肿瘤微环境中的定量工程生物学

马文涛[†], 魏婷[†], 傅雄飞^{*}, 李雪飞^{*}

中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳合成生物学创新研究院, 中国科学院定量工程生物学重点实验室, 深圳 518055

[†] 共同贡献

^{*} 联系人, E-mail: xf.fu@siat.ac.cn; xuefei.li@siat.ac.cn

2020-08-07 收稿, 2020-09-09 修回, 2020-09-09 接受, 2020-09-14 网络版发表

深圳市孔雀团队(KQTD2015033117210153, KQTD2016112915000294)资助

摘要 定量工程生物学在定量刻画肿瘤微环境方面起到了重要的作用, 也推动了肿瘤免疫疗法的机制研究. 然而在肿瘤免疫治疗的临床应用中, 大部分病人对免疫治疗无响应. 因此, 免疫治疗的响应机制是研究肿瘤免疫疗法的重点和难点. 其中, 肿瘤微环境被认为是该研究领域的重要突破口之一. 针对肿瘤微环境的定量测量与定量数据分析对肿瘤免疫疗法的机制研究产生积极而深远的影响. 例如: 利用定量生物学手段解析肿瘤微环境中的细胞种类、基因和蛋白的表达、各种细胞的空间位置、物理和化学因素、细胞外基质等, 并建立这些因素与肿瘤免疫疗法效果之间的定量关系; 运用工程生物学手段开发嵌合抗原受体T细胞、T细胞受体工程T细胞、树突状细胞疫苗等免疫疗法. 本文将主要介绍定量测量方法在肿瘤微环境前沿研究领域内的应用, 以及工程生物学在肿瘤的细胞免疫治疗中改造肿瘤微环境的应用.

关键词 定量生物学, 工程生物学, 肿瘤免疫治疗, 肿瘤微环境

肿瘤微环境中除癌细胞外还有其他多种细胞、组织、结构和生物分子等, 比如免疫细胞、成纤维细胞、微血管、细胞外基质、浸润其中的生物分子等^[1,2]. 近年来, 肿瘤的免疫疗法, 特别是免疫检查点抑制剂疗法, 被证明可以显著延长罹患皮肤癌、非小细胞肺癌等病人的生存期^[3,4]. 但免疫疗法也面临多个瓶颈问题. 例如, 大部分病人对免疫检查点抑制剂治疗无响应, 即便是对此类治疗方法响应最好的皮肤癌, 患者群体的长期响应率也仅在20%左右. 因此, 无响应的机制研究是当前癌症研究领域内的热点和难点. 现有的大量研究结果指出, 肿瘤内复杂的微环境可能是导致免疫疗法响应率较低的重要原因之一^[5~7]. 因此, 对肿瘤微环境的研究亟待提高.

近年来, 随着定量实验手段的飞速发展, 肿瘤微环

境正逐步得到定量的刻画和有针对性的改造, 这对肿瘤免疫治疗产生了积极而深远的影响. 本文首先介绍肿瘤微环境研究领域内先进的定量测量手段, 例如单细胞RNA测序(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)、单细胞质谱流式(cytometry by time-of-flight, CyTOF)等, 并介绍近期利用这些技术研究肿瘤微环境突破免疫细胞治疗瓶颈的相关工作; 其次, 介绍若干个结合深度学习的数据分析工作, 这些工作为定量刻画肿瘤微环境提供新颖的计算手段; 最后, 介绍近期利用工程生物学手段改造肿瘤微环境的工作, 例如嵌合抗原受体T细胞治疗、特异性T细胞受体免疫治疗、肿瘤新抗原疫苗等相关细胞治疗(图1). 希望通过本文对定量工程生物学在肿瘤微环境中的应用有一个概括性的描述与总结.

引用格式: 马文涛, 魏婷, 傅雄飞, 等. 肿瘤微环境中的定量工程生物学. 科学通报, 2021, 66: 319–328

Ma W T, Wei T, Fu X F, et al. Quantitative engineering biology in the tumor microenvironment (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 319–328, doi: [10.1360/TB-2020-0489](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0489)

图1 (网络版彩色)肿瘤微环境中的定量工程生物学

Figure 1 (Color online) Quantitative engineering biology in the research on the tumor microenvironment

1 定量生物学刻画肿瘤微环境

1.1 定量测量技术简介

肿瘤微环境由细胞和非细胞成分组成,包括周围血管、免疫细胞、成纤维细胞、肿瘤干细胞和细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)等,这些组分被认为是阻碍免疫治疗效果进一步提升的瓶颈因素之一^[8]。为了细致刻画肿瘤微环境中细胞的种类与状态,定量表征这些因素对免疫治疗的阻碍作用,单细胞测序^[9]、单细胞质谱流式^[10]等技术被用来解析肿瘤微环境的细胞类型与细胞内特异基因与蛋白的表达;多重免疫组化染色成像^[11]、多通道荧光成像^[12,13]、多重离子束成像^[14]等技术被用来探索肿瘤微环境内细胞的空间位置与蛋白表达状态。同时,微流控^[15]与3D细胞体外培养等技术^[16]与其他检测手段相结合,可以定量刻画肿瘤微环境中的诸多物理化学因素。接下来对这些定量测量技术进行概述,并结合具体案例,介绍这些技术在对理解肿瘤微环境、定量表征肿瘤微环境对免疫治疗的阻碍作用等方面的贡献。

(i) scRNA-seq技术对肿瘤微环境的刻画。通过对肿瘤内单个癌细胞的基因表达做高通量测量, Patel等人^[17]与Tirosh等人^[18]揭示了癌细胞转录异质性与预后之间的联系。通过测量肿瘤内单个免疫细胞的基因表达, Zhang等人^[19]揭示了肿瘤免疫微环境与癌症发展的关系, Li等人^[20]研究了T淋巴细胞的耗竭状态在癌症发展

过程中的伴随演化。运用scRNA-seq, Peng等人^[21]发现具有独特增生特征的导管细胞子集与肿瘤浸润T细胞的失活状态相关,这为预测抗肿瘤免疫应答提供了新的标记,并揭示了肿瘤固有转录状态与T细胞活化之间的联系。

Venteicher等人^[22]将16例患者样本的14226份单细胞RNA测序图谱与165例患者样本的整体RNA测序图谱相结合,剖析了胶质瘤样本中癌细胞的异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)的两种主流突变类型(IDH-A与IDH-O)在癌细胞构成、肿瘤微环境等方面的相似与不同之处。研究发现,从肿瘤的演化角度分析,两种突变类型的癌细胞所形成的肿瘤比较相似,这个结果暗示这两种突变类型可能具有相似的突变机制与祖细胞。此外,两类肿瘤的巨噬细胞与小胶质细胞之间的比例存在较明显的差异。该研究将癌细胞的基因型与肿瘤微环境之间建立了定量的联系,有助于理解二者之间的相互作用与演化机制。结合9万多个单细胞测序数据, Lambrechts等人^[23]发现了肺癌肿瘤中的52个细胞亚群,通过表征它们的表型和协同行为,更深层次地认识了由基质细胞组成的复杂的肿瘤微环境及其在抑制免疫细胞活性方面的作用。Zilionis等人^[24]使用scRNA-seq技术详细刻画了非小细胞肺癌患者的肿瘤浸润性髓样细胞(tumor-infiltrating myeloid cells, TIMs),共发现了25种状态的髓样细胞,并证明这些类别在不同的病人之间具有一致性。

综上所述,利用scRNA-seq技术的研究有助于加深

对肿瘤内细胞组分与细胞状态的理解,为将来研究免疫治疗靶标奠定了基础。

(ii) CyTOF技术对肿瘤微环境的刻画。CyTOF的基本原理是将标记有特定金属离子的抗体与相应的靶蛋白结合,借助流式细胞仪与飞行时间质谱技术,测量对应金属离子的丰度,从而实现对单个细胞中特定蛋白丰度的测量。利用CyTOF可以实现对肿瘤内大量单细胞的几十种特定蛋白的同时定量测量。例如, CyTOF可以帮助刻画早期肺腺癌中先天性免疫细胞的不同表型以及各表型的分布^[25]; 该技术还可以用来解析免疫治疗对肿瘤内免疫细胞群体构成的重编程效应^[26]; 利用CyTOF技术,在典型性霍奇金淋巴瘤肿瘤微环境中, Cader等人^[27]发现,与调节性T细胞相比, CD4⁺效应T细胞高表达免疫检查点蛋白PD-1,这种差异性表达可能是霍奇金淋巴瘤免疫逃逸的重要机制之一。综上所述,这些测量对表征肿瘤微环境、理解免疫治疗过程中的动力学与原理至关重要,为改造肿瘤微环境提供研究基础,进而提升免疫治疗的响应率及疗效。

(iii) 多通道荧光成像技术对肿瘤微环境的刻画。为了更好地理解肿瘤微环境,除了表征肿瘤的细胞种类,还需要清楚肿瘤组织中不同细胞的空间分布与演化,这些信息在治疗肿瘤中十分重要。例如,通过利用多通道荧光成像技术,可以解析胰腺癌肿瘤内不同种类的T细胞与癌细胞、细胞外基质纤维的空间关联性,从而发现纤维对T细胞浸润的促进作用^[28],其中杀伤性T细胞与癌细胞的接触被证明有助于延长患者的生存期; Parra等人^[29]发现,接受了新辅助化疗的非小细胞肺癌(NSCLC)患者的癌细胞表达了更高水平的PD-L1,其肿瘤内T细胞亚群也包含了更多的调节性T细胞,这表明新辅助化疗激活了肺癌中的特异性免疫反应机制。这个结果为改进治疗效果提供了新的思路,即在手术切除局部病灶之前,化疗与免疫治疗的联合疗法能够帮助患者最终获得更好的治疗效果。

(iv) 多重染色成像技术对肿瘤微环境的刻画。利用多重免疫荧光染色成像技术, Hwang等人^[30]发现了胰腺癌病人对免疫治疗的响应与肿瘤内特定耗竭状态的T细胞之间的关联性。利用多重离子束成像技术, Keren等人^[31]将三阴性乳腺癌肿瘤样本分为了免疫混合型与免疫分离型两大类,并同时在单细胞层次上深度解析了两种空间分布类型所对应的免疫细胞表型,从而发现了这些特点与病人预后之间的关联。这些成像技术也可用于表征肿瘤微环境内血管构筑和瘤内缺

氧、细胞增殖、细胞死亡以及药物分布等情况^[32],同时为定量刻画肿瘤微环境提供测量手段,从而为评估免疫治疗响应率与疗效提供数据与理论支撑。

(v) 其他检测技术对肿瘤微环境的刻画。肿瘤微环境中不仅包括了细胞与组织,还包括了营养、氧气、酸碱度等环境因素,这些因素对细胞免疫治疗的抗肿瘤效果有物理和功能上的限制。例如, Pavesi等人^[33]用体外3D培养模型的微设备平台检测不同氧气水平和炎症环境对工程化TCR-T细胞功能的影响,分析了免疫抑制场景下TCR-T细胞的功效; Anemone等人^[34]对现有的原位测量肿瘤微环境内pH的方法进行了比较详细的总结与对比; Huber等人^[35]对酸性环境所导致的免疫抑制效应进行了较完整的综述; 针对肿瘤微环境中由于细胞代谢所引起的细胞与细胞之间的耦合问题, Lyssiotis和Kimmelman^[36]对定量测量肿瘤微环境中的生化分子浓度等进行了细致的描述与总结,例如癌细胞与肿瘤相关巨噬细胞通过与效应T细胞竞争葡萄糖、色氨酸、精氨酸等营养物质,使得效应T细胞失去应有的活性,从而实现免疫抑制的微环境。另外,肿瘤中的细胞外基质纤维的排列模式与紧致程度被认为是影响癌细胞迁移能力的重要因素之一^[37-39],同时也可能影响免疫细胞在肿瘤微环境中的入侵^[40],因此定量刻画基质纤维的紧致程度十分重要。例如, Chang等人^[41]利用超声弹性成像技术对肿瘤的刚性程度进行了定量测量,间接反映出其中外基质纤维网络的力学特性,同时细胞外基质纤维的力学性质还可以通过颗粒跟踪微流变学^[42]、压痕流变^[43]、原子力显微镜^[44]等定量的测量手段进行表征。这些检测手段为探究免疫抑制微环境的形成机理提供了坚实的技术基础,为开发逆转免疫抑制微环境的新颖治疗手段提供思路。

综上所述,利用相应的定量测量技术刻画细胞组分的状态与空间分布、非细胞组分及化学和物理因素特征,可以为理解肿瘤微环境提供定量的数据支撑,进一步为理性改造肿瘤免疫微环境指明新的方向。

1.2 定量数据分析手段简介

高精度高通量测量技术的发展带来了海量的数据,因此,如何开发对应的计算方法,从而更好地利用和分析海量的数据就显得尤为必要。例如,在已有的癌症数据库中有大量的常规肿瘤切片染色图像,针对该类图片开发基于图像的深度学习算法,可以精确自动识别切片中的T细胞,从而实现了对13类癌症类型的5000多

份切片样本的数字重绘. 处理过的图像可以帮助人们根据T细胞的空间特征对肿瘤进行重新分类, 并将重定义的分类与病人的预后和其对治疗的响应建立定量的联系^[45]; 而且, 利用深度学习算法, 通过解析癌症数据库中肿瘤的转录和表观遗传数据, 来揭示样本中细胞干性特征与癌症扩散、免疫微环境特征以及肿瘤异质性之间的定量关联, 并预测潜在的药物靶点^[46]; 另外, 尽管单细胞测序等技术可以更加细致精确地刻画肿瘤微环境, 但鉴于成本原因, 此类技术暂时不能应用到大量临床样本中, 因此, 通过开发机器学习算法, 将单细胞测序数据与已有的肿瘤样本基因表达数据相结合, 数字化分离解析肿瘤样本中不同细胞的种类以及其基因表达状态, 从而对样本的肿瘤微环境进行数字化刻画分析, 并分析治疗对肿瘤微环境的影响^[47].

2 定量工程生物学改造肿瘤微环境

目前, 在癌症治疗研究领域内, 人们已经开始利用工程生物学技术手段通过基因重编程免疫细胞开发安全的免疫疗法^[48,49]. 相较于传统的药物开发与治疗方法, 工程生物学可以在提高治疗靶向性的同时更加系统性地对肿瘤微环境进行改造, 从而实现对肿瘤的长期抑制效果. 同时, 借助定量生物学的技术手段, 可以更加定量和全面地评估治疗效果, 有助于及时调整治疗策略. 目前, 领域内主流的肿瘤免疫细胞疗法包括嵌合抗原受体T细胞疗法、T细胞受体工程T细胞疗法以及多种先天免疫细胞疗法. 尽管这些疗法都取得了一定的成功, 但各自均遇到了相应的挑战. 例如, 嵌合抗原受体T细胞的靶向性、活性与持久性需要提升; T细胞受体工程T细胞与抗原之间的配对筛选速度、相应T细胞的活性等需要得到有效提高; 先天免疫细胞的治疗原理尚不清晰, 仍有待发掘. 本节着重介绍基于淋巴T细胞以及相关先天性免疫细胞的定量工程生物学改造、相关疗法的优点与所遇到的挑战, 以及其对肿瘤微环境的依赖与影响.

2.1 定量工程生物学在嵌合抗原受体T细胞治疗实体瘤中的应用

在细胞免疫治疗领域中, 嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)疗法得到越来越多的关注. CAR-T细胞使用质粒转染, mRNA或病毒载体转导, 可以表达特定的受体膜蛋白, 这些受体可帮助克隆T细胞特异性识别肿瘤细胞的表面抗原, 从而杀灭相

应的肿瘤细胞. 尽管CAR-T细胞疗法已在复发性和难治性B-淋巴细胞恶性肿瘤临床治疗中取得成功, 但目前可有效治疗实体瘤的CAR-T细胞疗法仍亟待开发, 并面临着诸多挑战和困难, 比如缺乏特异性抗原、细胞在体内的流动和扩增不良、复杂的免疫抑制性微环境、肿瘤逃逸和复发等^[50,51]. 定量工程生物学将有望帮助设计出更具功能性的嵌合抗原受体结构^[52], 增强细胞在体内流动和扩增能力^[53], 改造肿瘤微环境以增强CAR-T疗效^[54]等.

(i) CAR的设计元素增加T细胞的靶向性和特异性. 尽管CAR-T细胞可以杀灭肿瘤细胞, 但亦存在脱靶效应和过度活化等问题^[55-57], 应用工程生物学的方法, 在CAR-T细胞内设计适当的基因调控线路, 从而增强CAR-T细胞的特异性识别能力和自主控制能力, 提升其抗肿瘤效应, 并降低治疗毒性^[58]. 例如, 利用工程生物学的方法, 将其他膜蛋白的抗体与CD19的膜外区域进行蛋白融合, 可使得已有的靶向CD19的CAR-T细胞重新靶向任何肿瘤抗原^[59], 从而提升CAR-T细胞的靶向范围和特异性. 又例如, 应用工程生物学方法编辑过的CAR-T细胞(V-1 CAR-T)可以靶向上皮细胞的膜蛋白, 从而破坏瘤内新血管的形成、抑制肿瘤的生长和形成, 并抑制肿瘤细胞经由瘤血管向小鼠肺部的转移; 同时, 当此疗法与可表达白介素15(IL-15)的T细胞的联合应用时, 疗效得到了进一步的增强^[60].

(ii) CAR的设计元素增加T细胞的活性和持久性. 已有的实验表明, 针对实体肿瘤的CAR-T治疗的疗效不佳. 领域内普遍认为这是由于CAR-T细胞在肿瘤内的移动受限, 以及实体瘤内免疫微环境对其功能的抑制^[61]. 针对CAR-T细胞在肿瘤内移动受限的问题, 相关团队应用工程生物学方法, 基因编辑CAR-T细胞使其可以表达降解酶(如乙酰肝素酶), 该酶可降解细胞外基质的主要成分硫酸乙酰肝素蛋白聚糖. 这样, 肿瘤T细胞能更好地渗透到肿瘤组织, 更好地发挥抗肿瘤作用^[62].

针对实体瘤内免疫微环境对CAR-T细胞功能的抑制, 一种运用工程生物学的方法是将整合后的显性负受体(dominant negative receptor, DNR)编辑入CAR-T细胞, 这些受体可以克服肿瘤微环境内的抑制信号. DNR通常维持膜受体的胞外域, 但具有突变的或无效的胞内链, 可与内源性受体竞争并破坏下游信号传导^[63]. 实验表明, 通过对CAR-T细胞表面的铰链和跨膜蛋白进行生物工程修饰, 可以明显降低CAR-T细胞产生的细胞凋亡因子水平^[64,65], 从而有助于降低肿瘤内免疫微环境对

CAR-T细胞活性的抑制作用。此外, CAR-T细胞在治疗实体瘤的过程中很容易衰竭。有关实验表明, 阻断PD-1/PD-L1信号通路可能提高CAR-T细胞在实体瘤中的活力^[66]。实验表明, 经过表观遗传修饰PTL-CAR-T细胞, 即同时下调CAR-T细胞上PD-1、Tim-3和Lag-3这3个免疫检查点受体, 可有效控制肿瘤的生长^[67]。

CAR受体与靶抗原之间的化学计量关系可能会影响CAR-T细胞的抗肿瘤功效, 对这些参数的调控可以精确调节CAR-T细胞的活性^[68]。实验表明, 经CRISPR (clusters of regularly interspaced short palindromic repeats)基因编辑的CAR-T细胞在体外和动物模型中均显示出强大的抗肿瘤活性^[69,70]。

2.2 定量工程生物学在T细胞受体工程T细胞免疫治疗技术中的应用

T细胞受体工程T细胞(T-cell receptor T cell, TCR-T)免疫治疗技术也是一种利用工程生物学方法特异性改造淋巴T细胞的免疫疗法。与CAR-T细胞工程改造不同的是, TCR-T仍利用人体原有的抗原呈递与识别蛋白体系。当TCR-T的膜表面T细胞受体与抗原呈递细胞或肿瘤细胞表面上呈递了抗原肽的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)进行非共价结合时, 相应的TCR-T细胞就会激活。具有高度特异性的肿瘤相关抗原结合结构域的工程化T细胞是临床所需的, 这种工程化T细胞相对不容易引起脱靶的肿瘤毒性, 并且能够在肿瘤微环境中具有较强的活性和较长的持久性。目前比较受关注的肿瘤抗原是NY-ESO-1^[71]、MAGE-A3^[72]、PRAME^[73]等。

TCR-T细胞免疫疗法的关键步骤在于筛选出可以与癌细胞抗原有效结合并有效杀伤癌细胞的T细胞上的受体。Lu等人^[74]采用肿瘤浸润T细胞与经串联迷你基因(tandem mini-gene, TMG)转染或肽冲击的自体抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)共培养, 结合单细胞RNA测序分析T细胞, 鉴定高表达干扰素- γ (interferon gamma, IFN- γ)和白介素2(interleukin-2, IL-2)的T细胞所对应的TCR序列, 进而合成多个相关TCR序列, 并将其克隆到逆转录病毒中载体, 最后转导到供体T细胞中, 使得这些转导的T细胞特异性识别自体APC呈现的新抗原。此外, Segaliny等人^[75]使用液滴微流控技术进行功能筛选, 实时监控单个TCR-T细胞在识别目标肿瘤细胞的活化过程与状态, 从而提高T细胞治疗的特异性。这个系统将促进免疫治疗筛选和T细胞疗法的发展。

同时, 对肿瘤内T细胞的TCR序列进行分析, 也有助于理解T细胞群体在肿瘤微环境内的演化。Azizi等人^[76]通过对TCR序列数据以及相应的T细胞基因表达数据的分析, 揭示了肿瘤内T细胞TCR序列的持续演化以及肿瘤免疫环境中T细胞持续激活的规律, 这些发现对TCR-T治疗过程中是否需要及时调整相应的T细胞的TCR序列等关键问题提供了重要参考依据。通过这些方法所获得的TCR-T细胞将为可控且有针对性的肿瘤治疗提供相应的细胞与治疗方案。

2.3 定量工程生物学在先天性免疫细胞治疗中的应用

先天性免疫细胞是肿瘤微环境的重要组成部分之一, 充分利用和改造此类细胞不仅可以辅助现有的免疫疗法, 而且也可有潜力开发出安全有效的新型免疫治疗策略。目前, 先天性免疫细胞的免疫治疗研究主要包括树突细胞、巨噬细胞以及自然杀伤细胞等免疫疗法。

树突细胞(dendritic cell, DC)经常被称为“大自然的佐剂”, 被公认为最有效的抗原呈递细胞, 能够激活初级和记忆免疫反应。DC具有很强的抗原获取、呈递给T细胞的处理能力, 并通过高表达共刺激或共抑制分子来确定免疫激活或无反应^[77]。将DC疫苗接种策略与检查点抑制剂相结合, 这种新策略可更有效地治疗大肠癌^[78]。DC疫苗接种和PD-1阻断的联合疗法显示出协同效应, 可在原位神经胶质瘤小鼠模型中产生强大的靶向肿瘤的免疫反应, 这与肿瘤微环境的显著变化有关, 有利于M1极化的巨噬细胞和效应T细胞^[79]。通过选择不同的DC子集, 设计更有效的DC疫苗, 增强肿瘤的T细胞反应^[80]。

针对巨噬细胞进行工程改造的免疫疗法在肿瘤治疗中也扮演着重要的角色。例如, CD47-SIRP α (signal-regulatory protein α)信号通路又被称为“别吃我”信号, CD47与SIRP α 结合会抑制细胞骨架重组, 抑制肿瘤细胞的“别吃我”信号, 能促使巨噬细胞吞噬肿瘤细胞, 抑制肿瘤生长^[81,82]。

自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)也是肿瘤细胞免疫治疗的潜在效应细胞之一^[83], CAR-NK除了通过CAR特异性机制(通过scFv识别肿瘤相关抗原)杀死靶细胞外, NK细胞还可以通过各种激活的受体识别不同的配体, 自发地杀死肿瘤细胞^[84]。同时, NK细胞的另一个特点是所选取的效应细胞并不局限于自体细胞。CAR-NK细胞免疫疗法, 在治疗难治性恶性肿瘤上显示

出安全性和广阔的应用前景^[85]。

综上所述, 树突状细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞等在肿瘤微环境中也发挥着重要的作用, 虽然已经对这些细胞在免疫治疗中做了很多研究, 但是在治疗实体瘤中, 由于肿瘤微环境复杂, 免疫治疗的结果仍然不可预测, 还需进行更多的探索和临床研究。

2.4 定量工程生物学在其他层次上对肿瘤微环境的改造

首先, 在细胞外基质层面, 领域内主流观点认为, 肿瘤的纤维化是阻碍药物和免疫细胞与癌细胞相互作用的障碍之一, 并且Sherman等人^[86]的实验结果表明, 通过抑制维他命D受体的活性, 可以改变胰腺癌成纤维细胞的表型, 从而降低胰腺癌肿瘤的纤维化并提升化疗药物的功效。但同时, Özdemir等人^[87]通过消除小鼠成纤维细胞的实验表明, 紧密的纤维网络可能会帮助限制癌细胞的运动, 所以单纯降低肿瘤的纤维化可能会增加癌症扩散风险。因此, 对于肿瘤内纤维网络的改造仍需要在原理上进行更定量的探索^[88], 从而开展更有针对性的工程改造。

其次, 在改造肿瘤内血管生成和功能方面, 领域内已经有了丰富的研究成果^[89,90], 但仍面临着肿瘤耐药性的挑战^[91,92]。在近期, Stratman等人^[93]的工作表明, 抑制内皮细胞中磷酸肌醇的回收, 可以有效干预内皮细胞对血管生成因子的响应, 从而有效拮抗肿瘤内血管生成的信号。这些在不同层次上对肿瘤微环境的工程改造有望取得协同效应, 从而更有效地控制肿瘤的生长和转移。

3 总结与展望

肿瘤细胞免疫治疗(CAR-T、TCR-T、DC)在临床治疗肿瘤中引起了越来越多的关注, 通过各种方法使免疫细胞识别并杀伤癌细胞是目前研究的热点^[94]。随着多重成像、scDNA-Seq、CyTOF、针对海量数据的新颖计算方法、微流控芯片以及CRISPR基因编辑技术等生物技术的发展成熟, 我们能够更为深入地认识肿瘤微环境的复杂性、免疫细胞与肿瘤细胞间的相互作用机制等, 提高肿瘤细胞免疫治疗的临床效果, 攻克实体瘤治疗的难题。

尽管目前解析肿瘤微环境的技术逐渐增多和完善, 但仍然面临以下几大挑战。

首先, 由于肿瘤微环境比较复杂, 所包含的细胞类型繁多, 目前领域内尚未就所需刻画的关键特征达成共识。例如, T细胞的耗竭状态、肿瘤的异质性、癌细胞的基因变异水平等都与癌症的发展或病人对免疫治疗的响应有紧密的联系, 但目前人们对不同指标在不同癌症类型中的关键程度并未有统一而清晰的认识, 并且各个指标之间的联系尚未建立。一个清晰的定量指标体系将对肿瘤微环境的系统刻画与理解意义重大, 并将为理论计算分析肿瘤微环境提供更为系统的数据支撑。

其次, 实时追踪解析病人肿瘤微环境因各种因素导致目前缺乏相关的研究, 无法动态探索病人肿瘤微环境对免疫治疗响应的影响。实时追踪解析肿瘤微环境具体是指在免疫治疗过程前、中、后等多个时间点进行肿瘤样本采样, 及时定量解析肿瘤微环境的特征与变化。鉴于成本以及生物伦理方面的制约, 目前的评估时间点大多在治疗结束前或后, 仅有为数不多的研究机构正在开展相关的实时追踪研究。尽管有许多困难, 但此类研究的普及可以更准确地帮助特异性筛选可以响应治疗的病人, 也可以帮助后续开发相关的辅助治疗手段, 从而将病人的肿瘤微环境调整至可响应模式。

最后, 目前的免疫治疗的作用目标仍比较单一, 并且治疗机制仍未得到清晰的定量解析证实。例如, CAR-T、TCR-T等治疗手段是利用相关T细胞直接作用于癌细胞本身, 但通过调节肿瘤微环境从而实现治疗效果的成功范例相对较少。近期的一些工作证明了靶向微环境的治疗方案可以显著地提高已有免疫疗法的疗效。同时, 即便是最热门的两类免疫检查点抑制剂治疗方法(anti-CTLA4、anti-PD1/PDL1), 其各自对免疫微环境的作用差异性也仍在研究之中。这种作用机制不明确现状阻碍了对已有药物的工程增效以及新型高效药物的开发。因此, 定量解析现有治疗策略的实际治疗机制, 理性设计多靶点治疗的组合模式, 将有助于提升免疫治疗的疗效。

尽管充满了诸多挑战, 定量与工程生物学的方法已经为肿瘤微环境的研究提供了丰富的定量研究的相关数据, 帮助发现定量的规律, 为进一步改进已有的治疗策略、提出新的治疗策略提供坚实的基础。

参考文献

- Whiteside T L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 2008, 27: 5904–5912

- 2 Quail D F, Joyce J A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 2013, 19: 1423–1437
- 3 Schadendorf D, Hodi F S, Robert C, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 2015, 33: 1889–1894
- 4 Doroshow D B, Sanmamed M F, Hastings K, et al. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: Facts and hopes. *Clin Cancer Res*, 2019, 25: 4592–4602
- 5 Nagarsheth N, Wicha M, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17: 559–572
- 6 Tang H, Qiao J, Fu Y X. Immunotherapy and tumor microenvironment. *Cancer Lett*, 2016, 370: 85–90
- 7 Riaz N, Havel J J, Makarov V, et al. Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with nivolumab. *Cell*, 2017, 171: 934–949.e16
- 8 Swartz M A, Iida N, Roberts E W, et al. Tumor microenvironment complexity: Emerging roles in cancer therapy: Figure 1. *Cancer Res*, 2012, 72: 2473–2480
- 9 Zheng C, Zheng L, Yoo J K, et al. Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing. *Cell*, 2017, 169: 1342–1356.e16
- 10 Gadalla R, Noamani B, MacLeod B L, et al. Validation of CyTOF against flow cytometry for immunological studies and monitoring of human cancer clinical trials. *Front Oncol*, 2019, 9: 415
- 11 Tsujikawa T, Kumar S, Borkar R N, et al. Quantitative multiplex immunohistochemistry reveals myeloid-inflamed tumor-immune complexity associated with poor prognosis. *Cell Rep*, 2017, 19: 203–217
- 12 Stack E C, Wang C, Roman K A, et al. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: A review, with an assessment of tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods*, 2014, 70: 46–58
- 13 Parra E R, Uraoka N, Jiang M, et al. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Sci Rep*, 2017, 7: 13380
- 14 Ptacek J, Locke D, Finck R, et al. Multiplexed ion beam imaging (MIBI) for characterization of the tumor microenvironment across tumor types. *Lab Invest*, 2020, 100: 1111–1123
- 15 Ahn J, Sei Y J, Jeon N L, et al. Tumor Microenvironment on a chip: The progress and future perspective. *Bioengineering*, 2017, 4: 64
- 16 Thoma C R, Zimmermann M, Agarkova I, et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliver Rev*, 2014, 69–70: 29–41
- 17 Patel A P, Tirosh I, Trombetta J J, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, 2014, 344: 1396–1401
- 18 Tirosh I, Izar B, Prakadan S M, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*, 2016, 352: 189–196
- 19 Zhang Q, He Y, Luo N, et al. Landscape and dynamics of single immune cells in hepatocellular carcinoma. *Cell*, 2019, 179: 829–845.e20
- 20 Li H, van der Leun A M, Yofe I, et al. Dysfunctional CD8 T cells form a proliferative, dynamically regulated compartment within human melanoma. *Cell*, 2019, 176: 775–789.e18
- 21 Peng J, Sun B F, Chen C Y, et al. Single-cell RNA-seq highlights intra-tumoral heterogeneity and malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Res*, 2019, 29: 725–738
- 22 Venteicher A S, Tirosh I, Hebert C, et al. Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science*, 2017, 355: eaai8478
- 23 Lambrechts D, Wauters E, Boeckx B, et al. Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat Med*, 2018, 24: 1277–1289
- 24 Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, et al. Single-cell transcriptomics of human and mouse lung cancers reveals conserved myeloid populations across individuals and species. *Immunity*, 2019, 50: 1317–1334.e10
- 25 Lavin Y, Kobayashi S, Leader A, et al. Innate immune landscape in early lung adenocarcinoma by paired single-cell analyses. *Cell*, 2017, 169: 750–765.e17
- 26 Gubin M M, Esaulova E, Ward J P, et al. High-dimensional analysis delineates myeloid and lymphoid compartment remodeling during successful immune-checkpoint cancer therapy. *Cell*, 2018, 175: 1014–1030.e19
- 27 Cader F Z, Schackmann R C J, Hu X, et al. Mass cytometry of Hodgkin lymphoma reveals a CD4⁺ regulatory T-cell-rich and exhausted T-effector microenvironment. *Blood*, 2018, 132: 825–836
- 28 Carstens J L, Correa de Sampaio P, Yang D, et al. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat Commun*, 2017, 8: 15095
- 29 Parra E R, Villalobos P, Behrens C, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on the immune microenvironment in non-small cell lung carcinomas as determined by multiplex immunofluorescence and image analysis approaches. *J Immunother Cancer*, 2018, 6: 48
- 30 Hwang H J, Oh M S, Lee D W, et al. Multiplex quantitative analysis of stroma-mediated cancer cell invasion, matrix remodeling, and drug response in a 3D co-culture model of pancreatic tumor spheroids and stellate cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 258
- 31 Keren L, Bosse M, Marquez D, et al. A structured tumor-immune microenvironment in triple negative breast cancer revealed by multiplexed ion

- beam imaging. *Cell*, 2018, 174: 1373–1387.e19
- 32 Kalra J, Baker J. Multiplex immunohistochemistry for mapping the tumor microenvironment. *Methods Mol Biol*, 2017, 1554: 237–251
- 33 Pavesi A, Tan A T, Koh S, et al. A 3D microfluidic model for preclinical evaluation of TCR-engineered T cells against solid tumors. *JCI Insight*, 2017, 2: e89762
- 34 Anemone A, Consolino L, Arena F, et al. Imaging tumor acidosis: A survey of the available techniques for mapping *in vivo* tumor pH. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38: 25–49
- 35 Huber V, Camisaschi C, Berzi A, et al. Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Semin Cancer Biol*, 2017, 43: 74–89
- 36 Lyssiotis C A, Kimmelman A C. Metabolic interactions in the tumor microenvironment. *Trends Cell Biol*, 2017, 27: 863–875
- 37 Chaudhuri O, Koshy S T, Branco da Cunha C, et al. Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nat Mater*, 2014, 13: 970–978
- 38 Levental K R, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 2009, 139: 891–906
- 39 Huang S, Ingber D E. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell*, 2005, 8: 175–176
- 40 Acerbi I, Cassereau L, Dean I, et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol*, 2015, 7: 1120–1134
- 41 Chang J M, Park I A, Lee S H, et al. Stiffness of tumours measured by shear-wave elastography correlated with subtypes of breast cancer. *Eur Radiol*, 2013, 23: 2450–2458
- 42 Baker E L, Bonnecaze R T, Zaman M H. Extracellular matrix stiffness and architecture govern intracellular rheology in cancer. *Biophys J*, 2009, 97: 1013–1021
- 43 Paszek M J, Zahir N, Johnson K R, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 2005, 8: 241–254
- 44 Viji Babu P K, Radmacher M. Mechanics of brain tissues studied by atomic force microscopy: A perspective. *Front Neurosci*, 2019, 13: 600
- 45 Saltz J, Gupta R, Hou L, et al. Spatial organization and molecular correlation of tumor-infiltrating lymphocytes using deep learning on pathology images. *Cell Rep*, 2018, 23: 181–193.e7
- 46 Malta T M, Sokolov A, Gentles A J, et al. Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation. *Cell*, 2018, 173: 338–354.e15
- 47 Newman A M, Steen C B, Liu C L, et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 773–782
- 48 Kitada T, DiAndreth B, Teague B, et al. Programming gene and engineered-cell therapies with synthetic biology. *Science*, 2018, 359: eaad1067
- 49 Tokarew N, Ogonek J, Endres S, et al. Teaching an old dog new tricks: Next-generation CAR T cells. *Br J Cancer*, 2019, 120: 26–37
- 50 Wang Q, Wang Y, Lv H, et al. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol Ther*, 2015, 23: 184–191
- 51 Shiao S L, Ganesan A P, Rugo H S, et al. Immune microenvironments in solid tumors: New targets for therapy. *Genes Dev*, 2011, 25: 2559–2572
- 52 Caliendo F, Dukhinova M, Siciliano V. Engineered cell-based therapeutics: Synthetic biology meets immunology. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 43
- 53 Nishio N, Diaconu I, Liu H, et al. Armed oncolytic virus enhances immune functions of chimeric antigen receptor-modified T cells in solid tumors. *Cancer Res*, 2014, 74: 5195–5205
- 54 Ma L, Dichwalkar T, Chang J Y H, et al. Enhanced CAR-T cell activity against solid tumors by vaccine boosting through the chimeric receptor. *Science*, 2019, 365: 162–168
- 55 Roybal K T, Rupp L J, Morsut L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits. *Cell*, 2016, 164: 770–779
- 56 Nissim L, Wu M R, Pery E, et al. Synthetic RNA-based immunomodulatory gene circuits for cancer immunotherapy. *Cell*, 2017, 171: 1138–1150.e15
- 57 Siciliano V, DiAndreth B, Monel B, et al. Engineering modular intracellular protein sensor-actuator devices. *Nat Commun*, 2018, 9: 1881
- 58 Wu C Y, Roybal K T, Puchner E M, et al. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*, 2015, 350: aab407
- 59 Klesmith J R, Su L, Wu L, et al. Retargeting CD19 chimeric antigen receptor T cells via engineered CD19-fusion proteins. *Mol Pharm*, 2019, 16: 3544–3558
- 60 Wang W, Ma Y, Li J, et al. Specificity redirection by CAR with human VEGFR-1 affinity endows T lymphocytes with tumor-killing ability and anti-angiogenic potency. *Gene Ther*, 2013, 20: 970–978
- 61 Domschke C, Schneeweiss A, Stefanovic S, et al. Cellular immune responses and immune escape mechanisms in breast cancer: Determinants of immunotherapy. *Breast Care*, 2016, 11: 102–107
- 62 Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. *Nat Med*, 2015, 21: 524–529
- 63 Sheppard D. Dominant negative mutants: Tools for the study of protein function *in vitro* and *in vivo*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1994, 11: 1–6

- 64 Künkele A, Johnson A J, Roleczynski L S, et al. Functional tuning of CARs reveals signaling threshold above which CD8⁺ CTL antitumor potency is attenuated due to cell Fas-FasL-dependent AICD. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3: 368–379
- 65 Alabanza L, Pegues M, Geldres C, et al. Function of novel anti-CD19 chimeric antigen receptors with human variable regions is affected by hinge and transmembrane domains. *Mol Ther*, 2017, 25: 2452–2465
- 66 Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Invest*, 2016, 126: 3130–3144
- 67 Zou F, Lu L, Liu J, et al. Engineered triple inhibitory receptor resistance improves anti-tumor CAR-T cell performance via CD56. *Nat Commun*, 2019, 10: 4109
- 68 Walker A J, Majzner R G, Zhang L, et al. Tumor antigen and receptor densities regulate efficacy of a chimeric antigen receptor targeting anaplastic lymphoma kinase. *Mol Ther*, 2017, 25: 2189–2201
- 69 Ren J, Liu X, Fang C, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 2255–2266
- 70 Ren J, Zhang X, Liu X, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*, 2017, 8: 17002–17011
- 71 Robbins P F, Li Y F, El-Gamil M, et al. Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. *J Immunol*, 2008, 180: 6116–6131
- 72 Morgan R A, Chinnasamy N, Abate-Daga D, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother*, 2013, 36: 133–151
- 73 Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*, 1997, 6: 199–208
- 74 Lu Y C, Zheng Z, Robbins P F, et al. An efficient single-cell RNA-seq approach to identify neoantigen-specific T cell receptors. *Mol Ther*, 2018, 26: 379–389
- 75 Segaliny A I, Li G, Kong L, et al. Functional TCR T cell screening using single-cell droplet microfluidics. *Lab Chip*, 2018, 18: 3733–3749
- 76 Azizi E, Carr A J, Plitas G, et al. Single-cell map of diverse immune phenotypes in the breast tumor microenvironment. *Cell*, 2018, 174: 1293–1308.e36
- 77 Steinman R M. Decisions about dendritic cells: Past, present, and future. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 1–22
- 78 Gessani S, Belardelli F. Immune dysfunctions and immunotherapy in colorectal cancer: The role of dendritic cells. *Cancers*, 2019, 11: 1491
- 79 Van Woensel M, Mathivet T, Wauthoz N, et al. Sensitization of glioblastoma tumor micro-environment to chemo- and immunotherapy by Galectin-1 intranasal knock-down strategy. *Sci Rep*, 2017, 7: 1217
- 80 Huber A, Dammeijer F, Aerts J G J V, et al. Current state of dendritic cell-based immunotherapy: Opportunities for *in vitro* antigen loading of different DC subsets? *Front Immunol*, 2018, 9: 2804
- 81 Feng M, Jiang W, Kim B Y S, et al. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19: 568–586
- 82 Lian S, Xie X, Lu Y, et al. Checkpoint CD47 function on tumor metastasis and immune therapy. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 9105–9114
- 83 Rey J, Veuillen C, Vey N, et al. Natural killer and gammadelta T cells in haematological malignancies: Enhancing the immune effectors. *Trends Mol Med*, 2009, 15: 275–284
- 84 Sun C, Sun H, Zhang C, et al. NK cell receptor imbalance and NK cell dysfunction in HBV infection and hepatocellular carcinoma. *Cell Mol Immunol*, 2015, 12: 292–302
- 85 Shaffer B C, Le Luduec J B, Forlenza C, et al. Phase II study of haploidentical natural killer cell infusion for treatment of relapsed or persistent myeloid malignancies following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016, 22: 705–709
- 86 Sherman M H, Yu R T, Engle D D, et al. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell*, 2014, 159: 80–93
- 87 Özdemir B C, Pentcheva-Hoang T, Carstens J L, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 2015, 28: 831–833
- 88 Wang W Q, Liu L, Xu J Z, et al. Reflections on depletion of tumor stroma in pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta-Rev Cancer*, 2019, 1871: 267–272
- 89 Kerbel R S. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*, 2008, 358: 2039–2049
- 90 Ma J, Waxman D J. Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7: 3670–3684
- 91 Abdollahi A, Folkman J. Evading tumor evasion: Current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resist Updat*, 2010, 13: 16–28
- 92 Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 592–603
- 93 Stratman A N, Farrelly O M, Mikelis C M, et al. Anti-angiogenic effects of VEGF stimulation on endothelium deficient in phosphoinositide recycling. *Nat Commun*, 2020, 11: 1204
- 94 Velcheti V, Schalper K. Basic overview of current immunotherapy approaches in cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2016, 35: 298–308

Summary for “肿瘤微环境中的定量工程生物学”

Quantitative engineering biology in the tumor microenvironment

Wentao Ma[†], Ting Wei[†], Xiongfei Fu^{*} & Xuefei Li^{*}*CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shenzhen 518055, China*[†] Equally contributed to this work^{*} Corresponding authors, E-mail: xf.fu@siat.ac.cn; xuefei.li@siat.ac.cn

Immunotherapy is a breakthrough in recent cancer therapy; however, in current clinical settings, responses to the current immunotherapy strategies, such as immune-checkpoint blockade and adoptive T cell transfer, remain poor. Therefore, elucidating the mechanisms underlying the non-responsiveness of cancer patients is a current focus in the field of cancer research. Among various factors, the tumor microenvironment is considered to be a promising research direction. The tumor microenvironment is a complex system and an essential player in the success of cancer immunotherapy. The tumor microenvironment is composed of tumor cells, immune cells, fibroblasts, extracellular matrix, blood vessels, and nutrients. To quantify the effects of the tumor microenvironment on cancer immunotherapy as well as reshape the tumor microenvironment to synergistically enhance the cancer immunotherapy, quantitative engineering biology can be employed.

In this review, we will first introduce quantitative methods that measure parameters of the tumor microenvironment, such as mass cytometry by time-of-flight (CyTOF), multiplex imaging of tumor sections, single-cell RNA-seq. Specifically, CyTOF and multiplex imaging can provide the spatial information on tissue materials and the phenotype of different cells, which can be essential for predicting the response rate of cancer immunotherapy, whereas single-cell RNA-seq can give a more complete picture of the phenotypes of cells in tumors but without the spatial information. In addition, other quantitative methods that measure physical parameters of the tumor microenvironment, such as pH, tumor stiffness and oxygen level, can further help to elucidate the role of these factors in the spatial-temporal evolution of cell phenotypes and tissue materials in tumors. These technologies continue to provide quantitative understanding of the tumor microenvironment and fuel new ideas for engineering the tumor microenvironment. Furthermore, we will introduce the current, promising applications of engineering biology for reshaping the tumor microenvironment, such as immunotherapies based on chimeric antigen receptor T cells (CAR-T), T-cell receptor T cells (TCR-T), and dendritic-cell based tumor vaccines. Each engineering strategy has its own advantages and challenges, for example, CAR-T cells can target cells with specific surface proteins and do not require the co-stimulation process; however, they are currently limited to the target proteins for CAR-T. Furthermore, CAR-T therapy runs the risk of generating a cytokine storm. Conversely, TCR-T is safer, but the response rate is low without a deep understanding of complimentary suppressive pathways. Nevertheless, quantitative engineering biology is transforming research on tumor immunotherapy and new technologies are emerging to overcome the current barriers.

quantitative biology, engineering biology, tumor immunotherapy, tumor microenvironmentdoi: [10.1360/TB-2020-0489](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0489)