

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	090018
參展科別	醫學與健康科學
作品名稱	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
得獎獎項	

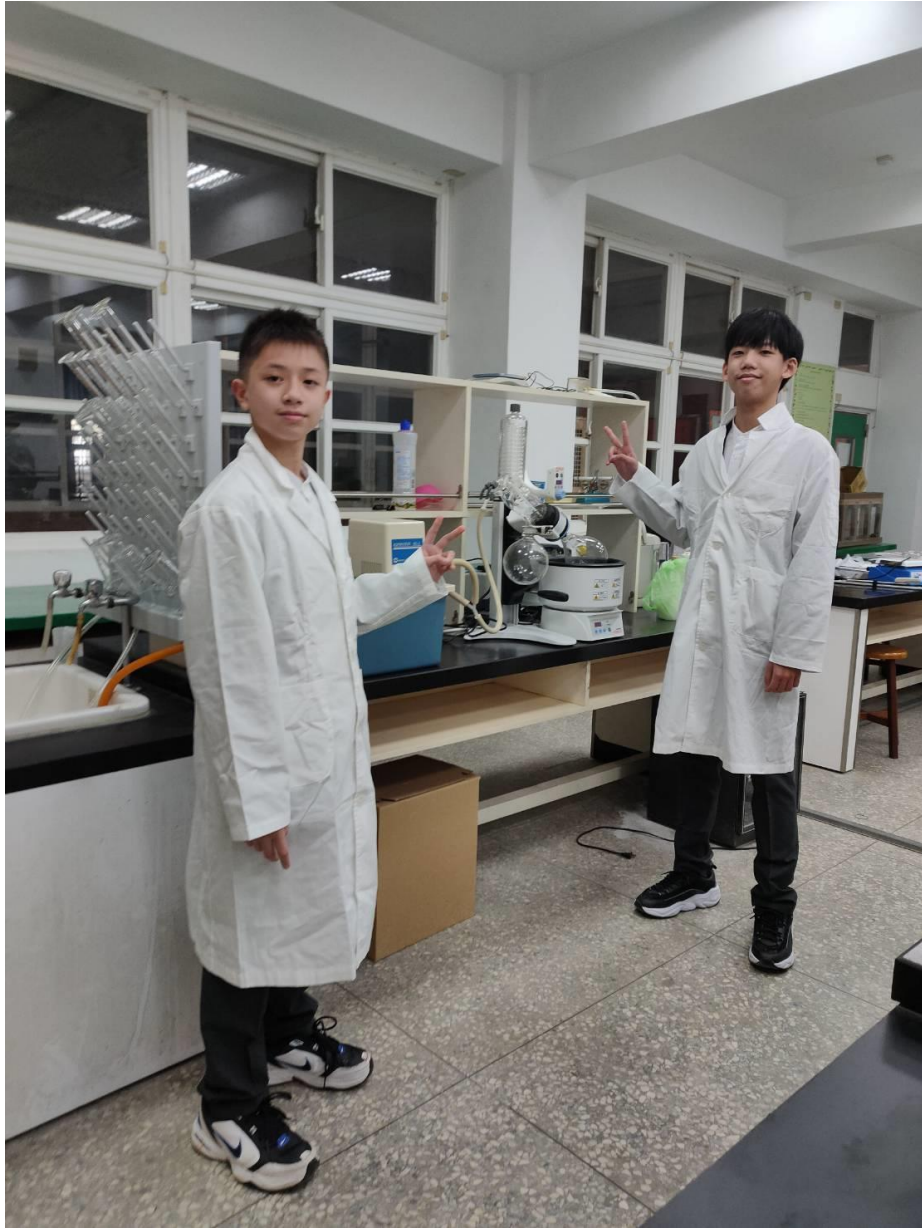
就讀學校 新北市立崇林國民中學

指導教師 羅陽青、魏子堂

作者姓名 王淮諳、賴守義

關鍵詞 iPSC、疫苗抗原、大腸直腸癌

作者簡介



摘要

癌症治癒方式成效有限，在 iPSC 中找出具有潛力的蛋白製成大腸直腸癌疫苗是本研究目的。

實驗先以 C57BL/6 小鼠之股骨及脛骨骨髓中造血幹細胞分化成為未活化的樹突細胞。放入安慰劑、CpG 佐劑、CpG+MC38、CpG+iPSC 等抗原物來進行免疫細胞活化測試，流式細胞儀分析結果驗證能否減緩小鼠大腸直腸癌的腫瘤生成。接著，利用質譜儀及大數據分析從 iPSC 中找出促使樹突細胞活化的抗原物蛋白成分，選出 3 個候選，透過西方墨點法確認其專一性。查詢候選蛋白 TTW1、2、3 在 The Human Protein Atlas 網站對大腸直腸癌之表現數據。

結果 iPSC 的抗原物促使樹突細胞的 MHC1 標記物活化，助於毒殺性 CD8+T 細胞的產生進而透過免疫系統預防大腸直腸癌的產生。TTW1 只有在 iPSC 細胞株表現出專一性，同時資料庫顯示 TTW1 在大腸直腸癌中具有高表現量。

目前未有文獻探討抗原疫苗的應用，團隊未來專注合成 iPSC 中 TTW1 蛋白，進一步開發成大腸直腸癌疫苗。

Abstract

Colorectal cancer has caused pain, taken away lives, and ruined families. It is also called a “silent killer” because it is often diagnosed at a very late stage due to the lack of symptoms. Although a lot of efforts have been put to prevent the disease and develop effective medication, many issues must be addressed for the early detection of cancer and to improve the therapy. The purpose of our research is to identify the protein with the potential for developing a vaccine to defend our bodies against colorectal cancer by assessing the proteins in iPSC.

First, the Hematopoietic stem cells in bone marrow taken from C57BL/6 rats’ femur and shin bone were differentiated into unactivated Dendritic cells (DC). Then the immune cell activation test was conducted by adding some antigens such as placebos, CPG adjuvants, CPG+MC38, and CpG+iPSC to the unactivated Dendritic cells (DC). The outcome was analyzed by flow cytometer to assess the possibility of slowing down the formation of tumors in the experimental subjects. Subsequently, mass spectrometers and big data were the techniques applied to analyze the elements of proteantigen which can activate DC in our testing, and then three candidate proteins were singled out. By using a western blot, we were able to determine the specificities of the three proteins. At last, we checked the Human Protein Atlas to find the data on their protein expression in colorectal cancer.

The outcome of our testing shows that TTW1 only shows its specificity in iPSC cell line. Besides, the data found in the Human Protein Atlas illustrates that TTW1 has a high expression figure in colorectal cancer. The finding proves that antigens in iPSC can activate DC MHC1 marker to help produce cytotoxic CD8+T cells, which in turn, triggers the immune system to defend against the disease.

There has not been any literature relevant to the application of antigen vaccines. Our research will focus on composing the target protein, TTW1, and look forward to developing a vaccine that can be used as a method for the early detection and screening of colorectal cancer.

壹、 前言

一、 研究動機

癌症是人類尚未克服的病症之一，在成長的過程中我們的親友或多或少也都得過，臺灣的名人豬哥亮先生便是因得到大腸直腸癌而過世。因此七年級時，於南一版生物課本中的科學新知談論到有關 iPSC 的相關資料，便引起我們極大的興趣，因為在查閱相關學術文章後於課餘時間與老師討論發現 iPSC 可能有助於預防或對抗癌症是醫學界重要的研究問題。經由和老師討論過後認為本校實驗室無法執行相關實驗與研究，於是我們上網搜索有做相關實驗之研究單位，而其中經歷幾次書信上的往來，我們得到了相關單位負責人的首肯，願意提供我們相關協助，才有幸可以向這個方向的研究發展。

癌症的成因是原癌基因(Proto-oncogene)、抑癌基因(Tumor suppressor)、DNA 修復基因(DNA repair)，發生突變而造成的。由於大腸直腸癌是一種進展較慢的癌症，發現時通常已到癌症的 II 期或 III 期，而這類型的癌症是無法用手術完全切除的，但不論何種方式，其副作用仍會對病患日常生活造成影響，且末期患者的治癒率只有 20~30%。因此治療大腸直腸的方法一直受到大家的重視，但大部分都無法提供顯著的幫助。

常見的大腸直腸癌治療方式有手術切除、化學治療和標靶藥物治療等等，每一種方式都有不可忽視的副作用和風險。在執行手術切除時，因為大腸直腸，尤其是低位直腸癌，附近血管複雜，必須將該區域的淋巴結清除乾淨，否則可能大量出血。在手術後未追蹤病情也有案例導致肛門、陰部出血，並且需要使用尿布，腫瘤也變得不易切除，這可能說明了手術切除無法根治大腸直腸癌。

iPSC (Induced pluripotent stem cell) 是由日本科學家山中申彌所發現，全名為：人工性誘導性多功能細胞，有助於醫學界之相關研究，已有報告證實 iPSC 具有開發各類癌症疫苗之潛力(Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer, 2021) (Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses In Vivo, 2018)。本篇研究主題的癌症疫苗屬於主動免疫的一環，藉由預先注射特定抗原來活化樹突細胞(DC)的 MHC1 表現，進而促使 CD8+T 毒殺癌症細胞。我們希望探討 iPSC 對小鼠 C57BL/6 之樹突細胞活化之影響，並找出有助於大腸直腸癌疫苗開發之關鍵抗原。

二、 研究目的

- (一) 設計實驗並確認過去文獻中 iPSC 是否可以減緩腫瘤生長。
- (二) 以 C57BL/6 小鼠的樹突細胞模擬免疫系統，測出 iPSC 對小鼠 C57BL/6 免疫系統活化之影響。
- (三) 利用質譜儀及大數據找出 iPSC 中獨有或共有的蛋白，篩選可能的目標蛋白候選。
- (四) 利用西方墨點法確認候選蛋白的專一性，找出目標抗原。
- (五) 查找 The Human Protein Atlas 網站確認目標抗原和大腸直腸癌的關係。

三、 文獻回顧

(一) 大腸直腸癌常見治療方式

大腸直腸癌(CRC)是全球最常見的癌症之一，2020 年時，CRC 占全癌症發生率的 10%、死亡總數的 9.6%，目前主要的治療方式是手術、標靶、和化療，第零期:CRC 未有轉移徵兆，使用手術優勢較大，第一期:有潛在性的轉移徵兆的話，通常會先用化療降低腫瘤大小，再使用手術治療，第二期:CRC 具有擴散性且不可切除，這類型的治療會是緩和性而非治療性，是為了減少症狀及腫瘤的侵略性及擴散性，所以選擇之方式會是在短時間之內能生效的治療方式，像是標靶治療，第三期:無法切除的腫瘤，治療的目的將是防止腫瘤發展，使用標靶，不過以上的治療方式的限制或副作用較多

(二) 目前癌症的免疫療法

1. T 細胞輸注療法 (Adoptive Cell therapy, ACT): 收集浸潤在腫瘤組織當中的 T 細胞(Tumor-infiltrating T cell) ，加入腫瘤片段並使用細胞激素培養，再將擴增後的 CD4 及 CD8 T 細胞輸注回病患體內。
2. 嵌合抗原受體重組 T 細胞免疫治療(Chimeric Antigen Receptor T-cell immune therapy, CAR-T): 使用 CAR-T 來進行治療，CAR-T 是病患自己的 T 細胞，在體外加入癌細胞的抗體，大量繁殖後再注入體內。
3. 自然殺手細胞 (Natural killer cell, NK cell): NK 細胞是一種毒殺性淋巴球，NK 細胞沒有專一性，是面對腫瘤的第一道防線，只要沒有表現 MHC-I (人類白血球抗原群)，或表現出異常分子被釋出後，NK 細胞就會將其毒殺。

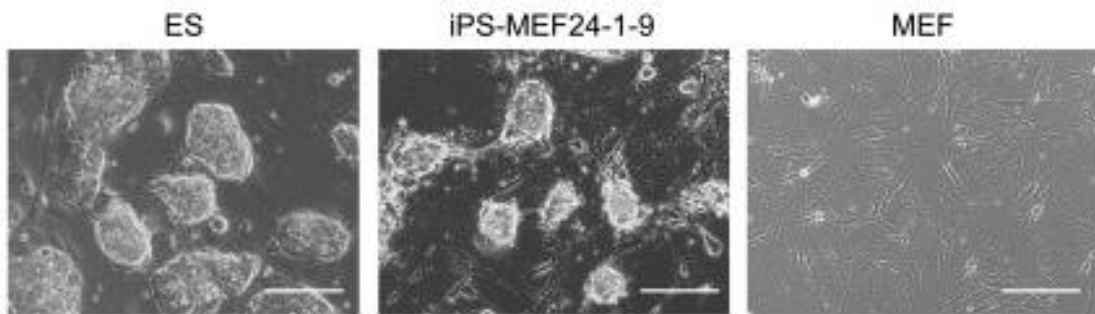
4. 溶瘤病毒 (Oncolytic virus): 溶瘤病毒主要透過兩個機制來對抗癌細胞，一是在受感染的腫瘤細胞內複製繁殖，直接造成腫瘤細胞溶解，二是引發免疫系統對抗腫瘤。
5. 雙特异性抗體藥物 (Bispecific T-cell engager antibody, BiTE): 雙特异性抗體藥物是一種兩端都可以接抗原的抗體，治療方法為一端與腫瘤表面上的抗原，另一端接上 T 細胞，活化 T 細胞將其毒殺。
6. 免疫前哨站抑制劑 (Check point inhibitor): 免疫前哨站抑制劑: 目前利用 CTLA-4 或 PD-1 的抑制劑來活化 T 細胞 (CTLA-4、PD-1，為 2018 諾貝爾生醫獎，皆會阻止 T 細胞過於活化)。
7. 腫瘤疫苗 (Cancer vaccine): 找出腫瘤的特定抗原，使免疫系統辨識，與本次實驗相關 (本實驗利用 iPSC)。
8. 樹突狀細胞疫苗: 大量繁殖 DC，將單核球分離，誘導分化成樹突狀細胞後，加入癌細胞抗原使其變成成熟的樹突狀細胞，輸回病患體內後將癌細胞抗原呈現給 T 細胞。

(三) 與本研究相關資料

1. 大腸直腸癌 (colorectal cancer):
簡稱為 CRC，根據世界衛生組織 WHO 於 2019 年的資料顯示，CRC 是當年發生率第三名，死亡率第二名的癌症。在中華民國，根據衛福部在 2022 年的資料 CRC 是本國發生率第二高，死亡率第三高的癌症。
Lancet 2019; 394: 1467–80
ROC Health Promotion Administration, Ministry of Health and Welfare 2022
2. CpG: 是本研究選用的佐劑，擁有放大實驗的活化反應，使結果更易判讀之功效。因為已知其無專一性，因此不影響實驗結果。
3. MC38: C57BL/6 小鼠大腸直腸癌細胞
4. MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts): C57BL/6 小鼠纖維母細胞
5. iPSC (induced Pluripotent Stem Cells): 誘導性多功能幹細胞
6. TTW1、2、3: 本研究第二階段實驗之後選蛋白代號

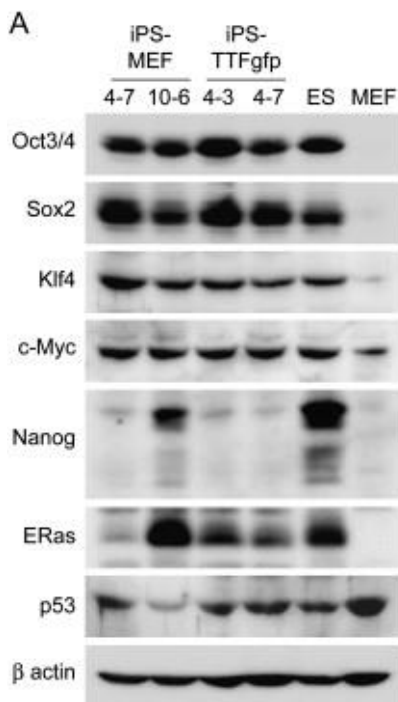
(五) iPSC 的背景

研究幹細胞一直有著學術道德的爭議問題，因此有關幹細胞應用於醫學方面之研究欠缺，但在 2006 年時諾貝爾獎得主山中申彌(Shinya Yamanaka)團隊篩選出 24 種候選基因，最後發現只要將四種轉錄因子(Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc)，藉由反轉錄病毒，送入細胞內可把一些細胞變回幹細胞，這些稱為誘導性多功能幹細胞(簡稱 iPSC)。(Shinya Yamanaka 等人，2006 年)



Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors Cell 論文圖 1 之 C

上圖為該團隊研究時所拍攝之 ES 細胞(胚胎幹細胞)、iPS 細胞(誘導性多功能幹細胞)和 MEF 細胞(纖維母細胞)之圖。



左圖為山中申彌團隊所執行之 iPS 細胞、ES 細胞、MEF 細胞等細胞之西方墨點法照膠圖，顯示了四種山中申彌因子(Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc)在不同細胞中之含量。

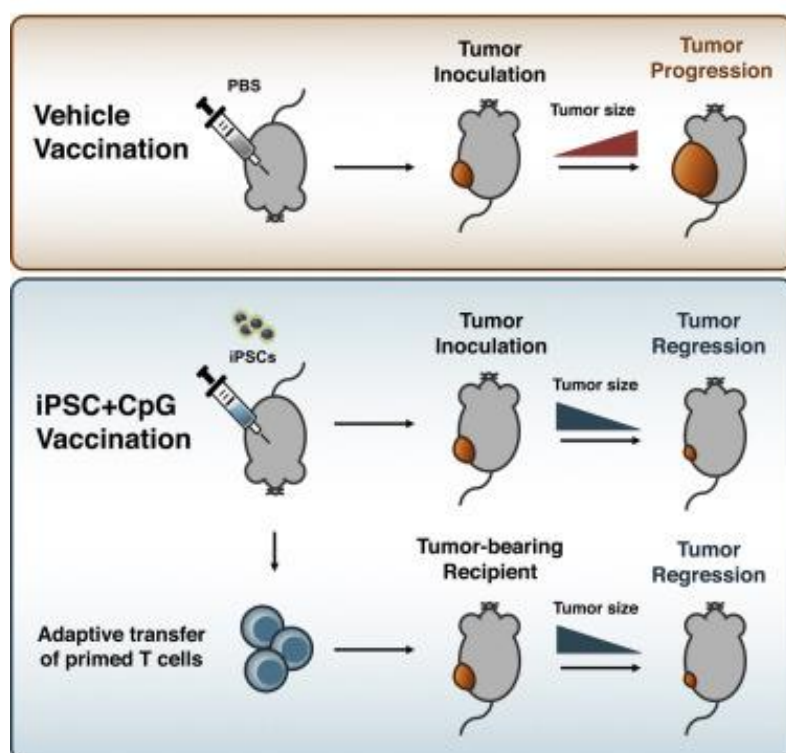
由於山中申彌所發現之 iPSC 屬於人工誘導而形成之幹細胞，因此在宗教或倫理道德上不受約束，對於之後幹細胞相關研究貢獻巨大，可供研究出治療帕金森病、脊髓損傷和糖尿病的方法，也有相關研究探討癌症與 iPSC 之間的關係，例如 Kooreman 等人和 Xiaoming Ouyang 等人分別在 2018 和 2021 年發表相關研究。(Shinya Yamanaka 等人，2006 年)

左圖:Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors Cell 論文圖 7 之 A

(六) 近期有關 iPSC 抗腫瘤疫苗相關研究

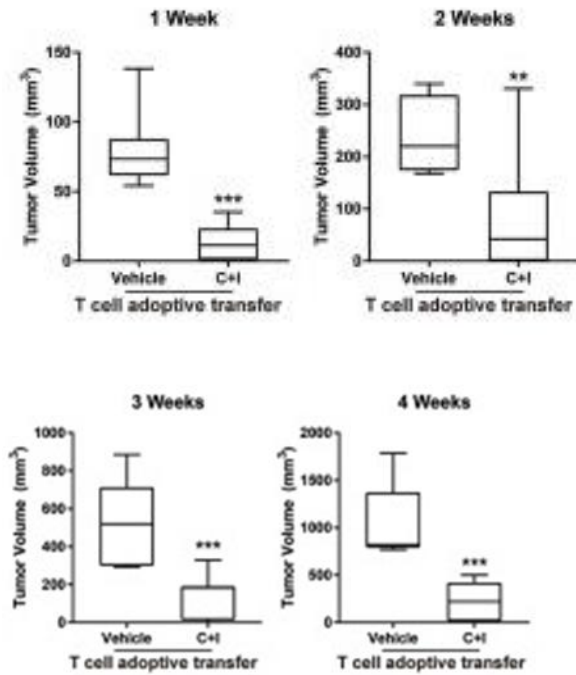
Nigel G. Kooreman 以及他的團隊在 2018 發表了基於自體 iPSC 的疫苗在體內引發抗腫瘤反應 (Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses) 之論文，他在論文中提出以下四大重點：

1. 輻照後的 iPSC 可以預防小鼠模型的乳癌、肺癌和皮膚癌。
2. iPSC 疫苗針對 iPSC 和癌細胞的共享表位
3. iPSC 疫苗促進體液和細胞介導的抗腫瘤免疫譜
4. iPSC 疫苗可以用來輔助治療癌症，重新激活免疫系統



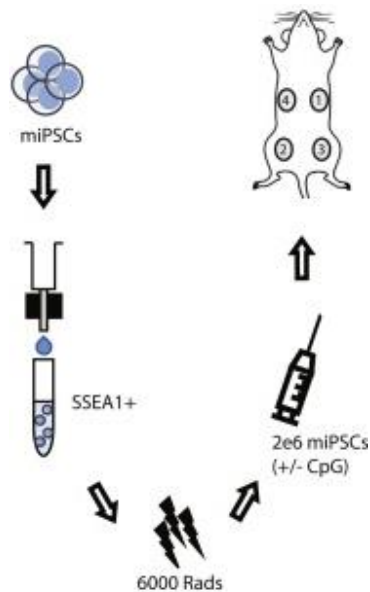
Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses in Vivo 論文的圖形化摘要圖

上圖中橘色部分為對照組，只在小鼠體內注射 PBS，之後接種腫瘤，發現腫瘤尺寸明顯變大，而藍色部分先將 CpG+iPSC 疫苗注射於小鼠體內，接種腫瘤疫苗會發現大部分小鼠腫瘤尺寸明顯變少，結果顯示了 iPSC 對於預防癌症有有益的效果。之後該團隊發現將預先施打 CpG+iPSC 疫苗的小鼠的 T 細胞轉移至帶有腫瘤的小鼠體內也可以有效的縮小腫瘤的尺寸，這顯示了 iPSC 可能可幫助活化 T 細胞，而此類 T 細胞有助於治療癌症，因此 iPSC 疫苗也有輔助癌症治療的應用。



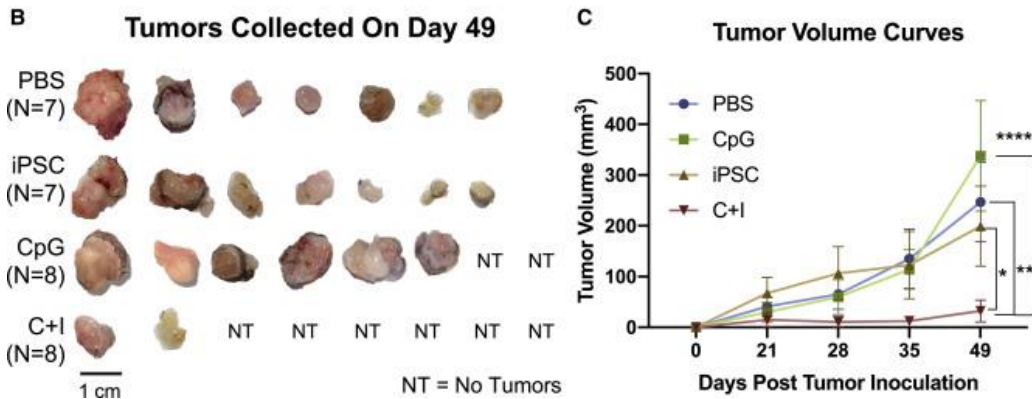
Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses in Vivo 圖 4 之 B

上圖中該實驗團隊將接種 Vehicle 接種和 CpG+iPSC 的小鼠之 T 細胞取出，注射進帶有乳腺癌的小鼠中，經過四週的觀察，由上圖可知接種 CpG+iPSC 組別的 T 細胞的小鼠之腫瘤大小明顯小於接種 Vehicle 組別中的腫瘤，該團隊也因此判斷 CpG+iPSC 疫苗接種小鼠的腫瘤免疫是 iPSC 和癌細胞之間共享表位的結果。由實驗結果也可判斷經由接種 CpG+iPSC 小鼠的 T 細胞或許可以用來輔助治療已經產生的乳腺癌腫瘤。(Kooreman 等人，2018 年)



左圖:Kooreman 團隊注射 iPSC 疫苗之流程圖

2021 年時，Xiaoming Ouyang 等人發表了基於 iPSC 的癌症疫苗在胰腺癌中的抗腫瘤作用(Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer) 論文，文中指出該團隊使用自體 CpG+iPSC 疫苗刺激細胞毒性抗腫瘤 CD8 + T 細胞效應和記憶反應，減少免疫抑制性 CD4 + T 調節細胞，並阻止了大部分的胰腺導管腺癌(PDAC)小鼠的腫瘤形成。該結果顯示 iPSC 疫苗對於低突變負擔的癌症 PDAC 也有值得研究的潛力。(Xiaoming Ouyang 等人，2021 年)



Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer 論文圖 1 之 B、C

依據 Xiaoming Ouyang 等人研究結果之圖表可以判斷出 CpG+iPSC(C+I)疫苗可以有效的預防小鼠胰腺導管腺癌。經由 49 天的觀察可以發現 C+I 的腫瘤是最早消失的，而從左圖可以得知 C+I 疫苗使該小鼠之腫瘤明顯小於其他組別的小鼠，證實了 iPSC 對預防小鼠胰腺導管腺癌有正面的效果。

(五) 先前研究和本研究與未來

上述 Kooreman 等人和 Xiaoming Ouyang 等人研究目前只能證明 iPSC 對於多種癌症有正向的影響，而引發上述結果之原因為 iPSC 和癌細胞共享表位，但其餘因子還有待查明，因此本研究將試驗 iPSC 對於活化小鼠免疫系統之成效，探討 iPSC 應用於大腸直腸癌疫苗之可能以及 iPSC 中有益於預防大腸直腸癌的因素。本研究經過質譜儀和數據庫篩選後，選出三種可能候選蛋白，但為了明確確認其專一性，我們使用西方墨點法進行實驗。西方墨點法(使用方法請看實驗方法八)常用以檢測蛋白質的表現量大小，利用特定蛋白能夠結合其特定蛋白抗原的原理進行著色，這樣我們可以確認是否有某蛋白只存在於 iPSC 中。未來相關研究將邁出小鼠研究領域，嘗試建立人類體外免疫系統模型，確認該蛋白在人體的成效。如果證實有效，下一步將會純化該蛋白，希冀能對於大腸直腸癌與其他相關癌症疫苗研究有更進一步的了解與幫助。

貳、 研究方法與過程

一、 研究設備與器材

(一) 本研究所使用的細胞株

小鼠誘導性多功能幹細胞株(C57BL/6 Mouse iPSCs cell line(iPSC))

小鼠胚胎成纖維細胞株(C57BL/6 Mouse Embryonic Fibroblasts line(MEF))

小鼠大腸直腸癌細胞株(C57BL/6 Mouse Cancer 38 line(MC38))

小鼠骨髓 (C57BL/6 Mouse Bone Marrow)

(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(PS) , 15140)

SYBR Green 實時螢光定量 PCR 預混液(Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems)

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(Laemmli sample buffer, 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™)

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

液體封固劑(ProLong™Gold antifade reagent with DAPI, Panion& BF Biotech, Taiwan)

二流蘇糖醇(Dithiothreitol ,DTT No-Weigh™ Format, Thermo Scientific™ Pierce™)

碘乙醯胺(Iodoacetamide ,No-Weigh™ Format, Thermo Scientific™ Pierce™)

(三) 設備與器材

1. 流式細胞儀(FACS , Fluorescence Activated Cell Sorter)
2. 細胞計數器(Cells counter)
3. 迷你濕式轉漬槽(Mini Trans-Blot Cell)
4. 倒立式顯微鏡
5. 恆溫培養箱
6. 無菌操作台
7. 大型離心機



1.流式細胞儀

2. 細胞計數器

3.迷你濕式轉漬槽



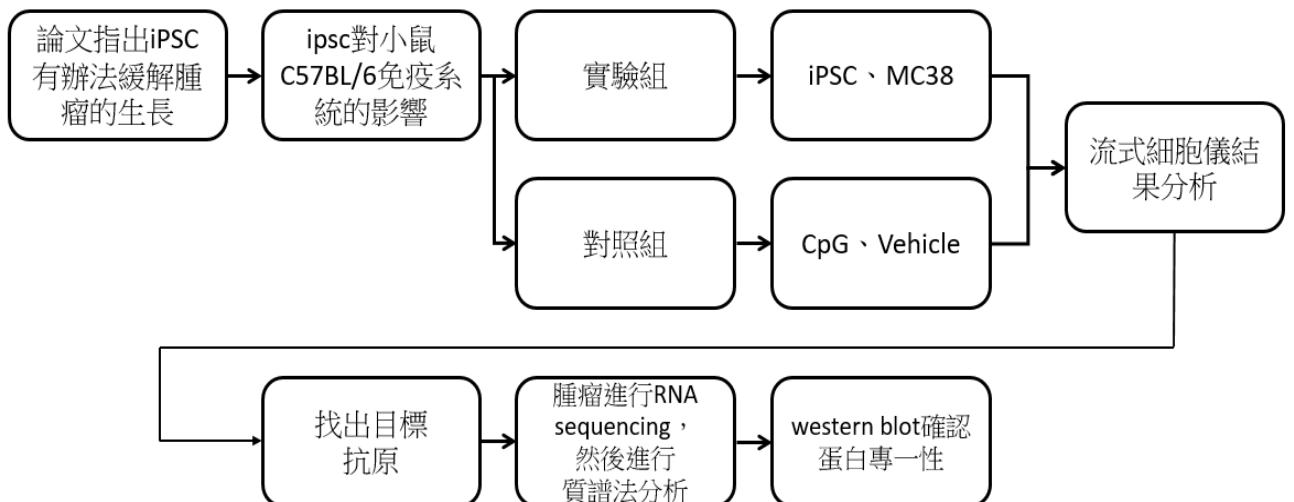
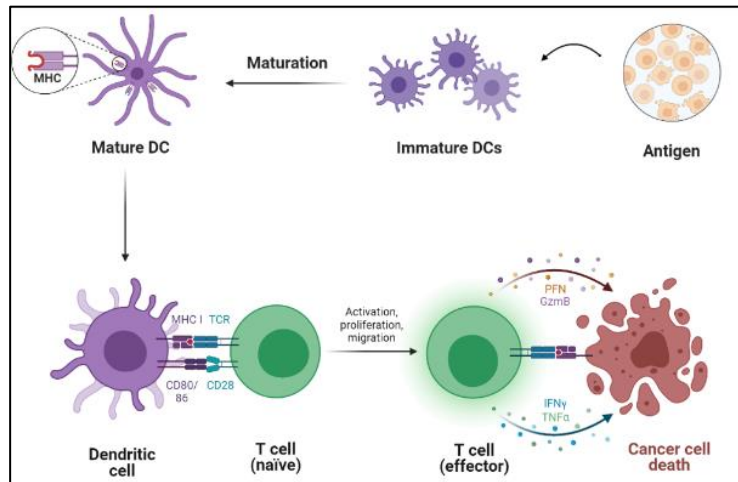
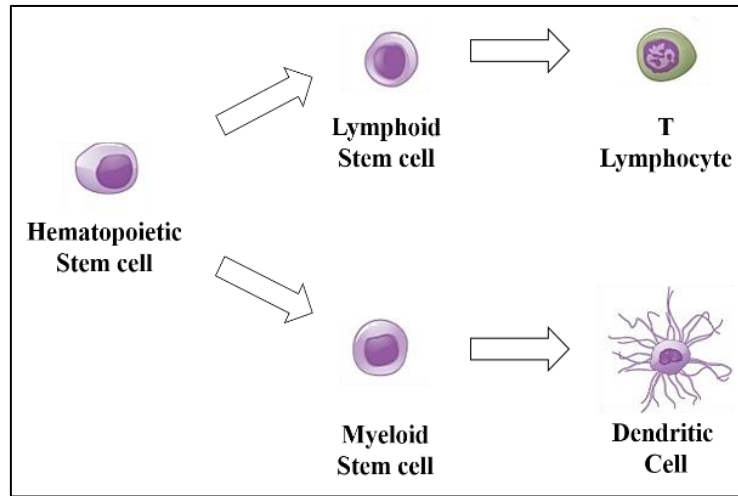
4.倒立式顯微鏡

5.恆溫培養箱 6.無菌操作台

7.大型離心機

上圖為本實驗所用儀器

二、 研究架構圖



參、 實驗方法

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 1 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，需要每天更換並觀察培養基。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 10uM 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、 iPSC 裂解物

本研究所使用之 iPSC 疫苗是將培養的 iPSC 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。

三、 MC38 培養

本研究使用的大腸直腸癌細胞 (MC38) 是來自 C57BL/6 小鼠。將 MC38 培養在 10cm 的培養皿中，每兩天觀察並繼代以及更換 10% FBS DMEM culture medium。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%。

四、 MEF 和 MC38 裂解物

將 MEF、MC38 大批培養後集中離心。每個離心管包含 1×10^8 個細胞，並儲存在 -20°C 的環境中，等待最後的大量頻譜分析。

五、 Mass Spectrometer 質譜儀

用 10 mM dithiothreitol (Thermo Scientific™ Pierce™ DTT No-Weigh™ Format)和烷基化的碘乙酰胺 [iodoacetamide (Thermo Scientific™ Pierce™ Iodoacetamide No-Weigh™ Format)] 20 mM 將裝有樣品的還原。在溶液加入密度 10mg/mL 的胰蛋白酶 [trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega)]，並作用在溫度 37°C 的環境中一整晚。樣品將會藉由壓縮脫鹽和乾燥方便保存。接著使用來自中央研究院生物化學研究所的公用 MS 設施來執行液相色譜法 [The LC-MS/MS (LTQ Orbitrap Velos™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer)] 分析。

六、 流式細胞儀

小鼠犧牲後新鮮收穫的脾臟中製備單個細胞懸液。細胞用緩衝液洗三次，並且使用紅血球裂解液去除紅血球，然後在 4°C 避光環境下進行 CD3、CD4 和 CD8 的染色半小時。接著使用緩衝液洗細胞三次，然後在冰上用碘化丙啶 (Propidium Iodide) 染色 15 分鐘，再使用緩衝液洗三次。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。

七、 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 50ug/30ul。

八、 西方墨點法

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 安培下進行 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。

九、 小鼠骨髓細胞

取出剛犧牲的小鼠股骨以及脛骨，去掉周圍的肌肉，最後用 70% 的酒精浸泡，以消毒細菌。然後切開兩端的骨頭，用含有培養基的注射器沖刷骨髓，直到骨髓變白。將收集培養基進行離心，最後的沉澱的細胞就是骨髓 (BM)。最後，將骨髓與 20 ng/ml 的 GM-CSF 和 10 ng/ml 的 IL-4 共同培養約 6 天，然後分化成樹突狀細胞。

十、 小鼠樹突細胞培養

分化 6 天后，將 2×10^6 個樹突狀細胞播種到 24 個孔中，在含有 0% FBS 的 RPMI 培養基中培養。我們將各組細胞裂解液加入到細胞中，共同培養 24 小時，然後進行 ELISA，測量 IL-6 的數量。

十一、 量化和統計分析

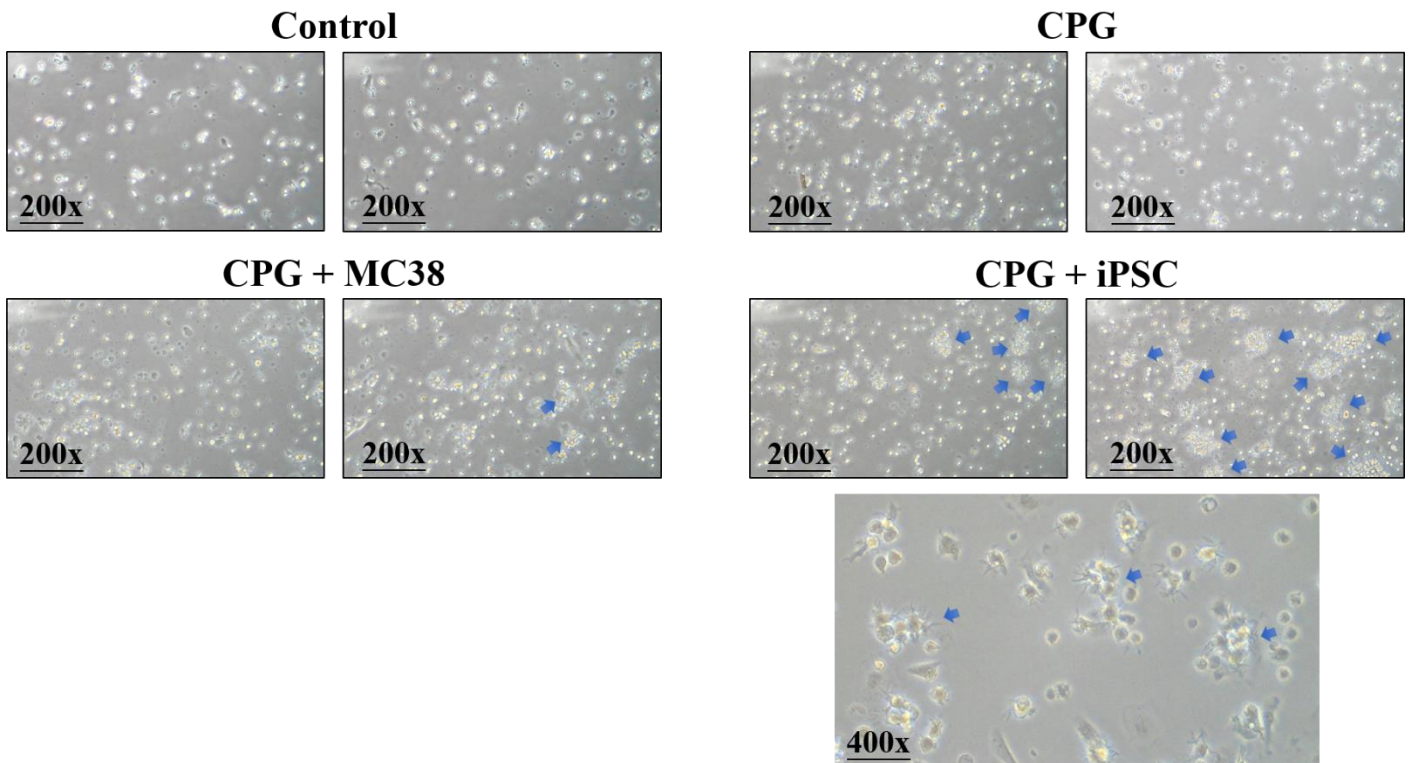
所有數值均以平均值 \pm s.d. 或平均值 \pm s.e.m. 表示，並在圖下註明: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

肆、 研究結果與討論

一、 研究結果

(一) 分析 iPSC 對小鼠 C57BL/6 樹突細胞的影響(實驗一)

首先分析各組別細胞對 C57BL/6 小鼠樹突細胞的影響。在圖一中所看到的團狀細胞(鏈結成團狀，藍色指標)為樹突細胞抓住抗原的形態圖。從圖一判斷會發現 CpG+iPSC 組別具有較多的團狀細胞並且從 400 倍的影像圖中可以觀察到周圍佈滿了樹突細胞。但是樹突細胞是否有被活化還需進一步使用流式細胞儀做檢測樹突細胞的標記物，例如 MHC1、MHC2。

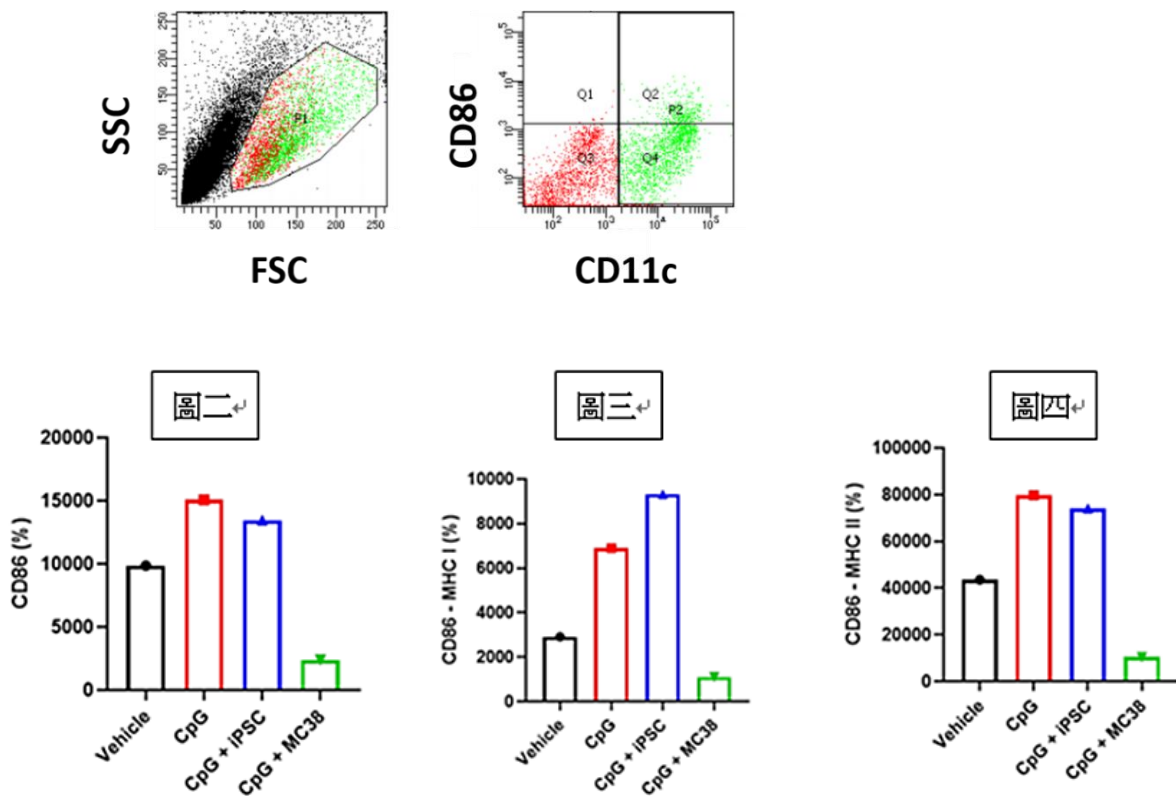


圖一:加入安慰劑(Control)、CpG 佐劑、CpG+MC38、CpG+iPSC 四種不同組別對小鼠

C57BL/6 樹突細胞之影響。骨髓細胞分化完成後去除已被活化之樹突細胞，並分成四組進行實驗。放置八天後所拍攝之實驗結果照片。右下方之圖為 400 倍放大後活化之 DC。

(二) 透過流式細胞儀確認 iPSC 對小鼠 C57BL/6 樹突細胞之影響(實驗一)

為了更清楚了解樹突細胞活化的表現狀態，我們使用流式細胞儀進行細胞圈選，進一步使用 CD11c 以及 CD86 雙標記物來圈選出活化後的樹突細胞。由圖二、三、四的結果圖可以比較各組別的樹突細胞活化狀態，像是 CD86、MHC1、MHC2 分別在各組別中的含量。由於 CPG 組是我們的對照組，因此在此次實驗中我們會比較 CpG+iPSC 組跟 CpG+MC38 組的表現。從結果中，我們發現 CpG+MC38 組各圖結果皆低於 Vehicle 組，判斷 MC38 能抑制樹突細胞活化。圖二可得知 CD86 含量在 Vehicle 組、CpG 組、CpG+iPSC 組都在 10000% 以上，證明樹突細胞有被活化成功。圖三跟四可得知 CpG+iPSC 組 MHC1 含量明顯最多，而 MHC2 含量 CpG+iPSC 組和 CpG 組十分相近，由此可知 iPSC 中的抗原主要可以促使樹突細胞表現 MHC1。MHC1 是活化 CD8+ 的最重要標記物，從而活化毒殺性 CD8+T 細胞，MHC2 則是活化輔助型的 CD4+T 細胞。



圖二、三、四: 實驗一各組別對 C57BL/6 小鼠之樹突細胞活化影響經流式細胞儀檢測出之結果柱狀圖，分別為 CD86、MHC1、MHC2。

由圖二、三、四可判斷 iPSC 對於小鼠 C57BL/6 之樹突細胞活化有所幫助，經由之前發表的論文顯示 Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses In Vivo 和 Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer 可佐證 iPSC 有助於免疫細胞的活化，因此我們為了進一步去了解其中可能之抗原，所以選用西方墨點法(western blot)進行電泳確認。

(三) 西方墨點法分析各蛋白在 MEF、MC38、iPSC 之含量(實驗二)

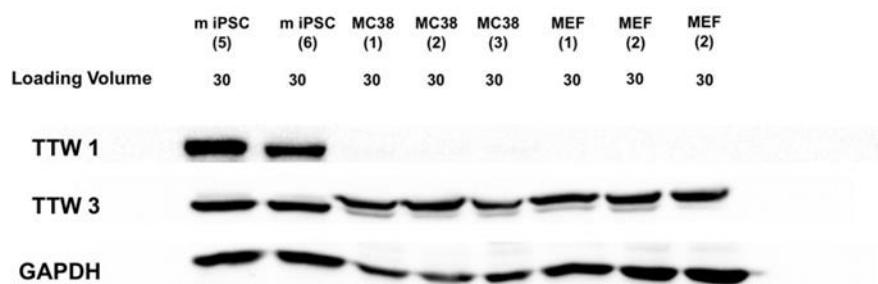
西方墨點法可分離出各種細胞中的蛋白，並透過 marker 判斷目標蛋白所在位置，最後進行照膠判斷該蛋白含量。在實驗初，我們選用 TTW1、TTW3 進行實驗並且每各組別的細胞都至少 N=2。由圖五可知 TTW1 只在 iPSC 含有，TTW3 則在實驗選用的各種細胞中有表現。

各細胞樣本所代表之對象:

iPSC:誘導性多功能人工幹細胞

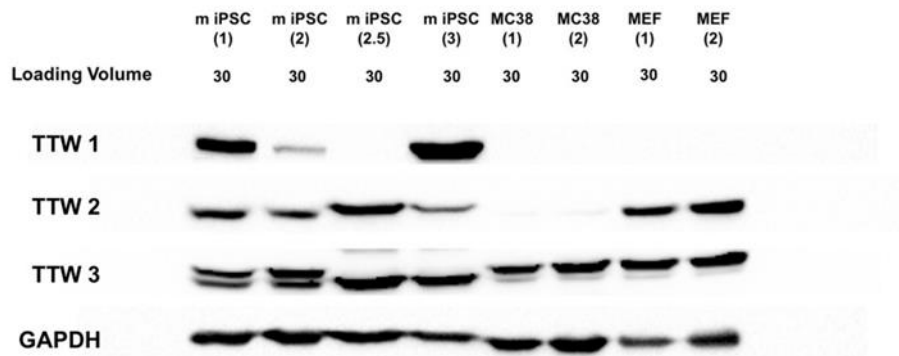
MC38:小鼠大腸直腸癌細胞

MEF:小鼠纖維母細胞(代表體內正常細胞)



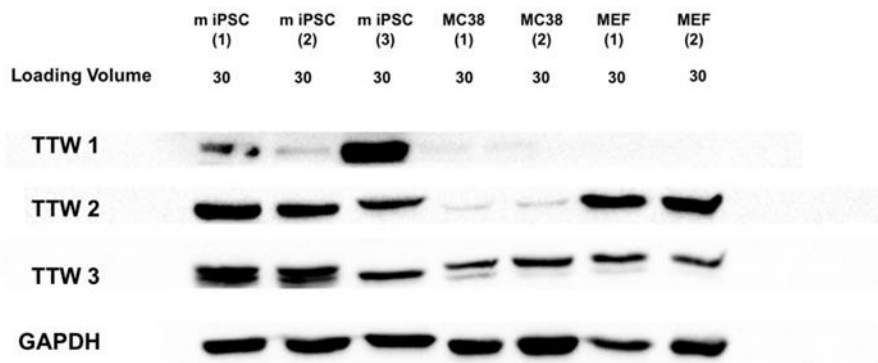
圖五:用西方墨點法測得 TTW1 和 TTW3 蛋白照膠圖。而細胞名稱下方之編號為不同批次之細胞樣本編號。

因應實驗三重複合有利後續實驗結果判讀，在第二次實驗中加入以分化的 iPSC 2.5 來進行實驗，可以發現到分化後的 iPSC 不具有 TTW1 蛋白表現，而稍微分化後的 iPSC 還是具有 TTW1 表現。為了驗證更多蛋白，我們加入了 TTW2 來進行後續實驗，從圖六可知 TTW2 在 MEF 和 iPSC 皆有表現，而已分化的 iPSC 細胞則不表現 TTW1 蛋白。



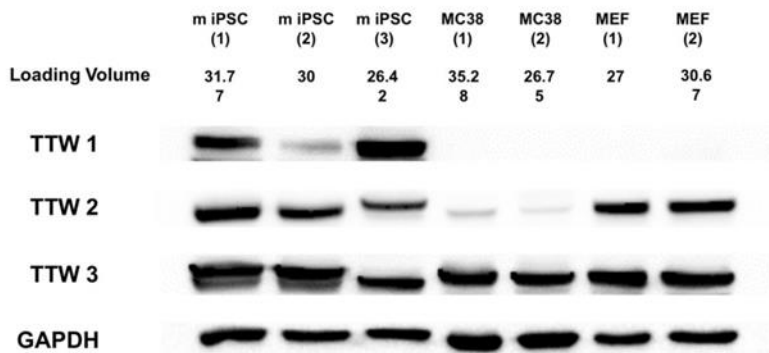
圖六、第二次西方墨點法分析實驗照膠圖。

第三次實驗結果，由圖七可以判斷 iPSC(2)確實是因為幹細胞特性沒那麼強所導致的，因為之後新加入 iPSC(3)健康細胞樣本實驗結果良好，因此 iPSC(2)之結果並不會影響實驗結果判讀。依照本次實驗結果，TTW1 在 iPSC 中以外之細胞樣本皆無表現，TTW2 只在 MC38 沒有表現，TTW3 在各細胞樣本皆由表現。可發現圖中顯示結果有些許歪扭，雖可作為實驗結果之一，但實驗技術還需要再加強。



圖七、第三次西方墨點法實驗照膠圖。

根據第四次實驗結果可發現此結果和圖七之結果相差無幾，可以互相佐證，因此基於以上實驗，我們可以謹慎判斷 TTW1 具有在 iPSC 的專一性，其他細胞未擁有。我們認為 TTW1 是本實驗想找出之目標抗原，且只會在具有幹細胞特性的 iPSC 中表現。

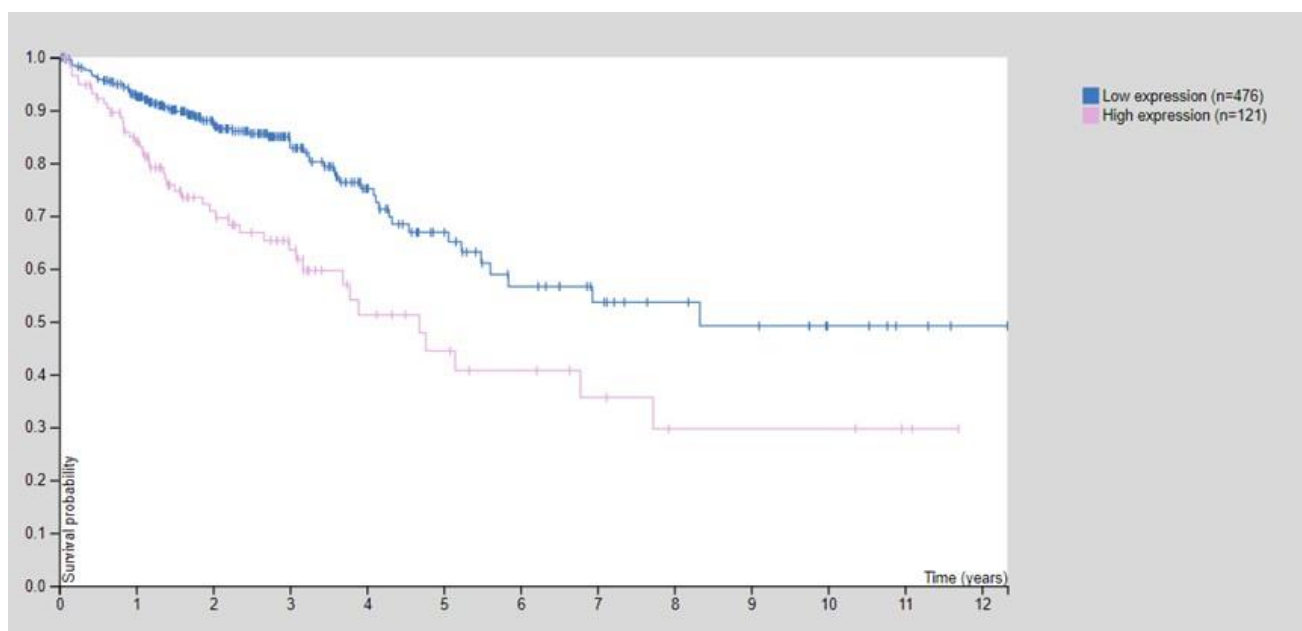


圖八、第四次西方墨點法實驗結果照膠圖。

雖然於結果可知 iPSC(2)中依舊含有 TTW2、TTW3、GAPDH 等，但因其他批次之 iPSC 都含有 TTW1，因此將造成 iPSC(2)結果之原因歸類於培養細胞之過程中導致批號 iPSC(2)走向分化。

(四) The Human Protein Atlas 網站圖表資料

根據 The Human Protein Atlas 網站的圖表資料(圖九)顯示，大腸直腸癌患者中 TTW1 低表現量者在第 5 年存活率可以高達七成，而同時間之 TTW1 高表現量患者存活率僅剩下四成，由此可知在大腸癌患者中檢測到 TTW1 表現量高的存活率較低，而 TTW1 表現量較低者存活率較高，因此推測在大腸直腸癌中 TTW1 表現量高的現象可能可當作癌症情況較嚴重的指標。在我國衛生福利部的衛福部第三期癌症研究計畫癌症監測研究成果中顯示，不論是 1 年還是 5 年存活率大腸直腸癌病患的社經地位有顯著差異(<https://mohwcrp.tw/surveillance/>)。社經地位依據診斷癌症時之投保薪資，高社經地位之投保薪資為 NTD57,800 以上，中社經地位為 NTD15,840-NTD57,779，低社經地位則為 NTD15,840 以下及低收入戶。若是能成功將 TTW1 蛋白有效合成並找出最佳的應用方式，將對未來大腸直腸癌病患得到莫大幫助。預防是我們的初衷，但過程中往往也會遇到瓶頸。拜 iPSC 之賜與發展，讓我們在對抗大腸直腸癌的路上，多了一項武器，期待能幫更多病人找到希望。



圖九、此圖來自於 The Human Protein Atlas 網站，是 TTW1 在大腸直腸癌病人表現高低和病人存活率統計圖。

二、 討論

根據世界衛生組織 WHO 於 2019 年的資料，大腸直腸癌是全球發生率第三高，死亡率第二高的癌症。而現今醫學上的療法還存在諸多副作用，更由於大腸直腸癌同時也是好發率高的癌症，因此與其治療不如預防。找出方式預防大腸直腸癌是現在醫療的未解之謎，也是本篇研究的目的。幹細胞的醫療用途一直是眾多實驗室熱衷的研究主題之一，因為其可以分化成各式功能的細胞，是人類研究再生科學或其他相關領域不可或缺的鑰匙。但礙於科學道德的阻礙，導致對於幹細胞醫療的研究駐足不前。而在 2006 年時，iPSC 打破這般情形。iPSC 全名:人工誘導多功能幹細胞 (Induced pluripotent stem cell)，由日本科學家山中伸彌所發現，是將山中伸彌因子轉錄進一般體細胞中轉化而成，因此無倫理道德的研究問題，在許多醫學領域有極大的貢獻。近來也有許多論文研究指出 iPSC 能預防多種癌症。論文 Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer 將 PBS、iPSC、CpG、CpG+iPSC 注入健康小鼠體內，之後接種腫瘤，經過 49 天的觀察，發現 CpG+iPSC 的預防效果最佳，可使腫瘤消失。研究結果顯示 iPSC 有助於開發胰臟管腺癌和其他癌症的疫苗接種。論文 Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses In Vivo 將 PBS(Vehicle Vaccination)和 CpG+iPSC Vaccination 注入小鼠體內，發現 PBS 跟 CPG 沒有預防效果，而 iPSC 可使腫瘤變小，有預防效果。而將上述已注射 CpG+iPSC Vaccination 的小鼠之 T 細胞轉移至其他腫瘤帶原小鼠體內，發現其腫瘤也因此明顯變小。該研究團隊認為 iPSC 可以有利於多種癌症的預防與治療的原因是其和癌細胞共同表位的結果，但其中詳情還有待後人調查。根據前人研究數據顯示 iPSC 可能在癌症的免疫治療中具有很高的價值。從上述的兩個實驗結果可以知道 iPSC 中的蛋白可能是大腸直腸癌疫苗的候選抗原。因此本篇研究設計實驗試圖尋找 iPSC 中的獨有蛋白。

為了驗證 iPSC 的確能活化小鼠免疫系統，我們將 C57BL/6 小鼠的骨髓細胞取出並分化成樹突細胞，發現 CpG+iPSC 使小鼠樹突細胞標記物 MHC1 含量提高，而 CpG+MC38 則是抑制小鼠樹突細胞，這結果顯示 iPSC 可以幫助活化小鼠的樹突細胞，並且根據之前的文獻顯示 MHC1 是會促使殺手 T 細胞增加。在實驗二中，我們選用三種蛋白分別給予代號 TTW1、TTW2、TTW3，透過我們反覆設計實驗並多次使用西方墨點法(western blot)跑電泳並且確認到在具有幹細胞特性的 iPSC 中才有 TTW1 蛋白。這項實驗推測 TTW1 可能是使小鼠樹突細胞標記物 MHC1 增加的原因之一，並且我們在 The Human Protein Atlas 網站確認了 TTW1 在人類大腸直腸癌具有高度的表現量，證明 TTW1 具有開發大腸直腸癌疫苗的研究價值。

基於上述實驗結果，發現了 TTW1 蛋白只表現在幹細胞特性強的 iPSC，這也代表 TTW1 是只有在幹細胞特性強的細胞株中才會存在的蛋白。這結果顯示 TTW1 可能是造成論文 Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer 和論文 Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses In Vivo 實驗可以成功的原因之一。推論依據是因為我們實驗中發現 TTW1 蛋白在分化後的 iPSC 細胞株會逐漸的被抑制，因此我們要抑制癌症幹細胞則需要具有幹細胞特性的蛋白，而這些蛋白不會存在於其他種類細胞中 ex:MC38、MEF。除此之外我們也希望製作出來的疫苗不會影響到太多的正常組織跟細胞，因此選擇具有幹細胞特性的蛋白將會減少許多免疫上所應引發的問題。從這些結果中我們認為 TTW1 是非常具有潛力的蛋白，因此我們會跟著研究團隊更深入探討 TTW1 蛋白的抑制癌症效果，並且希望這個蛋白有機會預防大腸直腸癌的產生。這篇研究的初步結果也是我們所樂見的研究結果。

伍、 結論與應用

一、 結論

根據實驗一跟二的樹突細胞分化以及活化結果， CpG +iPSC 組別在樹突細胞活化實驗中 MHC1 的表現量明顯高於 CpG +MC38，CpG + iPSC 的樹突細胞可以表現大量的 MHC1 對我們來說是非常好的結果，因為 MHC1 類型的樹突細胞可以活化具有毒殺性的 CD8 細胞，所以 CpG + iPSC 的結果是可觀的。

接著我們利用西方墨點法(western blot)確認候選蛋白在各細胞中是否存在。根據實驗二結果發現 TTW1 只有在具有幹細胞特性的 iPSC 才出現，而 TTW2 則會分別在 iPSC 和 MEF 中表現，則認為 TTW2 是原本就存在 MEF，因此在進行基因重新編程以後才沒有消失。TTW3 則是在 iPSC、MEF、MC38 中表現，因此我們認為這個蛋白是維持各細胞之間的正常生理功能。基於以上的實驗結果，我們排除了 TTW2 跟 TTW3 的主要原因是這類型的蛋白不具有針對癌症幹細胞的特性，因此被當作疫苗以後有可能會攻擊正常的組織以及細胞，從而引起免疫相關的問題。接著，我們利用了人類蛋白資料庫來進行驗證，從結果中發現到人類大腸直腸癌的病人中會高度表現 TTW1 蛋白，因此推論 TTW1 可能是造成 iPSC 疫苗可以成功預防大腸直腸癌的其中一個原因，並且我們認為這個蛋白有助於大腸直腸癌疫苗之開發。

二、 應用

大腸直腸癌是高發生率之癌症，其治療方式多為手術切除，再搭配化療或放射線治療進行輔助，但以上這些療法會使大部分病患生活不便，例如需裝上人工肛門等等不便之處，再加上大腸直腸癌第四期的存活機率低於 1%。我們認為本研究主要在探討大腸直腸癌疫苗製造之可能性與其關鍵抗原，應用於發生率高的大腸直腸癌預防，藉由 iPSC 對 C57BL/6 小鼠樹突細胞之影響和 TTW1 之發現，這將會促使預防疫苗研究以及大腸直腸癌研究多了一點發現，就算在開發疫苗過程中不如預期。我們仍可以把 TTW1 蛋白當作治療大腸直腸癌的藥物或是大腸直腸癌的癌症的健康檢測指標之一來進行後續研究跟應用。

陸、 參考文獻

- 一、王淮捷、賴守義 2022 年陽明交通大學生技小論文 癌不住你誘導我個人通訊
- 二、李建智 2020 淺論誘導性多功能幹細胞 (iPS 細胞)
<https://www.prsa.org.tw/people/education/content.php?id=50>
- 三、臺灣癌症基金會 大腸直腸癌- Colorectal Cancer
<https://www.canceraway.org.tw/cancerinfo.php?id=633D2D44-EC10-49BD-B7CF-E05EF6F7623A>
- 四、Becton, Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide USA. Dickinson and Company, 1-58; 2002
- 五、Inés Mármol, Cristina Sánchez-de-Diego, Alberto Pradilla Dieste, Elena Cerrada and María Jesús Rodríguez Yoldi 2017 Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. Molecular Classification of Human Cancer: Diagnosis and Treatment 18 (1) , 197
- 六、Julia Stiegelmaier , PhD,Jonathan Benjamin , MD PhD &Dirk Nagorsen , MD PhD. Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer. Volume 15, Issue 8
- 七、Kavitha Yaddanapudi, Chi Li, John W. Eaton 2018 Vaccination with induced pluripotent stem cells confers protection against cancer Cell Stem Cell ;22:501-13.
- 八、Kazutoshi Takahashi , Shinya Yamanaka 2006 Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors Cell ;26(4):663-76
- 九、Klarisa 2000 A GUIDE TO SUCCESSFUL WESTERN BLOTTING
<https://media.cellsignal.com/www/pdfs/resources/product-literature/application-western-blotting-guide.pdf>
- 十、Min Hwa Shin, Junghee Kim, Siyoung A. Lim, Jungwon Kim, Seong-Jin Kim,corresponding and Kyung-Mi Lee. NK Cell-Based Immunotherapies in Cancer. Immune Netw. 20(2): e14
- 十一、 National Geographic 2018 Cancer 101 | National Geographic
<https://www.youtube.com/watch?v=OcpCOnaqCF4>
- 十二、 Nigel G. Kooreman, Youngkyun Kim, Patricia E. de Almeida, Vittavat Termglinchan,

Sebastian Diecke, Ning-YiShao, Tzu-TangWei, Hyoju Yi, Devaveena Dey, Raman Nelakanti, Thomas P. Brouwer, David T. Paik, Idit Sagiv-Barfi, Arnold Han, Paul H.A. Quax, Jaap F. Hamming, Ronald Levy, Mark M. Davis and Joseph C. Wu Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses in Vivo. *Cell Stem Cell* 22,501-513, April 5, 2018

十三、 Peter M. van Galen and Martin C. Feiters Mass Spectrometry: part of the Instrumental Analysis in (Bio)Molecular Chemistry Course. Department of Organic Chemistry Molecular Chemistry Cluster nstitute for Molecules and Materials Faculty of Science Radboud University, Nijmegen. 1-65; 2016

十四、 Ralph Schneider; Clinical Diagnosis and Therapy of Colorectal Cancer ;731 Gull Ave, Foster City, CA 94404, USA. y OMICS Group eBooks ;1-14; 2015 Mar.

十五、 Sattva S. Neelapu, Sudhakar Tummala, Partow Kebriaei, William Wierda, Cristina Gutierrez, Frederick L. Locke, Krishna V. Komanduri, Yi Lin, Nitin Jain, Naval Daver, Jason Westin, Alison M. Gulbis, Monica E. Loghin, John F. de Groot, Sherry Adkins, Suzanne E. Davis, Katayoun Rezvani, Patrick Hwu & Elizabeth J. Shpall. 2018 Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 15, pages47–62W

十六、 Sofia Farkona, Eleftherios P. Diamandis and Ivan M. Blasutig. 2016 Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine*. 14 73

十七、 The Human Protein Atlas(人類蛋白大數據庫)

<https://www.proteinatlas.org/search/Colon+cancer>

十八、 Xiaoming Ouyang, Yu Liu, Yang Zhou, Jing Guo, Tzu-Tang Wei, Chun Liu, Bomi Lee, Binbin Chen ,Angela Zhang, Kerriann M. Casey, Lin Wang, Nigel G. Kooreman, Aida Habtezion, Edgar G. Engleman and Joseph C. Wu. Antitumor effects of iPSC-based cancer vaccine in pancreatic cancer *Stem Cell Reports* Vol.16 1468-1477, June 8, 2021

【評語】 090018

此作品利用 iPSC 找到 TTW1 可能為促進 DC 細胞增加 MHCI 表現的蛋白，顯示 iPSC 具有增加抗原呈現的功能。並以 human protein Atlas 資料庫中分析 TTW1 與大腸癌預後較差有關。利用 iPSC 作為癌症疫苗為相對新穎的發展策略，若能進一步證實 iPSC 中 TTW1 的蛋白特性與功能，釐清其在大腸直腸癌中的角色與功能，是否確實能增加 DC 抗原呈現功能，未來對癌症疫苗的發展應有所貢獻。實驗結果並不足以解釋 TTW1 蛋白就是造成腫瘤縮小的主要蛋白，中間有許多 gap 需要更多實驗去證明這之間的關聯性，尚需進行更深入的機制探討。