

# 膵癌および大腸癌に対する NK 細胞効果のインビトロ研究

*In-vitro* study for NK activity against pancreatic and colon cancer.

鳥居奈央 吉浦健太

Nao TORII and Kenta YOSHIURA

## 1. はじめに

リンパ球の 1 種であるナチュラルキラー (NK) 細胞は、自然免疫系における主要なエフェクター細胞であり、その標的は感染した外来病原体に限らず、自身の体内に発生した癌細胞に対しても攻撃することができる。癌細胞は、健全なヒトにおいても常に生じていて、NK 細胞が監視し、異常細胞が増える前に殺傷している。このように癌の発生、進展に重要な役割を果たしていることから、この NK 細胞の能力をさらに発揮させる方法が、癌の予防および治療の有効な対策になることが期待される。われわれは、これまで、大腸癌細胞株 DLD-1 と、NK 細胞株 KHYG-1 を用い、NK 細胞が大腸癌細胞を攻撃することを顕微鏡下に確認し、定量的評価ができるモデルを作製し報告した<sup>1)2)</sup>。2014 年の日本人の癌の部位別の死亡数は、肺癌、大腸癌、胃癌、膵臓癌、肝癌の順であり、これら主要な癌の 5 年相対生存率は大腸癌、胃癌は 70% 程度、肺癌、肝癌は 30% 程度であるが、膵癌は 8% と極端に低い。膵癌の 5 年相対生存率の低さは、発見が困難なため発見された時はすでに進行していること、比較的早く発見できて手術をしても再発が多いこと、手

術以外の治療手段である従来の抗癌剤や放射線が効きにくいことが原因とされる。癌に対する化学療法は、分子標的薬の登場により大きく進歩したが、膵癌では、現在エルロチニブが使用可能になったにすぎず、いまだに膵癌の治療は困難であり、新しい治療法が求められている。そこで、本研究では、膵癌細胞株を用いて、NK 細胞による抗癌モデルを作製し、アポトーシスに関連する検討等をおこなった。

## 2. 材料と方法

### 細胞株および培養法

NK 細胞株は KHYG-1 (独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク)、標的となる癌細胞株は大腸癌細胞 DLD-1 および膵癌細胞株 SUIT-2 (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 μg/ml) (ライフテクノロジー) を添加したものとした。KHYG-1 細胞の培養には、基本培養液に 50ng/mL ヒトリコンビンタンターロイキン 2 (hrIL-2 ; ORF Genetics) を添加した。培養細胞は、大気に二酸化炭素 (5%)

を加えた 37℃ 恒温槽で培養した。

#### 食品成分

黒酵母由来グルカン ( $\beta$ -1,3-1,6-グルカン) を東京化成工業より購入した。

#### 生存細胞数の評価

96 穴プレートに、DLD-1 細胞または SUI-2 細胞を播種し、24 時間培養した後、KHYG-1 細胞を加え、さらに 24 時間培養した。その後、ウェルをリン酸塩緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄し、プレートの底面に付着した生存癌細胞数を、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 試薬を含む培地を加え 3 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; 対照 630nm) を測定した。

#### アポトーシスの観察

NK 細胞に攻撃された SUI-2 細胞がアポトーシスを起こしていることを示すために、NucView 488 (Biotium, Inc. USA) を用いてカスパーゼ活性を可視化した。SUI-2 細胞をチャンバースライドに播種し 16 時間培養し定着させた後、KHYG 細胞を加え、8 時間後、および 24 時間後、培養液を除去し、NucView 488 溶液 (5  $\mu$ M) を加え室温で 30 分間インキュベートした。その後、チャンバーをはずし、カバーガラスをかぶせ、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 培養液中グランザイム B およびパーフォリン濃度の測定

24 穴プレートに、DLD-1 細胞または SUI-2 細胞を 10,000 個播種し、16 時間培養し付着させた後、同数の KHYG-1 細胞を加え、8、16、および 24 時間培養後、培養液を採取し、100G、5 分間遠心し上清を採取した。測定は ELISA キット (Human Granzyme B ELISA Kit、Human Perforin ELISA Kit; Diaclone, France)

を用いた。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上に検体とビオチン化抗 Granzyme B 抗体またはビオチン化抗 Perforin 抗体を入れ、室温で 3 時間インキュベートした。その後、3 回洗浄し、ストレプトアビジン-HRP を加え室温で 30 分間インキュベートした。3 回洗浄後、TMB 基質を加え 10 分間反応させた後 2M 硫酸で反応を停止し、発色した検液の吸光度 (450nm; 対照 630nm) を測定した。キットに付属する標品を用い検量線 ( $\sim 1000$  pg/ml) を作成し、吸光度を濃度に換算した。

#### 統計処理

2 群間の平均値の差は t 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 3. 結果

KHYG-1 細胞が SUI-2 細胞を死滅させるときの Effector/Target 比

96 ウェルの培養プレートに 5,000 個の SUI-2 細胞を播種し、24 時間培養し底面に定着させ、そこに KHYG-1 細胞を添加し、24 時間培養後の生存癌細胞を検討したところ、図 1 に示すように、加える KHYG-1 細胞を増やすほど、癌細胞の生存数は減少した。

#### SUI-2 細胞におけるアポトーシスの観察

SUI-2 細胞に KHYG 細胞を添加して 8 時間後および 24 時間後、NucView488 を作用させた。NucView488 は、蛍光物質を結合したカスパーゼ-3 基質であり、細胞内に浸透した後、細胞中のカスパーゼ-3 により切断され、切断された部分が核内に移行し DNA に結合し蛍光を発する。アポトーシスを起こしている細胞ではカスパーゼ-3 が誘導されているため、蛍光で標識される<sup>3)</sup>。共培養 8 時間後において、アポトーシス細胞の出現が確認された (図 2A、B)。24 時間後においては、核 DNA が分断さ

肺癌および大腸癌に対するNK細胞効果のインビトロ研究

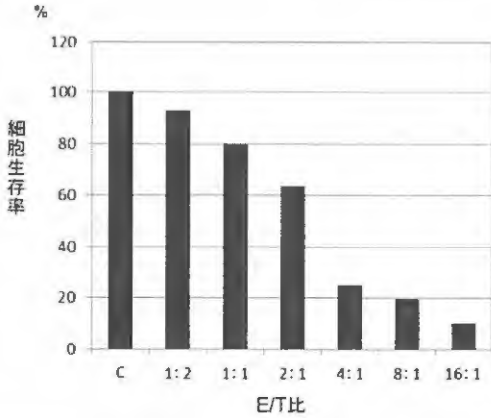


図1 培養中のSUIT-2細胞にKHYG-1細胞を加え共培養24時間後、培養プレート底面に付着生存しているSUIT-2細胞数を測定した。KHYG-1細胞を加えない場合を対照(C)100%とした。E/T比はKHYG細胞数とSUIT-2細胞数の比を示す。

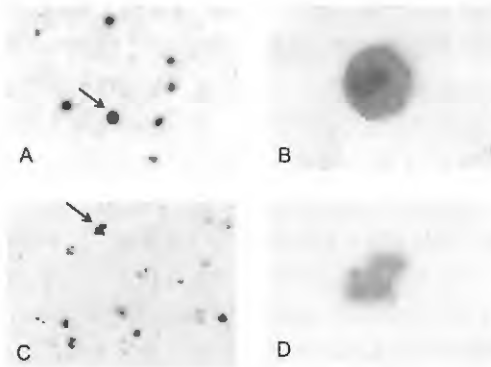


図2 培養中のSUIT-2細胞にKHYG細胞を加え共培養8時間後(A, B)または24時間後の、NucView処理後の蛍光顕微鏡写真。A, Cは400X。B, Dは、それぞれA, Cの中の矢印の細胞の拡大像。

れている像が確認された。これはアポトーシス後期をあらわす(図2C, D)。

グランザイムBおよびパーフォリン濃度測定

24穴プレートに、DLD-1細胞またはSUIT-2細胞を10,000個播種し16時間培養後、KYYG細胞を同数個加え、8、16および24時間後の

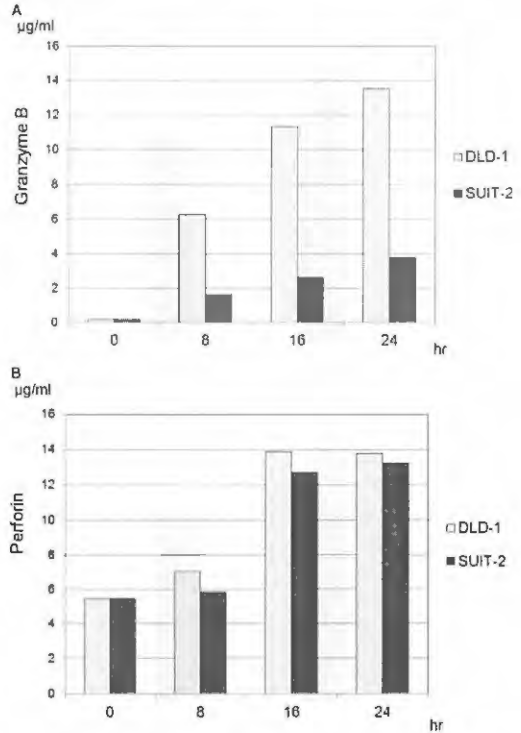


図3 A: DLD-1細胞とKHYG-1細胞の共培養、またはSUIT-2細胞とKHYG-1細胞の共培養後、各時間における培養上清中のグランザイムB濃度。B: DLD-1細胞とKHYG-1細胞の共培養、またはSUIT-2細胞とKHYG-1細胞の共培養後、各時間における培養上清中のパーフォリン濃度。

培養上清について各サイトカインをELISAで測定した。図3AはグランザイムBの各培養時間における上清中濃度を示す。KHYG-1単独ではほとんど分泌されていないが、DLD-1細胞との共培養により分泌され、上清中濃度の著明な上昇がみられた。一方、SUIT-2細胞との共培養においても、分泌が刺激されているが、DLD-1との共培養に比べて低い。図3Bは各培養時間における上清中のパーフォリン濃度を示す。パーフォリンは共培養前の培養上清で5.5µg/mlあり、DLD-1との共培養、SUIT-2との共培養いずれにおいても、8時間では大きな変化はなく、16時間、24時間の培養上清において濃度が2倍程度上昇している。

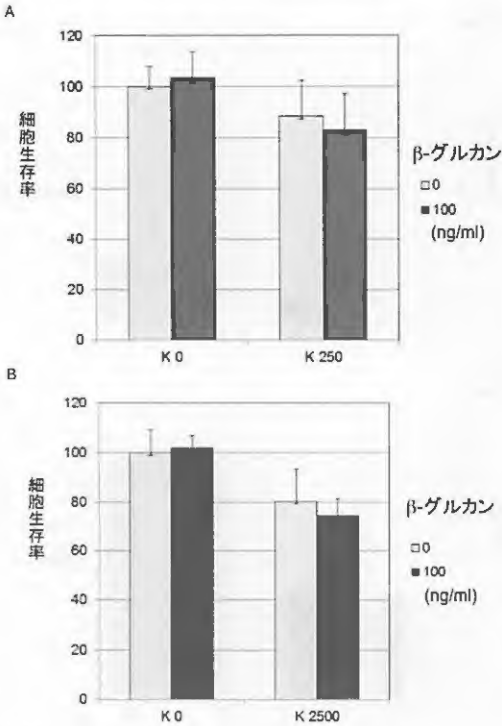


図 4 A:DLD-1 細胞(10,000 個)に KHYG-1 細胞(250 個)を共培養したときの、β-グルカンが DLD-1 細胞の生存率に与える影響。B:SUI-2 細胞(5,000 個)に KHYG-1 細胞(2,500 個)を共培養したときの、β-グルカンが SUI-2 細胞の生存率に与える影響。

β-グルカンの KHYG 細胞機能に対する影響

DLD-1 細胞または SUI-2 細胞と KHYG-1 細胞の共培養の各系において、β-グルカンを添加し、その影響を検討した。96 穴プレートに、DLD-1 細胞は 10,000 個播種し、KHYG 細胞は 250 個添加した。SUI-2 細胞は 5,000 個播種し、KHYG 細胞は 2,500 個添加した。各共培養系に、β-グルカン(100 ng/ml)を添加した。DLD-1 細胞(図 4A)、SUI-2 細胞(図 4B)とも、KHYG-1 と共培養したときの癌細胞の生存数が、β-グルカンの存在下で低下する傾向があるが、統計学的な有意差は認めなかった。

4. 考察

以前われわれは、大腸癌細胞株 DLD-1 細胞に対する NK 細胞株 KHYD-1 の抗癌モデルを作製し報告したが、本研究では、あらたに、悪性度が高く治療が困難な膵癌細胞株 SUI-2 を導入した。図 1 に示すように、癌細胞に対する NK 細胞の比(E/T 比)が 2:1 から 4:1 で、癌細胞は半減している。大腸癌 DLD-1 細胞では、既報で示したように、E/T 比 1:8 程度で癌細胞は半減したので、大腸癌 DLD-1 に比べ、膵癌 SUI-2 は、同数の癌細胞を死滅させるために 10 倍以上の NK 細胞が必要であることになり、膵癌細胞の NK 細胞に対する抵抗性を反映していると思われる。

本研究では、SUI-2 細胞が KHYG-1 細胞の攻撃によりアポトーシスを起こしていることを確認するため、カスパーゼ-3 活性の発現を蛍光観察した。図 2A に示すように KHYG-1 細胞添加後 8 時間で、カスパーゼ陽性の細胞が多数確認された。カスパーゼにより遊離した蛍光物質は核に移行し DNA に結合するため、DNA の形態が観察されるが、図 2B のように核全体に DNA が広がっている像は、アポトーシスの初期をあらわすと考えられる。一方、図 2C は、KHYG-1 細胞添加 24 時間後であるが、視野の中に粒状の蛍光が散在しているが、これらは核を含む細胞が分断したアポトーシス小体であり、またカスパーゼ陽性細胞の核が分断した像(図 2D)は、DNA の断片化を反映しており、アポトーシスが進行した状態と考えられる。

NK 細胞の攻撃により癌細胞にアポトーシスを起こしていることが観察されたので、NK 細胞が分泌するアポトーシス惹起物質であるグランザイム B とパーフォリンの分泌量を測定した。パーフォリンは、癌細胞膜に孔をあけ、そこからグランザイム B が細胞内に流入しアポトーシスを惹起する。結果に示したように、グランザイム B は、共培養前はほとんど分泌さ

れていないが、癌細胞との接触に反応して分泌されている。DLD-1細胞との共培養では、SUIT-2細胞との共培養に比べ、8、16、24時間とも濃度が4倍程度高い。パーフォリンは、共培養前にも分泌されているが、癌細胞との接触に反応して分泌が亢進している。ただし、DLD-1細胞との共培養とSUIT-2細胞との共培養の培養上清中の濃度に大きな差はない。このようにKHYG-1細胞のグランザイムBの分泌反応がDLD-1細胞には大きくSUIT-2細胞には小さいが、これが前述のSUIT-2細胞に対するE/T比がDLD-1細胞に対するときより大きいことに関連している可能性がある。また、NK細胞の活性化が膵癌では抑制されているとの議論がある。例えば、健常人のNK細胞やNK細胞株のグランザイムBやパーフォリン蛋白の発現が、単独培養あるいは正常膵管細胞のときに比べ、膵癌細胞株との共培養で低下したと報告されている<sup>4)</sup>。

NK細胞は、NK細胞上のNKG2Dが癌細胞上のNKG2DリガンドであるMICA/Bを認識することで攻撃するが、NK細胞の監視から逃れている癌細胞はMICA/Bを発現していない。最近、抗てんかん薬のバルプロ酸に、膵癌細胞のMICA/Bの発現を上げる作用がみつき、抗癌効果が期待される<sup>5)</sup>。

ほかにも膵癌が免疫系の攻撃から逃れるメカニズムがある。膵癌細胞はPD-1リガンド(PD1L)を発現し、PD1Lが細胞傷害性T細胞に発現するPD-1に結合しT細胞の活性化を抑制する<sup>6)</sup>。PD1Lは多くの癌に発現しており、PD1LとPD1の結合を阻止する目的で抗PD1モノクローナル抗体が開発され、分子標的薬ニボルマブとして、悪性黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌の治療に用いられて大きな効果を持っているが、膵癌では現在のところ認可されていない。

さらに本研究では、大腸癌と膵癌の両方の系で、 $\beta$ -グルカンが、KHYG細胞の機能に与える影響を検討した。 $\beta$ -グルカンは、グルコー

スが $\beta$ -グリコシド結合してできた多糖であり、きのこ類などに含まれる食物繊維である。古来より数々のきのこ類が薬用として用いられてきたが、その成分の一つが $\beta$ -グルカンである<sup>7)</sup>。今日では、 $\beta$ -グルカンの免疫活性化作用が知られ、癌の治療に有効であることが示され、シイタケ由来のレンチナンや、かわらたけ由来のクレスチンは、薬剤として認可されている。ただし単剤での抗癌効果は認められず、レンチナンは、再発胃癌、手術不能胃癌に対して、抗癌剤のテガフルとの併用で用いられる。また、クレスチンは、術後の胃癌、結腸癌、直腸癌における化学療法との併用、あるいは小細胞肺癌に対する化学療法等との併用で用いられる。また、末期患者への $\beta$ -グルカンの投与が、免疫活性を上げたという報告もある<sup>8)</sup>。今回の実験系では、黒酵母由来 $\beta$ -グルカン(100ng/ml)の明らかな効果は示されなかったが、条件を変えて実験を続ける必要がある。

## 5. 結び

本研究では、膵癌細胞株SUIT-2とNK細胞株KHYG-1の共培養系をあらたに作製し、大腸癌細胞株DLD-1とKHYG-1の共培養系と比較検討した。E/T比は、SUIT-2細胞の系がDLD-1細胞の系より10倍以上高く、SUIT-2細胞がDLD-1細胞に比べ、NK細胞の殺傷力に抵抗性があることが示された。アポトーシス関連物質の検討により、各共培養系におけるパーフォリンの分泌はほぼ同等であったが、グランザイムBの分泌がSUIT-2の共培養系において明らかに低値であり、NK抵抗性に関連している可能性が示唆された。今回作製した実験系は、いろいろな食品成分のNK細胞の効果に対する影響などの検討に有用と思われる。

## 文献

- 1) 吉浦健太：共立女子大学家政学部紀要，

- 109-114 (2015)
- 2) 吉浦健太：共立女子大学家政学部紀要，  
135-143 (2016)
- 3) H. Cen, F. Mao, I. Aronchik, R.J. Fuentes,  
and G.L. Firestone : *Faseb j*, 22, 2243-52  
(2008)
- 4) Y.P. Peng, J.J. Zhang, W.B. Liang, M. Tu,  
Z.P. Lu, J.S. Wei, K.R. Jiang, W.T. Gao, J.L.  
Wu, Z.K. Xu, Y. Miao, and Y. Zhu : *BMC  
Cancer*, 14, 738 (2014)
- 5) P. Shi, T. Yin, F. Zhou, P. Cui, S. Gou, and  
C. Wang : *BMC Cancer*, 14, 370 (2014)
- 6) A. Amedei, E. Niccolai, and D. Prisco :  
*Hum Vaccin Immunother*, 10, 3354-68  
(2014)
- 7) N.P. Money : *Fungal Biol*, 120, 449-53  
(2016)
- 8) J.G. Lee, Y.S. Kim, Y.J. Lee, H.Y. Ahn, M.  
Kim, M. Kim, M.J. Cho, Y. Cho, and J.H.  
Lee : *Nutrients*, 8, 336 (2016)