

培養細胞を用いたナチュラルキラー細胞の 抗大腸癌モデルの作製

Demonstration of anticancer activity of natural killer cells against colon cancer cells
in the culture system.

吉浦健太

Kenta YOSHIURA

1. はじめに

癌の予防法に対するアプローチとして、生体の免疫力を活用することは大きな可能性を持つ方法である。健全な生体においても、種々の環境要因および内在的要因により日夜体内で発生する酸化ストレスなどにより、遺伝子が傷害され、異常な細胞の出現は避けられないとされる¹⁾。しかし体内を監視するナチュラルキラー(NK)細胞をはじめとする免疫系が異常細胞を捉えて殺傷することにより、臨床的な癌の発症を抑えていると考えられている²⁾³⁾。さらに今日では、NK細胞の活性を上げることが抗癌戦略として重要であるとの認識から、NK細胞機能を上昇させる食品成分や薬剤の探索が重要な研究課題となっている^{4)~6)}。一方、生体の免疫システムの理解は近年急速に発展しており、家政学系をはじめ多くの学生にとっては難解である。そのなかにあって癌免疫の分野は興味を刺激される学生が多く、学生実験等にふさわしい題材であるが、実験手技が煩雑であり材料入手が容易でないことなどで敷居が高いのが実情である。以上の理由から、一般研究室でも容易にまた安全に施行できる適切な実験系が望まれる。そこで、この研究においては、臨床的に重

要な固形癌の一つである大腸癌を対象とし、NK細胞が癌細胞を攻撃する様子を顕微鏡下でリアルタイムに観察するとともに、定量的な癌細胞殺傷効果およびサイトカインの測定やRT-PCRによる遺伝子発現を含むNK細胞機能の測定を含めた *in vitro* モデルを作成した。

2. 材料と方法

細胞株および培養法

NK細胞として KHYG-1 (独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク)、および大腸癌細胞 DLD-1 (東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター) を用いた。基本培養液は、RPMI-1640 (シグマ) に、10% 牛胎児血清 (FBS)、ペニシリン (100U/ml) / ストレプトマイシン (100 μ g/ml) (ライフテクノロジー) を添加したものとした。細胞は、5% 二酸化炭素含有 37°C 恒温槽で培養した。

培養細胞の顕微鏡観察および経時的撮影

DLD-1 細胞を基本培養液に懸濁し、96 穴プレートに、ウェルあたり 10^4 個を播種し、一夜培養し、プレート底面に付着させた。KHYG-1 細胞は、基本培養液に 50ng/mL ヒトリコンピ

表 1 各遺伝子のプライマー塩基配列および PCR 産物長

遺伝子 (産物長)	位置	塩基配列
GAPDH (238 bp)	左	GAGTC AACGG ATTTG GTCGT
	右	TTGAT TTTGG AGGGA TCTCG
グランザイム B (167 bp)	左	GGAGG CCCTC TTGTG TGTA
	右	ATTAC AGCGG GGGCT TAGTT
パーフォリン (223 bp)	左	CTATA CGGGA TTCCA GCTCC A
	右	CGCAG GAACC TTTGT GTGTC

(bp: 塩基対)

ナントインターロイキン (hrIL) - 2 (ORF Genetics) を添加したもので培養し、DLD-1 細胞が付着したプレートに、ウェルあたり 10^4 個を加えた。位相差顕微鏡により、KHYG-1 細胞が DLD-1 細胞を攻撃する様子を観察し継続的に撮影した。

乳酸脱水素酵素 (LDH) 測定

前項と同様に、DLD-1 細胞 (ウェルあたり 10^4 個) を 96 穴プレートで培養後、同数の KHYG-1 細胞を添加し、その後、継続的に培養上清を採取し、培養上清中の LDH の活性を、細胞傷害性検出キット plus LDH (ロシュアプライドサイエンス) で測定した。具体的には、キット中の試薬が培養上清中の LDH により還元されて生じたホルマザンの吸光度 (492nm) をマイクロプレートリーダー (クロメート-4; マイクロテック) で測定した。

生存細胞数の検定

前項と同様に、96 穴プレートに、DLD-1 細胞をウェルあたり 10^4 個培養した後、種々の細胞数の KHYG-1 細胞を加え、24 時間培養した。その後、ウェルをリン酸塩緩衝液 (PBS) で洗浄し、プレートの底面に付着した生存細胞数を、Cell Counting Kit-8 (CCK-8; 同仁化学研究所) で測定した。具体的には、洗浄後のウェルに、キット中の WST-8 試薬を加え 2 時間培養し、生細胞が産生する NADH の還元活性により生

じたホルマザンの吸光度 (450nm) を測定した。

培養液中の IFN- γ 測定

24 穴プレートに、DLD-1 細胞を 3.5×10^4 個培養し付着させた後、同数の KHYG-1 細胞 (10^5 個/ml) を加え、6 時間培養後、上清を採取し、ELISA キット (Human IFN gamma ELISA Ready-SET-Go!; アフィメトリクス・ジャパン) で IFN- γ を測定した。具体的には、キット中のキャプチャー抗体を結合したプレートに検体を入れ 4°C で一夜インキュベートした。補足された IFN- γ に、HRP 二次抗体を結合させた後 TMB 基質を加え 2 M 硫酸で反応を停止し、発色の吸光度 (450nm) を測定した。吸光度は、キットに付属する標品で作成した検量線 ($4 \sim 500$ pg/ml) により濃度に換算した。

RT-PCR による遺伝子発現解析

グランザイム B、パーフォリン、対照としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子について RT-PCR を施行した。プライマーは、遺伝子配列データベース (GenBank, The National Center for Biotechnology Information; NCBI) をもとに、オンラインフリーソフトの Primer3Plus⁷⁾、および Primer-BLAST (NCBI) を利用して設計した。配列および PCR 産物長を、表 1 に示した。

DLD-1 細胞 (10^6 個) を 10cm ディッシュに一夜培養し接着させた上に、KHYG-1 細胞 (10^6 個)

を加え、6時間培養後、KHYG-1細胞を回収した。細胞のRNAは、簡易RNA抽出キットRT-PCR用(カネカ)で抽出し、RT-PCRは、PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2(タカラバイオ)の試薬およびプロトコルで施行した。PCR反応は、94℃:30秒、60℃:30秒、72℃:30秒を30サイクルとした。サーマルサイクラーは、PCRくん(北海道システムサイエンス)を用いた。PCR後、反応液に、Midori Green Direct(日本ジェネティクス)を加え、2%アガロースゲルに電気泳動し、青色LED(470nm)を照射し撮影した。

3. 結果

KHYG-1細胞によるDLD-1細胞攻撃の様態

培養プレート底面に付着させたDLD-1細胞に、KHYG-1細胞を加え、位相差顕微鏡で観察した。図1上段時系列写真に示すように、KHYG-1細胞は突起を出したり、細胞形態を変えながら活発に遊走し、DLD-1細胞に接近、接触し、その後数分でDLD-1細胞の細胞膜を穿孔した。その時、図1下段拡大写真に示すように、穿孔した細胞からの細胞内液の流出が確認された。

KHYG-1細胞によるDLD-1細胞傷害性の経時的定量評価

細胞膜穿孔により細胞内液が流出する結果、細胞内液に含まれるLDHが細胞外に逸脱すると思われるため、培養液中のLDH活性を経時的に測定した。図2に示すように、3時間以後、LDH活性の上昇すなわち細胞膜の傷害が始まっていることが明らかとなった。

KHYG-1細胞数とDLD-1細胞生存数の関係

KHYG-1細胞に攻撃されたDLD-1細胞の24時間後の残存生存数を、CCK-8キットで評価した。図3に示すように、攻撃されるDLD-1細胞(Target)に対し、加えたKHYG-1細胞

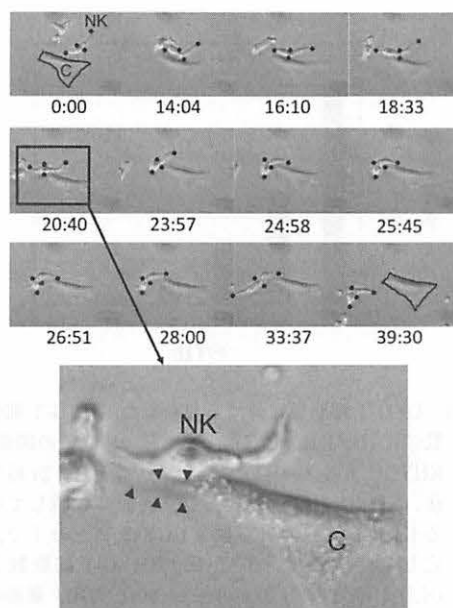


図1 NK細胞が大腸癌細胞を攻撃する様子を捉えた位相差顕微鏡写真。上段は時系列写真。数字は1枚目の時点からの経過時間(分:秒)を示す。NK細胞が形を変えながら癌細胞に向かって遊走し、接着した後、癌細胞の細胞膜を穿孔し、その後、離れて行く。1、12番目の写真、実線は癌細胞の輪郭を示す。各写真、4個の点は注目しているNK細胞の輪郭を示す。下段は上段20分40秒経過時の枠部分拡大。矢頭は癌細胞から流出する細胞質を示す。NK: NK細胞, C: 大腸癌細胞。400倍。

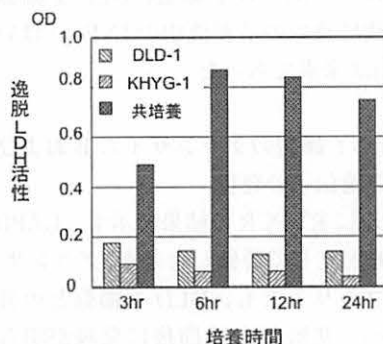


図2 培地中のLDH活性値の推移。KHYG-1細胞、DLD-1細胞、およびそれぞれ2種の共培養時の、各培養時間における培地中のLDH活性を示す。共培養により培養液中のLDH活性は増加し、6時間経過以降高値を持続する。横軸は、培養時間。縦軸はLDH活性(吸光度OD)。

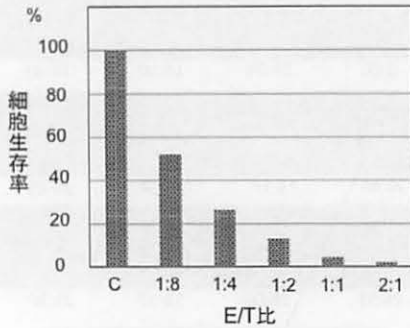


図 3 DLD-1 細胞数に対する負荷した KHYG-1 細胞数の比 (E/T 比) と、DLD-1 細胞の生存数の関係。KHYG-1 細胞と DLD-1 細胞を共培養し、24 時間後、KHYG-1 細胞を除去し、底面に付着している DLD-1 細胞の生存数を CCK-8 アッセイで測定した。横軸は、E/T 比 : KHYG-1 細胞数と DLD-1 細胞数 (effector / target) の比、縦軸は対照 (KHYG-1 細胞を加えない) に対する生存細胞数の比 (%)。C : 対照。

(Effector) が多いほど、すなわち、E/T 比が大きいかほど、残存生存細胞数は減少した。

KHYG-1 細胞培養液中の INF- γ の増加

KHYG-1 細胞と DLD-1 細胞を 6 時間共培養した後の培養液中に、92pg/ml の INF- γ が定量された。KHYG-1 細胞、DLD-1 細胞それぞれ単独培養での培養液中の INF- γ はいずれも 4pg/ml 未満であった。

KHYG-1 細胞のグランザイム B およびパーフォリン遺伝子の発現

図 5 に RT-PCR の結果を示す。GAPDH の発現を対照として評価したとき、グランザイム B、パーフォリンとも、DLD-1 細胞との共培養前に比べ、共培養 6 時間後に発現が明らかに増強した。特にパーフォリンは、共培養前はほとんど検出できなかったものが、共培養後、発現が明らかになった。

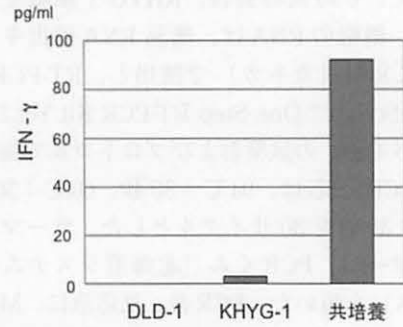


図 4 培養液中の INF- γ 値。DLD-1 細胞、KHYG-1 細胞、およびそれら 2 種の共培養時の、6 時間後の培養液中の INF- γ 値を示す。共培養により、培養液中の INF- γ が著明に増加した。

4. 考察

NK 細胞は、自然免疫系で機能するリンパ球のひとつで、腫瘍細胞やウイルス感染細胞を殺傷する能力を持つ。ヒトの細胞内では常に活性酸素が生成されており、遺伝子 DNA をはじめ種々の生体分子に傷害を与えている。このような活性酸素をはじめ、種々の環境因子が DNA の変異を惹起するため、癌細胞が体内に出現することは不可避とされる。しかし NK 細胞が監視し、体内に生まれた異常細胞を早期に排除するため、臨床的な癌の発症が抑制されていると考えられている。最近では、NK 細胞の癌細胞殺傷効果を、癌治療に応用する試みも行われているが、現状では確立された治療法とは言い難い⁸⁾。

従来、ヒト NK 細胞を研究する時は、ヒト末梢血から NK 細胞を採取するが、実験のたびに数十 ml の採血を行うのは、供血者の負担が大きい。そこで、もし NK 細胞の性質を持つ細胞株があれば、研究室で無限に増やすことが可能なため、非常に有用である。KHYG-1 細胞は、ナチュラルキラー細胞が腫瘍化した白血病患者から得られた細胞株で、ナチュラルキラー細胞の形質を保持しているとされる⁹⁾。また、KHYG-1 細胞は、K562 細胞や白血病細胞に対

する殺傷性を示し、NK細胞のモデルとして有用であることも示されている¹⁰⁾。

従来NK細胞の活性を評価する研究においては、NK細胞に対する感受性が高いことが知られる白血病由来のK562細胞を標的細胞とすることが多い。今回の研究では、NK細胞の標的として日本で癌部位別の死因で上位（男性では肺癌、胃癌に次いで3位、女性では1位、男女あわせて3位；2012年厚生労働省人口動態統計）を占める大腸癌を選択した。大腸癌細胞株DLD-1は、結果で示すようにKHYG-1細胞に感受性が高く、好適なモデルを作成することができた。

また、経時的な顕微鏡撮影を行うに際し、標的細胞が培養プレートの底面に付着している必要があり、DLD-1細胞は有用であった。図1に示すように、NK細胞の活発な形態変化、遊走能、さらに癌細胞膜の穿孔を観察できることは、学生実験等にふさわしい。

細胞膜穿孔による細胞内液の流出は、細胞内酵素の逸脱をきたすが、今回の実験で培養液中のLDH活性の経時的な上昇が確認された。従来、細胞傷害定量実験は、放射性同位元素のクロム51をあらかじめ細胞に取り込ませ、細胞が傷害されて細胞外に逸脱したクロム51の放射能を計測する方法が主流であるが、放射性同位元素の取り扱いが厳重な管理が可能な施設に限られるなど制約が多い。今回は、細胞に内在するLDHの測定により細胞傷害実験が可能であることが確認された。

傷害された癌細胞は死滅し生存細胞数が減少するが、今回の実験で、その定量をCCK-8キットで施行できることが示された。標的細胞として付着性のDLD-1細胞を使ったのは、NK細胞との共培養後も、生存癌細胞が培養プレートの底面に強く付着していることに着目したためである。共培養24時間後、培養液を取り除き、プレート底面を軽くピペッティングし、付着したKHYG-1細胞を取り除き、生存DLD-1細胞のみを残し、その数をCCK-8キットで測定し

た。図3では、初期のDLD-1細胞数に対する加えたKHYG-1細胞数の比（Effector/Target; E/T比）と生存DLD-1細胞の関係を示したが、E/T比1:8で生存付着細胞数が半減している。生存していても付着能が低下した癌細胞も取り除かれて過大評価される可能性があるものの、細胞傷害の指標として利用できると思われる。

NK細胞機能のひとつにサイトカインの1つインターフェロン-ガンマ（ $INF-\gamma$ ）の産生、分泌が知られているため、その定量をELISA法で行った。KHYG-1細胞とDLD-1細胞のそれぞれ単独での培養および共培養をおこない6時間後の培地中の $INF-\gamma$ を、図4に示した。KHYG-1細胞単独では $INF-\gamma$ の分泌はわずかであり、DLD-1細胞との共培養による刺激で $INF-\gamma$ が多量に産生分泌されたと考えられる。

図1に、KHYG-1細胞がDLD-1細胞の細胞膜を穿孔することが示されたが、NK細胞が癌細胞を攻撃する際、パーフォリンとグランザイムBを産生し、前者が細胞膜を穿孔し、後者

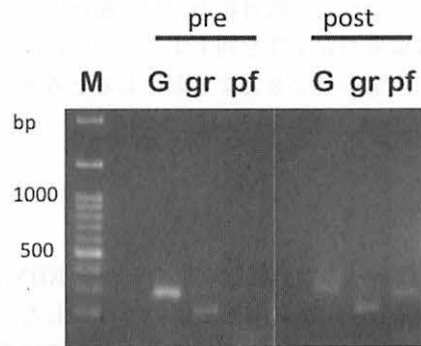


図5 KHYG-1細胞のグランザイムB、パーフォリン遺伝子発現。RT-PCR法により増幅したDNA断片のアガロースゲル電気泳動像。共培養前のKHYG-1細胞では、グランザイムBの発現量は対照のGAPDHより低く、パーフォリンの発現は検出できない。DLD-1細胞との共培養6時間後では、グランザイムB、パーフォリンともGAPDHに匹敵する発現を認める。M：分子量マーカー、G：GAPDH、gr：グランザイムB、pf：パーフォリン、pre：共培養前、post：共培養6時後、bp：塩基対数。

を癌細胞内に注入して癌細胞にアポトーシスを引き起こすことが知られている^{11) 12)}。そこで、この 2 つの遺伝子の発現を RT-PCR により検討した。共培養前の KHYG-1 細胞および、DLD-1 細胞との共培養 6 時間後に回収した KHYG-1 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。対照となるハウスキーピング遺伝子の GAPDH と比較した場合、パーフォリン、グランザイム B とともに共培養により発現が増加した。特にパーフォリンは、共培養前は発現がほとんど検出できなかった。前項の INF- γ と同様に、パーフォリンやグランザイム B は、DLD-1 細胞との共培養が刺激となり発現が増強することが示された。なお、PCR 産物の電気泳動後の可視化に際し、従来より、臭化エチジウムを DNA にインターカレーションさせ、紫外線で励起し発生する蛍光を観察する方法が一般的であるが、臭化エチジウムは強い変異原性が知られている。今回は、安全性の高い DNA 蛍光染色試薬を用い、青色 LED で励起し蛍光を発生させる方法を採用し、その実用性が確認された。臭化エチジウムや紫外線の使用を避けること等で実験環境の安全性を向上することは、学生実験を企画する上で重要な要素であると考えられる。

5. 結び

NK 細胞の大腸癌細胞攻撃モデルを KHYG-1 細胞および DLD-1 細胞を用いて作成した。このモデルにおいて、細胞膜穿孔の瞬間の顕微鏡写真撮影、LDH 逸脱法による細胞傷害試験、WST-8 試薬による細胞生存試験、ELISA 法による培養液中の INF- γ 定量、RT-PCR によるグランザイム B、パーフォリン遺伝子の発現実験が従来法に比べ安全かつ容易に実施され、明瞭な結果が示された。この実験系は、食品成分の NK 細胞機能に与える効果の評価をはじめと

する NK 細胞の抗癌活性の検討に関わる実験に広く活用されるものと思われる。

文献

- 1) D. Hanahan and R. A. Weinberg: *Cell*, 144, 646 (2011)
- 2) A. Moretta, E. Marcenaro, S. Parolini, G. Ferlazzo and L. Moretta: *Cell Death Differ.*, 15, 226 (2008)
- 3) M. A. Caligiuri: *Blood*, 112, 3 (2008)
- 4) Y. T. Bryceson, M. E. March, H. G. Ljunggren, E. O. Long, H. A. Young and J. Ortaldo: *Immunol. Rev.*, 214, 73 (2006)
- 5) V. Rizzello, I. Bonaccorsi, M. L. Dongarra, L. N. Fink and G. Ferlazzo: *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, 473097 (2011)
- 6) J. Wei, S. Bhatt, L. M. Chang, H. A. Sampson and M. Masilamani: *PLoS One*, 7, e47979 (2012)
- 7) S. Rozen and H. J. Skaletsky: "Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology" Humana Press, Totowa, N.J., 2000, p.365-386.
- 8) E. M. Levy, M. P. Roberti and J. Mordoh: *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, 676198 (2011)
- 9) M. Yagita, C. L. M, Huang, H. Umehara, Y. Matsuo, R. Tabata, M. Miyake, Y. Konaka and K. Takatsuki: *Leukemia*, 14, 922 (2000)
- 10) G. Suck, D. R. Branch, M.J. Smyth, R.G. Miller, J. Vergidis, S. Fahim and A. Keating: *Exp. Hematol.*, 33, 1160 (2005)
- 11) M. F. van den Broek and H. Hengartner: *Exp. Physiol.*, 85, 681 (2000)
- 12) S. P. Cullen, M. Brunet and S. J. Martin: *Cell Death Differ.*, 17, 616 (2010)