

转导细胞增殖的信号有限,因此,对肿瘤细胞的杀伤效果并不十分理想。第2代CAR增加了共刺激分子,如CD28、4-1BB和OX40等,由于存在共刺激信号,CAR-T可以充分活化,显著提高了对肿瘤细胞的杀伤能力。目前,第2代CAR基本上可以满足临床需要。第3代CAR在第2代CAR的基础上增加了1个共刺激信号,由于胞内区有2个共刺激信号分子,CAR在体内的增殖能力和对肿瘤细胞的杀伤力又得到了进一步提高。第4代CAR是在第3代CAR的基础上增加了促炎性细胞因子或共刺激分子的配体,其可以招募其他细胞因子进而放大局部肿瘤的免疫效应,主要用于实体肿瘤的治疗^[5]。

2 实体肿瘤靶点的选择

CAR-T治疗实体肿瘤面临的首要挑战是靶点的选择。理想的靶点是只在肿瘤细胞表面表达,而在其他细胞中不表达。CAR-T在血液系统恶性肿瘤治疗中取得了非常理想的疗效,很重要的原因之一是血液肿瘤细胞有特异性的靶点,如CD19分子。实体肿瘤细胞特异性靶点较少,目前应用的实体肿瘤靶点在肿瘤细胞中表达相对较高,但在正常组织中也有表达,CAR-T在杀伤肿瘤细胞的同时,不可避免地会对正常细胞造成损伤。尽管如此,越来越多的针对实体肿瘤靶点的CAR-T疗法已经开展,并取得了一定疗效。ZHANG等^[6]制备了针对癌胚抗原(carcino-embryonic antigen,CEA)的CAR-T,对10例CEA阳性的结直肠癌患者注射不同剂量的CAR-T,其中7例患者病情趋于稳定,2例患者病情稳定期超过30周,2例患者肿瘤体积明显缩小。也有学者通过靶向双唾液酸神经节苷脂(disialoganglioside, GD2)治疗脑胶质瘤和神经母细胞瘤患者。MOUNT等^[7]制备了针对GD2的CAR-T,体外实验证明其可以杀伤脑胶质瘤细胞,在小鼠体内可以清除脑胶质瘤细胞,这为治疗脑胶质瘤提供了一种新方法。LOUIS等^[8]采用针对GD2的CAR-T治疗19例神经母细胞瘤患者,8例患者临床症状得以缓解,3例患者临床症状几乎得到了完全缓解。AHMED等^[9]以人表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor, Her)2为靶点治疗19例Her2阳性肉瘤患者,3例患者肿瘤完全消失,4例患者临床症状得到缓解,患者的平均中位生存期达到了10.3个月;BROWN等^[10]利用靶向白细胞介素(interleukin, IL)-13受体 α 的CAR-T首次在患者体内清除了神经胶质母细胞瘤。此外,还有通过靶向间皮素治疗

胰腺癌^[11-12],通过靶向CD70治疗头颈部鳞癌和胶质瘤^[13-14],通过靶向表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)治疗非小细胞肺癌和胶质母细胞瘤^[15-16],通过靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖3治疗肝细胞癌^[17]等。尽管CAR-T治疗实体肿瘤的效果不如治疗血液系统恶性肿瘤的效果一样理想,但目前的研究已经看到了CAR-T治疗实体肿瘤的前景。

EGFR家族成员是许多实体肿瘤比较明确的靶标。EGFR是一种广泛存在于人体表皮细胞和基质细胞的具有酪氨酸激酶活性的膜表面受体,其家族主要包括Her1(EGFR)、Her2、Her3和Her4 4个成员。目前,Her3已作为新的肿瘤治疗靶点受到越来越多学者的重视^[18-19]。Her3在乳腺癌、非小细胞肺癌、结直肠癌、头颈癌、卵巢癌、胃癌和膀胱癌等多种恶性实体肿瘤中的表达均上调,通过配体依赖和非依赖途径参与肿瘤的发生、发展^[20-21]。Her3被认为是一个促进肿瘤发生的细胞因子^[22],其本身无酪氨酸激酶活性,而Her2无配体结合,二者需要与其他受体结合形成异二聚体才能发挥作用,其中Her3/Her2异二聚体是Her家族信号传导能力最强的二聚体,可以激活肿瘤细胞的丝裂原活化蛋白激酶信号通路和磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶通路促进细胞增殖,使细胞生长失控和恶性化^[23]。同时,使用靶向Her2药物进行治疗时,多种肿瘤细胞的Her3表达上调,研究发现,当肿瘤细胞对靶向Her2的药物产生耐受时,针对靶向Her3的治疗可以克服药物耐受性^[24]。ZUO等^[25]前期构建了靶向Her3的CAR-T,该CAR-T可识别杀伤Her3阳性表达的乳腺癌细胞SK-BR-3和BT-474,不能杀伤Her3表达下调和Her3阴性靶细胞;该CAR-T在裸鼠体内可以遏制SK-BR-3移植肿瘤的生长,有效延长荷瘤裸鼠的生存期,该研究为Her3阳性肿瘤治疗提供了新思路和新方法。

3 实体肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)

TME中存在大量的免疫细胞及免疫抑制分子、内皮细胞、成纤维细胞及细胞外基质,它们与肿瘤细胞共同组成巨大的免疫抑制网络^[26]。TME中的抑制性免疫细胞如调节性T细胞、髓源性抑制细胞(myeloid derived suppressor cells, MDSC)和肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAM)等分泌抑制性因子如IL-4、IL-10、IL-33、转化生长因子 β

(transforming growth factor β , TGF- β) 等^[27], 这些细胞及其分泌的细胞因子使 TME 中的免疫系统处于耐受状态, 严重抑制 CAR-T 的抗肿瘤作用。另外, 实体肿瘤细胞高表达程序性细胞死亡受体配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1), 通过程序性细胞死亡受体-1 (programmed cell death 1, PD-1)/PD-L1 信号通路抑制 T 细胞的活性, 产生免疫逃逸。T 细胞发生免疫反应时分泌 γ 干扰素 (interferon gamma, IFN- γ), 而 IFN- γ 可诱导肿瘤细胞 PD-L1 的表达^[28]。因此, CAR-T 在发挥抗肿瘤功能时不可避免地会受到 PD-1/PD-L1 信号通路的抑制。

CAR-T 治疗实体肿瘤时, 如何克服免疫抑制性 TME 的干扰是面临和必须解决的问题。研究者们进行了多种尝试, 如: 通过共表达显性失活的 TGF- β 受体, 克服 TGF- β 信号通路对免疫反应的抑制作用^[29]; 通过共表达共刺激分子配体 CD40L 和 4-1BBL, 减缓 CAR-T 耗竭从而应对免疫抑制性 TME^[30]; 联合诱导性表达 IL-12, 通过激活固有免疫细胞增强 CAR-T 杀伤功能^[31]; 靶向自然杀伤细胞活化性受体 NKG2D 以识别免疫抑制性细胞表达的 NKG2D 配体, 降低 TME 内 MDSC 及调节性 T 细胞的比例^[32]; 通过粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 中和反应减少 MDSC 募集, 拮抗肿瘤免疫抑制进而增强 CAR-T 抗肿瘤活性^[33]; 通过设计 PD-1-CD28 嵌合受体^[34] 或将 IL-4 胞内区更换为 IL-7 胞内区^[35], 使肿瘤细胞产生的抑制性信号转换为激活性信号。此外, 联合使用单克隆抗体阻断免疫检查点分子 PD-1 或细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 的抑制作用, 能进一步增强 CAR-T 的抗肿瘤功效^[36]。

4 细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS)

CAR-T 在杀伤肿瘤细胞的同时释放细胞因子以增强抗肿瘤作用, 存在诱发细胞因子风暴的可能, 即细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS)。在应用 CAR-T 疗法时, 机体会释放 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、GM-CSF、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、IFN- γ 等多种细胞因子, 诱发患者出现高热、低血压、头痛, 严重者出现呼吸困难、呼吸衰竭、多器官功能衰竭等症状, 甚至死亡^[37]。关于 CRS 产生的机制尚不十分清楚, 目前普遍认为, CAR-T 识别肿瘤细胞后会激活旁观者免疫细胞和非免疫细胞 (如内皮细胞)^[38], 导致

CRS。旁观者免疫细胞被激活后释放大量的细胞因子, 其中 IL-6、IL-10 和 IFN- γ 是核心细胞因子, IFN- γ 可以导致患者出现发热、寒战、头痛、头晕和疲劳。IFN- γ 也可以激活其他免疫细胞, 其中最重要的是巨噬细胞, 活化的巨噬细胞产生大量的细胞因子, 如 IL-6、TNF- α 和 IL-10 等。TNF- α 可以导致患者出现类似感冒样症状。IL-6 在 CRS 的发生、发展过程中起关键作用, 在 CRS 患者和小鼠模型中均可观察到 IL-6 水平持续升高, 高水平的 IL-6 可以导致患者出现毛细血管渗漏、补体被激活和弥散性血管内凝血^[39]。非免疫细胞中的内皮细胞活化后可引起血清血管生成素-2 和血管性血友病因子水平升高^[40], 这 2 种细胞因子可引起患者出现毛细血管渗漏、低血压和凝血功能障碍等, 严重者可以导致患者死亡。同时, 内皮细胞活化也可以产生 IL-6。剖检 1 例因 CAR-T 治疗死亡患者时发现, 内皮细胞分泌的高水平 IL-6 可能是引起严重 CRS 的主要原因, CRS 导致了患者的死亡^[41]。根据目前的研究报道, 在使用 CAR-T 治疗恶性肿瘤的过程中, 患者出现 CRS 暂时无法避免, 但可以采用 IL-6 受体阻断剂托珠单抗和糖皮质激素类药物进行干预, 严重时可采用血液透析治疗^[38]。CAR-T 治疗实体肿瘤还可能

5 CAR-T 细胞来源

目前, 针对实体肿瘤的治疗方法主要有手术治疗、化学治疗、放射治疗和靶向治疗 4 种方式, CAR-T 疗法属于靶向治疗的一种。近年来, 化学治疗、放射治疗联合 CAR-T 已成为肿瘤治疗的新策略。制备 CAR-T 最理想的细胞来源是使用患者自身 T 细胞, 但利用患者自体 T 细胞制备 CAR-T 的方法尚存在不足。由于患者经过化学治疗或放射治疗后, 从其体内分离的 T 细胞往往数量不足或功能障碍, 患者自体 T 细胞的分筛及基因编辑 CAR-T 周期长, 极为费时费力, 这些均直接影响 CAR-T 的治疗效果。在全球 CAR-T 行业的巨头公司, 研究人员使用健康人 T 细胞制备 CAR-T 解决了这一问题。2016 年辉瑞公司宣布与 Cellectis 公司合作进军 CAR-T 领域, Cellectis 公司主要提供健康人的 T 细胞。2016 年 2 月, Baxalta 公司与 Precision Bioscience 公司合作开发基于健康供者 T 细胞的新

型通用型 CAR-T 用于肿瘤治疗。2017 年 3 月,国际著名免疫学家 ALDERTON 教授在《Nature Reviews Cancer》发表评论,指出应用健康人 T 细胞制备通用型 CAR-T 将会是 CAR-T 未来发展的方向之一^[42]。由于健康供者 T 细胞对于患者而言是同种异体细胞,如何消除患者对外源同种异体细胞的免疫排斥反应是需要解决的关键问题。2017 年, QASIM 等^[43]用转录激活因子样效应物核酸酶技术将人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 不相符合的健康者 T 细胞的 CD52 分子和 T 细胞抗原受体 (T cell receptor, TCR) 基因敲除,进而改造成靶向 CD19 分子的通用型 CAR-T,对 2 例急性 B 淋巴细胞白血病婴儿进行治疗,2 例患儿虽未治愈,但症状得到明显缓解。REN 等^[44]通过 CRISPR/Cas9 同时敲除 TCR 和 HLA I 类分子构建了通用型 CAR-T,其可以减缓宿主针对异体细胞发生的免疫排斥反应,同时宿主未发生移植物抗宿主病。上述研究展示了通用型 CAR-T 对肿瘤的治疗效果,这为今后设计其他通用型 CAR-T 提供了参考依据。

6 展望

近年来,CAR-T 治疗实体肿瘤的临床试验项目显著增加,几乎呈指数增长。30 a 时间内,CAR-T 免疫疗法从概念到可以具体操作的方案,尤其是 CAR-T 免疫疗法在血液系统恶性肿瘤治疗中取得的惊人突破,让人们看到了彻底攻克某些类型肿瘤的希望。虽然,CAR-T 在实体肿瘤治疗领域的研究进展相对缓慢,治疗效果不如血液系统恶性肿瘤理想,但是,相信 CAR-T 治疗实体肿瘤与其他技术一样,还需要经历一个长的发展期才能进入到逐渐成熟的阶段,CAR-T 联合其他疗法治疗实体肿瘤将会是未来的发展趋势。CAR-T 治疗实体肿瘤尽管有困难,但未来仍值得期待。随着相应研究成果的出现,CAR-T 治疗实体肿瘤也将迎来新曙光。

参考文献:

[1] GROSS G, WAKS T, ESHHAR Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86 (24): 10024-10028.

[2] PORTER D L, LEVINE B L, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365 (8): 725-733.

[3] LEYFMAN Y. Chimeric antigen receptors: unleashing a new stage of anti-cancer therapy [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 182.

[4] SCHMIDTS A, MAUS M V. Making CAR T cells a solid option for solid tumors [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2593.

[5] AVANZI M P, YEKU O, LI X, et al. Engineered tumor-targeted T cells mediated enhanced anti-tumor efficacy both directly and through activation of the endogenous immune system [J]. *Cell Rep*, 2018, 23 (7): 2130-2141.

[6] ZHANG C, WANG Z, YANG Z, et al. Phase I escalating-dose trial of CAR-T therapy targeting CEA⁺ metastatic colorectal cancers [J]. *Mol Ther*, 2017, 25 (5): 1248-1258.

[7] MOUNT C W, MAJZNER R G, SUNDARESH S, et al. Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR-T cells in H3-K27M⁺ diffuse midline gliomas [J]. *Nat Med*, 2018, 24 (5): 572-579.

[8] LOUIS C U, SAVOLDO B, DOTTI G, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma [J]. *Blood*, 2011, 118 (23): 6050-6056.

[9] AHMED N, BRAWLEY V S, HEGDE M, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33 (15): 1688-1696.

[10] BROWN C E, ALIZADEH D, STARR R, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375 (26): 2561-2569.

[11] BEATTY G L, O'HARA M H, LACEY S F, et al. Activity of mesothelin-specific chimeric antigen receptor T cells against pancreatic carcinoma metastases in phase 1 trial [J]. *Gastroenterology*, 2018, 55 (1): 29-32.

[12] HE J, ZHANG Z, LV S, et al. Engineered CAR T cells targeting mesothelin by piggyBac transposon system for the treatment of pancreatic cancer [J]. *Cell Immunol*, 2018, 329: 31-40.

[13] PARK Y P, JIN L, BENNETT K B, et al. CD70 as a target for chimeric antigen receptor T cells in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2018, 78: 145-150.

[14] JIN L, GE H, LONG Y, et al. CD70, a novel target of CAR-T cell therapy for gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20 (1): 55-65.

[15] LI H, HUANG Y, JIANG D Q, et al. Antitumor activity of EGFR-specific CAR T cells against non-small-cell lung cancer cells *in vitro* and in mice [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (2): 177.

[16] JIANG H, GAO H, KONG J, et al. Selective targeting of glioblastoma with EGFRvIII/EGFR bitargeted chimeric antigen receptor T cell [J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6 (11): 1314-1326.

[17] PAN Z, DI S, SHI B, et al. Increased antitumor activities of glypican-3-specific chimeric antigen receptor-modified T cells by coexpression of a soluble PD1-CH3 fusion protein [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67 (10): 1621-1634.

[18] KARACHALIOU N, LAZZARI C, VERLICCHI A, et al. Her3 as a therapeutic target in cancer [J]. *Bio Drugs*, 2017, 31 (1): 63-73.

[19] KAWAKAMI H, YONESAKA K. Her3 and its ligand, heregulin, as targets for cancer therapy [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2016, 11 (3): 267-274.

[20] BASELGA J, SWAIN S M. Novel anticancer targets: revisiting

- ERBB2 and discovering ERBB3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9 (7):463-475.
- [21] MOTA J M, COLLIER K A, BARROS COSTA R L, *et al.* A comprehensive review of heregulins, HER3, and HER4 as potential therapeutic targets in cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (51):89284-89306.
- [22] KOL A, TERWISSCHA VAN SCHELTINGA A G, TIMMER-BOSSCHA H, *et al.* Her3, serious partner in crime; therapeutic approaches and potential biomarkers for effect of Her3-targeting [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 143(1):1-11.
- [23] ARTEAGA C L, ENGELMAN J A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(3):282-303.
- [24] MA J, LYU H, HUANG J, *et al.* Targeting of erbB3 receptors to overcome resistance in cancer treatment [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13:105.
- [25] ZUO B L, YAN B, ZHENG G X, *et al.* Targeting and suppression of HER3-positive breast cancer by T lymphocytes expressing a heregulin chimeric antigen receptor [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(3):393-401.
- [26] JOYCE J A, FEARON D T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment [J]. *Science*, 2015, 348(6230):74-80.
- [27] ZHANG E, GU J, XU H. Prospects for chimeric antigen receptor-modified T cell therapy for solid tumors [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):7.
- [28] ABIKO K, MATSUMURA N, HAMANISHI J, *et al.* IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(9):1501-1509.
- [29] FOSTER A E, DOTTI G, LU A, *et al.* Antitumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF- β receptor [J]. *J Immunother*, 2008, 31(5):500-505.
- [30] LONG A H, HASO W M, SHERN J F, *et al.* 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors [J]. *Nat Med*, 2015, 21(6):581-590.
- [31] 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(8):4133-4141.
- [32] ZHANG T, SENTMAN C L. Cancer immunotherapy using a bispecific NK receptor fusion protein that engages both T cells and tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(6):2066-2076.
- [33] BURGA R A, THORN M, POINT G R, *et al.* Liver myeloid-derived suppressor cells expand in response to liver metastases in mice and inhibit the anti-tumor efficacy of anti-CEA CAR-T [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(7):817-829.
- [34] 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.
- [35] LEEN A M, SUKUMARAN S, WATANABE N, *et al.* Reversal of tumor immune inhibition using a chimeric cytokine receptor [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(6):1211-1220.
- [36] JOHN L B, KERSHAW M H, DARCY P K. Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(10):e26286.
- [37] 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.
- [38] SHIMABUKURO-VORNHAGEN A, GÖDEL P, SUBKLEWE M, *et al.* Cytokine release syndrome [J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1):56.
- [39] HUNTER C A, JONES S A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(5):448-457.
- [40] 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.
- [41] OBSTFELD A E, FREY N V, MANSFIELD K, *et al.* Cytokine release syndrome associated with chimeric-antigen receptor T-cell therapy: clinicopathological insights [J]. *Blood*, 2017, 130(23):2569-2572.
- [42] ALDERTON G K. Immunotherapy: engineered T cells for all [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(4):206-207.
- [43] QASIM W, ZHANG H, SAMARASINHE S, *et al.* Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR-T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(374):pii: eaaj2013. DOI:10.1126/scitranslmed. aaj2013.
- [44] REN J, LIU X, FANG C, *et al.* Multiplex genome editing to generate universal CAR-T cells resistant to PD1 inhibition [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9):2255-2266.

(本文编辑:杨 博)