

原 著

ヒト NK 様培養細胞 KHYG-1を用いた NK 細胞機能の評価

安 藝 健 作¹⁾, 佐 藤 瑞 樹²⁾, 曾 根 淳 美³⁾, 川 添 和 義⁴⁾, 細 井 英 司¹⁾

¹⁾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

²⁾医療法人社団誠馨会千葉メディカルセンター薬剤部

³⁾徳島大学大学院保健科学教育部

⁴⁾昭和大学薬学部臨床薬学講座天然医薬治療学部門

(令和元年8月7日受付) (令和元年8月26日受理)

NK細胞はウイルスや腫瘍の排除に重要な役割を果たしている。近年、活性化NK細胞を用いた免疫細胞療法が注目されており、賦活物質の探索やNK細胞活性状態の評価が重要となっている。これまでにわれわれは、ヒトNK細胞膜抗原であるCD56抗原発現量とNK細胞活性あるいは細胞傷害性との間に正の相関を認め、CD56抗原を指標としてNK細胞機能が評価可能であることを明らかにした。この簡便な評価法は、NK細胞の機能評価や賦活物質の探索に有用である。しかし、ヒトNK細胞を用いるため、採血やNK細胞調整が必要となる。そこで、本研究ではヒトNK細胞の代替細胞としてNK様培養細胞KHYG-1の細胞膜上CD56抗原が細胞機能の評価指標となるかを検討した。

その結果、KHYG-1のIL-2刺激によってCD56抗原が濃度依存的に上昇し、IL-2刺激濃度の増加と共に細胞傷害性の上昇を認めた。これらの結果から、ヒトNK細胞と同様に、KHYG-1細胞膜上CD56抗原をNK細胞活性の評価指標に利用できる可能性が示唆された。

はじめに

ヒトには本来、細菌やウイルスなどの外敵から体を守る免疫機構が備わっている。この免疫機構では免疫担当細胞の役割が重要であり、T細胞、B細胞、NK (natural killer) 細胞などの細胞群が中心的に活躍している。特に、リンパ球の一種であるNK細胞は、ヒト免疫機構において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。しかし、そのNK細胞活性は個人により異なり、年齢とともに低下する傾向がある。

健康維持のためには、NK細胞活性を一定レベルに維持させ、必要に応じてNK細胞機能を増強させることも重要である。

近年、NK細胞を増殖・活性化する免疫療法が癌治療に応用されており、患者の血液から採取したNK細胞を活性化し、細胞傷害活性を高めてから点滴注射によって患者の体に戻す「免疫細胞療法」などが注目されている。また、生体内のNK細胞機能を向上させるための賦活物質の探索、それに伴いNK細胞の機能や活性状態の評価法の確立が重要となってきている^{1,2)}。一般的にNK細胞活性の評価には、放射性クロム放出アッセイ (⁵¹Cr-release assay) などの細胞傷害試験が主に用いられている。しかし、この方法は同位元素を用い、さらにその操作が煩雑で時間がかかるという難点があり、より簡便なNK細胞活性評価法の確立が必要とされている³⁾。われわれは、ヒトNK細胞のIL-2刺激により、主要細胞膜抗原であるCD56抗原の発現量とNK細胞活性との間に正の相関を認め、NK細胞の「活性化・細胞傷害活性」についてNK細胞膜上CD56抗原を指標として評価が可能であることを報告してきた⁴⁾。これにより、簡便なNK細胞活性の評価が可能となり、NK細胞の賦活物質の探索などに本評価法が有用であると考えている。しかし、本法では、ヒトのNK細胞を用意することが必要となるため毎回の採血やNK細胞の調整が必要となる。そこで、本研究ではヒトNK細胞の代替細胞としてNK様培養細胞KHYG-1の細胞膜上CD56抗原がNK細胞活性化の評価指標として用いることが可能であるかを検討した。

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% CO₂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. 細胞の形態学的変化および細胞膜上 CD56抗原発現量の測定

6ウェル細胞培養平底マルチプレートの各ウェルに, IL-2 (20 U/mL) で36時間培養した KHYG-1を 2.0×10^6 個/5 mLになるように播種した。各ウェルにIL-2を最終濃度が0, 5, 10, 20, 40, 100 U/mLとなるよう添加し, 48時間の刺激培養を行い, 細胞形態を顕微鏡にて観察した。その後, 1×10^6 個に調整した KHYG-1をパラホルムアルデヒド (1%) で固定, PBSにて洗浄した後, PE 標識抗 CD56抗体 (Biolegend) 3 μ Lを加え, 水中で15分インキュベーションした。PBSにて洗浄後, フローサイトメーター (BD FACSCalibur) により, 大型細胞数の変化, CD56抗原発現量を測定した。CD56抗原発現量の評価には, 幾何学的平均蛍光強度 (Geometric Mean Fluorescence Intensity: GMFI) を用いた。

3. 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 (5 U/mL) 条件下で24時間培養した。その後, 1% FBS, IL-2を最終濃度0, 10, 100 U/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 2×10^6 個/5 mLで播種し, 18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, 3×10^6 /mLに調整した。

(2) Target cell の前処理

1×10^6 cell の K562を回収し, 400 \times g, 5分間遠心し, 上清を除去した。培地100 μ Lで懸濁し, CFSE 溶液 (Biolegend) 0.6 μ L/PBS 100 μ L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 \times g, 5分間遠心し, 上清を除去した。培地にて細胞数を, 1.5×10^5 /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100 μ Lずつ播種し, 37°C, 5% CO₂条件下で8時間共培養を行った。共培養後, PBSを加え, 400 \times g, 5分間遠心, 上清を除去した後, 7-AAD 溶液 (Biolegend) 9 μ L/PBS 200 μ L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) を添加し, 洗浄を行ったあとに染色を行い, その後フローサイトメーターによって測定を行った。Effector cell: Target cell (E:T) 比に関しては, E:T=20:1と10:1の2条件について検討した。

(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: 530 nm), 7-AAD 陽性細胞 (死細胞) は FL-3 (蛍光波長: 680 nm) 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_{exp}=サンプルの溶解

Lysis_{spont}=K562の自発的溶解

Lysis_{max}=K562の完全溶解

結 果

1. KHYG-1の形態学的変化

顕微鏡を用いて, 各濃度 IL-2刺激後における KHYG-1の形態学的変化を観察した結果, IL-2濃度0 U/mLと比較して, 5 U/mLでは細胞の大型化が認められた。一方, 100 U/mLでは, 細胞の大型化に加え, 細胞形態の桿状への変化を認めた (図1-A)。

また, フローサイトメーターによる測定の結果においても, IL-2濃度5 U/mLでは, 0 U/mLでみられた小型細胞集団のほか, 新たな大型細胞集団が認められた。さらに100 U/mLの刺激では, 5 U/mLと比べて, 細胞の大型化, 細胞形態の変化が認められた (図1-B)。

2. 大型細胞数の増加

IL-2刺激による KHYG-1の大型細胞数の変化を測定した結果, IL-2濃度依存的に大型細胞数の増加が認められた。しかし, 20 U/mL以上の刺激では大型細胞数の増加は止まり, ほぼ一定の値となった (図2)。

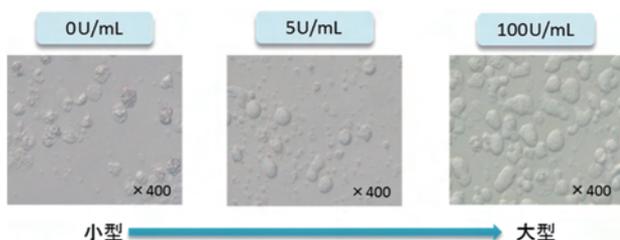


図1-A KHYG-1細胞の顕微鏡による観察
KHYG-1を各濃度IL-2で48時間、刺激培養を行い、顕微鏡にて観察。400倍で鏡検。

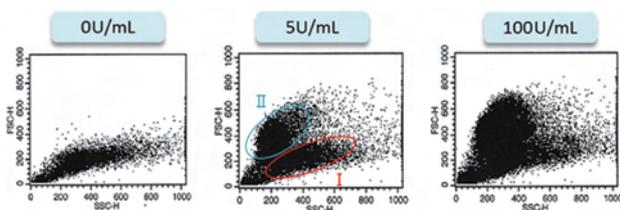


図1-B KHYG-1細胞のフローサイトメーターによる細胞形態変化
FSC-H:縦軸は細胞の大きさ, SSC-H:横軸は内部構造を表している。I:小型細胞集団, II:大型細胞集団

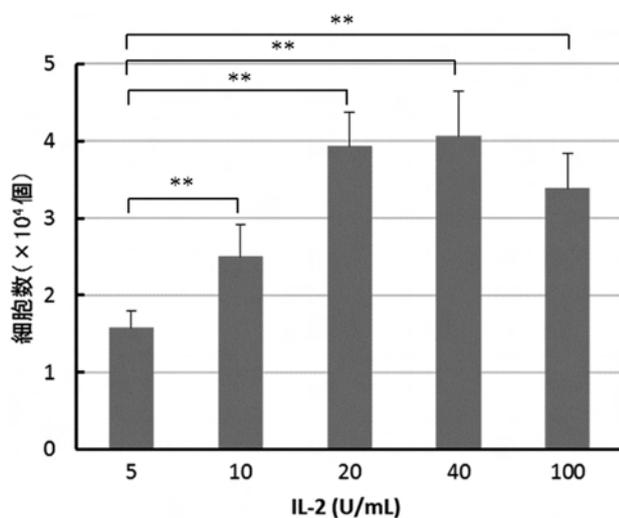


図2 IL-2刺激による大型細胞数の変化
図1-Bにおける小型細胞集団(I)=5000個を基準としたときの大型細胞集団(II)の細胞数の変化を示す。
means ± S.D., n=5 (**p<0.01)

3. CD56抗原発現量の変化

IL-2刺激によるKHYG-1細胞への影響を調べるため、指標として細胞膜上のCD56抗原発現量の変化を解析した。その結果、IL-2濃度5U/mLと比較して、すべてのIL-2濃度においてCD56抗原発現量の有意な上昇を認め、さらに濃度依存的な上昇を認めたが、IL-2濃度が20U/

mL以上では、その効果はプラトーに達した(図3)。

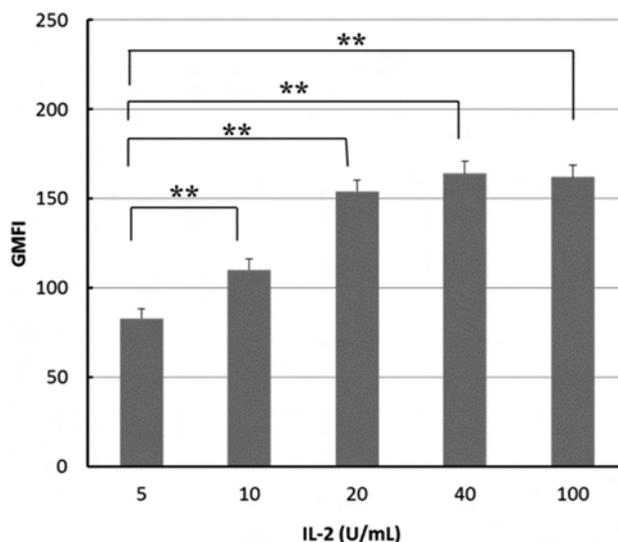


図3 IL-2刺激によるCD56抗原発現量
means ± S.D., n=5 (**p<0.01)

4. 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濃度の増加に伴い、細胞傷害性が増加することが認められた。また、Effector cell:Target cell (E:T)比における細胞傷害性については、E:T=20:1ではIL-2濃度刺激0U/mLと100U/mLとの間で有意差が認められた。一方、E:T=10:1ではIL-2濃度刺激0U/mLと10U/mLおよび100U/mLにおいて有意な細胞傷害率の上昇が認められた(図4)。

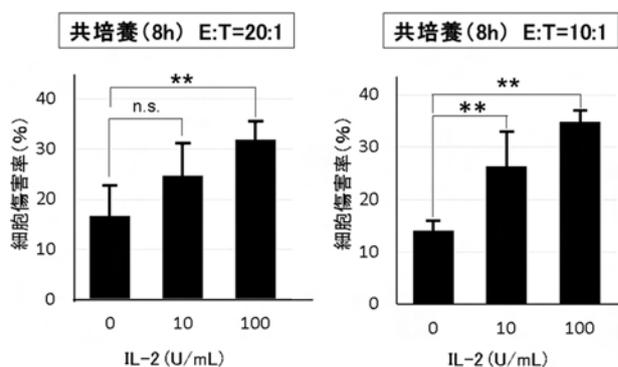


図4 KHYG-1のK562に対する細胞傷害性
means ± S.D., n=5 (**p<0.01, n.s.: Not Significant)

考 察

NK細胞は、1970年代初めに発見された細胞で、自然免疫の主要な因子として働く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¹⁾。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といった特徴を持ち、その機能については現在でもさまざまな検討が行われている。近年、患者自身のNK細胞を抽出し、体外で増殖・活性化し、患者の体内に戻すことでがんを治療する「免疫細胞療法」が注目されている²⁾。一般的に、NK細胞の活性化評価法には細胞傷害性³⁾やパーフォリン、グランザイム等のサイトカイン産生能などの解析が用いられているが、これらは操作が煩雑で解析に時間を要するといった難点が存在する。NK細胞の表面には、T細胞普遍的マーカーであるCD3抗原の他、通常ヒトでは、CD16 (FcγR III) 抗原やCD56抗原という表面マーカーを発現している。われわれは中でも特にCD56抗原に注目し、NK細胞膜上のCD56抗原を指標とすることで、より簡便なNK活性評価が可能であることを報告してきた⁴⁾。さらに、この方法を用いたNK細胞の賦活化物質の探索が可能となったが、この方法はヒトのNK細胞を使用し、採血やNK細胞の細胞調整などが必要であり、さらに侵襲的であることに加え、倫理面や採血を行う資格のない者には利用が困難である。そこで今回われわれは、ヒトNK細胞の代替細胞となるヒトNK様培養細胞KHYG-1を用いたNK細胞機能評価法を確立するため、KHYG-1においてもCD56抗原をNK細胞活性の評価に用いることが可能か検討を行った。

IL-2は、主に1型ヘルパーT細胞により産生されるサイトカインで、T細胞、B細胞、マクロファージ等の細胞に対して作用することが知られており、NK細胞においても増殖・活性化作用を有する⁵⁾。ヒトNK様培養細胞であるKHYG-1についてIL-2により刺激を行うと、細胞の形態に変化が認められた(図1-A, B)。具体的には、IL-2刺激濃度依存的に細胞が大型化し、桿状化や細胞増殖が進むという変化であり、KHYG-1に対するIL-2の影響が現れたと考えられる。また、細胞形態の変化に伴って、KHYG-1細胞膜上のCD56抗原の発現レベルの上昇が認められた(図3)。この結果から、ヒトNK細胞と同様にKHYG-1でもIL-2刺激によってCD56抗原の発現レベルが上昇することが明らかとなったが、それが活性化によるものかどうかを明らかにするため、さらに細胞傷

害性の検討を行った。その結果、IL-2刺激濃度の増加とともに細胞傷害性が上昇した(図4)。これらの結果より、IL-2刺激によってCD56抗原と細胞傷害性がともに上昇したことから、間接的ではあるが、ヒトNK細胞と同様、KHYG-1細胞においても細胞膜上のCD56抗原をNK細胞活性の評価指標として利用できる可能性が示唆された。

今回の検討により、ヒトNK様培養細胞であるKHYG-1を用いた細胞膜上のCD56抗原が活性化評価指標となり得ることが示唆されたことから、NK細胞の代替細胞として、KHYG-1が利用できる可能性が考えられる。これにより、細胞を非侵襲的に大量に入手することができ、NK細胞の活性化に影響を及ぼす薬剤効果の検討や賦活化物質の探索などが簡単に行えるようになり、NK細胞の研究に非常に有用であると考えられる。

また、NK細胞は加齢やストレスによって活性が低下し、食品や笑い、漢方などによって賦活化することが知られているが、その中でも現在われわれは漢方に注目している。特に、補中益気湯は、オウギ、タイソウ、ソウジュツ、チンピ、ニンジン、カンゾウ、トウキ、ショウマ、サイコ、ショウキョウから構成される漢方薬であり、体力の低下したものや食欲不振等に対して用いられる^{6,7)}。また、免疫系に対する効果も報告されているが、その詳細については不明な点も多く、NK細胞に対する補中益気湯の影響について検討を行うことは重要であると考えられる。今後は、今回確立したKHYG-1を用いた評価法により、補中益気湯刺激によるNK細胞活性について検討を行い、補中益気湯のNK細胞活性への有効性を科学的に評価することで、今後の臨床、患者治療に貢献したい。

文 献

- 1) Santoli, D., Koprowski, H.: Mechanisms of activation of human natural killer cells against tumor and virus-infected cells. *Immunol. Rev.* **44**: 125-163, 1979
- 2) リンパ球バンク株式会社 (<https://www.lymphocyte-bank.co.jp/tokuchou.html>)
- 3) 押味和夫, 狩野庄吾: Natural killer 細胞活性測定法, 日本臨床免疫学会誌, **3(4)**: 225-230, 1980
- 4) Oboshi, W., Aki, K., Tada, T., Watanabe, T., *et al.*: Flow Cytometric Evaluation of Surface CD56 Expression on Activated Natural Killer Cells as Fun-

- ctional Marker. The Journal of Medical Investigation, **63**(3, 4) : 199-203, 2016
- 5) Henney, C. S., Kuribayashi, K., Kern, D. E., Gillis, S. : Interleukin-2 augments natural killer cell activity. Nature., **291** : 335-338, 1981
- 6) ツムラ補中益気湯エキス顆粒 (医療用) 添付文書
- 7) 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

Evaluation of NK cell function using human NK-like cultured cell, KHYG-1

Kensaku Aki¹⁾, Mizuki Sato²⁾, Atsumi Sone³⁾, Kazuyoshi Kawazoe⁴⁾, and Eiji Hosoi¹⁾

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

²⁾*Pharmacy Department, Seikei-kai Chiba Medical Center, Chiba, Japan*

³⁾*Subdivision of Biomedical Laboratory Sciences, Graduate School of Health Sciences, Tokushima University, Tokushima, Japan*

⁴⁾*Division of Natural Medicine and Therapeutics, Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmacy, SHOWA University, Tokyo, Japan*

SUMMARY

NK cells play an important role in the elimination of viral infection and tumors. In recent years, immune cell therapy using activated NK cells has attracted attention, and the search for activators and evaluation of NK cell activity have become important. We previously reported a positive correlation between CD56 antigen expression, which is the major cell membrane antigen of human NK cells, and NK cell activity or cytotoxicity, and demonstrated that it is possible to evaluate NK cell function using the CD56 antigen as an index. This simple evaluation method is useful for functional evaluation of NK cells and the search for activators. However, it requires blood sampling and preparation of NK cells because it uses human NK cells. Therefore, in this study, we examined whether the CD56 antigen functions as an activation index using KHYG-1 human NK-like cultured cells as a substitute for NK cells.

As a result, the CD56 antigen on the KHYG-1 cell membrane was increased in a concentration-dependent manner by IL-2 stimulation, as was the cytotoxicity. This suggests that the CD56 antigen on the KHYG-1 cell membrane can be used as an evaluation index of NK activity as in human NK cells.

Key words : NK cell, KHYG-1, CD56 antigen, IL-2