

國立臺灣大學醫學院暨工學院醫學工程研究所

博士論文

Graduate Institute of Biomedical Engineering

College of Medicine and College of Engineering

National Taiwan University

Doctoral Dissertation



自然殺手細胞活性於前列腺癌預後的應用

Application of Natural Killer Cell Activity in Prostate

Cancer Prognosis

呂育全

Yu-Chuan Lu

指導教授：趙福杉 教授

Advisor: Fu-Shan Jaw, Professor

指導教授：黃昭淵 教授

Chao-Yuan Huang, Professor

中華民國 109 年 1 月

January, 2020



誌 謝

完成博士論文，首先要感謝的是指導教授趙福杉教授和黃昭淵教授對我的指導與鼓勵。趙福杉教授引領我進入醫學工程的領域，給予我許多的指導與啟發，這幾年獲益斐淺。黃昭淵教授提供本論文的題材及指導研究的方向，協助我克服研究和工作上的困境，是我從住院醫師時代以來最重要的導師。感謝龔秀妮副教授，於實驗與論文撰寫給予我相當多的指導與鼓勵，論文才能順利完成，我衷心地感謝這三位指導教授。

感謝余宏政教授、成佳憲教授、廖俊厚教授在百忙之中撥冗擔任我的論文口試委員，對於論文內容及將來研究的方向，給予我許多寶貴的建議，也讓此博士論文能夠更完整而嚴謹。

最後要感謝我的家人長期忍受我的工作與壓力，有他們一路以來的相伴與支持，本論文才得以完成。感謝天上的母親，有您過去苦心栽培與諄諄教誨，才有此篇論文的誕生；感謝我的岳母與妻子-曉亭，因為有您們的一路相伴，讓我在家庭生活上無後顧之憂，得以專心處理事業學業上的事務。希望我的努力能讓您們感到欣慰及驕傲。

謹以此文獻給我的雙親、岳雙親、妻子曉亭、和一對兒女騏任及顏竹

中文摘要



前列腺癌排名台灣男性十大癌症第五名，2015 年有約 5,000 位新病人，每年約有 1,200 位病人不幸死於前列腺癌。在新診斷的案例中，約 2/3 為局部前列腺癌，也就是未轉移的前列腺癌，局部前列腺癌又可分為低度、中度與高度風險前列腺癌；另外 1/3 則是已轉移的前列腺癌，就是晚期前列腺癌。近年來，隨著抽血前列腺特異抗原（prostate-specific antigen, PSA）的檢查廣泛使用，局部前列腺癌的診斷比率也逐漸增加。前列腺癌的臨床診斷與追蹤治療主要以前列腺特異抗原（PSA）與影像學為主要依歸，但 PSA 仍有其侷限性，例如臨床上約有百分之五的前列腺癌患者 PSA 很低($<4\text{ ng/ml}$)，而腫瘤惡性度(格里森分數)卻很高，於臨床診斷上相當困難，而這群患者也較容易發展荷爾蒙抗性且生存預後也較差，因而發展新型前列腺癌的檢測與術後追蹤方式對臨床治療與追蹤十分重要。

自然殺手細胞是人體免疫中非常重要的一環，能幫助身體對抗外來的病原體與消除人體癌變的細胞，自然殺手細胞活性與腫瘤的存在與否息息相關。其具有非專一性的細胞毒殺作用，並可分泌多種細胞激素調控免疫機制，當細胞被病毒感染、腫瘤細胞沒有表現主要組織相容性複合體 I (MHC-I)、或表現出異常分子被自然殺手細胞辨識出之後，自然殺手細胞會立刻釋放出穿孔素直接使目標細胞產生凋零，整個作用時間僅需要幾分鐘。而人體藉由先天的固有免疫，和後天的獲得免疫等防禦機制而達到防制或消除微生物的入侵或癌細胞的增生與存活。

本研究藉由測量自然殺手細胞活性來預測前列腺癌的預後，於前列腺癌根除手術前與術後四至六周抽取病患血液，以分析自然殺手細胞活性、自然殺手細胞數量、表面受體如 NKG2A 與 NKG2D、PSA、白血球數量(white blood cells, WBCs)

與 C 反應蛋白 (C-Reactive Protein, CRP) 等，並將分析血液中外泌體。自然殺手細胞活性是藉由 NK Vue® Kit 試驗方法，檢測自然殺手細胞釋放的干擾素- γ (Interferon gamma, IFN- γ) 進而得知自然殺手細胞活性。本研究發現，前列腺癌患者的自然殺手細胞活性顯著低於健康參與者。接受前列腺根除手術的患者，術後自然殺手細胞活性顯著較術前提升，而自然殺手細胞表面受體方面，術後抑制型受體 NKG2A 表現量明顯低於術前。此外，手術切緣陽性患者的術後自然殺手細胞活性顯著低於切緣陰性的患者。因此，自然殺手細胞活性可搭配 PSA 以提高臨床治療與追蹤的準確度。

自然殺手細胞的活性與腫瘤細胞衍生的外泌體有關係，外泌體已經被證實能透過包裹的物質影響目標細胞的功能，包括 mRNA, miRNA 和蛋白質等，但是詳細的控制機轉仍然不清楚。這些由腫瘤細胞分泌的外泌體會在腫瘤細胞與自然殺手細胞接觸之前被分泌出來，並與自然殺手細胞上的活化接受器結合，並活化自然殺手細胞。自然殺手細胞被活化之後，這些接受器會被吞噬到細胞內並代謝掉，因而降低自然殺手細胞活性。因此，前列腺癌細胞能藉此避免自然殺手細胞攻擊而存活。而在我們的研究中也初步發現，將患者術前與術後血液中的外泌體分別與 NK-92 細胞共同培養 24 小時，絕大部分與術後外泌體共同培養的 NK-92 細胞表面上的活化型受體 NKG2D 的表現量相較於術前有上升趨勢。同時，若將健康參與者與患者術前血液中的外泌體分別與 NK-92 細胞共同培養，也可發現與健康參與者外泌體共同培養的 NK-92 細胞上的 NKG2D 的表現量來的較高，也就是說，患者的外泌體會影響到自然殺手細胞表面 NKG2D 受體的表現量，進而可能影響到自然殺手細胞的活性。後續將持續研究外泌體與 NKG2A 的表現量的相關性，並分析前列腺根除手術前後的外泌體上表面配體蛋白質的組成，並藉由改變外泌體上重要配體（利用抗體或抑制劑進行中和或抑制），找出影響自然殺手細胞活性最重要的配體，以尋找最適合的抑制劑。希望未來能供臨床上使用，提高病人的自體免疫，以增加前列腺癌的治癒率，提供更全面的免疫治療方法。

關鍵字：前列腺癌、自然殺手細胞、自然殺手細胞活性、外泌體、前列腺根除術



英文摘要



Prostate cancer ranks the fifth among the top ten male cancers in Taiwan. There were approximately 5,000 new patients in 2015, and nearly 1,200 patients died of prostate cancer each year. Nonetheless, about two-thirds of newly diagnosed cases are localized prostate cancer, that is, non-metastatic prostate cancer. Localized prostate cancer can be divided into low risk, intermediate risk and high risk prostate cancer, and 1/3 is metastatic prostate cancer, which is advanced prostate cancer. In recent years, blood test for prostate specific antigen (PSA) has been widely used, and the proportion of localized prostate cancer has gradually increased. The clinically indicators for diagnosis and tracking treated prostate cancer patients mainly rely on prostate specific antigen PSA and imaging. However, about 5 percent of prostate cancer patients have very low PSA (< 4 ng/ml), but with high tumor grading (Gleason score). This group of patients is more likely to develop hormonal resistance disease and the survival prognosis is much poorer. Development of new detection methods for predicting prostate cancer is important for clinical treatment and tracking.

Natural killer (NK) cell plays an important role in human immune system. It can help one organism fighting against the external pathogen and internal cancerous cells. Therefore, the activity of NK cells (NKA) is believed to be associated with the existence of cancers. NK cells which were characterized with non-specific toxic effects can also secrete a variety of cytokines regulating the immune system to kill certain cancer cells or infected cells. If cells infected with a virus or tumor cells showed no MHC-I, or exhibiting abnormal molecules, NK cells release immediately perforin directly to the target cells and cause cell dying and apoptosis. The entire duration of action takes only

a few minutes. By innate and acquired immunity, the human body can achieve prevention and control of tumor cells, and eliminate microbial invasion.

This study was conducted by assessing the activity of NK cells to predict the prognosis of prostate cancer. Blood samples were drawn before and four to six weeks after prostatectomy to analyze the number and activity of NK cells, the surface receptors: NKG2A and NKG2D, PSA, white blood cells (WBCs), along with C-reactive protein (CRP). Analysis of exosomes in blood were also performed. The NKA was determined by the NK Vue® Kit test method, which measures the interferon- γ (IFN- γ) released by the NK cells. This study found that the activity of NK cells was evidently reduced in prostate cancer patients than in healthy participants. For patients undergoing prostatectomy, the postoperative activity of NK cells was measurably improved than before surgery. Meanwhile, with the surgical intervention, a significantly lower expression of surface receptors NKG2A (inhibitory receptor) was detected than preoperatively. In addition, postoperative NKA was significantly lower in patients with positive margins than in patients with negative margins. Therefore, NK cell activity could be combined with PSA to enhance the accuracy of clinical treatment and future follow-ups

NKA is currently known to be related with small vesicles released by cancer cells, called tumor derived exosomes. It has been confirmed that exosomes can alter the functions of recipient cells via their harboring molecules such as miRNAs, mRNAs and proteins; however, the exact mechanism is not well established. The exosomes released from prostate cancer cells will bind to the receptors on NK cells to activate NKA before the direct physical contact between tumors and NK cells. After activating NK cells, the NK cell receptors will be internalized and degraded, and the NKA will be diminished. Finally, prostate cancers may survive. In our research, the exosomes in the blood of

patients before and after prostatectomy were co-cultured with NK-92 cells for 24 hours. The expression of the activated receptor NKG2D on the surface of NK cell co-cultured with exosomes after prostatectomy had an upward trend compared with that before surgery.



The exosomes in the blood of healthy participants and patients before prostatectomy were also co-cultured with NK-92 cells, and the expression of NKG2D on NK-92 cells co-cultured with exosomes of healthy participants was also higher. That is, the exosomes of patients will affect the expression of NKG2D receptors on the surface of NK cells, which may affect the activity of NK cells. The effort will continue to study the correlation between the expression of NKG2A and exosomes, analyze the composition of the surface ligand proteins on the exosomes before and after prostatectomy, and change the important ligands on the exosomes (using neutralizing antibodies or inhibitory agents) to find the most important ligands that affect the NKA in order to find the most appropriate inhibitor. It is hoped that it can be used clinically in the future to improve the patient's autoimmunity, increase the cure rate of prostate cancer, and provide a more comprehensive immunotherapy method.

Key Words: prostate cancer, natural killer cell, natural killer cell activity, exosome, radical prostatectomy

目 錄



誌 謝	i
中文摘要	ii
英文摘要	v
圖目錄	x
表目錄	xi
第一章 背景介紹	1
第一節 流行病學研究	1
第二節 前列腺癌與自然殺手細胞活性之相關性	1
第三節 腫瘤衍生外泌體如何影響自然殺手細胞活性	3
第二章 研究方法與材料	5
第一節 藉由自然殺手細胞活性預測前列腺癌的預後	5
第一項 前列腺全切除術前後取血	5
第二項 外周血單核細胞分離 (PBMC isolation)	6
第三項 以流式細胞儀檢測自然殺手細胞的數量和活性	6
第四項 以 NKVue 檢測自然殺手細胞活性	7
第五項 NKVue 與前列腺癌預後的相關性	7
第六項 統計方法	7
第二節 前列腺腫瘤衍生外泌體於自然殺手細胞活性的調控機制	8
第一項 從血漿中分離外泌體	8
第二項 外泌體標記檢查	8
第三項 外泌體與自然殺手細胞株共同培養	9
第三章 結果	10
第一節 前列腺癌患者統計數據	10
第二節 自然殺手細胞的分類	11
第三節 前列腺癌患者和健康參與者的比較	11
第四節 前列腺全切除術前與術後比較	11
第一項 術前後自然殺手細胞的變化	11
第二項 術前後表面受體的變化	12
第五節 前列腺切除術前各種狀態的比較和相關性。	12
第一項 自然殺手細胞與表面受體數量箱線圖 - 依前列腺癌分期	12
第二項 自然殺手細胞與表面受體數量箱線圖 - 依格里森分數	12
第三項 自然殺手細胞特性箱線圖 - 依術後腫瘤切除邊緣陽性與否 ...	12
第六節 自然殺手細胞活性與 PSA 及自然殺手細胞數量之相關性	13
第七節 前列腺衍生外泌體與自然殺手細胞株共同培養結果。	13
第四章 討論	14
第一節 干擾素-γ 代表自然殺手細胞活性	14

第二節	自然殺手細胞活性與前列腺癌之相關性	15
第三節	自然殺手細胞的激活和抑制受體	16
第四節	前列腺癌與自然殺手細胞間的調控機制	17
第五章	結論	19
第六章	展望	20
(一)	本研究的主要成果及重要性	20
(二)	未來研究的方向	20
參考文獻		22
圖與表格		27
附錄		40



圖目錄

圖 3-1. 自然殺手細胞的分類	27
圖 3-2. 前列腺癌患者和健康參與者於自然殺手細胞活性、個數與表面接受器表現量的比較	28
圖 3-3. 手術前後自然殺手細胞活性與數目的變化	29
圖 3-4. 手術前後表面受體 NKG2D、NKG2A 與 NKG2D/NKG2A 的變化.....	30
圖 3-5. 術前各期別自然殺手細胞活性、數量與表面受體 NKG2D、 NKG2A 的比較	31
圖 3-6. 術前格里森分數與自然殺手細胞活性、數量與表面受體 NKG2D、NKG2A 的比較	32
圖 3-7. 術後腫瘤切除邊緣陽性與術後自然殺手細胞數量、活性與術 前後活性比例之相關性	33
圖 3-8. 自然殺手細胞活性與 PSA 及自然殺手細胞數量之相關性.....	34
圖 3-9. 前列腺腫瘤衍生之外泌體.....	35
圖 3-10. NK-92 細胞表面上的活化型受體 NKG2D 的表現量 (術前 vs 術 後).....	36
圖 3-11. NK-92 細胞表面上的活化型受體 NKG2D 的表現量 (健康參與 者 vs 前列腺癌患者)	37

表目錄



表 3-1. 前列腺癌患者臨床數據與腫瘤特徵	38
表 3-2. Paired comparisons of variables before and after prostatectomy ...	39



第一章 背景介紹

第一節 流行病學研究

前列腺癌是常見的侵襲性癌症，分別占美國和歐洲男性十大癌症死因中的第二位和第三位(1)。在台灣，前列腺癌的發生率迅速增加，現在已成為男性十大癌症中的第五名。前列腺癌具有三個階段，局部、局部晚期或轉移性前列腺癌。根據血清前列腺特異抗原（PSA）、格里森病理分數和臨床前列腺觸診結果，局部前列腺癌可分為低、中與高度風險(2)。大多數局部前列腺癌患者可藉由手術切除或放射線治療而治癒，而一部分高度風險患者可能會從根治性前列腺切除術後受益。前列腺癌檢測和預後的評估，可透過血液中的 PSA、病理報告與影像學來評估。但 PSA 仍有其侷限性，例如臨床上約有百分之五的前列腺癌患者 PSA 很低($<4 \text{ ng/ml}$)，而腫瘤惡性度(格里森分數)卻很高(3)，於臨床診斷上相當困難，而這群患者也較容易發展荷爾蒙抗性且生存預後也較差，因而發展新型前列腺癌的檢測與術後追蹤方式對臨床治療與追蹤十分重要。

第二節 前列腺癌與自然殺手細胞活性之相關性

根據研究顯示，前列腺癌可藉由表現與免疫細胞相關的分子來抑制抗腫瘤免疫反應，進而逃避了免疫監視(4)。自然殺手細胞在周邊血液的先天免疫 (innate immunity) 系統中扮演重要角色，並藉由細胞毒殺和細胞激素的產生提供對感染和腫瘤的早期防禦(5)。另一方面，自然殺手細胞也與適應性免疫系統 (adaptive immune system) 協調，以促進惡性腫瘤的根除(6)。早在數十年前，自然殺手細胞活性就已被證實與惡性腫瘤之間有相關性，若人體的自然殺手細胞活性較低，相較於活性高的人，有較高的罹癌風險(7)。而自然殺手細胞已在前列腺癌進行

廣泛的研究，有一研究於前列腺免疫組織化學（IHC）染色發現，自然殺手細胞上受體（NKp30 與 NKp46）的配體可在原發性前列腺癌細胞上表現，但在良性前列腺增生中卻沒表現(8)。另一研究則顯示，接受雄性素剝奪療法（androgen-deprivation therapy, ADT）後的患者，若有大量 CD56+ 自然殺手細胞產生，則其前列腺癌的預後相對較好，且 CD56+ 自然殺手細胞密度與前列腺癌儲精囊侵犯（病情較嚴重之患者）與否呈現負相關性(9)。因而可藉由測量自然殺手細胞活性來評估人體免疫系統能力，也可藉此來評估前列腺癌的嚴重程度與治療後的預後狀況。

自然殺手細胞活性有許多測量方法，包含測量自然殺手細胞數量（百分比）來推測人體內自然殺手細胞活性，可藉由流式細胞儀針對主要的自然殺手細胞標誌物進行自然殺手細胞數量的測量，這些標誌物包括 CD56、CD16 和 CD3 (CD56dim / CD16++ / CD3- 或 CD56bright / CD16- / CD3-)。但是，自然殺手細胞數量與自然殺手細胞活性並非總是呈現正相關性。另一種測量自然殺手細胞活性的方法是藉由鉻 51 釋放測定法（ ^{51}Cr 測定法）來評估其對癌細胞的細胞毒性(10)，該測定法對自然殺手細胞活性來說相對準確，但由於其半衰期較短，相對昂貴且具放射性，同時由於台灣實驗室安全法的諸多限制，故鉻 51 測定法無法在台灣使用。但近期發展了其他使用螢光染料（fluorescent dye）的替代測定法，例如以 BATDA，DIIo 和 羥基螢光素琥珀酰亞胺酯（carboxy fluorescein succinimidylester, CFSE）為染料(11)，將 K562 腫瘤細胞做上標記與自然殺手細胞培養數個小時，然後通過流式細胞儀檢測剩餘細胞的螢光，進而顯示自然殺手細胞的細胞毒性。此外，也有研究顯示可將一些表面受體視為自然殺手細胞活性的標記物，例如 NKG2D 可用於激活自然殺手細胞活性，NKG2A 用於抑制殺手細胞活性(11)，而這些表面受體可以透過流式細胞儀檢測特異性抗體而得知其活性。但是，上述這些針對自然殺手細胞活性的測定法都有其的缺點，需要特殊的技術或檢測儀器，於臨床上不容易進行。近年來發展了一種檢測自然殺手細胞活性的

新方法，即 NK Vue® ELISA (Promoca)，此測定法檢測自然殺手細胞釋放的干擾素- γ (Interferon gamma, IFN- γ)，干擾素- γ 可激活 T 細胞與促使抗原呈現細胞 (Antigen Presenting Cells, APCs)。此研究將比較上述的自然殺手細胞活性的測量方法與結果，並比較前列腺癌患者接受前列腺全切除術前後的臨床狀況與自然殺手細胞活性變化，以找出自然殺手細胞活性與前列腺癌術前後的關聯性。

第三節 腫瘤衍生外泌體如何影響自然殺手細胞活性

Drs. Randy Schekman、James Rothman 和 Thomas Südhof 於 1970 至 1990 年代對細胞衍生囊泡 (Cell derived vesicles) 分別於囊泡轉運基因、囊泡遞送和囊泡化學信使釋放方面進行深入研究，也因此獲得了 2013 年諾貝爾生理學/醫學獎 (The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2013)。在所有類型的細胞衍生囊泡中，外泌體 (帶有特殊蛋白質標誌 CD63) 具有免疫調節的生理作用，如 B 細胞衍生的外泌體已被證實可在體外激活 T 細胞(12)。此外，樹突狀細胞 (Dendritic Cells , DCs) ，也就是最有效力的抗原呈現細胞 (Antigen Presenting Cells, APCs)，藉由外泌體交換進行 DC-DC 通訊 (DC-to-DC communication) (13, 14)。此外，惡性腫瘤細胞也可藉由外泌體來抑制對其自身的免疫細胞毒性(15)。除了膜上的配體外，外泌體內還有 RNA，miRNA 和蛋白質。根據研究顯示，外泌體中的 miRNA 與自然殺手細胞活性有關，許多與腫瘤相關的 miRNA，例如 miR-21，miR-155，miR-146a，miR-23，miR-214 或 miR-568，通常被認為是腫瘤衍生外泌體的組成成分，它們會負調控免疫細胞的功能或誘導細胞凋亡(16, 17)。此外，外泌體內的 miR-1245 也被證明可以通過降低 NKG2D 來損害自然殺手細胞(18)。

前列腺腫瘤衍生外泌體已知可以調節自然殺手細胞活性，但是詳細的調節機制仍是未知數。此研究將使用各種測量自然殺手細胞活性的方法，並將結果相互比較以及與前列腺癌分期、PSA、腫瘤惡性度等進行比較，也將研究前列腺切除術前後自然殺手細胞活性和腫瘤衍生外泌體之間的交互作用，探索腫瘤衍生外泌體對於自然殺手細胞活性的調控機制。



第二章 研究方法與材料

第一節 藉由自然殺手細胞活性預測前列腺癌的預後

自然殺手細胞是抵抗異物或異常細胞(如癌細胞)的最重要的免疫細胞之一，活化自然殺手細胞的活化促進了免疫細胞攻擊癌細胞的過程(19)，故自然殺手細胞活性與對抗癌症的免疫系統強度成正向相關(20)。我們假設前列腺癌患者的自然殺手細胞活性低於健康男性，於前列腺全切除後自然殺手細胞活性增加，我們比較前列腺全切除術前後自然殺手細胞活性，並以手術後四至六周的自然殺手細胞活性來預測前列腺癌患者的預後。臨床上有幾種傳統的方法可以測量自然殺手細胞活性，包括自然殺手細胞數目(21)，鉻 51 釋放測定法 (51Cr 測定法) (22) 和自然殺手細胞表面受體表現量等。由於台灣不允許使用鉻，將藉由上述的其他方法來評估自然殺手細胞的活性，另外也將測試一種新方法 NK Vue® ELISA 來測量自然殺手細胞活性。

第一項 前列腺全切除術前後取血

為了將血液中的自然殺手細胞活性於有前列腺癌細胞的狀態與癌細胞清除後（相對健康）的狀況下進行比較，此研究於接受前列腺切除術前和術後四至六周的時間，從前列腺癌患者抽取血液。此研究通過台灣大學附設醫院研究倫理審查委員會審查 IRB201711106RINC，根據台灣大學附設醫院的規定，所有前列腺癌血液捐贈者都知情同意並簽署同意書。血液一部分送至實驗室分析自然殺手細胞活性、自然殺手細胞數量、表面受體如 NKG2A、NKG2D 等，並將分離血漿分析外泌體。另一部分血液送至台灣大學附設醫院檢測前列腺特異抗原 PSA、白血球數量(white blood cells, WBCs)與 C 反應蛋白 (C-Reactive Protein, CRP) 等。並從前列腺全切除術後的檢體中，由病理科醫師進行前列腺癌的病理分析，包含

腫瘤惡性度(格里森分數)、惡性腫瘤病理分期、有無包膜外延伸(extracapsular extension)與有無儲精囊侵犯(Seminal vesicle invasion)等。此研究收集83名患者全血，全血將用於外周血單核細胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分離與NK Vue® ELISA測量自然殺手細胞活性，此外血漿將儲存在-80°C之後供外泌體分離與分析使用。

第二項 外周血單核細胞分離 (PBMC isolation)

自然殺手細胞是血液中含核的細胞之一，故可於外周血單核細胞(PBMC)中找到。在PBMC分離過程中，使用lysoprep(一種梯度溶液)將白血球與紅血球分離；分離之後，PBMC可直接於實驗使用或培養在含10%FBS的DMEM培養基中一至兩天供之後使用。

第三項 以流式細胞儀檢測自然殺手細胞的數量和活性

過去對自然殺手細胞調節免疫系統的假設是人體內自然殺手細胞越多，則免疫系統越強，能殺死的癌細胞可能越多。首先，此研究藉由通過流式細胞儀計數PBMC中帶有自然殺手細胞標記抗體(CD56dim / CD16+ / CD3-或CD56bright / CD16- / CD3-)的自然殺手細胞數量和百分比。其次，自然殺手細胞活性受到表面受體(包括激活和抑制受體)的嚴格調控，其中最顯著的激活受體是NKG2D、NKP30和CD107a，抑制性受體則是KIA、NKG2A和Tin-3。藉由這些受體的表現程度來推定自然殺手細胞活性，並且整合各式受體組合後的協同信號激活自然細胞毒性(cytotoxicity)和細胞激素(cytokine)產生(23)。自然殺手細胞將與用於識別個別受體的不同抗體一起培養，再用與不同螢光綴合的相應第二抗體進行標記，並通過Fortessa細胞儀進行分析。若有較高的活化受體及較低的抑制受體表現則表示有較高的自然殺手細胞活性。



第四項 以 NKVue 檢測自然殺手細胞活性

這是一種藉由檢測自然殺手細胞釋放的干擾素- γ (Interferon gamma, IFN- γ) 來測量自然殺手細胞活性的新方法，此試驗僅需一毫升的全血，在NKVue 試管中與 Promoca 共同溫育二十四小時後，分離出血漿，再以酵素免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 測量得干擾素- γ 的含量。

第五項 NKVue 與前列腺癌預後的相關性

自然殺手細胞活性與前列腺癌嚴重程度之間的相關性已在 1993 年獲得證實 (24)，然而先前文獻僅比較未經治療的前列腺癌患者之間的自然殺手細胞活性，而並非比較同一前列腺癌患者接受手術治療前後的活性。

為了了解自然殺手細胞活性與前列腺癌預後的相關性，將以 NKVue 檢測自然殺手細胞活性，分析 NKVue 數值與前列腺特異抗原 PSA、腫瘤惡性度(格里森分數)與前列腺癌的病理分析與期別等之間的相關性。同時進一步比較所有檢測自然殺手細胞活性的方法，將自然殺手細胞數、激活受體數量、抑制受體數量等與 NKVue 的結果進行比較。

第六項 統計方法

定量變數以中位數 (四分位數範圍, interquartile range) 表示，而定性變數則以絕對值 (百分比) 來表示。本研究使用 Mann-Whitney U 檢驗方法比較術前術後的前列腺特異性抗原 (PSA)，自然殺手細胞活性與個數，NKG2A 與 NKG2D 表現量等。同時使用無母數統計 (Non-parametric statistics) 和相關分析

(Correlation Analysis) 來分析自然殺手細胞活性與自然殺手細胞數目、格里森分數, PSA 和前列腺癌分期等的關聯性。此研究使用 SPSS(Statistical Product and Service Solutions) 第 22 版進行統計分析，其雙向顯著性水平設定為 $p < 0.05$ 。



第二節 前列腺腫瘤衍生外泌體於自然殺手細胞活性的調控機制

第一項 從血漿中分離外泌體

由於外泌體很小，若使用傳統方式從血漿中分離外泌體，於梯度溶液中進行高速離心，十分費時。為了縮短處理外泌體分離的時間，此研究使用一種分離試劑盒 (Exoquick exosome precipitation solution, System Bioscience) (25)，總處理時間可以縮短到 1.5 小時，且不需要梯度溶液。分離出來的顆粒，範圍在 30–150 nm 之間，無法藉由一般顯微鏡觀察到。因此，需藉由穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 檢查外泌體的大小和膜結構。

第二項 外泌體標記檢查

將分離的顆粒，進行西方墨點法 (Western blot) 檢查其蛋白質標記物，如 CD63，以用來鑑定是否為外泌體；進而為了分離源自前列腺腫瘤的外泌體，使用前列腺標記物 PSMA 與磁珠進行免疫沉澱，以確認其為前列腺腫瘤衍生之外泌體。



第三項 外泌體與自然殺手細胞株共同培養

為了研究外泌體與自然殺手細胞的相互作用，此研究使用自然殺手細胞株 NK92 與外泌體共同培養。將健康參與者之外泌體與前列腺癌患者接受前列腺根除術前與術後血液中的外泌體，以上共三組分別與 NK-92 細胞，於無血清的培養基中共同培養 24 小時，以避免血清中的其他外泌體的干擾。然後，將藉由特異性抗體來測量 NK92 上激活受體和抑制受體的表現量，另外也藉由自然殺手細胞標誌物 CD56 和 CD3，以流式細胞儀中來鑑定特定的自然殺手細胞。



第三章 結果

第一節 前列腺癌患者統計數據

此研究收集自民國一百零六年三月至一百零八年七月，共有八十三位前列腺患者接受達文西手臂輔助前列腺根除手術，排除其中有三位患者過去曾罹患其他的惡性腫瘤病史，與一位患者術前 C 反應蛋白大於 1 mg/dL，故最後有七十九位患者接受術後長期追蹤與數據分析。

表 3-1 列出這七十九位患者的臨床數據與腫瘤特徵，患者的中位 (Interquartile Range, IQR) 年齡為 65.38 (61.16–68.08) 歲。術前 PSA 的中位數 (IQR) 為 8.72 (6.17–13.63) ng/mL, C 反應蛋白為 0.08 (0.04–0.13) mg/dL。

腫瘤特徵方面，術後病理發現有 16 位患者前列腺包膜外侵犯，13 位患者儲精囊侵犯及 6 位患者有骨盆腔淋巴結轉移。TNM 分期部分（根據美國癌症聯合委員會分期系統第 8 版），38 位 (48.1%) 患者為第二期，30 位 (38.0%) 為第三期，而第四期患者有 6 位。腫瘤惡性度（格里森分數）方面，絕大部分患者為 Grade Group 2 與 Grade Group 3 [7(4+3)]，分別是 42 位 (53.2%) 與 15 位 (19.0%)。

自然殺手細胞的活性與數目方面，手術前自然殺手活性 (Natural killer cell activity, NKA) 之中位數 (IQR) 為 411.86 pg/mL (156–895.6)，手術後為 877.57 pg/mL (431.63–2000)；自然殺手細胞數目部分，術前中位數 (IQR) 為 7.24 % (3.91–11.64)，而術後是 7.82 % (4.78–13.67)。



第二節 自然殺手細胞的分類

如圖 3-1，此研究對自然殺手細胞的不同亞型(subtype)進行分類，首先將 CD56⁺ / CD3-自然殺手細胞被從淋巴細胞中分離出（圖 A 中 P1），然後將 CD56⁺ / CD16⁺ / CD3-自然殺手細胞 P2 從 P1 篩選出來（圖 B）。

另一方面分離自然殺手細胞的不同子集：Q1 代表 CD56dim / CD16⁺ / CD3- 自然殺手細胞，而 Q3 代表 CD56bright / CD16- / CD3- 自然殺手細胞（圖 C）。

第三節 前列腺癌患者和健康參與者的比較

圖 3-2 顯示手術前，前列腺癌患者的自然殺手細胞活性（由 NKVue kit 測得）顯著較一般健康男性為低 (412 vs. 1276 pg/ml, p<0.0001)，而在自然殺手細胞個數與表面接受器（如 NKG2A 與 NKG2D）的表現量，前列腺癌患者和健康參與者相比並無明顯差別。

第四節 前列腺全切除術前與術後比較

第一項 術前後自然殺手細胞的變化

由表 3-2 術前術後配對比較顯示，術後自然殺手細胞活性明顯高於術前 (877.57 vs. 411.86 (pg / ml) ; p = 0.02)；然而自然殺手細胞數目的部分 (7.82 vs. 7.24 (%); p = 0.223) 術前術後則無顯著差別（圖 3-3.）。進一步分析自然殺手細胞主要亞群 CD56bright/CD16-/CD3- 與 CD56dim/CD16+/CD3-，與其組成比 CD56bright/CD16-/CD3- : CD56dim/CD16+/CD3- ratio，則發現術前後三者皆無顯著差異。



第二項 術前後表面受體的變化

術前後受體配對比較顯示於圖 3-4，術後自然殺手細胞表面受體 NKG2A 明顯低於術前 (326.56 vs. 384.29 (FI) ; $p = 0.039$)；然而術後表面受體 NKG2D 與術前的數值相比並無顯著差異 (534.41 vs. 594.01 (FI) ; $p = 0.272$)，術前後 NKG2D/NKG2A 比值亦無顯著差別 (1.37 vs. 1.47 ; $p = 0.149$)。

第五節 前列腺切除術前各種狀態的比較和相關性。

第一項 自然殺手細胞與表面受體數量箱線圖 - 依前列腺癌分期

圖 3-5 顯示前列腺癌的期別與術前自然殺手細胞活性、自然殺手細胞數以及自然殺手細胞表面受體數目並無顯著相關性。

第二項 自然殺手細胞與表面受體數量箱線圖 - 依格里森分數

圖 3-6. 顯示前列腺癌細胞惡性度(格里森分數)與術前自然殺手細胞活性、自然殺手細胞數目以及自然殺手細胞表面受體 (NKG2D 與 NKG2A) 數目並無明顯相關性。

第三項 自然殺手細胞特性箱線圖-依術後腫瘤切除邊緣陽性與否

由圖 3-7 可看出，前列腺根除術後切緣陰性與切緣陽性的患者相比，切緣陰性者術後自然殺手細胞數量與自然殺手細胞活性顯著較高 (7.23 vs. 10.99 (%), $p = 0.016$; 578 vs. 1507 (pg/ml), $p = 0.02$)。術前術後自然殺手細胞活性比值部分，切緣陰性與陽性患者相比則無明顯差別

(1.76 vs. 2.30, $p = 0.173$)。此外，陰性和陽性切緣兩組之間術後之 CD56bright / CD16- / CD3- 或 CD56dim / CD16+ / CD3- 細胞數目並沒有明顯差異。



第六節 自然殺手細胞活性與 PSA 及自然殺手細胞數量之相關性

由圖 3-8 相關分析 (correlation analysis) 顯示，術前或是術後，自然殺手細胞活性跟前列腺特異抗原 PSA 與自然殺手細胞數量皆無呈現相關性，自然殺手細胞數量與前列腺特異抗原 PSA 亦無相關性。

第七節 前列腺衍生外泌體與自然殺手細胞株共同培養結果。

將 12 位前列腺癌患者術前與術後血液中的外泌體（圖 3-9）分別與 NK-92 細胞共同培養 24 小時，有 10 個(83%)與術後外泌體共同培養的 NK-92 細胞表面上的活化型受體 NKG2D 的表現量相較於術前有上升趨勢（圖 3-10）。同時，若將健康參與者與患者術前血液中的外泌體分別與 NK-92 細胞共同培養，也可發現與健康參與者外泌體共同培養的 NK-92 細胞上的 NKG2D 的表現量來的較高（圖 3-11），也就是說，患者的外泌體會影響到自然殺手細胞表面 NKG2D 受體的表現量，進而可能影響到自然殺手細胞的活性。



第四章 討論

免疫系統對人體健康至關重要，近年來針對免疫療法有許多研究，而絕大部分專注於T細胞的研究(26)。除了T細胞外，先天免疫中的自然殺手細胞於周遭血液或腫瘤內發揮作用，藉由免疫系統中的細胞毒活性和細胞激素產生而對感染和腫瘤早期防禦(5)，同時也與適應性免疫系統協調運作，以促進根除惡性腫瘤細胞(6)。自然殺手細胞有兩個主要亞群 CD56dim/CD16+/CD3- 與 CD56bright/CD16-/CD3- 存在於周遭血液循環中，而絕大多數自然細胞是發揮直接細胞毒活性的 CD56dim 細胞(27)，大約 10% 的自然殺手細胞為 CD56bright CD16-CD3-，藉由刺激促炎性細胞激素（如 IFN- γ ）的分泌而在免疫調節中產生重要作用(28)。

第一節 干擾素- γ 代表自然殺手細胞活性

過去評估自然殺手細胞活性的 Gold standard，即鉻 (^{51}Cr) 釋放測定法，但由於同位素安全性的問題以及複雜的處理過程，因此執行起來並不容易。目前大多數研究使用干擾素- γ 產生來代表自然殺手細胞活性，根據 Derby 等人的研究(29)，IFN- γ 的產生與 ^{51}Cr 釋放的測定顯示出極好的相關性，可藉於測量 IFN- γ 的量代替傳統的 ^{51}Cr 釋放測定法。

與浸潤性自然殺手細胞（腫瘤組織中）相比，對大部分的惡性腫瘤而言，循環性自然殺手細胞（血液中）是更好的預後指標(30, 31)，並且更易於分離。同時，來自腫瘤組織的自然殺手細胞數量遠低於循環性自然殺手細胞數量，且使用 NKVue 分析試劑於臨床應用相對方便。

第二節 自然殺手細胞活性與前列腺癌之相關性



自然殺手細胞活性與前列腺癌惡化之間的相關性首次於西元 1993 年得到證實，發現於 D1 - D2 期之患者有較低的自然殺手細胞活性(24)。自然殺手細胞活性可以代表自然殺手細胞的功能，與惡性腫瘤細胞的存在與否密切相關，但過去的研究，僅比較了未經治療的前列腺癌症患者，並未包括接受手術治療的患者，而本研究主要探討前列腺根除術前後自然殺手細胞活性與數量的變化。

先前的研究發現，自然殺手細胞活性較低的男性在前列腺穿刺切片時較有可能診斷出罹患前列腺癌(32)；早期的研究也證實，晚期前列腺癌患者的自然殺手細胞活性明顯較低，而局部性前列腺癌患者的活性則無差異(33, 34)。最近的一項研究發現，前列腺癌患者的自然殺手細胞活性明顯降低，並隨著分期的嚴重性而逐漸降低(35)。另一項研究探討轉移性癌症患者中自然殺手細胞活性與治療效果之間的關係，在治療的前 2 個月中，自然殺手細胞活性較低的患者的預後明顯劣於治療後活性較高的患者(36)。

但在其他研究中卻有不一樣的發現，有研究認為自然殺手細胞活性與前列腺癌的檢測與格里森分級預測並無關聯性(37)。Tarle 等人發現前列腺癌合併淋巴結、骨或軟組織轉移的患者其自然殺手細胞活性急劇下降，而腫瘤惡性度與自然殺手細胞活性並無關聯(24)。

在本研究中，術前自然殺手細胞活性無法區分高惡性度腫瘤和低惡性度腫瘤。但是，手術切緣陰性的患者相較於陽性的患者，其術後自然殺手細胞活性與比率（術後 NKA / 術前 NKA）明顯更高，也就是說自然殺手細胞的活性與惡性腫瘤細胞的存在與否更加相關。同時，也發現較低期別前列腺癌（第一與二期）的術後自然殺手細胞活性高於較嚴重期別（第三和第四期）的自然殺手細胞活性。針對結直腸癌手術後的患者也有類似發現，與 1/2 期患者相比，3/4 期患者其術後自然殺手細胞活性也較低。在此研究中，36 位 3/4 期患者中的 25 例 (69.4%)

有陽性手術切緣。另一方面，在 43 位 1/2 期患者中，有 19 位 (44.2%) 的切緣為陽性。因此，我們認為，術後自然殺手細胞活性與分期有相關性是由於嚴重期別患者有較高陽性切緣狀態（癌細胞的存在）所致。



另一方面，比較陰性和陽性手術切緣組，兩個自然殺手細胞亞群的組成比並沒有發現差異，故自然殺手細胞的這兩個亞群皆不能成為腫瘤細胞外觀的預測指標。通過配對比較分析，兩個亞群中的術後和術前數據之間均無顯著差異。

第三節 自然殺手細胞的激活和抑制受體

自然殺手細胞對抗入侵的病原體和癌細胞的能力取決於自然殺手細胞上活化和抑制性受體信號刺激的綜合平衡。自然殺手細胞上有各種激活和抑制受體，以辨別特定配體，主要激活受體包括 CD16，NKG2D，NKG2C，CD226 (DNAM-1) ，CD244 (2B4) (38, 39)，激活受體 NKG2D 的配體是細胞壓力誘導分子 (cellular stress inducible molecules)，如 MICA，MICB 和 ULBPs24 等；主要抑制受體是殺手細胞免疫球蛋白樣受體 (KIR)，CD94 / NKG2A 和白細胞免疫球蛋白樣受體 1 (CD85)，其中大多數能識別 MHC I 類分子。即使自然殺手細胞對腫瘤細胞具有強大的細胞毒殺活性，但腫瘤細胞進化出多種機制來影響自然殺手細胞的活性和功能，進而逃避了免疫監控。有研究顯示，腫瘤細胞非典型 HLA (human leukocyte antigen) I 類分子 (例如 HLA-E 和 HLA-G) 的過度表達，會藉由與 CD94 / NKG2A 的結合產生對 NK 細胞的抗性(40)。而腫瘤細胞暴露於腫瘤反應性免疫細胞分泌的 IFN- γ ，可進一步增強 HLA-E 的表達，進而增強其對 NK 細胞的抵抗力(40-43)。另外，腫瘤微環境中較高量的 IL-12 也可能導致 NKG2A 在 NK 細胞上的表現量上升而產生對 NK 細胞的抵抗性(44-46)。另外，基礎研究也顯示，前列腺癌細胞藉由誘導 NK 細胞抑制性受體 (ILT2 / LILRB1) 的表達，並下調激活受體 Nkp46 (NCR1) ，NKG2D (KLRK1) 和 CD16 (FCGR3) 的表達，從而抑制 NK

細胞對腫瘤細胞的識別(4)。在許多癌症患者可觀察到 NKG2D 受體降低，包括乳
腺癌、肺癌、大腸癌、子宮頸癌，胰腺癌和胃癌(47-51)等，而 NKG2D 的表現減
少與自然殺手細胞功能降低及疾病進展相關(52-55)。而其他研究也顯示，NKG2A
阻斷劑與其他治療性抗體的結合在轉移性結直腸癌或頭頸癌患者上有顯著的反
應(56)。

然而，我們發現手術後 NKG2A 顯著下降，而 NKG2D 與 NKG2D / NKG2A 的比例
則無顯著差異。在過去研究中，較高密度的 NKG2A-CD94+腫瘤浸潤淋巴細胞
(tumour-infiltrating lymphocytes, TILs) 與卵巢癌或大腸癌患者的生存較差
相關(57)。在另一研究中也發現，癌細胞促進 CD8 + T 細胞上 CD94 和 NKG2A 的
表達，且腫瘤浸潤淋巴細胞比周圍 T 細胞表現出更高水平的 NKG2A(58)，也有證
據顯示破壞 NKG2A 可以誘導有效的抗腫瘤免疫力。在本研究中，手術後 NKG2A 顯
著下降，可能跟腫瘤移除後，減少相關因子促進自然殺手細胞上 NKG2A 的表達有
關，進而使得自然殺手細胞活性上升，後續仍需要更多基礎研究來證實此項假說。

第四節 前列腺癌與自然殺手細胞間的調控機制

除了表面受體調節外，過去研究也顯示自然殺手細胞活性會被腫瘤衍生外泌體
(tumor-derived exosomes) 所改變(59)。外泌體，可從大多數類型的細胞中釋
放胞內體來源 (Endosome-derived) 的小膜囊泡 (30-150nm)，含有許多信號顆
粒，其中包括了蛋白質和核酸等，可與遠處的其他細胞進行通訊(60)。

腫瘤衍生外泌體藉由影響 T 淋巴細胞或自然殺手細胞進而削弱免疫系統功
能，其可能藉由外泌體膜配體與自然殺手細胞活化受體 (如 NKG2D) 結合而激活
自然殺手細胞(61)。包括乳腺癌、肺癌、大腸癌、子宮頸癌、胰腺癌和胃癌在內
的大多數癌症患者中，自然殺手細胞的 NKG2D 表現量明顯降低(48, 50, 51, 62)。

先前的研究發現，前列腺癌衍生的外泌體可下調前列腺患者 NKG2D 介導的細胞毒性反應，從而導致免疫抑制和腫瘤逃逸(55)，若將前列腺癌患者與健康參與者相比，賀爾蒙抗性前列腺癌患者其循環自然殺手細胞和 CD8 + T 淋巴細胞上的表面 NKG2D 表現量明顯降低。此研究，未發現前列腺切除術後自然殺手細胞 NKG2D 表現量有明顯差異。但是，在健康的參與者身上發現，其自然殺手細胞上的 NKG2D 的表現量比前列腺患者略高，雖然沒達到統計上顯著的差異，可能是因為大多數前列腺癌都僅是局部疾病的緣故。

此研究將前列腺衍生外泌體與自然殺手細胞株共同培養。首先，將 12 位前列腺癌患者術前與術後血液中的外泌體分別與 NK-92 細胞共同培養 24 小時，有 10 個(83%)與術後外泌體共同培養的 NK-92 細胞表面上的活化型受體 NKG2D 的表現量相較於術前有上升趨勢，術前的外泌體較易影響到自然殺手細胞表面 NKG2D 受體的表現量。另一方面，若將健康參與者與患者術前血液中的外泌體分別與 NK-92 細胞共同培養，也可發現與健康參與者外泌體共同培養的 NK-92 細胞上的 NKG2D 的表現量來的較高，也就是說，患者的外泌體會影響到自然殺手細胞表面 NKG2D 受體的表現量，進而可能影響到自然殺手細胞的活性。



第五章 結論

本研究發現，前列腺癌患者的自然殺手細胞活性顯著低於健康參與者。於接受前列腺根除手術的患者中，術後自然殺手細胞活性顯著較術前提升，而表面受體方面，術後 NKG2A 明顯低於術前，NKG2D 則無顯著差別。此外，手術切緣陽性患者的術後自然殺手細胞活性顯著低於切緣陰性的患者。另一方面，自然殺手細胞活性與自然殺手細胞數目、前列腺特異抗原 PSA、腫瘤細胞惡性度、癌症分期等皆無呈現相關性。另一方面，患者的腫瘤衍生外泌體可能會影響到自然殺手細胞表面 NKG2D 受體的表現量，進而可能影響到自然殺手細胞的活性。

從此研究中，我們認為惡性腫瘤的存在與否是影響自然殺手細胞活性的關鍵因素。而前列腺癌與自然殺手細胞活性的詳細調控機轉，則需要進一步的研究來證明並找出影響自然殺手細胞活性最重要的配體，以供將來應用於臨床治療。



第六章 展望

(一) 本研究的主要成果及重要性

前列腺癌是目前最常見的癌症之一，對於前列腺癌的治療和預後分析已經發展了幾十年，臨床上診斷與追蹤治療後前列腺癌的指標以前列腺特異抗原(PSA)與影像學為主要依歸，但 PSA 仍有其侷限性。在此研究中，手術切緣陽性患者的術後自然殺手細胞活性顯著低於切緣陰性的患者 ($578 \text{ vs. } 1507 \text{ (pg/ml)}$), $p = 0.02$)，而手術切緣陽性患者之後生化復發 (biochemical recurrence, BCR) 的比例也相對來的高。在這群患者中，術後一個月前列腺特異抗原 (PSA) 中位數為 0.023 (ng/mL) ，絕大部分仍小於 0.1 (ng/mL) ，而此時自然殺手細胞活性為 578 (pg/ml) ，已顯著低於切緣陰性的患者 1507 (pg/ml) 。由上可知，自然殺手細胞活性相較於 PSA，是相對即時與靈敏的預後分析方法，同時也僅需抽一毫升的血即可測量，可發展成新型預測前列腺癌的檢測方式再搭配原有的 PSA，以提高臨床治療與追蹤的準確度。

(二) 未來研究的方向

目前局部前列腺癌的治療以手術或放射線治療為主流，轉移性攝護腺癌則以賀爾蒙去勢療法與化學治療為主要方向，免疫治療於前列腺癌治療中所扮演的角色仍著墨不深。本研究中，發現自然殺手細胞活性會受到腫瘤細胞存在與否有所影響，由腫瘤細胞衍生的外泌體會在腫瘤細胞與自然殺手細胞接觸之前被分泌至血液中，利用外泌體膜上配體 (ligands) 與自然殺手細胞上的接受器結合，先活化自然殺手細胞。自然殺手細胞被活化之後，這些與配體結合的接受器就會被吞噬到細胞內並代謝掉，進而降低了自然殺手細胞活性。

在未來的研究中，我們將分析前列腺根除手術前後的外泌體上表面配體蛋白質的組成，並藉由改變外泌體上重要配體(利用抗體或抑制劑進行中和或抑制)，找出影響自然殺手細胞活性最重要的配體，並尋找最適合的抑制劑。希望未來能供臨牀上使用，提高病人的自體免疫，以增加前列腺癌的治癒率，提供更全面的免疫治療方法。



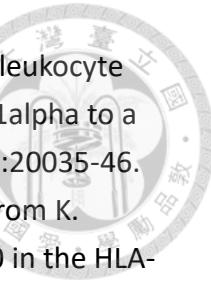
參考文獻

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403.
2. Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*. 2017;317(24):2532-42.
3. Yang DD, Mahal BAV, Sweeney C, Trinh QD, Feng FYC, Nguyen PL. Identification of low prostate-specific antigen, high Gleason prostate cancer as a unique hormone-resistant entity with poor survival: A contemporary analysis of 640,000 patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35.
4. Pasero C, Gravis G, Guerin M, Granjeaud S, Thomassin-Piana J, Rocchi P, et al. Inherent and Tumor-Driven Immune Tolerance in the Prostate Microenvironment Impairs Natural Killer Cell Antitumor Activity. *Cancer Res*. 2016;76(8):2153-65.
5. Bryceson YT, Chiang SC, Darmanin S, Fauriat C, Schlums H, Theorell J, et al. Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J Innate Immun*. 2011;3(3):216-26.
6. Gutkin DW, Shurin MR. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(1):45-57.
7. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000;356(9244):1795-9.
8. Arnon TI, Markel G, Bar-Ilan A, Hanna J, Fima E, Benchetrit F, et al. Harnessing soluble NK cell killer receptors for the generation of novel cancer immune therapy. *PLoS One*. 2008;3(5):e2150.
9. Gannon PO, Poisson AO, Delvoye N, Lapointe R, Mes-Masson AM, Saad F. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *J Immunol Methods*. 2009;348(1-2):9-17.
10. Chang L, Gusewitch GA, Chritton DB, Folz JC, Lebeck LK, Nehlsen-Cannarella SL. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 1993;166(1):45-54.
11. Vitale M, Zamai L, Neri LM, Manzoli L, Facchini A, Papa S. Natural killer function in flow cytometry: identification of human lymphoid subsets able to bind to the NK sensitive target K562. *Cytometry*. 1991;12(8):717-22.
12. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996;183(3):1161-72.

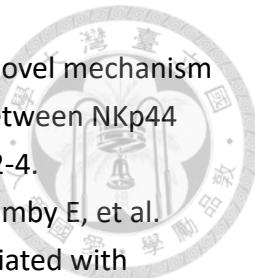
13. Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, Amigorena S. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol.* 2002;3(12):1156-62.
14. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stoltz DB, Papworth GD, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood.* 2004;104(10):3257-66.
15. Whiteside TL. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Tumor-Induced Immune Suppression. *Vaccines-Basel.* 2016;4(4).
16. Ye SB, Li ZL, Luo DH, Huang BJ, Chen YS, Zhang XS, et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 2014;5(14):5439-52.
17. Carissimi C, Carucci N, Colombo T, Piconese S, Azzalin G, Cipolletta E, et al. miR-21 is a negative modulator of T-cell activation. *Biochimie.* 2014;107:319-26.
18. Baginska J, Viry E, Paggetti J, Medves S, Berchem G, Moussay E, et al. The critical role of the tumor microenvironment in shaping natural killer cell-mediated anti-tumor immunity. *Front Immunol.* 2013;4.
19. Pross HF, Jondal M. Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1975;21(2):226-35.
20. Standish LJ, Sweet ES, Novack J, Wenner CA, Bridge C, Nelson A, et al. Breast cancer and the immune system. *J Soc Integr Oncol.* 2008;6(4):158-68.
21. Scanzano A, Cosentino M. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front Pharmacol.* 2015;6:171.
22. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology.* 1968;14(2):181-96.
23. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285(5428):727-9.
24. Tarle M, Kraljic I, Kastelan M. Comparison between Nk Cell-Activity and Prostate-Cancer Stage and Grade in Untreated Patients - Correlation with Tumor-Markers and Hormonal Serotest Data. *Urol Res.* 1993;21(1):17-21.
25. Umez T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene.* 2013;32(22):2747-55.
26. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol.* 2017;71(1):96-108.
27. Dowell AC, Oldham KA, Bhatt RI, Lee SP, Searle PF. Long-term proliferation of



- functional human NK cells, with conversion of CD56(dim) NK cells to a CD56 (bright) phenotype, induced by carcinoma cells co-expressing 4-1BBL and IL-12. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(5):615-28.
28. Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, et al. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol.* 2016;196(7):2923-31.
29. Derby EG, Reddy V, Nelson EL, Kopp WC, Baseler MW, Dawson JR, et al. Correlation of human CD56+ cell cytotoxicity and IFN-gamma production. *Cytokine.* 2001;13(2):85-90.
30. de Jonge K, Ebering A, Nassiri S, Maby-El Hajjami H, Ouertatani-Sakouhi H, Baumgaertner P, et al. Circulating CD56(bright) NK cells inversely correlate with survival of melanoma patients. *Sci Rep.* 2019;9(1):4487.
31. Mamessier E, Pradel LC, Thibault ML, Drevet C, Zouine A, Jacquemier J, et al. Peripheral blood NK cells from breast cancer patients are tumor-induced composite subsets. *J Immunol.* 2013;190(5):2424-36.
32. Barkin J, Rodriguez-Suarez R, Betito K. Association between natural killer cell activity and prostate cancer: a pilot study. *Can J Urol.* 2017;24(2):8708-13.
33. Kastelan M, Kraljic I, Tarle M. Nk Cell-Activity in Treated Prostate-Cancer Patients as a Probe for Circulating Tumor-Cells - Hormone Regulatory Effects Invivo. *Prostate.* 1992;21(2):111-20.
34. Marumo K, Ikeuchi K, Baba S, Ueno M, Tazaki H. Natural killer cell activity and recycling capacity of natural killer cells in patients with carcinoma of the prostate. *Keio J Med.* 1989;38(1):27-35.
35. Koo KC, Shim DH, Yang CM, Lee SB, Kim SM, Shin TY, et al. Reduction of the CD16(-)CD56bright NK cell subset precedes NK cell dysfunction in prostate cancer. *PLoS One.* 2013;8(11):e78049.
36. Hansen TF, Nederby L, Zedan AH, Mejlholm I, Henriksen JR, Steffensen KD, et al. Correlation Between Natural Killer Cell Activity and Treatment Effect in Patients with Disseminated Cancer. *Transl Oncol.* 2019;12(7):968-72.
37. Song W, Yu JW, Jeong BC, Seo SI, Jeon SS, Lee HM, et al. The clinical usefulness of natural killer cell activity in patients with suspected or diagnosed prostate cancer: an observational cross-sectional study. *Onco Targets Ther.* 2018;11:3883-9.
38. Koch J, Steinle A, Watzl C, Mandelboim O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol.* 2013;34(4):182-91.
39. Malhotra A, Shanker A. NK cells: immune cross-talk and therapeutic implications. *Immunotherapy.* 2011;3(10):1143-66.
40. Muntasell A, Ochoa MC, Cordeiro L, Berraondo P, Lopez-Diaz de Cerio A, Cabo M, et al. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2017;45:73-81.



41. Gustafson KS, Ginder GD. Interferon-gamma induction of the human leukocyte antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT1alpha to a distinct interferon-gamma-responsive element. *J Biol Chem.* 1996;271(33):20035-46.
42. Cerboni C, Mousavi-Jazi M, Wakiguchi H, Carbone E, Karre K, Soderstrom K. Synergistic effect of IFN-gamma and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 2001;31(10):2926-35.
43. Malmberg KJ, Levitsky V, Norell H, de Matos CT, Carlsten M, Schedvins K, et al. IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2002;110(10):1515-23.
44. Saez-Borderias A, Romo N, Magri G, Guma M, Angulo A, Lopez-Botet M. IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function. *J Immunol.* 2009;182(2):829-36.
45. Beziat V, Descours B, Parizot C, Debre P, Vieillard V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One.* 2010;5(8):e11966.
46. Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood.* 2012;120(24):4751-60.
47. Mamessier E, Sylvain A, Thibult ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3609-22.
48. Peng YP, Zhu Y, Zhang JJ, Xu ZK, Qian ZY, Dai CC, et al. Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. *J Transl Med.* 2013;11:262.
49. Garcia-Iglesias T, Del Toro-Arreola A, Albaran-Somoza B, Del Toro-Arreola S, Sanchez-Hernandez PE, Ramirez-Duenas MG, et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer.* 2009;9:186.
50. de Kruijff EM, Sajet A, van Nes JG, Putter H, Smit VT, Eagle RA, et al. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer.* 2012;12:24.
51. Shen Y, Lu C, Tian W, Wang L, Cui B, Jiao Y, et al. Possible association of decreased NKG2D expression levels and suppression of the activity of natural killer cells in patients with colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2012;40(4):1285-90.
52. Chinnery F, King CA, Elliott T, Bateman AR, James E. Viral antigen mediated NKp46 activation of NK cells results in tumor rejection via NK-DC crosstalk. *Oncoimmunology.* 2012;1(6):874-83.



53. Rosental B, Hadad U, Brusilovsky M, Campbell KS, Porgador A. A novel mechanism for cancer cells to evade immune attack by NK cells: The interaction between NKp44 and proliferating cell nuclear antigen. *Oncoimmunology*. 2012;1(4):572-4.
54. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, et al. Polymorphisms in FcgammaRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(3):474-81.
55. Lundholm M, Schroder M, Nagaeva O, Baranov V, Widmark A, Mincheva-Nilsson L, et al. Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression on natural killer cells and CD8+ T cells: mechanism of immune evasion. *PLoS One*. 2014;9(9):e108925.
56. Creelan BC, Antonia SJ. The NKG2A immune checkpoint - a new direction in cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(5):277-8.
57. Bossard C, Bezieau S, Matysiak-Budnik T, Volteau C, Laboisse CL, Jotereau F, et al. HLA-E/beta 2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. *International Journal of Cancer*. 2012;131(4):855-63.
58. Sheu BC, Chiou SH, Lin HH, Chow SN, Huang SC, Ho HN, et al. Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human cervical carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65(7):2921-9.
59. Zhao J, Schlosser HA, Wang Z, Qin J, Li J, Popp F, et al. Tumor-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Natural Killer Cell Function in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6).
60. Whiteside TL. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Adv Clin Chem*. 2016;74:103-41.
61. Molfetta R, Quatrini L, Santoni A, Paolini R. Regulation of NKG2D-Dependent NK Cell Functions: The Yin and the Yang of Receptor Endocytosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
62. Garcia-Iglesias T, del Toro-Arreola A, Albaran-Somoza B, del Toro-Arreola S, Sanchez-Hernandez PE, Ramirez-Duenas MG, et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *Bmc Cancer*. 2009;9.

圖與表格

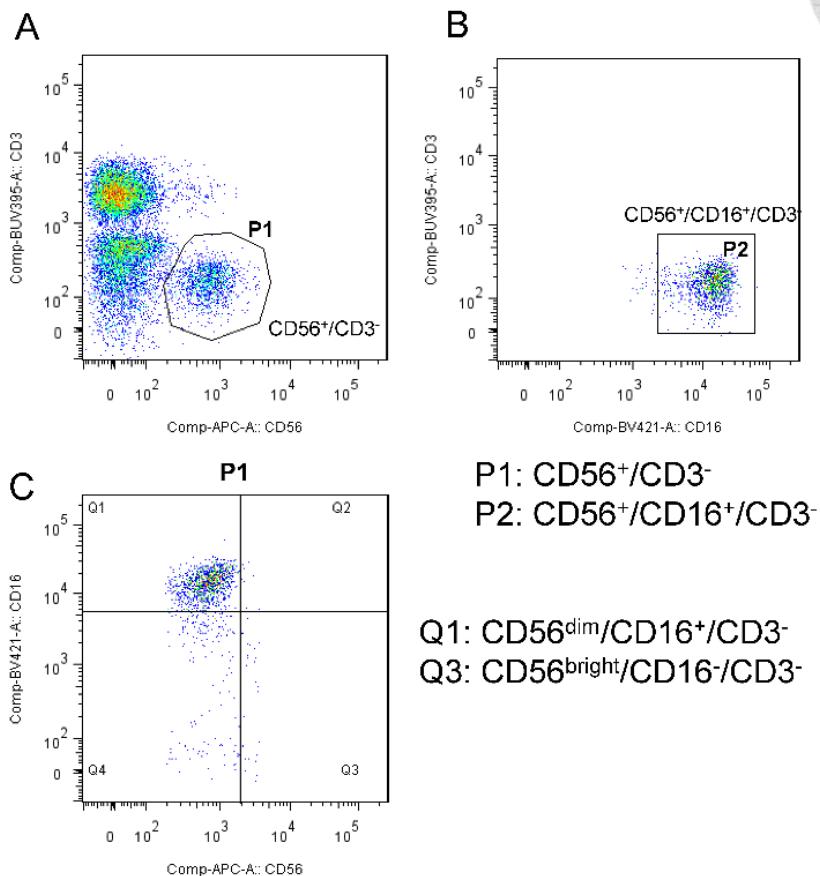


圖 3-1. 自然殺手細胞的分類

- (A) 藉由粒度 (granularity, SSC) 和大小 (size, FSC) 分布，將淋巴球從外周血單個核細胞分離出來
- (B) 藉由抗體染色將 CD56+/CD16+/CD3-自然殺手細胞從淋巴球分離出來
- (C) 藉由抗體染色區分自然殺手細胞的亞群—CD56^{dim}/CD16⁺/CD3⁻, and CD56^{bright}/CD16⁻/CD3⁻

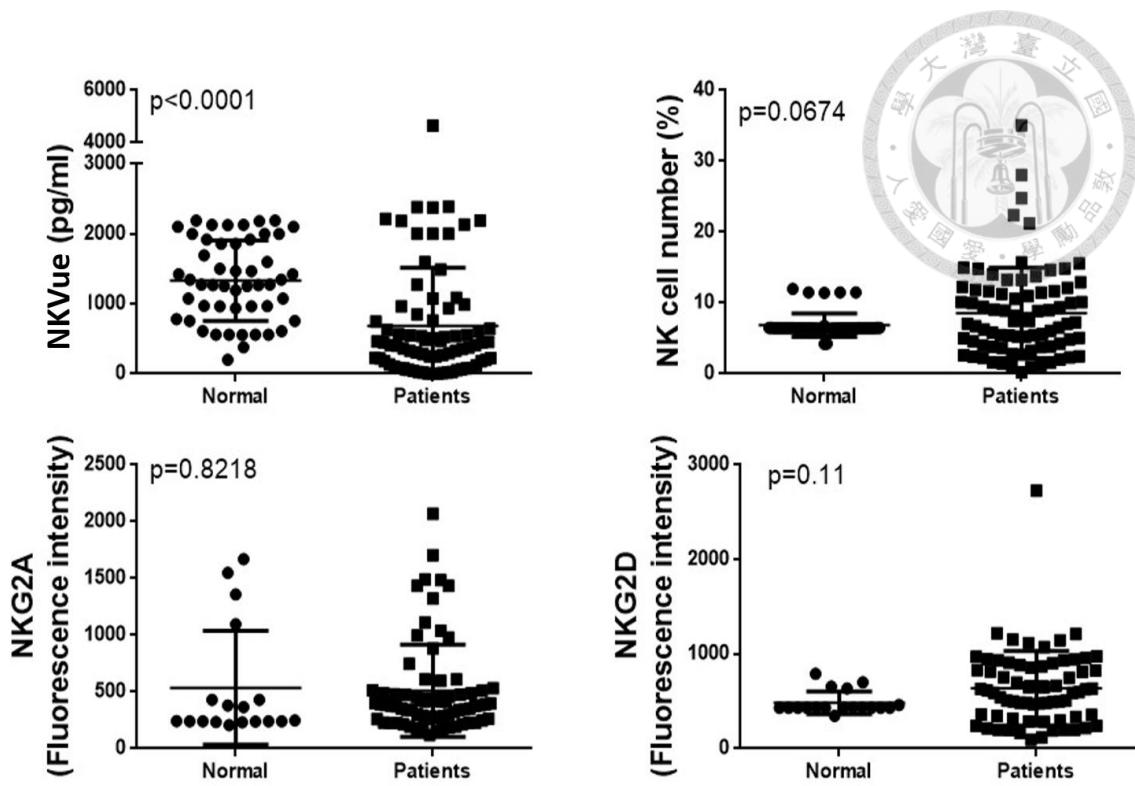


圖 3-2. 前列腺癌患者和健康參與者於自然殺手細胞活性、個數與表面接受器表現量的比較

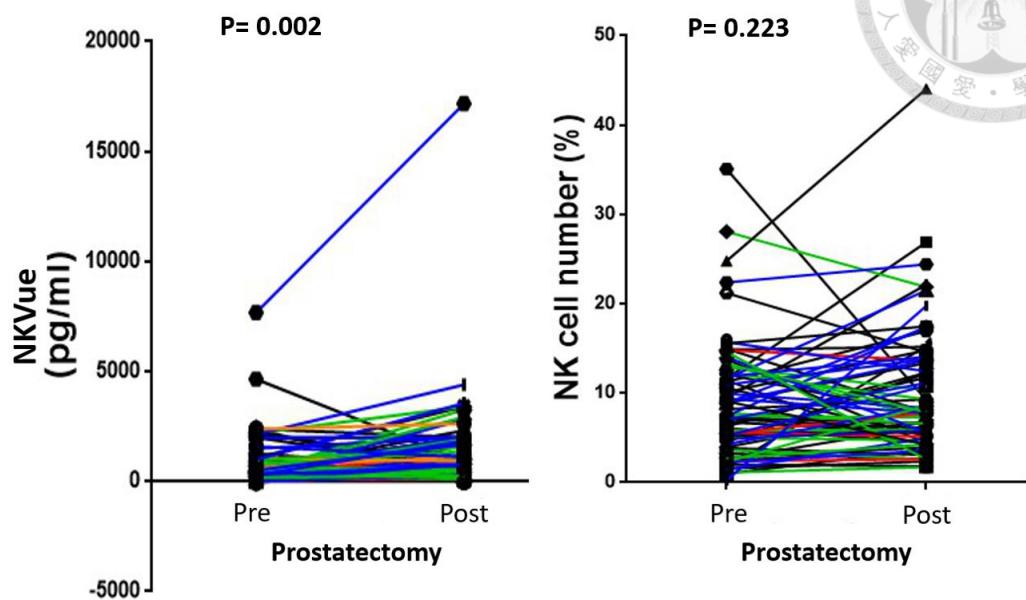


圖 3-3. 手術前後自然殺手細胞活性與數目的變化

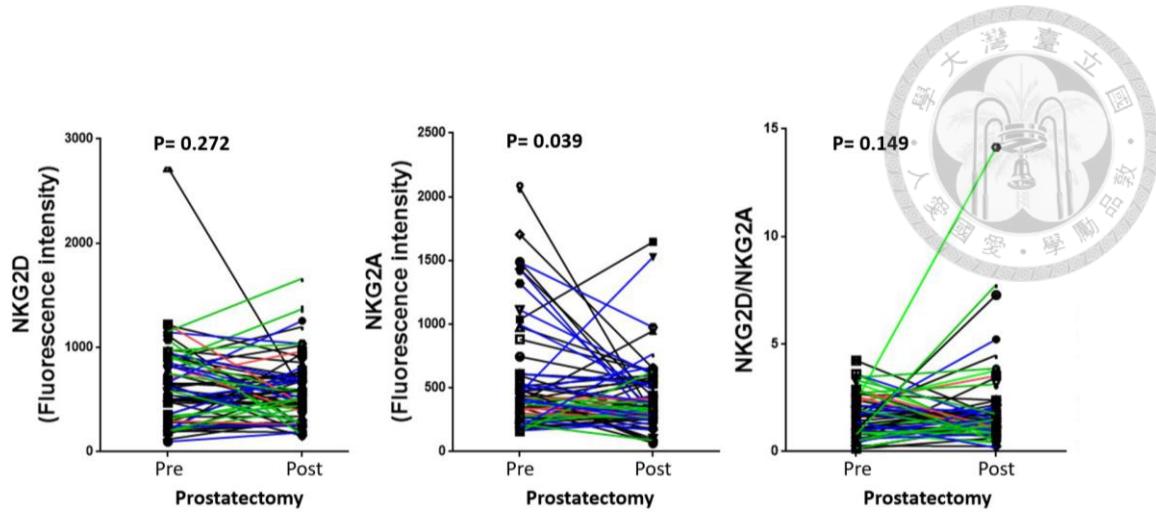


圖 3-4. 手術前後表面受體 NKG2D、NKG2A 與 NKG2D/NKG2A 的變化

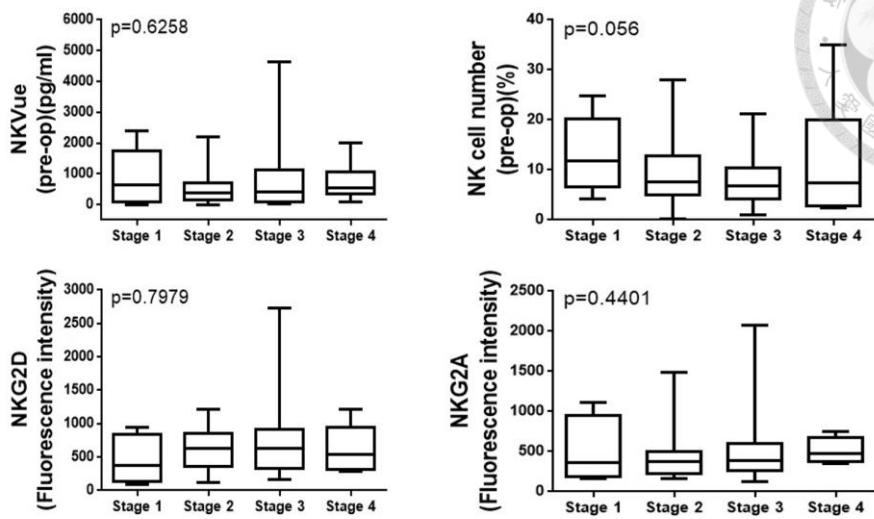


圖 3-5. 術前各期別自然殺手細胞活性、數量與表面受體 NKG2D、NKG2A 的比較

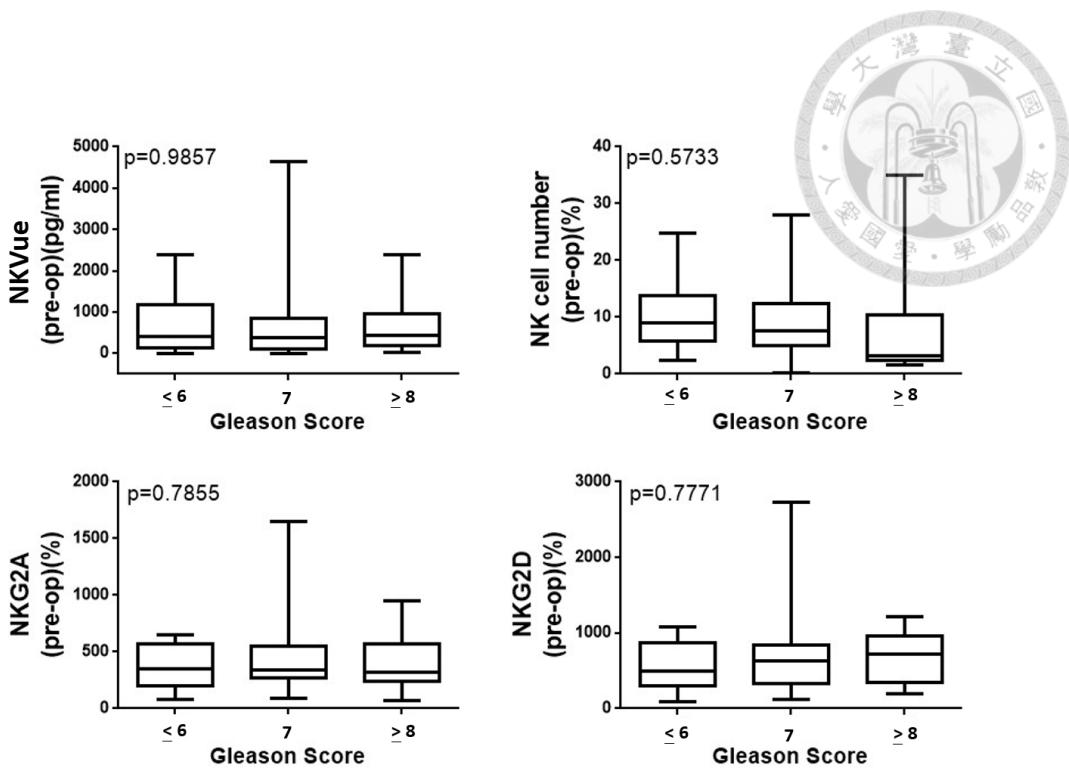


圖 3-6. 術前格里森分數與自然殺手細胞活性、數量與表面受體 NKG2D、NKG2A 的比較

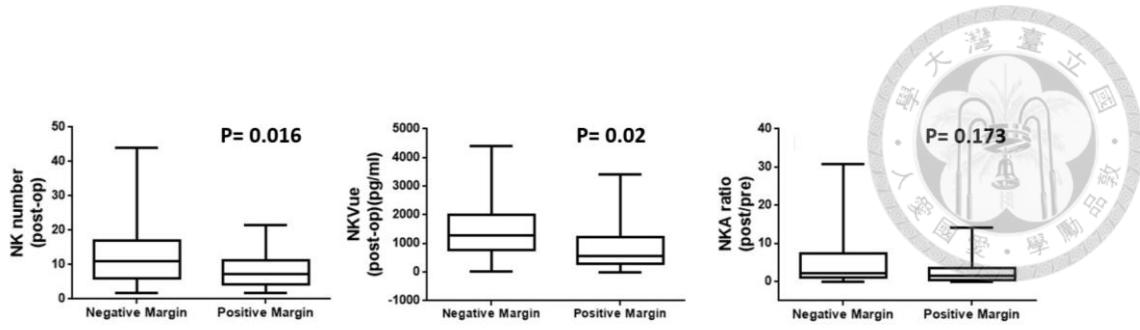


圖 3-7. 術後腫瘤切除邊緣陽性與術後自然殺手細胞數量、活性與術前後活性比例之相關性

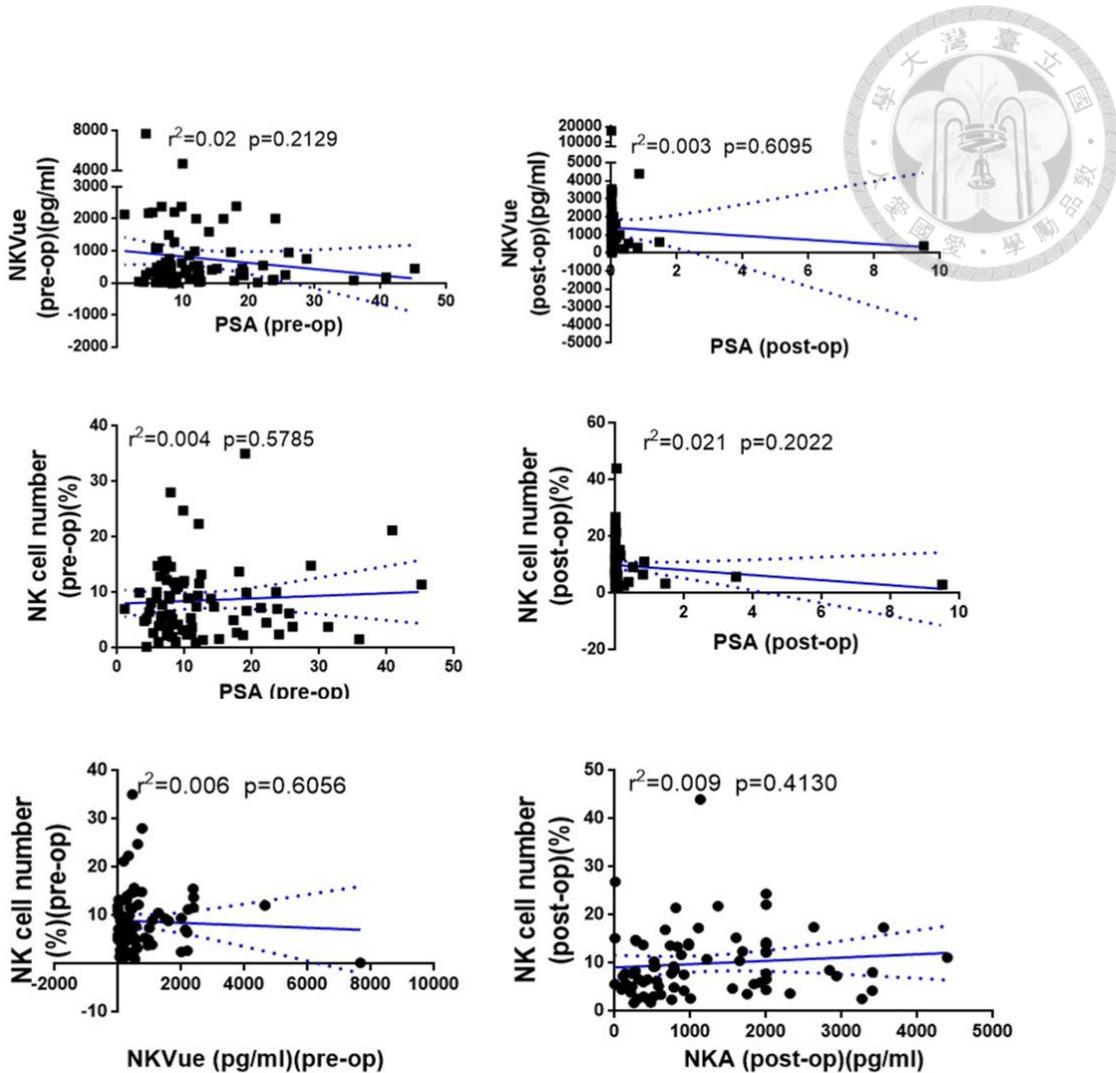


圖 3-8. 自然殺手細胞活性與 PSA 及自然殺手細胞數量之相關性

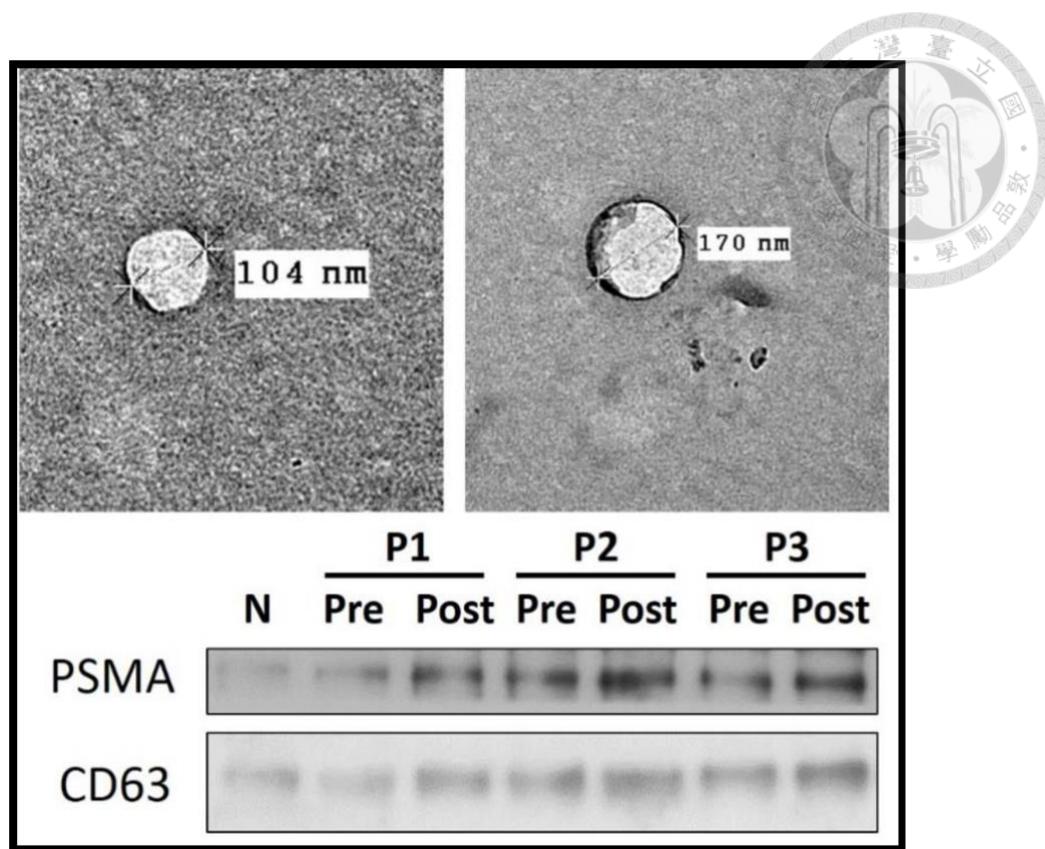


圖 3-9. 前列腺腫瘤衍生之外泌體

由血漿中分離出之外泌體，經過電子顯微鏡確認，並以 CD63 與 PSMA 染色確認其為前列腺腫瘤衍生之外泌體

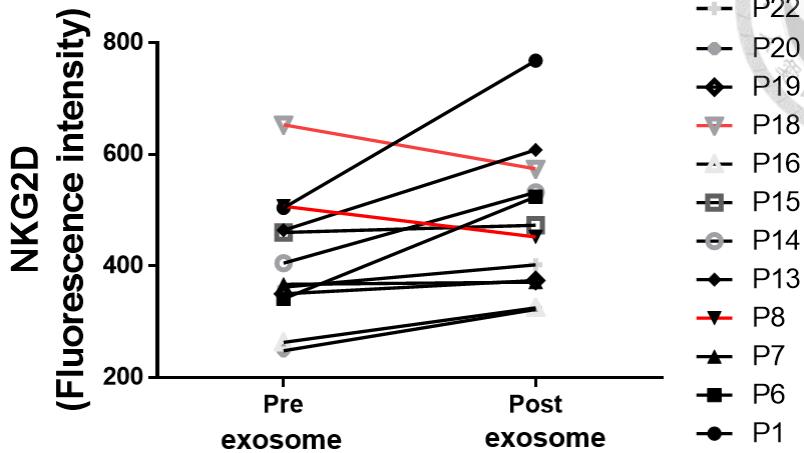
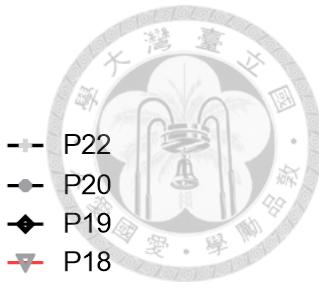


圖 3-10. NK-92 細胞表面上的活化型受體 NKG2D 的表現量（術前 vs 術後）

前列腺癌患者術前與術後血液中的外泌體與自然殺手細胞株共同培養後，NK-92 細胞表面 NKG2D 的表現量，其中有 10 位術後 NKG2D 的表現量有上升趨勢（黑色實線）

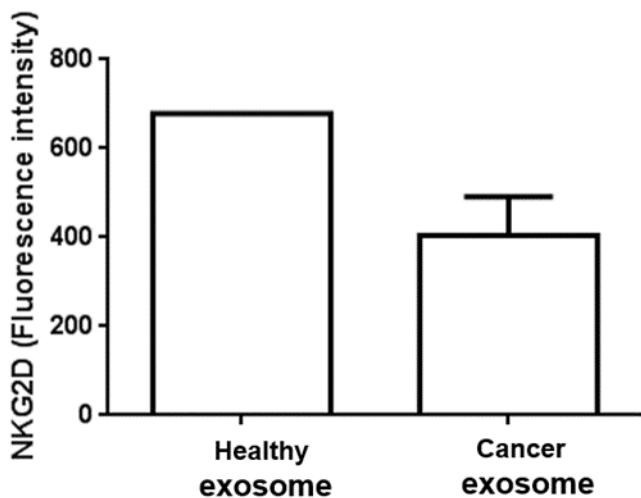


圖 3-11. NK-92 細胞表面上的活化型受體 NKG2D 的表現量（健康參與者 vs 前列腺癌患者）

健康參與者與前列腺癌患者術前血液中的外泌體與自然殺手細胞株共同培養後，NK-92 細胞表面 NKG2D 的表現量，健康參與者之 NKG2D 的表現量來的較高

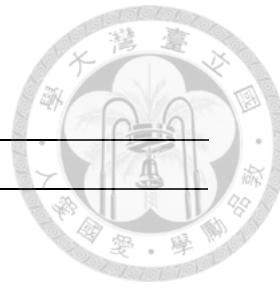


表 3-1. 前列腺癌患者臨床數據與腫瘤特徵

病人基本資料	
病人數目	79
年齡 (歲)	65.38 (61.16-68.08)
術前 PSA (ng/mL)	8.72 (6.17-13.63)
前列腺體積 (ml)	30.30 (22.58-38.58)
白血球數目 (cells/mL)	6.20 (5.535-7.02)
C 反應蛋白 (mg/dL)	0.08 (0.04-0.13)
腫瘤特徵 No. (%)	
前列腺包膜外延伸	16 (20.3)
儲精囊侵犯	13 (16.5)
淋巴結轉移	6 (7.6)
TNM 分期 No. (%)	
I	5 (6.3)
II	38 (48.1)
III	30 (38.0)
IV	6 (7.6)
格里森分數, No. (%)	
Grade Group 1 [≤ 6]	8 (10.1)
Grade Group 2 [7(3+4)]	42 (53.2)
Grade Group 3 [7(4+3)]	15 (19.0)
Grade Group 4 [8]	4 (5.1)
Grade Group 5 [9-10]	10 (12.7)
術前風險分期	
Low	18 (22.8)
Intermediate	36 (45.6)
High	18 (22.8)
Very high	7 (8.9)
術前自然殺手細胞活性 NKVue, pg/mL	411.86 (156-895.6)
術後自然殺手細胞活性 NKVue, pg/mL	877.57 (431.63-2000)
術前自然殺手細胞數目 (%)	7.24 (3.91-11.64)
術後自然殺手細胞數目 (%)	7.82 (4.78-13.67)

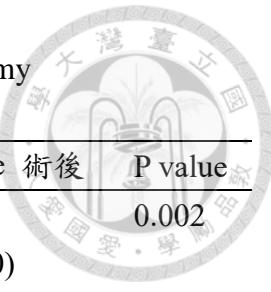


表 3-2. Paired comparisons of variables before and after prostatectomy

	Preoperative 術前	Postoperative 術後	P value
自然殺手細胞活性	411.86	877.57	0.002
NKVue (pg/mL)	(156-895.6)	(431.63-2000)	
自然殺手細胞數量	7.24 (3.91-11.64)	7.82 (4.78-13.67)	0.223
NK cell number (%)			
CD56 ^{bright} /CD16 ⁻ /CD3 ⁻ (%)	0.003 (0.002–0.005)	0.004 (0.002–0.006)	0.432
CD56 ^{dim} /CD16 ⁺ /CD3 ⁻ (%)	0.145 (0.075–0.219)	0.160 (0.091–0.231)	0.219
CD56 ^{bright} /CD16 ⁻ /CD3 ⁻ :	0.026 (0.014–0.046)	0.020 (0.011–0.045)	0.068
CD56 ^{dim} /CD16 ⁺ /CD3 ⁻ ratio			
PSA (ng/mL)	9.74 (7.28–14.94)	0.016 (0.012–0.036)	<0.001
NKG2A (FI)	384.29 (263.9- 512.20)	326.56 (257.69 -540.27)	0.039
NKG2D (FI)	594.01 (352.79- 859.25)	534.41 (344.81- 722.75)	0.272
NKG2D:NKG2A ratio	1.37 (0.87-2.29)	1.47 (0.97-2.12)	0.149

附錄

List of abbreviations



PSA: prostate-specific antigen

WBCs: white blood cells

CRP: C-Reactive Protein

IFN- γ : Interferon gamma

NK cell: Natural killer cell

NKA: the activity of NK cells

ADT: androgen-deprivation therapy

APCs: Antigen Presenting Cells

DCs: Dendritic Cells

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

TEM: transmission electron microscopy

IQR: Interquartile Range



HLA: human leukocyte antigen

TILs: tumour-infiltrating lymphocytes

BCR: biochemical recurrence