

ヒト分離 NK 細胞を用いた抗癌モデルの作製

Demonstration of anti-cancer effects of isolated human NK cells.

吉浦健太¹ 鳥居奈央¹

Kenta YOSHIURA and Nao TORII

1. はじめに

近年の高齢化社会において、脳血管疾患、虚血性心疾患、がんの三大疾病のうち、がんは罹患患者、死亡者数とも増加傾向にあり、最も脅威を与える存在である。前二者は、動脈硬化という共通の要因があるため、糖、脂質代謝や血圧などをターゲットとした対策が功を奏する。すなわち、運動、食生活を中心とした生活習慣の改善、および高血圧や糖尿病の早期発見と適切な治療が、動脈硬化性疾患の予防に極めて有効である。一方、がんは、疫学的に生活習慣の関与が大きいことは推測されるものの、根本的な遺伝子異常の発生メカニズムは未解明な点が多く、決定的な予防策は確立されていない。さらに治療に関しても発展途上にあり、治療期間が長期に及ぶことによる心身および経済的負担なども大きな問題となっている。

ヒトが生存する上で、遺伝子に障害をきたす種々のストレスは不可避であり、体内では常に癌細胞の発生は起きている。一方で、それに対し、細胞が持つ遺伝子修復機構や体内の免疫機構が働き、がんの発症を防いでいるとされる。その役目をもつもののひとつがリンパ球の1種であるナチュラルキラー（NK）細胞であり、体内に発生した癌細胞を攻撃し、その増殖を防いでいる。われわれはこの NK 細胞に注目し、これまで大腸および膀胱癌細胞株と NK 細胞株 KHYG-1 を使い、NK 細胞が癌細胞を攻撃する様子を顕微鏡下に観察し、定量的評価ができる

モデルを作成した^{1)~3)}。KHYG-1 細胞は NK 細胞機能を保持しており、癌細胞を攻撃するモデルとして有用であった。しかし、腫瘍由来の不死化細胞であるため、正常細胞とは細胞増殖、細胞死等に関する遺伝子になんらかの相違がある。よって、食品成分の効果を検定するにあたって結果の解釈に注意が必要である。そこで、本研究では、KHYG-1 細胞にかえて、健常ヒト血液から分離した NK 細胞を用いた抗癌モデルの作製を試みた。

2. 材料と方法

細胞培養および細胞株

大腸癌細胞株 DLD-1（東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター）は、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 RPMI-1640（シグマ）で培養した。分離ヒト NK 細胞の培養には、AlyS505NK-AC（細胞科学研究所）に 10%FBS、上記抗生物質、50ng/ml ヒトリコンビナントインターロイキン 2（hrIL-2；ORF Genetics）を添加したものを使用した。細胞は、二酸化炭素（5%）を加えた大気中、37℃で培養した。保存用の細胞は、バンバンカー（日本ジェネティクス）に懸濁し、-80℃で冷凍した。

ヒト NK 細胞の分離

健常者より血液 10ml を採取し、直ちに 0.5M EDTA 60μl を添加したうえ、RosetteSep for

1 家政学部食物栄養学科

human NK cells (Stemcell technologies, Canada) 500 μ l を加え静かに混和し、室温で20分間静置した。途中、数回静かに混和した。さらに、2%FBS加リン酸塩緩衝液 (PBS) を10ml 加え、静かに混和した。50ml 遠心チューブにリンパ球分離溶液 Lymphoprep (Alere Technologies, Norway) を15ml 入れ、その上に上記血液試料を静かに重層し、室温、1200 x g で20分間遠心した。遠心後、分離された希釈血清とリンパ球分離溶液の境界部に沈殿した細胞を回収し、2%FBS加PBS 10ml を加え混和し、室温、250 x g で10分間遠心した。上清を除去後、再度FBS加PBS 10ml を加え混和し、室温、250 x g で10分間遠心した。上清を除去後、NK 細胞培地に懸濁した。

細胞の計数

細胞の計数には、EVE Automatic cell counter (NanoEnTek, Korea)を使用した。細胞浮遊液10 μ l と trypan blue 色素液10 μ l を混合し、そのうち10 μ l を専用スライドに注入し、機器に挿入した。この機器により生細胞および死細胞数、細胞径の分布を計測した。

NK 細胞の観察および癌細胞のアポトーシスの観察

NK 細胞を癌細胞に加え共培養し2時間経過後、NK 細胞の挙動を位相差顕微鏡で観察した。また、癌細胞のアポトーシスを、NucView 488 (Biotium, USA) を用いて確認した。具体的には、DLD-1 細胞をチャンバースライドに播種し24時間培養し定着させた後、NK 細胞を加え、共培養19時間後、培養液を除去し、NucView 488 溶液 (5 μ 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。

NK 細胞の抗癌活性評価モデル

96 ウェルプレートに、DLD-1 細胞を10⁴個播種し、24時間培養した後、NK 細胞を加え、さ

らに19時間共培養した。その後、ウェルを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。

倫理規定

この研究は、共立女子大学研究倫理委員会の承認を受けて実施した。

3. 結果

NK 細胞の分離

方法に記したように、全血 10ml より、RosetteSep を利用した密度勾配遠心法により、NK 細胞を negative selection で分離した。回収細胞は、生細胞率92%、生細胞数 2.3×10^5 、細胞サイズは、図1のように、直径7 μ m 以上で、7~8 μ m にピークがあった。

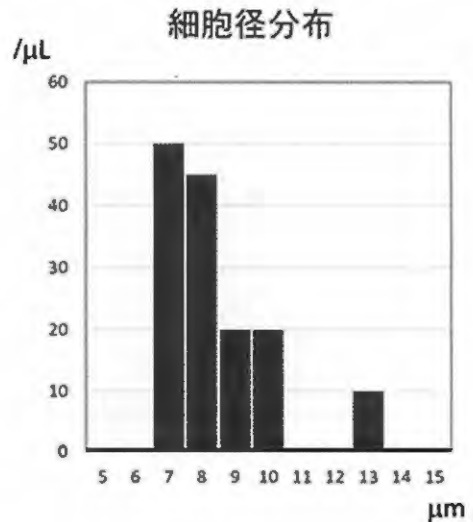


図1 分離したNK 細胞の細胞径分布
EVE Automatic cell counter による、細胞径分布ヒストグラム。ほとんど直径7 μ m 以上で、7~8 μ m にピークがある。

DLD-1 細胞を攻撃する NK 細胞の観察

24 時間前培養した DLD-1 細胞に、NK 細胞を加え共培養した。2 時間後、位相差顕微鏡で、NK 細胞の挙動を観察した。図 2 A に示すように、突起を出すなど、形態を活発に変化させながら、癌細胞に向かって遊走し接近する様子が観察された。

DLD-1 細胞におけるアポトーシスの観察

DLD-1 細胞と KHYG-1 細胞の共培養 19 時間後、NucView488 を 30 分間作用させた。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。図 2 B に示すように、共培養後の DLD-1 細胞にアポトーシスが生じていることが観察された。

NK 細胞の DLD-1 細胞に対する殺傷効果

方法に示したモデルにおいて、NK 細胞数を DLD-1 細胞数対して (Effector/Target 比)、2:1、1:1、1:2 に調整し、19 時間共培養後の DLD-1 細胞の生存率を調べた。図 3 に血液より分離した直後の NK 細胞を用いた実験 (A)、分離後培養 7 日後の NK 細胞を用いた実験 (B)、分離後培養 29 日後の NK 細胞を用いた実験 (C)、分離直後に凍結保存し、22 日後解凍し、さらに 21 日培養した NK 細胞を用いた実験 (D) の結果を示した。いずれも、E/T 比に依存した殺傷効果を認め、E/T 比 1:1 では、DLD-1 細胞の生存率は、それぞれ 57%、12%、32%、10% であった。

4. 考察

われわれはこれまで、大腸癌細胞株 DLD-1 細胞等に対する NK 細胞株 KHYD-1 を用いた抗癌モデルを作製してきた。NK 細胞株 KHYD-1 は、NK 細胞の機能を保持していることが知られており、有用なモデル細胞であるが、腫瘍化した細胞であるため、細胞増殖や細胞死に関する遺伝子発現などが正常細胞とは異なり、食品成分の効果を評価するモデルにおいて、正常とは異なる反応を示す可能性がある。よって本研究では、NK 細胞株 KHYD-1 にかえて、健常ヒト血液から分離した NK 細胞を用いた抗癌モデルの作製を試みた。

ヒト血液からの NK 細胞の分離は、通常、まず血液中の単核球を密度勾配遠心法により分離し、その後、細胞表面抗原に対する抗体を用いて NK 細胞を分離する。抗体による分離法には、蛍光色素を結合した抗体を用いたフローサイトメトリーによるセルソーティングや、磁気ビー

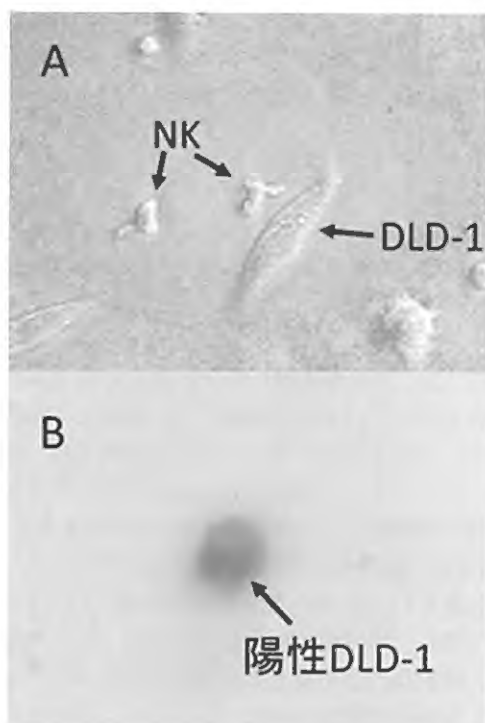


図2 NK細胞の顕微鏡観察

A: 分離ヒト NK 細胞と大腸癌 DLD-1 細胞の共培養 2 時間後の位相差顕微鏡像。NK 細胞は活発に形を変えながら癌細胞に接近する。B: 共培養 19 時間後、NucView 反応後の蛍光顕微鏡像。カスパーゼ-3 活性の発現細胞を認めた。

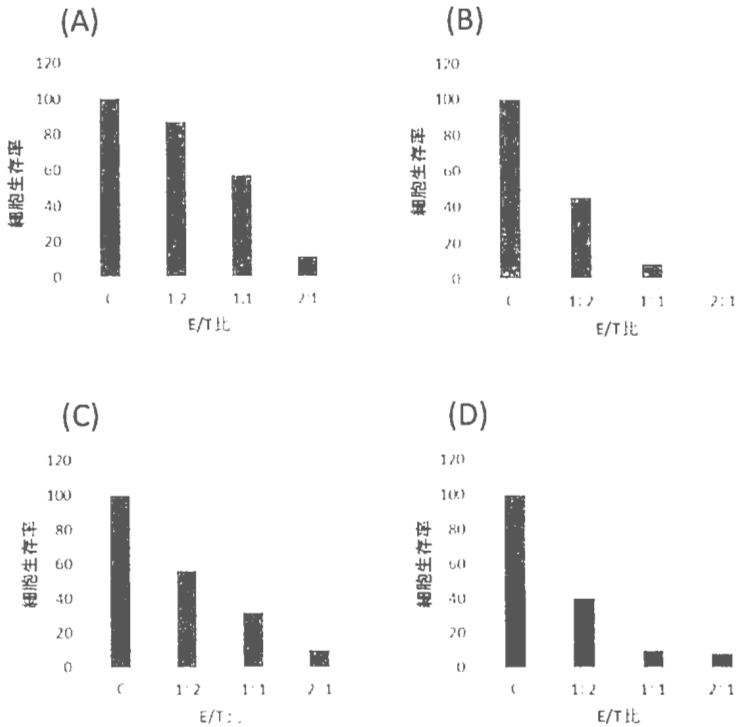


図3 NK細胞のDLD-1細胞殺傷効果

E/T比に依存してDLD-1細胞の生存率は低下した。A:分離直後のNK細胞 B:分離後培養7日後のNK細胞 C:分離後培養29日後のNK細胞。D:分離直後から22日間冷凍保存し、解凍後21日間培養したNK細胞。

ズに結合した抗体を用い磁気カラムなどで分離する方法がある。前者は大がかりな装置が必要であるため、後者の方法が広く普及している。本研究では、蛍光色素や磁気ビーズを使用しないで、全血から直接NK細胞を分離するRosetteSep試薬を用いた。この試薬はNK細胞以外の単核球の特異的な細胞表面抗原に対する抗体と赤血球に対する抗体を結合させた複合体である。図5Aに示すように、この抗体複合体を全血に混合すると、NK細胞以外の単核球は赤血球と結合し赤血球の集合（ロゼット）に捕捉される。その検体をリンパ球分離用比重液に重層し密度勾配遠心かけると、赤血球および顆粒球は最下層（図5B:第4層）に沈殿し、赤血球に捕捉されていないNK細胞のみが、比

重液（図5B:第3層）の上に沈殿し第2層を形成するので、それを採取した。採取した細胞をオートセルカウンターで計測した結果は、図1に示すように、細胞径7 μm 以上で、赤血球の混入は無かった。収量は10mlの全血から 2.3×10^5 個、細胞生存率は92%と良好であった。

分離したNK細胞を大腸癌細胞株DLD-1と共培養し、顕微鏡で観察したところ、NK細胞は、活発に形態を変えながら癌細胞に接近し攻撃する様子が観察された（図2A）。これは、以前報告したNK細胞株KHYD-1の場合と同様であった。また、攻撃を受けた、DLD-1細胞がアポトーシスを起こしていることを、NucView試薬（カスパーゼ-3活性により蛍光を発する）により確認した（図2B）。

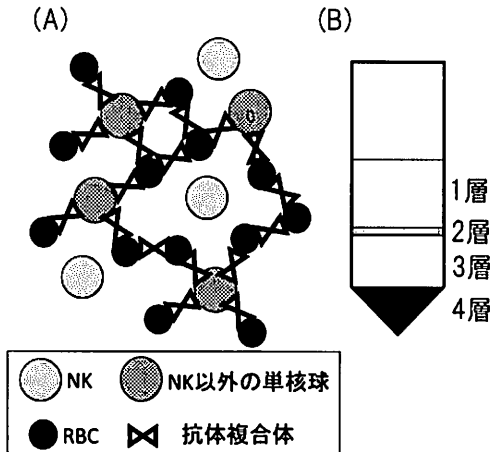


図4 NK細胞分離法の原理

A: RosetteSep 試薬はNK細胞には発現がなくNK細胞以外の単核球に発現する抗原に対する抗体と抗赤血球抗体の複合体である。これをEDTA加全血に加えると、赤血球のロゼットにNK細胞以外の単核球が補足されるが、NK細胞は遊離している。B: これを単核球分離用比重液に重層し遠心すると、赤血球、赤血球に補足されたNK細胞以外の単核球、および顆粒球は第4層に沈殿し、NK細胞は、比重液(第3層)と血清(第1層)の境界面に沈殿し第2層を形成する。

次に、分離NK細胞のDLD-1細胞に対する殺傷効果をE/T比1:2、1:1、2:1で検討した。本研究のモデルでは、96穴プレートを用い、DLD-1細胞を1穴あたり 1×10^4 個使うので、NK細胞が1度に最低 3.5×10^4 個必要であり、かなり消費する。そこで、分離した細胞を培養し増量を試み、癌細胞殺傷効果を保持するか経時的に検討した。また、一部の細胞は冷凍保存し、その後解凍した場合も検討した。図3に示したように、分離直後のNK細胞のみならず、29日まで培養したNK細胞でも、殺傷効果は維持されていた。さらに、分離直後に冷凍、 -80°C で22日間保存し、解凍後21日間培養した細胞でも、癌細胞殺傷効果は十分維持されていた。

今後、食品成分のNK細胞に関する効果をこの細胞モデルを活用して検討が可能である。最近の文献では、ブラックラズベリー⁴⁾、クロレラ⁵⁾、乳酸桿菌やビフィズス菌を含むヨーグルト⁶⁾、緑茶カテキン⁷⁾、緑茶由来多糖体⁸⁾、海藻

のミル⁹⁾、ニンニク¹⁰⁾、朝鮮人参¹¹⁾、冬虫夏草¹²⁾、甘遂¹³⁾、生薬由来の抗マalaria薬アルテミシニン¹⁴⁾、キバナシスラ¹⁵⁾など多様な食品や生薬にNK細胞活性化機能が示されており、今後さらに有効な食品の発見が増加すると思われる。

5. 結び

本研究では、ヒト血液から分離したNK細胞を用いて、癌細胞殺傷モデルを作製した。10mlの全血からRosetteSepを利用した密度勾配遠心法でNK細胞を分離し、分離直後、培養後、冷凍保存後のそれぞれのNK細胞で癌細胞殺傷能を検討したところ、いずれも十分な機能が認められた。この実験系は食物成分のNK細胞活性化能を検討するためのモデルとして有用であると考えられた。

文献

- 1) 吉浦健太：共立女子大学家政学部紀要, 61, 109-114 (2015)
- 2) 吉浦健太：共立女子大学家政学部紀要, 62, 135-143 (2016)
- 3) 鳥居奈央、吉浦健太：共立女子大学家政学部紀要, 63, 107-112 (2017)
- 4) P. Pan, et al.: *Front. Immunol.*, 8, 997 (2017).
- 5) D. Cheng, et al.: *Nutrients* 9, 708 (2017).
- 6) A. Lee, et al.: *Nutrients* 9, 558 (2017).
- 7) Y. H. Kim, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 64, 3591-3597 (2016).
- 8) H. R. Park, et al.: *Int. J. Biol. Macromol.*, 99, 179-186 (2017).
- 9) U. Surayot and S. You: *Int. J. Biol. Macromol.*, 98, 117-124 (2017).
- 10) S. S. Percival: *J. Nutr.*, 146, 433s-436s (2016).
- 11) L. X. He, et al.: *Food Funct.*, doi:10.1039/c7fo00957g (2017).
- 12) S. H. Jang, et al.: *Immune Netw.*, 16, 140-145 (2016).
- 13) S. Oh, et al.: *J. Sci. Food Agric.*, 96,

2635-2640 (2016).

14) Y. K. Houh, et al. : *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 1600
(2017).

15) L. C. Yang, C. Y. Lai and W. C. Lin :
Carbohydr. Polym., 155, 466-474 (2017).