國立陽明交通大學

專題報告

CTLA-4Ig會促進Renca及CT26癌細胞的體外生長

專題生：倪羽薇

指導教授：鄒協成 副教授

中華民國一一一年九月

CTLA-4Ig會促進Renca及CT26癌細胞的體外生長

學生：倪羽薇

指導教授：鄒協成

國立陽明交通大學

# 摘要

癌症是全球的主要死因，由於癌細胞會促使周遭細胞形成「腫瘤微環境」，導致藥物難以突破屏障進行治療，且腫瘤細胞會表達CD80/CD86與PD-L1，和T細胞上的CTLA-4與PD-1結合，抑制免疫細胞活性，進行免疫逃脫。然而腫瘤表達CD80/CD86是否與細胞生長相關仍然未知，因此我們運用實驗室設計的重組蛋白CTLA-4Ig探討其結合到癌細胞表達的CD80/CD86對癌細胞生長造成的變化。我們挑選了兩種會表達CD80/CD86的腫瘤細胞—腎皮質腺癌細胞Renca、結腸癌細胞CT26進行實驗。首先，利用flow cytometry確認Renca、CT26的CD80/CD86表達量，再運用cell counting、MTS assay、CCK8的方式測量癌細胞的生長情形。結果顯示在三種實驗方法中，加入CTLA-4Ig皆使癌細胞生長有加快的趨勢。

# 目錄

[摘要 i](#_Toc115899897)

[目錄 ii](#_Toc115899898)

[第一章 緒論 1](#_Toc115899899)

[1.1 癌症現況 1](#_Toc115899900)

[1.2 腫瘤免疫逃脫 1](#_Toc115899901)

[1.3 免疫療法 2](#_Toc115899902)

[1.4 腫瘤表現CD80/CD86的細胞病理意義 3](#_Toc115899903)

[第二章 研究動機 4](#_Toc115899904)

[第三章 研究材料與方法 5](#_Toc115899905)

[3.1 化學藥品 5](#_Toc115899906)

[3.2 Flow cytometry 5](#_Toc115899907)

[3.3 Cell culture 6](#_Toc115899908)

[3.4 Cell counting 6](#_Toc115899909)

[3.5 MTS assay 6](#_Toc115899910)

[3.6 CCK8 (cell counting kit-8) 7](#_Toc115899911)

[第四章 實驗結果 8](#_Toc115899912)

[4.1 CD80 and CD86 expression 8](#_Toc115899913)

[4.2 Cell growth rate 9](#_Toc115899914)

[4.2.1 Cell counting 9](#_Toc115899915)

[4.2.2 MTS assay 10](#_Toc115899916)

[4.2.3 CCK8 11](#_Toc115899917)

[第五章 結論與討論 14](#_Toc115899918)

[第六章 參考資料 16](#_Toc115899919)

# 第一章 緒論

## 1.1 癌症現況

癌症是現今造成死亡的主要原因，其中以乳腺癌、肺癌、結腸癌為常見癌症的前三名。根據WHO的數據 (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer) 2020年癌症造成全球近1000萬人死亡；根據衛福部統計，2021年臺灣癌症死亡人數約為5萬人，佔全台總死亡人數28%，位居死亡原因之首 (https://www.mohw.gov.tw/cp-16-70314-1.html)。

現行傳統癌症治療方法包含：手術、化學療法、放射線療法。手術切除腫瘤雖可以完全清除癌細胞，降低復發可能性，但切除器官恐怕造成身體負擔；化學療法是利用藥物經由血液運輸到全身來抑制癌細胞的生長，可以對抗癌細胞轉移，然而正因為透過血液循環全身，所以會傷害到癌細胞外的正常細胞；放射線療法相對於其他兩種治療方式副作用較低，但可能造成患者食慾不振等遲發性副作用，因此仍須定期回診。

由於癌細胞生長變化多端、難以預測，且可以透過免疫檢查點脫離免疫系統監測，改變其周遭環境，促使腫瘤生長更加容易。現今發展出新的癌症療法—免疫療法，可以透過運用免疫檢查點抑制劑促進免疫細胞活化攻擊癌細胞。

## 1.2 腫瘤免疫逃脫

腫瘤可以改變其周圍的環境，稱為腫瘤微環境 (tumor microenvironment, TME)，腫瘤微環境包含腫瘤周圍血管、成纖維細胞、免疫細胞及細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 等。隨著腫瘤的增長，對於血液中氧氣的需求量大增，使原先的血管無法提供足夠的氧氣讓腫瘤生長，造成腫瘤內部缺氧[1]。為了克服腫瘤中的缺氧環境，腫瘤微環境促進釋放血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 使血管增生，以提供癌細胞氧氣及營養，促進腫瘤的生長、轉移[2]。

正常細胞突變成腫瘤細胞的過程中會產生腫瘤抗原，抗原會引起免疫反應進而毒殺腫瘤細胞，讓腫瘤在生長的過程中面臨許多挑戰。為了避免免疫細胞的攻擊，腫瘤細胞發展出一系列免疫逃脫的方法：癌細胞表達CCL22 (C-C Motif Chemokine Ligand 22) 招喚Treg細胞進入腫瘤組織，抑制其他T細胞對腫瘤的毒殺[3]；myeloid-derived suppressor cell (MDSC) 抑制免疫細胞，例如：T細胞、巨噬細胞、樹突細胞，MDSC高度浸潤的腫瘤會造成治療效果降低[4]；利用M2巨噬細胞抑制發炎反應，進而使免疫細胞失活而無法對癌細胞攻擊[5]。

腫瘤細胞可透過低表達CD80/CD86與PD-L1，分別和浸潤腫瘤的tumor-infiltrating lymphocyte上的CTLA-4與PD-1結合，使淋巴細胞失活而無法攻擊腫瘤細胞[6]。「免疫療法」正是運用這項免疫逃脫機制促使免疫細胞持續保持活化狀態，使免疫細胞能對抗腫瘤細胞。

## 1.3 免疫療法

免疫療法 (immunotherapy) 可分為透過藥物、細胞療法、疫苗達成治療，目前在台灣能夠合法使用的只有藥物治療，免疫療法運用的藥物又稱為免疫檢查點抑制劑 (immune checkpoint inhibitors)。

為了避免引起過度的自體免疫反應，免疫細胞上可以被結合而抑制細胞活化、降低細胞活性的結合位點稱為「免疫檢查點」，常見在T細胞上的免疫檢查點有CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4)、PD-1 (programmed cell death protein 1) 等。腫瘤細胞上有著與免疫檢查點相對應結合的跨膜蛋白，例如：與CTLA-4結合的CD80/CD86、與PD-1結合的PD-L1，透過和免疫細胞上的免疫檢查點結合，可以形成「煞車」的作用，降低免疫細胞活性，導致免疫細胞無法殺死癌細胞[7]。

「免疫檢查點抑制劑」即針對癌細胞結合抑制免疫細胞的機制，將藥物與蛋白結合，使免疫檢查點無法與癌細胞的跨膜蛋白結合，進而無法產生抑制T細胞的訊號，使T細胞持續活化攻擊癌細胞，目前在轉移性黑色素瘤、淋巴癌、膀胱癌等癌症上皆有顯著的成效[8]。

## 1.4 腫瘤表現CD80/CD86的細胞病理意義

CD80/CD86最為人熟知的功能是會結合CD28產生「共刺激」訊號，促使T細胞被完全活化，而與CD28產生的訊號相反，CD80/CD86亦會與CTLA-4結合產生「共抑制」訊號，促使T細胞被抑制活化，且CTLA-4與CD80/CD86的結合能力較CD28強[9]。科學家利用這條路徑，建構出藉由人類CTLA-4胞外區域與抗體Fc (fragment crystallizable region, human IgG1) 融合而成的重組蛋白藥物 (CTLA-4Ig, abatacept)，使藥物與T細胞上的CD28競爭CD80/CD86，阻斷T細胞活化所需的共刺激訊號，抑制T細胞活化。這種藥物被使用於對抗過多T細胞被活化的自體免疫疾病 (autoimmune disease) ，例如：類風濕性關節炎[10]。

近年研究發現，腫瘤細胞會表現CD80/CD86，但CD80/CD86對於腫瘤的生理、病理意義仍然未知。腫瘤表現的CD80/CD86可能提供T細胞共刺激訊號，活化腫瘤浸潤的T細胞以毒殺腫瘤；相反地，腫瘤表現CD80/CD86也可能和T細胞的CTLA-4結合來抑制T細胞活性，逃脫免疫監控。除此之外，CD80/CD86是否在腫瘤的細胞生理扮演調控細胞生長的角色尚不清楚，因此進一步了解CD80/CD86在腫瘤發展的角色，將有助於日後發展更有效的腫瘤免疫療法。

# 第二章 研究動機

我們習知CTLA-4是一種T細胞上的表面受體，可以和抗原呈現細胞上所表達的CD80/CD86結合產生「共抑制」訊號，抑制T細胞活性。有些報導指出癌細胞也會表現CD80/CD86，可以藉此抑制T細胞。然而癌細胞表達CD80/CD86是否會對癌細胞生長造成影響仍然未知，因此我們利用實驗室生產出的CTLA-4Ig重組蛋白，測試結合到癌細胞的CD80/CD86後是否會促進或抑制癌細胞的生長。

# 第三章 研究材料與方法

## 3.1 化學藥品

實驗室使用的藥品皆符合美國化學協會試藥委員會最低標準為準則（ASC 級）。內容有乙二胺四乙酸（EDTA）、乙醇（Ethanol）、十六酸（Palmitic acid）、 油酸（Oleic acid）、氯化鈉（Sodium chloride）、氯化鉀（Potassium chloride）、磷 酸一氫鈉（Sodium hydrogen phosphate）、磷酸二氫鉀 （Monopotassium phosphate）、 達爾伯克氏必需基本培養基（DMEM）、羅斯威爾帕克紀念研究所培養基（RPMI 1640）、碳酸氫鈉（sodium hydrogen carbonate）。

## 3.2 Flow cytometry

將Renca、CT26用trypsin從well plate上分離下來，加入細胞培養液終止反應，以細胞培養液沖洗well plate兩次後在4 °C、300 g的條件下離心5分鐘，去除上清液後用1 mL細胞培養液回溶數細胞。加入Fc blocker，blocking 30分鐘，將anti-CD80-PE以濃度0.2 mg/mL、anti-CD86-PE以濃度0.2 mg/mL 配置成master mix並分別加入圓底的96 well plate，放在冰上染色一小時後，加入細胞培養液並用4 °C、400 g離心10分鐘洗去多餘抗體，去除上清液，以2％ paraformaldehyde固定。上flow cytometry前用40 μm cell strainer過濾。

## 3.3 Cell culture

Renca是從患有腎皮質腺癌的*Mus musculus*小鼠腎臟中分離出來的上皮細胞。CT26是N-nitroso-N-methylurethane (NNMU) 誘導的結腸癌細胞，為*Mus musculus*小鼠的成纖維細胞。

將特定細胞數（見實驗結果）的Renca細胞加入RPMI + 10% FBS，種植在24 well plate或96 well plate（見實驗結果）靜置在37 °C、5% CO2的細胞培養箱。將seeding當天訂為day post treatment (-1) (day -1)；seeding隔天進行加藥，控制組加入濃度0.15 μM的IgG，實驗組加入濃度0.15 μM 的CTLA-4Ig，並將加藥當天訂為day post treatment 0 (day 0)，加藥隔天訂為day post treatment 1 (day 1)，以此類推。在day 3時更換細胞培養液或繼代細胞，加入含有IgG或CTLA-4Ig的培養液進入well plate繼續培養細胞。

## 3.4 Cell counting

在day 6將細胞用trypsin從well plate上分離下來，加入細胞培養液終止反應，以細胞培養液沖洗well plate兩次後在4 °C、300 g的條件下離心5分鐘，去除上清液後用適當量的細胞培養液回溶細胞，取出小部分染上trypan blue，進行細胞計數。

## 3.5 MTS assay

MTS會與粒線體中的NADH dehydrogenase反應形成橘色的formazan，formazan的數量和存活細胞數呈正相關，以 OD490 nm測量吸光值，檢測樣品中formazan濃度即可推估細胞數。

在day 6將MTS assay與細胞培養液以體積1:10混合後加入細胞中，放入細胞培養箱一小時後吸出溶液到96 well plate測量吸光值。

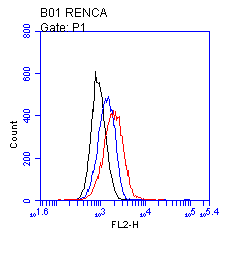
## 3.6 CCK8 (cell counting kit-8)

CCK8 (WST-8) 與粒線體中的NADH dehydrogenase反應形成橘色的WST-8 formazan，WST-8 formazan的數量和存活細胞數呈正相關，利用OD450 nm測量吸光值，檢測樣品中WST-8 formazan濃度可推估細胞數。

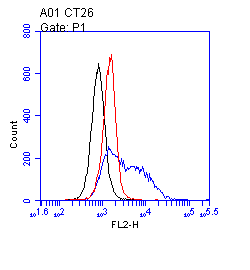
在day 6將CCK8與細胞培養液以體積1:10混合後加入細胞中，放入細胞培養箱一小時後吸出溶液到96 well plate測量吸光值。

# 第四章 實驗結果

## 4.1 CD80 and CD86 expression

 為了解Renca、CT26上是否有能夠和CTLA-4Ig結合的CD80/CD86，我們利用flow cytometry做分析。將Renca染上anti-CD80-PE及anti-CD86-PE抗體，進行flow cytometry。相較於沒有染專一性抗體的細胞，染上抗體的Renca螢光分佈曲線有向右偏移（螢光數值變強），表示螢光抗體有結合到細胞上的CD80/CD86，且可看出Renca會同時表達CD80及CD86，又CD86的表現量較CD80高，約為1.4倍。

**圖一**、Renca表達CD80/CD86

將CT26染上anti-CD80-PE及anti-CD86-PE抗體，進行flow cytometry。相較於沒有染色的細胞，染上抗體的CT26螢光分佈曲線有向右偏移（螢光數值變強），表示螢光抗體有結合到細胞上的CD80/CD86。從圖看出CT26會同時表達CD80及CD86，而CD80螢光表達強度的分佈範圍較CD86廣，且有部分細胞的CD80螢光表達強度較高。整體而言，CT26的CD80表現量較CD86高，約為3.4倍。

**圖二**、CT26表達CD80/CD86

## 4.2 Cell growth rate

為了解CTLA-4Ig是否會影響Renca、CT26癌細胞生長速度，我們利用cell counting、MTS assay、CCK8方式進行實驗。

### 4.2.1 Cell counting

我們在加藥前一天種植5000顆Renca細胞於24 well plate中，隔天將細胞培養液更換為含有IgG以及CTLA-4Ig的培養液，day 7將細胞從well plate上分離下來，利用細胞計數器計算細胞數量，發現在培養液中添加CTLA-4Ig會使Renca生長相較於加入IgG的組別細胞數淨增加101.25%，有加速生長的趨勢。

**圖三**、在含有CTLA-4Ig的培養液中的Renca有生長較快的趨勢

在加藥前一天種植CT26細胞於24 well plate中，隔天將細胞培養液更換為含有IgG以及CTLA-4Ig的培養液，day 3時將細胞從well plate上分離下來計算細胞數量，並回種1/5的細胞數繼續培養，day 6時將細胞全數分離下來計算24 well plate中細胞數量，day 6的細胞總數量計算為day 6時24 well plate中的細胞數乘5 （因只種回1/5）。實驗發現在培養液中添加CTLA-4Ig會使CT26生長相較於加入IgG的組別細胞數淨增加38.18%，有促進腫瘤生長的效果。



**圖四**、在含有CTLA-4Ig的培養液中的CT26有生長較快的趨勢

但使用細胞計數可能會因為操作技術、取的細胞數是否平均等多種原因而產生計算上的誤差，因此我們決定使用更為精確的方式來判斷細胞生長的情形。

### 4.2.2 MTS assay

為了印證cell counting實驗的結果，我們運用MTS assay測量Renca細胞及CT26的增生。

加藥前一天在24 well plate中種植5000顆Renca細胞，隔天將細胞培養液換成含有IgG或CTLA-4Ig的培養液並持續培養6天，在day 6時加入MTS assay，incubate一小時後測量吸光值OD490 nm，藉由吸光值判斷細胞多寡。根據實驗結果可以看出加入CTLA-4Ig吸光值淨增加11.54%，表示CTLA-4Ig會提升Renca細胞生長速度。

**圖五**、加入CTLA-4Ig的Renca在day 6 MTS assay吸光值較高

同樣在加藥前一天於24 well plate中種植5000顆CT26細胞，隔天將細胞培養液換成含有IgG或CTLA-4Ig的培養液並持續培養6天，day 3時將細胞從well plate上分離下來並回種1/5的細胞數繼續培養，在day 6時加入MTS assay，incubate一小時後測量吸光值OD490 nm。根據實驗結果可以看出加入CTLA-4Ig後吸光值淨增加37.89%，表示CTLA-4Ig亦會促進CT26的生長。

**圖六**、加入CTLA-4Ig的CT26在day 6 MTS assay吸光值較高

### 4.2.3 CCK8

再用另外一種方式測試CTLA-4Ig對於Renca及CT26細胞生長速度的影響，我們運用了CCK8 (cell counting kit-8) 進行實驗。

首先，將5000顆Renca種在24 well plate中，隔天將細胞培養液換成含有IgG或CTLA-4Ig的培養液並持續培養6天，在day 6時加入CCK8，incubate一小時後測量吸光值OD450 nm。實驗發現在day 6加入CCK8進行測試，控制組和加藥組的吸光值幾乎沒有差異，推測已達CCK8讀值的平原值。



**圖七**、 Renca在day 6 CCK8吸光值推測已達plateau

 另外，將5000顆CT26種在24 well plate中，隔天將細胞培養液換成含有IgG或CTLA-4Ig的培養液並持續培養6天，day 3將細胞從well plate上分離下來並回種1/5的細胞數繼續培養，在day 6時加入CCK8，incubate一小時後測量吸光值OD450 nm。實驗發現在控制組和加藥組的吸光值亦沒有差異，推測同樣已達CCK8讀值的平原值。

**圖八**、CT26在day 6 CCK8吸光值推測已達plateau

因此我們決定將實驗細胞數降低，並且更換為種在96 well plate，以避免在24 well plate中因種的細胞數量過於稀少而使細胞無法生長。

在96 well plate中種2000顆Renca，隔天將細胞培養液換成含有IgG或CTLA-4Ig的培養液並持續培養6天，在day 6時加入CCK8 incubate一小時後測量吸光值OD450 nm。實驗發現加了CTLA-4Ig的組別吸光值淨增加10.55%，細胞數量增加，反映出加入CTLA-4Ig的組別細胞生長較加入IgG的組別快。

**圖九**、加入CTLA-4Ig的Renca在day 6 CCK8吸光值較高

# 第五章 結論與討論

在flow cytometry的實驗中可以看出Renca及CT26皆會表達CD80/CD86。Renca細胞的CD86的表達量較CD80高；CT26細胞表達CD80數量的差異性較CD86高，具有更廣、更高的螢光表達強度，而低表達CD80的CT26細胞，其CD80的螢光強度和CD86表達的螢光強度相仿。目前尚不清楚是CD80或是CD86影響腫瘤生長，未來可以將CD80/CD86基因剔除，加入CTLA-4Ig測試對於沒有特定CD80/CD86的細胞是否仍有促進生長的作用。

實驗利用三種方式：cell counting、MTS assay、CCK8測CTLA-4Ig對於細胞生長速度的影響。首先，透過flow cytometry看出Renca、CT26帶有CD80/CD86這兩種可以和CTLA-4Ig結合的蛋白。從cell counting實驗中可以看出在加入CTLA-4Ig後，Renca、CT26兩種細胞的生長速度相較於沒有加藥的組別有加快的趨勢；藉由加入MTS assay後測量出的吸光值，可以看出細胞數量有明顯增加；從加入CCK8後所測量出的吸光值增加也可看出細胞生長速度加快的現象。

我發現CTLA-4Ig可以促進表現CD80/CD86的癌細胞生長，這項發現目前仍未被報導，但從以下推論，我認為這個發現是真實可信的。首先，我利用三種不同的實驗方式證明CTLA-4Ig加入癌細胞後皆發現促進細胞生長，雖然三種實驗方法的數據有所不同，但趨勢一致。其次，本實驗用了兩種不同組織來源的癌細胞Renca、CT26，皆能發現在加入CTLA-4Ig後會加速細胞生長，因此推測CD80/CD86可促進癌細胞生長的這個發現並非只在這兩種特定細胞上獨有，可能在其他種會表現CD80/CD86癌細胞上亦成立。

以cell counting和MTS/CCK8 assay所得到的實驗數據趨勢一致，但是數值有些許差異。Cell counting可以直接定量出細胞數量，但可能因實驗者技術純熟度而產生誤差；MTS/CCK assay較為敏感且步驟直接，但MTS/CCK assay是測定粒線體活性/數量，而非直接測量細胞數量。雖然粒線體活性/數量與細胞數量呈正相關，但現階段我們無法排除CTLA-4Ig-CD80/CD86的訊號傳遞，是否會改變癌細胞的粒線體活性，影響MTS/CCK assay的讀值。

我們好奇CD80/CD86是利用什麼途徑傳遞下游訊號影響癌細胞增生，未來可以讓CTLA-4Ig與癌細胞的CD80/CD86結合後，利用溫和的裂解緩衝液 (lysis buffer) 癌細胞釋放出蛋白，藉由免疫共沉澱 (co-immunoprecipitation, co-IP) 及western blot探討是否有其他癌細胞蛋白會結合到CD80/CD86而被免疫共沈澱下來，或探討CTLA-4Ig結合到癌細胞的CD80/CD86後，與一般不經過處理的癌細胞相比是否會引起蛋白質磷酸化 (total protein phosphorylation) 而產生蛋白質表現量差異。若有變化，可將具有差異表現量的蛋白挖出定序，來探討癌細胞上CD80/CD86結合上CTLA-4Ig會影響到哪條下游調控機制，或許能夠提供新的一種癌症治療方向。

# 第六章 參考資料

1. Li, Y., L. Zhao, and X.F. Li, Hypoxia and the Tumor Microenvironment*.* *Technol Cancer Res Treat*, **2021**. *20*: p. 15330338211036304.

2. Carmeliet, P., VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer*.* *Oncology*, **2005**. *69 Suppl 3*: p. 4-10.

3. Anz, D., et al., Suppression of intratumoral CCL22 by type i interferon inhibits migration of regulatory T cells and blocks cancer progression*.* *Cancer Res*, **2015**. *75*(21): p. 4483-93.

4. Vanhaver, C., P. van der Bruggen, and A.M. Bruger, MDSC in Mice and Men: Mechanisms of Immunosuppression in Cancer*. J Clin Med*, **2021**. *10*(13).

5. Mantovani, A., et al., Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, **2002**. *23*(11): p. 549-55.

6. Asrir, A., et al., Tumor-associated high endothelial venules mediate lymphocyte entry into tumors and predict response to PD-1 plus CTLA-4 combination immunotherapy*.* *Cancer Cell*, **2022**. *40*(3): p. 318-334.e9.

7. Abbott, M. and Y. Ustoyev, Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy*.* *Semin Oncol Nurs*, **2019**. *35*(5): p. 150923.

8. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy*.* *Cancer Cell*, **2015**. *27*(4): p. 450-61.

9. Krummel, M.F. and J.P. Allison, CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation*.* *J Exp Med*, **1995**. *182*(2): p. 459-65.

10. Genovese, M.C., et al., Abatacept for Rheumatoid Arthritis Refractory to Tumor Necrosis Factor α Inhibition*.* *New England Journal of Medicine*, **2005**. *353*(11): p. 1114-1123.