

# 臺灣重要感染症之研究

## Important Infectious Diseases in Taiwan

文・照片提供／陳培哲（臨床醫學研究所教授兼所長）

在世界各地包括臺灣，感染症仍是危害人類健康的重要病因，而各種新興感染症的影響更不容忽視。面臨感染症的威脅和新挑戰，如何預防和控制後基因體時代便成爲一件非常重要且急迫的議題。本整合計畫的目標在於結合各種本土重要感染症的研究，促進臺灣在國際學術舞台上的競爭優勢。這項計畫包含4個子計畫，分別探討人流感病毒及禽流感病毒，克雷伯氏肺炎桿菌，B型肝炎病毒，以及人類乳突病毒的致病機轉，並嘗試研發疫苗以及可能的治療模式，成果簡述如下。

### 子計畫1：人流感病毒及禽流感病毒之血凝集素引發人類免疫反應之探討及發展微小干擾核糖核酸來抑制流感病毒繁殖

Human Immune Response to Hemagglutinins of Human and Avian Influenza Viruses and Developing siRNA to Intervene Influenza Virus Replication

■ 主持人：黃立民（小兒科教授）

流行性感冒病毒(Influenza virus)是一種造成人類及動物患流行性感冒的RNA病毒，分類學上屬於正黏液病毒科，它會造成急性上呼吸道感染，並藉由空氣迅速的傳播，故在世界各地常會有週期性的大流行。本研

究針對流行性感冒病毒的基因設計多個長20到25個核苷酸的雙股RNA，稱shRNA(Short interfering RNA)，將其送入細胞後得抑制流行性感冒病毒的基因表現，以降低病毒在細胞內的複製。目前發現能有效抑制病毒複製的shRNA共3條，分別是針對病毒的PA基因2條(pSU6 PA-sh1, pSU6 PA-sh2)及PB2基因1條(pSU6 PB2-sh2)，與對照組(pSU6 shGFP)比較，抑制病毒的複製的效能70~90%以上(圖1)。另將此3條shRNA轉爲較穩定的mircoRNA結構(pSM30 PA-sh1, pSM30 PA-sh2, pSM30 PB2-sh2)，並進行合併miRNA的測試(pSM30 PA-sh1/PB2-sh2, pSM30 PA-sh2/PB2-sh2)，此3條miRNA在細胞內皆能抑制70%以上病毒的增殖，而合併miRNA則以PA-sh2和PB2-sh2合併後的抑制效果佳，可達84%。未來希望以shRNA建立動物模式，發展有效抑制流感病毒的治療方式。

而紅血球凝集素是流感病毒主要的膜套蛋白(占膜套蛋白的~80%)，以釘狀結構突出膜外。某些型的紅血球凝集素具有刺激免疫細胞(如巨噬細胞、T淋巴細胞)的能力並使細胞產生大量的細胞激素反應。利用桿狀病毒／昆蟲細胞系統表現可溶性全長度H1N1、H3N2、H5N1的紅血球凝集素(H1、H3、H5)，及H1N1紅血球凝集素的外部蛋白區段(ecto

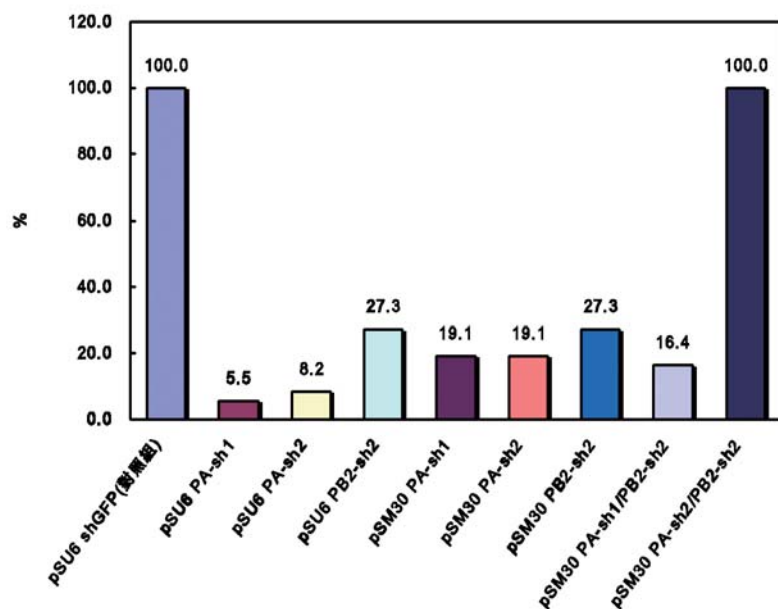


圖 1：各種 shRNA (Short interfering RNA) 抑制流行性感冒病毒的效果。

domain H1, eH1)。人類單核細胞分化的巨噬細胞培養在 500 ng/ml 的紅血球凝集素 (eH1、H1、H3、H5)，以 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) 當作 positive control。培養 0、3、6、12、24 小時後，以 real-time RT-PCR 分析紅血球凝集素引起的細胞激素訊息核糖核酸表現量。相較於 H1、H3、H5 可以刺激更多細胞激素基因表現，例如：IL-1 $\beta$ 、IL-8、MIP-1 $\alpha$ ，但 eH1 則無法有效誘發免疫細胞反應。值得注意的是，H5 和 LPS 引起明顯的 IP-10 基因表現 (圖 2A)，並以 IP-10 ELISA 實驗 (圖 2B) 加以佐證。所以禽流感病毒紅血球凝集素，較人禽流感病毒紅血球凝集素有更強之刺激免疫細胞的能力。

### 子計畫 2：原發性肝膿瘍之克雷伯氏肺炎桿菌莢膜結構、基因及血清型在致病之角色

The role of structure, genetic determinants of CPS region and serotypes in virulence of *Klebsiella pneumoniae* causing human primary liver abscess

■ 主持人：王錦堂 (微生物學教授)

克雷伯氏肺炎桿菌引起的社區性化膿性肝膿瘍為亞洲重要的新興感染症，在臺灣每年約造成數千名病例，克雷伯氏肺炎桿菌可以在社區中原本健康的人引起化膿性肝膿瘍，12% 可能併發腦膜炎或眼內炎，且病例有逐年增加的趨勢。本實驗室之前研究發現一重要致病基因 *magA*，和細菌高黏性、血清與吞噬細胞抗性、動物的致病力有關<sup>[1]</sup>，隨後也證實 *magA* 和其附近長約 25,000 鹼基對的基因區負責 K1 莢膜多醣體的合成<sup>[2]</sup>。根據這些研究，我們認為莢膜血清型在致病上扮演重要的角色。本計畫解開克雷伯氏肺炎桿菌 K1 血清型莢膜多醣體結構為 [→

3)- $\beta$ -D-Glc-(1→4)-[2,3-(*S*)-pyruvate]- $\beta$ -D-GlcA-(1→4)- $\alpha$ -L-Fuc-(1→)]，其中較特別的是具有乙醯化 (acetylation) 和丙酮醯化 (pyruvylation) 的修飾，剔除在 K1 莢膜多醣體合成基因區上的乙醯化和丙酮醯化的基因，使得對抗 K1 血清抗體抗原反應消失，乙醯化和丙酮醯化基因剔除株對老鼠的致病力顯著下降，因此莢膜多醣體的乙醯化和丙酮醯化修飾可能對於莢膜結構和致病力非常重要。分析引起肝膿瘍的克雷伯氏肺炎桿菌菌株，約有 80% (47/60) 屬於具有 *magA*，即為莢膜 K1 血清型，其餘 13 株引起肝膿瘍的克雷伯氏肺炎桿菌菌株為不具有 *magA*/非莢膜 K1 血清型，因此進一步完成全部菌株的莢膜血清分型。13 株中有 5 株是 K2，2 株是 K5，2 株是 K54，2 株是 K57，1 株是 K20，還有一株無法以 77 種血清分型，這些菌株的莢膜基因區以長聚合酶連鎖反應放大並完成定序，並因此證實此一無法以 77 種血清分型的菌株為一新的莢膜基因型<sup>[3]</sup>。

參考文獻：

[1] Fang CT., Chuang YP., Shun CT., Chang SC., Wang JT. (2004) A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing

Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. J. Exp. Med. 199(5): 697-705.

[2]Chuang YP, Fang CT, Lai SY, Chang SC, Wang JT. (2006) Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. J Infect Dis. 193(5):645-54.

[3]Pan YJ, Fang HC, Yang HC, Lin TL, Hsieh PF, Tsai FC, Keynan Y, Wang JT. (2008) Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. J Clin Microbiol (in press)

### 子計畫 3：以人體和土撥鼠模式研究急性肝炎和慢性 B 型肝炎急性發作中天生性免疫反應的角色

Studying on the Role of Innate Immunity in Acute Infection and Acute Exacerbation of Chronic Hepatitis B in Human and Woodchuck Model

■ 主持人：劉俊人（臨床研究所副教授暨內科部主治醫師）

吳慧琳（肝炎研究中心副研究員）

慢性 B 型肝炎急性發作的免疫致病機轉迄今尚未明瞭。我們之前以前瞻性研究及全長病毒基因體分析來探討病毒株變異與慢性 B 型肝炎急性發作的相關性，結果顯示急性發作的引發與病毒發生變異無關，反而是宿主的免疫狀態改變，導致無法控制病毒複製可能是促發 B 型肝炎急性發作的主因。除了細胞性免疫反應外，非細胞溶解性免疫機制在控制病毒上扮演著很

重要的角色。因此在本計畫中假設慢性 B 型肝炎急性發作是因為宿主免疫狀態改變，使 B 型肝炎病毒有機會複製，進而引發急性發作。為了驗證此一假設，我們利用人體檢體以及土撥鼠動物模式來探討急性發作中何種及何時免疫反應改變，特別著重細胞動素和化學動素系統。

本計畫在 48 位慢性 B 型肝炎急性發作的各個重要時間點取得其周邊血清。我們分析各種細胞動素／化學動素改變與慢性 B 型肝炎急性發作的相關性，結果發現 IL10 和 IP10 動素在病毒量竄升到最高點時，在統計學上有意義地增加。而宿主控制病毒的免疫反應主要是發生在肝內，因此僅探討血清中的免疫反應是不足的。除了探索已知功能的細胞動素和化學動素外，為了更完整廣泛探討其他可能具影響力的免疫成分，我們也利用微矩陣晶片在 7 位患者（接受干擾素治療，療效良好，而且有治療前後之肝切片檢體可供分析）找尋與急性發作相關的各種免疫反應變化。結果顯示 44 個肝臟內基因表現在肝發炎前後有明顯改變，而且主要與 STAT1 和 Tumor necrosis factor alpha 途徑有關。為釐清這些基因的角色，我們收集了另外 7 位患者（接受干擾素治療，療效不佳，而且有治療前後之肝切片檢體可供分析），正利用微矩陣晶片進行同樣分析。

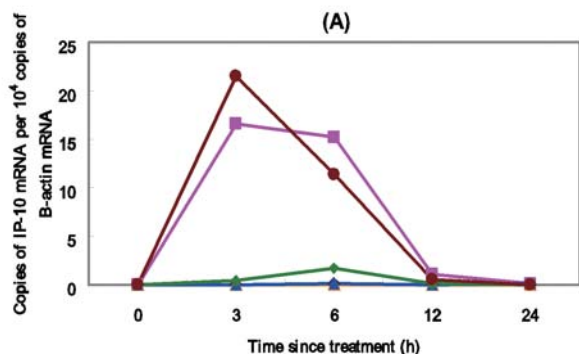


圖 2A：LPS、H1N1、H3N2、H5N1 的紅血球凝集素刺激巨噬細胞 IP-10 基因表現，H5 和 LPS 引起明顯的 IP-10 基因表現。

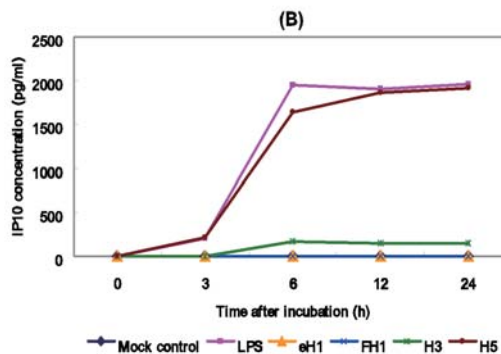


圖 2B：LPS、H1N1、H3N2、H5N1 的紅血球凝集素刺激巨噬細胞 IP-10 製造。



(1)急性發作中B型肝炎病毒量驟升時的細胞動素/化學動素變化：與病毒量驟升最有相關的細胞動素/化學動素包括IL10、MIG以及IP10。

Cytokines	Change (mean ± SD)	P	Chemokines	Change (mean ± SD)	P
TNF- $\alpha$	-0.55±8.8	0.6901	CXCL8 (IL8)	-2.4±59.7	0.8043
IFN- $\gamma$	-5.96±31	0.2191	CXCL9 (MIG)	241±444	0.0014
IL2	1.06±5.78	0.2335	CXCL10 (IP10)	574±798	0.0001
IL4	-0.66±8.7	0.6241	CCL2 (MCP1)	19.9±107	0.2589
IL6	0.12±6.79	0.9910	CCL5 (RANTES)	333±1401	0.1409
IL10	2.36±4.52	0.0018			

Paired T test

(2) 餵食土撥鼠類固醇下引發之急性發作：一系列血清ALT、WHV DNA以及組織病理學變化。

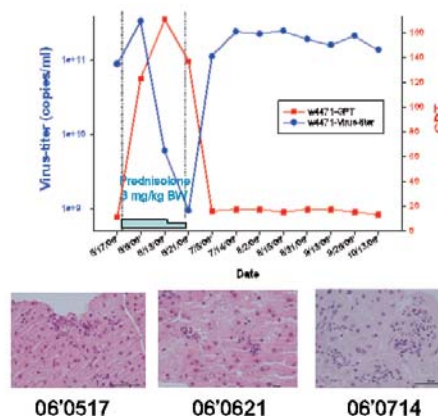


圖 3：以人體和土撥鼠模式研究慢性 B 型肝炎急性發作中天生性免疫反應的角色。

另一個策略是利用土撥鼠建立慢性 B 型肝炎急性發作的模式。研究結果顯示利用類固醇餵食及停藥策略，當我們使用每公斤體重 3mg 較高劑量的 prednisolone 時，可以在 WHV 帶原土撥鼠引發急性發作。此外，為了有系統的研究涉及 B 型肝炎急性發作有關的因子，和臺大基因體醫學研究中心生物資訊核心合作，評估利用人類微陣晶片來分析土撥鼠肝臟基因表現的可行性，初步結果顯示，人類 NTU-8K cDNA 微陣晶片可用來偵測土撥鼠肝臟基因的表現。最後，我們嘗試針對非帶原土撥鼠進行病毒感染，以引發急性肝炎並探討與急性病毒感染相關之土撥鼠肝臟基因的表現。

經由此研究，已初步釐清人體何種免疫反應改變是造成急性發作的重要因素，以及與急性發作相關的宿主免疫狀態的改變。

參考資料：The results concerning identification of cytokines/chemokines associated with the surge of hepatitis viral load during acute exacerbation has been submitted. The work of molecular cloning of woodchucks IL-8 genes have been published as conference

paper in the International HBV meeting, Rome, Italy, 2007 (pp141). This part of work has also been submitted.

#### 子計畫 4：建立 HLA-A24 轉殖鼠及研發 HBV 及 HPV 治療性的疫苗

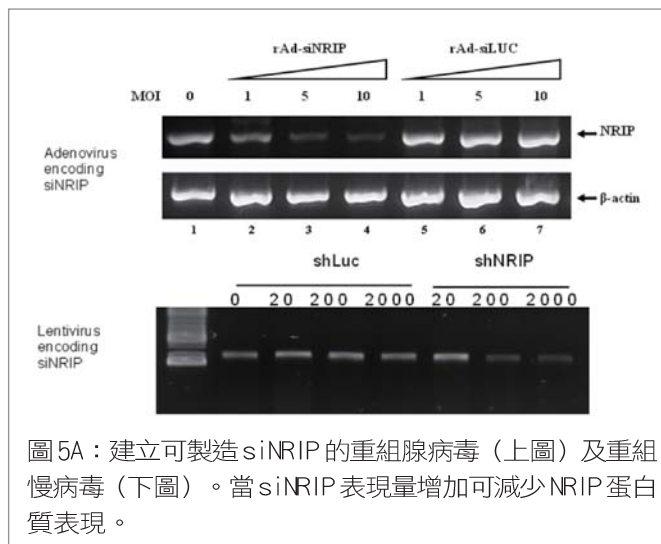
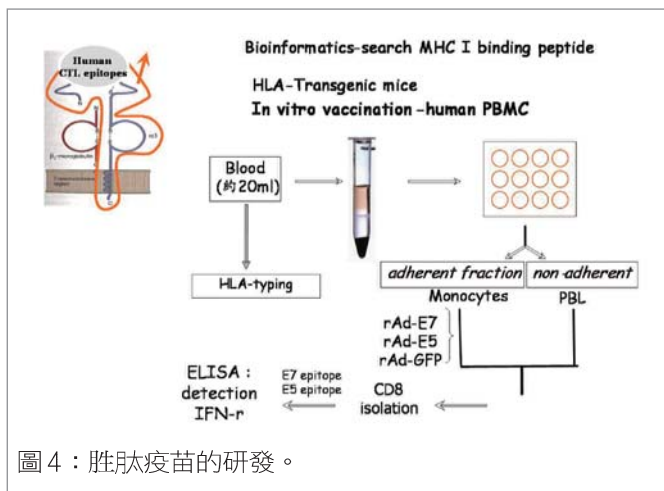
Generation of HLA-24 Transgenic Mice and Develop Human Papillomavirus and Hepatitis B Virus Therapeutic Vaccines

■ 主持人：陳小梨（微生物學教授兼所長）

本計畫對於癌症的治療策略有 2 種方法：一為腫瘤疫苗、一為荷爾蒙療法，其對於病毒及荷爾蒙相關的腫瘤生成是非常重要的。

為了製作腫瘤疫苗，我們建立了勝肽疫苗的實驗平台（圖 4）：（1）利用生物資訊判斷欲檢測之抗原的淋巴細胞毒殺抗原決定位並且合成該段勝肽。（2）藉由 T2 細胞結合法確認人類組織抗原勝肽的結合力。（3）利用人類組織抗原基因轉殖老鼠確認淋巴細胞毒殺抗原決定位之免疫活性。（4）在人體外的實驗，利用腺病毒傳送測試之抗原與人血中之淋巴





球進行接種，經由觀察純化出來的CD8 T細胞中 IFN- $\gamma$  的產量來測定具胜肽專一性之細胞免疫活性。

至於荷爾蒙療法，我們已發現一 Nuclea Receptor Interaction Protein(NRIP)基因 (GenBank<sup>TM</sup> Accession Number. AY766164 and AAX09330)，其功能為核受體的轉錄輔因子並調控基因表現，並調控男性荷爾蒙受體蛋白質的穩定。我們又發現NRIP RNA干擾素可抑制NRIP的表現 (JBC 280: 2000-2009, 2005; NAR 36: 51-56, 2008)。因此我們製造了可表現siNRIP的重組腺病毒及重組慢病毒 (圖5A)。在探討siNRIP對癌症細胞生長影響的實驗結果指出，在2393T細胞、不含人類乳突瘤病毒之子宮頸癌 C33A 細胞、前列腺癌 LNCaP 細胞 (圖5B)、含人類乳突瘤病毒之子宮頸癌CasKi細胞及乳癌MCF-7細胞 (圖5C) 中抑制了NRIP表現量後，並發現其具有抑制細胞生長的效果。

參考資料：From this project, we have published two papers, one for tumor vaccine approach published on Journal of Virology 81: 2869, 2007; the other for hormone therapy on Nucleic Acids Research 36: 51-66, 2008.

圖(本專欄企畫／研究發展處)

