

Ocena obecności antygeny CD25 na limfocytach pacjentów chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP)

Presence of CD25 antigen on lymphocytes of patients treated for non-small cell lung cancer (NSCLC)



Paweł Rybojad¹, Jacek Tabarkiewicz², Tomasz Koncewicz¹, Grzegorz Górniewski¹, Jacek Roliński², Kazimierz Goździuk¹

¹Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej, AM, Lublin

²Zakład Immunologii Klinicznej, AM, Lublin

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2006; 3 (3): 285–289

Streszczenie

Cel: Celem przeprowadzonych badań była ocena obecności markera aktywacji CD25 na limfocytach T i B we krwi obwodowej, guzie i najbliższym guza węzle chłonnym u chorych leczonych operacyjnie z powodu NDRP.

Materiał i metody: Badaniem objęto 29 kolejnych chorych na NDRP w stopniu zaawansowania IB–IIIA poddanych radykalnej resekcji zmian nowotworowych. Ocenie poddano subpopulację limfocytów we krwi obwodowej, guzie nowotworowym i drenującym węzle chłonnym. Grupę odniesienia stanowiło 15 zdrowych ochotników, u których oceniono odsetek limfocytów we krwi obwodowej. Do oznaczenia markerów aktywacji w pobranym materiale tkankowym użyto przeciwciał monoklonalnych i cytometru przepływowego.

Wyniki: W badaniach własnych stwierdzono istotnie największy odsetek limfocytów CD4⁺/CD25⁺ w obrębie węzła chłonnego. Ich procent był wyższy w stosunku do komórek tego typu, znajdujących się we krwi. Jednocześnie odnotowano, że procent limfocytów CD4⁺/CD25⁺ był wyższy w obrębie guza w porównaniu z krwią obwodową. Różnice w poszczególnych kompartmentach nie były jednak istotne statystycznie. U chorych na NDRP stwierdzono wzrost odsetka limfocytów CD4⁺ i CD19⁺ wykazujących ekspresję antygeny CD25 oraz spadek limfocytów CD8⁺/CD25⁺ w porównaniu z osobami zdrowymi.

Wnioski: Zebrane informacje sugerują istotny udział poszczególnych subpopulacji limfocytów w przebiegu NDRP. Obniżony odsetek aktywowanych limfocytów CD8⁺ u chorych na NDRP w porównaniu z osobami zdrowymi może być związany z osłabieniem odpowiedzi komórkowej, a co za tym idzie, odpowiedzi przeciwnowotworowej. Natomiast wzrost procentu limfocytów CD4⁺ oraz CD19⁺ noszących na swej powierzchni marker CD25 u chorych w porównaniu ze zdrowymi może świadczyć o aktywacji odpowiedzi typu Th2, która może być przejawem immunosupresyjnego wpływu nowotworu.

Słowa kluczowe: CD25, limfocyty T, limfocyty B, rak płuca.

Abstract

Aim: The aim of the study was to evaluate the presence of CD25 antigen on lymphocytes in blood, tumour and lymph nodes of patients treated for NSCLC.

Materials and methods: 29 people suffering from NSCLC were included in this study (Group 1). In addition we evaluated lymphocytes in blood of 15 healthy donors (Group 2). The percentages of lymphocyte subpopulations were compared between tissue compartments and between the two groups. The evaluation was done using monoclonal antibodies and flow cytometry.

Results: We found the highest percentage of CD4⁺/CD25⁺ in lymph nodes of NSCLC patients. The percentage of CD4⁺/CD25⁺ was higher in tumour and in lymph nodes than in blood. Comparison of lymphocyte subpopulations between the two groups showed that in the blood of patients the percentages of CD4⁺/CD25⁺ and CD19⁺/CD25⁺ were higher and the percentage of CD8⁺/CD25⁺ was lower than in Group 2.

Conclusion: Lower percentage of CD8⁺/CD25⁺ in the blood of patients treated for NSCLC might be explained with weakness of cellular immunodefence which could be connected with insufficient antitumour protection. Elevated levels of CD4⁺/CD25⁺ and CD19⁺/CD25⁺ in the blood of patients may be related to activation of the Th2 defence path. This could be the result of immunosuppressive tumour activity.

Key words: CD25, T and B lymphocytes, lung cancer.

Adres do korespondencji: dr med. Paweł Rybojad, Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej, Akademia Medyczna, ul. Jaczewskiego 8, 20-095 Lublin, tel. +48 81 742 52 09, faks +48 81 742 55 06, e-mail: rybojad@wp.pl

Wstęp

Rak płuca jest od lat jednym z najważniejszych problemów współczesnej cywilizacji. Pomimo rozwoju nauk medycznych nie udało się osiągnąć istotnych postępów w jego leczeniu. Główną przyczyną jest jego skryty przebieg, co powoduje, że większość wykrywanych przypadków stanowią pacjenci, u których choroba ta jest już w wysokich stopniach zaawansowania.

Nadzieję na poprawę tego stanu rzeczy wiąże się z dynamicznym w ostatnich czasach rozwojem niektórych gałęzi wiedzy z pogranicza medycyny i biologii, takich jak immunologia i genetyka, które mogą pomóc w lepszym poznaniu i zrozumieniu procesów zachodzących w trakcie patogenezy raka płuca, a także w poszukiwaniu nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych.

Podstawą badań w dziedzinie immunologii nowotworów jest fakt, że komórki ulegające przemianie nowotworowej nabierają w jej trakcie odrębnych od komórek prawidłowych cech antygenowych, stymulujących w sposób ciągły układ immunologiczny.

Wydaje się, że w początkowej fazie rozwoju nowotworu mechanizmy nadzoru immunologicznego mogą odgrywać istotną rolę w eliminacji transformowanych komórek, których liczba nie przekracza krytycznej wielkości. Najistotniejszą rolę odgrywają tutaj komórki NK, makrofagi oraz niektóre limfocyty T cytotoksyczne. Jeżeli nowotwór ominie ten wstępny układ nadzoru, to może być następnie rozpoznany przez swoisty układ odpornościowy i wzbudzić odpowiedź humoralną i komórkową. Przeciwciała przeciw nowotworom oraz efektorowe limfocyty T współdziałają z mechanizmami nieswoistymi w walce z nowotworem [1, 2].

Dowodzono, że wykładnikiem stanu odporności organizmu może być liczba i rodzaj limfocytów o określonym immunofenotypie oraz stan ich aktywacji. Dokładne ustalenie aktualnego stanu odpowiedzi immunologicznej było niezwykle trudne do czasu, gdy odkryto determinanty CD (*cluster of differentiation*), a do diagnostyki wprowadzono cytometrię przepływową i przeciwciała monoklonalne.

Poszczególne etapy dojrzewania i aktywacji limfocytów charakteryzują się ekspresją ściśle określonych cząsteczek CD, dzięki którym możliwe stało się śledzenie procesów zachodzących w trakcie odpowiedzi immunologicznej, porównywanie ich natężenia w poszczególnych tkankach, a także zmian, jakim podlegają w zależności od zastosowanego leczenia. CD19 jest glikoproteiną występującą na wszystkich limfocytach B, niezależnie od ich stadium dojrzewania. Antygen CD4 występuje na limfocytach T, które rozpoznają antygeny MHC klasy II i najczęściej są to limfocyty pomocnicze. Częścią CD8 jest natomiast charakterystyczna dla limfocytów T, które rozpoznają antygeny prezentowane w kontekście MHC klasy I i najczęściej są to limfocyty supresorowe i cytotoksyczne. Antygen CD25 obecny jest zarówno na aktywowanych limfocytach B, jak i T. Uważany jest za pośredni marker aktywacji limfocytów [3–7].

Cel pracy

Celem przeprowadzonych badań była:

- 1) ocena ekspresji antygeny CD25 na limfocytach T (CD4⁺, CD8⁺) i B (CD19⁺) we krwi obwodowej, guzie i najbliższym guza węzle chłonny u chorych na NDRP,
- 2) porównanie odsetków badanych subpopulacji pomiędzy tkankami,
- 3) porównanie odsetków badanych limfocytów we krwi obwodowej u ludzi zdrowych i chorych na NDRP.

Materiał i metody

Badaniami objęto 29 kolejnych chorych na NDRP, w stopniu zaawansowania IB–IIIA, poddanych radykalnej resekcji zmian nowotworowych w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej AM w Lublinie.

Warunkiem włączenia do grupy badanej (grupa 1.) było ustalenie typu histopatologicznego NDRP w okresie kwalifikacji do leczenia. Chorzy ci w okresie poprzedzającego miesiąca nie wykazywali cech infekcji, nie przyjmowali leków mających wpływ na układ immunologiczny, nie mieli wykonywanej transfuzji krwi lub preparatów krwiopochodnych, nie chorowali na choroby alergiczne. Dodatkowo 15 zdrowych ochotników stanowiło grupę odniesienia (grupa 2.).

Ocenie poddano ekspresję antygeny CD25 na limfocytach T (CD4⁺, CD8⁺) i B (CD19⁺) we krwi obwodowej, guzie nowotworowym i drenującym węzle chłonny wszystkich badanych chorych.

U zdrowych ochotników zebranych w grupie 2. ocenie poddano jedynie krew obwodową.

Krew z żyły odłokciowej, w ilości 15 ml, pobierano do heparynizowanych probówek, a następnie rozcieńczano zbufozowanym roztworem soli fizjologicznej – PBS w proporcji 1:1. Węzły chłonne i fragmenty guza nowotworowego pozyskiwano w trakcie zabiegu operacyjnego. Materiał tkankowy homogenizowano, a uzyskaną zawiesinę filtrowano w celu usunięcia fragmentów tkanek. Rozcieńczoną krew oraz zawiesinę komórek z guza i węzła chłonnego nawarstwiano na preparat Gradisol L (Aqua Medica, Polska), a następnie wirowano w gradiencie gęstości przez 20 min przy przyspieszeniu 700x g. Uzyskane komórki płukano 2-krotnie w roztworze PBS, po czym oceniano ich liczbę w komorze Neubauera oraz żywotność za pomocą błękitu trepanu.

Za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur firmy Becton Dickinson, USA wyposażonego w laser argonowy o długości fali 488 nm, oceniano natężenie odpowiedniej fluorescencji i na tej podstawie określano obecność odpowiednio wyznakowanych antygenów limfocytarnych.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono za pomocą programu Statistica 5.0 PL. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± odchylenie standardowe (SD), medianę, wartość najmniejszą szeregu statystycznego (min), wartość największą szeregu statystycznego (max). Zgodność rozkładu poszczególnych zmiennych w obrębie grup z rozkładem normalnym sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Ponieważ badane zmienne nie miały

rozkładu normalnego, w dalszej analizie posłużono się testami nieparametrycznymi: U Manna Whitneya i kolejności par Wilcozona. Wyniki jako istotne statystycznie przyjmowano przy poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Wyniki

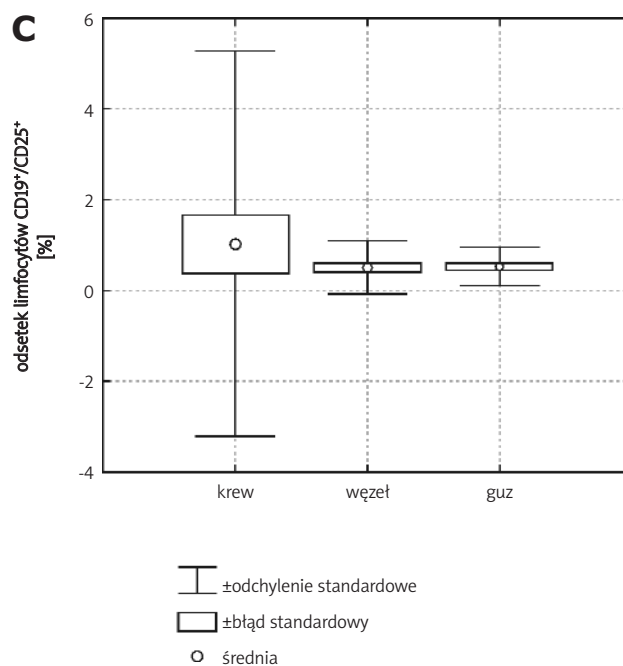
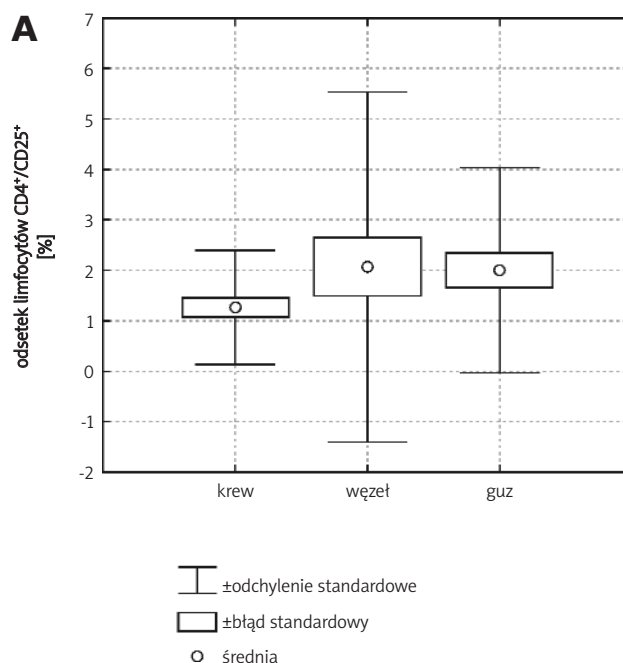
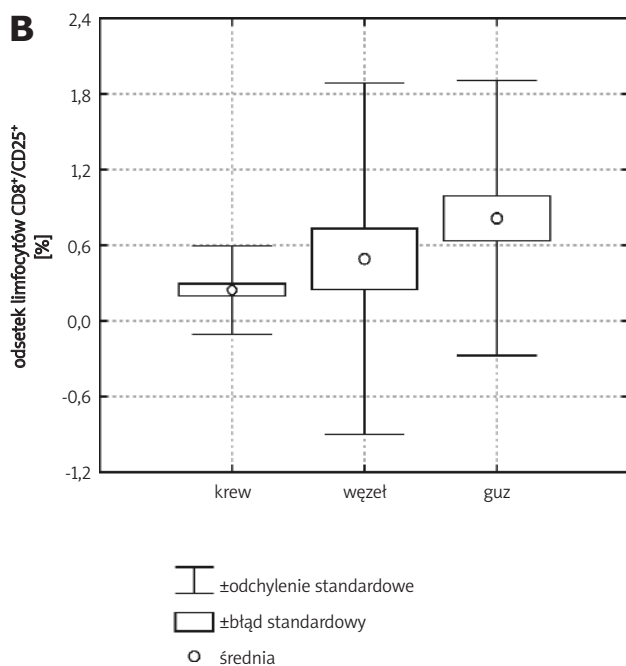
Ocena udziału poszczególnych subpopulacji limfocytów w badanych tkankach u chorych na NSCLC

Najwięcej limfocytów $CD4^+/CD25^+$ stwierdzono w obrębie węzła chłonnego ($2,33 \pm 3,94\%$, mediana = $0,81\%$). Odsetek tych limfocytów był istotnie wyższy ($p = 0,03$) w stosunku do komórek tego typu znajdujących się we krwi obwodowej ($1,03 \pm 0,98\%$, mediana = $0,54\%$). Jednocześnie ich procent był wyższy w obrębie guza nowotworowego ($2,08 \pm 2,12\%$, mediana = $1,28\%$) w porównaniu z krwią. Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic między odsetkiem limfocytów $CD4^+/CD25^+$ w guzie i węźle chłonnym. Powyższe zależności prezentuje ryc. 1a.

Odsetek limfocytów $CD8^+/CD25^+$ okazał się najwyższy w obrębie komórek naciekających zmianę nowotworową ($0,95 \pm 1,23\%$). Ich procent we krwi obwodowej ($0,18 \pm 0,25\%$, mediana = $0,06\%$) był istotnie niższy niż w guzie i węźle chłonnym ($0,62 \pm 1,63\%$, mediana = $0,14\%$), (odpowiednio $p = 0,00016$ i $p = 0,024$). Równocześnie liczba tych komórek w guzie była istotnie wyższa niż w obrębie węzła chłonnego ($p = 0,041$). Wyniki zobrazowano na ryc. 1b.

Najwięcej limfocytów $CD19^+$ mających na swej powierzchni receptor dla IL-2 ($CD25$) stwierdzono wśród ko-

mórek znajdujących się we krwi ($1,23 \pm 5,25\%$, mediana = $0,13\%$). Ich poziom był istotnie wyższy w stosunku do komórek tego typu w obrębie węzła chłonnego ($0,53 \pm 0,6\%$, mediana = $0,22\%$) i guza ($0,56 \pm 0,45\%$, mediana = $1,61\%$), (odpowiednio $p = 0,02$ i $p = 0,005$). Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic między procentem tych limfocytów w guzie i węźle chłonnym. Wyniki zilustrowano na ryc. 1c.



Ryc. 1a. – Odsetek limfocytów $CD4^+/CD25^+$ w poszczególnych tkankach u chorych leczonych z powodu NDRP; **b.** – Odsetek limfocytów $CD8^+/CD25^+$ w poszczególnych tkankach u chorych leczonych z powodu NDRP; **c.** – Odsetek limfocytów $CD19^+/CD25^+$ w poszczególnych tkankach u chorych leczonych z powodu NDRP

Porównanie odsetka badanych limfocytów we krwi obwodowej u chorych i zdrowych

Po porównaniu odsetków limfocytów charakteryzujących się poszczególnymi immunofenotypami w porównywanych grupach okazało się, że w grupie odniesienia statystycznie istotnie większy był poziom limfocytów CD8⁺/CD25⁺, ($0,36 \pm 0,31\%$, mediana = $0,19\%$), $p=0,035$. Natomiast we krwi pacjentów grupy 1. w porównaniu z osobami zdrowymi stwierdzono istotnie wyższy odsetek limfocytów CD19⁺/CD25⁺, które wynosiły ($1,23 \pm 5,25\%$, mediana = $0,13\%$), $p=0,011$. Zależności te przedstawia ryc. 2.

Dyskusja

Z powodu ciągłych trudności w zrozumieniu patogenez chorób nowotworowych, a co za tym idzie, braku wysoce skutecznych metod terapeutycznych, naturalne stało się duże zainteresowanie zastosowaniem nowych technik immunologicznych. Ich użycie pozwoliło na wyjaśnienie wielu zjawisk zachodzących w organizmie w trakcie rozwoju choroby nowotworowej [8–11].

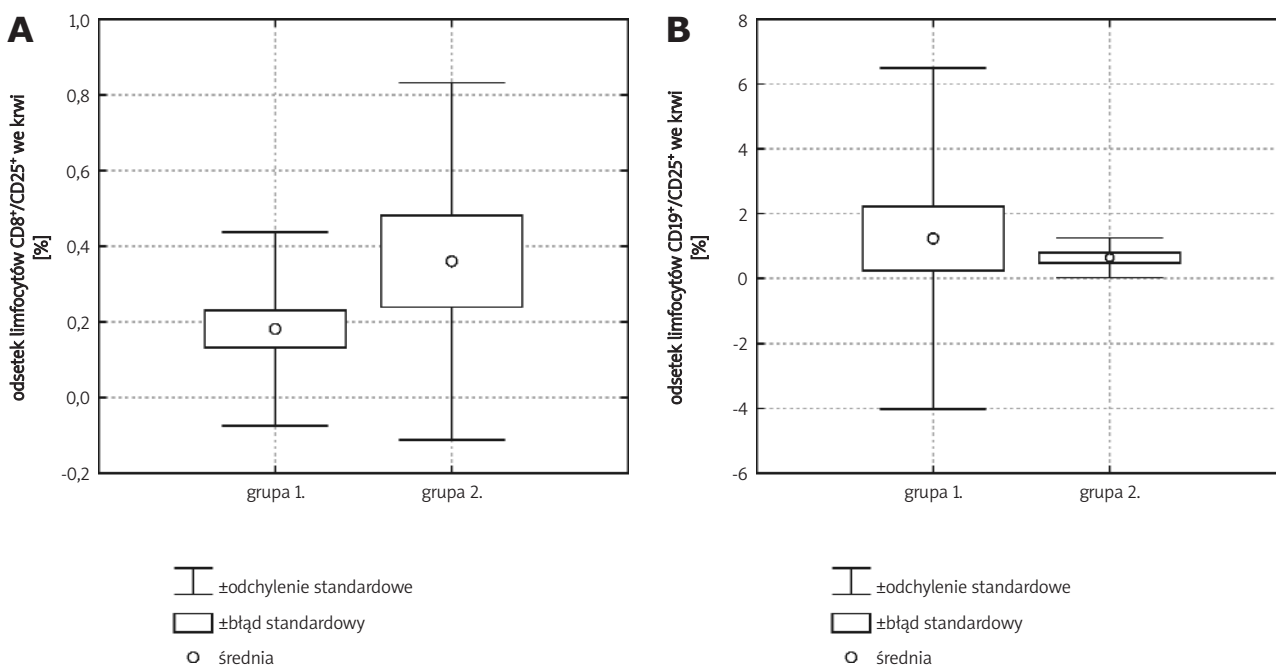
Mimo że NDRP stanowi tak ważny problem medyczny i społeczny, liczba prac odnoszących się do niego, a poświęconych zmianom poziomów poszczególnych subpopulacji limfocytów w przebiegu NDRP jest wybitnie ograniczona. Dlatego też w wielu przypadkach odnoszono uzyskane dane do aktualnego stanu badań dotyczących innych nowotworów. Dotychczasowe dane w piśmiennictwie wskazują, że obrona organizmu przeciwko nowotworom odbywa się głównie na drodze odpowiedzi komórkowej, a odpowiedź humoralna raczej sprzyja rozwojowi guza [12]. Limfocyty B biorą udział w jednej i drugiej, choć ich rola w odpowiedzi

komórkowej polega głównie na prezentowaniu antygenów limfocytom T.

W badaniach własnych wykazano, iż komórki CD19⁺ mające na swej powierzchni markery CD25 gromadzą się głównie w guzie, a najmniejszy ich odsetek znajduje się we krwi. Spostrzeżenia te wydają się odmienne w stosunku do danych z piśmiennictwa, gdzie odsetek aktywowanych limfocytów B naciekających guz był znacznie mniejszy w porównaniu z krwią obwodową [13, 14]. Należy jednak zaznaczyć, że dane opisane przez zespoły Mitropoulosa i Kowalczyka dotyczyły nowotworów nerek.

We wszystkich badanych grupach aktywowane limfocyty T noszące na swej powierzchni markery CD25 są zlokalizowane głównie w węzle chłonny i guzie, a ich średni odsetek był tam istotnie (7–8 razy) wyższy w porównaniu z krwią obwodową. Spostrzeżenia te mogą świadczyć o wysokim stopniu aktywacji w wymienionych przedziałach tkankowych. Limfocyty T po zetknięciu się z antygenami nowotworowymi ulegają aktywacji i migrują do tkanek bezpośrednio dotkniętych procesem nowotworowym, aby tam zwalczać komórki guza.

Dotychczasowe badania skupiały się przede wszystkim na roli, jaką odgrywają limfocyty CD8⁺ w obronie organizmu przeciw komórkom nowotworowym, limfocytom CD4⁺ badacze poświęcali znacznie mniej uwagi. Ostatnie badania dowiodły, że limfocyty CD4⁺ sprawują prawdopodobnie kluczową rolę w regulacji przeciwnowotworowych procesów obronnych [15, 16]. Hung i wsp. dowiedli, że usunięcie limfocytów CD4⁺, poprzez blokadę odpowiednimi przeciwciałami lub eliminację genetyczną, powoduje brak odpowiedzi przeciwnowotworowej zarówno poprzez mechanizmy związane z limfocytami CD4⁺, jak i komórkami CD8⁺ [15, 17].



Ryc. 2a. – Porównanie odsetka limfocytów CD8⁺/CD25⁺ we krwi pacjentów leczonych z powodu NDRP i osób zdrowych; b. – porównanie odsetka limfocytów CD19⁺/CD25⁺ we krwi pacjentów leczonych z powodu NDRP i osób zdrowych

Porównując rozkład odsetków aktywowanych limfocytów T CD8⁺, stwierdzono, że zawartość procentowa limfocytów CD8⁺/CD25⁺ była największa w obrębie guza, mniejsza w węzle chłonnym, a najmniejsza w obrębie krwi obwodowej. Spostrzeżenia te mogą świadczyć o wysokim stopniu aktywacji limfocytów T CD8⁺ w obrębie guza i węzła chłonnego, a co za tym idzie, o skutecznej odpowiedzi komórkowej zachodzącej w obrębie tych tkanek.

Z analizy powyższych wyników można wysnuć przypuszczenie, że aktywowane limfocyty T – CD8⁺ i CD4⁺ gromadzą się głównie w tkankach bezpośrednio dotkniętych procesem nowotworowym, a więc w guzie i węzle chłonnym. Podobne wyniki otrzymały zespoły badawcze pod kierownictwem Riemann, Kuo i Mazzoccoli [1, 10, 18] u chorych na raka płuca oraz zespół Kowalczyka u pacjentów z rakiem nerki [13].

Porównując poszczególne subpopulacje aktywowanych limfocytów w grupie 1. w stosunku do grupy kontrolnej, istotne statystycznie różnice stwierdzono w procentowej zawartości limfocytów CD8⁺/CD25⁺ i CD4⁺/CD25⁺, których większy odsetek zanotowano we krwi zdrowych ludzi, oraz CD19⁺/CD25⁺, których procent przeważał u pacjentów z grupy 1. Przewaga odsetka limfocytów CD19⁺/CD25⁺ we krwi obwodowej u chorych na NDRP może być przejawem immunosupresyjnego wpływu nowotworu poprzez aktywację odpowiedzi, w której główną rolę sprawują limfocyty pomocnicze Th2. Produkują one cytokiny będące czynnikami wzrostu i różnicowania limfocytów B i wspomagają głównie odpowiedź humoralną, która jest uznawana za sprzyjającą rozwojowi guza [19, 20].

Wytłumaczeniem, dlaczego aktywowane limfocyty CD8⁺/CD25⁺ i CD4⁺/CD25⁺ występują w większym odsetku we krwi ludzi zdrowych, może być fakt, że u chorych na NDRP aktywowane limfocyty T gromadzą się w tkankach wciągniętych bezpośrednio w proces nowotworowy, a więc w guzie i węzłach chłonnych. U zdrowych osób aktywowane limfocyty krążą we krwi, oczekując na sygnał do działania.

Ostatnio jest prowadzonych wiele badań nad zastosowaniem szczepionek przeciwnowotworowych z użyciem antygenów rakowych. Kliniczna skuteczność tej terapii jest jednak ograniczona, pomimo że większość pacjentów ma prekursorów limfocytów specyficznych dla antygenów użytych w szczepieniach. Możliwe, że odsetkowa przewaga limfocytów T regulujących odpowiedzialna jest za słabą odpowiedź na to leczenie. W wielu badaniach wykazano, że zredukowanie poziomu limfocytów CD4⁺/CD25⁺ w obrębie nacieku nowotworowego powodowało zwiększenie odpowiedzi związanej z limfocytami CD8⁺, prowadzącej do odzrucenia guza [21, 22].

Wnioski

Zebrane informacje sugerują istotny udział poszczególnych subpopulacji limfocytów w przebiegu NDRP. Obniżony odsetek aktywowanych limfocytów CD8⁺ u chorych na NDRP w porównaniu z osobami zdrowymi może być

związany osłabieniem odpowiedzi komórkowej, a co za tym idzie, odpowiedzi przeciwnowotworowej. Natomiast wzrost procentu limfocytów CD4⁺ oraz CD19⁺ noszących na swej powierzchni marker CD25 u osób chorych w porównaniu ze zdrowymi może świadczyć o aktywacji odpowiedzi typu Th2, która może być przejawem immunosupresyjnego wpływu nowotworu.

Praca wyróżniona przez Komitet Naukowy III Kongresu Polskiego Towarzystwa Kardio-Torakochirurgów, Wrocław, 18–20.05.2006.

Piśmiennictwo

1. Kuo SH, Chang DB, Lee YC, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer are activated T lymphocytes. *Respiratology* 1998; 3: 55-9.
2. Maine GN, Mule JJ. Making room for T cells. *J Clin Invest* 2002; 15: 157-9.
3. Hol B, Hintzen R, Van Lier R, et al. Soluble and cellular markers of t cell activation in patients with pulmonary sarcoidosis. *Amer Rev Resp Dis* 1993; 148: 643-9.
4. Kahn M, Sugawara H, McGowan P, et al. CD4+ T cell clones specific for the human p97 melanoma associated antigen can eradicate pulmonary metastases from a murine tumor expressing the p97 antigen. *J Immunol* 1991; 146: 3235-42.
5. Smith KA. The interleukin 2 receptor. *Annu Rev Cell Biol* 1989; 5: 397-425.
6. Vilella R, Mila J, Sole J, et al. Sequential appearance of the activation antigens. *Leucocyte typing IV*. Oxford University Press 1989: 495-8.
7. Woo Y, Yeh H, Chu CS, et al. Cutting edge: regulatory t cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 2002; 168: 4272-6.
8. Cottrell JJ, Freeson PF. Preoperative assessment of the thoracic surgical patient. *Clin Chest Med* 1992; 13: 47-56.
9. Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* 1991; 49: 281-355.
10. Mazzoccoli G, Grilli M, Caroughi S, et al. Immune systems alterations in lung cancer patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003; 16: 167-74.
11. Michalek J, Buchler T, Hajek R. T Lymphocyte therapy of cancer. *Physiol Res* 2004; 53: 463-9.
12. Barbera-Guillem E, Nelson MB, Barr B, et al. B lymphocyte pathology in human colorectal cancer. Experimental and clinical therapeutic effects of partial B cell depletion. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 48: 541-9.
13. Kowalczyk D, Skorupski W, Kwias Z. Flow cytometric analysis of TIL in patients with renal carcinoma. *Br J Urol* 1997; 80: 543-7.
14. Mitropoulos D, Kooi S, Rodriguez-Villanueva J, et al. Characterization of fresh (uncultured) tumor-infiltrating T lymphocytes (TIL) and TIL-derived T cell lines from patients with renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 321-7.
15. Bennett SR, Carbone FR, Karmalis F, et al. induction of a CD8+ cytotoxic t lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med* 1997; 186: 65-70.
16. Manici S, Sturnilo MA, Imro J, et al. Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4+ cytotoxic cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J Exp Med* 1999; 189: 1965-71.
17. Cho Y, Miyamoto M, Kato K, et al. CD4⁺ and CD8⁺ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1555-9.
18. Riemann D, Wenzel K, Schulz T, et al. Phenotypic analysis of T lymphocytes isolated from non-small-cell lung cancer. *Int Arch Immunol* 1997; 114: 38-45.
19. Ito N, Nakamura H, Metsugi H, et al. Dissociation between T helper type 1 and type 2 differentiation and cytokine production in tumor-infiltrating lymphocytes in patients with lung cancer. *Surg Today* 2001; 31: 390-4.
20. Van den Hove LE, Van Gool SW, Van Poppel H, et al.: Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumor-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 501-9.
21. Nagai H, Hara T, Horikawa M, et al. Elimination of CD4⁺ T cells enhances anti-tumor effect of locally secreted interleukin-12 on B16 mouse melanoma and induces vitiligo-like coat color alteration. *J Inv Dermatol* 2000; 115: 1059-64.
22. Onizuka S, Tawara J, Shimizu S, et al. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999; 59: 3128-33.