

·综述·

CAR-T细胞免疫治疗实体瘤的研究进展

姚铮,李子涵,高利明,胡星,陈颜,潘文琦,李谦*

(中国药科大学生命科学与技术学院,南京 210009)

摘要 近年来过继性细胞免疫疗法因效果显著而得到广泛认可,尤其是CD19特异嵌合抗原受体(CAR)的自体T细胞治疗恶性血液瘤取得成功。本文总结实体肿瘤存在肿瘤免疫微环境、靶点不均一以及免疫抑制性受体等原因导致CAR-T无法有效治疗,提出改进CAR-T细胞以提高T细胞浸润、共表达细胞因子与酶以及修饰相关受体等方式提高CAR-T抗实体肿瘤活性,为后续CAR-T细胞治疗实体肿瘤研究奠定理论基础。

关键词 嵌合抗原受体T细胞;实体瘤;免疫微环境;免疫治疗;进展

中图分类号 R733.1 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)04-0496-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20210413

引用本文 姚铮,李子涵,高利明,等.CAR-T细胞免疫治疗实体瘤的研究进展[J].中国药科大学学报,2021,52(4):496-504.

Cite this article as: YAO Zheng, LI Zihan, GAO Liming, et al. Advances of research on CAR-T cell immunotherapy for solid tumors[J]. *J. China Pharm Univ*, 2021, 52(4):496-504.

Advances of research on CAR-T cell immunotherapy for solid tumors

YAO Zheng, LI Zihan, GAO Liming, HU Xing, CHEN Yan, PAN Wenqi, LI Qian*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Adoptive cellular immunotherapy has been widely recognized in recent years due to its remarkable results, especially the success of CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR) autologous T cell therapy for malignant hematoma. Previous studies have found the existence of tumor immune microenvironment, heterogeneous targets, and immunosuppressive receptors in solid tumors, which has led to the shortcomings of CAR-T treatment of solid tumors. This article proposes the methods to improve CAR-T cells to increase T cell infiltration, co-expression of cytokines and enzymes and modification of related receptors in order to enhance the anti-solid tumor activity of CAR-T, laying a theoretical foundation for the follow-up CAR-T cell treatment of solid tumors.

Key words chimeric antigen receptor T cell; solid tumor; immune microenvironment; immunotherapy; advances

随着肿瘤生物学和免疫学的发展,肿瘤免疫治疗已成为近年来肿瘤治疗领域的新途径^[1]。表达抗原特异性的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)的基因工程T细胞的过继转移(一种新型肿瘤免疫疗法),在治疗一些人类血液恶性肿瘤包括白血病和淋巴瘤方面已经取得显著成功^[2]。单链可变抗原(single chain variable fragment, scFv)和信号结构域的整合能够赋予CAR具有显著的特异性和细胞毒性,能够以不依赖人类

白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)的方式发挥活性。最初的CAR结构包含scFv和CD3ζ信号结构域,这使得T细胞具有短暂的激活和细胞毒性^[3]。在一些研究和临床试验中,为了改善CAR-T细胞的细胞毒性和持久性,已经将共刺激信号分子,如CD28或CD137(4-1BB)整合到细胞内信号传导域中^[4]。

在治疗血液瘤方面,特别是在急性淋巴细胞白血病中,CAR-T细胞免疫疗法尽管有很高的临

床响应率,但 CAR-T 细胞的过继转移对实体瘤的治疗仍面临诸多挑战。从理论上讲,修饰的 T 细胞对肿瘤部位的归巢能力差,肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)含有许多免疫抑制性细胞和其他免疫抑制因子(结构如图 1 所示)都会降低

CAR-T 细胞的细胞毒性。本文全面分析限制 CAR-T 细胞治疗实体瘤的因素,介绍一些克服这些障碍的方法,对研究人员和医护人员有效对抗实体瘤具有一定的参考价值。

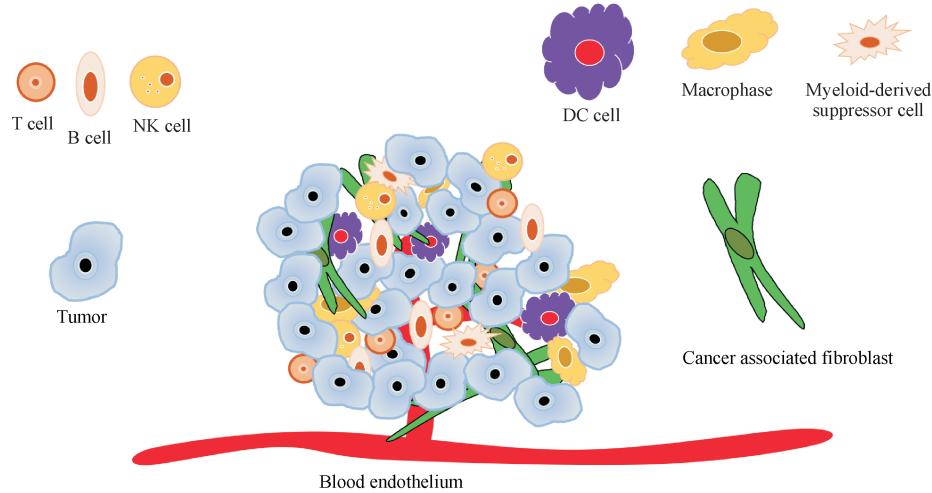


图 1 肿瘤微环境

1 实体瘤肿瘤微环境中的障碍

1.1 物理屏障

TME 中的细胞外基质(extracellular matrix, ECM),包括蛋白聚酶和糖肽酶,对肿瘤的生物学行为和免疫系统的重塑有多重作用。一些研究表明,ECM 中的一些蛋白质是非结构基质蛋白,如硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG),它们在维持肿瘤细胞增殖和迁移中起主要作用^[5]。肿瘤相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)是肿瘤基质的主要成分。CAFs 主要分布于血管周围或肿瘤外周纤维间质内,分泌细胞因子、ECM 以及相关酶分子。肿瘤细胞与基质成分之间相互作用,形成了功能复杂的 TME。T 细胞在攻击基质丰富的实体瘤时几乎没有能力穿透肿瘤病灶部位,导致抗肿瘤活性的下降^[6]。因此,提高工程化 T 细胞特异性降解富含基质的实体瘤中 ECM 而又不损害其细胞毒性,将显著增强抗肿瘤活性。

1.2 免疫抑制细胞和分泌的细胞因子

在 TME 中,免疫抑制主要由免疫抑制细胞介导:调节性 T 细胞(regulatory cells, Tregs),会减弱效应 T 细胞活性,促进 TME 的免疫抑制;骨髓源抑制

性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs),作为 TME 中的免疫负调控因素,能够抑制多种免疫细胞活性;M2 型巨噬细胞,通过分泌辅助 T 细胞 2 (T helper 2, Th2) 细胞因子促进血管生成和肿瘤侵袭。这些细胞在实体瘤内释放细胞因子如转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和白细胞介素 10 (IL-10),这些组成与成分都将严重抑制回输的 CAR-T 细胞疗效。

1.2.1 Tregs Tregs 在调节免疫应答中发挥重要作用,包括 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Tregs 和 I 型 Tregs,生成与作用机制如图 2 所示。TGF- β 对 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Tregs 发挥功能至关重要,而 Foxp3(叉头框蛋白 P3)是其转录调节因子,在 Tregs 中高表达^[7]。I 型 Tregs 通过分泌细胞因子 IL-10 发挥抑制活性。一般来说, Tregs 在炎症和肿瘤部位富集,通过各种机制调节免疫反应。活化的 Tregs 可以通过快速吸收 IL-2 直接消除过多的 T 细胞,这导致缺乏足够的效应细胞抵抗恶性肿瘤。此外,这些抑制性细胞可以产生许多抑制 T 细胞活性的免疫调节因子,如 TGF- β 和 IL-10,以此构成负调节循环,形成免疫抑制。

1.2.2 MDSCs MDSCs 是免疫抑制细胞的一个主要成分,负调节免疫反应,从而降低免疫系统的肿瘤免疫能力。MDSCs 的负调控机制是通过诱导

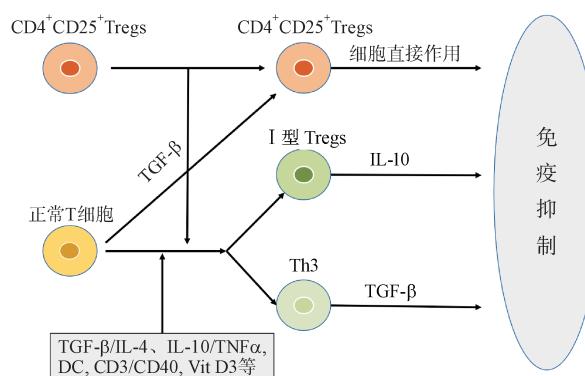


图2 Tregs生成与作用机制

型一氧化氮酶、精氨酸酶催化酶 I、环氧合酶-2、前列腺素 E2、TGF-β、IL-10 和 Tregs 介导其抑制作用。另外,MDSCs 的存在与肿瘤细胞的生长有关,在前列腺癌和结肠癌中,MDSCs 产生活性氮,致使趋化因子 CCL2(C-C chemokine ligand2, CCL2)发生硝化,抑制 Th1(T helper 1, 辅助 T 细胞 1)型效应细胞的浸润。因此,抑制 MDSCs 功能已被证实可以改善 TME 中的抗肿瘤免疫反应^[8]。靶向治疗 MDSCs 的免疫检查点 c-Rel, 可以明显改善小鼠黑色素瘤模型与淋巴瘤模型的肿瘤情况, 肿瘤生长得到明显抑制^[9]。因此,合理处理 MDSCs 可以有效提高肿瘤免疫活性。

1.2.3 肿瘤相关巨噬细胞 M2型巨噬细胞成为肿瘤相关性巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs), 通过表达可溶性蛋白和细胞因子(如 IL-10、基质金属蛋白酶、尿激酶型纤溶酶原激活剂、血管内皮生长因子、血小板衍生生长因子等), 在肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移过程中发挥作用。表达的 IL-10 能够有效地抑制细胞毒性 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的活化, 最终导致肿瘤细胞的快速增殖。过量的 M2型巨噬细胞释放特异性降解细胞外基质的基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP2) 和基质金属蛋白酶 9(MMP9), 从而促进了肿瘤细胞和肿瘤基质细胞的迁移, 导致了肿瘤细胞更加难以被免疫细胞的追踪与杀伤^[10]。此外, M2型巨噬细胞可以通过消耗 L-氨基酸, 产生促进肿瘤细胞增殖的鸟氨酸和多胺^[11]。

1.3 免疫抑制性受体

1.3.1 CTLA4 通常机体内 T 细胞的活性通过激活信号途径和抑制信号途径来调节, 最终导致健康人体内 T 细胞的活性平衡。通过抗原刺激信号

和共刺激信号活化的 T 细胞能够快速增殖和功能分化。当 T 细胞过度活跃时, 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen4, CTLA4) 结合 B7 分子接到的抑制信号将终止 T 细胞的功能。CTLA4 是 CD28 的同系物, 对 T 细胞产生抑制信号, 然后使其处于无活性状态。理论上, CTLA4 募集磷酸酯酶到 T 细胞受体的 CD3 ζ 结构域, 从而通过免疫受体酪氨酸激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 的去磷酸化来减弱 T 细胞的功能。此外, 一些研究已经证明, T 细胞的 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR) 激活能够启动 CTLA4 胞内结构域的磷酸化, 称为免疫受体酪氨酸抑制基序, 同时也能够延长活化的 T 细胞表面 CTLA4 的表达^[12]。基于 CTLA4 功能的原理, 减少 CTLA4 内源性表达或抑制其活性可以用于肿瘤的免疫治疗。

1.3.2 PD-1 继 CTLA4 后肿瘤免疫治疗领域另一个重要免疫检查点是程序性死亡受体 1(programmed death 1, PD-1), 它是一种细胞表面受体, 属于免疫球蛋白超家族, 仅在活化的 T 淋巴细胞上表达。在结构上, 成熟的 PD-1 蛋白包含细胞外识别结构域、跨膜区以及细胞内尾部。功能上, PD-1 在抑制 T 细胞活性中起重要作用。具有两个磷酸化位点的尾部, 一个 ITM 和一个基于免疫受体酪氨酸的转换基序, 它们均负调节 T 细胞受体信号。如果肿瘤细胞激活 PD-1, 也会产生抑制信号, 从而阻止效应 T 细胞的增殖, 使 T 细胞不能及时有效地识别肿瘤细胞, 从而使肿瘤细胞逃避免疫细胞的追杀。基于 CTLA4 和 PD-1 在不同抑制途径中的功能, CTLA4 抗体和 PD-1 抗体的联合治疗已经成为通过检查点抑制从而对抗肿瘤的有效方法^[13]。

1.3.3 其他免疫检查点 尽管 CTLA4 和 PD-1 通路能够有效地负调节 T 淋巴细胞的免疫应答, 但它们仅代表抑制抗肿瘤应答潜在靶点的“冰山一角”。随着肿瘤免疫治疗中 T 细胞的发展, 随后又发现多种抑制免疫应答的免疫检查点, 例如淋巴细胞激活基因 3(lymphocyte-activation gene3, LAG3), T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 3(T-cellimmunoglobulin mucin 3, TM3) 和 T 细胞活化的 V 域 Ig 抑制剂(V-domain Ig suppressor of T cell activation, VISTA)。蛋白 LAG3 是一种细胞耗竭的标记, 在激活的 T 细

胞和其他免疫细胞上广泛表达,它是一种重要的抑制性受体,能够以比 CD4 更高的亲和力结合主要组织相容性复合体 II 类(major histocompatibility complex class II, MHC II),进而阻止抗肿瘤免疫反应。在 T 细胞上表达的受体蛋白 TIM3 可以启动 TIM3/Galectin-9 信号传导途径,其可以抑制淋巴细胞应答并促进细胞凋亡^[14]。VISTA 是一种在造血细胞和白细胞上表达的负调节受体,可降低 T 细胞的活性和细胞毒性细胞因子的产生^[15]。

1.4 缺乏趋化因子受体

CAR-T 细胞治疗实体瘤的主要障碍是 T 细胞难以渗入实体瘤组织内部。趋化因子是一类能够吸引白细胞到感染部位的蛋白质,介导多种免疫细胞进入肿瘤微环境,帮助 T 细胞进入肿瘤并影响肿瘤免疫和治疗效果。一些实体瘤能够分泌趋化因子,如趋化因子 12(CXCL12) 和趋化因子 15(CXCL5),但肿瘤细胞抑制这些因子的分泌会不

利于 T 细胞的渗透。相反,T 细胞表面缺乏表达一些与实体瘤分泌的趋化因子相匹配的趋化因子受体^[16]。一些报道显示,虽然实体瘤能够大量分泌趋化因子,如属于 C-C 趋化因子家族的 CCL2,但是相应的趋化因子受体,如可特异性结合 CCL2 的 CCR2b 和 CCR4,在 T 细胞上表达量很低,这导致 T 细胞归巢能力的降低。

1.5 肿瘤抗原不均一性

众所周知,CAR-T 细胞通过 scFv 结构识别并靶向肿瘤细胞表面抗原,scFv 由单克隆抗体的轻链和重链的可变结构域抗体组成。膜蛋白 CD19 在几乎所有的 B 细胞恶性肿瘤中均有广泛表达,这导致了 CD19 特异性 CAR-T 细胞的治疗效果令人鼓舞。然而,对于实体瘤,由于缺乏肿瘤特异性抗原以及肿瘤抗原的异质性,CAR-T 细胞治疗的应用受到严重限制。目前进行临床试验的 CAR-T 靶点见表 1。

表 1 处于临床试验阶段的 CAR-T 实体瘤靶点

靶点	CAR 结构	肿瘤类型
前列腺特异性膜抗原(PSMA)	CD3 ζ 和 CD28	前列腺癌
间皮素(MSLN)	CD3 和 4-1BB	恶性胸膜间皮瘤、前列腺癌
	CD3 ζ 和 CD28	恶性胸膜间皮瘤
	CD3 ζ 、CD28 和 4-1BB	间皮瘤、胰腺癌和软组织癌
成纤维细胞活化蛋白(FPA)	CD3 ζ 和 CD28	间皮瘤
表皮生长因子 vIII(EGFRvIII)	CD3 ζ 和 4-1BB	神经胶质瘤
	CD3 ζ 、CD28 和 4-1BB	神经胶质瘤
癌胚抗原(CEA)	CD3 ζ 和 CD28	继发性肝癌
CD171	CD3 ζ 、4-1BB 或者 CD3 ζ 、CD28 和 4-1BB	神经母细胞瘤
神经节苷脂糖 2(GD2)	CD3 ζ 、OX40 和 CD28	神经母细胞瘤、骨肉瘤和黑色素瘤
磷脂酰肌醇蛋白聚酶 3(GPC3)	CD3 ζ 、CD28 和 4-1BB	晚期肝癌
人表皮生长因子受体-2(HER2)	CD3 ζ 和 CD28	胶质母细胞瘤
白细胞介素 13(IL-13)	CD3 ζ 和 4-1BB	神经胶质瘤

1.6 免疫系统中的其他免疫抑制因子

1.6.1 CD47 在人体免疫系统中,巨噬细胞基于靶细胞上吞噬信号(“吃我”)和抗吞噬信号(“不吃我”)之间的平衡发挥吞噬功能。抗吞噬信号取决于靶细胞上表达的 CD47 分子与巨噬细胞上呈递的信号调节蛋白 α (signal regulatory protein α , SIRP α) 之间的相互作用,导致 SIRP α 的 ITM 磷酸化。跨膜蛋白 CD47 在许多肿瘤细胞中均过度表达^[17]。通常 CD47-SIRP α 介导的抗吞噬细胞信号

允许肿瘤细胞逃避免疫监视。因此,为了增强免疫系统应对肿瘤的能力,CD47 可以用作肿瘤免疫治疗领域的新靶点。

1.6.2 CD73 和腺苷 CAR-T 细胞治疗实体瘤未取得成功很大程度上是由于腺苷的大量产生。腺苷由胞外腺苷一磷酸通过胞外酶催化产生,CD73 在肿瘤细胞或免疫抑制性细胞上表达,有助于将具有免疫激活作用的 ATP 转化为腺苷^[18]。产生的腺苷促进肿瘤生长和疾病发展,导致 T 细胞和 NK

细胞的细胞毒性被抑制,细胞因子的产生和增殖被抑制从而抑制抗原呈递细胞,促进Terg的增殖和抑制免疫活性,刺激MDSC和M2型巨噬细胞的极化^[19]。

总之,在被抑制的免疫“监视”条件下,CAR修饰的T细胞会面临许多障碍。随着对肿瘤生物学和免疫学的进一步研究,科学家开发了一些策略克服这些障碍,使得对于实体瘤应用CAR-T成为可能。本文根据作用机制进一步描述了这些方法如何改善TME,进而增强T细胞功能。

2 提高CAR-T细胞功能的策略

2.1 选择肿瘤特异性抗原

CAR结构的抗原特异性直接决定了修饰T细胞的精确活性和安全性。然而,对于实体瘤,肿瘤抗原的异质性导致无效的免疫监视,从而导致难治性和复发性肿瘤。一些研究人员试图找到肿瘤干细胞的标志物,这些标志物在肿瘤分化的早期阶段被认为是肿瘤特异性抗原。有研究报道,生殖干细胞(POWIL2)异化激活产物(PL2L60)在各种血癌和实体瘤中广泛表达,介导肿瘤的发生发展,同时PIWIL2/PL2L60蛋白特异性单克隆抗体(克隆KAO3)可以抑制癌前干细胞在免疫缺陷小鼠内的致瘤能力,也能有效抑制多种肿瘤生长,包括淋巴瘤、乳腺癌、肺癌和宫颈癌等^[20]。鉴定肿瘤特异性抗原为开发用于实体瘤的靶向疗法提供了强有力的新工具。

2.2 CAR-T细胞的浸润和归巢

2.2.1 趋化因子受体 为了增强T细胞对肿瘤的归巢能力,一些趋化性手段给予T细胞强大的靶向实体瘤的能力。肿瘤细胞分泌的趋化因子与修饰T细胞上的趋化因子受体相结合可促进更多的T细胞到达实体瘤部位。对于恶性胸膜间皮瘤,同时表达CCR2b和间皮素特异性CAR-T细胞可增加其迁移至肿瘤部位并消除靶细胞的能力。此外,其他研究小组也已经描述了类似的CAR方法,具有更强的运输和抗肿瘤效力,例如在治疗霍奇金淋巴瘤中使用表达CCR4的CD30特异性CAR-T细胞和在神经母细胞瘤中使用表达CCR2b的GD2特异性CAR-T细胞^[21]。在这些研究中,用功能性趋化因子受体修饰的CAR-T细胞在体内具有显著的肿瘤定位和抗肿瘤效力。

2.2.2 成纤维细胞活化蛋白 先前的报道已经证明肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)能够促进血管生成,在实体瘤的进展和转移中发挥重要作用。因此,CAF是肿瘤恶性进展的关键决定因素,是肿瘤治疗的重要目标。靶向CAF是CAR-T治疗实体瘤的新方法。Schuberth等^[22]利用CAR开发了一种特异性针对成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)的T细胞,FAP在CAF上大量表达,在异种移植间皮瘤的动物模型试验结果中显示,FAP-CAR-T治疗能显著提升生存时间,提高生存率。Wang等^[23]研究表明,靶向FAP阳性细胞通过表位扩展增强抗肿瘤免疫活性。在小鼠间皮瘤与肺癌模型中,使用FAP-CAR治疗3d后,内源性CD4⁺ T细胞活化,随后内源性CD69⁺,CD8⁺ T细胞浸润数量增加。使用CAF-CAR-T细胞进行的临床试验正在进行中(NCT01722149)。总之,靶向CAF的治疗策略是根除肿瘤的有效方法。

2.2.3 整合素 对于实体瘤而言,修饰的T细胞缺乏浸润肿瘤实质的能力,导致其体内效力十分有限。一般而言,整合素 $\alpha v\beta 3$ 在实体瘤的新生血管内皮细胞表面高度表达,靶向整合素是可以解决T细胞缺乏浸润能力的问题。因此,Fu等^[24]提出了一种很有发展前景的策略,即将T细胞植入能偶靶向 $\alpha v\beta 3$ 的含有echistatin的CAR(T-eCAR)。T-eCAR细胞的回输影响肿瘤新生血管系统,导致肿瘤显著缩小,但对正常组织的血管没有脱靶效应。一项基于靶向整合素 $\beta 7$ 的研究设计了MMG49 CAR特异性靶向整合素 $\beta 7$ 活性构象,该靶点在大多数骨髓瘤细胞表面表达且具有活性构象,体内实验结果表明,MMG49 CAR-T会特异性杀死小鼠体内的骨髓瘤细胞,具有显著的抗肿瘤活性且对正常细胞没有伤害^[25]。

2.3 共表达免疫因子和酶

细胞因子是一种信号蛋白,具有显著增强或消除CAR-T细胞功能的能力。与免疫刺激细胞因子共同表达的CAR可显著提高免疫抑制性,例如IL-12可以调控T细胞多种T细胞的发育,对免疫反应的方向以及免疫相关疾病具有显著影响;IL-15在T细胞运输过程中起关键作用。同时为了进一步提升抵抗TME的能力,T细胞被改造以表达一些细胞因子,如IL-12或IL-15,并分泌一些酶,如过

氧化氢酶等,结构如图3所示。

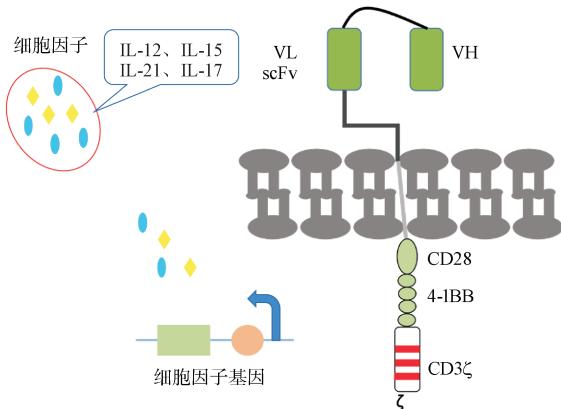


图3 共表达细胞因子的CAR-T结构

2.3.1 IL-12 免疫调节细胞因子 IL-12 能够促进免疫抑制的快速逆转,在 T 淋巴细胞和其他免疫细胞的活化中起重要作用,是抗肿瘤免疫的有效诱导剂。通过设计表达 IL-12 的 CAR-T 细胞可以作为改进 CAR-T 的新思路。Pegram 等^[26]报道,分泌 IL-12 的靶向 CD19 的 CAR-T 细胞能消除全身性肿瘤并获得最佳的抗肿瘤反应。另一个研究也显示,通过基因工程改造 CAR-T 细胞使其分泌微量 IL-12,体内实验中,与 4 只未经治疗的小鼠相比,分泌 IL-12 的 CAR-T 细胞疗法显著提高了 7 只淋巴瘤小鼠的存活时间。另外,分泌 IL-12 的 CAR-T 细胞称为 TRUCKs,不仅增强修饰 T 细胞的活化和细胞毒性,而且还导致 Th1 极化状态,吸引内源性 T 细胞和其他先天免疫细胞根除肿瘤细胞。

2.3.2 IL-15 一些研究表明,细胞因子 IL-15 通过结合 IL2R $\beta\gamma\zeta$ 复合物,能够有效增强记忆性 CD8 $^+$ T 细胞和 NK 细胞的功能,而不激活具有免疫抑制功能的调节性 T 淋巴细胞。通过设计表达 IL-15 的 CAR-T 细胞便可以增强免疫细胞的功能,改善突破肿瘤微环境。Chow 等^[27]证明 IL-15 在体内 CD8 $^+$ T 细胞的运输中发挥重要作用。因此,表达 IL-15 的 T 细胞可以作为消除免疫抑制微环境中靶细胞的有效武器。有研究联合表达 IL-15 的 CD19 CAR-T 细胞疗法,比较 CD19 CAR-T 与 IL15-CD19 CAR-T 抗肿瘤能力,给予抗原刺激后,IL-15 CD19 CAR-T 具有比 CD19 CAR-T 细胞更大的增殖能力,并且在异种移植淋巴瘤动物模型中,注射 IL-15 CD19 CAR-T 细胞的小鼠肿瘤消除更快,具有更强的肿瘤杀伤活性,且不对正常细胞进行杀伤^[28]。

上述研究证明了 CAR-T 细胞通过联合分泌 IL-15 可以增强 CAR-T 细胞的增殖能力提高抗肿瘤活性。

2.3.3 过氧化氢酶 在实体瘤中,浸润的 T 细胞经常会遇到丰富的活性氧,这是肿瘤微环境的一个标志,会损害修饰 T 细胞的抗肿瘤活性。保护 T 细胞免受氧化应激的一种方法是设计一种 CAR-T 细胞共同表达过氧化氢酶。Ligtenberg 等^[29]开发了一种新型 T 细胞模式(称为 CAR-CAT-T 细胞),具有共表达过氧化氢酶的 CAR,其催化过氧化氢转化为水和氧,从而改善肿瘤微环境,提升免疫细胞的抗肿瘤活性。作者还在体外对癌胚抗原(CEA)和从表皮生长因子受体-2(HER2)CAR-T 细胞进行了检测,发现与单纯 CAR 相比,此类 CAR-T 具有较低的氧化状态,并具有较好的增殖活力和细胞毒性。工程化的 T 细胞可以通过代谢过氧化氢和减少氧化应激介导的抑制来减少肿瘤的氧化状态,并保持其抗肿瘤活性。

2.3.4 HVEM(疱疹病毒侵入介体) 疱疹病毒侵入介体(herpesvirus entry mediator, HVEM, 图 4),被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员 14(TNFRSF14),是中心淋巴瘤中最常见的突变基因,这些突变可破坏与 BTLA(B and T lymphocyte attenuator, B、T 淋巴细胞衰减因子) 的抑制性受体之间的相互作用,通过恶化淋巴基质活化和增加滤泡辅助性 T 细胞的招募从而诱导淋巴细胞癌生长所需的关键微环境。工程化 T 细胞可以携带 HVEM 从而阻止 HVEM-BTLA 作用被破坏。HVEM 的丢失通常驱动中心淋巴瘤的发生并诱导肿瘤微环境。Boice 等^[30]设计携带可溶性 HVEM 的 CD19 特异性 CAR-T 细胞,通过释放可溶性 HVEM 在局部增强对淋巴瘤的治疗活性,携带 HVEM 的 CD19 CAR-T 具有更强大的抗肿瘤活性。这些研究结果也阐明了一种新方法,来修复肿瘤抑制性的 HVEM-BTLA 交互,并抑制了淋巴瘤细胞的生长。此外该方法也表明,CAR-T 细胞不仅直接攻击肿瘤细胞,同时还具有精确治疗的药物传递工具。

2.4 修饰一些相关受体

2.4.1 4-1BBL 最近的一些报道显示,第 2 代 CAR 组成型表达 CD28 配体或 4-1BB 配体(CD80 或 4-1BBL) 可以增强体内 T 细胞活性,当 4-1BB 与 4-1BBL 或抗体激动剂结合,共刺激信号可促进 T 细胞的增殖和活化,并抑制活化诱导的细胞凋亡,进

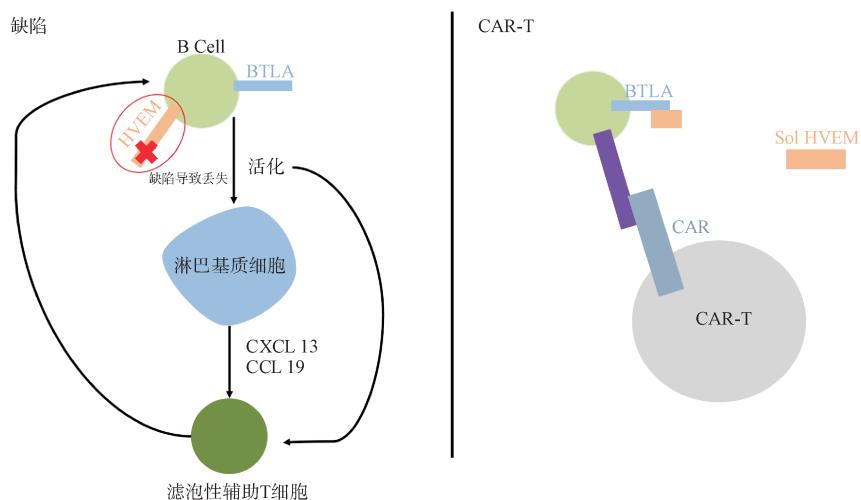


图4 疱疹病毒侵入介体(HVEM)缺失机制

而增强T细胞的免疫杀伤功能。同时,诱导单核细胞等活化,促进细胞因子的分泌,使单核细胞、树突状细胞等在免疫调节中发挥作用。这可能以双向的方式在T细胞内直接传导信号,并间接触发TME中其他表达4-1BB的免疫细胞。在第2代CAR组成型表达4-1BBL的研究中,与正常的CD19 CAR-T相比,表达4-1BBL的CAR-T细胞在体内实验以最低剂量注射,且在回输CAR-T后一周便消除了肿瘤,显著优于CD19 CAR-T^[31]。因此,共表达4-1BBL可称为CAR-T设计的一种有效思路。

2.4.2 CD40L 实体瘤的免疫治疗需要有效地破坏免疫抑制的肿瘤微环境。CD40-CD40L介导的信号能够诱导抗原呈递细胞的活化,增强对弱免疫原性肿瘤细胞抗原的呈递,从而诱导肿瘤特异性免疫。设计CAR-T细胞表达CD40L便可以激活该信号通路,增加其抗肿瘤活性。Marigo等^[32]证实在树突状细胞分泌肿瘤坏死因子时,CD40/CD40L信号通路对与CD8⁺ T细胞介导的肿瘤排斥是必须的,CD8⁺ T细胞是有效抗肿瘤细胞免疫的核心。另外CD40分子与活化的T细胞表面CD40L相互作用,增强T细胞的细胞毒活性,增加细胞因子的释放,有效提高宿主的抗肿瘤免疫反应。因此,可以设想通过将CAR修饰T细胞与CD40-CD40L途径组合来实现肿瘤的消除。

2.4.3 DN TGF-βR Dominant-negative TGF-β受体(DN TGF-βR)是一类TGF-β的受体,可以结合TGF-β,从而减少TGF-β的量,进而减少免疫抑制

效应。TME中存在许多由肿瘤细胞分泌的免疫抑制性细胞因子,包括显著抑制肿瘤特异性免疫的TGF-β。基于此机制,减少T细胞表面该受体的表达是克服TGF-β诱导免疫抑制的有效策略。Bolland等^[33]证明EBV特异性T细胞表达DN TGF-βR可以抑制TGF-β的抑制作用,从而延长T细胞存活时间,体内试验中,表达DN TGF-βR的CAR-T细胞在模型体内的存活时间明显优于正常的CAR-T细胞,从而提升CAR-T细胞在体内的作用时间,提升抗肿瘤活性。在临床试验NCT03089293涉及前列腺癌的治疗过程中,在前列腺特异性膜抗原靶向CAR载体中表达dominant-negative TGFβ受体,以减少TGF-β抑制T细胞的活性的作用。目前该临床试验还处于I期。

2.5 阻断免疫检查点

先前的报道显示,实体瘤采用各种对策来削弱T细胞的细胞毒性,包括T细胞表达的免疫检查点。这些在活化的T细胞上表达的免疫性受体与表达在靶细胞上的配体具有高亲和力,有效抑制T细胞的效力。为了克服这一障碍,一些有效的技术已经出现,包括单克隆抗体(mAb)和基因编辑。对于mAb免疫疗法,与免疫检查点阻断相关的临床试验已经证明,mAb可以逆转T细胞耗竭并恢复抗肿瘤免疫性,如抗PD-1的mAb,抗LAG3的mAb和抗BISTA的mAb。

CRISPR/Cas9技术开发了破坏免疫检查点来重新编程T细胞的非病毒方法。Su等证明通过电转染编码sgRNA和Cas9的治理来敲除T细胞的

PD-1, 导致 PD-1 表达的显著降低, 细胞毒性显著增强。Gao 等^[34]证明利用 CRISPR/Cas9 系统敲除 CTLA4 的细胞毒性 T 细胞能够抑制肿瘤生长并促进肿瘤根除。因此, 包括 CAR-T 细胞和检查点阻断在哪的一体化方法有助于提高 T 细胞的功效。

为了逆转 PDL-1 介导的 T 细胞耗竭, Prosser 等^[35]提供了一种新策略, 通过将 PD-1 的跨膜和胞内域与 CD28 进行交换, 从而将 PD-1 转化为 T 细胞共刺激受体。研究表明, 肿瘤 PDL1 能够显著刺激表达 PD-1, CD28 嵌合受体的 T 细胞, 导致细胞因子分泌增加并增加细胞毒性。

3 应用前景

CAR-T 细胞疗法在一些针对血液恶性肿瘤的临床试验中取得巨大成功, 为治疗富含免疫抑制因子的实体瘤提供了一种可行的方案。最近几年, 免疫抑制环境的特征已经详细阐明, 提出了一些能够让 CAR-T 细胞克服这些障碍和增强肿瘤消除的新方法。有研究报道联合使用特殊设计的分子佐剂可以增强 CAR-T 的杀伤活性, 也为探索 CAR-T 的实体瘤治疗提供了新的思路与方向^[36]。借鉴于 CAR-T 治疗实体瘤的研究, 在抗衰老方面 CAR-T 的应用也加速进行, 近些年就有多篇报道关于 CAR-T 抗衰老研究, 主要是应用于直接对抗衰老细胞^[37], 其基础也是基于 CAR-T 的实体瘤治疗。本文概述了实体瘤 TME 对免疫监视的抑制机制, 并探讨了通过优化 CAR 结构和改善肿瘤诱导的免疫抑制环境来增强 CAR-T 细胞功效的一些有前景的方法。为了增强 CAR-T 细胞治疗实体瘤的疗效, 通过修饰 T 细胞以维持细胞毒性, 同时通过重塑改善实体瘤肿瘤微环境以增强效应细胞的疗效, 以此来达到 CAR-T 细胞治疗实体肿瘤的目的。

References

- [1] Yip A, Webster RM. The market for chimeric antigen receptor T cell therapies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, **17**(3):161.
- [2] Lee SY, Olsen P, Lee DH, et al. Preclinical optimization of a CD20-specific chimeric antigen receptor vector and culture conditions[J]. *J Immunother*, 2018, **41**(1):19-31.
- [3] Gomes-Silva D, Mukherjee M, Srinivasan M, et al. Tonic 4-1BB costimulation in chimeric antigen receptor impedes T cell survival and is vector-dependent[J]. *Cell Rep*, 2017, **21**(1):17-26.
- [4] Mardiana S, John LB, Henderson MA, et al. A multifunctional role for adjuvant anti-4-1BB therapy in augmenting antitumor response by chimeric antigen receptor T cell[J]. *Cancer Res*, 2017, **77**(6):1296-1309.
- [5] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2016, **97**:4-27.
- [6] Digre A, Singh K, Abrink M, et al. Overexpression of heparinase enhances T lymphocyte activities and intensifies the inflammatory response in a model of murine rheumatoid arthritis[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**:46229.
- [7] Foutenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. *Nat Immunol*, 2003, **4**(4):330.
- [8] Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E. Myeloid-Derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects[J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, **91**(8):493-502.
- [9] Li T, Li X, Zamani A, et al. C-Rel is a myeloid checkpoint for cancer immunotherapy[J]. *Nat Cancer*, 2020, **1**(5):507-517.
- [10] Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis[J]. *Cell*, 2006, **124**(2):263.
- [11] Sharda DR, Yu S, Ray M, et al. Regulation of macrophage arginase expression and tumor growth by the Ron receptor tyrosine kinase[J]. *J Immunol*, 2011, **187**(5):2181-2192.
- [12] Baroja ML, Luenberg D, Chau T, et al. The inhibitory function of CTLA-4 does not require its tyrosine phosphorylation[J]. *J Immunol*, 2000, **164**(1):49-55.
- [13] Curran MA, Montalvo W, Yagita H, et al. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors[J]. *PNAS*, 2010, **107**(9):4275-4280.
- [14] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity[J]. *Nat Immunol*, 2005, **6**(12):1245-1252.
- [15] Wang L, Rubinstein R, Lines JL, et al. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses[J]. *J Exp Med*, 2011, **208**(3):577-592.
- [16] Harlin H, Meng Y, Peterson AC, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8⁺ T-cell recruitment[J]. *Cancer Res*, 2009, **69**(7):3077-3085.
- [17] Sick E, Jeanne A, Schneider C, et al. CD47 update: a multifaceted actor in the tumor microenvironment of potential therapeutic interest[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, **167**(7):1415-1430.
- [18] Weber WP, Feder-Mengus C, Chiarugi A, et al. Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8⁺ T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines[J]. *Eur J Immunol*, 2006, **36**(2):296-304.
- [19] Della CM, Carlonagno S, Frumento G, et al. The tryptophan catabolite L-kynurenone inhibits the surface expression of

- NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function [J]. *Blood*, 2006, **108**(13):4118-4125.
- [20] Ye Y, Yin DT, Li C, et al. Identification of Piwil-like (PL2L) proteins that promote tumorigenesis [J]. *PLoS One*, 2010, **5**(10):e13406.
- [21] Craddock JA, Lu A, Bear A, et al. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b [J]. *J Immunother*, 2010, **33**(8):780-788.
- [22] Schuberth PC, Hagedorn C, Jensen SM, et al. Treatment of malignant pleural mesothelioma by fibroblast activation protein-specific re-directed T cells [J]. *J Transl Med*, 2013, **11**(1):187.
- [23] Wang Y, Xu Y, Li SS, et al. Targeting FLT3 in acute myeloid leukemia using ligand-based chimeric antigen receptor engineered T cells [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, **11**(1):60.
- [24] Fu X, Rivera A, Tao L, et al. Genetically modified T cells targeting neovasculature efficiently destroy tumor blood vessels, shrink established solid tumors and increase nanoparticle delivery [J]. *Int J Cancer*, 2013, **133**(10):2483-2492.
- [25] Hosen N, Matsunaga Y, Hasegawa K, et al. The activated conformation of integrin β 7 is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy [J]. *Nat Med*, 2017, **23**(12):1436-1443.
- [26] Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning [J]. *Blood*, 2012, **119**(18):4133-4141.
- [27] Chow KPN, Qiu JT, Lee JM, et al. Selective reduction of post-selection CD8 thymocyte proliferation in IL-15R α Deficient Mice [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(3):e33152.
- [28] Marin V, Hoyos VM, Savoldo B, et al. *In vitro* and *in vivo* mode of a novel immunotherapy approach for chronic lymphocytic leukemia by anti-CD23 chimeric antigen receptor [J]. *Blood*, 2011, **117**(18):4736-4745.
- [29] Ligtenberg MA, Mougakakos D, Mukhopadhyay M, et al. Coexpressed catalase protects chimeric antigen receptor-redirected T cells as well as bystander cells from oxidative stress-induced loss of antitumor activity [J]. *J Immunol*, 2016, **196**(2):759-766.
- [30] Boice M, Salloum D, Mourcin F, et al. Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T cells [J]. *Cell*, 2016, **167**(2):405-418.
- [31] Holohan DR, Lee JC, Bluestone JA, et al. Shifting the evolving CAR T cell platform into higher gear [J]. *Cancer Cell*, 2015, **28**(4):401-402.
- [32] Marigo I, Zilio S, Desantis G, et al. T Cell cancer therapy requires CD40-CD40L activation of tumor necrosis factor and inducible nitric-oxide-synthase-producing dendritic cells [J]. *Cancer Cell*, 2016, **30**(3):377-390.
- [33] Bolland CM, Rossig C, Calonge MJ, et al. Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity [J]. *Blood*, 2002, **99**(9):3179-3187.
- [34] Gao J, Shi LZ, Zhao H, et al. Loss of IFN- γ pathway genes in tumor cells as a mechanism of resistance to anti-CTLA-4 therapy [J]. *Cell*, 2016, **167**(2):397-404.
- [35] Prosser ME, Brown CE, Shami AF, et al. Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8(+) cytotoxic T cells modified to express a PD1; CD28 chimeric receptor [J]. *Mol Immunol*, 2012, **51**(3/4):263-272.
- [36] Ma L, Dichwakar T, Chang JYH, et al. Enhanced CAR-T cell activity against solid tumors by vaccine boosting through the chimeric receptor [J]. *Science*, 2019, **365**(6449):162-168.
- [37] Amor C, Feucht J, Leibold J, et al. Senolytic CAR T cells reverse senescence-associated pathologies [J]. *Nature*, 2020, **5839**(7814):127-132.
- [38] Sachdeva M, Busser BW, Temburni S, et al. Repurposing endogenous immune pathways to tailor and control chimeric antigen receptor T cell functionality [J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1):5100.