

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	090024
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	運用細胞水膠化技術製作微流道晶片進行抗原 專一性T細胞之篩選 Flow-induced Mechanical Screening of Antigen Specific T cells with Biomimetic Microfluidic Chip
就讀學校	臺北市立建國高級中學
指導教師	胡哲銘 劉翠華
作者姓名	羅文劭
關鍵詞	<u>免疫療法(Immunotherapy)、水膠細胞(Gelated cells)、微流道晶片(Microfluidic Chip)</u>

作者簡介



大家好，我是羅文劭，來自台北市立建國高級中學。自高一開始，我積極參加生物相關競賽，並有幸加入中央研究院胡哲銘教授的實驗室，展開了有關抗原專一性 T 細胞篩選方法的研究。過程中，我在實驗與比賽中探索未知、分享心得，體驗了科學的挑戰與樂趣。衷心感謝胡哲銘教授、徐崇堯學長以及所有支持我的人，讓我能夠持續成長。

2025 臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：北區

科別：醫學與健康科學科

作品名稱：

運用細胞水膠化技術製作微流道晶片進行抗原專一性 T 細胞之篩選
Flow-induced Mechanical Screening of Antigen Specific T cells with
Biomimetic Microfluidic Chip

關鍵詞：免疫療法(Immunotherapy)、水膠細胞(Gelated cells)、微流道晶片(Microfluidic Chip)

編號：

(編號由國立臺灣科學教育館統一填列)

摘要

積極發展癌症相關治療策略極為重要，其中 T 細胞免疫療法 (adoptive T cell therapy) 是一深具臨床價值的選項。即是將 T 細胞自體內取出後並增殖到一定數量，而後將其回輸病人體內使得 T 細胞攻擊癌細胞。此方式關鍵的步驟在於必須要能夠篩選出足量的抗原專一性 T 細胞。現行主要的篩選方法雖然方便，但會誤捕不相關抗原專一性 T 細胞，降低治療效率。為解決此問題，本研究將利用水膠細胞技術，運用其完整保存生物膜的特性，模仿細胞膜之免疫突觸現象，搭配微流控晶片可控制流速改變沖刷力的特性，成功開發一可篩選親和力較高之 T 細胞微流道晶片。已在晶片內建立可置換任意抗原之水膠細胞單層，並以 SIINFEKEL 抗原作為模擬，達到極高之置換率。預期能在未來的研究中提升篩選專一性與數量，進而提升其臨床價值。

Abstract

The development of effective cancer therapies is of paramount importance. Adoptive T cell therapy, which involves isolating, expanding, and reinfusing a patient's T cells to target cancer cells, has shown significant clinical promise. A critical step in this approach is the efficient selection of antigen-specific T cells. While current methods are convenient, they often result in the enrichment of T cells with non-specific antigen reactivity, thereby reducing therapeutic efficacy. To address this challenge, we have developed a microfluidic chip for the selection of high-affinity T cells by utilizing intracellular hydrogelation technology. This technology enables the preservation of intact cell membranes, mimicking the immunological synapse formed between T cells and antigen-presenting cells. By integrating this technology with microfluidics, which allows for precise control of flow rate and shear stress, we have successfully created a platform for the selective enrichment of high-affinity T cells. We created a hydrogelated cell monolayer within the chip that can be functionalized with various antigens are created, and have demonstrated highly efficient antigen loading using SIINFEKEL as a model antigen. We anticipate that this technology will enable the selection of T cells with enhanced specificity and quantity, ultimately improving the clinical outcomes of adoptive T cell therapy.

壹、前言

一、 癌症治療的重要性

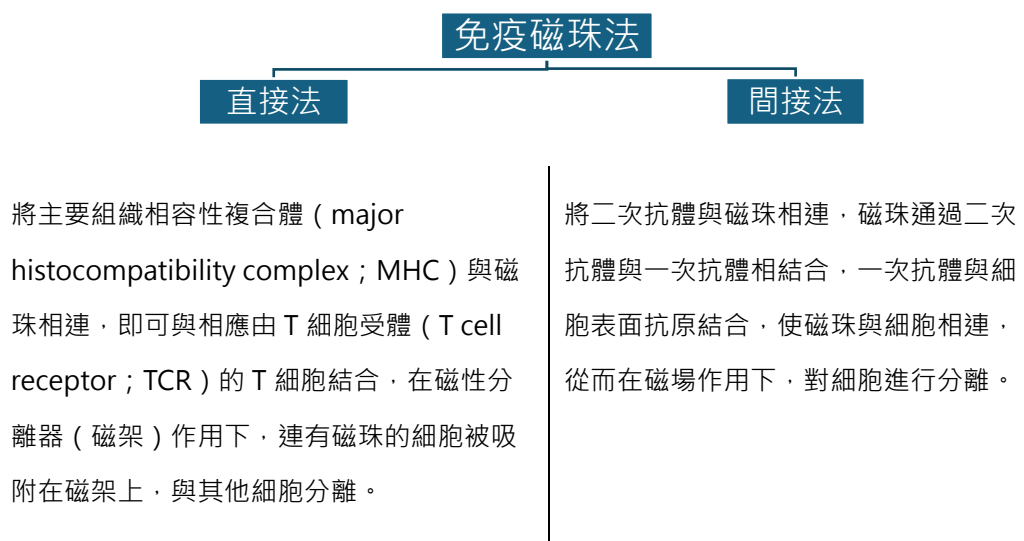
癌症為我國國民 24 歲以上的主要死因，甚至為全國國民第一名之死因¹，部分癌症也同時位居世界死因之第 6 名²，可見癌症是威脅人類生命的主要原因之一，故癌症的治療為目前極為重要的課題之一。

二、 T 細胞療法為一具前瞻性且可增強癌症治療效果之方法

現行癌症治療方法包含使用患者免疫系統治療之免疫療法，其中，T 細胞療法可以輔助免疫檢查點抑制劑療法，甚至單獨作為主力療法治療血液性癌症，如白血病、淋巴瘤等。其亦可與傳統的放射性療法與化療合作，在傳統放射性療法與化學療法攻擊腫瘤時，癌組織有可能在裂解過程中釋放出更多腫瘤抗原，進而成為 T 細胞辨識癌細胞的重要訊息，使 T 細胞對癌細胞的偵測與消滅更為敏感。依據此多重優勢，決定研究主要以 T 細胞為主。

三、 現在抗原專一性 T 細胞篩選與提取過程複雜且會有誤捕狀況

以現在技術要分離 T 細胞進行 T 細胞免疫療法，主要會使用 MHC 包覆粒子分離法 (pMHC-functionalized probes)，以抗體與免疫細胞的結合，進行分離，以下為兩種常用的策略：



以上使用抗體的分離過程均相當複雜，且因抗體可能誤捉受體相近之免疫細胞，故想利用仿生科技解決目前問題。經查詢，體內主要是使用免疫突觸 (Immunological

synapse ; IS) 進行免疫反應，其運作主要是抗原呈現細胞 (antigen-presenting cells ; APCs) 呈現 MHC，由 TCR 進行辨認，進而由 T 細胞捕捉，同時因細胞膜流體鑲嵌模型，使其他受體移往 TCR 與 MHC 結合的位點附近，與 APCs 上對應接合點結合，形成連結產生機械力。

四、 水膠細胞有極佳仿生特性

根據中研院生物醫學研究所胡哲銘副研究員團隊的多篇研究，細胞水膠化後，本體不會使用資源與增殖，失去了生命現象，但保留了許多活體細胞的膜特性，具備多重特性與可開發面向:

1. 可以較全面性的模擬細胞膜上特性，保留膜脂與膜蛋白流動性

水膠化的樹突細胞能夠有效地與 T 細胞互動，並在體外和體內促進細胞分裂，證明了細胞膜界面的功能得到了保留

2. 對細胞單層進行水膠聚合反應，可對平面基材實現細胞膜覆蓋

水膠細胞的膜流動性，相當適合模擬免疫突觸，且因其已經失去生命現象，故 MHC 與 TCR 不會脫落，機械力不會消失，故針對其開發篩選 T 細胞的功能。

五、 微流道

在進行懸浮性磁性水膠化抗原呈現細胞 (Magnetized polymerized antigen presenting cell ; Mag-pAPCs) 的篩選實驗過程中，發現其與傳統 MHC 包覆式粒子分離法 (pMHC-functionalized probes) 有相當大的突破，但過程中仍然有非抗原專一性 T 細胞 (non-cognate T cell) 黏附至 Mag-pAPCs 上，因體內抗原專一性 T 細胞比例極低，若有非抗原專一性 T 細胞黏附至 Mag-pAPC 上，篩選結果專一性將大大降低。為克服此一限制，故模擬人體內血流狀況，擬以微流道流速與沖刷力之高度可控性，以經控制之沖刷力去除進行訊息交換，鍵結力較弱之非抗原專一性 T 細胞 (non-cognate T cell)，留下形成專一性免疫突觸，具備強勁機械力之抗原專一性 T 細胞。

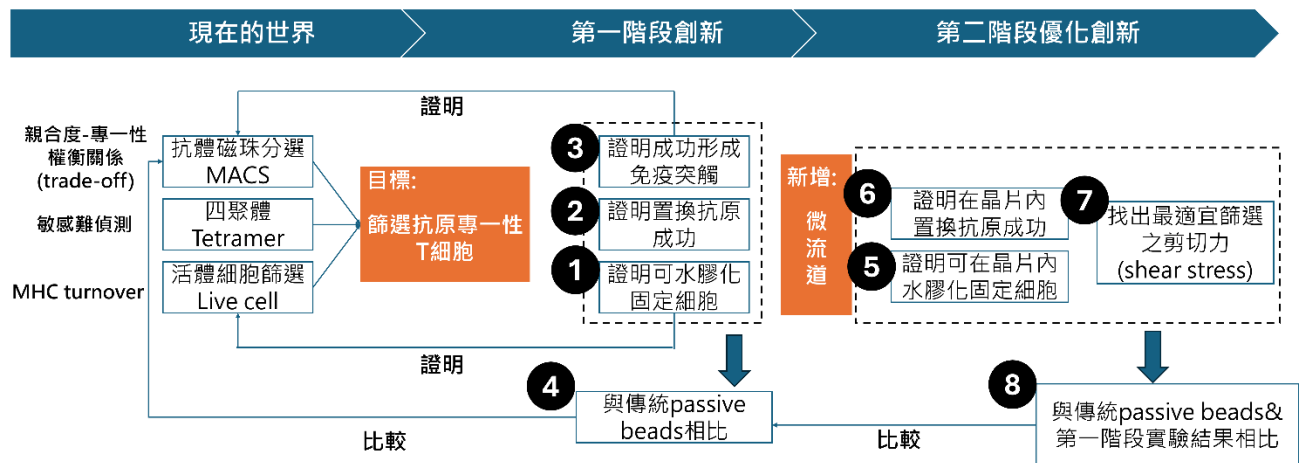
綜以上分析，我們決定結合細胞水膠化技術之細胞穩定性、抗原置換技術的抗原調整性與微流道系統的力道可控性，開發一可進行抗原專一性 T 細胞篩選之晶片。

貳、研究目的

- 一、 運用水膠化技術與磁力進行抗原專一性 T 細胞 (Antigen specific T cell) 篩選
- 二、 基於研究目的 (一) 得出之結果，運用流體力學水膠化技術開發微流道晶片並測算相關參數，提升抗原專一性 T 細胞篩選專一性

參、研究方法與過程

一、 研究架構圖



二、 研究設備與器材

(一) 細胞株:

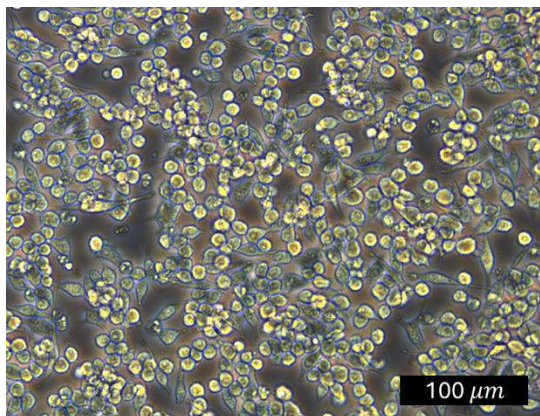


圖 1 DC2.4 Mouse Dendritic Cell Line

(作者攝影)

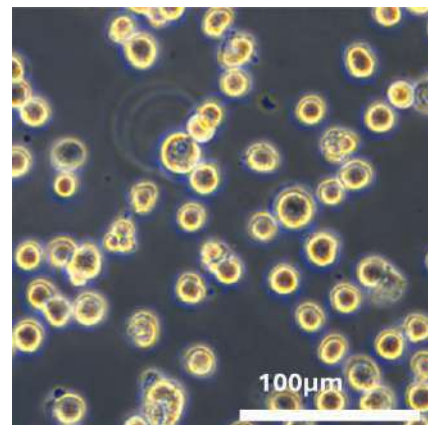


圖 2 JAWSII Mouse Cell Line

(作者攝影)

(二) 晶片:



圖 3 Ibidi I luer 0.4 ibidi treated

(作者攝影)

(三) 動物

1. C57BL/6 小鼠
2. OT-I transferred mouse

(四) 培養液:

名稱	比例
RPMI 1640	10%
胎牛血清 (Fetal Bovine Serum ; FBS)	
盤尼西林-鏈黴素混合抗生素 (Penicillin-Streptomycin Antibiotics)	1%

表 1 培養液成分表

(五) 藥品與用途:

名稱	規格	用途
聚 (乙二醇) 二丙烯酸酯 Poly (ethylene glycol) diacrylate ; PEG-DA	數均分子量 $M_n 575$	
鋰苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸鹽 Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate ; LAP		光起始劑 (Photoinitiator) 照射紫外光時 促進 PEG-DA 成膠
Gibco™ TrypLE™ Express Enzyme		使貼附於培養皿底部之 細胞懸浮
磷酸鹽緩衝生理鹽水 Phosphate buffered saline ; PBS		培養與操作各式沖洗、稀釋等 需等滲透壓操作之步驟
Corning® Cell-Tak™ Cell and Tissue Adhesive		促進細胞貼附於晶片， 避免水膠化後遭流體沖刷脫落
SIINFEKL/H-2kb 抗體	2mg/mL H ₂ O	進行抗體置換
Passive Beads (DynaBeads)		作為對照組使用

表 2 藥品一覽表

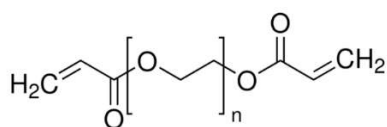


圖 4 聚 (乙二醇) 二丙烯酸酯 PEG-DA

(作者繪製)



圖 5 鋰苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸鹽 LAP

(作者繪製)

(六) 設備規格與用途:

名稱	規格與參數	用途
強力磁鐵		提供磁力以吸引
紫外光燈箱	UV-365	照射紫外光使水膠細胞成膠
細胞培養箱	5% CO ₂ ; 37 ° C	細胞培養
流式細胞儀		配合螢光染劑檢測細胞與特徵
高階電控倒立顯微鏡	LEICA DMI8 S	細胞觀察與攝影
雷射高解析度顯微鏡	不詳	
穿透式電子顯微鏡		
冷房	4 ° C	保存培養液
冰箱	4 ° C	保存藥品
	-80 ° C	保存細胞

表 3 設備一覽表

三、 研究方法

(一) 細胞培養與繼代

細胞名稱	DC 2.4	JAWSII
培養液種類	RPMI	DMEM
胎牛血清 (Fetal bovine serum ; FBS)	10%	
青黴素/鏈黴素雙抗生素 (Penicillin-Streptomycin)	1%	
培養環境	37 ° C ; 5% CO ₂	
照護頻率與方法	待細胞長至約培養盤七、八成滿時，使用 TrypLE (一種非動物源性的重組胰蛋白酶) 將細胞自培養皿上收集並離心，取其中 1/4 的細胞繼代 (passage) 培養。	

表 4 細胞培養與照護條件一覽表

(二) 細胞胞內水膠化 (intracellular hydrogelation)

1. 將細胞收集，以 500G 離心 5 分鐘，去除上清液 (晶片內水膠化省略)
2. 以 PBS 確實清洗兩次，避免培養液中酚紅干擾成膠
3. 按表 4 加入所需藥品，室溫靜置 5 分鐘
4. 以 500G 離心 5 分鐘，去除上清液 (晶片內水膠化略，改以 PBS 沖洗)
5. 加入 500 μL 無酚紅培養液，混合均勻
6. 以 UV-365 照射 30 秒

名稱		配方				
LAP 溶液		1 mg LAP+20 μ L H ₂ O				
PEG-DA 等滲透壓溶液		200 μ L PEG-DA+1100 μ L H ₂ O				
用於10 ⁶ 個細胞						
濃度	4%	10%	15%	20%	40%	60%
培養液	730 μ L	340 μ L	15 μ L	790 μ L	590 μ L	390 μ L
PEG-DA	等滲透壓溶液			純藥品		
	260 μ L	650 μ L	975 μ L	200 μ L	400 μ L	600 μ L
LAP 溶液	10 μ L					

表 5 細胞水膠化藥品配製濃度表

(三) SIINFEKL 抗原置換

1. 將細胞收集，以 500G 離心 5 分鐘，去除上清液（晶片內置換省略）
2. 注入 SIINFEKL 抗體，室溫靜置 5 分鐘
3. 以 500G 離心 5 分鐘，去除上清液（晶片內置換省略，改以 PBS 沖洗）

(四) 分離小鼠初代脾臟細胞（Mouse primary splenocyte）

- (1) 以過量 Isoflurane 麻醉劑安樂死小鼠，並執行斷頸
- (2) 由鼠腹側以手術剪刀開一長條狀口，取出脾臟
- (3) 將脾臟磨碎，以 500G 離心 5 分鐘，去除上清液
- (4) 添加 10 mL 紅血球裂解液（RBC lysis buffer），室溫靜置 5 分鐘
- (5) 以 500G 離心 5 分鐘，去除上清液，以 PBS 清洗

(五) 強化細胞附著力之晶片前處理

- (1) 以 12 μ L 0.1M NaOH_(aq) 混合 24 μ L Corning® Cell-Tak™ Cell and Tissue Adhesive 與 176 μ L 1M NaHCO_{3(aq)} 製備浸液
- (2) 將浸液注入晶片直至管道完全充滿浸液，靜置室溫 20 分鐘後沖洗去除

(六) 倫理與動物福祉

本研究動物相關實驗均恪遵經中央研究院實驗動物照護及使用委員會核准之實驗設計與操作，操作過程全程由專業科學家在旁指導與輔助，維護動物福祉。

肆、研究結果與討論

一、成功製備保留生物膜表面 (biomembrane interface) 之磁性水膠化抗原呈現細胞 (Magnetized polymerized antigen presenting cell ; Mag-pAPCs)

透過細胞膜通透性高且分子量低的聚 (乙二醇) 二丙烯酸酯 (Poly (ethylene glycol) diacrylate ; PEG-DA) ($M_n=575$ Da) 與藍光敏感性之鋰苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸鹽 (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate ; LAP) 在 UV-365 作用後，細胞質成功被水膠化，並完整保留其生物膜功能^{3,4}。為賦予 pAPCs 磁力，使其可用於 T 細胞篩選，抗原呈現細胞 (APC) 在水膠化前，會先與超順磁性微粒共培養。

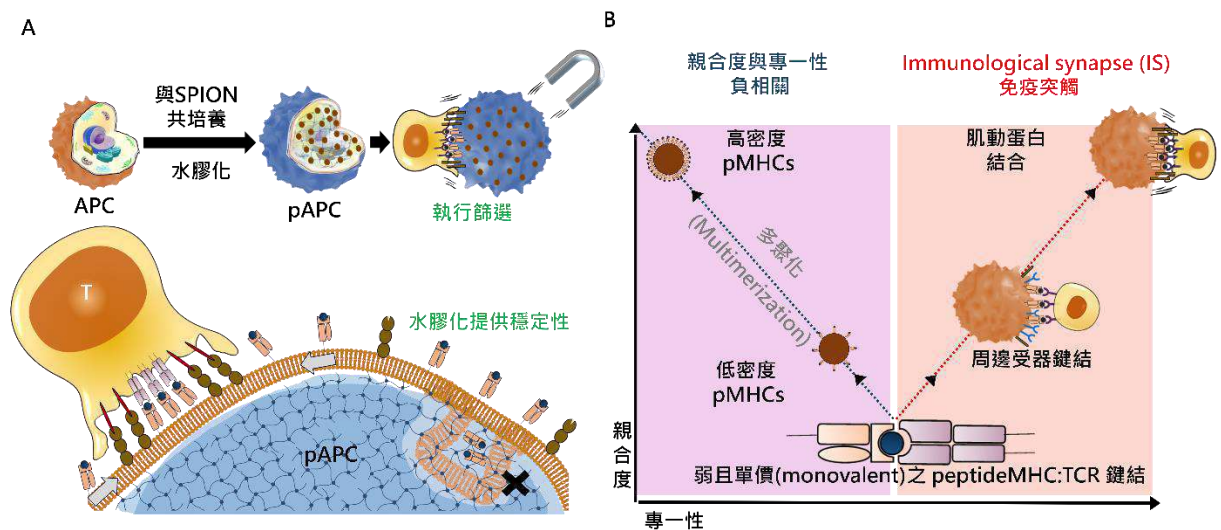


圖 6、Mag-pAPC 的置備、原理與特性

A: 實驗過程示意圖

B: 含有多聚體配體 (multimeric ligands) 的被動篩選微粒 (passive probe) 與透過免疫突觸鍵結捕捉的 T 細胞親和力和專一性關係差異示意圖

(作者繪製)

實驗使用之 APC 種類為 JAWSII，會先以脂多醣 (Lipopolysaccharide ; LPS) 活化後，添加 60 奈米之超順磁性氧化鐵微粒 (SPION) (圖 7A)，細胞會以胞吞作用吞噬粒子，即形成具備磁力，且因超順磁性粒子作用而易於分散與聚集之細胞 (圖 7B)。

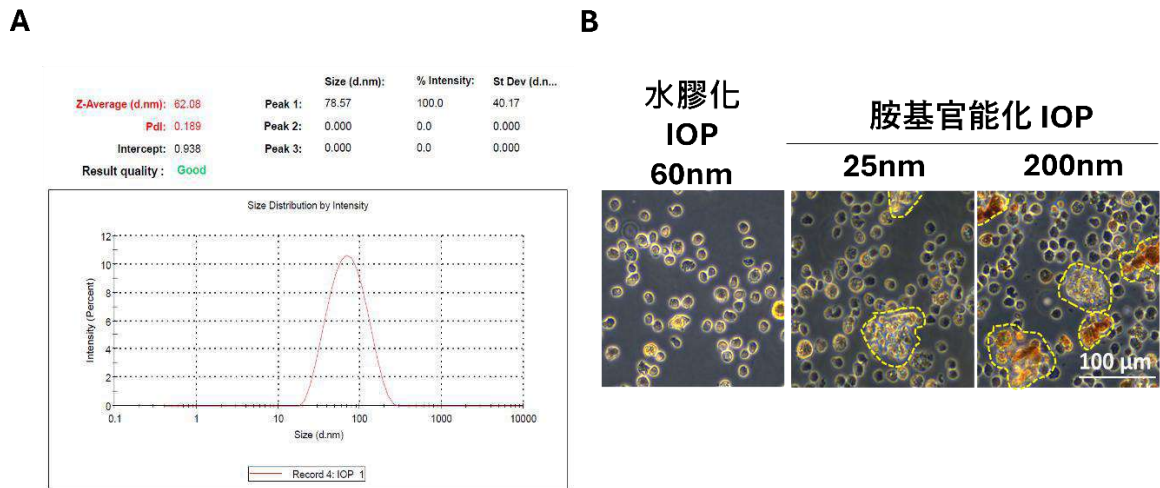


圖 7、SPION 磁珠可在保證磁性的同時避免細胞沾黏

A: SPION 磁珠的尺寸物理參數圖

B: 水膠化與胺基功能化磁珠細胞影像，可見水膠化細胞並無沾黏情況。

(作者繪製)

經過胞內水膠化 (intracellular hydrogelation) 後，該細胞保持著與一般樹突細胞相似的構造與表面膜功能，且展現了聚合物表現之高度穩定性。

將水膠化之磁化抗原呈現細胞 (Mag-pAPCs) 與一般抗原呈現細胞置入低張溶液 (水； H_2O) 中，相較於一般細胞之破裂，Mag-pAPCs 展現出對滲透壓之高度容忍性，完整保持其細胞型態 (圖 8A)。經穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy ; TEM) 觀察，發現其具備極高之 SPION 含量 (圖 8B)。

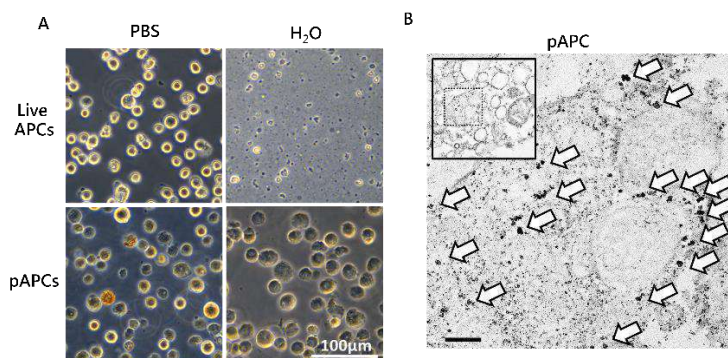


圖 8、Mag-pAPC 成功置備的影像證據

A: 可見光視野顯微鏡下，水膠化抗原呈現細胞 (pAPC) 與 APC 在等張緩衝液 (PBS) 與低張溶液 (H_2O) 的細胞狀態；比例尺=100 μm

B: 穿透式電子顯微鏡照片顯示細胞內含有氧化鐵磁力微粒；比例尺=100nm

(作者繪製)

使用磁鐵刺激後，有高達 80% 之細胞成功聚集於磁鐵周圍，證明其有高達 80% 之細胞可以成功被磁化 (圖 9A)，經沖洗後，使用磁力固定 Mag-APCs，移除未經磁化之細胞，即可有良率高達 100% 之 Mag-pAPCs 進行後續之 T 細胞篩選與捕捉 (圖 9B)。

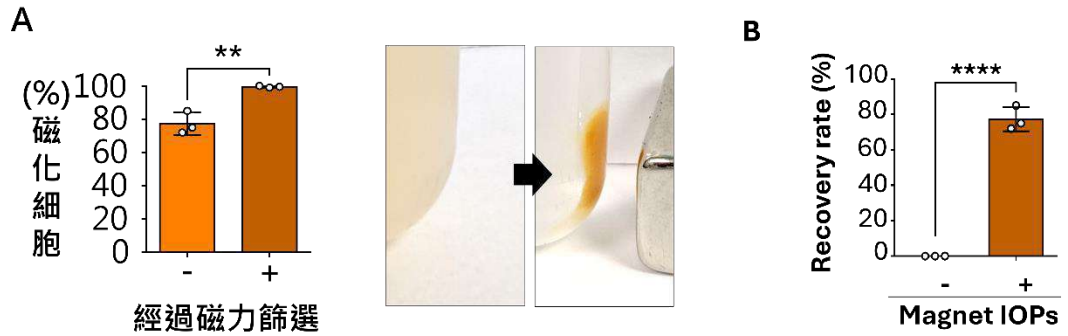


圖 9、Mag-pAPC 的置備效率與純化

A: 將磁鐵置於內含 Mag-pAPC 的液體邊，約 80% 的 Mag-pAPC 成功被回收。(** p < 0.01)

B: 捕捉磁化之細胞，並進行再純化，得到 100% 磁力有效之 Mag-pAPC (**** p < 0.0001)

(作者繪製)

在辨識 T 細胞與形成免疫突觸 (Immunological synapse ; IS) 的過程中，表面之蛋白質至關重要，其中，主要組織相容性複合體 (MHC)、CD80 蛋白、CD86 蛋白與細胞間黏附分子 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1 ; ICAM-1) 是決定性的因子，經流式細胞儀分析，證實 Mag-pAPCs 與活體 APC 具備相同的活化因子 (圖 10)。

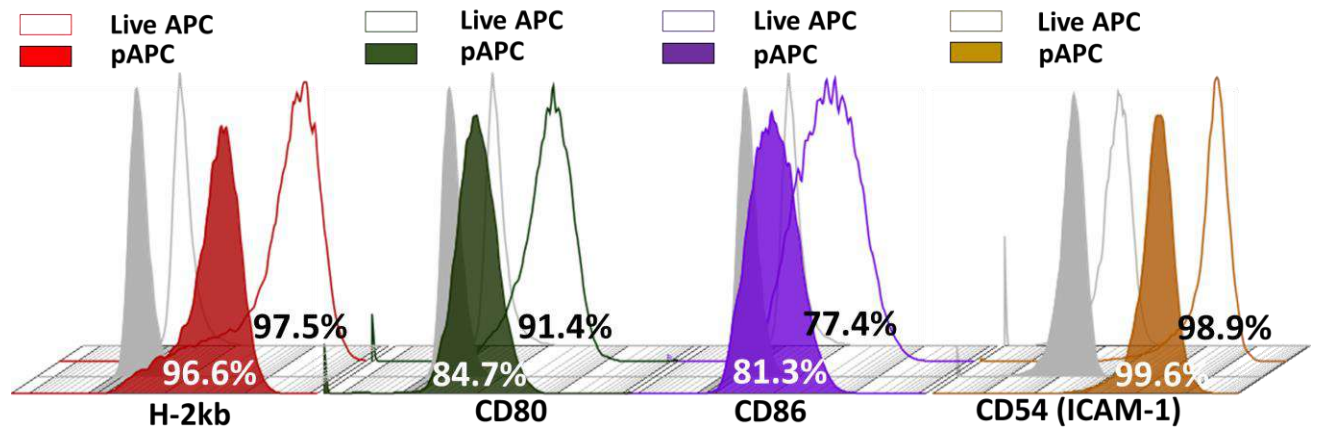


圖 10、Mag-pAPC 表面各項蛋白質均功能完好

針對 H-2kb, CD80, CD86, and ICAM1 等表面蛋白以流式細胞儀進行檢驗，灰色為背景雜訊對照組 (Isotype)

(作者繪製)

pAPCs 經檢測不含內毒素(圖 11)。

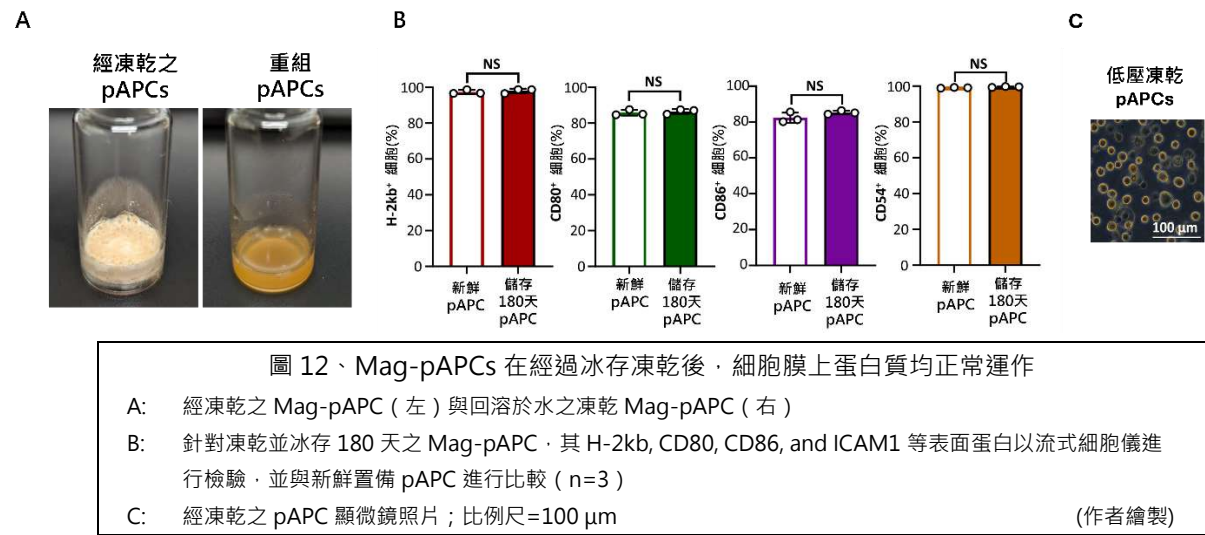
內毒素檢測		
LPS (對照組)		+
蒸餾水 (對照組)		<0.25 EU/mL
pAPCs		<0.25 EU/mL
培養液		<0.25 EU/mL

圖 11、Mag-pAPC 安全性檢測

Mag-pAPC 經內毒素檢測，未檢出內毒素存在。

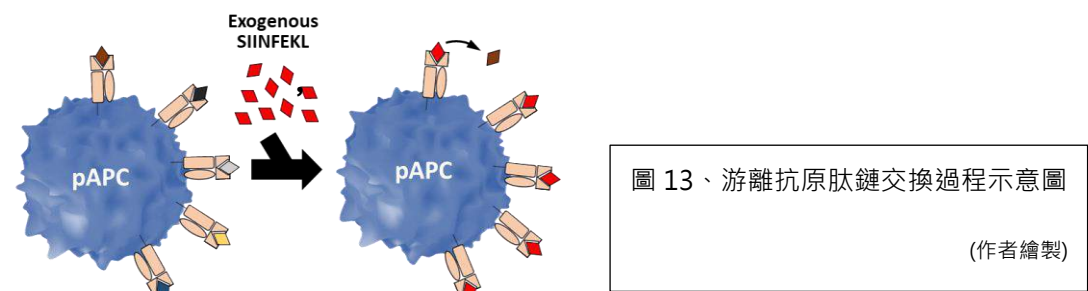
(作者繪製)

且細胞質聚合賦予 pAPCs 強健的穩定性，使其作為重組 pAPCs 經過 6 個月凍乾保存後仍能維持與免疫突觸形成相關的所有信號分子(圖 12)。



二、動力學驅動的抗原肽鏈置換能使 pAPCs 穩定呈現抗原

為了調整 pAPCs 呈現的抗原至所需的肽鏈目標，我們採用了一種動力學驅動的肽鏈置換法，將 pAPCs 暴露於濃度超過肽鏈的解離常數的選擇性抗原 (圖 13)。



實驗以 SIINFEKL 作為模型抗原，依賴濃度差進行置換(圖 14)。

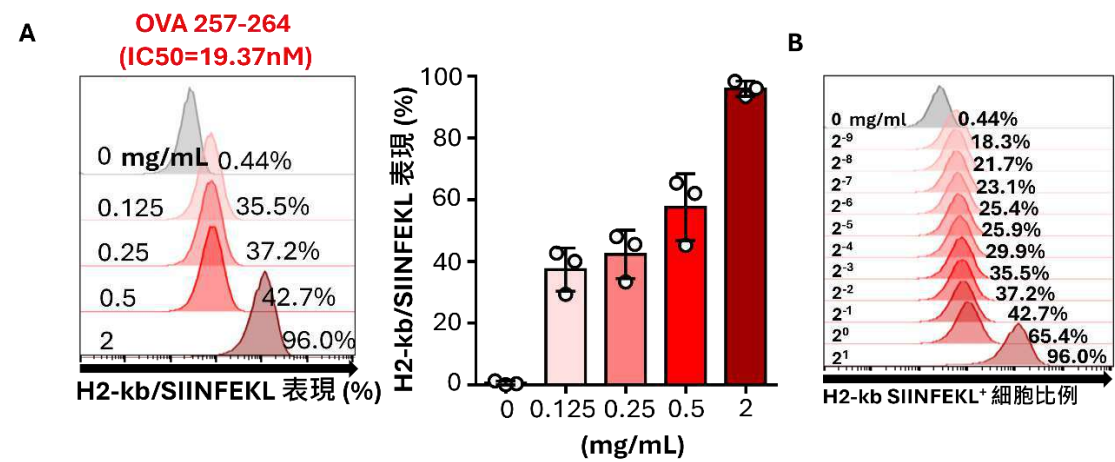
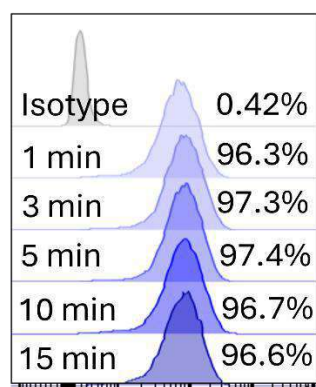


圖 14、SIINFEKL 抗原置換成功率與 SIINFEKL 濃度關係圖

(作者繪製)

透過 SIINFEKL/H-2kb 抗體染色評估 pAPCs 上 SIINFEKL 的呈現，發現抗原替換與細胞外肽鏈濃度呈正相關，在 2 mg/mL 的 SIINFEKL 濃度下，可在 1 分鐘內完成完全的抗原替換(圖 15)。



H2-kb/SIINFEKL 表現 (%)

圖 15、抗原置換時間與置換成功率關係圖

以流式細胞儀分析置換時間 (1 至 15 分鐘) 與置換成功率之關係圖

(作者繪製)

為比較 pAPCs 與活細胞上的抗原呈遞，我們使用常見的抗原遞送方法製備了活體 APCs，包括與含抗原蛋白的蛋白質共培養 (incubation with antigen-containing protein)、與長肽鏈共培養 (incubation with long peptides)、以含抗原的質體轉染 (antigen-containing plasmid transfection) 置換以及短肽鏈脈衝 (short peptide pulsing) (圖 16)。

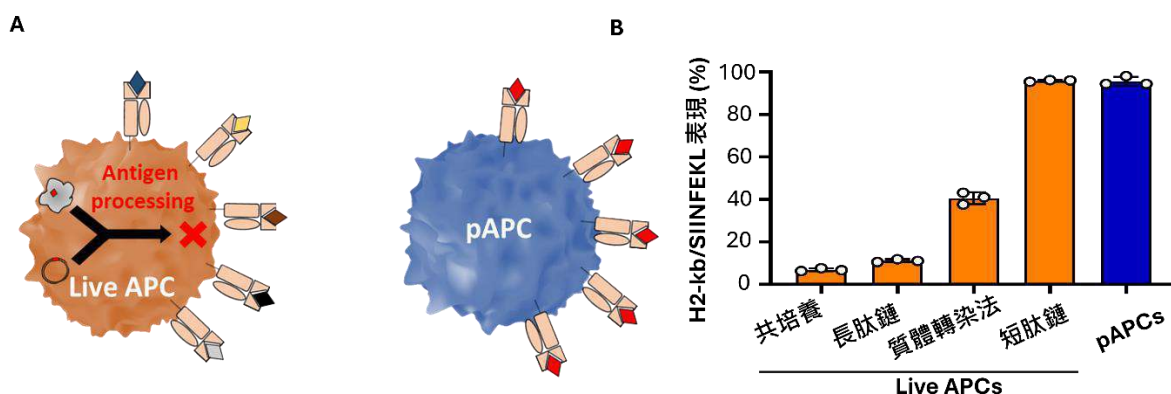


圖 16、使用各式置換技術對 APC 與 pAPC 進行置換

D: 活 APC 與 pAPC 受短肽鏈抗原脈衝 (antigen pulsing) 示意圖

E: 以流式細胞儀分析活 APC 受 ovalbumin、OVA₂₄₈₋₂₇₄ (27 胺基酸) 與 SIINFEKL4 小時置換與含 SIINFEKL 質體 48 小時轉染之 H2-K_b SIINFEKL⁺比例圖

(作者繪製)

與經過抗原替換的 pAPCs 相比，含抗原蛋白的蛋白質共培養、與長肽鏈共培養、以含抗原的質體感染以及短肽鏈脈衝的活體 APCs 顯示出較弱的 SIINFEKL/H-2kb 信號，這反映了抗原處理效率低下，可能影響 APCs 的特異性。直接將活體 APCs 與

SIINFEKL 肽鏈脈衝，可產生與抗原置換的 pAPCs 相當的抗原呈遞。然而，活細胞的 MHC 更新 (MHC turnover) 導致表面抗原迅速消失(圖 17)。

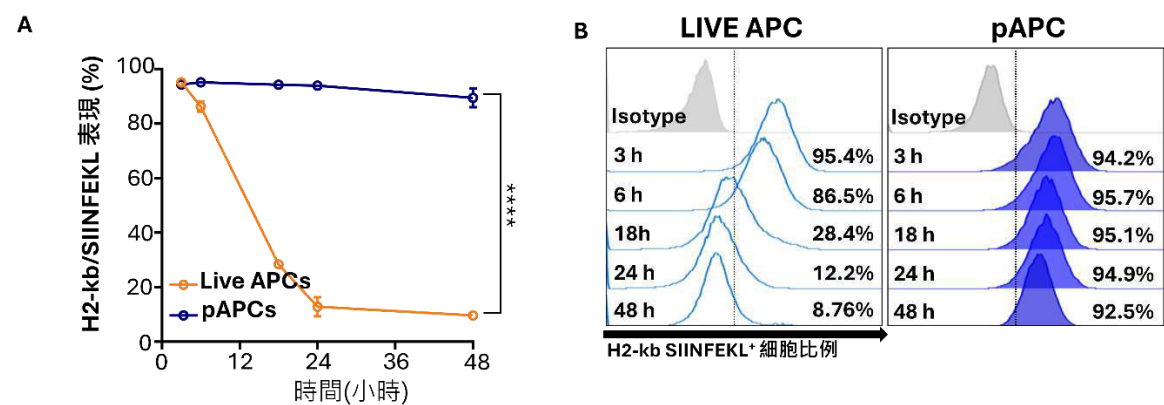


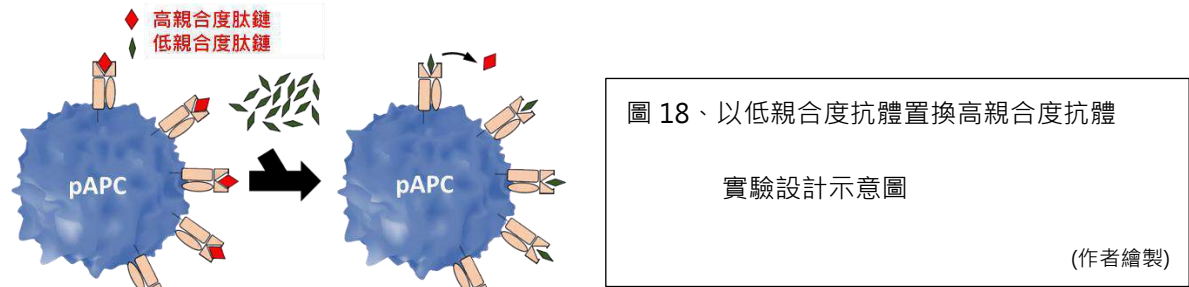
圖 17、APC 與 pAPC 置換抗原後，保留抗原的細胞比例隨時間變化關係圖
**** p<0.0001 (作者繪製)

而 pAPCs 則允許可控且持續的抗原呈遞。為了展示 pAPCs 與具有不同 MHC 結合親和力的肽鏈抗原的可定制性，我們檢查了另外兩種 H-2kb 限制性肽鏈，分別為源自流感 PB1 聚合酶的 PB1₇₀₃₋₇₁₁ 與源自人類乳突狀病毒 E6 蛋白的 E6₄₈₋₅₇，與 SIINFEKL 相比具有較低的 MHC 結合親和力。雖然 SIINFEKL 的結合親和力為 19.37 nM，但 PB1₇₀₃₋₇₁₁ 和 E6₄₈₋₅₇ 的結合親和力分別為 44.25 nM 和 700.35 nM (表 6)。

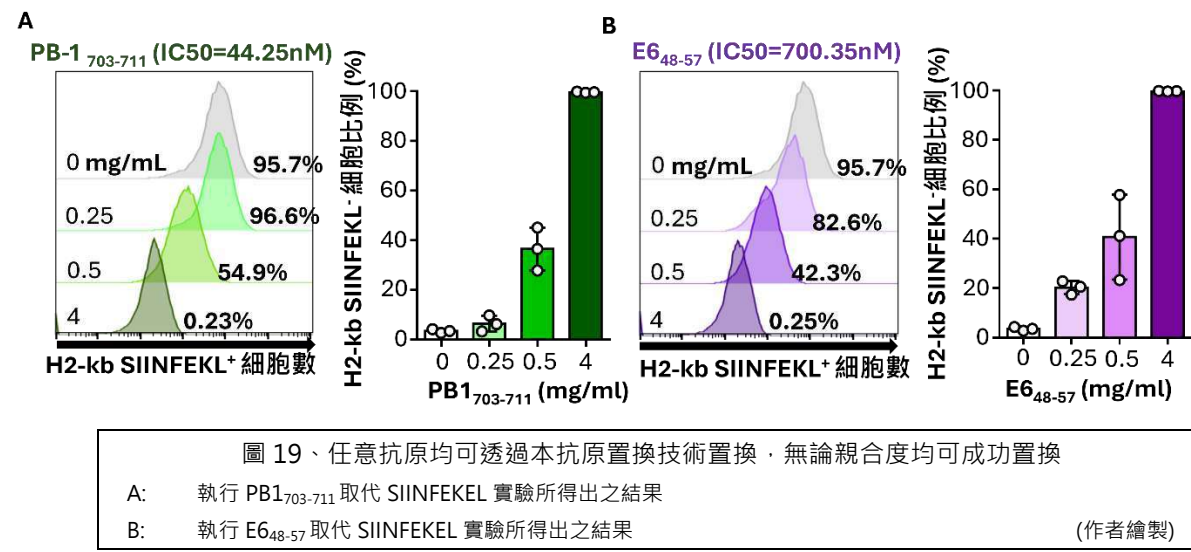
Name	Origin	Sequence	Allele	ANN IC50 (nM)	SMM IC50 (nM)
OVA (257-264)	Ovalbumin	SIINFEKL	H2-Kb	19.37	80.3
E6-48	TC-1/human papilloma virus	EYVDFAFRDL	H2-Kb	700.35	1413.61
PB1703-711	Influenza	SSYRRPVGI	H2-Kb	44.25	166

表 6、SIINFEKEL、PB1₇₀₃₋₇₁₁ 與 E6₄₈₋₅₇ 各項參數一覽表(廠商提供)

為研究肽鏈的交換效率，將載有 SIINFEKL 的 pAPCs 暴露於不同濃度的 PB1₇₀₃₋₇₁₁ 或 E6₄₈₋₅₇(圖 18)。



儘管 SIINFEKL 具有較高的結合親和力，但 SIINFEKL/H-2Kb+細胞仍隨著置換肽鏈濃度的增加而成比例地減少，並且在 4 mg/mL 的 PB1₇₀₃₋₇₁₁ 或 E6₄₈₋₅₇ 肽鏈共培養 5 分鐘後即可實現完全的肽鏈置換(圖 19)。



低親和力抗原的呈遞，透過使用來自 OT-I 轉基因 PB1 疫苗接種小鼠的 CD8⁺ T 細胞進行的 CD8⁺ T 細胞活化實驗得到了進一步證實(圖 20A、B)。與未置換肽鏈的 pAPCs 相比，置換 SIINFEKL 的 pAPCs 顯著提升了 OT-I 專一性 T 細胞的活化(圖 20C)。

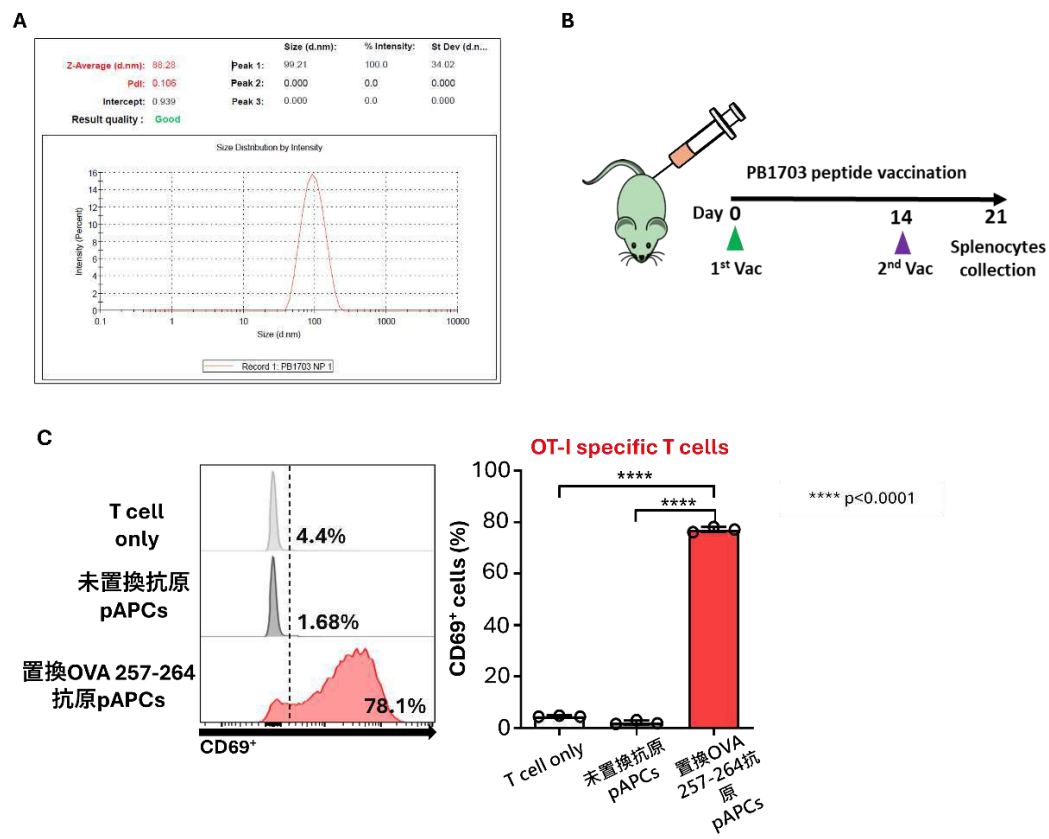


圖 20、OT-I 轉基因 PB1 疫苗接種小鼠 CD8 T 細胞活化實驗

- A: 粒子大小測量結果
B: 實驗設計
C: 以流式細胞儀分析 OT-I 專一性 T 細胞之結果

(作者繪製)

經 PB1703-711 肽鏈替換的 SIINFEKL 抗原置換 pAPCs 喪失了活化 OT-I 特異性 T 細胞的能力。且，這些 pAPCs 能夠提高來自 PB1₇₀₃₋₇₁₁ 疫苗接種小鼠的 CD8 T 細胞中 CD69 的水平。這進一步證實了高親和力的 SIINFEKL 已被低親和力的 PB1703-711 取代。這些結果證明了 pAPCs 在可調控、持續的抗原呈遞方面的多功能性，即使對於具有低 MHC 結合親和力的次優抗原也是如此。

三、Mag-pAPCs 與抗原專一性 T 細胞成功建立免疫突觸 (Immunological synapse ; IS) 為檢驗 pAPCs 與抗原專一性 CD8 T 細胞的結合，我們進行螢光抗體染色以觀察負責形成超分子活化複合體 (Supramolecular activation complex ; SMAC) 的假想膜分子，包括 APCs 上的細胞間黏著分子 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1 ; ICAM-1) 和 MHC-I，以及 CD8 T 細胞上的 T 細胞受體 V α 2 鏈 (TCR V α 2) 和淋巴球功能性抗原 1 (Lymphocyte function-associated antigen 1 ; LFA-1) (圖 21A)。經螢光顯微鏡檢查 SIINFELK 抗原置換的 pAPCs 和 OT-I 特異性 CD8 T 細胞後，我們觀察到 ICAM-1、MHC-I、TCR 和 LFA-1 向 pAPCs 與 T 細胞之間的界面聚集(圖 21B、C)，證明了 pAPCs 允許膜分子自由流動，以進行 T 細胞介導的配體排列。

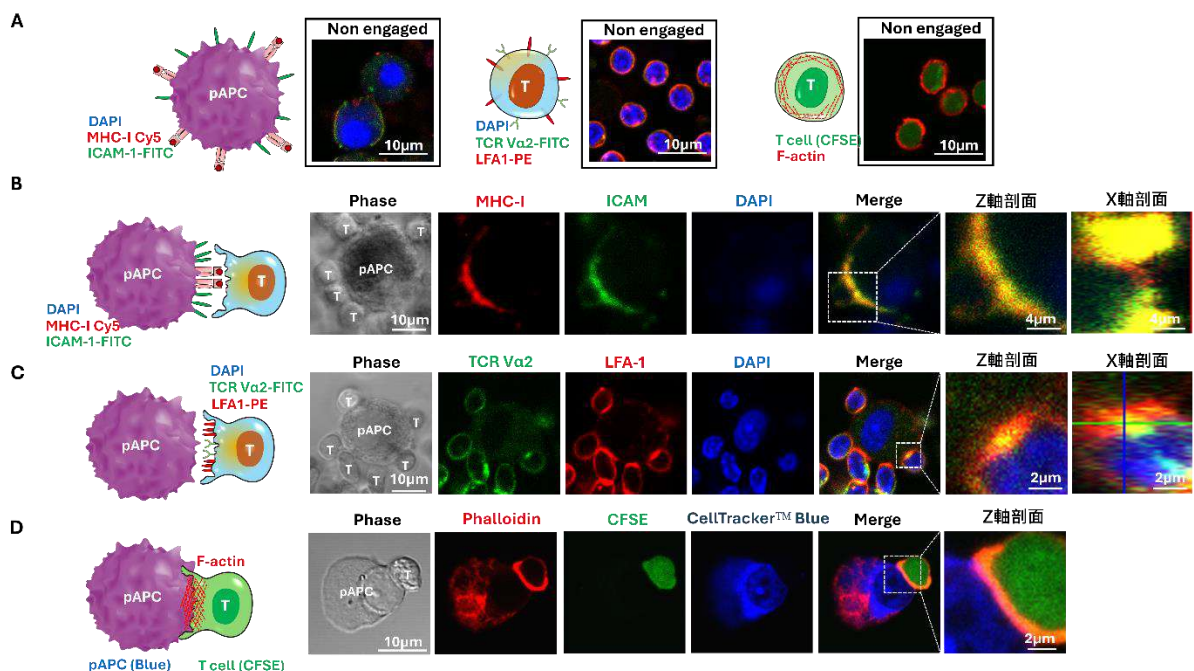


圖 21、Mag-pAPCs 與抗原專一性 T 細胞建立可用於磁力分離之免疫突觸的過程

- A: 在無細胞接觸的情況下，pAPCs 表面表現均勻分佈的 MHC-I 和 ICAM-1，而從 OT-I 轉基因小鼠獲得的 CD8⁺ T 細胞顯示均勻分佈的 TCR、LFA-1 和肌動蛋白纖維。pAPCs 被用 anti-H-2Kb、anti-ICAM-1 和 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色。OT-I 特異性 CD8⁺ T 細胞用 anti-TCR Vα2、anti-LFA-1、DAPI 和鬼筆環肽(phalloidin)染色；比例尺 = 10 μm
- B: SIINFEKL 抗原置換的 pAPCs 接觸的 OT-I CD8⁺ T 細胞顯示 MHC-I 和 ICAM-1 在細胞-細胞界面(cell-cell interface)的極化分佈。放大的圖像為模式化的配體簇，MHC-I 聚集於中心，而 ICAM-1 聚集於邊緣；比例尺 = 10 和 4 μm
- C: SIINFEKL 抗原置換的 pAPCs 接觸的 OT-I CD8⁺ T 細胞顯示 TCR 和 LFA-1 在細胞-細胞界面(cell-cell interface)的極化分佈。放大的圖像為模式化的配體簇，TCR 聚集於中心，而 LFA-1 聚集於邊緣；比例尺 = 10 和 2 μm
- D: SIINFEKL 抗原置換的 pAPCs 接觸的 OT-I CD8⁺ T 細胞在細胞-細胞界面(cell-cell interface)上展示 F-肌動蛋白的極化；比例尺 = 10 和 2 微米

(作者繪製)

對 pAPC/T 細胞界面的放大觀察進一步揭示了受體的環狀排列模式，界面周圍富含 ICAM-1 和 LFA-1，核心富含 MHC-I 和 TCR，顯示了中央 SMAC (cSMAC) 和周邊 SMAC (pSMAC) 的建立⁵。因 SMAC 的形成由 T 細胞內細胞骨架運動介導的分子運動控制，我們還透過鬼筆環肽染色 (Phalloidin Staining) 觀察到 CD8 T 細胞內的絲狀肌動蛋白 (F-肌動蛋白)。與 pAPC 結合的 T 細胞在細胞與細胞之間的界面 (cell-cell interface) 顯示出極化的細胞骨架重塑，這賦予了收縮力，加強了 pAPC 結合。為了證明免疫突觸 (Immunological synapse; IS) 的形成提供了適於磁性分離抗原專一性 T 細胞的穩定結合，將與 OT-I T 細胞共培養的 pAPCs 置於磁場中，延時攝影 (Time-lapsed imaging) 顯示，T 細胞與 pAPCs 之間的結合受到磁場誘導運動，向磁鐵移動(圖 22)。

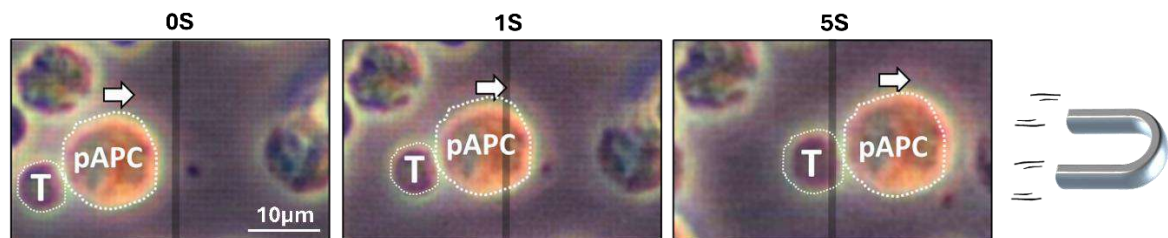


圖 22、Mag-pAPCs 與抗原專一性 T 細胞結合後，受磁場引導而移動

(作者繪製)

此外，在螢光色素偶聯的 pAPC (fluorophore-conjugated pAPC) 與抗原專一性 T 細胞長時間共培養後，我們觀察到細胞間黏附 (Trogocytosis)，即檢測到膜分子從 pAPCs 主動轉移至 T 細胞 (圖 23)。

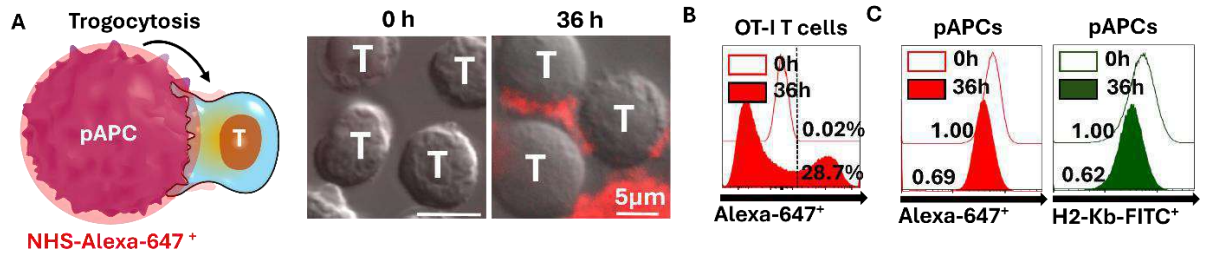


圖 23、T 細胞展現細胞間黏附 (Trogocytosis)，主動提取 pAPC 膜上分子
 A: 實驗設計示意圖，以 NHS-Alexa-647 將 pAPC 染色，而後以螢顯微鏡觀察 T 細胞展現細胞間黏附 (Trogocytosis)，主動提取 pAPC 膜上分子。
 B: 實驗結果可發現，36 小時後 T 細胞展現細胞間黏附 (Trogocytosis)，主動提取 pAPC 膜上分子。
 C: 螢光分析結果，pAPC 表面分子遭 T 細胞取走(例如 MHC)，導致 pAPC 螢光減弱，T 細胞螢光增強。

(作者繪製)

T 細胞主動提取膜的證據進一步證實了免疫突觸 (Immunological synapse ; IS) 的形成和 pAPCs 與 T 細胞之間的活性結合大大相關。這些結果證明了 pAPCs 能夠與抗原專一性 T 細胞建立免疫突觸 (Immunological synapse ; IS)，以進行捕獲和分離。

四、 Mag-pAPCs 捕捉 T 細胞與傳統 MHC 包覆粒子分離法 (pMHC-functionalized probes) 的比較

由於淋巴細胞的結合是一種動態過程，涉及抗原專一性和非抗原專一性細胞相互作用的差異性結合速率和解離速率 (on/off-rates)^{6,7}，pAPCs 的穩定性質允許對抗原專一性和非抗原專一性細胞的結合進行系統性的檢驗(圖 24)。



圖 24、各項捕捉時的參數對捕捉結果的影響趨勢示意圖 (作者繪製)

實驗過程中，CD8⁺ T 細胞分別取自 WT 小鼠和 OT-I 轉基因小鼠以代表非專一性和抗原專一性 T 細胞。來自 WT 小鼠的 T 細胞以 CFSE 染色，而來自 OT-I 小鼠的 T 細胞則未染色，以便進行流式細胞儀分析。抗原專一性和非專一性 CD8⁺ T 細胞以 1:9 的細胞比例共培養，並分別添加 SIINKEKL 抗原置換與呈現 APC 原始抗原的 Mag-pAPCs 進行磁性分離，證實了置換 SIINKEKL 抗原的 pAPCs 對抗原專一性 CD8⁺ T 細胞的捕獲能力(圖 25)。

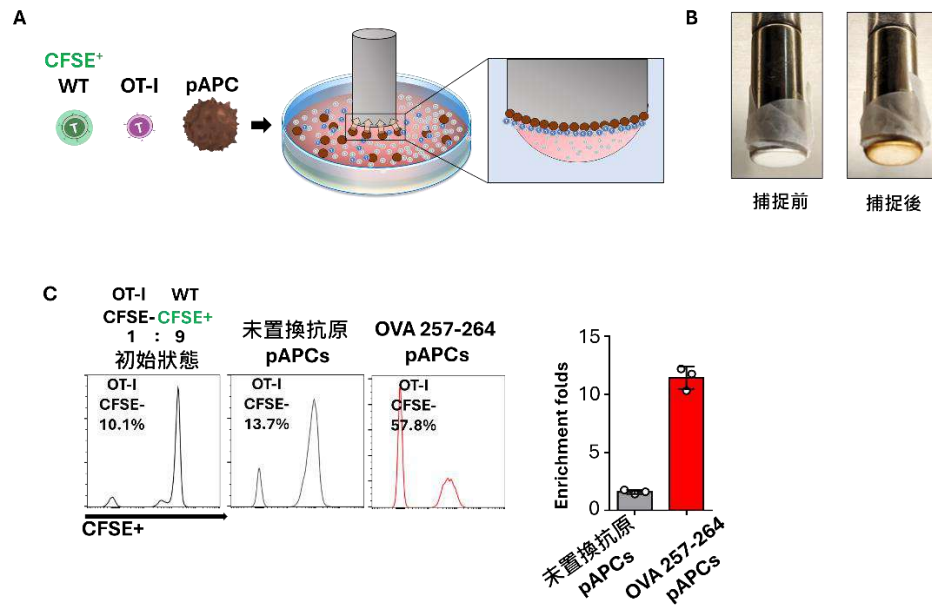


圖 25、Mag-pAPC 大幅提升抗原專一性 T 細胞捕捉率

- A: 實驗裝置示意圖。使用包裹有實驗用封口膜的磁鐵實現磁性捕獲，並透過去除封口膜分離捕獲的細胞。
- B: 捕捉前後照片，可以清楚觀察到褐色 Mag-pAPC 聚集在磁鐵上
- C: 分別以置換 SIINFEKEL 抗原之 pAPC 與一般 pAPC 進行捕捉，可以明顯發現置換 SIINFEKEL 抗原之 pAPC 捕捉能力較一般 pAPC 好

(作者繪製)

在不同反應時間的研究中，我們觀察到免疫突觸 (Immunological synapse ; IS) 介導的 T 細胞捕獲率與反應時間呈高度正相關，1-6 小時的反應時間產生了最高的抗原專一性 T 細胞回收率和富集倍數 (Enrichment fold) (圖 26)。

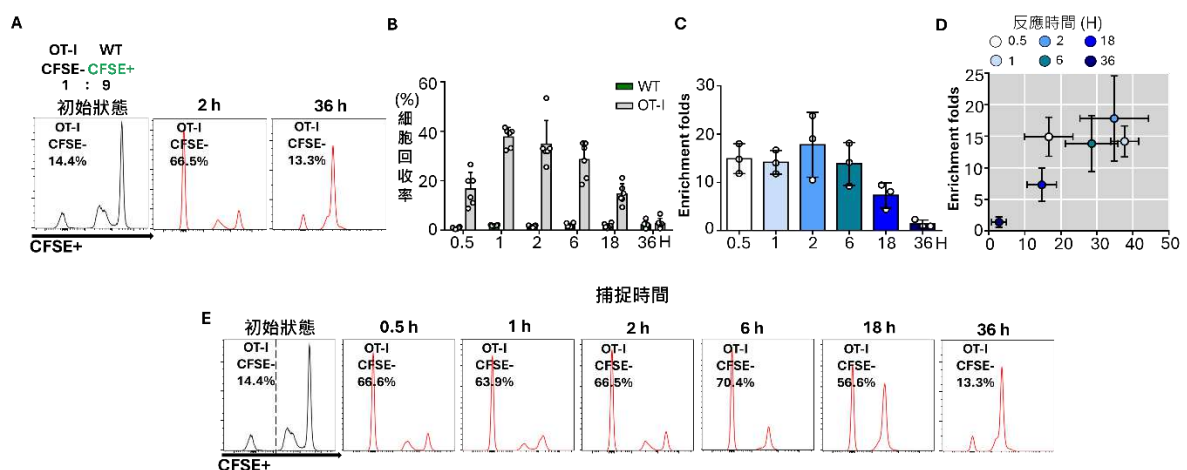


圖 26、Mag-pAPCs 捕捉 T 細胞在捕捉時間 1~6 小時發揮最大功效

- A: 流式細胞儀分析結果。經 2 小時捕捉後，透過磁性分離富集特定抗原的 CD8⁺ T 細胞。含有 10% OT-I CD8⁺ T 細胞的 10⁶ CD8⁺ T 細胞與 10⁶ pAPCs 共培養 0.5 小時到 36 小時不等，而後進行磁性分離和流式細胞術，分析捕捉時間對抗原專一性 T 細胞捕獲的影響。
- B: 根據捕獲前後 OT-I/WT CD8⁺ T 細胞數量計算得出 WT 和 OT-I T 細胞的回收率
- C、D: 根據捕獲前後 OT-I/WT CD8⁺ T 細胞數量計算得出 OT-I CD8⁺ T 細胞富集倍數 (Enrichment fold)
- E: 捕捉率在 6 小時之後迅速衰退

(作者繪製)

低於 1 小時的反應時間導致抗原專一性 T 細胞回收率降低，這表明免疫突觸 (Immunological synapse ; IS) 建立的反應時間不足。值得注意的是，超過 6 小時的反應時間減少了抗原專一性 T 細胞的捕獲，而在 36 小時時，pAPCs 完全喪失了其 T 細胞捕獲能力。T 細胞捕獲能力的下降可能歸因於細胞間黏附 (Trogocytosis)，這是由於 pAPCs 與抗原專一性 T 細胞之間的強力結合導致的，這在長時間共培養後導致 pAPCs 逐漸失去 MHC-I 分子 (圖 23C)。在 2 小時的抗原置換時間顯示出最佳的捕獲效率後，我們接著檢查細胞密度影響免疫突觸 (Immunological synapse ; IS) 的結合趨勢。在檢查 0.125×10^6 至 2×10^6 cells/cm² (~15%滿盤(confluency)至 200%滿盤) 之間的細胞密度時，觀察到捕獲率和專一性的非線性趨勢。隨著細胞密度從 0.125×10^6 cells/cm² 增加到 0.25×10^6 cells/cm²，抗原專一性 T 細胞的回收產率和富集倍數 (Enrichment fold) 的升高反映了碰撞頻率的提高，有利於 pAPCs 與 T 細胞之間建立免疫突觸 (Immunological Synapse ; IS)，以便隨後捕獲。然而，當細胞密度超過 0.25×10^6 cells/cm² 時，捕獲專一性反而會降低(圖 27)。

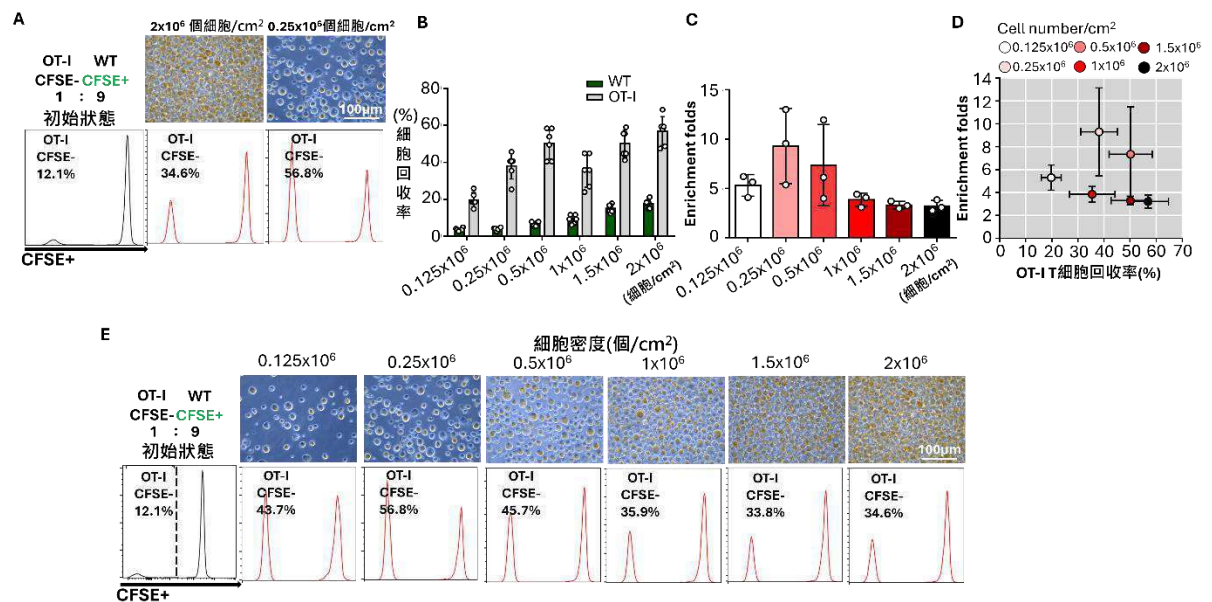


圖 27、Mag-pAPCs 捕捉 T 細胞在特定細胞密度發揮最大值

- A: 在細胞密度為 0.25×10^6 下捕捉後，透過 pAPCs 磁性分離富集特定抗原的 CD8⁺ T 細胞。包含 10% OT-I T 細胞的 10^6 個 T 細胞與 10^6 個 pAPCs 共培養 2 小時後進行分離和流式細胞術，分析細胞密度對抗原專一性 T 細胞捕獲的影響。
- B: 根據捕獲前後 OT-I/WT CD8⁺ T 細胞數量計算得出 WT 和 OT-I T 細胞的回收率
- C、D: 根據捕獲前後 OT-I/WT CD8⁺ T 細胞數量計算得出 OT-I CD8⁺ T 細胞富集倍數 (Enrichment fold)
- E 細胞密度在 0.25×10^6 時捕捉效率最佳

(作者繪製)

在超過 0.5×10^6 cells/cm² 的細胞密度下，儘管抗原專一性 T 細胞的回收產率仍然高，但較高的細胞密度與專一性 T 細胞捕獲的增加呈負相關。由於已知非抗原專一性 T 細胞比抗原專一性 T 細胞更快地從細胞標靶脫離⁷，我們進一步檢查了 T 細胞捕獲後的非抗原專一性細胞脫落是否可以提高抗原專一性 T 細胞的捕獲專一性(圖 28)。

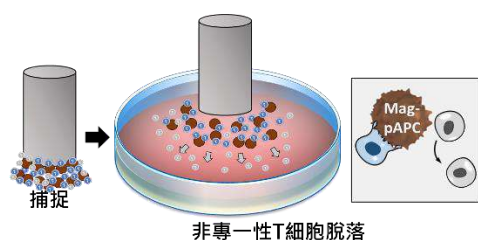


圖 28、經過 15 分鐘非專一性細胞脫落處理後，

pAPCs 捕獲的抗原專一性 T 細胞示意圖

(作者繪製)

根據 0.25×10^6 cells/cm² 和 2 小時共培養的最佳捕獲參數，pAPC 捕獲後，隨後的非專一性 T 細胞脫落顯著增加了抗原專一性 T 細胞的純度，將富集倍數 (Enrichment fold) 提高了近 2 倍，並達到了約 80%的抗原專一性 T 細胞純度(圖 29)。

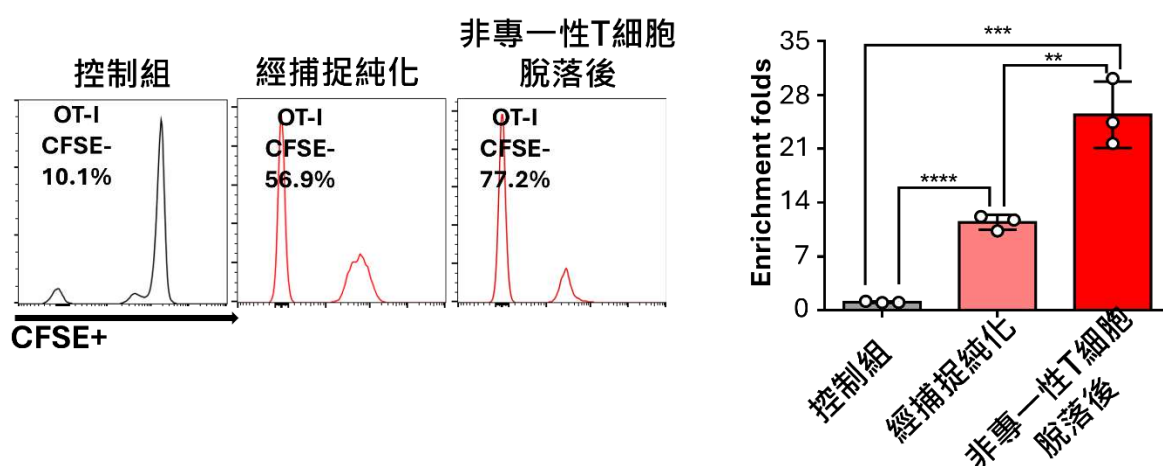
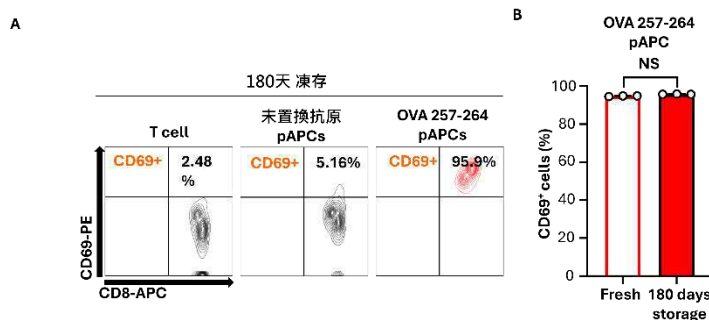


圖 29、綜合所有最佳參數，Mag-pAPC 達到了約 80%的抗原專一性 T 細胞純度

(作者繪製)

我們進一步觀察到，經過長時間儲存 (180 天) 的 pAPCs 表現出與新製備的 pAPCs 相當的仿生淋巴細胞結合和捕獲效率 (圖 30)。這些結果突顯了 pAPCs 用於抗原呈現的持久、仿生特性，並為 pAPC 介導的細胞捕獲提供了最佳參數。



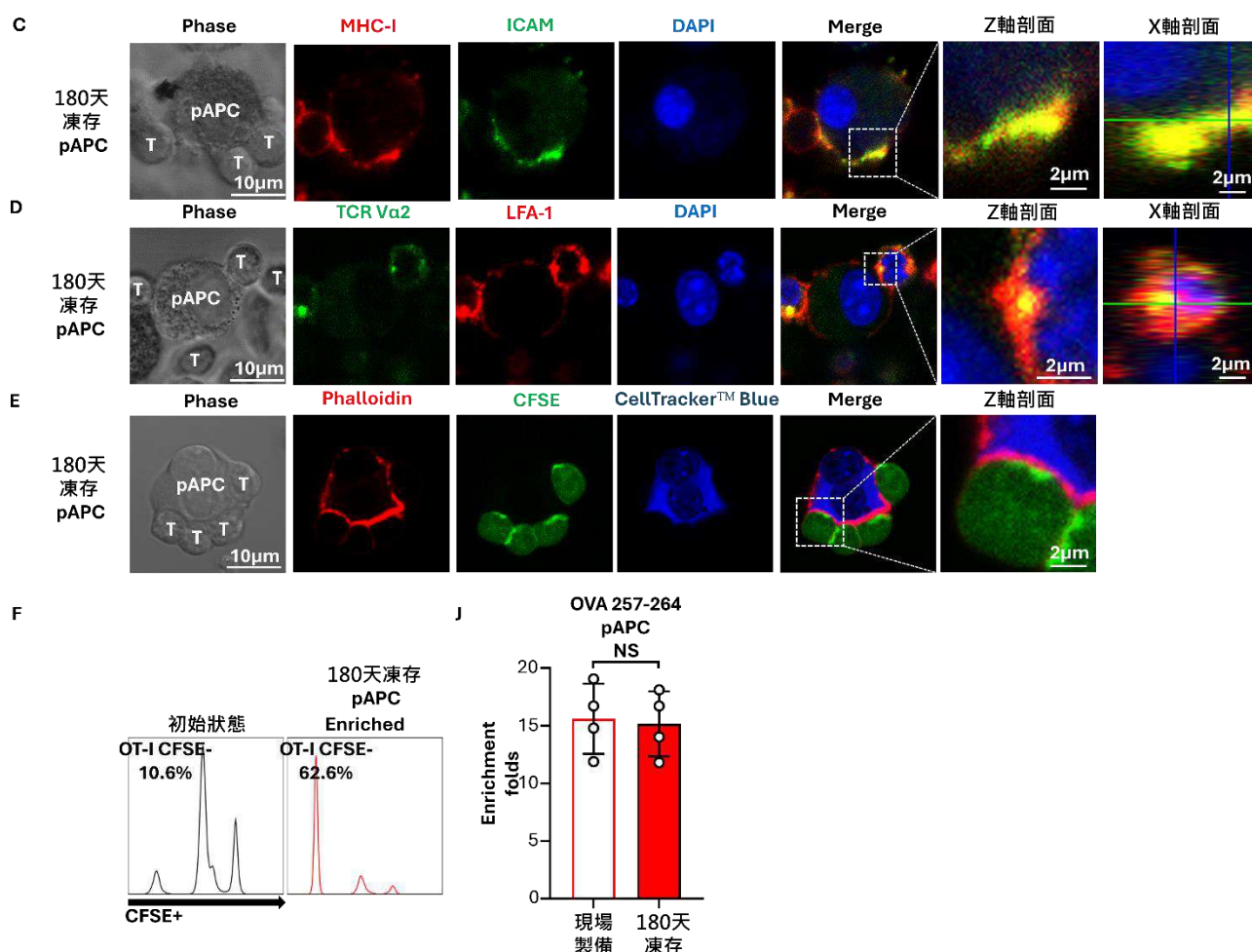


圖 30、凍存 180 天之 Mag-pAPCs 對捕捉抗原專一性的表現

A、B: 檢測凍存 180 天之 Mag-pAPC，發現其 CD69 功能近乎無影響。

C-E: 使用螢光觀察凍存 180 天之 Mag-pAPC 捕捉抗原專一性 T 細胞，發現其膜上各受體功能運作正常，形成免疫突觸捕捉抗原專一性 T 細胞

F: 運作流式細胞儀比較新製備之 Mag-pAPC 與凍存 180 天之 Mag-pAPC 之捕捉結果，無統計上差異。

(作者繪製)

五、以 Mag-pAPCs 進行之抗原專一性 T 細胞 (Antigen-specific T cell) 篩選優化為比較 pAPCs 與傳統 MHC 包覆式粒子分離法 (pMHC-functionalized probes)，我們製備了以用不同密度 SIINFEKL-H-2Kb 單體 (2 至 2×10^4 pMHCs/ μm^2) 包覆的 Dynabeads，用於 OT-I 特異性 CD8⁺ T 細胞捕捉(圖 31)。

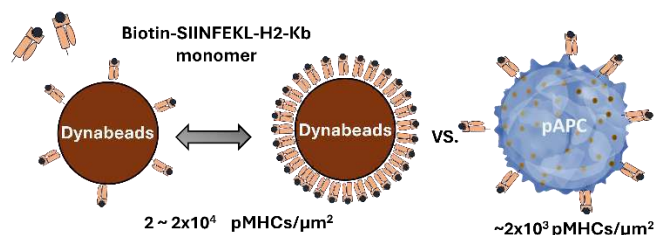


圖 31、具備不同密度 pMHC (2 到 2×10^4 pMHCs/ μm^2) 的 Dynabeads 和 pAPC 比較的示意圖

(作者繪製)

值得注意的是，預計 pAPCs 的平均表面 pMHC 密度與活體 APCs 相同

$(2 \times 10^3 \text{ pMHCs}/\mu\text{m}^2)^2$ ^{8,9}。用生物素化(biotinylated)的 SIINFEKL-H2Kb 單體對鏈黴素偶聯的 Dynabeads 進行包覆，可控制 5×10^4 pMHC 包覆至每個 $2\mu\text{m}$ 磁珠 ($2 \times 10^4 \text{ pMHCs}/\mu\text{m}^2$) (圖 32)。

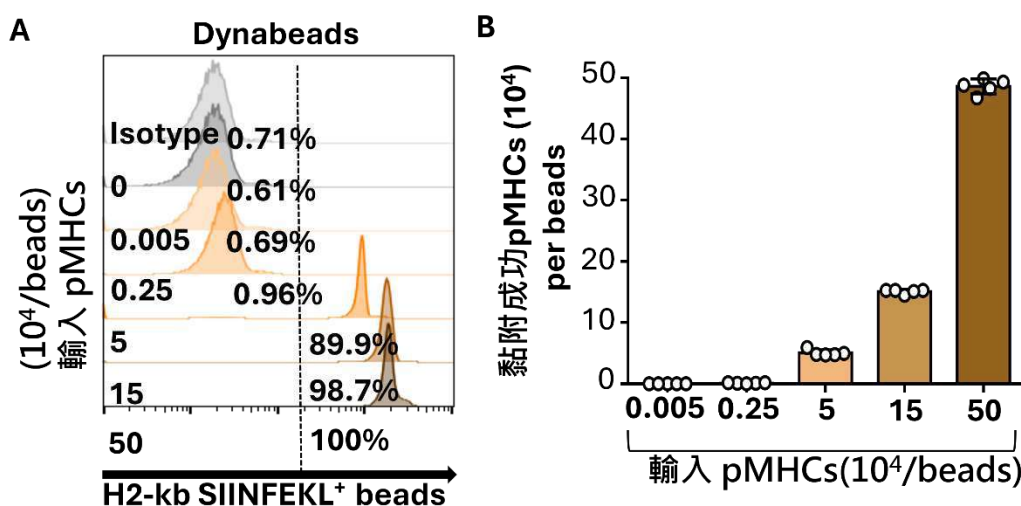


圖 32、以 Mag-pAPCs 進行之抗原專一性 T 細胞 (Antigen-specific T cell) 篩選優化

- A: 連接有不同密度生物素-SIINFEKL-H-2Kb 單體的 Dynabeads 使用 anti H2-kb-SIINFEKL 抗體進行流式細胞儀分析
- B: 使用微量 BCA 測定 (n=5) 定量測定 Dynabeads 上的 pMHC 含量

(作者繪製)

在含有 10% OT-I T 細胞和 90%非抗原專一性 T 細胞的 CD8^+ T 細胞混合液中，比較了 pAPCs 與各種 pMHC 包覆捕捉法的捕獲效率。使用總表面積相當的 Dynabeads 和 pAPCs，直接磁性捕獲後 2 小時的培養結果顯示，增加 Dynabeads 上的 pMHC 密度可使總 CD8^+ T 細胞的回收率更高，而具有 6×10^3 和 $2 \times 10^4 \text{ pMHCs}/\mu\text{m}^2$ 的 Dynabeads 比 SIINFEKL 抗原置換的 pAPCs 回收更多的 T 細胞(圖 33)。

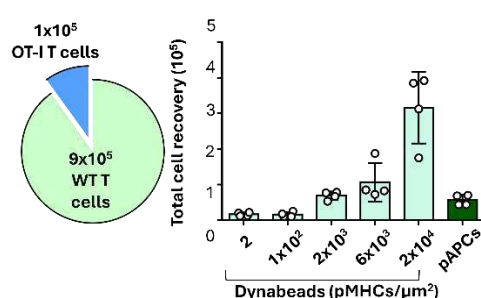


圖 33、Dynabeads 的捕捉狀況

在含有 10%專一性 T 細胞的 CD8^+ T 細胞混合液中，用不同 Dynabeads 進行 T 細胞的捕捉。含有 10^5 OT-I T 細胞的 10^6 T 細胞混合液與 10^6 pAPCs 或等效總表面積的 5×10^7 Dynabeads 作用 2 小時，然後進行 T 細胞分離和計數 (n=4)

(作者繪製)

對回收的 T 細胞中 OT-I 特異性的分析顯示，pAPC 和 Dynabeads 分別以 2×10^3 和 6×10^3 、 $2 \times 10^4 \text{ pMHCs}/\mu\text{m}^2$ 的濃度達到了抗原專一性 T 細胞的回收細胞數極值(圖 34)。

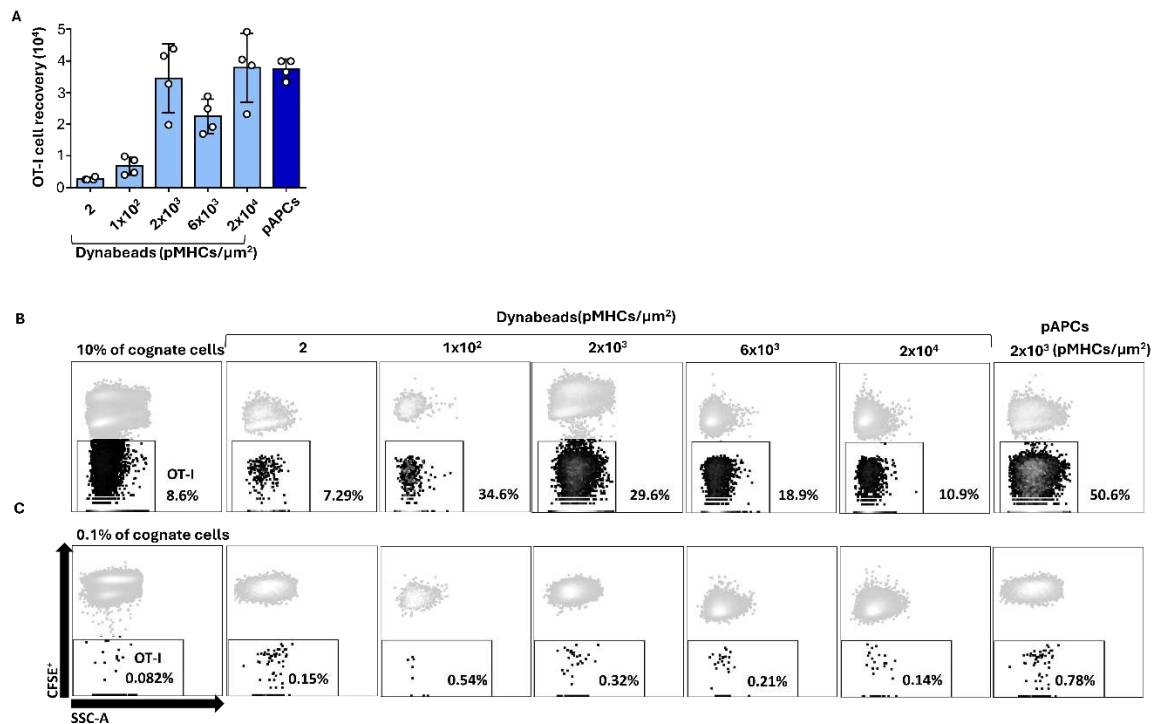


圖 34、以不同條件之 Dynabeads 與 pAPC 篩選法進行比較

- A: 在含有 10% 專一性 T 細胞的 CD8^+ T 細胞混合液中，以不同 Dynabeads 進行 T 細胞的捕捉。將含有 10^5 OT-I T 細胞的 10^6 T 細胞混合液與 10^6 pAPCs 或等效總表面積的 5×10^7 Dynabeads 作用 2 小時，然後進行 T 細胞分離和計數 (n=4)
- B: 在含有 10% 專一性 T 細胞的 CD8^+ T 細胞混合液中，以不同 Dynabeads 進行 T 細胞的捕捉。將含有 10^5 OT-I T 細胞的 10^6 T 細胞混合液與 10^6 pAPCs 或各種不同 Dynabeads 作用 2 小時，然後進行流式細胞儀分析
- C: 在含有 0.1% 稀薄專一性 T 細胞的 CD8^+ T 細胞混合液中，以不同 Dynabeads 進行 T 細胞的捕捉。將含有 10^5 OT-I T 細胞的 10^6 T 細胞混合液與 10^6 pAPCs 或各種不同 Dynabeads 作用 2 小時，然後進行流式細胞儀分析

(作者繪製)

綜合以上數據，值得注意的是， 2×10^4 pMHCs/ μm^2 的 Dynabeads 顯示出區分抗原專一性和非專一性 T 細胞的能力減弱(圖 35)。

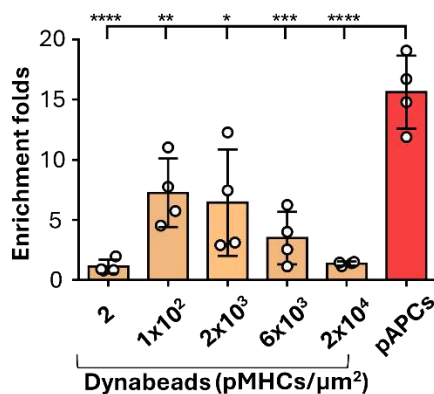


圖 35、pAPC 或 Dynabeads 分離後抗原專一性 OT-I T 細胞的富集倍數 (n=4)

(作者繪製)

這些結果表明，對於被動篩選微粒 (passive probe)，pMHC 超過最佳密度會導致與非抗原專一性 T 細胞的非特異性結合。另一方面，pAPCs 在抗原專一性 T 細胞的整體富集倍數(Enrichment fold)優於所有 Dynabeads。在另一項 T 細胞捕獲研究中，抗原專一性 T 細胞減少至總 CD8⁺ T 細胞數的 0.1%，被動篩選微粒 (passive probe) 的親和力與專一性的權衡(trade-off)進一步放大。高 pMHC 密度 Dynabeads 捕獲的總 T 細胞較多，但與此形成對比的是，抗原專一性 OT-I T 細胞的回收率較低(圖 36)。

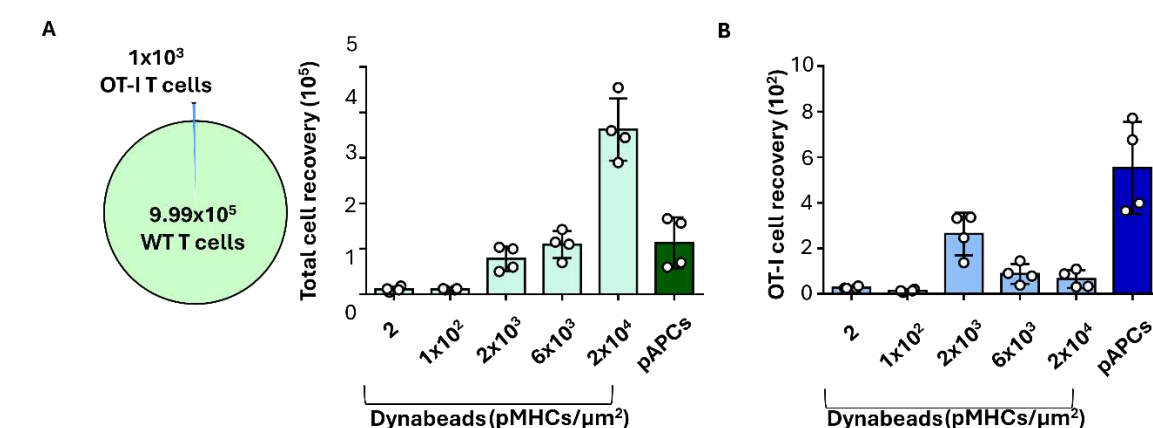


圖 36、抗原專一性 OT-I T 細胞的回收率與 Dynabeads 的關係

- A: 在含有 0.1% 抗原專一性 T 細胞的 CD8⁺ T 細胞混合液中，用不同 Dynabeads 進行 T 細胞的回收。含有 10³ OT-I T 細胞的 10⁶ T 細胞與 10⁶ pAPCs 或等效總表面積的 5 × 10⁷ Dynabeads 作用 2 小時，然後進行 T 細胞分離和計數 (n=4)。
- B: 使用不同 Dynabeads 定量 OT-I T 細胞的回收 (n=4)。

(作者繪製)

相比之下，pAPCs 捕獲的 T 細胞以最少的非專一性結合回收了最多的 OT-I T 細胞，從而產生了最高的 OT-I T 細胞富集倍數(Enrichment fold) (圖 37)。

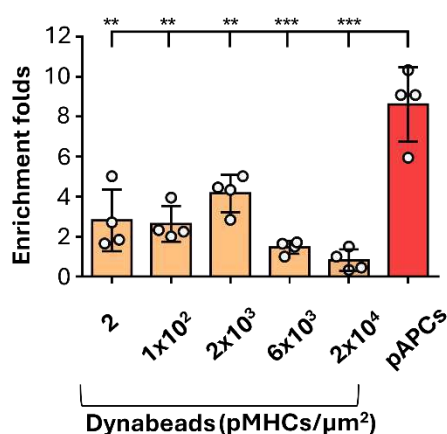


圖 37、pAPC 或 Dynabeads 分離後抗原專一性 OT-I T 細胞的富集倍數 (n=4)

(作者繪製)

進一步檢查具有不同 pMHC 濃度的 pMHC 包覆式 Dynabeads 並未改善抗原專一性 T 細胞的富集，結果始終反映了與被動篩選微粒 (passive probe) 設計相關的專一性-親合度權衡(trade-off)。這些發現證實了 pAPCs 進行仿生 T 細胞捕獲的優勢，並突顯了其在分離低濃度抗原專一性 T 細胞方面的適用性。

六、 成功於晶片內製備水膠化抗原呈現細胞單層 (Polymerized antigen presenting cell monolayer ; pAPC monolayer in chip)

為使細胞緊貼晶片底壁，利於進行後續實驗操作，本實驗選用 DC2.4 貼附型細胞作為實驗細胞株，透過細胞膜通透性高且分子量低的聚 (乙二醇) 二丙烯酸酯 (Poly (ethylene glycol) diacrylate ; PEG-DA)(Mn=575 Da) 與藍光敏感性之鋰苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸鹽 (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate ; LAP) 在 UV-365 作用後，細胞質成功被水膠化，並完整保留其生物膜功能^{3,4} (圖表 38A)。但，在製作過程中，由於此細胞株附著力較 JAWSII 貼附部分稍顯不足，且細胞水膠化後，細胞質較水膠化前劇烈膨脹，使細胞底部與晶片壁之貼附著力點遭破壞 (圖表 38a)，反覆沖洗與注入藥劑之過程中，我們發現流道中央之細胞脫落殆盡，與流道側邊殘存高密度細胞形成強烈對比 (圖表 38b)。為解決此一困境，我們採用 Corning® Cell-Tak™ Cell and Tissue Adhesive 加強附著力，使用後細胞貼附率明顯有效提升。為證明在晶片內水膠化成功固定細胞，我們製作 2 片晶片，分別水膠化與浸泡於等滲透壓培養液中，而後將大量水沖入，觀察到水膠細胞晶片內細胞均保持原狀，並未膨脹破裂；反之，一般細胞製成之晶片，有大量細胞破裂，在顯微鏡視野下近乎無法發現完整細胞 (圖表 38B)。由此可證在晶片內製備水膠化抗原呈現細胞單層(pAPC monolayer)可行。

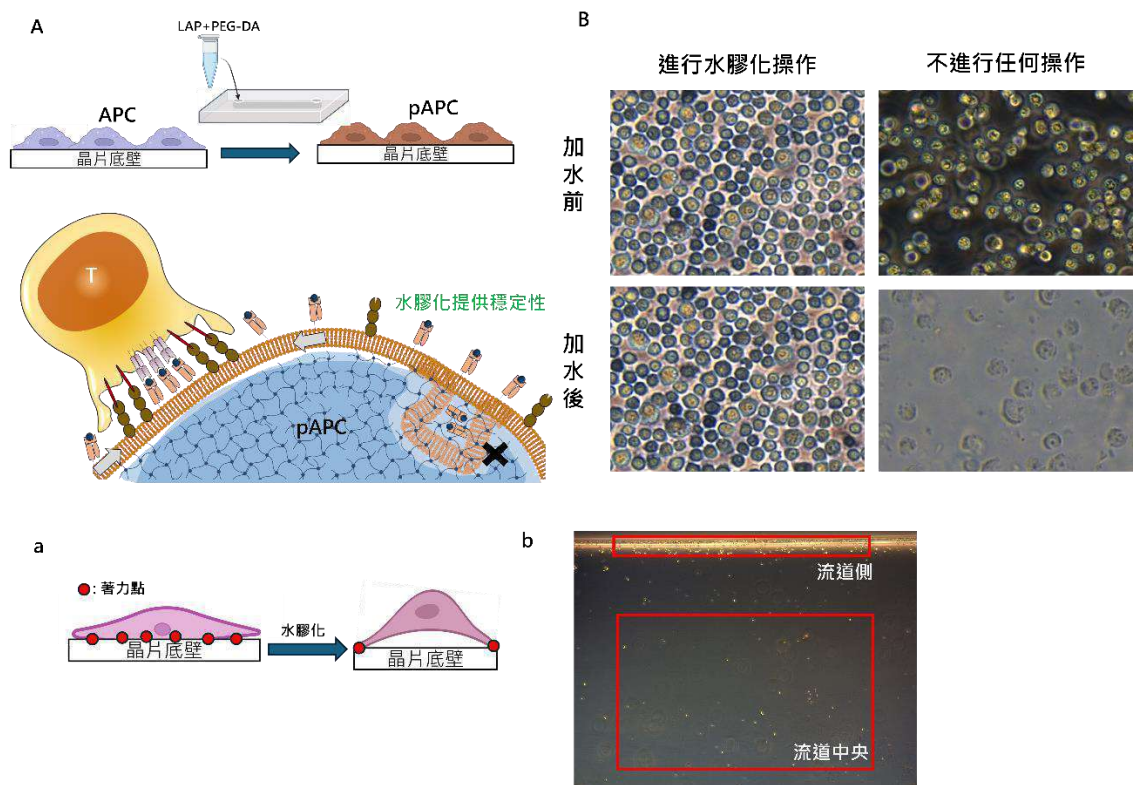


圖 38、成功於晶片內製備水膠化抗原呈現細胞單層 (pAPC monolayer in chip)

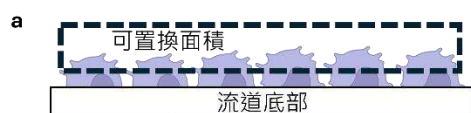
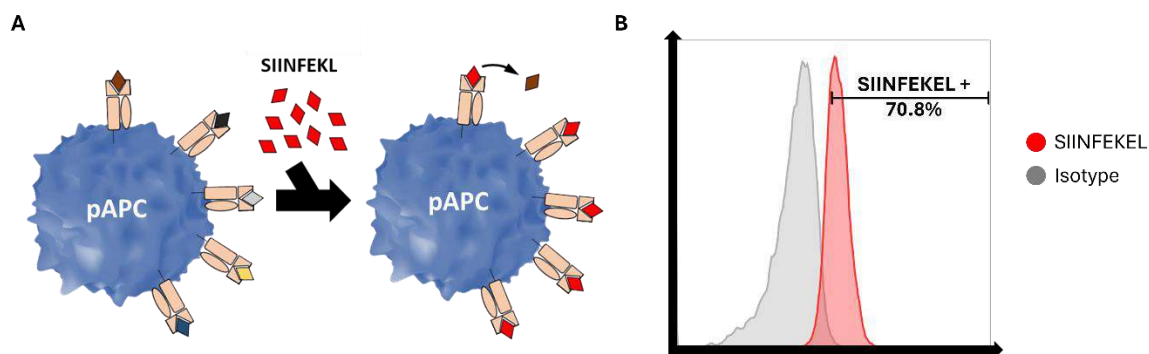
A: 實驗過程示意圖

B: 水膠化細胞與一般細胞在晶片內受滲透壓衝擊前後樣態。pAPC 維持細胞型態與貼附狀態，反之，一般細胞迅速破裂，並從晶片上脫落，難以辨識細胞樣態。證明可成功於晶片內製備水膠化抗原呈現細胞單層 (pAPC monolayer in chip)

(作者繪製)

七、晶片內進行動力學驅動的抗原肽鏈置換能使 pAPCs 穩定呈現抗原

為了調整 pAPCs 呈現的抗原至所需的肽鏈目標，我們採用了實驗 2 之動力學驅動的肽鏈置換法，將 pAPCs 暴露於濃度超過肽鏈解離常數的選擇性抗原 (圖表 39A)。實驗以 SIINFEKL 作為模型抗原，依賴濃度差進行置換。由實驗(二)的探究，我們沿用最佳數據，在 2 mg/mL 的 SIINFEKL 濃度下，可在 1 分鐘內完成完全的抗原替換。將細胞以 TrypLE 從晶片上取下，而後透過 SIINFEKL/H-2kb 抗體染色評估 pAPCs 上 SIINFEKL 的呈現，經流式細胞儀檢測，細胞置換率高達 70% (圖表 39B)。且因為晶片之特性，緊密排列之細胞單層(monolayer)黏附在晶片底部，細胞之間近乎毫無間隙，可進行抗原置換之範圍僅限細胞上半部(圖表 39a)，此狀態達到 70%置換率，可視為完全置換。

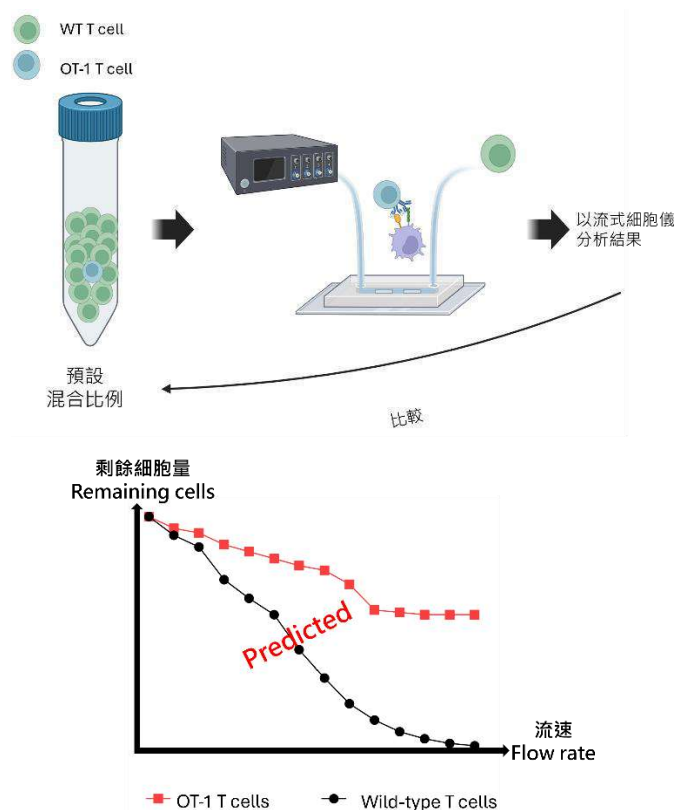


圖表 39、晶片內進行動力學驅動的抗原肽鏈置換能使 pAPCs 穩定呈現抗原
 A: 游離抗原肽鏈交換過程示意圖
 B: 以流式細胞儀分析目標抗原(SIINFEKL)置換率

(作者繪製)

八、水膠化抗原呈現細胞晶片 (pAPC chip) 使用生物性捕捉方式捕捉 T 細胞與傳統 MHC 包覆式粒子分離法 (pMHC-functionalized probes) 的比較

預計以 T 細胞-癌細胞捕殺實驗(killing) 與動物實驗進行驗證。



肆、結論與應用

- 一、 運用水膠化技術與磁力進行抗原專一性 T 細胞 (Antigen specific T cell) 篩選
 - (一) 成功製備保留生物膜表面 (biomembrane interface) 之磁性水膠化抗原呈現細胞 (Magnetized polymerized antigen presenting cell ; Mag-pAPCs)
 - (二) 成功使用動力學驅動的抗原肽鏈置換使 pAPCs 穩定呈現抗原
 - (三) 成功使 Mag-pAPCs 與抗原專一性 T 細胞成功建立可用於磁力分離之免疫突觸
 - (四) 進行 Mag-pAPCs 捕捉 T 細胞與傳統 MHC 包覆粒子分離法 (pMHC-functionalized probes) 的效益比較，證實本 Mag-pAPC 篩選法可以大大提升抗原專一性 T 細胞篩選效率
- 二、 基於研究目的 (一) 得出之結果，運用流體力學水膠化技術開發微流道晶片並測算相關參數，提升抗原專一性 T 細胞篩選專一性
 - (一) 成功於晶片內製備保留生物膜表面 (biomembrane interface) 之水膠化抗原呈現細胞單層 (Polymerized antigen presenting cell monolayer ; pAPC monolayer)
 - (二) 成功於晶片內進行動力學驅動的抗原肽鏈置換，使 pAPCs 穩定呈現抗原
 - (三) (進行中)進行水膠化抗原呈現細胞晶片 (pAPC chip) 使用生物性捕捉方式捕捉 T 細胞與傳統 MHC 包覆式粒子分離法 (pMHC-functionalized probes) 的比較，將抗原專一性 T 細胞篩選效率較 Mag-pAPC 法和其他現行方法大為提升(預期結果)。

未來展望與應用

本作品可有效率的篩選出高專一性高親合度之抗原專一性 T 細胞，在癌症治療與精準醫學有極為遠大之前景。可從癌症病患體內篩選出抗原專一性 T 細胞，於體外進行大量複製，而後回輸患者體內進行低副作用且高專一性，極為有效率之癌症免疫治療。

在觀察實驗室其他成員進行動物實驗的過程中，我們也觀察到一現象，罹患癌症之小鼠在施打抗原專一性 T 細胞後，腫瘤迅速被壓制，但經過一段時間後，腫瘤又不受控制的生長，重新施打先前分離之抗原專一性 T 細胞後，仍然無效。人道處理後分析腫瘤樣本，發現腫瘤內原先主流之抗原已消失，取而代之是另一種抗原。推測是具備原先抗原之癌細胞已被抗原專一性 T 細胞殺滅殆盡，而極少部分非帶有該抗原之癌細胞存活並大量分裂，導致腫瘤復發。由於微流道具備模組化之特性，我們認為微流道系統可以解決這樣的困境並將其納入未來研究方向。可以透過將不同數量之流道串聯、並聯，調整流速，篩選出不同親合度之抗原專一性 T 細胞。解決腫瘤中少部分癌細胞逃脫捕殺的現象。

伍、參考文獻

1. Department of Statics, M., Taiwan. (ed. M. Department of Statics, Taiwan) (Department of Statics, MOHW, Taiwan, <https://dep.mohw.gov.tw/dos/lp-5069-113-xCat-y112.html>; 2023).
2. World Health Organization, U. (ed. U. World Health Organization) (World Health Organization, UN, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>; 2024).
3. Lin, J.C. et al. Facile Transformation of Murine and Human Primary Dendritic Cells into Robust and Modular Artificial Antigen-Presenting Systems by Intracellular Hydrogelation. *Adv Mater* **33**, e2101190 (2021).
4. Lin, J.C. et al. Intracellular hydrogelation preserves fluid and functional cell membrane interfaces for biological interactions. *Nat Commun* **10**, 1057 (2019).
5. Huppa, J.B. & Davis, M.M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983 (2003).
6. Lanzavecchia, A., Iezzi, G. & Viola, A. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* **96**, 1-4 (1999).
7. McKeithan, T.W. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5042-5046 (1995).
8. Kuznetsov, A., Voronina, A., Govorun, V. & Arapidi, G. Critical Review of Existing MHC I Immunopeptidome Isolation Methods. *Molecules* **25** (2020).
9. Lanoix, J. et al. Comparison of the MHC I Immunopeptidome Repertoire of B-Cell Lymphoblasts Using Two Isolation Methods. *Proteomics* **18**, e1700251 (2018).

【評語】 090024

1. 創新性與重要性：

本研究提出了一種創新的 T 細胞篩選方法，結合水膠細胞技術和微流控晶片，以提高 T 細胞免疫療法的效率，具有重要的臨床意義。T 細胞免疫療法是一種深具潛力的癌症治療策略，但其成功關鍵在於能夠篩選出足量的抗原專一性 T 細胞。現有的篩選方法雖然便利，但存在誤捕不相關抗原專一性 T 細胞的問題，降低了治療效率。本研究通過模仿細胞膜的免疫突觸現象，並利用微流控晶片控制流速改變沖刷力，開發出一種可篩選親和力較高 T 細胞的微流道晶片。這種方法不僅有望提高 T 細胞篩選的專一性和數量，還可能顯著提升 T 細胞免疫療法的臨床價值。

2. 優點：

該研究巧妙地利用水膠細胞技術的特性，完整保存生物膜並模仿細胞膜的免疫突觸現象，這為更精確地篩選 T 細胞提供了可能。其次，研究結合了微流控晶片技術，通過控制流速來改變沖刷力，這種方法可以更有效地篩選出親和力較高的 T 細胞。此外，研究成功在晶片內建立了可置換任意抗原的水膠細胞單層，並以

SIINFEKEL 抗原作為模擬，達到了極高的置換率。這種靈活性使得該技術可以應用於不同類型的抗原，增加了其在各種癌症治療中的潛在應用價值。最後，這種方法有望顯著提高 T 細胞篩選的專一性和數量，這對於提升 T 細胞免疫療法的效果至關重要。

3. 待改進的部分：

T 細胞治療是未來細胞治療的主要方向之一，建議可以將本研究的技術與現今大家在使用的 T 細胞純化技術進行優劣比較。研究目前主要集中在技術的開發和初步驗證階段，還需要進行更多的實驗來確認其在實際 T 細胞篩選中的效果。其次，研究使用 SIINFEKEL 抗原作為模擬，但還需要測試更多不同類型的抗原，以確保該技術的廣泛適用性。此外，研究還需要進一步探討如何將這種技術擴大規模，以滿足臨床應用的需求。最後，雖然研究提到了提升篩選專一性和數量的預期，但還需要具體的數據來支持這一說法。未來的研究應該包括與現有篩選方法的直接比較，以量化新方法的優勢。這些改進將有助於進一步提升該技術的可靠性和臨床應用潛力。