

腎細胞癌の腫瘍内浸潤リンパ球におよぼす 遺伝子組換えインターフェロン γ の影響

—臨床病期との関連性について—

日本大学駿河台病院泌尿器科 (部長: 滝本至得)

川田 望, 滝本 至得, 平野 大作, 山本 忠男
平方 仁, 山中弥太郎, 岡田 安弘, 千野 健志
杉本 周路, 五十嵐 匠

IMMUNOLOGICAL EFFECT OF RECOMBINANT INTERFERON- γ ON TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES OF RENAL CELL CARCINOMA —RELATIONSHIP WITH CLINICAL STAGE—

Nozomu KAWATA, Yukie TAKIMOTO, Daisaku HIRANO, Tadao YAMAMOTO,
Hitoshi HIRAKATA, Yataro YAMANAKA, Yasuhiro OKADA, Kenji CHINO,
Shuji SUGIMOTO and Takumi IGARASHI

From the Department of Urology, Nihon University School of Medicine Surugadai Hospital

We studied the relationship between clinical stage and tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in 26 cases of renal cell carcinoma. In 10 patients, interferon- γ (IFN- γ) was administered preoperatively (administration group); 5 patients had low stage (Robson $\leq$ I), and the remaining 5 patients had high stage (Robson $\geq$ II) tumors. The other 16 patients underwent nephrectomy alone without preoperative IFN administration (control group); 11 patients had low stage, and the remaining 5 patients had high stage tumors. Immunohistochemical studies of tumor infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma showed a significantly high incidence of CD3, CD8, CD11b and ICAM-1 in the administration group, while CD4, LFA-1 and Ber-MAC3 were increased without significance ($p < 0.05$). Concerning clinical stage (Robson), a significant increase in CD3, CD8, CD11b and ICAM-1 was observed in the patients with high-stage tumors in the administration group compared to those in the control group ($p < 0.05$). This suggested that TIL could be changed by preoperative administration of IFN- γ .

(Acta Urol. Jpn. 42: 1-4, 1996)

Key words: Renal cell carcinoma, Tumor infiltrating lymphocytes, Interferon- γ , Clinical stage

緒 言 対 象

Balch ら¹⁾は腎細胞癌の腫瘍内浸潤リンパ球について、他の癌組織と比較して腫瘍内浸潤リンパ球 (以下 TIL) が多いことを報告しており、われわれも腎細胞癌症例にインターフェロン γ (以下 IFN- γ) を術前に投与した投与群が、無投与群と比較して CD3, CD8, CD11b が有意に多いことを報告した²⁾。しかし、どのような症例に多く認められるのか、臨床病理学的項目との関連については未だ不明な点が多い。そこで術前に遺伝子組換え IFN- γ を投与して、どのような症例に各種免疫担当細胞が存在するのか、臨床病理学的項目との関連性について検討したので報告する。

対象症例を Table 1 に示す。術前に IFN- γ を投与した症例 (以下投与群) は10例で、術前に IFN- γ を投与しない症例 (以下無投与群) は16例であった。投与群の腫瘍の長径は25から 90 mm であり、無投与群

Table 1. Characteristics of the patients in this study group

	Administration group	Control group
Sex (m:f)	8:2	14:2
Age	40-71	38-81
Size (mm)	25-90*	20-70*
Stage Robson $\leq$ I : Robinson $\geq$ II	5:5	11:5

* $p < 0.05$

の腫瘍の長径は20から70 mmで、投与群に腫瘍長径の大きい症例が多かった (Mann-Whitney's U test, $p < 0.05$). Robson 分類³⁾では投与群がⅠ以下が5例, Ⅱ以上が5例で、一方無投与群はⅠ以下が11例, Ⅱ以上が5例で術前治療と臨床病期との間には関連性はみられなかった ($\chi^2 = 0.91$).

方 法

IFN- γ の投与方法は、術前に500万 Japan Reference Unit (以下 JRU) を隔日に8回、計4,000万 JRU 皮下投与した。TIL に対する免疫組織学的検討は下記の如く行った。

① 採取した腎臓より変性のみられない腫瘍組織を急速凍結。

② 5 μ m の厚さに連続切片を作製し、10% 兔血清で非特異反応を防止後、酵素抗体間接法で国際 CD 分類に基づき以下の項目について検討した。用いた抗体は CD3 (pan T cell DAKO 社), CD4 (helper/inducer T cell DAKO 社), CD8 (suppressor/killer T cell DAKO 社), CD11b (monocytes, NK cell DAKO 社), LFA-1 (lymphocytes function associated antigen-1, CD11a DAKO 社), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54 コスモ・バイオ社)。そして stimulated macrophage として Ber-MAC3⁴⁾ (DAKO 社) である。

③ 3,3'-diaminobenzidine で発色後、脱水、封入後に接眼ミクロメーターを用いて、最低でも30視野にわたり有核細胞数に対する各陽性細胞の比率を算出した。

④ 検定には Mann-Whitney's U test を用いて5%以下を有意とした。

結 果

投与群10例と無投与群16例における各腫瘍内浸潤リンパ球 (以下 TIL) の結果を Fig. 1 に示す。CD3, CD4, CD8, CD11b, LFA-1, Ber-MAC3, ICAM-1 はそれぞれ投与群に多いが、なかでも CD3, CD8,

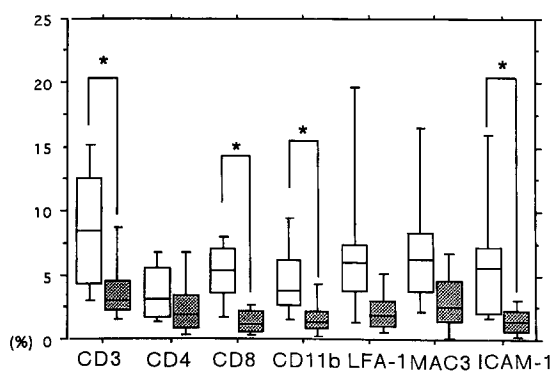


Fig. 1. Comparison of TIL. □ Administration group n=10, ▨ Control group n=16, * $p < 0.05$

CD11b, ICAM-1 が有意に多い結果となった ($p < 0.05$). つぎに、これらの4種のTILが臨床病期とどのような関係にあるのか Robson 分類について検討した。

臨床病期との関係について。

CD3 では Fig. 2 に示す様に low stage では投与群、無投与群の間に有意差はみられなかったが、high

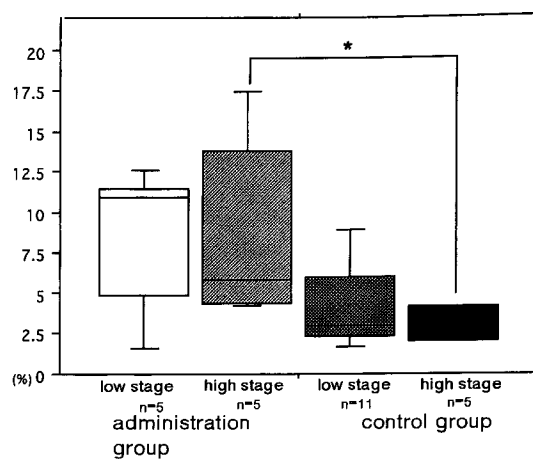


Fig. 2. Comparison of CD3. * $p < 0.05$

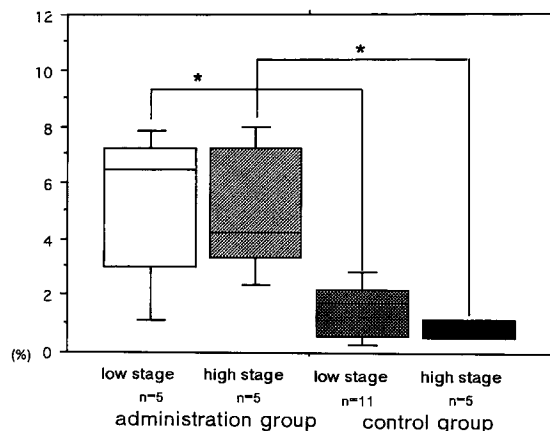


Fig. 3. Comparison of CD8. * $p < 0.05$

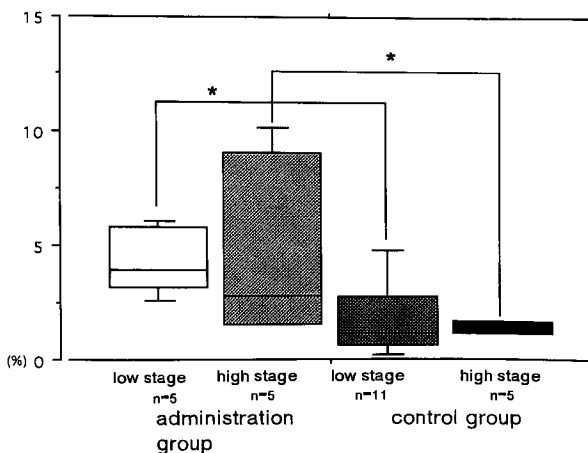


Fig. 4. Comparison of CD11b. * $p < 0.05$

stage では投与群に有意に多い結果となった ($p < 0.05$).

CD8 では Fig. 3 に示す様に high stage, low stage ともに有意に投与群に多い結果となった ($p < 0.05$).

CD11b では Fig. 4 に示す様に CD8 と同様に high stage, low stage ともに投与群に多い結果となった.

つぎに Fig. 5 に示す様に ICAM-1 では low stage では有意差は認められないが, high stage では投与群に有意に多い結果となった ($p < 0.05$).

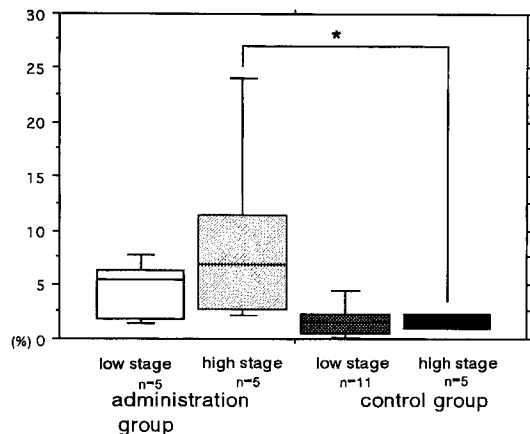


Fig. 5. Comparison of ICAM-1. * $p < 0.05$

考 察

進行性腎細胞癌の症例に対して Horoszewicz ら⁵⁾ は, IFN- γ の有用性について 3 施設の結果を検討し, 121 症例中 CR が 1 例, PR が 10 例と両者を併せても 10% に満たないと述べ, それに対して IFN- α は leukocyte, lymphoblastoid, 遺伝子組換えのいずれもが, それぞれ 18%, 15%, 14% と 10% を越える結果を示している. 一方, IFN- γ は, ラットを用いた実験では, Moorselaar ら⁶⁾ により腎細胞癌に対する抗腫瘍効果が確認されている. しかし, 臨床面ではその有用性は前述したように期待されたほどではない. すでにわれわれは IFN- γ を術前に投与することにより, TIL に対して影響のあることを報告している²⁾ また松田ら⁷⁾ は, 腎癌の予後と腫瘍内浸潤リンパ球との関連性について, リンパ球の浸潤が多い症例は予後が良好であることを報告している. IFN- γ の抗腫瘍作用の一つとして TIL におよぼす影響を考慮するならば, どのような症例に投与すれば TIL に変化が認められるのか, 臨床病期との関連性と IFN- γ の術前投与の有用性について考察を行った.

TIL と臨床病期との関係について, 長瀬ら⁸⁾ は, pT2 以下の症例と pT3 以上の症例を比較すると, CD3 は前者に多く CD8 は後者に多く認められることを報告している. また, 大西ら⁹⁾ は, natural human IFN- γ を, 術前に総量 2.1×10^7 IU を筋肉内投与し

た結果, high stage 症例で投与群に CD3, CD8 の上昇が認められたことを報告している. 今回の結果では CD3 では high stage 症例で投与群に多くみられ, CD8 においては臨床病期にかかわらず投与群に多く見られる結果となった. サイトカインの種類は異なるが Lee ら¹⁰⁾ は腎癌由来の浸潤リンパ球に, IL-6 を加えると CD8 が増加することを確認し, それらのサイトカインで活性化した CD8 は *in vitro* で抗腫瘍効果を発揮することが Finke ら¹¹⁾ により報告されている. 以上のことは腫瘍に対する免疫応答, 特に拒絶反応に対して IFN- γ の影響が現れていると考えられる.

NK 細胞について CD16 を用いて検討した大西⁹⁾ らの報告では, 投与群, 無投与群ともにほとんど認められず, 臨床病期とも関連がないことを報告している. 一方長瀬ら⁸⁾ の報告では, 投与群での検討はないが, 臨床病期が上がるにつれ CD16 の上昇が確認されている. 一方 Finke ら¹¹⁾ によれば浸潤リンパ球のうち, 抗腫瘍効果を発揮するものは CD4, CD8 が主体で CD56 陽性細胞が主体となりえないことを報告している. 今回の結果では, 投与群では臨床病期にかかわらず無投与群と比較して多くみられ, IFN- γ の影響が示唆される結果となった. 今後 CD11b が多く認められた症例について, 長期予後を含めて検討する必要があると考えられる.

接着分子については, 今回の結果では投与群, high stage でより多くの ICAM-1 陽性リンパ球が認められたが, Dougherty ら¹²⁾ によればヒト末梢血中において ICAM-1 陽性細胞はほとんどが単球系の細胞で, リンパ球を phorbol 12,13-dibutyrate で活性化させると ICAM-1 陽性になることが確認されている. 今回の結果においても投与群の high stage 症例の ICAM-1 陽性細胞は同症例の CD11b より多くみられ, このことは単球系細胞のみならず, T リンパ球にも ICAM-1 陽性細胞が含まれていることを示す

しかし TIL の種類と遠隔成績についてはいまだ不明である. そこでどの TIL が増加すれば high stage 症例であっても遠隔成績が改善されるのか, 今後観察期間を重ね検討する予定である.

結 語

1. 腎細胞癌症例を対象として, 術前に IFN- γ を投与した投与群と無投与群で比較すると, CD3, CD8, CD11b, ICAM-1 が有意に多く認められた.

2. High stage の症例で無投与群に比べ CD3, CD8, CD11b, ICAM-1 が投与群に有意に多く認められた.

本論文の要旨は, 第82回日本泌尿器科学会総会において報告した.

文 献

- 1) Balch CM, Biley LB, Bae YJ, et al.: Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancer. Arch Surg **125**: 200-205, 1990
- 2) 川田 望, 小野昌哉, 遠藤真琴, ほか: 腎細胞癌患者の免疫能におよぼす遺伝子組換えインターフェロン γ の影響. 泌尿紀要 **39**: 511-515, 1993
- 3) 泌尿器科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会編: 泌尿器科 病理・放射線科 腎癌取り扱い規約, 第一版, pp 45, 金原出版, 1983
- 4) Backe E, Schwaring R, Ernst M, et al.: Ber-MAC3: new monoclonal antibody that defines human monocytes/macrophage differentiation antigen. J Clin Pathol **44**: 936-945, 1991
- 5) Horoszewicz JS and Murphy GP: An assessment of the current use of human interferons in therapy of urological cancers. J Urol **142**: 1173-1180, 1989
- 6) Moorselaar RJA, Beniers AJMC, Hendriks BT, et al.: *In vivo* antiproliferative effects of gamma-interferon and tumor necrosis factor alpha in a rat renal cell carcinoma model system. J Urol **143**: 1247-1251, 1990
- 7) 松田 稔, 長船 匡, 古武敏彦, ほか: 腎細胞癌, 発育様式およびリンパ球浸潤の臨床的意義について. 日泌尿会誌 **67**: 1064-1069, 1976
- 8) 長瀬 泰, 森山信夫, 保坂義男, ほか: 腎細胞癌患者における腫瘍組織内隣接腫瘍腎組織, 末梢血中の各リンパ球サブセットの比較検討. 日泌尿会誌 **82**: 216-224, 1991
- 9) 大西哲郎: 腎細胞癌原発巣浸潤リンパ球 subset の評価と IFN- γ 投与が及ぼす免疫学的効果に関する研究. 日泌尿会誌 **82**: 216-224, 1991
- 10) Lee TY, Koo AS, Peyret C, et al.: The effect of interleukin-6 on tumor-infiltrating lymphocytes derived from human renal cell cancer. J Urol **145**: 1991
- 11) Finke JH, Rayman P, Alexander J, et al.: Characterization of the cytotoxic activity of CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. Cancer Res **50**: 2363-2370, 1990
- 12) Dougherty GJ, Murdoch S and Hogg N: The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response. Eur J Immunol **18**: 35-39, 1988

(Received on November 30, 1994)
(Accepted on October 18, 1995)