

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190737

嵌合抗原受体-T 细胞免疫治疗在黑素瘤中的应用进展

邓心怡, 顾建英*

复旦大学附属中山医院整形外科, 上海 200032

[摘要] 嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)-T 细胞疗法是一种过继性细胞免疫疗法, 近年来在肿瘤免疫治疗中极具研究前景。目前, CAR-T 细胞疗法已运用于血液系统恶性肿瘤(如急性 B 淋巴细胞白血病等)的研究和临床治疗中, 并取得了不俗成果。但对于将 CAR-T 细胞运用于实体肿瘤的治疗仍存在相当多的困难。本文就 CAR-T 细胞疗法的原理、在黑素瘤治疗中的应用及面临的挑战、CAR-T 细胞治疗的副作用和相应对策等方面进行综述。

[关键词] 嵌合抗原受体; T 淋巴细胞; 黑素瘤; 肿瘤免疫治疗

[中图分类号] R 730.3 **[文献标志码]** A

The progress of chimeric antigen receptor-T cell immunotherapy in the treatment of melanoma

DENG Xin-yi, GU Jian-ying*

Department of Plastic Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] The application of chimeric antigen receptor-T cell (CAR-T) cells is a promising cellular immunotherapy in oncotherapy recent years. Gratifying results have been achieved in the treatment of hematologic malignancies such as B-lymphocytic leukemia by using CAR-T cells, but considerable difficulties still need to be overcome in the treatment of solid tumors. This review mainly discusses the principle, application, as well as the side effects of CAR-T cells therapy.

[Key Words] Chimeric antigen reporter; T cell; melanoma; tumor immunotherapy

肿瘤治疗向来是医学研究的重点, 面对手术切除、放化疗等传统治疗手段效果不理想的肿瘤, 近年基于分子生物学及免疫学发展起来的细胞免疫治疗有望成为一种新的强有力的抗肿瘤手段, 而嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)免疫疗法也研究热点之一。通过基因工程技术对 T 淋巴细胞进行修饰, 使其表面能表达嵌合抗原受体。这种受体使细胞不依赖主要组织相容性复合体及抗原提呈细胞对肿瘤抗原的识别和呈递过程, 自身直接识别肿瘤蛋白质及脂类抗原, 这一特性使其对肿瘤细胞有很强的靶向识别能力。现阶段 CAR-T 细胞在临床上主要用于治疗急性 B 淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤等血液系统恶性肿瘤^[2]。鉴于 CAR-T 细胞疗法在血液系统恶性肿瘤治疗中的优秀表现, 科学家们也逐渐将研究目光转向 CAR-T 细胞在黑素瘤等实体肿瘤治疗的运用。虽然目前关于 CAR-T 细胞疗法在实体肿瘤中运用的研究已经取得了一定的进展, 但相关实验结果也

暴露出, 将 CAR-T 细胞疗法作为一种实体肿瘤标准治疗方案尚有相当多的困难需要克服。

1 CAR-T 细胞

1.1 CAR-T 细胞的特性与机制 CAR-T 细胞的功能结构大致由三个部分组成, 包括胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域^[3]。胞外结构域为一个单链可变片段(scFv), 该片段来源于肿瘤特异性抗原的单克隆抗体, 对于特定的肿瘤抗原具有较好的靶向识别作用。跨膜结构域为一个共刺激结构域, 其中可含有如 CD4、CD7、CD8、CD28 和 CD3 ζ 等蛋白分子^[1]。胞内结构域为一个 T 细胞免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAMs), 发挥了信号转导的作用, 将胞外信号传入细胞内。随着研究的深入, 至今已发展出四代 CAR-T 细胞, 它们的结构大多遵循此模式, 其区别主要在于: 第一代 CAR-T 细胞的胞内仅有一个活化基序, 而第二代和第三代 CAR-T

[收稿日期] 2019-05-13

[接受日期] 2019-10-08

[基金项目] 复旦大学附属中山医院院内科研课题(2017YFC0910003)。Supported by Research Project of Zhongshan Hospital, Fudan University(2017YFC0910003)。

[作者简介] 邓心怡, 硕士生。E-mail: m18819431194@163.com

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-60268029, E-mail: zhongshanhospital@163.com

细胞分别在活化基序上添加了一个和两个共刺激信号分子,使 CAR-T 细胞识别、活化和抗肿瘤能力的的能力得到增强。而第四代 CAR-T 细胞还在上述结构基础上增加了至少一个用于编码嵌合抗原受体及其启动子的载体,这样就可以使 CAR-T 细胞激活的同时产生大量有活性的细胞因子,达到调节肿瘤微环境、增强肿瘤杀伤能力的目的。此种设计赋予了 T 细胞直接识别肿瘤特异性抗原并自主激活的能力,因此不再依赖主要组织相容性复合体分子及抗原提呈细胞对抗原的呈递作用。在与肿瘤细胞接触后,CAR-T 细胞即可释放大量颗粒酶、穿孔素、肿瘤坏死因子等,对肿瘤细胞进行高效杀伤。

1.2 CAR-T 细胞的优势 CAR-T 细胞的这种结构使之同时具备了细胞免疫和体液免疫的特点,大大提高了其抗肿瘤效率。大量临床试验及运用实例表明,CAR-T 细胞主要具有以下优势:①特异性高:CAR-T 细胞表面单链可变片段(scFv)的设计源自肿瘤特异性抗原单克隆抗体,因此可通过抗原-抗体识别机制,准确识别肿瘤细胞,有效减少肿瘤免疫逃逸现象^[4]。②靶向性强:CAR-T 细胞的结构赋予其靶向识别肿瘤特异性抗原的能力,而这些特异性抗原通常情况下并不在正常细胞表面表达,因此 CAR-T 细胞能对肿瘤细胞进行“精确打击”。③效率高:CAR-T 细胞不需要经过抗原呈递细胞,并且不依赖 MHC 对肿瘤细胞进行识别^[5],直接识别肿瘤抗原与之结合,省去了抗原提呈的步骤,大大提高抗肿瘤效率。④覆盖面广泛:同起源的肿瘤细胞表面往往表达有相同或近似的肿瘤抗原,因此针对某一特定肿瘤抗原的 CAR-T 细胞构建完成后便可用于多种表达同一肿瘤抗原的肿瘤的治疗,“一药多用”使得治疗效率大大提高。⑤持久性好:CAR-T 细胞基于 T 细胞进行编辑,保留了 T 细胞增殖活性,输入体内后可大量增殖并形成记忆 T 细胞长期存在,因此可在较长时间内维持对肿瘤细胞的持续性杀灭作用。⑥可改变肿瘤微环境:有研究^[6]提示,CAR-T 细胞可抑制肿瘤微环境中相关抑制性细胞的功能,明显减少免疫抑制性细胞因子的分泌,改变肿瘤微环境,易于肿瘤杀伤性细胞的后续进入,并抑制肿瘤的增殖,间接增强了其杀灭肿瘤的能力。

2 CAR-T 细胞的运用

CAR-T 细胞疗法是一种具有特异性的过继性免疫效应细胞治疗方法,与传统肿瘤治疗方案如手术切除治疗及放化疗相比,CAR-T 细胞治疗具有更

精确的靶向性,杀伤肿瘤组织的时,对正常组织的损伤更小,肿瘤杀伤效果维持时间更久等明显优势。基于 CAR-T 细胞的诸多优势,CAR-T 细胞疗法有潜力成为一种新的肿瘤治疗模式。随着研究的深入,CAR-T 细胞结构不断得到优化,现已开发出四代 CAR-T 细胞,并开始将其逐步运用于临床试验和治疗^[7]。

2.1 CAR-T 细胞在血液恶性肿瘤中的运用

CAR-T 细胞的临床试验首先在血液恶性肿瘤中展开。Rosenberg 课题组^[8]在 2010 年发表了首篇关于 CAR-T 细胞的临床治疗结果,该研究提示,通过注射抗 CD19 分子的 CAR-T 细胞,晚期滤泡淋巴瘤患者的肿瘤负荷明显消退,获得了较长时间的部分缓解。随后,我国团队^[9]也于 2015 年至 2016 年尝试采用 CD19-CAR-T 细胞治疗了 64 例难治性复发 B 淋巴细胞急性白血病患者,取得了良好治疗效果。基于良好的临床治疗反馈,各大生物公司开始研发 CAR-T 细胞抗肿瘤药物,美国食品药品监督管理局于 2017 年受理了诺华和凯特制药两个公司关于 CAR-T 疗法的申请,授予其“突破性疗法”地位,紧接着,全球第一个 CAR-T 细胞疗法上市。该疗法早期主要运用于淋巴瘤及白血病的治疗,基于良好的治疗反馈,近年来也开始尝试将其用于如黑色素瘤、神经胶质瘤等实体性肿瘤的临床试验中。

2.2 CAR-T 细胞在黑色素瘤中的运用 黑色素瘤是一种中外胚层神经嵴来源的黑素细胞的高度恶性肿瘤,预后差、治疗难度大。以往多采用手术切除治疗,但黑色素瘤转移较早,转移性黑色素瘤患者预后极差。据统计,我国远处转移黑色素瘤患者十年生存率尚不足 10%^[10]。

黑色素瘤细胞携带有大量的突变基因序列,其细胞表面表达有大量肿瘤新抗原,这一特性使之容易被免疫系统所识别。基于此特征,科学家们很早便开始在黑色素瘤的治疗中尝试应用免疫疗法^[11],且取得了不错的疗效。鉴于 CAR-T 细胞在治疗血液恶性肿瘤的尝试中表现优异,科学家们开始将研究目光转向黑色素瘤的治疗。美国国立卫生研究院癌症研究所癌症研究中心外科分会于 2006 年进行了一项实验研究^[12],使用反转录病毒改造正常的循环中的淋巴细胞,使其表达识别黑色素瘤分化抗原(melanoma antigen recognized by T cells 1, MART1)的 TCR,将此种细胞回输入患者体内,发现能够有效介导肿瘤的消退。2014 年 Christian Krug 等^[13]以黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白多糖(Melanoma-

associated chondroitin sulfate proteoglycan, MCSP) 作为治疗靶点, 构建并鉴定了第 1、2 两代 CAR-T 细胞。其抗肿瘤活性鉴定结果提示, 两代 CAR-T 细胞均可有效杀伤黑素瘤细胞。患黑素瘤小鼠经过输注 CAR-T 细胞, 生存期得到了明显的延长, 且此效果在第 2 代 CAR-T 细胞中表现得更为显著。之后在 2017 年, 一项由 Efrat 等发起的关于运用过继细胞疗法 (ACT) 治疗恶性黑素瘤的研究^[14] 显示: 通过回输 VEGFR2-CAR-T 细胞而接受过继细胞疗法的 24 名患者中, 缓解率为 4%。一系列实验研究表明, CAR-T 细胞过继细胞免疫疗法对于黑素瘤有极大的治疗潜力, 但目前仍存在一些不可忽视的问题阻碍着此疗法的临床运用。

3 CAR-T 细胞疗法治疗黑素瘤面临的问题及对策

CAR-T 细胞在肿瘤杀伤中所表现出来的各种优势, 使之成为肿瘤治疗方面的研究热点, 被认为是肿瘤治疗的新方向。通过研究发现, 血液系统恶性肿瘤细胞表面携带大量肿瘤特异性抗原便于 CAR-T 细胞的识别, 无屏障作用的循环系统使得 CAR-T 细胞能够迅速扩散及分布, 以及 T 淋巴细胞的归巢效应, 这些特性赋予 CAR-T 细胞在治疗血液系统恶性肿瘤的运用中的巨大优势。虽然科学家已经过诸多尝试, 然而目前 CAR-T 细胞治疗实体肿瘤如黑素瘤仍存在许多障碍^[14]。

3.1 趋化过程中的物理障碍 黑素瘤为实体性肿瘤, 与血液系统肿瘤无屏障作用不同, 肿瘤微环境形成的物理屏障对 CAR-T 细胞是一种阻碍。CAR-T 细胞需要从血管中移出, 跨越内皮屏障^[16], 迁徙至病灶处, 随后需要分泌降解酶, 主动降解细胞外基质^[17] 以到达并接触肿瘤细胞。以往回输 CAR-T 细胞多通过静脉注射, 而对于黑素瘤而言, 肿瘤处病灶内注射^[18] 可有效避免上述物理障碍。另外有研究者设计出表达相应细胞因子受体的 CAR-T 细胞, 使之利用“归巢”效应定位并迁徙至肿瘤细胞所在部位^[19]。

3.2 肿瘤微环境的免疫抑制 实体肿瘤存在肿瘤微环境, 这是 CAR-T 细胞面临的最重要的障碍之一。肿瘤微环境中存在的基质细胞、调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 等营造了免疫抑制环境, CAR-T 细胞的抗肿瘤活性在其中将受到抑制。宾夕法尼亚大学的一个研究小组报道了一种利用免疫抑制细胞因子来规避此影响的策略, 他们使 CAR-T 细胞表达 dnTGF- β 受体, 通过实验观察发

现, 这一措施可增强 CAR-T 细胞在肿瘤微环境中的存活、分泌细胞因子及肿瘤杀伤的能力^[20]。

3.3 肿瘤的免疫逃逸 接受 CAR-T 细胞治疗的患者在最初有效的治疗反应后, 可能会出现肿瘤的进展, 这很可能是由于肿瘤细胞启动了“免疫逃逸机制”, 绕过了现有的免疫识别系统所导致^[21]。这些机制包括靶抗原的下调或丢失。黑素瘤为一种高度异质性肿瘤, 因此识别单一肿瘤抗原的 CAR-T 细胞很容易在使用一段时间后出现“脱靶”现象。因此有研究者提出, 使 CAR-T 细胞同时表达 2 种肿瘤特异性受体的方法来应对此现象^[22]。构建串联 CAR 体系 (“tandem” CAR, TanCAR) 可以降低肿瘤抗原逃逸的概率, 如构建表达 HER2 抗体和 IL13R α_2 抗体的 CAR-T 细胞, 单个 HER2 或 IL13R α_2 就能激活 TanCAR, 当两种抗原同时被识别时则能够产生更强的活性, TanCAR-T 细胞能有效增强 T 细胞抗肿瘤效应, 减少肿瘤复发^[23]。

3.4 治疗相关毒性作用 CAR-T 治疗的毒性作用主要分为肿瘤靶向毒性和非肿瘤/靶向毒性。肿瘤靶向毒性产生的机制主要是, CAR-T 细胞经回输大量增殖, 迅速识别杀伤肿瘤细胞, 导致细胞内炎性细胞因子短时间内大量释放, 即引起细胞因子释放综合征 (cytokine-release syndrome, CRS)。同时, 肿瘤细胞大量溶解, 细胞内离子释放入内环境, 造成以高钾、高磷、高尿酸等症状为主的肿瘤溶解综合征 (tumor lysis syndrome, TLS)。对于靶向毒性, 主要有如下几种对应方法^[5]: ①设计 CAR 时加入可控性自杀基因作为安全开关; ②优化 CAR-T 细胞回输方案, 由少量逐渐过渡, 缓慢增加回输量; ③先回输少量 1 代 CAR-T 细胞, 待机体适应后改用 2 代或 3 代 CAR-T 细胞增强抗肿瘤效果; ④回输 CAR-T 细胞的同时注射免疫抑制剂, 白细胞介素 1、白细胞介素 6 等细胞因子的拮抗剂能有效防止 CRS 及缓解已发生的 CRS。

非肿瘤/靶向毒性的产生机制为, CAR-T 细胞依赖肿瘤表面抗原发挥作用, 而它所识别的肿瘤抗原往往不仅表达于肿瘤细胞表面, 某些正常细胞表面也可能有不同程度的表达, 因此 CAR-T 细胞识别肿瘤抗原时有可能出现误差, 对健康组织也造成损伤。要解决此类问题, 就需要发现特异性更高的肿瘤表面抗原。

4 总结与展望

作为一种新型过继性免疫细胞疗法, CAR-T 细

胞疗法通过数十年的研究已经逐步成熟,目前在血液系统恶性肿瘤的治疗中已取得显著成效,且已经开始了较广泛的临床使用。通过上述总结,CAR-T具有高效准确及长期维持等优点,是否可将其用于黑色素瘤等实体肿瘤的治疗是目前的研究热点,鉴于其在血液系统恶性肿瘤中的优秀表现,其治疗实体肿瘤的潜力不容小觑。但现阶段存在的诸多障碍,如肿瘤微环境的物理屏障作用,肿瘤的抗原下调导致脱靶效应,非肿瘤细胞的错误识别,治疗相关的毒性反应等仍待进一步的研究以克服。相信在不远的未来,CAR-T细胞过继免疫疗法将更加成熟,有望成为新一代强有力的抗肿瘤手段。

参考文献

[1] 荣 斌,原 野,吴纯启,等. CAR-T细胞免疫疗法的研究进展[J]. 中西医结合心血管病杂志, 2018(30):8-10.

[2] SCHWARZBICH M A, WITZENS-HARIG M. Cellular immunotherapy in B-Cell malignancy[J]. *Oncol Res Treat*, 2017,40(11):674-681.

[3] RAMOS C A, DOTTI G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2011,11(7):855-873.

[4] CURRAN K J, PEGRAM H J, BRENTJENS R J. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions[J]. *J Gene Med*, 2012, 14(6):405-415.

[5] KOCHENDERFER J N, ROSENBERG S A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013,10(5):267-276.

[6] SIMON B, USLU U. CAR-T cell therapy in melanoma: a future success story? [J]. *Exp Dermatol*, 2018, 27(12): 1315-1321.

[7] MELENHORST J J, LEVINE B L. Innovation and opportunity for chimeric antigen receptor targeted T cells[J]. *Cytotherapy*, 2013,15(9):1046-1053.

[8] 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.

[9] 童春容. 第二代 CD19-CAR-T 细胞治疗难治复发急性 B 淋巴细胞白血病的经验及问题[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017,24(1):18-21.

[10] 陈 翔. 2017 年皮肤肿瘤临床进展回顾[J]. *皮肤病与性病*, 2018,40(2):177-178.

[11] WEIZMAN E, COHEN C J. Engineering T-Cell specificity genetically to generate anti-melanoma reactivity[J]. *Methods Mol Biol*, 2016.

[12] MORGAN R A, DUDLEY M E, WUNDERLICH J R, et

al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes [J]. *Science*, 2006, 314 (5796): 126-129.

[13] KRUG C, BIRKHOLZ K, PAULUS A, et al. Stability and activity of MCSP-specific chimeric antigen receptors (CARs) depend on the scFv antigen-binding domain and the protein backbone[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015,64(12): 1623-1635.

[14] AHMAD K. Adoptive T-cell therapy effective in metastatic melanoma[J]. *Lancet Oncol*, 2002,3(11):652.

[15] BEAVIS P A, SLANEY C Y, KERSHAW M H, et al. Reprogramming the tumor microenvironment to enhance adoptive cellular therapy[J]. *Semin Immunol*, 2016,28(1): 64-72.

[16] HAY K A, HANAFI L A, LI D, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy[J]. *Blood*, 2017,130(21):2295-2306.

[17] OVERSTREET M G, GAYLO A, ANGERMANN B R, et al. Inflammation-induced interstitial migration of effector CD4+ T cells is dependent on integrin α V[J]. *Nat Immunol*, 2013,14(9):949-958.

[18] BROWN C E, BADIE B, BARISH M E, et al. Bioactivity and safety of IL13R α 2-redirected chimeric antigen receptor CD8+ T cells in patients with recurrent glioblastoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2015,21(18):4062-4072.

[19] SAPOZNIK S, ORTENBERG R, GALORE-HASKEL G, et al. CXCR1 as a novel target for directing reactive T cells toward melanoma: implications for adoptive cell transfer immunotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012,61 (10):1833-1847.

[20] KLOSS C C, LEE J, ZHANG A, et al. Dominant-negative TGF-beta receptor enhances PSMA-targeted human CAR T cell proliferation and augments prostate cancer eradication [J]. *Mol Ther*, 2018,26(7):1855-1866.

[21] POGGI A, MUSSO A, DAPINO I, et al. Mechanisms of tumor escape from immune system: Role of mesenchymal stromal cells[J]. *Immunol Lett*, 2014,159(1-2):55-72.

[22] KENDERIAN S S, RUELLA M, SHESTOVA O, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2015,29(8):1637-1647.

[23] HEGDE M, MUKHERJEE M, GRADA Z, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R α 2 mitigate tumor antigen escape[J]. *J Clin Invest*, 2016,126(8):3036-3052.

[24] CURRAN K J, PEGRAM H J, BRENTJENS R J. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions[J]. *J Gene Med*, 2012, 14(6):405-415.

[本文编辑] 翟铨铨, 贾泽军