

DOI: 10.13376/j.cblls/2023102

文章编号: 1004-0374(2023)07-0916-09

# CAR-T细胞治疗结直肠癌的现状与挑战

罗霞<sup>1</sup>, 唐语哲<sup>2</sup>, 胡晓东<sup>2</sup>, 董靖宇<sup>2</sup>, 胡嘉<sup>2\*</sup>

(1 华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 武汉 430030; 2 武汉科技大学生命科学与健康学院, 武汉 430065)

**摘要:** 全球结直肠癌的发病率和致死率居高不下。传统的治疗方案, 如手术、化疗或联合治疗可用于治疗早期结直肠癌患者, 然而复发性、转移性结直肠癌目前仍然缺乏有效的治疗手段。过继嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 疗法已经在恶性血液肿瘤的治疗中取得了成功, 研究人员也开展了 CAR-T 细胞用于治疗晚期结直肠癌的研究。本文总结了目前 CAR-T 细胞治疗结直肠癌的现状与挑战, 汇总了 CAR-T 细胞治疗结直肠癌的靶点, 阐述了 CAR-T 疗法治疗结直肠癌的临床前和临床研究, 并对提高 CAR-T 细胞疗法治疗结直肠癌的安全性和有效性策略进行综述。

**关键词:** 过继嵌合抗原受体 T 细胞; 结直肠癌; 免疫治疗; 肿瘤相关抗原; 肿瘤微环境  
**中图分类号:** R730.5; R735 **文献标志码:** A

## Current status and challenges of CAR-T therapy in colorectal cancer treatment

LUO Xia<sup>1</sup>, TANG Yu-Zhe<sup>2</sup>, HU Xiao-Dong<sup>2</sup>, DONG Jing-Yu<sup>2</sup>, HU Jia<sup>2\*</sup>

(1 Department of Laboratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2 College of Life Sciences and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China)

**Abstract:** The incidence and mortality of colorectal cancer (CRC) are high worldwide. Conventional treatment options for early-staged CRC patients include surgery, chemotherapy or combination therapy. However, there is still lack of effective treatments for recurrent and metastatic CRC. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy has gained great successes in the treatment of hematologic malignancies. Researchers are working to investigate whether CAR-T cells can be used for CRC treatment. In this review, we summarize the current status and challenges, the targets, the completed and ongoing pre-clinical and clinical studies of CAR-T cell therapy in CRC, and review the strategies which can be used to improve its safety and efficacy.

**Key words:** CAR-T; colorectal cancer; immunotherapy; tumor-associated antigens; tumor microenvironment

### 1 结直肠癌治疗现状

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 全球发病率在恶性肿瘤中高居第三位, 也是第二大恶性肿瘤死亡原因。2020 年全球新增 CRC 患者 188 万例, CRC 相关死亡人数 91.5 万例, 给社会经济带来严重负担<sup>[1]</sup>。CRC 发生发展是一个多因素、多步骤过程, 涉及到多种基因组改变, 包括染色体不稳定性、微卫星不稳定性和 CpG 岛甲基化缺陷等<sup>[2]</sup>。结肠腺瘤样息肉病基因 (adenomatous polyposis coli, APC)、肿瘤蛋白 53 (tumor protein 53, TP53) 或 SMAD 同源物 4 (SMAD family member 4, SMAD4) 等肿瘤抑

制基因表达或功能缺陷以及无翅型 MMTV 整合位点家族 (wingless-type MMTV integration site family, WNT)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等分子通路异常参与了 CRC 的发展<sup>[3]</sup>。

CRC 的预后与诊断发现时期相关, 早期 CRC 患者 5 年总生存率 (overall survival, OS) 达 90% 以上,

收稿日期: 2023-03-07; 修回日期: 2023-04-16

基金项目: 湖北省自然科学基金创新发展联合基金项目(2022CFD109)

\*通信作者: E-mail: hujia123@wust.edu.cn

手术联合化疗是提高早期患者生存的有效手段<sup>[4]</sup>。然而CRC早期很难发现,约50%的患者在诊断时已经出现淋巴和远处器官转移,传统治疗方案效果较差。对于晚期CRC患者,主要采用化疗药物和靶向药物联合的治疗方法。常用的化疗药物有奥沙利铂类、氟尿嘧啶类和伊立替康;靶向药物包括血管生成抑制剂(贝伐单抗)、表皮生长因子受体抑制剂(西妥昔单抗)和多激酶抑制剂(瑞格拉非尼)等<sup>[5]</sup>。尽管上述联合治疗方案显著改善了晚期CRC患者的预后,然而据美国临床统计分析发现,美国CRC患者5年生存率约为64%,而转移性CRC仅为12%,中国患者的预后甚至更差<sup>[2,6]</sup>。这些临床数据提示,开发新的策略用于治疗晚期CRC仍然迫在眉睫。

近几十年,免疫疗法在肿瘤治疗中异军突起。免疫检查点阻断疗法(immune checkpoint blockade, ICB)在黑色素瘤和非小细胞肺癌治疗中效果显著。遗憾的是,只有少数错配修复缺陷(mismatch repair deficiency, dMMR)/高度微卫星不稳定(microsatellite instability-high, MSI-H)的CRC患者对ICB疗法有反应<sup>[7]</sup>。CAR-T细胞疗法是一种极具潜力的细胞免疫疗法,具有靶向精准、杀瘤能力强、效果持久等优势。CAR-T细胞已经在血液肿瘤中显示出非常好的治疗效果,有望为CRC治疗带来新的希望。

## 2 CAR-T细胞疗法

### 2.1 嵌合抗原受体的结构及发展阶段

CAR-T细胞是经基因修饰表达嵌合受体的T细胞,能够以主要组织相容性分子(major histocom-

patibility complex, MHC)无关的方式靶向特定抗原<sup>[8]</sup>。CAR-T细胞治疗过程是将T细胞从患者的外周血中分离并在体外扩增,进行嵌合抗原受体表达修饰后回输至患者体内。CAR结构主要由以下三部分组成<sup>[9]</sup>。(1)细胞外结构域:包括抗原结合域和铰链区,前者通常是一种单链抗体片段(single chain antibody fragment, scFv),能够识别靶细胞表面抗原;铰链区将单链抗体片段与跨膜结构域相连,允许抗原结合域进入目标表位。(2)跨膜结构域:跨膜结构域通常来源于白细胞分化抗原4(cluster of differentiation 4, CD4)、白细胞分化抗原8 $\alpha$ (CD8 $\alpha$ )或白细胞分化抗原28(CD28),连接胞外段和胞内段。(3)胞内结构域:包括共刺激域和信号转导结构域。前者通常来自CD28受体家族或肿瘤坏死因子受体家族如CD28或肿瘤坏死因子受体超家族成员9(TNF receptor superfamily member 9, TNFRSF9/4-1-BB),实现共刺激分子和细胞内信号双重活化,提高T细胞增殖和杀瘤能力。后者通常为T细胞受体白细胞分化抗原3 $\zeta$ 链(CD3 $\zeta$ ),发挥信号转导功能(图1)。

CAR-T细胞的研究始于20世纪80年代末,研究人员发现将抗体可变区与T细胞受体恒定区结合,可以使T细胞同时具有特异性识别和细胞杀伤功能,即第一代CAR-T细胞。由于第一代CAR缺乏共刺激信号,因此抗肿瘤活性有限<sup>[10]</sup>。第二代CAR的胞内域包含一个共刺激分子(TNFRSF9/4-1-BB或CD28),目前获批上市的CAR-T产品主要是第二代CAR结构<sup>[11]</sup>。第三代CAR的胞内域包含两个共刺激分子,增强了CAR-T细胞活性和增殖能

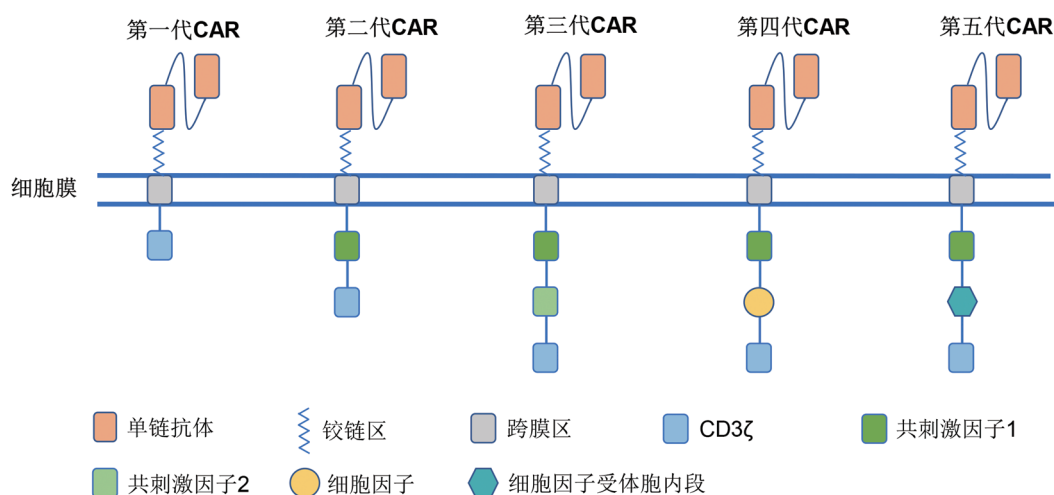


图1 第一代到第五代CAR分子结构示意图

力<sup>[12]</sup>。第四代 CAR 又被称为 TRUCK 细胞 (T-cells redirected for universal cytokine killing), 在 CAR 结构中引入了细胞因子 (如白介素 -12 或白介素 -15), 可以募集并活化其他免疫细胞, 改善肿瘤微环境<sup>[13]</sup>。值得注意的是, 尽管第三代和第四代 CAR 结构与第二代 CAR 相比在临床前模型中抑瘤效果更好, 但在实际临床应用中它们的优势仍有待证明。有研究发现第三代和第四代 CAR-T 细胞过度活化可以导致 T 细胞衰竭。第五代 CAR 在第二代的基础上添加了激活其他信号通路的共刺激结构域, 如白介素 2 受体  $\beta$  (interleukin-2 receptor  $\beta$ , IL-2R $\beta$ ) 胞内结合信号转导因子和转录激活因子 3/5 (signal transducer and activator of transcription 3/5, STAT3/5) 的结构域, 但其安全性和有效性也需进一步验证<sup>[14]</sup> (图 1)。此外, 针对自体 CAR-T 细胞生产周期长、费用高等缺点, 目前已经开发了异体通用型 CAR-T 细胞 (universal CAR-T)。其原理是通过基因编辑或非基因编辑的手段对 T 细胞进行改造, 降低异体 T 细胞的免疫排斥反应。基因编辑包括锌指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 和 CRISPR/Cas9 等技术; 非基因编辑可编码一种 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 抑制肽来抑制或消除 TCR 信号<sup>[15]</sup>。

## 2.2 CAR-T细胞在实体瘤中的应用

CAR-T 细胞疗法在血液肿瘤中有良好的治疗效果。中国和美国是开展 CAR-T 细胞疗法研究以及临床试验的主要力量, 目前全球已有 8 款针对血液肿瘤的 CAR-T 产品获批上市, 其中美国上市 6 款, 中国上市 2 款, 包括靶向 B 淋巴细胞抗原 CD19 的疗法 (Kymriah、Yescarta、Tecartus、Breyanzi、奕凯达、倍诺达) 和靶向 B 细胞成熟抗原 (B cell maturation antigen, BCMA) 的疗法 (Abecma、Carvykti)。遗憾的是, CAR-T 细胞疗法在实体肿瘤 (包括 CRC) 中的治疗效果一般, 面临以下许多难题和挑战。(1) 缺乏肿瘤特异性抗原。CAR-T 细胞治疗实体瘤的靶点通常也在正常细胞中表达。CAR-T 疗法治疗血液肿瘤的常见副作用为细胞因子释放综合征 (cytokine release syndrome, CRS) 和神经毒性, 而在实体肿瘤中常见的副作用是 CAR-T 细胞非特异性靶向引起的严重毒性反应<sup>[16]</sup>。2010 年, 研究报道了一名肺部和肝脏转移的结肠癌患者接受靶向人类表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 的 CAR-T 细胞治疗, 最终该患者死于呼吸

窘迫综合征, 可能原因是 CAR-T 细胞对低表达 HER2 的肺上皮细胞产生非特异性杀伤<sup>[17]</sup>。(2) 不利的肿瘤微环境。物理障碍, 如肿瘤间质可以阻止 T 细胞浸润。此外, 实体肿瘤内部的酸性和免疫抑制性微环境可以抑制 CAR-T 细胞增殖和活性<sup>[18]</sup>。靶向肿瘤相关糖蛋白 72 (tumor-associated glycoprotein 72, TAG-72) 的 CAR-T 细胞治疗 CRC 的临床试验结果表明, 尽管 TAG-72 CAR-T 细胞具有很好的安全性, 但由于免疫抑制性微环境和不能够有效渗透肿瘤组织, 其疗效有限<sup>[19]</sup>。(3) CAR-T 细胞衰竭。肿瘤抗原持续性刺激可以诱导抑制性受体表达, 使 T 细胞失去效应功能。CRC 组织中的 T 细胞与非肿瘤组织中的 T 细胞相比增殖能力明显降低, 抑制性受体表达升高, 分泌较多的 IL-17 和更少的 IL-2<sup>[20]</sup>。针对上述问题, 研究人员也开发了多种应对措施。

## 3 CAR-T细胞疗法在CRC中的应用

### 3.1 CRC的靶点

寻找合适的肿瘤抗原以提高 CAR-T 细胞疗法的临床适用性和安全性是一个重大挑战。肿瘤抗原包括肿瘤特异性抗原 (tumor specific antigens, TSAs) 和肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigens, TAAs)。前者在正常细胞中不表达, 而在肿瘤细胞中特异性表达; 后者在正常细胞中低表达, 但在肿瘤细胞中高表达。多数上皮来源的实体瘤缺乏 TSA, 只能选择 TAA 作为 CAR-T 细胞治疗的靶点。

#### 3.1.1 癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)

CEA 属于癌胚抗原细胞黏附分子 (carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule, CEACAM) 家族, 在正常组织中表达较低, 而在 CRC 中表达升高, 可作为 CRC 的肿瘤标志物和免疫治疗靶点<sup>[21]</sup>。一项临床试验 (NCT02349724) 募集了 10 例晚期 CRC 患者接受 CEA CAR-T 细胞治疗, 其中 7 例患者在治疗后病情稳定 (stable disease, SD), 2 例患者 SD 维持 30 周以上, 多数患者血清 CEA 水平明显下降。即使在高剂量下人体对 CAR-T 细胞也具有较好的耐受性, 仅有部分患者出现发热、淋巴细胞减少和肝功能受损<sup>[22]</sup>。在另外一项 I 期临床试验中, 使用 CEACAM5 CAR-T 细胞则没有观察到显著的临床疗效, 但由于患者出现明显的呼吸系统毒性导致临床试验提前终止<sup>[10]</sup>。此外, 有研究发现 CEA CAR-Treg 细胞在小鼠模型中可以抑制结肠炎向 CRC 进展<sup>[23]</sup>。

#### 3.1.2 人类表皮生长因子受体-2 (HER2)

HER2 是一种跨膜糖蛋白受体, 主要存在于发

育中的呼吸和消化系统的上皮细胞以及中枢神经系统的室管膜细胞中<sup>[24]</sup>。HER2 CAR-T细胞在CRC异体肿瘤模型中能够有效杀伤肿瘤<sup>[25]</sup>。尽管临床前研究表明HER2 CAR-T细胞可能是一种有前途的CRC治疗方法,但在临床中的主要挑战是脱靶毒性。一名转移到肺部和肝脏的结肠癌患者接受HER2 CAR-T细胞治疗后出现了严重的呼吸窘迫并死亡,可能是由于CAR-T细胞对低表达HER2的肺上皮细胞产生了非特异性杀伤<sup>[17]</sup>。

### 3.1.3 肿瘤相关糖蛋白72 (TAG-72)

TAG-72在大多数正常组织中不表达,而在80%的CRC中高表达且与患者预后不良有关。两项临床试验分别采用全身(C9701)或局部肝动脉灌注(C9702)的方式进行TAG72 CAR-T细胞给药,结果表明TAG72 CAR-T细胞具有很好的安全性,但CAR-T细胞不能有效渗透到肿瘤中心区域,在血液中持续时间较短<sup>[19]</sup>。

### 3.1.4 NK细胞受体2D (NKG2-D activating NK receptor, NKG2D)

NKG2D是一种C型凝集素样激活受体,可特异性与多个配体(NKG2D ligand, NKG2DL)结合,包括MHC-I类多肽相关序列A和B(MHC class I polypeptide-related sequence A and B, MICA和MICB)以及6个UL16结合蛋白(UL16 binding protein 1~6, ULBP1~6)。NKG2DL在多种肿瘤中高表达,包括卵巢癌、结直肠癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌等<sup>[26]</sup>。NKG2D CAR-T细胞可以杀伤结肠癌细胞,在小鼠模型中抑制肿瘤生长,对小鼠重要器官没有明显副作用<sup>[27]</sup>。此外,有研究人员构建了靶向RNA输出1(ribonucleic acid export 1, RAE1,一种NKG2DL)的NKG2D CAR-T细胞,可以抑制CRC小鼠模型肿瘤血管生成<sup>[28]</sup>。

### 3.1.5 鸟苷酰环化酶2C (guanylate cyclase 2C, GUCY2C)

GUCY2C是鸟苷酰环化酶家族的一员,正常组织中仅在从十二指肠到直肠的肠上皮细胞和下丘脑的一个神经元亚群中表达,而在原发性和转移性CRC中高表达,是CRC潜在的免疫治疗靶点<sup>[29]</sup>。GUCY2C CAR-T细胞可以有效杀伤GUCY2C<sup>+</sup>肿瘤细胞,在CRC小鼠模型中抑制肿瘤生长和远处肺转移,提高小鼠存活率<sup>[30-31]</sup>。

### 3.1.6 肝肠钙黏蛋白(cadherin-17, CDH17)

有研究表明CDH17可以作为CAR-T细胞治疗CRC的靶点。CDH17是一种Ca<sup>2+</sup>依赖的黏附分子,在正常肠道上皮细胞和CRC中均有表达<sup>[32]</sup>。有意

思的是,CDH17仅表达于正常肠上皮细胞之间紧密连接的侧膜上,在细胞顶端或底面不表达。而由于肿瘤细胞缺乏极性,CDH17在肿瘤细胞表面均表达。CDH17 CAR-T细胞在CRC小鼠模型中可以有效杀伤肿瘤,而不损害表达CDH17的正常组织,该研究也为寻找CRC的靶点提供了新的思路<sup>[33]</sup>。

### 3.1.7 间皮素(mesothelin, MSLN)

MSLN是一种表达在细胞表面的糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白,在正常组织中其表达局限于胸膜、心包、腹膜和阴道膜的间皮细胞。MSLN在胸膜间皮瘤、结直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、肺腺癌等恶性肿瘤中表达较高,其中60%的CRC患者MSLN阳性<sup>[34]</sup>,MSLN在CRC中的临床病理特征和预后尚未完全阐明。研究表明MSLN CAR-T细胞在小鼠模型中有效抑制CRC的进展<sup>[35]</sup>。MSLN是CAR-T疗法比较热门的靶点,已有多项MSLN CAR-T细胞治疗晚期实体瘤(包括CRC)的临床试验正在开展(NCT02959151、NCT04503980)<sup>[36]</sup>。

除上述研究外,还有多个针对CRC的CAR-T治疗靶点正在开展研究和临床试验,包括造血干细胞抗原CD133<sup>[37]</sup>、上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)<sup>[38]</sup>、膜型热休克蛋白70(heat shock protein 70, Hsp70)<sup>[39]</sup>、B7同源体3(B7 homolog 3, B7-H3)<sup>[40]</sup>、胎盘碱性磷酸酶(placental alkaline phosphatase, PLAP)<sup>[41]</sup>、黏蛋白1(mucin 1, MUC1)(NCT02617134)、细胞间质上皮转换因子(cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-Met)(NCT-03638206)、双肾上腺皮质激素样激酶1(doublecortin like kinase 1, DCLK1)<sup>[42]</sup>和癌症/睾丸相关抗原(cancer/testis antigens, CTA)等<sup>[43]</sup>。

## 3.2 提高CAR-T细胞的安全性

接受CAR-T细胞治疗的CRC患者出现的副作用主要是CAR-T细胞对正常组织细胞产生非特异性杀伤毒性<sup>[44]</sup>。目前开发了多种抑制CAR-T细胞对正常组织非特异杀伤的方法。(1)双重抗原靶向的抑制型CAR结构(inhibitory CARs, iCARs),当它识别仅由正常细胞表达的特定抗原后会产生抑制信号,减少CAR-T细胞毒性<sup>[45]</sup>。(2)利用小分子药物控制CAR-T细胞活性,该方法的原理是只有在肿瘤抗原和小分子药物同时存在的情况下,抗原结合位点和细胞内信号域才能形成完整的信号通路,激活CAR-T细胞。这种药物调控系统可以精确控制CAR-T细胞的活性<sup>[46]</sup>。(3)双受体CAR(dual-receptor CAR, dCAR),当CAR-T细胞结合一种肿瘤抗原时,

只能提供低效的 T 细胞激活信号, 而同时识别另外一种抗原时, 可以提供更强的 T 细胞激活信号, 产生更强的杀伤效果<sup>[47]</sup>。(4) 合成 Notch 结构 (synthetic Notch, SynNotch), 该结构由起始和应答元件组成, 起始元件的受体识别肿瘤抗原后导致胞内 Notch 片段切割进入细胞核, 促进另一个 CAR 应答元件的转录表达, 表达的 CAR 可以识别另一个肿瘤抗原并触发细胞杀伤作用<sup>[48]</sup>。此外, 还有一些其他的策略也可以提高 CAR-T 细胞治疗实体瘤的靶向性和安全性, 例如局部给药、在 CAR 结构中增加可诱导的 Caspase9 自杀元件<sup>[44]</sup>、特异性 T 细胞衔接器 (bispecific T cell engage) 系统<sup>[49]</sup>、聚焦超声 (focused ultrasound, FUS) 联合 CAR-T 细胞治疗<sup>[50]</sup> 等, 这些方案后续可能在 CRC 治疗中展开应用。

### 3.3 增强CAR-T细胞的治疗效果

尽管临床前研究提示 CAR-T 细胞对 CRC 有较强的杀伤作用, 但在实际的临床应用中, CAR-T 细胞对 CRC 的治疗效果受到各种因素的制约, 如 T 细胞固有抑制机制、肿瘤物理屏障、免疫抑制性微环境等。针对上述问题, 研究人员开发了多种应对策略。

#### 3.3.1 增强CAR-T细胞自身活性及增殖能力

细胞因子在 T 细胞增殖活化过程中发挥重要作用, 然而肿瘤组织中促免疫细胞因子含量较低。IL-12 可以上调 CEA CAR-T 细胞中干扰素  $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN  $\gamma$ )、IL-2 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的表达, IL-12 和 CEA CAR-T 细胞联用比单独使用 CAR-T 细胞有更强的杀瘤能力<sup>[51]</sup>。IL-12-EGFR CAR-T 细胞治疗转移性 CRC 的安全性和可行性已经开展临床试验评估 (NCT03542799、NCT02959151)。此外, 有研究利用间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 可以分泌大量免疫激活分子的特性, 将释放 IL-7 和 IL-12 的 MSCs 与 CAR-T 细胞联合使用, 可以延长 CAR-T 细胞在体内的存活时间, 增强细胞的杀伤能力<sup>[52]</sup>。

#### 3.3.2 增强CAR-T细胞的浸润

CRC 肿瘤组织中 CAR-T 细胞浸润较少, 肿瘤微环境中趋化因子和 CAR-T 细胞表达的趋化因子受体不匹配是限制 CAR-T 细胞肿瘤浸润的关键因素之一。CXC 趋化因子受体 3 (chemokine C-X-C motif receptor 3, CXCR3) 和 CC 趋化因子受体 5 (C-C chemokine receptor type 5, CCR5) 在 CRC 肿瘤浸润性淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) 中高表达并影响 T 细胞转运。对 CAR 结构进行改造

使其表达 CXCR3 和 CCR5 可以显著改善 CAR-T 细胞的肿瘤浸润能力<sup>[45]</sup>。肿瘤血管形成与免疫细胞迁移到肿瘤组织密切相关。HER2 CAR-T 细胞联合肿瘤血管阻滞剂 CA4P 可以促进 T 细胞浸润到 CRC 组织, 比 CA4P 或 HER2 CAR-T 细胞单独使用有更好的抗肿瘤效果<sup>[53]</sup>。

#### 3.3.3 改善肿瘤免疫抑制性微环境

肿瘤微环境中有大量的免疫抑制性分子和细胞, 如前列腺素 E2、腺苷和骨髓源性抑制细胞等, 这种免疫抑制性微环境是限制 CAR-T 细胞功能的另一个重要原因。使用免疫抑制性分子和细胞 (如髓源性抑制细胞、调节性 T 细胞和 IL-10) 的中和抗体可以增强 CAR-T 细胞在 CRC 组织中的增殖和活性<sup>[54-56]</sup>。免疫检查点阻断疗法 (immune checkpoint blockade, ICB) 也能增强 CAR-T 细胞对 CRC 的杀伤活性, 提示 CAR-T 细胞联合 ICB 可能是一种有效治疗 CRC 的方法<sup>[41]</sup>。鉴于肿瘤微环境中存在大量免疫抑制分子, 将免疫抑制因子受体如白介素 4 受体 (interleukin-4R, IL-4R) 的胞外配体结合区与免疫激活分子如白介素 7 受体 (IL-7R) 或白介素 2 受体 (IL-2R) 的胞内结构域在 CAR-T 细胞中整合表达, 可以将免疫抑制信号转化为刺激信号<sup>[57]</sup>。根据促炎细胞因子积累和 T 细胞浸润情况, 可以将肿瘤分为冷肿瘤或热肿瘤。通常以 T 细胞浸润和免疫激活为特征的热肿瘤对免疫治疗反应更好, 因此使 TME 进入促炎状态可以增强 CAR-T 细胞的抗肿瘤能力。CD30 通路促进 T 细胞向免疫抑制性 Th2 细胞分化, 双靶向 CD30 和 CEA 的 CAR-T 细胞在 CRC 中有显著的促炎和肿瘤抑制能力<sup>[58]</sup>。对 CRC 肿瘤负荷的小鼠静脉注射减毒活布氏菌可以使肿瘤微环境进入促炎状态, 增强 CAR-T 细胞的杀瘤效果<sup>[59]</sup>。

除上述方法外, 还有一些改善 CAR-T 细胞治疗实体瘤效果的策略, 例如 CAR-T 细胞联合溶瘤病毒, 溶瘤病毒可以破坏肿瘤组织, 增强 CAR-T 细胞的浸润和杀伤能力<sup>[60]</sup>。有研究开发了一种疫苗, 将该疫苗递送至淋巴结后可以显著激活 CAR-T 细胞的增殖和活化, 这些方案后续也可能用于 CRC 治疗<sup>[61]</sup>。表 1 和表 2 总结了目前开展基础研究和临床试验的 CAR-T 细胞治疗 CRC 的靶点。

## 4 总结与展望

CAR-T 细胞疗法是肿瘤免疫治疗的热点领域, 近十年来进展迅速。人们通过各种手段对 CAR 结构进行改造 (第一至第五代), 以增强 CAR-T 细胞

表1 CAR-T细胞治疗CRC的靶向抗原(临床前研究)

靶点	实验方案	实验结果	参考文献
CEA	CEA CAR-T细胞联合IL-12	IL-12促进CAR-T细胞活化、增殖,抑制肿瘤生长	[51]
	抗MDSC和Treg抗体联合CEA CAR-T细胞腹腔注射	腹腔注射CAR-T细胞能够长期抑瘤,与抗MDSC和Treg抗体联用抑制腹膜癌转移	[56]
	表达Bcl-xL的CEA CAR-T细胞	Bcl-xL增强CAR-T细胞在肿瘤中的蓄积,抑制肿瘤生长,提高小鼠生存率	[62]
	CD30/CEA双靶向CAR-T细胞	CD30/CEA CAR-T细胞活化能力增强	[58]
	IL-10联合CEA CAR-T细胞	IL-10抗体增加CAR-T细胞活化和细胞毒性	[54]
	Cbl-b缺失的CEA CAR-T细胞	Cbl-b缺失抑制CAR-T细胞衰竭,促进INF $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 表达	[63]
NKG2D	NKG2D/PD-L1双靶向CAR-T细胞	CAR-T细胞在CRC腹膜转移小鼠模型中根除肿瘤	[64]
	NKG2D CAR-T细胞	CAR-T细胞抑制CRC肿瘤生长,无明显毒副作用	[27]
	NKG2D CAR-T细胞	CAR-T细胞通过靶向Rae1抑制肿瘤血管形成	[28]
GUCY2C	GUCY2C CAR-T细胞	CAR-T细胞抑制CRC肿瘤生长及转移,对正常组织无损伤	[30-31]
CDH17	CDH17 CAR-T细胞	CAR-T细胞杀伤CRC肿瘤,不损害表达CDH17的正常组织	[33]
PLAP	PLAP CAR-T与免疫检查点抑制剂联用	CAR-T细胞抑制LoVo细胞的生长,与免疫检查点抑制剂联用增加CAR-T细胞的活性	[41]
MSLN	MSLN CAR-T细胞	CAR-T细胞抑制CRC肿瘤生长,升高细胞因子水平	[35]
mHsp70	Hsp70 CAR-T细胞	CAR-T细胞通过释放颗粒酶B和IFN $\gamma$ 杀伤CRC细胞	[39]
CD133	CD133 CAR-T细胞	CAR-T细胞有效杀伤CD133阳性CRC细胞	[37]
EpCAM	EpCAM CAR-T细胞	CAR-T细胞延缓小鼠CRC肿瘤生长,无全身毒性	[38, 65-66]
	EpCAM CAR-T细胞和WNT抑制剂联用	CAR-T细胞与WNT抑制剂联用有协同杀伤作用;WNT抑制剂改善T细胞浸润,延缓CAR-T细胞衰竭	[67]
HER2	HER2 CAR-T细胞	CAR-T细胞抑制CRC肿瘤生长,预防转移与复发	[25, 68]
DCLK1	DCLK1 CAR-T细胞	CAR-T细胞抑制CRC细胞生长	[42]

的安全性和有效性。然而值得注意的是,目前上市的CAR-T细胞产品主要采用的还是第二代CAR,尽管后续的几代CAR-T细胞在临床前的研究中表现更好,但是其在临床中的有效性和安全性仍然需要进一步验证。

尽管CAR-T细胞治疗在CRC临床前研究中显示了良好的抑瘤效果,但在实际的临床应用中并没有达到预期的疗效,面临着非肿瘤靶向毒性、CAR-T细胞浸润程度低、肿瘤免疫抑制性微环境等问题。研究人员目前正在通过各种手段解决上述障碍,例如通过蛋白质组学技术寻找特异性靶点、对CAR结构进行改造、探索CAR-T细胞联合治疗策略等。目前正在开展的数十项CAR-T细胞治疗CRC的临床试验将来可能会提供解决这些问题的答案。总之,CAR-T细胞疗法为晚期难治性/转移性CRC的治疗带来新的方向和希望。

#### [参 考 文 献]

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 209-49
- [2] El Bali M, Bakkach J, Bennani-Mechita M. Colorectal cancer: from genetic landscape to targeted therapy. *J Oncol*, 2021, 2021: 9918116
- [3] Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2009, 361:2449-60
- [4] Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*, 2019, 14: 89-103
- [5] Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2008, 134: 1296-310
- [6] Wang YQ, Li HZ, Gong WW, et al. Cancer incidence and mortality in Zhejiang Province, Southeast China, 2016: a population-based study. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134: 1959-66
- [7] Jin Z, Sinicrope FA. Mismatch repair-deficient colorectal cancer: building on checkpoint blockade. *J Clin Oncol*, 2022, 40: 2735-50
- [8] Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86: 10024-8
- [9] Labanieh L, Mackall CL. CAR immune cells: design principles, resistance and the next generation. *Nature*, 2023, 614: 635-48
- [10] Thistlethwaite FC, Gilham DE, Guest RD, et al. The

表2 CAR-T细胞治疗CRC的靶向抗原(临床试验)

靶点	编号	肿瘤类型	受试人数	分期	开始时间	试验状态	结果	
CEA	NCT02349724	实体瘤(包括CRC)	75	I	2015	未知	10例CRC患者中7例病情稳定(SD), 2例疾病进展(PD)。部分患者出现发热, 淋巴细胞减少和肝功能受损等副作用	
	NCT02416466	CRC肝转移	8	I	2015	完成	6例CRC患者中2例病情稳定(SD), 4例疾病进展(PD), 部分患者出现发热, 结肠炎和K <sup>+</sup> 浓度降低等副作用, 但未出现严重CRS及神经毒性	
	NCT02850536	CRC肝转移	5	I	2016	完成	未知	
	NCT02959151	转移性CRC	20	I/II	2016	未知	未知	
	NCT04348643	实体瘤(包括CRC)	40	I/II	2020	招募	未知	
	NCT04513431	III期CRC以及肝转移	18	I	2020	未招募	未知	
	NCT05240950	CRC肝转移	18	I	2022	招募	未知	
	NCT05396300	实体瘤(包括CRC)	60	I	2022	招募	未知	
	NCT05415475	实体瘤(包括CRC)	36	I	2022	招募	未知	
	NCT05736731	实体瘤(包括CRC)	16	I/II	2023	未招募	未知	
NKG2D	NCT05382377	CRC	18	I	2022	招募	未知	
	NCT03310008	CRC肝转移	36	I	2017	未知	未知	
	NCT03370198	CRC肝转移	1	I	2017	未知	未知	
	NCT03692429	转移性CRC	49	I	2018	招募	15例CRC患者中2例病情部分缓解(PR), 9例病情稳定(SD), 4例疾病进展(PD), 未出现严重不良反应	
	NCT04107142	实体瘤(包括CRC)	10	I	2019	未知	未知	
	NCT04550663	实体瘤(包括CRC)	10	I	2020	未知	未知	
	NCT05131763	实体瘤(包括CRC)	3	I	2021	招募	未知	
	NCT05248048	难治性转移性CRC	9	I	2022	招募	未知	
	GUCY2C	NCT05287165	CRC	19	I	2022	招募	未知
		NCT05319314	CRC	30	I	2022	招募	未知
MSLN	NCT04503980	CRC	10	I	2020	未知	未知	
	NCT05089266	CRC	30	I	2021	未招募	未知	
CD133	NCT02541370	实体瘤(包括CRC)	20	I/II	2015	完成	未知	
EpCAM	NCT03013712	实体瘤(包括CRC)	60	I/II	2017	未知	未知	
	NCT05028933	实体瘤(包括CRC)	48	I	2021	招募	未知	
B7-H3	NCT05190185	实体瘤(包括CRC)	18	I	2022	招募	未知	
HER2	NCT03740256	实体瘤(包括CRC)	45	I	2018	招募	未知	
MUC1	NCT02617134	实体瘤(包括CRC)	20	I/II	2015	未知	未知	
	NCT05239143	实体瘤(包括CRC)	100	I	2022	招募	未知	
C-Met	NCT03638206	实体瘤(包括CRC)	73	I/II	2018	未知	未知	
EGFR	NCT03152435	CRC	20	I/II	2017	未知	未知	
	NCT03542799	转移性CRC	20	I	2018	未知	未知	

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

[11] Li S, Zhang J, Wang M, et al. Treatment of acute

lymphoblastic leukaemia with the second generation of CD19 CAR-T containing either CD28 or 4-1BB. *Br J Haematol*, 2018, 181: 360-71

[12] Enblad G, Karlsson H, Gammelgard G, et al. A Phase I/IIa trial using CD19-targeted third-generation CAR T cells for lymphoma and leukemia. *Clin Cancer Res*, 2018, 24:

- 6185-94
- [13] Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15: 1145-54
- [14] Kagoya Y, Tanaka S, Guo T, et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat Med*, 2018, 24: 352-9
- [15] Young RM, Engel NW, Uslu U, et al. Next-generation CAR T-cell therapies. *Cancer Discov*, 2022, 12: 1625-33
- [16] Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev*, 2019, 34: 45-55
- [17] Morgan RA, Yang JC, Kitano M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, 2010, 18: 843-51
- [18] Scarfo I, Maus MV. Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*, 2017, 5: 28
- [19] 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
- [20] Bell HN, Huber AK, Singhal R, et al. Microenvironmental ammonia enhances T cell exhaustion in colorectal cancer. *Cell Metab*, 2023, 35:134-49.e136
- [21] Han ZW, Lyv ZW, Cui B, et al. The old CEACAMs find their new role in tumor immunotherapy. *Invest New Drugs*, 2020, 38: 1888-98
- [22] Zhang C, Wang Z, Yang Z, et al. Phase I escalating-dose trial of CAR-T therapy targeting CEA<sup>+</sup> metastatic colorectal cancers. *Mol Ther*, 2017, 25: 1248-58
- [23] Blat D, Zigmund E, Alteber Z, et al. Suppression of murine colitis and its associated cancer by carcinoembryonic antigen-specific regulatory T cells. *Mol Ther*, 2014, 22: 1018-28
- [24] La Salvia A, Lopez-Gomez V, Garcia-Carbonero R. HER2-targeted therapy: an emerging strategy in advanced colorectal cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28: 29-38
- [25] Xu J, Meng Q, Sun H, et al. HER2-specific chimeric antigen receptor-T cells for targeted therapy of metastatic colorectal cancer. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 1109
- [26] Dhar P, Wu JD. NKG2D and its ligands in cancer. *Curr Opin Immunol*, 2018, 51: 55-61
- [27] Deng X, Gao F, Li N, et al. Antitumor activity of NKG2D CAR-T cells against human colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Am J Cancer Res*, 2019, 9: 945-58
- [28] Zhang T, Sentman CL. Mouse tumor vasculature expresses NKG2D ligands and can be targeted by chimeric NKG2D-modified T cells. *J Immunol*, 2013, 190: 2455-63
- [29] Valentino MA, Lin JE, Snook AE, et al. A uroguanylin-GUCY2C endocrine axis regulates feeding in mice. *J Clin Invest*, 2011, 121: 3578-88
- [30] Magee MS, Kraft CL, Abraham TS, et al. GUCY2C-directed CAR-T cells oppose colorectal cancer metastases without autoimmunity. *Oncoimmunology*, 2016, 5: e1227897
- [31] Magee MS, Abraham TS, Baybutt TR, et al. Human GUCY2C-targeted chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cells eliminate colorectal cancer metastases. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6: 509-16
- [32] Wendeler MW, Drenckhahn D, Gessner R, et al. Intestinal LI-cadherin acts as a Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesion switch. *J Mol Biol*, 2007, 370: 220-30
- [33] Feng Z, He X, Zhang X, et al. Potent suppression of neuroendocrine tumors and gastrointestinal cancers by CDH17CAR T cells without toxicity to normal tissues. *Nat Cancer*, 2022, 3: 581-94
- [34] Weidemann S, Gagelmann P, Gorbokon N, et al. Mesothelin expression in human tumors: a tissue microarray study on 12,679 tumors. *Biomedicines*, 2021, 9: 397
- [35] Zhang Q, Liu G, Liu J, et al. The antitumor capacity of mesothelin-CAR-T cells in targeting solid tumors in mice. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 20: 556-68
- [36] Schoutrop E, Renken S, Micallef-Nilsson I, et al. Troglodytosis and fratricide killing impede MSLN-directed CAR T cell functionality. *Oncoimmunology*, 2022, 11: 2093426
- [37] 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
- [38] Zhang BL, Li D, Gong YL, et al. Preclinical evaluation of chimeric antigen receptor-modified T cells specific to epithelial cell adhesion molecule for treating colorectal cancer. *Hum Gene Ther*, 2019, 30: 402-12
- [39] Bashiri-Dezfouli A, Yazdi M, Benmebarek MR, et al. CAR T cells targeting membrane-bound Hsp70 on tumor cells mimic Hsp70-primed NK cells. *Front Immunol*, 2022, 13: 883694
- [40] Huang B, Luo L, Wang J, et al. B7-H3 specific T cells with chimeric antigen receptor and decoy PD-1 receptors eradicate established solid human tumors in mouse models. *Oncoimmunology*, 2020, 9: 1684127
- [41] Li X, Berahovich R, Zhou H, et al. PLAP-CAR T cells mediate high specific cytotoxicity against colon cancer cells. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2020, 25: 1765-86
- [42] Sureban SM, Berahovich R, Zhou H, et al. DCLK1 monoclonal antibody-based CAR-T cells as a novel treatment strategy against human colorectal cancers. *Cancers (Basel)*, 2019, 12: 54
- [43] Aparicio C, Belder M, Enriquez L, et al. Cell therapy for colorectal cancer: the promise of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 11781
- [44] Flugel CL, Majzner RG, Krenciute G, et al. Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20: 49-62
- [45] D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, et al. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 282
- [46] Foster AE, Mahendravada A, Shinnars NP, et al. Regulated expansion and survival of chimeric antigen receptor-modified T cells using small molecule-dependent inducible



- MyD88/CD40. *Mol Ther*, 2017, 25: 2176-88
- [47] Zhang E, Yang P, Gu J, et al. Recombination of a dual-CAR-modified T lymphocyte to accurately eliminate pancreatic malignancy. *J Hematol Oncol*, 2018, 11: 102
- [48] 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
- [49] Kim MS, Ma JS, Yun H, et al. Redirection of genetically engineered CAR-T cells using bifunctional small molecules. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 2832-5
- [50] Wu Y, Liu Y, Huang Z, et al. Control of the activity of CAR-T cells within tumours via focused ultrasound. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5: 1336-47
- [51] Chi X, Yang P, Zhang E, et al. Significantly increased anti-tumor activity of carcinoembryonic antigen-specific chimeric antigen receptor T cells in combination with recombinant human IL-12. *Cancer Med*, 2019, 8: 4753-65
- [52] Hombach AA, Geumann U, Gunther C, et al. IL7-IL12 engineered mesenchymal stem cells (MSCs) improve a CAR T cell attack against colorectal cancer cells. *Cells*, 2020, 9: 873
- [53] Deng C, Zhao J, Zhou S, et al. The vascular disrupting agent CA4P improves the antitumor efficacy of CAR-T cells in preclinical models of solid human tumors. *Mol Ther*, 2020, 28: 75-88
- [54] Sullivan KM, Jiang X, Guha P, et al. Blockade of interleukin 10 potentiates antitumour immune function in human colorectal cancer liver metastases. *Gut*, 2023, 72: 325-37
- [55] Mardiana S, John LB, Henderson MA, et al. A multifunctional role for adjuvant anti-4-1BB therapy in augmenting antitumor response by chimeric antigen receptor T cells. *Cancer Res*, 2017, 77: 1296-309
- [56] Katz SC, Point GR, Cunetta M, et al. Regional CAR-T cell infusions for peritoneal carcinomatosis are superior to systemic delivery. *Cancer Gene Ther*, 2016, 23: 142-8
- [57] Forster S, Radpour R. Molecular immunotherapy: promising approach to treat metastatic colorectal cancer by targeting resistant cancer cells or cancer stem cells. *Front Oncol*, 2020, 10: 569017
- [58] Hombach AA, Rappi G, Abken H. Blocking CD30 on T cells by a dual specific CAR for CD30 and colon cancer antigens improves the CAR T cell response against CD30 tumors. *Mol Ther*, 2019, 27: 1825-35
- [59] Guo F, Das JK, Kobayashi KS, et al. Live attenuated bacterium limits cancer resistance to CAR-T therapy by remodeling the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*, 2022, 10: e003760
- [60] Park AK, Fong Y, Kim SI, et al. Effective combination immunotherapy using oncolytic viruses to deliver CAR targets to solid tumors. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaaz1863
- [61] Ma L, Dichwalkar T, Chang JYH, et al. Enhanced CAR-T cell activity against solid tumors by vaccine boosting through the chimeric receptor. *Science*, 2019, 365: 162-8
- [62] Fan J, Das JK, Xiong X, et al. Development of CAR-T cell persistence in adoptive immunotherapy of solid tumors. *Front Oncol*, 2020, 10: 574860
- [63] Kumar J, Kumar R, Kumar Singh A, et al. Deletion of Cbl-b inhibits CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion and promotes CAR T-cell function. *J Immunother Cancer*, 2021, 9:
- [64] Jiang G, Ng YY, Tay JCK, et al. Dual CAR-T cells to treat cancers co-expressing NKG2D and PD1 ligands in xenograft models of peritoneal metastasis. *Cancer Immunol Immunother*, 2023, 72: 223-34
- [65] Zhou Y, Wen P, Li M, et al. Construction of chimeric antigen receptor-modified T cells targeting EpCAM and assessment of their anti-tumor effect on cancer cells. *Mol Med Rep*, 2019, 20: 2355-64
- [66] Ang WX, Li Z, Chi Z, et al. Intraperitoneal immunotherapy with T cells stably and transiently expressing anti-EpCAM CAR in xenograft models of peritoneal carcinomatosis. *Oncotarget*, 2017, 8: 13545-59
- [67] Li W, Zhou Y, Wu Z, et al. Targeting Wnt signaling in the tumor immune microenvironment to enhancing EpCAM CAR T-cell therapy. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 724306
- [68] Teng R, Zhao J, Zhao Y, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells repressed solid tumors and their relapse in an established patient-derived colon carcinoma xenograft model. *J Immunother*, 2019, 42: 33-42