (2020), Activation and expansion of human T cells using artificial antigen-presenting cell scaffolds. *Nature Protocols* volume 15, 773 - 798.

- 十三、 Liu B, Chen W, Evavold BD, Zhu C. (2014), Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide-MHC triggers T cell signaling. *Cell* .157:357 - 368.
- 十四、 Li Y-C, Chen B-M, Wu P-C, Cheng T-L, Kao L-S, Tao M-H, Lieber A, Roffler SR. (2010) Cutting Edge: mechanical forces acting on T cells immobilized via the TCR complex can trigger TCR signaling. *J Immunol*. 184:5959 - 5963.
- 十五、 Hui KL, Balagopalan L, Samelson LE, Upadhyaya A. (2015) ,Cytoskeletal forces during signaling activation in Jurkat T-cells. *Mol Biol Cell* .26:685 - 695.
- 十六、 Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS. (2010),Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* . 2:a002311.

【評語】 080004

本實驗研發新型水膠細胞優化技術，成功提供一個平台供應淋巴細胞激活信號（MHCantigen complex）、共刺激配體及細胞因子刺激三大要素，能激增殺手T細胞。實驗中優化的水膠細胞能完整保留細胞膜的表面特性，經實驗證實無生物安全性的疑慮。另外本實驗也著重於探討人工合成抗原細胞強韌度對T細胞增生程度的影響。我們利用水膠細胞易改變細胞質強韌度且不影響生物相容性的優點，針對T細胞增生程度進行比較。本研究結果顯示，高細胞質強韌度(120kPa)的人工合成抗原細胞（aAPCs, Artificial antigen presenting cells）擁有高效率的T細胞激活潛力，相對於低細胞質強韌度(25kPa)的對照組可以提高約51.2%，並達到顯著差異，推測其和收縮性及突出性絲狀肌動蛋白增加以致訊號增強有關。

優點：免疫療法是一個很重要的新型治療方法，本實驗的新型水膠細胞優化技術提供臨床醫學免疫療法一個高潛力的新技術平台。

缺點：很多實驗的細節，例如要添加的試劑，似乎需要參考很多文獻，而變成條件最適化的簡單實驗，而缺乏學理探討。

研究建議：圖五、七與二十一螢光顯微鏡取景稍有失焦之憾，圖十四 A 水凝膠細胞由上而下的濃度疑是 0%、40%、15%、4%？圖二十七~三十若是四重複的實驗可歸併成一個圖並以統計分析的方式呈現，圖三十四若非出自作者的實驗成果宜列參考文獻。