

Zytokine in der Tumor-Wirt-Interaktion

D.N. Männel, P. Orosz, B. Echtenacher, J. Rüschoff und W. Falk

Eine Reihe von Zytokinen besitzt direkte oder indirekte antitumorale Wirksamkeit. Insbesondere Interferone^{15, 27, 34} und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)^{1, 6, 31, 32} üben sowohl eine direkte tumorzytotoxische als auch eine indirekte immunmodulatorische Anti-Tumor-Wirkung aus. Die indirekte Wirkungsweise über Aktivierung von T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten und Makrophagen, Granulozyten und anderen Zelltypen wird auch den Zytokinen Interleukin (IL)-1²⁴, IL-2^{7, 12, 16}, IL-4^{19, 33}, IL-7¹⁸ und dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor⁸ zugeschrieben. Die Anwendung dieser Substanzen gegen Tumoren wäre deshalb wünschenswert. Aufgrund der breiten Wirkungsspektren der Zytokine sind jedoch in vivo viele Nebenwirkungen zu erwarten. Beispiele dafür sind die inflammatorischen Zytokine TNF und IL-1. Viele verschiedene Zelltypen tragen Rezeptoren für diese Zytokine, so daß eine Vielzahl von Effekten in vitro und in vivo beobachtet werden kann^{5, 11}. So ist z.B. die Endothelzelle eine sehr wichtige Zielzelle für TNF und IL-1. Da bei systemischer Applikation dieser Zytokine alle Endothelien erreicht werden, sind demnach auch andere als nur antitumorale Wirkungen zu erwarten.

Es sind sogar Effekte von TNF beschrieben worden, die Tumorwachstum und Metastasierung begünstigen können. Durch Aktivierung des Enzyms Kollagenase kann die Streuung von Tumorzellen gefördert werden⁹. Die Angiogenese wird stimuliert¹⁴, und die Adhärenz von Tumorzellen an Endothelzellen wird erhöht^{4, 10, 29}. Es wurde auch gezeigt, daß TNF invasives

Wachstum von Tumorzellen in der Bauchhöhle unterstützt und die Bildung von Tumorknötchen unter der Mesothelschicht fördert^{21, 22}.

Dazu kommen Beobachtungen, die auf eine vom Tumor verursachte, endogene TNF-Produktion schließen lassen. Tumorinduzierte Produktion von endogenem TNF wurde sowohl an Biopsiematerial von Tumorpatienten^{3, 26} als auch im Serum^{2, 25} und in Tiermodellen^{23, 28} gezeigt. Der Nachweis von TNF ist zwar am besten dokumentiert, aber die Beobachtung läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf IL-1 und andere Zytokine, die bei Entzündungen eine Rolle spielen, ausdehnen.

Um die Rolle von TNF in der Pathophysiologie von Tumorwachstum und Metastasierung zu klären, haben wir in einem Metastasierungsmodell in Mäusen die Wirkung von endogenem und exogenem TNF untersucht. In Maustumor-Modellen kann eine erhöhte Fähigkeit zur Produktion von endogenem TNF, Interferon- γ und IL-6 während des Tumorwachstums gezeigt werden²⁸. Um zu klären, ob diese Produktion von Entzündungsmediatoren nur zufällig mit dem Tumorwachstum korreliert oder ob dies einen Überwachungs- und Abwehrmechanismus des Organismus gegen den Tumor darstellt, wurde endogenes TNF durch Antikörper gegen TNF in vivo neutralisiert. Mäusen wurden syngene Fibrosarkomzellen (10^6 Zellen) subkutan injiziert, die sich zu einem soliden Tumor entwickelten. Wurde während des Wachstums der Tumoren endogenes TNF in den Tieren durch Anti-TNF-Antikörper neutralisiert, konnte keinerlei Unterschied in der Größe der sich ent-

wickelnden Tumoren gemessen werden²³. Diese Beobachtung spricht entweder dafür, daß das endogene TNF keine Bedeutung für Tumorzellwachstum hat oder daß unter diesen Versuchsbedingungen – wegen des zu großen Tumorzellinokulats oder Unzugänglichkeit des endogenen TNF für den neutralisierenden Antikörper – eine potentielle Wirkung von endogenem tumorinduziertem TNF in diesem Modell nicht nachweisbar war. Aus Versuchen mit metastasierenden Maustumoren (Lewis-Lung-Karzinomzellen und EsB-Leukämiezellen) gab es jedoch Hinweise dafür, daß die Metastasierung durch die Neutralisierung von endogenem TNF beeinflusst wurde. Tiere mit intramuskulär inokulierten Lewis-Lung-Karzinomzellen entwickelten in Gegenwart von Anti-TNF-Antikörpern deutlich weniger Lungenmetastasen. Entsprechend wurden im EsB-Modell, wenn die EsB-Zellen subkutan inokuliert worden waren, weniger Metastasen in Milz und Leber gezählt. Wieder zeigte sich an den Primärtumoren kein Effekt auf das Wachstum durch die Anti-TNF-Behandlung.

Um diesen metastasenfördernden Effekt von TNF in einem reproduzierbaren, einfachen Metastasierungsmodell systematisch untersuchen zu können, wurde Mäusen die oben erwähnten Fibrosarkomzellen (3×10^5 Zellen) intravenös injiziert und die Anzahl der Metastasen in der Lunge nach 12 Tagen gezählt. Wurde gleichzeitig mit der Tumorzellgabe endogenes TNF durch eine einmalige Gabe von Anti-TNF-Antikörpern neutralisiert, entwickelten sich deutlich weniger Lungenmetastasen (Tab. 1). Die Neutralisierung von Interferon- γ (IFN- γ) dagegen hatte keinen Einfluß auf die Metastasenzahl. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß IFN- γ in diesem Modell keine wesentliche Rolle spielt. Einen weiteren Hinweis auf die metastasenfördernde Wirkung von TNF liefern die in Tab. 2 beschriebenen Ergebnisse. Gleichzeitiges Verabreichen von rekombinantem Maus-TNF (rmTNF) mit den Tumorzellen führte zu einer dosisabhängigen Vermehrung der Metastasen (Tab. 2). Für IL-1 wurde in einem anderen Mausmodell ein ähnlicher Einfluß auf die Metastasierung beschrieben¹⁷. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde zusätzlich gezeigt, daß möglicherweise eine unmittelbare Wirkung von TNF auf die Tumorzellen die Metastasierung fördert, da Tumorzellen, wenn sie in vitro vor Inokulation TNF ausgesetzt worden waren, ebenfalls ein höheres Metastasierungspotential

zeigten²⁰. Entsprechende Vorinkubation der Fibrosarkomzellen mit TNF führten in unserem Modell jedoch zu keiner stärkeren Metastasierung. Auch war TNF in vitro weder direkt zytotoxisch noch wachstumsfördernd für die Fibrosarkomzellen, wenn Einbau von radioaktivem Thymidin als Maß für die Proliferation bestimmt wurde.

Tabelle 1 Verringerung der Lungenmetastasenzahl durch Anti-TNF-Antikörper

Behandlung	Metastasenzahl \pm SEM
Kontrolle	58,5 \pm 7,9
Anti-TNF-Antikörper	9,6 \pm 5,6
Anti-IFN- γ -Antikörper	48,7 \pm 16,3
Ratten-IgG	66,9 \pm 18,0

Die Tiere wurden mit den angegebenen Substanzen (Kontrolle: Puffer, Antikörper: 40 μ g) 5 Stunden vor Tumorzellinokulation i.v. behandelt. Am Tag 11 wurden die Tiere getötet und die Anzahl der äußerlich sichtbaren Lungenmetastasen bestimmt.

Tabelle 2 Erhöhung der Lungenmetastasenzahl durch rmTNF

Behandlung	Lungenmetastasenzahl \pm SEM
Kontrolle	44,8 \pm 9,6
0,08 μ g rmTNF	46,5 \pm 10,3
0,4 μ g rmTNF	82,0 \pm 13,4
2,0 μ g rmTNF	163,3 \pm 22,5
10,0 μ g rmTNF	> 220

Die Tiere wurden mit den angegebenen Substanzen wie in Tab. 1 behandelt und die Lungenmetastasenzahl bestimmt.

Die Frage, zu welchem Zeitpunkt TNF seine metastasierungsfördernde Wirkung ausübt, wurde durch die Gabe von rmTNF zu verschiedenen Zeiten vor oder nach Tumorzellinokulation untersucht. Eine Verstärkung der Metastasierung wurde beobachtet, wenn TNF 5 Stunden vor oder 1 Stunde nach den Tumorzellen verabreicht wurde (Tab. 3). Wenn Anti-TNF-Antikörper 24 Stunden nach den Tumorzellen verabreicht wurden, konnte keine Änderung der Metastasenzahl gemessen werden. Dies deutet darauf hin, daß das endogene TNF eine frühe Phase der Metastasierung von im Blut zirkulierenden Tumorzellen beeinflusst. Möglicherweise wird durch TNF die Anheftung der Tumorzellen an das Kapillarendothel in den Lungengefäßen verstärkt und dadurch die Diapedese und Extravasation gefördert. Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen durch TNF ist eine vielfach beschriebene Funktion von TNF¹⁴.

Tabelle 3 Zeitliche Abhängigkeit der Erhöhung der Metastasenzahl von der rmTNF-Behandlung

Behandlung	Zeitpunkt	Metastasenzahl \pm SEM
Kontrolle	-5 Std.	46,2 \pm 10,2
rmTNF	-24 Std.	59,7 \pm 16,9
rmTNF	-5 Std.	185,0 \pm 31,7
rmTNF	+1 Std.	169,3 \pm 4,3
rmTNF	+24 Std.	45,6 \pm 1,9
rmTNF	+48 Std.	30,5 \pm 8,8

Die Tiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten vor oder nach Tumorzellinokulation wie in Tab. 1 (rmTNF: 7,5 μ g) behandelt und die Lungenmetastasenzahl bestimmt.

In histologischen Untersuchungen von Lungenpräparaten der Versuchstiere konnten 5 Tage nach Tumorzellgabe Mikrometastasen in den Septen des Lungenparenchyms gezählt werden. Auch zu diesem frühen Zeitpunkt war der verringerte Effekt von Anti-TNF-Antikörpern und der erhöhende Effekt von rmTNF auf die Metastasenzahl deutlich. Eine Anfärbung dieser Mikrometastasen mit Silbernitrat zeigte deutlich, daß die Behandlung der Tiere mit rmTNF zu mehr mit Silber anfärbbaren Proteinstrukturen in den Nukleoli führte. Dieser Befund stellt eine mit höherer Proliferationsaktivität der Tumorzellen zunehmende Anzahl Nukleolus organisierender Regionen (AgNOR) dar²⁸ (Tab. 4). Entsprechend führte Neutralisierung von endogenem TNF zu einer Verringerung der Zahl der AgNOR. Dies spricht im Gegensatz zu unseren oben erwähnten In-vitro-Befunden dafür, daß TNF das proliferative Potential der Tumorzellen in vivo positiv beeinflusste. Diese Beobachtung muß jedoch nicht auf einer direkten Wirkung von TNF auf die Tumorzellen beruhen, sondern kann einen indirekten Effekt, der durch Endothelzellen und andere beteiligte Blut- oder Gewebszellen vermittelt werden kann, darstellen.

Die Beteiligung anderer Zytokine wie IL-1 oder IL-6 und die Rolle von anderen als Tumor-

und Endothelzellen bei der durch TNF geförderten Metastasierung wird derzeit untersucht. Die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen scheint dabei besonders wichtig zu sein.

Da diese Wirkung von TNF in unserem Metastasierungsmodell nur einen Ausschnitt aus dem Wirkungsspektrum von TNF widerspiegelt, bleibt offen, ob eine solche Wirkung für das Problem der Metastasierung nach operativer Entfernung von Primärtumoren von Bedeutung ist. Die Gefahr der verstärkten Metastasierung besteht jedoch, bis die antitumorale Wirkung von TNF oder anderen Zytokinen auf molekularer Ebene von weiteren, möglicherweise schädlichen Wirkungen getrennt und separat beeinflusst werden kann. Wenn sich ein derartiger Befund, wie hier im Mausmodell beschrieben, in klinischen Untersuchungen bestätigen ließe, würde dies bedeuten, daß sich eine zusätzliche Immunstimulierung nach Entfernung eines Primärtumors, die sich in einer erhöhten Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie TNF äußert, für die Patienten möglicherweise nachteilig auswirkt.

Literatur

- Asher, J.L., J.J. Mule, A. Kasid, N.P. Restifo, J.C. Salo, C.M. Reichert, G. Jaffe, B. Fendly, M. Kriegler, S.A. Rosenberg. 1991 J. Immunol. 146: 3227
- Balkwill, F., F. Burke, D. Talbot, J. Tavernier, R. Osborne, S. Naylor, H. Durbin, W. Fiers. 1987 Lancet 2: 1229
- Beissert S., M. Bergholz, I. Waage, G. Lepsien, A. Schauer, K. Pfizenmaier, M. Krönke. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5064
- Bereta, M., J. Bereta, S. Cohen, K. Zaifert, M.C. Cohen. 1991 Cell. Immunol. 136: 263
- Beutler, B. 1992 Tumor Necrosis Factors. Raven Press, New York
- Blankenstein, T., Z. Qin, K. Überla, W. Müller, H. Rosen, H.D. Volk, T. Diamantstein. 1991 J. Exp. Med. 173: 1047
- Bubenik, J., J. Simova, T. Jandlova. 1990 Immunol. Lett 23: 287
- Colombo, M.P., G. Ferrari, A. Stoppacciaro, M. Parenza, M. Rodolfo, F. Mavilio, G. Parmiani. 1991 J. Exp. Med. 173: 889

Tabelle 4 Erhöhung der proliferativen Aktivität der Tumorzellen durch rmTNF-Behandlung

Behandlung	Mikrometastasen-flächenzahl \pm SEM	Durchmesser \pm SEM	AgNOR \pm SEM
Kontrolle	0,18 \pm 0,11	96,67 \pm 15,63	1,80 \pm 0,02
rmTNF	1,43 \pm 0,25	180,0 \pm 14,97	14,30 \pm 0,94

Die Tiere wurden 5 Stunden vor Tumorzellinokulation i.v. behandelt (Kontrolle: Puffer, rmTNF: 10 μ g). Am Tag 5 wurden die Tiere getötet und die Flächenzahl (pro mm²) und der maximale Durchmesser (μ m) der Mikrometastasen nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung bzw. die silberaffinen Nukleolistrukturen (AgNOR) nach Silbernitratfärbung in Lungenpräparaten bestimmt.

- ⁹ Dayer, J.M., B. Beutler, A. Cerami. 1985 *J. Exp. Med.* 162: 2163
- ¹⁰ Dejana, E., F. Bertocchi, M.C. Bortolami, A. Regonesi, A. Tonta, F. Breviario, R. Giavazzi. 1988 *J. Clin. Invest.* 82: 1466
- ¹¹ Dinarello, C.A., R. Neta. 1989 *Biotherapy* 1: 245
- ¹² Fearon, E.R., D.M. Pardoll, T. Itaya, P. Golumbek, H.I. Levitsky, J.W. Simons, H. Karasuyama, B. Vogelstein. P. Frost. 1990 *Cell* 60: 397
- ¹³ Frater-Schröder, M., W. Risau, R. Hallmann, P. Gautschi, P. Böhlen. 1987: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5277
- ¹⁴ Gamble, J.R., W.B. Smith, M.A. Vadas. 1992 in B. Beutler *Tumor Necrosis Factors* Raven Press, New York p 65
- ¹⁵ Gansbacher, G., R. Bannerji, B. Daniels, K. Zier, K. Cronin, E. Gilboa. 1990 *Cancer Res.* 50: 7820
- ¹⁶ Gansbacher, B., K. Zier, B. Daniels, K. Cronin, R. Bannerji, E. Gilboa. 1990 *J. Exp. Med.* 172: 1217
- ¹⁷ Giavazzi, R., A. Garofalo, M.R. Bani, M. Abbate, P. Ghezzi, D. Boraschi, A. Mantovani, E. Dejana. 1990 *Cancer Res.* 50: 4771
- ¹⁸ Hock, H., M. Dorsch, T. Diamantstein, T. Blankenstein. 1991 *J. Exp. Med.* 174: 1291
- ¹⁹ Li, W., T. Diamantstein, T. Blankenstein. 1990 *Mol. Immunol.* 27: 1331
- ²⁰ Lollini, P.L., C. DeGiovanni, G. Nicoletti, A. Bontadini, P.L. Tazzari, L. Landuzzui, K. Scotlandi, P. Nanni. 1990 *Clin. Exp. Metastasis* 8: 215
- ²¹ Malik, S.T., D.B. Griffin, W. Fiers, F.R. Balkwill. 1989 *Int. J. Cancer* 44: 918
- ²² Malik, S.T.A., S.M. Naylor, N. East, A. Oliff, F.R. Balkwill. 1990 *Eur. J. Cancer* 26: 1031
- ²³ Männel, D.N., R. Jänicke, U. Westenfelder, B. Echtenacher, A. Kist, W. Falk. 1990 *Lymphokine Res.* 4: 485
- ²⁴ Nakamura, S., K. Nakata, S. Kashimoto, H. Yoshida, M. Yamada. 1986 *Jpn. J. Cancer Res.* 77: 767
- ²⁵ Nara, K., H. Odagiri, M. Fujii, Y. Yamanaka, M. Tokoyama, T. Morita, M. Sasaki, M. Kon, T. Abo. 1987 *Cancer Immunol. Immunother.* 25: 126
- ²⁶ Naylor, S.M., S.T.A. Malik, W.H. Stamp, T. Jobling, F.R. Balkwill. 1990 *Eur. J. Cancer* 26: 1027
- ²⁷ Niederle, N., P. von Wussow. 1990 *Interferone, Präklinische und klinische Befunde.* Springer Verlag, Berlin
- ²⁸ Rakhmilevich, A.L., R.J. North. 1991 *Cytokine* 3: 398
- ²⁹ Rice, G.E., M.A. Gimbrone, M.P. Bevilacqua. 1988 *Am. J. Pathol.* 133: 204
- ³⁰ Rüschoff, J., J.K. Neumann, H. Contractor, K. Plate, C. Thomas. 1990 *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116: 480
- ³¹ Taguchi, T., Y. Sohmura. 1991 *Immunotherapy* 3: 177
- ³² Teng, M.N., B.H. Park, H.K. Köppen, K.J. Tracey, B.M. Fendly, H. Schreiber. 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3535
- ³³ Tepper, R.I., P.K. Pattengale, P. Leder. 1989 *Cell* 57: 503
- ³⁴ Watanabe, Y., K. Kuribayashi, S. Mijatake, K. Nishihara, E. Nakayama, T. Taniyama, T. Sakata. 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9456