

靶向 CD74 的嵌合抗原受体 T 细胞的抗白血病细胞作用研究

刘一鸣^{1,2}, 谢乐灵^{1,2}, 邢海燕^{1,2}, 唐克晶^{1,2}, 王敏^{1,2}, 饶青^{1,2*}

1.中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)北京协和医学院,血液与健康全国重点实验室,国家血液系统疾病临床医学研究中心,天津市血液病细胞治疗研究重点实验室,细胞生态海河实验室,天津 300020;
2.天津医学健康研究院,天津 301600

摘要:嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cell, CAR-T)疗法目前已应用于血液肿瘤的治疗,前期研究发现 CD74 在白血病患者白血病干细胞中高表达,为了探索其对白血病细胞的杀伤作用,通过 CD74 CAR 表达载体的构建、慢病毒载体的包装及 T 细胞的感染,制备 CD74 CAR-T 细胞。利用体外杀伤实验及细胞因子的释放检测确定 CAR-T 细胞对 CD74⁺ 的白血病细胞的特异性杀伤作用。结果显示,CD74 CAR-T 分别与 CD74⁺ 的 THP-1 及 CD74⁻ 的 K562 白血病细胞共培养时,THP-1 细胞可被清除,而对 CD74⁻ 的 K562 细胞无明显杀伤作用。CD74 CAR-T 细胞可被 CD74⁺ 的 THP-1 细胞有效激活,通过细胞因子释放途径有效杀伤白血病细胞。研究成功构建了靶向 CD74⁺ 的白血病细胞的 CAR-T 细胞,为白血病的免疫治疗提供了新的靶点和免疫治疗策略。

关键词:嵌合抗原受体修饰的 T 细胞;CD74;急性髓系白血病;白血病干细胞

DOI:10.19586/j.2095-2341.2024.0016

中图分类号:Q291, R733.71

文献标志码:A

Anti-leukemia Effect of Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting CD74 Positive Leukemia Cells

LIU Yiming^{1,2}, XIE Leling^{1,2}, XING Haiyan^{1,2}, TANG Kejing^{1,2}, WANG Min^{1,2}, RAO Qing^{1,2*}

1.State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Tianjin Key Laboratory of Cell Therapy for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China;

2.Tianjin Institutes of Health Science, Tianjin 301600, China

Abstract:Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) therapy has been used in treatment of hematological malignancy. The previous study has found that CD74 is highly expressed in leukemia stem cells. In order to explore its killing effect on leukemia cells, CD74 CAR-T cells were prepared by constructing CD74 CAR expression vector, packing lentivirus and infecting T cells. The specific killing effect of CAR-T cells on CD74 positive leukemia cells was determined by killing experiment in vitro and cytokine release detection. The results showed that when CD74 CAR-T was co-cultured with CD74⁺ THP-1 or CD74⁻ K562 leukemia cells, THP-1 cells could be eliminated, but there was no obvious killing effect on CD74⁻ K562 cells. CD74⁺ THP-1 cells could effectively activate CAR-T cells, and activated anti-CD74 CAR-T cells could effectively leukemia cells through cytotoxicity pathways. The study successfully established CAR-T cells targeting CD74⁺ leukemia cells, thus providing new target and immunotherapy strategy for leukemia immunotherapy.

Key words:chimeric antigen receptor T cell; CD74; acute myeloid leukemia; leukemia stem cell

白血病干细胞(leukemia stem cell, LSC)是白血病复发难治的重要根源之一,其作为少数具有

自我更新潜能并抵抗化疗的一群白血病细胞,长期的自我更新能力可驱动克隆生长。LSC表现出

收稿日期:2024-01-31; 接受日期:2024-03-21

基金项目:国家自然科学基金项目(81770106)。

联系方式:刘一鸣 E-mail: liuyiming@ihcams.ac.cn; *通信作者 饶青 E-mail: raoqing@ihcams.ac.cn

特定的表型,特别是在治疗应激反应中,介导治疗耐药性^[1]。对LSC生物学特征进行深入探究,从而对其进行靶向治疗,能够改善治疗预后。

为了探究LSC静息、耐受化疗等干性特征的机制,本课题组前期研究发现CD74在静息的LSC中表达上调。正常生理状态下,CD74表达于MHC II阳性细胞表面,包括树突状细胞(dendritic cell, DC)、单核细胞/巨噬细胞、朗格汉斯细胞等^[2]。此外,CD74也在多种恶性细胞中高表达^[-3-5]。基于前期发现CD74是部分AML白血病干细胞的表面标志,本研究构建靶向CD74的嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T, CAR-T),探索其是否可以特异性杀伤CD74⁺的白血病细胞。利用CD74单克隆抗体的轻链可变区和重链可变区序列(克隆号LL1)^[6],应用重组方法构建了CD74 CAR表达载体,以验证靶向CD74 CAR-T的抗白血病作用;将慢病毒载体制备成病毒,感染人T淋巴细胞,将CD74 CAR-T细胞与CD74⁺白血病细胞系共培养,从杀伤效果、细胞因子释放水平验证了CD74 CAR-T可以特异性杀伤CD74⁺白血病细胞。

随着免疫治疗技术研究的进步,免疫治疗在肿瘤尤其是血液肿瘤的治疗取得了重大进展,白血病细胞新靶点的发现以及靶向新靶点的CAR-T治疗可有效改善血液肿瘤的预后^[7],本研究构建CD74 CAR-T可以特异性杀伤CD74⁺白血病细胞,将为白血病的免疫治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 试验材料

K562、THP-1细胞系在本实验室长期保存培养;人T淋巴细胞来自健康成人供者外周血,取自天津市血液中心。实验所用抗体均购自Biolegend;流式细胞仪购自美国安捷伦公司;FACS Aria III流式细胞仪购自美国BD公司;细胞因子(IFN- γ 、TNF- α 、IL-6)联合检测试剂盒购自杭州赛基生物公司;细胞因子IFN- γ 购自R&D公司;

1.2 试验方法

1.2.1 pCDH-CD74-BB-CD3 ζ -GFP载体构建 根据实验室前期构建的pCDH-CD19-BB-CD3 ζ -GFP载体序列,通过限制性内切酶酶切获得除抗原结合区之外的载体序列。通过PCR技术扩增人CD74scFv成熟肽序列,作为该CAR结构的抗原

结合区。将载体片段及抗原结合区片段通过重组连接、转化、挑菌、鉴定、测序,留取测序正确的克隆,文章中皆命名为CD74 CAR。对照载体为保存在实验室的PCDH-T2A-GFP载体,本文命名为VEC。

1.2.2 慢病毒包装和浓缩 将目的质粒CD74 CAR或空载体VEC与包装质粒psPAX2、PMD2.G按比例混合后,加入PEI,转染HEK293T细胞,收集病毒上清并浓缩。将载体包装成病毒,感染人原代T细胞72 h,检测感染效率。

1.2.3 T细胞的培养与激活 复苏正常供者T细胞,用T细胞完全培养基(KBM581+5% FBS+rhIL-250 IU $\cdot$ mL⁻¹)重悬计数,按1 $\times$ 10⁶·孔⁻¹的细胞密度,将T细胞铺于24孔板中;取出CD3/CD28磁珠,按照T细胞:CD3/CD28磁珠比例1:1加入磁珠,磁珠加入之前先用无血清的T细胞培养基洗涤3遍,用完全培养基按100 μ L·孔⁻¹重悬磁珠,铺于24孔板中;用完全培养基将每孔体积补充至1 mL。

1.2.4 靶细胞的制备 IFN- γ 诱导THP-1,THP-1细胞悬液离心计数,将细胞密度调成1 $\times$ 10⁶·mL⁻¹;取24孔板,每孔加入200 μ L细胞悬液,加入100 U·mL⁻¹的IFN- γ ,添加培养基将细胞体系补齐1 mL(RPM1640+10%N血清),共孵育72 h,检测CD74的表达。

1.2.5 CD74 CAR-T细胞杀伤功能的检测 以感染后第7天的VEC-T和CD74 CAR-T细胞作为效应T细胞,以白血病细胞系K562、IFN- γ 诱导后的THP-1细胞作为靶细胞,24孔板每孔加入100 μ L VEC-T或者CD74 CAR-T细胞悬液(1 $\times$ 10⁵·孔⁻¹);按照效靶比1:1分别加入不同数量的靶细胞;用培养基(KBM581+5% FBS)将培养体系补齐至1 mL。分别在24、48 h检测残留靶细胞;48 h检测因子释放。

1.2.6 统计方法 应用Graphpad Prism 9.0软件对所有数据进行统计处理,结果以Mean $\pm$ SD表示,采用 t 检验及单(双)因素方差分析进行统计学分析, $P<0.05$ 认为差异有显著的统计学意义。

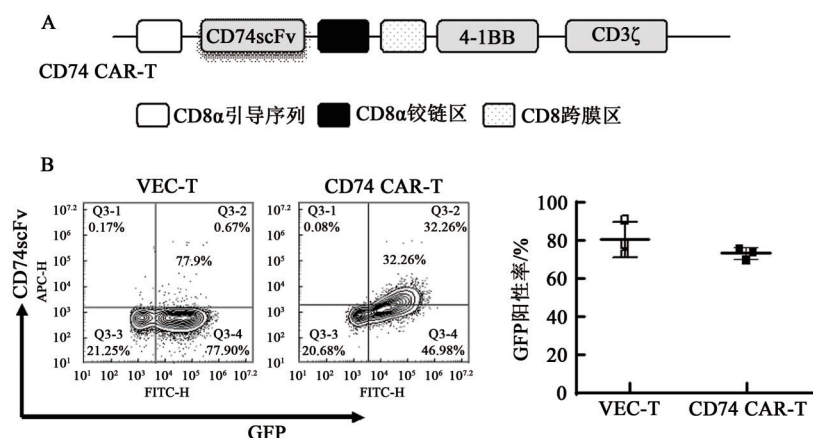
2 结果与分析

2.1 CD74 CAR-T细胞的制备

CD74 CAR-T载体结构示意图如图1A所示,感染活化24 h后的健康供者T细胞,在细胞感染72 h后,检测感染阳性率,Fab抗体标记CD74scFv在T细胞表面的表达,图1B为检测VEC-T及

CAR-T细胞感染效率的流式分析图。其中,VEC-T细胞感染效率在80%左右,CD74 CAR-T细胞感

染效率在70%左右,表明CD74 CAR成功表达于T细胞表面。



A: CD74 CAR-T 结构图; B: CD74 CAR-T 和 VEC-T 细胞感染效率流式图及统计图; scFv—单链抗体可变区; GFP—绿色荧光蛋白

图1 CD74 CAR-T细胞的建立

Fig. 1 Preparation of CD74 CAR-T cells

2.2 白血病细胞系表面CD74的表达

为检测构建的CD74 CAR-T对白血病细胞的杀伤功能,研究以人急性髓系白血病细胞系IFN- γ 诱导的THP-1和K562分别作为CD74⁺及CD74⁻的靶细胞,检测2个细胞系的CD74表达水平。如图

2所示,流式细胞术检测THP-1细胞和K562细胞CD74表达水平,2种细胞系CD74表达阳性率分别为33.02%和0.06%,表明THP-1在IFN- γ 诱导下可表达CD74,可作为验证CD74 CAR-T杀伤功能的CD74⁺的靶细胞。

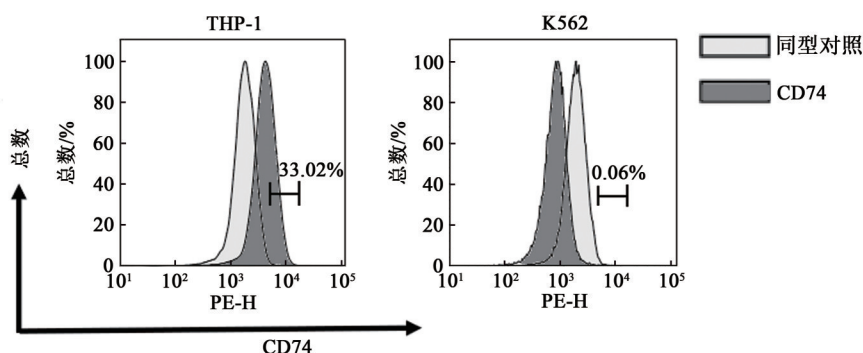


图2 IFN- γ 诱导的THP-1细胞和K562细胞表面CD74的表达

Fig. 2 The expression of CD74 in THP-1 and K562 cells

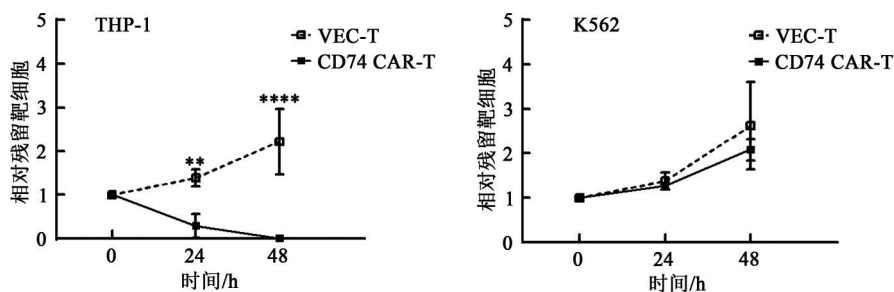
2.3 CD74 CAR-T细胞对CD74⁺的白血病细胞的特异性杀伤

为了证实CD74 CAR-T可以特异性清除CD74⁺AML细胞,研究将CD74 CAR-T或VEC-T分别与K562、THP-1按照效靶比1:1进行共培养,利用流式细胞术检测残留靶细胞的数量。实验结果如图3所示,当细胞共培养48 h后,CD74 CAR-T可以有效地杀伤CD74⁺的THP-1,而VEC-T细胞对THP-1细胞无明显杀伤。同时,CD74 CAR-T对

CD74⁻的K562无明显杀伤作用,表明CD74 CAR-T对白血病细胞的杀伤具有特异性。

2.4 CD74 CAR-T细胞与靶细胞共培养后的细胞因子分泌

细胞因子分泌也是参与T细胞杀伤的方式之一,Th1类细胞因子分泌IFN- γ 、TNF- α 可以促进细胞免疫应答,而IL-6与细胞的激活有关。研究收集了CD74 CAR-T或VEC-T和靶细胞共培养48 h的上清,检测细胞因子的分泌情况,如图4显



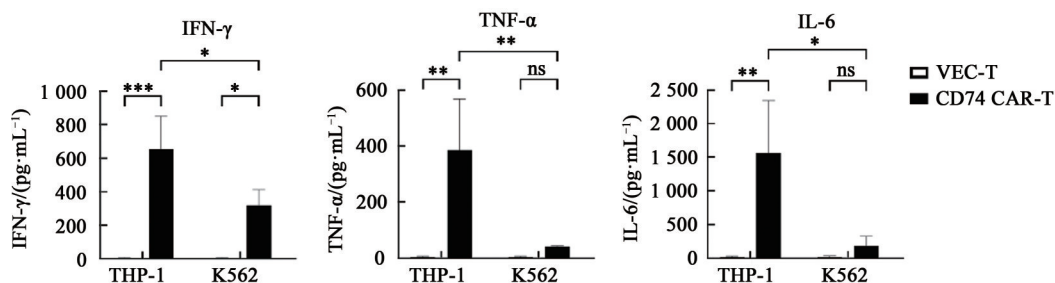
注: **和****分别表示在 $P<0.01$ 和 $P<0.0001$ 水平上具有统计学意义。

图3 CD74 CAR-T细胞与靶细胞共培养24、48 h后相对残留靶细胞比例

Fig. 3 Relative proportion of residual target cells after co culturing of CD74 CAR-T cells with target cell for 24 and 48 h

示,与THP-1细胞共培养后,和VEC-T组相比,CD74 CAR-T组IFN- γ 、TNF- α 、IL-6细胞因子分泌显著升高;而与K562共培养后,CD74 CAR-T细胞

产生的TNF- α 及IL-6与VEC-T组无显著性差异。研究结果进一步表明CD74 CAR-T细胞的激活具有特异性。



注: *, **, ***分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 水平上具有统计学意义;ns表示无统计学意义。

图4 CD74 CAR-T或VEC-T和靶细胞共培养上清中各类细胞因子分泌水平

Fig. 4 Production of cytokines by VEC-T or CD74 CAR-T cells after co-culturing with target cells for 48 h

3 讨论

药物化疗以及同种异体干细胞移植可在一定程度上提高AML患者的生存率。靶向治疗和不同类别治疗药物的组合可有效改善治疗的耐药性^[8]。近几年随着对肿瘤细胞表面抗原的深入研究,许多高表达于肿瘤细胞表面,且在正常组织中不表达或低表达的抗原被发现可以作为肿瘤CAR-T治疗的靶点^[9-10],CAR-T免疫疗法的出现进一步提高了白血病的治疗效果。

CD74在多种恶性肿瘤中高表达,包括B细胞肿瘤^[11]、多发性骨髓瘤^[12]、非小细胞肺癌^[13]和胃癌^[14],加上CD74在与抗体或配体结合时发生快速内化,使其成为这些肿瘤疾病的一个有吸引力的靶点。

目前,研究发现人源化抗CD74单克隆抗体LL1是一种有效的治疗剂,可能对治疗多发性骨

髓瘤等B细胞恶性肿瘤具有重要价值^[15]。CD74在肿瘤细胞上的快速内化和相对较高的表达是用作偶联化疗剂或放射性药物载体的决定性因素。例如,放射性同位素^[16]、阿霉素^[17]和两栖动物胞质核糖核酸酶 ranpirinase^[18],当与人源化抗CD74单克隆抗体LL1联合使用时,存活率显著提高,并且在临床前研究的小鼠和非人灵长类动物模型中耐受性度好^[19]。目前,用于临床的hLL1的开发也在进行中。

基于以上研究背景,本文构建了靶向CD74的嵌合抗原受体。体外实验证实CD74 CAR-T被CD74⁺的肿瘤细胞激活,同时分泌IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子特异性杀伤肿瘤细胞。未来研究计划将在体内实验中进一步验证CD74 CAR-T治疗AML肿瘤细胞的有效性。

综上所述,本研究成功构建的靶向CD74抗原的第二代CAR-T细胞具有特异性的抗肿瘤作

用,研究结果提示CD74是治疗CD74⁺肿瘤细胞的有效靶点,CD74 CAR-T的研究可为肿瘤免疫治疗的发展提供新思路。

参 考 文 献

- [1] STELMACH P, TRUMPP A. Leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia[J]. *Haematologica*, 2023, 108(2): 353-366.
- [2] SU H, NA N, ZHANG X, *et al.* The biological function and significance of CD74 in immune diseases[J]. *Inflamm. Res.*, 2017, 66(3): 209-216.
- [3] SANCHEZ-NIÑO M D, SANZ A B, RUIZ-ANDRES O, *et al.* MIF, CD74 and other partners in kidney disease: tales of a promiscuous couple[J]. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2013, 24(1): 23-40.
- [4] KASHIMA Y, SHIBAHARA D, SUZUKI A, *et al.* Single-cell analyses reveal diverse mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer[J]. *Cancer Res.*, 2021, 81(18): 4835-4848.
- [5] LASKIN J, LIU S V, TOLBA K, *et al.* NRG1 fusion-driven tumors: biology, detection, and the therapeutic role of afatinib and other ErbB-targeting agents[J]. *Ann. Oncol.*, 2020, 31(12): 1693-1703.
- [6] D·M·戈登伯格, H·汉森, S·O·梁, 等. 内在化抗-CD74抗体和使用方法: CN 03809863.6[P]. 2011-04-13.
- [7] 范蓓, 王园园, 赵云霞, 等. 免疫系统人源化小鼠模型构建技术探讨[J]. *生物技术进展*, 2022, 12(6): 922-928.
FAN B, WANG Y Y, ZHAO Y X, *et al.* Discussion on the construction technology of mouse model with humanized immune[J]. *Curr. Biotechnol.*, 2022, 12(6): 922-928.
- [8] LIU H. Emerging agents and regimens for AML[J/OL]. *J. Hematol. Oncol.*, 2021, 14(1): 49[2024-04-10]. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01062-w>.
- [9] 张鹏晓, 胡念. 黑色素瘤免疫治疗作用机制研究进展[J]. *生物技术进展*, 2023, 13(6): 900-906.
ZHANG P X, HU N. The research progress on action mechanism of melanoma immunotherapy[J]. *Curr. Biotechnol.*, 2023, 13(6): 900-906.
- [10] 高朗, 于思雪, 袁春森, 等. 黏蛋白在肿瘤免疫治疗中的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2023, 13(3): 390-398.
GAO L, YU S X, YUAN C S, *et al.* Research progress of mucin in tumor immunotherapy[J]. *Curr. Biotechnol.*, 2023, 13(3): 390-398.
- [11] MILES R R, CAIRO M S, SATWANI P, *et al.* Immunophenotypic identification of possible therapeutic targets in paediatric non-hodgkin lymphomas: a children's oncology group report[J]. *Br. J. Haematol.*, 2007, 138(4): 506-512.
- [12] BURTON J D, ELY S, REDDY P K, *et al.* CD74 is expressed by multiple myeloma and is a promising target for therapy[J]. *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10(19): 6606-6611.
- [13] MCCLELLAND M, ZHAO L, CARSKADON S, *et al.* Expression of CD74, the receptor for macrophage migration inhibitory factor, in non-small cell lung cancer[J]. *Am. J. Pathol.*, 2009, 174(2): 638-646.
- [14] CONROY H, MAWHINNEY L, DONNELLY S C. Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF): the potential missing link[J]. *QJM-Int. J. Med.*, 2010, 103(11): 831-836.
- [15] STEIN R, MATTES M J, CARDILLO T M, *et al.* CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms[J]. *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13(18): 5556-5563.
- [16] OCHAKOVSKAYA R, OSORIO L, GOLDENBERG D M, *et al.* Therapy of disseminated B-cell lymphoma xenografts in severe combined immunodeficient mice with an anti-CD74 antibody conjugated with (111)indium, (67)gallium, or (90)trium[J]. *Clin. Cancer Res.*, 2001, 7(6): 1505-1510.
- [17] SAPRA P, STEIN R, PICKETT J, *et al.* Anti-CD74 antibody-doxorubicin conjugate, IMMU-110, in a human multiple myeloma xenograft and in monkeys[J]. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11(14): 5257-5264.
- [18] CHANG C H, SAPRA P, VANAMA S S, *et al.* Effective therapy of human lymphoma xenografts with a novel recombinant ribonuclease/anti-CD74 humanized IgG4 antibody immunotoxin[J]. *Blood*, 2005, 106(13): 4308-4314.
- [19] BORGHESE F, CLANCHY F I. CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease[J]. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2011, 15(3): 237-251.