

● 基礎

T細胞の免疫疲弊と免疫チェックポイント分子

榮川 伸吾* 鶴殿 平一郎**

要 旨

T細胞疲弊とは、抗原特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）における段階的な機能低下の過程である。疲弊過程においてCTL上には免疫チェックポイント分子（疲弊分子）が発現される。疲弊による抗原特異的なCTLの機能喪失の制御は、感染症やがんの治療に非常に重要である。2013年、進行性悪性黒色腫患者において抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体（免疫チェックポイント分子阻害抗体）による抗体療法により劇的な腫瘍縮小効果があると報告された。近年ではT細胞疲弊のさらなる理解として、疲弊の分子メカニズムについて記憶細胞の分化や免疫代謝（immune metabolism）の観点からも研究が盛んに行われている。細胞レベルの代謝調節は、新たな疲弊制御法の確立に直結する可能性を秘めている。

免疫疲弊とは

T細胞疲弊（T-cell exhaustion）の概念は、慢性リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）感染マウスにおけるウイルス抗原特異的なCTLの機能喪失により提唱された¹⁾。感染病原体の排除後、T細胞は記憶T細胞へと分化する。記憶T細胞は、病原体由来の抗原の体内への再侵入時に、即座に病原体を除去することが可能なエフェクター細胞に分化する。記憶T細胞は、抗原による刺激がなくても長期間生存する特徴を獲得する²⁾。

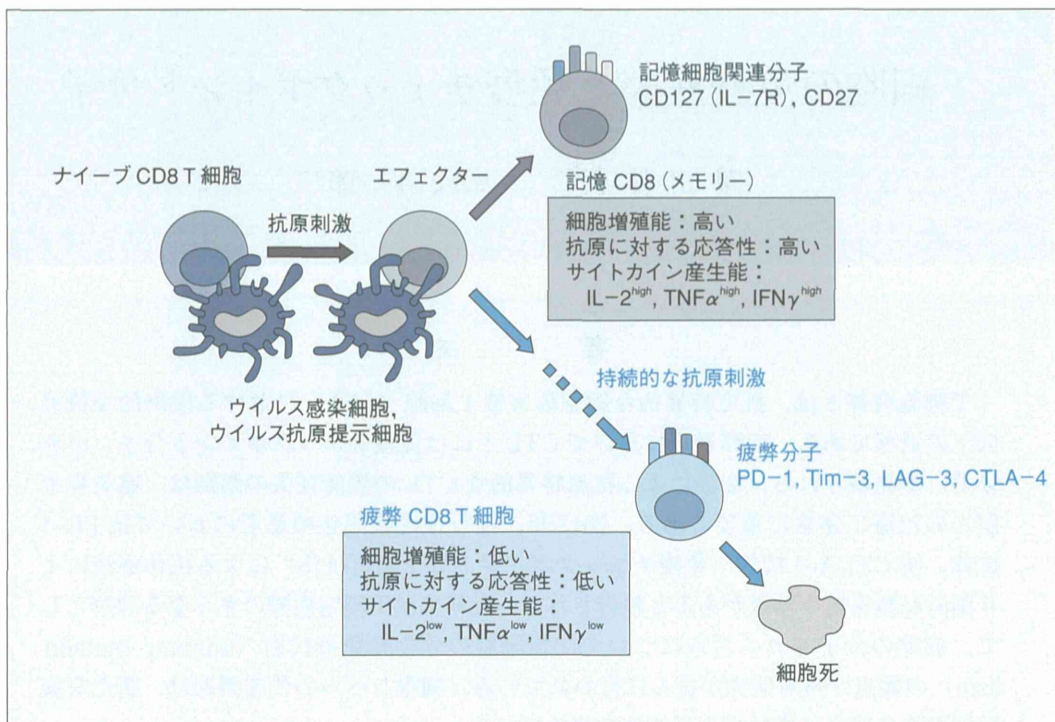
疲弊CD8 T細胞は、慢性型LCMV感染

のマウス実験モデルにおけるウイルス特異的なCD8 T細胞のサイトカイン産生能喪失により同定された¹⁾。疲弊における機能喪失には段階がある。初期段階として、抗原特異的なCD8 T細胞においてIL-2産生能、細胞分裂能、標的細胞に対する細胞傷害性が失われ、中間段階としてはTNF α の産生能が失われる。最終段階ではIFN γ の産生能が失われ、アポトーシスにより死滅する³⁾（図1）。この段階的な機能低下の中、疲弊CD8 T細胞上にはprogrammed death-1（PD-1）、cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4（CTLA-4）、T cell immunoglobulin mucin 3（Tim-3）、lymphocyte activation gene-3（LAG-3）などの免疫チェックポイント分子（疲弊分子）が発現される。これら疲弊分子とそのリガンドの結合により、さらにT細胞は疲弊に陥る。疲弊が進むと、ナイーブマー

* 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
病態制御科学専攻 腫瘍制御学講座 免疫学分野
** 同 教授

キーワード：CD8 T細胞，免疫疲弊，免疫代謝，
がん

図1 ウイルス感染におけるT細胞疲弊



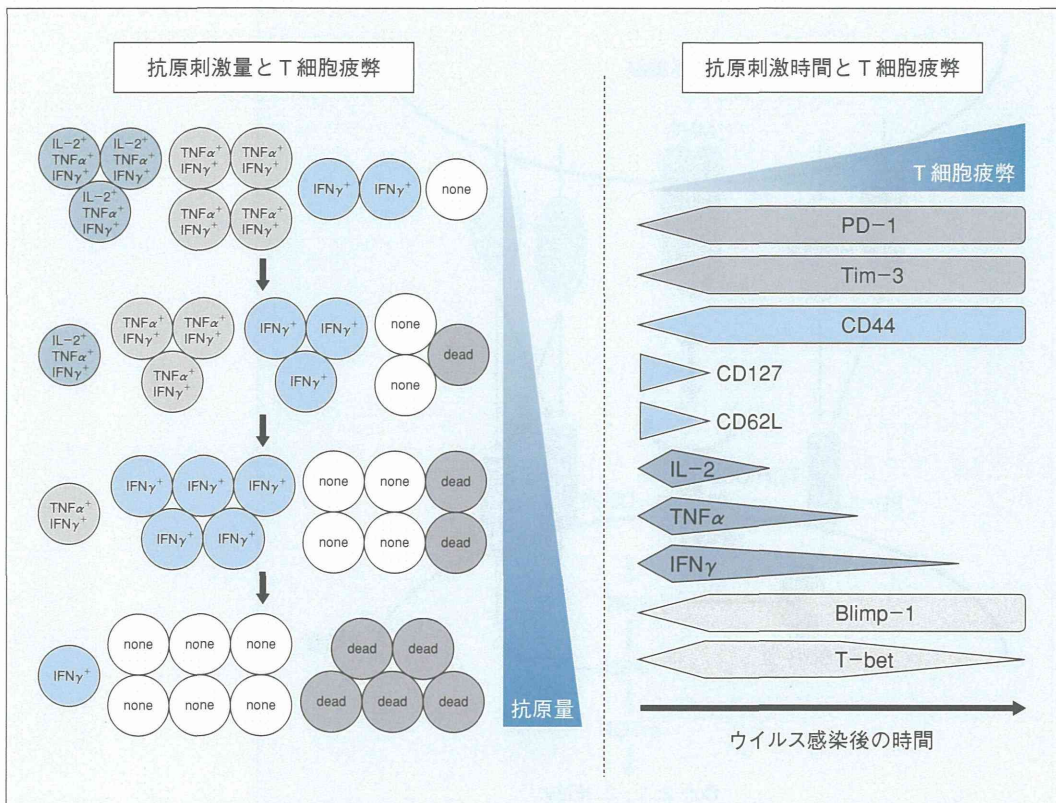
略語：巻末の「今月の略語」参照

カー (CD62L) や記憶T細胞の形成に重要なサイトカイン IL-7 の受容体 (CD127) が低下し, 分化マーカー (CD44) が発現上昇する. 疲弊T細胞には転写因子 Blimp-1⁴⁾ が高発現し, 疲弊後期では T-bet⁵⁾ が低下する (図2右). 疲弊 CD8 T細胞は, サイトカイン産生能低下, 長期間生存できない, 疲弊分子を発現しているという記憶T細胞とは全く逆の性質により, 機能的なT細胞と明確に分別される. また, ウイルス感染マウス体内の CD8 T細胞が認識する抗原量 (ウイルス量) および CD8 T細胞が受ける抗原刺激時間と疲弊 CD8 T細胞の誘導は相関する (図2左). このことは, 抗原を認識する CD8 T細胞の T細胞受容体 (TCR) のシグナル強度と CD8 T細胞の疲弊が非常に密接な関係にあることを意味する⁶⁾.

PD-1 による負の制御

PD-1 (CD279) は, 1992年に細胞死が誘導されたT細胞ハイブリドマにおいて発現上昇する遺伝子として同定された⁷⁾. 1999年には, *Pdcd1* (PD-1をコードする遺伝子) 欠損マウスでは自己免疫が起こることにより, 免疫系においてPD-1が重要な負の調節因子であることが明らかとなった⁸⁾⁹⁾. PD-1のリガンドPD-L1 (CD274), PD-L2 (CD273) は2000~2001年に同定された. PD-1はT, B, NK T細胞, 単球, 樹状細胞などに発現が確認されており, ナীব (抗原に感作されていない) 細胞には発現しない. PD-1はT細胞の抗原認識時に速やかに細胞表面上に発現上昇する. PD-L1, PD-L2はT, B細胞, 樹状細胞, マクロファージ, 間葉系幹細胞, 骨髄由来肥満細胞¹⁰⁾などに定常的に発現している.

図2 抗原刺激量および抗原刺激時間とT細胞疲弊



略語：巻末の「今月の略語」参照

また非造血細胞においても広く発現しており、特にタイプ 1, 2 IFN の刺激による活性化後に発現が確認されている¹¹⁾。

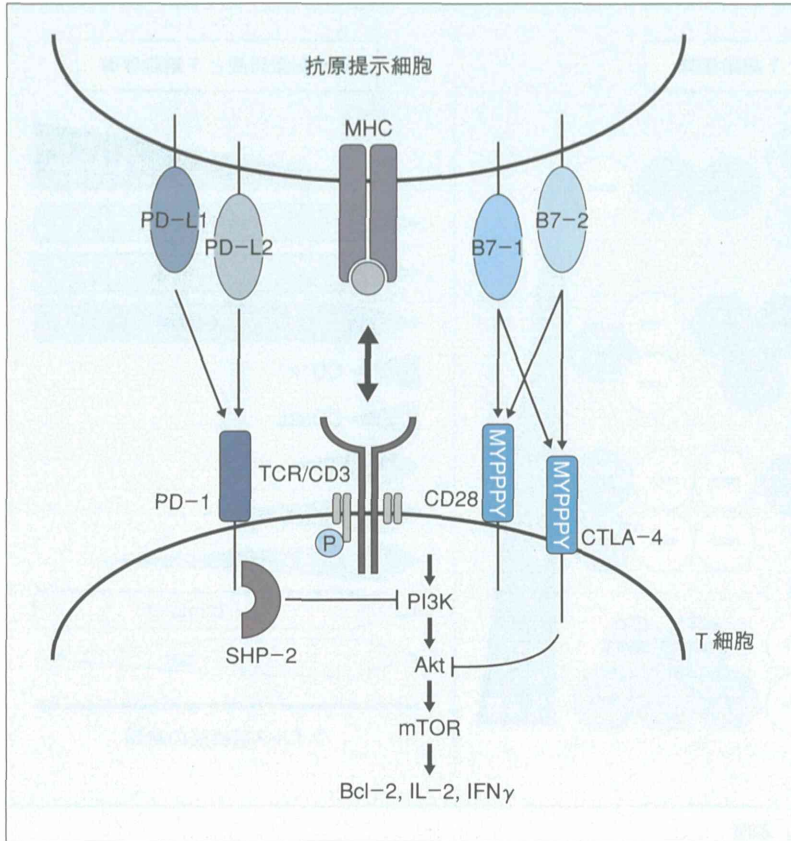
PD-1 は、リガンドである PD-L1, PD-L2 と結合して T 細胞機能を負に調節する。主な作用は、IL-2, TNF α , IFN γ といったサイトカイン産生を抑制することである。T 細胞の抗原認識時には、TCR と抗原 + MHC 複合体の結合および共刺激分子 CD28 と B7 分子の結合により PI3K-Akt-mTOR シグナルが伝達され、サイトカイン産生が誘導される。PD-1 は膜貫通ドメインに immuno-receptor tyrosine inhibitory motif (ITIM) 配列を有しており、ITIM にはアダプタータンパク質 SHP-2 が結合している。PD-1 とリガンドとの結合により、SHP-2 が ZAP70/CD3 ζ (TCR

シグナルを仲介) のリン酸化を阻害し、PI3K の活性を抑制して TCR シグナルの downstream を負に制御する¹²⁾。その結果、サイトカイン産生が抑制される (図 3)。

CTLA-4 による負の制御

CTLA-4 (CD152) は共刺激分子 CD28 の構造的ホモログであり、1987 年に CTL の機能に非常に重要な因子であると報告された¹³⁾。CTLA-4 は制御性 T 細胞 (Treg) や活性化した T 細胞上において発現される。CTLA-4 および CD28 は、抗原提示細胞などに発現する B7-1 (CD80) および B7-2 (CD86) に結合するために重要な MYPPY モチーフを同様に有している。CTLA-4 は、B7 に対する結合親和性が非常に高いため、CD28-B7 の

図3 PD-1, CTLA-4 分子による TCR シグナルの負の制御



略語：巻末の「今月の略語」参照

共刺激シグナルを阻害するとともに TCR のシグナルを阻害 (Aktリン酸化阻害)¹⁴⁾ することで、活性化した T 細胞の機能を抑制する (図 3)。

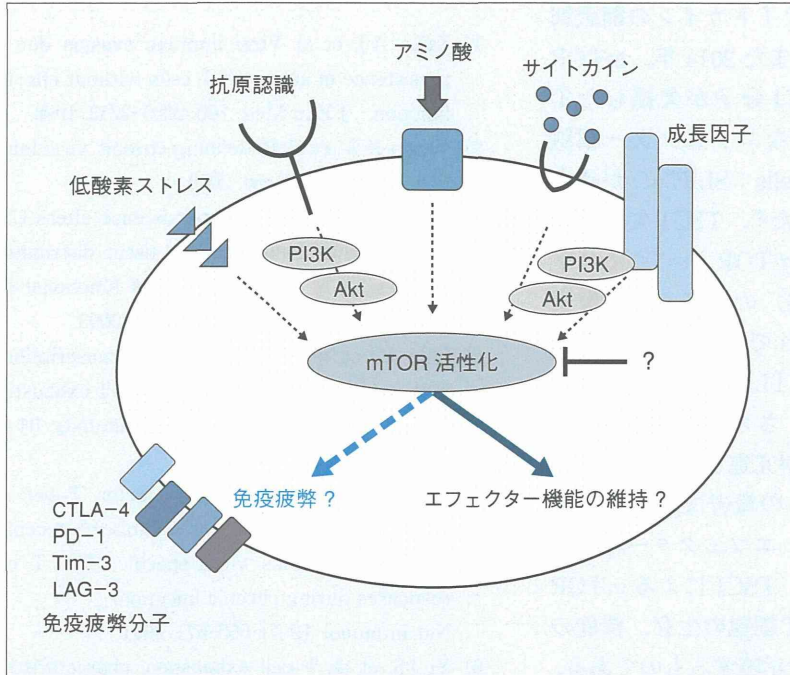
CTLA-4 ノックアウトマウスではリンパ増殖性疾患が誘発される¹⁵⁾。このマウスでは生後 5~6 日目で T 細胞の活性化が観察され、生後 18~28 日には活性化したリンパ球の非リンパ組織への浸潤が起こり死に至る。CTLA-4 が欠損した T 細胞は活性化の表現型 (CD69⁺, CD25⁺, CD44^{hi}, CD45RB^{lo}, CD62L^{lo}) を示し¹⁵⁾、非常に増殖能が高い。また、CTLA-4 欠損 T 細胞では IL-2, 4, 6 などのサイトカイン産生能も上昇する。以上より、CTLA-4 は末梢の T 細胞の寛容、ホメオスタシスにも非

常に重要な分子であると言える。

がんにおける CD8 T 細胞疲弊について

疲弊 CD8 T 細胞の制御は、がん治療において非常に重要である。2013 年、進行性悪性黒色腫患者において、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体併用により劇的な腫瘍縮小効果があると報告された¹⁶⁾。がん患者では疲弊 CD8 T 細胞が多く存在するが、疲弊分子阻害抗体により喪失した機能が回復し、再び抗腫瘍応答を発揮することが明らかになったわけである。しかしながら、全身的な T 細胞活性化による自己免疫疾患の発症などの副作用も危惧されている。また、疲弊分子は PD-1, CTLA-4 をはじめ LAG-3, Tim-3, CD244,

図4 腫瘍環境下のT細胞疲弊ストレスと代謝制御による機能回復



略語：巻末の「今月の略語」参照

CD160と数多く存在する¹⁷⁾。疲弊段階が進むと、複数種類の疲弊分子が抗原特異的なCD8 T細胞に同時に発現する¹⁷⁾。これらすべての疲弊分子をそれぞれの特異的抗体で制御することは、非常に困難であると予想される。

腫瘍局所では、がん細胞から分泌される免疫抑制因子、疲弊分子のリガンド、微小環境内に存在するさまざまな細胞から産生されるサイトカインの刺激や、がん抗原によるTCR刺激、Tregなどの抑制制御、腫瘍環境特有の低酸素ストレスなど、腫瘍浸潤CD8 T細胞を疲弊させる要因は多岐にわたる。腫瘍局所のT細胞疲弊の分子メカニズムの解明は、T細胞疲弊の根本的な制御につながる可能性がある。

T細胞免疫疲弊と細胞代謝

「免疫疲弊とは」の項において、T細胞疲弊と抗原認識、TCRシグナルには密接な関係が

あるということを述べた。TCRのシグナル下流にはPI3K-Akt-mTOR経路が存在する。mTORはさまざまな代謝経路を調節するエネルギーセンサーの役割を果たし、代謝調節はT細胞の活性化、分化、増殖に必須であると考えられている¹⁸⁾。近年、mTORの特異的阻害薬であるラパマイシンを用いた研究により、mTORシグナル下流においてIRF4分子がエフェクター細胞の誘導に重要な転写因子であることが明らかにされた¹⁹⁾。mTOR-IRF4は、TCRシグナルの強度依存的にさまざまな転写因子や代謝関連因子を誘導する。TCRのシグナルが強い場合、IRF4の発現が上昇し、T-bet、Blimp-1などのエフェクター細胞を誘導する転写因子の発現を上昇させ、エフェクター細胞を誘導する¹⁹⁾。この際、IRF4はまた、糖代謝関連因子を調節する転写因子HIF1 α の発現を誘導²⁰⁾し、T細胞膜上のグルコーストランスポーターGlutや糖代

謝に必要な酵素の発現を上昇させる²⁰⁾。これら酵素は IFN γ などのサイトカインの翻訳制御にも関与している²¹⁾。また 2014 年, mTOR の活性を調節する TSC1 分子が欠損した T 細胞では, 非常に短命なエフェクター細胞 (short-lived effector cells : SLECs) が誘導されることが報告された²²⁾。TSC1 欠損 T 細胞では, PI3K-Akt-mTOR (mTOR の下流のリン酸化 S6 を指標) のシグナルが野生型の T 細胞より誘導されている。TSC1 欠損 T 細胞では Tim-3 や CTLA-4 などの疲弊分子の発現も上昇する²²⁾。さらに細胞の酸素消費量が増大し, 解糖系が亢進されていることが明らかにされた²²⁾。この報告は, TCR シグナルは T 細胞の活性化, エフェクター細胞への分化に重要であるが, TSC1 による mTOR の調節がエフェクター T 細胞の生存, 機能の維持に重要であることを示唆するものである。

腫瘍環境下では, 炎症, 低酸素ストレスやがん抗原刺激により, T 細胞において PI3K-Akt-mTOR シグナルの誘導が予想される (図 4)。腫瘍局所環境下でのこれら経路の制御や解凍系の調節は, 腫瘍組織に浸潤した T 細胞の疲弊制御, 機能維持に重要であると考えられる。

おわりに

免疫疲弊の制御はがん治療において重要である。その制御法としては抗体による制御が主になると思われるが, 副作用からまた別のアプローチを考える必要もあるかもしれない。代謝関連因子制御による疲弊 T 細胞の機能調節は, 根本的な治療法となり得る可能性を秘めている。将来的にはこれら疲弊 T 細胞の機能制御と, がんワクチンなどの免疫増強法, 腫瘍そのものを抑制する分子標的薬との併用療法により, より効果的ながん治療になり得るのではないかと考えられる。

文 献

- 1) Zajac A J, et al: Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188: 2205-2213, 1998.
- 2) Virgin H W, et al: Redefining chronic viral infection. *Cell* 138: 30-50, 2009.
- 3) Wherry E J, et al: Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 77: 4911-4927, 2003.
- 4) Shin H, et al: A role for the transcriptional repressor Blimp-1 in CD8(+) T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 31 (2): 309-320, 2009.
- 5) Kao C, et al: Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8⁺ T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol* 12 (7): 663-671, 2011.
- 6) Yi J S, et al: T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology* 129 (4): 474-481, 2010.
- 7) Ishida Y, et al: Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11: 3887-3895, 1992.
- 8) Nishimura H, et al: Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11: 141-151, 1999.
- 9) Nishimura H, et al: Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291: 319-322, 2001.
- 10) Yamazaki T, et al: Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169: 5538-5545, 2002.
- 11) Schreiner B, et al: Interferon- β enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 155: 172-182, 2004.
- 12) Sheppard K A, et al: PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/

- CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* **574** (1-3): 37-41, 2004.
- 13) Brunet JF, et al: A new member of the immunoglobulin superfamily CTLA-4. *Nature* **328**: 267-270, 1987.
- 14) Parry RV, et al: CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* **25** (21): 9543-9553, 2005.
- 15) Tivol EA, et al: Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**: 541-547, 1995.
- 16) Wolchok JD, et al: Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* **369** (2): 122-133, 2013.
- 17) Baitsch L, et al: Exhaustion of tumor-specific CD8⁺ T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest* **121** (6): 2350-2360, 2011.
- 18) Araki K, et al: mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* **460** (7251): 108-112, 2009.
- 19) Yao S, et al: Interferon regulatory factor 4 sustains CD8(+) T cell expansion and effector differentiation. *Immunity* **39** (5): 833-845, 2013.
- 20) Doedens AL, et al: Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol* **14** (11): 1173-1182, 2013.
- 21) Chang CH, et al: Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* **153** (6): 1239-1251, 2013.
- 22) Shrestha S, et al: Tsc1 promotes the differentiation of memory CD8⁺ T cells via orchestrating the transcriptional and metabolic programs. *Proc Natl Acad Sci USA* **111** (41): 14858-14863, 2014.

T Cell Exhaustion and Imm checkpoints Molecules

Shingo Eikawa, Heiichiro Udono

Department of Immunology, Okayama University Graduate School of
Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Review Article

Immunotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcomas

**Takenori Uehara,^{1,2} Tomohiro Fujiwara,^{1,3} Ken Takeda,^{1,4} Toshiyuki Kunisada,^{1,5}
Toshifumi Ozaki,¹ and Heiichiro Udono²**

¹Department of Orthopaedic Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan

²Department of Immunology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan

³Center of Innovative Medicine, Okayama University Hospital, Okayama 700-8558, Japan

⁴Department of Intelligent Orthopaedic System, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan

⁵Department of Medical Materials for Musculoskeletal Reconstruction, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan

Correspondence should be addressed to Heiichiro Udono; udono@cc.okayama-u.ac.jp

Received 25 July 2014; Accepted 13 November 2014

Academic Editor: Mohammad Owais

Copyright © Takenori Uehara et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Although multimodal therapies including surgery, chemotherapy, and radiotherapy have improved clinical outcomes of patients with bone and soft tissue sarcomas, the prognosis of patients has plateaued over these 20 years. Immunotherapies have shown the effectiveness for several types of advanced tumors. Immunotherapies, such as cytokine therapies, vaccinations, and adoptive cell transfers, have also been investigated for bone and soft tissue sarcomas. Cytokine therapies with interleukin-2 or interferons have limited efficacy because of their cytotoxicities. Liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (L-MTP-PE), an activator of the innate immune system, has been approved as adjuvant therapeutics in combination with conventional chemotherapy in Europe, which has improved the 5-year overall survival of patients. Vaccinations and transfer of T cells transduced to express chimeric antigen receptors have shown some efficacy for sarcomas. Ipilimumab and nivolumab are monoclonal antibodies designed to inhibit immune checkpoint mechanisms. These antibodies have recently been shown to be effective for patients with melanoma and also investigated for patients with sarcomas. In this review, we provide an overview of various trials of immunotherapies for bone and soft tissue sarcomas, and discuss their potential as adjuvant therapies in combination with conventional therapies.

1. Introduction

Sarcomas are malignant tumors of mesenchymal origin, including bones, muscles, fat, nerves, and blood vessels. According to the Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) database, prevalence of sarcoma accounts for nearly 21% of all pediatric solid malignant tumors and less than 1% of all adult solid malignant tumors [1]. It was estimated that approximately 11,400 Americans would be diagnosed with soft tissue sarcomas and 3,000 with bone sarcoma in 2013 [2]. Based on the survival data obtained from the National Cancer Data Base of the American College of Surgeons, the relative 5-year survival rate is approximately 66% for patients with bone and soft tissue sarcomas, 53.9% for osteosarcomas ($n = 8,104$),

75.2% for chondrosarcoma ($n = 6,476$), and 50.6% for Ewing's sarcomas ($n = 3,225$) [3]. According to the classification by the World Health Organization, the group of bone and soft tissue sarcomas includes more than 100 histological subtypes [4]. The prognosis of patients with bone and soft tissue sarcomas is associated with histological diagnoses [5]. Standard treatment modalities include surgical resection, chemotherapy, and often radiotherapy [6–8]. Despite these multimodality therapies, survival rates have not been improved over recent 20 years [9]. Therefore, new effective treatment over conventional therapy is urgently needed.

Historically, Coley reported a case of unresectable small-cell sarcoma of the neck in 1891. The sarcoma completely regressed after a severe episode of erysipelas. He reported

that a systemic response against erysipelas influenced the patient's tumor [10]. The mechanism by which erysipelas caused tumor regression was unclear at that time. However, it is now understood that the activation of innate immunity through Toll-like receptors (TLRs) by erysipelas followed by activation of acquired immunity specific to sarcoma may contribute to the underlying mechanism [11]. Thus, the case described by Coley was the first to demonstrate that the immune system is involved in the spontaneous regression of sarcomas. Over the past 100 years, his work had encouraged many scientists to work on cancer immunology, in an attempt to find a cure for cancers [12, 13].

The dissection of the molecular mechanisms of innate and acquired immunity has enabled medical doctors and scientists to apply various cancer immunotherapies such as vaccines, antibodies, adjuvants, and cell therapies [29–31]. Utilizing modern cancer immunotherapies for patients with sarcomas began in the 1980s as a cytokine therapy [32, 33], and more recently antigen-specific cancer vaccines and/or cell therapies have been developed [34, 35].

2. Overview of Cancer Immunology

2.1. Immune System Overview. Knowledge about the immune system is essential for understanding the principles underpinning cancer immunotherapy. There are two types of immune responses against microbes: called innate and adaptive immunity [36]. Innate immunity, whose main components are phagocytic cells (neutrophils and macrophages) and natural killer cells, provides the initial defense against invading microbes during infection [37, 38]. Small molecular proteins called cytokines mediate many activities of the cells involved in innate immunity. In addition to cytokines, pattern recognition molecules such as TLRs expressed on dendritic cells (DCs) and macrophages play critical roles in the activation of innate immunity. These components also have a role in communicating with acquired (adaptive) immunity [39, 40]. The key components of adaptive immunity, following the initial innate immunity, are T and B lymphocytes. The lymphocytes play a central role in eliminating infectious pathogens, virus infected cells, and cancer cells and also in generating antigen-specific memory cells [37].

Adaptive immunity consists of humoral and cell-mediated immunity. T lymphocytes recognize short peptides as antigens presented by major histocompatibility complexes (MHCs) on the cell surface of DCs [41, 42]. CD8 and CD4 T cells recognize antigen in the context of MHC class I and class II molecules, respectively [43, 44]. Primed and activated T cells differentiate into mature effector cells while undergoing clonal expansion. The effector CD8 T cells recognize virus infected cells and tumor cells and eliminate them from the body. The differentiation of naïve CD8 T cells into effector and memory CD8 T cells is mediated by the “help” of CD4 T cells or by a stimulation of TLRs of DC [43–45]. “Help” means signals occurring within DCs whose CD40 interacts with CD40L of CD4 T cells to express large amounts of CD80/86 to interact with CD28 of CD8 T cells [46–48]. Signals from either CD40 or TLRs activate DCs,

and this process then initiates the activation of naïve CD8 T cells following antigen recognition [49].

DCs, B cells, and macrophages are professional antigen-presenting cells (APCs) [50, 51]. Among them, DCs are the most effective APCs [51, 52]. For example, B cells and macrophages present endogenous and internalized exogenous antigens with MHC class I and class II molecules [53], respectively. Therefore, B cells and macrophages can only activate CD4 T cells when they internalize extracellular antigens [54]. On the other hand, DCs are able to process both endogenous and exogenous antigens with MHC class I molecules to activate CD8 T cells. This is referred to as cross-presentation and is essential in fighting against virus infected cells and tumor cells [55–57].

2.2. Tumor Immunology and Immune Checkpoint. Tumor antigens recognized by the immune system are categorized into cancer testis antigens (CTAs), melanocyte differentiation antigens, mutated proteins, overexpressed proteins, and viral antigens [58] (Figure 1). Several types of CTAs have been identified in patients with sarcomas (Table 1). Because tumor antigens are potential targets that induce cytotoxic immune responses [59], many clinical trials have utilized tumor antigens as vaccines for decades. The results, however, are limited and the desired therapeutic effect is not achieved [60, 61].

Although antitumor immunity is induced in patients with cancer vaccines, recent advancements in cancer immunity have revealed the presence of immune-inhibitory mechanisms, referred to as immune checkpoints [62], in the draining of lymph nodes and tumor sites. CTLA-4, a protein receptor expressed on T cells, downregulates T cell activation [63]. The structure of CTLA-4 is similar to CD28, with a T cell costimulatory receptor. Immune inhibition is caused by the competition between CD28 and CTLA-4 to bind CD80/86 on DCs [64]. Regulatory T cells (Tregs) that define CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells highly express CTLA-4 and suppress the activation of cytotoxic lymphocytes [65]. The inhibition of activated T cells via CTLA-4 occurs particularly within draining lymph nodes [66]. Programmed cell death protein 1 (PD1) is also an immune checkpoint receptor expressed on T cells, particularly cytotoxic lymphocytes [67, 68]. Tumor cells upregulate the expression of PD-ligand 1 (PD-L1), and the interaction of PD1 with PD-L1 downregulates the function of T cells within the tumor microenvironment [69, 70]. The immune checkpoint is therefore considered to be an important therapeutic target. Anti-CTLA-4 and anti-PD1 antibodies have been introduced for clinical use in some cancers [71]. In addition to CTLA4 and PD-1, there are similar cell surface molecules of activated effector T cells, such as Tim-3 and LAG3, that suppress tumor immunity [72]. Inflammation in the tumor microenvironment induces STAT3 activation within tumors and Tregs. In contrast, STAT3 in certain tumors is constitutively activated by genetic alterations [73, 74]. STAT3 activation leads tumor cells and Tregs to express molecules that are related to immune checkpoints, such as PD-L1, and eventually inhibit T cell function [75, 76].

TABLE 1: Cancer testis antigens in bone and soft tissue sarcomas.

Sarcoma subtypes	Expression of cancer testis antigens						
	NY-ESO	LAGE	MAGE-A3	MAGE-A4	MAGE-A9	PRAME	SSX-2
Bone sarcomas							
Osteosarcoma [14]	+	+	+	+			
Ewing's sarcoma [14]	+	+	+	+			
Chondrosarcoma [14]	+	+	+	+			
Soft tissue sarcomas							
Synovial sarcoma [15]	+	+	+	+	+	+	+
Malignant fibrous histiocytoma, pleomorphic spindle cell sarcoma [15]	+	+	+			+	+
Liposarcoma [15]	+	+	+	+	+		+
Leiomyosarcoma [15]		+	+	+	+	+	

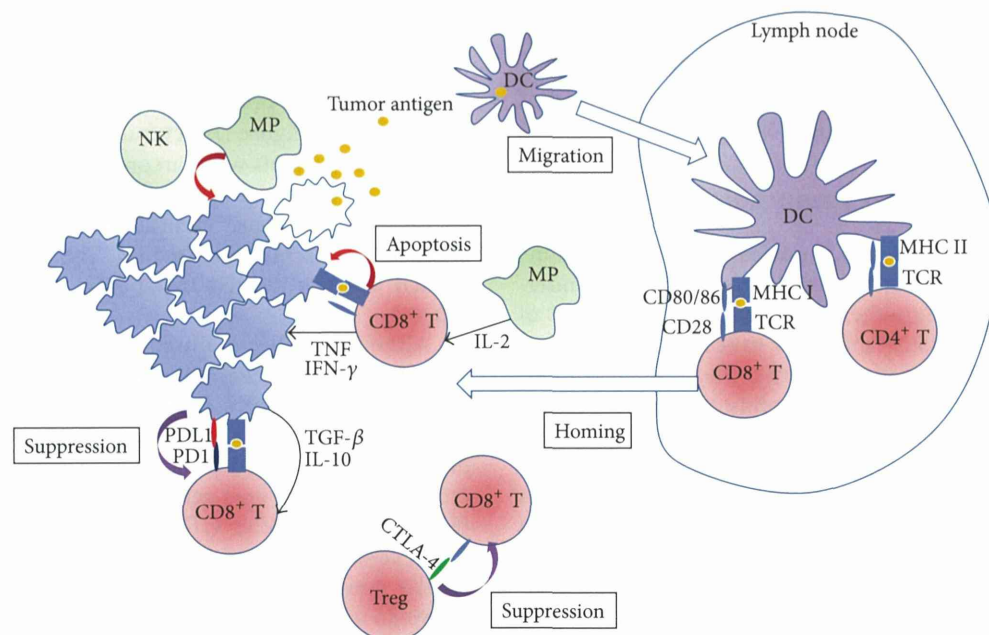


FIGURE 1: An overview of tumor immunology. Tumor cells are initially attacked by the innate immune system. DCs capture tumor antigens at the tumor site and migrate to the tumor draining lymph nodes. DCs present the tumor antigen to T cells within the lymph node. Antigen-specific CD4 and CD8 T cells are stimulated by DCs. After stimulation, T cells differentiate into effector cells and activate at the tumor site. Effector CD8 T cells kill tumor cells, although their function is regulated by the immune checkpoint mechanism. NK: natural killer cell; MP: macrophage; DC: dendritic cell.

3. Outcomes of Clinical Trials for Bone and Soft Tissue Sarcomas

Treatments for bone and soft tissue sarcomas include surgery, chemotherapy, and radiotherapy. To date, clinical results of combined therapies have been more successful than those of surgical approaches. However, as described above, the prognosis of bone and soft tissue sarcomas has plateaued since the 1990s. In these recent years, immunotherapies are expected to further improve the prognosis of patients, and several clinical trials have been performed (Tables 2 and 3).

3.1. *Cytokine Therapies.* Cytokines are proteins that regulate the immune system. Interleukin-2 (IL-2) and interferons (IFNs) have been used in the immunotherapy for sarcomas

[77], and clinical results are evident. IL-2 leads to the activation and expansion of CD4 and CD8 T cells [78]. Rosenberg et al. established a tumor regression model involving recombinant IL-2 injection for murine melanoma and sarcomas [32]. Then, several studies described the effectiveness of high-dose IL-2 therapy for patients with metastatic melanomas [79, 80]. Therefore, recombinant IL-2 was administered to patients with bone and soft tissue sarcomas [16]. Schwinger et al. reported a positive clinical result using a high-dose IL-2 treatment in two patients with Ewing's sarcomas and four patients with metastatic osteosarcomas. Patients had already been treated with surgery (1–5 times), chemotherapy (7–43 cycles), and radiation therapy (for patients with Ewing's sarcoma). Although one patient with metastatic osteosarcoma progressed during the treatment period, two patients with