

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

日本大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 岡田清己教授)

川田 望, 小野 昌哉, 遠藤 真琴, 一瀬 岳人
濱田 隆正, 平野 大作, 布施 卓郎, 滝本 至得

IMMUNOLOGICAL EFFECT OF RECOMBINANT INTERFERON- γ IN RENAL CELL CARCINOMA

Nozomu Kawata, Masaya Ono, Makoto Endo,
Taketo Ichinose, Tadamasa Hamada, Daisaku Hirano,
Takuro Fuse and Yukie Takimoto

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

The immunological effect of interferon- γ (IFN- γ) was investigated in 18 cases of renal cell carcinoma before and after the operation. In 6 patients, IFN- γ was administered preoperatively for 21 days (administration group), while 12 patients underwent nephrectomy alone without pre-operative treatment (control group). The peripheral immunological effects were measured at before and 12 days after the operation in the administration group and at 11 days in the control group. In the administration group, a marked increase was noted in the test of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) activity and natural killer (NK) activity, and slight increase in CD4/8 and CD11b. In low stage cases, no appreciable effect was obtained by the administration of IFN- γ . However, in high stage cases, IFN- γ tended to increase the value of ADCC activity and NK activity.

Immunohistochemical studies of tumor infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma showed a high incidence of CD8 and CD11b in the administration group. Moreover, the presence of CD8 was higher than that of CD4 in the administration group in contrast to the results of the peripheral blood analysis.

(Acta Urol. Jpn. 39: 511-515, 1993)

Key words: Renal cell carcinoma, Immunological effect, Tumor infiltrating lymphocytes, Interferon- γ .

緒 言 方 法

近年, 進行性腎細胞癌に対する治療として, 手術療法以外にはインターフェロンを中心とする biological response modifier (以下 BRM) 療法が主流となりつつある。しかしインターフェロンによる腎細胞癌原発巣浸潤リンパ球への影響, および末梢血免疫能におよぼす影響についてはいまだ不明な点が多い。そこで, 腎細胞癌患者18例を対象として, 術前に遺伝子組み換え型インターフェロン γ (以下 IFN γ) を投与した6例と, 無投与の12例について, 以下の項目について検討した。①腎細胞癌原発巣浸潤リンパ球のサブセットの検討。②末梢血免疫能におよぼす影響。その結果若干の知見をえたので報告する。

1) 対象症例

対象とした症例は, 1990年5月より日本大学医学部付属駿河台病院泌尿器科で, 原発巣あるいは転移病巣を摘除しえた18例の腎細胞癌症例である。18例のうち, 術前に IFN γ を投与した6例 (以下投与群) は平均年齢53.6歳, 男女比2:1, Robson の stage 分類でⅢ以上の high stage が2例, Ⅱ以下の low stage が4例であった。一方術前に無投与の12例 (以下非投与群) は平均年齢58.8歳, 男女比3:1, high stage が3例, low stage が9例であった。両者を比較すると, 投与群の平均年齢が高かった。stage では, 投与群に Robson の stage 分類でⅢ以上の

high stage が多く、非投与群にⅡ以下の low stage が多く背景因子は同一ではなかった。

2) 投与方法

IFN γ は、遺伝子組換え型 interferon γ -1a を用い、術前20日から25日より(平均21.6日) 5×10^6 Japan reference unit (以下 JRU) を隔日に計8回、総量 40×10^6 JRU 皮下投与した。

副作用は、全例に熱発、全身倦怠感が初回投与日にみられたが、投与を中止するほどではなかった。また、血液生化学的に IFN γ が起因と考えられる異常値は認められなかった。

3) 原発巣浸潤リンパ球 (以下 TIL) の検討

投与群6例のうち5例 (high stage 1例, low stage 4例)、非投与群12例のうち6例 (high stage 2例, low stage 4例) 計11例の腎摘後の標本を用いて、国際 CD 分類に基づき以下の検討を行った²⁾。

リンパ球のサブセットを、DACO 社 monoclonal 抗体を用い、酵素抗体間接法で CD3 (pan T cell), CD4 (helper/inducer T cell), CD 8 (suppressor/killer T cell), CD11b (monocytes, NK cell) について検討した。

方法は、正常腎組織に隣合う腫瘍周辺部より採取した組織を急速凍結後、クリオスタットで連続切片を作成し乾燥。10%正常家兔血清で5分間室温で反応後、monoclonal 抗体を切片の上のせ湿室で12時間室温で反応。PBS で15分間洗浄後、horseradish peroxidase 標識2次抗体を切片の上のせ湿室で30分間室温で反応。DAB にて発色し、封入後検鏡した。測定は接眼マイクロメーターの10 $\times$ 10のます目を用いて、連続切片で測定した全有核細胞数に対する各陽性細胞の比率を、最低でも30視野以上にわたり測定した。

4) 末梢血免疫能の測定

投与群6例と非投与群12例を対象として、末梢血免疫能について検討した。採血は、投与群は IFN γ 投

与前と、手術後全身状態の落ちついた術後平均12.5日に行い、非投与群では、手術前と手術後平均11日に採血を行った。投与群での投与前と手術後の比較、そして非投与群での手術前と手術後の比較を行った。検討項目は、抗体依存性細胞障害活性 (以下 ADCC 活性)、natural killer 活性 (以下 NK 活性)、そして、リンパ球サブセット (以下 PBL) として CD3, CD-4, CD8, CD11b である。

a) ADCC 活性は、 ^{51}Cr 標識ニワトリ赤血球を標的として ^{51}Cr 遊離法で測定した。実験放出から自然放出をひいたものを、最大放出から自然放出をひいたもので除し、100を乗じたものを % cytotoxicity とした³⁾。

b) NK 活性は、 ^{51}Cr 標識ヒト白血病細胞 K562 を標的として ^{51}Cr 遊離法で測定した⁴⁾。

c) PBL の測定は、flow-cytometry を用いて CD3, CD4, CD8, CD11b について行い、その比率をリンパ球数に乘じて絶対数で検討した。なお、平均値の検討には Student's t-test を用い、危険率5%以下を有意とした。

結 果

1) IFN γ による TIL の影響を、投与群5例と非投与群6例について検討したものを Fig. 1 に示す。

投与群と非投与群の TIL の有核細胞数に対する比率を平均 $\pm$ SD で比較すると、CD8 および CD11b では、投与群が非投与群に比べ有意に高く、CD3, CD4 では、有意差はないが投与群が非投与群に比較して高い傾向がみられた。

2) IFN γ 投与による末梢血免疫能におよぼす影響についての結果を以下に示す。ADCC 活性では非投与群において手術前40.5 $\pm$ 17.6が手術後35.8 $\pm$ 21.7に減少したのに対し、投与群では手術前22.9 $\pm$ 19.9が52.5 $\pm$ 19.1 ($p < 0.05$) と上昇を認めた。

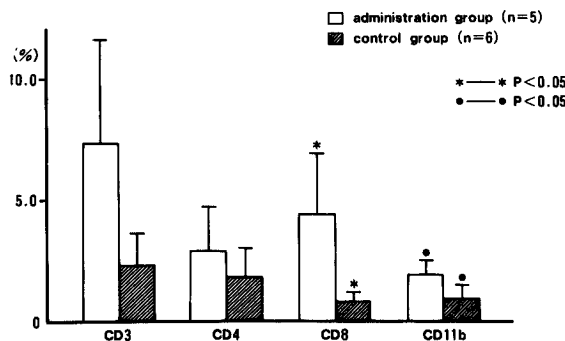


Fig. 1. Comparison of TIL (mean $\pm$ SD)

NK 活性では非投与群において手術前 11.0 ± 6.9 が 15.1 ± 11.0 , また投与群では 8.0 ± 5.8 が 14.8 ± 6.3 と投与群, 非投与群ともに有意ではないが上昇がみられた。

つぎにリンパ球では非投与群において手術前 $2,114 \pm 466$ が手術後 $1,859 \pm 591$ と有意ではないが減少の傾向がみられた。しかし投与群では手術前 $2,035 \pm 408$ であったのが手術後 $2,030 \pm 360$ を示し無投与群ほどの減少はみられなかった。

CD3 では非投与群において手術前 $1,622 \pm 496$ であったのが手術後 $1,301 \pm 493$ と減少を示し, 投与群では手術前 $1,483 \pm 360$ であったのが, 手術後 $1,429 \pm 229$ と非投与群程の減少はみられなかった。

CD4 では非投与群において手術前 877 ± 246 が手術後 815 ± 246 と減少したのに対して, 投与群では, 手術前 859 ± 131 が有意ではないが 926 ± 257 と上昇する傾向がみられた。

CD8 では非投与群において手術前 701 ± 248 であったのが 535 ± 271 と減少し, 同様に投与群では 612 ± 334 から 554 ± 266 へと減少する傾向がみられた。

これを CD4/8 で検討すると, 非投与群において手術前 1.48 ± 0.46 であったのが手術後 1.78 ± 0.63 と上昇し, 同様に投与群でも 1.76 ± 0.69 が手術後 2.1 ± 1.1 と有意ではないが上昇する傾向がみられた。

そして CD11b では非投与群において手術前 438 ± 225 であったのが手術後 434 ± 175 となり, 投与群では 436 ± 153 であったものが 549 ± 257 と有意ではないが上昇する傾向がみられた。

以上の結果を ADCC 活性, NK 活性, CD3, CD4/8, CD11b について low stage と high stage に分けて検討したものが Table 1, 2 である。ADCC 活性では非投与群で high stage で手術後の活性値が減少しているのに対して投与群では両ステージともに活性値が上昇している傾向がみられた。

つぎに NK 活性では, 非投与群では low stage で手術後活性値の上昇がみられるが, high stage では変動はみられず, 投与群では両ステージともに上昇がみられた。CD3 では投与群と比較し, 非投与群で減少する傾向が認められた。CD4/8 では非投与群および投与群の両ステージに上昇がみられた。これは Table 1 には示さないが CD4 と CD8 に分けてみると, CD4 では投与群と非投与群の low stage において上昇がみられ, 非投与群の high stage では減少が認められ, CD8 ではいずれも減少がみられた。すなわち CD4 が上昇し, CD8 が減少したために CD4/8 が上昇したことを示唆する。CD11b では非投与群の

Table 1. Comparison of ADCC, NK cell activity and PBL by before and after operation according to stage in administration group.

ADMINISTRATION GROUP (n=6)				
		before	after	
ADCC (%)	LOW STAGE (n=4)	21.9 $\pm$ 17.5	49.4 $\pm$ 22.7	
	HIGH STAGE (n=2)	24.9 $\pm$ 23.9	58.8 $\pm$ 2.6	
NK (%)	LOW STAGE (n=4)	10.3 $\pm$ 6.5	15.6 $\pm$ 7.5	
	HIGH STAGE (n=2)	6.1 $\pm$ 2.1	13.2 $\pm$ 1.8	
CD3 absolute value	LOW STAGE (n=4)	1358 $\pm$ 170	1340 $\pm$ 208	
	HIGH STAGE (n=2)	1670 $\pm$ 471	1609 $\pm$ 149	
CD4/8	LOW STAGE (n=4)	2.1 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 0.9	
	HIGH STAGE (n=2)	0.9 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.4	
CD11b absolute value	LOW STAGE (n=4)	410 $\pm$ 173	247 $\pm$ 118	
	HIGH STAGE (n=2)	425 $\pm$ 115	732 $\pm$ 298	
mean $\pm$ SD				
No significant differences were observed between before and after operation.				

Table 2. Comparison of ADCC, NK cell activity and PBL by before and after operation according to stage in control group.

CONTROL GROUP (n=12)				
		before	after	
ADCC (%)	LOW STAGE (n=9)	36.3 $\pm$ 6.5	39.1 $\pm$ 19.8	
	HIGH STAGE (n=3)	46.9 $\pm$ 25.0	25.7 $\pm$ 23.9	
NK (%)	LOW STAGE (n=9)	12.7 $\pm$ 5.9	16.5 $\pm$ 11.5	
	HIGH STAGE (n=3)	8.5 $\pm$ 7.5	8.7 $\pm$ 4.4	
CD3 absolute value	LOW STAGE (n=9)	1625 $\pm$ 637	1375 $\pm$ 421	
	HIGH STAGE (n=3)	1618 $\pm$ 73	1077 $\pm$ 612	
CD4/8	LOW STAGE (n=9)	1.2 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.6	
	HIGH STAGE (n=3)	1.7 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.5	
CD11b absolute value	LOW STAGE (n=9)	453 $\pm$ 266	492 $\pm$ 156	
	HIGH STAGE (n=3)	415 $\pm$ 137	259 $\pm$ 94	
mean $\pm$ SD				
No significant differences were observed between before and after operation.				

high stage を除いていずれも上昇が認められた。

考 察

インターフェロン α の免疫学的効果については Hengst⁵⁾により ADCC 活性, NK 活性の増強効果が報告され, 一方では Quesada⁶⁾により IFN α が腎細胞癌に用いられ, 奏効率26%という成績が報告された。今回各種インターフェロンの中でも IFN γ を

用いた理由は、各種インターフェロンを免疫調節作用から検討すると NK 活性および ADCC 活性ともに IFN γ が最も増強効果があるとされているからである⁷⁾。しかし、インターフェロンがおよぼす免疫学的影響のなかでも、TIL におよぼす影響と末梢血免疫能については不明な点も多いことから、①IFN γ と TIL の関係、②末梢血免疫能および原発巣浸潤リンパ球サブセットとの関係、③ステージ別にみた IFN γ の免疫能におよぼす影響について、以下の検討を行った。

① 腎癌における TIL について

腎癌原発巣浸潤リンパ球と予後との関係について、松田ら⁸⁾はリンパ球浸潤が高度になれば、その症例の予後は比較的良好であったと報告し、腫瘍の悪性度とは独立して予後の推測因子となりうることを報告している。また、Balch⁹⁾は120例の悪性腫瘍について腫瘍浸潤リンパ球を検索し、腎細胞癌はメラノーマ、大腸癌、乳癌などに比較して腫瘍浸潤リンパ球が多く、NK 細胞も多いことを報告している。そして、Lee¹⁰⁾は腎細胞癌由来の腫瘍浸潤リンパ球のほとんどが T 細胞で、77~98%が CD3 であったと報告している。また Finkle¹¹⁾は腫瘍浸潤リンパ球の cytolytic activity について検討したところ、CD4、CD8 に分離すると最小限の活性を示すのみであったが、分離しないリンパ球は活性を示し、その活性は NK 細胞数に関連があることを報告している。また、CD8 の活性化にはキラーヘルパー因子（以下 KHF）が必要とされ、そのなかでも KHF_dは IFN γ と考えられている¹²⁾。すなわち、原発巣浸潤リンパ球数だけでは計りきれない、腫瘍を取り巻く免疫学的環境の変化がおきていることが推測される。今回の結果では、CD8 および CD11b が有意差をもって投与群が非投与群を上回り、また非投与群では CD4 が CD8 を上回っているが、投与群では CD8 が CD4 を上回る結果となった。これは IFN γ による CD8 の活性化を示唆し、腫瘍細胞の抗原提示に CD8 が関与するものと考えられる。

② 末梢血免疫能および原発巣浸潤リンパ球サブセットとの関係について

ADCC 活性は、Fc レセプターを有するリンパ球、マクロファージ、好中球などがエフェクター細胞としてあげられている。しかし、そのエフェクター細胞の主体は、CD11 と CD16 が大多数を占める large granular lymphocyte とみなされている¹³⁾。また、NK 活性は large granular lymphocyte とよばれる NK 細胞がエフェクター細胞と考えられ、それが natural killer cytotoxic factor を放出することによ

り起きると考えられている¹⁴⁾。さらに NK 細胞の数だけではなく NK 細胞の質の問題があげられ、IFN による非障害性 NK 細胞から障害性 NK 細胞への付与が考えられる⁷⁾。従って、末梢血においては、リンパ球サブセットだけで免疫能を評価することは限界があると考えられる。工藤らによれば、長期観察例では NK 活性が高値を示したものに予後良好例があると報告があり¹⁵⁾、今後、サブセットのみならず活性値についても注目していく必要があると考えられる。

末梢血リンパ球サブセットと原発巣浸潤リンパ球サブセットの関係については、後者では、前者と異なり T 細胞が主体を占める。また、末梢血に比較し原発巣浸潤リンパ球では NK 細胞数が少ないことが報告され¹⁶⁾、今回の結果と同じとなった。しかし、IFN と NK 細胞との関係については、IFN は NK 前駆細胞へ働いて NK 細胞へと増殖分化させることが知られている¹³⁾。このことは、TIL では末梢血と比較して NK 細胞数は少ないが、投与群では非投与群より多く、IFN γ による免疫学的機構への影響と考えられる。

CD4 と CD8 については、末梢血では CD8 の減少は CD4 の減少を上回るため、結果として CD4/CD8 は有意差はないが上昇する傾向がみられた。一方、TIL においては前述したように、投与群においてその関係は逆転し、末梢血におけるリンパ球サブセットの変動が、原発巣に対する免疫能を直接反映していないことが推測され、今後、投与症例において長期間の観察が必要と考えられる。

③ ステージ別にみた IFN γ の末梢血免疫能におよぼす影響

今回の検討症例、計18例中 high stage 症例は5例存在し、そのうち遠隔転移を伴ったものは3例を数える。腎細胞癌の治療にあたり原発巣の摘除が原則とされているが、手術およびそれに伴う操作により患者の免疫能が低下した場合、転移病巣の進行が危惧される。投与群において ADCC 活性、NK 活性ではともに両ステージにおいて活性値の上昇がみられ、非投与群 high stage 症例で ADCC 活性が低下を示すのと対照的である。同様に CD11b においても投与群ではステージにかかわらず、上昇の傾向がみられた。つまり low stage においては術前投与の影響はみられないが、high stage では術前投与の影響が ADCC 活性を中心としてみられ、high stage の症例については、手術前に投与することが、末梢血における免疫能の活性化を促すことを意味するものと考えられる。

結 語

1. IFN- γ の投与により, 原発巣浸潤リンパ球サブセットは非投与群に比較して CD8, CD11b が有意に上昇し, CD3, CD4 も有意ではないが上昇する傾向がみられた。

2. IFN- γ の投与により, 投与前に比較して ADCC 活性は有意に上昇し, NK 活性も有意ではないが上昇する傾向が認められた。特に, high stage 症例で両者の活性は, 投与前および非投与群と比較しても上昇する傾向がみられ, high stage 症例での IFN- γ の手術前投与の有用性を示唆するものと考えられる。

稿を終えるに臨み, 恩師岡田清己教授の御指導, 御校閲に感謝いたします。

本論文の要旨は, 第29回 癌治療学会総会において報告した。

文 献

- 1) 日本泌尿器科学会, 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
- 2) 石黒 靖, 波多野道弘, 新保敏和: ヒト白血球分化抗原. *Biotherapy* 5: 172-200, 1991
- 3) 日沼州司, 多田正人, 熊谷勝男: ^{51}Cr 標識抗体を用いた抗体依存性細胞仲介性細胞障害活性 (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC) の測定. 免疫実験操作法Ⅷ, pp. 2443-2451, 日本免疫学会, 金沢, 1979
- 4) 狩野庄吾: NK 細胞活性. *臨免疫* 13 (suppl. 3): 361-365, 1981
- 5) Hengst JCD, Kempf RA, Kanmitchell J, et al.: Immunological effects of recombinant interferon- $\alpha 2$ in cancer patients. *Biol Response Mod* 2: 516-527, 1983
- 6) Quesada JR, Swanson DA, Trindade A, et al.: RENAL cell carcinoma: Anti tumor effects of leukocytes interferon. *Cancer Res* 43: 940-947, 1983
- 7) 曾根三郎, 国重英治: インターフェロンの免疫調節作用. *臨成人病* 18: 28-32, 1988
- 8) 松田 稔, 長船匡男, 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
- 9) Balch CM, Riley LB, Bae YJ, et al.: Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancer. *Arch Surg* 125: 200-205, 1990
- 10) Lee TY, Koo AS, Peyret C, et al.: The effects of interleukin-6 on tumor-infiltrating lymphocytes derived from human renal cell cancer. *J Urol* 145: 663-667, 1991
- 11) Finke JH, Rayman P, Alexander J, et al.: Characterization of the cytolytic activity of CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 50: 2363-2370, 1990
- 12) 岡田全司, 北原美佐, 岸本 進: KHF. *日臨* 46: 296-300, 1988
- 13) OrtaLdo JR, Woodhouse C and Morgan AC: Analysis of effector cells in human antibody-dependent cellular cytotoxicity with murine monoclonal antibodies. *J Immunol* 138: 3566-3572, 1987
- 14) 星野 孝, 内田温士: NKCF の生物学的特性と免疫学的意義. *Biomedica* 3: 46-53, 1988
- 15) 工藤達也, 相馬 博, 工藤真哉, ほか: 進行性腎細胞癌に対するインターフェロンの治療効果と免疫能の変動. *J Jpn Soc Cancer Ther* 25: 40-44, 1990
- 16) 大西哲郎: 腎細胞癌原発巣浸潤リンパ球 subset の評価と, IFN- γ の投与がおよぼす免疫的效果に関する研究. *日泌尿会誌* 82: 216-224, 1991

(Received on November 13, 1992)
(Accepted on February 23, 1993)