

嵌合抗原受体修饰 T 细胞免疫治疗肿瘤的研究进展

Progress of cancer immunotherapy by chimeric antigen receptor-engineered T cells

秦方园, 陈雅宁 综述; 韩双印 审阅 (郑州大学人民医院 转化医学中心, 河南 郑州 450003)

[摘 要] 以嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰 T 细胞为基础的肿瘤过继细胞免疫治疗近年来取得了很大的进步,它赋予 T 细胞靶向杀伤活性,并可克服肿瘤局部免疫抑制微环境和打破宿主免疫耐受状态。CAR 以单链抗体-共刺激分子-免疫受体酪氨酸活化基序的嵌合模式修饰 T 细胞显示出良好的抗肿瘤作用, I / II 期临床试验在白血病、淋巴瘤等恶性肿瘤中取得了令人鼓舞的治疗效果; CAR 修饰 T 细胞临床治疗也带来了挑战,比如脱靶效应、细胞因子风暴、移植物抗宿主病样损伤等。研究者正在通过安装人工基因调控系统、优化共刺激分子、筛选最佳治疗潜质的 T 细胞亚群来提高 CAR 修饰 T 细胞的有效性和安全性,相信随着研究的不段深入,基于 CAR 的免疫治疗新策略会给肿瘤患者带来新的希望。

[关键词] 过继细胞免疫治疗;嵌合抗原受体;肿瘤;基因治疗;靶向免疫

[中图分类号] R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0648-04

随着肿瘤免疫学理论和技术的发展,过继细胞免疫治疗近年来取得了长足的进步。以嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰 T 细胞为代表的肿瘤靶向免疫治疗的成就尤为突出^[1],在体外和临床试验中表现出良好的靶向性、杀伤性和持久性,展示了巨大的应用潜力和发展前景。

1 CAR 的原理和发展

CAR 修饰 T 细胞是将识别肿瘤相关抗原的单链抗体和 T 细胞的活化基序结合为一体,即将抗体对肿瘤抗原的高亲和力与 T 淋巴细胞的杀伤机制相结合,通过基因转导方法转染 T 细胞,使其具有特异性识别并杀伤肿瘤细胞的能力^[2]。第一代 CAR 由识别肿瘤表面抗原的单链抗体(single chain fragment variable, scFv)和免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM, 通常为 CD3 ζ 和 Fc ϵ RI γ)组成。然而, ITAM 发出的激活信号只能引起 T 细胞短暂的分裂和较低水平的细胞因子分泌,不能提供长时间的多克隆扩增和持续的体内抗肿瘤效应。依照 T 细胞活化的双信号学说, T 细胞的激活和增殖需要共刺激信号,因此第二代和第三代 CAR 引入了共刺激分子信号序列(costimulatory molecule, CM), 如 CD28、DAP10、CD134 和 CD137 等^[3], 提高了 T 细胞的细胞毒性、增殖活性、存活时间、细胞因子释放等(图 1)。众多的研究^[4]以肿瘤抗原识别-细胞因子释放-细胞毒性反应激活的功能结构,用电穿孔、转座子系统、逆转录病毒、慢病毒等基因转导方法修饰

T 细胞,验证了 Her2、CEA、PSMA 等单链抗体及 CD28、CD134 和 CD137 等共刺激分子转染 T 细胞的抗肿瘤作用,表现出了令人满意的抗肿瘤作用。

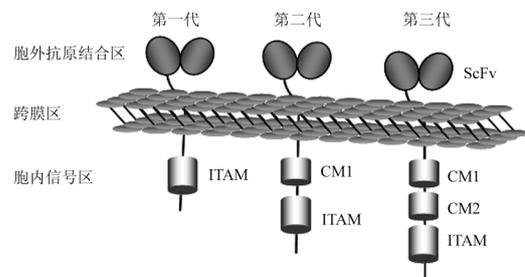


图 1 嵌合抗原受体结构示意图
ScFv: 单链抗体; CM: 共刺激分子;
ITAM: 免疫受体酪氨酸活化基序

2 CAR 修饰 T 细胞的临床应用

近年来, CAR 修饰 T 细胞技术在白血病、淋巴瘤、黑素瘤、脑胶质瘤等恶性肿瘤中显示出良好的抗肿瘤效应。2011 年美国 June 研究小组^[5-6]在《新英格兰医学杂志》和《科学·转化医学》上发表了应用

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81172415)。Project supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81172415)

[作者简介] 秦方园(1982 -),女,河南省郑州市人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗基础研究。E-mail: qinfangyuan@hnbeike.com

[通信作者] 韩双印(HAN Shuang-yin, corresponding author), E-mail: shuangyinhan@yahoo.com

CAR 修饰 T 细胞成功治疗慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 的临床研究报告,引起了广泛的关注。该研究用第二代 CD19-CAR(scFvCD19-CD137-CD3 ξ)修饰的 T 细胞靶向治疗 CLL,接受治疗的 3 例患者,CAR⁺ T 细胞不但在体内扩增 1 000 倍以上,还维持有效治疗活性达 6 个月以上,2 例患者病情达到完全缓解。部分 CAR 修饰 T 细胞甚至以记忆细胞形式存在,再次接触 CLL 细胞时会产生快速反应。Till 等^[7]用第一代 CD20-CAR 质粒电穿孔修饰 T 细胞治疗 7 例 B 细胞淋巴瘤,2 例较早地出现完全反应,1 例显示了部分反应,4 例病情稳定。在另一项研究^[8]中,17 例转移性黑色素瘤患者接受了靶向人黑色素瘤标志物 α -MART-1 的 CAR 修饰 T 细胞治疗,2 例患者的肿瘤完全消退,15 例患者外周血中持久存在相当比例的移植 T 细胞(9%~56%),且病情稳定。Pule 等^[9]将 GD2 作为靶抗原,利用第二代 CAR 修饰 EBV 特异性 T 细胞治疗儿童成神经细胞瘤,结果表明,EBV 特异性 CAR 修饰 T 细胞输注后在患者循环中存活长达 6 周,而非 EBV 特异性细胞仅维持 1 周,治疗的 11 例患者中 6 例肿瘤减退或肿瘤细胞坏死。此外还有以 HER-2、CEA、EGFRv III 为靶点分别治疗乳腺癌^[10]、结肠癌^[11]和胶质瘤^[12],以前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen,PSMA)为靶点治疗前列腺癌^[13]、以胎儿型乙酰胆碱受体(embryonic-type nicotinic acetylcholine receptors, γ -nAChR)为靶点治疗横纹肌肉瘤^[14]、以上皮黏蛋白(mucin-1,MUC-1)为靶点治疗乳腺癌^[15]等,多数都取得了一定的临床效果。

3 CAR 修饰 T 细胞临床应用中的的一些问题

随着 CAR 修饰 T 细胞临床应用的增多,其安全性等问题也引起人们的关注,2010 年美国 DNA 重组委员会召开专门研讨会总结了 CAR 修饰 T 细胞临床试验的结果^[16]。CAR 临床应用的主要挑战在于这种“超自然”T 细胞的脱靶效应、细胞因子风暴和移植物抗宿主病样损伤。

3.1 CAR 修饰 T 细胞的脱靶效应

CAR 修饰 T 细胞临床应用的一个重要问题是脱靶效应。作为分子靶点的肿瘤抗原中,真正的肿瘤特异性抗原很少,大多数为肿瘤相关抗原。如果这些抗原在重要脏器上也有表达,势必造成免疫损伤。当然一些组织可能通过天然的屏障免于受到 CAR 修饰 T 细胞的攻击,如睾丸,但是体内大多数组织不具备这些屏障。例如,用特异性识别碳酸酐

酶-IX(carbonic anhydrase-IX,CA-IX)CAR 修饰 T 细胞治疗转移性肾细胞癌可能会造成肝细胞毒性,因为正常肝脏细胞上低水平表达 CA-IX^[17]。Rosenberg 小组^[18]报道 1 例接受 CD19-CAR 修饰 T 细胞治疗淋巴瘤患者,外周血 CD19⁺淋巴瘤细胞消除的同时,其 B 细胞也消失长达 39 周,表明脱靶效应对健康成熟 B 细胞存在潜在威胁。

3.2 CAR 修饰 T 细胞引起的细胞因子风暴

CAR 修饰 T 细胞的共刺激分子信号泄漏或激活阈值偏低会造成细胞因子风暴。CAR 修饰 T 细胞与肿瘤抗原的结合使 T 细胞活化,这一结果可能导致大量的炎症细胞因子释放到循环中,如 IFN- γ 和 TNF- α 等,即所谓“细胞因子风暴”^[19],这会引起急性呼吸窘迫综合征和多器官功能衰竭,有时甚至危及患者生命,因此,密切监测重要器官的功能是必需的。一例 CLL 患者接受环磷酰胺治疗 2 d 后使用第二代 CD19-CAR⁺ T 细胞进行抗肿瘤治疗后,出现了低血压、呼吸困难和肾衰竭。尸检后分析,可能是环磷酰胺增强了 CD19-CAR⁺ T 细胞的“细胞因子风暴”效应所致^[20]。美国国家癌症研究所(National Cancer Institute,NCI)研究人员^[21]报道一例结肠癌合并肝和肺转移患者接受第三代 HER2-CAR 修饰 T 细胞治疗 5 d 后死亡,血液中有高水平的 IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 、IL-6 等细胞因子,考虑与输注大量的 HER2-CAR⁺ T 细胞结合抗原后释放的过量细胞因子有关。

3.3 CAR 修饰 T 细胞引起的移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)样损伤

CAR 修饰 T 细胞应用的另一个问题是发生类似于异基因造血干细胞移植中出现的 GVHD^[22]。移植物抗肿瘤作用(graft versus tumour effect,GVT)常常伴随着免疫效应细胞对正常组织的攻击,尤其是当肿瘤相关抗原在健康组织也有表达的时候,其抗癌效能与其毒性程度相关联。例如靶向 MART-1 的 CAR⁺ T 细胞治疗黑色素瘤的临床试验中,一些患者出现了皮疹、葡萄膜炎或听力减退,严重者出现多器官功能衰竭而死亡^[23]。如何保证发挥 CAR⁺ T 细胞生物有效性的同时,减少其潜在危险性,是实现基因及细胞治疗恶性肿瘤需要解决的问题之一。

4 提高 CAR 修饰 T 细胞临床应用安全性的对策

4.1 人工调控 CAR 表达

人工调控基因表达是实现基因治疗的安全策略之一。当 CAR⁺ T 细胞输入患者体内出现明显免疫损伤时,利用人工基因调控手段(如启动自杀基因)清

除 CAR⁺T 细胞, 可以防止严重不良事件的发生。为此, 一些自杀基因系统引入了 CAR 共同修饰 T 细胞, 以增加治疗的安全性, 如单纯疱疹病毒胸苷激酶/丙氧鸟苷(herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir, HSV-TK/GCV)、化学诱导二聚化/半胱天冬酶 9(chemical induced dimer/caspases 9, CID/casp9) 等。HSV-TK/GCV 系统是应用最早的可调控自杀基因, 已有超过 100 例患者接受了 HSV-TK 调控的基因或细胞治疗, 也被用于 CAR⁺T 细胞治疗^[24]。但是, HSV-TK 的免疫原性、GCV 的不兼容性和细胞周期依赖性给它的临床应用带来了局限性。CID/casp9 是通过化学诱导二聚化激活凋亡相关基因 caspase-9, 启动细胞凋亡调控 CAR⁺T 细胞。他克莫司结合蛋白-12(FK506 binding protein-12, FKBP-12) 近年常用于诱导二聚化, 将其与 caspase-9 连接, 可以激活后者, 清除 CAR⁺T 细胞^[25-26]。FKBP12-CID 作为可调控的安全开关, 具有本底低、特异性强、诱导效率高等特点。另外, 有研究利用抗 CD20 的利妥昔单抗(rituximab) 清除 CAR⁺T 细胞^[27]。用 CD20 与 CAR 一起修饰 T 细胞, 使 CAR⁺T 细胞也表达 CD20, 当需要清除 CAR⁺T 细胞时, 给予 rituximab, 利用抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用清除 CAR⁺T 细胞。Rituximab 的优点为人源化抗体不良反应小, 缺陷是正常 B 细胞的损耗。

4.2 T 细胞亚群/型选择

CAR 的修饰赋予 T 细胞抗原特异性杀伤和抗原依赖性增殖, 然而, 过继转移的细胞还需要克服肿瘤局部免疫抑制微环境和打破宿主免疫耐受状态, 需要记忆 T 细胞的启动和维持、Th1/Th2 极化方向的正确诱导等^[28]。哪个亚型的 T 细胞能够担当重任, 表现出良好的治疗潜质呢? 有证据^[29-30]表明, 尽管效应记忆 T 细胞(effector memory T cell, T_{EM}) 细胞在体外毒性方面优于中枢记忆 T 细胞(central memory T cell, T_{CM}), 但在体内 T_{CM} 具有较强的抗肿瘤效应和建立免疫记忆潜能。CAR 修饰的初始 T 细胞亚群/型也影响它们的体外扩增和体内治疗作用。CAR 修饰的 T 细胞体外扩增时, CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞共同培养对细胞毒效应 T 细胞的大量制备有帮助; 树突状细胞与 T 细胞共培养对幼稚 T 细胞到效应/记忆 T 细胞转化、细胞因子分泌(Th1/Th2) 有重要作用。精确地分离和检测潜在最有效的 T 细胞亚群/型, 用少量的细胞达到最佳的治疗效果, 将会提高临床应用的安全性。

4.3 最佳共刺激分子的选择

CAR 胞内信号区不同的共刺激分子激活 T 细

胞产生的抗肿瘤效应有所差异, 比如在细胞毒性、细胞因子分泌、增殖活性、存活时间等方面。Brentjens 等^[31]将 CD28、CD134 和 CD137 等共刺激分子分别嵌合到 CD3 ζ 链上, 发现仅有 CD28-CD3 ζ 组合可以不依赖外源的 B7 共刺激, 在接触抗原后使修饰的 T 细胞显著增殖, 说明 CD28 是必要的共刺激分子。CD134 是另一个重要的共刺激分子, 一些研究^[32]显示它的信号作用可以进一步增强 CD28 修饰的 T 细胞活化, 将 CD134 嵌合到 CD28 和 CD3 ζ 链的第三代 CAR, 能使移植后的 T 细胞持久增殖和增强 IL-2 分泌。另外, 有研究^[33]表明, CD137 能提高 T 细胞存活和抵抗激活诱导性细胞凋亡(activation-induced cell death, AICD)。因此, 选择最佳的共刺激分子达到良好的抗肿瘤作用, 又避免引起不必要的免疫损伤也是提高安全性的策略之一。

5 展望

CAR 修饰 T 细胞肿瘤免疫治疗理论上的优势和临床前期试验结果使其具有诱人的应用前景, 正以难以置信的速度在国外进行 I/II 期临床研究。目前, 人们一方面寻找肿瘤特异性抗原作为分子靶点^[34]和开发适合 CAR 的单链抗体; 另一方面, 优化 CAR 的结构、筛选良好治疗潜质的 T 细胞亚群/型, 以提高其有效性和安全性^[35-36]。随着研究的不断深入, 相信不久的将来 CAR 修饰 T 细胞会给肿瘤治疗带来新的希望。

[参考文献]

- [1] Lipowska-Bhalla G, Gilham DE, Hawkins RE, et al. Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: Achievements and challenges [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(7): 953-962.
- [2] Ramos CA, Dotti G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2011, 11(7): 855-873.
- [3] Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells [J]. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(11): 550-557.
- [4] Pham CD, Mitchell DA. Chasing cancer with chimeric antigen receptor therapy [J]. *Immunotherapy*, 2012, 4(4): 365-367.
- [5] Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725-733.
- [6] Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(95): 95-73.
- [7] Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for

- indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells [J]. *Blood*, 2008, 112(6): 2261-2271.
- [8] Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes [J]. *Science*, 2006, 314(5796): 126-129.
- [9] Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor specific receptors: Persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma [J]. *Nat Med*, 2008, 14(11): 1264-1270.
- [10] Wang H, Wei H, Zhang R, et al. Genetically targeted T cells eradicate established breast cancer in syngeneic mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3): 943-950.
- [11] Sasaki T, Ikeda H, Sato M, et al. Antitumor activity of chimeric immunoreceptor gene-modified Tc1 and Th1 cells against autologous carcinoembryonic antigen-expressing colon cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(9): 920-927.
- [12] Ohno M, Natsume A, Ichiro Iwami K, et al. Retrovirally engineered T-cell-based immunotherapy targeting type III variant epidermal growth factor receptor, a glioma-associated antigen [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(12): 2518-2524.
- [13] Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, et al. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(2): 413-420.
- [14] Gattenlöhner S, Marx A, Markfort B, et al. Rhabdomyosarcoma lysis by T cells expressing a human autoantibody-based chimeric receptor targeting the fetal acetylcholine receptor [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 24-28.
- [15] Maher J, Wilkie S. CAR mechanics: Driving T cells into the MUC of cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(11): 4559-4562.
- [16] Ertl HC, Zaia J, Rosenberg SA, et al. Considerations for the clinical application of chimeric antigen receptor T cells: Observations from a recombinant DNA advisory committee symposium held June 15, 2010 [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3175-3181.
- [17] Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically re-targeted against carbonic anhydrase IX: First clinical experience [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(13): e20-22.
- [18] Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19 [J]. *Blood*, 2010, 116(20): 4099-4102.
- [19] Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells [J]. *Blood*, 2012, 119(12): 2709-2720.
- [20] Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: Case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 666-668.
- [21] Morgan RA, Yang JC, Kitano M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2 [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(4): 843-851.
- [22] Brentjens RJ, Rivière I, Park JH, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias [J]. *Blood*, 2011, 118(18): 4817-4828.
- [23] Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen [J]. *Blood*, 2009, 114(3): 535-546.
- [24] Casucci M, Bondanza A. Suicide gene therapy to increase the safety of chimeric antigen receptor-redirectioned T lymphocytes [J]. *J Cancer*, 2011, 2(1): 378-382.
- [25] Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(18): 1673-1683.
- [26] Ramos CA, Asgari Z, Liu E, et al. An inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of mesenchymal stromal cell therapies [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(6): 1107-1115.
- [27] Introna M, Barbui AM, Bambiacioni F, et al. Genetic modification of human T cells with CD20: A strategy to purify and lyse transduced cells with anti-CD20 antibodies [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(4): 611-620.
- [28] Kohn DB, Dotti G, Brentjens R, et al. CARs on track in the clinic [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(3): 432-438.
- [29] Neeson P, Shin A, Tainton KM, et al. *Ex vivo* culture of chimeric antigen receptor T cells generates functional CD8⁺ T cells with effector and central memory-like phenotype [J]. *Gene Ther*, 2010, 17(9): 1105-1116.
- [30] 何以丰, 狄文. 癌相关 CD8⁺ 记忆 T 细胞在过继免疫治疗中的应用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(2): 116-121.
- [31] Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18 Pt 1): 5426-5435.
- [32] Redmond WL, Ruby CE, Weinberg AD. The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival [J]. *Crit Rev Immunol*, 2009, 29(3): 187-201.
- [33] Song DG, Ye Q, Carpenito C, et al. *In vivo* persistence, tumor localization, and antitumor activity of CAR-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD137 (4-1BB) [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13): 4617-4627.
- [34] Shirasu N, Kuroki M. Functional design of chimeric T-cell antigen receptors for adoptive immunotherapy of cancer: Architecture and outcomes [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(6): 2377-2383.
- [35] Gilham DE, Debets R, Pule M, et al. CAR-T cells and solid tumors: Tuning T cells to challenge an inveterate foe [J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(7): 377-384.
- [36] Stroncek DF, Berger C, Cheever MA, et al. New directions in cellular therapy of cancer: A summary of the summit on cellular therapy for cancer [J]. *J Transl Med*, 2012, 10(1): 48-52.

[收稿日期] 2012 - 06 - 15

[修回日期] 2012 - 09 - 25

[本文编辑] 王莹