

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.02.003

· 院士论坛 ·

## 肿瘤精准细胞免疫治疗: 梦想照进现实

钱其军, 吴孟超(第二军医大学 东方肝胆外科医院, 上海 200438)



**钱其军** 博士, 博士生导师, 上海细胞治疗研究院院长、上海细胞治疗工程技术研究中心主任、上海吴孟超肿瘤医学中心执行主任、第二军医大学肿瘤生物治疗诊治中心主任、第二军医大学东方肝胆外科医院生物治疗科主任及病毒治疗实验室主任; 国家杰出青年基金获得者, 上海市领军人才及优秀学科带头人。中国医师协会肿瘤防治规范化培训工作委员会委员, 中国医药生物技术协会基因治疗分会常委, 中国医药生物技术协会医药生物技术临床应用专业常委, 中华医学会肿瘤学分会肝癌学组委员, 中国抗癌协会肝癌学组委员, 中国抗癌协会肿瘤生物治疗专业委员会委员。《中华肿瘤杂志》、《中国肿瘤生物治疗杂志》、《癌症》杂志编委, 《中国组织工程研究与临床康复》杂志首席编委, 《药学实践杂志》副主编。主要从事肿瘤的基因-病毒治疗及免疫细胞过继治疗方面的研究, 作为负责人承担国家杰出青年基金项目 1 项、国家自然科学基金国际合作重大项目 1 项、国家自然科学基金重点项目 1 项、国家自然科学基金海外杰出青年项目 1 项(国内负责人)、国家自然科学基金面上项目 3 项、国家“863 计划”研究项目 2 项及艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病的防治重大专项研究子项目 1 项。近年来, 荣获国家与省部级奖项 7 项, 在 *Cancer Res*、*Clin Cancer Res*、*Mol Ther* 等发表 SCI-E 收录论文 61 篇, 授权发明专利 13 项(含美国发明专利 2 项)。E-mail: qianqj@163.com



**吴孟超** 国际著名肝胆外科专家, 中国科学院院士, 主任医师、教授, 现任第二军医大学东方肝胆外科医院院长、东方肝胆外科研究所所长, 国际外科学会会员和国际肝胆胰协会会员, 兼任中华医学会咨询委员会主任、中德医学协会副理事长、第九届解放军医学科学技术委员会顾问、《黄家驹外科学》第七版主编等职。曾任中华医学会副会长、中国癌症基金会副主席、军队医学科学技术委员会常务委员、中日消化道外科学会中方主席等学术职务。是我国肝脏外科的主要创始人、国际肝癌研究的重要开拓者、肝脏外科事业的重要推动者, 所领导的学科从一个“三人研究小组”发展到目前的三级甲等专科医院和肝胆外科研究所, 成为国际上规模最大的肝胆疾病诊疗中心和科研基地。从事肝脏外科领域的研究五十多年来, 获国家、军队和上海市科技进步一、二等奖 24 项, 出版《腹部外科手术学图谱》、《肝脏外科学》等专著 18 部, 在国内外知名刊物上发表学术论文 1 200 余篇。1994 年获全国“侨界十杰”荣誉称号、陈家庚医学科学奖、香港何梁何利医学奖, 1996 年由中央军委授予“模范医学专家”荣誉称号, 2005 年获国家最高科学技术奖, 2011 年获国际小行星命名, 2012 年当选感动中国年度人物。E-mail: mcwu@public.sta.net.cn

**[摘要]** 精准医疗( precision medicine )作为一种全新的医学概念与医疗模式, 已日益在恶性肿瘤临床治疗中显示其价值。精准细胞免疫治疗( precision cell immunotherapy, PCIT)是基于肿瘤患者基因检测, 筛选可引起强烈免疫反应的新抗原( neo-antigen ), 进而寻找并富集针对新抗原的精准 T 细胞( precision T cell for neo-antigen, PNA-T ), 扩增后回输患者的治疗新策略。相对于其他精准医学治疗方式, 精准细胞免疫治疗具有比较独特的优势, 有望成为中国肿瘤精准医学治疗的重要突破口。本文围绕肿瘤精准细胞免疫治疗面临的机遇与挑战, 从概念、特点、流程、技术难点等方面进行了详细阐述, 并对比了其与传统基因嵌合抗原受体 T 细胞( chimeric antigen receptor T cell, CAR-T )的异同, 勾勒出肿瘤精准细胞免疫治疗的美好前景。

**[关键词]** 精准医疗; 肿瘤; 精准细胞免疫治疗; 精准 T 细胞; 嵌合抗原受体 T 细胞

**[中图分类号]** R730.51; R730.54; Q789

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2015)02-0151-08

## Precision cancer immunotherapy: From theory to practice

Qian Qijun, Wu Mengchao ( Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China )

**[基金项目]** 国家科技重大专项资助项目( No. 2013ZX09102-060, 2013ZX10002-010-007, 2012ZX0002-014-005 )。Project supported by the National Key Science and Technology Program of China ( No. 2013ZX09102-060, 2013ZX10002-010-007, 2012ZX0002-014-005 )

[ **Abstract** ] Precision medicine is a novel medical concept and medical model. Its benefits in the treatment of malignant tumors are being increasingly demonstrated in clinical settings. Precision immunotherapy is one of precision medicine strategies. In case of cancer treatment, precision immunotherapy involves genetic screening of mutations, identification of the neo-antigen(s) capable of triggering strong immune responses using bioinformatics tools, screening and enrichment of the precision T cells for Neo-Antigen(s) (referred to as PNA-Ts), and amplification of the PNA-Ts in a large scale and trans-fusion of the PNA-Ts back into the autologous patients. Among the various existing treatment strategies for cancer patients, precision immunotherapy, by virtue of its unique advantages, is expected to become an important breakthrough in the treatment of cancer in China. This paper aims to outline the concept, features, processes, technical difficulties, etc. of precision cancer immunotherapy and compare the cons and pros of precision immunotherapy and chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy. We will also discuss the opportunities and challenges of precision immunotherapy in the treatment of cancer, particularly in China.

[ **Keywords** ] precision medicine; tumor; precision cell immunotherapy; precision T cell; chimeric antigen receptor T cell

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22(2): 151-158 ]

自 2015 年 1 月 20 日美国总统奥巴马高调宣布启动“精准医疗计划(Precision Medicine Initiative)”以来,全球范围内掀起一股精准医疗热。在国内,精准医疗也风生水起,受到业内学者、药企代表、患者等相关人群的广泛关注。精准医疗本质上是一种更为精确的个性化医疗,非常适用于恶性肿瘤的临床治疗。而相对于其他精准医疗策略,精准细胞免疫治疗(precision cell immunotherapy, PCIT)具有开发周期相对较短、投入相对较低的优势,适合我国的国情,具有巨大的应用前景,有望成为我国恶性肿瘤精准医疗的一大突破口。

## 1 精准医疗是肿瘤临床治疗的必然趋势

精准医疗(precision medicine)是通过基因组、蛋白质组等组学技术和医学前沿技术,对疾病进行精细分类及精确诊断,从而对疾病和特定患者进行个性化精准治疗的新型医学概念与医疗模式<sup>[1]</sup>。2011 年,在“人类基因组计划”完成近 10 年后,这一概念由美国著名基因组学家 Olson 博士在其参与起草的美国国家智库报告《走向精准医疗》中首次提出。精准医疗模式集合了诸多现代医学科技发展的知识与技术体系,体现了医学科学发展趋势,也代表了临床实践发展的方向,将带来一场新的医疗革命并将深刻影响未来医疗模式。正是基于此考虑,2015 年 1 月 20 日,美国总统奥巴马在白宫高调宣布启动“精准医疗计划”,拟通过分析 100 万名志愿者的基因信息,研究遗传性变异在疾病发生发展中的作用,了解疾病治疗的分子基础,为药物研发与患者“精准治疗”明确方向,以推动个性化医疗的发展,并希望以此“引领一个医学新时代”。

在美国提出的精准医疗计划中,恶性肿瘤的精准医疗是“重中之重”,美国国立卫生研究院下设的国家癌症研究所将接受重点资助开展解码肿瘤基因及开发精准治疗研究。那么,为什么要从肿瘤着手开展精准医疗计划呢?诚然,这与当前日趋严峻的肿瘤防治形势相关,另一个重要的原因是提升肿瘤疗效的迫切需求。众所周知,肿瘤本质上是一种由一系列基因变异的积累导致的复杂遗传疾病,这意味着肿瘤的基因组是动态变化的,且存在着高度异质性。不同的疾病进展阶段以及不同的肿瘤细胞可能携带不同的变异信息,从而对以大规模人群为基础开发和测试药物的治疗模式构成了颠覆性挑战。据一项覆盖 9 个国家和地区的 1 217 例患者的泛亚洲科研显示:如果没有基因检测鉴定相关的靶标却接受了靶向治疗,死亡风险将增加 185%<sup>[2]</sup>。而新一代测序技术能够无假设、高分辨率地分析基因组,获知这些不同的变异信息,能为制定更具针对性和有效性的防治措施提供准确依据,指导医生对患者采取个性化用药。基于上述原因,精准医疗模式已然成为癌症治疗刻不容缓的任务,是恶性肿瘤治疗的大势所趋。

在具体操作中,肿瘤精准医疗通常可划分为以下三部曲:基因检测,大数据分析和用药指导。第一步,基因检测是患者变异信息的获知过程,如通过高通量测序方法获得肿瘤单核苷酸有义突变、拷贝数变异、基因移位和融合基因等海量基因变异信息,该环节中相关检测技术的精确性及所检测对象(如肿瘤组织标本)所反映信息的全面性是关键。第二步,大数据分析是相关变异信息的解码与提炼过程,即从海量的组学数据中抽丝剥茧、去粗存精,提取有

价值信息,发挥前后两个环节之间承上启下的作用,该环节相应分析模型与分析方法的精确性是关键。第三步,用药指导是以大数据分析结果作为参考,制定因人、因病而异的治疗方案的过程;而治疗的结果也可以反馈到第一个环节,通过新的环路保证治疗能随病情的变化而做出相应的调整。候选药物可涵盖所有类型恶性肿瘤临床用药,甚至用于其他疾病治疗的药物。该环节中,可供选择的治疗药物的丰富度直接关系到实施精准医疗治疗的成败。

精准医疗直指恶性肿瘤临床治疗的软肋,其好处不言而喻,已在临床治疗中越来越显现其价值。然而,每个患者多个癌细胞在癌变过程中与之相关的基因突变位点有成千上万处,而其中起决定性作用的基因突变往往不足十处,如何从每个患者成千上万处体细胞突变中找到每个肿瘤细胞真正的阿喀琉斯之踵,即引发癌变的关键基因,并非是一件容易的事;由于肿瘤的异质性,同一肿瘤患者不同癌细胞的基因突变并不一定相同,不同关键基因突变的随机组合,导致癌症治疗难度大为增加;更为严重的事是癌症细胞周期检查点已破坏,各种新突变及融合基因仍在不断累积,这些新突变及融合基因可能会破坏这些靶向药物的靶点及其下游信号,从而使靶向治疗药物失效。因此,看似已抑制了关键基因,但癌症细胞又建立新的关键基因并产生旁路。按精准医学模式,希望将癌症变为一种慢性病,但从发现靶点—使用靶向药物—靶点突变或建立新旁路—癌症复发—寻找新靶点—使用新靶向药物,这种反复的猫捉老鼠的游戏,传统药物开发手段难以开发满足所有变异信息的治疗药物,同时肿瘤基因突变的速度可导致费尽心思寻找到的药物在几个月时间内失效,患者只能辗转于不同药物的变换,对患者家庭乃至整个医疗保险体系造成巨大经济负担。肿瘤精准医疗的这一系统性缺陷应值得引起充分的重视。

## 2 精准细胞免疫治疗是肿瘤精准医疗的重要突破口

人类的免疫系统具有高度的特异性,能正确区分正常和恶性细胞,能以高度的敏感性和特异性识别“非自我的”分子或细胞,功能正常的T淋巴细胞能通过其细胞表面TCR受体(T cell receptor)正确识别肿瘤细胞中“非自我”改变,清除肿瘤细胞。因而,从这个意义上说,通过激活、修复、改构、甚至重建患者抗肿瘤免疫细胞反应的治疗方法,尤其肿瘤细胞免疫治疗,天然具有精准治疗的特征。通过激活患者体内残存肿瘤特异性T细胞的治疗方式,已被证实具有良好的临床疗效<sup>[3-8]</sup>。更值得庆幸的是,不同T细胞所

携带的TCR受体千差万别,具有高度的多样性,为实施针对不同肿瘤变异信息的精准医学治疗提供了足够的广度。而且,免疫细胞来源于患者自体,作为一种“活的药物”,具有自主性与自我适应能力,能有效缩短开发时间<sup>[9]</sup>。因而,精准细胞免疫治疗有望成为肿瘤精准医疗的一个重要突破口。

本文定义的精准细胞免疫治疗是通过高通量基因测序及大数据分析,获得针对癌细胞特异性新抗原(neo-antigens)和具有高效应的精准T细胞(precision T cell for neoantigen, PNA-T),富集PNA-T对肿瘤患者进行精准免疫治疗。涉及的步骤(图1)包括:(1)基因检测:高通量基因检测手段获取患者的癌细胞特有的基因变异信息(包括突变、融合基因等),从中筛选出能高效激活免疫反应的肿瘤特异性新抗原,这种新抗原可以来自细胞核、细胞质、细胞膜任何部位;(2)免疫靶点的筛选:根据患者的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分型,寻找能引发强烈免疫的新表位(neo-epitopes);(3)寻找并富集针对新抗原表位的PNA-T:主要通过负载新表位的树突状细胞(dendritic cells, DC)刺激,标记后的MHC-新表位耦联体流式/磁珠分选富集PNA-T,克隆PNA-T的TCR基因,通过转基因修饰手段快速获得转基因PNA-T;(4)过继细胞回输治疗:大量扩增PNA-T,实施过继回输治疗,并跟踪PNA-T的变化规律与肿瘤关系。因而,肿瘤精准细胞免疫治疗是更为个性化的免疫细胞治疗技术,属于第三代免疫细胞治疗技术(三代免疫细胞治疗技术的比较见表1)。

虽然肿瘤精准细胞免疫治疗是一个新概念,但该领域内研究者已进行了一些探索研究<sup>[10-11]</sup>。2013年,Rosenberg领导的团队率先采用外显子测序技术,鉴别在患者中表达的突变蛋白,并用一种MHC分子-抗原表位亲和力算法进行模拟预测评估,进而合成候选的抗原表位,开展免疫反应验证。通过此方法,研究人员能快速鉴别出了在患者肿瘤细胞上表达,能被肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TIL)识别的突变抗原<sup>[12]</sup>。2014年,Rosenberg团队将该方法成功应用到临床,他们通过高深度外显子测序技术、免疫反应功能验证,筛选出一位转移性胆管癌患者的高频突变基因,并鉴定到其对应的TIL克隆,通过大量扩增该TIL克隆并实施回输治疗,使患者的病情得到有效控制<sup>[13]</sup>。2014年底,另一个研究团队联合应用外显子测序技术、转录组测序技术、高通量蛋白质谱分析技术,及MHC分子-抗原表位亲和力模拟预测技术,寻找到

能被 T 细胞识别从而高效激活免疫反应的多肽疫苗,该个性化肿瘤疫苗兼具预防性疫苗与治疗性疫苗的效能<sup>[6]</sup>。笔者研究团队作为全国第一家获得细胞治疗应用批文的单位,对精准医疗在免疫细胞治疗方向中应用的重要性有深刻的体会,前瞻性地

开展了精准细胞免疫治疗的技术开发,搭建了高通量测序平台,采用了患者循环肿瘤细胞的富集与单细胞分离技术、免疫新靶点的生物信息学筛选技术等,为实施精准细胞免疫治疗打下坚实的基础。

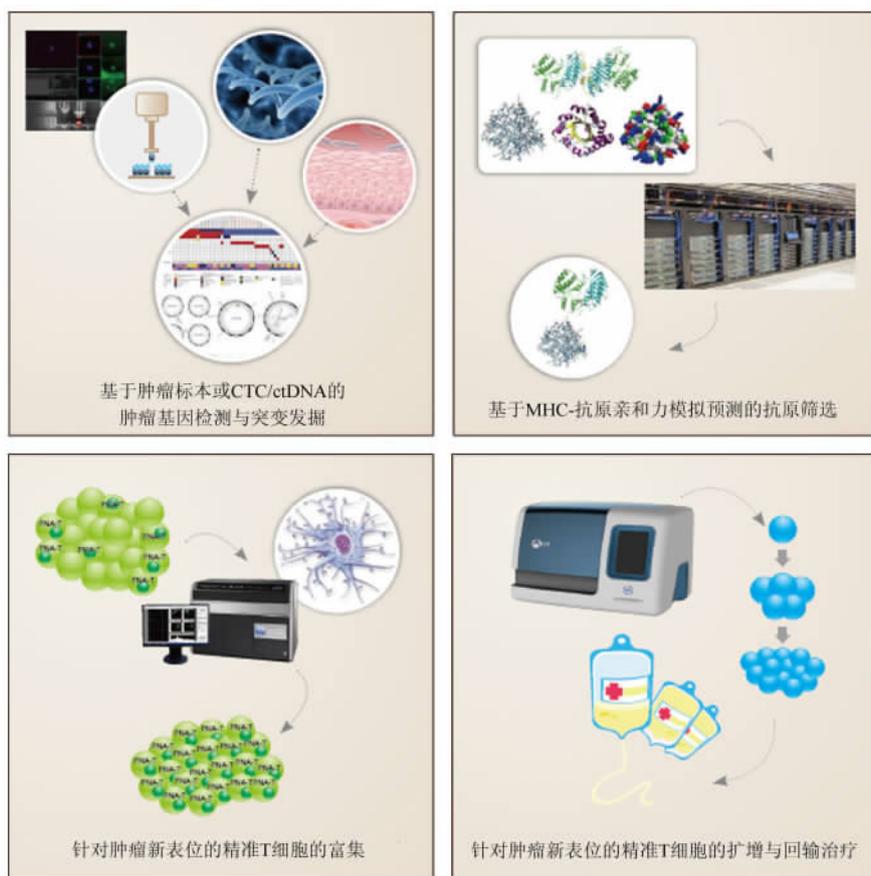


图 1 精准细胞免疫治疗的大致流程

CTC:循环肿瘤细胞( circulating tumor cell );ctDNA:循环肿瘤 DNA( circulating tumor DNA );  
MHC:主要组织相容性复合体( major histocompatibility complex )

表 1 三代免疫细胞治疗技术的比较

发展阶段	名称	代表性产品	应用状态	疗效	技术难度
第一代	非特异性细胞免疫治疗	LAK、NK、CIK、DC(无抗原)-CIK	国内流行	(1)能明显提高患者生活质量; (2)少部分患者能延长生存时间	简单
第二代	特异细胞免疫治疗	针对非个体化、肿瘤常见抗原的 DC 及 DC-CTL 针对个体化、未经筛选肿瘤抗原群的 DC 及 DC-CTL、TIL	国际流行	(1)能明显提高患者生活质量; (2)有相当部分患者能延长生存时间; (3)有些患者长期生存	中等
第三代	精准细胞免疫治疗	应用肿瘤新抗原特异性精准 T 细胞( PNA-T)进行治疗	未来方向	(1)能明显提高患者生活质量; (2)较多患者能延长生存时间; (3)部分患者能被治愈	复杂

### 3 肿瘤精准细胞免疫治疗面临的技术难点

如前所述,免疫治疗的理想靶点具有区别于其他靶向治疗策略的特征:小分子靶向药物注重的是能有效干预对肿瘤细胞生长、侵袭、转移等细胞行为至关重要的基因及调控通路,而细胞免疫治疗的关注点是其能否有效地被免疫系统识别,引起有效的免疫反应。所以,同样从基因检测出发,精准细胞免疫治疗的侧重点具有其特殊性,目前仍有几大技术难题亟待解决。

#### 3.1 方便快速地获取肿瘤患者的基因组变异信息

实际上,这是肿瘤基因检测所面临的共性问题。肿瘤基因检测最直接的对象是患者原代组织标本,但对于那些未进行过手术的肿瘤患者,肿瘤标本不易获取,而活检穿刺的技术虽已较为成熟,但患者接受度相对较低,尤其对那些已发生多处转移的患者。即便之前留有标本,但往往是几个月前甚至是几年前保存的局部标本,鉴于肿瘤基因组的动态性与异质性,它们反映的信息已经是过时的或者代表的信息不全。循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)和循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)由肿瘤发生的各个部位释放入血,能良好地反映患者整体的肿瘤负荷、恶性程度、转移能力以及实时的基因突变信息<sup>[13-14]</sup>。因而,选择 CTC 和 ctDNA 作为基因检测的样品来源,可以保证肿瘤治疗在取样信息上的全面精准,且与组织活检相比具有检查微创小、无放射性污染、经济等优点,并允许对治疗反应进行实时监测。

然而,如何获取高纯度的 CTC 细胞并进行基因测序,以及如何在外周血巨大噪音背景的情况下准确检测 ctDNA 是一项具有挑战的工作。笔者研究团队通过分离介质、抗体捕获、荧光扫描显微技术、激光显微捕获等整合技术平台可以高效获得单个 CTC 细胞用于基因检测;同时开发了通过油滴 PCR 实现在一个油滴内单个 CTC 基因检测技术,以及利用纳米孔径的芯片进行 ctDNA 的肿瘤突变基因检测技术。发展类似于 CAPP-Seq 的超灵敏测序方法,可以实现 100% 地检出 2~4 期 NSCLC 患者 ctDNA,也可检出 1 期 NSCLC 患者 50% 的 ctDNA,可以特异性(96%)检出等位基因突变,并将错误率降低至约 0.02% 水平。这类技术平台有望利用 CTC 和 ctDNA 进行外周血肿瘤基因的精准检测,为精准细胞免疫治疗提供可靠的检测依据。

#### 3.2 快速准确地筛选免疫细胞治疗的合适靶点

在肿瘤表观遗传修饰变异尚无法被有效利用的

现实条件下,细胞免疫治疗更多的着眼点是肿瘤基因组遗传变异,而只有那些能形成新的氨基酸序列且在肿瘤细胞中有效表达的变异信息才能被免疫系统有效识别。因而,通过外显子组测序探知肿瘤的基因组变异信息,通过 RNA 转录组测序确定发生变异的 DNA 的转录情况,是寻找适合免疫治疗新抗原的常规方法。获得一系列候选新抗原信息后,如何从中筛选出能被抗原提呈细胞有效提呈的抗原,即新表位是至关重要的一步。通常的观点认为,能与 MHC 分子高效结合的抗原序列,能更好地形成 MHC 分子-抗原复合物,从而具备更高的概率被提呈到细胞表面,成为新抗原表位。因而,预测 MHC 分子与抗原的亲合力是该环节的关键要素。随着 MHC 分子的空间结构越来越清晰化、准确化,多种 MHC 分子-抗原复合物的数学模型已被建立,通过计算机模拟运算能预估出每种抗原与 MHC 分子的亲合力数值。但鉴于 MHC 分子亚型的多样性,新抗原前后氨基酸序列以不同组合、不同长度形成表位的多样性,数据庞大,目前该预测方法仍不够成熟,假阳性或假阴性仍普遍存在,需要后续耗时耗力的验证工作。因而,MHC 分子与抗原的亲合力的准确预估,仍有待于通过数据的不断积累、预测模型的不断优化来实现。

#### 3.3 高效寻找 PNA-T 的 TCR 组学技术

肿瘤精准细胞免疫治疗最终的效应细胞是 PNA-T。然而,虽然正常人的 TCR 多样性巨大,但肿瘤患者经过长期的免疫编辑,或经过其他非特异性治疗策略处理后,其 TCR 组多样性较正常人明显降低,TCR 多样性的降低预示着患者体内预留的识别特定表位的 TCR 丰富度降低,即使经过上述两个步骤成功寻找到合适的新抗原表位,但可能无法在患者体内找到与之对应的 PNA-T(除非通过转基因 TCR-T 技术实现),精准细胞免疫治疗仍将以失败告终。因而,除了对肿瘤变异信息进行高通量检测分析外,还需从免疫 T 细胞角度进行考量,通过高通量测序的方法评估肿瘤患者体内是否存留能对肿瘤抗原起反应的 PNA-T。目前,利用 TCR 组学高通量测序技术可以较为准确地获得患者的 TCR 多样性数据,可以分析肿瘤患者和正常人之间 TCR 多样性的差异。但由于 TCR 与表位的作用并不是一一对应关系的,即同一个 TCR 可以结合不同的表位,而同一个表位也可能被不同的 TCR 所识别,显然它们之间亲合力会有所差异。而且 TCR 组库测序得到的是大量单独的  $\alpha$  链和  $\beta$  链信息,这些  $\alpha$  链和  $\beta$  链理论上可以通过不同的组合构成千差万别的

TCR。因而,以目前的技术水平仍难以解析出哪个 TCR-T 细胞具有识别特定抗原表位的功能。可以预想,如果通过技术进步以及抗原表位-TCR 配对大数据的积累,能最终实现获得针对特定抗原表位,能快速地鉴别出哪些 T 细胞携带的 TCR 基因能对其有效识别并发挥治疗作用,那么将大大缩短肿瘤免疫治疗的开发进程,为患者的治疗赢得宝贵的时间,并可以通过测序或数字 PCR 等手段检测体内这一群或者单个 PNA-T 的克隆增殖情况,实时监测治疗的获益情况。笔者所在团队正致力于发展基于 CTC 和 ctDNA 为样本来源的肿瘤抗原测序技术以及 TCR 组库的测序技术,包括通过油滴技术实现高通量的单个 T 细胞的微乳滴 PCR (emulsion-PCR, emPCR) 测序来获得  $\alpha$  链和  $\beta$  链的匹配信息,以此打开筛选特定抗原反应性 TCR 受体的方便之门。

### 3.4 新表位特异性 PNA-T 的富集与扩增

实施精准细胞免疫治疗的最后阶段是 PNA-T 克隆的富集与扩增,有 3 个策略可供选择:(1)将新表位负载到患者自体的 DC 中,然后应用成熟的 DC 刺激相应的 PNA-T 亚群特异性增殖。该策略的优点是相对成熟,但由于涉及 DC 的抗原负载、DC 内的抗原加工、DC 对 T 细胞的提呈等一系列过程,各个环节的技术障碍均会影响相应 T 细胞的富集效率;且 DC 扩增不易,导致该流程耗费时间较长。(2)PNA-T 的直接分选。通过在体外合成 HLA-抗原肽四聚体(HLA-peptide tetramer)能够有效地被特异性 T 细胞识别,配合流式细胞分选术,可以从淋巴细胞中分选出抗原特异性的 T 细胞克隆,再通过成熟的 T 细胞培养方案可大量扩增相应的 T 细胞克隆。但分选流式仪器价格昂贵,细胞通量有限,长时间分选会影响细胞活力,对后续细胞培养造成不良影响。为此,笔者实验室建立结合 HLA-抗原肽四聚体与免疫磁珠法的 T 细胞分选技术,有效提高细胞分选通量,且磁珠可通过后续切除消除其对细胞的影响,整个流程符合临床应用规范。下一步将设法将该技术集成到单一仪器设备中,提高操作的便捷性与稳定性。(3)通过转基因修饰手段,将克隆到的 PNA-T 的 TCR 基因导入初始 T 细胞,使其快速具有识别并杀伤携带相应新表位的肿瘤细胞的能力。

### 3.5 基于 PNA-T 变化规律的疗效的实时监控技术

疗效评估是过继细胞免疫治疗的一大技术难点。与其他治疗方式不同,经行过继细胞治疗后,肿瘤负载可能不会立即缩小,甚至可能暂时增大,不利于临床医生对病情的准确掌控。因而,应用 PNA-T

对肿瘤患者实施过继细胞治疗,在治疗过程需要跟踪血液中 PNA-T 及其来源记忆性 T 细胞的数量变化,对比观察其与肿瘤缩小或肿瘤复发、进展的关联性,同时实时监控血液中 CTC、ctDNA 的含量变化以及肿瘤新突变位点出现情况。通过数据的积累,建立关联 PNA-T 体内动态变化规律与患者疗效的数学模型,从而实现医生能对病情实时作准确判定甚至预判的目标,以作出相应治疗对策的调整,使患者能更好地获益。

### 3.6 增强精准细胞免疫治疗体内疗效的辅助技术

相对于体外培养条件,肿瘤部位存在抑制免疫的微环境。例如,肿瘤细胞表面高表达的 PDL1 可与 T 细胞表面 PD1 结合,使浸润到肿瘤部位的 T 细胞失能,这也是为何一些免疫检查点(如 PD1/PDL1、CTLA4)单抗能通过重新激活体内残留的肿瘤特异性 T 细胞,而在实体瘤的临床治疗中发挥良好疗效的基本原理。另一方面,T 细胞的持续发挥作用,需要共刺激信号(T 细胞第二信号)的辅助,回输后的 T 细胞如缺乏共刺激信号,将很快衰竭死亡,这也是嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)T 细胞技术将第一信号与第二信号偶联在同一分子上的根本原因。因而,为有效提高精准细胞免疫治疗的疗效,一方面可以通过免疫检查点单抗的联合使用,阻断肿瘤微环境对回输后肿瘤特异性 T 细胞的不良干扰效应;另一方面,可以借助基因转染技术,将相应的传递共刺激信号元件在体外导入肿瘤特异性 T 细胞,从而延长回输后肿瘤特异性 T 细胞在体内的存活时间与治疗作用。在此方面,笔者团队已建立一系列核心技术,申请中国发明专利 5 项(已授权 1 项),显示出良好的应用价值。

## 4 精准细胞免疫治疗与 CAR-T 细胞治疗的比较

在国际上另一种热门的免疫细胞治疗技术是 CAR-T 细胞治疗技术。精准细胞免疫治疗与它既具有共性特征,也有其各自的特殊属性,两者具体比较见表 2。

CAR 是识别肿瘤细胞膜上肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)的单链抗体和胞内信号域“免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM;通常为 CD3 $\zeta$  或 Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ )”通过铰链区相连构成的嵌合基因。将 CAR 基因通过基因转导/转染的技术导入患者 T 细胞后,使其表达 CAR 基因,获得的 CAR-T 细胞具有识别并攻击表达相应 TAA 的肿瘤细胞的能力。因而,CAR-T 技术本质是通过基因转染手段快速获得

肿瘤杀伤性 T 细胞的方法。由于 CAR-T 细胞所识别的是肿瘤细胞表面的蛋白,而非与 MHC 分子结合形成 MHC-抗原复合物从而被提呈到细胞表面的抗原,因而可绕过 T 细胞的 MHC 分子限制性。而且,CAR-T 技术通常将 T 细胞的第一信号与第二信号偶联到同一分子结构中,使 CAR-T 细胞具有更强的自主性,基本无需其他类型免疫细胞的辅助即可发挥治疗作用。鉴于 CAR-T 技术的精妙设计,其具有广阔的应用前景。

精准细胞免疫治疗与 CAR-T 技术所采用的效应细胞均是患者自体的 T 淋巴细胞,不同之处在于所针对的靶点类型的差别:精准细胞免疫治疗瞄准的是患者特有的新抗原(即肿瘤特异性抗原),这些新抗原与 MHC 分子结合形成 MHC-抗原复合物后被提呈到细胞表面,在被提呈前,这些抗原可以分布在细胞各个位置,包括细胞核、细胞质、细胞膜上,可选择范围更广。所以,不管是效应细胞本身还是所针对的抗原,精准细胞免疫治疗均是个性化的。CAR-T 技术所针对的靶点是表达在肿瘤细胞膜上

的肿瘤相关抗原,可供选择的范围较窄,特异性相对较差;但这一抗原可以是一类患者群体中普遍存在的抗原靶点,如表达于 B 细胞淋巴瘤细胞表面的 CD19 蛋白。因而,CAR-T 技术所选用的效应细胞来源是个性化的,但治疗靶点是非个性化的,无需通过高通量的检测手段配合。

通常情况下,精准细胞免疫治疗策略是从患者自体 T 细胞群体中找到天然存在的、能针对新抗原的肿瘤特异性 T 细胞,归根到底采用的是未经人工改造的天然免疫细胞;而 CAR-T 技术涉及转基因过程,是人工改造的肿瘤特异性 T 细胞。目前,转基因修饰技术多采用慢病毒载体系统,慢病毒为 RNA 病毒,其规模化生产及病毒稳定性均面临诸多技术障碍。为解决该难题,笔者实验室已研发出一套高效的非病毒载体系统,该非病毒载体比慢病毒载体具有更高的转染率,具有易于规模化生产及稳定性高的特点,将为 CAR-T 技术的广泛临床应用铺平道路。

表 2 精准 T 细胞(PNA-T)免疫治疗与 CAR-T 免疫治疗的比较

治疗类型	细胞类别	细胞来源	靶点抗原	靶点类型	适用群体	人工改造	高通量 基因检测
CAR-T	人工改造的肿瘤特异性 T 细胞	患者自体	肿瘤相关抗原	细胞膜蛋白	特定患者群体	必需	非必需
PNA-T	天然的肿瘤特异性 T 细胞	患者自体	肿瘤特异性抗原	细胞膜蛋白、核蛋白、胞质蛋白	患者特有	非必需	必需

## 5 结 语

随着人们对恶性肿瘤认识的不断深刻,已经越来越意识到实施肿瘤精准医疗的必要性与迫切性。而相对于其他基因检测指导下的个性化治疗方式,精准细胞免疫治疗作为一种“活的药物”,为快速制定针对特定新抗原表位的治疗方式提供足够的广度与可行性。因而,有理由相信,精准医学的“重中之重”是肿瘤精准医学,而中国的肿瘤精准医学突破口在于肿瘤精准细胞免疫治疗。随着精准细胞免疫治疗各项配套技术的日趋成熟与完善,它将在恶性肿瘤治疗中发挥越来越重要的作用。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Mirnezami R, Nicholson J, Darzi A. Preparing for precision medicine [ J ]. N Engl J Med, 2012, 366( 6 ): 489-491.  
[ 2 ] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-

paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma [ J ]. N Engl J Med, 2009, 361( 10 ): 947-957.

- [ 3 ] Powles T, Eder JP, Fine GD, et al. MPDL3280A ( anti-PD-L1 ) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer [ J ]. Nature, 2014, 515( 7528 ): 558-562.  
[ 4 ] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance [ J ]. Nature, 2014, 515( 7528 ): 568-571.  
[ 5 ] Gubin MM, Zhang X, Schuster H, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens [ J ]. Nature, 2014, 515( 7528 ): 577-581.  
[ 6 ] Yadav M, Jhunjhunwala S, Phung QT, et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing [ J ]. Nature, 2014, 515( 7528 ): 572-576.  
[ 7 ] Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients [ J ]. Nature, 2014, 515( 7528 ): 563-567.  
[ 8 ] Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy [ J ]. Science, 2015, 348( 6230 ): 56-61.  
[ 9 ] Fischbach MA, Bluestone JA, Lim WA. Cell-based therapeutics:

- The next pillar of medicine [ J ]. *Sci Transl Med*, 2013, 5( 179 ): 179ps7.
- [ 10 ] Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer [ J ]. *Science*, 2015, 348 ( 6230 ): 62-68.
- [ 11 ] Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy [ J ]. *Science*, 2015, 348( 6230 ): 69-74.
- [ 12 ] Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells [ J ]. *Nat Med*, 2013, 19( 6 ): 747-752.
- [ 13 ] Tran E, Turcotte S, Gros A, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4<sup>+</sup> T cells in a patient with epithelial cancer [ J ]. *Science*, 2014, 344( 6184 ): 641-645.
- [ 14 ] Yu M, Bardia A, Aceto N, et al. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility [ J ]. *Science*, 2014, 345( 6193 ):216-220.
- [ 15 ] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies [ J ]. *Sci Transl Med*, 2014, 6( 224 ):224ra24.
- [ 收稿日期 ] 2015 -03 -28 [ 修回日期 ] 2015 -04 -08  
[ 本文编辑 ] 黄静怡

· 科技动态 ·

## MALT1 蛋白通过水解 RNA 结合蛋白 roquin 和 regnase-1 促进 Th17 细胞分化

德国环境与健康研究中心的 Heissmeyer 教授和他的研究团队发现, RNA 结合蛋白 roquin 和 regnase-1 通过靶向 Th17 分化关键因子(如 IL-6、ICOS 和 c-Rel 等)的 mRNA 抑制其分化;而 MALT1 蛋白则可以通过水解 roquin 和 regnase-1 解除这一抑制。其相关研究成果发表在 2014 年 10 月 5 日的 *Nat Immunol* 杂志上。

随着表观遗传学与免疫学的不断交叉发展,表观遗传修饰在免疫应答调控中的作用日渐成为免疫学研究的前沿热点。其中由 RNA 结合蛋白参与的转录后水平修饰通过改变靶向基因的有效翻译或 mRNA 稳定性而影响重大基因的表达,在免疫应答调控中发挥着至关重要的作用。已有研究报道, RNA 结合蛋白如 roquin-1 或 regnase-1 的基因缺失都会导致小鼠产生严重的自身免疫性疾病。Roquin-1 或 regnase-1 可以靶向信号通路关键受体(如 OX40)、细胞因子(如 TNF)等的 mRNA, 改变 mRNA 的稳定性影响其表达,调控免疫反应。但目前为止, roquin-1 或 regnase-1 这两种 RNA 结合蛋白之间的联系,以及二者的免疫调控是否存在协同性仍亟待明确。

Heissmeyer 研究团队构建 Rc3h1fl/flRc3h2fl/flCd4-Cre 小鼠,即 CD4<sup>+</sup> T 细胞中特异性缺失 roquin 蛋白的条件性敲除小鼠。研究发现该小鼠表现出严重的肺部炎症,继而证实发生这种严重疾病的原因是 roquin 蛋白的缺失,导致机体 T 细胞分化失衡,从而使 T 细胞过度往 Th17 方向分化,提示 roquin 蛋白参与了 Th17 分化的调控。该团队进一步对 roquin 蛋白自身的调控进行研究,发现在 TCR 活化情况下, roquin 蛋白被水解,而 MALT1 蛋白参与其中。TCR 活化信号刺激导致 MALT1 蛋白通过识别 roquin 蛋白上的第 510 和 579 位点精氨酸水解该蛋白,从而解除 roquin 蛋白对于 Th17 分化关键因子 OX40、IL-6 等靶向基因表达的抑制作用,促进 T 细胞往 Th17 方向分化。最后,该团队研究了 roquin 和 regnase-1 这两种 RNA 结合蛋白之间的相互关联及在 Th17 分化中的协同作用。研究证实, roquin 和 regnase-1 二者之间存在着蛋白间的相互结合,并相互协同抑制 Th17 的分化,这分别依赖于 roquin 蛋白上的 ROQ 序列和 regnase-1 蛋白的核酸酶活性。简而言之, Heissmeyer 研究团队发现, roquin 蛋白依赖其 ROQ 序列与 regnase-1 蛋白相互结合,通过 regnase-1 蛋白的核酸酶活性靶向 Th17 分化关键因子 OX40、IL-6 等的 mRNA,降低 mRNA 的稳定性,抑制其有效表达,从而控制 Th17 过度极化;而在 TCR 信号活化的条件下, MALT1 可以通过识别 roquin 蛋白上的第 510 和 579 位点精氨酸,水解 roquin 和 regnase-1,从而解除这两种 RNA 结合蛋白对于靶基因的抑制作用,促进 Th17 的分化。

Heissmeyer 团队这一成果,不仅明确了 roquin-1 和 regnase-1 这两种 RNA 结合蛋白在 Th17 分化中的协同关系,深化了转录后水平调控在 T 细胞分化中的作用;同时解释了 roquin-1 蛋白翻译后水平的自身调控机制,将转录后水平修饰、翻译后水平修饰与免疫应答调控三者紧密关联起来。并且该作用对应机制的研究深入详细, roquin-1、regnase-1 和 MALT1 三者之间相互作用具体到关键氨基酸位点,数据详实可信。不过 roquin-1 及 regnase-1 参与免疫应答调控的相关靶基因已被报道,本文中并未提出其他新的靶基因,在这一点上尚缺新意。另外,该研究仅局限为 roquin-1 和 regnase-1 在 T 细胞分化中的调控作用,而这两种蛋白缺陷小鼠在之前报道中严重的疾病情况提示, roquin-1 和 regnase-1 在其他免疫细胞分化活化及应答反应中也发挥着不可或缺的作用,有待深入研究。

[ 夏梦 摘译, 刘娟 审阅. Jeltsch KM, Hu D, Brenner S, et al. *Nat Immunol*, 2014, 15( 11 ):1079-1089. ]