

自体来源肿瘤全细胞疫苗的研究现状

鄢玲利, 刘白南

(遵义医学院 免疫学教研室, 贵州省免疫学研究生教育创新基地, 遵义 563000)

摘要: 自体来源肿瘤全细胞疫苗 (autologous whole tumor cell vaccine, AWTCV) 是现今肿瘤免疫疗法中备受关注的一种靶向疗法, 它利用患者自身来源的完整肿瘤细胞制备疫苗。与其他靶向特定抗原的免疫疗法相比, 其具有携带相对完整的已知和未知肿瘤抗原、不受 MHC 限制等优势, 因此避免了由于在肿瘤发展过程中某些抗原丢失而造成的肿瘤细胞免疫逃逸。不过, 仅仅将肿瘤细胞灭活后制成的疫苗免疫原性极弱, 并不能诱导足够的抗肿瘤免疫效应。为解决这一问题, 目前研究者们主要采取对肿瘤细胞进行基因修饰, 通过与佐剂或单克隆抗体联合使用等方法来达到提升疫苗抗肿瘤效果的目的。文章就 AWTCV 的制备、应用与发展前景作综述。

关键词: 肿瘤全细胞疫苗; 自体肿瘤细胞疫苗; 免疫治疗; 肿瘤微环境

中图分类号: R539.22

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)04-0327-06

肿瘤免疫治疗已成为当今肿瘤治疗中最有前景的疗法之一, 目前, 手术和放化疗等传统治疗方式对于部分恶性肿瘤、进展迅速的肿瘤和晚期肿瘤患者效果较差。而肿瘤免疫治疗早已成为众多抗肿瘤疗法中的研究热点, 例如肿瘤疫苗 (tumor vaccine, TV)、单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb)、过继细胞转移法 (adoptive cell transfer, ACT) 等, 部分肿瘤的免疫治疗方式已进入较为成熟的研究阶段, 抑或已投入临床使用。例如, 针对 B 淋巴细胞系肿瘤的 CD19 嵌合抗原受体 T 细胞疗法已用于临床治疗^[1]。而先前在美国上市的 HPV 9 价疫苗 (GARDASIL[®] 9)^[2] 现已在我国获批使用, 这就意味着对于肿瘤的控制已逐渐从治疗层面向预防层面发展, 同时也证明了肿瘤疫苗是一种有前景的抗肿瘤疗法。

肿瘤疫苗主要包括肿瘤细胞疫苗^[3]、肿瘤多肽疫苗^[4]、肿瘤 DNA 疫苗^[5] 等。其中, 自体来源的肿瘤全细胞疫苗 (autologous whole tumor cell vaccine, AWTCV) 利用完整的自体肿瘤细胞制备疫苗, 由于肿瘤细胞表达肿瘤特异性抗原 (tumor specific antigen, TSA) 和肿瘤相关抗原 (tumor

associated antigen, TAA), 所以自然状态下其免疫原性较弱。完整的自体肿瘤细胞在经过不同的方法灭活处理后, 失去了致瘤性而保留了免疫原性, 成为一种免疫原, 能诱导机体产生特异性免疫应答。此外, 由于取材于肿瘤患者自身, 故可以避免由于 MHC 不匹配而发生的特异性自身免疫反应。但直接将肿瘤细胞灭活后制备的疫苗免疫原性极弱, 很难产生有效的抗肿瘤免疫效应。因此, 研究者通过多种方式对 AWTCV 进行优化以提升肿瘤细胞疫苗的免疫原性。

另一方面, 基于 AWTCV 的抗肿瘤疗法与其他免疫疗法面临着同样的阻碍, 即肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 所产生的物理屏障, 如微血管床和基质屏障的形成^[6], 以及在 TME 中免疫抑制效应的形成, 如肿瘤分泌抑制 T 细胞活化的趋化因子^[7]、APC 的成熟和活化受到抑制等, 这些现象可能与基因表达谱相关的一系列免疫抑制和 NF- κ B 信号通路的异常激活密切相关^[8-9]。此外, TME 中的细胞和分子还能改变 Treg 表型使其分泌抑制性细胞因子, 如 IL-10、IL-17 等, 从而抑制效应 T 细胞的功能^[10]。髓源抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSC) 也与 TME 中免疫抑制的形成密切相关^[11]。并且, 许多肿瘤还能下调其自身 MHC 或共刺激分子表达, 以及瘤内高异质性的形成导致肿瘤抗原发生突变或表达量降低, 最终使肿瘤细胞逃逸 T 细胞的识别和杀伤^[12]。总之, 肿瘤发生免疫耐受和免疫

收稿日期: 2018-03-08

基金项目: 国家地区基金面上项目 (81560276); 贵州省人力资源和社会保障厅留学人员科技活动项目 [黔人项目资助合同 (2014)8 号]

作者简介: 鄢玲利 (1992-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫治疗相关研究

通信作者: 刘白南 (E-mail: bnliu@hotmail.com)

逃逸的机制是多方面的。

针对上述问题, 研究者们选择在制备 AWTCV 时对肿瘤细胞进行适当的基因修饰, 并通过联合佐剂、免疫检查点抑制剂等方法提升 AWTCV 抗肿瘤治疗效果。

1 利用基因修饰的方法制备 AWTCV

1.1 基因修饰的方法 基因修饰的 AWTCV 是目前研究最多的肿瘤细胞疫苗, 选择合适的目的基因是影响 AWTCV 效果的关键所在。最常用的方法是选择来自于肿瘤组织或者 TME 中高表达的 TAA 或 TSA, 通过基因工程技术转染到自体来源的肿瘤细胞中, 使目的基因在肿瘤细胞中过表达,

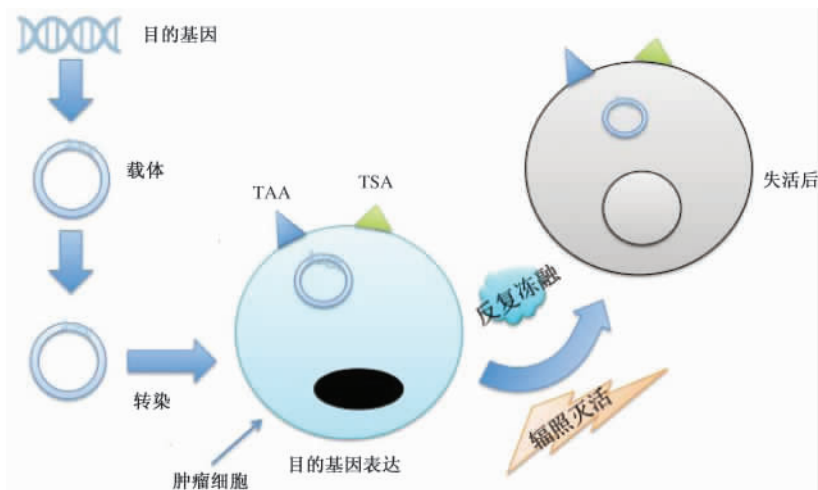


图 1 利用基因修饰的方法制备 AWTCV

1.2 靶点的选择

1.2.1 靶向 TME 在 TME 中存在许多利于肿瘤生长、转移的物质, 抗肿瘤免疫可以通过破坏这些成分来实现。癌症相关成纤维母细胞(cancer associated fibroblast, CAF)是 TME 中的重要组成部分, CAF 能够诱导免疫抑制形成和促进肿瘤的发展、转移。研究表明, CAF 高表达成纤维细胞激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP), FAP 通过促进趋化因子配体(例如 CCL2 和 CXCL12)的分泌而引起免疫抑制的形成^[14]。Chen 等^[15]通过制备高表达 FAP 的 AWTCV, 以小鼠实体肿瘤和经血行转移瘤为研究模型, 在经 AWTCV 治疗后发现其能增强 CD8⁺ T 细胞所介导的抗肿瘤效应, 且能有效减少免疫抑制细胞(例如 Treg)在 TME 中的聚集。此外, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为促进 TME 形

再通过辐照灭活处理后制成疫苗(图 1)。当携带大量 TAA 或 TSA 并处于灭活状态的肿瘤细胞进入机体时, 就能增加机体针对 TAA 或 TSA 发生特异性免疫应答的机会, 使机体的抗肿瘤免疫反应得到加强。此外, 一类能刺激机体产生固有免疫应答的抗原分子也可用于 AWTCV 研究中。当携带此类抗原的 AWTCV 进入机体时, 就能通过引起固有免疫应答来辅助增强疫苗的效果^[13]。经基因修饰以及灭活处理的肿瘤细胞作为外来物进入机体时, 还能引起 DC 的成熟和活化, 激活的 DC 再活化初始 T 细胞, 这一系列反应使得机体免疫系统恢复对肿瘤细胞的识别以及杀伤能力。近年来, 许多学者就基因修饰的 AWTCV 展开了深入研究。

成以及肿瘤生长和远处转移的关键因子, 也被应用于肿瘤细胞基因修饰^[16]。

1.2.2 刺激固有免疫辅助增强 AWTCV 的抗肿瘤效应 由于免疫逃逸的形成导致机体免疫系统不能准确地识别肿瘤细胞, 研究者们可以通过增强疫苗的免疫原性, 刺激机体产生固有免疫应答, 从而辅助增强疫苗的特异性抗肿瘤免疫。 α -1, 3-半乳糖基转移酶(α -1, 3-galactosyltransferase, α -1, 3-GT)可以编码一种不存在于人体的碳水化合物表位 α -Gal, 当其作为异种抗原进入机体时就能诱发其产生强烈的固有免疫应答。Xue 等^[17]制备过表达 α -1, 3-GT 的人乳腺癌细胞疫苗并用于裸鼠乳腺癌模型, 发现疫苗能促进 APC 的成熟, 增强 CD8⁺ T 细胞在 TME 中的聚集, 同时, 还促进了 IL-12、IFN- γ 的分泌, 表现出促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞转移的作用。

1.2.3 靶向 TAA/TSA 间皮素是一种高表达于卵巢癌的 TAA, 已有研究证实将过表达间皮素的 AWTCV 用于裸鼠卵巢癌治疗时, 能显著增加间皮素特异性效应 T 细胞的比例, 从而达到有效的抗肿瘤治疗效果^[18]。由于 TAA 始终会低表达于某些正常细胞或组织, 所以过表达 TAA 的 AWTCV 也可能产生脱靶效应等副作用, 此时 TSA 或许是一个更理想的选择, 然而可供选择的 TSA 非常少。含 DEP 结构域的蛋白质 1 (DEP domain containing 1, DEPDC1) 是一种新型肿瘤抗原, 在许多肿瘤中呈高表达。在一项将 DEPDC1 作为治疗神经胶质瘤靶分子的研究中发现, 抑制 DEPDC1 表达后, A20 (又称肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白) 表达上调并负调控 NF- κ B 信号通路, 从而抑制由该通路活化而激活的抗凋亡基因^[19]。目前选择 DEPDC1 作为靶点的多肽类疫苗能引起特异性 CTL 效应^[20]。因此, 研究者或许可以筛选出 DEPDC1 中

能引起 T 细胞特异性识别的表位片段基因, 再将其修饰到肿瘤细胞中, 以肿瘤细胞疫苗的方式展开对其抗肿瘤效应的研究。

肿瘤的发展是一个多阶段性、高异质性的过程, 单纯使用一种抗肿瘤疗法并不能达到最佳效果。因此, 多种疗法联合使用以提升治疗效果也成为了研究热点。

2 AWTCV 的联合应用

2.1 AWTCV 联合抗协同刺激分子抗体 T 细胞的免疫调节在抗肿瘤效应中扮演重要角色, 其中, 协同刺激分子共同作用控制着 T 细胞的活化程度。协同刺激分子从功能上可以分为两大类, 即共刺激分子和共抑制分子。协同刺激分子的异常活化是导致免疫抑制形成的主要因素, 因此将抗协同刺激分子抗体与 AWTCV 联合使用可以有效提升其抗肿瘤效果 (图 2)。

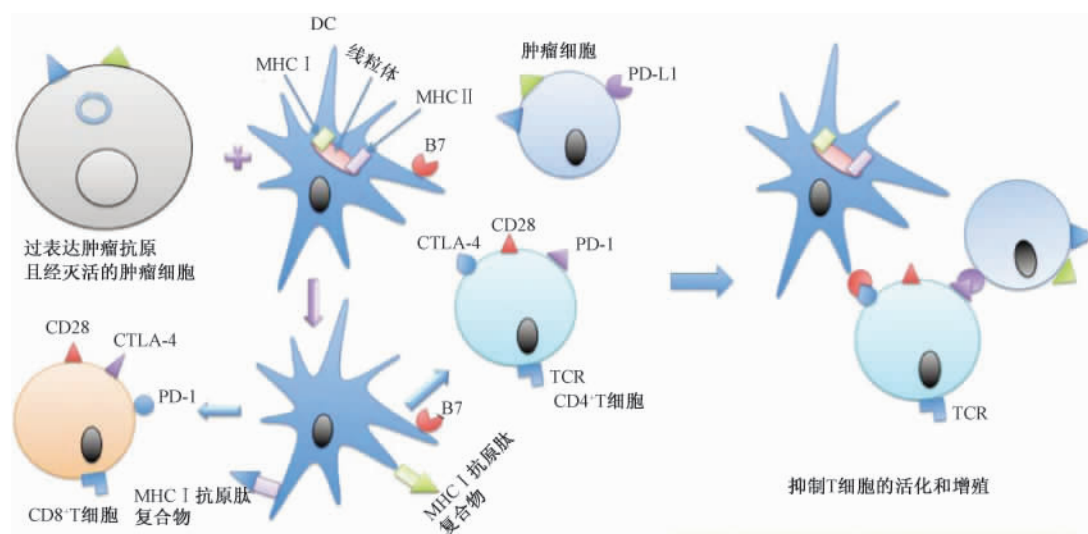


图2 免疫抑制的形成对 AWTCV 起效产生阻碍

2.1.1 共刺激分子 4-1BB (CD137) 与 OX40 (CD134) 4-1BB 与 OX40 均属于肿瘤坏死因子受体超家族 (tumor necrosis factor receptor, TNF-R) 成员, 主要表达于活化的 T 细胞表面, 4-1BB、OX40 与其各自的配体结合后作为共刺激分子提供 T 细胞活化信号。其中, 4-1BB 也高表达于在肿瘤抑制微环境中起关键作用的 CD4⁺ Foxp3⁺ Treg。研究表明, 使用 4-1BB 的竞争性抗体能有效降低 Treg 免疫抑制作用的产生和上调效应 T 细胞活性^[21]。OX40 在激活的 T 细胞上表达增加, 瘤内 CD8⁺ T 细胞表面高表达的 OX40 增强了 TCR 介导的免疫应答, 体现出对 TAA 更强的识别及应答能

力, 因此 OX40 可以作为免疫治疗的一个靶点^[22]。已有研究者采用抗共刺激分子抗体联合 AWTCV 治疗肿瘤。Jahan 等^[23]设计激动型抗 OX40 单克隆抗体单独治疗肿瘤, 与表达 GM-CSF 的神经胶质瘤细胞疫苗 (GVAX) 联合治疗后, 发现该抗体在神经胶质瘤小鼠模型上单独或者与 GVAX 联合使用均展现出抗肿瘤效应, 联合治疗与降低 TIL 耗竭显著相关, 证实了激动型抗体与肿瘤细胞疫苗能产生协同作用。

2.1.2 共抑制分子 PD-1/PD-L1、CTLA-4/B7 CTLA-4 是一种表达于 T 细胞表面的跨膜蛋白, 它与配体 B7 结合能抑制 T 细胞活化; PD-1 也表

达于 T 细胞表面, 当与肿瘤细胞表面 PD-L1 结合时能抑制 T 细胞的增殖和细胞因子的产生, 因此 CTLA-4 与 PD-1/PD-L1 作为 T 细胞活化的共抑制分子作用显著, 所以阻断免疫检查点受体可以增加细胞介导的免疫效应^[24-25], 故其联合肿瘤疫苗能增强肿瘤特异性 T 细胞的抗肿瘤效应。Shi 等^[26]发现, 经 GM-CSF 修饰的 AWTCV 能上调 CD8⁺ T 细胞表面 PD-1 的表达, 从而导致免疫抑制的产生, 但在联合使用 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂抗体与 GM-CSF 修饰的 AWTCV 时, 在小鼠膀胱癌模型中可以促进 DC 成熟, 增加 T 细胞活化和 IFN- γ 分泌, 并能增强肿瘤特异性细胞毒性等抗肿瘤效应。

2.2 AWTCV 联合免疫佐剂 佐剂由于其分子特性, 可以非特异性地刺激机体产生固有免疫应答, 再通过促进 APC 对抗原的摄取和提呈——即运输环节, 和通过直接增强免疫细胞的活化和功能——即调节免疫激活环节, 来增强机体的免疫应答^[27]。传统佐剂包括明矾、油乳胶, 新型佐剂包括分子靶向特异性分子模式受体, 如 TLR 或免疫调节细胞因子 (GM-CSF、IL-12)^[28-29]。刚地弓形虫分泌的 profilin 样蛋白能够被小鼠 TLR11 和人类 TLR5 所识别, 通过激活髓源分化巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophage, BMM) 的 MyD88 信号通路, 增强后者的吞噬效率和 IL-12、IFN- γ 等抗肿瘤生长的细胞因子和趋化因子的产生^[30]。其作为佐剂与 AWTCV 联合使用时, 能显著增强疫苗的肿瘤治疗效果^[30]。此外也有部分研究将细胞因子作为佐剂联合 AWTCV 使用。Chen 等^[31]通过建立小鼠 Lewis 肺癌模型, 证实负载 IL-15 的阳离子脂质体作为佐剂联合 AWTCV 能增强细胞免疫和体液免疫应答, 诱导高水平的 IFN- γ 产生以及抗原特异性免疫细胞在肿瘤组织中的聚集。IL-2 可刺激 T 细胞分化, 促进 CTL 发挥效应, 辅助增强机体免疫系统对肿瘤细胞的识别以及杀伤作用; IL-15 则通过活化 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞实现有效的抗肿瘤效应, 且与 IL-2 相比具有更小的毒副作用^[32]。还有利用纳米技术将佐剂负载到聚乳酸-羟基乙酸共聚物上, 将制备好的微粒锚定到肿瘤细胞表面, 这种处理方法相较于溶解在液相中的佐剂, 具有更好的增强免疫应答的效果^[33]。

3 癌症干细胞 (cancer stem cell, CSC) 疫苗

普通 AWTCV 所覆盖的肿瘤抗原谱并不完

整, 当恶性肿瘤发展到转移阶段时, 由于基因突变可导致瘤内异质性的形成, 肿瘤抗原的表达也会因为肿瘤的发展阶段不同而具有一定的差异性。因此, 普通 AWTCV 对于某些高异质性肿瘤不能引起有效的抗原特异性抗肿瘤免疫反应^[34]。CSC 是一种分化潜能大且对放化疗不敏感的肿瘤细胞, 因为 CSC 不仅具有自我更新能力, 还能分化出多种突变型的肿瘤细胞, 这与肿瘤的发生发展和转移密切相关^[35]。因此, 以 CSC 为基础制备的疫苗可用于高异质性肿瘤治疗的研究。Zhao 等^[36]制备黑色素瘤的干细胞疫苗用于治疗小鼠黑色素瘤, 证实其可以靶向 CSC, 增强 NK 细胞活性, 在延长小鼠生存期的同时显示出显著的抗肿瘤效应。此外在另一项研究中, Wang 等^[37]也发现使用 GM-CSF 和 IL-2 修饰的 MB49 膀胱癌干细胞疫苗在膀胱癌小鼠模型上能显著地减小肿瘤体积并延长荷瘤小鼠生存期, 且可诱导长效的免疫记忆。

4 AWTCV 治疗所面临的问题

AWTCV 在临床试验中至今没有得到突破性进展, 主要原因有: (1) 需要足够的自体肿瘤组织来制备, 故必须从患者自身肿瘤组织中分离肿瘤细胞, 这对于晚期恶病质肿瘤患者而言难以实现, 如胰腺癌患者, 在确诊时病情已发展至中晚期, 无法进行手术治疗; (2) 多数患者由于病情发展迅速, 不能等到疫苗制备完成, 且目前制备技术不成熟, 未能进入临床试用阶段; (3) 由于肿瘤细胞在体外经过各种方法处理后其疫苗制作效果的差别缺少比较研究, 故体外制备的效益无法保证。因此, 目前 AWTCV 还面临着许多困难需要克服。

5 结语

肿瘤免疫治疗在肿瘤的众多治疗方式中扮演重要角色, 多项研究成果展现出巨大的发展前景, 而 AWTCV 在肿瘤的预防和治疗方面均表现出一定的优势。研究者可以通过寻找更有效的靶分子, 优化制备方案, 发展多种方式, 如联合治疗、佐剂加强效应和与高科技材料如纳米材料等相结合的策略, 改善 AWTCV 的治疗效果。因此, AWTCV 还具有很大的发展空间。

参考文献

- [1] Makita S, Yoshimura K, Tobinai K. Clinical development of anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for B-cell

- non-Hodgkin lymphoma[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(6): 1109-1118.
- [2] Zhai L, Tumban E. Gardasil-9: A global survey of projected efficacy[J]. *Antiviral Res*, 2016, 130: 101-109.
- [3] Srivatsan S, Patel JM, Bozeman EN, *et al*. Allogeneic tumor cell vaccines: The promise and limitations in clinical trials[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(1): 52-63.
- [4] Kumai T, Kobayashi H, Harabuchi Y, *et al*. Peptide vaccines in cancer-old concept revisited[J]. *Curr Opin Immunol*, 2017, 45: 1-7.
- [5] Zahm CD, Colluru VT, McNeel DG. DNA vaccines for prostate cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174: 27-42.
- [6] De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(8): 457-474.
- [7] Feig C, Jones JO, Kraman M, *et al*. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(50): 20212-20217.
- [8] Papaioannou NE, Beniata OV, Vitsos P, *et al*. Harnessing the immune system to improve cancer therapy[J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(14): 261.
- [9] Lee H, Herrmann A, Deng JH, *et al*. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(4): 283-293.
- [10] Ward-Hartstonge KA, Kemp RA. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response[J]. *Clin Transl Immunology*, 2017, 6(9): e154.
- [11] Solito S, Marigo I, Pinton L, *et al*. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1319: 47-65.
- [12] Le DT, Lutz E, Uram JN, *et al*. Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer[J]. *J Immunother*, 2013, 36(7): 382-389.
- [13] Yao X, Dong Z, Zhang Q, *et al*. Epithelial ovarian cancer stem-like cells expressing α -gal epitopes increase the immunogenicity of tumor associated antigens[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 956.
- [14] Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age[J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 480-489.
- [15] Chen M, Xiang R, Wen Y, *et al*. A whole-cell tumor vaccine modified to express fibroblast activation protein induces anti-tumor immunity against both tumor cells and cancer-associated fibroblasts[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14421.
- [16] Kan B, Yang L, Wen YJ, *et al*. Irradiated VEGF(164)-modified tumor cell vaccine protected mice from the parental tumor challenge[J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(2): 197-205.
- [17] Xue D, Liang Y, Duan S, *et al*. Enhanced anti-tumor immunity against breast cancer induced by whole tumor cell vaccines genetically modified expressing α -Gal epitopes[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(5): 2843-2851.
- [18] Chang MC, Chen YL, Chiang YC, *et al*. Mesothelin-specific cell-based vaccine generates antigen-specific immunity and potent antitumor effects by combining with IL-12 immunomodulator[J]. *Gene Ther*, 2016, 23(1): 38-49.
- [19] Kikuchi R, Sampetrean O, Saya H, *et al*. Functional analysis of the DEPDC1 oncoantigen in malignant glioma and brain tumor initiating cells[J]. *J Neurooncol*, 2017, 133(2): 297-307.
- [20] Obara W, Ohsawa R, Kanehira M, *et al*. Cancer peptide vaccine therapy developed from oncoantigens identified through genome-wide expression profile analysis for bladder cancer[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42(7): 591-600.
- [21] Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, *et al*. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy[J]. *Eur J Cancer*, 2016, 52: 50-66.
- [22] Montler R, Bell RB, Thalhoffer C, *et al*. OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor-infiltrating T cells in head and neck cancer[J]. *Clin Transl Immunology*, 2016, 5(4): e70.
- [23] Jahan N, Talat H, Curry WT. Agonist OX40 immunotherapy improves survival in glioma-bearing mice and is complementary with vaccination with irradiated GM-CSF-expressing tumor cells[J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20(1): 44-54.
- [24] Fourcade J, Sun ZJ, Pagliano O, *et al*. PD-1 and Tim-3 regulate the expansion of tumor antigen-specific CD8(+) T cells induced by melanoma vaccines[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(4): 1045-1055.
- [25] Zuazo M, Gato-Cañas M, Llorente N, *et al*. Molecular mechanisms of programmed cell death-1 dependent T cell suppression: Relevance for immunotherapy[J]. *Ann Transl Med*, 2017, 5(19): 385.
- [26] Shi X, Zhang X, Li J, *et al*. PD-1/PD-L1 blockade enhances the efficacy of SA-GM-CSF surface-modified tumor vaccine in prostate cancer[J]. *Cancer Lett*, 2017, 406: 27-35.
- [27] Toussi DN, Massari P. Immune adjuvant effect of molecularly-defined Toll-like receptor ligands[J]. *Vaccines (Basel)*, 2014, 2(2): 323-353.
- [28] Vasquez M, Tenesaca S, Berraondo P. New trends in antitumor vaccines in melanoma[J]. *Ann Transl Med*, 2017, 5(19): 384.
- [29] Li JK, Balic JJ, Yu L, *et al*. TLR agonists as adjuvants for cancer vaccines[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1024: 195-212.

(下转第 336 页)