

口腔扁平上皮癌細胞株（Sq-1979）および  
その転移リンパ節由来癌細胞株（L5-11）  
移植マウスにおける骨髄由来免疫抑制細胞  
の比較

すみ しげき  
鷺見 成紀

本論文の要旨は，第185回朝日大学歯学研究科発表会  
（2016年9月20日，岐阜）において発表した．  
本論文の一部は，第58回歯科基礎医学会学術大会  
（2016年8月25日，札幌）において発表した．

## 緒 言

口腔扁平上皮癌（OSCC）を含む頭頸部癌において、リンパ節転移の有無は患者の予後を大きく左右する重要な因子である。リンパ節転移のない患者の5年生存率は63～86%であるのに対し、転移を有する患者ではそれが20～36%とかなり低下する<sup>1,2)</sup>。従来、リンパ節転移と予後との関連は腫瘍細胞の転移能の獲得<sup>3,4)</sup>や化学療法剤への薬剤抵抗性獲得<sup>5)</sup>など癌細胞の形質の違いで説明されてきたが、OSCC患者の予後を正確に予測するためには、患者の免疫系を含む全身状態を総合的に把握することが重要である。がんによる免疫系制御には、直接または特異的な受容体を介してリンパ球などを抑制する場合<sup>6)</sup>のほかに、腫瘍関連線維芽細胞<sup>7)</sup>や骨髄由来免疫抑制細胞（Myeloid-derived suppressor cell：MDSC）の誘導が重要な役割を果たす場合などが報告されている<sup>8)</sup>。

MDSCは炎症や担癌状態などで、腫瘍組織・脾臓などの造血器官・末梢血中やリンパ節において増加する。また、担癌状態や炎症などにおいて免疫応答を抑制的に調節していることが知られている<sup>9-11)</sup>。マウスのMDSCは、形態および表現型が単球と類似した細胞表面マーカー $CD11b^+Ly6C^{hi}Ly6G^-$ の未熟単核細胞（Monocytic MDSC：M-MDSC）と、形態および表現型が好中球と類似した細胞表面マーカー $CD11b^+Ly6C^{lo}Ly6G^+$ の未熟多形核細胞

(Polymorphonuclear MDSC : PMN-MDSC) の 2 群に細分される<sup>12)</sup>. MDSC は, 制御性 T 細胞を誘導<sup>13)</sup>する場合や, Arginase-1 や Inducible nitric oxide synthase の働きを介し, アルギニン欠乏状態, Reactive oxygen species および Reactive nitrogen species の誘導により T 細胞の機能を抑制<sup>14)</sup>し抗腫瘍免疫を抑制して腫瘍増殖や転移を促進する場合が考えられている<sup>15-18)</sup>. また, MDSC は, T 細胞のみならず NK 細胞<sup>19,20)</sup>にも作用し, 組織浸潤や上皮間葉転換や, 転移前の足掛かりの形成<sup>15)</sup>にも関与することが知られている. しかし, OSCC が高い増殖能や転移能を獲得してゆく過程で MDSC の制御がどのように変化し, 機能するのかは十分に知られていない.

Adachi ら<sup>21)</sup>は, リンパ節転移能を有する OSCC の悪性形質を詳細に検討する目的で, C3H マウス頬粘膜 OSCC 細胞株 Sq-1979 を同系統マウスの頸部皮下に移植し, 頸部転移リンパ節巣より L 細胞群を樹立した. Sq-1979 移植マウスに比べ, L 細胞群移植マウスの腫瘍は有意に速い増大を示し, また, 高い生着率と低い生存率および特異的なマーカー遺伝子発現を示すことを明らかにした<sup>21)</sup>.

本研究では, Sq-1979 および L 細胞群の一つである L5-11 細胞を同系統マウスに移植し, 腫瘍組織内および脾臓における MDSC の変化を観察して OSCC 細胞の悪性形質の獲得に伴って引き起こされる免疫制御機構

の変化について検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

6週齢あるいは8週齢雄性 C3H/HeN 系統マウス, 75匹 (清水実験材料, 京都) を朝日大学動物飼育施設において Oriental MF solid chow(オリエンタル酵母工業, 東京) を与え 1週間, 順化のため飼育し, 実験に用いた. すべての動物実験は, 朝日大学動物実験倫理委員会の承認 (承認番号: 16-017) を得て実施した.

### 2. Sq-1979 および L5-11 細胞の培養

C3H マウス頬粘膜 OSCC 細胞株 Sq-1979 (理化学研究所バイオリソースセンター, 茨城) および, Sq-1979 細胞移植マウスの転移リンパ節巣より樹立した L5-11 細胞<sup>21)</sup>を用いた. いずれも 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 含有混合気インキュベーター内で, 10% 牛胎児血清 (FBS, ニチレイバイオサイエンス, 東京), 1% antibiotic solution (100mg/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を含んだ Eagle's Minimum Essential Medium (NaHCO<sub>3</sub>, グルタミン含有, 和光純薬工業, 大阪) を用いて培養した.

### 3. MTT assay による細胞増殖の測定

$1 \times 10^3$  個の Sq-1979 および L5-11 細胞を 96 穴マイクロタイタープレートに播種したのち,  $5 \mu\text{L}$  の MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を添加し, Cell Proliferation Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) によるホルマザン色素の発色を吸光度  $595\text{nm}$  で TECAN Spectra Flour plus XFluor4 software (テカンジャパン, 神奈川) にて 4 日間測定した.

### 4. 腫瘍増殖の評価

$1 \times 10^6$  個の Sq-1979 および L5-11 細胞を  $0.1\text{mL}$  の PBS に懸濁し, マウス側腹皮下に移植し, 腫瘍体積を 3 日ごとに測定した. 腫瘍体積は (長径  $\times$  短径<sup>2</sup>) / 2 の計算式で求めた<sup>22)</sup>. コントロール群として  $0.1\text{mL}$  PBS を投与した.

### 5. 腫瘍および脾臓からの細胞の単離

OSCC 細胞移植後, 腫瘍増殖曲線を参考に移植後 21 日目に腫瘍と脾臓を摘出した. 摘出した腫瘍は細切し, Enzyme mix of tumor dissociation kit (ミルテニーバイオテク, 東京) で  $37^\circ\text{C}$ , 40 分間攪拌しながら反応させた. 細胞懸濁液を MACS SmartStrainer<sup>®</sup> ( $70\mu\text{m}$ ) (ミルテニーバイオテク, 東京) で濾過し, Red blood cell lysis solution ( $10\times$ ) (ミルテニーバイオテク, 東京) にて赤

血球を除去し，再度 MACS SmartStrainer<sup>®</sup>（70 $\mu$ m）で濾過した．また，脾細胞の単離は脾臓を細切し，Red blood cell lysis solution（10 $\times$ ）で赤血球を除去後，MACS SmartStrainer<sup>®</sup>（70 $\mu$ m）で濾過し行った．

## 6．Flow cytometry（FACS）解析

腫瘍または脾臓より得た細胞懸濁液に，細胞  $1 \times 10^6$  個当たり 1  $\mu$ g の CD16/32（eBioscience, Santa Clara, CA, USA）を添加し氷上で 10 分間反応させ Fc 受容体をブロックした．マウス MDSC Flow Cocktail 2（PE 標識抗 CD11b 抗体，FITC 標識抗 Ly6G 抗体，APC 標識抗 Ly6C 抗体；BioLegend, San Diego, CA, USA）（表 1），また，マウス T 細胞サブセットを観察するために，FITC 標識抗 CD8a 抗体，PE 標識抗 CD4 抗体を用い，さらにコントロールとして FITC 標識 IgG2a，PE 標識 IgG2b（BD Pharmingen, San Diego, CA, USA）（表 2）を暗所で 30 分間反応させ，細胞を洗浄の後，FACS 溶液（0.5% BSA in PBS）にて懸濁した．データー測定および解析は，EC800 Flow Cytometry Analyzer<sup>®</sup>と EC800 analysis software<sup>®</sup>（Sony Biotechnology Inc., 東京）を用いて行った．



表 1 MDSC の FACS 解析に用いた抗体

Antibody	Clone	Label	Source
anti-mouse CD11b	M1/70	PE	Sony Biotechnology Inc. , San Jose, CA, USA
anti-mouse Ly6G	1A8	FITC	Sony Biotechnology Inc. , San Jose, CA, USA
anti-mouse Ly6C	HK1.4	APC	Sony Biotechnology Inc. , San Jose, CA, USA

PE : Phycoerythrin

FITC : Fluorescein isothiocyanate

APC : Allophycocyanin

表 2 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞の FACS 解析に用いた抗体

Antibody	Clone	Label	Source
anti-mouse CD8a	53-6.7	FITC	Sony Biotechnology Inc. , San Jose, CA, USA
anti-mouse CD4	GK1.5	PE	Sony Biotechnology Inc. , San Jose, CA, USA
mouse IgG2a	G155-178	FITC	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
mouse IgG2b	27-35	PE	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

FITC : Fluorescein isothiocyanate

PE : Phycoerythrin

## 8 . 統計処理

各実験群の測定値は平均±標準偏差で表記した。2群間の検定には Student's *t*-test で、3群間の検定には Turkey-Kramer test および Bonferroni/Dunn 法で行った。P < 0.05 を有意差有りとした。

## 結 果

### 1. *in vitro* における Sq-1979 および L5-11 細胞の増殖の特徴

*in vitro* において L5-11 細胞は Sq-1979 細胞と比べ、孤立散在性に増殖した (図 1 A). また, 細胞増殖速度は Sq-1979 と L5-11 細胞間で有意な差は認められなかった (図 1 B).

図 1 A

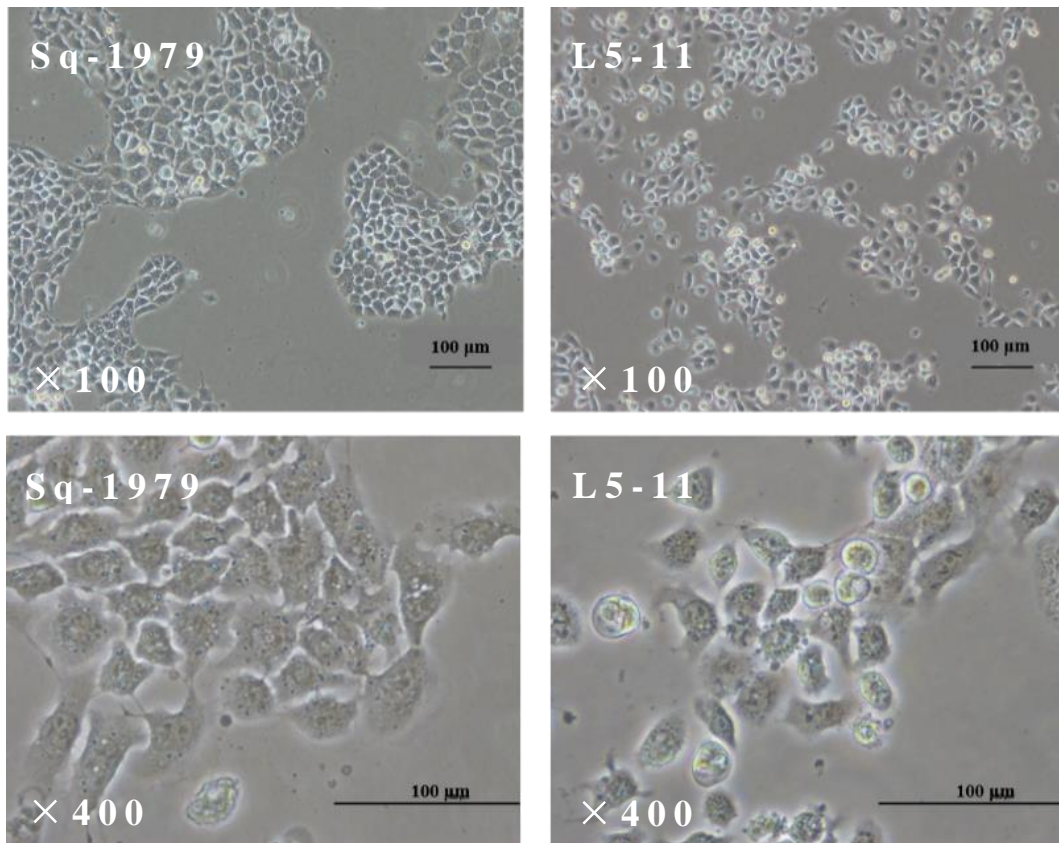


図 1 B

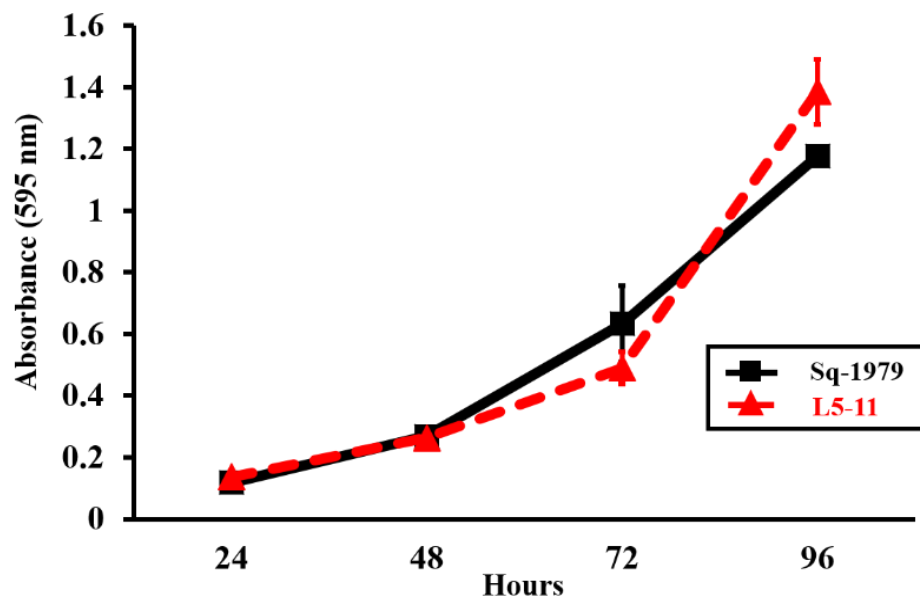


図 1 *in vitro* における Sq-1979 および L5-11 細胞の増殖

A: 培養 2 日目の Sq-1979 (左) と L5-11 (右) 細胞像.

上が  $\times 100$  で下が  $\times 400$  である.

B: *in vitro* における細胞増殖速度の比較.

縦軸にホルマザン色素の吸光度, 横軸に時間を示す.

## 2. *in vivo* における Sq-1979 および L5-11 移植マウスの腫瘍増殖の評価

L5-11 移植マウス群における腫瘍増殖速度は Sq-1979 移植マウス群のそれより有意に早い速度で増大していた (図 2)。

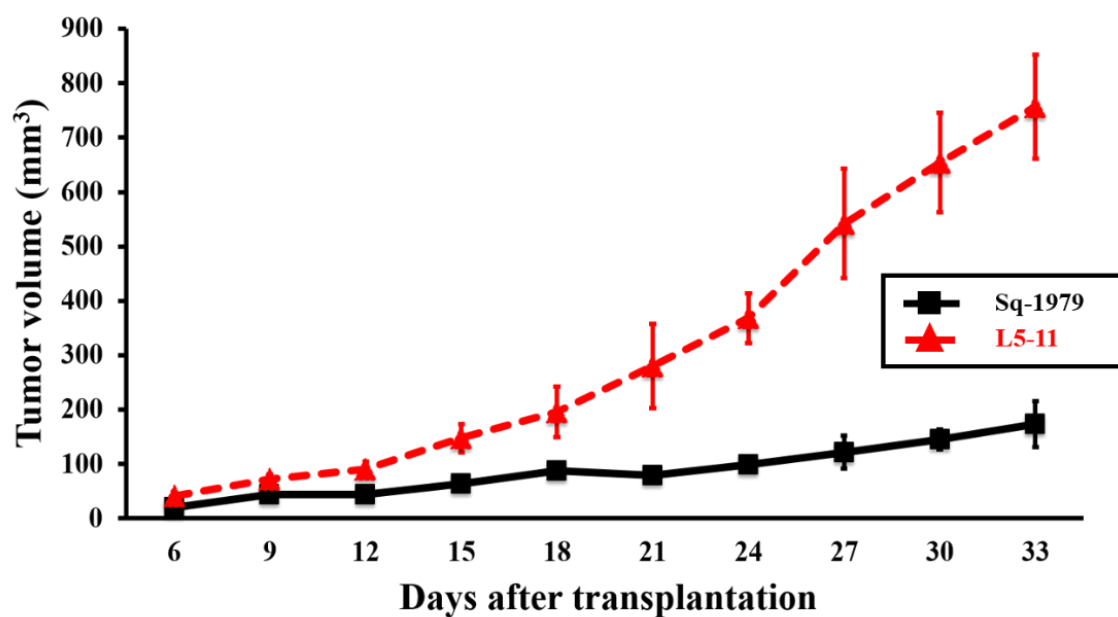


図 2 *in vivo* における Sq-1979 および L5-11 移植マウス群の腫瘍増殖の評価

縦軸に腫瘍体積，横軸に移植後の日数を示す (n = 13)。

### 3. OSCC 移植マウスの腫瘍および脾臓

OSCC 移植後 21 日目の移植マウスから摘出した L5-11 細胞由来の腫瘍および脾臓は Sq-1979 移植マウスのそれに比べ顕著に増大し (図 3 A), 細胞数も増加していた (図 3 B). コントロール群および Sq-1979 移植マウス由来の脾臓および脾細胞数の間には有意な違いや差はみられなかった.

図 3 A

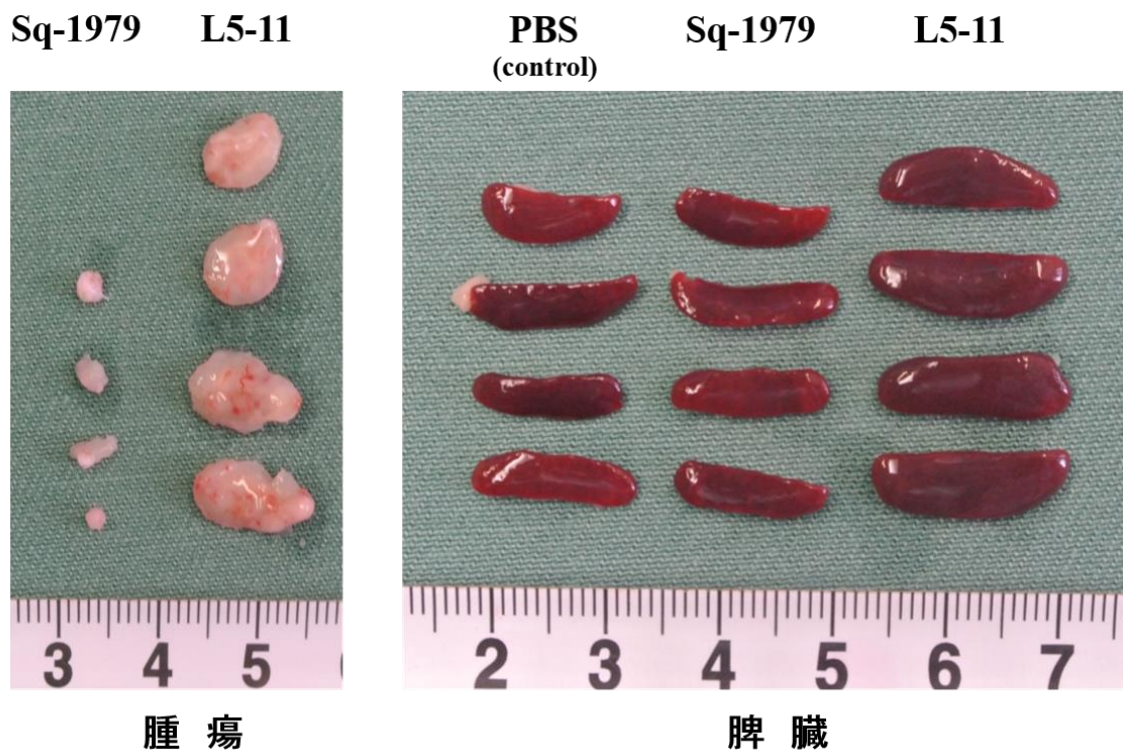


図 3 B

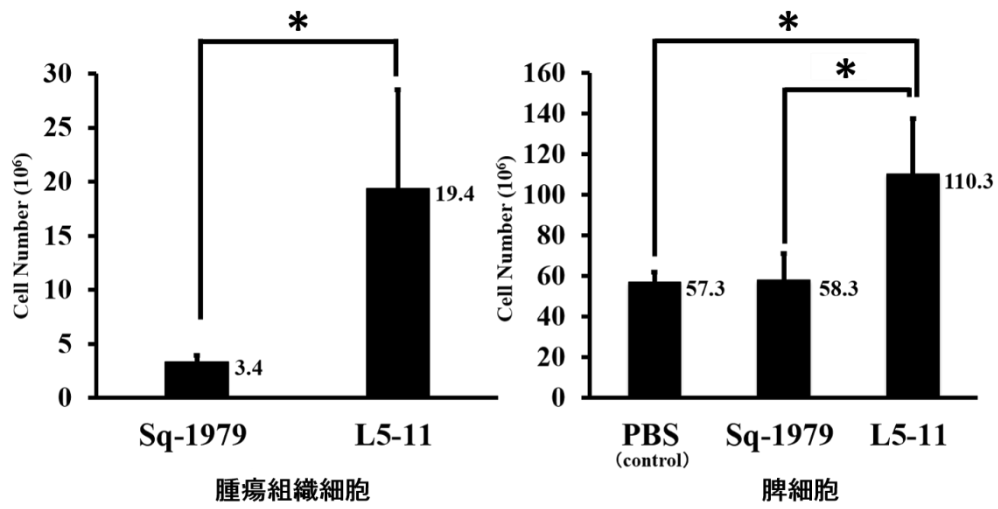


図 3 OSCC 移植マウスから摘出した腫瘍および脾臓

A : 移植後 21 日目の腫瘍と脾臓 .

B : 腫瘍組織細胞と脾細胞の総細胞数の比較 .

#### 4. 腫瘍組織における MDSC 分画の分布

腫瘍組織内における CD11b<sup>+</sup> 細胞の総数および分画の比率は, Sq-1979 移植マウス群 (平均  $0.18 \times 10^6$  個, 4.8%) に比べ L5-11 移植マウス群 (平均  $11.61 \times 10^6$  個, 48.4%) で有意に高かった (図 4 A, B). 腫瘍組織内における M-MDSC の総数および分画の比率は, Sq-1979 移植マウス群 (平均  $0.003 \times 10^6$  個, 0.1%) に比べ L5-11 移植マウス群 (平均  $0.2 \times 10^6$  個, 0.9%) で有意に高かった (図 4 C). 腫瘍組織内の PMN-MDSC の総数および細胞分画の比率も同様に, Sq-1979 移植マウス群 (平均  $0.01 \times 10^6$  個, 2.7%) に比べ L5-11 移植マウス群 (平均  $9.14 \times 10^6$  個, 38.1%) において顕著に高い値を示した. また, 総数において PMN-MDSC は M-MDSC より 30 倍以上高かった.



图 4 A

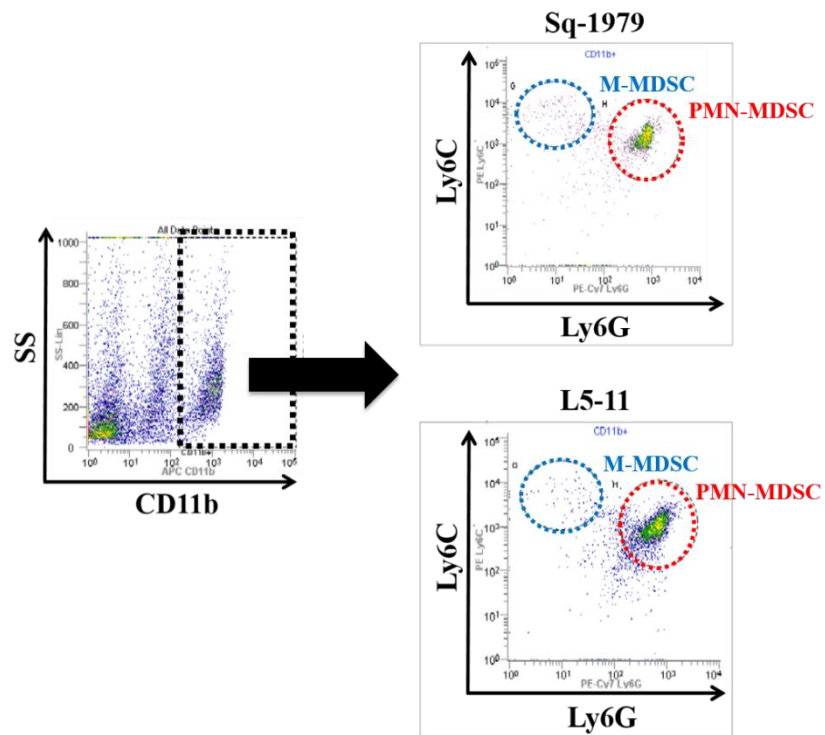


图 4 B

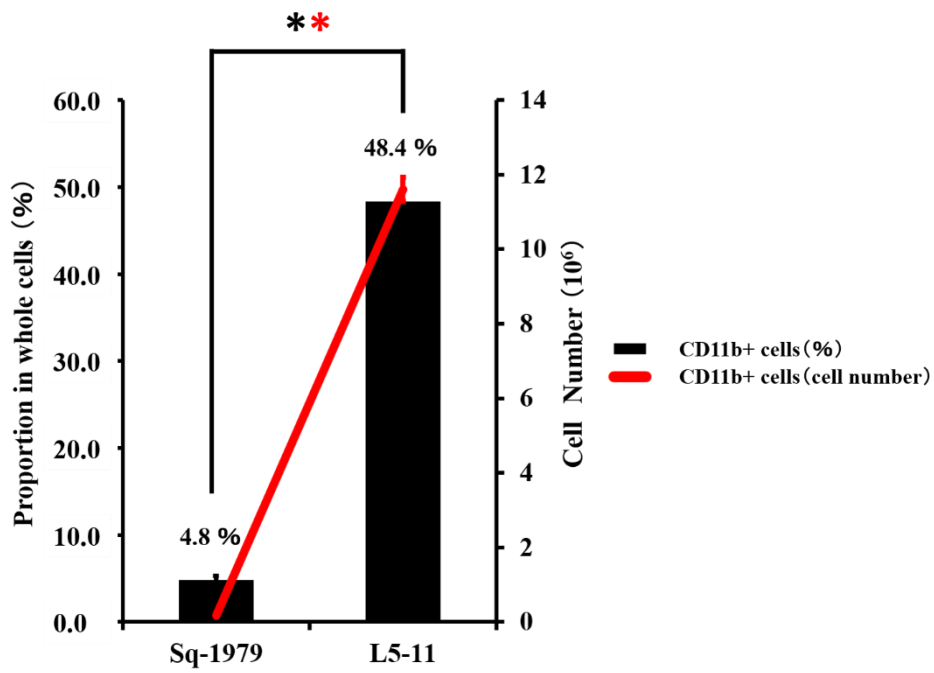


図 4 C

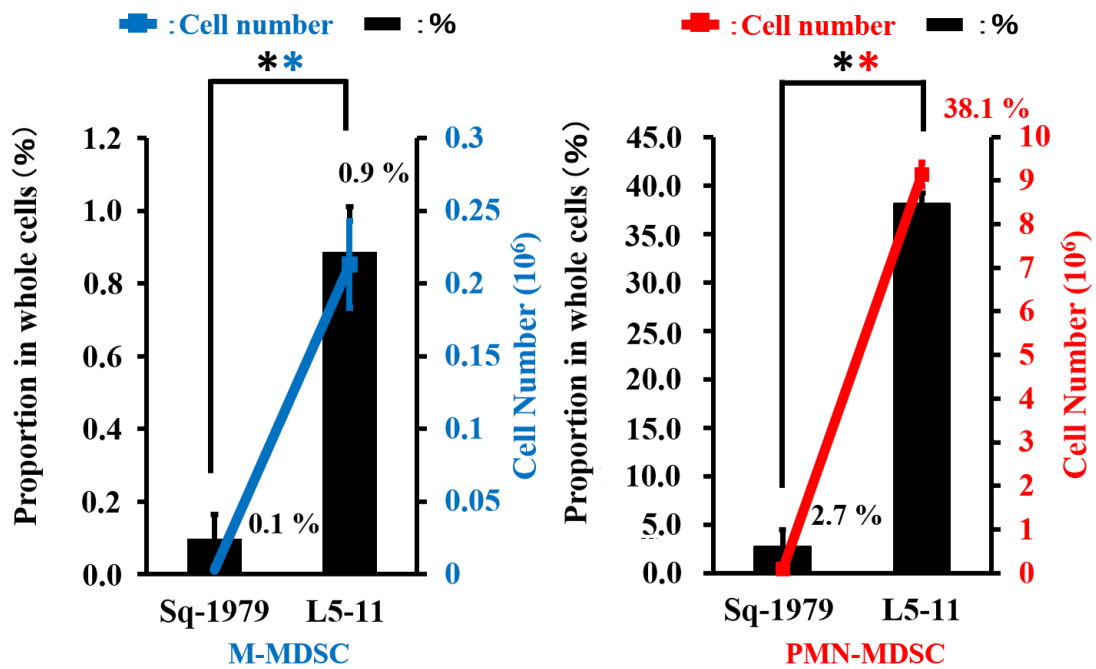


図 4 腫瘍組織における MDSC 分画

A: 腫瘍内 MDSC の FACS 解析の結果を示す。CD11b<sup>+</sup> 細胞の分画から、Ly6G および Ly6C 細胞分画を展開し、M-MDSC、PMN-MDSC 分画（破線部分）を特定した。

B: 腫瘍組織内における CD11b<sup>+</sup> 細胞分画の比較。

C: Sq-1979 および L5-11 由来腫瘍組織における M-MDSC および PMN-MDSC の比率。CD11b<sup>+</sup> 細胞および MDSC の総細胞数および総細胞数に対する MDSC の比率を、それぞれのグラフの縦軸左と棒グラフ、および縦軸右と折れ線グラフに示す (\*: P < 0.05, n = 12)。

## 5. 脾臓における MDSC 分画の分布

脾臓内における CD11b<sup>+</sup> 細胞分画の総数および比率は、L5-11 移植マウス群（平均  $15.27 \times 10^6$  個，15.2%）では Sq-1979 移植マウス群に比べ，有意に高い値が観察された（図 5 A, B）。一方，コントロール群（平均  $5.95 \times 10^6$  個，10.4%）と Sq-1979 移植マウス群（平均  $4.01 \times 10^6$  個，9.0%）との間では，有意な差は観察されなかった（図 5 A, B）。

脾臓内における M-MDSC の総数および分画の比率は，コントロール群（平均  $1.2 \times 10^6$  個，2.3%），Sq-1979 移植マウス群（平均  $1.3 \times 10^6$  個，2.0%），L5-11 移植マウス群（平均  $2.0 \times 10^6$  個，2.0%）の間で，有意な差は観察されなかった（図 5 C）。脾臓内における PMN-MDSC の総数および分画の割合は，L5-11 移植マウス群（平均  $8.8 \times 10^6$  個，8.4%）では Sq-1979 移植マウス群に比べ，有意に高い値が観察された（図 5 C）。一方，コントロール群（平均  $2.8 \times 10^6$  個，5.0%）と Sq-1979 移植マウス群（平均  $3.4 \times 10^6$  個，5.9%）との間では，有意な差は観察されなかった（図 5 C）。

图 5 A

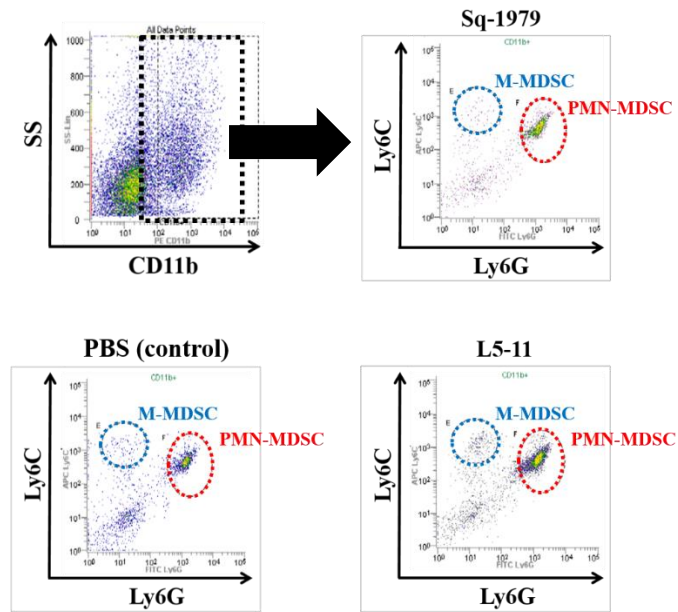


图 5 B

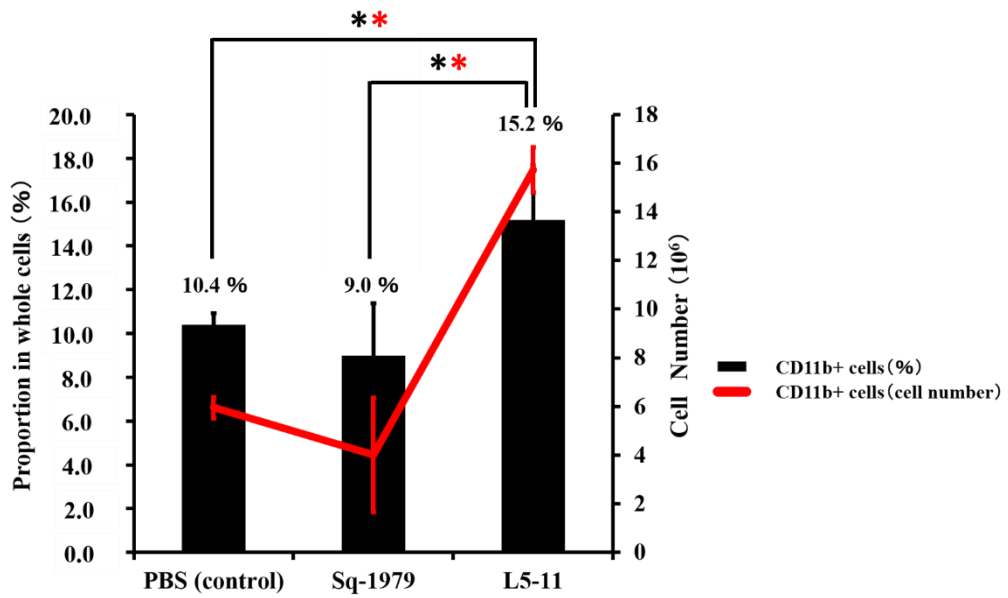


図 5 C

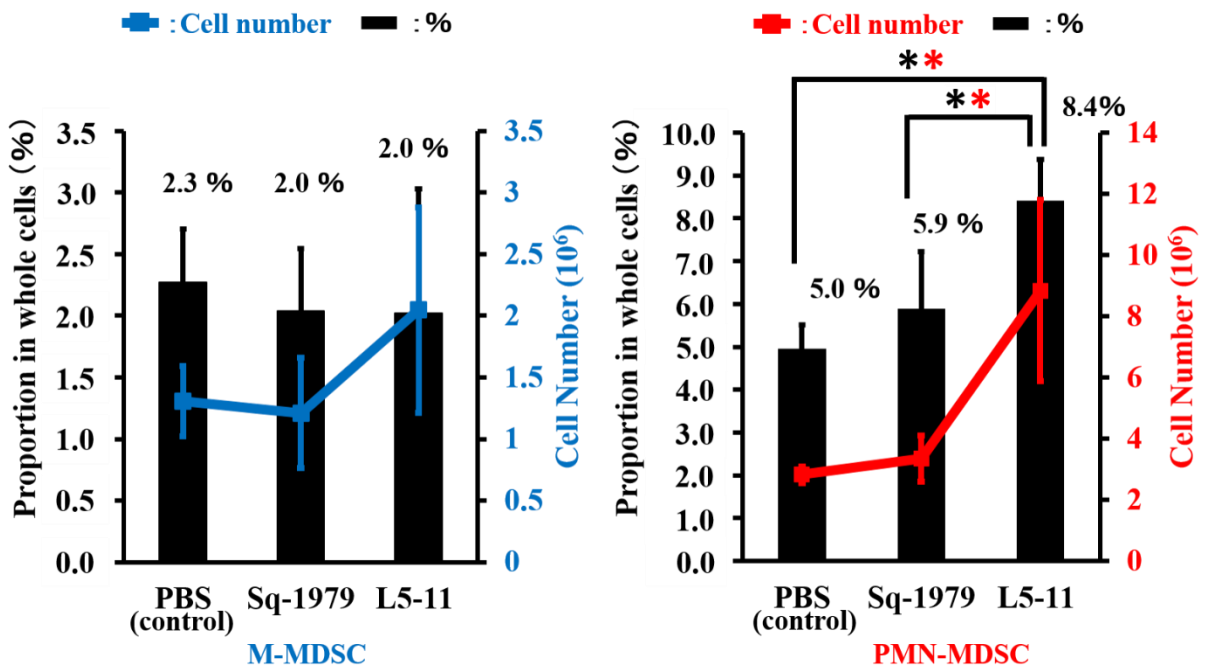


図 5 脾臓における MDSC 分画

A: 腫瘍内 MDSC と同様の方法で分画を展開した。

B: 脾細胞における CD11b<sup>+</sup> 細胞分画の比較。

C: Sq-1979 および L5-11 移植マウス群の脾細胞における M-MDSC および PMN-MDSC の比較。CD11b<sup>+</sup> 細胞および MDSC の総細胞数 および総細胞数に対する MDSC 分画の比率を、それぞれのグラフの縦軸左と棒グラフ、および縦軸右と折れ線グラフに示す

(\* : P < 0.05, n = 12).

6. 腫瘍組織における CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞分画の分布

腫瘍内における CD4<sup>+</sup> T 細胞数は Sq-1979 移植マウス群（平均  $0.05 \times 10^6$  個）と比べ L5-11 移植マウス群（平均  $0.33 \times 10^6$  個）で顕著に増加していたが，総細胞数に対する比率は Sq-1979 移植マウス群（平均 1.3%）と L5-11 移植マウス群（平均 1.4%）間で有意な差を認めなかった（図 6 A, B）. 一方，CD8<sup>+</sup> T 細胞はその細胞数，比率ともに Sq-1979 移植マウス群（平均  $0.05 \times 10^6$  個，1.3%）と比較し L5-11 移植マウス群（平均  $0.55 \times 10^6$  個，2.3%）で有意に増加していた（図 6 A, B）.

図 6 A

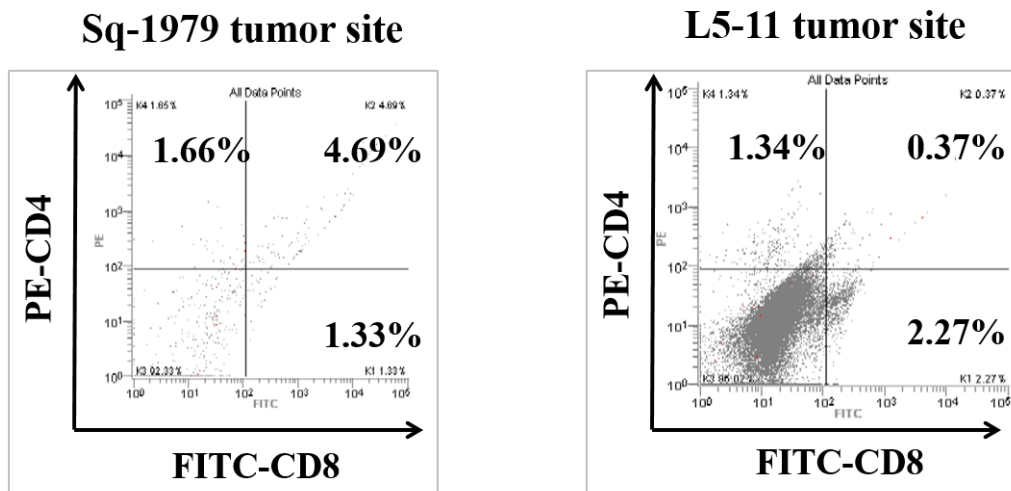


図 6 B

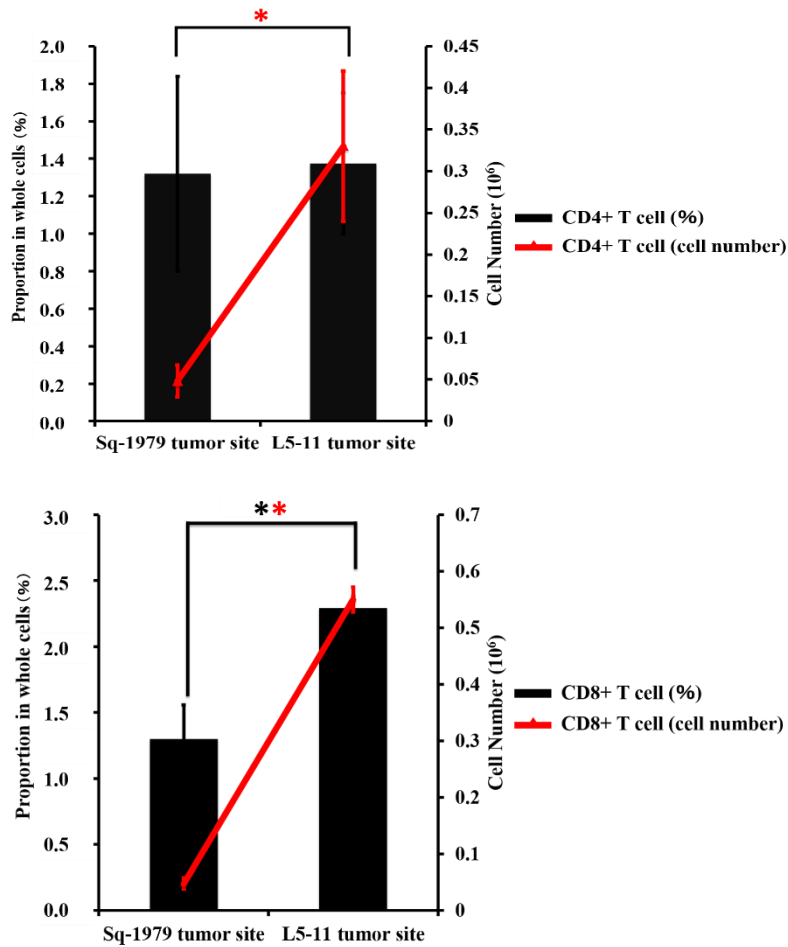


図 6 腫瘍組織における CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞分画

A: 腫瘍内 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞の FACS 解析の結果を示す. Sq-1979 および L5-11 由来腫瘍組織より CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞分画を展開した.

B: Sq-1979 および L5-11 由来腫瘍組織における CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞の比較. 総細胞数に対する CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞の比率を, それぞれの図の縦軸左と棒グラフ, および縦軸右と折れ線グラフに示す (\*: P < 0.05, n = 12).

## 7. 脾臓における CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞分画の分布

脾臓内 CD4<sup>+</sup> T 細胞の総数および総脾細胞数に対する比率は, コントロール群 (平均  $6.63 \times 10^6$  個, 11.5%), Sq-1979 移植マウス群 (平均  $7.66 \times 10^6$  個, 13.1%) の間では有意な差は見られなかったが, これに比べて L5-11 移植マウス群 (平均  $3.02 \times 10^6$  個, 2.8%) では, 共に有意に減少していた (図 7 A, B). 一方, CD8<sup>+</sup> T 細胞の総数および総脾細胞数に対する比率は, コントロール群 (平均  $1.64 \times 10^6$  個, 2.8%) に比べ Sq-1979 移植マウス群 (平均  $3.05 \times 10^6$  個, 5.2%) で共に有意に増加していた (図 7 A, B). これに対して, L5-11 移植マウス群 (平均  $0.31 \times 10^6$  個, 0.3%) では, 両者に比べ細胞数および比率共に顕著な減少が認められた (図 7 A, B).

図 7 A

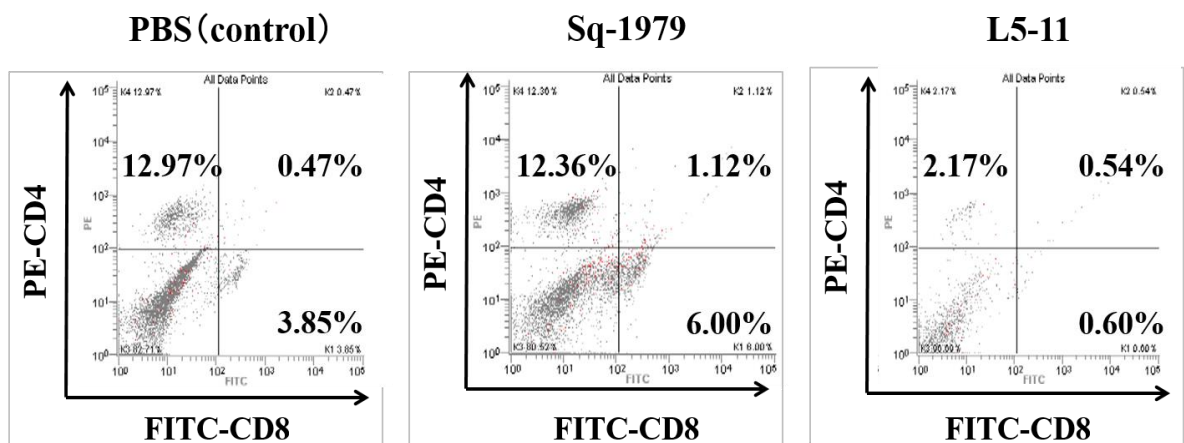




図 7 B

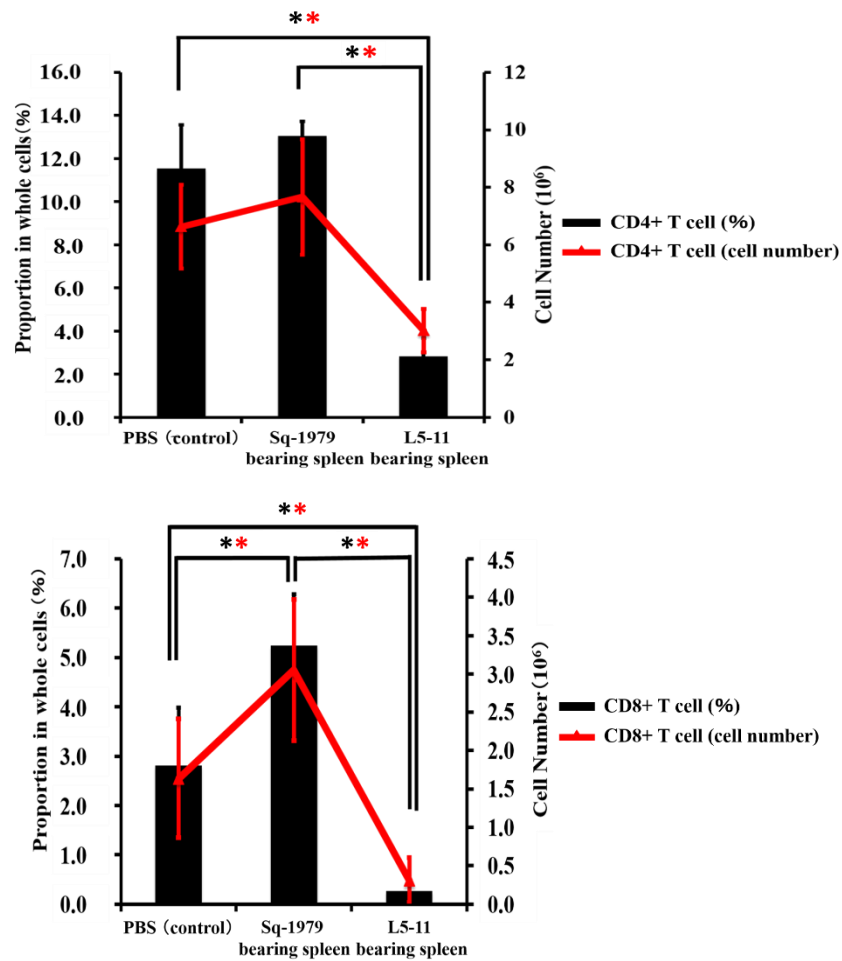


図 7 脾臓における CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞分画

A : 腫瘍内 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞と同様の方法で展開した .

B : Sq-1979, L5-11 移植マウス群およびコントロール群の脾細胞における CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞の比較 . 総細胞数に対する陽性細胞の総数と比率を , それぞれの図の縦軸左と棒グラフ , 縦軸右と折れ線グラフに示す (\* : P < 0.05, n = 12) .

## 考 察

OSCC 移植マウスにおける MDSC の動態を観察すると、親細胞 Sq-1979 に比べ、高い腫瘍増殖能を有する L5-11 移植マウス群の腫瘍組織において顕著な M-および PMN-MDSC 誘導が観察された。細胞の実数において PMN-MDSC は M-MDSC より 30 倍以上高く、L5-11 移植マウスにおいて実質的に MDSC の機能を担っていることが推測された。一方、同マウス群の脾臓においても有意な PMN-MDSC 分画の増加が認められた。PMN-MDSC は、担癌マウスにおける総 MDSC の 75～80% 以上を示すことが報告されており<sup>17)</sup>、今回の結果を支持している。

一般的に、抗腫瘍免疫抑制能は主に M-MDSC が保持していると考えられている<sup>18,19)</sup>。一方で、PMN-MDSC は M-MDSC より免疫抑制能力は低い<sup>20)</sup>が、抗原特異的な免疫抑制に関与しているという報告もあり<sup>23)</sup>、その役割が異なることが示唆されている。腫瘍組織内および脾臓内での MDSC の増加は過去にも報告されているが<sup>15,16)</sup>、ヒト症例では MDSC サブセットが症例により異なり、腎細胞癌、膵癌、非小細胞肺癌などでは PMN-MDSC が、肝細胞癌、膀胱癌、卵巣癌、メラノーマ、前立腺癌などでは M-MDSC が検出されている<sup>24)</sup>。ヒト OSCC の予後と MDSC サブセットとの関係は今後の検討課題として残されている。

骨髄系前駆細胞マーカーである CD11b を有する細胞

(CD11b<sup>+</sup> 細胞) は, Sq-1979 移植マウス群とコントロール群の脾臓ではその比率に有意な差を認めなかったが, L5-11 移植マウス群では Ly6G<sup>+</sup> 細胞と同様, 腫瘍組織と脾臓の両方で増加しており, 少なくとも高い腫瘍増殖能を獲得した L5-11 細胞由来のシグナルによってこれらの表面マーカー発現が協調的に促進されていることが示唆された.

MDSC の機能は抗腫瘍免疫を制御し腫瘍細胞を保護するのみならず, 腫瘍微小環境のリモデリング, 転移前ニッチの確立や, 上皮間葉転換を容易にするなど多岐にわたる<sup>13)</sup>ことが指摘されており, OSCC においても同様に高い腫瘍増殖能を制御することが予想される.

癌患者の予後には腫瘍組織内, 末梢血中 CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup> T 細胞が関係しているといわれている<sup>25)</sup>. Sq-1979 移植マウス群では, コントロール群に比べ脾臓内の CD8<sup>+</sup> T 細胞の細胞数と比率が上昇したにもかかわらず L5-11 移植マウス群では CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞が共に顕著に低下していた. このことから, L5-11 移植マウス群では, PMN-MDSC によって強力に全身免疫能が抑制されていることが示唆された. しかしながら, L5-11 移植マウス群の腫瘍組織では Sq-1979 移植マウス群のそれに比べ, PMN-MDSC が増加しているにもかかわらず, CD8<sup>+</sup> T 細胞も増加しており, PMN-MDSC による免疫制御機構は脾臓と末梢の腫瘍組織において異なることが推測された. 特に腫瘍組織に浸潤している CD8<sup>+</sup>

T 細胞は様々な抑制機構により不応性に陥っていることも考えられる<sup>26)</sup>。一方，Sq-1979 移植マウス群の脾臓では CD8<sup>+</sup>T 細胞が増加しており，MDSC に依存しない免疫制御が行われていることが推測された。

今回の結果から，マウス OSCC では，PMN-MDSC の誘導が何らかの形で *in vivo* における腫瘍増殖の増強を始めとする悪性形質の獲得に寄与していることが示唆されたが，MDSC の関与がどのような機構を介して行われるのか，特に腫瘍組織と脾臓での制御の違いや意義についての解明は今後の課題である。

## 結 論

- 1 . 腫瘍組織において Sq-1979 移植マウス群に比べ L5-11 移植マウス群で M-および顕著な PMN-MDSC の増加を認めた .
- 2 . 脾臓においてコントロール群と Sq-1979 移植マウス群に比べ L5-11 移植マウス群で PMN-MDSC の増加を認めた .
- 3 . 腫瘍組織において Sq-1979 移植マウス群に比べて L5-11 移植マウス群で CD8<sup>+</sup> T 細胞の増加を認めた .
- 4 . 脾臓においてコントロール群に比較し L5-11 移植マウス群で顕著な CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 細胞の減少を認めたが , Sq-1979 移植マウスの CD8<sup>+</sup> T 細胞は増加していた .

以上のことからマウスでは腫瘍の増大や転移能の獲得などに伴い MDSC が腫瘍組織および脾臓において増加し , 全身免疫系における T 細胞の抑制をもたらすことが示唆された .

## 引用文献

- 1) Kalnins IK, Leonard AG, Sako K, Razack MS and Shedd DP. Correlation between prognosis and degree of lymph node involvement in carcinoma of the oral cavity. *Am J Surg.* 1977 ; 134 : 450-454.
- 2) Grandi C, Alloisio M, Moglia D, Podrecca S, Sala L, Salvatori P and Molinari R. Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas therapeutic implications. *Head Neck Surg.* 1985 ; 8 : 67-73.
- 3) Pang MF, Georgoudaki AM, Lambut L, Johansson J, Tabor V, Hagikura K, Jin Y, Jansson M, Alexander JS, Nelson CM, Jakobsson L, Betsholtz C, Sund M, Karlsson MC and Fuxe J. TGF- $\beta$ 1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. *Oncogene.* 2016 ; 35 : 748-760.
- 4) Ohnishi K, Yamaguchi M, Erdenebaatar C, Saito F, Tashiro H, Katabuchi H, Takeya M and Komohara Y. Prognostic significance of CD169-positive lymph node sinus macrophages in patients with endometrial carcinoma. *Cancer Sci.* 2016 ; 107 : 846-852.

- 5) Jung EJ, Santarpia L, Kim J, Esteva FJ, Moretti E, Buzdar AU, Di Leo A, Le XF, Bast RC Jr, Park ST, Puztai L and Calin GA. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer*. 2012 ; 118 : 2603-2614.
- 6) Condamine T, Ramachandran I, Youn JI and Gabrilovich DI. Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells. *Annu Rev Med*. 2015 ; 66 : 97-110.
- 7) Nazareth MR, Broderick L, Simpson-Abelson MR, Kelleher RJ Jr, Yokota SJ and Bankert RB. Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells. *J Immunol*. 2007 ; 178 : 5552-5562.
- 8) Heim CE, Vidlak D, Scherr TD, Kozel JA, Holzapfel M, Muirhead DE and Kielian T. Myeloid-derived suppressor cells contribute to *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *J Immunol*. 2014 ; 192 : 3778-3792.
- 9) Gabrilovich DI and Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009 ; 9 : 162-174.

- 10) Youn JI, Kumar V, Collazo M, Nefedova Y, Condamine T, Cheng P, Villagra A, Antonia S, McCaffrey JC, Fishman M, Sarnaik A, Horna P, Sotomayor E and Gabrilovich DI. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat Immunol.* 2013 ; 14 : 211-220.
- 11) Nagaraj S, Schrum AG, Cho HI, Celis E and Gabrilovich DI. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2010 ; 184 : 3106-3116.
- 12) Weiss JM, Subleski JJ, Back T, Chen X, Watkins SK, Yagita H, Sayers TJ, Murphy WJ and Witrout RH. Regulatory T cells and myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment undergo Fas-dependent cell death during IL-2/alphaCD40 therapy. *J Immunol.* 2014 ; 192 : 5821-5829.
- 13) Marvel D and Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment : expect the unexpected. *J Clin Invest.* 2015 ; 125 : 3356-3364.
- 14) Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, Cho HI, Celis E, Quiceno



- DG, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC and Gabrilovich DI. HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med.* 2010 ; 207 : 2439-2453.
- 15) Khaled YS, Ammori BJ and Elkord E. Increased levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood and tumour tissue of pancreatic cancer patients. *J Immunol Res.* 2014 ; 2014 : 879897-879905.
- 16) Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, Zdrojowy R, Pluzanska A, Szczylik C, Staehler M, Brugger W, Dietrich PY, Mendrzyk R, Hilf N, Schoor O, Fritsche J, Mahr A, Maurer D, Vass V, Trautwein C, Lewandrowski P, Flohr C, Pohla H, Stanczak JJ, Bronte V, Mandruzzato S, Biedermann T, Pawelec G, Derhovanessian E, Yamagishi H, Miki T, Hongo F, Takaha N, Hirakawa K, Tanaka H, Stevanovic S, Frisch J, Mayer-Mokler A, Kirner A, Rammensee HG, Reinhardt C and Singh-Jasuja H. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med.* 2012 ; 18 : 1254-1261.

- 17) Youn JI, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK and Gabrilovich DI. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Leukoc Biol.* 2012 ; 91 : 167-181.
- 18) Wynn TA. Myeloid-cell differentiation redefined in cancer. *Nat Immunol.* 2013 ; 14 : 197-199.
- 19) Haverkamp JM, Smith AM, Weinlich R, Dillon CP, Qualls JE, Neale G, Koss B, Kim Y, Bronte V, Herold MJ, Green DR, Opferman JT and Murray PJ. Myeloid-derived suppressor activity is mediated by monocytic lineages maintained by continuous inhibition of extrinsic and intrinsic death pathways. *Immunity.* 2014 ; 41 : 947-959.
- 20) Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodriguez PC, Sica A, Umansky V, Vonderheide RH and Gabrilovich DI. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* 2016 ; 7 : 12150-12159.
- 21) Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Inagaki T, Sumi S, Motohashi M,

- Muramatsu Y, Sumitomo S, Shikimori M, Yamazaki Y and Kondoh N. Gene expression analyses associated with malignant phenotypes of metastatic subclones derived from a mouse oral squamous cell carcinoma cell line, Sq-1979. *Oncol Lett.* 2016 ; in press.
- 22) Klopp AH, Zhang Y, Solley T, Amaya-Manzanares F, Marini F, Andreeff M, Debeb B, Woodward W, Schmandt R, Broaddus R, Lu K and Kolonin MG. Omental adipose tissue-derived stromal cells promote vascularization and growth of endometrial tumors. *Clin Cancer Res.* 2012 ; 18 : 771-782.
- 23) Schouppe E, Mommer C, Movahedi K, Laoui D, Morias Y, Gysemans C, Luyckx A, De Baetselier P and Van Ginderachter JA. Tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subsets exert either inhibitory or stimulatory effects on distinct CD8<sup>+</sup> T-cell activation events. *Eur J Immunol.* 2013 ; 43 : 2930-2942.
- 24) Stromnes IM, Greenberg PD and Hingorani SR. Molecular Pathways : Myeloid Complicity in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 ; 20 : 5157-5170.
- 25) Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang

Y, Jiang T and Wu A. Tumour-infiltrating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer*. 2014 ; 110 : 2560-2568.

- 26) Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, Ferris RL and Delgoffe GM. The tumor microenvironment represses T cell mitochondrial biogenesis to drive intratumoral T cell metabolic insufficiency and dysfunction. *Immunity*. 2016 ; 45 : 374-388.