

DOI: 10.13376/j.cblls/2022030

文章编号: 1004-0374(2022)03-0254-07

嵌合抗原受体T细胞治疗原发性肝癌研究进展

刘圣艳¹, 朱丽晨¹, 赵欣悦¹, 施 维¹, 杨晓梅^{1*}, 卢小玲^{2*}

(1 广西医科大学基础医学院, 广西纳米抗体研究重点实验室, 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021;

2 广西医科大学附属口腔医学院, 广西纳米抗体研究重点实验室, 广西纳米抗体国际联合研究中心, 南宁 530021)

摘要: 近 30 年来, CAR 技术已经从第一代发展到第五代。CAR-T 细胞疗法治疗原发性肝癌取得了很大进展, 但仍存在挑战。该文将对 CAR-T 细胞治疗原发性肝癌所选择的靶点进行总结, 对 CAR-T 细胞疗法治疗原发性肝癌的临床前研究和临床研究进行回顾, 另外还将对 CAR-T 细胞疗法治疗原发性肝癌面临的挑战及解决措施进行综述。

关键词: 原发性肝癌; 嵌合抗原受体 T 细胞; CAR-T 细胞疗法

中图分类号: R392.1 **文献标志码:** A

Advances in the treatment of primary hepatic carcinoma with chimeric antigen receptor T cells

LIU Sheng-Yan¹, ZHU Li-Chen¹, ZHAO Xin-Yue¹, SHI Wei¹, YANG Xiao-Mei^{1*}, LU Xiao-Ling^{2*}

(1 International Nanobody Research Center of Guangxi, Key Nanobody Research Laboratory of Guangxi, Basic Medical College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2 International Nanobody Research Center of Guangxi, Key Nanobody Research Laboratory of Guangxi, Department of Stomatology, Stomatology College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: For nearly 30 years, the technology of CARs have been developed from the first generation to the fifth generation. CAR-T cell therapy in the treatment of primary hepatic carcinoma has made great progress, but it is still a challenge. Herein, we will summarize the selected targets for CAR-T cells in the treatment of primary liver cancer, and review both the preclinical trials and clinical trials of CAR-T cell therapy for primary liver cancer. Moreover, the challenges and solutions of CAR-T cell therapy for primary liver cancer will also be reviewed in this article.

Key words: primary hepatic carcinoma; chimeric antigen receptor modified T (CAR-T) cell; CAR-T therapy

原发性肝癌有“癌王”之称, 是我国常见的恶性肿瘤, 其中 85% 以上为肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)。早期肝癌首选的治疗手段为手术切除, 但大多数 HCC 患者发现时已处晚期, 丧失手术指征, 只能采取化疗、放疗、靶向治疗等治疗手段, 这些疗法虽然能延长部分患者生存期, 但治疗效果并不显著, 愈后较差。基于嵌合抗原受体修饰的 T 细胞 (chimeric antigen receptor modified T cells, CAR-T) 细胞疗法在治疗 CD19⁺ 血液瘤中取得的重大进展, 很多学者也在探索将 CAR-T 细胞疗法用于治疗实体瘤^[1]。

CAR-T 细胞疗法最先在血液瘤治疗中展示出

惊人效果, 目前靶向 CD19 的 CAR-T 细胞不仅对 B 细胞急性淋巴细胞白血病 (acute lymphocytic leukemia, ALL) 有效, 且对 B 细胞淋巴瘤也有很好的治疗效果。经美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准, 已经有 4 款以 CD19 为靶点的 CAR-T 细胞产品 (Kymriah、Yescarta、Tecartus 和 Bretanxi)

收稿日期: 2021-09-08; 修回日期: 2021-10-23

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFE0117300), 广西基地和人才专项(桂科 AD20238062)

*通信作者: E-mail: 260718428@qq.com (杨晓梅); luxiaoling@gxmu.edu.cn (卢小玲)

成功上市,在临床治疗急性淋巴细胞白血病和复发/难治性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、其他疗法无效的成人套细胞淋巴瘤以及弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者中取得了不错的应用效果。

基于 CAR-T 细胞疗法在血液瘤治疗中取得的重大突破,越来越多学者开始将 CAR-T 细胞疗法应用于实体瘤研究。但是 CAR-T 细胞疗法早期在实体瘤中进行尝试时,由于对免疫认知的局限,并未取得理想效果。随着研究者对免疫知识领域的进一步探索,为 CAR-T 细胞疗法的实践提供了理论基础。近年来, CAR-T 细胞疗法在原发性肝癌治疗临床前研究中已经取得了很大进展,部分针对肝癌的 CAR-T 项目已经处于临床研究阶段^[2]。现就 CAR-T 细胞疗法治疗原发性肝癌的研究进展进行综述。

1 嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)结构

胞外抗原结合区、铰链区、跨膜区和胞内信号转导区构成 CAR 基本结构^[3]。胞外抗原结合区主要由单链抗体可变区(single-chain variable fragment, scFv)构成,可特异性识别靶细胞表面抗原;铰链区在 T 细胞活化过程中起关键作用,其大小、灵活性和活动范围与 CAR-T 细胞发挥抗肿瘤作用相关;跨膜区由 CD4、CD28 或 CD8 的跨膜区构成,连接 CAR 胞外区和胞内区;胞内区含免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAMs),由 T 细胞受体 TCR/CD3 ζ 链或免疫球蛋白 Fc 受体 Fc ϵ RI γ 链构成,具有信号转导功能。CAR 分子主要通过抗体特异性识别肿瘤细胞特异性抗原,通过 CAR 分子胞内区的激活片段,激活 T 细胞,发挥抗肿瘤作用。因此, CAR 分子各区域都会影响 CAR-T 细胞的功能。

2 CAR技术的发展

目前, CAR 技术已经从第一代发展到第五代:第一代 CAR 由可胞外识别肿瘤抗原的 scFv 和胞内可激活 T 细胞的 ITAMs (如 CD3 ζ 和 Fc ϵ RI γ) 组成,但由于肿瘤细胞表面共刺激分子表达减弱或缺乏, CAR-T 细胞活化缺乏第二信号, T 细胞活化能力有限,因此 T 细胞在体内持续时间短且细胞因子分泌水平低,对肿瘤杀伤能力较弱^[4]。为了增强 CAR-T 细胞的抗肿瘤效果,研究者开始对 CAR 的结构进行改造。相比第一代 CAR,第二代 CAR 在胞内信号区增加了一个共刺激分子(如 CD28、CD27 或

CD137 等),有效延长了 T 细胞在体内的存活时间并加强了其细胞毒性^[5]。第三代 CAR 引入了两个以上共刺激分子,进一步加强了其信号转导能力,提升了 CAR-T 细胞抗肿瘤活性^[6]。在此基础上第四代 CAR (TRUCKs) 加入了可调控元件,如可共表达细胞因子等,增强了 CAR-T 疗法的安全性和可控性^[7]。基于第二代 CAR,第五代通用 CAR 应运而生,可以识别多种抗原,具有更好的灵活性^[8]。由于第二代 CAR-T 细胞疗法在血液瘤治疗中具有很好的疗效,目前临床应用相对较广泛的是第二代 CAR,第三到五代 CAR 发展仍未完善,还处于研究阶段。

3 CAR-T细胞抗肿瘤机制

CAR-T 细胞的构建是通过分离培养自体 T 细胞,利用基因工程技术对 T 细胞进行改造,使其表达 CAR。将改造后的 T 细胞(CAR-T 细胞)经体外扩增后回输入患者体内,通过 CAR-T 细胞表面表达的抗体特异性识别肿瘤细胞,并同时激活下游信号通路,实现 CAR-T 细胞活化增殖及对肿瘤细胞的特异性杀伤作用。相比于传统 T 细胞过继疗法而言, CAR-T 细胞不需要 MHC 分子参与,直接对肿瘤细胞发挥杀伤作用^[9]。此外,通过加入共刺激分子,二代以后的 CAR-T 细胞有更好的活化增殖潜能,发挥更强的抗癌作用^[10-11]。活化的 CAR-T 细胞通过以下 3 种途径杀伤肿瘤细胞:(1)通过释放穿孔素颗粒酶溶解肿瘤细胞;(2)通过 FasL-Fas 途径诱发肿瘤细胞自发程序性死亡;(3)通过白细胞介素、肿瘤坏死因子的释放,调节肿瘤微环境,抑制肿瘤细胞生长^[12]。CAR-T 细胞疗法在血液系统恶性肿瘤治疗中取得了重大突破,大量研究证实 CAR-T 细胞疗法在实体瘤治疗中也有不错的应用前景。

4 CAR-T细胞疗法在原发性肝癌治疗中的应用

4.1 GPC3 CAR-T细胞

磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (glypican-3, GPC3) C 端经糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidyl inositol, GPI) 链接在细胞膜上,通过调节 Wnt/Frizzled 通路促进癌细胞生长,并与其增殖分化和迁移侵袭有关。GPC3 在肝癌组织中高表达,在正常组织中基本不表达,不仅可以用于 HCC 患者早期筛查和诊断,也可用于判断肝癌患者经靶向治疗后的疗效和预后。因此, GPC3 是 CAR-T 细胞疗法治疗肝癌的理想靶点之一^[13]。

Li 等^[14]分别设计了只含有 CD3 ζ 的第一代 CAR (Gz)、含 CD3 ζ 和 CD28 或 4-1BB 的第二代 CAR (G28z 和 GBBz) 以及含 CD3 ζ 、CD28 和 4-1BB 的第三代 CAR (G28BBz), 并比较这 4 种 CAR-T 细胞的抗肿瘤效果。结果发现, 含 4-1BB 的第二代 CAR 可诱导 Th1 类细胞因子分泌, 使 CAR-T 细胞有更好的增殖潜能, 抗肿瘤效果优于其他 3 种 CAR-T 细胞。Jiang 等^[15]建立了荷人来源的移植瘤 (patient-derived xenograft, PDX) NSI 小鼠模型, 发现 GPC3 CAR-T 细胞对高表达 GPC3 的 PDX 瘤有明显的杀伤作用, 且对低表达 GPC3 的 PDX 瘤也有明显的抑瘤作用。Shi 等^[16]报告了 GPC3 CAR-T 细胞疗法的 I 期临床试验结果, 发现 CAR-T 细胞在晚期 HCC 患者中具有早期的抗肿瘤迹象, 并且安全性好。

为增强 GPC3 CAR-T 细胞增殖能力和持久性, Batra 等^[17]设计可共表达 IL-21 和 IL-15 的 GPC3 CAR-T 细胞, 能够延长 T 细胞的存活时间并产生记忆性 T 细胞, 具有很好的抗肿瘤效果。Liu 等^[18]设计诱导表达 IL-12 的 GPC3 CAR-T 细胞, IL-12 可增强这些 CAR-T 细胞的浸润能力和持久性, 并且副作用更小。Xiong 等^[19]探索了共表达 IL-7 和 PH20 的 GPC3 CAR-T 细胞的抗肝癌作用, 结果表明 G3CAR-7 \times 20 具有更好的增殖能力且可浸润到肿瘤组织内部发挥作用。

为降低 GPC3 CAR-T 细胞的脱靶效应, Li 等^[20]成功制备了一种双特异性 CAR-T 细胞, 即 CAR_{gpc3-egfr}, 其中一个靶点是 GPC3, 另一个靶点是人表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR), 这种 CAR-T 细胞可分泌更高水平的细胞因子, 并且能更好地抑制肿瘤生长, 延长荷瘤小鼠生存期。另外, Chen 等^[21]构建了可同时靶向 GPC3 以及肝脏特异性抗原脱唾液酸糖蛋白受体 1 (asialo-glycoprotein receptor 1, ASGR1) 的 CAR-T 细胞。这种 CAR-T 细胞可产生更强的增殖活性, 在体内体外均可有效清除 GPC3⁺ASGR1⁺ 肿瘤细胞。

为了减少 CAR-T 细胞耗竭, 增加 CAR-T 细胞抗肿瘤能力并维持其作用持久性, Guo 等^[22]通过 CRISPR/Cas9 技术阻断 GPC3 CAR-T 细胞 PD-1/CD28 通路, 进而更好地发挥 CAR-T 细胞抗肿瘤作用并且避免耗竭。Pan 等^[23]将 PD-1 胞外结构域与 IgG4 的 CH3 结构域引入到 GPC3-28Z T 细胞, 制备了阻断 PD-1/PD-L1 通路的 GPC3-28Z-sPD1 T 细胞。该 CAR-T 细胞避免了 PD-1/PD-L1 通路激活引起的 T 细胞耗竭, 增殖能力更强, 并可影响肿瘤微环境中

的其他免疫细胞, 具有更好的抗肿瘤能力。

为进一步增强 CAR-T 细胞杀伤肿瘤细胞的作用效果, Wu 等^[24]将 GPC3 CAR-T 细胞疗法与索拉菲尼联用后有效延长了荷瘤小鼠生存期, 说明通过联用抗肿瘤药物可增强 CAR-T 细胞疗法的作用效果, 为 CAR-T 细胞疗法的临床实践提供了参考。

上述 GPC3 CAR-T 细胞疗法通过增强 T 细胞增殖能力、增加 CAR-T 细胞在体内存活时间、改善肿瘤免疫抑制微环境以及与其他治疗手段相联合等方式提高了治疗效果, 为 GPC3 CAR-T 细胞的临床应用打下良好的基础。

4.2 MUC-1 CAR-T 细胞

相比于正常细胞, 肝癌细胞表面高表达 MUC-1 且具有不同的糖基化位点。MUC-1 通过改变 TGF- β 信号抑制通路促进肝癌细胞生长, 因此可作为 CAR-T 细胞治疗的理想靶点^[25]。我国学者构建了针对 MUC-1 的第一代和第三代 CAR, 通过制备 MUC1 Jurkat CAR-T 细胞和 G3MUC1 Jurkat CAR-T 细胞, 发现它们均能特异性杀伤 MUC-1 高表达的 QCY-7701 肝癌细胞, 而对低表达 MUC-1 的正常细胞基本没有杀伤作用。第三代 CAR (G3MUC1-CAR) 修饰的 Jurkat T 细胞经靶抗原刺激后, 增殖能力、细胞因子分泌量和对靶细胞的杀伤效率均高于第一代 CAR (MUC1-CAR)^[26]。目前关于以 MUC-1 为靶点制备 CAR-T 细胞治疗肝癌的报道相对较少, 但 MUC-1 CAR-T 疗法仍然有很大的研究价值及应用潜力。

4.3 AFP CAR-T 细胞

甲胎蛋白 (alpha fetal protein, AFP) 是内胚层组织细胞分泌的糖蛋白, 在肝癌患者血清及组织中表达水平明显升高, 因此可作为肝癌标记物^[27]。Liu 等^[28]构建了 ET1402L1-CAR-T (AFP-CAR-T) 细胞, 这种 CAR-T 细胞可特异性杀伤 HLA-A*02:01⁺/AFP⁺ 阳性靶细胞, 对单阳性细胞以及正常细胞均无杀伤作用。AFP-CAR-T 细胞通过不同给药途径治疗荷 HepG2 和 AFP158-SK-HEP-1 SCID-Beige 瘤小鼠, 结果表明, 相比于瘤内注射, 静脉输注方式能更快速地抑制肿瘤生长。此外, 在腹腔内肝癌异种移植瘤模型中, AFP CAR-T 细胞也有不错的抗肿瘤活性。Sun 等^[29]构建的 CAR-T 细胞可在体外特异性识别并杀伤 HLA-A*02:01⁺/AFP⁺ 阳性肝癌细胞系 HepG2 细胞, 在体内实验中可抑制荷 HepG2 NOD/SCID 瘤小鼠体内肿瘤生长。为了进一步提高 CAR-T 细胞的治疗效果, 他们构建了可同时表达 AFP 和

IL-15 的人 B 细胞淋巴瘤细胞系 (BA15 细胞), 发现该 CAR-T 细胞经 BA15 细胞刺激后, 增殖活化能力优于其他对照组, 且可特异性杀伤 AFP⁺ HLA-A*02:01⁺ HepG2 细胞, 并能更有效地抑制荷 HepG2 瘤 NOD/SCID 小鼠体内肿瘤的生长^[30]。目前, 中国正在进行 AFP CAR-T 细胞疗法 I 期临床试验 (NCT033493255), 结果表明 AFP CAR-T 细胞没有明显的毒副作用。还有两项临床试验处于研究阶段 (NCT03965546、NCT03998033), 它们将对 AFP CAR-T 细胞治疗肝癌患者的安全性和有效性进行评估。由此可见, AFP CAR-T 细胞从抗肿瘤效果和安全性来说, 在肝癌治疗方面具有良好的应用前景。

4.4 CEA CAR-T 细胞

肝癌转移是很多患者的致死病因, CEA 是肝癌转移治疗的理想靶点^[31]。Katz 等^[32]用 CEA CAR-T 细胞通过肝动脉灌注治疗 (hepatic artery infusions, HAI) 方式 (NCT02416466) 对 6 名肝转移患者进行治疗。治疗后患者均未出现毒性反应, 证实了 CEA CAR-T 细胞治疗的安全性。在治疗过程中, 他们发现患者血清中 CEA 水平下降 39%, INF- γ 分泌量也明显提高, 但 CAR-T 细胞易耗竭, 可能与肿瘤微环境中的免疫抑制细胞与抑制性细胞因子有关。之后, 他们采用 HAI 和选择性内放疗 (selective internal radiation therapy, SIRT) 方式 (临床编号: NCT-01373047), 治疗这 6 名肝转移患者, 治疗后患者没有出现明显的神经毒性以及细胞因子风暴, 进一步验证了 CEA CAR-T 细胞疗法的安全性^[33]。Zhang 等^[34]通过静脉给药的方式为肝转移患者输注不同剂量的 CEA CAR-T 细胞, 结果表明, CEA CAR-T 细胞对大部分患者有一定的治疗效果, 且患者对 CEA CAR-T 细胞疗法耐受性良好。CEA CAR-T 细胞疗法治疗肝转移具有安全性及可行性, 但治疗效果欠佳, 可能与肝癌组织本身特殊性有关。为增强 CEA CAR-T 细胞治疗效果, Burga 等^[35]制备了 CEA CAR-T 细胞与靶向 L-MDSC 药物联合使用, 经门静脉注射治疗荷 MC38CEA 瘤 C57BL/6 小鼠, 可延长荷瘤小鼠生存期; L-MDSC 细胞会抑制 CAR-T 细胞功能, CEA CAR-T 细胞通过与靶向 L-MDSC 细胞的药物联用, 可以作为未来临床试验的合理策略。

4.5 CD133 CAR-T 细胞

肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 与肿瘤形成、转移、复发相关, CD133 是肿瘤干细胞的特异性标记, 据此 Wang 等^[36]制备了 CD133 CAR-T 细胞, 发现该 CAR-T 细胞可特异性杀伤 CD133⁺ 靶细胞,

在体内可显著抑制荷 CD133⁺ 瘤小鼠肿瘤生长。之后他们进行了 CD133 CAR-T 细胞疗法的 I 期临床试验, 结果表明 CAR-T 细胞疗法对肝癌患者具有治疗效果^[37]。Wang 等^[38]利用 CD133 CAR-T 细胞治疗 21 位 HCC 患者 (NCT02541370), 经治疗后, 这些患者的中位无进展生存期 (progression free survival, PFS) 为 6.8 个月, 中位总生存期 (overall survival, OS) 为 12 个月, 证实了 CD133 CAR-T 细胞在 HCC 患者体内具有良好的抗肿瘤活性和安全性。Feng 等^[39]对一名患有胆管癌的患者进行 CAR-T 细胞鸡尾酒疗法 (NCT02541370), 经 CD133 CAR-T 细胞治疗后, 患者得到部分缓解, 但出现细胞因子风暴等不良反应。CD133 高表达表明肝癌患者预后不良, 而且与肿瘤复发和转移相关, 以 CD133 为靶点制备 CAR-T 细胞将为肝癌治疗提供新思路, 但是从目前研究结果来看其安全性还有待提高。

4.6 肝炎病毒抗原 CAR-T 细胞

大量研究发现, 肝癌发生与肝炎病毒感染密切相关^[40], 其中以乙型肝炎病毒 (viral hepatitis type B, HBV) 和丙型肝炎病毒 (viral hepatitis type C, HCV) 感染多见。因此, 可通过 HBV 和 HCV 的特异性抗原构建 CAR 以延缓 HBV 感染诱导的肝癌进程。Bohne 等^[41]设计并制备了靶向 HBV-S 和 HBV-L 蛋白的 CAR-T 细胞, 这些 CAR-T 细胞可特异性识别 HBsAg 阳性 HepG2 细胞, 并释放 IFN- γ 、IL-2 等细胞因子。通过比较这两种 CAR-T 细胞抗肿瘤效果, 发现 HBV-S CAR-T 细胞优于 HBV-L CAR-T 细胞。Krebs 等^[42]构建的 HBV-S CAR-T 细胞可在具有免疫活性的 HBV 转基因小鼠中扩增, 并定位于 HBV 感染的肝脏部位发挥抗肿瘤作用, 有效控制 HBV 复制。Kruse 等^[43]制备了 HBsAg CAR-T 并进行了一系列体内体外实验, 发现 HBsAg CAR-T 可特异性识别 HBV 阳性细胞并有效降低 HBV 感染小鼠体内 HBsAg 和 HBV-DNA 表达水平。另外, Sautto 等^[44]制备了靶向 HCV/E2 糖蛋白的 CAR-T 细胞, 体外实验结果表明 CAR-T 可以控制 HCV 病毒感染, 分泌 IFN- γ 、IL-2 和肿瘤坏死因子 α , 并裂解 HCV 感染的肝细胞。病毒感染是肝癌发生的风险因素之一, 构建靶向肝炎病毒性抗原的 CAR-T 细胞可能是一项很有前景的治疗手段。

4.7 其他靶点

除上述靶点外, 我国学者使用 CD105 纳米抗体制备了 CD105 CAR-T 细胞^[37], 可在体外特异性杀伤 CD105 阳性肿瘤细胞并分泌 IL-2 等细胞因子,

在荷瘤小鼠体内可抑制肿瘤生长, 延长荷瘤小鼠生存期^[45]; 另外, CD147 CAR-T 细胞^[46] 以及 NKG2D CAR-T 细胞^[47] 在体内体外实验中均具有不错的抗肿瘤活性, 为进一步临床试验奠定了基础。通过制备 TAG-72 CAR-T 细胞治疗肝癌也处于临床研究阶段^[48]。

5 CAR-T细胞治疗原发性肝癌存在的问题及解决策略

5.1 CAR-T细胞疗法面临的挑战

在实际临床上, CAR-T 细胞疗法治疗血液瘤已经取得了重大进展, 但 CAR-T 细胞疗法治疗原发性肝癌的效果并不理想。首先, 原发性肝癌可供选择的特异性抗原很少, 大多数为肿瘤相关性抗原, 这类抗原在正常组织或细胞中也会表达, 因此可能会造成正常组织脏器的损伤及自身免疫缺陷, 称为脱靶效应^[49]。其次, 由于实体瘤特殊的肿瘤结构, CAR-T 细胞很难进入到肿瘤组织内部发挥作用。另外, 肝脏是一种免疫器官, 其中的免疫组织和免疫细胞对人体正常生理状态至关重要。而 HCC 属于炎性肿瘤, 尽管有大量 T 细胞浸润, 但是由于肿瘤内存在大量免疫检查点并能分泌免疫抑制分子, 使得免疫系统不能正常清除肿瘤细胞, 为肝癌产生与转移创造了条件。处于缺氧状态和代谢异常的肿瘤微环境也限制了 CAR-T 细胞的作用效果^[50]。此外, CAR-T 细胞在发挥抗肿瘤作用的同时会产生大量 TNF- α 、IL-12 和 IL-6 等细胞因子, 这些大量释放的细胞因子可能产生细胞因子风暴等毒性反应^[51]。由于 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用, 大量肿瘤细胞发生裂解, 产生肿瘤溶解综合征。这些副作用可能威胁到患者生命, 因此, 要实现 CAR-T 细胞治疗 HCC 的临床应用, 需要找到更加安全有效的方式克服目前 CAR-T 细胞治疗 HCC 存在的问题。

5.2 CAR-T细胞疗法解决策略

CAR-T 细胞疗法治疗原发性肝癌 HCC 具有很好的应用前景, 但在治疗过程中存在上述问题。可以做出如下改进: 进一步筛查肿瘤特异性抗原或者对现有抗原进行进一步研究, 如将现有抗原与 Notch 信号通路相结合, 进而提高 CAR-T 细胞的治疗效果^[52]; 也可以通过制备 FAP CAR-T 细胞或制备 CAR-T 细胞使其表达乙酰肝素酶以减弱肿瘤细胞外基质纤维化, 进而提高 CAR-T 细胞的抗肿瘤效果。为使 CAR-T 细胞能够更好地到达肿瘤组织内部, 可使 CAR-T 细胞共表达趋化因子受体; 也

可将 CAR-T 细胞疗法与溶瘤病毒联合治疗, 使溶瘤病毒表达 IL-15 等趋化因子; CAR-T 细胞疗法与其他治疗方法相结合, 如局部介入或联合使用化疗药物, 可以增强 CAR-T 细胞抗肿瘤效果。为打破肿瘤微环境的限制, 可使 CAR-T 细胞分泌过氧化氢酶以纠正缺氧状态; 也可以通过阻断免疫检查点的免疫抑制信号, 如 PD-1/PD-L1、CTLA-4 等, 如使用 PD-1 或 CTLA-4 抑制剂或敲除 PD-1 或 CTLA-4 基因等, 减少 CAR-T 细胞耗竭, 增强对肿瘤细胞的杀伤活性^[53]。为减少 CAR-T 细胞治疗过程中产生的副作用, 可以引入自杀基因调控开关^[54], 减少 CAR-T 细胞的毒性以及逐渐提高 CAR-T 细胞输注剂量, 以减少 CAR-T 细胞对正常组织的损伤。

6 结语与展望

CAR-T 细胞疗法作为一项新兴的免疫治疗措施, 在实体瘤治疗中逐渐崭露头角并处于快速发展阶段, 但通过 CAR-T 细胞疗法治疗肝癌大部分仍处于临床前研究阶段, 一部分临床试验也正在进行, 但其安全性和有效性仍不明确。在以后的研究中要着重解决如何进一步增强 CAR-T 细胞克服肿瘤微环境的能力, 如何寻找更特异性的抗原, 如何更好地控制 CAR-T 细胞的细胞毒性等。

因此, 可以做出如下改进。(1) CAR-T 细胞疗法治疗肝癌的特异性抗原选择至关重要。(2) CAR-T 细胞在肿瘤组织内部发挥作用是其治疗成功的关键。可以将 CAR-T 细胞疗法与其他治疗方法相结合, 如通过瘤内或者肝动脉内注射 CAR-T 细胞, 也可以与放疗或化疗相结合。(3) 在 CAR-T 细胞治疗过程中, 肿瘤免疫抑制微环境在很大程度上减弱了 T 细胞的作用效果。因此, 可通过构建分泌型 CAR-T, 分泌 PD-1 抗体或 CTLA-4 抗体, 以拮抗 PD-1 或 CTLA-4 等免疫抑制分子; 或者分泌 IL-15 等细胞因子, 使 CAR-T 细胞更好地发挥作用。相信随着 CAR-T 细胞疗法的不断发展, 一定会为原发性肝癌的治疗带来新的曙光。

[参 考 文 献]

- [1] Testino G, Leone S, Patussi V, et al. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and proposal of treatment. *Minerva Med*, 2016, 107: 413-26
- [2] Dal Bo M, De Mattia E, Baboci L, et al. New insights into the pharmacological, immunological, and CAR-T-cell approaches in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Drug Resist Updat*, 2020, 51: 100702
- [3] Sermer D, Brentjens R. CAR T-cell therapy: full speed

- ahead. *Hematol Oncol*, 2019, 37 (Suppl 1): 95-100
- [4] Thistlethwaite FC, Gilham DE, Guest RD, et al. The clinical efficacy of first-generation carcinoembryonic antigen (CEACAM5)-specific CAR T cells is limited by poor persistence and transient pre-conditioning-dependent respiratory toxicity. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66: 1425-36
- [5] Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells. *Cancer Cell*, 2015, 28: 415-28
- [6] Tang XY, Sun Y, Zhang A, et al. Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia: a non-randomised, open-label phase I trial protocol. *BMJ Open*, 2016, 6: e013904
- [7] Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15: 1145-54
- [8] Zhao J, Lin Q, Song Y, et al. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol*, 2018, 11: 132
- [9] Feins S, Kong W, Williams EF, et al. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *Am J Hematol*, 2019, 94: S3-S9
- [10] Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest*, 2011, 121: 1822-6
- [11] Drent E, Poels R, Ruiters R, et al. Combined CD28 and 4-1BB costimulation potentiates affinity-tuned chimeric antigen receptor-engineered T cells. *Clin Cancer Res*, 2019, 25: 4014-25
- [12] Benmehar MR, Karches CH, Cadilha BL, et al. Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1283
- [13] Zhou F, Shang W, Yu X, et al. Glypican-3: a promising biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment. *Med Res Rev*, 2018, 38: 741-67
- [14] Li W, Guo L, Rathi P, et al. Redirecting T cells to glypican-3 with 4-1BB zeta chimeric antigen receptors results in Th1 polarization and potent antitumor activity. *Hum Gene Ther*, 2017, 28: 437-48
- [15] Jiang Z, Jiang X, Chen S, et al. Anti-GPC3-CAR T cells suppress the growth of tumor cells in patient-derived xenografts of hepatocellular carcinoma. *Front Immunol*, 2017, 7: 690
- [16] Shi D, Shi Y, Kaseb AO, et al. Chimeric antigen receptor-glypican-3 T-cell therapy for advanced hepatocellular carcinoma: results of phase I trials. *Clin Cancer Res*, 2020, 26: 3979-89
- [17] Batra SA, Rathi P, Guo L, et al. Glypican-3-specific CAR T cells coexpressing IL15 and IL21 have superior expansion and antitumor activity against hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8: 309-20
- [18] Liu Y, Di S, Shi B, Zhang H, et al. Armored inducible expression of IL-12 enhances antitumor activity of glypican-3-targeted chimeric antigen receptor-engineered T cells in hepatocellular carcinoma. *J Immunol*, 2019, 203: 198-207
- [19] Xiong X, Xi J, Liu Q, et al. Co-expression of IL-7 and PH20 promote anti-GPC3 CAR-T tumour suppressor activity *in vivo* and *in vitro*. *Liver Int*, 2021, 41: 1033-43
- [20] Li K, Qian S, Huang M, et al. Development of GPC3 and EGFR-dual-targeting chimeric antigen receptor-T cells for adoptive T cell therapy. *Am J Transl Res*, 2021, 13: 156-67
- [21] Chen C, Li K, Jiang H, et al. Development of T cells carrying two complementary chimeric antigen receptors against glypican-3 and asialoglycoprotein receptor 1 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66: 475-89
- [22] Guo X, Jiang H, Shi B, et al. Disruption of PD-1 enhanced the anti-tumor activity of chimeric antigen receptor T cells against hepatocellular carcinoma. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1118
- [23] Pan Z, Di S, Shi B, et al. Increased antitumor activities of glypican-3-specific chimeric antigen receptor-modified T cells by coexpression of a soluble PD1-CH3 fusion protein. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67: 1621-34
- [24] Wu X, Luo H, Shi B, et al. Combined antitumor effects of sorafenib and GPC3-CAR T cells in mouse models of hepatocellular carcinoma. *Mol Ther*, 2019, 27: 1483-94
- [25] Yuan SF, Li KZ, Wang L, et al. Expression of MUC1 and its significance in hepatocellular and cholangiocarcinoma tissue. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 4661-6
- [26] 马宜冬, 王真, 巩睿智, 等. 靶向黏蛋白 1 嵌合抗原受体修饰的Jurkat T 细胞特异杀伤肝癌细胞. *第二军医大学学报*, 2014, 35: 1177-82
- [27] Luo P, Wu S, Yu Y, et al. Current status and perspective biomarkers in AFP negative HCC: towards screening for and diagnosing hepatocellular carcinoma at an earlier stage. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26: 599-603
- [28] Liu H, Xu Y, Xiang J, et al. Targeting α -fetoprotein (AFP)-MHC complex with CAR T-cell therapy for liver cancer. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 478-88
- [29] Sun L, Guo H, Jiang R, et al. Engineered cytotoxic T lymphocytes with AFP-specific TCR gene for adoptive immunotherapy in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol*, 2016, 37: 799-806
- [30] Sun L, Guo H, Jiang R, et al. Artificial antigen-presenting cells expressing AFP158-166 peptide and interleukin-15 activate AFP-specific cytotoxic T lymphocytes. *Oncotarget*, 2016, 7: 17579-90
- [31] Yoshikawa M, Morine Y, Ikemoto T, et al. Elevated preoperative serum CEA level is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma through the epithelial-mesenchymal transition. *Anticancer Res*, 2017, 37: 1169-75
- [32] Katz SC, Burga RA, McCormack E, et al. Phase I hepatic immunotherapy for metastases study of intra-arterial chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy for CEA⁺ liver metastases. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 3149-59
- [33] Katz SC, Hardaway J, Prince E, et al. HITM-SIR: phase

- Ib trial of intraarterial chimeric antigen receptor T-cell therapy and selective internal radiation therapy for CEA⁺ liver metastases. *Cancer Gene Ther*, 2020, 27: 341-55
- [34] Zhang C, Wang Z, Yang Z, et al. Phase I escalating-dose trial of CAR-T therapy targeting CEA⁺ metastatic colorectal cancers. *Mol Ther*, 2017, 25: 1248-58
- [35] Burga RA, Thorn M, Point GR, et al. Liver myeloid-derived suppressor cells expand in response to liver metastases in mice and inhibit the anti-tumor efficacy of anti-CEA CAR-T. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64: 817-29
- [36] Wang Y, Chen M, Wu Z, et al. CD133-directed CAR T cells for advanced metastasis malignancies: A phase I trial. *Oncoimmunology*, 2018, 7: e1440169
- [37] Dai H, Tong C, Shi D, et al. Efficacy and biomarker analysis of CD133-directed CAR T cells in advanced hepatocellular carcinoma: a single-arm, open-label, phase II trial. *Oncoimmunology*, 2020, 9: 1846926
- [38] Wang Y, Chen M, Wu Z, et al. CD133-directed CAR T cells for advanced metastasis malignancies: a phase I trial. *Oncoimmunology*, 2018, 7: e1440169
- [39] Feng K, Guo Y, Liu Y, et al. Cocktail treatment with EGFR-specific and CD133-specific chimeric antigen receptor-modified T cells in a patient with advanced cholangiocarcinoma. *J Hematol Oncol*, 2017, 10: 4
- [40] Xie Y. Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1018: 11-21
- [41] Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology*, 2008, 134: 239-47
- [42] Krebs K, Böttinger N, Huang LR, et al. T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice. *Gastroenterology*, 2013, 145: 456-65
- [43] Kruse RL, Shum T, Tashiro H, et al. HBsAg-redirection T cells exhibit antiviral activity in HBV-infected human liver chimeric mice. *Cytotherapy*, 2018, 20: 697-705
- [44] Sautto GA, Wisskirchen K, Clementi N, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells redirected against hepatitis C virus (HCV) E2 glycoprotein. *Gut*, 2016, 65: 512-23
- [45] Mo F, Duan S, Jiang X, et al. Nanobody-based chimeric antigen receptor T cells designed by CRISPR/Cas9 technology for solid tumor immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 80
- [46] Tseng HC, Xiong W, Badeti S, et al. Efficacy of anti-CD147 chimeric antigen receptors targeting hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*, 2020, 11: 4810
- [47] Sun B, Yang D, Dai H, et al. Eradication of hepatocellular carcinoma by NKG2D-based CAR-T cells. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7: 1813-23
- [48] Hege KM, Bergsland EK, Fisher GA, et al. Safety, tumor trafficking and immunogenicity of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells specific for TAG-72 in colorectal cancer. *J Immunother Cancer*, 2017, 5: 22
- [49] Castellarin M, Sands C, Da T, et al. A rational mouse model to detect on-target, off-tumor CAR T cell toxicity. *JCI Insight*, 2020, 5: e136012
- [50] Zhang Q, Lou Y, Bai XL, et al. Immunometabolism: a novel perspective of liver cancer microenvironment and its influence on tumor progression. *World J Gastroenterol*, 2018, 24: 3500-12
- [51] Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer*, 2018, 6: 56
- [52] Hyrenius-Wittsten A, Su Y, Park M, et al. SynNotch CAR circuits enhance solid tumor recognition and promote persistent antitumor activity in mouse models. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eabd8836
- [53] Saka D, Gökalp M, Piyade B, et al. Mechanisms of T-cell exhaustion in pancreatic cancer. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 2274
- [54] Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a "safety switch" to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 235