

結核病及其治療之挑戰

中央研究院高中生命科學研究人才培育計畫

112年11月4日

呂桐睿 (Todd L Lowary)

生物化學研究所中央研究院

生化科學研究所國立台灣大學

tlowary@gate.sinica.edu.tw

lowarylaboratory.ca



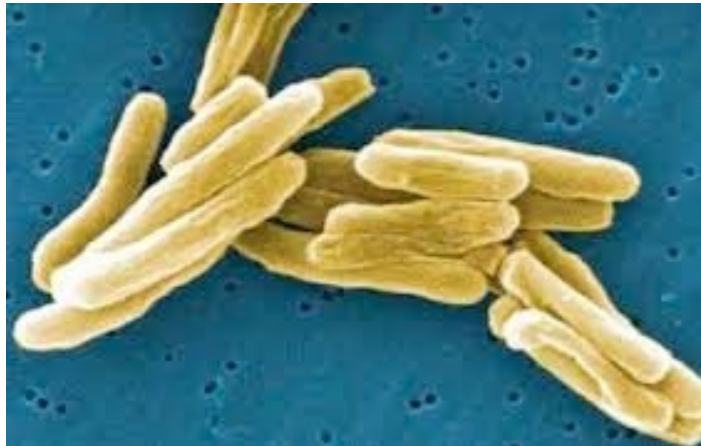
國立臺灣大學生命科學院
生化科學研究所



分枝桿菌 和 分枝桿菌疾病

★ 有超過 190 種分枝桿菌。大多數是無害的，但有些是人類病原體：

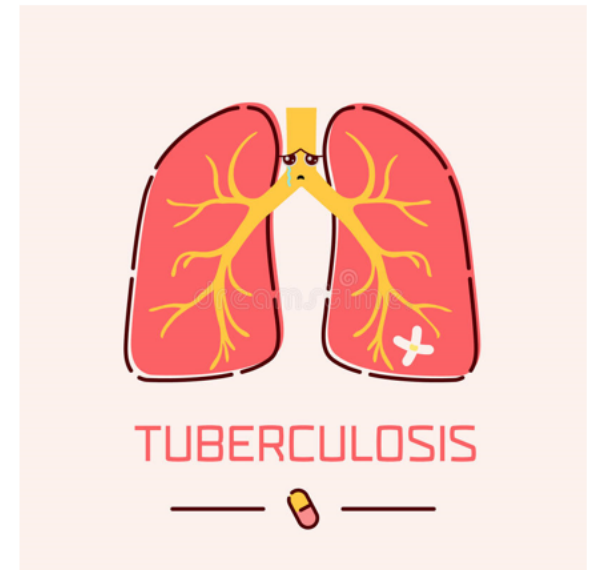
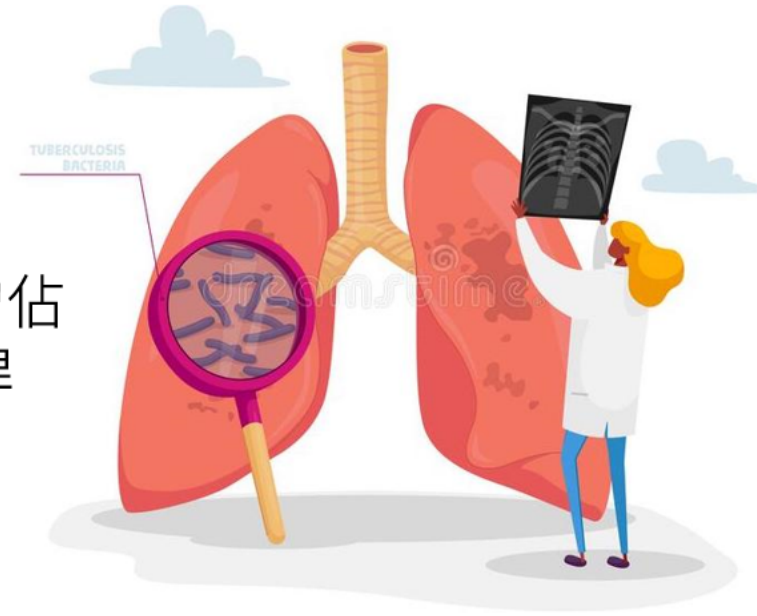
- 結核桿菌 – 結核病 ←
- 麻風分枝桿菌 – 麻風病（漢森病）
- 鳥分枝桿菌 – 免疫功能低下者易感染。
- 膿腫分枝桿菌 – 免疫功能低下者易感染。



結核分枝桿菌的電子顯微照片

結核病(Tuberculosis, TB)

- ★ 主要影響肺部的疾病。
- ★ 可怕的事實：
 - 據估計，約 **2,700,000,000 (!)** 人（約佔世界人口的 1/3）感染了結核分枝桿菌。
- ★ 好消息：
 - 對於免疫系統健康的人，他們通常不會生病或出現症狀而是以**潛伏性結核病 (latent TB)** 的形式留在體內。
- ★ 然而：
 - 當被感染的人免疫功能低下時，可能會發展為 **活動性結核病 (active TB)**。



結核病的症狀是什麼？

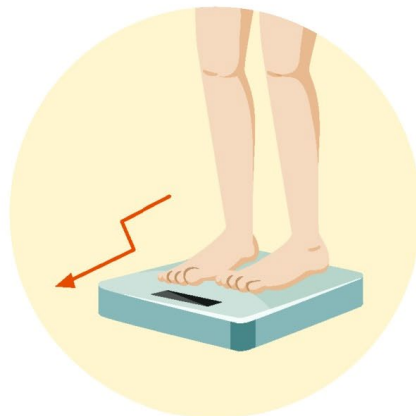
Tuberculosis Symptoms



發燒 fever



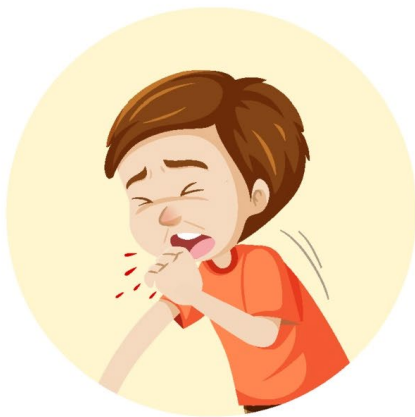
fatigue 疲勞



weight loss 體重減輕



持續咳嗽 persistent cough



blood in cough 咳血



night sweats 夜間盜汗

結核病—嚴重程度及區域

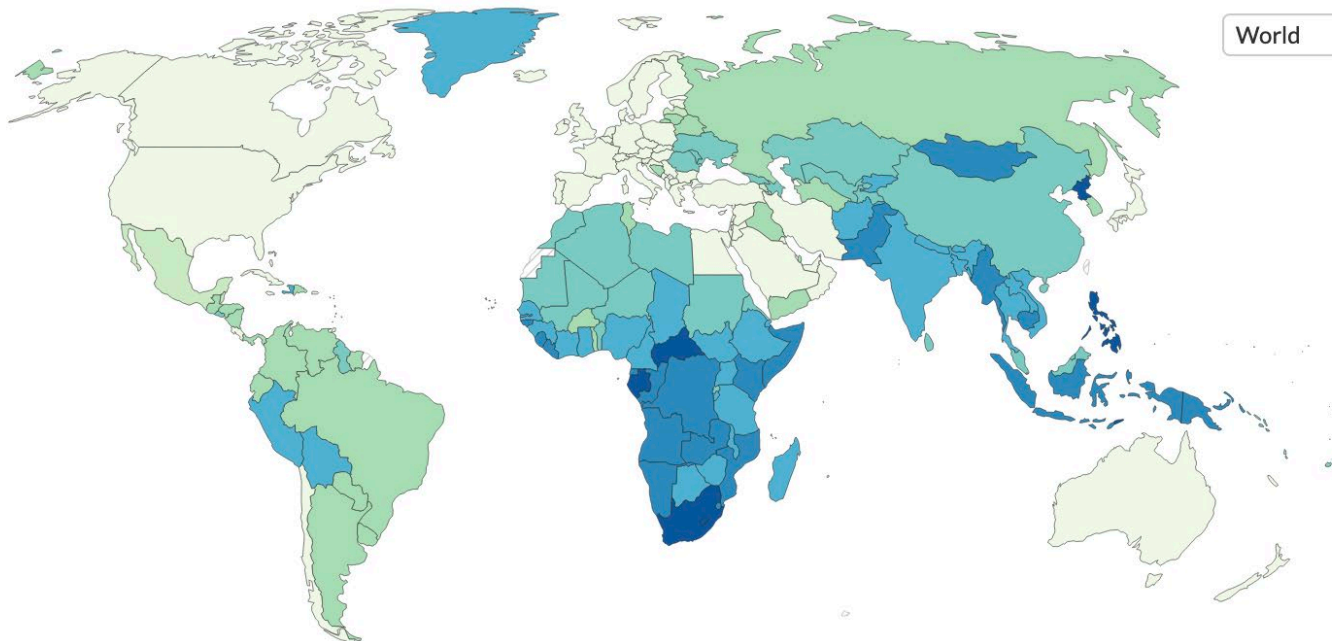
2020 年，常見死因的第 13 名；全球有 150 萬人死於結核病
在傳染病中僅次於 COVID-19

Tuberculosis incidence, 2020

Incidence of tuberculosis is the estimated number of new and relapse tuberculosis cases arising in a given year, expressed per 100,000 population. All forms of TB are included, including cases in people living with HIV.

Our World
in Data

World



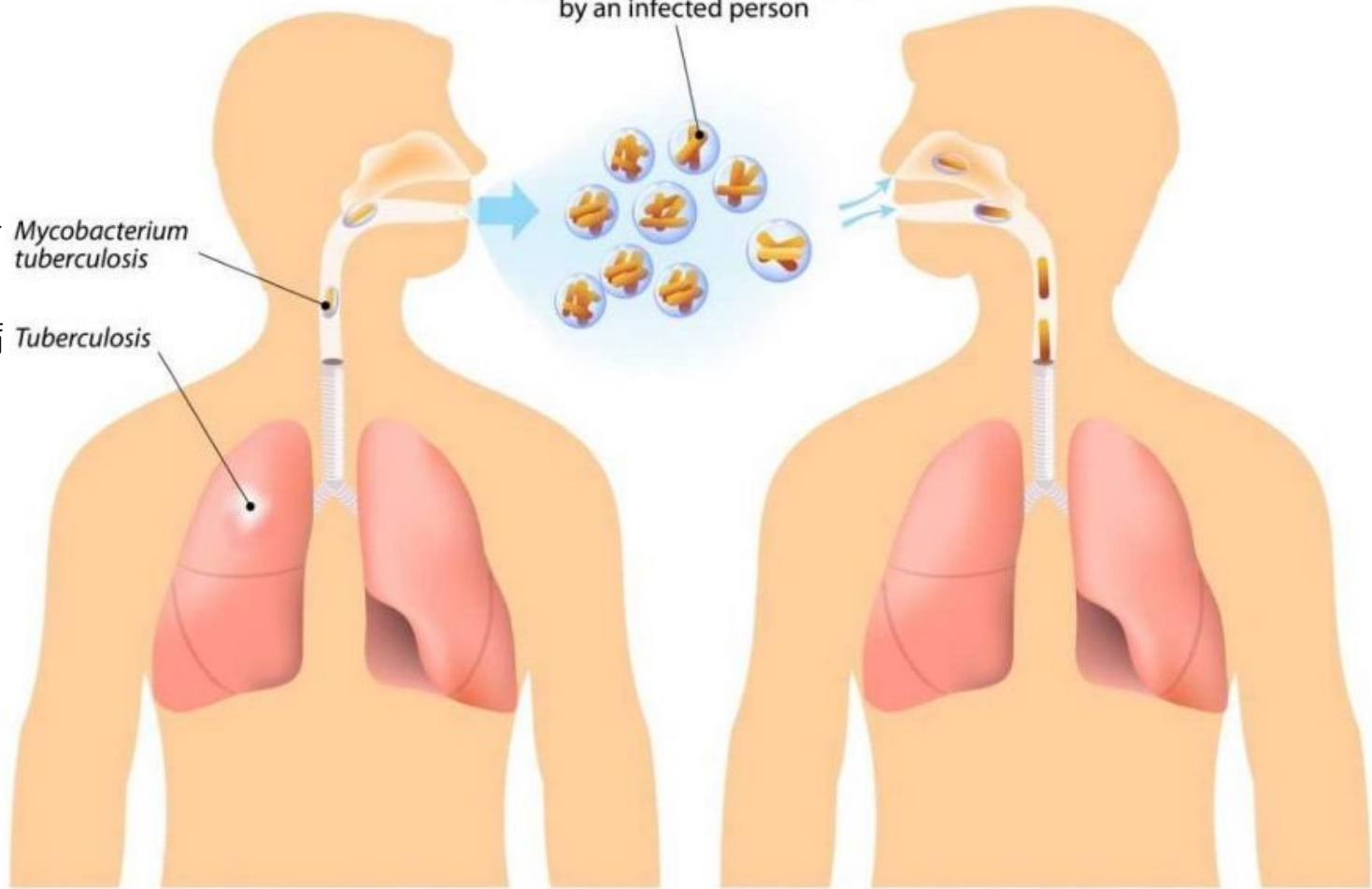
結核病如何傳播？

帶原者咳嗽或噴嚏的飛沫

Droplets from a cough or sneeze
by an infected person

結核桿菌 *Mycobacterium
tuberculosis*

結核病 *Tuberculosis*



重要：潛伏性結核病患者 **Latent TB** (>90%的結核分枝桿菌感染者) 不會傳播這種細菌。

是否有預防感染的結核病疫苗？

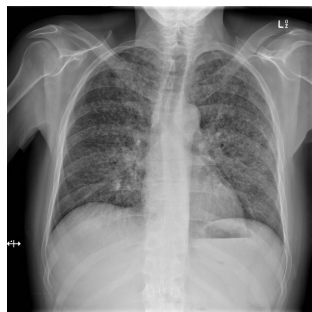
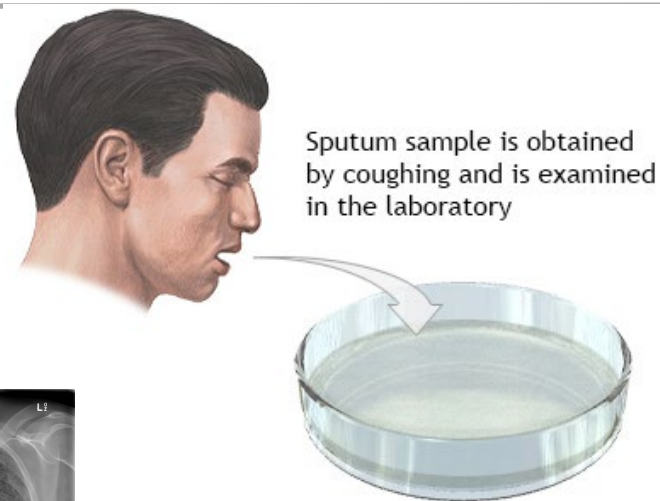
- ★ 包括台灣在內的許多國家都使用卡介苗 *Bacillus Calmette-Guérin (BCG)* 為結核病疫苗。
- ★ 首次使用於人類是在100年前—1921年。
- ★ 然而：
 - 保護兒童免受結核病侵害。
 - 對成人沒有保護作用。
- ★ *BCG* 疫苗被認為是一種一般的免疫增強劑，但不是具體針對結核病的。
- ★ *BCG* 疫苗被認為可用於其他疾病，包括癌症、糖尿病甚至 *COVID-19*。但還需要更多的研究。



仍然需要更好的結核病疫苗！

如何診斷結核病？

- ★ 從痰液檢體培養
 - 緩慢
- ★ 肺部 X 光
 - 需要昂貴的設備
- ★ PCR(如 COVID-19)
 - 昂貴
- ★ 檢測尿液中的生物標記
 - ★ 缺乏敏感性



還需要更好的結核
病診斷方法！

結核病當前的挑戰

- ★ 缺乏好的疫苗
- ★ 診斷緩慢或昂貴。
- ★ 治療時間過長導致人們無法完成治療。這會導致**抗藥性**。
- ★ **MDR TB – Multi-Drug Resistant TB**. 多重抗藥性結核病。
- ★ **XDR TB – eXtensviely Drug Resistant TB**. 廣泛抗藥性結核病。

Drug Resistant TB
(DR-TB)
抗藥性結核病

對INH和RIF
有抗藥性

MDR TB

MDR+ 第二線
抗生素抗藥性

XDR TB

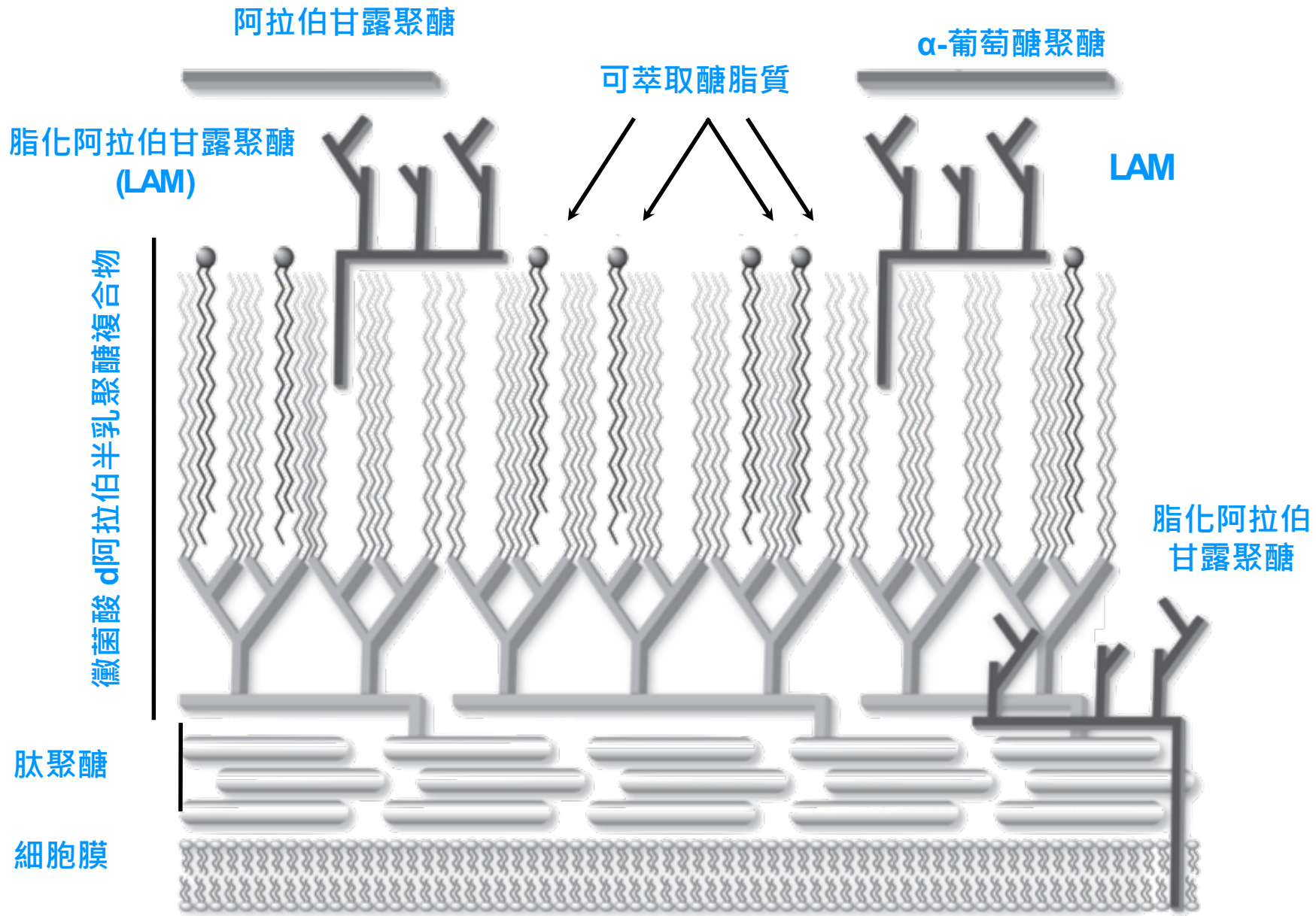
為什麼結核病治療需要這麼長時間？

結核桿菌生長緩慢，並且已經形成了“隱藏”在人體細胞內免疫系統無法偵測到的機制。

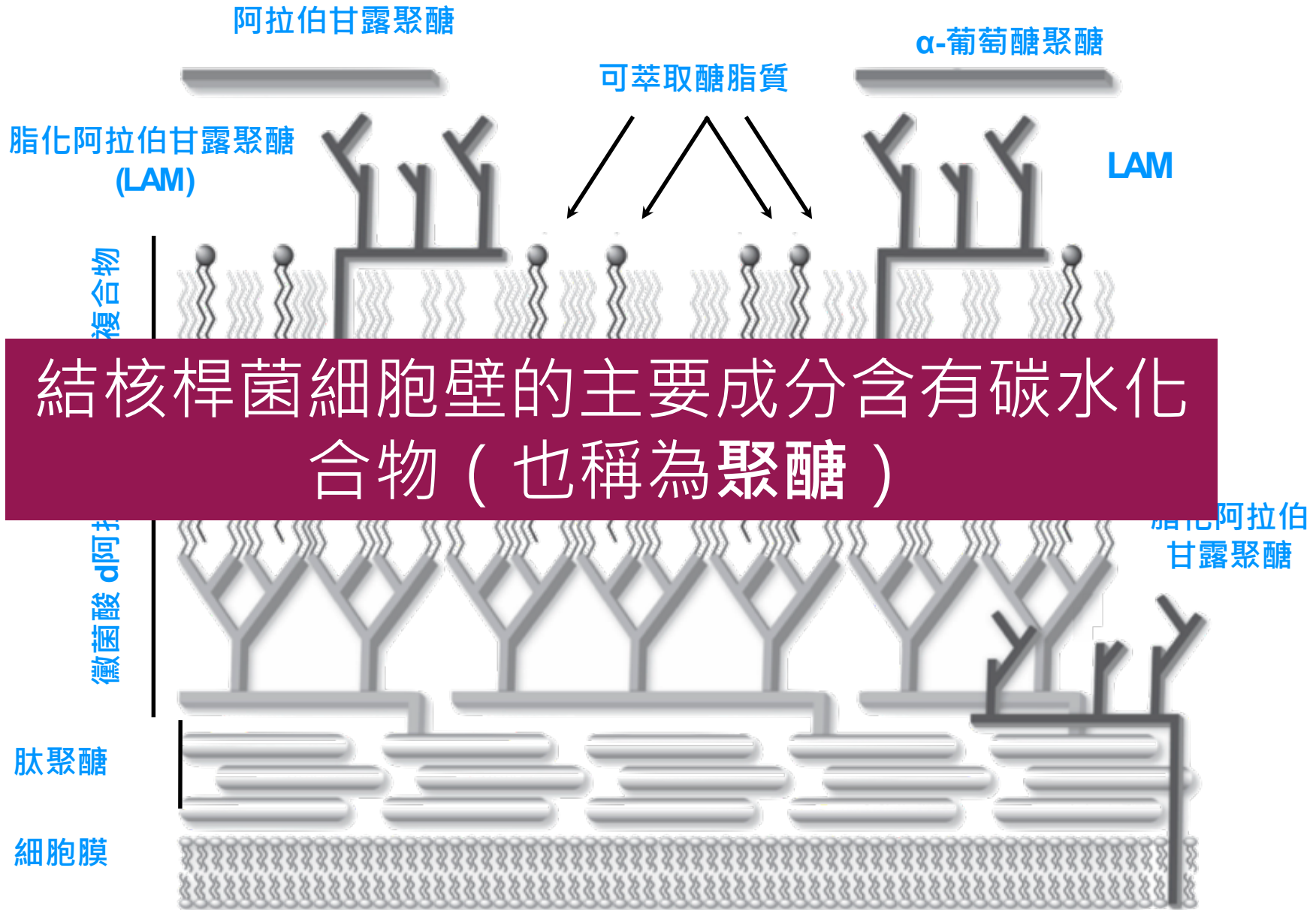
藥物很難進入結核桿菌以發揮其殺菌作用。

這兩個特徵都源於結核桿菌特別的細胞壁

分枝桿菌細胞壁



分枝桿菌細胞壁



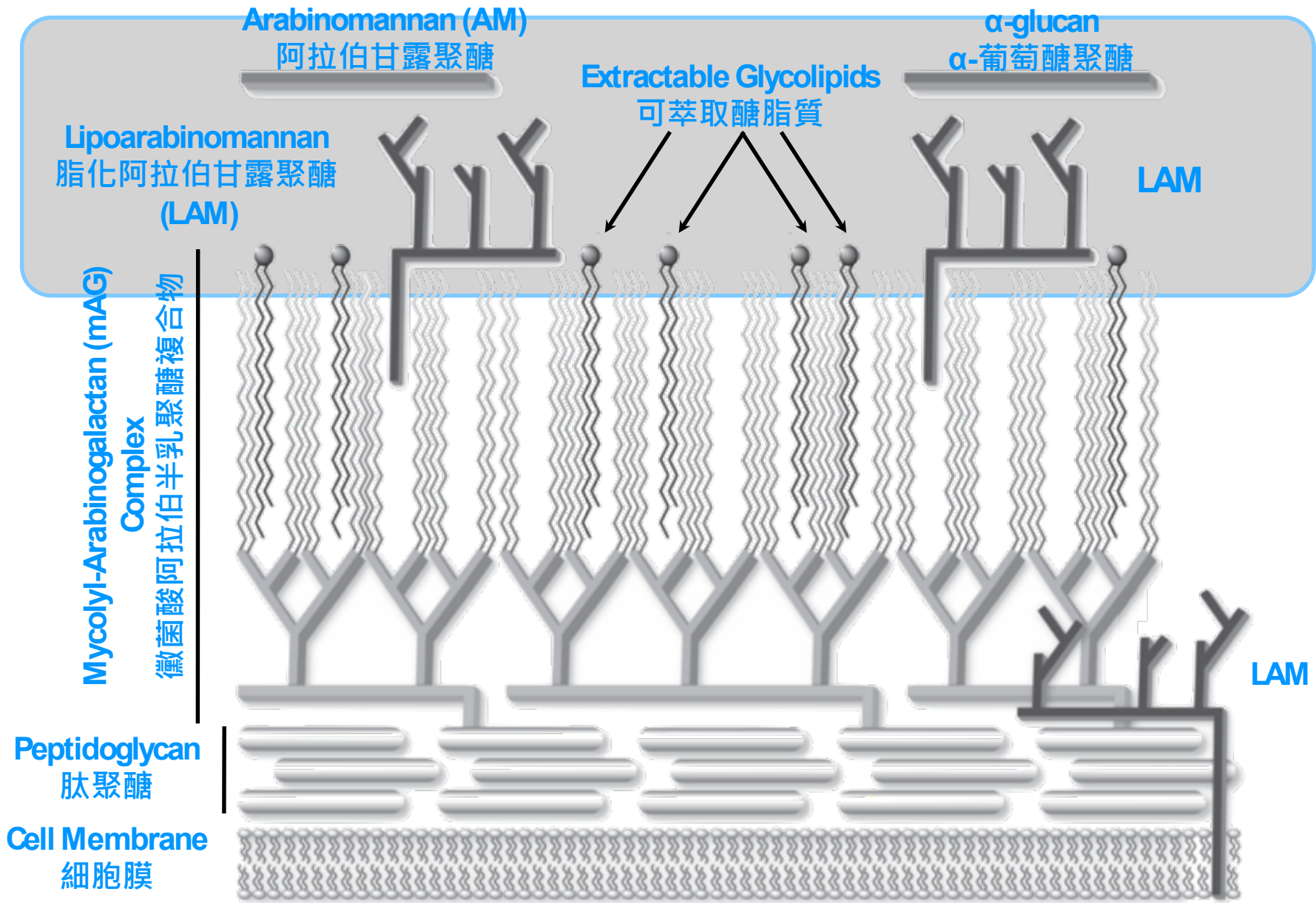
呂桐睿的實驗室結核病相關研究

研究分枝桿菌聚醣生物學功能的探針的合成與評估

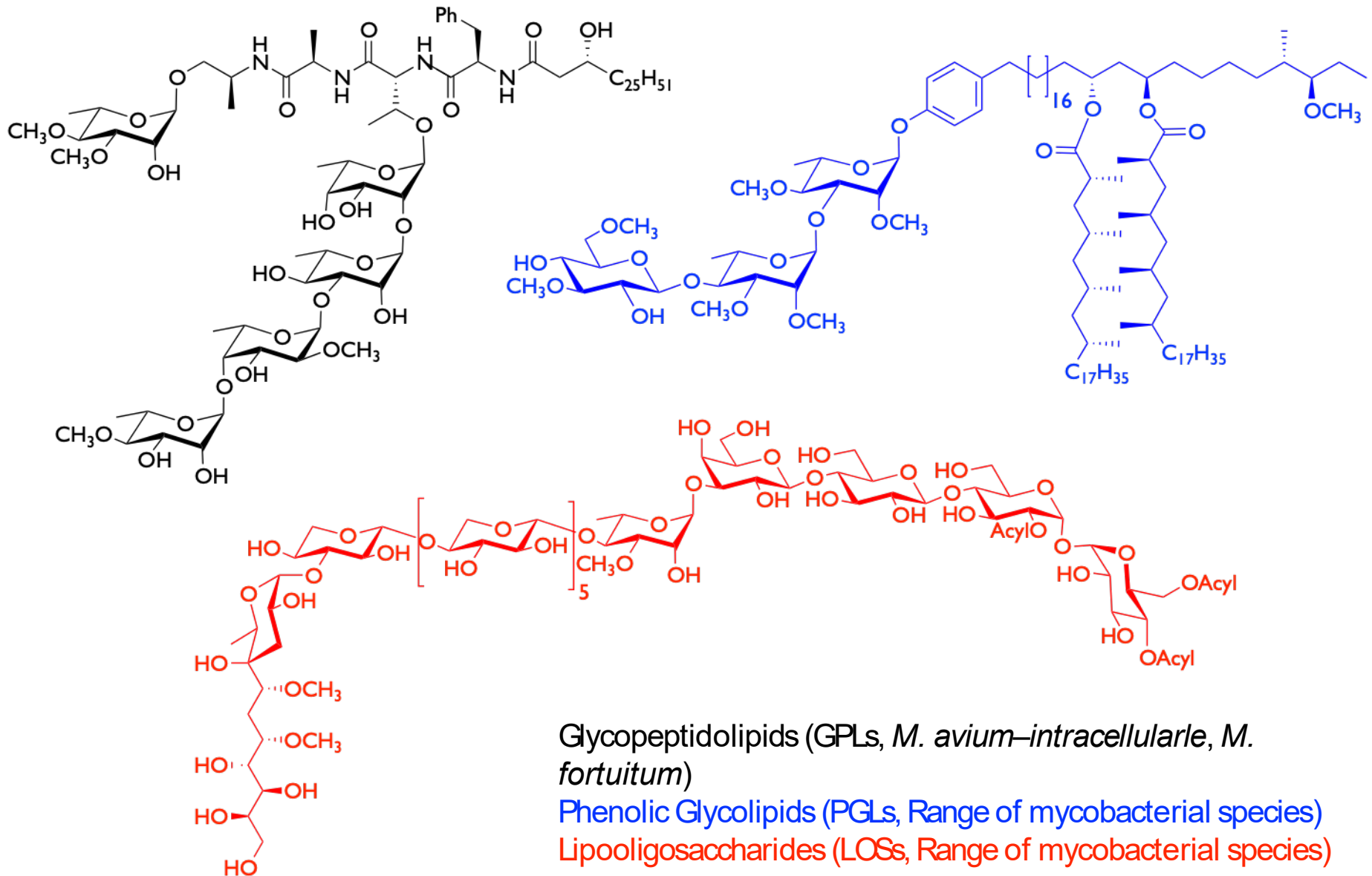
結核桿菌聚醣的組成和免疫識別

分枝桿菌噬菌體的鑑定和特性

分枝桿菌細胞壁



可萃取醣脂質的例子



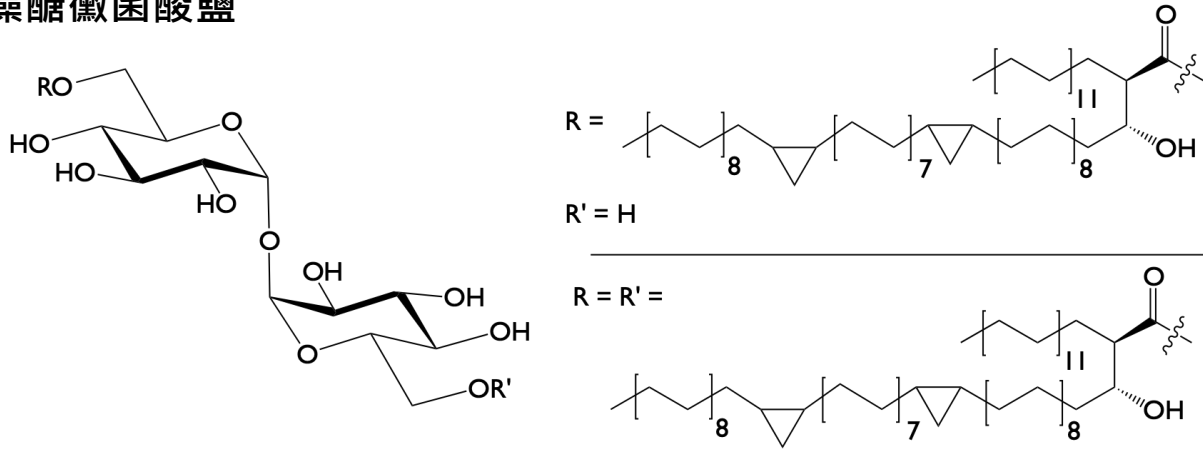
Glycopeptidolipids (GPLs, *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*)

Phenolic Glycolipids (PGLs, Range of mycobacterial species)

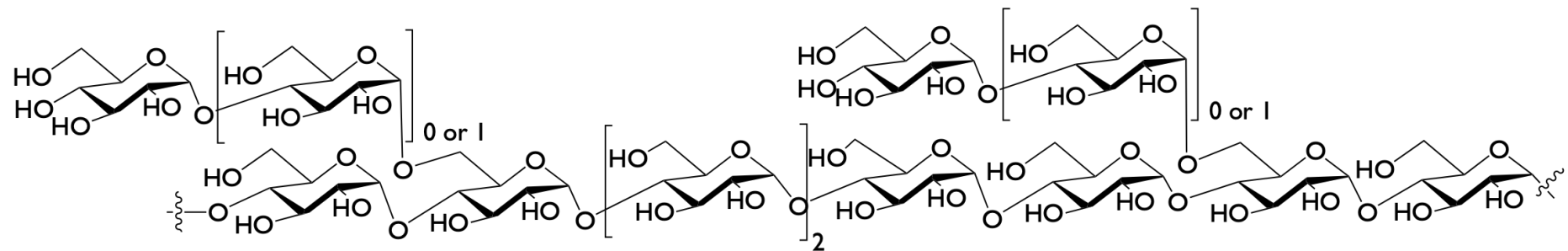
Lipooligosaccharides (LOSs, Range of mycobacterial species)

海藻糖黴菌酸鹽和 α -葡萄糖聚糖

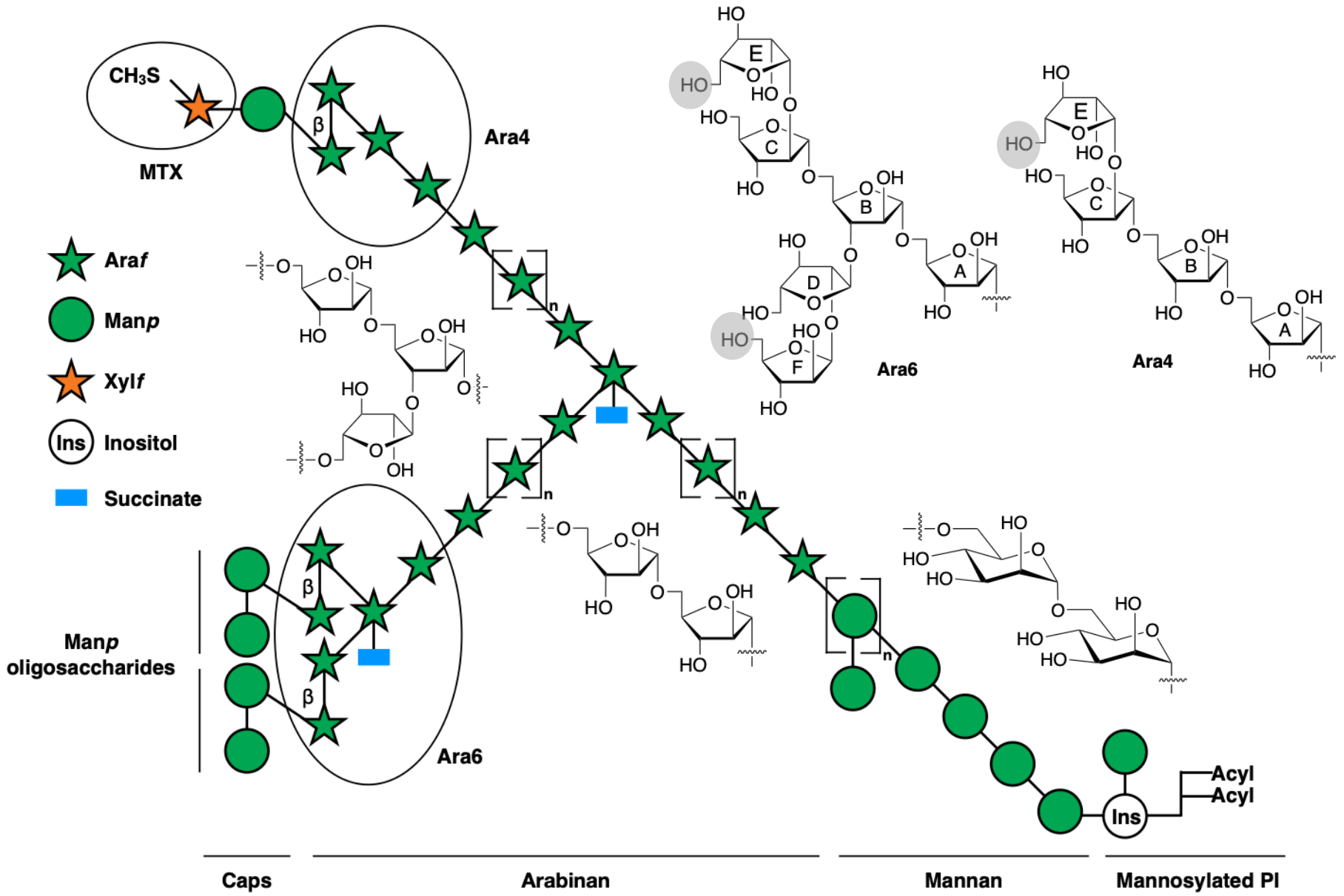
Trehalose Mycolates 海藻糖黴菌酸鹽



α -Glucan α -葡萄糖聚糖

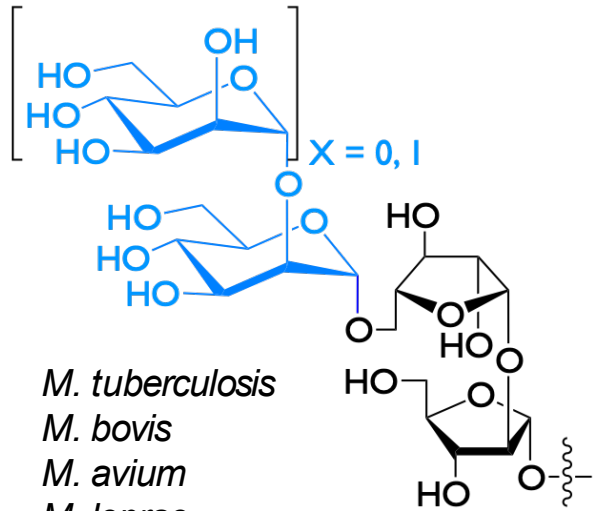


脂化阿拉伯甘露醣/阿拉伯甘露聚糖



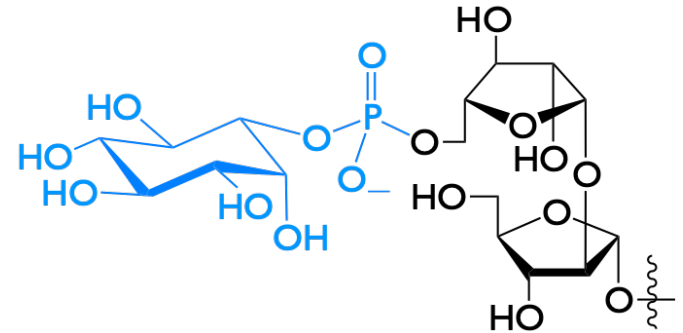
脂化阿拉伯甘露糖的末端

α -(1→2)-Linked D-Manp_x (ManLAM)



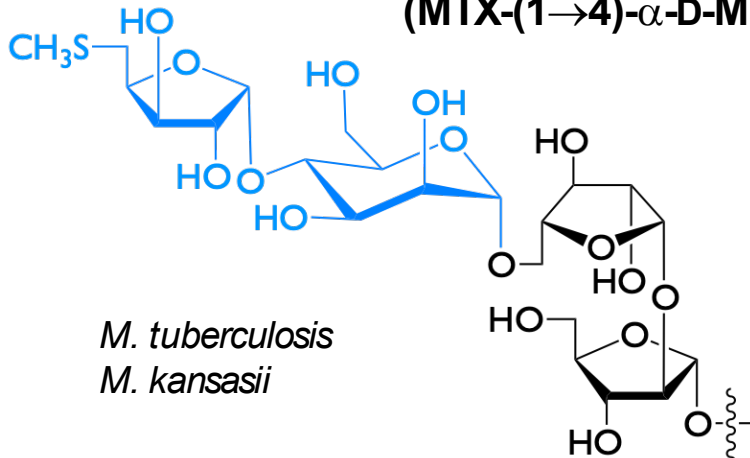
M. tuberculosis
M. bovis
M. avium
M. leprae

Inositol Phosphates (PILAM)



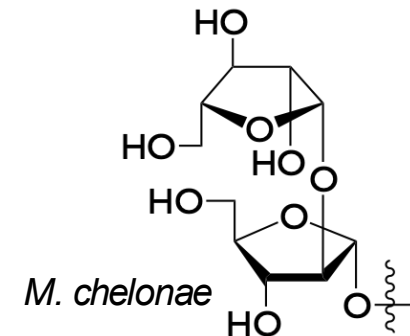
M. smegmatis
M. fortuitum

5-Methylthio- α -D-Xylf-(1→4)- α -D-Manp (MTX-(1→4)- α -D-Manp)



M. tuberculosis
M. kansasii

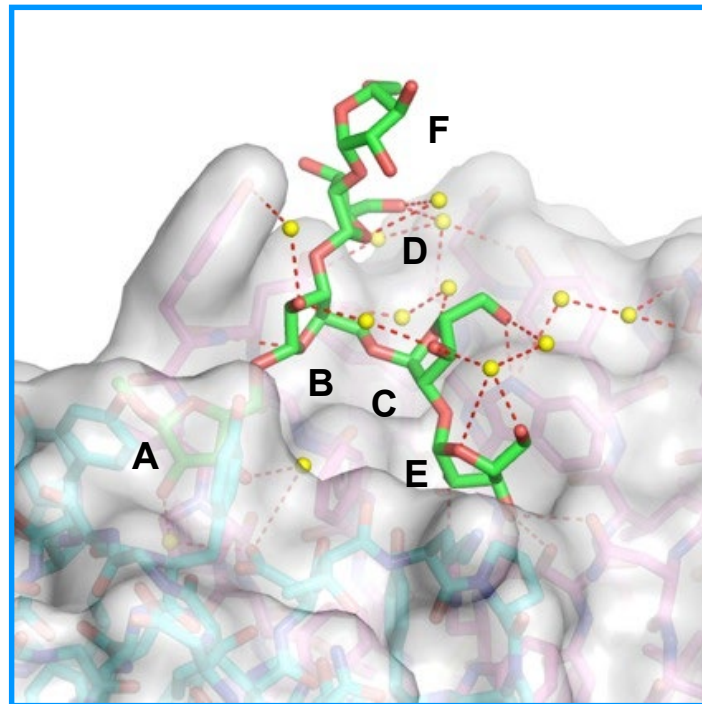
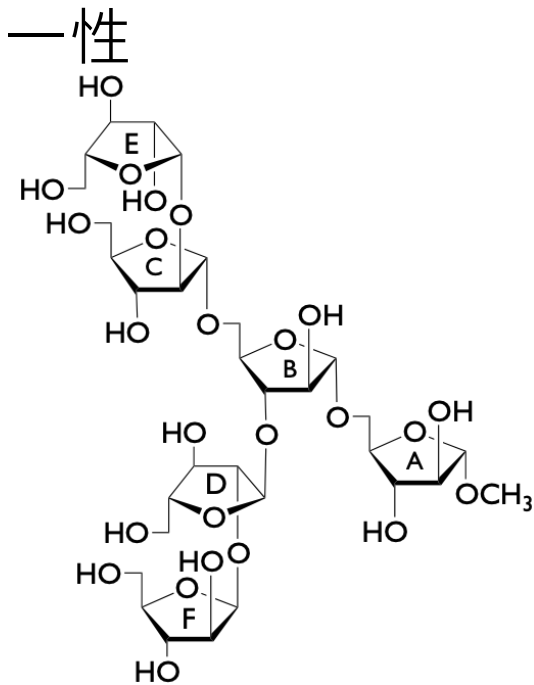
No Capping



M. chelonae

分枝桿菌聚醣在免疫學的角色

- ★ 免疫系統凝集素的配體
- ★ 有效的抗體誘導劑
- ★ 缺乏其分子結構所影響的的作用的理解
- 已知許多anti-LAM的單株抗體，但僅理解一種(CS-35)的專一性



研究方法

目的

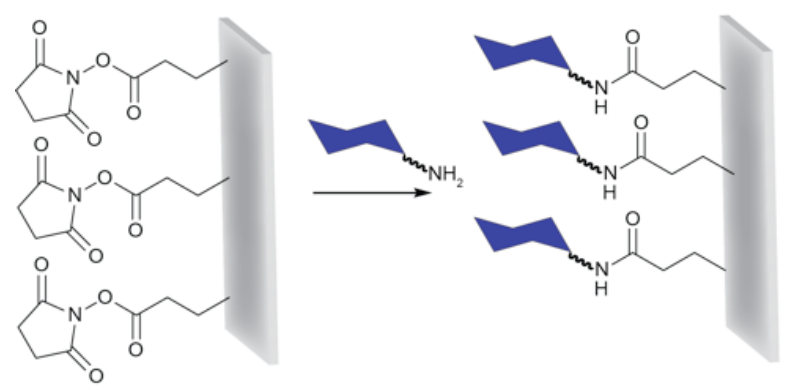
化學合成

合成的分枝桿菌細胞壁上的聚醣

75個聚醣

- 25 LAM Fragments
- 18 GPLs
- 20 PGLs
- 6 LOSs
- 2 trehalose mycolates
- 4 α -glucan fragments

固定在晶片上



酵素免疫測定法

結構與功能的關聯

抗原合成與從自然界分離之比較

★ 使用化學合成的優勢

- 獲得具有已知結構的明確分子，其純度通常高於從自然界分離的分子
- 可獲得相關的分子片段來探討結構及其功能
- 比從自然界分離獲得相對大量(毫克級或克級)的化合物
- 可在分子上標記特殊基團並與其他分子進行連結

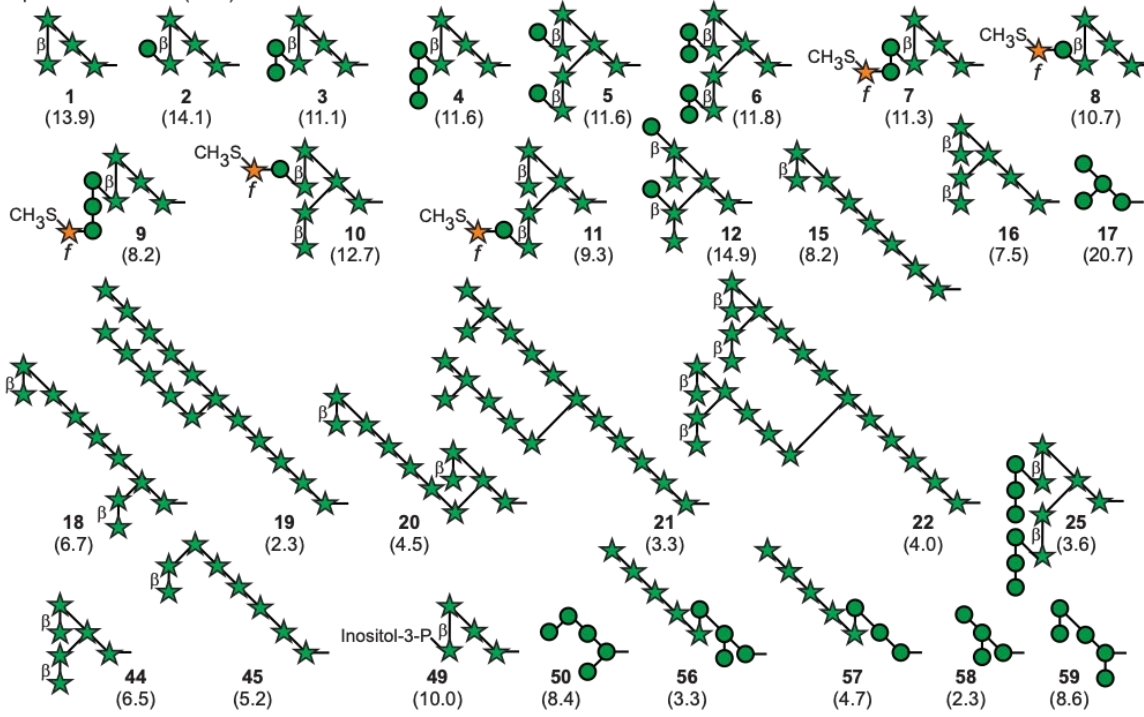
★ 使用化學合成的缺點

- 勞力密集；需要大量的技術及專長
- 需要了解分子中潛在抗原基團以進行抗原合成

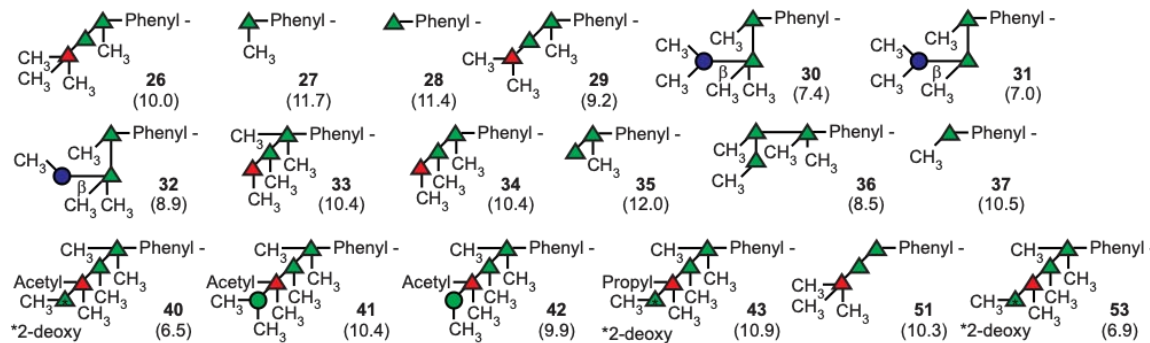
陣列上化合物的合成需要 200 多年的工作（20人工作10年）。

60個醣晶片抗原

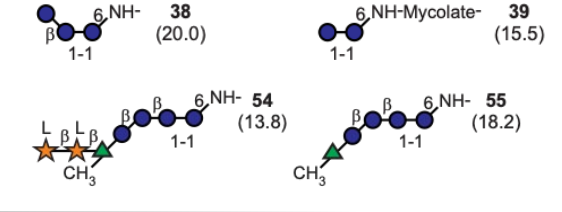
Lipoarabinomannan (LAM)



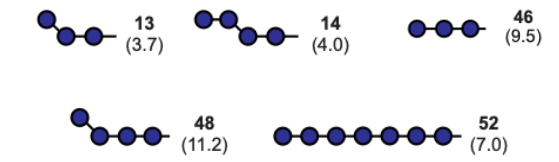
Phenolic glycolipids (PGL)



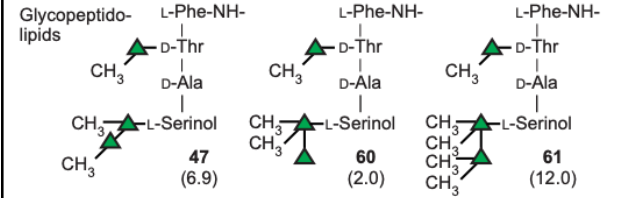
Trehalose mycolates and lipooligosaccharides (LOS)



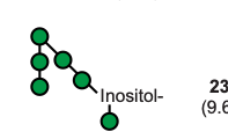
Capsular α glucans



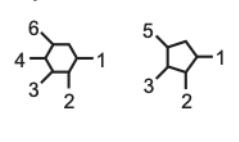
Glycopeptidolipids



Phosphatidyl-myo-inositol mannoside (PIM)



Pyranose Furanose



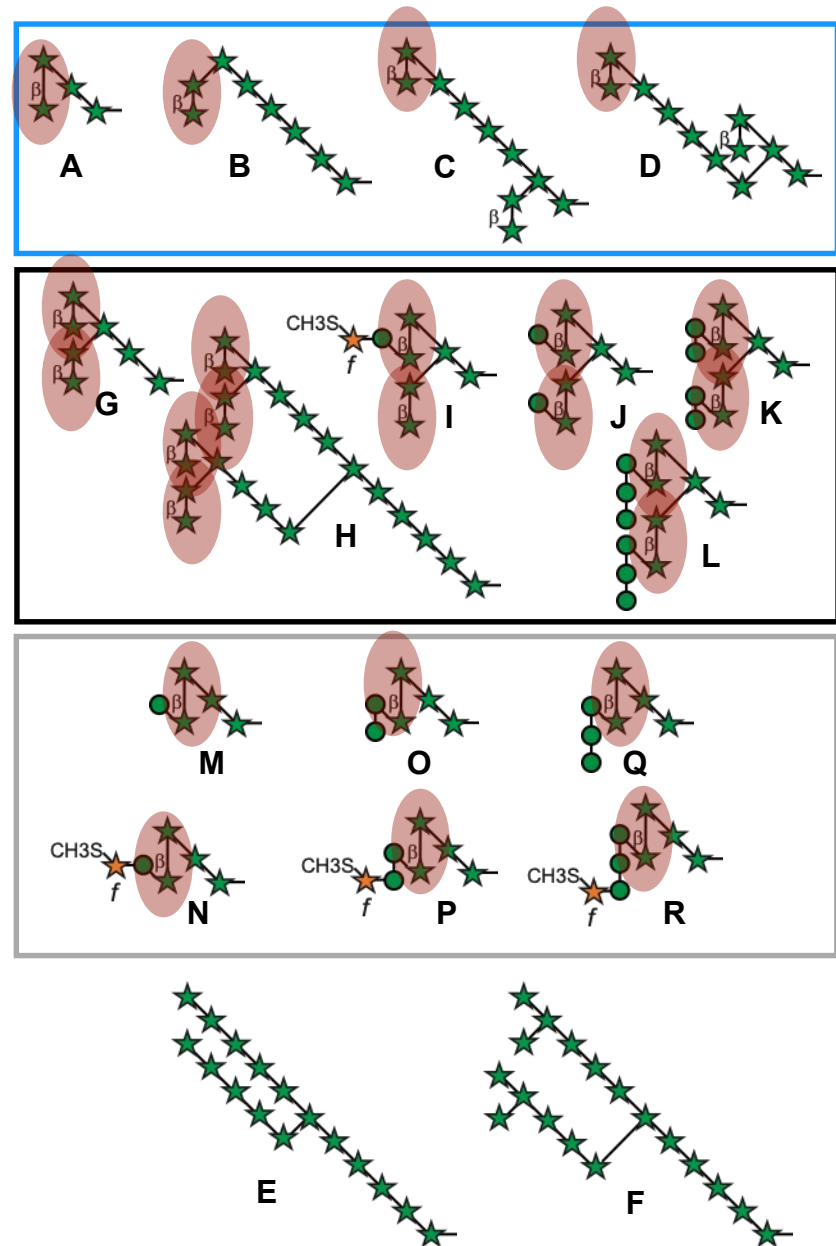
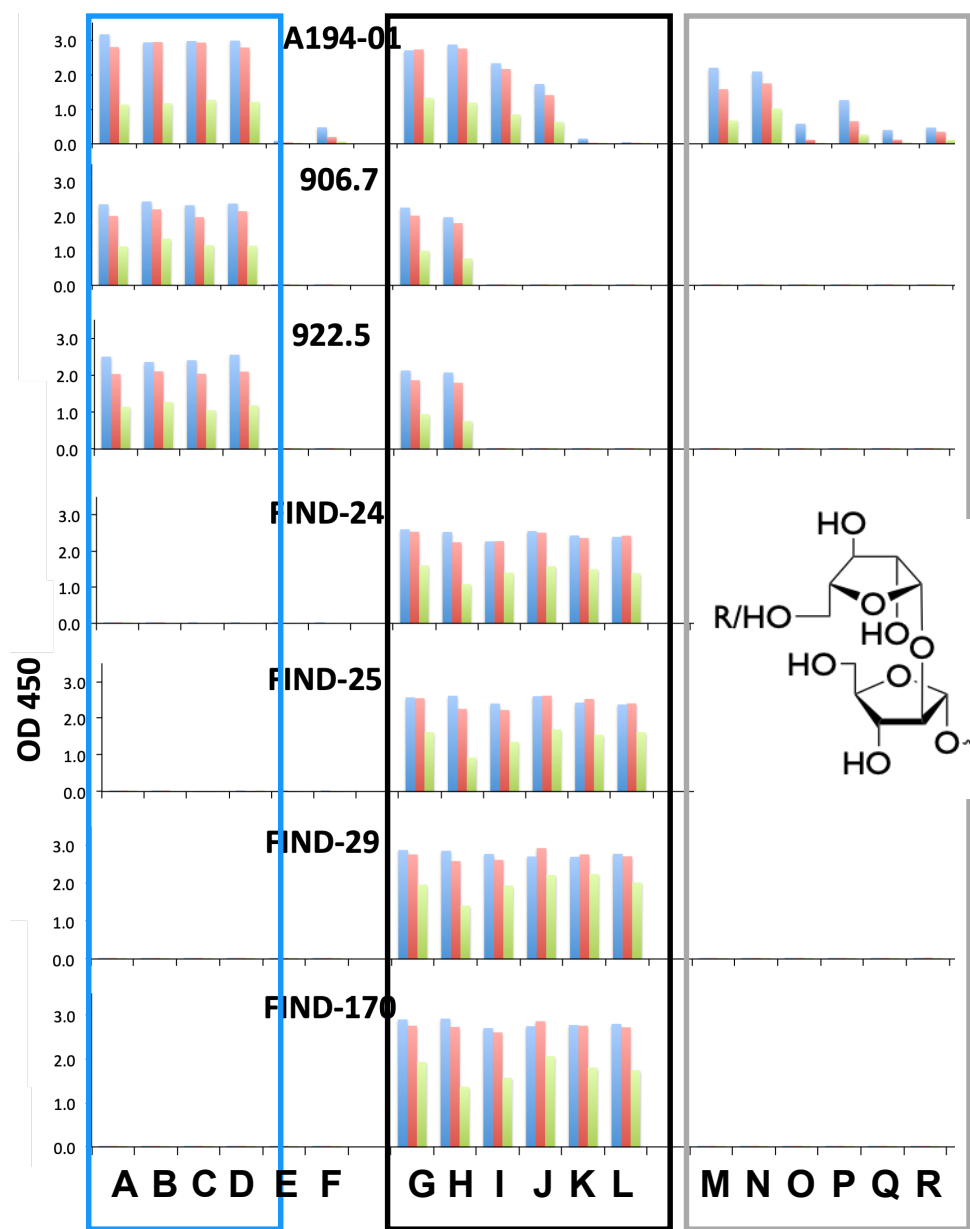
- Mannopyranose
- Glucopyranose
- ▲ Rhamnopyranose
- ▲ Fucopyranose
- ★ Arabinofuranose
- ★ Xylopyranose
- ★ Xylofuranose

Anti-LAM抗體的專一性

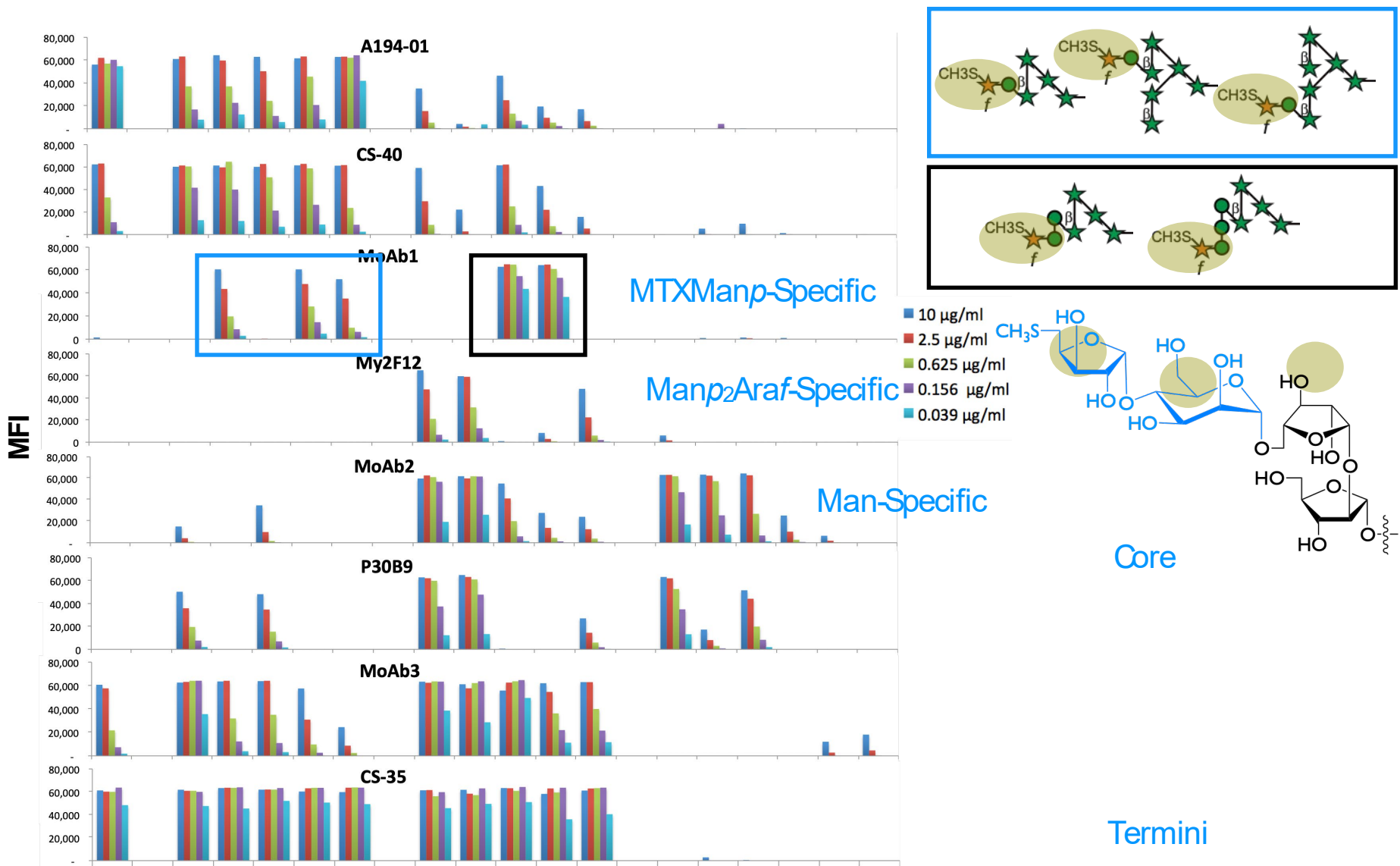
- ★ 感染分枝桿菌的個體中存在高效價的Anti-LAM 抗體
- ★ 只有一種Anti-LAM單株抗體(CS-35)的特異性是已知的
- ★ 篩選的抗體：

	Murine		Human	Other
FIND 24		CS-40		MoAb1 (rabbit)
FIND 25		906.7		MoAb2 (rabbit)
FIND 29		908.1		MoAb3 (chicken)
FIND 170		922.5		
CS-35				

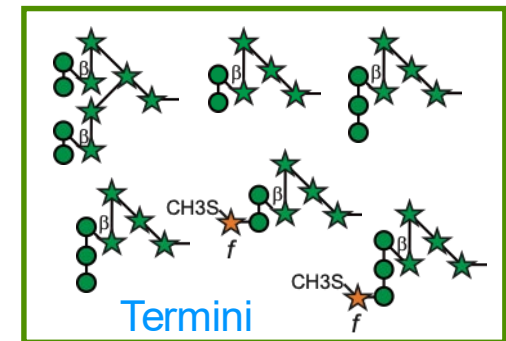
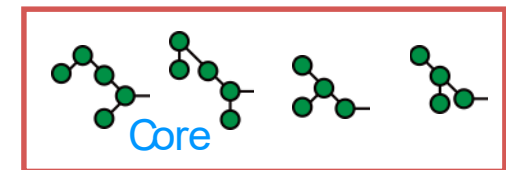
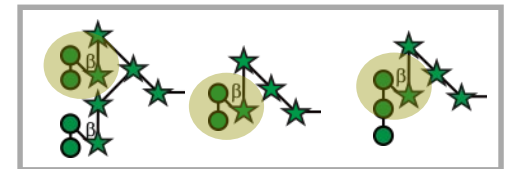
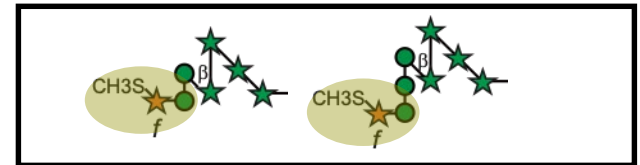
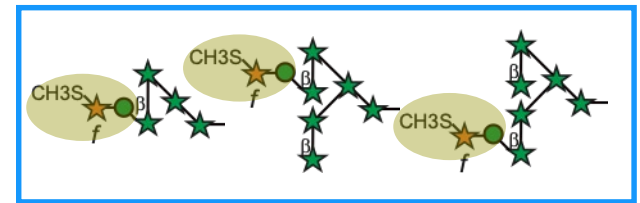
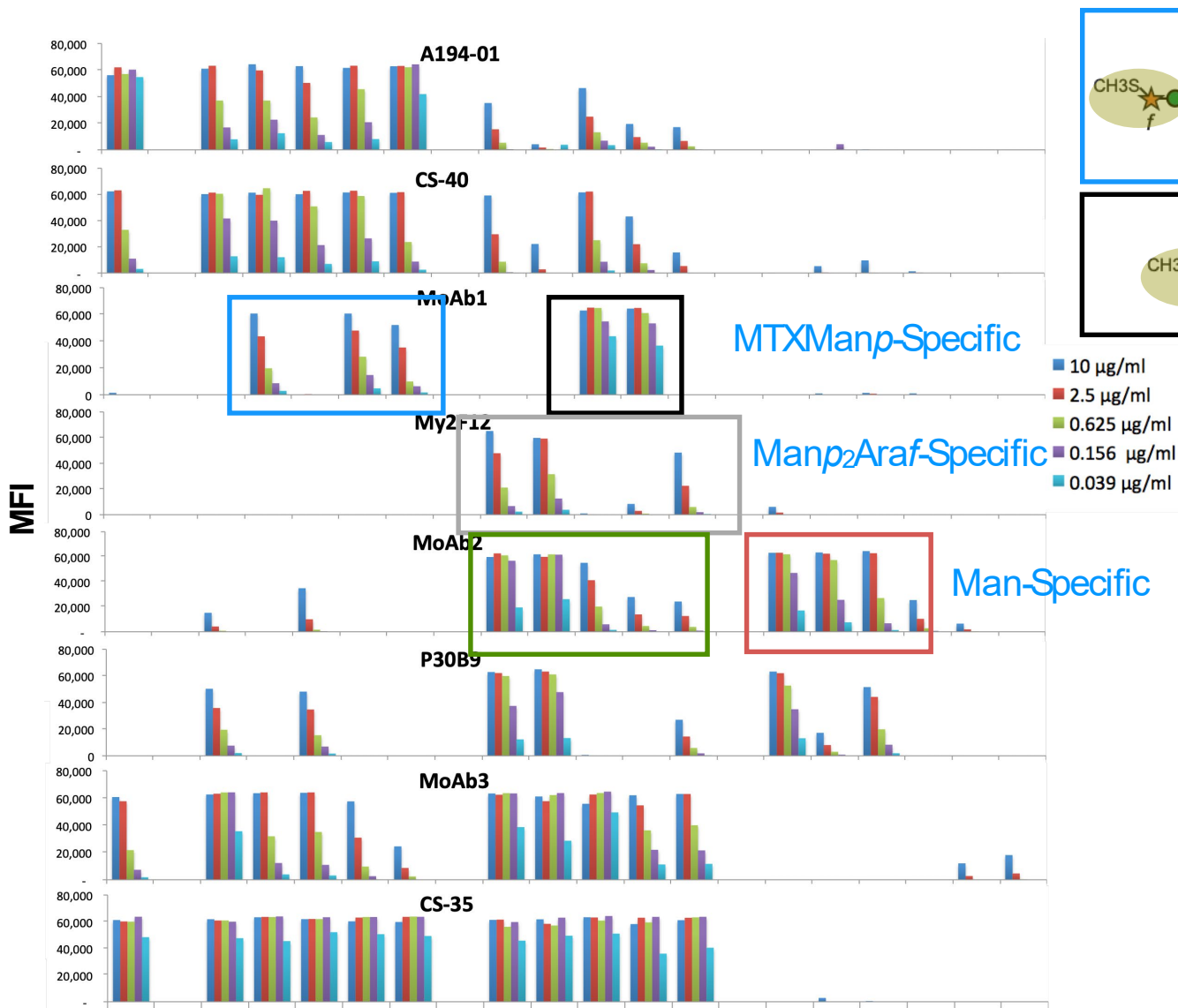
篩選Anti-LAM 抗體



篩選Anti-LAM 抗體



篩選Anti-LAM 抗體



需要結核桿菌的診斷方法

全球市場：>\$10億/年

★ 現有常見結合桿菌感染診斷方法：

- 貴
- 耗時
- 在開發(低、中)國家時效性不佳
- 不可靠

★ **GeneExpert**，被視為最好的結核病診斷工具之一。採用痰液，每次測試費用 10 美元（由蓋茨基金會資助）。與其他核酸增幅檢驗(NAAT) 類似。

★ 痰液不適合診斷兒童結核病，且不能用於診斷肺外結核病

使用尿液檢測肺結核

★ Alere Determine TB LAM™ Diagnostic for TB

- 僅對HIV病患有效
- 所使用的單株抗體對 LAM 的靈敏度較低。因而需要高濃度的 LAM，而 LAM 僅存在於免疫功能較弱的個體中

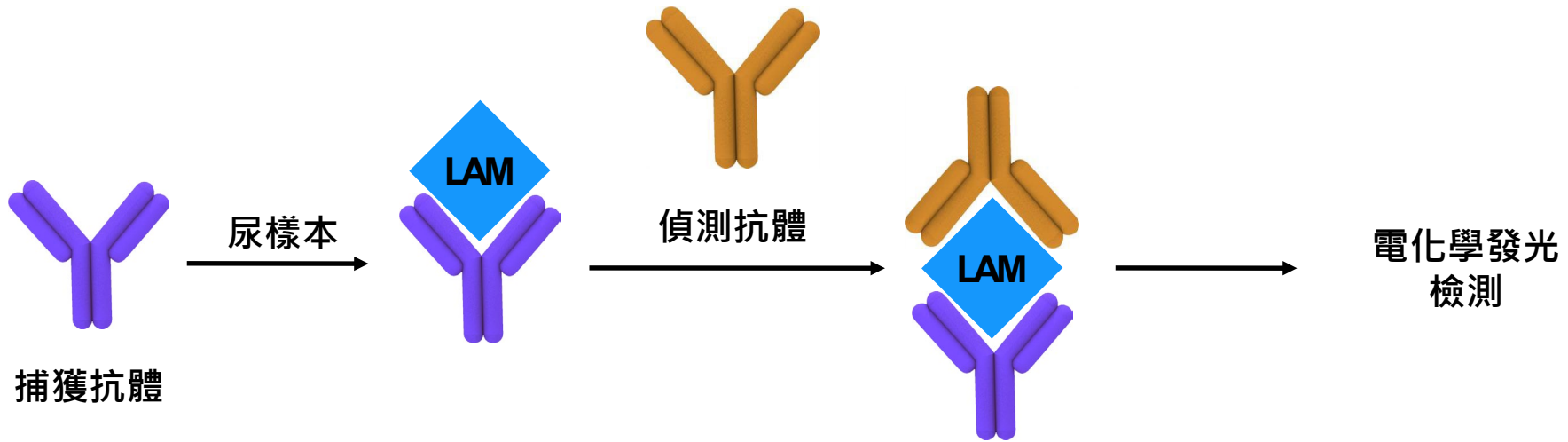
★ 更靈敏的單株抗體或成對的單株抗體（同時捕獲和檢測的單株抗體）能否更有效？

- 可以!
 - *J. Clin. Microbiol.* **2018**, 56, e01338-18
 - *PLOS One* **2019**, 14, e0215443
 - *Lancet Infect. Dis.* **2019**, 19, 852
 - *J. Clin. Investig.* **2020**, 130, 5756



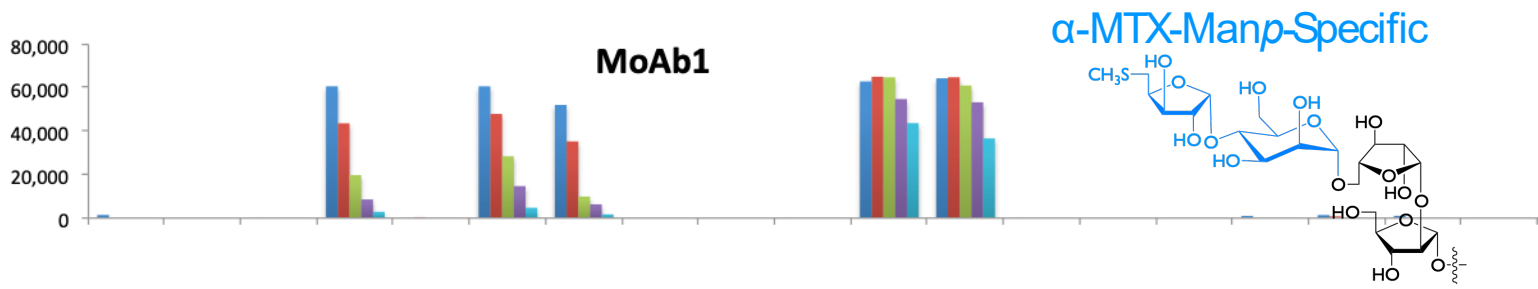
跟 Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND) 和 Dr. Abraham Pinter (羅格斯大學)

化驗 (Fujifilm) – 與創新診斷方法基金會(FIND)合作

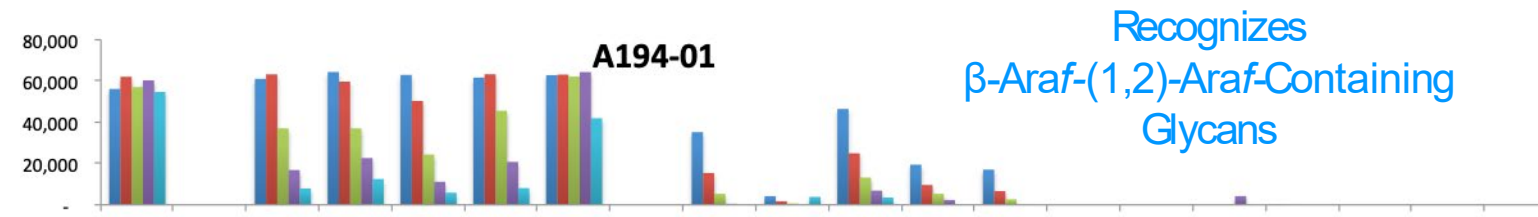


FIND 評估 100 對不同的捕獲和檢測抗體

最佳捕獲抗體



最佳檢測抗體



診斷靈敏性/專一性

High Sensitivity - Low false negatives
靈敏性高 – 偽陰性機率低

High Specificity - Low false positives
專一性高 – 偽陽性機率低

	HIV+		HIV-	
	Sensitivity 靈敏性	Specificity 專一性	Sensitivity 靈敏性	Specificity 專一性
Alere TB	44%	100%	13%	100%
Fujifilm (this work)	100%	93%	80%	100%

我們能做得更好嗎？

這些聚醣（和新聚醣），特別是帶有 MTX 殘基的聚醣，被用於生成新的 Anti-LAM 單株抗體

找到更好結合(酯)阿拉伯甘露聚糖的抗體

合成更多抗原以產生其他抗體
(與FIND機構 & GADx機構, UK
合作)

用現有的抗體進行
抗體親和力成熟的過程
(與FIND機構合作)

篩選抗體基因庫
(與FIND機構合作)

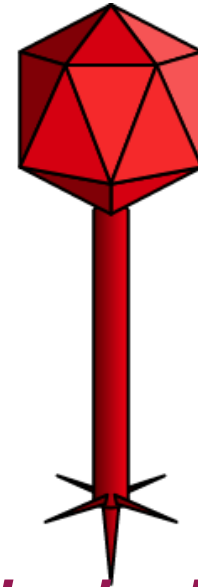
從結核病患者分離出結合酯阿
拉伯甘露聚糖的B細胞
(與J. Achkar, Albert Einstein醫
學院合作)

其他非蛋白質的抗體
(例如:適體)
(他人現有的成果並不樂觀)

分枝桿菌噬菌體的蛋白質
(與G. Hatfull,
Pittsburgh大學合作)

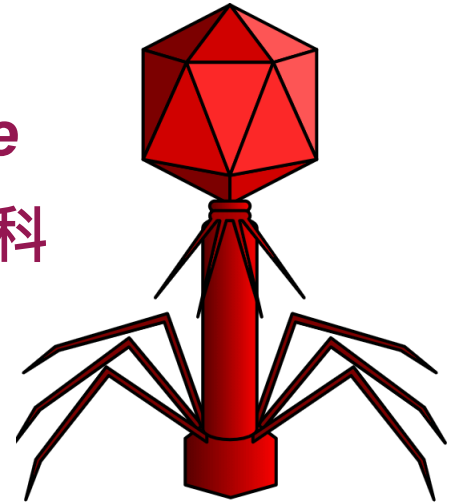
分枝桿菌噬菌體

- ★ 感染分枝桿菌的病毒
- ★ 廣泛存在於土壤和水中
- ★ 對人類無害，但可以殺死特定的細菌。
- ★ 目前已記錄了 12,000 種分枝桿菌噬菌體 (phagesdb.org)。
 - 沒有人從台灣本土環境中分離出分枝桿菌噬菌體
- ★ 已有約 2000 種噬菌體完成基因定序。
- ★ 分枝桿菌噬菌體已被用於治療分枝桿菌疾病



Siphoviridae

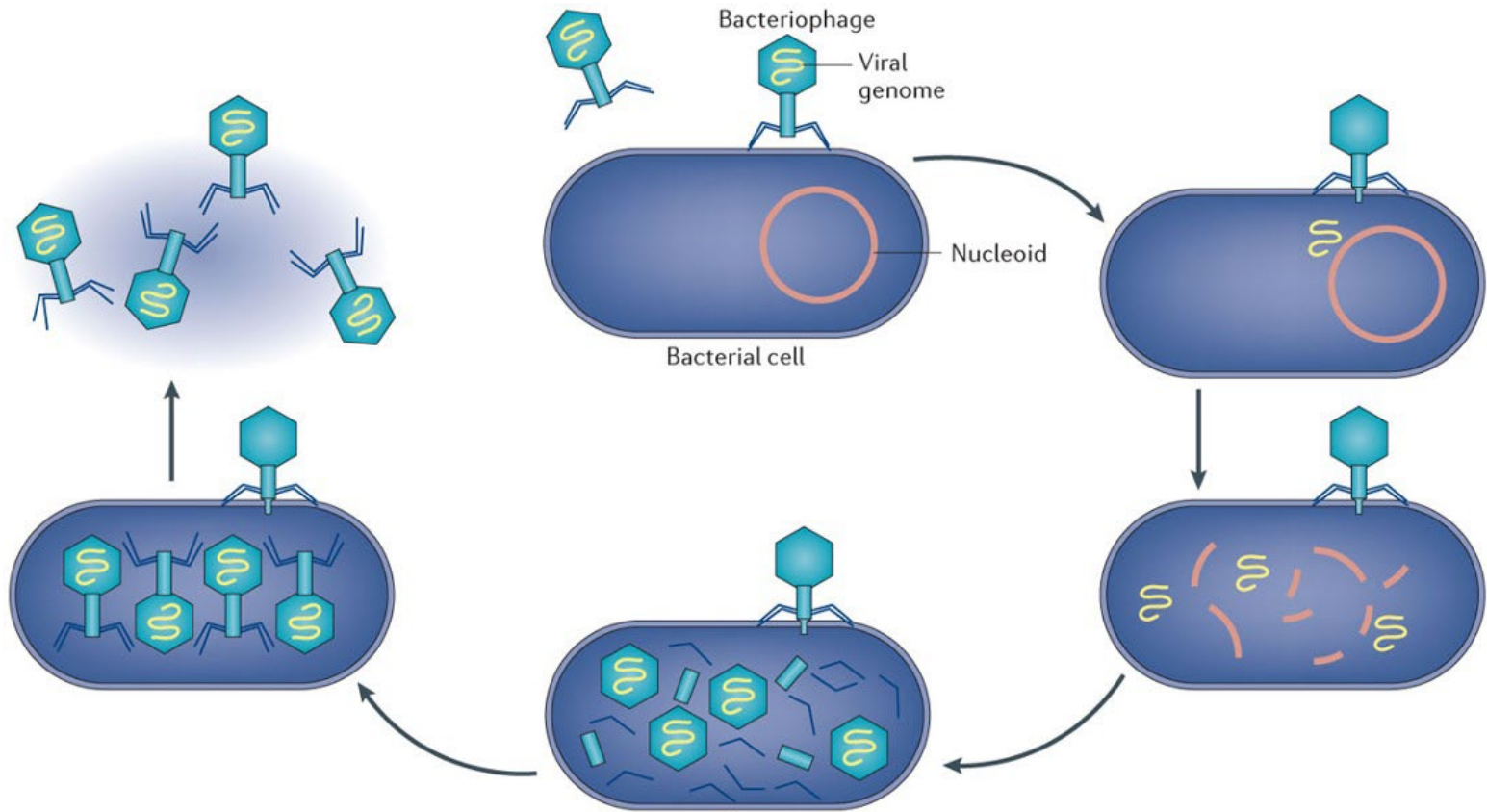
長尾噬菌體科



Myoviridae 肌尾噬菌體科

什麼是（分枝桿菌）噬菌體療法？

抗生素的替代品：噬菌體不是藥物，但可以殺死細菌。

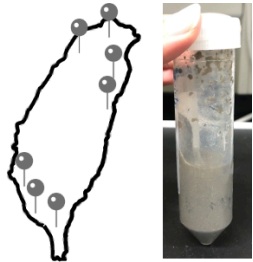


我們能在台灣找到有用的噬菌體嗎？

分枝桿菌噬菌體鑑定 - 1

土壤樣品採集

Soil sample collection

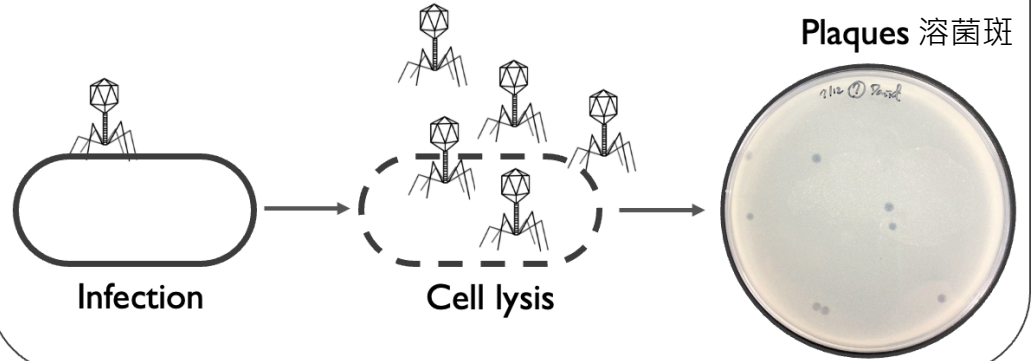


Soil samples from Taiwan

- Moist topsoil
- Compost

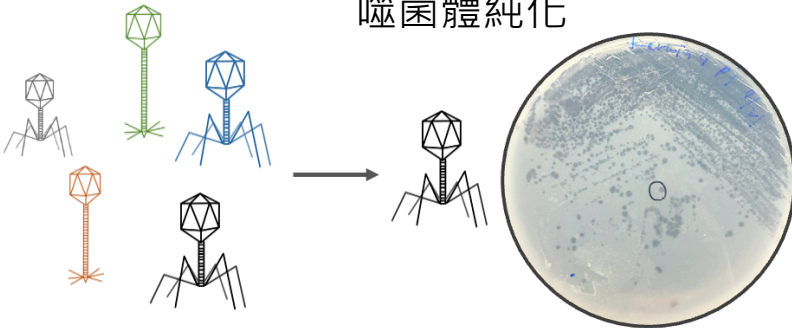
土壤樣品分離

Soil sample isolation



Phage purification

噬菌體純化

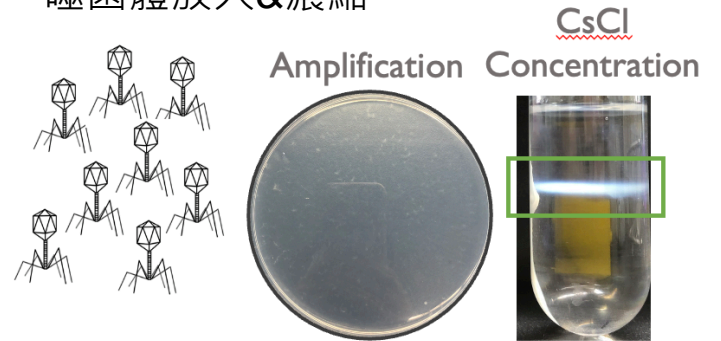


Confirm phages are from the same plaque.

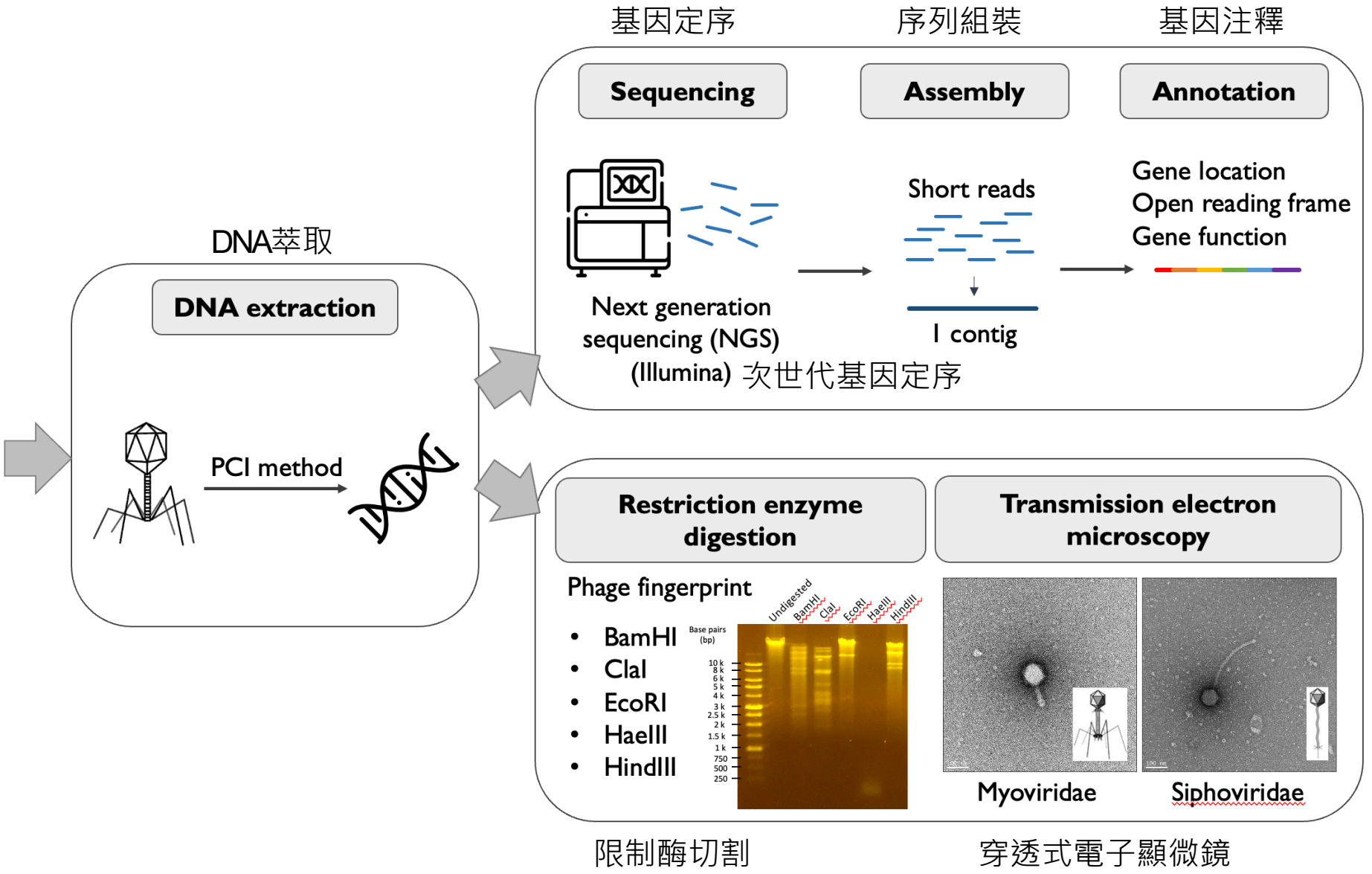
確保噬菌體來自單一的溶菌斑

Phage amplification & concentration

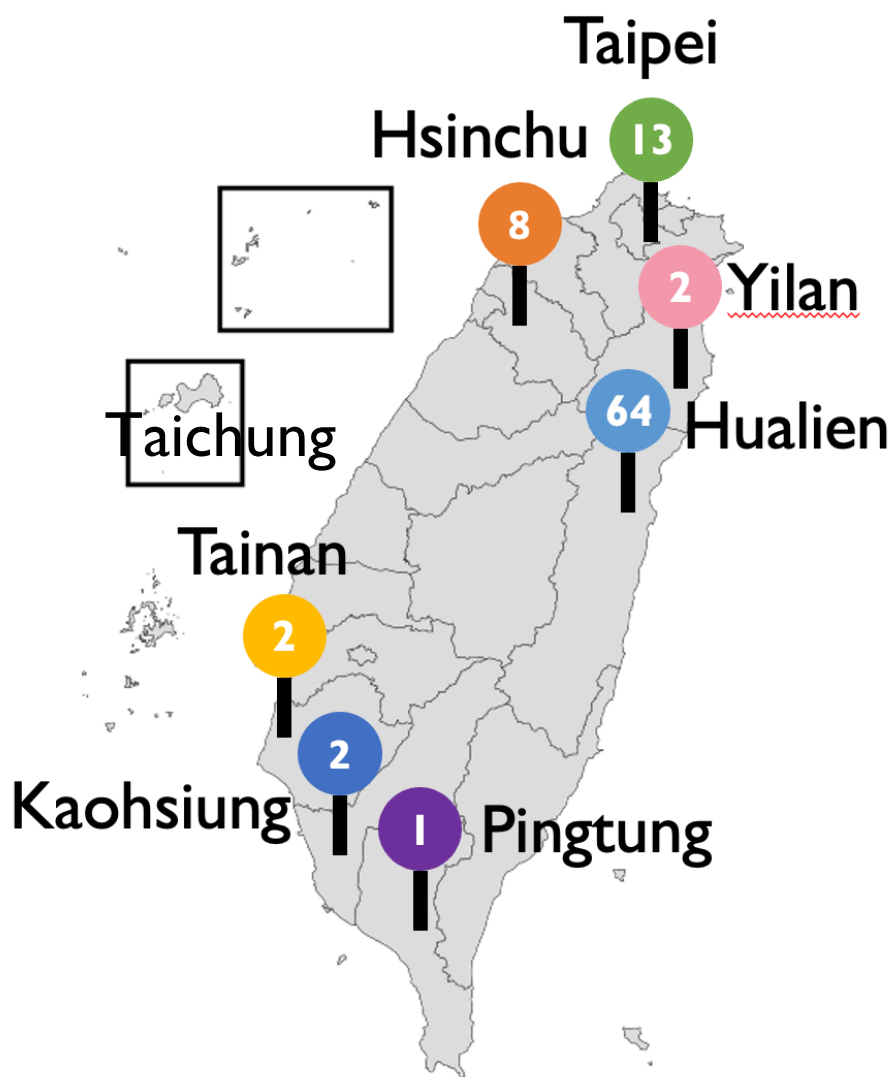
噬菌體放大&濃縮



分枝桿菌噬菌體鑑定 - 2



迄今為止鑑定的噬菌體

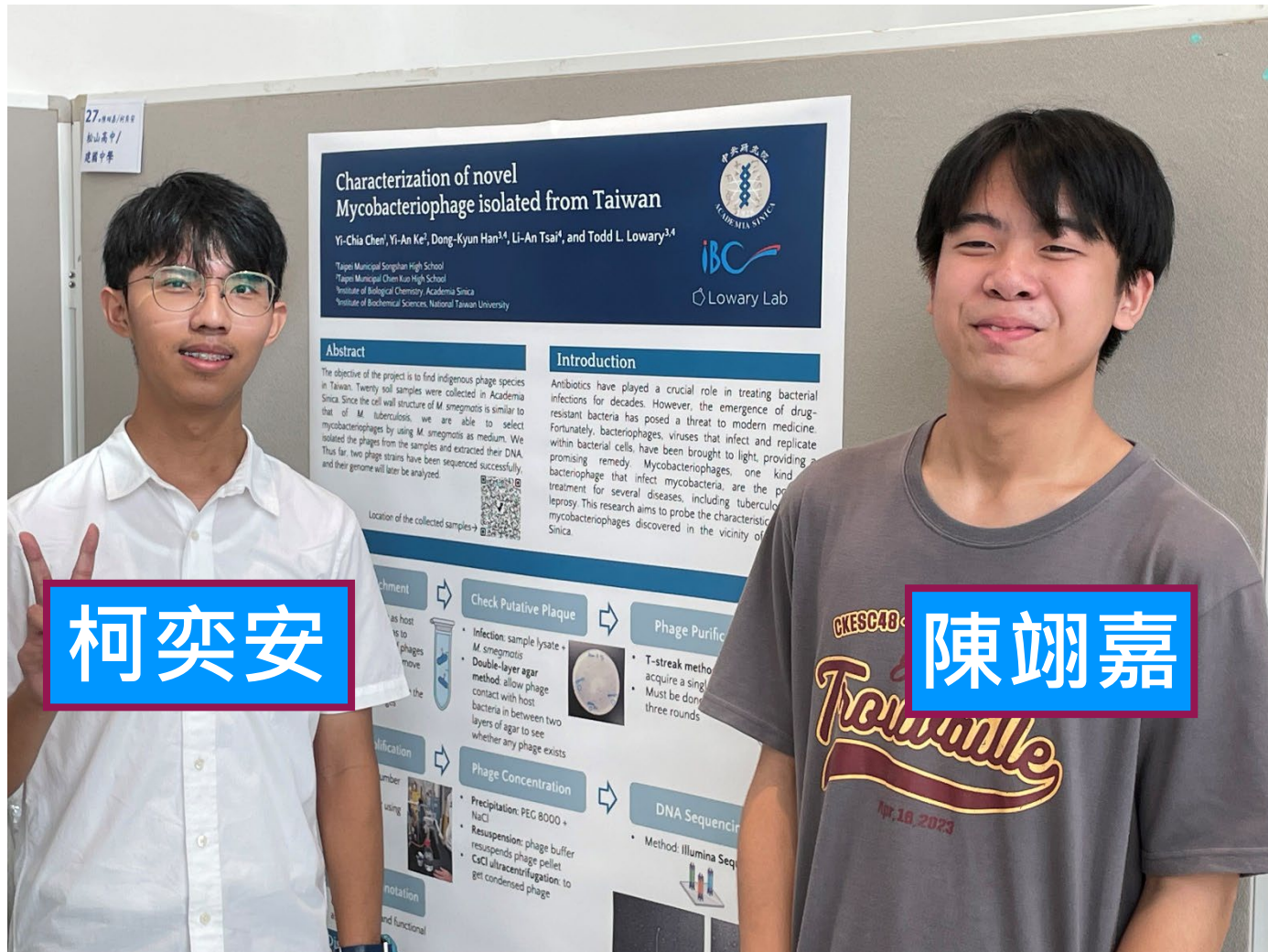


含有噬菌體檢體/總共採集檢體數

- 台北: 13/82
- 新竹: 8/18
- 台中: 0/4
- 台南: 2/4
- 高雄: 2/7
- 屏東: 1/4
- 宜蘭: 2/11
- 花蓮: 64/443

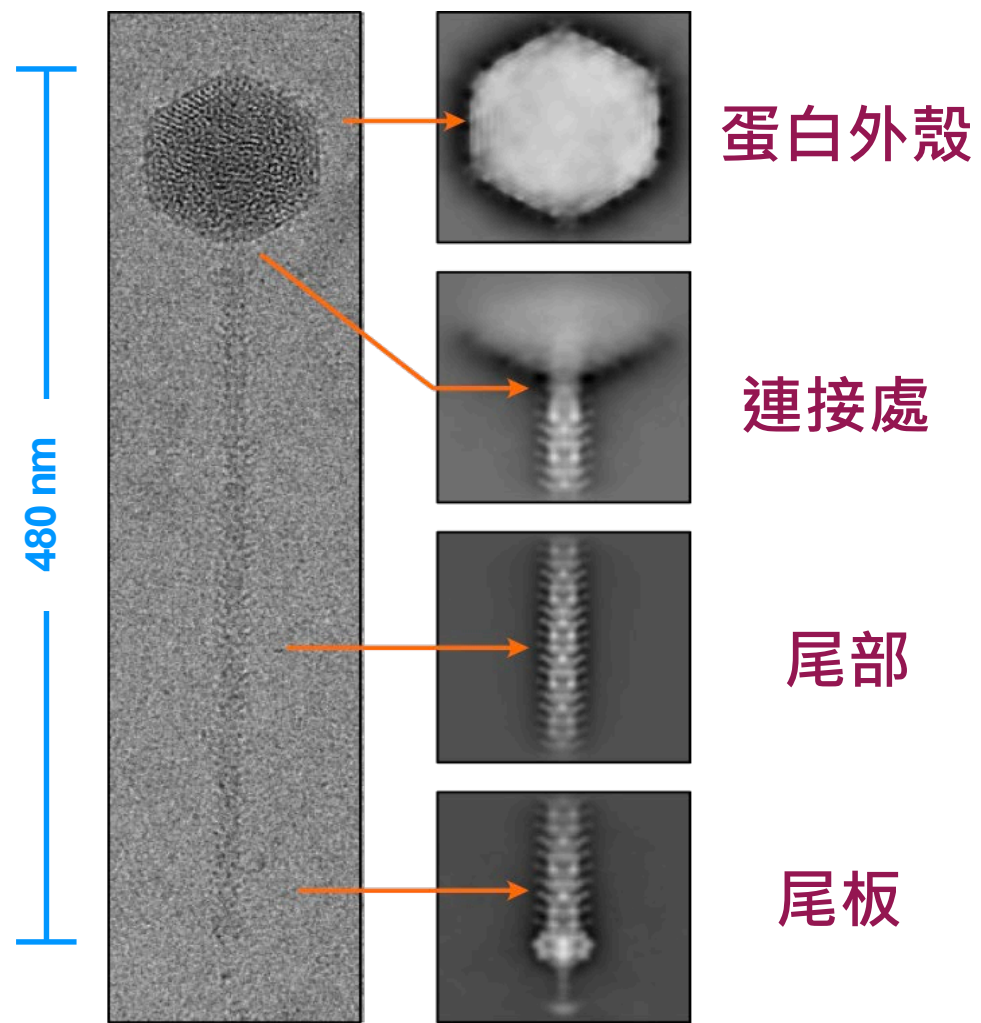
$$92/573 = 16.1\%$$

中研院高中生命科學研究人才培育計畫的學生



今天海報展示在四樓

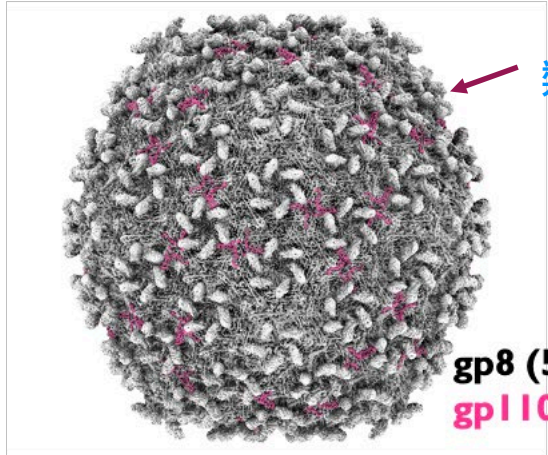
冷凍電顯 噬菌體 Douge (豆格) – 新竹



整個噬菌體只由
12個蛋質所組成

冷凍電顯 噬菌體 Douge (豆格) – 新竹

蛋白外殼 – 解析度 3.22Å



類免疫球蛋白區塊

gp8 (540mer)
gp110 (120 mer)

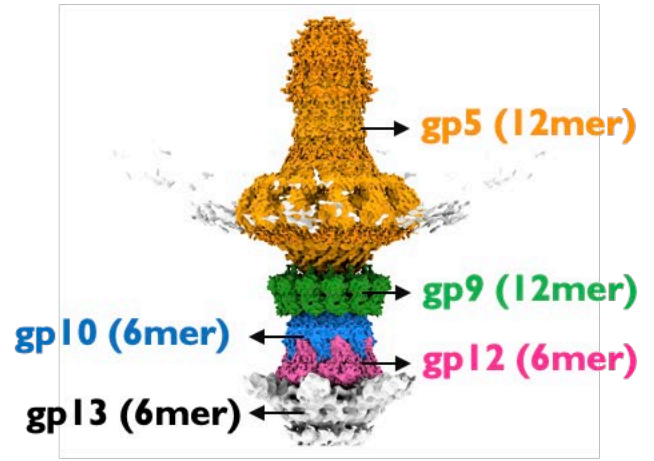
尾部 – 解析度 ~2.2 Å



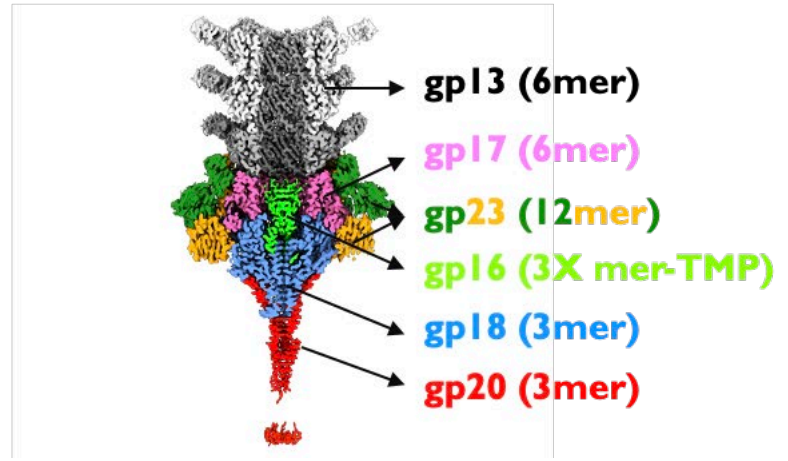
類免疫球蛋白區塊

gp13 (6X mer)

連接處 – 解析度 ~3.5 Å



尾板 – 解析度 ~3.0 Å



總結

- ★ 結核病是全球嚴重的健康問題。
- ★ 我們需要更好的結核病疫苗和診斷方法。
- ★ 抗生素可用於治療結核病，但需要較長的藥物治療期。
- ★ 結核病治療中的抗藥性問題。
- ★ 噬菌體療法是治療結核病和其他分枝桿菌疾病的抗生素替代方案。
- ★ 中央研究院的研究人員正試圖解決這些問題。

問題嗎？