

國立台灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

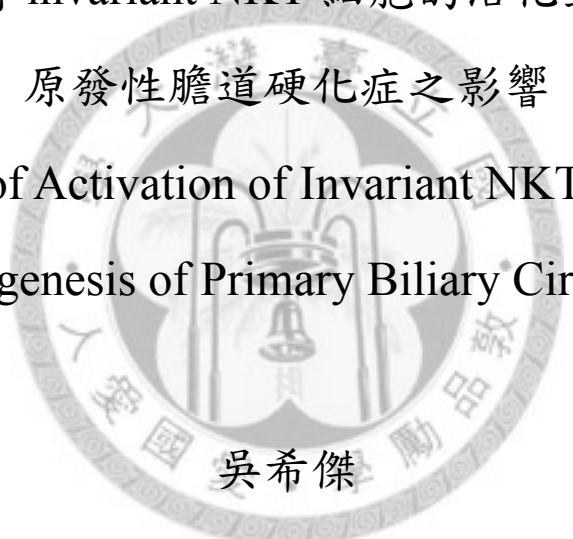
Master Thesis

探討 invariant NKT 細胞的活化對於

原發性膽道硬化症之影響

The Effects of Activation of Invariant NKT Cells on the

Pathogenesis of Primary Biliary Cirrhosis



吳希傑

Si-Jie Wu

指導教授：莊雅惠 博士

Adivisor : Ya-Hui Chuang, Ph.D.

中華民國九十九年七月

July, 2010

## 致謝

碩士論文終於完稿了!首先，要感謝教導我的老師-莊雅惠老師，在這短短的兩年內，除了提供良好的實驗研究環境及學術指導外，更分享許多老師人生經驗，增廣我的見聞。在我實驗失敗之時，亦以正面態度代替責備，讓我從錯誤中學習，培養解決問題的能力。除了實驗外，在老師活潑個性的帶領下，實驗室氣氛相當融洽，素有「瘋子實驗室」之稱，讓我可以愉快的心情下，完成我的實驗。再來要感謝我的口試委員們，陶秘華老師、孫昭玲老師以及楊曜旭老師，提供許多實驗上的建議，讓我的論文更加完整，而您們的肯定也讓我更有自信面對未來的挑戰。

此外，我要感謝江伯倫老師及其實驗室學長姐們對我實驗上的指導與幫助，尤其是參加江家 meeting 的進度報告，除了訓練我的口語報告能力外，老師們的建議也對我有莫大的幫助。這兩年的實驗室生活中，都是在 R406 中度過，除了要感謝老師外，亦要感謝「瘋子實驗室」的成員們，謝謝姿君學姊在實驗技術上的指導，謝謝曉玉在一起共事中的配合，謝謝佑儒分擔實驗室男丁的工作量，謝謝肇軒幫忙訂貨與泡試劑，謝謝盈均幫忙代養與運送小鼠，這樣堅強的組合讓我能夠順利地完成我的論文，而大家的歡笑，也讓我苦悶的研究生涯中，增添許多樂趣。接下來要感謝雅倩老師實驗室的成員們，Henda (晟泰)、梓明、嘉芸、彥君、凱欣、瑋廷、紋綺，謝謝你們對我的生活及實驗上的幫助。還有我的室友阿凱(昱凱)、康康(哲康)，感謝他們在住宿時對我的照顧。

最後，要感謝我的家人，老爸、老媽、純姊、紋姊、芳姊、雲姊、阿電、小瑜，感謝他們在精神上的關心與經濟上的支持，讓我能夠無後顧之憂地專心做研究，完成我的碩士論文。總之，謝謝大家的幫忙，讓我順利完成了這人生的階段大事，希望未來亦能有機會回饋大家。

## 中文摘要

PBC 為慢性膽汁鬱積肝臟的自體免疫疾病，患者肝臟門脈三角出現自體反應淋巴球浸潤以及血清中可測得抗粒線體自體抗體，嚴重者導致肝臟衰竭。iNKT 細胞在經由抗原呈獻細胞表面分子 CD1d 呈獻抗原 (glycolipid) 活化後，會在短時間內分泌大量細胞激素，如 IL-4 及 IFN- $\gamma$  等，調控其他免疫細胞。在 PBC 患者肝臟內有較多 iNKT 細胞，且其膽道上皮細胞亦表現較多 CD1d 分子，推測 iNKT 細胞可能會影響疾病的發生。我們先前發現 dnTGF $\beta$ RII PBC 小鼠肝臟含有高量過度活化且分泌高量 IFN- $\gamma$  的 iNKT 細胞。再者，iNKT 細胞缺乏之 dnTGF $\beta$ RII 小鼠的肝臟淋巴球浸潤減少且膽道發炎減輕，推測 iNKT 細胞可能在早期藉由 IFN- $\gamma$  的分泌而促使疾病加重。在此，我們進一步探討 iNKT cells 活化對此疾病的影響。我們以靜脈注射 $\alpha$ -GalCer 活化 iNKT cells，並觀察其對於 xenobiotics (2-OA BSA) 致敏之 PBC 小鼠疾病進程變化。

我們在初期以靜脈注射給予 2-OA BSA 致敏小鼠 $\alpha$ -GalCer，活化小鼠體內 iNKT 細胞，12 週後觀察晚期 PBC 小鼠肝臟病理變化以及血清中 AMAs 效價高低。結果顯示給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠，血清 anti-PDC-E2 IgG 以及 IgM 效價增高、肝臟門脈區發炎和膽道破壞嚴重，甚至出現肝臟肉芽腫及纖維化。分析其肝臟單核細胞組成，發現執行毒殺功能之 CD8<sup>+</sup> T cells 顯著增加，且肝臟出現 Th1 與 Th17 細胞激素微環境。進一步分析致敏 4 週後之結果，給予 $\alpha$ -GalCer 的 2-OA BSA 致敏小鼠已加快 PBC 疾病進程，包括血清 AMAs 效價顯著升高及肝臟門脈三角更多淋巴球浸潤及膽道破壞，同時肝臟中 CD8<sup>+</sup> T cells 亦已顯著增加。深入探討其機制，我們發現給予 $\alpha$ -GalCer 至 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠可促使肝臟 DCs 表面 MHC class I 分子表現量增加，可能因此導致更多 CD8<sup>+</sup> T cells 遷移至肝臟，造成肝臟膽道破壞加重。此外，我們利用 *pichia pastoris* 酵母菌表現 mPDC-E2 蛋白片段，證實在 2-OA BSA 致敏之 PBC 小鼠體內有 mPDC-E2-specific

auto-reactive T cells。

由此研究結果，我們在 xenobiotic (2-OA BSA) 引起之 PBC 小鼠模式中，再以 $\alpha$ -GalCer 活化 iNKT cells 可加快及加重 PBC 疾病進程，且產生更為相似 PBC 病人的肝臟肉芽腫及纖維化的病徵。因此，未來我們可在此一小鼠模式下，配合 $\alpha$ -GalCer 的給予，使成為更好的 PBC 小鼠模式。加上 mPDC-E2 之製備及證明小鼠體內有 auto-reactive T cells 之存在，且此 auto-reactive T cells 亦是對抗與人類相同的自體抗原 (PDC-E2)，給予 $\alpha$ -GalCer 之 2-OA BSA 致敏小鼠將可廣泛用於研究 PBC 疾病之自體免疫機轉及治療的應用。

**關鍵詞：原發性膽道硬化症、iNKT cells、 $\alpha$ -GalCer、2-OA BSA 致敏小鼠、mPDC-E2、mPDC-E2-specific auto-reactive T cells**



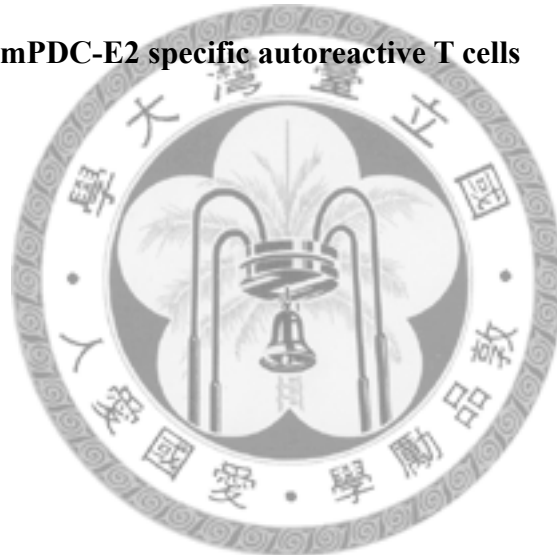
## Abstract

Primary biliary cirrhosis (PBC) is a chronic cholestatic liver autoimmune disease. The characteristics of PBC are the presence of anti-mitochondrial auto-Abs, the presence of auto-reactive lymphocyte infiltration in the portal triad of liver, and the destruction of biliary epithelial cells. The destroyed liver would become fibrosis and then failure at the end stage of disease. Invariant NKT (iNKT) cells, an unconventional T cells, are activated by glycolipids, such as  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer), presented by CD1d molecule on antigen presenting cells. After activation, iNKT cells immediately secrete a variety of cytokines, such as IL-4 and IFN- $\gamma$ , to regulate downstream immune cells. In PBC patients, both the frequency of iNKT cells and CD1d expression on bile duct epithelium were increased, suggesting that iNKT cells are correlated with the onset of PBC. Our previous study demonstrated that the increased number of hyper-reactive liver iNKT cells which secreted more IFN- $\gamma$  than IL-4 was noted in dnTGF $\beta$ RII PBC mice. However, in NKT cell deficient dnTGF $\beta$ RII mice, lymphocyte infiltration and bile duct damage in liver were alleviated. These results suggested that iNKT cells exacerbated liver bile duct injury by IFN- $\gamma$  production in early stage. In this study, we investigated the effects of activating iNKT cells in PBC. We intravenously injected  $\alpha$ -GalCer to activate iNKT cells and evaluated the PBC progress in xenobiotic (2-OA BSA) -induced PBC mouse model.

We report herein  $\alpha$ -GalCer injection exacerbated autoimmune cholangitis in 2-OA BSA immunized mice, including increased AMA production, portal inflammation, bile duct damage, granuloma formation as well as fibrosis, and Th1 and Th17 prone immune responses. Liver total mononuclear cells were significantly increased in  $\alpha$ -GalCer-injected 2-OA BSA immunized mice. Importantly, significantly increased CD8<sup>+</sup> T cells in the liver were noted in  $\alpha$ -GalCer-injected 2-OA BSA immunized mice. Moreover,  $\alpha$ -GalCer intravenous injection up-regulated the antigen presenting capacity of dendritic cells (DCs) in 2-OA BSA immunized mice. These results suggest that iNKT cell activation by  $\alpha$ -GalCer administration exacerbate PBC by either secreting IFN- $\gamma$  or stimulating the maturation of DCs and subsequently recruiting CD8<sup>+</sup> T cells to destroy bile ducts. In addition, we also identified mPDC-E2 specific auto-reactive T cells in 2-OA BSA-immunized mice.

In conclusion, our results demonstrated that administration with  $\alpha$ -GalCer to activate iNKT cells in 2-OA BSA immunized mice exacerbate profound liver injury. Moreover, the features of  $\alpha$ -GalCer injected 2-OA BSA immunized mice were more similar to that of patients of PBC, such as the presence of granuloma and fibrosis. Meanwhile, we also expressed mPDC-E2 and defined the presence of auto-reactive T cells directed against PDC-E2, the immune dominant autoantigen of human PBC. Therefore,  $\alpha$ -GalCer administration in 2-OA BSA immunized mice could be a better mouse model for studying the mechanism of autoimmune pathogenesis and therapeutic strategies of PBC.

**Keyword: primary biliary cirrhosis, iNKT cells,  $\alpha$ -GalCer, 2-OA BSA-induced PBC mouse model, mPDC-E2 specific autoreactive T cells**



## 縮寫對照表

2-OA BSA	2-octynoic acid bovine serum albumin
$\alpha$ -GalCer	$\alpha$ -galactosylceramide
ABD	Autoimmune biliary disease
AMAs	Anti-mitochondrial antibodies
APCs	Antigen presenting cells
BMDCs	Bone marrow-derived dendritic cells
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
Con A	Concanavalin A
DCs	Dendritic cells
dnTGF $\beta$ RII	Dominant negative TGF- $\beta$ receptor II transgene
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
H-E stain	Hematoxylin and eosin stain
HBSS	Hank's balanced saline solution
HSCs	Hepatic stellate cells
IFA	Incomplete Freund's Adjuvant
iNKT cells	Invariant natural killer T cells
i.v.	Intravenously
NK cells	Natural killer cells
NOD	Non obese diabetic
PBC	Primary biliary cirrhosis
PDC-E2	Pyruvate dehydrogenase complex-E2 subunit
TCR	T cell receptor
Th	T helper

# 目錄

封面	
口試委員審定書	
碩士論文授權書	
致謝 .....	i
中文摘要 .....	ii
Abstract.....	iv
縮寫對照表 .....	vi
圖表目錄 .....	ix
第一章 總論 .....	1
1.1 原發性膽道硬化症 (primary biliary cirrhosis ; PBC).....	1
1.2 PBC 之動物模式.....	4
第二章 探討 iNKT cells 的活化對於原發性膽道硬化症小鼠之影響 .....	7
1. 研究背景 .....	7
1.1 自然殺手 T 細胞 (Nature Killer T cells ; NKT cells).....	7
1.2 iNKT cells 在自體免疫病中扮演之角色.....	9
1.3 iNKT cells 在 PBC 扮演之角色.....	10
2. 研究目的 .....	11
3. 材料與方法.....	12
4. 實驗結果 .....	17
4.1 Naïve 小鼠給予 $\alpha$ -GalCer 後，體內 iNKT cells 迅速活化，並在短時間內釋放出 IL-4 及 IFN- $\gamma$ .....	17
4.2 12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠血清 AMAs 效價上升、晚期肝臟膽道破壞加重，進而引發肝臟纖維化.....	17
4.3 12 週後，初期給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠，吸引大量 CD8 <sup>+</sup> T cells 浸潤至肝臟.....	20
4.4 12 週後，初期給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠建立 Th1 與 Th17 主導之細胞激素微環境.....	20
4.5 4 週後，初期給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠膽道破壞加快、血清	

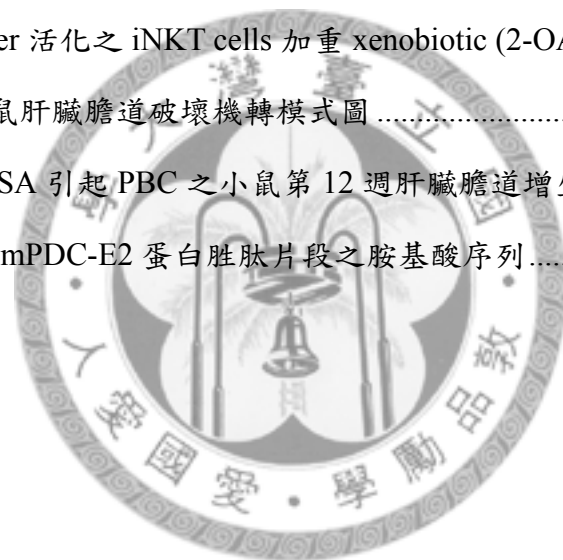


AMAs 效價上升.....	21
4.6 4 週後，初期給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠吸引大量 CD8 <sup>+</sup> T cells 與 B cells 浸潤至肝臟.....	22
4.7 4 週後，初期給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠可活化肝臟與脾臟 DCs，並增加其呈獻抗原之能力.....	23
5. 討論.....	25
第三章 Xenobiotic 引起之原發性膽道硬化症小鼠模式體內 mPDC-E2-specific autoreactive T cells.....	30
1. 研究背景.....	30
1.1 自體反應 T 淋巴球 (Auto-reactive T lymphocyte).....	30
1.2 自體反應 T 淋巴球在 PBC 疾病扮演之角色.....	31
2. 研究目的.....	33
3. 材料與方法.....	34
4. 實驗結果.....	37
4.1 以 <i>Pichia pastoris</i> 酵母菌表現蛋白系統表現小鼠 PDC-E2 蛋白片段.....	37
4.2 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠體內，可測得 mPDC-E2-specific T cells.....	37
5. 討論.....	40
第四章 總結.....	42
圖.....	44
表.....	69
參考文獻.....	72
附錄.....	81

## 圖表目錄

圖一、	Xenobiotics (2-OA BSA) 引發小鼠產生原發性膽道硬化症之 實驗程序.....	45
圖二、	給予 $\alpha$ -GalCer 後，小鼠血清 IL-4 與 IFN- $\gamma$ 濃度迅速上升.....	46
圖三、	給予 $\alpha$ -GalCer 一小時後，iNKT cells 迅速釋放 IL-4 與 IFN- $\gamma$ .....	47
圖四、	給予 $\alpha$ -GalCer 促使 PBC 小鼠血清中 anti-PDC-E2 IgM 和 IgG 效價上升.....	48
圖五、	12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠肝臟膽道破壞更嚴重.....	49
圖六、	12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠產生肝臟纖維化.....	50
圖七、	12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠肝臟中可見 HSCs .....	51
圖八、	12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠肝臟單核細胞總數增加.....	52
圖九、	12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠肝臟 CD8 <sup>+</sup> T cells 細胞 數增加.....	53
圖十、	12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠肝臟建立 Th1 與 Th17 細胞激素微環境.....	54
圖十一、	4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠肝臟膽道破壞加快.....	55
圖十二、	4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠血清中 anti-PDC-E2 IgM 和 IgG 效價上升 .....	56
圖十三、	4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠肝臟單核細胞增加.....	57
圖十四、	4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠肝臟免疫細胞增加.....	58
圖十五、	給予 $\alpha$ -GalCer 18 小時後，迅速促使小鼠肝臟與脾臟內 DCs 成熟.....	59
圖十六、	4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠肝臟 DCs 細胞數增加 .....	60
圖十七、	4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠肝臟與脾臟 DCs 表面的	

MHC class I 與 MHC class II 分子表現量均增加 .....	61
圖十八、 mPDC-E2 DNA 及胺基酸序列與 pPICZ $\alpha$ B 載體 .....	62
圖十九、 小鼠 PDC-E2 酵母菌表現系統流程圖 .....	63
圖二十、 <i>Pichia pastoris</i> 酵母菌表現 mPDC-E2 蛋白片段.....	64
圖二十一、脾臟 T cells 與 BMDCs 之純度 .....	65
圖二十二、2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠脾臟中存在有 mPDC-E2-specific T cells.....	66
圖二十三、2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠脾臟存在有 mPDC-E2-specific T cells .....	67
圖二十四、 $\alpha$ -GalCer 活化之 iNKT cells 加重 xenobiotic (2-OA BSA) 引起之 PBC 小鼠肝臟膽道破壞機轉模式圖 .....	68
表一、 2-OA BSA 引起 PBC 之小鼠第 12 週肝臟膽道增生與纖維化情形 ...	70
表二、 合成之 mPDC-E2 蛋白胜肽片段之胺基酸序列.....	71



# 第一章 總論

## 1.1 原發性膽道硬化症 (primary biliary cirrhosis ; PBC)

PBC 為慢性膽汁鬱積肝臟的自體免疫疾病，主要盛行於北歐與北美等西方國家，在東方國家除日本外餘較為少見，且好發於年齡約為 55~60 歲的中年女性，其發生率較男性為高 (1-4)。

臨床症狀為有較高比例之患者早期出現疲累及不明原因搔癢，並在數月至數年出現黃疸症狀；由於膽道破壞，膽汁鬱積於肝臟，使得代謝有毒物無法排出，造成肝臟纖維化、硬化，甚至產生肝臟衰竭。目前診斷 PBC 之準則為：血清中可測得的抗粒線體抗體 (antimitochondrial antibodies ; AMAs) 、肝臟組織切片顯示門脈三角的膽道破壞以及肝臟酵素 (如鹼性磷酸酶) 超過六個月的上升，病患若具有以上兩種病徵，則推測可能患有原發性膽道硬化症，若要確診，須具備以上三種病徵 (1-2, 5)。

目前認為造成此一疾病原因可能牽涉到遺傳因子與環境因子，家族發病與同卵雙胞胎發病機率較一般人為高，且與 X 染色體有較高之相關性，故女性得病率高於男性；環境存在之細菌或化合物可能因與自體抗原決定位相似，藉由感染或暴露，引發分子擬似機轉 (molecular mimicry) 造成疾病，但目前對其真正致病機轉尚未明瞭 (2, 5)。

### 1.1.1 組織學上的病理特徵

疾病過程中，發炎細胞浸潤至肝臟門脈三角，其中以淋巴球 (T cells 與 B cells) 為主，造成門脈三角之膽道上皮細胞受到破壞，利用 H-E 染色後，可觀察到淋巴球浸潤、門脈三角結構散亂，甚至無法識別出膽道管腔；根據肝臟切片發炎程度可將疾病分級：第一級為大量發炎細胞浸潤至門脈三角。第二級為膽道數目減少，發炎範圍延伸出門脈三角。第三級為在門脈三角間產生纖維化間隔。第四級

為肝臟產生硬化 (1-2) 。

#### 1.1.1.1 肝臟發炎細胞浸潤

疾病初期的病灶上，可發現膽道上皮細胞被淋巴球所環繞，其細胞型態為空泡狀、縮小樣以及皺縮樣，此壞死之膽道上皮細胞周圍會形成肉芽腫狀 (granuloma) 病灶，且此肉芽腫中含有大量發炎細胞，如組織球、淋巴球、漿細胞、以及嗜伊紅性白血球。疾病中期後，發炎細胞逐漸由損壞的門脈三角區往外擴散，此一時期的膽道已遭破壞嚴重，無法辨識其管腔，周圍之肝細胞亦逐漸空泡化，造成碎片狀壞死 (biliary piecemeal necrosis) (1, 6-8) 。

#### 1.1.1.2 肝臟纖維化及硬化

疾病後期病灶，肝臟膽道及其周圍肝細胞受到發炎細胞的破壞後，可能釋放氧化物質或形成凋亡小體 (apoptotic bodies)，促使肝臟星狀細胞 (hepatic stellate cells; HSCs) 活化，並分化成為肌纖維母細胞 (myofibroblasts)，分泌細胞激素吸引更多發炎細胞至肝臟並沉積細胞外間質蛋白 (extracellular matrix proteins)，如膠原蛋白纖維以及網狀蛋白纖維，造成肝臟纖維化間隔形成，最後肝臟持續結疤，產生肝臟結節而硬化 (1, 9-10) 。

#### 1.1.2 免疫學上的病理特徵

自從美國 university of California at Davis 的 Dr. Gershwin 研究團隊成功表現出人類粒線體酵素抗原 (pyruvate dehydrogenase complex-E2 subunit; PDC-E2) 並鑑定為 PBC 之自體抗原後 (11)，PBC 研究迅速發展，如發現人類自體反應淋巴球之抗原決定位 (epitope) 以及建立動物模式等，目前科學家仍致力於利用動物模式尋找出 PBC 相關致病因子及其免疫學上之病理機制。

### 1.1.2.1 自體抗體反應 (Auto-antibody response)

目前已知 PBC 之自體抗原為 2-oxo-acid dehydrogenase complexes 家族中的 pyruvate dehydrogenase complex-E2 subunit (PDC-E2) 、 branched-chain 2-oxo-acid dehydrogenase complex-E2 subunit (BCKD-E2) 、 ketoglutaric acid dehydrogenase complex-E2 subunit (OGDC-E2) 及 di-hydrolipoamide dehydrogenase-binding protein (E3-BP) ，這四種自體抗原位於粒線體基質中，主要參與酮酸氧化脫羧作用，且同樣具有相似之 lipoyl domain。PBC 病人血清中以 anti-PDC-E2 autoAbs 較為常見，約有 95% 的患者帶有此自體抗體，是 PBC 診斷指標之一，同時，此抗體對抗之抗原決定位位於 PDC-E2 lipoyl domain 上 (2, 12) 。

目前認為 PBC 致病機制可能牽涉到 auto-reactive B cells 所產生之 AMAs，當膽道上皮細胞死亡後，粒線體基質中的 PDC-E2 暴露，與 AMAs 結合形成免疫複合體，被 APCs 吞噬並呈獻給 PDC-E2-specific T cells，造成此細胞浸潤至肝臟門脈三角，破壞膽道上皮細胞；AMAs 當中的 anti-PDC-E2 IgA 亦可能經由穿胞運輸 (transcytosis) 進入膽道細胞與胞內粒線體反應，造成細胞死亡，釋放更多 PDC-E2 抗原，引發後續自體免疫反應 (13) 。

### 1.1.2.2 自體反應 T 淋巴球 (Auto-reactive T lymphocyte)

PBC 患者的肝臟中存在有 PDC-E2-specific lymphocyte (包括 CD4<sup>+</sup> T cells 、 CD8<sup>+</sup> T cells 及 NKT cells) 浸潤至門脈三角，其細胞百分比較周邊血液中來得高，而細胞表面上 T cell receptor (TCR) 所辨認之 epitope 亦位於 PDC-E2 lipoyl domain 上 (12-13) 。分析肝臟中浸潤之單核細胞，發現細胞內 IFN- $\gamma$  mRNA 表現量較 IL-4 mRNA 來得高，且 IFN- $\gamma$  表現量與膽道發炎程度呈高度相關，表示此一疾病較偏向 Th1 細胞主導之免疫反應 (14-15) 。且由於 PDC-E2-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells 的鑑定，認為此肝臟增加之 CD8<sup>+</sup> T cells 可能為毒殺膽道上皮細胞的主要元凶之一 (16-17) 。

## 1.2 PBC 之動物模式

PBC是屬於慢性的膽汁鬱積肝臟疾病，故在研究此疾病相關之免疫機制時，受限於檢體來源，只能取得PBC患者晚期發病後肝臟組織，使得科學家無法得知疾病初期肝臟內發炎反應或細胞免疫反應，因而亟需動物模式來研究此一疾病之進程，包含體內如何破除免疫耐受性 (break immune tolerance) 產生自體反應抗體、淋巴球以及浸潤至肝臟之發炎細胞扮演何種角色等自體免疫相關機制，更重要為尋找出此一疾病的致病因子。及至目前已發展出五種類似於PBC病徵的自體免疫膽道疾病 (autoimmune biliary disease; ABD) 動物模式，包括NOD.c3c4 and NOD.c3c4-derived、dominant negative transforming growth factor- $\beta$  receptor II (dnTGF $\beta$ RII)、IL-2R $\alpha^{-/-}$ 、*Novosphingobium spp.* -infected以及xenobiotic-induced PBC動物模式 (18-24)。

### 1.1.1 NOD.c3c4 and NOD.c3c4-derived小鼠模式

NOD (non-obese diabetic) 小鼠原為自發性糖尿病小鼠模式，由於體內免疫細胞缺陷，產生自體免疫反應，同時亦造成其他自體免疫疾病，如自體免疫唾腺炎、甲狀腺炎及類Sjögren症候群。意外發現將NOD小鼠染色體3與4上的Idd (insulin-dependent diabetes) 基因組與正常小鼠置換後，此小鼠不會產生糖尿病，反而出現淋巴球浸潤至肝臟膽道以及肝臟出現類肉芽腫組織、血清中可偵測出AMAs等PBC疾病症狀。目前認為其發病原因可能為基因缺陷所導致T細胞不正常增生所致 (18-19)。

### 1.1.2 Dominant negative TGF- $\beta$ receptor II 小鼠模式

TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) 是具免疫調節功能之細胞激素，但因TGF- $\beta$ 基因剔除小鼠出生3至4周內即死亡，無法用以研究自體免疫疾病。然而，利用基因轉殖技術，將具有缺陷之TGF- $\beta$  receptor II接合在CD4 promoter下表現，

使具有 CD4 promoter 之細胞因 dominant negative TGF- $\beta$  receptor II 基因，使得表現的 TGF- $\beta$  受體無法接收 TGF- $\beta$  訊息傳遞，因而發現此小鼠在生長過程中，自發性產生 AMAs、淋巴球浸潤至肝臟膽道、肝臟內 CD8<sup>+</sup> T cells 大幅增加 (20)。若將 CD8<sup>+</sup> T cells 轉移至 Rag-1<sup>-/-</sup> 小鼠，則亦出現 PBC 病徵，表示 dominant negative TGF- $\beta$  receptor II 轉殖小鼠體內可能存在有自體反應 CD8<sup>+</sup> T cells，且此細胞在 PBC 疾病進程上應扮演重要之角色 (18, 25)。

### 1.1.3 IL-2R $\alpha$ <sup>-/-</sup> 小鼠模式

IL-2 對於 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells 的發育與擴展相當重要，若將 IL-2 receptor  $\alpha$  剔除，小鼠出現嚴重貧血及自體免疫疾病。血清可偵測得 AMAs，肝臟出現淋巴球浸潤至門脈區以及發炎現象，且肝臟內 CD8<sup>+</sup> T cells 亦有明顯增加情形 (18, 21)。

### 1.1.4 *Novosphingobium spp* -infected 小鼠模式

*Novosphingobium aromaticivorans* 體內存在有相似 PDC-E2 的抗原，且具保留性抗原決定位點 (conserved epitope)，同時，此細菌細胞壁亦含醣脂質，可活化主導 innate immunity 之 NKT cells，因此，科學家利用此細菌感染小鼠，發現血清中亦可偵測到 AMAs 的存在，且肝臟門脈三角出現淋巴球浸潤及膽道破壞，甚至形成肉芽腫組織 (22-23)。

### 1.1.5 Xenobiotic-induced PBC 小鼠模式

在 2008 年，Dr. Gershiwin 實驗室發表利用 2-octynoic acid (2-OA) (一種 xenobiotics) 接合至胎牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 上的 lysine，成功引發小鼠產生 PBC 病徵。2-OA 化合物主要為模擬 PDC-E2 上 lipoyl domain 之 lipoic acid，搭配 complete Freund's Adjuvant (CFA) 與 incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 佐劑，以腹腔注射的方式，成功使得小鼠血清中 AMAs 效價上升、



淋巴球浸潤至肝臟門脈三角以及肝臟 CD8<sup>+</sup> T cells 增加。此疾病小鼠基因背景正常，藉由環境因子破除免疫耐受性而產生疾病，對於探討 PBC 的免疫機轉例如先天性免疫、toll-like receptors、autoreactive T cells 與 B cells、regulatory T cells、自然發生性自體抗體、細胞凋亡、免疫調控或免疫療法都是極好的動物模式 (24)。



## 第二章 探討 iNKT cells 的活化對於原發性膽道硬化症小鼠之影響

### 1. 研究背景

#### 1.1 自然殺手 T 細胞 (Nature Killer T cells ; NKT cells)

NKT cells 除了型態與一般傳統 T cells 類似外，其表面標記以及功能均與一般 T cells 不相同。在疾病上主要擔任調控者的角色，負責調控其下游免疫細胞，如 T cells、NK cells、B cells 以及 DCs 等細胞，因此，NKT cells 被認為與許多疾病相關，如自體免疫疾病、腫瘤、感染、動脈硬化症、移植以及氣喘等 (26-28)。

##### 1.1.1 NKT cells 的定義

NKT cells 其細胞表面除了表現 T 細胞標記 $\alpha\beta$  TCR 及 CD3 外，亦表現 NK cells 系列標記，如在 C57BL/6 小鼠上表現 NK 1.1 以及在人類上表現 CD56 等標記。此外，依據其 TCR 與對抗原呈獻細胞 (antigen presenting cells ; APCs) CD1d (MHC class I like) 依賴性的不同，可將 NKT cells 分為三群 (29)：

- (1) Type 1 NKT (classical NKT) cells：其 TCR 為 semi-invariant CD1d-restricted  $\alpha\beta$  TCR，固定是由  $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$  配對  $V\beta 8$ 、 $V\beta 7$  或  $V\beta 2$  組成 (人類則為  $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$  配對  $V\beta 11$ )，故此細胞群亦稱為 invariant NKT ( iNKT ) cells (30-31);其可專一性地辨識經由 APCs 上 CD1d 所呈獻的醣脂類 (glycolipid)，如  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer；marine sponge 的萃取物)，而活化 (32-33)。
- (2) Type 2 NKT (non-classical NKT) cells：其 TCR 並非固定組成，而是多樣性的；且亦可辨認由 CD1d 所呈獻的抗原，但無法辨認 $\alpha$ -GalCer (33)。
- (3) Type 3 NKT (NKT-like) 細胞：其表面標記表現 NK1.1，且 TCR 具有多樣性，但無法辨認 CD1d 分子以及 $\alpha$ -GalCer (33)。

### 1.1.2 iNKT cells 的活化

iNKT cells 除上述表現 invariant TCR 外，亦可經由 CD4 與 CD8 加以分類，小鼠體內大多數 iNKT cells 表現 CD4<sup>+</sup> 或兩者都不表現 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)，而人類 iNKT cells 則部分細胞可表現 CD8α<sup>+</sup>。iNKT 細胞在小鼠肝臟中含量很高，約佔有肝臟淋巴球的 10-40%，其他器官組織 (如脾臟、淋巴結、胸腺與血液) 含量則較少 (34-35)。

iNKT cells 可辨識 APCs 表面的 CD1d 分子與呈獻之醣脂類抗原而活化。其中，CD1d 分子會表現在腸道黏膜上皮細胞 (包括膽道上皮細胞)、造血細胞、胸腺細胞、T cells、B cells、肝細胞、巨噬細胞以及 DCs 表面上 (36)。而 CD1d 分子所呈獻之醣脂類依照來源可分為內源性 (endogenous) 與外源性 (exogenous)；內源性醣脂類如 isoglobotrihexosylceramide (iGb3)，對於 NKT 的發育可能扮演重要角色 (26, 37)。外源性醣脂類多存在於革蘭氏陰性、脂多醣陰性菌的細胞壁上，如 *Sphingomonas* 菌株以及 *Borrelia burgdorferi*，可活化 iNKT cells，引發 innate immune response，幫助其他免疫細胞清除感染源 (26)。

### 1.1.3 iNKT cells 的生物功能

iNKT cells 主要扮演免疫調控之角色。當 iNKT cells 辨識到 APCs 表面 CD1d 分子呈獻之 α-GalCer 後，短時間內即分泌大量細胞激素 (cytokine) 以及趨化激素 (chemokine)，包括 Th1 細胞激素 (IFN-γ、TNF-α)、Th2 細胞激素 (IL-4、IL-10、IL-13)，調控其下游細胞如 T cells、B cells、DCs 及 NK cells 等 (27, 38-39)。除大量分泌細胞激素外，iNKT cells 亦可藉由細胞表面 FasL 與細胞內 perforin 及 granzyme 執行毒殺能力 (28)。

當 iNKT 細胞受 DCs 呈獻 α-GalCer 活化後，亦會釋放細胞激素促使 DCs 成熟，如釋放 IFN-γ 與 IL-4，使得 DCs 表面分子 CD80、CD86 以及 CD40 表現量增加，同時 DCs 呈獻抗原能力亦會加強。而 DCs 受到 iNKT 細胞活化後，除了分化成熟外，亦分泌 IL-12 加強 iNKT cells 反應以及活化下游 NK cells，引發 NK cells

的毒殺作用，故 iNKT cells 亦具有間接調控毒殺腫瘤細胞功能 (28)。然而，在 NOD 小鼠引起之第一型糖尿病模式下，iNKT 細胞分泌之細胞激素如 IL-4、IL-13、GM-CSF 等，亦可能促使 DCs 分化成耐受型 DC (tolerogenic DC)，釋放 IL-12 能力下降，並增加 IL-10 分泌，促進調控型 T 細胞 (regulatory T cells) 抑制自體反應 T 細胞 (28)。因此，從以上兩種結果顯示，iNKT cells 可同時具備促進及抑制免疫系統之功能。

由於 iNKT 細胞功能複雜，目前對於其免疫反應上的角色分歧，主要認為其具有 Th1 與 Th2 反應調控、調控自體免疫反應、控制微生物感染及排斥腫瘤的能力，其中，調控自體免疫反應功能爭議較多，故需要更多研究才能了解其調控機轉 (38)。

## 1.2 iNKT cells 在自體免疫病中扮演之角色

自體免疫疾病為體內產生對抗自體抗原之抗體與免疫細胞，通常為過度免疫反應。iNKT cells 因活化後可分泌多種細胞激素而具備有調控免疫反應之能力，故一般認為 iNKT cells 在自體免疫中應扮演著重要角色，而在許多的自體免疫動物模式下，確實亦發現 iNKT 細胞同時具有抑制與促進自體免疫的產生 (40)。

NOD 小鼠模式下，給予 $\alpha$ -GalCer，可促使 Th2 細胞分化，抑制 IFN- $\gamma$  分泌，並藉由 regulatory T cells 幫助下，避免小鼠產生自體免疫糖尿病 (41-42)。而在另一種 type 1 diabetes 轉殖基因鼠下 (Ins-HA mice)，則發現大量的 iNKT 細胞會促使致糖尿病 CD8<sup>+</sup> T cells 破壞胰島 $\beta$ 細胞，加重疾病 (43)。此外，在多發性硬化症小鼠模式下 (experimental autoimmune encephalomyelitis mice; EAE mice)，給予 $\alpha$ -GalCer 後，同樣可避免及加重疾病 (44-45)。造成這些不一致的結果，目前推測可能與所使用之動物模式或 $\alpha$ -GalCer 給予的劑量、路徑以及時間點有關。

由於 iNKT cells 在自體免疫疾病上可能同時扮演避免疾病以及加重疾病之角色，故其相關之調控機制需更加清楚，才能應用至人體，做為治療之用途。

### 1.3 iNKT cells 在 PBC 扮演之角色

iNKT cells 佔有肝臟淋巴球的比例較周邊血液高，甚至在小鼠肝臟可高達 40%，目前原因不明，但推測可能與肝臟 kuppfer cells、竇狀隙內皮細胞以及肝細胞表現較高之 CD1d 分子有關 (46)。

然而，在 Concanavalin A (Con A) 引起之肝炎小鼠模式下，發現在缺少 NKT cells 下 (CD1d<sup>-/-</sup> mice)，小鼠肝臟不會產生病徵，並推測疾病的發生可能與 iNKT cells 產生之 IFN- $\gamma$  與 TNF- $\alpha$  有關 (47)；同時，給予  $\alpha$ -GalCer 至小鼠，亦會引起短時間內 ALT 上升，產生肝臟發炎之情形 (48)。故推測 iNKT cells 可能對於肝臟疾病的產生有舉足輕重的角色。

PBC 亦是肝臟發炎疾病。PBC 病人肝臟膽道上皮細胞相較於其他肝臟疾病 (慢性病毒性肝炎) 及正常人表現較多 CD1d 分子；同時，病人肝臟內 iNKT 細胞亦較正常人多，故推測 iNKT cells 可能在此一疾病下扮演某種角色 (49-50)。

在動物模式上我們發現 6-8 週的 dnTGF $\beta$ RII 小鼠模式，小鼠肝臟中含有高度活化之 iNKT cells，分泌較高量之 IFN- $\gamma$ 。並且，利用 dnTGF $\beta$ RII mice 與 CD1d 剔除小鼠 (CD1d<sup>-/-</sup> mice) 育種後，其子代 (CD1d-deficient dnTGF $\beta$ RII mice) 肝臟淋巴球浸潤減少以及膽道發炎情況減輕，表示 iNKT cells 可能會影響 PBC 疾病 (51)。此外，在以 *Novosphingobium spp.* 感染引發 PBC 之研究，顯示除了此菌具有 PDC-E2 homologous enzyme 外，其表面細胞壁亦含有活化 NKT 細胞的醣脂類，有可能是引起小鼠破除免疫耐受性的原因，再者，利用 CD1d<sup>-/-</sup> mice 感染此菌，則發現疾病症狀如自體抗粒線體抗體效價下降以及膽道發炎損壞程度減輕的現象 (23)。以上研究說明 iNKT 細胞可能在疾病初期扮演使疾病加重之角色。

## 2. 研究目的

我們先前的研究發現 dnTGF $\beta$ R2 小鼠體內 iNKT cells 在早期可藉由 IFN- $\gamma$  的分泌而使 PBC 變得更加嚴重。欲進一步探討 iNKT cells 活化對此疾病的影響，我們以靜脈注射 $\alpha$ -GalCer 活化 iNKT cells，並觀察其對於 xenobiotics (2-OA BSA) 致敏之 PBC 小鼠疾病進程變化。

本實驗選擇初期以 $\alpha$ -GalCer 靜脈內注射方式活化 xenobiotics (2-OA BSA) 致敏之 PBC 小鼠體內的 iNKT cells，利用觀察小鼠體內 anti-PDC-E2 自體抗體 (IgG、IgM 與 IgA) 效價、肝臟單核細胞浸潤現象以及肝臟病理變化來研究在疾病初期活化 iNKT cells 對疾病進程的變化，更進一步，我們探討造成此疾病進程變化的原因。



### 3. 材料與方法

#### 3.1 實驗用小鼠

實驗選用 8 至 9 週大 C57BL/6 (B6) 雌性小鼠，購置台大醫學院動物中心或國家實驗動物中心，由台大醫學院動物中心代養。小鼠飼養於塑膠籠位，內鋪厚實墊料，數量控制在 6 隻小鼠以下，給予乾淨充足食物及飲水，濕度控制在  $60 \pm 10\%$ ，溫度控制為  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ，並有適當之光週期（日照時間：每日八時至二十時）。動物照護與動物操作流程經國立台灣大學動物委員會 (Animal Committee of National Taiwan University) 核定。

#### 3.2 Xenobiotics (2-OA BSA) 引發 PBC 小鼠模式之建立

根據 Dr. Gershwin (University of California at Davis, CA, USA) 實驗室所建立之小鼠模式，簡述如下：每隻小鼠以腹腔內注射 (intraperitoneal ; i.p.) 2-octynoic acid BSA (2-OA BSA ;  $100\mu\text{g}/150\mu\text{l}$ )，混合於等量 CFA (Cat. NO. SI-F5881, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 或是 IFA (Cat. NO. SI-F5506, Sigma Aldrich) 中。第一次致敏以 CFA 當佐劑，之後每隔兩週以 IFA 當佐劑 boost，第 4 或 12 週犧牲小鼠。實驗流程見圖一。2-OA BSA 亦由 Dr. Gershwin 實驗室提供 (24)。

#### 3.3 $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) 之給予

第一次致敏前 18 小時以靜脈注射 (intravenously ; i.v.) 方式給予  $\alpha$ -GalCer (KRN7000, Cat. NO. SL-232, BIOMOL, Malford Court, Exeter, UK) ( $2\mu\text{g}$  in  $100\mu\text{l}$  PBS)，控制組給予 PBS，並在第 2 週與第 4 週再次給予  $\alpha$ -GalCer ( $2\mu\text{g}$  in  $100\mu\text{l}$  PBS) 或 PBS (圖一)。

#### 3.4 血清樣品之收集

實驗進行後每隔兩週以眼窩採血 (retro-orbital) 收集血液。在給予  $\alpha$ -GalCer

或 2-OA BSA 前採血，採取血量約 100 $\mu$ l，靜置 2~4 小時後，先以 7500 rpm 轉速離心 5 分鐘，再以 7000 rpm 轉速離心 10 分鐘，收集血清，於-20 $^{\circ}$ C 保存。

### 3.5 小鼠肝臟之灌流與病理切片判讀

小鼠斷頸犧牲後，開啟腹腔，以 30G 針頭從肝門靜脈或下腔大靜脈注射 0.2% BSA in PBS，對肝臟進行灌流；取下肝臟後，剪取四小葉肝葉，放入切片卡匣，固定於 10% 福馬林，包埋於 paraffin，並切下 4 $\mu$ m 厚度，製作成玻片，以 hematoxyline-eosin (H&E) 染色、Silver (reticulin) 染色、Azan 染色以及  $\alpha$ -smooth muscle actin 免疫組織化學染色，並於光學顯微鏡下，觀察病理變化。病理切片染色部份，委託台大動物中心製作。病理分數判讀部份，委託病理學家 Dr. Koichi Tsuneyama (University of Toyama School of Medicine, Japan) 判讀，評估項目包括肝臟發炎、門脈發炎、膽道破壞以及肉芽腫程度，其分數代表，分數 0：無明顯差異，分數 1：微小，分數 2：輕微，分數 3：中度，分數 4：嚴重。

### 3.6 小鼠肝臟單核細胞之純化

取下灌流過的肝臟，以 100 $\mu$ m cell strainer (Cat. NO. 352360, BD, San Jose, CA, USA) 將細胞磨入 0.2% BSA (Cat. NO. A3059, Sigma-Aldrich) in PBS 中；700 rpm 離心 1 分鐘，取上層細胞懸浮液，移至新 15ml 離心管；再以 0.2% BSA in PBS 潤洗細胞三次，轉速為 1500 rpm，時間 5 分鐘；細胞團塊以 8 ml 0.2% BSA in HBSS (Hank's balanced salt solution) 懸浮後，從底部加入 3 ml 室溫 Histopaque (Cat. NO. 10771, Sigma Aldrich)，室溫離心 2000 rpm，時間 20 分鐘，離心機下降速度改為慢速；取出界面層細胞至新離心管，加入 0.2% BSA in PBS，混合均勻後，離心 2500 rpm，時間 10 分鐘；完成後再 0.2% BSA in PBS 潤洗 2 次，最後以細胞計數器計數細胞。



### 3.7 小鼠脾臟細胞之純化

取下脾臟後，磨碎組織入 0.2% BSA in PBS 中，形成細胞懸浮液，並轉移至 15ml 離心管，靜置 10 分鐘；取上層無沉渣之細胞懸浮液至新 15ml 離心管，離心，轉速為 1500 rpm，時間 5 分鐘；去除上清液，並懸浮細胞團塊，加入冰 ACK buffer，作用 1 分鐘後，加入 0.2% BSA in PBS 潤洗細胞 2 次，轉速為 1500 rpm，時間 5 分鐘；完成後，以細胞計數器計數細胞。

### 3.8 流式細胞儀 (flow cytometry) 分析細胞表面及細胞內抗原

利用螢光標的抗體結合至目標細胞表現之特異抗原上，透過流式細胞儀機器，對目標細胞上之特異抗原表現加以分析。染色之各種螢光標定抗體：Alexa 488-conjugated anti-IL-4 mAb (Cat. NO. 557728, clone 11B11)、Alexa 488-conjugate anti-IFN- $\gamma$  mAb (Cat. NO. 557724, clone XMG1.2)，以上抗體廠牌為 BD；FITC conjugated anti-I-A<sup>b</sup> mAb (Cat. NO. 115305, clone KH74)、FITC conjugated anti-H-2K<sup>b</sup> mAb (Cat. NO. 116505, clone AF6-88.5)、PE conjugated anti-CD8 mAb (Cat. NO. 100707, clone 53-6.7)、PE conjugated anti-CD19 mAb (Cat. NO. 115707, clone 6D5)、PE conjugated anti-CD11c mAb (Cat. NO. 117307, clone N418)、PerCP/Cy5.5 conjugated anti-CD4 mAb (Cat. NO. 110433, clone GK1.5)、PerCP/Cy5.5 conjugated anti-TCR $\beta$  mAb (Cat. NO. 109227, clone H57-597)、PerCP/Cy5.5 conjugated anti-CD3 mAb (Cat. NO. 100327, clone 145-2C11)、PerCP/Cy5.5 conjugated anti-CD80 mAb (Cat. NO. 104721, clone 16-10A1)、PerCP/Cy5.5 conjugated anti-CD11c mAb (Cat. NO. 117327, clone N418)、PerCP/Cy5.5 conjugated anti-CD1d mAb (Cat. NO. 123513, clone 1B1)、APC conjugated anti-CD3 mAb (Cat. NO. 100311, clone 145-2C11)，以上抗體廠牌為 Biolegend (San Diego, CA, USA)；FITC conjugated anti-CD3 mAb (Cat. NO. 11-0031, clone 145-2C11)、PE conjugated anti-CD86 mAb (Cat. NO. 12-0862, clone GL1)、PE conjugated anti-CD40 mAb (Cat. NO. 12-0401, clone 1C10)、APC

conjugated anti-NK1.1 mAb (Cat. NO. 17-5941, clone PK136), 以上抗體廠牌為 eBioscience (San Diego, CA, USA) ; PE conjugated CD1d tetramer loaded with PBS57 (Dr. David Serreze (Jackson Lab, Bar Harbor, ME, USA) 提供) 。

細胞表面染色步驟:將細胞分裝為  $5 \times 10^5$ /管 (細胞內染色為  $1 \times 10^6$ /管), 5000 rpm 離心 2 分鐘; 將細胞團塊拍散, 加入 50  $\mu$ l 0.2% BSA in PBS (含 0.25 $\mu$ g Fc blocker, anti-16/32 Ab, Cat. NO. 14-0161, clone 93),  $4^\circ\text{C}$  下作用 10 分鐘; 加入 50  $\mu$ l 已定量之螢光抗體,  $4^\circ\text{C}$  下作用 30 分鐘; 以 1 ml 0.2% BSA in PBS 潤洗 1 次 (5000rpm; 2 分鐘); 去除上清液, 加入 350  $\mu$ l 0.2% BSA in PBS, 即可利用 FACS Calibur (BD) 分析。

細胞內染色步驟:完成細胞表面染色;加入 BD Fix/Perm buffer (70  $\mu$ l/test),  $4^\circ\text{C}$  下作用 15 分鐘; 以 1 ml 1X BD Perm/Wash buffer 潤洗 1 次 (8000rpm; 2 分鐘); 加入 50  $\mu$ l 1X BD Perm/Wash buffer (內含已標定螢光抗體),  $4^\circ\text{C}$  下作用 30 分鐘; 以 1 ml X BD Perm/Wash buffer S 潤洗 1 次 (8000rpm; 2 分鐘); 去除上清液, 加入 350  $\mu$ l 0.2% BSA in PBS, 即可利用 FACS Calibur (BD) 分析。

### 3.9 肝臟單核細胞之培養、刺激

無菌分離純化出肝臟單核細胞, 以  $2 \times 10^5$  cells/well, 培養在 96 well 圓底細胞培養盤上, 細胞以 1 $\mu$ g/ml anti-CD3Ab (Cat. NO. 100313, clone 145-2C11, Biolegend) 及 1 $\mu$ g/ml anti-CD28 Ab (Cat. NO. 100211, clone 37.51, Biolegend) 刺激, 總體積為 200 $\mu$ l, 細胞培養基為 RPMI-1640 (10% FBS、1% L-glutamin、1% PSA、1% HEPES), 培養細胞 48 小時後, 收集細胞培養液上清液。

### 3.10 以 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 測量 AMAs

PDC-E2 重組蛋白 (52) 利用 carbonate coating buffer (pH 9.6) 稀釋至濃度為 1 $\mu$ g/100 $\mu$ l, 加入 100 $\mu$ l 至 ELISA 盤 well 中,  $4^\circ\text{C}$  靜置過夜; 隔天以 0.05% tween 20 (Cat.NO. P5927, Sigma-Aldrich) in PBS 潤洗 4 次後; 加入 200 $\mu$ l blocking buffer (1%

casein) ，室溫靜置 1 小時，以 0.05% tween 20 in PBS 潤洗 4 次；加入 100 $\mu$ l 血清檢體 (IgG 測量以 1% casein 稀釋 400 倍，IgA 為 1:200)，室溫靜置 2 小時後，以 0.05% tween 20 in PBS 沖洗 10 次；加入 100 $\mu$ l HRP conjugated anti-mouse IgG (Cat. NO. 62-6720, Zymed laboratories, San Francisco, CA, USA) 或是 IgM (Cat. NO. 62-6820, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (1:10000) 或是 IgA (Cat. NO. 62-6520, Zymed laboratories) (1:5000) 後，室溫靜置 1 小時後，以 0.05% tween 20 in PBS 沖洗 10 次；加入 100  $\mu$ l tetramethylbenzidine substrate (TMB) (Cat. NO. 01016-1, Clinical Science Products, Mansfield, MA, USA) 呈色；最後加入 100  $\mu$ l 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，以 ELISA reader (SpectraMax M5<sup>e</sup>, Cisbio Bioassays, Bedford, MA, USA) 讀取 OD<sub>450nm</sub> 減去 OD<sub>540nm</sub> 吸光值。

### 3.11 以 ELISA 測量細胞激素之濃度

肝臟單核細胞培養 48 小時之細胞上清液，利用 R&D DuoSet<sup>®</sup> ELISA kit (Minneapolis, MN, USA) 分別定量 IL-4 (Cat. NO. DY404)、IFN- $\gamma$  (Cat. NO. DY485)、IL-17 (Cat. NO. DY421) 之濃度，實驗步驟皆依照產品所附之說明書操作。

### 3.12 繪圖及統計分析

繪圖及統計分析均使用 GraphPad Prism 5 軟體，繪製垂直散布圖與曲線圖，以 mean 與 SEM 表示；統計方法為軟體內建 Mann Whitney test， $\alpha$  值設定在 0.05。  
\*, p<0.05；\*\*, p<0.001；\*\*\*, p<0.0001。

流式細胞儀數據以 flow jo7.5 軟體分析與繪圖。

## 4. 實驗結果

### 4.1 Naïve 小鼠給予 $\alpha$ -GalCer 後，體內 iNKT cells 迅速活化，並在短時間內釋放出 IL-4 及 IFN- $\gamma$

為了解 $\alpha$ -GalCer 是否會活化體內 iNKT cells，我們利用眼窩靜脈內注射的方式給予小鼠 2  $\mu$ g  $\alpha$ -GalCer 或 PBS，在不同時間點，以眼窩採血方式收集小鼠血液，並分離血清，利用 ELISA 測量血清中 IL-4 及 IFN- $\gamma$  的濃度。結果顯示給予 PBS 組小鼠沒有釋放 IL-4 及 IFN- $\gamma$ ；相反地，給予小鼠 2  $\mu$ g  $\alpha$ -GalCer 後，血清 IL-4 在 2 小時迅速達最高峰 ( $7001.9 \pm 255.9$  pg/ml) (圖二 A)；IFN- $\gamma$  方面，在給予 $\alpha$ -GalCer 後 6 小時達到最高峰 ( $648.2 \pm 120.3$  pg/ml)，並持續釋放至約 24 小時 (圖二 B)。因此，給予 $\alpha$ -GalCer 至小鼠體內，血清中細胞激素會在短時間內上升，達至最大分泌量後下降。

接著，我們欲確認血清中細胞激素為小鼠體內 iNKT cells 受 $\alpha$ -GalCer 刺激活化後所分泌。我們同樣利用 i.v. 方式給予小鼠 2  $\mu$ g  $\alpha$ -GalCer，1 小時後犧牲小鼠，分離小鼠肝臟單核細胞，進行 IL-4 與 IFN- $\gamma$  細胞內染色。結果顯示在給 $\alpha$ -GalCer 後 1 小時，小鼠體內肝臟單核細胞中，主要分泌 IL-4 與 IFN- $\gamma$  之細胞群為帶 CD3<sup>+</sup>CD1d tetramer<sup>+</sup> 之 iNKT cells。其中，8.46% iNKT cells 分泌 IL-4，44.3% iNKT cells 分泌 IFN- $\gamma$ 。其他細胞群相對分泌量較低，甚至沒有分泌 (圖三)。因此，我們可確定血清中細胞激素應為 iNKT cells 受刺激所分泌。

綜合以上，我們發現以 i.v. 方式給予小鼠 $\alpha$ -GalCer 後，會促使小鼠體內 iNKT cells 活化，並在短時間內釋放 IL-4 與 IFN- $\gamma$  至血清中，其中 IL-4 分泌時間較 IFN- $\gamma$  短暫，只維持 6 小時，而 IFN- $\gamma$  可持續分泌至 24 小時。

### 4.2 12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠血清 AMAs 效價上升、晚期肝臟膽道破壞加重，進而引發肝臟纖維化

依據第一章總論所提 PBC 疾病較偏向 Th1 細胞主導之免疫反應，IFN- $\gamma$  對於

疾病之影響可能較 IL-4 重要 (14-15) 。且前一實驗已證實小鼠體內 iNKT cells 受 $\alpha$ -GalCer 刺激後，會大量分泌 IL-4 及 IFN- $\gamma$ ，其中，IFN- $\gamma$ 持續時間較 IL-4 久，故我們選擇在給予 $\alpha$ -GalCer 後，小鼠體內無 IL-4 影響下，以 2-OA BSA 致敏小鼠，探討初期以 $\alpha$ -GalCer 活化 PBC 小鼠體內 iNKT cells 對於 PBC 病情有何影響。實驗設計為以 i.v. 方式注射小鼠 2  $\mu$ g  $\alpha$ -GalCer，18 小時後，以 i.p. 方式注射 2-OA BSA 混合 CFA 佐劑致敏小鼠，每隔兩週注射一次， $\alpha$ -GalCer 注射至第 4 週，2-OA BSA 混合 IFA 佐劑注射至第 10 週，並在第 12 週犧牲小鼠 (圖一)。

首先，我們使用重組 PDC-E2 蛋白，以 ELISA 方式偵測血清 AMAs 效價。實驗數據顯示，兩組 PBC 小鼠血清中 AMA 效價均隨著致敏時間而增加，表示所有小鼠注射 2-OA BSA 後，皆可產生破除免疫耐受性的現象 (圖四)。在初次致敏 4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 組別在 anti-PDC-E2 IgM 與 IgG 效價均高於 PBC 組別，且在 IgM 部分，分別於第 4 週與第 12 週達統計上差異；IgG 部分，則為致敏 4 週後，均達統計上顯著高於 PBS 組別 (圖四 A、B)。IgA 部分，兩組則無明顯差異 (圖四 C)。以上結果顯示，PBC 小鼠給予 $\alpha$ -GalCer 活化 iNKT cells 後，可能直接地或間接地刺激 auto-reactive B cell，製造更多親和力高之抗 PDC-E2 自體抗體，如 anti-PDC-E2 IgG，並釋放至血清中。

接著，我們在第 12 週犧牲 PBC 小鼠，探討給予 $\alpha$ -GalCer 對於晚期 PBC 小鼠疾病變化有何影響。結果顯示，肝臟病理組織切片在 H-E 染色下，兩組皆出現淋巴球浸潤至肝臟門脈三角、肝臟門脈區發炎、膽道破壞及膽道增生現象，但可明顯發現給予 $\alpha$ -GalCer 組別淋巴球浸潤範圍較大，造成較嚴重之肝臟門脈區發炎及膽管破壞。而給予 $\alpha$ -GalCer 組別肝臟中，除出現上述之病徵外，亦發現門脈區附近出現肉芽腫組織以及門脈間纖維化間隔 (圖五 A)。肝臟病理切片經病理學家評估後，以病理分數表示其嚴重程度，發現給予 $\alpha$ -GalCer 組別其病理分數，無論是肝臟發炎、門脈區發炎、膽道破壞及產生肉芽腫程度皆高於 PBS 組別 (圖五 B)。從以上病理數據顯示，我們證實在初期給予 PBC 小鼠 $\alpha$ -GalCer，會促使 PBC 小鼠肝臟膽道的發炎及破壞加重，甚至如晚期 PBC 病人一樣，產生肝臟

肉芽腫及纖維化間隔。

為進一步確認給予 $\alpha$ -GalCer 組別之 PBC 小鼠其肝臟是具有纖維化病徵，我們使用銀染色與 Azan 染色方式，觀察小鼠肝臟中是否存在膠原蛋白纖維與網狀蛋白纖維等細胞外基質沉積。在銀染色下，給予 PBS 組別肝臟門脈區間無任何蛋白纖維沉積，給予 $\alpha$ -GalCer 組別肝臟門脈區間則出現粉紅色之膠原蛋白纖維與黑色網狀纖維蛋白沉積 (圖六 A)。此外，我們亦使用 Azan 染色方式來證實給予 $\alpha$ -GalCer 組別肝臟確實存在有膠原蛋白沉積。結果顯示，在 200X 視野下，給予 $\alpha$ -GalCer 組別肝臟門脈區間有藍色膠原蛋白纖維沉積，且是由門脈三角間互相延伸所形成之纖維化間隔 (圖六 B)。統計所有給予 PBS 組別與 $\alpha$ -GalCer 組別之肝臟纖維化情形，發現只有在給予 $\alpha$ -GalCer 才會出現肝臟纖維化，且嚴重程度為中度 (表一)。表示 $\alpha$ -GalCer 的給予，會促使 PBS 小鼠肝臟產生纖維化。

當肝臟受損傷時，會導致肝臟竇狀間隙中 HSCs 活化，分化成肌纖維母細胞，對肝臟進行修復，並沉積膠原蛋白纖維等細胞外基質，造成肝臟纖維化 (9)。其中， $\alpha$ -SMA 為 HSCs 活化標記，因此，我們以免疫組織化學染色法方式，針對 PBC 小鼠肝臟中帶有 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 標記之細胞，探討 $\alpha$ -GalCer 組別之肝臟纖維化是否與 HSCs 活化有關。由染色切片顯示，在 PBC 小鼠肝臟中，只有 $\alpha$ -GalCer 組別肝臟中存在有 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> cells，並散布在肝臟間隙中，高倍率視野下檢視，可觀察出 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> cells，因細胞質可儲存 retinoid，出現脂質空泡樣 (圖七)。

故從以上病理組織切片數據中，我們可以斷定地提出，在初期給予 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠 $\alpha$ -GalCer 後，活化 PBC 小鼠體內 iNKT cells，會促使 PBC 小鼠肝臟膽道破壞情形加重，進而造成 PBC 小鼠肝臟纖維化，其中，肝臟纖維化成因，可能為 HSCs 活化後，分泌並沉積膠原蛋白所造成。

#### 4.3 12 週後，初期給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠，吸引大量 $CD8^+$ T cells 浸潤至肝臟

我們接著分析 PBC 小鼠肝臟中單核細胞總數與組成，探討給予 $\alpha$ -GalCer 導致 PBC 疾病加重之成因。我們利用 Histopaque 濃度梯度離心方式分離肝臟單核細胞，ACK buffer 處理紅血球方式分離脾臟細胞。細胞經顯微鏡計數後發現， $\alpha$ -GalCer 組別在肝臟單核細胞總數高於 PBS 組別，但未達統計上顯著 (圖八 A)。脾臟細胞總數方面，兩組間無明顯差異 (圖八 B)。表示給予 $\alpha$ -GalCer 後，能專一性地造成肝臟浸潤之單核細胞增加，而不影響脾臟之細胞數變化。

為了解是何種免疫細胞影響 PBC 小鼠晚期疾病加重，我們利用流式細胞儀分析 PBC 小鼠肝臟單核細胞之組成。結果顯示，給予 $\alpha$ -GalCer 組別其肝臟單核細胞百分比組成相較於 PBS 組別，在  $CD3^+$ T cells 及  $CD8^+$ T cells 皆達統計上顯著增加，而 B cells 則相對達統計上顯著減少 (圖九 A)。在細胞總數上， $\alpha$ -GalCer 組別依舊在  $CD3^+$ T cells 及  $CD8^+$ T cells 達統計上顯著增加，其他免疫細胞則稍微增加，其中，具毒殺能力之  $CD8^+$ T cells 增加 2-3 倍 ( $p < 0.001$ ) (圖九 B)。

由上述實驗可知，我們在初期給予 PBC 小鼠 $\alpha$ -GalCer 後，會吸引大量執行毒殺功能之  $CD8^+$ T cells 浸潤至肝臟中，因而導致晚期 PBC 小鼠疾病加重。

#### 4.4 12 週後，初期給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠建立 Th1 與 Th17 主導之細胞激素微環境

欲深入探討給予 $\alpha$ -GalCer 至 PBC 小鼠後，為何會加重肝臟膽道破壞。我們分離 PBC 小鼠肝臟單核細胞，以 anti-CD3 Ab 與 anti-CD28 Ab 非特異性地刺激 T cells 48 小時後，收集細胞培養上清液，量測肝臟 T cells 所分泌之 IL-4、IFN- $\gamma$  與 IL-17 濃度。結果顯示，給予 $\alpha$ -GalCer 組別其 IFN- $\gamma$  對 IL-4 比值高於 PBS 組別，表示較具 Th1 細胞激素優勢 (圖十 A)。除了 Th1 反應外，Th17 反應亦與 PBC 嚴重程度相關 (53)，因此，我們量測 IL-17 對 IL-4 之比值，結果顯示給予 $\alpha$ -GalCer 組別其比值高於 PBS 組別，表示亦具有 Th17 細胞激素優勢 (圖十 B)。總之給

予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠肝臟免疫狀態，是較偏向 Th1 與 Th17 主導之免疫反應，可能與導致 PBC 小鼠疾病加重的成因有關。

#### 4.5 4 週後，初期給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠膽道破壞加快、血清 AMAs 效價上升

由於 PBC 疾病屬慢性肝臟膽道疾病，故先前實驗中，犧牲小鼠時間點皆為初次致敏後第 12 週，表示疾病晚期狀態。為探討初期給予 $\alpha$ -GalCer 對於早期 PBC 疾病的影響，我們依據小鼠血清 AMA 結果（圖四；IgM 與 IgG 在第 4 週達統計上差異），選擇犧牲點為致敏後第 4 週。實驗設計如圖一所示，同時，我們亦加入數組 $\alpha$ -GalCer 控制組（組別說明如圖十一），以探討 $\alpha$ -GalCer 對於肝臟之影響。由 H-E 染色之病理組織切片顯示，給予 $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 組別 4 週已明顯出現大範圍淋巴球浸潤至門脈三角區，門脈區發炎及膽道破壞之情形。給予 PBS / CFA / 2-OA 組別只出現輕微淋巴球浸潤。PBS 控制組肝臟內則完全無淋巴球浸潤現象，可清楚辨識出膽道管腔。然而 $\alpha$ -GC 與 $\alpha$ -GC / CFA 控制組卻可見輕微門脈三角區浸潤現象，但嚴重程度不如給予 $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 組別（圖十一）。

接著，為評估給予 $\alpha$ -GC 或 $\alpha$ -GC / CFA 造成之門脈區浸潤現象是否與 PBC 疾病相關，我們測量各組小鼠血清中 AMAs 效價。結果顯示，給予 PBS 或 $\alpha$ -GC 或 $\alpha$ -GC / CFA 並沒有在致敏 4 週後產生 anti-PDC-E2 IgM 與 IgG 效價，而給予 $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 組別則可在致敏 4 週產生相當高的 anti-PDC-E2 IgM 與 IgG 效價，統計上顯著高於給予 $\alpha$ -GC / CFA 與 PBS / CFA / 2-OA 組別（圖十二）。

由上述結果顯示，在無 2-OA BSA 的致敏下，初期只給予 $\alpha$ -GalCer 或給予 $\alpha$ -GalCer 外加 CFA 佐劑會造成輕微門脈三角區浸潤現象，但無膽道破壞及 AMAs 的產生，表示其並未破除免疫耐受性且細胞浸潤現象應為非特異性浸潤。而給予 $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 之 PBC 小鼠除了出現較嚴重淋巴球浸潤及膽道破壞外，亦因同時給予 $\alpha$ -GalCer 與 2-OA BSA 而產生高效價之 AMAs。因此，在 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠模式下，初期給予 $\alpha$ -GalCer 可有效地加快 PBC 疾病進程，使疾病



更趨嚴重。

#### 4.6 4 週後，初期給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠吸引大量 $CD8^+$ T cells 與 B cells 浸潤至肝臟

我們接續先前實驗，分析致敏 4 週後，各組小鼠肝臟單核細胞總數與組成，探討初期給予 $\alpha$ -GalCer 對於加快早期 PBC 疾病進程的成因。結果顯示，給予 $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 組別其肝臟單核細胞相較於控制組 $\alpha$ -GC / CFA 以及 PBS / CFA / 2-OA 組別均有顯著上升 (圖十三)，表示給予 $\alpha$ -GalCer 至 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠可有效增加肝臟單核細胞總數。而 $\alpha$ -GC 與 $\alpha$ -GC / CFA 組別其總數與 PBS 組別相近 (圖十三)，表示單純只給予 $\alpha$ -GalCer 而無 2-OA BSA 並不會影響致敏 4 週後小鼠肝臟單核細胞總數變化。

進一步分析肝臟單核細胞組成總數。如圖十四 A 所示， $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 組別各種免疫細胞總數均顯著高於 $\alpha$ -GC / CFA 與 PBS / CFA / 2-OA 控制組，尤其是 T cells 與 B cells (圖十四 A)。此外 $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 組的  $CD8^+$  T cells 細胞數比起 $\alpha$ -GC / CFA 與 PBS / CFA / 2-OA 控制組亦顯著增加 (圖十四 B)。然而我們觀察到 $\alpha$ -GC 及 $\alpha$ -GC / CFA 兩組比起 PBS 組亦有顯著增加的 T cells (尤其是  $CD8^+$  T cells) (圖十四 A, B)，表示給予 $\alpha$ -GalCer 即可促使 T cells 遷移至肝臟中造成 T cells 細胞數上升。以上結果顯示，給予 $\alpha$ -GalCer 與 2-OA BSA 可能具有協同作用，加強因 2-OA BSA 產生之自體免疫反應，增加  $CD8^+$  T cells 遷移至肝臟，造成肝臟膽道破壞加快。但在缺少 2-OA BSA 的情況下，單純只給予小鼠  $\alpha$ -GalCer 與 CFA 佐劑，雖可增加  $CD8^+$  T cells 遷移至肝臟，卻無法有效引起 PBC 疾病，故其肝臟單核細胞總數及肝臟  $CD8^+$  T cells 細胞數均低於給予 $\alpha$ -GalCer 之 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠組別。

總結上述實驗，我們發現在早期 PBC 疾病進程中，初期給予 PBC 小鼠  $\alpha$ -GalCer，會加快 PBC 疾病發生，其原因可能與 $\alpha$ -GalCer 吸引較多  $CD8^+$  T cells 與 B cells 浸潤至肝臟中有關，其中  $CD8^+$  T cell 主要執行細胞毒殺作用，B cell

則負責分泌自體抗體。

#### 4.7 4 週後，初期給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠可活化肝臟與脾臟 DCs，並增加其呈獻抗原之能力

過去文獻指出，經 $\alpha$ -GalCer 刺激後活化之 iNKT cells，會釋放細胞激素，促使 DCs 表面分子 CD80、CD86 及 CD40 表現量增加，同時，DCs 呈獻抗原能力亦會加強 (28)。故我們探討初期給予 PBC 小鼠 $\alpha$ -GalCer，引發大量 CD8<sup>+</sup> T cells 浸潤至肝臟，並加重肝臟膽道破壞，是否牽涉到 DCs 呈獻抗原能力的改變。

首先，我們 i.v. 注射 $\alpha$ -GalCer 至小鼠眼窩靜脈叢，18 小時後，分離小鼠肝臟單核細胞與脾臟細胞，以流式細胞儀分析 DCs 表面分子表現量。因肝臟單核細胞中存在有一細胞群表現 CD11c<sup>+</sup>NK 1.1<sup>+</sup>，但未表現 MHC class II，故我們以 NK 1.1 標記將其排除，並定義 DCs 為 CD11c<sup>+</sup>NK 1.1<sup>-</sup> 細胞群。結果顯示，注射 $\alpha$ -GalCer 組別相較於 PBS 組別，其肝臟與脾臟之 DCs 表現較多的 MHC class I、MHC class II、CD40、CD80、CD86 以及 CD1d 分子 (圖十五)。表示 $\alpha$ -GalCer 的給予，的確有效促使肝臟與脾臟 DCs 成熟。

接續上述實驗，我們在 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠模式上，評估 $\alpha$ -GalCer 對於 PBC 小鼠體內 DCs 抗原呈獻能力的影響。實驗設計如圖一，我們選擇第 4 週給予 $\alpha$ -GalCer 後 18 小時犧牲 PBC 小鼠。實驗結果顯示，給予 $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 組別肝臟 DCs 數量顯著高於給予 PBS / CFA / 2-OA 組別 (圖十六 A)，但脾臟 DCs 方面，兩組沒有統計上顯著差異 (圖十六 B)。在 DCs 表面分子表現量部分，肝臟 DCs 在 MHC class I、MHC class II、CD40 與 CD86 分子的表現量上，給予 $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 組別有升高的情形，而 CD80 分子表現量，兩組間差異較小 (圖十七 A)。脾臟 DCs 則在 CD40、CD80 與 CD86 分子的表現量兩組別差異較小，但在 MHC class I 與 MHC class II 分子表現量，給予 $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 組別高於 PBS / CFA / 2-OA 組別 (圖十七 B)。表示在致敏四週後， $\alpha$ -GalCer 對於 DCs 的影響在共刺激分子 CD40、CD80 以及 CD86 分子有減弱的現象，而與

抗原呈獻相關分子如 MHC class I 與 class II 依舊呈獻較高的表現。

綜合上述兩實驗，我們可發現，給予 $\alpha$ -GalCer 至小鼠體內，確實可促使 DCs 成熟，加強呈獻抗原的能力。而在 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠模式下，給予 $\alpha$ -GalCer 亦可促使肝臟 DCs 數量增加，伴隨抗原呈獻能力提升，特別是與 CD8<sup>+</sup> T cells 活化相關之 MHC class I 分子，可能是造成 CD8<sup>+</sup> T cells 遷移至肝臟，加重肝臟膽道破壞的成因之一。



## 5. 討論

我們的研究顯示，以 $\alpha$ -GalCer 活化 iNKT cells，可促使 iNKT cells 迅速釋放 IL-4 與 IFN- $\gamma$ ，活化下游細胞，包括 DCs。當 DCs 受 iNKT cells 刺激後，即增加其表面分子 MHC class I、MHC class II、CD40、CD80、CD86 與 CD1d 的表現，轉變成為成熟的 DCs，並提升其抗原呈獻能力。在 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠模式下，我們初期以 $\alpha$ -GalCer 活化 PBC 小鼠 iNKT cells，發現 PBC 小鼠血清 anti-PDC-E2 IgM 與 IgG 效價上升、晚期肝臟膽道破壞情形加重，甚至引起肝臟纖維化。進一步分析肝臟單核細胞組成，發現執行毒殺功能之 CD8<sup>+</sup> T cells 有明顯增加，且肝臟中存在有 Th1 與 Th17 主導之細胞激素微環境。在 PBC 疾病早期，我們發現 $\alpha$ -GalCer 的給予亦會吸引 CD8<sup>+</sup> T cells 至肝臟，加快膽道破壞，這現象可能與肝臟 DCs 數量增加以及具較強 MHC class I 抗原呈獻能力相關。

先前的研究證明 dnTGF $\beta$ R2 PBC 小鼠體內 iNKT cells 在早期可藉由 IFN- $\gamma$  的分泌而使 PBC 變得更加嚴重 (51)。然而，在 dnTGF $\beta$ R2 小鼠模式下，其 iNKT cells 的 TGF $\beta$ R2 基因亦是 dominant negative 的情形，所以在 dnTGF $\beta$ R2 小鼠體內觀察到 iNKT cells 數目增加以及釋放較多 IFN- $\gamma$  可能是 PBC 疾病進程所造成，但亦可能是 iNKT cells 本身的 TGF $\beta$  訊息傳遞缺陷所造成，因此我們在此選用 2-OA BSA 致敏的 PBC 小鼠模式，以排除基因缺陷的問題。為了進一步了解疾病初期分泌 IFN- $\gamma$  的 iNKT cells 如何促使 PBC 加重，在我們的研究中，我們選擇在給予 $\alpha$ -GalCer 後，血清中存在 IFN- $\gamma$  且無 IL-4 的狀態下，再給予 2-OA BSA 致敏小鼠。我們的結果顯示，除了得到與先前研究相同之結論外，我們更進一步證實，活化之 iNKT cells 可能藉由吸引 CD8<sup>+</sup> T cells 至肝臟而加重膽道破壞 (圖九與圖十四)。

在肝臟中，NKT cells 佔單核細胞的比例遠大於在其他器官的比例，且其在肝臟疾病中扮演重要角色 (46, 48, 54-57)。目前已有許多肝炎疾病模式，證實其病理角色，如 Con A 引起肝炎小鼠模式下，在體內在缺少 iNKT cells 的狀態下

(CD1d<sup>-/-</sup>小鼠)，無法利用 Con A 引起小鼠產生肝炎 (47)。另外，單純給予  $\alpha$ -GalCer 至正常小鼠，可促使肝臟 iNKT cells 細胞毒殺能力上升，如 FasL 表現量上升，並在短時間內造成血清 ALT (alanine aminotransferase) 酵素上升以及肝臟組織損壞 (48, 54, 57-58)，同時配合 D-galatosamine 致敏小鼠，使得小鼠肝臟出現肝臟器質性出血與肝細胞凋亡，甚至造成小鼠死亡 (59)，進一步利用 V $\alpha$ 14<sup>-/-</sup>小鼠與 TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup>小鼠實驗，證明此結果與 iNKT cells 的活化及 TNF- $\alpha$  產生有關 (59)。在我們的研究中，我們使用  $\alpha$ -GalCer 專一性地活化 iNKT cells，證明在 2-OA BSA 引起之 PBC 模式下，iNKT cells 的活化亦會使得小鼠肝臟損害加重。根據過去文獻推測，給予  $\alpha$ -GalCer 雖會造成肝臟損傷，但其為短期性 iNKT cells 活化免疫反應之損壞，為非專一性損傷，但在此破壞過程中，肝細胞過度凋亡可能導致細胞內粒線體釋出，致使自體抗原 PDC-E2 的裸露，而期間內，我們給予小鼠 2-OA BSA 破除小鼠免疫耐受性，造成更多 PDC-E2-specific auto-reactive T cells 的活化，進而加重肝臟膽道損傷，長久破壞下，更促使 PBC 小鼠肝臟纖維化。但本研究中，尚未利用 CD1d<sup>-/-</sup>小鼠，探討在缺乏 iNKT cells 下，是否會減輕 PBC 疾病。

在我們的研究中，發現給予 PBC 小鼠  $\alpha$ -GalCer，會吸引大量 CD8<sup>+</sup> T cells 至肝臟中 (圖九與圖十四)。但由於 PBC 小鼠 CD8<sup>+</sup> T cells 的 epitope 尚未明瞭，故我們無法證明大量增加的 CD8<sup>+</sup> T cells 是否為 mPDC-E2 specific T cells。PBC 病人中 PDC-E2-specific CD8<sup>+</sup> T cells 可能主要為毒殺膽道上皮細胞的主要元凶之一 (16-17)，故我們可推測增加的 CD8<sup>+</sup> T cells 與疾病的加重相關。過去文獻利用 Tf-mOVA 轉殖鼠探討 iNKT cells 對於 Ag-specific CD8<sup>+</sup> T cell 的影響，發現同時給予  $\alpha$ -GalCer 與 OT-I T cells 至 Tf-mOVA 轉殖鼠，可加強 OT-I T cells 對於肝臟的破壞 (60)。在我們的實驗中，小鼠本身並未有 APCs 呈獻自體抗原，故需 2-OA BSA 致敏後，破除免疫耐受性，才能產生針對膽道破壞之 CD8<sup>+</sup> T cells，並遷移至肝臟中；在給予  $\alpha$ -GalCer 後，可能因 iNKT cells 的活化，加強 APCs 呈獻抗原的能力，進而吸引更多 CD8<sup>+</sup> T cells 至肝臟中，造成肝臟膽道破壞加重。

DCs 是連接 innate immunity 與 adaptive immunity 間主要的橋梁，在給予抗原後，DCs 可啟動 CD4<sup>+</sup> 與 CD8<sup>+</sup> T cell 免疫反應，同時，DCs 亦可經由 CD1d 分子呈獻  $\alpha$ -GalCer，活化 iNKT cells (61-64)。在我們實驗結果中，以  $\alpha$ -GalCer 注射小鼠後，小鼠肝臟與脾臟 DCs 除了增加 CD1d 表現外，更加强抗原呈獻分子 MHC class I、MHC class II、CD40、CD80 與 CD86 的表現，表示 DCs 活化 iNKT cells 後，可與 iNKT cells 互動，促使 DCs 本身更加成熟。另外，其他研究團隊亦利用 OVA 小鼠模式，給予  $\alpha$ -GalCer 後，純化出 DCs，並與 OT-I T cells 培養，測量細胞增生與 IFN- $\gamma$  之釋放，證明  $\alpha$ -GalCer 的給予，有助於 Th1 主導之免疫反應 (64)。在我們的 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠模式下，給予  $\alpha$ -GalCer 後，在早期 PBC 疾病進程中，小鼠肝臟 DCs 數量明顯上升，其表面分子 MHC class I 表現量提升，可能與肝臟 CD8<sup>+</sup> T cells 數量增加相關；同時，肝臟亦有 Th1 主導之細胞激素微環境，表示給予  $\alpha$ -GalCer 後，確實有可能經由肝臟 DCs 抗原呈獻能力的提升，促使肝臟行 Th1 免疫反應及吸引更多 CD8<sup>+</sup> T cells，加重肝臟膽道破壞。但由於目前尚未鑑定出 PBC 小鼠 T cells epitope 蛋白序列，故我們無法證明是 Ag-specific T cells。然而， $\alpha$ -GalCer 除了有助於提升 DCs 免疫性外，利用小鼠接種表現 OVA 抗原之腫瘤細胞實驗，亦證明  $\alpha$ -GalCer 的給予經由 DCs 成熟的路徑有助於 OVA-specific CD8<sup>+</sup> T cell 的毒殺能力 (61, 64)。故我們推測，給予  $\alpha$ -GalCer 至 PBC 小鼠，可能經由 DCs 的幫助，增加肝臟 mPDC-E2-specific CD8<sup>+</sup> T cells 數量及毒殺能力，造成肝臟膽道破壞。

然而，在我們的研究中，發現給予 naïve 小鼠  $\alpha$ -GalCer 後，確實可在短時間使 DCs 更加成熟，但在致敏 4 週後，同樣給予  $\alpha$ -GalCer 後犧牲 PBC 小鼠，卻發現 MHC class I、MHC class II、CD40、CD86、CD80 的表現量不如 naïve 小鼠，表示一定有未知的因素牽涉到 DCs 表面分子的表現，可能是給予的時間或次數。在給予  $\alpha$ -GalCer 次數方面，PBC 小鼠在致敏 4 週時，已接受過 3 次  $\alpha$ -GalCer 的給予，可能引發 iNKT cells 的 anergy (65)，造成後來 2 次給予之  $\alpha$ -GalCer 失去效用，或許只需給予 1 次  $\alpha$ -GalCer，即可達到相同效果，這一部分需更多實驗證

明。

在自體抗體 anti-PDC-E2 Ab 部分，我們發現給予 PBC 小鼠 $\alpha$ -GalCer，可大幅增加血清中 AMAs 的效價，包括 IgG 與 IgM，尤其是 Anti-PDC-E2 IgG，上升幅度最大，表示 B cells 可能有 class switch 現象 (圖四 B)；同時，在分析肝臟單核細胞組成中，我們亦發現肝臟 B cells 的數量有上升的情形 (圖十四 A)，故推測這兩者應有相關。過去文獻發現，CD1d-restricted NKT cells 以 $\alpha$ -GalCer 刺激後，具有幫助 B cells 增生與抗體分泌之功能，若配合抗原的給予，則可增加 B cells 釋放 Ag-specific Ab 的效價，其機制主要牽涉到 CD40 與 CD40L 間的互動 (66-67)。故我們推測給予 $\alpha$ -GalCer 活化 iNKT cells 後，可能會增加 iNKT cells 表面分子 CD40L 或釋放細胞激素，刺激自體反應 B cells 增生，增加 CD40 的表現，進行 class switch，分泌較多高親和力之 IgG 自體抗體。

目前的 PBC 小鼠模式，包括 NOD.c3c4 and NOD.c3c4-derived、IL-2R $\alpha$ <sup>-/-</sup>、dnTGF $\beta$ RII PBC 小鼠模式，雖有出現膽道破壞，但均未出現肝臟纖維化這項 PBC 病人臨床重要病徵。本研究中，給予 PBC 小鼠 $\alpha$ -GalCer，可引發 PBC 小鼠產生肝臟纖維化，包括肝臟病理切片中出現纖維化間隔、膠原蛋白纖維與網狀蛋白纖維沉積，以及出現 HSCs 活化的現象 (圖六與圖七)。有關 iNKT cells 在肝臟纖維化的角色研究不多。已知只給予 $\alpha$ -GalCer 至正常小鼠會造成小鼠肝臟組織損壞 (58)，但並不知是否發生肝臟纖維化。在 CCl<sub>4</sub> 引起之肝臟纖維化小鼠模式下，將 CCl<sub>4</sub> 注射入缺乏 iNKT cells 的小鼠會增加早期肝臟纖維化發生，因此認為 iNKT cells 在疾病早期具有防止纖維化產生之能力。然而在給予小鼠 CCl<sub>4</sub> 及 $\alpha$ -GalCer 後，肝臟發炎與纖維化情形反而更加嚴重。這不一致的結果可能為 $\alpha$ -GalCer 刺激 iNKT cells 活化，造成肝臟破壞之強度高於其保護力，因而促進 CCl<sub>4</sub> 所引起之肝臟纖維化 (68-69)。另外，CCl<sub>4</sub> 或 thioacetamide 引起之肝臟纖維化小鼠模式及 CD8<sup>+</sup> T cells 引起之移植物反宿主病模式中均證明肝臟 CD8<sup>+</sup> T cells 具有造成肝臟纖維化之能力 (70-71)。在我們的實驗模式下，給予 PBC 小鼠 $\alpha$ -GalCer 後，引起大量 CD8<sup>+</sup> T cells 浸潤至肝臟中，亦可能是造成 PBC 小鼠肝臟纖維化原因之

一。至於 $\alpha$ -GalCer 直接造成肝纖維化或 $\alpha$ -GalCer 間接幫助 2-OA BSA 致敏小鼠產生肝纖維化則需進一步研究。

過去文獻指出， $\alpha$ -GalCer 因可刺激 iNKT cells，引發其下游細胞的活化，包括可快速促使 DCs 與 B cells 的成熟、NK 的毒殺能力以及 T cell 的反應，故其被認為具有疫苗佐劑與免疫治療的效果。在疫苗佐劑的部分，已證實 $\alpha$ -GalCer 有助於發展卵巢腫瘤疫苗、HIV 疫苗、DNA 疫苗、流感疫苗與瘧疾疫苗 (72-76)。在免疫治療部分，文獻證實可利用直接靜脈給予 $\alpha$ -GalCer、給予 $\alpha$ -GalCer loaded DCs 或給予被 $\alpha$ -GalCer 活化過之 iNKT cells 來治療感染或癌症，其中更有些治療方法已進入臨床試驗，表示其應用可行性高 (74, 77-79)。但在我們的實驗中，卻發現給予 PBC 小鼠 $\alpha$ -GalCer 後，會加重肝臟膽管破壞及產生肝臟纖維化。此外，其他研究肝臟疾病的團隊亦發現 $\alpha$ -GalCer 活化 iNKT cells 的免疫反應中，亦伴隨相當程度的肝臟損傷等副作用 (58, 68-69)，故未來應用 $\alpha$ -GalCer 當疫苗佐劑或是免疫治療需較周全的考慮，以避免其所帶來之傷害。

綜而言之，在我們的研究中，發現初期給予 PBC 小鼠 $\alpha$ -GalCer，可增加肝臟與脾臟中 DCs 上的 CD1d 分子表現，進而與 iNKT cells 互動，促使 iNKT cell 活化。當 iNKT cells 活化後，在短時間內釋放大量細胞激素，刺激肝臟與脾臟中 DCs 成熟，提升其抗原呈獻能力，進而在 PBC 疾病初期，表現較高 MHC class I 分子，吸引大量  $CD8^+$  T cells 浸潤至肝臟中，並建立 Th1 與 Th17 之細胞激素微環境，加快 PBC 疾病的進程，同時，肝臟中 B cells 數量亦增加，釋放更多親和力高的自體抗體。在 PBC 疾病晚期，由於  $CD8^+$  T cells 的大量浸潤，加重肝臟膽管的破壞，使得肝臟中 HSCs 活化，並引起肝臟纖維化。



### 第三章 Xenobiotic 引起之原發性膽道硬化症小鼠模式體內 mPDC-E2-specific autoreactive T cells

#### 1. 研究背景

##### 1.1 自體反應 T 淋巴球 (Auto-reactive T lymphocyte)

許多器官專一性自體免疫疾病，如第一型糖尿病、多發性硬化症及重症肌無力等，auto-reactive T cells 在疾病發展上扮演著重要的角色。當 auto-reactive T cells 辨識到抗原呈獻細胞呈獻之自體抗原後，被刺激而活化，進而引起發炎反應，吸引發炎細胞至發炎部位，造成自體組織破壞。或是 auto-reactive T cells 本身大量浸潤至該器官組織，執行自體抗原專一性毒殺作用，造成器官組織上的細胞死亡 (80)。雖然 autoreactive T cells 之角色已漸漸了解，但尚有許多自體免疫疾病之 auto-reactive T cells 未被鑑定出其自體抗原，故科學家仍持續研究，尋找出自體抗原，以利自體免疫疾病之診斷與治療。

##### 1.1.1 自體反應 T 淋巴球 (Auto-reactive lymphocyte) 的形成

T cells 發育過程中，TCR 表面分子會在胸腺進行篩選，並分化成熟。當 TCR 可辨識胸腺上皮細胞之 MHC 時，T cells 可免於凋亡，此過程稱之為 positive selection。篩選完成後之 T cells，即進入 negative selection，此過程之 APC 表面 MHC 分子上帶有自體抗原，若 T cells 辨識出自體抗原，則會接受凋亡訊息，如此便可免除 auto-reactive T cells 的形成。但此 negative selection 的過程中，可能因 TCR 親和力較弱，或是基因缺陷，而逃離消除的命運，因此，導致周邊免疫系統中，仍有微量的 auto-reactive T cells。雖然如此，這些 auto-reactive T cells 在體內仍受週邊免疫系統，如 regulatory T cells 的抑制，當破除免疫耐受性後，auto-reactive T cells 便會活化，造成自體組織損害 (81-82)。

### 1.1.2 自體反應 T 淋巴球 (Auto-reactive lymphocyte) 的活化

自體免疫疾病的形成，主要牽涉至體內破除免疫耐受性，造成針對自體抗原之淋巴球活化，包括 auto-reactive T cells 與 auto-reactive B cells。目前對於 auto-reactive T cells 的活化，有以下幾種可能機制 (83-84)：

- (1) 分子擬似機轉 (Molecule mimicry)：此種機制主要為微生物感染，產生之 Ag-specific T cells，針對相似於微生物抗原的自體組織反應，造成自體組織損害。
- (2) Bystander activation：此機制亦是經由微生物感染，產生大量發炎因子，造成非特異性活化 bystander T cells，並針對自體組織反應與破壞。
- (3) 藥物代謝：此過程中，藥物代謝產生之化學代謝物，黏附至自體組織上，被 neo-Ag-specific T cells 辨認，造成自體組織破壞。
- (4) Epitope spreading：在可能由微生物感染或藥物代謝造成自體組織破壞的過程中，因破壞造成之組織自體抗原大量暴露，使得劇烈之免疫反應形成 self-Ag-specific T cells，再度對自體組織破壞。

### 1.2 自體反應 T 淋巴球在 PBC 疾病扮演之角色

PBC 是一種器官專一性自體免疫疾病，其肝臟膽道可見大量淋巴球浸潤，主要為 T cells。根據肝臟單核細胞 mRNA 分析，發現細胞內 IFN- $\gamma$  mRNA 表現量較 IL-4 mRNA 高，且 IFN- $\gamma$  表現量與膽道發炎程度呈高度相關，故認為其為 Th1 細胞主導之免疫反應 (14-15)。

目前研究，已發現 PBC 病人體內存在有 auto-reactive CD4<sup>+</sup> T cells，其 epitope 位於粒線體的 PDC-E2 inner lipoyl domain 上 (163-176 胺基酸) 與 PDC-E2 outer lipoyl domain (36-49 胺基酸) (85) (附錄一)；此外，利用 PDC-E2 163-176 胺基酸序列刺激 PBC 病人 T cells，更發現 PBC 病人肝臟與淋巴結中之 auto-reactive T cells 的反應遠高於周邊血液單核球，表示肝臟中，的確存在較多與反應較強之 auto-reactive T cells，且主要針對 PDC-E2 inner lipoyl domain 上 163-176 胺基酸序

列，且此序列應為較重要之 CD4<sup>+</sup> T cell epitope (86)。在 CD8<sup>+</sup> T cells 方面，亦鑑定出其 epitope 位於人類 PDC-E2 inner lipoyl domain 159-167 胺基酸序列上，且此細胞群亦可能是毒殺膽道上皮細胞之 auto-reactive T cells (16-17) (附錄一)。

目前眾多 PBC 小鼠模式中，如 dnTGFβRII、IL-2Rα<sup>-/-</sup>、*Novosphingobium spp.*-infected 小鼠模式等，其主要症狀為血清出現 AMAs、肝臟病理切片顯示淋巴球浸潤及膽道破壞等類似人類 PBC 病徵，卻尚未證實小鼠動物模式體內有 PDC-E2 specific T cells。



## 2. 研究目的

在此研究中，我們探討以 xenobiotics 引發 PBC 的小鼠體內是否有 auto-reactive T cells，尤其是 mPDC-E2-specific autoreactive T cells。本實驗以 *Pichia pastoris* 酵母菌表現 mPDC-E2 蛋白片段，並利用 BM-derived DCs 呈獻此蛋白片段而與注射 xenobiotic 小鼠的脾臟 T 細胞共同培養，藉由 T 細胞增生實驗探討 PDC-E2-specific auto-reactive T cells 存在與否。



### 3. 材料與方法

#### 3.1 以 *Pichia pastoris* 酵母菌表現蛋白系統表現小鼠 PDC-E2 蛋白片段

因全長 mPDC-E2 表現不易。依照 PBC 病人 T cell 與 B cell 反應之 PDC-E2 epitope 位點 (附錄一)，我們只表現 mPDC-E2 胺基酸 177-314 片段 (圖十八)。此段 mPDC-E2 胺基酸片段是由 Dr. Gershwin 實驗室 (UC Davis, CA, USA) 建構於 *E.coli* 表現系統中，但因表現之蛋白易受細菌內毒素汙染，去除不易，不適用於刺激細胞，因此，我們改以酵母菌系統 (真核系統) 來表現蛋白。我們選擇使用 EasySelect *Pichia* Expression Kit (Cat. NO. K1740-01, invitrogen) 表現蛋白，其 pPICZ $\alpha$  B 載體上帶有  $\alpha$ -factor signal peptide，可將表現之蛋白帶出細胞外 (圖十八)。實驗流程依照所附之說明書操作 (圖十九)。純化出之蛋白以 Pierce® BCA protein assay kit 定量 (Cat. NO. 23227, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)。

#### 3.2 SDS-PAGE 分析 mPDC-E2 蛋白表現量

製備 12% SDS-PAGE；以 4X SDS loading dye 混和 10 $\mu$ g mPDC-E2，煮沸 100°C，10 分鐘；跑 SDS-PAGE (stacking gel: 80V, 30 分鐘；separating gel: 120V, 2 小時)；跑完 SDS-PAGE 後，移除 stacking gel；以 PageBlue (CAT. NO. R0571, Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) 染色，隔夜；以二次水退染。

#### 3.3 西方墨點法確認 mPDC-E2 蛋白專一性

SDS-PAGE 跑膠完成之 mPDC-E2 蛋白，在 western transfer buffer 下轉移至 PVDF membrane 上 (300mA, 1 小時)；以 5% 脫脂牛奶 blocking 1 小時；加入一抗 (mPDC-E2 mAb: 1:1000；anti-His tag Ab: 1:5000) 4°C，隔夜；以 TBST 潤洗三次，每次 10 分鐘；加入二抗 (HRP conjugated anti-m-IgG Ab: 1:10000)，室溫，1 小時；以 TBST 潤洗三次，每次 10 分鐘；使用 ECL detection system 呈色；

使用 LAS3000 (Fujifilm) 偵測 ECL 放出之冷光。

### 3.4 小鼠脾臟細胞之純化

實驗方法參照第二章材料與方法中 3.7 節。

### 3.5 流式細胞儀 (flow cytometry) 分析細胞表面及細胞內抗原

實驗方法參照第二章材料與方法中 3.8 節。

### 3.6 純化 T cells

分離出脾臟細胞與肝臟單細胞後我們使用磁珠分離法 (BD IMag<sup>TM</sup>) 提高 T cells 純度，以 anti-mouse CD45R/B220 magnetic particle (Cat. NO. 551513, BD IMag<sup>TM</sup>) 染色後，進行細胞純化，純化步驟皆依照所附之說明書操作，收取未被磁鐵抓取之細胞群 (T cell rich population)，計數細胞數，並以流式細胞儀分析 T cells 純度。

### 3.7 BMDCs 的培養並 pulse 蛋白片段

取 4-8 週大小鼠腿骨 (包含腿骨與脛骨)，去除肌肉後，利用 3ml 針筒與 HBSS 將腿骨骨髓沖洗出，並以針筒吹吸，將骨髓細胞打散；靜置 10 分鐘後，將細胞上清液轉移至新的 50ml 離心管並離心 (1500 rpm, 5 分鐘)；懸浮細胞團塊，加入冰的 ACK buffer，作用 45 秒，以大量 HBSS 潤洗 2 次，並計數細胞。將細胞濃度以 RPMI-10 調整為  $1.2 \times 10^6$  cell/ml，培養  $1.2 \times 10^6$  細胞在 24 well 平底盤中，並添加 500U/ml 的 GM-CSF (Cat. NO. 315-03, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) 與 500U/ml IL-4 (Cat. NO. 34-8041-85, eBioscience)。培養至第三天時，從 well 吸出 0.7ml 培養基，再補入 0.75ml 含有 GM-CSF 與 IL-4 的 RPMI-10；第五天時，先更換新鮮培養基後，將細胞吹吸懸浮後，轉移至新的 well 中；第六天，加入 100 $\mu$ g mPDC-E2 蛋白片段；隔夜後，潤洗細胞一次；以 AIM-5 (Cat. NO. 12055-091, GIBCO®, Invitrogen) 外加 2% TCM (Cat. NO. 1002, Protide

Pharmaceuticals, Lake Zurich, IL, USA) 調整濃度為  $6 \times 10^4$  cell/ml, 接種 6000 protein pulsed BMDCs/100 $\mu$ l 至 96 well 圓底盤。mPDC-E2 胜肽以每三段為一組 (表二), 在第七天加入 100 $\mu$ g / per peptide, 3 小時後, 以 AIM-5 外加 2% TCM 調整濃度為  $6 \times 10^4$  cell/ml, 接種 6000 protein pulsed DCs/100 $\mu$ l 至 96 well 圓底盤。

### 3.8 Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) 細胞增生實驗

純化之 T cells, 以  $1 \times 10^7$  cell 加入 5 $\mu$ M CFSE (Cat. NO. 2188, Sigma-Aldrich) in 1ml RPMI-10, 混合均勻, 室溫靜置 5 分鐘, 用 10 X 體積的 RPMI-10 潤洗 1 次, 以 AIM-5 外加 2% TCM 調整濃度為  $4 \times 10^6$  cell/ml, 接種  $4 \times 10^5$  cell/100  $\mu$ l 至含有 100 $\mu$ l protein pulsed BMDCs 的 96 well 圓底盤。培養五天後, 以 APC conjugated anti-CD3 Ab (Cat. NO. 100311, clone 145-2C11, biolegend) 及 7-AAD (Cat. NO. 00-6993, eBioscience) 染色, 利用 FACS Calibur (BD) 分析 T cells 增生情形。

### 3.9 [<sup>3</sup>H]-thymidine 細胞增生實驗

純化之 T cells 以 AIM-5 外加 2% TCM 調整濃度為  $4 \times 10^6$  cell/ml, 接種  $4 \times 10^5$  cell/100  $\mu$ l 至含有 100 $\mu$ l protein pulsed BMDCs 的 96 well 圓底盤。培養五天, 最後 7-8 小時前加入 1 $\mu$ Ci / ml [<sup>3</sup>H]-thymidine, 以 cell harvest 收集細胞至濾紙上, 烘乾後, 使用  $\beta$  count 計算細胞放射線強度。

### 3.10 繪圖及統計分析

繪圖及統計分析均使用 GraphPad Prism 5 軟體, 繪製垂直散布圖與曲線圖, 以 mean 與 SEM 表示; 統計方法為軟體內建 Mann Whitney test,  $\alpha$  值設定在 0.05。  
\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ 。

流式細胞儀數據以 flow jo7.5 軟體分析與繪圖。

## 4. 實驗結果

### 4.1 以 *Pichia pastoris* 酵母菌表現蛋白系統表現小鼠 PDC-E2 蛋白片段

為探討 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠體內是否存在有 mPDC-E2-specific auto-reactive T cells，我們選擇使用 *Pichia* expression system 表現 mPDC-E2 蛋白片段，其優點在於酵母菌屬於真核細胞，其蛋白表現較貼近小鼠細胞，且不會有細菌內毒素汙染，適合用於刺激細胞增生。

首先，我們將可能具有 T cell epitope 之 mPDC-E2 DNA 片段以 *EcoR* I 及 *Xba* I 限制酶切割後，接入酵母菌載體 pPICZ $\alpha$  B 上 (圖十八)，並轉型至 *pichia pastoris* 酵母菌中，以甲醇誘發酵母菌表現 mPDC-E2 蛋白片段後，收集不同時間點之酵母菌上清液，利用 SDS-PAGE 分析不同時間點酵母菌表現蛋白之效率。結果顯示，以甲醇誘發後，24 小時即有蛋白表現至酵母菌上清液中，而 48 小時達最高量，之後時間點蛋白濃度無明顯增加，其蛋白分子量約為 17 KDa，與預測之 mPDC-E2 蛋白分子量相近 (17.12 KDa)，故在之後的 mPDC-E2 表現，我們選定誘發表現時間為 48 小時 (圖二十 A)。

接著，我們利用 Ni<sup>2+</sup>管柱純化蛋白尾短有 6X His 標記之 mPDC-E2 蛋白片段。結果顯示，純化後之 mPDC-E2 蛋白片段分子量大約位於 17 KDa，與預測值 (17.12 KDa) 相符 (圖二十 B)。為確認表現之蛋白是蛋白尾短帶有 6X His 標記之 mPDC-E2 蛋白片段，我們以西方墨點法偵測蛋白專一性。結果顯示，表現之 mPDC-E2 蛋白片段可被 anti-His tag 抗體與 anti-PDC-E2-specific 單株抗體雜交，並偵測出冷光 (圖二十 C)。表示此純化之蛋白帶有 His tag 且為 mPDC-E2 蛋白。

### 4.2 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠體內，可測得 mPDC-E2-specific T cells

目前眾多 PBC 小鼠模式中，尚無法證實小鼠體內存在有 mPDC-E2 specific T cells，除全長 mPDC-E2 蛋白表現不易外，亦牽涉到小鼠模式是否產生破除免疫



耐受性。故我們選擇 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠模式，探討小鼠是否會因外來物 2-OA BSA 的致敏，產生 mPDC-E2 specific auto-reactive T cells。

我們培養 BMDCs 並 pulse mPDC-E2 蛋白片段或合成之 mPDC-E2 胜肽 (表二)，與 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠脾臟 T cells 共同培養，利用 CFSE 染色及 [<sup>3</sup>H]-thymidine 偵測 T cells 是否增生。結果顯示，純化後之脾臟細胞其 T cells 純度為 81.9 % (圖二十一 A)，培養分化之 BMDCs 純度為 60.6 %，且大部分 DCs 高度表現 MHC class II (圖二十一 B)，表示其抗原呈獻能力較佳，適用於呈獻抗原至 T cells。

Ag-pulsed BMDCs 與純化之脾臟 T cells 培養五天後，以流式細胞儀分析 CFSE 標定之 T cells 螢光強度及測定細胞放射線強度。結果顯示，與 non-pulsed BMDCs 培養之 T cells，其低 CFSE 螢光強度百分比佔所有 T cells 16.8 %，表示約有 16.8 % T cells 分裂一次以上 (圖二十二 A)。與 m-PDC-E2-pulsed BMDCs 培養之 T cells，約有 47.0 % T cells 分裂一次以上，且大部分細胞 CFSE 螢光強度較低 (圖二十二 B)。與合成之 mPDC-E2 胜肽-pulsed BMDCs 培養之 T cells，在 G1 (20.6 %)、G2 (24.9 %)、G9 (21.1 %)、G12 (22.7 %) 與 G16 (23.7 %) 其分裂之 T cells 百分比高於 non-pulsed BMDCs 培養之 T cells，其中 G9 位於表現之 mPDC-E2 蛋白片段中 (圖二十二 C)。表示純化之脾臟 T cells 中，應有一群 T cells 其 TCR 對於我們 pulse 的 mPDC-E2 及合成之胜肽有反應，且受 BMDCs 刺激後會增生。在測定細胞放射線強度部分，發現只有 mPDC-E2-pulsed BMDCs 與 T cells 共培養後，其放射線 S.I. (Stimulation Index) 數值高於 3，其他培養組放射線 S.I.數值則小於 3 (圖二十三)，表示共培養第五天後，加入 [<sup>3</sup>H]-thymidine 的期間內 (7-8 小時)，只有 mPDC-E2 組才有增生現象。

以上實驗結果可知，利用 2-OA BSA 引起之小鼠模式脾臟中，可測得一群 mPDC-E2-specific auto-reactive T cells，且其 TCR 辨識之 epitope 位於我們以酵母菌表現之 mPDC-E2 蛋白片段中。且利用合成之 mPDC-E2 胜肽 pulsed BMDCs，亦可知道 mPDC-E2-specific auto-reactive T cells 其 epitope 除了位於 177-314 胺基

酸序列 (酵母菌表現之 mPDC-E2 蛋白片段) 外，亦可能有其他 epitope 位於 177-314 胺基酸序列外。



## 5. 討論

在我們的研究中，證明以 *pichia pastoris* 酵母菌表現之 mPDC-E2 蛋白片段，可藉由 BMDCs 呈獻蛋白抗原至 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠脾臟 T cells，促使 T cells 活化，並且增生。表示在此 xenobiotic 引起之 PBC 小鼠模式中，因 2-OA BSA 的致敏作用，導致小鼠破除體內免疫耐受性，除產生 AMAs 及肝臟膽道疾病外，更存在有 mPDC-E2-specific auto-reactive T cells。

在 PBC 疾病研究上，自從發現自體抗原 PDC-E2 起，已陸續找出病人體內 auto-reactive T cell 之抗原 epitopes。其利用全長人類 PDC-E2 及合成之人類 PDC-E2 胜肽，建立 auto-reactive T cell clone，並進一步分析其 epitope 位點。及至現今，我們已了解 PBC 病人體內存在有一群針對 PDC-E2 之 auto-reactive T cells，且其 epitope 主要位於 PDC-E2 inner lipoyl domain 上 (86-88)。由於 PBC 病人肝臟檢體來源受限，只能了解 PBC 病人體內存在有 auto-reactive T cells。但我們並不清楚 auto-reactive T cells 如何對膽道造成破壞。近年來已陸續有 PBC 小鼠模式的建立，試圖找尋出 PBC 疾病之致病機轉。然而，在眾多的小鼠模式中，雖有出現 PBC 病徵，但因尚未證明在這些 PBC 小鼠模式中，存在有 mPDC-E2-specific auto-reactive T cells 而無法探討 auto-reactive T cells 在 PBC 致病機轉上的角色。在 dnTGF $\beta$ R2 小鼠模式中，以細胞轉移方式，將 CD8<sup>+</sup> T cells 轉移至 Rag1<sup>-/-</sup>小鼠體內，發現 Rag1<sup>-/-</sup>小鼠肝臟出現淋巴球浸潤至膽道 (25)，表示在 PBC 小鼠的建立上，的確是有 auto-reactive T cells 的存在，只是因 dnTGF $\beta$ R2 小鼠除肝臟外，尚有多處器官有自體免疫疾病，因此無法確定這些移植而致病的 auto-reactive T cells 是 PDC-E2 specific。在我們的研究中，我們證明 2-OA BSA 致敏的 PBC 小鼠模式體內存在有一群 mPDC-E2-specific auto-reactive T cells，因此我們將可以此動物模式進一步研究 auto-reactive T cells 在 PBC 之角色。

在 CFSE 的實驗中，我們發現 PBC 小鼠脾臟 T cells 可辨認出不同的 mPDC-E2 胜肽，出現細胞增生現象，而這些不同組的 mPDC-E2 胜肽卻不位於預測之

PDC-E2 inner lipoyl domain 上，如 G1、G2、G12 與 G16，只有 G9 是位於預測片段內。在先前文獻中，PBC 病人 T cell epitope 除位於 PDC-E2 inner lipoyl domain 上外，在 outer lipoyl domain (hPDC-E2 36-49 胺基酸) 上亦存在有 T cells epitope，不同病人之 auto-reactive T cell clone 辨識之 PDC-E2 胜肽不盡相同 (88)。故在我們的實驗中，PBC 小鼠體內 auto-reactive T cells 有可能辨識出非 mPDC-E2 inner lipoyl domain 上的 epitope，且人類 auto-reactive T cells 辨識之 epitope 也未必與小鼠 auto-reactive T cells 相同，如可造成 EAE 小鼠體內 auto-reactive T cells 活化之 epitope 未必可活化多發性硬化症病人體內 T cells (89)，故尚需更多實驗，才能確定 2-OA BSA 引起 PBC 小鼠之 auto-reactive T cell epitopes。

在本實驗中，使用 PBC 小鼠脾臟 T cells，與 Ag-pulsed BM DCs 作共同培養，尚未使用淋巴球浸潤及膽道破壞嚴重之肝臟 T cells。在過去文獻中，發現 PBC 病人肝臟存在有大於周邊血液 100-150 倍之 PDC-E2 163-176-specific T cells (86)。故我們可以合理推測，在 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠肝臟內，應該有更多的 mPDC-E2-specific auto-reactive T cells。

總結本實驗，我們利用酵母菌表現之 mPDC-E2 蛋白片段，在 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠模式中，證明此小鼠模式體內有 mPDC-E2-specific auto-reactive T cells。此結果亦佐證 PBC 疾病的發生可能藉由接觸環境中相似 PDC-E2 inner lipoyl domain 上之 lipoic acid 的化合物，而導致破除免疫耐受性，產生此自體免疫疾病。同時，在未來中，我們亦可利用此 PBC 小鼠模式，進行疾病免疫機轉研究，尋找出更為有效的治療方式。

## 第四章 總結

在 PBC 疾病研究上，自從自體抗原 PDC-E2 的發現後，其免疫機轉已逐漸明朗，包括鑑定出 auto-reactive B cells 與 T cells 及其 epitope、自體抗體 AMAs 的角色、膽道細胞的破壞及凋亡等，但受限於病人檢體來源，只能取得 PBC 患者晚期發病後之肝臟組織，故尚無法得知疾病初期肝臟內發炎反應或細胞免疫反應，及免疫系統如何破除免疫耐受性而發病。因此，近年來，科學家們致力於發展 PBC 小鼠動物模式，希望藉由動物模式研究 PBC 致病機轉及疾病早期 innate immunity 所扮演之角色。

在本研究中，所使用之 PBC 動物模式為 xenobiotic (2-OA BSA) 引起之 PBC 小鼠模式，其優點在於小鼠基因背景正常，是由 2-OA BSA 破除免疫耐受性所產生。且其 PBC 病徵為血清中可偵測 AMAs、肝臟出現淋巴球浸潤及肝臟膽道破壞。並且在此研究中我們證明此小鼠模式體內存在有 mPDC-E2-specific auto-reactive T cells。

先前文獻中，證實 PBC 患者肝臟內 iNKT cells 數量較其他肝臟疾病多、肝臟膽道上皮細胞表現較多 CD1d 分子，而其他小鼠模式亦證實 iNKT cells 對於引起 PBC 疾病有相關聯，但未探討其機制為何。故在本研究中，我們在初期以靜脈內注射方式給予 2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠  $\alpha$ -GalCer，活化小鼠體內 iNKT cells，探討活化之 iNKT cells 對於 PBC 疾病的影響。

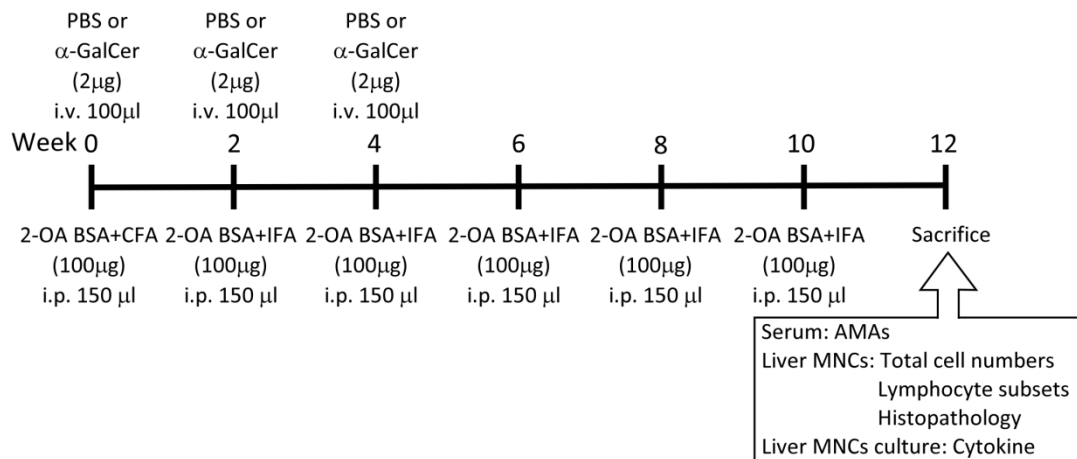
在我們的實驗成果中，我們發現初期給予 PBC 小鼠  $\alpha$ -GalCer 會促使血清 AMAs 效價上升、加重晚期 PBC 小鼠肝臟膽道破壞及加快早期 PBC 小鼠疾病進程。其機制可能為給予  $\alpha$ -GalCer 後，肝臟中 immature DCs 吞噬  $\alpha$ -GalCer，增加表面 CD1d 分子表現，並呈獻  $\alpha$ -GalCer 至 iNKT cells，促使 iNKT cells 活化。iNKT cells 受刺激後，在短時間內釋放 IL-4 與 IFN- $\gamma$ ，並提升 DCs 呈獻抗原之能力。在給予 2-OA BSA 4 週後，我們發現肝臟 DCs 數量增加，且其表面 MHC class I

與 class II 分子表現量增加，同時亦觀察到肝臟免疫細胞數量上升，尤其是執行毒殺功能的 CD8<sup>+</sup> T cells。致敏 12 週的晚期 PBC 小鼠肝臟 CD8<sup>+</sup> T cells 數量依舊較高，且肝臟免疫狀態為 Th1 與 Th17 細胞激素微環境，可能導致肝臟膽道破壞加重（圖二十四）。

綜合以上論述，我們在 xenobiotic (2-OA BSA) 引起之 PBC 小鼠模式中，發現以  $\alpha$ -GalCer 活化 iNKT cells 可加快及加重 PBC 疾病進程，且產生更為相似 PBC 病人病徵，如肝臟肉芽腫及纖維化。因此，未來我們可在此一小鼠模式下，配合  $\alpha$ -GalCer 的給予，成為另一更為相近 PBC 患者的 PBC 小鼠模式。加上 mPDC-E2 之製備及證明 mPDC-E2-specific auto-reactive T cells 之存在，給予  $\alpha$ -GalCer 之 2-OA BSA 致敏小鼠將可廣泛用於研究 PBC 疾病之自體免疫機轉及治療。



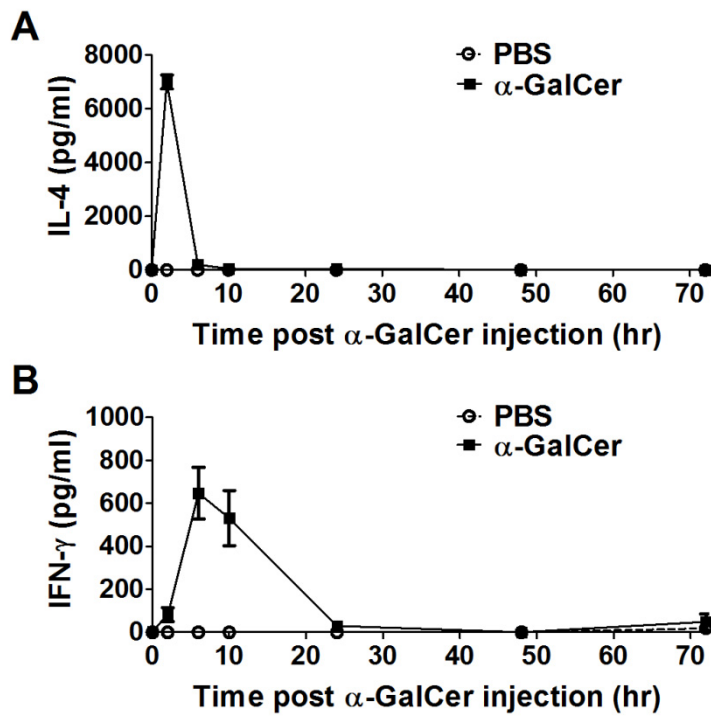




**圖一、Xenobiotics (2-OA BSA) 引發小鼠產生原發性膽道硬化症之實驗程序。**

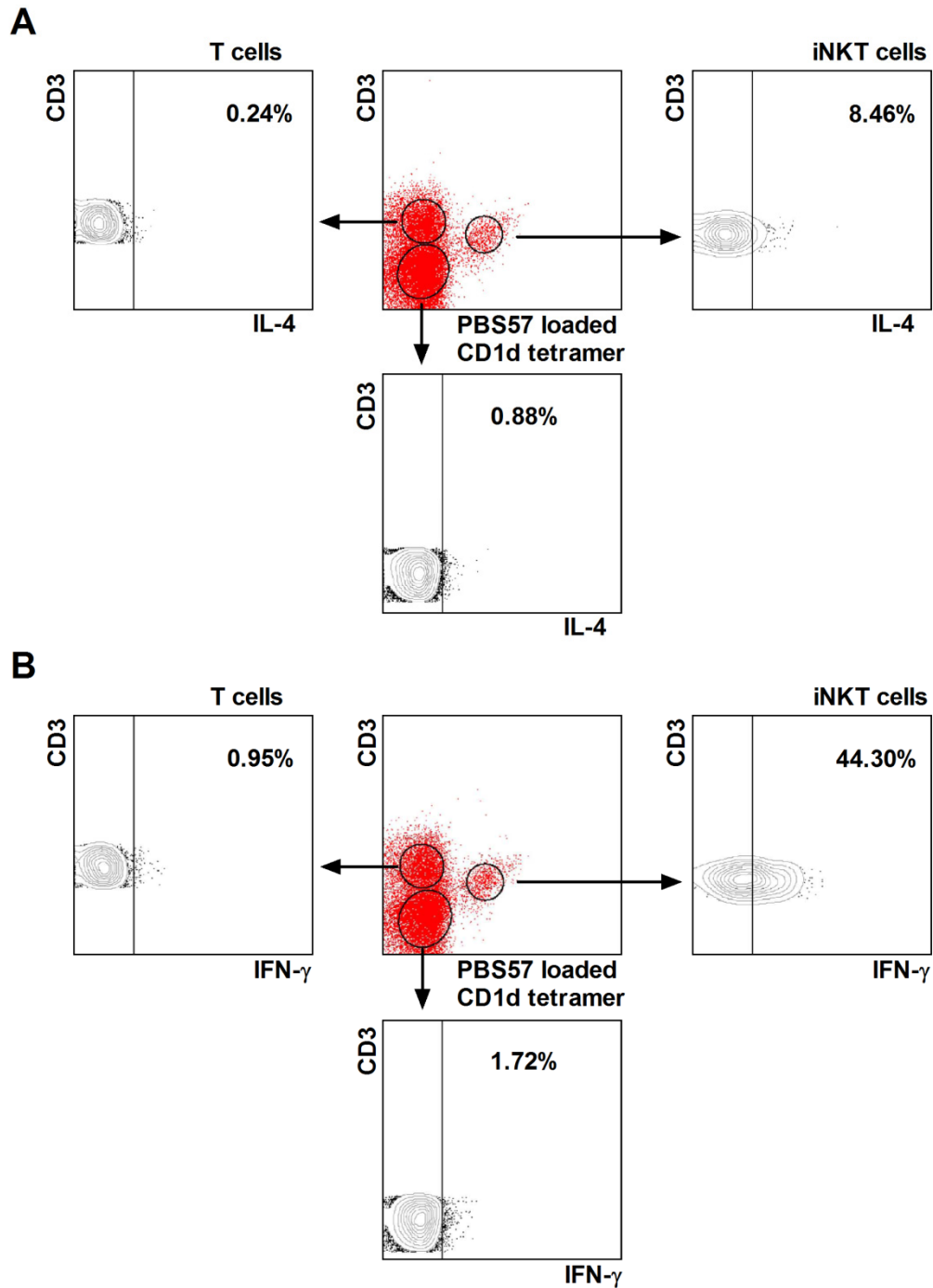
實驗分為 i.v. 注射 PBS 與 i.v. 注射  $\alpha$ -GalCer 兩組，C57BL/6 小鼠在第 0 週以靜脈注射 2 $\mu$ g  $\alpha$ -GalCer 或 PBS，18 小時後，再以 100  $\mu$ g 2-OA BSA 混合 CFA 佐劑，以 i.p. 方式注射。第 2 週與第 4 週同第 0 週注射  $\alpha$ -GalCer 及 2-OA BSA，但將 CFA 改為 IFA。之後每隔兩週注射 2-OA BSA 混合 IFA 至第 10 週，並在第 12 週犧牲小鼠。小鼠在第 0 週  $\alpha$ -GalCer 注射前及每 2 週致敏前抽血，收集血清以測量 AMAs。小鼠犧牲後，製作肝臟切片供病理學檢查、計數肝臟單核細胞、以流式細胞儀分析細胞組成及測量細胞分泌之細胞激素。





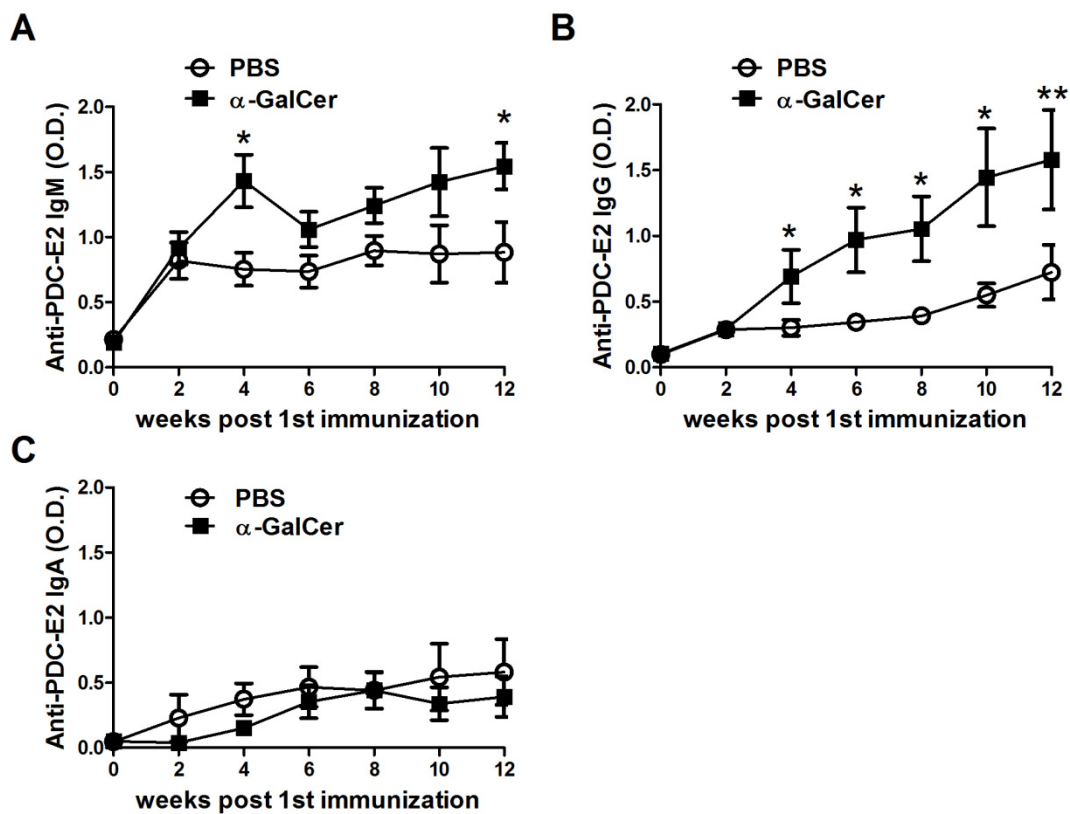
圖二、給予 $\alpha$ -GalCer後，小鼠血清 IL-4 與 IFN- $\gamma$  濃度迅速上升。

將 2 $\mu$ g  $\alpha$ -GalCer 或 PBS 以 i.v. 注射至小鼠眼窩靜脈叢，並在不同時間點採集血液，分離血清樣品，再以 ELISA 方式測量血清 IL-4 (A) 與 IFN- $\gamma$  (B) 濃度。每組樣本數為 7-11。



圖三、給予 $\alpha$ -GalCer 一小時後，iNKT cells 迅速釋放 IL-4 與 IFN- $\gamma$ 。

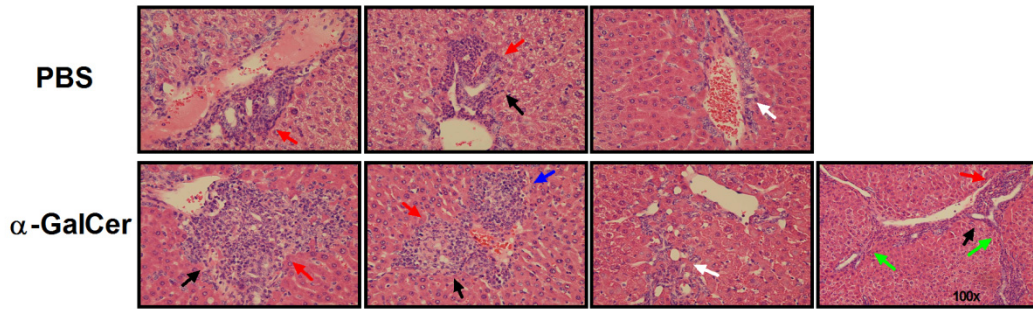
將 2 $\mu$ g  $\alpha$ -GalCer 以 i.v. 注射至小鼠眼窩靜脈叢，並在一小時後犧牲小鼠，分離出肝臟單核細胞，進行 IL-4 (A) 與 IFN- $\gamma$  (B) 細胞內染色，再以流式細胞儀分析。根據細胞表面標記可將肝臟單核細胞分為 T cells (CD3<sup>+</sup> PBS57 loaded CD1d tetramer<sup>-</sup>)、iNKT cells (CD3<sup>+</sup> PBS57 loaded CD1d tetramer<sup>+</sup>) 及 non-T、non iNKT cells (CD3<sup>-</sup> PBS57 loaded CD1d tetramer<sup>-</sup>)。



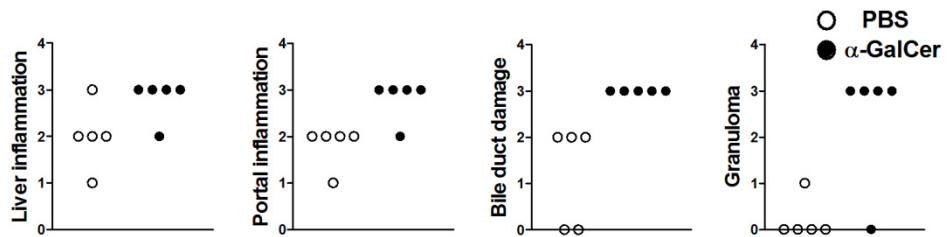
圖四、給予 $\alpha$ -GalCer 促使 PBC 小鼠血清中 anti-PDC-E2 IgM 和 IgG 效價上升。

i.v.注射 $\alpha$ -GalCer 或 PBS 之 2-OA BSA 致敏小鼠 (說明如圖一)的血清 anti-PDC-E2 IgM (A), IgG (B) 及 IgA (C)效價。 Anti-PDC-E2 IgM, 血清稀釋倍數為 1:400; Anti-PDC-E2 IgG, 血清稀釋倍數為 1:400; Anti-PDC-E2 IgA, 血清稀釋倍數為 1:200。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ 。每組樣本數為 10-18。

A

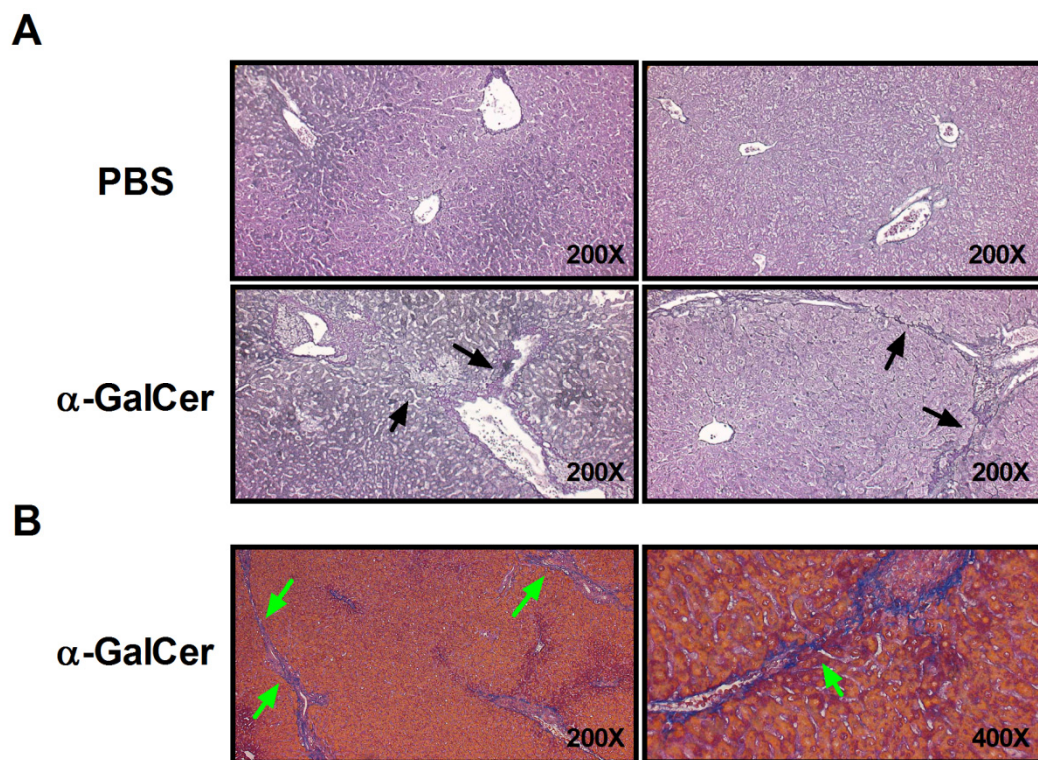


B



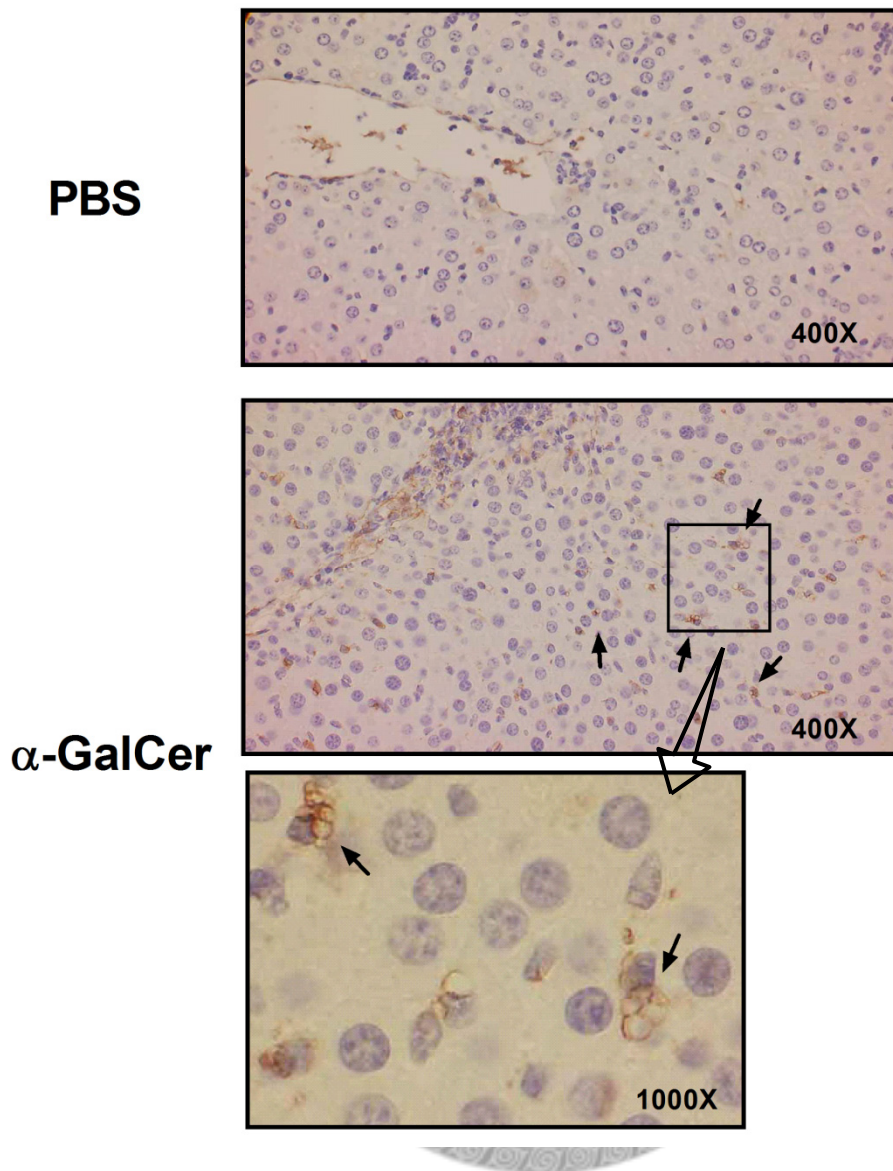
圖五、12週後，給予 $\alpha$ -GalCer之PBC小鼠肝臟膽道破壞更嚴重。

(A) H-E 染色下之肝臟病理切片。(B) 肝臟病理分數評估。肝臟病理切片400X 視野下之門脈三角；紅色箭頭表示肝臟門脈區發炎，黑色箭頭表示膽管破壞，白色箭頭表示膽道增生，藍色箭頭表示肉芽腫組織，綠色箭頭 (100X) 表示纖維化間隔。分數評估，包含評估肝臟發炎、門脈發炎、膽管破壞以及肉芽腫程度；分數0：無明顯差別，分數1：微小，分數2：輕微，分數3：中度，分數4：嚴重。每組樣本數為5。



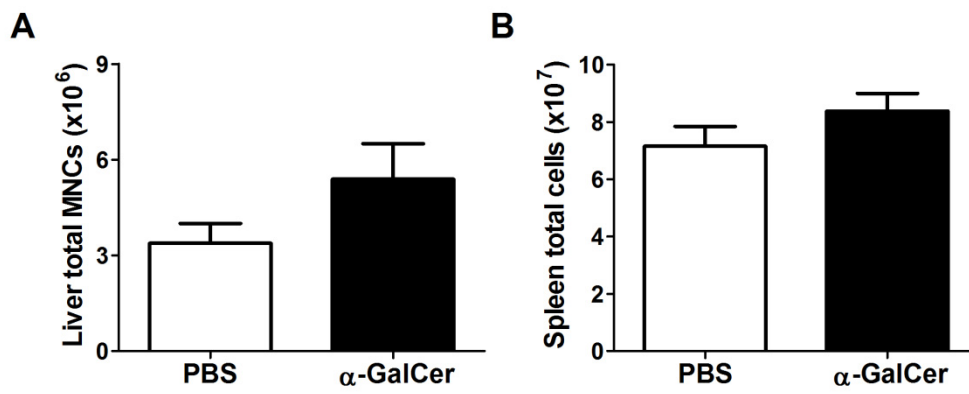
圖六、12週後，給予 $\alpha$ -GalCer之 PBC 小鼠產生肝臟纖維化。

石蠟包埋之 PBC 小鼠肝臟組織，切成 4  $\mu$ m 厚度，以銀染色與 Azan 染色，觀察肝臟細胞外基質（膠原蛋白纖維、網狀蛋白纖維）沉積。(A) 銀染色下，膠原蛋白纖維呈現粉紅色沉積，網狀蛋白纖維呈現黑色沉積，黑色箭頭表示門脈三角間有蛋白纖維沉積。(B) Azan 染色下，膠原蛋白纖維呈現藍色沉積，綠色箭頭表示門脈三角間有膠原蛋白纖維沉積。



圖七、12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠肝臟中可見 HSCs。

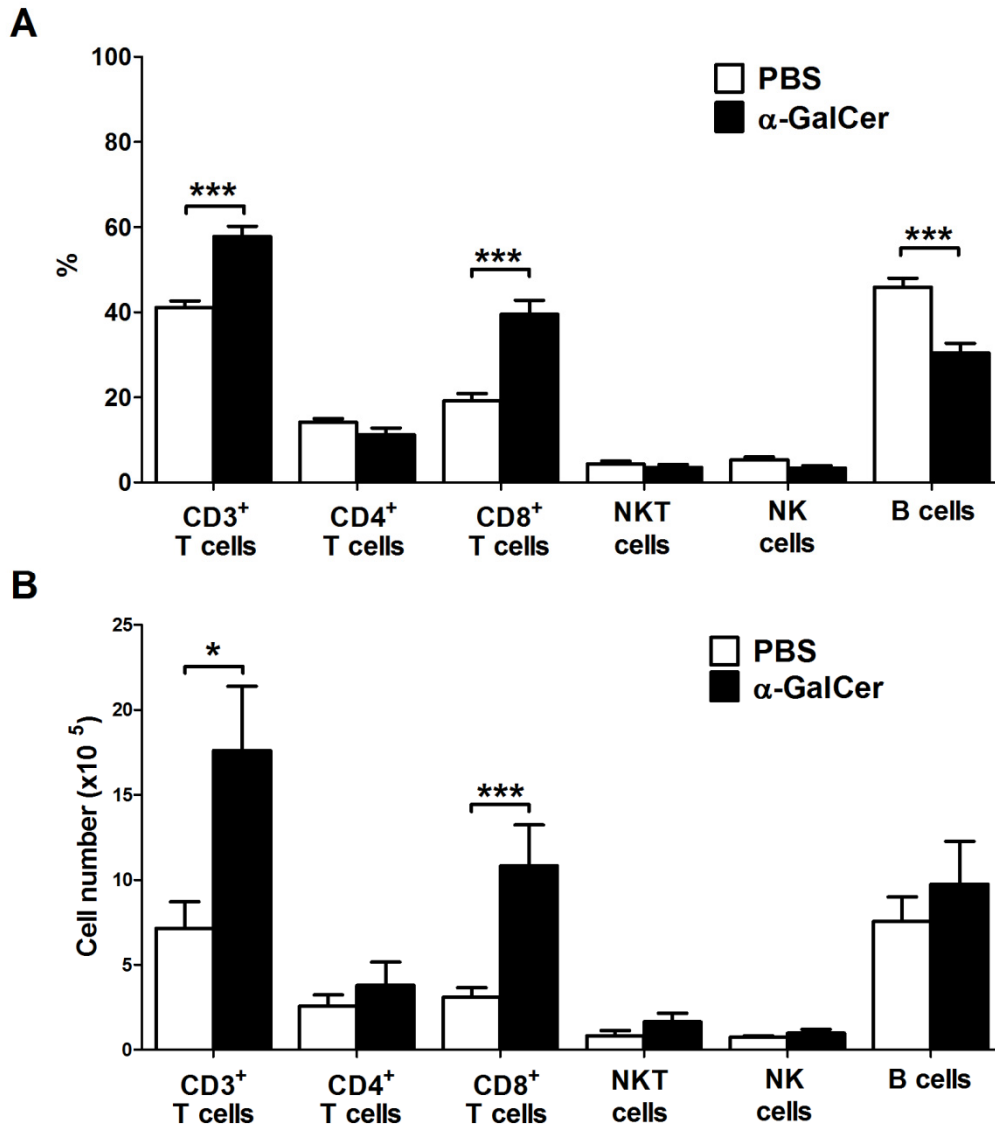
PBS 組與 $\alpha$ -GalCer 組 PBC 小鼠肝臟 400X 與 1000X 視野下， $\alpha$ -SMA 免疫化學染色切片。 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>細胞因帶有脂質空泡，經染色後呈現褐色空泡狀，黑色箭頭表示 $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>細胞。



圖八、12週後，給予 $\alpha$ -GalCer之 PBC 小鼠肝臟單核細胞總數增加。

(A) 肝臟單核細胞數。(B) 脾臟細胞數。肝臟樣本數為 9 隻，脾臟樣本數為 5 隻。

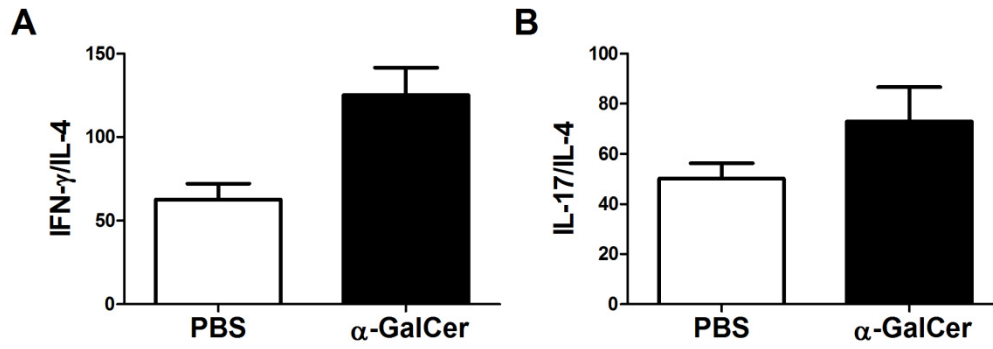




圖九、12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠肝臟 CD8<sup>+</sup> T cells 細胞數增加。

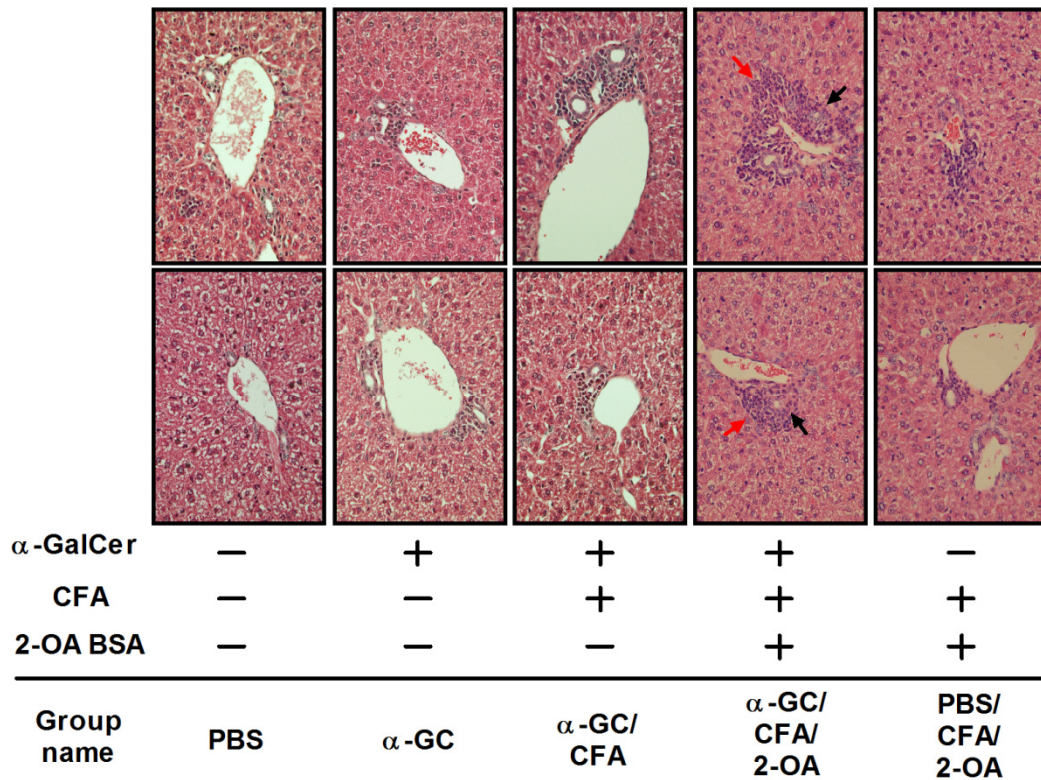
以流式細胞儀分析 $\alpha$ -GalCer 組與 PBS 組之 PBC 小鼠肝臟單核細胞組成。(A) 肝臟單核細胞組成百分比。(B) 肝臟單核細胞組成細胞數。CD3<sup>+</sup> T cells 定義為 CD3<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>細胞群，CD4<sup>+</sup> T cells 定義為 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>細胞群，CD8<sup>+</sup> T cells 定義為 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>細胞群，NKT cells 定義為 CD3<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>細胞群，NK cells 定義為 NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup>細胞群，B cells 定義為 CD19<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>細胞群。樣本數為 9-10 隻。\*, p<0.05；\*\*\*, p<0.001。





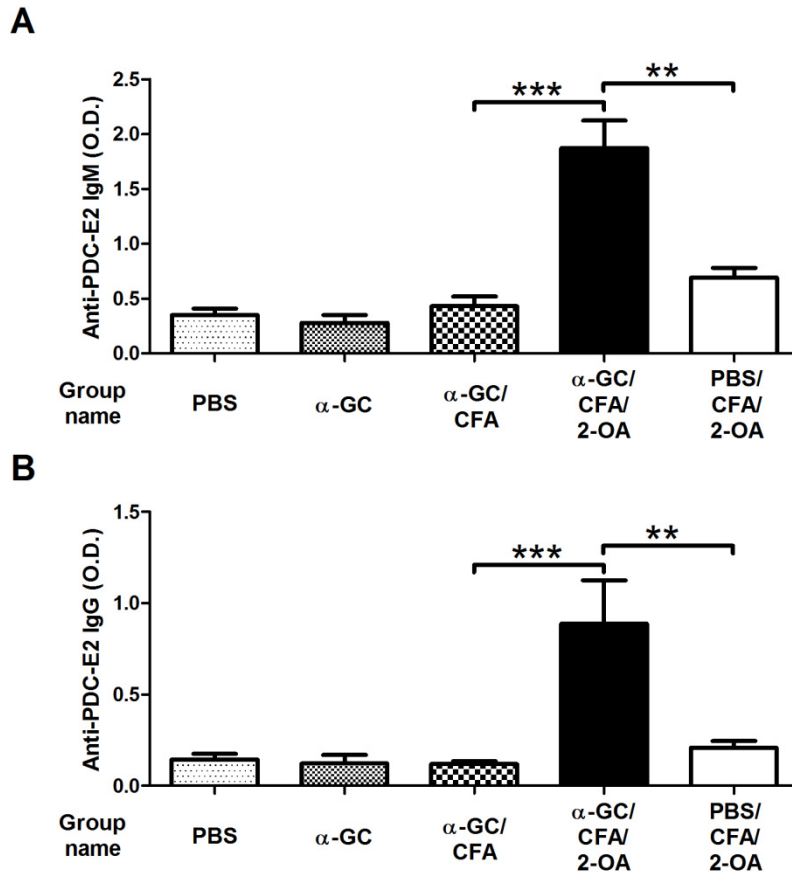
圖十、12 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 之 PBC 小鼠肝臟建立 Th1 與 Th17 細胞激素微環境。

(A) 肝臟單核細胞分泌之 IFN- $\gamma$ /IL-4 比值。(B) IL-17/IL-4 比值。 $\alpha$ -GalCer 組別與 PBS 組別之 PBC 小鼠肝臟單核細胞經 anti-CD3 Ab 與 anti-CD28 Ab 刺激 48 小時後，收取細胞培養上清液，以 ELISA 方式，測量細胞經刺激後所產生之 IL-4、IFN- $\gamma$  以及 IL-17。樣本數為 4。



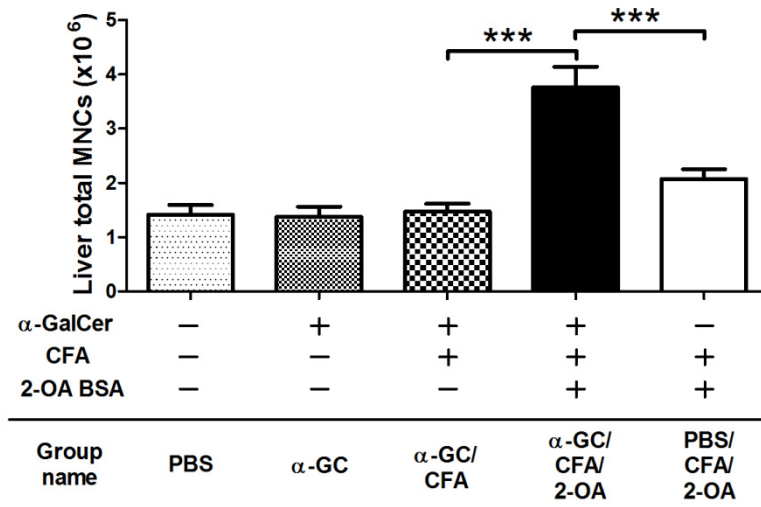
圖十一、4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠肝臟膽道破壞加快。

小鼠致敏步驟如圖一，第 4 週犧牲小鼠。H-E 染色下之肝臟病理切片。紅色箭頭表示肝臟門脈區發炎，黑色箭頭表示膽管破壞。PBS 組只有注射 PBS (i.v.)。 $\alpha$ -GC 組只有注射 2 $\mu$ g  $\alpha$ -GalCer (i.v.)。 $\alpha$ -GC / CFA 組注射 2 $\mu$ g  $\alpha$ -GalCer (i.v.) 與注射 CFA/IFA (i.p.)。 $\alpha$ -GC / CFA / 2-OA 組注射 2 $\mu$ g  $\alpha$ -GalCer (i.v.) 與 100 $\mu$ g 2-OA BSA 混和 CFA/IFA (i.p.)。PBS / CFA / 2-OA 組注射 PBS (i.v.) 與 100 $\mu$ g 2-OA BSA 混和 CFA/IFA (i.p.)。樣本數為 5。



圖十二、4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠血清中 anti-PDC-E2 IgM 和 IgG 效價上升。

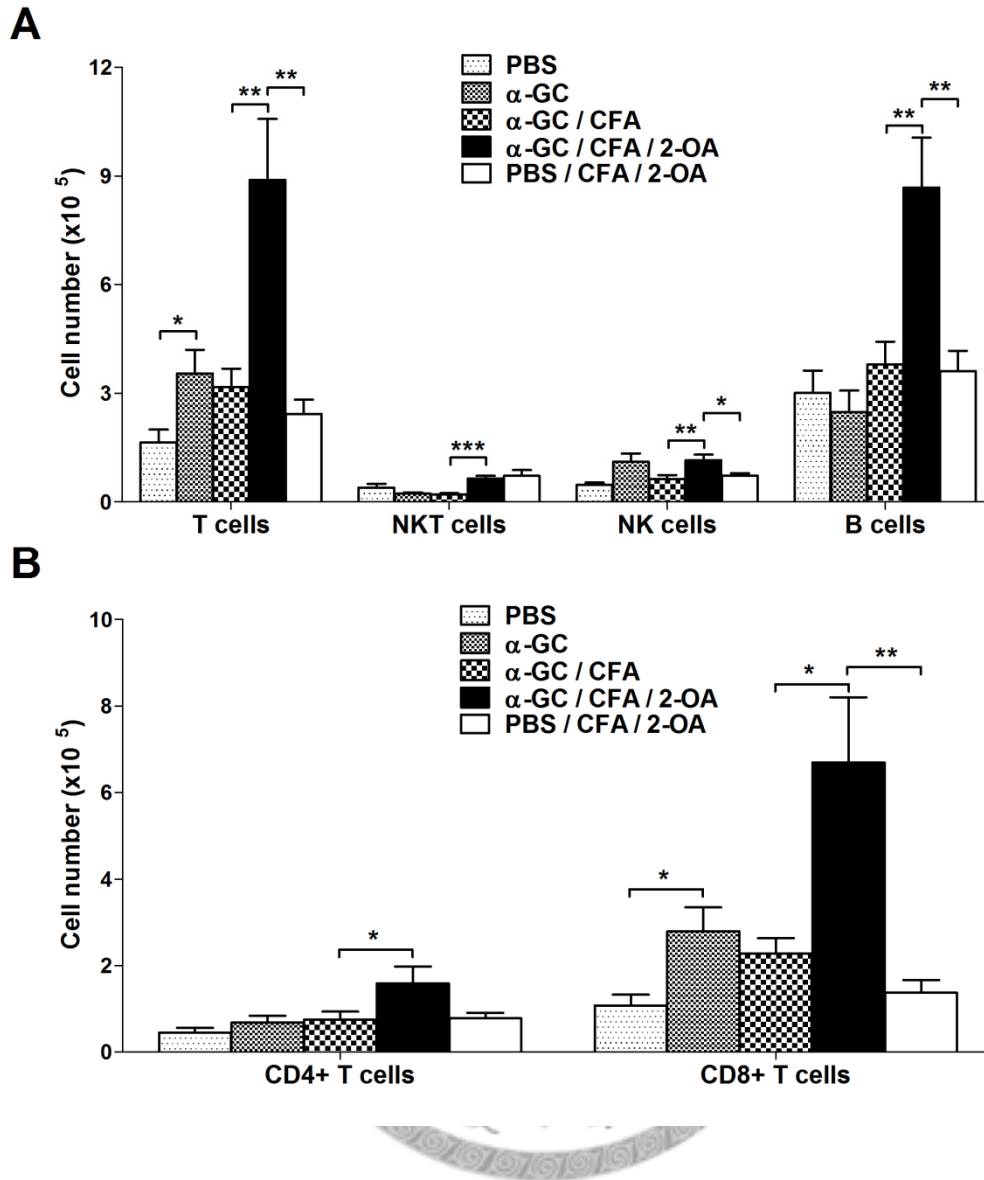
(A) Anti-PDC-E2 IgM，血清稀釋倍數為 1:400。 (B) Anti-PDC-E2 IgG，血清稀釋倍數為 1:400。實驗分組說明如圖十一。\*\*,  $p < 0.001$ ；\*\*\*,  $p < 0.0001$ 。每組樣本數為 3-8。



圖十三、4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠肝臟單核細胞增加。

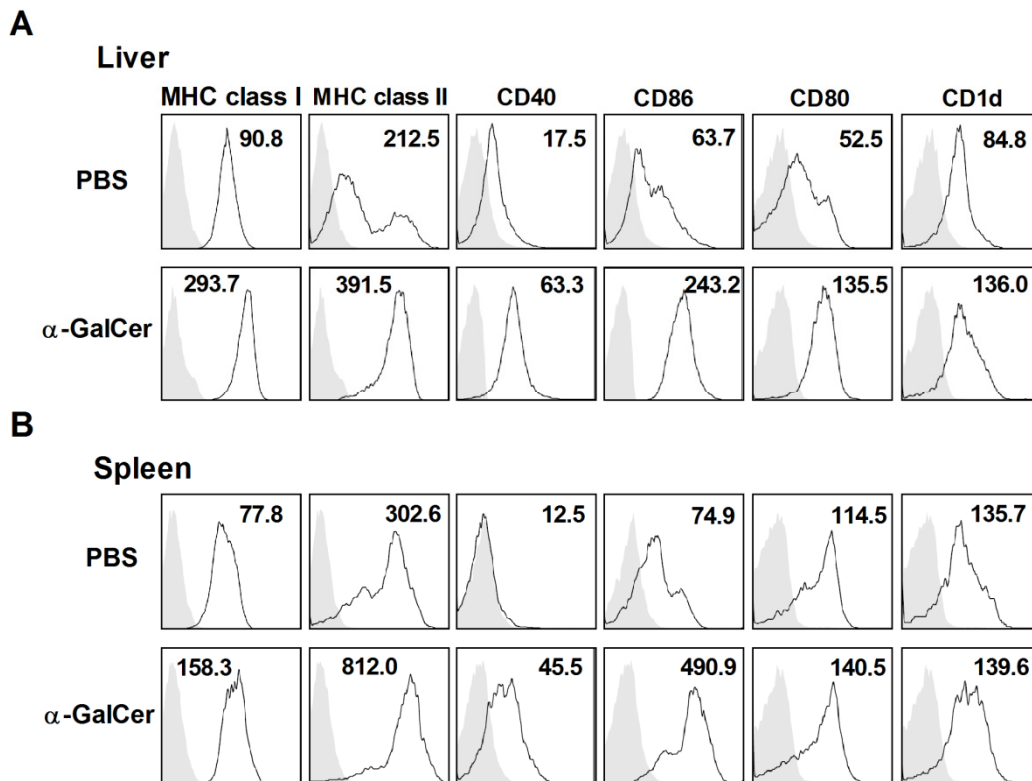
肝臟單核細胞總數。實驗分組如圖十一所述。肝臟樣本數為 8-11 隻。\*\*\*,  $p < 0.001$ 。





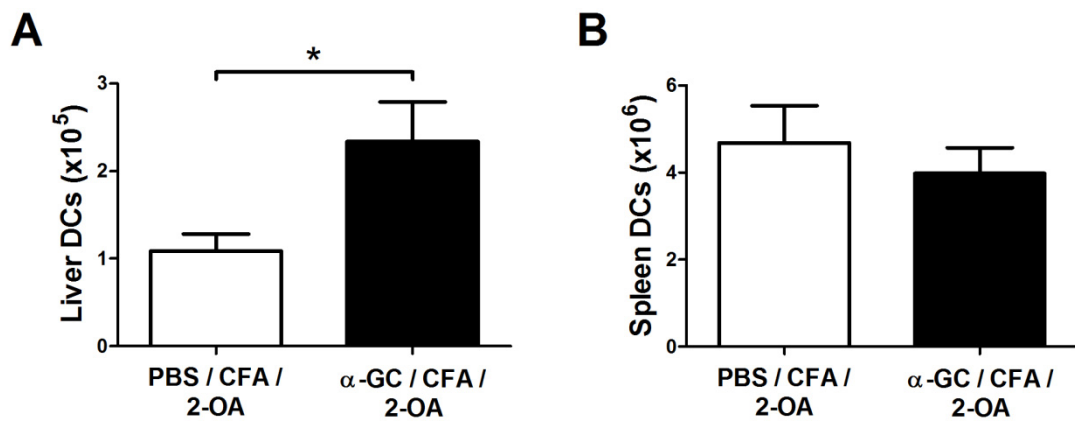
圖十四、4週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠肝臟免疫細胞增加。

以流式細胞儀分析各組(分組如圖十一)之小鼠肝臟單核細胞組成。(A) 肝臟單核細胞組成細胞數。(B) 肝臟 T cells 組成細胞數。CD3<sup>+</sup> T cells 定義為 CD3<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>細胞群，NKT cells 定義為 CD3<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>細胞群，NK cells 定義為 NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup>細胞群，B cells 定義為 CD19<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>細胞群，CD4<sup>+</sup> T cells 定義為 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>細胞群，CD8<sup>+</sup> T cells 定義為 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup>細胞群。樣本數為 8-11 隻。\*，p<0.05；\*\*，p<0.01；\*\*\*，p<0.001。



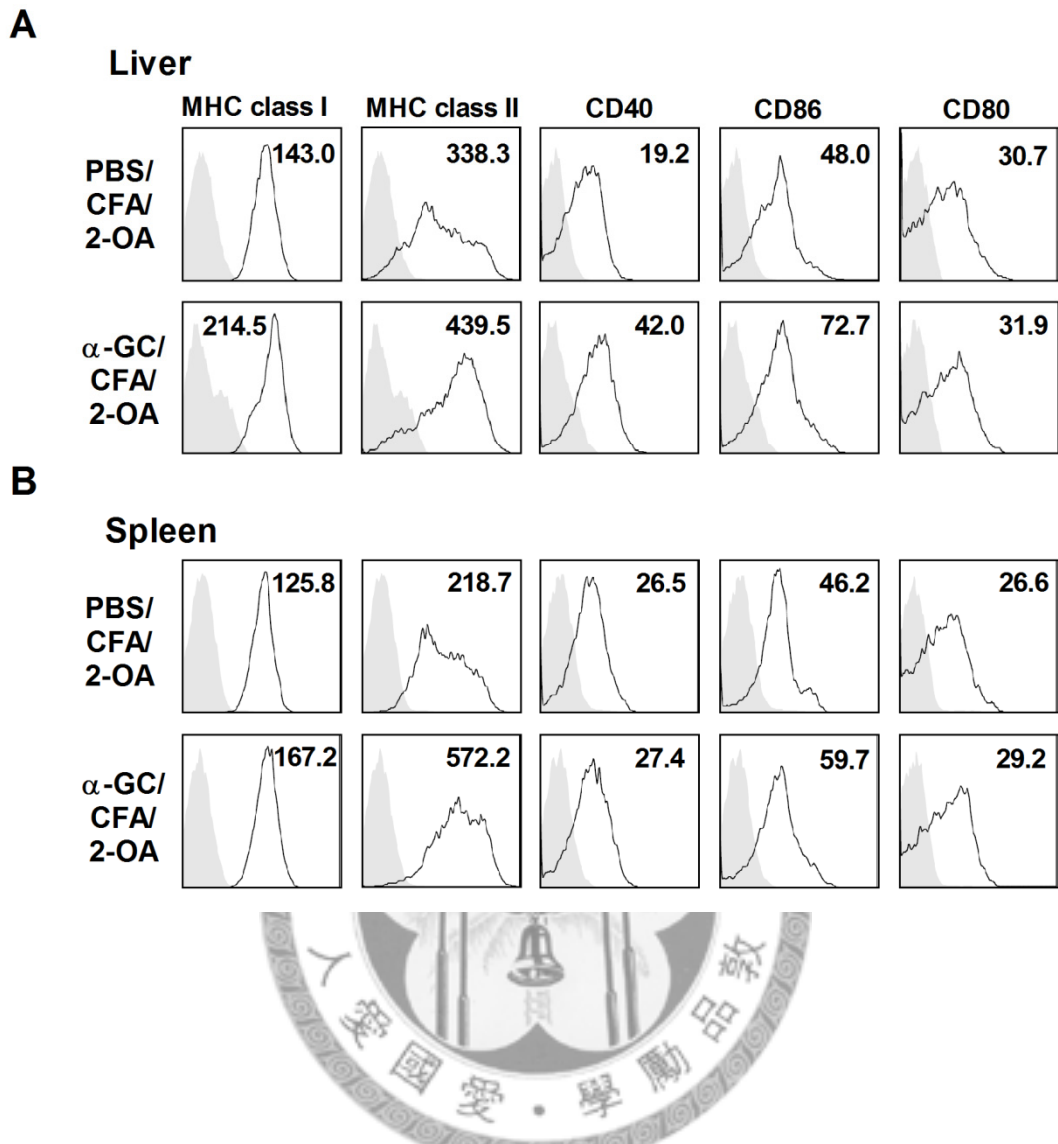
圖十五、給予 $\alpha$ -GalCer 18 小時後，迅速促使小鼠肝臟與脾臟內 DCs 成熟。

將  $2\mu\text{g}$   $\alpha$ -GalCer 或 PBS 注射至小鼠眼窩靜脈叢 (i.v.)，18 小時後犧牲小鼠，取出肝臟與脾臟，分離出肝臟與脾臟單核細胞，進行 DCs 表面分子染色 (包括 anti-H-2K<sup>b</sup>、I-A<sup>b</sup>、CD40、CD86、CD80、CD1d)，並利用流式細胞儀分析。(A) 肝臟 (B) 脾臟 DCs 表面分子表現量。結果以平均螢光強度 (MFI；mean fluorescence intensity) 表示。DCs 定義為 CD11c<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>細胞群。灰色面積表示抗體之 isotype control。



圖十六、4週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠肝臟 DCs 細胞數增加。

小鼠第0週及第2週致敏步驟如圖一，第4週時再以 i.v. 給予  $\alpha$ -GalCer 或 PBS 18 小時後，犧牲小鼠，取肝臟與脾臟，分離單核細胞，進行 DC 表面分子染色，以流式細胞儀分析 DC 的百分比，再乘上肝臟及脾臟單核細胞總數得 DC 數。(A) 肝臟 DCs 細胞數。(B) 脾臟 DCs 細胞數。DCs 定義為  $CD11c^+NK1.1^-$  細胞群。肝臟樣本數為 6 隻，脾臟樣本數為 6 隻。\*,  $p < 0.05$ 。



圖十七、4 週後，給予 $\alpha$ -GalCer 的 PBC 小鼠肝臟與脾臟 DCs 表面的 MHC class I 與 MHC class II 分子表現量均增加。

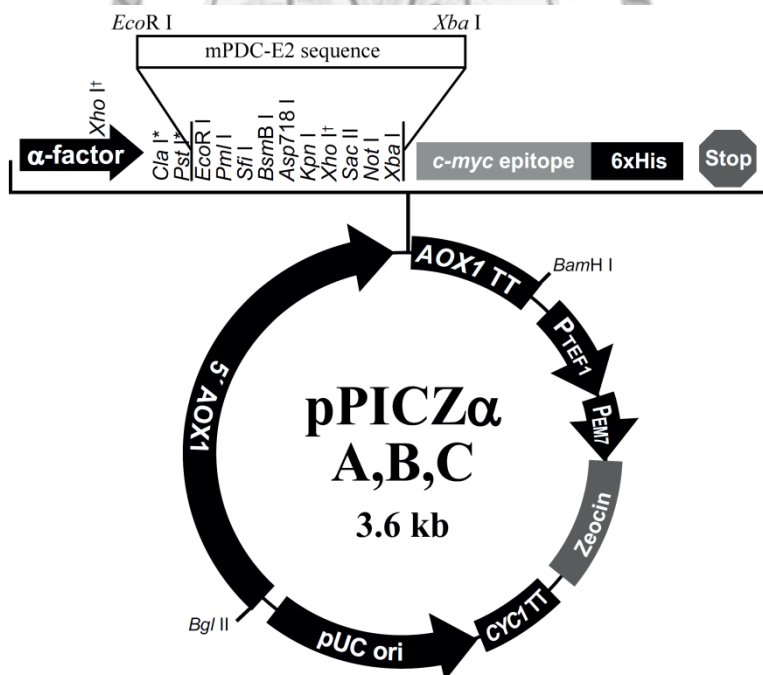
(A) 肝臟 DCs 各種抗原呈獻表面分子表現量。(B) 脾臟 DCs 各種抗原呈獻表面分子表現量。小鼠第 0 週及第 2 週致敏步驟如圖一，第 4 週時再以 i.v. 給予  $\alpha$ -GalCer 或 PBS 18 小時後，犧牲小鼠，取肝臟與脾臟，分離單核細胞，進行 DCs 表面分子染色 (包括 anti-H-2K<sup>b</sup>、I-A<sup>b</sup>、CD40、CD86、CD80)，並利用流式細胞儀分析。(A) 肝臟 (B) 脾臟 DCs 表面分子表現量。結果以平均螢光強度 (MFI; mean fluorescence intensity) 表示。DCs 定義為 CD11c<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>細胞群。灰色面積表示抗體之 isotype control。



*EcoR*I  
 ACGTGAATTC

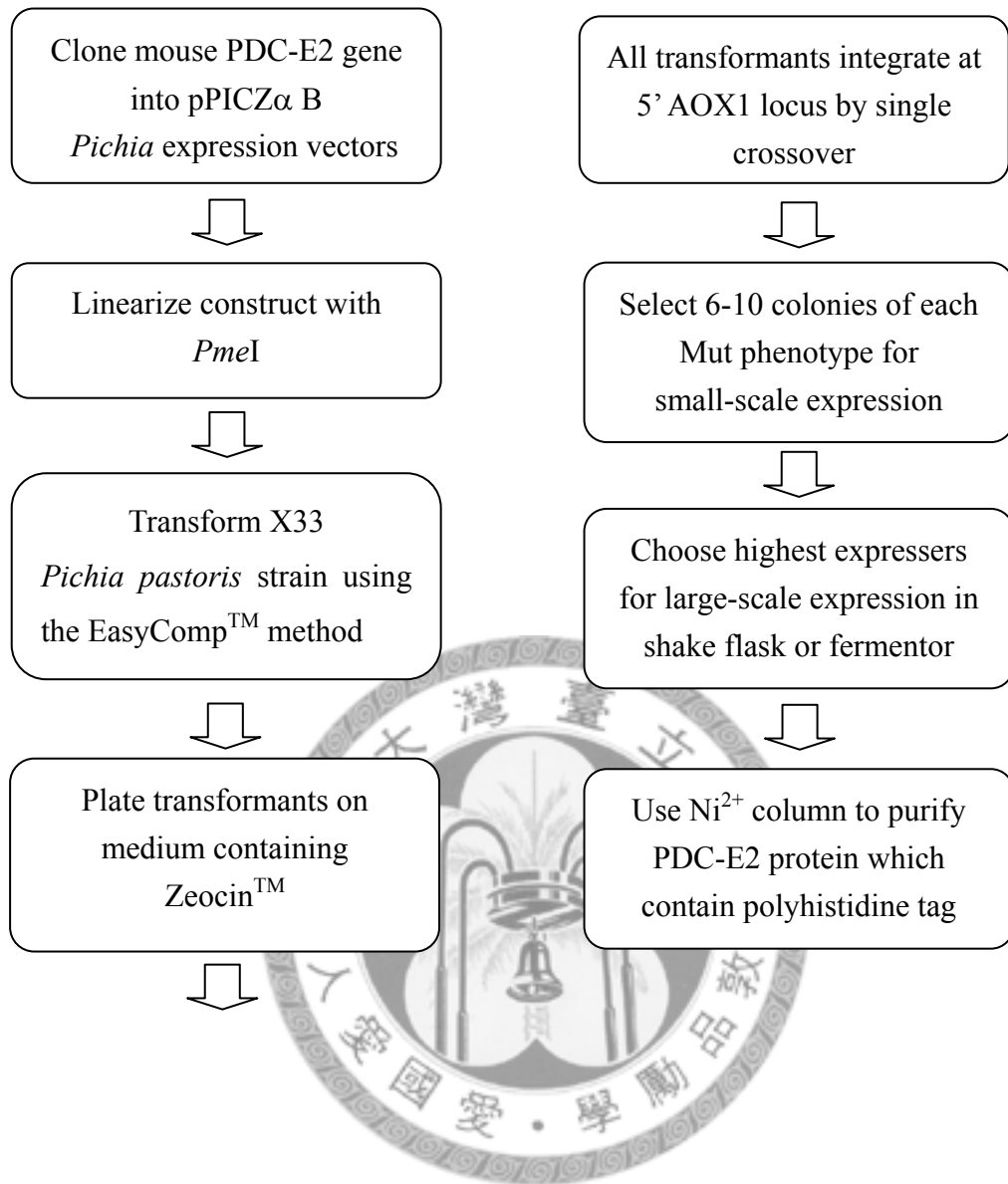
1	AAT	TAT	ACA	TTG	GAT	TTG	GCG	GCG	GCA	GCT	GCC	CCA	CAG	GCA	GCC
1	N	Y	T	L	D	L	A	A	A	A	A	P	Q	A	A
46	CCA	GCT	GCA	GCC	CCA	GCT	CCA	GCT	GCT	GCC	CCA	GCG	GCA	CCT	TCT
16	P	A	A	A	P	A	P	A	A	A	P	A	A	P	S
91	GCA	AGC	GCT	CCC	GGT	AGC	TCC	TAT	CCT	ACT	CAT	ATG	CAG	ATT	GTT
31	A	S	A	P	G	S	S	Y	P	T	H	M	Q	I	V
136	CTT	CCT	GCC	CTC	TCC	CCA	ACC	ATG	ACC	ATG	GGC	ACG	GTC	CAG	AGG
46	L	P	A	L	S	P	T	M	T	M	G	T	V	Q	R
181	TGG	GAA	AAG	AAA	GTG	GGC	GAG	AAG	CTG	AGT	GAA	GGA	GAC	TTG	CTG
61	W	E	K	K	V	G	E	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>L</b>
226	GCA	GAG	ATA	GAG	ACC	GAC	AAG	GCC	ACC	ATA	GGC	TTT	GAA	GTA	CAA
76	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>I</b>	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	G	F	E	V	Q
271	GAA	GAA	GGT	TAT	CTG	GCA	AAA	ATC	CTG	GTC	CCT	GAA	GGC	ACA	AGG
91	E	E	G	Y	L	A	K	I	L	V	P	E	G	T	R
361	GAT	GTT	CCT	CTG	GGA	GCT	CCA	CTA	TGT	ATC	ATA	GTA	GAA	AAG	CAG
106	D	V	P	L	G	A	P	L	C	I	I	V	E	K	Q
361	GAA	GAT	ATA	GCA	GCA	TTT	GCA	GAC	TAC	AGG	CCA	ACA	GAA	GTG	ACC
121	E	D	I	A	A	F	A	D	Y	R	P	T	E	V	T
406	AGC	TTA	AAG	CCT	CTAG	TAT									
136	S	L	K												

*Xba*I



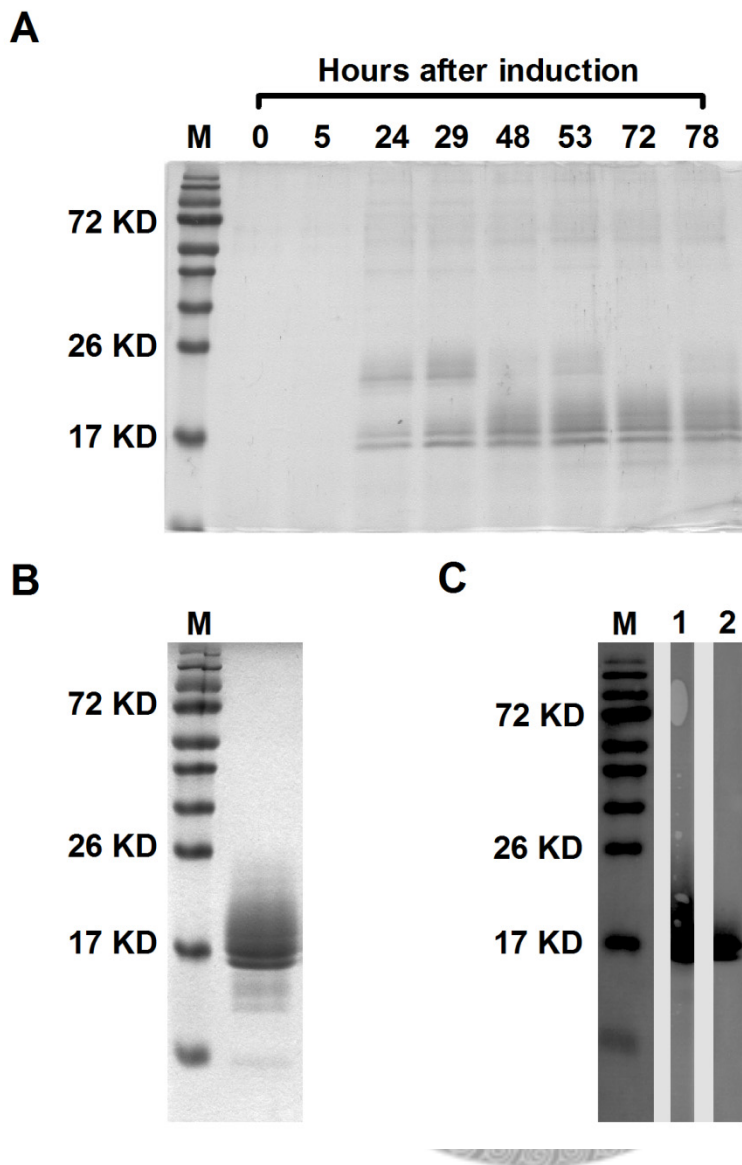
圖十八、mPDC-E2 DNA 及胺基酸序列與 pPICZα B 載體。

將 mPDC-E2 DNA 片段含有 408 個核苷酸 (138 個胺基酸) 接入 pPICZα B 載體中如圖示 *EcoR*I 與 *Xba*I 切位。mPDC-E2 中的 68-85 胺基酸序列，因與 human T cell epitope (附錄一) 相似，可能含有 mouse T cell epitope (以粗體表示)。



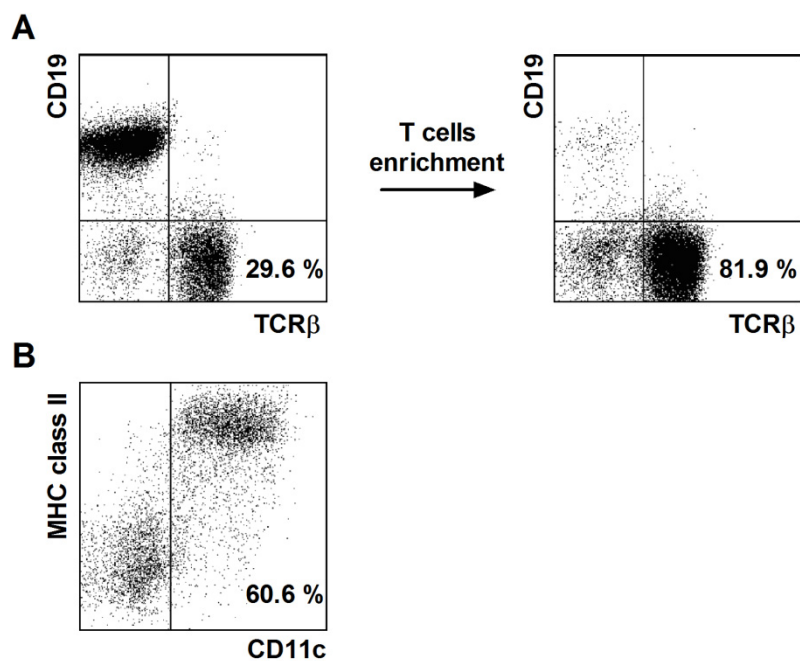
圖十九、小鼠 PDC-E2 酵母菌表現系統流程圖。

將 mPDC-E2 基因 clone 到 pPICZα B 載體中，利用 *PmeI* 限制酶將載體線性化，轉形至 *Pichia pastoris* 中，挑選出具抗 zeocin 且發生 DNA crossover 的菌落。先挑 6-10 個 colony 先小量表現蛋白，再選擇出具高表現量的菌落，最後使用  $\text{Ni}^{2+}$  column 純化出帶有 polyhistidine tag 的 mPDC-E2 蛋白片段。



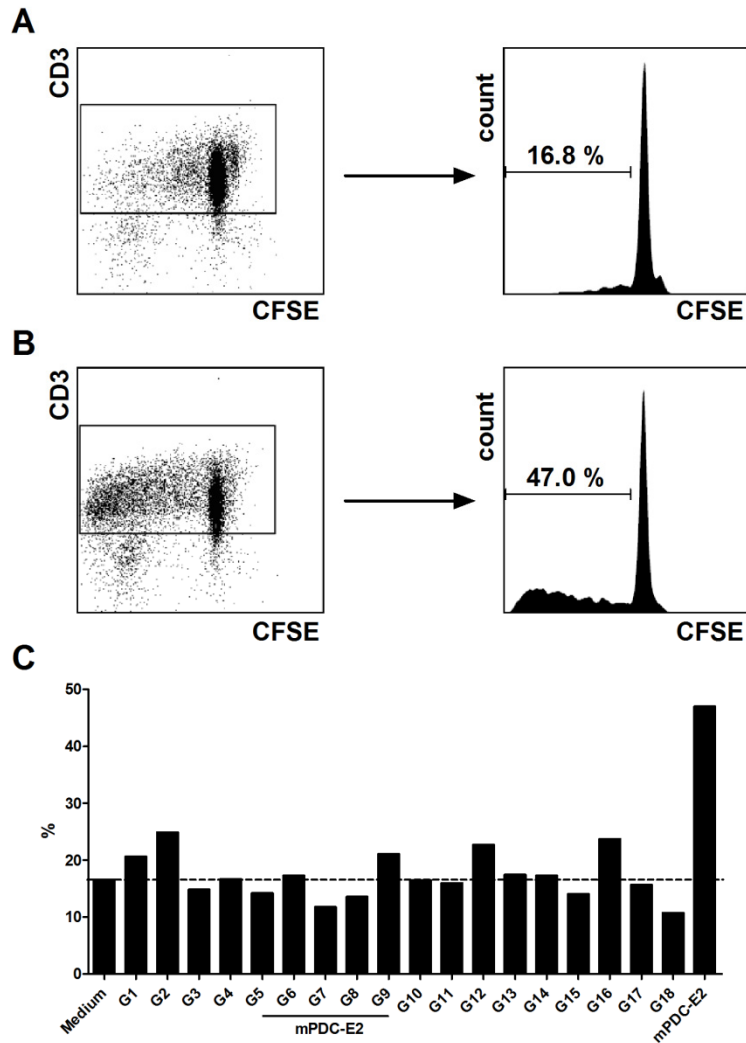
圖二十、*Pichia pastoris* 酵母菌表現 mPDC-E2 蛋白片段。

挑選 mPDC-E2 酵母菌菌株，以甲醇誘發酵母菌表現蛋白片段。(A) 誘發時間內，mPDC-E2 蛋白片段表現量。(B) 純化後之 mPDC-E2 蛋白片段。(C) 以 anti-His tag 抗體及 anti-PDC-E2-specific 單株抗體確認表現之蛋白。1:anti-His tag、2: anti-PDC-E2-specific 單株抗體 (2H4C8)。



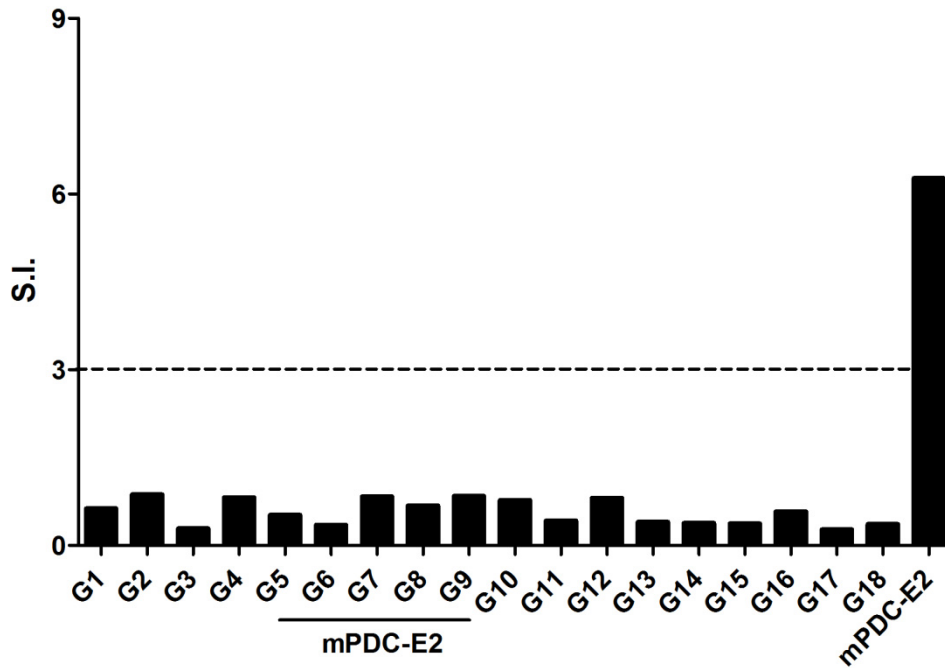
圖二十一、脾臟 T cells 與 BM-derived DCs 之純度。

(A) 2-OA BSA 致敏之 PBS 小鼠脾臟細胞經磁珠分離法 (BD IMag<sup>TM</sup>) 所得之 T cells 純度。(B) BM-derived DCs 經培養七天後, DCs 表現的 CD11c 及 MHC class II 百分比。



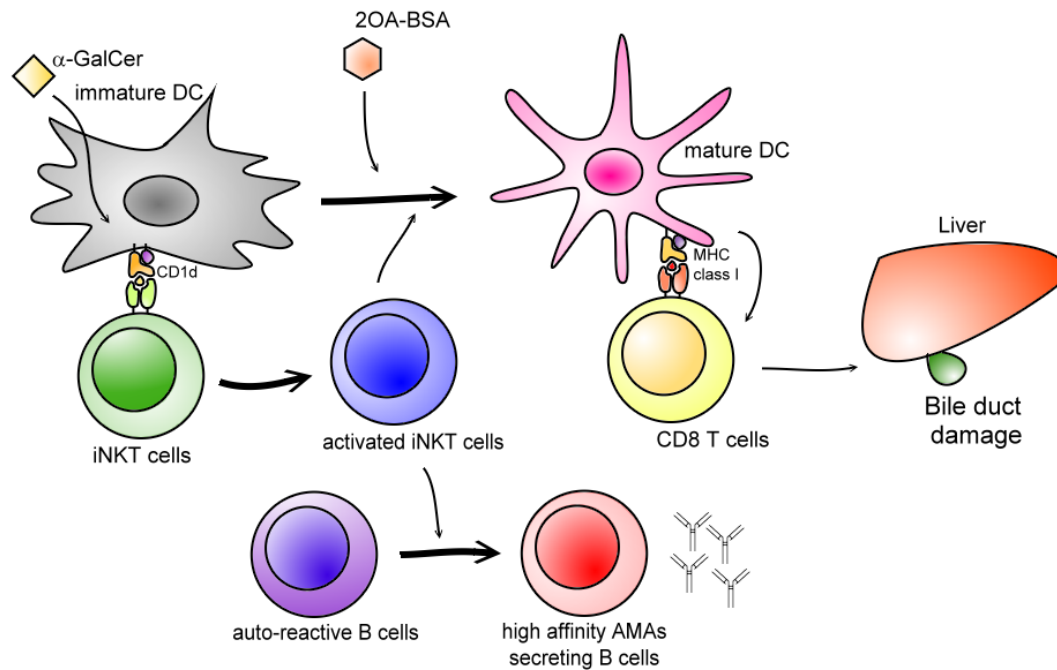
圖二十二、2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠脾臟中存在有 mPDC-E2-specific T cells。

以 mPDC-E2-pulsed BM-DCs 與 CFSE 標定之 T cells 進行培養，五天後以流式細胞儀分析 T cells 的 CFSE 螢光強度及增生狀態。(A) 未有 Ag pulsed 之 BMDCs 與 CFSE 標定之 T cells 進行培養，T cells 表現 CFSE 之情形。(B) mPDC-E2 pulsed BMDCs 與 CFSE 標定之 T cells 進行培養，T cells 表現 CFSE 之情形。(C) 各種培養狀態之 T cells 表現 CFSE 之百分比。



圖二十三、2-OA BSA 引起之 PBC 小鼠脾臟存在有 mPDC-E2-specific T cells。

以 mPDC-E2-pulsed BM-DCs 與脾臟 T cells 進行培養，五天後加入  $^3\text{H}$ -thymidine 進行增生實驗。各種培養狀態下，細胞放射線強度。S.I.: stimulation index。



圖二十四、 $\alpha$ -GalCer 活化之 iNKT cells 加重 xenobiotic (2-OA BSA) 引起之 PBC 小鼠肝臟膽道破壞免疫機轉模式圖

給予 $\alpha$ -GalCer 後，肝臟中 immature DCs 吞噬 $\alpha$ -GalCer，增加其表面 CD1d 分子表現，並呈獻 $\alpha$ -GalCer 給 iNKT cells，促使 iNKT cells 活化。活化之 iNKT cells 可幫助 immature DCs 在致敏 2-OA BSA 的期間內，提升其抗原呈獻能力，成為 mature DCs，除肝臟 DCs 數量明顯增加外，其表面 MHC class I 分子表現量亦增高，可活化執行毒殺功能的  $CD8^+$  T cells，致使  $CD8^+$  T cells 持續遷移至肝臟中，造成肝臟膽道破壞加重。同時，活化之 iNKT cells 亦可促進肝臟 B cells 數量增加，使 auto-reactive B cells 分化成為 high affinity AMAs secreting B cells，分泌較多與親和力較高之 AMAs。





表一、2-OA BSA 引起 PBC 之小鼠第 12 週肝臟膽道增生與纖維化情形。

		Proliferating bile ductules	Fibrosis
12 weeks	PBS	4/5	0/5
	$\alpha$ -GalCer	5/5	1/5 (mild) 4/5 (moderate)



表二、合成之 mPDC-E2 蛋白胜肽片段之胺基酸序。

		Group	mPDC-E2 Peptide	Group	mPDC-E2 Peptide	
Yeast expressed mPDC-E2	G1		MWRVCARRARSAVPR	G10	VAAVPPTQPVAPTP	
			VPRDGFRRWAALKE			PTPSAAPAGPKGRVF
			LKEGPGAPCGSPRIG			RVFVSPLAKKLAAEK
	G2		RIGPAAVRCGSGIPR	G11	AEKGIDLTQVKGTGP	
			IPRYGVRSLCGWSSG			TGPEGRIIKKDIDSF
			SSGSGTVPRNLLRQ			DSFVPSKAAPAAAAA
	G3		LRQLLGSPRRSYSL	G12	AAAMAPPGPRVAPAP	
			YSLPPHQKVPLPSLS			PAPAGVFTDIPISNI
			SLSPTMQAGTIARWE			SNIRRVIAQRLMQSK
	G4		RWEKKEGEEKISEGDL	G13	QSKQTIPHYYSVDV	
			GDLIAEVETDKATVG			VDVNMGEVLLVRKEL
			TVGFESLEECYMAKI			KELNKMLEGKKGKISV
	G5		AKILVPEGTRDVPVG	G14	ISVNDFFIKASALAC	
			PVGSIICTVEKPQD			LACKLVPEANSSWMD
			<b>PQDIEAFKNYTLDLA</b>			WMDTVIRQNHVVDVS
	G6		<b>DLAAAAAPQAAPAAA</b>	G15	DVSVAVSTPAGLITP	
			<b>AAAPAPAAAPAAPSA</b>			ITPIVFNAHIKGLT
			<b>PSASAPGSSYPHMQ</b>			LETIASDVVSLASKA
G7		<b>HMQIVLPALSPTMTM</b>	G16	SKAREGKLQPHEFQG		
		<b>MTMGTVQRWEKKVGE</b>			FQGGTFTISNLGMFG	
		<b>VGEKLSEGDLLAEIE</b>			MFGIKNFSAIINPPQ	
G8		<b>EIETDKATIGFEVQE</b>	G17	PPQACILAIGASEDK		
		<b>VQEEGYLAKILVPEG</b>			EDKLIPADNEKGFVDV	
		<b>PEGTRDVPLGAPLCI</b>			FDVASVMSVTLSCDH	
G9		<b>LCIIVEKQEDIAAFA</b>	G18	CDHRVVDGAVGAQWL		
		<b>AFADYRPTEVTS LKP</b>			QWLAEFKKYLEKPIT	
		LKPQAAPPAPPVAA			PITMLL	

mPDC-E2-specific T cells 的實驗中，我們將每三段胜肽為一組，共分 18 組 (G1-G18) 以進行實驗 (圖二十二、二十三)。其中我們以 *Pichia pastoris* 表現之 mPDC-E2 蛋白片段包含 G5 至 G9 蛋白胜肽。



參考文獻

1. Kaplan MM. 1996. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 335: 1570-80
2. Kaplan MM, Gershwin ME. 2005. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 353: 1261-73
3. Wong RK, Lim SG, Wee A, Chan YH, Aung MO, Wai CT. 2008. Primary biliary cirrhosis in Singapore: evaluation of demography, prognostic factors and natural course in a multi-ethnic population. *J Gastroenterol Hepatol* 23: 599-605
4. Su CW, Hung HH, Huo TI, Huang YH, Li CP, Lin HC, Lee PC, Lee SD, Wu JC. 2008. Natural history and prognostic factors of primary biliary cirrhosis in Taiwan: a follow-up study up to 18 years. *Liver Int* 28: 1305-13
5. Jones DE. 2008. Pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Postgrad Med J* 84: 23-33
6. Scheuer P. 1967. Primary biliary cirrhosis. *Proc R Soc Med* 60: 1257-60
7. Ludwig J. 1987. New concepts in biliary cirrhosis. *Seminars in Liver Disease* 7: 293
8. Portmann B, Popper H, Neuberger J, Williams R. 1985. Sequential and diagnostic features in primary biliary cirrhosis based on serial histologic study in 209 patients. *Gastroenterology* 88: 1777-90
9. Friedman SL. 2008. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88: 125-72
10. Friedman SL. 2008. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134: 1655-69
11. Gershwin ME, Mackay IR, Sturgess A, Coppel RL. 1987. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 138: 3525-31
12. Ishibashi H, Shimoda S, Gershwin ME. 2005. The immune response to mitochondrial autoantigens. *Semin Liver Dis* 25: 337-46
13. Gershwin ME, Mackay IR. 2008. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths. *Hepatology* 47: 737-45
14. Berg PA, Klein R, Rocken M. 1997. Cytokines in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 17: 115-23
15. Harada K, Van de Water J, Leung PS, Coppel RL, Ansari A, Nakanuma Y, Gershwin ME. 1997. In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology* 25: 791-6
16. Kita H, Lian ZX, Van de Water J, He XS, Matsumura S, Kaplan M, Luketic V, Coppel RL, Ansari AA, Gershwin ME. 2002. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-

- presented by dendritic cells. *J Exp Med* 195: 113-23
17. Kita H, Matsumura S, He XS, Ansari AA, Lian ZX, Van de Water J, Coppel RL, Kaplan MM, Gershwin ME. 2002. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 109: 1231-40
  18. Chuang YH, Ridgway WM, Ueno Y, Gershwin ME. 2008. Animal models of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis* 12: 333-47; ix
  19. Irie J, Wu Y, Wicker LS, Rainbow D, Nalesnik MA, Hirsch R, Peterson LB, Leung PS, Cheng C, Mackay IR, Gershwin ME, Ridgway WM. 2006. NOD.c3c4 congenic mice develop autoimmune biliary disease that serologically and pathogenetically models human primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 203: 1209-19
  20. Oertelt S, Lian ZX, Cheng CM, Chuang YH, Padgett KA, He XS, Ridgway WM, Ansari AA, Coppel RL, Li MO, Flavell RA, Kronenberg M, Mackay IR, Gershwin ME. 2006. Anti-mitochondrial antibodies and primary biliary cirrhosis in TGF-beta receptor II dominant-negative mice. *J Immunol* 177: 1655-60
  21. Wakabayashi K, Lian ZX, Moritoki Y, Lan RY, Tsuneyama K, Chuang YH, Yang GX, Ridgway W, Ueno Y, Ansari AA, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. 2006. IL-2 receptor alpha(-/-) mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 44: 1240-9
  22. Kaplan MM. 2004. *Novosphingobium aromaticivorans*: a potential initiator of primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 99: 2147-9
  23. Mattner J, Savage PB, Leung P, Oertelt SS, Wang V, Trivedi O, Scanlon ST, Pendem K, Teyton L, Hart J, Ridgway WM, Wicker LS, Gershwin ME, Bendelac A. 2008. Liver autoimmunity triggered by microbial activation of natural killer T cells. *Cell Host Microbe* 3: 304-15
  24. Wakabayashi K, Lian ZX, Leung PS, Moritoki Y, Tsuneyama K, Kurth MJ, Lam KS, Yoshida K, Yang GX, Hibi T, Ansari AA, Ridgway WM, Coppel RL, Mackay IR, Gershwin ME. 2008. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatology* 48: 531-40
  25. Yang GX, Lian ZX, Chuang YH, Moritoki Y, Lan RY, Wakabayashi K, Ansari AA, Flavell RA, Ridgway WM, Coppel RL, Tsuneyama K, Mackay IR, Gershwin ME. 2008. Adoptive transfer of CD8(+) T cells from transforming growth factor beta receptor type II (dominant negative form) induces autoimmune cholangitis in mice. *Hepatology* 47: 1974-82
  26. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev*

*Immunol* 25: 297-336

27. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. 2008. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol* 20: 358-68
28. Wilson SB, Delovitch TL. 2003. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 211-22
29. Godfrey DI, Kronenberg M. 2004. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 114: 1379-88
30. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. 1993. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med* 178: 1-16
31. Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. 1994. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* 180: 1171-6
32. Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, Kronenberg M. 1998. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosyl-ceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* 188: 1521-8
33. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 4: 231-7
34. Emoto M, Kaufmann SH. 2003. Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends Immunol* 24: 364-9
35. Klugewitz K, Adams DH, Emoto M, Eulenburg K, Hamann A. 2004. The composition of intrahepatic lymphocytes: shaped by selective recruitment? *Trends Immunol* 25: 590-4
36. Porcelli SA, Modlin RL. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17: 297-329
37. Boes M, Stoppelenburg AJ, Sille FC. 2009. Endosomal processing for antigen presentation mediated by CD1 and Class I major histocompatibility complex: roads to display or destruction. *Immunology* 127: 163-70
38. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21: 573-83
39. Kronenberg M, Gapin L. 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2: 557-68
40. Wu L, Van Kaer L. 2009. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr Mol Med* 9: 4-14

41. Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. 2001. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 7: 1052-6
42. Ly D, Mi QS, Hussain S, Delovitch TL. 2006. Protection from type 1 diabetes by invariant NK T cells requires the activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 177: 3695-704
43. Griseri T, Beaudoin L, Novak J, Mars LT, Lepault F, Liblau R, Lehuen A. 2005. Invariant NKT cells exacerbate type 1 diabetes induced by CD8 T cells. *J Immunol* 175: 2091-101
44. Furlan R, Bergami A, Cantarella D, Brambilla E, Taniguchi M, Dellabona P, Casorati G, Martino G. 2003. Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *Eur J Immunol* 33: 1830-8
45. Jahng AW, Maricic I, Pedersen B, Burdin N, Naidenko O, Kronenberg M, Koezuka Y, Kumar V. 2001. Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 194: 1789-99
46. Swain MG. 2008. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin Sci (Lond)* 114: 457-66
47. Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. 2000. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5498-503
48. Biburger M, Tiegs G. 2005. Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J Immunol* 175: 1540-50
49. Tsuneyama K, Yasoshima M, Harada K, Hiramatsu K, Gershwin ME, Nakanuma Y. 1998. Increased CD1d expression on small bile duct epithelium and epithelioid granuloma in livers in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 28: 620-3
50. Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M, Ansari AA, Rogers P, He XS, Koning F, Mikayama T, Van De Water J, Coppel RL, Kaplan M, Gershwin ME. 2002. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* 123: 1031-43
51. Chuang YH, Lian ZX, Yang GX, Shu SA, Moritoki Y, Ridgway WM, Ansari AA, Kronenberg M, Flavell RA, Gao B, Gershwin ME. 2008. Natural killer T cells exacerbate liver injury in a transforming growth factor beta receptor II

- dominant-negative mouse model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 47: 571-80
52. Moteki S, Leung PS, Coppel RL, Dickson ER, Kaplan MM, Munoz S, Gershwin ME. 1996. Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochondrial autoantibodies. *Hepatology* 24: 97-103
  53. Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, Lian ZX, Yang GX, Hsu W, Moritoki Y, Ansari AA, Kemper C, Price J, Atkinson JP, Coppel RL, Gershwin ME. 2009. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 32: 43-51
  54. Nakagawa R, Nagafune I, Tazunoki Y, Ehara H, Tomura H, Iijima R, Motoki K, Kamishohara M, Seki S. 2001. Mechanisms of the antimetastatic effect in the liver and of the hepatocyte injury induced by alpha-galactosylceramide in mice. *J Immunol* 166: 6578-84
  55. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15: 535-62
  56. MacDonald HR. 1995. NK1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells: new clues to their origin, specificity, and function. *J Exp Med* 182: 633-8
  57. Trobonjaca Z, Leithauser F, Moller P, Schirmbeck R, Reimann J. 2001. Activating immunity in the liver. I. Liver dendritic cells (but not hepatocytes) are potent activators of IFN-gamma release by liver NKT cells. *J Immunol* 167: 1413-22
  58. Osman Y, Kawamura T, Naito T, Takeda K, Van Kaer L, Okumura K, Abo T. 2000. Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* 30: 1919-28
  59. Fujii H, Seki S, Kobayashi S, Kitada T, Kawakita N, Adachi K, Tsutsui H, Nakanishi K, Fujiwara H, Ikarashi Y, Taniguchi M, Kronenberg M, Ikemoto M, Nakajima Y, Arakawa T, Kaneda K. 2005. A murine model of NKT cell-mediated liver injury induced by alpha-galactosylceramide/d-galactosamine. *Virchows Arch* 446: 663-73
  60. Sprengers D, Sille FC, Derkow K, Besra GS, Janssen HL, Schott E, Boes M. 2008. Critical role for CD1d-restricted invariant NKT cells in stimulating intrahepatic CD8 T-cell responses to liver antigen. *Gastroenterology* 134: 2132-43
  61. Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM. 2004. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* 199: 1607-18



62. Fujii S, Shimizu K, Hemmi H, Steinman RM. 2007. Innate Valpha14(+) natural killer T cells mature dendritic cells, leading to strong adaptive immunity. *Immunol Rev* 220: 183-98
63. Fujii S, Shimizu K, Hemmi H, Fukui M, Bonito AJ, Chen G, Franck RW, Tsuji M, Steinman RM. 2006. Glycolipid alpha-C-galactosylceramide is a distinct inducer of dendritic cell function during innate and adaptive immune responses of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11252-7
64. Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. 2003. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J Exp Med* 198: 267-79
65. Parekh VV, Wilson MT, Olivares-Villagomez D, Singh AK, Wu L, Wang CR, Joyce S, Van Kaer L. 2005. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J Clin Invest* 115: 2572-83
66. Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, Dellabona P, Abrignani S. 2003. CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* 197: 1051-7
67. Tonti E, Galli G, Malzone C, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. 2009. NKT-cell help to B lymphocytes can occur independently of cognate interaction. *Blood* 113: 370-6
68. Park O, Jeong WI, Wang L, Wang H, Lian ZX, Gershwin ME, Gao B. 2009. Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology* 49: 1683-94
69. Gao B, Radaeva S, Park O. 2009. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol* 86: 513-28
70. Inada S, Suzuki K, Kimura T, Hayashi A, Narita T, Yui R, Asakura H, Fujiwara M. 1995. Concentric fibrosis and cellular infiltration around bile ducts induced by graft-versus-host reaction in mice: a role of CD8+ cells. *Autoimmunity* 22: 163-71
71. Safadi R, Ohta M, Alvarez CE, Fiel MI, Bansal M, Mehal WZ, Friedman SL. 2004. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. *Gastroenterology* 127: 870-82
72. Youn HJ, Ko SY, Lee KA, Ko HJ, Lee YS, Fujihashi K, Boyaka PN, Kim SH, Horimoto T, Kweon MN, Kang CY. 2007. A single intranasal immunization with inactivated influenza virus and alpha-galactosylceramide induces long-term protective immunity without redirecting antigen to the central

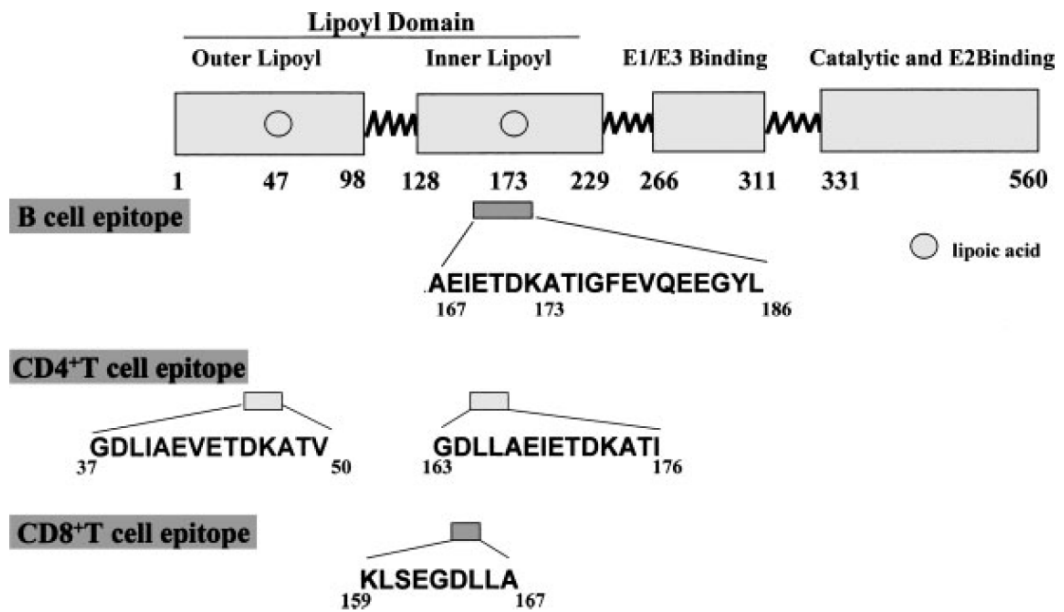
- nervous system. *Vaccine* 25: 5189-98
73. Choi YS, Hoory T, Monie A, Wu A, Connolly D, Hung CF. 2008. alpha-Galactosylceramide enhances the protective and therapeutic effects of tumor cell based vaccines for ovarian tumors. *Vaccine* 26: 5855-63
  74. Cerundolo V, Silk JD, Masri SH, Salio M. 2009. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol* 9: 28-38
  75. Huang Y, Chen A, Li X, Chen Z, Zhang W, Song Y, Gurner D, Gardiner D, Basu S, Ho DD, Tsuji M. 2008. Enhancement of HIV DNA vaccine immunogenicity by the NKT cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Vaccine* 26: 1807-16
  76. Gonzalez-Aseguinolaza G, Van Kaer L, Bergmann CC, Wilson JM, Schmiege J, Kronenberg M, Nakayama T, Taniguchi M, Koezuka Y, Tsuji M. 2002. Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J Exp Med* 195: 617-24
  77. Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M, von Blumberg BM, Scheper RJ, van der Vliet HJ, van den Eertwegh AJ, Roelvink M, Beijnen J, Zwierzina H, Pinedo HM. 2002. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 8: 3702-9
  78. Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, Lin H, Yamaura A, Ide K, Abraham R, Juji T, Macfarlane DJ, Nicol AJ. 2004. Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 103: 383-9
  79. Motohashi S, Ishikawa A, Ishikawa E, Otsuji M, Iizasa T, Hanaoka H, Shimizu N, Horiguchi S, Okamoto Y, Fujii S, Taniguchi M, Fujisawa T, Nakayama T. 2006. A phase I study of in vitro expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12: 6079-86
  80. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. 2008. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun* 31: 252-6
  81. Ohashi PS. 2003. Negative selection and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 15: 668-76
  82. Felix NJ, Allen PM. 2007. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol* 7: 942-53
  83. Christen U, von Herrath MG. 2004. Initiation of autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 16: 759-67
  84. Ely LK, Burrows SR, Purcell AW, Rossjohn J, McCluskey J. 2008. T-cells behaving badly: structural insights into alloreactivity and autoimmunity. *Curr*

*Opin Immunol* 20: 575-80

85. Shimoda S, Nakamura M, Shigematsu H, Tanimoto H, Gushima T, Gershwin ME, Ishibashi H. 2000. Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 31: 1212-6
86. Shimoda S, Van de Water J, Ansari A, Nakamura M, Ishibashi H, Coppel RL, Lake J, Keeffe EB, Roche TE, Gershwin ME. 1998. Identification and precursor frequency analysis of a common T cell epitope motif in mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest* 102: 1831-40
87. Van de Water J, Ansari A, Prindiville T, Coppel RL, Ricalton N, Kotzin BL, Liu S, Roche TE, Krams SM, Munoz S, Gershwin ME. 1995. Heterogeneity of autoreactive T cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 181: 723-33
88. Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Hayashida K, Niho Y. 1995. HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases. *J Exp Med* 181: 1835-45
89. Grau-Lopez L, Raich D, Ramo-Tello C, Naranjo-Gomez M, Davalos A, Pujol-Borrell R, Borrás FE, Martínez-Caceres E. 2009. Myelin peptides in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 8: 650-3



# 附錄一、人類 PDC-E2-specific T cells 與 B cells 之 epitopes



Adapted from *Semin Liver Dis* 25: 337-46. Figure 2.



## 附錄二、常見溶液與試劑配方與來源

### 一、細胞等張溶液

#### 1. Hank balanced salt solution (HBSS) Sigma-Aldrich H2387

將粉末泡開成 1×濃度後，進行高溫高壓滅菌 (autoclave) 後，再利用 NaHCO<sub>3</sub> 將溶液 pH 值調成 7.2-7.4。

#### 2. phosphate buffer saline (PBS)

以下為 10× PBS 的配方：

NaCl	80g	<u>Amresco 0241</u>
KCl	2g	<u>Merck 529552</u>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4g	<u>J.T.Baker JTB-3246-01</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4g	<u>Bionovas AS0930</u>

溶解於 800ml ddH<sub>2</sub>O 後，調整 pH 值至 7.2-7.4，加 ddH<sub>2</sub>O 至 1L。

將 10× PBS 稀釋 10 倍後即為可使用之 1× PBS。

### 二、麻醉藥

#### pentobarbital sodium ; C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub> SCI pharmtech 051100

(旭富製藥科技)

5mg 粉末加入 1ml PBS (濃度為 5 mg/ml)，並利用 0.22μm filter (SLG9033RS, millipore) 過濾後即可使用。注射劑量為 50 mg/kg，一般六至八週大小鼠體重約為 20g，故約注射 200μl 麻醉藥。

### 三·細胞培養液

#### 1. RPMI-1640 complete medium

RPMI-1640 medium	1L	<u>Thermo SH30027.02</u>
Foetal bovine serum	100ml (10%)	<u>Biological industries</u> <u>04-001-1A Lot no. 215538</u>
1.5M Hepes	10ml (15mM)	<u>Amresco 0511</u>
200mM L-Glutamine	10ml (2mM)	<u>Biological industries</u> <u>03-020-1B</u>
PSA (如下列所示)	10ml	<u>Biological industries</u> <u>03-033-1B</u>
1000 U/ml Penicillin	(10 U/ml)	
10 mg/ml Streptomycin	(0.1 mg/ml)	
0.025mg/ml Amphotericin	(0.25 µg/ml)	

### 四·ELISA 所需試劑

#### 1. mouse anti-PDC-E2 Ig coating buffer

carbonate coating buffer 配方：

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.8g	<u>Merck 106392</u>
NaHCO <sub>3</sub>	1.46g	<u>和光純藥工業株氏會社 198-01315</u>
NaN <sub>3</sub>	0.1g	<u>Ferax Art.-Nr.11 112 25194</u>

溶解於 400ml ddH<sub>2</sub>O，調整 pH 值至 9.6，加 ddH<sub>2</sub>O 至 500ml。

## 五·肝臟組織固定液

### 10% 中性福馬林

Formaldehyde (37-40%)	100mL	<u>J.T.Baker JT-2106-02</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4g	<u>Bionovas GS100-30</u>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.5g	<u>和光純藥工業株氏會社 192-02815</u>
ddH <sub>2</sub> O	900mL	

## 六·SDS-PAGE 與西方墨點法所需試劑

### 1. 12% SDS-PAGE resolving gel (2 gels)



ddH <sub>2</sub> O	3.3ml	
30% acrylamide mix	4.0ml	Bionovas AA0230
1.5M Tris (pH 8.8)	2.5ml	J.T.Baker 4099-02
10% SDS	0.1ml	Jersey Lab. Supply 151-21-3
10% ammonium persulfate	0.1ml	Amersco 0486
TEMED	0.004ml	Bopnovas AT0170

### 2. 5% SDS-PAGE stacking gel (2 gels)

ddH <sub>2</sub> O	2.15ml	
30% acrylamide mix	0.83ml	Bionovas AA0230
1.5M Tris (pH 8.8)	1.25ml	J.T.Baker 4099-02
10% SDS	0.05ml	ersey Lab. Supply 151-21-3
10% ammonium persulfate	0.05ml	Amersco 0486
TEMED	0.005ml	Bopnovas AT0170

### 3. 5X SDS-PAGE running buffer



Tris-base	15.1g	J.T.Baker 4099-02
Glycine	72g	UniRegion UR-Gly001
SDS	5g	ersey Lab. Supply 151-21-3

溶解於 1L ddH<sub>2</sub>O

#### 4. Western transfer buffer

Glycine	14.4g	UniRegion UR-Gly001
Tris-base	3.028g	J.T.Baker 4099-02
Methanol	200ml	Mallinckrodt 3016-08
ddH <sub>2</sub> O	800ml	

#### 5. 10X TBS buffer (Tris Buffered Saline)

Tris-base	60.5g	J.T.Baker 4099-02
NaCl	90g	Amresco 0241

溶解於 800ml ddH<sub>2</sub>O，調整 pH 值至 7.4，加 ddH<sub>2</sub>O 至 1L。

### 七·其他常用實驗試劑配方與來源

#### 1. ACK lysis buffer

NH <sub>4</sub> Cl	8.29g (0.15M)	<u>Ferax Art.-Nr.00 149 7152824</u>
KHCO <sub>3</sub>	14.5g (10mM)	<u>Ferax Art.-Nr.00 898 25096</u>
EDTA	0.037g (0.1mM)	<u>Sigma-Aldrich ED2SS</u>

溶解於 800ml ddH<sub>2</sub>O，調整 pH 值至 7.2-7.4，加 ddH<sub>2</sub>O 至 1L，置於 4°C 保存。