

Ocena wewnątrzkomórkowej ekspresji interleukiny 17 u pacjentek z rakiem jajnika

Evaluation of the intracellular expression of interleukin 17 in patients with ovarian cancer

Rogała Ewelina¹, Nowicka Aldona¹, Bednarek Wiesława¹, Barczyński Bartłomiej¹, Wertel Iwona¹, Zakrzewski Maciej², Kotarski Jan¹

¹ I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Polska

² Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Polska

Streszczenie

Poznanie roli interleukiny 17 (IL-17) doprowadziło do zidentyfikowania nowej subpopulacji limfocytów T pomocniczych – limfocytów Th17 oraz limfocytów T cytotoksycznych wydzielających IL-17 (Tc17). Coraz więcej uwagi poświęca się ich roli w odporności przeciwnowotworowej.

Cel pracy: Ocena subpopulacji limfocytów T CD4+ i CD8+ wykazujących ekspresję IL-17 we krwi obwodowej, płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej pacjentek z rakiem jajnika.

Materiał i Metody: Badaniami objęto grupę 40 kobiet operowanych z powodu zaawansowanego raka jajnika. Grupę referencyjną stanowiły 24 pacjentki operowane z powodu surowicznych torbieli jajników. W celu oceny komórek T CD4+ i CD8+ produkujących IL-17 przeprowadzane były 4 godzinne hodowle limfocytów (2×10^6) w obecności jonomycyny (1 µg/ml) i PMA (50 ng/ml). Ekspresja IL-17 w limfocytach CD4 i CD8 oceniana była metodą cytometrii przepływowej.

Wyniki: Zarówno we krwi, płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej stwierdzono obecność limfocytów CD4+ i CD8+ wykazujących ekspresję IL-17. Ekspresja IL-17 w limfocytach CD4+ obecnych we krwi, płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej pacjentek z rakiem jajnika była wyższa od występujących w limfocytach CD8+. Odsetek limfocytów T pomocniczych CD4+/IL-17+ izolowanych z tkanki guza był znamienne wyższy ($p=001$) w porównaniu z izolowanymi z krwi, natomiast nie różnił się z limfocytami występującymi w płynie otrzewnowym. Odsetek limfocytów T cytotoksycznych CD8+/IL-17+ izolowanych z tkanki guza nie różnił się znamienne od odsetka limfocytów obecnych we krwi i płynie otrzewnowym. Nie wykazano także istotności statystycznej w odsetku limfocytów CD8+/IL-17+ obecnych w płynie otrzewnowym i we krwi pacjentek z rakiem jajnika.

Wnioski: Wysoki odsetek limfocytów CD4+/IL-17+ i CD8+/IL-17+ w tkance guza wskazuje, że limfocyty te są akumulowane w środowisku guza.

Słowa kluczowe: **interleukina 17 / limfocyty Th17 / rak jajnika /**

Adres do korespondencji:

Ewelina Rogala
I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii UM w Lublinie,
20-081 Lublin, ul. Staszica 16, Polska
tel./fax 81 5327847,
email: evelin84@wp.pl

Otrzymano: 23.02.2012
Zaakceptowano do druku: 14.05.2012

Abstract

Knowledge of the role of interleukin 17 (IL-17) has led to the identification of new subpopulation of T helper lymphocytes – Th17 and T cytotoxic lymphocytes secreting IL-17 (Tc17). An increasing amount of attention is paid to their role in anti-tumor immunity.

Aim: The aim of this study was to evaluate the percentage of peripheral blood, peritoneal fluid and cancer tissue CD4+ and CD8+ T lymphocytes producing IL-17 in patients with ovarian cancer.

Material and Methods: Forty patients operated due to advanced ovarian carcinoma and twenty-four patients with functional follicle ovarian cysts were recruited. Peripheral blood, peritoneal fluid and cancer tissue mononuclear cells from ovarian cancer patients were stimulated for 4 hours *ex vivo* with phorbol myristate acetate (PMA) (50ng/ml) and ionomycin (1µg/ml). The percentage of CD4+ and CD8+ T cells producing IL-17 was measured using flow cytometry.

Results: CD4+ and CD8+ T lymphocytes producing IL-17 were detected in the peripheral blood, peritoneal fluid and cancer tissue of ovarian cancer patients. The percentage of CD4+ T cells producing IL-17 was higher in the peripheral blood, peritoneal fluid and cancer tissue when compared to CD8+/IL17+ T cells. The percentage of CD4+/IL-17+ was significantly higher in cancer tissue compared to T cells derived from peripheral blood. There was no difference in the percentage of CD4+/IL-17+ T cells between peripheral blood and peritoneal fluid and peritoneal fluid and cancer tissue of ovarian cancer patients. There was no difference in the percentage of CD8+/IL-17+ T lymphocytes in the peripheral blood, peritoneal fluid and cancer tissue in patients suffering from ovarian cancer.

Conclusions: Increased percentage of CD4+/IL-17+ and CD8+/IL-17+ T cells in cancer tissue indicates that these cells are accumulated in ovarian cancer microenvironment.

Key words: **interleukin 17 / Th17 lymphocytes / ovarian cancer /**

Wstęp

Rak jajnika jest chorobą heterogenną, a jej złożony patomechanizm pozostaje nadal do końca niewyjaśniony [1]. Brak charakterystycznych objawów klinicznych w początkowym stadium choroby powoduje, że większość pacjentek zgłasza się z zaawansowanym nowotworem [2]. Ze względu na brak zaleceń dotyczących badań profilaktycznych, postępu w leczeniu raka jajnika upatruje się w poprawie rozpoznawania choroby nowotworowej oraz opracowaniu nowych sposobów leczenia nawrotu lub progresji guza po standardowej terapii [1]. Nowym, obiecującym sposobem leczenia wydaje się immunoterapia komórkowa, w której znaczenie mogą mieć limfocyty Th17.

Limfocyty Th17 należą do stosunkowo niedawno odkrytej, subpopulacji pomocniczych limfocytów T (Th). Komórki Th17 nie wydzielają cytokin typowych dla odpowiedzi Th1 czy Th2 lecz charakteryzują się wysoką ekspresją interleukiny 17 (IL-17) [3]. IL-17 (znana także jako IL-17A) została opisana po raz pierwszy w 1995 r., a dalsze badania pozwoliły na odkrycie kolejnych pięciu członków „rodziny IL-17” (IL-17A, -17B, -17C, -17D, -17E, -17F) [4,5]. IL-17 poprzez aktywację wydzielania cytokin; interleukinę 1 β (IL-1 β), interleukinę 6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α) i chemokin: interleukinę 8 (IL-8), CXCL-1, CXCL-6 wpływa na migrację leukocytów, głównie neutrofilii i rozwój szybkiej reakcji zapalnej [6]. Do innych cytokin prozapalnych wydzielanych przez limfocyty Th17 należą: interleukina 21, 22, 26 (IL-21, IL-22, IL-26). IL-21 stymuluje proliferację i różnicowanie limfocytów B, limfocytów T CD8+ i komórek NK (*natural killer*) [7]. Aktywność sekrecyjna limfocytów Th17 pozwala na wyodrębnienie subpopulacji komórek wykazujących ekspresję interleukiny 10 (IL-10) oraz podwójnie pozytywnych komórek wydzielających jednocześnie IL-17 i interferon gamma (IFN- γ) [8, 9]. Przeprowadzone do tej pory badania nie ujawniają roli zarówno jednych jak i drugich komórek w patogenezie chorób związanych z biologią Th17.

Odkrycie limfocytów Th17 przyczyniło się do rozwoju badań nad mechanizmami regulującymi różnicowanie się komórek Th17 i pozwoliło na zidentyfikowanie czynników prowadzących do rozwoju tej linii [10]. Kluczową rolę w indukcji różnicowania mysich komórek Th17 odgrywają cytokiny IL-6, IL-21 i transformujący czynnik wzrostu-beta (TGF- β -*transforming growth factor beta*) [11]. Różnicowanie ludzkich komórek Th17 wymaga wyższych stężeń IL-1 β , IL-6 i TGF- β , poprzez stymulację ekspresji czynnika transkrypcyjnego ROR γ t [12]. ROR γ t jest głównym czynnikiem różnicującym limfocyty w kierunku Th17, podobnie jak czynnik T-bet dla limfocytów Th1, GATA-3 dla limfocytów Th2 oraz FoxP3 dla limfocytów T regulatorowych (Treg) [13].

Pomimo, że limfocyty Th17 uznano za odrębną populację dość niedawno, to rola IL-17 w patogenezie określonych chorób znana była już wiele lat temu. Do tej pory najlepiej poznano rolę komórek Th17 w patogenezie chorób autoimmunologicznych, alergicznych i zapalnych. Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się także ich znaczeniu w odporności przeciwnowotworowej. Badania potwierdzają obecność limfocytów Th17 w mikrośrodkowisku raka jajnika, lecz nadal nie określono ich wpływu na rozrost komórek nowotworowych. Kontrowersje wokół udziału limfocytów Th17 w patogenezie chorób nowotworowych sugerują, że IL-17 jako cytokina o działaniu pleiotropowym może mieć wpływ zarówno stymulujący jak i hamujący proces nowotworzenia [14].

Limfocyty T cytotoksyczne produkujące IL-17 (Tc17) zidentyfikowane zostały zarówno w organizmie mysim jak i ludzkim [15]. Komórki te, mimo, że nie należą do subpopulacji limfocytów Th17 nabywają zdolności do produkcji IL-17 w obecności cytokin typowych dla Th17. Badania wykazały, że kluczową rolę w różnicowaniu komórek CD8+/IL-17+ odgrywa czynnik transkrypcyjny STAT3 i ROR γ t. Jednakże rola tych komórek w odporności przeciwnowotworowej pozostaje nadal nieznana [16].

Cel pracy

Celem badań była ocena subpopulacji limfocytów T CD4+ i CD8+ wykazujących ekspresję IL-17 we krwi obwodowej, płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej pacjentek z rakiem jajnika.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 40 kobiet leczonych operacyjnie z powodu raka jajnika w II^o lub III^o stopniu zaawansowania wg FIGO. Histopatologiczna ocena wykazała obecność: raka surowiczego w n=17 i raka endometrioidalnego w n=23 przypadkach. U badanych pacjentek stwierdzono nowotwór w stopniu różnicowania wg WHO: G2 (n=21) oraz G3 (n=19). Grupę referencyjną stanowiły 24 pacjentki operowane z powodu surowiczych torbieli jajników.

Krew obwodowa do badań pobierana była do strzykawki z heparyną sodową 20j/ml. Płyn otrzewnowy aspirowano z jamy brzusznej z przestrzeni Douglasa w czasie zabiegu operacyjnego. Fragment tkanki nowotworowej wielkości 1 cm³ rozdrabniano przy użyciu skalpela. Komórki jednojądrzaste krwi, płynu otrzewnowego i rozdrobnionej tkanki nowotworowej izolowano przez wirowanie w gradiencie gęstości (Gradisol L firmy Aqua Medica) przez 20 min. przy 2800 obrotów/minutę. Otrzymane komórki płukano 0,9% zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej PBS bez jonów Ca i Mg. Ilość uzyskanych komórek oceniano w komorze Neubauera, żywotność komórek określano z zastosowaniem błękitu trypanu.

W celu oceny komórek T CD4+ i CD8+ produkujących IL-17 przeprowadzane były 4 godzinne hodowle limfocytów (2x10⁶) w obecności jonomycyny (1μg/ml) i PMA (50ng/ml) oraz w obecności inhibitora transportu białek – GolgiStop. W celu oceny spontanicznej ekspresji IL-17 w 10 badanych hodowlach przeprowadzano inkubację w podłożu hodowlanym bez dodatku PMA i jonomycyny, tylko w obecności preparatu GolgiStop. Po 4 godzinnej inkubacji komórki znakowano przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom powierzchniowym limfocytów (CD3, CD4, CD8). Następnie próbki utrwalano, permabilizowano i znakowano przeciwciałem przeciwko wewnątrzkomórkowej IL-17, zgodnie z procedurą producenta (eBiosciences, San Diego, USA). Ekspresja IL-17 w limfocytach CD4 i CD8 oceniana była metodą cytometrii przepływowej.

Wyniki

Uzyskane wyniki przedstawiono w formie tabeli (Tabela I, Tabela II), oraz w formie rycin. (Rycina 1, 2, 3, 4).

Zarówno we krwi, płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej stwierdzono obecność limfocytów CD4+ i CD8+ wykazujących ekspresję IL-17. Odsetek limfocytów CD4+ wydzielających IL-17 we krwi, płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej pacjentek z rakiem jajnika był wyższy w porównaniu z komórkami CD8+.

Odsetek limfocytów CD4+/IL-17+ izolowanych z tkanki guza był znamienne wyższy (p=001) w porównaniu z limfocytami obecnymi we krwi. Nie wykazano różnicy istotnej statystycznej w odsetku limfocytów CD4+/IL-17+ w płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej a także w płynie otrzewnowym i krwi pacjentek z rakiem jajnika.

Odsetek limfocytów CD8+/IL-17+ izolowanych z tkanki guza był najwyższy, jakkolwiek nie różnił się znamienne od odsetka

Tabela I. Odsetek limfocytów T CD4+/IL-17+ i CD8+/IL-17+ we krwi, płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej pacjentek z rakiem jajnika.

	Wybrane parametry	
	Limfocyty CD4+/IL-17+ (%)	Limfocyty CD8+/IL-17+ (%)
Tkanka nowotworowa	2,83 (0,21-19,28)	0,18 (0,07-4,78)
Krew	0,69 (0,09-4,17)	0,10 (0,02-25,96)
Płyn otrzewnowy	0,50 (0,06-2,52)	0,09 (0,02-0,69)

Tabela II. Odsetek limfocytów T CD4+/IL-17+ i CD8+/IL-17+ we krwi pacjentek z rakiem jajnika i torbielami surowiczymi.

	Limfocyty CD4+/IL-17+ (%)	Limfocyty CD8+/IL-17+ (%)
Grupa referencyjna	0,95 (0,21-2,04)	0,12 (0,03-1,10)
Rak jajnika	0,74 (0,09-4,17)	0,10 (0,03-0,55)

limfocytów obecnych we krwi i płynie otrzewnowym. Nie wykazano także istotnych statystycznie różnic w odsetku limfocytów CD8+/IL-17+ w płynie otrzewnowym i krwi pacjentek z rakiem jajnika.

Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie w odsetku limfocytów CD4+/IL-17+ i CD8+/IL-17+ we krwi pacjentek z rakiem jajnika i torbielami surowiczymi. Odsetek limfocytów CD4+/IL-17+ i CD8+/IL-17+ we krwi, płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej pacjentek w II i III stopniu zaawansowania choroby nowotworowej nie różnił się istotnie.

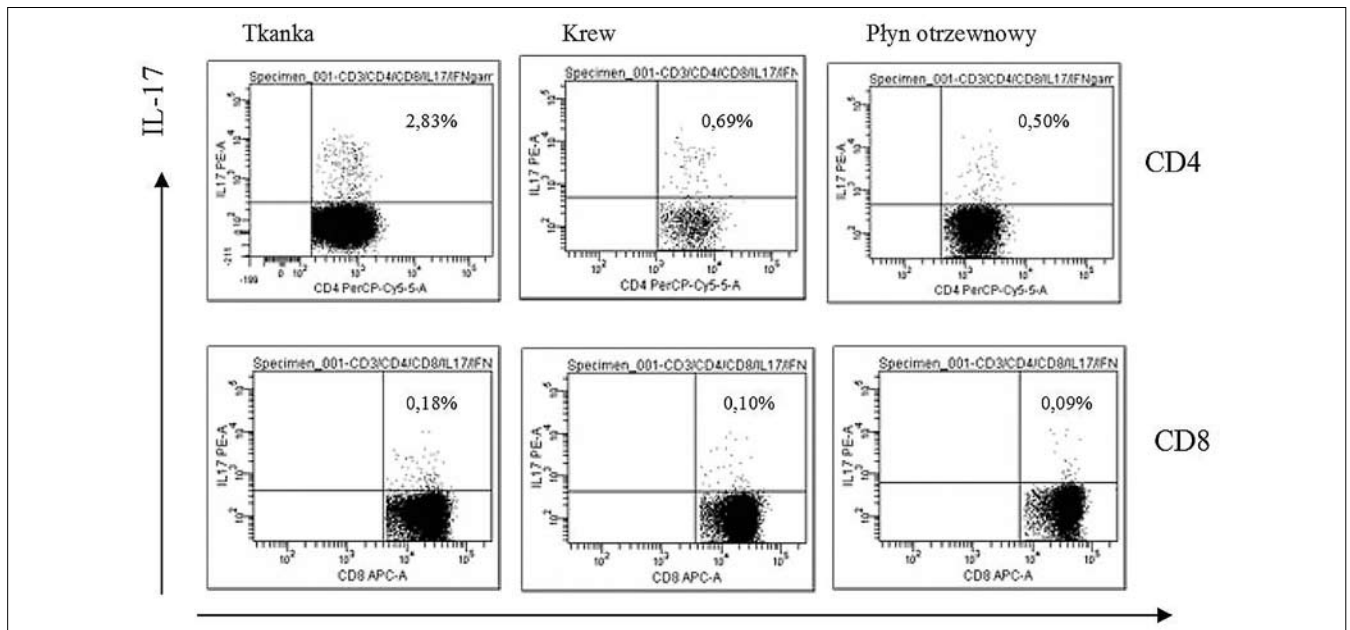
Nie wykazano także różnicy istotnej statystycznie w odsetku limfocytów CD4+/IL-17+ i CD8+/IL-17+ we krwi, płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej pacjentek z różnymi histologicznie guzami jajnika.

Dyskusja

W ciągu ostatnich kilku lat, limfocyty Th17 stały się istotnym elementem w badaniach nad patogenезą i progresją chorób nowotworowych. Mimo, że wykazano zwiększony odsetek komórek wydzielających IL-17 w mikrośrodkowisku guzów w tym raka jajnika, to do dziś wpływ tych komórek na ich rozwój ciągle pozostaje przedmiotem dyskusji. Można przypuszczać, że IL-17 jako cytokina o działaniu plejotropowym może mieć znaczenie prognostyczne lub przeciwnie – stymulować rozrost guza.

W prezentowanej pracy wykazano obecność zarówno limfocytów T CD4+ jak i CD8+ z ekspresją IL-17 we krwi, płynie otrzewnowym jak i tkance nowotworowej, przy czym ekspresja była wyższa w komórkach CD4+(w tkance nowotworowej ok. 15 razy, we krwi 7 razy i w płynie otrzewnowym 5 razy). Ciekawą obserwacją wydaje się odnotowany w naszych badaniach najwyższy odsetek limfocytów CD4+/IL-17+ i CD8+/IL-17+ w tkance nowotworowej. Prawdopodobnie limfocyty Th17 i Tc17 migrują z krwi do guza u pacjentów z rakiem jajnika gdzie następnie są akumulowane. Obecność limfocytów T z ekspresją IL-17 u pacjentek z rakiem jajnika wykazały także badania Kryczek i wsp. Badacze Ci zaobserwowali znamienne wyższy odsetek limfocy-

Rogala E, et al.



Rycina 1. Cytometryczna analiza limfocytów T CD4 i CD8 wykazujących ekspresję IL-17 we krwi, płynie otrzewnowym i tkance pacjentek z rakiem jajnika.

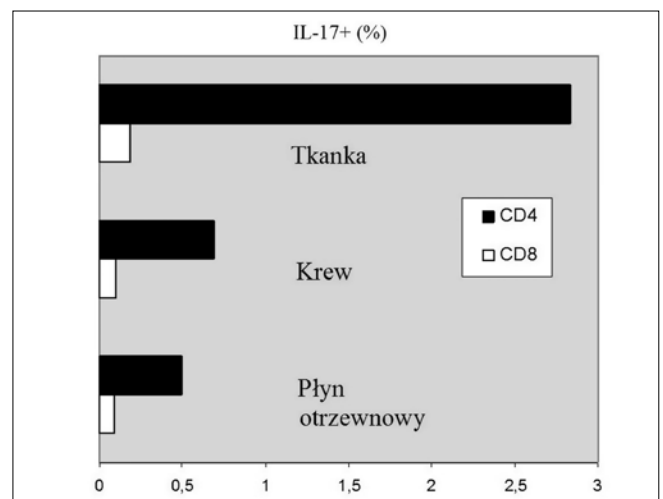
tów Th17 w tkance nowotworowej w porównaniu z limfocytami obecnymi w węzłach chłonnych oraz we krwi pacjentek zarówno zdrowych jak i z rakiem jajnika [14]. Można więc wnioskować, że limfocyty Th17 mogą migrować do środowiska guza [17].

Kryczek i wsp. oceniali także fenotyp komórek z ekspresją IL-17 w mikrośrodowisku raka jajnika. Badania te wykazały, że 99% limfocytów T infiltrujących guz stanowiły limfocyty o fenotypie CD4+/IL-17+, zaś tylko 1% limfocyty CD8+/IL-17+ [14]. Inne dane dostarczone także przez Kryczek i wsp. potwierdziły wyższy odsetek limfocytów Th17 w tkance nowotworowej i płynie otrzewnowym pacjentek z rakiem jajnika [17].

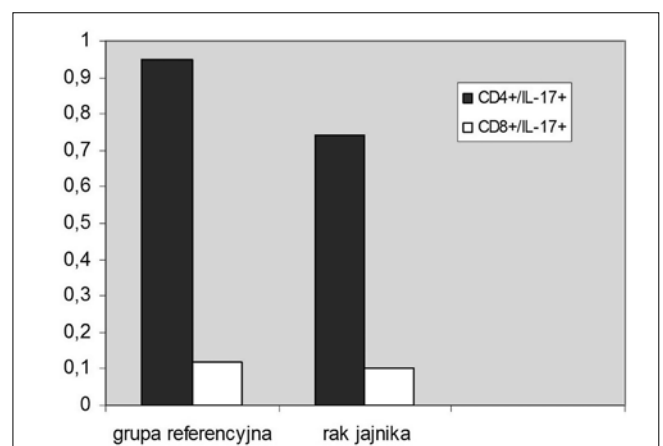
O obecności limfocytów Th17 wśród limfocytów T infiltrujących guz u pacjentek z rakiem jajnika, świadczą także doniesienia zespołu kierowanego przez Miyahara i wsp. Badacze Ci wykazali, że limfocyty Th17 pacjentek z rakiem jajnika stanowią ok. 25% limfocytów T infiltrujących guz, podczas gdy we krwi limfocyty te stanowią zaledwie 1% mononuklearów pacjentek zdrowych [18].

Ciekawych obserwacji dostarczyli także Kato i wsp. Autorzy potwierdzili obecność zwiększonego odsetka limfocytów Th17 u pacjentek z rakiem jajnika i po raz pierwszy zasugerowali, że IL-17 może stymulować wzrost guzów poprzez działanie proangiogenne. Nie odnotowano natomiast znamienych korelacji pomiędzy ekspresją IL-17 a stopniem klinicznego zaawansowania raka jajnika, jego typem histologicznym i stopniem zróżnicowania, przerzutowaniem do węzłów chłonnych i przeżyciem [19].

Wysokie stężenie IL-17 oraz odsetek komórek Th17 zaobserwowano także we krwi chorych na ostrą białaczkę szpikową [20]. Podobne dane odnoszą się także do guzów litych. Obecność zwiększonej liczby komórek T z ekspresją IL-17 opisano we krwi oraz środowisku guza nowotworowego chorych na czerniaka, raka piersi, jelita grubego, żołądka, wątroby [21, 22, 23]. Próbie oceny występowania limfocytów Th17 we krwi i tkance pacjentów z rakiem trzustki podjęli ostatnio He i wsp. Badania zespołu wykazały zwiększoną obecność limfocytów CD4+ wykazujących ekspresję IL-17.

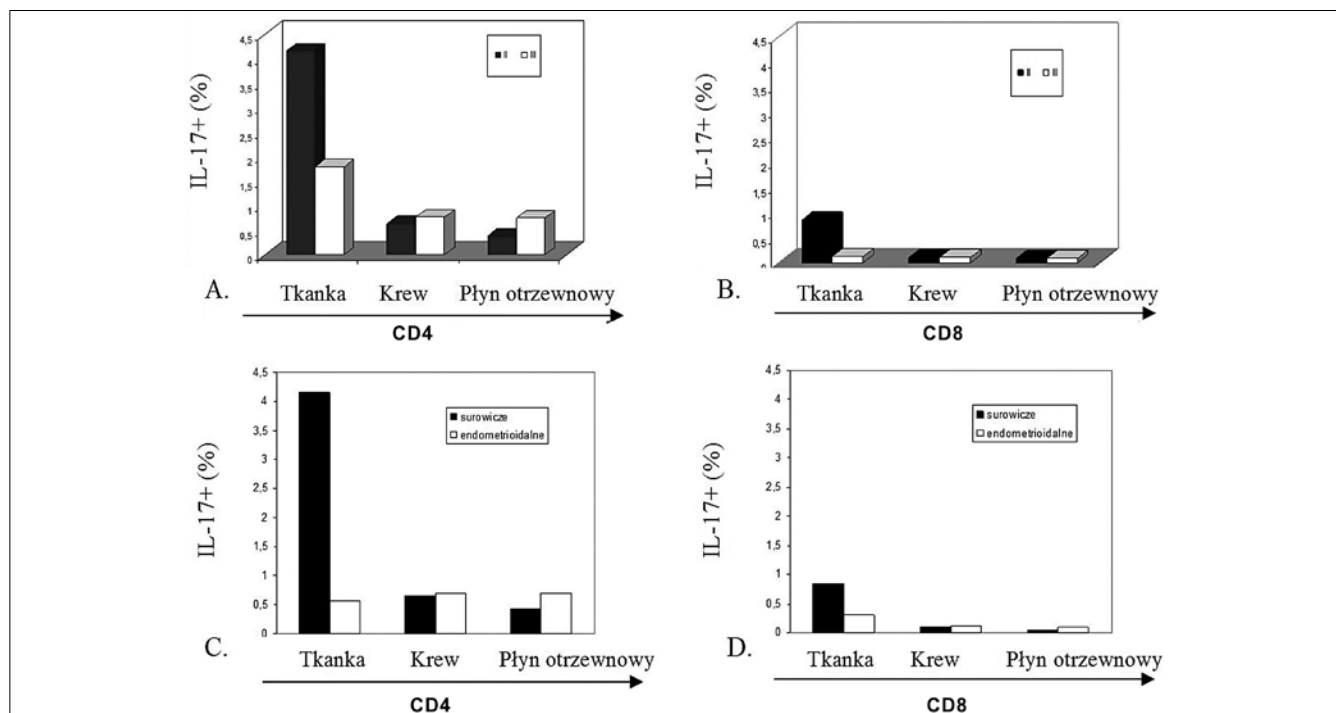


Rycina 2. Odsetek limfocytów T CD4 i CD8 wykazujących ekspresję IL-17 we krwi, płynie otrzewnowym i tkance pacjentek z rakiem jajnika.



Rycina 3. Odsetek limfocytów CD4+/IL-17+ i CD8+/IL-17+ we krwi pacjentek z rakiem jajnika i torbielami surowiczymi.

Ocena wewnątrzkomórkowej ekspresji interleukiny 17 u pacjentek z rakiem jajnika.



Rycina 4. Odsetek limfocytów CD4 i CD8 wykazujących ekspresję IL-17 we krwi, płynie otrzewnowym i tkance pacjentek z II i III stopniem zaawansowania raka jajnika (A i B) oraz pacjentek z endometrioidalnymi i surowiczymi guzami jajnika (C i D).

Odsetek limfocytów Th17 u pacjentów z III i IV stopniem zaawansowania choroby nowotworowej był znacznie wyższy w porównaniu do pacjentów ze stopniem I i II. Odnotowano także istotnie wyższy odsetek komórek Th17 w tkance nowotworowej w porównaniu z krwią pacjentów z rakiem trzustki. Na podstawie tej analizy można sugerować, że limfocyty Th17 są akumulowane w środowisku guza lub mogą migrować z krwi do tkanki nowotworowej pacjentów z rakiem trzustki [24].

Z przedstawionych danych wynika, że limfocyty Th17 biorą znaczny udział w kształtowaniu raka jajnika. W świetle powyższych badań oceny limfocytów Th17 we krwi, płynie otrzewnowym i tkance nowotworowej pacjentek z rakiem jajnika ciekawym wydaje się dokładniejsze poznanie ich biologii, mechanizmów różnicowania, supresji oraz roli w odporności przeciwnowotworowej. Dalsze badania mogą mieć także kluczowe znaczenie dla rozwoju metod immunoterapii z wykorzystaniem limfocytów Th17.

Wnioski

Wysoki odsetek limfocytów CD4+/IL-17+ i CD8+/IL-17+ w tkance guza dowodzi, że limfocyty te są akumulowane w środowisku guza.

Przeprowadzone badania były finansowane z grantu: KBN N N407038537 oraz KBN N407114036. Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Zgoda Komisji Bioetycznej na projekt „Ocena komórek Th17 u pacjentek z rakiem jajnika” – Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie, Al. Raclawickie 1, nr zgody KE-0254 /150/2011

Piśmiennictwo

1. Bednarek W, Mazurek M, Cwiklińska A, Baczyński B. Ekspresja wybranych markerów i modulatorów angiogenezy u chorych na raka jajnika w okresie przed-, około- i pomenopauzalnym. *Ginekol Pol.* 2009, 80, 93-98.
2. Prat J, Ribe A, Gallardo A. Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol.* 2005, 36, 861-870.
3. Harrington L, Hatton R, Mangan P, [et al.]. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005, 6, 1123-1132.
4. Yao Z, Painter S, Fanslow W, [et al.]. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol.* 1995, 155, 5483-5486.
5. Paradowska A, Maśliński W, Grzybowska-Kowalczyk A, Łacki J. The function of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007, 55, 329-334.
6. Kolls J, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004, 21, 467-476.
7. Bryant V, Ma C, Avery D, [et al.]. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol.* 2007, 179, 8180-8190.
8. Anderson C, Oukka M, Kuchroo V, Sacks D. CD4+CD25-Foxp3-Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 2007, 204, 285-297.
9. Acosta-Rodriguez E, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukin 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 2007, 8, 942-949.
10. Zhou L, Lopes J, Chong M, [et al.]. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma1 function. *Nature.* 2008, 453, 236-240.
11. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther.* 2008, 10, 206.
12. Acosta-Rodriguez E, Rivino L, Geginat J, [et al.]. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007, 6, 639-646.
13. Fontenot J, Rasmussen J, Williams L, [et al.]. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005, 22, 329-341.
14. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, [et al.]. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood.* 2009, 114, 1141-1149.
15. Kondo T, Takata H, Matsuki F, Takiguchi M. Cutting Edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol.* 2009, 182, 1794-1798.
16. Yen H, Harris T, Wada S, [et al.]. Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J Immunol.* 2009, 183, 7161-7168.
17. Kryczek I, Wei S, Zou L, [et al.]. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol.* 2007, 178, 6730-6733.
18. Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, [et al.]. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2008, 105, 11505-11510.
19. Kato T, Furumoto H, Ogura T, [et al.]. Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 282, 735-738.
20. Wu C, Wang S, Wang F, [et al.]. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol.* 2009, 158, 199-204.
21. Su X, Hsueh E, Zhang Y, [et al.]. Tumor Microenvironments Direct the Recruitment and Expansion of Human Th17 Cells. *J Immunol.* 2010, 184, 1630-1641.
22. Zhang B, Rong G, Wei H, [et al.]. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, 374, 533-537.
23. Zhang J, Yau J, Xu J, [et al.]. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol.* 2009, 50, 980-989.
24. He S, Fei M, Wu Y, [et al.]. Distribution and clinical significance of Th17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients. *Int J Mol Sci.* 2011, 11, 7424-7437.