

[文章编号] 1007-385X(2008)03-0289-03

PD-1/PD-L1 信号途径在肿瘤免疫逃逸机制中的作用

Role of PD-1/PD-L1 signal pathway in the immunoregulation mechanism of tumor evasion

陈陆俊^{1,2}, 孙 静²综述; 张学光^{2*} 审阅(1. 苏州大学 附属第三医院 综合实验室, 江苏 常州 213003; 2. 苏州大学 医学生物技术研究所, 江苏 苏州 215007)

[摘 要] PD-1/PD-L1 作为免疫球蛋白超家族协同刺激分子的重要成员, 参与自身免疫、移植免疫以及肿瘤免疫等机体免疫调节过程。PD-1 是一个主要表达在活化 T 细胞上的抑制性受体, 与其配体 PD-L1 结合, 可显著抑制 T 细胞的活化和增殖, 并调节细胞因子的表达和分泌。PD-L1 则广泛表达在多种免疫细胞、上皮细胞以及肿瘤细胞上。目前诸多研究表明, 多种人类肿瘤大量表达的 PD-L1 分子与患者临床病理特征及预后紧密相关, 成为肿瘤检出和预后判断的新的生物学指标。肿瘤细胞通过高表达 PD-L1 分子, 与 T 细胞上的受体 PD-1 的结合, 传递负性调控信号, 导致肿瘤抗原特异性 T 细胞的诱导凋亡和免疫无能, 使肿瘤细胞逃避机体的免疫监控和杀伤。阐明 PD-1/PD-L1 信号转导机制在肿瘤免疫应答中的作用, 并尝试将阻断该信号通路应用于肿瘤免疫治疗, 对进一步拓展肿瘤治疗的思路和方法具有重要价值。

[关键词] PD-1/PD-L1; 肿瘤; 免疫逃逸

[中图分类号] R735.7 [文献标志码] A

肿瘤免疫治疗已经成为继手术、化疗、放疗后一种有效的疗法而被广泛应用于临床。但是, 肿瘤细胞亦可通过多种途径逃避机体的免疫监控和杀伤, 使肿瘤细胞增殖得不到有效控制, 导致肿瘤的进一步生长。究其原因, 肿瘤细胞可以表达和分泌的一些膜分子和可溶性细胞因子形成肿瘤细胞生长的微环境, 干扰和阻止机体免疫系统对肿瘤细胞增殖的监控。众所周知, T 细胞活化需要双重信号的协同作用, 分别是抗原提呈信号和协同刺激信号。协同刺激分子(costimulatory molecules)通过为淋巴细胞提供正性或负性的调控信号参与机体免疫应答。PD-1/PD-L1 作为 B7/CD28 协同刺激分子超家族的重要成员, 已被证实通过抑制 T 细胞的活化和增殖来负调控免疫应答, 并在肿瘤细胞免疫逃逸机制中发挥重要作用^[1-2]。本文就这方面的研究进展作一综述。

1 PD-1/PD-L1 的定位、结构和表达

PD-1(programmed death-1)最初是在凋亡的 T 细胞杂交瘤中利用削减杂交的方法得到的, 由于其和细胞凋亡相关而被命名为程序性死亡-1 受体。人 PD-1 基因定位于染色体 2q37.3, 和 CTLA-4 基因具有 23% 的同源性, 其开放阅读框编码一个相对分子质量为 55 000 的免疫球蛋白超家族 I 型跨膜糖蛋白。其胞外区包含一个 IgV 样结构域, 有 4 个重要的 N 连接糖基化位点, 并被重度糖基化, 该结构可能在与配体的结合中发挥重要作用。其胞内段含有一个免疫受体酪氨酸依赖抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM), 正是此基序使得胞质段的磷酸化得到恢

复, 发挥拮抗抗原受体信号的功能^[3]。

目前, PD-1 的配体被证实有两个, 分别是 PD-L1 (又称 B7-H1) 和 PD-L2 (又称 B7-DC)。人 PD-L1 基因定位于染色体 9p24, 其开放阅读框编码一个含有 290 个氨基酸的 I 型跨膜蛋白, 由胞外区 IgV、IgC 结构域、疏水性跨膜结构域、30 个氨基酸片段且带电荷的胞内区组成。人 PD-L1 的胞外段与 B7-1, B7-2 具有较高的同源性, 分别达 20% 和 15%, 且该肽段含有 4 个明显的半胱氨酸残基, 便于其胞外段的重链和轻链形成二硫键结构^[1]。人 PD-L1 mRNA 主要为 4.2 kb, 此外还有 1.8 kb、3.7 kb 和 7.2 kb 等 3 种转录形式, 但它们的编码产物基本相同。PD-L1 mRNA 主要表达于胎盘(特别是合体滋养层和外绒毛状的细胞滋养层)、心脏(鼠中表达较低)、肝脏、肺、肾、骨骼肌等非淋巴组织和少数造血组织(一些骨髓造血细胞以及白血病细胞系), 但在淋巴结和脾脏等淋巴组织的表达量甚微。PD-L1 蛋白广泛表达于抗原提呈细胞(APCs)、活化 T、B 细胞、巨噬细胞、胎盘滋养层、心肌内皮和胸腺皮质上皮细胞。在许多人类肿瘤组织中均可检测到 PD-L1 蛋白的表达, 且许多癌组织较正常组织中的 PD-L1 表达水

[基金项目] 国家自然科学基金重点资助项目(No. 30330540), 江苏省高校自然科学基金基础研究资助项目(No. 06KJB310093), Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30330540), Natural Science Foundation of Higher Education Institutions of Jiangsu Province (No. 06KJB310093)

[作者简介] 陈陆俊(1981-), 男, 江苏省常州市人, 硕士, 见习研究员, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究

* Corresponding author. E-mail: smbxuegz@public1.sz.js.cn.

平明显上调^[4]。

2 PD-1/PD-L1 在淋巴细胞免疫应答中的作用

Dong 等^[1]发现低剂量激发型 CD3 单抗与 PD-L1 Ig 联合应用可有效刺激 T 细胞的增殖,促进 IL-10 的分泌,且这种正性刺激作用呈明显的 IL-2 剂量依赖效应。但也有研究^[5]表明,PD-1/PD-L1 信号可抑制 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的增殖和活化,使细胞周期滞留在 G₀/G₁ 期,同时降低 IL-2、IFN- γ 和 IL-10 的表达和分泌。在这一过程中,TCR 和 CD28 信号的相对强度决定了 T 细胞活化程度。在适量 TCR 信号存在的情况下,PD-L1 对 T 细胞增殖的抑制作用明显,而在适量 TCR 信号存在且无 CD28 协同刺激信号存在时,才促进 T 细胞增殖。相比较而言,在 PD-1/PD-L1 信号缺陷的情况下,T 细胞活化所需 TCR 信号的阈值相应降低。

PD-1 在低度激活的 B 细胞上的表达可抑制其进一步活化,这部分 B 细胞遇到组织细胞表面的自身抗原时,被再度激活。组织细胞表面的 PD-L1 与 B 细胞表达的 PD-1 相互作用可抑制自身反应性 B 细胞的激活,从而阻止这类 B 细胞分化为产生抗自身抗体的浆细胞。其具体机制为:PD-1/PD-L1 信号协同 BCR 抑制 Ca²⁺ 内流及下游信号激活分子如 syk、磷脂酰肌醇-3 激酶、磷脂酶-3 和 vav 的酪氨酸残基的磷酸化,这种抑制效应是 PD-1 的 C 端酪氨酸残基与 SHP-2 酪氨酸磷酸酶结合的结果,而非胞质区 N 端 ITIM 基序内的酪氨酸残基参与所致^[3]。因此 PD-1/PD-L1 信号途径可以通过反应的启动和效应阶段两个层次来负调控 B 细胞免疫应答的强度和持续时间。

T、B 细胞在抗原提供的第一信号及协同刺激分子提供的第二信号的共同作用下,有效活化,并分化为效应 T 细胞及记忆性细胞,发挥免疫防御功能。而这一过程又引起一系列协同刺激分子的上调或下调表达,以维持淋巴细胞处于持续的激活状态而又防止其过度活化的动态平衡。活化的 T、B 效应细胞可归巢到组织中的炎症部位,由于吞噬抗原的不成熟 DC 在炎症介质如 IFN- γ 、TNF- α 的刺激下可迅速上调 PD-L1 的表达^[1],因而推测在此部位不成熟的 DC 可通过 PD-1/PD-L1 信号的介导而调节效应 T 细胞的功能、限制免疫应答无限放大及自身组织的过度损伤。有研究^[6]显示,IFN- γ 可显著上调单核细胞 PD-L1 的表达,因此,PD-L1 可能在 Th1 细胞介导的炎症反应中被诱导表达,并负反馈抑制 Th1 细胞的效应功能。T、B 细胞在初次免疫应答后,部分激活的 CD8⁺ 自身反应性 T 细胞可能归巢到组织中,组织细胞表面的 MHC I 类分子及自身抗原可为这类 T 细胞提供激活信号,而表达在活化 CD8⁺ T 细胞表面的 PD-1 分子可通过与组织细胞表

面高表达的 PD-L1 相互作用而抑制自身反应性 CD8⁺ T 细胞的激活,并诱导其进入凋亡^[5]。由此可见,PD-1/PD-L1 信号通路对 T、B 细胞免疫应答的调控具有重要作用。

3 PD-1/PD-L1 在肿瘤免疫逃逸效应中的作用

PD-L1 在肿瘤组织中的大量表达提示 PD-1/PD-L1 信号通路在肿瘤免疫应答中发挥重要作用。许多肿瘤细胞株表面可表达 PD-L1 或在 IFN- γ 诱导作用下高表达 PD-L1,它与其受体 PD-1 相互作用,导致肿瘤抗原特异性 T 细胞凋亡,使肿瘤细胞逃脱机体免疫监控。体外实验表明,转染 PD-L1 的人黑素瘤细胞株 624mel (天然不表达 PD-L1 分子)可诱导 CD8⁺ CTL 的凋亡。正常情况下,CD8⁺ CTL 通过识别 624mel 的 HLA-A2 中 gp100 抗原表位对 624mel 进行杀伤,但转染 PD-L1 的 624mel 对 CD8⁺ CTL 的识别和杀伤有明显抵制作用,同时未经转染 PD-L1 的 624mel 均受到 CD8⁺ CTL 的杀伤作用^[2]。体内实验表明,分别将空载的 P815 肿瘤细胞和转染 PD-L1 的 P815 肿瘤细胞植入免疫缺陷型 RAG-2^{-/-}小鼠体内,随即注射激活的 2C T 细胞,结果发现空载 P815 肿瘤细胞的 RAG-2^{-/-}小鼠体内 2C T 细胞显著增加,但植入转染 PD-L1 的 P815 肿瘤细胞的 RAG-2^{-/-}小鼠体内 2C T 细胞并未增加,而是出现了 2C T 细胞的凋亡^[2]。通过转基因方式使 PD-L1^{-/-} P815 肿瘤细胞表达 PD-L1,可使 P815 对特异性 T 细胞抗原受体介导的、通过细胞毒性 T 细胞产生的溶胞作用易感性降低,同时这种 P815 在宿主体内的肿瘤诱发能力和侵袭能力明显增强。但是,通过 PD-L1 单抗进行阻断均可逆转上述结果^[7]。内源性的 PD-L1 同样可以有效抑制 T 细胞的活化及其功能的发挥,同时下调细胞因子的表达和分泌。因此,阻断 PD-1/PD-L1 的信号途径已经成为抗肿瘤免疫的一个重要手段,它可通过激活 T 细胞来起到连接主动免疫和被动免疫的桥梁作用^[8]。

4 PD-L1 在肿瘤组织中的表达及其临床意义

PD-L1 广泛表达在造血系统和非造血系统肿瘤细胞表面。到目前为止,应用免疫组织化学方法,已先后在乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、食管癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、神经胶质瘤、黑素瘤等人类肿瘤组织中检测到 PD-L1 蛋白的表达,且 PD-L1 的表达水平和患者的临床病理特征及预后紧密相关。

Ghebeh 等^[9]发现,PD-L1 在乳腺癌肿瘤细胞中的表达水平和肿瘤的组织学分型、雌激素受体及孕酮受体表达水平显著相关。同时,PD-L1 在肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating T lymphocytes, TILs)中亦有表

达,且表达水平和肿瘤大小、组织学分型以及淋巴浸润程度显著相关。通过石蜡切片免疫组化双标记法,发现乳腺癌肿瘤细胞中 PD-L1 和 Ki-67 的表达水平显著正相关,提示 PD-L1 参与的肿瘤免疫应答过程对肿瘤细胞的分化具有重要影响^[10]。通过冰冻切片免疫组化双标记法,Ghebeh^[11]等进一步证实,乳腺癌组织中 PD-L1⁺ T 细胞和 Foxp3⁺ Treg 在数量上呈显著正相关,并且 Foxp3⁺ Treg、PD-L1⁺ T 细胞及 PD-1⁺ T 细胞在乳腺癌中的浸润程度同时与患者肿瘤的组织学分型、孕酮受体表达水平显著相关,这一结果提示诸多负性调控的 TILs 在肿瘤中的浸润,在相当程度上弱化了肿瘤细胞的免疫原性,因此,PD-1/PD-L1 信号可作为乳腺癌免疫治疗的潜在分子靶标。Hamanishi 等^[12]在卵巢癌中发现肿瘤细胞 PD-L1 的表达水平和 CD8⁺ T 的浸润程度负相关,且 PD-L1 表达水平和患者预后负相关,而 CD8⁺ T 的浸润程度和患者预后正相关。Konishi 等^[13]检测到 PD-L1 在非小细胞肺癌中高表达。虽然 PD-L1 在非小细胞肺癌中的表达和患者临床病理特征及预后无相关性,但是他们发现在 PD-L1 表达阳性的肿瘤组织中,TILs 数量显著少于 PD-L1 表达阴性的肿瘤组织,提示肿瘤细胞通过表达 PD-L1,阻碍淋巴细胞在肿瘤部位的浸润,或是诱导浸润的淋巴细胞凋亡。肾癌组织中肿瘤细胞不表达 PD-1,但 TILs 高表达 PD-1,且肿瘤细胞 PD-L1 蛋白的表达水平及 PD-1 + TILs 的浸润程度均和患者预后负相关^[14-15]。PD-L1 在胰腺癌中的表达和肿瘤细胞分化程度、肿瘤分期相关,并且肿瘤组织中 PD-L1、IL-10 在蛋白和 mRNA 两个表达水平上均显著正相关^[16]。本课题组孙静等^[17]报道,PD-L1 在胃癌中的表达和肿瘤大小、浸润深度及淋巴结转移相关,同时 PD-L1 的表达水平是评价患者预后的重要指标,<2 年存活期的患者其 PD-L1 表达的阳性率显著高于 >5 年存活期的患者。

5 PD-1/PD-L1 在肿瘤免疫治疗中的作用

在抗肿瘤免疫中,通常遵循肿瘤特异性 T 细胞活化、T 细胞增殖、肿瘤浸润和 T 细胞记忆应答加强的步骤。研究表明,肿瘤细胞以及肿瘤微环境中的 APCs 表达的 PD-L1 均可经 PD-1/PD-L1 信号通路抑制肿瘤抗原特异性 T 细胞的活化,下调 T 细胞介导的肿瘤免疫应答。因此,干预 PD-1/PD-L1 信号有望成为肿瘤免疫治疗的新策略。应用抗 PD-L1 单抗治疗荷瘤小鼠模型,能明显抑制局部肿瘤生长,并表现出良好的完全缓解率^[18]。应用活化的 CTL 联合抗 PD-L1 单抗治疗荷瘤小鼠模型,相比较于单纯的 CTL 治疗,能有效提高荷瘤小鼠的远期存活率^[19]。小鼠体内实验亦表明,阻断 PD-1/PD-L1 信号可以促进肿瘤抗原特异性 T 细胞的

增殖,发挥杀伤肿瘤细胞的作用,从而有效提高植入体内的 T 细胞存活率,增强免疫治疗效果。

肿瘤免疫治疗的临床效果与肿瘤组织中的 CD8⁺ T 细胞浸润以及 IFN- γ 的分泌是紧密相关的。体外实验证实,通过阻断肿瘤细胞上相关的 PD-L1 信号可上调浸润 CD8⁺ T 细胞 IFN- γ 的分泌,提示 PD-1/PD-L1 信号通路的阻断在以诱导 I 型免疫应答为目的的肿瘤免疫应答中发挥了重要作用^[8]。接种肿瘤疫苗的肿瘤免疫治疗方案亦是增强肿瘤抗原提呈作用和 T 细胞活性达到抗肿瘤的目的。针对 PD-1/PD-L1 信号通路的负调控作用,选择抗 PD-L1 单抗配合肿瘤疫苗进行肿瘤免疫治疗可有效加强肿瘤疫苗的免疫激活作用,减弱肿瘤微环境对疗效的影响。

在肿瘤免疫应答中,肿瘤抗原特异性 T 细胞的诱导凋亡和无反应性是肿瘤细胞免疫逃逸中的主要机制,而 PD-1/PD-L1 信号正是许多肿瘤细胞实现免疫逃逸的重要途径^[2, 20]。在采用移植 T 细胞或接种肿瘤疫苗的肿瘤免疫治疗方案中,同时进行干预 APCs 或肿瘤细胞与 T 细胞间的 PD-1/PD-L1 信号通路,有可能进一步加强抗肿瘤效应。在未来,将这些新的思路运用到临床的肿瘤免疫治疗当具有重要的价值。

[参考文献]

- [1] Dong H, Zhu G, Tamada K, *et al.* B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion[J]. *Nat Med*, 1999, 5(12):1365-1369.
- [2] Dong H, Strome SE, Salomao DR, *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion[J]. *Nat Med*, 2002, 8(8): 793-800.
- [3] Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, *et al.* SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation[J]. *J Immunol*, 2004, 173(2): 945-954.
- [4] Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, *et al.* Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production[J]. *J Immunol*, 2003, 170(3):1257-1266.
- [5] Carter L, Fouser LA, Jussif J, *et al.* PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(3): 634-643.
- [6] Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5336-5341.
- [7] Hirano F, Kaneko K, Tamura H, *et al.* Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(3): 1089-1096.
- [8] Blank C, Kuball J, Voelkl S, *et al.* Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses *in vitro*[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(2):317-327.

(下转第 295 页)

[文章编号] 1007-385X(2008)03-0292-03

基因修饰 T 淋巴细胞在肿瘤免疫治疗中的应用

Research progress on genetically-engineered T lymphocytes in anti-tumor immunotherapy

王 谨, 李升平*, 郑利民(中山大学肿瘤防治中心 华南肿瘤学国家重点实验室 肝胆科, 广州 510060)

[摘要] 基因修饰 T 细胞是指利用基因工程方法对 T 细胞进行基因修饰, 通过提高 T 细胞对抗原的结合能力、增强活化信号的耐受、延长 T 细胞在体内的生存时间、增加肿瘤组织中活化 T 细胞的数量以及改进基因免疫治疗的安全性, 最终达到提高 T 细胞肿瘤免疫治疗的疗效。尽管该方法还存在许多问题, 但是最近几年经基因修饰 T 细胞过继性免疫治疗在基础与临床研究方面均取得了可喜的进展。随着人们对肿瘤免疫研究的深入和基因工程技术的快速发展, 基因修饰的 T 细胞在肿瘤免疫治疗中将有广阔的应用前景。

[关键词] 基因修饰; T 淋巴细胞; 肿瘤; 免疫治疗

[中图分类号] R730.3 **[文献标志码]** A

肿瘤免疫治疗近年来发展迅速, 但整体效果依然欠佳。究其原因, 可能与肿瘤通过各种机制产生免疫逃逸有关^[1], 如肿瘤细胞表达与正常组织细胞相同的抗原, 使机体免疫系统不能有效识别; 通过丢失肿瘤抗原, 下调 HLA 使抗原不能有效提呈; 通过下调 TNF- α 受体、Fas 受体等来抵抗细胞因子及 CTL 的抗肿瘤效应; 还可以通过分泌免疫抑制因子如 TGF- β 和 IL-10 等来抑制免疫活性细胞的功能等。肿瘤浸润性 T 细胞 (tumor-infiltrating lymphocyte, TIL) 过继性免疫治疗虽然在部分肿瘤取得成功, 但是在其他大多数肿瘤中并没有达到预期的效果。其主要原因包括: TIL 难以获得, 这些 T 细胞经体外扩增后其功能活性下降, 到达肿瘤组织的 T 细胞数量不足以及在肿瘤局部微环境中丧失免疫活性等^[2]。

随着肿瘤免疫研究的逐步深入以及分子生物学技术的快速发展, 人们正在探讨用基因工程方法对 T 细胞进行基因修饰, 以达到增强 T 细胞识别体内肿瘤抗原的能力、延长传输 T 细胞的体内寿命、诱导 T 细胞在肿瘤组织的浸润以及改进基因免疫治疗的安全性等。本文对近几年在这些方面取得的部分成果进行综述。

1 增强 T 细胞识别肿瘤抗原的能力

1.1 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 基因修饰的 T 细胞过继性免疫治疗

传统的 T 细胞过继性免疫治疗是从肿瘤组织中分离肿瘤特异性 T 细胞, 经扩增后回输到体内。但是分离肿瘤特异性 T 细胞通常是很困难的, 以黑色素瘤患者为例, 在很多情况下即使把整个黑色素瘤切下来, 也不能获得足够量的肿瘤特异性 T 细胞^[3]。为了克服这一缺陷, 研究者从肿瘤特异性 T 细胞提取编码 α 、 β 链的基因, 利用载体技术将此基因转染受试者的 T 细胞, 而这

些受试者通常是体内缺乏肿瘤特异性 T 细胞的肿瘤患者。经这样处理后, 受者的 T 细胞就能表达肿瘤特异性 TCR。这种方法可以产生大量肿瘤抗原特异性 T 细胞。美国国立癌症研究所 (NCI) 从 TIL 过继性免疫治疗后黑色素瘤完全消退的患者中获取抗 MART-1 的 TCR 基因, 用基因工程的方法将该基因导入外周血淋巴细胞中 (peripheral blood leucocyte, PBL), 接着在细胞因子、单克隆抗体存在的条件下体外孵育一定时间, 获得大量具有抗 MART-1-TCR 的肿瘤特异性 T 细胞。利用该方法获得的 T 细胞输注给 17 例转移性黑色素瘤的患者。这 17 例患者均处于肿瘤进展期, 之前用 IL-2 细胞因子治疗无效。在过继性免疫治疗前接受了淋巴细胞去除性化疗或放疗。结果发现有 2 例患者肿瘤持续性消退, 按实体瘤的疗效评价标准 (RECIST) 达到部分缓解^[4]。这一结果让人鼓舞。

利用人 P53 蛋白刺激 HLA-A2 转基因小鼠, 获得 HLA 限制的具有抗人 P53 表位的小鼠 CTLs。从中提取出识别人 p53 表位 TCR α 、 β 链基因, 然后转导小鼠外周血淋巴细胞, 经体外扩增后, 输注到小鼠体内。基因修饰的 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞均在抗原的刺激下活化, 表现出很强的杀肿瘤活性, 在 HLA-A2.1 存在条件下能识别野生和突变的肿瘤 P53^[5]。也有人设计出可以识别 NY-ESO-1^[6]、GP100^[7] 抗原的 CTL, 用于治疗黑色素瘤, 显示出较强抗肿瘤活性。

利用 TCR 基因修饰的 T 细胞解决了肿瘤特异性 T

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目 (No. 05001750)。Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 05001750)

[作者简介] 王 谨 (1983-), 男, 湖北省天门市人, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤的免疫治疗

* Corresponding author. E-mail: lishengp@mail.sysu.edu.cn

细胞不易获得的难题;利用基因工程的方法,可以设计出天然不存在的能识别肿瘤特异性抗原的 TCR^[6]。但是仍然面临很多问题,如发挥作用需 MHC 限制,鉴别提取肿瘤特异性 TCR α 、 β 基因的过程复杂,内源性 $\alpha\beta$ 链与外源性 $\alpha\beta$ 链可能交联形成无意义链甚至自身反应链,进而引起自身免疫性疾病^[8,9]。

1.2 嵌合性受体(chimeric antigen receptor, CAR)基因修饰

与用基因工程的方法获得肿瘤特异性 TCR 相比,肿瘤特异性单克隆抗体则相对容易获得。借助于基因工程的方法,将抗体的抗原结合区(Fab)或者单链抗体可变区(ScFv)与 T 细胞的信号传导区相结合,构建成嵌合体即为 CAR。将嵌合体基因转染受试者 T 细胞,使之具有能持久识别特定抗原的能力。最近几年研究者相继设计出多种 CAR^[10]。

表达 HER2 的乳腺癌细胞是免疫治疗的一个极好的潜在作用靶点。首先将特异性识别和结合 p185HER2 的嵌合 T 细胞受体-N29 γ 基因转染 T 细胞。然后利用基因工程的方法将人 Her-2 转入小鼠乳腺癌细胞 MT901 和纤维肉瘤细胞 MCA207,建立表达人 HER-2 的小鼠乳腺癌肺转移模型和纤维肉瘤肺转移模型。接着用表达 N29 γ 的 T 细胞治疗 MT901/HER2、MCA207/HER2 肺转移模型小鼠肿瘤明显消退,并证实了其抗肿瘤的效应与输入的细胞数量有关,较晚期肺转移瘤的消退需要输入较大数量的 T 细胞^[11]。Brentjens 等^[12]用抗 CD19 单克隆抗体 ScFv 段与 T 细胞 CD28, CD3- ζ 联合构建嵌合性 T 细胞,能有效发挥溶肿瘤细胞作用。表达 CE7R 的嵌合性 T 细胞能特异性结合肿瘤细胞表面黏附分子,在治疗难治性儿童成神经细胞瘤方面取得了肯定的疗效^[13]。

嵌合性受体具有如下优点:抗体比 TCR α 、 β 链容易获得;不仅能识别蛋白抗原,而且可以识别糖脂类抗原;发挥作用无需 MHC 抗原提呈;传输细胞输注体内后不仅直接发挥溶细胞作用,通过分泌细胞因子,招募其他效应细胞共同发挥抗肿瘤作用。其缺点包括:要求抗原必须在肿瘤细胞表面表达,与抗原结合后不能引起 T 细胞完整的活化,在宿主主体内容易被可溶性抗原抑制。另外,从鼠源性单克隆抗体中获得的 ScFv 和 Fab 可能会引起机体的免疫应答;再者,如果肿瘤抗原发生突变, CAR 识别肿瘤抗原的能力将大为降低^[12,10]。这些问题的解决有待进一步研究。

1.3 采用其他结构作为抗原识别区

Zhang 等^[14]将 NK 细胞的识别肿瘤抗原的表面受体 NKG-2D 转入人外周血 T 细胞,在体外实验能杀死多种 NKG-2D 配体阳性的肿瘤细胞,并分泌 Th1 细胞因子如 TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF 和趋化因子 CCL-3,

CCL-5,进一步增强宿主抗肿瘤免疫。Teng 等^[15]将嗜酸性细胞表面受体 Fc ϵ R I 基因转入 T 细胞,构建的表达 Fc ϵ R I-CD28-TCR ζ 的 T 细胞以肿瘤 IgE 依赖性方式发挥抗肿瘤作用,并分泌 IFN- γ 、GM-CSF 等细胞因子增强抗肿瘤免疫反应。

2 增强 T 细胞活化信号转导或者延长 T 细胞的体内存活时间

基因修饰的 T 细胞在结合抗原后不能全部活化或者输注的 T 细胞在体内存活时间短,可导致过继性免疫治疗的失败^[16]。为了克服这一障碍,研究者将一些与 T 细胞活化和存活有关的基因转入 T 细胞,取得了较好的效果。

Rosenberg 等^[3]把 IL-2 基因转入 T 细胞,在 IL-2 缺乏、抗原存在的环境里, T 细胞能分泌 IL-2,在体内存活、增生的时间超过 3 个月。Maher 等^[16]将胞内段 CD-28 融合 T 细胞中,构建了 ScFv-CD28-CD3 ζ T 细胞。在 IL-2 缺乏的环境下,在抗原的刺激下,表达 ScFv-CD28-CD3 ζ 的 T 细胞被激活,分泌大量的 IL-2,并在体内大量增殖,抗肿瘤效应明显增强。Martin 等^[17-18]将 OX40、CD28 同时转导 T 细胞,各组分连接顺序依次是 ScFv-CD28-OX40-CD3 ζ ,拥有此结构的 T 细胞扩增能力、生存时间、分泌 IL-2 和 TNF- α 的能力显著优于 ScFv-CD28-CD3 ζ T 细胞。

BCL-2 的过表达能阻碍细胞因子缺乏引起的 T 细胞死亡。把 BCL-2 基因导入 TIL 中,在 IL-2 缺乏的环境下能延长 T 细胞在体内的存活时间,从而增强了免疫治疗的效果。当联合疫苗疗法和 IL-2 疗法后,肿瘤几乎完全消退。虽然 BCL-2 过表达与淋巴瘤的发生相关,但是此实验并没有观测到 T 细胞的恶性转化,而且目前也无转入 BCL-2 后引发肿瘤的报道^[19]。

此外,最近研究^[20-21]显示,多种细胞因子如 IL-7、IL-15、IL-21 等与输注 T 细胞的存活有关。用 IL-7、IL-15、IL-21 等细胞因子基因转导 T 细胞有望增强过继性免疫治疗的疗效。

3 增加 T 细胞向肿瘤组织迁移

大量的 T 细胞不能到达肿瘤组织是导致过继性免疫治疗失败的最主要的原因之一^[22]。趋化因子与趋化因子受体相互作用是免疫细胞向肿瘤部位趋化、迁移的重要因素。Kershaw 等^[23]将趋化因子受体 CXCR2 转入 T 细胞,可以使大量的 T 细胞向分泌趋化因子 CXCL-1 的肿瘤部位迁移。但是迄今为止,能有效渗入到实体瘤的 T 细胞还不能让人满意,因此在分子水平上认识 T 细胞进入实体瘤所需的趋化因子和黏附分子是十分必要的。

4 对抗肿瘤部位免疫抑制微环境

肿瘤部位一些免疫调节细胞和免疫抑制因子共同构成了免疫抑制微环境,进入该区域的免疫效应细胞失去活性,也是过继性免疫治疗失败的重要原因。其中,调节性 T 细胞(Treg)起重要的负调节作用。肿瘤微环境内的 Treg 能抑制基因修饰 T 细胞的功能^[7]。在多种小鼠肿瘤模型中证实消除肿瘤微环境中的 Treg 细胞,能减轻小鼠肿瘤负荷^[24]。FOXP3 是 Treg 分化发育中重要的转录因子。利用 RNA 干扰技术,敲除调节性 T 细胞 Foxp3 基因,从而对抗机体内肿瘤抑制微环境,有望增强过继性免疫治疗的效果^[25]。

5 基因修饰的 T 细胞的安全性问题

安全性一直是基因修饰的 T 细胞研究中关注的问题。把经体外扩增、具有高亲和力的 T 细胞输注体内可能引起自身免疫疾病^[2]。更为严重的是,由于逆转录病毒的随机整合,可能引起淋巴细胞的恶性转化。将普通 IL-2R 链通过逆转录病毒载体转染到自体骨髓 CD34⁺ 干细胞用以治疗严重联合免疫缺陷严重联合免疫缺陷(SCID),经治疗的 10 例患者有 2 例出现急性 T 淋巴细胞性白血病。可能是因为逆转录病毒整合到 LMO 启动子附近,引起 LMO 不恰当的激活,导致了 T 细胞的异常增殖^[26]。为了解决这一问题,研究者将自杀基因 HSV-TK 导入 T 细胞。但 HSV-TK 免疫源性强,容易引起机体对转导的 T 细胞的排斥。Berger 等^[27]将 Fas 与 FK506 结合蛋白连接后导入到 T 细胞,在加入诱导物 AP1903 后,Fas 途径被激活,基因修饰的 T 细胞可被高效地清除。Karin 等^[28]将 caspase9 与 FK506 结合蛋白在基因水平上连接后再导入到 T 细胞,加入化学诱导物后引起近 99% 基因修饰 T 细胞的凋亡。

6 结语

综上所述,通过基因修饰的方法,可以增强 T 细胞体内识别肿瘤的能力。T 细胞经 CD28、BCL-2、IL-2、OX40 等基因修饰后,在抗原的刺激下活化,能分泌更多的细胞因子,在体内存活时间更长。转入趋化因子受体以增强 T 细胞的归巢能力,转入自杀基因以改进安全性,清除肿瘤组织的 Treg 细胞以对抗免疫抑制微环境的影响。

虽然上述方法单独应用都可能使肿瘤消退,但是要达到真正意义上的治愈需要综合应用多种方法^[21]。随着对肿瘤免疫认识的进一步深入以及载体技术的改进,基因修饰的 T 细胞过继性免疫治疗将有更广阔的应用前景。

[参考文献]

- [1] Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, *et al.* Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(4): 299-308.
- [2] Leen AM, Rooney CM, Foster AE, *et al.* Improving T cell therapy for cancer[J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 243-265.
- [3] Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(2): 14639-14645.
- [4] 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.
- [5] Cohen CJ, Zheng Z, Bray R, *et al.* Recognition of fresh human tumor by human peripheral blood lymphocytes transduced with a bicistronic retroviral vector encoding a murine Anti-p53 TCR[J]. *J Immunol*, 2005, 175(9): 5799-5808.
- [6] Zhao Y, Zheng Z, Robbins PF, *et al.* Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes recognize and kill diverse human tumor cell lines[J]. *J Immunol*, 2005, 174(7): 4415-4423.
- [7] Abad JD, Wrzensinski C, Overwijk W, *et al.* T-cell receptor gene therapy of established tumors in a murine melanoma model[J]. *J Immunother*, 2008, 31(1): 1-6.
- [8] Cohen CJ, Li YF, El-Gamil M, *et al.* Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3898-38903.
- [9] van der Veken LT, Hagedoorn RS, van Loenen MM, *et al.* Alpha beta T-cell receptor engineered gamma delta T cells mediate effective antileukemic reactivity[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6): 3331-3337.
- [10] Eshhar Z. The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008, 181: 329-342.
- [11] Li S, Yang J, Urban F, *et al.* Genetically engineered T cells expressing a HER2-specific chimeric receptor mediate antigen-specific tumor regression[J]. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15(6): 382-392.
- [12] Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, *et al.* Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 15(13): 5426-5435.
- [13] Park JR, Digiusto DL, Slovak M, *et al.* Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(4): 825-833.
- [14] Zhang T, Barber A, Sentman CL, *et al.* Generation of antitumor responses by genetic modification of primary human T cells with a chimeric NKG2D receptor[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(11): 5927-5933.
- [15] Teng MW, Kershaw MH, Jackson JT, *et al.* Adoptive transfer of chimeric FcepsilonRI gene modified human T cells for cancer immunotherapy[J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(11): 1134-1143.
- [16] Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, *et al.* Human T-lymphocyte cyto-

- toxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta / CD28 receptor[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(1): 70-75.
- [17] Pule MA, Straathof KC, Dotti G, *et al.* A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells[J]. *Mol Ther*, 2005, 12(5): 933-941.
- [18] Wang J, Jensen M, Lin Y, *et al.* Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains[J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(8): 712-725.
- [19] Charo J, Finkelstein SE, Grewal N, *et al.* Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific T-cell survival[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(5): 2001-2008.
- [20] Hinrichs CS, Spolski R, Paulos CM, *et al.* IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8⁺ T cells for adoptive immunotherapy[J]. *Blood*, 2008, 111(11): 5326-5333.
- [21] Wrzesinski C, Restifo NP. Less is more: lymphodepletion followed by hematopoietic stem cell transplant augments adoptive T-cell-based anti-tumor immunotherapy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17(2): 195-201.
- [22] Oeffinger R. Cancer immunotherapy is more than a numbers game [J]. *Science*, 2006, 314(5796): 68-69.
- [23] Kershaw M, Wang G, Westwood J, *et al.* Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(16): 1971-1980.
- [24] Jarnicki A, Lysaght J, Todryk S, *et al.* Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2006, 177(2): 896-904.
- [25] Klaiber N. Potential for stimulating host anti-tumor immune response via RNAi-mediated local FOXP3 knockdown[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(5): 519-520.
- [26] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1[J]. *Science*, 2003, 302(5644): 415-419.
- [27] Berger C, Blau CA, Huang ML, *et al.* Pharmacologically regulated Fas-mediated death of adoptively transferred T cells in a nonhuman primate model[J]. *Blood*, 2004, 103(4): 1261-1269.
- [28] Karin C, Straathof, Martin A, *et al.* An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy[J]. *Blood*, 2005, 105(11): 4247-4254.
- [收稿日期] 2007 - 10 - 31 [修回日期] 2008 - 02 - 22
[本文编辑] 王 莹

(上接第 291 页)

- [9] Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omar A, *et al.* The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors[J]. *Neoplasia*, 2006, 8(3): 190-198.
- [10] Ghebeh H, Tullah A, Mohammed S, *et al.* Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67 expressing tumor cells[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(4): 751-758.
- [11] Ghebeh H, Barhoush E, Tullah A, *et al.* FOXP3⁺ Tregs and B7-H1⁺/PD-1⁺ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: implication for immunotherapy[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 57.
- [12] Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer[J]. *Proc Natl Aca Sci USA*, 2007, 104(9): 3360-3365.
- [13] Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, *et al.* B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15): 5094-5100.
- [14] Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, *et al.* Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3381-3385.
- [15] Thompson RH, Dong H, Lohse CM, *et al.* PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(6): 1757-1761.
- [16] Geng L, Huang D, Liu J, *et al.* B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, [Epub ahead of print]
- [17] Sun J, Xu K, Wu C, *et al.* PD-L1 expression analysis in gastric carcinoma tissue and blocking of tumor-associated PD-L1 signaling by two functional monoclonal antibodies[J]. *Tissue Antigens*, 2007, 69(1): 19-27.
- [18] Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(19): 12293-12297.
- [19] Strome SE, Dong H, Tamura H, *et al.* B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6501-6505.
- [20] Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance[J]. *Trends Immunol*, 2006, 27(4): 195-201.
- [收稿日期] 2008 - 01 - 20 [修回日期] 2008 - 05 - 22
[本文编辑] 王 莹