

인체신세포암에서 자연살해세포의 활성화

고신대학교 의학부 비뇨기과학교실

류 현 열, Andrew C. von Eschenbach*

***Department of Urology, The University of Texas
M.D. Anderson Cancer Center**

Natural Killer Cell Activation on Human Renal Cell Carcinoma.

Hyun Yul Rhew.

**Department of Urology. Kosin Medical College
Pusan 602-702. Korea.**

Andrew C.von Eschenbach.

**Department of Urology. The University of Texas
MD Anderson Cancer Center 77030. U.S.A.**

= Abstract =

Natural killer (NK) cells that had infiltrated renal cell carcinoma(RCC) proliferated vigorously in culture which activated interleukin-2(IL-2) and lysed autologous tumor cells. We studied the susceptibility of RCC cells to NK-cell lysis and their ability to stimulate proliferation and function of NK cells. Cells from primary culture of RCC(p-RCC cells) were significantly more susceptible to lysis mediated by human NK3.3 clones than were cells from primary culture of metastatic melanomas. RCC cells clones was also susceptible to lysis by NK3.3 clones and IL-2 activated peripheral blood lymphocytes(PBLs). Incubation of NK3.3 clones with p-RCC cells in the absence of IL-2 induced proliferation of NK3.3 clones, whereas incubation with cells from primary culture of metastatic melanomas, K562 cells tested did not. The p-RCC cells from earlier passages were more potent inducers of NK-cell proliferation than were those from older passages. Cell-free culture supernatants of p-RCC cells with or without NK3.3 clones failed to induce NK-cell proliferation. Incubation of NK cells purified from PBLs with p-RCC cells induced higher proliferation of the NK cells only in the presence of IL-2, whereas incubation with cells from primary culture of metastatic melanomas did not. In summary, these results suggest that RCC cells are able to activate NK cells, potentially through cell-to-cell interaction.

Key Words : Natural killer cell, NK 3.3 clone, Renal Cell Carcinoma

서 론

자연살해(Natural killer, NK)세포의 생물학적 기능은 종양세포를 파괴하는 효과, 자연살해 효과, 전이의 방어, 골절이식편의 거부등에 관여하고있다. 그러나 NK cell의 항종양성효과는 획득면역이 형성되기전에 종양발생병소에 있어서의 1차적인 방어의 성질을 갖는다고 할수 있다. 이러한 종양발생 초기의 NK 세포의 활성증가는 연구자들에 의해 암 이식 마우스에서의 초기 활성증가가 확인된 바 있으며 Djeu 등⁷⁾에 의하면 NK세포 활성화도의 증가는 암 세포에 유발되는 interferon, interleukin-2 와 (IL-2) 함께 배양으로 증강된다고 알려져있다^{14, 22)}.

신세포암(RCC)은 원발성종양의 약 85%를 차지하는 악성종양으로 약 30-40%에서 진단 당시 이미 원격전이를 보이고 항화학요법 또는 방사선치료에 무반응 또는 저항하는 종양으로 몇가지 생요법에 반응하는 소수의 종양이다^{2, 9, 26, 29, 30)}. 특히하게도 이 신세포암의 대단히 적은 예에서 자연소실의 현상이 보고되고 있다^{6, 30)}. Balch등¹⁾와 Itoh등¹⁶⁾은 신세포암에서 임파구의 침윤이 다른 암보다 높게 나타난다고 보고한 이래 종양침윤 임파구(TILs)가 IL-2의 활성화 후 주요 조직적합성 복합체(MHC) 비제한성 세포독성도를 강력하게 나타내며 CD³⁺ CD⁵⁶⁺ 또는 CD³⁻ CD¹⁶의 자연살해(NK)세포가 동종종양 세포용해에 원초적 역할을 한다고 알려져 있다. 그러나 IL-2에 활성화된 신세포암 종양침윤 임파구내의 T-세포는 세포독성도가 없거나 MHC-비제한적 세포독성도가 낮다고 알려져 왔다. 1988년 Melder등²³⁾은 IL-2 초기 배양시에 비적합성 세포를 제거하지 않으면 말초혈액에서 대량의 NK 세포는 증식할 수 없다고 하였고, 일단의 연구자는 신세포암 종양침윤 임파구의 NK세포는 IL-2 배양시 대단히 잘 증식된다고 보고하였다^{1, 12, 16)}. 이러한 논란은 신세포암 종양침윤 임파구내의 NK세포가 말초혈액 단핵세포 또는 다른 종양과 다르거나

또는 신세포암내의 NK세포와 비교하여 IL-2 배양하에서 대단한 NK 세포의 증식을 자극한다는 것을 시사한다고 하겠다. 본 연구에서는 인체 신세포암주가 NK세포를 활성화할 수 있는가를 측정하기 위해 NK3.3 clone을 작동세포(effector cell)로 하여 NK세포에 의한 신세포암세포의 용해도에 따른 감수성과 NK 세포의 증식 자극 능력과 그 기능을 측정 하였다.

재료 및 방법

1. 세포주의 1차배양

암세포주의 일차배양을 위해 신세포암과 전이성 악성 흑색종의 적출시 조직을 얻어 Collagenase(2ng/ml)와 type IV-DNase(0.4ng/ml)를 사용하여 단세포 현탁액으로 만들었다. 20ml Dulbecco's modified Eagle's 배지(DMEM)에 10%FBS, glutamine과 400U/ml penicillin과 400 ug/ml streptomycin을 첨가하여 75cm²의 배양 병에 넣어 37℃의 온도와 5% CO₂-95% 공기의 상태에서 배양하였다. 표적종양 세포주로 K562 세포주를 RPMI-1640 배지에 10% FBS 를 첨가하여 배양 하였다.

2. 작동세포(Effector cell)의 배양

작동세포로 NK3.3clone을 사용하기 위해 RPMI-1640 배지에 10% heat-inactivated pooled human AB serum(North American Biologicals, Miami, FL), 10%Lymphocult-T(Biotest, Fairfield, NJ)를 첨가하여 NK3.3클론이 1-3×10⁵ cells/ml의 연속 배양되도록 유지하였고. 200u/ml γIL-2에서 3일간 배양되었다. 이 NK클론은 K562 표적세포에 중등도의 세포독성도를 나타내고 작동세포:표적세포 비가 40:1일때 10-20%의 특이용해도를 나타내도록 하였다.

3. 말초혈액 단핵세포(PBMCs)에서 NK세포 분리 동정

건강한 제공자로 부터 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-CD16MAb(Becton Dickinson, Mountain View, CA)의 방법으로 CD¹⁶⁺ NK-cell 분해를 분리하였고 200u/ml IL-2의 배지에서 3일간 배양하여 γ IL-2 activated PBLs을 얻었다.

4. 종양세포의 클로닝(cloning)

신세포암의 1차배양은 종양세포주(RC40)는 배양 1달뒤에 trypsin화 하였다. DMEM배지에 10%FBS를 첨가하여 96-well의 microplate에 0.5cell/well되게 배양하였다. well내 배양증식된 종양세포는 1주, 2주 간격으로 역상현미경으로 관찰하고 한 개의 clone포함하는 이 well을 표적clone으로 사용하였다. 서로 다른 세 개의 clone을 만들었고 URO2와 URO3 항원에 양성으로 염색되었다.

5. 종양세포와 NK 세포의 배양

신세포암 세포주를 trypsin화하고 세척한 후 세슘(Cs) 방사기에서 7000rad 방사후 10%FBS를 첨가한 DMEM 5ml를 재부유하였다. DMEM와 10%FBS의 배지에 하루동안 배양하였고 최상층액을 버린후 RPMI-1640와 10% AB serum배지에 다양한 수의 NK 세포를 넣고 γ IL-2를 200u/ml 첨가군과 비첨가군으로 무작위로 나누어 배양하였다. 배양 2-5일후 NK 세포 증식을 실험하여 표현형 또는 세포독성도에 따라서 NK 세포는 산출하였고 NK 세포의 증식은 Itoh¹⁶가 사용한 방법인 3H-thymidine (TdR) 0.5 μ Ci로 측정하였고, 자극계수(stimulation index)는 다음과 같이 산출하였다.

$$SI = \frac{\text{cpm of NK3.3 cultured with stimulator cell} - \text{cpm of stimulator cell}}{\text{cpm of NK3.3 cultured without stimulator cell}}$$

6. 세포독성도 분석

세포독성도 측정을 위해 4시간과 6시간 Cr 방출검사법을 사용하였으나 ⁵¹Cr으로 부착성 세포를 표지화 다음 96well에서 밤새 배양하였다. 작동세포 첨가전에 배양관을 세척하였다. 자연방출율은 4시간에 20% 16시간에 30%를 초과를 하지 않도록 하였다. 모든실험은 삼중 실험 하였고 특이용해도는 Hayakawa등¹¹⁾의 방법을 따랐다.

결 과

NK 세포유도 세포독성도 감수성검사를 위해 4례의 신세포암 세포주와 전이성악성흑색종 3례 K562세포가 표적세포로 사용되었다(Table I). 신세포암 세포주는 CM 또는 IL-2이 있는 배지에서 NK3.3clone에 의한 용해도가 흑색종보다 의미있는 높은 용해도를 보였다. 신세포암 세포주(RC40)에서 만들어진 신세포암clone을 3개로 만들어 Nk3.3 clone과 IL-2-activated PBLs의 상관관계에서는(Table II) K 562와 RC 40clone/3 종양세포는 작용세포로 높은 감수성이 있었다.

NK 3.3clone은 8명의 환자에서는 조사된 신세포암세포에 IL-2없이 4일간 배양되고 흑색종 3명, K562 세포주 각각 배양되었다. 대부분의 신세포암세포의 1차배양세포는 NK 세포증식이 의미있게 유도되었고 자극지수(SI)는 8명중 5명에서 5를 넘었고 평균과 표준편차는 16.7 $\pm$ 12.6이었다. 이와 반면에 흑색종의 3명중 1례에서 증식이 유도되었다. 자극지수(SI)는 3개의 흑색종 모두 5를 넘지 않았고 평균은 2.1 $\pm$ 1.7 이었고 P<0.05로 통계적 의미가 신세포암보다 낮았다(Table III). 신세포암주의 1차배양세포에는 작동세포 대 자극세포비가 8:1이 되어야 의미있는 증식이 유도되었고 비 2:1또는 1:1에 최고치에 도달하였다..최상층액에는 어떠한 자극세포도 유도되지않고 이러한 자극체를 포함한 NK3.3 clone으로 부터의 상층액배양도 증식에 실패하였다.본실험에서 5례의 신세포암

세포와 일차배양세포주의 배양기간과 NK 세포 증식유도의 상관관계를 조사하였다(Fig 1). 5례에 있어서 NK 세포 자극활성도는 1차배양 세포의 배양기간이 길수록 감소하였다. 5례중 4례에서(아마도 배양 1개월후) 첫 조사시기에 자극제의 높은 자극지수(SI)를 얻었다. NK cell 자극활성도는 3례흑색종 모두에서는 관찰되지 않았다.

γ IL-2 포함군과 비포함군에 대한 p-RCC세포 주 5례와 전이성 악성흑색성종양세포 3례에 대해 NK3.3clone을 3일간 배양하였다. γ IL-2 비포함군에서 NK 3.3clone은 낮게 나타났었으나 의미있는 세포독성도가 있었으며 흑색종에서는 나타나지 않았다. γ IL-2 포함군에서는 IL-2 단독군보다 의미있게 높게 ($p < 0.01$) 독성도가 나타났다. NK cell 증식농도 같은 방법으로 실험하여 배지단독군, p-RCC군, 흑색종군에서 3H-TdR 흡착하여 NK clone을 배양하여 각각 187 ± 56 , $3,275 \pm 4$, 286 과 578 ± 624 이었고 IL-2 단독군, p-RCC군과 IL-2와 흑색종과 IL-2군 각각은 $19,225 \pm 4,759$, $3,247 \pm 6,803$ ($p > 0.02$)와 $29,171 \pm 9,356$ 와 이었다.

고 찰

종양에 대한 세포성 면역기전에 관여하는 여러 작동세포(effector cell, EF)중 하나로써 자연살해세포(Natural Killer cell, NK cell) 특히 사전 감각없이 미 감각상태에서 target cell에 대한 즉각적인 세포독성을 나타낸다고 한다. 세포독성 T 세포와 달리 NK세포는 역학적 기억과 MHC구속성이 결여되어 동계(synergic), 동종(allogenic), 이종(xenogenic)의 각종 표적세포를 파괴할 수 있는 특징이 있다¹⁵⁾. NK 세포는 대한 감수성은 주요조직적합성 복합체(MHC)분자와 같은 정상세포 표면항원의 소실과 관련되어 있으며 이것은 interferon과 같은 MHC항원의 발현을 증강시키는 물질과 배양된 세포는 NK 세포의 세포독성에 저항성을 보인

다는 것을 알수있다. NK세포집단은 Antibody dependant cell mediated cytotoxicity(ADCC)를 보이는 작동세포 집단인 K 세포와 중합되어 있으나 NK 세포의 경우 Fc수용체는 세포독성과 무관하며 항체를 필요하지 않으며 항원 특이성을 보이지않는다. Hayakawa등^{11, 12)}이 전이성 흑색종의 원초배양세포보다 NK 세포용해에 대하여 p-RCC가 더 예민도가 높음을 보고하였다. RCC-cell clone이나 비종양성신세포의 1차 배양세포들은 NK 세포집락군과 IL-2 activated PBLs에 의해 세포용해가 높았다. 더 나아가서 p-RCC cell과 비종양성인 배양세포는 NK3.3 clone의 증식을 유도한다. 이것은 RCC의 세포에서 근원하는것을 근위곡세뇨관의 상피세포에서 나온것이다^{3, 25)}. 비종양성 신배양세포는 대부분 상피세포로 구성되어 있다. RCC cell과 정상신세포는 몇가지 공통점을 갖고 있는데 예를 들면 1)적어도 몇달동안은 실험관 내에서(in vitro) 왕성하게 증식하며^{18, 20)} 2)인체 NK 활성도에 따라 저지되며 (contact inhibition)^{13, 31)} 3)상피성성장인자(epidermal-growth-factor)수송기유전자를 나타낸다³¹⁾. 이런결과로 신세포막세포와 신상피세포는 유사한 항원성 결정인자를 가져서 분자성질은 명확하지 않으나 NK 세포용해 감수도를 나타내게 된다.

IL-2-activated PBMCs는 처음에는 종양세포에만 독성이 있다고 비종양세포에는 없다고 하였으나¹⁰⁾ 나중에 정상혈관내피세포가 IL-2-activated PBMCs에 의해 용해된다고 보고하였다⁵⁾. 혈관내피세포 또는 신세포를 용해하는 IL-2-activated PBMCs는 IL-2-therapy-induced vascular leak syndrome또는 신독성을 포함한다고 하였다^{4, 27)}.

1985년 Phillip등²⁵⁾은 K562종양세포는 NK 세포 증식유도능력이 있다고 보고 하였다. 그러나 이 결과는 저자를 포함한 다른 연구자들에게서 검증되지 않았다. 이 의견의 불일치의 하나의 이유는 각각 다른 실험실에서 이 실험에 사용되는 K562세포주의 표현형과 또는 기능적

변화가 발생하기 때문일 것이다. 어떤 인체 B 세포주에서 오직 IL-2에 의한 상가작용으로 NK 세포의 증식이 촉진된다고 보고하였고¹⁹⁾ B-세포주의 용매성입자는 NK-세포자극인자(NKSF)처럼 순수분리 된다¹⁹⁾. 이것이 바로 현재 IL-2이다. B-세포주는 NK 세포증식유도는 안되나 그러나 이 관찰은 1989년 Kobayashi¹⁹⁾ 관찰과는 일치하지는 않으며 선택적 B-cell line만이 NK 세포증식을 자극할 수 있다고 하겠다.

NK3.3군이 있는 P-RCC세포배지와 없는 것 배양액에서 무세포 최상층 부유물을 농축한 것은 NK3.3군 증식유도에 실패 하였다. P-RCC 배양의 무세포 최상층 부유물은 1ng/nl의 phorbol myristate acetate로 자극하여도 역시 NK 3.3 clone의 증식유도가 되지않으나 그래서 비록 용해성 매개자가 배제되지 않는다고 하여도 p-RCC cell의 NK3.3군의 증식유도는 세포 대 세포간의 반응이 크게 영향하는 것 같다.

신세포암에서 TIL내 NK 세포의 수는 AIH-V serum free배지와 IL-2가 있는 gas통과성 bag 속에서는 첫수주간 500배이상 크게 증가하였으나 그 반면에 신세포암내 TIL내 T 세포수는 배양기간내 증가 하지 않았다¹²⁾. 이에 비해 흑색종의 NK 세포는 배지에서 의미있게 증식하지 않았다. 그 반면에 흑색종의 T 세포는 IL-2하 배지에서 왕성하게 증식되었고 동종 종양 특이성 세포독성도를 보였다. 이 결과는 IL-2가 있는 신세포암 종양의 배양에서는 NK 세포의 왕성한 증식을 신세포암내 공존하는 암세포들이 부분적으로 관여하는 것이다¹²⁾. 다시 말하면 autologous RCC cell lysis로 일으킨다는 것이다.

K562 cell에 대한 인체의 PBMC의 세포독성도는 신세포암을 포함한 종양세포와 비종양신 세포를 포함한 비종양세포의 초기배양의 monolayer와 짧은 시간의 접촉(18시간)후에 감소한다^{13, 31)}. 본 연구에서는 p-RCC세포와 NK 3.3을 포함한 4일간 배양한 결과는 NK세포독성도의 증가를 보게되었다. 이 상반된 결과는 각각 다른 실험방법이기 때문이다. (전 PBMC 대 NK

3.3군 또는 18시간 대 4일간 배양)PBMCs또는 부분적으로 대한 granular lymphocyte는 세포 내에서 T,NK 다른형태로 polyclonal population으로 구성되어있다. 그래서 억제효과는 monolayer의 cell과 NK 세포 사이의 직접적 상호작용을 나타내는지에 대해서는 명확하지 않다.

전이성흑색종과 신세포암은 현재의 생치료법에 부분적으로 반응하는 2개의 고형종양이며^{9, 26)} 흑색종내 T 세포인 TIL으로 종양성장 조절의 주요무기로 생각되나 그반면에 신세포암내의 T cell의 역할은 아직 미스테리이다^{3, 8, 12, 16, 17)}. 그반면에 NK 세포는 IL-2배양에 1차적으로 반응하는 물질이고 역시 각각 개체의 신세포암세포용해에 중요한 역할을 하는 것을 시사한다. 우리의 결과는 신세포암세포 NK 세포 활성화하는 능력이 있으며 이 결과는 신세포암의 생물학적 특성의 이해에 중요한 관건이 될것이다.

결 론

이상의 결과를 볼 때 NK 세포는 신세포암 세포 용해에 중요한 역할을 하며 신세포암세포들이 NK 세포를 활성화하는 능력이 있으며 이것은 세포대세포의 상호작용으로 일어나는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Balch CM, Riley LB, Bae Y-J, Salmeron MA, Platsoucas CD, von Eschenbach A.C and Itoh K : Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. Arch Surg 125 : 200-205,1990
2. Bander NH, Finstad CL, Cordon Cardo C, Ramsawak Rd, Vaughan ED, Jr Whitmore WF, Jr, Oettgen HF, Melamed MR and Old LJ : Analysis of a mouse monoclonal antibody that reacts with a specific region of the human proximal tubule and subsets of renal

- cell carcinomas. *Cancer Res* 49 : 6774-6780, 1989
3. Beldegrun A, Muul LM and Rosenberg SA : Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer isolation characterization and antitumor activity. *Cancer Res* 48 : 206-214, 1988
 4. Beldegrun A, Webb DE, Austin HA, Steinberg SM, White DE, Linehan WM and Rosenebrg SA : Effects of interleukin 2 on renal function in patients receiving immunotherapy for advanced cancer. *Ann Intern Med* 106 : 817-822, 1987
 5. Damle NK, Doyle LV, Bender JR and Bradley EC : Interleukin 2-activated human lymphocytes exhibit enhanced adhesion to normal vascular endothelial cells and cause their lysis. *J Immunol* 138 : 1779-1785, 1987
 6. Dekernion J, Ramming K and Smith R : The natural history of metastatic renal cell carcinoma : A computer analysis. *J Urol* 120 : 148-152, 1978
 7. Djeu JY, Huang KY and Herberman RB : Augmentation of mouse natural killer cell activity and induction of interferon by tumor cells in vivo. *J Exp Med* 151:718-789, 1980
 8. Finke JH, Rayman P, Alexander J, Edinger M, Tubbs RR, Connelly R, Pontes E, and Bukowski R : Characterization of the cytotoxic activity of CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 50 : 2363-2370, 1990
 9. Foon EA : Biological response modifiers : The new immunotherapy *Cancer Res* 49: 1621-1639, 1989
 10. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ and Rosenberg SA : Lymphokine-activated killer cell phenomenon lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155 : 1823-1841, 1982
 11. Hayakawa K, Salmeron MA, Kornbluth J, Bucana C and Itoh K : The role of IL-4 in proliferation and differentiation of human natural killer cells study of an IL-4-dependent versus an IL-2-dependent natural killer cell clone. *J Immunol* 146 : 2453-2460, 1991a
 12. Hayakawa K, Salmeron MA, Parkinson DR, Markowitz AB, von Eschenbach AC, Legha SS, Balch CM, Ross MI, Augustus LB and Itoh K : Study of tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive therapy of renal cell carcinoma (RCC) and metastatic melanoma. Sequential proliferation of cytotoxic natural killer and noncytotoxic T cells in RCC. *J Immunother* 10 : 313-325, 1991b
 13. Heiskala M, Tlikorkala O and Timonen T : Inhibition of human natural killer activity by monolayer of primary cell cultures. *Nat Immun Cell Growth Regul* 6 : 1-11, 1987
 14. Henny CS, Kuribayashi K, Kern DE and Gills S : Interleukin-2 augmentats natural killer cell activity. *Nature* 291 : 335, 1981
 15. Herberman RB : Natural killer cells. *Clini Biol Res* 58 : 33, 1981
 16. Itoh K, Platsoucas CD and Balch CM : Autologous tumor specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas activation by interleukin 2 and autologous tumor cells and involvement of the T cell receptor. *J Exp Med* 168 : 1419-1441, 1988
 17. Kim TY, von Eschenbach AC, Filaccio MD, Hayakawa K, Parkinson DR and Itoh D : Colnal analysis of lymphocytes from tumor peripheral blood and nontumorous kidney

- in primary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 50:5263-5268,1990
18. Kirchheimer JC, Wojta J, Christ G, Hienert G and Binder BR : Mitogenic effect of urokinase on malignant and unaffected adjacent human renal cells. *Carcinogenesis* 9 : 2121-2123,1988
 19. Kobayashi M, Ffiz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B and Trinchieri G : Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170 : 827-845,1989
 20. Kovacs G, Szucs S, De-Riese W and Baumgartel H : Specific chromosome aberration in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 40 : 171-178,1987
 21. Kornbluth J, Flomenberg N and Dupont B : Cell surface phenotype of a cloned line of human natural killer cells. *J Immunol* 129 : 2831-2837,1982
 22. Lala PK, Santer V, Libenson H, Parhar RS : Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. *Cell Immunol* 93:250-264,1985
 23. Melder RJ, Whiteside TL, Hiserodt JC, Bujanovic NL and Herberman RB : Human adherent lymphokine-activated killer (ALAK) cells. A new approach to adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res* 48 : 3461-3469,1988
 24. Oberling C, Rouviere M and Haguenu F : Ultrastructure of the clear cells in renal carcinomas and its importance for the demonstration of their renal origin. *Nature (Lond)* 186 : 402-403,1960
 25. Phillips JH and Lanier LL : A model for the differentiation of human natural killer cells
 - Studies on the in vitro activation of Leu-11 granular lymphocytes with a natural killer-sensitive tumor cell K526. *J Exp Med* 161 : 1464-1482,1985
 26. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FR, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, Seipp CA, Simpson CG and White DE : 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. *New Engl J Med* 316 : 889-897,1978
 27. Rosenstein M, Ettinghausen SE and Rosenberg SA : Extravasation of intravascular fluid mediated by the systemic administration of recombinant IL2 *J immunol* 137 : 1735-1742,1986
 28. Sargent ER, Gomellian LG, Beldegrun A, Linehan WM and Kasid A : Epidermal growth factor receptor gene expression in normal human kidney and renal cell carcinoma. *J Urol* 142 : 1364-1368,1989
 29. Skinner DG, Covin RB, Vermillion CD, Pfester RC and Leadbetter WG : Diagnosis and management of renal cell carcinoma. *Cancer* 28 : 1165-1170,1971
 30. Tanagho EA, McAnich JW : *Smith's General Urology*, 14ed. Connecticut : Appleton & Lange, 1995, 374-385
 31. Yagita M, and Saksela E : Reduction by Ok-432 of the monolayer contact-mediated inhibition of human natural killer cell activity. *Immunol Lett* 25:347-353,1990

Table I. NK-cell Cytotoxicity Against Cells from Primary Culture Cell Lines Developed from Human Renal Cell Carcinoma(p-RCC)

Target cells	% specific lysis in 4-hr and 16-hr assays by NK3.3 clones cultured with			
	CM		γ IL-2	
	4hr	6h	4hr	6hr
K 562	8	28	21	54
RC40	5	24	12	49
RC42	8	13	14	56
RC43	3	7	8	26
RC45	5	8	9	21
(mean $\pm$ SD)	5.8 $\pm$ 1.94	16.2 $\pm$ 8.79	12.8 $\pm$ 4.61	41.2 $\pm$ 6.94
M50	2	3	1	5
M62	2	5	9	18
M75	0	3	1	2
(mean $\pm$ SD)	1.33 $\pm$ 0.94	3.67 $\pm$ 0.94	3.67 $\pm$ 3.77	8.33 $\pm$ 6.94

* NK3.3 clones cultured with conditioned medium (CM) or 200U/ml rIL-2 were used as effector cells. Target cells were K562 cells, 4 different p-RCCs and 3 different primary culture of human melanomas. Values represent mean $\pm$ SD of specific lysis in 4-hr and 16-hr ^{51}Cr -release assays at an E:T ratio of 40. Values were at least $p < 0.02$ vs. those of primary culture of melanomas (Student 2-tailed t-test).

Table II. NK-Cell Activity Against RCC Cell Lines

Target Cells	NK3.3 mediated % lysis 16hr assay			IL-PBL-mediated % lysis 4hr assay		
	40	20	10	40	20	10
K562	40	31	24	64	52	29
RC40-clone11	28	16	7	56	28	13
RC40-clone12	40	19	13	48	37	13
RC40-clone14	36	17	8	39	23	9

* NK3.3 cells cultured with Conditioned Medium (CM) and PBMCs cultured with 200u/ml γ IL-2 for 3 days were washed and used as effector cells against K562 cells and 3 different tumor cell clones established from p-RCC Cells of an RC40 patients values rep-

resent means percentages/specific lysis of triplicated assays at 3 different ratio.

Table III. Induction of NK cell Proliferation by Incubation with Cell from Primary Culture of Renal Cell Carcinoma (p-RCC) and Metastatic Malignant Melanoma

Stimulators	No. of cases tested	Proliferation of NK3.3 clones		
		NK-cell clone (cpm)	NK plus tumor cells (cpm)	SI
RCC	8	1.878 $\pm$ 2.134	13.462 $\pm$ 9340	16.7 $\pm$ 12.6
Metastatic Melanoma	3	3280 $\pm$ 2.438	6.843 $\pm$ 7.306	2.1 $\pm$ 1.7
K562 cell line	1	2360	2875	1.2

* NK3.3 clones were incubated for 4 days with irradiated p-RCCs, metastatic melanoma. ^3H -TdR uptake of irradiated stimulator was 1.000cpm. Values shown reflect subtraction of background signals. At least $p < 0.05$ vs cpm by NK cells alone student's 2-tailed t-test.

Fig. 1 Stimulation of NK-cells Proliferation by incubation with p-RCC cells

