

· 专家论坛 ·

DOI: 10.12464/j.issn.0253-9802.2024-0331

抑制 CAR-T 细胞衰竭的策略研究

欢迎扫码观看
文章视频简介符琼玉, 郝新宝[✉], 陶石
(海南医科大学第一附属医院血液内科, 海南 海口 570100)

通信作者简介: 郝新宝, 医学博士, 血液/肿瘤学教授、主任医师, 博士生导师(南京医科大学及海南医科大学)。海南医科大学第一附属医院血液内科学科带头人。长期从事血液病、肿瘤的医疗、教学和科研工作, 同时开展小分子化合物、大分子蛋白药物及细胞药物开发、临床研究转化及项目管理 30 多年。曾承担国家自然科学基金、军队及省部级课题共计 20 余项, 在国内外期刊发表论文逾 100 篇, 谷歌学术统计总引用约 2 600 次, 单篇最高引用 797 次, H-index 15, 培养博士、硕士研究生 30 多人。E-mail: haoxb@hainmc.edu.cn。

【摘要】 免疫治疗在临床抗肿瘤治疗中取得了良好的疗效, 尤其是嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 疗法作为一种新兴的肿瘤免疫疗法, 在血液系统恶性肿瘤临床治疗中取得了突破性的疗效。但 CAR-T 细胞在治疗过程中会面临逐渐衰竭的问题, 特别是在实体瘤的治疗中, 导致抗肿瘤疗效欠佳及复发等风险。文章分析了 CAR-T 细胞衰竭的可能机制, 并阐述了抑制 CAR-T 细胞衰竭的相关研究进展, 以期设计合理的治疗策略, 减少 CAR-T 细胞的衰竭, 提高 CAR-T 细胞的效能。

【关键词】 CAR-T 细胞; T 细胞衰竭; 衰竭机制; 调控策略

Research on strategies to inhibit CAR-T cell exhaustion

FU Qiongyu, HAO Xinbao[✉], TAO Shi

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, China)

Corresponding author: HAO Xinbao, E-mail: haoxb@hainmc.edu.cn

【Abstract】 Immunotherapy has achieved good efficacy in clinical anti-tumor therapy, especially chimeric antigen receptor T cell (CAR-T cell) therapy, as an emerging tumor immunotherapy, has achieved breakthrough efficacy in the clinical treatment of hematologic malignancies. However, CAR-T cell face the problem of gradual exhaustion during the treatment process, especially in the treatment of solid tumors, which will lead to poor anti-tumor efficacy and possible risks such as recurrence. This paper analyzed the possible mechanism of CAR-T cell exhaustion and describes the relevant research progress in inhibiting CAR-T cell exhaustion, with a view to designing reasonable therapeutic strategies to reduce CAR-T cell exhaustion and improve the efficacy of CAR-T cell.

【Key words】 CAR-T cell; T cell exhaustion; Mechanisms of exhaustion; Governance policies

免疫疗法在肿瘤治疗中取得了显著的效果, 尤其是嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 疗法, 在抗肿瘤方面取得了突破性的进展。尽管 CAR-T 疗法在治疗血液系统恶性肿瘤方面取得了成功, 但 T 细胞在体内易耗尽, 尤其是进入实体肿瘤后, 因此 CAR-T 细胞衰竭是实体肿瘤治疗成功的主要障碍之一^[1]。T 细胞耗竭现象首次在慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎

病 (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) 感染小鼠的 CD8⁺T 细胞中被观察到, 并在癌症和其他感染模型中得到证实^[2]。在慢性感染或癌变过程中, 由于病原体或肿瘤细胞的抗原或炎症因子对 T 细胞的刺激持续时间较长, 导致记忆和效应 T 细胞功能逐渐丧失, 这一过程即 T 细胞衰竭。T 细胞衰竭的特征包括多种抑制受体的共同表达、效应功能的逐渐丧失以及效应细胞的过度分化。肿瘤

收稿日期: 2024-08-14

基金项目: 海南省卫生健康行业科研项目 (22A200239)

作者简介: 符琼玉, 硕士研究生, 研究方向: 血液恶性肿瘤, E-mail: fuqiongyu123@163.com

中的T细胞衰竭与免疫治疗的效果呈负相关,因此,探索CAR-T细胞衰竭的机制对于减少CAR-T细胞衰竭、提高CAR-T细胞效能以及设计新的治疗策略至关重要。本文综述了CAR-T细胞衰竭的机制以及基于这些机制的CAR-T细胞治疗策略的最新研究进展,旨在更好地理解CAR-T细胞疗法在肿瘤治疗中的作用,为提高其疗效提供科学依据。

1 CAR-T细胞衰竭的机制

1.1 CAR的结构设计影响CAR-T细胞衰竭

CAR由3个主要部分组成:细胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。CAR-T细胞技术经历了4代的发展,第一代CAR-T细胞只有CD3结构域(CD3 domain, CD3 ζ);第二代CAR-T细胞包括CD3 ζ 和共刺激结构域(costimulatory domain, CM);第三代CAR-T细胞有2个不同的CM;第四代CAR-T细胞具有额外的细胞内结构域,用于调节细胞因子或其他共刺激分子的表达^[3]。第一代CAR含有一个单链可变片段(single-chain fragment variable, scFv),该片段与CD3 ζ 的细胞内信号域相连。这些CAR仅提供T细胞启动信号而缺乏共刺激分子,通过CD3 ζ 的信号传导不足以启动静息T细胞,由于信号传导能力有限,第一代CAR-T细胞不能实现持续应答^[3,4]。第二代CAR包括一个CM(CD28、4-1BB、OX-40、ICOS和CD134),为T细胞的激活提供了第二个信号,可以防止CAR-T细胞的衰竭,其中含CD28和 ζ 链的CAR-T细胞(chimeric antigen receptor T-cell with CD28 and ζ -chain, CD28 ζ CAR-T细胞)与含4-1BB和 ζ 链的CAR-T细胞(chimeric antigen receptor T-cell with 4-1BB and ζ -chain,

4-1BB ζ CAR-T细胞)相比,4-1BB ζ CAR-T细胞在体内的持久性更强,但杀伤作用更弱,因此研究人员将这2种共刺激分子整合到CAR-T细胞的结构中,从而开发了第三代CAR-T细胞^[3]。第三代CAR具有多个CM,进一步增强T细胞的活化、增殖和细胞因子的产生;第四代CAR-T细胞被设计为在识别目标抗原时分泌特定的细胞因子,这是通过在CAR结构中添加第二个基因来实现的,该基因编码细胞因子或其他免疫调节因子(酶或配体);第三代和第四代的抗肿瘤作用增强,但毒性和其他副作用增加^[5]。见表1。

1.2 体外扩增条件影响CAR-T细胞衰竭

在CAR-T细胞制造过程中,多个技术因素都会影响T细胞在体内的持久性和有效性,包括冷冻保存、培养中接收的激活信号的剂量和培养时间^[6]。为了获得足够的CAR-T细胞数量,这些细胞需要在体外扩增。在扩增过程中,通常添加细胞因子白介素-2(interleukin-2, IL-2),但这种做法可能导致CAR-T细胞衰竭并降低它们在体内的持久性。相比之下,在辅助性T细胞9(T helper 9 cell, Th9)培养条件下极化和扩增的CAR-T细胞(T9 CAR-T)对已建立的肿瘤具有增强的抗肿瘤活性。与IL-2极化的T1 CAR-T细胞相比,T9 CAR-T细胞分泌IL-9及少量干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ),表达中枢记忆表型和较低水平的衰竭标志物,并表现出强大的增殖能力,因此T9 CAR-T细胞比T1 CAR-T细胞在体内对血液和实体肿瘤具有更大的抗肿瘤活性^[7]。此外,CAR-T细胞的衰竭水平随着体外扩增时间的延长而增加,因此,培养时间较短的“年轻”细胞在体内表现出较低的衰竭标志物和更强的长期杀伤功能^[8]。这些发现提示在CAR-T细胞的生产中,需要精细调控培养条件和时间,以优化CAR-T细胞的持久性和疗效。

表1 4代CAR-T细胞的结构差异及优缺点

Table 1 The structural differences, advantages and disadvantages of the four generations of CAR-T cells

CAR-T细胞	结构差异	优点	缺点
第一代	只有CD3结构域(CD3 ζ)	结构相对简单	缺乏共刺激结构域,T细胞增殖能力和持久性有限,抗肿瘤效果欠佳
第二代	在第一代基础上加入了一个共刺激结构域(如CD28或4-1BB)	增强了T细胞的增殖能力、存活和持久性	只有一个共刺激结构域,抗肿瘤效果不稳定
第三代	含有两个或多个共刺激结构域	增强T细胞的活化、增殖和细胞因子的产生,抗肿瘤活性提高	技术复杂,毒性和副作用增加
第四代	具有额外的细胞内结构域,用于调节细胞因子或其他共刺激分子的表达	具有更强的抗肿瘤活性	技术难度大,毒性和副作用增加

1.3 抑制性受体持续高表达与 T 细胞衰竭相关

衰竭的 T 细胞表现出多种抑制性受体 (inhibitory receptor, IR) 过表达的特征, 相关 IR 如程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed death-1, PD-1)、淋巴细胞激活基因 3 (lymphocyte activation gene-3, LAG-3)、2B4 (CD244)、CD160、T 细胞免疫球蛋白黏蛋白 -3 (T-cell immunoglobulin mucin-3, TIM-3)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CTLA-4) 等。IR 通过以下 4 种不同的方式诱导 T 细胞衰竭: ①抑制激活受体的细胞内信号, ②上调 T 细胞衰竭相关基因, ③影响 T 细胞的代谢, ④阻止共刺激信号^[9]。在慢性感染和癌症中, 由于抗原持续存在, 多个 IR 表现出持续高表达的状态, 这是耗尽的 CD8⁺T 细胞的生物标志之一。IR 在多种免疫细胞表面被发现, 它们与配体结合后, 通过多种分子机制负向调节免疫细胞的功能, 其中 PD-1 和 CTLA-4 与 CD8⁺T 细胞衰竭的关系最为密切^[10]。PD-1 主要表达于活化的 T 细胞、B 淋巴细胞、树突状细胞 (dendritic cell, DC)、自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK 细胞) 和调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg)。在活化的 T 细胞表面, 外周抗原被 T 细胞识别后, PD-1 表达上调; 外周 T 细胞受体 (T-cell receptor, TCR) 识别肿瘤抗原后, 程序性细胞死亡配体 1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 或 PD-L2 会结合 PD-1 并激活下游相关信号通路, 通过反馈抑制阻断 TCR 信号通路, 下调由 B 细胞淋巴瘤 -2 样蛋白 1 (B-cell lymphoma-2-like 1, BCL2L1) 编码的 B 细胞淋巴瘤 - 超大蛋白 (B-cell lymphoma-extra-large, Bcl-xL) 等特异性抗凋亡蛋白分子和促炎因子的表达, 最终抑制 T 细胞的存活、增殖和免疫功能^[11]。CTLA-4 在衰竭 T 细胞 (exhausted T cell, Tex)、活化 T 细胞和 Treg 中高度表达, CTLA-4 和 CD28 都是免疫球蛋白超家族成员 (immunoglobulin superfamily, IgSF), CTLA-4 对 B7-1/2 具有较高的亲和力, CTLA-4 与 CD28 竞争结合 B7-1/2, CD28 与 B7-1/2 结合可促进 T 细胞增殖和激活, 而 CTLA-4 与 B7-1/2 结合则阻止早期 T 细胞激活^[12]。

1.4 抗原持续暴露导致 T 细胞衰竭

在慢性感染或癌症中, T 细胞在相关高水平抗原的慢性刺激下会依次分化至终末衰竭, Tex 可表现为 IR 的持续表达 (如 PD-1、LAG-3、2B4 和 CTLA-4 的持续表达), 产生效应细胞因子如 IFN- γ 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 的

能力减弱, 以及 T 细胞增殖能力的降低^[13]。在人和小鼠模型中, T 细胞耗竭的程度与抗原刺激的持续时间呈正相关。一项关于 CD8⁺T 细胞衰竭的研究显示, T 细胞与抗原短时间孵育后, 部分 Tex 可以恢复功能, 但长期孵育则无法恢复 Tex 的功能^[9]。例如符合 CAR-T 细胞治疗条件的患者通常患有复发 / 难治性疾病, 由于广泛的癌症病史, 患者的 T 细胞暴露于慢性肿瘤抗原以及多种化学治疗药物, 据报道, 白血病诱导的 T 细胞功能障碍导致自体 CAR-T 细胞的效果不理想。与健康个体产生的 CAR-T 细胞相比, 这些 CAR-T 细胞清除肿瘤的效果较差^[14]。因此 CAR-T 细胞的衰竭与长期暴露于抗原有密切关系。

1.5 肿瘤微环境影响 CAR-T 细胞的衰竭

肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 包括肿瘤细胞、免疫细胞和基质细胞等多种细胞以及可溶性因子如细胞因子、代谢物和细胞外囊泡 (extracellular vesicle, EV)^[15]。TME 复杂的成分对 CAR-T 细胞发挥了复杂的调节作用。在 TME 中, 存在多种机制阻碍 CAR-T 细胞的治疗效果, 包括代谢燃料的竞争、CAR-T 细胞耗竭机制、物理障碍阻止有效 CAR-T 细胞浸润、免疫抑制细胞因子和细胞类型。TME 不仅阻碍 CAR-T 细胞运输到作用位点, 影响 CAR-T 细胞的代谢功能, 还产生导致 T 细胞衰竭的免疫抑制环境^[16]。TME 中的强抗炎信号, 如细胞因子 IL-10 和转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β), 诱导巨噬细胞和 DC 向免疫抑制活性极化, 从而抑制 CAR-T 细胞功能; Treg、髓源性抑制细胞和癌症相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAF) 也有助于拮抗 CAR-T 细胞, 最终导致恶劣的微环境使得 CAR-T 细胞衰竭和失活^[1]。IL-10 由癌细胞和多种免疫细胞 (Treg、DC、B 细胞、单核 / 巨噬细胞等) 分泌, IL-10 对其他效应免疫细胞有抑制作用, 包括有效的抗肿瘤细胞毒性 NK 细胞和 CD8⁺T 细胞^[17]。TGF- β 由许多肿瘤细胞分泌, 调节 TME 中多种类型的免疫细胞, 包括 T 细胞、NK 细胞和巨噬细胞; 典型的 TGF- β 信号通路 SMAD 既控制肿瘤转移, 又控制免疫调节从而调节肿瘤免疫。TGF- β 在 TME 中的主要作用之一是产生调节性 T 细胞, 从而抑制抗肿瘤免疫^[18]。例如 TGF- β 下游激活的 SMAD2/3 诱导瘤内 CD8⁺T 细胞上 PD-1 的表达, 导致胃癌患者的 CD8⁺T 细胞功能障碍、衰竭和肿瘤生长增加^[19]。

1.6 转录因子的表达影响 CAR-T 细胞的耗竭

Tex 的转录谱与效应 T 细胞和记忆 T 细胞明显不同, 多种转录因子包括干扰素调节因子 4 (interferon regulatory factor 4, IRF4)、碱性亮氨酸拉链 ATF 样转录因子 (basic leucine zipper ATF-like transcription factor, BATF)、活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cell, NFAT)、核受体亚家族 4A 组 (nuclear receptor subfamily 4 group A, NR4A)、胸腺细胞选择相关高迁移率组蛋白 (thymocyte selection-associated high mobility group box protein, TOX)、T 细胞因子 -1 (T-cell factor 1, TCF-1)、T 细胞中表达的 T-box (T-box expressed in T cells, T-bet)、EOMES 和 B 细胞诱导成熟蛋白 1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1, BLIMP1) 等构成复杂的调控网络, 参与 T 细胞耗竭的过程^[20-21]。特别是 IRF4、BATF、NR4A1 等在 T 细胞抗原受体 (T-cell receptor, TCR) 信号下游发挥作用, 参与 T 细胞衰竭状态的形成, 并且这些转录因子大多参与包括 PD-1 在内的多种 IR 的表达, 从而限制效应因子的功能^[21]。研究表明, 在 LCMV 感染中, 衰竭细胞比记忆 T 细胞具有更高的核 EOMES : T-bet 比率, 因此可以使用 T 细胞中 T-bet 和 EOMES 的相对水平来定义衰竭^[22]。多种转录因子参与了 CAR-T 细胞衰竭的调控网络, 调节转录因子可以抑制 CAR-T 细胞的衰竭。

2 抑制 CAR-T 细胞衰竭的调控策略

2.1 优化 CAR-T 细胞结构

CAR-T 细胞的结构与其功能特性密切相关, 包括 scFv 分子、CM 和细胞内信号传导结构域在内的组成元件都对激活和耗竭具有调控作用, 通过优化 CAR 的结构和调控其表达模式, 可以有效地减弱强直性 CAR 信号, 防止 CAR-T 细胞衰竭^[23]。例如, 有研究者设计了带有短或长 scFv 连接体的 CD22 CAR 和 CD33 CAR, 发现短 scFv 连接体 (CART22-short 或 CART33-short) 具有优异的细胞毒性, 分泌更多的 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α , 导致衰竭相关表面蛋白的表达降低, 具有显著的抗白血病活性, 提高了动物的存活率, 因此 CD22 CAR 和 CD33 CAR 提高了 CAR-T 细胞在体内的作用时间^[24]。CD28 和 4-1BB 是两种最常见的共刺激分子,

它们与 CAR-T 细胞中的抗原识别结构域相连; 与含有 CD28/CD3 的 CAR-T 细胞相比, 含有共刺激分子 4-1BB/CD3 的 CAR-T 细胞可以延长存活时间, 减少衰竭, 并具有更好的分化表型^[9]。在第二代 CAR 的结构中加入了可以调节细胞因子 (如 IL-12、IL-18、IL-21、IL-23) 表达的结构域, 这些细胞因子的表达通过改善 TME 或促进记忆性 T 细胞的生成来增加 CAR-T 细胞在体内的持久性^[3]。

2.2 改进 CAR-T 细胞体外扩增技术

CAR-T 细胞在体外扩增是治疗的一个关键步骤, 这一过程会影响 CAR-T 细胞的衰竭。为了改进体外扩增技术, 研究人员进行了多项创新, 例如 CAR-T 细胞扩增期间抑制从头甲基化可以阻断异常 DNA 甲基化 (DNA methylation, DNAm), 从而提高治疗效果。Salz 等^[25]的研究结果证实了这些有害的 DNAm 变化是在培养扩增过程中不断获得的, 通过缩短培养期以避免功能失调的甲基化程序可能是提高过继细胞疗法的有前景的制造策略。

此外, CAR 的强直信号传导, 即在无肿瘤抗原刺激的情况下自发的 CAR 激活被认为是控制 CAR-T 疗效的关键, 如 Chen 等^[26]的研究提出了一个 CAR-T 功能适应度和 CAR 强直信号强度之间的关联模型, 该模型由 CAR 抗原结合域表面的带正电荷贴片 (positively charged patch, PCP) 控制; 在这个模型中, 低效率的强直信号导致 CAR-T 缺乏持久性, 而过度的强直信号导致 CAR-T 耗竭, 因此通过在 CAR 设计中修改 PCP 或在离体培养过程中调整离子浓度来微调强直信号, 可以获得最佳的 CAR-T 细胞适应性; 合理调整 PCP 以优化 CAR-T 细胞的强直信号和体内适应性是下一代 CAR 的一种有前景的设计策略。

2.3 阻断免疫检查点的应用

免疫检查点阻断在肿瘤免疫治疗中对防止 T 细胞衰竭起着重要作用。靶向免疫检查点可有效缓解 T 细胞衰竭, 阻断 PD-1 及其配体 PD-L1 与 CTLA-4 可显著提高 T 细胞的杀伤功能, 免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 单克隆抗体已被美国食品药品监督管理局批准用于临床^[20]。Chong 等^[27]的研究显示, 在靶向 CD19 的 CAR-T 细胞 (chimeric antigen receptor T-cell targeting CD19, CD19 CAR-T 细胞) 治疗后难治性和 (或) 复发的 B 细胞淋巴瘤患者中, 使用 PD-1 抑制剂派姆单

抗的患者有 25% 实现了完全缓解或部分缓解。使用飞行时间质谱细胞技术 (mass cytometry by time of flight, CyTOF) 的深度免疫分析显示, 临床应答者的 CAR-T 细胞活化和增殖增加, T 细胞耗竭减少, 这表明 PD-1 抑制剂在改善 T 细胞衰竭和增强 CD19 CAR-T 细胞疗效方面具有一定的作用。此外, 利用 CRISPR-Cas9 技术 [一种高效、精准的基因编辑工具, 该系统由 CRISPR 相关蛋白 Cas9 和单导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 组成] 破坏 CAR-T 细胞中的 IR 可显著增强其对免疫抑制性 TME 的抗性, 这是一种很有前景的癌症免疫治疗方式。研究表明, CAR-T 细胞中 CRISPR-Cas9 对免疫检查点的破坏, 如 PD-1 破坏的表皮生长因子受体 III 型突变体嵌合抗原受体 (epidermal growth factor receptor variant III -chimeric antigen receptor, EGFRv III -CAR) -T 细胞在胶质母细胞瘤中表现出增强的细胞毒性和衰竭减少^[28-29]。Agarwal 等^[30] 的研究发现, 在临床前白血病和骨髓瘤模型中, CRISPR-Cas9 介导的 CTLA-4 缺失可改善 CAR-T 细胞增殖和抗肿瘤疗效, CTLA-4 缺陷允许在高抗原负荷条件下无对抗 CD28 信号传导和维持 T 细胞表面的 CAR 表达; 在临床研究中, CTLA-4 的缺失挽救了之前 CAR-T 细胞治疗失败的白血病患者的 T 细胞功能, 因此选择性删除 CTLA-4 可以激活功能失调的慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) 患者的 T 细胞, 为提高患者对 CAR-T 细胞治疗的反应提供了一种策略。这些研究强调了免疫检查点阻断在 CAR-T 细胞治疗中的重要性, 并指出了通过基因编辑技术改善 CAR-T 细胞衰竭的新途径。

2.4 克服肿瘤微环境的免疫抑制提高 CAR-T 细胞疗效

TME 中的可溶性免疫抑制因子 [如腺苷、吲哚胺 2, 3-双加氧酶 1 (indoleamine 2, 3-dioxygenase 1, IDO1)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和 TGF- β]、免疫抑制非肿瘤细胞 [如髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSC)、肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM)、基质细胞] 和胶原蛋白可促进 T 细胞的衰竭^[9]。近年来, 为了克服复杂的 TME 以提高 CAR-T 细胞疗效, 研究者们开发了多种新策略。例如 Li 等^[31] 的研究发现, 腺苷 A2A 受体 (A2A receptor, A2AR) 和腺苷 A2B 受体 (A2B receptor, A2BR) 在人源性 CAR-T 细胞中

表达上调, 并且只有 A2AR 对腺苷诱导的 CART 细胞功能损伤负责; 在体外用 CRISPR-Cas9 破坏人 CAR-T 细胞中的 A2AR 基因, 可以增加 CAR-T 细胞的抗肿瘤功能并阻止其衰竭。Chen 等^[32] 设计了 CAR-T 细胞, 使其分泌双特异性陷阱蛋白, 共同靶向 PD-1 和 TGF- β , 这种改造的 CAR-T 细胞能够减弱抑制性 T 细胞信号, 增强 T 细胞的持久性和扩张性, 提高效应细胞功能和抗衰竭能力。Liu 等^[33] 研究了成纤维细胞活化蛋白 (fibroblast activation protein, FAP) 靶向 CAR-T 细胞, 发现其可以通过重塑 TME 来增加序贯 CAR-T 治疗的抗肿瘤活性。FAP 靶向 CAR-T 细胞清除 CAF, 减少了 MDSC 的募集、分化和免疫抑制作用, 改善了现有的 CD8⁺ T 细胞。此外, FAP 靶向 CAR-T 细胞还能抑制肿瘤部位的 MDSC, 并促进 CLDN18.2 靶向 CAR-T 细胞的浸润和存活。

2.5 CAR-T 细胞衰竭的转录调控

在 CAR-T 细胞衰竭的调控网络中, 多种转录因子扮演着关键角色。在连续的 TCR 信号传导作用下, Tex 细胞经历了从前体 Tex (precursor Tex cells, Tpex) 细胞到过渡性 Tex 细胞, 最终到终末 Tex (terminal Tex cells, Tex^{term}) 细胞的层次分化轨迹。在这个过程中, 关键转录因子如 TCF-1、TOX 和 T-box 家族成员 (T-bet、Eomes) 轮流调节不同 Tex 簇的衰竭程序^[34]。Zheng 等^[35] 的研究利用免疫功能正常的 B 细胞急性淋巴细胞白血病 (B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) 小鼠模型证明, 调节性核糖核酸酶 1 (Regnase-1) 缺乏会促进 TCF-1 表达, 从而增强 CAR-T 细胞的扩增和记忆样细胞的形成, 改善 CAR-T 介导的肿瘤清除, 并持续缓解和对继发性肿瘤攻击的保护。由于 Regnase-1 直接靶向转录因子 7 (transcription factor 7, Tcf7) 信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 其缺乏会增加 TCF-1 的表达, 促进 Tpex 的形成, 支持 CAR-T 细胞的长期持久性和功能。Seo 等^[36] 利用 CAR-T 细胞模型发现, TOX 和胸腺细胞选择相关高迁移率组蛋白 2 (thymocyte selection-associated high mobility group box protein 2, TOX2) 在 CD8⁺ CAR⁺ PD-1^{high} TIM3^{high} (耗尽) 的肿瘤浸润淋巴细胞 (chimeric antigen receptor-tumor infiltrating lymphocytes, CAR-TILs) 中被高度诱导, 并且 TOX 和 TOX2 双缺位 (TOX double-knock out, TOX DKO) 的 CAR-TILs 在抑制肿瘤生长和延长肿瘤小鼠生存方面比野生型 (wild-type, WT)、TOX 缺

位或 TOX2 缺位的 CAR-TILs 更有效。该研究表明 TOX 和 NR4A 转录因子对 NFAT 下游 CD8⁺T 细胞衰竭的转录程序至关重要,提示破坏 TOX 和 NR4A 的表达或活性有希望作为癌症免疫治疗的策略。

2.6 CAR-T 细胞衰竭的表观遗传调控

CAR-T 细胞的表观遗传重塑被认为是提升其疗效的一种潜在手段,它可能通过减少耗竭、改善运输和穿透能力、促进记忆表型来实现这一目标,从而增强 CAR-T 细胞持久性和改善患者预后^[37]。本文重点关注表观遗传调控对 T 细胞衰竭的影响。Zebley 等^[38]对复发/难治性 B 细胞急性淋巴细胞白血病患者输注后的 CD8⁺CD19-CAR-T 细胞进行了纵向全基因组 DNA 甲基化分析,发现输注后的 CAR-T 细胞表现为与记忆电位相关基因[如 Tcf7 和淋巴细胞增强因子 1 (lymphoid enhancer factor 1, LEF1)]的抑制以及 DNA 甲基化特征[如 C-X3-C 趋化因子受体 1 (C-X3-C chemokine receptor 1, CX3CR1)、BATF 和 TOX 的去甲基化],这些变化标志着其向衰竭祖 T 细胞的过渡,因此 CD19-CAR-T 细胞经历了与耗竭相关的 DNA 甲基化编程。从头 DNA 甲基化会促使 T 细胞衰竭,而甲基化抑制则会增强体内 T 细胞恢复活力。例如地西他滨是一种被批准用于临床的 DNA 甲基转移酶抑制剂,在体外和体内,地西他滨处理的嵌合抗原受体 (decitabine-treated chimeric antigen receptor, dCAR)-T 细胞的抗肿瘤活性、细胞因子的产生和增殖都得到了增强,此外,dCAR-T 细胞可以在低剂量下根除大体积肿瘤,且肿瘤浸润的 dCAR-T 细胞在体内保持相对较高的记忆相关基因表达和较低的衰竭相关基因表达^[39]。这些发现表明了表观遗传调控有可能在未来成为逆转 CAR-T 细胞衰竭的重要方法。

2.7 CAR-T 细胞衰竭的代谢调节策略

代谢在 T 细胞存活、激活、发育、增殖、分化和抗肿瘤效应功能中起着关键作用,通过体外代谢调节可以改善免疫功能和持久性,涉及的关键代谢途径包括糖酵解、氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS)、线粒体生物发生和脂肪酸氧化 (fatty acid oxidation, FAO)^[40]。目前,针对减少 CAR-T 细胞衰竭的代谢调节有很多新策略,例如 Renauer 等^[41]用多组学方法鉴定了腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase, ADA) 和丙酮酸脱氢酶激酶 1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)

作为人类原代 T 细胞和 CAR-T 细胞中的关键代谢酶,研究表明 ADA 的过表达能够改善不同供体来源的 CD19 特异性和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 特异性 CAR-T 细胞的功能,通过增强癌症溶解、CAR-T 细胞增殖、中枢记忆生成以及减少衰竭来评估。研究还显示,ADA 过表达在体内实体瘤模型中显著提高了 HER2 特异性 CAR-T 细胞的疗效。Lontos 等^[42]的研究发现了一种抗抑制的工程版过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1 α , PGC-1 α) 可以代谢重编程人类 CAR-T 细胞,PGC-1 α 转导的 CAR-T 细胞的转录组学分析表明,这种方法有效地诱导了线粒体生物发生,但也上调了与效应功能相关的程序;用这些细胞治疗患有实体瘤的免疫缺陷动物,大大提高了体内疗效;该研究数据进一步支持了代谢重编程在免疫调节治疗中的作用,并强调了 PGC-1 α 等基因作为有吸引力的候选基因,可与嵌合受体或 TCR 一起用于实体瘤的细胞治疗。

2.8 增加记忆 T 细胞比例提高 CAR-T 细胞的持久性

T 细胞有多种亚群,每个亚群都有不同的增殖潜能。初始 T 细胞 (naive T cell, TN)、干细胞记忆 T 细胞 (stem cell memory T cell, TSCM) 和中枢记忆 T 细胞 (central memory T cell, TCM) 相较于效应 T 细胞具有更高的增殖潜能,这些细胞比例的增加能够提高 CAR-T 细胞在体内的持久性^[43]。因此为了增强 CAR-T 细胞的持久性,研究者致力于提高记忆 T 细胞在 CAR-T 细胞中的比例。不同类型的细胞因子对免疫细胞有不同的激活作用,例如 IL-2 细胞因子倾向于激活 CD8⁺T 细胞增殖产生效应功能,而 IL-21 细胞因子则更倾向于激活具有中枢记忆表型的细胞,其在体内的持久性更强,抗肿瘤活性更高,因此在设计和临床应用工程细胞因子时,需要考虑它们对免疫细胞激活的偏好,以确定不同工程细胞因子的具体应用^[44]。

TSCM 样特性对 CAR-T 细胞治疗的成功至关重要,Kondo 等^[45]研究报道了 NOTCH/OP9 系统能有效地将传统的人类 CAR-T 细胞转化为 TSCM 样 CAR-T 细胞 (CAR-iTSCM 细胞),并且线粒体代谢重编程在这种转化中发挥了关键作用,NOTCH 信号在 iTSCM 形成过程中促进线粒体生物发生和脂肪酸合成,这对 iTSCM 细胞的特性至关重要;叉头框蛋白 M1 (Forkhead box M1, FOXM1) 被认为

是 NOTCH 的下游靶标, 负责这些代谢变化和随后的 iTSCM 分化; 与 NOTCH 诱导的 CAR-iTSCM 细胞一样, FOXM1 诱导的 CAR-iTSCM 细胞与常规 CAR-T 细胞相比具有更强的抗肿瘤潜能, 表明 NOTCH 或 FOXM1 驱动的 CAR-iTSCM 形成是改善癌症免疫治疗的有效策略。

3 结语与展望

本文探讨了 CAR-T 细胞衰竭的可能机制, 并概述了当前抑制 CAR-T 细胞衰竭的主要策略。期待未来可以设计出能够更有效地抵抗衰竭或靶向衰竭诱导因子的 CAR-T 细胞, 以此提高 CAR-T 细胞的抗肿瘤疗效。在致力于延缓 CAR-T 细胞衰竭的同时, 也需要关注 CAR-T 细胞疗法可能产生的毒副作用, 如细胞因子释放综合征和神经毒性等, 及时采取相应措施预防及治疗。

利益冲突声明: 本研究未受到企业、公司等第三方资助, 不存在潜在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] BROOKENS S K, POSEY A D. Chimeric antigen receptor T-cell therapy [J]. *Cancer J*, 2023, 29 (1): 28-33. DOI: 10.1097/ppo.0000000000000636.
- [2] KIM P S, AHMED R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection [J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22 (2): 223-230. DOI: 10.1016/j.coi.2010.02.005.
- [3] KONG Y, TANG L, YOU Y, et al. Analysis of causes for poor persistence of CAR-T cell therapy *in vivo* [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1063454. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1063454.
- [4] LÓPEZ-CANTILLO G, URUEÑA C, CAMACHO B A, et al. CAR-T cell performance: how to improve their persistence [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 878209. DOI: 10.3389/fimmu.2022.878209.
- [5] ZHENG Z, LI S, LIU M, et al. Fine-tuning through generations: advances in structure and production of CAR-T therapy [J]. *Cancers*, 2023, 15 (13): 3476. DOI: 10.3390/cancers15133476.
- [6] REDDY O L, STRONCEK D F, PANCH S R. Improving CAR T cell therapy by optimizing critical quality attributes [J]. *Semin Hematol*, 2020, 57 (2): 33-38. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2020.07.005.
- [7] LIU L, BI E, MA X, et al. Enhanced CAR-T activity against established tumors by polarizing human T cells to secrete interleukin-9 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 5902. DOI: 10.1038/s41467-020-19672-2.
- [8] CARUSO H G, TANAKA R, LIANG J, et al. Shortened *ex vivo* manufacturing time of EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor (CAR) T cells reduces immune exhaustion and enhances antiglioma therapeutic function [J]. *J Neurooncol*, 2019, 145 (3): 429-439. DOI: 10.1007/s11060-019-03311-y.
- [9] YIN X, HE L, GUO Z. T-cell exhaustion in CAR-T-cell therapy and strategies to overcome it [J]. *Immunology*, 2023, 169 (4): 400-411. DOI: 10.1111/imm.13642.
- [10] HUANG Y, JIA A, WANG Y, et al. CD8⁺T cell exhaustion in anti-tumour immunity: the new insights for cancer immunotherapy [J]. *Immunology*, 2023, 168 (1): 30-48. DOI: 10.1111/imm.13588.
- [11] GUTIC B, BOZANOVIC T, MANDIC A, et al. Programmed cell death-1 and its ligands: current knowledge and possibilities in immunotherapy [J]. *Clinics*, 2023, 78: 100177. DOI: 10.1016/j.clinsp.2023.100177.
- [12] SADRABADI A E, MASOUDNIA M, BAKHSHI H, et al. A comprehensive review on T cells, B cells, natural killer cells, and dendritic cells exhaustion: from main concepts to clinical use [J]. *Acta Med Iran*, 2023, 61 (2): 66-76. DOI: 10.18502/acta.v61i2.12530.
- [13] BULLIARD Y, ANDERSSON B S, BAYSAL M A, et al. Reprogramming T cell differentiation and exhaustion in CAR-T cell therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16 (1): 108. DOI: 10.1186/s13045-023-01504-7.
- [14] ZEBLEY C C, YOUNGBLOOD B. Mechanisms of T cell exhaustion guiding next-generation immunotherapy [J]. *Trends Cancer*, 2022, 8 (9): 726-734. DOI: 10.1016/j.trecan.2022.04.004.
- [15] ANDERSON N M, SIMON M C. The tumor microenvironment [J]. *Curr Biol*, 2020, 30 (16): R921-R925. DOI: 10.1016/j.cub.2020.06.081.
- [16] KANKEU FONKOUA L A, SIRPILLA O, SAKEMURA R, et al. CAR T cell therapy and the tumor microenvironment: current challenges and opportunities [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2022, 25: 69-77. DOI: 10.1016/j.omto.2022.03.009.
- [17] MIRLEKAR B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: its implications in cancer immunotherapy [J]. *SAGE Open Med*, 2022, 10: 20503121211069012. DOI: 10.1177/20503121211069012.
- [18] MARUYAMA T, CHEN W, SHIBATA H. TGF- β and cancer immunotherapy [J]. *Biol Pharm Bull*, 2022, 45 (2): 155-161. DOI: 10.1248/bpb.b21-00966.
- [19] SHEN Y, TENG Y, LV Y, et al. PD-1 does not mark tumor-infiltrating CD8⁺T cell dysfunction in human gastric cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8 (2): e000422. DOI: 10.1136/jitc-2019-000422.
- [20] CHI X, LUO S, YE P, et al. T-cell exhaustion and stemness in antitumor immunity: characteristics, mechanisms, and implications [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1104771. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1104771.
- [21] JENKINS E, WHITEHEAD T, FELLERMAYER M, et al. The current state and future of T-cell exhaustion research [J]. *Oxf*

- Open Immunol, 2023, 4 (1): iqad006. DOI: 10.1093/oxfimm/iqad006.
- [22] MCLANE L M, NGIOW S F, CHEN Z, et al. Role of nuclear localization in the regulation and function of T-bet and Eomes in exhausted CD8 T cells [J]. Cell Rep, 2021, 35 (6): 109120. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109120.
- [23] ZHU X, LI Q, ZHU X. Mechanisms of CAR T cell exhaustion and current counteraction strategies [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10 : 1034257. DOI: 10.3389/fcell.2022.1034257.
- [24] SINGH N, FREY N V, ENGELS B, et al. Antigen-independent activation enhances the efficacy of 4-1BB-costimulated CD22 CAR T cells [J]. Nat Med, 2021, 27 (5): 842-850. DOI: 10.1038/s41591-021-01326-5.
- [25] SALZ L, SEITZ A, SCHÄFER D, et al. Culture expansion of CAR T cells results in aberrant DNA methylation that is associated with adverse clinical outcome [J]. Leukemia, 2023, 37 (9): 1868-1878. DOI: 10.1038/s41375-023-01966-1.
- [26] CHEN J, QIU S, LI W, et al. Tuning charge density of chimeric antigen receptor optimizes tonic signaling and CAR-T cell fitness [J]. Cell Res, 2023, 33 (5): 341-354. DOI: 10.1038/s41422-023-00789-0.
- [27] CHONG E A, ALANIO C, SVOBODA J, et al. Pembrolizumab for B-cell lymphomas relapsing after or refractory to CD19-directed CAR T-cell therapy [J]. Blood, 2022, 139 (7): 1026-1038. DOI: 10.1182/blood.2021012634.
- [28] WEI W, CHEN Z N, WANG K. CRISPR/Cas9 : a powerful strategy to improve CAR-T cell persistence [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (15): 12317. DOI: 10.3390/ijms241512317.
- [29] NAKAZAWA T, NATSUME A, NISHIMURA F, et al. Effect of CRISPR/Cas9-mediated PD-1-disrupted primary human third-generation CAR-T cells targeting EGFRvIII on *in vitro* human glioblastoma cell growth [J]. Cells, 2020, 9 (4): 998. DOI: 10.3390/cells9040998.
- [30] AGARWAL S, AZNAR M A, RECH A J, et al. Deletion of the inhibitory co-receptor CTLA-4 enhances and invigorates chimeric antigen receptor T cells [J]. Immunity, 2023, 56 (10): 2388-2407.e9. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.09.001.
- [31] LI N, TANG N, CHENG C, et al. Improving the anti-solid tumor efficacy of CAR-T cells by inhibiting adenosine signaling pathway [J]. Oncoimmunology, 2020, 9 (1): 1824643. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1824643.
- [32] CHEN X, YANG S, LI S, et al. Secretion of bispecific protein of anti-PD-1 fused with TGF- β trap enhances antitumor efficacy of CAR-T cell therapy [J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 21 : 144-157. DOI: 10.1016/j.omto.2021.03.014.
- [33] LIU Y, SUN Y, WANG P, et al. FAP-targeted CAR-T suppresses MDSCs recruitment to improve the antitumor efficacy of claudin18.2-targeted CAR-T against pancreatic cancer [J]. J Transl Med, 2023, 21 (1): 255. DOI: 10.1186/s12967-023-04080-z.
- [34] TIAN W, QIN G, JIA M, et al. Hierarchical transcriptional network governing heterogeneous T cell exhaustion and its implications for immune checkpoint blockade [J]. Front Immunol, 2023, 14 : 1198551. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1198551.
- [35] ZHENG W, WEI J, ZEBLEY C C, et al. Regnase-1 suppresses TCF-1+ precursor exhausted T-cell formation to limit CAR-T-cell responses against ALL [J]. Blood, 2021, 138 (2): 122-135. DOI: 10.1182/blood.2020009309.
- [36] SEO H, CHEN J, GONZÁLEZ-AVALOS E, et al. TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8⁺T cell exhaustion [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116 (25): 12410-12415. DOI: 10.1073/pnas.1905675116.
- [37] ALVANOU M, LYSANDROU M, CHRISTOPHI P, et al. Empowering the potential of CAR-T cell immunotherapies by epigenetic reprogramming [J]. Cancers, 2023, 15 (7): 1935. DOI: 10.3390/cancers15071935.
- [38] ZEBLEY C C, BROWN C, MI T, et al. CD19-CAR T cells undergo exhaustion DNA methylation programming in patients with acute lymphoblastic leukemia [J]. Cell Rep, 2021, 37 (9): 110079. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.110079.
- [39] WANG Y, TONG C, DAI H, et al. Low-dose decitabine priming endows CAR T cells with enhanced and persistent antitumor potential via epigenetic reprogramming [J]. Nat Commun, 2021, 12 (1): 409. DOI: 10.1038/s41467-020-20696-x.
- [40] LI W, PAN X, CHEN L, et al. Cell metabolism-based optimization strategy of CAR-T cell function in cancer therapy [J]. Front Immunol, 2023, 14 : 1186383. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1186383.
- [41] RENAUER P, PARK J J, BAI M, et al. Immunogenetic metabolomics reveals key enzymes that modulate CAR T-cell metabolism and function [J]. Cancer Immunol Res, 2023, 11 (8): 1068-1084. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-22-0565.
- [42] LONTOS K, WANG Y, JOSHI S K, et al. Metabolic reprogramming via an engineered PGC-1 α improves human chimeric antigen receptor T-cell therapy against solid tumors [J]. J Immunother Cancer, 2023, 11 (3): e006522. DOI: 10.1136/jitc-2022-006522.
- [43] MCLELLAN A D, ALI HOSSEINI RAD S M. Chimeric antigen receptor T cell persistence and memory cell formation [J]. Immunol Cell Biol, 2019, 97 (7): 664-674. DOI: 10.1111/imcb.12254.
- [44] ZHOU Y, QUAN G, LIU Y, et al. The application of Interleukin-2 family cytokines in tumor immunotherapy research [J]. Front Immunol, 2023, 14 : 1090311. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1090311.
- [45] KONDO T, ANDO M, NAO N, et al. The NOTCH-FOXO1 axis plays a key role in mitochondrial biogenesis in the induction of human stem cell memory-like CAR-T cells [J]. Cancer Res, 2020, 80 (3): 471-483. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1196.

(责任编辑: 郑巧兰)