

國立臺灣大學醫學院口腔生物科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Oral Biology, College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討口腔鱗狀上皮細胞癌中表現

B7-H1和PD-1之浸潤T淋巴球

Identification of B7-H1 and PD-1 expressing T cells
infiltrated in human oral squamous cell carcinoma



Yu-Chih Ou

指導教授：賈景山 博士

Advisor: Jean-San Chia, Ph.D.

中華民國九十八年七月

July, 2009

國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

探討口腔鱗狀上皮細胞癌中表現

B7-H1和PD-1之浸潤T淋巴球

Identification of B7-H1 and PD-1 expressing T cells
infiltrated in human oral squamous cell carcinoma

本論文係歐育志君 (R96450009) 在國立臺灣大學口腔生物科學研究所完成之碩士學位論文，於民國九十八年六月二十四日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明



指導教授 賈景山博士

口腔生物科學研究所所長 郭彥彬博士

口試時間 中華民國九十八年六月二十四日

致謝

這兩年的台大研究生活非常的充實，首先感謝賈景山教授讓我接觸臨床的研究工作，讓我不只是學到實驗的技術，還有很多的邏輯思考和待人處世的方式，感謝許秉寧老師和李建國老師對我論文以及口試所給的指導，感謝秋月學姐對我實驗技術、實驗方向和論文思考所給予的指導，感謝珮茹學姐和淑惠學姐在我剛進實驗室時對我的耐心指導，感謝惠婷學姐、筱菁學姐、佩旻學姐，感謝奇玄學長、達哥、韋君學姐、雅婷學姐、宛伶、中帆、旻潔、鴻偉，感謝我母親以及姐姐的支持，最後感謝律穎的陪伴。



摘要

在口腔中超過95%的惡性腫瘤為口腔鱗狀上皮細胞癌，並且為台灣六大常見侵襲癌症死因之一。人類產生在不同器官或組織的癌症，其疾病起因除了基因毒性和致癌基因突變外，免疫編輯(immune-editing)也被視為一個重要的因素，目前已經有研究指出調節性T細胞(Tregs)和表現抑制性B7分子的細胞對於腫瘤微環境的免疫抑制以及腫瘤生長都有貢獻。在本論文中發現口腔癌腫瘤組織抑制性B7-H1分子和調節性T細胞的表現相關性，接著分析口腔癌病人表現抑制性B7-H1分子的腫瘤浸潤調節性T細胞。研究發現腫瘤組織CD4+CD25+Foxp3+調節性T細胞有88.08%表現B7-H1，比起病人PBMC(64.71%)($p=0.001$)和正常人PBMC(73.78%)($p=0.04$)都高出許多，並且發現腫瘤組織B7-H1+Foxp3+和Foxp3+細胞之百分比在TIL呈現中度相關($r=0.61$)，而在CD4+ T細胞內則是呈現高度相關($r=0.75$)。TIL內CD4+ CD25+Foxp3-活化T細胞之B7-H1接受體PD-1(programmed death-1)的平均表現螢光表現強度大約是PBMC的六倍高，CD4+CD25-Foxp3-未活化T細胞在TIL大約是PBMC的五倍高，然而CD4+CD25+Foxp3+調節性T在TIL大約只有PBMC的二倍高，並且發現B7-H1+Foxp3+表現百分比和PD-1表現強度在腫瘤組織CD4+T細胞($r=0.6$)具有中度相關性。此外在組織免疫染色也發現，口腔癌腫瘤組織中有Foxp3+ B7-H1+、Foxp3+ B7-H1-和PD-1+的浸潤T細胞。因此本論文發現有表現共同抑制性B7-H1分子的調節性T細胞亞群，浸潤於口腔鱗狀上皮細胞癌中，並且可能是藉由和PD-1的結合而具有免疫調節的功能。

Abstract

Oral squamous cell carcinoma(OSCC) accounts for over 90% of the oral malignant neoplasms, ranks as the sixth major cause of cancer mortality rate in Taiwan and the incidence rate is raising. In addition to mutation of oncogene and gene toxicity, the cancer immune-editing is one of the important factors in human cancer currently. The regulatory T cell and high levels of expression of coinhibitory B7 molecules are the mediators of immunosuppression in tumor microenvironment. Therefore, we investigated the relationship of B7-H1 and regulatory T cells in human oral squamous cell carcinoma. The results indicate that, in TIL, proportion of distinct CD25⁺ Foxp3⁺ cells in the CD4⁺ subset (88.08%) were enriched relative to that found in PBMC (64.71 %) from OSCC patients($p= 0.001$) and PBMC(73.78%) from healthy donor ($p=0.04$). The linear correlation analysis indicated that Foxp3⁺ and B7-H1⁺Foxp3⁺ Tregs were positively correlated in TIL($R=0.61$) and CD4⁺ T cell($R=0.75$). The PD-1 (the receptor of B7-H1) average expression on CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ in TIL is five- or six-fold to PBMC, but it is only two fold in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell. The linear analysis indicated that PD-1 average expression and proportion of B7-H1⁺Foxp3⁺ Tregs on CD4⁺T cell were positively correlated ($R=0.60$). Furthermore, we also observe the B7-H1⁺ Foxp3⁺Tregs and PD-1⁺ T cell in the immunohistochemistry. Therefore, B7-H1⁺Tregs and PD-1⁺ T cell infiltrated in tumor may play a immunoregulatory role in oral squamous cell carcinoma.

目錄

口試委員會審定書.....	1
致謝.....	2
中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
目錄.....	5
第一章、緒論	
第一節、研究背景	
一、口腔鱗狀上皮細胞癌.....	9
二、口腔癌免疫抑制作用.....	11
三、調節性 T 細胞(regulatory T cells).....	12
四、抑制性B7分子(inhibitory B7 molecules).....	15
第二節、研究動機與目的.....	20
第二章、實驗分法與材料	
第一節、檢體的收集及來源.....	21
第二節、人類口腔鱗狀上皮細胞癌組織內淋巴球的分離與純化.....	22
第三節、人類周邊血液單核球的分離與純化.....	22
第四節、細胞表面染色.....	23
第五節、細胞內染色.....	23
第六節、腫瘤組織和正常組織之 RNA 萃取.....	24
第七節、即時定量聚合酶連鎖反應(real-time PCR).....	24
第八節、口腔癌組織及正常人組織的包埋和冷凍切片.....	24
第九節、組織免疫染色.....	25

第十節、反應性 T 細胞及調節性 T 細胞篩選分離方法及細胞增生和抑制試驗
.....25

第十一節、周邊血液單核球與口腔鱗狀癌細胞株體外共同培養方法.....26

第三章、 結果

第一節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤CD4+CD25+淋巴球，其
B7-H1 共同抑制分子的細胞表現百分比和表現強度.....27

第二節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤 CD4+T 細胞，B7-H1 和
Foxp3、CD25 之表現有相關性.....27

第三節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤 CD4+Foxp3+調節性 T 細胞
表現較高比例且較高量的 B7-H1，且 B7-H1+Foxp3+細胞和 Foxp3+細
胞有相關性.....28

第四節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤 CD4+CD25+Foxp3+調節性
T 細胞表現較高比例且較高量的 B7-H1.....29

第五節、口腔鱗狀細胞癌腫瘤組織 CD4+CD25+Foxp3-和 CD4+CD25-Foxp3-T
細胞表現較高量的 PD-1，且 CD25+Foxp3+B7-H1+ T 細胞和
Foxp3-PD-1+ T 細胞有相關性.....30

第六節、口腔鱗狀細胞癌細胞株 SAS 誘導 CD4+CD25+細胞之 B7-H1 表現
.....31

第七節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤 B7-H1+CD4+CD25+
Foxp3+細胞表現較高比例且較高量的 ICOS.....31

第八節、腫瘤組織表現較高量B7-H1、Foxp3、IL-10、IFN- γ 、CD4、PD-1、
B7-DC和B7-H4之RNA，且Foxp3和B7-H1有相關性.....32

第九節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出調節性T細胞具有抑制細胞增生的功能.....	32
第四章、討論.....	34
第五章、參考文獻.....	38
第六章、圖表	
圖一、PBMC 和 TIL CD4+CD25+T 細胞之 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度.....	50
圖二、統計 PBMC 和 TIL 的 CD4+CD25+T 細胞之 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度.....	51
圖三、TIL CD4+CD25high、intermediate、low、negative T 細胞之 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度.....	52
圖四、PBMC 和 TIL CD4+Foxp3+ T 細胞之 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度.....	53
圖五、統計 PBMC 和 TIL CD4+Foxp3+ T 細胞的 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度.....	54
圖六、腫瘤組織 Foxp3+B7-H1+T 細胞和 Foxp3+T 細胞的相關性.....	55
圖七、PBMC 和 TIL 的 CD4+CD25+Foxp3+、CD4+CD25+Foxp3-、CD4+CD25-Foxp3- T 細胞之 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度.....	56
圖八、統計 PBMC 和 TIL 的 CD4+CD25+Foxp3+、CD4+CD25+Foxp3-、CD4+CD25-Foxp3- T 細胞之 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度.....	57
圖九、PBMC 和 TIL 的 CD4+CD25+Foxp3+、CD4+CD25+Foxp3-、CD4+CD25-Foxp3- T 細胞之 PD-1 共同抑制分子的細胞螢光表現強度.....	58

圖十、腫瘤組織 Foxp3+B7-H1+T 細胞和 PD-1 T 細胞的相關性.....	59
圖十一、口腔鱗狀細胞癌腫瘤組織經組織切片和免疫染色所見到的 CD4+CD25+ Foxp3+B7-H1+調節性 T 細胞和 PD-1 浸潤細胞.....	60
圖十二、口腔鱗狀細胞癌細胞株 SAS 誘導 CD4+CD25+T 細胞之 B7-H1 表 現.....	61
圖十三、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤 CD4+Foxp3+細胞的 B7-H1 和 ICOS 表現相關性.....	62
圖十四、在腫瘤組織 RNA level B7-H1 和相關分子的表現量以及其相關性	63
圖十五、口腔鱗狀細胞癌病患之 PBMC CD4+CD25hi 細胞的細胞增生抑制試 驗.....	64
附圖一、調節性 T 細胞免疫抑制機制.....	65
附圖二、B7 分子的表現和功能.....	65

第一章、緒論

第一節、研究背景

一、 口腔鱗狀上皮細胞癌(oral squamous cell carcinoma)

癌症的發生是由於基因的突變或缺失，使得原本正常的細胞轉型變成持續不斷生長的癌細胞，口腔癌就是屬於口腔及口咽部任何一部位所發生的癌症。口腔包括的部位有唇、頰黏膜（唇和臉頰的內襯）、牙齒、齒槽、舌頭下方的口腔底部、前三分之二的舌頭、口腔頂部的前面部分（硬顎）、牙齦及智齒後方的小區域，口咽部則包含了後三分之一的舌頭、軟顎、扁桃腺及喉嚨後壁，另外唾液腺遍布口腔並製造唾液，以保持口腔的濕潤及幫助消化食物，其中口腔癌發生的部位以舌部和頰黏膜最多。口腔癌從組織學上可分為有鱗狀細胞癌(squamous cell carcinoma)、疣狀癌、腺樣囊狀癌、黏液表皮樣癌、黑色素瘤，其中又以鱗狀細胞癌佔絕大多數(約佔90%)(Hunter et al., 2005)。

在臺灣地區，根據 2009 年行政院衛生局癌症資料統計，口腔癌是男女兩性癌症發生率之第六名，而且高居男性癌症發生率的第四名(Department of Health, 2009)。2009 年的死亡原因統計資料則顯示，口腔癌在台灣癌症死亡率排名從 1981 年的第十一位，到 1996 年上升至第七位，近來在 2009 年則再上升至第六位，其中男性死亡率更是由原本的第八位上升至第四位，死亡成長率 16.91%，為惡性腫瘤之首。口腔癌的發生率及死亡率近年以來節節上升，並且超過了鼻咽癌，不僅罹病平均年齡下降，而且每年發現的新病例及死亡人數都超過千人，已成為國人頭頸部癌症的第一位，由此可見口腔癌對台灣人民健康威脅之嚴重性。

台灣地區口腔癌好發年齡集中於 40 歲至 70 歲，平均年齡 54 歲，其中男性 52 歲、女性 53 歲，兩者無顯著差別，而發生於男女之比率為 3:1，其中男性相對比較容易罹患口腔癌，可能是由於 90% 以上口腔癌病患有嚼檳榔習慣，也因此顯示嚼檳榔在台灣地區的口腔癌佔極關鍵地位。罹患口腔鱗狀上皮細胞癌的原因，一直都是多因性，在歐美國家和日本族群中，抽煙和酗酒是口腔癌最主要的風險因子 (LaVecchia et al., 1997)；而在臺灣和東南亞國家口腔癌的高發生率與咀嚼檳榔的習性有關。

臺灣地區檳榔的成分含有檳榔子 (areca nut)、荖花 (unripened fruit of *Piper* Linn)、荖葉 (betel leaf of *Piper* Linn)、荖籐 (*Piper betle* Linn)、石灰 (slaked lime) 及香料。檳榔子成分中的檳榔鹼 (arecaidine) 和檳榔素 (arecoline)，對於體外培養的人類面頰上皮細胞，有遺傳毒性致癌作用 (Shirname et al., 1983; Shirname et al., 1984)，並且會導致發生 DNA 受損機率增加 (Dave et al., 1992)，具有致突變性的潛力。此外檳榔萃取物也會促使口腔黏膜細胞合成膠原蛋白質的量增加，使分解及吞食膠原蛋白質的能力下降，形成過量之膠原纖維堆積，而產生口腔癌前病變。荖花內含致癌物黃樟素 (safrole)，荖葉的致突變性潛力很低，荖籐則是在長期嚼食情況下，可能產生強烈化學性刺激的亞硝基致癌物質。紅灰和石灰會使口腔環境變成鹼性，在鹼性環境檳榔塊中一些成份會釋放出一些游離基，而游離基易引起細胞變性。因此檳榔中複雜的成份，會使口腔產生癌前病變，像是口腔黏膜纖維化、白斑、紅斑、疣狀增生等等，如果再加上酒精和香菸對於口腔黏膜刺激產生的協同作用 (Lee et al., 2003)，很容易就會導致口腔癌的發生。

分析鱗狀細胞癌相關基因和分子的變異，在東南亞地區不同於西方地區人口，有族群之間的差異性 (Scully et al., 2000)。因此可以推測，台灣地區人口罹患口腔鱗狀上皮細胞癌，也可能由於種族和地區的區別，存在不同的免疫調節或免疫抑制作用。

二、口腔癌免疫抑制作用(immunosuppression)

免疫編輯(immunoediting)在致癌機轉中扮演重要角色，即是癌病變組織會引導周圍環境，形成一個抑制型免疫反應，藉此讓癌細胞擴散(Kim et al., 2007)。免疫編輯過程大致分為三個時期:排除癌細胞時期(elimination phase)、癌細胞和宿主免疫系統平衡時期(equilibrium phase)，以及癌細胞逃離宿主免疫系統時期(escape phase)。排除時期(elimination phase)代表免疫監測(immunosurveillance)的概念，免疫系統去除變異的癌細胞，在平衡時期(equilibrium phase)，則是免疫細胞和腫瘤細胞之間互相作用，之後的逃離宿主免疫系統時期(escape phase)，腫瘤細胞誘發免疫抑制使免疫細胞死亡或是呈現不活化狀態，也可能腫瘤細胞變異或是減少免疫性，使得只有少數的免疫細胞能辨識毒殺腫瘤細胞，造成腫瘤持續生長侵略的環境。

近年來有研究指出免疫抑制和口腔鱗狀上皮細胞癌的發生是具有關連性，在肝臟移植和骨髓移植的病人具有免疫抑制作用產生後，患者會有口腔白斑癌前病變產生(Hernandez et al., 2003)，甚至會導致口腔癌(Bhatia et al., 2001)。此外參與對抗腫瘤的免疫細胞，主要有自然殺手細胞(NK cell)和毒殺型T細胞(cytotoxic T-cell)，在頭頸癌轉移的病人中，發現多數的自然殺手細胞、及T細胞具有較低的毒殺能力(Schantz et al., 1986)，或是其功能根本被口腔癌細胞所抑制(Jewett et al., 2006; Laad et al., 1996)。而且研究顯示頭頸癌病患的周邊血液，其自然殺手細胞、T細胞、樹突細胞以及腫瘤浸潤的淋巴細胞，皆發現有不正常訊息傳遞路徑，也會誘發細胞自然凋亡和使細胞增生能力降低(Hoffmann et al., 2002b; Reichert et al., 2002)，其可以作為免疫細胞受腫瘤抑制的指標(Hoffmann et al., 2002a)。儘管如此，關於口腔鱗狀細胞癌免疫抑制的調節機制仍然不是非常清楚，因此癌症的免疫抑制作用成為癌症治療的熱門研究主題。

目前的研究指出，跟癌症免疫抑制有相關的分子和細胞分為三類，(1)失去功能的抗原呈現細胞(antigen-presenting cells)，包括樹突狀細胞(dendritic cells)、巨食細胞(macrophage)和骨髓性抑制細胞(myeloid-derived suppressor);(2)調節性T細胞(regulatory T cells);(3)高度表現抑制性B7分子的免疫細胞(抗原呈現細胞、T和B細胞)、腫瘤細胞(tumor cell)、基質細胞(stroma cell)，這些分子和細胞被認為和腫瘤逃避免疫系統攻擊有高度的相關性(Zou et al., 2008)。

三、調節性T細胞(regulatory T cells, Tregs)

免疫的耐受性調節可以分為兩種，分別是在初級淋巴組織(primary lymphoid organs)所進行細胞族群刪除(clonal deletion)的中樞耐受性(central tolerance)，以及在人體周邊由調節性T細胞所維持的周邊耐受性(peripheral tolerance)。調節性T細胞(regulatory T cell, Tregs)是一群具有負調節機體免疫反應的淋巴細胞，可以維持自體抗原的耐受性和避免免疫反應過度。這群具有負調節功能的細胞，1970年Gershon等人曾命名為抑制T細胞(suppressor T cell)，因為缺乏明確的表面標誌，研究長期處於停滯不前的困境；直到1995年Sakaguchi等人，提出自體耐受性(self-tolerance)主要是藉由一群CD4⁺ CD25⁺ T淋巴細胞執行，而這群細胞被稱之為調節性T細胞(Sakaguchi et al., 1995)。2001年Bennett等人研究IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked)自體免疫疾病時，發現病人有轉錄因子Foxp3的基因缺失(Bennett et al., 2001)，並且在日後研究也發現Foxp3和調節性T細胞的分化(Wan et al., 2007)、抑制功能、細胞增生以及細胞代謝(Gavin et al., 2007; Lin et al., 2007)有關聯性，而Foxp3在調節性T細胞的表現可以維持其表現型和抑制功能 (Williams et al., 2007)，因此Foxp3的表現普遍被認定是調節性T細胞的特徵。

老鼠體內調節性T細胞的研究，目前已有三種不同的CD4調節性T細胞並被明確的歸類，根據其表面標記特徵、產生細胞的來源和作用機制的不同，可分為CD4+CD25+Foxp3+調節性T細胞、Tr1細胞和Th3細胞等多種亞型。根據細胞的來源，可分為從胸腺發展而成的自然調節性T細胞CD4+CD25+Foxp3+Treg (natural occurring Treg)(Sakaguchi, 2004)，和在體表經由誘導產生的Tr1細胞和Th3細胞(Walker et al., 2003)。自然調節性CD4+CD25+Foxp3+Treg是目前研究較為徹底的亞型，在正常人和小鼠的外周邊血及脾臟組織的CD4+T細胞，佔有5-10%(Zou, 2006)，並且在細胞表面持續表達CD25分子（即為IL-2受體 α 鏈），更具有專一性的標記因子Forkhead or winged helix of transcription factor P3，簡稱Foxp3/FOXP3，此為轉錄因子與調節性T細胞的生成及功能有關(Hori et al., 2003)，此外有研究指出老鼠的調節性T細胞會表現GITR (glucocorticoid-induced tumour-necrosis factor (TNF)-receptor related protein)和CTLA4(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4)，CTLA4會和活化T細胞上的B7分子結合，藉此抑制T細胞的活化或細胞激素之生成，有助於研究老鼠的調節性T細胞和發展免疫治療。自然調節性T細胞CD4+CD25+Foxp3+其抑制的對象可能是功能性T細胞或是樹突狀細胞，其抑制的機制可以藉由分泌抑制型細胞激素（IL-10、IL35、TGF- β ）、分泌穿孔素和顆粒酵素分解細胞、CD25競爭功能性T細胞活化所需的細胞激素IL-2以及一些未知分子使得功能性T細胞之細胞周期停滯，另一方面自然調節性T細胞也可能藉由CTLA4、LAG-3以及一些代謝物的形成（IDO等等），抑制樹突狀細胞的成熟和協同刺激(Shevach et al, 2009; Vignali et al, 2008)（附圖一）。在體表誘導產生的CD4+CD25+Treg和自然調節性T細胞表現的特徵相似，可以從非調節性的CD4+T細胞誘導產生(Bluestone et al, 2003)，第一型調節性T細胞(type 1 regulatory T cell, Tr1)，為另一類亞型的CD4+Treg，Tr1不會表現或是表現低量CD25表面分子，是屬於Foxp3-的細胞，和CD4+CD25+Treg表現的特徵不同(Maynard et al., 2007; Strauss et al., 2007a)，但能產生高量的IL-10、適量的TGF- β 、少量的IL-2、IFN- γ ，

但不產生IL-4 (Roncarolo et al., 2006), 藉此也能與Th1和Th2之間作區別, Tr1需在IL-10存在情況下誘導產生, 細胞抑制免疫反應的主要機制, 是藉由產生具有免疫調節功能的細胞激素IL-10和TGF- β 。另一種為Th3細胞, Th3型調節性T細胞, 是在研究口服耐受機制的過程中發現的, 主要分泌TGF- β 來調節免疫功能, 對Th1和Th2都具有抑制作用(Weiner, 2001)。

最早人類調節性T細胞的研究中, 人類非小細胞肺癌也發現到CD4+CD25+調節性T細胞, 在腫瘤組織內有增加的情形(Woo et al., 2001), 類似的研究也發表在卵巢癌(Curiel et al., 2004)、乳癌及胰臟癌(Liyanage et al., 2002)、胃癌與食道癌(Ichihara et al., 2003), 且這些浸潤於腫瘤組織內的調節性T細胞, 有抑制同源性T細胞的能力(Woo et al., 2002)。Curiel等人發現在人類卵巢癌, 大量CD4+CD25+FOXP3+Treg存在腫瘤內, 會抑制腫瘤抗原特異性T細胞的活化及增生, 直接證實調節性T細胞會在腫瘤不斷發展期間累積於腫瘤組織內, 且這樣的調節性T細胞有助於腫瘤生長(Curiel et al., 2004)。最近研究顯示出調節性T細胞, 造成的免疫抑制反應是一個腫瘤躲避免疫的關鍵機制, 且成為主要阻礙腫瘤免疫治療的細胞(Curiel, 2007)。在早期人類調節性T細胞的研究中, 高度表現CD25的細胞(CD25^{high/bright})具有較強的抑制能力(Baecher-Allan et al., 2001), 約佔CD4+T細胞的1-2%, 然而健康的個體體內, 不表現CD25^{high} Foxp3^{high} T細胞群, 且發現有CD25^{low} Foxp3^{low}的細胞亞群, 因此一般研究都認定CD25^{high} Foxp3^{high} T細胞為具有抑制功能的調節性T細胞。

調節性T細胞在小鼠癌症模型中已廣泛研究, 並且明確定義出調節性T細胞及其參與作用, 但是在人體的免疫中, 不同調節性T細胞亞群表現的細胞激素和抑制作用, 仍然沒有很明確的研究結果。近年來在頭頸部鱗狀上皮細胞癌中指出, 在腫瘤組織浸潤淋巴球中, 發現有高量的CD25^{high}Foxp3⁺抑制型T細胞存在

(Strauss et al., 2007b), 並且指出頭頸部鱗狀上皮細胞癌病人的CD4+CD25high細胞亞群, 具有抑制T細胞活化生長的能力, 且其抑制T細胞生長之能力比健康人的CD4+CD25high細胞亞群更佳。

T淋巴球的活化及免疫功能被輔助刺激分子(co-stimulatory molecules)所調節, CD28作為B7基因產物的接收器, 主要功能為起始T細胞的免疫反應; CTLA-4與B7基因產物有更高度的親和力, 在T細胞活化後被誘導而表現, 主要功能為負調節T細胞的免疫反應; 誘導性輔助刺激分子(inducible costimulatory molecule; ICOS)屬於CD28/CTLA-4家族第三成員, 主要表現在已活化的T細胞, 研究顯示ICOS^{-/-}細胞在體外培養失去活化以及增生的能力, 此外, ICOS對於T細胞priming以及產生Th2細胞激素扮演關鍵的角色。近期研究發現黑色素瘤病患, 其腫瘤浸潤淋巴細胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)中分離出的CD4+CD25+Foxp3+調節性T細胞會高度表現inducible costimulatory molecule(ICOS), 並且證實這群ICOS+Foxp3+nTregs其功能會相似表現IL-10的Tr1細胞(Ito et al., 2008), 之後, 自然調節性T細胞更直接被區分為ICOS+Foxp3+Treg與ICOS-Foxp3+Treg, 並且在研究中指出ICOS+Foxp3+Treg可藉由表現IL-10抑制樹突細胞的功能以及表現TGF- β 抑制T細胞的功能, 然而, ICOS-Foxp3+Treg只會表現TGF- β 。不僅是功能上有所差異, 這兩群調節性細胞在調控自身的存活與增殖上也有不同的特性。

四、抑制性B7分子(inhibitory B7 molecules)

免疫系統在正常的情況下, 抗原呈現細胞(APCs)會吞噬抗原(antigen), 經過組裝後抗原呈現細胞會將主要組織相容性複合體-抗原複合物(major histocompatibility complex, MHC-antigen complex), 呈現給T cell receptor(TCR) (Jenkins et al., 1987), 然而要完全活化T細胞, 還必須靠抗原呈現細胞上的共同刺激分子(costimulatory molecules) B7-1(CD80)和B7-2(CD86), B7-1和B7-2與T細胞表面的

CD28相互作用(Azuma and Freeman,1993),這樣的結合可以給與T細胞第二活化的訊息,使得T細胞可以被完全活化,引發下游的免疫反應。為了避免T細胞的過度活化,T細胞自身會表現另一個可以和CD28競爭CD80、CD86的接受體CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4),CTLA-4會負向的調控T細胞增生(Linsley et al,1991),所以T細胞的活化,可以由正向和負向的訊息維持巧妙的平衡。

活化T細胞所表現的CD28及CTLA-4具有相同的配體,即是B7分子(CD80、CD86),最近新的研究發現B7分子有基因同源性的相似分子,這些分子被歸類為B7家族的成員,目前所被研究的B7家族有七個成員,分別為B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、B7h(B7-H2)、PD-L1(PD-ligand1)(B7-H1)、PD-L2(PD-ligand2)(B7-DC),以及最新成員B7-H3、B7x(B7-H4)。綜合近年來的研究將這些B7分子以親緣關係(phylogenetic analysis)分為三類(Zang and Allison, 2007)(附圖二):第一類包含B7-1、B7-2、B7h(ICOS-L),在傳遞共同刺激訊息扮演關鍵性的角色;第二類則包含PD-L1(B7-H1)(CD274)和PD-L2(B7-DC)(CD273),其PD-L1, PD-L2/PD-1 路徑為共同抑制的功能,雖然其抑制功能和B7-1、B7-2/CTLA-4 pathway之差異尚未完全釐清,但已有文獻指出T細胞PD-1(programmed death-1)(CD279)和B7-H1、B7-DC的結合與周邊耐受性、腫瘤免疫、感染免疫、移植免疫、過敏以及自體免疫疾病都有相關,PD-1的細胞質的尾端含有immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)以及immunoreceptor tyrosine switch motif (ITSM),前者是用來調控抑制訊號,後者則是負責PD-1與PD-L1結合後的訊號。PD-1可表現在CD4+ T細胞, CD8+ T細胞, 自然殺手T細胞, B細胞等;第三類包含B7-H3、B7x(B7-H4),其相對應之受體尚待研究發現,其功能較偏向為共同抑制;第三類包含B7-H3、B7x(B7-H4),其相對應之受體尚待研究發現,其功能較偏向為共同抑制。

1992年有研究在細胞凋亡細胞株發現PD-1是50-55-kDa第一型穿膜醣蛋白，和CTLA-4、CD28有33%基因序列相等(Ishida et al,1992)，之後在自體免疫疾病的研究也證實PD-1和細胞凋亡的直接關連性(Nishimura et al., 1998)。1999年發現和CD28相似的分子ICOS(Swallow et al,1999)，同年Dong也發現新的B7基因同源分子，命名為B7-H1，在這項研究中指出B7-H1會表現在人類活化的巨噬細胞、T細胞、B細胞，然而B7-H1的接受體並非已知的分子CTLA-4、CD28和ICOS，在其功能方面發現B7-H1的確會影響T細胞的增生以及促進IL-10的產生，此外隔年也發現了ICOS-L(B7-H2)，也歸類為B7家族的新成員。2000年Freeman發現，B7-H1的接受體是T細胞傳遞細胞凋亡訊息的PD-1(programmed death-1)，所以B7-H1也稱為PD ligand-1(PD-L1)，此外在隔年也發現PD-1的第二個配體，命名為PD ligand-2(B7-DC) (Latchman et al,2001)，並且發現B7-DC只表現在樹突狀細胞和巨噬細胞 (Tseng et al,2001)，PD-L1和PD-L2都是第一型穿膜醣蛋白，並且有20%胺基酸和B7-1、B7-2相等。2001年同時也選殖出其他B7家族成員B7-H3 (Chapoval et al, 2001)，而在2003年也發現了B7-H4(Sica et al, 2003)，但是其接受體仍然還在研究當中。

近年來研究指出B7-H1除了會表現在活化的T細胞、B細胞、樹突狀細胞、單核球/巨噬細胞，也會表現在癌細胞(Dong et al,2002)、自然殺手細胞、活化的內皮細胞、間質幹細胞以及細胞培養的骨髓性肥大細胞(Zou et al, 2008)，並且有研究指出IFN- γ 會促進B7-H1在上皮細胞、內皮細胞、骨髓性細胞和癌細胞的表現(Dong et al,2002)，對於細胞本身可能有保護作用。多數的研究指出表現在癌細胞和骨髓性細胞的B7-H1會促進T細胞細胞凋亡和抑制T細胞的活化和增生(Dong et al,2002 ; Curiel et al,2003)，可能是由於B7-H1和PD-1的結合而抑制了T細胞接受體的活化訊息傳遞(Freeman et al,2000)，但也有少數的研究指出B7-H1的抑制功能是不需要接受體PD-1的，其藉由CD80來傳遞抑制T細胞活化的訊息(Butte et al,2007)

。此外也有研究指出B7-H1的表現是細胞訊息傳遞的接受體，對於動物體內表現B7-H1的癌細胞自身而言，有抗細胞凋亡的保護作用(Azuma et al,2008)，還有動物實驗研究指出天真T細胞表現的B7-H1和樹突狀細胞表現共同刺激分子有相關(Talay et al,2009)，因此B7-H1是一個在多種不同細胞都會表現並且是具有多種不同功能的B7家族一員。然而對於B7-H1表現和功能的研究，一般是在癌細胞或是抗原呈現細胞，對於B7-H1表現在T細胞的研究和其詳細的功能，仍然還是屬於比較少被研究探討的。

對於B7-H1分子在人類癌症的研究探討，乳癌(Ghebeh et al,2006)、大腸癌、胃癌(Wu, et al,2006)、肺癌(Konishi et al,2004)、卵巢癌(Hamanishi et al,2007)、胰臟癌(Nomi et al,2007)、腎細胞癌(Thompson et al,2006)、以及尿道癌(Nakanishi et al,2007)等等，在很多癌症組織都發現有高量B7-H1表現，並且經過統計發現B7-H1表現量和腫瘤的大小、病程、轉移、預後、危險因子都有關聯性。其中在乳癌的研究中發現，B7-H1在TIL(tumor infiltrate lymphocyte)中的表現和腫瘤大小、病程以及腫瘤指標HER2表現有相關(Ghebeh et al,2006)，並且在乳癌腫瘤組織切片中可以發現Foxp3+調節性T細胞和表現B7-H1的T細胞共同浸潤到腫瘤組織(Ghebeh et al,2008)。另一方面在胰臟癌的研究指出，B7-H1的表現在胰臟癌病人腫瘤組織相對於健康正常人胰臟高許多，而有B7-H1+的腫瘤組織也具有較高量的Foxp3+調節性T細胞存在(Loos et al,2008)，並且發現B7-H1和細胞激素IL-10在腫瘤組織的表現量呈現正相關性(Geng et al,2008)。B7-H1表現在T細胞的研究還不是非常多，2003年有類風濕性關節炎研究指出，T細胞上表現的B7-H1會接收自體抗體的訊息，誘導T細胞產生細胞凋亡(Dong et al,2003)，後來表現在T細胞上的B7-H1也被認定具有抑制T細胞活化的功能(Seo et al,2006)，並且在乳癌研究發現T細胞上的B7-H1和一些危險因子都有相關性。此外有更進一步非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphomas)和移植免疫的研究指出，表現在調節性T細胞上的B7-H1，

具有抑制T細胞的活化增生的功能(Yang et al,2006) (Kitazawa et al,2007)。

在許多不同腫瘤組織的研究發現，B7-H1的表現對於免疫抑制作用是具有相關性的，並且可能和Foxp3+調節性T細胞的免疫調節作用也有關聯性。此外B7-DC在肺癌(Konishi et al,2004)、卵巢癌(Hamanishi et al,2007)和胰臟癌(Nomi et al,2007)被發現，屬於比較少在癌症中被發現的B7抑制性分子，另一個B7-H4則是會表現在女性生殖道上皮細胞、腎臟、肺臟、胰臟等少數人體器官，卵巢癌的研究發現有高量的B7-H4表現在巨噬細胞(Kryczek et al.,2006a)以及在病人血清中也有低量的B7-H4表現(Simon et al,2006)，並且發現巨噬細胞的B7-H4會降低抗原特異性T細胞的活化增生，更進一步有研究指出卵巢癌調節性T細胞會促進巨噬細胞分泌IL-6和IL-10，而IL-6和IL-10會刺激巨噬細胞自身B7-H4的表現，這些在腫瘤微環境內大量表現B7-H4的巨噬細胞，會直接抑制T細胞之細胞週期(Kryczek et al.,2006b)。這些不同的B7抑制性分子PD-L1(B7-H1)、(B7-DC)和B7x(B7-H4)，可能在腫瘤微環境當中不同細胞上表現並且以不同的機制造促進免疫抑制，使腫瘤可以逃避宿主免疫攻擊並且不斷生長，至於這些B7抑制性分子在腫瘤微環境中所表現的是哪些細胞和其真正複雜免疫機制都還需要更進一步的探討和研究。

第二節、研究動機與目的

腫瘤細胞可能藉由不同方式來逃避宿主免疫反應，由本實驗室先前的研究結果發現，口腔鱗狀細胞癌病患之腫瘤組織內浸潤CD3+CD4+之淋巴細胞中，CD4+CD25+T細胞佔所有CD4+T細胞比例有22.81%，而病患的周邊血液CD4+CD25+T細胞只有7.8%，因此存在於腫瘤組織內的CD4+CD25+T細胞，相對於該病患的周邊血液CD4+CD25+T細胞比例高許多。存在於口腔鱗狀細胞癌組織內的CD4+CD25+Foxp3+之調節性T細胞，大約有16.19%，而在病患的周邊血液中，偵測到比例大約3.67%的CD4+CD25+Foxp3+之調節性T細胞，高量的CD4+CD25+Foxp3+之調節性T細胞存在口腔癌腫瘤組織內，且進一步研究發現CD4+CD25high的調節性T細胞具有抑制T細胞活化增生的能力。

過去有研究指出，人類口腔癌細胞株和人類口腔鱗狀癌組織有B7-H1的大量表現(Tsushima et al,2006)，因此本論文中想要探討B7-H1分子在口腔鱗狀細胞癌腫瘤組織之浸潤淋巴球的分布和表現，而浸潤在腫瘤組織中的調節性T細胞其免疫抑制功能，是不是有可能和B7-H1的表現有相關性。若能釐清口腔鱗狀細胞癌腫瘤組織中B7-H1和調節性T細胞免疫抑制的相關機制，未來可能將相關的調控分子，作為治療時的標的，進而達到作為病患治療預後的目標，對於建立人類口腔癌免疫療法，將有助於提供重要且必要性之訊息。

第二章、實驗方法及材料

第一節、檢體的收集及來源

本研究將以十七例口腔癌病人之腫瘤組織和周邊血液為研究材料，並蒐集健康正常人之口腔組織和周邊血液作為對照比較，其中有十五名為男性，女性只有兩名，病患的年齡從二十九歲至七十三歲。口腔鱗狀細胞癌的病患，在癌症分期手術後，其口腔鱗狀上皮細胞癌組織收集成實驗組。每個病例的癌症分期(surgical stage)，癌症病理分級(histological stage)，淋巴或血管侵犯都會被紀錄，其中口腔癌一般較容易轉移的部位除了頸部淋巴結外還包括肺臟、肝臟及骨骼。根據1997年美國癌症醫學會(AJCC)的口腔癌分期的定義為標準：

零期：即原位癌。腫瘤細胞局限在口腔黏膜上皮內

第一期：腫瘤的最長徑小於或等於2公分且無頸部淋巴結及遠端轉移

第二期：腫瘤的最長徑大於2公分但不超過4公分，且無頸部淋巴結及遠端轉移

第三期：腫瘤的最長徑大於4公分或已轉移到同側頸部一個淋巴結，

此淋巴結之最長徑不超過3公分

第四期：有以下任何一種情形包括：1.腫瘤侵犯鄰近的組織(如：穿過骨外層，深入深層肌肉、上頷竇、皮膚等);2.頸部淋巴結轉移的數目超過1個(不論是在原發病灶的同側、對側或兩側都有)，或是淋巴結的最大徑已超過3公分;3.無論腫瘤大小及淋巴結是否轉移，已發生遠處轉移者。

在開刀前，必須有完整且詳細的記錄記載病人過去病史，並且符合下列基本的要求，才會納入本實驗之收集樣本中；第一為所有病患在接受手術前，皆有病理切片的術前口腔臨狀上皮細胞癌之證明；第二為病患沒有明顯且嚴重局部發炎現象；第三為術前沒有接受特殊非手術性的治療。納入本實驗的病患都必須接受檢查，且沒有其他伴隨的併發症或疾病，且皆不患有人類後天免疫不全疾病的證明，同時願意參與本實驗且簽署同意書。手術進行後，手術標本都會接受病理科醫師的診斷，來排除其他有可能共存的惡性腫瘤。

第二節、人類口腔鱗狀上皮細胞癌組織內淋巴球的分離與純化

人類口腔癌組織內淋巴球的分離方法，是根據1997年Bor-Ching Sheu等人，所發表的方法加以改良(Sheu et al., 1997)。台大醫院接受手術治療的病人中，以無菌方法收集口腔鱗狀細胞癌組織，並利用phosphate-buffered saline (PBS)將其上血塊沖洗乾淨，之後用刀片切成碎片，加入RPMI-1640 medium (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)研磨後，再以380 μm 及45.7 μm 篩孔之濾網分別過濾，濾液以1200 rpm (RS-720, KUBOTA)離心10分鐘，再以1300 rpm (RS-720, KUBOTA)離心10分鐘，以不同濃度的Percoll solution分層(含20 %, 55 %, 100 %)，單核細胞球(mononuclear cell)會位於55 %及100 %的Percoll solution之間，而癌細胞會位於20 %及55 %的Percoll solution之間，以此方法將口腔癌細胞和腫瘤內浸潤淋巴球分離。將分離出來的腫瘤內浸潤單核細胞球，以anti-CD3、anti-CD4單株抗體做螢光染色，並進行流式細胞儀(BD FACS Calibur)分析，藉由細胞的大小(與FSC成正比)，顆粒性(與SSC成正比)與CD3、CD4的標定來確定不同亞群T淋巴球的分布。

第三節、人類周邊血液單核球的分離與純化

從醫院接受手術治療的病人中收集血液標本，於手術進行前抽取20cc靜脈血，置於含有肝素(heparin)的採血管中，先以3000 rpm離心20分鐘(RS-720, KUBOTA)，吸取上層的血漿後，加入等量的Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)，再用Ficoll hypaque (1.077 density, Pharmacia Biotech Co.)分離出周邊血液中的單核細胞球(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)，分離出的單核細胞球懸浮於RPMI-1640 medium (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)，使其濃度為 1×10^6 cells/ml。將分離出來的腫瘤內浸潤單核細胞球，以anti-CD3、anti-CD4單株抗體做螢光染色，並進行流式細胞儀(BD FACS Calibur)

分析，藉由細胞的大小（與 FSC 成正比），顆粒性（與 SSC 成正比）與 CD3、CD4 的標定來確定不同亞群 T 淋巴球的分布。

第四節 細胞表面染色

將分離出的周邊血液和腫瘤組織內浸潤淋巴球，分別以螢光標定如下：anti-CD4-FITC、anti-CD25-PE、anti-CD3-PerCP，以及標定 biotin-B7-H1(MIH1)、biotin-B7-PD-1(MIH4)並以老鼠之 streptavidin-APC 當做第二級抗體(eBioscience, San Diego, Calif.)，IgG₁κ isotype control-APC(eBioscience, San Diego, Calif.)做為對照，並以 CellQuest software (Beckton-Dickinson Inc.)進行資料分析。

第五節 細胞內染色

為了偵測調節性 T 細胞的轉錄因子 Foxp3，將分離出來的周邊血液單核細胞，先分別加入 anti-CD4-PerCP、anti-CD25-PE，以及標定 biotin-B7-H1(MIH1)、biotin-B7-PD-1(MIH4)並以老鼠之 streptavidin-APC 當做第二級抗體(eBioscience, San Diego, Calif.)，IgG₁κ isotype control-APC(eBioscience, San Diego, Calif.)做為對照，混合均勻後，於4°C 避光作用30 分鐘，利用 Cytfix/Cytoperm buffer (eBioscience, San Diego, Calif.)在冰上作用一小時，再利用一倍的 permeabilization buffer (eBioscience, San Diego, Calif.)連續三次沖洗細胞，使細胞固定及破壞細胞膜讓通透性增加，在染胞內分子前，先使用2%胎牛血清(fetal calf serum)結合非特异性抗原，再藉由 anti-Foxp3單株抗體(eBioscience, San Diego, Calif.)偵測調節性 T 細胞，以流式細胞儀進行分析。以 FSC、SSC、CD4定義出 CD4⁺淋巴球細胞，觀察不同 T 細胞亞群表現 B7-H1和 PD-1的百分比和表現強度。

第六節 腫瘤組織和正常組織之 RNA 萃取

將約 0.5mm³ 大小之腫瘤組織或口腔內非腫瘤組織磨碎後，加入 Solution D (4 M Guanidinium iso-thiocyanate、25 mM Sodium citrate pH 7.0、0.5% Sarcosyl、0.1 M b-Mercaptoethanol)，搖晃均勻後加入 2 M Sodium Acetate pH 4.0、Acid phenol (Water saturated)、Chloroform:isoamyl (49:1)，搖晃均勻後冰上作用 20 分鐘，9000 rpm 4 度 C 20 分鐘，取上清液加入 1 倍體積 Isopropanol-20 度 C 沉澱一小時，9000 rpm 4 度 C 20 分鐘，Pellet 加 Solution D 0.5 ml，並加入 0.5 ml Isopropanol-20 度 C。經由光譜分析儀(Ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience)定量 total RNA 後取 2 μ g RNA 以 RQ1 DNase (Promega)於 65°C 中作用 30 分鐘，進行 DNA 清除，進一步利用 M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)以及 oligo(dT)於 37°C 中作用 1 小時以進行反轉錄的動作。

第七節 即時定量聚合酶連鎖反應(real-time PCR)

本實驗中所使用之 primers 是由 Primer express v3.0所設計，包括 B7-H1、PD-1、IL-10、IFN- γ 、Foxp3、CD4、B7-H4、B7-DC。cDNA 利用 POWER SYBR GREEN PCR Master Mix(Applied Biosystem)於 Applied Biosystem 7500 system 中進行同步定量聚合酶連鎖反應。結果之不同基因 Ct 值將以 GAPDH Ct 值作為基準，使用公式如下：Relative expression = (2^{-dCt})。

第八節 口腔癌組織及正常組織的組織包埋和冷凍切片

口腔鱗狀上皮細胞癌腫瘤組織和正常組織經收集後，以 Optimal Cutting Temperature(O.C.T.) Tissue-Tek (Sakura, Tokyo, Japan)包埋組織，並存放於-80 度 C 之環境中，待組織冷凍後將組織切成厚度 5 μ m 之組織切片，並將組織切片存放於-80 度 C。

第九節 組織免疫染色(Immunohistochemistry)

組織冷凍切片和丙酮(acetone)反應 10 分鐘固定組織，用二次水(ddH₂O)、1XPBS wash 後，以 3% 過氧化氫(hydrogen peroxide)和組織切片反應 20 分鐘去除內生性過氧化酶活性(oxidase activity)，1X PBS wash 完後用疏水性(hydrophobic pen)筆劃出組織範圍，再以 10% goat serum blocking(Zymed Laboratories,histostain bulk kit) 20 分鐘，避免非特異性抗體和組織的結合，接著加入 1:50 的 mouse anti-human 抗體 anti-MIH1(B7-H1)、anti-MIH4(PD-1)、1:100 anti-Foxp3(eBioscience, San Diego, Calif.)，在 4 度 C 反應 overnight，1X PBS wash 後加入 anti-mouse biotinylated secondary Ab(Zymed Laboratories,histostain bulk kit)室溫作用 20 分鐘，1X PBS wash 後再加入 streptavidin-peroxidase conjugate(Zymed Laboratories ,histostain bulk kit)室溫作用 20 分鐘，1X PBS wash 後加入 DAB(Dako)呈色，並以 Mayer's hematoxylin 做複染劑 5 分鐘，running water 之後經 50-75-85-95%酒精 10 次、100%酒精將組織脫水，最後將組織切片浸入 xylene 並以膠封片，最後在顯微鏡下觀察。雙分子染色則是以 1:100 mouse anti-human-Foxp-3 染色 24 小時之後，以 DAB(Dako)呈色，再以 1:50 的 mouse anti-human 抗體 anti-MIH1 (B7-H1)，最後用 AEC(BiogeneX)呈色，再進行複染。

第十節、反應性T細胞及調節性T細胞篩選方法及細胞增生和抑制試驗

20 c.c.靜脈血，置於含有肝素(heparin)的採血管中，首先分離周邊血液的單核球，進行 anti-CD3-PerCP、anti-CD4-FITC、anti-CD25-PE 染色，利用流式細胞分選儀(BD FACSAria Cell Sorter)分選出 CD3+CD4+CD25-細胞，即為反應細胞(responder cells)，CD3-細胞即為 B 細胞和單核球細胞，作為抗原呈現細胞(APC)，CD4+CD25^{high}細胞作為抑制細胞，將分選出的反應細胞(CD3+CD4+CD25-)標定 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)，放置 1×10^5 細胞於 96-well plate，再加入 RPMI-1640 medium (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY,

USA), 以 plate-bound anti-CD3 (加入 100 μ l 的 2.5 μ g/ml anti-CD3 於 96 well 盤中, 於 37°C 作用 2 個小時後, 以 PBS 清洗兩次後, 即可加入細胞作用) 和 抗原呈現細胞 (APC) 等刺激細胞增生, CD25^{high} 細胞和 B7-H1 Ab preincubate 以及不和 B7-H1 Ab preincubate 兩組細胞, 分別和有 CFSE 標定的反應 T 細胞以 1:1 或是 1:2 歷經 84-120 小時後, 再利用流式細胞儀分析增生結果, 藉此評估調節性 T 細胞, 抑制同源的 CD4⁺CD25⁺T 細胞增生的能力和 B7-H1 分子是否相關。

第十一節、周邊血液單核球與口腔鱗狀癌細胞株在體外共同培養方法

20 c.c. 靜脈血, 置於含有肝素 (heparin) 的採血管中, 放置 1×10^6 細胞於 12-well plate, 再放入照放線或不照放射線兩組 2×10^5 的口腔鱗狀癌細胞株 SAS, 一起培養五天, 培養後的細胞加入 biotin-B7-H1 (MIH1), 且以老鼠之 streptavidin-APC 當做第二級抗體 (eBioscience, San Diego, Calif.), IgG₁ κ isotype control-APC (eBioscience, San Diego, Calif.) 做為對照, 並分別加入 anti-CD4、anti-CD25 及單株抗體 (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, Becton-Dickinson, San Jose, CA) 和染細胞內 Foxp3 染色 (eBioscience, San Diego, Calif.), 以流式細胞儀進行分析, 利用 CellQuest software (BD Biosciences) 整理分析實驗結果, 觀察表現 CD4⁺CD25⁺T 細胞以及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 調節性 T 細胞表現 B7-H1 所佔的百分比和平均表現強度。

第三章、結果

第一節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤CD4+CD25+淋巴球，其B7-H1共同抑制分子的細胞表現百分比和表現強度

為了探討浸潤於口腔鱗狀上皮細胞癌中之淋巴細胞的特性，採用機械式磨碎分離方法，將口腔癌組織中的腫瘤浸潤淋巴球(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)分離出來，以PBMC當做對照組再藉由螢光免疫染色及流式細胞儀分析，圖一A以其中一個病例顯示分析的方式，先以細胞的大小（與FSC成正比），顆粒性（與SSC成正比）圈選出淋巴細胞（為R1），再與CD3⁺和CD4⁺的標定來確定T淋巴球的分布，分析CD4+CD25+T細胞表現共同抑制分子B7-H1之比例。圖一B顯示兩個不同病患，其CD4+CD25+細胞表現較高比例和較低比例的B7-H1分子，其中腫瘤浸潤的B7-H1+CD4+CD25+T細胞，佔所有CD4+CD25+T細胞的比例(百分比%)和表現量(平均螢光值MFI)都比周邊血液稍高。但是經過圖二的統計，腫瘤浸潤B7-H1+CD4+CD25+T細胞佔所有CD4+CD25+T細胞比例78.25%(MFI=64.08) (n=17)，而病患的周邊血液只有64.76%(MFI=47.14) (n=17) (百分比例% $p=0.09$ ，平均螢光值MFI $p=0.05$)，雖然在平均比例和平均表現量上腫瘤和周邊血液仍有些微的不同，但是並沒有達到統計上的顯著差異($p<0.05$)。

第二節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤 CD4+T 細胞，B7-H1 和 Foxp3、CD25 之表現有相關性

利用流式細胞儀分析，將腫瘤浸潤並同時表現 CD4 及 CD25 的 T 細胞群，根據細胞 CD25 的螢光強度，將細胞分為三群，CD25 表現螢光強度較高的細胞

群定義為 CD4+CD25high 細胞，將 CD25 表現螢光強度較低的細胞群定義為 CD4+CD25low 細胞，而另一群表現 CD25 螢光強度介於上述兩者中間，我們定義為 CD4+CD25intermediate 細胞，上述細胞亞群分群以圖三 A 左圖表示。再將分出的三群細胞，統計各亞群細胞表現 B7-H1 之比例，結果以圖三 A 右圖顯示，在口腔癌腫瘤組織內，CD4+CD25high 細胞亞群有 85.62% 表現 B7-H1，CD4+CD25intermediate 有 77.91% 而 CD4+CD25low 有 73.05% (n=17)，顯示 B7-H1 在三細胞亞群的平均表現比例和 CD25 的表現量(螢光值)有些微的相關性，但是並沒有達到統計上的顯著差異(CD4+CD25high 和 CD4+CD25low $p=0.07$)。

過去有研究指出 CD25highFoxp3+調節性 T 細胞(Strauss et al., 2007b)具有抑制 T 細胞活化增生的功能，並且 CD25 和 Foxp3 具有正相關，為了分析 CD25、Foxp3 和 B7-H1 的相關性，利用細胞內 Foxp3 以及細胞外 CD25、B7-H1 的免疫螢光染色和流式細胞儀，圖三 B 將腫瘤浸潤 CD4+細胞分為 CD4+CD25high 和 CD4+CD25-兩群，發現 CD4+CD25high 表現較高量的 Foxp3 和 B7-H1，而 CD4+CD25-則是不表現 Foxp3 以及表現較低量的和 B7-H1。

第三節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤 CD4+Foxp3+調節

性 T 細胞表現較高比例且較高量的 B7-H1，且 B7-H1+

Foxp3+細胞和 Foxp3+細胞有相關性

由於研究觀察到 B7-H1 和 Foxp3 表現的相關性，更進一步想研究腫瘤組織和周邊血液 Foxp3+調節性 T 細胞表現 B7-H1 的比例和表現量，以細胞內外染色和流式細胞儀偵測 Foxp3 細胞表現 B7-H1 百分比和表現強度，並以健康成人周邊血液當做對照，圖四 A 可以看到選取 CD4+Foxp3+細胞的方式，圖四 B 為其中一個

病人的 B7-H1 表現百分比和表現強度。圖五為經過統計結果顯示，在腫瘤組織浸潤 CD4+Foxp3+調節性 T 細胞所表現 B7-H1 的細胞比例 85.47% ，比病人 PBMC 63.20%(* $p=0.005$)和正常人 PBMC68.15%(** $p=0.004$)都來的高($n=12$)，而腫瘤組織浸潤 CD4+Foxp3+調節性 T 細胞之 B7-H1 表現量(MFI=58.21)比正常人 PBMC 27.306(** $p=0.001$)和病人 PBMC 34.29 (* $p=0.006$)都高($n=13$)。

研究指出 B7-H1+CD4+Foxp3+調節性 T 細胞在腫瘤組織所佔的百分相對於周邊比較高，因此認為 B7-H1+CD4+Foxp3+調節性 T 細胞也許對於腫瘤生長或逃避宿主免疫攻擊是非常重要的，利用流式細胞儀分析 B7-H1+Foxp3+細胞和 Foxp3+細胞在 TIL 和 CD4+ T 細胞內所佔的百分比，圖六 A 我們可以統計出結果並發現 B7-H1+Foxp3+和 Foxp3+細胞之百分比在 TIL 呈現中度正相關($R=0.61$)，而圖六 B 在 CD4+T 細胞內則是呈現高度正相關($R=0.75$)。

第四節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤 CD4+CD25+

Foxp3+調節性 T 細胞表現較高比例且較高量的 B7-H1

為了釐清 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞在腫瘤組織所扮演的角色，利用細胞內和外螢光免疫螢光染色，分析 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞、CD4+CD25+Foxp3-活化 T 細胞、CD4+CD25-Foxp3-未活化 T 細胞，三細胞群 B7-H1 的表現百分比和表現量，並以病人和正常周邊血液作為對照，圖七 A 為細胞選取的方式，圖七 B 為其中一個病人之三群細胞 B7-H1 的表現百分比和表現量，圖八為經過統計後三群細胞的表現百分比和表現量，圖八 A 腫瘤組織內 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞有 88.08%表現 B7-H1，比起病人 PBMC(64.71%)(** $p=0.001$)和正常人 PBMC(73.78%)(* $p=0.04$)都高許多，在 CD4+CD25+Foxp3-活化 T 細胞、CD4+CD25-Foxp3-未活化 T 細胞則是沒有看到

顯著差異性。圖八 B 腫瘤組織內 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞有表現 B7-H1 之 MFI=58.24, 比起病人 PBMC(35.7)(* $p=0.02$)和正常人 PBMC(28.28)**($p=0.002$) 都高許多, 而 CD4+CD25+Foxp3-活化 T 細胞、CD4+CD25-Foxp3-未活化 T 細胞的 B7-H1 表現量也都有類似的情形。

第五節、口腔鱗狀細胞癌腫瘤組織 CD4+CD25+Foxp3-和

CD4+CD25-Foxp3- T 細胞表現較高量的 PD-1, 且 CD25+

Foxp3+B7-H1+ T 細胞和 Foxp3-PD-1+ T 細胞有相關性

為了可以更進一步證實 B7-H1+CD4+Foxp3+調節性 T 細胞在腫瘤組織內的重要性, 利用細胞內和外螢光免疫螢光染色, 分析 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞、未活化 T 細胞, 三細胞群 PD-1 的表現量, 並以病人和正常周邊血液作為對照, 圖九 A 為其中一個病人之三群細胞 PD-1 的表現百分比和表現量, 圖九 B 為經過統計後三群細胞的表現百分比和表現量, 腫瘤組織內 CD4+CD25+Foxp3-的 PD-1 平均表現量 MFI=629.25, 而 CD4+CD25-Foxp3-平均表現量 MFI=534.37, 兩群細胞比 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞 MFI=250.19 高出許多(* $p=0.02$), 其中 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞、CD4+CD25+Foxp3-活化 T 細胞、CD4+CD25-Foxp3-未活化 T 細胞在腫瘤組織的 PD-1 表現量比病人和正常人 PBMC 都高許多, 腫瘤組織內 CD4+CD25+Foxp3-活化 T 細胞在 TIL 之 B7-H1 接受體 PD-1 平均表現量大約是 PBMC 的六倍, CD4+CD25-Foxp3- T 細胞在 TIL 之 PD-1 平均表現量大約是 PBMC 的五倍, 然而 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 在 TIL 之 PD-1 平均表現量大約只有 PBMC 的二倍。

由於觀察到腫瘤組織調節性 T 細胞表現 B7-H1 和非調節性 T 細胞表現 PD-1 的相對關係，藉由螢光免疫染色和流式細胞儀分析後發現，圖十 A B7-H1+Foxp3+ 和 PD-1 在 TIL($r=0.74$)和 CD4+T 細胞($r=0.70$)都具有高度正相關，圖十 B 並且發現 B7-H1+Foxp3+表現百分比和 Foxp3-細胞 PD-1 表現強度在腫瘤組織 CD4+T 細胞($r=0.6$)具有中度相關性。

此外我們利用口腔鱗狀細胞癌病人取下的腫瘤組織，進行組織免疫染色，圖十一可以看到在口腔鱗狀細胞癌的腫瘤組織有 B7-H1+CD4+Foxp3+調節性 T 細胞的存在，並且也有表現 B7-H1 的接受體 PD-1 的浸潤細胞。

第六節、口腔鱗狀細胞癌細胞株 SAS 誘導 CD4+CD25+表現 B7-H1

為了證實在口腔鱗狀細胞癌的腫瘤微環境會誘導 CD4+CD25+ Foxp3+調節性 T 細胞表現 B7-H1，利用體外細胞共同培養的系統，放置 PBMC 1×10^6 細胞於 12-well plate，再放入不同細胞比例的口腔鱗狀細胞癌細胞株 SAS，或是照射過放射線的 SAS 細胞共同培養於 RPMI medium 中，一起培養五天，觀察 CD4+CD25+ T 細胞以及 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞表現 B7-H1 之比例有無增加。圖十二顯示流式細胞儀資料分析後的結果以及細胞選取的方式，圖十二可以看到當 PBMC 單獨培養時，CD4+CD25+表現 B7-H1 的比例大約是 20.7%，而加入 1/5 細胞數的口腔鱗狀細胞癌細胞株 SAS 共同培養時，CD4+CD25+表現 B7-H1 的比例上升到 56.25%，若是加入 1/5 細胞數的放射線照射口腔鱗狀細胞癌細胞株 SAS 共同培養時，CD4+CD25+表現 B7-H1 的比例上升到 50.27%。

第七節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤 B7-H1+CD4+ CD25+ Foxp3+細胞表現較高比例且較高量的 ICOS

為了進一步了解 B7-H1+CD4+CD25+ Foxp3+ 的細胞特性，我們想 B7-H1+CD4+CD25+ Foxp3+ 的表現型，有研究指出 ICOS+FOXP3+ Treg 可藉由表現 IL-10 抑制樹突細胞的功能 (Ito et al., 2008)，圖十三是 B7-H1+和 ICOS 在 CD4+Foxp3+細胞群的表現關聯性和細胞選取的方式，可以發現 ICOS+FOXP3+ Treg 表現較高比例且較高量的 B7-H1，在 n=3 統計雖然百分比只有 10%的差異性，而表現量有兩倍的差異性，由於個體數目和範圍的限制，並沒有達到統計上的意義。

第八節、腫瘤組織表現較高量B7-H1、Foxp3、IL-10、IFN- γ 、CD4、PD-1、B7-DC和B7-H4之RNA，且Foxp3和B7-H1有相關性

為了更證實B7-H1和Foxp3表現的相關性，我們萃取出腫瘤組織中的RNA，以同一個病人的非腫瘤口腔組織作為對照，並且進行B7-H1、Foxp3和其他分子的即時聚合酶連鎖反應，發現腫瘤組織所表現的B7-H1(0.0081) 和Foxp3 (0.0195)，都比非腫瘤組織高(0.0009)(0.0002)，B7-H1大約是九倍而Foxp3則是兩百倍，並且統計十個不同口腔癌病人腫瘤組織，圖十四B結果顯示B7-H1和Foxp3的表現量具有中度相關($r=0.54$)。圖十四A腫瘤組織的RNA可以看到IL-10、IFN- γ 、CD4、PD-1、B7-DC、B7-H4、Foxp3和B7-H1和的表現量都比正常組織高出許多。

第九節、口腔鱗狀細胞癌病患分離出調節性T細胞具有抑制細胞增生的功能

為了證實B7-H1+CD4+CD25+ Foxp3+具有抑制T細胞增生的功能，並且可能有一部分是藉由B7-H1而抑制T細胞增生，圖十五A將細胞刺激五天後我們比較中

和B7-H1的CD4+CD25hi抑制功能是否和CD4+CD25hi有所差異性，研究發現單獨只有responder cell(CD4+CD25-)加入CD3抗體和APC(CD3-)刺激，可以看到64.43%的細胞增生，當加入1:1的CD4+CD25hi細胞時，可以看到28.94%的細胞增生，PBMC的調節性T細胞達到50%以上的抑制效果，如果先和B7-H1抗體結合的CD4+CD25hi則是看到21.61%的細胞增生，和CD4+CD25hi細胞抑制效果沒有太大差異性。圖十五B當刺激三天時可以看到19.72%的細胞增生，當加入CD4+CD25hi細胞時可以看到10.47%的細胞增生，而先和B7-H1抗體結合的CD4+CD25hi細胞則是有10.29%的細胞增生，和CD4+CD25hi細胞的抑制效果仍然沒有太大的差異性。



第四章、討論

B7-H1在許多惡性腫瘤都被研究過，包括卵巢癌，結腸癌，頭頸部的鱗狀細胞癌(Strome et al. 2003)，非小細胞肺癌(Konishi et al. 2004)，腎細胞癌(Thompson et al. 2004)，食道癌(Ohigashi et al. 2005)，乳癌(Ghebeh et al. 2006)，胃癌(Wu et al. 2006)，口腔鱗狀細胞癌(Tsushima et al. 2006)等。許多腫瘤浸潤性T淋巴球之Foxp3⁺調節性T細胞確實有上升的情形，並且與術後的復發情形，存活率，淋巴轉移等臨床病理危險因子有關(Bate et al. 2006, Liyanage et al. 2002)。在腫瘤浸潤性淋巴球中若有Foxp3、B7-H1 及其接受體PD-1分子一起表現於相同的腫瘤組織中，可能會有協同作用使病人的免疫反應減弱(Ghebeh et al. 2008)。但也有報告指出B7-H1及PD-1兩者皆會表現在CD4⁺CD25⁺調節性T細胞，但是他們真正的功能至今尚未明瞭。

本論文由口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤CD4⁺CD25⁺ T細胞，研究發現其B7-H1共同抑制分子的細胞表現比例，在每一病患個體比起PBMC的CD4⁺CD25⁺ T細胞都高，平均值比例雖然有一些不同，但是可能由於每一個病患體內T細胞活化程度有很大的差別，百分比的分布非常廣，因此沒有達到統計上顯著的差異。此外我們將腫瘤浸潤CD4⁺ T細胞分成CD4⁺CD25^{high}細胞、CD4⁺CD25^{intermediate}細胞、CD4⁺CD25^{low}細胞和CD4⁺CD25⁻細胞，發現三細胞亞群隨著CD25的表現量下降其B7-H1表現百分比也會下降，雖然沒有統計上的顯著差異，但是由於也發現Foxp3的和B7-H1的螢光表現量可能有關聯性，因此Foxp3⁺細胞和B7-H1⁺細胞在腫瘤組織免疫調控可能有相似或協同的作用。

過去研究在乳癌腫瘤組織切片中可以發現Foxp3⁺調節性T細胞和表現B7-H1/PD-1的T細胞共同浸潤到腫瘤組織(Ghebeh et al,2008)，而有B7-H1⁺的腫瘤組織也具有較高量的Foxp3⁺調節性T細胞存在(Loos et al,2008)，並且Foxp3⁺調節性T

細胞和B7-H1有正相關性，此外非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphomas)和移植免疫的研究指出，表現在調節性T細胞上的B7-H1，具有抑制T細胞的活化增生的功能(Yang et al,2006) (Kitazawa et al,2007)。由於我們也在口腔癌腫瘤組織看到Foxp3和B7-H1的相關性，因此我們想進一步研究，口腔鱗狀細胞癌腫瘤組織浸潤Foxp3+調節性T細胞是否會表現B7-H1，B7-H1在很多腫瘤組織和抗原呈現細胞都會表現，並且在活化的CD4+都會看到B7-H1，因此我們必須詳細分析不同亞群細胞表現B7-H1的百分比和表現量，才能說明B7-H1的表現在其中的相對重要性。

在本論文研究發現CD4+Foxp3+調節性T細胞會表現B7-H1，並且在腫瘤組織比病人和正常PBMC的表現比例($p=0.005$) ($p=0.004$)和表現量($p=0.0007$)都高，因此我們想進一步研究B7-H1+CD4+Foxp3+調節性T細胞在腫瘤組織的重要性，有可能B7-H1+CD4+Foxp3+在腫瘤微環境扮演重要的免疫抑制角色。此外我們也發現了B7-H1+Foxp3+和Foxp3+細胞在腫瘤組織有正相關性，B7-H1+Foxp3+和Foxp3+細胞之百分比在TIL呈現中度正相關($r=0.61$)，而在CD4+T細胞內則是呈現高度正相關($r=0.75$)，因此更加支持了本研究的假設。

接著我們進一步了解B7-H1在腫瘤組織淋巴球表現的分布，將PBMC和TIL分為CD4+CD25+Foxp3+調節性T細胞、CD4+CD25+Foxp3-活化T細胞、CD4+CD25-Foxp3-未活化T細胞，分析三細胞群B7-H1的表現百分比和表現量，研究發現不論是在正常人或病人的PBMC，其中CD4+CD25+Foxp3+調節性T細胞B7-H1的表現比例在週邊血液都是三群T細胞中最底的，然而在腫瘤組織的CD4+CD25+Foxp3+調節性T細胞則是比病人PBMC($**p=0.001$)和正常人PBMC($*p=0.04$)表現較高比例的B7-H1，雖然三群T細胞在腫瘤組織都可觀察到平均螢光表現強度都有上升，但是卻只有CD4+CD25+Foxp3+調節性T細胞在腫瘤局

部可以看到B7-H1的表現比例有明顯變化，有可能是口腔癌在腫瘤組織誘導出一群表現B7-H1的調節性T細胞。CD4+CD25+Foxp3-活化T細胞、CD4+CD25-Foxp3-未活化T細胞在周邊表現的B7-H1可能有其他我們未知的功能，因此我們認為只有CD4+CD25+Foxp3+調節性T細胞所表現的B7-H1，對於腫瘤微環境的免疫抑制較有相關性，此外三群T細胞在腫瘤微環境都可以看到B7-H1平均表現量的上升，可能是由於大量活化細胞激素所影響，導致我們看到的差異性。

為了證實 CD4+CD25+B7-H1+Foxp3+T 細胞，對於口腔鱗狀細胞癌的免疫抑制是有影響的，因此我們以同樣方式，將 PBMC 和 TIL 分為 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞、CD4+CD25+Foxp3-活化 T 細胞、CD4+CD25-Foxp3-未活化 T 細胞，分析三細胞群的 PD-1 表現百分比和表現量，研究發現 PD-1 在三群細胞的表現比例都會有上升的現象，但是在平均螢光表現量則是發現，CD4+CD25+Foxp3-活化 T 細胞在 TIL 之 PD-1 平均表現量大約是 PBMC 的六倍高，而 CD4+CD25-Foxp3-未活化 T 細胞在 TIL 之 PD-1 平均表現量大約是 PBMC 的五倍高，然而 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 在 TIL 之 PD-1 平均表現量大約只有 PBMC 的二倍高，因此本論文發現可能是口腔癌腫瘤組織的高比例 CD4+CD25+B7-H1+Foxp3+T 細胞，結合 CD4+CD25+Foxp3-活化 T 細胞、CD4+CD25-Foxp3-未活化 T 細胞上高表現量的 PD-1，使得 T 細胞的功能受到抑制，進而讓腫瘤環境產生免疫抑制，使腫瘤不斷生長。

此外我們有利用腫瘤組織萃取的 RNA 進行即時聚合酶鏈反應後，也發現 PD-1 和 B7-H1 在腫瘤組織的高表現量，並且經過統計也看到 PD-1 和 B7-H1 具有中度相關($r=0.54$)，在流式細胞儀經過分析後也發現 B7-H1+Foxp3+和 PD-1 在 TIL($r=0.74$)和 CD4+T 細胞($r=0.70$)都具有高度正相關，B7-H1+Foxp3+表現百分比和 Foxp3-細胞 PD-1 表現強度在腫瘤組織 CD4+T 細胞($r=0.6$)具有中度相關性。

這樣的假設也利用口腔鱗狀細胞癌腫瘤組織進行組織免疫染色來證實，發現有 B7-H1+CD4+Foxp3+調節性 T 細胞的存在，也有表現 B7-H1 的接受體 PD-1 的浸潤細胞，因此 CD4+CD25+B7-H1+Foxp3+T 細胞的確有可能藉由和 PD-1 的結合影響 T 細胞功能。藉由口腔鱗狀癌細胞細胞株 SAS 和 PBMC 的體外共同培養系統，可以觀察到 SAS 會誘導 CD4+CD25+表現較高比例的 B7-H1，因此我們初步認為口腔癌細胞會影響 CD4+CD25+調節性 T 細胞的 B7-H1 表現。

進一步我們發現腫瘤組織 CD4+CD25+Foxp3+ICOS+細胞表現比例稍高的 B7-H1，並且表現兩倍量的 B7-H1，因此可能 B7-H1 和 ICOS 的表現可能有相關性。此外在腫瘤組織的 RNA 可以看到較高量 IL-10、IFN- γ 、CD4、PD-1、B7-DC、B7-H4、Foxp3 和 B7-H1，因此可以了解其對於腫瘤組織的免疫調節重要性。

雖然在細胞增生實驗當中，無論在強烈(五天)或微弱(三天)的刺激下，都沒有看到 B7-H1 對 CD4+CD25+ T 細胞抑制功能的貢獻，但是有可能在腫瘤浸潤中表現比例高且量多 B7-H1 的 CD4+CD25+ T 細胞才會有明顯的功能，因此在週邊血液的細胞比較不容易看到 B7-H1 的免疫抑制功能。此外過去有研究認為 B7-H1 對於細胞本身具有促進或抑制細胞凋亡的功能，因此在腫瘤組織的 CD4+CD25+B7-H1+Foxp3+T 細胞，也有可能是調節性 T 細胞本身的訊息傳遞調控接受體。此外由於可以明顯觀察到腫瘤組織 PD-1 表現量的上升，因此可能還有其他的例如腫瘤細胞或是抗原呈現細胞表現 B7-H1，可以和 PD-1 作用。

第五章、參考文獻

1. Azuma, M., D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and C. Somoza. 1993. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366:76-79.
2. Azuma, T., S. Yao, G. Zhu, A. S. Flies, S. J. Flies, and L. Chen. 2008. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 111:3635-3643.
3. Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler. 2001. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167:1245-1253.
4. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
5. Bhatia, S., A. D. Louie, R. Bhatia, M. R. O'Donnell, H. Fung, A. Kashyap, A. Krishnan, A. Molina, A. Nademane, J. C. Niland, P. A. Parker, D. S. Snyder, R. Spielberger, A. Stein, and S. J. Forman. 2001. Solid cancers after bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 19:464-471.
6. Bluestone, J. A., and A. K. Abbas. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3:253-257.
7. Butte, M. J., M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27:111-122.
8. Chapoval, A. I., J. Ni, J. S. Lau, R. A. Wilcox, D. B. Flies, D. Liu, H. Dong, G. L. Sica, G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 2001. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol*

- 2:269-274.
9. Curiel, T. J. 2007. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 117:1167-1174.
 10. Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949.
 11. Curiel, T. J., S. Wei, H. Dong, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, R. Krzysiek, K. L. Knutson, B. Daniel, M. C. Zimmermann, O. David, M. Burow, A. Gordon, N. Dhurandhar, L. Myers, R. Berggren, A. Hemminki, R. D. Alvarez, D. Emilie, D. T. Curiel, L. Chen, and W. Zou. 2003. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 9:562-567.
 12. Dave, B. J., A. H. Trivedi, and S. G. Adhvaryu. 1992. Role of areca nut consumption in the cause of oral cancers. A cytogenetic assessment. *Cancer* 70:1017-1023.
 13. Dong, H., S. E. Strome, E. L. Matteson, K. G. Moder, D. B. Flies, G. Zhu, H. Tamura, C. L. Driscoll, and L. Chen. 2003. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 111:363-370.
 14. Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of

- immune evasion. *Nat Med* 8:793-800.
15. Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5:1365-1369.
 16. Freeman, G. J., J. G. Gribben, V. A. Boussiotis, J. W. Ng, V. A. Restivo, Jr., L. A. Lombard, G. S. Gray, and L. M. Nadler. 1993. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262:909-911.
 17. Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-1034.
 18. Gavin, M. A., J. P. Rasmussen, J. D. Fontenot, V. Vasta, V. C. Manganiello, J. A. Beavo, and A. Y. Rudensky. 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445:771-775.
 19. Geng, L., D. Huang, J. Liu, Y. Qian, J. Deng, D. Li, Z. Hu, J. Zhang, G. Jiang, and S. Zheng. 2008. B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:1021-1027.
 20. Ghebeh, H., E. Barhoush, A. Tulbah, N. Elkum, T. Al-Tweigeri, and S. Dermime. 2008. FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. *BMC Cancer* 8:57.

21. Ghebeh, H., S. Mohammed, A. Al-Omair, A. Qattan, C. Lehe, G. Al-Qudaihi, N. Elkum, M. Alshabanah, S. Bin Amer, A. Tulbah, D. Ajarim, T. Al-Tweigeri, and S. Dermime. 2006. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia* 8:190-198.
22. Hamanishi, J., M. Mandai, M. Iwasaki, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Higuchi, H. Yagi, K. Takakura, N. Minato, T. Honjo, and S. Fujii. 2007. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3360-3365.
23. Hernandez, G., L. Arriba, C. Jimenez, J. V. Bagan, B. Rivera, M. Lucas, and E. Moreno. 2003. Rapid progression from oral leukoplakia to carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. *Oral Oncol* 39:87-90.
24. Hoffmann, T. K., A. D. Donnenberg, S. D. Finkelstein, V. S. Donnenberg, U. Friebe-Hoffmann, E. N. Myers, E. Appella, A. B. DeLeo, and T. L. Whiteside. 2002a. Frequencies of tetramer⁺ T cells specific for the wild-type sequence p53(264-272) peptide in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Res* 62:3521-3529.
25. Hoffmann, T. K., G. Dworacki, T. Tsukihiro, N. Meidenbauer, W. Gooding, J. T. Johnson, and T. L. Whiteside. 2002b. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 8:2553-2562.
26. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
27. Hunter, K. D., E. K. Parkinson, and P. R. Harrison. 2005. Profiling early head

- and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 5:127-135.
28. Ichihara, F., K. Kono, A. Takahashi, H. Kawaida, H. Sugai, and H. Fujii. 2003. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 9:4404-4408.
 29. Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11:3887-3895.
 30. Ito, T., S. Hanabuchi, Y. H. Wang, W. R. Park, K. Arima, L. Bover, F. X. Qin, M. Gilliet, and Y. J. Liu. 2008. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28:870-880.
 31. Jenkins, M. K., and R. H. Schwartz. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 165:302-319.
 32. Jewett, A., N. A. Cacalano, A. Teruel, M. Romero, M. Rashedi, M. Wang, and H. Nakamura. 2006. Inhibition of nuclear factor kappa B (NFkappaB) activity in oral tumor cells prevents depletion of NK cells and increases their functional activation. *Cancer Immunol Immunother* 55:1052-1063.
 33. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121:1-14.
 34. Kitazawa, Y., M. Fujino, Q. Wang, H. Kimura, M. Azuma, M. Kubo, R. Abe, and X. K. Li. 2007. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation* 83:774-782.
 35. Konishi, J., K. Yamazaki, M. Azuma, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, and M.

- Nishimura. 2004. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 10:5094-5100.
36. Kryczek, I., S. Wei, W. Gong, X. Shu, W. Szeliga, L. Vatan, L. Chen, G. Wang, and W. Zou. 2008. Cutting edge: IFN-gamma enables APC to promote memory Th17 and abate Th1 cell development. *J Immunol* 181:5842-5846.
37. Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, G. Zhu, P. Mottram, H. Xu, L. Chen, and W. Zou. 2006a. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* 177:40-44.
38. Kryczek, I., L. Zou, P. Rodriguez, G. Zhu, S. Wei, P. Mottram, M. Brumlik, P. Cheng, T. Curiel, L. Myers, A. Lackner, X. Alvarez, A. Ochoa, L. Chen, and W. Zou. 2006b. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 203:871-881.
39. La Vecchia, C., A. Tavani, S. Franceschi, F. Levi, G. Corrao, and E. Negri. 1997. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 33:302-312.
40. Laad, A., J. Kode, S. Chavan, R. Rao, A. R. Fakih, and S. Chiplunkar. 1996. Limiting dilution analysis of proliferating and cytotoxic lymphocytes in the peripheral blood and tumours of oral cancer patients. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32B:337-342.
41. Latchman, Y., C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A. J. Long, J. A. Brown, R. Nunes, E. A. Greenfield, K. Bourque, V. A. Boussiotis, L. L. Carter, B. M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2:261-268.
42. Lee, C. H., Y. C. Ko, H. L. Huang, Y. Y. Chao, C. C. Tsai, T. Y. Shieh, and L. M.

- Lin. 2003. The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis in southern Taiwan. *Br J Cancer* 88:366-372.
43. Lin, W., D. Haribhai, L. M. Relland, N. Truong, M. R. Carlson, C. B. Williams, and T. A. Chatila. 2007. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* 8:359-368.
44. Linsley, P. S., W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle, and J. A. Ledbetter. 1991. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174:561-569.
45. Liyanage, U. K., T. T. Moore, H. G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J. A. Drebin, S. M. Strasberg, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure, and D. C. Linehan. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169:2756-2761.
46. Loos, M., N. A. Giese, J. Kleeff, T. Giese, M. M. Gaida, F. Bergmann, M. Laschinger, W. B. M, and H. Friess. 2008. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. *Cancer Lett* 268:98-109.
47. Maynard, C. L., L. E. Harrington, K. M. Janowski, J. R. Oliver, C. L. Zindl, A. Y. Rudensky, and C. T. Weaver. 2007. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* 8:931-941.
48. Nakanishi, J., Y. Wada, K. Matsumoto, M. Azuma, K. Kikuchi, and S. Ueda. 2007. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer*

- Immunol Immunother* 56:1173-1182.
49. Nishimura, H., N. Minato, T. Nakano, and T. Honjo. 1998. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 10:1563-1572.
50. Nomi, T., M. Sho, T. Akahori, K. Hamada, A. Kubo, H. Kanehiro, S. Nakamura, K. Enomoto, H. Yagita, M. Azuma, and Y. Nakajima. 2007. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 13:2151-2157.
51. Reichert, T. E., L. Strauss, E. M. Wagner, W. Gooding, and T. L. Whiteside. 2002. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 8:3137-3145.
52. Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
53. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
54. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
55. Schantz, S. P., E. J. Shillitoe, B. Brown, and B. Campbell. 1986. Natural killer cell activity and head and neck cancer: a clinical assessment. *J Natl Cancer*

Inst 77:869-875.

56. Scully, C., J. K. Field, and H. Tanzawa. 2000. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 36:256-263.
57. Seo, S. K., H. M. Seo, H. Y. Jeong, I. W. Choi, Y. M. Park, H. Yagita, L. Chen, and I. H. Choi. 2006. Co-inhibitory role of T-cell-associated B7-H1 and B7-DC in the T-cell immune response. *Immunol Lett* 102:222-228.
58. Shevach, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30:636-645.
59. Shirname, L. P., M. M. Menon, and S. V. Bhide. 1984. Mutagenicity of betel quid and its ingredients using mammalian test systems. *Carcinogenesis* 5:501-503.
60. Shirname, L. P., M. M. Menon, J. Nair, and S. V. Bhide. 1983. Correlation of mutagenicity and tumorigenicity of betel quid and its ingredients. *Nutr Cancer* 5:87-91.
61. Simon, I., S. Zhuo, L. Corral, E. P. Diamandis, M. J. Sarno, R. L. Wolfert, and N. W. Kim. 2006. B7-h4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res* 66:1570-1575.
62. Strauss, L., C. Bergmann, W. Gooding, J. T. Johnson, and T. L. Whiteside. 2007a. The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 13:6301-6311.
63. Strauss, L., C. Bergmann, M. Szczepanski, W. Gooding, J. T. Johnson, and T. L. Whiteside. 2007b. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in

- the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 13:4345-4354.
64. Strauss, L., C. Bergmann, and T. L. Whiteside. 2009. Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 182:1469-1480.
 65. Swallow, M. M., J. J. Wallin, and W. C. Sha. 1999. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* 11:423-432.
 66. Talay, O., C. H. Shen, L. Chen, and J. Chen. 2009. B7-H1 (PD-L1) on T cells is required for T-cell-mediated conditioning of dendritic cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2741-2746.
 67. Thompson, R. H., M. D. Gillett, J. C. Cheville, C. M. Lohse, H. Dong, W. S. Webster, L. Chen, H. Zincke, M. L. Blute, B. C. Leibovich, and E. D. Kwon. 2005. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 104:2084-2091.
 68. Tseng, S. Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J. E. Slansky, S. I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D. M. Pardoll, and H. Tsuchiya. 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193:839-846.
 69. Tsushima, F., K. Tanaka, N. Otsuki, P. Youngnak, H. Iwai, K. Omura, and M. Azuma. 2006. Predominant expression of B7-H1 and its immunoregulatory roles in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 42:268-274.
 70. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.
 71. Walker, M. R., D. J. Kasprowicz, V. H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J. H. Buckner, and S. F. Ziegler. 2003. Induction of Foxp3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest*

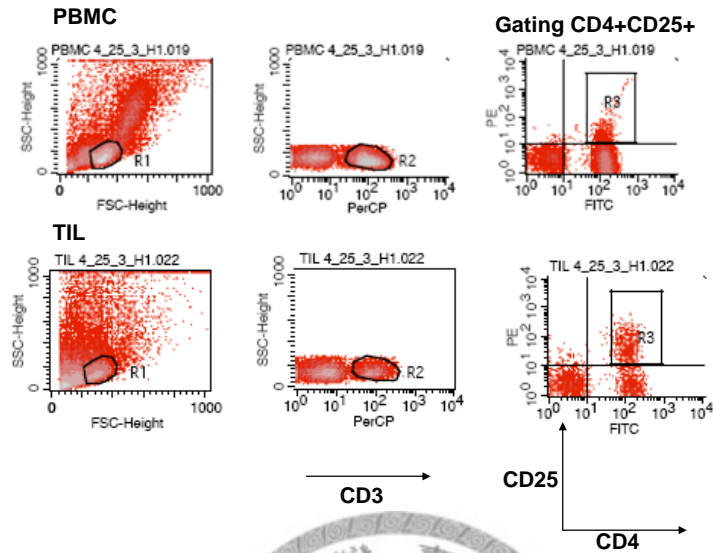
- 112:1437-1443.
72. Wan, Y. Y., and R. A. Flavell. 2007. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445:766-770.
73. Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.
74. Williams, L. M., and A. Y. Rudensky. 2007. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 8:277-284.
75. Woo, E. Y., C. S. Chu, T. J. Goletz, K. Schlienger, H. Yeh, G. Coukos, S. C. Rubin, L. R. Kaiser, and C. H. June. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61:4766-4772.
76. Woo, E. Y., H. Yeh, C. S. Chu, K. Schlienger, R. G. Carroll, J. L. Riley, L. R. Kaiser, and C. H. June. 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168:4272-4276.
77. Wu, C., Y. Zhu, J. Jiang, J. Zhao, X. G. Zhang, and N. Xu. 2006. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem* 108:19-24.
78. Yang, Z. Z., A. J. Novak, M. J. Stenson, T. E. Witzig, and S. M. Ansell. 2006. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107:3639-3646.
79. Zang, X., and J. P. Allison. 2007. The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition. *Clin Cancer Res* 13:5271-5279.

80. Zhou, P., X. Zheng, H. Zhang, Y. Liu, and P. Zheng. 2009. B7 blockade alters the balance between regulatory T cells and tumor-reactive T cells for immunotherapy of cancer. *Clin Cancer Res* 15:960-970.
81. Zou, W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6:295-307.
82. Zou, W., and L. Chen. 2008. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8:467-477.

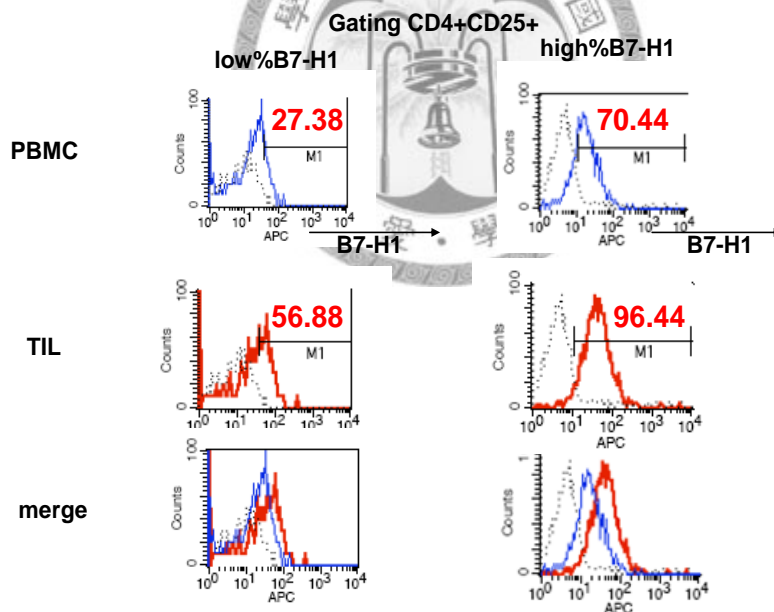


第六章、圖表

(A)

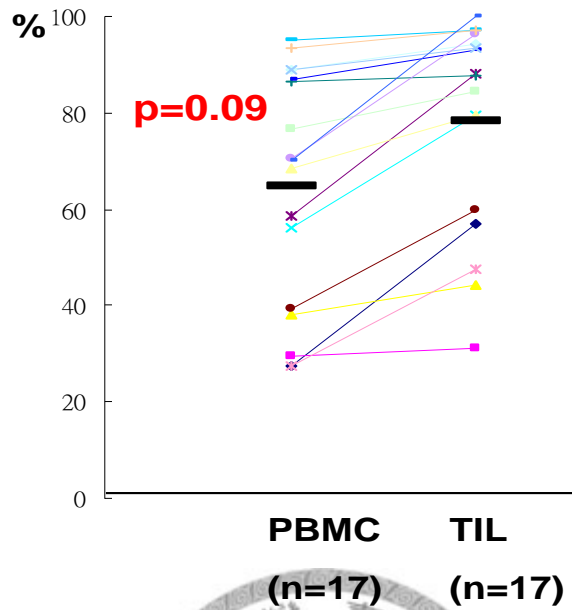


(B)

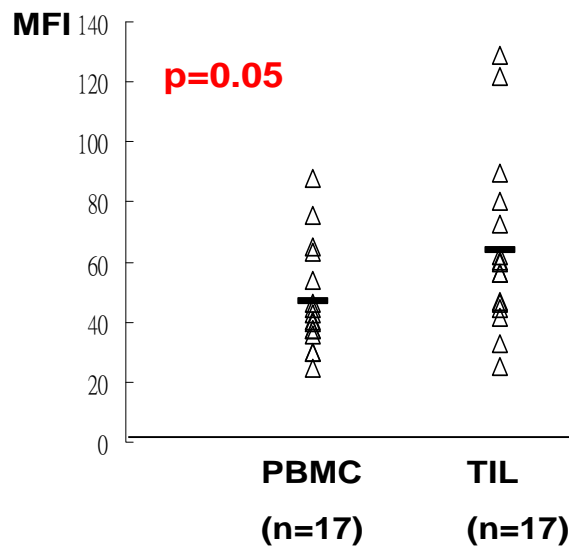


圖一. PBMC 和 TIL CD4+CD25+T 細胞之 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度(A)PBMC 和 TIL 經過 CD3+和 CD4+CD25+細胞選取後，(B)觀察 B7-H1 的表現百分比和表現強度，藍色實線是 PBMC，紅色實線是 TIL，黑色虛線是 isotype control，左邊是表現低 B7-H1 百分比 (PBMC 27.38%，TIL56.88%)，右邊是表現高 B7-H1 百分比(PBMC 70.44%，TIL96.44%)的兩個不同病人個體。在所有病人個體都可以看到 TIL 的百分比和表現強度皆有比 PBMC 稍高的趨勢。

(A)

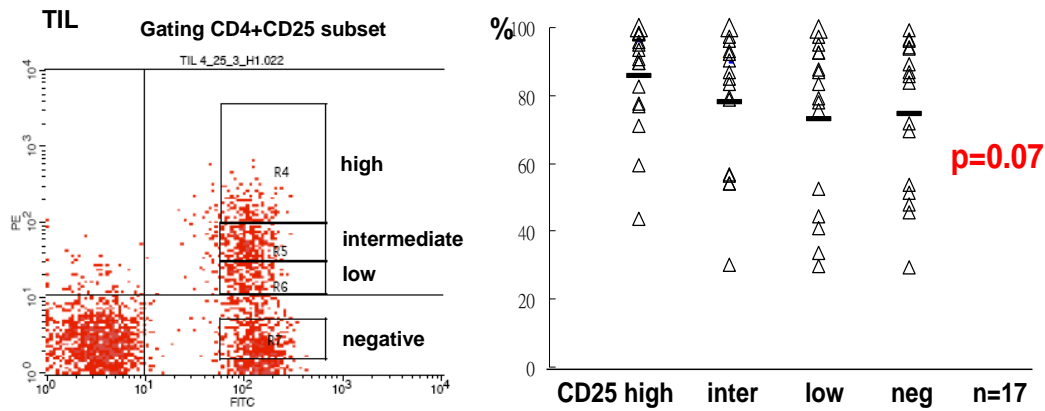


(B)

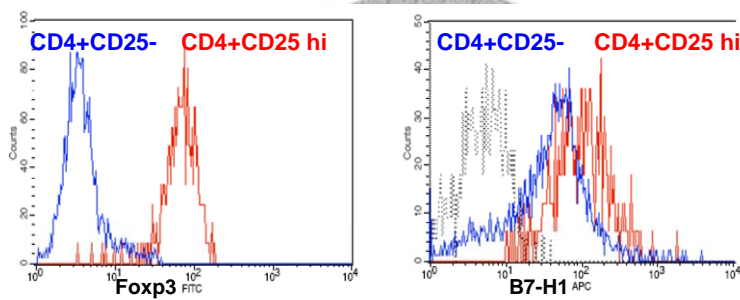


圖二. 統計 PBMC 和 TIL 的 CD4+CD25+T 細胞之 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度。PBMC 和 TIL 經過 CD3+和 CD4+CD25+細胞選取後，觀察 B7-H1 的表現百分比和表現強度，經過十七個病人的統計結果，發現 PBMC 和 TIL 的(A)百分比(PBMC 64.76%，TIL 78.25% $p=0.09$)和(B)表現強度(PBMC 47.14，TIL 64.08 $p=0.05$)，都沒有顯著的差異性。

(A)

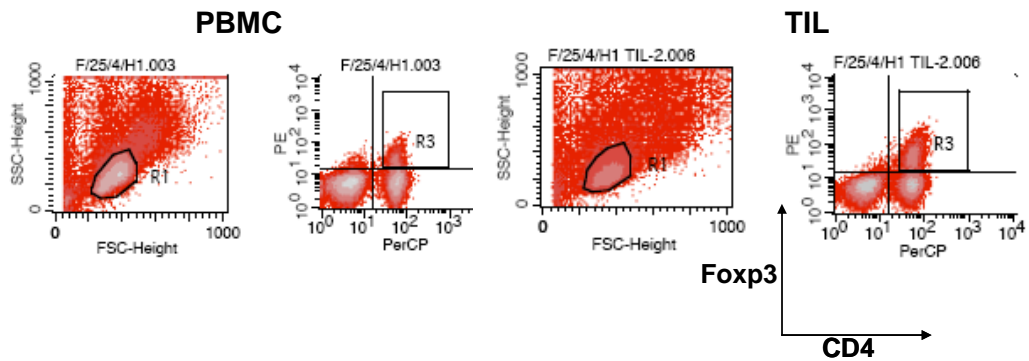


(B)

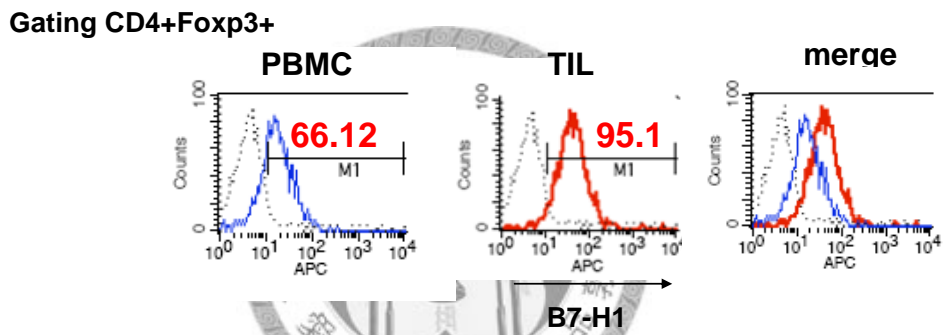


圖三. TIL CD4+CD25high、intermediate、low、negative T 細胞之 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度(A)將 TIL 的 CD4+ T 細胞根據 CD25 的表現量將細胞分為四群，左邊為細胞選取情形，右圖為統計 CD4+CD25high、intermediate、low 和 negative 四群細胞之 B7-H1 表現百分比比例(%)，發現 TIL CD4+細胞表現 B7-H1 的平均百分比(%), 隨著 CD25 細胞螢光表現強度增強有上升的情形，但是統計十七個病人的結果後，發現百分比並沒有顯著的差異性($p=0.09$)(B)將 TIL 的 CD4+ T 細胞群分為 high 和 negative 二群，觀察 CD4+CD25high、CD4+CD25- T 細胞的 B7-H1 的螢光表現量，藍色實線是 CD4+CD25-，紅色實線是 CD4+CD25high，黑色虛線是 isotype control，發現 TIL CD4+細胞表現 B7-H1 的細胞螢光表現強度，和 CD25 的表現與否有相關，間接也和 Foxp3 的表現強度有關聯性。

(A)

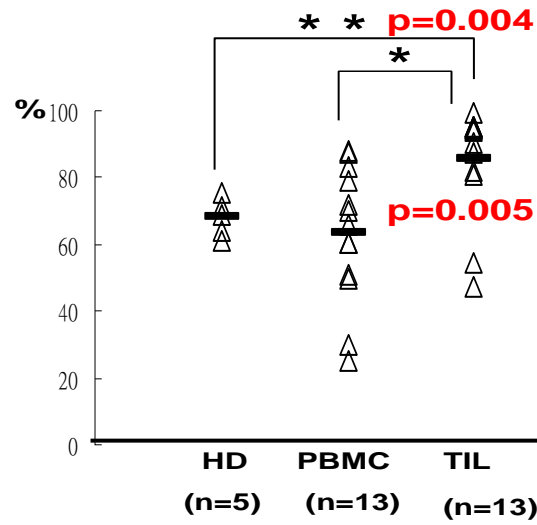


(B)

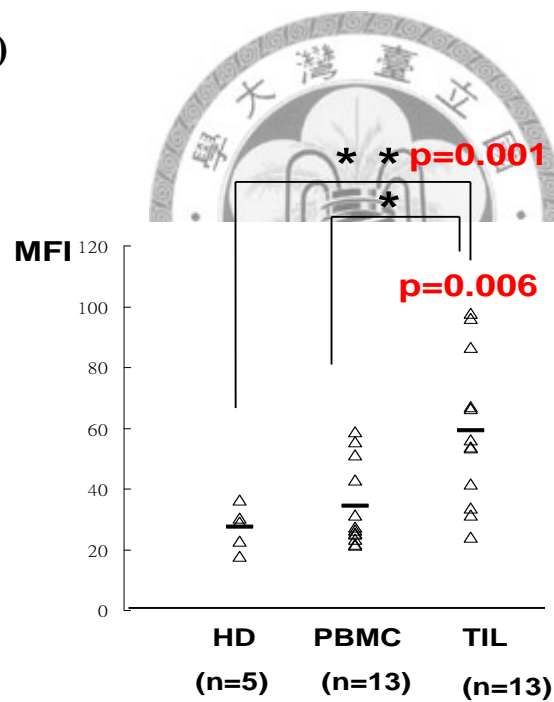


圖四. PBMC和TIL CD4+Foyp3+ T細胞之B7-H1共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度(A)PBMC和TIL經過CD4+ Foyp3+細胞選取後，(B)觀察B7-H1的表現百分比和表現強度，藍色實線是PBMC，紅色實線是TIL，黑色虛線是isotype control，在很多病人個體都可以看到TIL的百分比和表現強度皆有比PBMC較高的趨勢。

(A)

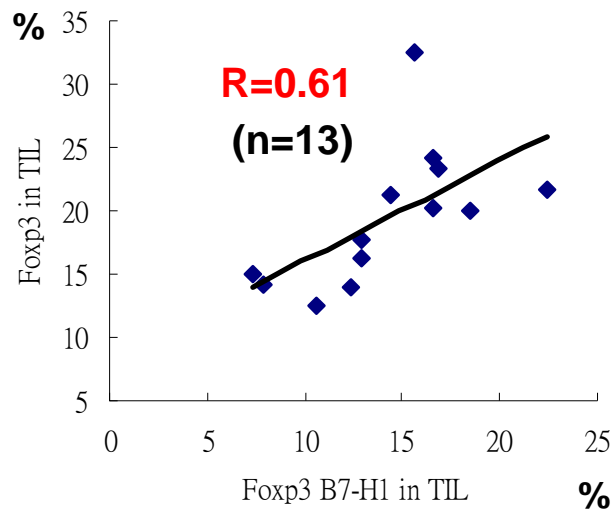


(B)



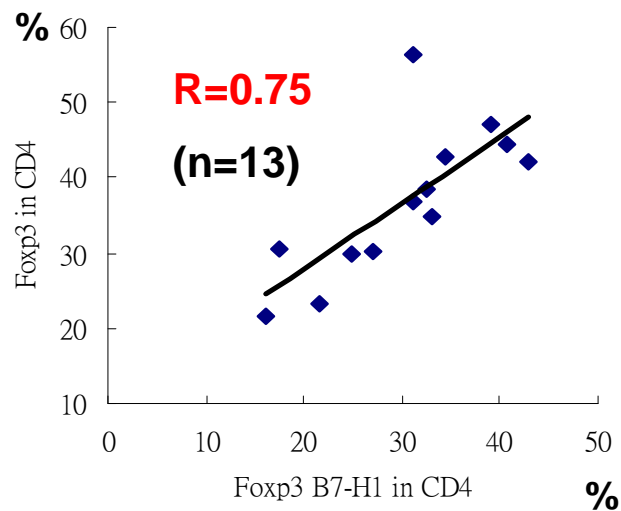
圖五. 統計 PBMC 和 TIL CD4+Foxp3+ T 細胞的 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度 PBMC 和 TIL 經過 CD4+CD25+細胞選取後，觀察 B7-H1 的表現百分比和表現強度，經過十三個病人的統計結果，發現 (A)TIL CD4+Foxp3+ 表現 B7-H1 的百分比例 85.47% 比病人 PBMC 63.20% (* $p=0.005$) 和正常人 PBMC 68.15% 都高 (** $p=0.004$)，而 (B)TIL CD4+Foxp3+ 調節性 T 細胞之 B7-H1 平均細胞螢光表現強度 MFI=59.04 比病人 PBMC 34.29 (* $p=0.006$) 和正常人 PBMC 27.31 都高 (** $p=0.001$)。

(A)



moderate correlation

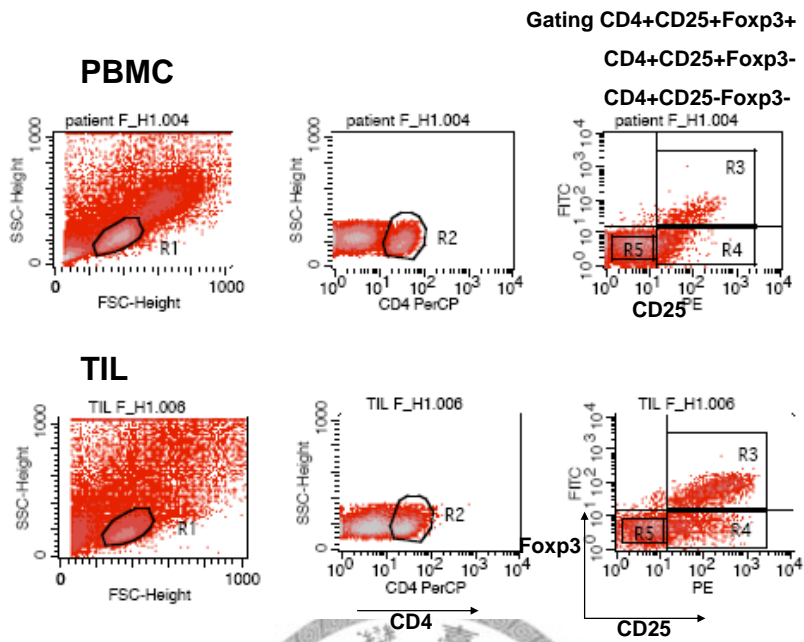
(B)



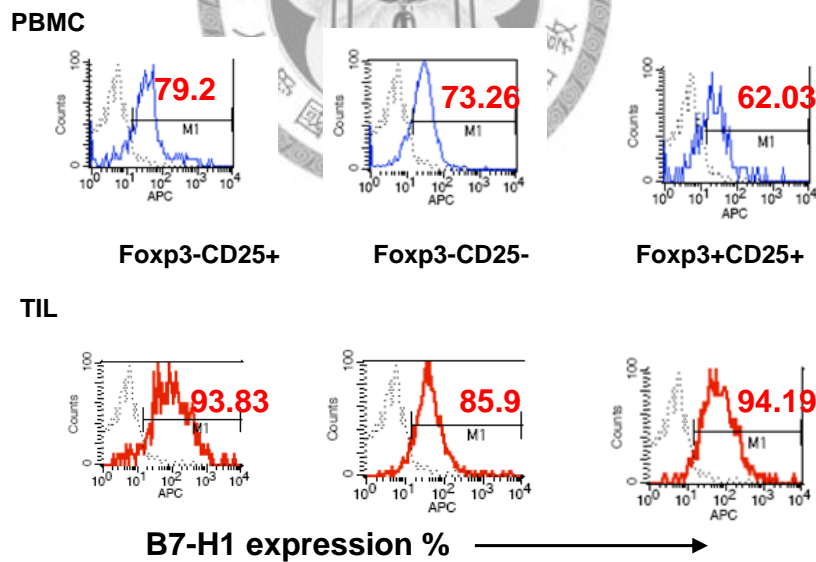
high correlation

圖六. 腫瘤組織Fxp3+B7-H1+T細胞和Fxp3+T細胞的相關性經過流式細胞儀分析和統計後可以看到CD4+Fxp3+B7-H1+和CD4+Fxp3+ T細胞的正相關性，(A)統計結果發現B7-H1+Fxp3+和Fxp3+細胞之百分比在TIL呈現中度相關($r=0.61$)，(B)而在CD4+T細胞內則是呈現高度相關($r=0.75$)。(0.5-0.7為中度相關，0.7-0.8為高度相關，0.8-0.9為非常高度相關)。

(A)

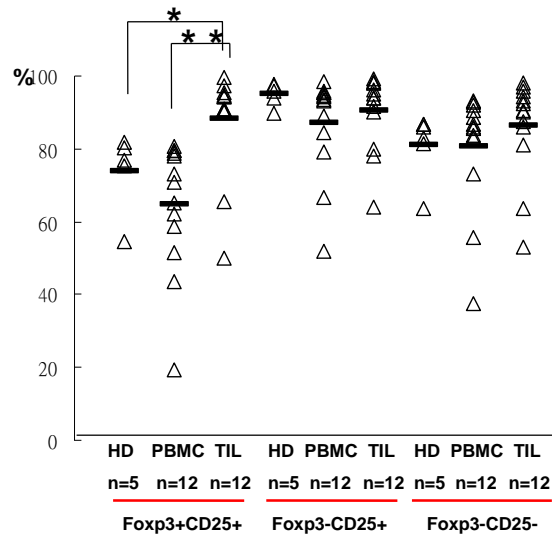


(B)

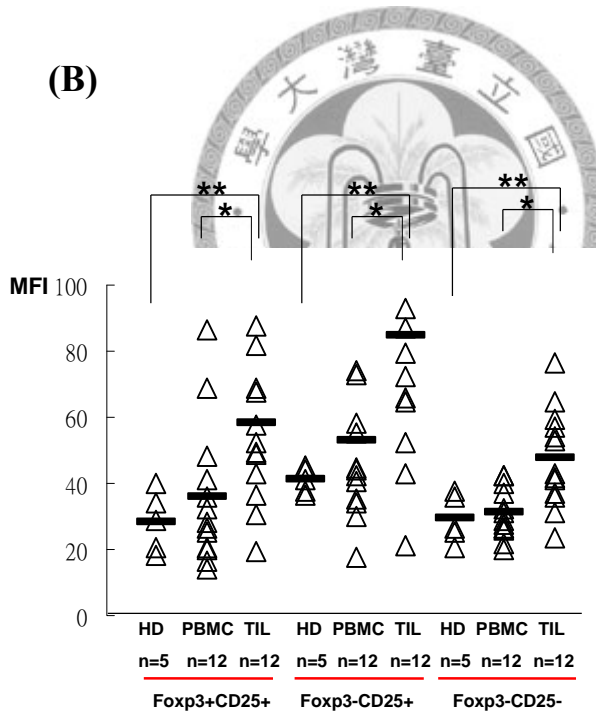


圖七. PBMC 和 TIL 的 CD4+CD25+Foxp3+、CD4+CD25+Foxp3-、CD4+CD25-Foxp3- T細胞之B7-H1共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度(A)PBMC和TIL經過CD4+和CD25、Foxp3細胞選取後，觀察B7-H1的表現百分比和表現強度，(B)觀察B7-H1的表現百分比和表現強度，藍色實線是PBMC，紅色實線是TIL，黑色虛線是isotype control，在很多病人個體都可以看到TIL的百分比和表現強度皆有比PBMC高的趨勢，而TIL CD4+CD25+Foxp3+的百分比上升幅度較大。

(A)

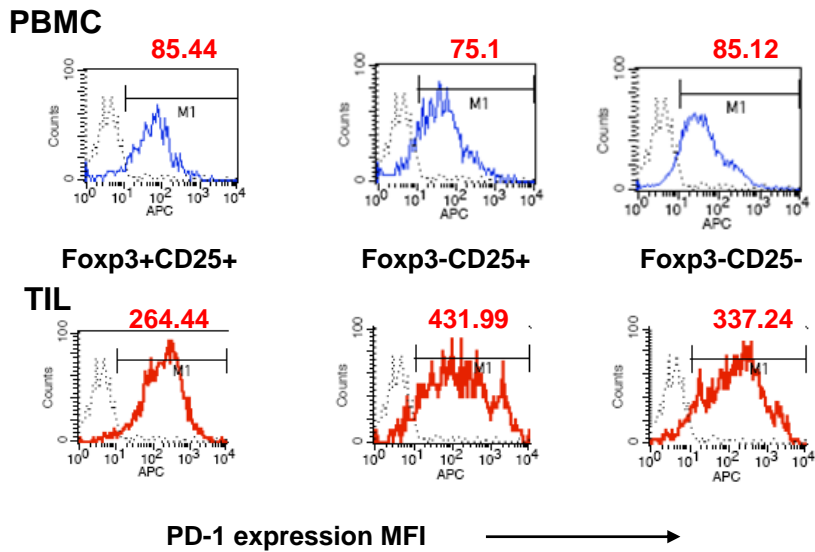


(B)

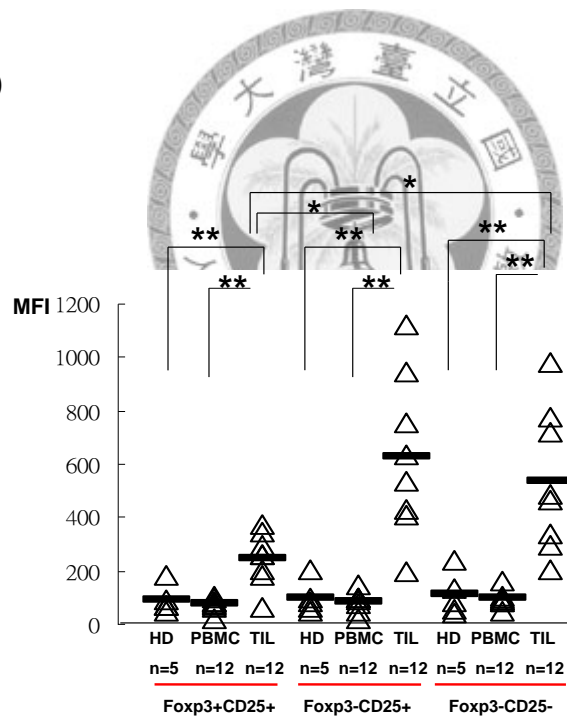


圖八. 統計 PBMC 和 TIL 的 CD4+CD25+Foxp3+、CD4+CD25+Foxp3-、CD4+CD25-Foxp3- T 細胞之 B7-H1 共同抑制分子細胞群體表現百分比和平均細胞螢光表現強度(A)經過統計十二個病人的結果後，發現 TIL CD4+CD25+Foxp3+ 調節性 T 細胞有 88.08%表現 B7-H1，比起病人 PBMC(64.71%)(** $p=0.001$)和正常人 PBMC(73.78%)($p=0.04$)都高許多，此外腫瘤組織內 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞有表現 B7-H1 之 MFI=58.24，比起病人 PBMC(35.7)($p=0.02$)和正常人 PBMC(28.28)(** $p=0.002$)都高許多，而 CD4+CD25+Foxp3-活化 T 細胞、CD4+CD25-Foxp3-未活化 T 細胞的 B7-H1 表現強度也都有類似的情形。

(A)

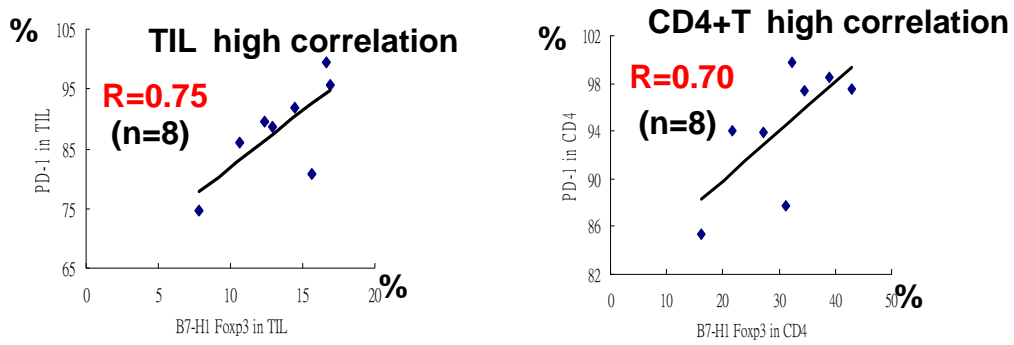


(B)

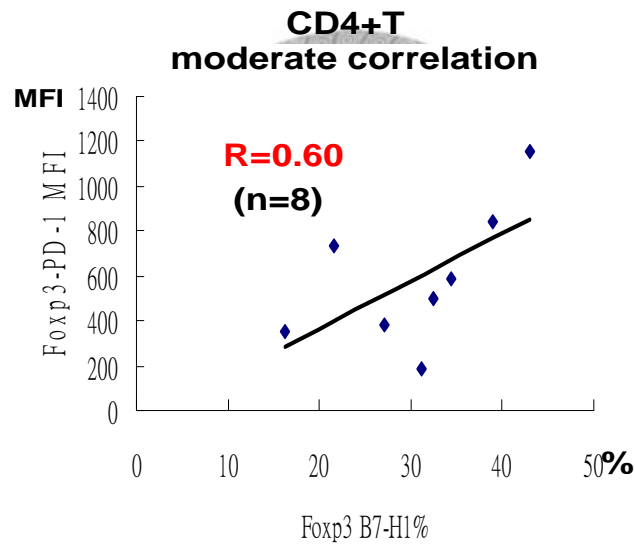


圖九 .PBMC 和 TIL 的 CD4+CD25+Fcpx3+ 、 CD4+CD25+Fcpx3- 、 CD4+CD25-Fcpx3- T細胞之PD-1共同抑制分子的細胞螢光表現強度 (A)經過 CD4、CD25和Fcpx3的細胞選取後，觀察PD-1的表現，TIL的平均螢光表現強度比起PBMC皆高出許多倍(B)經過統計八個病人的結果後，發現TIL CD4+CD25+Fcpx3+ 表現 PD-1 的強度比起 CD4+CD25+Fcpx3+ 、 CD4+CD25+Fcpx3-兩群細胞低，而TIL CD4+CD25+Fcpx3+平均螢光表現量強度大約是病人PBMC和正常人PBMC的兩倍，CD4+CD25+Fcpx3-活化T細胞是六倍，CD4+CD25-Fcpx3-未活化T細胞是五倍。

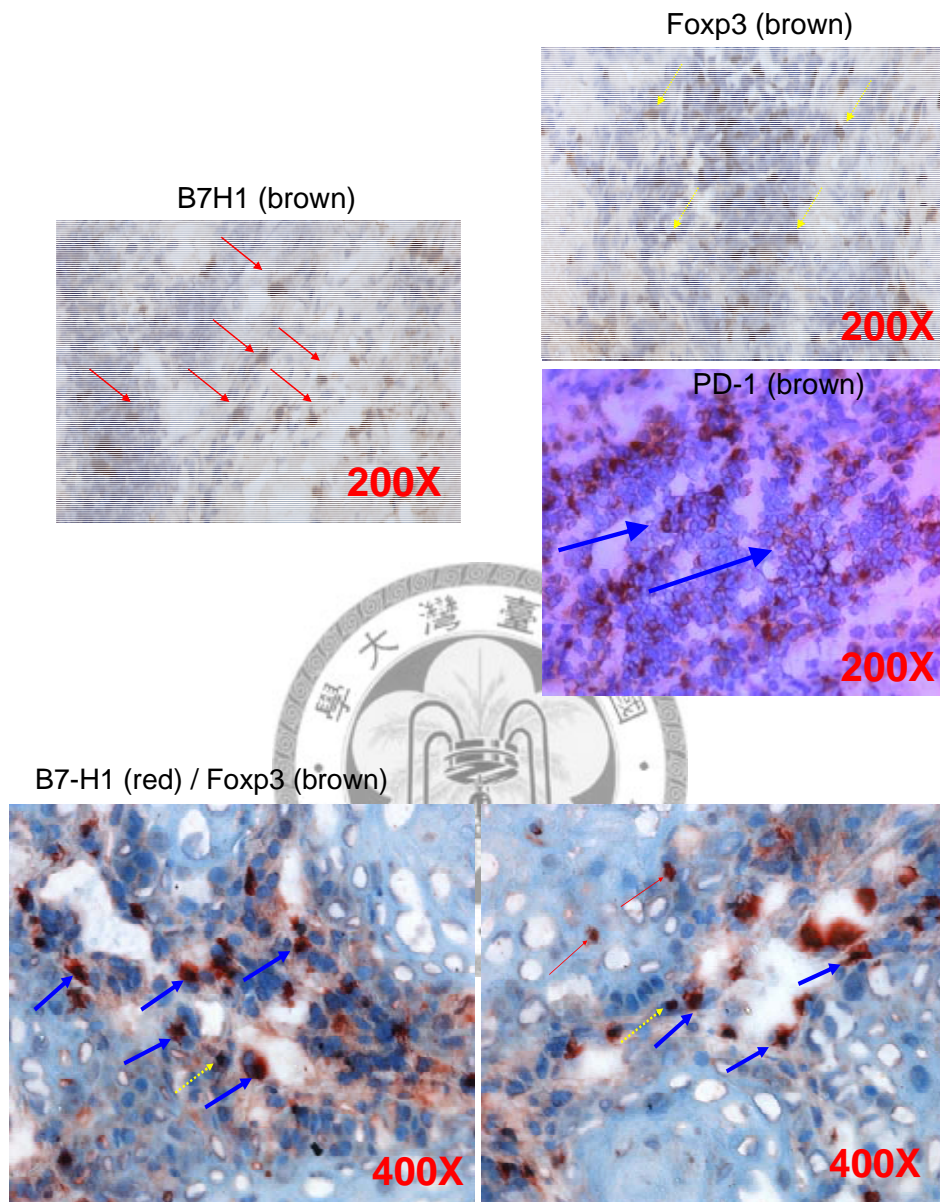
(A)



(B)

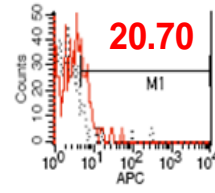
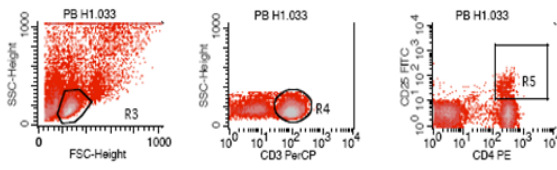


圖十．腫瘤組織 Foxp3+B7-H1+T 細胞和 PD-1 T 細胞的相關性藉由螢光免疫染色和流式細胞儀分析後發現，B7-H1+Foxp3+和 PD-1 在 TIL($r=0.74$)和 CD4+T 細胞($r=0.70$)都具有高度正相關，並且發現 B7-H1+Foxp3+表現百分比和 Foxp3-細胞 PD-1 表現強度在腫瘤組織 CD4+T 細胞($r=0.6$)具有中度相關性。

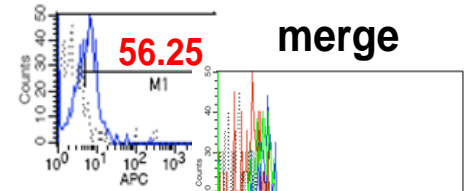
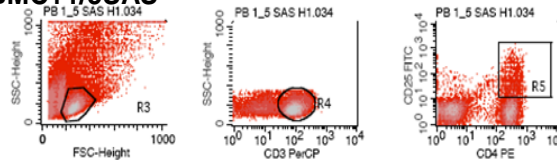


圖十一. 口腔鱗狀細胞癌腫瘤組織經組織切片和免疫染色所見到的CD4+CD25+Foxp3+B7-H1+調節性T細胞和PD-1浸潤細胞利用手術取下的口腔鱗狀細胞癌的腫瘤組織，包埋切片後進行組織免疫染色，可以看到在口腔鱗狀細胞癌的腫瘤組織有B7-H1+CD4+Foxp3+調節性T細胞的存在，並且也有表現B7-H1接受體PD-1的浸潤細胞。

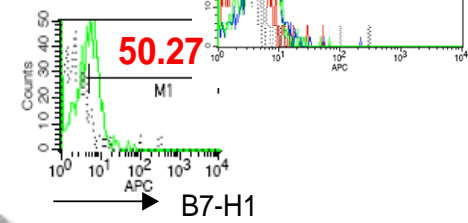
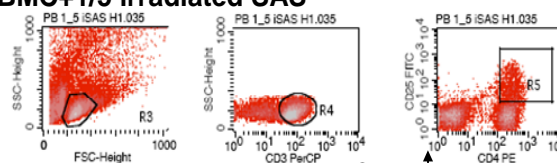
PBMC



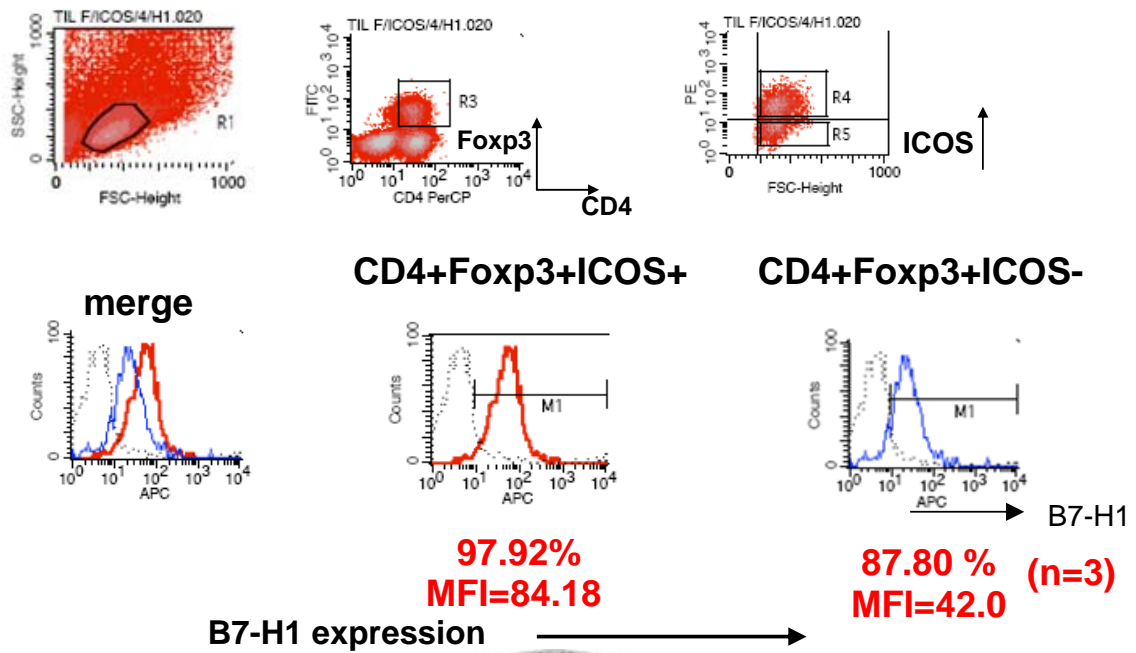
PBMC+1/5SAS



PBMC+1/5 irradiated SAS

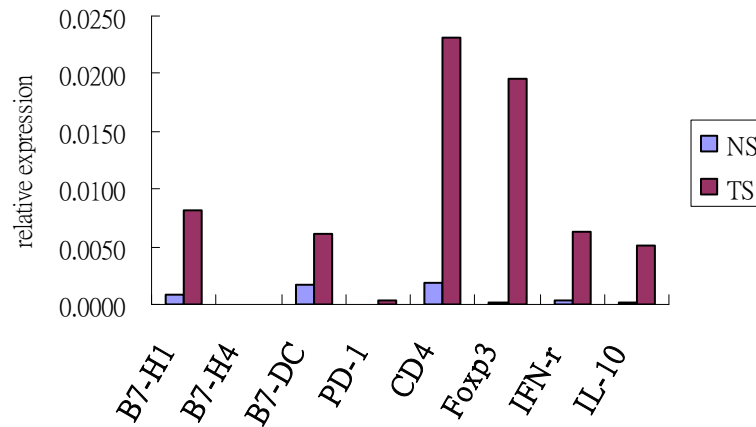


圖十二. 口腔鱗狀細胞癌細胞株SAS誘導CD4+CD25+T細胞之B7-H1表現當PBMC單獨培養時，CD4+CD25+表現B7-H1的比例大約是20.7%，而加入1/5細胞數的口腔鱗狀細胞癌細胞株SAS共同培養時，CD4+CD25+表現B7-H1的比例上升到56.25%，若是加入1/5細胞數的放射線照射口腔鱗狀細胞癌細胞株SAS共同培養時，CD4+CD25+表現B7-H1的比例上升到50.27%。

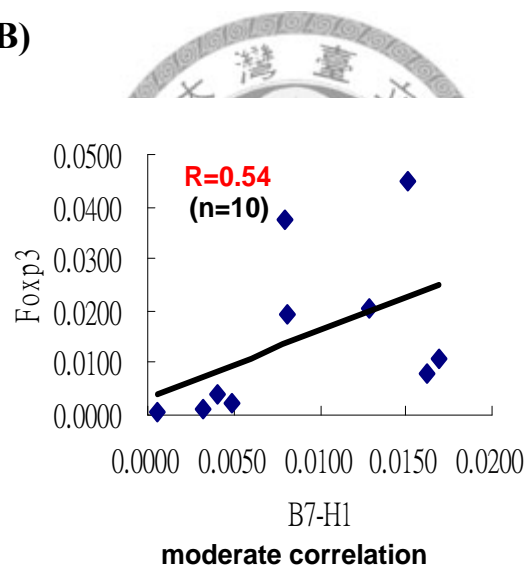


圖十三. 口腔鱗狀細胞癌病患分離出之腫瘤內浸潤 CD4+Foxp3+細胞的 B7-H1 和 ICOS 表現相關性選取 TIL CD4+Foxp3+的細胞，再將細胞分成 ICOS+和 ICOS-，觀察 B7-H1 的表現百分比和螢光表現強度，可以發現 ICOS+FOXP3+ Treg 表現較高百分比且強度較高的 B7-H1，經過統計(n=3)百分比有 10%的差異性，而表現量有兩倍的差異性。

(A)

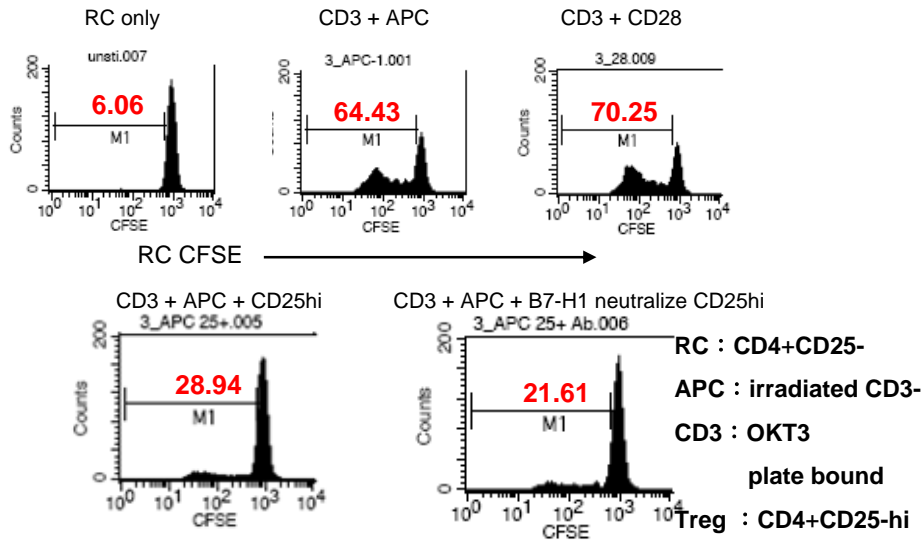


(B)

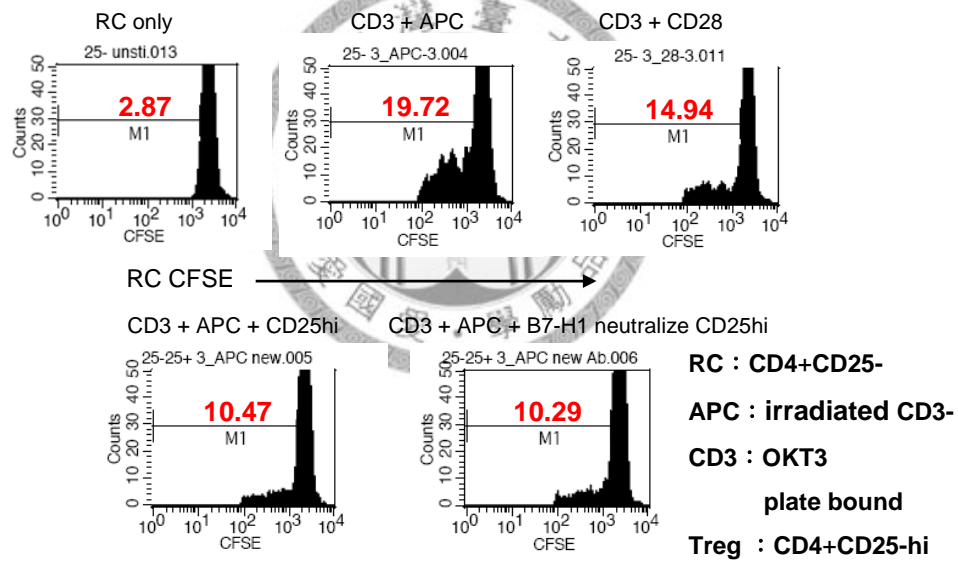


圖十四. 在腫瘤組織RNA level B7-H1和相關分子的表現量以及其相關性(A)腫瘤組織的RNA可以看到IL-10、IFN- γ 、CD4、PD-1、B7-DC、B7-H4、Foxp3和B7-H1和的表現量比正常組織高出許多，(B)經過十個病人統計，可以觀察發現Foxp3和B7-H1具有中度相關($r=0.54$)。

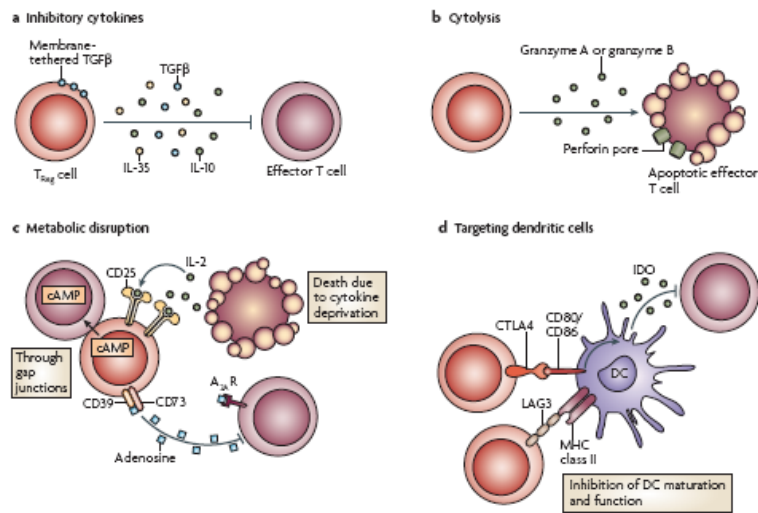
(A)



(B)



圖十五. 口腔鱗狀細胞癌病患之PBMC CD4+CD25hi細胞的細胞增生抑制試驗(A) 加入responder cell(RC,CD4+CD25-)和APC(CD3-)刺激五天可以看到64.43%的細胞增生，當加入CD4+CD25hi細胞時可以看到28.94%的細胞增生，達到50%以上的抑制效果，而先和B7-H1抗體結合的CD4+CD25hi細胞則是有21.61%的細胞增生，和CD4+CD25hi細胞的抑制效果沒有太大的差異性。(B)加入responder cell(CD4+CD25-)和APC(CD3-)刺激三天可以看到19.72%的細胞增生，當加入CD4+CD25hi細胞時可以看到10.47%的細胞增生，達到50%的抑制效果，而先和B7-H1抗體結合的CD4+CD25hi細胞則是有10.29%的細胞增生，和CD4+CD25hi細胞的抑制效果仍然沒有太大的差異性。



附圖一. 調節性 T 細胞免疫抑制機制

Vignali et al. 2008 How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.

The B7 family ligands			The CD28 family receptors		
Expression	Name		Name	Expression	Function
Group I					
APC	B7-1	↔	CD28	T cells	Costimulation
APC	B7-2	↔	CTLA-4	Activated T cells	Coinhibition
APC, tissue	B7h (B7-H2)	→	ICOS	Activated T cells	Costimulation
Group II					
APC, tissue, tumors	PD-L1 (B7-H1)	→	PD-1	Activated T, B, and myeloid cells	Coinhibition
APC	PD-L2 (B7-DC)	→	PD-1	Activated T, B, and myeloid cells	Coinhibition
Group III					
APC, tissue, tumors	B7-H3	→	Unidentified receptor	Activated T cells	Coinhibition
Tissue, tumors	B7x (B7-H4)	→	Unidentified receptor	Activated T cells	Coinhibition

附圖二. B7 分子的表現和功能

Zang et al. 2007 The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition.

Clin Cancer Res 13:5271-5279.