

出國報告(出國類別：短修)

慢性 B 型肝炎患者中各病程的
HBV 專一性 CD8 T 細胞的鑑別及評估

服務機關：國防醫學院 三軍總醫院

姓名職稱：黃瑋琛、中校軍醫官

派赴國家：美國

出國期間：111 年 9 月 1 日至 112 年 8 月 31 日

報告日期：112 年 8 月 28 日

摘要

B 型肝炎病毒感染在全世界造成嚴重的危害，尤其是對亞洲人群。過往研究表明，B 型肝炎病毒感染的轉歸與宿主免疫密切相關。持續 HBV 抗原的暴露和慢性發炎刺激引發的 T 細胞免疫病理反應是慢性 B 型肝炎疾病惡化的關鍵因素。因此希望藉由慢性 B 型肝炎患者的各病程來進一步鑑別並了解的 HBV 專一性 CD8 T 細胞的免疫特性。

目次

摘要	2
目次	3
本文	4
目的	4
過程	5
臨床樣本分析	5
研究材料及方法	6
HBV 專一性 CD8 T 細胞的鑑別	7
肝炎和 HBVcore 特異性 CD8 T 細胞上相應的 PD-1 波動	7
心得及建議	9

本文

目的

在這項台灣研究隊列中，我們希望更多了解慢性 HBV 感染中各病程的差異，以及相關不同病毒表位靶標而變化的 T 細胞屬性。因此，我們希望能藉此評估 HBV_{core} Ag 特異性 CD8 T 的表型特徵細胞並進一步評估其在 HBV 肝臟炎症過程中的相應變化。

過程

臨床樣本分析：

血液樣本採集自台灣台北三軍總醫院招募的慢性 B 型肝炎 (CHB) 患者和健康對照 (HC) 捐獻者。該研究得到了國際審查委員會的批准，並獲得了每個人的書面知情同意。通過血清丙氨酸轉氨酶評估肝臟炎症指數 (ALT, <40 IU/ml 被認為是正常水平)。通過 PCR 或基於序列的基因分型測試確定研究對象的人類白細胞抗原 (HLA) 基因型。該隊列中的慢性 B 型肝炎患者 HBsAg 和/或 HBV DNA 呈陽性超過 6 個月，並且證實沒有 C 型肝炎病毒 (HCV) 或 HIV 感染的證據。CHB 患者和對照的臨床特徵見下表。

Total 1000 cryo-vials (5M or 10M cells per vial) mixed with PMBC or IHL (from perfusates, liver tissue)	
Total 75 donors:	<ul style="list-style-type: none">• Healthy donors: 6• HBV-infected patients: 69
69 HBV-infected patients	<ul style="list-style-type: none">• Immune tolerant (IT): 7• Hepatitis: 25 (HBeAg\oplus: 10, HBeAg\ominus: 15)• Inactive carrier (HBeAg\ominus): 17• Occult infection (HBsAg\ominus/Anti-HBs\ominus/Anti-HBc\oplus): 7• Functional cure with Anti-HBs\oplus (HBsAg\ominus/Anti-HBs\oplus/Anti-HBc\oplus): 23• Treatment naïve: 62• Nuc. treated: 7 (pre-treatment samples: 5)• HBV-related HCC: 3
Longitudinal samples	<ul style="list-style-type: none">• HBeAg\oplus \rightarrow HBeAg\ominus seroconversion: 4• Lo ALT \rightarrow Hi ALT: 9 (HBeAg\oplus: 3; HBeAg\ominus: 4; HBeAg \oplus/\ominus seroconversion: 2)
IHL samples	<ul style="list-style-type: none">• Total donors: 13• With paired PBMC: 9; IHL alone: 4• HBV-infected liver tissue with HCC: 3• IHL from perfusates without HCC: 10 (HBV infected: 3; Healthy: 7)
HLA typing	<ul style="list-style-type: none">• Fully checked: 12• Partially checked: 28
Other virus	Serological positive for CMV, EBV, or others: 12

研究材料及方法：

與哈佛醫學院 (HMS) 及麻州總醫院 (MGH) 的肝病研究團隊合作 (<https://www.lauerkimlab.com/home>)，我們通過負載 HLA 限制性肽的主要組織相容性複合物 (pMHC) 四聚體對抗原特異性 CD8 T 細胞進行離體評估，如下表。

Class	HLA-type	sequence	position	protein	name	
Class I CD8	A01:01	LLDTASALY	30-38	CORE	30c	
		A02:01	FLPSDFFPSV	18-27	CORE	18c
		ILCWGELMTL	59-69	CORE	59c	
		FLLTRILTI	194-202	ENVELOPE	183e	
		FLGGSPVCL	215-223	ENVELOPE	215e	
		WLSLLVPFV	335-343	ENVELOPE	335e	
		GLSRYVARL	455-463	POLYMERASE	455p	
		KTYGWKLHL	498-506	POLYMERASE	155p	
		YMDDVVLGA	549-557	POLYMERASE	162p	
		HLYSHPIVL	504-512	POLYMERASE	156p	
		GMLPVCPLI	276-284	ENVELOPE	60s	
		ILSPFLPLL		ENVELOPE	73s	
		YLWEWASV	335-342	ENVELOPE	67s	
		FLLSLGIHL	575-583	POLYMERASE	575p	
	A03:01	CTCPTVQASK	12-21	PRE-CORE	12p	
		A24:02	LWFHISCLTF	101-110	CORE	101c
			KYTSPFWLL	756-764	POLYMERASE	413p
			EYLVSFGVW	117-125	CORE	117c
	A11:01	STLPETTVVRR	141-151	CORE	141c	
		YVNVNMGLK	88-96	CORE	377c	
		TTDLEAYFK	105-113	X	105x	
	B07:02/B07:01	GPCALRFTSA	67-76	X		
	B08:01	GLKILQLL	123-130	CORE	123c	
		FLLTRILTI	194-202	ENVELOPE	183e	
	B35:01	LPSDFFPSV	19-27	CORE	18c	
		SPYSWEQEL	172-180	POLYMERASE	172p	
	B51:01	LPSDFFPSV	19-27	CORE	18c	
	B40:01	AEDLNLGNL	40-48	POLYMERASE	40p	

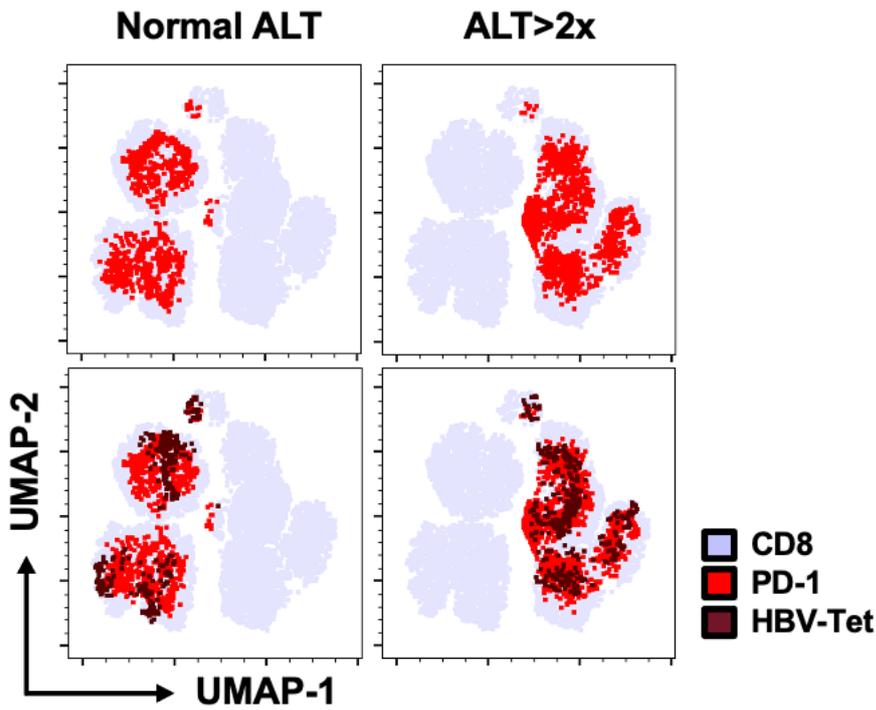
HBV 專一性 CD8 T 細胞的鑑別：

接下來，我們通過 pMHC 多聚體直接評估病毒特異性 CD8 T 細胞。因為台灣的 HLA 等位基因頻率與美國或歐洲國家明顯不同，我們還根據台灣優勢 HLA 等位基因進行表位預測。通過使用針對 HBV 抗原免疫顯性表位的 HLA 限制性 pMHC I 類四聚體，我們直接離體檢查了 HBV 特異性 CD8 T 細胞（如下表）。

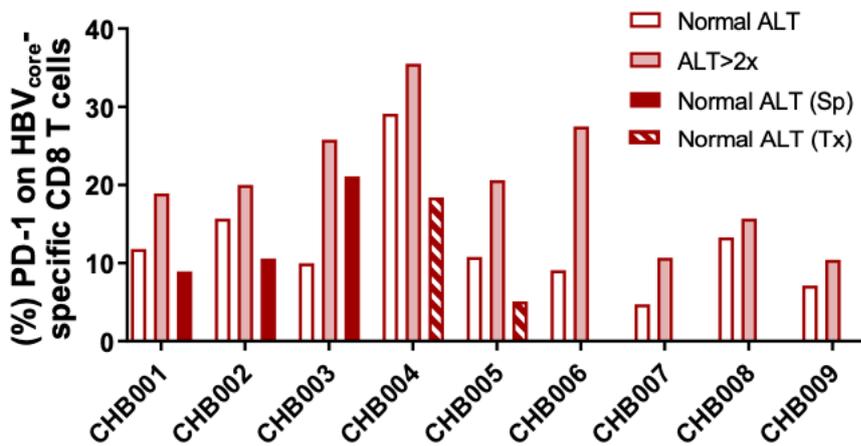
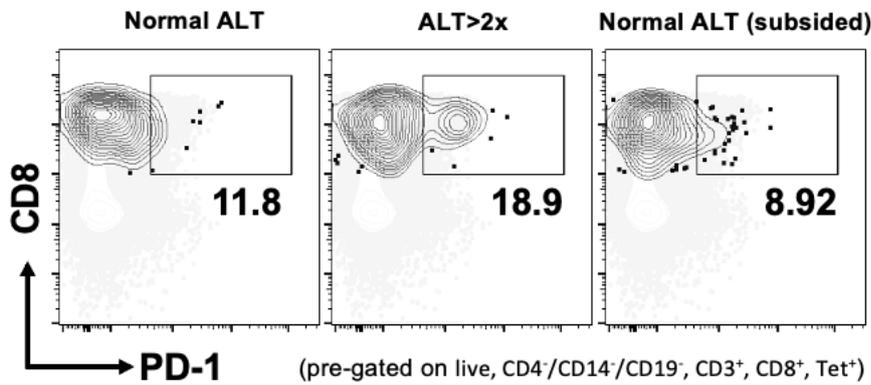
Sample ID & HLA typing	Disease information	Positive Tetramer Results	Sample ID & HLA typing	Disease information	Positive Tetramer Results
YRH61.1 HLA*A11:01 HLA*B40:01	M/59 HBeAg ⊖ Hepatitis ALT >2X HBV DNA: 13800 IU/mL	CD8*/40p Tet*	PYH81.4 HLA*A02:01 HLA*A24:02 HLA*B40:01 HLA*B51:01	M/37 HBeAg ⊕ Hepatitis ALT >2X HBV DNA: 60640112 IU/mL *Longitudinal samples: HBeAg ⊕ → Anti-HBe ⊕	CD8*/18c Tet* CD8*/40p Tet*
WG60.1 HLA*A02:01 HLA*A11:01	M/62 HBeAg ⊖ Hepatitis ALT >2X HBV DNA: 92876 IU/mL Fibroscan: F4	CD8*/18c Tet* CD8*/575p Tet*	FML58.2 HLA*A24:02	F/63 HBeAg ⊖ Hepatitis ALT >2X HBV DNA: 137000 IU/ml *Longitudinal samples: Hi ALT → Lo ALT	CD8*/101c Tet* CD8*/117c Tet*
WHC70.2 HLA*A11:01 HLA*A24:02 HLA*B35:01	M/48 HBeAg ⊖ Hepatitis ALT >2X HBV DNA: 1140000 IU/mL	CD8*/18c Tet* Ex v/yp	CJC89.1 HLA*A11:01 HLA*B40:01	F/28 Anti-HBs ⊕ Functional cure *Liver donor: Paired PBMC & IHL	CD8*/40p Tet*

肝炎和 HBVcore 特異性 CD8 T 細胞上相應的 PD-1 波動：

我們的研究表明，慢性 B 型肝炎患者的 HBV 核心特異性 CD8 T 細胞上的 PD-1 表達與肝臟炎症存在相互變化。這種相關性具有重要的免疫反應意義，具有在個體肝炎護理中臨床應用的潛力(如下圖)。

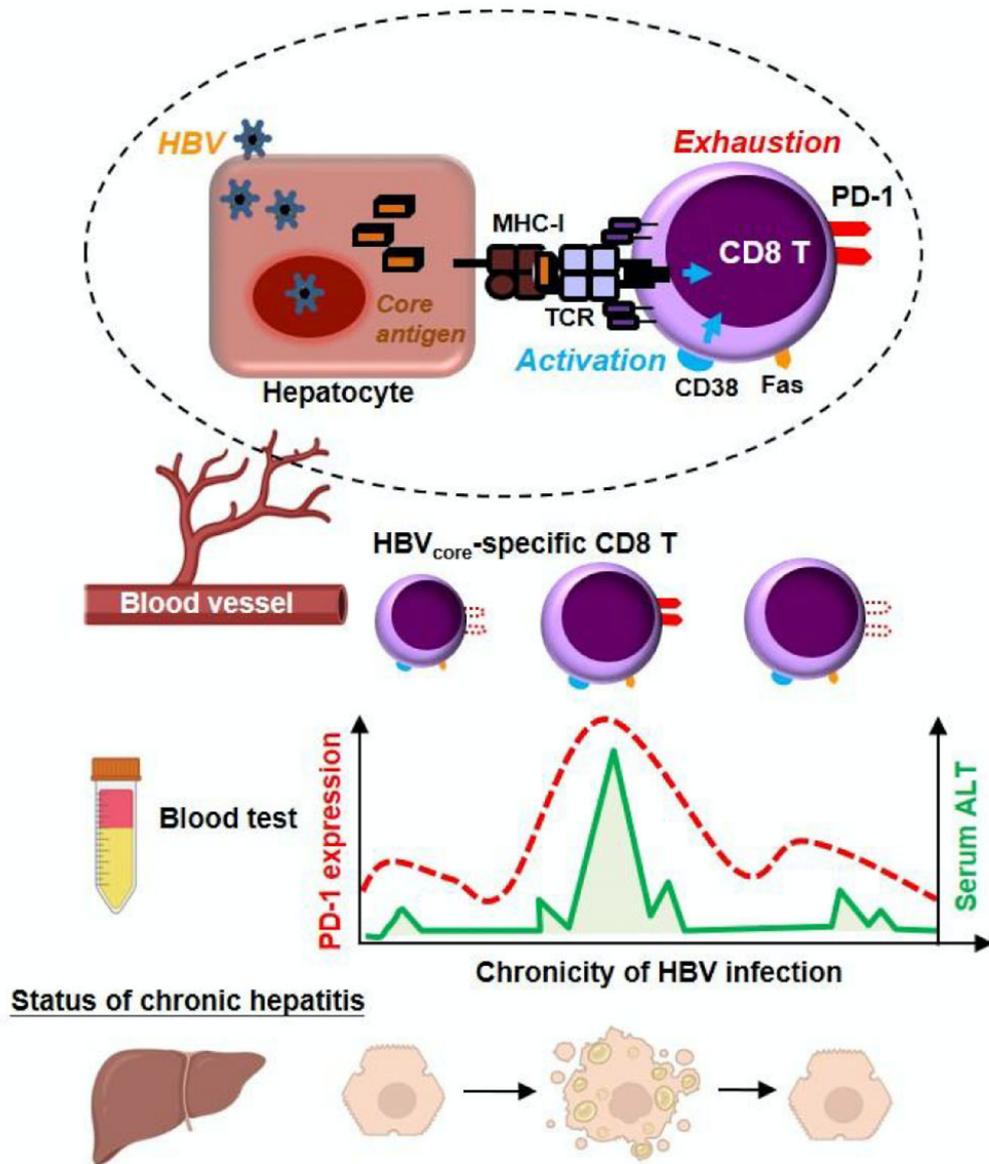


Longitudinal Paired Study



心得及建議

總體而言，我們的研究揭示了慢性 HBV 感染中 CD8 T 細胞的免疫病理學特徵。此外，我們的研究結果表明，HBV_{core} Ag 特異性 CD8 T 細胞上的 PD-1 表達水平可以被視為疾病進展或治療反應的個人免疫反應的指標，因此具有臨床應用的價值（如圖）。



目前職於國防醫學院參與研究之現況：本人有全學院最完整的 B 肝各病程的細胞液氮儲存庫 (近 8000 份血液 or 肝臟的免疫細胞臨床檢體)，但因實驗室空間及設備有限(無足夠空間存放、細胞無菌操作台風扇過熱且老舊、離心機狀態超過保養年限、貴儀中心各設備對於臨床

檢體使用門檻高)，加上院內助理人事聘用經費限制及人員訓練不易，因此只能將本人累積數年珍貴的臨床檢體資源轉往院外的其它的研究單位(eg: 哈佛醫學院 or 中研院...)，期待能對於醫學領域有更好的科研貢獻。參照過去一年在哈佛醫學院及麻州總醫院(MGH)肝病研究中心的經驗，職看到他們醫研單位對於臨床疾病研究的重視及投注的資源和有效率的管理系統。因此，職建議我們國防醫學院對於臨床檢體相關的醫學研究能提供更友善的實驗環境及存放空間，研究助理的聘用及訓練能有彈性及提供協助和管理，貴儀中心也能更加開放及鼓勵同仁的參與及使用，如此才能讓國醫中心的研究發展有機會向下扎根、向上結果。