

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.020

肿瘤基因突变组学在肿瘤免疫治疗中的意义

Significance of mutanome in tumor immunotherapy

郑晓¹综述; 鞠景芳², 卢斌峰³, 蒋敬庭¹审阅 (1. 常州市第一人民医院 肿瘤生物诊疗中心, 江苏 常州 213003; 2. Department of Pathology & Cancer Center, Stony Brook University, Stony Brook, NY 11794, USA; 3. Department of Immunology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15213, USA)

[摘要] 肿瘤基因突变的研究为转化医学研究提供了重要手段,对基因突变的深入探索改变了肿瘤的诊断、分类和预后评估方式,显著提高了肿瘤的临床治疗效果,同时也为个体化肿瘤免疫治疗的发展奠定基础并提供了新策略。本文对近年来这些领域的研究和肿瘤免疫治疗的临床应用进展予以介绍,并提出“突变组学(mutanome)”的概念,就基因突变组学与肿瘤的发生、与肿瘤疫苗治疗和过继免疫治疗的关系研究进展等方面作一综述。

[关键词] 突变组;肿瘤免疫治疗;肿瘤疫苗;全外显子组测序

[中图分类号] R730.51; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)06-0794-05

肿瘤是多基因及表观遗传变异的结果,其变异类型包括基因融合、基因拷贝数变化、单碱基突变、原癌基因异常表达、mRNA 异常剪接、表观修饰调控异常、microRNA 调控异常和 DNA 甲基化等。目前开展的肿瘤全基因组分析可高效地识别以点突变和拷贝数变化为主的基因变异,将为转化医学研究提供重要手段。单个患者的突变组合与所在人群的其他个体存在异质性,并且很有可能随着病情的变化而改变,呈现出稳定性,这种异质性和不稳定性决定了每位患者不同的临床特征和治疗效果。由此,提出了将每位肿瘤患者的体细胞基因突变的总和称为“突变组学(mutanome)”的理论体系^[1]。患者个体都携带着属于自身的具有高度特异性的突变标记(mutation signature),且 95% 具有专一性^[1]。新一代测序技术能检测出个体肿瘤的基因突变组表达谱,肿瘤基因突变组研究能够从基因水平发掘和认识这些标志,对于更精细的分子诊断、预后评估和治疗方法的选择等均具有重要意义,为临床干预肿瘤提供了有效的个体化监测手段和免疫治疗新靶点。研究肿瘤基因突变为肿瘤免疫治疗的临床应用、疗效监测与评价体系奠定基础^[2]。本文就近年来基因突变组学与肿瘤的发生、与肿瘤疫苗治疗和过继免疫治疗的关系研究进展综述如下。

1 肿瘤基因突变组学与肿瘤发生的关系

正常细胞的恶性转化常需经过多次突变,在空间上,这些突变存在于不同染色体的各个位置;在时间上,突变出现于肿瘤发生、发展和转归的各个时

相,因此恶性转化是一个多基因参与、突变积累的级联反应。研究^[3]表明,大多数肿瘤都同时携带有多基因突变,并且治疗过程中还会有新的基因突变产生,这些继发突变是肿瘤耐药和侵袭性增加的重要机制。基础研究与临床应用应该关注肿瘤组织的异质性,部分肿瘤患者在初诊时只有很少一部分肿瘤细胞携带导致预后差的基因突变(如 *FLT3* 突变),但该部分细胞往往在化疗后残留并成为复发的主要诱因^[4]。

Alexandrov 等^[5]通过对 7 042 个常见肿瘤患者的基因组进行分析,筛选出了 20 多个 DNA 突变标记,阐释了 30 种临床最常见肿瘤的大部分基因突变类型,揭示了肿瘤发生中基因突变过程的多样性,对重新理解肿瘤病因具有潜在影响。绝大部分肿瘤由机体细胞内 DNA 突变所引起,每个突变过程都在它

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81171653);海外及港澳学者合作研究基金资助(No. 31428005);江苏省条件建设与民生科技专项资金项目资助(No. BL2014034);江苏省科技型企业技术创新基金资助项目(No. BC2012093)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81171653), the Cooperation Research Foundation of Overseas, the Hong Kong and Macao Scholars (No. 31428005), the Conditional Construction the Livelihood Projects of Jiangsu Province(No. BL2014034), and the Technology Innovation Foundation of Jiangsu Science and Technology Enterprise(No. BC2012093)

[作者简介] 郑晓(1985-),男,江苏省常州市人,助理研究员,主要从事肿瘤免疫治疗、细胞与分子生物学研究, E-mail: zhengxia923@163.com

[通信作者] 蒋敬庭(Jiang Jingting, corresponding author), E-mail: jiangjingting@suda.edu.cn

导致的癌症基因组上留下了一种特定的突变模式,即突变标记。一些突变标记存在于多个癌症类型中,而另一些则局限于一种癌症类型。所有的肿瘤都具有两种或以上的标记,反映了肿瘤形成各种过程中的相互作用。在 30 种肿瘤突变标记中,有 25 种是与年龄相关的标记。该项研究还发现了已知能“编辑”突变 DNA 的酶家族,即 apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC),这个酶家族的成员可被病毒感染而激活,从而生成的突变标记有可能在发挥保护细胞、抵御病毒作用的同时,对正常基因组造成间接损害。该研究揭示了大多数肿瘤形成突变过程对肿瘤基因组的作用,对了解肿瘤发生及疾病预防和治疗具有重要意义。

2 肿瘤基因突变组学与肿瘤疫苗治疗

肿瘤抗原是肿瘤免疫治疗的基础,抗肿瘤疫苗可以刺激机体产生免疫反应,达到预防和治疗肿瘤的目的。新一代测序技术通过超快速高通量的测序数据开创了基因组研究的新局面^[6]。小鼠肿瘤基因组^[7]、人类主要肿瘤和细胞系的基因组和外显子组方面的研究^[8-10]发现,肿瘤的发生和发展是由各类突变的组合不断积累导致的,而新一代测序技术能够检测出个体肿瘤的突变组表达谱,从而为临床干预肿瘤提供了有效的个体化监测手段和免疫治疗新靶点。

利用新一代测序技术对人类肿瘤基因突变组的研究发现肿瘤通常携带数十甚至数百种非同义替换突变。可用靶向性作用的方法研究某种特定肿瘤患者所共有的突变,如在 90% 的慢性髓细胞性白血病患者中,小分子抑制剂可靶向作用于 bcr-abl 融合蛋白,从而发挥抗白血病作用。然而,同一类肿瘤患者的共同突变很少,大多数突变具有个体特异性,这在很大程度上阻碍了利用突变组信息开发靶向性治疗药物的进展。因为一旦某种突变被鉴定出来,通常需要有大量的投入用于研究突变对于功能的影响,进而应用于传统靶向治疗,例如需要区分肿瘤突变属于驱动突变(driver mutation)还是乘客突变(passenger mutation)。目前有关这些突变的免疫原性或其引起的免疫反应特性的相关研究尚少。很多突变可作为特别有效的疫苗靶点,因为这些突变能产生不受制于中枢免疫耐受的肿瘤抗原。在小鼠和人类患者中均存在具有免疫原性的肿瘤突变的相关报道,一些突变能诱导小鼠肿瘤抑制^[11-12]和使恶性黑色素瘤患者的肿瘤成为机体自主免疫应答的靶点^[13]。

伴随肿瘤异质性的基因突变多样性为制备多表

位肿瘤疫苗提供了条件。有研究^[1]通过新一代外显子组测序技术鉴别了 B16F10 小鼠黑色素瘤细胞中 962 种非同义替换体细胞点突变,发现了其中的 563 种突变,且其中一些突变可影响调控细胞增殖、黏附、迁移及凋亡的传统肿瘤抑制基因和主要致癌信号通路,从而有可能成为驱动突变,包括在黑色素瘤中发现的 *Aim1* 和 *Trrap* 突变,两者均可用于靶向治疗。肿瘤相关抗原的突变可引起 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞介导的免疫反应^[1,13-14]。人类肿瘤平均携带 100~120 种非同义替换突变。通过计算机模拟预测发现,每个患者约有 40~60 种 HLA I 类限制性表位来源于肿瘤特异性体细胞突变^[15]。在 B16F10 黑色素瘤中鉴定出的 563 种表达蛋白的突变中约有 180 种 T 细胞效应特异性突变,这与由计算机模拟预测的结果一致^[1],但这些研究结果仍需通过大样本量和更广泛的临床实验来验证。

基于深度测序的个体肿瘤基因突变组检测为肿瘤个体化免疫治疗开创了一个新局面,为制备靶向性疫苗奠定了基础^[16-19]。每个肿瘤患者都拥有个体化的基因突变图谱,且其中超过 95% 的突变具有特异性^[6]。因此,基于突变表位多样性疫苗的肿瘤个体化免疫治疗需要从每个患者的肿瘤中确定这些特异性突变。体内外实验揭示了肿瘤突变和抗原表位图谱之间的相关性,证实了肿瘤中的许多非同义替换体细胞突变具有免疫原性和抗肿瘤疫苗活性,该技术系统性分析具有免疫原性的突变,为肿瘤患者个体化免疫治疗提供了可能。

3 肿瘤基因突变组学与过继免疫治疗

所有恶性肿瘤都存在非同义替换突变或其他遗传学改变^[20],过继性 T 细胞治疗正是利用肿瘤的这个特征,通过在体外扩增经肿瘤抗原刺激的 T 细胞,并将这些 T 细胞回输至患者体内以增强其抗肿瘤免疫力。肿瘤是随着各种突变不断累积而产生的,其中的每一种突变都有可能被免疫系统识别。肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)能特异性识别突变基因产物可能是免疫治疗取得较好疗效的基础。

通过全外显子组测序进行肿瘤基因突变组学分析,可快速鉴别出肿瘤特异性 T 细胞识别的独特突变抗原,进一步评估 TIL 致使肿瘤持续消退的能力及其识别突变基因产物等抗原的能力之间潜在的联系,更好地了解其作用机制^[21]。有研究^[22]通过合成出候选的突变 T 细胞抗原表位,并用一种 MHC 结合算法对候选表位进行评估,鉴别出了在患者肿

瘤细胞上表达并能被肿瘤浸润淋巴细胞识别的突变抗原。这种新技术能够更快、更容易地鉴别出免疫系统 T 细胞识别的突变基因抗原。

通过全外显子组测序对 3 例高度恶性浆液性卵巢癌(high-grade serous ovarian cancer, HGSC)患者的肿瘤样本进行检测, 并评估 T 细胞对突变产物的免疫应答^[23]。1 例患者在第一次复发时对类固醇脱氢酶样蛋白 1 [NAD (P) dependent steroid dehydrogenase-like 1, NSDHL1] 上的一个点突变 HSDL1L25V 产生了免疫应答, 且这种免疫应答随着肿瘤细胞突变表位表达的显著增加而明显增强, 然而未能在原发性腹水和实体肿瘤组织中检测到该免疫应答。尽管在二次复发时肿瘤组织中依然存在大量 HSDL1L25V 突变表位, 但并未能在该患者体内检测到突变特异性的 T 细胞应答。据此可以认为, 在第一次缓解期间, 该患者的免疫系统对突变产生的 T 细胞应答最终消失了。临床结果表明, 尽管免疫系统对发生改变的肿瘤基因突变组产生免疫应答, 但最终并未能清除这些肿瘤细胞。

采用全外显子组测序检测经 TIL 输注治疗且疗效显著的黑素瘤患者的突变情况^[21]发现, 每个肿瘤患者中均存在 264 ~ 574 种非同义替换突变, 而用于治疗的 TIL 中大部分的 T 细胞能识别来自每个患者体内 2 ~ 3 个体细胞突变的 MHC I 类表位, 但研究表明, 仅有 0.3% ~ 1.1% 的突变可以导致 T 细胞免疫应答。有研究^[24]结果表明, 在预测的 448 种突变的 CD8⁺ T 细胞表位中仅有 2 种被 CD8⁺ TIL 所识别。这些研究的共同发现是, 理论上这种综合筛选的方法能检测出所有的 MHC I 类表位和许多包含这种突变的 MHC II 类表位的免疫应答, 但仅有极少一部分肿瘤突变可被自体 T 细胞识别并产生免疫应答。表达量不足、MHC I 类或 II 类表位的亲和力不足或缺少相应的 TCR 等原因也可造成 T 细胞无法对突变基因产物产生免疫应答。能引起相应 T 细胞表位发生变化的突变可能被免疫系统所识别, 但对这些突变的免疫应答也可能被诸如外周免疫耐受或免疫抑制这些因素所影响^[25]。另一种可能是免疫忽视(immunological ignorance), 一种潜在的突变因为竞争不过其他具有更高亲和力表位的突变或物理障碍等原因而不能引起 T 细胞应答^[26-27]。但这种突变有可能成为免疫治疗的靶抗原^[28]。

研究通过全外显子组测序的方法在一个由甲基胆蒽诱导形成肉瘤的小鼠模型中鉴别出了一种突变的肿瘤抑制抗原^[29]。另有研究^[1]通过对 B16F10

小鼠黑素瘤细胞进行全外显子组测序, 鉴别出了具有免疫原性的突变表位。且通过上述方法鉴别出的两种表位对 B16F10 肿瘤细胞的体内生长有一定的局部调控功能, 说明这种方法或可作为全外显子组测序的辅助分析方法, 帮助研究者更高效地找到具有潜在应用价值的突变位点, 以降低脱靶效应(off-target effect), 对鉴别临床相关肿瘤抗原具有更高的实用性。

尽管特异性识别突变的 T 细胞在黑素瘤的过继性细胞治疗和其他免疫治疗的临床疗效中发挥了重要的作用^[21, 24, 30-33], 但在上皮细胞癌中, 免疫系统是否能产生一种对突变具有特异性的 T 细胞应答并形成一种有效的个体化免疫治疗仍不清楚^[34]。上皮细胞癌占有恶性肿瘤的 80% 以上, 但其所含的突变却比黑素瘤少^[35-38]。有研究^[39]表明, 对肿瘤细胞表达的一种突变产生特异性识别的 T 细胞在一例罹患上皮细胞癌的患者中显示了抗癌活性。通过全外显子组测序确定了肿瘤浸润性 CD4⁺ T 细胞对患有胆管癌伴有肝转移和肺转移的上皮细胞癌患者所表达的 *ERBB2IP* 突变具有特异性。对该患者输注 *ERBB2IP* 突变特异性的 T 细胞可导致肿瘤的消退及病情的稳定。此外, 经高纯度的 *ERBB2IP* 突变特异性的 T 细胞治疗后所呈现的肿瘤消退证实了 *ERBB2IP* 突变特异性 T 细胞介导了该患者肿瘤的消退。该研究结果提示, 突变特异性 T 细胞应答可能发展成为一种有效的个体化肿瘤免疫疗法。尽管目前过继性突变特异性 T 细胞治疗在上皮源性肿瘤中的研究成果还不多, 但以肿瘤基因突变组学分析为基础的免疫疗法将是免疫治疗发展的趋势之一。

4 展 望

新一代测序技术为基因突变组学的研究奠定了基础, 通过对肿瘤基因突变组学的数据分析, 并基于突变编码制备的疫苗能促进对肿瘤细胞的特异性免疫反应。后天获得的突变能通过肿瘤相关性 T 细胞激发免疫应答, 这可造成机体对该肿瘤产生免疫选择。肿瘤基因突变组学的研究为促进免疫治疗操作规范的完善和制备特异性肿瘤疫苗提供潜在的靶标, 也为肿瘤联合免疫治疗提供了新策略。以肿瘤基因突变组学的深入研究和精确的靶向治疗为标志的精准医疗时代的到来, 也必将带来思想观念的巨大突破, 为恶性肿瘤的治愈或转变为慢性可控的疾病提供了可能。

[参考文献]

- [1] Castle JC, Kreiter S, Diekmann J, et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(5): 1081-1091.
- [2] Li XD, Ji M, Zheng X, et al. Evaluation of tumor response to cytokine-induced killer cells therapy in malignant solid tumors [J]. *J Transl Med*, 2014, 12(1): 215.
- [3] Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome [J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 719-724.
- [4] Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(12): 1090-1098.
- [5] Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer [J]. *Nature*, 2013, 500(7463): 415-421.
- [6] Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise [J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1553-1558.
- [7] Wartman LD, Larson DE, Xiang Z, et al. Sequencing a mouse acute promyelocytic leukemia genome reveals genetic events relevant for disease progression [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(4): 1445-1455.
- [8] Sjoblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers [J]. *Science*, 2006, 314(5797): 268-274.
- [9] Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome [J]. *Nature*, 2010, 463(7278): 191-196.
- [10] Ding L, Ellis MJ, Li S, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft [J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 999-1005.
- [11] Dubey P, Hendrickson RC, Meredith SC, et al. The immunodominant antigen of an ultraviolet-induced regressor tumor is generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68 [J]. *J Exp Med*, 1997, 185(4): 695-705.
- [12] Ikeda H, Ohta N, Furukawa K, et al. Mutated mitogen-activated protein kinase: a tumor rejection antigen of mouse sarcoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(12): 6375-6379.
- [13] Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, et al. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(44): 16013-16018.
- [14] Chen L, McGowan P, Ashe S, et al. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity [J]. *J Exp Med*, 1994, 179(2): 523-532.
- [15] Segal NH, Parsons DW, Peggs KS, et al. Epitope landscape in breast and colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3): 889-892.
- [16] Sahin U, Tureci O, Chen YT, et al. Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and melanoma: basis for polyvalent CT vaccine strategies [J]. *Int J Cancer*, 1998, 78(3): 387-389.
- [17] Sturniolo T, Bono E, Ding J, et al. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(6): 555-561.
- [18] Hannani D, Sistigu A, Kepp O, et al. Prerequisites for the antitumor vaccine-like effect of chemotherapy and radiotherapy [J]. *Cancer J*, 2011, 17(5): 351-358.
- [19] Rammensee HG, Weinschenk T, Gouttefangeas C, et al. Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination [J]. *Immunol Rev*, 2002, 188: 164-176.
- [20] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes [J]. *Science*, 2013, 339(6127): 1546-1558.
- [21] 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.
- [22] Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, et al. NetMHCpan, a method for quantitative predictions of peptide binding to any HLA-A and -B locus protein of known sequence [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2(8): e796.
- [23] Wick DA, Webb JR, Nielsen JS, et al. Surveillance of the tumor mutanome by T cells during progression from primary to recurrent ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(5): 1125-1134.
- [24] van Rooij N, van Buuren MM, Philips D, et al. Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(32): e439-442.
- [25] Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(Suppl 8): viii6-9.
- [26] Buhman JD, Slansky JE. Improving T cell responses to modified peptides in tumor vaccines [J]. *Immunol Res*, 2013, 55(1/3): 34-47.
- [27] Mrass P, Weninger W. Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors [J]. *Immunol Rev*, 2006, 213(1): 195-212.
- [28] Heemskerck B, Kvistborg P, Schumacher TN. The cancer antigenome [J]. *EMBO J*, 2013, 32(2): 194-203.
- [29] Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoeediting [J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 400-404.
- [30] Corbiere V, Chapiro J, Stroobant V, et al. Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1253-1262.
- [31] Huang J, El-Gamil M, Dudley ME, et al. T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product [J]. *J Immunol*, 2004, 172(10): 6057-6064.
- [32] Lu YC, Yao X, Li YF, et al. Mutated PPP1R3B is recognized by T cells used to treat a melanoma patient who experienced a durable complete tumor regression [J]. *J Immunol*, 2013, 190(12): 6034-6042.
- [33] Vigneron N, Stroobant V, Van den Eynde BJ, et al. Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update [J]. *Cancer*

- Immun, 2013, 13: 15.
- [34] Weden S, Klemp M, Gladhaug IP, et al. Long-term follow-up of patients with resected pancreatic cancer following vaccination against mutant K-ras [J]. Int J Cancer, 2011, 128(5): 1120-1128.
- [35] Echechakir H, Mami-Chouaib F, Vergnon I, et al. A point mutation in the alpha-actinin-4 gene generates an antigenic peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human lung carcinoma [J]. Cancer Res, 2001, 61(10): 4078-4083.
- [36] Hogan KT, Eisinger DP, Cupp SB 3rd, et al. The peptide recognized by HLA-A68. 2-restricted, squamous cell carcinoma of the lung-specific cytotoxic T lymphocytes is derived from a mutated elongation factor 2 gene [J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 5144-5150.
- [37] Karanikas V, Colau D, Baurain JF, et al. High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival [J]. Cancer Res, 2001, 61(9): 3718-3724.
- [38] Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, et al. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma [J]. J Exp Med, 1997, 186(5): 785-793.
- [39] Tran E, Turcotte S, Gros A, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4⁺ T cells in a patient with epithelial cancer [J]. Science, 2014, 344(6184): 641-645.
- [收稿日期] 2015-02-10 [修回日期] 2015-10-25
[本文编辑] 党瑞山

· 科技动态 ·

皮肤微生物可通过 DC 引发特异保护性免疫应答

皮肤上共生的微生物群体有着很高的多样性,这个群体的组成会随着时间推移而发生改变。美国国家过敏和传染病研究所 Belkaid 博士的研究小组发现,小鼠全身外涂表皮葡萄球菌后可长期影响皮肤表面的菌落构成,并诱导皮肤的 IL-17A 及 IFN- γ 生成。将表皮葡萄球菌小鼠耳廓外涂和皮下注射两种方式进行比较,2 周后发现只有外涂可引起 IL-17A 的增加,同时皮下的其他炎性细胞如中性粒细胞和单核细胞及其他炎症因子没有增加,推测这种外涂共生菌引起的反应与炎症无关。如采用其他共生菌(包括人源表皮葡萄球菌和鼠源表皮葡萄球菌)进行皮肤外涂,也引起类似的 IL-17A 及 IFN- γ 分泌增加的反应,但只有表皮葡萄球菌才引起 CD8⁺ T 细胞分泌 IL-17A 的反应,与小鼠品系、饲养条件、物种无关。因此推测,普遍存在于皮肤表面的表皮葡萄球菌会引发独特的免疫反应。

树突状细胞(dendritic cell, DC)是另一种类型的免疫细胞。在 *CCR7*^{-/-} 小鼠耳廓外涂表皮葡萄球菌后,发现诱导上述特异性 CD8⁺ T 细胞产生减少,表明 DC 在诱导产生该特定的非炎性反应中发挥了关键作用。由此研究人员分析了皮下三群 DC,即朗格汉斯细胞、CD103⁺ DC 和 CD11b⁺ DC。采用基因敲除和抗体中和反应来消除不同亚群 DC 的作用后,观察外涂表皮葡萄球菌是否能够诱导这种特异的 CD8⁺ T 细胞反应,结果发现白喉毒素选择敲除 *LAT* 后,朗格汉斯细胞减少,不影响这种特异的 CD8⁺ T 细胞反应;*batf3* 和 *irf8* 敲除后影响 CD103⁺ DC 的发育,从而减少分泌 IL-17A 的 CD8⁺ T 细胞产生;*ifr4* 敲除后影响 CD11b⁺ DC 的 MHC II-肽复合物作用,也减少分泌 IL-17A 的 CD8⁺ T 细胞产生。采用 CSF1R 的抗体中和后,可明显影响 3 群 DC 及 IL-17A⁺ CD8⁺ T 细胞的数目,IL-1 的分泌明显降低,影响 CD8⁺ T 细胞分泌 IL-17A;采用 *IL-1R*^{-/-} 小鼠,外源增加 IL-1 及分选 CD11b⁺ CD103-DC 后的基因芯片检测,明确 CD8⁺ T 细胞是通过 IL-1 促进 IL-17A 的分泌。以上结果表明,CD103⁺ DC 影响表皮葡萄球菌引起的特异 CD8⁺ T 细胞反应,而 CD11b⁺ DC 可以通过影响 IL-1 的分泌来调节产生 IL-17A 的 CD8⁺ T 细胞反应。

进一步从体外纯化出皮肤或者局部淋巴结的 CD8⁺ T 细胞,与负载表皮葡萄球菌的 DC 或其共生菌及 TLR 受体刺激剂共培养,发现只有表皮葡萄球菌能引起这种反应;而采用缺失 MHC I 分子的 $\beta 2m$ ^{-/-} 小鼠这种反应消失。因此,在表皮产生 IL-17A 的 CD8⁺ T 细胞反应是表皮葡萄球菌所特有的反应。这种特有的反应可在组织内稳态和局部免疫中起到了重要的作用。预先用表皮葡萄球菌诱导皮肤的 CD8⁺ T 细胞特异性反应后进行皮下白色念珠菌感染,可以减少白色念珠菌的菌落形成数而保护宿主;如采用抗 CD8⁺ 抗体及抗 IL-17A 抗体处理后,则白色念珠菌的菌落形成数增加,逆转保护作用。基因芯片分析表明这种特异性 T 细胞反应上调了表皮滤泡细胞内的钙结合蛋白 S100A8 和 S100A9,从而趋化中性粒细胞促进皮肤的固有免疫来抗击外来病原的入侵。

本研究有助于解释不同皮肤部位的微生物变化如何在皮肤疾病中发挥作用。为了深入理解组织特异性免疫和相关病理过程,研究人员下一步将会鉴定与皮肤共生菌有关的化学信使,分析他们对免疫系统的刺激效果。鉴于皮肤共生菌能在不引起炎症的情况下激活免疫系统,人们还可以在此基础上开发新佐剂(免疫促进物质)添加到疫苗或药物中。

[姜岩岩 摘译,郭振红 审阅. Naik S, Bouladoux N, Linehan JL, et al. Nature, 2015, 520(7545): 104-108.]