

出國報告（出國類別：進修）

放射線與免疫調控之交互作用與 臨床應用研究

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設癌醫中心醫院

姓名職稱：藍耿學/主治醫師

派赴國家/地區：美國/威斯康辛州

出國期間：107 年 8 月 1 日 - 109 年 7 月 5 日

報告日期：109 年 8 月 6 日

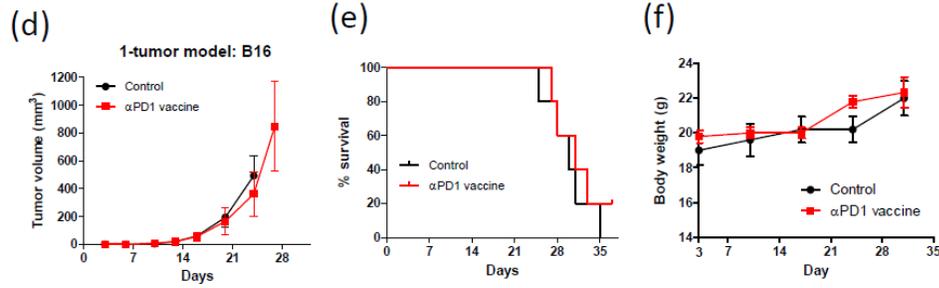
摘要

放射治療合併免疫治療是極富潛力的腫瘤治療方式。職前往位於 University of Wisconsin Carbone Cancer Center 的 Dr. Zackary S. Morris 實驗室進修。研究主題之一是研發新型的 DNA vaccines 免疫治療；成果顯示此 DNA vaccines 可引發特異的免疫控制點抗體，並在合併放射治療時促進動物模型中黑色素瘤的抑制效果。另一研究是研發新式 IL-15 cytokine 藥物，其特點是藉著連接的 albumin-binding domain (ABD) 增加在活體中的活性，並且其副作用比現行使用的 IL-2 輕微；初步成果顯示 IL15-ABD 可活化 CD4+ 及 CD8+ 細胞，也使 IFN γ 表現上升。

在實驗室進行基礎研究之餘，也參觀了 UW 的放射腫瘤部門的臨床運作，與臨床團隊交流。預期此次進修的經驗將有助於與 Carbone Cancer Center 及其放射腫瘤部門持續的合作與交流。

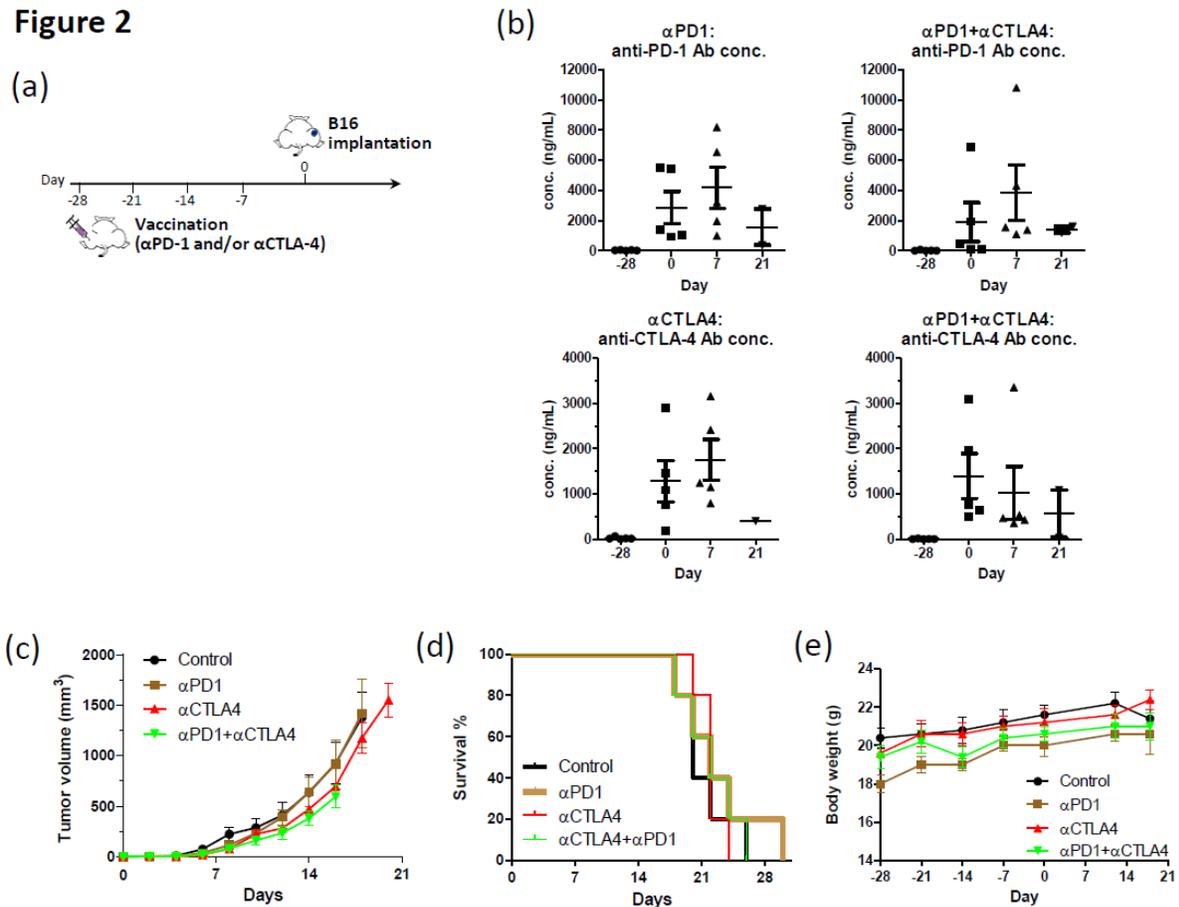
目次

摘要-----	02
目的-----	04
過程-----	04
心得及建議事項-----	10



然而接種 α PD1 並沒有顯著地影響 B16 腫瘤生長或實驗小鼠的存活 (Figure 1d & 1e)。 α PD1 沒有明顯副作用 (Figure 1f)。探討為何接種 α PD1 並無法抑制 B16 腫瘤生長的原因，可能是接種疫苗後至抗體產生需要時間，來不及抑制快速生長的腫瘤 (B16)；另外，可能需要同時抑制另一個免疫控制點，CTLA-4，才能達到療效。因此，如 Figure 2a 所示，在注射 B16 腫瘤前先接種疫苗，並且比較單獨接種 α PD1、單獨接種 α CTLA4、與同時接種 α PD1 + α CTLA4 的抑癌作用。

Figure 2

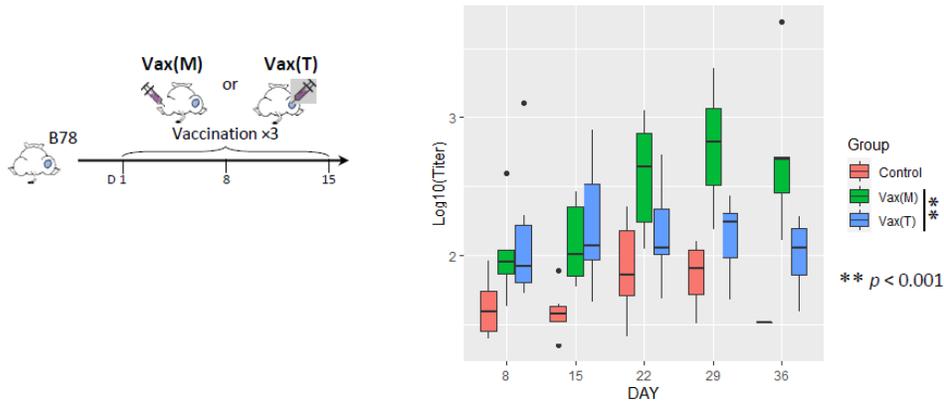


如 Figure 2b 所示：同時接種 α PD1 + α CTLA4 同樣引起實驗小鼠產生 anti-PD-1 及 anti-CTLA-4 抗體 (right panels)；抗體濃度與單獨接種個別的 α PD1 或 α CTLA4 疫苗 (left panels) 相近。然而 α PD1 + α CTLA4 仍然沒有顯著地影響 B16 腫瘤生長或實驗小鼠的存活 (Figure 2c & 2d)。 α PD1 + α CTLA4 也沒有引發明顯副作用 (Figure 2e)。由於 DNA vaccines 本身的抑癌效果不明顯，我們後續的研究則探討 DNA vaccines 合併其他腫瘤治療方式 (尤其放射治療) 的效果。

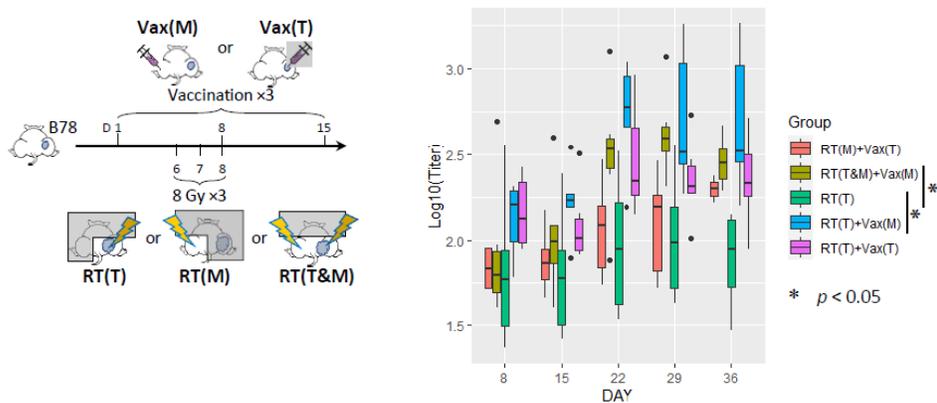
首先，我們研究此 DNA vaccines 的作用是否會受到接種所在的活體微環境 (microenvironment) 的影響。通常此類 DNA vaccines 的注射部位多為正常肌肉組織 (在此以 Vax(M) 來表示此種接種疫苗方式)；如 Figure 3a, left panel 所示的實驗方式，我們比較將疫苗注射於腫瘤之中的接種方式 (以 Vax(T) 表示)。以 ELISA 檢驗實驗小鼠的血清，可看到疫苗接種後產生了特異性抗體，而 Vax(M) 接種方式的抗體濃度顯著高於 Vax(T) 方式 (Figure 3a, right panel)。

Figure 3

(a)

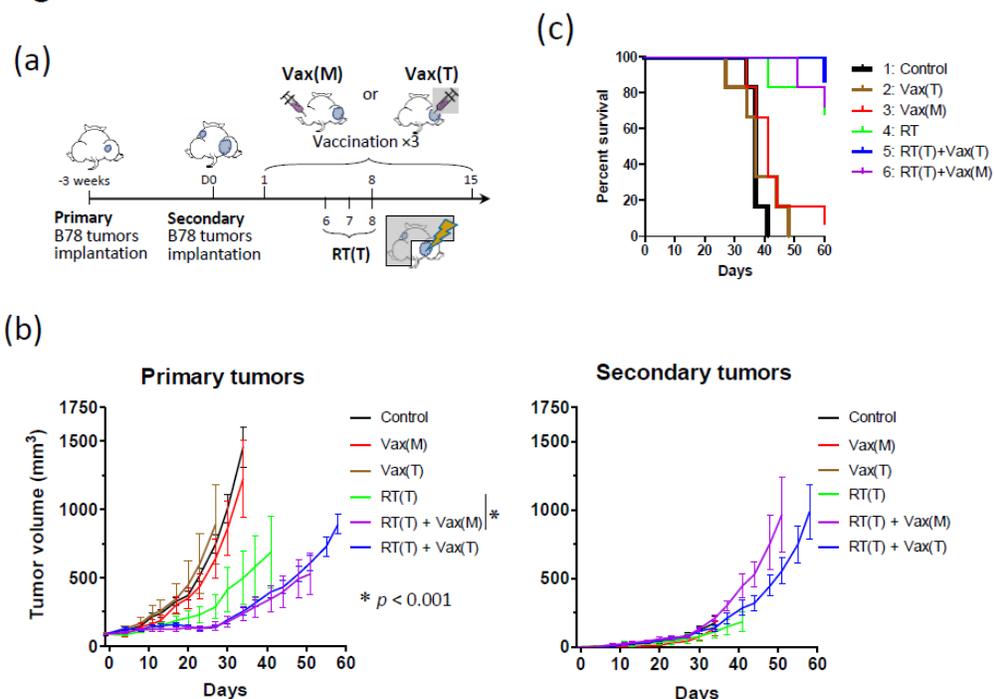


(b)



再來我們測試這個 immune checkpoints DNA vaccine platform 與放射治療 (radiotherapy, RT) 合併使用的影響 (實驗方式如 Figure 3b, left panel 所示)。以 RT 照射動物腫瘤 (RT(T) 與 Vax(M) 或 Vax(T) 合併治療，並不會影響特異性抗體的產生 (Figure 3b, right panel)。

Figure 4



瞭解了 immune checkpoint DNA vaccines 合併 RT 時產生特異性抗體的情形之後，我們接著檢視此種合併治療對於小鼠腫瘤模型的作用。如 Figure 4a 所示的實驗設計，先在小鼠身體右側建立 B78 腫瘤 (稱為 Primary tumors)；等 Primary tumors 達到接近 100 mm³時，在小鼠左側建立另一個 B78 腫瘤 (稱為 Secondary tumors)。比起單獨給予 RT，Vax(M)與 RT 合併治療時顯著地抑制 Primary tumors 的生長 ($p < 0.001$; Figure 4b, left panel)。只是此種合併治療方式並未引發足以抑制遠端的 Secondary tumors 的免疫反應 (Figure 4b, right panel)。

此研究的成果，在 American Association for Cancer Research (AACR) 2020 Virtual Meeting 中發表 Poster

此計畫後續的研究方向，可以考慮使用其他的腫瘤模型，因為 B78 腫瘤屬於 immunologically “cold” tumor，較不易引發免疫反應。此外，也考慮在合併 immune checkpoint DNA vaccines 與 RT 之外，再合併第三種治療 (例如 cytokines)，可能促進對抗腫瘤的免疫反應。

II. Targeted Radiation Therapy (TRT) for management of micrometastases and/or residual disease

來到進修地點之後的新研究計畫是探討 TRT 是否可應用在 residual tumor 或 micrometastasis 的情況，成為輔助主要腫瘤治療 (例如 surgery) 之後的 adjuvant therapy。TRT 是此處研究團隊的研究重點之一，研究成果顯示其對於癌症治療極富潛力。其原理是將合適的放射性同位素與具有腫瘤特異性的分子結合，以達到抑癌效果。此種具腫瘤特異性的放射治療與傳統放射治療的不同在於：使用的同位素 (例如 iodine-125，甚至較常用於影像

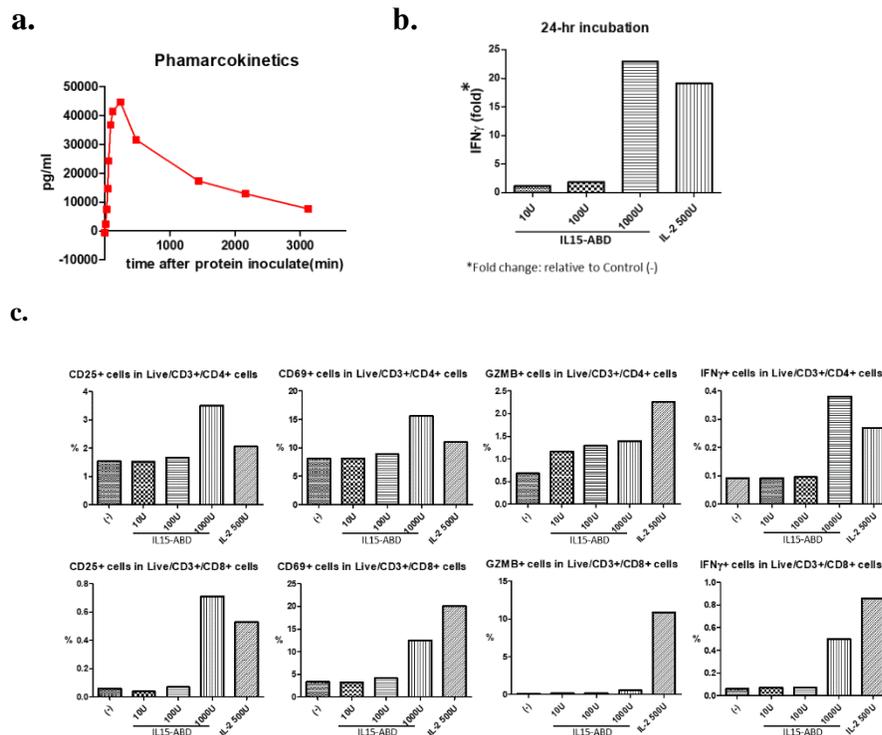
應用而非治療用的 iodine-124 等等) 釋放低能量電子，並且藉由具有腫瘤特異性的分子的引導至腫瘤部位，使其放射線只會影響其鄰近的腫瘤細胞，而不會波及附近的正常組織。

首先我們嘗試建立適合進行此研究的動物實驗模型。在 pilot study 中，分別以不同數目的 Panc02 胰臟癌細胞經靜脈注射至小鼠中，模擬 residual disease 或是 micrometastasis，觀察腫瘤產生的狀況及小鼠存活時間。目前此動物模型尚未完善，但是在過程中也學習了諸多動物實驗、flow cytometry 等等技術。

III. In situ tumor vaccination with the combination of a novel cytokine, radiotherapy, and immune checkpoint blockade

此處研究團隊的研究重點之一，是利用 RT 與其他免疫調控治療合併，引發針對腫瘤的免疫反應，即 in situ tumor vaccination。Dr. Morris 的團隊近年相關研究成果，顯示合併 RT 與 IL-2 immunocytokine (IL-2 linked to GD2) 可引發 in situ tumor vaccination effect；而且進一步合併 T-cell checkpoint blockade，更可加強此效果。我的另一項研究計畫，是研發一個新型的 IL-15 配方—IL15-ABD (albumin binding domain)，藉以合併 RT 與其他免疫治療，達到 in situ tumor vaccination 效果。相較於 IL-2，IL-15 同樣具有抑制細胞凋亡的作用，但是不會擴增 regulatory T cells。鏈結 ABD 的 IL-15 配方可使其在活體中的 half live 由 44 分鐘延長到大約 8 小時 (Figure 5a)

Figure 5



首先我們測試 IL15-ABD 在 in vivo 中對於免疫細胞的作用。在 C57BL/6 小鼠 splenocytes 的培養液中加入 IL15-ABD，經過 24 小時後收取 mRNA 進行 qPCR，顯示 IL15-ABD 可以顯

著的引發 $IFN \gamma$ 的基因表現(Figure 6b)。同時使用 Flowcytometry 分析(Figure 6c)，可看到 IL15-ABD 可活化 CD4+及 CD8+細胞(CD25 及 CD69 markers 上升)， $IFN \gamma$ 表現也上升。後續將進行 in vivo 實驗，利用此配方合併 RT 及免疫檢查點免疫治療以引發 in situ tumor vaccination effect，並探究 IL15-ABD 對於個別類型的免疫細胞(NK cells、dendritic cells、macrophages 等等)的作用。

實驗設備

Paul Carbone Cancer Center 的動物實驗室中，其中一項設備是可精準照射放射線的 Xstrahl SARRP (Small Animal Radiation Research Platform，如圖)。此設備具有幾項功能：影像導引功能、高解析度的 cone beam-CT 影像，可定位照射目標及輔助放射劑量給予；可勾畫 contours，設計治療計畫，並可進行 3D-conformal (順型)放射治療。另外，其開放式的平台可允許其他增設影像模組或新式的技術。此設備可提供精準、穩定的實驗輸出，對於 in vitro 或 in vivo 研究都很有幫助。



Clinical Observation

在威斯康辛大學進修期間，除了進行基礎研究之外，感謝 Professor Paul Harari 主動提供在其放射腫瘤部門(Department of Human Oncology)觀摩臨床運作的機會。

1. 每周一次的 Chart Rounds 中討論當周開始接受放射治療的病案，另外尚有各種瘤別的多科團隊會議，常有富挑戰性的病例。期間各主治醫師也屢屢詰問住院醫師相關治療決策決定的過程與文獻，過程相當充實。

UW Department of Human Oncology 的放射治療設備與技術頗有與國內不同或值得借鏡之處。例如：使用 MRI 執行 real-time 影像導引 (image guidance) 的直線加速器- ViewRay，目前僅在美國 9 家放射治療機構設置，因此是難得的參觀機會。此部門的近接放射治療 (brachytherapy) 技術也相當成熟，以攝護腺癌及婦癌為大宗。其中對攝護腺癌的 interstitial implant 近接治療印象深刻，包括麻醉部門的合作默契、器械植入的技術層面、治療計畫最佳化的電腦運算等等。

心得及建議事項

此次赴美國進修，要感謝癌醫中心醫院提供的機會以及科部的支持。這次到美國 University of Wisconsin Carbone Cancer Center，進修場所的實驗室主持人 - Dr. Zachary Morris，是一位 Radiation Oncologist 及 Physician Scientist；此實驗室的研究重心是探討多種放射線治療模式與免疫治療的合作療效，其中除了傳統的 external beam radiation、brachytherapy 之外，還包括 targeted radiation therapy (TRT，是將放射性同位素鑲嵌於 targeted molecule 的藥物)、immunocytokine (將 cytokine 與 targeting molecule 結合的藥物) 等等。在進修期間，我延續先前的研究主題，繼續研發 immune checkpoint blockade DNA vaccines，以期發展出有別於現今以抗體為主的免疫治療，進一步增進放射治療的效用。所得的研究成果已於今年的 AACR 年會 (因 Covid-19 疫情而改為 Virtual Meeting) 發表海報；目前正在撰寫論文，預計近期投稿。Carbone Cancer Center 的研究室與實驗環境的設置較為開放，因此有利於與其他研究者討論與合作。定期舉行的 Journal Club 與研究會議中，可以接觸到眾多其他研究團隊的成果與討論。

進修期間的收穫不僅是研究方面的啟發，也豐富了人生的經驗。威斯康辛州位於美國的中西部，四季氣候分明。第一年我們租了一間 house (獨門獨院的房屋)，夏天需要修剪草坪、拔雜草，秋天掃落葉，冬天則是鏟不完的雪；算是體驗了當地人的家居生活。兩個小孩分別就讀中學及高中，接觸美國的教育方式也是難得的經驗。學校早早就放學，作業也不多，因此課外活動也很重要。這樣的教育方式，應該有助於小孩發掘自己的興趣。

依個人的經驗來說，若是進修期間為一年，可能時間不足以讓研究的進度大幅增加，特別是涉及 bench work/wet lab、動物實驗等等的研究主題。因此建議在短暫的進修期間多多觀察，吸收當地研究機構、各個研究團隊的研究主題與方法，避免過度專注於自己的研究而錯失了其他學習的機會。另外，建議進修經費的補助方式能有所調整。現行的規定是等到進修結束才能請領大半的補助，對於進修期間的經濟是頗大的壓力，特別是攜家帶眷進修的家庭。