

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 : 研究單株抗體攻擊甲促素受器專一性 B 細胞作為葛瑞 *
* 名 稱 : 夫氏症(Grave ' s disease)標靶治療之可行性 *
* ***** *

執行計畫學生： 鄭筱潔
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-024-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 詹明修

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 99年04月06日

研究單株抗體攻擊甲促素受器專一性 B 細胞做為

葛瑞夫氏症 (Grave's disease) 標靶治療之可行性

(一) 摘要

甲狀腺素是調節新陳代謝的重要荷爾蒙，我們身體中所有器官的功能幾乎都會受到甲狀腺分泌狀況的影響，包括心臟、眼睛、骨骼等等。而甲狀腺機能亢進 (Hyperthyroidism) 則是因為甲狀腺製造或分泌了過多的甲狀腺素，所引發出來的一連串臨床症狀。甲狀腺機能亢進的原因有許多，而其中最常見的即為自體免疫所造成的甲狀腺機能亢進，即葛瑞夫氏症 (Grave's disease)。對 Grave's disease 研究中發現，患者體內的甲促素受器抗體 (anti-TSH-R Ab) 在血液中的含量很高，因而導致甲狀腺機能亢進。現階段的治療均以甲狀腺為標的，以藥物毒殺或是手術來除去過多之亢進的甲狀腺細胞，然而有時會因過度治療而導致於甲狀腺功能低下。由於在一般免疫反應中，抗原可對應誘導出抗體，而抗體可以再誘導出 anti-idiotypic 抗體。我想利用病患的 anti-idiotypic，或是將病患之 anti-TSH-R Ab 自體抗體免疫小鼠，由小鼠製造 anti-anti-TSH-R Ab 單株抗體，經鏈結細胞毒殺藥物，毒殺 autoreactive 記憶型 B 淋巴細胞，以減少 anti-TSH-R Ab 的製造。我們預期所獲得之抗體能成功結合於 anti-TSH-R 之 autoreactive 記憶型 B 淋巴細胞，並經由細胞毒殺藥物的作用下可以去除這些自體免疫反應之細胞。

(二) 研究動機與研究問題

葛瑞夫氏症 (Grave's disease) 為一自體免疫疾病，而現今對於自體免疫疾病其整個致病機轉尚無全盤了解。且當中 Grave's disease 所伴隨的凸眼症 (exophthalmos) 不僅是對於患者外觀上的困擾外，眼部的病變嚴重甚至會導致失明。

詹明修老師實驗室目前正積極改良單株抗體製程。希望藉由縮短製備單株抗體製程的技術，可以運用到許多自體免疫疾病、新興傳染症或是癌症的治療。由於我的家族成員中有人有 Grave's disease，所以我想要設計專一性單株抗體來辨識產生 TSH-R Ab 的 B 細胞，進而在抗體上鍵結治療藥物，以標靶治療的概念消除 Grave's disease 患者中產生 TSH-R Ab 的 B 細胞，藉此達到治療的效果。

(三) 文獻回顧與探討

一、甲狀腺機能亢進 (Hyperthyroidism)

甲狀腺機能亢進在台灣是一常見的疾病。在流行病學統計中，甲狀腺疾病占人口的百分之四，而其中的百分之三十，即為甲狀腺機能亢進，且患者以女性居多。其臨床症

狀有:心悸、怕熱、焦慮、體重減輕、經期不順、眼部病變等等。造成甲狀腺機能亢進的原因有許多,有壓力性造成或是遺傳導致。而在遺傳性疾病中又以葛瑞夫氏症(Grave's disease)最為常見,約佔百分之九十。¹

葛瑞夫氏症(Grave's disease)是一種自體免疫疾病,其病患體內的免疫系統製造出許多-甲促素受器抗體(TSH-R Ab)。而釋放到血液中的 TSH-R Ab 會連結到甲狀腺體的特定部位,使甲狀腺分泌過多的甲狀腺素,因而引發甲狀腺機能亢進的症狀。其伴隨的併發症:凸眼症(exophthalmos),是因眼球肌內細胞也有此類接受器(TSH-R),而被甲促素受器抗體(TSH-R Ab)所刺激,導致眼球附近聚積液體,造成的眼部水腫,迫使眼睛朝外部突出。嚴重時,將會導致眼瞼無法閉合,進而引發角膜發炎或感染,甚至失明。^{2,3}

目前控制甲狀腺機能亢進之主要三種方法如下:

- 1. 抗甲狀腺藥物療法:**主要對於具有小腺體與輕度疾病之年輕病患。此療法是利用藥物去改變甲狀腺荷爾蒙合成或是改變血清中 T3、T4 之濃度。此療法的優點,是唯一可以保存完整甲狀腺體之療法且可避免甲狀腺機能不足與過度治療的危險。但缺點是需要長期的治療與觀察(1~2年),而且有 60~70% 之復發率。¹
- 2. 外科甲狀腺切除術:**大部分甲狀腺切除是針對具有非常大甲狀腺體或多結節甲狀腺腫病人之治療。復發率較低,但卻可能產生甲狀腺機能低下的副作用。一旦產生此副作用,即須終生服用甲狀腺素。¹
- 3. 放射活性碘破壞腺體:**此療法對大部分 21 歲以上之病人是較佳的療法。此療法是利用放射性碘去破壞甲狀腺體。治療約 6~12 個星期後,腺體將萎縮到正常甲狀腺狀態。主要併發症會發生甲狀腺機能不足約占 80%,此時便需終身補充甲狀腺素。^{1,4}

有關 Grave's disease 造成患者血液中高濃度的 TSH-R Ab 原因還不是很清楚。只因因為血液中過多的 TSH-R Ab 會過度刺激甲狀腺體,造成甲狀腺機能亢進。如果我們可以設法中和血液中此類過多的抗體,或是清除分泌此抗體的免疫細胞。是否就可以達到治療的效果?

二、單株抗體 (monoclonal antibody)

單株抗體是由Kohler與Milstein於1975年所發明的技術,並於1984年獲得諾貝爾生理醫學獎。抗體製備依照其製備流程的困難度分多株抗體 (polyclonal antibodies) 與單株抗體 (monoclonal antibody) 兩類。抗原與佐劑混合後經多次注射於動物體內,抽取血液製成之血清屬多株抗體。多株抗體的優點為可較快得到所要之抗體,但每次製備抗體效價不一樣、需重複製備、且多株抗體的辨識抗原位置不一致、非專一性結合的反應較強。而單株抗體的優點是為單一細胞株製造之抗體,具抗原專一性、非專一性反應弱、可源源不絕生產我們所需的抗體,其缺點為製程繁瑣,需要很長時間與金錢。^{5,6}

三、標靶治療(targeting therapy)

近年來在癌症治療上，標靶治療（一種直接針對標的物進行破壞的治療）已成為一種治療的新趨勢⁷。是否以標靶治療的概念來運用到 Grave's disease 的治療是我有興趣的題目。

(四) 方法及材料

本研究希望獲得具專一性辨識 anti-TSH-R Ab 的單株抗體，以此抗體追蹤並毒殺可製造 anti-TSH-R Ab 之記憶型 B 淋巴細胞，藉此減低血中 anti-TSH-R 自體抗體的含量以達減輕症狀與治癒之目的。

細胞株

SW579 人類甲狀腺上皮細胞癌(ATCC HTB-107)。細胞以含有10% 胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS)、抗生素(100 µg/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin) 及 2mM L-glutamine 之 L-15 培養液 (Gibco) 培養於 37°C without CO₂ 培養箱。

Jurkat 人類癌化T細胞。細胞以含有10% 胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS)、抗生素(100 µg/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin) 及 2mM L-glutamine 之 RPMI1640 培養液 (Sigma) 培養於 37°C 5% CO₂ 培養箱。

Immunocytochemistry (ICC)

- * 1X Phosphate buffered saline
- * 1% Paraformaldehyde in PBS
- * 1% BSA Staining buffer (PBS with 1% BSA, 0.09%NaN₃)
- * Permeablization buffer (0.1% Triton X-100 and 0.1% SDS in PBS)
- * 1% BSA Blocking buffer (PBS with 1% BSA)
- * A 組一級抗體部份使用健康人的血清當作 control 組
- * B 組一級抗體部份使用 Grave's disease 患者的血清

預做實驗前一天先將 SW579 種在 24 well 盤中。隔天，待細胞滿盤後，移除培養液，並以 1ml 的 1X PBS 清洗一次。接著使用 1% 的 paraformaldehyde 在室溫下作用 30 分鐘，以固定細胞。爾後以 1ml 的 staining buffer 清洗一次，並以 Permeablization buffer 浸潤十分鐘，以 300µl 的 blocking buffer 以填補細胞空缺的部分，在室溫下作用 2 小時。接著使用 0.3 % H₂O₂ 作用 1 分鐘，耗盡細胞中的 Peroxidase，再以 PBS 清洗

兩次。一抗的部份分成 A 組與 B 組兩組別。分別使用十倍稀釋血清樣品(300 μ l / well) 在室溫下作用 1 小時。反應完，以 1ml PBS 清洗三次，每次五分鐘。再以二抗 (anti-human IgG conjugate HRP) 作用 1 小時，接著以 1ml PBS 清洗三次。最後使用 AEC 呈色，待反應適當後，以 1ml milli-Q 中止反應。

酵素結合免疫吸附法(ELISA)

先將 SW579 種在 24 well 盤中。隔天，待細胞滿盤後，移除培養液，並以 1ml 的 1X PBS 清洗一次。接著使用 1% 的 paraformaldehyde 在室溫下作用 30 分鐘，以固定細胞。爾後以 1ml 的 staining buffer 清洗一次，並以 300 μ l 的 blocking buffer 以填補抗原附著空缺的部分，於室溫反應 1 小時。經 PBS-Tween 清洗兩次，每孔再加入 300 μ l 已稀釋的血清樣品，於 37°C 反應一小時。重複以 PBST 清洗三次後，每孔再加入 300 μ l 的二抗在室溫下作用 1 小時。重複清洗三次後，每孔再加入 200 μ l 過氧化酶呈色受質 TMB Substrate Solution 反應 5 分鐘，停止反應將 sample 溶液移到另一乾淨之 96 孔盤中。再以 ELISA 判讀機於 620 nm 下判讀。

破細胞、西方點墨法 (Western blotting)

先將所要實驗之細胞 (Jurkat、HeLa、SW579) 分別以 1X PBS 清洗一次，接著各加入 1 ml 的 lysis buffer 在冰上作用二十分鐘。作用完以刮刀將細胞刮落，並收集細胞液，以 12000 rpm 在 4°C 下離心二十分鐘。收集上清液加入 1/4 體積冰冷的 5x sample buffer，電泳前再置於 100°C 水浴 10 分鐘隨即置於冰上。以 12.5% 的 SDS Polyacrylamide 膠體於 120 伏特電壓進行電泳。

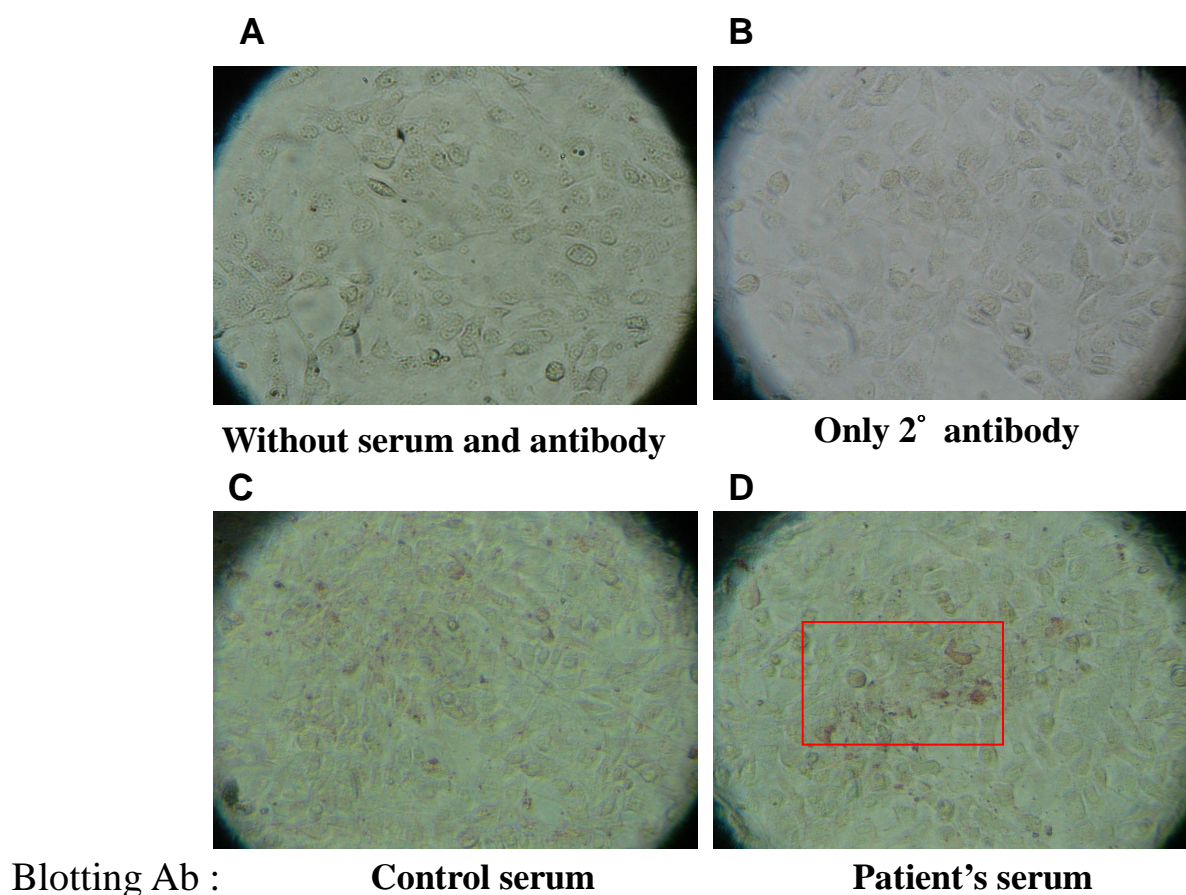
西方墨點法 (Western blotting) 以濕式轉漬於 PVDF membrane，以 80 volts 於室溫轉漬 1 小時。完成後 membrane 經 5% 脫脂奶粉在 4°C blocking 8 小時，經 PBS-T 清洗之後，Jurkat 及 HeLa 的蛋白質膜先換為一級抗體在 4°C 作用 8 小時。之後在將此兩張模取出後，換置 SW579 的蛋白質膜於原先的一級抗體在 4°C 作用 8 小時。重複清洗後加入二級抗體於 4°C 作用 8 小時，清洗後以冷光或 AEC 顯影。

Immortalization of Lymphocytes

用 1.5 ml 的 Trypsin-EDTA 加入 75T flask 將 B95-8 收起來，且以 1200 rpm 使細胞沉澱下來，並收集上清液。吸取之上清液通過 0.45- μ m 的過濾器，使上清液保持在無菌狀態。將上清液以超高速離心兩個小時，使培養液的病毒顆粒完全沉澱下來。取 600 μ l 的濃縮病毒液與 Grave's disease 患者的 PBMC (細胞數為: 5×10^7)，在 RPMI1640 培養液於 37°C 下共同感染兩小時。最後將感染液以含有 10% 胎牛血清、1 μ g/ml cyclosporine A 之 RPMI1640 培養液稀釋成 6×10^5 cell/well 培養，每格幾天再適時補充培養液，持續至細胞群出現。

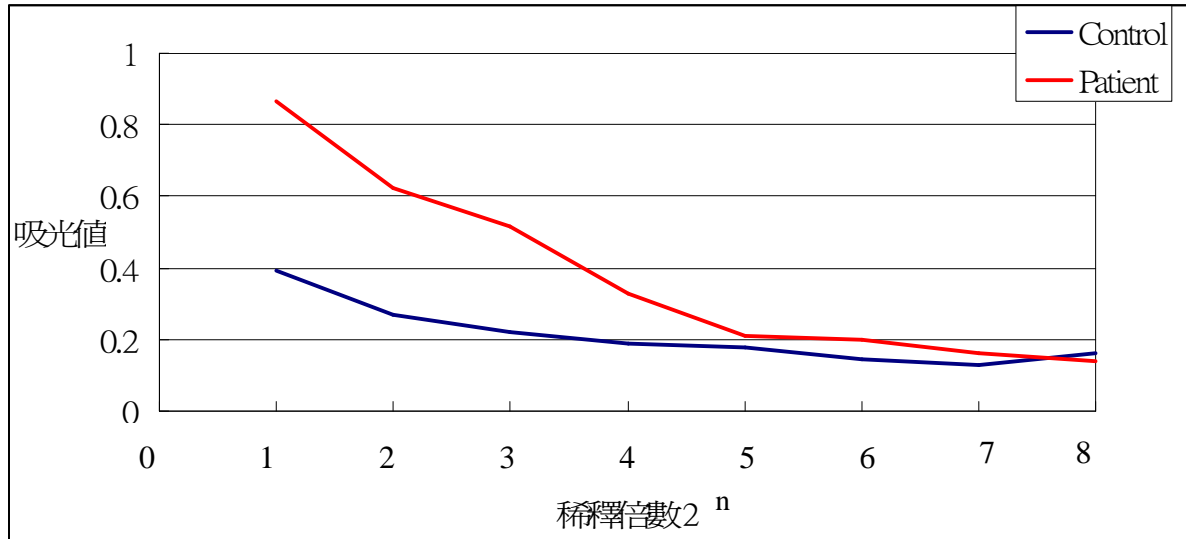
(五) 實驗結果

為確認 Grave's disease 患者血清中有特異性的 TSH-R Ab，是否可藉由某一細胞平台做為日後檢測抗體依據之一，因此以下先測試人類甲狀腺上皮細胞癌之細胞株 (SW579)，可否作為細胞檢測平台的實驗。圖一為以患者血清中抗體做為一級抗體對應健康人的血清 control 抗體之細胞免疫染色。由圖中紅色部位可得知，Grave's disease 患者血清中的抗體，可以辨認 SW579 上的專一性受體。且其所辨認到的受體，比健康人抗體所辨認的量還多。推測，Grave's disease 患者血清中的 TSH-R Ab，可以辨認到 SW579 細胞上的 TSH-R。



圖一、以 Grave's disease 患者血清抗體和健康人血清抗體進行免疫細胞染色，檢測 SW579 中有其專一性受體。紅色部位為抗體標定之處，且 Grave's disease 患者的抗體較健康人的抗體所辨認的量多。

已知 SW579 可以辨識 Grave's disease 患者與健康人血清抗體的差異。接著以 ELISA 去量化兩者之間的差異。由圖 2 可以得知，SW579 所辨認之 Grave's disease 患者與健康人血清專一性抗體，有超過 16 倍之量的差異。



圖二，以 Grave's disease 患者血清抗體和健康人血清抗體進行 ELISA 之量化。

(六) 實驗討論

SW579 為人類甲狀腺上皮細胞，我們認為在其細胞上存在 TSH-R。因此，想藉此去探討 Grave's disease 患者血清中 anti-TSHR Ab 的量是否會比一般健康人的量多。從圖一中可以看出，Patient's serum 組有被專一性的染色，Control serum 組的部份也有些許被辨認的地方。推測的原因可能為，人體的血清裡含有多種且不同量的抗體存在；SW579 上面可能存在多種受器，才会有都被專一性染色的現象。但在兩者的比較下，Grave's disease 患者之血清，似乎存在較多的特異性抗體，我們推測可能即為 anti-TSHR Ab。

接著以 ELISA 去量化兩者之間的差異。由圖 2 可以得知，兩者可以明顯看出量的差異，但血清的背景值依舊很高，並無法斷定其真正的倍數差異。只能推測 Grave's disease 患者與健康人血清專一性抗體約為 16 倍之多。為了改善此現象，下次可以改先以其他細胞株(Jurkat、 HeLa)先抓取一些可以被一般型受體辨認的抗體，減低血清中背景值。

在研究期間，曾經做過多次的 Immortalization of Lymphocytes，但目前還未成功挑出單一個細胞株。推測的原因有，B95-8 中的病毒效價可能不足，導致無法使細胞不死化；亦可能為病毒量的濃度過高，導致細胞死亡。之後可以以這些推測去做近一步的改善。

(七) 參考文獻

1. Basic and Clinical Pharmacology, 8/e By Bertram G. Katzung ISBN: 0-8385-0598-8
2. Lehmann GM, Feldon SE, Smith TJ, Phipps RP . Number 9, 2008. Immune Mechanisms

in Thyroid Eye Disease. **THYROID**. 18(9):959-65.

3. Kuriyan AE, Phipps RP, Feldon SE. 2008 Nov. The eye and thyroid disease. **Curr Opin Ophthalmol**. 19(6):499-506.
4. Ceccarelli C, Canale D, Vitti P. 2008 Nov. Radioactive iodine (131I) effects on male fertility. **Curr Opin Urol**. 18(6):598-601.
5. Nelson, P. N., G. M. Reynolds, E. E. Waldron, E. Ward, K. Giannopoulos, and P. G. Murray. 2000. Monoclonal antibodies. **Mol. Pathol**. 53:111-117. Review.
6. Breedveld, F. C. 2000. Therapeutic monoclonal antibodies. **Lancet**. 355:735-740. Review.
7. Furukawa T. 2008. Epub 2008 Dec 24. Molecular targeting therapy for pancreatic cancer: current knowledge and perspectives from bench to bedside. **J Gastroenterol**. 43(12):905-11.