腎細胞癌患者における血清可溶性 interferon receptor 値の 臨床的意義の検討

*愛媛大学泌尿器科学教室 (主任: 横山雅好教授)

**徳島大学泌尿器科学教室 (主任: 香川 征教授)

***大塚製薬株式会社細胞工学研究所

伊勢田徳宏* 横山 雅好* 金山 博臣**
大本 安一*** 香川 征**

AN INVESTIGATION OF SERUM SOLUBLE INTERFERON RECEPTOR LEVELS IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

Tokuhiro Iseda*, Masayoshi Yokoyama*, Hiroomi Kanayana**,

Yasukazu Oomoto*** and Susumu Kagawa**

*Department of Urology, Ehime Medical University

**Department of Urology, Tokushima Medical University

***Cellular Technology Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

(Objective) Serum soluble interferon α/β receptor (s-IFN-receptor) levels were determined in renal cell carcinoma (RCC) patients to study the clinical significance of the measurement.

(Subjects and Methods) S-IFN-receptor levels were measured in RCC patients ($n = 27$) and healthy volunteers ($n = 22$) by enzyme immunoassay technique.

(Results) Significantly higher serum s-IFN-receptor levels were observed in RCC patients compared with the healthy volunteers ($p < 0.003$). The high s-IFN receptor levels in the patients suggested seriousness and mal-prognosis of this disease. The 4-years survival rate of the higher level group (with the mean value of 2.7 ± 1.7 ng/ml or more) was 53.3%, while the lower level group's rate was 78.7% (Statistical analysis result by Logrank (Mantel-Cox) test; $p = 0.4289$).

(Conclusion) Further study in more subjects is required to determine the feasibility of the s-IFN receptor levels as a prognosis marker, since correlation between the prognosis and s-IFN receptor level was not clarified by this study result.

Key words: serum soluble interferon α/β receptor, renal cell carcinoma, marker of RCC

要旨: (目的) 腎細胞癌における interferon receptor の発現の有無, 発現量, 発現部位ならびにその意義は検討されておらず, 同様に細胞核内からの伝達により産生されている酵素や蛋白なども検討されていない. 今回, 抗体を用いた ELISA 法による細胞膜外部分の可溶性 interferon- α/β receptor (s-IFN-receptor) の測定系が確立されたので腎細胞癌患者血清を用い臨床的意義を検討した.

(対象・方法) 1990 年から 1995 年までに愛媛大学医学部泌尿器科を受診した腎細胞癌患者 27 例の血清中 s-IFN-receptor 値の測定を行った. 採血は治療前空腹時とし, 血清分離した後測定するまで -80 度で凍結保存した. また徳島大学医学部で測定した健常者 22 例の血清中 s-IFN-receptor 値と比較した.

(結果) 腎細胞癌患者では健常者に比し, 血清 s-IFN-receptor 値は有意に高値であった ($p < 0.003$). High risk 群の s-IFN-receptor 値は高かった. 生存率について, 今回の腎細胞癌患者の s-IFN-receptor 平均値の 2.7 ± 1.7 ng/ml 以上と未満で検討したところ, 高値群では 4 年の累積生存率は 53.3%, 低値群では 78.7% であった (Logrank 検定, $p = 0.4289$). High risk 群と low risk 群の 4 年生存率では有意差はあっ

たが (Logrank 検定, $p=0.0342$), high risk 群および low risk 群において s-IFN-receptor 値と生存率に相関がなかった. s-IFN-receptor 値は, 一般的に腎細胞癌の予後因子とされている CRP, 赤沈とは相関していなかった (Spearman Rho 値, 0.33, 0.31).

(結論) 今回, s-IFN-receptor 値と予後との関連を明らかにすることはできなかったが, 腎細胞癌治療前において, 一般的に予後因子とされる CRP, 赤沈とは相関しておらず, 今後, これらとは独立した因子である可能性を含め, さらに症例数を増やして検討する必要があると考えられる.

キーワード: 可溶性インターフェロン α/β レセプター, 腎細胞癌, 腫瘍マーカー

緒 言

現在, interferon α , γ は腎細胞癌に対する治療に用いられており interferon の効果発現の作用機序は生体への直接効果や免疫活性の増強などと報告されている^{1)~3)}. Interferon は筋肉注射投与にて血中に出現し, 細胞膜上の受容体 (receptor) に結合し, それに引き続き細胞内にシグナルが伝達され, 伝達されたシグナルに従い免疫増強効果, 殺細胞効果等を発現することが想定される. しかし, 腎細胞癌における interferon receptor の発現の有無, 発現量, 発現部位ならびにその意義は検討されておらず, 同様に細胞核内からの伝達により産生されている酵素や蛋白質なども検討されていない.

Interferon receptor は receptor 構造が interferon- α と interferon- β に共通な I 型 interferon receptor とこれとは異なる interferon- γ の II 型 interferon receptor の 2 種類が存在⁴⁾し, いずれの interferon receptor も細胞膜を貫通している. 今回, この I 型 interferon receptor に対する抗体を用いた ELISA 法による細胞膜外部分の可溶性 interferon- α/β receptor (s-IFN-receptor) の測定系が確立された⁵⁾ので腎細胞癌患者血清を用い臨床的意義を検討した.

対象・方法

1990 年から 1995 年までに愛媛大学医学部泌尿器科を受診した腎細胞癌患者 27 例治療前の血清中 s-IFN-receptor 値の測定を行った.

s-IFN-receptor の測定法について示す⁵⁾. まず interferon α/β receptor を RT-PCR 法により Daudi 細胞からクローニングした⁵⁾. シークエンスを確認した後, 可溶性部分を大腸菌にて発現させ陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製し, s-IFN-receptor を得た. なお同定はアミノ酸組成 (日立製 L8500) 及び N 末端シークエンス (アプライドバイオシステムズ製 477A プロテインシークエンサー) により行い, 目的の蛋白質であることを確認した.

精製したリコンビナント蛋白質を免疫源としてウサ

ギに免疫し, ポリクロナール抗体を得た. 一方, 同じ免疫源を用い, マウスに免疫し, 常法によりモノクロナール抗体を得た⁵⁾. s-IFN-receptor の測定系はモノクロナール抗体とポリクロナール抗体によるサンドイッチ ELISA で, HRP をトレーサーとして微量の s-IFN-receptor を検出した.

具体的にはプロテイン A カラムで精製したモノクロナール抗体 (ANOC4867) を 0.1M 炭酸バッファ (pH 8.2) で 10 μ g/ml に調製し, Microtiter maxisorp プレートに 100 μ l 加えて, 4 $^{\circ}$ C で一晚固相化した. 続いて, プレートを PBST (PBS/0.05% Tween-20) で 2 回洗浄し, PBS/0.1% BSA 溶液でブロッキング, シールして, 使用するまで 4 $^{\circ}$ C に保管した. 精製したリコンビナント s-IFN-receptor を標準品として, スタンダードカーブを作成した. スタンダードは 10% FCS/PBS で希釈し, 測定範囲は, 20~2,000pg/ml であった.

Serum/Plasma/Urine サンプルは希釈バッファ (PBS/10%, FCS/0.05% Tween-20) で 3 倍に希釈し, 150 μ l 加えた. 一昼夜, 室温で反応後, 350 μ l の PBST で 4 回洗浄した後, 100 μ l のウサギ抗 s-IFN-receptor (OCT4811, 5,000 倍希釈) を加えて, 更に室温で 2hr 反応させた. 反応後, プレートを洗浄して, HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG を 100 μ l 加えて, 室温で 2 時間反応させた. 最後に, 100 μ l の酵素基質液 (1mg/ml O-phenylenediamine の入った 0.1M クエン酸ナトリウム・バッファ (pH 5.0)/0.03% H₂O₂) を加えて, 室温で 10 分間反応させ, 100 μ l の 2N H₂SO₄ を加えて酵素反応停止させた. 492nm での吸光度は iEMSReader を使って測定し, リコンビナント s-IFN-receptor によって得られたスタンダードカーブを用いて, 検体中での s-IFN-receptor 濃度を計算した.

基本的に採血は治療前の早朝空腹時とし, 血清分離した後測定まで -80 度に保存した. 正常コントロールは徳島大学医学部で測定した健常者 22 例の血清中 s-IFN-receptor 値とし, 今回の結果と比較した. 重篤度については low risk 群を G1・G2 および stage I・

図1 腎細胞癌患者と健常者との血清 s-IFN-receptor 値の比較

表 腎細胞癌患者背景とその S-IFN-receptor 値

		症例数 (人)	S-IFN-receptor 値 (ng/ml)
性	男	22	3.0 ± 1.7
	女	5	1.6 ± 0.8
年齢	50 歳未満	5	1.7 ± 0.8
	50 歳以上 60 歳未満	4	1.8 ± 1.0
	60 歳以上 70 歳未満	10	2.9 ± 1.3
	70 歳以上	8	3.6 ± 2.3
組織学的細胞型			
通常型	淡明細胞亜型	16	2.8 ± 1.7
	顆粒細胞亜型	5	1.6 ± 0.8
	混合亜型	5	3.1 ± 1.7
多形細胞型		1	5.6
組織学的異型度	grade 1	5	3.3 ± 2.6
	grade 2	17	2.1 ± 1.2
	grade 3	3	5.0 ± 0.6
病理学的病期分類	stage II	14	2.6 ± 1.9
	stage III 以上	13	3.0 ± 1.5
重篤度	low	15	2.6 ± 1.8
	high	9	3.1 ± 1.7

low 群；G1・G2 および stage I・stage II

high 群；G3 および stage III・stage IV

図2 腎細胞癌患者の重篤別血清 s-IFN-receptor 値の比較

stage II とし, high risk 群を G3 もしくは stage III・stage IV とした. なお stage 分類は腎癌取り扱い規約第 2 版 (1992 年 12 月) に従った. 統計学的検討は s-IFN-receptor 値が正規分布するかどうか未確認であるので, 対応のない 2 群間 data として扱い Mann-Whitney の U 検定を用いた. また, 検査値の相関については Spearman 順位相関係数を求め, 生存率については Logrank 検定を用いた.

結 果

腎細胞癌患者の背景を表に示す. 男性 22 例, 女性 5 例, 平均年齢は 61.4 歳であった. 健常者では男性 20 例, 女性 2 例, 平均年齢は 33.0 歳であった. TNM 分類 (腎癌取り扱い規約第 2 版) では, T2 は 15 例, T3 以上は 12 例, N0 は 24 例, N1 以上は 3 例, M0 は 18 例, M1 は 9 例, V0 は 20 例, V1 以上は 6 例であった. 病期分類では stage II は 14 例, stage III 以上は 13 例であった. 異型度は G1 は 5 例, G2 以上は 20 例であった.

s-IFN-receptor 値については, 腎細胞癌患者は 2.7 ± 1.7 ng/ml, 健常者は 1.7 ± 0.3 ng/ml と有意に腎細胞癌患者が高値であった ($p < 0.003$, 図 1). 健常者においては性差および年齢との相関は認められなかった (Spearman Rho 値, 0.165, 0.132).

表に患者背景別の s-IFN-receptor 値を示す. High

risk 群の s-IFN-receptor 値は高かった (表, 図 2) が, 患者背景別での有意差は認めなかった. High risk 群と low risk 群の 4 年生存率では有意差はあったが (Logrank 検定, $p = 0.0342$), high risk 群および low risk 群において s-IFN-receptor 値と生存率に相関がなかった. また, 今回の腎細胞癌患者の s-IFN-receptor 平均値の 2.7 ± 1.7 ng/ml 以上と未満で検討したところ, 高値群では 4 年の累積生存率は 53.3%, 低値群では 78.7% であった (Logrank 検定, $p = 0.4289$). 一般的に腎細胞癌の予後因子といわれている CRP, 赤沈と s-IFN-receptor 値とは相関していなかった (Spearman Rho 係数, 0.33, 0.31, 図 3).

考 察

Interferon の抗腫瘍効果に関する機序は直接的殺細胞作用と間接作用として NK cell 活性の上昇など宿主側の免疫活性増強作用によるとされる^{1)~3)}.

Interferon の癌細胞に対する作用が直接的または間接的作用のいずれであるとしても標的細胞膜上の interferon receptor に結合し, それに引き続き細胞内にシグナルが伝達され, 伝達されたシグナルに従って免疫増強効果, 殺細胞効果などの作用が発現すると考えられる. 実際, B 型, C 型肝炎では, 細胞内に伝達されたシグナルにより抗ウイルス作用をもつ 2,5 adenylate synthetase などの酵素が産生されることが確認され

図3 腎細胞癌患者の血清 s-IFN-receptor 値と赤沈, CRP の相関

ている⁶⁾。しかし、腎細胞癌における細胞内の伝達系の検討は未だされていない。臨床における腎細胞癌に対する interferon の奏効率は低く約 20% 前後⁷⁾であり、臨床現場では、奏効率を上げるための投与方法⁸⁾の検討あるいは、種々の併用療法^{9)~12)}が検討されている。同様に肝炎患者に対する interferon の奏効率も約 20%¹³⁾と低い。この奏効率低値の理由として、筋肉内投与された interferon が血中に存在する何らかの阻害物質に不活化される可能性が否定できない。そのような阻害物質の 1 つとして interferon- α/β receptor が想定され、今回、s-IFN- α/β receptor 測定系が ELISA 法で確立された⁵⁾。血清中 s-IFN-receptor と interferon の結合能についての検討はされていないが、s-IFN-receptor 値を測定することにより、宿主の interferon に対する効果感受性を判定出来る可能性が示唆される。

Interferon α/β receptor は細胞膜を貫通している receptor であり、細胞膜外部分は 217 残基のアミノ酸から構成されている。

Interferon- α/β receptor が血清中に存在する機序としては、外部内部からの刺激による物理的切り出しによるもの、あるいは生体からのシグナルによる細胞外 receptor 部分の遊離 (shedding) によるものなどが考えられる。たとえば可溶性 TNF- α は単球やマクロファージの細胞膜上で産生された TNF- α の前駆体 (膜結合性蛋白質) がその後 TNF- α 変換酵素によりプロセッシングを受け可溶性となり血液中へ放出され腫瘍壊死作用などを示すと考えられており^{14)~17)}、interferon- α/β receptor も同様な機序を示すのではないかと考えられる。

Interferon は投与中に抗体が出来るとの報告があり、抗体が出来ると interferon の効果が不応または再燃となるとされている¹⁸⁾¹⁹⁾。Interferon 抗体の正体は

詳細は分かっておらず interferon- α/β receptor との関連性も検討されていないが、interferon 抗体と s-IFN-receptor が同様な効果発現阻止作用機序を示すなら、治療前の s-IFN-receptor 値の測定で interferon の効果のある程度予測することができ臨床的に意義があるものになるかもしれない。

腎細胞癌患者背景において、有意差はなかったものの high risk 群の s-IFN-receptor 値が高かった。実際、生存率についても、高値群では 4 年の累積生存率は 53.3%、低値群では 78.7% であり、かつ一般的に腎細胞癌の予後因子と言われている CRP、赤沈とは相関していなかった。今回、有意差がなく、また症例数が少ないため、s-IFN-receptor がこれらとは独立した因子である可能性を含め、予後因子となるか否かは今後さらに症例数を増やして検討する必要があると考えられる。また s-IFN-receptor 値と IFN- α の治療における予後との関連についても検討する予定である。

文 献

- 1) Ortaldo, J.R., Herberman, R.B., Harvey, C., Osheroff, P., Pan, Y., Kelder, B. and Pestka, S.: A species of human α interferon that lacks the ability to boost human natural killer activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4926—4929, 1984.
- 2) 柳原康夫, 栢沢史朗, 石井清士, 平井嘉勝: ヒトインターフェロン α (MOR-22) のヒト NK 細胞活性に対する作用. *癌と化学療法*, **13**(2), 342—348, 1986.
- 3) Greiner, J.W., Fisher, P.B., Pestka, S. and Schlom, J.: Differential Effects of Recombinant Human Leukocyte Interferons on Cell Surface Antigen Expression. *Cancer Research*, **46**, 4984—4990, 1986.
- 4) Uze, G., Lutfalla, G. and Gresser, I.: Genetic transfer of a functional human interferon α receptor

- into mouse cells : cloning and expression of its cDNA. *Cell*, **60**, 225—234, 1990.
- 5) 村口正宏, 大本安一 : 遺伝子操作を用いた新規生理活性物質の発現と測定系の確立. *細胞*, **29**(6), 30—34, 1997.
 - 6) Schmidt, A., Zilberstein, A., Schulman, L., Pederman, P., Berissi, H. and Revel, M. : Interferon Action : Isolation of nuclease, a translation inhibitor activated by interferon-induced (2' 5') oligoadenylate. *FEBS. Lett.*, **95**, 275—279, 1978.
 - 7) Horoszewicz, J.S. and Murphy, G.P. : An assessment of the current use of human interferons in therapy of urologic cancers. *J.Urol.*, **142**, 1173—1180, 1989.
 - 8) 大西哲郎, 町田豊平, 増田富士男, 白川 浩, 波多野孝史, 牧野秀樹 : 腎細胞癌の腎摘除が及ぼす免疫抑制と, 術前のインターフェロン投与が術後免疫能に及ぼす効果に関する検討. 特にインターフェロン- α とインターフェロン- γ の差に関して. *Biotherapy*, **5**, 1699—1707, 1991.
 - 9) Vogelzang, N.J., Lipton, A. and Figlin, R.A. : Subcutaneous interleukin-2 plus interferon Alfa-2a in metastatic renal cancer : an outpatient multicenter trial. *J.Clin. Oncol.*, **11**, 1809—1816, 1993.
 - 10) Foon, K., Doroshow, J., Bonnem, E., Fefer, A., Graham, S., Grosh, B., Narayan, P., Elias, L., Harvey, H., Schulof, R., Williams, R., Rinehart, J., Zekan, P., Catalona, W., Dillman, R., Salmon, S. and Galasso, F. : A prospective randomized trial of alpha 2B-interferon/gamma interferon or the combination in advanced metastatic renal cell carcinoma. *J. Biol. Response Mod.*, **7**, 540—545, 1998.
 - 11) Schornagel, J.H., Verweij, J., Bokkel Huinink, W. W., Klijn, J.G. M., Mulder, P.H. M., Debruyne, F.M. J., Deijk, W.A., Roozendaal, K., Kok, T.C., Veenhof, K.H. N., Berkel, J. and Oosterom, A.T. : Phase II study of recombinant interferon alpha-2A and vinblastine in advanced metastatic renal cell carcinoma. *J.Urol.*, **142**, 253—256, 1989.
 - 12) Kinouchi, T., Saiki, S., Maeda, O., Kuroda, M., Usami, M. and Kotake, T. : Treatment of advanced renal cell carcinoma with a combination of human lymphoblastoid interferon- α and cimetidine. *J.Urol.*, **157**, 1604—1607, 1997.
 - 13) Carithers, R.L. Jr. and Emerson, S.S. : Therapy of hepatitis C : meta-analysis of interferon alfa-2b trials. *Hepatology*. 26 Suppl., **1**, 83S-88S, 1997.
 - 14) Mohler, K.M., Sleath, P.R., Fitzner, J.N., Cerretti, D. P., Alderson, M., Kerwar, S.S., Torrance, D.S., Otten-Evans, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K., Kronheim, S.R., Petersen, M., Gerhart, M., Kozlosky, C.J., March, C.J. and Black, R.A. : Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumor necrosis factor processing. *Nature*, **370**, 218—220, 1994.
 - 15) Gearing, A.J. H., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A.H., Drummond, A.H., Galloway, W.A., Gilbert, R., Gordon, J. L., Leber, T.M., Mangan, M., Miller, K., Nayee, P., Owen, K., Patel, S., Thomas, W., Wells, G., Wood, L. M. and Woolley, K. : Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature*, **370**, 555—557, 1994.
 - 16) McGeehan, G.M., Becherer, J.D., Bast Jr., R.C., Boyer, C.M., Champion, B., Connolly, K.M., Conway, J.G., Furdon, P., Karp, S., Kidao, S., McElroy, A.B., Nichols, J., Pryzwansky, K.M., Schoenen, F., Sekut, L., Truesdale, A., Verghese, M., Warner, J. and Ways, J.P. : Regulation of tumor necrosis factor- α processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature*, **370**, 558—561, 1994.
 - 17) Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Claus, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. : The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, **83**, 793—802, 1995.
 - 18) Quesada, J.R., Rios, A., Swanson, D., Trown, P. and Gutterman, J.U. : Antitumor activity of recombinant-derived interferon alpha in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **3**, 1522—1528, 1985.
 - 19) Prummer, O. : interferon-alpha antibodies in patients with renal cell carcinoma treated with recombinant interferon-alpha-2a in an adjuvant multicenter trial. *Cancer*, **71**, 1828—1834, 1993.

(1999年3月17日受付, 2000年2月10日受理)