

新北市政府 110 年度自行研究報告

研究報告名稱：

評估自然殺手細胞在 3D 培養環境下對食道癌細胞的毒殺效果

研究機關：新北市立聯合醫院

研究人員：謝致政

研究期程：110.01.01-110.12.31

新北市政府 110 年度自行研究成果摘要表

計 畫 名 稱	評估自然殺手細胞在 3D 培養環境下對食道癌細胞的毒殺效果
期 程	自 110 年 1 月 1 日至 110 年 12 月 31 日
經 費	998,000 元
緣 起 與 目 的	<ol style="list-style-type: none"> 1. 探討利用自然殺手細胞，對食道癌進行免疫療法的效率。 2. 探討食道癌腫瘤微環境中代謝產物乳酸，對自然殺手細胞胞殺作用的影響。 3. 建立體外類器官癌細胞立體培養環境，做為個人化癌症治療的模式。 4. 評估自然殺手細胞在體外類器官癌細胞立體培養環境的胞殺作用效果。
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。我們會利用體外 2D 和 3D 培養方法，分析 NK-92 對食道癌細胞株的胞殺能力，比較在 2D 和 3D 培養下，NK92 的胞殺能力有無不同。同時評估癌細胞代謝之產物，乳酸是否會影響 NK 細胞的胞殺作用與可能相關的作用機轉。同時利用乳酸受器 GPR81 的拮抗劑和乳酸運輸蛋白 MCT1 拮抗劑，評估 GPR81 或 MCT1 作為食道癌治療標的蛋白的可行性。</p>
研 究 發 現 及 建 議	<p>我們的研究發現主要歸納成下列幾點：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. NK92 對食道癌細胞株具有毒殺能力，適量數目的 NK 細胞與作用時間，可以有效的毒殺食道癌細胞。 2. 乳酸可以影響 NK92 細胞的活性，增加 NK92 細胞上的抑制性受體表現增加。 3. 乳酸也可造成食道癌細胞上的免疫檢查點配體表現量增加，進而影響 NK92 細胞的毒殺能力。 4. 乳酸透過 MCT1 的運輸蛋白通道影響 NK92 細胞的毒殺能力，抑制 MCT1 的功能，能減少乳酸對 NK92 細胞的影響。

	<p>5. 利用食道癌細胞株，可以有效建立體外 3D 培養系統。在 3D 系統上，癌症細胞的外型與 2D 平面有所不同。</p> <p>建議： 由於這次研究主要以細胞株為研究材料，能否用在人體內或實際的人類食道癌細胞是否能和細胞株一樣，可以有效的被 NK92 細胞毒殺，應該是直到繼續探討的研究議題。而 3D 培養系統，也是一個值得開發的體外癌症研究平台技術，對後續個人化的癌症治療應該會有所助益。</p>
備	註

一、摘要

研究目的:

1. 探討利用自然殺手細胞，對食道癌進行免疫療法的效率。
2. 探討食道癌腫瘤微環境中代謝產物乳酸，對自然殺手細胞胞殺作用的影響。
3. 建立體外類器官癌細胞立體培養環境，做為個人化癌症治療的模式。
4. 評估自然殺手細胞在體外類器官癌細胞立體培養環境的胞殺作用效果。

研究方法:

利用食道癌細胞株和 NK92 細胞株，在體外建立細胞毒殺分析平台，同時探討乳酸所扮演的角色。利用乳酸受體 GPR81 的抑制劑和乳酸運輸蛋白 MCT1 的抑制劑，分析乳酸對 NK92 細胞影響的機制。同時建立體外腫瘤 3D 培養的技術與 NK92 的 3D 環境下毒殺分析方法。

重要發現:

我們的研究發現主要歸納成下列幾點:

1. NK92 對食道癌細胞株具有毒殺能力，適量數目的 NK 細胞與作用時間，可以有效的毒殺食道癌細胞。
2. 乳酸可以影響 NK92 細胞的活性，增加 NK92 細胞上的抑制性受體表現增加。
3. 乳酸也可造成食道癌細胞上的免疫檢查點配體表現量增加，進而影響 NK92 細胞的毒殺能力。
4. 乳酸透過 MCT1 的運輸蛋白通道影響 NK92 細胞的毒殺能力，抑制 MCT1 的功能，能減少乳酸對 NK92 細胞的影響。
5. 利用食道癌細胞株，可以有效建立體外 3D 培養系統。在 3D 系統上，癌症細胞的外型與 2D 平面有所不同。

主要建議及政策意涵:

由於這次研究主要以細胞株為研究材料，能否用在人體內或實際的人類食道癌細胞是否能和細胞株一樣，可以有效的被 NK92 細胞毒殺，應該是直到繼續探討的研究議題。而 3D 培養系統，也是一個值得開發的體外癌症研究平台技術，對後續個人

化的癌症治療應該會有所助益。

二、主旨及背景說明

根據最新的統計，2017年食道癌在國內的發生率為10萬分之7.5，排名第10。若以男性來看，則排名第6，發生率為10萬分之14.5。男性發生率遠高於女性，為女性的14.2倍。若以死亡率來看，食道癌在所有癌症死亡率排名第9；而在男性癌症死亡率排名第5。可見食道癌是國內重要的癌症之一。而食道癌的治療，通常以手術為主，再輔以放射線治療或是化學藥物治療。然而，由於食道的特性，食道癌發現時，常是癌症的較晚期，轉移的機率大，治療的效果也較差。因此，尋找更新的治療方式是刻不容緩。近幾年，免疫療法的興起，與個人化治療的趨勢，使的癌症的治療有突破性的發展。本研究計畫的主要目的，有下列幾點：

1. 探討利用自然殺手細胞，對食道癌進行免疫療法的效率。
2. 探討食道癌腫瘤微環境中代謝產物乳酸，對自然殺手細胞胞殺作用的影響。
3. 建立體外類器官癌細胞立體培養環境，做為個人化癌症治療的模式。
4. 評估自然殺手細胞在體外類器官癌細胞立體培養環境的胞殺作用效果。

希望藉由此研究，能開發出新的食道癌治療方向。

三、相關研究、文獻之檢討

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。其基本原理是激發本身的免疫力去消滅癌細胞。到目前為止，有下列幾類的免疫療法被開發出來，利用單株抗體對抗癌細胞的腫瘤抗原；利用病毒感染摧毀癌細胞；利用免疫細胞（T細胞或自然殺手細胞, Natural killer(NK) cell)胞殺癌細胞；癌症疫苗等 (1, 2)。

2011年，美國食品藥物管理局(FDA)核准了 ipilimumab 治療黑色素細胞瘤，開啟了癌症免疫療法的新世代。Ipilimumab 是對抗細胞

毒殺型 T 細胞第四型抗原(cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CTLA-4)的單株抗體 (3, 4)。CTLA-4 是一種所謂免疫檢查點(immune checkpoint)的蛋白，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。迄今，許多利用抑制免疫檢查點的抗體藥物也被發明與實際臨床運用在不同癌症的治療上，例如對抗 PD-L1/PD-1 的相關抗體藥物 (5, 6)。

PD-1 蛋白為免疫檢查點受體，位於 T 細胞，B 細胞等免疫細胞的表面，它的配體(ligand)有 2 種，PD-L1 和 PD-L2，除了免疫細胞外，癌細胞上也可以表現出此配體蛋白。當 PD-L1/PD-L2 結合上 PD-1 受體後，會抑制免疫細胞的活性，使癌細胞逃脫免疫系統的監控。一般而言，PD-L1/PD-L2 表現愈高，癌症的預後就愈不好。目前臨床上已開發出對抗 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。

此外，CAR-T 細胞的治療方法也核准在臨床上利用。所謂 CAR-T 細胞，CAR 是 chimeric antigen receptor 縮寫，是將特定的抗原蛋白，結合到類似 T 細胞表面抗原骨架所形成的一個人造嵌合式細胞表面受體，此受體轉染入 T 細胞內，產生所謂的 CAR-T 細胞，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。CAR-T 在血液性腫瘤的治療有不錯的效果，但在固態腫瘤(solid tumor)的治療卻不如預期 (7~9)。

食道癌的免疫療法

食道癌的主要治療方法，目前仍是以手術切除，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。過去普遍認為，食道癌並不是那麼適合利用免疫療法來治療。主要是因為，過去的研究發現，食道癌的腫瘤突變負荷(tumor mutational burden, TMB)較低，腫瘤內的浸潤的 T 細胞也較少。而這些指標都與免疫療法的成功率有關(10,11)。然而，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。

Ohigashi 等學者，利用免疫染色，在 31 個食道鱗狀上皮細胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)，42% 檢體為 PD-L1 陽性，

48%檢體為PD-L2 陽性，而這些病患的預後都較差。Lim 等學者在韓國的研究也發現，PD-L1 在 73 個 ESCC 檢體中，56%具高表現，整體的存活率也較短。在台灣，陳妙芬醫師等學者在 162 個 ESCC 檢體中，發現 45%檢體為 PD-L1 陽性，PDF-L1 陽性患者的整體的存活率也較短 (12-14)。

Zhang 等學者在 158 個 ESCC 檢體中，發現 87%的腫瘤檢體會表現 CLTA-4，其中有 58%的檢體 CLTA-4 表現被認為是上升的。而腫瘤其中的浸潤的淋巴細胞，也有 58% CLTA-4 的表現。而 CLTA-4 的表現也和較短的整體存活率正相關 (15)。

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 (16)。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 (17)。

腫瘤微環境與免疫抑制

腫瘤微環境 (tumor microenvironment, 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。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(18)。過去的研究發現，腫瘤微環境中的一些物質能抑制免疫細胞的功能，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- 到 TME，TGF- 可以促進 Treg 細胞的增生，抑制免疫作用細胞(effector cells)的擴張。同時，TGF- 也可以直接或間接的藉由影響細胞與細胞間的接觸，抑制 NK 細胞的胞殺作用(cytotoxicity) (19)。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 (20-23)。

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 (25)。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 (26)。Hyunsuk Shim 等人發現當在大鼠的纖維母細胞(fibroblast)過度表現 c-Myc，會使纖維母細胞的 LDHA 表現上升，並產生大量乳酸，纖維母細胞會從原來的氧化磷酸化代謝模式轉為糖解為主的代謝模式 (27)。這說明了在腫瘤形成的過程中，致癌基因不只扮演使細胞性狀轉型(transformation)。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 (28)。

最近在肺癌的研究發現，乳酸可以藉由 GPR81 活化

transcriptional coactivator TAZ，導致 PDL-1 的表現上升。PD-L1 可以協助癌細胞逃過 T 細胞的攻擊(29)。GPR81 是屬於 Gi 類型的 G 蛋白，此類蛋白在接受到促進劑(agonist)刺激後，會抑制細胞內的 ATP 轉換成 cAMP 的途徑，進而抑制 cyclic AMP 下游相關訊息傳導。乳酸為 GPR81 體內天然促進劑。GPR81 最早是被發現大量表達在脂肪細胞表面，乳酸透過激活 GPR81，來抑制 cAMP 下游的訊息傳導途徑，造成脂肪分解受到抑制 (30-32)。如果我們在腫瘤微環境中阻斷乳酸受體 GPR81，是否可以提升 T 細胞或 NK 細胞的胞殺能力，進而改善現有的免疫療法不足之處，這是值得研究的議題。

自然殺手細胞免疫療法

自然殺手細胞(Natural killer (NK) cell)是體內免疫系統除了 T 細胞之外，另一個重要的抑制癌細胞進展的免疫細胞。當正常細胞發生癌化病變時，細胞常會發生致癌性改變(oncogenic alteration)，此時細胞表面的一些抗原會發生變異而被 NK 細胞所辨識，並進行胞殺作用(33)。

和 T 細胞專一性的辨識癌細胞的機轉不同，NK 細胞並不會在細胞膜表面表現出重整後的特殊抗原受體，NK 細胞主要藉由標的細胞上的配體活化 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 (34)。這是由於細胞表面的 KIR 受體會和正常細胞 MHC-1 分子結合，釋放出抑制性的訊號以抑制 NK 細胞的功能 (35)。而當細胞受到病毒感染或癌化時，其 MHC-1 分子的表現會降低或消失，以逃避免 T 細胞的攻擊，這情況，剛好使 NK 細胞的抑制訊號減少，進而活化的訊號將驅使 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。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，其中最為成功的例子是在治療神經膠質母細胞瘤的臨床試驗上。神經膠質母細胞瘤(Neuroblastoma)是極為惡性的癌細胞，他帶有GD2抗原。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)。除了CAR NK 92在對神經膠質母細胞瘤(Neuroblastoma)，CAR-NK 92對T細胞淋巴瘤(39)，也顯示其強大的胞殺能力以及抗癌潛力。

類器官的體外培養

癌症的研究，體外2D平面的細胞培養一直都是主要的研究方法，不管是利用癌症細胞株或是原腫瘤細胞。然而。在體外平面培養環境，與細胞真正在體內的3D立體環境，有很大的不同。在3D環境中，細胞會展現許多不同於2D中的特性，例如細胞型態、生長速度、細胞凋亡程度、移動情形甚至是幹細胞特性的展現(40,41)。為了要能模擬腫瘤細胞真正的體內培養環境，因此利用動物實驗將病患的腫瘤細胞移植到動物體內，使其能成長成類似病患體內的腫瘤細胞，衍伸出所謂的病患衍生異種移植腫瘤(patient-derived xenografts, PDXs)的技術(42)。利用此技術，使研究人員可以看到更類似病患身體內的腫瘤生長情形也可以提供一個快速篩藥與治療方法的平台，對癌症的研究與病患的治療產生許多正面與重大的影響。

然而，過去的研究中，也發現很多細胞實驗的結果無法驗證於動物實驗之中。而動物實驗所需要的經費多，時間上也較耗時，都限制它的發展性。因此，現今的研究趨勢，已朝向利用體外3D培養環境，去模擬生物體內的作用機制，能比傳統的平面培養系統更接近生物體內的環境，也比動物實驗更加節省時間和金錢，實驗所需材料單純，也容易控制實驗條件。許多研究已發現，在3D環境中，細胞能從四面八方與其他細胞進行接觸，所以也能模擬腫瘤在大量增值後而產生的缺氧環境。許多針對抗藥性的研究，發現在3D環境

中，細胞會表現比較好的抗藥性，且細胞型態及生長狀況比傳統 2D 培養更接近實際的狀況，因此 3D 培養可以做為一個良好的體外腫瘤建置平台。建構細胞培養的立體微環境可以使用不同的物質，例如：組成細胞外間質的各種蛋白質及塑膠纖維等等，其中第一型膠原蛋白為人體內細胞間質中，比例最高的蛋白質，能夠被纖維母細胞釋放至細胞生長環境，有支撐及維持組織彈性的作用。在乳癌的研究中，觀察到膠原蛋白能增強細胞 matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) 的表現，而進一步促進癌細胞轉移 (43)。還有會促進胰臟癌的惡化作用 (44)。顯示腫瘤微環境中的膠原蛋白與癌症的發展有密不可分的關係，因此常被選擇作為建構 3D 培養的材料。除了第一型膠原蛋白外，細胞外基質的混合物 (Matrigel) 進行 3D 培養使用的材料(45)。

近年類器官(organoid)的體外培養，已成為癌症研究的重要方法。類器官的體外培養，可以利用病患的腫瘤組織或正常組織，在體外培養出類似體內腫瘤組織或正常組織的結構。利用特定的生長因子，可以任意改變培養條件，觀察癌症細胞的各種變化，甚至腫瘤微環境，免疫細胞間的關係也可以利用類器官的體外培養進行深入的研究。而利用病患腫瘤組織，在體外進行類器官的培養，就類似利用小鼠進行異種移植腫瘤(patient-derived xenografts, PDXs)的技術，可以進行快速的藥物篩檢，與設計個人化的醫療方針 (45-47)。

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: 探討利用自然殺手細胞，對食道癌進行免疫療法的效率。

為了評估自然殺手細胞對食道癌進行免疫療法的效率，我們先在體外利用自然殺手細胞株 NK92，進行對食道癌細胞株的毒殺作用，不同比例(E:T ratio)的 NK92 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 Calcein AM 和結晶紫染色評估。

AIM 2: 探討食道癌腫瘤微環境中代謝產物乳酸，對自然殺手細胞毒殺作用的影響。

2.1: 乳酸，對自然殺手細胞毒殺作用的影響

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。因此，我們也在體外模擬體內的腫瘤微環境，在癌細胞培養時，加入適量之乳酸，經培養 7 天後，再加入 NK92 細胞共培養 4-6 小時，然後再以 MTT assay 評估食道癌細胞株的存活率。

2.2: 乳酸受體 GPR81，對自然殺手細胞胞殺作用的影響

腫瘤微環境中的乳酸，可以透過細胞上的乳酸受體 GPR81，將乳酸訊號傳遞到細胞內，進而影響細胞的活性。因此，我們將利用受體 GPR81 的結抗劑，3OBA (3-hydroxy butyric acid) 來抑制乳酸受體 GPR81 的活性或是利用 anti-GPR81 shRNA 來抑制癌細胞 GPR81 的表現。之後，加入適量之乳酸，經培養 7 天後，再加入 NK92 細胞共培養 4-6 小時，然後再以 MTT assay 評估食道癌細胞株的存活率。藉此，評估乳酸是否透過乳酸受體 GPR81，影響自然殺手細胞的胞殺作用。

2.3: 乳酸運輸蛋白 MCT1，對自然殺手細胞胞殺作用的影響

腫瘤微環境中的乳酸，也可以透過細胞上的乳酸運輸蛋白 MCT1，將乳酸運輸到細胞內，進而影響細胞的活性。因此，我們將利用 MCT1 的結抗劑，AZD3965 來抑制乳酸運輸蛋白 MCT1 的活性或是利用 anti-MCT1 shRNA 來抑制癌細胞 MCT1 的表現。之後，加入適量之乳酸，經培養 7 天後，再加入 NK92 細胞共培養 4-6 小時，然後再以 MTT assay 評估食道癌細胞株的存活率。藉此，評估乳酸是否透過運輸蛋白 MCT1，影響自然殺手細胞的胞殺作用。

AIM 3: 建立體外類器官癌細胞立體培養環境，做為個人化癌症治療的模式。

體外 3D 立體培養環境中，細胞會展現許多不同於 2D 平面培養的特性，例如細胞型態、生長速度、細胞凋亡程度、細胞移動、甚至是幹細胞特性的展現。許多研究也發現，在 3D 立體環境中，細胞會表現比較好的抗藥性，且細胞型態及生長狀況比傳統 2D 平面培養更接近實際的狀況。而且，利用 3D 立體環境去模擬生物體內的作用機制，能比傳統的平面培養系統更接近生物體內的環境，比動物實驗也更加節省時間和金錢，材料單純更容易控制實驗條件。

建構細胞培養的立體微環境可以使用不同的物質，例如：組成細胞外間質的各種蛋白質及塑膠纖維等等，其中第一型膠原蛋白為人體內細胞間質中，比例最高的蛋白質，能夠被纖維母細胞釋放至細胞生長環境，有支撐及維持組織彈性的作用。過去的研究也顯示腫瘤微環境中的膠原蛋白與癌症的發展有密不可分的關係，因此我們將以第一型膠原蛋白作為材料，建構食道癌的體外類器官癌細胞立體培養環境。我們首先將以食道癌細胞株建立穩定的流程後，在嘗試利用病患的食道癌檢體，建立以病患為主的體外類器官癌細胞立體培養環境。

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 SensiFASTTM 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 StepOnePlusTM 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，RPIA 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細胞毒殺能力的評估

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 Calcein AM 和結晶紫染色評估 NK 細胞毒殺能力。

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 對於腫瘤細胞毒殺的能力。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 對食道癌細胞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，之後將剩餘的腫瘤細胞用 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。

GPR81抑制劑3-Hydroxybutyric acid (3-OBA) treatment

根據過去文獻報導，3mM 的 3-OBA 可以有效的阻斷乳酸受體 GPR81 並阻滯乳酸透過 GPR81 所產生的下游訊息傳導。參考過去文獻，我們亦採用 3mM 濃度的 3-OBA treatment 來 blockade 乳酸受體 GPR81。食道癌細胞株與 NK 細胞預先以 3-OBA blockade 30-60 分鐘，以充分讓 3-OBA antagonist 結合上乳酸受體 GPR81，而後加入乳酸，並評估經由 Western Blot 以及 NK cytotoxic assay 來評估 blockade 之後所造成的後續效應。

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。

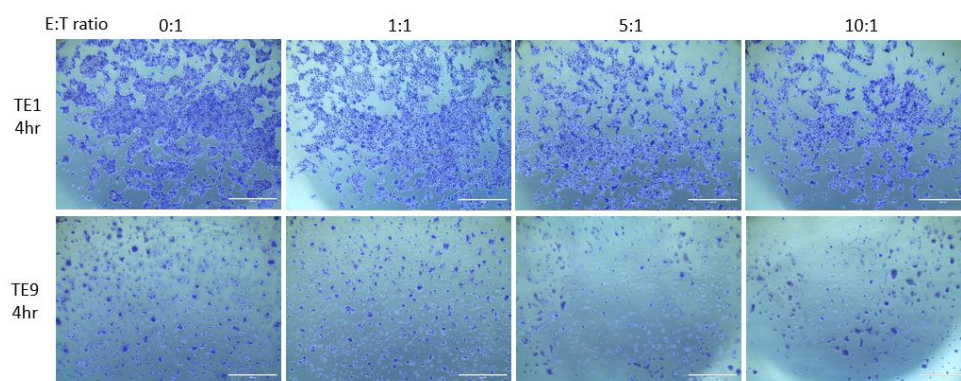
五、研究發現

NK92 對食道癌細胞具有毒殺效果

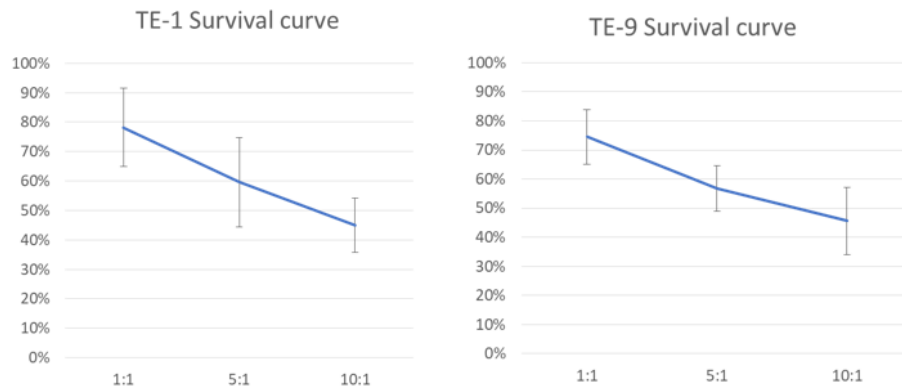
我們首先利用 2 株食道癌細胞株 TE1 和 TE9 進行 NK92 細胞的毒殺實驗。我們發現 NK92 細胞對 TE1 和 TE9 食道癌細胞都具有毒殺作用，經過 4 小時的作用，TE1 和 TE9 細胞，對 NK92 抗性都類似，高倍數量的 NK92 細胞可以造成 50% 細胞死亡。利用結晶紫計算細胞數目或 Calcein AM 量測螢光強度，都有類似的結果。(圖一)

圖一

A.



B.



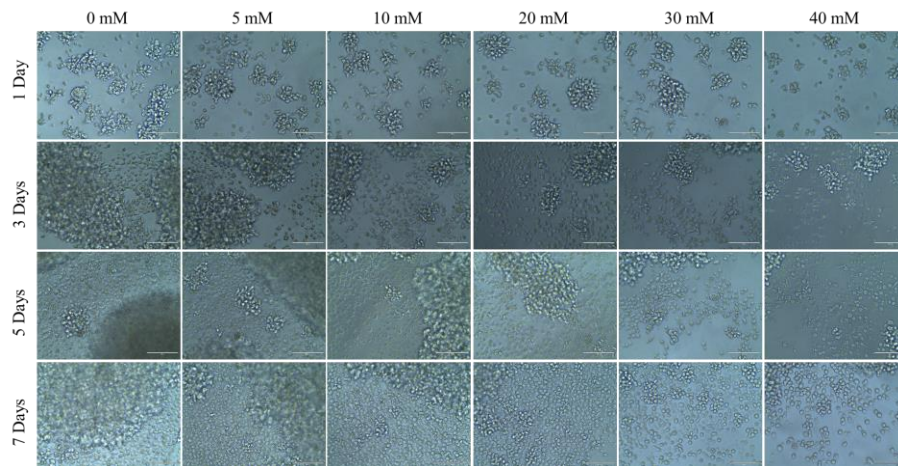
圖一、NK92 細胞對食道癌細胞株的毒殺作用。(A)TE1 和 TE9 細胞株和 NK92 細胞以不同的比例(E:T ratio)處理 4 小時後，以結晶紫染色後，殘存的食道癌細胞。(B)利用 Calcein AM 染色劑，先行處理食道癌細胞後，經毒殺作用分析所得到的食道癌細胞株存活率。

乳酸影響 NK92 細胞的生存

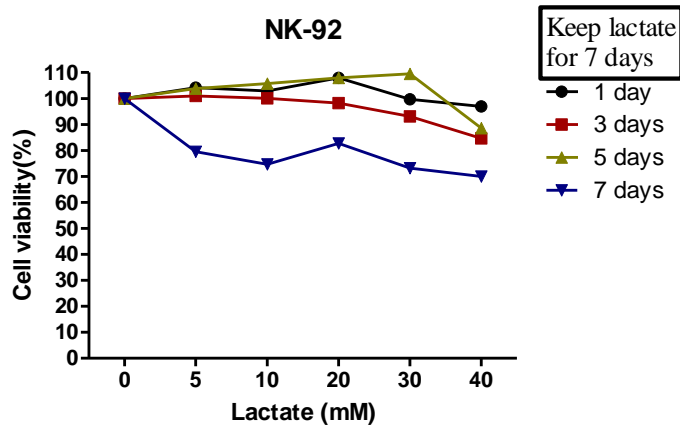
為了進一步了解乳酸對 NK92 細胞的影響，我們利用不同濃度的乳酸，不同時間的處理，分析乳酸對 NK92 細胞的影響。發現長時間的乳酸處理，即使低濃度也會造成 NK92 細胞存活率降低。(圖二)

圖二

A.



B.



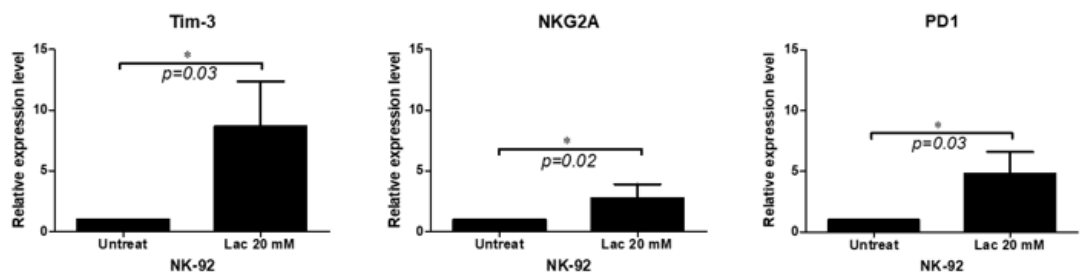
圖二、乳酸對 NK92 細胞存活的影响。(A)不同乳酸濃度與時間處理後，NK92 細胞的型態與數目。(B)較長時間的處理，不同濃度的乳酸，都會造成 NK92 細胞的生存率降低。

乳酸影响 NK92 細胞和食道癌細胞免疫检查点蛋白的表現

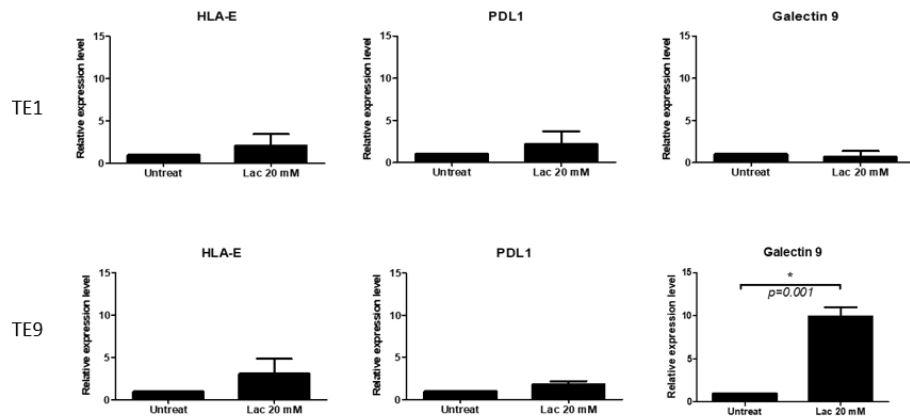
我們進一步分析乳酸對 NK92 細胞和食道癌細胞的免疫检查点相關蛋白的影响。我們利用 20mM 乳酸處理 7 天後，利用 q-PCR 方法分析，發現 Tim-3, NKG2A 和 PD1 等 3 個蛋白在 NK92 細胞有表現有上升跡象，而其相對應的配體蛋白，在食道癌細胞株，僅在 TE9 細胞株 Galectin9 (Tim-3 配體)有明顯表現上升。(圖三)

圖三、

A.



B

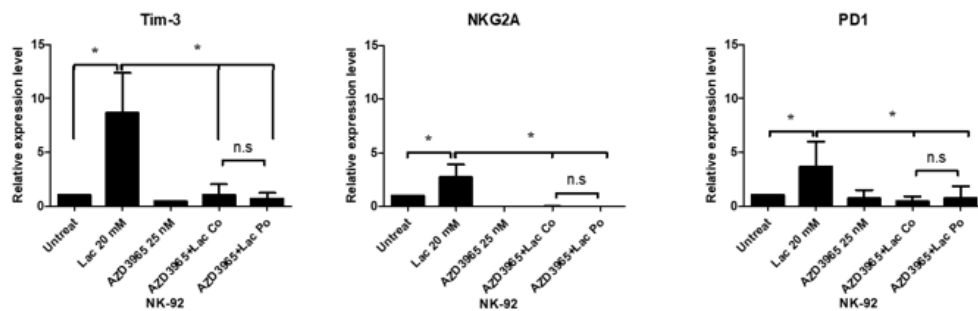


圖三、乳酸對 NK92 和食道癌細胞免疫檢查點蛋白的影響。(A) 經 20mM 乳酸處理 7 天後，檢測 NK92 細胞 mRNA 表現，發現乳酸處理後，Tim-3, NKG2A 和 PD1 的表現顯著增加。(B) 而分析乳酸處理後的食道癌細胞，則只有 TE9 的 Galectin 9 (Tim-3 配體) 表現增加，HLA-E (NKG2A 配體) 和 PDL1 (PD1 配體) 無明顯變化。

乳酸透過 MCT-1 運輸蛋白影響 NK92 細胞

我們利用 MCT-1 運輸蛋白的抑制劑 AZD3965 和乳酸同時處理 NK92 細胞，發現抑制 MCT-1，能使抑制因乳酸作用而增加表現的 Tim-3, NKG2A 和 PD1 等 3 個免疫檢查點蛋白。(圖四)

圖四

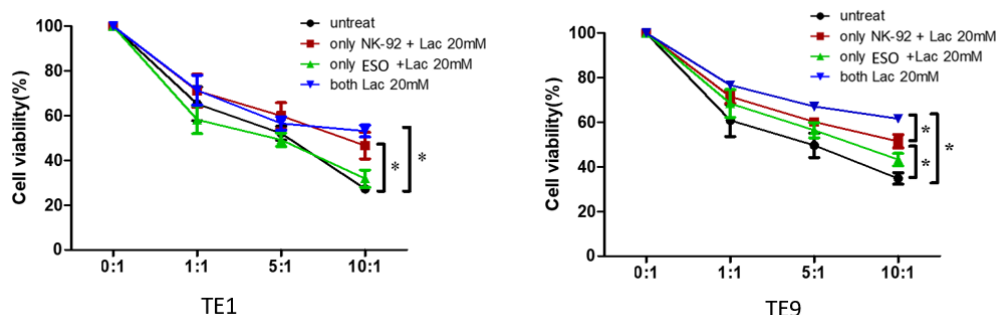


圖四、抑制 MCT-1 的功能，能影響乳酸對 NK92 細胞的作用。Tim-3, NKG2A 和 PD1 的 mRNA 表現，因為 AZD3965 的處理，而受到抑制。AZD3965+Lac CO: AZD3965 與乳酸同時加入；AZD3965+Lac PO: 先加入 AZD3965 後 30 分鐘後，再加入乳酸。(*: $p < 0.05$)

乳酸處理能影響 NK92 細胞的毒殺能力

分別利用乳酸處理 NK92 細胞或是食道癌細胞後，再進行細胞毒殺試驗分析，發現乳酸處理過的 NK92 細胞，其細胞毒殺能力明顯降低。而食道癌細胞株 TE9 經乳酸處理後，有明顯提升對抗 NK92 細胞毒殺的能力，但 TE1 卻沒有變化。(圖五)

圖五

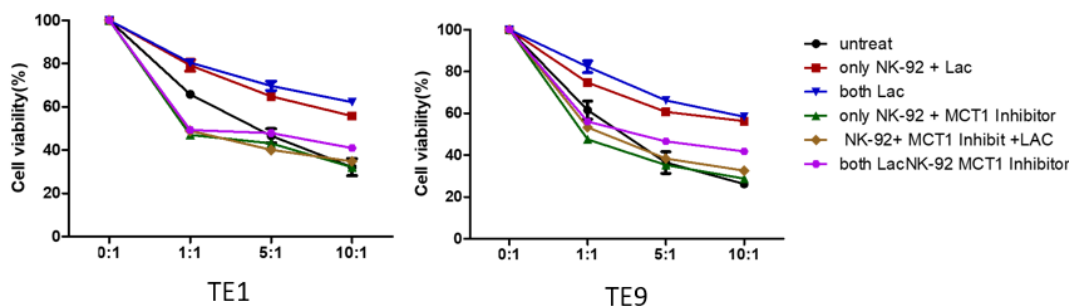


圖五、乳酸影響 NK92 細胞的毒殺能力。單獨利用乳酸處理 NK92 細胞(棕色線)或食道癌細胞(綠色線)，或同時處理 NK92 和食道癌細胞(藍色線) 7 天，NK92 明顯受乳酸影響其細胞毒殺能力，而只有 TE9 細胞經乳酸處理後，對 NK92 的抗性增加。 (*: $p < 0.05$)

MCT-1 運輸蛋白抑制劑能抑制乳酸對 NK92 細胞的影響

利用 MCT-1 運輸蛋白抑制劑 AZD3965 分別處理 NK92 細胞，或食道癌細胞，在有或無乳酸環境下，測試 NK92 細胞的毒殺能力，發現抑制了 MCT-1 功能後，乳酸對 NK92 細胞或 TE9 食道癌的細胞影響能力都降低，NK92 毒殺能力因而提升起來，乳酸的抑制作用被削弱了。(圖六)

圖六

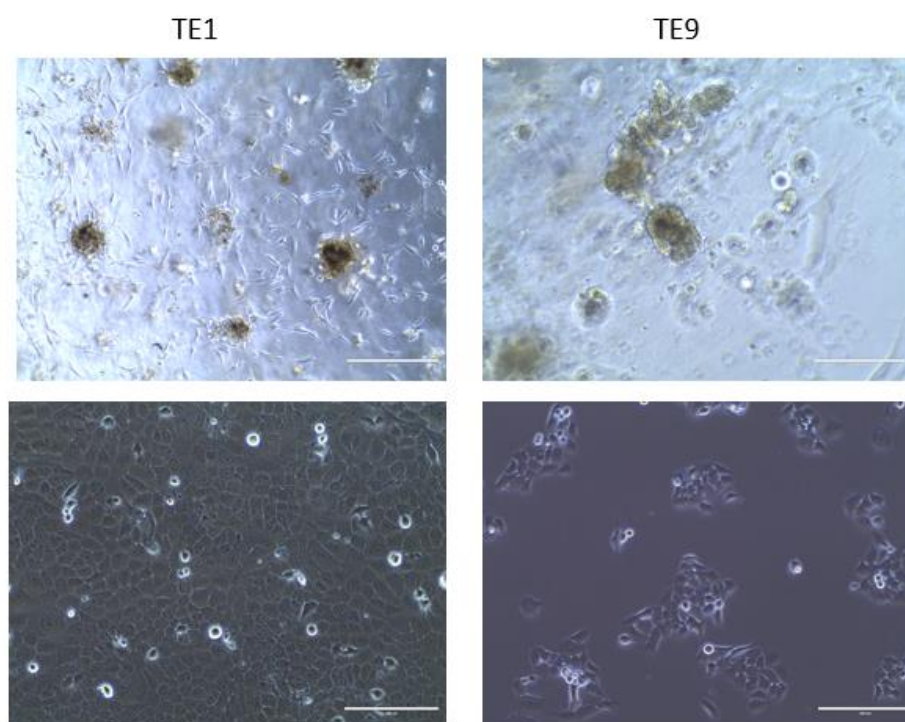


圖六、抑制 MCT-1 能影響乳酸對 NK92 的毒殺能力。紅色線:只有 NK92 經乳酸處理；藍色線:NK92 和食道癌細胞都經乳酸處理；綠色線:只有 NK92 經 MCT-1 抑制劑處理；棕色線:NK92 經乳酸和 MCT-1 抑制劑處理；粉紅色線:NK92，食道癌細胞都經乳酸和 MCT-1 抑制劑處理

食道癌細胞株的 3D 培養

我們利用 matrigel 在體外建構 3D 的細胞培養環境。在 3D 立體環境下，食道癌細胞可以形成球體的結構，其外觀也和 2D 平面培養時有所不同。(圖七)

圖七



圖七、食道癌細胞株的體外 3D 培養。TE1 和 TE9 在 3D 立體環境下，都可形成球狀聚集的細胞團塊(上圖)，與 2D 平面的細胞型態截然不同(下圖)。

六、結論與建議

免疫療法是目前癌症治療的一新方向，許多成功的案例確實鼓舞著我們。然而，也仍有許多的關卡需要去克服，特別是對固態腫瘤(solid tumor)的療效。固態腫瘤會形成特殊的腫瘤微環境，

影響進入的免疫細胞功能，削減其毒殺腫瘤細胞的能力。而腫瘤微環境中，充滿著乳酸，許多的研究也認為乳酸會影響免疫細胞的功能，造成固態腫瘤進行免疫療法時，功效不如預期。乳酸如何影響免疫細胞，詳細機制還不清楚。若能了解其機制，對癌症的免疫療法將會有一新的思考方向。

我們在這個計劃的發現：

1. NK92 細胞確實能在體外毒殺食道癌細胞，因此可以嘗試進行更進一步的體內研究。
2. 乳酸確實會影響 NK92 細胞的存活，進而影響其毒殺作用：使用相同的細胞量，經乳酸處理過的 NK92 細胞，其毒殺能力明顯降低
3. 乳酸也會影響食道癌細胞，使其對抗 NK92 細胞的毒殺能力增強。
4. 乳酸會藉由 MCT-1 的運輸蛋白，促進 NK92 細胞的免疫檢查點蛋白，Tim 3，NKG2A 和 PD1 的表現上升，進而削弱 NK92 細胞的毒殺能力。而抑制 MCT-1，可以恢復 NK92 細胞的毒殺能力。
5. 乳酸仍可能透過乳酸受體 GPR81 影響 NK92 或是腫瘤細胞的運作，但常用 GPR81 拮抗劑 3-OBA，並不是一個好的拮抗劑，與本計畫中，無法有效的抑制 GPR81 的功能。
6. 食道癌細胞可以利用 matrigel 的物質，在體外形成一 3D 立體培養環境。可以作用模擬測試 NK92 細胞在體內的情況。

本研究還有許多應該再深入探討的地方與工作。NK92 細胞在 3D 立體環境的毒殺分析，我們還沒成功建立。是否有更好的乳酸抑制劑，與乳酸在 NK92 細胞或是腫瘤細胞內的訊息傳導機轉都是值得再繼續研究探討的標的。

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, pages 537–543.
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.