

出國報告（出國類別：進修）

巨細胞病毒 CMV 引起的老化反應及 移殖後感染之免疫反應變化

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院雲林分院

姓名職稱：楊豐榮 主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：104 年 11 月 15 日至 105 年 2 月 15 日

報告日期：105 年 4 月 20 日

摘要

巨細胞病毒(CMV)被認為是促進免疫系統老化的重要因子之一。CMV 的感染在老人，免疫力低下的人或器官移植患者，可能造成危及生命的嚴重的併發症。根據統計，CMV 慢性感染的盛行率可高達 80%。是慢性感染的 CMV 藉由不斷的活化，逐漸會造成免疫系統老化的現象。眾多的研究近一步顯示，免疫系統的老化往往伴隨血液中發炎因子上升，心血管疾病，死亡率增加，以及老人的衰弱現象。由於 CMV 感染後個體免疫反應有很大的變異性，所以瞭解感染者間的 CMV 反應現象程度不同可能可以用來預測免疫系統的老化以及相關疾病。使用流式細胞儀，可以對 CMV 病毒引起的免疫變化做詳盡的分析。本人出國學習免疫功能相關的測定方法，希望能提升本院老年及移植醫學相關研究及服務。

目次

| | | |
|--------|-------|----|
| 壹、目的 | ----- | 1 |
| 貳、過程 | ----- | 2 |
| 參、心得 | ----- | 8 |
| 肆、建議事項 | ----- | 10 |

壹、目的

巨細胞病毒(Cytomegalovirus, 簡稱 CMV) 亦稱細胞包涵體病毒，被感染的細胞腫大，並有巨大的核內包涵體，巨細胞病毒主要侵犯上皮細胞，由於感染該病毒後可出現巨大細胞，故名巨細胞病毒。為一種常見的病毒，無論是成人，甚至包括未出生的嬰兒均有可能感染。會導致水痘、帶狀疱疹和口唇疱疹。雖然可以透過藥物預防及治療，但一旦感染 CMV 之後，無法完全清除病毒，且終身停留在體內。它可通過性接觸傳染，在人體內引起多種疾病，並可能與致癌有關。感染初期時其實並沒有明顯症狀，有些人會有疲倦、腺體腫大、發燒和喉嚨痛等類似感冒症狀，因此大多數人不會發現自己已經感染 CMV。因感染途徑不同而異。

此研究最終的目的是能免疫變化做詳盡的分析(polyfunctionality analysis)來預測疾病的進展。除了最新的發展，也觀摩學習國外的研究環境和實驗室的運作，了解國外學者間合作計畫和博士後研究員的學習方式。

貳、過程

職於 104 年中獲知能有機會出國進修，遂開始了一連串的準備工作。在獲得老師--約翰霍普金斯大學免疫學教授同意後，確定成行！將病人集中於 2015 年 11 月 14 前看完，中間用最快的速度申請 J1 簽證訪美，於拿到簽證當日前往機場，於 11 月 16 日抵美，隨即赴醫院報到、體驗並與老師訂定進修計畫，敲定在未來的三箇月中，我將參與教授的實驗工作項目。另一個國防醫學院的高材生宋柏儀夫婦的協助，住宿及飲食問題均獲得快速的解決。真的很幸運，得知有共同的朋友讓剛到約翰霍普金斯的我們備感親切，也覺得此行會彌足珍貴。研究主要是分三大部份：

免疫研究的概論：免疫力是來保護我們個體免於病原菌的感染，因此如果因為病毒感染，如人類免疫缺乏病毒的感染，造成後天性免疫缺乏病症，或先天遺傳形成的免疫缺乏病症(immunodeficiency)，會使這些人無法抵抗感染。反過來說，有時免疫力太強也會造成疾病，如自体免疫疾病(autoimmunity)，過敏反應(allergy)，這些過度敏感(hypersensitivity)造成的反應引起的疾病，是臨床上常見的免疫疾病，另外移植(transplantation)時，我們也希望能關掉或降低免疫反應。但對於癌細胞(tumor)，又希望能增強免疫系統來殺掉癌細胞。因此整個免疫系統的調節，從疫苗(vaccine)的預防，到發炎反應造成的組織傷害和現代醫學實習相關。免疫系統擁有不同作用的白血球及淋巴細胞、不同功能的蛋白質因子，如免疫球蛋白、介白質(interleukin,IL) 及細胞激素 (cytokine) 等，互相協調合作，形成人體的防禦力。

治療疾病除了採用藥物治療之外，如何從免疫系統著手來治療疾病以及免疫療法 (immunotherapy) 作用的機制是另一個重要的研究方向。免疫療法可以廣泛地定義為利用免疫系統成分或是免疫機制的治療方法。免疫療法亦可分為主動免疫療法 (active immunotherapy)，如施打疫苗，及被動免疫療法 (active immunotherapy)，如注射抗體。免疫療法的藥物包括一些具特異性的大分子和

小分子，包括細胞激素、細胞激素受器、與抗原結合的單株抗體及抑制淋巴訊號傳遞的藥物，也包括一些以非特異性方法壓抑或刺激免疫系統的療法。細胞繼代免疫療法意指從生物體內（如血漿）取得一群 T 細胞，在體外藉細胞激素、單株抗體或是抗原呈現細胞來刺激活化、大量繁殖該群 T 細胞成爲抗原特異性（antigen-specific）的作用 T 細胞（effector T），藉由 infusion 將這群活化的 T 細胞重新輸回病人體內，來消滅病人體內的抗原(21, 22)。大部分病毒感染疾病並不需要這種治療方法，但是針對某些病人，例如免疫不全或是癌症患者，此方法能協助病人在體內重建具有高度抗原特異性及活性的 T 細胞，因此，是一種極具發展潛力的免疫療法。細胞繼代免疫療法目前已經成功地用於治療癌症及病毒感染性疾病，最早的例子是在 1995 年成功地治療因爲異體骨髓移植而感染 CMV 的病人。

免疫反應依其特異性及記憶性的有無，分爲先天性及後天性。先天性免疫系統包括可溶性化學因子、干擾素、補體系統、嗜中性淋巴球及巨噬細胞（macrophage）的吞噬作用和自然殺手細胞的毒殺作用等。後天性免疫系統包括體液免疫及細胞免疫，前者包括抗體生成系統，後者包括淋巴細胞、淋巴激素及免疫記憶系統。記憶的功能使免疫系統對已對付過的抗原，引發強而快速的次發反應，可將外來危害因子有效去除。

免疫反應對抗原會有不同反應是由於主要組織相容複合物（major histocompatibility complex, MHC）的作用。外來抗原通常需要經過細胞處理與 MHC 分子結合後，才能被免疫系統所認知。因此 MHC 的類型與個人對特定因子的免疫力有關，是造成個體對疾病易感性的重要因素。人類的 MHC 又名人類白血球抗原（human leukocyte antigen, HLA）。HLA 可分爲 class I、class II，爲結構相似的醣蛋白，與抗原呈現功能有關。HLA class I 抗原表現於所有體細胞上，而 class II 只表現於巨噬細胞、B 細胞及樹突狀細胞(dendritic cell) 的細胞表面上。人體內有一種高度分化的免疫細胞，叫做抗原呈現細胞（antigen presenting cells, APC）。一般 APC 是指巨噬細胞、B 細胞、樹突狀細胞這三種免

疫細胞，可以吞噬細胞外部的抗原，將抗原利用細胞內的蛋白酵素加以處理，把具有抗原性的小片斷蛋白 (胜月太, peptide) 放在主要組織相容複合物 (MHC II) 上，讓 T-helper 細胞所辨識。但是只有 MHC-胜月太複合物不能引發特異性 T 細胞免疫反應；要激活特異性抗原的 T 細胞免疫反應必需同時存在二種免疫信號 (二把鑰匙) 才行。第一個信號是經由 APC 表面的 MHC- 胜月太複合物與 T 細胞上的 T 細胞接受器 (T cell receptor, TCR) 結合，將信號傳給 T 細胞；第二信號來自於 APC 表面上的共激分子 (co-stimulatory molecule) 與 T 細胞表面上的特定接受器結合而傳遞。當 TCR 與大量 MHC- 胜月太複合物緊密結合時，只須少量的共激分子就可以激活 T 細胞；同時當大量的共激分子存在時，TCR 與 MHC- 胜月太複合物結合數目約原來的 20% 就可以激活 T 細胞。儘管巨噬細胞、B 細胞、樹突狀細胞這三種 APC 都能呈現抗原並使原始或有記憶的作用性 T 細胞 (effector T cell) 活化，但是只有樹突狀細胞能使從來未對付過抗原的處女 Naive T cell 啟動。樹突狀細胞也可以啟動 B 細胞，並藉由分泌 IL-12 而使 B 細胞轉變為漿細胞；因此樹突狀細胞被視為「專業的」(professional) APC。

實驗的設計與操作：目前實驗或免疫治療用的樹突狀細胞製備單核白血球誘導出的樹突狀細胞(monocyte-derived dendritic cell, MoDC)。自從 1996 年以後 Bender 等及 Romani 等改良上述方法，用 GM-CSF 及 IL-4 與 PBMC 共同培養 7 天後，再加上單核白血球條件培養基 (monocyte-conditioned medium, MCM) 可從 40 mL 週邊血成功誘導出約 3×10^6 /mL 成熟的樹突狀細胞，也因此促進了樹突狀細胞各方面研究的進步。

樹突狀細胞的特性使其研究中是最受矚目的成員之一。長久以來發現在人類腫瘤周邊常圍繞著一些單核細胞，其中最主要的是 T 細胞。在不同的腫瘤，巨噬細胞、樹突狀細胞、B 細胞可能以不同比例存在著。在腫瘤的地方樹突狀細胞主要負責攫取處理抗原，並將腫瘤相關抗原 (tumor-associated antigen) 呈現給 naive T 及記憶性 T 細胞，因此對於產生毒殺腫瘤的 T 細胞，樹突狀細胞占有

重要地位。因為在有腫瘤的個體上抗腫瘤的免疫反應是不足的，長久以來大家均假設樹突狀細胞也被腫瘤所改變；有人提出腫瘤產生的因子可使樹突狀細胞凋亡或阻撓樹突狀細胞的成熟，從腫瘤分離出的樹突狀細胞有高比例是死亡的；但在 IL-2 及 IL-15 存在下腫瘤的樹突狀細胞可以存活而不凋亡，這些細胞激素可以調節樹突狀細胞的存活。目前已證實是因為 IL-2 及 IL-15 促進抗凋亡基因 Bcl-1 及 Bcl-xL 的表現而使樹突狀細胞免於凋亡。細胞繼代免疫療法中最關鍵的一點就是將 T 細胞自體內取出之後，如何有效地活化這群 T 細胞。T 細胞充分活化通常需要兩組訊息 (signal)，或者外加第三組訊息作為輔助。其中第一組訊息 (signal 1) 為主要組織相容複合物 (major histocompatibility complex, MHC) 呈獻抗原特異性月生肽，傳遞訊息給 T 細胞受器 (T cell receptor, TCR)。第二組訊息 (signal 2) 為共刺激分子 (co-stimulatory molecule)，由抗原呈獻細胞上的共刺激分子與 T 細胞上相對應的受器鍵結後，將傳遞訊息給 T 細胞。第三組訊息為細胞激素，會由 APC 或是 T 細胞產生，同樣具刺激 T 細胞的功能。

目前在臨床上活化 T 細胞使用的方式大多是以棘狀細胞 (dendritic cell, DC) 作為 APC 來刺激 T 細胞。在所有 professional APC (包括 DC、巨噬細胞和 B 細胞) 當中，棘狀細胞被視為最有潛力的 APC。不僅因為棘狀細胞的細胞表面上的數種分子，包括共刺激分子 (co-stimulatory molecule)、黏著分子 (adhesion molecule) 和主要組織相容複合分子 (major histocompatibility complex (MHC) molecule) 的表現都高於其他 professional APC，也因為棘狀細胞在體內游移 (migration)、捕捉抗原

(antigen capture) 以及抗原處理 (antigen processing) 各方面都有很高的能力(31)。因此，以棘狀細胞呈獻抗原 (antigen-loaded DC) 是目前非常廣泛地用來增生抗原特異性毒殺 T 細胞 (CTL) 的方法。

人造抗原呈獻細胞 (artificial antigen presenting cell, aAPC): 棘狀細胞儘管具有上述的優點，然而在臨床使用上仍然有諸多的限制。例如，為了增生 T 細胞

到達足以供臨床使用的數量，勢必需要不斷地培養棘狀細胞，就必須不斷地從病人身上取得單核球。此外，棘狀細胞的數量、品質亦會因操作人員的技術不佳，或者是病人因接受治療使得身體狀況不佳而有所影響。有一種新方法，同樣要達到快速增生具有功能的 T 細胞，但使用上必須更方便。因應這樣的想法，發展一種隨時都能取得、容易培養、且適合不同病人的人造抗原呈獻細胞（artificial antigen presenting cell ,aAPC）的構想就此浮現。人造抗原呈獻細胞（aAPC）目前粗分成細胞性（cellular）以及非細胞性（acellular）兩種(33)。細胞性的 aAPC 包括昆蟲細胞（insect cell）、纖維母細胞（fibroblast）、人類血癌細胞（leukemia cell line, K562）；非細胞性的 aAPC 包括磁珠、脂質體（liposome）。

本實驗室是以 nano-beads 作基礎，以提供人造抗原呈獻細胞確實刺激 T 細胞增生的方法，計畫構築一種人造抗原呈獻細胞，用來刺激各種特異性 CD8 T 細胞的增生。設計人造抗原呈獻細胞上所要呈獻的三組不同訊息是目前重要的實驗方向。

免疫調節功能評估，是針對包括非特異性及特異性免疫功能之評估。所謂非特異性免疫力主要包括如中性白血球（neutrophils）及單核球（monocytes）的吞噬能力或是自然殺手細胞的活性（natural killer activity）。而特異性免疫力主要是針對一些特定的抗原作進一步的評估，在老鼠身上可以利用外加注射一些特定的抗原，再進行抗原特異性免疫反應的評估，其中可以包括如特異性抗體的測定或是抗原特異性的 T 細胞增殖反應和細胞激素的研究。至於人體的抗原特異性免疫力的評估，則可能必須與疫苗注射來合併進行。同時，如果要評估免疫細胞的功能時，應該分別由質與量兩方面來加以分析。量方面主要是測定各種免疫細胞的數目，目前利用螢光流體計數儀可以容易地將免疫細胞正確地計算出。

在美國三個月中，因為氣溫皆在零度以上，有長達一個月均在大雪中，每天從早上到晚上均在實驗室認真實驗，也因此學習到不少技術的方法及判讀，另外也老師給學生很大的空間，支持我買任何的實驗設備，多次的討論所留下的印象非常深刻，也在 B2 實驗動物中心學習到不少的動物的照顧方法。由於免疫功能

在正常人或是為數不少的疾病都扮演著一個重要的關係，未來如果要更正確地評估在這些免疫疾病上的可能調節功能，也許需要另外建立動物模式或是經由人體的臨床試驗來加以評估這些功能。

參、心得

赴美三箇月中，在約翰霍普金斯的 PhD 的醫師們，生活也十分忙碌，每天清晨 6 點即開始他們一天的活動，也都是忙到下午六、七點，大伙也都興致洋洋未見疲態！每位主治醫師都有自己的專精項目，他們只需專心在其臨床的專長應用上即可，很讓人羨慕。有大家在臨床上的累積，有更大病患資源，相對比臺灣多，罕病在這裡便不少見，和我同期的神內 PhD 學生 Joe，可以一個月的門診看到約一百例的多發性結節的病人，他的診斷及思路是我望塵莫及的。國防醫學院的宋醫師，更是實驗室有強大的研究動力的人。日以繼夜的研究精神，其夫人亦全力支持，鶼鶼情深，令人動容。今觀約翰霍普金斯大學醫學院百年史，從一默默無聞的學校，經過百年來各個菁英前仆後繼的努力下，得到現在全美排名第三的醫學院及連續十六年全美排名第一的醫院的榮耀。這中間當然是每位主事者盡心盡力，但是我想他們心中都有一個信念，就是要讓這個地方更好。有此中心思想的串聯，自然而然的就會有永續發展的動力。一年中與我共事者，每一位都盡己之所能完成其分內的事，他們都以身為約翰霍普金斯的一份子為榮。本院創院至今十二年，是一家年輕的大學醫院，我想只要每一位成員都能盡力做好本份，持之以恆，以身為大的一份子為榮，假以時日，必可使本院躋身世界一流的研究中心。

免疫學是外內科學系中蠻晚發展的科系之一，也是最深奧難懂的學科。由於科技的進步及研究方法的精進，已有越來越多的謎團一一被解開，但仍有許多未知之處尚待努力！而職此次赴美進修於 JHU 教授實驗室內所見，其能整合相關的基礎學科，藉著機會難得的臨床人體測試來對疾病的病態生理學探討研究，真是讓我大開眼界。反觀國內基礎研究及臨床科系間的聯繫溝通常受研究經費的分配影響而無法得到充分的合作，於此，職認為國內應該還有進步的空間。

此次難能可貴的進修讓我有機會，在臨床和研究上都學到很多最新的發展及最新的技術，回國後，已開始收集透析病患的臨床計劃(目前已收案 276 人)，除

了相關研究的繼續，並將繼續與美國及亞東醫院的合作，鼓勵同仁參與研究和整合研究能量，在重要同學的引導下可引起另一波研究熱潮。

感謝國家與醫院的院長、及同仁們給我這個進修的機會，願未來能帶給臺灣與臺大醫院雲林分院，無論在臨床醫療或研究上最先進的資訊與技術，也能促進自己臨床研究的能力。

肆、建議事項

- 一、資源整合：每年都有院內同仁出國進修，這是建立本院與他院溝通交流的管道，是否請相關單位可以將這些同仁進修所在地，在人事室上闢一專區，可以協助日後欲出國之人員參考，並可以利用連絡。
- 二、醫療保險：美國政府規定持 J1 簽證一定要有醫療保險的保障，且在美國境內認可的醫療保險。也許每家醫院或醫療機構狀況不同，但多數會要求 J1 身分本人自行負責。依規定職於停留美國期間必須負擔每個月 291 美元的醫療保險費，且必須在學校內承保，如果是非醫師職，也是一筆大數目，希望院方在後續的申請上，可否請相關單位日後能提供相關訊息以方便赴美的學員參考或可申請相關額外的補助，以更加保障學員安全。
- 三、臺灣的基礎研究環境近年來受限較多，與國外主持人討論，美國對基礎研究還是比較全面性且量多的補助，建議可以讓對相關研究有興趣者都出國進修學習，對研究的規模和方法都會有新的視野。
- 四、若欲提升臺灣的研究排名可以此方式培養優秀人才或是參考國外的研究環境。