

計畫編號：DOH96-TD-G-111-013

行政院衛生署九十六年度科技研究計畫

以幹細胞趨癌特性及分子基因造影技術來研究肺癌之分子轉移機制

研究報告

執行機構：台北醫學大學

計畫主持人：鄧文炳

研究人員：

執行期間：96年1月1日至96年12月31日

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，依合約之規定：如對

媒體發布研究成果應事先徵求本署同意*

目錄

中文摘要.....	2
Abstract.....	3
前言.....	4
材料與方法.....	6
結果.....	9
討論.....	14
結論.....	18
新年度計畫實驗目標.....	19
參考文獻.....	20
圖.....	23
附錄.....	32

中文摘要

近年來於醫學研究上，雖然已有大幅的進步，但肺癌仍是許多已開發國家的主要死因，其中包括台灣。理想的癌症治療應該是能全身性的移除不同部位的腫瘤，並能專一性的分辨惡性和良性的細胞。於我們先前的研究中已證實了幹細胞的活體趨癌特性，所以本計畫的第一個目標是了解參與調控趨癌特性的分子，先於體外建立癌細胞刺激幹細胞移動的實驗模式，並發現專一性針對 CXCR4 的中和抗體(12G5)的確可以降低幹細胞受癌細胞刺激所產生的移動。第二個目標則是以幹細胞趨癌特性為基礎設計了一個”木馬屠城計”(Trojan horse)的治療策略，應用幹細胞的趨癌特性和蛋白質疫苗的組成而達到抑制和預防腫瘤生長的作用，我們先建立了基因轉殖的人類間葉幹細胞，以及針對此基因的蛋白質疫苗，首先我們將基因轉殖的幹細胞引進腫瘤中並隨其共同發展，七天後注射疫苗而抑制或破壞腫瘤的生長。研究結果清楚的顯示，在皮下或肺部腫瘤的模式中，我們利用分子造影監測到合併幹細胞和蛋白質疫苗的治療可以明顯的抑制腫瘤的生長，我們認為腫瘤抑制的效果和由疫苗所引起的專一性免疫反應有很高的相關性，並且我們也證實了合併療法會透過造成細胞產生程式性死亡而達到抑制腫瘤的效果。最後的部分則是了解和肺癌產生骨骼轉移的現象和相關調控機制。利用非侵入性分子造影監測肺癌細胞於活體內轉移的情形，成功的建立了肺癌骨骼轉移的動物模式，並利用體外共同培養的模式模擬肺癌產生骨骼轉移時的環境，再分析肺癌細胞中和癌症轉移相關的基因表現，其中包括了 SDF-1/CXCR4、CTGF、IL-11 和 PTHrP 都有明顯的上升。目前為止，我們發現 SDF-1/CXCR4 在幹細胞趨癌的移動中扮演重要的角色，而基因轉殖的人類間葉幹細胞可以作為一個萬用的追蹤腫瘤工具並媒介蛋白質疫苗抑制腫瘤的效果，所以這種應用幹細胞以及蛋白質疫苗的新策略具有作為移除多種癌症療法的潛能。此外我們也建立肺癌骨骼轉移的動物模式，並且初步篩選出和肺癌骨骼轉移相關的代表基因，希望進一步的應用於癌症轉移研究和治療中。

關鍵字：蛋白質疫苗，SDF-1/CXCR4，癌症轉移，非侵入性造影

Abstract

Despite of recent advances in medical research, lung cancer is still the leading cause for cancer death in many developed countries including Taiwan. Ideally, cancer treatments should eradicate systemic tumor at multiple sites including primary and metastatic, and also have the specificity to discriminate between neoplastic and nonneoplastic cells. In our previous studies, we have demonstrated that mesenchymal stem cells (MSCs) were able to target tumors lesions *in vivo*. Therefore, our first goal is to investigate which molecules that regulated the tumor targeting of stem cells. We established a model to observe the migration of stem cells induced by cancer cells *in vitro*. Our results indicated that antibody neutralization of CXCR4 on stem cell can diminish the its migration induced by cancer cell. The second goal is to devise a novel "Trojan horse" therapeutic strategy which consists of stem cell and protein vaccine to inhibit and prevent tumor growth. A protein vaccine was developed to recognize specifically the modified MSCs. These modified MSCs were then introduced to infiltrate the tumor followed by the inoculation of vaccine to destroy and or inhibit tumor growth, thereby constituting our "Trojan Horse" strategy. Our data clearly indicated that either in subcutaneous or in pulmonary tumor model, tumor development was greatly inhibited by the combined treatment of MSCs and protein vaccine. We investigated that the efficiency of tumor suppression was highly related with the specific immune response induced by the protein vaccine, and we also demonstrated that combined treatment inhibited tumor growth through inducing programmed cell death. The third part of this project is to utilize optical imaging (non-invasive) technique to monitor lung tumor formation and metastases of human lung cancer cells in a mouse model. We successfully established a non-invasive molecular imaging system for long-term monitoring of the migration and development of luciferase-transduced human lung cancer cells. Next, we identified bone-metastatic potential of human lung cancer cells with *in vivo* imaging and *in vitro* co-culture system. The bioluminescence imaging data demonstrated the bone-metastatic potential of human lung cancer cells in mouse. Similarly, *in vitro* co-culture system showed that after 28 days of co-culturing with bone marrow cells, bone metastases related genes such as CXCR4, PTHrP, CTGF and IL11 in the human lung cancer cells were found up-regulated. These data strongly implicated that cancer cells promote metastases via these genes. In summary, we have demonstrated that SDF-1/CXCR4 axis was important to the tumor-targeting of stem cells, and we have also shown that engineered MSCs could be used as an universal tumor-homing device and mediate the anti-tumor effect of fusion protein vaccine. Therefore, this novel strategy using MSCs and protein vaccine could be a potential therapeutic intervention for eradicating multiple cancers. In addition, we have established the animal model of bone metastases of lung cancer, and we have identified the marker genes related to the bone metastases of lung cancer.

Key words: protein vaccine, SDF-1/CXCR4, cancer metastases, noninvasive imaging

前言

癌症在台灣已連續 21 年蟬連 10 大死因之首，無論其發生率和死亡率都呈現逐年上升的趨勢。其中肺癌於近十年來已成為全世界癌症死亡的首位(1)。而在台灣，衛生署統計顯示肺癌目前仍居男性十大癌症死亡的第二位，女性十大死亡的首位。抽煙仍是造成肺癌的主因，約 85% 的肺癌都是由抽煙所引起，而剩下的 15% 則可能由於長期暴露於職業性污染物(石棉、氬氣)或日常環境的致癌物以及未知的基因因素所造成(2)。肺癌主要可分為兩大類，非小細胞性肺癌(Non-small-cell lung cancer; NSCLC)和小細胞性肺癌(Small-cell lung cancer; SCLC)，其中非小細胞性肺癌包括了腺癌(adenocarcinoma)、鱗狀細胞癌(squamous cell carcinoma)、支氣管肺泡細胞癌(bronchioalveolar carcinoma)和大細胞癌(large-cell carcinoma)。非小細胞性肺癌和小細胞性肺癌表現了不同的組織病理學特徵(histopathologic characteristics)，可能是由於此兩類細胞中分別表現其個別的基因損害不同所致(3)。然而 80 % 的肺癌都是由非小細胞性肺癌所引起的其發生率和致死率也都相當高。

腫瘤發展的過程中，包括了癌細胞的增生以及對於周邊組織的滲透。當周邊組織變成包含在腫瘤基質(stroma)的發育之中時，會誘發產生不同的疾病生理以及疾病型態上的改變過程。腫瘤基質的發展中，組織重組和血管新生是必須的過程。最近的文獻已經確定了腫瘤血管新生作用的三個主要機制：(i)具有新增血管的存在，(ii)內皮細胞快速生長以及 (iii)全身性的召集骨髓所產生的內皮性和間葉性前驅細胞。間葉幹細胞(Mesenchymal stem cell, MSC)具有自我更新(self-renewal)及分化成身體不同細胞的能力，利用間葉幹細胞於體內的可變性當成一種新的治療方法，用以修復骨頭(4)、脊髓(5)、皮膚(6)、血管(7)和心肌結構性的損傷(8)。而在我們的先前研究中，我們證明了體外所送入的人類間葉幹細胞，能有活體內標的性趨向於微小腫瘤並於其中增生和分化(9)，此結果亦顯示幹細胞可當作一個追蹤物，合併媒介物應用於癌症細胞治療中。雖然幹細胞的趨癌特性已於相當多的文獻被報導，但確切調控此現象的分子或訊號途徑尚不明瞭，所以本計畫第一部分實驗為利用活體外抗體中和方式探討幹細胞的趨癌機制希望證明其於臨床上應用的有效性，則此種治療策略更可進一步的應用到轉移性腫瘤的偵測及治療上。所以本計畫的第二部分實驗主要想證明幹細胞趨癌特性的機制，並利用幹細胞的此特性結合蛋白質疫苗形成合併的癌症療法。簡單來說，就是將人類間葉幹細胞表現特殊的目標抗原，從血管經由循環系統送入後，能有效的標的移動到腫瘤位置，再利用專一性針對目標抗原的蛋白質疫苗，以幹細胞媒介進而對腫瘤產生抑制。

另一方面，經過統計後發現 90 % 的癌症病患的死亡，都是由癌症的轉移(metastases)所引起(10)，所以在臨床上進行癌症治療前，首先要考慮的是防範癌細胞轉移造成的損害，特別是位於淋巴、骨、肝臟、肺臟和中樞神經系統等組織(11, 12)。癌症的轉移是一個非常複雜的過程，由一系列的連續的步驟所產生，簡單來說，包括了癌細胞侵犯周邊組織、內滲(intravasation)、存活於循環系統中並利用其運送癌細胞、停留於第二位置、外滲(extravasation)，並於最後停留在第二器官中並持續增生(13)。經過研究發現癌細胞的突變是促使產生癌症轉移的主要因素，特別是致癌基因(oncogene)以及抑癌基因(tumor-suppressor gene)的突變，例如 Bax、MSH6、IGFRII 等，都和癌症產生轉移的表現相關(14, 15)。然而在活體實驗中，即使從同一個腫瘤所產生的肺、骨、淋巴結轉移，其中的轉移細胞所表現的基因組也都不相同，可證明基因的改變除了促使轉移的

發生外，更可決定所轉移的目標位置(16)。骨骼系統是一個最容易被轉移的位置，包括了乳癌、肺癌、前列腺癌、甲狀腺癌和腎癌都極容易轉移到骨骼中。骨轉移在臨床上通常會造成骨頭極度的疼痛、病理性骨折、脊髓神經的擠壓等症狀(17, 18)，骨轉移疾病要比原位骨癌更常造成骨骼的惡性破壞及病態發生，並且會造成極高的死亡率(19)。對於乳癌和前列腺癌所造成之骨轉移的相關研究於近年來呈現大幅度的增加，對於其轉移的發生途徑及基因表現已有了相當的了解，已知癌症的骨轉移主要是骨髓中的造骨細胞(osteoblast)、蝕骨細胞(osteoclast)以及基質細胞(stromal cell)和癌細胞之間，產生複雜的交互作用(interaction)，並且參與了許多的生長因子(growth factor)、細胞激素(cytokine)和趨化激素(chemokine)等(20)，但目前對於造成肺癌產生骨骼轉移的基因表現或訊號途徑仍未相當了解。所以本計畫的第三部分則是利用生物冷光造影的技術，活體監人類肺癌細胞的轉移，並建立肺癌產生骨骼轉移的動物模式，進一步的篩選具有骨轉移特性的肺癌細胞。希望能提供進一步找出造成肺癌產生骨轉移的關鍵機制以及其相關影響基因，並且能更了解發生肺癌的確切原因以及尋求更有效的治療方式。

材料與方法

細胞培養

YD-SML 細胞株是衍生自變異型 NIH3T3 細胞株的肉瘤細胞株，YD-SML-tk 為轉型感染 HSV1-tk 基因的 YD-SML 細胞株，YD-SML-tk 的選殖是以攜帶有 HSV1-tk 以及 NeoR 基因的反轉錄病毒(retrovirus) 當載體。YD-SML 及 YD-SML-tk 細胞培養於含有 10 % FBS、100 U/ml penicillin、10 µg/ml streptomycin、0.25 µg/ml amphotericin B 的 MEM 培養液，置於含 5 % CO₂、溫度 37°C 的潮濕培養箱中培養。H441 細胞株為 human pulmonary adenocarcinoma cell 屬於非小細胞性肺癌(Non-small-cell lung cancer; NSCLC)，於 1982 年由 A.F. Gazdar、M. Brower 和 D. Carney 從患有肺臟乳頭狀腺癌(papillary adenocarcinoma)的心包膜液(pericardial fluid)中培養出。再利用攜帶有綠色螢光蛋白基因(green fluorescent protein; GFP)和螢火蟲生物冷光素(Firefly luciferase; Fluc)基因的反轉錄病毒載體進行感染，而選殖出帶有此兩段報導基因的 H441GL 細胞。H441GL 細胞培養於含有 10 % FBS、100 U/ml penicillin、10 µg/ml streptomycin、0.25 µg/ml amphotericin B、1 % NEAA 的 RPMI1640 培養液，置於含 5 % CO₂、溫度 37°C 的潮濕培養箱中培養。Kp-hMSCs 細胞株為人類間葉幹細胞(Human mesenchymal stem cell)，從一位 61 歲女性捐贈者的骨髓中分離出，利用攜帶有 16 型人類乳突瘤病毒 E6/E7 基因(Human papillomaviruses-16 E6/E7; HPV16 E6/E7)的反轉錄病毒載體進行感染，所選殖出不朽化(immortalize)的人類間葉幹細胞。Kp-hMSCs 細胞培養於含有 10 % FBS、100 U/ml penicillin、10 µg/ml streptomycin、0.25 µg/ml amphotericin B 的 DMEM-LG 培養液，置於含 5 % CO₂、溫度 37°C 的潮濕培養箱中培養。上述細胞繼代培養時，先吸掉培養液，以 8 ml PBS (Phosphate-buffered Saline; 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, PH=7.4)清洗二次，再吸掉 PBS。然後加入預先於 37°C 回溫的 0.05% trypsin-EDTA 1ml，置於培養箱中作用 5~10 分鐘。可輕拍培養皿使細胞容易脫落，並置於顯微鏡底下觀察。待細胞皆被切下後，加入適量培養液終止 trypsin-EDTA 的作用，以無菌滴管抽吸細胞懸浮液數次，將細胞充分打散後，而細胞數目計算則以粒子計數器(Z1 coulter counter®, BECKMAN COULTER)進行。

蛋白質疫苗

本實驗所使用的蛋白質疫苗為 PE(ΔIII)-E7-KDEL3 (生寶臍帶血公司)，原始濃度為 3.8 mg/ml 保存於 -20°C，使用前取出置於室溫下自然溶解，實驗中的使用量約為 0.1 mg/mice，所以取 26 µl PE(ΔIII)-E7-KDEL3 加入 154 µl PBS，置於 37°C 活化 2 小時，再加入 20 µl ISA206 adjuvant，即完成蛋白質疫苗混合液。

動物實驗

結合幹細胞和蛋白質疫苗的癌症合併療法實驗中使用雌性免疫正常老鼠(FVB/N female mice)，而肺癌細胞轉移實驗中使用雌性嚴重免疫不全老鼠(CB17-Severe combined immunodeficient, CB17-SCID female mice)。老鼠週齡皆為 6-8 週、每隻老鼠體重約 20 ± 2 公克。所有飼養籠需先經高溫高壓滅菌後才可使用，而且動物均養在無特定病原菌 (Specific Pathogen Free, SPF) 的環境，並維持恆溫(22-24°C)、恆濕(60-80%)及 12 小時光照/黑暗週期，實驗動物可以自由攝食經滅菌之動物飼料及去離子水。老鼠犧牲皆以腹腔注射過量麻醉進行。

(一) 結合人類間葉幹細胞和蛋白質疫苗的腫瘤合併治療：本實驗進行皮下腫瘤和肺部腫瘤兩種腫瘤模式的治療應用

(1) 皮下腫瘤模式

第一組：於老鼠右側皮下注射溶於 100 μ l PBS 的 2×10^5 YD-SML-tk 細胞。此組為 control 組。

第二組：於老鼠右側皮下注射溶於 100 μ l PBS 的 2×10^5 YD-SML-tk 細胞，3 天後於尾靜脈注射溶於 100 μ l PBS 的 10^6 Kp-hMSCs 細胞。此組為 Kp-hMSCs 組。

第三組：於老鼠右側皮下注射溶於 100 μ l PBS 的 2×10^5 YD-SML-tk 細胞，分別於 7 天、14 天和 21 天於背部皮下注射 200 μ l 的蛋白質疫苗混合液。此組為 PE(Δ III)-E7-KDEL 組。

第四組：於老鼠尾靜脈注射溶於 100 μ l PBS 的 2×10^5 YD-SML-tk 細胞，3 天後於尾靜脈注射溶於 100 μ l PBS 的 10^6 Kp-hMSCs 細胞，再分別於經過 4 天、11 天和 18 天於背部皮下注射 200 μ l 的蛋白質疫苗混合液。此組為 Kp-hMSCs + PE(Δ III)-E7-KDEL 組。

所有老鼠於注射 YD-SML-tk 細胞 28 天後犧牲抽取血清進行性抗體偵測。

皮下腫瘤進行體積之測量，利用量測尺測量出腫瘤的長軸和短軸，腫瘤體積計算方式為 $1/2 \times \text{長軸} \times \text{短軸}^2$ 。

血清中抗體反應偵測，將小鼠血清以 1:1000 與 PE(Δ III)-E7-KDEL3 抗原，進行 Western Blotting，測試血清中 E7 專一性抗體之反應強度。

(2) 肺部腫瘤模式

第一組：於老鼠尾靜脈注射溶於 100 μ l PBS 的 10^5 YD-SML-tk 細胞。此組為 control 組。

第二組：於老鼠尾靜脈注射溶於 100 μ l PBS 的 10^5 YD-SML-tk 細胞，3 天後於尾靜脈注射溶於 100 μ l PBS 的 2×10^5 Kp-hMSCs 細胞。此組為 Kp-hMSCs 組。

第三組：於老鼠尾靜脈注射溶於 100 μ l PBS 的 10^5 YD-SML-tk 細胞，分別於 7 天和 14 天於背部皮下注射 200 μ l 的蛋白質疫苗混合液。此組為 PE(Δ III)-E7-KDEL 組。

第四組：於老鼠尾靜脈注射溶於 100 μ l PBS 的 10^5 YD-SML-tk 細胞，3 天後於尾靜脈注射溶於 100 μ l PBS 的 2×10^5 Kp-hMSCs 細胞，再分別於 4 天和 11 天於背部皮下注射 200 μ l 的蛋白質疫苗混合液。此組為 Kp-hMSCs + PE(Δ III)-E7-KDEL 組。

所有老鼠於注射 YD-SML-tk 細胞 21 天後犧牲，取出肺臟進行腫瘤結節計數、組織切片染色和組織反轉錄酶-聚合酶連鎖效應實驗。

(二) 人類肺癌細胞於活體轉移之動物實驗

準備 CB17-SCID 母鼠，將老鼠分為三組。第一組於老鼠尾靜脈中注射溶於 100 μ l PBS 的 1×10^6 H441GL 細胞；第二組於老鼠右腿皮下注射溶於 100 μ l PBS 的 1×10^6 H441GL 細胞；第三組同時於老鼠右腿皮下及尾靜脈中各注射溶於 100 μ l PBS 的 1×10^6 H441GL 細胞。分別於 H441GL 細胞注射後 1 天、3 天、7 天和 14 天進行生物冷光造影，並於 23 天進行生物冷光造影和 X 光造影(X-ray imaging)，造影結束後將老鼠犧牲，取出腫瘤、肺臟、右腿、左腿和脊椎等組織，將從第一組和第三組老鼠中所取出的組織

進行生物冷光造影後進行冷凍切片，並以 H&E 和免疫組織染色分析。而第二組則直接將組織取出以 10%福馬林固定後，進行石蠟切片及 H&E 染色。

單光子放射電腦斷層造影 (Single photon emission tomography, SPECT)

首先於老鼠腹腔注射 $500\mu\text{l}$ 0.9 % NaI，於 15 分鐘後從老鼠尾靜脈注射含有 $100\mu\text{Ci}$ [^{131}F]-FIAU 溶於 $200\mu\text{l}$ 的生理食鹽水的溶液，而於藥物注射後 24 小時利用單光子放射電腦斷層掃描進行平面造影，將老鼠以腹腔注射麻醉劑 (Tiletamine 10 mg/kg + Xylazine 10mg/kg) 麻醉，固定四肢後放置於裝置有 Pinhole collimator 的單光子放射電腦斷層掃描(e.cam Fixed 180, SIEMES)，老鼠距離 Pinhole 6 公分，先以 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 沿著老鼠外型劃一圈並擷取影像以做為老鼠外型標定，再收取 10 分鐘 [^{131}I]-FIAU 的影像。

生物冷光造影 (Bioluminescence imaging, BLI)

本實驗利用 IVIS imaging system(IVIS® Imaging System 50 Series, Xenogen) 進行生物冷光造影，首先老鼠腹腔注射 150 mg/kg D-luciferin，10 分鐘後將老鼠固定於儀器暗箱中進行造影，造影時間從 120 秒開始，並依據防止訊號強度飽和而縮短時間，本實驗中老鼠全程以氣體麻醉(2 % Isoflurane and 98 % Oxygen)。

結果

SDF-1/CXCR4 調控幹細胞之趨癌特性

本實驗室先前研究中證明幹細胞具有於活體內標的趨向微小腫瘤的能力，但其造成機制尚不明瞭，已知 SDF-1/CXCR4 和調控許多細胞的移動有關，其中包括了幹細胞和癌細胞。所以我們利用針對 CXCR4 專一性的抗體(12G5)來中和細胞上的 CXCR4 表現，並以體外實驗觀察當 CXCR4 受到中和時對細胞移動的影響。由於已有文獻指出 CXCR4 會影響癌細胞的移動情形，所以首先我們利用 12G5 抗體中和 H441GL 後，再以 wound healing assay 和 transwell assay 觀察其移動情形，在 wound healing assay 中，有加入 12G5 抗體的實驗組其於劃線後 24 小時的移動距離比沒有使用 12G5 抗體的組別來的短(圖一、A)。而利用 Transwell assay 也證明了 12G5 抗體會降 H441GL 穿過 transwell 的移動能力(圖一、B)，而將 Transwell assay 的實驗結果量化後，可以發現 H441GL 移動的數量隨著 12G5 抗體濃度的增加而下降(圖一、C)。此結果顯示癌細胞的移動的確會受到 CXCR4 的表現所影響，與證明了 12G5 抗體抑制細胞移動的可行性。

接著我們設計一個體外實驗利用 Transwell assay 觀察幹細胞是否會受到癌細胞的刺激而移動，結果顯示下層有 H441GL 細胞的實驗組，其上層的 Kp-hMSCs 移動較多的細胞(圖二、A)，經過量化後明顯的觀察到其差異(圖二、B)，證明癌細胞的確會刺激幹細胞的移動。在經過前述的實驗確認癌細胞可以在體外的狀態吸引幹細胞移動的實驗模式後，我們應用前述的實驗模式進一步探討 CXCR4 是否有參與在癌細胞刺激幹細胞的移動中，結果顯示將 12G5 抗體加入 Kp-hMSCs 中會抑制其受到癌細胞刺激所引起的移動，但並沒有隨著抗體濃度增加而有明顯增強的抑制結果(圖三、A)，然而相對的若將 12G5 加入 H441GL 細胞中，則對 Kp-hMSCs 細胞的移動沒有任何抑制的效果(圖三、B)。

結合人類間葉幹細胞和蛋白質疫苗合併治療皮下肺腫瘤

由於本實驗室於先前研究中證明幹細胞具有於活體內標的趨向微小腫瘤的能力，所以此實驗就為應用幹細胞趨癌特性所衍生的癌症療法。由於疫苗需要免疫系統的參與才可達到有效的治療功能，所以為了配合蛋白質疫苗的治療，必須使用免疫正常的動物模式。所以此部分應用較單純的皮下腫瘤模式來進行實驗。我們於皮下腫瘤建立初期，從尾靜脈注射 Kp-hMSCs 細胞進行幹細胞標的腫瘤，隨後進行蛋白質疫苗的免疫誘發(immunization)。首先我們利用單光子放射電腦斷層掃描進行平面造影監測活體中腫瘤的生長狀態，造影結果發現除了使用 Kp-hMSCs 細胞和 PE(Δ III)-E7-KDEL3 治療的組別外，其他三組的腫瘤訊號都隨著天數而增加，而合併 Kp-hMSCs 細胞和 PE(Δ III)-E7-KDEL3 治療的老鼠即使到了 34 天其皮下腫瘤的造影訊號仍相當的微弱(圖四、A)。相對應的結果也可從皮下腫瘤的體積量測實驗中觀察到，除了合併 Kp-hMSCs 細胞和 PE(Δ III)-E7-KDEL3 治療的組別外，其他組別老鼠的皮下腫瘤體積隨著天數的增加都有明顯成長(圖四、B)。爲了了解我們所使用的蛋白質疫苗是否真的於實驗動物中引發專一性的免疫反應，所以去偵測小鼠血液中 E7 的專一性抗體，經由 Western Blot 的實驗結果顯示，合併 Kp-hMSCs 細胞和 PE(Δ III)-E7-KDEL3 處理的小鼠表現有 E7 專一性抗體，而雖然 Kp-hMSCs 細胞表現有 E7 抗原，但只處理 Kp-hMSCs 細胞的小鼠則偵測不到 E7 抗體的產生。然而當將偵測抗體的結果和腫瘤體積大小相對照時，會發現當抗體反應越強則其腫瘤體積越小(圖

五)。由此可以推測，抑制腫瘤的效果，與蛋白質疫苗誘發的免疫反應強度有相關性。

結合人類間葉幹細胞和蛋白質疫苗合併治療肺部轉移腫瘤

經由前項實驗證明即使在免疫正常的 FVB/N 小鼠中，我們所使用的人類間葉幹細胞和蛋白質疫苗對於皮下腫瘤有明顯的抑制效果，這也顯示了我們所使用的人類間葉幹細胞仍具有標的移動到腫瘤的能力，所以進一步的我們想試驗此種合併療法應用於體內腫瘤模式的可行性，於是使用本實驗室之前所建立的肺部轉移腫瘤動物模式(ref)來進行。實驗中同樣先於肺部腫瘤建立初期，從尾靜脈注射 Kp-hMSCs 細胞進行幹細胞標的腫瘤的步驟，之後再進行蛋白質疫苗的免疫誘發(immunization)。同樣的我們利用單光子放射電腦斷層掃描進行平面造影監測活體中肺部腫瘤的生長狀態，首先四組於第 7 天的造影結果並沒有明顯的差異，由於肺部腫瘤尚未形成到足夠的數量，所以四組的造影結果並沒有在肺部有明顯的訊號而都只有是腹腔的背景訊值，而在 14 天的造影結果可以發現合併使用 Kp-hMSCs 細胞和 PE(Δ III)-E7-KDEL3 治療組其肺部的訊號較其他三組為弱，特別是和不治療的 control 組差異最明顯(圖六)。再經過兩次蛋白質疫苗的免疫後犧牲老鼠，取出其肺臟直接觀察所產生的腫瘤節結(nodule)，可以發現同時使用 Kp-hMSCs 細胞和 PE(Δ III)-E7-KDEL3 治療組別的老鼠有相當明顯的抑制效果(圖七、A)，而在組織切片染色後，於使用 Kp-hMSCs 細胞和 PE(Δ III)-E7-KDEL3 治療的老鼠肺臟切片中，仍可觀察到許多在正常肺臟中所表現的肺泡組織型態，箭號指出其中的腫瘤結節組織，而於另外三組的肺臟切片中，其所表現的是已完全被腫瘤細胞所充滿的實質組織型態：而非正常的空泡型態，顯示我們所使用的治療策略的確能抑制腫瘤並幫助肺臟保有正常的型態(圖七、B)。進行腫瘤結節計數將所有實驗組的肺臟腫瘤結節數量化後(control 組：98.8 $\pm$ 31.36；Kp-hMSCs 組：85.4 $\pm$ 37.15；PE(Δ III)-E7-KDEL3 組：113 $\pm$ 35.28；Kp-hMSCs + PE(Δ III)-E7-KDEL3 組：31.2 $\pm$ 13.44)，更可明顯比較出其差異，顯示結合人類間葉幹細胞和蛋白質疫苗的治療策略的確有抑制肺部腫瘤生長的效果(圖七、C)。進一步萃取不同實驗組別老鼠肺臟的 total RNA 後，利用 RT-PCR 檢測其中的 HSV1-tk 基因和 HPV16 E6/E7 基因的表現，HSV1-tk 為 YD-SML-tk 細胞所特定表現的 DNA 片段，可用來確認我們所使用的肺部腫瘤模式是否由 YD-SML-tk 轉移而來(圖八、A)。而 HPV16 E6/E7 則是用來代表 Kp-hMSCs 的表現基因，顯示其於體內的存在位置，實驗結果顯示在 Kp-hMSCs 組的老鼠肺臟中有 HPV16 E6/E7 的表現，顯示其肺部的確有 Kp-hMSCs 細胞存在，亦可證明 Kp-hMSCs 在我們的實驗動物中的確有標的移動到肺部腫瘤的能力，然而再加入蛋白質疫苗後的 Kp-hMSCs + PE(Δ III)-E7-KDEL3 組別中，其老鼠肺臟並無法偵測到 HPV16 E6/E7 的表現(圖八、B)，由於我們所使用的策略是先運用人類間葉幹細胞趨向腫瘤的特性，再以人類間葉幹細胞所表現的 HPV16 E6/E7 基因為媒介，使蛋白質疫苗以人類間葉幹細胞為目標物，進而使得免疫攻擊至腫瘤處。此結果可能為人類間葉幹細胞為蛋白質疫苗攻擊目標物的佐證，由於蛋白質疫苗引發的免疫，攻擊了位於腫瘤處的 Kp-hMSCs 進而影響了腫瘤的生長，所以位於腫瘤的 Kp-hMSCs 亦被引發的免疫所消滅，因此無法偵測到 HPV16 E6/E7 的表現。

人類間葉幹細胞和蛋白質疫苗合併療法經由細胞凋亡而抑制腫瘤

以 TUNEL 染色來分析比較皮下腫瘤模式中，Kp-hMSCs + PE(Δ III)-E7-KDEL3 組和單用 Kp-hMSCs 組的腫瘤切片中，其細胞凋亡的數量的差異。染色結果中，綠色螢光代表 TUNEL 染色，紅色螢光的 PI 則代表細胞核，將兩個結果合併之後就可代表產生凋亡的細胞，結果顯示經由合併 Kp-hMSCs + PE(Δ III)-E7-KDEL3 治療的組別中，其腫瘤之中的細胞凋亡情形比單以 Kp-hMSCs 處理的對照組要來得明顯(圖九、A)，而經過量化統計後也可發現同樣的結果(圖九、B)。

非侵入性分子造影連續監測人類肺癌細胞於活體內之轉移

我們使用帶有綠色螢光蛋白基因(green fluorescent protein; GFP)和螢火蟲生物冷光素(Firefly luciferase; Fluc)基因的人類肺癌細胞(H441GL)進行活體的轉移實驗，由於生物冷光造影的高敏感度及專一性，所以本實驗利用密集的時間點進行連續性造影。將 H441GL 細胞注射入 CB17-SCID 小鼠中進行活體轉移的實驗，分別於腫瘤注射後第 1、3、7、14 及 23 天進行生物冷光造影。結果顯示第一組從尾靜脈注射 H441GL 細胞的老鼠中，由於生理循環的因素，於 1 天後即可在肺部偵測到明顯的顯影，而於 3 天和 7 天的影像中，肺部位置顯影雖比較微弱，但在 14 天時又可清楚偵測到，顯示 H441GL 細胞經由循環後，開始慢慢聚集並於肺部生長。而第 7 天的影像中已經在右後肢偵測到微弱的顯影，表示除了肺部，少量的細胞轉移至後肢部位生長，而在 14 天的影像中肺部和兩肢後肢的位置的有明顯的顯影訊號，更可確定 H441GL 細胞經由循環系統，除了肺臟亦轉移到後肢的部位(圖十 (i))。而第二組皮下腫瘤組的老鼠，腫瘤隨著時間的增加而生長，右腿皮下腫瘤處的顯影亦隨著天數而增強，但在所有時間點的影像中，其顯影位置仍侷限在右腿處，並沒有在身體其他部位有明顯的訊號表現(圖十 (ii))。在同時於右腿皮下和尾靜脈注射細胞的第三組老鼠中，右腿皮下腫瘤的顯影如同第二組老鼠是隨著天數而增強，而肺部的顯影則和第一組老鼠相似，第 1 天有很清楚的肺部顯影，但隨著天數會先減弱而後增強，不同的是此組老鼠於第 7 天在左後肢就可得到明顯的影像，而 14 天由於兩肢後肢的訊號太強，所以導致肺部的訊號無法明顯表現，但在之後的實驗中證明肺部仍具有腫瘤細胞的存在(圖十 (iii))。由於第一組及第三組老鼠的造影表現有轉移骨頭的可能性，所以於第 23 天的生物冷光造影後，以相同的姿勢進行 X 光造影，再將生物冷光造影圖和 X 光造影圖利用軟體重疊於一起。經由圖像重疊後發現，第一組老鼠的生物冷光顯影的位置相對於 X 光造影圖，其訊號表現於後肢骨頭的位置(圖十一、A)。而第三組老鼠由於生物冷光顯影訊號強度很強且範圍很大，對應於 X 光造影位置並不只侷限於骨頭，但骨頭的位置仍包括在訊號表現的位置之內，由於第三組老鼠的腫瘤生長較大，因此從 X 光造影圖上可發現後肢的骨骼結構已不完整，研判骨頭可能已受癌細胞破壞侵入而有骨質瓦解的情況(圖十一、B)。

人類肺癌細胞轉移之組織生物冷光造影

經由非侵入性冷光造影果顯示 H441GL 細胞經由循環後會存在於某些特定位置顯影。為了更確認細胞所轉移的組織為何，在第 23 天造影後將老鼠犧牲，取出特定組織直接進行生物冷光造影。從第一組老鼠中所取出的肺臟可清楚的看到結節(nodule)狀的顯影，而左後肢、右後肢也都有訊號表現，對照於非侵入

式的造影結果其表現位置是相符合的，然而在脊椎組織也發現了微小的影像(圖十二、A)。由於脊椎組織的信號強度微弱並且在活體造影中是沒有偵測到的，所以初步推測可能是實驗操作的誤差所產生的沾粘所致，而此推測可由進一步的組織切片染色分析得到確認。而相對於第三組老鼠非侵入式的生物冷光影像，右腿腫瘤位置有明顯的顯影，取出腫瘤後直接造影得到相對應的結果，但將腫瘤分離後所取出的右後肢和對側左後肢也都有很明顯的訊號表現，對應於圖九 B 的造影結果，可證明 H441GL 細胞不只局限皮下腫瘤位置並已轉移至後肢的部位。而在脊椎組織的部位其顯影位置是位於下端，靠近骨盆接近左後肢的部位。雖然在活體造影時肺部並沒有明顯的訊號表現，但在直接進行肺臟的造影時，可以得到結節(nodule)狀的顯影，但訊號強度的確較其他組織低，此可能為肺部在活體造影上無法明顯表現的原因(圖十二、B)。

組織染色分析人類肺癌之骨轉移現象

由於非侵入性活體以及組織的生物冷光造影都顯示 H441GL 細胞具有透過循環系統而轉移的能力，為了更確定其轉移到骨骼的能力，因此進行組織切片染色的分析，以精確的分析 H441GL 細胞其於受轉移組織的位置。第一組老鼠的右後肢在骨骼下方有明顯的腫瘤細胞(圖十三、A)，而將圖中黑框處放大觀察(圖十三、B)，並以連續片利用 Anti-GFP 抗體進行免疫組織染色，顯示骨骼邊緣的細胞有 GFP 的表現，表示其為我們所送入的 H441GL 細胞，而在高倍的觀察下可發現 H441GL 細胞不只存在於骨骼邊緣，有些已經有初步侵入骨骼而存在於上方的骨骼之中(圖十三、C)。而左後肢的切片更可以證明其轉移骨骼的能力，在低倍觀察下，即可在骨骼中央發現有別於正常骨髓細胞型態的細胞存在(圖十三、D)，經由免疫組織染色確認其為 H441GL 細胞，並且在高倍觀察下可親楚觀察出癌細胞和骨髓細胞的分界(圖十三、E, F)。為了確認圖十二、A 中脊椎組織造影的訊號表現是因為其他的因素例如操作誤差的沾粘，而非腫瘤細胞本身的轉移所表現，我們觀察脊椎組織的切片，發現其組織型態皆正常的表現，並無受腫瘤細胞轉移的現象證明前述的推測。第三組老鼠取出組織進行冷凍切片後，直接以螢光顯微鏡觀察綠色螢光表現，在肺臟可觀察到肺臟腫瘤結節的螢光表現，皮下腫瘤切片亦可明顯的觀察到綠色螢光的表現。由於皮下腫瘤是種於老鼠的右腿上，所以在右後肢的切片中，可以發現存在於肌肉層的 H441GL 細胞所表現的螢光(圖十四、A)，而在股骨(femur)靠近脛骨(tibia)交界的關節處則可明顯的觀察到骨頭結構已受到癌細胞侵入所破壞，此結果亦可在左後肢的切片中觀察到，並且在左後肢股骨中已發現有轉移的 H441GL，並且明顯的侵犯到骨髓細胞的位置(圖十四、B)。而於脊椎組織切片中，脊椎下端靠近骨盆處，亦可發現 H441GL 細胞的存在，然而其中亦有侵犯入骨骼並破壞骨骼結構的部分(圖十四、C)。由於第三組同時將 H441GL 細胞注射皮下和尾靜脈的老鼠其受轉移的骨骼破壞較第一組的老鼠嚴重，所以懷疑皮下的腫瘤是否也具有轉移到他處的能力，於是將第二組只於皮下注射 H441GL 細胞的老鼠於同樣的時間點進行組織切片分析，可以發現除了皮下的腫瘤外，其他包括了肺臟、脊椎、右後肢和左後肢等組織的切片，並無觀察到腫瘤細胞的存在，而且都保持有正常的組織型態，例如肺臟的肺泡空腔型態(圖十五、A)、脊柱骨骼(圖十五、B)和股骨脛骨之間的骨骼關節處(圖十五、C, D)的完整，顯示腫瘤細胞的轉移主要還是倚靠從血管送入經由循環後才能發生。

骨髓刺激肺癌細胞之轉移相關基因表現

上述實驗發現我們所使用的肺癌細胞株具有骨骼轉移的能力，所以建立體外共同培養的實驗模式，利用新鮮抽取的小鼠骨髓和 H441GL 共同培養，再分析 H441GL 中和轉移相關的基因是否受到刺激而改變。經過不同時間和骨髓的共同培養後，以 RT-PCR 分析 H441GL 中的基因表現，其中包括有 CXCR4、SDF-1、PTHrP、CTGF、TGF β R1、IL-11 和 MMP1，並以 GAPDH 作為定量控制(圖十六)。分別將每個 Marker gene 經由 GAPDH 平均化後，進行量化統計，結果顯示除了 TGF β R1 和 MMP1 外，其他的基因在經過 28 天的共同培養後都有明顯的上升，而其中 CXCR4 的表現幾乎在所有時間點都可以看到差異(圖十七)。

多樣式肺癌腫瘤動物模式之建立

前述的肺癌轉移動物實驗，我們已證明了經由尾靜脈注射的肺癌細胞的確具有骨骼轉移的能力，而且在皮下和尾靜脈同時注射癌細胞的實驗組中，可以發現皮下腫瘤和轉移的腫瘤似乎有些交互影響，然而皮下的腫瘤模式並不能代表真實的肺癌的原位腫瘤，而從尾靜脈注射癌細胞的實驗模式能否代表肺癌的轉移，在不同的文獻討論中亦有不同的解釋，而目前經由血液送入循環系統中的癌細胞轉移動物模式主要經有兩種途徑，一為尾靜脈注射另一為左心室注射，所以我們也建立左心室轉移的動物模式並運用分子造影技術進行監測，以更全面的應用於肺癌轉移研究的實驗。而我們也希望建立肺部原位腫瘤的動物模式，利用氣管切開術，直接從氣管將癌細胞送入肺部，希望直接從肺部建立原位肺癌的動物模式。經由造影結果顯示，經由尾靜脈注射的肺癌細胞，由於正常生理循環的關係，於注射當天聚集於肺部，而在 7~14 天會在下肢形成骨骼轉移(圖十八、A)。而從左心室注射癌細胞的實驗中，因為細胞從左心室注射後會由動脈送出，所以在注射當天會呈現全身性的訊號，但也在 7~14 天開始產生全身性和下肢骨骼的轉移(圖十八、B)，顯示 H441GL 所具有的骨骼轉移能力無論在哪種轉移動物模式中都可被證實。最後經過氣切後，從氣管送入細胞所建立的肺部原位腫瘤動物模式中，於注射當天可於右肺中觀察到清楚的造影訊號，但隨著時間的增加觀察到細胞似乎移動到氣切傷口的位置(圖十八、C)，初步推測可能由於傷口所引發的發炎反應導致癌細胞的移動，所以目前原位腫瘤動物模式的建立尚未完全，仍需進一步的嘗試和修改。

討論

近年來，幹細胞是醫學界最熱門的研究對象，因為它充滿著無限的可能，可於體外進行培養，透過適當的刺激進而分化成各式各樣的細胞，一開始多運用其可分化的特性而可以進行組織修復與再生的治療。其中骨髓中的間葉幹細胞為近來常被應用於研究中的細胞種類，其具有多樣化的分化能力早已被許多文獻所報導，而我們於先前研究已證實了間葉幹細胞能夠受到癌細胞的吸引而趨化至腫瘤中，並且分化成為血管內皮細胞(9)。但其條控機制並未被詳細的研究出，所以我們利用 Transwell assay 將幹細胞和癌細胞進行共同培養，進而模擬一個幹細胞趨癌移動的體外實驗模式，並且應用專一性中和抗體顯露出 SDF-1/CXCR4 在幹細胞趨癌的移動中有著一定程度的影響。SDF-1/CXCR4 為一種化學激素(chemokines)，化學激素簡單來說就是會導致化學趨向移動(chemoattractant)的蛋白，其依據位於 N 端的 cysteine 的組合分成四類，包括了 CC、CXC、C 和 CX₃C 四個家族，其中 SDF-1 (CXCL12)/CXCR4 就為 CXC 家族(21, 22)，已有研究發現 SDF-1/CXCR4 和癌症的轉移有很高的相關性，尤其是骨骼轉移，而其中造成癌細胞移動到骨骼的機制中，亦被發現類似於調控幹細胞或前驅細胞到骨髓中保存的機制。我們於體外實驗中證實了 SDF-1/CXCR4 會幫助調控幹細胞的趨癌特性，所以我們將利用 shRNA 的技術建立穩定的 SDF-1 downregulated 肺癌細胞和 CXCR4 downregulated 間葉幹細胞，並利用分子造影的技術於活體內證明 SDF-1/CXCR4 對於幹細胞趨癌移動的影響，目前我們已設計並建構好帶有抑制 SDF-1 和 CXCR4 表現的 shRNA(附錄)，目前正在進行穩定細胞株的篩選。由於幹細胞和癌細胞都是高度可變性的細胞，並且幹細胞的趨癌特性是一個相當複雜的過程，所以我們相信除了 SDF-1/CXCR4 之外，還有其他的調控因子，例如已有文獻證明乳癌細胞會透過 Monocyte Chemotactic Protein-1(MCP-1)調控幹細胞的趨癌移動(23)，希望應用目前的實驗架構在未來能證明出其他調控幹細胞驅癌移動的關鍵分子，並提供未來臨床的應用。

肺癌目前仍是引起癌症死亡最主要的病因，而其中肺癌轉移又是臨床治療上的一大障礙，因此本計畫主要針對肺癌的治療和轉移為研究主題。癌症的治療，除了早期診斷，早期手術切除外，一旦蔓延，即需依靠其他療法的協助。而目前的臨床對於肺癌的治療方式，主要還是以放射線療法、化學療法和手術切除為主，但依據不同期的肺癌，需要結合不同的治療方式，以求達到最有效的結果(24)。但由於癌症的放射療法和化學藥物，並無法專一性的針對癌細胞進行毒殺，導致很多情況下其療效有限，加上副作用嚴重，常令病人痛苦不堪(25, 26)。於是本計畫的第二部分研究是希望建立一個有效且副作用低的肺癌治療法，近年研究者針對癌症開發了所許多不同的癌症療法，包括了單株抗體治療、細胞激素及生長因子療法、基因治療以及疫苗治療等，其中運用免疫的疫苗治療包括了 DNA 疫苗、蛋白質疫苗以及樹突細胞疫苗等種類，而由於疫苗療法是專一性的針對一個目標，所以無法廣泛適用於多種類的治療，而對於癌症來說，仍受限於許多癌症無表現特定抗原，亦或抗原不容易被偵測(27)。本實驗利用間葉幹細胞為媒介配合與生技公司開發之疫苗(28)進行免疫療法，應用幹細胞的趨癌特性於癌症治療已於前段敘述和證明，其他研究中也應用將一特定酵素基因利用基因工程技術置入幹細胞中表現，應用其趨癌特性再投予前驅藥物，可以連帶摧毀在周遭的癌細胞，已達到抑制甚或治療癌症的功效。所以我們利用人類間葉幹細胞使其表現特定抗原可被蛋白質疫苗所辨認而引起的

免疫所偵測。實驗結果證明，此種合併治療的策略的確可以抑制腫瘤的生長，雖然在免疫正常的老鼠中，或許因為些許異種排斥的問題，導致部份的人類間葉幹細胞表現較弱，但其於不同種生物內的應用性已被證明。由於幹細胞和一些前驅細胞屬於分化較前期的細胞，所以此類細胞具有跨越物種的特性，其他的文獻研究中亦證明此一特性，包括了運用 human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cell 治療 mdx (X-linked muscular dystrophy) 小鼠的肌肉萎縮(29)，及將 human pancreatic islet-derived progenitor cell 移植於 C57BL/6 小鼠中(30)，都是將人類的幹細胞和前趨細胞運用於免疫正常的老鼠上，並且證明了其能抵抗異種免疫排斥的特性，此可為本實驗運用人類間葉幹細胞於 FVB/N 小鼠上，仍能保持細胞原有的趨癌特性，而不受排斥的影響做一佐證。

疫苗療法所引發的免疫攻擊為呈現一個特定抗原給免疫細胞進行辨認，而進行專一性的攻擊，PE(Δ III)-E7-KDEL 是針對子宮頸癌所發展的融合蛋白質疫苗，具高專一性且有效的誘發免疫治療(28)。其專一性在本實驗可由只以 PE(Δ III)-E7-KDEL 治療 YD-SML-tk 肺部腫瘤老鼠的結果得到印證，由於 YD-SML-tk 細胞並不表現 PE(Δ III)-E7-KDEL 所辨認的 HPV16 E7 抗原，所以並沒有任何治療效果產生。而在結合了以人類間葉幹細胞為媒介的蛋白質疫苗治療，可以明顯的看出其具有抑制肺部腫瘤生長的效果。然而當蛋白質疫苗治療以人類間葉幹細胞為目標，免疫會針對 Kp-hMSCs 進行攻擊時，會而導致 Kp-hMSCs 死亡，所以實驗中合併 Kp-hMSCs 和 PE(Δ III)-E7-KDEL 的老鼠，其肺部組織中已偵測不到代表 Kp-MSCs 細胞的 HPV16 E6/E7 基因表現，但疫苗療法是具有專一性的攻擊，理論上並無法直接攻擊腫瘤細胞，所以其又是如何影響腫瘤細胞的生長呢，可能的原因有二：(i) 雖然 YD-SML-tk 細胞並非由 PE(Δ III)-E7-KDEL 所誘發之免疫所直接攻擊的目標，但由於 Kp-hMSCs 除了標的腫瘤外，能更進一步的移植 (engraft) 於腫瘤中，並參與了腫瘤的血管新生及基質的生長(9)，所以當免疫針對 Kp-hMSCs 進行攻擊時，會導致輸送養分廢物的血管以及腫瘤基質都受到攻擊，亦可能破壞了鄰近腫瘤的部分結構及組織，許多文獻也證明血管新生是腫瘤生長的必要因素，所以當抑制血管的新生或破壞腫瘤內的血管，都可達到抑制腫瘤的效果(31)。(ii) 當以 Kp-hMSCs 為目標的免疫反應發生時，大量的免疫細胞會聚集到具有 Kp-hMSCs 的腫瘤週邊。專一性的 T 和 B 淋巴球進行攻擊時，將會伴隨一連串的免疫反應，T 和 B 淋巴球會分泌許多的參與免疫反應的細胞激素(cytokine)和趨化激素(chemokine)，此激素包括了會刺激非專一性的免疫細胞活化，例如受介白素 2(interleukin-2, IL-2)和干擾素(interferon, INF)所刺激的自然殺手細胞 (Natural killer cells, NK cells)，和受干擾素 γ (interferon γ , INF γ)、tumor necrosis factor (TNF)、介白素 4(interleukin-4, IL-4)和 granulocyte-macrophages colony-stimulating factor (GM-CSF)所刺激的巨嗜細胞(Macrophages)(32)，這些非專一性的免疫細胞都可能引起腫瘤的細胞溶解(cytolysis)。此外受活化淋巴細胞亦會分泌許多抑制腫瘤的細胞激素，其中包括了干擾素(interferon β , INF β)(33)、受介白素 2 (interleukin-2, IL-2)(34, 35)及腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)(36)，這些免疫細胞和激素都可能由於高度的分泌活化於腫瘤週邊而達到抑制腫瘤的生長，目前本實驗是正在探討中。

肺癌是一個好發轉移的癌症，而其轉移多發生於淋巴結、脊髓、腦和骨骼，而當肺癌發生轉移時又使得臨床治療所遭遇極大的困難，其中當骨轉移發生時會造成病患極大的痛楚，臨床症狀包括了骨痛、病理性骨折、神經壓迫，

更嚴重者造成神經受阻或血鈣過高，進而危及生命。所以在本計畫中的第三部分就為研究關於肺癌的骨骼轉移，利用非侵入性的方式在動物模式中監測活體內的肺癌細胞轉移，並後續分析肺癌細胞是否具有轉移骨頭的能力。應用非侵入性的分子造影技術來追蹤細胞在活體的移動，是許多免疫學及腫瘤學研究的共同目標，而運用報導基因/探針(Reporter gene/probe)策略的分子基因造影，更是大大提高了追蹤細胞移動的專一性和效率。所以本實驗中利用生物冷光造影非侵入性監測帶有 GFP 和 Luciferase 的人類肺癌細胞 (H441GL) 於老鼠體內的移動，由生物冷光造影可以發現經由血管送入的肺癌細胞，在 7 天後開始偵測到肺癌轉移的跡象，而在 14 和 23 天就可以明顯的觀察到除了肺臟外，主要在後肢的部位已轉移了大量的癌細胞。經由結合了多型式的造影(Multimodality imaging)，利用 X 光造影更初步確定 H441GL 細胞轉移到骨骼位置，並且也可從骨骼結構的完整性進行佐證。組織學分析以 H441GL 細胞中的 GFP 為標誌物，利用免疫組織染色和直接觀察螢光表現以確認 H441GL 細胞轉移到骨骼中。可以發現經由血管送入的 H441GL 細胞的確有轉移到骨骼的能力。而且在較嚴重的組別中，癌細胞甚至會將整個骨骼組織破壞，此結果可和 X 光造影結果相對照。多形式造影是將不同造影模式的優點應用於同個受測目標以獲得更準確的偵測，本實驗使用了螢光影像、生物冷光影像及 X 光影像用以監測肺癌的骨轉移潛能，結合了螢光影像於細胞層面的高表現，生物冷光於小動物實驗的高敏感度和低背景值，然而 X 光造影雖非專一性的基因造影，但能提供一個解剖組織位置的對照，以提供生物冷光影像位置更準確的對照。而相較於生物冷光造影來說，應用核子造影的優點之一是由於其具有斷層掃描功能，使產生之影像有良好的空間解析度。核子基因造影於癌症應用上，最常使用的報導基因就是第一部分實驗中所使用的第一型疱疹病毒胸腺嘧啶激酶基因(HSV1-tk)，其中主要的因素之一是其同時也可應用為基因治療中的自殺基因(suicide gene)。所以為了要結合各種造影的使用優勢和利用不同報導基因特性，目前已開發出適用於包括螢光、生物冷光和核子三種造影型式的融合報導基因，應用多型式造影的分子基因造影，大大的提高了分子基因造影的應用性及準確度(37, 38, 39)。

現今已有許多利用分子造影技術監測活體細胞移動的研究，包括了以 SPECT 造影監測轉導 HSV1-tk 基因的 T 淋巴細胞(40)、以 MRI 造影監測標誌氧化鐵奈米粒子的 T 淋巴細胞(41)、以 SPECT 造影監測轉導 HSV1-tk 基因的老鼠肉瘤細胞(42)和以生物冷光造影監測轉導 Luciferase 基因的人類乳癌細胞(43)。而本實驗應用生物冷光造影監測人類肺癌細胞的骨轉移，由於生物冷光造影的特性其的確能於早期觀察到發生轉移的腫瘤細胞，第一組老鼠於 23 天的生物冷光造影中在後肢骨骼位置有明顯的訊號表現，然而在 X 光造影圖中卻無發觀察到骨骼組織的異常，然而雖然在第三組老鼠於 23 天的 X 光造影圖能觀察到骨骼結構的破壞，但無論從生物冷光造影或後續的組織切片染色分析都會發現此轉移已經到相當嚴重的情況。而其他文獻中亦有類似的實驗結果，其比較傳統以 X 光造影觀察骨骼受到乳癌細胞所破壞的型態，大約要花 10~12 週才可清楚觀察到，但其使用生物冷光造影的在 8 天後就可初步得到明顯的影像，而 16 天後可得到相當強的訊號表現，然而繼續對照則 X 光造影要到 45 天才可觀察到癌細胞轉移骨骼的影像(43, 44)。證明生物冷光造影相當適合應用於癌症轉移的研究上，其可提供早期及精確的轉瘤細胞的轉移情況。

癌症轉移是研究癌症學中一個不可忽略的重要主題。癌症轉移骨骼的完整機制尚未非常明確，目前已有研究顯示癌症轉移到骨骼的機制之一，是利用 SDF-1/CXCR4 此組化學趨化素(chemokine)接受器和配體組合作為媒介，其與造血性幹細胞(Hematopoietic stem cell, HSC)移動至骨骼中進行造血作用(Hematopoiesis)的機制是非常相似的(45)。不同的癌症其轉移的骨骼的機制，雖會類似但也不盡相同，目前在針對乳癌的骨轉移(13, 43, 44, 46)、前列腺癌的骨轉移(18, 46)已有相當的文獻討論，但針對肺癌骨轉移的機制調控探討尚未相當明瞭，所以本研究中利用一體外共同培養的模式，研究肺癌細胞受到骨髓刺激後是否會改變和轉移相關的基因表現，結果顯示包括了和癌細胞移動(homing)相關的 SDF-1/CXCR4、和血管新生(angiogenesis)相關的 CTGF、和蝕骨作用(osteolysis)相關的 IL-11 以及和調控造骨細胞(osteoblast)相關的 PTHrP 都有明顯的上升，顯示肺癌產生的骨骼轉移主要還是和骨髓中的細胞進行交互作用所產生，經由此體外實驗也證實肺癌產生骨轉移時會表現特定的 marker gene，目前已在進行利用活體轉移的方式篩選不同骨轉移能力的肺癌細胞，並希望將來進一步的分析出準確影響肺癌骨骼轉移的代表或調控基因，提供未來診斷或治療之應用。

針對參與於癌症骨骼轉移中的細胞，普遍認為骨髓中的造骨細胞(osteoblast)、蝕骨細胞(osteoclast)以及基質細胞(stromal cell)都參其中，而包括了骨衍生生長因子(bone-derived growth factor)、造骨因子(osteoblastic factor)和蝕骨因子(osteolytic factor)更是關鍵的影響因子。本實驗中轉移較嚴重的組別可以觀察到 H441GL 細胞將整各骨骼組織破壞瓦解，此由於肺癌所產生的骨轉移的是屬於 lytic bone metastases 的型式。一般來說當癌症轉移到骨骼時，會導致骨骼重塑作用(bone remodeling)很大的改變，正常的骨骼重塑作用結合了由蝕骨細胞(osteoclast)所產生的再吸收作用(bone resorption)以及由造骨細胞所完成的骨生成作用(bone formation)，而此二作用互相協調則可維持骨質密度的平衡以確保骨骼的健康，但癌症發生骨轉移時，會破壞骨骼重塑的平衡，所以依據癌細胞會和骨細胞的不同因子作用而影響骨重塑作用，可分為增加再吸收作用的 osteolytic tumor、增加骨生成作用的 osteosclerotic (osteoblastic) tumor 或是影響兩個作用的 mixed tumor。lytic bone metastases 是為較常發生的癌症轉移型式，許多種癌症會產生 lytic bone metastases 而其中又以乳癌病患特別容易發生，而會導致骨生成的 osteoblastic 型式的骨轉移則最常由前列腺癌產生。相較於 lytic bone metastases，blastic bone metastases 對骨型態的破壞和骨健康的傷害是較低的，肺癌產生的骨轉移造成 lytic bone metastases 的症狀和參與的導致骨骼重塑過程中再吸收作用大於生成作用的機制和細胞都和骨質疏鬆症相類似，所以也開始有文獻探導肺癌轉移和骨質疏鬆症之間是否存有相關的調控連結，所以我們也已開發了一個利用去除早老化老鼠的卵巢所導致的骨質疏鬆症動物模式，其中也應用了分子造影技術和骨前驅細胞進行骨骼組織再生修復，目前開發此骨質疏鬆症動物模式的研究成果以投遞至 Nature medicine 期刊中，而此動物模式也將進一步的應用於癌症轉移和骨質疏鬆症的研究中。

結論

由於我們之前的研究發表證實了幹細胞於活體的趨癌特性，於是本計畫第一部分利用體外的 Transwell assay 實驗證明了 SDF-1/CXCR4 具有調控幹細胞趨癌的移動，此外第二部分則應用幹細胞趨癌特性結合蛋白質疫苗的建立一新的廣效型癌症療法，並證明了幹細胞跨物種的多樣使用性，提供新的策略應用疫苗療法治療癌症，突破疫苗治療單一目標的限制，並提供了未來臨床對於疫苗癌症法的應用性。本研究的第三部分則針對了肺癌的骨骼轉移進行多項的實驗，我們成功的以生物冷光活體造影監測，轉導有螢火蟲生物冷光素(Firefly luciferase)基因的人類肺癌細胞移動的情形，並確認了此細胞株的骨轉移能力，證明此人類肺癌細胞的骨轉移動物模式，進一步的利用體外共同培養實驗初步篩選出和肺癌骨轉移相關的基因表現。綜合以上對肺癌轉移的研究結果，期望能更進一步的探討針對肺癌所產生的骨轉移，了解其詳細的機制、所參與的因子以及更確切的骨轉移相關的基因表現和訊號路徑，以及開發適當的動物模式，研究包括肺癌原位、轉移和特定器官組織之間的關係。

新年度計畫實驗目標

1. 利用 shRNA 建立並篩選穩定 CXCR4-downregulated mesenchymal stem cells 和 SDF-1-downregulated lung cancer cells，並利用分子造影技術進行活體內幹細胞趨癌特性的機制探討。
2. 間葉幹細胞和蛋白質疫苗合併癌症療法的機制研究。
3. 應用活體轉移實驗篩選不同能力的骨轉移肺癌細胞株，進一步分析其中基因表現之差異。
4. 建立不同的肺癌腫瘤動物模式，包括原位和不同途徑之轉移模式，並應用於探討原為腫瘤和轉移腫瘤之交互作用的研究。

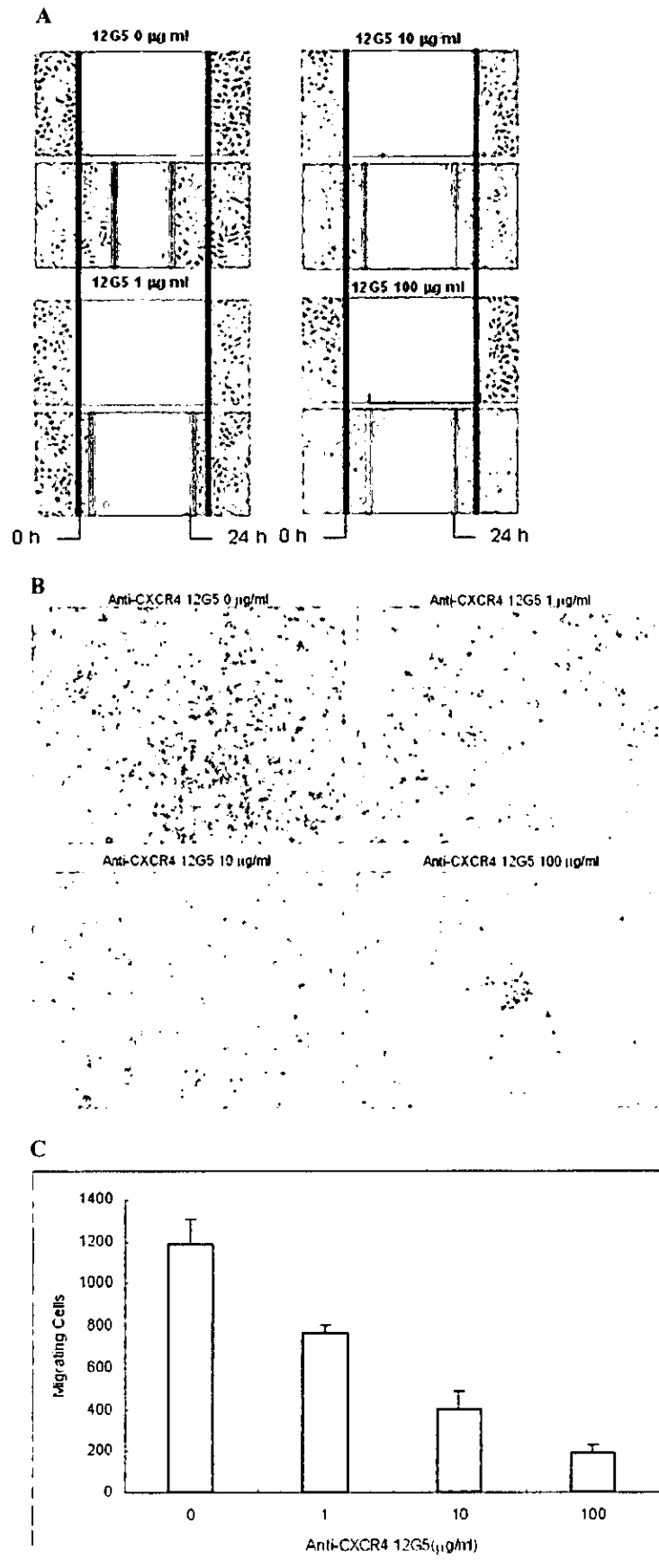
参考文献

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin.* 1999;49(1):8-31, 31.
2. Doll SR. Smoking and lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(1):4-6.
3. Meuwissen R, Berns A. Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev.* 2005;19(6):643-664.
4. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem.* 1994;56(3):283-294.
5. Jin HK, Carter JE, Huntley GW, Schuchman EH. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J Clin Invest.* 2002;109(9):1183-1191.
6. Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2397-2402.
7. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* Feb 2002;109(3):337-346.
8. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant.* 2003;7 Suppl 3:86-88.
9. Hung SC, Deng WP, Yang WK, et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res.* 2005;11(21):7749-7756.
10. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(6):449-458.
11. Sierra A. Metastases and their microenvironments: linking pathogenesis and therapy. *Drug Resist Updat.* 2005;8(4):247-257.
12. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(6):448-456.
13. Mastro AM, Gay CV, Welch DR. The skeleton as a unique environment for breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20(3):275-284.
14. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 1999;9(12):M57-60.
15. Perucho M. Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. *Oncogene.* 2003;22(15):2223-2225.
16. Gu B, Espana L, Mendez O, Torregrosa A, Sierra A. Organ-selective chemoresistance in metastasis from human breast cancer cells: inhibition of apoptosis, genetic variability and microenvironment at the metastatic focus. *Carcinogenesis.* 2004;25(12):2293-2301.
17. Rubens RD. Bone metastases--the clinical problem. *Eur J Cancer.* 1998;34(2):210-213.
18. Cooper CR, Chay CH, Gendernalik JD, et al. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer.* 2003;97(3 Suppl):739-747.
19. Ikeda I, Miura T, Kondo I. Pyridinium cross-links as urinary markers of bone metastases in patients with prostate cancer. *Br J Urol.* 1996;77(1):102-106.
20. Bagi CM. Targeting of therapeutic agents to bone to treat metastatic cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(7):995-1010.

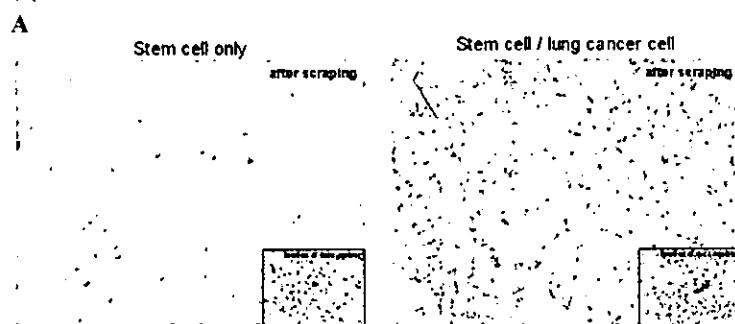
21. Jordan NJ, Kolios G, Abbot SE, Sinai MA, Thompson DA, Petraki K, Westwick J. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest*. 1999;104(8):1061-1069.
22. Eddleston J, Christiansen SC, Zuraw BL. Functional expression of the C-X-C chemokine receptor CXCR4 by human bronchial epithelial cells: regulation by proinflammatory mediators. *J Immunol*. 2002;169(11):6445-6451.
23. Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, Lowery AJ, Hennessy E, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res*. 2007;13(17):5020-5027.
24. Spiro SG, Porter JC. Lung cancer--where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(9):1166-1196.
25. Meriggi F, Zaniboni A. Non-small-cell lung cancer in the elderly. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;57(2):183-190.
26. Ohira T, Suga Y, Nagatsuka Y, et al. Early-stage lung cancer: diagnosis and treatment. *Int J Clin Oncol*. 2006;11(1):9-12.
27. Cheng WF, Hung CF, Pai SI, et al. Repeated DNA vaccinations elicited qualitatively different cytotoxic T lymphocytes and improved protective antitumor effects. *J Biomed Sci*. 2002;9(6 Pt 2):675-687.
28. Liao CW, Chen CA, Lee CN, et al. Fusion protein vaccine by domains of bacterial exotoxin linked with a tumor antigen generates potent immunologic responses and antitumor effects. *Cancer Res*. 2005;65(19):9089-9098.
29. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med*. 2005;201(9):1397-1405.
30. Abraham EJ, Kodama S, Lin JC, Ubeda M, Faustman DL, Habener JF. Human pancreatic islet-derived progenitor cell engraftment in immunocompetent mice. *Am J Pathol*. 2004;164(3):817-830.
31. Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;54(1):53-61.
32. Paeslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Medical Immunology. *Lange medical book*. 2001;tenth edition.
33. Clifford JL, Walch E, Yang X, et al. Suppression of type I interferon signaling proteins is an early event in squamous skin carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2002;8(7):2067-2072.
34. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther*. 2004;11(14):1155-1164.
35. Abdel-Wahab Z, Dar M, Osanto S, et al. Eradication of melanoma pulmonary metastases by immunotherapy with tumor cells engineered to secrete interleukin-2 or gamma interferon. *Cancer Gene Ther*. 1997;4(1):33-41.
36. Xiang J, Chen Y, Moyana T. Combinational immunotherapy for established tumors with engineered tumor vaccines and adenovirus-mediated gene transfer. *Cancer Gene Ther*. 2000;7(7):1023-1033.
37. Ray P, De A, Min JJ, Tsien RY, Gambhir SS. Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res*. 2004;64(4):1323-1330.
38. Ponomarev V, Doubrovin M, Serganova I, et al. A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31(5):740-751.

39. Kim YJ, Dubey P, Ray P, Gambhir SS, Witte ON. Multimodality imaging of lymphocytic migration using lentiviral-based transduction of a tri-fusion reporter gene. *Mol Imaging Biol.* 2004;6(5):331-340.
40. Koehne G, Doubrovin M, Doubrovina E, et al. Serial in vivo imaging of the targeted migration of human HSV-TK-transduced antigen-specific lymphocytes. *Nat Biotechnol.* 2003;21(4):405-413.
41. Dodd CH, Hsu HC, Chu WJ, et al. Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles. *J Immunol Methods.* 2001;256(1-2):89-105.
42. Deng WP, Wu CC, Lee CC, et al. Serial in vivo imaging of the lung metastases model and gene therapy using HSV1-tk and ganciclovir. *J Nucl Med.* 2006;47(5):877-884.
43. Minn AJ, Kang Y, Serganova I, et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest.* 2005;115(1):44-55.
44. Kang Y, Siegel PM, Shu W, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell.* 2003;3(6):537-549.
45. Neiva K, Sun YX, Taichman RS. The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(10):1449-1454.
46. Kang Y, He W, Tulley S, et al. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(39):13909-13914.

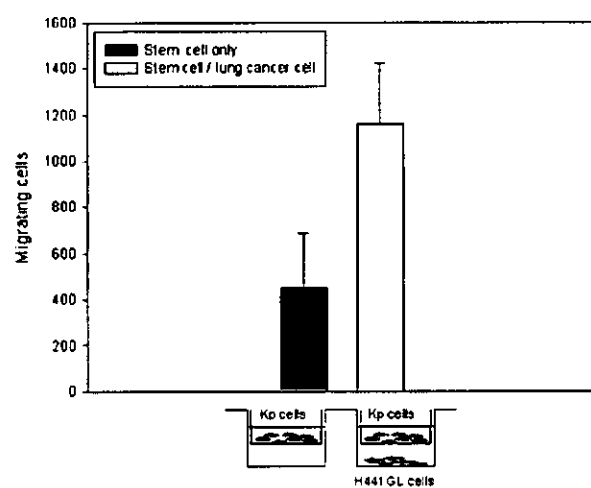
圖一



圖二

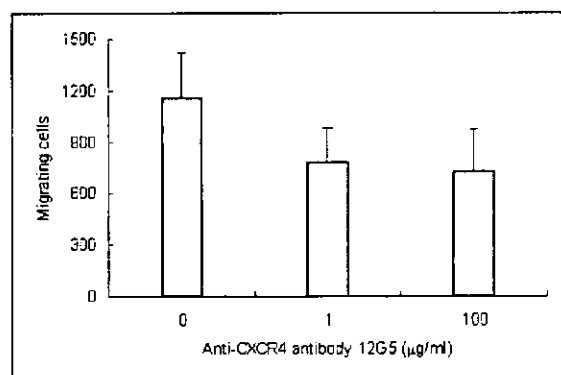


B

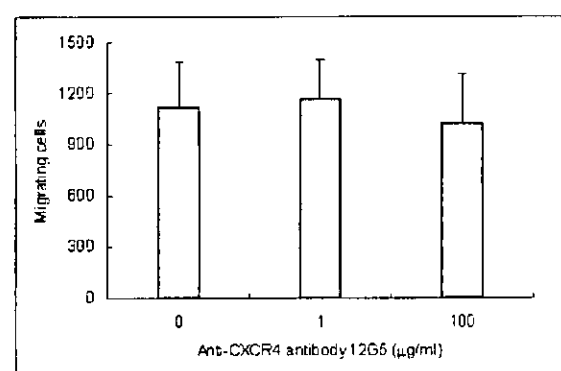


圖三

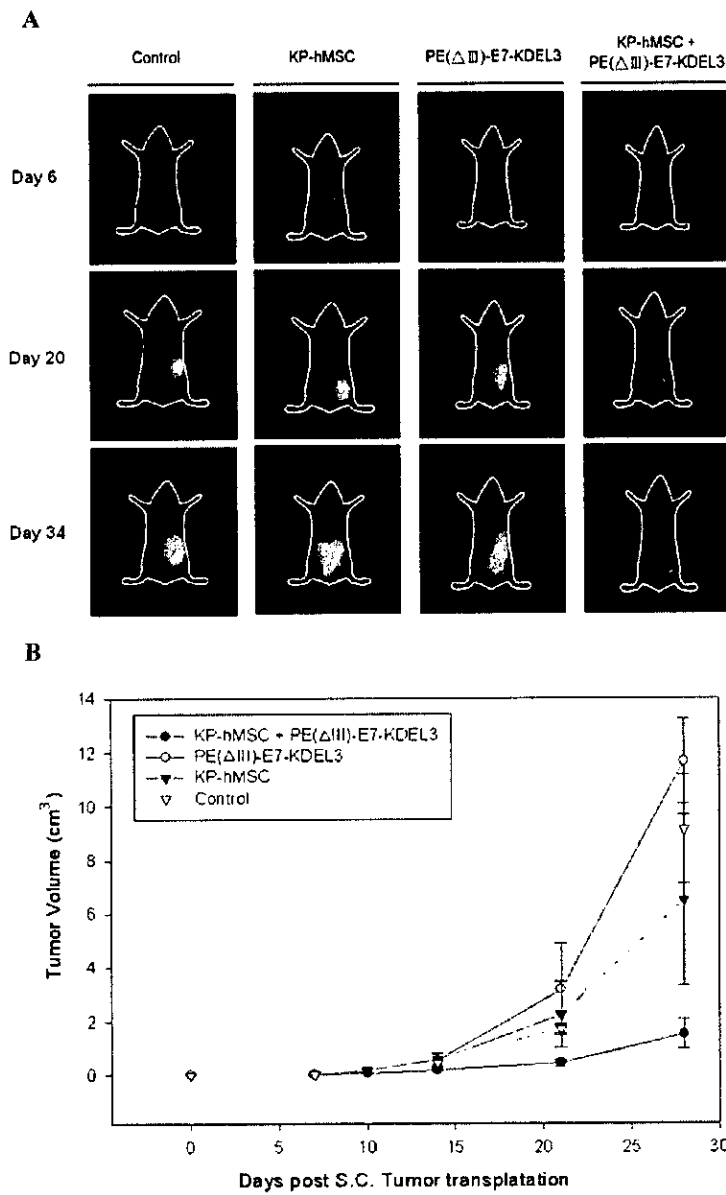
A



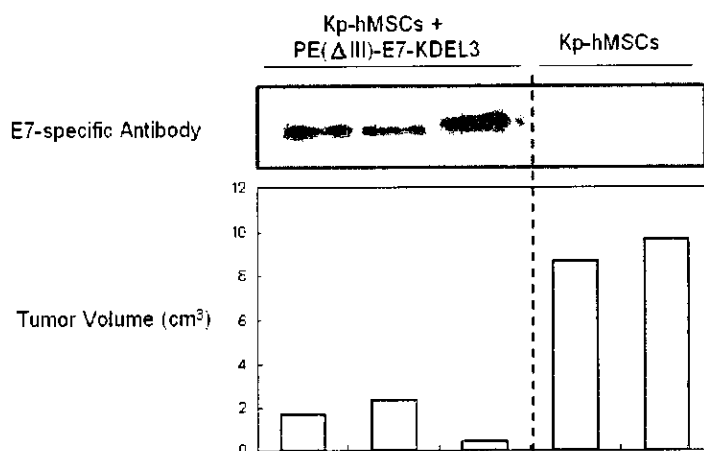
B



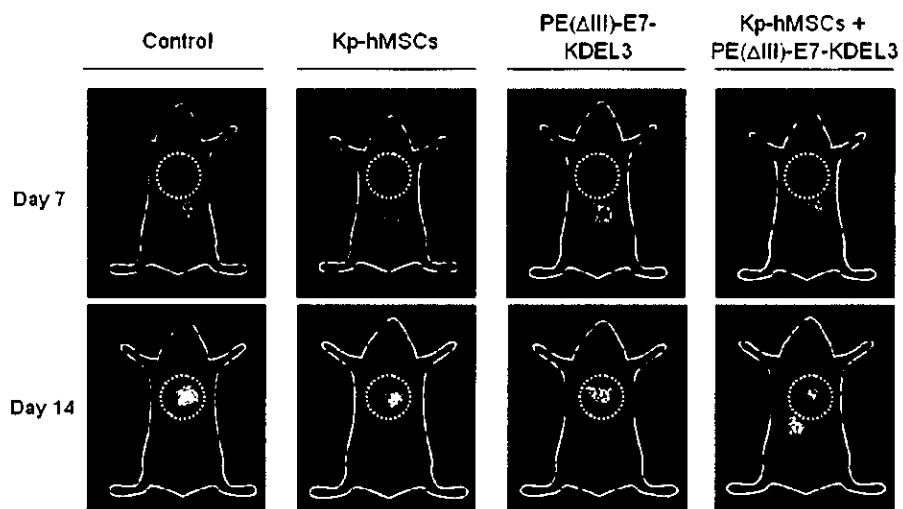
圖四



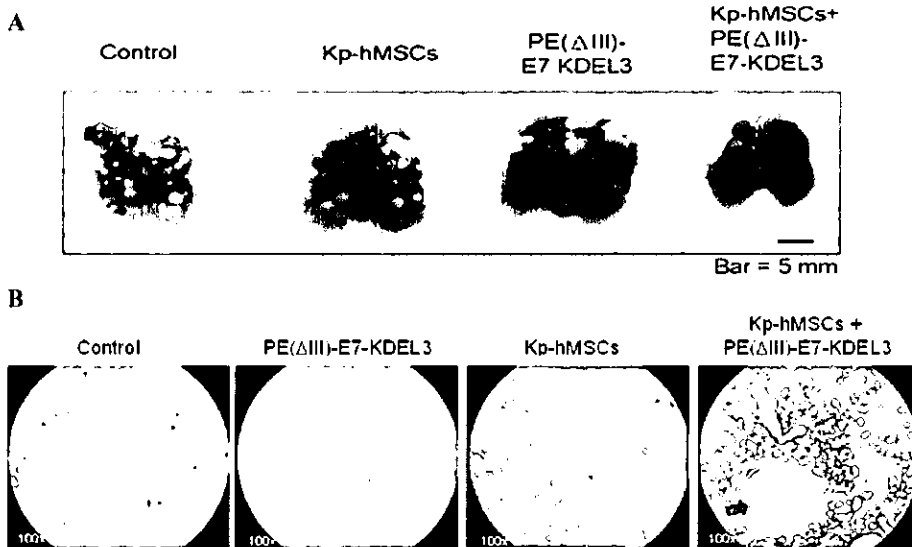
圖五



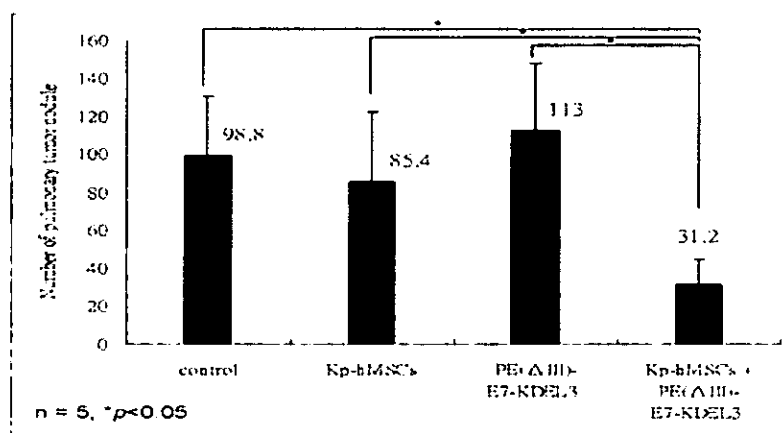
圖六



圖七

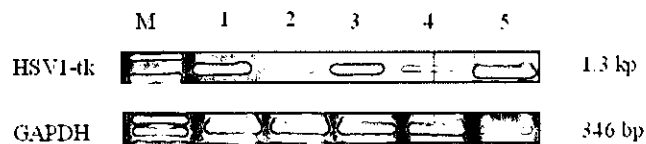


C



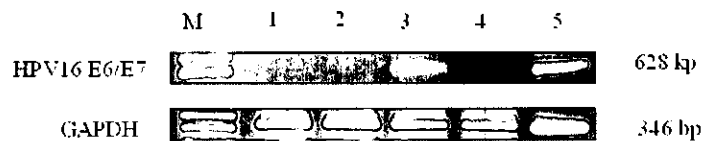
圖八

A



Lane M: Bio-100bpTM DNA Ladder
 Lane 1: lung tissue (YD-SML-tk)
 Lane 2: lung tissue (YD-SML-tk / PE(Δ III)-E7-KDEL3)
 Lane 3: lung tissue (YD-SML-tk / Kp-hMSCs)
 Lane 4: lung tissue (YD-SML-tk / Kp-hMSCs + PE(Δ III)-E7-KDEL3)
 Lane 5: YD-SML-tk cell

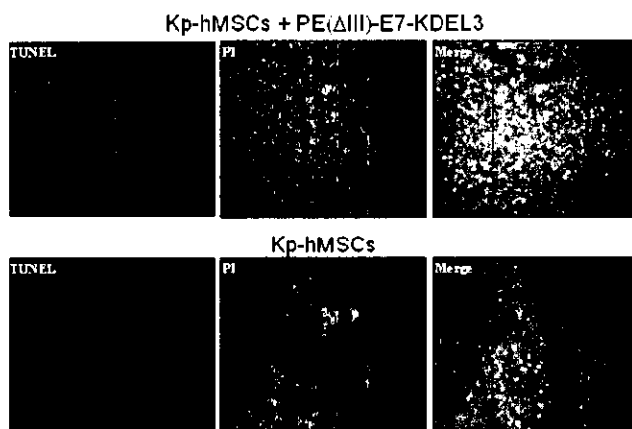
B



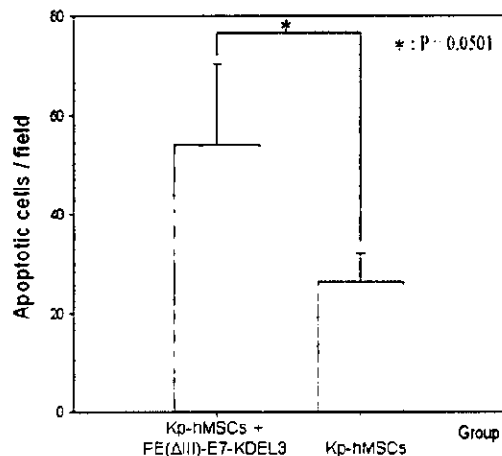
Lane M: Bio-100bpTM DNA Ladder
 Lane 1: lung tissue (YD-SML-tk)
 Lane 2: lung tissue (YD-SML-tk / PE(Δ III)-E7-KDEL3)
 Lane 3: lung tissue (YD-SML-tk / Kp-hMSCs)
 Lane 4: lung tissue (YD-SML-tk / Kp-hMSCs + PE(Δ III)-E7-KDEL3)
 Lane 5: Kp-hMSCs cell

圖九

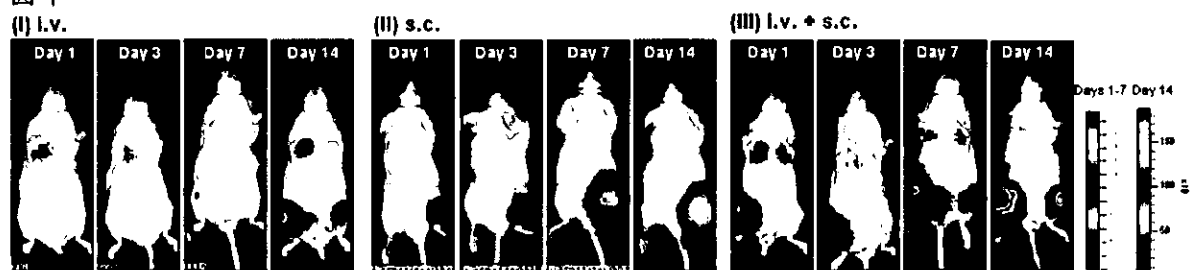
A



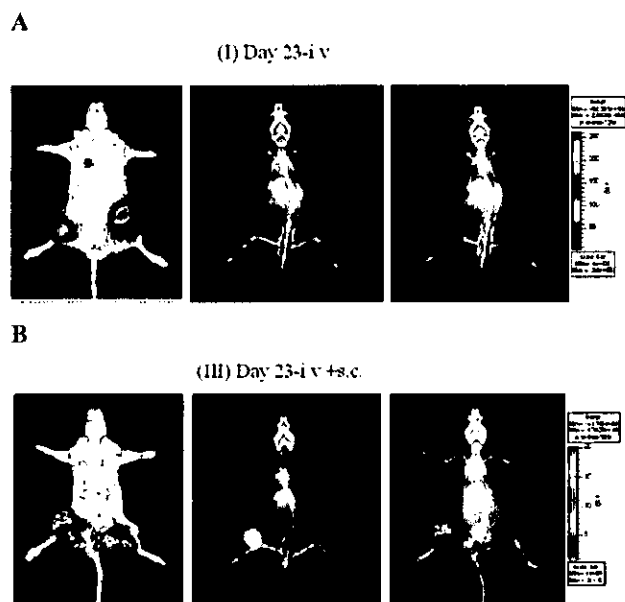
B



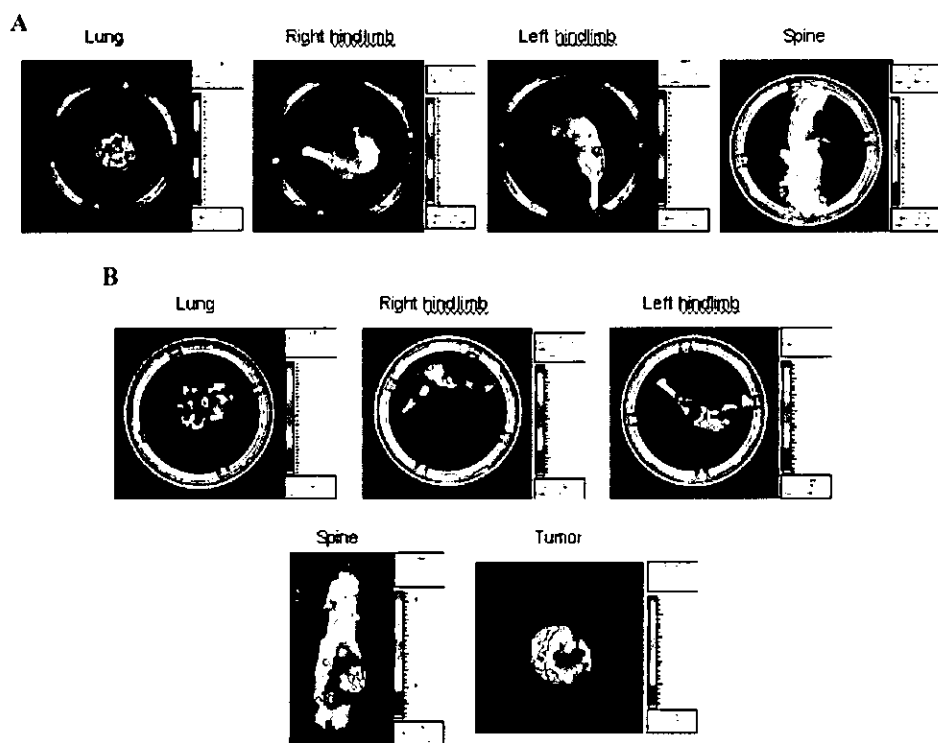
圖十



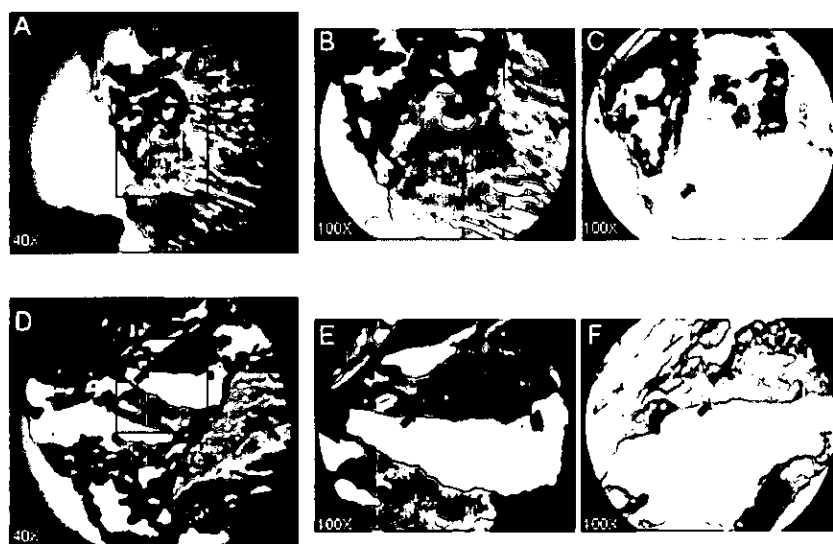
圖十一



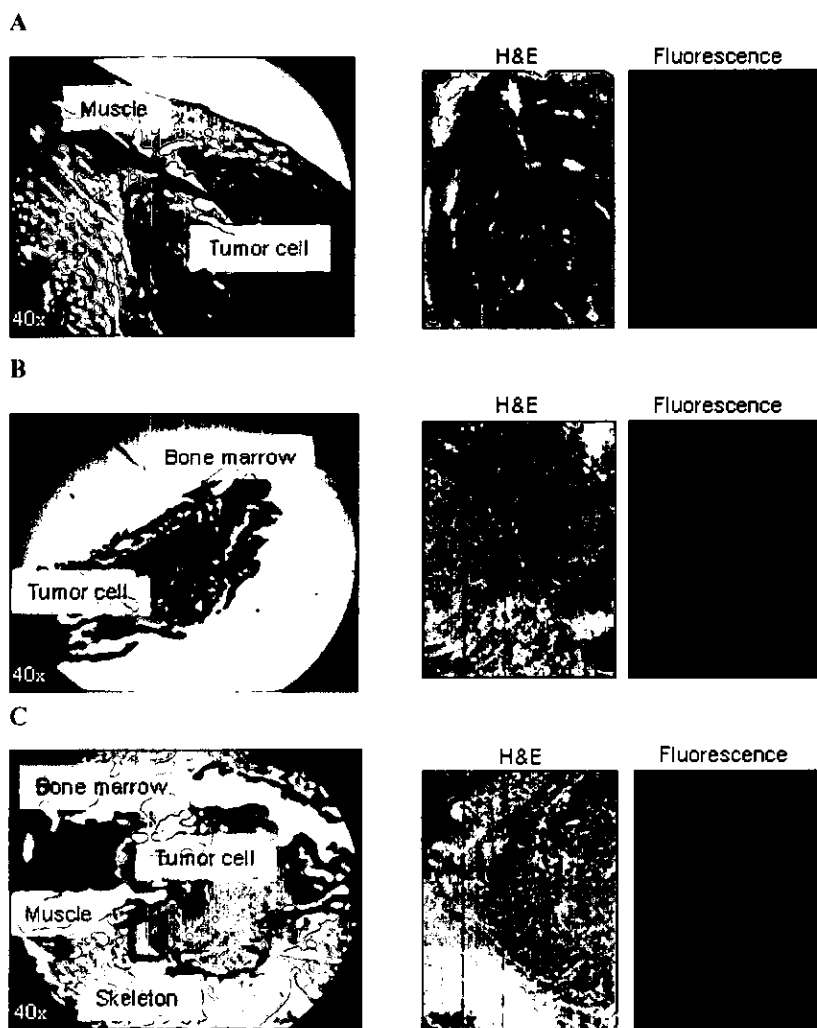
圖十二



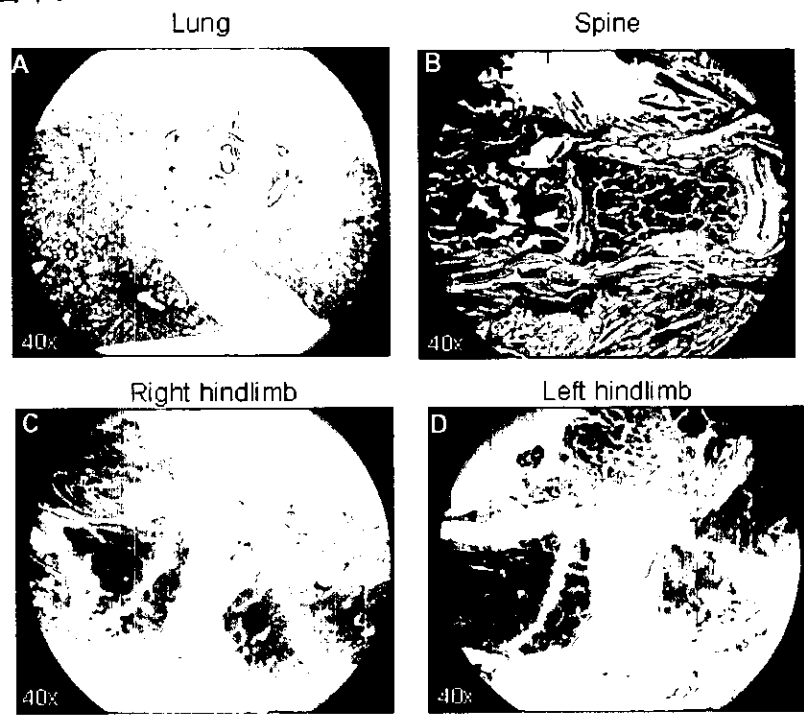
圖十三



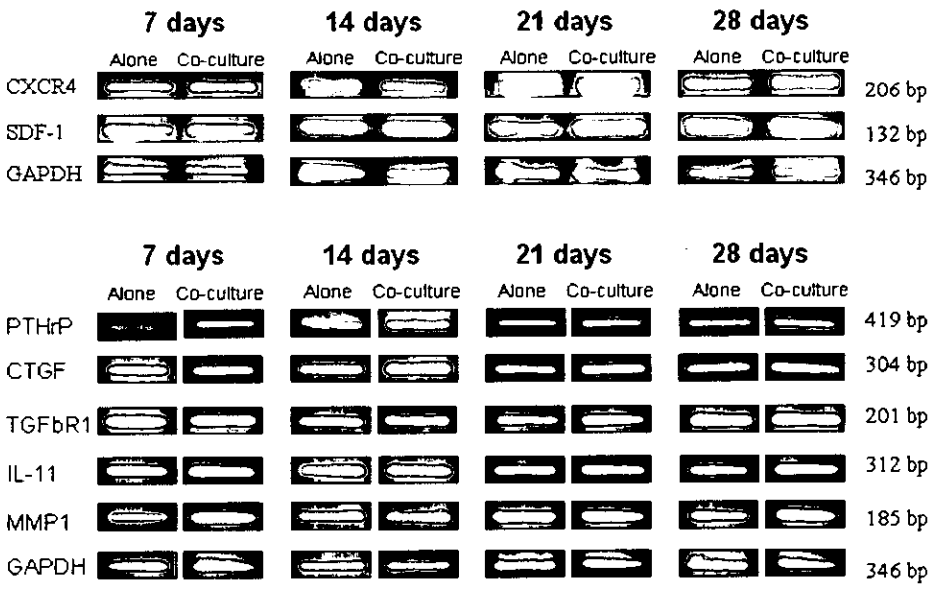
圖十四



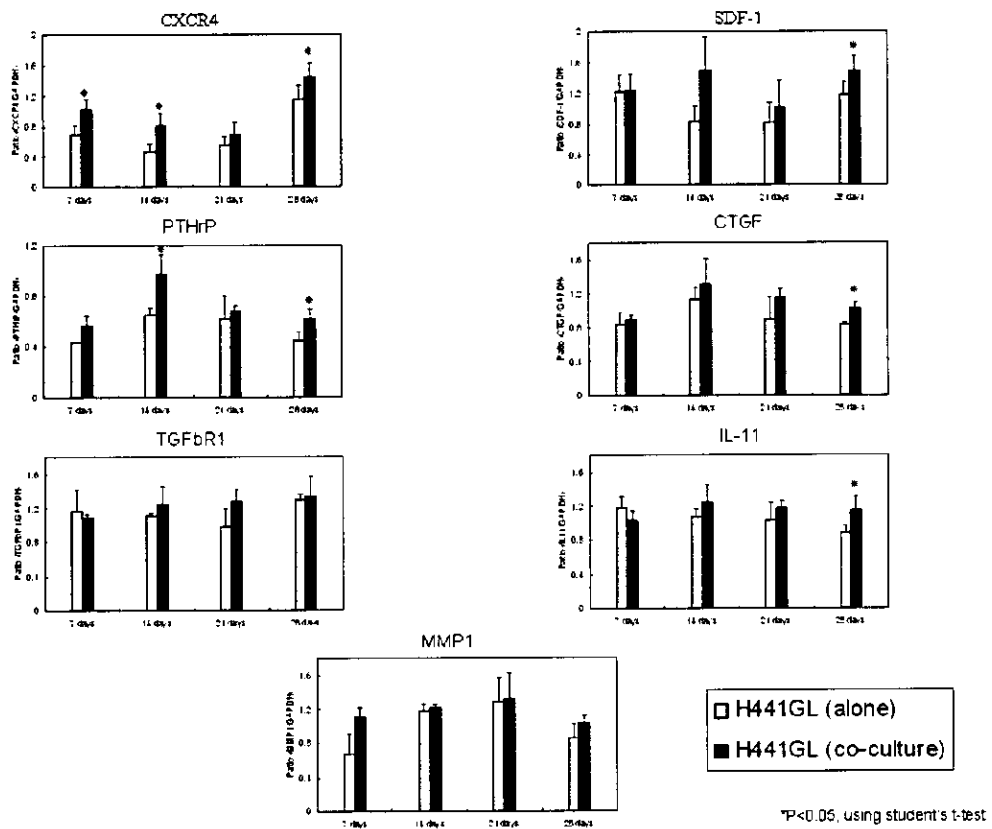
圖十五



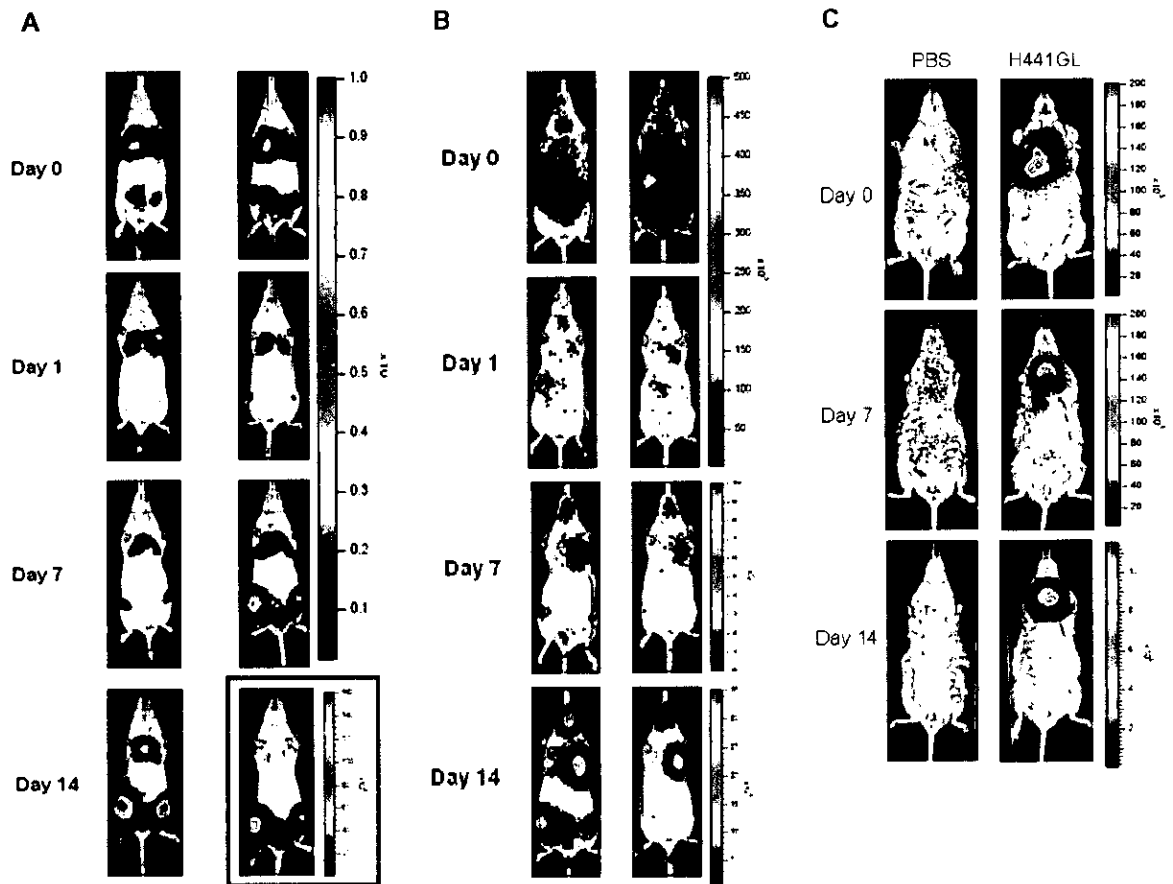
圖十六



圖十七



圖十八

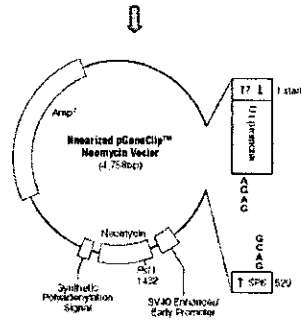


附錄

Target

SDF-1	
Clone ID	Insert Sequence
1	TCCTGGACATGAAGATTCTTT
2	ACCAAAGCTTTCATGTAACT
3	TTGCCCTTATTAGAGTGTCTTT
4	AGCCCGGCTGAAGAACAACAA

CXCR4	
Clone ID	Insert Sequence
1	TGGGTGGTTGTGTTCCAGTTT
2	GTCCTGCTATTGCATTATCAT
3	CATGGGTTACCAGAAGAACT
4	GATCAGCATCGACTCCTTCAT



RT-PCR

