

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

NK 細胞受不表現 MHC 且生產 TGF-b 之 CTVT 腫瘤中之細胞素的影響,並開發治療不表現 MHC 且生產 TGF-b 腫瘤的基因

(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-002-021-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人：朱瑞民

報告類型：完整報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 11 月 1 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

NK 細胞受不表現MHC 且生產TGF- β 之CTVT 腫瘤中之細胞素的影響,並開發治療不表現MHC 且生產TGF- β 腫瘤的基因(3/3)

計畫類別： 個別型計畫

計畫編號： NSC91-2313-B-002-391-

執行期間： 93 年08 月01 日至94 年07 月31 日

執行單位： 國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人： 朱瑞民

報告類型： 完整報告

處理方式： 本計畫可公開查詢

中華民國94 年10 月31 日

摘要

犬傳染性花柳性腫瘤(Canine transmissible venereal tumor, CTVT)的細胞表面僅能表現極少量的 MHC (1)，CTVT 在生長期及消退期會分泌大量的 TGF- β 。TGF- β 確具有使 MHC I 和 II 不表現以及抑制 NK 細胞活性的特性，但在消退期中，TGF- β 存在下的腫瘤仍能進行消退的原因是，此時期之腫瘤浸潤淋巴球 (Tumor infiltrating lymphocytes, TILs) 會分泌大量的 IL-6。IL-6 已知能恢復被 TGF- β 所抑制之 NK 細胞的毒殺作用(2)。在 CTVT 之 TILs 中，有高達 85 % 以上為疑似 NK 細胞的非 T 非 B 淋巴球，而 IL-15 在 NK 細胞之活化上又扮演著重要的角色。基於以上的發現，本實驗先構築 IL-6 與 IL-15 兩個質體，並確定其可分泌具生物活性的 IL-6 與 IL-15。再設計一複合式的基因療法，以肌肉活體基因電衝的方式，將 IL-6 及 IL-15 基因導入帶有 CTVT 腫瘤之 C.B-17 SCID mice 體內，以觀察其對 CTVT 生長之影響與提升小鼠之存活率。上述之實驗設計主要希望藉由 IL-6 解除 TGF- β 對 NK 活性的抑制，再進一步以 IL-15 活化 NK 細胞，以達到消退腫瘤的目的。除了活體實驗外，本研究同時以細胞培養的方式，探討 TGF- β 對於小鼠脾臟細胞之 NK 活性抑制效應，以及 IL-6 和 IL-15 二者對於 TGF- β 所抑制之 NK 活性之回復作用，配合複合式免疫療法的效果，探討 NK 細胞在此 MHC 低表現，且產生 TGF-

β 的腫瘤中所扮演的角色。在細胞培養實驗中，我們證實了 IL-6 和 IL-15 合併使用時，能有效的解除 TGF- β 對於 NK 細胞的活性抑制能力。更進一步在 NK 細胞毒殺實驗中，發現單核細胞也會增強 NK 細胞的毒殺作用。對於在 BALB/c 小鼠中我們成功的以 IL-6 和 IL-15 質體在小鼠體內製造具功能的 IL-6 和 IL-15。合併使用 IL-6 和 IL-15 質體可使小鼠脾臟中的 NK 細胞數目上升，且增加 NK 細胞毒殺能力。單獨使用 IL-15 質體之小鼠則 NK 細胞毒殺能力稍有提升，但 NK 細胞之數目則和 IL-6 及 Vector 處理組相同；而 IL-6 質體則對於 NK 細胞之數目及毒殺能力均無影響。IL-6 及 IL-15 合併使用對於 CTVT 的形成 (Establishment) 有明顯的抑制效果，且能顯著的延緩已形成 (Established) 之 CTVT 腫瘤的生長。單獨使用 IL-6 或 IL-15 質體者則對於 CTVT 腫瘤之消退沒有影響。給予 Anti-asialo GM-1 抗體阻斷 C.B-17 SCID 小鼠之 NK 細胞功能時，IL-6 及 IL-15 質體便無法發揮功用使腫瘤消退。上述結果證實了 NK 細胞在此複合式療法中扮演了對抗 CTVT 的主要角色。

關鍵字：Anti-asialo GM-1 Ab、CTVT、IL-6、IL-15、NK cells

Abstract

Canine transmissible venereal tumor (CTVT) has low levels of MHC molecules on the cell surface. CTVT spontaneously regresses after a 4-6 months of growth. CTVT cells secrete high concentrations of TGF- β during tumor growth. TGF- β inhibits NK cell cytotoxicity. However, CTVT undergoes regression when TGF- β concentration remains high because tumor infiltrating lymphocytes (TIL) produce large amounts of IL-6. IL-6 is a strong TGF- β antagonist and is one of the key substances that restore NK cell cytotoxicity against CTVT cells. Based on these findings, we devised and tested a new immuno-gene therapy strategy that uses both IL-6 and IL-15. IL-6 antagonized the inhibitory effect of TGF- β on NK cell cytotoxicity. In a cell culture system, we evaluated the role of NK cells in tumor regression and the ability of IL-6 and IL-15 to restore TGF- β -inhibited NK cell cytotoxicity. Only the treatment using both IL-6 and IL-15 effectively relieved the inhibitory effect of TGF- β and activated NK cell cytotoxicity. The IL-6 and IL-15 only treatments did not increase, or only slightly increased, NK cell cytotoxicity. Electroporation of IL-6 and IL-15 plasmids into BALB/c mice increased the ratio of NK cells in the spleen and promoted splenocyte NK cell cytotoxicity. The IL-6 and IL-15 only treatments did not significantly change the NK cell ratio or the cytotoxicity of NK cells. However, in the IL-15 treatment, there was a slight elevation of NK cell ratio. In CB17/SCID mice, electroporation with both IL-6 and IL-15 plasmids strongly inhibited the growth and establishment of CTVT. IL-6 or IL-15 alone had no effect. In CB17/SCID mice treated with anti-asialo GM-1 antibody, which blocks NK cell function, combined electroporation with

IL-6 and IL-15 was unable to suppress CTVT growth. Thus, NK cells play a key role in suppressing tumors with low MHC expression and high TGF- β secretion. Gene therapy using both IL-6 and IL-15 effectively suppressed the growth and establishment of the tumor.

關鍵字：Anti-asialo GM-1 Ab、CTVT、IL-6、IL-15、NK cells

前言

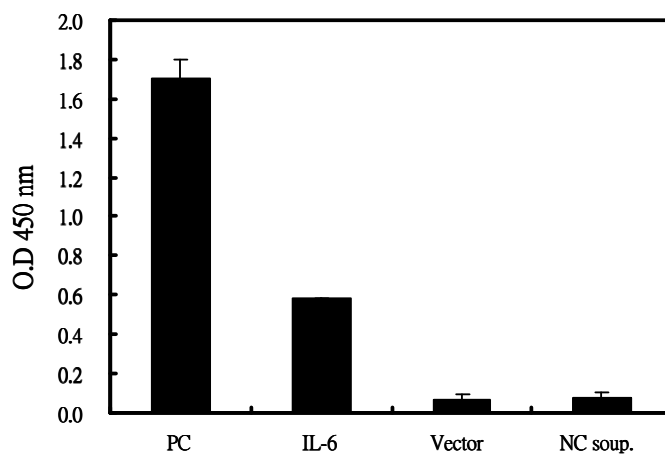
腫瘤藉由多種機制逃避宿主免疫系統的監控而生長，其中 MHC 分子的不表現或低表現性是腫瘤細胞常用的機制之一。在此同時，腫瘤也會產生免疫調節性細胞素 TGF- β 來抑制會因 MHC 分子不表現所活化之 NK 細胞，因此，免疫系統無法正常的執行功能，所以腫瘤便在宿主體內肆無忌憚的生長。如何解除 TGF- β 對於免疫系統的抑制功能，一直以來是腫瘤免疫學家們努力的目標之一。抗 TGF- β 抗體的施打與 TGF- β 之 Antisense-oligonucleotides 基因療法是目前用來對抗 TGF- β 的主要方法。而近來的研究則發現，IL-6 (3) 也可抑制 TGF- β 的功能。Ohta 等人 (2000) 首先在免疫細胞上研究 IL-6 和 TGF- β 之交互作用。發現 TGF- β 會抑制 T 細胞之細胞增生能力，但當加入 IL-6 時，TGF- β 之抑制作用隨即被解除，使得 T 細胞得以恢復其功能。除了解除 TGF- β 對 NK 細胞之抑制外，尚可使用下述之細胞素對 NK 細胞進行進一步的活化作用，其分別為：IL-2，IL-12，IL-15，IL-18 以及 IL-21。而 IL-15 對 NK 細胞的成熟、生存，與分化扮演著極為重要的地位 (4)。肌肉活體基因電衝在近年來開始被廣為使用，肌肉本身可有效的吸收基因並產生基因所編碼的蛋白質，使用電衝後更可增加基因的表現量與延長表現的時間。

綜合上述原因，CTVT 的生長可能和 MHC 的低表現性，以及在 TGF-

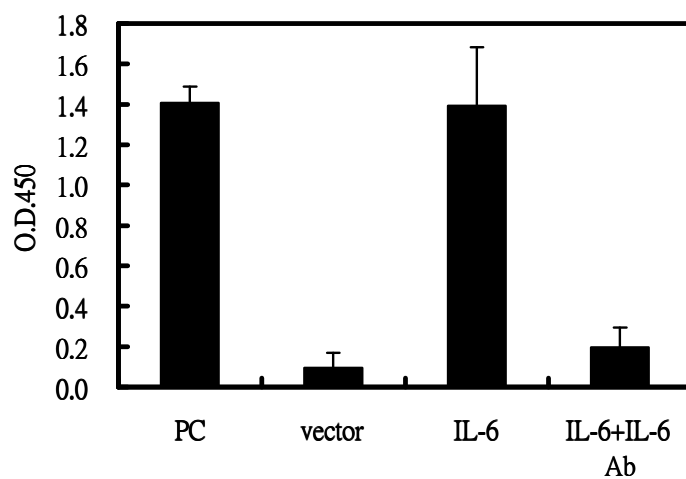
β 和 IL-6 之交互作用下所調控之 NK 細胞的毒殺能力有極大的關係。因此，針對 CTVT 逃避及抑制宿主免疫系統的特性，本實驗以只具有正常功能之 NK 細胞的 Severe combined immunodeficient (SCID) mice (C.B-17 SCID) 為動物模式，設計一運用肌肉活體電衝方式植入多種細胞素的免疫基因療法，運用 IL-6 拮抗 TGF- β 的作用，解除宿主的免疫抑制狀態，再以 IL-15 活化體內 NK 細胞針對腫瘤的毒殺活性。而本實驗之目的的一方面在印證 IL-6 和 IL-15 對於受 TGF- β 所抑制之 NK 細胞的回復作用，另一方面則在評估此免疫療法對於 CTVT 之療效，以期日後能運用在相似特性之腫瘤治療上。

結果

A.



B.



圖一、IL-6 質體活性測試。使用 CellTiter 96® AQueous One Solution，

以 TF-1 細胞進行細胞分裂能力試驗。

A. X 軸為 O.D. 450 nm 之讀值，Y 軸為不同之處理組。

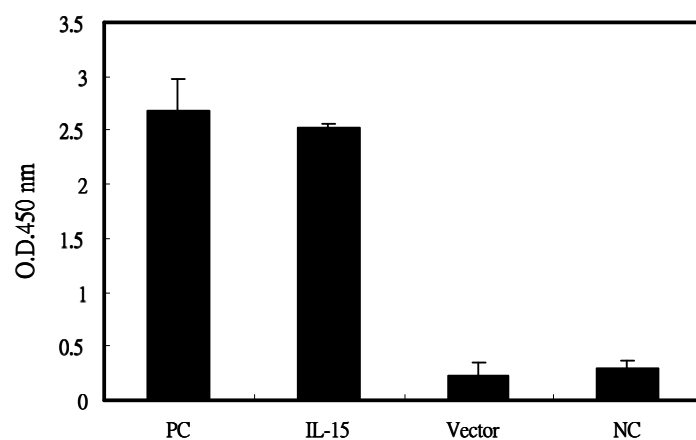
「PC」表示使用人工合成之人類 IL-6 蛋白質（recombinant human

IL-6）；「IL-6」為 IL-6 質體轉染後之 Balb/3T3 細胞上清液；

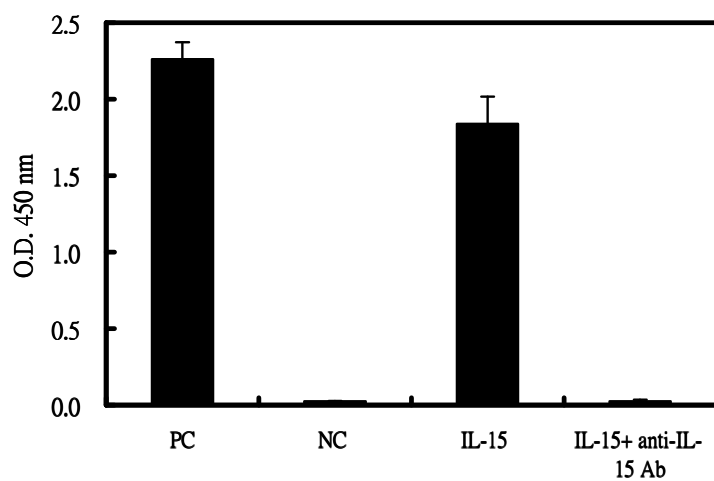
「vector」則為轉染不插入任何基因之 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 質體所得之上清液；NC 則是沒有質體只加入 lipofectamine 於 Balb/3T3 細胞中之培養液。

B. 「PC」，IL-6」，及「vector」之處理同 A 圖，「IL-6+IL-6 Ab」組則另外加入 5 μ g 之 Rabbit-anti-human polyclonal IL6 抗體。測試之結果顯示 IL-6 質體轉染 Balb/3T3 細胞後所得之上清液可有效的使 TF-1 細胞進行細胞分裂，而轉染不含任何基因的 pcDNA3.1/V5-his-TOPO 質體及單獨培養 Balb/3T3 的上清液則不具此活性，而此上清液中所含的細胞分裂活性在加入了 polyclonal rabbit anti-human IL-6 抗體後即被阻斷。

A.



B.



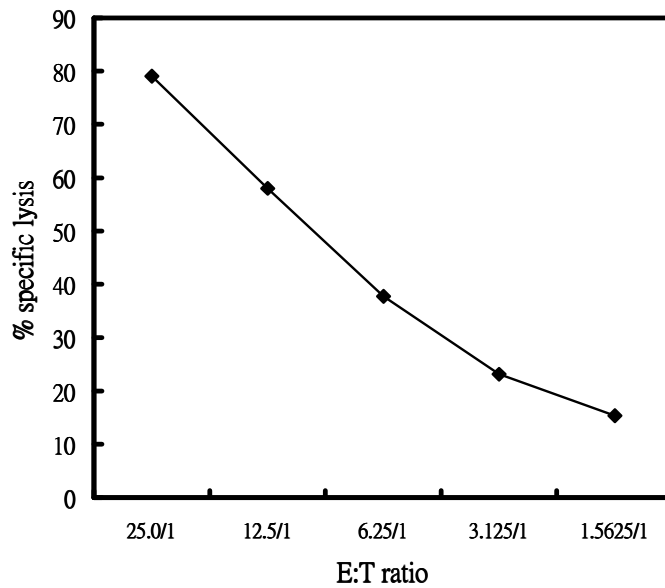
圖二、IL-15 質體活性測試。使用 CellTiter 96® AQueous One Solution，以 TF-1 細胞進行細胞分裂能力試驗。

A. X 軸為 O.D. 450 nm 之讀值，Y 軸為不同之處理組。「PC」表示使用人工合成之人類 IL-15 蛋白質（recombinant human IL-15）；「IL-15」為 IL-15 質體轉染後之 Balb/3T3 細胞上清液；「vector」則為轉染不插入任何基因之 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 質體所得之上

清液；NC 則是沒有質體只加入 lipofectamine 於 Balb/3T3 細胞中之培養液。

B. 「PC」，IL-15」及「vector」之處理同 A 圖，「IL-15+IL-15 Ab」組則另外加入 3.75 μ g 之 IL-15 抗體。

測試之結果顯示 IL-15 質體轉染 Balb/3T3 細胞後所得之上清液可有效的使 HT-2 細胞進行細胞分裂，且其活性和 PC 組相近；而轉染不含任何基因的 pcDNA3.1 /V5-his-TOPO 質體及單獨培養 Balb/3T3 的上清液則不具此活性，而此上清液中所含的細胞分裂活性在加入了 polyclonal rabbit anti-human IL-15 抗體後即被阻斷。

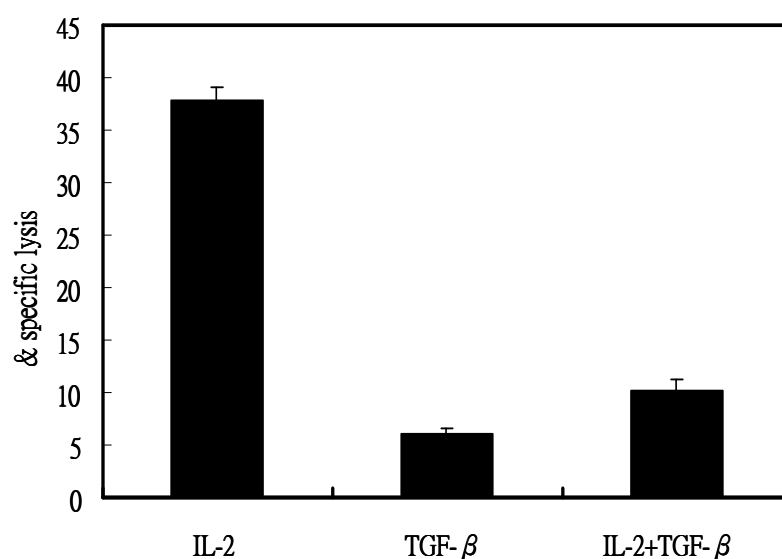


圖三、小鼠 NK 毒殺能力測試。

由 BALB/c 小鼠取得脾臟細胞，以 ACK lysis buffer 溶去紅血球，於 24 孔盤中每孔放入 2×10^6 個脾臟細胞，並加入 1000 U 之 IL-2 培養，於培養之第 3 天再加入等量之 IL-2，培養 6 天後進行 NK 毒殺能測試，將脾臟細胞與事先標定有螢光染劑 DIOC18 之 YAC-1 細胞混合作用 6 小時，再加入 PI 染色後以流式細胞分析儀進行分析。上圖 X 軸不同比例之脾臟細胞與 YAC-1 細胞混合；Y 軸為 YAC-1 細胞被毒殺之百分比。

結果發現，在 E/T ratio 為 25/1 時，其對 YAC-1 之毒殺作用可達到 $79.05 \pm 0.45\%$ ；12.5/1 時為 $58.02 \pm 1.44\%$ ；6.25/1 時為 $37.77 \pm 1.39\%$ ；3.125/1 及 1.5625/1 時則分別為 $23.12 \pm 0.73\%$ 及 $15.32 \pm 0.6\%$ 。結果顯示 BALB/c 小鼠之 NK 細胞毒殺反應在進行 6 小時後，其 E/T

ratio 為 25/1 時即可達到良好之效果，E:T ratio 為 100/1 及 50/1 時則毒殺效應反而開始下降（ $63.01 \pm 3.1\%$ 及 $77.03 \pm 2.64\%$ ）。

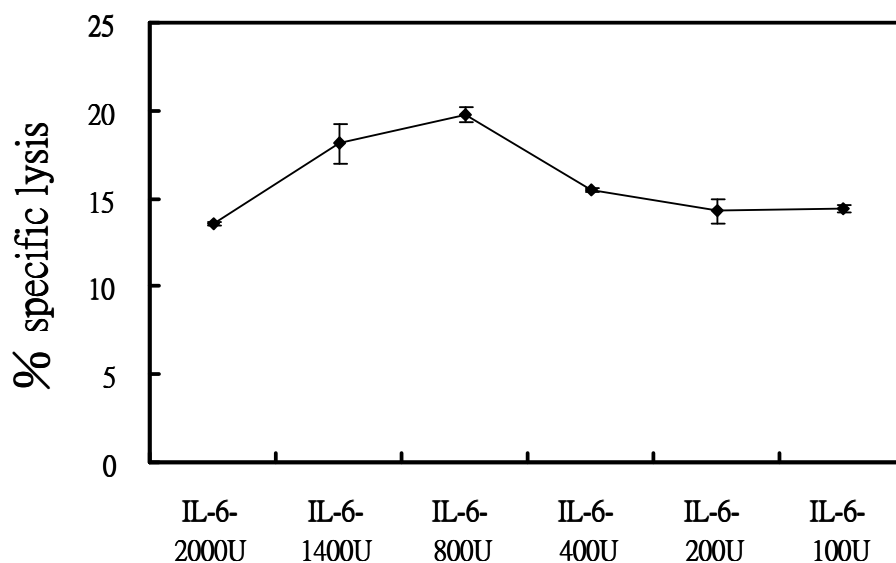


圖四、TGF- β 對 NK 細胞毒殺能力之影響。

BALB/c 小鼠之脾臟細胞在以 ACK lysis buffer 處理後，分別以每 2×10^6 個脾臟細胞 1000 U 之 IL-2，200 U 之 TGF- β ，以及 1000 U 之 IL-2 + 200 U 之 TGF- β 三種處理組進行培養，並於第 3 天追加一次上述劑量之細胞素，之後於第 6 天進行 NK 細胞毒殺能力測試。圖上所視為 E/T ratio 為 6.25/1 時之結果，X 軸為不同之處理組，Y 軸為 YAC-1 細胞被毒殺之百分比。

結果發現 TGF- β 會明顯的抑制 IL-2 所活化之 NK 細胞的毒殺能力（ $10.21 \pm 1.10\%$ ），而單獨以 TGF- β 培養之處理組（ 6.05 ± 0.62

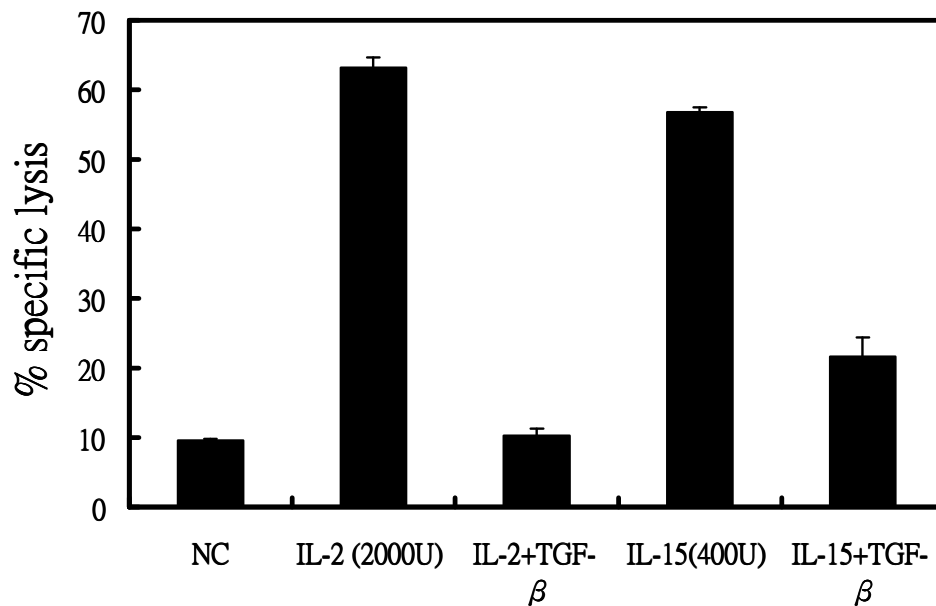
%) 則由於未經過任何之活化，故所造成之 YAC-1 細胞死亡百分比和不經任何處理之 Negative control 組結果相似 ($9.76 \pm 0.87\%$)



圖五、IL-6 對 NK 細胞毒殺能力之影響。

以 24 孔盤培養 BALB/c 小鼠之脾臟細胞，每孔細胞數為 2×10^6 ，共分成 7 個處理組，分別加入 2000 U、1400 U、800 U、400 U、200 U，以及 100 U 之 IL-6 進行培養，並於第 3 天重複上述劑量再加一次 IL-6，於第 6 天進行 NK 細胞毒殺作用。上圖之 E/T ratio 為 13/1。X 軸表示不同之 IL-6 劑量；Y 軸為 YAC-1 細胞被毒殺之百分比。

結果發現 YAC-1 細胞之死亡比率沒有隨著 IL-6 之劑量加高而上升，且在 800 U 以上之 IL-6 作用下，NK 毒殺能力反而開始下降

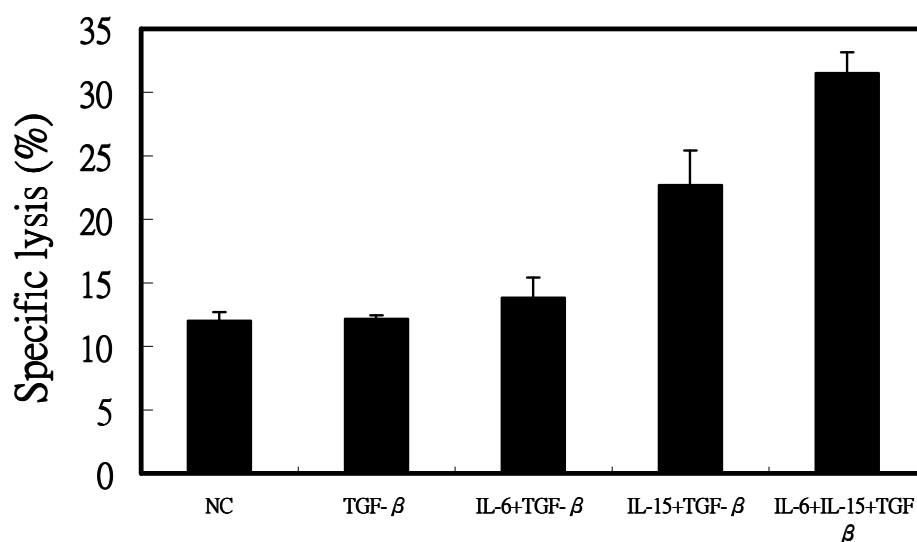


圖六、IL-15 對 TGF- β 所抑制之 NK 細胞能力的回復作用優於 IL-2。

以 24 孔盤培養 BALB/c 小鼠之脾臟細胞，每孔細胞數為 2×10^6 ，實驗分為 5 個處理組培養細胞：分別為不加任何細胞素之控制組（NC）、1000 U 之 IL-2、1000 U 之 IL-2 + 200 U 之 TGF- β 、200 U 之 IL-15、以及 200 U 之 IL-15 + 200 U 之 TGF- β 。並於第 3 天時於上述各處理組中分別再加一次各細胞素。於第 6 天進行毒殺作用。上圖為 E/T ratio 為 13/1 時所測得之結果。X 軸表各不同之處理組；Y 軸為 YAC-1 細胞被毒殺之百分比。

結果顯示當我們將 IL-2 或 IL-15 和 TGF- β 共同加入以培養脾臟細胞時，發現 TGF- β 會完全抑制由 IL-2 組所活化之 LAK 細胞的毒殺能力，而只能部分抑制 IL-15 組之 NK 細胞的毒殺能力，此結果顯示

IL-15 本身對 NK 的激活、以及回復由 TGF- β 所抑制之 NK 細胞毒殺活性的能力優於 IL-2

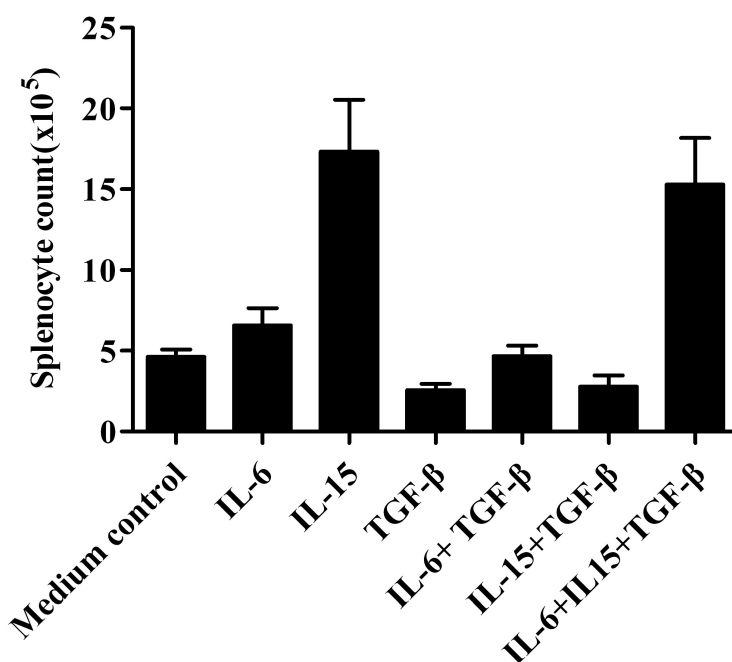


圖七、合併使用 IL-6 及 IL-15 對 TGF- β 所抑制 NK 細胞活性之影響。

共分為 5 個處理組培養 BALB/c 小鼠之脾臟細胞：分別為不加任何細胞素之控制組（NC）200 U 之 TGF- β 、200 U 之 IL-6 + 200 U 之 TGF- β 、200 U 之 IL-15 + 200 U 之 TGF- β 、以及 200 U 之 IL-6 + 200 U 之 IL-15 + 200 U 之 TGF- β 。並於第 3 天時於上述各處理組中分別再加一次各細胞素。於第 6 天進行毒殺作用。上圖為 E/T ratio 為 13/1 時所測得之結果。X 軸表各不同之處理組；Y 軸為 YAC-1 細胞被毒殺之百分比。上圖每一處理組均進行 3 重複（N=3）。

由實驗結果得知，若將 IL-6 和 TGF- β 或是以 IL-15 和 TGF- β 一同

和小鼠脾臟細胞培養時，和只加入 TGF- β 之處理組相比，發現 IL-6 在此並無法促成 NK 毒殺活性之提升，而 IL-15 則能緩慢的提升被 TGF- β 所抑制的 NK 毒殺能力。但若合併使用 IL-6 和 IL-15，則其提升的效果將會非常顯著。

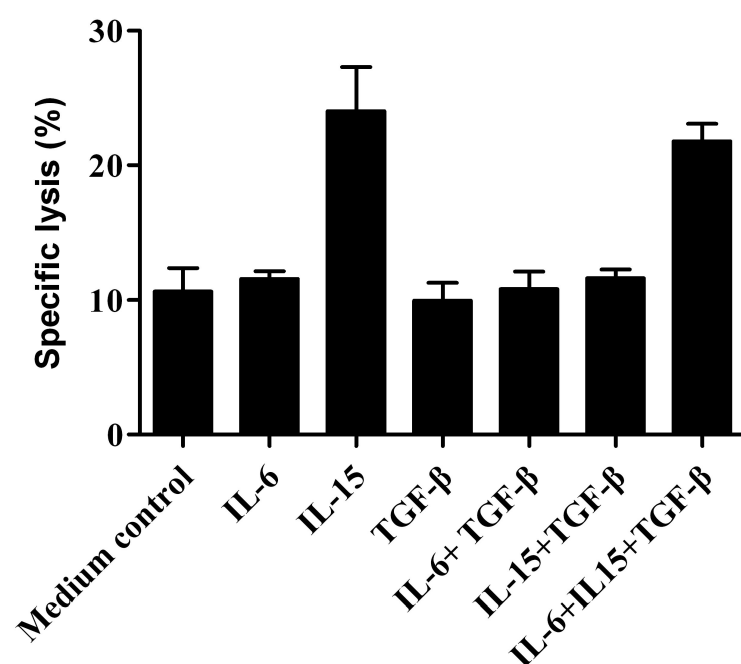


圖八、單核細胞在所使用 IL-6 及 IL-15 對 TGF- β 抑制脾臟細胞數目之影響。

將 BALB/c 小鼠之脾臟細胞培養 8 小時，使單核細胞完全貼壁，以去除單核細胞，在分為 5 個處理組：分別為不加任何細胞素之控制組 (NC) 200 U 之 TGF- β 、200 U 之 IL-6 + 200 U 之 TGF- β 、200 U 之 IL-15 + 200 U 之 TGF- β 、以及 200 U 之 IL-6 + 200 U 之 IL-15 +

200 U之 TGF- β 。並於第 3 天時於上述各處理組中分別再加一次各細胞素。於第 6 天進行細胞計數。

結果顯示除去單核細胞後，單獨 IL-15 仍可造成脾臟細胞數目增加，若合併使用 IL-6 和 IL-15，與控制組相比則有顯著性提升。

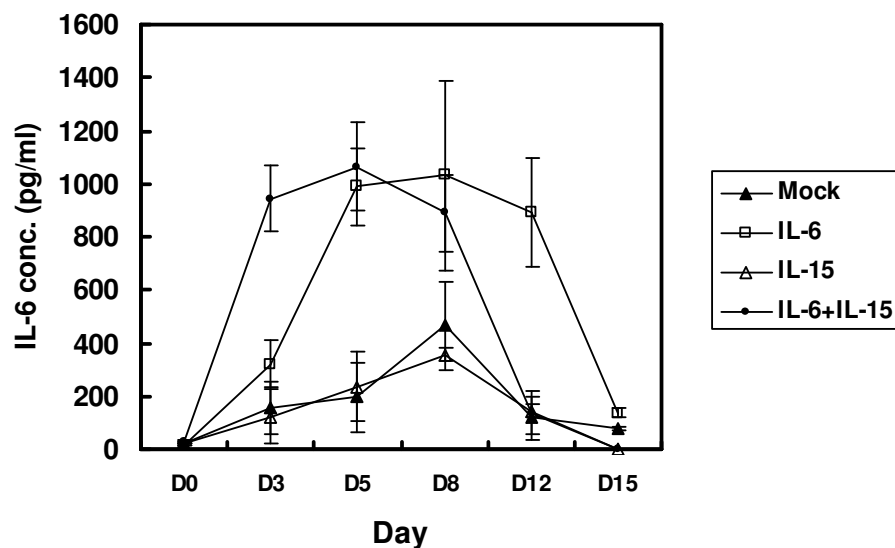


圖九、單核細胞在所使用 IL-6 及 IL-15 對 TGF- β 抑制 NK 細胞毒殺之影響。

將 BALB/c 小鼠之脾臟細胞培養 8 小時，使單核細胞完全貼壁，以去除單核細胞，在分為 5 個處理組：分別為不加任何細胞素之控制組 (NC) 200 U 之 TGF- β 、200 U 之 IL-6 + 200 U 之 TGF- β 、200 U 之 IL-15 + 200 U 之 TGF- β 、以及 200 U 之 IL-6 + 200 U 之 IL-15 +

200 U之 TGF- β 。並於第 3 天時於上述各處理組中分別再加一次各細胞素。於第 6 天進行毒殺作用。上圖為 E/T ratio 為 13/1 時所測得之結果。X 軸表各不同之處理組；Y 軸為 YAC-1 細胞被毒殺之百分比。

由實驗結果得知，若去除單核細胞後，將 IL-6 和 TGF- β 或是以 IL-15 和 TGF- β 一同和小鼠脾臟細胞培養時，和只加入 TGF- β 之處理組相比，發現 IL-6 在此並無法促成 NK 毒殺活性之提升，而 IL-15 則能緩慢的提升被 TGF- β 所抑制的 NK 毒殺能力。但若合併使用 IL-6 和 IL-15，則其提升的效果將會非常顯著。

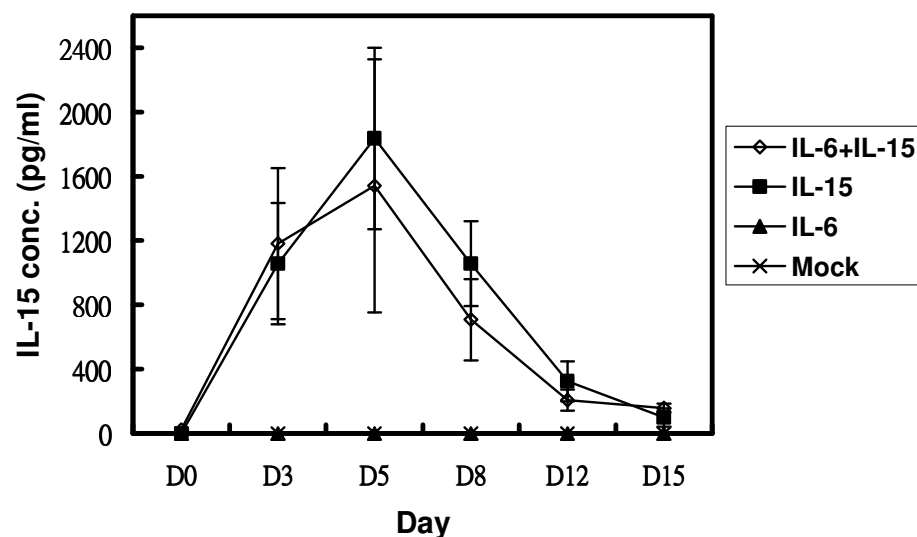


圖十、肌肉基因電衝導入 IL-6 及 IL-15 質體於 BALB/c 小鼠體內後血清 IL-6 之表現。

以肌肉活體基因電衝之方式，將 Mock 質體、IL-6、IL-15、IL-6 + IL-15 質體導入 BALB/c 小鼠體內，取第 0 天、第 3、5、8、12、15 天之血清，以商業化 IL-6 ELISA 套組進行血清 IL-6 之濃度測試。圖中 X 軸為抽血之天數，Y 軸為 IL-6 之濃度 (pg/ml)。「▲」表 Mock 質體組；「□」表 IL-6 質體組；「△」表 IL-15 質體組；「●」表 IL-6 + IL-15 質體組上圖每一處理組均進行 6 重複 (N=6)。

實驗結果證實此質體可在小鼠體內產生蛋白質。血清中的 IL-6 在各實驗組中均可被測到，唯濃度高低及表現時間有所差異，IL-6 處理組其濃度約在第 8 天達到高峰，而在第 12 天開始快速下降；IL-6 + IL-15 處理組則約在第 3 天起即可測到 IL-6，而在第 5 天達到高峰，

從第 8 天開始下降。

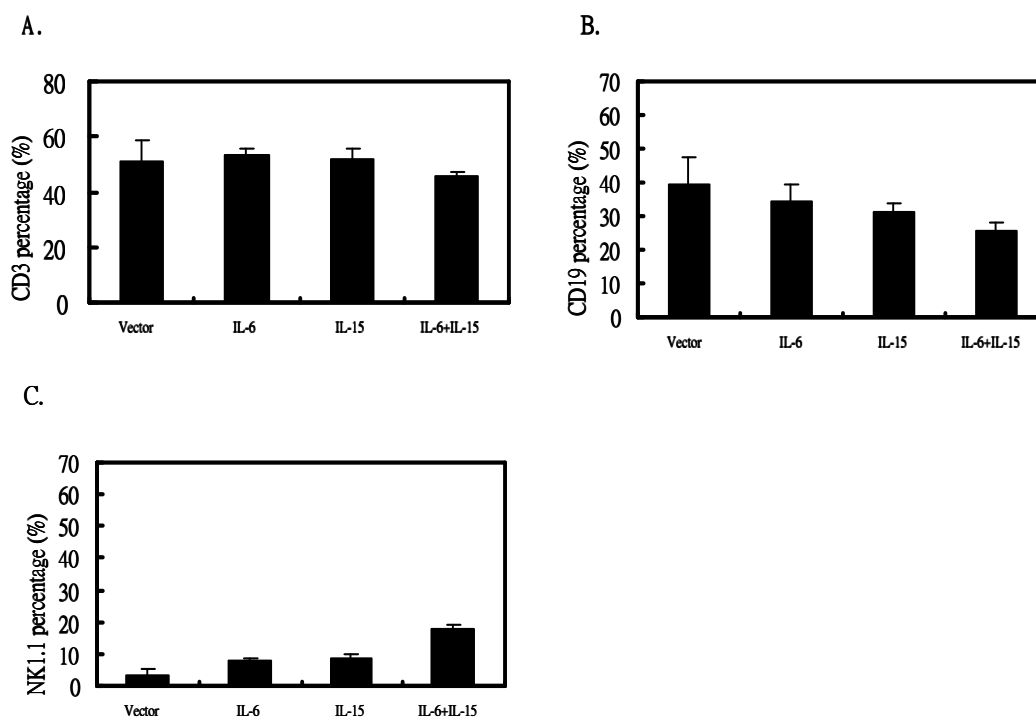


圖十一、肌肉基因電衝導入 IL-6 及 IL-15 質體於 BALB/c 小鼠體內後血清 IL-15 之表現。

以肌肉活體基因電衝之方式，將 Mock 質體、IL-6、IL-15、IL-6 + IL-15 質體導入 BALB/c 小鼠體內，取第 0 天、第 3、5、8、12、15 天之血清，以商業化 IL-15 ELISA 套組進行血清 IL-15 之濃度測試。圖中 X 軸為抽血之天數，Y 軸為 IL-15 之濃度 (pg/ml)。x「」表 Mock 質體組；「▲」表 IL-6 質體組；「■」表 IL-15 質體組；「◇」表 IL-6 + IL-15 質體組。上圖每一處理組均進行 6 重複 (N=6)。

實驗結果證實此質體可在小鼠體內產生蛋白質。血清中 IL-15 之濃度則只有在 IL-15 及 IL-6 + IL-15 處理組中才會被偵測到。IL-15 處理

組約在第 3 天開始升高，到第 5 天達到高峰，之後開始下降，至第 15 天以幾乎偵測不到；IL-6 + IL-15 處理組之結果和 IL-15 處理組相似



圖十二、肌肉活體基因電衝導入 IL-6 及 IL-15 質體於 BALB/c 小鼠體內後脾臟淋巴球族群之分佈狀況。

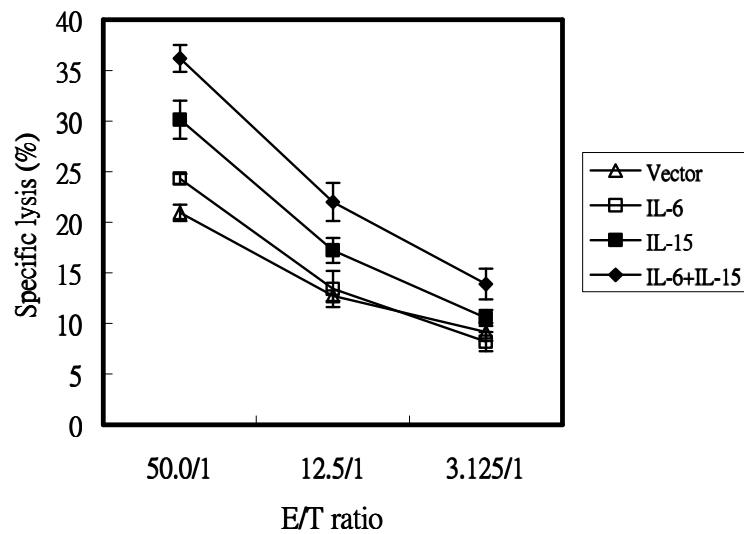
進行肌肉活體基因電衝後第 14 天取出小鼠之脾臟細胞 (N=4) 以流式細胞分析儀進行脾臟細胞免疫細胞族群分析。

A. 各處理組中 CD3+ T 細胞之百分比。

B. 各處理組中 CD19+ B 細胞之百分比。

C. 各處理組中 NK1.1+ NK 細胞百分比。

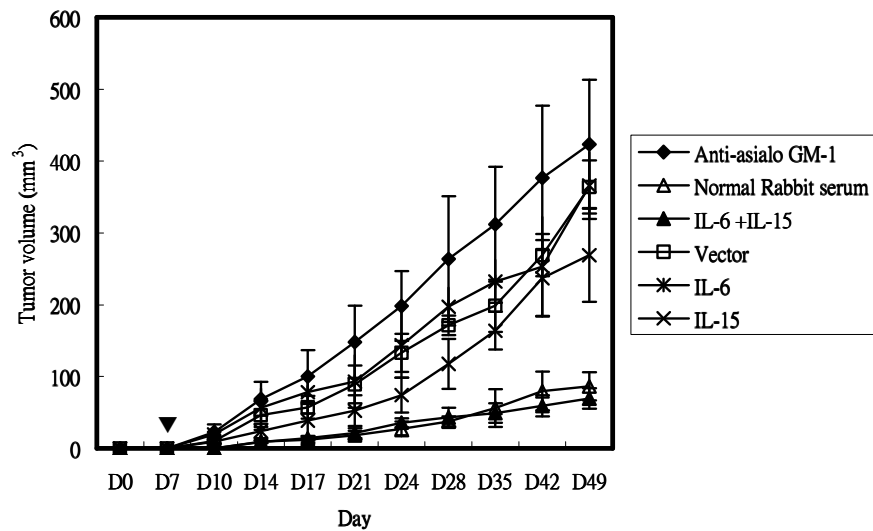
結果顯示，脾臟中之 T 細胞以及 B 細胞，在 4 處理組間之比率極為相近，互相之間沒有顯著性之差異。此 4 組之 T 細胞比率分別為：Mock 質體： $51.31 \pm 7.54\%$ ；IL-6 質體： $53.69 \pm 2.26\%$ ；IL-15 質體： $51.69 \pm 3.82\%$ ；IL-6 +IL-15 質體： $53.69 \pm 2.26\%$ 。而 B 細胞比率則為：Mock 質體： $39.47 \pm 8.07\%$ ；IL-6 質體： $34.35 \pm 4.90\%$ ；IL-15 質體： $31.47 \pm 2.54\%$ ；IL-6 +IL-15 質體： $25.39 \pm 2.48\%$ ；而在 NK 細胞方面，則很明顯發現合併使用 IL-6 和 IL-15 之處理組之比率顯著的上升（ $17.56 \pm 1.35\%$ ）；其餘各組 NK 細胞之比率分別為 Mock 質體： $3.49 \pm 1.35\%$ ；IL-6 質體： $7.71 \pm 0.78\%$ ；IL-15 質體： $8.63 \pm 1.42\%$ 。



圖十三、肌肉活體基因電衝導入 IL-6 及 IL-15 質體於 BALB/c 小鼠體內後脾臟細胞之 NK 細胞毒殺能力測試。

進行肌肉活體基因電衝後第 14 天取出小鼠之脾臟細胞 (N=4)，進行 4 小時之 NK 毒殺能力測試。上圖中 X 軸表示不同之 E/T ratio，Y 軸則為 YAC-1 細胞之死亡百分比。△ 表 Mock 質體組；□ 表 IL-6 質體組；■ 表 IL-15 質體組；◆ 表 IL-6 + IL-15 質體組。

結果顯示在 NK 細胞之毒殺能力方面，IL-6 + IL-15 處理組的 NK 細胞毒殺能力不論在任何之 E/T ratio 下，均優於其他 3 組；IL-15 處理組則在 E/T ratio=50/ 及 12.5/1 顯著高於 Mock 及 IL-6 質體組，而於 3.125/1 時和其他 2 組無顯著性差異；IL-6 和 Mock 處理組則於任何 E/T ratio 之下其 NK 毒殺能力均無顯著差異。

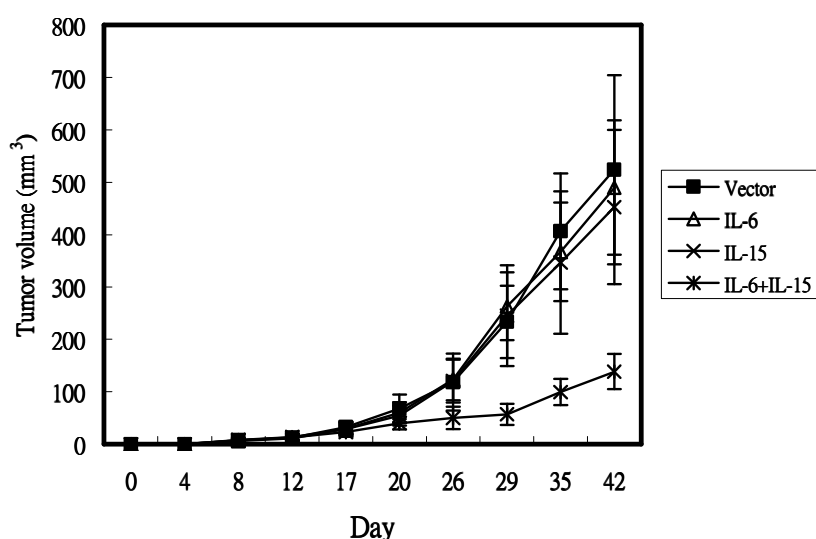


圖十四、複合式免疫基因療法對於 CTVT 形成之影響。

分別於 C. B-17 SCID 小鼠之背部兩側接種 1×10^8 之 CTVT 細胞，接種後的第 7 天進行肌肉活體基因電衝導入 Vector、IL-6、IL-15、IL-6 + IL-15 質體各 $100 \mu\text{g}$ ，而後觀察其腫瘤生長曲線。上圖中「□」表 Vector 質體組；「*」表 IL-6 質體組；「x」表 IL-15 質體組；「▲」表 IL-6 + IL-15 質體組；「◆」表施打 Anti-asialo GM1 抗體並接受 IL-6 + IL-15 質體組；「△」表施打 Normal rabbit serum 並接受 IL-6 + IL-15 質體組。每組處理組含 5 隻小鼠 (N=5)。

結果發現合併使用 IL-6 及 IL-15 質體之 C. B-17 SCID 小鼠其腫瘤約在第 14 天才開始長成肉眼可見之扁平腫瘤團塊（直徑 2-3 mm），且在觀察期間其腫瘤體積明顯小於其他處理組。而單獨使用 IL-15 質體之小鼠其腫瘤體積雖然有小於 IL-6 及 Vector

處理組之趨勢，但統計上無顯著差異 ($p > 0.05$) IL-6 質體組則 CTVT 之生長速度和 Vector 組相近，統計學上亦無顯著差異。使用 Anti-asialo GM-1 抗體阻斷 NK 細胞的作用，再施以 IL-6 和 IL-15 基因電衝，結果發現其腫瘤生長速度明顯加快，腫瘤體積也明顯大於其他處理組。

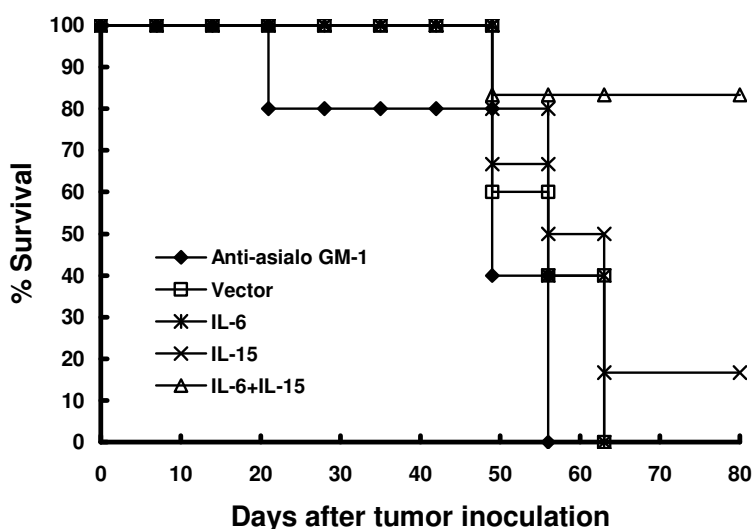


圖十五、複合式免疫基因療法治療下之 CTVT 生長曲線。

分別於 C. B-17 SCID 小鼠之背部兩側接種 1×10^8 之 CTVT 細胞，接種後的第 14 天（此時腫瘤直徑約為 0.5 mm 左右）進行肌肉活體基因電衝導入 Vector、IL-6、IL-15、IL-6 + IL-15 質體各 100 μ g，而後觀察其腫瘤生長曲線。圖中「■」表 Vector 質體組；「△」表 IL-6 質體組；「×」表 IL-15 質體組；「*」表 IL-6 + IL-15 質體組；「◆」

表施打 Anti-asialo GM1 抗體並接受 IL-6 + IL-15 質體組。以上每個處理組含 6 隻小鼠 (N=6)。

使用 IL-6 和 IL-15 合併治療之處理組其在進行電衝後腫瘤之生長速度明顯減緩，並有 3 顆腫瘤 (N=6，每隻小鼠接種背部 2 側) 完全消退，不再生長，而在觀察期間該組之腫瘤平均體積明顯低於其他 3 組 (Vvector 質體組、IL-6，及 IL-15 質體組)。相較於合併使用時之顯著療效，IL-6 及 IL-15 單獨使用實則療效不明顯，和 Mock 質體的陰性對照組體積極為相近。

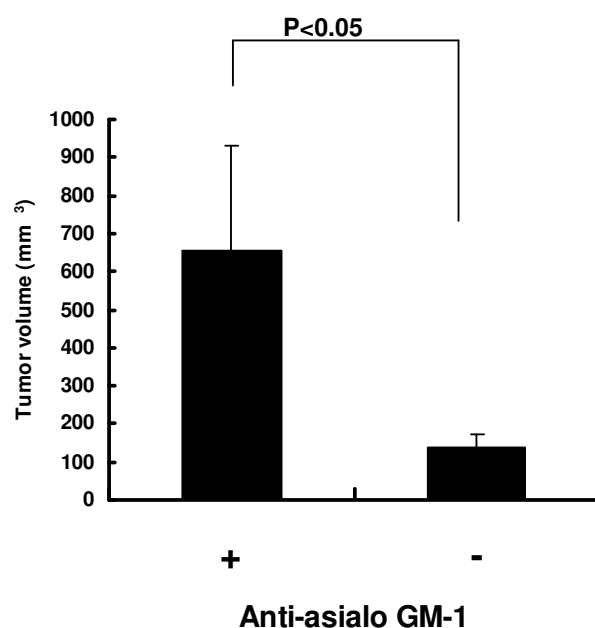


圖十六、合併式免疫療法對於小鼠存活率之影響。

上圖中 X 軸表示接種腫瘤後之觀察天數，Y 軸則表示接受各種基

因療法後之小鼠存活率 (N=5-6) 施打 Anti-asialo GM-1 抗體之處
理組於第 14 天仍然給予 IL-6 及 IL-15 合併使用之基因療法。

結果顯示合併給予 IL-6 和 IL-15 可以明顯增加小鼠存活率。但施
打 Anti-asialo GM-1 抗體之小鼠即使同樣給予等量之 IL-6 和 IL-15
質體，其死亡率明顯升高。



圖十七、阻斷 NK 細胞的作用對複合式免疫療法中 CTVT 生長之影響。

上圖中 X 軸分別表示施打 Anti-asialo GM-1 抗體及其對照組 (N
=6) Y 軸表示腫瘤體積 (mm³) 兩組分別於腫瘤長至直徑約 5 mm 時
進行肌肉活體基因電衝，將 IL-6 及 IL-15 基因送入實驗鼠體內。此
圖為第 42 天時 2 組之平均腫瘤體積。

結果顯示施打 Anti-asialo GM-1 抗體之小鼠即使同樣給予等量之 IL-6 和 IL-15 質體，也無法壓抑腫瘤之生長。

討論

本研究以合併使用分別屬於 Th1 及 Th2 類型細胞素之 IL-6 和 IL-15，有別於過去所使用之腫瘤免疫療法，只強調以單一或多種之 Th1 類細胞素（例如 IL-2、IL-12、IL-2 + IL-12、IL-12 + IL-18）對宿主之免疫系統進行活化。本療法則著重在針對腫瘤本身之特性，一方面解除 TGF- β 所造成的免疫抑制，另一方面再加強活化免疫系統之效應，而達到腫瘤消退之功效。研究中探討 IL-6 和 IL-15 複合式療法的作用機制，以及 NK 細胞在對抗 CTVT 上所扮演的角色。於是，我們在 C.B-17 SCID 小鼠身上進行 CTVT 的異種腫瘤細胞之接種（Xenotransplantation）以缺乏 T 細胞及 B 細胞功能之 C.B-17 SCID 小鼠為動物模式，可幫助我們瞭解 NK 細胞和 CTVT 腫瘤之間的交互作用。且以細胞培養模式中印證 IL-6 和 IL-15 對 TGF- β 所抑制之 NK 細胞活性的回復效應及單核細胞之影響；

為了瞭解 TGF- β 對於 NK 細胞活性之影響，我們以細胞培養的方式，同時將 IL-2 (2000 U/ml) 和 TGF- β (200 U/ml) 加入培養 BALB/c 小鼠之脾臟細胞，在經過 6 天之作用後，在只加入之 TGF- β 單獨培養組的毒殺能力和只加入細胞培養液之陰性對照組相近，而在同時加入 IL-2 及 TGF- β 之處理組中則發現 TGF- β 可顯著的抑制由 IL-2 所活化之 NK 細胞毒殺能力。TGF- β 對於 NK 細胞的抑制功能在許多文獻

中均有研究，Rook 等人 (5) 以 2 ng/ml 之 TGF- β 培養人類之周邊血液淋巴球，只需 20 小時的時間就可有效的抑制此群細胞之 NK 毒殺活性，而同樣的結果也發現在 IL-2 所刺激之大顆粒性細胞 (Large granular lymphocytes, LGLs) Rook 等人同時發現，這群經過活化的 LGLs 細胞表面會表現出數目極為龐大的高親和性 TGF- β 受器，因而解釋 TGF- β 抑制 NK 毒殺能力的現象。除了影響 NK 細胞的活性外，TGF- β 也被證實會抑制 NK 細胞的 DNA 合成，而降低細胞分裂的能力 (6)。造成 NK 細胞分裂能力降低的機制目前並不清楚。

相對於 TGF- β 對 IL-2 所活化之小鼠脾臟 NK 細胞活性之明顯抑制效果，它只能部分抑制由 IL-15 所活化之脾臟細胞的 NK 毒殺能力。且在活化 NK 細胞毒殺活性的能力上，只需要使用低劑量的 IL-15 (400 U/ml) 即可和高劑量的 IL-2 (2000 U/ml) 得到相同的效果。IL-15 和 IL-2 有許多相似的功能，在細胞培養的測試中，它們皆可促使 B 細胞產生免疫球蛋白，刺激 T、B、及 NK 細胞的分裂，活化 T 細胞、強化 NK 細胞之細胞毒殺能力，以及增加 T 細胞和 NK 細胞 IFN- γ 的產量等 (7)。相似的受器結構及細胞內之訊息傳遞路徑是造成它們有這麼多功能重複之原因

本實驗在 In vitro 的脾臟細胞 NK 毒殺試驗中，發現 IL-6 和 TGF- β 共同作用對於 BALB/c 小鼠脾臟細胞中之 NK 細胞活性並沒有任何影

響，其毒殺百分比和未經任何細胞素刺激的陰性對照組、以及 TGF- β 單獨作用的處理組非常相近，在統計學上亦沒有顯著性差異。造成此差異的原因可能是在我們的實驗系統中，小鼠脾臟細胞並未經過活化，即直接以 IL-6 或 TGF- β 加入作用，進行為期 6 天的培養。由於我們的小鼠脾臟細胞一直處於未活化的狀態，所以無法由此實驗中正面地評估 IL-6 是否真的拮抗了 TGF- β 對 NK 毒殺能力的抑制效應。然而在同一個實驗中，對於 TGF- β 的 NK 細胞抑制作用，我們發現合併使用 IL-6 和 IL-15，和單獨使用 IL-6 或 IL-15 的處理組相比，對於 YAC-1 細胞的毒殺比率明顯提高。此結果解釋了在單獨作用的情況下，若只有 IL-6 的存在，雖解除了 TGF- β 對 NK 細胞的抑制作用，卻缺乏活化 NK 細胞的物質，使得毒殺的效應不顯著；反之，若只存在活化 NK 細胞的 IL-15，卻無法移除 TGF- β ，則 NK 細胞之活性便會受其抑制而無法完全回復。而唯有在 IL-6 和 IL-15 同時存在的情況下，以 IL-6 拮抗 TGF- β 對 NK 細胞的免疫抑制作用，再以 IL-15 進一步的活化 NK 細胞，才是有效提升 NK 毒殺能力的方法。

為了進一步確定 IL-6 在 IL-6 和 IL-15 合併使用時對於 NK 細胞活性的回復是因為拮抗了 TGF- β 的作用，而非 IL-6 本身對 NK 細胞的激活反應，因此我們使用由低至高不同劑量的 IL-6，加入脾臟細胞中作用 6 天，再評估其 NK 細胞的毒殺效力。結果顯示在我們的系統

中，IL-6 本身對於活化 NK 細胞的能力並不顯著，甚至在高劑量時，反而會使毒殺能力降低。

當我們合併使用 IL-6 和 IL-15，以對抗 TGF- β 對於 NK 細胞毒殺能力的抑制作用時，IL-15 在此所扮演的角色主要在維持 NK 細胞的存活、增生，並增加其活性；而 IL-6 則可能有雙重功能，它的主功能在於扭轉 TGF- β 對於 NK 細胞所造成的功能缺失，使 NK 細胞回復至正常的狀態，次要的功能則可進一步幫助提升 NK 細胞的活性，雖然在活化的效能上並不如 IL-2 或 IL-15 強效，但仍可對 NK 細胞產生影響。上述 IL-6 活化 NK 細胞的推論可與我們所進行之 BALB/c 小鼠活體實驗相互對照。因為當我們將 IL-6 及 IL-15 質體合併給予 BALB/c 小鼠時，在沒有 TGF- β 之存在下，IL-6 和 IL-15 之共同使用即會顯著的增加 NK 細胞之數目與活性。

有了以上的結果，我們進一步研究 IL-6 和 IL-15 合併使用時對於活體內免疫系統之影響，我們以肌肉活體基因電衝之方式，將 IL-6 及 IL-15 質體單獨或一起送入 BALB/c 小鼠之體內，評估其對小鼠脾臟中免疫細胞之影響。最後我們應用此原理，以只具有功能性 NK 細胞的 C.B-17 SCID 小鼠為模式，進行 IL-6 及 IL-15 基因電衝，以瞭解 IL-6 及 IL-15 對產生 TGF- β 的腫瘤模式 CTVT 的治療效果。

在進行質體基因電衝後之第 14 天，我們發現，相較於單獨使

用 IL-6 或 IL-15 質體，合併使用此二質體之處理組小鼠的脾臟中，NK 細胞之數目和 NK 細胞的毒殺能力均呈現明顯之上升現象。我們已知在脾臟中 NK 細胞所佔之比率遠少於 T 細胞及 B 細胞，而 IL-6 已知是 B 細胞和 T 細胞分化及增生之促進因子 (8)；IL-15 則除了是 NK 細胞發育及增生所必須之細胞素外，對於 T 細胞及 B 細胞亦有刺激活化的作用 (9, 10)。因此，在小鼠脾臟中，T 細胞及 B 細胞接受 IL-6 及 IL-15 刺激之比率將遠高於 NK 細胞，然而我們卻發現，當合併使用 IL-6 及 IL-15 質體時，小鼠體內 NK 細胞之數目及活性均有明顯之提高，而此現象在單獨使用 IL-6 及 IL-15 質體時並不存在。相關的機制需要進一步的探討。在其他之處理組中，我們可見 IL-6、IL-15 以及 Vector 質體此三組對於 NK 細胞數目上的影響彼此間並沒有顯著性差異 ($P>0.05$)。在 NK 毒殺能力上，則 IL-15 處理組在 E/T ratio 50/1 及 12.5/1 時，其雖然低於 IL-6 和 IL-15 合併使用者，但仍顯著的高於 IL-6 和 Vector 處理組，此結果與我們的預期相符合，說明了 IL-15 本身即可促進 NK 細胞之活化。

當我們以肌肉活體基因電衝之方式，將 IL-6 和 IL-15 質體合併使用於接種 CTVT 之 C.B-17 SCID 小鼠時，我們再次驗證了此二細胞素之組合對於 CTVT 的確具有顯著的抑制腫瘤生長之效果。實驗主要分為二部分進行：第一部分在評估 IL-6 和 IL-15 兩者對於腫瘤形成

(Establishment) 之影響；第二部分則進一步觀察此二細胞素對於已形成 (Established) 之腫瘤的治療效果。在腫瘤的形成方面，我們發現 IL-6 和 IL-15 合併使用時對於腫瘤有最佳之抑制作用。IL-15 單獨使用時對於 CTVT 之生長亦有輕微之延緩作用，但單獨使用 IL-6 腫瘤則無明顯影響；然而，當 CTVT 腫瘤已經形成後，唯有共同給予 IL-6 和 IL-15 質體之小鼠才能有效的減緩 CTVT 之生長速度，只投予 IL-6 或 IL-15 質體皆無法遏阻腫瘤的持續生長。如由腹腔注射投予 Anti-asialo GM-1 抗體，同時接受 IL-6 和 IL-15 之質體後，CTVT 仍然持續不斷的在其體內生長。以上的結果說明了 NK 細胞在此複合式的基因療法中，扮演了決定性之角色。

我們認為，唯有合併使用 IL-6 和 IL-15 質體，一方面以 IL-6 拮抗 TGF- β 的免疫抑制效應，一方面以 IL-15 加強 NK 細胞之活化，才能成功的抑制 CTVT 的生長。而相關條件的配合，如質體使用的劑量、肌肉活體基因電衝條件的調整、電衝進行之位置（肌肉或是腫瘤）等，都是我們應該再進一步研究的方向，我們希望能藉此取得一最佳化之條件，以增進其療效。此外，在我們的研究模式中，使用的是缺乏功能性 T 細胞及 B 細胞之小鼠品系，就可明確的看見對 CTVT 的治療效果，若此複合式療法進一步推廣至免疫健全之大型動物時，例如犬隻，則除了 NK 的功能會被提升外，體內其他的免疫細胞，例如 T

淋巴球以及 B 淋巴球，也能在 IL-6 及 IL-15 之作用下，各司其職，以對抗 CTVT 細胞。我們希望能針對此複合式療法作更深入的研究，及進一步的驗證，以期能對動物甚至人類的腫瘤治療提供助益。

參考資料

1. Hsiao, Y. W., Liao, K. W., Hung, S. W., and Chu, R. M. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 87: 19-27, 2002.
2. Hsiao, Y. W., Liao, K. W., Hung, S. W., and Chu, R. M. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. *J Immunol*, 172: 1508-1514, 2004.
3. Ohta, K., Yamagami, S., Taylor, A. W., and Streilein, J. W. IL-6 antagonizes TGF-beta and abolishes immune privilege in eyes with endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 2591-2599, 2000.
4. Suzuki, K., Nakazato, H., Matsui, H., Hasumi, M., Shibata, Y., Ito, K., Fukabori, Y., Kurokawa, K., and Yamanaka, H. NK cell-mediated anti-tumor immune response to human prostate cancer cell, PC-3: immunogene therapy using a highly secretable form of interleukin-15 gene transfer. *J Leukoc Biol*, 69: 531-537, 2001.
5. Rook, A. H., Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Burlington, D. B., Lane, H. C., and Fauci, A. S. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol*, 136: 3916-3920, 1986.
6. Bellone, G., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G., and Rodeck, U. Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *J Immunol*, 155: 1066-1073, 1995.
7. DiSanto, J. P. Cytokines: shared receptors, distinct functions. *Curr Biol*, 7: R424-426, 1997.
8. Rabinowich, H., Sedlmayr, P., Herberman, R. B., and Whiteside, T. L. Response of human NK cells to IL-6 alterations of the cell surface phenotype, adhesion to fibronectin and laminin, and tumor necrosis factor-alpha/beta secretion. *J Immunol*, 150: 4844-4855, 1993.
9. Bulfone-Paus, S., Ungureanu, D., Pohl, T., Lindner, G., Paus, R., Ruckert, R., Krause, H., and Kunzendorf, U. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat Med*, 3: 1124-1128, 1997.
10. Armitage, R. J., Macduff, B. M., Eisenman, J., Paxton, R., and Grabstein, K. H. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol*, 154: 483-490, 1995.