

新北市政府 112 年度自行研究報告

研究報告名稱：

評估 T 細胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 做為
食道癌免疫治療的可行性

研究機關：新北市立聯合醫院

研究人員：謝致政

研究期程：112.01.01-112.12.31

新北市政府 112 年度自行研究成果摘要表

計 畫 名 稱	評估 T 細胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 做為食道癌免疫治療的可行性
期 程	自 112 年 1 月 1 日至 112 年 12 月 31 日
經 費	1,000,000 元
緣 起 與 目 的	以 NK 細胞為主的免疫療法，也運用在許多的癌症治療上。人造嵌合式細胞表面抗原受體 NK 細胞 (CAR-NK)和 NK 細胞上的免疫檢查點被認為是免疫療法的重要標的。T 細胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 (TIM-3)和其配體蛋白(如半乳糖凝集素 9, Galectin-9)，就像 PD-1/PD-L1 一樣，影響著 NK 細胞對癌細胞的毒殺能力。因此，本計畫將以 NK 細胞為對象，探討 NK 細胞上的免疫檢查點蛋白 TIM-3，做為治療食道癌的免疫療法新標的的可行性，希望對食道癌治療提出一新的方向。
方 法 與 過 程	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。我們會建立抑制 TIM-3 功能的 NK92 細胞 (Non-Tim-3 NK92)，分析 Non-Tim-3 NK92 細胞對食道癌細胞株的毒殺能力，比較不同 TIM-3 表現的 NK92 細胞，其毒殺能力是否會不同。同時也評估乳酸是否會影響 TIM-3/ Galectin-9 的表現，以及對 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 Non-Tim-3-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。
研 究 發 現 及 建 議	1. 抑制 TIM-3 的表現，能提升 NK92 細胞的毒殺能力。 2. 腫瘤微環境中的乳酸能增加食道癌細胞的 Galectin-9 的表現，也會提升 NK92 細胞 TIM-3 的表現。因此乳酸能提升癌細胞對免疫療法的抗性，可能是藉由增加免疫檢查點的配體和受

	體的表現，使得免疫細胞的毒殺能力被抑制進而逃脫免疫系統的監控。 3. 抑制 TIM-3 的表現，能減緩乳酸產生抑制毒殺能力，提升 NK92 細胞的毒殺力。 4. 乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑的使用，能提升 NK92 細胞的毒殺能力，顯示乳酸要影響癌細胞或是 NK92 細胞，應該需要通過乳酸運輸蛋白進入細胞內，抑制了其進入細胞的途徑，其所產生的影響就減弱了。 5. 結合乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑和抑制 TIM-3 表現的 NK92 細胞，更能提升 NK92 細胞對食道癌的毒殺能力。 後續能持續進行從病患取得的腫瘤檢體的體外試驗或是利用動物實驗驗證本研究的結果
備	註

一. 摘要(包含研究目的、研究方法、重要發現、主要建議及政策意涵)。

癌症免疫療法為近年開發出來的新癌症治療方法。在許多癌症或腫瘤的治療上呈現相當不錯的治療效果，特別是血液性的腫瘤。目前臨床上常規使用的癌症免疫療法主要以免疫檢查點抑制劑或是人造嵌合式細胞表面抗原受體 T 細胞(chimeric antigen receptor, CAR-T)的細胞療法為主。這些免疫療法主要都是以 T 細胞為主的治療方式。雖然在特定癌症的治療上，免疫療法有很好的成效。但對於某些固態型的腫瘤，免疫療法的成效就仍有許多值得改善的地方。目前食道癌的免疫療法主要也是以免疫檢查點抑制劑為主，特別是針對 PD-1/PD-L1。

過去許多的文獻指出，自然殺手細胞(Natural Killer cells, NK)是除了 T 細胞外，體內根除癌細胞的另一重要的免疫細胞。以 NK 細胞為主的免疫療法，也運用在許多的癌症治療上。人造嵌合式細胞表面抗原受體 NK 細胞 (CAR-NK)和 NK 細胞上的免疫檢查點被認為是免疫療法的重要標的。T 細胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 (TIM-3)和其配體蛋白(如半乳糖凝集素 9, Galectin-9)，就像 PD-1/PD-L1 一樣，影響著 NK 細胞對癌細胞的毒殺能力。

因此，本計畫將以 NK 細胞為對象，探討 NK 細胞上的免疫檢查點蛋白 TIM-3，做為治療食道癌的免疫療法新標的的可行性，希望對食道癌治療提出一新的方向。

目的：

1. 建立抑制 TIM-3 功能的 NK 細胞(Non-Tim-3 NK)，比較其與具 TIM-3 功能的 NK 細胞的細胞毒殺能力差異，並評估其對食道癌細胞之毒殺作用。
2. 評估乳酸對 TIM-3/ Galectin-9 的影響與機轉，同時探討對 NK 細胞毒殺食道癌細胞之影響
3. 評估結合乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，和 Non-Tim-3 NK，對食道癌細胞之毒殺作用

方法：

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。我們會建立抑制 TIM-3 功能的 NK92 細胞 (Non-Tim-3 NK92)，分析 Non-Tim-3 NK92 細胞對食道癌細胞株的毒殺能力，比較不同 TIM-3 表現的 NK92 細胞，其毒殺能力是否會不同。同時也評估乳酸是否會影響 TIM-3/ Galectin-9 的表現，以及對 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 Non-Tim-3-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。

重要發現：

6. 抑制 TIM-3 的表現，能提升 NK92 細胞的毒殺能力。
7. 腫瘤微環境中的乳酸能增加食道癌細胞的 Galectin-9 的表現，也會提升 NK92 細胞 TIM-3 的表現。
8. 抑制 TIM-3 的表現，能減緩乳酸產生抑制毒殺能力，提升 NK92 細胞的毒殺力。
9. 乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑的使用，能提升 NK92 細胞的毒殺能力，顯示乳酸要影響癌細胞或是 NK92 細胞，應該需要通過乳酸運輸蛋白進入細胞內，抑制了其進入細胞的途徑，其所產生的影響就減弱了。
10. 結合乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑和抑制 TIM-3 表現的 NK92 細胞，更能提升 NK92 細胞對食道癌的毒殺能力

二. 主旨及背景說明

癌症免疫療法是近年開發出的新的癌症治療方法。已在血液性的腫瘤和部分癌症的治療上，獲得極大的成效。雖然，目前食道癌的治療仍以傳統的手術切除、放射線治療或是化學藥物治療為主。近幾年，免疫療法也被嘗試運用在食道癌的治療上，然而成效仍有待改進。因此尋找更新的治療方式是刻不容緩。

目前的免疫療法，主要利用 PD1/PD-L1 的免疫檢查點抑制劑或是以 T 細胞為主的治療方法。在免疫檢查點的治療方面，尋找新的治療標的，獨立於 PD1/PD-L1 或是結合 PD1/PD-L1 的治療是一新的趨勢。而 TIM-3/Gal-9 被認為是極具潛力的下個免疫檢查點標的。而細胞免疫療法中，自然殺手細胞(NK cell) 屬於先天的自然免疫系統，不同於 T 細胞，需要特定抗原的活化，也被認為是極有潛力的細胞免疫療法。TIM-3 也是 NK 細胞上的免疫檢查點受器。我們過去的研究也發現，腫瘤微環境中的乳酸會抑制浸潤到腫瘤微環境的免疫細胞，使癌細胞逃脫免疫的監控。因此，我們想在這個計畫，探討新的免疫檢查點 TIM-3/Gal-9，NK 細胞和抑制乳酸的相互作用機轉，建置一新的食道癌免疫療法。

本研究計畫的主要目的，有下列幾點：

1. 建立抑制 TIM-3 功能的 NK 細胞 (Non-Tim-3 NK)，比較其與具 TIM-3 功能的 NK 細胞的細胞毒殺能力差異，並評估其對食道癌細胞之毒殺作用。
2. 評估乳酸對 TIM-3/ Galectin-9 的影響與機轉，同時探討對 NK 92 細胞毒殺食道癌細胞之影響
3. 評估結合乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，和 Non-Tim-3 NK，對食道癌細胞之毒殺作用

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

免疫療法已是臨床常規的癌症治療方法之一。目前主要有抑制免疫檢查點蛋白(immune checkpoint)的抑制劑和利用 T 細胞的細胞療法，在血液性腫瘤以及一些特定的腫瘤上，有相當不錯的治療成效。

目前臨床上使用的抑制免疫檢查點抑制劑，都是以 CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4)和 PD-1/PD-L1 這二種免疫檢查點蛋白為主要的標的物。免疫療法最早開始於 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(1, 2)。後來也陸續核准了許多對抗 PD-1 和 PD-L1 的抗體藥物。這些藥物都藉由結合免疫檢查點，阻斷後續的活化，使免疫細胞對癌細胞的毒殺能力不被抑制，並提升免疫細胞對癌細胞的毒殺，而達到治療的目的(3, 4)。

而在 T 細胞免疫細胞療法方面，主要是利用所謂的 CAR-T 細胞療法。CAR-T 細胞是指將此特定的人造抗原蛋白 (chimeric antigen receptor, CAR)結合到 T 細胞表面，成為一新的改良過的 T 細胞，稱為 CAR-T 細胞。而此人造抗原蛋白可以根據不同的腫瘤特性，通常選定在腫瘤細胞有大量表現或具特異性之腫瘤抗原來設計，可以達到達到個人化醫療的目的(5)。

雖然，CTLA-4，PD-1/PD-L1 的抑制劑，和 CAR-T 的治療已是臨床常規療法(6-9)，但治療癌症的成效仍有提升的空間。尋找新的免疫檢查點或是新的免疫細胞療法，仍是刻不容緩的。

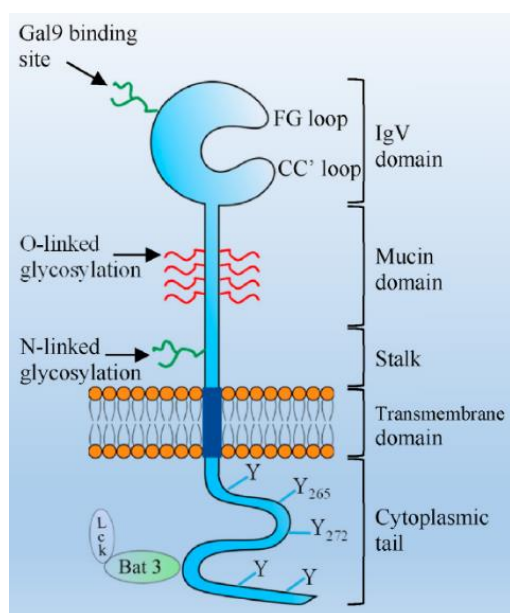
T 細胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 (TIM-3)

T 細胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 (TIM-3)，也被稱為第二型 A 型肝炎病毒細胞受器 (hepatitis A virus cellular receptor 2, HAVCR2)，由 302 個胺基酸組成，是一種穿膜蛋白，屬於免疫球蛋白家族成員之一(10)。細胞外遠端結構為 N 端免疫球蛋白結構域 (protein domain)，主要功能是抑制細胞毒殺型 T 細胞 (cytotoxic T cell)和第一型輔助 T 細胞(Th1 cell)；也能抑制如 γ 干擾素或腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF)等細胞激素的表現。除了在 T 細胞表現外，TIM-3 被發現也會在自然殺手細胞 (natural killer cell, NK)和樹突細胞(dendritic cell, DC)等非 T 細胞的免疫細胞表現。TIM-3 可以調節先天和後天的免疫反應，被認為和 PD-1 一樣，是一種免疫檢查點(immune checkpoint)蛋白

(11,12)。

TIM-3 有多的配體(ligand)，例如 Gal-9、PtdSer、HMGB1 和 CEACAM-1。Gal-9(Galectin-9, 第九型半乳糖凝集素)和 TIM-3 的結合被認為會導致 T 細胞的凋亡，也會造成 NK 細胞增加 γ 干擾素的製造(13)。在沒有配體的刺激下，TIM-3 胞內的蛋白結構域會結合上 Bat3 (HLA-B-associated transcript 3)，並結合上淋巴細胞特異激酶(lymphocyte specific kinase, Lck)，刺激 T 細胞。若 Gal-9 結合上 TIM-3，會造成 Bat3 無法連結到 TIM-3 胞內的蛋白結構域，轉而抑制了 T 細胞的訊息(圖一)。

圖一



圖一、TIM-3 的蛋白結構圖(節錄自 Sashi Kandel et al., *Cancer Letters* 510 (2021) 67–78)。

過去的研究也發現在慢性 B 肝感染的病人抑制 TIM-3，會造成 NK 細胞的毒殺能力增強。在晚期黑色素細胞瘤的病人，也可以發現其 NK 細胞有高 TIM-3 表現量。許多的癌症研究也發現，癌症病人的周邊 NK 細胞和腫瘤浸潤淋巴細胞，也有高 TIM-3 表現的情況。NK 細胞的 TIM-3 高表現，在與配體結合後，如 Gal-9，可能導致 NK 細胞的耗損，造成毒殺腫瘤細胞功能的降低。許多腫瘤也被發現能製造分泌 TIM-3。有研究認為 Gal-9 可以降低 NK 細胞的功能，而游離的 TIM-3 可以抑制 T 細胞的功能，因此導致腫瘤細胞逃脫免疫系統的監控。總合研究也指出 TIM-3 可以作為癌症整體存活率的預後指標，也和癌症的免疫調節有明

確的相關(14-20)。

而 Gal-9 是一可溶性的蛋白質，在一些表皮細胞，血管內皮細胞，T 細胞，B 細胞或巨噬細胞等都具有高表現的特徵(21)。和其受體 TIM-3 結合後，對不同的免疫細胞造成不同的影響。對 T 細胞而言，TIM-3/Gal-9 的結合，會抑制 Th1, Th17 和 cytotoxic T 細胞，降低其分裂能力，移動能力，導致細胞凋亡，使整體的 T 細胞免疫力下降。但對 NK 細胞而言，正常生理狀況，TIM-3/Gal-9 的結合，會促使 NK 細胞製造 γ 干擾素，提升其細胞毒殺能力，強化先天免疫的能力(innate immunity)。但在腫瘤微環境中(TME)，卻可能導致 NK 細胞的耗損衰竭，降低其對腫瘤細胞的毒殺能力。整體而言，TIM-3/Gal-9 是一個相當有潛力的免疫治療新標的(22-24)。

TIM-3 和 Gal-9 在食道癌的表現

TIM-3 和其配體 Galectin-9 在食道癌的表現又如何?由中國學者 Baoen Shan 等人的研究發現，TIM-3 在食道鱗狀上皮細胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)的表現量比正常食道細胞要來的高;而且高表現的 TIM-3 與食道癌細胞的轉移與較差的預後有關。韓國學者的研究也發現在手術切除後的食道鱗狀上皮細胞癌的檢體，TIM-3 都有高表現的現象，高表現 TIM-3 也和食道癌病患較差的存活率有關。研究也發現，Gal-9 可以抑制食道癌細胞株的生長，促進細胞的凋亡。在動物實驗中也發現 Gal-9 具有抑制腫瘤生長的能力。在其他癌症也有發現類似的現象。在子宮頸癌患者，Gal-9 的表現，在腫瘤細胞的表現較正常組織為低，且在分化較好的癌細胞，比分化較差的癌細胞表現量更多。而在 Hou 等學者對位於中國的食道鱗狀上皮細胞癌患者的研究，他們發現約有 15-20% 的患者，會有高表現 Gal-9 和 TIM-3 的情形。TIM-3 的高表現和患者較差的預後有關；而相反的，高表現 Gal-9 的患者，整體存活率較佳(25-26)。

綜合過去的研究，我們可以推論，Gal-9 有抑制癌細胞生長，轉移和促進凋亡的能力。在癌症腫瘤發生時，細胞內高表現的 Gal-9 具有抗癌的功能。然而，Gal-9 和 TIM-3 在免疫細胞的結合，卻會導致 T 細胞的凋亡與耗竭，初期似乎會促進 NK 細胞製造 γ 干擾素，提升其細胞毒殺能力，但卻也會造成 NK 細胞的耗竭，最後造成免疫系統對癌細胞毒殺能力降低。TIM-3/Gal-9 對癌細胞與免疫細胞作用上的差異，如何運用在癌症治療上，仍需進一步研究釐清。

自然殺手細胞免疫療法

除了 T 淋巴細胞外，自然殺手細胞(Natural killer (NK) cell)也是另一種能對抗癌細胞的免疫細胞(27)。NK 細胞屬於先天免疫系統一環，並不需要特殊抗原的活化。由於癌細胞本為體內的細胞，在癌化過程常會失去本身自我的 MHC 分子，因而導致先天免疫系統的 NK 細胞，可以主要藉由未偵測到癌細胞上的自我的 MHC 分子的機轉，活化 NK 細胞，進而對癌細胞產生毒殺作用。類似 T 細胞，NK 細胞上的特定受體也可抑制性受體和活化性受體二大類 (28)。

利用 NK 細胞進行的免疫細胞療法也有許多的不錯的研究成果，在運用的常規癌症治療上，是令人期待的 (29)。NK 92 細胞為一種 NK 細胞株，來自於非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)病人，它的特色是沒有抑制性的 KIR 受體，但具有所有活化性受體，等(30)。NK92 已是細胞株，可以輕易地在體外大量培養，特別的是在最初的臨床研究發現，NK92 細胞可以運用在不同的患者身上，也沒有發現嚴重的排斥性。這使得 NK 92 細胞在癌症治療應用上，可以不同於 CAR-T 的治療，要自患者血液抽取的本身的細胞，經過後製後，才能用於患者。這使得 NK92 細胞能較廣泛地運用在各類型的癌細胞與不同患者上 (31, 32)。

腫瘤微環境與免疫抑制

固態瘤的腫瘤微環境 (tumor microenvironment, TME) 是一相當複雜的環境，存在很多促進或干擾癌細胞生長的因素。TME 環境中包含了腫瘤細胞，間質細胞，和浸潤的各種免疫細胞 (Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)。環境內的組織間液，也包含這些細胞的代謝產物，其組成成分、含氧量、酸鹼度等也受到這些細胞影響。而這種交互作用，可能影響癌細胞的生長或轉移(33)。

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。乳酸除了含有原葡萄糖內大量未被釋出的能量外，近年的研究也發現對腫瘤的生長具有多方面的影響 (34, 35)。

腫瘤細胞藉由糖解反應產生大量的乳酸，會釋放到 TME，

影響腫瘤微環境的生態。過去的研究發現，乳酸不僅可以做為 TME 中其他細胞的能量來源，也可以誘發其他間質細胞的質變，促使其改變本身的特性，協助腫瘤細胞的發展。例如腫瘤相關纖維母細胞 (cancer associated fibroblast, CAF) 和 M2 型巨噬細胞的形成，促進腫瘤的惡化 (36)。近年也有文獻指出乳酸在 TME 環境裡，會協助癌細胞逃脫免疫監控，促進癌細胞的發展和轉移。這些包括發現乳酸會抑制毒殺型 T 細胞的 IL-2 以及干擾素- γ 的製造，造成免疫抑制效果。Brand 等人也發現腫瘤周圍 T 細胞以及 NK 細胞數量與乳酸的存在與否有關。這些研究結果都顯示乳酸具備免疫抑制，協助癌細胞逃脫免疫監控的能力。但其詳細的分子機制與免疫細胞上的免疫檢查點蛋白間的關係，仍不是很清楚 (37)。

因此，本計畫的主要目標：

1. 建立抑制 TIM-3 功能的 NK 細胞 (Non-Tim-3 NK)，比較其與具 TIM-3 功能的 NK 細胞的細胞毒殺能力差異，並評估其對食道癌細胞之毒殺作用。
2. 評估乳酸對 TIM-3/ Galectin-9 的影響與機轉，同時探討對 NK 92 細胞毒殺食道癌細胞之影響
3. 評估結合乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，和 Non-Tim-3 NK，對食道癌細胞之毒殺作用

四. 研究方法(包含研究內容、範圍、對象、限制與過程)。

AIM 1: 建立抑制 TIM-3 功能的 NK92 細胞 (Non-Tim-3 NK92)，比較其與具 TIM-3 功能的 NK92 細胞的細胞毒殺能力差異，並評估其對食道癌細胞之毒殺作用。

為了評估 TIM-3 的表現，對自然殺手細胞的毒殺能力影響，以及對食道癌進行免疫療法的效率，我們將建立抑制 TIM-3 功能的 NK92 細胞 (Non-Tim-3 NK92)，再評估其對食道癌細胞株的毒殺作用。我們會以 NK92 細胞和 Non-Tim-3 NK92 細胞同時進行實驗比較。利用不同作用細胞與腫瘤細胞比例(E:T ratio)的 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)染色或鈣黃綠素(Calcein AM)二種方法評估。Non-Tim-3 NK92 的建立，將會利用 anti-TIM-3 shRNA，利用電穿孔方式將 shRNA 傳染(transfection)入 NK92 細胞，再利用抗生素篩選出被轉染的 NK 92 自然殺手細胞株。利用西方墨點法，評估 TIM-3 的抑制效果。

AIM 2: 評估乳酸對 TIM-3/ Galectin-9 的影響與機轉，同時探討對 NK 92 細胞毒殺食道癌細胞之影響

過去的許多研究都認為腫瘤微環境可能影響免疫細胞對癌細胞的監控 而乳酸可能扮演重要的角色。TIM-3/ Galectin-9 是否受到乳酸的影響，進而造成 NK 細胞的毒殺能力改變。我們會先以乳酸處理食道癌細胞株和 NK92 細胞，觀察食道癌細胞株和 NK92 細胞的 TIM-3/ Galectin-9 表現。同時探討，這種變化的可能機轉。

AIM3. 評估結合乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，和 Non-Tim-3 NK，對食道癌細胞之毒殺作用

3.1 評估乳酸對 Non-Tim-3 NK 的作用:我們會先以乳酸處理 Non-Tim-3 NK 細胞 7 天後，再進行對食道癌細胞的毒殺實驗。並和乳酸處理 NK92 細胞後，對食道癌細胞的毒殺效果進行比較。

3.2 評估 MCT1 抑制劑對 Non-Tim-3 NK 的作用:

3.2.1 我們會先以 MCT1 抑制劑處理 Non-Tim-3 NK 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 Non-Tim-3 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 Non-Tim-3 NK 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 Non-Tim-3 NK 細胞對食道癌細胞的毒殺實驗。

3.3.3 我們會以 Non-Tim-3 NK 細胞對食道癌細胞的毒殺實驗的同時加上 MCT1 抑制劑，分析對食道癌細胞的毒殺效果

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。

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 細胞毒殺能力。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 小時候，利用 Calcein AM 方法和結晶紫染色法進行細胞毒殺能力分析。

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

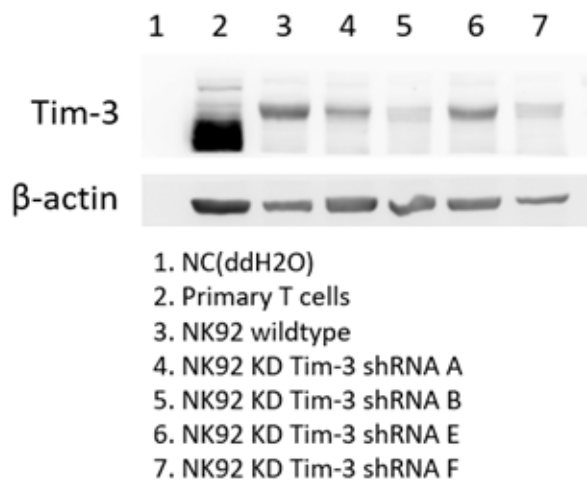
我們選用 25 nM AZD3965 這個單羧酸轉運蛋白 1 抑制劑濃度來處理本次研究的細胞(Belouèche-Babari et al., 2017)，並設計實驗測量基因和蛋白表現上的變化以及對免疫細胞毒殺毒性的影響。單羧酸轉運蛋白 1 抑制劑溶劑配置:以 5 mg 單羧酸轉運蛋白 1 抑制劑 AZD3965 粉末溶在二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)配置成濃度 1 mM。

五. 研究發現。

AIM 1: 建立抑制 TIM-3 功能的 NK92 細胞 (Non-Tim-3 NK92)，比較其與具 TIM-3 功能的 NK92 細胞的細胞毒殺能力差異，並評估其對食道癌細胞之毒殺作用。

我們建立了 4 株抑制 TIM-3 功能的 NK92 細胞 (Non-Tim-3 NK92)，並利用西方墨點法，分析其對 TIM-3 表現的抑制效果。

圖一、

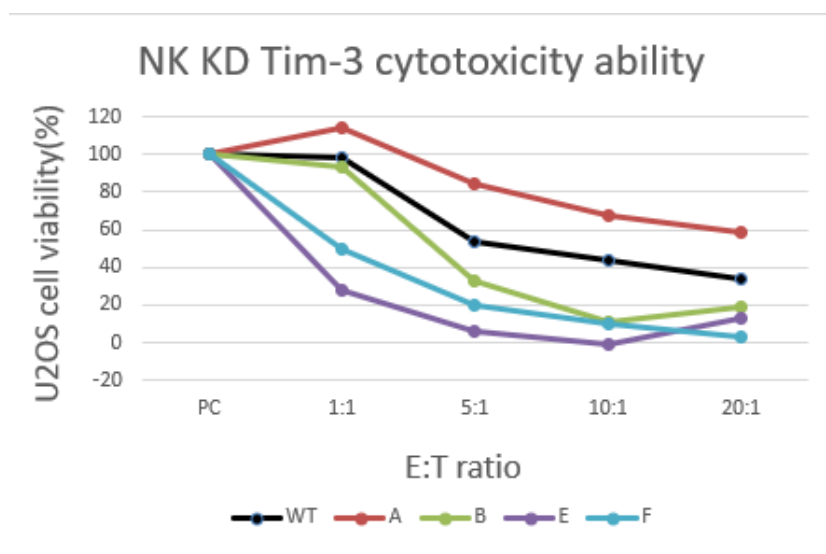


圖一. 利用電穿孔方式將 anti-TIM-3 shRNA 質體轉染到 NK92 細胞。利用西方墨點法分析 TIM-3 的蛋白表現，相對於原 NK92 細胞 TIM-3 的表現，anti-TIM-3 shRNA A, B, E, F 4 株 NK92 細胞，其 TIM-3 表現都被抑制，抑制程度 B>F>A>E。

接下來，我們先利用骨肉瘤細胞株(U2OS)來測試此四株細胞株的毒殺作用。利用 U2OS 骨肉瘤細胞，主要是因為過去本實驗室發現 U2OS 在乳酸處理下，其 Gal-9 的表現量會升高，可以用來測試 TIM-3 的功能活性。我們發現 4 株抑制 TIM-3 功能的 NK92 細胞 (Non-Tim-3 NK92)對 U2OS 的毒殺能力並不一致。雖然，TIM-3 的表現都被抑制。如圖二所示，除了 A 細胞株外，B、E、F 等 3 株 Non-Tim-3 NK92 細胞，其對 U2OS 的毒殺能力都增強了。表示降低 TIM-3 的表現，可以減少 Gal-9 對 TIM-3 的刺激，增強 NK92 細胞的毒殺能力。至於 A 細胞株為何沒有增強 NK92 細胞的毒殺能力，原因目前還不明。後續的實驗，我們將先選擇 B 和 F 2 株細胞作為

實驗的主要材料。

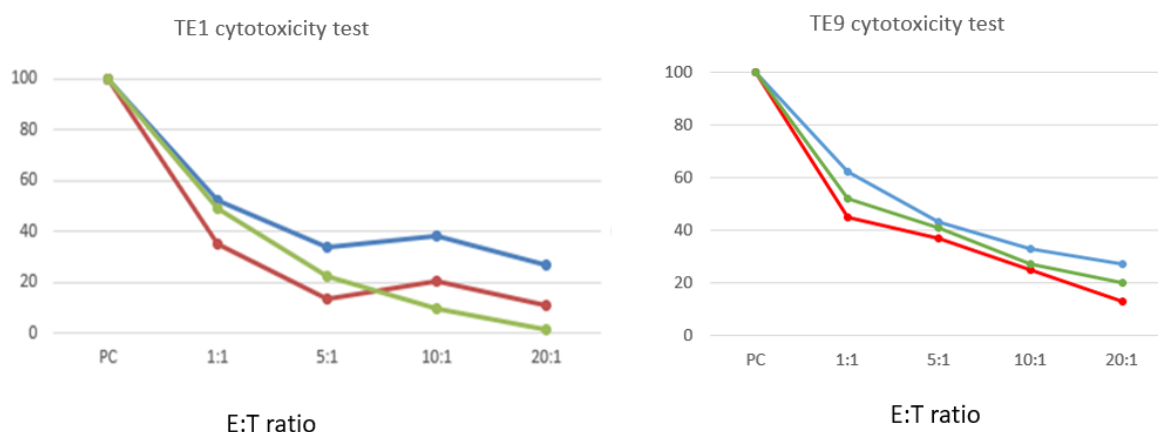
圖二、



圖二、Non-Tim-3 NK92 細胞對 U2OS 的毒殺能力測試。在不同 E:T ratio 下，B，E，F 細胞都比 wild type NK92 細胞毒殺能力強。

我們接下來利用食道癌細胞株 TE-1，TE-9 測試 Non-Tim-3 NK92 細胞的毒殺能力。二株(B,F) Non-Tim-3 NK92 的毒殺能力，在 TE-1 食道癌細胞株也可以看到較 wild type NK92 細胞毒殺能力強。(圖三)

圖三、

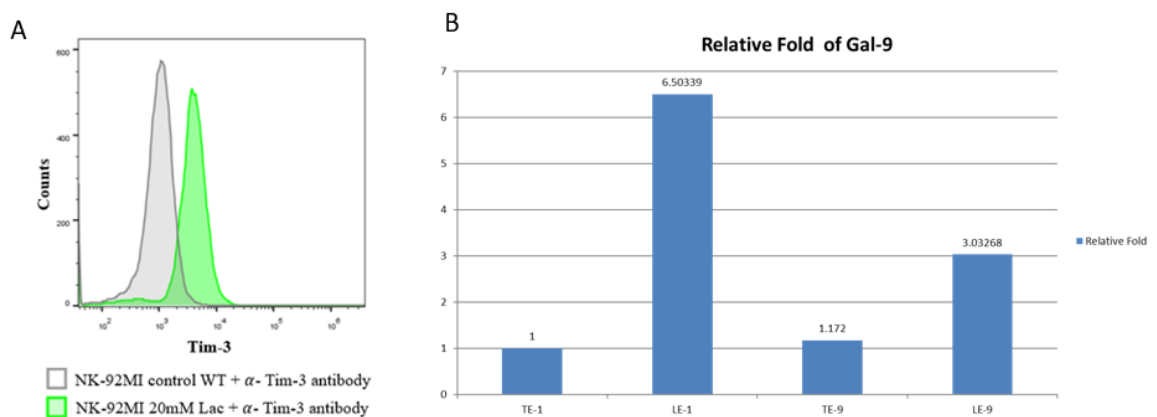


圖三、Non-Tim-3 NK92 細胞對 TE1，TE9 食道癌細胞的毒殺能力測試。B (綠線)，F (紅線) Non-Tim-3 NK92 細胞都比 wild type NK92 (藍線) 細胞毒殺能力強，TE1 細胞也比 TE9 更易被毒殺。

AIM 2: 評估乳酸對 TIM-3/ Galectin-9 的影響與機轉，同時探討對 NK 92 細胞毒殺食道癌細胞之影響

以乳酸處理 NK92 細胞 7 天後，分析其 TIM-3 的表現，發現 TIM-3 確實有上升的現象。再利用乳酸處理食道癌細胞株，分析其 Galectin-9 的表現，初步也發現乳酸會刺激食道癌細胞 Galectin-9 的 mRNA 表現。(圖三)

圖三

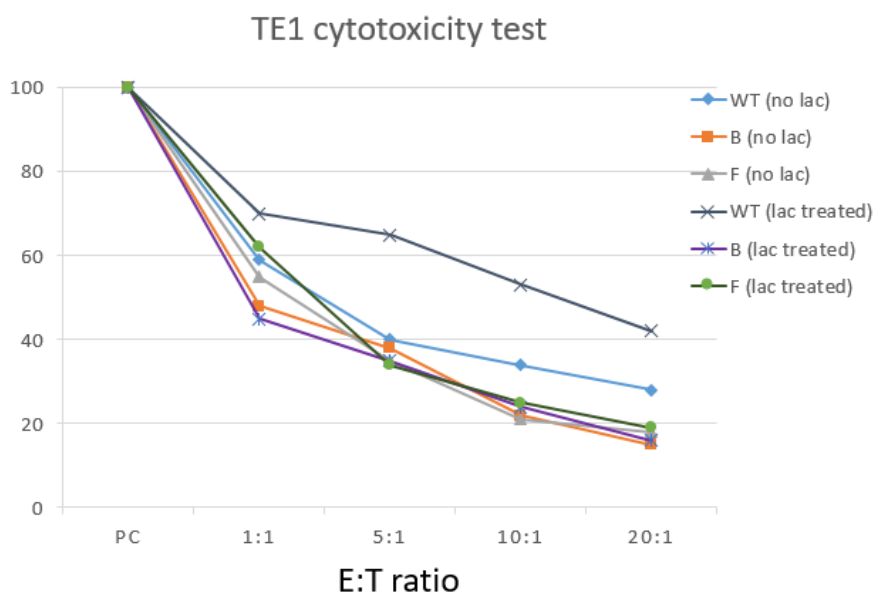


圖三. 利用乳酸處理 NK92 細胞和食道癌細胞株，發現 TIM-3 和 Galectin-9 的表現都上升。(A)利用流式細胞儀分析 NK92 表面 TIM-3 的表現量。(B)利用 RT-qPCR 方法分析，Galectin-9 mRNA 表現。LE-1 和 LE-9 分別代表經乳酸處理後的 TE1 和 TE9 細胞。

我們利用乳酸處理食道癌細胞株後，再利用 wild type NK92 和 Non-Tim-3 NK92 細胞，測試其毒殺能力。在體內腫瘤微環境中，由於乳酸的增加，造成細胞毒殺能力的降低。我們也發現乳酸會增加食道癌細胞的 Galectin-9 的表現，TE1 細胞增加的量較 TE9 為多，而 NK92 細胞經乳酸處理後 TIM3 的表現也增加。因此，食道癌細胞可以藉由 Galectin-9 和 TIM3 的結合作用，抑制 NK92 細胞的毒殺能力。因此，抑制 NK92 細胞 TIM3 的表現，有可能減緩乳酸對 NK92 細胞的抑制效果。

我們進行細胞毒殺試驗，發現乳酸處理後的食道癌細胞對 NK92 細胞確實較有抗性。而將 TIM3 knockdown 的 Non-Tim-3 NK92 細胞對乳酸處理後的食道癌細胞，其毒殺能力不受乳酸的影響(圖四)。TE1 和 TE9 食道癌細胞也相同類似的反應。

圖四



圖

四、評估乳酸處理後的食道癌細胞 TE1，對 NK92 細胞的毒殺能力影響。No lac 代表食道癌細胞未經乳酸處理， lac treated 代表食道癌細胞經乳酸處理 7 天後，再進行細胞毒殺試驗。藍線和黑線為 wild type NK92 細胞，橘線和紫線為 Non-Tim-3 NK92 細胞株 B，灰線和綠線是 Non-Tim-3 NK92 細胞株 F。

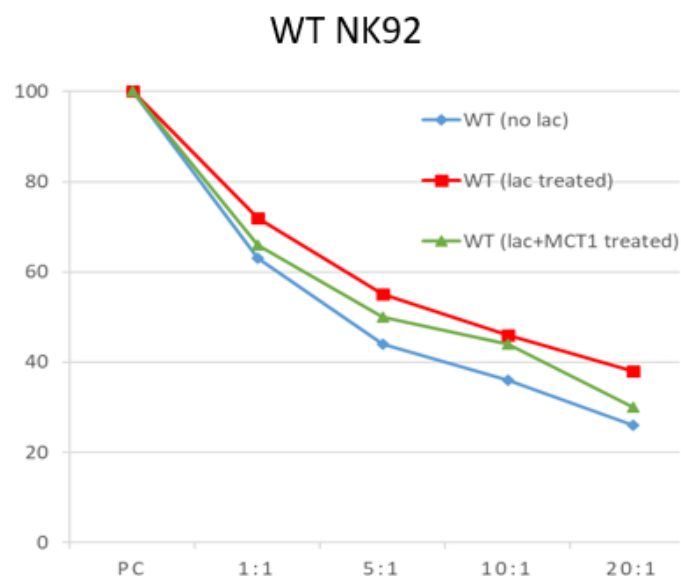
AIM3. 評估結合乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑，和 Non-Tim-3 NK，對食道癌細胞之毒殺作用

我們接著評估結合乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑和 Non-Tim-3 NK92 細胞，是否能增進食道癌細胞的毒殺能力。

我們先測試利用 wild type NK92 細胞結合 MCT-1 抑制劑，發現在乳酸處理的情狀下，二者的結合對食道癌細胞的毒殺能力有提升的現象。(圖五)

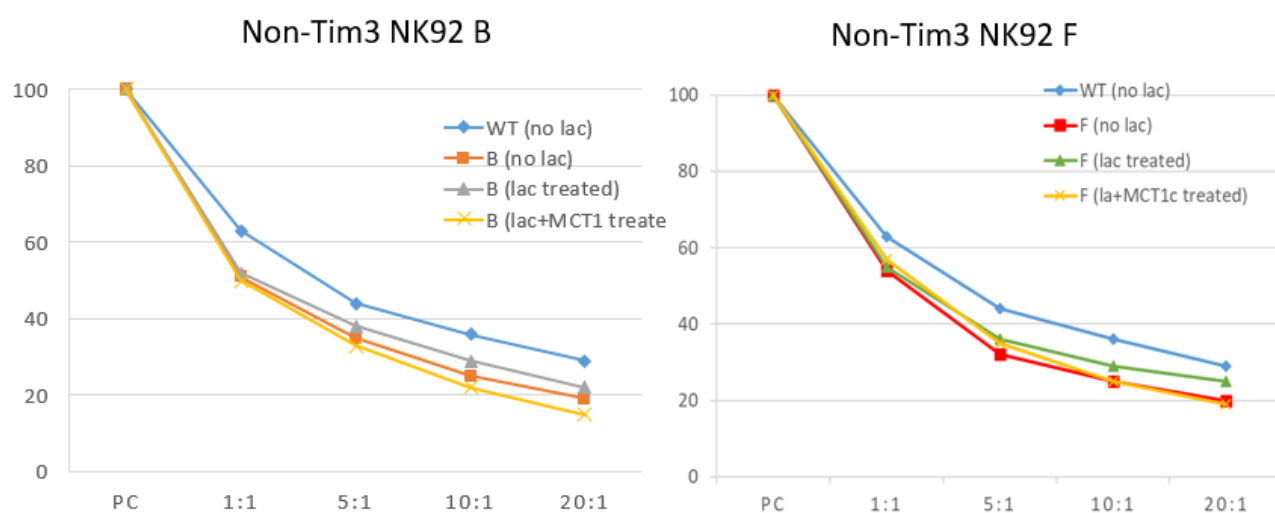
我們接著利用 knockdown TIM-3 的 NK92 細胞，在進行一樣的測試。由於 Non-Tim-3 NK92，其 TIM-3 的表現已經很低，受乳酸的影響較少，因此，我們經乳酸處理後，再加上 MCT-1 抑制劑，我們發現，MCT-1 抑制劑也能增加 Non-Tim-3 NK92 的細胞毒殺能力。

圖五



圖五、食道癌細胞株 TE1，經乳酸處理後，以 wild type NK92 細胞測試其細胞毒殺能力。乳酸能降低 NK92 細胞的毒殺能力(紅線)。但加上 MCT-1 抑制劑，可能減緩乳酸的作用，提升 NK92 的毒殺能力(綠線)。

圖六



圖六、結合 MCT-1 抑制劑和 Non-Tim-3 NK92 細胞，測試其對食道癌細胞株 TE-1 的毒殺能力。對 Non-Tim-3 NK92B 細胞而言，乳酸處理，並未明顯引響其細胞毒殺能力(灰線和橘線)，但加上 MCT-1 抑制劑後，有提升 Non-Tim-3 NK92B 的毒殺能力。而對 Non-Tim-3 NK92F，乳酸處理，造成 NK92 的毒殺能力略為減弱(紅線和綠線)，而 MCT-1 抑制劑，有提升 Non-Tim-3 NK92F 的毒殺能力。

六. 結論與建議(分立即可行之建議及長期性建議)。

我們利用食道癌細胞株 TE1 和 TE9, 測試腫瘤微環境中的乳酸, 和自然殺手細胞上的免疫檢查點 TIM-3 蛋白對利用 NK 細胞質型的免疫療法的影響。我們的研究結果有下列幾點發現:

11. 抑制 TIM-3 的表現, 能提升 NK92 細胞的毒殺能力。
12. 腫瘤微環境中的乳酸能增加食道癌細胞的 Galectin-9 的表現, 也會提升 NK92 細胞 TIM-3 的表現。因此乳酸能提升癌細胞對免疫療法的抗性, 可能是藉由增加免疫檢查點的配體和受體的表現, 使得免疫細胞的毒殺能力被抑制, 進而逃脫免疫系統的監控。
13. 抑制 TIM-3 的表現, 能減緩乳酸產生抑制毒殺能力, 提升 NK92 細胞的毒殺力。
14. 乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑的使用, 能提升 NK92 細胞的毒殺能力, 顯示乳酸要影響癌細胞或是 NK92 細胞, 應該需要通過乳酸運輸蛋白進入細胞內, 抑制了其進入細胞的途徑, 其所產生的影響就減弱了。
15. 結合乳酸運輸蛋白(MCT-1)抑制劑和抑制 TIM-3 表現的 NK92 細胞, 更能提升 NK92 細胞對食道癌的毒殺能力。

本計畫就食道癌細胞株的研究結果, 發現抑制腫瘤微環境的乳酸作用, 再加上抑制 NK 細胞表現免疫檢查點 TIM-3 的表現, 可以提升 NK92 細胞對食道癌細胞的毒殺能力, 雖然目前只是細胞株的研究結果, 但以後若能持續進行, 例如從病患取得的腫瘤檢體進行體外試驗或是利用動物實驗驗證本研究的結果, 都是值得繼續深入探討, 開發出對食道癌的新穎治療方法。

七. 參考文獻

1. Brunet JF, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily — CTLA-4. *Nature*. 1987;328(6127):267–270.
2. Walunas TL, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994;1(5):405–413.
3. 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.
4. 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.
5. June CH, Sadelain M. Chimeric antigen receptor therapy. *N Engl J Med*. 2018; 379: 64–73
6. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2947–53
7. 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.
8. 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
9. Jiao R, Luo H, Xu W, Ge H (2019)
Immune checkpoint inhibitors in esophageal squamous cell carcinoma : progress and opportunities..*Onco Targets Ther*.12:6023-6032
10. L. Monney, et al., Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease, *Nature* 415 (6871) (2002) 536–541.
11. A.C. Anderson, et al., Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells, *Science* 318 (5853) (2007) 1141–1143.
12. W.D. Hastings, et al., TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines, *Eur J Immunol* 39 (9) (2009) 2492–2501.
13. C. Zhu, et al., The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T

- helper type 1 immunity, *Nat Immunol* 6 (12) (2005) 1245–1252.
14. Y. Ju, et al., The Tim-3/galectin-9 pathway involves in the homeostasis of hepatic Tregs in a mouse model of concanavalin A-induced hepatitis, *Mol Immunol* 58 (1) (2014) 85–91.
 15. X. Gao, et al., TIM-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression, *PLoS One* 7 (2) (2012), e30676.
 16. Z.Z. Yang, et al., IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma, *J Clin Invest* 122 (4) (2012) 1271–1282.
 17. E. Zhou, et al., Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis of patients with colon cancer, *Int J Clin Exp Pathol* 8 (7) (2015) 8018–8027.
 18. Y.R. Piao, et al., Prognostic value of T cell immunoglobulin mucin-3 in prostate cancer, *Asian Pac J Cancer Prev* 14 (6) (2013) 3897–3901.
 19. Y. Cao, et al., Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis, *PLoS One* 8 (1) (2013), e53834.
 20. Y. Cao, et al., Correction: Tim-3 Expression in Cervical Cancer Promotes Tumor Metastasis, *PLoS One* 11 (3) (2016), e0152830.
 21. Thijssen, V.L.; Heusschen, R.; Caers, J.; Gri_oen, A.W. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis:A systematic review. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, 1855, 235–247
 22. Seki, M.; Oomizu, S.; Sakata, K.; Sakata, A.; Arikawa, T.; Watanabe, K.; Ito, K.; Takeshita, K.; Niki, T.; Saita, N.; et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin. Immunol.* **2008**, 127, 78–88.
 23. Madireddi, S.; Eun, S.-Y.; Lee, S.-W.; Nem_covi_cová, I.; Mehta, A.K.; Zajonc, D.M.; Nishi, N.; Niki, T.;Hirashima, M.; Croft, M. Galectin-9 controls the therapeutic activity of 4-1BB-targeting antibodies. *J. Exp. Med.* **2014**, 211, 1433–1448.
 24. Nagahara, K.; Arikawa, T.; Oomizu, S.; Kontani, K.; Nobumoto, A.; Tateno, H.; Watanabe, K.; Niki, T.;Katoh, S.; Miyake, M.; et al. Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8 T cells and enhances antitumor immunity via Galectin-9-Tim-3 interactions. *J. Immunol.* **2008**, 181, 7660–7669
 25. N. Hou, J. Ma, W. Li, L. Zhao, Q. Gao, L. Mai, T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein-3 and galectin-9 protein

- expression: potential prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma for Chinese patients, *Oncol Lett* 14 (2017) 8007–8013.
26. Zhao Y, Chen D, Wang W, Zhao T, Wen J, Zhang F, Duan S, Chen C, Sang Y, Zhang Y, Chen Y. Significance of TIM-3 Expression in Resected Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Thorac Surg.* 2020;**109**:1551–1557.
 27. 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.
 28. Jun Wu 1, Lewis L Lanier. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res.* 2003;90:127-56
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144:646-674.
 34. HeidenMGV, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009; 324:1029–33.
 35. Pucino V, Bombardieri M, Pitzalis C, Mauro C. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity. *Eur J Immunol.* 2017; 47:14–21.
 36. 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.

37. 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