

·综述·

## 自然杀伤细胞在神经胶质瘤免疫治疗中的研究进展

孙士隆, 陈保东

(北京大学深圳医院神经外科, 广东 深圳 518063)

**摘要:** 自然杀伤(NK)细胞是T细胞后具有临床应用前景的另一类抗肿瘤免疫细胞。NK细胞的活性主要受其表面受体和免疫微环境的调控,胶质瘤较强的免疫抑制性肿瘤微环境使NK细胞免疫治疗效率较低。本综述从胶质瘤-NK细胞交互作用角度讨论NK细胞在脑胶质瘤免疫治疗中作用的最新研究进展,总结靶向NK细胞的化合物、单克隆抗体和细胞因子疗法,重点讨论了基因修饰的NK细胞在胶质瘤免疫治疗的现状及趋势,以及胶质瘤细胞的相关免疫逃逸分子机制,为基于NK细胞的免疫治疗神经胶质瘤提供理论依据和新的思路。

**关键词:** 神经胶质瘤;自然杀伤细胞;免疫治疗;临床试验

**中图分类号:** R739.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2023)03-0511-08

**DOI:** 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0320

### Research Progress of NK Cells in Immunotherapy of Glioma

SUN Shi-long, CHEN Bao-dong

(Department of Neurosurgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China)

Correspondence to: CHEN Bao-dong; E-mail: 623564186@qq.com

**Abstract:** Natural Killer (NK) cells are another type of anti-tumor immune cells with promising clinical application in addition to T cells. NK cell activity is mainly regulated by its surface receptors and immune microenvironment. The strong immunosuppressive microenvironment of glioma results in low efficiency of NK cell immunotherapy. This article reviews NK cells in the immunotherapy for glioma from the interaction of glioma-NK cell, and the latest research progress of targeted NK cells compounds, monoclonal antibody, and cytokine therapy, focusing on the genetic modification of NK cells in the present situation and trend of glioma immunotherapy, and molecular mechanism of glioma cells related to immune escape. We hope this article will provide theoretical basis and new ideas for NK cell-based immunotherapy of glioma.

**Key words:** glioma; natural killer cell; immunotherapy; clinical trial

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(3): 511-518]

中枢神经系统(CNS)最常见的原发性脑肿瘤是胶质细胞瘤,WHO根据其生物学行为将其分为1~4级。1~2级为低级别胶质瘤,3~4级为高级别胶质瘤,其中4级胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最具侵袭性,占有颅内肿瘤的15%~20%,约占所有成人胶质瘤的50%<sup>[1]</sup>。全球GBM的发病率约为每10万人中有10例,GBM的中位生存期为14.6

个月,其中1年、2年和5年的生存率分别估计为28.4%、11.5%和3.4%<sup>[2]</sup>。由于高级别胶质瘤常常复发,传统的治疗包括手术治疗,放疗或化疗往往不理想,GBM仍然是一个重大的公共卫生负担。

神经胶质瘤的免疫原性差、复杂及对免疫具有抑制作用的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)是治疗恶性脑胶质瘤的主要挑战,自然杀伤

收稿日期:2022-08-25

基金项目:国家自然科学基金(81772685),北京大学深圳医院院内基金(JCYJ2019001RC)

作者简介:孙士隆,硕士,住院医师,研究方向:中枢神经系统肿瘤临床与基础,E-mail: sunshilongky@126.com;陈保东,通信作者,主任医师,研究方向:中枢神经系统肿瘤临床与基础,E-mail: 623564186@qq.com

(natural killer, NK) 细胞是固有免疫细胞的重要组成部分,具有直接杀伤功能。NK 细胞表面表达多种活化型和抑制型受体,共同参与监视恶性病变细胞。因此,胶质瘤细胞表达 NK 细胞活化型和抑制型受体的配体数量和丰度影响 NK 细胞的激活程度<sup>[3]</sup>。此外,GBM 的微环境中存在大量免疫抑制因子抑制 NK 细胞免疫反应,增加 NK 细胞在胶质瘤的浸润程度、提高 NK 细胞活力成为靶向 NK 细胞免疫治疗的主要策略,目前,靶向肿瘤免疫微环境、靶向肿瘤细胞同时联合 NK 细胞治疗的研究显示出治疗肿瘤的潜力。在这里,我们回顾了 NK 细胞对神经胶质瘤免疫治疗的最新研究进展。

## 1 NK 细胞的功能

NK 细胞是一种先天淋巴细胞家族的成员,根据表面标志物 CD56 和 CD16 的相对表达情况,人 NK 细胞可分为两个不同的亚群:CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK 细胞和 CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK 细胞。CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK 细胞主要存在于淋巴结中,其功能为免疫调节作用,可以释放不同细胞因子,如干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ), 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 及粒-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 等,促进肿瘤细胞凋亡并且抑制其增殖。外周血液循环中的 CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK 细胞,可通过释放颗粒酶和穿孔素杀伤感染细胞及癌变细胞。此外,CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK 细胞亚群通过表达 CD16 受体与肿瘤细胞相结合,介导抗体依赖的细胞毒性作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 发挥抗肿瘤效应<sup>[4]</sup>。NK 细胞能够在不预先激活的情况下快速识别恶变细胞并立刻做出反应,因此,NK 细胞构成了免疫系统抵御病毒和癌症的第一道防线<sup>[5]</sup>。

NK 细胞上表达一系列功能受体,主要可分为激活型 (activatory killer receptor, AKR) 和抑制型 (inhibitory killer receptor, IKR) 受体两大类,其中 AKR 包括 NK 细胞受体蛋白 1 (natural cell receptor protein 1, NKR-P1)、天然细胞毒受体 (natural cytotoxicity receptor, NCR) 和 NK2 组家族受体 D (natural-killer group 2 D, NKG2D) 等。NKp30 和 NKp46 是 NK 细胞上重要的 NCR。IKR 包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer cell immunoglobulin-like re-

ceptors, KIRs)、C 型凝集素抑制受体 CD94/NKG2A 等。KIR 及其配体 I 类主要组织相容性复合体 (MHC-I) 分子具有高度多态性,特殊的相互作用会影响一些疾病的发生率、进展和预后。此外,还发现了其他参与调节 NK 细胞毒性的非 MHC-I 类依赖的特异性抑制性受体,包括 T 细胞免疫球蛋白粘液素 3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3, TIM-3) 和 T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域 (T cell immunoglobulin and ITIM domains, TIGIT)、脊髓灰质炎病毒受体相关免疫球蛋白结构域包含蛋白 (poliovirus receptor related immunoglobulin domain-containing protein, PVRIG)、程序性死亡受体 1 (programmed death-1, PD-1) 等,TIGIT 能与 CD226 (DNAX accessory molecule-1, DNAM-1) 竞争结合配体 CD155 和 CD112, DNAM-1 是一种在 T 细胞和 NK 细胞上表达的共刺激分子,已经确定 PVRIG 和 TIGIT 是 DNAM 通路中关键的平行和互补的抑制通路。

NK 细胞通过活化受体和抑制受体与其相应配体的结合,不依赖于 MHC-I 类分子从而快速、直接地对靶细胞发挥抗病毒及抗肿瘤的作用。由于不表达 MHC-I 类肿瘤细胞可以逃避细胞毒 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocyte, CTL) 识别,而 NK 细胞主要依赖 NCR 和 NKG2D 发挥杀伤作用,因此,NK 细胞在肿瘤免疫中就变得至关重要。

## 2 神经胶质瘤微环境中的 NK 细胞及相互作用

### 2.1 神经胶质瘤对 NK 细胞功能的影响

神经胶质瘤被认为是淋巴细胞低浸润的免疫“冷肿瘤”,胶质瘤形成的微环境具有全身性和局部性抑制免疫反应的能力。正常细胞表面的 MHC-I 可以结合 NK 细胞表面的抑制性受体,从而控制 NK 细胞的杀伤功能,而中枢神经系统恶性肿瘤中过度表达 MHC-I,抑制了 NK 细胞的活性。大部分胶质瘤细胞高表达 MHC-I 分子,并与 KIRs 结合抑制了 NK 细胞的活性。NKG2D 是 NK 细胞非依赖 MHC-I 特异性激活受体,NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力取决于肿瘤细胞 NKG2D 配体的数量。脑胶质瘤细胞还可调节 NK 细胞表面的受体数量以抑制 NK 细胞的功能,弥漫性神经胶质瘤中产生异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase 1/2, IDH1/2)

基因突变后促进了许多免疫基因的表现遗传重编程,包括 NKG2D 配体数量的下调和对 NK 细胞介导的细胞毒裂解细胞能力的抵抗。有研究报道, IDH 突变型胶质瘤更容易发生突变是因为突变使自身的 NKG2D 配体失活,从而逃避 NK 细胞介导的免疫监视<sup>[6-7]</sup>。但另有研究发现,脑胶质瘤 IDH1-R132H 突变能够通过调控肿瘤免疫微环境,从而招募更多的 NK 细胞到肿瘤组织部位,改善患者预后<sup>[8]</sup>。

除了下调 NKG2D 配体使 NK 细胞受体失活,胶质瘤还可通过分泌细胞因子影响 NK 细胞的功能, GBM 中的胶质瘤干细胞 (glioma stem cells, GSCs) 能大量诱导和分泌 TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ), 使胶质瘤免疫微环境中的 NK 细胞功能受到明显的抑制<sup>[9]</sup>。GSCs 表达的  $\alpha$ v 整合素与 NK 细胞上的 CD9 和 CD103 之间的相互作用,从而诱导 GSCs 产生 TGF- $\beta$ , GSC 释放的 TGF- $\beta$  激活 NK 细胞上的相应受体 TGFBR2 (transforming growth factor beta receptor 2, TGFBR2), 从而阻断其抗肿瘤活性。将供体来源的 NK 细胞或同种异体的 NK 细胞与靶向  $\alpha$ v 整合素或 TGF- $\beta$  受体的抑制剂相结合可改善其抗肿瘤活性<sup>[10]</sup>。TGF- $\beta$  也可通过下调 NKG2D 表达抑制外周血 NK 细胞功能<sup>[11-12]</sup>。GBM 患者中常常存在淋巴细胞减少,因为脑胶质瘤常信号转导和转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 过度磷酸化可诱导多种可溶性免疫抑制因子进而抑制 CTL 的活性和增殖,其中包括白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、前列腺素 E-2 (prostaglandin E2, PGE-2)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和 TGF- $\beta$ <sup>[13]</sup>。此外,神经胶质瘤还可分泌碳水化合物结合蛋白、半乳糖凝集素 1 (galectin1) 等可溶性免疫抑制因子,降低淋巴细胞的活力。Galectin1 缺乏的胶质瘤更容易被 NK 细胞裂解,并在适应抗肿瘤免疫反应之前被 NK 细胞清除,抑制人脑胶质瘤的 Galectin-1 可以恢复 NK 细胞免疫监测能力,从而提高胶质瘤患者的生存率。胶质瘤细胞还能够上调吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO) 进而抑制抗肿瘤免疫。IDO 作为色氨酸代谢的关键限速酶,能够使色氨酸耗尽,并产生代谢产物犬尿氨酸,犬尿氨酸可灭活 NK 细胞并促进免疫抑制调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 的生成,从而参与肿瘤的免疫抑制。

与健康人相比,胶质瘤患者外周血中髓系来源

的抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 积聚增多<sup>[14-15]</sup>。MDSC 通过与巨噬细胞相互作用促进 IL-10 表达,同时抑制 IL-12 的分泌,诱导巨噬细胞向促肿瘤 M2 型转换。还有其他各种趋化因子和细胞因子,如 CX3CL1 和 CCL5 等通过募集胶质瘤相关巨噬细胞在 TME 中促进异常肿瘤血管生成<sup>[16-17]</sup>。另外肿瘤的绝对生存优势剥夺周围其他正常细胞的营养和氧气可能抑制 NK 细胞代谢和抗肿瘤活性<sup>[18]</sup>。

## 2.2 NK 细胞在神经胶质瘤免疫中的作用

NK 细胞的数量与神经胶质瘤预后相关,神经元能够通过产生趋化因子 CX3CL1 使 CX3CR1+ NK 细胞向大脑聚集<sup>[19]</sup>。在一项研究中发现,GBM 与乳腺癌或黑色素瘤相比, NK 细胞浸润肿瘤程度最高,这表明 NK 细胞在神经胶质瘤免疫监测中发挥着重要作用<sup>[20]</sup>。NK 细胞在脑膜瘤和转移性脑肿瘤中均有浸润<sup>[21]</sup>,并在体外实验中能够裂解 GBM 和髓母细胞瘤<sup>[22]</sup>。NK 细胞受体种类与数量与脑肿瘤的免疫监测强弱程度有关,在 GBM 中激活杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer cell immunoglobulin like receptor 2DS2, KIR2DS4) 的等位基因与控制巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 的基因表达相关,CMV 通过加强外周细胞的募集和促进肿瘤血管生成诱导血小板衍生生长因子 D (platelet derived growth factor D, PDGFD) 的表达进而增强 GBM 的生长<sup>[23]</sup>。而大多数 GBM 中 PDGFD 能够与活化的 NKp44 受体结合,以增强 NK 细胞的杀伤能力来控制肿瘤生长,提高 GBM 患者的存活率。人胶质瘤中高表达 B7-H6 (NKp30 配体),可能通过与 NKp30 特异性结合上调 IL-32 表达而诱导肿瘤发展。这些研究表明 NK 细胞对神经胶质瘤患者的预后有着显著影响。

NK 细胞是机体天然免疫的关键效应细胞,在 TME 的浸润程度可以作为肿瘤预后的可靠指标。基于生物信息学结果表明, NK 细胞活化基因表达水平高的胶质瘤患者的预后明显改善。低级别的胶质瘤较高级别胶质瘤相比,活化的 NK 细胞数量明显较多,这表明从低级别胶质瘤向高级别胶质瘤的转变过程中,活化的 NK 细胞数量是明显较少的<sup>[24]</sup>。另一项研究也表明,活化的 NK 细胞的数量与 GBM 患者的存活率之间有着显著关系<sup>[25]</sup>。因此, NK 细胞能够阻碍脑胶质瘤向恶性转化。NK 细胞能有效杀伤未分化的 GSCs, NK 细胞释放的 IFN- $\gamma$  能够促进 GSCs 分化并增强了其对化疗的敏感性,但降低了

对NK细胞细胞毒性的敏感性<sup>[26]</sup>。提示增强NK细胞对GSCs的杀伤性和促进NK细胞释放IFN- $\gamma$ 诱导GSCs分化将是靶向治疗的重要方向<sup>[27-28]</sup>。

### 3 NK细胞在神经胶质瘤治疗中的应用

#### 3.1 激活NK细胞治疗

中枢神经系统肿瘤通常免疫原性差,免疫抑制程度高,因此免疫治疗的效果差。NK细胞的细胞活性是由抑制型受体还是激活型受体占优势决定的。脑胶质瘤化疗药物以及分子靶向药物除了能够上调NK细胞激活型受体数量外,还能够促进NK细胞释放细胞因子或诱导NKG2D配体表达。替莫唑胺(temozolomide, TMZ)或放疗治疗能够使GBM患者胶质瘤组织NKG2D配体的表达增加,并且在动物实验中表明TMZ或放疗诱导的NKG2D配体表达增加延长了GBM小鼠模型的存活时间。激活DNA损伤修复反应(DNA damage repair, DDR)能诱导NKG2D配体生成以增强NK细胞抗肿瘤功能,蛋白酶体抑制剂硼替佐米(bortezomib, BTZ)通过激活DDR来诱导激活型受体NKG2D和DNAM-1的配体的表达,因此促进了NK细胞对GBM的杀伤力。在一项实验中有25%的实验动物,因为使用自体NK细胞和BTZ联合治疗显著抑制了肿瘤的生长从而延长了生存时间<sup>[27]</sup>。BTZ结合溶瘤病毒(oncolytic herpes simplex virus, OHSV)及NK细胞的三联疗法对于治疗GBM更加有效,BTZ增加了NK细胞激活受体DNAM-1表达,而OHSV感染能诱导NK细胞分泌IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ ,从而导致更多的肿瘤细胞死亡,并提高了裸鼠移植瘤的存活率。去甲基化合物地西他滨增加了NKG2D配体的表达从而恢复了NK细胞对IDH突变胶质瘤细胞的裂解能力<sup>[29]</sup>。组蛋白去乙酰化酶抑制剂毛霉菌素A诱导NKG2D配体的上调,促进NK细胞介导的GBM细胞的裂解<sup>[30]</sup>。

近年来发现既能识别肿瘤抗原又能结合Nkp46和CD16的三功能抗体,与传统针对肿瘤抗原的抗体相比,在体内外表现出更好的抗肿瘤作用<sup>[31]</sup>。MHC I类链相关基因A和B(MICA和MICB)编码的蛋白属于NKG2D配体,使用抗体防止肿瘤细胞表面MICA和MICB丢失,促进NKG2D与其配体之间的结合并抑制了肿瘤的生长,其抗肿瘤作用

主要是通过激活NKG2D和CD16实现<sup>[32]</sup>。KIRs能够识别肿瘤细胞上的MHC I类分子,抑制NK细胞活化进而促进肿瘤细胞生长。同种异体NK细胞的KIR受体无法识别受体患者的MHC I类分子,因此缺乏抑制NK细胞活化的信号,从而达到杀伤肿瘤细胞的目的。使用具有KIR2DS2免疫基因型的NK细胞可有效杀伤GBM并延长动物生存期。

#### 3.2 联合治疗

实体瘤免疫治疗效率较低的主要原因与TME的免疫抑制作用有关。目前,靶向肿瘤免疫微环境、靶向肿瘤细胞同时联合NK细胞治疗的研究显示出肿瘤治疗潜力。近年来研究表明,NK细胞联合单克隆抗体或化学药物治疗GBM,可显著改善动物的生存率。硫酸软骨素蛋白多糖4(chondroitin sulphate proteoglycan 4, CSPG4),也称为神经胶质抗原2(neuron-glia antigen 2, NG2),在细胞内的信号传递中起着重要作用,可以激活细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、局部粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)等细胞内的信号传递,这些信号传递与肿瘤的生长和转移密切相关。有研究证明将活化的NK细胞与靶向NG2的单克隆抗体(mAb9.2.27)相结合,可抑制肿瘤生长并延长GBM大鼠的存活时间。针对GBM抗原的研究表明,NK细胞是通过IFN- $\gamma$ 分泌而不是细胞毒作用来调节GBM的促炎环境。NK细胞和mAb9.2.27联合治疗大鼠GBM的原理是能将胶质瘤相关巨噬细胞由抗炎M2型向促炎M1型转化,受到治疗的大鼠脑脊液中IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ 水平显著增加,而免疫抑制细胞因子IL-10、IL-6和IL-1 $\beta$ 显著减少。癌症佐剂能够增强抗肿瘤免疫反应,含有未甲基化胞嘧啶-鸟苷基序的寡核苷酸(CpG oligonucleotide, CpG-ODN),可模拟病原体相关分子模式(PAMPs),诱导浆细胞样树突状细胞(PDCs)产生I型干扰素(IFN-I),IFN-I能够增强NK细胞抗肿瘤功能。尽管CpG-ODN治疗在体外实验取得了令人鼓舞的结果,但对原发性和复发性胶质瘤患者的体内研究结果显示,单独使用CpG-ODN的治疗并没有明显的治疗效果。研究表明了在反复低剂量给予CpG-ODN的小鼠脑胶质瘤模型中,NK细胞是主要的抗肿瘤效应细胞,肿瘤浸润性NK细胞仍然容易受到局部和全身抑制,需要更有效的方法去增强脑TME中NK细胞的功能,因此,使用CpG-ODN和Treg消除的联合治疗能加强NK细胞对脑胶质瘤的杀伤作用。

恶性神经胶质瘤诱导生成的人类白细胞抗原(HLA-E)和凝集素样转录物1(lectin-like transcript 1, LLT1),分别与CD94/NKG2A和CD161结合使NK细胞的功能受到抑制。用小干扰RNA或封闭抗体阻断HLA-E; CD94/NKG2A或LLT1: CD161可促进NK细胞对胶质瘤细胞的裂解。人源化的抗NKG2A抗体“莫纳利珠单抗(monalizumab)”与抗表皮生长因子受体(EGFR)的“西妥昔单抗”的联合治疗,能有效地促进被西妥昔单抗对头颈部鳞状细胞癌的抗体依赖性细胞毒(ADCC)<sup>[33]</sup>。EGFR是包括胶质瘤在内的各种肿瘤类型治疗的主要靶点,提示monalizumab阻断NKG2A有可能增强NK细胞介导的针对神经胶质瘤的ADCC,特别是对TMZ耐药的胶质瘤<sup>[34]</sup>。

抗PD-1和抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)联合疗法治疗,增加了NK细胞和CD8+T细胞在CNS的浸润,并提高了GBM小鼠模型的存活率。血脑屏障(BBB)是一种选择性渗透膜,它能阻碍有害物质进入脑实质,但也会阻碍免疫治疗药物和免疫细胞进入脑实质。聚( $\beta$ -L-苹果酸)与抗PD-1或抗CTLA-4的抗体共价结合促进了跨BBB转运,提升了颅内接种GL261小鼠中的NK细胞浸润率和小鼠的生存时间<sup>[35]</sup>。将这些技术方法与溶瘤细胞潜能的NK细胞相结合,可能有助于克服BBB的选择透过性的局限和脑TME的免疫抑制性<sup>[36]</sup>。

### 3.3 基因修饰的NK细胞

嵌合抗原受体(chimeric antigen receptors, CARs)是以肿瘤特异性抗体单链可变区(scFv)取代TCR的 $\alpha$ 、 $\beta$ 链可变区,通过跨膜连接区与T细胞或NK细胞受体的CD3 $\zeta$ 信号链融合,可分别转导自体细胞毒性T淋巴细胞(CAR-T)或NK细胞(CAR-NK),可通过scFv识别肿瘤特异性抗原,从而特异性杀伤肿瘤细胞。基于NKG2D的CAR-T细胞的过继转输与放疗相结合,在GL261原位胶质瘤小鼠模型中显示出治疗协同作用,接种GL261小鼠肿瘤内注射CAR-T细胞比静脉注射CAR-T细胞的小鼠存活率更高,表明静脉注射CAR-T细胞进入脑实质的数量较少。CAR-T在体内持续扩增容易导致细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS),并会引起的移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD),对患者生命造成严重影响。CAR-NK细胞避免了CAR-T的上述缺点,因为CAR-NK疗法能靶向各种肿瘤抗原,包括表皮生长因子受体(EGFR)、酪氨酸激酶受体2(HER2,

也称ErbB2)等,经过设计的CAR-NK能够靶向肿瘤抗原,同时还保留了天然细胞毒性的能力。

40%至60%的GBM存在EGFR基因扩增和EGFR蛋白过表达,而在正常脑组织中不表达或仅极少表达。GBM通常共同表达EGFR和EGFR III型突变体(EGFRv III),根据不同的靶点,可以制备不同CAR-NK特异性靶向GBM的EGFR和EGFRv III<sup>[37]</sup>。有研究证实,CAR-NK-92细胞(高表达NK细胞活化受体)有效抑制了接种EGFR-或EGFRv III-过表达的异种移植胶质瘤的生长,通过对携带表达EGFR或EGFRv III的GBM异种移植的免疫抑制小鼠(NSG小鼠)颅内反复注射CAR-NK-92细胞(高表达NK细胞活化受体)进行治疗,与对照组仅使用NK-92治疗相比,显著抑制了肿瘤的生长并提高了动物的总体存活率<sup>[38]</sup>。HER2作为EGFR家族一员,在健康成人中枢神经系统中不表达,但在80%的GBM中表达,并且与低生存率相关。针对表达EGFR/EGFRv III和HER2肿瘤抗原的CAR-NK细胞在体外对原发性GBM肿瘤细胞和细胞系显示出强大的细胞毒作用<sup>[39]</sup>。将特异性靶向HER2的NK细胞注射至异种移植GBM细胞的NSG小鼠模型中,结果显示其有效的抑制了肿瘤的进展,使生存期得以延长,HER2-NK-92/CAR-NK将在潜在抗原丢失的情况下仍发挥杀伤肿瘤作用,保持正常NK细胞的细胞毒功能。GSCs对同种异体的NK细胞敏感,特异性靶向HER2CAR NK-92细胞能够裂解HER2+的GSCs,但在长期作用后,靶细胞也被缺乏CAR的亲代NK-92细胞消除。溶瘤病毒(OV)具有双重溶瘤作用,既能直接攻击癌细胞,又能激发肿瘤特异性免疫反应。将EGFR-CAR-NK细胞和高表达人IL15/IL15R $\alpha$  sushi结构域融合蛋白的溶瘤病毒(OV-IL15C)联合治疗GBM小鼠,联合治疗组胶质瘤组织中NK细胞和CD8+T细胞浸润、激活程度明显高于单独治疗组,并且联合治疗的效果也明显较高,小鼠生存期明显延长<sup>[40]</sup>。因此,CAR-NK细胞的激活由CAR信号和NK细胞自身信号整合决定。

### 3.4 NK细胞治疗胶质瘤的技术瓶颈以及未来方向

NK细胞为基础的癌症过继免疫治疗是一个快速发展的领域,如识别和有效阻断NK细胞免疫检查点,以及使用双特异性杀伤细胞接合物或通过CAR装载对NK细胞肿瘤特异性溶解能力的重新定向,有望使实体肿瘤患者受益。原代NK细胞转基因效率仅约15%,NK细胞转基因效率是CAR-NK

应用的主要技术瓶颈。如何有效提高NK细胞转基因效率,是CAR-NK细胞疗法的重要研究方向。目前,CAR-NK细胞已经进入了治疗恶性胶质瘤的临床试验。除了正在进行的关于工程化的CAR-NK-92细胞的研究,其他异体来源的外周血或脐血NK细胞,或从诱导多能干细胞分化的NK细胞,也即将进入脑肿瘤临床试验。然而,GBM强大的适应性,使其能逃避免疫攻击,克服GBM免疫抑制的同时,因CAR靶向抗原异质性表达引起免疫逃逸仍然是重要挑战。HER2-CAR-T治疗GBM已经显示出这些细胞被转移到肿瘤中,但是在TME中高效能功能的T细胞导致抗原丢失变体的快速选择<sup>[41]</sup>。CAR-NK细胞也可能遇到类似的问题。然而,NK细胞自然表现出广泛的细胞毒作用,其激活受体与肿瘤细胞表达的各种配体相互作用,例如自然细胞毒性受体(NKp46、NKp44和NKp30)、NKG2D和DNAM-1(CD226)。这些NK细胞受体通常识别在免疫细胞或长期治疗压力下肿瘤细胞上表达的应激诱导配体。因此,CAR-NK细胞可通过CAR依赖和NK细胞受体依赖性途径抑制胶质瘤细胞,这样有利于清除低表达或不表达CAR靶向抗原的GBM细胞。HER2-NK-92/5.28z CAR-NK将在潜在抗原丢失的情况下保持效应器功能,从而使过继转移细胞的细胞毒功能恢复到基线NK细胞的细胞毒功能。目前HER2-CAR-NK治疗正在一项进行GBM治疗的临床试验(CAR2BRAIN; NCT0338978)中。

与CAR-T细胞相比,CAR-NK细胞寿命较短和在体内有限的扩增,因此在治疗上更高的安全性,但也限制了它们的长期有效性,需要反复治疗才有效果。IL-15等促炎细胞因子和CAR的异位表达不仅可以增加CAR-NK细胞本身的持久性,而且还促进T细胞的渗透和激活。通过诱导内源性免疫记忆的方法已成为CAR-NK细胞免疫激活治疗GBM的基础<sup>[42]</sup>。在GBM患者中,过继NK细胞转输与传统放射治疗、免疫检查点抑制剂、血管生成抑制剂或髓系细胞间调节剂之间的合理结合,

通过调节TME中固有免疫细胞和获得性免疫细胞的功能,可能是充分发挥CAR-NK细胞对GBM的细胞毒作用的有效策略<sup>[43-45]</sup>。

## 4 小结

NK细胞是机体的一线防御系统,在抵御癌细胞方面有重要的作用。胶质瘤中的NK细胞浸润与胶质瘤的预后有关,根据TCGA数据库的RNA测序数据分析,在低级别胶质瘤和GBM中NK细胞浸润得分高于T细胞<sup>[46]</sup>,但胶质瘤的微环境抑制了NK细胞导致NK细胞无法发挥正常的功能。输注到患者体内的NK细胞会再次被肿瘤细胞或者肿瘤相关单核/巨噬细胞释放的抑制信号诱导为功能障碍/缺陷的细胞,并迅速失去识别杀伤肿瘤的能力。到目前为止,对于GBM产生免疫治疗抵抗或肿瘤固有特性的了解还很少。因此,深入探寻体内(包括胶质瘤微环境中)NK细胞功能紊乱或机制,有利于寻找到逆转NK细胞功能紊乱新的办法。N6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine, m6A)修饰的失调与胶质瘤发生、发展和耐药密切相关<sup>[47-48]</sup>。研究发现,在m6A得分高的胰腺导管腺癌中,较高的m6A得分与T细胞衰竭和较低的NK细胞相关<sup>[49]</sup>,作为一个新兴领域,m6A修饰状态与胶质瘤免疫细胞浸润及NK细胞功能的关系尚不清。

从最新的数据来看,免疫治疗联合其他治疗手段可能是最终在GBM治疗取得突破的策略。因此,NK细胞与针对抗血管生成因子受体、EGFR突变、表观遗传学等分子靶向药物的联合治疗,均是未来治疗神经胶质瘤的方向。目前NK细胞的治疗大多处于动物实验阶段,在患者中的应用尚有一段距离,基于NK细胞的联合疗法有望在临床试验中得到进一步研究,并且有必要重新考虑评估免疫治疗方法的临床试验设计,以快速获得有关这些方法潜在临床影响的信息。我们相信基于NK细胞的免疫治疗在未来的胶质瘤治疗中将会有更好的表现。

## 参考文献

[1] Yang DX, Jing Y, Xu ZM, et al. Primary glioblastoma of cerebellopontine angle in adult mimicking acoustic neuroma[J]. World Neurosurg, 2019, 122: 48-52.

[2] Davis FG, Smith TR, Gittleman HR, et al. Glioblastoma incidence rate trends in Canada and the United States compared with England, 1995-2015 [J]. Neuro

- Oncol, 2020, 22(2): 301–302.
- [3] Pan C, Zhai Y, Li G, et al. NK cell-based immunotherapy and therapeutic perspective in gliomas [J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 751183.
- [4] Cubitt CC, McClain E, Becker-Hapak M, et al. A novel fusion protein scaffold 18/12/TxM activates the IL-12, IL-15, and IL-18 receptors to induce human memory-like natural killer cells [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2022, 24: 585–596.
- [5] Roma S, Carpen L, Raveane A, et al. The dual role of innate lymphoid and natural killer cells in cancer: from phenotype to single-cell transcriptomics, functions and clinical uses [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(20): 5042.
- [6] Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(10): 781–790.
- [7] Cho U, Yang SH, Yoo C. Estimation of the occurrence rates of IDH1 and IDH2 mutations in gliomas and the reconsideration of IDH-wildtype anaplastic astrocytomas: an institutional experience [J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(6): 3000605211019258.
- [8] Ren F, Zhao Q, Huang L, et al. The R132H mutation in IDH1 promotes the recruitment of NK cells through CX3CL1/CX3CR1 chemotaxis and is correlated with a better prognosis in gliomas [J]. *Immunol Cell Biol*, 2019, 97(5): 457–469.
- [9] Gonzalez-Junca A, Driscoll KE, Pellicciotta I, et al. Autocrine TGFbeta is a survival factor for monocytes and drives immunosuppressive lineage commitment [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(2): 306–320.
- [10] Shaim H, Shanley M, Basar R, et al. Targeting the alphav integrin/TGF-beta axis improves natural killer cell function against glioblastoma stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(14): e142116.
- [11] Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 4120–4125.
- [12] Close HJ, Stead LF, Nsengimana J, et al. Expression profiling of single cells and patient cohorts identifies multiple immunosuppressive pathways and an altered NK cell phenotype in glioblastoma [J]. *Clin Exp Immunol*, 2020, 200(1): 33–44.
- [13] Wei J, Barr J, Kong LY, et al. Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(1): 67–78.
- [14] Raychaudhuri B, Rayman P, Ireland J, et al. Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2011, 13(6): 591–599.
- [15] Rodrigues JC, Gonzalez GC, Zhang L, et al. Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties [J]. *Neuro Oncol*, 2010, 12(4): 351–365.
- [16] Laudati E, Curro D, Navarra P, et al. Blockade of CCR5 receptor prevents M2 microglia phenotype in a microglia-glioma paradigm [J]. *Neurochem Int*, 2017, 108: 100–108.
- [17] Held-Feindt J, Hattermann K, Muerkoster SS, et al. CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs) [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(9): 1553–1566.
- [18] O'Brien KL, Finlay DK. Immunometabolism and natural killer cell responses [J]. *Nature Rev Immunol*, 2019, 19(5): 282–290.
- [19] Dekker LJM, Verheul C, Wensveen N, et al. Effects of the IDH1 R132H mutation on the energy metabolism: a comparison between tissue and corresponding primary glioma cell cultures [J]. *ACS Omega*, 2022, 7(4): 3568–3578.
- [20] Holl EK, Frazier VN, Landa K, et al. Examining peripheral and tumor cellular immunome in patients with cancer [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1767.
- [21] Griessmair L, Pirringer L, Mountford S, et al. Expression of IL-37 correlates with immune cell infiltrate and fibrosis in pediatric autoimmune liver diseases [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2022, 74(6): 742–749.
- [22] Sivori S, Parolini S, Marcenaro E, et al. Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines [J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 107(2): 220–225.
- [23] Krenzlin H, Behera P, Lorenz V, et al. Cytomegalovirus promotes murine glioblastoma growth via pericyte recruitment and angiogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(4): 1671–1683.
- [24] Lu J, Li H, Chen Z, et al. Identification of 3 subpopulations of tumor-infiltrating immune cells for malignant transformation of low-grade glioma [J]. *Cancer Cell International*, 2019, 19: 265.
- [25] Mostafa H, Pala A, Hogel J, et al. Immune phenotypes predict survival in patients with glioblastoma multiforme [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1): 77.
- [26] Tseng HC, Inagaki A, Bui VT, et al. Differential targeting of stem cells and differentiated glioblastomas by

- NK cells [J]. *Journal of Cancer*, 2015, 6 (9) : 866–876.
- [27] Zeng X, Yao D, Liu L, et al. Terminal differentiation of bone marrow NK cells and increased circulation of TIGIT(+) NK cells may be related to poor outcome in acute myeloid leukemia [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2022, 18(4): 456–464.
- [28] Razavi SM, Lee KE, Jin BE, et al. Immune evasion strategies of glioblastoma [J]. *Front Surg*, 2016, 3: 11.
- [29] Zhang X, Kim WJ, Rao AV, et al. In vivo efficacy of decitabine as a natural killer cell-mediated immunotherapy against isocitrate dehydrogenase mutant gliomas [J]. *Neurosurg Focus*, 2022, 52(2): E3.
- [30] Horing E, Podlech O, Silkenstedt B, et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin a promotes apoptosis and antitumor immunity in glioblastoma cells [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(4): 1351–1360.
- [31] Gauthier L, Morel A, Anceriz N, et al. Multifunctional natural killer cell engagers targeting Nkp46 trigger protective tumor immunity [J]. *Cell*, 2019, 177(7) : 1701–1713. e16.
- [32] Ferrari De Andrade L, Tay RE, Pan D, et al. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity [J]. *Science*, 2018, 359(6383) : 1537–1542.
- [33] Andre P, Denis C, Soulas C, et al. Anti-NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both t and NK cells [J]. *Cell*, 2018, 175(7) : 1731–1743. e13.
- [34] Meng X, Zhao Y, Han B, et al. Dual functionalized brain-targeting nanoinhibitors restrain temozolomide-resistant glioma via attenuating EGFR and MET signaling pathways [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1) : 594.
- [35] Galstyan A, Markman JL, Shatalova ES, et al. Author correction: blood-brain barrier permeable nano immunoconjugates induce local immune responses for glioma therapy [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1) : 6170.
- [36] Barrow AD, Colonna M. Tailoring Natural Killer cell immunotherapy to the tumour microenvironment [J]. *Semin Immunol*, 2017, 31: 30–36.
- [37] Liu C, He Y, Feng X, et al. Expression of EPHA5 in lung adenocarcinoma is associated with lymph node metastasis and EGFR mutation [J]. *APMIS*, 2022, 130(6) : 338–345.
- [38] Genssler S, Burger MC, Zhang C, et al. Dual targeting of glioblastoma with chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells overcomes heterogeneity of target antigen expression and enhances antitumor activity and survival [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5 (4) : e1119354.
- [39] Shams A, Shabani R, Asgari H, et al. In vitro elimination of EL4 cancer cells from spermatogonia stem cells by miRNA-143- and 206-loaded folic acid-conjugated PLGA nanoparticles [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2022, 17(8) : 531–545.
- [40] Ma R, Lu T, Li Z, et al. An oncolytic virus expressing IL15/IL15R $\alpha$  combined with off-the-shelf EGFR-CAR NK cells targets glioblastoma [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(13) : 3635–3648.
- [41] Brown CE, Badie B, Barish ME, et al. Bioactivity and safety of IL13Ralpha2-redirected chimeric antigen receptor CD8+ T Cells in patients with recurrent glioblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21 (18) : 4062–4072.
- [42] Zhang C, Burger MC, Jennewein L, et al. ErbB2/HER2-specific NK cells for targeted therapy of glioblastoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(5). doi: 10.1093/jnci/djv375.
- [43] Dar TB, Henson RM, Shiao SL. Targeting innate immunity to enhance the efficacy of radiation therapy [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 3077.
- [44] Sevenich L. Turning "cold" into "hot" tumors—opportunities and challenges for radio-immunotherapy against primary and metastatic brain cancers [J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 163.
- [45] Gras Navarro A, Espedal H, Joseph JV, et al. Pre-treatment of glioblastoma with bortezomib potentiates natural killer cell cytotoxicity through TRAIL/DR5 mediated apoptosis and prolongs animal survival [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(7) : 996.
- [46] Cozar B, Greppi M, Carpentier S, et al. Tumor-infiltrating natural killer cells [J]. *Cancer Discovery*, 2021, 11(1) : 34–44.
- [47] Tassinari V, Cesarini V, Tomaselli S, et al. ADAR1 is a new target of METTL3 and plays a pro-oncogenic role in glioblastoma by an editing-independent mechanism [J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1) : 51.
- [48] Chang YZ, Chai RC, Pang B, et al. METTL3 enhances the stability of MALAT1 with the assistance of HuR via m6A modification and activates NF- $\kappa$ B to promote the malignant progression of IDH-wildtype glioma [J]. *Cancer Letters*, 2021, 511: 36–46.
- [49] Zhou Z, Zhang J, Xu C, et al. An integrated model of N6-methyladenosine regulators to predict tumor aggressiveness and immune evasion in pancreatic cancer [J]. *EBioMedicine*, 2021, 65: 103271.