

計畫編號：DOH95-DC-1412

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

流感病毒群體研究—先天免疫力受體與
病毒交互作用、免疫分析技術平台、病
毒基因變異對宿主免疫反應之影響、原
始病毒疫苗模式之生產

研究報告

執行機構：國立陽明大學

計畫主持人：謝世良

協同主持人：王學偉、黃智生

研究人員：葉乃嘉、林銘裕、蘇珣涵、黃國展、

黃靖惠、王佳欣、王聖帆

執行期間：95年01月01日至95年12月31日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

封面

目錄

計畫總摘要.....	1
三個子計畫間的互動關係.....	3
計畫總目標.....	5
壹、第壹子計畫	
中文摘要	10
英文摘要	12
一、本文	
1、前言	14
2、材料與方法	14
3、結果	15
4、討論	16
5、結論與建議	17
6、計畫重要研究成果及具體建議	17
7、參考文獻	18
8、圖	
圖一、融合蛋白鑑定-1	19
圖二、融合蛋白鑑定-2	19
圖三、融合蛋白鑑定-3	20
圖四、融合蛋白鑑定-4	20
9、表	
表一、各個先天免疫受體與 C 型凝集素引子 (primer) 及 PCR 反應條件.....	21
貳、第貳子計畫	
中文摘要	23
英文摘要	25
一、本文	
1、前言	26
2、材料與方法	28
3、結果	29
4、討論	30
5、結論與建議	30

6、計畫重要研究成果及具體建議	31
7、參考文獻	32
8、圖	
圖一、健康的支氣管上皮細胞在體外培養可分化成具有纖毛之 上皮細胞	33
圖二、培養中之不死型小呼吸道 (small airway) 上皮細胞株.....	33
圖三、以 Plaque assay 測定感染力及定病毒效價(titer).....	34
參、第參子計畫	
中文摘要	35
英文摘要	37
一、本文	
1、前言	38
2、材料與方法	40
3、結果	42
4、討論	44
5、結論與建議	45
6、計畫重要研究成果及具體建議	45
7、參考文獻	46
8、圖	
圖一、Flow chart for cloning of HLA-DRA1*0101/DRB1*0080302 or HLA-DRA1*0101/DRB1*0080302 into pAcUW51 vector... 48	48
9、表	
表一、Phenotype and allele frequency of HLA-DRB1* among Taiwan Minnan population (1995-2005)	49
肆、附件	
一、審查委員意見.....	50
二、審查委員意見回覆.....	53

計畫總摘要：

關鍵詞：先天免疫力，適應性免疫機制，流行性感冒病毒

流行性感冒是一種在全球公共衛生學中，極具重要性的疾病。藉由呼吸道進入人體之後，流感病毒會吸附到呼吸道黏膜上並在此處感染黏膜細胞。病毒一開始會被不具專一性的先天免疫力機制(innate immune mechanism)所偵測到並加以破壞。如果流感病毒逃過這些早期的防禦機制，它們仍然就會被具有專一性的適應性免疫機制(adaptive immune mechanism)所偵測並加以消滅。不過，根據文獻表示，流感病毒的基因的變異與宿主先天遺傳的本質決定了宿主被病毒感染後的免疫能力。因此雖然宿主細胞產生抗體是靠辨識流感病毒的紅血球凝聚素(hemagglutinin)以及神經胺酸酶(neuraminidase)，但是由於流感病毒的抗原微變(antigenic drift)十分快速，使得宿主之前存在的抗體無法辨識新突變的病毒而一再的被感染。經由文獻上的報導，目前已經知道流感病毒的致病性決定於病毒本身基因序列的變異，但是實際的機制至今還不明朗。除此之外，流感病毒的紅血球凝聚素(hemagglutinin)以及神經胺酸酶(neuraminidase)的抗原微變(antigenic drift)迅速，使得由傳統方式生產的流感疫苗很難符合目前全球疾病的需求。因此，本計畫主要的目的是 1) 建立一個免疫學分析技術平台，用來鑑定專一辨識流感病毒顆粒的先天免疫系統受體，並且建立一個高效率的細胞激素

(cytokine)分析系統用來觀測宿主細胞對病毒顆粒的免疫反應; 2) 我們將建立一個不死型 (immortalized) 的支氣管上皮細胞株，並基於這個上皮細胞株建立流感病毒感染平台，用來觀測宿主細胞對病毒顆粒的免疫反應。配合其他高通量基因體學方面的工具，如蛋白質晶片或細胞激素陣列; 3) 我們將針對禽流感病毒常見的CD4 T細胞可以認識的病毒抗原片段，並依據國人常見的第二型白血球組織抗原 (HLA-DR) 研發人類第二型白血球組織抗原四聚體試劑，用來評估禽流感疫苗在施打後刺激專一CD4 T細胞產生的功效。這將有益於瞭解病毒的致病機轉, 並疫苗的有效性。

三個子計畫間的互動關係

急性感冒病毒造成的死亡與病人肺部嚴重發炎，造成換氣功能的降低，而引起急性呼吸衰竭息息相關。但為何病毒感染會引發細胞激素風暴(cytokine storm)，其機制(mechanism)仍然未知。而不同的病毒感染人類肺部上皮細胞的能力及引起發炎反應的能力，目前卻無適當的技術平台加以評估。此外，目前國家疫苗中心準備製造感冒疫苗，因此評估接受疫苗注射後人體的細胞及體液免疫反應 (cellular and humoral immunity)是刻不容緩的議題。為了解決上述的3大課題，我們3個實驗室攜手合作，發展相關技術平台，以研究宿主對流感病毒及疫苗的反應。

近來的研究知道，宿主的抗原呈獻細胞(如樹突狀細胞及巨噬細胞)上表現許多先天免疫受體 如 Toll-like receptor (TLR)、凝集素受體 (lectin receptor) 、TREM 受體等，會與病原菌及病毒結合，並引起發炎反應，因此子計畫1的目的乃將這些受體以基因重組技術及RT-PCR放大cDNA片斷並與IgG.Fc結合，形成基因重組蛋白。這些蛋白可當成探針，利用ELISA及免疫沈澱的方式以決定流感病毒究竟是透過何種受體引起發炎反應。一旦鑑定出受體,將來就能經由阻斷病毒刺激受體引起發炎反應。此外要研究不同來源的病毒對肺部上皮細胞有何不同的感染力，就必須建立不死型的人類肺部上皮細胞，建立體外感染模式，如此就可提供一

個有力的技術平台以評估病毒的毒性及感染力。此外，可將病毒與不死型的人類肺部上皮與巨噬細胞共同培養，引起發炎反應，以顯示在體內發炎的狀況。此時再將先天免疫受體的基因重組蛋白加入，可測試何者可阻斷發炎反應，就可知道病毒究竟透過哪一個受體以激發 cytokine 的釋放。有關疫苗的細胞反應，目前最可靠的是 MHC tetramer，由於市面上的 MHC tetramer 都是西方人種並非台灣人種的 MHC tetramer，因此第三子計畫的目的即在於製造台灣人最主要基因型的 MHC tetramer，而主持人黃博士是此方面的專家，也是國內唯一(或極少數)具有合成 MHC tetramer 的專家。這些 tetramer 將來不只可用於流感病毒的研究，也可以用來研究宿主對其他病毒及病原菌的細胞性免疫反應。因此建立技術對國內疫苗製劑的評估非常重要。

計畫總目標

第壹子計畫

- 1) 建立一個先天免疫受體和流感病毒中 HA 及 NA 的受體結合實驗(receptor binding assay), 以尋找與 HA 結合之 NKC 或 LRC 上的先天免疫受體。
- 2) 產生兩個基因重組 HA1.Fc 融合蛋白用來檢測對樹突細胞(DCs)以及巨噬細胞(macrophages)刺激的影響, 並且去調控其功能。
- 3) 利用細胞激素微陣列(cytokine array)去檢測受到流感病毒感染的病人肺部上層細胞或是用氣管灌洗法(bronchial lavage)採集的檢體中細胞激素(cytokine)的量。

第貳子計畫

- 1) 將人類的端粒酶 (telomerase) 選殖 (clone) 進入反轉錄病毒載體, 並將端粒酶利用反轉錄病毒載體送入初代培養支氣管上皮細胞, 開始建立不死型的支氣管上皮細胞株。
- 2) 選殖不死型的支氣管上皮細胞株, 鑑定其特性, 並以不同的人類流感病毒株感染所建立的不死型上皮細胞株, 以追蹤病毒在細胞內的複製情況及感染細胞的存活情形。
- 3) 分析各病毒基因對上皮細胞的影響, 包括細胞激素分泌型態。

第參子計畫

- 1) 建立人類第二型白血球組織抗原四聚體的技術平台，並製造一些以國人常見的^{*}第二型白血球組織抗原 (HLA-DRB109012^{*}, HLA-DRB15011^{*}, HLA-DRB12021^{*}) 所構築的人類第二型白血球組織抗原四聚體。
- 2) 篩檢可被國人常見第二型白血球組織抗原所表現的且可被 CD4 T 細胞所辨認的一般流感病毒之 HA (hemagglutinin) 抗原決定位點 (CD4 T epitopes) 。
- 3) 製造並應用人類第二型白血球組織抗原四聚體試劑結合上可被 CD4 T 細胞所辨認的一般流感病毒之 HA (hemagglutinin) 抗原決定位點，來進行已接種流感疫苗之志願者其免疫系統反應之評估。

1. 各年度預計達成目標

壹

第一年(2006) 達成目標：

- 1) 構築 NKC 以及 LRC 之基因的細胞外區域植株

- ◆ NKC： NKG2D and other 10 C-type lectin receptors.

- ◆ NKC Proximity： AICL， NKR-P1， *MAFA-L*， *KLRF-1*， *DCIR*

第二年(2007)達成目標：

- 1) 建立改良酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)以偵測病毒顆粒，NA，HA 以及先天免疫力受-Fc 融合蛋白質之相互作用。
- 2) 建立單核球與樹突細胞(DCs)之體外感染系統。

第三年(2008)達成目標：

- 1) 利用中和試驗(neutralization assay)來決定抗 HA，抗 M 以及抗 NP 抗體的量以評估 B 細胞對原型疫苗(prototype vaccine)之反應。
- 2) 尋找與 HA 結合之 NKC 或 LRC 上的先天免疫受體。

貳

第一年(2006) 達成目標：

1. 將人類的端粒酶 (telomerase) 選殖 (clone) 進入反轉錄病毒載體；
2. 分離健康的支氣管上皮細胞，鑑定其特性，並加以培養；
3. 將端粒酶利用反轉錄病毒載體送入初代培養支氣管上皮細胞，開始建立不死型的支氣管上皮細胞株。

第二年(2007) 達成目標：

1. 選殖不死型的支氣管上皮細胞株；
2. 鑑定不死型上皮細胞株的特性，包括端粒酶活性與分化成纖毛上皮細胞的能力；
3. 開始以人類流感病毒株感染所建立的不死型上皮細胞株以及初代上

皮細胞。

第三年(2008) 達成目標：

1. 以不同的人類流感病毒株感染所建立的不死型上皮細胞株及初代上皮細胞；
2. 追蹤不同的病毒株在細胞內的複製情況，以及感染細胞的存活情形；
3. 偵測細胞激素分泌型態，分析病毒對不死型上皮細胞株及初代上皮細胞的影響，以知道所建立的不死型上皮細胞株與初代上皮細胞的異同。

參

第一年(2006) 達成目標：

- ◆ 建立一個技術平台將第二型白血球組織抗原 (HLA-DRB109012*, HLA-DRB15011*, HLA-DRB12021*) 做成人類第二型白血球組織抗原四聚體試劑 (class II MHC tetramer) 。

第二年(2007)達成目標：

- ◆ 篩選可被國人常見第二型白血球組織抗原(HLA-DRB109012*, HLA-DRB15011*, HLA-DRB12021*) 所表現的且可被CD4 T細胞所辨認的一般流感病毒 (H1, H3 strains) 之 HA (hemagglutinin) 抗原決定位點(CD4 T epitopes) 。

第三年(2008)達成目標：

- ◆ 以第二年所發現的一般流感病毒 (H1, H3 strains) 之 HA (hemagglutinin) 抗原決定位點合成胜肽，製造可以辨識流感病毒 HA 的專一性 CD4 T 細胞之人類第二型白血球組織抗原四聚體試劑。
- ◆ 使用人類第二型白血球組織抗原四聚體試劑來評估已打過流感疫苗的國內志願者，比較施打前後專一性 CD4 T 細胞在周邊血液中共存的頻率是否增加。

壹、第壹子計畫

中文摘要：

流行性感冒是一種在全球公共衛生學中，極具重要性的疾病。藉由呼吸道進入人體之後，流感病毒會吸附到呼吸道黏膜上並在此處感染黏膜細胞。病毒一開始會被不具專一性的先天免疫力機制(innate immune mechanism)所偵測到並加以破壞。如果流感病毒逃過這些早期的防禦機制，它們仍然就會被具有專一性的適應性免疫機制(adaptive immune mechanism)所偵測並加以消滅。不過，根據文獻表示，流感病毒的基因的變異與宿主先天遺傳的本質決定了宿主被病毒感染後的免疫能力。因此雖然宿主細胞產生抗體是靠辨識流感病毒的紅血球凝聚素(hemagglutinin)以及神經胺酸酶(neuraminidase)，但是由於流感病毒的抗原微變(antigenic drift)十分快速，使得宿主之前存在的抗體無法辨識新突變的病毒而一再的被感染。經由文獻上的報導，目前已經知道流感病毒的致病性決定於病毒本身基因序列的變異，但是實際的機制至今還不明朗。除此之外，流感病毒的紅血球凝聚素(hemagglutinin)以及神經胺酸酶(neuraminidase)的抗原微變(antigenic drift)迅速，使得由傳統方式生產的流感疫苗很難符合目前全球疾病的需求。因此，本計畫主要的目的是建立一個免疫學分析技術平台，用來鑑定專一辨識流感病毒顆粒的先天免疫系統受體，並且建立一個高效率的細胞激素(cytokine)分析系統用來觀測宿主細胞對病毒顆粒的免疫反應。目前我們已

經得到的 25 個先天免疫受體融合蛋白，初步已經用傳統方式來偵測先天免疫受體與流感病毒的交互作用，預計明年可以建立改良式的篩檢平台，快速鑑定流感與先天免疫受體之間的結合情形。

Abstract

Influenza virus causes worldwide epidemics and is an important issue in public health. Entering human via respiratory tract, influenza virus will bind epithelial cells and infect the cells locally. Influenza virus can be sensed and destroyed by non-specific innate immune mechanism during early times. If the virus managed to escape these early defense mechanisms, they may still be sensed and eventually destroyed by specific adaptive immune mechanism. However, according to literatures, the genetic variation and host genetic material can decide the immune response to influenza infection. Due to rapid antigenic drift, although host cells produce antibodies that recognize hemagglutinin and neuraminidase of influenza virus, the antibodies produced is not capable of recognizing the “new mutant”, resulting repeatedly infection. Through reported literatures, it is known that the pathogenicity of influenza virus is determined by the genomic sequence variation. Despite this, the actual mechanism is still vague. In addition, the rapid antigenic drift of influenza virus hemagglutinin and neuraminidase make it very difficult to produce influenza vaccine that is able to fulfill the need of current global epidemic. Thus, the aim of this project is to establish an immune screening platform to identify innate immunity receptor that is able to recognize influenza virus particle, and establish a highly efficient cell cytokine analysis system to observe host cell immune response to virus particle. We have obtained 25 innate immunity fusion protein so far, and preliminary tested innate immunity receptor interaction to influenza virus. We expect to establish improved screening platform to rapidly identify innate immunity receptor

interaction with influenza virus in the coming year.

一、本文

1、前言

流行性感冒病毒是一種高接觸傳染並且會引發急性呼吸道的疾病。在二十世紀發生的多次流行性感冒，分別由 H1N1(1918), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2) 1977 (H1N1)以及 1997(H5N1) 等病毒所引起。根據文獻記載,在這些二十世紀發生的流感當中，以 1918 年爆發的“西班牙流型感冒”(Spanish influenza) 最為嚴重。1997 年,在受到 A 型禽流感病毒感染 18 人當中，有 6 個人死亡，並且證實是直接由已感染的鳥類傳染給人。至今，我們仍未明瞭這些病毒是透過何種機制造成感染者的死亡。

流感病毒的抗體是藉由辨識病毒的紅血球凝聚素(hemagglutinin, HA)以及神經胺酸酶(neuraminidase, NA)上的抗原決定素中和(neutralize)病毒，不過病毒頻繁的抗原微變(antigenic drift) 使得宿主之前存在的抗體無法有效防止新突變的病毒感染。紅血球凝聚素會與宿主細胞的唾液酸(sialic acid)受體結合以便於病毒穿透細胞膜進而進入細胞中。NA 的酵素活性對於移除 HA, NA 以及細胞膜上糖蛋白的唾液酸(sialic acid)扮演著很重要的角色。除此之外，NA 能讓病毒穿透呼吸道的黏膜層。雖然病毒進入宿主的過程已經被透徹研究，但是流感病毒如何被宿主細胞上的受體辨識以及病毒如何感染細胞則尚不清楚。然而，從流感病毒感染到出現致病性症狀之間的潛伏期十分短，顯示著先天免疫力機制或是預成同源辨識成份(preformed cognate recognition components) 是很重要的。由於殺手細胞(NK cell)負責在感染初期辨識病毒以及受病毒感染的細胞，而細胞本身帶有許多先天免疫力受體，因此我們試圖找出辨識流感病毒位於自然殺手複合體(natural killer complex, NKC)以及白血球受器複合體 (leukocyte receptor complex, LRC)的先天免疫力受體，病毒實驗將在陽明大學既有的第二級生物安全實驗室 (P2 lab) 進行。

2、材料與方法

(1).首先我們根據HUGO (The human genome organisation)

Gene Nomenclature Committee (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>) 的命名，找出表現在先天免疫細胞的受體與C型凝集素。將這些C型凝集素與其他先天免疫細胞受體氨基酸序列送到SMART (simple molecule architecture research tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 去分析這些凝集素的穿越細胞膜區段(transmembrane domain)，設計核酸引子(表一)將細胞膜外區段(extracellular domain)以PCR的方式增殖出來。PCR所用的模版是利用RT-PCR的方法從各種免疫細胞反轉錄得到的cDNA。

(2). 利用重組DNA的技術將這些先天免疫受體與C型凝集素的細胞膜外區段與human IgG1 Fc_{mut} (Fc_{mut}不會與Fc receptor結合) 結合在一起，限制酵素購自New England BioLabs (NEB), Promega Co.。之後以真核細胞293 FreeStyle™系統表現重組蛋白，將質體DNA與293fectin™混合於Opti-MEM^R (Invitrogen, 31985-062) 並靜置於室溫20~30分鐘後，加入具有293-F細胞的FreeStyle™ 293 expression medium (Invitrogen, 12338-018) 中，置於37 ± 8 % CO₂細胞培養箱中培養48小時，以1,500rpm將細胞離下，收集上清液，進行蛋白質純化。因為所表現之蛋白質皆含有人類G1型免疫球蛋白Fc部分，可以A蛋白洋菜膠粒(protein A sepharose beads, Pharmacia Co.) 進行純化，protein A beads之準備參照廠商說明。以蛋白質分析套組作定量(DC protein assay, Bio-Rad Co.)，並以西方墨點轉印法偵測生產的融合蛋白。

3、結果

產生可溶性先天免疫融合蛋白

我們針對各個先天免疫受體的細胞膜外區段 (extracellular domain) 設計核酸引子, 並以 PCR 的方式從 cDNA 將凝集素基因的細胞膜外區段增殖出來, 接下來將增殖出來的 DNA 片段利用 TA cloning kits 轉接到 yT&A 質體上, 由於 DNA 片段接到 yT&A 質體上之後有正向與反向的兩種可能, 所以必須先確定其方向之後, 挑選 DNA 片段方向正確的 clone 進行去氧核糖核酸定序, 再以合適之限制酶將凝集素的細胞膜外區段的 DNA 片段從 yT&A 質體上切下來, 並以 DNA T4 ligase 將以限制酶修飾過的 DNA 片段連接到以合適限制酶修飾過的 pcDNA3/hIgG1-mutant 或 pSecTag2C/hIgG1-mutant 表現質體上。當我們將先天免疫受體的細胞膜外區段轉接到表現質體後, 便利用 293 FreeStyle™ 系統表現 Fc_{mut} 凝集素融合蛋白質。因為這些 Fc_{mut} 凝集素融合蛋白質為可溶性蛋白質, 且會分泌到細胞培養液中, 所以我們可以收集含有 Fc_{mut} 凝集素融合蛋白質的細胞培養液, 並利用人類免疫球蛋白的 Fc 部分與 A 蛋白 (protein A) 具有高親和力的特性, 以 A 蛋白洋菜膠小球 (protein A sepharose beads) 管柱將 Fc_{mut} 凝集素融合蛋白從細胞培養液中純化分離出來, 並且利用西方墨點法鑑定所純化出來的 Fc_{mut} 凝集素融合蛋白 (圖一至圖四)。目前我們已經利用這樣的方式表現了 25 種 Fc_{mut} 凝集素融合蛋白。

4、討論

雖然期中曾經遇上幾個蛋白質表達不順利的情形, 但之後都克服了技術層面上的問題, 目前得到的 25 個先天免疫受體融合蛋白, 初步已經用傳統方式來偵測先天免疫受體與流感病毒的交互作用, 預計明年可以建立改良式的篩檢平台, 快速鑑定流感與先天免疫受體之間的結合情

形。

5、結論與建議

急性流感病毒感染造成的發炎反應常導致肺部器官的暫時性功能衰竭，目前並無有效的治療方法以降低發炎反應卻又不影響病人對抗流感病毒的免疫應，故只能以支持性療法及呼吸器維持病人生命。不但成本浩大，醫療資源也無法應付病毒大流行時暴增的病患，因而造成大量的死亡率。建立改良式的篩檢平台，可以快速鑑定流感與先天免疫受體之間的結合情形，從而發展阻斷急性流感病毒感染造成的發炎反應，以拯救病患生命。期望政府單位能給予長期研究經費以達到此長期目標。

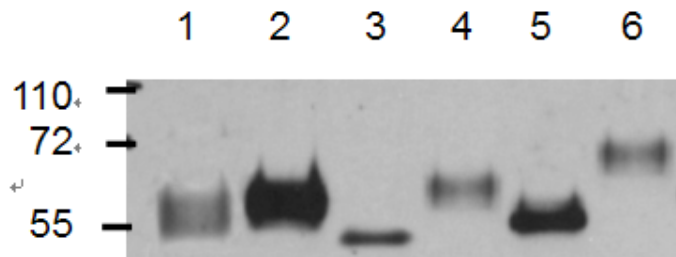
6、計畫重要研究成果及具體建議

目前已利用基因重組技術製造出 25 個先天免疫受體融合蛋白，並已經用傳統方式來偵測先天免疫受體與流感病毒的交互作用，預計明年可以建立改良式的篩檢平台，快速鑑定流感與先天免疫受體之間的結合情形。若能增加經費，則可爭增加先天免疫受體融合蛋白的數目，使本技術能含括 95% 以上的先天免疫受體融合蛋白(約 50 個)，如此則可能了解人類基因套組 (human genome) 所製造的先天免疫受體在流感病毒感染中的角色。

7、參考文獻：

- (1).Tran, T. H., Nguyen, T. L., Nguyen, T. D., Luong, T. S., Pham, P. M., Nguyen, V. C., Pham, T. S., Vo, C. D., Le, T. Q., Ngo, T. T., Dao, B. K., Le, P. P., Nguyen, T. T., Hoang, T. L., Cao, V. T., Le, T. G., Nguyen, D. T., Le, H. N., Nguyen, K. T., Le, H. S., Le, V. T., Christiane, D., Tran, T. T., Menno de, J., Schultsz, C., Cheng, P., Lim, W., Horby, P., and Farrar, J. (2004) *N Engl J Med* **350**(12), 1179-1188
- (2).Uiprasertkul, M., Puthavathana, P., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Srisook, K., Peiris, M., Nicholls, J. M., Chokephaibulkit, K., Vanprapar, N., and Auewarakul, P. (2005) *Emerg Infect Dis* **11**(7), 1036-1041
- (3). Kash, J. C., Basler, C. F., Garcia-Sastre, A., Carter, V., Billharz, R., Swayne, D. E., Przygodzki, R. M., Taubenberger, J. K., Katze, M. G., and Tumpey, T. M. (2004) *J Virol* **78**(17), 9499-9511
- (4). Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., and Klenk, H. D. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13), 4620-4624
- (5). Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., and Klenk, H. D. (2004) *J Virol* **78**(22), 12665-12667
- (6). Lee CW, and Suarez DL. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination. (2005) *Anim Health Res Rev.* ,**6**(1):1-15.
- (7). Couch RB. Advances in influenza virus vaccine research. (1993) *Ann N Y Acad Sci.* **685**:803-12.

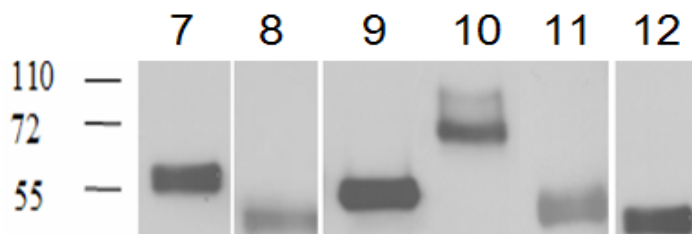
8、圖



圖一、融合蛋白鑑定-1

Lane	1	2	3	4	5	6
Fc fusion protein	AICL	BDCA-2	BIMLEC	CLEC-1	CLEC-6	NKp44
分子量 (KD)	56	57	54	60	55	69

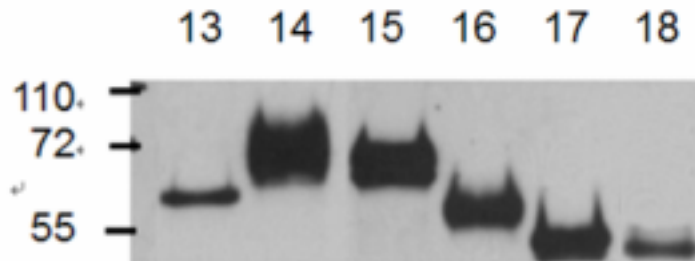
目前所有 25 個先天免疫受體已可表現，由號碼 1-6 分別依序為 AICL.Fc, BDCA-2.Fc, BIMLEC.Fc, CLEC1.Fc, CLEC-6.Fc 以及 NKp44.Fc 的融合蛋白。



圖二、融合蛋白鑑定-2

Lane	7	8	9	10	11	12
Fc fusion protein	TREM1	TREM2	TLT1	TLT2	NKG2D	CLEC-2
分子量 (KD)	56	51	55	63	54	52

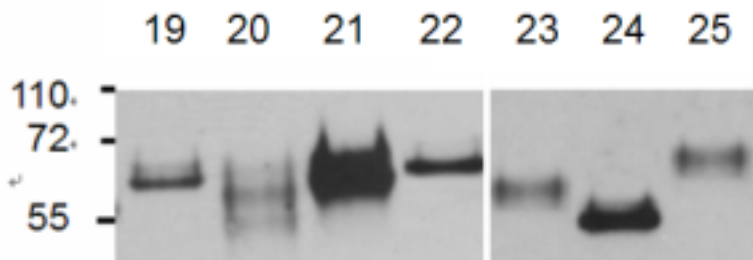
號碼 7-12 分別依序為 TREM1.Fc, TREM2.Fc, TLT1.Fc, TLT2.Fc, NKG2D.Fc 以及 CLEC2.Fc 的融合蛋白。



圖三、融合蛋白鑑定-3

Lane	13	14	15	16	17	18
Fc fusion protein	DCIR	DC-SIGN	DC-SIGNR	Detin-1	Detin-2	NKp30
分子量 (KD)	61	72	69	56	52	50

號碼 13-18 分別依序為 DCIR.Fc, DC-SIGN.Fc, DC-SIGNR.Fc, Dectin-1.Fc, Dectin-2.Fc 以及 NKp30.Fc 的融合蛋白。



圖四、融合蛋白鑑定-4

Lane	19	20	21	22	23	24	25
Fc fusion protein	NKp46	MAFAL	MDL-1	MINCLE	KLRF-1	NKR-P1	FDF03
分子量 (KD)	68	63	68	68	60	55	68

號碼 19-25 分別依序為 NKp46.Fc, MAFAL.Fc, MDL1.Fc, MINCLE.Fc, KLRF-1.Fc, NKR-P1.Fc 以及 FDF03.Fc 的融合蛋白。

9、表

表一、各個先天免疫受體與 C 型凝集素引子 (primer) 及 PCR 反應條件

Innate immunity receptor	sense primer /antisense primer
AICL	5'-GGATCCTCTCAGAGTTTATGCCCC-3'/ 5'-GGATCCCCCATTATCTTAGACAT-3''
BDCA-2	5'-GGATCCTTTATGTATAGCAAACTGTCAAG-3'/ 5'-GAATTCTTATATGTAGATCTTCTTCATCTT-3'
BIMLEC	5'-GGATCCTCATGCTCCGGGCCGCG -3'/ 5'-GAATTCGCTAGCAATCACCAATGCTGA-3'
CLEC-1	5'-GAATCCTTTTCAGTACTACCAGCTCTCC-3'/ 5'-GAATTCTCAGTCACCTTCGCCTAATGT-3'
CLEC-6	5'-GAATCCCATCACAACTTTTCACGCTGT-3'/ 5'-GAATTCCTAGTTCAATGTTGTTCCAGG-3'
NKp44	5'-CCCCTGGACTCCCCGCGA-3'/ 5'-AGGGGGTCTGTGTGGAGGCAGAG-3'
TREM1	5'-GAAGGATGAGGA AAGACCAGGC-3'/ 5'-CATCGGCAGTTGACTTGGGTG-3'
TREM2	5'-AGGGTGGCATGGAGCCTCTC-3'/ 5'GAATTCACATGGGCATCCTCGAA-3'
TLT1	5'-CAGCCATGGGCCTCACCTG-3'/ 5'-GAATCCTGGCTGGGTTGCAAAGGG-3'
TLT2	5'-GAACCATGGCCCCAGCCTTC-3 5'-GAATCCTGGTGCCTGATGGAGGGC-3'
NKG2D	5'- GGAGTGCTGTATTCCTAAAC-3'/ 5'-GTTTAGGAATACAGCACTCC-3'
CLEC-2	5'-GGATCCCTGGGGATTTGGTCTGTC-3'/ 5'-GAATTCCTAAGGTAGTTGGTCCAC-3'
DCIR	5' -GGATCCTTTCAAAAATATTCTCAGCTTCTT-3'/ 5' -GAATTCTCATAAGTGGATCTTCATCATC-3'
DC-SIGN	5'-GGATCCAAGGTCCCCAGCTCCATAAG-3'/ 5'-GAATTCCTACGCAGGAGGGGGGT-3'
DC-SIGNR	5'-GGATCCTCCAAGGTCCCCAGCTCC-3'/ 5'-GAATTCCTATTCGTCTCTGAAGCAGG-3
Dectin-1	5'-GGATCCACCATGGCTATTTGGAGATCC-3'/

	5'-GAATTCCTTACATTGAAAACCTTCTTCTCACA-3'
Dectin-2	5'-GGATCCACATATGGTGAAACTGGC-3'/ 5'-GAATTCATCAGTCGATGGGC-3'
NKp30	5'-CAACTGGGACATCTTCCGACATG-3'/ 5'-CCCTAGCTGAGGATGTTCTTTCTCC-3
NKp46	5'-ACACTGGATCCATGTCTTCCACACTCCCT-3'/ 5'-ATACGAATTCTGTCCCTCGGTGGGCT-3'
MAFA-L	5'-GGATCCTGCCAGGGCTCCAACT-3'/ 5'-ATGACAGATCTGAGGGTCA-3
MDL-1	5'-AGATCTAGTAACGATGGTTTTACCAC-3' 5'-GAATTCCTGTGATCATTGGCATTCTT -3'
MINCLE	5'-GAAGATCTACATTTTCGCATCTTTCAAACC-3' 5'-GCGGTTAAAGAGATTTTCCTTTGTTCA-3'
KLRF-1	5'-GGATCCGTTTCTCAGGGAGTATTG-3' 5'-GAATTCACTCTAATACTGACAAATCCA-3'
NKR-P1	5'-GGATCCTGCAGTGTGGACATTCAA-3' 5'-GAATTCTCAAGAGTCAGGATACAC-3'
FDF 03	5'- AATAAGGATCCCCATGGGTCGGCCCCT-3'/ 5'-CACTCGAATTCTGAGCGTCGTTTGCCTGT-3'

貳、第貳子計畫

中文摘要：

目前已知禽流感病毒主要侵犯人體的氣管、肺部和小腸的上皮細胞。禽流感病毒在這些宿主細胞建立複製以產生更多後代，並造成宿主細胞病變死亡。禽流感病毒造成病人死亡的一個可能機制，在於人體內免疫系統辨識入侵的病毒或是受感染的宿主細胞後過度反應，造成某些細胞激素的過度分泌，形成免疫風暴破壞體內細胞，最後導致病人死亡。另外，禽流感病毒本身的毒性也可能較強，直接影響受感染的宿主細胞的基因表現和細胞激素分泌，造成宿主細胞病變死亡，進而影響人體免疫系統。病毒學家利用細胞培養系統來研究病毒的複製和致病機制。目前廣泛應用的癌化上皮細胞株，其基因表現和分化狀態和真實的體內健康上皮細胞已經相差太遠，利用它們得到的資訊並不是最合適的。在這個計畫裡我們申請經費和人力的支持來建立不死型的支氣管上皮細胞株，並基於這個平台，研究病毒感染後宿主細胞的變化，包括宿主細胞死亡的情形和細胞激素分泌型態的改變。今年我們成功選殖人類的端粒酶進入反轉錄病毒載體，並成功得到並培養健康的支氣管上皮細胞，開始建立不死型的支氣管上皮細胞株。另外，為加速計畫執行進度，故經由國際合作管道，獲得表現端粒酶的不死型的小呼吸道 (small

airway) 上皮細胞株。我們並增殖並定量國內 A 型流感病毒株 H1N1, H3N2 及 B 型流感病毒株, 建立病毒庫存, 以利下年度計畫執行。

中文關鍵詞(至少三個)：禽流感，不死型上皮細胞株，細胞激素

Abstract:

It is known that bird flu virus can infect human lung and intestine epithelial cells. Infected host cells are killed by cytokines released from over-activated immune system. Besides, the virulence of bird flu virus may be stronger than that of human flu viruses so that infected cells will be killed by virus itself. The gene expression pattern and cytokine secretion pattern in infected cells may be different from those of non-infected cells, and those changes eventually cause cell death and immune attack. Virologists use cancer cell line to study virus replication and pathogenesis. However, those cancer cell lines are not the best ones for this purpose. In this 3-year project we aim to establish a human immortalized epithelial cell line and use it to study the pathogenesis of bird flu virus, including the cytokine profile change after virus infection. In this year we have cloned human telomerase and started to establish an immortalized human bronchial epithelial cell line. To facilitate our research, we also obtained an immortalized human small airway epithelial cell line from our collaborator in the USA. We have also amplified local type A human flu viruses (H1N1 & H3N2) and type B flu virus to make a central stock, which will be used in next year.

Keyword: bird flu, immortalized epithelial cell, cytokine

一、本文

1、前言

禽類流行性感冒(以下簡稱禽流感)本屬於鳥類的疾病，但是最近幾年發生禽流感病毒（包括病毒株 H5N1, H9N2, H7N7）感染人類並致死的病例，使得我們開始擔心禽流感病毒大流行的可能性。基於病理解剖的病例報告，目前已知禽流感病毒主要侵犯人體的氣管、肺部和小腸的上皮細胞 (1,2)。禽流感病毒在這些宿主細胞建立複製以產生更多後代，並造成宿主細胞病變死亡。禽流感病毒造成病人死亡的一個可能機制，在於人體內免疫系統辨識入侵的病毒或是受感染的宿主細胞以後過度反應，造成某些細胞激素（如第六型細胞間質激素，IL6）的過度分泌，進而形成免疫風暴破壞體內細胞，最後導致病人死亡 (3)。另外，我們推測禽流感病毒本身的毒性也可能較強，直接影響受感染的宿主細胞的基因表現和細胞激素分泌型態，造成宿主細胞病變死亡，進而影響人體免疫系統。

目前關於禽流感病毒的活體實驗大多利用實驗動物為感染對象，主要包括老鼠，雪貂 (ferret) 和猴類。這種實驗方法雖然能反映禽流感病毒在活體內的複製和致病機制，但是仍然有它的局限，例如並不是所有的實驗室都有感染性動物操作的場所及經驗，實驗動物所反映的現象並不見得適用在人類，無法細部分析病毒基因和宿主環境的互動，以及無

法進行大量藥物篩選。為了克服這些缺點，長期以來病毒學家利用細胞培養系統來研究病毒的複製和致病機制，並篩選抗病毒的藥物。在流感病毒的分離和研究，或甚至於疫苗的研發上，狗腎上皮細胞株 (Madin-Darby Canine Kidney, MDCK) 長期以來被廣泛的利用，不過這個實驗系統仍然不是利用人類細胞。有些實驗室利用癌化轉型的人類上皮細胞株來進行研究，但是那些癌化的上皮細胞株的基因表現和分化狀態和人體內健康上皮細胞已經相差太遠，利用它們得到的資訊或是利用它們進行藥物篩選並不是最合適的。

少部份實驗室利用初代培養 (primary culture) 的技術，從人體內分離健康的支氣管上皮細胞並加以培養，來研究流感病毒感染宿主細胞的機制。這個系統雖然能真實的反映人體和流感病毒的互動，但是並不是所有的實驗室都有初代培養的技術，而且那些健康的初代培養支氣管上皮細胞有其生長期限，沒有辦法一直在體外增生。為了克服以上這些缺失，建立一個最能真實反映人體細胞和流感病毒互動的研究平台，我們建議建立一個不死型 (immortalized) 的支氣管上皮細胞株，並基於這個上皮細胞株建立流感病毒感染平台。這樣的細胞株能一直在體外增生，但是又保有初代健康上皮細胞的絕大多數特性（如分化狀態，基因表現，染色體狀態……等等）。如此一來，這樣的細胞株同時兼具一般細

胞株和初代健康上皮細胞的優點，卻沒有上述的缺點，十分適合用來進行流感病毒的研究和藥物篩選。

在這個為期三年的計劃裡，我們申請經費和人力的支持來建立人類的不死型支氣管上皮細胞株，並基於這種上皮細胞株建立流感病毒感染平台。我們將基於這個平台，研究病毒感染後宿主細胞的變化，主要是宿主細胞死亡的情形和細胞激素分泌型態的改變。我們推測禽流感病毒本身的毒性也可能較強，直接影響受感染的宿主細胞的基因表現和細胞激素分泌型態，造成宿主細胞病變死亡，進而影響人體免疫系統。我們將以較溫和的人類流感病毒 (H3 及 H1 病毒株，經由合作由臨床病毒實驗室提供) 建立感染平台，病毒實驗將在陽明大學既有的第二級生物安全實驗室 (P2 lab) 進行。

2、材料與方法

(1). 人類呼吸道纖毛上皮細胞培養

無血清培養液自 Cambrex 公司購得 (Cambrex, USA)。為測試人類呼吸道纖毛上皮細胞分化特性，另外將呼吸道纖毛上皮細胞培養在覆蓋第 I 型膠原凝膠的支持膜上，採用無血清培養液 (Cambrex, USA)，行氣液界面 (Air-Liquid interface) 培養，6 周後進行石臘包埋及染色。

(2). 溶菌斑試驗 (Plaque assay)

將病毒序列稀釋，在plate每格置入不同稀釋倍率的病毒液0.1 ml，靜置在含5% CO₂的37°C incubator中，使病毒吸附1小時。吸去其內含有未附著的病毒的殘餘病毒液。用PBS清洗之。用含1% agarose 的DMEM medium 2ml覆蓋之，使往後釋放出的病毒只能朝平面方向擴散。置於含5% CO₂的37°C incubator，培養2天，取出plate。小心吸去細胞層上的agarose。用1%的結晶紫(crystal violet)染色90分鐘。小心用清水沖洗，避免沖散細胞。將plate倒置，使其乾燥。計數每個well內的plaque量。

3、結果

今年我們成功選殖人類的端粒酶進入反轉錄病毒載體，並成功得到及培養健康的初代 (primary) 人類支氣管上皮細胞：液面下培養 6 周的人類支氣管上皮細胞細胞纖毛分化很差(0.31%)，而行氣液界面(Air-Liquid interface)培養 2 周的支氣管上皮細胞纖毛分化數量明顯增加(8.62%) (圖 1)。我們已開始建立不死型的支氣管上皮細胞株，正持續培養中(已達 53 代)。不過，為加速計畫執行進度，故經由國際合作管道另外獲得表現端粒酶的不死型的小呼吸道 (small airway) 上皮細胞株 (圖 2)(4)。另外，我們並已增殖並定量國內 A 型流感病毒株 H1N1, H3N2 及 B 型流感病毒株 (圖 3)，以建立病毒庫存。

4、討論

今年我們成功得到初代及不死型的人類呼吸道上皮細胞，並已增殖並定量國內 A 型流感病毒株 H1N1, H3N2 及 B 型流感病毒株 (圖 3)，建立病毒庫存，有利下年度計畫執行。我們正進行端粒酶活性試驗，確認端粒酶活性在我們的不死型的呼吸道上皮細胞中，其活性的確上升。我們也必須以 FISH (Fluorescence in situ hybridization) 等方法鑑定不死型呼吸道上皮細胞的染色體有無異常。這些鑑定工作將於明年進行。另一方面，為加速計畫執行進度，我們會直接利用經由國際合作管道所獲得的不死型的小呼吸道上皮細胞，研究 H5N1 病毒對細胞的影響。明年可進行病毒感染系統的建立。

本計畫另一主題在探討禽流感病毒株 H5N1 對人類呼吸道上皮細胞的影響，但目前無完整 H5N1 病毒株可供進行上皮細胞感染。我們在第二年將以分子生物技術，研究個別 H5N1 病毒基因對人類呼吸道上皮細胞的影響。我們將以人類流感病毒株 H1N1 的基因為對照組。如此既可得知 H5N1 病毒致病機轉，又可避免實驗室感染。

5、結論與建議

建議國內能有中央實驗室可接受預約提供禽流感病毒部分 cDNA 或受感染細胞蛋白質等無感染力之物質，以利國內研究禽流感病毒致病

機轉。

6、計畫重要研究成果及具體建議

今年我們成功得到初代及不死型的人類呼吸道上皮細胞，並已增殖並定量國內 A 型流感病毒株 H1N1, H3N2 及 B 型流感病毒株 (圖 3)，建立病毒庫存。

7、参考文献：

- (1). Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen VC, Pham TS, Vo CD, Le TQ, Ngo TT, Dao BK, Le PP, Nguyen TT, Hoang TL, Cao VT, Le TG, Nguyen DT, Le HN, Nguyen KT, Le HS, Le VT, Christiane D, Tran TT, Menno de J, Schultsz C, Cheng P, Lim W, Horby P, Farrar J; World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 350, 1179-88 (2004).
- (2). Uprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, Pooruk P, Srisook K, Peiris M, Nicholls JM, Chokephaibulkit K, Vanprapar N, Auewarakul P. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *J Exp Med*. 203:689-97 (2006)
- (3). Kash JC, Basler CF, Garcia-Sastre A, Carter V, Billharz R, Swayne DE, Przygodzki RM, Taubenberger JK, Katze MG, Tumpey TM. Global host immune response: pathogenesis and transcriptional profiling of type A influenza viruses expressing the hemagglutinin and neuraminidase genes from the 1918 pandemic virus. *J Virol* 78, 9499-511 (2004).
- (4). Piao CQ, Liu L, Zhao YL, Balajee AS, Suzuki M, Hei TK. Immortalization of human small airway epithelial cells by ectopic expression of telomerase. *Carcinogenesis*. 26:725-31 (2005)

8、圖

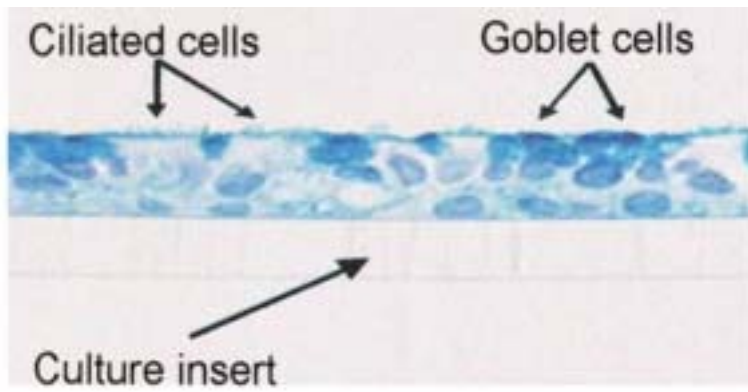


圖 1. 健康的支氣管上皮細胞在體外培養可分化成具有纖毛之上皮細胞

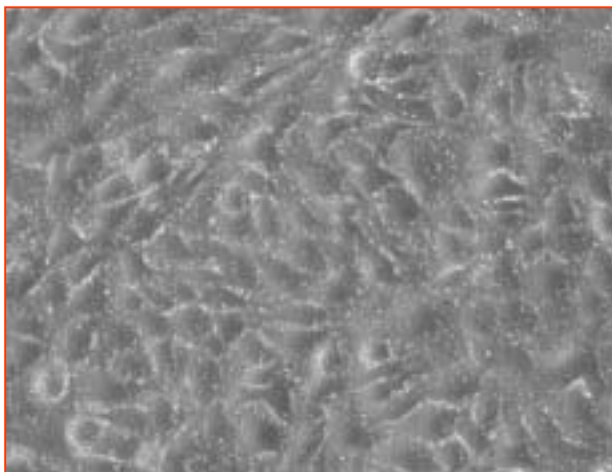


圖 2. 培養中之不死型小呼吸道 (small airway) 上皮細胞株

以Plaque assay測定感染力

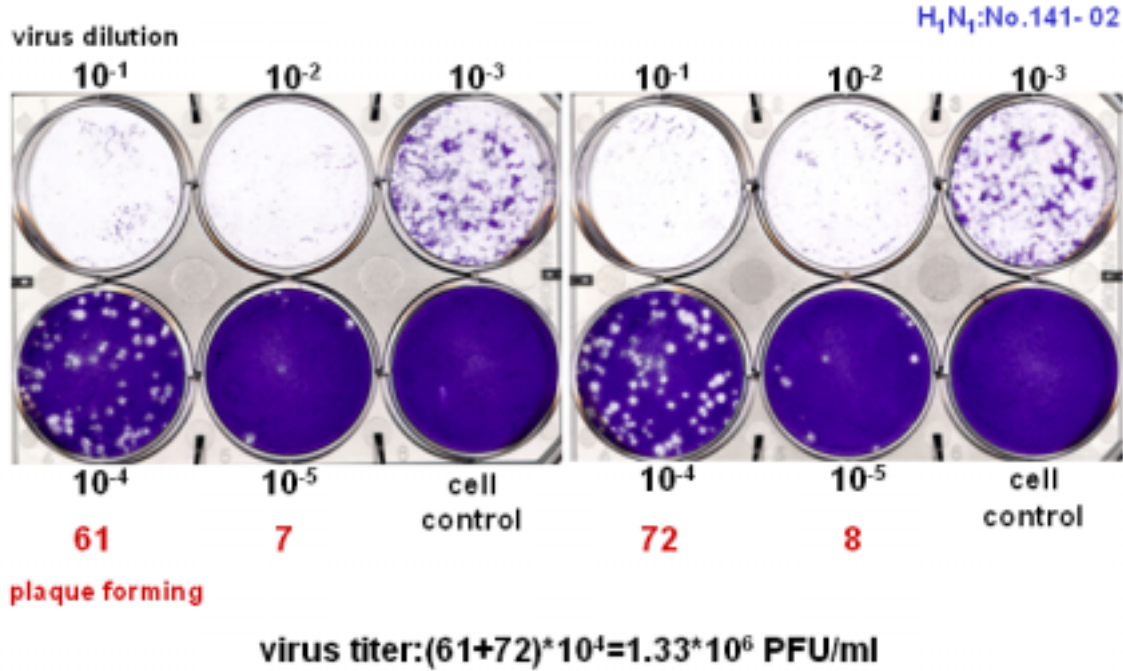


圖 3. 以 Plaque assay 測定感染力及定病毒效價(titer).

參、第參子計畫

中文摘要：

流感疫苗的研發在公衛學上對於這個人類重要傳染性疾病的防治有極重要的貢獻，對於易受感染的族群例如老年人，嬰幼兒，或第一線的醫護人員都提供了很大的保護作用。但是疫苗的研發必須有效的評估其功效，除了產生中和型抗體的效價要高，對於刺激專一性的 CD4T 淋巴細胞的產生也同時必須加以評估。

本計劃的目的是想建立可被 CD4T 淋巴細胞所辨認的一般流感病毒抗原及可被國人常見第二型白血球組織抗原(HLA-DR) 所表現的資料庫，同時建立一個人類第二性白血球組織抗原四聚體試劑來評估流感疫苗刺激專一性的 CD4T 淋巴細胞產生的功效，並進行已接種流感疫苗之志願者其免疫系統反應之篩選。

今年的進度主要是建立一個技術平台將第二型白血球組織抗原 (HLA-DRB1 *090102, HLA-DRB1*080302) 做成人類第二型白血球組織抗原四聚體(class II MHC tetramer)，它們的 alpha-chain 都是 HLA-DRA1-0101, 並利用已知可以被這些 DR 分子所呈獻的胜肽 CLIP (Class-II associated invariant chain peptide) 來確認成功建立四聚體技術平台。目前我們已經將可以在 baculovirus 表現的載體以分生的技術把 HLA-DR 的 gene 連結進

去，並做 plaque assay，以 Western blotting 確認陽性的 colony,養成小量的病毒後，再逐漸擴大病毒的效價.最後用四公升的培養基做大量的合成蛋白質的純化。

我們並已開始收集有注射今年的流感疫苗的人並篩檢他們的 HLA-DR 的型，這方面的資料庫對於我們第二年以後的計畫執行時必需的。

關鍵詞： 人類第二性白血球組織抗原四聚體試劑， 流行性感冒疫苗，疫苗

Abstract:

This aim of this study is to build a data base based on influenza virus antigens presented by the most common HLA-DR alleles in Taiwan. We also will set up a platform of making the MHC class II tetramers based on the common Taiwanese HLA-DR alleles. After the development of this technique, we can screen the CD4 epitopes on the viral antigens presented by CD4 T cells. The final goal of this platform is to monitor the efficacy of flu vaccine by the detection of specific CD4+ T response to HA or NA epitopes.

What we have done for the first year is to set up the platform of making MHC-class II tetramer. So far we have successfully make HLA-DRB1*080302 and HLA-DRB1 *090102 associated with HLA-DRA1*0101. These two HLA-DR alleles are very common among the Taiwanese population. In order to stabilize the structure, we leave CLIP (class II associated invariant chain peptide) in the binding groove but it can be replaced with viral peptide later after digestion by Rhino3C protease. We have finished cloning process and transfection into insect cells. The correct recombinant virus clones were identified by plaque assay and amplified to make higher tittered stocks. The purification of recombinant proteins is in process.

In addition, we start collecting samples from those who receive the current flu vaccines and determine their HLA-DR phenotype. The information will be used for the projects list on the 2nd year.

Keyword: MHC class II tetramer, HLA-DR, influenza

一、本文

1、前言

流行性感冒病毒在人類之間傳播已經由來已久，由於感冒病毒在其他動物也有物種專一性的病毒株，例如鳥禽類，馬，豬，等等，這些動物的流感病毒有時也會因基因重組而獲得感染人類的機會，病毒頻繁的抗原改變(antigenic shift)也使得人類不斷受新突變病毒感染的威脅大增，由於很多人從沒受過此種新病毒的感染，因此沒有保護的抗體，一旦有新突變的流感病毒株出現，通常會造成流感的大流行 (2).

流感疫苗的問世在公衛學上對於這個人類重要傳染性疾病的防治有極重要的貢獻，對於易受感染的族群例如老年人,嬰幼兒,或第一線的醫護人員都提供了很大的保護作用 (1,3)。病毒的紅血球凝聚素(hemagglutinin, HA)以及神經胺酸酶(neuraminidase, NA)上的抗原決定素是疫苗產生中和性抗體(neutralizing antibodies)的主要來源 (3)，疫苗的研發必須有效的評估其功效，除了產生中和型抗體的效價要高，對於刺激專一性的 CD4T 淋巴細胞的產生也同時必須加以評估。

專一性 CD4 T 淋巴細胞對於體液免疫反應扮演重要的角色，也間接影響抗體效價產生的時間與多寡，在疫苗研發的過程中，不但抗體的效價是一個重要的指標，專一性 CD4 T 淋巴細胞是否被刺激產生也是疫苗開發中必須評估的重要項目。為了精確的評估國人在施打疫苗後產

生專一性 CD4 T 淋巴細胞的數量，我們必須先建立可被 CD4T 淋巴細胞所辨認的一般流感病毒抗原同時可被國人常見第二型白血球組織抗原(HLA-DR) 所表現出來的資料庫。雖然一般流感病毒抗原可被 CD4T 淋巴細胞所認識的抗原位點 (epitopes)並可被白種人常見第二型白血球組織抗原(HLA-DR) 所表現的抗原位點資料庫已經文獻中可以找到，例如歐美常見的 HLA-DRB1*0401 HLA-DRB1*0101 都可以表現 HA306-318 (5)，不過國人常見的第二型白血球組織抗原(HLA-DR)與白種人還是有很大差別，所以建立可被 CD4T 淋巴細胞所辨認的一般流感病毒抗原及可被國人常見第二型白血球組織抗原(HLA-DR) 所表現的資料庫是必須的。我們將利用 Dr. Kwok 實驗室所發展出來的技術 (tetramer guided epitope mapping) (4,6)來找尋可被國人常見的第二型白血球組織抗原(HLA-DRB1*090102 及 HLA-DRB1 *080302)所表現出來的 HA 抗原決定位點。

人類第二型白血球組織抗原四聚體試劑 (class II MHC tetramer)，可以用來偵測周邊血液中對特定病毒蛋白的抗原有特異性辨識功能的 CD4 T 細胞，此試劑的高度敏感性在於第二型白血球組織抗原結合蛋白質片段後與 T 細胞之間的專一辨認，根據以前的研究 (5)，這方面試劑的敏感性可以測到萬分之三比例的特異性細胞，也因為四聚體試劑的發展

與技術的成熟，以往只能偵測比例較高且親合力較強的 CD8 T 細胞，但由於現在第二型白血球組織抗原四聚體試劑的發展與技術的成熟，則連專一性 CD4 T 細胞都能輕易測得，這對自體免疫性疾病的瞭解或是疫苗發展都有很大的幫助(7)。

我們所發展出來的人類第二型白血球組織抗原四聚體免疫平台，不但可以用來評估疫苗的功效，也可以用來評估癌症或自體免疫疾病治療後專一性 CD4 細胞量的變化，應該對國內做這方面研究的實驗室有很大貢獻。

這個計畫主要分三年進行，目前第一年的研究目的是建立一個發展人類第二型白血球組織抗原四聚體試劑的技術平台，我們首先會做出 HLA-DRB1 *080302 and HLA-DRB1 *090102 配合 HLA-DRA1*0101 的四聚體試劑，等有了這個試劑，我們就可以進行尋找一般流感病毒抗原可被 CD4T 淋巴細胞所認識並且被 HLA-DRB1*080302 and HLA-DRB1 *090102 所呈現的抗原位點 (epitopes)。

2、材料與方法

(1)、載體構築：

Dr. Sally Ward 所提供的 baculovirus 載體是以 pAcUW51 為骨架 (9,10)，含有老鼠 MHC-II I-A^u 的 α 和 β 鏈序列，分別可以用 BglII 及

BamHI 將其切出並做轉殖到另一個載體中方便我們置換為人類的 HLA-DR α 和 β 鏈，我們由台大醫院血清免疫室拿到國人常見第二型白血球組織抗原(HLA-DRB1*090102 和 HLA-DRB1*080302)的周邊血，經過 Ficoll Hypaque 將周邊血液單核球分離並進行 RNA 的抽取，用專一的引子將 HLA-DR 的 α 和 β 鏈合成 cDNA，再轉殖到含有原來 BglII 及 BamHI 切出來的片段做置換，並且將原來含胜肽片段的部份也換成可以表達 CLIP 片段的序列，然後再把已置換過的 BglII 和 BamHI 兩段產物與原始 Dr. Sally Ward 所提供的 baculovirus 載體做最後重組置換，就能合成一個可以表現人類第二型白血球組織抗原四聚體的載體。

(2)、人類第二型白血球組織抗原四聚體試劑的製造

參考 Dr. Ward 實驗室的製造與純化方法 (9,10), 簡述如下: 可以表現人類第二型白血球組織抗原四聚體的 baculovirus 載體必需與 15ng linearized BaculoGold (from BD) DNA 同時轉染 Sf9 細胞，經過 plaque assay 挑選出含有重組 DNA 的 baculovirus 病毒株，用 anti-His 抗體去篩選表現量比較高的，然後再經過三次的培養以增加病毒的 titer，最後以 High-Five 細胞(感染 M.O.I=10, 1×10^6 cells/ml)來表達大量的重組蛋白，通常在 62-64 小時感染後就可以收培養液，經過 PBS 的隔夜透析，含有重組蛋白的培養液先通過第一根管柱 (Talon Cobalt column), 含有

His tag 的蛋白會被吸附純化，沖出物經過 PBS 的隔夜透析後再過第二根親和力管柱(含有 anti-HLA β 鏈的專一性抗體)，沖出物經過 PBS 的隔夜透析後即可濃縮 (Amicon 離心管)，用 BirA(Avidity, Denver, CO.USA) 酵素進行 biotinylation, 在室溫隔夜反應，經過 PBS 的隔夜透析後即可得到人類第二型白血球組織抗原的單體，要染色前再以 PE 標示的 Streptavidin 與單體一起在 4°C 反應 30 分鐘，就可以得到 PE 標示的人類第二型白血球組織抗原四聚體。

3、結果

由於第二型白血球組織抗原四聚體一般都是由昆蟲細胞表達，而原來由 Dr. Sally Ward 所提供的 baculovirus 載體是含有老鼠 MHC-II I-A^u 的 α 和 β 鏈，我們必須先將老鼠的序列部分置換為人類的 HLA-DR α 和 β 鏈序列並且先做出含有 CLIP 胜肽片段的人類第二型白血球組織抗原四聚體試劑，以後可以再將 CLIP 片段切除，置換成我們想要表達的病毒 HA 中的胜肽片段。

我們由台大醫院血清免疫室拿到國人常見第二型白血球組織抗原 (HLA-DRB1*090102 和 HLA-DRB1*080302) 的周邊血，雖然他們的 HLA-DRtyping 並沒有到 080302 或 090102 六位數，但是根據定序結果我們所取得的檢體都是符合到六位數，由此可見這樣的表現型的確在台灣是常見的。用專一的引子(分別含限制酶的位切點)將 HLA-DR 的 α 和 β 鏈合成 cDNA，再轉殖到含有原來 BglIII 及 BamHI 切出來的片段做

置換，由於沒有胜肽片段的四聚體是不穩定的，但是我們目前還沒有辦法預知以後要放入的病毒胜肽片段，所以就先放入 CLIP 胜肽片段，這個設計可以利用 CLIP 胜肽片段上有一個 Rhino3C protease 的位切點，最後合成的蛋白可以用這種酵素將 CLIP 胜肽片段切斷，並且置換我們想要的病毒胜肽片段。在每一個環節我們都會先做 DNA 定序來確定，最後一步是再把已置換過的 BglII 和 BamHI 兩段產物與原始 Dr. Sally Ward 所提供的 baculovirus 載體做重組置換（用 pAcUW51 為骨架），就能合成一個可以表現人類第二型白血球組織抗原四聚體的載體。最後在整個載體上的 α 和 β 鏈我們也做了完整的 DNA 定序以確保表現蛋白的正確性。

我們選用 BD 的 BacloGold linearized DNA 來做為共同轉染的病毒成分，此外也選擇可以配合的 SF9 細胞來作為初始病毒培養的細胞株，雖然最後的大量培養合成蛋白是使用 High Five 細胞。我們使用 anti-His 的抗體來篩選能表現最高量的病毒株，經過兩次的病毒放大培養，最後可以用 5 毫升的病毒量來感染 500 毫升的 High Five 細胞，在 24 度的震盪培養箱中培養 62-64 小時，就可以收蛋白。所有蛋白會經過兩根 column 的純化，一根是 anti-His 的 cobalt column，另一根是 anti-HLADR 的 column，在純化的過程中，我們都維持低溫並加入蛋白酶抑制劑，以

確保蛋白的活性。

目前我們估計合成蛋白的量大約是 4 公升的產量小於 200ug，這種產量對於我們這種蛋白以昆蟲細胞的表現方式應該是合理的產率，但是要再進行下一步的 peptide 置換進而合成四聚體可能還有改善的空間。

4、討論

為了改善合成蛋白產率的問題，我們參考了另一個實驗室的作法 (11)，將 cheperon calreticulin 同時送入昆蟲細胞中，他們也是使用 pAcUW51 的載體來表現 HLA-DR 分子，因此我們可以參考他們的方法來改善合成蛋白的產量問題，雖然他們可以將產量提高到 50-70mg，但是我們的系統是否達到這種產率可能還得考慮所表現的 HLA-DR 種類，因為他們用的是 HLA-DR0401 和 HLA-DR0101 的載體，我們目前正在於他們連繫，希望可以盡快取得 calreticulin 的表現載體。

另一個技術層面的問題是如何可以合成出一個將 CLIP 置換成含另一個 peptide 的四聚體，我們對於合成置換後的單體並沒有問題，但是如果用 streptavidin 去連接四個單體並做染色還是有些技術上的問題有待突破，我目前想到的改進方法是使用 DNP 標定的 peptide，這種 peptide 在置換後應該可以讓我們使用 anti-DNP 的 column 來純化已被置換的單體蛋白，最後再用 streptavidin 去連接時，形成含有置換過 peptide 的

四聚體的比例應該會大大提高，這樣的四聚體用來染色效果應該會比沒經過進一步純化的四聚體來的好。

5、結論與建議

我們所發展出來的人類第二型白血球組織抗原四聚體免疫平台不但可以藉由有效地測量周邊血液中可辨認流感病毒中 HA 特定抗原的 CD4T 細胞的頻率，以評估流感疫苗的功效，也可以用於評估癌症治療或自體免疫疾病治療後專一性 CD4 細胞量的變化，這個系統的開發應該對國內做自體免疫疾病的致病機轉提供有力的工具，同時這技術對於臨床應用有很大開發潛力。

6、計畫重要研究成果及具體建議

在台灣我們已經有能力合成人類第二型白血球組織抗原四聚體免疫試劑，這個平台的建立對於疫苗的研發有幫助外，對於其他需要偵測轉移性 CD4 T 細胞的基礎研究人員也有其應用性。

7、参考文献

- (1). Lee CW, and Suarez DL: Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination. *Anim Health Res Rev.* 2005 ;6(1):1-15.
- (2). Horimoto T, and Kawaoka Y: Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 8:591-600.
- (3). Couch RB. Advances in influenza virus vaccine research. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;685:803-12.
- (4). Reijonen H, and Kwok WW Use of HLA class II tetramers in tracking antigen-specific T cells and mapping T-cell epitopes. *Methods.* 2003; 29(3):282-8.
- (5). Danke NA, and Kwok WW. HLA class II-restricted CD4+ T cell responses directed against influenza viral antigens postinfluenza vaccination. *J Immunol.* 2003;171(6):3163-9.
- (6). Novak EJ, Liu AW, Gebe JA, Falk BA, Nepom GT, Koelle DM, and Kwok WW. Tetramer-guided epitope mapping: rapid identification and characterization of immunodominant CD4+ T cell epitopes from complex antigens. *J Immunol.* 2001 ;166(11):6665-70.
- (7). Kita H, He XS, and Gershwin ME. Application of tetramer technology in studies on autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2003;2(1):43-9.
- (8). Constantin CM, Bonney EE, Altman JD, and Strickland OL. Major histocompatibility complex (MHC) tetramer technology: an evaluation. *Biol Res Nurs.* 2002;4(2):115-27.
- (9). Radu CG, Ober BT, Colantonio L, Qadri A, and Ward ES. Expression and characterization of recombinant soluble peptide: I-A complexes associated with murine experimental autoimmune diseases. *J Immunol.* 1998;160(12):5915-21.

- (10). **Radu CG, Anderton SM, Firan M, Wraith DC, and Ward ES**. Detection of autoreactive T cells in H-2u mice using peptide-MHC multimers. *Int Immunol*. 2000;12(11):1553-60.
- (11). **Fourneau J-M, Cohen H, and van Endert PM**. A chaperon-assisted high yield system for the production of HLA-DR4 tetramers in insect cells. *J. Immunol. Methods* 2004;285:253-264.

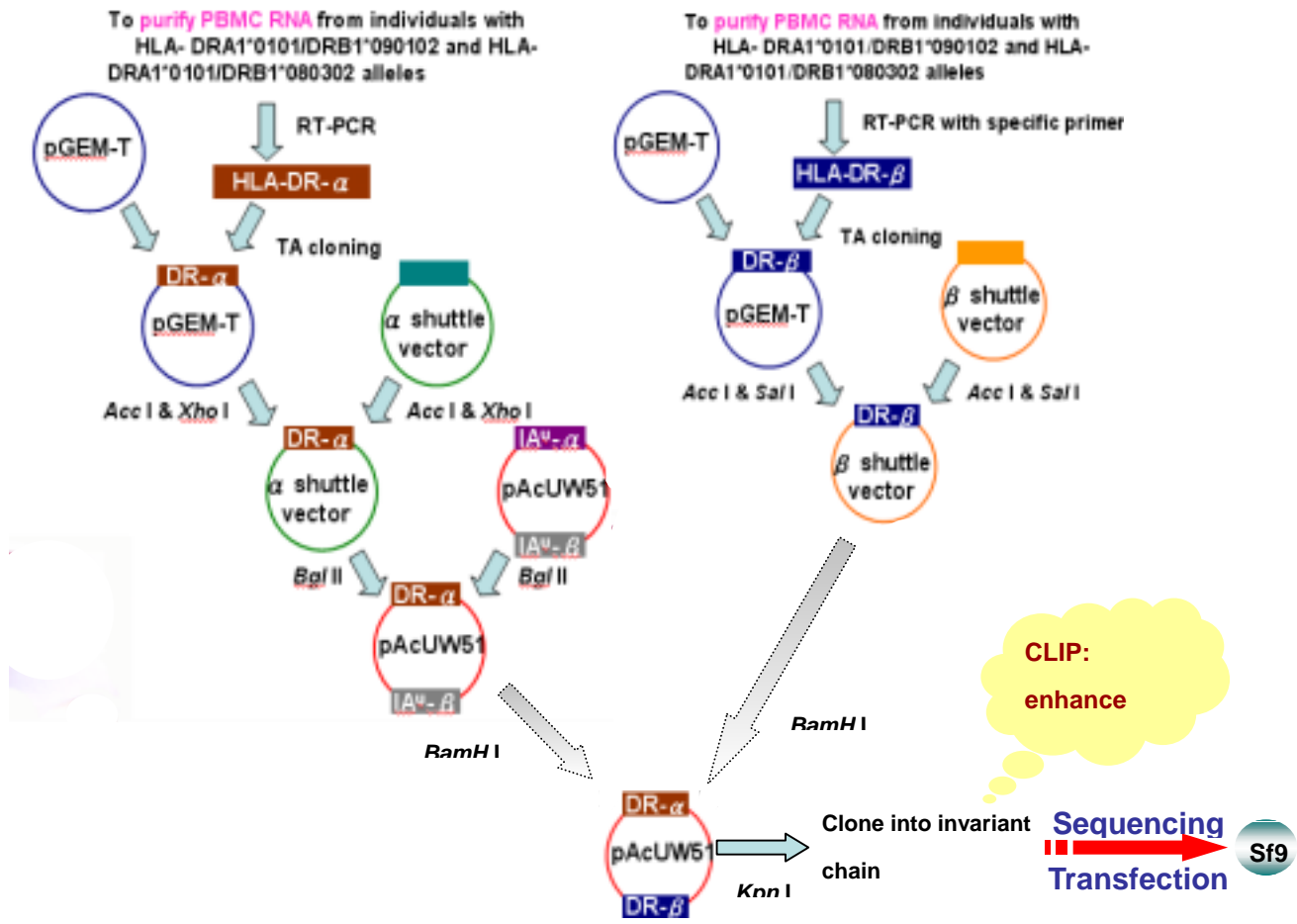


Fig.1 Flow chart for cloning of HLA-DRA1*0101/DRB1*0080302 or HLA-DRA1*0101/DRB1*0080302 into pAcUW51 vector.

HLA-DR / phenotype freq. /Allele freq.

DRB1*01	1	0.005
DRB1*0101	1	0.005
DRB1*0102	0	0
DRB1*03	9.8	0.054
DRB1*030101	9.8	0.054
DRB1*030102	0	0
DRB1*04	27.5	0.152
DRB1*0401	0	0
DRB1*0403	8.8	0.049
DRB1*0404	2.9	0.015
DRB1*040501	12.7	0.064
DRB1*040502	0	0
DRB1*0406	2.9	0.015
DRB1*0410	2	0.01
DRB1*0436	0	0
DRB1*07	2	0.01
DRB1*0701	2	0.01
DRB1*08	21.6	0.118
DRB1*0802	0	0
DRB1*080302	21.6	0.118
DRB1*0809	0	0
DRB1*09	33.3	0.176
DRB1*090102	33.3	0.176

DRB1*10	3.9	0.02
DRB1*1001	3.9	0.02
DRB1*11	11.8	0.059
DRB1*110101	11.8	0.059
DRB1*110102	0	0
DRB1*12	25.5	0.127
DRB1*1201	4.9	0.025
DRB1*120201	20.6	0.103
DRB1*120202	0	0
DRB1*13	8.8	0.044
DRB1*1301	1	0.005
DRB1*1302	6.9	0.034
DRB1*1312	1	0.005
DRB1*1351	0	0
DRB1*14	11.8	0.064
DRB1*1401	6.9	0.034
DRB1*1403	1	0.005
DRB1*1404	1	0.005
DRB1*1405	2	0.01
DRB1*1407	1	0.005
DRB1*1443	1	0.005

DRB1*15	16.7	0.088
DRB1*150101	15.7	0.078
DRB1*150102	0	0
DRB1*150201	2	0.01
DRB1*150202	0	0
DRB1*16	14.7	0.083
DRB1*160201	14.7	0.083
DRB1*160202	0	0

Table 1. Phenotype and allele frequency of HLA-DRB1* among Taiwan Minnan population (1995-2005). From: <http://www.allelefreqencies.net/test/default1.asp>

審查委員意見 1412

1. 應整合成大王貞仁教授的免疫學研究，以避免資源重複。
2. 有關病毒與先天免疫受器結合研究，未看到相關研究數據，且令人不解此項研究計畫運用？是為偵測病毒或者其他目的？可與免疫受器有反應的病源體太多，且結合後的反應結果仍有待研究，時間與經費將是一大問題，是否符合以任務為導向的流感計畫值得討論。
3. 研究計畫多見敘述，少見數據，請多補足相關研究數據。

1. 此一整合型計畫主要是要探討流感病毒的免疫機轉、和疫苗的製備等。而在整個計畫中主要是由免疫受體、上皮細胞與病毒的交互作用和測定流感病毒的 T 細胞頻率等三個子計畫來進行。整個研究報告書中最大的缺失是對三個子計畫之間的互動關係說明不清楚，而且三個子計畫的成果要如何來相輔相成，在報告書中也看不出。也許是第一年的計畫所以需要較多時間來建立方法，否則整體的執行成效其實不是很顯著。另外，主持人也應該在今年計畫執行後針對可能的缺失，提出替代或是輔助的方法才是，但是在研究報告書中也未提到。

2. 此一研究計畫涵蓋三個子計畫，但是在研究報告中並未針對這三個計畫成果的重要性再作進一步的詳細探討。因為未看到整個計畫書的內容，但

是在報告書中還是應該對整個計畫的研究成果和未來的發展有一個更清楚的討論，才能夠更清楚地了解究竟是否能夠有未來的發展前景。

3. 在第一子計畫中，主要是各個不同的免疫受體，在這年度的計畫中一共合成了 25 個重組蛋白。但是並未看到這些免疫受體蛋白與流感病毒交互作用的結果，究竟是否能夠利用這些免疫受體蛋白研究與流感病毒之間的交互作用，似乎在研究報告中看不出。

4. 第二子計畫的主要目的是要建立人類上皮細胞株，再了解流感病毒對這些上皮細胞的影響。但是，主持人在計畫中又希望將這些細胞培養成不死型的細胞株。究竟主持人要觀察流感病毒對上皮細胞是否會導致細胞的死亡而造成發炎，還是要研究流感否會刺激上皮細胞而導致高量的趨化激素或是發炎性細胞激素。如果是要誘發細胞的死亡，又要建立不死型的細胞株，是否有些矛盾？是否直接利用初代細胞來進行研究即可。比起其他兩個子計畫，此一子計畫的研究成果明顯較少。

5. 第三個子計畫的主要目的是要建立 HLA-DRB1 的 tetramer，以來測定未來患者的 CD4+ T 細胞的頻率。但是，對 CD4+ 的 T 細胞來說，其實利用細胞增殖反應便可以測定。當初為何不建立 tetramer 的系統來建議測定細胞毒殺性(CD8+)的 T 細胞頻率？

6. 由於在計畫報告書中並未看到今年度的經費編列及使用情形，所以還是

不容易來了解這樣的經費預算有這樣的研究成果是否合理。同時，建議主持人如果有計畫要繼續執行明年度的計畫，應該在成果報告書中對明年度的計畫內容展望稍加詳細的說明。而經了解後知道三個子計畫的總經費為一年五百萬元，目前的研究成果對這樣的經費預算的確是少了些。尤其是第二子計畫，只是要建立上皮細胞株，最後也是由國外取得所需要的細胞株，也就是自己執行的成果其實不是很明顯。

7. 三個子計劃都需要高度的生物技術，執行至今已有一些初步的成果，需要更多的時間才能完成這些技術平台，然後利用這些技術平台來評估流感病毒在先天免疫力受體與病毒交互作用、免疫分析技術平台、病毒基因變異對宿主免疫反應之影響、原始病毒疫苗模式之生產。這些平台在國外已有，但國內尚未有，尤其是人類第二性白血球組織抗原四聚體試劑，我們需要有這些重要的工具，才能自由運用。

審查委員意見回覆

Reviewer 1

- (1) Reviewer 似乎沒有機會看到本計畫書，不甚瞭解本實驗之目的。因此在修正的計畫書中，已將原來計畫之摘要及各子計畫目標加入(第 1 頁至第 9 頁)，並在第 3 頁說明三個計畫書之間的互動關係。
- (2) 由於本報告為第一年之年度報告，故僅將第一年預計達成的目標之相關結果列入。

Reviewer 2

- (1) (2) 三個子計畫之間的互動關係，請見本報告書第 3 頁至第 4 頁。
- (3) 與流感病毒作用的受體，在 25 個已測試的蛋白中，發現 2 個會與 H1N1 病毒作用，由於這是第 2 年的目標，因此未放在今年的報告書中。
- (4) 在第二子計畫我們將基於不死型的上皮細胞株平台，研究病毒感染後宿主細胞的變化，主要研究禽流感病毒基因是否引起上皮宿主細胞激素分泌型態的改變(包括趨化激素或是發炎性細胞激素)，上皮宿主細胞是否吸引免疫細胞(趨化現象)，以及那一個上皮宿主細胞分泌的激素扮演重要角色。這部份將可回答在病人體內，肺部為何有嚴重的免疫細胞浸潤(infiltration)情形。

不死型的細胞株只是不會進入休眠(senescence)而能持續生長增殖，所以在研究方面提供源源不絕的材料。所謂”不死型”(immortalized)細胞株只是指它們能克服生長代數限制，在體外一直增生，但是其他特性與初代細胞一致。它們在研究中也能被病毒誘發進行細胞凋亡(apoptosis)等反應，但是我們還有其他未進行實驗的細胞，可以持續提供研究材料。故並無矛盾。

直接利用初代上皮細胞雖可以進行類似研究，但是初代細胞不能長期培養(只能培養 10 代左右)，而且非常昂貴(50,000 元/管，每管約 2×10^5 個細胞)，有其來源上的限制，為長期研究，故當初設定以不死型的上皮細胞株作為研究平台。

研究成果方面，主要因第一年著重於不死型的上皮細胞株建立，大多時間在細胞培養、增殖足夠流感病毒、與選殖人類或病毒基因方面，故成果較不明顯。建立這類的細胞株需花費較長時間，當初提計畫時已考慮並提及，所以原本預計用一年半才能進行病毒學方面實驗。除了由國外取得所需要的細胞株，在本年度我們也同時建立自己的細胞株。我們選殖人類端粒酶(Telomerase)進入反轉錄病毒載體，並感染初代人類”氣管”上皮細胞，正持續觀察追蹤細胞生長，目前已培養了16代(每3-4天一代)。只是在我們以往運用及建立不死型”內皮”細胞株的經驗，只用端粒酶建立的細胞株常因p16活化而在半年後又開始抑制細胞週期，生長緩慢而進入休眠(senescence)停止生長，此時就必需重挑細胞株，或再加入SV40病毒T抗原等以抑制Rb等的作用。在建立類似細胞株的論文中，通常以端粒酶建立不死型細胞株需持續觀察追蹤180天以上才能確保細胞不會因p16等活化而又進入休眠，並需確認細胞內端粒酶活性，以及染色體套數，才能確知所得到的為健康的不死型細胞株。基於以上經驗，我們在本年度計畫中雖得到細胞，但是還無法確知在我們自己建立的細胞株的確可用。但我們還是希望能縮短花在技術與平台上的時間，早日進行流感病毒致病機制的實驗。所以，我們一方面繼續建立觀察自己的細胞株，一方面也由國外取得人類不死型”小呼吸道”上皮細胞，無論如何，我們在第二年度仍會繼續建立自己的細胞株。

除了建立細胞株，我們在同時也準備其他材料。為了使每次流感病毒感染實驗的結果能一致，我們在本年度計畫中進行流感病毒增殖定量，進行庫存，並定期檢查病毒存活率。目前已增殖三種不同的流感病毒株(A型流感病毒株H1N1、H3N2, B型流感病毒)。我們也已經從人類流感病毒選殖了病毒基因，目前正進行點突變。總之，我們已建妥所需平台，相信在第二年能有明確的研究成果。希望能得到持續的計畫支持。

目前已知禽類流行性感冒(以下簡稱禽流感)主要侵犯人體的氣管、肺部和小腸的上皮細胞。禽流感病毒在這些宿主細胞建立複製以產生更多後代，並造成宿主細胞病變死亡。禽流感病毒造成病人死亡的可能機制，在於人體內免疫系統辨識入侵的病毒或是受感染的宿主細胞以後過度反應，造成細胞激素的過度分泌，進而形成”免疫風暴”破壞體

內細胞，最後導致病人死亡。另外，禽流感病毒本身的毒性也可能較強，直接影響受感染的宿主細胞的基因表現和細胞激素分泌型態，造成宿主細胞病變死亡，進而影響人體免疫系統。第二子計畫的主要目的就在建立一個能真實反映人體內上皮細胞和流感病毒、以及免疫細胞之間互動的體外研究平台。主要研究禽流感病毒基因是否引起上皮宿主細胞激素分泌型態的改變(包括趨化激素或是發炎性細胞激素)，上皮宿主細胞是否吸引免疫細胞(趨化現象)，以及那一個上皮宿主細胞分泌的激素扮演重要角色。將與第一與第三子計畫密切合作，自其他子計畫取得免疫細胞方面的材料與研究方法經驗，並可探討一旦病毒與先天免疫受器結合，免疫細胞對上皮細胞是否具有較高毒殺力或趨化現象。

在預期的研究成果和未來的發展，. 第二子計畫將可以提供一個全面性的機制，解答禽流感病毒形成”免疫風暴” 的原因及結果，回答臨床上為何禽流感病毒比其他人類流感病毒更容易造成人類死亡。這個流感病毒感染平台日後並可應用於研究其他以上皮細胞為宿主的病毒(如 SARS 冠狀病毒)，或其他新興傳染病。同一平台日後並可應用於藥物篩選的研究，用來研發抗病毒的藥物。因為這種不死型的細胞株保有初代健康上皮細胞的絕大多數特性(如分化狀態，基因表現，染色體狀態……等等)，但能一直在體外增生，所以同時兼具一般細胞株和初代健康上皮細胞的優點，十分適合用來進行病毒的研究和藥物篩選。

(5) 針對審查委員的建議有關測定流感病毒的 T 細胞頻率的子計劃，我有以下的補充說明：

1. 這個人類第二型白血球組織抗原四聚體的試劑在國外已經有，但是他們有的試劑主要是針對 DR0401, 0101 和 0404，這些 alleles 在台灣的組群並不是最普遍的，所以我們才想建立一個以台灣常見的 DR allele 為主的人類第二型白血球組織抗原四聚體的試劑平台，而 DR080302 與 DR090102 是我們首先要建立的。
2. 第一年工作主要在建立 DR080302 及 090102 的四聚體平台，因此大部分的時間是在構築載體與表現蛋白，目前並沒有很多的相關數據可以呈獻於報告中。

3. 利用細胞增殖的方法是可以測定 CD4T 細胞的反應，但是可能由於專一性的 CD4T 細胞數目不夠而使得增值的反應不明顯，要精確的測定專一性的 CD4T 細胞反應須用 ELISPOT 或是 intracellular cytokine staining，但是由於它們的操作技術層較高且會比較費時，且四聚體的技術理論上可以用來測得 ex vivo 的 CD4T 細胞，不需要 in vitro 的操作，但是如果週邊血液中專一性的 CD4T 細胞頻率太低的話，也是需要做一些 in vitro 的放大。加上四聚體的標定同時，可以配合表面分子染色或是 intracellular cytokine staining，這樣的複染可對於專一性的 CD4T 細胞做進一步的 phenotype 分析，因此對於疫苗的開發可以提供較多有用的資訊。建議為何不測定 CD8 CTL 的頻率？CD8 CTL 固然對病毒的控制有關，但是 CD4T 細胞在疫苗的開發上也有重要的意義，因為抗體的效價要高也是跟有多少專一性的 CD4T 細胞的量有很大的關係，因此我們才會試著發展這個四聚體平台，相信對於疫苗的研發有應用的價值。國衛院的疫苗中心已經成功開發出人類第一型白血球組織抗原四聚體的試劑來偵測專一性的 CD8 T 細胞，但是國內還沒有針對國人常見的 DR allele 做出第二型白血球組織抗原四聚體的試劑，這樣的平台一旦開發出來，不僅疫苗的開發可以使用，對於其他想定量對於病原菌專一性 CD4T 細胞，或是免疫的自體反應 CD4T 細胞都會是一個很有效的工具。
4. 第二型白血球組織抗原四聚體試劑還可以作為 epitope mapping 的工具（如第二年所提），但是其缺點是必須針對某一特定的 HLADR allele 做出試劑，人類的 DR allele 太多，故我們只能從比較常見的 allele 先做，來分析這些人對於疫苗的反應。
5. 第二年或是第三年的計畫我們目前也有做準備工作，例如篩選一些 healthy donors 有 DR090102 和 DR080302 的人，以及從施打過今年的流感疫苗的人篩選 DR090102 和 DR080302 的人，分析疫苗株的 HA 或 NA 序列等。
6. 這三個計畫之間的相連性，應該是在於探討體內細胞從直接感染的上皮細胞到負責 innate immunity 的細胞，甚至於到對於流感病毒專一性的 CD4T 細胞所分泌的 cytokine 做一個全盤性的分析，可以提供流

感感染的免疫學與臨床研究的資訊。前兩年的研究有不少偏重於系統的建立與確認系統在病毒感染後的表現型分析，用四聚體技術來偵測流感病毒專一性 CD4T 細胞也要在第三年才會做到，但是三年的計畫最後可以提供流感病毒是如何與宿主細胞或是宿主的免疫細胞相互作用，那些受體會因此被活化而造成 cytokine 的大量分泌，這樣的資訊對於禽流感的研究也會有很大的幫助。

(6)有關經費運用。

第一子計畫

本計畫需要由人類週邊血液大量培養巨噬細胞及樹突狀細胞，抽取 RNA、RT-PCR、基因重組、培養細胞、轉殖(transfectin)、純化蛋白及培養病毒，這需要大量經費才可支持。因為培養基、胎牛血清、蛋白質純化都非常昂貴，並且必需由技術非常熟練的博士生及助理二人方可在一年之內完成蛋白質製造。

第二子計畫

研究成果方面，主要因第一年著重於技術平台與材料製備上，故成果較不明顯。但我們已建妥所需平台(請見上)，相信在第二年能有明確的研究成果。

研究經費方面，請見下表：

國立陽明大學計畫經費收支明細表

列印

Excel

計畫代碼：95GD143-2 (編號:DOH95-DC-1412)				時間:2006/11/30-11:49:44			
計畫名稱：流感病毒群體研究-先天免疫力受體與病毒交互作用、免疫分析技術平台、病毒基因變異對宿主免疫反應之影響、原始病毒疫苗模式之生產(第一年)							
主持人：王學偉				單位：L33 微免所			
執行期限：95.01.01~95.12.31				委託單位：行政院衛生署疾病管制局			
補助項目	核定金額	實支數	暫付數	請購未銷數	核銷簽證	餘額繳回	餘額
人事費	545,802	422,163	0	0	0		123,639
業務費	624,198	624,162	0	0	0		36
管理費	80,000	80,000	0	0	0		0
合計	1,250,000	1,126,325	0	0	0	0	123,675

第三子計畫

經費的使用方面，第一年的經費多數使用於分生方面，載體的構築與 baculovirus 系統的建立，昆蟲細胞的培養與蛋白的純化，由於人類第二型白血球組織抗原四聚體的產量是非常低，所以我們以前在美國的系統是一次會培養 4 公升的昆蟲細胞，純化的過程中要經過透析，因為 supernatant 量大所以純化的過程也需要不少的透析膜，另外我們也要開始合成 peptide，蛋白純化後也需要進一步的處理，例如 *in vitro* biotinylation，或是用 protease 切除做 peptide 的置換，這些後處理也是需要一些花費，還有我們已經開始做一些人的 HLA-DR 篩選，第一年的經費扣除人事費與管理費外都有充分的利用。

- (7) 第一子計畫之技術平台，國外尚無此一系列之蛋白從事有計畫的篩選，這乃是開創性的工作。第二子計畫之技術平台，目前國外只有兩株類似的細胞株，而且尚無人用此種細胞進行病毒與藥物研究，也是開創性的工作。第三子計畫也是國人必需自己生產，國外並無國人之 MHC tetramer 可供使用。