

靶向肿瘤干细胞的免疫疗法

江 伦, 白 丽*

(大理大学 基础医学院 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000)

摘要: 由于肿瘤干细胞(TSCs)与肿瘤的发生、发展、转移、复发和耐药等有着密切关系,是肿瘤的根源细胞,意味着治愈肿瘤的关键途径可能在于根除 TSCs。因传统的手术、化疗和放疗等对肿瘤治疗的方法无法杀死 TSCs,容易导致肿瘤转移和复发,而靶向 TSCs 的免疫疗法已确定能杀伤 TSCs,如靶向 TSCs 的表面抗原、T细胞靶向 TSCs 的应用和分化疗法等。

关键词: 肿瘤;肿瘤干细胞;免疫疗法

中图分类号:R730.51 文献标志码:A

Immunotherapy of targeting at tumor stem cells

JIANG Lun, BAI Li*

(Yunnan Key Laboratory for Biomedical Research and Development of Insects, Basic Medical College, Dali University, Dali 671000, China)

Abstract: Tumor stem cells(TSCs), because of its close related to occurrence, development, metastasis, recurrence and drug resistance of tumor, are considered by research community as a root cell bank of the tumor. In other words, The key way to cure tumor may be to eradicate TSCs. The traditional surgery, chemotherapy and radiotherapy not only have few effect in killing TSCs, but result in recurrence and metastasis easily. However, TSCs can definitely killed by the immunotherapy targeting TSCs, for instance, targeting the surface antigens of TSCs', T cells targeting the TSCs, differentiation therapy and so on.

Key words: tumor; tumor stem cells; immunotherapy

肿瘤干细胞(tumor stem cells, TSCs)又叫癌干细胞(cancer stem cells, CSCs)和癌起始细胞(cancer initiating cells, CICs)等,是血液肿瘤和实体瘤中分离的一小群特殊细胞,具有高致癌作用,能长期自我更新,有分化成多种细胞谱系的能力,广泛参与肿瘤的发生、发展、转移、复发和耐药等过程^[1]。一个 TSCs 通过非对称分裂形成两个细胞,一个细胞保持母代干细胞的能力,另一个细胞则定向分化形成非肿瘤干细胞(non-stem cancer cells, NSCCs),成为

肿瘤块或者补充死亡的肿瘤细胞^[1-2],故认为 TSCs 是肿瘤的起始细胞或者种子细胞并且能维持肿瘤生存。因此,治愈肿瘤关键可能在于根除 TSCs。克隆进化模型理论^[3]认为,肿瘤的发生是由于基因连续突变积累的结果。基于此理论衍生出来的化疗、放疗以及手术疗法可能存在先天缺陷,虽能杀死大部分肿瘤细胞,但对 TSCs 无反应,残余的 TSCs 使肿瘤复发和转移。因此,众多学者认为利用人体免疫反应根除 TSCs 的免疫治疗有广阔的前景。

收稿日期:2016-12-30 修回日期:2017-04-25

基金项目:国家自然科学基金(81360319);云南省科技厅重点项目(2014FA007)

*通信作者(corresponding author): lbai@dali.edu.cn

1 靶向抗原的疗法

TSCs 和肿瘤微环境存在很多关键分子,靶向抗原治疗的关键分子主要包括 TSCs 肿瘤表面抗原、TSCs 传导信号通路检查点和形成肿瘤微环境的关键点。特异性地针对这些标志物的免疫细胞或者细胞因子,能直接或间接杀伤 TSCs。

1.1 靶向 TSCs 表面抗原

TSCs 抗原是指只表达或高表达于 TSCs 表面的新抗原。CD44 受体是位于 TSCs 表面的特异性肿瘤抗原,所有 CD44 受体或者亚型的配体都是透明质酸(hyaluronan, HA)。HA 与 CD44 受体结合产生的相互作用包括:1) 激活/调节膜上信号域,如转化生长因子 $\beta 1$ 型受体(transforming growth factor $\beta 1$ receptor, $\text{GF}\beta\text{R}1$) 和酪氨酸酶受体(ErbB2 和 EGFR),刺激细胞增殖。2) 介导非受体激酶,如 Src 家族或 Ras 家族的三磷酸鸟苷酶,通过中介最终激活蛋白激酶途径 MAPK 和 PI3 激酶,这些通路 with 细胞增殖、存活、迁移、入侵和抗药有密切关系。3) 刺激转代谢蛋白,使 TSCs 产生抗药性。4) 诱导细胞骨架改变,从而促进细胞移动和侵袭^[4]。总之,CD44 受体特异性抗原在 TSCs 中扮演重要角色。利用单克隆抗体 MEN-85 结合 CD44 的透明质酸盐结合域(hyaluronate-binding domain, HABD)的 C 端引起构象重排,将信号传入 HA 结合槽,导致 CD44 受体从 TSCs 表面脱落,从而阻断 HA-CD44 的信号通路^[5]。在此机制上,发现体外靶向 CD44 受体抗原治疗人胰腺癌的 TSCs^[6],能杀死 TSCs 和肿瘤细胞。此类特异性抗原可表达于多种 TSCs 的表面。一个 TSCs 也可以表达多种特异性抗原。如 CD44 受体还可以表达于肺癌以及乳腺癌的 TSCs^[4],乳腺癌的 TSCs 不仅表达 CD44 受体还表达 ALDH 分子^[3]。目前,TSCs 上发现不少特异性抗原,但此类抗原并不在所有类型肿瘤的 TSCs 表面都表达。将来的研究方向可能是找到高效通用的特异性抗原或者靶向多种特异性抗原的多效价抗体来治疗所有类型的肿瘤。

1.2 靶向信号通路抗原-检查点

信号通路在 TSCs 的生存、更新和转移中扮演重要角色,各条信号通路上均有关键蛋白被视为检查点。能增强基因转录因子的表达,提高肿瘤瘤块形成和 TSCs 发展肿瘤的能力,增加 TSCs 表面特异

性抗原的表达,抑制细胞凋亡等。Notch 信号通路在肿瘤微环境中异常活跃,运用抑制剂靶向阻断检查点的信号传递,能减少 TSCs 细胞数量和抑制肿瘤发生发展^[7]。Wnt 信号通路主要在干细胞以及分化过程中发挥作用,阻滞 Wnt 信号能降低 TSCs 表面分子 CD44 和乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)表达和抑制肿瘤自我更新和转移。刺猬信号通路(Hh)可维持 TSCs 生存;TGF- β 信号通路抑制适应性免疫反应和促进 TSCs 自我更新和抑制分化。可将检查点视为抗原,利用特异性单克隆抗体靶向阻滞检查点或靶向阻滞多条信号通路的各个检查点,比如 Notch 途径中成束蛋白和 Wnt 途径中的 β 连环蛋白联合阻滞,可能比药物单独阻滞精准高效。

1.3 靶向肿瘤微环境中的抗原

肿瘤微环境成分与 TSCs 有复杂的相互作用,前者包括间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、肿瘤相关的巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)、调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)、癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)、细胞因子和生长因子网络等。这些成分在支持和保持 TSCs 生存发挥重要作用。例如 Treg 细胞抑制免疫应答,CAFs 能合成肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种多样的生物因子,促进肿瘤细胞的生长和浸润,特别是微环境内的肿瘤细胞也能分泌的因子,能刺激 TSCs 自我更新,诱导血管生存,并招募免疫细胞和其他基质细胞分泌额外的因子促进肿瘤侵袭和迁移^[8]。针对这些成分,运用单克隆抗体靶向清除,打破 TSCs 肿瘤微环境的稳态,导致 TSCs 凋亡,可能是一个研究方向。

2 DC 疫苗靶向 TSCs 中的应用

树突状细胞疫苗已成为癌疫苗治疗 TSCs 的热点。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是已知的最强大的抗原呈递细胞,未成熟的 DCs 细胞刺激 T 细胞能力弱,接触抗原后变成成熟的 DCs,成熟的 DCs 能高效刺激 T 细胞产生免疫应答。在肿瘤 TSCs 的微环境中,成熟的 DCs 少,抗原呈递能力弱,将大量成熟 DCs 与 TSCs 溶解物制成疫苗用于治疗小鼠恶性黑色素瘤的实验中,证实大量成熟的 DCs 能有有效的

把抗原呈递给细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL), 产生适应免疫反应, 杀死 TSCs^[9]; 同时抑制血管相关因子 VEGF、VCAM 和 ICAM-1 的生成^[10]。DC 疫苗是通过成熟 DC 细胞与产物如转染的抗原, 纯化肽, 肿瘤细胞, 肿瘤细胞溶解物等共同包被, 增加内生抗原, 从而产生高效的免疫反应。通过 DC 疫苗包被不同产物构建 6 组实验, 发现基于树突状细胞和细胞因子诱导的杀伤细胞组 (DC-CIK) 效果比其他组 (包括基于 TSCs 溶解产物的 DC 疫苗) 更高效^[11]。基于 2003—2014 年的临床病例分析验证了 DC-CIK 组的疗效^[12]。DC 疫苗不能直接杀伤 TSCs, 但作为免疫杀伤细胞识别 TSCs 中重要的桥梁, 是激活杀伤细胞的关键。

3 过继免疫疗法在靶向 TSCs 治疗中的应用

3.1 T 细胞过继疗法

T 细胞是适应性免疫的主要效应细胞, 免疫应答中能形成记忆 T 细胞, 从而得到长久免疫力而被重视。CTL 和辅助性 T 细胞(helper T cell, Th) 是抗肿瘤的重要细胞。在体外实验, 活化的 T 细胞通过 NKG2D/DNAM1 系统激活 T 细胞溶解肿瘤细胞, 而且确定能杀死 TSCs。T 细胞通过细胞与细胞接触方式被活化, T 细胞表面的 NKG2D 分子是识别抗原的重要受体, 未激活状态的 T 细胞 NKG2D 分子表达低, 识别能力弱。同时 TSCs 表面过度表达腱生蛋白 C (tenascin-C), 此蛋白能与 T 细胞的整合素结合, 阻断 T 细胞受体与配体结合时产生的信号传入细胞内部, 从而阻断识别 TSCs, 最终抑制 T 细胞活化和增殖。TSCs 高表达 TGF- β 和 PD-1 配体以及微环境中 Treg 细胞等也发挥了抑制 T 细胞的活化增殖的功能。用 IL-2 活化 T 细胞, 将活化的 T 细胞在体外或过继小鼠体内都能通过抗特异性抗原 Ep-CAM, 从而靶向杀死 TSCs^[13]。

3.2 NK 细胞过继疗法

自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 是 1980 中期发现的免疫细胞, 人 NK 细胞以表面有 CD56 和 CD16 (Fc γ RIII) 分子为特征, 具有抗肿瘤、抗微生物感染和参与排斥反应的能力。近年研究表明, NK 细胞可能是适合杀伤 TSCs 的细胞。原因如下: 1) 抗肿瘤免疫中, NK 细胞无需像 T 细胞一样接受处理的抗原呈递, 而是通过表面活化性受体如

NKG2D/NKG2C 等对“自身”与“非己”进行快速识别, 并直接杀伤肿瘤细胞和靶细胞; 也可通过 ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 作用或者 (和) 分泌细胞因子协助杀伤肿瘤细胞^[14-15], 在免疫监视中以效应细胞发挥重要作用。2) NK 细胞能表达 MHC I 类分子协助识别靶细胞。3) NK 细胞优先靶向杀伤特异性抗原过表达的 TSCs, 同时杀伤 NSCCs, 从而完全清除肿瘤^[16]。4) TSCs 低表达 MHC I 类分子和高表达配体分子, 配体分子能被 NK 细胞识别, 此特性能被 NK 细胞很好的识别并杀死 TSCs。目前, NK 细胞过继免疫疗法已经在恶性血液肿瘤方面得到验证, 但在实体肿瘤治疗效果不佳, 主要是因为机体无能力提供足够的活化 NK^[14, 17]。Ames^[14] 则通过体外培养 NK 细胞并活化, 然后将 NK 细胞过继给小鼠, 观察到活化的 NK 细胞能优先杀伤 TSCs。由此可以推断, 如能活化 NK 细胞并增加足够的数量, 加上 NK 细胞先天优势, 则抗肿瘤能事半功倍。

3.3 CIK 过继疗法

早期, 细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine-induced killer cell, CIK) 作为辅助治疗肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), 能减少肿瘤复发率, 延长无病生存和总生存率^[18], 展示免疫治疗前景。进一步研究发现, CIK 细胞共表达 CD3 和 CD56, 具有自然杀伤淋巴细胞的细胞毒性的特点^[19-20]。故将 CIK 细胞在体外激活增殖后过继给患者, 以提高患者抗肿瘤的免疫力。CIK 细胞过继疗法早期用于抗自体黑色素瘤的 TSCs; 继而, 有 CIK 细胞能杀死自体转移性骨肉瘤和软组织肉瘤等其他实体肿瘤 TSCs 的报道^[21-22]。CIK 细胞能高效杀死 TSCs 和杀死 NSCCs, 主要通过表面受体 NKG2D/NKp30 和 DNAM-1 直接识别靶细胞的机制和分泌因子协助抗肿瘤细胞。相比 T 细胞识别 TSCs 受主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 限制而言, 此机制使 CIK 细胞具有更强效杀死 TSCs 和非 TSCs 的肿瘤细胞的能力^[23]。

4 分化疗法在靶向 TSCs 疗法中的应用

正常细胞一般具有密度抑制依赖的特性, 即细胞分化增殖一定数量后会反馈抑制细胞分裂, 使细

胞分裂停止。TSCs 能持续通过非对称分裂,既保留了子代干细胞,又分化新的肿瘤细胞来形成肿瘤块或者更新凋亡的肿瘤细胞。因此,TSCs 不仅失去了密度抑制依赖的特性,而且还使 TSCs 处于动态的未分化状态。运用细胞因子 IL-15 分化治疗肾癌,希望通过分化肾癌 TSCs 使此细胞最终形成高分化细胞,从而失去干细胞特性^[19],但结果注定令人失望。因为 NSCCs 在肿瘤微环境下,能转化成 TSCs 并获得干细胞特性^[24]。故在未阐明肿瘤微环境的作用以及 TSCs 与 NSCCs 转化机制前,分化疗法将受限制。

5 免疫增强剂在靶向 TSCs 疗法中的应用

适应性免疫是抗肿瘤的主要部分,但由于肿瘤微环境中不仅缺乏适当的 T 细胞共刺激信号和高亲和力的 T 细胞配体来激活 T 细胞,而且肿瘤微环境中的 Treg 细胞和 IL-10、IL-13 和 TGF- β 等细胞因子共同抑制抗肿瘤免疫反应,使活化的 T 细胞减少且效率降低、适应性免疫反应迟缓,从而导致 TSCs 处于免疫豁免状态。现已发现 CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4) 和 PD-1 (programmed death 1) 信号通路与 TSCs 的免疫豁免状态有关,CTLA-4 和 PD-1 受体或者配体的抗体等能提高适应性免疫抗 TSCs 的免疫力^[25]。

6 存在问题与展望

随着研究证实 TSCs 与肿瘤的发生、发展、转

移和复发等有着密切关系,TSCs 是肿瘤生长的起始细胞,治疗肿瘤关键可能在于根除 TSCs,从而吸引越来越多的国内外学者的广泛关注和研究。免疫疗法被认为是继化疗、放疗和手术后的治疗肿瘤的重要方法。靶向标记分子的治疗,具有一定的效果。但是,TSCs 自我更新和抗原漂移的问题还需要进一步研究。DC 疫苗在一定程度上解决了 T 细胞识别 TSCs 的问题,但处于肿瘤微环境的 T 细胞功能弱,可能需要与 T 细胞过继疗法结合。NK 细胞和 CIK 细胞是目前最具潜力的抗肿瘤细胞,人体治疗也收到良好的疗效;但只在特定肿瘤的特定阶段起作用,缺乏普遍性,必须进一步研究其治疗机制。当前分化疗法虽然受限,但随着机制逐步阐明,此疗法可能会是一个不错选择。鉴于肿瘤的发生发展转移复发是多方面多层次的原因,单独治疗效果往往有限,联合治疗将是必然的趋势。如细胞因子先活化 CIK 细胞,然后 CIK 细胞联合 DCs 抗 TSCs,免疫增强剂与过继免疫联合等,所以肿瘤的治疗是一个系统的过程,需要整个免疫系统、多种免疫方法参与。总的来说,免疫治疗大部分处于理论研究阶段,还需要回答很多问题,如实验所用 TSCs 是否具有肿瘤的异质性,实验模型与临床相关性有多少,免疫细胞与肿瘤微环境和 TSCs 的相互作用等。虽然研究成果取得阶段性成果,但是距离治愈肿瘤任重而道远。

参考文献:

- [1] Koren S, Bentires-Alj M. Breast tumor heterogeneity: source of fitness, hurdle for therapy[J]. *Mol Cell*, 2015, 60:537-546.
- [2] Zhong C, Wu JD, Fang MM, *et al*. Clinicopathological significance and prognostic value of the expression of the cancer stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36: 7623-7630.
- [3] Peiris-Pages M, Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, *et al*. Cancer stem cell metabolism[J]. *Breast cancer Res*, 2016, 18:55-64.
- [4] Thapa R, Wilson GD. The importance of CD44 as a stem cell biomarker and therapeutic target in cancer[J/OL]. *Stem Cell Int*, 2016, 2016: 2087204- 2087219. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200096>. doi: 10.1155/2016/2087204.
- [5] Skerlova J, Kral V, Kachala M, *et al*. Molecular mechanism for the action of the anti-CD44 monoclonal antibody MEM-85[J]. *J Struct Biol*, 2015, 191:214-223.
- [6] Li L, Hao X, Qin J, *et al*. Antibody against CD44s inhibits pancreatic tumor initiation and postradiation recurrence in mice[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146:1108-1118.
- [7] Mamaeva V, Niemi R, Beck M, *et al*. Inhibiting notch activity in breast cancer stem cells by glucose

- functionalized nanoparticlesscarrying gamma-secretase inhibitors[J]. *Mol Ther*,2016,24:926-936.
- [8] Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? [J]. *Cell Stem Cell*,2015,16:225-238.
- [9] Dashti A, Ebrahimi M, Hadjati J, *et al.* Dendritic cell based immunotherapy using tumor stem cells mediates potent antitumor immune responses[J]. *Cancer Lett*,2016, 374:175-185.
- [10] Zhou X, Liao Y, Li H, *et al.* Dendritic cell vaccination enhances antiangiogenesis induced by endostatin in rat glioma[J]. *J Cancer Res Ther*,2016,12:198-203.
- [11] Chen Q, Cui XX, Liang PF, *et al.* Immunotherapy with dendritic cells and cytokine-induced killer cells for MDA-MB-231 breast cancer stem cells in nude mice[J]. *Am J Transl Res*,2016,8:2947-2955.
- [12] Han RX, Liu X, Pan P, *et al.* Effectiveness and safety of chemotherapy combined with dendritic cells co-cultured with cytokine-induced killer cells in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9: e108958. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4182599>. doi:10.1371/journal.pone.0108958.
- [13] Deng Z, Wu Y, Ma W, *et al.* Adoptive T-cell therapy of prostate cancer targeting the cancer stem cell antigen Ep-CAM[J]. *BMC Immunol*,2015,16:1-9.
- [14] Ames E, Murphy WJ. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*,2014,63:21-28.
- [15] Diessner J, Bruttel V, Becker K, *et al.* Targeting breast cancer stem cells with HER2-specific antibodies and natural killer cells [J]. *Am J Cancer Res*, 2013, 3: 211-220.
- [16] Talerico R, Todaro M, Di Franco S, *et al.* Human NK cells selective targeting of colon cancer-initiating cells: a role for natural cytotoxicity receptors and MHC class I molecules [J]. *J Immunol*,2013,190:2381-2390.
- [17] Klingemann HG. Cellular therapy of cancer with natural killer cells where do we stand? [J]. *Cytotherapy*,2013, 15:1185-1194.
- [18] Chen JL, Lao XM, Lin XJ, *et al.* Adjuvant cytokine-induced killer cell therapy improves disease-free and overall survival in solitary and nonmicrovascular invasive hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2016,95:e2665-e2674.
- [19] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [J]. *J Cancer*, 2011, 2: 363-368.
- [20] Schmidt TL, Negrin RS, Contag CH. A killer choice for cancer immunotherapy [J]. *Immunol Res*, 2014, 58: 300-306.
- [21] Kim JS, Kim YG, Park EJ, *et al.* Cell-based immunotherapy for colorectal cancer with cytokine-induced killer cells[J]. *Immune Network*,2016,16:99-108.
- [22] Rong XX, Wei F, Lin XL, *et al.* Recognition and killing of cancer stem-like cell population in hepatocellular carcinoma cells by cytokine-induced killer cells via NKG2d-ligands recognition [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5:e1086060-e1086074.doi:10.1080/2162402X.2015. 1086060.
- [23] Azzi S, Bruno S, Giron-Michel J, *et al.* Differentiation therapy: targeting human renal cancer stem cells with interleukin 15[J]. *J Natl Cancer Inst*,2011,103:1884-1898.
- [24] Chen W, Dong J, Haiech J, *et al.* Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy [J/OL]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 1740936- 1740949. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4932171/>. doi:10.1155-2016-1740936.
- [25] Hirohashi Y, Torigoe T, Tsukahara T, *et al.* Immune responses to human cancer stem-like cells/cancer-initiating cells[J]. *Cancer Sci*,2016,107:12-17.