

异基因造血干细胞移植后 NK 细胞免疫重建的研究进展

曹勋红, 余星星, 胡利娟, 黄晓军, 赵翔宇

(北京大学人民医院 北京大学血液研究所, 北京 100044)

摘要: 异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)是治疗血液系统恶性肿瘤有效且唯一的治愈方法, 移植成功与否主要取决于移植后受者造血系统和免疫系统的恢复程度。HSCT 后免疫系统的恢复, 也被称为免疫重建, 其中 NK 细胞的免疫重建最为重要, 它在个体的早期防御和 allo-HSCT 的成败中发挥重要的作用。文章即对 allo-HSCT 中 NK 细胞免疫重建规律、促进 NK 细胞免疫重建的相关免疫治疗方法及疗效的进展作一综述。

关键词: 异基因造血干细胞移植; NK 细胞; 免疫重建; 免疫治疗

中图分类号: R392.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)01-0064-04

异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT)预后依赖于造血系统和免疫系统的恢复, 其中免疫系统的恢复包括免疫细胞数量的恢复和功能的重建。机体免疫重建快慢与移植后相关并发症的预后相关^[1]。免疫重建又包括固有免疫重建和适应性免疫重建, 适应性免疫应答主要由 T 淋巴细胞介导移植物抗白血病(graft versus leukemia, GVL)效应来发挥移植后的治疗巩固作用, 但是移植后适应性免疫重建往往要耗时 1~2 年之久^[2]。相比之下, 固有免疫重建特别是 NK 细胞重建早于适应性免疫重建, 这有利于机体早期防御^[3]。

NK 细胞的防御机制不同于 T/B 淋巴细胞^[4], 其效应功能受 NK 细胞表面活化型和抑制型受体的调节。NK 细胞表面杀伤性免疫球蛋白受体(killer immunoglobulin-like receptor, KIR)通过与 HLA-I 类分子识别、结合获得自身免疫耐受, 因此, 感染或肿瘤中诱导的 MHC I 类分子缺失将使 NK 细胞活化, 进而清除异常细胞。同时, NK 细胞即使在 HLA 不相合的环境中也不会导致移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD), 并且对感染、复发的控制都有较好的效果^[5]。基于此, NK 细胞过继性免疫治疗^[6]在治疗血液恶性肿

瘤中取得了不错的疗效^[7]。因此, 了解 NK 细胞在 allo-HSCT 中的重建规律对指导临床治疗有着重要的意义。

1 全合 allo-HSCT 后 NK 细胞的重建规律

在正常人体内, NK 细胞获得功能是通过 NK 细胞表面 KIR 与 HLA 的相互作用来实现的, 表达针对自身 KIR 的 HLA 分子(即 KIR 配体)的 NK 细胞为“经认证(licensed)”NK 细胞或“经教育(educated)”NK 细胞, 其功能强, 易于被活化; 缺乏针对自身 KIR 配体的 NK 细胞为“未认证(unlicensed)”NK 细胞或“未教育(uneducated)”NK 细胞, 功能上处于免疫低反应状态, 不易于被活化。NK 细胞如何在移植后获得认证或教育, 目前尚不清楚。

NK 细胞在全合移植后 1 个月即可达到供者水平, 但早期重建以不成熟亚群 CD56^{bright} NKG2A⁻ KIR⁻ 为主。Björklund 等^[8]监测全合移植后 105 例患者的 NK 细胞表型和功能重建发现, NK 细胞重建早且以 CD56^{bright} 亚群为主, 而受者 NK 细胞杀伤功能在移植后 12 周才达到供者水平。目前, 针对 NK 细胞同种异体反应性作用有 2 种假说, 即“丢失自我”模式和“KIR/KIR 配体错配”模式。前者指供者体内本身为未认证状态的 NK 细胞, 回输至受者体内, 受到移植后早期细胞因子风暴活化, 打破了免疫低反应状态, NK 细胞被活化而发挥杀伤效应^[9]; 后者指供者和受者 NK 细胞 KIR 配体不合, 当将供者体内经认证 NK 细胞回输至患者体内时, 因为患者缺乏相应 KIR 配体, 激活了供者

收稿日期: 2018-03-22

基金项目: 国家自然科学基金(81670166, 81870140); 首都临床特色应用研究与成果推广项目(Z171100001017098)

作者简介: 曹勋红(1994-), 女, 硕士生, 主要从事移植免疫方向研究

通信作者: 赵翔宇(E-mail: zhao_xy@bjmu.edu.cn)

来源的经认证NK细胞,从而发挥杀伤活性^[10]。在全合allo-HSCT中,主要由前者发挥GVL效用^[11]。NK细胞移植后功能重建慢于其数量恢复,且功能重建良好与否与移植后临床预后密切相关^[3]。此外,KIR和HLA-I类分子是各自独立的遗传因素。即使是HLA全相合的供者和受者,对于近亲来源的造血干细胞移植,也只有25%的供者和受者KIR表型完全相同,而非血缘关系的供者和受者其KIR匹配率几乎为0。这说明NK细胞发挥GVL效应仍取决于其表面受体种类多样性和活化型与抑制型表面受体的相互协调^[12]。有临床研究表明,有血缘关系^[13]或非血缘关系^[14]的供者和受者NK细胞表面活化型受体表达与移植后复发率的降低有关。因此,移植后NK细胞表面受体重建情况可作为临床预后评估指标。

2 单倍型造血干细胞移植后NK细胞的重建规律

与全合移植后NK细胞重建类似,本课题组研究发现单倍型体外非去T淋巴细胞移植后受者NK细胞在30d时即可达到供者水平,但以CD56^{bright}为主;移植后30d的NK细胞分泌IFN- γ 能力已达到供者水平,但杀伤能力仍弱于供者NK细胞^[15]。HLA-I/II类分子是T淋巴细胞介导GVHD的主要分子,因此临床上往往采用移植去T淋巴细胞方案减少GVHD。然而NK细胞作为适应性免疫的桥梁,T淋巴细胞是否能影响移植后NK细胞免疫重建?Nguyen等^[16]发现供者移植组中的成熟T淋巴细胞可减少CD3⁻CD56^{bright}和NKG2A⁺亚群数量并增强NK细胞的抗肿瘤杀伤能力。同时,供者和受者HLA不全相合的移植背景也将影响NK细胞在受者体内的被教育过程,即NK细胞功能的发挥有赖于NK细胞表面KIR受体与自身HLA-I类分子的识别、结合。Zhao等^[17]发现单倍型allo-HSCT受者若表达与供者NK细胞表面KIR结合的HLA-I类分子,则能降低移植后的复发率。由此可以得出,供者NK细胞若无法与受者HLA-I类分子结合,将不利于NK细胞功能的发挥,但是NK细胞是在何时、何地暴露于HLA-I类分子并完功能化仍需要进一步研究^[18]。

3 allo-HSCT后NK细胞免疫重建与移植后合并症的关系

移植后NK细胞免疫重建状态的稳定将影响移

植后并发症的转归,而NK细胞免疫重建又与多种因素有关。

3.1 感染 固有免疫特别是NK细胞是防御感染的重要屏障,本课题组研究提示单倍型移植后15d CD56^{bright}快速重建,移植的感染发病率低,移植相关死亡率(transplant-related mortality, TRM)低,总体生存率(overall survival, OS)好^[15];美国骨髓移植协会推荐用15d CD56^{bright}来预测移植后感染的发生^[19];Drylewicz等^[20]报道也证实了移植后30d快速重建的NK细胞可以降低移植后巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染率。本课题组的研究也提示NK细胞快速重建有助于预防移植后感染^[21]。与此同时,有文献报道NKG2C的重建与CMV的发生密切相关,移植后CMV感染可促进NKG2C⁺NK细胞免疫重建^[22],且NKG2C被认为是CMV感染后具有功能性亚群的NK细胞表面标志物。然而,Della等^[23]对NKG2C基因缺失合并人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)并接受脐血造血干细胞移植后患者的NK细胞成熟性进行分析,发现即使NKG2C不表达,HCMV感染仍可刺激NK细胞功能发挥和成熟,这说明可能存在其他诱导NK细胞发育成熟的机制。

3.2 GVHD 已有动物实验表明,NK细胞可降低GVHD发生^[24],但是移植后NK细胞快速重建是否可降低GVHD呢?Chang等^[15]发现单倍型移植后NK/T细胞比例高,移植后发生GVHD风险低,提示NK细胞快速重建可减少HSCT治疗后GVHD的发生率,课题组进一步研究证实NK细胞中NKG2A⁺亚群快速重建对GVHD具有保护作用^[25]。Kim等^[26]研究结果也证实造血干细胞移植后早期,NK细胞计数低、急性GVHD发生率高,因此NK细胞可作为患者早期并发急性GVHD的预测因子。但是当移植合并GVHD时,是否会影响NK细胞的免疫重建呢^[27]?Huenecke等^[28]根据儿童移植后患者NK细胞表面CD56表达水平分为:CD56⁺⁺CD16⁻(CD56^{bright})、CD56⁺⁺CD16⁺(CD56^{intermediate=int})、CD56⁺CD16⁺⁺(CD56^{dim})并发现移植后2个月,并发急性GVHD患者的CD56^{bright}数量明显下降,提示GVHD不仅影响NK细胞表型,还可以降低患者体内NK细胞数量。总之,NK细胞与GVHD可互相影响,但是在GVHD环境中,NK细胞重建还受到干细胞来源和预处理条

件等的影响,因此需要做进一步研究。

4 移植后药物对NK细胞免疫重建的影响

allo-HSCT后,尤其是HLA不全相合移植后,因为发生GVHD的风险较大,需要应用多种免疫抑制剂来预防,Zohren等^[29]使用Tac/MMF预处理方案发现其对早期和晚期GVHD均有效。但是临床运用免疫抑制剂抑制T/B淋巴细胞增殖以预防GVHD时,是否会影响allo-HSCT后NK细胞的免疫重建呢?环磷酰胺是抑制T/B淋巴细胞的重要免疫抑制剂,有研究发现移植后环磷酰胺的应用可影响到NK细胞免疫重建^[30],即环磷酰胺能够抑制成熟NK细胞亚群的免疫重建,从而削弱移植后NK细胞发挥的同种反应性。Brehm等^[31]的体外实验也证实长期使用免疫抑制剂霉酚酸酯会严重抑制NK细胞增殖,功能抑制则表现为影响NK细胞化学因子分泌,表面细胞毒性受体、相关黏附分子和活化型受体表达下降。但IL-2可挽救霉酚酸酯对NK细胞数量、功能和信号传递的抑制作用^[31]。以上研究均表明移植后免疫抑制剂的组合会影响NK细胞免疫重建,但是关于免疫抑制剂对NK细胞重建的研究目前仍很少,需要在此方面进行更多的研究。

5 促进移植后NK细胞免疫重建的治疗进展

NK细胞免疫重建与移植疗效密切相关,可以通过免疫治疗促进移植后NK细胞重建改善移植疗效。本课题组对早期移植后患者运用小剂量的IL-2干预治疗,发现IL-2利于体内NK细胞和Treg扩增,降低慢性GVHD风险^[32]。Alpdogan等^[33]也发现IL-15可明显增加移植后小鼠体内NK细胞数量并提高机体抗肿瘤能力。NK细胞过继性免疫疗法也被认为是促进移植后NK细胞免疫重建的辅助性治疗方法。Ciurea等^[5]在移植前后对高危髓系肿瘤患者输注体外扩增的NK细胞,结果表明移植后NK细胞表型和功能重建明显加快,复发率也降低。以上均提示细胞因子和过继性细胞治疗可加快移植后NK细胞免疫重建,但具体的临床疗效还需要更多的研究。移植后NK细胞免疫重建也受其他免疫细胞调节。Lugthart等^[34]对93例儿童患者采用全合移植方案,并根据移植后T细胞免疫重建状态分析,发现T细胞免疫重建差组的NK细胞重建快且以CD56^{bright}为主,说明NK细胞快速重

建一方面可以弥补体内T淋巴细胞重建较晚的状态,另一方面提示T淋巴细胞可能调节NK细胞的免疫重建状态。总之,NK细胞作为连接固有免疫和适应性免疫的重要桥梁,其与众多免疫细胞间的调控网络复杂多变,因此仍需要进行更多的研究。

6 结语

NK细胞在移植后抗肿瘤和防御感染中均发挥重要的作用,因此提高移植后NK细胞重建速度将有利于防范移植后相关并发症的发生。移植后NK细胞重建受多种因素影响,如何在达到最大程度的有效治疗的同时减少并发症(感染、GVHD)及治疗方式(免疫抑制剂、移植植物来源)等对NK免疫重建的影响将是未来攻坚的重点。

参考文献

- [1] Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2014, 20(4): 440-449.
- [2] Ogonek J, Juric MK, Ghimire S, et al. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Front Immunol, 2016, 7: 1664-3224.
- [3] Pical-Izard C, Crocchiolo R, Granjeaud S, et al. Reconstitution of natural killer cells in HLA-matched HSCT after reduced-intensity conditioning: Impact on clinical outcome[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2015, 21(3): 429-439.
- [4] 任海龙, 邵东燕, 李琦, 等. NK细胞应用于肿瘤免疫治疗的研究进展[J]. 现代免疫学, 2017, 37(3): 233-237.
- [5] Ciurea SO, Schafer JR, Bassett R, et al. Phase 1 clinical trial using mbIL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation[J]. Blood, 2017, 130(16): 1857-1868.
- [6] Davis ZB, Felices M, Verneris MR, et al. Natural killer cell adoptive transfer therapy[J]. The Cancer Journal, 2015, 21(6): 486-491.
- [7] Otegbeye F, Ojo E, Moreton S, et al. Inhibiting TGF-beta signaling preserves the function of highly activated, in vitro expanded natural killer cells in AML and colon cancer models[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0191358.
- [8] Björklund AT, Schaffer M, Fauriat C, et al. NK cells expressing inhibitory KIR for non-self-ligands remain tolerant in HLA-matched sibling stem cell transplantation[J]. Blood, 2010, 115(13): 2686-2694.
- [9] Raut DH. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells[J]. Semin Immunol, 2006, 18(3): 145-150.
- [10] Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, et al. Natural killer cell alloreactivity and haplo-identical hematopoietic transplantation[J]. Cytotherapy, 2006, 8(6): 554-558.

- [11] Yu J, Venstrom JM, Liu XR, *et al.* Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *Blood*, 2009, 113(16): 3875-3884.
- [12] Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, *et al.* Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion[J]. *Blood*, 2006, 107(1): 159-166.
- [13] Impola U, Turpeinen H, Alakulppi N, *et al.* Donor haplotype B of NK KIR receptor reduces the relapse risk in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation of AML patients[J]. *Front Immuno*, 2014, 5: 1-5.
- [14] Faridi RM, Kemp TJ, Dharmani-Khan P, *et al.* Donor-recipient matching for KIR genotypes reduces chronic GVHD and missing inhibitory KIR ligands protect against relapse after myeloablative, HLA matched hematopoietic cell transplantation[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0158242.
- [15] Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. Effects of the NK cell recovery on outcomes of unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation for patients with hematologic malignancies[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008, 14(3): 323-334.
- [16] Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, *et al.* NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations; Immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect[J]. *Blood*, 105(2005): 4135-4142.
- [17] Zhao XY, Chang YJ, Zhao XS, *et al.* Recipient expression of ligands for donor inhibitory KIRs enhances NK-cell function to control leukemic relapse after haploidentical transplantation[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(8): 2396-2408.
- [18] Miller JS, Blazar BR. Control of acute myeloid leukemia relapse-dance between KIRs and HLA [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(9): 866-868.
- [19] Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, *et al.* Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: A global perspective [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, 15(10): 1143-1238.
- [20] Drylewicz J, Schellens IM, Gaiser R, *et al.* Rapid reconstitution of CD4 T cells and NK cells protects against CMV-reactivation after allogeneic stem cell transplantation[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 230.
- [21] Yu XX, Xu LL, Chang YJ, *et al.* Rapid reconstitution of NK1 cells after allogeneic transplantation is associated with a reduced incidence of graft-versus-host disease[J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(8): 902-911.
- [22] Kheav VD, Busson M, Scieuc C, *et al.* Favorable impact of natural killer cell reconstitution on chronic graft-versus-host disease and cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Haematologica*, 2014, 99(12): 1860-1867.
- [23] Della CM, Falco M, Bertaina A, *et al.* Human cytomegalovirus infection promotes rapid maturation of NK cells expressing activating killer Ig-like receptor in patients transplanted with NKG2C^{-/-} umbilical cord blood[J]. *J Immunol*, 2014, 192(4): 1471-1479.
- [24] Hüber CM, Doisne JM, Colucci F, *et al.* IL-12/15/18-pretreated NK cells suppress GvHD in a mouse model of mismatched hematopoietic cell transplantation[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(6): 1727-1735.
- [25] Hu LJ, Zhao XY, Yu XX, *et al.* Quantity and quality reconstitution of NKG2A⁺ NK cells are associated with graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019, 25(1): 1-11.
- [26] Kim SY, Lee H, Han MS, *et al.* Post-transplantation natural killer cell count: A predictor of acute graft-versus-host disease and survival outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2016, 16(9): 527-535.
- [27] Ullrich E, Salzmann-Manrique E, Bakhtiar S, *et al.* Relation between acute GvHD and NK cell subset reconstitution following allogeneic stem cell transplantation[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 595.
- [28] Huenecke S, Cappel C, Esser R, *et al.* Development of three different NK cell subpopulations during immune reconstitution after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; Prognostic markers in GVHD and viral infections [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1664-3224.
- [29] Zohren F, Schroeder T, Czibere A, *et al.* Tacrolimus and MMF following matched unrelated nonmyeloablative-SCT [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2011, 46(5): 747-755.
- [30] Russo A, Oliveira G, Berglund S, *et al.* NK cell recovery after haploidentical HSCT with post-transplant cyclophosphamide; Dynamics and clinical implications[J]. *Blood*, 2018, 131(2): 247-262.
- [31] Brehm C, Huenecke S, Esser R, *et al.* Interleukin-2-stimulated natural killer cells are less susceptible to mycophenolate mofetil than non-activated NK cells; Possible consequences for immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63(8): 821-833.
- [32] Zhao XY, Zhao XS, Wang YT, *et al.* Prophylactic use of low-dose interleukin-2 and the clinical outcomes of hematopoietic stem cell transplantation; A randomized study [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(12): e1250992.
- [33] Alpdogan O, Eng JM, Muriglan SJ, *et al.* Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation[J]. *Blood*, 2005, 105(2): 865-873.
- [34] Lughart G, Goedhart M, van Leeuwen MM, *et al.* Expansion of cytotoxic CD56 bright natural killer cells during T-cell deficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *J Allergy Clin Immun*, 2017, 14(5): 1466-1469.