

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

## 靈芝免疫調節蛋白合併癌症免疫療法抑制黑色素瘤生成與抑制 其轉移之作用機轉

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 104-2311-B-040-001-  
執行期間：104年08月01日至105年07月31日  
執行單位：中山醫學大學附設醫院

計畫主持人：蕭玉屏  
共同主持人：柯俊良  
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：侯婷譯  
                  博士班研究生-兼任助理人員：呂俊德

中華民國 105 年 11 月 02 日

中文摘要：黑色素瘤惡性度高，易轉移且致病因複雜。在腫瘤微環境中，黑色素瘤可經由程序性死亡配體1 (Programmed death-ligand 1, PD-L1)以及B7 抗原，分別與T 細胞之程序性死亡受體1 (Programmed death-1, PD-1)及毒殺型T 淋巴細胞相關抗原4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4)結合，抑制浸潤之毒殺型T 細胞活化而逃避免疫攻擊。以PD1 與CTLA-4 抗體增強T 細胞抗癌能力，已為臨床上使用之黑色素瘤免疫治療。靈芝免疫調節蛋白(GMI)已知具有活化T細胞之功效。本研究透過靈芝免疫調節蛋白(GMI)合併免疫療法，探討打擊不同的標靶，以增加黑色素瘤的治療療效。我們的結果顯示，GMI誘導A375.S2和B16F10黑色素瘤細胞之細胞形態改變。傷口癒合試驗表示，GMI可顯著抑制A375.S2和B16F10黑色素瘤細胞之移行能力。透過西方墨點法證實，GMI可抑制 Integrin  $\alpha$ V、Integrin  $\beta$ 1、p-FAK之蛋白表現。GMI結合 Chidamide共同處理會增加LC3-II 及Cleaved Caspase-7及之表現。GMI 與Chidamide會抑制人類臍靜脈血管內皮細胞 (HUVEC) 之管狀構造形成。在動物實驗中發現，GMI 與Pembrolizumab 均可抑制黑色素瘤的遠端轉移。本研究證實GMI 具有發展免疫治療佐劑之潛力，對黑色素瘤治療提供新的契機。

中文關鍵詞：靈芝免疫調節蛋白、Integrins、轉移、黑色素瘤

英文摘要：Malignant melanoma is an aggressive form with high metastatic rate and a complex etiology. In the tumor microenvironment, melanoma suppresses the infiltrating cytotoxic T cells activation through the interaction of programmed death-ligand 1 (PD-L1)/ programmed death 1 (PD-1) and B7/CTLA-4. PD1 and CTLA-4 antibodies are used as melanoma immunotherapy via potentiating antitumor T-cell responses. Ganoderma immunomodulatory protein can activate T cells activation. This study is to investigate the combination therapy with Ganoderma immunomodulatory proteins (GMI) and Pembrolizumab by hitting different targets concurrently. Our data demonstrated that GMI induced cell morphological changes and in A375.S2 human melanoma cells and B16F10 mouse melanoma cells in vitro. GMI significantly inhibit melanoma cell migration in A375.S2 and B16F10 melanoma cells by Wound-healing assay. GMI inhibited the expressions of Integrin  $\alpha$ V, Integrin  $\beta$ 1 and p-FAK by western blot. GMI combined with Chidamide restrained the expression of LC3-II and the cleaved forms of caspase-7. GMI and Chidamide inhibited tube formation on Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Both of GMI and Pembrolizumab can inhibit distant metastasis of melanoma in mice model. This study may prove that GMI is a potential immunotherapeutic adjuvant against melanoma metastasis.

英文關鍵詞：Ganoderma immunomodulatory proteins, Integrins, Metastasis,

Melanoma

## 科技部補助專題研究計畫成果報告

(成果報告/期末報告)

靈芝免疫調節蛋白合併癌症免疫療法抑制黑色素瘤生成與抑制其轉移之作用機轉

Investigation of the Mechanisms of Proliferation and Metastasis Inhibition by Combined treatment with Ganoderma Immunomodulatory Proteins and Immunotherapy in Melanoma

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104 - 2311 - B - 040 - 001 -

執行期間：104 年 08 月 01 日 至 105 年 07 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學

計畫主持人：蕭玉屏

共同主持人：柯俊良

計畫參與人員：呂俊德、侯婷譯

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

中 華 民 國 105 年 10 月 30 日

# 靈芝免疫調節蛋白合併癌症免疫療法抑制黑色素瘤生成與抑制其轉移之作用機轉

Investigation of the Mechanisms of Proliferation and Metastasis Inhibition by Combined treatment with Ganoderma Immunomodulatory Proteins and Immunotherapy in Melanoma

計畫類別：個別型計畫    整合型計畫

計畫編號：MOST 104 - 2311 - B - 040 - 001 -

執行期間：104 年 08 月 01 日 至 105 年 07 月 31 日

## 中文摘要：

黑色素瘤惡性度高，易轉移且致病因複雜。在腫瘤微環境中，黑色素瘤可經由程序性死亡配體1 (Programmed death-ligand 1, PD-L1)以及B7 抗原，分別與T 細胞之程序性死亡受體1 (Programmed death-1, PD-1)及毒殺型T 淋巴細胞相關抗原4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4)結合，抑制浸潤之毒殺型T 細胞活化而逃避免疫攻擊。以PD1 與CTLA-4 抗體增強T 細胞抗癌能力，已為臨床上使用之黑色素瘤免疫治療。靈芝免疫調節蛋白(GMI)已知具有活化T細胞之功效。本研究透過靈芝免疫調節蛋白(GMI)合併免疫療法，探討打擊不同的標靶，以增加黑色素瘤的治療療效。我們的結果顯示，GMI誘導A375.S2和B16F10黑色素瘤細胞之細胞形態改變。傷口癒合試驗表示，GMI可顯著抑制A375.S2和B16F10黑色素瘤細胞之移行能力。透過西方墨點法證實，GMI可抑制Integrin  $\alpha$ V、Integrin  $\beta$ 1、p-FAK之蛋白表現。GMI結合Chidamide共同處理會增加LC3-II及Cleaved Caspase-7及之表現。GMI與Chidamide會抑制人類臍靜脈血管內皮細胞(HUVEC)之管狀構造形成。在動物實驗中發現，GMI與Pembrolizumab均可抑制黑色素瘤的遠端轉移。本研究證實GMI具有發展免疫治療佐劑之潛力，對黑色素瘤治療提供新的契機。

## 關鍵字：

靈芝免疫調節蛋白、Integrins、轉移、黑色素瘤

## 英文摘要

Malignant melanoma is an aggressive form with high metastatic rate and a complex etiology. In the tumor microenvironment, melanoma suppresses the infiltrating cytotoxic T cells activation through the interaction of programmed death-ligand 1 (PD-L1)/programmed death 1 (PD-1) and B7/CTLA-4. PD1 and CTLA-4 antibodies are used as melanoma immunotherapy via potentiating antitumor T-cell responses. Ganoderma immunomodulatory protein can activate T cells activation. This study is to investigate the combination therapy with Ganoderma immunomodulatory proteins (GMI) and Pembrolizumab by hitting different targets concurrently. Our data demonstrated that GMI induced cell morphological changes and in A375.S2 human melanoma cells and B16F10 mouse melanoma cells in vitro. GMI significantly inhibit melanoma cell migration in A375.S2 and B16F10 melanoma cells by Wound-healing assay. GMI inhibited the expressions of Integrin  $\alpha$ V, Integrin  $\beta$ 1 and p-FAK by western blot. GMI combined with Chidamide restrained the expression of LC3-II and the cleaved forms of caspase-7. GMI and Chidamide inhibited tube formation on Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Both of GMI and Pembrolizumab can inhibit distant metastasis of melanoma in mice model. This study may prove that GMI is a potential immunotherapeutic adjuvant against melanoma metastasis.

## Key words:

Ganoderma immunomodulatory proteins, Integrins, Metastasis, Melanoma

## 緒言：

皮膚惡性黑色素瘤 (cutaneous malignant melanoma: CMM) 具有高侵襲性及高轉移性，近年來探討標靶治療搭配免疫治療勝過以往的單一治療 [1, 2]。包括致癌基因的標靶藥物 (Vemurafenib、Dabrafenib 與 Trametinib) 及免疫治療 (Pembrolizumab、Ipilimumab 與 Nivolumab) 等。已知 PD-1 (programmed cell death protein 1) 及其配體 PD-L1 (Programmed death-ligand 1) 會抑制抗腫瘤效果。臨床試驗顯示，透過抗體阻斷，對有耐藥性的黑色素瘤患者具有良好的治療效果 [3]。T 細胞主要存在於血液與組織中，其中也包括腫瘤組織。在活化狀態下，T 細胞具有破壞腫瘤細胞的能力。然而，腫瘤浸潤性 T 細胞通常是失活態 (anergized)，使腫瘤細胞可抵抗其毒殺作用 [4]。透過抗體阻斷 T 細胞抑制因子 (T cell-inhibitory molecules) 活化 T 細胞，是一種可行的免疫療法 (Immunotherapy)。在臨床試驗結果中，Nivolumab (anti-PD-1) 結合 Ipilimumab (anti-CTLA-4) 使用效果更勝於單一藥劑之使用 [5, 6]。

Keytruda (Pembrolizumab) 是由美商默沙東藥廠 (Merck Sharp Dohme) 所研發，以免疫檢查點程序性細胞死亡 1 (Programmed cell death 1, PD-1) 為作用標靶之單株抗體。其作用機轉是透過針對阻礙 PD-1 與其配體 PD-L1 及 PD-L2 的結合，達到抑制 PD-1 的作用 [7, 8]。T 細胞活化，PD-1 會表現在活化的 T 細胞表面。當 PD-1 與抗原呈現細胞 (Antigen Presenting Cells, APCs) 上的 PD-L1 及 PD-L2 或腫瘤細胞上的 PD-L1 作用，將失去其功能活性，進而抑制免疫反應 [9-12]。因此，較常見之人類癌症免疫療法是透過單株抗體的調控，特異性阻斷 PD-1/ PD-L1/ PD-L2 訊息路徑，達到提升抗腫瘤免疫反應及增強誘發腫瘤細胞死亡之效果 [13, 14]。文獻指出，Pembrolizumab 具有延長疾病無惡化存活期與整體存活期。整體而言，Pembrolizumab 與 Ipilimumab 之副作用相似，以疲倦、腹瀉、皮疹、無力、噁心、肝功能異常、甲狀腺功能低下等為主，但相較於 Ipilimumab，Pembrolizumab 嚴重毒性反應較低 [15-20]。如何減少 Pembrolizumab 藥物劑量以達到最好的療效，並且減少藥費，減少副作用，是我們努力的目標。

已知靈芝具有保健及抗癌等多方面的功效，例如靈芝多醣萃取物可改善血糖血脂異常 [21]；靈芝三萜類可抑制口腔鱗狀上皮癌 [22]；在乳癌方面，靈芝萃取液 (*G. lucidum* extract, GLE) 透過抑制 Akt 活性及轉錄因子 AP-1 與 NF- $\kappa$ B，造成 cyclin D1 下降，抑制人類乳癌細胞 MAD-MB-231 之生長與轉移 [23]。文獻證實，重組松杉靈芝免疫調節蛋白 (reFIP-gts) 可抑制人類肺癌細胞株 A549 之端粒酶活性表現，達抑癌效果 [24, 25]。reFIP-gts 會促使 A549 肺癌細胞株走向細胞衰老 (senescence)，且在動物實驗中也證實 reFIP-gts 確實有抑制腫瘤生長的能力 [26]。而在對順鉑有抗藥性 (Cisplatin-resistant) 的泌尿道上皮癌細胞 N/P 中處理 FIP-gts，會增強自體吞噬細胞死亡 (Autophagic Cell Death) [27]。小孢子靈芝免疫調節蛋白 (Fungal immunomodulatory protein - *Ganoderma microsporum*, GMI) 其胺基酸序列與 reFIP-gts 相似度高達 83%，研究發現其可透過減少 EGFR 的磷酸化，以及阻止其下游 Akt 路徑的活化，進而抑制 EGF 所活化的細胞移行與侵襲能力。從博登細胞移行器也發現，GMI 可抑制 TNF- $\alpha$  所誘導的侵襲能力，其機制是透過調控 NF- $\kappa$ B/MMP-9 路徑達到抗腫瘤侵襲及抗發炎之功效 [28]。在動物實驗中也發現，對於皮下注射 A549 肺癌細胞的裸鼠，口服 GMI 可抑制腫瘤細胞生長及誘發細胞自噬 [29]。GMI 可以強化 Cisplatin 所誘發的細胞凋亡 (apoptosis)，兩者透過 autophagy/caspase-7-dependent 與 survivin- 和 ERCC1-independent 路徑誘發非小細胞肺癌之腫瘤細胞凋亡 [30]。

## 實驗步驟

### 一、細胞存活試驗 (Cell viability assay)

CCK-8 assay是常用於測定細胞存活率的分析方法之一。本研究使用Cell Counting Kit-8 (Sigma, 96992)測定細胞存活率，實驗步驟遵循原廠步驟指示。WST-8 ([2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]) 為一種水溶性Tetrazolium鹽類，主要是藉由活細胞粒線體內的脫氫酶反應，可還原生成水溶性黃色結晶物質formazan的特性，偵測細胞存活率或生長速率。於96孔細胞培養盤中種植黑色素瘤細胞 (A375.S2:  $5 \times 10^3$  cells/well; B16F10:  $3 \times 10^3$  cells/well)，經不同濃度的GMI及Chidamide處理，於24及48小時分別直接加入CCK-8試劑(10  $\mu$ L/well)，於37°C細胞培養箱中待其作用一小時。利用ELISA reader進行分析，在波長450 nm下偵測其吸光值。吸光值愈大，則表示細胞存活率愈高。因活細胞才具有活性粒線體酵素，故所測得之吸光值與活細胞數量成正比關係。

### 二、細胞週期變化 (Cell cycle distribution)

種植細胞 $5 \times 10^5$ 數目至6 cm培養皿中，於37°C細胞培養箱中培養16小時，處理不同濃度的GMI及Chidamide，作用24小時。待時間點作用完畢，收細胞，並以1×PBS清洗兩次，接著進行1000 rpm離心5分鐘，小心移除上清液，緩慢加入3 mL-70%酒精固定細胞，置於4°C冰箱。隔天再次以1×PBS清洗兩次，小心移除上清液，接著加入1 mL PI染劑【1% Triton X-100, 0.5 mg/mL RNase A, 4  $\mu$ g/mL propidium iodide】混合均勻，且需避光，室溫作用30分鐘。上機前，需將細胞通過40  $\mu$ m nylon mesh，以過濾聚集的細胞，避免阻塞流式細胞儀之樣品吸入孔。把單細胞懸浮液收集在流式細胞儀專用管中，即可準備上機。本計畫實驗使用Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)系統，以流式細胞儀(FACSCalibur™, BD)進行分析。

### 三、傷口癒合試驗 (Wound-healing assay)

本計畫實驗使用silicon culture inserts (Ibidi, Germany)進行傷口癒合試驗。於24孔細胞培養盤中放置insert，每個insert有左右兩孔洞，於每個孔洞中種植細胞 $2 \times 10^4$ 數目，置於37°C細胞培養箱中

待其貼附。隔天，移除insert與舊細胞培養液，分別處理不同濃度的GMI (0, 0.6, 1.2  $\mu$ M)。於指定時間使用倒立式顯微鏡觀察傷口癒合速率。

### 四、西方點墨法 (Western Blot)

種植細胞 $5 \times 10^5$ 數目至6 cm培養皿中，於37°C細胞培養箱中培養16小時，處理不同濃度的GMI及Chidamide，作用24小時。待時間點作用完畢，先以1×PBS清洗兩次，移除上清液，加入100  $\mu$ L細胞均質緩衝液(RIPA buffer)使細胞溶解。接著，置冰上，於4°C下以超音波均質機將細胞完全打破。以12000 rpm離心20分鐘。取上清液至新的微量離心管中，並另外進行蛋白質定量。樣品將以SDS-聚丙稀醯胺膠體電泳法分析，經過轉漬(Transfer)，接著以5%脫脂奶粉進行Blocking。之後分別加入專一性的一級抗體: anti-Integrin  $\alpha 5$  (Cell Signaling, #4705)、anti-Integrin  $\alpha V$  (Cell Signaling, #4711)、anti-Integrin  $\beta 1$  (Cell Signaling, #9699)、anti-Integrin  $\beta 3$  (Cell Signaling, #13166)、antiphospho-FAK (Cell Signaling, #3283)、anti-FAK (Millipore, #05-537)、antiphospho-Erk1/2 (Cell Signaling, #9101)、antiphospho-Rb (Cell Signaling, #9308)、antiphospho-Chk1 (Cell Signaling, #2341)、anticleaved caspase-7 (Cell Signaling, #9491)、anti-LC3B (Cell Signaling, #3868)、anti-Survivin (Cell Signaling, #2808)、anti- $\beta$ -actin (Sigma, A4700)，置於4°C下搖晃浸泡至少16小時。隔天以1×TTBS buffer清洗2次，每次10分鐘。接著分別加入二級抗體: anti-rabbit IgG-HRP (Cell Signaling #7074) 或 anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)，於室溫下震盪作用1小時。以1×TTBS buffer清洗2次，10分鐘。最後利用E.C.L.呈色劑，以1:1的方式均勻混合Enhanced luminol reagent與Oxidizing reagent，將membrane與呈色劑作用3~5分鐘，將螢光曝光在X-光底片，約10分鐘內，再以顯影劑及定影劑將影像沖洗出。最後即可透過Image J軟體進行蛋白表現之影像定量分析。

### 五、管柱形成試驗 (Tube formation)

本計畫實驗使用人類臍靜脈血管內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)

探討靈芝之免疫調節蛋白影響腫瘤血管新生之細胞模式。種植HUVECs細胞 $5 \times 10^5$ 數目至6 cm培養皿中，置於 $37^\circ\text{C}$ 細胞培養箱中待其貼附。隔天，移除舊細胞培養液，分別加入不同濃度的GMI及Chidamide處理，24小時後，打下細胞，使用 $\mu$ -Slide Angiogenesis (15-well, ibidi, 81506)，於每個well中加入 $10\mu\text{L}$ -Matrigel<sup>®</sup> (BD)，約5分鐘後，再種HUVEC ( $5.5 \times 10^3$  cells/well)細胞。置於 $37^\circ\text{C}$ 細胞培養箱中培養，待時間點以倒立式顯微鏡觀察管狀結構的型態以及形成狀況。

## 六、動物實驗

本計畫動物實驗設計選用八週大的 C57BL/6 公黑鼠(財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心,台灣),將B16-F10黑色素瘤細胞( $1 \times 10^5$  cells/mice)以尾靜脈注射方式 (intravenous injection) 注入小鼠體內。使用胃管餵食方式每天給與靈芝免疫調節蛋白 GMI，並搭配使用 Pembrolizumab (anti-PD-1)，21 天後犧牲小鼠，並分析其腫瘤生長分佈情形。組別分成五組: (A)正常控制組(無癌細胞接種，無藥物介入治療)、(B)腫瘤控制組(有癌細胞接種，無藥物介入治療)、(C)GMI 組(胃管餵食 GMI 8 mg/kg，無藥物介入治療)、(D)Pembrolizumab 組(胃管餵食 PBS，尾靜脈注射 Pembrolizumab 10 mg/kg)、(E)GMI+ Pembrolizumab 組(胃管餵食 GMI 8 mg/kg，尾靜脈注射 Pembrolizumab 10 mg/kg)。

### 實驗結果:

#### 一、靈芝免疫調節蛋白GMI改變黑色素瘤細胞形態與抑制細胞移行

我們要觀察靈芝免疫調節蛋白 GMI 是否誘使 A375.S2 與 B16F10 黑色素瘤細胞形態改變。首先，對 A375.S2 與 B16F10 處理不同濃度的 GMI(0, 0.6, 1.2  $\mu\text{M}$ )，於 24 小時後以倒立式顯微鏡觀察並拍攝細胞形態。結果顯示(Figure 1. A)，相較於未處理 GMI 的黑色素瘤細胞，處理 GMI 後，兩株黑色素瘤細胞均會變的較細長，細胞間隙均也變得較大，尤其是再黑色素瘤細胞處理 GMI 1.2  $\mu\text{M}$  最為明顯。相較兩株黑色素瘤細胞，以 A375.S2 細胞對 GMI 較為敏感。進一步，我們將透過傷口癒合試驗觀察 GMI 是否影響 A375.S2 與 B16F10

黑色素瘤細胞之細胞移行能力。結果顯示(Figure 1. B)，隨著 GMI 處理濃度增加，抑制傷口癒合效果越好。其結果表示，GMI 可顯著抑制 A375.S2 與 B16F10 黑色素瘤細胞之細胞移行。

## 二、分析GMI結合Chidamide共同處理對A375.S2與B16F10黑色素瘤細胞存活率之影響

本計畫實驗使用 Cell Counting Kit-8 (Sigma, 96992) 測定 GMI 與 Chidamide 或 GMI 結合 Chidamide 共同處理對 A375.S2 與 B16F10 黑色素瘤細胞存活率之影響。結果顯示，對於 A375.S2 細胞(Figure 2.A)處理 24 小時不同濃度的 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ )，其細胞存活率分別為 100、80、64、51%。處理 GMI(0.6  $\mu\text{M}$ ) 結合 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) 共同處理，其細胞存活率分別為 89、67、62、45%。處理 GMI (1.2  $\mu\text{M}$ ) 結合 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) 共同處理，其細胞存活率分別為 74、66、60、55%。處理 48 小時不同濃度的 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ )，其細胞存活率分別為 103、70、61、51%。處理 GMI(0.6  $\mu\text{M}$ ) 結合 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) 共同處理，其細胞存活率分別為 85、62、56、41%。處理 GMI (1.2  $\mu\text{M}$ ) 結合 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) 共同處理，其細胞存活率分別為 68、51、43、37%。對於 B16F10 細胞(Figure 2. B)處理 24 小時不同濃度的 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ )，其細胞存活率分別為 100、107、103、82%。處理 GMI(0.6  $\mu\text{M}$ ) 結合 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) 共同處理，其細胞存活率分別為 92、110、104、86%。處理 GMI (1.2  $\mu\text{M}$ ) 結合 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) 共同處理，其細胞存活率分別為 93、104、100、86%。處理 48 小時不同濃度的 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ )，其細胞存活率分別為 100、100、94、65%。處理 GMI(0.6  $\mu\text{M}$ ) 結合 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) 共同處理，其細胞存活率分別為 100、113、91、74%。處理 GMI (1.2  $\mu\text{M}$ ) 結合 Chidamide (0, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ ) 共同處理，其細胞存活率分別為 93、118、108、72%。其結果表示，GMI 結合 Chidamide 共同處理可顯著抑制 A375.S2 與 B16F10 黑色素瘤細胞之細胞存活率。相較兩株黑色素瘤細胞，又以 A375.S2 細胞對 GMI 與 Chidamide 較為敏感。



### 三、分析GMI結合Chidamide共同處理對A375.S2黑色素瘤細胞是否影響細胞週期誘發細胞凋亡

由 Figure 2.A 及 Figure 2. B 結果顯示，GMI 結合 Chidamide 共同處理可顯著抑制黑色素瘤細胞存活。因此，進一步，我們將探討其是否透過影響細胞週期停滯及誘發細胞凋亡，進而影響細胞存活。首先，我們以流式細胞儀分析細胞週期分布，結果顯示(Figure 2. C)，單獨處理 GMI 與 Chidamide 或結合 GMI 與 Chidamide 共同處理並不顯著影響細胞週期。另外，我們使用 Annexin V/Propidium Iodide 進行雙染分析是否影響細胞凋亡。Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>屬 Early Apoptosis，Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>屬 Late Apoptosis/Necrosis。對 A375.S2 單獨處理 GMI (0, 0.6, 1.2  $\mu$ M) 24 小時，早期細胞凋亡比例分別為 1、19、19%，晚期細胞凋亡比例分別為 3、25、33%。處理 Chidamide (20  $\mu$ M) 結合 GMI (0, 0.6, 1.2  $\mu$ M) 共同處理，早期細胞凋亡比例分別為 6、18、16%，晚期細胞凋亡比例分別為 3、36、51%。因此，其結果表示，GMI 可顯著誘發細胞凋亡。

### 五、分析GMI結合Chidamide共同處理對A375.S2黑色素瘤細胞是否影響Integrins/p-FAK訊息路徑

已知組合蛋白(Integrins)主要負責細胞外間質與細胞間之交互作用，可調控細胞生長、分化、黏貼、伸展與細胞遷移。而 Integrin 所誘導的腫瘤細胞移行，需要 FAK (focal adhesion kinase)與 SFK (Src family kinase)訊號傳遞。首先，先探討 A375.S2 黑色素瘤細胞中各類 Integrins 之表現。結果顯示(Figure 3. A)，隨著 GMI 處理濃度增加，Integrin  $\alpha$ V 及 Integrin  $\beta$ 1 表現量顯著遞減。進一步發現(Figure 3. B)，其下游 p-FAK 之表現也隨著 GMI 處理濃度增加，表現量顯著降低。而 Chidamide 可顯著抑制 p-Rb、p-Chk1 表現量，並活化 Cleaved Caspase-7 之表現。GMI 及 Chidamide 可顯著提升 LC3 B 表現量，並降低 Survivin 之表現。

### 六、GMI結合Chidamide抑制人類臍靜脈血管內皮細胞 (HUVEC) 之管狀構造形成

腫瘤增生形成 spheroid，會促進血管新生，而血管新生於腫瘤發展進程中扮演重要角色。因此，我們將探討 GMI 結合 Chidamide 對腫瘤血管

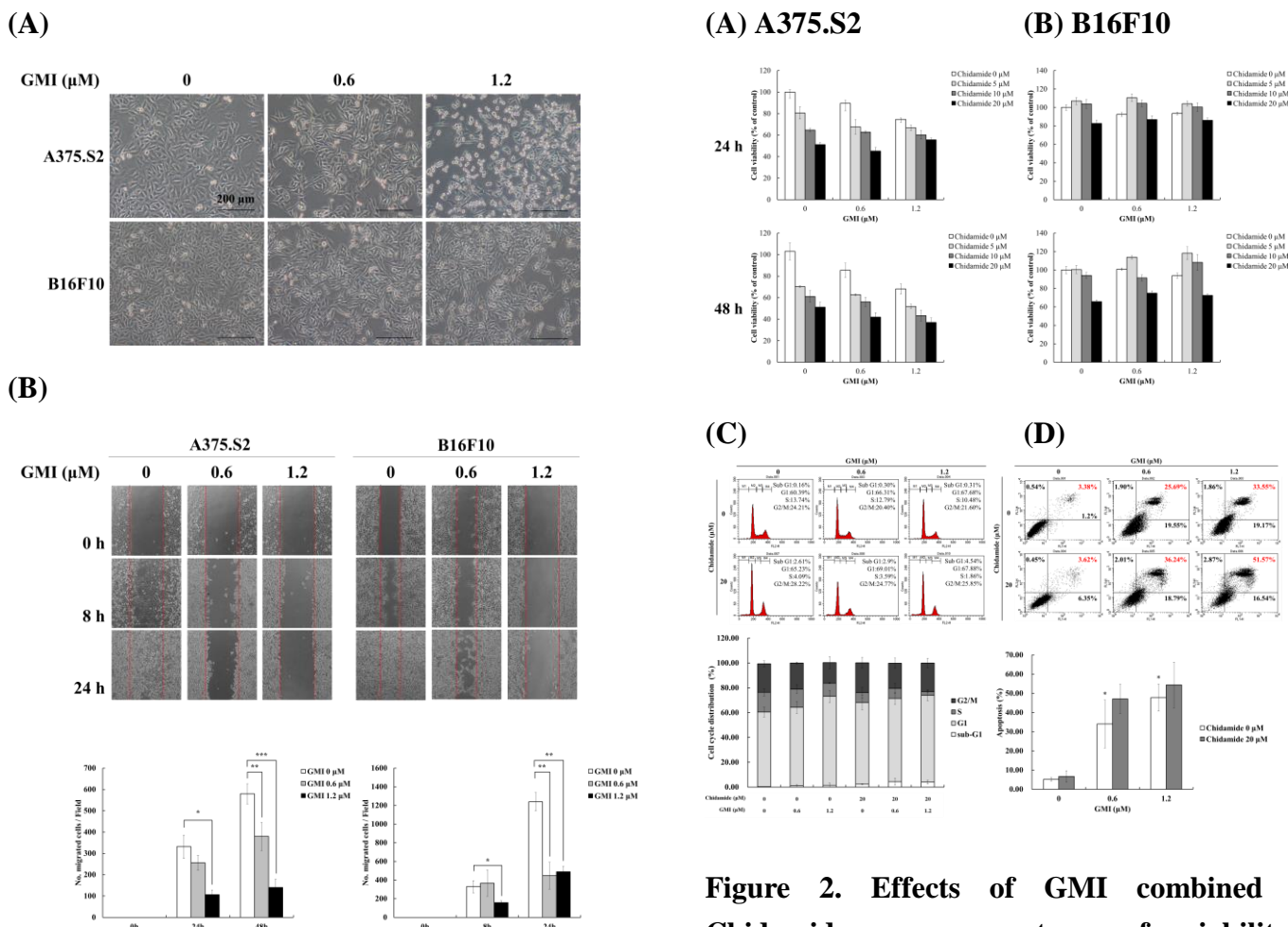
新生所造成的影響。透過相位差顯微鏡觀察 HUVEC 細胞之管狀構造形成 (Tube formation)，結果顯示(Figure 4. A)，隨著 GMI 處理濃度增加，可抑制管狀構造形成；結合 Chidamide 共同處理也具有抑制效果。經 ImageJ (NIH)軟體量化結果顯示(Figure 4.B)，單獨處理 GMI 可顯著抑制 Covered Area、Total Loops、Total Tube Length 及 Total Branching Points。

### 七、靈芝免疫調節蛋白GMI 可抑制B16F10黑色素瘤細胞之遠端轉移

透過尾靜脈注射方式，將 B16F10 黑色素瘤細胞注射至 C57BL/6JNarl 小鼠進行動物實驗，觀察腫瘤細胞遠端轉移之情形。組別分成五組：(A)正常控制組(無癌細胞接種，無藥物介入治療)、(B)腫瘤控制組(有癌細胞接種，無藥物介入治療)、(C)GMI 組(胃管餵食 GMI 8 mg/kg，無藥物介入治療)、(D)Pembrolizumab 組 (胃管餵食 PBS，尾靜脈注射 Pembrolizumab 10 mg/kg)、(E)GMI+Pembrolizumab 組 (胃管餵食 GMI 8 mg/kg，尾靜脈注射 Pembrolizumab 10 mg/kg)。結果顯示(Figure 5. A)，GMI 及 Pembrolizumab 可顯著抑制黑色素瘤細胞之遠端肺臟轉移。在(Figure 5. B)

### 八、靈芝免疫調節蛋白GMI 可顯著抑制罹癌小鼠之脾臟中的骨髓衍生抑制細胞(MDSC)

待動物實驗結束，將小鼠犧牲取出脾臟細胞，透過螢光染色後進行流式細胞儀分析細胞群落分佈。標的細胞:骨髓衍生抑制細胞 MDSC (myeloid derived suppressor cells)，屬 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>。結果顯示(Figure 5. C)，正常控制組 MDSC 百分比為 3.2%，腫瘤控制組為 8.9%，GMI 組為 3.1%，Pembrolizumab 組為 3.2%，GMI+Pembrolizumab 組為 3.1%。其結果表示，GMI 及 Pembrolizumab 可顯著抑制脾臟中的骨髓衍生抑制細胞百分比(MDSC%)。

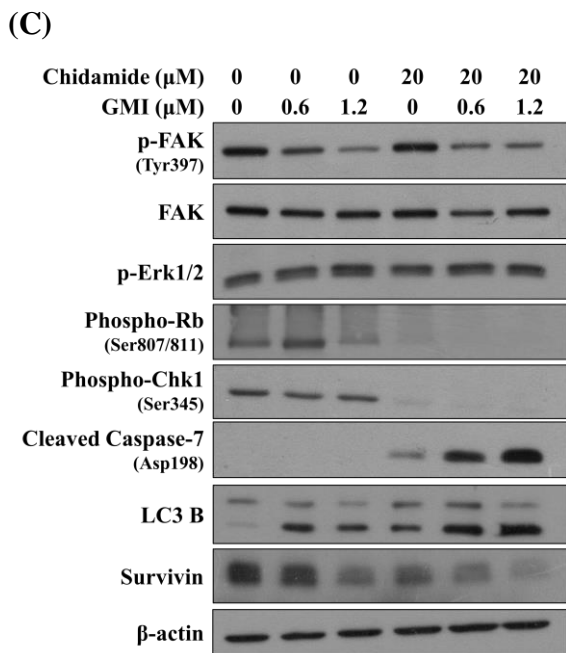
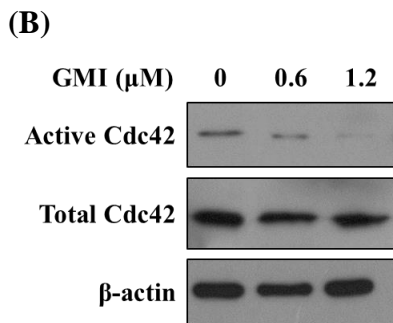
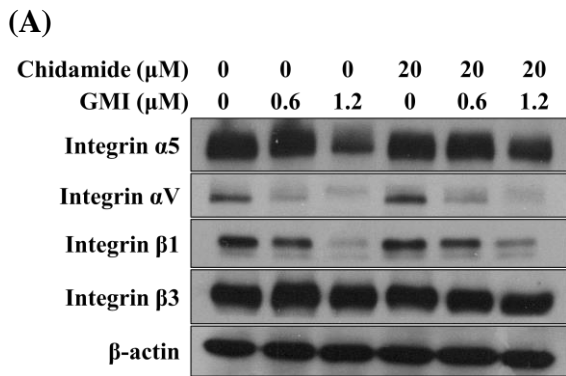


**Figure 1. (A) GMI induced cell morphological changes in A375.S2 human melanoma cells and B16F10 mouse melanoma cells in vitro.** A375.S2 ( $5 \times 10^5$  cells/dish) and B16F10 ( $3 \times 10^5$  cells/dish) in 6 cm-dish were treated with various concentrations of GMI (0, 0.6, 1.2 μM) for 24 h. To examine the cell morphology and photography undertaken by phase contrast microscope (Original magnification  $\times 100$ ; scale bar, 200 μm). **(B) GMI significantly inhibit melanoma cell migration in A375.S2 human melanoma cells and B16F10 mouse melanoma cells.** A375.S2 ( $5 \times 10^5$  cells/dish) and B16F10 ( $3 \times 10^5$  cells/dish) in 6 cm-dish were treated with various concentrations of GMI (0, 0.6, 1.2 μM) for 24 h. By using silicon culture inserts, A375.S2 or B16F10 ( $2 \times 10^4$  cells/well) were seeded and attached in each insert. The numbers of cells migrating into the wound area were counted based on the dashed line as time zero. The data are shown as mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. The symbol (\*) indicates a  $P < 0.05$  versus group of control with Student's t-test.

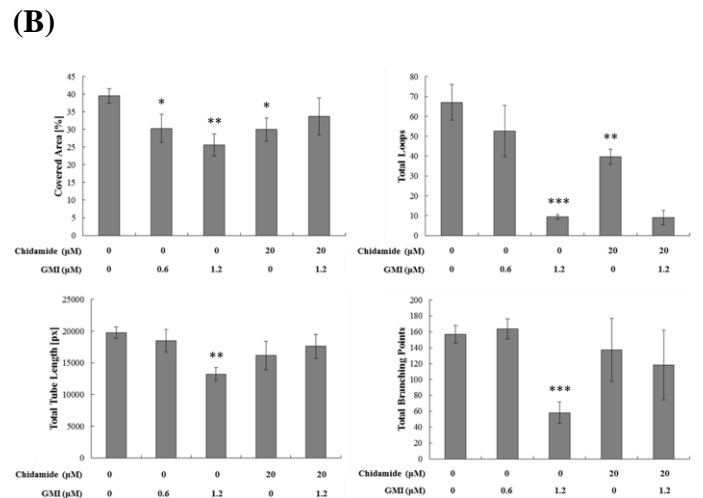
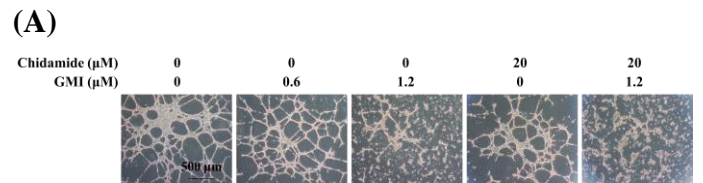
**(A) A375.S2** **(B) B16F10**

**(C)** **(D)**

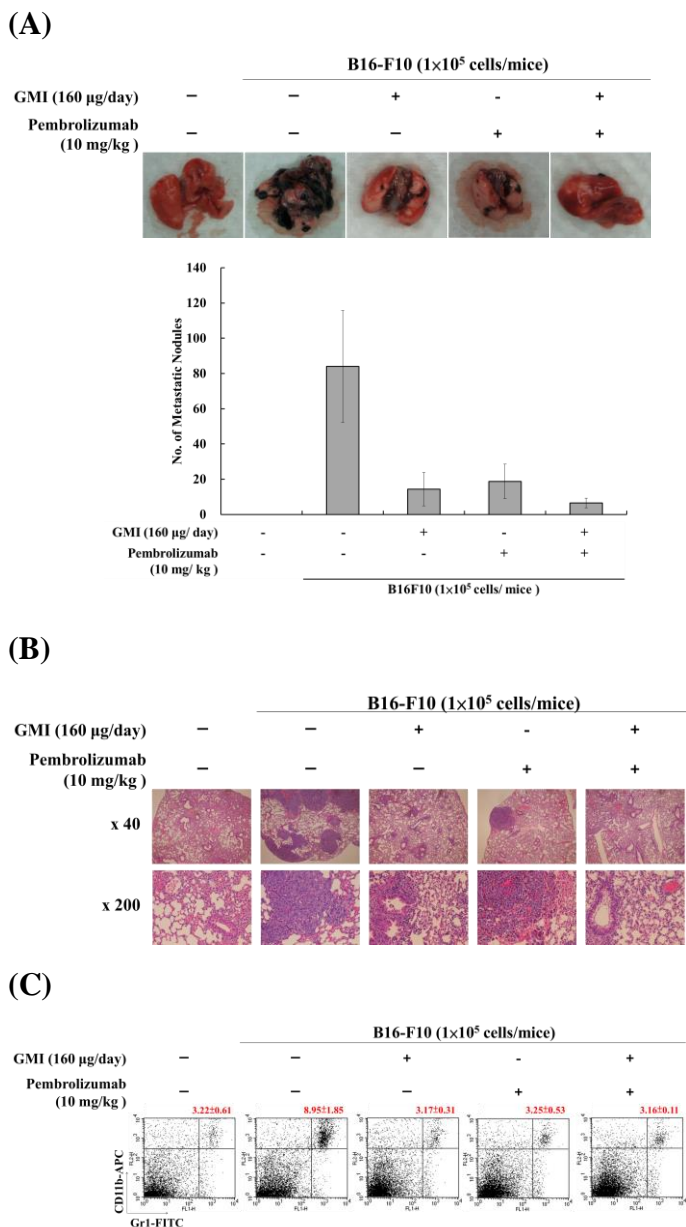
**Figure 2. Effects of GMI combined with Chidamide on percentage of viability in melanoma cells.** (A) A375.S2 ( $5 \times 10^3$  cells/well) and (B) B16F10 ( $3 \times 10^3$  cells/well) in 96-well plates were treated with various concentrations of Chidamide (0, 5, 10, 20 μM) combined with GMI (0, 0.6, 1.2 μM) for 24 and 48 h. To determine the cell viability was analyzed on CCK-8 assay. (C) Cell cycle distribution of A375.S2 cells treated Chidamide combined with GMI as examined by Flow cytometry. A375.S2 ( $5 \times 10^5$  cells/6 cm-dish) were treated with various concentration of Chidamide (0, 20 μM) combined with GMI (0, 0.6, 1.2 μM) for 24 h. (D) Effect of GMI and Chidamide on Annexin-V/Propidium iodide assay in A375.S2 cells. After GMI and Chidamide cotreatment for 24 h, A375.S2 cells ( $5 \times 10^5$  cells/6 cm-dish) were harvested and subjected to annexin V-FITC/propidium iodide staining and flow cytometry analysis. Annexin V-FITC positive (early apoptosis) and annexin V-FITC/PI positive (late apoptosis/necrosis) were quantified as apoptotic cells. The data are presented as mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.



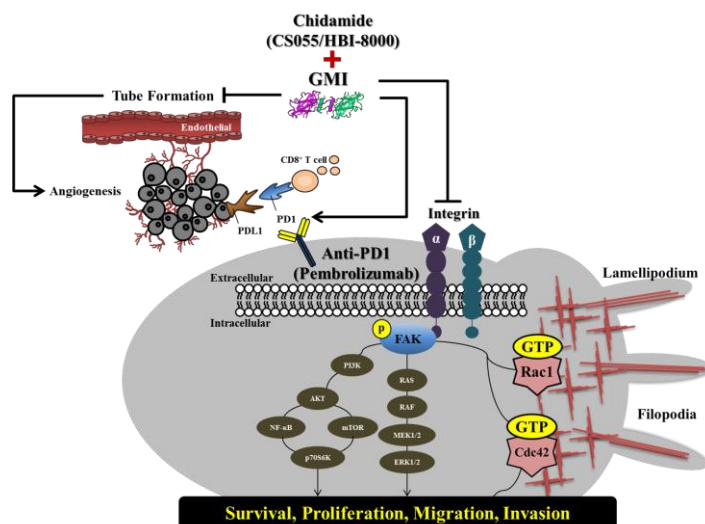
**Figure 3. Effects of GMI combined with Chidamide on Integrins/p-FAK signaling pathway in A375.S2 cells.** A375.S2 ( $5 \times 10^5$  cells/dish) in 6 cm-dish were co-treated with Chidamide (0, 20  $\mu\text{M}$ ) and GMI (0, 0.6, 1.2  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. (A) GMI and Chidamide dose- dependently inhibited integrin  $\alpha V$  and  $\beta 1$  expression. (B) GMI decreased the Cdc42 activity manifested by reducing the level of GTP-Cdc42 (C) GMI and Chidamide downregulates the expression of p-FAK, p-Rb, Survivin and promoted the expression of cleaved Caspase-7 and LC3-II expression.  $\beta$ -actin was a loading control.



**Figure 4. GMI combined with Chidamide inhibited tube formation on Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in vitro.** HUVECs ( $2.5 \times 10^5$  cells/dish) in 6 cm-dish were treated with various concentrations of GMI (0, 0.6, 1.2  $\mu\text{M}$ ) and Chidamide (0, 20  $\mu\text{M}$ ) in 6 cm-dish for 24 h. By using ibidi  $\mu$ -slides (15-well; ibidi), HUVECs ( $5.5 \times 10^3$  cells/well) were seeded in each well, coated with Matrigel<sup>®</sup> (BD). (A) To evaluate tubule formation and take photography by phase contrast microscope (Original magnification Upper  $\times 40$ ; Downer  $\times 100$ ) after 6 h. (B) Tube formation was analyzed by using ImageJ (NIH) software to quantitate covered area, total loops, total tube length and total branching points.



**Figure 5. GMI suppresses B16F10 melanoma cell lung metastasis in vivo.** B16F10 cells suspension (1×10<sup>5</sup> cells/100 µL) were injected via a tail vein into C57BL/6mice. Mice were treated as described in Materials and Methods Section. (A) Gross appearance of pulmonary metastasis clearly visible was shown in upper panel. To quantify the number of experimental lung metastases in all lung regions demonstrates in the lower panel. (B) Representative images of lung sections were evaluated by H&E stain. (C) GMI treatment reduced the levels of splenic CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSC.



**Figure 6. A suggested model of GMI suppresses metastasis in melanoma cells.** To summarize data in this study.

### 討論:

本實驗室先前研究證實，靈芝免疫調節蛋白具有免疫調節及抗癌功效[28-31]。為探討靈芝免疫調節蛋白於黑色素瘤之治療及應用的可行性，本計畫研究證實 GMI 具有抑制黑色素瘤細胞轉移(Figure 1.)及抑制血管新生(Figure 4.)。動物實驗證實(Figure 5.)GMI 能顯著抑制黑色素瘤細胞之遠端肺部轉移。

全世界每年花費在研發癌症新藥至少上千億美元，現今轉移性黑色素瘤的標靶免疫藥物，缺點為太過昂貴，而且有效期程太短，因此延長惡性黑色素瘤的存活率、抑制黑色素瘤的轉移、研發有效而副作用少的新穎合併治療藥物是目前方針，策略性地合併免疫治療與標靶治療對抗高侵襲、高轉移且高抗性之黑色素瘤是具有發展潛力的。本計畫期盼研發對轉移性黑色素瘤之優良藥物與策略，增加患者存活率，延長治療藥物之有效期程，與減低藥物副作用，減低藥費並以提升患者生活品質。在動物實驗證實(Figure 5.)，GMI 與單株抗體藥 Pembrolizumab 的遠端轉移抑制效果相似。綜合研究結果顯示(Figure 6.)，GMI 具有抑癌潛力並且可能是免疫標靶治療的最佳佐劑。

黑色素瘤的惡性度高，容易轉移而且致病因複雜，且常對單一治療失敗並快速地產生抗藥性。因此，應思索更有效的治療策略，例如合併



療法可同時打擊不同的標靶，以增加黑色素瘤的療效。腫瘤微環境可幫助我們瞭解腫瘤的各種免疫逃脫系統(Tumor escape from the immune system)，參與的包括有活化T細胞與骨髓(myeloid cells)的免疫檢查點接受器、釋放的細胞激素與代謝物[32]。腫瘤細胞會分泌具有功能性的分子，常透過誘發血管滲漏(vascular leakiness) [33]、促進招募促血管新生的免疫細胞 [34]、影響器官趨性(organotropism) [35]，形成建立適合癌細胞轉移的微環境 (pre-metastatic niche)，進而增加腫瘤轉移。

近年來，外泌素(Exosomes)被認為在腫瘤發展進程中扮演重要角色。2015年文獻指出新的癌症轉移分子機制，該研究團隊認為：癌症腫瘤轉移前會先釋放 Exosomes，藉由其表面所呈現的 Integrins 受體蛋白具有對不同器官組織具有不同的專一性親和力進入血液循環，即能將 Exosomes 運輸到特定的器官組織，導致腫瘤轉移 [36]。而本計畫研究結果顯示(Figure 3.)，GMI 可顯著降低 A375.S2 黑色素瘤細胞中 Integrin  $\alpha V$  及 Integrin  $\beta 1$  之表現。因此，將來我們可能可以更進一步探討：GMI 是否是透過影響黑色素瘤分泌 Exosomes 表面所呈現的 Integrins 受體蛋白，進而影響腫瘤轉移的能力。

雖然癌症治療方針日益進步，但在癌症腫瘤發展過程中，免疫逃避 (Immune evasion) 的影響為目前治療中所面臨的一大難題。由於腫瘤微環境(tumor microenvironment)常促使體內免疫細胞處於不活化狀態，使腫瘤內部傾向免疫抑制。癌症免疫療法是希望透過腫瘤細胞標靶的特異性，活化免疫細胞反應，以促進提升人體免疫力或強化免疫系統對癌細胞的辨識，進而改善癌症腫瘤免疫逃避 [37, 38]。因此，另一方面我們也可以利用靈芝免疫調節蛋白之調節免疫特性，探討靈芝免疫調節蛋白合併免疫治療是否會調控腫瘤微環境(調控 Th1/Th2/Th17/Treg 等)，活化免疫細胞反應，增強抗原呈現性，促進免疫系統對癌細胞的辨識，增強免疫細胞攻擊腫瘤，增強免疫治療效果。

#### 誌謝：

感謝科技部 MOST 104 - 2311 - B - 040 - 001 - 計劃提供研究經費。

#### 參考文獻

1. Wong, D.J. and A. Ribas, *Targeted Therapy for Melanoma*. Cancer Treat Res, 2016. **167**: p. 251-62.
2. Hu-Lieskovan, S., et al., *Combining targeted therapy with immunotherapy in BRAF-mutant melanoma: promise and challenges*. J Clin Oncol, 2014. **32**(21): p. 2248-54.
3. Mahoney, K.M., G.J. Freeman, and D.F. McDermott, *The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma*. Clin Ther, 2015. **37**(4): p. 764-82.
4. Barker, H.E., et al., *The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(7): p. 409-25.
5. Hassel, J.C., *Ipilimumab plus nivolumab for advanced melanoma*. Lancet Oncol, 2016.
6. Tsai, K.K. and A.I. Daud, *Nivolumab plus ipilimumab in the treatment of advanced melanoma*. J Hematol Oncol, 2015. **8**: p. 123.
7. Improta, G., et al., *New developments in the management of advanced melanoma - role of pembrolizumab*. Onco Targets Ther, 2015. **8**: p. 2535-43.
8. Hersey, P. and K. Gowrishankar, *Pembrolizumab joins the anti-PD-1 armamentarium in the treatment of melanoma*. Future Oncol, 2015. **11**(1): p. 133-40.
9. Ohaegbulam, K.C., et al., *Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway*. Trends Mol Med, 2015. **21**(1): p. 24-33.
10. Ott, P.A., F.S. Hodi, and C. Robert, *CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(19): p. 5300-9.
11. Hersey, P. and S. Gallagher, *A focus on*

- PD-L1 in human melanoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(3): p. 514-6.
12. Gajewski, T.F., H. Schreiber, and Y.X. Fu, *Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 1014-22.
  13. Ileana, E., S. Champiat, and J.C. Soria, *[Immune-checkpoints: the new anti-cancer immunotherapies]*. Bull Cancer, 2013. **100**(6): p. 601-10.
  14. Tsai, K.K. and A.I. Daud, *The Role of Anti-PD-1/PD-L1 Agents in Melanoma: Progress to Date*. Drugs, 2015. **75**(6): p. 563-75.
  15. Robert, C., et al., *Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **372**(26): p. 2521-32.
  16. Robert, C., et al., *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. N Engl J Med, 2015. **372**(4): p. 320-30.
  17. Wolchok, J.D., et al., *Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma*. N Engl J Med, 2013. **369**(2): p. 122-33.
  18. Tsai, K.K. and A.I. Daud, *Nivolumab plus ipilimumab in the treatment of advanced melanoma*. J Hematol Oncol, 2015. **8**(1): p. 123.
  19. Hamid, O., et al., *Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma*. N Engl J Med, 2013. **369**(2): p. 134-44.
  20. Robert, C., et al., *Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase I trial*. Lancet, 2014. **384**(9948): p. 1109-17.
  21. Chu, T.T., et al., *Study of potential cardioprotective effects of Ganoderma lucidum (Lingzhi): results of a controlled human intervention trial*. Br J Nutr, 2012. **107**(7): p. 1017-27.
  22. Gao, Y., et al., *Study of the extraction process and in vivo inhibitory effect of ganoderma triterpenes in oral mucosa cancer*. Molecules, 2011. **16**(7): p. 5315-32.
  23. Martinez-Montemayor, M.M., et al., *Ganoderma lucidum (Reishi) inhibits cancer cell growth and expression of key molecules in inflammatory breast cancer*. Nutr Cancer, 2011. **63**(7): p. 1085-94.
  24. Liao, C.H., et al., *Nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase and calcium signaling in repression of telomerase activity in human lung cancer cells by fungal immunomodulatory protein from Ganoderma tsugae*. Biochem Pharmacol, 2007. **74**(10): p. 1541-54.
  25. Liao, C.H., et al., *Transcriptionally mediated inhibition of telomerase of fungal immunomodulatory protein from Ganoderma tsugae in A549 human lung adenocarcinoma cell line*. Mol Carcinog, 2006. **45**(4): p. 220-9.
  26. Liao, C.H., et al., *Induction of premature senescence in human lung cancer by fungal immunomodulatory protein from Ganoderma tsugae*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**(5): p. 1851-9.
  27. Li, J.R., et al., *FIP-gts Potentiate Autophagic Cell Death Against Cisplatin-resistant Urothelial Cancer Cells*. Anticancer Res, 2014. **34**(6): p. 2973-83.
  28. Lin, C.H., et al., *GMI, a Ganoderma immunomodulatory protein, down-regulates tumor necrosis factor alpha-induced expression of matrix metalloproteinase 9 via NF-kappaB pathway in human alveolar epithelial A549 cells*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(22): p. 12014-21.
  29. Hsin, I.L., et al., *GMI, an immunomodulatory protein from Ganoderma microsporum, induces autophagy in non-small cell lung cancer cells*. Autophagy, 2011. **7**(8): p. 873-82.

30. Hsin, I.L., et al., *GMI, an Immunomodulatory Protein from Ganoderma microsporum, Potentiates Cisplatin-Induced Apoptosis via Autophagy in Lung Cancer Cells*. *Mol Pharm*, 2015. **12**(5): p. 1534-43.
31. Hsin, I.L., et al., *Inhibition of lysosome degradation on autophagosome formation and responses to GMI, an immunomodulatory protein from Ganoderma microsporum*. *Br J Pharmacol*, 2012. **167**(6): p. 1287-300.
32. Smyth, M.J., et al., *Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015.
33. Zhou, W., et al., *Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis*. *Cancer Cell*, 2014. **25**(4): p. 501-15.
34. Chang, Q., et al., *The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis*. *Neoplasia*, 2013. **15**(7): p. 848-62.
35. Lu, X. and Y. Kang, *Organotropism of breast cancer metastasis*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2007. **12**(2-3): p. 153-62.
36. Hoshino, A., et al., *Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis*. *Nature*, 2015. **527**(7578): p. 329-35.
37. Dulos, J., et al., *PD-1 blockade augments Th1 and Th17 and suppresses Th2 responses in peripheral blood from patients with prostate and advanced melanoma cancer*. *J Immunother*, 2012. **35**(2): p. 169-78.
38. Melero, I., et al., *Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(2): p. 95-106.

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/09/29

科技部補助計畫	計畫名稱: 靈芝免疫調節蛋白合併癌症免疫療法抑制黑色素瘤生成與抑制其轉移之作用機轉
	計畫主持人: 蕭玉屏
	計畫編號: 104-2311-B-040-001- 學門領域: 營養保健
無研發成果推廣資料	



104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：蕭玉屏			計畫編號：104-2311-B-040-001-				
計畫名稱：靈芝免疫調節蛋白合併癌症免疫療法抑制黑色素瘤生成與抑制其轉移之作用機轉							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		1	篇	撰寫中	
		研討會論文		0			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇	
			研討會論文		0		
			專書		0	本	
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他			0	篇			
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
其他		0					

	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	1		呂俊德
		博士後研究員	0		
		專任助理	1		侯婷譯
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

### 1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

### 2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以200字為限）

專利：撰寫中，預計申請。

涉及專利、其他智慧財產權、論文尚未發表者，二年後公開查詢。

### 3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

全世界每年花費在研發癌症新藥至少上千億美元，現今轉移性黑色素瘤的標靶免疫藥物，缺點為太過昂貴，而且有效期程太短，因此延長惡性黑色素瘤的存活率、抑制黑色素瘤的轉移、研發有效而副作用少的新穎合併治療藥物是目前方針，策略性地合併免疫治療與標靶治療對抗高侵襲、高轉移且高抗性之黑色素瘤是具有發展潛力的。本計畫期盼研發對轉移性黑色素瘤之優良藥物與策略，增加患者存活率，延長治療藥物之有效期程，與減低藥物副作用，減低藥費並以提升患者生活品質。為探討靈芝免疫調節蛋白於黑色素瘤之治療及應用的可行性，本計畫研究證實GMI具有抑制黑色素瘤細胞轉移及抑制血管新生。動物實驗證實GMI能顯著抑制黑色素瘤細胞之遠端肺部轉移且，GMI與單株抗體藥Pembrolizumab的遠端轉移抑制效果相似。綜合研究結果顯示，GMI具有抑癌潛力並且可能是免疫標靶治療的最佳佐劑。

### 4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否  是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否  是

說明：（以150字為限）

黑色素瘤惡性度高，且常對單一治療失敗並快速產生抗藥性。因此應思索更有效治療策略，如合併療法同時打擊不同標靶，增加治療效果。實驗證實GMI能顯著抑制黑色素瘤細胞之遠端肺部轉移，且GMI與Pembrolizumab的遠端轉移抑制效果相似。綜合結果顯示，GMI具有抑癌潛力並且可能是免疫標靶治療的最佳佐劑。