

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10613

研究課題名(和文)人工知能(AI)技術を用いたNK細胞の胃がん浸潤能律速因子の検索

研究課題名(英文)Examination of factors disturbed ADCC activity of NK cells to the solid tumor

研究代表者

上野 富雄(TOMIO, UENO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：70284255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NK細胞の固形がんに対する抗体依存性細胞障害を妨げている要因を明らかにし、抗体療法の効果を上げることを目的とした。方法としては、がん遺伝子であるHER2に着目し、HER2に結合する抗HER2抗体を添加してNK細胞とヒト胃がん・乳がん細胞株を培養、NK細胞の細胞傷害活性を観察した。また、NK細胞・ヒト胃がん・乳がん細胞株の表面に発現しているタンパク質を探索した。その結果、HER2を細胞表面に発現しているがん細胞株はNK細胞による抗体依存性細胞障害が働いている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
固形がんに対するNK細胞浸潤能向上のための、基礎データとなる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to examine the factors which disturbed the activity of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of natural killer T cells (NK cells) to the solid tumor and to improve the effect of antibody dependent immunotherapy. We co-incubated NK cells with either HER2+ human gastric cancer cell line (HSC-60) or HER2+ human breast cancer cell line (SK-BR-3), while adding anti-HER2 antibody. Also, we co-incubated NK cells with HER2- human breast cancer cell line (HCC1599), adding anti-HER2 antibody. We observed each ADCC activity of NK cells. We investigated the surface marker which appeared on alive cells after treatment. As a result, cells which have HER2 protein at the surface, could impair ADCC activity of NK cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：ADCC NK細胞 HER2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年のがんに対する免疫療法のうち、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性を用いた抗体療法はその効果が大変期待されている。しかし、固形がんに対する NK 細胞の浸潤能の欠如がその治療効果を妨げていることも解ってきた。NK 細胞の固形がんに対する浸潤能を阻害している要因を明らかにすれば、抗体依存性細胞障害を用いた抗体療法の効果を上げることが出来ると考えた。

### 2. 研究の目的

胃がんをターゲットとして抗体依存性細胞障害活性を飛躍的に高める因子を探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

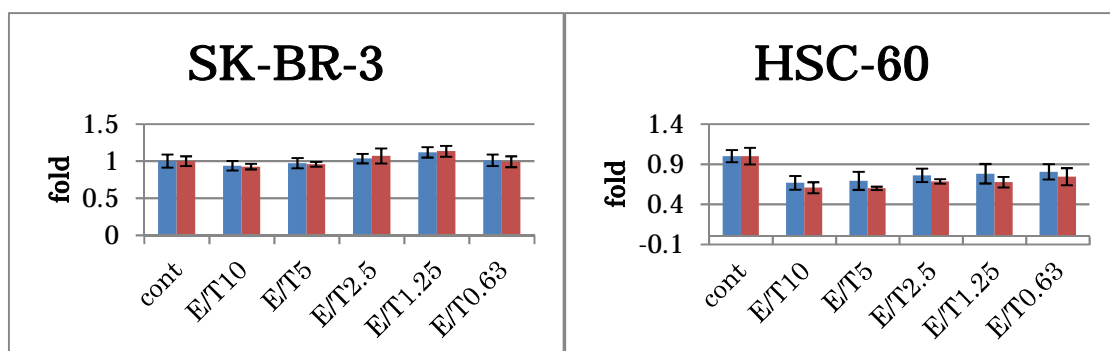
まず、Her2 陽性ヒト胃がん細胞株 HSC-60、Her2 陽性ヒト乳がん細胞株 SK-BR-3、Her2 陰性ヒト乳がん細胞株 HCC1599 を活性化 NK 細胞と抗 Her2 抗体存在下で共培養を行い、NK 細胞の抗 Her2 抗体存在下/非存在下における細胞障害活性をカルセイン染色を用いて測定した。抗 Her2 抗体の濃度は 10ug/ml、作用時間は 4 時間であった。

NK 細胞の表面マーカーの探索を行った。NK 細胞機能活性のマーカーである CD107A、NK 細胞と一部の T 細胞に発現しており、免疫応答の調節に重要な役割を果たす KIR/CD158、NK 細胞とマクロファージが発現している CD16、NK 細胞と T 細胞に発現している CD56、NK 細胞と一部の T 細胞に発現しており、リガンドが結合すると NK 細胞が活性化する CD314(NKG2D)、すべての造血系細胞の細胞膜上に発現する CD45、T 細胞のマーカーである CD3 について Flow cytometer で発現を確認した。また、死細胞判定には FVS510 を用い、解析は生細胞について行った。

ヒトがん細胞株の表面マーカーの探索を行った。がん遺伝子であり、各種がんにおいて発現が見られる HER2、腫瘍免疫、つまりがん細胞表面上に発現することで細胞傷害性 T 細胞の攻撃対象となる HLA-ABC について Flow cytometer で発現を確認した。また、死細胞判定には FVS510 を用い、解析は生細胞について行った。

### 4. 研究成果

HSC-60 では抗 Her2 抗体存在下において細胞傷害活性の上昇傾向が見られたが、SK-BR-3、HCC1599 では抗 Her2 抗体存在下でも細胞傷害活性の変化は見られなかった。



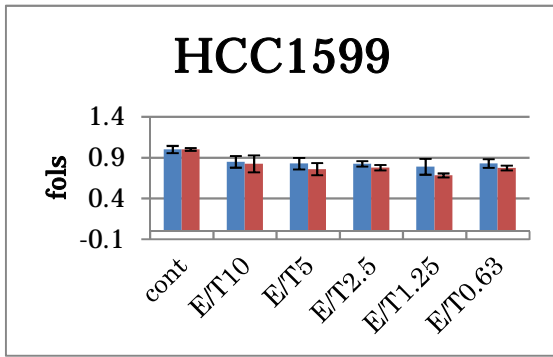


Figure.1 NK 細胞による各種ヒトがん細胞に対する細胞残存率。

( : 抗 HER2 抗体 +、 : 抗 HER2 抗体 - )

NK 細胞について、CD45 陽性細胞、つまり造血系細胞集団から CD3(-)造血系細胞集団を分画、その集団から CD16 と CD56 どちらも陽性である細胞集団、つまり NK 細胞集団を同定した。この NK 細胞集団について CD107A、CD158、CD314 の発現について検討した。単独で培養した NK 細胞については、CD107A は陰性であり、CD158 は陽性集団と陰性集団が分かれ、CD314 は陽性集団のみであった(Figure.2a)。NK 細胞とヒト乳がん細胞株 SK-BR-3 を共培養した場合、CD107A の発現が増加傾向にあった(Figure.2b)。

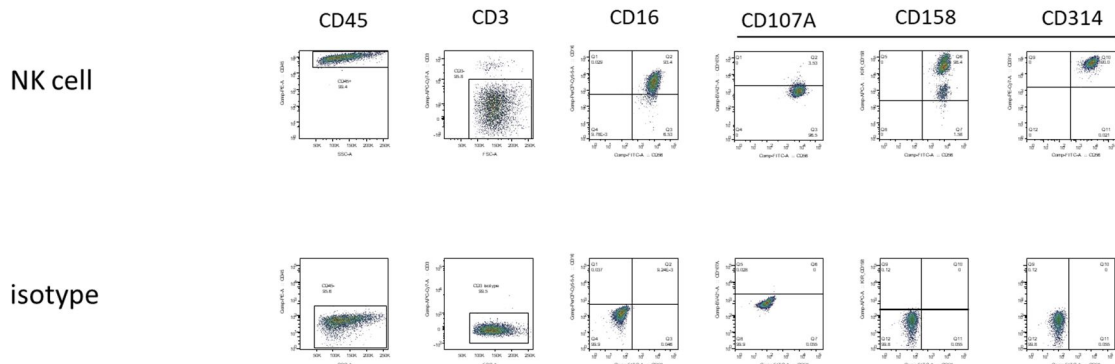
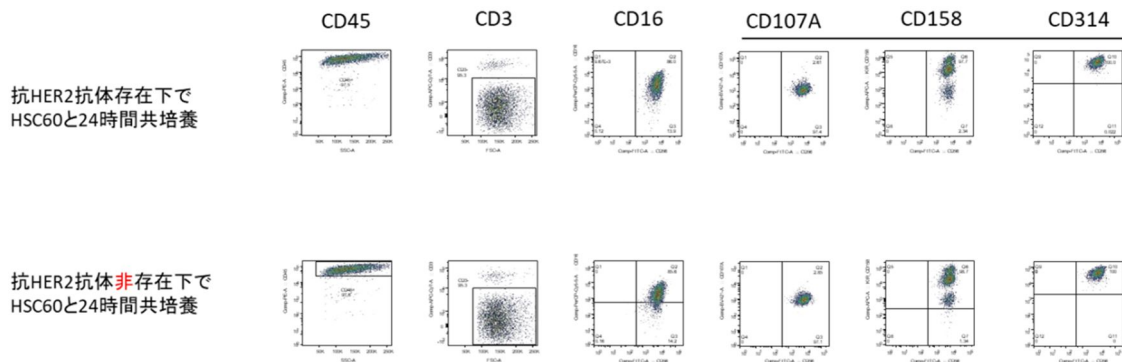
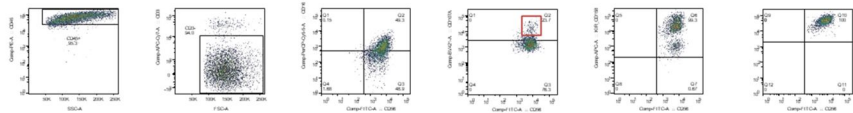


Figure2a. NK 細胞の表面マーカー探索

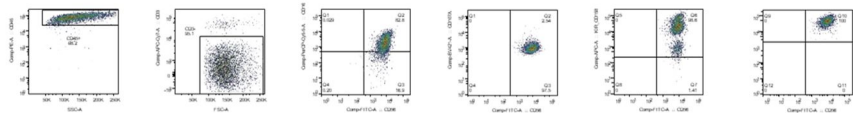


様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

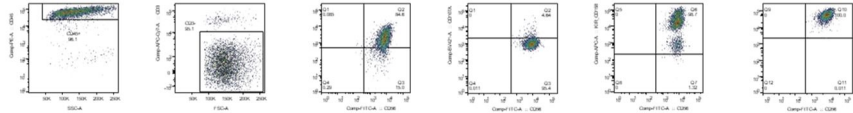
抗HER2抗体存在下で  
SK-BR-3と24時間共培養



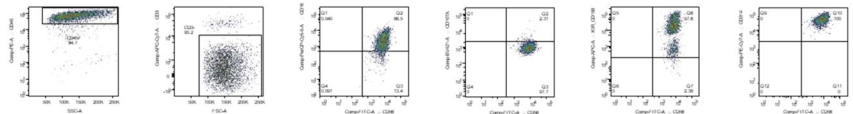
抗HER2抗体非存在下で  
SK-BR-3と24時間共培養



抗HER2抗体存在下で  
HCC1599と24時間共培養

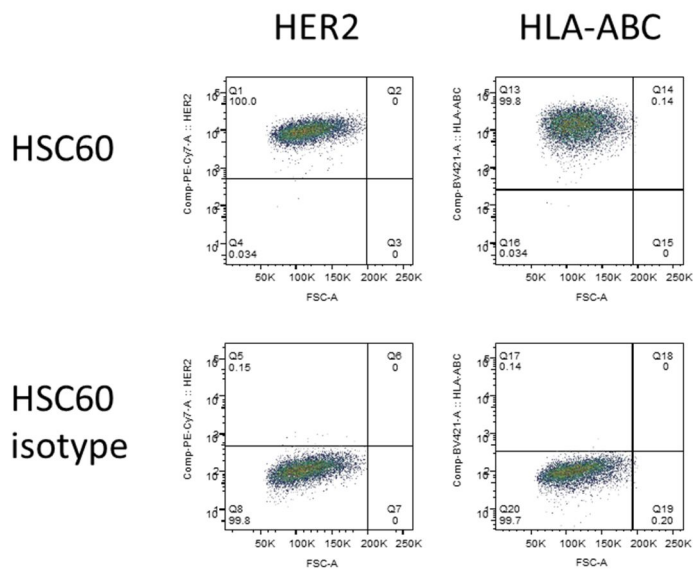


抗HER2抗体非存在下で  
HCC1599と24時間共培養



**Figure 2b.** NK 細胞をヒトがん細胞と共培養した場合の表面マーカー探索 (E/T=10, 24 時間)

ヒトがん細胞について、ヒト胃癌細胞株 HSC-60 においては HER2、HLA-ABC どちらも発現が認められた。ヒト乳がん細胞株 SK-BR-3 においては HER2 の発現ははっきり認められたが、HLA-ABC の発現は弱かった。



様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

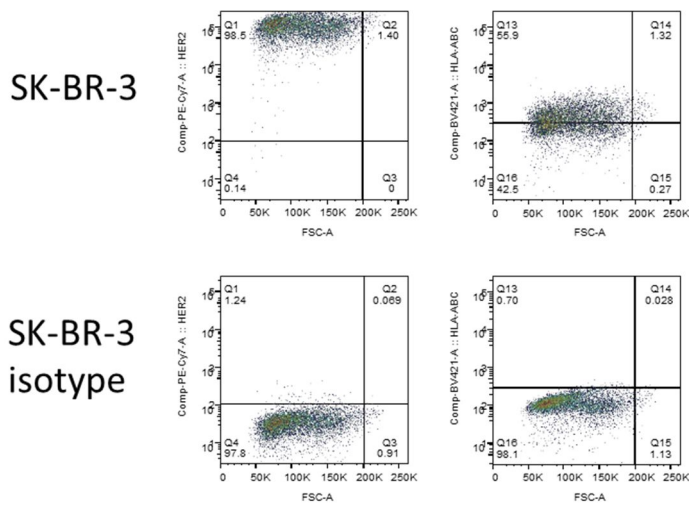


Figure 3. 各細胞株における HER2、HLA-ABC の発現

以上の結果より、抗 Her2 抗体下では NK 細胞のヒト胃がん細胞株 HSC-60 への抗体依存性細胞傷害活性がわずかながら上昇傾向であること、NK 細胞機能活性化マーカーである CD107A の発現は SK-BR-3 との共培養で上昇すること、CD158 については発現している NK 細胞とそうでない NK 細胞が存在していることが明らかとなった。現時点で、本研究の目的である胃がん細胞において、抗体依存性細胞障害活性を飛躍的に高める因子は探索しきれていない。しかし HER2 が細胞表面に発現していることで NK 細胞の抗体依存性細胞傷害活性を高める可能性があると考えられる。NK 細胞表面マーカーの探索で CD107a の発現が弱いことから、NK 細胞が十分に活性化していない可能性がある。条件を検討し、NK 細胞が活性化した状態ならば、今回の結果を踏まえて HER2 を発現しているヒトがん細胞株に対する NK 細胞の抗体依存性細胞傷害活性は高まる可能性もあるので検討予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉村 清  (YOSHIMURA KIYOSHI)  (30346564)	昭和大学・腫瘍内科・教授    (32622)	