

嵌合抗原受体修饰 CIK 细胞抗肿瘤研究进展

Progresses of anti-tumor research on chimeric antigen receptor modified CIK cells

姚惟琦^{1,2}综述;饶巍³,周宏灏¹审阅(1. 武汉生物技术研究院,湖北 武汉 430075;2. 武汉大学人民医院,湖北 武汉 430060;3. 武汉汉密顿生物科技股份有限公司 研发中心,湖北 武汉 430075)

[摘要] 在过去的 20 多年中,CIK 细胞已逐步从实验室研究走向临床应用研究并展现了一定的抗癌效果。然而,CIK 细胞存在缺乏抗原特异性、靶向性不足、体内存活时间短等问题限制了其在临床上的应用。随着嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的 T 细胞(CAR-T)技术的兴起,CIK 细胞的 CAR 修饰潜力也倍受关注。本文就 CAR-CIK 细胞的构建思路、效应细胞来源和简化治疗优势、基础研究和临床转化现状以及目前 CAR-CIK 面临的瓶颈问题等的研究进展作一综述。

[关键词] 嵌合抗原受体;细胞因子诱导的杀伤细胞;肿瘤;免疫治疗

[中图分类号] R730.54; R392.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)05-0720-07

自上世纪 90 年代 Schmidt-Wolf 等^[1]首次以抗 CD3-mAb、IFN- γ 、IL-2 等多种细胞因子培养 PBMC,得到一个有强大抗肿瘤活性的细胞群并命名为 CIK 细胞以来,在过去的 20 多年中,CIK 细胞已经逐步从实验室研究走向临床应用,并在白血病等多种肿瘤中展现了一定的治疗效果^[2,4]。然而,CIK 细胞缺乏抗原特异性、靶向性不足限制了抗肿瘤效果^[5],同时由于 CIK 细胞是终端分化性效应 T 细胞^[6],在肿瘤患者体内存活时间较短,其数量、质量的下降以及肿瘤免疫逃逸机制的存在,在体内的抗肿瘤功能无法得到充分发挥。因而,迫切需要寻找新的策略来增加 CIK 细胞的靶向性和持久性。随着嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰的 T 细胞(CAR-T)技术的兴起,CAR 修饰 CIK(CAR-CIK)细胞的潜力也倍受关注。CIK 细胞因其独特的识别靶细胞的机制、短暂的生理周期、易于体外扩增培养、广谱杀瘤能力等^[7,8]优势,被视为同样有潜力通过 CAR 修饰增强其抗肿瘤能力的效应细胞。通过 CAR 修饰 CIK 细胞有望增强其靶向杀伤肿瘤细胞的能力并研制出具有强大抗肿瘤作用的效应细胞,正成为 CAR-T 细胞疗法的一个重要研究方向。

1 CAR-CIK 细胞

CAR 分子由胞外抗原结合区[由多种单克隆抗体连接成单链可变片段(single chain Fragment variable, scFv)]、穿膜区和胞内细胞信号区(TCR ζ 链/CD3 复合物)构成,CAR 识别抗原后促发 T 细胞激活,引起一系列的靶细胞杀伤作用和细胞因子释放。早期的第 1 代 CAR 由识别肿瘤表面抗原的单链抗

体和免疫受体酪氨酸活化基序(immuno-receptor tyrosine-based activation motifs, ITAM;通常为 CD3 ζ 或 Fc ϵ RI γ)组成;但面临 T 细胞增殖能力弱、细胞毒性不强、存活时间短等问题;第 2 代和第 3 代 CAR 在第 1 代的基础上引入 1 个或 2 个共同刺激信号域,旨在提高 T 细胞的细胞毒活性、增殖活性与存活时间,促进细胞因子的释放;第 4 代 CAR 引入了表达细胞因子或共刺激配体,其目的是增强 CAR-T 细胞的扩增和寿命。CAR-CIK 细胞的研发大多基于 CAR-T 细胞研究基础上的模仿和改造。

1.1 抗原结合区和穿膜区

CAR-CIK 细胞抗原结合区和穿膜区和 CAR-T 细胞基本相同。抗原结合区能够与肿瘤细胞表面表达的肿瘤相关抗原紧密结合,决定着 CAR 结构的靶向性,主要由 scFv 组成。目前研究者^[9-14]已经在 CIK 细胞上尝试靶向 CD19、CD33、CD123、HER2、EGFR、CEA、CD28 等多种抗原的 CAR 修饰,同时也在探索各种策略来提高肿瘤杀伤的特异性。一般认为穿膜区对 CAR-CIK 细胞的整体结构和功能没有明显的影响。已有多种穿膜区被运用到了 CAR-

[基金项目] 湖北省中小企业技术创新计划资助项目(No. 2015DAL091);武汉市 3551 光谷人才计划资助项目(No. F85, No. H133)。Project supported by the Projects of Small and Medium Enterprises Technology Innovation of Hubei Province (No. 2015DAL091), and the 3551 Optical Valley Talents Plan of Wuhan City (No. F85, No. H133)

[作者简介] 姚惟琦(1986-),女,湖北武汉人,博士,主要从事恶性肿瘤生物治疗的基础与临床研究,E-mail:happywq@hotmail.com

[通信作者] 周宏灏(ZHOU Honghao, corresponding author),E-mail:731766534@qq.com;饶巍(RAO Wei, co-corresponding author),E-mail:thegreatmountain_140@126.com

CIK 细胞中并能将膜外信号顺利传递到胞内,如 CD3 ζ 穿膜序列、CD8 α ^[13]穿膜序列等。

1.2 胞内信号区

CD3 ζ 是 CAR 结构最为经典的胞内信号段,含有 3 个 ITAM。CAR-CIK 细胞常以 CD3 ζ 作为第一信号基序,再连接一个共刺激分子基序(二代 CAR),例如 CD28 或 4-1BB 共同组成胞内信号区。以 CD19 scFv 作为抗原结合区分别与 CD3 ζ 、CD28/CD3 ζ 或 4-1BB/CD3 ζ 胞内信号区融合构建 CAR-CIK 细胞,并以急性淋巴细胞性白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)细胞作为杀伤对象进行比较,结果显示含有两个信号基序结构的 CIK 细胞杀伤性更强。特别是 4-1BB/CD3 ζ 作为信号域的 CAR-CIK 细胞,IL-10 分泌急剧减少,扩增能力显著提高^[15]。然而,融合两种共刺激分子激活 T 细胞(特别是 CIK 细胞)产生的第 3 代 CAR 细胞其抗肿瘤活性与第 2 代 CAR 细胞相比尚无定论^[16]。如有研究^[17]表明,与第 2 代 CD28-CD3 ζ T 细胞相比,第 3 代 CD28-CD134(OX40)-CD3 ζ T 细胞分泌的细胞因子(Th1/Th2)能产生更强、更持久的抗肿瘤作用;而在 CAR-CIK 细胞的研究^[18]则发现,将 OX40 嵌合到 CD28 和 CD3 ζ 链的第 3 代 CAR 的“超级共刺激因子”CD28-OX40- ζ CAR 更容易加速 CD56⁺ CIK 细胞终端性突变产生高频率的激活诱导性细胞凋亡(activation-induced cell death, AICD),这反而会降低 CIK 细胞存活时间和杀瘤效果,而 CD28- ζ CAR 修饰的 CIK 细胞(第 2 代)整体效果要优于第 3 代 CD28- ζ -OX40 CAR。此外,CAR-CIK 细胞研发中也尝试了一些特殊的共刺激分子。DAP10 是 CIK 细胞重要的活化信号调节分子,Marin 等^[15]以 CD19 受体为胞外区,胞内信号区分别为 DAP10、4-1BB /CD3 ζ 或 CD28/CD3 ζ ,检测其对白血病细胞的杀伤效应,结果发现,CD19-DAP10 结构在细胞因子分泌、细胞溶解和抑制肿瘤生长等方面的抗肿瘤作用要弱于 CD19-CD3 ζ 。表明 CIK 细胞自发的杀伤效应虽可受 DAP10 信号有效驱动,但人工修饰的 CD3 ζ 级联激活效果更佳。

1.3 转染

稳定、高效、安全的基因转导是实施 CAR 修饰 T 细胞治疗的保障。与 CAR-T 细胞相比,细胞的转染也同样适用于 CAR-CIK 细胞。目前多使用病毒转染(逆转录病毒和慢病毒载体)及理化转染(如转座子系统)等方法修饰 CIK 细胞。病毒基因转导的优势是效率高、CAR 修饰 CIK 细胞培养至临床级数量所需的时间短(约 2~3 周),但临床级病毒制备

设施要求严格、重组病毒花费成本较高。而理化转染方法中,以“睡美人(sleeping beauty, SB)”为代表的新方法转染效率也有了极大地提高。有研究^[19-20]报道,采用 SB 系统在靶向 CD123 的第 3 代 CAR 修饰 CIK 细胞,转染效率可达 39%~52%,在靶向 CD19 抗原的 CAR 修饰 CIK 细胞研究中达 50%的表达率。此外,体外转录编码 CAR 的 RNA、电穿孔 CIK 细胞也是可行的方法。如在一项研究^[12]中,以 RNA 为载体,采用电穿孔方法,Her-2/neu CIR-CIK 在 CIK 细胞中的转染效率可达 95%。

2 CAR-CIK 细胞来源及临床转化的成本

理想的 CAR 修饰的效应细胞一般需具备以下特点:(1)在体内或者体外可以实现扩增以满足过继回输的要求;(2)具备足够强度的肿瘤杀伤能力;(3)能够到达肿瘤局部;(4)没有或者具有易控的毒副作用^[21]。CIK 细胞恰好满足了以上特点。CIK 细胞的群体具有异质性,不同来源、不同群体各具优缺点,选择其中一种合适的效应细胞不仅能够最大程度地发挥 CAR 修饰的潜能,同时也有助于控制治疗成本,提高临床转化的可能性。

2.1 外周血来源的 CIK 细胞

外周血是 CIK 细胞的主要来源。恶性肿瘤患者存在不同程度的免疫机能受损,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞数量降低。用患者自体的 CIK 细胞经体外扩增回输安全性好,可避免由于交叉感染引发其他疾病,目前流行的“用自己的细胞治疗自己的病”说法即指此种方法。已有多多种有效的方法从外周血中纯化扩增足量的 CIK 细胞用于过继免疫治疗^[22-24],CAR 修饰的 CIK 也正在研发中(表 1)。

2.2 脐带血来源的 CIK 细胞

脐带血也是 CIK 细胞的重要来源。脐带血来源广泛、采取方便、免疫原性弱,同时富含造血干细胞和单核细胞,脐血 CD34⁺细胞较骨髓和外周血 CD34⁺细胞含量更高、更纯、增殖潜力更强^[8,25-26]。经培养后,脐带血中 CD3⁺CD56⁺细胞(CIK 细胞的主要效应细胞)扩增达几百到上千倍以上,且 CD3⁺CD8⁺T 细胞明显增加,CD3⁺CD16⁺CD56⁺细胞亦明显增加,结果表明脐带血可以培养出强劲的 CIK 细胞,且扩增潜力极强,其扩增出的 CIK 细胞杀伤活性亦高于外周血 CIK 细胞^[27-28]。因此,可以认为来源于脐带血的 CIK 细胞更适合用于临床治疗。虽然目前暂无 CAR 修饰脐带血来源的 CIK 细胞的研究报道,但可以预见,脐带血来源的 CAR-CIK 细胞也能够有效解决外周血来源的 CIK 细胞所存在

的一些不足,为 CAR-CIK 技术的优化提供一种新的策略。

表 1 CAR 修饰的外周血来源的 CIK 细胞

靶点	CAR 结构	转染方法
CD19 ^[8]	HTM/CD3 ζ	逆转录病毒
	HTM/DAP10	
	HTM/ ζ -chain	
	HTM/CD28 /CD3 ζ	
	HTM/4-1BB/ ζ -chain	
CD33 ^[9]	CD3 ζ	逆转录病毒
	CD28-OX40/3 ζ	
CD123 ^[10]	VL/VH TM/CD28 TCR/CD3 ζ	逆转录病毒
Her2/neu ^[11]	CD28/CD3 ζ	电穿孔
EGFR(EGFR, ErbB1, Her1) ^[12]	anti-EGFR(scFv)	慢病毒
	CD8 α TM/CD28/CD3 ζ	
NKG2D ^[15]	CD28- ζ -OX40	逆转录病毒
	CD28- ζ	

2.3 CAR-CIK 细胞治疗的简化

由于现有的 CAR-T 技术效应细胞多为经过 α -CD3/ α -CD28 刺激分选或 CD4、CD8 磁珠分离得到的纯度较高的 T 细胞,T 细胞纯度高杀伤力大,瞬时释放大量细胞因子和破裂的肿瘤细胞产生的各种有毒成分,造成患者在“治愈”肿瘤的同时由于细胞因子风暴产生“濒临死亡”的危险。这在多项 CAR-T 细胞治疗白血病和淋巴瘤的临床试验中均有报道^[29-30]。再者,CAR-T 细胞治疗一般以自身 T 细胞经过基因工程技术改造扩增后成为可以应用的效应细胞。从获得患者 T 细胞到最终得到治疗所需数量的 CAR-T 细胞之间涉及到很多技术步骤,人力、物力消耗巨大且周期较长。而选用 CIK 这种异质混合型的细胞,由于其纯度(特别是 CD3⁺CD56⁺效应细胞含量)有限^[31-32],对于治疗时易产生的严重副反应有减轻作用。对于 CAR-CIK 细胞的获得,只需要对血液进行简单的梯度离心分离,再进行转染和细胞因子诱导扩增,故其技术操作较现在比较火热的 CAR-T 细胞简便,且耗材成本及技术成本更低,可以有效的降低市场价格,易于被广大癌症患者接受。另外,使用 CAR-CIK 细胞,尤其是脐血 CIK 细胞等易于扩增改造的异体效应细胞,除了能够增强治疗的通用性和简易性,同时还可以弥补晚期肿

瘤患者免疫低下导致的自身免疫细胞弱化的缺点,降低 GVHD 发生的风险。

3 CAR-CIK 细胞的抗肿瘤效应及临床转化研究

3.1 抗血液肿瘤效果

近年来,随着 CAR-T 细胞在白血病治疗研究中取得了重大突破^[33-34],同时也重新引起了人们对 CIK 细胞在白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤等血液肿瘤中效应的关注。由于 CIK 细胞来源广泛,无论是从自体还是脐带血中获得的单核细胞在 IFN- γ 、OKT3 和高剂量的 IL-2 刺激下容易培养扩增,同时 CIK 细胞具有很弱的免疫排斥反应,发生 GVHD 风险很低。此外,CIK 细胞能够到达骨髓、脾、肝和淋巴结等白血病浸润的组织^[35-36]。因此,选择最佳的共刺激分子的 CAR 修饰 CIK 细胞成为治疗血液系统肿瘤的策略之一。Marin 等^[15]采用逆转录病毒转导不同 anti-CD19 嵌合抗原受体:抗-CD19-3 ζ ,抗-CD19-DAP10,抗-CD19-4-1B-3 ζ 和抗-CD19-CD28-3 ζ 转导 CIK 细胞,分析其对 ALL 细胞的杀伤能力。结果表明,含有 4-1BB 或 CD28 共刺激分子的 CAR 比抗-CD19- ζ 或 抗-CD19-DAP10 对 ALL 细胞具有更强的细胞毒作用。体外试验^[11]表明,将 SFG-逆转录病毒载体构建的抗 CD123-CAR 元件转导到细胞因子诱导的 CIK 细胞体内,转导的 CIK 细胞能够强烈体外杀伤 CD123⁺ 细胞株和初始急性髓细胞性白血病(acute myelocytic leukemia, AML)细胞,并且不影响造血干细胞和祖细胞(haematopoietic stem/progenitor cells, HSPCs)和低 CD123 抗原表达的正常细胞;其后,陆续有通过体内动物实验研究^[37-38]进一步证实了其安全有效性。研究结果为抗 CD123-CAR-CIK 临床治疗 AML 奠定了基础。

3.2 抗实体肿瘤效果

除了血液肿瘤之外,CAR-CIK 细胞在实体瘤研究中也取得一定的效果。通过 Her-2、CEA、EGFR 等肿瘤潜在靶点,可以实现对实体瘤的靶向杀伤。Yoon 等^[12]通过构建无胸腺裸鼠 SKOV3 卵巢癌模型,研究比较了曲妥珠单抗、mock-CIK、Her-2/neu CIR 转导的 CIK 细胞(CIR-CIK)输注治疗 SKOV3 卵巢移植瘤裸鼠模型,结果表明 CIK 细胞由于缺乏抗原特异性,对 SKOV3 荷瘤鼠无明显的抑瘤效果;而曲妥珠单抗和 CIR-CIK 细胞均显示了较强的抗瘤效果,且 CIR-CIK 细胞优于人源化 Her-2/neu 特异性单克隆抗体——曲妥珠单抗。Schlimper 等^[14]报道,CEA-CAR 修饰的 CIK 细胞活化能力增强,促进更多的炎性因子释放,因而产生了更强的结肠癌细

胞溶解能力,且活化能力 CEA CD28-3 ζ CAR 修饰的 CIK 细胞优于 CD3 ζ -CAR。Hombach 等^[18]通过 CEA⁺C15A3 肿瘤细胞移植免疫缺陷型小鼠,成功构建移植瘤模型,然后分别采用 CD28- ζ 和 CD28- ζ -OX40 CAR 修饰的 CIK 细胞静脉回输小鼠体内,观察肿瘤生长情况,结果表明采用 CD28- ζ 修饰的 CAR-CIK 细胞明显延缓了肿瘤的生长;而 CD28- ζ -OX40-CAR 和未进行基因修饰的 CIK 细胞没有出现这种状况。此外,研究还发现,同时给免疫缺陷型小鼠注射 CEA⁺C15A3 肿瘤细胞和 CAR-CIK 细胞,尽管 CD28- ζ -OX40 CAR-CIK 比未行修饰的 CIK 细胞能发挥更好的抗癌效果,但 CD28- ζ -CAR-CIK 效果要优于 CD28- ζ -OX40 CAR-CIK 细胞,比 CD28- ζ -OX40 CAR-CIK 能更好的产生持久的抗癌效应,更有效的抑制肿瘤生长。Ren 等^[13]采用慢病毒载体编码的 EGFR 特异性 CAR 转导 CIK 细胞,体外实验结果表明,与各种 EGFR 阳性肿瘤细胞共培养后,CAR-CIK 细胞的细胞毒作用显著提高,IFN- γ 和 IL-2 等细胞因子的产生明显增加。进一步体内实验研究表明,在 BALB/c 裸鼠皮下移植肿瘤模型中,CAR-CIK 细胞能够抑制移植瘤生长,延长 EGFR 过表达人肿瘤移植裸鼠的生存期。而且,这种具有人 EGFR⁺ 肿瘤的小鼠肿瘤生长抑制和生存期延长与 CAR-CIK 细胞在体内存活时间高度相关。研究结果为 CAR-CIK 细胞治疗 EGFR 过表达肿瘤的临床应用提供了实验依据。

3.3 CAR-CIK 细胞的临床转化研究

与众多开展的 CAR-T 临床研究相比,CAR-CIK 细胞在临床转化上的进展仍然比较局限,目前只有极少数公开的报道。如在一项多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)的临床试验中(临床试验号: NCT01886976)^[39],采用自体的 CD138-CAR 修饰 CIK 效应细胞治疗 5 例化疗耐药的 MM 患者,所有患者接受 3~6 次预定剂量的 CAR-CIK-138 细胞(平均细胞数量为 $0.756 \times 10^7/\text{kg}$),整个治疗过程中未发生无法耐受的毒性反应(仅有类似 CIK 细胞输注中出现的发热、寒战等不良反应,并在数小时后自行缓解),4 例病情 SD 超过 3 个月,1 例后期发展为晚期浆细胞性白血病患者外周血骨髓瘤细胞比例从 10.5% 降至 3% 以下。结果表明 CAR-CIK-138 安全、可行、耐受性好,对 MM 具有体内抗癌活性,值得深入研究。

4 CAR-CIK 抗肿瘤研究和临床应用的瓶颈和对策

4.1 转染载体的缺陷

为了获得高效率的基因转移,CAR-CIK 和 CAR-T 一样,主要还是使用逆转录病毒、慢病毒等基因转导方法完成 CAR 向效应细胞中的转移。虽然病毒载体的转移效率很高,但是却存在着一些缺陷,如载体容量有限、插入突变、致毒致癌隐患、诱导机体免疫反应等^[40-41]。发掘和优化非病毒载体,提高其转染效率是解决上述问题的有效途径。

4.2 靶向/脱靶毒性

大多数 CAR 定向的靶抗原不是肿瘤特有的,部分肿瘤抗原也会在正常细胞中表达,因而它会导致对机体其他正常组织的免疫攻击,即脱靶效应。如针对 CD19 的 CAR-T 细胞治疗,会导致 B 细胞发育不良,靶向 Her-2 的 CAR-T 细胞治疗以及靶向 MAGE-A3 的 TCR-T,都能导致肿瘤部位以外的其他组织或器官遭受攻击,例如产生心肺系统毒性^[42-44]。又如针对 CD33 的 CAR-CIK 细胞虽然能产生强烈的杀伤 AML 能力,但与此同时由于 CD33 也在 HSPCs 上高表达,因而也造成了对 HSPCs 的脱靶毒性^[10]。因此,必须选择合适的肿瘤特异性抗原合成 CAR-CIK,从而在攻击肿瘤细胞的同时能够区分正常细胞免受攻击。也就是说,CAR-CIK 细胞特异性必须要满足既能杀伤癌细胞,又要避免对正常细胞的攻击。这意味着 CAR-CIK 疗法的研发必须是精准的、特异的,粗放的研发方式只会带来风险。由于目前尚未有临床数据评估 CAR-CIK 细胞的脱靶毒性的程度,但是如果出现严重的脱靶效应,可考虑通过剂量爬坡方法、引入带有自杀基因的调控开关^[45-46]、嵌合多种抗原受体等方式降低其风险。

4.3 细胞因子风暴/细胞因子释放综合征

由于 CAR 拥有多重胞内信号区,CM 信号泄漏或 T 细胞激活阈值降低造成的大量炎症细胞因子如 IL-6、IFN- γ 和 TNF- α 等释放入血,可引起急性呼吸窘迫综合征和多器官衰竭,即所谓“细胞因子风暴(cytokine release syndrome, CRS)””。针对 CAR-T 细胞回输引起的 CRS,临床上利用糖皮质激素和 IL-6 受体拮抗药物——托珠单抗(tocilizumab)、利妥昔单抗(rituximab)等细胞因子拮抗剂缓解 CRS 的产生^[47]。CAR-T 细胞引起的 CRS 同样适用于 CAR-CIK 细胞。因而可以考虑通过剂量控制和药物辅助治疗[免疫调节剂 IL-6 受体拮抗药物托珠单抗和(或)糖皮质类激素]来预防 CAR-CIK 细胞治疗 CRS 的产生。同时有研究观察到 CRS 也与疾病进展程度或者肿瘤负荷^[33, 48]以及回输的剂量^[49]有相关性,在高疾病负荷的患者体内或一次性输注的过高的 CAR-T 细胞剂量,有较高的细胞因子释放。这

意味着将 CAR-CIK 细胞应用于疾病早期患者身上, 在疾病恶化之前使用 CAR-CIK 细胞来杀灭肿瘤细胞, 或者免疫治疗前通过联合密集化疗降低肿瘤负荷, 或者采用多次、小剂量的 CAR-CIK 细胞回输, 发生严重 CRS 的风险将大大降低。

4.4 克服免疫抑制

尽管采用表达特异性抗原的 CAR 基因修饰 T 细胞的过继疗法是癌症治疗的理想选择。然而 CAR-T 细胞也必须面对实体瘤微环境免疫抑制因子的障碍, 这也是目前 CAR-T 疗法在实体瘤上疗效欠佳的原因之一。当对抗实体肿瘤时会有巨大的表型的不均一性, 从而使 CAR-T 技术受到限制。通过 CAR-T 细胞的处理, 初始的肿瘤减少之后, 抗原阴性的肿瘤细胞并不能被 CAR 识别, 从而导致了肿瘤的逃逸。CAR-CIK 细胞同样需要克服肿瘤微环境免疫抑制。因此, 在实体瘤中 CAR-CIK 细胞必须进行进一步基因修饰以应对肿瘤微环境免疫抑制因子。如可借鉴 CAR-T 在 CAR-CIK 细胞嵌入表达显性负向型 TGF- β 受体克服 TGF- β 对 CIK 效应细胞的抑制效应; 嵌入靶向 NKG2D 抗原来识别免疫抑制细胞如骨髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)表达的 NKG2D 配体, 调节肿瘤微环境中的 T 细胞和内皮细胞; 消除抑制性免疫受体 CTLA-4; 降低 Fas 诱导的细胞凋亡的敏感性^[29, 50-51]。CAR-CIK 细胞还可以联合抗 PD1 抗体抵抗肿瘤免疫抑制^[52]。此外, 可通过 PD1-CD28 嵌合受体将肿瘤 PD-L1 转变为配体, 传递 CD28 共刺激信号给 CD8⁺ T 细胞来提高其抗癌能力^[53]。一种新型的针对实体瘤的基因工程编辑的 CAR-T 细胞“TRUCKs CAR(IL-12)”, 通过在 CAR 相关抗原上链接一个可诱导 IL-12 盒分泌 IL-12, 能提高抗癌功能, 更好的影响肿瘤基质的抑制性细胞(如 Treg 细胞), 旨在募集又一波免疫细胞发起对未表达 CAR 靶向抗原的肿瘤细胞(抗原阴性) 识别。这种新型 CAR-T 细胞与常规的 CAR-T 细胞相比对肿瘤的破坏性更强且不需要进行化疗预处理^[54-55]。这也是未来 CAR-CIK 细胞技术可以借鉴的方向。

5 展 望

通过基因工程与分子生物学手段将最新构建的 CAR 结构克隆到血液(患者外周血或脐带血) 来源的单核细胞内, 同时由多种细胞因子诱导后形成一种既能靶向杀伤肿瘤又可以在体内增殖的 CAR-CIK 细胞。由于该细胞具有靶向性高、效应细胞杀伤温和、技术成本相对较低等优点, 将极大改善现行

CIK 细胞技术的临床治疗效果, 降低目前 CAR-T 细胞技术的治疗成本, 能够惠及到更多病患, 具有巨大的潜在经济及社会效益。尽管目前 CAR-CIK 细胞治疗的临床报道极为有限, CAR-CIK 细胞治疗也面临一些瓶颈问题, 有关 CAR-CIK 细胞的制备也在不断优化和改造中。相信随着研究的不断深入, CAR-CIK 细胞技术面临的瓶颈问题将会被逐一攻克, 在不久的将来 CAR 修饰的 CIK 细胞将会给肿瘤治疗带来新的希望。

【参 考 文 献】

- [1] SCHMIDT-WOLF I G, NEGRIN R S, KIEM H P, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity [J]. *J Exp Med*, 1991, 174(1):139-149.
- [2] LINN Y C, HUI K M. Cytokine-induced NK-like T cells: from bench to bedside [J/OL]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 435745[2016-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847766/>. DOI:10.1155/2010/435745.
- [3] YANG X Y, ZENG H, CHEN F P. Cytokine-induced killer cells: a novel immunotherapy strategy for leukemia [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(2):535-541. DOI: 10.3892/ol.2014.2780.
- [4] SANGIOLO D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [J/OL]. *J Cancer*, 2011, 2: 363-368 [2016-04-01]. <http://www.jcancer.org/v02p0363.htm>. DOI: 10.7150/jca.2.363.
- [5] SCHMIDT T L, NEGRIN R S, CONTAG C H. A killer choice for cancer immunotherapy [J]. *Immunol Res*, 2014, 58(2-3):300-306. DOI: 10.1007/s12026-014-8507-2.
- [6] FRANCESCHETTI M, PIEVANI A, BORLERI G, et al. Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(5):616-628. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.01.010.
- [7] RUTELLA S, IUDICONE P, BONANNO G, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells generated with a new good manufacturing practice-grade protocol [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(7): 841-850. DOI: 10.3109/14653249.2012.681038.
- [8] GUO Y L, HAN W D. Cytokine-induced killer(CIK) cells: from basic research to clinical translation [J]. *Chin J Cancer*, 2015, 34(3):99-107. DOI: 10.1186/s40880-015-0002-1.
- [9] MARIN V, DANDER E, BIAGI E, et al. Characterization of in vitro migratory properties of anti-CD19 chimeric receptor-redirected CIK cells for their potential use in B-ALL immunotherapy [J]. *Exp Hematol*, 2006, 34(9):1218-1229. DOI: 10.1016/j.exphem.2006.05.004.
- [10] MARIN V, PIZZITOLA I, AGOSTONI V, et al. Cytokine induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors [J]. *Haematologica*, 2010, 95(12):2144-2152. DOI: 10.3324/haematol.2010.026310.

- [11] TETTAMANTI S, MARIN V, PIZZITOLA I, et al. Targeting of acute myeloid leukaemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor [J]. *Br J Haematol*, 2013, 161(3):389-401. DOI: 10.1111/bjh.12282.
- [12] YOON S H, LEE J M, WOO S J, et al. Transfer of Her-2/neu specificity into cytokine-induced killer (CIK) cells with RNA encoding chimeric immune receptor (CIR) [J]. *J Clin Immunol*, 2009, 29(6):806-814. DOI: 10.1007/s10875-009-9308-6.
- [13] REN X Q, MA W L, LU H, et al. Modification of cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors (CARs) enhances antitumor immunity to epidermal growth factor receptor (EGFR)-positive malignancies [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64 (12):1517-1529. DOI: 10.1007/s00262-015-1757-6.
- [14] SCHLIMPER C, HOMBACH A A, ABKEN H, et al. Improved activation toward primary colorectal cancer cells by antigen-specific targeting autologous cytokine-induced killer cells [J/OL]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 238924 [2016-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3310246>. DOI: 10.1155/2012/238924.
- [15] MARIN V, KAKUDA H, DANDER E, et al. Enhancement of the anti-leukemic activity of cytokine induced killer cells with an anti-CD19 chimeric receptor delivering a 4-1BB-z activating signal [J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(9):1388-1397. DOI: 10.1016/j.exphem.2007.05.018.
- [16] RAMOS C A, DOTTI G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2011, 11(7): 855-873. DOI: 10.1517/14712598.2011.573476.
- [17] HOMBACH A A, HEIDERS J, FOPPE M, et al. OX40 co-stimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4⁺ T cells [J/OL]. *Oncoimmunol*, 2012, 1(4): 459-466 [2016-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3382912>. PMID: 22754764.
- [18] HOMBACH A A, RAPPL G, ABKEN H. Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 "super-stimulation" [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(12):2268-2277. DOI: 10.1038/mt.2013.192.
- [19] MAGNANI C, GIORDANO-ATTIANESE G, TETTAMANTI S, et al. Sleeping beauty system-mediated expression of chimeric antigen receptors (CARs) in CIK cells: a novel tool towards the cure of childhood leukemia [J]. *Cytotherapy*, 2013, Suppl 15(4): S53. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.01.206.
- [20] MAGNANI C, TURAZZI N, BENEDICENTI F, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells engineered with chimeric antigen receptors (CARS) By Sleeping Beauty System [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(4):S32. DOI: 10.1016/j.jcyt.2014.01.107.
- [21] 殷书磊, 于益芝, 曹雪涛. CAR-NK 抗肿瘤研究的现状与发展趋势 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(1):1-10. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.001
- [22] LINN Y C, YONG H X, NIAM M, et al. A phase I/II clinical trial of autologous cytokine induced killer cells as adjuvant immunotherapy for acute and chronic myeloid leukemia in clinical remission [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(7):851-859. DOI: 10.3109/14653249.2012.694419.
- [23] LI R, WANG C, LIU L, et al. Autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in lung cancer: a phase II clinical study [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(11):2125-2133. DOI: 10.1007/s00262-012-1260-2.
- [24] CHUNG M J, PARK J Y, BANG S, et al. Phase II clinical trial of ex vivo-expanded cytokine-induced killer cells therapy in advanced pancreatic cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63(9):939-946. DOI: 10.1007/s00262-014-1566-3.
- [25] CLARK E M, JOSHI D S, GRIMM A B, et al. Ultrastructural basis of enhanced antitumor cytotoxicity of cord blood-derived CTLs: a comparative analysis with peripheral blood and bone marrow [J/OL]. *Int J Oncol*, 2010, 37 (3): 645-653 [2016-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMID:20664933>. DOI: 10.3892/ijo_00000713.
- [26] AYELLO J, VAN DE WEN C, CAIRO E, et al. Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells: implications for adoptive cellular immunotherapy [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(10): 1216-1229. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.07.009.
- [27] LI Y, SCHMIDT-WOLF I G, WU Y F, et al. Optimized protocols for generation of cord blood-derived cytokine-induced killer/natural killer cells [J/OL]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9):3493-3499 [2016-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PMID:20944128>.
- [28] ZHANG Z, ZHAO X, ZHANG T, et al. Phenotypic characterization and anti-tumor effects of cytokine-induced killer cells derived from cord blood [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(1):86-97. DOI: 10.1016/j.jcyt.2014.09.006.
- [29] DAI H, WANG Y, LU X C, et al. Chimeric antigen receptors modified T-cells for cancer therapy [J/OL]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(7):djv439 [2016-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4948566>. DOI: 10.1093/jnci/djv439.
- [30] TURTLE C J, HANAFI L A, BERGER C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺:CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(6):2123-2138. DOI: 10.1172/JCI85309
- [31] 殷雪, 徐鑫, 赵瑶, 等. 抗体介导的高效 CIK(AMHE-CIK)细胞体外诱导的数种优化方案的比较研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(1):191-196. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2016.01.036.
- [32] ZHANG Z, WANG L, LUO Z, et al. Efficacy and safety of cord blood-derived cytokine-induced killer cells in treatment of patients with malignancies [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(8):1130-1138. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.04.002
- [33] MAUDE S L, FREY N, SHAW P A, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371 (16): 1507-1517. DOI: 10.1056/NEJMoa1407222.
- [34] PEGRAM H J, SMITH E L, RAFIQ S, et al. CAR therapy for hematological cancer: can success seen in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia be applied to other hematological

- malignancies? [J]. *Immunotherapy*, 2015, 7(5): 545-561. DOI:10.2217/imt.15.6.
- [35] INTRONA M, FRANCESCETTI M, CIOCCA A, et al. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2006, 38(9):621-627. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705503.
- [36] EDINGER M, CAO Y A, VERNERIS M R, et al. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging [J]. *Blood*, 2003, 101(2): 640-648. DOI: 10.1182/blood-2002-06-1751.
- [37] PIZZITOLA I, ANJOS-AFONSO F, ROUAULT-PIERRE K, et al. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo [J]. *Leukemia*, 2014, 28(8):1596-1605. DOI: 10.1038/leu.2014.62.
- [38] TETTAMANTI S, BIONDI A, BIAGI E, et al. CD123 AML targeting by chimeric antigen receptors: a novel magic bullet for AML therapeutics? [J/OL]. *Oncoimmunology*, 2014, 3: e28835 [2016-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4106165/>. DOI:0.4161/onci.28835.
- [39] GUO B, CHEN M, HAN Q W, et al. CD138-directed adoptive immunotherapy of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells for multiple myeloma [J]. *J Cell Immunother*, 2016, 2(1): 28-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocit.2014.11.001>.
- [40] OLDHAM R A, BERINSTEIN E M, MEDIN J A. Lentiviral vectors in cancer immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2015, 7(3): 271-284. DOI: 10.2217/imt.14.108.
- [41] CHIRA S, JACKSON C S, OPREA I, et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31):30675-30703. DOI: 10.18632/oncotarget.5169.
- [42] BRENTJENS R, YE H, 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. DOI: 10.1038/mt.2010.31.
- [43] MORGAN R A, YANG J C, 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. DOI: 10.1038/mt.2010.24.
- [44] KOCHENDERFER J N, WILSON W H, JANIK J E, 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. DOI: 10.1182/blood-2010-04-281931.
- [45] MARIN V, CRIBIOLI E, PHILIP B, et al. Comparison of different suicide-gene strategies for the safety improvement of genetically manipulated T cells [J]. *Hum Gene Ther Methods*, 23(6):376-386. DOI: 10.1089/hgtb.2012.050.
- [46] GARGETT T, BROWN M P. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells [J/OL]. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 235 [2016-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211380/>. DOI: 10.3389/fphar.2014.00235.
- [47] DAVILA M L, RIVIERE I, WANG X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T-cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia [J/OL]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra25 [2016-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4684949/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [48] LEE D W, KOCHENDERFER J N, STETLER-STEVENSON M, et al. T-cells expressing CD19v chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial [J]. *Lancet*, 2015, 385(9967): 517-528. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
- [49] KOCHENDERFER J N, DUDLEY M E, FELDMAN S A, 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. DOI: 10.1182/blood-2011-10-384388.
- [50] ZHANG T, SENTMAN C L. Mouse tumor vasculature expresses NKG2D ligands and can be targeted by chimeric NKG2D-modified T-cells [J]. *J Immunol*, 2013, 190(5):2455-2463. DOI: 10.4049/jimmunol.1201314.
- [51] CONDOMINES M, ARNASON J, BENJAMIN R, et al. Tumor-targeted human T-cells expressing CD28-based chimeric antigen receptors circumvent CTLA-4 inhibition [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130518 [2016-04-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4482147/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0130518.
- [52] JOHN L B, DEVAUD C, DUONG C P, et al. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T-cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(20): 5636-5646. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0458.
- [53] PROSSER M E, BROWN C E, SHAMI A F, 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. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.03.023.
- [54] CHMIELEWSKI M, ABKEN H. TRUCKs: the fourth generation of CARs [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(8): 1145-1154. DOI: 10.1517/14712598.2015.1046430.
- [55] PEGRAM H J, LEE J C, HAYMAN E G, 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. DOI: 10.1182/blood-2011-12-400044.
- [收稿日期] 2016 - 04 - 26 [修回日期] 2016 - 09 - 05
- [本文编辑] 党瑞山