



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the differentiation of myeloid cells under the chemotherapy-treated human pancreatic cancer microenvironment
Author(s)	武内, 慎太郎
Description	配架番号 : 2186
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11956号
Issue Date	2015-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11956
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60031
Type	doctoral thesis
File Information	Shintaro_Takeuchi.pdf



学 位 論 文

Studies on the differentiation of myeloid cells under the
chemotherapy-treated human pancreatic cancer microenvironment

(ヒト膵癌化学療法下の微小環境におけるミエロイド細胞の分化に関する研究)

2015年9月

北 海 道 大 学

武 内 慎 太 郎

目次

【発表論文目録および学会発表目録】	1 頁
【緒言】	2 頁
【略語表】	3 頁
【実験方法】	4 頁
【実験結果】	10 頁
【考察】	24 頁
【総括および結論】	27 頁
【謝辞】	28 頁
【引用文献】	29 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Shintaro Takeuchi, Muhammad Baghdadi, Takahiro Tsuchikawa, Haruka Wada, Toru Nakamura, Hirotake Abe, Sayaka Nakanishi, Yuh Usui, Kohtaro Higuchi, Mizuna Takahashi, Kazuho Inoko, Shoki Sato, Hironobu Takano, Toshiaki Shichinohe, Ken-ichiro Seino and Satoshi Hirano

Chemotherapy-derived inflammatory response accelerates the formation of immunosuppressive myeloid cells in human pancreatic cancer microenvironment

Cancer Research, May, 2015

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Shintaro Takeuchi, Takahiro Tsuchikawa, Haruka Wada, Toru Nakamura, Toshiaki Shichinohe, Ken-ichiro Seino, Satoshi Hirano

Diffrentiation of macrophages in the microenvironment of pancreatic cancer

第9回研究ネットワーク国際シンポジウム、2014年6月19日、大阪

2. Shintaro Takeuchi, Takahiro Tsuchikawa, Toru Nakamura, Toshiaki Shichinohe, Ken-ichiro Seino, Satoshi Hirano

Pancreatic cancer facilitates myeloid-derived suppressor cell formation under chemotherapy-treated conditions

第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、横浜

緒 言

膵癌は膵管上皮（膵導管細胞）に発生する悪性新生物であり、早期発見が非常に困難な上に、進行が早く予後不良の疾患である。世界的にもその死亡率は増加傾向にあり、有効な治療法の開発が求められている¹。膵癌治療において化学療法は、手術可能例を含めその治療成績改善の鍵となるものであり、近年、いくつか有効なレジメンが報告されている²⁻⁴。また当初、切除不能な膵癌に対しても化学療法著効症例に対して手術を適応することで、予後の改善が得られる可能性が報告されている^{5,6}。しかし、いまだ多くの症例では化学療法抵抗性であり、その治療反応を改善させるための新たな知見が待たれている。

近年、腫瘍微小環境に関する研究が多く報告されており、その構成要素である線維芽細胞や免疫細胞、血管内皮細胞などは VEGF や EGF など多くのサイトカインや成長因子を癌細胞に供給して増殖を促進したり、TGF- β 等を介して上皮間葉転換を進めることで浸潤や転移と関連すると言われている^{7,8}。

膵癌は活性型の KRAS 遺伝子により、種々のサイトカインやケモカインの発現を介して、炎症環境を形成する作用が強い癌種で、その増殖や浸潤、転移は腫瘍微小環境に大きく依存していると報告されている⁹。膵癌由来の分泌因子に、特に強く影響を受けるのが、マクロファージ、単球、顆粒球などのミエロイド細胞であり、膵癌の進行や転移を促進する¹⁰。ミエロイド細胞の中で特に、近年注目されているものとして Myeloid-derived suppressor cells(MDSC)がある。MDSC は骨髄由来の未分化な細胞で、健常な状態ではほとんど末梢に存在しないが、担癌状態において、抗腫瘍免疫を抑制し、または血管造生を促進するなど、腫瘍進行を促進する細胞群であり、腫瘍周囲の単球や顆粒球の多くは MDSC の形質を有すると言われる^{11,12}。膵癌における直近の研究では、遺伝子改変マウスを用いた実験によって、膵癌の発生と進行には、KRAS 遺伝子由来の GM-CSF の発現を介した MDSC の誘導が必須であることがわかり、膵癌微小環境における MDSC の重要性が提唱された^{13,14}。しかし、実際にヒト膵癌においてこのような機構が働いているのか、さらに抗癌剤投与によりどのような変化を生じるかは明らかとなっていなかった。

これらの背景を元に、本研究ではヒト膵癌微小環境におけるミエロイド細胞に着目し、抗癌剤投与によりミエロイド細胞がどのような分化形態を示すのかを明らかとすることを目的とした。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ATCC	American Type Culture Collection
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
TMA	tissue microarray
PBS	phosphate buffered saline
GEM	gemcitabine
5-FU	5-fluorouracil
RT-PCR	reverse transcription- polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
cDNA	complementary DNA
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
NF-kB	nuclear factor-kappaB
SEM	standard error of the mean
MAPK	mitogen-activated protein kinase
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
S-1	tegafur, gimeracil, oteracil, potassium,

実験方法

1) 細胞株

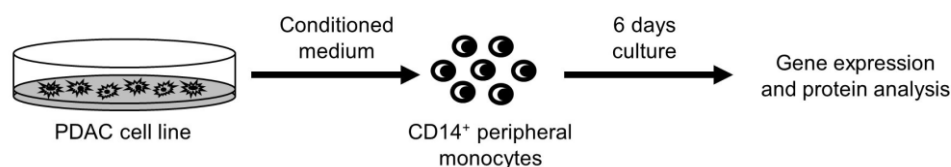
ヒト膵癌細胞株(Capan-1, Capan-2, PANC-1, MIAPaCa-2, and BxPC-3)、ヒト子宮頸癌細胞株(HeLa)、ヒト白血病細胞株(Jurkat)は ATCC より購入した。ヒト膵癌細胞株 PK-45P と PK-1 は理化学研究所より購入した。PCI-43 と PCI-43-P5 は当教室にてヒト膵癌検体より過去に樹立した細胞株である¹⁵。細胞培地としては Capan-1 は IMDM(WAKO)、Capan-2 は McCoy's 5A medium(WAKO)、PANC-1、MIAPaCa-2、HeLa、PCI-43 および PCI-43-P5 は DMEM (WAKO)を使用し、BxPC-3、Jurkat、PK-45P および PK-1 は RPMI-1640 (WAKO) を使用した。また、いずれの培地も牛胎仔血清(Cell culture Bioscience)とペニシリン/ストレプトマイシン(Life technologies)を添加し、それぞれ終濃度を 10%、1%として、37°C、5% CO₂ 下で培養した。ヒト単球へ作用させるための膵癌培養上清は、Capan-1 と PANC-1 を RPMI 1640 (WAKO)に 10%の牛胎仔血清(Cell culture Bioscience)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、10mM HEPES 緩衝液、1% L-グルタミン、1mM ピルビン酸ナトリウム、1% 非必須アミノ酸(Life technologies)と 50μM 2-メルカプトエタノール(WAKO)を添加した培地にて培養し採取した。

2) ヒト単球の培養

培養実験のプロトコルとシェーマを図 1 に示す。ヒト膵癌細胞由来の因子がミエロイド細胞の分化に与える影響を解析するため、膵癌細胞株の培養上清を用いた *in vitro* の実験系を構築した。ミエロイド細胞として健常人ボランティアより容易に分離可能な正常単球を用いた。通常の状態での膵癌細胞株の培養上清は細胞が 80%コンフルエントになった時点で回収し、0.2μm のフィルター(Sartorius Stedim Biotech)を通した後に単球に作用させた。臨床の化学療法投与下での環境を模倣するため、抗癌剤;GEM (Eli Lilly)または 5-FU (KYOWA KIRIN)を実際に患者に投与される血中濃度付近 (GEM; 1-30μM, 5-FU; 10μg/ml)となるように培養液に投与し、60 分間培養し作用させた後、抗癌剤を除去するため培地を吸引後、PBS にて念入りに洗浄し、新鮮な培地に交換した。72 時間の培養後、上清を回収し、上述のフィルターを通した後、同様に単球に作用させた。ヒト単球は、健常人ボランティアより採取した PBMC より CD14 陽性細胞を磁気分離システムにて精製採取し(Milteny Biotech)、上述の膵癌細胞培養上清内で 6 日間培養した。培養 6 日目に細胞形態の肉眼的観察を行い、遺伝子と蛋白発現をそれぞれ定量的 RT-PCR、フローサイトメトリー法を用いて解析した。膵癌細胞培養上清の GM-CSF の中和実験では、単球の培養初日より培養上清に anti-human GM-CSF (Clone BVD2-23B6; Biolegend, 10μg/ml) を加え、中和した条

件にて同様に単球の培養を行った。

a)



b)

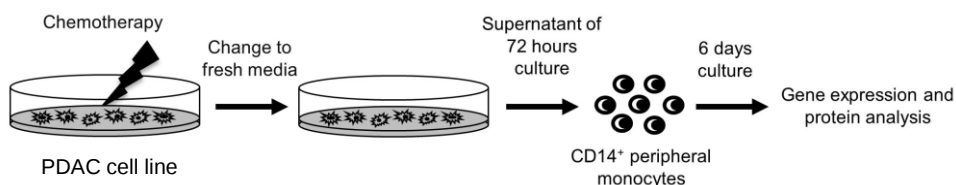


図 1 *in vitro* 実験における培養プロトコルのシェーマ

a) 膵癌細胞より培養上清を回収し、健康人より採取し分離した CD14 陽性単球を、その中で 6 日間培養した。培養 6 日目に遺伝子または蛋白発現解析を行った。b) 抗癌剤投与条件では膵癌細胞に抗癌剤を作用させ 60 分培養した後、抗癌剤を良く洗浄し新鮮な培養上清に変換した。a) と同様、培養 6 日目の遺伝子または蛋白発現解析を行った。

2) フローサイトメトリー

単球の蛋白発現をフローサイトメトリー法を用いて解析した。血球の懸濁液を FcR ブロッカー；Human FcR blocker (Miltenyi Biotec)または anti-mouse CD16/32 (BD Biosciences)を用いてブロッキング後、目的の蛍光抗体にて染色した。ヒト蛋白に対する蛍光抗体と反応条件を表 1 に示す。機器は FACS canto II (BD Biosciences)を用い、解析は FlowJo software V7.6.5 (Tomy Digital Biology) を用いて行った。

表 1 フローサイトメトリーに用いた抗体と反応条件

Molecule	Clone	Dilution	Manufacture
HLA-DR	L243	1:100	BD Biosciences
CD15	H198	1:100	BD Biosciences
CD11b	80H5	1:100	BECKMAN COULTER
CD33	D3HL60.251	1:100	BECKMAN COULTER
CD14	TÜK4	1:100	Miltenyi Biotec
CCR2	K036C2	1:25	Biolegend
CX3CR1	2A9-1	1:100	Biolegend

4) 定量的 RT-PCR

細胞から total RNA を RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出後、Prime Script RT Master Mix (TAKARA BIO)を用いて cDNA 合成を行った。合成した cDNA の標的配列を作製した特異的プライマーにて、StepOne Real-time PCR system (Applied Biosystems)を用いて増幅し、comparative C_T method を用いて定量化した。定量補正にはハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* を用いた。プライマーは事前に Melt curve の 1 峰性を確認し、その特異性を確認してから使用した。全ての実験を duplicate にて行った。使用したプライマーを表 1 に示す。

表 2 プライマー配列

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>GAPDH</i>	5'-AACAGCGACACCCACTCCTC-3'	5'-ATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'
<i>M-CSF</i>	5'-GCCTGCGTCCGAACCTTCTA-3'	5'-ACTGCTAGGGATGGCTTTGG-3'
<i>GM-CSF</i>	5'-ATGATGGCCAGCCACTACAA-3'	5'-CTGGCTCCCAGCAGTCAAAG-3'
<i>IL-6</i>	5'-GGCACTGGCAGAAAACAACC-3'	5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'
<i>IL-8</i>	5'-CTGCGCCAACACAGAAAATTA-3'	5'-ATTGCATCTGGCAACCTAC-3'
<i>IL-1B</i>	5'-ATCACTGAACTGCACGTCC-3'	5'-GCCCCAAGGCCACAGGTATTT-3'
<i>PTCS2</i>	5'-GTTCCACCCGCGAGTACAGAA-3'	5'-AGGGCTTCAGCATAAAGCGT-3'
<i>TNF</i>	5'-CACAGTGAAGTGCTGGCAAC-3'	5'-AGGAAGGCCTAAGGTCCACT-3'
<i>VEGF-A</i>	5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3'	5'-GCAGTAGCTGCGCTGATAGA-3'
<i>CXCL-12</i>	5'-CTACAGATGCCCCATGCCGAT-3'	5'-CAGCCGGGCTACAATCTGAA-3'
<i>SCF</i>	5'-AGCCAGCTCCCTTAGGAATGA-3'	5'-TGCCCTTGTAAGACTTGGCTG-3'
<i>TGF-B1</i>	5'-GGGACTATCCACCTGCAAGA-3'	5'-GAACCCGTTGATGTCCACTT-3'
<i>CCL-2</i>	5'-CAGCAAGTGTCCTCAAAGAAGCTG-3'	5'-TGGAATCCTGAACCCACTTCTGC-3'
<i>NOS2</i>	5'-TCCAAGGTATCCTGGAGCGA-3'	5'-AATGTGGGGCTGTTGGTGAA-3'
<i>ARG1</i>	5'-ATGTTGACGGACTGGACCCATCT-3'	5'-TGCAACTGCTGTGTTCACTGTTTC-3'
<i>IL-10</i>	5'-GAGATGCCTTCAGCAGAGTGA-3'	5'-ACATGCGCCTTGATGTCTGG-3'

5) サイトカインの測定

細胞培養上清のサイトカインの測定は、ELISA キット GM-CSF IL-8 (Biolegend)、IL-6 (R&D systems) をプロトコルに従い用いた。全ての実験において、96well dish における独立した 3 つの well から採取した上清の平均値を比較した。

6) ウェスタンブロット法

細胞内シグナル蛋白の解析を SDS-PAGE ウェスタンブロット法にて行った。

細胞からの蛋白サンプルはプロテアーゼ阻害剤を含有した RIPA buffer を用いて回収し、10% SDS-PAGE に溶解させ泳動し、PVDF メンブレン (GE Healthcare) に転写した。メンブレンは対象蛋白の 1 次抗体を反応後、horseradish peroxidase (HRP) 標識の 2 次抗体を反応させ、enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare) を用いてバンドの発光を検出した。ローディングコントロールには beta-ACTIN を用いた。1 次抗体は ERK, p-ERK, AKT, pAKT (Cell signaling)、beta-ACTIN (Millipore)、2 次抗体は (Jackson ImmunoResearch) を使用した。

7) NF- κ B ルシフェラーゼレポーターアッセイ

抗癌剤投与時の膀胱細胞の NF- κ B のプロモーター活性をレポーターアッセイを用いて測定した。ベクターと発光出薬は市販の Ready-To-GlowTM secreted luciferase reporter system (Clontech) を使用した。PANC-1 細胞に NF- κ B をエンコードした分泌型ルシフェラーゼ発現プラスミドを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入し、G418 にて恒常発現株を選択した。この恒常発現株に GEM を投与し、30 分後、36 時間後、72 時間後それぞれの培養上清のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は細胞数にて補正し、単位細胞あたりの値を比較した。

8) T-cell 増殖アッセイ

培養した単球の T-cell への作用を解析するため、同一健康人より採取した単球と CD4 または CD8 陽性 T リンパ球を CD3 と CD28 の刺激下で共培養し、T-cell の増殖を ³H チミジンアッセイにて測定した。T リンパ球は採取した健康人 PBMC より CD4⁺ T cell isolation kit 、CD8⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) にて分離し、anti-CD3 抗体 (OKT3; eBioscience、3 μ g/ml) と anti-CD28 抗体 (CD28.2; Biolegend、1 μ g/ml) の刺激下で増殖させ、培養した。上述の方法で培養された T リンパ球を段階的に細胞数の比率を変えて単球と共培養し、72 時間後に ³H チミジンを測定することで細胞増殖を評価した。

9) 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は通常の酵素ポリマー法を用いて行った。臨床検体のパラフィン包埋標本を 5 μ m に薄切し、スライドガラスに張り付け、切片を作製した。切片の脱パラフィンをキシレンにて行った後、エタノールで脱水し、citrate buffer (pH 6.0) 、または Tris-EDTA buffer (pH 9.0) 内で 20 分沸騰させることで抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性を 3% H₂O₂ 加メタノールにて除去した。ブロッキングには市販の 3 種のブロッキング製剤 (10% ヤギ血清 (Nichirei)、Protein-Block Serum-Free Ready-To-Use (DAKO)、antibody diluent with background

reducing components (DAKO)) を等量でカクテル化して使用した。免疫組織化学染色には Histofine series (Nichirei) を使用した。1 次抗体は 60 分、室温または 4℃、overnight にて反応させ、2 次抗体は 20 分、室温で反応させた。使用した 1 次抗体の反応条件を表 3 に示す。免疫組織化学反応は基質 (DAB, Fast Red II (Nichirei)) を反応後、ヘマトキシリンで核染色を行い検出した。

表 3 免疫組織化学染色に用いた抗体と反応条件

Molecule	Clone	Dilution	Retrieval	Manufacture
GM-CSF	LS-C104671	1:100	Citrate buffer (pH6), Steam 20min	LSBio
CD14	ab49755	1:25	Citrate buffer (pH6), Steam 15min	Abcam
HLA-DR	EPR3692	1:400	Citrate buffer (pH6), Steam 15min	Abcam
CD66b	G10F5	1:50	Tris-EDTA buffer (pH9), Steam 20min	BioLegend

10) ヒト膵癌組織検体と免疫組織化学染色の評価法

ヒト膵癌組織検体の GM-CSF 発現と予後解析は、TMA を用いた免疫組織化学的染色により解析した。TMA は 1994 年から 2005 年の間の北海道大学病院消化器外科 II の 99 例の手術検体から構成され、当教室で過去に作成したものである。臨床情報が不足しているものやサンプルが不良なものを解析から除外した 68 検体を解析に用いた。免疫染色の評価法として GM-CSF の染色強度を①スコア 0 (正常膵と比べて同等または、より弱い染色強度を示す場合)、②スコア 1+ (正常膵と比べて強い染色で、細胞質が部分的に染色される場合)、③スコア 2+ (正常膵と比べて強い染色で、細胞質がびまん性に染色される場合)、の 3 段階に分けて判定した。

また、抗癌剤投与下でのヒト膵癌微小環境のミエロイド細胞の蛋白発現を免疫組織化学染色法を用いて行った。すなわち、術前に化学療法投与が行われた膵癌検体と同時期に切除された化学療法未施行症例を高倍率 (400 倍) 下にランダムに 5 領域選択し、染色陽性の細胞数の平均値を比較検討した。

これらの実験における、免疫組織化学染色のスコア化または細胞数のカウントは、臨床情報を把握しない 2 人の独立した実験者によって行われた。

11) 統計解析

In vitro のデータの統計解析にはパラメトリック検定を適用し、群間検定には、Student's *t*-test を使用した。臨床検体のデータの統計解析にはノンパラメトリック検定を適用し、群間検定には Man-Whitney *U* test を、臨床病理学的因子の相関解析には Fisher's exact test、または χ^2 test を用いた。生存期間は手術日から死亡または最終確認生存確認日までの日数とし、Kaplan-Meier 法を用い log-rank test

にて群間の比較検定を行った。数値データは平均値 $\pm$ SEMで示し、 P 値 < 0.05 を有意差ありとした。統計計算と解析には、StatFlex software v6.0. (アーテック)を使用した。

12) 研究倫理

本研究は健常人血液サンプルと、北海道大学病院消化器外科Ⅱの膵癌外科切除検体を用いている。これらのヒト検体を用いた実験は北海道大学病院 倫理委員会の申請許可 (No.013-0389,013-0390) を経て行った。

実 験 結 果

1) ヒト単球は膀胱癌細胞株培養上清下で MDSC に分化する

ヒト膀胱癌細胞の分泌因子がミエロイド細胞の分化にどのように影響を与えるかを解析するために、健康人から容易に分離採取可能な単球を材料として選択し、膀胱癌培養上清下でどのような蛋白発現パターンを示すかを解析した。培養 6 日目の単球に対し顕微鏡による形態学的観察を行ったところ、通常の培地のみで培養した単球は紡錘形の接着細胞に分化するのに対し、膀胱癌細胞株の培養上清で培養した単球は浮遊しており、全く異なる形態を示すことが分かった (図 2a)。この浮遊した細胞の膜蛋白のパターンをフローサイトメトリーにてスクリーニングしたところ、抗原提示機構に関連する HLA-DR がより低い細胞集団であることがわかった (図 2b)。さらに多重染色で表面マーカーを詳細に解析したところ CD14 陽性、CD33 陽性で HLA-DR がより低発現を示す細胞であることがわかった (図 2c)。さらに、これらの細胞の免疫抑制能を調べるため、MDSC の特徴である Nitric oxide synthase 2 (NOS2) と Arginase 1 (ARG1) の酵素産生をフローサイトメトリーにて解析したところ、2 つの酵素を高発現することがわかった (図 2d)。さらに、これらの単球はミエロイドマーカーである CD11b やケモカインレセプターである CCR2 を発現し、顆粒球のマーカーである CD15、tissue resident macrophage のマーカーである CX3CR1 は陰性であった (図 2e)。これらの表面蛋白、機能蛋白のスクリーニングの結果は、過去の報告における単球由来の MDSC (Mo-MDSC) としての蛋白発現パターンと一致しており¹⁶⁻¹⁹、ヒト単球は膀胱癌細胞培養上清下では Mo-MDSC に分化することが実験的に確認された。

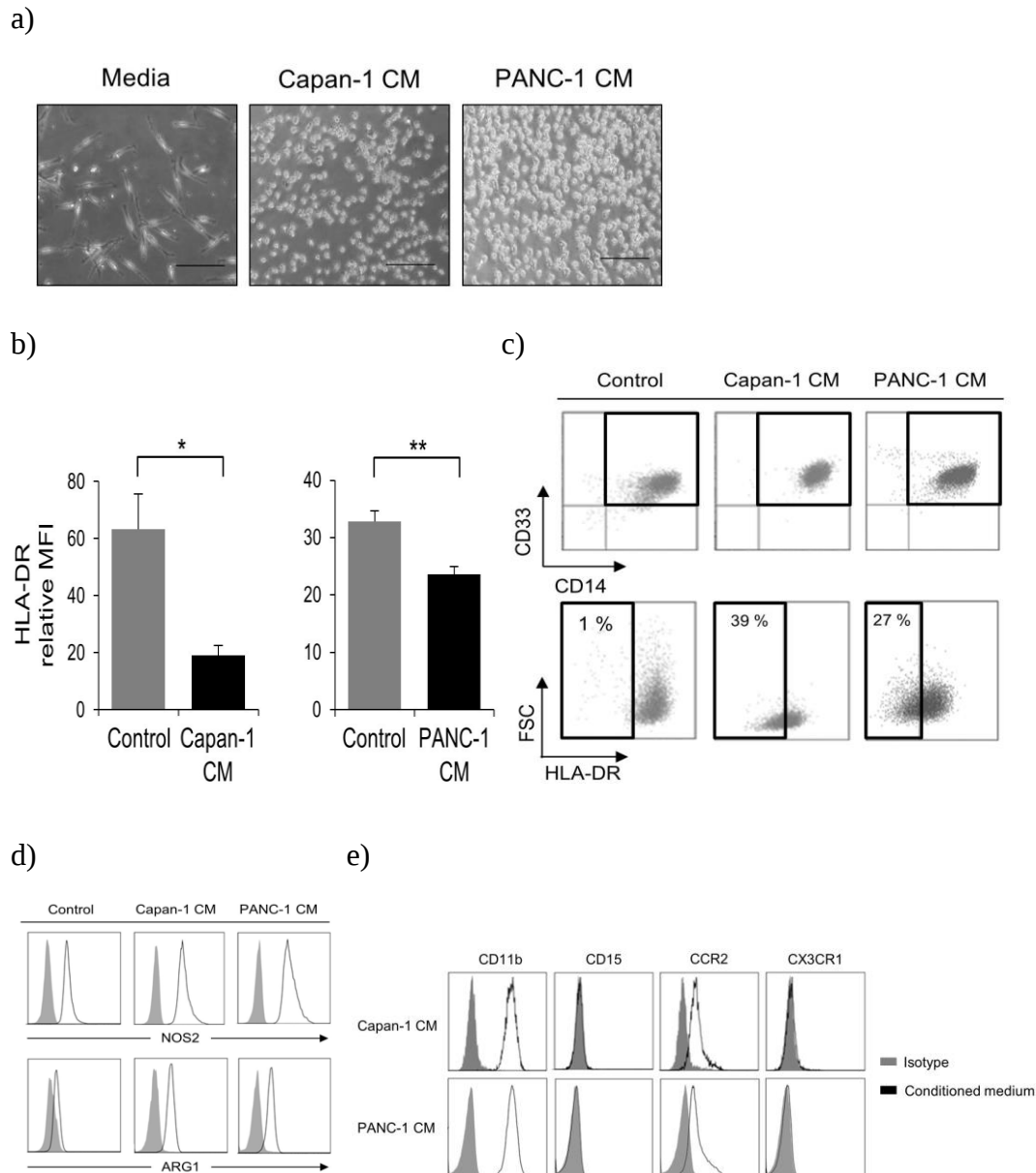


図2 ヒト膵癌細胞の培養上清によりヒト単球は MDSC に分化する

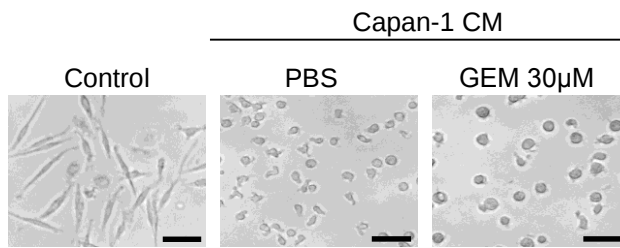
a) 培養した単球の形態学的観察結果。通常の培地で培養した単球は、6日目には、紡錘形の接着細胞に分化するのに対し、膵癌細胞培養上清下 (Capan-1 または PANC-1) では円形の浮遊細胞となった。Scale bars: 100 μ m b) 培養6日目の単球の HLA-DR の発現レベル。通常の培地と比較して、膵癌細胞培養上清下 (Capan-1 または PANC-1) では単球の HLA-DR はより低発現であった。(n=3 donors) c) 培養6日目の単球の CD14、CD33、HLA-DR 発現の多重染色パターン。Capan-1 の培養上清で培養した単球は、CD14 陽性、CD33 陽性、HLA-DR 低発現パターンを示し、Mo-MDSC と類似した。d) 培養6日目での単球の NOS2 と ARG1 の発現。Capan-1、PANC-1 の培養上清で培養した単球は、通常の培地 (control) で培養したものと比べて、NOS2 と ARG-1 をより高く発現した。Gray histogram: isotype, gray line: Conditioned medium. e) 種々の表面マーカ

一のスクリーニング結果。Capan-1 の培養上清で培養した単球は、CD11b と CCR-2 が陽性で、CD15 と CX3CR1 は陰性で Mo-MDSC として矛盾しない蛋白発現パターンであった。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

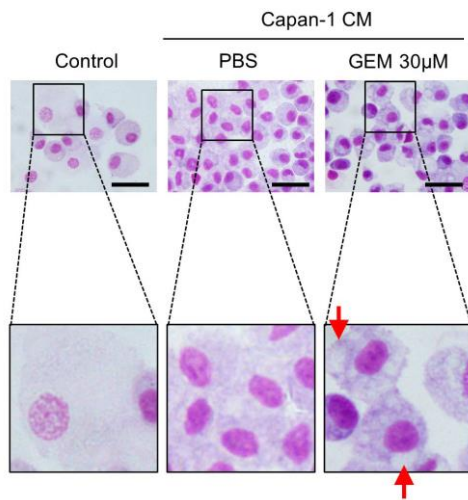
2) 抗癌剤投与条件での膵癌細胞上清は単球から MDSC への分化をより促進する

次に、膵癌細胞に抗癌剤を投与した条件において膵癌細胞培養上清が単球の分化へどのように影響を与えるかを解析するため、まず、ヒト膵癌細胞株 Capan-1 と GEM を使用した *in vitro* のモデルにて実験を行った。顕微鏡による形態学的観察を行ったところ、培養 6 日目において GEM 投与条件下の上清で培養された単球は、明らかにより径の大きい細胞形態を示すことがわかった (図 3a)。さらにメイ・ギムザ染色を用いてより詳細に形態を評価したところ、これらの細胞は細胞質に空胞形成を伴うという特徴を有した(図 3b)。このように GEM を投与した条件の膵癌細胞の培養上清では、明らかに単球の形質へ影響を与えることを形態学的に確認できた。フローサイトメトリーを行うと forward and side scatter の voltage がより高く、観察結果と矛盾しない結果であった。また、HLA-DR の発現を確認したところ、HLA-DR 低発現細胞の形成がより促進されていることがわかった (図 3c, d)。さらに、これらの細胞が免疫抑制に関与する酵素やサイトカインを発現するかを定量的 RT-PCR にてスクリーニングを行ったところ、NOS2 のみが有意に発現が上昇していた (図 3f)。よって、抗癌剤投与条件下での膵癌細胞培養上清で培養した単球は、形態学的に明らかに異なる細胞に分化し、これらの細胞は HLA-DR の発現が通常条件での膵癌細胞培養上清でより低発現で、また免疫を抑制する NOS2 をより高発現する細胞集団であることがわかった。これらの分子生物学的特性は MDSC の性質を示すものであり、化学療法投与条件下では膵癌細胞により単球の MDSC への分化がより促進されることが実験的に示された。

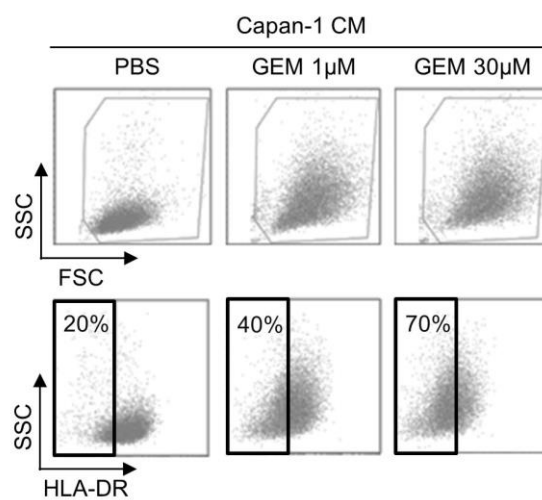
a)



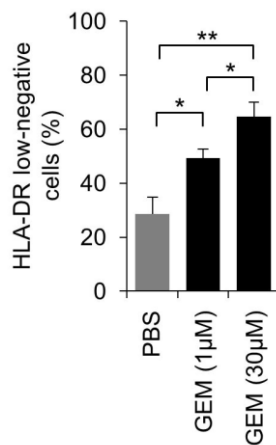
b)



c)



d)



e)

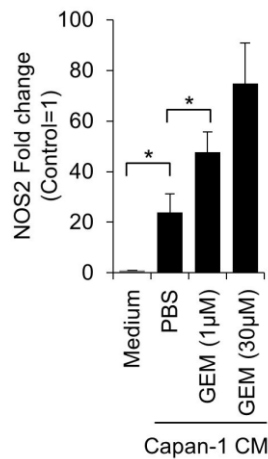


図 3 抗癌剤投与後の膵癌細胞の培養上清により誘導された単球はより MDSC のマーカーを発現する

a) GEM 投与条件での Capan-1 の培養上清で培養した単球の培養 6 日目の形態学的観察。PBS 投与群に比べ、より径の大きい細胞に分化した。Scale bars: 100μm b) メイ・ギムザ染色による培養 6 日目の単球の形態学的観察。GEM 投与条件での Capan-1 の培養上清で培養した単球は、PBS 投与群に比べ、特徴的な細胞質に空胞を有する形態変化を起こした (赤矢印)。Scale bars:

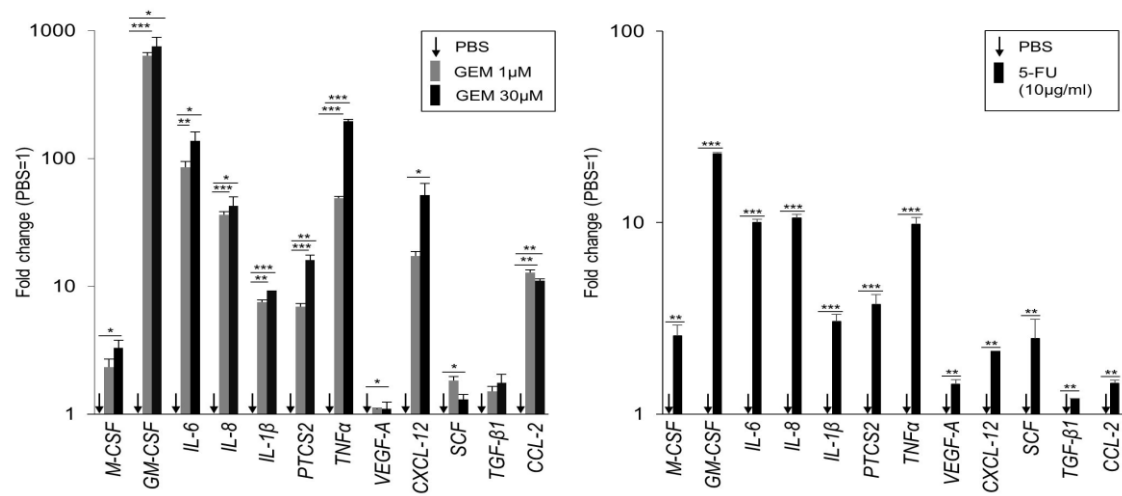
20 μ m c,d) 培養 6 日目の単球の形態と蛋白発現解析。GEM 投与条件での Capan-1 の培養上清で培養した単球は、PBS 投与群に比べ、forward and side scatter がより大きな細胞であり、HLA-DR がより低い細胞集団であった。(n=3 donors) e) 培養 6 日目の単球の遺伝子発現解析。GEM 投与条件での膵癌細胞培養上清で培養した単球は、PBS 投与群に比べ、NOS2 の発現が有意に高かった。P < 0.05; ** P < 0.01.

3) 化学療法は膵癌細胞の MAPK シグナルや NF κ B の転写因子の活性化を介して GM-CSF や炎症性サイトカインの発現を増強させる

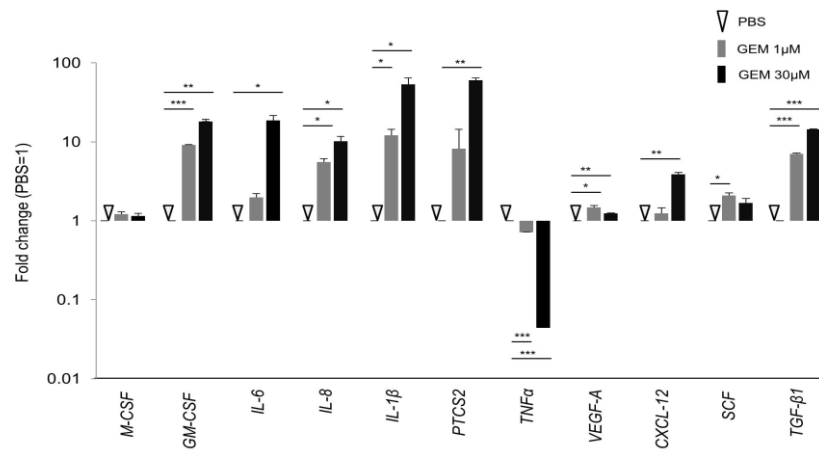
次に、Capan-1 と PANC-1 に GEM、5-FU を投与した際のサイトカインまたはケモカインの変化を検出することとした。定量的 RT-PCR により GEM 投与下での Capan-1 と PANC-1 のサイトカイン遺伝子の発現パターンを解析したところ、多くの炎症性サイトカインの発現が GEM や 5-FU 投与により亢進することがわかった (図 4a)。このうち GM-CSF は Capan-1、PANC-1 の両方で発現が上昇していた。ELISA 法により GEM 投与下での膵癌細胞の培養上清の GM-CSF 濃度を測定したところ、RT-PCR の結果と一致するように GEM の濃度依存性に GM-CSF の濃度が上昇しており、蛋白レベルでの発現上昇が確認された (図 4b)。次に、ウエスタンブロット法による蛋白解析の結果、膵癌細胞の多くのサイトカインの活性化シグナルのうち MAPK シグナルを示すリン酸化 ERK が、GEM 投与により発現が上昇していることがわかった (図 4c)。さらに、GM-CSF を含む多くの炎症性サイトカインの主要な転写因子である NF- κ B に関しても、GEM 投与により変化が起きていないかをルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて検出した。単位細胞あたりの、NF- κ B のプロモーター活性は、GEM 投与により増強することが示された (図 4d)。これらの結果から、化学療法により膵癌細胞の MAPK シグナルや NF- κ B の活性上昇が起こること、多くの炎症性サイトカインの発現が増強し、その中でも GM-CSF の発現増強の程度がきわめて強いことがわかった。以後、化学療法による膵癌細胞への作用で、ミエロイド細胞への分化を与える候補分子として GM-CSF に焦点を当て実験を継続した。

a)

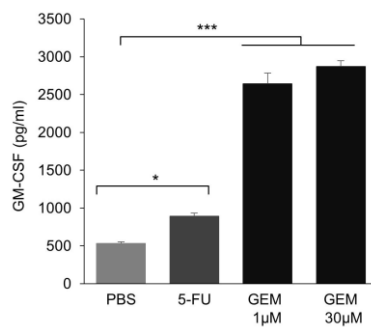
Capan-1



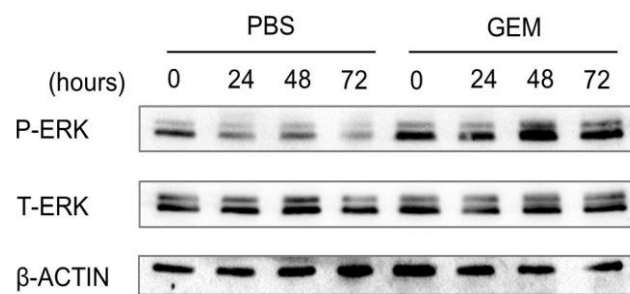
PANC-1



b)



c)



d)

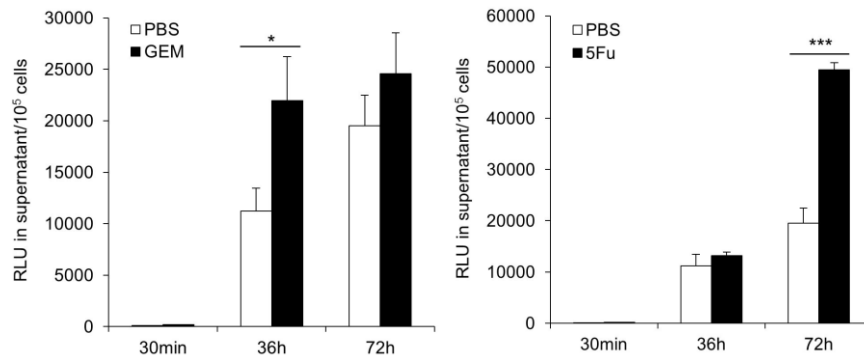


図 4 抗癌剤投与により膵癌細胞の炎症性サイトカイン、ケモカインの発現は上昇し、MAPK や NF- κ B の細胞内シグナルが増強する

a) 定量的逆転写 PCR による、GEM または 5-FU 投与後 72 時間の Capan-1 または PANC-1 のサイトカイン、ケモカインの発現スクリーニング結果。Capan-1 においては、多くのサイトカイン、ケモカインが PBS 投与群と比べて GEM または 5-FU 投与群の方がより発現が高いことがわかった。(PBS 投与群を 1 とした。) PANC-1 においては、GEM 投与群で TNF α 以外のサイトカイン、ケモカインの発現が高いことがわかった。b) GEM または 5-FU 投与後 72 時間の Capan1 培養上清内の GM-CSF 蛋白濃度測定。GM-CSF の濃度は GEM の濃度依存性に上昇した。c) ウェスタンブロット法による Capan-1 のリン酸化 ERK の検出。PBS 投与群と比べて GEM 投与群は、時間依存性に、リン酸化 ERK の発現が高かった。d) レポーターアッセイによる PANC-1 の NF- κ B 活性の検出。PBS 投与群と比べて GEM、5-FU 投与群の方が、単位細胞あたりの NF- κ B プロモーター活性が高いことがわかった。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

4) 膵癌培養上清中の GM-CSF を中和することにより単球の MDSC への分化が抑制され、T 細胞増殖抑制能もブロックされる

これまでの結果から、GM-CSF がヒトの膵癌細胞において、また GEM、5-FU 投与によりその発現が上昇することがわかった。このため、GEM 投与後の Capan-1 の培養上清で抗 GM-CSF モノクローナル抗体を用いて GM-CSF の中和を行い、その上清での単球の変化を検出した。GEM 投与条件下の Capan-1 培養上清において GM-CSF を中和すると、そこで培養された単球は、forward and side scatter が減少し、有意ではないが HLA-DR の発現が若干回復し (図 5a)、メイ・ギムザ染色で認めた空胞形成の消失を認めた (図 5b)。次に、GM-CSF の中和による単球の T 細胞の抑制能の評価を行った。すなわち、Capan-1 の培養上清で培養した単球と、採取した CD4 陽性 T-cell または CD8 陽性 T-cell の autologous な共培養の系により、単球の CD3/28 刺激下での T-cell の増殖への影響を評価した。通常の Capan-1 の培養上清で培養した単球は T 細胞の増殖を抑制し、さらに GEM 投与条件下での Capan-1 培養上清で培養した単球は、その抑制効果が有意に高い

ことがわかった(図 5c)。培養上清より GM-CSF を中和すると、培養された単球の T 細胞の増殖抑制効果は減弱した(図 5c)。これらの *in vitro* の実験結果より、Capan-1 に対して GEM を投与した際、GM-CSF 依存性に単球が MDSC へと分化し、T 細胞の増殖を抑制することが示されるとともに、GM-CSF の中和により MDSC の形成を防ぎ、T 細胞の増殖が回復することが示された。

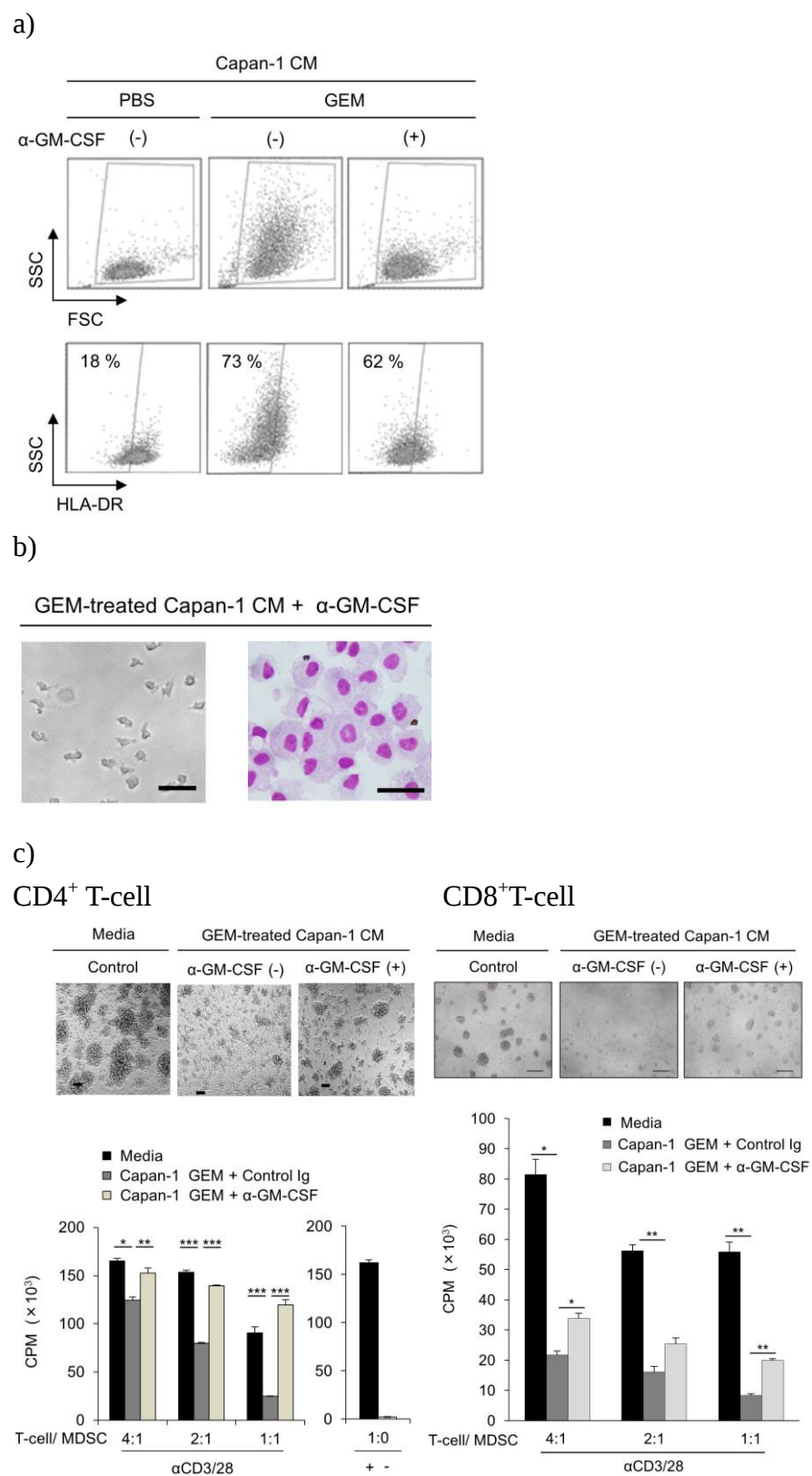


図5 GM-CSF を抗癌剤投与下の膵癌細胞培養上清より中和することで誘導

された MDSC の形態学的変化が消失し免疫抑制能が減弱する

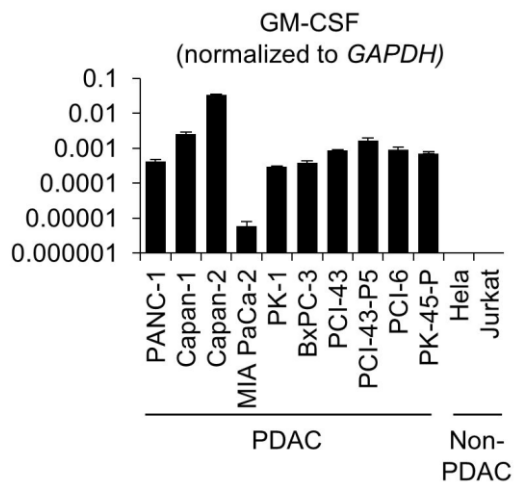
a) GM-CSF を中和したときの、GEM 投与条件下での Capan-1 の上清による単球の形態と HLA-DR の発現の変化。GM-CSF の中和により、forward and side scatter が減少し、HLA-DR の発現が、有意差は認めないものの回復した。抗 GM-CSF 抗体は 10 µg/ml で使用した。b) 顕微鏡とメイ・ギムザ染色による GM-CSF を中和したときの、GEM 投与条件下での Capan-1 の上清による単球の形態変化。GM-CSF の中和により細胞径は小さくなり、細胞質の空胞形成も消失した。顕微鏡写真； Scale bars: 100 µm, メイ・ギムザ染色; Scale bars : 20 µm

c) CD3/28 刺激下、Autologus の系により単球と 72 時間共培養した CD4 陽性 T-cell, CD8 陽性 T-cell の顕微鏡所見と ³H チミジンアッセイによる細胞数評価。Capan-1 の培養上清で培養された単球は、T-cell の抑制能を有し、GEM 投与条件ではその抑制能は増強され、上清から GM-CSF を中和することで、抑制能は解除されることがわかった。Scale bar: 10 µm. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

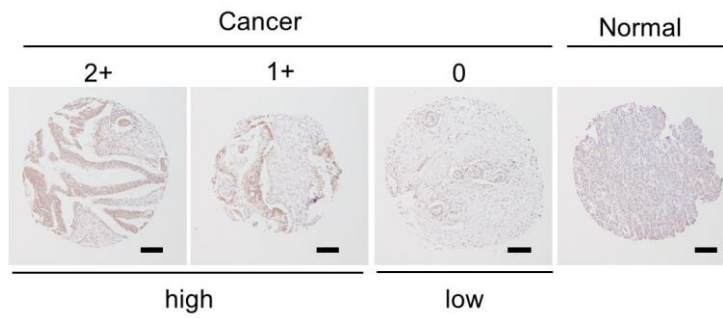
5) GM-CSF は複数のヒト膵癌細胞株、ヒト膵癌組織検体で発現しており、膵癌患者の予後不良因子である

GM-CSF の発現をヒト膵癌において確認するために、複数の膵癌細胞株から採取した cDNA を用いて定量的 RT-PCR でその発現をスクリーニングしたところ、程度の差はあるものの、全ての膵癌細胞において発現が確認された。対照とした他癌種(Hela、Jurkat)では発現が確認されず、GM-CSF の発現は膵癌に特徴的な形質である可能性がある (図 6a)。次に、ヒト膵癌組織における GM-CSF の発現を確認するため、68 症例の膵癌手術検体を免疫組織化学染色により解析した。実験方法に従い、GM-CSF の染色強度を 2+,1+,0 の 3 段階に判定し、2+と 1+を発現陽性(high)、0 を発現陰性(low)とした(図 6b)。74%が発現陽性であり、high と low で生存期間を比較すると生存期間の中央値は、high 群で 13.9 ヶ月、low 群で 25.7 ヶ月と、high 群で有意に生存期間が短かった(図 6c,d)。表 3 に TMA における GM-CSF の発現強度と臨床病理学的因子の関連を示したが、年齢に差を認めた以外、GM-CSF 陽性と陰性で患者背景に差はなかった。これらの結果から、GM-CSF の発現、産生はヒト膵癌において特定の臨床病理学的因子と関連なく予後に影響することがわかった。

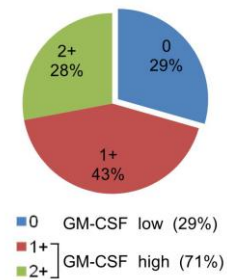
a)



b)



c)



d)

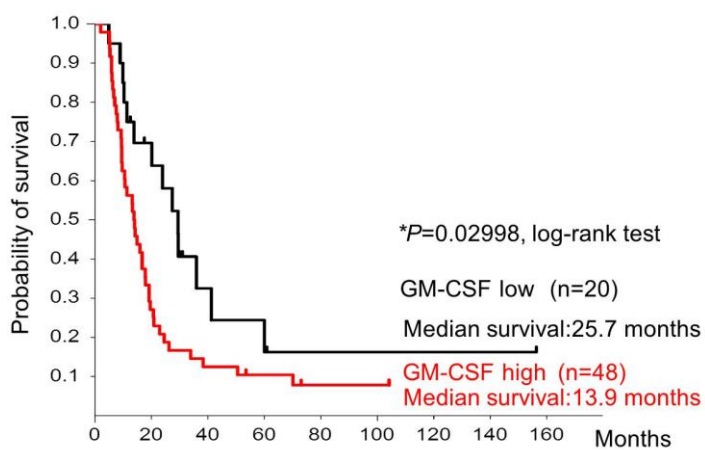


図 6 GM-CSF はヒト膵癌細胞株やヒト膵癌組織の多くで発現しており膵癌患者の予後不良と関連する

a) GM-CSF のヒト膵癌細胞株における発現スクリーニング。すべての膵癌細胞株において

GM-CSF の発現が陽性であった。b) 膵癌組織、正常膵の GM-CSF 発現パターン。染色強度に基づき、2+,1+,0 の3段階に分け、2+,1+を high、0 を low とした。Scale bars: 100 μ m c) GM-CSF の染色強度の内訳。71%の患者が high のカテゴリーであった。d) GM-CSF high 群または low 群の Kaplan-Meier 生存曲線。GM-CSF high 群は、有意に生存期間が短いことがわかった。

表 3 ヒト膵癌組織検体 TMA の患者背景と GM-CSF の発現強度

Variable	GM-CSF low (n=20)	GM-CSF high (n=48)	P-value ^a
Age			0.048
≤ 66 years	14	21	
> 66 years	6	27	
Sex			0.252
Male	15	29	
Female	5	19	
Tumor location			0.15
Pancreas head	13	39	
Pancreas body, tail	7	9	
Tumor size			0.659
≤ 3 cm	8	22	
> 3 cm	12	26	
Lymph node metastasis			0.667
positive	14	31	
negative	6	17	
Lymphatic invasion			0.539
positive	16	35	
negative	4	13	
Venous invasion			0.712
positive	17	39	
negative	3	9	
UICC stage			0.455
I+II	6	19	
III	14	29	

^a : χ^2 test

6) 術前化学療法施行群の膵癌組織の微小環境で有意に MDSC が多い
化学療法が単球や顆粒球などのミエロイド細胞の分化へ与える影響を、ヒト組

組織検体にて解析するために、術前に化学療法を受けた膵癌症例と同時期に化学療法を受けていない症例との間で、間質における MDSC マーカーの発現を比較した。使用した検体は 2005 年から 2010 年の間の北海道大学消化器外科 II の手術検体で、化学療法の有無以外は患者背景に差がない 9 例の化学療法未施行群と 6 例の術前化学療法群病理組織標本で、各腫瘍の中心部をピックアップしたものである。化学療法のレジメンは GEM 単剤、または GEM と S-1(5-FU のプロドラッグ)または 5-FU の併用療法が施行されていた。患者の背景因子を表 4、5 に示す。結果を図 7 に示すが、化学療法投与群は CD14 陽性細胞における HLA-DR 陽性細胞の割合または数は化学療法未施行群に比べて有意に低い、すなわち HLA-DR を発現しない単球が優勢であった(図 7a,c)。顆粒球系の MDSC を示すとされる CD66b の陽性細胞は化学療法投与群の方が未施行群と比べて有意に多かった (図 7b,c)。これらの結果からヒト膵癌組織においても GEM を含めた化学療法群でより MDSC の誘導が引き起こされている可能性が示された。

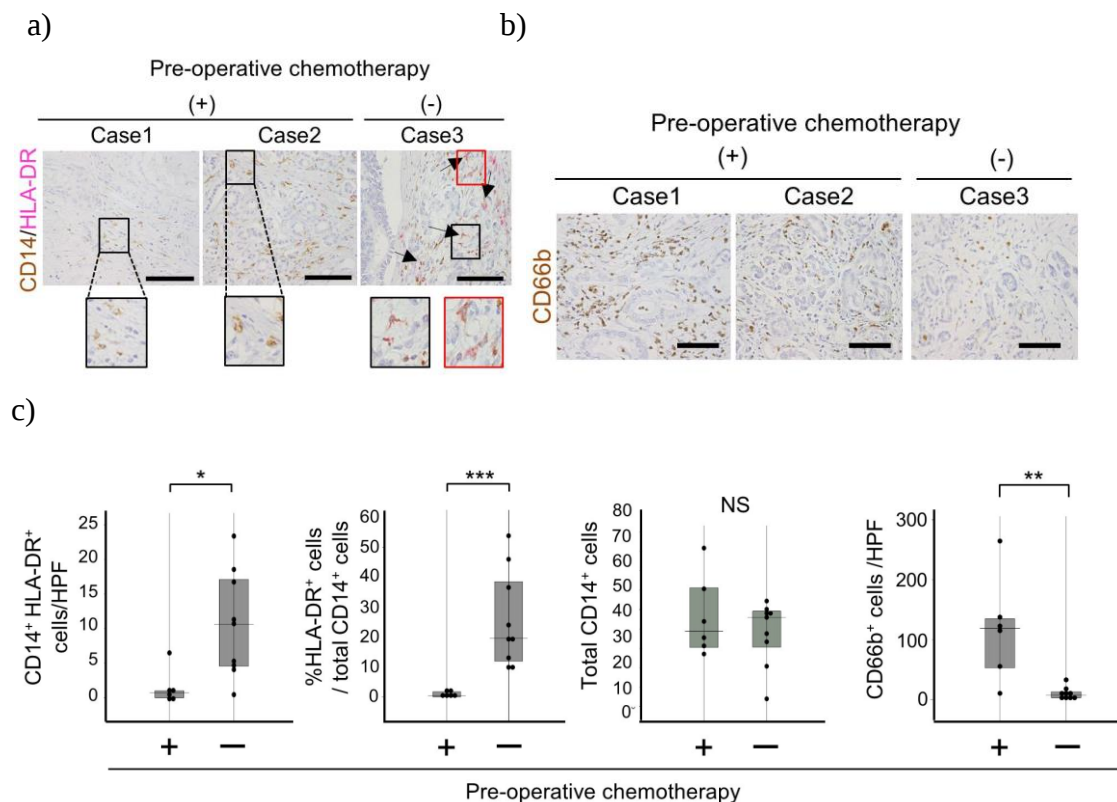


図 7 術前化学療法を施行した膵癌患者の組織において MDSC が有意に多い
a,c) CD14 と HLA-DR の共染色と CD14 陽性かつ HLA-DR 陽性細胞の割合と数。化学療法群では、CD14 と HLA-DR がどちらも陽性となる細胞は数、割合ともに少ない傾向にあった。一方、全ての CD14 陽性細胞数は有意差を認めなかった。b,c) CD66 陽性細胞は化学療法群で有意に CD66b 陽性細胞数が多かった。 Scale bars: 100μm、* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

表 4 ミエロイド細胞の蛋白発現の比較解析に用いた膵癌組織検体の術前化学療法群と化学療法未施行群（コントロール）の患者背景

	Pre-operative chemotherapy (-) (n=9)	Pre-operative chemotherapy (+) (n=6)	P-value ^a
Age(years)	69 (51-85)	61(43-68)	0.301
Sex(male/female)	3/6	2/4	1.000
Pathological UICC stage I +II/ III	8/1	3/3	0.235

^a:Fisher's exact test

表 5 術前化学療法群の患者背景詳細

Age	Sex	Regimen	Clinical response ^a	Pathological response ^b
43	Female	GEM+S-1	PR	II a
65	Male	GEM	PR	II a
55	Male	GEM+S-1	PR	I
66	Female	GEM+S-1	SD	I
68	Female	GEM+5FU	PR	II b
67	Female	GEM+5FU	PR	II a

GEM: Gemcitabine, S-1: tegafur,gimeracil, oteracil, potassium, 5-FU: 5-fluorouracil.
PR: Partial response, SD: Stable disease.

^a:RECIST criteria version 1.1.による臨床治療効果判定、^b:Evans's score による病理学的治療効果判定（grade I; 腫瘍の破壊が 10%まで, grade II a ; 同 10–50%、grade II b; 同 50–90%、grade III.; 同>90%、 grade IV.; 完全奏功）

考 察

本研究では、まず、*in vitro* の実験系において膵癌微小環境におけるミエロイド細胞、その中でも特に近年提唱されている MDSC に着目した。さらに、その分化に関連する因子として GM-CSF に注目し、通常の状態のみでなく抗癌剤投与という治療条件下における細胞の分化にも注目した。

今回の研究では *In vitro* のヒト膵癌細胞株とヒト単球を用いた実験系から、ヒト膵癌細胞には培養上清に含まれるサイトカインやケモカイン、その他の分泌因子を介して正常単球を MDSC に分化させる作用があることが示唆された。さらに、ヒト膵癌細胞に抗癌剤を投与すると、同様の条件で培養上清により形成される単球は、HLA-DR の発現低下や NOS2 の発現上昇など、より強く MDSC の形質を示す細胞へ分化することが確認された。これらの単球は蛋白発現のパターンのみでなく、CD4 陽性または CD8 陽性細胞の増殖を抑制し、機能的にも報告されている MDSC として矛盾しなかった。そして、HLA-DR や NOS2 の発現上昇と相関するように、抗癌剤投与条件では、その抑制能がより顕著であることも確認された。この現象から、抗癌剤投与により培養上清に含まれる何らかの分泌因子の変化が、分化した単球の蛋白発現や免疫抑制能などの形質の違いに関連すると考察した。膵癌細胞は恒常的に炎症性のサイトカインやケモカインを発現していると言われているため、既知の蛋白を選択し、GEM や 5-FU といった抗癌剤投与により、膵癌細胞のサイトカインやケモカインなどの分泌因子の発現の変化をスクリーニングしたところ、抗癌剤投与により GM-CSF を含む多くのサイトカインやケモカインの発現が上昇することが確認された。この理由として、本研究の蛋白解析の結果からは、さまざまな炎症性サイトカインの上流の経路である MAPK シグナルや NFκ-B などの転写因子への作用が関連していることが挙げられる。抗癌剤投与によりヒト膵癌細胞において発現上昇を認めたサイトカインやケモカインのうち、GM-CSF の発現上昇は顕著であったが、GM-CSF は近年、マウス膵癌発癌モデルにおいて MDSC の産生と膵癌の発生、進行の維持に必須の分子であることが報告されている^{13,14}。今回の結果から GM-CSF をヒト膵癌の、特に抗癌剤投与下においても膵癌と MDSC を関連づける重要な分子であると仮定し、GM-CSF を培養上清から中和する実験を行った。その結果、単球の形態変化や HLA-DR の発現低下などの現象が消失し、T 細胞の抑制能も解除された。このことから、ヒト膵癌細胞の培養上清と抗癌剤投与による単球の変化は GM-CSF に依存していることが示され、ヒト膵癌においてもマウスと同様に GM-CSF による周囲環境への MDSC の形成が起きており、抗癌剤投与を行うと GM-CSF の発現上昇を介して。周囲環境における MDSC の形成はより促進すると仮説した (図 8)。

In vitro の実験結果は細胞株や培養条件を含め生体環境を再現しうるものかどうかはわからないという実験的な制約があるため、今回、仮定した現象が実際の臨床でも再現性のあるものかを考察する目的で、ヒト膀胱癌細胞の網羅的解析とヒト組織検体を用いた実験を行った。すべてのヒト膀胱癌細胞において GM-CSF の発現が陽性であり、また、組織における GM-CSF の発現が膀胱癌の予後と関連していることから、ヒト膀胱癌微小環境における GM-CSF の重要性が確認された。MDSC に関しては、術前化学療法を行ったヒト膀胱癌組織において、単球系、顆粒球系ともに、その発現マーカーを有する細胞が有意に多かったことから、化学療法により MDSC への分化傾向が促進されていることが示され、*in vitro* の結果と合致するものであった。

近年、MDSC は分泌因子の放出により癌細胞の細胞内シグナルの変化を介して、その化学療法抵抗性の獲得に寄与すると報告されている²⁰。また、化学療法の治療効果は宿主の免疫に強く依存していることが報告されており^{21,22}、MDSC による細胞性免疫の抑制は間接的にも化学療法抵抗性を補助すると考えられる。このような MDSC の機能を考えると、本研究で示された GM-CSF を介した MDSC の形成は、ヒト膀胱癌の化学療法抵抗性獲得の一翼を担っている可能性が考えられる。MDSC の形成に関連する主要なサイトカインとして GM-CSF が同定されたことから、臨床的な治療応用を視野に本研究の結果を考察すると、GM-CSF を抑制することで MDSC 産生を抑え、前述の化学療法抵抗性を解除することで、化学療法との併用効果が期待できる (図 8)。実際に MDSC を標的とした薬物療法は GM-CSF 以外の分子を標的としたものがすでに報告されており²³、GM-CSF を標的とした治療も今後の研究対象と期待できると考えている。

以上、ヒト膀胱癌における GM-CSF を介した MDSC の形成と、化学療法との関連、さらに臨床的な治療応用について考察してきたが、本研究には以下の 2 つの制約があり今後の課題として解決する必要がある。

まず、GM-CSF と MDSC の形成に関して、今回、マウスにおける過去の報告と一致したこと、その発現上昇が顕著であることから、このサイトカインに特化して実験を進めたが、一方で MDSC の形成に関与するサイトカインとしては、他にも G-CSF、IL-6、VEGF などいくつか報告されている¹¹。このため、GM-CSF のみでなく、その他の蛋白の関連も考えるべきである。また、抗癌剤投与による細胞死が起こると、サイトカインやケモカインだけでなく、ミエロイド細胞の分化に影響を与えるとされる核酸や ATP など蛋白以外の分泌因子も細胞上清内に認めるとされる^{24,25}。このように、膀胱癌から放出される分泌因子は複数であるため、MDSC の形成を GM-CSF 単一で決定づけることはできない。

次に化学療法と腫瘍免疫の関係についてだが、これまで一般に化学療法はドキソルビシンやオキサリプラチンなどの薬剤で抗腫瘍免疫を促進すると報告さ

れてきた²⁶。さらに GEM や 5-FU はマウスの他癌腫の細胞ではむしろ MDSC を抑制するという報告^{27,28}もある。今回の結果からは、少なくともヒト膵癌において GEM や 5-FU は MDSC の形成を促進し、それ自体は免疫抑制の方向に働く可能性があるという結論に留まり、複数の細胞種が絡み合った膵癌微小環境の中で、化学療法が腫瘍免疫に与える影響は一事象のみで決定づけることはできない。

近年、膵癌の実地臨床においては術前化学療法の臨床試験を含め、化学療法後の手術症例が増加傾向にある^{29,30}。本研究で使用した化学療法後の切除検体は限られた症例数のみの対象にとどまったが、今後、こういった症例の蓄積により化学療法後膵癌の MDSC を含めた微小環境形成機構、また、その薬剤抵抗性獲得のメカニズムに迫ることができる可能性があると考えている。

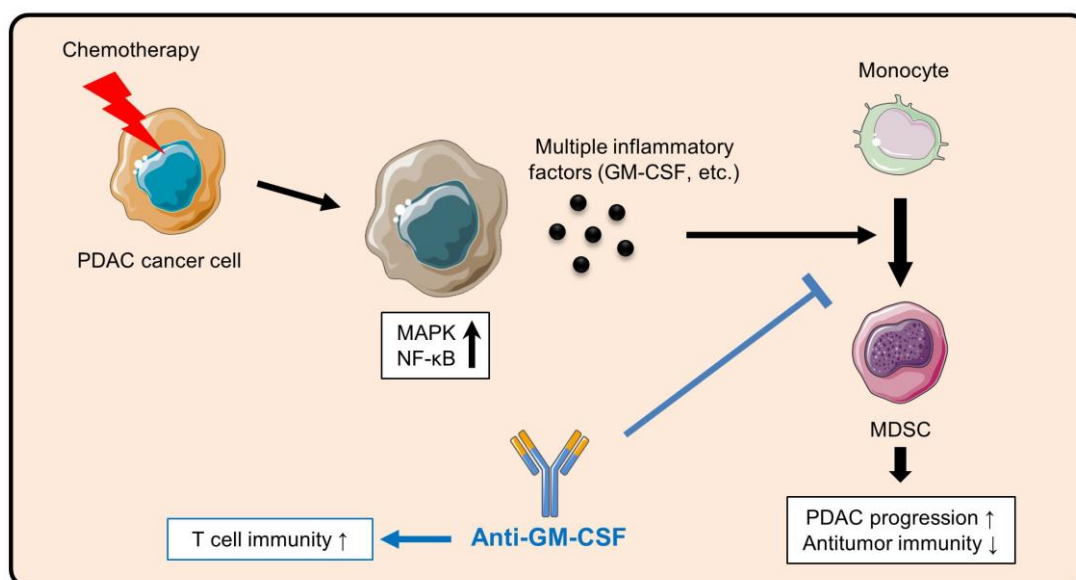


図 8 ヒト膵癌微小環境における MDSC 形成促進のメカニズム

ヒト膵癌微小環境における MDSC 形成促進のメカニズムの仮説を示すシェーマ。膵癌細胞から放出される GM-CSF をはじめとした分泌因子により単球から MDSC が形成される。抗癌剤により MAPK シグナルや NFκB のプロモーター活性が上がることで、特に GM-CSF の発現が顕著に上昇し、MDSC の形成はさらに促進する。MDSC は自身の放出する蛋白により膵癌細胞の増殖や化学療法抵抗性に寄与するとともに T 細胞の増殖を抑制し、抗腫瘍免疫を抑制する。GM-CSF の中和抗体を投与することで、この作用を抑制し、MDSC の制御ができる可能性がある。

総 括 お よ び 結 論

本研究により以下の 3 つの新知見が得られた。

- (1) ヒト膵癌細胞の培養上清が単球に作用すると MDSC に分化する。膵癌細胞に GEM や 5-FU を作用させると、MAPK や NF- κ B といった炎症性シグナルの増強と、多くのサイトカインやケモカインの発現上昇が起き、この条件でのヒト膵癌細胞培養上清が単球に作用することで、MDSC としての蛋白発現や機能が増強する。これらの現象は培養上清中の GM-CSF に強く依存している。
- (2) GM-CSF は多くの膵癌患者の組織切片において発現しており、予後不良と関連する。
- (3) 術前に化学療法投与した膵癌の組織切片では、未治療群に比べて MDSC が優位であった。

本研究により、ヒト膵癌微小環境においては抗癌剤投与により膵癌細胞から GM-CSF の産生が増え、MDSC の形成が促進される可能性があることを見いだした。MDSC は化学療法抵抗性や腫瘍免疫の抑制に関連する細胞群であり、今回得られた知見は、膵癌微小環境とその化学療法耐性機構の解明に寄与するものと考えている。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝致します。また特に、基礎実験部分全般について御指導いただきました、共同研究先の北海道大学遺伝子制御研究所免疫生物学分野 清野研一郎 教授に感謝致します。研究全般にわたり、有意義な御指導御鞭撻いただきました北海道大学大学院消化器外科学分野Ⅱ 土川貴裕助教に深く感謝致します。投稿論文作製にあたり、御指導いただきました北海道大学遺伝子制御研究所免疫生物学分野 **Muhammad Baghdadi** 助教に深く感謝致します。また、特に初期の実験指導や科学的考察の方法について御指導いただいた、北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野Ⅱ 故 宮本正樹助教に深く感謝致します。また、本研究を遂行するにあたり、御協力いただいた北海道大学大学院消化器外科学分野Ⅱの皆様、北海道大学遺伝子制御研究所免疫生物学分野の皆様は心より感謝致します。

引 用 文 献

- 1 Ryan, D. P., Hong, T. S. & Bardeesy, N. Pancreatic Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* **371**, 1039-1049, doi:doi:10.1056/NEJMra1404198 (2014).
- 2 Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* **364**, 1817-1825, doi:doi:10.1056/NEJMoa1011923 (2011).
- 3 Von Hoff, D. D. *et al.* Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine* **369**, 1691-1703, doi:doi:10.1056/NEJMoa1304369 (2013).
- 4 Paulson, A. S., Tran Cao, H. S., Tempero, M. A. & Lowy, A. M. Therapeutic Advances in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **144**, 1316-1326, doi:http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.078 (2013).
- 5 Kato, K. *et al.* Adjuvant surgical therapy for patients with initially-unresectable pancreatic cancer with long-term favorable responses to chemotherapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* **18**, 712-716, doi:10.1007/s00534-011-0391-8 (2011).
- 6 Satoi, S. *et al.* Role of adjuvant surgery for patients with initially unresectable pancreatic cancer with a long-term favorable response to non-surgical anti-cancer treatments: results of a project study for pancreatic surgery by the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* **20**, 590-600, doi:10.1007/s00534-013-0616-0 (2013).
- 7 Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* **19**, 1423-1437, doi:10.1038/nm.3394 (2013).
- 8 Apte, M. V., Wilson, J. S., Lugea, A. & Pandol, S. J. A Starring Role for Stellate Cells in the Pancreatic Cancer Microenvironment. *Gastroenterology* **144**, 1210-1219, doi:http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.11.037 (2013).
- 9 di Magliano, M. P. & Logsdon, C. D. Roles for KRAS in Pancreatic Tumor Development and Progression. *Gastroenterology* **144**, 1220-1229, doi:http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.071 (2013).
- 10 Zheng, L., Xue, J., Jaffee, E. M. & Habtezion, A. Role of Immune Cells and Immune-Based Therapies in Pancreatitis and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* **144**, 1230-1240, doi:http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.12.042 (2013).
- 11 Talmadge, J. E. & Gabrilovich, D. I. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* **13**, 739-752, doi:10.1038/nrc3581 (2013).
- 12 Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the

- immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162-174 (2009).
- 13 Pylayeva-Gupta, Y., Lee, Kyoung E., Hajdu, Cristina H., Miller, G. & Bar-Sagi, D. Oncogenic Kras-Induced GM-CSF Production Promotes the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Cell* **21**, 836-847 (2012).
 - 14 Bayne, Lauren J. *et al.* Tumor-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Regulates Myeloid Inflammation and T Cell Immunity in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **21**, 822-835 (2012).
 - 15 Shichinohe, T. *et al.* Suppression of Pancreatic Cancer by the Dominant NegativerasMutant, N116Y. *Journal of Surgical Research* **66**, 125-130, doi:http://dx.doi.org/10.1006/jsre.1996.0383 (1996).
 - 16 Almand, B. *et al.* Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer. *The Journal of Immunology* **166**, 678-689, doi:10.4049/jimmunol.166.1.678 (2001).
 - 17 Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M. & Gabrilovich, D. I. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. *The Journal of Immunology* **181**, 5791-5802, doi:10.4049/jimmunol.181.8.5791 (2008).
 - 18 Virtuoso, L. P. *et al.* Characterization of iNOS(+) Neutrophil-like ring cell in tumor-bearing mice. *J Transl Med* **10**, 152, doi:10.1186/1479-5876-10-152 (2012).
 - 19 Vasquez-Dunddel, D. *et al.* STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *The Journal of Clinical Investigation* **123**, 1580-1589, doi:10.1172/jci60083 (2013).
 - 20 Di Mitri, D. *et al.* Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature advance online publication*, doi:10.1038/nature13638 <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/abs/nature13638.html#supplementary-information> (2014).
 - 21 Halama, N. *et al.* Localization and Density of Immune Cells in the Invasive Margin of Human Colorectal Cancer Liver Metastases Are Prognostic for Response to Chemotherapy. *Cancer Research* **71**, 5670-5677, doi:10.1158/0008-5472.can-11-0268 (2011).
 - 22 Andre, F. *et al.* Molecular Pathways: Involvement of Immune Pathways in the Therapeutic Response and Outcome in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* **19**, 28-33, doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-2701 (2013).
 - 23 Stromnes, I. M. *et al.* Targeted depletion of an MDSC subset unmasks pancreatic ductal adenocarcinoma to adaptive immunity. *Gut*, doi:10.1136/gutjnl-2013-306271 (2014).
 - 24 Vernon, P. J. *et al.* The Receptor for Advanced Glycation End Products Promotes

- Pancreatic Carcinogenesis and Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *The Journal of Immunology* **190**, 1372-1379, doi:10.4049/jimmunol.1201151 (2013).
- 25 Krysko, O., Love Aaes, T., Bachert, C., Vandenabeele, P. & Krysko, D. V. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis* **4**, e631, doi:10.1038/cddis.2013.156 (2013).
- 26 Galluzzi, L., Senovilla, L., Zitvogel, L. & Kroemer, G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 215-233 (2012).
- 27 Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A. S., Kaiser, L. R. & Albelda, S. M. Gemcitabine Selectively Eliminates Splenic Gr-1+/CD11b+ Myeloid Suppressor Cells in Tumor-Bearing Animals and Enhances Antitumor Immune Activity. *Clinical Cancer Research* **11**, 6713-6721, doi:10.1158/1078-0432.ccr-05-0883 (2005).
- 28 Vincent, J. *et al.* 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity. *Cancer Research* **70**, 3052-3061, doi:10.1158/0008-5472.can-09-3690 (2010).
- 29 White, R. R. & Evans, D. B. Neoadjuvant chemotherapy for localized pancreatic cancer: too little or too long? *Ann Surg Oncol* **21**, 1508-1509, doi:10.1245/s10434-014-3490-3 (2014).
- 30 Boeck, S. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy in pancreatic cancer: innovative, but still difficult. *Br J Cancer*, doi:10.1038/bjc.2014.60 (2014).