

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

樹突細胞為基礎的基因療法在過敏疾病的應用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-3112-P-002-002-Y

執行期間：91年01月01日至91年12月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所

計畫主持人：江伯倫

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 92 年 5 月 7 日

## 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

計畫名稱:樹突細胞為基礎的基因療法在過敏疾病的應用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 91-3112-P-002-002-Y

執行期間：91 年 01 月 01 日 至 91 年 12 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所

計畫主持人:江伯倫教授

## 一、摘要

### 中文摘要：

我們去年的研究報告中已經顯示我們可以在試管內培養出樹突細胞，同時對這些樹突細胞的表面標記和功能分析也已經完成。另外，我們在小鼠身上建立一個氣喘的動物模式，利用卵蛋白來誘發抗原特異性 IgE、呼吸道的發炎和肺功能的改變。目前，有關樹突細胞的功能分析和動物模式的建立在去年和今年上半年的執行中都已經完成。而我們目前正在更進一步利用不同培養和刺激來促進樹突細胞分泌更多的 IL-12，IL-12 已經知道可以促進第一型 T 輔助細胞的發育；如果能夠在培養中促進樹突細胞分泌更多的 IL-12，對過敏疾病的治療將有所助益。我們利用 ribavirin 及 CpG motif 與樹突細胞一起培養，結果發現可以有效地誘發樹突細胞分泌更高量的 IL-12。我們將這些與 ribavirin 和 CpG motif 一道培養和加入卵蛋白的樹突細胞注射入小鼠體內，結果發現這些經過處理的樹突細胞能夠有效地降低體內卵蛋白特異性 IgE 和增加卵蛋白特異性 IgG2a 的濃度。同時，經過這樣處理的樹突細胞注射入小鼠體內也可以降低 IL-5 的濃度和降低呼吸道的發炎反應。

今年我們更進一步利用已經完成的腺病毒載體表現 IL-12 和 IL-18 基因來感染樹突細胞，再應用到過敏疾病的治療上。我們研究結果發現將這些有表現 IL-12 及 IL-18 基因腺病毒感染的樹突細胞在致敏前先給予，的確可以有效地降低血清中過敏原特異性 IgE 的濃度，同時也可以有效地減少氣管沖洗液內嗜酸性白血球的數目，也可以有效地降低呼吸道的阻力。而在這些感染腺病毒的情形下，可以觀察到同時利用 Adv/IL-12 和 Adv/IL-18 感染的樹突細胞能夠發揮最好的功能而降低上述的發炎指標。為了進一步了解這些樹突細胞是否也能夠發揮治療的效果，我們將這些經腺病毒處理過的樹突細胞經由氣管內給予的方式來治療。我們研究的結果發現這樣的治療方式也可以達到改善呼吸道過敏的效果，尤其是感染 IL-12 基因的樹突細胞能夠得到最好的治療效果。這點研究結果跟我們前面的結果相一致，表示 IL-12 本身便具有抗發炎的效果，所以在已經建立好氣喘的動物模式上還是能夠經由氣管內給予的方式達到改善的效果。

我們目前正利用跟細胞凋亡相關的基因如 Fas L，也是利用腺病毒載體來表現，希望能夠達到治療的效果。此一部份的研究還在繼續進行中，相信未來也將有一些令人感到有興趣的研究結果。

中文關鍵詞(至少三個)：樹突細胞、基因療法、過敏疾病

### 英文摘要:

The aim of this study is to explore the possibility of application of dendritic cells in enhancing immune response in prevention of allergic diseases. It has been well documented that dendritic cells can play an important role in triggering immune response. In the past year, we have established animal model of airway inflammation and cultured dendritic cells for the treatment. Both ribavirin and CpG motif were used to culture with dendritic cells, phenotypic analysis and cytokine profiles of the dendritic cells were assayed. The results suggested both ribavirin and CpG motif can increase IL-12 production by the dendritic cells *in vitro*. Further, ribavirin or CpG motif modified dendritic cells pulsed with ovalbumin (OVA) antigen can increase OVA-specific IgG2a and decrease OVA-specific IgE antibody *in vivo*. The level of IL-5 and airway hyperresponsiveness were also decreased in mice treated with ribavirin or CpG motif modulated dendritic cells. All the data suggested *in vitro* modulated dendritic cells can be applied for the treatment of animal model of asthma. In addition, we also establish the method of primary lung cell culture for the evaluation of the effect of IL-12. IL-12 can decrease eotaxin levels both *in vitro* and *in vivo*. To further enhance the function of dendritic cells, various cytokine genes such as IL-12, IL-18 or GM-CSF will be introduced into dendritic cells by adenoviral vector after pulsing with allergen.

We also investigated the possible application of cytokine-gene modulated dendritic cells on the alleviation of airway inflammation. The significant amount of IL-12 or IL-18 levels was expressed by Ad-IL-12 or Ad-IL-18 infected bone marrow-derived dendritic cells. These cytokine-genes modulated DCs pulsed with ovalbumin antigen (OVA) were injected intravenously into the naïve mice one week before sensitization or days before inhalation challenge in mice sensitized with OVA antigen. Ad-IL-12 and Ad-IL-18 infected dendritic cells effectively decreased the anti-OVA IgE Ab level in serum and subsequently suppressed airway inflammation. In contrast, late treatment with Ad-IL-12 infected DCs could alleviate the eosinophilia, AHR, eotaxin expression, and enhance the IFN- $\gamma$  expression in BAL fluid. Ad-IL-18 alone could induce the IFN- $\gamma$  expression but could not suppress the eosinophilia efficiently when compared to those of the Ad-IL-12 treated group. This is the first study to apply cytokine-genes modulated DCs for the murine model of asthma and might shed light on further understanding the role and possible therapeutic application of dendritic cells in asthma.

Further, adenoviral vector expressing Fas ligand has been also constructed also. Fas-L expressing dendritic cells pulsed with allergen will be used to induce death of allergen-specific T cells in pre-established mouse of airway inflammation. All the results here showed this project is in very good progress. We believe more and more interesting results will be completed in the future.

Key words: Dendritic cells, gene therapy, allergic diseases

## 二、本文

如附件

## 三、計畫成果自評

本研究計畫利用目前最新的生物技術，包括基因療法和樹突細胞，運用到近年來流行率一直攀升的過敏疾病。我們的研究結果發現可以順利地在試管中培養出小鼠和人類的樹突細胞，以提供未來在相關免疫疾病如腫瘤、過敏疾病和自體免疫疾病上的應用。同時，我們也建立 DNA 載體和腺病毒來將細胞激素和細胞凋亡基因送入樹突細胞或是動物體內，都有相當好的成果。目前我們在利用細胞激素 DNA 載體治療小鼠的動物模式上，以及利用試管內調節樹突細胞的功能來治療過敏疾病上都有不錯的成果。目前有四篇相關的研究論文正在撰寫中，其中有一篇也已經發表；另外一篇目前正在修稿中。另外兩篇也已經分別投稿，目前還在等期刊審查結果的回音中。

1. Ye YL, Lee YL, Fu CL, Chiang BL: Interleukin-12 decreases eotaxin level of cultured primary lung cells and alleviates airway inflammation in vivo. *Cytokine* 2002; 16: 76-84.
2. Chiang DJ, Ye YL, W-L Chan, Lee YL, Fu CL, N-Y Hsu, Chiang BL: Ribavirin or CpG DNA sequence modulated dendritic cells decrease antigen-specific IgE level and airway inflammation. *Am J Res Crit Care Med* (Revised)
3. Fu CL, Lee YL, Ye YL, Chiang BL: The therapeutic effect of different cytokine DNA plasmids on airway hyperresponsiveness in animal model of asthma. *Clin Exp Allergy* (Submitted)
4. Ye YL, Lee YL, Chuang ZJ, Lai HJ, Chen CC, Tao MH, Chiang BL. Cytokine expressing adenoviruses modulated dendritic cells alleviate airway inflammation in the animal model of asthma. *Gene Therapy* (Submitted)

今年度的研究結果顯示我們的研究進度都按照原來的計畫內容，而且有些計畫內容已經提早完成，所以目前已經完成四篇論文的撰寫，都已經投稿出去。同時，我們的計畫也分別建立了下列的技術：

1. 氣喘的小鼠模式的建立，由於我們建立了由小鼠來的氣喘模式，可以讓我們在未來能夠進一步研究氣喘的發病機轉和研發一些相關的治療。

2. 樹突細胞的培養：我們已經建立一個試管內的系統，可以來培養出樹突細胞以作為免疫療法的基礎。這些研究成果也都可以應用到其他如腫瘤、自體免疫疾病和感染疾病的治療上。

3. 在過去兩年多的時間，我們建立了許多可以表現細胞激素基因的載體，包括 IL-4、IFN- $\alpha$ 、IL-10、IL-12 和 IL-18 等基因的質體和腺病毒載體。這些細胞激素基因的載體，可望應用於相關疾病的免疫療法上。