

NKG2D リガンドの発現と  
担癌マウスモデルにおける PSK の  
抗腫瘍効果との相関

氏名 小長井 文乃

所属 山口大学大学院 医学系研究科

医学専攻

消化器・腫瘍外科学講座

平成 29 年 8 月

## 目次

1. 要旨	3
2. 背景・目的	3
3. 方法	4
4. 結果	6
5. 考察	7
6. 結語	8
7. 謝辞	8
8. 参考文献	8
9. 図表	11

## 1. 要旨

NKG2D リガンド (NKG2DL) は腫瘍細胞に広く発現し、受容体である NKG2D を発現する免疫細胞の活性化因子として働く一方で、免疫抑制因子としても作用し二面性を有することが報告されている。PSK は免疫賦活作用を有し、本邦において化学療法との併用による消化器癌及び小細胞肺癌に対する治療に用いられている。本論文では、PSK に対する感受性を規定する腫瘍の特徴を明らかにすることを目的とし、癌細胞における NKG2DL の発現に着目した。

マウス癌細胞の代表的な NKG2DL である Rae-1 family と H60 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。また、各細胞株を BALB/c マウスに皮下移植後、PSK を腹腔内投与し、PSK の抗腫瘍効果を比較した。各担癌マウスにおける免疫細胞の NKG2D の発現及び細胞内 IFN- $\gamma$  の産生を指標とし、PSK 投与による CD8<sup>+</sup> T 細胞活性への影響を検討した。その結果、PSK は Rae-1 family と H60 の両リガンドを発現しない Meth-A 細胞に対し最も抗腫瘍効果を示し、H60 のみ発現する 4T1 細胞に対しては効果が小さく、両リガンドを発現する K-BALB 細胞に対しては全く効果を示さなかった。NKG2DL の発現は PSK の抗腫瘍効果と逆相関を示した。また、PSK 感受性 Meth-A 細胞移植マウスの CD8<sup>+</sup> T 細胞において、PSK 投与により、NKG2D の発現に加え細胞内 IFN- $\gamma$  の産生が有意に増加した。一方、PSK 非感受性 K-BALB 細胞移植マウスにおいて、PSK 投与による CD8<sup>+</sup> T 細胞活性への影響は認められなかった。以上より、各細胞株の NKG2DL 発現パターンが担癌マウスにおける PSK の抗腫瘍効果を規定する可能性を見出した。

## 2. 背景・目的

Natural killer group member D (NKG2D) は NK 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞に発現する活性化受容体である。腫瘍に発現する NKG2D リガンド (NKG2DL) は主に NKG2D との相互作用により NK 細胞の活性化に関わる因子として知られている。しかし、腫瘍上の NKG2DL の発現と T 細胞表面上の NKG2D との関連が T 細胞の活性化へ与える影響は未だ明らかになっていない。NKG2DL は NKG2D を発現する NK 細胞と結合し免疫活性化因子として作用する一方で、恒常的に NKG2DL に暴露されることにより免疫エフェクター細胞の活性が減弱することも報告されている<sup>1</sup>。即ち、NK 細胞の活性制御において NKG2DL は免疫刺激及び免疫抑制の相反する免疫学的特徴を有する。また、我々は胃癌患者の外科的切除組織において、NKG2D を発現する腫瘍に浸潤する免疫細胞は NK 細胞ではなく主に CD8<sup>+</sup>T 細胞であることを見出した (Oncology report in press)。そこで、本研究では、NKG2DL/ NKG2D 相互作用が T 細胞の活性化或いは抑制に果たす役割、更に免疫療法の治療効果へ与える影響を明らかにすることを目指した。

NKG2DL は複数同定され、ヒト NKG2DL は UL16 結合タンパク質 (ULBP1-6)<sup>2</sup>、MHC クラス I 関連タンパク質 A、B (MICA/ B)<sup>3</sup>、マウス NKG2DL は Rae-1 family、H60、Mult-1 が主に知られている<sup>1,4</sup>。NKG2DL は腫瘍細胞に広く発現し、NKG2D を有する NK

細胞、CD8<sup>+</sup> T細胞、 $\gamma\delta$  T細胞を活性化し、腫瘍排除を誘導する。マウス NKG2DLのうち、Mult-1は例外的に正常組織においても発現が認められるが、Rae-1 familyやH60はウイルス感染やDNA障害等の細胞内ストレスにより誘導され、様々な腫瘍細胞において発現が亢進している<sup>5</sup>。しかしながら、恒常的暴露などの特定条件下においてNKG2DLが免疫応答を減弱し、免疫監視機構からの逃避に寄与することも示されている<sup>6,7</sup>。

NKG2DL/NKG2D相互作用に関与する腫瘍由来の免疫抑制或いは免疫刺激因子を明らかにするため、我々は免疫賦活剤であるprotein-bound polysaccharide-K (PSK) (別名クレステン)を用いた<sup>8,9</sup>。PSKはカワラタケCM101株の菌糸体より抽出され<sup>10</sup>、本邦において化学療法との併用による消化器癌及び小細胞肺癌に対する治療に用いられている。本研究では、まず、腫瘍におけるNKG2DLの発現プロファイルと各担癌マウスにおけるPSKの抗腫瘍効果との関係性を検討した。次に、NKG2DL発現細胞或いは非発現細胞を移植したマウスを用い、CD8<sup>+</sup> T細胞におけるNKG2Dの発現及び細胞内IFN- $\gamma$ の産生を指標として、腫瘍におけるNKG2DLの発現がT細胞の活性化に関与するか否かを検討した。

### 3.方法

#### 【マウス及び細胞株】

雌性BALB/cマウス(8-10週齢)は日本クレア株式会社から購入した。全てのマウスは山口大学動物施設においてspecific pathogen-free (SPF)条件下で飼育された。全ての動物実験は山口大学動物使用委員会の承認を受け実施した。

用いた細胞株を以下に示す。Meth-A: BALB/cマウス由来メチルコラントレン誘導線維肉腫細胞<sup>11</sup>、CT26: BALB/cマウス由来大腸腺癌細胞<sup>12</sup>、4T1: BALB/cマウス自然発生乳癌細胞<sup>13</sup>、S180: マウス肉腫細胞<sup>14</sup>、K-BALB: BALB/cマウス由来肉腫細胞<sup>15</sup>、ISOS-1: SCIDマウス由来血管肉腫細胞<sup>16</sup>、RAG: BALB/cマウス由来腎臓腺癌細胞<sup>17</sup>、CMT-93: C57BL/6<sup>icrf</sup>マウス由来大腸癌細胞<sup>18</sup>。全ての細胞はAmerican Type Culture Collectionより購入し、非働化ウシ血清10%を含むDMEM-F12培地を用い、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養した。

#### 【担癌マウスにおけるPSKの抗腫瘍効果】

1匹当たり $1 \times 10^6$ 個の各腫瘍細胞をBALB/cマウスに皮下移植し、移植翌日よりPSKを週3回腹腔内投与した(n=7-9, Figure 1A)。マウスを経過観察し、腫瘍が壊死或いは最大腫瘍サイズ $6,000\text{mm}^3$ を超えた時点で安楽死させた。両腫瘍移植モデルにおいて、 $1 \times 10^6$ 個のK-BALB皮下移植7日後に $1 \times 10^6$ 個のMeth-Aを移植し、Meth-A移植翌日よりPSKを週3回腹腔内投与し4週間後に安楽死させた。(n=8, Figure 5A, B)。腫瘍コントロールマウスは各腫瘍細胞を皮下移植後に生理食塩水を投与した。正常コントロールマウスには腫瘍移植及びPSK投与を実施しなかった。腫瘍径はノギスを用いて測定し、腫瘍体積は以下の式 $A \times B^2 \times 0.5$  (A: 長径, B: 短径)より算出した。

#### 【フローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析】

フローサイトメトリーにより、Meth-A、S180、4T1、CT26、K-BALB、ISOS-1 の各細胞表面上の NKG2DL、Rae-1 family 及び H60 の発現を解析した。また、Meth-A、4T1、K-BALB 細胞表面上の MHC クラス I 分子 H-2D<sup>d</sup>、H-2K<sup>d</sup>、H-2L<sup>d</sup>/H-2D<sup>b</sup> の発現を解析した。Meth-A、K-BALB 移植マウスの末梢血中 CD49b<sup>+</sup> NK 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞上の NKG2D の発現を測定した。後大静脈より採血後、BD Pharm Lyse を添加し赤血球を溶血した。回収した単核球は NK 細胞、T 細胞の表面マーカーとして各々 CD8a、CD49b、加えて NKG2D を染色した。洗浄後、細胞を PBS に懸濁し、フローサイトメトリーにより測定した。用いた抗体を以下に示す。PE-conjugated anti-Rae-1 antibody (以下 Ab と略す) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、PE-conjugated anti-H60 Ab (R&D Systems)、PE-conjugated anti-H-2Dd Ab (BioLegend, San Diego, CA, USA)、PE-conjugated anti-H-2Kd Ab (BioLegend)、PE-conjugated anti-H-2Ld/H-2Db Ab (BioLegend)、PE-conjugated isotype-control Ab (R&D Systems)、FITC-conjugated anti-CD4 Ab (BD Biosciences)、PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD8a Ab (BD Biosciences)、APC-conjugated anti-CD49b Ab (BD Biosciences)、PE-conjugated anti-NKG2D Ab (BioLegend)。各抗体により染色した細胞は FACSCalibur を用いて測定し、データ解析は FlowJo software を用いた。

#### 【細胞内サイトカイン解析】

Meth-A、K-BALB 細胞を各々1匹当たり  $1 \times 10^6$  個皮下移植 4 週後、各移植モデルより脾臓細胞を回収した。脾臓細胞  $2 \times 10^6$  個を brefeldin A で 37°C 5 時間インキュベートした。活性化刺激のため、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 5 ng/mL) 及び A23187 (250 ng/mL) を添加した。細胞を洗浄後 Fcg III/II receptor blocker [anti-mouse CD16/32 (eBioscience, San Diego, CA, USA)] でインキュベートした。細胞を PE-conjugated anti-CD49b、PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD4、APC-conjugated anti-CD8a Abs で各々染色後、fixation/permeabilization solution (BD Biosciences) を用いて固定及び透過処理を行った。最後に、FITC-conjugated anti-IFN- $\gamma$  Ab 或いは FITC-conjugated control Ab を添加し、各抗体により染色した細胞は FACSCalibur を用いて測定した。データ解析は FlowJo software (Treestar Inc., San Carlos, CA, USA) を用いた。

#### 【統計解析】

結果は平均値±標準誤差で表示した。全てのデータは GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて解析した。検定には一元配置或いは二元配置分散分析 (ANOVA)、Bonferroni post-hoc test、Mann-Whitney U-test を用いた。P 値が 0.05 以下の時、統計学的有意とした。

#### 4.結果

##### 【腫瘍増殖に対する PSK の効果】

PSK は Meth-A 細胞移植マウスにおいて最も抗腫瘍効果を示し、生理食塩水投与と比較し PSK 投与により腫瘍体積は有意に低下した ( $P=0.0001$ )。S180 細胞移植マウスにおいても同様の結果が得られた (data not shown)。4T1 細胞移植マウスにおいて、PSK は腫瘍体積を低下させるが有意差はなかった。CT26 細胞移植マウスにおいても同様の結果が得られた (data not shown)。K-BALB 細胞移植マウスにおいて、PSK は全く抗腫瘍効果を示さなかった。ISOS-1 細胞移植マウスにおいても同様の結果が得られた (data not shown) (Figure 1)。なお、RAG 細胞、CMT93 細胞はマウスに生着しなかった (data not shown)。

##### 【癌細胞株における NKG2DL の発現】

Meth-A、S180 細胞は Rae-1 family、H60 ともに発現が認められなかった(Figure 2A)。4T1、CT26 細胞は H60 のみを発現を認めた(Figure 2B)。K-BALB、ISOS-1 は Rae-1 family、H60 ともに発現が認められた(Figure 2C)。RAG、CMT93 細胞は Rae-1 family のみ発現が認められた(Figure 2D)。代表的なマウス NKG2DL である Rae-1 family、H60 両リガンドは PSK 投与に対し最も感受性のある Meth-A で発現しておらず、弱い感受性を示す 4T1 では H60 のみ発現し、非感受性 K-BALB では両リガンドが発現していた(Table I)。

##### 【癌細胞株における MHC クラス I 分子の発現】

MHC クラス I 分子である H-2D<sup>d</sup>、H-2K<sup>d</sup>、H-2L<sup>d</sup> は Meth-A、4T1、K-BALB に広く発現していた (Figure 3)。

##### 【CD49<sup>+</sup> NK 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞における NKG2D の発現及び細胞内 IFN- $\gamma$ の産生】

CD49<sup>+</sup> NK 細胞における NKG2D の発現は、正常マウスと比較し Meth-A、K-BALB 移植マウスにおいてわずかに低く、Meth-A と K-BALB 間には差が認められなかった(Figure 4A,  $n = 4$ )。一方、CD8<sup>+</sup> T 細胞における NKG2D の発現は、正常マウスと比較し Meth-A 移植マウスにおいて有意に高かった (Figure 4B,  $n = 4$ ,  $p < 0.0001$ )。正常マウスの CD8<sup>+</sup> T 細胞では NKG2D の発現がほとんど認められず、担癌状態により NKG2D の発現が誘導されたことが示唆された(Figure 4B)。また、CD8<sup>+</sup> T 細胞において、Meth-A 移植マウスは K-BALB 移植マウスと比較し有意に NKG2D の発現が高かった(Figure 4B,  $n = 4$ ,  $p = 0.0004$ )。一方、CD8<sup>+</sup> T 細胞における細胞内 IFN- $\gamma$  の産生は正常マウス、担癌マウスに有意な差は認められなかった(Figure 4C,  $n = 4$ )。

##### 【CD8<sup>+</sup> T 細胞における NKG2D の発現及び細胞内 IFN- $\gamma$ の産生に対する PSK の効果】

Meth-A 移植マウスでは CD8<sup>+</sup> T 細胞における NKG2D の発現は PSK 投与により有意に増

加した (Figure 4D,  $p=0.0159$ )。K-BALB 移植マウスにおいても同様の傾向が見られたが有意差は認められなかった (Figure 4E)。CD8<sup>+</sup> T 細胞における細胞内 IFN- $\gamma$  の産生は Meth-A 移植マウスでは PSK 投与により有意に上昇した (Figure 4F,  $p=0.0079$ )。一方、K-BALB 移植マウスでは変化が認められなかった (Figure 4G)。

#### 【Meth-A、K-BALB 両細胞移植マウスにおける PSK の効果】

K-BALB 移植 7 日後に Meth-A を移植し、翌日から PSK 投与を開始した (Figure 5A)。K-BALB 存在下では PSK 感受性 Meth-A に対する PSK の抗腫瘍効果が消失した (Figure 5B)。一方、同実験において、Meth-A のみ移植したマウスでは、PSK 投与により Meth-A の増殖は有意に低下した (Figures 5C–D,  $p=0.0004$ ,  $n=8$ )。

### 5. 考察

PSK は Meth-A 細胞に対し最も抗腫瘍効果を示し、4T1 細胞に対しては効果が小さく、K-BALB 細胞に対しては全く効果を示さなかった。Meth-A は Rae-1 family、H60 両リガンドを発現せず、4T1 は H60 のみ発現し、K-BALB は Rae-1 family、H60 両リガンドを発現する。よって、移植腫瘍毎に異なる PSK に対する感受性は、腫瘍に発現する代表的な NKG2DL である Rae-1 family、H60 の発現パターンと関連することが示唆された。一方、腫瘍細胞における MHC クラス I 分子は各細胞で広く発現しており、本モデルにおける PSK の抗腫瘍効果に大きな影響を及ぼさないことが示された。

現在までに、NKG2DL の発現と薬剤による抗腫瘍免疫応答との関連が複数報告されている。フルオロウラシル (5-FU) はマウス大腸癌細胞 MC38 細胞において Rae-1、H60 の発現を増加させ、5-FU により誘導される細胞溶解活性は NKG2D/Rae-1 或いは H60 シグナリングに一部依存することが示されている<sup>19</sup>。また、IL-2 を発現する組換えワクシニアウイルス (rvv-IL-2) をワクチン接種したマウスを用い、NK 細胞における NKG2D と CD16 の発現が抗腫瘍効果と関連することが報告されている。当研究において、H60 を発現せず Rae-1 のみ発現する SCC VII/SF 細胞株由来の腫瘍は TGF- $\beta$ 1 を高発現し、rvv-IL-2 ワクチン接種により TGF- $\beta$ 1 の発現低下が認められた。単離した NK 細胞は SCC VII/SF 細胞との共培養により、NKG2D と CD16 の発現が低下し、これら受容体の発現低下は癌細胞が産生した TGF- $\beta$ 1 により引き起こされる可能性が挙げられた<sup>20</sup>。さらに、NKG2D シグナルの阻害がマウス CD4<sup>+</sup>T 細胞を介した大腸炎を防ぐことが示され、NKG2D シグナル経路が CD4<sup>+</sup>T 細胞を介した疾患の進行に大きく関与し、炎症性腸疾患の新たな治療標的となり得ることを示唆している<sup>21</sup>。これらの研究は、NK 細胞や CD4<sup>+</sup>T 細胞と腫瘍との関連を示すために NKG2DL と NKG2D の相互作用を評価したものである。これまでに、様々な研究において NK 細胞における NKG2D の機能が注目されてきたが、NKG2DL/NKG2D 相互作用により誘導される CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化が抗腫瘍効果を発揮するメカニズムについては十分明らかにされていない。

本研究では、CD8<sup>+</sup> T細胞上の NKG2D と腫瘍上の NKG2DL の相互作用が腫瘍免疫に対し重要な役割を担う可能性を示した。免疫刺激剤として、直接的な T細胞刺激作用を有する抗 4-1BB 抗体<sup>22</sup>等の代わりに PSK を用い、担癌マウスにおける NKG2DL/NKG2D 相互作用を介した T細胞の活性化を検討した。PSK による免疫刺激は、腫瘍における NKG2DL の発現の違いが、生体内で、NKG2D を発現する T細胞の活性に影響を与えるか否かを明らかにすることを目的とした。NKG2DL 非発現 Meth-A 移植マウスにおいて、PSK 投与により CD8<sup>+</sup> T細胞の NKG2D の発現に加え、細胞内 IFN- $\gamma$  の産生を有意に上昇させた。一方、NKG2DL 発現 K-BALB 移植マウスにおいて、PSK による CD8<sup>+</sup> T細胞の NKG2D の発現及び細胞内 IFN- $\gamma$  の産生は有意な変化を認めなかった。また、PSK 非感受性 K-BALB 移植後に PSK 感受性 Meth-A を移植した両腫瘍移植モデルにおいて、Meth-A に対する PSK の抗腫瘍効果が失われたことから、MethA 及び K-BALB に対する PSK の抗腫瘍効果の違いは、各腫瘍の増悪性や免疫細胞に対する感受性だけではなく、腫瘍移植により構築される全身性の免疫応答に起因することが示唆された。これらの結果は、PSK による CD8<sup>+</sup> T細胞の活性化は腫瘍細胞における NKG2DL の発現に依存し、NKG2DL の発現が免疫抑制的に働き腫瘍の免疫回避に寄与することが示唆された。よって、腫瘍における NKG2DL の発現パターンが PSK の治療効果を予測する因子となり得ると考えられ、本知見が他の免疫療法に対して広く意義あるものとなることが期待される。

## 6. 結語

担癌マウスにおいて PSK の抗腫瘍効果と NKG2DL の発現は逆相関を示し、Rae-1 family や H60 は免疫抑制因子として作用することが示唆された。腫瘍における NKG2DL の発現が宿主の腫瘍免疫に影響を及ぼし、免疫療法による抗腫瘍効果の誘導に関与する可能性が示された。NKG2DL の免疫抑制機序及び臨床での治療効果予測因子としての有用性に関し、更なる検討が必要であると考えられる。

## 7. 謝辞

実験の直接指導を頂いた吉村清先生（国立がん研究センター 分野長）、岡正朗先生（現山口大学長）、永野浩昭先生（山口大学大学院 消化器・腫瘍外科学 教授）、内田素行氏、和田勉氏（株式会社クレハ）に深謝申し上げます。

## 8. 参考文献

1. Raulet DH: Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. Nature Reviews Immunology 3: 781-790, 2003.
2. Cao W and He W: UL16 binding proteins. Immunobiology 209: 283-290, 2004.
3. Collins RW: Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. European journal of immunogenetics : official journal of



- the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics 31: 105-114, 2004.
4. Hasan M, Krmpotic A, Ruzsics Z, Bubic I, Lenac T, Halenius A, Loewendorf A, Messerle M, Hengel H, Jonjic S and Koszinowski UH: Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein. *Journal of virology* 79: 2920-2930, 2005.
  5. Mistry AR and O'Callaghan CA: Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* 121: 439-447, 2007.
  6. Nielsen MM, Dyring-Andersen B, Schmidt JD, Witherden D, Lovato P, Woetmann A, Odum N, Poulsen SS, Havran WL, Geisler C and Bonefeld CM: NKG2D-dependent activation of dendritic epidermal T cells in contact hypersensitivity. *The Journal of investigative dermatology* 135: 1311-1319, 2015.
  7. Groh V, Wu J, Yee C and Spies T: Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419: 734-738, 2002.
  8. Fritz H, Kennedy DA, Ishii M, Fergusson D, Fernandes R, Cooley K and Seely D: Polysaccharide K and *Coriolus versicolor* extracts for lung cancer: a systematic review. *Integrative cancer therapies* 14: 201-211, 2015.
  9. Maehara Y, Tsujitani S, Saeki H, Oki E, Yoshinaga K, Emi Y, Morita M, Kohnoe S, Kakeji Y, Yano T and Baba H: Biological mechanism and clinical effect of protein-bound polysaccharide K (KRESTIN((R))): review of development and future perspectives. *Surgery today* 42: 8-28, 2012.
  10. Cui J and Chisti Y: Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology advances* 21: 109-122, 2003.
  11. DeLeo AB, Shiku H, Takahashi T, John M and Old LJ: Cell surface antigens of chemically induced sarcomas of the mouse. I. Murine leukemia virus-related antigens and alloantigens on cultured fibroblasts and sarcoma cells: description of a unique antigen on BALB/c Meth A sarcoma. *The Journal of experimental medicine* 146: 720-734, 1977.
  12. Griswold DP and Corbett TH: A colon tumor model for anticancer agent evaluation. *Cancer* 36: 2441-2444, 1975.
  13. Aslakson CJ and Miller FR: Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer research* 52: 1399-1405, 1992.
  14. Alfaro G, Lomeli C, Ocadiz R, Ortega V, Barrera R, Ramirez M and Nava G: Immunologic and genetic characterization of S180, a cell line of murine origin capable of growing in different inbred strains of mice. *Veterinary immunology and immunopathology* 30: 385-398, 1992.
  15. Aaronson SA and Weaver CA: Characterization of murine sarcoma virus (Kirsten) transformation of mouse and human cells. *The Journal of general virology* 13: 245-252, 1971.
  16. Masuzawa M, Fujimura T, Tsubokawa M, Nishiyama S, Katsuoka K, Terada E, Kunita S, Sakurai Y and Kato H: Establishment of a new murine-phenotypic angiosarcoma cell line (ISOS-1).

Journal of dermatological science 16: 91-98, 1998.

17. Duivenvoorden WC, Hopmans SN, Gallino D, Farrell T, Gerdes C, Glennie D, Lukka H and Pinthus JH: Inhibition of carbonic anhydrase IX (CA9) sensitizes renal cell carcinoma to ionizing radiation. *Oncology reports* 34: 1968-1976, 2015.

18. Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, Matsuzaki S, Tanaka F, Mimori K, Kamohara Y, Inoue H and Mori M: CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Annals of surgical oncology* 15: 2927-2933, 2008.

19. Aketa H, Tatsumi T, Kohga K, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Nawa T, Shigekawa M, Hikita H, Sakamori R, Hosui A, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N and Takehara T: The combination therapy of alpha-galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice. *International journal of cancer* 133: 1126-1134, 2013.

20. Dasgupta S, Bhattacharya-Chatterjee M, O'Malley BW, Jr. and Chatterjee SK: Inhibition of NK cell activity through TGF-beta 1 by down-regulation of NKG2D in a murine model of head and neck cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 175: 5541-5550, 2005.

21. Ito Y, Kanai T, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Yoshioka A, Tomita T, Nagaishi T, Sakamoto N, Sakanishi T, Okumura K, Yagita H and Watanabe M: Blockade of NKG2D signaling prevents the development of murine CD4+ T cell-mediated colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 294: G199-207, 2008.

22. Weigelin B, Bolanos E, Teijeira A, Martinez-Forero I, Labiano S, Azpilikueta A, Morales-Kastresana A, Quetglas JI, Wagena E, Sanchez-Paulete AR, Chen L, Friedl P and Melero I: Focusing and sustaining the antitumor CTL effector killer response by agonist anti-CD137 mAb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 7551-7556, 2015.

23. Konagai A, Yoshimura K, Hazama S, Yamamoto N, Aoki K, Ueno T, Fujioka M, Iijima H, Kato M, Uchida M, Wada T, Inoue M, Asao T, Fuse M, Wada S, Kuramasu A, Kamei R, Takeda S, Yamamoto S, Yoshino S, Oka M and Nagano H: Correlation between NKG2DL Expression and Antitumor Effect of Protein Bound Polysaccharide-K in Tumor-Bearing Mouse Models. *Anticancer Research*, 2017.

9. 図表

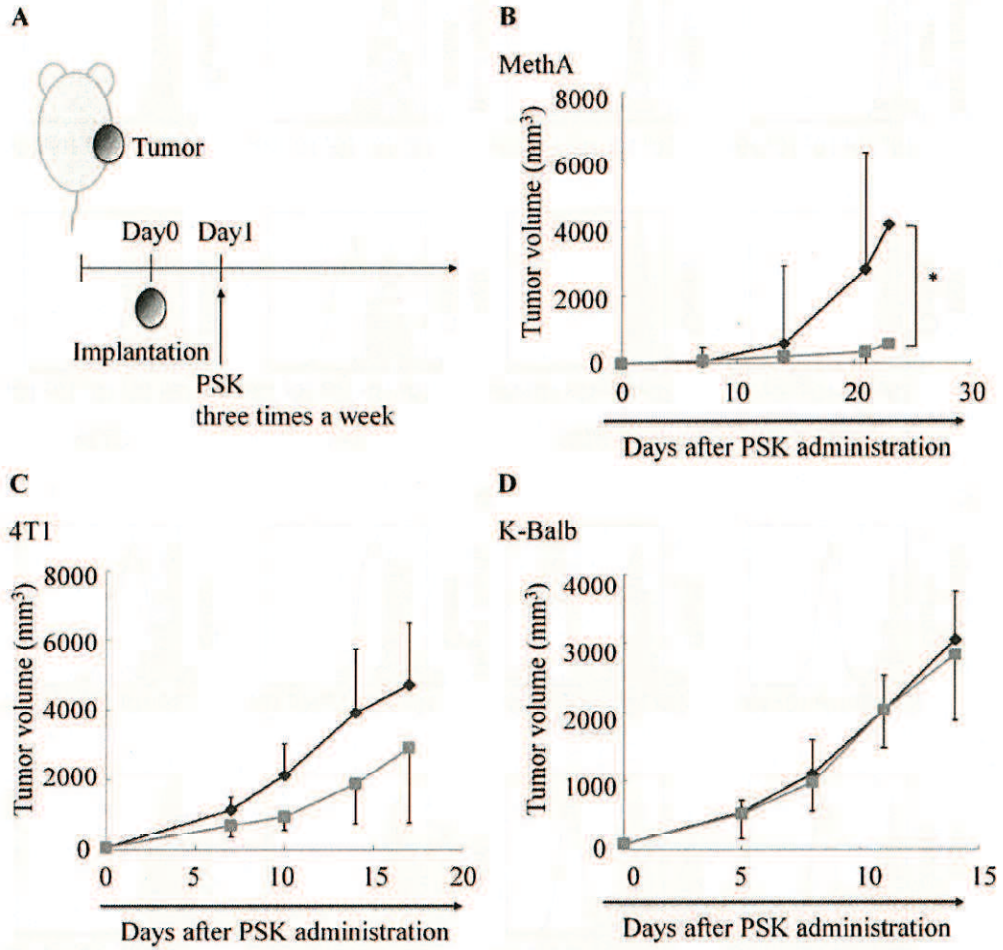


Figure 1. Effect of PSK on tumor growth. (A) Tumor cells were implanted subcutaneously into mice at  $1 \times 10^6$  cells per mouse, and polysaccharide-K (PSK) was administered intraperitoneally three times per week from day 1 after implantation. (B-D) Effect of PSK on tumor growth in mice. Gray line: mice treated with PSK, black line: tumor control mice treated with saline. The antitumor effect of PSK was in decreasing order of Meth-A > 4T1 > K-BALB (\* $p=0.0001$ ).

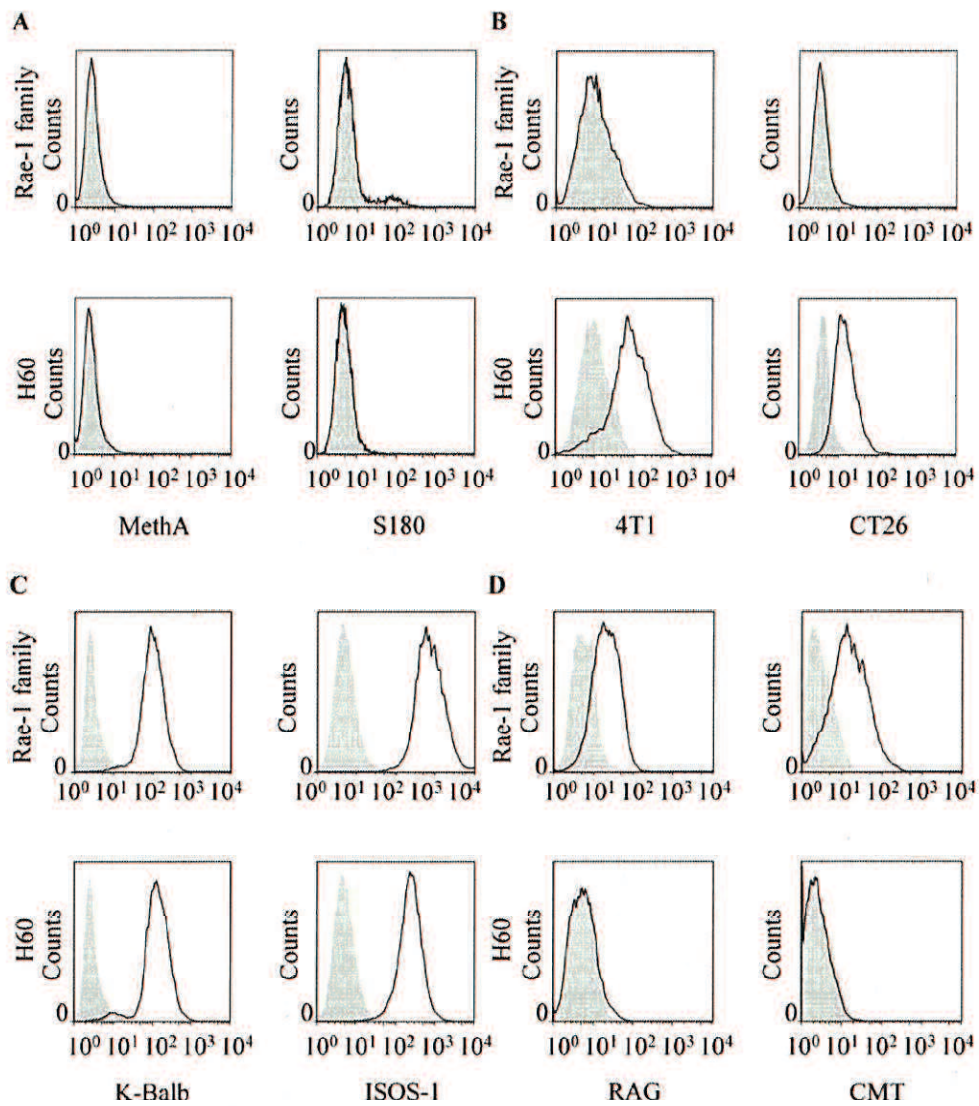


Figure 2. Expression of NKG2DLs on cancer cell lines. (A) Expression of NKG2DLs; Rae-1 family and H60, on Meth-A and S180 tumor cells. (B) Expression of Rae-1 family and H60 on 4T1 and CT26 tumor cells. (C) Expression of Rae-1 family and H60 on K-BALB and ISOS-1 tumor cells. (D) Expression of Rae-1 family and H60 on RAG and CMT tumor cells.

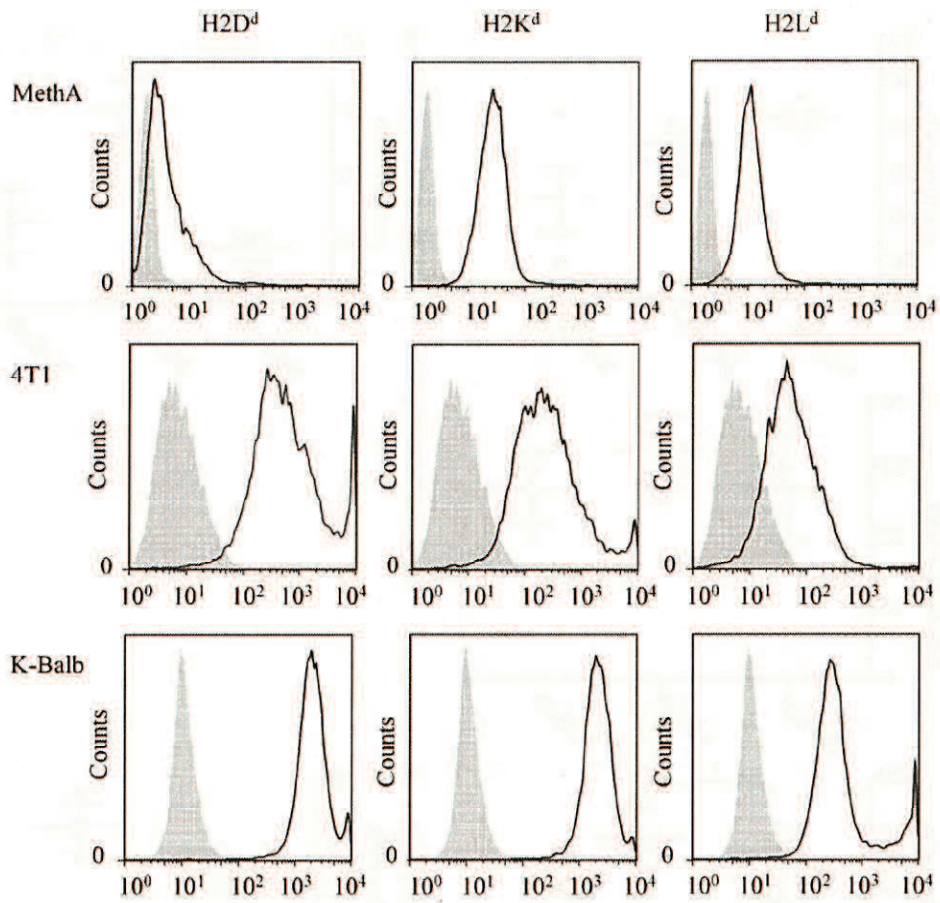


Figure 3. Expression of MHC Class I molecules in Meth-A, 4T1, and K-BALB cells. Upper row indicates expression of MHC Class I molecules in Meth-A. Middle and lower row indicate expression of MHC Class I molecules in 4T1 and K-BALB respectively. All cell lines express MHC Class I molecules.

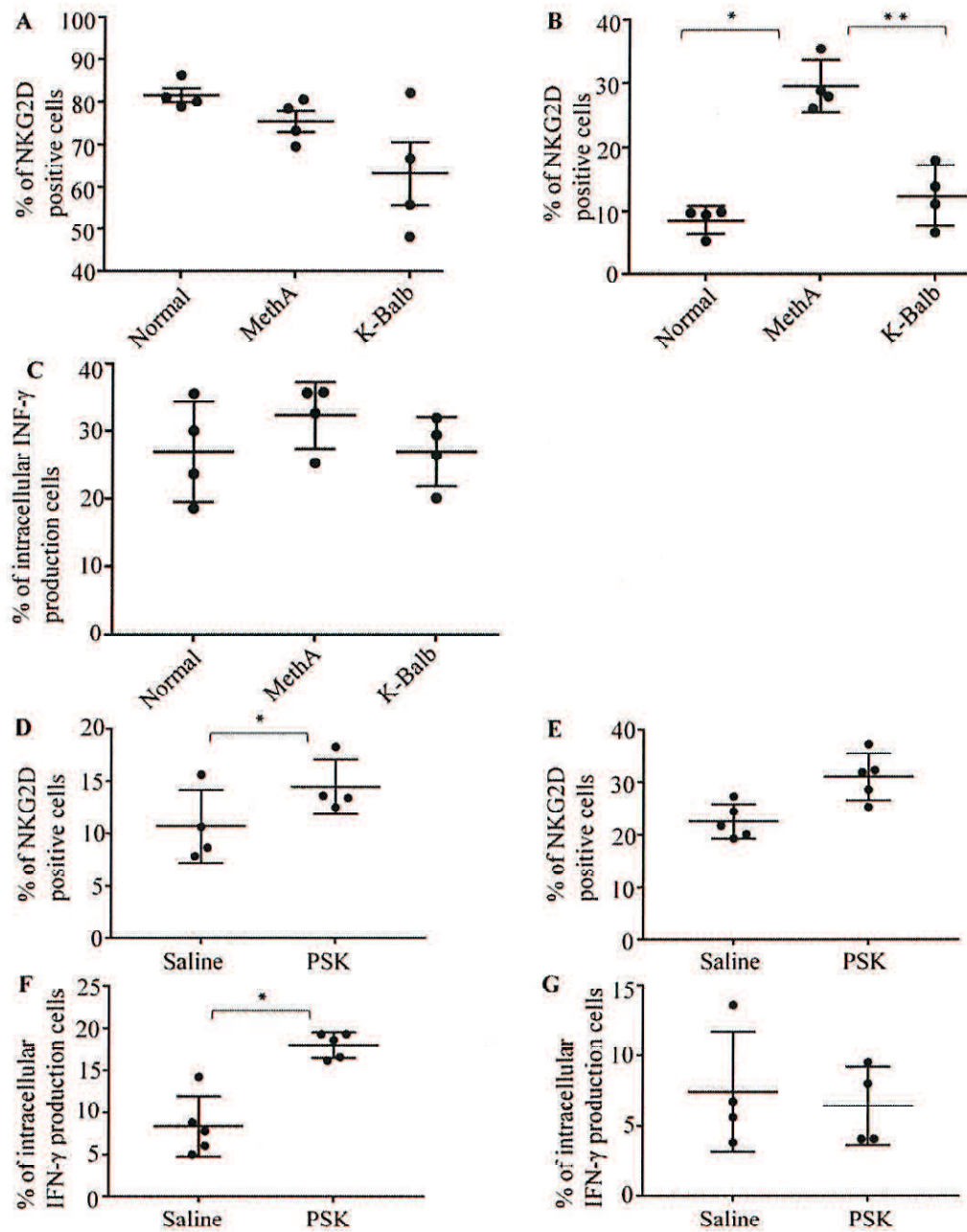


Figure 4. NKG2D expression and IFN-g production in immune cells. (A) NKG2D expression on CD49b<sup>+</sup> NK cells. (B) NKG2D expression on CD8<sup>+</sup> T cells (\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.0004$ ). (C) Percentage of IFN- $\gamma$  production in CD8<sup>+</sup> T cells of mice implanted with Meth-A or K-BALB cell lines. (D) Expression of NKG2D on CD8<sup>+</sup> T cells in Meth-A-implanted mice with/without PSK treatment (\* $p = 0.0159$ ). (E) Expression of NKG2D on CD8<sup>+</sup> T cells in K-BALB-implanted mice with/without PSK treatment. (F) IFN- $\gamma$  production in CD8<sup>+</sup> T cells in Meth-A-implanted mice with/without PSK treatment. (\* $p = 0.0079$ ). (G) IFN- $\gamma$  production in CD8<sup>+</sup> T cells in K-BALB-implanted mice with/without PSK treatment.

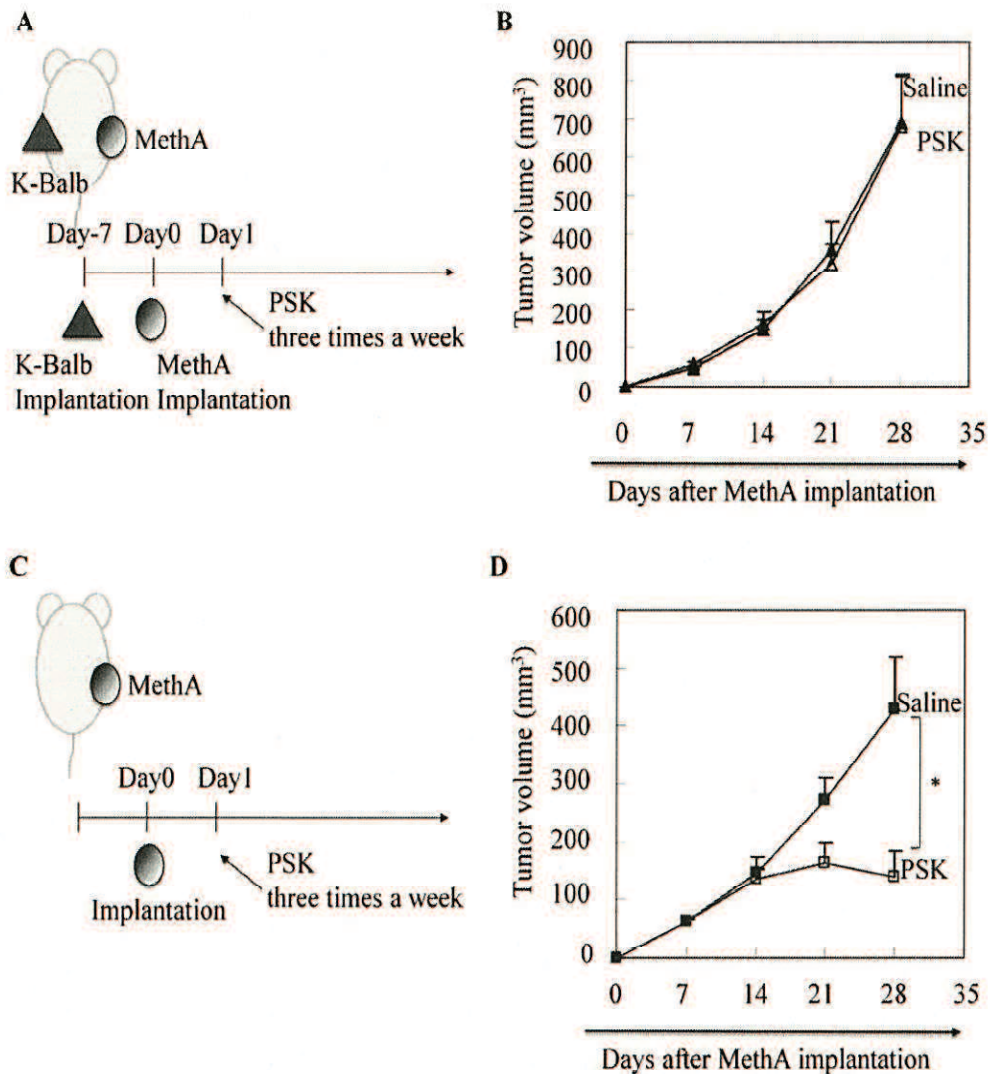


Figure 5. Effect of PSK in mice implanted with K-BALB and Meth-A cells. (A) Mice were implanted with K-BALB cells 7 days (day -7) before implantation with Meth-A cells ( $1 \times 10^6$  cells per mouse) (day 0) and treated with PSK three times a week from day 1. (B) Antitumor effect of PSK was completely lost, resulting in growth of both tumors. The curve indicates growth of tumor derived from Meth-A cells. (C) Mice were implanted with Meth-A cells alone at  $1 \times 10^6$  cells per mouse on day 0, and then treated with PSK on day 1 and three times a week thereafter. (D) Effect of PSK on mouse xenograft tumor growth (\* $p=0.0004$ ).

Table I. Relationship between NKG2DL expression and effect of PSK on tumor growth.

Tumor cell	NKG2DL expression		Antitumor effect of PSK
	Rae-1 family	H60	
Meth-A	Not expressed	Not expressed	Strong
S180	Not expressed	Not expressed	-
4T1	Not Expressed	Expressed	Weak
CT26	Not Expressed	Expressed	-
K-BALB	Expressed	Expressed	None
ISOS-1	Expressed	Expressed	-