

DOI: 10.13376/j.cbls/2017115

文章编号: 1004-0374(2017)09-0855-09



吴扬哲, 理学博士, 暨南大学生物医学转化研究院副研究员。目前已在专业学术期刊上发表研究论文 40 余篇, 其中 h-index 为 14, i10-index 为 20 (谷歌学术)。研究方向主要包括: (1) $\gamma\delta$ T 细胞抗肿瘤的机制及临床应用研究; (2) 纳米粒子在 $\gamma\delta$ T 细胞抗肿瘤免疫中的机制及应用。



尹芝南, 德国柏林自由大学免疫学博士, 暨南大学生物医学转化研究院院长。国家杰出青年基金获得者, 科技部重大科学研究计划首席科学家, 教育部“长江学者”特聘教授, 高层次海外留学归国创业人才, 国家人力资源和社会保障部新“百千万”人才工程“有突出贡献中青年专家”。目前的研究方向主要包括: (1) 小鼠 $\gamma\delta$ T 细胞生物学; (2) 人 $\gamma\delta$ T 细胞与疾病; (3) 小分子药物筛选与机制研究; (4) 肠道菌群与免疫系统相互作用; (5) CD4 T 细胞 mTOR、miR-146a 等关键基因的调节功能研究; (6) 免疫分子与心理学相互关系研究等。

人 $\gamma\delta$ T细胞的抗肿瘤临床免疫治疗新进展

谈思怡^{1,3}, 向征², 徐艳¹, 吴扬哲^{1*}, 尹芝南^{1*}

(1 暨南大学生物医学转化研究院及附属第一医院, 广州 510632; 2 香港大学李嘉诚医学院儿童及青少年科学系, 转化免疫学实验室, 香港; 3 中山大学肿瘤防治中心生物治疗中心, 广州 510060)

摘要: $\gamma\delta$ T 细胞自发现 30 余年来, 其研究较其他免疫细胞相对滞后, 甚至被认为是进化的“残留物 (relics)”。但越来越多的研究显示, $\gamma\delta$ T 细胞在人的免疫功能中发挥着非常重要的作用, 是天然免疫与获得性免疫的“桥梁”。近年来, $\gamma\delta$ T 细胞的抗肿瘤、抗感染的相关研究表明了 $\gamma\delta$ T 细胞在肿瘤免疫与感染免疫中具有重要功能和临床应用价值。V γ 9V δ 2 亚群是只存在于外周血的一类人 $\gamma\delta$ T 细胞, 其数量虽少, 但其功能全面、强大。相比肿瘤或传染病患者自体 $\gamma\delta$ T 细胞的功能被抑制或“后天不足”, 健康人来源的同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞由于功能健康, 其临床应用价值更具优势。现以抗肿瘤应用为落脚点, 综述人 $\gamma\delta$ T 细胞的生物学功能, 识别肿瘤细胞的分子免疫机制, 并简单总结国际上自体 $\gamma\delta$ T 细胞抗肿瘤的应用进展; 同时, 简述国际上最新关于同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞在抗肿瘤方面的应用动态, 并介绍了笔者团队同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞治疗肿瘤的进展概况。

关键词: 同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞; 抗肿瘤免疫治疗; 临床应用

中图分类号: R735; R392.3

文献标志码: A

收稿日期: 2017-09-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31570898); 广州市健康医疗协同创新重大专项(201604020006); 广东省自然科学基金项目(2016A030313112)

*通信作者: 吴扬哲, E-mail: tyzwu@jnu.edu.cn; 尹芝南, E-mail: zhinan.yin@yale.edu

Recent progress on human $\gamma\delta$ T cells based tumor immunotherapy

TAN Si-Yi^{1,3}, XIANG Zheng², XU Yan¹, WU Yang-Zhe^{1*}, YIN Zhi-Nan^{1*}

(1 Biomedical Translational Research Institute, The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2 Li Ka Shing Faculty of Medicine, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, Laboratory for Translational Immunology, University of Hong Kong, Hong Kong SAR; 3 Department of Biotherapy, Sun Yat-Sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

Abstract: Human $\gamma\delta$ T cells have been treated as evolutionary relics for a long time since the discovery in 1986. Therefore, people paid much less attention to this specific group of T lymphocytes than other types of immune cells. However, increasing reports showed that $\gamma\delta$ T cells play many important roles in human immune responses, and “bridge” between innate immunity and acquired immunity. Among several subsets of $\gamma\delta$ T cells, V γ 9V δ 2 subset only represents in peripheral blood of human and primates. Although the small population in T lymphocytes, investigations on this group of $\gamma\delta$ T cells during the past a few years revealed that they directly involve in both anti-tumor and anti-infections, and that they can be applied in clinical treatment of tumor and infection using adoptive infusion. In this review, focused on anti-tumor application of $\gamma\delta$ T cells, we discussed the immunological function of $\gamma\delta$ T cells, and the molecular mechanism of how $\gamma\delta$ T cells recognize cancer cells. Then, we summarized literature reports on using autologous $\gamma\delta$ T cells in tumor immunotherapy. In the end, we briefly reviewed the latest international progress on allogenic $\gamma\delta$ T cells in anti-tumor research, and then we presented the work progress of our own group on research and development of allogenic $\gamma\delta$ T cells in anti-tumor and anti-infection.

Key words: allogenic $\gamma\delta$ T cells; anti-tumor immunotherapy; clinical application

T淋巴细胞在人的免疫功能响应及调控等过程中发挥关键作用。人的T淋巴细胞根据其细胞表面受体(TCR)结构的不同,可以分为 $\alpha\beta$ (如CD4、CD8等)和 $\gamma\delta$ T细胞两大类(图1)。人外周血淋巴细胞以 $\alpha\beta$ T细胞为主, $\gamma\delta$ T细胞一般只占1%~5%。由于细胞表面受体结构的差异,这两类细胞的功能以及在免疫应答中的响应机制也有显著差异,比如 $\alpha\beta$ T细胞对抗原的识别依赖于MHC分子,而 $\gamma\delta$ T细胞对抗原的识别则不需要MHC分子的参与,且其本身就具有抗原提呈特性与功能。

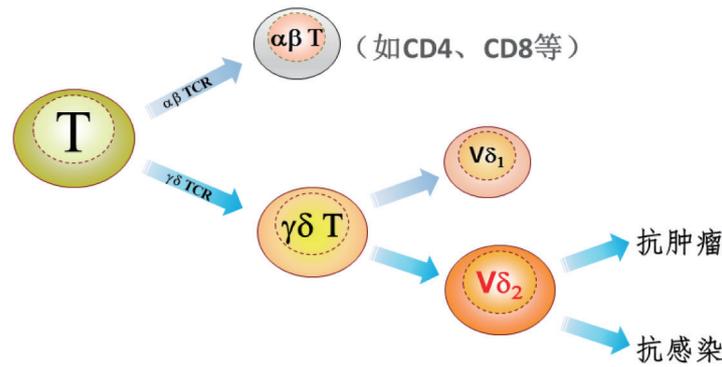
根据 γ 链和 δ 链的结构差异, $\gamma\delta$ T细胞又可以分为两个主要的亚群,即V δ 1和V δ 2。由于 γ 、 δ 链结构的不同,各亚群的功能也有差异,比如V δ 2细胞亚群就具有抑制病菌感染及抗肿瘤的特性(图1)。V γ 9V δ 2亚群(即V δ 2)是只存在于人类和灵长类的一类 $\gamma\delta$ T细胞。在人外周血中,50%~90%的 $\gamma\delta$ T细胞均表达V γ 9V δ 2受体分子。目前,对V γ 9V δ 2这一亚群T细胞的免疫功能研究,特别是基于其对各种癌症进行免疫疗法的相关研究已经在国际上受到愈来愈多的免疫学家和研究人员的重视。越来越多的研究报道表明,V γ 9V δ 2T细胞对肿瘤的发生发展具有非常重要的抑制作用,能显著抑制肿瘤细胞的生长,同时对病毒(如乙肝病毒)、细菌(如结核菌)感染具有治疗作用。这一群 $\gamma\delta$ T

细胞(本文均指V γ 9V δ 2亚群)同时兼具抗肿瘤、抗感染能力。

人类 $\gamma\delta$ T细胞具有很多独特的生物学功能。根据其分布和T细胞受体以及抗原识别模式,这群细胞被认为是连接天然免疫和适应性免疫的“桥梁”。 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤细胞、细菌、病毒感染细胞的杀伤不受MHC分子的限制, $\gamma\delta$ T细胞介导的免疫应答无需抗原提呈细胞参与,可以选择性地识别、杀伤肿瘤细胞和被病菌感染的细胞。目前 $\gamma\delta$ T细胞(患者自体细胞)已用于多种晚期实体瘤的临床试验研究,显示出了很好的安全性及一定的疗效。 $\gamma\delta$ T细胞目前已成为肿瘤细胞疗法中的重要组成部分,也是目前免疫细胞治疗研究领域的一个重要热点。本文综述了V γ 9V δ 2T细胞的生物学特征、识别及杀伤肿瘤细胞的分子机制,以及临床研究现状,最后简单介绍笔者团队的最新研究进展。

1 $\gamma\delta$ T细胞的生物学特点

在成人外周血及淋巴组织中, $\gamma\delta$ T细胞占CD3⁺T淋巴细胞的1%~10%,10%~30%在小肠黏膜中被发现,并有少量的 $\gamma\delta$ T细胞(少于5%) in 舌部及生殖系统中被发现^[1-4]。人的 $\gamma\delta$ T细胞主要根据它们的V δ 链来区分,V δ 1⁺细胞主要分布在胸腺和外周组织中,而共表达V δ 2链和V γ 9链的V γ 9V δ 2T



人的T细胞根据受体结构的差异, 可以分成 $\alpha\beta$ (如CD4、CD8等)和 $\gamma\delta$ T细胞两大类。而 $\gamma\delta$ T细胞又可以分为V δ 1和V δ 2两个亚群。其中V δ 2兼具抗肿瘤、抗感染的双重能力。

图1 T细胞分类及其亚群

细胞在外周血中占多数^[5]。在健康人的外周血和淋巴器官中, 大多数 $\gamma\delta$ T细胞主要是V γ 9V δ 2T细胞^[6]。大量的体外实验与临床数据已证实, V γ 9V δ 2T细胞在抗肿瘤免疫及免疫细胞治疗中发挥着重要的作用。

$\gamma\delta$ T细胞最大的特点是共表达TCR $\gamma\delta$ 链及NK细胞的重要受体NKG2D, 因此, $\gamma\delta$ T细胞兼具了T细胞和NK细胞的功能。 $\gamma\delta$ T细胞除了能以非MHC分子限制性的方式直接识别和杀伤肿瘤细胞以及病菌感染的细胞外, 还可以通过分泌各种细胞因子来活化其他的免疫细胞, 如树突状细胞、巨噬细胞、CD8⁺T淋巴细胞等。自1986年发现人 $\gamma\delta$ T细胞, 近30多年来众多的研究工作表明, 这群特殊的T细胞参与调控了人体多种生理功能, 包括免疫内稳态、免疫保护、免疫监视、炎症和自身免疫^[7]等。因此, 在人外周血中, $\gamma\delta$ T细胞数量虽然较少, 但是功能十分重要、强大, 是T细胞中的“特种部队”。

2 $\gamma\delta$ T细胞识别肿瘤细胞的分子机制

$\gamma\delta$ T细胞, 包括V δ 2⁺、V δ 1⁺细胞亚群, 均能够识别肿瘤细胞上表达水平异常升高的分子、热休克蛋白, 以及异位表达的离子通道蛋白、磷酸盐分子等。对于这些蛋白、分子以及代谢产物等, $\gamma\delta$ T细胞可以通过TCR以及NKG2D等受体一一对其进行识别, 也可同时进行识别与结合^[8](图2)。

甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway) 是以乙酰辅酶A为原料合成异戊二烯焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 和二甲烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 的一条代谢途径, 存在于

所有高等真核生物和很多病毒中。该途径的中间产物是活化的异戊二烯单位, 是类固醇、类萜等生物分子的合成前体。有报道显示, 大多数人类癌症出现的p53突变可以显著上调肿瘤细胞中的甲羟戊酸途径, 所以IPP及其同分异构体DMAPP于肿瘤细胞中积累有助于 $\gamma\delta$ T细胞识别和杀伤肿瘤细胞^[9-10]。双磷酸盐类已广泛用于治疗骨质疏松症、转移性骨病、多发性骨髓瘤、乳腺癌及前列腺癌等恶性肿瘤, 抑制法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP) 合成酶, 致使胞内上游分子IPP及DMAPP聚集^[11]。这也是我们利用小分子磷酸盐药物帕米磷酸盐 (pamidronate, PAM) 或唑来膦酸盐 (zoledronate, Zol) 等体外扩增获得大量V γ 9V δ 2T细胞用于临床试验研究的原理^[6]。

$\gamma\delta$ T细胞可通过TCR等受体感知IPP水平的变化, 以靶细胞所展示的“压力信号”, 如MHC I相关链A和链B (MHC class I-related chain A and chain B, MICA/MICB)、巨细胞病毒糖蛋白UL16结合蛋白 (UL16 binding proteins, ULBPs) 和人类mutS同源蛋白2 (human MS homolog 2, hMSH2) 区分肿瘤细胞和正常细胞^[12]。TCR依赖性激活后, V γ 9V δ 2T细胞通过释放效应分子识别并杀死肿瘤细胞, 如颗粒酶、穿孔素及Th-1相关细胞因子。通过Fas/FasL、NKG2D、TRAIL、TNF- α 途径以及CD16分子介导的ADCC作用, 诱导肿瘤细胞凋亡。除了激活性受体外, 还有NKG2A/CD94等抑制性受体相互作用来调节V γ 9V δ 2T细胞活性。此外, 淋巴细胞功能相关抗原-1 (lymphocyte function antigen-1, LFA-1)、细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 也参与调节V γ 9V δ 2T

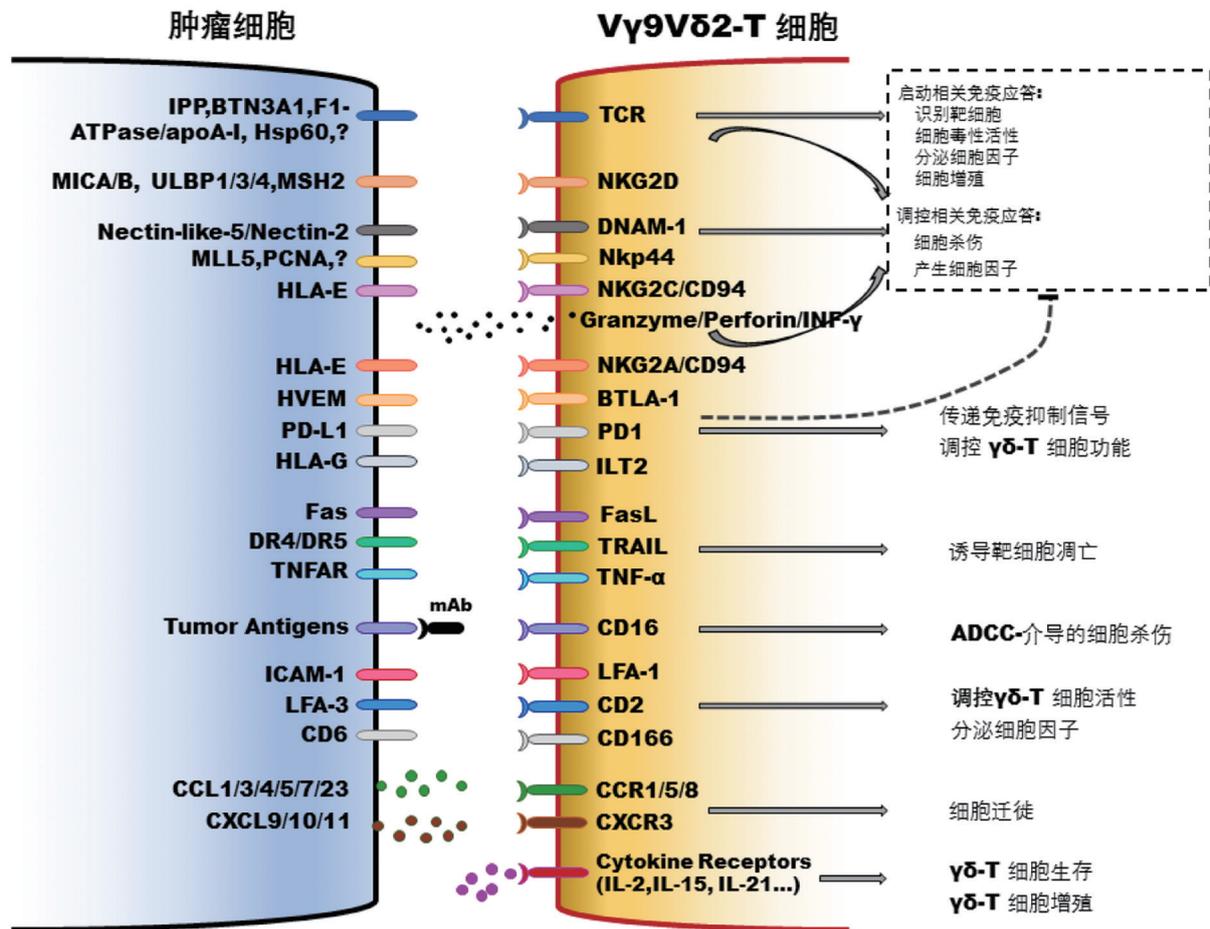


图2 $\gamma\delta$ T细胞识别、杀伤肿瘤细胞过程所涉及分子相互作用机制的示意图(改编自[13])。

细胞的抗肿瘤活性。趋化因子受体 CCR5 具有调控 $V\gamma 9V\delta 2$ T 细胞迁移到肿瘤部位的能力。另外, $V\gamma 9V\delta 2$ T 细胞的生长及增殖由不同的细胞因子调节, 如 IL-2 及 IL-15 等。

3 $\gamma\delta$ T细胞介导的肿瘤免疫

近年来, 大量的研究表明 $\gamma\delta$ T 细胞是介导肿瘤免疫的重要组成部分之一。 $\gamma\delta$ T 细胞在抗肿瘤免疫应答中的贡献包括“效应”功能和“辅助”功能。首先, $\gamma\delta$ T 细胞参与和介导抗肿瘤活性的关键步骤包括: (1) 活化。 $\gamma\delta$ T 细胞在外周血中受 TCR 相关配体 [磷酸抗原 (phosphoantigens, P-Ags) 或者肿瘤细胞内源性 IPP] 刺激后被激活^[14]。(2) 迁移。活化的 $\gamma\delta$ T 细胞上调趋化因子受体, 随后利用趋化因子梯度被招募至肿瘤部位。(3) 细胞毒性活性。到达肿瘤后, $\gamma\delta$ T 细胞浸润肿瘤组织内识别并杀死肿瘤细胞。(4) 免疫抑制。在肿瘤微环境中, 肿瘤细胞及其他细胞 (如基质细胞、肿瘤相关巨噬细胞) 产

生免疫抑制细胞因子诱导 $\gamma\delta$ T 细胞表现出与 Th17 及 Treg 相似的特征。此外, $\gamma\delta$ T 细胞抗肿瘤活性可以通过其表面表达抑制性受体, 如 PD-1, 及与肿瘤细胞上表达的相应的配体结合而被抑制。(5) 促肿瘤生长。被极化的 $\gamma\delta$ T 细胞可以分泌直接促进肿瘤生长的 IL-17, 另外其产生的 IL-4、IL-10 及 TGF- β 不仅可以招募免疫抑制细胞, 如骨髓来源的抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs), 还可以抑制天然和适应性免疫介导的抗肿瘤反应^[15-18]。

$\gamma\delta$ T 细胞的抗肿瘤效应功能主要包括: (1) $\gamma\delta$ T 细胞既可通过与 TCR 配体磷酸抗原、F1-ATPase、BTN3A1、EPCR 等相互作用识别肿瘤细胞^[14], 又可通过固有受体的配体 ULBP、MICA/B、Nectin-like 5 等相互结合, 诱导 $\gamma\delta$ T 细胞活化, 依赖穿孔素-颗粒酶途径、Fas-FasL、肿瘤细胞坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 相关凋亡诱导配体受体 (TNF-related apoptosis inducing ligand receptors, TRAILR)

等途径介导免疫反应, 直接杀死肿瘤细胞或是被病毒感染后的正常细胞^[19-20]。(2) 与NK细胞类似, $\gamma\delta$ T细胞表达的CD16 (Fc γ RIII) 受体可以结合免疫球蛋白G (IgG) 的Fc段。磷酸抗原激活后的 $\gamma\delta$ T细胞可以上调CD16的表达水平^[21], 从而增强了ADCC (antibody- dependent cell-mediated cytotoxicity), 即抗体依赖的细胞毒性作用。有体外研究表明, 临床应用肿瘤治疗单克隆抗体, 如利妥昔单抗 (Rituximab)、赫赛汀 (Trastuzumab)、阿来组单抗 (Alemtuzumab) 可以通过CD16介导ADCC激活 $\gamma\delta$ T细胞^[22-24]。

$\gamma\delta$ T细胞的辅助抗肿瘤功能主要包括: (1) 活化后的 $\gamma\delta$ T细胞可分泌大量的TNF- α 及IFN- γ , 这两种细胞因子是主导抗肿瘤、抗感染的两种细胞因子^[25-26]; 并表达CD40L, 可以促进DC和巨噬细胞成熟与活化, 这些成熟的DC细胞及活化的巨噬细胞随后可以诱导CD4、CD8 $\alpha\beta$ T细胞的分化, 从而提高其适应性抗肿瘤免疫应答^[27-30]。(2) 一些研究显示, 激活的 $\gamma\delta$ T细胞也可以行使APC功能, 通过表达MHC I和II、CD40、CD83、CD86分子, 激活固有免疫细胞及 $\alpha\beta$ -T细胞的抗肿瘤活性^[31-32]。(3) Schneiders等^[33]研究显示激活的 $\gamma\delta$ T细胞可以提呈糖脂抗原给恒定自然杀伤T细胞 (invariant natural killer T-cells, iNKT), 从而促进其抗肿瘤免疫。(4) 表达CD137L的 $\gamma\delta$ T细胞可以与NK细胞表面上的CD137共刺激分子结合, 共刺激信号可上调NK细胞的细胞毒活性从而杀死一般NK细胞无能为力的实体瘤细胞^[34]。(5) 尽管IL-17 ($\gamma\delta$ T细胞也是一种Th-17细胞) 在肿瘤免疫中的生物学功能仍有争议^[35-38], 但通过一些体外和动物实验研究表明, 它们可能通过间接机制参与抗肿瘤免疫反应^[35]。

4 $\gamma\delta$ T细胞肿瘤临床试验研究进展

在过去的近半个世纪当中, 人类一直在寻找有效的途径以达到对恶性肿瘤的治疗目的。长期以来, 手术、化疗、放疗都是临床上治疗肿瘤的常规手段, 但它们都有自己的局限性和严重的副作用。目前, 免疫细胞疗法已经是肿瘤的“第四类”新型疗法, 是当代生物学技术发展的综合产物, 它不仅弥补了传统治疗手段的局限性, 也是被人们寄予厚望的、最有发展前景的一类治疗手段。

4.1 $\gamma\delta$ T细胞在同类免疫细胞治疗中的优势

从20世纪60~70年代开始, 研究人员已经发现人类自身的淋巴细胞可以杀死和清除肿瘤细胞。到目前为止, 细胞免疫治疗随着我们对肿瘤免疫学

的深入研究而得到了长足发展。从早期的淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK)、细胞因子诱导的杀伤性细胞 (CIK)、辅以树突状细胞的DC-CIK、肿瘤浸润性T淋巴细胞 (TIL)、肿瘤抗原特异性的T淋巴细胞 (TCR-T), 到目前刚刚在美国上市的嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T), 这些细胞免疫治疗从非特异性、广谱性发展至现在的特异性、精准性, 它们在临床中为治疗肿瘤发挥了重要的作用。

但是, 以上提及的几种细胞治疗手段也存在着不足之处。例如, LAK和CIK (包括DC-CIK) 在体外扩增杀伤性细胞的同时, 也会扩增调节性T细胞 (Treg), 回输至患者体内后, 反而进一步抑制体内免疫系统控制肿瘤生长的能力。而对于TIL, 目前主要受限于很难从实体瘤组织内收集足够数目的具有肿瘤杀伤能力的T淋巴细胞, 使得体外扩增比较困难。TCR-T和CAR-T是当前最为热门的细胞免疫治疗策略, 在血液肿瘤中已取得令人瞩目的治疗效果。但受其自身细胞特性的影响, 在治疗实体瘤上还没有突破。另外, 基因改造技术要求高、毒副作用、脱靶效应、过度活化引起的细胞因子风暴, 杀伤体内表达CD19或CD20分子的正常细胞、高昂的制备成本等均制约着CAR-T或TCR-T的临床应用。

目前, 基于 $\gamma\delta$ T细胞的免疫细胞疗法已受到越来越多的关注和重视, 主要原因是 (表1): $\gamma\delta$ T细胞可以快速地在体外和体内特异性大量扩增的同时而不扩增Treg; 对于血液瘤和实体瘤都有良好的治疗效果; 对于人体内的正常细胞没有杀伤能力; 无需基因改造即有强大的杀伤能力。

4.2 自体 $\gamma\delta$ T细胞的抗肿瘤临床研究进展

由于 $\gamma\delta$ T细胞独特的优势, 近十年来, 研究者们已经开展了很多 $\gamma\delta$ T用于肿瘤治疗的临床研究。但是, 到目前为止, 所有的文献报道均是利用患者自体的 $\gamma\delta$ T或直接体内扩增或体外扩增后回输患者体内, 以达到治疗的目的。体内扩增的原理是, 用治疗骨质疏松症药物的小分子磷酸盐, 如帕米磷酸盐、唑来膦酸盐等, 与低剂量重组白介素-2 (IL-2) 联用, 以实现体内扩增 $\gamma\delta$ T细胞治疗肿瘤的目的^[6]。体外扩增则是将患者外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 利用小分子磷酸盐加IL-2扩增后回输患者用于过继免疫治疗, 这也是目前大部分文献报道研究的做法。

自体 $\gamma\delta$ T细胞在抗肿瘤免疫治疗中的安全性和有效性在大量的临床试验中已经得到确认, 对于

表1 与其他免疫细胞疗法相比, $\gamma\delta$ T细胞的优势和特点

	$\gamma\delta$ T	CAR-T	NK	TCR-T	DC-CIK
治疗价格/次	~¥10 000	~¥100 000	~¥20 000	/	~¥20 000
制备过程	易体外扩增, 纯度>95%	技术要求高, 制备复杂。~30%	易体外扩增, 纯度>80%	用基因技术修改 TCR提高亲和力、杀伤力	肿瘤抗原处理DC, 细胞因子诱导培养CIK
细胞来源	健康人/血站 PBMC (异体)	自体	自体	自体	自体
脱靶率	具广谱性, 选择性杀伤癌细胞	脱靶导致严重毒副作用	/	有脱靶风险	/
便捷性	能大量冻存, 可即时使用	必须运回工厂, 当次生产 当次使用	当次生产 当次使用	当次生产 当次使用	当次生产 当次使用
副作用	无	可引发严重细胞因子风暴	基本没有	视力、听力、皮肤毒性	/
肿瘤适应症	可抑制实体瘤、非实体瘤	急/慢性B细胞瘤, 90% / 87%治愈	广谱特性	转移性黑色素瘤 响应率20%~55%	有一定疗效, 提高生活质量
传染性疾病	TB、HBV、HIV等	/	/	/	/

不同类型的癌症均表现出较好的治疗效果, 如白血病/淋巴瘤、黑色素瘤、肾细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、结直肠癌、多发性骨髓瘤、胃肠道肿瘤、卵巢癌、宫颈癌、骨癌等^[39-40]。用唑来膦酸盐激活扩增的自体 $\gamma\delta$ T 细胞治疗 15 例复发性非小细胞肺癌的 I 期临床研究显示, 3 例患者病情稳定, 6 例缓解。此外, 11 例晚期肾癌患者在接受 $\gamma\delta$ T 细胞治疗后, 有 6 例患者在回输 4 周仍保持疾病稳定 (SD), 且无因回输 $\gamma\delta$ T 细胞引起的死亡病例; 但发生了 2 例 3 级不良事件, 一个为细菌性肺炎, 另一个为放射性肺炎, 且均无显著证据表明不良事件的发生与 $\gamma\delta$ T 细胞输注相关^[41]。Dieli 等^[42]利用唑来膦酸盐在体内激活 $\gamma\delta$ T 细胞用于治疗 18 例激素难治性前列腺癌, 其中 3 例患者病情得到缓解, 5 例患者病情稳定。Bennouna 等^[43]对 10 例肾细胞癌患者应用 $\gamma\delta$ T 细胞进行过继性免疫治疗后, 6 例患者病情保持稳定, 且与对照组相比肿瘤体积明显缩小, 毒副反应轻微, 生存期也有所延长, 治疗效果显著。Kobayashi 等^[44]应用自体 $\gamma\delta$ T 细胞治疗 7 例晚期肾癌, 每周或每 2 周回输一次, 共 6~12 次; 利用肿瘤倍增时间 (doubling time, DT)、电子计算机断层扫描并结合流式分析结果观察疗效, 结果显示 5 例患者的 DT 延长, 3 例患者外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞数量增加, 对外来抗原应答加强, 而没有明显毒副作用。此外, 11 例晚期肾细胞癌患者接受自体 $\gamma\delta$ T 细胞治疗后, 3~5 d 外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞数量就达到峰值, 肿瘤倍增时间延长, 肿瘤体积明显

缩小, 最终 1 例完全缓解 (complete response, CR)、5 例稳定 (stable disease, SD)、5 例进展期 (progressive disease, PD)^[45]。而关于多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 的研究表明, 患者肿瘤切除前及治疗过程中 $\gamma\delta$ T 细胞均明显减少, 在切除肿瘤组织中的血管周围有 $\gamma\delta$ T 细胞累积, 但在肿瘤实质没有发现 $\gamma\delta$ T 细胞侵入, 说明 $\gamma\delta$ T 细胞数量减少和功能丧失早于或与肿瘤增长同步^[46]。到目前为止, 有关 $\gamma\delta$ T 细胞免疫治疗骨肉瘤的研究较少, 有研究发现 IFN- γ 可通过提高骨肉瘤细胞系 HOS 和 U2OS 细胞表面 Fas 的表达, 进而促进 $\gamma\delta$ T 细胞通过 Fas/FasL 途径对骨肉瘤细胞的杀伤作用^[47]。另一项研究表明, 尽管骨肉瘤患者来源的 $\gamma\delta$ T 细胞对骨肉瘤细胞系的杀伤作用较健康人来源的 $\gamma\delta$ T 细胞弱, 但唑来膦酸盐可显著增强原发、复发和肺转移骨肉瘤患者 $\gamma\delta$ T 细胞的抗骨肉瘤作用^[48]。这些临床研究表明自体 $\gamma\delta$ T 细胞应用于肿瘤的临床治疗具有一定的疗效。

4.3 同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞的抗肿瘤研究进展

虽然文献报道了不少利用自体 $\gamma\delta$ T 细胞进行抗肿瘤治疗的临床研究, 但是关于同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞的治疗应用才刚刚在国际上兴起。我们知道, 肿瘤的发生发展就是因为机体免疫系统长期被抑制, 癌细胞或功能异常的细胞逃避免疫监视所导致的后果。因此, 自体 $\gamma\delta$ T 细胞用于肿瘤治疗并非最优选择。相比患者自体免疫细胞, 来自健康人的同种异体免疫细胞具有更大的优势。而 $\gamma\delta$ T 细胞由于其对

癌细胞的识别不需 MHC 分子的参与, 可以直接选择性识别、杀伤癌细胞, 更重要的是, 不同人来源的 $\gamma\delta$ T 细胞没有排异性。笔者团队近期的临床研究验证了同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞的这些特性。来自健康人的 PBMC 体外扩增后过继给肿瘤患者, 安全、无排斥、无细胞因子风暴。

目前, 国内外的同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞用于临床治疗的研究才刚刚开始。就我们所知, 关于这方面的基础研究还未见文献报道; 而从事开发同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞应用的商业公司有以色列的 GCT (Gamma-Cell Bio-Technologies)、英国的 GDT (GammaDelta Therapeutics) 和 TCB (TC Biopharm) 等生物治疗公司, 特别是 TCB 刚刚获得欧盟“Horizon 2020”计划 400 万欧元的经费资助, 用于研发同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞对各种癌症的免疫治疗。就国内来说, 目前除了笔者团队还没有见到其他团队在进行类似工作的报道。

4.4 笔者团队在同种异体 $\gamma\delta$ T细胞用于抗肿瘤临床研究的进展

$\gamma\delta$ T 细胞在 T 细胞中不占数量优势, 但是其功能全面、强大, 可以比拟为 T 细胞中的“特种部队”。其在适应性免疫和获得性免疫两方面均具有非常重要的功能。越来越多的研究表明, 这群细胞在免疫功能的响应中发挥着不可或缺的作用。相比其他免疫细胞, 人 $\gamma\delta$ T 细胞最独特的优势在于其既有抗肿瘤的功能, 又具有抗感染的作用。在 $\gamma\delta$ T 细胞抗感染的相关研究方面, 美国伊利诺大学芝加哥分校的 Zheng W. Chen 教授多年来做了大量的工作, 发表了数十篇的研究论文。而笔者团队此前也在这方面做了多年的研究, 亦发表了一系列研究报道, 比如关于 $\gamma\delta$ T 细胞对病毒性肝功能损伤起保护作用^[49], 对 EBV 病毒诱发的肿瘤具有治疗作用^[6]等。

基于团队的基础研究工作, 以及 $\gamma\delta$ T 细胞的独特功能优势, 我们自 2017 年初正式开展了 $\gamma\delta$ T 细胞对肿瘤的临床治疗研究工作。我们的相关临床研究已经在 CFDA 和美国 FDA 等网站进行了注册 (美国临床试验数据库注册号: NCT03113058、NCT03183206、NCT03183219、NCT03183232、NCT03180437; 中国临床试验注册中心注册号: ChiCTR-OIh-17011870), 所有 $\gamma\delta$ T 细胞的试验研究均对患者免费进行。

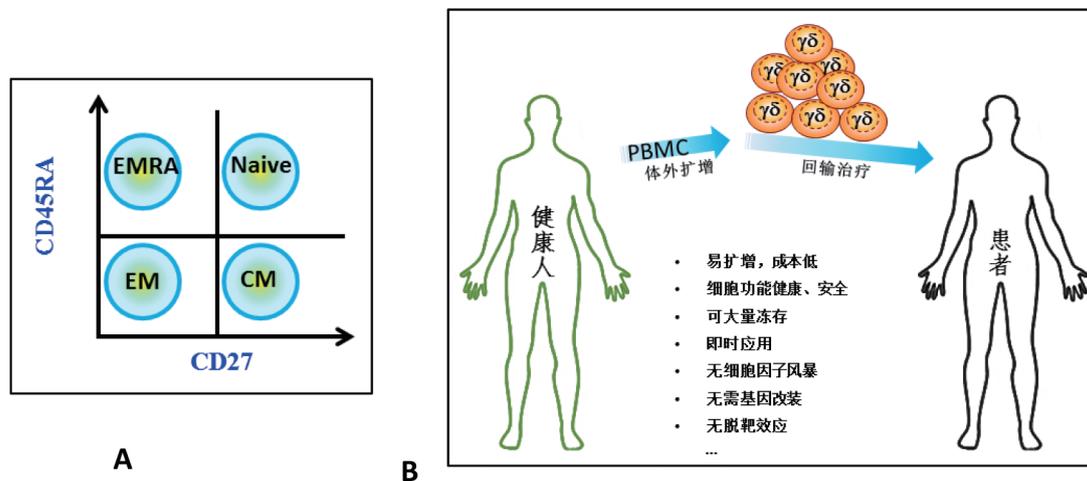
为了进行 $\gamma\delta$ T 细胞对肿瘤的临床试验研究, 我们首先在现有的 $\gamma\delta$ T 细胞体外扩增条件的基础上, 新研发了体外扩增的“第二代”配方。经过我

们的前期研究发现, “第二代”配方不仅可以显著提高 $\gamma\delta$ T 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力, 还可以同时显著延长细胞的存活时间, 并可以显著增加具有杀伤功能的 $\gamma\delta$ T 效应细胞 (EMRA) 的比例 (图 3A)。

截至 2017 年 8 月底, 我们已经对 40 例肿瘤患者进行了同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞的治疗。我们的方案就是把健康人的外周血 PBMC 利用我们的“第二代”配方进行体外扩增, 达到 10^8 细胞数后, 回输肿瘤患者体内进行过继治疗 (图 3B)。根据我们的临床观察结果, 同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞具有安全、无排斥、无细胞因子风暴等特点, 对患者没有观察到毒副作用。目前, 我们已经设计了一套患者治疗前后免疫功能评估的方案, 以评估 $\gamma\delta$ T 细胞治疗对患者免疫功能的影响和调节作用。在 $\gamma\delta$ T 细胞治疗前后, 我们对患者的临床评估指标主要包括: (1) 免疫功能评估 (包括细胞因子水平、免疫细胞功能状态等); (2) PD、SD、PR、CR 等; (3) 患者生活质量观察; (4) 肿瘤标志物检查; (5) 影像学监测肿瘤进展情况等。

目前, 我们主要专注于四种类型的恶性肿瘤, 即晚期肝癌、胰腺癌、肺癌及三阴型乳腺癌。我们即将开展的感染类疾病的临床治疗研究主要包括: 耐药性结核、活动性乙肝、艾滋、结核合并艾滋、耐药结核合并活动性乙肝等。通过第一阶段 (Phase I) 对肿瘤的治疗, 同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞安全性通过了临床测试, 能够增强患者的免疫功能包括提高细胞因子的分泌水平和杀伤性细胞的功能状态, 而且能显著改善患者的生活质量。但更多的临床治疗尚在检测、分析或观察跟踪中。

综上所述, $\gamma\delta$ T 细胞自发现到现在仅 30 余年, 其基础研究特别是抗肿瘤、抗感染的相关研究相比其他免疫细胞还十分滞后。关于人同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞在抗肿瘤临床应用方面, 我们认为还有非常多的课题需要深入研究。比如, $\gamma\delta$ T 细胞的抗肿瘤杀伤机制, 包括分子机制和生物物理机制等还需要进一步深入研究; 还需要继续改进、研发使 $\gamma\delta$ T 细胞具有更强杀伤能力和更长存活时间的培养、扩增条件; 探索以 $\gamma\delta$ T 细胞为基础联合其他免疫细胞, 如 NK 细胞等对肿瘤的疗效; 探索与治疗性抗体, 如抗 PD-1、抗 PD-L1 和抗 CTLA-4 等治疗性单抗药物联合应用的疗效等。总之, $\gamma\delta$ T 细胞在肿瘤免疫中起重要作用, 将是一种前景广阔的治疗新手段。 $\gamma\delta$ T 细胞扩增的可靠性、方法的可重复性, 来自健康人外周血中的 $\gamma\delta$ T 细胞的体外扩增及回输, 证明了同种异体 $\gamma\delta$ T 细胞的抗肿瘤治疗的安全性、可实施性。



A: 同种异体 $\gamma\delta$ T细胞体外扩增“第二代”配方不仅可以显著延长细胞的存活时间, 还可以显著增加具有杀伤功能的 $\gamma\delta$ T效应细胞(EMRA)的比例, 提高 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤细胞的杀伤能力; B: 健康人来源的同种异体 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤患者的过继治疗具有众多特点, 如细胞功能健康、安全、易扩增、成本低、无毒性副作用、无需基因改造等, 其应用前景更加广阔。

图3 $\gamma\delta$ T细胞过继免疫治疗示意图

最后, 关于 $\gamma\delta$ T细胞的一系列基础及临床应用相关课题的研究将不仅促进我们对 $\gamma\delta$ T细胞抗肿瘤机制的理解, 也能更进一步推进 $\gamma\delta$ T细胞的抗肿瘤临床应用。

[参 考 文 献]

- [1] Bonneville M, Chen ZW, Dechanet-Merville J, et al. Chicago 2014--30 years of $\gamma\delta$ T cells. *Cell Immunol*, 2015, 296: 3-9
- [2] Chien YH, Meyer C, Bonneville M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 121-55
- [3] Lafont V, Sanchez F, Laprevotte E, et al. Plasticity of $\gamma\delta$ T cells: Impact on the anti-tumor response. *Front Immunol*, 2014, 5: 622
- [4] O'Brien RL, Born WK. Dermal $\gamma\delta$ T cells--What have we learned? *Cell Immunol*, 2015, 296: 62-9
- [5] Ribeiro ST, Ribot JC, Silva-Santos B. Five layers of receptor signaling in $\gamma\delta$ T-cell differentiation and activation. *Front Immunol*, 2015, 6: 15
- [6] Xiang Z, Liu Y, Zheng J, et al. Targeted activation of human V γ 9V δ 2-T cells controls Epstein-Barr virus-induced B cell lymphoproliferative disease. *Cancer Cell*, 2014, 26: 565-76
- [7] Ferreira LM. $\gamma\delta$ T cells: innately adaptive immune cells? *Int Rev Immunol*, 2013, 32: 223-48
- [8] Kabelitz D, Kalyan S, Oberg HH, et al. Human V δ 2 versus non-V δ 2 $\gamma\delta$ T cells in antitumor immunity. *Oncoimmunology*, 2013, 2: e23304
- [9] Freed-Pastor WA, Mizuno H, Zhao X, et al. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell*, 2012, 148: 244-58
- [10] Thurnher M, Nussbaumer O, Gruenbacher G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 3524-31
- [11] Riganti C, Massaia M, Davey MS, et al. Human $\gamma\delta$ T-cell responses in infection and immunotherapy: Common mechanisms, common mediators? *Eur J Immunol*, 2012, 42: 1668-76
- [12] Groh V, Steinle A, Bauer S, et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science*, 1998, 279: 1737-40
- [13] Xiang Z, Tu W. Dual face of V γ 9V δ 2-T cells in tumor immunology: anti- versus pro-tumoral activities. *Front Immunol*, 2017, 8: 1-13
- [14] Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood*, 2012, 120: 2269-79
- [15] Fowler DW, Bodman-Smith MD. Harnessing the power of V δ 2 cells in cancer immunotherapy. *Clin Exp Immunol*, 2015, 180: 1-10
- [16] Kuhl AA, Pawlowski NN, Grollich K, et al. Human peripheral $\gamma\delta$ T cells possess regulatory potential. *Immunology*, 2009, 128: 580-8
- [17] Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol*, 2009, 183: 4169-75
- [18] Wu P, Wu D, Ni C, et al. $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*, 2014, 40: 785-800
- [19] Das H, Groh V, Kuijl C, et al. MICA engagement by human V γ 2V δ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*, 2001, 15: 83-93
- [20] Wrobel P, Shojaei H, Schitteck B, et al. Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human $\gamma\delta$ T cells:

- Involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor-versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J Immunol*, 2007, 66: 320-8
- [21] Chen Z, Freedman MS. CD16+ $\gamma\delta$ T cells mediate antibody dependent cellular cytotoxicity: potential mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol*, 2008, 128: 219-27
- [22] Gertner-Dardenne J, Bonnafous C, Bezombes C, et al. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood*, 2009, 113: 4875-84
- [23] Braza MS, Klein B, Fiol G, et al. $\gamma\delta$ T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody. *Haematologica*, 2011, 96: 400-7
- [24] Capietto A-H, Martinet L, Fournié J-J. Stimulated $\gamma\delta$ T cells increase the *in vivo* efficacy of trastuzumab in HER-2⁺ breast cancer. *J Immunol*, 2011, 187: 1031-8
- [25] Lu Y, Yang W, Qin C, et al. Responsiveness of stromal fibroblasts to IFN- γ blocks tumor growth via angiostasis. *J Immunol*, 2009, 183: 6413-21
- [26] Talmadge J, Black P, Tribble H, et al. Preclinical approaches to the treatment of metastatic disease: therapeutic properties of rH TNF, rM IFN- γ , and rH IL-2. *Drugs Exp Clin Res*, 1986, 13: 327-37
- [27] Conti L, Casetti R, Cardone M, et al. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated $\gamma\delta$ T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol*, 2005, 174: 252-60
- [28] Dunne MR, Madrigal-Estebas L, Tobin LM, et al. (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2 enyl pyrophosphate-stimulated V γ 9V δ 2 T cells possess T helper type 1-promoting adjuvant activity for human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59: 1109-20
- [29] Ismaili J, Orlislagers V, Poupot R, et al. Human $\gamma\delta$ T cells induce dendritic cell maturation. *Clin Immunol*, 2002, 103: 296-302
- [30] Devilder MC, Maillet S, Bouyge-Moreau I, et al. Potentiation of antigen-stimulated V γ 9V δ 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *J Immunol*, 2006, 176: 1386-93
- [31] Brandes M, Willimann K, Bioley G, et al. Cross-presenting human $\gamma\delta$ T cells induce robust CD8⁺ $\alpha\beta$ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 2307-12
- [32] Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human $\gamma\delta$ T cells. *Science*, 2005, 309: 264-8
- [33] Schneiders FL, Prodohl J, Ruben JM, et al. CD1d-restricted antigen presentation by V γ 9V δ 2-T cells requires trogocytosis. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2: 732-40
- [34] Maniar A, Zhang X, Lin W, et al. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood*, 2010, 116: 1726-33
- [35] Kryczek I, Wei S, Szeliga W, et al. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*, 2009, 114: 357-9
- [36] Ngiow SF, Smyth MJ, Teng MW. Does IL-17 suppress tumor growth? *Blood*, 2010, 115: 2554-5; author reply 2556-7
- [37] Muranski P, Restifo NP. Does IL-17 promote tumor growth? *Blood*, 2009, 114: 231-2
- [38] Du JW, Xu KY, Fang LY, et al. Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer. *Mol Med Rep*, 2012, 6: 1099-102
- [39] Braza MS, Klein B. Anti-tumour immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol*, 2013, 160: 123-32
- [40] Kobayashi H, Tanaka Y. $\gamma\delta$ T cell immunotherapy-a review. *Pharmaceuticals: Basel*: 2015, 8: 40-61
- [41] Sakamoto M, Nakajima J, Murakawa T, et al. Adoptive immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer using zoledronate-expanded $\gamma\delta$ T cells: a phase I clinical study. *J Immunother*, 2011, 34: 202-11
- [42] Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, et al. Targeting human $\{\gamma\delta\}$ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, 2007, 67: 7450-7
- [43] Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, et al. Phase-I study of Innacell $\gamma\delta$, an autologous cell-therapy product highly enriched in $\gamma\delta$ 2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57: 1599-609
- [44] Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, et al. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using $\gamma\delta$ T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56: 469-76
- [45] Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, et al. Phase I/II study of adoptive transfer of $\gamma\delta$ T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60: 1075-84
- [46] Bryant NL, Suarez-Cuervo C, Gillespie GY, et al. Characterization and immunotherapeutic potential of $\gamma\delta$ T-cells in patients with glioblastoma. *Neuro Oncol*, 2009, 11: 357-67
- [47] Li Z, Xu Q, Peng H, et al. IFN- γ enhances HOS and U2OS cell lines susceptibility to $\gamma\delta$ T cell-mediated killing through the Fas/Fas ligand pathway. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11: 496-503
- [48] Li Z, Peng H, Xu Q, et al. Sensitization of human osteosarcoma cells to V γ 9V δ 2 T-cell-mediated cytotoxicity by zoledronate. *J Orthop Res*, 2012, 30: 824-30
- [49] Wu X, Zhang JY, Huang A, et al. Decreased V δ 2 $\gamma\delta$ T cells associated with liver damage by regulation of Th17 response in patients with chronic hepatitis B. *J Infect Dis*, 2013, 208: 1294-304