
原 著

ヒト腎癌細胞株・膀胱癌細胞株におけるインターフェロンによる主要組織適合抗原の発現修飾

古川 敦子, 宮本 忠幸, 安芸 雅史, 菅 政治, 金山 博臣
香川 征

徳島大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 香川 征 教授)

(平成8年1月10日受付)

Induction of expressions of HLA class I and class II antigens by interferon on human renal cell carcinoma or bladder cancer cell lines

Atsuko Furukawa, Tadayuki Miyamoto, Masashi Aki, Masaharu Kan, Hiro-omi Kanayama and Susumu Kagawa

Department of Urology, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima

(Director : Prof. Susumu Kagawa)

SUMMARY

Interferon-induced expressions of HLA class I and class II (DR, DP, DQ) antigens on human renal cell carcinoma (RCC) cell lines and bladder cancer cell lines were analyzed by flowcytometry.

Class I antigen was present on all six different RCC cell lines and the expression was enhanced with IFN- γ treatment except one cell line, Caki-2. Although no RCC cell lines expressed class II antigens without IFN- γ treatment, the treatment induced the expression of DR antigen in all cell lines except Caki-2. DP antigen was induced on KPK-1 and KPK-13 with exposure to IFN- γ . On the other hand, bladder cancer cell lines studied showed surface expression of class I antigen and enhanced expression of class I antigen with IFN- γ treatment. However, IFN- γ didn't enhance the expression of class II antigens on any of those bladder cancer cell lines.

The minimum concentrations of IFN- γ to increase the expression of class I and DR antigens on both KPK-13 and ACHN were 4 IU/ml and 100 IU/ml, respectively. The incubation time with IFN- γ to get the maximal expression of class I and DR antigens on KPK-13 were 36 hr and 48 hr, respectively. Meanwhile, although the expression of class I antigen on RCC cell lines was enhanced by IFN- α , IFN- α could not give any effect in class II antigens. Our results demonstrate the obvious effect of IFN- γ to enhance the expression of not only HLA class I antigen but also class II antigens on RCC cell lines.

(received January 10, 1996)

Key words : renal cell carcinoma cell line, bladder cancer cell line,
human leukocyte antigen (HLA), interferon (IFN)

ヒト主要組織適合抗原 (HLA) のうち, class I 抗原はほとんどの有核細胞に発現しており, class II 抗原は網内系細胞や血管内皮細胞など比較的限られた細胞に発現している (Natali ら, 1981). 腫瘍の中には class I 抗原または class II 抗原を発現しているものがあり, これらの発現は Interferon (IFN) などのサイトカインによって修飾を受けることがある (Schwartz ら,

1985; Nissen ら, 1987).

腎細胞癌に対しては近年サイトカインの投与 (Goldstein, Laszlo, 1986; Rosenberg, 1988; Krown, 1987; Fujita ら, 1988; Garnick, Reich, 1988; Sarna ら, 1987) や, LAK 細胞による受動免疫療法 (Rosenberg ら, 1987) が試みられ, 比較的高い抗腫瘍効果をもたらしているが, その作用機序等に関しては不明な

Table 1 Induction of HLA class I and II antigens on renal cell carcinoma and bladder cancer cell lines by interferon (IFN)

		Renal cell carcinoma cell lines					
		Caki-1	Caki-2	A704	KPK-1	KPK-13	ACHN
class I	pre	+	+	+	+	+	+
	IFN- γ	+	-	+	+	+	+
	IFN- α	+	-	+	+	+	+
DR	pre	-	-	-	-	-	-
	IFN- γ	+	-	+	+	+	+
	IFN- α	-	-	-	-	-	-
DP	pre	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	IFN- γ	-	-	-	+	+	-
	IFN- α	-	-	-	-	-	-
DQ	pre	-	-	-	-	-	-
	IFN- γ	-	-	\pm	-	-	-
	IFN- α	-	-	-	-	-	-
		Bladder cancer cell lines					
		T-24	HT-1376	HT-1197	MGH-U1	BOY	
class I	pre	+	+	+	+	+	
	IFN- γ	+	+	+	+	+	
DR	pre	-	\pm	-	-	-	
	IFN- γ	-	-	-	-	-	
DP	pre	-	+	+	-	+	
	IFN- γ	-	-	-	-	-	
DQ	pre	-	-	-	-	-	
	IFN- γ	-	-	-	-	-	

点が多い。そこで、今回我々は腎癌細胞株および膀胱癌細胞株における HLA 発現に対する IFN の影響についてフローサイトメトリーによる解析を行った。

材料および方法

1. 細胞株

腎癌細胞株は Caki-1, Caki-2, KPK-1, KPK-13,

A704, ACHN の 6 株を、膀胱癌細胞株は T24, HT-1376, HT-1197, HGH-U1, BOY の 5 株を用いた。

Caki-1, Caki-2 は 10% ウシ胎仔血清 (FBS) 添加 McCoy's 5A 培地で、その他の細胞株は 10% FBS 添加 RPMI 1640 培地で培養した。KPK-1, KPK-13 は内藤誠二先生 (九州大学泌尿器科) から、BOY は白浜勉先生 (鹿児島大学泌尿器科) から譲与いただき、その

Expression of HLA class I antigen on renal cancer cell lines

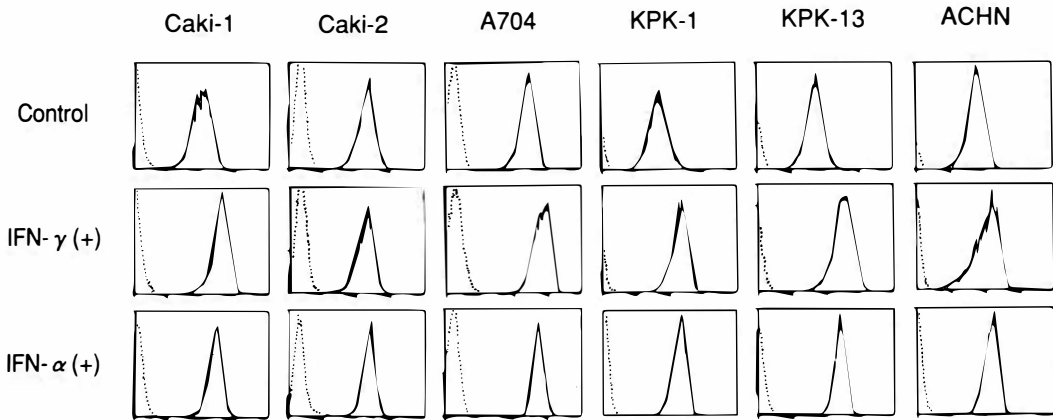


Fig. 1 Flowcytometric analysis for the expression of HLA class I antigens on renal cell carcinoma cell lines after incubation with IFN- γ or α

Expression of HLA-DR antigen on renal cancer cell lines

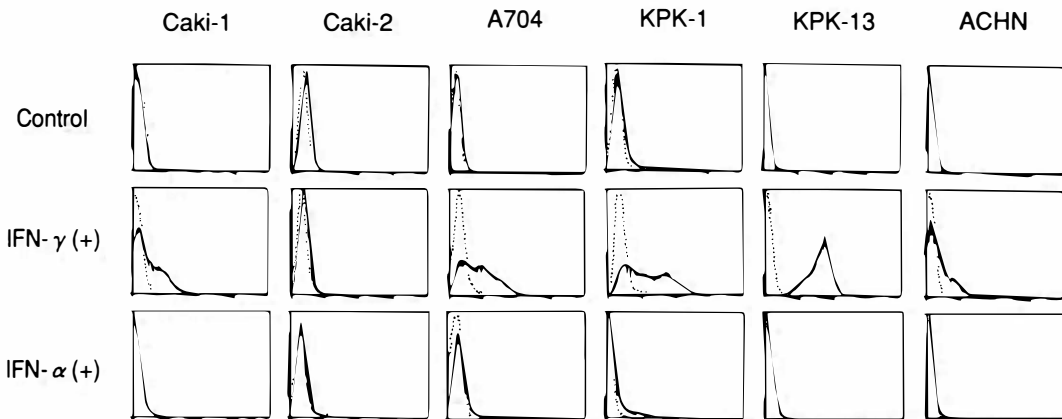


Fig. 2 Flowcytometric analysis for the expression of HLA-DR antigens on renal cell carcinoma cell lines after incubation with IFN- γ or α

他の細胞株は ATCC (Rockville, MD) から供給を受けた。

2. フローサイトメトリー解析

培養細胞を 0.25% trypsin+0.02% EDTA 溶液にて単一浮遊細胞とし、2% FBS 添加 磷酸緩衝液 (PBS) で洗浄後各一次抗体と 4°C で 30 分反応させた。2% FBS 添加 PBS で 2 回洗浄後、さらに FITC 標識抗マウス IgG (医学生物研究所, 名古屋) を加えて 4°C, 30 分反応させ、洗浄後ナイロンメッシュを通過させた後、生細胞 1×10^4 個の蛍光強度を FACSscan (Beckton Dickinson, Mountain View, CA) にて解析した。

一次抗体は、抗 HLA class I (HLA-A, B, C) 抗体 (B9. 12. 1), および抗 HLA class II 抗体である抗 HLA-DR 抗体 (B8. 12. 2) (コスモバイオ, 東京), 抗 HLA-DP 抗体 (B7/21), および抗 HLA-DQ 抗体 (1a3) (Leinco Technologies, Inc., MO) を用いた。

3. IFN による誘導

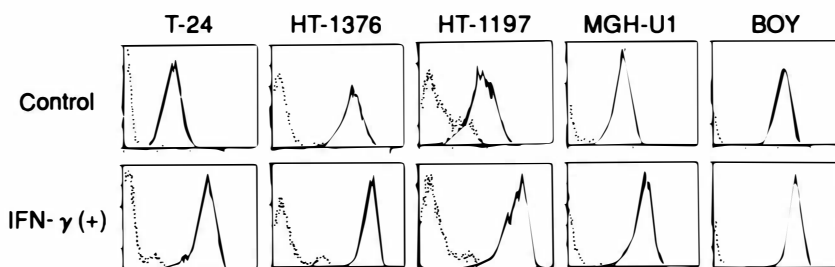
IFN は recombinant human interferon- γ (Mallinckrodt, MO) または natural human interferon- α (住友製薬, 大阪) を使用した。

IFN- γ 500 IU/ml または IFN- α 500 IU/ml を添加し、48 時間培養した後に各細胞における HLA の発現誘導を FACSscan にて解析した。

4. IFN の濃度依存性・時間依存性効果

IFN- γ の濃度依存性を確認するために KPK-13 および ACHN を用い、IFN- γ の濃度を 4, 20, 100, 500, 2500 IU/ml となるように培養液中に添加し、48 時間培養後の HLA class I および HLA-DR 抗原発現の変化について解析を行った。さらに、IFN- γ の時間依存性をみるために KPK-13 を用い IFN- γ を 500 IU/ml の濃度になるように培養液中に添加し、3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 時間後の HLA class I および HLA-DR 抗原発現の変化について検討を行った。

A Expression of HLA class I antigen on bladder cancer cell lines



B Expression of HLA-DR antigen on bladder cancer cell lines



Fig. 3 Flowcytometric analysis for the expression of HLA class I (A) and HLA-DR(B) antigens on bladder cancer cell lines after incubation with IFN- γ

結 果

1. 腎癌細胞株および膀胱癌細胞株における HLA 発現および IFN の影響

腎癌細胞株では無処置の細胞株すべてに class I 抗原の発現が認められ、IFN- γ 500 IU/ml を加えて 48 時間培養することにより、Caki-2 を除くすべての腎癌細胞株で class I 抗原発現の増強が認められた (Fig. 1 and Table 1). HLA class II 抗原のうち、DR 抗原は今回検討した腎癌細胞株ではどの細胞株にも発現していなかったが、IFN- γ 500 IU/ml を添加し、48 時間培養することにより Caki-2 を除く腎癌細胞株に DR 抗原の発現が誘導された (Fig. 2 and Table 1). DR 抗原が誘導された細胞株の中で、ほとんどすべての細胞が陽性に転化したのは KPK-13 のみであり、他の株には比較的多くの陰性細胞が存在した。一方、DP 抗原は無処置の状態ではすべての細胞株でほとんど発現していなかったが、IFN- γ を 500 IU/ml 添加すると、KPK-1, KPK-13 で発現が誘導された (Table 1). また DQ 抗原の発現は IFN- γ の添加により A704 にのみわずかに認められた (Table 1). したがって、class II 抗原のうち、IFN- γ による発現誘導頻度が最も高いのは DR 抗原であった。

一方、膀胱癌細胞株では class I 抗原はすべての細胞株に発現しており、IFN- γ により発現が増強された。しかし、DR 抗原陽性細胞は HT-1376 にわずかに

存在するが、どの膀胱癌細胞株においても IFN- γ により増強されなかった (Fig. 3 and Table 1). また、DP 抗原は HT-1376, HT-1197, BOY に発現しているが IFN- γ による増強はされず、DQ 抗原を発現している細胞株はなく IFN- γ によっても増強されなかった。

さらに腎細胞癌における IFN- α の class I 抗原および DR 抗原の発現に対する影響を検討した。IFN- α 500 IU/ml を添加し 48 時間培養することにより、IFN- γ 同様 Caki-2 を除くすべての細胞株に class I の発現の増強を認めた (Fig. 1). しかし、DR 抗原発現に関しては、IFN- γ と異なり、どの腎癌細胞株においても発現を誘導しなかった (Fig. 2). この傾向は DP, DQ 抗原においても同様であった。すなわち腎癌細胞株において IFN- α は class I 抗原の発現に対して IFN- γ と同じ効果を示すが、class II 抗原発現には全く影響しなかった。

2. IFN の濃度依存性・時間依存性効果

腎癌細胞株 KPK-13 と ACHN を用いて IFN- γ の投与量による HLA 発現の変化を検討した。class I 抗原は無処置の状態でもすべての細胞に発現しているので、発現の増強を蛍光強度の変化で表し、DR 抗原は発現が誘導された陽性細胞の割合で表した (Fig. 4). class I 抗原は、KPK-13, ACHN ともに 4 IU/ml と非常に低濃度で発現の増強が認められ、20 IU/ml 以上の濃度でプラトーとなった。一方、DR 抗原は、KPK-13 では 4 IU/ml で発現しはじめ、濃度依存性に発現が誘

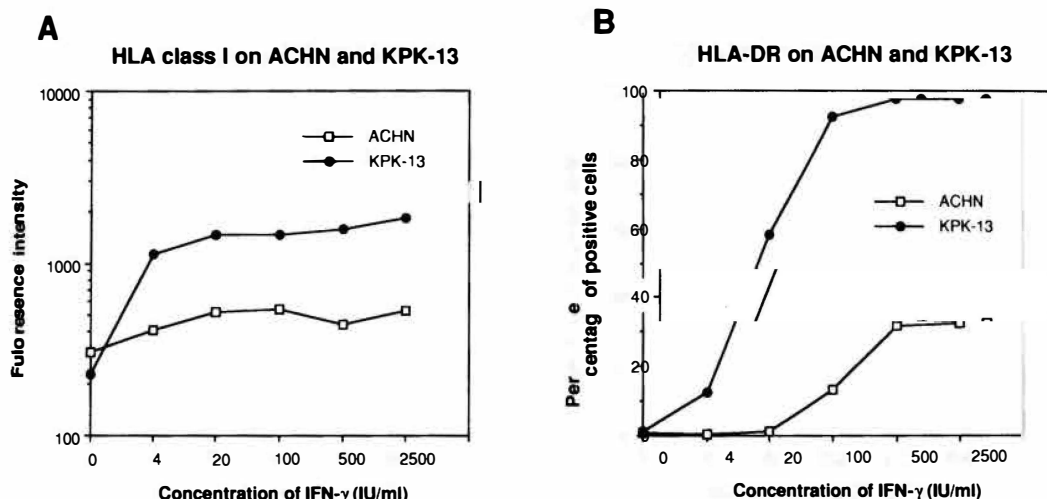


Fig. 4 Dose response curve of the expression of HLA class I (A) or HLA-DR (B) on renal cell carcinoma cell lines. ACHN (\square), KPK-13 (\bullet).

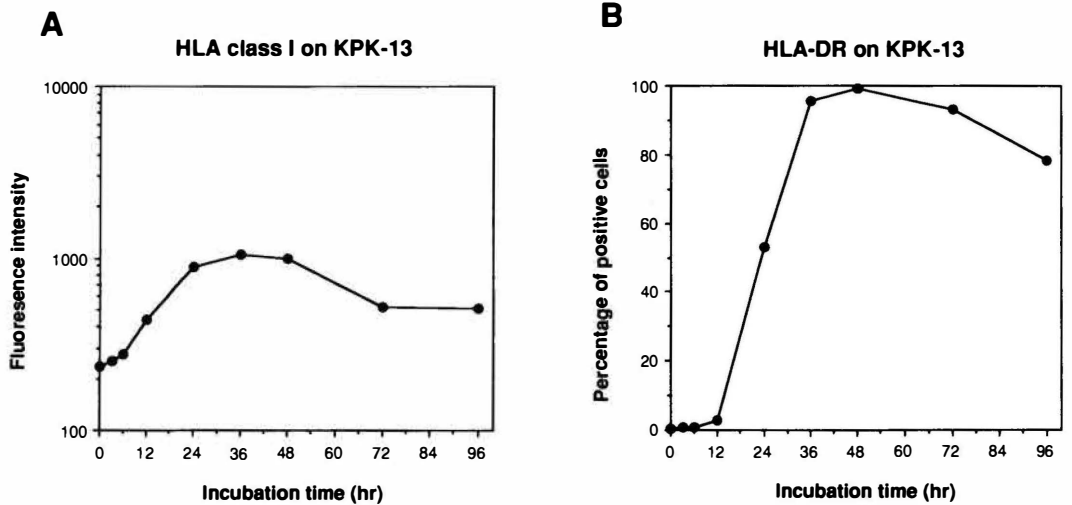


Fig. 5 Kinetics of the incubation with IFN- γ on the expression of HLA class I (A) or HLA-DR(B) on KPK-13.

導され 500 IU/ml で陽性細胞の比率が最高になり、それ以上の濃度ではほぼプラトーとなった。ACHN では 100 IU/ml で発現が誘導されはじめ、500 IU/ml で最高となり、それ以上の濃度でプラトーとなった。

また、IFN- γ により class I 抗原のみでなく DR 抗原もほとんどすべての細胞で陽性となる腎癌細胞株 KPK-13 を用いて HLA 発現強度の経時変化を検討した。class I 抗原の発現は IFN- γ 500 IU/ml 添加後 36 時間で最も強く増強し、それ以後発現はやや減弱するものの、引き続き認められた。一方、DR 抗原は、IFN- γ 500 IU/ml 投与後 24 時間で発現が認められるようになり、陽性細胞の比率が最大となるのは 48 時間後であり、それ以降は発現はやや減弱した (Fig. 5)。

考 察

主要組織適合抗原は種々の免疫反応に重要な役割を果たしている。これまでいろいろなヒト上皮性腫瘍で HLA class I および class II 抗原の発現が検討されており、特に class II 抗原は正常上皮には通常発現されないが、IFN を投与することにより多くの上皮性腫瘍細胞表面に発現が誘導されることが報告されている。今回、臨床的に IFN の全身投与が有効な腎癌と、そうでない膀胱癌の細胞株を用いて HLA の発現とそれに対する IFN の影響について検討した。

富田は、正常腎尿細管上皮には認められない HLA-DR が多くの腎癌組織に認められること、腎癌細胞株

ACHN および KRC/Y において IFN- γ の添加により DR 抗原が誘導されることを報告している (富田, 1990)。我々の検討した腎癌細胞株でも Caki-1, KPK-1, KPK-13, A704, ACHN で同様の結果を得ている。このことは IFN による DR 抗原の誘導により腎癌細胞の免疫原性が高まり宿主の免疫系を活性化できる可能性を示唆している。しかし今回検討した細胞株すべてにおいて DR 抗原が誘導されたわけではなかったこと、class II 抗原のうち、他の DP, DQ 抗原の発現が DR 抗原とは異なっていたことは腎癌細胞の種類により免疫原性が異なり、治療に対する反応性が様でない可能性が考えられた。一方、今回検討した膀胱癌細胞株では DR 抗原はほとんど発現が認められず、IFN- γ によっても誘導されなかった。この傾向は DP, DQ 抗原においても同様であった。このような、腎癌細胞株と膀胱癌細胞株における IFN による HLA の発現誘導の差異は、臨床での IFN 療法の有効性を反映している可能性も考えられるが、臨床例における癌免疫はインターロイキン等他のサイトカインや接着分子などのネットワークが複雑に関与しており、in vitro の結果がそのまま結びつくものではないと思われる。

一方、腎癌細胞株を用いた濃度依存性についての検討では、IFN- γ の濃度が 100 IU/ml であれば class I および DR 抗原の発現をとともに誘導できることが示された。ヒトにおいて IFN- γ $\cdot 8 \times 10^6$ IU/m² を 1 時間かけて点滴静注した場合、血清中濃度は投与終了直後

に約 200 IU/ml と最大値を示した後に速やかに低下するが、連日投与した場合には 150~200 IU/ml に保つことができるとされている(小川ら, 1987)。したがって腎癌患者への治療として IFN- γ を用いた場合には、投与期間中は血中濃度を 100 IU/ml に保つことが可能である。今回の結果では class I 抗原の発現の増強は低濃度でも認められ、しかも高濃度でも発現に対する抑制は認められず、また DR 抗原の発現誘導が 100 IU/ml で認められた。腎癌患者の血清中 IFN 濃度と腎癌細胞株培養上清中 IFN 濃度をそのまま比較することはできないが、今回の *in vitro* の実験結果は臨床の場での IFN- γ の免疫活性に対する影響を反映している可能性が考えられた。

他方、IFN- α の治療効果は主に直接の抗腫瘍障害活性と class I 抗原発現増強を介した CTL (細胞障害性 T リンパ球) 活性の増強の 2 つのメカニズムが考えられている。このサイトカインは一般に腎癌細胞において class I 抗原の発現は促進するが、class II 抗原の発現は誘導しないと報告されている(富田, 1990; 永田, 1993; 富田ら, 1991)。今回の我々の検討でもどの腎癌細胞株においても DR, DP, DQ いずれの抗原の誘導も認めなかった。Buszello らは、腎細胞癌患者より摘出した組織を用いて免疫組織化学により class I の発現を検討したところ、原発巣では 15% に class I の発現が減弱していたが転移巣では 50% とより高頻度に class I 減弱を認めたと報告しており (Buszello ら, 1994)、また、Bernhard らは、リンパ球と腎癌細胞を混合培養し腎癌細胞に対する CTL をクローン化したところ、class I (HLA-A2) の一致する腎癌細胞だけでなく、HLA-A2 を発現するメラノーマ細胞や正常培養腎細胞に対しても細胞障害活性を有していたと報告している (Bernhard, 1994)。このようなことから、腎細胞癌患者における IFN- α の効果は HLA class I の発現増強を介したものであることも考えられる。

in vitro での実験結果をそのまま臨床例に結びつけることは早急であるが、このような *in vitro* でのデータの蓄積を元に臨床例におけるより有効な治療法の選択が可能になるものと思われる。

結 語

腎癌細胞 6 株、膀胱癌細胞 5 株を用い、IFN による HLA 発現誘導について調べ、以下の結果を得た。

(1) 腎癌細胞、膀胱癌細胞すべてに HLA class I 抗原を発現していたが、class II 抗原は一部に弱い発現が認められたのみであった。

(2) IFN- γ は腎癌細胞、膀胱癌細胞ともに class I 抗原の発現を増強したが、class II 抗原は腎癌細胞のみで誘導された。

(3) IFN- α は腎癌細胞において class I の発現を増強したが class II には影響がなかった。

文 献

- Bernhard, H., Kabach, J., Wolfel, T., Busch, P., Storkel, S., Stockle, M. and Wolfel, C. (1994): Cellular immune response to human renal-cell carcinomas: definition antigen recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T-lymphocyte (CTL) clones. *Int. J. Cancer*, 59, 837-842
- Buszello, H. and Ackermann, R. (1994): Immunohistochemical studies on the expression of HLA class I and antigens in renal cell carcinoma: comparison of primary and metastatic tumor tissues. *Eur. Urol.*, 25, 158-163
- Fujita, T., Asano, H., Naide, Y., Ono, Y., Ohshima, S., Suzuki, K., Aso, Y., Ariyoshi, Y., Fukushima, M. and Ota, K. (1988): Antitumor effects of human lymphoblastoid interferon on advanced renal-cell carcinoma. *J. Urol.*, 139, 256-258
- Garnick, M. B., Reich, S. D., Maxwell, B., Coval-Goldsmith, S., Riche, J. P. and Rudnick, S. A. (1988): Phase I/II study of recombinant interferon gamma in advanced renal-cell carcinoma. *J. Urol.*, 139, 251-255
- Goldstein, D. and Laszlo, J. (1986): Interferon therapy in cancer: From imaginon to interferon. *Cancer Res.*, 46, 4315-4329
- Krown, S. E. (1987): Interferon treatment of renal cell carcinoma: Current status and future prospects. *Cancer*, 59, 647-651
- Natali, P. G., De Martino, C., Quaranta, V., Nicotra, M. R., Erezza, F., Pellegrino, M. A. and Ferrone, S. (1981): Expression like antigens in normal human nonlymphoid tissues. *Transplantation*, 31, 75-78
- Nissen, M. H., Larsen, J. K., Plesner, T., Olesen, B. K. and Ernst, P. (1987): α -interferon

- induces enhanced expression of HLA-ABC antigens and β -2-microglobulin in vivo and in vitro in various subsets of human lymphoid cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 69, 632-638
- 9 永田美保 (1993) : 腎細胞癌組織における MHC 抗原の発現と IFN- α の MHC 抗原発現に与える効果. *日泌尿会誌*, 84, 814-821
 - 10 小川一誠・高久史磨・前川 正・太田和雄, 市丸道人・泉雄 勝・高倉公朋・池田重雄・小磯謙吉・町田豊平・加藤 俊 (1987) : 遺伝子組換えインターフェロング (S-6810) の Phase I Study. *癌と化学療法*, 14, 446-452
 - 11 Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., Avis, F. P., Leitman, S., Linehan, W. M., Robertson, C. N., Lee, R. E., Rubin, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C. G. and White, D. E. (1987) : A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.*, 316, 889-897
 - 12 Rosenberg, S. A. (1988) : Immunotherapy of cancer using interleukin 2 : Current status and future prospects. *Immunol. Today*, 9, 58-62
 - 13 Sarna, G., Figlin, R. and De Kernion, J. B. (1987) : Interferon in renal-cell carcinoma. *Cancer*, 59, 610-612
 - 14 Schwartz, R., Momburg, F., Moldenhauer, G., Dorken B. and Schirmacher, V. (1985) : Induction of HLA class-II antigen expression on human carcinoma cell lines by IFN-gamma. *Int. J. Cancer*, 35, 245-250
 - 15 富田善彦 (1990) : 腎細胞癌におけるクラス II 主要組織適合抗原—免疫組織学的検討及び腎癌細胞株におけるインターフェロンによる発現の誘導—。 *日泌尿会誌*, 81, 1079-1086
 - 16 富田善彦・西山 勉・佐藤昭太郎・藤原道夫 (1991) : 腎細胞癌における主要組織適合抗原と細胞間接着因子 (ICAM-1) の発現. 免疫組織学的検討及び腎癌細胞株におけるサイトカインの影響. *日泌尿会誌*, 87, 232-238