

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology, College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

分析人類口腔鱗狀上皮細胞癌浸潤之調節性T細胞

與Th17細胞間相互關係

Characterization of tumor infiltrating regulatory T cells  
and the interplay with Th17 cells in human oral  
squamous cell carcinoma

賴宛伶

Wan-Ling Lai

指導教授：賈景山 博士

Advisor: Jean-San Chia, Ph.D.

中華民國九十八年六月

June, 2009

## 致謝

首先誠摯的感謝指導教授賈景山博士，老師悉心的教導使我能對於口腔癌免疫抑制的領域進行深入的探討，不時的討論並指點我正確的方向，使我在這兩年中獲益匪淺。老師對學問的嚴謹更是我在學習過程中的典範。本論文的完成另外亦得感謝免疫學研究所的李建國老師大力協助，及免疫學研究所許秉寧老師的支持。因為有你們的體諒及幫忙，使得本論文能夠更完整而嚴謹。

兩年裏的日子，實驗室裏共同的生活點滴，學術上的討論、言不及義的閒扯、一起努力奮鬥到三更半夜，這些經歷讓我會永遠深深的牢記在心裡，感謝各位學長姐、同學、學弟妹的共同砥礪，你/妳們的陪伴讓兩年的研究生活變得絢麗多彩。感謝秋月、惠婷、筱菁以及珮茹學姐們不厭其煩的指出我研究中的缺失，且總能在我迷惘時為我解惑，感謝育志同學這兩年來一起互相幫忙及體諒，才能完成這篇論文，也感謝中帆、鴻偉同學的相互扶持，恭喜我們順利走過這兩年。此外，實驗室的傑仁、永煌、惠祺、旻潔、靖寧當然也不能忘記，你/妳們的幫忙及搞笑讓我的研究所生涯更增添了許多風采。

維尼在背後的默默支持更是我前進的動力，沒有維尼的體諒、包容，相信這兩年的生活將是很不一樣的光景。

最後，謹以此文獻給一直默默支持我的家人，雖然這幾年在台北念研究所無法時常回家，你們卻總能體諒我甚至一再提醒要我別太累，你們的關心我會永遠銘記在心。

## 中文摘要

口腔鱗狀上皮細胞癌(OSCC)在全世界屬於排名第六名的癌症，其治療後存活率仍然相當低。由調節性 T 細胞造成的免疫抑制被認為對口腔鱗狀上皮細胞癌的產生扮演重要角色，在近期研究中發現  $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ 調節性 T 細胞可被區分成兩群表現型不同的細胞，分別為  $ICOS^+Foxp3^+$ 調節性 T 細胞以及  $ICOS^-Foxp3^+$ 調節性 T 細胞， $ICOS^+Foxp3^+$ 調節性 T 細胞被認為屬於表現 IL-10 以及少量 mTGF- $\beta$ ，而  $ICOS^-Foxp3^+$ 調節性 T 細胞只表現 mTGF- $\beta$ 。在實驗室先前研究中已知口腔鱗狀上皮細胞癌的病患其腫瘤內浸潤淋巴細胞中  $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ 調節性 T 細胞所佔的比例比病患血液中高出許多，此外先前研究也發現到病患浸潤腫瘤內調節性 T 細胞可依 CD25、Foxp3 表現量的差異在細分為不同亞群的調節性 T 細胞，並且表現出不同程度的細胞激素，在本研究中將探討口腔鱗狀上皮細胞癌腫瘤內浸潤淋巴細胞中的調節性 T 細胞是否也可利用 ICOS 表現差異來區分成不同表現型的調節性 T 細胞。除此之外，近期研究中，Th17 細胞在腫瘤中扮演的角色也廣泛的被探討當中，許多研究確實也發現 Th17 細胞與腫瘤生長息息相關，更有研究指出腫瘤中 Th17 細胞與調節性 T 細胞有重要的相互關係，然而究竟 Th17 細胞對腫瘤生長扮演甚麼角色以及與調節性 T 細胞之間的相互關係為何至今仍不清楚，本篇研究中發現腫瘤浸潤淋巴細胞中存在大量 Th17 細胞以及  $IL-17^+Foxp3^+$ 細胞，這與腫瘤微環境中存在高量的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TGF- $\beta$  等誘導 Th17 細胞產生的細胞激素結果一致。此外，研究中也發現不同於血液中研究的結過，在腫瘤內  $IL-17^+Foxp3^+$ 細胞與 Th17 細胞的分佈具有非常高度相關性，而 Th17 細胞與調節性 T 細胞的分佈則形成負相關，這說明了確實 Th17 細胞與調節性 T 細胞間確實有著重要的相關性。為了進一步證實腫瘤細胞對於 Th17 細胞的產生有直接相關性，我們利用體外共同培養實驗證實了的確腫瘤細胞能誘導  $IL-17^+Foxp3^+$ 細胞的產生。由於 Th17 細胞起出的研究被認為是與病原菌的清除相關，而口腔鱗狀上皮細胞癌已知時常會伴隨著細菌感染的發生，研究中也觀察到病患腫瘤組織中確實存在著細菌 16S RNA，因此在口腔鱗狀上皮細胞癌腫瘤內發現的 Th17 細胞與細菌感染是否也具有相關性，在研究中也將進一步探討。

## Abstract

Oral squamous-cell carcinoma (OSCC) was the sixth most common cancer worldwide with low survival rates after therapy. Immunosuppression mediated by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T (Treg) cells was a characteristic feature of OSCC. Recent studies have defined two subsets of FOXP3<sup>+</sup> natural Treg cells by the expression of the costimulatory molecule ICOS and IL-10 or TGF- $\beta$ . Our previous study revealed that proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells in TIL were significantly enriched relative to that found in PBMC from OSCC patients. Moreover, there were different subsets of regulatory T cells infiltrated in OSCC. The specific aim was to identify and characterize the different subsets of Tregs in TIL based on ICOS expression. In addition, association of Tregs with the presence of Th17 cells was also investigated to confirm whether there was synergistic or antagonistic relationship between these cells in TIL of OSCC. Despite the important role of Th17 cells in the pathogenesis of many autoimmune diseases, their prevalence and the mechanisms by which they are generated and regulated in cancer remain unclear. A recent study found that the tumor-associated Th17 cells and Treg cells were synchronically increased following tumor development. The kinetic distribution of Treg cells and Th17 cells suggested their close relationship in the tumor. In this study, we reported that the high percentage of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells and IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in the tumor site, compared with the low percentage of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells and IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in PBMC from healthy donor and cancer patient. These finding consisted with the high level of IL-1 $\beta$ 、IL-6、TGF- $\beta$  presented in the tumor microenvironment. Moreover, this study also found the prevalence of IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells and Th17 cells were high positive correlation, and the prevalence of Th17 cells and Foxp3 cells were high negative correlation in the tumor site. To further demonstrate the role of tumor cells in the induction of IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells, the in vitro coculture system were performed. The results show coculture of PBMC with tumor cells could generate high percentage of Th17 cells and IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells. It has been reported that viable bacteria presented within oral squamous cell carcinoma tissue. The correlation between Th17 cells generation and bacteria infection in OSCC needs further investigation.

# 目 錄

誌謝.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
目錄.....	iv
圖表目錄.....	vi
第一章 緒論.....	1
第一節 研究背景.....	1
一、口腔癌.....	1
二、口腔鱗狀上皮細胞癌部位免疫抑制作用.....	2
三、調節性 T 細胞.....	3
四、誘導性輔助刺激分子.....	5
五、CD4 <sup>+</sup> T 細胞譜系分化的可塑性.....	5
六、輔助型 T 細胞亞群—Th17.....	6
第二節 研究動機與目的.....	8
第二章 研究材料與方法.....	10
第一節 人類周邊血液單核細胞收集與分離.....	10
第二節 口腔鱗狀上皮細胞癌病患腫瘤浸潤淋巴細胞分離純化.....	10
第三節 人類周邊血液 CD4 <sup>+</sup> T 細胞分離.....	10
第四節 細胞表面染色.....	11
第五節 細胞內染色.....	11
第六節 腫瘤組織之 RNA 萃取.....	11
第七節 同步定量(real-time)聚合酶連鎖反應.....	12
第八節 PBMC 與口腔癌細胞株體外培養.....	12
第九節 細胞激素測定.....	12

第十節 統計分析.....	13
第三章 結果.....	14
第一節 分析 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 之調節性 T 細胞之 ICOS 表現.....	14
第二節 分析 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 之調節性 T 細胞之 mTGF-β 表現.....	14
第三節 分析浸潤口腔鱗狀上皮細胞癌組織及周邊血液之 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 調節性 T 細胞其 Foxp3 與 ICOS 表現情形.....	15
第四節 統計病患 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 之調節性 T 細胞之 ICOS 表現.....	15
第五節 分析腫瘤內浸潤以及周邊血液單核球之 Th17 細胞.....	15
第六節 分析病患周邊血液單核細胞中 IL-17 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> 細胞含量.....	16
第七節 探討浸潤腫瘤內 Th17 細胞、調節性 T 細胞、IL-17 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> 細胞間分佈的相關性.....	17
第八節 分析腫瘤微環境中細胞激素表現之情形.....	17
第九節 PBMC 與口腔癌細胞株進行體外培養實驗.....	18
第十節 分析腫瘤微環境中細菌存在情形.....	18
第四章 討論.....	20
第五章 參考文獻.....	24

## 圖表目錄

圖一、分析浸潤腫瘤內、轉移淋巴結和周邊血液之CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 調節性T細胞其ICOS表現.....	31
圖二、分別探討腫瘤內浸潤淋巴球CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> 、CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>low</sup> 和CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>intermediate</sup> 細胞亞群其ICOS表現量.....	32
圖三、分析浸潤腫瘤內、轉移淋巴結和周邊血液之 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 調節性 T 細胞其 mTGF-β 表現.....	33
圖四、分析浸潤腫瘤內及周邊血液之 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 調節性 T 細胞其 Foxp3與 ICOS 表現情形.....	34
圖五、統計浸潤腫瘤內、轉移淋巴結和周邊血液之CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 調節性T細胞其ICOS表現.....	35
圖六、比較健康個體、病患周邊血液單核細胞以及浸潤腫瘤內淋巴細胞中 Th17 細胞含量.....	36
圖七、比較健康個體、病患周邊血液單核細胞以及浸潤腫瘤內淋巴細胞中 IL-17 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> 細胞含量.....	37
圖八、探討浸潤腫瘤內淋巴細胞中 Foxp3 <sup>+</sup> 調節性 T 細胞與 Th17細胞分佈相關性.....	38
圖九、探討口腔癌病患周邊血液中 Foxp3 <sup>+</sup> 調節性 T 細胞與 Th17細胞分佈相關性.....	39

圖十、分析病患腫瘤微環境中細胞激素或轉錄因子存在的情形.....	40
圖十一、分析病患腫瘤微環境與非腫瘤微環境中細胞激素或轉錄因子存在的情形 .....	41
圖十二、利用PBMC與口腔癌細胞株進行體外培養，以誘導出Th17細胞、 IL-17 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> 細胞產生.....	42
圖十三、利用CD4 <sup>+</sup> T細胞與口腔癌細胞株進行體外培養，以誘導出Th17細 胞、IL-17 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> 細胞產生.....	43
圖十四、分析病患腫瘤微環境中細菌存在情形.....	44
表一、本研究中分析之口腔鱗狀上皮細胞癌病患的臨床病理相關數據，包括年 齡、性別、腫瘤起源處、以及病理分期.....	45
附圖一、由環境周圍的細胞激素決定 CD4 T 細胞的分化與轉化.....	46





## 第一章 緒論

### 第一節 研究背景

#### 一、口腔癌

頭頸癌包括口腔至咽喉部所有的鱗狀上皮癌，全世界每年約有五萬例以上的頭頸癌新病例產生，而頭頸癌中佔最高比例的即是口腔癌。在台灣口腔癌已經連續兩年高居男性癌症死亡率的第四名，僅次於肝癌、肺癌及大腸直腸癌。口腔癌是由口腔內的組織細胞惡化所形成的腫瘤。口腔癌發生的部位包括唇、舌、口底、頰黏膜、齒槽黏膜、齒齦、口蓋、上顎竇及顎骨等。口腔癌的種類可分為鱗狀上皮細胞癌、疣狀癌、腺樣囊狀癌、黏液表皮樣癌等，其中95%以上屬於鱗狀上皮細胞癌(Lo W.L. *et al.*, 2003)。

近年來，口腔癌的發生率持續上升中，由行政院衛生署統計資料顯示，台灣口腔癌造成的死亡人數於民國七十五年的423人，在民國八十五年增加為1042人，民國九十年增加為1560人，甚至在民國九十五年增加為2202人，不僅如此，口腔癌病患的平均年齡也逐年下降至41-50歲之間。於民國九十七年癌症死亡原因統計中，口腔癌位於造成癌症死亡第六名，並且高居男性癌症的第四名。罹患口腔鱗狀上皮細胞癌的原因為多因性，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(La Vecchia *et al.*, 1997; Takezaki *et al.*, 1996)；而在臺灣和東南亞國家，口腔鱗狀上皮細胞癌的高發生率與咀嚼檳榔的習性有關(Notani *et al.*, 2000)，根據統計90%以上的口腔癌病人會有嚼檳榔的習慣，且大多數人也同時有抽菸及喝酒的習慣(Ko *et al.*, 1992)。有研究指出檳榔萃取物，含有一種遺傳毒性致癌物(Shirname *et al.*, 1983; Shirname *et al.*, 1984)，促使發生DNA受損機率增加(Dave *et al.*, 1992)，因此，檳榔造成的基因毒性作用，也可能會導致口腔黏膜的致癌變化。

關於口腔癌的臨床病灶通常為經篩選或病理組織切片檢查有上皮增生過度角質化及有異常細胞都可能被列為癌前期病灶而經病理切片認定有惡性腫瘤如有核異常濃染，上皮增生且基底層破裂使細胞侵入皮下組織，或細胞有大量有絲

分裂等，並可分為角質化或非角質化之鱗狀上皮癌。但臨床上依據國際癌症協會(UICC)及美國癌症協會(AJCC)對口腔癌都有其分期，分期主要作為未來建立治療方法及預後之判斷，大致分成下列四期別：

- (1)第一期:病灶小於 2 公分，無頸部淋巴節及全身轉移。
- (2)第二期:病灶大於 2 公分小於 4 公分，無頸部淋巴節或全身轉移。
- (3)第三期:病灶大於 4 公分或任何大小，且有單側(同側)1 個小於或等於 3 公分頸部淋巴節轉移。
- (4)第四期:病灶侵犯鄰近組織或任何大小之病灶有超過 3 公分之頸部淋巴結轉移，或有多個淋巴結轉移或有遠端轉移之病灶。

不同時期的病灶其預後情形也不同，口腔癌前期及第一、二期口腔癌都有很好的五年以上存活率，一般高於百分之六十以上。第三、四期口腔癌其五年存活率低於百分之五十及百分之三十以下。

## 二、口腔鱗狀上皮細胞癌部位免疫抑制作用

1909年 Ehrlich 首先提出的免疫監測(immune surveillance)觀念，認為免疫系統具有辨認並且摧毀剛轉型的細胞，因此能有效的抑制腫瘤形成(Ehrlich, P. *et al.*, 1909)；1960年有科學家在老鼠中證實“腫瘤專一性抗原(tumor-specific antigen)”能誘導出免疫反應，以對抗由化學制癌物或病毒引起的移植腫瘤(Old L. J. *et al.*, 1964)，進一步的證實了免疫監測假說(immune surveillance hypothesis)。之後也陸續的出現免疫不全導致腫瘤產生假說，並且被證實免疫不全的老鼠較免疫健全老鼠易長出淋巴瘤(Houghton, A. N. *et al.*, 2004)。不僅如此，腎臟移植病人也被報導易長出惡性黑色素瘤、肺癌、大腸癌與膀胱癌等，證實免疫不全的病患確實會增加罹癌的機率。

目前研究癌症學者認為免疫編輯(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(Dunn *et al.*, 2002; Dunn *et al.*, 2004)。免疫編輯過程大致分為三個時期:去除癌病變組織(elimination phase)、平衡期(equilibrium phase)，以及癌細胞逃離宿主的免疫反應(escape phase)。排除期(elimination phase)代表免疫監測的概念，免疫

反應作用去除變異的癌細胞，然而，在平衡期(equilibrium phase)和癌細胞逃離免疫反應期間，免疫細胞和腫瘤細胞之間互相作用，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，也可能由腫瘤細胞變異或是減少免疫性，導致只有少數的免疫細胞能辨識毒殺腫瘤細胞，躲避攻擊持續生長。最終，腫瘤細胞和免疫細胞相互作用結果，造成腫瘤侵略的環境。

有文獻指出，壓制腫瘤生長的免疫反應，會被口腔癌細胞作用而受抑制。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)，其功能皆被口腔癌細胞抑制(Jewett *et al.*, 2006; Laad *et al.*, 1996)。在口腔鱗狀上皮細胞癌病患中，已發現自然殺手細胞、T 細胞或是樹突細胞皆呈現缺陷狀態，研究指出在病人周邊血的自然殺手細胞、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、和細胞增生能力降低(Hoffmann *et al.*, 2002b; Reichert *et al.*, 2002)。儘管如此，關於口腔鱗狀上皮細胞癌調節的免疫抑制機制至今仍不明確。近年來，對於調節性 T 淋巴球在腫瘤、與病人周邊血液增生的報告，皆指出調節性 T 淋巴球的增生，會幫助癌細胞躲避免疫系統監控，並幫助腫瘤之生長。因此調節性 T 細胞，被認為和腫瘤逃避免疫機轉有高度相關性。

### 三、調節性 T 細胞

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，通常起著維持自身耐受和避免免疫反應過度損傷自體的重要作用。70 年代曾命名為抑制 T 細胞 (suppressor T cell)，因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<sup>+</sup> T 淋巴細胞執行，而這群細胞被稱之為調節性 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，較少研究調節性 T 細胞的角色(Zou, 2006)，不同亞群的人類調節性 T 細胞，抑制免疫反應的機制，又更少研究和探討。調節性 T 細胞有多種類，可分為 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性 T 細胞、Tr1 細胞與 Th3 細胞等亞型。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性 T 細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs)為目前最被廣泛研究的調節性 T 細胞,依形成來源可分為由胸腺發展而成的天然調節性 T 細胞(natural occurring Treg)(Sakaguchi, 2004),和於體表經由誘導產生的誘導性調節性 T 細胞(iTreg)(Walker *et al.*, 2003)。研究指出,自然調節性 T 細胞,在正常人、和小鼠的外周邊血及脾臟組織的 CD4<sup>+</sup>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  $\alpha$  鏈),更具有專一性的標記因子 Forkhead or winged helix of transcription factor P3, 簡稱 Foxp3/FOXP3, 此轉錄因子,與調節性 T 細胞的生成及功能有關(Hori *et al.*, 2003)。

腫瘤細胞會表現一系列的抗原,其中包含自體抗原(self-antigens),而調節性 T 細胞已經被報導指出主要能有效維持針對自體抗原 T 細胞的耐受性,因此被聯想到與腫瘤形成有相關性(Zou, 2006)。在許多中癌症研究中都證實在腫瘤微環境中存在著高比例的調節性 T 細胞,包括在口腔鱗狀細胞癌的研究,這群浸潤在腫瘤中的調節性 T 細胞表現 IL-10、TGF- $\beta$  等細胞激素,並且具有免疫抑制的能力(Laura Strauss *et al.*, 2007)。

調節性T細胞的抑制對象包括CD4<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞、樹突細胞(Dendritic cells)、B細胞、巨噬細胞(Macrophages)、造骨細胞(Osteoblasts)、肥大細胞(Mast cells)、天然殺手細胞(NK cells)、自然殺手T細胞(NK T cells)等,而調節性T細胞主要有幾點特色,不同於一般Th1、Th2細胞,當調節性T細胞經由TCR與costimulatory訊號刺激後,細胞本身並不會增生,但是當同時接受TCR與IL-2刺激時調節性T細胞便會增生,調節性T細胞本身並不會產生IL-2、IL-4、IFN- $\gamma$ 等細胞激素,調節性T細胞須藉由TCR刺激活化後才能進行抑制,一旦調節性T細胞已經活化,便不在需要TCR刺激即能進行抑制,並且不受MHC限制(Ethan M. Shevach, 2009)。調節性T細胞主要透過以下四種機制來進行抑制Foxp3<sup>+</sup> T細胞的反應(a)調節性T細胞會產生抑制型細胞激素IL-10、TGF- $\beta$ 、IL-35來促使Foxp3<sup>+</sup> T細胞的細胞週期停止,(b)調節性T細胞屬於高度CD25(IL-2 receptor  $\alpha$ )表現的細胞,會藉由競爭掉其他T細胞也需要的IL-2,促使其他的T細胞走向apoptosis,(c)活化的調節性T細胞可進行類似毒殺細胞的功能,釋放出Granzyme毒殺Foxp3<sup>+</sup> T細胞,(d)調節性T細胞也會藉由其表面表現的Galectin-1或其他未知的分子經

effector T細胞表面受器結合後造成effector T細胞的細胞週期停止。

#### 四、誘導性輔助刺激分子(inducible costimulatory molecule ; ICOS)

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<sup>-/-</sup>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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>調節性T細胞會高度表現inducible costimulatory molecule (ICOS),並且證實這群ICOS<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>天然調節性T細胞其功能會相似表現IL-10的Tr1細胞(Laura Strauss *et al.*, 2008),之後,自然調節性T細胞更直接被區分為ICOS<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>調節性T細胞與ICOS<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>調節性T細胞,並且在研究中指出ICOS<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>調節性T細胞可藉由表現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<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>調節性T細胞只會表現TGF-β(Tomoki Ito *et al.*, 2008)。不僅是功能上有所差異,這兩群調節性T細胞在調控自身的存活與增殖上也有不同的特性。

#### 五、CD4<sup>+</sup>T細胞譜系分化的可塑性(Plasticity of CD4<sup>+</sup>T Cell Lineage Differentiation)

一般認為naïve CD4<sup>+</sup>T細胞會分化成不同的功能的T細胞而被歸納成為特定細胞譜系,並且此分化後的細胞是不可逆的,Th1(T helper type I)細胞穩定的表現IFN-γ、Th2(T helper type II)細胞表現IL-4。後期被發現並且深入探討的另外兩群CD4<sup>+</sup>T細胞-調節性T細胞與Th17細胞讓科學家們必須重新思考是否這些輔助型T細胞所呈現的確實是一種不可逆性的分化終點,實際上,許多證據已證實CD4<sup>+</sup>T細胞,特別是調節性T細胞與Th17細胞皆具有高度的可塑性,研究認為調節性T細胞表現的Foxp3與Th17細胞表現的IL-17皆不是這麼的穩定,而促使

CD4<sup>+</sup> T細胞的分化以及轉化似乎決定於細胞激素(見附圖一)，當抗原呈現細胞遇到外來抗原將其呈現在MHC分子上，naïve CD4<sup>+</sup> T細胞可進而分化成為Th1、Th2、Th17、iTreg以及Tfh等細胞亞群。這些細胞的分化是藉由先天性免疫反應所產生的細胞激素所決定，像是IFN- $\gamma$ 與IL-12對於Th1細胞的分化重要，而IL-4主要導致Th2細胞產生，TGF- $\beta$ 與IL-6同時存在可誘導Th17細胞，TGF- $\beta$ 、Retinoic acid(RA)與IL-2的存在則參與了調節性T細胞的生成，而Tfh的細胞生成則需要IL-21的參與(Liang Zhou *et al.*, 2009)。雖然Th1、Th2細胞呈現出較穩定的型態，而調節性T細胞與Th17細胞在適當的刺激之下卻能快速的轉換成為其他型態的輔助型T細胞，舉例來說，調節性T細胞在存在有IL-6與IL-21的刺激之下能轉變成為IL-17-producing的細胞，而調節性T細胞轉變成為Tfh細胞則需要B細胞以及CD40-CD40L的結合。Th17細胞受IL-12能轉變成為IFN- $\gamma$ -producing的Th1細胞或是受IL-4刺激轉變成為IL-4-producing的Th2細胞(Liang Zhou *et al.*, 2009)。

#### 六、輔助型 T 細胞亞群—Th17

Th17 細胞主要特徵是會分泌 IL-17A、IL-17F、IL-22等細胞激素的輔助型 T 細胞，以往被認為主要的功能為清除一些無法被 Th1以及 Th2 細胞有效率清除的細胞外病原菌。Th17細胞可藉由產生前發炎性細胞激素(proinflammatory cytokines)、趨化激素(chemokines)、金屬蛋白酵素(metalloproteinases)對抗病原菌感染(Estelle Bettelli *et al.*, 2008)。此外，Th17細胞對於引發自體性免疫反應疾病似乎也扮演重要的角色(Becher, B. *et al.*, 2002)。事實上，2002年 Ilona Kryczek 等人發現 Th17細胞出現在腫瘤移植小鼠血液的比例較在正常小鼠的血液中高；不僅如此，在小鼠的腫瘤部位存在更大量的 IL-17<sup>+</sup>細胞，這些現象同時在口腔鱗狀上皮細胞癌、黑色素癌、前列腺癌、肉瘤移植小鼠中皆可發現。進一步地，Ilona Kryczek 等人在卵巢癌症病患血液中也發現比正常人高比例的 Th17細胞，並且，相同於小鼠實驗的發現，腫瘤部位存在更高比例的 Th17細胞。同時，Ilona Kryczek 等人發現隨著腫瘤的生長，腫瘤中的調節性 T 細胞與 Th17細胞存在的趨勢，彼此間似乎有著關聯性，而 IL-2在調控之間的動態平衡扮演著重要角色(Ilona Kryczek *et al.*, 2007)。更有趣的是，在本研究的重心口腔鱗狀上皮細胞癌中，

被報導經常伴隨著細菌感染的發生(Samuel J. Hooper *et al.*, 2006)，引起我們好奇是否在口腔腫瘤中會因此而存在 Th17細胞。

目前已有文獻指出針對人類卵巢癌症病患，相較於病患與健康個體周邊血液，腫瘤微環境中存在高比例的 Th17細胞，這些 Th17細胞似乎與腫瘤微環境中存在高量的 IL-6、IL-1 $\beta$  等細胞激素有關，並且也在體外細胞培養實驗中證實，將 CD4<sup>+</sup> T 細胞與腫瘤細胞共同培養後會產生大量的 Th17細胞(Yoshihiro Miyahara *et al.*, 2009)。

在近期許多人針對Th17細胞與Foxp3<sup>+</sup>調節性T細胞間進行研究與探討，發現到IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的存在，甚至進一步針對這群獨特的細胞群進行了解後發現IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的確是由Foxp3<sup>+</sup>調節性T細胞經由特定細胞激素刺激之後而形成的(Kui Shin Voo *et al.*, 2009；Gaelle Beriou *et al.*, 2009)，而IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的存在似乎是短暫性的，當除去細胞激素的刺激後，IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞又會回到Foxp3<sup>+</sup>調節性T細胞的狀態，回復免疫抑制的功能(Gaelle Beriou *et al.*, 2009)。



## 第二節 研究動機與目的

腫瘤細胞透過許多機制來逃避人體的免疫系統攻擊，進而促使腫瘤不斷的生長，其中，腫瘤浸潤之調節性 T 細胞被認為會抑制針對癌細胞的免疫反應。由本實驗室先前的研究結果發現在口腔鱗狀細胞癌病患之腫瘤組織內浸潤 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>之淋巴細胞中，CD25<sup>+</sup> T 細胞所佔比例為22.8±8.7%，相對於病患之週邊血液中的比例為7.8 ±5.6 %。不僅如此，研究中也發現腫瘤組織內浸潤 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>之淋巴細胞，其表現 Foxp3轉錄因子的程度與 CD25表現量具有相關性，進一步可將腫瘤組織內浸潤 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>之淋巴細胞區分為高度表現 CD25和 Foxp3 細胞亞群 (CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>high</sup>)、中度表現 CD25和 Foxp3 細胞亞群 (CD25<sup>intermediate</sup>Foxp3<sup>intermediate</sup>)、低度表現 CD25和 Foxp3 細胞亞群 (CD25<sup>low</sup>Foxp3<sup>low</sup>)，並且發現 CD25<sup>low</sup>和 CD25<sup>intermediate</sup>細胞亞群表現 IL-10；然而 CD25<sup>high</sup>細胞亞群幾乎不會表現。

由於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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>調節性 T 細胞會高度表現 inducible costimulatory molecule(ICOS)，並且證實這群 ICOS<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>調節性 T 細胞其功能會相似表現 IL-10的 Tr1細胞(Laura Strauss *et al.*, 2008)，因此，本實驗將探討腫瘤組織內浸潤淋巴細胞會表現 IL-10之調節性 T 細胞亞群與 ICOS 表現之相關性，並進一步研究表現 ICOS 與否之細胞亞群分別對於腫瘤生長有何影響。

在腫瘤微環境中，TGF-β扮演極重要的角色，近期有研究指出TGF-β可促進 Foxp3<sup>+</sup>調節性T細胞的生成，然而，當TGF-β同時加上IL-6作用，則會抑制Foxp3<sup>+</sup>調節性T細胞的生成，並且，促使CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞生成；有文獻指出，CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性T細胞以細胞間接觸(cell-cell contact dependent)造成的免疫抑制作用主要是透過細胞表面之TGF-β(mTGF-β)所促使(Kazuhiko Nakamura *et al.*, 2001)，當利用anti-TGF-β抗體除去調節性T細胞所產生之TGF-β的作用後，能有效降低由調節性T細胞產生之抑制作用，然而，利用transwell技術阻斷細胞間接觸後，調節性T細胞即無法有效發揮TGF-β作用，產生免疫抑制能力，證實調節性T細胞主要利用細胞膜上之TGF-β (mTGF-β)透過細胞間接觸而產生免疫抑制作用，因此，透過探討腫瘤微環境中調節性T細胞mTGF-β表現，可幫助釐清在腫瘤內與其他部



位之調節性T細胞其表現型及功能的差異。

Ilona Kryczek 等人在 ovarian 癌症病患血液中也發現比正常人高比例的 Th17 細胞，並且，相同於小鼠實驗的發現，腫瘤部位存在更高比例的 Th17細胞，不僅如此，隨著腫瘤的生長，腫瘤中的調節性 T 細胞與 Th17細胞存在的趨勢，彼此間似乎有著關聯性。2006年 Estelle Bettelli 等人提出了誘導型調節性 T 細胞與 Th17 細胞間相互作用(interplay)的概念，TGF- $\beta$  能誘導調節性 T 細胞專一性轉錄因子 Foxp3的表現，並且為維持誘導型調節性 T 細胞於周邊免疫所必須；然而，當同時存在 IL-1 $\beta$ 、IL-6與 TGF- $\beta$  卻抑制調節性 T 細胞的生成，相反地促進 Th17 細胞的生成。

本研究也將進一步探討在口腔癌病患之腫瘤浸潤淋巴球中 IL-17<sup>+</sup>細胞的分佈，並且探討在腫瘤浸潤淋巴球中，Th17細胞調節性 T 細胞間的關聯性、IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的存在以及與腫瘤中細菌感染的相關性。此外，本研究也將利用體外共同培養研究探討腫瘤細胞參與 Th17細胞、IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>調節性 T 細胞等細胞群的形成，以證實腫瘤細胞對 Th17細胞、IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的產生扮演重要的角色。



## 第二章 研究材料與方法

### 第一節 人類周邊血液單核細胞收集與分離

本研究所收集之口腔鱗狀上皮細胞癌病患血液樣本，於手術進行前抽取20-30毫升靜脈血液，至於含有肝素(heparin)的採血管中，先以轉速3000rpm 離心血液20分鐘(RS-720, KUBOTA)，吸去上層血漿後，加入等量 Hank's Buffered Salt Solution(HBSS)，再利用 Ficoll hypaque (1.077 density, Pharmacia Biotech Co.)離心分離出周邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)，以 trypan blue 染色記算細胞數目。分離出的周邊血液單核細胞以 anti-CD3單株抗體染色，利用流式細胞儀以細胞大小(與 FSC 成正比)、細胞顆粒性(與 SSC 成正比)、CD3<sup>+</sup>來界定 T 細胞的分佈。

### 第二節 口腔鱗狀上皮細胞癌病患腫瘤浸潤淋巴細胞分離純化

將口腔鱗狀細胞癌組織以無菌方法收集，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100 μm 及40 μm 篩孔之濾網分別過濾，濾液以1000 rpm (RS-720, KUBOTA)離心10分鐘，再以1200 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，以此方法將口腔鱗狀上皮細胞癌細胞和腫瘤內浸潤淋巴球分離。分離出之腫瘤浸潤淋巴細胞，以 trypan blue 染色記算細胞數目。將腫瘤內浸潤單核細胞球以 anti-CD3單株抗體做螢光染色，區分出 T 淋巴球並進行流式細胞儀(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<sup>+</sup>的標定來確定 T 淋巴球的分布。

### 第三節 人類周邊血液 CD4<sup>+</sup> T 細胞分離

抽取20-30毫升靜脈血液，至於含有肝素(heparin)的採血管中，加入50μl/ml

RosetteSep® Human CD4+ T cell enrichment cocktail (StemCell Technologies )，於室溫中靜置20分鐘，加入等倍體積的PBS + 2% FBS，再利用Ficoll hypaque (1.077 density, Pharmacia Biotech Co.)離心分離出CD4+ T細胞，以trypan blue染色記算細胞數目。分離出的周邊血液CD4+ T細胞將進一步進行體外共同培養實驗。

#### 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 FITC、PE 及 Per-CP 螢光標定如下：anti-CD4-PerCP、anti-CD25-FITC anti-ICOS-PE、anti-mTGF- $\beta$ -PE 以及老鼠之 IgG1 isotype control-PE 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

為了偵測不同細胞群產生的細胞激素，將分離出來的周邊血液單核細胞，先以 5ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)(Sigma-Aldrich) 和 1 $\mu$ g/ml ionomycin(Sigma-Aldrich)，再同時加入 4 $\mu$ M monensin(eBioscience, San Diego, Calif.)一起經4小時刺激，以 PBS 沖洗細胞一次後，先分別加入 anti-CD3-PerCP、anti-CD4-FITC 單株抗體 (Becton-Dickinson Immunocytometry System; Beckton-Dickinson Inc., San Jose, CA, USA)，混合均勻後，於4°C 避光作用30分鐘，利用 Cytofix/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.)連續二次沖洗細胞，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 bovine serum) 結合非特異性抗原，再藉由 anti-IFN- $\gamma$ -FITC(eBioscience, San Diego, Calif.)單株抗體、anti-IL-17-PE 單株抗體 (eBioscience, San Diego, Calif.)以及 anti-Foxp3單株抗體(eBioscience, San Diego, Calif.)偵測細胞內細胞激素的表現，以流式細胞儀進行分析。以 FSC、SSC、CD4 定義出 CD4<sup>+</sup>淋巴球細胞，觀察 CD4<sup>+</sup>或 CD4<sup>-</sup>細胞表現細胞激素的情形。

#### 第六節 腫瘤組織之 RNA 萃取

將約0.5mm<sup>3</sup>大小之腫瘤組織或非腫瘤組織磨碎後以 phenol 萃取出 total RNA，經由光譜分析儀(Ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience )定量 total RNA 後取2ug 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 同步定量(real-time)聚合酶連鎖反應

本實驗中所使用之 primers 是由 Primer express v3.0所設計，包括 IL-6、IL-10、IL-15、IL-17、IL-22、IL-23、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、ROR $\gamma$ t、Foxp3、CD4、Universal 16S。cDNA 利用 POWER SYBR GREEN PCR Master Mix(Applied Biosystem)、特定 primers 與二次蒸餾水以說明書中建議比例混勻，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<sup>-dCt</sup>)。

## 第八節、PBMC與口腔癌細胞株體外培養

PBMC由健康個體血液中分離出，將1X10<sup>6</sup> PBMC置於24-well plate中以 RPMI with 10% FBS培養，本研究中採用口腔癌細胞株SAS以1:5的比例(2X10<sup>5</sup>)與PBMC進行共同培養，在有anti-CD3/CD28抗體刺激下培養五天後分別收集細胞與上清液，細胞直接進行細胞內染色並且以流式細胞儀分析Th17細胞以及IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞。上清液則進行ELISA測定細胞激素IL-1 $\beta$ 、IL-6。

## 第九節、細胞激素測定

以R&D的ELISA套組測定細胞培養的培養液中IL-1 $\beta$ 、IL-6的濃度。依照R&D套組所附步驟，先將capture抗體，以1XPBS稀釋180倍後，取100  $\mu$ l加入96孔微量盤中，置於4°C 冰箱。隔夜以PBST (0.05 % Tween-20/PBS)清洗三次後，加入200 $\mu$ l含1 % BSA的1XPBS中，於室溫下作用二小時，以PBST清洗三次後，將上述所收取的體外混合細胞培養之上清液適量稀釋後，取100 $\mu$ l加入96孔微量盤

中置於4°C冰箱待隔夜。隔夜用1XPBST清洗3次後，以含1 % BSA的1XPBS將偵測抗體稀釋180倍後加入，於室溫下作用二小時。清洗三次後加入HRP標定的streptoavidin，於室溫下避光作用20分鐘後，加入四甲基聯苯胺(TMB，3,3',5,5'-tetramethyl benzidine)呈色，直到呈現藍色後，視深淺情況加入2N硫酸停止反應。利用96孔讀盤儀測量波長450 nm，再扣除以波長550 nm所測的背景值，以R&D套組所附標準液所得到的公式，算出細胞激素的濃度。

## 第十節、統計分析

本研究中實驗結果皆以平均值(Mean)與標準差(Standard Deviation)表示，以 Student's t-test 比較實驗結果中各項數據之間的差異，並且以  $p < 0.05$  作為達到統計學上的顯著差異的界定標準。腫瘤中各細胞亞群的分佈，相關性以相關係數分析，當相關係數之絕對值達小於0.3時，為低度相關；絕對值介於0.3~0.7時，即為中度相關；達0.7~0.8時，即為高度相關；若達0.8以上時，即為非常高度相關。



### 第三章 結果

#### 第一節 分析 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>之調節性 T 細胞之 ICOS 表現

探討口腔鱗狀上皮細胞癌各部位之 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性 T 細胞其 ICOS 表現量之差異，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，將口腔癌病患分離出之腫瘤內浸潤淋巴球、轉移淋巴結之淋巴球、周邊血液單核細胞，再藉由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)，利用流式細胞儀圈選出同時表現 CD4、CD25 之細胞群，分析其 ICOS 表現量，以 ICOS 抗體之 isotype control 對照之，由結果顯示(圖一(A))在病人周邊血液單核細胞中，同時表現 CD4、CD25 之細胞群幾乎不表現 ICOS，只有 0.71%；在病人淋巴結轉移之淋巴球同時表現 CD4、CD25 之細胞群則低度表現 ICOS，約有 19%；而在病人腫瘤浸潤淋巴球中，同時表現 CD4、CD25 之細胞群則可觀察到有顯著表現 ICOS 之次細胞群，有 48% 為 ICOS<sup>+</sup>調節性 T 細胞。

由於本實驗室先前的研究發現隨著 CD25 表現量不同，可以將調節性 T 細胞分成不同亞群，因此我們也好奇是否隨著 CD25 表現量有差異的調節性 T 細胞，其表現 ICOS 分子的情形是否也有所差異，我們將一位病患的腫瘤浸潤淋巴細胞經由流式細胞儀分析，在圈選 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>intermediate</sup> 細胞亞群後，觀察其 ICOS 表現量(圖二)，結果發現雖然各亞群 ICOS 表現量差異不大(如 Histogram Plot 所示)，然而，似乎隨著 CD25 表現量越高，各細胞群有表現 ICOS 的細胞比例也隨之增高。

#### 第二節 分析 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>之調節性 T 細胞之 mTGF-β 表現

進一步探討口腔鱗狀上皮細胞癌病患各部位之 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性 T 細胞其 mTGF-β 表現情形，由於 ICOS<sup>+</sup>調節性 T 細胞被認為是表現 IL-10 及 mTGF-β 的細胞激素，將病患之腫瘤內浸潤淋巴球、轉移淋巴結之淋巴球、周邊血液單核細胞個別分離後，利用流式細胞儀先以細胞的大小（與 FSC 成正比），顆粒性（與

SSC 成正比) 圈選出淋巴細胞(為 R1)，再圈選出同時表現 CD4、CD25 之細胞群，分析其 mTGF- $\beta$  表現情形，結果顯示為一位病患(圖三)周邊血液單核細胞中，同時表現 CD4、CD25 之細胞群中可發現高度表現 mTGF- $\beta$  的次細胞群；然而，分析病人腫瘤浸潤淋巴球以及轉移淋巴結之淋巴球，僅微量的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 細胞表現 mTGF- $\beta$ 。

### 第三節 分析浸潤口腔鱗狀上皮細胞癌組織及周邊血液之 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 調節性 T 細胞其 Foxp3 與 ICOS 表現情形

由於目前針對於調節性 T 細胞的表現型主要被認定為屬於 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 細胞，所以接著進一步探討 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 細胞表現 ICOS 的情形(圖四)，符合先前所看到的現象，由一位病患的分析結果顯示，在腫瘤浸潤淋巴球中的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 細胞發現有大部分屬於是 ICOS<sup>+</sup>，約為 52.54%，反之，在病患血液中只存在少量 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> 細胞，約為 5.68%。此實驗結果符合在黑色素瘤病患中的研究，皆可觀察到高量的 ICOS<sup>+</sup> 調節性 T 細胞存在在腫瘤中。

### 第四節 統計病患 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 之調節性 T 細胞之 ICOS 表現

分別由十位病患周邊血液單核細胞、九位病患浸潤腫瘤內之淋巴細胞以及四位病患轉移淋巴結之淋巴細胞中表現 ICOS 之細胞佔其 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 細胞群之比例(圖五)。結果顯示在病患血液調節性 T 細胞中約有 0.84% 表現 ICOS、在浸潤腫瘤調節性 T 細胞中約有 37.6% 表現 ICOS、在轉移淋巴結的調節性 T 細胞約有 35.61% 表現 ICOS。經 student test 統計後，腫瘤中 ICOS<sup>+</sup> 調節性 T 細胞與血液中 ICOS<sup>+</sup> 調節性 T 細胞的比例有顯著性的差異。顯示在口腔癌病患腫瘤浸潤淋巴細胞中含有較高比例的 ICOS<sup>+</sup> 調節性 T 細胞。

### 第五節 分析腫瘤內浸潤以及周邊血液單核球之 Th17 細胞

由於近期的研究中指出人類的卵巢癌、腎癌、胰臟癌等病患周邊血液中存在 Th17 細胞的比例高於健康人的周邊血液，因此，為探討人類口腔鱗狀細胞癌

病患其周邊血液以及腫瘤內是否存在高比例的 Th17細胞，首先將病患之周邊血液單核細胞以及浸潤腫瘤內淋巴細胞分離後，以5ng/ml PMA 與1 $\mu$ g/ml ionomycin 刺激細胞激素的產生，並且同時加入4 $\mu$ M monensin 抑制細胞激素的分泌，經4小時刺激後，進行細胞內染色，從圖六(A)結果中可發現在病患血液中表現 IL-17 之細胞群(1.34%)，但比例似乎與健康個體(2.22%)中所含比例無顯著差異，然而，比較腫瘤內 Th17細胞比例(2.63%)可發現比血液中顯著的較高，顯示相較於血液單核細胞中的含量，口腔癌病患腫瘤中的確有存在大量的 Th17細胞，統計十位病患浸潤腫瘤淋巴細胞、十七位病患周邊血液單核細胞和五位健康個體周邊血液單核細胞的 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞佔所有 CD4<sup>+</sup>細胞的比例，結果如圖六(B)所示，腫瘤內 Th17細胞約佔所有 CD4<sup>+</sup>細胞的8.45%，在病患以及健康個體血液中分別只佔了2.53%、3.30%。經 Student's t-test 檢定後確認腫瘤內 Th17細胞含量與周邊血液中 Th17細胞含量有顯著的差異。

#### 第六節 分析病患周邊血液單核細胞中 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞含量

在近期研究中發現到一群屬於 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞，主要是由調節性 T 細胞經由發炎性細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6刺激之後轉變而成，然而這群細胞的意義及功能都尚未清楚，由於先前研究已經發現在口腔癌病患腫瘤中存在高量的 Th17細胞，而我們想探討在腫瘤中是否存在 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞，將病患之周邊血液單核細胞以及浸潤腫瘤內淋巴細胞以5ng/ml PMA 與1 $\mu$ g/ml ionomycin 刺激細胞激素的產生，並且同時加入4 $\mu$ M monensin 抑制細胞激素的分泌，經4小時刺激後，進行細胞內染色，經由流式細胞儀可發現在腫瘤中的確存在高量的 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞(0.75%)(圖七 A)，然而，病患血液中只含有少量的 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞(0.42%)。如圖七(B)顯示統計十位病患浸潤腫瘤淋巴細胞、十七位病患周邊血液單核細胞和五位健康個體周邊血液單核細胞的 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞佔所有 CD4<sup>+</sup>細胞的比例，IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞在腫瘤內約佔所有 CD4<sup>+</sup>細胞的2.04%，在病患以及健康個體血液中分別只佔了0.33%、0.36%。經 Student's t-test 檢定後確認腫瘤內 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞含量與周邊血液中 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞含量有顯著的差異。之後我們也將進一步探討造成腫瘤中存在高量的 Th17細胞、IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的原因究竟為何。



## 第七節 探討浸潤腫瘤內 Th17細胞、調節性 T 細胞、IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞間分佈的相關性

如圖八所示，將十二位病患的腫瘤內浸潤 Th17細胞、調節性 T 細胞、IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞百分比分別經由統計後得到相關係數，分別為 Th17細胞與 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的0.95，屬於非常高度正相關；調節性 T 細胞與 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的-0.25，屬於不相關；Th17細胞與調節性 T 細胞的-0.73，屬於高度負相關。由結果顯示 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的分佈並非取決於調節性 T 細胞分佈的多寡，反而與 Th17細胞具有高度相關。此外，進一步將十九位病患周邊血液之 Th17細胞、調節性 T 細胞、IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞百分比分別經由統計後得到相關係數(圖九)，分別為 Th17細胞與 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的0.80；調節性 T 細胞與 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的0.84；Th17細胞與調節性 T 細胞的0.79，皆屬於高度正相關。此實驗結果顯示在腫瘤中調節性 T 細胞與 Th17細胞其分佈的相關性與在周邊血液中的相關性明顯的不同，也說明在腫瘤的特殊環境之下會促使調節性 T 細胞與 Th17細胞間的相互關係有所改變。

## 第八節 分析腫瘤微環境中細胞激素表現之情形

由於在先前的研究中已發現到在腫瘤中浸潤了大量的 Th17細胞，甚至浸潤大量的 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞，而文獻中也指出在適當的環境之下，例如細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6等刺激之下會促使大量的 Th17細胞產生，於是我們進一步確認是否腫瘤中存在的細胞激素與誘導這些細胞產生有著相關性，首先將病患腫瘤組織研磨純化 RNA 並反轉錄成 cDNA 後，利用即時定量 PCR 來探討腫瘤中 IFN- $\gamma$ 、IL-10、IL-15、IL-17、IL-1 $\beta$ 、IL-23、IL-6、TGF- $\beta$  等細胞激素表現情形，從八位病患腫瘤部位細胞激素表現情形可發現到大量存在著與 Th17細胞相關的細胞激素像是 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TGF- $\beta$ (圖十)，此外，將同一位病患的腫瘤以及非腫瘤組織進行相同的細胞激素同步定量反轉錄實驗(圖十一)，發現腫瘤部位的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TGF- $\beta$  等細胞激素含量的確皆比非腫瘤部位來的高，因此，我們發現似乎在口腔鱗狀上皮細胞癌的腫瘤微環境中的細胞激素是傾向於誘導 Th17細胞產生。

## 第九節 PBMC 與口腔癌細胞株進行體外培養實驗

為進一步證實先前觀察到腫瘤微環境中存在著高量的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TGF- $\beta$  確實與誘導 Th17細胞、IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞有關，我們利用健康個體 PBMC 與口腔癌細胞株 SAS 以5:1的比例進行共同培養，並在 anti-CD3/CD28刺激下培養，第五天分別收集細胞進行細胞內染色以及將上清液進行 ELISA 作細胞激素測試，結果顯示(圖十二)在 PBMC 與癌細胞共同培養的實驗與 PBMC 對照組比較後可發現，上清液中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6的濃度確實上升，符合我們所預期，在腫瘤細胞存在之下確實形成了高濃度的 IL-1 $\beta$ 、IL-6環境，而進一步探討 Th17細胞與調節性 T 細胞的生成，除了看到與實驗室先前研究的結果一致，當 PBMC 與癌細胞共同培養後會促使調節性 T 細胞的比例上升(9.16%→30.97%)，IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞(0.81%→4.17%)比例確實也都有增加。我們進一步將健康個體周邊血液淋巴細胞中 CD4<sup>+</sup>T 細胞分離後，利用 CD4<sup>+</sup>T 細胞與癌細胞進行共同培養(圖十三)，此實驗也得到一致的結果，在 CD4<sup>+</sup>T 細胞與癌細胞共同培養的實驗與 CD4<sup>+</sup>T 細胞對照組比較後可發現，上清液中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6的濃度確實也隨之上升，並且 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞(0.08%→0.99%)與調節性 T 細胞(3.77%→12.84%)的比例增加的更為明顯。

## 第十節 分析腫瘤微環境中細菌存在情形

在本研究中已經證實癌細胞可促使 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞，然而這樣的現象在體外培養的實驗中是必須要藉由 TCR 與 Co-stimulatory molecule 的刺激下才可觀察到，然而在體內腫瘤環境中如何發生同樣的現象還須待釐清。在許多文獻中已提到，口腔鱗狀上皮細胞癌比較一般癌症不同的特點是常伴隨著細菌感染的發生，這也造成了腫瘤的生成有如一個慢性發炎的環境，我們好奇在觀察到腫瘤中浸潤大量 Th17細胞、IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞的現象與口腔癌伴隨的細菌感染是否有相關性，首先我們將病患腫瘤組織研磨純化出 RNA 並且利用 universal 細菌16S RNA 引子進行反轉錄實驗，得到細菌 cDNA 後以聚和酶連鎖反應方式放大 cDNA 數量，初步對照十位病患腫瘤中存在總細菌量與 IL-17<sup>+</sup>細胞量並檢視其相互關係，結果如圖十四顯示，似乎 IL-17<sup>+</sup>細胞量與總細菌量無顯著的相關性，實際上，先前文獻指出，Th17細胞只針對特定細菌感染有所反應，我們推測此實驗結果

與 Th17細胞只會被特定細菌誘導出有關，因此，往後將進一步針對特定菌種進行探討與 IL-17<sup>+</sup>細胞的相關性。



## 第四章 討論

無論在健康個體中或疾病中，CD4<sup>+</sup>淋巴細胞中的調節性T細胞已被認為對於免疫調節網絡中扮演極重要的角色，這些細胞能有效抑制CD8<sup>+</sup>毒殺型細胞與CD4<sup>+</sup>輔助型T細胞，並且是透過dose dependent、cell-contact dependent、cytokine independent、antigen-nonspecific等方式(Shevach, 2000; Dieckmann *et al*, 2001; Jonuleit *et al*, 2001; Ng *et al*, 2001; Taams *et al*, 2001)。先前研究結果認為調節性T細胞會抑制針對腫瘤相關抗原(tumor-associated antigens)的T細胞免疫反應。在腫瘤環境中調節性T細胞主要是透過幾個機制來發揮免疫抑制的功能，首先，調節性T細胞會透過誘導抗原呈現細胞表現抑制性co-stimulatory molecules像是B7-H1進而抑制effector T細胞的作用；活化的調節性T細胞也會藉由釋放Perforin與Granzyme B來促使抗原呈現細胞以及effector T細胞走向細胞凋亡；調節性T細胞也透過表面上的CTLA-4與抗原呈現細胞表面CD80/CD86結合後引起釋放IDO，導致T細胞的Tryptophan合成受抑制而走向細胞凋亡；此外，調節性T細胞會表現細胞激素TGF-β並且促使抗原呈現細胞表現細胞激素IL-10導致抗原呈現細胞功能不全以及T細胞Anergy (Zou, 2006)。

臨床上對於口腔癌治療多只侷限於化學治療以及手術切除，然而治療後復發率確極高，若要能達到最高治療效果必須能同時加強對抗腫瘤的免疫反應，由於許多研究已經提出調節性T細胞確實對於腫瘤的生長扮演重要角色(Zou, 2006； Shimizu, J. *et al*, 1999； Jones, E. *et al*, 2002)，抑制調節性T細胞的功能即是重要的目標之一，因此，許多研究也更進一步的探討調節性T細胞的型態與功能，2008年由Laura Strauss等人發表的研究中發現在黑色素瘤浸潤之調節性T細胞會大量表現ICOS分子在細胞表面上，這現象在病患周邊血液淋巴細胞中則較為微弱(Laura Strauss *et al.*, 2008)，在同時期也有研究指出在周邊血液及胸線中的調節性T細胞可利用ICOS分子的表現區分為兩群功能不相同的調節性T細胞(Tomoki Ito *et al.*, 2008)。

經由初步實驗結果觀察到在人類鱗狀上皮細胞癌腫瘤內似乎存在大量的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>細胞，並且也進一步證實這群ICOS<sup>+</sup>T細胞之FOXP3之表現。在初步研究中發現高度表現CD25的調節性T細胞，屬於ICOS<sup>+</sup>的比例較高，然

而，先前研究已經證實 ICOS<sup>+</sup>調節性 T 細胞與 ICOS<sup>-</sup>調節性 T 細胞屬於兩群功能相異的細胞。分析病人周邊血液單核細胞、浸潤轉移淋巴結及腫瘤內之 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性 T 細胞，個別表現 mTGF- $\beta$  情形，結果發現在周邊血液中之 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞高量表現 mTGF- $\beta$ ，然而在浸潤轉移淋巴結及腫瘤內之 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞只少量表現 mTGF- $\beta$ 。

由抗原的刺激要形成有效的免疫反應除了 TCR 與 MHC 分子間作用外，還取決共同刺激分子以及細胞激素的作用，最主要的共同刺激分子 receptor/ligand 即是 B7/CD28 pathway，而近期的研究發現 ICOS/ICOSL(ICOS/B7-H2)路徑主要參與調控 T 細胞引發的免疫反應以及耐受性，不像是 CD28 會持續表現在 T 細胞表面，ICOS 須接受 TCR 被刺激後才會被正向調控(Andreas Hutloff *et al.*, 1999)，證據顯示 B7/CD28 的結合會影響 IL-2 衍生的反應，而 ICOS 卻能特別引起 IL-10 的產生。先前研究已知 ICOS 不只會表現在 effector T 細胞中，也會表現在調節性 T 細胞中。Storkus 等人發現(Aklile Berhanu *et al.*, 2007)在老鼠腫瘤中發現一群 CD4<sup>+</sup>細胞具有活化型/記憶型的型態(ICOS<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>CD45RB<sup>low</sup>)能抑制異體 T 細胞的增生以及 IFN- $\gamma$  的表現。在攝護腺癌病患中也發現到浸潤腫瘤中的調節性 T 細胞會表現高量的 ICOS 與 GITR 當相較於病患周邊血液的調節性 T 細胞(Ashley M. Miller *et al.*, 2006)。由於 ICOS<sup>+</sup>調節性 T 細胞被認為會比 ICOS<sup>-</sup>調節性 T 細胞具有更強的免疫抑制能力，這現象也許與較高量的抑制性細胞激素 IL-10、TGF- $\beta$  產生有關，此外，ICOS<sup>+</sup>調節性 T 細胞也被發現具有高量的 Fas、FasL、Granzyme B 等參與毒殺 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>細胞相關的分子。因此，在腫瘤淋巴細胞增加表現 ICOS 的調節性 T 細胞似乎是增加了這些調節性 T 細胞的抑制功能。

除了研究調節性 T 細胞對腫瘤生長的影响外，另一群淋巴細胞也被熱烈的探討中，2007年 Ilona Kryczek 等人發表研究發現 Th17細胞與腫瘤的生長有相關性，並且在研究中也提到隨著腫瘤生長 Th17細胞與調節性 T 細胞間似乎也有相關(Ilona Kryczek *et al.*, 2007)。2008年 Yoshihiro Miyahara 等人的研究指出在人類卵巢癌中存在有高量的 IL-17 producing 細胞，並且由腫瘤分離出的癌細胞、纖維母細胞、抗原呈現細胞會表現大量的 IL-6、IL-1 $\beta$  等與 Th17細胞分化相關的細胞

激素，此外，他們將腫瘤分離出的癌細胞、抗原呈現細胞與周邊血液分離出的 CD4<sup>+</sup>細胞共同培養後會產生高比例的 Th17細胞，而以中和性抗體 anti-IL-1、anti-IL-6加入共同培養系統中能有效抑制 Th17細胞的產生。由於腫瘤的形成與生長常伴隨著發炎反應，因此在腫瘤部位聚集發炎性細胞 Th17細胞是可被預測的，然而這些細胞的存在對於腫瘤的形成究竟扮演甚麼角色還無法被釐清。

在實驗中我們也觀察到口腔癌病患其周邊血液單核細胞中確實存在 IL-17<sup>+</sup>細胞，由於 IL-17<sup>+</sup>細胞已被證實為不表現 IFN- $\gamma$ ，在實驗我們利用同時染色 IL-17與 IFN-r 進一步證實我們所觀察到的細胞的確屬於 Th17細胞，然而，病患血液中所存在的 Th17細胞似乎與健康個體血液中含量無太大差異，反之，腫瘤內浸潤 Th17細胞在淋巴球中所含的比例則顯著的高出血液中，這與先前已被報導過的研究結果相符。

此外，研究中發現到了腫瘤中存在大量 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞存在，而這些細胞的存在的確與腫瘤環境中的細胞激素有著相關性，像是 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TGF- $\beta$  都大量存在於多數病患腫瘤中。雖然在腫瘤中觀察到大量 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞存在是由於腫瘤內部原本就存在高量調節性 T 細胞所導致，然而，我們進行了各細胞群間分佈的相關性統計，結果顯示 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞並不與腫瘤內調節性 T 細胞具有相關性，反觀 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞與 Th17細胞的分佈似乎呈現出非常高度的相關性，有趣的是我們在周邊血液中各細胞群間分佈的統計結果發現 Th17細胞、調節性 T 細胞的比例呈現正相關的關係，這顯示相較於血液，腫瘤中的特殊環境造成 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞高量的產生。另一方面，我們也發現到在周邊血液中的調節性 T 細胞與 Th17細胞分成現正相關，但是在腫瘤中存在的 Th17細胞與調節性 T 細胞似乎呈現高度負相關的關係，這與 Ilona Kryczek 等人發現隨著腫瘤的生長，腫瘤中的調節性 T 細胞與 Th17細胞存在的趨勢呈現正相關是不一致的結果，我們推論可能的原因是 Ilona Kryczek 的研究是在小鼠模型中實驗的結果，與我們實際觀察臨床病患的狀況不太相同，並且在不同腫瘤形態中或許調節性 T 細胞與 Th17 細胞間扮演的角色也不盡相同。

先前研究已發現調節性 T 細胞在發炎環境下會轉變成為表現 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>的細胞，並暫時失去免疫抑制的功能，然而，當離開發炎環境時 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>

細胞會恢復成為調節性 T 細胞的狀態，這樣具有多變性的調節性 T 細胞功用似乎可以因應人體免疫系統突然遭受及性感染時，可快速抑制免疫抑制反應並且快速成為發炎反應的狀態。文獻指出只有特定表現型調節性 T 細胞具有產生 IL-17 的能力，主要是  $CD4^+CD45RA^{neg}CD25^{high}CCR6^+HLA-DR^{neg}Foxp3^+$  調節性 T 細胞群能在適當細胞激素刺激後轉變成為 IL-17+Foxp3+ 細胞(Gaelle Beriou *et al.*, 2009)，這也顯示出調節性 T 細胞包括了許多細胞功能不同的亞群，中和本實驗的結果可推論在腫瘤中的調節性 T 細胞中有能力轉變成為調節性 T 細胞的細胞亞群可能比例較高。然而此推論需要更進一步的實驗來證實。

利用 PBMC 與口腔癌細胞共同培養的研究證實了口腔癌細胞卻時能促使 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 細胞的產生，而此現象確實是在高濃度 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的環境中進行，在純化的 CD4<sup>+</sup> T 細胞共同培養系統中也得到了相同的結果，若要進一步證實 IL-1 $\beta$ 、IL-6 對於 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 細胞的產生扮演決定性的角色，我們也將更進一步利用中和性抗體去除 IL-1 $\beta$ 、IL-6 以觀察是否會抑制 PBMC 與口腔癌細胞共同培養系統中產生 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> 細胞。

據文獻以證實口腔癌常伴隨著細菌感染進而引發劇烈發炎反應，由於 Th17 細胞起先被認為由病原菌的感染所引起，我們好奇是否由於口腔鱗狀上皮細胞癌中常伴隨著細菌感染促使腫瘤中存在大量的 IL-17<sup>+</sup> 細胞，雖然初步研究中發現似乎在各病患腫瘤中 IL-17<sup>+</sup> 細胞的數量並不與細菌量有顯著相關性，但也許是由於只有特定細菌種類才會引發 IL-17<sup>+</sup> 細胞的免疫反應。

## 參考文獻

- Ayyouba, M., Deknuydta, F., Raimbauda, I., Dousseta, C., Levequea, L., Bioleya, G. & Valmoria, D. (2009). Human memory FOXP3<sup>+</sup> Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the TH17 lineage-specific transcription factor ROR $\gamma$ t. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8635–8640.
- Berhanu, A., Huang, J., Watkins, S. C., Okada, H. & Storkus, W. J. (2007). Treatment-Enhanced CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Family Related<sup>High</sup> Regulatory Tumor-Infiltrating T Cells Limit the Effectiveness of Cytokine-Based Immunotherapy. *J Immunol* 178: 3400-3408.
- Beriou, G., Costantino, C. M., Ashley, C. W., Yang, L., Kuchroo, V. K., Baecher-Allan, C. & Hafler, D. A. (2009). IL-17 producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 30: 4240-4249.
- Bettelli, E., Korn, T., Oukka M. & Kuchroo V. K. (2008). Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature Rev* 453: 1051-1057.
- Casares, N., Arribillaga, L., Sarobe, P., Dotor, J., Ascensio'n Lopez-Diaz de Cerio, Melero, I., Prieto, J., Borra's-Cuesta, F. & Lasarte, J. J. (2003). CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatory cells inhibit activation of tumour-primed CD4<sup>+</sup> T cells with IFN- $\gamma$ -dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumour immunity elicited by peptide vaccination. *J Immunol* 171: 5931–5939.
- Dave, B. J., Trivedi, A. H. & Adhvaryu, S. G. (1992). Role of areca nut consumption in the cause of oral cancers. A cytogenetic assessment. *Cancer* 70: 1017-1023.
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T & Schuler G (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193: 1303–1310.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3: 991-998.



Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21: 137-148.

van Elsas, A., Suttmuller, R. P., Hurwitz, A. A., Ziskin, J., Villasenor, J., Medema, J. P., Overwijk, W. W., Restifo, N. P., Melief, C. J., Offringa, R. & Allison, J. P. (2001). Elucidating the autoimmune and antitumour effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J Exp Med* 194: 481–489.

Gallimore, A. & Godkin, A. (2007). Regulatory T cells and tumour immunity – observations in mice and men. *Immunology* 123: 157–163.

Shevach, E. M. (2009). Mechanisms of Foxp3<sup>+</sup> T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* 30: 636-645.

Golgher, D., Jones, E., Powrie, F., Elliott, T. & Gallimore, A. (2002). Depletion of CD25<sup>+</sup> regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumour rejection antigens. *Eur J Immunol* 32: 3267–3275.

Hoffmann, T. K., Dworacki, G., Tsukihira, T., Meidenbauer, N., Gooding, W., Johnson, J. T. & Whiteside, T. L. (2002b). Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 8: 2553-2562.

Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.

Hooper, S. J., Crean, S. J., Lewis, M. A. O., Spratt, D. A., Wade W. G. & Wilson, M. J. (2006). Viable Bacteria Present within Oral Squamous Cell Carcinoma Tissue. *J Clin Micro* 44: 1719–1725.

Houghton A. N. & Guevara-Patiño, J. A. (2004). Immune recognition of self in immunity against cancer. *J Clin Invest* 114: 468-471.

Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R.,

Anagnostopoulos, I. & Kroczeck, R. A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397: 263-266.

Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y. H., Park, W. R., Arima, K., Bover, L., Qin, X. F., Gilliet, M. & Liu, Y. J. (2008). Two Functional Subsets of FOXP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Human Thymus and Periphery. *Immunity* 28: 870–880.

Jewett, A., Cacalano, N. A., Teruel, A., Romero, M., Rashedi, M., Wang, M. & Nakamura, H. (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.

Jones, E., Dahm-Vicker, M., Simon, A. K., Green, A., Powrie, F., Cerundolo, V. & Gallimore, A. (2002). Depletion of CD25<sup>+</sup> regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immun* 2: 1-12.

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J & Enk AH (2001). Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193: 1285–1294.

Ko, Y. C., Chiang, T. A., Chang, S. J. & Hsieh, S. F. (1992). Prevalence of betel quid chewing habit in Taiwan and related sociodemographic factors. *J Oral Pathol Med* 21: 261-264.

Ko, K., Yamazaki, S., Nakamura, K., Nishioka, T., Hirota, K., Yamaguchi, T., Shimizu, J., Nomura, T., Chiba, T. & Sakaguchi, S. (2005). Treatment of advanced tumours with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor infiltrating Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 202: 885–891.

Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Altuwajri, S., Szeliga, W., Kolls, J., Chang A. & Zou, W. (2007). Cutting Edge: Th17 and Regulatory T Cell Dynamics and the Regulation by IL-2 in the Tumor Microenvironment. *J Immunol* 178: 6730–6733.

Laad, A., Kode, J., Chavan, S., Rao, R., Fakih, A. R. & Chiplunkar, S. (1996). Limiting dilution analysis of proliferating and cytotoxic lymphocytes in the peripheral

blood and tumours of oral cancer patients. *Eur J Cancer* 32B: 337-342.

La Vecchia, C., Tavani, A., Franceschi, S., Levi, F., Corrao, G. & Negri, E. (1997). Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 33: 302-312.

Lo, W. L., Kao, S. Y., Chi, L. Y., Wong, Y. K. & Chang, R. C. S. (2003). Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg* 61: 751-758.

Miller, A. M., Lundberg, K., Özenc, V., Banham, A. H., Hellström, M., Egevad, L. & Pisa, P. (2006). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T Cells Are Enriched in the Tumor and Peripheral Blood of Prostate Cancer Patients. *J Immunol* 177: 7398-7405.

Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J. & Wang R. F. (2008). Generation and regulation of human CD4<sup>+</sup> IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40: 15505-15510.

Nagai, H., Horikawa, T., Hara, I., Fukunaga, A., Oniki, S., Oka, M., Nishigori, C. & Ichihashi, M. (2004). *In vivo* elimination of CD25<sup>+</sup> regulatory T cells leads to tumour rejection of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer. *Exp Dermatol* 13: 613-620.

Nakamura, K., A. Kitani, & W. Strober. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *J Exp Med* 194: 629-644.

Old, L. J. & Boyse, E. A. (1964). Immunology of experimental tumors. *Annu Rev Med* 15: 167-86.

Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T. & Nakayama, E. (1999). Tumour rejection by *in vivo* administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor monoclonal antibody). *Cancer Res* 59: 3128-3133.

Prasad, S. J., Farrand, K. J., Matthews, S. A., Chang, J. H., McHugh, R. S. & Ronchese, F. (2005). Dendritic cells loaded with stressed tumour cells elicit

long-lasting protective tumour immunity in mice depleted of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 174: 90–98.

Reichert, T. E., Strauss, L., Wagner, E. M., Gooding, W. & Whiteside, T. L. (2002). Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 8: 3137-3145.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-562.

Shevach, E. M. (2000). Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 18: 423–449.

Shirname, L. P., Menon, M. M., Nair, J. & Bhide, S. V. (1983). Correlation of mutagenicity and tumorigenicity of betel quid and its ingredients. *Nutr Cancer* 5: 87-91.

Shirname, L. P., Menon, M. M. & Bhide, S. V. (1984). Mutagenicity of betel quid and its ingredients using mammalian test systems. *Carcinogenesis* 5: 501-503.

Shimizu, J., Yamazaki, S. & Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumour immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: a common basis between tumour immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163: 5211–5218.

Steitz, J., Bruck, J., Lenz, J., Knop, J. & Tuting, T. (2001). Depletion of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon  $\alpha$ -induced, CD8<sup>+</sup>T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res* 61: 8643–8646.

Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M., Gooding, W., Johnson, J. T. & Whiteside, T. L. (2007). A Unique Subset of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T Cells Secreting Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Mediates suppression in the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res* 13: 4345-4354.

Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M. J., Lang, S., Kirkwood, J. M. & Whiteside, T. L. (2008). Expression of ICOS on Human Melanoma-Infiltrating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> T Regulatory Cells: Implications and Impact on Tumor-Mediated Immune Suppression. *J Immunol* 180: 2967-2980.

Sutmuller, R.P., van Duivenvoorde, L. M., van Elsas, A., Schumacher, T. N., Wildenberg, M. E., Allison, J. P., Toes, R. E., Offringa, R. & Melief, C. J. (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25<sup>+</sup>regulatory T cells in antitumour therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 194: 823–832.

Taams, L. S., Smith, J., Rustin, M. H., Salmon, M., Poulter, L. W. & Akbar, A. N. (2001). Human anergic/suppressive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 31: 1122–1131.

Takezaki, T., Hirose, K., Inoue, M., Hamajima, N., Kuroishi, T., Nakamura, S., Koshikawa, T., Matsuura, H. & Tajima, K. (1996). Tobacco, alcohol and dietary factors associated with the risk of oral cancer among Japanese. *Jpn J Cancer Res* 87: 555-562.

Tanaka, H., Tanaka, J., Kjaergaard, J. & Shu, S. (2002). Depletion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumourdraining lymph nodes. *J Immunother* 25: 207–217.

Voo, K. S., Wang, Y. H., Santori, F.R., Boggiano, C., Wang, Y. H., Arima, K., Bover, L., Hanabuchi, S., Khalili, J., Marinova, E., Zheng, B., Littman D. R. & Liu. Y. J. (2009). Identification of IL-17-producing FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:4793-4798.

Walker, M. R., Kasprovicz, D. J., Gersuk, V. H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J. H. & Ziegler, S. F. (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. *J Clin Invest* 112: 1437-1443.

Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Krausz, T., Chong, A., Schreiber, H. & Fu, Y. X. (2005). Intratumour depletion of CD4<sup>+</sup> cells unmasks tumour immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumours. *J Exp Med* 201: 779–791.

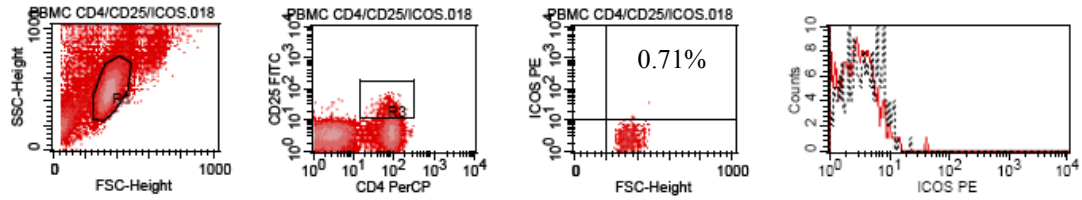
Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Rev* 6: 295-307.

Zhou, L., Chong, M. M. W. & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4<sup>+</sup> T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* 30: 646-655.

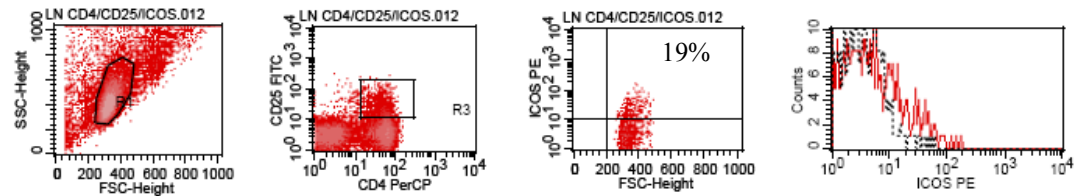


## 第六章 圖表

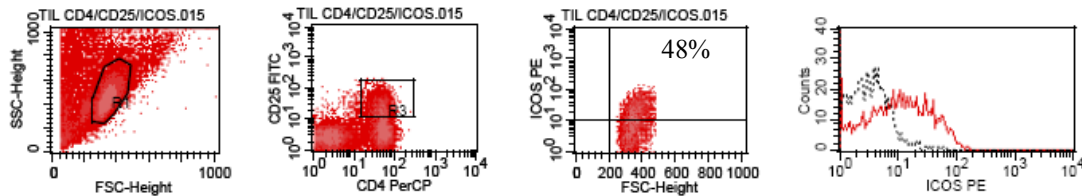
### (A) PBMC



### (B) Lymph node



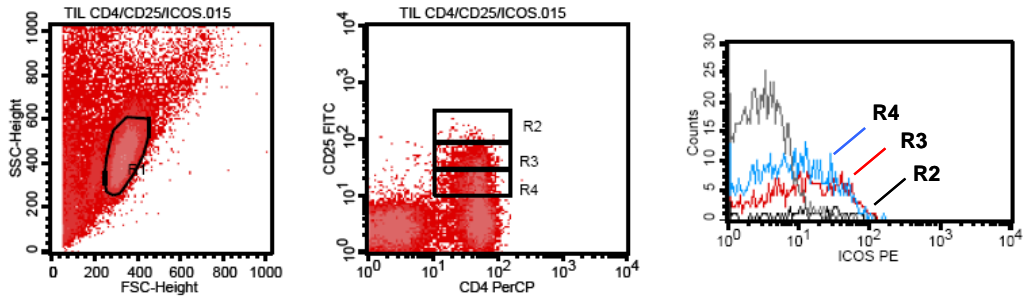
### (C) TIL



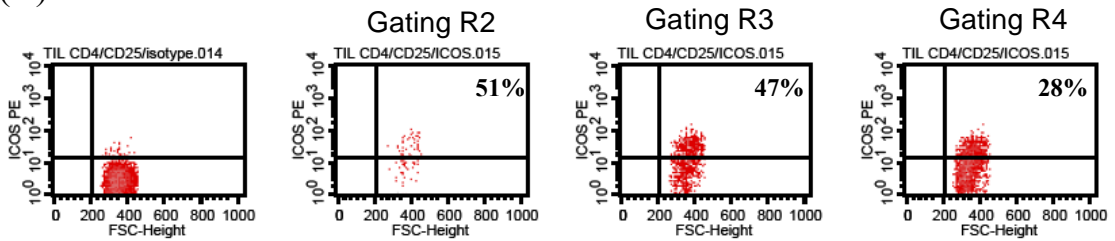
圖一、分析浸潤腫瘤內、轉移淋巴結和周邊血液之 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性 T 細胞其 ICOS 表現

結果顯示為一位病患分離後的淋巴細胞以 anti-CD4-PerCP、anti-CD25-FITC、anti-ICOS-PE 抗體標示後上流式細胞儀分析，首先由 FSC/SSC 圈選出淋巴細胞群，圖(A)將病患周邊單核細胞圈選出 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞群，經分析後表現 ICOS 之細胞佔約0.71%。圖(B)將病患轉移淋巴結之淋巴細胞圈選出 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞群，經分析後表現 ICOS 之細胞佔約19%。圖(C)將病患浸潤腫瘤內之淋巴細胞圈選出 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞群，經分析後表現 ICOS 之細胞佔約48%。

(A)



(B)

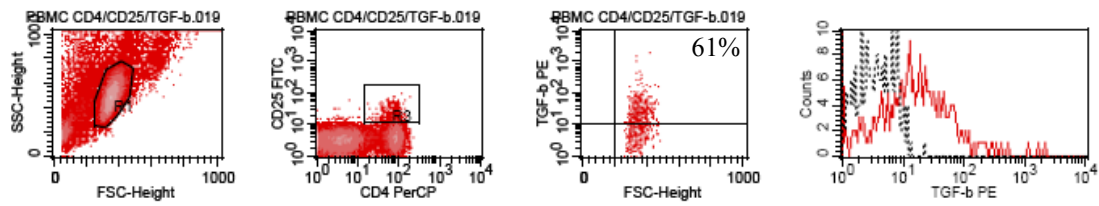


圖二、分別探討腫瘤內浸潤淋巴球  $CD4^+CD25^{high}$ 、 $CD4^+CD25^{low}$  和  $CD4^+CD25^{intermediate}$  細胞亞群其 ICOS 表現量

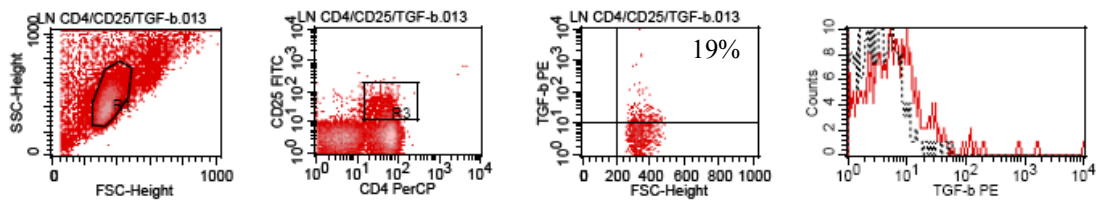
將浸潤腫瘤淋巴細胞以 anti-CD4-PerCP、anti-CD25-FITC、anti-ICOS-PE 抗體標示後經流式細胞儀分析，首先由 FSC/SSC 圈選出淋巴細胞群，圖(A)為浸潤腫瘤淋巴球圈選出  $CD4^+CD25^{high}$ (R2)、 $CD4^+CD25^{intermediate}$ (R3)和  $CD4^+CD25^{low}$ (R4)細胞群，以 Histogram Plot 比較 ICOS 的表現量。圖(B)以 Density Plot 分析  $CD4^+CD25^{high}$ (R2)、 $CD4^+CD25^{intermediate}$ (R3)和  $CD4^+CD25^{low}$ (R4)細胞群個別表現 ICOS 的比例。



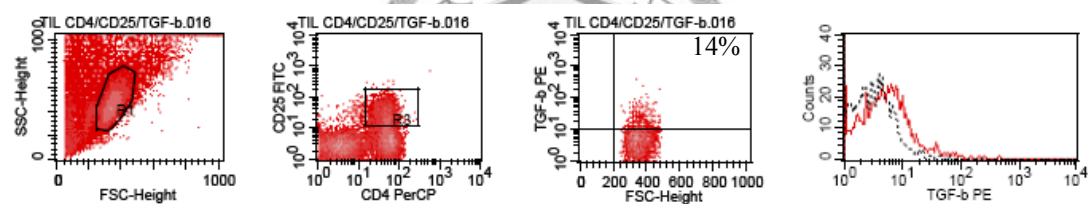
(A) PBMC



(B) Lymph node

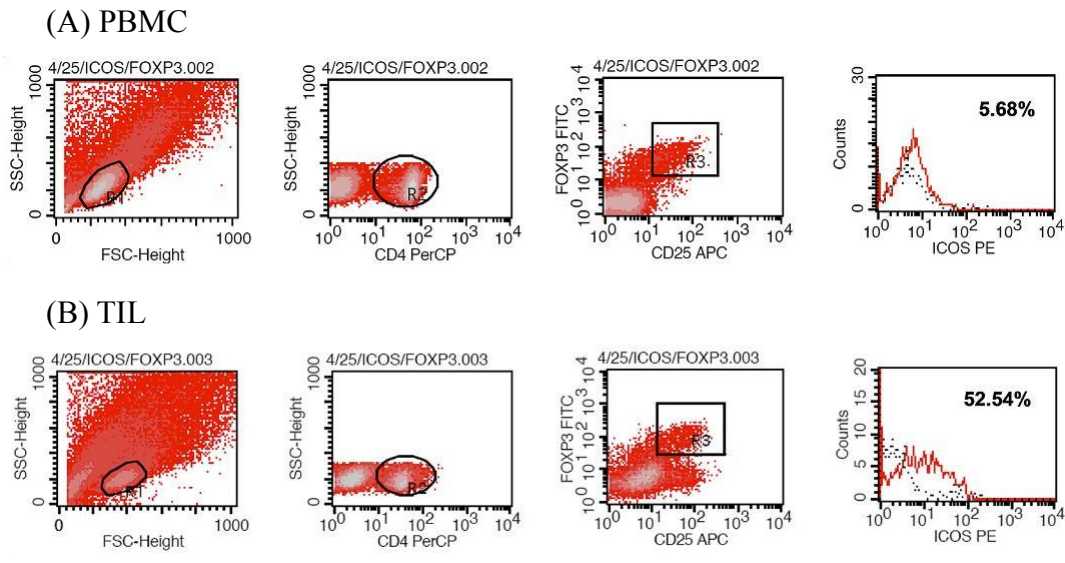


(C) TIL



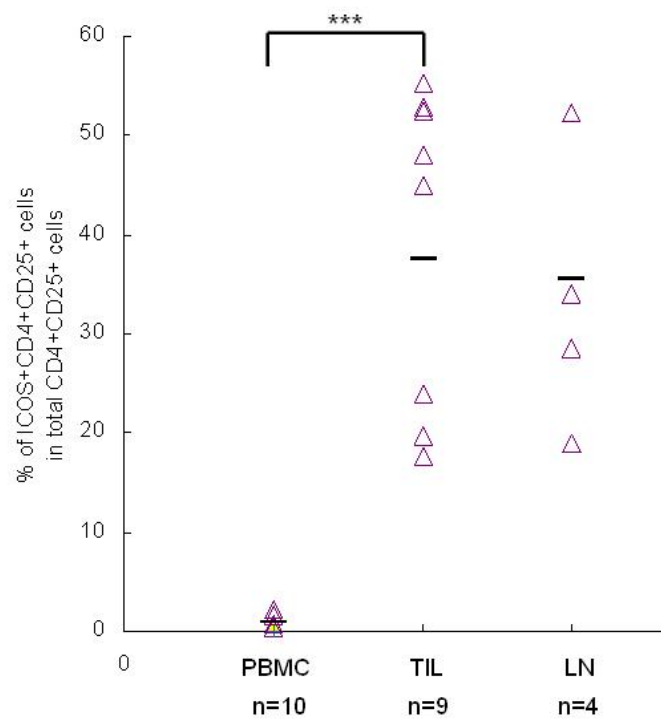
圖三、分析浸潤腫瘤內、轉移淋巴結和周邊血液之  $CD4^+CD25^+$  調節性 T 細胞其 mTGF- $\beta$  表現

結果顯示為一位病患分離後的淋巴細胞以 anti-CD4-PerCP、anti-CD25-FITC、anti-mTGF- $\beta$ -PE 抗體標示後上流式細胞儀分析，首先由 FSC/SSC 圈選出淋巴細胞群，圖(A)從病患周邊血液單核細胞圈選出  $CD4^+CD25^+$  細胞群，分析其中表現 mTGF- $\beta$  之細胞佔約61%。圖(B)從病患轉移淋巴結之淋巴細胞圈選出  $CD4^+CD25^+$  細胞群，分析其中表現 mTGF- $\beta$  之細胞佔約19%。圖(C)從病患浸潤腫瘤內之淋巴細胞圈選出  $CD4^+CD25^+$  細胞群，分析其中表現 mTGF- $\beta$  之細胞佔約14%。



圖四、分析浸潤腫瘤內及周邊血液之 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>調節性 T 細胞其 Foxp3 與 ICOS 表現情形

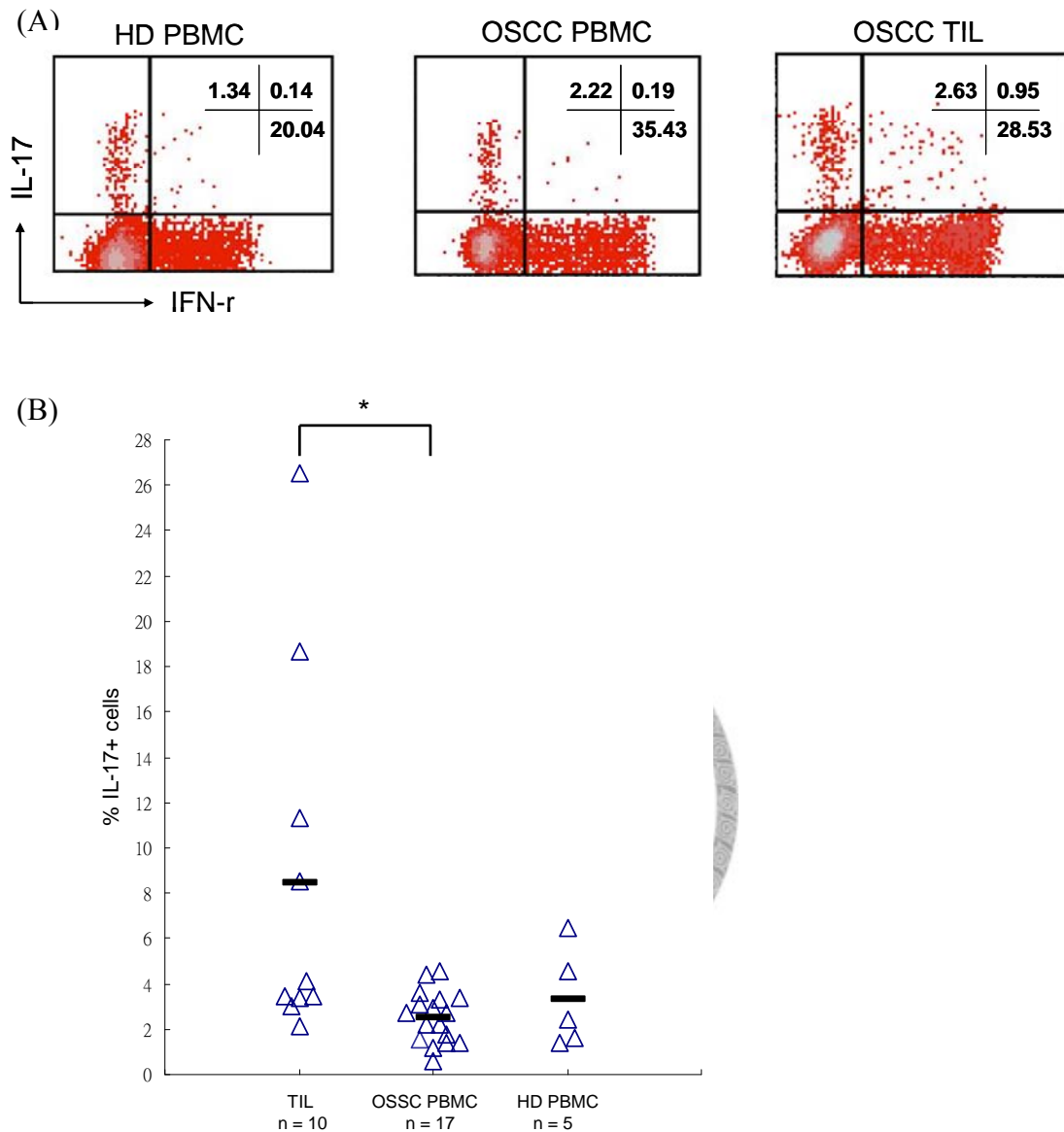
由一位病患腫瘤及血液中分離出淋巴細胞，經由 anti-CD4-PerCP、anti-CD25-APC、anti-Foxp3-FITC、anti-ICOS-PE 抗體標示細胞，經由流式細胞儀分析，圖(A)從病患周邊血液單核細胞圈選出 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>細胞群，分析其中表現 ICOS 之細胞佔約5.68%。圖(B)從病患浸潤腫瘤內之淋巴細胞圈選出 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>細胞群，分析其中表現 ICOS 之細胞佔約52.54%。



圖五、統計浸潤腫瘤內、轉移淋巴結和周邊血液之  $CD4^+CD25^+$  調節性 T 細胞其 ICOS 表現

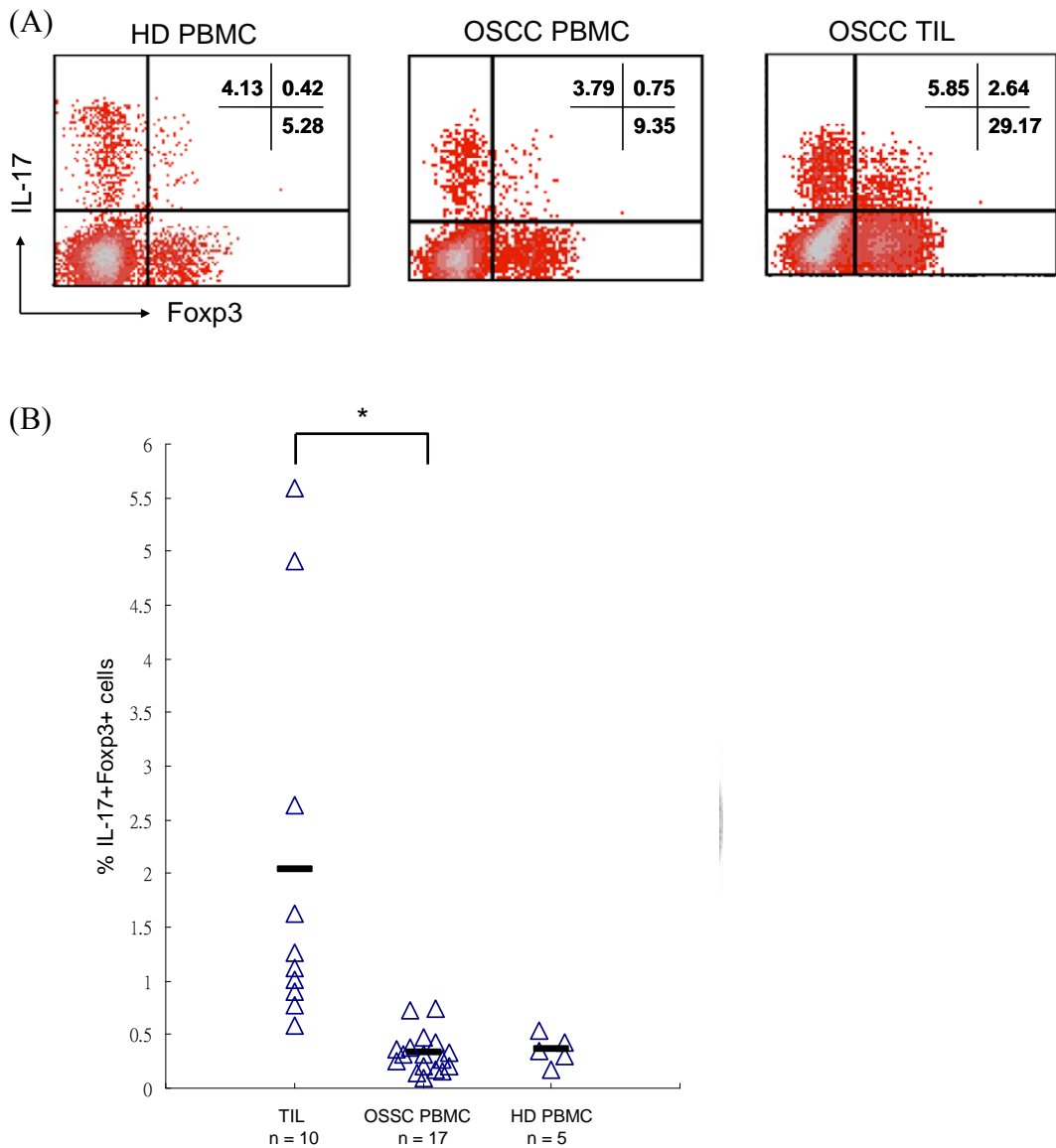
分別由十位病患周邊血液單核細胞、九位病患浸潤腫瘤內之淋巴細胞以及四位病患轉移淋巴結之淋巴細胞中表現 ICOS 之細胞佔其  $CD4^+CD25^+$  細胞群之比例。

\*\*\*代表統計學上 p 值小於0.0001。



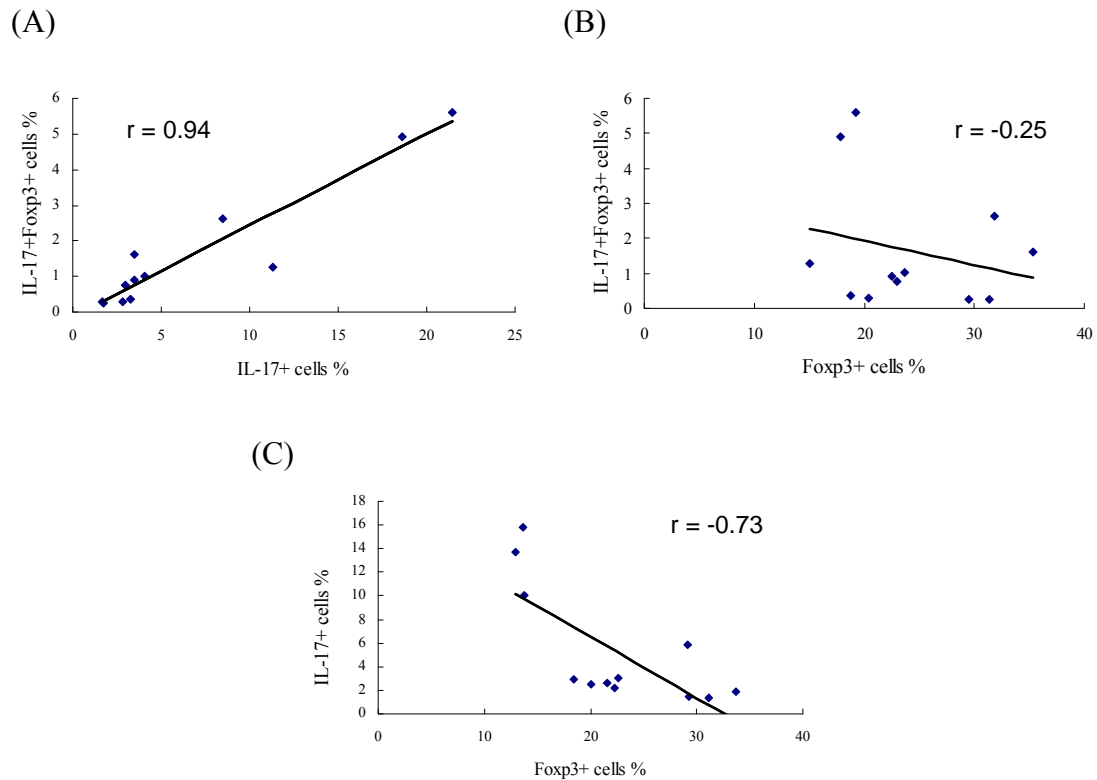
圖六、比較健康個體、病患周邊血液單核細胞以及浸潤腫瘤內淋巴細胞中 Th17 細胞含量

圖(A)為健康個體、病患周邊血液單核細胞和浸潤腫瘤內之淋巴細胞分離後，利用細胞內染色技術標記細胞 IL-17-PE 以及 IFN- $\gamma$ -FITC 並分析 IL-17<sup>+</sup>細胞佔所有 CD4<sup>+</sup>細胞的比例。顯示為一位健康個體及兩位病患分析的結果。圖(B)統計十位病患浸潤腫瘤淋巴細胞、十七位病患周邊血液單核細胞和五位健康個體周邊血液單核細胞的 CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞佔所有 CD4<sup>+</sup>細胞的比例。\*代表統計學上 p 值小於0.05。



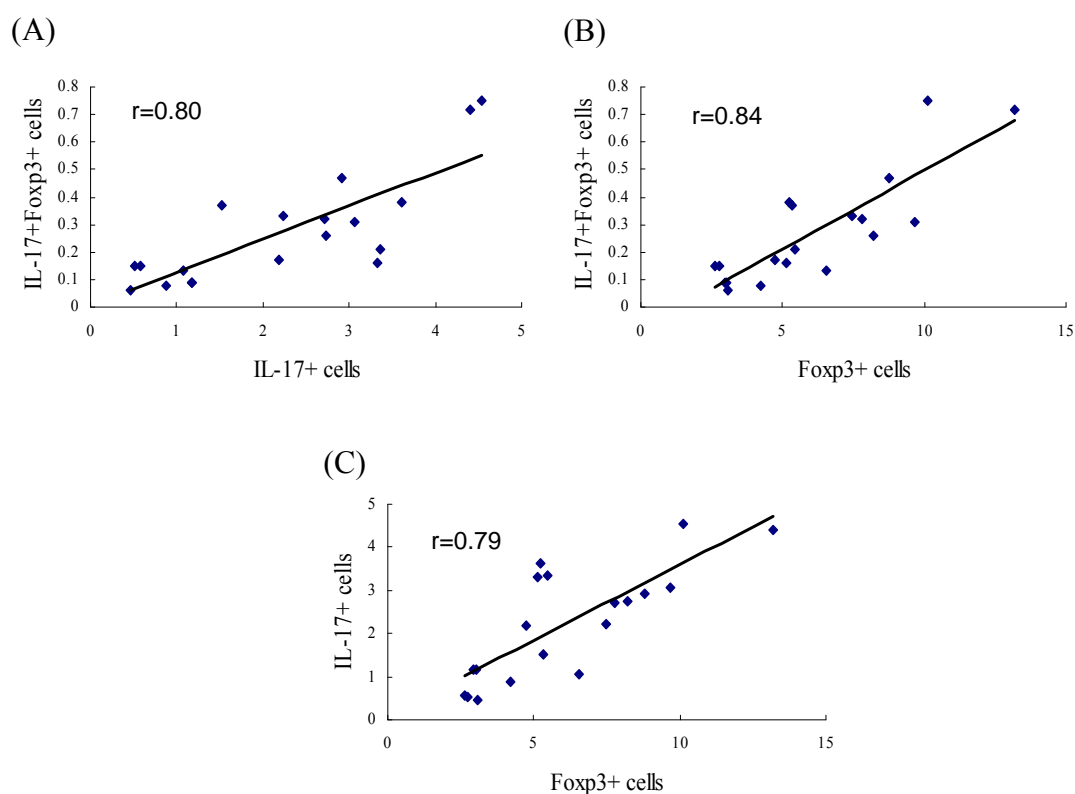
圖七、 比較健康個體、病患周邊血液單核細胞以及浸潤腫瘤內淋巴細胞中 IL-17<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞含量

圖(A)將健康個體、病患周邊血液單核細胞和浸潤腫瘤內之淋巴細胞利用細胞內染色技術標記細胞 IL-17-PE 以及 Fcpx3-FITC 並分析 IL-17<sup>+</sup>Fcpx3<sup>+</sup>細胞佔所有 CD4<sup>+</sup>細胞的比例。顯示為一位健康個體及兩位病患分析的結果。圖(B)統計十位病患浸潤腫瘤淋巴細胞、十七位病患周邊血液單核細胞和五位健康個體周邊血液單核細胞的 IL-17<sup>+</sup>Fcpx3<sup>+</sup>細胞佔所有 CD4<sup>+</sup>細胞的比例。\*代表統計學上 p 值小於 0.05。



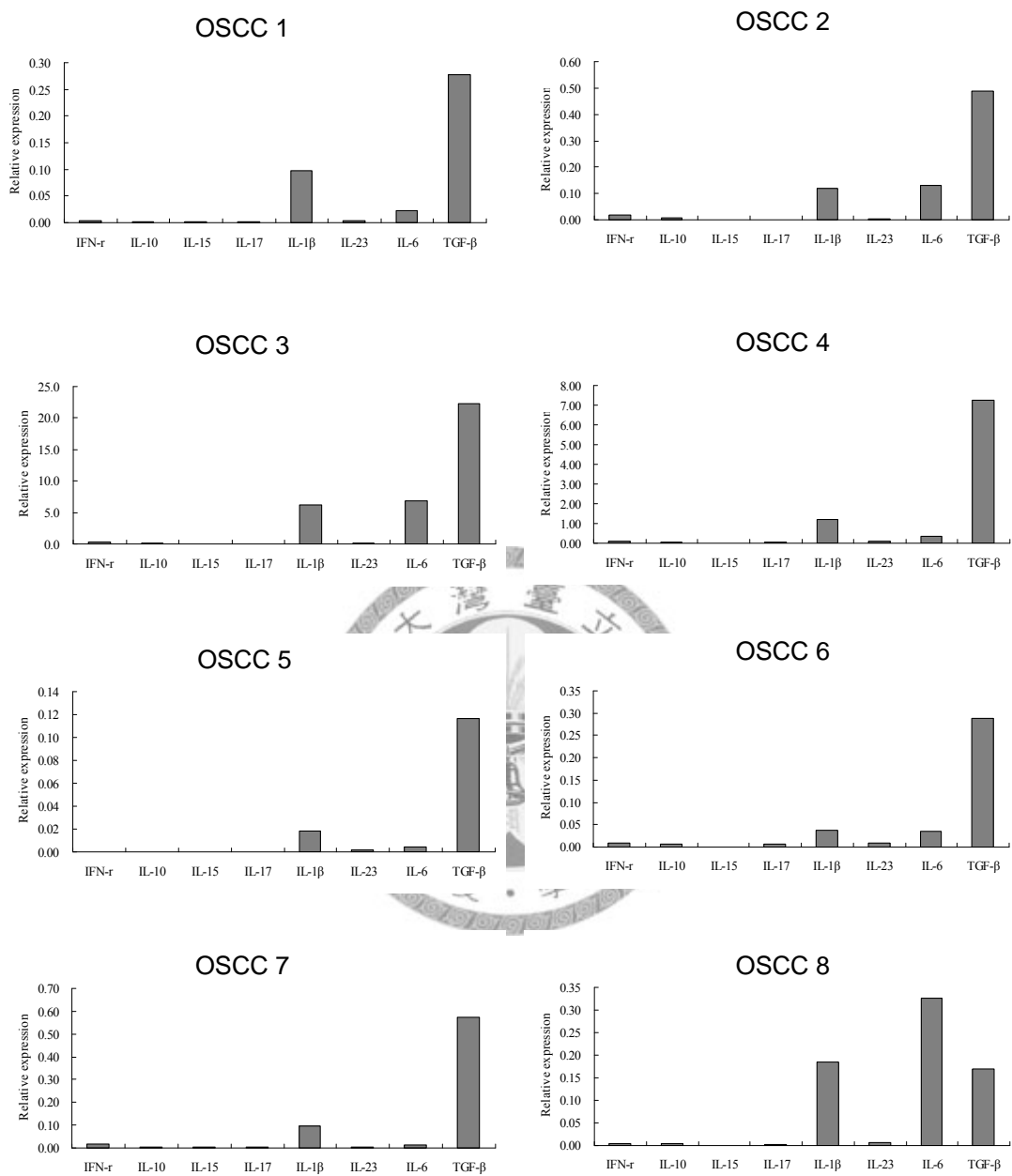
圖八、探討浸潤腫瘤內淋巴細胞中 FoXP3<sup>+</sup>調節性 T 細胞與 Th17 細胞分佈相關性

將各病患腫瘤內淋巴細胞之 Th17 細胞、調節性 T 細胞、IL-17<sup>+</sup>FoXP3<sup>+</sup>細胞佔 CD4<sup>+</sup> 細胞百分比收集後，以 Excel 分析各細胞群間的相關性，圖(A)為十二位病患浸潤腫瘤內淋巴細胞中 Th17 細胞與 IL-17<sup>+</sup>FoXP3<sup>+</sup>細胞的分佈具有非常高度正相關性，相關係數  $r$  值為 0.94。圖(B)為十二位病患浸潤腫瘤內淋巴細胞中調節性 T 細胞與 IL-17<sup>+</sup>FoXP3<sup>+</sup>細胞的分佈不具有相關性，相關係數  $r$  值為 -0.25。圖(C)為十二位病患浸潤腫瘤內淋巴細胞中 Th17 細胞與調節性 T 細胞的分佈具有高度負相關性，相關係數  $r$  值為 -0.74。當相關係數  $r$  之絕對值達小於 0.3 時，為低度相關；絕對值介於 0.3~0.7 時，即為中度相關；達 0.7~0.8 時，即為高度相關；若達 0.8 以上時，即為非常高度相關。



圖九、探討口腔癌病患周邊血液中  $\text{Foxp3}^+$  調節性 T 細胞與  $\text{Th17}$  細胞分佈相關性

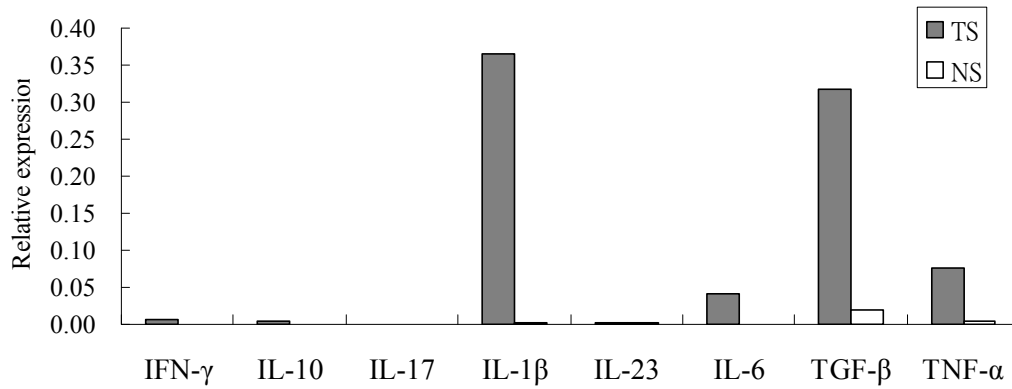
將各病患周邊血液之  $\text{Th17}$  細胞、調節性 T 細胞、 $\text{IL-17}^+\text{Foxp3}^+$  細胞佔  $\text{CD4}^+$  細胞百分比收集後，以 Excel 分析各細胞群間的相關性，圖(A)為十九位病患浸潤腫瘤內淋巴細胞中  $\text{Th17}$  細胞與  $\text{IL-17}^+\text{Foxp3}^+$  細胞的分佈具有非常高度正相關性，相關係數  $r$  值為 0.80。圖(B)為十九位病患浸潤腫瘤內淋巴細胞中調節性 T 細胞與  $\text{IL-17}^+\text{Foxp3}^+$  細胞的分佈不具有相關性，相關係數  $r$  值為 0.84。圖(C)為十九位病患浸潤腫瘤內淋巴細胞中  $\text{Th17}$  細胞與調節性 T 細胞的分佈具有高度負相關性，相關係數  $r$  值為 0.79。當相關係數  $r$  之絕對值達小於 0.3 時，為低度相關；絕對值介於 0.3~0.7 時，即為中度相關；達 0.7~0.8 時，即為高度相關；若達 0.8 以上時，即為非常高度相關。



圖十、分析病患腫瘤微環境中細胞激素或轉錄因子存在的情形

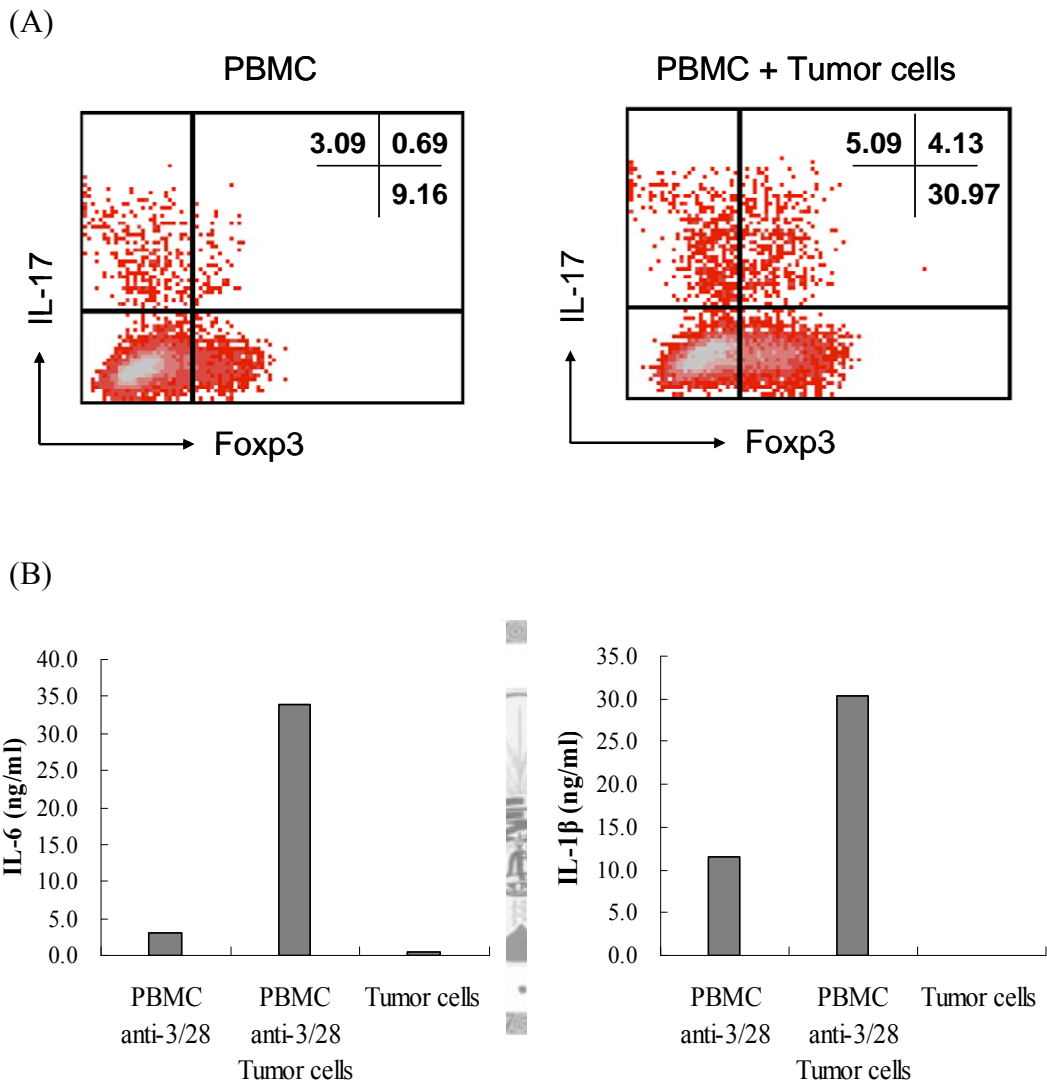
結果顯示由八位病患腫瘤組織 RNA 分離並進行反轉錄作用後得到各組織的 cDNA，利用 real-time PCR 檢視各細胞激素以及轉錄因子表現情形。不同基因表現量皆以 GAPDH 表現量進行標準化，Relative expression =  $2^{-(dCt)}$ 。





圖十一、分析病患腫瘤微環境與非腫瘤微環境中細胞激素或轉錄因子存在的情形

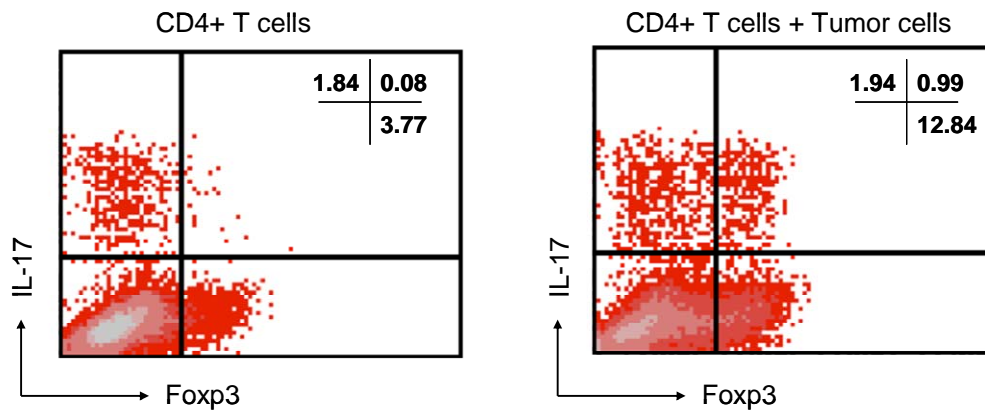
純化一位病患的腫瘤組織(TS)與非腫瘤組織(NS)的 RNA 並進行反轉錄作用後得到各組織的 cDNA，利用 real-time PCR 檢視各細胞激素以及轉錄因子表現情形。不同基因表現量皆以 GAPDH 表現量進行標準化，Relative expression =  $2^{-(dCt)}$ 。



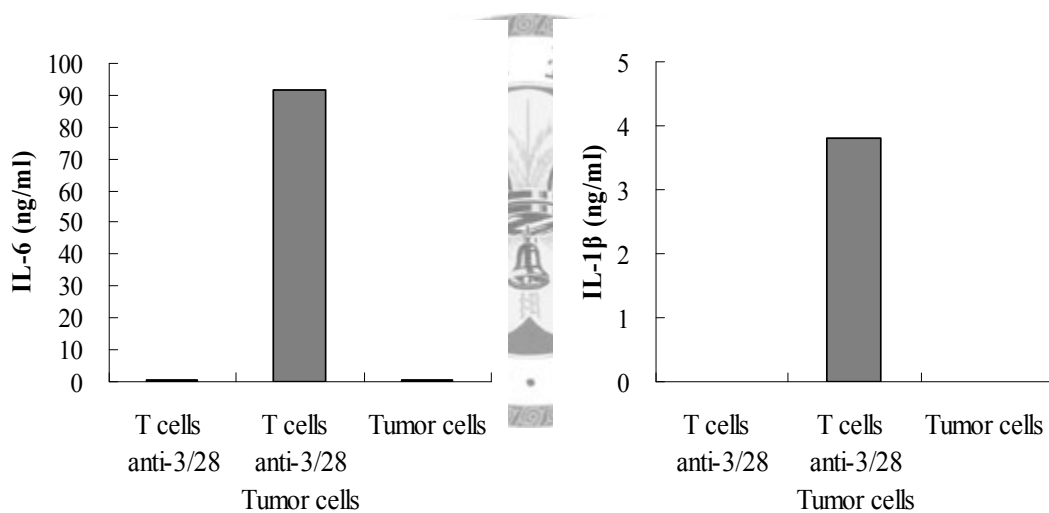
圖十二、利用 PBMC 與口腔癌細胞株進行體外培養，以誘導出 Th17細胞、 $IL-17^+Foxp3^+$ 細胞產生

圖(A)為分離正常人 PBMC 與癌細胞株 SAS 以5：1的比例，在 anti-CD3/CD28刺激下共同培養於 RPMI-10% FBS 中，第五天將細胞以 PBS 沖洗一次後，以 PMA/Ionomycin 刺激四小時，接著進行細胞內染色標示 IL-17-PE 與 Foxp3-FITC，進行流式細胞儀分析並與 PBMC 對照組進行比較。(B) 將培養五天之各實驗組上清液收集，以 ELISA 測試各實驗組中 IL-6、IL-1 $\beta$  的濃度。

(A)



(B)



圖十三、利用 CD4<sup>+</sup> T 細胞與口腔癌細胞株進行體外培養，以誘導出 Th17 細胞、IL-17<sup>+</sup>Fopx3<sup>+</sup>細胞產生

圖(A)為分離正常人 PBMC 中的 CD4<sup>+</sup> T 細胞與癌細胞株 SAS 以 5:1 的比例，在 anti-CD3/CD28 刺激下共同培養於 RPMI-10% FBS 中，第五天將細胞以 PBS 沖洗一次後，以 PMA/Ionomycin 刺激四小時，接著進行細胞內染色標示 IL-17-PE 與 Fopx3-FITC，進行流式細胞儀分析並與 CD4<sup>+</sup> T 細胞對照組進行比較。(B) 將培養五天之各實驗組上清液收集，以 ELISA 測試各實驗組中 IL-6、IL-1 $\beta$  的濃度。

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
relative 16S	1.84	13.08	12.51	16.97	1.00	12.77	7.51	15.40	6.14	12.37
IL-17/CD4	0.10	0.19	0.15	0.06	3.56	0.19	20.11	0.04	0.53	3.66
RORrt/CD4	0.13	0.47	0.04	0.05	0.42	0.17	7.62	0.04	0.25	1.79

圖十四、分析病患腫瘤微環境中細菌存在情形

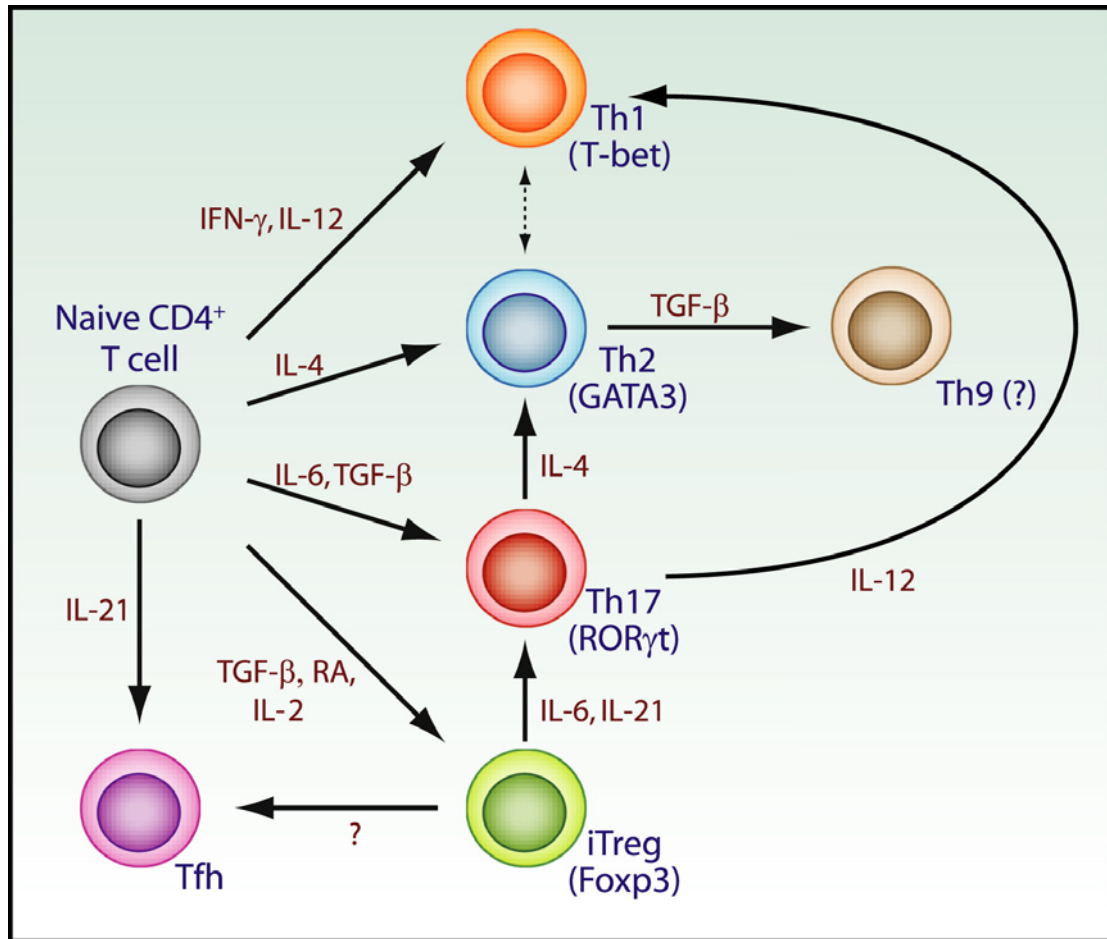
結果顯示由八位病患腫瘤組織 RNA 分離並進行 Universal bacterial 16S 反轉錄作用後得到各組織的 bacterial 16s cDNA。將各病患 16S cDNA 進行 PCR 後取一表現量最低之病患標準化之。表中顯示 IL-17/CD4、RORrt/CD4 分別為將 IL-17、RORrt 利用 CD4 標準化後的結果與 16S 量做對照。



Clinicopathologic characteristics of patients with HNSCC in this study

	n	%
<b>Age(y)</b>		
Mean range	27~89	
<b>Sex</b>		
Male	71	89.87
Female	8	10.13
Total	79	
<b>Tumor site</b>		
Buccal	24	30.38
Tongue	24	30.38
Gingiva	10	12.66
Hypopharynx	11	13.92
Mouth floor	4	5.06
Palate	3	3.80
Tonsil (oropharynx)	3	3.80
<b>Clinicopathologic stage</b>		
I	13	16.46
II	7	8.86
III	8	10.13
IV	51	64.56

表一、本研究中分析之口腔鱗狀上皮細胞癌病患的臨床病理相關數據，包括年齡、性別、腫瘤起源處、以及病理分期。



附圖一、由環境周圍的細胞激素決定 CD4 T 細胞的分化與轉化

(Immunity, Volume 30, Issue 5, 646-655, 22 May 2009)