

# 中華民國第 61 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

052006

激增殺手 T 細胞的水膠細胞平台於免疫療法的  
應用

學校名稱：臺北市私立復興實驗高級中學

作者： 高二 廖韋俐	指導老師： 馬瑪宣
---------------	--------------

關鍵詞：免疫療法、T 細胞激活、細胞基質軟硬度

## 摘要

本研究研發新型水膠細胞優化技術，將天然抗原呈現細胞做成平台，成功提供 MHC-I、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 aAPCs 基質的軟硬度對 T 細胞增生程度的影響。我們利用水膠細胞易改變細胞基質軟硬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。結果顯示高細胞基質硬度(120kPa)的 aAPCs 擁有高程度的 T 細胞激活潛力，相對於低細胞基質硬度(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。

## 壹、研究動機

### 一、文獻探討

癌症已經蟬聯 38 年國人十大死因的榜首，台灣每年約有超過 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

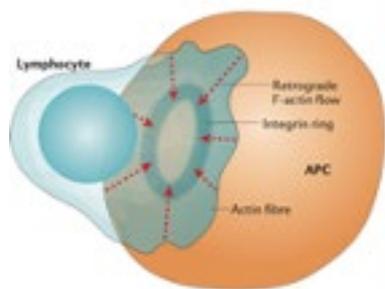
現今的免疫療法分為藥物治療、細胞治療以及疫苗，三種方法。而最具有專一性及療效反應突出的是細胞治療。而針對特定抗原的有效 T 細胞刺激和增生，是現今針對傳染病和癌症的免疫療法的主要目標。藉由將 T 細胞以及樹突細胞在體外強化培養，培養具有專一性攻擊能力的 T 細胞，運用於 T 細胞輸入療法。

## 現今研究在人工抗原呈現細胞上的限制

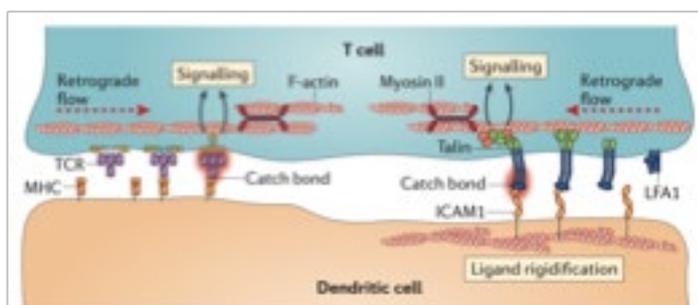
由於天然的 APCs 細胞難以保存抗原的特定表型，且培養細胞的過程耗損許多人力及材料資源，許多研究致力於研發人工的 APCs。研究方向主要致力在探討材料的特性、大小的不同和免疫細胞在體外擴增的關係(John W, *et al.*, 2017)。有些研究會製造不同材質的介面，並添加抗原，利用控制 aAPCs 表面的抗原密度來調控免疫細胞的增生與分化(David K.Y. Zhang, *et al.*, 2020)。深入探討，可以發現現今的技術牽涉到細胞膜的流動性、細胞的立體結構、密度以及細胞膜上的配體接合狀態，因此製程困難耗時，且在體外擴增的 T 細胞要輸入回患者體內時很可能喪失其特定表型。

## 免疫細胞能感知外在機械力

目前已知抗原呈現基質表面所構成的機械力對淋巴激活信號有很大的作用，由 APC 提供的肌動蛋白逆行流會影響細胞間黏附因子和肌動蛋白的結合蛋白之間的鍵結持久度。MHC 和 TCR 間的外源性胜肽的接合會進而影響 TCR 誘導的  $Ca^{2+}$  離子通量，供 T 細胞本身更大的激活訊號，進而影響到其激活的程度。



圖一、由APC的機械力和淋巴細胞的交互關係



圖二、TCR、MHC及細胞間黏附因子和受機械力而影響鍵結程度(來源：Morgan Huse,2017)

## 二、實驗動機

細胞免疫療法是癌症及感染症治療最具專一性且療效顯著的方法，然而在體外培養擴增 T 細胞需要耗費許多的人力及材料資源，且將擴增的 T 細胞重新植回患者體內時可能會喪失其特定表型。文獻也顯示，TCR 和 MHC 會受機械力作用，進而影響 T 細胞的擴增。因此本

實驗想研發一個新興的人工抗原呈現細胞平台，希望未來能有機會直接在體內擴專一性 T 細胞，並且透過簡易的方式能調控 aAPCs 的基質軟硬度，進而促進專一性 T 細胞的激活及擴增。要完成這項目標，需考量到極高的生物相容性，本實驗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。

## 貳、研究目的

- 一、研發新型水膠細胞優化技術將小鼠樹突細胞胞內成膠狀
- 二、借由改變小鼠樹突細胞胞內基質的軟硬度調控胞毒型 T 細胞的增生程度
- 三、檢測水膠優化後小鼠樹突細胞的生物相容性及免疫相容性

## 參、研究設備及器材

### 一、細胞株:

本研究採用的細胞株為小鼠的樹突細胞 JAWS II，是天然的抗原呈現細胞

### 二、藥品及試劑

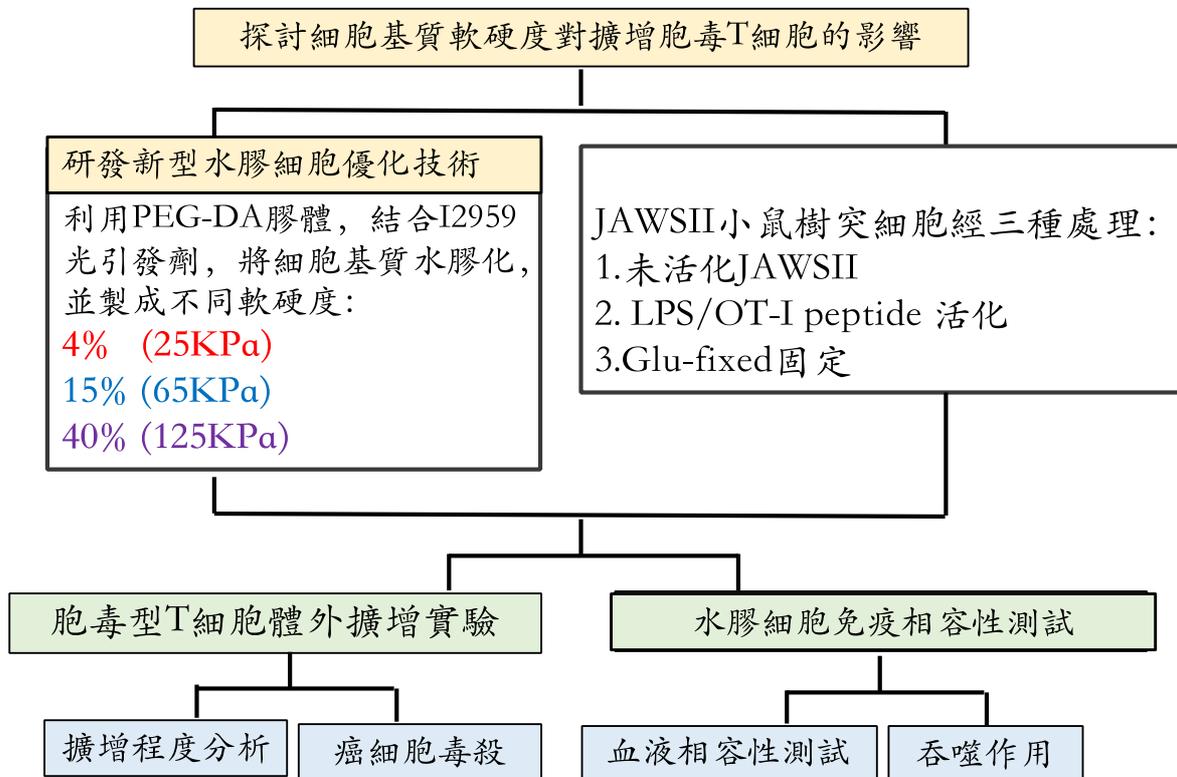
MEM 培養基（Minimum Essential Media）、[-] phenol red medium、DMSO 細胞抗凍劑（Dimethyl Sulfoxide）、Trypsin、GM-CSF、PBS、PEG-DA、I2959、sodium citrate buffer、calcium chloride、LPS、CD8a antibody、RPMI、CD47 antibody、CD47 isotype、Hoechst 33342 dye、CFSE、CCK-8 Kit

### 三、器材

細胞培養箱、電動吸管、微量吸管分注器、真空吸取器、無菌操作台、恆溫水浴槽、10 公分培養皿、冰塊、離心機、15mL 離心管、50mL 離心管、24 孔盤、96 孔盤、重複使用式細胞計數片、流式細胞儀、UV-crosslinker 照射儀、超音波洗淨機、微盤分析儀

## 肆、研究過程或方法

### 一、研究架構圖



### 二、細胞培養

將小鼠樹突細胞細胞株: JAWS II 培養於含 Ribonucleotides、Deoxyribonucleosides、4 mL-glutamine、1 mM sodium pyruvate、5 ng ml<sup>-1</sup> 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%CO<sub>2</sub>、37° C 之細胞箱培養。

### 三、細胞繼代

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。

### 四、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  $\mu$ L PBS 及 1.1  $\mu$ 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。

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

將細胞以  $5 \times 10^4$  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。

### 六、從 PBMC 中分離 T 細胞

每  $10^7$  的 PBMC 加入 80  $\mu$ L 的 Buffer 與 20  $\mu$ L 的 CD3 Microbeads(MACS® cell separation)，混合後在 4°C 作用 15 分鐘。每  $10^7$  的細胞加入 1 至 2mL 的 Buffer 清洗，以 300 XG 離心 10 分鐘，移除上清液，接著以 500ul 的 buffer 回溶細胞。以 500  $\mu$ L 的

buffer 潤洗放置在 MACS Separator 上的 MACS Column，加入回溶細胞，潤洗三次，移除 MACS Column。加入 1mL 的 buffer 並以活塞輕推即完成。

## 七、胞毒型 T 細胞增生及毒殺

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膠細胞。將 CFSE 標記的 OT-1 細胞在 RPMI 中與活 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。將細胞用大鼠抗小鼠 CD8a 抗體染色，通過流式細胞儀進行分析。以 1:5 的比例共同培養 EG7-OVA 細胞和 CD8+T 細胞，另將 control 細胞與 EG7-OVA 細胞共同培養作為對照組。培養 72 小時後，以流式細胞儀分析癌細胞的存活率以得知擴增出來的 T 細胞的毒殺效果，共進行三次實驗。

## 八、吞噬作用實驗 (Phagocytosis assay)

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，再繼續做製成水膠細胞的實驗，以便後續實驗觀察。將吞噬細胞以  $5 \times 10^4$  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。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。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。

## 九、血小板聚集測定 (Platelet Aggregation Assay)

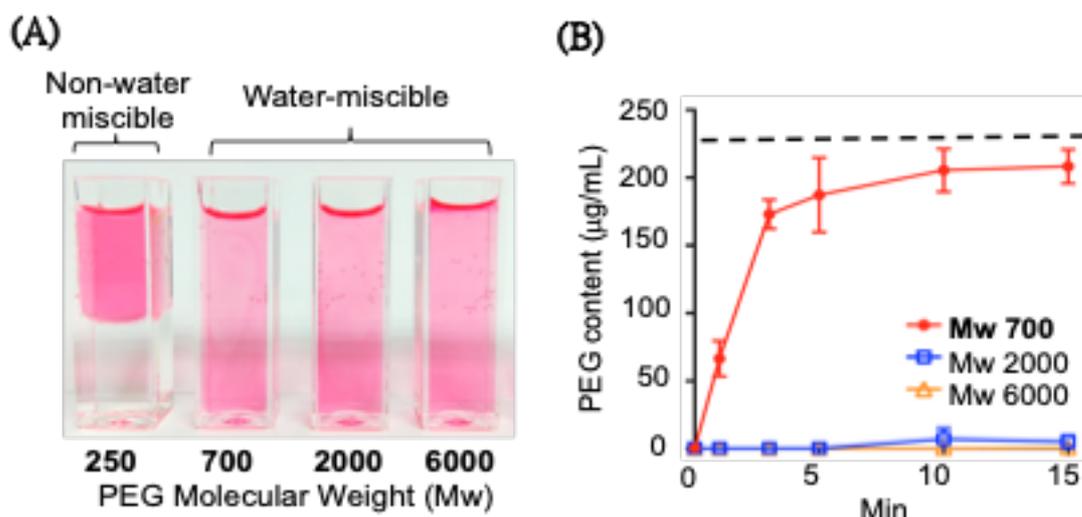
配置 0.106mol/L(M) 檸檬酸鈉緩衝液、0.075mol/L(M) calcium chloride 以 50uLPBS 回溶、備好  $6 \times 10^6$  個 GC、Glu-fixed cell、Live cell。準備以 1:20 的比例 activated zymosan。

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。

## 伍、研究結果

### 一、研發新型水膠細胞優化技術將小鼠樹突細胞胞內成膠狀

#### (一) 篩選不同分子量的聚乙二醇雙丙烯酸酯



圖三. 不同分子量的聚乙二醇雙丙烯酸酯(A)與水相容性(B)細胞膜穿透實驗

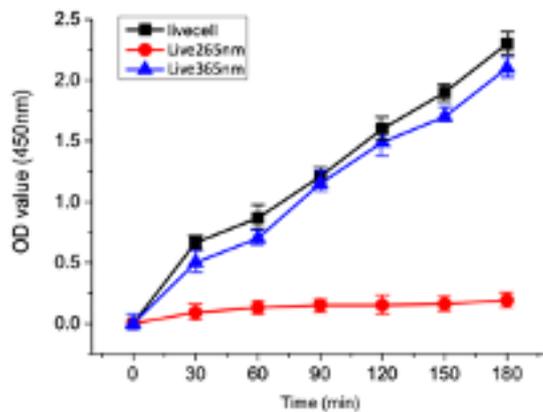
1. 聚乙二醇雙丙烯酸酯擁有黏稠性、柔軟性和天然細胞組織相似，因此本實驗選用其作為細胞內水膠化的材料。實驗顯示分子量 250 的 PEGDA 無法與水相溶。
2. 取分子量 700、2000 及 6000，200 µL 的 PEGDA 加入 20 µL I2959/DMSO，充分混合均勻。將 PEG-DA + I2959 緩慢地沿著管壁加入細胞中，在室溫靜置反應 5 分鐘，離心 500 XG，移除剩餘上清液。再以 500 µL 的 [-] phenol red medium 回溶 pellet，快速混合均勻，以 UV-crosslinker 照射。形成細胞內水膠化後，加入 200 µL 的十二烷基硫酸

鈉 (Sodium dodecyl sulfate, SDS)，充分混合後，使用 ELISA 測定吸光度值，並和對照組比對，換算其穿透細胞膜的速率。

3. 在細胞膜穿透實驗中，數據顯示分子量 2000 及 6000 的 PEGDA 穿透能力差，因此選用分子量 700 的 PEGDA 作為後續實驗的材料。

## (二) 篩選激發水膠的雷射光波長- CCK-8 細胞毒性試驗

藉由 WST-8 被活細胞內的脫氫酶還原成水溶性 橘黃色產物，來測定活細胞。實驗結果顯示活細胞有良好呈色反應。365nm 波長的紫外光不會對細胞及細胞膜造成損傷，照射 265nm 波長的紫外光則使細胞損壞。因此本實驗後續以 365nm 波長的紫外光激發細胞內的水膠。

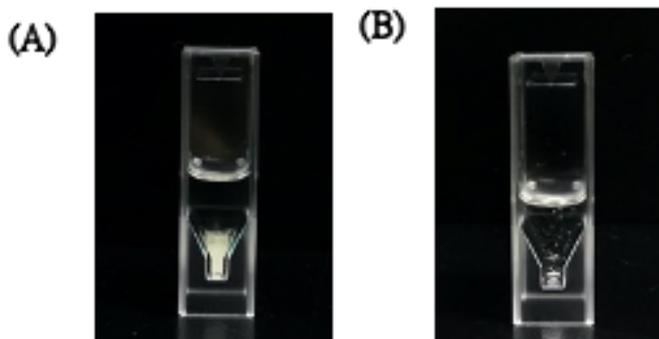


圖四. CCK-8 細胞毒性試驗吸光值

## (三) 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。



圖五. 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. 細胞內的水凝膠化實驗

- 建立細胞內水凝膠化技術須考慮三個因素：一、使用低分子量的親水性交聯單體來促進細胞質滲透。二、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。三、最小化細胞外交聯，防止細胞膜的表面抗原被掩蓋。
- 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。

- (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  $\mu$ L 的 DMSO（溶解後為很淡的黃色）。
- (2) 取 200  $\mu$ L 的 PEG-DA（MW 700），加入 20  $\mu$ L 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細胞中，充分混合均勻。

GC %	4%	15%	40%
PEG-DA + I2959	40 $\mu$ L	150 $\mu$ L	400 $\mu$ L
Medium containing cells	800 $\mu$ L	250 $\mu$ L	600 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	160 $\mu$ L	600 $\mu$ L	0 $\mu$ L
Total	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L

表一. 細胞內水膠配置比例 (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）。

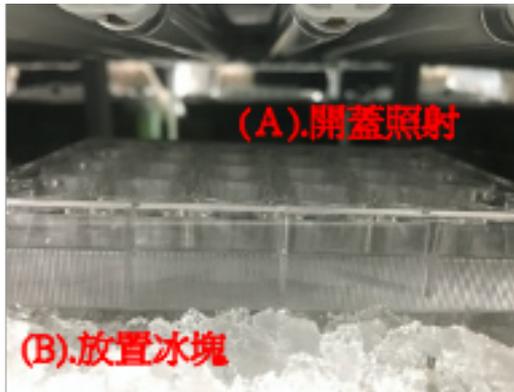
(6) 離心 500 XG，5 分鐘



圖九.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。

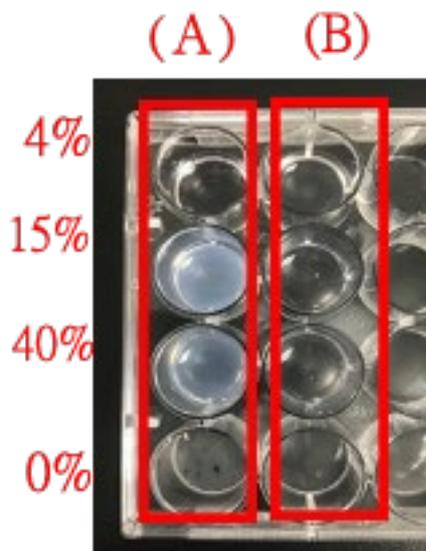
(7) 取 500  $\mu$ L 上清液為 positive control (load 在其中一個 well)，移除剩餘上清液。再以 500  $\mu$ L 的 [-] phenol red medium 回溶 pellet，快速混合均勻，load 至 well 內。

(8) 將 24 孔盤放置於含冰的鐵盤中，打開其蓋子，以 UV-crosslinker 照射



圖十. 細胞盤內照射紫外光(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。

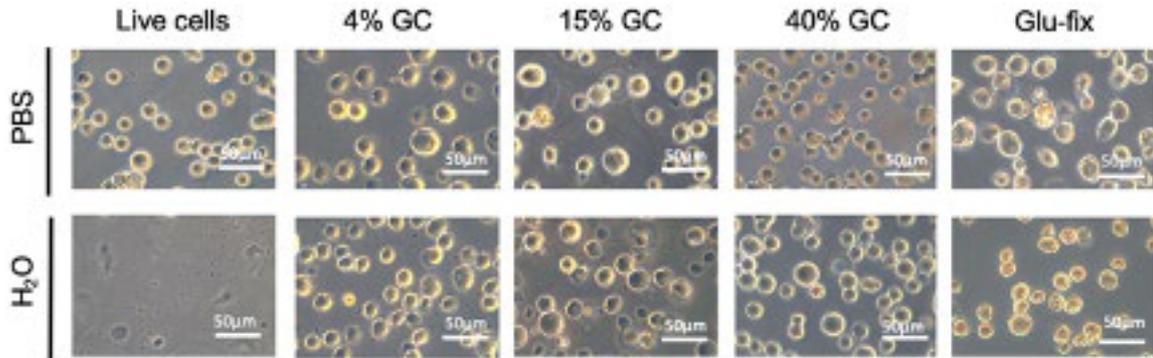
(9) 將 24 孔盤內細胞移至 eppendorf 內，離心 1000 XG，5 分鐘，移除上清液，以[-] phenol red medium 回溶。



圖十一.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  $\mu$ L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。

(四) 水膠化小鼠樹突細胞(G-DCs)形態特性觀察

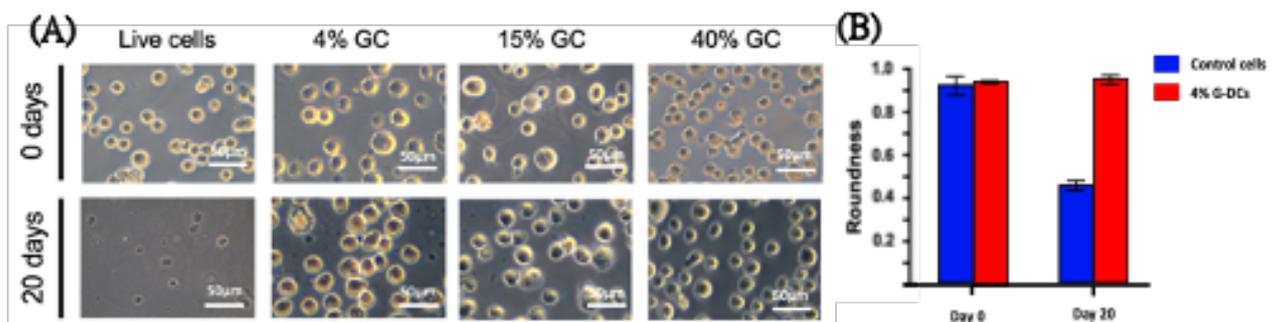
1. 不濃度水膠細胞和正常細胞在 PBS 和水中的細胞形態比較



圖十二.水膠細胞形態觀察。

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形態表現。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。

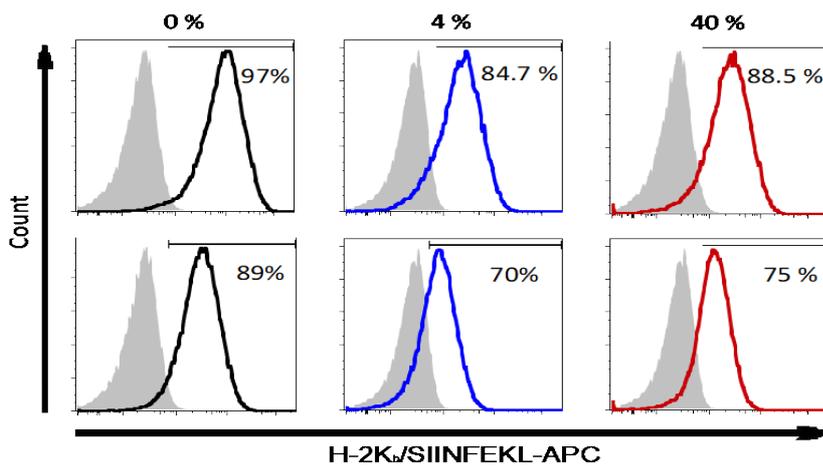
2. 放置二十天後的水膠細胞(G-DCs)形態觀察



圖十三.(A)放置二十天水膠細胞和正常細胞形態比較(B)穩定性比較

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。顯示水膠化的 APCs 能在沒有人力及材料成本的培養下維持其形態的高度穩定性。

#### （五）水膠化小鼠樹突細胞(G-DCs)的 MHC-I 呈現量試驗



圖十四.水膠細胞的 MHC-I 表現率

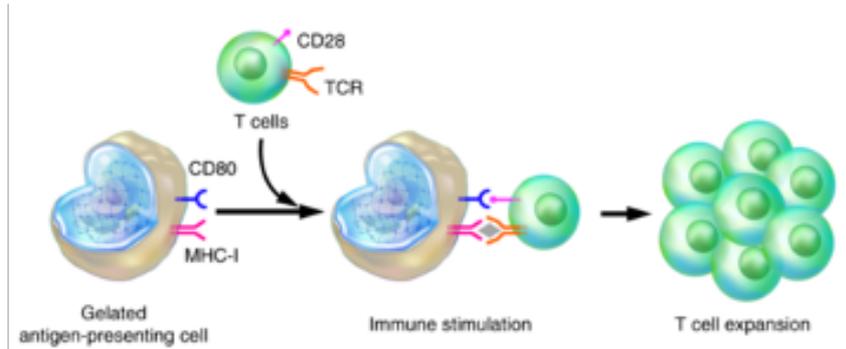
以 FC 分析水膠細胞的 MHC 表現率，得到 40%水膠細胞的 MHC-I 表現率為 88.5%，使用 LPS 及 OT-I peptide 活化後表現率為 75%。

## 二、借由改變小鼠樹突細胞胞內基質的軟硬度調控胞毒型 T 細胞的增生程度

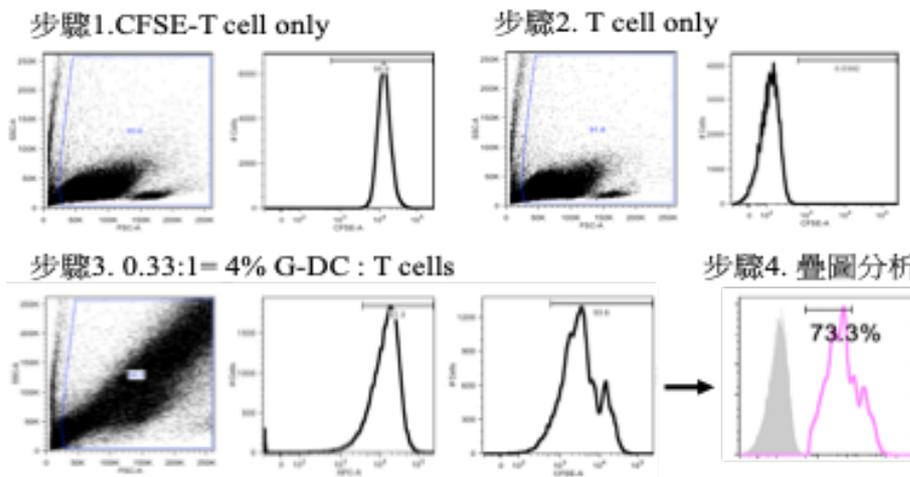
### （一）實驗前置

- 使用 LPS 活化 JAWS II 細胞 24 小時。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；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，此種協同受體提高了 T 細胞受體在功能上的特異性，延長了 T 細胞與抗原呈遞細胞的作用時間。



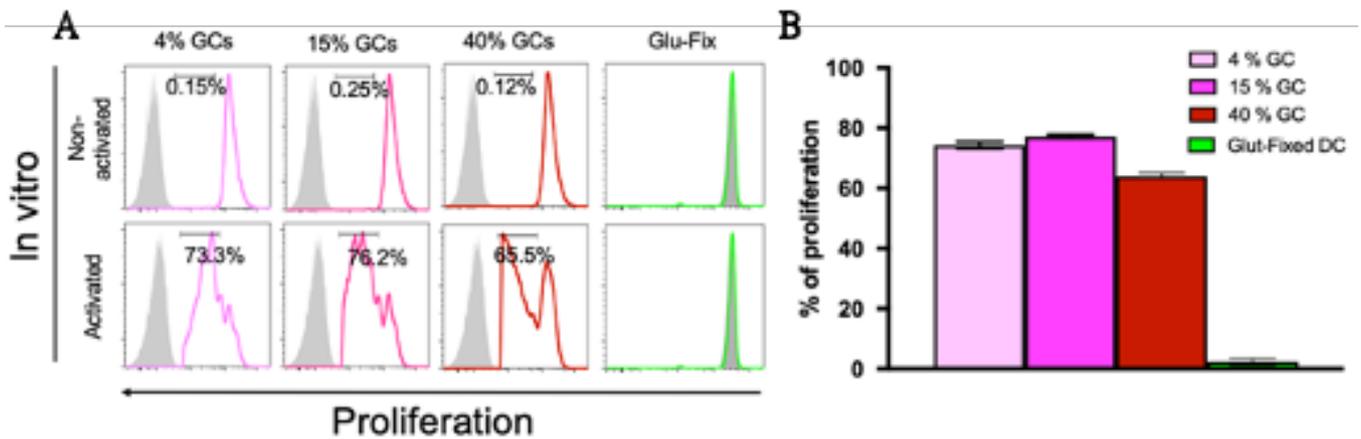
圖十五. T 細胞和APC之間相互作用的示意圖。(來源：Jung-chen Lin .et al., 2019)。



圖十六. 細胞流式分析儀初始數據二維點散圖。由三個圖疊圖分析得T細胞擴增程度。

## (二) 實驗結果分析

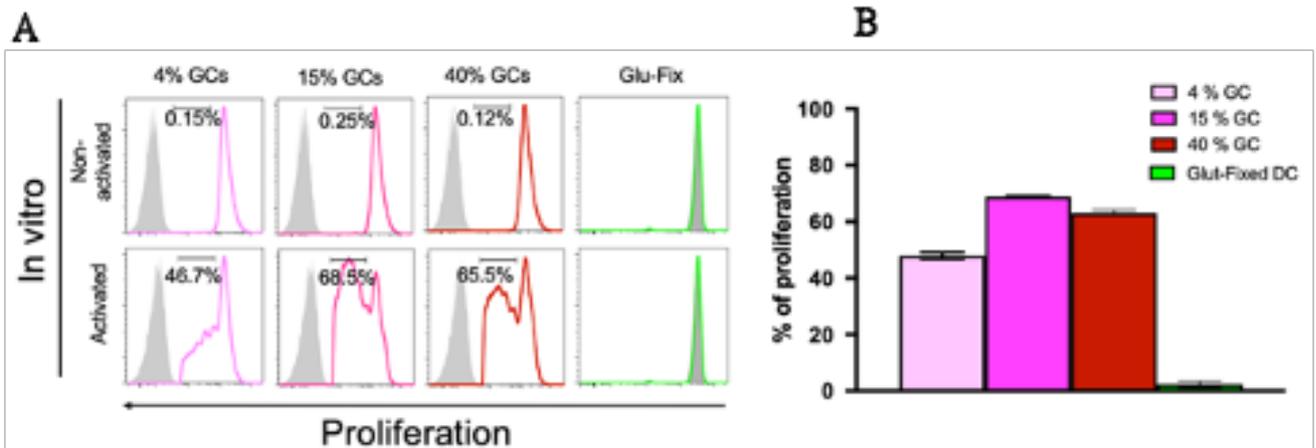
1. G-DCs: OT-I T cells= 0.3333:1, Day3



圖十七.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。G-DCs: OT-I T cells=  $4 \times 10^4$ :  $12 \times 10^4$ = 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。

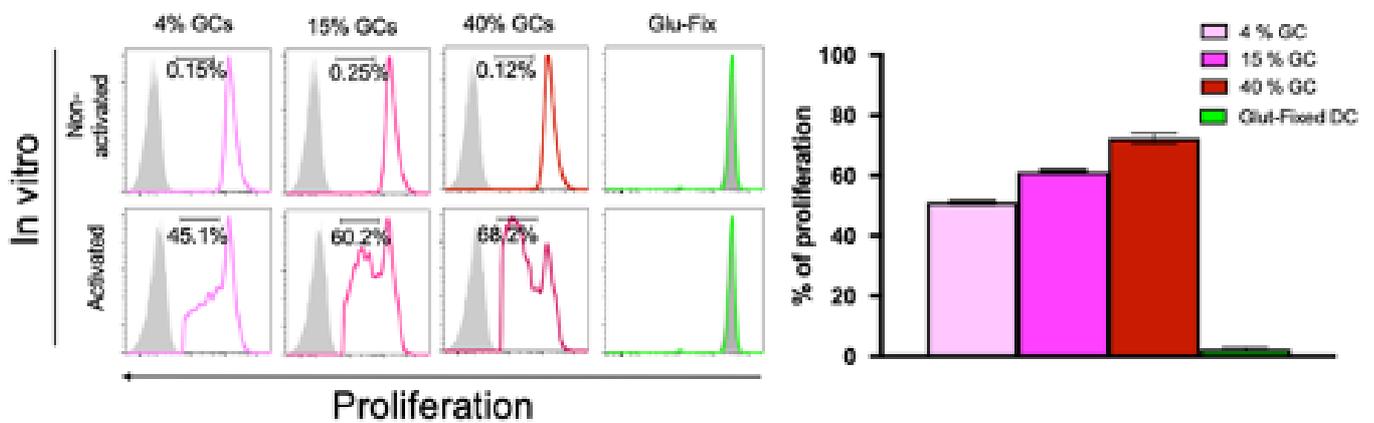
2. G-DCs: OT-I T cells= 0.221: 1, Day3



圖十八 .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。G-DCs: OT-I T cells=  $2.66 \times 10^4$ :  $12 \times 10^4$ = 0.221: 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=0.221:1 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-I 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。

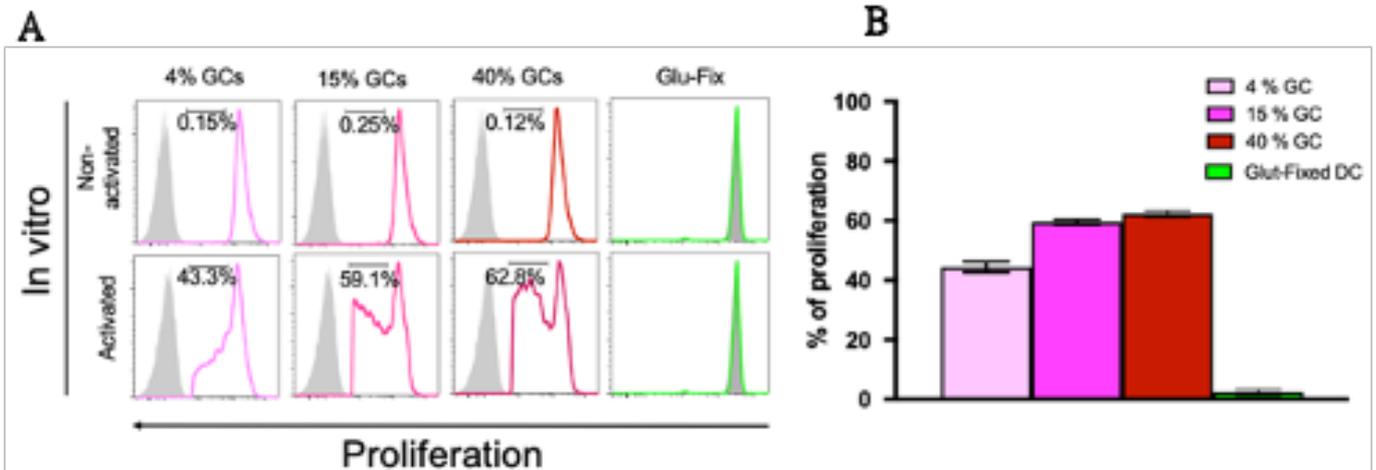
### 3. G-DCs: OT-I T cells= 0.11: 1; Day3



圖十九 .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G-DCs: OT-I T cells= $1.33 \times 10^4$ :  $12 \times 10^4$ = 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%。

#### 4. G-DCs: OT-I T cells= 0.0555:1; Day3



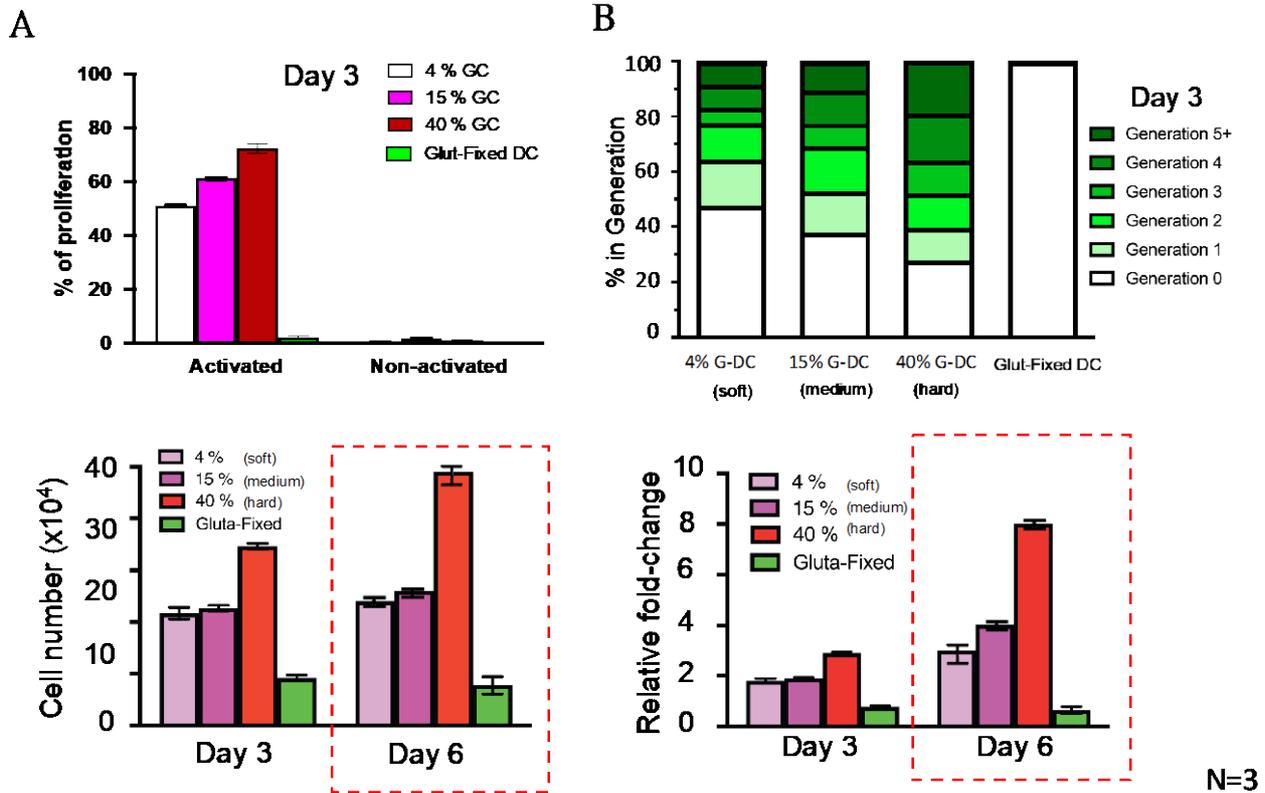
圖二十 .G-DC體外擴增抗原特异性T細胞。(A)流式細胞儀的T細胞增生量化圖 (B) 不同硬度造成增生比例差異的柱狀圖。G-DCs: OT-I T cells=0.66x10<sup>4</sup>: 12x10<sup>4</sup>= 0.0555:1; Day 3。

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 細胞刺激是抗原特异性的，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。

➤ 透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。

### 5. 延長 G-DCs 激活 T 細胞的天數

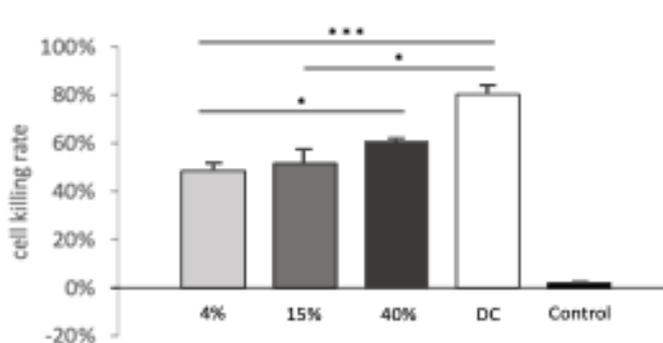


圖二十一. GC: T 細胞=0.221: 1 不同天數的激活程度差異。(A)不同硬度造成增生三天比例差異的柱狀圖 (B) T 細胞增生代數的比例圖 (C) 3 天和 6 天不同硬度 T 細胞增生細胞柱狀圖 (D) 3 天和 6 天不同硬度 T 細胞增生差異倍數柱狀圖：利用 CFSE 將 OT-1T 細胞染上螢光，並使用不同軟硬度的水膠細胞激活，觀測其增生能力。G-DCs: OT-1 T cells=  $2.66 \times 10^4$ :  $12 \times 10^4$ = 0.221: 1; Day 3。

(1) 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。和（圖二十一 A）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。

- (2) 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。(圖二十一 C) 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。(圖二十一 D) 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。
- (3) 實驗結果得知，不同硬度的水膠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。

#### 6. 擴增之 CD8+ T 細胞對 EG7-OVA 癌細胞的毒殺試驗



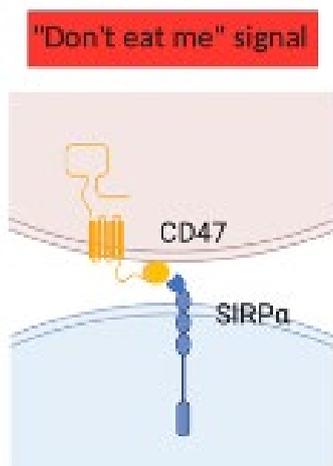
圖二十二. 細胞毒殺測試之 cell killing rate。

- (1) 40%水膠細胞擴增出的 CD8+細胞毒殺能力高於 4%水膠細胞所擴增出的 CD8+細胞，且有統計上的顯著差異。毒殺能力水膠細胞的基質硬度比例的增加而有升高的趨勢。
- (2) 本實驗證實了由水膠細胞擴增出的胞毒 T 細胞仍然具有毒殺的能力，並且藉由水膠細胞平台基質的軟硬度改變可以簡易的調控 T 細胞數目，甚至影響 T 細胞的品質，這將是本實驗未來進一步的研究方向。

### 三、檢測水膠優化後小鼠樹突細胞的生物相容性及免疫相容性

#### (一) 吞噬作用實驗

## 1. 實驗原理



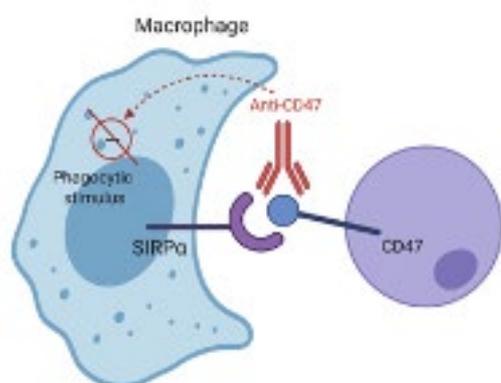
圖二十三. CD47 為本實驗水凝膠細胞表面的免疫球蛋白，透過和吞噬細胞上的信號調節蛋白 SIRP  $\alpha$  結合的相互作用，傳遞信號，使自身不會被吞噬細胞清除。

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

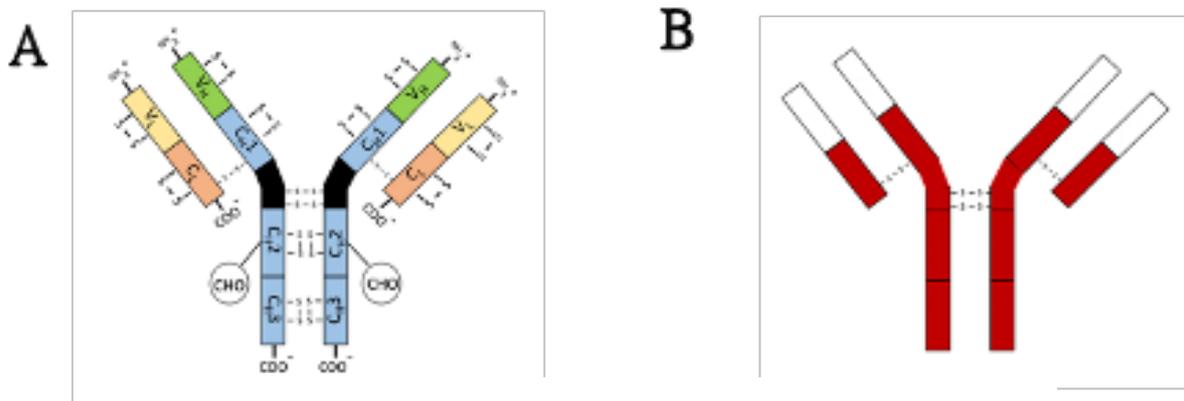
- 由於本實驗的細胞株 JAWS II 本身為一種樹突細胞，具有吞噬作用且為重要的抗原呈現細胞。以 JAWS II 作為吞噬細胞，吞噬已水凝膠化的 JAWS II 細胞，藉此判斷水凝膠化技術是否能完整保留膜上的辨識蛋白。CD47 作為一種在細胞膜上的跨膜蛋白，是免疫球蛋白的超家族。藉由與信號調節蛋白  $\alpha$  (SIRP  $\alpha$ ) 相互作用，介導雙向的信號轉導，抑制吞噬作用的發生。本實驗想證實我們能用水凝膠化技術完整保留細胞上的蛋白及膜的流動性，因此選用 CD47 作為判讀。若細胞不會被吞噬則代表水凝膠化技術不會破壞細胞的訊號判讀及免疫機制。



圖二十四. anti-CD47 於吞噬作用所控制的訊號傳導情形示意圖，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  $\alpha$  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。

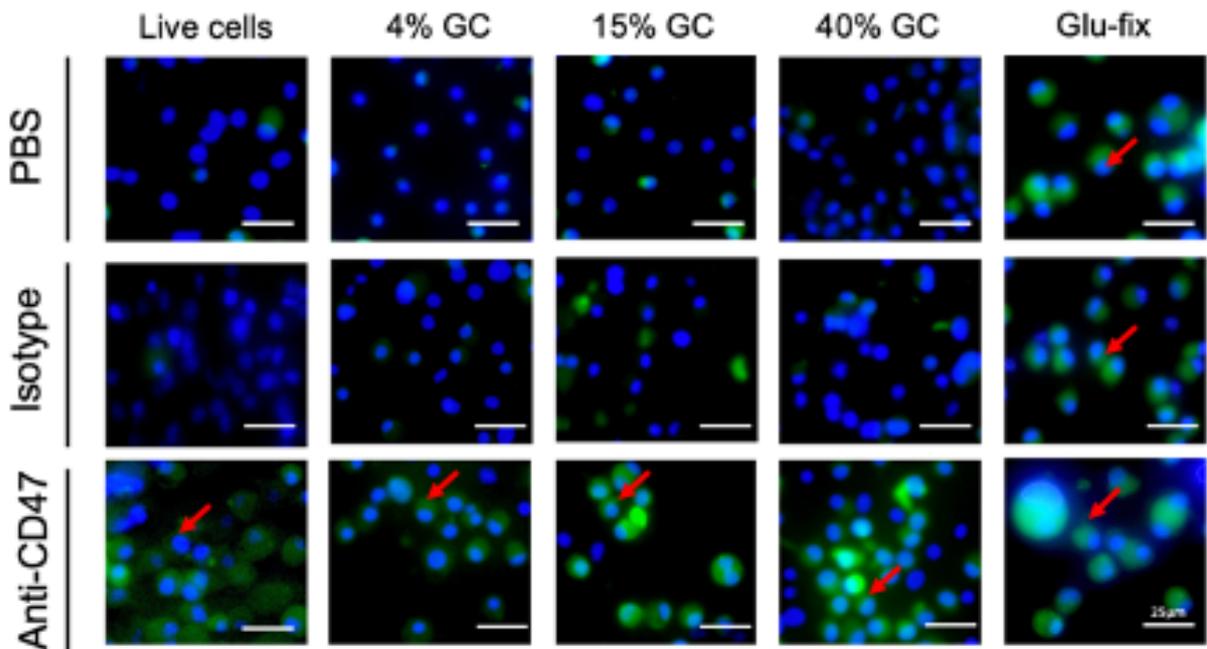
圖片繪自 Created with BioRender.com

- 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。



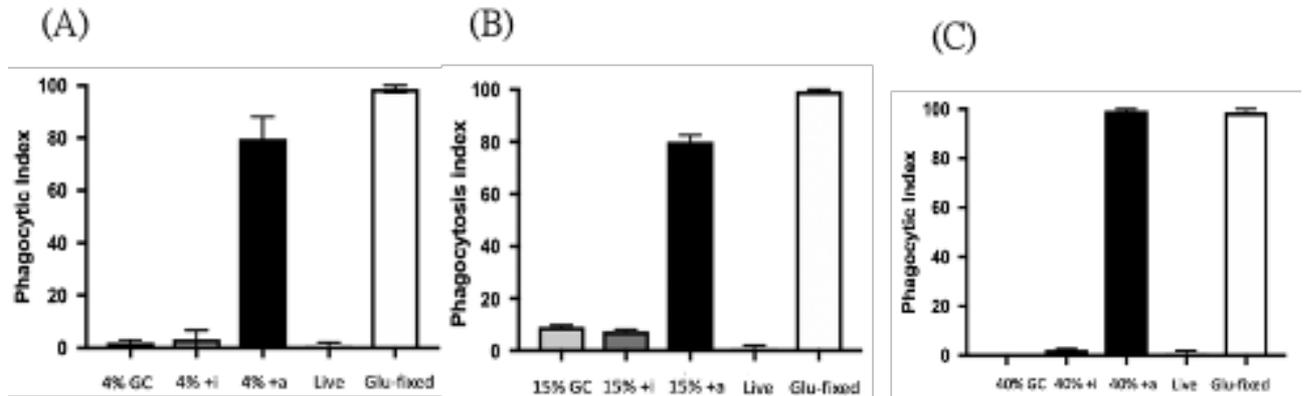
圖二十五. 免疫球蛋白(Ig)及其同種型(isotype)示意圖

## (二) 實驗結果分析



圖二十六.吞噬作用細胞在雷射光激發下的顯微影像疊加圖

- 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噬作用的吞噬細胞和細胞相互作用。



圖二十七. 水膠細胞吞噬作用結果(A)4%(B)15%(C)40%

### 1. 4%水膠細胞吞噬實驗結果

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  $\alpha$  形成相互作用。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。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。

### 2. 15%水膠細胞吞噬實驗結果

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  $\alpha$  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。15%水膠細胞添加 anti-CD47 Isotype 後被吞噬的比例佔全體細胞的 7%。15%水膠細胞添加 anti-CD47 後，吞噬程度來到 89%。

### 3. 40%水膠細胞吞噬實驗結果

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  $\alpha$  形成相互作用。40%水膠細胞添加 anti-CD47 Isotype 後被吞噬的比例佔全體細胞的 2%。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。

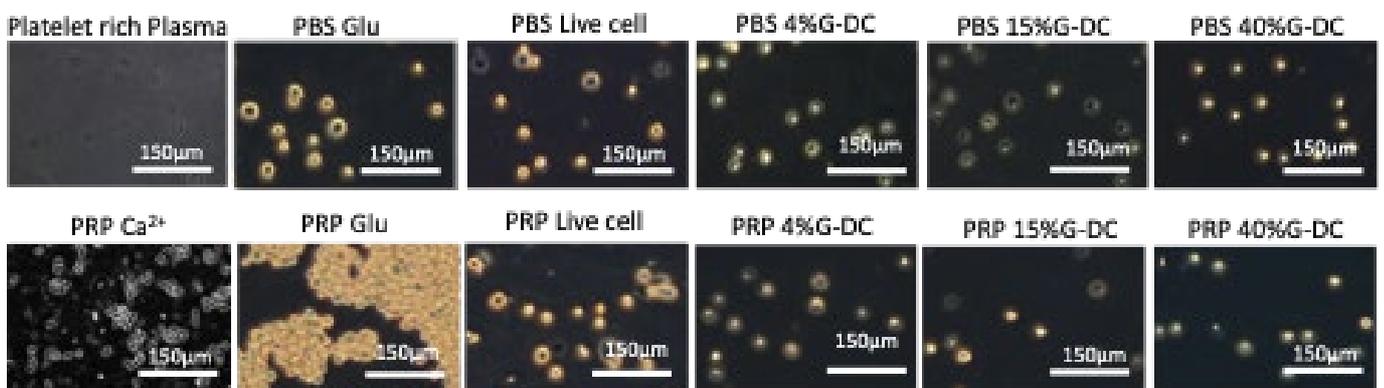
### 4. 比較活細胞、水凝膠細胞和戊二醛化細胞，膜的表面處理前後的不同吞噬作用程度

(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  $\alpha$  的相互作用，導致吞噬作用發生，此組做為正調控。

(2)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。

(3)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。

#### (二) 針對血液相容性對水膠細胞進行的血小板凝集試驗



圖二十八.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。

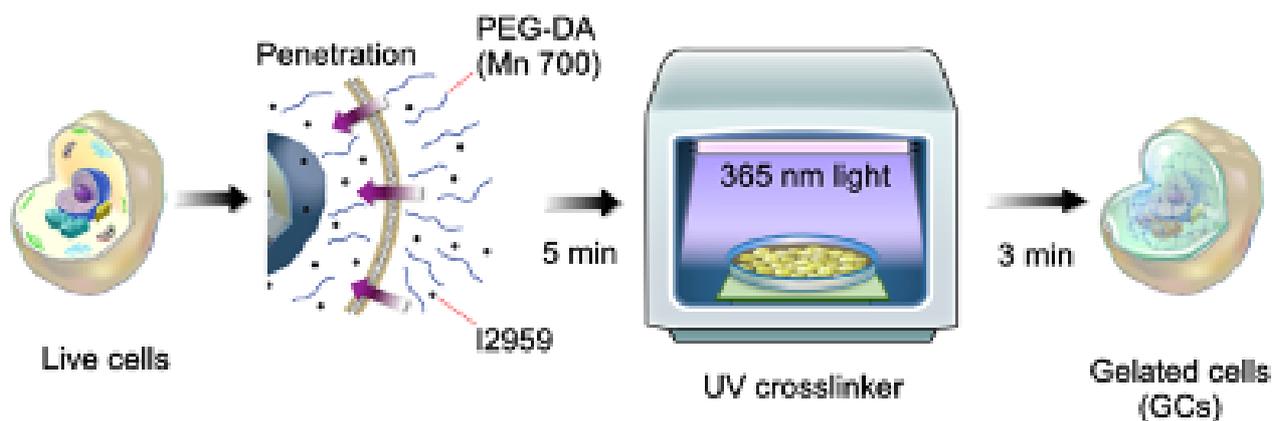
## 陸、 討論

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。這些發現突出了改善 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(Morgan Huse,2017)(Liu B ,*et al.*, 2017) . 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。



圖二十九.成功製作以簡單的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

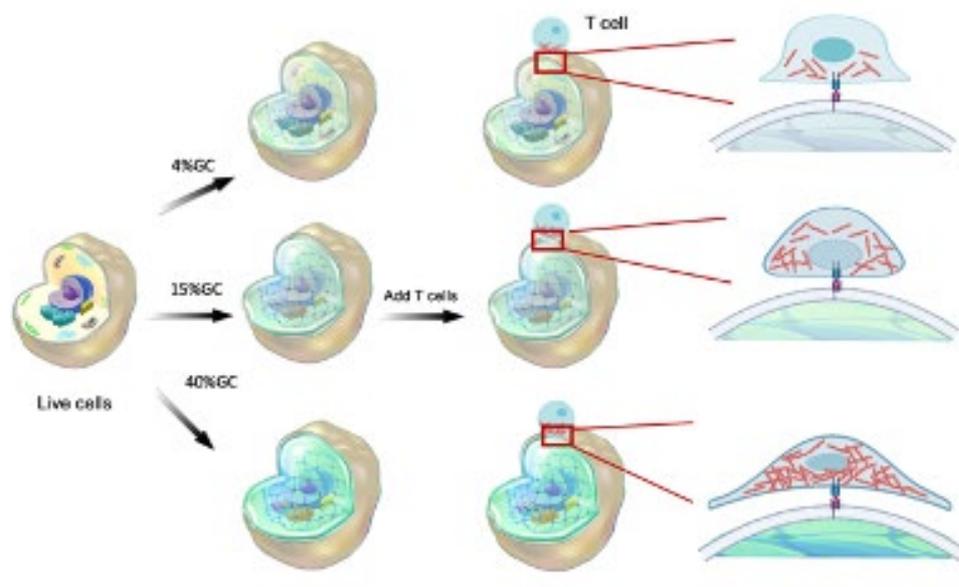
先前的研究指出 Irgacure 2959 (I2959) 可以用在光交聯的化學機制和紫外光活化聚合與聚乙二醇形成水凝膠二丙烯酸酯 (PEGDA)。為了使這種交聯反應在細胞內進行，小鼠樹突細胞細胞 JAWS II 使用 I2959 和 PEGDA 混合進行交聯。利用顯微鏡觀察，顯示 JAWS II 細胞已成功凝膠化。圖像顯示出水凝膠網絡形成可以幫助細胞保持其形狀超過 20 天，表明 GC 擁有耐久性的優點。實驗數據顯示，本實驗優化了新興的細胞內水膠化系統，取代了現有的

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，可避免膜結成交叉連結的結構，破壞細胞免疫辨識功能。

## (二) 水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<sup>+</sup>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。

## (三) 不同硬度的水膠細胞可以精準調控 T 細胞增生程度



圖三十.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。圖片繪自 Created with BioRender.com

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。許多生物化學工程領域的研究者(Michael Saitakis, .et al., 2016)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。推測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。

#### (四) 水膠細胞擁有高度的生物相容性

現今最流行的免疫療法 ACT(Adoptive Cell Therapy)，是將患者的 T 細胞分離出來，藉由體外擴增的技術，在體外培養專一性 T 細胞，數週後重新植回患者體內。第一個關鍵點在於是否能在短時間培養大量的專一性 T 細胞，而這點在水膠細胞可大幅提高 CD8+T 細胞增生程度的實驗中，可證實水膠細胞的第一個優勢。第二個關鍵點在於，培養後的 T 細胞在重新植回患者體內的過程中，可能喪失其特定表型，然而水膠細胞的高度相容信可以完全解決現今的這個問題，它有很大的潛力可以直接在患者體內進行專一性的 T 細胞擴增，而這點是現今其他 aAPCs 無法做到的。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，他們所建構 aAPCs 的方法是 bottom-up approach，而水膠細胞則是 top-down approach，這便是水膠細胞能簡易保存自然狀況的細胞膜流動性、細胞立體結構、密度以及細胞膜上配體接合狀態的關鍵因素。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訊號給吞噬細胞。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  $\alpha$  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。

## 柒、 結論

- 一、新型優化的細胞內水膠化技術結合 Irgacure 2959(I2959) 和分子量 700 的 PEGDA，在 365nm 的雷射光激發下，可形成膜內水凝膠聚合物網路，並保有細胞免疫辨識功能。
- 二、水凝膠化樹突狀細胞能成功激活 CD8+ T 細胞，透過改變其硬度及激活天數可提升 51.2% 的胞毒型 T 細胞增生程度，更有易保存性、持久穩定性、高度生物免疫相容性。
- 三、本實驗結合了優化的水膠細胞，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，也有體內增生的潛力，突破了現今人工抗原呈現細胞的諸多限制，期望應用於專一個體化的免疫療法治療。

## 捌、 參考文獻資料

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. Nat. 10:1057.

Morgan Huse. Mechanical forces in the immune system. *Nat. Reviews. Immunology.* (2017).17:679-688.

David K.Y. Zhang, Alexander S. Cheung, David J. Mooney. (2020) Activation and expansion of human T cells using artificial antigen-presenting cell scaffolds. *Nat. Protoc.* 15: 773–798.

John W. Hickey, Fernando P. Vicente, Gregory P. Howard, Hai-Quan Mao, Jonathan P. Schneck. (2017) Biologically inspired design of nanoparticle artificial antigen-presenting cells for immunomodulation. *Nano Lett.* 17:7045-7054.

Morteza Aramesh, Diana Stoycheva, Lion Raaz, Enrico Klotzsch. (2019) Engineering T-cell activation for immunotherapy by mechanical forces. *ELSEVIER.* 10:134–141.

Michael Saitakis, Stephanie 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: 1-29.

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.

Hui KL, Balagopalan L, Samelson LE, Upadhyaya A. (2015) Cytoskeletal forces during signaling activation in Jurkat T-cells. *Mol Biol Cell.* 26:685 – 695.

Marjolein Schluck, Roel Hammink, Carl G. Figdor, Martijn Verdoes, Jorieke Weiden. (2019) Biomaterial-Based Activation and Expansion of Tumor-Specific T Cells. *Front Immunol.* 10: 931.

Neha M. Nataraj, Alex P. Dang, Lance C. Kam, Jounghyun H. Lee. (2018) Ex vivo induction of regulatory T cells from conventional CD4<sup>+</sup> T cells is sensitive to substrate rigidity. *Society for Biomaterial*.3001-3008.

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.

## 【評語】 052006

1. 此作品的研究目標清楚且聚焦，研究方向及結果對免疫治療研究領域具有貢獻。
2. 此研究雖具有實用價值與潛力，然過去已有類似的相關研究，在理論創新上，其新穎性較為不足。在文獻回顧的段落中，應說明此作品探討的方向與過去研究有哪些不同。
3. 此研究所使用的方法大致合理可行，多數資料的數據分析雖有使用統計方法，但大多未進行顯著性檢定，以確定不同組別之間是否具顯著性差異。此外，作品中一部分的英文縮寫(如 GC)未於一開始出現就給予定義，圖說也未說明，使得讀者不易閱讀。有些實驗方法寫在結果中，也是不適當的做法。細胞質強韌度有數據，但不知使用何種方法測量，在實驗設計上應更清楚說明。實驗使用到 PBMC，作品中也未提及其來源。
4. 簡報資料編排大致合理，但內容稍嫌擁擠，尤其是呈現的字數太多；此外，有些圖的字太小、不清晰。雖原始構想顯然來自原實驗室或老師提供之想法，但自己對其知識之掌握良好，有初步結果顯示可行性，可以再深入探討其中的機制。

## 作品簡報

# 激增殺手T細胞的水膠細胞平台 於免疫療法的應用

科別: 動物與醫學學科

組別: 高級中等學校組

# 簡介

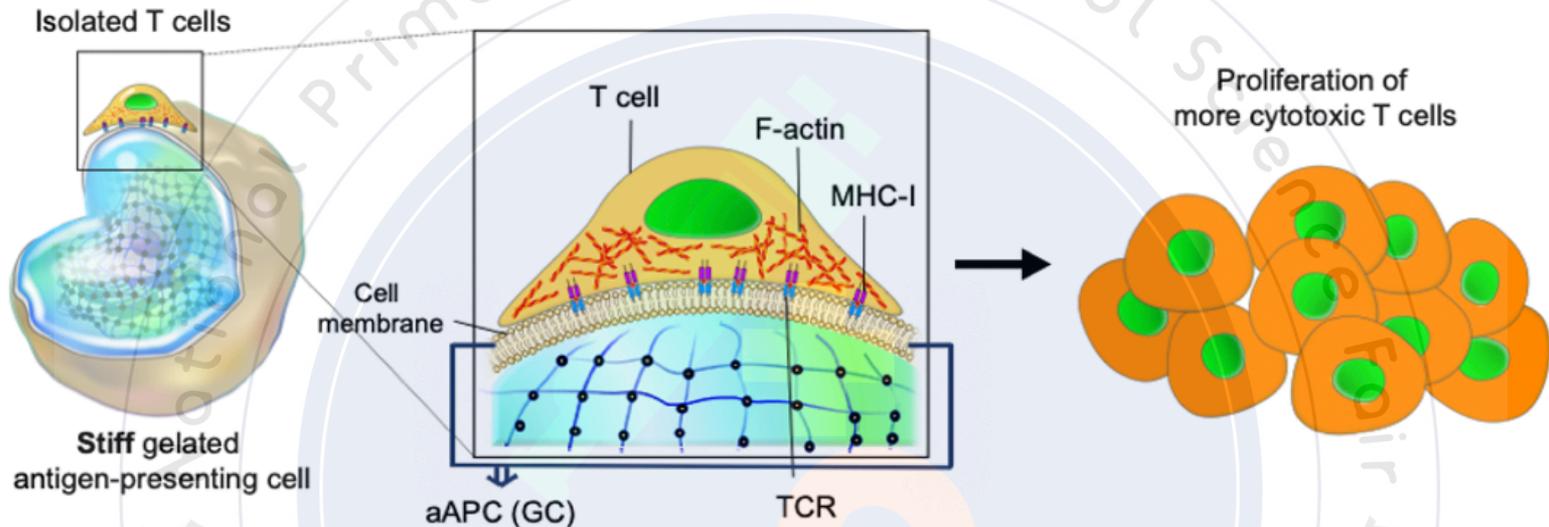


圖1.藉由改變水膠細胞基質軟硬度精準調控T細胞增生

本研究研發新型水膠細胞優化技術，將天然抗原呈現細胞做成平台，能激增殺手T細胞，經實驗證實無生物安全性的疑慮，有體內激活的潛力。實驗更著重於探討 aAPCs 基質的軟硬度對T細胞增生程度的影響，高細胞基質硬度(120kPa)，相對於低細胞基質硬度(25kPa)的對照組可以提高約 51.2%的 T 細胞激活程度，推測其和收縮性及突出性肌動蛋白增加致訊號增強有關。新型水膠細胞優化技術將提供臨床醫學免疫療法一個高潛力的新技術平台。

# 研究方法過程與方法

## 養小鼠樹突細胞 (天然抗原呈現細胞)



培養老鼠樹突細胞



滲透壓差異、光交聯化學機制



樹突細胞細胞基質水凝膠化

1. 以CCK-8 assay進行細胞毒性測試
2. 以AFM分析水膠細胞基質的軟硬度

## MHC-I 呈現量試驗、胞毒型 T 細胞擴增及毒殺

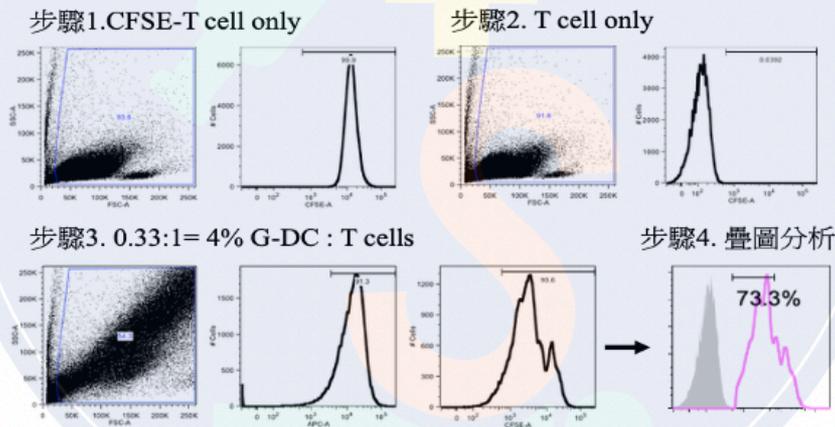
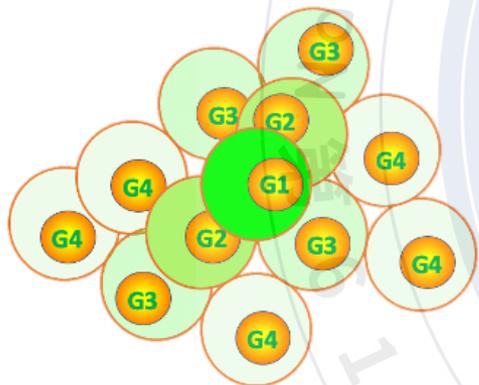


圖2. 擴增測試方法；  
細胞流式分析儀初始數據二維點散圖。  
由三個圖疊圖分析得 T 細胞擴增程度。

## 生物相容性檢測

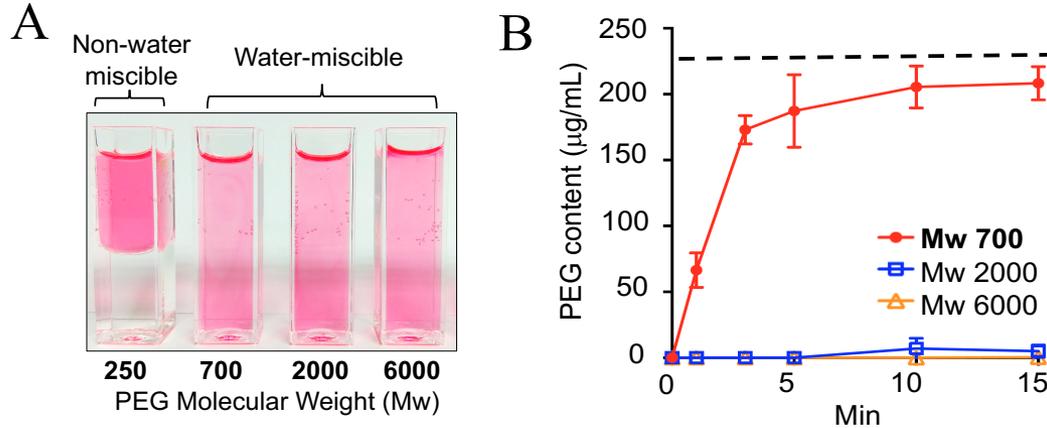
吞噬作用實驗：  
赫斯特染色標記活細胞細胞核  
螢光染料標記活細胞細胞質

血小板聚集測定：  
配置檸檬酸鈉緩衝液、100uL加入以50uL PBS 回溶的待測樣本，300XG離心後移除上清液。在37°C避光靜置10分鐘後，低速離心抽取下層離心液體。

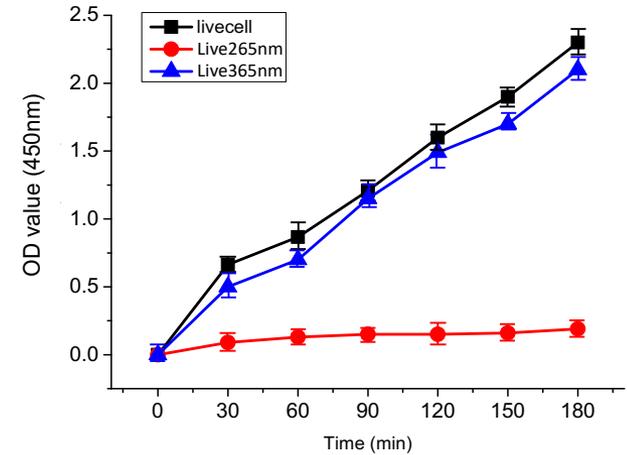
# 研究過程與方法

## 1. 研發新型細胞內水膠化優化技術

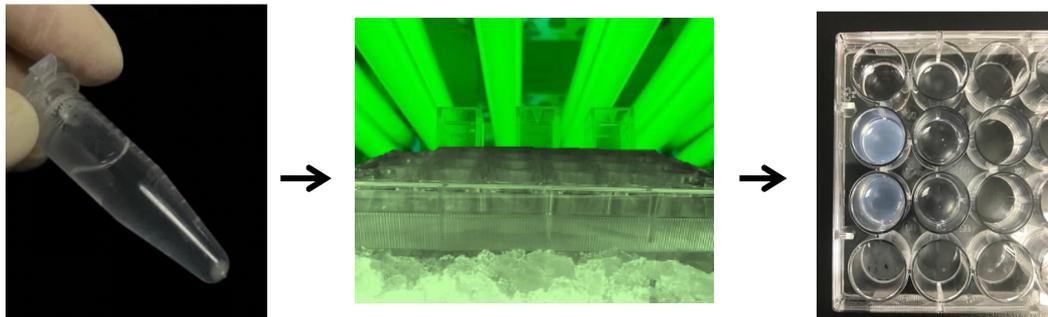
### (1) 細胞內水膠化材料 - 篩選不同分子量的聚乙二醇雙丙烯酸酯



### (2) CCK-8 細胞毒性試驗



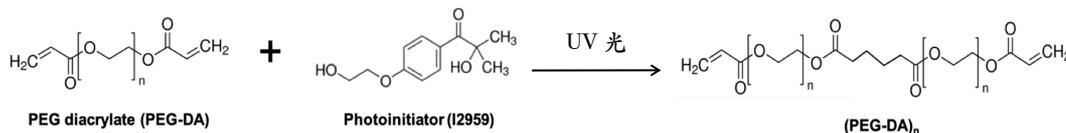
### (3) 新型水膠細胞優化技術將小鼠樹突細胞胞內固定膠狀



使PEGDA與I2959混合液  
滲透進細胞基質

於24孔盤中以UV光激發小鼠樹突細胞

細胞內水凝膠化成型



- 數據顯示分子量 700 的 PEGDA 穿透細胞膜能力最佳。
- 365nm 波長的紫外光不會對細胞及細胞膜造成損傷。
- 建立優化的胞內水凝膠製作流程，製作專一化的凝膠硬度。

圖3.(1)PEGDA分子量篩選及細胞滲透實驗  
(2)CCK-8細胞毒性測試(3)標準化流程制定

# 結果與討論

## 1. 水膠化小鼠樹突細胞形態特性觀察

### (1) G-DC外觀形態構造特性觀察

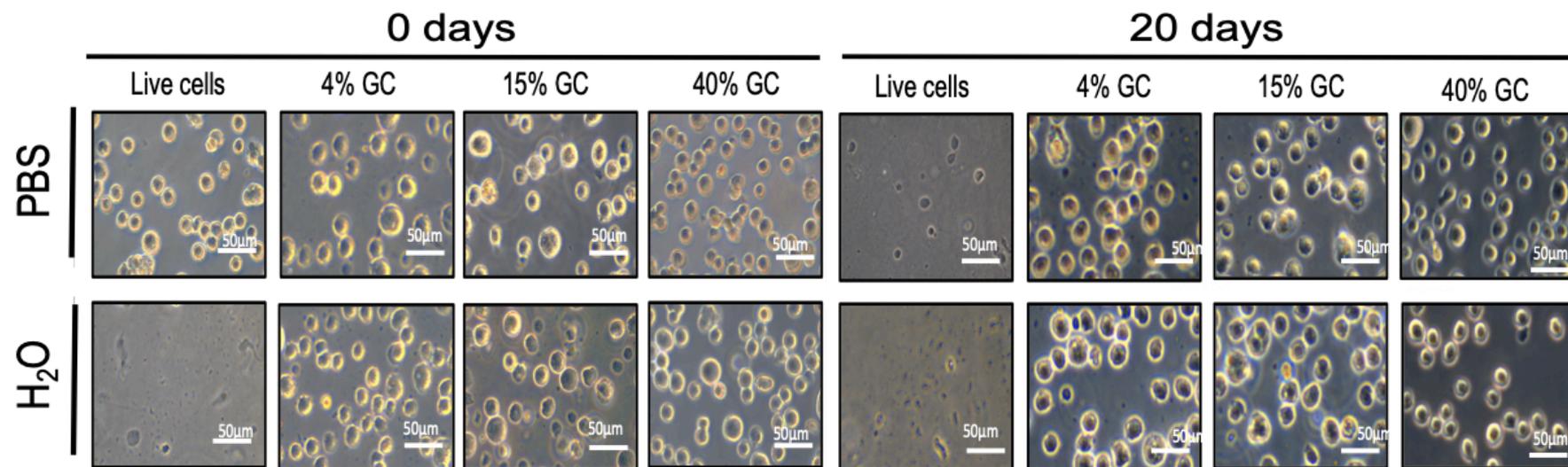
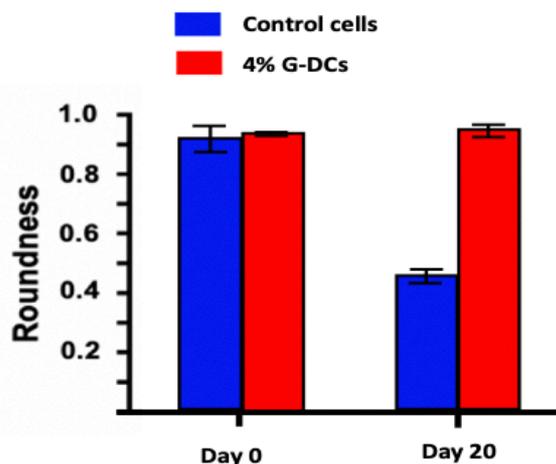


圖4.G-DCs構造觀察與天然樹突細胞比對



1. 4%、15%、40%的水膠化樹突細胞可以克服外在的滲透壓環境，不造成其細胞膜脹破。
2. 水膠化的樹突細胞在 PBS 中放置在 4°C 冰箱 20 天後，並沒有結構或形態上的差異，顯示其高度的穩定性。

圖5.G-DCs和天然細胞完整度比較

# 結果與討論

## 1. 水膠化小鼠樹突細胞型態特性觀察

### (2) G-DC楊氏係數檢測

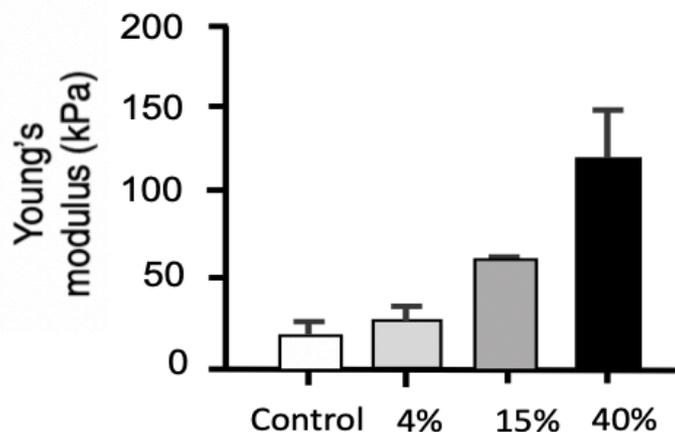


圖6.G-DCs細胞基質軟硬度

### (3) G-DC的MHC-I呈現量試驗

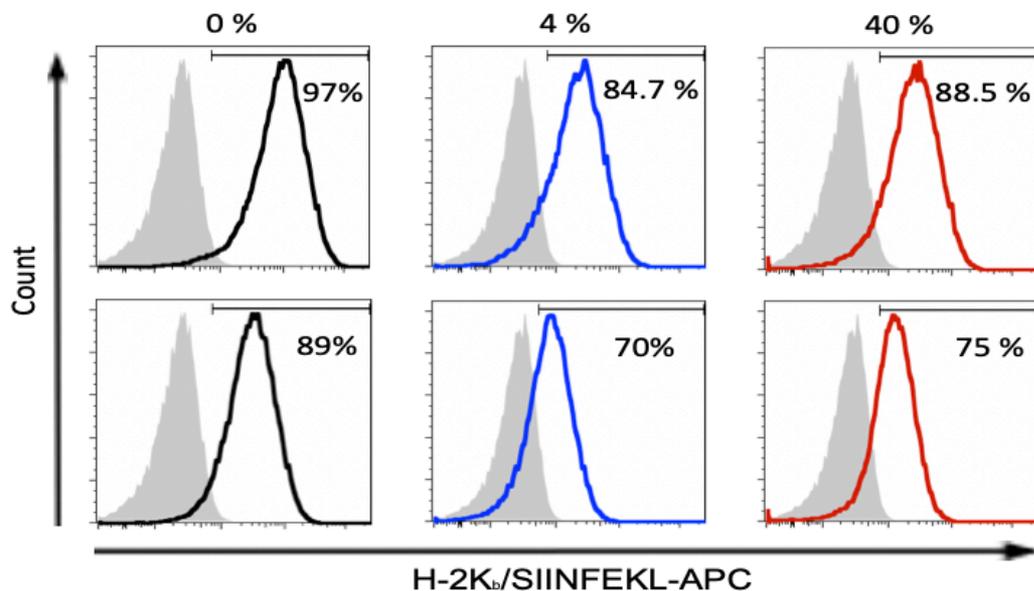


圖7.G-DCs細胞MHC-I呈現量

1. 以AFM分析水膠細胞基質的軟硬度，其楊氏係數和PEG-DA的濃度呈正相關。
2. 以FC分析水膠細胞的MHC表現率，得到 40%水膠細胞的 MHC-I表現率為88.5%，使用LPS及OT-I peptide 活化後表現率為75%。

# 結果與討論

## 2. 水膠化小鼠樹突細胞激活胞毒型T細胞體外擴增實驗

### (1) G-DC激增胞毒型T細胞擴增程度分析

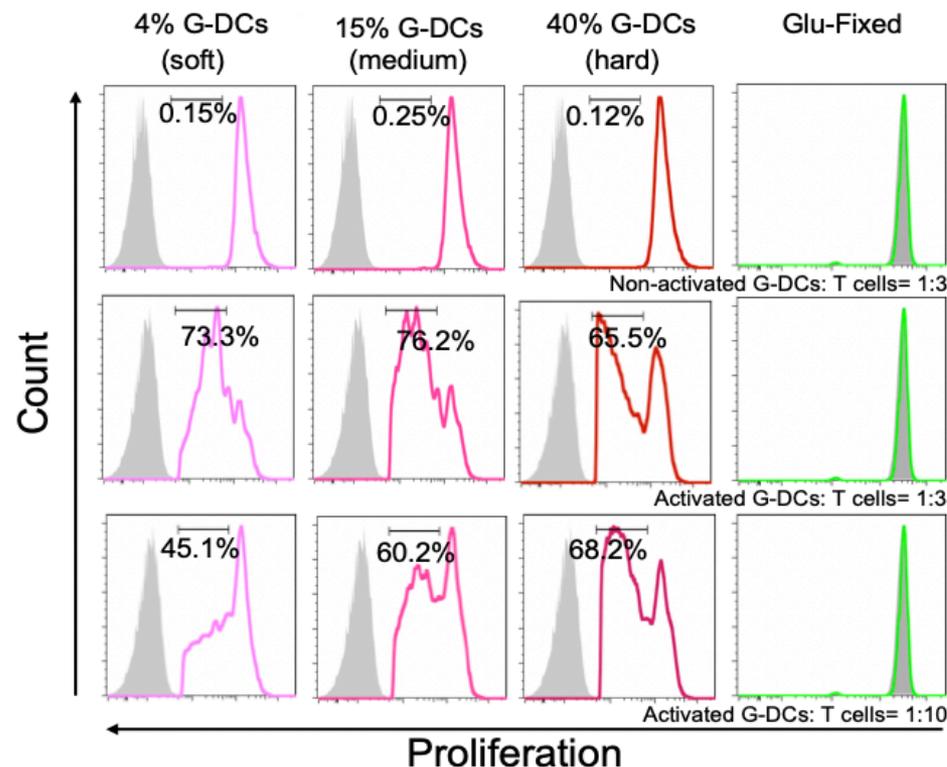


圖8.不同硬度G-DCs體外擴增抗原特异性T細胞

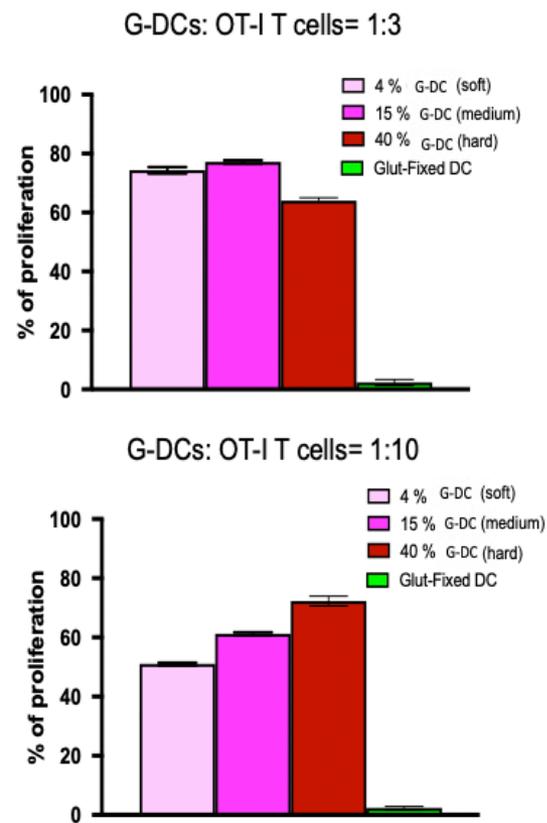


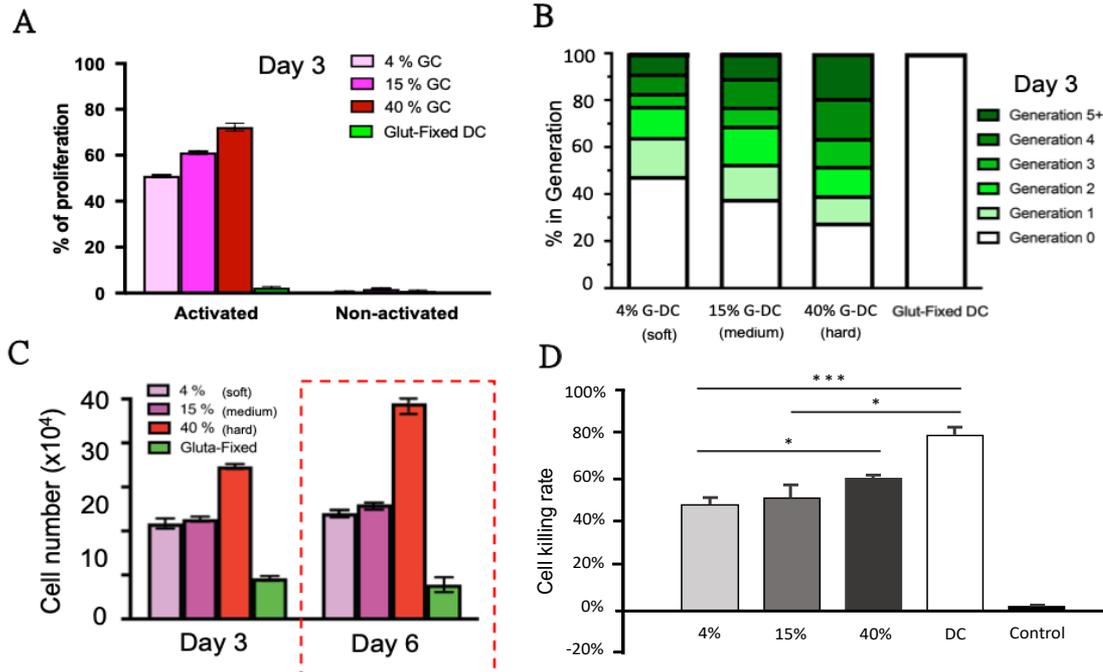
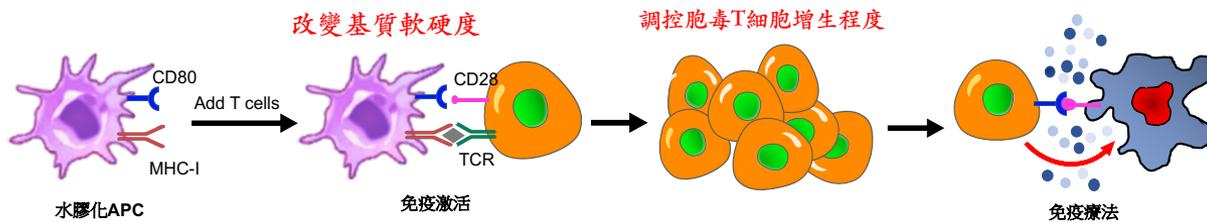
圖9. 擴增抗原特异性T細胞比例差異

- 實驗結果顯示水膠化的樹突細胞皆能有效激活 OT-I T 細胞，並誘導抗原特异性的 CD8+T 細胞擴增。
- T 細胞的活化程度受到APC濃度及APC軟硬度相互影響。

# 結果與討論

## 2. 水膠化小鼠樹突細胞激活胞毒型T細胞體外擴增實驗

### (1) G-DC激增胞毒型T細胞擴增程度分析



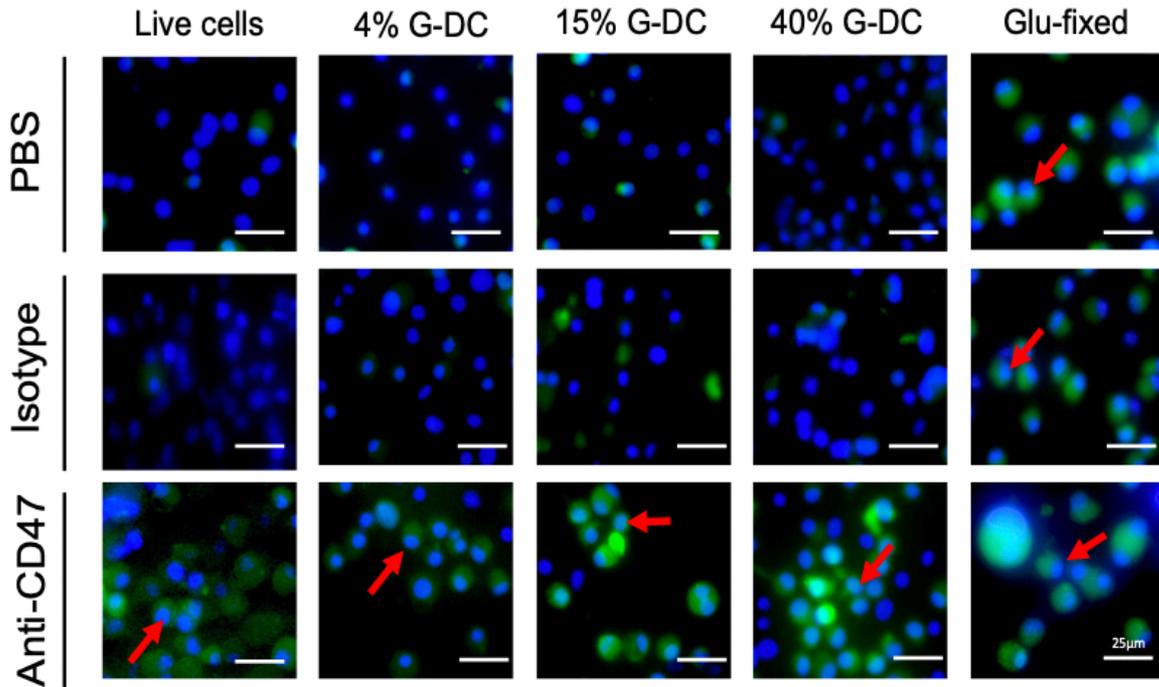
1. 活化時間增長，高硬度 APC 擴增 CD8+T 細胞的 功效會有上升的趨勢。
2. 相較激活三天低硬度 4%G-DC 共提升了 51.2% 的胞毒型 T 細胞增生程度。
3. 40%G-DCs 擴增出的 CD8+細胞毒殺能力高於 4%G-DCs 所擴增出的 CD8+細胞，有統計上的顯著差異。
4. 毒殺能力水膠細胞的基質硬度比例的增加而有升高的趨勢。

圖 10. (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 (D) 細胞毒殺測試之 cell killing rate

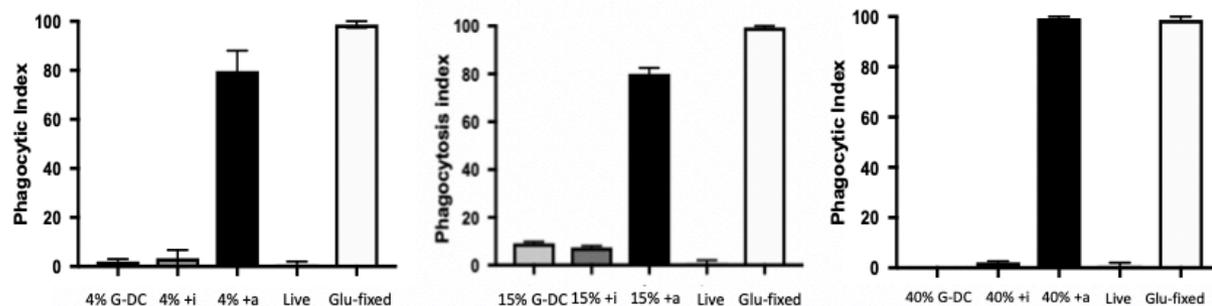
# 結果與討論

## 3. 檢測水膠化小鼠樹突細胞的生物相容性

### (1) G-DC吞嚥作用實驗



Hoechst33342: JAWS II (phagocyte) CFSE: G-DCs (phagosome)



1. 實驗結果顯示，isotype 的組別不會造成吞嚥作用，證實 anti-CD47 的 V 端是決定吞嚥差異的關鍵處。
2. 加入 anti-CD47，將干擾 CD47 和 SIRP $\alpha$  的相互作用，導致吞嚥作用發生。
3. 此實驗證實 G-DC 之所以不會造成吞嚥作用，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 作為吞嚥作用的主要調控因子。

圖11.吞嚥作用細胞在雷射光激發下的顯微影像疊加圖、水膠細胞吞嚥作用結果分析

# 結果與討論

## 3. 檢測水膠化小鼠樹突細胞的生物相容性

### (2) 針對血液相容性對G-DC 進行的血小板凝集試驗

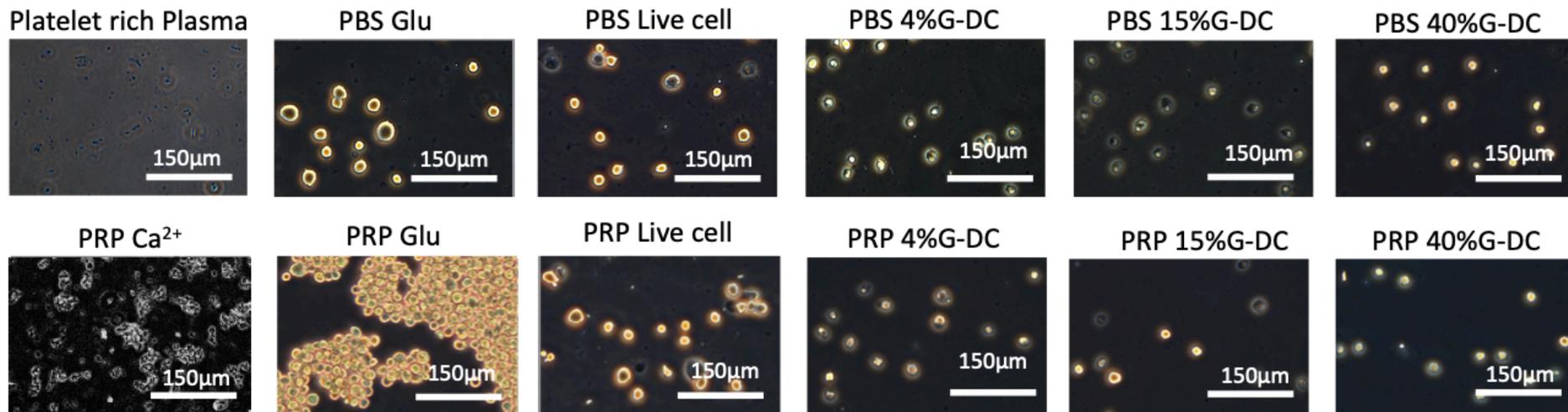


圖12. 水膠細胞血小板凝集試驗

1. Glu-fixed 的細胞和血漿作用後，產生細胞聚集的現象，由於細胞膜被固化表面蛋白功能損壞，因此會導致血液相容性異常的狀況發生。
2. 4%、15%、40%的水膠化樹突細胞在血漿中的細胞狀態和 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。

# 結果與討論

	現今 aAPC	G-DC
方法	在脂質顆粒上安裝信號 安裝抗原在奈米粒子	胞內基質水膠化
細胞膜流動性	X	V
抗原自然分佈	X	V
退化、降解	V	X
大量製造、良好品質	VX	V
生物相容性	X	V
調控胞毒型T細胞擴增能力	X	V

1. 相比於現今的aAPC，本實驗採取的是top-down的合成方式，可以保留細胞膜及膜上抗原最天然的呈現方式，能有效激活T細胞。
2. 此外，透過改變G-DC的基質軟硬度，除了能擴大51.2%的T細胞增生程度，更能精準的調控殺手T細胞的增生程度，應用於個體化治療。
3. 最後，G-DC的高度生物相容性，使它有機會直接在動物體內進行治療，避免T細胞在轉植過程中喪失其抗原特定表型。

# 結論與未來展望

1. 新型優化的細胞內水膠化技術結合Irgacure 2959(I2959) 和分子量700的PEGDA，在365nm的雷射光激發下，可形成膜內水凝膠聚合物網路，並保有細胞免疫辨識功能。
2. 水凝膠化樹突狀細胞能成功激活CD8+ T 細胞，透過改變其硬度及激活天數可提升51.2%的胞毒型T細胞增生程度，更有易保存性、持久穩定性、高度生物免疫相容性。
3. 本實驗結合了優化的水膠細胞，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，也有體內增生的潛力，突破了現今人工抗原呈現細胞的諸多限制，期望應用於專一個體化的免疫療法治療。
4. 未來規劃觀察T細胞和G-DCs的突觸，探討鈣離子和肌動蛋白絲與其擴增的相關性;期望可以藉由改變G-DCs基質軟硬度去調控T細胞的功能及種類，做定點的體內擴增胞毒型 T細胞。

## 參考資料

- 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. *Nat.* 10:1057.
- Morgan Huse. Mechanical forces in the immune system. *Nat. Reviews. Immunology.* (2017).17:679- 688.
- David K.Y. Zhang, Alexander S. Cheung, David J. Mooney. (2020) Activation and expansion of human T cells using artificial antigen-presenting cell scaffolds. *Nat. Protoc.* 15: 773–798.