

新北市政府 111 年度自行研究報告

研究報告名稱：

評估結合嵌合上皮細胞黏附分子抗原受體之自然殺手細胞和單羧酸轉運蛋白抑制劑對食道癌細胞的治療效果

研究機關：新北市立聯合醫院

研究人員：謝致政

研究期程：111.01.01-111.12.31

新北市政府 111 年度自行研究成果摘要表

計 畫 名 稱	評估結合嵌合上皮細胞黏附分子抗原受體之自然殺手細胞和單羧酸轉運蛋白抑制劑對食道癌細胞的治療效果
期 程	自 111 年 1 月 1 日至 111 年 12 月 31 日
經 費	1,000,000 元
緣 起 與 目 的	<p>整體研究計畫的主要目的：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 建立 EpCAM-CAR-NK 92 細胞，並評估其對食道癌細胞之毒殺作用 2. 評估乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，對 NK 92 細胞毒殺食道癌細胞之影響 3. 評估結合 EpCAM-CAR-NK 92 和乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，對食道癌細胞之毒殺作用
方 法 與 過 程	<p>本計畫的研究方法，將以食道癌細胞株和自然殺手細胞株 NK-92 為主要的研究材料。我們會建立 EpCAM-CAR-NK 92 細胞，分析 EpCAM-CAR-NK 92 細胞對食道癌細胞株的毒殺能力，比較不同 EpCAM 表現的食道癌細胞，EpCAM-CAR-NK 92 的毒殺能力是否會不同。同時也評估乳酸是否會影響 EpCAM-CAR-NK 92 細胞的毒殺作用與可能相關的作用機轉。同時利用乳酸運輸蛋白 MCT1 抑制劑結合 EpCAM-CAR-NK 92，評估二者的合用，是否對食道癌的治療有加成性的效果。</p>
研 究 發 現 及 建 議	<p>我們的實驗研究結果有下列幾點：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 我們建立了一株具有特異性結合 EpCAM 的 CAR-NK92 細胞株，稱為 EpCAM CAR-NK92。進一步的研究也發現，EpCAM CAR-NK92 較原來的 NK92 細胞，對聚球的食道癌細胞株 TE-1 和 TE-9 都有較強的毒殺能力。特別是 TE-1 細胞。

2. 我們也發現乳酸也可以抑制 NK92 細胞對食道癌細胞株的毒殺能力。但在利用乳酸運輸蛋白 (MCT-1) 抑制劑測試可能的機轉時，發現 TE-1 和 TE-9 細胞株的反應不太一樣。TE-1 呈現出乳酸可能透過乳酸運輸蛋白 (MCT-1) 進入腫瘤細胞和 NK92 細胞內，進而影響腫瘤細胞和 NK92 細胞的功能。利用 MCT-1 抑制劑，可以有效的抑制乳酸的 NK92 細胞毒殺能力的壓抑，使其恢復到與無乳酸處理時的狀態一樣。然而，TE-9 細胞株，卻有不一樣的反應，其對 MCT-1 抑制劑似乎無反應，加入 MCT-1 抑制劑，也無法恢復 NK92 細胞受到乳酸的影響。
3. 由於 TE-1 和 TE-9 對乳酸的反應和對 NK92 細胞毒殺能力的不一致，我們進一步分析其可能的機轉。我們發現 TE-1 和 TE-9 所表現的 MICA 蛋白質的量就有差異，TE-1 較 TE-9 為高。而 MICA 是 NK 細胞 NKG2D 受體的配體蛋白。NKG2D 是 NK 細胞的激活受體，可以刺激 NK 細胞的活性，增強其細胞毒殺能力。因此，TE-1 較易受到 NK92 細胞的毒殺，可能與其較高的 MICA 表現有關。而乳酸處理後，也可以二細胞株的 MICA 表現量都降低，或許也因此降低了 NK92 細胞的毒殺能力。
4. 乳酸如何影響食道癌細胞和 NK92 細胞，從 MCT-1 的抑制劑作用結果來看，TE-1 細胞和 TE-9 細胞使用的機轉似乎不同。乳酸似乎可以透過 MCT-1 影響 TE-1 細胞的作用，因此抑制 MCT-1 的功能，乳酸對 TE-1 的影響就減弱了。而 TE-9，MCT-1 就較無作用，抑制 MCT-1，並不影響乳酸的作用。由於，乳酸也可以透過乳酸受體 GPR81 影響細胞的作用，或是另一個乳酸運輸蛋白 MCT-4，也可以取代

	<p>MCT-1 的功能，TE-9 細胞是否透過這些方式受到乳酸影響，需要進一步釐清。</p> <p>從我們的實驗結果，可以得知，EpCAM CAR-NK92 細胞株對聚球的食道癌細胞有更強的毒殺能力，由於聚球細胞通常有更強的腫瘤幹細胞特性，本身對治療就較有抗性，而上皮細胞類的腫瘤幹細胞常會有 EpCAM 高表現的情況，因此，我們的實驗可以發現，EpCAM CAR-NK92 有更強的毒殺聚球細胞的能力。此外，我們的結果也證明抑制乳酸的作用，可以強化 NK 細胞的毒殺能力，而不同食道癌細胞對乳酸作用，可能有多個不同的運作機轉，進一步的實驗，將這些機轉釐清楚，應該可以對後續將乳酸作為治療標的，有更明確的了解。雖然，目前尚無法有明確證據證明結合 EpCAM CAR-NK92 和抑制乳酸作用可以有更佳，對食道癌的治療有更佳的效果，但我們的實驗數據，得到一些正面的結果，這樣的治療策略是值得進一步研究。</p>
備	註

一、摘要

食道癌目前的治療仍是以手術、放射治療和化學療法為主。近幾年，免疫療法被認為是癌症治療上的重要里程碑。已有幾種免疫檢查點阻斷劑被用來治療食道癌，同時許多針對食道癌的免疫療法研究也持續進行中。然而，另一個臨床上非常重要的免疫療法：人造嵌合式細胞表面抗原受體 T 細胞(chimeric antigen receptor, CAR-T)，也被認為是治療癌症一重要的利器。CAR-T 需要有一專一的腫瘤抗原。而上皮細胞黏附分子(EpCAM)在食道癌細胞常會過度表現，也被認為是可能與腫瘤幹細胞有關，因此被視為一重要免疫治療的標的分子。由於，T 細胞屬於後天免疫，常需要特定的抗原活化，而自然殺手細胞(natural killer cell, NK)則為先天免疫的一環，可以直接毒殺癌細胞。因此，利用自然殺手細胞進行的免疫療法，也是一重要的治療方式。除此之外，癌細胞的代謝所產生的過多乳酸，被認為會影響免疫療法的功效。因此，本計畫將針對食道癌細胞高表現 EpCAM 的特性，對食道癌治療提出一新的方向。

目的：

1. 建立 EpCAM-CAR-NK 92 細胞，並評估其對食道癌細胞之毒殺作用
2. 評估乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，對 NK 92 細胞毒殺食道癌細胞之影響
3. 評估結合 EpCAM-CAR-NK 92 和乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，對食道癌細胞之毒殺作用

結果：

1. 我們建立了一株具有特異性結合 EpCAM 的 CAR-NK92 細胞株，稱為 EpCAM CAR-NK92。進一步的研究也發現，EpCAM CAR-NK92 較原來的 NK92 細胞，對聚球的食道癌細胞株 TE-1 和 TE-9 都有較強的毒殺能力。特別是 TE-1 細胞。

2. 我們也發現乳酸也可以抑制 NK92 細胞對食道癌細胞株的毒殺能力。但在利用乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑測試可能的機轉時，發現 TE-1 和 TE-9 細胞株的反應不太一樣。TE-1 呈現出乳酸可能透過乳酸運輸蛋白(MCT-1)進入腫瘤細胞和 NK92 細胞內，進而影響腫瘤細胞和

NK92 細胞的功能。利用 MCT-1 抑制劑，可以有效的抑制乳酸的 NK92 細胞毒殺能力的壓抑，使其恢復到與無乳酸處理時的狀態一樣。然而，TE-9 細胞株，卻有不一樣的反應，其對 MCT-1 抑制劑似乎無反應，加入 MCT-1 抑制劑，也無法恢復 NK92 細胞受到乳酸的影響。

3. 由於 TE-1 和 TE-9 對乳酸的反應和對 NK92 細胞毒殺能力的不一致，我們進一步分析其可能的機轉。我們發現 TE-1 和 TE-9 所表現的 MICA 蛋白質的量就有差異，TE-1 較 TE-9 為高。而 MICA 是 NK 細胞 NKG2D 受體的配體蛋白。NKG2D 是 NK 細胞的激活受體，可以刺激 NK 細胞的活性，增強其細胞毒殺能力。因此，TE-1 較易受到 NK92 細胞的毒殺，可能與其較高的 MICA 表現有關。而乳酸處理後，也可以二細胞株的 MICA 表現量都降低，或許也因此降低了 NK92 細胞的毒殺能力。

4. 乳酸如何影響食道癌細胞和 NK92 細胞，從 MCT-1 的抑制劑作用結果來看，TE-1 細胞和 TE-9 細胞使用的機轉似乎不同。乳酸似乎可以透過 MCT-1 影響 TE-1 細胞的作用，因此抑制 MCT-1 的功能，乳酸對 TE-1 的影響就減弱了。而 TE-9，MCT-1 就較無作用，抑制 MCT-1，並不影響乳酸的作用。由於，乳酸也可以透過乳酸受體 GPR81 影響細胞的作用，或是另一個乳酸運輸蛋白 MCT-4，也可以取代 MCT-1 的功能，TE-9 細胞是否透過這些方式受到乳酸影響，需要近一步釐清。

二、主旨及背景說明

本計畫的主旨是探討新的食道癌的治療方略，主要的研究方法，將以食道癌細胞株和自然殺手細胞株 NK-92 為主要的研究材料。我們會建立 EpCAM-CAR-NK 92 細胞，分析 EpCAM-CAR-NK 92 細胞對食道癌細胞株的毒殺能力，比較不同 EpCAM 表現的食道癌細胞，EpCAM-CAR-NK 92 的毒殺能力是否會不同。同時也評估乳酸是否會影響 EpCAM-CAR-NK 92 細胞的毒殺作用與可能相關的作用機轉。同時利用乳酸運輸蛋白 MCT1 抑制劑結合 EpCAM-CAR-NK 92，評估二者的合用，是否對食道癌的治療有加成性的效果。

三、相關研究、文獻之檢討

上皮細胞黏附分子(Epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)

上皮細胞黏附分子(EpCAM)是一種細胞膜上的醣蛋白，主要表現在上皮細胞上(epithelium)，特別是鱗狀上皮細胞(squamous epithelium)。EpCAM 是由位於第 2 號染色體 2p21 位置上的 epcam 基因所轉譯出的蛋白。epcam 基因全長約 14kb，含 9 個外顯子(exon)，轉錄的 mRNA 約有 1.5kb。EpCAM 蛋白有 314 胺基酸，其中 26 個胺基酸位於細胞質內(EpICD)，而其細胞外的結構功能區域(EpEx)則包含一個類上皮生長因子功能區(epidermal growth factor (EGF)-like domain)和甲狀腺球蛋白功能區(Thyroglobulin domains)。EpCAM 會以 4 聯體(Tetramers)方式，在細胞膜上執行其功能(1~3)。(圖一)

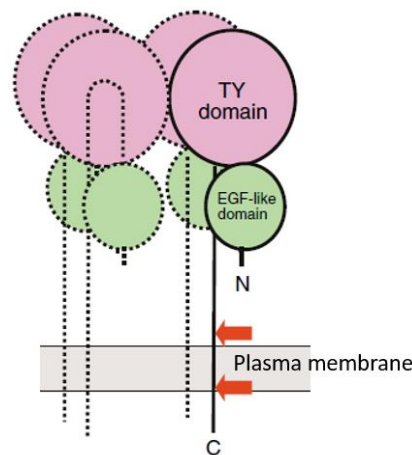


Fig 1、EpCAM 蛋白在細胞膜上的功能結構圖。

(引用 Dr PA Baeuerle 發表於 British Journal of Cancer (2007) 96, 417 - 423 之插圖)

EpCAM 最早是在大腸癌細胞發現，被認為是一種腫瘤抗原(tumor antigen)(4)。其能抑制 E-鈣黏蛋白(E-cadherin)的作用，使細胞間的連結變得較鬆散；此外，結合第 7 型密連蛋白 claudin 7，可以干擾細胞間的連結，促使細胞的移動，增生，癌化，甚至細胞的轉移。許多的腫瘤細胞，例如膀胱癌，胰臟癌，乳癌，都可以看到 EpCAM 的高表現(5-7)。一些比較不分化的腫瘤細胞，較大的腫瘤或是具有淋巴結轉移的腫瘤，也常看到較高的 EpCAM 表現。過去的許多研究也發現，在子宮頸癌、肝癌，乳癌，攝護腺癌等，癌細胞有

高表現的 EpCAM，病患的預後較差，存活率也較短。因此認為 EpCAM 具有致癌的作用。探究其可能的機轉，過去研究發現 EpCAM 可以被 tumor necrosis factor- α -converting enzyme 將其胞外蛋白功能區(EpEx)切下，而其胞內功能區(EpICD)也可以被 presenilin-2 切下，成為訊息傳遞分子。EpICD 與轉錄因子 Lef-1 形成的複合體，能活化 c-myc, cyclin A 和 cyclin E 的表現，促進細胞的增生，因此高表現的 EpCAM 可能藉此訊息傳遞路徑，促進癌細胞的進展(8-10)。

然而，從 EpCAM 蛋白本身的生理功能來看，可以加強細胞間的連結，因此可以防止細胞的轉移。在腎臟癌(renal clear cell carcinoma)和甲狀腺癌確實有發現，高表現的 EpCAM 可以抑制癌細胞的轉移，具高表現 EpCAM 的這二類癌症患者其存和率也較佳。但是這樣的現象就也在其他類別的腫瘤細胞，如卵巢癌和胃癌發現過(11,12)。

EpCAM 在食道癌的表現

而 EpCAM 在食道癌的表現又如何?由日本學者 Hitoshi Kimura 等人的研究發現，幾乎 98%左右的食道癌細胞都具 EpCAM 蛋白的表現，而且在癌細胞的表現量都比正常食道細胞要來的高；而 EpCAM 的表現高低和食道癌的生長的深度，血管的侵犯和臨床分期呈正相關。但高表現 EpCAM 的食道癌病患其存活率卻是較高的(13)。這和在腎臟癌，卵巢癌或胃癌所看的現象一致。探討可能的原因，是細胞癌化早期 EpCAM 會過度的表現，高表現的 EpCAM 蛋白會使細胞的連接更緊密，抑制了其轉移能力。但 Tatsuo Matsuda 等學者對食道鱗狀上皮細胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)的研究卻有不一樣的結果。他們發現高表現的 EpCAM 食道癌患者其存活率是較差的；同時利用食道癌細胞株研究發現，若將 EpCAM 的表現抑制，其生成腫瘤的能力會降低(14)。

雖然，EpCAM 的表現在食道癌究竟是有利生存或不利生存似乎有不同的研究發現。但 EpCAM 在食道癌細胞確實較正常細胞有更高的表現。因此，在現在講究精準醫療的年代，EpCAM 被認為是一個值得作為癌症治療的標的物，也是現在癌症免疫療法的一個目標。

癌症的免疫療法

免疫療法是近年最被期待的癌症治療方法之一。利用抑制免疫檢查點蛋白(immune checkpoint)的抗體製劑，以及利用 T 細胞和自然殺手細胞(natural killer cell, NK cell)的免疫細胞療法，已是臨床常規的癌症治療方法，特別在血液性腫瘤上的治療更有相當不錯的治療成效。

CTLA-4(cytotoxic T lymphocyte antigen-4)和 PD-1 蛋白都是所謂的免疫檢查點蛋白，通常位於免疫細胞，如 T 細胞，NK 細胞的細胞膜表面，具有調控免疫細胞的能力。2011 年，美國食品藥物管理局(FDA)核准了對抗 CTLA-4 的單株抗體 ipilimumab 用來治療黑色素細胞瘤，開啟了癌症免疫療法的新世代(15,16)。癌細胞也常高度表現出免疫檢查點的配體蛋白，如 PD-L1，和 PD-1 受體結合後，會抑制免疫細胞的活性，使癌細胞逃脫免疫系統的監控。目前臨床上也已開發出對抗 PD-1 和 PD-L1 的抗體藥物，藉由防止免疫檢查點的活化，提升免疫細胞對癌細胞的毒殺作用達到治療的目的(17,18)。

而在利用免疫細胞療法方面，一種利用人造嵌合式細胞表面抗原受體的方法(chimeric antigen receptor, CAR)被發明出來，將此特定的人造抗原蛋白，結合到 T 細胞表面產生所謂的 CAR-T 細胞，CAR-T 細胞的治療方法也核准在臨床上利用(19)。而此特定的抗原蛋白，通常選定在癌細胞有大量表現或特定之腫瘤抗原，因此可以依不同人、不同的癌細胞的特性來設計，達到個人化醫療的目的。根據這樣的原理與假說，EpCAM 蛋白會是一個適合製作 CAR 的標的物。

食道癌的免疫療法

食道癌的主要治療方法，目前仍是以傳統的手術切除，伴隨放射線治療或是化學治療為主。雖然有多種治療方式，但是食道癌還是有很高的復發率。在臨床上，免疫療法的運用仍是卻乏的。過去也有一些研究發現，食道癌也會過度表現一些相關免疫檢查點的蛋白。如 Ohigashi 等學者，在食道鱗狀上皮細胞癌(ESCC)的研究，發現 42% 檢體為 PD-L1 陽性，48% 檢體為 PD-L2 陽性。Lim 等韓國學者的研究也發現，ESCC 檢體中，56% 具高表現的 PD-L1，其整體的存活率也較短(20-21)。除了 PD/PDL1 外，CLTA-4 在 ESCC 檢體中表現被認為也是上升的，而 CLTA-4 的表現也和較短的整體存活率正相關 (22)。因此，已有許多結合免疫檢查點抑制劑與傳統化學藥物治療或是放射治療運用在食道癌的臨床試驗案，初期的結果呈現較為樂觀，整體食道癌患

者存活率有增加之趨勢。美國 FDA 也通過了幾項用來治療食道癌 (esophageal carcinoma) 的免疫檢查點抑制單株抗體藥物，如 Opdivo (nivolumab) 和 Keytruda (pembrolizumab) (23)。

腫瘤微環境與免疫抑制

雖然免疫療法開啟了治療癌症的新方向，但免疫療法的成功與否卻受到很多因素的影響。特別是在固態瘤的腫瘤微環境 (tumor microenvironment, TME)，存在很多干擾免疫系統運作的因素。TME 是一個相當複雜的環境，其中包含了腫瘤細胞，各種間質細胞，和浸潤的各種免疫細胞 (Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)。而環境內細胞間的組織間液，其組成成分、含氧量、酸鹼度等也受到這些細胞影響。而這些交互作用，更能影響癌細胞的發展甚或轉移 (24)。

TILs 被認為是癌症免疫療法成功與否最重要的因素。過去的研究發現，腫瘤微環境中的一些物質能抑制 TILs 的功能，協助癌細胞逃脫免疫系統的監控。例如，癌細胞或是間質細胞會分泌 TGF- β 促進 Treg 細胞的增生，抑制免疫作用細胞 (effector cells) 的擴張 (25)。此外，TME 也深受癌細胞代謝的影響。癌細胞代謝有個重要的現象，一般稱為 Warburg effects。

西元 1920 年，德國科學家 Otto Warburg 發現在體外培養的腫瘤組織裡，癌細胞有非常高的葡萄糖消耗率並且轉換葡萄糖產生大量乳酸 (Lactic acid)，即使在氧氣充足的環境之下亦是如此。這種不同於正常細胞的能量代謝反應，以偏好進行糖解反應的現象，就被稱為 Warburg effect。糖解反應的終產物是乳酸，估計大部分的腫瘤細胞可以產生高於正常細胞 40 倍以上的乳酸。乳酸除了含有原葡萄糖內大量未被釋出的能量外，近年的研究也發現他對腫瘤的生長具有多方面的影響 (26, 27)。

腫瘤細胞藉由糖解反應產生大量的乳酸，這些乳酸會釋放到細胞外，影響腫瘤微環境的生態。乳酸可以做為微環境中其他腫瘤細胞的能量來源，也可以誘發其他間質細胞的代謝偏移，使其偏好糖解反應，轉變成為腫瘤相關纖維母細胞 (cancer associated fibroblast, CAF)。另一方面，癌細胞釋放的乳酸也會誘發巨噬細胞產生極化作用，使其表現出 M2 型巨噬細胞的特性以促進腫瘤的惡化 (28)。除了乳酸會影響腫瘤微環境，也有其他研究證實癌細胞的代謝途徑會受到

周遭微環境的影響。乳酸對腫瘤生長的重要性除了以代謝的角度來探討外，也有文獻指出乳酸在整個腫瘤微環境裡對免疫抑制的貢獻。Karin Fischer 等人發現乳酸會抑制 CD8 T 細胞的細胞激素 IL-2 以及干擾素 IFN- γ ，進而造成免疫抑制。乳酸脫氫酶(Lactate dehydrogenase A LDHA)為糖解反應中最末端的反應所需之酵素，負責丙酮酸(pyruvate)進一步轉換成乳酸。許多致癌基因(Oncogene)被發現會參與調控 LDHA 表現，進而促使細胞代謝模式更趨向糖解反應 (29)。Brand 等人進一步發現若抑制癌細胞的 LDHA 表現，可以使腫瘤周圍 T 細胞以及 NK 細胞數量顯著提升，並使腫瘤生長趨緩。這些研究結果都顯示乳酸具備免疫抑制功能，能協助癌細胞逃脫免疫監控的能力。但其詳細的分子機制仍是不明 (30)。

自然殺手細胞免疫療法

在腫瘤微環境的免疫細胞，除了淋巴細胞外，自然殺手細胞 (Natural killer (NK) cell)也是另一個能抑制癌細胞進展的免疫細胞(31)。和 T 細胞專一性的辨識癌細胞的機轉不同，NK 細胞並不需要癌細胞上特殊抗原的活化，NK 細胞主要藉由癌細胞上的配體活化 NK 細胞上先天的特定受體而產生作用。而 NK 細胞上的特定受體主要有二大類，一類為抑制性受體，例如 KIR 受體 (Killer-cell immunoglobulin-like receptor)，另一類為活化性受體，例如 NCR (natural cytotoxicity receptors)，NKp46、NKp30、NKp44 等 (32)。NK 細胞屬於先天自然免疫系統，會受到本身正常細胞上的 MHC-1 所釋放出抑制性訊號而抑制其功能 (33)。但當細胞受到病毒感染或癌化時，其 MHC-1 分子的表現就會降低或消失，使 NK 細胞的抑制訊號減少，進而驅使 NK 細胞發揮細胞毒殺的功能。同時細胞癌化過程，也可能產生許多新的腫瘤抗原，可以進一步活化 NK 細胞的活化性受體，使 NK 細胞更具細胞毒殺之能力。

利用 NK 細胞進行的免疫療法，在血液性腫瘤和固態瘤的治療研究上，都有令人期待的結果。日本學者 Fujisaki 等人發明的體外 NK 細胞擴增系統 (Natural Killer Cell Activation and Expansion System, NKAES)更使 NK 細胞免疫療法能在臨床上真正運用(34)。Lim KS 等學者利用食道癌細胞株的研究發現，食道癌細胞株會表現大量的 MICA、MICB 和 NKG2DLs。而 NKG2D 是 NK 細胞上的活化性受體，

NKG2DL 為其配體，能和 NKG2D 結合而活化 NK 細胞，使其具有細胞毒殺作用。NKG2DLs-NKG2D 的相互反應，能有效活化 NK 細胞對食道癌細胞株進行胞殺作用。其更進一步發現，促進癌細胞 EMT 的因子，也會增強 NKG2DL 的表現，使癌細胞更易被 NK 細胞毒殺。因此 NK 細胞免疫療法，應是治療食道癌的一可行方法 (35)。

而 NK 92 細胞為一個 NK 細胞株，來自於非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)病人，它的特色是除了低表現的 KIR2DL4 受體外，沒有其他的抑制性的 KIR 受體，但具有所有活化性受體，如 NKp30, NKp46, 2B4, NKGD, E, CD28 等(36)。這使得 NK 92 細胞在癌症治療應用上可以突破過去一般從患者血液抽取的 NK 細胞所遇到的障礙，也可以較廣泛的運用在各類型的癌細胞。

此外隨著嵌合抗體 T 細胞 (Chimeric antigen receptor, CAR T) 療法技術的發展，CAR-NK 92 也受到重視，被賦予對表現特定抗原的癌細胞專一性的殺傷力。GD2-specific-CAR-NK 92 經實驗證實可以有效的清除帶有 GD2 抗原的神經膠質母細胞瘤 (37,38)。

四、研究方法

本計畫將以食道癌細胞株 TE1、TE9 和 NK92 細胞做為研究材料。研究實驗進行如下所述：

AIM 1: 建立 EpCAM-CAR-NK 92 細胞，並評估其對食道癌細胞之毒殺作用。

為了評估 EpCAM-CAR-NK 92 自然殺手細胞對食道癌進行免疫療法的效率，我們先建立 EpCAM-CAR-NK 92 自然殺手細胞株，再進行對食道癌細胞株的毒殺作用，不同比例(E:T ratio)的 EpCAM-CAR-NK 92 細胞 (E, effector cell)和食道癌細胞株 (T, tumor cell)共培養 4 小時後，觀察食道癌細胞株的存活率。食道癌細胞株的存活率將以結晶紫(crystal violet)染色和鈣黃綠素(Calcein AM)二種方法評估。

EpCAM-CAR 將利用 Creative Biolabs 公司所生產的 Anti-EPCAM (CBXS-4684) h(CD28-CD3 ζ) CAR 做為研究的工具。此 CAR 為第 2 代 CAR 產品，具有 CD28 和 CD3 ζ 做為細胞內部的訊息傳遞，刺激 NK 細胞的增生與活化。我們將利用 lipofetamin3000 試劑與實驗步驟進行 CAR 載體的傳染(transfection)，以建立 EpCAM-CAR-NK 92 自然殺手細胞株。

AIM 2: 評估乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，對NK 92 細胞毒殺食道癌細胞之影響。

腫瘤微環境中會出現大量的乳酸，而乳酸可能影響免疫細胞對癌細胞的監控。我們會先以乳酸處理食道癌細胞株，觀察食道癌細胞株的變化，包含其增生能力(proliferation)與移動能力(migration)是否增強。接著，再將乳酸處理過的食道癌細胞株與NK92 細胞一起進行細胞毒殺實驗。完成初步實驗後，我們會再利用 MCT-1 抑制劑處理食道癌細胞和NK92 細胞，然後再進行細胞毒殺實驗。

AIM3.評估結合 EpCAM-CAR-NK 92 和乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，對食道癌細胞之毒殺作用

3.1 評估乳酸對 EpCAM-CAR-NK 92 的作用:我們會先以乳酸處理 EpCAM-CAR-NK 92 細胞 7 天後，再進行對食道癌細胞的毒殺實驗。

3.2 評估 MCT1 抑制劑對 EpCAM-CAR-NK 92 的作用:

3.2.1 我們會先以 MCT1 抑制劑處理 EpCAM-CAR-NK 92 細胞 7 天後，再進行對食道癌細胞的毒殺實驗。

3.2.2 我們會先以乳酸加上 MCT1 抑制劑處理 EpCAM-CAR-NK 92 細胞 7 天後，再進行對食道癌細胞的毒殺實驗。

3.3 評估 MCT1 抑制劑對食道癌細胞的作用:

3.3.1 我們會先以 MCT1 抑制劑處理食道癌細胞 7 天後，再進行 EpCAM-CAR-NK 92 對食道癌細胞的毒殺實驗。

3.3.2 我們會先以乳酸加上 MCT1 抑制劑處理食道癌細胞 7 天後，再進行 EpCAM-CAR-NK 92 細胞對食道癌細胞的毒殺實驗。

實驗步驟:

細胞培養

食道癌細胞株 TE1、TE9 以 complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培養，並加入 10%胎牛血清 fetal bovine serum (FBS)、1mM sodium pyruvate、1% antibiotic-antimycotic solution 來培養。NK92MI 以 Alpha Minimal Essential medium without ribonucleosides and deoxyribonucleosides 來培養，並加入 12.5%胎牛血

清 fetal bovine serum (FBS)、12.5%馬血清 horse serum、2 mM L-glutamine、1.5g/L sodium bicarbonate、0.2 mM inositol、0.1 mM 2-mercaptoethanol、0.02 mM folic acid。HEK-293T 以 complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培養並加入 10%胎牛血清 fetal bovine serum (FBS)、0.1% antibiotic-antimycotic solution 來培養。刻意降低 antibiotic-antimycotic solution 濃度以增加病毒生產以及 transfection 效率。所有進行 virus transfection 亦以 complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、10%胎牛血清 fetal bovine serum (FBS)、0.1% antibiotic-antimycotic solution 來培養。為了避免在 DMEM complete medium(22.5mM glucose concentration)下過多的葡萄糖轉換成乳酸造成實驗干擾，所有進行添加乳酸實驗的細胞以 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose (5mM glucose concentration)來培養，並依實驗需求加入乳酸來探討乳酸的效應。

RNA 萃取

所有 cell lysate 以 1ml TRIzol Reagent 混和均勻，並儲存至-80°C。當要進行 RNA 萃取時，將樣品取至室溫靜置 5 分鐘。而後加入 0.2 ml chloroform 並且 inverted 約 15 秒鐘後，放置室溫靜置 3 分鐘。將樣品放置離心機，在 4°C 下 12,000 rpm 15 分鐘，使樣品分層。小心以 Pipetman 吸取上層澄清液至新的 1.5 ml microcentrifuge tube。加入等體積的 isopropanol 來將 RNA 給沉降出來。輕輕 invert 樣品大約 10-15 次，並靜置室溫約 5 分鐘。將樣品放置離心機，在 4°C 12,000 rpm 下轉 15 分鐘，之後 RNA 會完全沉澱在 microcentrifuge tube 底部。將上清液去除，並加入 1 ml 75% ethanol 然後在 4°C 12,000 rpm 下轉 20 分鐘。去除酒精，並打開抽氣櫃的空氣將樣品剩餘酒精蒸乾，此步驟約需 10-20 分鐘。

Reverse transcription

我們使用 Protech MLV Reverse Transcription kit 將 RNA 反轉錄成 cDNA。步驟如下：

先將 RNA 與 Reaction buffer、10mM dNTP、Oligo (dT)18、DEPC water、RNase inhibitor 加入 0.2ml microcentrifuge tube 並放入 PCR machine 裡，65°C 5 分鐘，此步驟目的是為了 denature 樣品。之

後放置在冰上一分鐘，並加入 Reverse Transcriptase 進入樣品，接著將樣品放入 PCR machine，以 42°C 60 分鐘處理，使樣品進行反轉錄，最後以 70°C、10 分鐘來加熱樣品，此步驟為 termination，最後得到 cDNA 並放入 -20°C 冰箱保存。

Real-Time Polymerase Chain Reaction

我們使用 SYBR green 系統來進行 real-time PCR。100ng 的 cDNA 養品、50nM forward / reverse primer、1 x SensiFAST™ SYBR 共計 10µl 加入 96 孔盤並封膜，使用離心機以 2000rpm 離心 2 分鐘，此步驟是確保 cDNA 樣品以及 primer 不會黏著在管壁上，而後將 96 孔盤置入 StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 來進行 RT-PCR 反應並偵測定量 gene expression。設定時我們以控制組的 actin (或者 α -tubulin) 設定為 internal control。一共有兩個 stage：第一個 stage 是 polymerase activation，95°C 加熱 10 分鐘。接著第二個 stage 總共有 40 個 cycle，每個 cycle 分別為 melting step (95°C、15 秒鐘) 以及 annealing / extending step (60°C、1 分鐘)。基因的相對量是以目標基因的 Ct (threshold cycle) 為標準，計算方式簡介如下： Ct of Target gene – Ct of reference gene = DCt 。待測樣品的 DCt – 基準點 (calibrator) 的 DCt 可以得到 $DDCt$ 。再帶入公式 2^{-DDCt} ，計算相對倍率。

蛋白質萃取

當細胞到達 8 分滿時 (80% confluence) 我們使用 Biological Industries (BI) 的 Trypsin EDTA (0.5%) 10X，以 PBS 稀釋到 3X，取 1ml 加入 10 cm 細胞培養盤 (或是 0.3-0.5ml 加入 6 孔盤) 置入細胞培養箱 37°C、五分鐘，使細胞 detached。再以等體積於 trypsin 的 cell culture medium 加入細胞來中和 EDTA，並將細胞液以 pipetman 吸起，並置入 microcentrifuge tube 以 4°C、5000rpm 約 5 分鐘，讓細胞 pellet 沉澱。再將上清液吸起並置換 1ml PBS，重複上述步驟離心 5 分鐘，吸起上清液並將 pellet 放入 -80°C 冰箱保存。若要進行 protein 萃取，則 Pellet 必須全程置於冰上處理。Pellet 以 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis，RIPA solution 需加入 protease inhibitor 避免蛋白受到 protease 水解，比例上為 RIPA：

Protease inhibitor = 9 : 1。將 RIPA solution 加入樣品並且 pipet 均勻並置於冰上 30 分鐘，而後放入超音波清洗機，以超音波震盪約 1 分鐘。重複上述步驟兩次。最後將樣品放入離心機，以 12000 rpm、4°C、20 分鐘的條件下進行離心，而後吸取上清液並將之放入新的 microcentrifuge tube，保存在 -80°C 冰箱保存。

西方墨點法 Western Blot

根據蛋白質的分子量，選擇置備合適的 gel 將其分離。Gel 依據置備過程，Gel acrylamide percentage 可分為 8%、10%、12.5%、15%、20%。我們研究的蛋白裡，phospho-Janus kinase 分子量為 130 kDa，故使用 8% acrylamide gel 來分離蛋白樣品。而 galectin-1 分子量為 15 kDa，使用 15% 的 acrylamide gel。其餘的蛋白分子量都落在 30-100 kDa 之間故使用 10% acrylamide gel 來分離樣品。膠體電泳的步驟為 60 伏特、1 小時使樣品跑過上膠，接著以 90 伏特、2 小時使樣品在下膠跑開。結束後準備 nitrocellulose blotting membrane，並將膠體放到 nitrocellulose blotting membrane 上使用 transfer cassette 將其固定、泡在 transfer buffer 內進行利用電壓將膠體上的蛋白轉漬到 nitrocellulose blotting membrane 上。Transfer 步驟全程在 4°C 冰箱裡進行，Transfer 條件為 300 毫安培、100 分鐘。待 Transfer 完成後，配置 tris-buffered saline / Tween-20 (0.5%) 液來進行洗滌，簡稱 TBST solution。將 nitrocellulose blotting membrane 從 transfer cassette 取出，放入 TBST solution 內洗滌約 5-10 分鐘，待洗滌完成後進行 blocking。配製 3-5% Bovine Serum Albumin (Thermo Fisher) TBST solution 做為 blocking solution，並將 nitrocellulose blotting membrane 置入含 5-10ml 的 blocking solution 盒子內，放在 shaker 上搖晃 60 分鐘。Blocking 完成後，進入初級抗體(primary antibodies)的步驟。初級抗體以 1.5% BSA TBST solution 進行配製，抗體與 TBST solution 比例為大約 1 : 500 – 1 : 10000，這部分依個別抗體的 datasheet 建議而定。初級抗體作用條件為 4°C、16 小時。待初級抗體作用完成後，將 membrane 取出並以 TBST 進行洗滌，洗滌條件為室溫之下 10 分鐘，並且重複此步驟三次，將沒有結合在 membrane 上 target protein 的初級抗體洗去。待初級抗體 incubation 完成後，配製次級抗體並將 membrane 與次級抗體 solution 在室溫下作用一小時。次級抗體分為

rabbit-、mouse-、goat- conjugated with horse radish peroxidase (HRP)，依據抗體 datasheet 上抗體來源 Host 物種，選定相對應的次級抗體來進行次級抗體實驗。完成後，帶有 HRP 的二級抗體／一級抗體／目標蛋白會形成一個 complex，加入 1：1 比例混合的 light reagent 及 oxidant reagent(Western Lighting Plus-ECL, PerkinElmer)，使 membrane 上的 HRP 經過化學反應產生 electrochemiluminescence，並以 Luminescence／Fluorescence Imaging System LAS-4000 進行偵測。

乳酸 Lactate treatment

有別於真正腫瘤微環境中酸性的乳酸，我們暫時排除酸性 pH 值所帶來的效應，專一的探討乳酸所造成的影響，故我們使用乳酸鹽 (Sodium Lactate) 來處理細胞。(Sigma-Aldrich 71718-50G)。之前文獻統計腫瘤內部乳酸濃度範圍為 8-40 mM lactate concentration。我們選用 20mM 這個乳酸濃度來處理手邊的細胞，並設計實驗測量基因、蛋白表現上的變化以及對細胞毒殺的影響。

NK 細胞殺能力的評估

使用 NK cell / Target cell 共同培養在 96 孔盤來評估 NK 細胞殺能力。前日將 Target cell 種在 96 孔盤並待其貼盤，而後吸取上清液並換上 Alpha Minimal Essential medium 培養液，並依 E/T ratio 比例加入相對應的 NK 細胞進入 96 孔盤，共同培養 4 小時，以 PBS 洗去懸浮的 NK 細胞後，加入含 MTT assay reagent 的 medium (比例為 1：4 MTT reagent：Alpha Minimal Essential medium) 後避光一小時，利用 Elisa reader (Tecan Trading AG) 來測量 cell viability。(Excitation wavelength at 560nm and emission wavelength at 590nm)。

Calcein AM assay

利用 Calcein AM 方法(Bio Vision)可對活細胞進行螢光標記的細胞染色試劑來評估 NK-92 對於食道癌細胞毒殺的能力。NK-92 對食道癌細胞完成細胞毒殺作用後，配置 Calcein AM Buffer(比例為 1:2000)，配置完成後加入細胞染色 20-30 分鐘。完成後將上清液吸出，加入 1x Lysis Buffer 培養 10 分鐘，之後將上清液吸到白色 96 孔盤。利用 ELISA reader (Tecan Trading AG) 來測量 cell viability

(Fluorescent Excitation wavelength at 485 nm and emission wavelength at 530 nm)。再利用 Calcein AM 公式進行計算。

$$\text{Calcein AM 公式} = \left[\frac{\text{各條件細胞毒殺實驗數據} - \text{單獨NK-92數據}}{\text{單獨食道癌實驗數據} - \text{Calcein AM溶液數據}} \right] * 100 \%$$

結晶紫(crystal violet)染色計算NK-92細胞毒殺能力

利用 crystal violet 進行染色，配置 0.5% crystal violet buffer (75 mL 三次水和 25 mL 甲醇)。NK-92 對食道癌完成細胞毒殺作用後，用 PBS buffer 清洗一次，將 NK-92 細胞清洗乾淨，之後將剩餘的癌細胞用 100%冰甲醇固定 20 分鐘，固定完後將甲醇溶液倒出後，使用 0.5% crystal violet buffer 進行染色 20 分鐘，再用二次水進行清洗，將細胞洗乾淨(洗至吸出水分顏色變透明為止)，再進行晾乾，最後再進行拍照以及數據分析。

單羧酸轉運蛋白 1 抑制劑 Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) Inhibitor AZD3965 處理

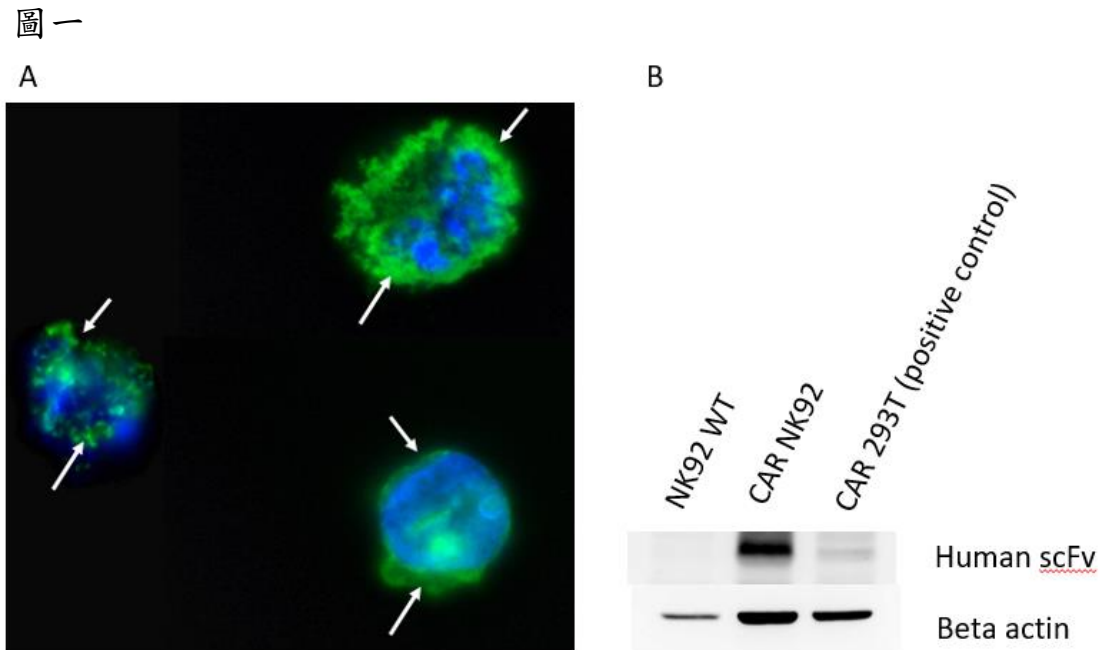
我們選用 25 nM AZD3965 這個單羧酸轉運蛋白 1 抑制劑濃度來處理本次研究的細胞(Belouèche-Babari et al., 2017)，並設計實驗測量基因和蛋白表現上的變化以及對免疫細胞毒殺毒性的影響。單羧酸轉運蛋白 1 抑制劑溶劑配置:以 5 mg 單羧酸轉運蛋白 1 抑制劑 AZD3965 粉末溶在二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)配置成濃度 1 mM。

五、研究發現

1. 建立 EpCAM-CAR-NK 92 細胞，並評估其對食道癌細胞之毒殺作用

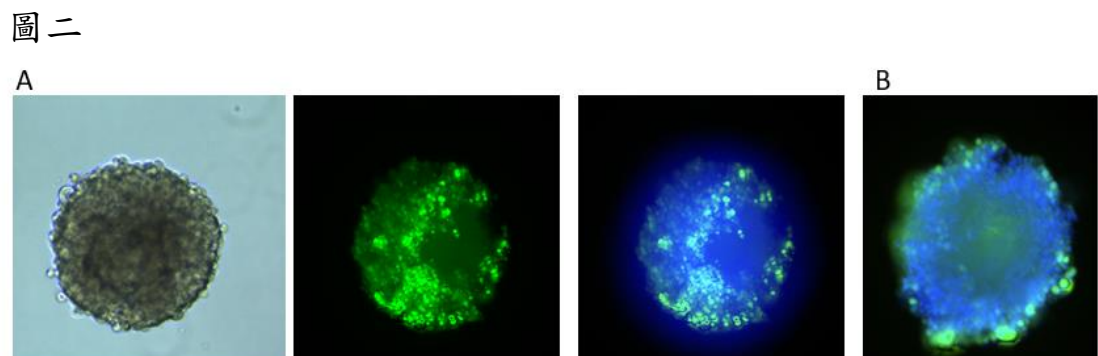
我們首先嘗試利用 lipofetamine3000 微脂體方式轉染來建立 Anti-EpCAM-CAR NK 92 細胞株，但因為 NK92 細胞的低轉染率，實驗並未成功。後來，我們改利用電穿孔方式，將 Anti-EPCAM (CBXS-4684) h(CD28-CD3ζ) CAR 轉染到 NK92 細胞，建立 EpCAM-CAR-NK 92 細胞株。再利用 Goat-anti-horse IgG f(ab)²-FITC 對此細胞進行偵測，確實可以在轉染的 NK92 細胞上，偵測出螢光訊號，代表 Anti-EpCAM CAR 會表現在 NK92 細胞上。進一步利用西方墨點法，以 anti-scFv 的抗體偵測，也可以發現我們所建立的 EpCAM-CAR-

NK 92 有較強的表現。(圖一)



圖一、EpCAM-CAR-NK 92 細胞株的建立。A.利用 Goat-anti-horse IgG f(ab)²-FITC 抗體，可以在 CAR-NK 92 細胞上看到螢光；利用 anti-scFv 的抗體，也可以發現 CAR-NK 92 有較高的 scFv 的表現。

為了確認在 3D 培養的情況下，利用 Calcein AM 螢光染劑染聚球腫瘤細胞的情況，我們測試了不同的染色時間，發現在 30 分鐘的作用下，Calcein AM 即可將大部分的細胞染色，隨著染色的時間越長，位在球體中心的細胞，也會被染色。(圖二)

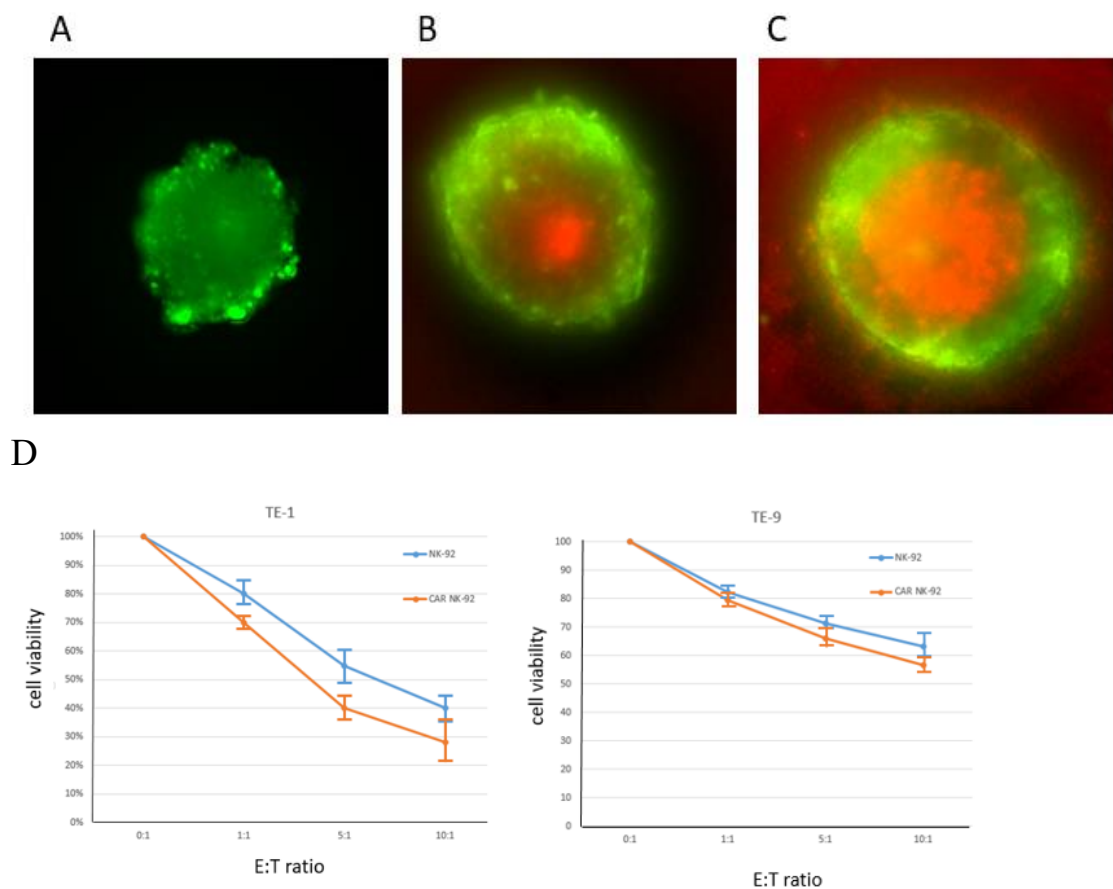


圖二、利用 Calcein AM 螢光染色，進行 3D 食道癌聚球細胞的染色。A.在 3D 聚球實驗中，30 分鐘的染色，已可見到球體的

表現細胞已被染上螢光劑。B.而 60 分鐘的染色，則可以看到球體的中心細胞，也被染上 Calcein AM 螢光染劑。

為了更精準測試 NK 細胞在 3D 情況下的細胞毒殺試驗，我們利用 propidium iodide (PI) 染劑色的特性，PI 對活細胞的細胞膜穿透力不佳，因此只會對死細胞染色。因此，我們在 3D 培養的環境下，加入不同細胞數的 NK92 或是 EpCAM CAR-NK 細胞，作用 48 小時後，我們發現 EpCAM CAR-NK92 確實有比原來的 NK-92 細胞的毒殺能力要強。(圖三)

圖三



圖三、利用 Propidium iodide (PI) 染劑偵測 NK92 細胞對食道癌 3D 培養下聚球細胞的毒殺能力。(A)剛加入 NK92 細胞時，TE-1 聚球細胞，Calcein Am 螢光呈色圖像。(B)NK92 細胞作用 24 小時後，(C)作用 48 小時後的 PI 與 Calcein Am 螢光呈色的圖像。可以發現，隨著 NK92 細胞作用時間越長，PI 的螢光強度越強，說明細胞死亡的數目也越多。(D)再加入不同比例的 NK92 細胞或 EpCAM CAR-NK92 細胞，經 48 小時的共

培養，分析 NK92 和 EpCAM CAR-NK92 細胞。分別對 TE-1 和 TE-9 的毒殺能力。

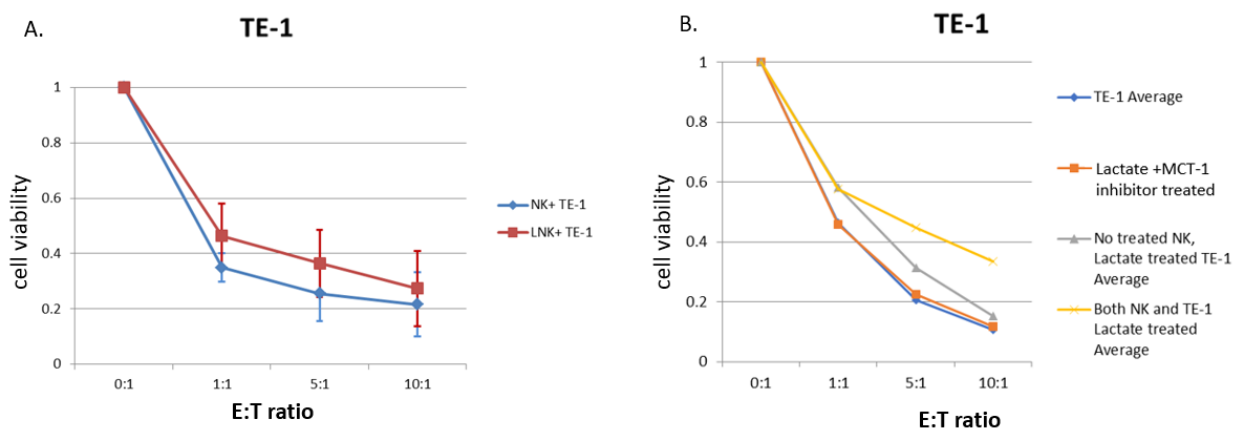
藉由 3D 聚球細胞的毒殺試驗，我們發現 EpCAM CAR-NK92 細胞確實比 NK92 細胞有更強的毒殺能力。而 2 株不同的食道癌細胞，也發現 TE-9 細胞對 NK92 較具抗性。

2. 評估乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，對 NK 92 細胞毒殺食道癌細胞之影響

乳酸會影響 NK 細胞的毒殺功能，已在許多的實驗被證明過，我們再進行骨肉瘤試驗時，也發現同樣的情況。在食道癌是否也會產生一樣的結果，我利用乳酸和乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，進行了 NK 細胞對食道癌的毒殺試驗。我們發現對食道癌 TE-1 細胞株而言，經過乳酸處理的 NK92 細胞，或是 TE-1 細胞，都能使 NK92 細胞的毒殺能力降低，若同時利用乳酸處理的 N92 細胞和 TE-1 細胞，對 NK92 細胞的毒殺能力又更有抗性。而當使用了乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑後，NK92 細胞的毒殺能力，就恢復正常。(圖四)

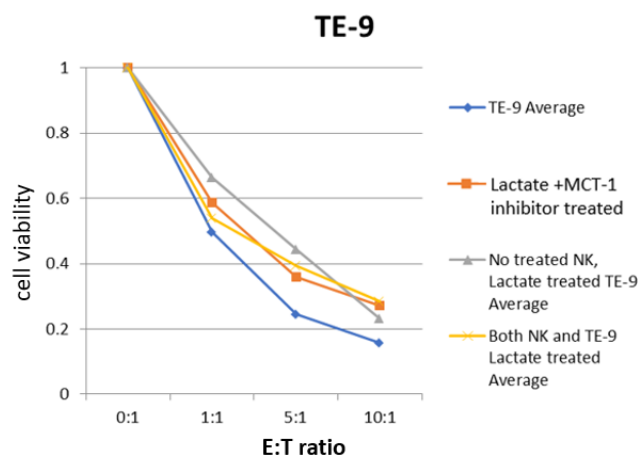
但在 TE-9 的食道癌細胞株，卻看見不完全一樣的結果。我們發現，單獨乳酸處理 TE-9 細胞，會抑制 NK92 的毒殺能力，但同時利用乳酸處理 NK92 細胞和 TE-9 細胞，卻不會增加 NK92 細胞毒殺能力的抑制。同時利用乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑後，NK92 細胞的毒殺能力，卻無法像在 TE-1 細胞一樣，恢復到正常的狀態。(圖五)

圖四、



圖四、乳酸和乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑對 NK92 細胞毒殺能的影響。(A)NK92 細胞經乳酸處理後，對 TE-1 細胞的毒殺能力變弱。(B)同時利用乳酸處理 NK92 細胞和 TE-1 細胞(黃色線)，使 NK92 的毒殺能力降低最多，而只利用乳酸處理 TE-1 細胞 (灰色線)，也會造成 NK92 細胞的毒殺能力降低。在實驗中加入乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑後(橘色線)，乳酸對 NK92 細胞的毒殺能力的影響，就被抑制了，NK92 細胞的毒殺能力，恢復成與無乳酸處理(藍色線)的情況一樣。

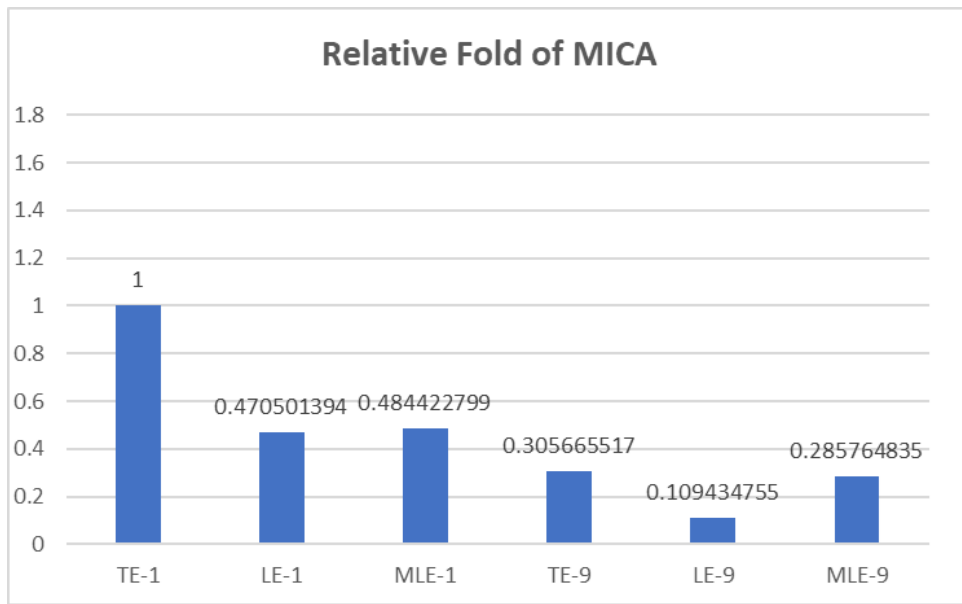
圖五



圖五、乳酸和乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑對 NK92 細胞毒殺 TE-9 細胞能的影響。同時利用乳酸處理 NK92 細胞和 TE-9 細胞(黃色線)，對 NK92 的毒殺能力降低和只利用乳酸處理 TE-9 細胞 (灰色線)類似。在實驗中加入乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑後(橘色線)，乳酸對 NK92 細胞的毒殺能力的影響，仍然一樣，並未恢復成與無乳酸處理(藍色線)的情況一樣。

我們進一步了解 TE-1 和 TE-9 對 NK92 細胞的反應的差異，是否和 MICA (Major Histocompatibility Complex class I related Chain A) 蛋白有關。MICA 為 NK 細胞上 NKG2D 受體的配體蛋白，具有刺激 NK 細胞活性的功能。我們分析了 TE-1，TE-9 細胞，在乳酸處理前後，和加入乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑後的表現情況。(圖六)

圖六、



圖六、MICA (Major Histocompatibility Complex class I related Chain A)在食道癌細胞株 TE-1，TE-9 的 mRNA 表現情況。以 TE-1 的 MICA 表現量當作基準點，TE-9 細胞的 MICA 表現量只有 TE-1 的 1/3 左右；而乳酸處理後的 TE-1 細胞(LE-1)和 TE-9 細胞(LE-9)， MICA 的表現量都會降低，但在加入 (MCT-1)抑制劑後 (MLE-1、MLE-9)，MICA 的表現並沒有變化，和乳酸處理後的結果類似。

3.評估結合 EpCAM-CAR-NK 92 和乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，對食道癌細胞之毒殺作用

此部分的實驗，在進行中，還未有明確的結果。

六、結論與建議

整體而言，我們的實驗研究結果有下列幾點：

1. 我們建立了一株具有特異性結合 EpCAM 的 CAR-NK92 細胞株，稱為 EpCAM CAR-NK92。進一步的研究也發現，EpCAM CAR-NK92 較原來的 NK92 細胞，對聚球的食道癌細胞株 TE-1 和 TE-9 都有較強的毒殺能力。特別是 TE-1 細胞。
2. 我們也發現乳酸也可以抑制 NK92 細胞對食道癌細胞株的毒殺能力。但在利用乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑測試可能的機轉時，發現 TE-1 和 TE-9 細胞株的反應不太一樣。TE-1 呈現出乳酸可能透過乳酸運輸蛋白(MCT-1)進入腫瘤細胞和 NK92 細胞內，進而影響腫瘤細胞和 NK92 細胞的功能。利用 MCT-1 抑制劑，可以有效的抑制乳酸的 NK92 細胞毒殺能力的壓抑，使其恢復到與無乳酸處理時的狀態一樣。然而，TE-9 細胞株，卻有不一樣的反應，其對 MCT-1 抑制劑似乎無反應，加入 MCT-1 抑制劑，也無法恢復 NK92 細胞受到乳酸的影響。
3. 由於 TE-1 和 TE-9 對乳酸的反應和對 NK92 細胞毒殺能力的不一致，我們進一步分析其可能的機轉。我們發現 TE-1 和 TE-9 所表現的 MICA 蛋白質的量就有差異，TE-1 較 TE-9 為高。而 MICA 是 NK 細胞 NKG2D 受體的配體蛋白。NKG2D 是 NK 細胞的激活受體，可以刺激 NK 細胞的活性，增強其細胞毒殺能力。因此，TE-1 較易受到 NK92 細胞的毒殺，可能與其較高的 MICA 表現有關。而乳酸處理後，也可以二細胞株的 MICA 表現量都降低，或許也因此降低了 NK92 細胞的毒殺能力。
4. 乳酸如何影響食道癌細胞和 NK92 細胞，從 MCT-1 的抑制劑作用結果來看，TE-1 細胞和 TE-9 細胞使用的機轉似乎不同。乳酸似乎可以透過 MCT-1 影響 TE-1 細胞的作用，因此抑制 MCT-1 的功能，乳酸對 TE-1 的影響就減弱了。而 TE-9，MCT-1 就較無作用，抑制 MCT-1，並不影響乳酸的作用。由於，乳酸也可以透過乳酸受體 GPR81 影響細胞的作用，或是另一個乳酸運輸蛋白 MCT-4，也可以取代 MCT-1 的功能，TE-9 細胞是否透過這些方式受到乳酸影響，需要進一步釐清。

由於，NK92 細胞的轉染不易，我們嘗試了許多的實驗步驟，才找到合適的電穿孔方法，才順利建立 EpCAM CAR-NK92 細胞株，也因此影響整體的實驗進度。原計畫預計完成的 MCT-1 抑制劑和 EpCAM CAR-NK92 的聯合作用實驗，還在進行中，還沒有明確的結果，無法做出任何結論。但從我們的實驗結果，可以得知，EpCAM CAR-NK92 細胞株對聚球的食道癌細胞有更強的毒殺能力，由於聚球細胞通常有更強的腫瘤幹細胞特性，本身對治療就較有抗性，而上皮細胞類的腫瘤幹細胞常會有 EpCAM 高表現的情況，因此，我們的實驗可以發現，EpCAM CAR-NK92 有更強的毒殺聚球細胞的能力。此外，我們的結果也證明抑制乳酸的作用，可以強化 NK 細胞的毒殺能力，而不同食道癌細胞對乳酸作用，可能有多個不同的運作機轉，進一步的實驗，將這些機轉釐清楚，應該可以對後續將乳酸作為治療標的，有更明確的了解。雖然，目前尚無法有明確證據證明結合 EpCAM CAR-NK92 和抑制乳酸作用可以有更佳，對食道癌的治療有更佳的效果，但我們的實驗數據，得到一些正面的結果，這樣的治療策略是值得進一步研究。

七、參考文獻

1. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*. 2006;90:51–81.
2. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*. 2013;342(6165):1432–1433
3. Brunet JF, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily — CTLA-4. *Nature*. 1987;328(6127):267–270.
4. Walunas TL, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994;1(5):405–413.
5. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992;11: 3887–95.
6. Araki K, Youngblood B, Ahmed R. Programmed cell death 1-directed immunotherapy for enhancing T-cell function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2013;78:239–47.
7. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2016; 3: 16011
8. Halle S, Keyser KA, Stahl FR, Busche A, Marquardt A, Zheng X, Galla M, Heissmeyer V, Heller K, Boelter J et al. In vivo killing capacity of cytotoxic T cells is limited and involves dynamic interactions and T cell cooperativity. *Immunity* 2016; 44: 233 – 245
9. June CH, Sadelain M. Chimeric antigen receptor therapy. *N Engl J Med*. 2018; 379: 64–73
10. Toh U, Yamana H, Sueyoshi S, et al. Locoregional cellular immunotherapy for patients with advanced esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:4663–73.
11. Ueda Y, Yamagishi H, Tanioka Y, et al. Clinical application of adoptive immunotherapy and IL-2 for the treatment of advanced digestive tract cancer. *Hepatogastroenterology* 1999; 46 (Suppl 1):1274–9.
12. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2947–53
13. Lim SH, Hong M, Ahn S, et al. Changes in tumour expression

- of programmed death-ligand 1 after neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy in patients with squamous oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 2016; 52:1–9.
14. Chen MF, Chen PT, Chen WC, Lu MS, Lin PY, Lee KD. The role of PD-L1 in the radiation response and prognosis for esophageal squamous cell carcinoma related to IL-6 and T-cell immunosuppression. *Oncotarget* 2016; 7:7913–24.
 15. Zhang XF, Pan K, Weng DS, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 expression in esophageal carcinoma: implications for prognosis. *Oncotarget* 2016; 7:26670–9.
 16. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res.* 2009; 69:4010–4017.
 17. Lim KS, Mimura K, Kua LF, Shiraishi K, Kono K. Implication of highly cytotoxic natural killer cells for esophageal squamous cell carcinoma treatment. *J Immunother.* 2018; 41:261-273.
 18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144:646-674.
 19. Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A, Teng MW. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13:143-158.
 20. HeidenMGV, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009; 324:1029–33.
 21. Pucino V, Bombardieri M, Pitzalis C, Mauro C. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity. *Eur J Immunol.* 2017; 47:14–21.
 22. Cassim S, Pouyssegur J. Tumor microenvironment: a metabolic player that shapes the immune response. *Int J Mol Sci.* 2019; 21:E157.
 23. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer’s Achilles’ heel. *Cancer Cell.* 2008; 13:472–82.
 24. Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell cycle.* 2009; 8, 3984-4001.
 25. Colegio, O.R., Chu, N.Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M.,

- Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., *et al.*. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014; 513, 559-563.
26. Karin Fischer, Petra Hoffmann, Simon Voelkl, Norbert Meidenbauer, Julia Ammer, Matthias Edinger, Eva Gottfried, Sabine Schwarz, Gregor Rothe, et al.,. Inhibitory effect of tumor cell–derived lactic acid on human T cells. *Blood* (2007), 1 may 2007 volume 109, number 9
 27. Hyunsuk Shim, Christine Dolde, Brian C. Lewis, Chyi-Sun Wu, Gerard Dang, Richard A. Jungmann, Riccardo Dalla-Favera, and Chi V. Dang. c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 24; 94(13): 6658–6663.
 28. Almut Brand, Katrin Singer, Gudrun E. Koehl, Wolfgang Mueller-Klieser, Kathrin Renner, Marina Kreutz. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metabolism* 2016; 24, 657–671
 29. J Feng, H Yang, Y Zhang, H Wei, Z Zhu, B Zhu, M Yang, W Cao, L Wang¹ and Z Wu. Tumor cell- derived lactate induces TAZ-dependent upregulation of PD-L1 through GPR81 in human lung cancer cells. *Oncogene* 2017; 36, 5829–5839
 30. Santos N, Pereira-Nunes A, Baltazar F, Granja S. Lactate as a regulator of cancer inflammation and immunity. *Immunometabolism*. 2019; 1:e190015.
 31. Roland CL, Arumugam T, Deng D, Liu SH, Philip B, Gomez S, et al. Cell surface lactate receptor GPR81 is crucial for cancer cell survival. *Cancer Res*. 2014; 74:5301–10.
 32. Lee YJ, Shin KJ, Park SA, Park KS, Park S, Heo K, et al. Gprotein- coupled receptor 81 promotes a malignant phenotype in breast cancer through angiogenic factor secretion. *Oncotarget*. 2016; 7:70898– 911.
 33. David H. Raulet and Nadia Guerra. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of NK cell receptors. *Nat Rev Immunol*. 2009 Aug; 9(8): 568–580.
 34. Jun Wu¹, Lewis L Lanier. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res*. 2003;90:127-56

35. Jeffrey C. Boyington, Shawn A. Motyka, Peter Schuck, Andrew G. Brooks and Peter D. Sun. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 2000; 405, pages537–543.
36. Guitta Maki, Hans-G. Klingemann, Jeffrey A. Martinson, and Ying K. Tam.. Factors Regulating the Cytotoxic Activity of the Human Natural Killer Cell Line, NK-92. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 2004; Vol. 10, No. 3.
37. Ruth Esser, Tina Müller, Dörthe Stefes, Stephan Kloess,a Diana Seidel,c Stephen D Gillies et al., NK cells engineered to express a GD2-specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *J Cell Mol Med.* 2012 Mar; 16(3): 569–581.
38. Nicola Mitwasi, Anja Feldmann, Claudia Arndt, Stefanie Koristka, Nicole Berndt et al., “UniCAR”-modified off-the-shelf NK-92 cells for targeting of GD2-expressing tumour cells. *Scientific Reports* 2020; 10, Article number: 2141.
39. Kevin H. Chen,*, Masayuki Wada¹, Amelia E. Firor, Kevin G. Pinz¹, Alexander Jares, Hua Liu, Huda Salman, Marc Golightly, Fengshuo Lan, Xun Jiang and Yupo Ma. Novel anti-CD3 chimeric antigen receptor targeting of aggressive T cell malignancies. *Oncotarget.* 2016; 7:56219-56232.
40. Chen, L., Xiao, Z., Meng, Y., Zhao, Y., Han, J., Su, G., Chen, B., and Dai, J. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials* 2012; 33, 1437-1444.
41. Krause, S., Maffini, M.V., Soto, A.M., and Sonnenschein, C. The microenvironment determines the breast cancer cells' phenotype: organization of MCF7 cells in 3D cultures. *BMC cancer* 2010; 10, 263.
42. U. Ben-David, et al., Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution, *Nat Genet* 2017; 49, 1567–1575.
43. Kim, S.H., Lee, H.Y., Jung, S.P., Kim, S., Lee, J.E., Nam, S.J., and Bae, J.W. Role of secreted type I collagen derived from stromal cells in two breast cancer cell lines. *Oncology letters* 2014; 8, 507-512.
44. Armstrong, T., Packham, G., Murphy, L.B., Bateman, A.C., Conti, J.A., Fine, D.R., Johnson, C.D., Benyon, R.C., and Iredale, J.P.

- (2004). Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research* 2004; *10*, 7427-7437.
45. J. Drost, H. Clevers, Organoids in cancer research, *Nat Rev Cancer* 2018;18, 407–418.
46. J.T. Neal, et al., Organoid modeling of the tumor immune microenvironment, *Cell* 2018; 175; 1972–1988 e16.
47. F. Weeber, et al., Tumor organoids as a pre-clinical cancer model for drug discovery. *Cell Chem Biol* . 2017 Sep 21;24(9):1092-1100.