

# 2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090022

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 對抗上皮細胞黏附因子之 CAR-T 細胞於癌症免疫治療之研究

得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 吳漢忠、李宏孝

作者姓名 盧佑宜、倪培薰

關鍵詞 CAR T、EpCAM、癌症免疫療法

## 作者簡介



大家好，我們是盧佑宜與倪培薰，來自臺北市立第一女子高級中學。在高一時，我們選定以生物為研究領域，經過培訓後很幸運的進入吳漢忠老師的實驗室進行專題研究，深入了解 CAR-T、學習實驗技巧及研究方法。

在這段日子裡，深深感謝教授與學校老師及實驗室的學長姐們悉心教導、耐心協助，讓我們能夠克服困難、摸索前進，累積了滿滿的收穫與珍貴的回憶。很高興能夠入圍國際科展，期待與大家分享我們的研究成果。

## 摘要

以往人類對抗癌症只能依靠手術、化療、電療等治標不治本的手段殺死癌細胞，不僅效率差且有強烈的副作用，而 CAR-T 免疫療法透過活化病人自身免疫細胞來專一性的治療癌症。

本研究旨在發展能治療實質固態瘤的 CAR-T 免疫療法，透過活化由人血中所分離出來的 T 細胞，使之能辨識在癌細胞中大量表現的上皮細胞黏附因子 (EpCAM)，並建立一套體外細胞毒殺測試的模型來測試 CAR-T 殺死腫瘤細胞的能力，以篩選出具有發展潛力 CAR-T 細胞。

本研究從外周血單個核細胞 (PBMC) 中分離 T 細胞，透過基因重組技術與 lentivirus 來改造 T 細胞，使 T 細胞表現 CAR 基因，再利用 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 活化，並以大腸癌細胞株 HCT116 當作癌細胞目標，測試 CAR-T 是否有能力殺死腫瘤細胞，另外也以不表現 EpCAM 的 A549 肺癌細胞株、H460 肺癌細胞株進行毒殺能力測試，結果顯示此 CAR-T 細胞有高度專一性，證明此 CAR-T 細胞具有潛力成為新一代的 CAR-T 免疫療法。

## Abstract

In order to cure cancer, human can only rely on therapies such as surgeries, chemotherapy, and radiotherapy, which treat the symptoms but do not cure the disease. These therapies not only have low efficiencies but also have strong side effects; on the other hand, having lower side effects, CAR-T immunotherapy can specifically kill cancer cells by activating immunocytes of the patients themselves.

This study aims to develop a CAR-T immunotherapy which can cure solid tumors by activating T cells isolated from human blood and making them able to identify EpCAM, which expresses in abundance on most cancer cells.

Before proceeding to examine the CAR-T efficiency, it is necessary to isolate T cells from PBMCs, then conduct genetic recombination by using lentivirus to engineer T cells, whereby enabling T cells to express the CAR gene. Finally, Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 will be used to activate the CAR-gene-expressing T cells. Using colon cancer cell HCT116 as a cancer cell target to build the cytotoxicity assay model, the model tests whether the CAR-T cells can kill the cancer cells. Also, to ensure the specificity of the anti-EpCAM CAR-T cells, cytotoxicity assay models are built with A549 cancer cells and H460 cancer cells which do not express EpCAM. The results show that the CAR-T cells can recognize EpCAM on colorectal cancer cells with high specificity, which proves that this kind of CAR-T cell has high potential of becoming a new generation of CAR-T immunotherapy.

# 壹、前言

## 一、研究動機

CAR-T 療法全名為 chimeric antigen receptor T cell therapy，中文為嵌合抗原受體 T 細胞療法。是一種誘導病人自身的 T 細胞來消滅癌細胞的療法。臨床實驗指出 CAR-T 療法在血液科惡性腫瘤有顯著的療效，然而應用在固態腫瘤上效果卻相當有限，最大的原因在於沒有一個有效的標靶。

首先，實質固態瘤具有高度的異質性，使 CAR-T 細胞較難有效辨識與攻擊癌細胞。第二，實質固態瘤的腫瘤微環境會抑制 CAR-T 細胞的活性並使其失效。第三，由於表現在實質固態瘤上的抗原往往會少量表現在正常細胞，使 CAR-T 細胞誤殺正常細胞，因此時常導致副作用產生。綜合以上原因，我們想透過此研究找出針對固態瘤更具專一性的 CAR-T 細胞。

## 二、研究背景

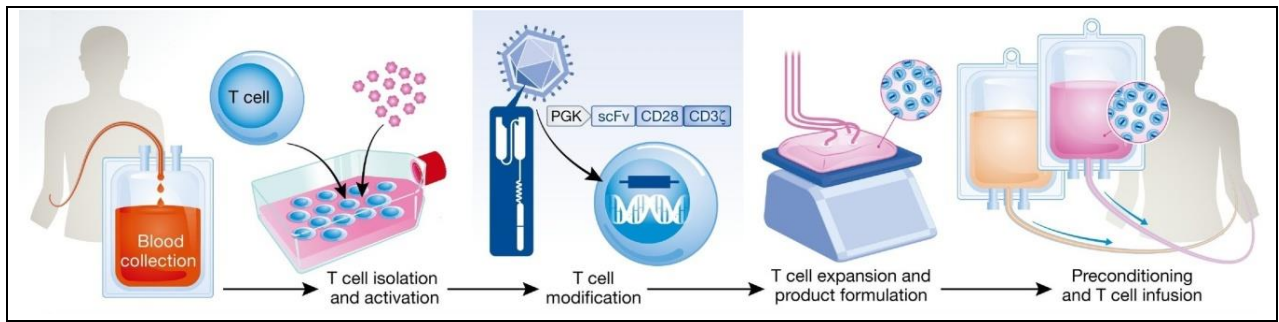
### (一) 上皮細胞黏附因子 (Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)

上皮細胞黏附因子 (EpCAM) 是一種與細胞間的黏附有關的跨膜糖蛋白 (transmembrane glycoprotein)，會大量表現在上皮細胞癌，包括結腸直腸癌、頭頸癌、乳癌、肝癌等。近年來，許多研究運用 EpCAM 作為標的蛋白，發展偵測血液中循環的癌細胞或腫瘤幹細胞。

### (二) CAR-T 免疫療法

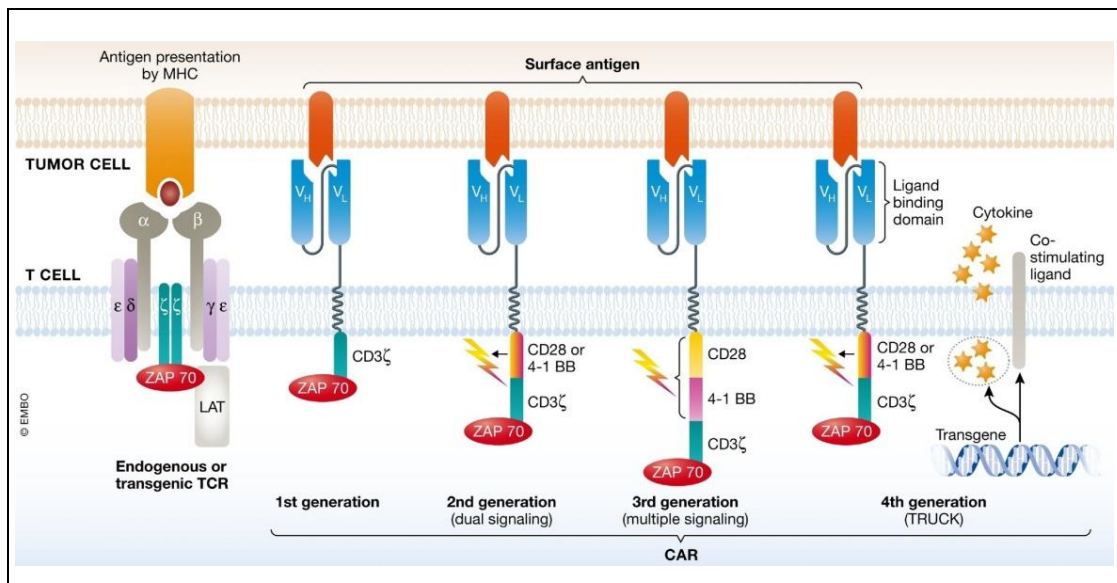
CAR-T 療法是一種癌症免疫療法，利用基因工程技術改造，使 T 細胞能辨識腫瘤細胞的抗原並攻擊消滅腫瘤。

療程首先會先分離出患者的 T 細胞，透過基因編輯改造 T 細胞，使細胞表現特定可偵測癌細胞的 scFv (single-chain variable fragment)，經過擴增後回輸至患者體內。



圖一、CAR-T 療法之流程示意圖 (Hartmann et al. 2017)

本實驗中使用第三代 CAR-T。第三代 CAR-T 的結構包含 scFv (單鍊抗體, single-chain variable fragment)、鉸鏈區 (hinge region)、穿膜區域 (transmembrane domain)、兩個共同刺激分子 (co-stimulatory domain)、胞內訊號傳導結構域 (intracellular signaling domain)。scFv 可以專一性辨識癌細胞, 並與癌細胞表面的抗原結合; 兩個共同刺激分子分別為 CD28 與 4-1BB, 當 CAR-T 與抗原結合後會引發兩個活化 T 細胞的訊號, 使 T 細胞持續活化不會衰亡; 細胞內訊息傳遞區為 CD3 $\zeta$ , 負責傳遞激活訊號。激活信號加上共同刺激信號兩條通路被激活, T 細胞才有長期抗腫瘤的活性。



圖二、CAR-T 細胞各代之結構比較 (Hartmann et al. 2017)

美國食品藥物管理局 (FDA) 在 2017 年核准了兩項 CAR-T 治療產品, 分別是諾華 (Novartis) 的 Kymriah 與吉利德 (Gilead) 所併購的凱特 (Kite) 旗下的 Yescarta。Kymriah 主要鎖定的適應症為急性淋巴性白血病 (Acute lymphoblastic leukemia, ALL), Yescarta 則是瀰漫性大 B 細胞淋巴瘤 (Diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), 兩種產品皆以 CD19 作為標靶, 針對血液惡性腫瘤 (hematological tumor) 治療。雖然目前越來越多的 CAR-T

治療固態腫瘤（solid tumor）的國際期刊發表，但尚未有治療固態腫瘤的療法上市。原因在於固態腫瘤很少表現出特定一種抗原，通常在固態腫瘤細胞上大量表現的抗原也會在正常細胞上少量表現；而腫瘤微環境（tumor microenvironment）會抑制 CAR-T 細胞的活性，使 CAR-T 療法在固態腫瘤方面療效不彰。

### 三、研究目的

- （一） 製備 anti-EpCAM CAR-T cells
- （二） 分析 anti-EpCAM CAR-T cells 對於 HCT116 大腸癌細胞株的毒殺作用

## 貳、研究方法或過程

### 一、研究設備與器材

#### （一） 細胞株與菌株

Jurkat 細胞株、293T 細胞株、HCT116-YFP 細胞株、A549 細胞株、H460 細胞株、E. coli Stbl3 菌株、PBMC（iXCells Biotechnologies）

#### （二） 藥品及試劑

PBS、PS、DMEM Medium、RPMI Medium、FBS（胎牛血清，fetal bovine serum）、trypsin、lentivirus 質體、Ampicillin 抗生素、DNA ladder marker、DNA gel loading dye、TAE 緩衝液、agarose、70%EtOH、Trypan blue、FACS buffer（1xPBS，1%FBS）、dNTP mix（10mM each）、PCR reaction buffer、FastDigest restriction enzyme buffer、AfeI、CIP、Gibson Assembly Master Mix、Genejet、LB 培養基

### (三) 器材

Nano Drop ND-1000、重複使用式細胞計數片、流式細胞儀、培養箱、水平電泳槽、電動吸管(pipette aid)、刻度移液管(serological pipette)、微量吸管分注器(pipette)、微量吸管尖(pipette tip)、無菌操作台、恆溫水浴槽、流式細胞管、無菌玻璃珠、巴士德無菌吸管、10公分培養皿、15公分培養皿、冰塊、離心機、超高速離心機、15mL離心管、50mL離心管、24孔盤、96孔盤、Eppendorf、4°C冰箱、-80°C冰箱、拭鏡紙、電腦、微波爐、QIAquick PCR Purification Kit、熱循環器(thermal cycler)、FairBiotech Plasmid Miniprep Kit、Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28、CD3 MicroBeads

## 二、實驗方法

### (一) 細胞培養

細胞株	培養基
293T	DMEM (10%FBS)
Jurkat	RPMI (10%FBS)
HCT116-YFP	RPMI (10%FBS)
A549	RPMI (10%FBS)
H460	RPMI (10%FBS)

表一、細胞株和對應的培養基

將細胞培養在含有 10mL medium 的 10 公分培養皿中，設定培養箱條件為 37°C、5%二氧化碳，視細胞生長速度，約 3 天更換一次 medium。當細胞生長至九分滿時，得以分盤進行實驗，或繼續進行細胞繼代。

### (二) 細胞繼代

#### 1. 附著型細胞

當細胞生長九分滿時，由培養箱移入無菌操作台內，先以巴士德無菌吸管移除舊的 medium，再加入 PBS 潤洗後吸除。接著加入 2mL 的 trypsin-EDTA，均勻搖晃使溶液充滿底面，以 37°C 作用 2 至 5 分鐘後，用手輕拍培養皿底部使細

胞浮起。接著再加入 6mL medium 於培養皿之中，以抑制 trypsin 的繼續作用。進行細胞計數後，吸出 medium，放入離心管中，以 1000rpm 離心 10 分鐘。吸除上清液，加入適量 medium 回溶細胞，使細胞密度為  $10^6$  (個細胞/mL)，可將細胞移入別的培養皿進行實驗或繼代到新培養皿中。

## 2. 懸浮型細胞

當細胞生長九分滿時，由培養箱移入無菌操作台內，進行細胞計數後，吸出 medium，放入離心管中，以 1000rpm 離心 10 分鐘。吸除上清液，加入適量 medium 回溶細胞，使細胞密度為  $10^6$  (個細胞/mL)，可將細胞移入別的培養皿進行實驗或繼代到新培養皿中。

## (三) PCR

### PCR 配方

項目	每個反應的添加量
DNA 模板 (100-200ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Primer-F (10mM)	1 $\mu$ L
Primer-R (10mM)	1 $\mu$ L
Kapa 5x	10 $\mu$ L
dNTP mix (10mM each)	1 $\mu$ L
DNA 聚合酶	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	35 $\mu$ L
總量	50 $\mu$ L

表二、PCR 配方與用量

### PCR 機器溫控循環設定

程序	循環次數	溫度	持續時間
1	1	95°C	3 分鐘
2	35	98°C	20 秒
		65°C	15 秒
		72°C	30 秒
3	1	72°C	1 分鐘

表三、PCR 機器溫控循環設定



#### (四) 製造 lentivirus

medium : DMEM ( 10%FBS )

第一天 293T cell seeding

在 15 公分培養盤內加入  $5 \times 10^6$  個 293T 細胞，放進 37°C 培養箱。

第二天 細胞轉染

觀察細胞貼盤狀況以及生長密度(約七到八分滿)，進行轉染的一到兩小時前，先將培養基換成 11.25mL 的 DMEM( 2%FBS )。分裝兩管 562.5 $\mu$ L 的 DMEM( 無血清 )，將帶有目標基因的質體 4.5 $\mu$ g、pCMVDR8.91 4.5 $\mu$ g、pMD.G 2.25 $\mu$ g 加入其中一管 562.5 $\mu$ L 的 DMEM( 無血清 )中；再將 33.75 $\mu$ L 的 Genejet 加入另一管 562.5 $\mu$ L 的 DMEM ( 無血清 )中。將混有 Genejet 的 DMEM 加入混有 DNA 的 DMEM 中，混合均勻後，平均的加入 15cm dish 中。之後放進 37°C 培養箱培養。

質體	比例	添加量
目標質體	2	4.5 $\mu$ g
pCMVDR8.91	2	4.5 $\mu$ g
pMD.G	1	2.25 $\mu$ g

表四、細胞轉染所需質體的種類、比例及用量

第三天 更換 medium

將舊的 medium 移除，再加入 15mL 的 DMEM medium。

第四天 收集上清液

收集 medium ( 15mL ) 後，再加入 15mL 的 DMEM。

第五天 收集上清液並濃縮 lentivirus

收集 medium( 15mL )。將兩天收集到含有 lentivirus 的 DMEM 共 30mL 以 25000rpm 離心 2 小時。離心後移除大部分的上清液，留下大約 400 至 500 $\mu$ L 的 DMEM medium，將 lentivirus 與 DMEM medium 混合均勻，即可獲得濃縮的 lentivirus。

## (五) lentivirus 感染

medium : RPMI (10%FBS、IL-2 50u/μL、IL-15 1ng/mL、polybrene 8ug/mL)

在 24 孔盤的每孔加入  $10^6$  個 T 細胞，medium 總體積為 500μL。接著在每孔加入 20μL 的 lentivirus，稍微晃動盤子使其均勻混合。以 800g 25°C 離心 30 分鐘，使 lentivirus 和 T 細胞的接觸機率增加，之後放入 37°C 培養箱。隔天以 medium 添加至總體積為 1000μL，之後放進 37°C 培養箱培養。

## (六) 細胞毒殺測試

medium : RPMI (10%FBS、IL-2 50u/μL、IL-15 1ng/mL)

目標癌細胞：HCT116 (EpCAM+)、A549 (EpCAM-)、H460 (EpCAM-)

第一天 lentivirus 感染

先計算 T 細胞的數目，再用 lentivirus 感染 T 細胞，使 T 細胞表現 CAR。

第二天 癌細胞種植

將每個孔內的 medium 補充至 1000μL，繼續放回 37°C 培養箱。另使用平底 96 孔盤，每個孔內種  $1.5 \times 10^4$  個癌細胞、總體積為 200μL。

第三天 CAR-T 與癌細胞共同培養

使用流式細胞儀測試感染 lentivirus 48 小時後的 T 細胞的 FLAG-TAG-tag 表現量，以求得 T 細胞的 CAR-T 基因表現率。另觀察癌細胞的貼壁狀況，並移除上清液。將 T 細胞濃度乘以 CAR-T 表現率，得到有效 CAR-T 細胞的濃度，將 CAR-T 細胞與癌細胞在 200μL 的 RPMI medium 中分別以 10:1、5:1 的比例共同培養。

第四天 細胞毒殺效果檢驗

移除上清液，將 96 孔盤中貼壁的癌細胞用 200μL 的 PBS 沖洗三次，以移除殘餘的 CAR-T 細胞。加入 50μL 的 trypsin，在培養箱中放置五分鐘後加入 150μL 的 RPMI medium 以抑制 trypsin 的繼續作用，收取癌細胞，並用顯微鏡觀察孔內以確保沒有細胞殘留，之後準備流式細胞儀的細胞樣本。

### (七) 流式細胞儀樣本準備

將收下來的細胞放入尖底的 96 孔盤，加入 100 $\mu$ L 的 FACS buffer，設定離心 800g、2 分鐘、4 $^{\circ}$ C，甩乾後再加入 200 $\mu$ L 的 FACS buffer，以同樣條件離心後再甩乾。加入 50 $\mu$ L 的抗體（稀釋 400 倍），在冰上放 30 分鐘後加入 100 $\mu$ L 的 FACS buffer，以同樣條件離心後甩乾。再加入 200 $\mu$ L 的 FACS buffer，以同樣條件離心後甩乾，重複三次，移除未結合的抗體。最後以 400 $\mu$ L 的 FACS buffer 回溶細胞，收取 100 $\mu$ L 放入流式細胞管，用流式細胞儀計算細胞的數量。

### (八) 限制酶切割

在 eppendorf 中加入下述材料，並於 37 $^{\circ}$ C 放置過夜。

項目	量
DNA	X $\mu$ L
CutSmart buffer 10x	5 $\mu$ L
限制酶（NEB）	（每種各）1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	加到總體積為 50 $\mu$ L
總體積	50 $\mu$ L

表五、限制酶切割所需項目及用量

### (九) Gibson assembly

在冰上混合以下材料後以 50 $^{\circ}$ C 水浴 15 分鐘。：

insert DNA 總量	0.02-0.5 pmols
質體	50-100ng
Gibson Assembly Master Mix (2x)	10 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	加到總體積為 20 $\mu$ L
總體積	20 $\mu$ L

表六、Gibson Assembly 所需項目及用量

### (十) 質體製備（轉型作用，transformation）

將勝任細胞 Stb13 溶液置於冰上解凍，取 100 $\mu$ L 加入預冷的 eppendorf，再加入

含有 100 至 200ng 目標 DNA 的質體溶液、緩和的 pipetting 混合，冰浴 20 分鐘。將 eppendorf 放入預熱好的 42°C 的水浴槽 45 秒，進行熱休克，取出後再冰浴 2 分鐘。用 pipet 均勻的將溶液滴在含有抗生素的 LB 培養基上，倒入滅菌過的玻璃珠並搖晃，進行塗盤，待溶液吸乾後放入 37°C 培養箱隔夜培養 16 至 18 小時。

隔天在養菌管加入含抗生素的液態 LB 培養基 2mL，以微量吸管尖挑取單一菌落，放入培養基中，在 37°C 培養箱內培養 16 至 18 小時。之後以 FairBiotech Plasmid Miniprep Kit 抽取質體 DNA。

#### (十一) 從 PBMC 中分離 T 細胞

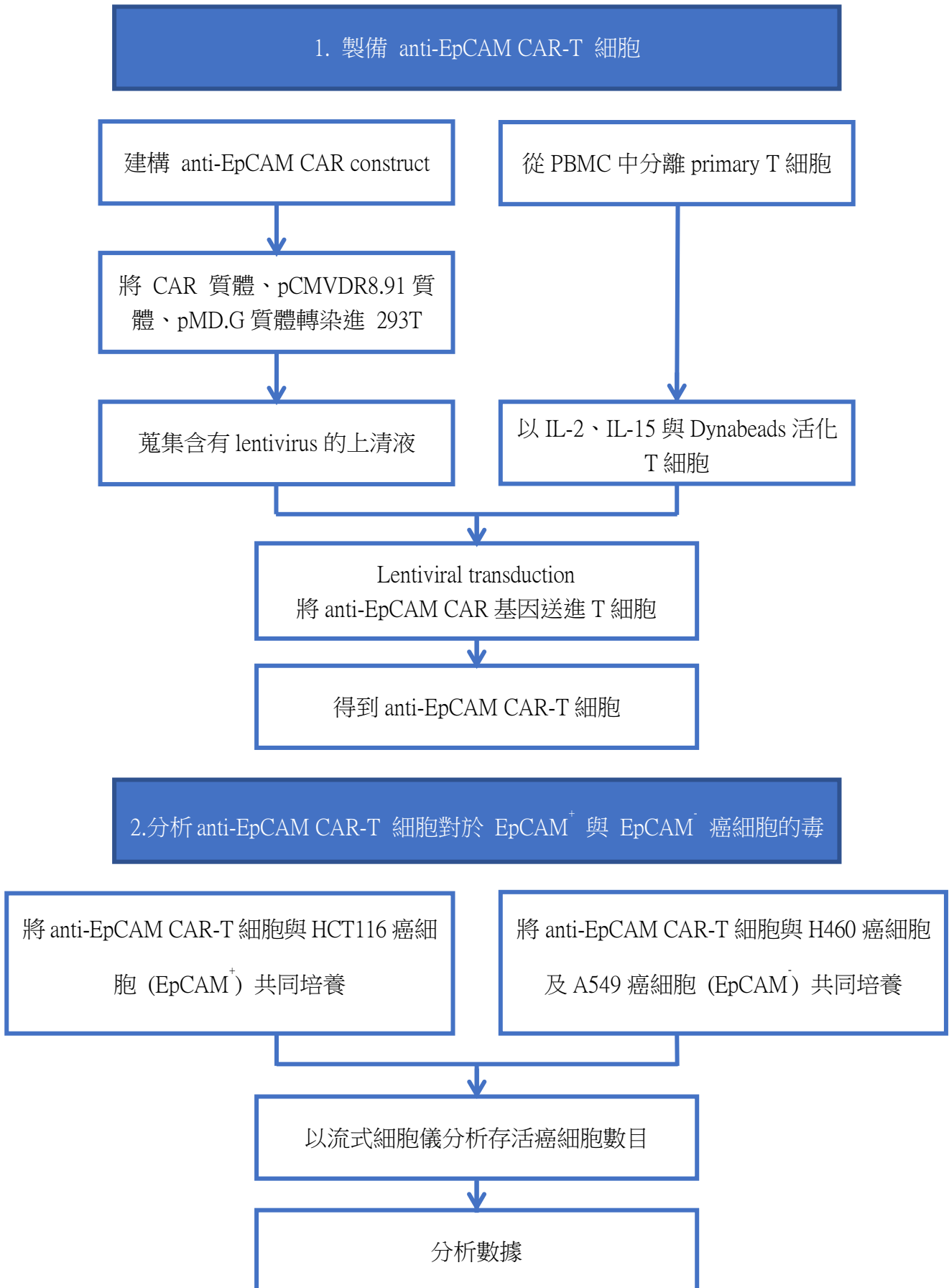
Buffer：PBS (2mM EDTA、0.5%BSA)

每  $10^7$  的 PBMC 加入 80 $\mu$ L 的 Buffer 與 20 $\mu$ L 的 CD3 MicroBeads (MACS® cell separation)，混合後在 4 至 8°C 作用 15 分鐘。接著每  $10^7$  的細胞加入 1 至 2mL 的 Buffer 清洗，以 300g 離心 10 分鐘，移除上清液，接著以 500 $\mu$ L 的 buffer 回溶細胞。將 MACS Column 放在 MACS Separator 上，以 500 $\mu$ L 的 buffer 潤洗，待 Column 內的液體滴光後，加入回溶過的細胞，接著以 500 $\mu$ L 的 buffer 清洗三次。將 MACS Column 從 MACS Separator 上移除，加入 1mL 的 buffer 並以活塞輕推，蒐集流出的液體即完成。

#### (十二) T 細胞活化與增殖

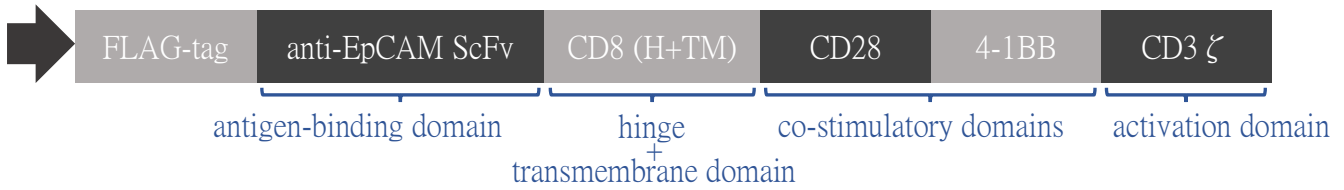
在 RPMI (10%FBS、IL-2 10u/ $\mu$ L、IL-15 1ng/mL、Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 每  $10^6$  個細胞 25 $\mu$ L) 中加入 T 細胞，使細胞濃度為  $10^6$  (個細胞/mL)，放進 37°C 培養箱。每天觀察細胞的數目與大小。當細胞濃度達到  $2.5 \times 10^6$  (個細胞/mL) 或培養基變黃時，將一部分細胞繼代到新培養皿中。

### 三、實驗流程



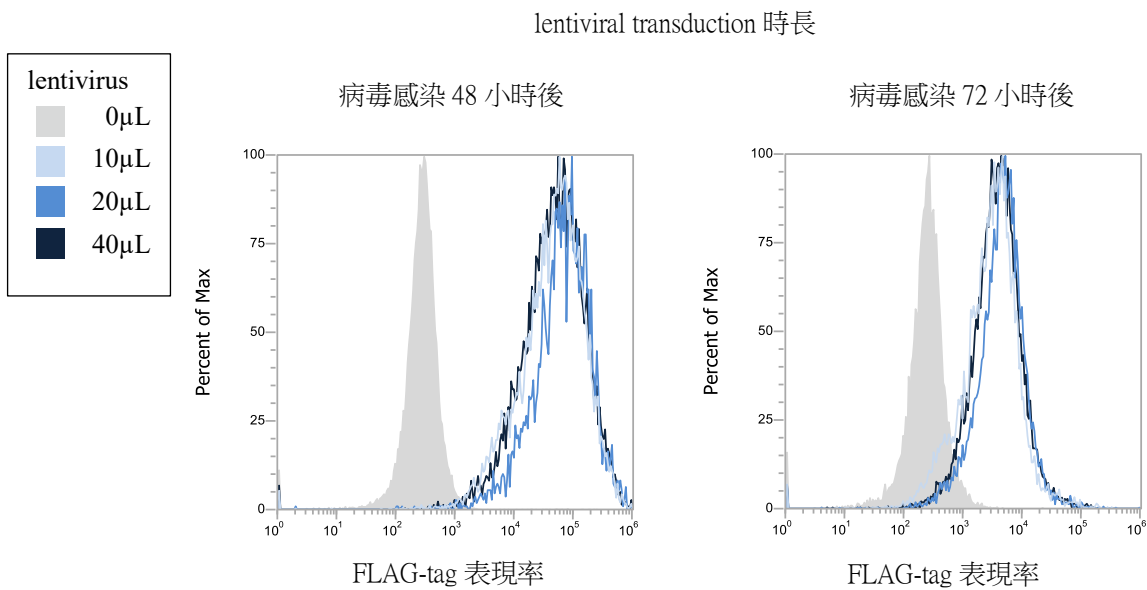
## 參、研究結果

一、將所建構的 anti-EpCAM CAR construct 送進 PIH5 質體

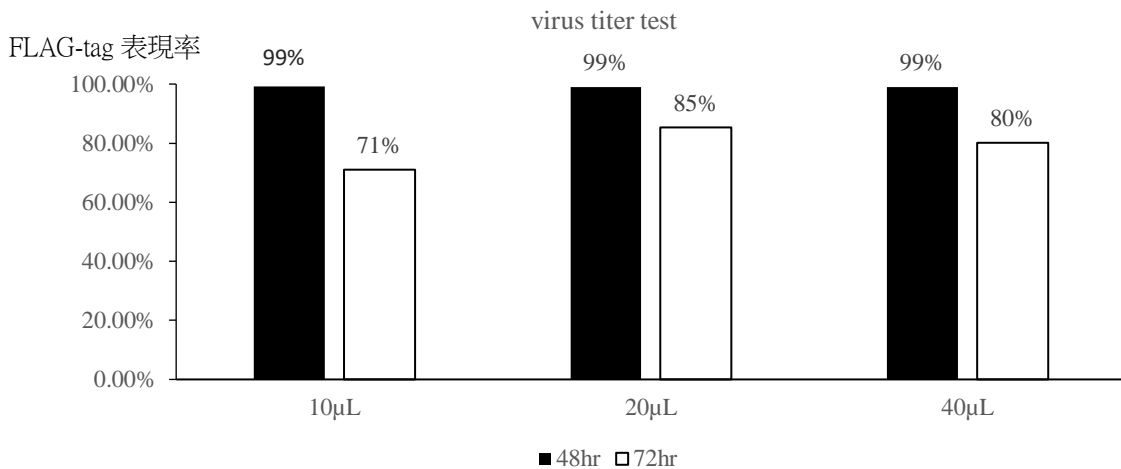


圖三、anti-EpCAM CAR construct 之示意圖

二、確認 lentiviral transduction 的最佳時長與病毒效價



圖四、病毒效價測試



圖五、病毒效價測試

lentivirus 感染細胞後，大部分需要 48 至 72 小時以上才會穩定表現蛋白質，因此本實驗分別在每  $10^6$  個 Jurkat 細胞加入不同體積的 lentivirus 濃縮液，使 Jurkat 細胞經過 48 小時與 72 小時的 lentiviral transduction 後，檢測 FLAG-tag 表現量。

Jurkat 為癌化的 T 細胞，與 primary T cell 相似度較高，且成本較低，故本病毒效價測試以 Jurkat 細胞株來做測試。

本實驗使 CAR-T 表現 FLAG-tag，可藉由使用流式細胞儀分析 T 細胞感染病毒後的 FLAG-tag 表現率，以得知 CAR-T 的比率。

如圖所示，可發現 lentivirus 感染後放置時間過長會使 Jurkat 細胞的 FLAG-tag 表現率降低，因此 48 小時是 lentiviral transduction 的最佳時長。每  $10^6$  個 Jurkat 細胞加入 20 $\mu$ L 的 lentivirus 濃縮液之感染效果最佳，FLAG-tag 表現率隨時間減少的幅度最小。

推測 FLAG-tag 表現率隨時間降低原因如下：

1. 未受感染的細胞生長速率較快，經過長時間培養後數量增加較快，因此降低受感染細胞的比例。
2. lentivirus 對細胞產生毒性，造成細胞死亡。

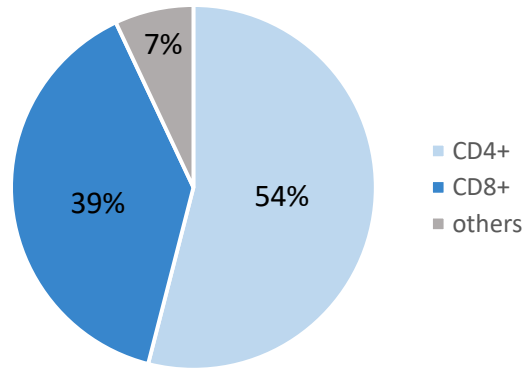
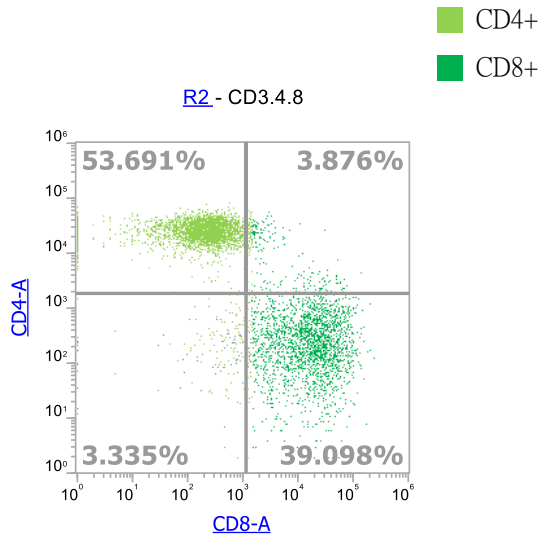
另外，即使 lentivirus 濃度相同，每批 lentivirus 的感染效率與品質皆不固定，故每生產一批 lentivirus 都須重新做一次效價測試，以確保 lentivirus 的品質。

### 三、primary T cell 中表現 CD4<sup>+</sup>細胞與表現 CD8<sup>+</sup>細胞的分佈比例

利用 CD3 MicroBeads 分離出 T 細胞，經過 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 活化後，以流式細胞儀檢測 CD4<sup>+</sup>與 CD8<sup>+</sup>的 T 細胞比例。

T 細胞主要包含表現 CD4<sup>+</sup>的輔助型 T 細胞，與表現 CD8<sup>+</sup>的胞毒性 T 細胞。在細胞毒殺測試中，真正執行細胞毒殺作用的細胞是表現 CD8<sup>+</sup>的胞毒性 T 細胞，因此必須確保 primary T cell 中有足夠的細胞表現 CD8<sup>+</sup>，以進行細胞毒殺測試。

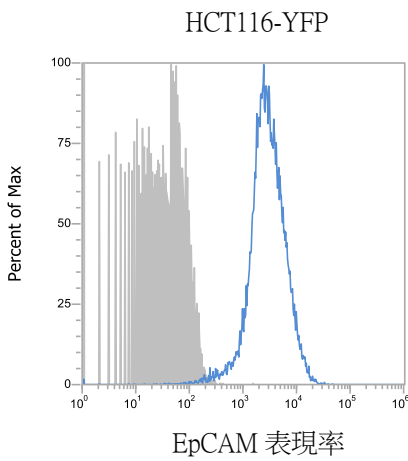
正常成年人中的 CD8<sup>+</sup>表現率大約是 33%；本實驗使用的 primary T cell CD8<sup>+</sup>表現率大約是 42%，CD8<sup>+</sup>表現量足夠，可以進行細胞毒殺測試。



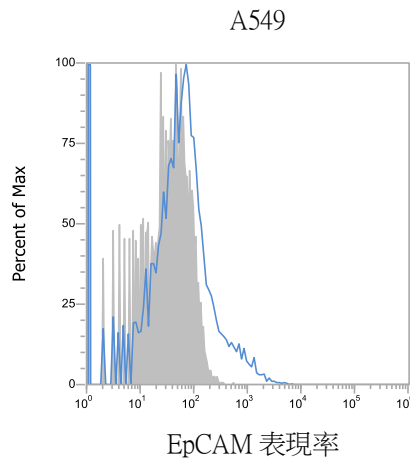
圖六、primary T cell CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>表現的分布

圖七、primary T cell CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>表現的分布

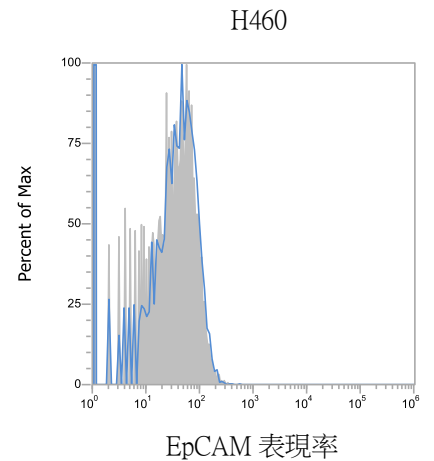
#### 四、各種癌細胞的 EpCAM 表現量



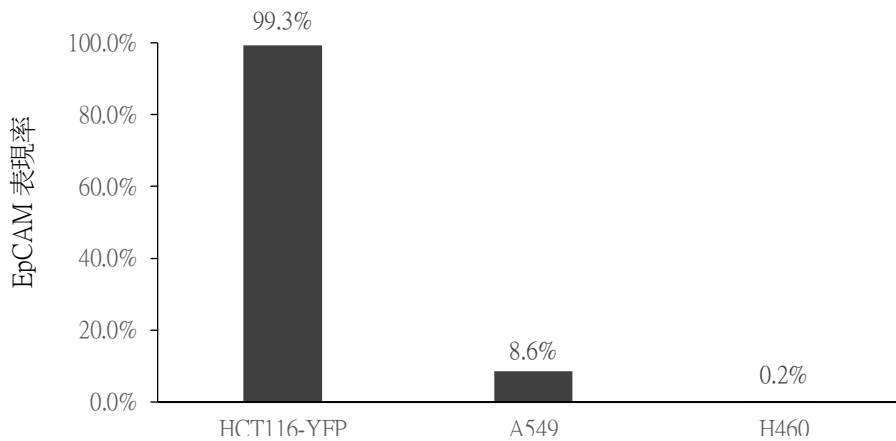
圖八、HCT116 細胞的 EpCAM 表現率



圖九、A549 細胞的 EpCAM 表現率



圖十、H460 細胞的 EpCAM 表現率



圖十一、實驗中使用的三種細胞的 EpCAM 表現率



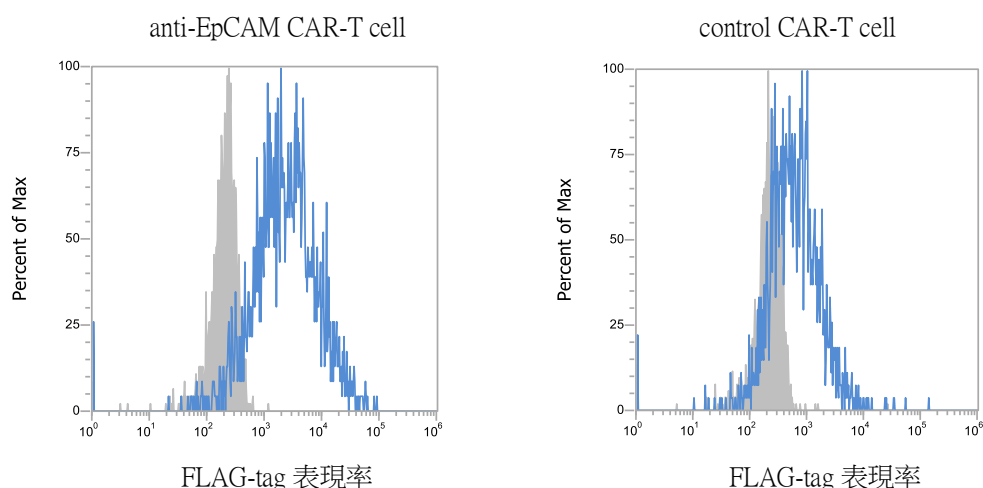
HCT116-YFP 細胞株、A549 細胞株、H460 細胞株的 EpCAM 表現率分別為 99.3%、8.6%、0.2%。

本研究發展的 CAR-T 細胞標靶為 EpCAM，因此需要找到大量表現 EpCAM 的癌細胞當作細胞毒殺測試的目標細胞。根據文獻探討，大腸癌細胞株 HCT116 過度表達 EpCAM。經過測試，HCT116-YFP 細胞株中幾乎所有細胞皆表現 EpCAM，故 HCT116-YFP 適合當作本實驗中細胞毒殺測試的目標細胞；而幾乎不表現 EpCAM 的癌症細胞 A549 細胞株和 H460 細胞株則適合當作測試 anti-EpCAM CAR-T 細胞專一性的毒殺目標細胞。

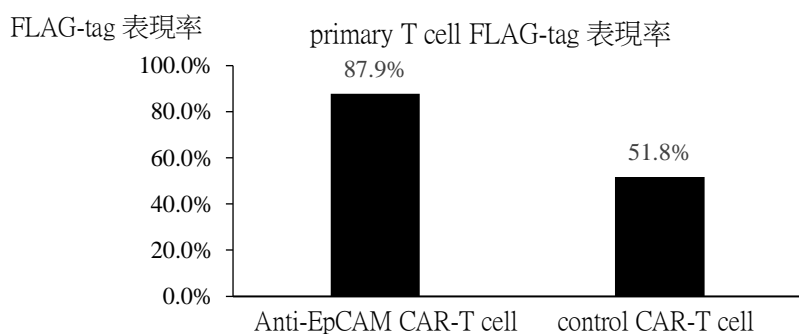
### 五、利用 lentiviral transduction 使 primary T cell 轉變成 CAR-T 細胞

以流式細胞儀測量 lentiviral transduction 48 小時後 primary T cell 的 FLAG-tag 表現率，可推算出 CAR-T 細胞的數量：

$$\text{CAR-T 細胞數量} = \text{primary T cell 數量} \times \text{FLAG-tag 表現率}$$



圖十二、用 lentivirus 感染 primary T cell 48 小時後的 FLAG-tag 表現率



圖十三、用 lentivirus 感染 primary T cell 48 小時後的 FLAG-tag 表現率

以流式細胞儀分析 primary T cell 的 FLAG-tag 表現率，得到 anti-EpCAM CAR-T 細胞的 FLAG-tag 表現率為 87.9%，control CAR-T 細胞的表現率為 51.8%。

Control CAR-T 細胞為缺少 antigen-binding domain 的 CAR-T 細胞。

#### 六、分析 anti-EpCAM CAR-T 細胞對於 EpCAM+ 癌細胞的毒殺效果

以 1:10 和 1:5 的比例共同培養 HCT116 細胞(EpCAM+)和 Anti-EpCAM CAR-T 細胞，另將 control CAR-T 細胞與 HCT116 細胞共同培養作為對照組。培養基使用 RPMI (IL-2 1.25ng/mL、IL-15 0.1mg/mL)。培養 16 小時後，以流式細胞儀分析癌細胞的存活率以得知 CAR-T 細胞的毒殺效果，共進行三次實驗。\*\* p value < 0.05。

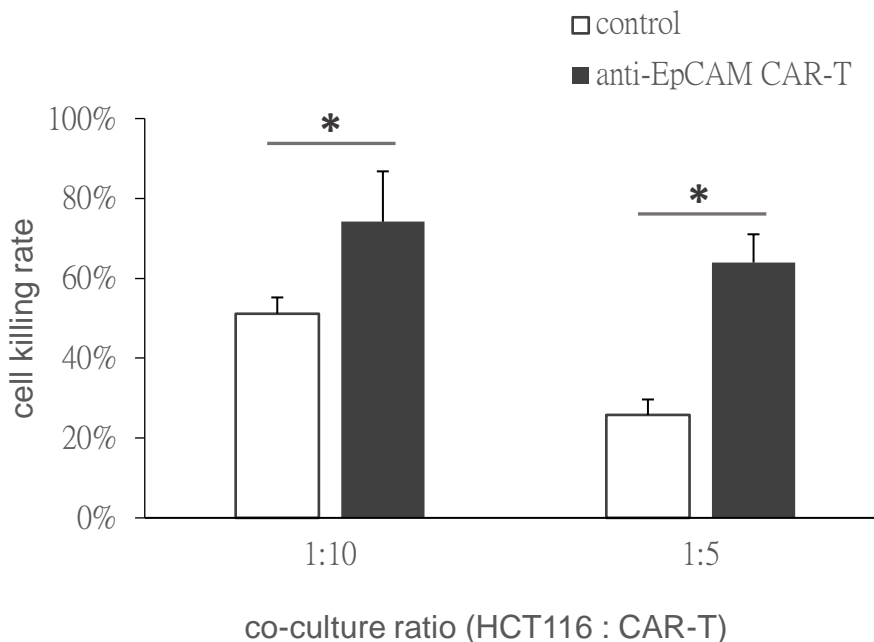
計算方法如下：

$$\text{Cell Killing Rate} = 1 - \frac{CN_{c+t}}{CN_c}$$

$$CN_{c+t} = \text{Cancer Cell Number}_{\text{co-culture}}$$

$$CN_c = \text{Cancer Cell Number}_{\text{cancer cell}}$$

整理三次重複實驗後結果如下圖。

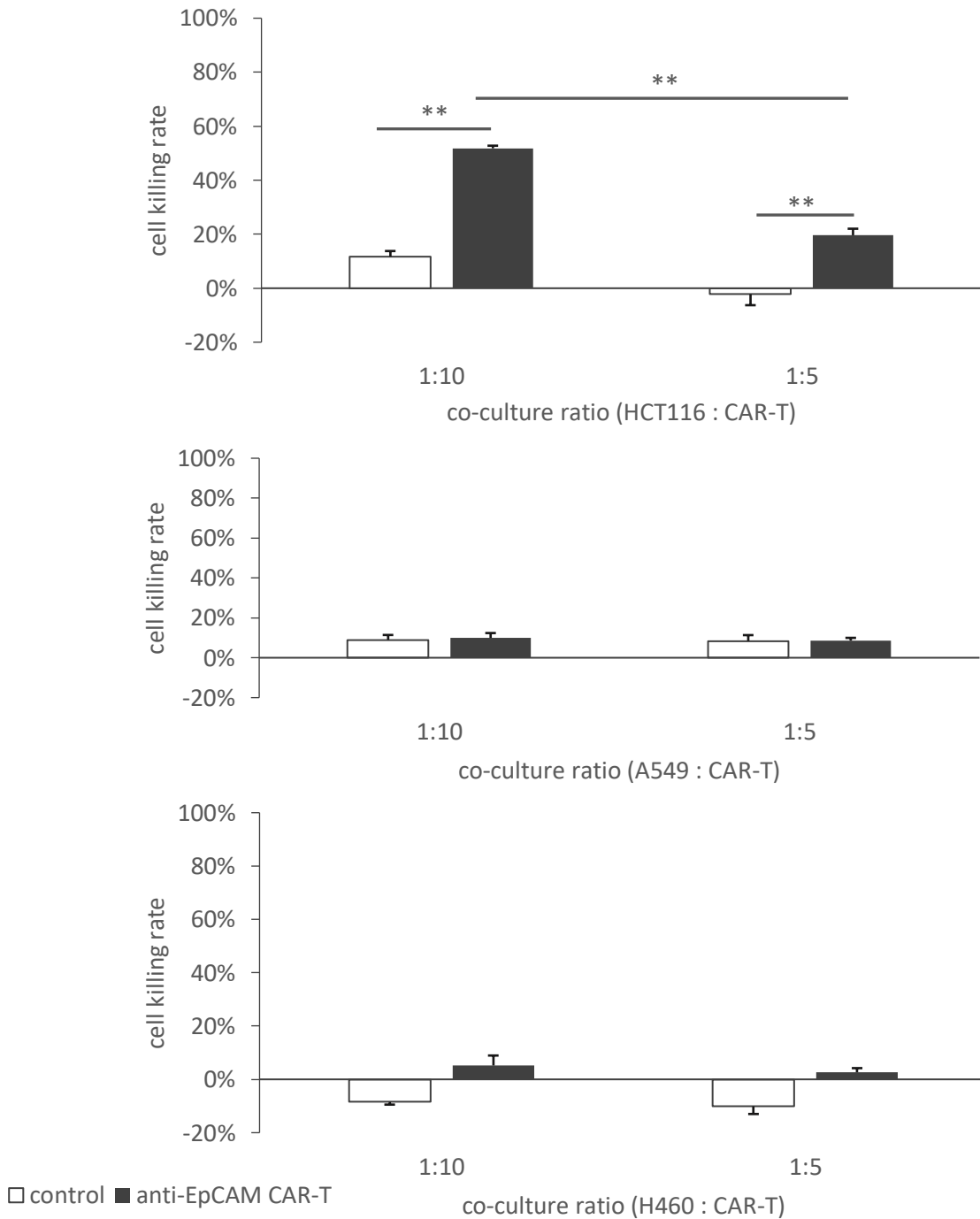


圖十四、細胞毒殺測試之 cell killing rate (\* : p ≤ 0.05)

由圖十三可得知，Anti-EpCAM CAR-T 細胞毒殺能力遠高於與對照組的 CAR-T 細胞且有統計上的顯著差異，且毒殺能力隨著 CAR-T 細胞比例的增加而有升高的趨勢。

### 七、分析 anti-EpCAM CAR-T 細胞對於 EpCAM+與 EpCAM-癌細胞的毒殺效果

以 1:10 和 1:5 的比例將 anti-EpCAM CAR-T 細胞與 HCT116 細胞 (EpCAM+)、A549 細胞 (EpCAM-)、H460 細胞 (EpCAM-) 分別共同培養，另將 control CAR-T 細胞也與 HCT116 細胞、A549 細胞、H460 細胞分別以 1:10 和 1:5 的比例共同培養作為對照組。培養基使用 RPMI (不添加細胞激素)。培養 16 小時後，以流式細胞儀分析癌細胞的存活率以得知 CAR-T 細胞的毒殺效果，共進行三次實驗。



圖十五、細胞毒殺測試之 cell killing rate (\*\* : p value ≤ 0.01)

A549 與 H460 為 EpCAM-的細胞株。由圖十四可得知，anti-EpCAM CAR-T 對 A549 與 H460 皆不具顯著的毒殺效果，可證明 anti-EpCAM CAR-T 對 EpCAM 的專一性。

## 肆、討論

1. 圖十四顯示 anti-EpCAM CAR-T 對 EpCAM 具有專一性。
2. T細胞在 lentiviral transduction 的前 2 至 3 天活化為最佳。若是活化時間過長，則 CAR-T 的功效會有降低的趨勢。
3. 圖十四以及後續的實驗中，RPMI 中並無外加任何細胞激素。由於未來預計測試 CAR-T 的 *in vivo* 效果，而在動物實驗中不適合外加細胞激素，故本實驗亦模擬此情形而不外加細胞激素。

## 伍、結論與應用

CAR-T 療法是一種癌症免疫療法，已被 FDA 核准上市，目前雖然能有效治療血液惡性腫瘤，但對固態腫瘤的療效有限。本研究透過基因重組技術，使用 lentivirus 將 anti-EpCAM CAR 基因送入 T 細胞，成功改造人體 T 細胞成為 CAR-T 細胞，並透過建立 EpCAM<sup>+</sup>與 EpCAM 的細胞毒殺測試模型以測試 anti-EpCAM CAR-T 細胞之毒殺效果。結果顯示 anti-EpCAM CAR-T 細胞可毒殺 EpCAM<sup>+</sup>細胞，且對 EpCAM 具有專一性。

本研究發展出以 EpCAM 作為標靶的 CAR-T 細胞，且能成功毒殺大腸癌細胞，證明此 CAR-T 細胞在治療固態腫瘤方面具有極高的發展潛力。未來會測試 Anti-EpCAM CAR-T 細胞對於 EpCAM<sup>+</sup>一般組織細胞的毒殺測試，以及透過動物實驗測試在體內的治療效果與副作用的程度。

## 陸、参考文献

- 一、Beatty, Gregory L, and Mark O' Hara. 2016. "Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Treatment of Solid Tumors: Defining the Challenges and next Steps." *Pharmacology and Therapeutics* 166: 30 - 39.
- 二、Choi, Bryan D et al. 2019. "Escape Without Detectable Toxicity." *Nature biotechnology*.
- 三、Fajardo, Carlos Alberto et al. 2017. "Oncolytic Adenoviral Delivery of an EGFR-Targeting t-Cell Engager Improves Antitumor Efficacy." *Cancer Research* 77(8): 2052 - 63.
- 四、Filley, Anna C, Mario Henriquez, and Mahua Dey. 2018. "CAR T Immunotherapy: Development, Success, and Translation to Malignant Gliomas and Other Solid Tumors." *Frontiers in Oncology* 8(OCT): 1 - 19.
- 五、Hartmann, Jessica, Martina Schüßler-Lenz, Attilio Bondanza, and Christian J Buchholz. 2017. "Clinical Development of CAR T Cells—Challenges and Opportunities in Translating Innovative Treatment Concepts." *EMBO Molecular Medicine* 9(9): 1183 - 97.
- 六、Wing, Anna et al. 2018. "Improving CART-Cell Therapy of Solid Tumors with Oncolytic Virus - Driven Production of a Bispecific T-Cell Engager." *Cancer Immunology Research* 6(5): 605 - 16.

## 【評語】 090022

有關本研究，有以下建議：

1. 宜更進一步探討毒殺的分子機制，及利用高度表達 EpCAM 的不同細胞株做實驗

2. Trendy approach in cancer therapy.

The poster presentation is clear enough to the audience.

Some minor changes in the poster is recommended, for example: label representative blots with Molecular Weight, add statistics methods, sample number, and p-value in the Materials and Methods, and Results sections.