

Transforming growth factor- β_1 immobilises dendritic cells within skin tumours and facilitates tumour escape from the immune system

Cancer Immunol Immunother (2005) 54: 898–906

Abstract

人類皮膚的腫瘤通常會因為免疫排斥而自行消退，我們以鼠類皮膚腫瘤做為動物模式。先前的研究指出，progressor 皮膚腫瘤會抑制 DC 從腫瘤移動到淋巴結，而 TGF β_1 是其中主要的反應因子。我們想要知道是否增加 TGF β_1 會幫助腫瘤細胞躲避免疫系統的破壞，在鼠類 regressor 鱗狀細胞癌中感染 TGF β_1 的基因，會使得原本的 regressor 變成 progressor，加速腫瘤細胞在體內和體外實驗的生長。TGF β_1 存在會使得 DC 滲透的數目減少約 25%，皮膚腫瘤產生的 TGF β_1 ，足以將 DC 固定在腫瘤中，而不會移動到淋巴結，也會減少 T 細胞滲透的數量，預防腫瘤消退(regression)，所以是一個主要的調節分子，決定皮膚腫瘤的消長。

Introduction

人類皮膚腫瘤常常會有一部份或是全部消退，即使沒有醫療的介入，免疫系統也會破壞腫瘤，皮膚腫瘤的自發性消退和 T 細胞滲透所產生 γ -interferon 和 lymphotoxin 有關。Ultraviolet radiation (UVR) 所誘導出來的鼠類皮膚腫瘤會因為受到免疫系統的攻擊而消退，或是因躲避免疫系統的攻擊而生長，但是這樣的機制目前仍然不清楚。

幾種癌症侵略的機制，可以防止免疫系統活化，我們最近發現，progressor 皮膚癌會抑制 dendritic cell (DC) 從腫瘤到淋巴結的移動。把 DC 固定在腫瘤的 Progressor tumor 會分泌 transforming growth factor- β_1 (TGF β_1)。DC 屬於抗原呈現細胞，幫助免疫細胞進入腫瘤處，我們可以預測有多少 DC 會滲透到腫瘤細胞中，DC 會帶著抗原並移動到局部的淋巴結，呈現抗原給 T 細胞，並產生免疫力。在動物及人類中顯示皮膚癌會誘導免疫反應，當 DC 細胞帶著抗原到淋巴結，免疫系統會把腫瘤摧毀；但如果 DC 被破壞掉而不能夠移動到淋巴結，那腫瘤細胞就可以躲避免疫性的破壞。在部分的研究中我們發現長腫瘤的動物和癌症病患都有 DC 缺陷的問題。

TGF- β_1 基因剔除的小鼠缺乏表皮細胞的 DC，又稱為 Langerhans Cell (LC)，DC 前驅物在體外發育時需要 TGF- β_1 ，才可生成 LC，在表皮上大量表現 TGF- β_1 ，會對 DC 細胞有重大的影響，並和皮膚的免疫力有關係。

Abbreviation

DC	Dendritic cell
LC	Langerhans cell
TGF (A) and (B) factor-b1	Transforming growth transfected clones
TGF-b1	Transforming growth factor-b1
UVR	Ultraviolet radiation
UCo	Untransfected clone
VCo	Empty vector transfected clone

Materials and methods

In vitro proliferation assay

In vivo growth of tumours

In vitro migration of DC from tumours

In vivo migration of DC from tumours to lymph nodes

Results

Characterization of TGF β_1 -transfected cell clones

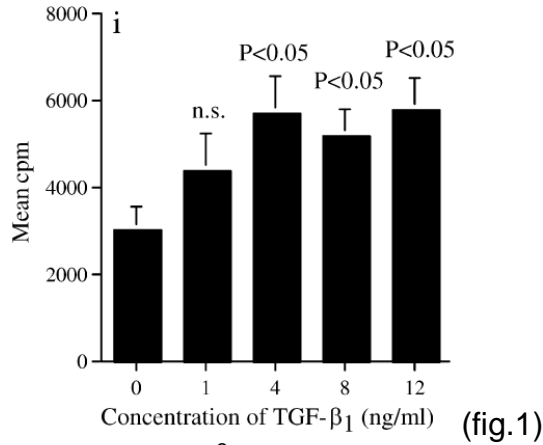
Vco:分泌11pg/ml TGF- β_1

Uco:分泌13pg/ml TGF- β_1

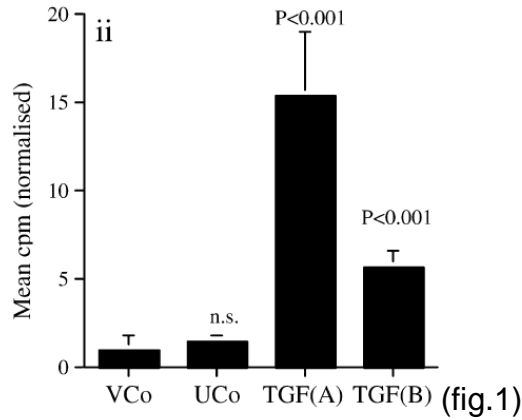
TGF (A) and (B):分別分泌114和64 pg/ml TGF- β_1

有被感染的clones分泌的TGF- β_1 量大約是沒有被感染的clones的TGF- β_1 量的5~10倍。有被感染TGF- β_1 的clones具有類似纖維母細胞的紡錘絲型態，相較於沒有被感染的細胞，則呈現較圓的形狀，但是大致上而言並沒有太大的不同，在細胞凋亡的數目，腫瘤的等級，有絲分裂速率，壞死和基質間的反應上差異不大。

TGF- β_1 augments in vitro proliferation of the SCC clone

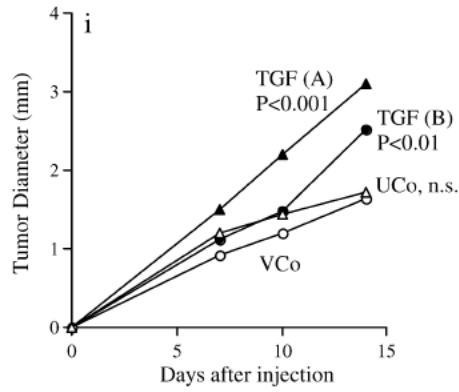


TGF- β_1 明顯地增加未被感染細胞的 [3 H]-thymidine 吸收 (fig.1a)



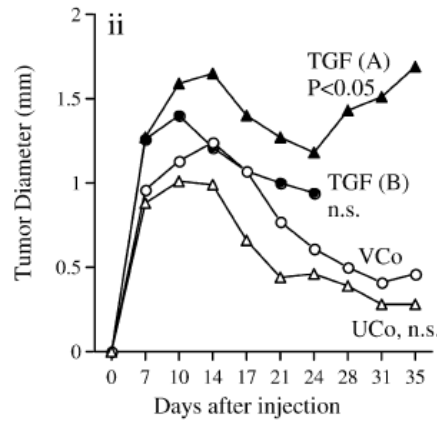
被感染 TGF- β_1 基因的細胞，其細胞生長速率明顯的加強。尤其是 TGF(A) 擁有最大量的 TGF- β_1 ，最高的體外生長速率。

TGF- β 1 enhances growth of tumors in athymic and syngeneic mice



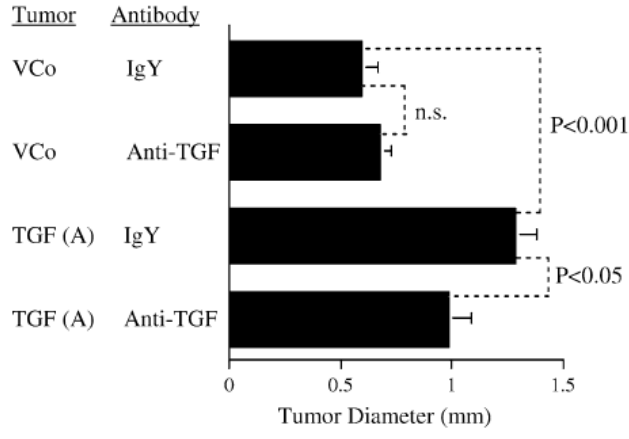
(fig.2a)

注射細胞到無胸腺的小鼠中，可以看到細胞持續且漸進式的生長。被感染TGF- β 1的細胞和控制組比較起來，在體內的實驗中腫瘤很明顯地生長(fig.2a)，這個實驗只能做到第十四天，因為超過十四天後，腫瘤生長過大，基於道德上的考量必須停止實驗。



(fig.2b)

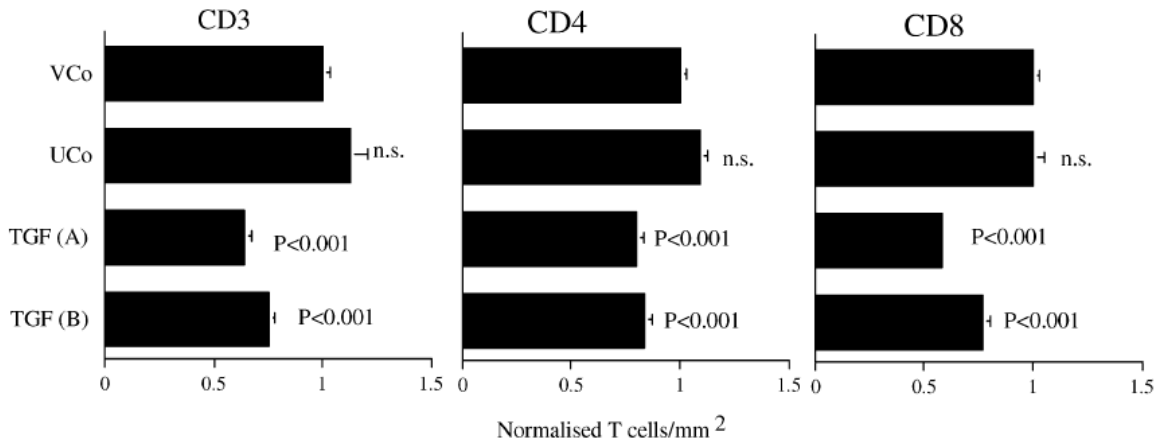
把癌細胞轉殖到C3H/HeN的小鼠體內，可以看到在第十到十四天以前，癌細胞呈現漸進式生長。可是在無胸腺的小鼠中，腫瘤沒有消退的現象，這可能是因為C3H/HeN小鼠有健全地免疫系統，所以在第零到十四天之間，有TGF- β 1表現的細胞持續生長，但是只有TGF(A)的腫瘤生長具有統計上的意義。在腫瘤消退期(第14天後)，TGF(A)仍然持續生長，TGF(B)的表現和許多癌細胞一樣，其腫瘤生長快速，因為道德上的因素，在第二十四天時必須把腫瘤剔除。最後TGF(A)小鼠在第35天的腫瘤大小比第24天大24%。



(fig.3)

為了確定被感染的細胞生長增加是否是因為TGF- β 1所造成的，我們做了體內的抗體中和實驗(fig.3)。測量腫瘤直徑得知，TGF(A)會造成明顯的細胞生長，如果加入anti-TGF- β 1的抗體會明顯地減少原本TGF(A)的生長，但是並不影響只有被空的載體感染的細胞生長速率。

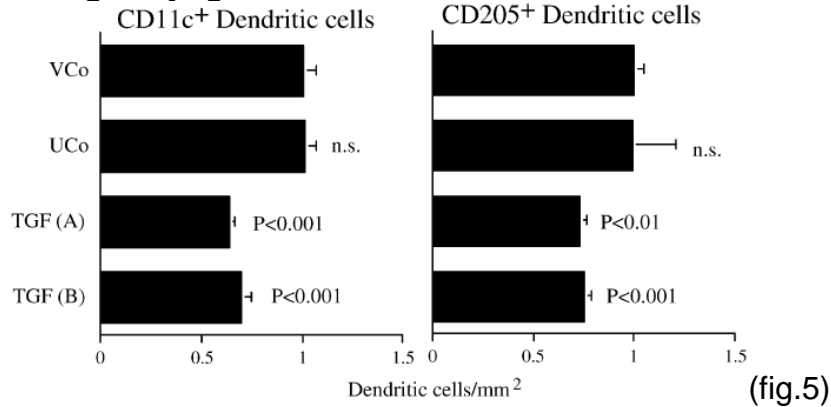
TGF- β 1 decreases the number of infiltrating CD3+, CD4+ and CD8+ T cells in tumours growing in syngeneic mice



(fig.4)

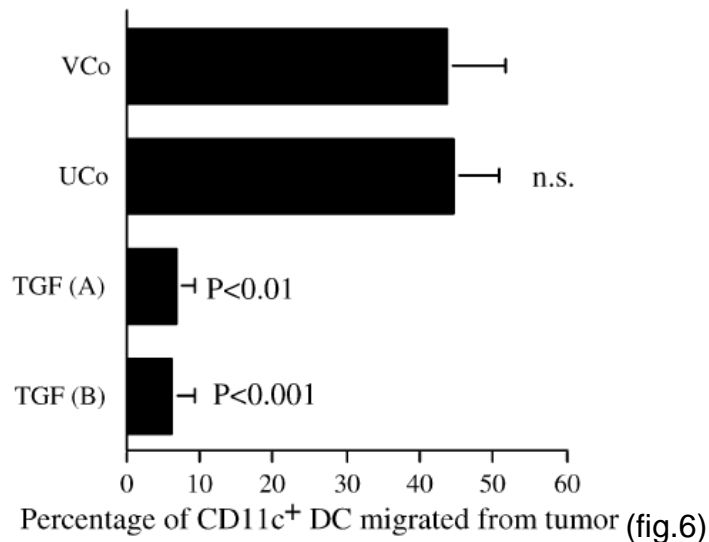
在C3H/HeN小鼠體內注射TGF- β 1，經過十一天，取出腫瘤，此時腫瘤達到生長的高峰，準備開始消退，我們想利用這時的腫瘤來檢測是什麼機制導致腫瘤消退。由實驗的結果得知，在TGF(A)和TGF(B)中CD3, CD4和CD8很明顯地減少，但是在有載體和沒有載體感染的控制組中並沒有明顯的不同。

TGF- β 1 decreases the number of infiltrating CD11c+ and CD205+ DCs in tumours growing in syngeneic mice



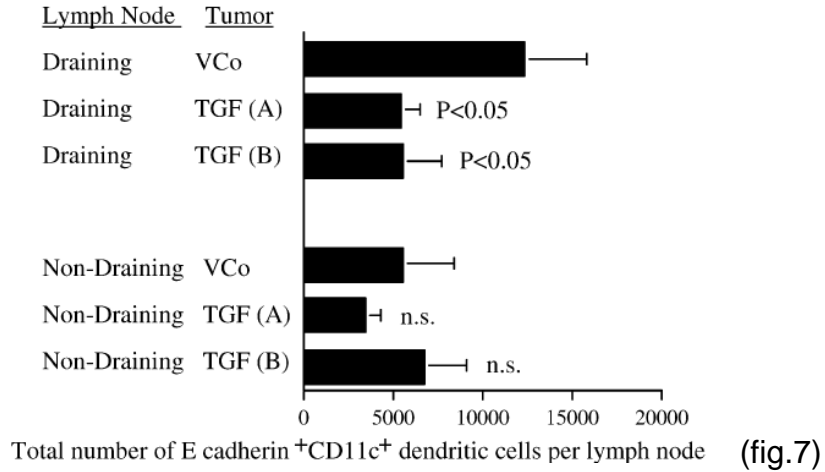
CD11c+和CD205+滲透到被感染TGF- β 1基因的腫瘤數量很明顯的比控制組減少(fig.5)，腫瘤中CD11b+巨噬細胞的數量非常少 (<10 cells/mm²,和100-300個CD11c+ cells/mm²比較起來)，所以少量的CD11c表現並不會影響到CD11c+的數量。

TGF- β 1 inhibits migration of dendritic cells out of the tumor



在細胞培養中，大約有45%的控制組的DC受到刺激而移動離開腫瘤，被感染TGF- β 1細胞CD11c+ DC移動離開腫瘤的數量降至6.5%(TGF(A))和6.0%(TGF(B))。我們不知道為什麼兩個TGF- β 1會抑制DC移動，但是兩腫瘤會出現最大抑制濃度，類似的現象也出現在CD205上。

TGF- β 1 reduces the number of tumor-derived dendritic cells in draining but not non-draining lymph nodes



CD11c DC 滲透出腫瘤要有 E-cadherin，所以我們淋巴結中 DC 的 E-cadherin 和 CD11c，經過流式細胞儀，計算出 E-cadherin 和 CD11c 的細胞數目，結果如上圖，在所有 CD11c⁺細胞中，大約只有 0.15% 具有滲透出腫瘤，而往淋巴結移動的能力。一個被 TGF- β 1 感染動物的淋巴結中，大約含有 5000 個 E-cadherin⁺CD11c⁺細胞，這大約是控制組的一半，也就是說被 TGF- β 1 基因感染，會減少從腫瘤移動到淋巴結的 DC 數目。

Discussion

利用基因插入的方式增加 TGF- β 1 的產量可以

1. 使原本腫瘤 regressor 變成 progressor
2. 因為 CD4 和 CD8 T 細胞的關係，而減少 DC 滲透的數目
3. 抑制 DC 從腫瘤滲透到淋巴結的數目
4. 抑制 keratinocytes 的生長分化
5. 刺激腫瘤生長，提供生長優勢

References

1. Halliday GM, Le S (2001) Transforming growth factor-beta produced by progressor tumors inhibits, while IL-10 produced by regressor tumors enhances, Langerhans cell migration from skin. *Int Immunol* 13:1147 – 1154
2. Nugent MA, Lane EA, Keski-Oja J, Moses HL, Newman MJ (1989) Growth stimulation, altered regulation of epidermal growth factor receptors, and autocrine transformation of spontaneously transformed normal rat kidney cells by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 49:3884 – 3890