

---

## 原 著

---

### ヒトNK様培養細胞KHYG-1の細胞傷害における細胞傷害性顆粒の分泌動態

安藝健作<sup>1)</sup>, 三輪詩佳<sup>2)</sup>, 佐藤瑞樹<sup>3)</sup>, 曾根淳美<sup>4)</sup>, 川添和義<sup>5)</sup>, 細井英司<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>徳島大学大学院医歯薬学研究部医用検査学系細胞・免疫解析学分野

<sup>2)</sup>兵庫県立丹波医療センター検査部

<sup>3)</sup>医療法人社団誠馨会千葉メディカルセンター薬剤部

<sup>4)</sup>徳島大学大学院保健科学教育部

<sup>5)</sup>昭和大学薬学部臨床薬学講座天然医薬治療学部門

(令和2年4月15日受付) (令和2年5月15日受理)

現在, がん治療は「手術療法」, 「化学療法」, 「放射線療法」の三大療法が行われているが, 第四の治療として「免疫療法」が注目されている。これまでにわれわれは, 免疫療法で注目されているNK細胞の基礎的研究を行い, ヒトNK細胞の代替細胞となるNK様培養細胞KHYG-1の細胞膜上CD56抗原が, ヒトNK細胞と同様にNK細胞活性化の評価指標となること, またIL-2刺激に伴ってKHYG-1の細胞傷害性が上昇することを報告している。

本研究では, 微量の賦活化物質の効果を評価可能にするため, 従来の細胞傷害性測定法を改良することで, その細胞傷害性率と低濃度のIL-2刺激での測定感度を上昇することができ, より微量の賦活化物質の効果を評価可能にした。また, KHYG-1細胞内顆粒の動態観察では, 標的細胞への顆粒の流入後, その細胞が傷害される様子をリアルタイムに観察できた。さらに, IL-2刺激によるKHYG-1の活性化と細胞内グランザイムBの発現量の変化を明らかにでき, 今後の研究課題が示された。

#### はじめに

現代人は, さまざまな環境・立場で多くのストレスを感じ, そのストレスによる免疫機能への影響が問題となっている。特にNK細胞活性低下による免疫機能低下はウイルス感染症やがん発症・転移と深い関係があるという報告もあり, 生体におけるNK細胞の役割は重要である<sup>1)</sup>。

現在, がん治療法として提案される治療法には「手術療法」, 「化学療法」, 「放射線療法」による三大療法がよく知られている。これらの治療法の特徴を活かし, 患者の症状やがんの種類, 部位などによって適した治療法を選択, また組み合わせて治療が行われている。最近, この基本のがん治療の他に, さまざまな治療法の確立が進められ, 治療の選択肢は増えている。その中でも特に注目されているのが, 第四の治療法と言われるがん免疫療法である<sup>2)</sup>。

現在, 効果が証明されている免疫療法は, 免疫チェックポイント阻害薬を用いてがん細胞が免疫にブレーキをかけることを防ぎ, 免疫細胞の活性化を持続する方法<sup>3)</sup>や, 患者自身のT細胞を取り出し, 体外でがん細胞の目印を見分ける遺伝子を組み込み, 増殖後, 再び体内に戻しT細胞の攻撃力を高めるCAR-T療法と呼ばれる方法である<sup>4)</sup>。その他にも, サイトカイン療法などの体内の免疫力を高める方法や, T細胞以外の免疫細胞, 特に活性化NK細胞を用いた免疫細胞療法で, がんを治療するための基礎研究, 臨床応用の試みがなされている<sup>5,6)</sup>。

われわれの研究室では, このがん免疫療法に注目し, ウイルス感染細胞やがん細胞などの腫瘍の排除に重要な役割を果たしているNK細胞について基礎研究を進めている。現在までに, ヒトNK細胞のIL-2刺激による検討で, 主要細胞膜抗原であるCD56抗原の発現量とNK細胞傷害性との間に正の相関を認め, NK細胞の「活性化・細胞傷害性」がNK細胞膜上CD56抗原を指標とし

て評価することが可能であることを報告している<sup>7)</sup>。また、NK細胞の代替細胞としてNK様培養細胞であるKHYG-1細胞を用いた検討を行い、ヒトNK細胞と同様にIL-2刺激によってKHYG-1細胞の細胞傷害性が上昇したことから、細胞が活性化したことを認めた<sup>8)</sup>。

本研究ではKHYG-1細胞を用いた従来の細胞傷害性測定法の改良と、KHYG-1細胞の細胞傷害性の作用機序、特にパーフォリンやグランザイムを含む細胞内顆粒の動態、さらに代表的なヒトNK細胞傷害性顆粒の一つであるグランザイムBについて、IL-2刺激におけるKHYG-1細胞内での変化を検討した。

## 方 法

### 1. 細胞培養

ヒトNK様細胞培養株KHYG-1 (effector cell : JCRB細胞バンク)、慢性骨髄性白血病細胞株K562 (target cell)を使用した。細胞は、10% FBSを含むRPMI-1640 (WAKO)\* (\*以下、培地と表記)を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養を行った。また、KHYG-1は生存にIL-2 (Pepro Tech)を必要とするため、20単位 (U/mL)のIL-2を加え、継代培養した。

### 2. 細胞傷害性

#### (1)Effector cellの前処理

KHYG-1を0.1%FBSを含むRPMI-1640、IL-2 (5U/mL)条件下で26時間培養した。その後、処理細胞 (2 × 10<sup>6</sup>個/5 mL)を1%FBSを含むRPMI-1640、IL-2を最終濃度0, 1, 10, 100U/mLとなるようにそれぞれ6ウェル細胞培養平底マルチプレートに播種し、22時間刺激を行った。刺激後、細胞数を数え、10%FBSを含むRPMI-1640により、3 × 10<sup>6</sup>個/mLに調整した。

#### (2)Target cellの前処理

1 × 10<sup>6</sup>cellのK562を回収し、400 × g、5分間遠心し、上清を除去した。培地100μLで懸濁し、CFSE溶液 (Biolegend) 0.6μL/PBS 100μLを加え、室温暗所で15分間染色を行った。培地を2 mL加え、400 × g、5分間遠心後、上清を除去した。培地にて細胞数を、1.5 × 10<sup>5</sup>個/mLに調整した。

#### (3)細胞傷害性の測定

U底96穴プレートに調整したKHYG-1およびK562を100μLずつ播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で8時間共培養を行った。共培養後、PBSを加え、400 × g、5分間遠

心、上清を除去した後、7-AAD溶液 (Biolegend) 9μL/PBS 200μLを加え、15分間染色を行った。完全溶解には、0.5%サポニン (WAKO)を添加・洗浄した後、7-ADDにて染色し、フローサイトメーター (BD FACSCalibur)によって測定を行った。Effector cell : Target cell (E : T)比に関しては、E : T=10 : 1の条件で検討した。

#### (4)細胞傷害性の算出

CFSE陽性細胞 (全 target cell)は、フローサイトメーターにおけるFL-1 (蛍光波長 : 530nm)、7-AAD陽性細胞 (死細胞)はFL-3 (蛍光波長 : 680nm)で解析を行い、以下の式により細胞傷害性 (%)を算出した。

$$\text{細胞傷害率 (\%)} = \frac{(\% \text{Lysis}_{\text{exp}} - \% \text{Lysis}_{\text{spont}})}{(\% \text{Lysis}_{\text{max}} - \% \text{Lysis}_{\text{spont}})} \times 100$$

Lysis<sub>exp</sub>=サンプルの溶解

Lysis<sub>spont</sub>=K562の自発的溶解

Lysis<sub>max</sub>=K562の完全溶解

### 3. 細胞内顆粒の動態観察

#### (1)Effector cell前処理

細胞傷害性測定と同様に、KHYG-1を0.1%FBSを含むRPMI-1640、IL-2(5U/mL)条件下で26時間培養した。その後、処理細胞 (2 × 10<sup>6</sup>個/5 mL)を1%FBSを含むRPMI-1640、IL-2を最終濃度100U/mLとなるように6ウェル細胞培養平底マルチプレートに播種し、22時間刺激終了30分前にウェルにLysoTracker Deep Red (Thermo Fisher Scientific)溶液1μL (LysoTracker Deep Red 0.1μL/培地0.9μL)を添加・反応させた。細胞をカウントし、細胞懸濁液を回収後培地に加え遠心(400 × g/5分)し、上清を除去した。さらに培地を加え再度遠心し、上清を除去した後、培地で1.5 × 10<sup>6</sup>個/mlに調整した。

#### (2)Target cell前処理

細胞傷害性測定と同様に、1 × 10<sup>6</sup>cellのK562を回収し、400 × g、5分間遠心し、上清を除去した。培地100μLで懸濁し、CFSE溶液 (Biolegend) 0.6μL/PBS 100μLを加え、室温暗所で15分間染色した。さらに培地を2 mL加え、400 × g、5分間遠心後、上清を除去し、培地にて細胞数を、3 × 10<sup>5</sup>個/mlに調整した。

#### (3)細胞内顆粒の動態観察

調整したKHYG-1およびK562を平底滅菌96ウェル組織培養プレートに100μLずつ播種し、37°C・5%CO<sub>2</sub>条件下で約2時間インキュベーションした。インキュベーション中の細胞内顆粒の動きや細胞形態の変化をBZ-X

800オールインワン顕微鏡 (KEYENCE) を用いて、継時的に観察した。蛍光と明視野に分けてタイムラプス撮影を30秒に一度の間隔で行い、リアルタイムオーバーレイにより多重画像を画面上でリアルタイムに重ね合わせて表示した。励起/蛍光が495/519のCFSEには、BZ-X フィルタ GFP を用い、励起/蛍光が647/668の LysoTracker Deep Red には、BZ-X フィルタ Cy-5 を使用した。また、輝度の少ない培養細胞を用いているためブラックバランスにより背景を暗くし、バックグラウンドと区別するために位相差像を用いて輪郭を正確に抽出して解析を行った。

#### 4. グランザイム B の測定

##### (1) KHYG-1細胞の前処理・刺激培養

細胞傷害性測定と同様に、KHYG-1を0.1%FBSを含むRPMI-1640, IL-2 (5 U/mL) 条件下で26時間培養した。その後、処理細胞 ( $2 \times 10^6$ 個/5 mL) を1%FBSを含むRPMI-1640, IL-2を最終濃度0, 1, 10, 100U/mLとなるようにそれぞれ6ウェル細胞培養平底マルチプレートに播種し、22時間刺激を行った。

##### (2) 細胞膜透過処理

刺激後、細胞数を数え、10%FBSを含むRPMI-1640により、 $5 \times 10^6$ 個/mLに調整した。KHYG-1細胞内のグランザイム B を染色するためKHYG-1細胞  $5 \times 10^6$ 個/mL を50 $\mu$ l に IntraPreP (BECKMAN COULTER) 試薬 1 と試薬 2 を加え、細胞膜透過処理を行った。

##### (3) グランザイム B の測定

細胞膜透過処理後のKHYG-1細胞にPE標識抗GranzymeB抗体 (Biolegend) 5 $\mu$ l を加え、室温で15分インキュベーションした。PBSにて洗浄後、細胞内のグランザイム B をフローサイトメーターにて測定した。グランザイム B 発現量は、GMFI (Geometric Mean Fluorescence Intensity: 幾何学的平均蛍光強度) を用いて評価した。

## 結 果

### 1. KHYG-1の K562に対する細胞傷害性

KHYG-1の K562細胞に対する細胞傷害性について検討した結果、IL-2濃度依存的に細胞傷害性が上昇することが認められた。IL-2濃度0 U/ml と比較すると、1, 10, 100U/ml のすべてのIL-2刺激において細胞傷害率が有意に増加した (図1)。

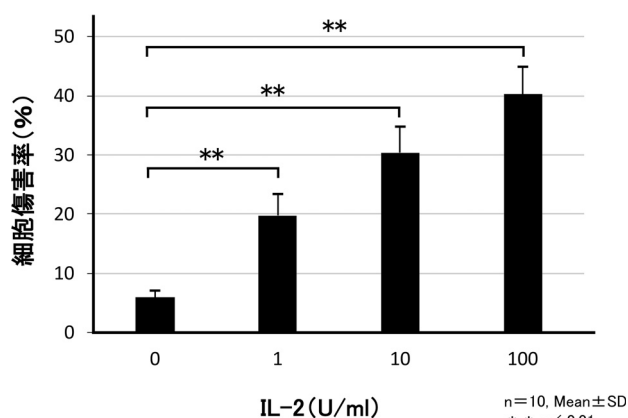


図1 IL-2刺激によるKHYG-1のK562に対する細胞傷害性の変化  
調整したKHYG-1およびK562を96ウェルプレートで2時間共培養後、フローサイトメーターにて細胞傷害性を測定。  
mean±S.D., n=10 (\*\*p<0.01)

### 2. KHYG-1細胞内顆粒の動態観察

標的細胞に対するKHYG-1の細胞傷害性について、詳細な作用機序を確認するため、細胞傷害性測定時と同様に低血清で培養処理したKHYG-1を100U/mlのIL-2で22時間刺激後、KHYG-1細胞内顆粒をLysoTracker Deep Redで染色した。その後、標的細胞となるK562と共培養し、これらの顆粒の動きを観察した。赤色がKHYG-1内の細胞内顆粒、緑色がCFSEで染色したK562を示しており、細胞の継時的変化の一部を画像としてとらえた。観察開始時の0分では、KHYG-1とK562が結合し始めたと考えられた (図2A)。さらに、19分経過頃には、KHYG-1内の一部の細胞内顆粒がK562内に流入する様子が確認できた (図2B)。また、59分経過頃にはK562内にさらに細胞内顆粒が流入し、K562の細胞形態が変化しはじめた (図2C)。その後は時間経過とともに、K562細胞は縮小し、1時間29分が経過する頃には、K562の細胞形態は原型を留めることなく破壊されたことを確認できた (図2D)。

### 3. KHYG-1細胞内のグランザイム B 発現量の変化

KHYG-1細胞内に存在するグランザイム B について検討した結果、IL-2刺激によって細胞内グランザイム B が増加することが認められた。0 U/ml (IL-2で刺激なし) と比較すると、1, 10U/ml のIL-2刺激では明らかな増加は認められなかったが、100U/ml のIL-2刺激では有意な上昇を認め、IL-2刺激によって細胞内のグランザイム B の増加が確認できた (図3)。

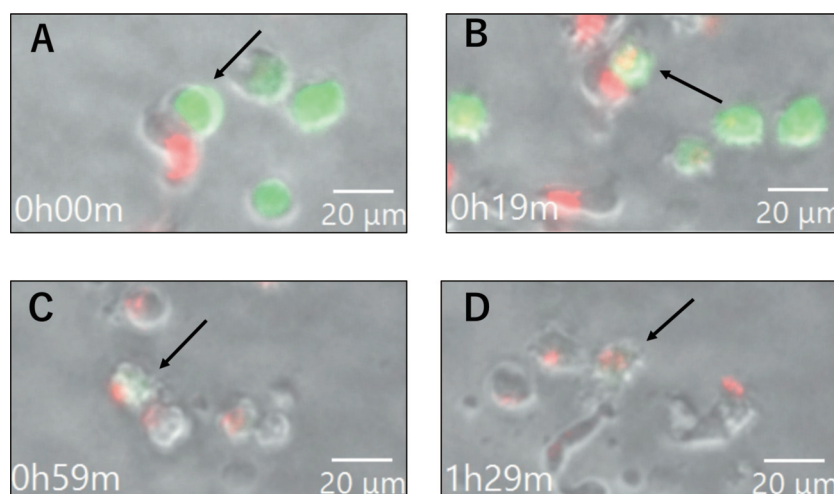


図2 A-D KHYG-1によるK562細胞傷害時の細胞内顆粒の動態観察  
 共培養開始5分後から観察を開始し、約2時間細胞傷害の様子を経過観察した。各図の左下の時間は、観察開始後の経過時間を示した。また、赤色がKHYG-1 (100U/ml)内の細胞内顆粒、緑色がK562を表している。(Effector cell : Target cell (E : T) 比 = 5 : 1)

## 考 察

NK細胞は、細胞傷害性リンパ球の一種であり、ウイルス感染細胞や腫瘍の排除において重要な役割を果たしている。最も特徴的であるのは非自己の認識であり、正常な自己の細胞を攻撃することなく、ウイルス感染細胞や腫瘍を特異的に傷害する。また、NK細胞は抗体のFc領域を認識することで細胞傷害性が增强する抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を持ち、このADCC活性を治療に応用した分子標的薬治療が考案され、現在臨床の現場において利用されている。その他にも、患者自身のNK細胞を抽出し、体外で増殖・活性化した後、患者の体内に戻すことでがんを治療する「高活性化NK細胞免疫療法」が注目されている<sup>2)</sup>。免疫担当細胞においてNK細胞は非常に重要な細胞である。

われわれの研究室では、NK細胞に注目し、ヒトNK細胞の代替細胞となるNK様培養細胞KHYG-1においても、ヒトNK細胞と同様にIL-2刺激に伴って標的細胞に対する細胞傷害性が上昇することを報告している<sup>7,8)</sup>。本研究では、微量の賦活化物質の効果を評価可能にするため、従来用いている細胞傷害性測定法におけるKHYG-1細胞の処理条件(低血清・刺激時間)の再設定を行い、さらにKHYG-1細胞の細胞傷害性の作用機序、細胞内顆粒の動態、代表的なヒトNK細胞傷害性顆粒の一つであるグランザイムBについて、IL-2刺激におけ

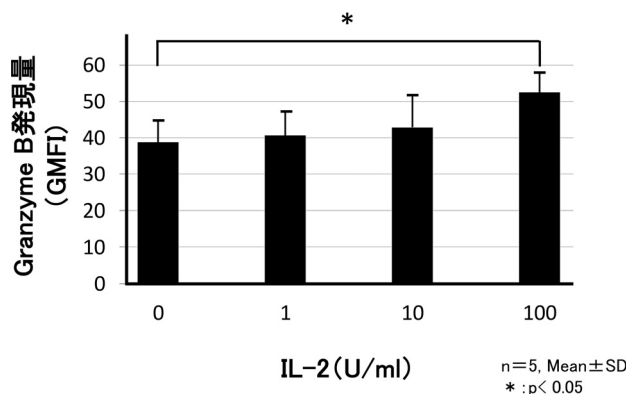


図3 IL-2刺激によるKHYG-1細胞内のGranzyme B発現解析  
 Granzyme B発現量は、フローサイトメーターのGMFI (Geometric Mean Fluorescence Intensity : 幾何学的平均蛍光強度)を指標に評価。mean±S.D., n=5 (\*p<0.05)

るKHYG-1細胞内での変化を検討した。

KHYG-1による細胞傷害性測定については、低血清処理の時間を従来法の24時間から26時間に変更し、さらに各濃度のIL-2刺激時間を18時間から22時間に変更することで、従来法に比べ10, 100U/mlのIL-2刺激における細胞傷害性率が4~5%上昇した<sup>7)</sup>。また、IL-2濃度依存的に細胞傷害性率が上昇することを認めた(図1)。測定系で用いるKHYG-1細胞の前処理条件は、本解析法において非常に重要であり、今回の再設定により、従来法に比べ細胞傷害性率と特に低濃度のIL-2刺激での測定感度を上昇することができた。今後、より微量の賦



活化物質の効果を評価可能になることが期待される。

KHYG-1細胞内顆粒の動態観察では、標的細胞であるK562に結合したKHYG-1細胞から顆粒が流入する様子や、時間経過に伴いK562細胞が傷害される様子をリアルタイムに観察することができた(図2A~D)。KHYG-1細胞を用いた細胞傷害性のメカニズムに関するこのような画像解析の報告はほとんどなく、標的細胞の傷害がKHYG-1細胞内の顆粒によって引き起こされていることを証明した貴重なデータであると考えられる。また、本研究ではIL-2刺激によるKHYG-1細胞内の細胞傷害性顆粒の一つであるグランザイムBの変化について検討を行った。低濃度IL-2刺激では対照(IL-2で刺激なし)と比較してその発現量に明らかな差を認めなかったが、100U/mL(高濃度)のIL-2刺激において有意な上昇を認めた(図3)。細胞傷害率の結果から考察すると、低濃度のIL-2刺激においても有意な差が出ていることから、その細胞傷害性の主役であると考えられている細胞内顆粒グランザイムBの発現も濃度依存的に上昇すると考えられたが、今回の結果は異なった。これには二つの原因が考えられる。原因の一つとしては、本法ではタンパク質としてのグランザイムB発現を測定しているため、感度があまり高くなく、低濃度IL-2刺激での変化が認められなかった可能性が考えられる。そのため、より感度の高いmRNAの発現レベルで評価すれば低濃度のIL-2刺激においても発現上昇を検出できた可能性があることから、今後グランザイムBのmRNA発現量について定量PCRによって測定する必要がある。もうひとつの原因としては、グランザイムのサブタイプが考えられる。現在のところ、ヒトNK細胞中にはグランザイムA, B, H, K, Mの5種類が発見されており、その中でもグランザイムAとBは活性化した細胞傷害性T(CTL)細胞中に大量に発現されることで有名であり、グランザイムの中で最も研究が進んでいる。その他のグランザイムは希少グランザイムと呼ばれ、主にNK細胞中に発現することも知られているが、まだ十分な研究は進められていない。今回、ヒトNK細胞の主要なグランザイムBについて検討したが、KHYG-1細胞の細胞傷害性において中心的役割を果たしている細胞傷害性顆粒はグランザイムMであるという報告もある<sup>9)</sup>。このことから今回の検討で、低濃度のIL-2刺激ではグランザイムBの発現量にあまり変化が起きなかった可能性が考えられる。今後、グランザイムMの変化について検討する必要がある。

今回の検討より、ヒトNK様培養細胞であるKHYG-1細胞の細胞傷害性における細胞内顆粒の動態、さらにKHYG-1細胞の活性化とグランザイムBの変化との関係を明らかにでき、今後の検討課題が示された。また、細胞傷害性測定法については測定感度の上昇により、従来法に比べ、より微量物質の測定が可能と考えられる。今後、改良した本細胞傷害性測定法とこれまでに確立したNK細胞膜上CD56抗原を指標とした解析法を組み合わせることで、NK細胞の活性化に及ぼす薬剤効果の検討や賦活化物質の探索、特に、免疫系に対する効果やNK細胞活性を上昇させることが報告されている補中益気湯や十全大補湯などの漢方薬<sup>10-12)</sup>について、その有効性を科学的に評価したいと考えている。NK細胞活性化の研究は、「免疫細胞療法」の研究発展に寄与するものであり、将来の臨床における患者治療に貢献することが期待される。

## 文 献

- 1) Reiche, E. M., Nunes, S. O., Morimoto, H. K.: Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol.*, **5**(10) : 617-25, 2004
- 2) Kruger, S., Ilmer, M., Kobold, S., Cadilha, B. L., *et al.*: Advances in cancer immunotherapy 2019-latest trends. *J Exp Clin Cancer Res.*, **19**, **38**(1) : 268, 2019
- 3) Gong, B., Kiyotani, K., Sakata, S., Nagano, S., *et al.*: Secreted PD-L1 variants mediate resistance to PD-L1 blockade therapy in non-small cell lung cancer. *J Exp med.*, **216**(4) : 982-1000, 2019
- 4) Wang, Z., Wu, Z., Liu, Y., Han, W.: New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol.*, **10**(1) : 53, 2017
- 5) Li, C. Y., Huang, Q., Kung, H. F.: Cytokine and immuno-gene therapy for solid tumors. *Cell Mol Immunol.*, **2**(2) : 81-91, 2005
- 6) Ciurea, S. O., Schafer, J. R., Bassett, R., Denman, C. J., *et al.*: Phase 1 clinical trial using mbIL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood*, **130**(16) : 1857-1868, 2017
- 7) Oboshi, W., Aki, K., Tada, T., Watanabe, T., *et al.*: Flow Cytometric Evaluation of Surface CD 56 Expression on Activated Natural Killer Cells as Functional Marker. *The Journal of Medical Investigation*,

- 63(3, 4) : 199-203, 2016
- 8) 安藝健作, 佐藤瑞樹, 曾根淳美, 川添和義 他: ヒト NK 様培養細胞 KHYG-1 を用いた NK 細胞機能の評価. 四国医誌, 75 卷 5, 6 号 : 165-170, 2019
- 9) Suck, G., Branch, D. R., Smyth, M. J., Miller, R. G., *et al.*: KHYG-1, a model for the study of enhanced natural killer cell cytotoxicity. *Exp Hematol.*, 33 (10) : 1160-71, 2007
- 10) ツムラ補中益気湯エキス顆粒 (医療用) 添付文書
- 11) 大野修嗣: 漢方薬「補中益気湯」の Natural killer 細胞活性に及ぼす影響. *アレルギー*, 37(2) : 107-114, 1988
- 12) ツムラ十全大補湯エキス顆粒 (医療用) 添付文書

## *Secretion dynamics of cytotoxic granules in the cytotoxicity of the human NK-like cultured cells KHYG-1*

*Kensaku Aki<sup>1)</sup>, Utaka Miwa<sup>2)</sup>, Mizuki Sato<sup>3)</sup>, Atsumi Sone<sup>4)</sup>, Kazuyoshi Kawazoe<sup>5)</sup>, and Eiji Hosoi<sup>1)</sup>*

<sup>1)</sup>*Department of Cells and Immunity Analytics, Subdivision of Biomedical Laboratory Sciences, Division of Health Science, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima, Japan*

<sup>2)</sup>*Department of Clinical Laboratory, Hyogo Prefectural Tamba Medical Center, Hyogo, Japan*

<sup>3)</sup>*Pharmacy Department, Seikei-kai Chiba Medical Center, Chiba, Japan*

<sup>4)</sup>*Subdivision of Biomedical Laboratory Sciences, Graduate School of Health Sciences, Tokushima University, Tokushima, Japan*

<sup>5)</sup>*Division of Natural Medicine and Therapeutics, Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmacy, SHOWA University, Tokyo, Japan*

### SUMMARY

Three major therapies, “surgery”, “chemotherapy”, and “radiotherapy”, have been used to treat cancer. Recently, “immunotherapy” has attracted attention as the fourth treatment. We previously performed fundamental studies using NK cells, one cell type that has attracted attention in immunotherapy, and revealed that the surface CD56 antigen on the KHYG-1 human NK cell-like cultured cells as a substitute for human NK cells can be used as an evaluation index of NK cell activity as in human NK cells. We also reported that the cytotoxicity of KHYG-1 increases by IL-2 stimulation. In this study, we improved the conventional cytotoxicity measurement method to evaluate the effects of a small amount of activator on NK cells. As a result, the cytotoxicity rate and measurement sensitivity at low-concentration IL-2 stimulation were increased, and it became possible to evaluate the effects of a smaller amount of the activator. In the dynamic observation of KHYG-1 intracellular granules, it was possible to observe in real time how the target cells were damaged after the influx of granules. Furthermore, the relationship between the activation of KHYG-1 and the change in the intracellular expression level of granzyme B by IL-2 stimulation was clarified, and future research tasks were shown.

Key words : NK cell, KHYG-1, cytotoxicity, granzyme B, IL-2