

NK 细胞应用于肿瘤免疫治疗的研究进展

任海龙, 邵东燕[#], 李琦, 师俊玲, 杨慧, 靳明亮, 黄庆生

(西北工业大学 生命学院 空间生物实验模拟技术重点实验室, 西安 710072)

摘要: NK 细胞作为固有免疫细胞, 它的激活无 MHC 限制也不需预先致敏, 其在肿瘤免疫治疗中的作用受到越来越多的关注。然而, 在肿瘤发生过程中, 肿瘤细胞依然可以逃避 NK 细胞的杀伤, 相关机制也各有报道。为了解决此问题, 近年来, 在增强 NK 细胞抗肿瘤活性和提高 NK 细胞特异性杀伤肿瘤方面取得了令人瞩目的研究成果。这提示 NK 细胞在肿瘤免疫治疗中具有广阔的应用前景。本文主要对抗体介导的 NK 细胞、与受者杀伤细胞 KIR 不匹配的同种异体 NK 细胞、嵌合抗原受体介导的 NK 细胞和免疫检查点抑制剂联合 NK 细胞对肿瘤细胞的细胞毒活性进行归纳与总结, 以期后续肿瘤免疫治疗相关基础和临床应用研究提供较为清晰的思路和参考。

关键词: NK 细胞; 免疫治疗; 免疫球蛋白样受体; 嵌合抗原受体; 免疫检查点抑制剂

中图分类号: R392.12

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2017)03-233-05

随着现代免疫学理论和技术的发展, 免疫细胞治疗成为继手术、放疗和化疗之后的肿瘤治疗新手段。其中, T 细胞和 NK 细胞是杀伤肿瘤的两把利器。T 细胞在造血系统恶性肿瘤治疗中已取得了卓越成绩, 但由于 T 细胞容易引起移植物抗宿主病 (graft versus host disease, GVHD), 因此容易产生细胞因子风暴、靶点毒性和肿瘤溶解综合征等不良反应。与 T 细胞有所不同, NK 细胞属于固有免疫细胞, 在杀伤肿瘤细胞时不需要预先致敏、不依赖抗体与补体的结合且无 MHC 限制性。因此, NK 细胞在肿瘤免疫治疗方面的优势得到越来越多的关注。本文将就不同形式活化与介导的 NK 细胞应用于肿瘤免疫治疗的进展予以分析和总结, 具体如下。

1 NK 细胞的免疫学分型和表面功能受体

NK 细胞主要来源于骨髓淋巴样干细胞, 约占体内淋巴细胞的 10%, 主要分布于外周血和外周淋巴组织^[1]。根据 NK 细胞表面分化抗原 56 (clus-

ter of differentiation, CD) 密度的不同, 人 NK 细胞可以分为 CD56^{dim} 和 CD56^{bright} 2 个亚群。CD56^{dim} NK 细胞约占其总数的 (90~95)%, 主要存在于外周血中, 具有杀伤靶细胞的细胞毒活性; CD56^{bright} 细胞大约只占 NK 细胞的 (5~10)%, 细胞毒活性弱, 以分泌免疫调控因子为主。然而, 经白细胞介素 2 (interleukin 2, IL-2) 活化的 CD56^{bright} NK 细胞也可产生与 CD56^{dim} NK 细胞类似的杀伤活性^[2]。

不同于 T、B 细胞表面有特异性受体, NK 细胞具有直接识别和区分自身正常与异常组织细胞的能力。NK 细胞表面受体根据结构的不同, 可分为免疫球蛋白超家族与 C 型凝集素超家族。免疫球蛋白超家族主要包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体、白细胞免疫球蛋白样受体和自然细胞毒受体等; C 型凝集素超家族主要包括杀伤细胞凝集素样受体——CD94 和自然杀伤簇 2 (natural-killer group 2, NKG 2)^[3]。根据功能的不同, NK 细胞表面受体可分为杀伤细胞活化受体和杀伤细胞抑制受体。前者与靶细胞表面相应配体结合后, 可激发 NK 细胞产生杀伤作用; 后者与靶细胞表面相应配体结合后, 则可抑制其杀伤作用。NK 细胞对肿瘤的杀伤活性主要表现为活化性受体和抑制性受体与相应配体结合后 2 种信号的平衡^[4]。

2 不同形式活化和介导的 NK 细胞在肿瘤免疫治疗中的应用

2.1 抗体介导的 NK 细胞的细胞毒作用 NK 细胞

收稿日期: 2016-11-02

基金项目: 西北工业大学 2016 年度研究生创意新种子基金 (Z2016196); 陕西省自然科学基金项目 (2015JQ3083); 国家自然科学基金青年基金项目 (81502465); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (3102014JCQ15001)

作者简介: 任海龙 (1991-), 硕士研究生 (E-mail: renhailong123@mail.nwpu.edu.cn); # 并列第一作者

通信作者: 黄庆生 (E-mail: huangqingsheng@nwpu.edu.cn)

表面表达高水平的免疫球蛋白 IgG Fc 受体 (CD16), 在肿瘤 IgG 抗体存在的条件下, NK 细胞可通过表面 CD16 分子识别与 IgG 抗体特异性结合的肿瘤细胞, CD16 与 NK 细胞内对应的含有“免疫受体酪氨酸活化基序”的衔接蛋白相互作用, 使得衔接蛋白发生磷酸化, 从而启动胞内信号传导, 激活 NK 细胞释放穿孔素和颗粒酶杀伤靶细胞, 这一以 IgG 为中间桥梁, 定向介导 NK 细胞杀伤靶细胞的过程称为抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)^[5]。此外, NK 细胞活化后, 自身还可以通过分泌细胞因子, 如 IFN- γ 、IL-2 和 TNF 及相关配体, 增强机体抗感染免疫作用和发挥免疫调节作用^[6]。

抗体介导的 NK 细胞能够靶向杀伤肿瘤细胞或者增强 NK 细胞的 ADCC 作用。Lin 等^[7]研究表明 NK 细胞在抗 CD137 单克隆抗体作用下, 活化信号分子 CD137 表达提高, 使 NK 细胞在脱颗粒、分泌 IFN- γ 和抗肿瘤活性方面能力明显增强。Kana-zawa 等^[8]研究的抗趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CCR4) 单抗已经在日本获得批准, 主要功能在于该单抗能够增强 NK 细胞表面 CD16 与白血病患者 CCR4⁺T 淋巴细胞的结合能力, 从而提高 NK 细胞的 ADCC 作用。Romain 等^[9]利用抗体工程技术对 IgG 单克隆抗体的 Fc 区域位点进行改造, 从而成功研发出靶向急性髓细胞 CD33 的改造性单克隆抗体, 发现其介导 ADCC 诱导的肿瘤凋亡效果是野生型单克隆抗体的 2 倍。此外, 另一种新近报道的靶向 CD20 工程化单克隆抗体也具有类似的增强 ADCC 活性的功能^[9]。这些结果说明基于提高 ADCC 作用的抗体具有广泛的开发应用前景。

2.2 供受者 KIR-HLA 不匹配与 NK 细胞抗肿瘤效应 NK 细胞免疫球蛋白样受体 (killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR) 属于免疫球蛋白超家族中的 I 型跨膜糖蛋白, 表达于成熟 NK 细胞表面。目前发现的 KIR 可分为抑制型 KIR 受体和活化型 KIR 受体 2 组, 每组 KIR 可通过其特定的胞外结构域与特定的人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 分子结合, 分别介导 NK 细胞对靶细胞的抑制性或活化性反应。NK 细胞能对体内正常细胞产生免疫耐受, 但又可以杀伤肿瘤细胞的原因在于 NK 细胞可通过表面抑制型 KIR 受

体识别自身正常细胞的 HLA-I 类分子, 转导杀伤抑制性信号至胞内, 阻止 NK 细胞对正常细胞的杀伤, 但肿瘤细胞表面缺乏 HLA-I 类信号分子, 容易被 NK 细胞识别并攻击^[10]。当供受者 KIR-HLA 受配体不相合时, 可引起 NK 细胞的异源反应性, 从而激活供者 NK 细胞杀伤受者细胞。因此, 关于 KIR 的研究成为了 NK 细胞免疫治疗的热点问题。

当肿瘤患者回输体外扩增的异体 NK 细胞时, 由于 KIR-HLA 相互匹配, 其杀伤肿瘤细胞的效果并不明显^[11], 但在接受 NK 细胞免疫治疗的 60 位高危白血病患者中, 20 名供受者 KIR-HLA 不匹配的患者与 40 名供受者 KIR-HLA 匹配患者相比, 由于其体内残余的抗原提呈细胞的清除, GVHD 发生率与复发率显著下降, 患者存活率极大提高^[12]。NK 细胞在治疗髓性白血病和淋巴细胞白血病时, 供受者 KIR-HLA 不匹配的 NK 细胞能有效增强移植抗白血病效应^[13], 从而提高患者的生存率。此外, 在肾癌、胃癌、肠癌、卵巢癌等实体瘤治疗中, 供受者 KIR-HLA 不匹配的 NK 细胞也显示出较好的治疗效果^[14]。在有关 KIR 的研究过程中, 许多研究小组均采用回输供受者 KIR-HLA 不匹配的 NK 细胞治疗恶性肿瘤, 且显示出较好的安全性, 期待此项技术能取得更大的治疗前景。

2.3 嵌合抗原受体修饰 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤 嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR) 技术是利用基因工程技术, 使 NK 细胞表面表达可识别靶细胞的小分子抗体结构, 胞内具有活化信号域结构, 依此来增强 NK 细胞识别、杀伤肿瘤的能力。目前, CAR 的研究已从第一代单信号结构域 (Fc ϵ RI 受体 γ 链或 CD3 复合物 ζ 链) 的信号分子发展为第三代包含 CD28、CD137 等共刺激分子的多信号结构域。采用 CAR 修饰的 T 淋巴细胞 (CAR-T) 已经在造血系统恶性肿瘤的治疗中取得了令人瞩目的成绩^[15]。然而, CAR-T 在临床研究中容易出现许多副作用, 如 GVHD、细胞因子风暴以及脱靶效应等。相对而言, NK 细胞引起的细胞因子分泌水平则明显弱于 T 细胞。因此, NK 细胞被认为是更具有应用前景的导向抗肿瘤免疫效应细胞。

目前利用抗 CD19 和抗 CD20 的 CAR-NK 治疗 B 细胞恶性肿瘤已经取得了良好的效果。据研究报道, 经电穿孔或者慢病毒转染方式获得的抗

CD19 和抗 CD20 的 CAR-NK 细胞均可以显著杀伤 CD19⁺ 和 CD20⁺ 的急、慢性淋巴细胞白血病细胞^[16]。在多发性骨髓瘤的小鼠模型研究中, 回输靶向 CD138 的 CAR-NK 细胞的小鼠与回输正常 NK 细胞的小鼠相比, 其存活的时间更久^[17]。CAR-NK 在实体瘤中的有关研究也取得了一定的进展。通过神经节苷脂 2 (ganglioside 2, GD2)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、NKG2D 的配体等肿瘤靶点, 可以实现对实体瘤细胞的靶向杀伤。GD2 在神经细胞瘤、黑色素瘤、成纤维细胞瘤、乳腺癌、软组织肉瘤等肿瘤细胞高表达, 抗 GD2 的 CAR-NK 能够靶向增强 NK 细胞对 GD2⁺ 神经细胞瘤和乳腺癌的细胞毒作用, 从而对神经细胞瘤和乳腺癌产生杀伤活性^[18]。EGFR 高表达于胶质母细胞瘤细胞与乳腺癌细胞表面, 有关抗 EGFR 的 CAR-NK 在胶质母细胞瘤与乳腺癌的治疗方面已经取得了很好的治疗效果^[19]。除此之外, NKG2D 的配体在大多数肿瘤细胞表面表达, 以 NKG2D 配体为靶标设计的 CAR-NK 细胞在治疗横纹肌肉瘤和前列腺癌中也受到了越来越多的关注^[20]。

2.4 免疫检查点抑制剂介导的 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤 当机体发生肿瘤时, 依旧有部分原发性肿瘤细胞在免疫系统的监视下发生转移, 表明肿瘤细胞可以通过多种方式逃逸机体的免疫监视, 继而分裂、生长。有关肿瘤细胞的免疫逃逸机制有多种解释, 其中免疫检查点中的共抑制分子抑制免疫细胞的杀伤活性是近些年的关注热点。淋巴细胞的免疫检查点主要由共刺激和共抑制分子组成, 它们可以激活或抑制免疫细胞的活性从而调节免疫应答^[21]。关于免疫检查点的研究主要聚焦于研制免疫检查点抑制剂抗体, 通过封闭抑制性检查点, 提高免疫细胞增殖、迁移和细胞毒活性。目前, 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4) 和程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed death 1, PD-1) 抑制剂的应用已经取得了巨大成功^[22]。

有研究发现 PD-1 的表达并不限于活化的 T 淋巴细胞, 同时也表达于 NK 细胞表面^[23]。研究发现骨髓瘤和肾癌患者的 NK 细胞表面表达 PD-1, 且其能减弱 NK 细胞的杀伤活性, 而当外加抗 PD-1 抗体时, NK 细胞杀伤肿瘤细胞的能力显著增强^[2]。NK 细胞表达的抑制性检查点 TIGIT 和

CD96 可抑制 NK 细胞的细胞毒作用, 但是在杀伤肿瘤细胞时, 外加抗 TIGIT 和 CD96 抗体时能显著增强 NK 细胞的细胞毒作用^[24]。此外, NK 细胞的检查点抑制剂复合物 CD94/NKG2A 异二聚体, 能够识别非经典的 HLA-I 类分子 HLA-E, 肿瘤细胞表面 HLA-E 的高表达可显著降低 NK 细胞的杀伤能力^[25], 针对 CD94/NKG2A 的封闭性抗体 Monalizumab 已经进入临床 II 期试验, 正在对其治疗头颈癌和卵巢癌的效果进行评估^[26]。

3 NK 细胞应用于肿瘤免疫治疗的临床研究现状及问题

虽然 CAR-NK 细胞在对 GVHD 预防和实体瘤的杀伤方面取得了一定的效果, 但是在目前的临床研究中, NK 细胞仍有一些问题亟待解决: 有研究指出, NK 细胞在个体临床研究治疗胰腺癌、胶质母细胞瘤及子宫内膜癌等实体瘤时, 它的细胞毒作用效果会出现较大的个体差异^[14, 27]。这些临床研究显示, NK 细胞对于部分实体瘤的个体杀伤效果具有不确定性。在 CAR-NK 的临床研究中, 转染获得大量的 CAR-NK 细胞是靶向杀伤肿瘤细胞的关键, 但是传统的脂质体和电穿孔转染方法以及目前采用最多的病毒转染方法, 其转染效率普遍较低, 而且 CAR-NK 细胞的制备也存在耗时、有安全隐患及细胞免疫反应等技术难关需要解决^[28]。

除此之外, NK 细胞扩增到一定的数量才能被当作效应细胞, 但在正常人体外周血中, NK 细胞数量仅占淋巴细胞总数的 10% 左右。近几年, 研究者主要通过体外刺激培养进行 NK 细胞的扩增, 有研究利用基因工程构建可表达 IL-2、IL-15、IL-18 和 IL-21 等细胞因子的 K562 细胞系, 在体外对外周血、脐带血中 NK 细胞进行刺激以扩增获得 NK 细胞, 但与 T 细胞扩增相比其扩增效率较低, 且工程细胞系存在一定的风险^[29]。因此, 如何获得高质量、高纯度的 NK 细胞成为 NK 细胞临床研究最为关键的问题。

4 结语与展望

综上所述, NK 细胞作为固有免疫中重要的效应细胞, 具有强大的抗肿瘤功能。随着细胞免疫治疗技术和生物技术的不断发展, 实现了诸多基于 NK 细胞生物特点的创新和发展并取得了一系列的显著成果, 使得不同形式活化的 NK 细胞在细胞免

疫治疗中发挥着重要作用,从而受到越来越多的关注。虽然NK细胞在肿瘤免疫的研究过程中也存在一些问题,比如NK细胞在部分实体瘤的个体治疗中的不确定性,高质量、高纯度NK细胞的获取以及CAR-NK细胞转染率低等问题,但人们有理由期待NK细胞在细胞免疫治疗方面的新突破,这将在肿瘤治疗上探索出更加有效的免疫治疗新方法。

参考文献

- [1] Cheng M, Chen Y, Xiao W, *et al.* NK cell-based immunotherapy for malignant diseases[J]. *Cell Mol Immunol*, 2013, 10(3): 230-252.
- [2] Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(3): 536-544.
- [3] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells[J]. *Science*, 2011, 331(6013): 44-49.
- [4] Peruzzi G, Masilamani M, Borrego F, *et al.* Endocytosis as a mechanism of regulating natural killer cell function: unique endocytic and trafficking pathway for CD94/NKG2A[J]. *Immunol Res*, 2009, 43(1-3): 210-222.
- [5] Romain G, Senyukov V, Rey-Villamizar N, *et al.* Antibody Fc engineering improves frequency and promotes kinetic boosting of serial killing mediated by NK cells[J]. *Blood*, 2014, 124(22): 3241-3249.
- [6] 马茜, 叶鸣宇, 汪洋. NK细胞受体及作用机制[J]. *现代免疫学*, 2011, 31(6): 507-511.
- [7] Lin W, Voskens CJ, Zhang X, *et al.* Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies[J]. *Blood*, 2008, 112(3): 699-707.
- [8] Kanazawa T, Hiramatsu Y, Iwata S, *et al.* Anti-CCR4 monoclonal antibody mogamulizumab for the treatment of EBV-associated T- and NK-cell lymphoproliferative diseases[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(19): 5075-5084.
- [9] Terszowski G, Klein C, Stern M. KIR/HLA interactions negatively affect rituximab-but not GA101 (obinutuzumab)-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity[J]. *J Immunol*, 2014, 192(12): 5618-5624.
- [10] Watzl C. The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"?[J]. *Microb Infect*, 2003, 5(1): 31-37.
- [11] Klingemann H. Challenges of cancer therapy with natural killer cells[J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(3): 245-249.
- [12] Varbanova V, Naumova E, Mihaylova A. Killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and ligands and their role in hematologic malignancies[J]. *Cancer Immunol Immunoth*, 2016, 65(4): 427-440.
- [13] Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, *et al.* Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia[J]. *Blood*, 2010, 116(14): 2411-2419.
- [14] Re F, Staudacher C, Zama L, *et al.* Killer cell Ig-like receptors ligand-mismatched, alloreactive natural killer cells lyse primary solid tumors[J]. *Cancer*, 2006, 107(3): 640-648.
- [15] Cheadle EJ, Gornall H, Baldan V, *et al.* CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic[J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(1): 91-106.
- [16] Chu Y, Hochberg J, Yahr A, *et al.* Targeting CD20⁺ aggressive B-cell Non-Hodgkin Lymphoma by anti-CD20 CAR mRNA-modified expanded natural killer cells in vitro and in NSG mice[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(4): 333-344.
- [17] Jiang H, Zhang W, Shang P, *et al.* Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(2): 297-310.
- [18] Battula VL, Shi Y, Evans KW, *et al.* Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(6): 2066-2078.
- [19] Schönfeld K, Sahm C, Zhang C, *et al.* Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor[J]. *Mol Ther*, 2015, 23(2): 330-338.
- [20] Chang YH, Connolly J, Shimasaki N, *et al.* A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(6): 1777-1786.
- [21] Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(4): 227-242.
- [22] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 252-264.
- [23] Kleffel S, Posch C, Barthel SR, *et al.* Melanoma cell-intrinsic PD-1 receptor functions promote tumor growth[J]. *Cell*, 2015, 162(6): 1242-1256.
- [24] Stanitsky N, Simic H, Arapovic J, *et al.* The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(42): 17858-17863.
- [25] Fruci D, Monaco EL, Cifaldi L, *et al.* T and NK cells: two sides of tumor immunoevasion[J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1): 1.
- [26] Monaco EL, Tremante E, Cerboni C, *et al.* Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells[J]. *Neoplasia*, 2011, 13(9): 822-834.
- [27] Jarahian M, Watzl C, Issa Y, *et al.* Blockade of natural killer cell-mediated lysis by NCAM140 expressed on tumor cells[J]. *Intern J Cancer*, 2007, 120(12): 2625-2634.
- [28] Poupot M, Turrin CO, Caminade AM, *et al.* Poly(phosphorhydrazone) dendrimers: yin and yang of monocyte activation for human NK cell amplification applied to immunotherapy a-

gainst multiple myeloma[J]. *Nanomedicine: Nanotechnol, Biol Med*, 2016, 12(8): 2321-2330.

[29] Chouaib S, Pittari G, Nanbakhsh A, *et al*. Improving the

outcome of leukemia by natural killer cell-based immunotherapeutic strategies[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 95.