

出國報告（出國類別：研究）

學習血液癌症相關領域之研究

服務機關：國立成功大學附設醫院

姓名職稱：陳雅萍主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：103年11月10日至105年11月09日

報告日期：106年1月4日

摘要

此次出國選擇進修的地方為美國的梅奧醫學中心之血液癌症相關實驗室。在 Stephen Ansell 教授的淋巴癌研究團隊從事淋巴癌微環境的免疫細胞之研究：單核球與巨噬細胞在人類淋巴癌的角色。由於人類組織中的單核球與巨噬細胞之萃取並無標準化的萃取方式，因此本人設計幾個不同的方式來進行，其中以免疫磁性分離的負篩選分離的結果最好。經由表面抗原 14 與訊息調控蛋白表達的狀態可將這些單核球與巨噬細胞分為三種不同細胞群。在人類周邊血液、正常組織或是惡性淋巴癌組織都可以發現這三種不同的單核球與巨噬細胞的存在，而且在不同檢體這三種不同的細胞群具有不同的百分比。除此之外，這三種不同的單核球與巨噬細胞各具有不同的細胞表型、吞噬能力與細胞遷移。

目次

本文

一、目的.....	第 1 頁
二、過程.....	第 2 頁
三、心得.....	第 10 頁
四、建議事項	第 11 頁
五、附錄.....	第 11 頁

本文

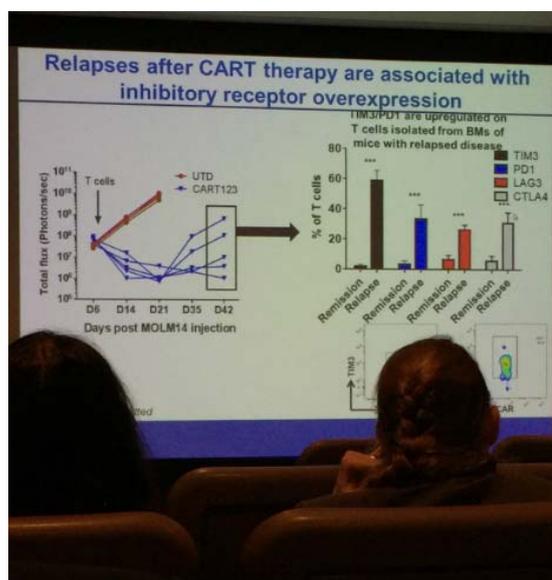
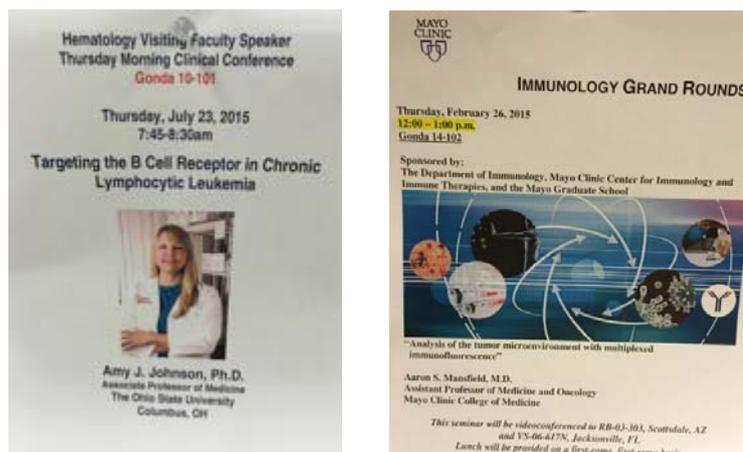
一、目的

過去的癌症研究主要集中在腫瘤細胞本身，但是近年來許多的癌症研究發現腫瘤細胞的周遭有許多的細胞外基質與免疫細胞和非免疫細胞的存在，它們彼此間會交互作用，並進而對癌症的生長、進展與轉移有很大的關聯性，這些統稱為癌症微環境。由於本人過去主要從事血液癌症相關領域的工作，所以本人此次出國選擇進修的地方為位於美國明尼蘇達州的梅奧醫學中心之血液癌症相關實驗室。本人本次出國的目的主要是學習血液癌症相關領域之研究，特別是人類淋巴瘤微環境的探討，其中又以單核球與巨噬細胞為本人此次的研究重點。過去對於癌症組織的單核球與巨噬細胞之研究主要以免疫組織染色或是從周邊血液之單核細胞予以培養來研究其特徵與功能，但是這樣的研究結果常常無法有效的代表真實的組織單核球與巨噬細胞的特性。雖然已經有許多的學者報導適當的方式來萃取人類周邊血液的單核球，但是關於人類組織中的單核球與巨噬細胞之萃取在過去並無標準化的萃取方式，因此本研究主要是尋找適當的方式來萃取組織中的單核球與巨噬細胞並進一步找出它們的特性。

二、過程

- (一) 計畫執行經過：民國一〇三年十一月至美國明尼蘇達州的梅奧醫學中心之血液癌症相關實驗室從事與學習血液癌症相關領域之研究並於民國一〇五年十一月結束。
- (二) 出國期間行程：民國一〇三年至十一月十日到民國一〇五年十一月九日出國（民國一〇三年至民國一〇四年接受補助）。
- (三) 參訪單位及訪問過程：出國研究的地方為美國明尼蘇達州的梅奧醫學中心之血液癌症相關實驗室，由 Stephen Ansell 所領導的團隊作淋巴癌微環境的研究，每一個星期都有兩次的實驗研究進度報告與討論，每個周/月皆有相關學術會議。

圖一：定期學術會議與進度報告



- (四) 研究項目性質：淋巴癌微環境之探討，尤其是針對單核球與巨噬細胞的萃取與研究其特徵。
- (五) 研究主題：學習血液癌症相關領域之研究。
- (六) 研究機關(機構、單位)介紹：美國梅奧醫學中心 (Mayo Clinic) 是世界著名的醫療機構，位於美國明尼蘇達州之羅徹斯特 (Rochester)，於西元 1864 年威廉·沃渥爾·梅約 (William Worrall Mayo) 先生在美國明尼蘇達州之羅徹斯特開設診所，已擁有

超過一百五十年的歷史(圖二)。

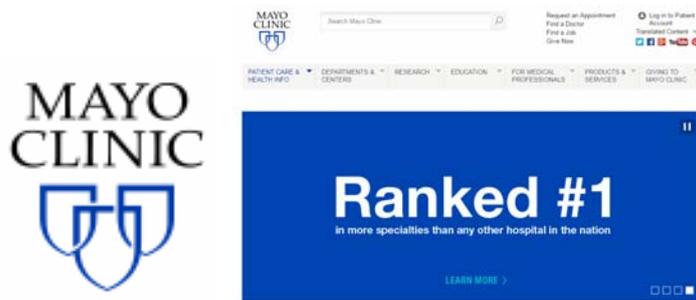
圖二：梅奧醫學中心 (西元 2015 年拍攝)



在每年的美國新聞與世界報導 (U.S. News & World Report) 全美最佳醫院調查中被選為最佳醫院之榜首。梅奧醫學中心的標誌是由三個盾牌組成(圖三)，分別代表照顧病人、研究與教學，在前面的一個盾牌表示照顧病人，而兩側的盾牌分別表示研究與教學，因為照顧病人是需要研究與教學的支持。

這個標誌說明梅奧醫學中心的理念：照顧病人的最大利益以及病人的需要為優先，也是梅奧醫學中心父子兩代三人終身努力的目標。

圖三：梅奧醫學中心的標誌與排名



每年醫院會評選優良醫師並予以表揚(圖四)。

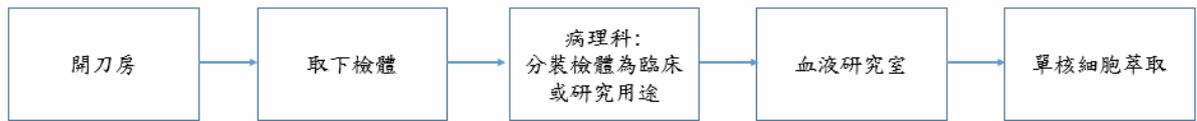
圖四：梅奧醫學中心優良醫師公告



(七) 研究經過:

首先先練習由周邊血液萃取單核細胞之後，再開始進行萃取組織之單核細胞(圖五)。

圖五：萃取組織單核細胞的流程



接下來以四種方式來進行從單核細胞來萃取單核球與巨噬細胞：

1. 細胞黏著到玻璃或塑膠器皿方式(Plastic Adherence)
2. Percoll密度梯度分離法(Percoll density gradient centrifugation)
3. 流式細胞分選儀(Flow cytometry sorting)
4. 免疫磁性分離法(Immunomagnetic isolation)

各方法之優缺點如下：

萃取單核球與巨噬細胞方式	優點	缺點
細胞黏著到玻璃或塑膠器皿方式	便宜 時間上易配合	有些細胞不會貼附 細胞型態於 24 小時改變 純化度最差
Percoll密度梯度分離法	次便宜 時間上易配合	純化度偏差
流式細胞分選儀	純化度高	費用昂貴 耗時 時間上不易配合
免疫磁性分離法	純化度高 時間上易配合	費用昂貴

由於時間與細胞量上的限制，結果發現以免疫磁性分離法(圖六)比較可能有機會保留完整的單核球與巨噬細胞。

圖六：免疫磁性分離法，分為自動化或手動法



自動化



手動版

另外免疫磁性分離法也分作為正篩選與負篩選，一般過去的研究皆以正篩選並以針對表面抗原 14 的抗體來分離單核球與巨噬細胞，但是缺點是會遺漏不帶有表面抗原 14 的單核球與巨噬細胞。負篩選法可以完整保留帶有與不帶有表面抗原 14 的單核球與巨噬細胞。由於檢體來源主要是 B 型淋巴癌，因此後來發現必須多增加以這樣針對表面抗原 19 的抗體來移除 B 型淋巴球之汙染，最後制定完整萃取流程(圖七)。

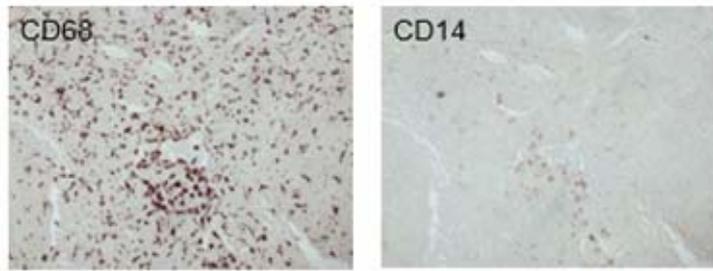
圖七：萃取組織單核細胞的流程



(八) 研究成果或檢討事項：

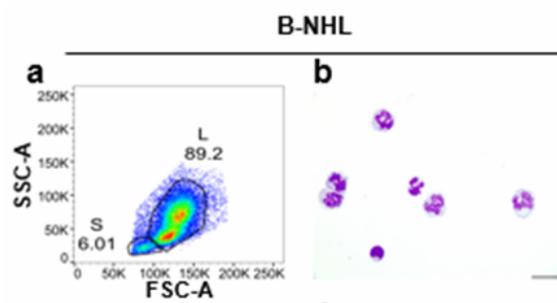
在萃取人類組織單核球與巨噬細胞的過程中，遭遇細胞純化不全的問題，尤其是 B 型淋巴球之汙染。因此針對不同的組織型態必須調整適當的抗體來獲取人類組織單核球與巨噬細胞。許多的研究以正篩選並以針對表面抗原 14 的抗體來分離單核球與巨噬細胞，但是本研究以組織免疫染色發現淋巴癌組織中帶有表面抗原 14 的單核球與巨噬細胞比率偏低，造成很難用正篩選針對表面抗原 14 的抗體來分離足夠的單核球與巨噬細胞(圖八)。

圖八：淋巴癌之免疫組織染色顯示帶有表面抗原 14 的單核球與巨噬細胞比率偏低



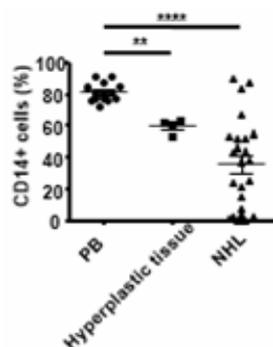
以本研究所制定的萃取模型可以完整呈現單核球與巨噬細胞，大多數的單核球與巨噬細胞是細胞偏大(圖九)。

圖九：組織萃取單核球與巨噬細胞的細胞型態



在人類周邊血液、正常組織或是惡性淋巴癌組織都可以發現具有不同的百分比的表面抗原 14 表現，其中又以惡性淋巴癌組織中帶有表面抗原 14 的單核球與巨噬細胞偏少 (圖十)。

圖十：表面抗原 14 在不同檢體的表現分布



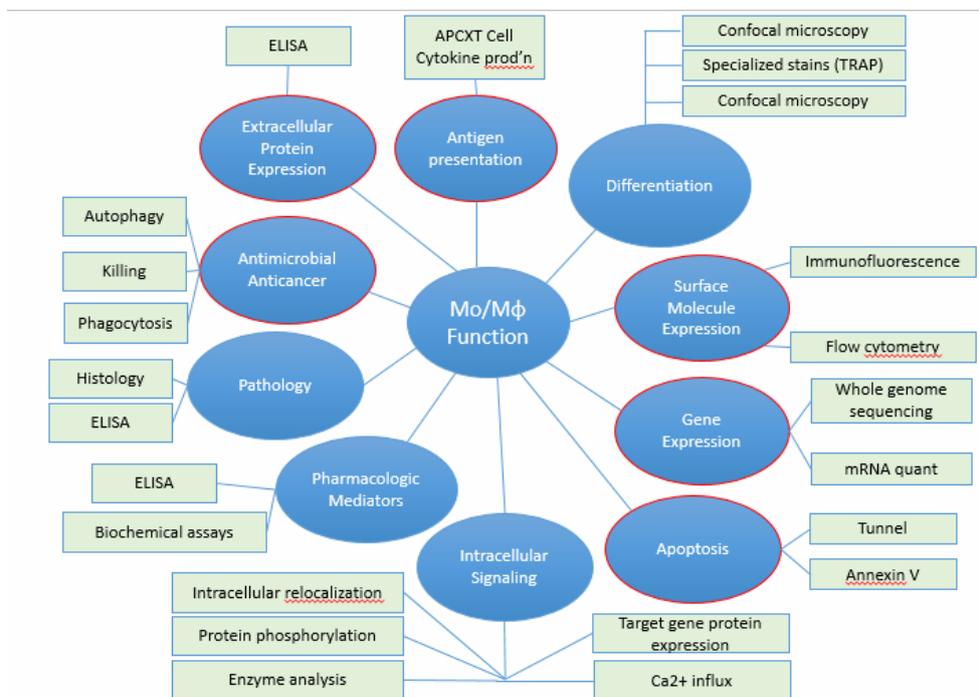
而根據表面抗原 14 與訊息調控蛋白的表現高低將單核球與巨噬細胞分為三大類：

- 1.表面抗原 14 表現與訊息調控蛋白高表現
- 2.表面抗原 14 無表現與訊息調控蛋白低表現
- 3.表面抗原 14 無表現與訊息調控蛋白無表現

在人類周邊血液、正常組織或是惡性淋巴癌組織都可以發現這三種不同的單核球與巨噬細胞群的存在，而且在不同檢體這三種不同的細胞群具有不同的百分比。相較於人類周邊血液與正常組織，惡性淋巴癌組織有較多的單核球與巨噬細胞群不表達表面抗原 14 與訊息調控蛋白。

相較於其他細胞群，帶有表面抗原 14 與訊息調控蛋白高表現的單核球與巨噬細胞群具有比較典型的單核球與巨噬細胞表型。由於單核球與巨噬細胞具有多種功能，本研究主要探討單核球與巨噬細胞之吞噬能力與細胞遷移能力((參考圖一)。

參考圖一：單核球與巨噬細胞之功能與測試



研究結果顯示這三種不同的單核球與巨噬細胞具有不同的吞噬能力與細胞遷移。相較於其他細胞群，帶有表面抗原 14 與訊息調控蛋白高表現的單核球與巨噬細胞群具有較強的吞噬能力與細胞遷移能力。

由於目前有許多的臨床試驗開始著手阻斷表面抗原 47 與訊息調控蛋白的結合而提高單核球與巨噬細胞的吞嚥能力(參考圖二)，因此本研究的發現將會對這類的治療具有其重要性，尤其是單核球與巨噬細胞不表達訊息調控蛋白。

參考圖二：阻斷表面抗原 47 與訊息調控蛋白的相關臨床試驗報導

<http://www.nature.com/nrd/journal/v15/n6/pdf/nrd.2016.111.pdf>

Immuno-oncologists eye up macrophage targets

Drugs that tap into macrophages' natural appetites, find ways to reduce their immunosuppressive effects or reduce their presence in the tumour milieu could complement existing immuno-oncology strategies.

Chris Morrison

A handful of macrophage-based mechanisms are emerging as a new wave of immuno-oncology drug targets. Recent investments, including a February 2016 US\$75 million debut venture capital round for start-up Forty Seven Inc., underscore the enthusiasm and should propel several drug candidates through early-stage clinical trials.

"Most of the focus in immuno-oncology has been on the T-cell side," says Craig Gibbs, chief business officer at Forty Seven. But macrophages can constitute as much as 50% of a tumour's mass. "And high macrophage tumour infiltration is associated with a worse prognosis across a range of tumours. It makes sense that they'll be important in oncology."

Macrophages are specialized immune cells found all over the body that exist primarily to swallow old or threatening cells, as well as cellular debris, through a process called phagocytosis. But tumour cells have molecular disguises and signalling mechanisms to both elude and dampen macrophages' phagocytic instincts. These tumour cells can also induce a population of so-called tumour-associated

macrophages (TAMs) to help them escape other immune responses, for instance, by recruiting immunosuppressors like regulatory T cells and by encouraging angiogenesis.

And so strategies that seek to restore the natural talents of macrophages and control the TAMs that dampen the immune response have flourished in recent years. Manipulating these soldiers of the innate immune system in tandem with increasingly powerful immunotherapies that unleash the adaptive immune system may hold more promise than either approach alone. "It's pretty clear that the tumour cells, the T cells, and the macrophages are all talking to each other in the tumour microenvironment," says Deciphera Pharmaceuticals founder and chief scientific officer Dan Flynn. "It's almost like a circuit board."

Working up an appetite

The most advanced target in terms of driving macrophages to recognize and absorb cancer cells is CD47. CD47 is expressed on all human cells and helps macrophages to distinguish self from non-self cells. Tumours, however, can survive by overexpressing the 'don't-eat-me' CD47 signal. By preventing CD47 from binding to a molecule called signal regulatory protein- α (SIRP α) on

the surface of all macrophages, researchers believe they can restore the pro-phagocytic balance.

At least three companies have entered the clinic with drugs that target the CD47 pathway.

Forty Seven, unusually for such a young company, already has a drug candidate in clinical trials, the antibody Hu5F9-G4 — licensed from the Stanford lab of company founder Irv Weissman, who is co-credited with discovering the role of CD47 in 2009 (*Cell* 138, 286–299; 2009 and *Cell* 138, 271–285; 2009). Celgene's CC-90002 is another anti-CD47 antibody, licensed from Inhibrx in 2012. Trillium's decoy-receptor approach fuses the business end of SIRP α to an immunoglobulin G1 tail. All three drugs are in Phase I trials, with first results expected before the end of 2016.

The Swiss biotech NovImmune is pursuing a bispecific antibody approach: its preclinical candidate NI-1701 binds to both CD47 and CD19, a target in several haematological cancers. NI-1701 may reach the clinic by early 2017. By co-targeting CD19, NovImmune aims to reduce toxicity related to hitting CD47 in other tissues, says NovImmune chief business officer Adrian Mills.

The hope for all these drugs is that CD47 disruption will both boost the activity of macrophages and lead to the induction of better anti-tumour T cell responses. "The simplest mechanistic explanation is that by making macrophages more phagocytic, you can increase the antigen load," says Trillium chief scientific officer Bob Uger. By increasing antigen presentation by macrophages, these drugs could stimulate the T cell response.

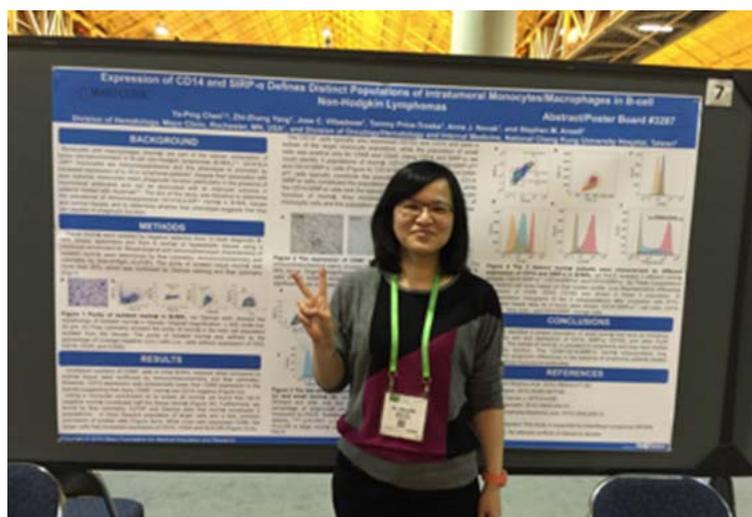
Evidence supporting this mechanism comes from Weissman's lab (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 11103–11108; 2013). Another

NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY

VOLUME 15 | JUNE 2016 | 373

本出國進修研究成果已於民國一〇五年四月於美國紐奧良舉辦的美國癌症研究學會發表初步研究成果(圖十一)，也透過此次大會認識更多的研究學者(圖十二)。

圖十一：西元 2016 年四月於美國紐奧良舉辦的美國癌症研究學會年會發表海報



三、心得

過去認為癌症相關的巨噬細胞是可以簡單分為兩種主要型態：M1 及 M2。M1 癌症相關的巨噬細胞可以分泌促發炎細胞激素並進而抑制癌症生長。相反的，M2 癌症相關的巨噬細胞會分泌的第二型細胞激素並進而促進抗發炎反應，因而促進癌症的生長。然而經由本研究的實驗過程中，我了解到淋巴癌組織內的巨噬細胞並不是可以單純的以 M1 或 M2 存在，常常是 M1 和 M2 共同存在，或是以其他型態來表現。許多的研究是以針對表面抗原 14 的抗體來分離單核球與巨噬細胞或是以針對表面抗原 14 的抗體來分離單核球，再進一步用其他細胞激素來促進其分化為各式型態的巨噬細胞來做後續實驗。由出國進修研究的結果發現組織中的單核球與巨噬細胞不見得一定會表達表面抗原 14，因此過去許多的研究成果大多是根據帶有表面抗原 14 的單核球與巨噬細胞所做的結果。

透過萃取單核球與巨噬細胞的過程學習如何使用免疫磁性分離法來萃取想要的免疫細胞，以及如何調整抗體的量來得到純粹的單核球與巨噬細胞。在獲取單核球與巨噬細胞之後，學習以流式細胞儀 (BD Calibur 與 BD Canto-II) 來進行細胞表型分析。由於單核球與巨噬細胞常有非專一性的抗體結合，因此在進行細胞表型分析前必須以適當的實驗藥劑來避免此非專一性的抗體結合而造成錯誤的細胞表型分析。經由本次的出國進修學習到如何設計單核球與巨噬細胞的功能分析：吞噬能力、細胞遷移能力以及 T 型淋巴球的活化。梅奧醫學中心相當重視實驗室安全，因此研究者必須每年需定期接受實驗室相關教育訓練與時數以及考核才能進行實驗室之研究。而且當遇到實施工程時，會以適當的防護措施來避免其他人員受傷(圖十四)。

圖十四：實驗室施工時的適當防護以及如何偵測輻射值



透過本次的出國進修機會可以更加接觸不同的國家文化、生活體驗與人文風情，更能增加英語口說與聽力能力。

四、建議事項

- (一) 出國前在選擇實驗室方面最好能夠親自到該機構該單位參訪以及討論之後的研究主題以便能有選擇更適合自己長才的舞台。
- (二) 建議我們自己的國家能夠多創造更多說英語的環境。
- (三) 透過出國機會建立合作的研究平台。
- (四) 多參與國際學術會議來分享自己的研究成果並透過討論尋求研究的改善之道。

五、附錄

B-NHL：B 型淋巴癌

CD14：表面抗原 14

CD68：表面抗原 68

FSC：前散射光

SSC：側散射光

PB：周邊血液

Hyperplastic tissue：增生組織

NHL：淋巴癌

%：百分比

**：表現有差異

****：表現有極大差異