



李斌, 博士, 二级研究员, 上海市免疫学研究所课题组长、余灏学者、上海交通大学特聘教授。李斌博士长期从事免疫调节及重大免疫相关疾病如自身免疫病、过敏性疾病及恶性肿瘤相关基础及其临床应用研究。近五年, 主持国家自然科学基金重点及面上项目和国家杰出青年科学基金等基金。近五年, 李斌课题组在国际学术刊物 *Immunity*、*PNAS*、*Nat Commun*、*JBC*、*J Immunol Cutting Edge*、*PLoS Pathogens*、*JCEM*、*Front Immunol*、*Br J Pharmacol* 等发表通讯及共同通讯论文40余篇, 在 *Blood*、*Sci Immunol*、*PNAS*、*Nat Commun*、*J Exp Med*、*Cell Res* 等发表合作论文10余篇, 受邀Springer Press主编免疫代谢与肿瘤英文书籍1部, 致力于研究调节性T细胞稳定性的动态调控及其临床应用。

<http://sii.shsmu.edu.cn/DetailMemberInfo.php?pid=6&cid=22&num=22&id=60>

## 免疫微环境介导的肿瘤耐受机制及其靶向治疗

刘鑫男 李丹 李斌\*

(上海交通大学医学院上海市免疫学研究所, 上海 200025)

**摘要** 肿瘤微环境是肿瘤细胞赖以生存的特殊环境, 包括肿瘤间质、邻近细胞、血管周边多种免疫细胞和免疫相关介质等组分。肿瘤微环境中各个组分的变化对肿瘤生长、侵袭、转移以及肿瘤的免疫耐受都产生了重要的影响。肿瘤免疫治疗是继放疗、化疗和手术治疗之后的第四种有效的治疗方法。但是大量的临床研究证实, 肿瘤免疫疗法的临床治疗效果会受到肿瘤免疫微环境的影响。深入研究肿瘤微环境可以为肿瘤免疫疗法提供新的靶点, 避免现有免疫疗法的免疫耐受现象, 并为个性化精准医疗提供可能。该综述总结了肿瘤微环境对肿瘤免疫治疗的影响, 旨在提出以免疫微环境为靶点的肿瘤免疫治疗新策略。

**关键词** 肿瘤微环境; 免疫耐受; 肿瘤免疫治疗; Treg

## Tumor Immune Microenvironment: Challenge and Also the New Target of the Anti-Tumor Therapy

Liu Xinnan, Li Dan, Li Bin\*

(Shanghai Institute of Immunology, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract** The tumor microenvironment is a special place for the living of tumor cells, consists of tumor mesenchyme, adjacent cells, blood vessels-various immune cells cytokines and chemokines. Changes in the components of tumor microenvironment may have an important impact on tumor growth, invasion, metastasis, and anti-tumor immune tolerance. Tumor immunotherapy is recently identified as an effective anti-tumor treatment

国家杰出青年科学基金(批准号: 31525008)、国家自然科学基金重点项目(批准号: 81830051)和国家自然科学基金面上项目(批准号: 31670911)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-63846590-776783, E-mail: binli@shsmu.edu.cn

This work was supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (Grant No.31525008) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81830051, 31670911)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-63846590-776783, E-mail: binli@shsmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-01-17 16:32:42

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190117.1632.006.html>

after radiotherapy, chemotherapy and surgery. Many clinical studies have confirmed that the clinical therapeutic effect of tumor immunotherapy would be affected by the tumor immune microenvironment. Therefore, targeting tumor microenvironment could provide a new strategy for tumor immunotherapy to avoid the immune tolerance of existing immunotherapy, and provide therapeutic opportunities for personalized precision medicine. This review summarizes the impact of tumor microenvironment dynamics on tumor immunotherapy and aims to propose new anti-tumor therapeutic strategies by targeting immune microenvironment.

**Keywords** tumor microenvironment; immune tolerance; tumor immunotherapy; regulatory T cell

如果肿瘤是一个独立器官,我们要考虑的不仅仅是肿瘤细胞的基因突变,还要考虑发生遗传变异的肿瘤细胞对组织微环境的适应性。肿瘤免疫疗法通过激活免疫细胞对癌细胞的杀伤作用,近些年来成为继放疗、化疗、手术之后第四种有效的癌症治疗方法<sup>[1]</sup>。特别是免疫检查点疗法近年来取得突破性进展,2018年也获得了诺贝尔生理或医学奖,相关抗体药物不断获批上市用于治疗救人,为肿瘤临床治疗提供了新的契机。与常规的肿瘤疗法相比,肿瘤免疫疗法主要针对免疫系统或肿瘤微环境而非肿瘤细胞本身,并且可以在联合治疗中很好地诱导抗肿瘤的协同作用<sup>[2]</sup>。然而,现阶段肿瘤免疫疗法的疗效具有局限性,常常仅针对部分患者具有明显治疗效果,临床治疗结果存在显著的个体差异。越来越多的证据表明,肿瘤免疫治疗效果的差异性往往可以归因于肿瘤微环境的异质性<sup>[3]</sup>。我们常说的肿瘤微环境由肿瘤细胞、肿瘤浸润性免疫细胞、癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)、肿瘤血管系统和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)构成<sup>[4]</sup>。它们共同促进肿瘤生长、转化及侵袭,保护肿瘤细胞逃避宿主的免疫监视,导致肿瘤对于某些免疫疗法产生抗性并为肿瘤休眠以及转移提供基础<sup>[5]</sup>。此外,恶性肿瘤的存在引发机体一系列生理变化,这些变化可以改变肿瘤微环境使得微环境更利于肿瘤细胞生存、增殖。最新研究发现,免疫微环境可直接或间接地影响肿瘤发生发展。其机理包括促进肿瘤血管生成、改变肿瘤生物学特性、筛选出适应微环境的肿瘤细胞存活,或通过建立适宜的肿瘤微环境从而促进肿瘤的进展,甚至也可以调控肿瘤干细胞的活性<sup>[6]</sup>。

在本综述中,我们将总结免疫微环境对肿瘤发生的作用以及以肿瘤免疫微环境为治疗靶点的肿瘤免疫疗法相关研究进展。我们将详细解读调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)在肿瘤微环境中发挥的

作用以及其作为肿瘤免疫治疗靶点的相关研究进展。

## 1 免疫微环境的形成及对肿瘤发生的影响

肿瘤内血管形成对癌细胞的浸润和转移有重要作用。肿瘤血管是肿瘤营养输送及肿瘤细胞逃逸的通道,肿瘤微环境可调控肿瘤血管的生成,影响肿瘤的生长和迁移<sup>[7]</sup>。新生血管来源于骨髓的内皮前体细胞,肿瘤微环境中的内皮前体细胞经修饰后促进肿瘤血管形成和肿瘤异质性的发生<sup>[6]</sup>。肿瘤血管生成的始动因素是肿瘤微环境内促血管生成因子(pro-angiogenesis factor)和血管生成抑制因子(anti-angiogenesis factor)的失衡,导致血管基底膜重构,局部缺氧,这些变化有助于肿瘤发生浸润和转移<sup>[8]</sup>。

肿瘤微环境含有多种细胞成分,包括肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophage, TAM)等多种免疫细胞。在肿瘤部位聚集的免疫细胞中,巨噬细胞最丰富。研究发现,巨噬细胞出现在肿瘤发生发展的全过程,并且促进肿瘤进展,表现在刺激肿瘤血管生成和增强肿瘤细胞迁移、侵袭和转移<sup>[9]</sup>。肿瘤相关巨噬细胞进入缺氧或坏死区域,可以分泌血管活性因子(如VEGF、IL-8和PGE2等)以及蛋白酶(如MMP-9和μPA)诱导肿瘤血管生成。此外,巨噬细胞也可以和肿瘤细胞相互作用,通过促进肿瘤细胞侵袭而进入血管,其机制是破坏细胞外间质和促进肿瘤细胞运动<sup>[10]</sup>。

肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)是肿瘤微环境的主要基质细胞,不仅是肿瘤生长的“土壤”,更能通过旁分泌的方式分泌多种可溶性因子,与肿瘤细胞及肿瘤间质中的其他细胞发生相互作用,促进肿瘤的发生、生长、侵袭及转移<sup>[11]</sup>。肿瘤微环境活化之后,CAF产生前炎症因子,以NF-κB依赖的方式促进肿瘤进展,驱动淋巴细胞浸润,刺激血管形成和血管通透性增加<sup>[12]</sup>。另外,在不同类型的肿瘤微环境中发现有调节性T细胞(Treg)

浸润。Treg细胞是调节机体免疫系统的免疫抑制细胞,它通过抑制抗肿瘤免疫和诱导肿瘤血管生成促进肿瘤的进展<sup>[13]</sup>。免疫微环境促进肿瘤血管生成是影响肿瘤进展的主要机制。

骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)来源于骨髓祖细胞和未成熟髓细胞,是树突状细胞(dendritic cells, DCs)、巨噬细胞和粒细胞的前体。这些前体细胞被肿瘤来源的因子(tumor derived factor, TDF)由骨髓募集到外周,并进一步诱导活化,活化后的MDSC通过各种机制抑制机体抗肿瘤免疫,使肿瘤逃避机体的免疫监视和攻击,促进肿瘤发展<sup>[14]</sup>。肿瘤微环境诱导MDSC募集不仅会抑制继发性免疫应答,还会通过基质纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、TGF- $\beta$ 、VEGFA促进肿瘤血管形成<sup>[15]</sup>。MDSC不仅会抑制效应T细胞增殖、活化和迁移,也会促进调节性T细胞扩增<sup>[16]</sup>。

## 2 针对肿瘤微环境的免疫治疗

肿瘤免疫微环境的复杂性与异质性增加了肿瘤免疫治疗的难度,也影响了免疫治疗的效率。免疫微环境不仅具有遗传稳定性,还具有低抗性和低复发风险,成为近些年来肿瘤免疫治疗的新靶点<sup>[17]</sup>。近些年来,免疫检查点抑制剂为癌症治疗提供了新方向,并成为当前肿瘤免疫治疗的聚焦点<sup>[18]</sup>。肿瘤微环境的抗肿瘤免疫点也具有其他的有益靶标,并且与常规肿瘤疗法联合应用可以更大程度地提高肿瘤免疫疗法的效率<sup>[19]</sup>。

### 2.1 免疫检查点阻断

免疫检查点抑制剂通过激活免疫细胞功能并使肿瘤微环境正常化治疗肿瘤,现已成为治疗多种类型肿瘤的有效手段<sup>[20]</sup>。针对程序性细胞死亡蛋白-1(programmed death-1, PD-1)及其配体PD-L1(programmed death-ligand 1)的单克隆抗体已成功用于临床应用,并已被批准用于黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾癌和膀胱癌等多种癌症<sup>[21]</sup>。抗PD-1抗体Keytruda(又称pembrolizumab)已被FDA(Food and Drug Administration)批准用于治疗带有微卫星不稳定性高(microsatellite instability-high, MSI-H)或错配修复缺陷(DNA mis-match repair deficient, dMMR)的实体瘤患者<sup>[22]</sup>。该批准证实了靶向肿瘤微环境的免疫疗法在癌症治疗中的重要地位,也肯定了肿瘤免

疫治疗作为肿瘤联合治疗主体的治疗新策略。

随着PD-1/PD-L1抑制剂在肿瘤治疗中的成功实现,PD-1/PD-L1抑制剂与其他免疫检查点的联合治疗也受到了极大的关注。临床研究表明,抗PD-1/PD-L1抗体与细胞毒T淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)抑制剂联合使用可以提高晚期黑色素瘤患者治疗效率<sup>[23-24]</sup>,并且已被FDA批准用于治疗BRAF V600E野生型的不可切除或转移性黑色素瘤患者。最新一项II期临床试验(CheckMate 069)显示,与单独使用CTLA-4抑制剂ipilimumab相比,PD-1抑制剂nivolumab与CTLA-4抑制剂ipilimumab联合治疗可改善晚期黑色素瘤患者的治疗,联合治疗和单独治疗的2年生存率分别为63.8%和53.6%<sup>[25]</sup>。此外,Wei等<sup>[26]</sup>分析了免疫检查点阻断对人黑色素瘤和小鼠肿瘤模型中肿瘤浸润性免疫细胞的影响,结果显示,PD-1抗体主要诱导了肿瘤浸润性耗竭型CD8<sup>+</sup>T细胞亚群的扩增。相反,CTLA-4抗体除了影响耗竭性CD8<sup>+</sup>T细胞,还增加了Th1样CD4<sup>+</sup>T细胞的数目。这提示,我们PD-1抗体与CTLA-4抗体的联合疗法可以克服肿瘤浸润性T细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)的功能障碍以及异质性。

此外,PD-1/PD-L1抗体治疗可以与其他表达在T细胞上的其他免疫检查点进行联合治疗并可以提高PD-1/PD-L1抗体治疗的有效性,如TIM-3<sup>[27-28]</sup>、LAG-3<sup>[29]</sup>。目前,5项TIM-3与PD-1的联合抑制临床试验(NCT02817633、NCT03099109、NCT02608268、NCT03066648和NCT02947165)正在进行中。另外,8项LAG-3和PD-1抗体组合的临床试验(NCT02658981、NCT01968109、NCT02061761、NCT03005782、NCT02676869、NCT02966548、NCT02488759和NCT02060188)也在招募中(<https://ClinicalTrials.gov>)。Claudin低表达的乳腺癌代表着一种侵袭性乳腺癌亚型,具有不良预后反应并高表达EMT基因。研究显示,EMT基因可以将Treg细胞募集到肿瘤微环境中,从而抑制有效的抗肿瘤免疫反应<sup>[30]</sup>。这提示,未来的临床试验应针对肿瘤微环境中的免疫抑制元素与免疫检查点封锁的联合,以提高肿瘤免疫治疗的效率。

总之,合理选择免疫检查点抑制剂治疗与其他免疫疗法的联合是实现肿瘤个性化治疗必然的选择,关于联合治疗的具体机制也需要进行进一步的

探索。

## 2.2 肿瘤代谢调节

通过调节肿瘤代谢来改善肿瘤微环境的免疫抑制是当下热门的研究方向。现有研究中,通过抑制吲哚胺2,3加双氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)抑制肿瘤代谢的免疫疗法取得了显著的效果。

目前,针对IDO的药物主要有两大类:(1)高效的IDO抑制剂,可直接抑制色氨酸的降解,例如药物epacadostat<sup>[31]</sup>;(2)IDO通路抑制剂,抑制色氨酸的降解,并逆转IDO介导的免疫抑制,如药物indoximod<sup>[32]</sup>。此外,这2种药物的安全性和临床效果也在最近的临床试验中得到了证实<sup>[33-34]</sup>。肿瘤细胞代谢研究的重大突破也为免疫疗法提供了新的选择。IDO抑制剂epacadostat和抗PD-1抗体pembrolizumab的联合治疗已被证明具有良好的临床效果,能够提高晚期癌症的客观缓解率和疾病控制率<sup>[35]</sup>。因此,可以推断IDO抑制剂与免疫检查点抑制剂具有潜在的协同作用。

此外,IDO抑制剂的成功试验,使得其他与肿瘤相关的异常代谢氨基酸也逐渐成为了研究热点。谷氨酰胺酶抑制剂CB-839单独应用(NCT02861300)以及与PD-1抗体nivolumab(NCT02771626)组合应用于实体瘤治疗的临床试验均在招募中。

缺氧和酸性微环境与肿瘤代谢的后果相关,因此逆转缺氧与酸性微环境也成为抑制肿瘤的策略。乳酸可以特异性上调B细胞淋巴瘤2基因(B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)表达,进而促进肿瘤细胞对葡萄糖饥饿的抵抗力<sup>[36]</sup>。在乳酸代谢异常的临床试验中,顺铂和依托泊苷联合*Bcl-2*抑制剂AT-101可以增强抗肿瘤作用<sup>[37]</sup>。单羧酸转运蛋白抑制剂AZD3965可以抑制缺氧肿瘤细胞释放乳酸,并抑制其生长和生存。相关临床试验(NCT01791595),也正在招募中<sup>[38]</sup>。

## 2.3 肿瘤基质监管

调节肿瘤微环境的基质成分可以逆转其免疫抑制现象。促进肿瘤血管正常化,减弱CAF的功能能够有效地将氧气、药物、免疫细胞和其他成分输送到肿瘤组织,对抑制肿瘤增殖和侵袭起到关键作用<sup>[39]</sup>。

抗血管生成疗法中,VEFG的抗体Avastin (bevacizumab)已于2003年获得FDA批准。除此以外,许多抑制剂已被批准用于多种肿瘤的临床治疗。然而,肿瘤可以频繁逃避这些药物的作用,导致最终无

治疗进展<sup>[40]</sup>。而促进血管正常化可以消除肿瘤微环境的缺氧现象,并和Th1细胞相互作用,增强抗肿瘤免疫<sup>[41]</sup>。

贝伐单抗和干扰素- $\alpha$ 的联合治疗也已进入2期和3期临床试验,并证明转移性肾细胞癌的临床效果得到改善,与单药治疗相比,联合应用抗血管治疗和免疫治疗具有临床价值<sup>[42-43]</sup>。此外,VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂apatinib和PD-1抑制剂联合治疗的临床试验(NCT03092895和NCT02942329)目前正在招募,以评估治疗胃癌的效果。

此外,还有一些研究试图通过调节CAF在肿瘤微环境中的功能来改善免疫抑制状况<sup>[44]</sup>。人源化单克隆抗体sibrotuzumab针对CAF上的特异性抗原FAP $\alpha$ ,可阻断其蛋白酶和信号转导的双重功能,减少其对抗肿瘤免疫的负调控,从而抑制肿瘤进展、侵袭和转移。RO6874281是含有IL-2变体序列的FAP $\alpha$ 特异性靶向抗体。IL-2变体不与Tregs结合,这可能会阻止Tregs的免疫抑制能力<sup>[45]</sup>。通过特异性靶向FAP $\alpha$ ,抗体不仅可以增加局部IL-2浓度以激活肿瘤微环境中的免疫效应细胞,还通过直接阻断FAP $\alpha$ 抑制肿瘤微环境的恶化。由于FAP在肿瘤基质中的一致表达,通过改造T细胞使其表达FAP特异性嵌合抗原受体,可以抑制肿瘤增殖并增强宿主免疫<sup>[46-48]</sup>。

## 2.4 结合化疗与放疗进行治疗

不同的化疗药物,其功能有可能涉及到不同的抗肿瘤免疫机制<sup>[49]</sup>,比如:(1)增加免疫原性,引起肿瘤细胞凋亡,该类药物有蒽环类药物、5-氟尿嘧啶(5-Fu)、奥沙利铂等;(2)通过直接激活免疫效应细胞加强肿瘤免疫,如吉西他滨、紫杉醇和培美曲塞等;(3)药物间接免疫刺激抑制免疫抑制细胞作用,如5-Fu、环磷酰胺和奥沙利铂等。放射疗法可以影响肿瘤免疫应答。辐射引起的肿瘤细胞死亡可以通过诱导肿瘤细胞上的抗原表达和激活淋巴细胞来增强机体抗肿瘤免疫力<sup>[50-51]</sup>,并产生伴随远隔效应<sup>[52]</sup>。化疗或放疗可以提前消除大量肿瘤细胞,并在肿瘤微环境中暴露大量肿瘤抗原和新抗原产物,募集更多的免疫效应细胞,最终改变肿瘤微环境的免疫抑制状态。目前,将免疫疗法与化学疗法或放射疗法相结合的基本原理已得到验证<sup>[53]</sup>,并在临床前开展了前期研究<sup>[54]</sup>。因此,将免疫疗法与标准常规疗法(包括化学疗法或放射疗法)相结合,可以发挥协同抗肿瘤作用<sup>[55]</sup>,

但最有益的剂量和最合适的给药时间需要进一步的研究确认<sup>[56]</sup>。

### 3 Treg细胞与肿瘤微环境

#### 3.1 Treg细胞在肿瘤微环境中的作用机制

3.1.1 Treg对肿瘤微环境其他免疫细胞的调控作用  
现已发现, FOXP3<sup>+</sup> Treg细胞可在多种免疫反应中发挥调控作用, 如自身免疫、过敏反应、移植物排斥反应等<sup>[57]</sup>。肿瘤是生长于特异微环境中的、有别于机体自身的特殊抗原, 其形成和发展必然需要逃过机体的免疫监视<sup>[13]</sup>。因此, 也需要相对应的免疫调节因素参与其中, Treg特别是iTreg则是其重要一环。肿瘤微环境是肿瘤赖以生存和发展的重要条件, Treg与其他细胞、细胞因子、细胞外基质等, 共同营造了合适的肿瘤生长微环境。

Treg与树突状细胞(dendritic cells, DCs)之间存在着诸多关联。Treg能与DCs接触而发挥作用。Treg表面的CTLA-4作为共刺激分子, 能够与DCs表面的CD80/86结合, 促使DCs上调IDO酶的表达, 进而向效应性T细胞传递异质性信号<sup>[58]</sup>。未成熟的DCs可以诱导免疫耐受, Treg细胞能够抑制成熟DCs提呈的同种抗原的混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction, MLR)<sup>[59-60]</sup>。

此外, Treg与效应性T细胞(effector T cell, Teff)之间也存在着诸多相互调控机制。Treg能够表达丝氨酸蛋白酶和半乳糖素-1(galactin-1)直接与效应性T细胞结合导致细胞凋亡或周期中止。在CTL细胞对特异抗原进行大规模杀伤前, Treg能更快地完成活化, 并在早期阻断CTL的扩增<sup>[61]</sup>。IL-2是效应细胞生长的必需因子, Treg通过在其表面高表达IL-2受体CD25, 消耗大量的IL-2, 产生竞争性抑制的效应<sup>[62]</sup>。此外, Treg能通过缝隙连接作用将大量cAMP转移至效应细胞中, 干扰细胞代谢<sup>[63]</sup>。Treg还能调控自然杀伤细胞(natural killer cells, NKs)的功能, 从而影响NK对肿瘤杀伤。FOXP3<sup>+</sup> Treg可以高表达颗粒酶B, 通过颗粒酶/穿孔素依赖性途径, 使NKs/CTLs等免疫细胞溶解<sup>[64]</sup>。

3.1.2 Treg通过细胞因子调控肿瘤免疫  
除了直接作用于肿瘤微环境中的免疫细胞, Treg还能够通过分泌多种细胞因子调控肿瘤免疫的过程。Treg能分泌IL-35、IL-10、转化生长因子-β(trans-forming growth factor-β, TGF-β)等抑制性细胞因子, 这些因

子能促进抗凋亡分子的表达, 使肿瘤细胞能抵御免疫效应细胞的诱导凋亡的作用。TGF-β不仅能全面抑制机体的免疫系统功能, 还能够帮助肿瘤细胞逃避免疫效应细胞识别和侦察<sup>[65]</sup>。研究显示, TGF-β能通过抑制NKs的细胞毒杀伤作用使肿瘤细胞在宿主内存活<sup>[66]</sup>。DNAX活化蛋白12(DNAX-activating protein of 12 kDa, DAP12)是广泛存在于NKs、粒细胞、单核/巨噬细胞表面的跨膜受体, 在传递活化信号中发挥重要作用。TGF-β能通过miRNA-183抑制性调控DAP12功能, 减弱免疫细胞杀伤、吞噬、抗原递呈的效应<sup>[67]</sup>。

#### 3.2 Treg细胞在癌症诊断以及预后中的意义

越来越多研究表明, 大量Treg细胞会侵入患者及小鼠疾病模型各类实体性肿瘤中<sup>[68-76]</sup>。已有研究发现, 肿瘤患者头部和颈部<sup>[68]</sup>、乳腺<sup>[69]</sup>、肺<sup>[70]</sup>、肝脏<sup>[71]</sup>、胃肠道<sup>[72]</sup>、胰腺<sup>[73]</sup>和卵巢<sup>[74]</sup>的肿瘤往往有大量肿瘤浸润的Treg细胞。重要的是, 肿瘤侵袭性CD8<sup>+</sup> T细胞与FOXP3<sup>+</sup> Treg细胞的比例降低通常与预后不良相关。此外, 通过最近对先前发表数据进行分析表明, 在宫颈、肾、乳腺和黑色素瘤中的大多数实体肿瘤中, 肿瘤浸润性FOXP3<sup>+</sup>细胞的高频率与患者的存活率显著负相关<sup>[75]</sup>。另外, 霍奇金淋巴瘤或结直肠癌(carcinoma of colon and rectum, CRC)患者体内Treg细胞数量增加, 其预后与Treg细胞数目多少间的相互关系仍有待深入研究<sup>[76]</sup>。因此, Treg确实能够在肿瘤预防、诊断、治疗、预后等方面作为一项参考指标。然而, 由于不同肿瘤发病机制的差异以及肿瘤细胞及微环境高度异质性, 目前还难以仅凭Treg数量或与其相关的有限几个指标对疾病的治疗转归进行可靠的判断, 我们需要进一步深入研究不同来源肿瘤及同来源不同病程阶段肿瘤的Treg免疫调控机制。

### 4 针对Treg的肿瘤免疫疗法

针对Treg细胞的肿瘤免疫疗法的最新进展表明, 相对特异性表达于Treg细胞的某些分子是Treg功能调节的靶点, 也是肿瘤免疫治疗的潜在靶点。这些分子包括CTLA-4、GITR、CCR4、CCR8、PD-1、OX-40和LAG3, 以及上述CD25和CD15。

#### 4.1 免疫检查点阻断可能具有消耗Treg的作用

肿瘤免疫疗法最近的突破之一是临床使用抗CTLA-4抗体, 通常称为检查点阻滞疗法。已经多种

类型的癌症患者中测试了两种针对CTLA-4的完全人源化单克隆抗体, 即ipilimumab和tremelimumab, 包括黑素瘤、前列腺癌和肾细胞癌。虽然, CTLA-4抗体首先被认为可以增加肿瘤浸润性CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>T细胞的活性, 但最近的研究表明, 该抗体具有另外一种作用的可能性, 可以通过主要影响Treg细胞从而增强抗肿瘤免疫反应<sup>[77-79]</sup>。研究显示, 在Fc受体缺陷小鼠中, 抗CTLA-4 mAb的抗肿瘤活性依赖于肿瘤组织中效应Treg细胞的消耗过程, 而不影响传统T细胞(conventional T cells, Tconv)细胞的再活化。这些效应Treg细胞丰富存在于肿瘤组织中并且表达高水平的CTLA-4。在癌症患者中, ipilimumab的临床效果与肿瘤组织中Treg细胞数量的减少之间存在很强的相关性<sup>[80-81]</sup>。研究表明, 阻断B7-CTLA-4相互作用会降低CTLA-4抗体带来的免疫不良反应, 同样也会造成调节性T细胞与效应性T细胞的比率下降<sup>[82-83]</sup>, 这更进一步证明, Treg细胞消耗对于肿瘤免疫点治疗疗效的重要作用。而抗PD-1抗体, 即nivolumab, 另一种检查点阻断抗体, 是否在肿瘤组织中具有Treg消耗作用仍需要进一步研究。

#### 4.2 肿瘤微环境中Treg细胞的消耗

为了选择性消耗肿瘤浸润性Treg细胞, 同时保留对抑制自身免疫至关重要的其他Treg细胞, 其中一种策略是特异性靶向效应性Treg细胞, 使其高度活化、增殖, 易通过细胞凋亡而死亡<sup>[84]</sup>。

效应性Treg细胞在肿瘤组织中占主导地位, 效应性Treg细胞的消耗会介导肿瘤微环境的平衡从免疫抑制转移到免疫激活。尽管在此过程中完整的原始Treg细胞会不断供应效应性Treg细胞。因此, 在效应性Treg细胞上特异性或选择性表达的分子可以成为良好的靶标。例如, CCR4主要由效应性Treg细胞表达, 而不是由天然Treg细胞和Th2细胞表达<sup>[85]</sup>, 并且Treg迁移渗入各种肿瘤组织可能依赖于肿瘤细胞或浸润性巨噬细胞上CCR4配体(CCL17、CCL22)的表达<sup>[86]</sup>。现有研究中, 抗CCR4抗体已被证实可以有效地选择性消除效应Treg细胞并增加体内肿瘤抗原特异性CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的数量<sup>[85]</sup>。

#### 4.3 针对Treg抑制性功能的激动性抗体

GITR是由Treg细胞表达的另一种分子, 同样可以作为Treg功能调节的靶标。与Tconv细胞相比, Treg细胞组成型表达高水平的GITR, 然而, 激活后的Tconv细胞也表达GITR, 而Treg细胞上的GITR水

平进一步上调。在小鼠中, 施用激动性抗GITR抗体(非消耗性)可以消除Treg细胞介导的抑制功能并增强Tconv细胞的效应功能以打破免疫自身耐受<sup>[87-88]</sup>。相同抗体用于成瘤的小鼠中可以破坏免疫-耐受并引起有效的抗肿瘤免疫应答, 伴随着分泌IFN- $\gamma$ 的CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>T细胞增加, 以及肿瘤的根除<sup>[89]</sup>。此外, 用小鼠IgG2a替换原始大鼠IgG2b的Fc部分而产生的嵌合抗GITR抗体可以选择性消除小鼠中的Treg细胞, 进而表现有效的杀肿瘤活性<sup>[77]</sup>。GITR的激动性抗体正在临床试验中, 以测试其在黑素瘤和其他晚期实体瘤患者中的效力。此外, 特异于其他TNFR的激动性抗体超家族分子, 如OX40, 也在进行临床研究<sup>[81]</sup>。

#### 4.4 小分子药物用于调节Treg消耗及其功能

除抗体介导的Treg消耗疗法外, 研究证明, 小分子药物可以有效靶向Treg细胞<sup>[91-94]</sup>。举一个例子, 环磷酰胺的节律施用<sup>[90]</sup>。环磷酰胺是传统化学疗法中经常使用的抗肿瘤药, 由于环磷酰胺是一种干扰DNA复制的烷化剂, 它会杀死高度增殖的细胞。施用高剂量环磷酰胺严重影响所有T细胞。然而, 当长期低剂量使用时, 该药物已被证明可选择性地减少高增殖的Treg细胞, 包括肿瘤组织中的Treg细胞, 并增强人和啮齿动物的抗肿瘤免疫反应<sup>[90]</sup>。此外, 越来越多的研究表明, 低剂量节律性环磷酰胺联合其他免疫治疗药物具有良好的抗肿瘤效果与潜力<sup>[91-94]</sup>。

### 5 讨论

肿瘤微环境影响着肿瘤的代谢重组, 通过代谢竞争和代谢共生维持免疫细胞的功能和调控免疫系统。肿瘤微环境的异质性将引起免疫抑制, 然后导致免疫疗法的效力差异。免疫疗法的有效性有限仍然是一个重大挑战, 探索免疫治疗和细胞毒药物或分子靶向药物联合的多模式治疗(multimodal therapy)可能最终改善接受肿瘤免疫治疗患者的预后。

Treg细胞作为免疫自身耐受的关键介质被发现, 其在自身免疫以及肿瘤免疫中介导的免疫抑制功能已得到了广泛探索。Treg细胞在肿瘤免疫中的抑制作用被广泛接受, 当前针对Treg细胞的肿瘤免疫疗法正在逐步开发中。促进Treg细胞消耗(例如通过减少Treg细胞数量或降低其在肿瘤组织中的抑制活性)与肿瘤特异性效应T细胞活化(例如通过癌

症疫苗或免疫检查点阻断)的联合疗法可以增强个体治疗效率。经过抗癌药物、电离辐射或有效的肿瘤抗原疫苗处理的肿瘤可以释放自身抗原和肿瘤相关抗原,引起局部炎症,这可能会在肿瘤组织中募集和激活Treg细胞,从而阻碍随后的抗肿瘤免疫反应。因此,为了强效激活效应T细胞,有必要在其他免疫治疗(例如疫苗接种和检查点阻断)之前耗尽Treg细胞或减弱其抑制活性。我们猜想,各种机理明确的免疫干预的有序组合将使当前的肿瘤免疫疗法在临床中更有效。

综上,我们认为,免疫微环境是肿瘤免疫治疗创新与优化的热门方向,而Treg作为肿瘤免疫微环境的重要组分,对其功能的调控也将对肿瘤免疫治疗带来新的突破。

### 参考文献 (References)

- Whiteside TL, Demaria S, Rodriguez-Ruiz ME, Zarour HM, Melero I. Emerging opportunities and challenges in cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2016; 22(8): 1845-55.
- Tang H, Qiao J, Fu YX. Immunotherapy and tumor micro-environment. *Cancer Lett* 2016; 370(1): 85-90.
- Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2015; 21(4): 687-92.
- Sautes-Fridman C, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Fisson S, Fridman WH, Cremer I, *et al.* Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30(1): 13-25.
- Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, *et al.* Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res* 2012; 72(10): 2473-80.
- Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 2013; 501(7467): 346-54.
- Fokas E, McKenna WG, Muschel RJ. The impact of tumor microenvironment on cancer treatment and its modulation by direct and indirect antivascular strategies. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31(3/4): 823-42.
- Semenza GL. Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis. *Oncogene* 2013; 32(35): 4057-63.
- Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014; 41(1): 49-61.
- Dondossola E, Rangel R, Guzman-Rojas L, Barbu EM, Hosoya H, St John LS, *et al.* CD13-positive bone marrow-derived myeloid cells promote angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(51): 20717-22.
- Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21(1): 33-9.
- Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner. *Cancer Cell* 2010; 17(2): 135-47.
- Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* 2012; 72(9): 2162-71.
- Liu Q, Liao Q, Zhao Y. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) facilitate distant metastasis of malignancies by shielding circulating tumor cells (CTC) from immune surveillance. *Med Hypotheses* 2016; 87: 34-9.
- Motz GT, Coukos G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(10): 702-11.
- Komohara Y, Morita T, Annan DA, Horlad H, Ohnishi K, Yamada S, *et al.* The coordinated actions of TIM-3 on cancer and myeloid cells in the regulation of tumorigenicity and clinical prognosis in clear cell renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Res* 2015; 3(9): 999-1007.
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013; 19(11): 1423-37.
- Li Y, Li F, Jiang F, Lü X, Zhang R, Lu A, *et al.* A mini-review for cancer immunotherapy: molecular understanding of PD-1/PD-L1 pathway & Translational blockade of immune checkpoints. *Int J Mol Sci* 2016; 17(7): 55-9.
- Ledford H. Cocktails for cancer with a measure of immunotherapy. *Nature* 2016; 532(7598): 162-4.
- Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; 348(6230): 56-61.
- Raval RR, Sharabi AB, Walker AJ, Drake CG, Sharma P. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *J Immunother Cancer* 2014; 2: 14.
- Holbeck SL, Collins JM, Doroshow JH. Analysis of Food and Drug Administration-approved anticancer agents in the NCI60 panel of human tumor cell lines. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(5): 1451-60.
- Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory pathways in immunotherapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2016; 34: 539-73.
- Boutros C, Tarhini A, Routier E, Lambotte O, Ladurie FL, Carbonnel F, *et al.* Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13(8): 473-86.
- Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann KF, McDermott DF, *et al.* Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(11): 1558-68.
- Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, Zhao Y, Anang NAS, Andrews MC, *et al.* Distinct cellular mechanisms underlie anti-CTLA-4 and anti-PD-1 checkpoint blockade. *Cell* 2017; 170(6): 1120-33, e17.
- Shayan G, Srivastava R, Li J, Schmitt N, Kane LP, Ferris RL. Adaptive resistance to anti-PD1 therapy by Tim-3 upregulation is mediated by the PI3K-Akt pathway in head and neck cancer. *Oncoimmunology* 2017; 6(1): e1261779.
- Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprie GS, Buczkowski KA, Richards WG, *et al.* Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune

- checkpoints. *Nat Commun* 2016; 7: 10501.
- 29 Foy SP, Sennino B, dela Cruz T, Cote JJ, Gordon EJ, Kemp F, *et al.* Poxvirus-based active immunotherapy with PD-1 and LAG-3 dual immune checkpoint inhibition overcomes compensatory immune regulation, yielding complete tumor regression in mice. *PLoS One* 2016; 11(2): e0150084.
  - 30 Taylor NA, Vick SC, Iglesia MD, Brickey WJ, Midkiff BR, McKinnon KP, *et al.* Treg depletion potentiates checkpoint inhibition in claudin-low breast cancer. *J Clin Invest* 2017; 127(9): 3472-83.
  - 31 Yue EW, Sparks R, Polam P, Modi D, Douty B, Wayland B, *et al.* INCB24360 (Epcadostat), a highly potent and selective indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor for immuno-oncology. *ACS Med Chem Lett* 2017; 8(5): 486-91.
  - 32 Zhai L, Spranger S, Binder DC, Gritsina G, Lauing KL, Giles FJ, *et al.* Molecular pathways: Targeting IDO1 and other tryptophan dioxygenases for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2015; 21(24): 5427-33.
  - 33 Beatty GL, O'Dwyer PJ, Clark J, Shi JG, Bowman KJ, Scherle PA, *et al.* First-in-human phase I study of the oral inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase-1 epacadostat (INCB024360) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2017; 23(13): 3269-76.
  - 34 Soliman HH, Minton SE, Han HS, Ismail-Khan R, Neuger A, Khambati F, *et al.* A phase I study of indoximod in patients with advanced malignancies. *Oncotarget* 2016; 7(16): 22928-38.
  - 35 Mitchell TC, Hamid O, Smith DC, Bauer TM, Wasser JS, Olszanski AJ, *et al.* Epcadostat plus pembrolizumab in patients with advanced solid tumors: phase I results from a multicenter, open-label phase I/II trial (ECHO-202/KEYNOTE-037). *J Clin Oncol* 2018, doi: JCO2018789602.
  - 36 Huang C, Sheng S, Li R, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate promotes resistance to glucose starvation via upregulation of Bcl-2 mediated by mTOR activation. *Oncol Rep* 2015; 33(2): 875-84.
  - 37 Schelman WR, Mohammed TA, Traynor AM, Kolesar JM, Marnocha RM, Eickhoff J, *et al.* A phase I study of AT-101 with cisplatin and etoposide in patients with advanced solid tumors with an expanded cohort in extensive-stage small cell lung cancer. *Invest New Drugs* 2014; 32(2): 295-302.
  - 38 Kershaw S, Cummings J, Morris K, Tugwood J, Dive C. Optimisation of immunofluorescence methods to determine MCT1 and MCT4 expression in circulating tumour cells. *BMC Cancer* 2015; 15: 387.
  - 39 Tarallo V, De Falco S. The vascular endothelial growth factors and receptors family: Up to now the only target for anti-angiogenesis therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2015; 64: 185-9.
  - 40 Bueno MJ, Mouron S, Quintela-Fandino M. Personalising and targeting antiangiogenic resistance: a complex and multifactorial approach. *Br J Cancer* 2017; 116(9): 1119-25.
  - 41 Tian L, Goldstein A, Wang H, Ching Lo H, Sun Kim I, Welte T, *et al.* Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming. *Nature* 2017; 544(7649): 250-4.
  - 42 Melichar B, Bracarda S, Matveev V, Alekseev B, Ivanov S, Zyryanov A, *et al.* A multinational phase II trial of bevacizumab with low-dose interferon-alpha2a as first-line treatment of metastatic renal cell carcinoma: BEVLIN. *Ann Oncol* 2013; 24(9): 2396-402.
  - 43 Rini BI, Bellmunt J, Clancy J, Wang K, Niethammer AG, Hariharan S, *et al.* Randomized phase III trial of temsirolimus and bevacizumab versus interferon alfa and bevacizumab in metastatic renal cell carcinoma: INTORACT trial. *J Clin Oncol* 2014; 32(8): 752-9.
  - 44 Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016; 16(9): 582-98.
  - 45 Arenas-Ramirez N, Woytschak J, Boyman O. Interleukin-2: biology, design and application. *Trends Immunol* 2015; 36(12): 763-77.
  - 46 Kakarla S, Chow KK, Mata M, Shaffer DR, Song XT, Wu MF, *et al.* Antitumor effects of chimeric receptor engineered human T cells directed to tumor stroma. *Mol Ther* 2013; 21(8): 1611-20.
  - 47 Tran E, Chinnasamy D, Yu Z, Morgan RA, Lee CC, Restifo NP, *et al.* Immune targeting of fibroblast activation protein triggers recognition of multipotent bone marrow stromal cells and cachexia. *J Exp Med* 2013; 210(6): 1125-35.
  - 48 Wang LC, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar RS, Kapoor V, *et al.* Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res* 2014; 2(2): 154-66.
  - 49 Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological mechanisms underneath the efficacy of cancer therapy. *Cancer Immunol Res* 2016; 4(11): 895-902.
  - 50 Teng F, Kong L, Meng X, Yang J, Yu J. Radiotherapy combined with immune checkpoint blockade immunotherapy: Achievements and challenges. *Cancer Lett* 2015; 365(1): 23-9.
  - 51 Kalbasi A, June CH, Haas N, Vapiwala N. Radiation and immunotherapy: a synergistic combination. *J Clin Invest* 2013; 123(7): 2756-63.
  - 52 Park B, Yee C, Lee KM. The effect of radiation on the immune response to cancers. *Int J Mol Sci* 2014; 15(1): 927-43.
  - 53 Dalglish AG. Rationale for combining immunotherapy with chemotherapy. *Immunotherapy* 2015; 7(3): 309-16.
  - 54 Sharabi AB, Lim M, DeWeese TL, Drake CG. Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy. *Lancet Oncol* 2015; 16(13): e498-509.
  - 55 Shahabi V, Postow MA, Tuck D, Wolchok JD. Immune-priming of the tumor microenvironment by radiotherapy: rationale for combination with immunotherapy to improve anticancer efficacy. *Am J Clin Oncol* 2015; 38(1): 90-7.
  - 56 Hughes PE, Caenepeel S, Wu LC. Targeted therapy and checkpoint immunotherapy combinations for the treatment of cancer. *Trends Immunol* 2016; 37(7): 462-76.
  - 57 Berod L, Puttur F, Huehn J, Sparwasser T. Tregs in infection and vaccinology: heroes or traitors? *Microb Biotechnol* 2012; 5(2): 260-9.
  - 58 Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006; 118(2): 240-9.
  - 59 Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L,

- et al.* Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 2008; 180(9): 5916-26.
- 60 Oleinika K, Nibbs RJ, Graham GJ, Fraser AR. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clin Exp Immunol* 2013; 171(1): 36-45.
- 61 Chappert P, Leboeuf M, Rameau P, Lalfer M, Desbois S, Liblau RS, *et al.* Antigen-specific Treg impair CD8<sup>+</sup> T-cell priming by blocking early T-cell expansion. *Eur J Immunol* 2010; 40(2): 339-50.
- 62 Garg G, Tyler JR, Yang JH, Cutler AJ, Downes K, Pekalski M, *et al.* Type 1 diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *J Immunol* 2012; 188(9): 4644-53.
- 63 Vang AG, Housley W, Dong H, Basole C, Ben-Sasson SZ, Kream BE, *et al.* Regulatory T-cells and cAMP suppress effector T-cells independently of PKA-CREM/ICER: a potential role for Epac. *Biochem J* 2013; 456(3): 463-73.
- 64 Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans* 2013; 41(1): 245-51.
- 65 Wang J, Shao N, Ding X, Tan B, Song Q, Wang N, *et al.* Crosstalk between transforming growth factor-beta signaling pathway and long non-coding RNAs in cancer. *Cancer Lett* 2016; 370(2): 296-301.
- 66 Lee HM, Kim KS, Kim J. A comparative study of the effects of inhibitory cytokines on human natural killer cells and the mechanistic features of transforming growth factor-beta. *Cell Immunol* 2014; 290(1): 52-61.
- 67 Donatelli SS, Zhou JM, Gilvary DL, Eksioglu EA, Chen X, Cress WD, *et al.* TGF-beta-inducible microRNA-183 silences tumor-associated natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(11): 4203-8.
- 68 Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 2005; 92(5): 913-20.
- 69 Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, *et al.* Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169(5): 2756-61.
- 70 Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9(2): 606-12.
- 71 Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(6): 2457-64.
- 72 Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003; 98(5): 1089-99.
- 73 Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18): 5423-34.
- 74 Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, *et al.* Intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(51): 18538-43.
- 75 Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2015; 5: 15179.
- 76 Wilke CM, Wu K, Zhao E, Wang G, Zou W. Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. *Int J Cancer* 2010; 127(4): 748-58.
- 77 Bulliard Y, Jolicoeur R, Windman M, Rue SM, Ettenberg S, Knee DA, *et al.* Activating Fc gamma receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med* 2013; 210(9): 1685-93.
- 78 Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, *et al.* Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 2013; 210(9): 1695-710.
- 79 Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, *et al.* Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res* 2013; 1(1): 32-42.
- 80 Liakou CI, Kamat A, Tang DN, Chen H, Sun J, Troncso P, *et al.* CTLA-4 blockade increases IFN-gamma-producing CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(39): 14987-92.
- 81 Hodi FS, Butler M, Oble DA, Seiden MV, Haluska FG, Kruse A, *et al.* Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(8): 3005-10.
- 82 Du X, Liu M, Su J, Zhang P, Tang F, Ye P, *et al.* Uncoupling therapeutic from immunotherapy-related adverse effects for safer and effective anti-CTLA-4 antibodies in CTLA4 humanized mice. *Cell Res* 2018; 28(4): 433-47.
- 83 Du X, Tang F, Liu M, Su J, Zhang Y, Wu W, *et al.* A reappraisal of CTLA-4 checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Cell Res* 2018; 28(4): 416-32.
- 84 Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res* 2017; 27(1): 109-18.
- 85 Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, *et al.* Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(44): 17945-50.
- 86 Faget J, Biota C, Bachelot T, Gobert M, Treilleux I, Goutagny N, *et al.* Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells. *Cancer Res* 2011; 71(19): 6143-52.
- 87 McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, *et al.* CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16(2): 311-23.
- 88 Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, Young DA, Luxenberg D, Carreno BM, *et al.* Engagement of glucocorticoid-induced

- TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2004; 173(8): 5008-20.
- 89 Ko K, Yamazaki S, Nakamura K, Nishioka T, Hirota K, Yamaguchi T, *et al.* Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 202(7): 885-91.
- 90 Ge Y, Domschke C, Stoiber N, Schott S, Heil J, Rom J, *et al.* Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(3): 353-62.
- 91 Le DT, Jaffee EM. Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: a current perspective. *Cancer Res* 2012; 72(14): 3439-44.
- 92 Hirschhorn-Cymerman D, Rizzuto GA, Merghoub T, Cohen AD, Avogadri F, Lesokhin AM, *et al.* OX40 engagement and chemotherapy combination provides potent antitumor immunity with concomitant regulatory T cell apoptosis. *J Exp Med* 2009; 206(5): 1103-16.
- 93 Motoyoshi Y, Kaminoda K, Saitoh O, Hamasaki K, Nakao K, Ishii N, *et al.* Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncol Rep* 2006; 16(1): 141-6.
- 94 Klein O, Davis ID, McArthur GA, Chen L, Haydon A, Parente P, *et al.* Low-dose cyclophosphamide enhances antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses to NY-ESO-1/ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64(4): 507-18.