

过表达NKG2D-CD3 ζ 的NY-ESO-1 TCR-T细胞对一例急性髓系白血病患者原代细胞的杀伤活性体外研究

张蕊¹ 牟男² 蒲业迪¹ 李青¹ 江嫣雨¹ 袁婷¹ 邓琦¹

¹天津市第一中心医院血液科 300192; ²上海吉凯生物技术有限公司 201206

通信作者: 邓琦, Email: kachydeng@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.11.013

Overexpression of NKG2D-CD3 ζ in NY-ESO-1 TCR-T cells enhanced cytotoxicity to acute myeloid leukemia cells *in vitro*

Zhang Rui¹, Mou Nan², Pu Yedi¹, Li Qing¹, Jiang Yanyu¹, Yuan Ting¹, Deng Qi¹

¹Department of Hematology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; ²Shanghai Genbase

Biotechnology Co., Ltd. Shanghai 201206, China

Corresponding author: Deng Qi, Email: kachydeng@126.com

纽约食管鳞状上皮癌抗原1(New York esophageal squamous cell carcinoma 1, NY-ESO-1)是癌-辜丸抗原(CTA)家族中的重要成员,能诱导细胞和体液免疫应答^[1-3]。文献报道抗NY-ESO-1 T细胞受体(TCR)1G4可识别HLA-A*02:01限制性p157-165肽段^[4]。而目前NY-ESO-1特异性TCR嵌合型T细胞在急性髓系白血病(AML)中的研究甚少,疗效也不甚明确。

自然杀伤细胞活化型受体2(NKG2D)主要表达于NK细胞、CD8⁺T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞,特定的CD4⁺T细胞也有表达^[5-6]。在激活的CD8⁺T细胞中,NKG2D可能提供共刺激功能,尤其对于缺乏CD28(T细胞的传统共刺激受体)表达的高度活化的CD8⁺T细胞激活作用最为明显^[7]。如IL-15刺激人的CD8⁺T细胞被有效激活后,在T细胞受体激活缺失的情况下,NKG2D的参与足以触发靶细胞杀伤^[8]。最近有研究发现NKG2D的配体NKG2DL在白血病干细胞表面缺失引起免疫逃逸,针对耐药的AML患者增强NKG2DL的表达可提高免疫治疗与化疗效果,减少复发^[9]。NKG2DL主要包括MHC class I chain-related(MIC)基因家族的两个成员MICA/MICB和UL16结合蛋白家族6个成员(ULBP1~6)^[10-11]。我们构建并制备NY-ESO-1 TCR-T细胞,观察其功能,并将其过表达NKG2D-CD3 ζ ,通过持续提供刺激激活信号并结合肿瘤表面配体NKG2DL,观察是否增强NY-ESO-1 TCR-T细胞对AML原代细胞的杀伤活性。

材料与方法

1. 细胞株及主要试剂:293T细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC)。T2是TB杂交瘤细胞,稳定表达A0201;T2M1是稳定转染了ESO1 p157-165的T2细胞,该细胞株可呈递被TCR识别的ESO1 p157-165肽。含有TCR α/β 以及NY-ESO-1 p157-165序列的慢病毒制剂由上海吉凯公司提

供。T淋巴细胞分离液购自上海碧云天生物技术有限公司。Lenti-Pac™慢病毒颗粒包装试剂盒购自上海伯易生物科技有限公司。CD3分选磁珠和CD3/CD28刺激磁珠购自上海拜力生物科技有限公司。LDH细胞毒性检测试剂盒、ELISA检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。CD3-APC(Z6410048)、NKG2D-APC(130-111-846)和MICA/MICB(130-118-830)流式抗体购自德国美天旎生物技术有限公司,NYESO-1-APC(TB-M011-2)流式抗体购自上海拜力生物科技有限公司。

2. 免疫组化:石蜡切片脱蜡后,3%双氧水中孵育10 min,浸入0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0),高火加热至沸腾,反复1次,再进行封闭、一抗、二抗孵育,使用DAB显色试剂盒显色,封片。采用丹吉尔电子有限公司生产的P250 FLASH病理切片扫描仪对切片进行图像采集。阳性着色细胞数评分:阳性细胞数<5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,76%~100%为4分。阳性着色强度评分:无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。两者计分相乘即为阳性等级:0分为阴性,1~4分为弱阳性,5~8分为阳性,9~12分为强阳性。

3. 质粒转化、扩增、提取:NKG2D-CD3 ζ 过表达质粒和空载质粒(pHBLV-CMV-MCS-T2A-Puro)购买于上海汉恒生物公司。感受态细胞置于冰上解冻,加入NKG2D-CD3 ζ 或空载质粒,冰中放置30 min,42℃放置30~60 s,再次置于冰中2~3 min。加入37℃预温的SOC培养基,振荡培养。取适量培养后的菌液,三区划菌,37℃过夜培养。挑取单个白色菌落,放入SOC培养基中,37℃振荡培养。取500 μ l培养后的菌液加入SOC培养基中,37℃振荡培养。采用无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒后进行定量。

4. 慢病毒包装及滴度测试:转染前48 h,在大皿中转染 1×10^7 293 T细胞,采用Lenti-Pac™慢病毒颗粒包装试剂盒包

装慢病毒,72 h后用超速离心法离心浓缩病毒并检测滴度。用无血清的DMEM培养基悬病毒沉淀,分装,-80℃保存。

5. 分离AML患者白血病细胞:选取1例复发/难治AML患者骨髓标本,标本采集经我院伦理委员会批准,获研究对象知情同意并签署知情同意书。该患者信息如下:受体限制性配型为HLA-A*0201,并且组化检测显示存在NY-ESO-1的表达,符合NY-ESO-1 TCR-T细胞的治疗范围。利用T淋巴细胞分离液从该患者骨髓标本分离单个核细胞,再利用CD33磁珠分选获得AML原代细胞进行扩增培养。

6. NY-ESO-1 TCR-T细胞的制备:单采复发/难治AML患者外周血单个核细胞,T淋巴细胞分离液分离,利用CD3的分选磁珠选出CD3⁺T细胞。培养第4天接种慢病毒,将T细胞按10⁷/ml培养基重悬,加入含TCR α / β 以及NY-ESO-1 p157-165序列的慢病毒或含空载质粒(pCDH-EF1a-MCS-T2A-copGFP)的慢病毒,37℃CO₂培养箱孵育30 min。孵育完成后,加入培养基,控制细胞接种密度在0.5×10⁶/ml,加入终浓度为1 μg/ml的CD3/CD28单抗进行培养。取(0.5~1.0)×10⁶ TCR-T细胞,加入抗V β 13.1或HLA-A02:p157-165 Tetramer进行染色后,上流式细胞仪检测表达率。

7. NKG2D-CD3 ζ 的慢病毒质粒感染NY-ESO-1 TCR-T细胞:将NKG2D-CD3 ζ 慢病毒质粒按MOI为20:1的比例感染对数生长期的NY-ESO-1 TCR-T细胞,72 h后加入NKG2D的抗体,流式细胞术检测NKG2D-CD3 ζ 转染效率。

8. NY-ESO-1 TCR-T细胞与患者单个核细胞的混合培养比例的选择:用CD33磁珠分选AML患者骨髓白血病原代细胞作为靶细胞。将NY-ESO-1 TCR-T细胞与靶细胞按照效靶比(E:T)为10:1、3:1、1:1、0.3:1进行混合培养48 h,吸取150 μl上清利用LDH释放检测方法进行测定。

9. 体外杀伤活性的检测:各处理组置于含10%FBS的RPMI 1640培养基,37℃、饱和湿度、5%CO₂培养箱中培养。ELISA法检测NY-ESO-1 TCR-T细胞的IL-2、TNF α 和IFN γ 炎症因子释放水平。按LDH细胞毒性检测试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪检测490 nm处吸光度(A)值,计算其杀伤率。每组设3个复孔,实验重复3次。杀伤率(%) = $(A_{\text{效应细胞自发释放}} - A_{\text{靶细胞自发释放}}) / (A_{\text{效应细胞最大释放}} - A_{\text{靶细胞自发释放}}) \times 100\%$ 。

10. 细胞因子释放测定:将NY-ESO-1 TCR-T细胞用DPBS清洗2次,按照20 000:20 000与AML原代细胞混合培

养于含2% FBS的RPMI 1640培养基16~24 h,吸取50~100 μl上清,利用ELISA测定IL-2、TNF α 和IFN γ 炎症因子释放水平。按ELISA检测试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪测定450 nm处A值。同样方法检测过表达NKG2D-CD3 ζ 的NY-ESO-1 TCR-T细胞的细胞因子释放水平。

11. MICA/MICB表达的检测:利用流式细胞术检测过表达NKG2D-CD3 ζ 的NY-ESO-1 TCR-T细胞作用前后AML细胞中MICA/MICB的表达水平。

12. 统计学处理:实验数据均采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,两两比较采用t检验,双侧P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

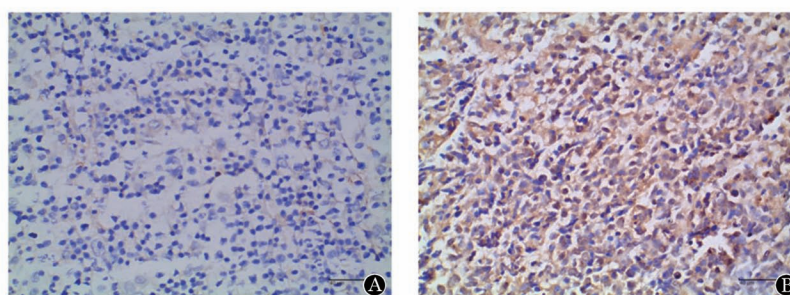
1. AML患者骨髓标本NY-ESO-1的表达及NY-ESO-1 TCR-T细胞转染效率:免疫组化结果显示加入NY-ESO-1抗体后,AML患者骨髓标本胞质与胞核有棕黄色着色,阳性细胞数在76%~100%,积分为8分,显示NY-ESO-1表达呈阳性(图1)。

分别用含TCR α / β 以及NY-ESO-1 p157-165序列或空载体的慢病毒感染AML原代细胞72 h后,取(0.5~1.0)×10⁶ TCR-T细胞,加入抗V β 13.1或HLA-A02:p157-165 Tetramer进行染色后,采用流式细胞术检测表达率。转染NY-ESO-1 TCR-T细胞中NY-ESO-1的表达率为70.37%(图2)。

2. NY-ESO-1 TCR-T细胞对AML原代细胞的体外杀伤:将NY-ESO-1 TCR-T细胞与AML原代细胞按0.1:1、1:1、3:1和10:1比例混合培养48 h,杀伤活性分别为1.37%、4.9%、22.67%、37.27%。为了在其后的研究中比较过表达NKG2D-CD3 ζ 与否的NY-ESO-1 TCR-T细胞对靶细胞杀伤活性的差异,我们选择了3:1的效靶比进行其后的实验。

3. NY-ESO-1 TCR-T细胞对不同靶细胞的炎症因子释放水平:将NY-ESO-1 TCR-T细胞与靶细胞按照效靶比为3:1进行混合培养24 h,实验结果显示相比转染空载体的TCR-T细胞与T2M1细胞株混合培养组,转染NY-ESO-1的TCR-T细胞释放炎症因子的水平显著升高,差异具有统计学意义(P<0.001)(图3)。

4. 过表达NKG2D-CD3 ζ 的NY-ESO-1 TCR-T细胞的杀伤活性和炎症因子释放情况:将包装好的NKG2D-CD3 ζ 慢



A: 阴性对照; B: AML患者骨髓标本

图1 免疫组化检测急性髓系白血病(AML)患者骨髓标本者NY-ESO-1的表达(×400)

病毒质粒按 MOI 为 20:1 的比例感染对数生长期的 NY-ESO-1 TCR-T 细胞,72 h 后加入 NKG2D 抗体,流式细胞术检测显示其表达率为 56.71%(图 4)。

利用慢病毒转染的方法将 NKG2D-CD3 ζ 过表达质粒或空载质粒转染到 NY-ESO-1 TCR-T 细胞,检测转染后的 NY-ESO-1 TCR-T 细胞对 AML 患者原代细胞的杀伤活性和炎症因子释放情况。实验结果显示,相比空白对照组,空载质粒转染组的杀伤率为 24.17%,过表达质粒转染组的杀伤率明显提高,为 47.3%,两组差异具有统计学意义($P < 0.001$)。同时,过表达质粒转染组分泌的 IL-2、TNF α 和 IFN γ 炎症因

子水平较空载质粒转染组提高 2~3 倍,其中 IL-2 和 IFN γ 释放的水平较高(图 5)。表明过表达 NKG2D-CD3 ζ 可增强 NY-ESO-1 TCR-T 细胞的杀伤活性和炎症因子释放水平。

5. 过表达 NKG2D-CD3 ζ 对 AML 患者原代细胞 MICA/MICB 表达的影响:流式细胞术检测结果显示,AML 患者原代细胞与 NY-ESO-1 TCR-T 细胞混合培养 0 h 后,MICA/MICB 的表达水平约为 1.45%;与过表达 NKG2D-CD3 ζ 的 NY-ESO-1 TCR-T 细胞混合培养 48 h 后,MICA/MICB 表达水平约为 22.44%。表明过表达 NKG2D-CD3 ζ 可增强患者 AML 原代细胞 MICA/MICB 的表达。

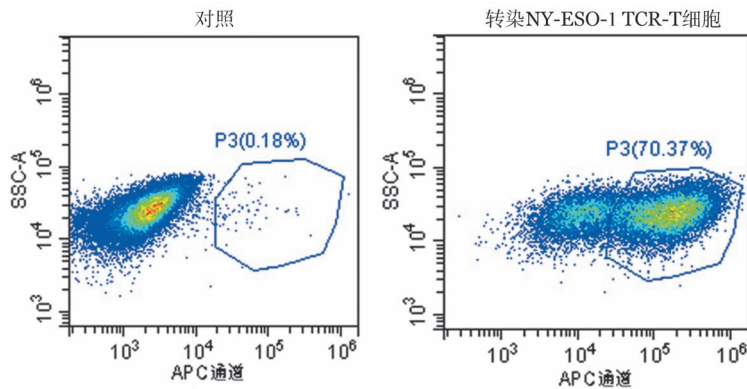
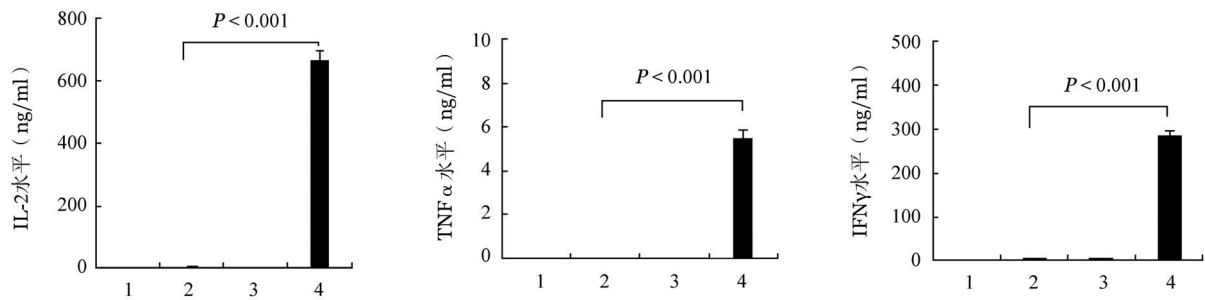


图 2 NY-ESO-1 TCR-T 细胞中 NY-ESO-1 的表达率



1:转染空载体的 TCR-T 细胞与 T2 细胞混合培养组;2:转染空载体的 TCR-T 细胞与 T2M1 细胞混合培养组;3:转染 NY-ESO-1 的 TCR-T 细胞与 T2 细胞混合培养组;4:转染 NY-ESO-1 的 TCR-T 细胞与 T2M1 细胞混合培养组

图 3 NY-ESO-1 TCR-T 细胞对不同细胞的炎症因子释放水平

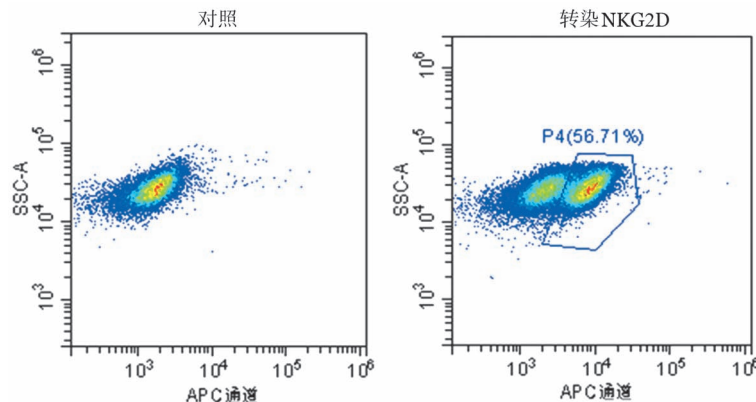


图 4 NKG2D-CD3 ζ 转染 NY-ESO-1 TCR-T 细胞后 NKG2D 的表达率

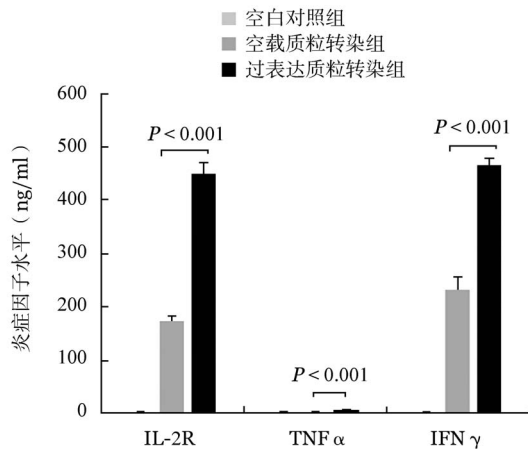


图5 过表达NKG2D-CD3 ζ 的NY-ESO-1 TCR-T细胞的炎症因子释放水平

讨 论

AML应用一线化疗方案取得了满意的疗效,但仍有约20%的患者因耐药不能达到完全缓解;对一线疗法满意,而未接受造血干细胞移植的患者,50%以上在2年内复发^[12-13]。急需新的疗法,针对复发/难治AML进行挽救治疗。

TCR-T细胞技术在血液病研究中越来越广泛,研究发现高亲和力TCR可诱导产生更强的下游信号通路激活,更加有效地清除肿瘤组织^[14]。NY-ESO-1在骨髓瘤、神经母细胞瘤、滑膜肉瘤、黑色素瘤等多种类型肿瘤中广泛表达^[15-16]。研究表明,HLA-A2限制性NY-ESO-1/LAGE-1转导的CD8⁺T细胞过继性T细胞疗法改善了难治性黑色素瘤和滑膜细胞肉瘤患者的临床缓解率和总体生存率^[17]。NY-ESO-1特异性TCR-T细胞在复发/难治多发性骨髓瘤的治疗中也取得了一定成效^[18]。

2014年Srivastava等^[19]发现,HMA类药物地西他滨可通过降低NY-ESO-1启动子区域甲基化,诱导AML细胞表达NY-ESO-1抗原。同时证实地西他滨处理的AML原代细胞,可诱导NY-ESO-1特异性CD8⁺T细胞的表达^[20]。也有文献提示,NY-ESO-1疫苗联合地西他滨可诱导MDS/AML患者NY-ESO-1特异性体液反应,同时发现CD141高表达的DC细胞的增加与NY-ESO-1特异性免疫应答相关^[21]。目前,NY-ESO-1 TCR-T细胞治疗复发/难治AML尚未见临床报道,本研究体外实验分析了NY-ESO-1 TCR-T细胞对复发/难治AML患者的原代细胞是否具有杀伤活性,以及如何进一步提高其杀伤效果。

NKG2D是固有免疫系统中一个重要的激活受体,它通过识别靶细胞表面的配体来传递活化信号并激活免疫系统,从而对靶细胞发挥杀伤作用。目前已知的NKG2D配体,包括MHC I类配体MICA/MICB和UL16结合蛋白编码的ULBPs配体。NKG2D受体/NKG2D配体对肿瘤的免疫调节起着相当重要的作用,在肿瘤发生早期启动机体固有免疫,起到免疫监视及清除作用^[22-24]。文献报道在复发/难治

AML患者中白血病细胞表面NKG2D配体的表达缺失,缺失NKG2D配体的AML患者缓解率和总生存期明显降低^[9]。也有文献显示,增强癌细胞表面不同配体的表达,可显著提高NKG2D-CAR-T细胞的治疗效果^[8]。NKG2D配体的表达可以调节肿瘤细胞,NKG2D-CD3 ζ 融合信号域使T细胞能够识别天然的NKG2D配体,发挥其杀伤肿瘤细胞的功能^[25]。

我们的结果显示:过表达NKG2D-CD3 ζ 的NY-ESO-1 TCR-T细胞,可持续识别肿瘤细胞的NKG2D配体,同时增强了对AML原代细胞的杀伤活性,进而增强NY-ESO-1 TCR-T细胞的疗效。我们下一步拟构建表达NY-ESO-1特异性抗原和HLA0201有效片段的AML细胞株,验证上述结论,并构建该细胞株的小鼠模型,观察体内疗效。

参 考 文 献

- [1] Rodolfo M, Luksch R, Stockert E, et al. Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (20): 6948-6955.
- [2] Jungbluth AA, Antonescu CR, Busam KJ, et al. Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1 but not MAGE-A1 or CT7 [J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(2):252-256. DOI: 10.1002/ijc.1451.
- [3] Barrow C, Browning J, MacGregor D, et al. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(3 Pt 1):764-771. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1544.
- [4] Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes [J]. *J Exp Med*, 1998, 187(2):265-270. DOI: 10.1084/jem.187.2.265.
- [5] Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor [J]. *Immunity*, 2001, 14 (2):123-133. DOI: 10.1016/s1074-7613(01)00095-4.
- [6] 臧怡雯, 周易明, 陈宗祐. NKG2D及其配体在肿瘤免疫中的研究进展 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2011, 38(4): 367-371. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8467.2011.04.019.
- [7] Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, et al. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 413-441. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095951.
- [8] Sun B, Yang D, Dai H, et al. Eradication of Hepatocellular Carcinoma by NKG2D-Based CAR-T Cells [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(11):1813-1823. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0026.
- [9] Paczulla AM, Rothfelder K, Raffel S, et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion [J]. *Nature*, 2019, 572(7768):254-259. DOI: 10.1038/

- s41586-019-1410-1.
- [10] Steinle A, Li P, Morris DL, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family [J]. *Immunogenetics*, 2001, 53 (4):279-287. DOI: 10.1007/s002510100325.
- [11] Ullrich E, Koch J, Cerwenka A, et al. New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(10):e26097. DOI: 10.4161/onci.26097.
- [12] Bose P, Vachhani P, Cortes JE. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2017, 18(3):17. DOI: 10.1007/s11864-017-0456-2.
- [13] Yang D, Zhang X, Zhang X, et al. The progress and current status of immunotherapy in acute myeloid leukemia [J]. *Ann Hematol*, 2017, 96(12):1965-1982. DOI: 10.1007/s00277-017-3148-x.
- [14] Lynn RC, Poussin M, Kalota A, et al. Targeting of folate receptor β on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells [J]. *Blood*, 2015, 125(22):3466-3476. DOI: 10.1182/blood-2014-11-612721.
- [15] Rodolfo M, Luksch R, Stockert E, et al. Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(20):6948-6955.
- [16] Jungbluth AA, Antonescu CR, Busam KJ, et al. Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1 but not MAGE-A1 or CT7 [J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(2):252-256. DOI: 10.1002/ijc.1451.
- [17] Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J, et al. NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:947. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00947.
- [18] Mastaglio S, Genovese P, Magnani Z, et al. NY-ESO-1 TCR single edited stem and central memory T cells to treat multiple myeloma without graft-versus-host disease [J]. *Blood*, 2017, 130(5):606-618. DOI: 10.1182/blood-2016-08-732636.
- [19] Srivastava P, Paluch BE, Matsuzaki J, et al. Immunomodulatory action of SGI-110, a hypomethylating agent, in acute myeloid leukemia cells and xenografts [J]. *Leuk Res*, 2014, 38(11):1332-1341. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.09.001.
- [20] Srivastava P, Paluch BE, Matsuzaki J, et al. Induction of cancer testis antigen expression in circulating acute myeloid leukemia blasts following hypomethylating agent monotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11):12840-12856. DOI: 10.18632/oncotarget.7326.
- [21] Griffiths EA, Srivastava P, Matsuzaki J, et al. NY-ESO-1 Vaccination in Combination with Decitabine Induces Antigen-Specific T-lymphocyte Responses in Patients with Myelodysplastic Syndrome [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(5):1019-1029. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1792.
- [22] Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(9):566-581. DOI: 10.1038/nrc.2016.97.
- [23] Poggi A, Catellani S, Garuti A, et al. Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate [J]. *Leukemia*, 2009, 23(4):641-648. DOI: 10.1038/leu.2008.354.
- [24] Leung WH, Vong QP, Lin W, et al. Modulation of NKG2D ligand expression and metastasis in tumors by spironolactone via RXR γ activation [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(12):2675-2692. DOI: 10.1084/jem.20122292.
- [25] Zhang T, Sentman CL. Mouse tumor vasculature expresses NKG2D ligands and can be targeted by chimeric NKG2D-modified T cells [J]. *J Immunol*, 2013, 190(5):2455-2463. DOI: 10.4049/jimmunol.1201314.

(收稿日期:2020-06-19)
(本文编辑:王叶青)

·读者·作者·编者·

关于提供伦理委员会批准文件及受试对象知情同意书的通知

根据中华医学会杂志社的相关规定,当以人体为研究对象时,作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位、地区或国家)所制订的伦理学标准并提供该委员会的批准文件复印件,同时在正文中说明受试对象或其监护人是否知情同意。

本刊编辑部