

FOXP3⁺调节性T细胞与免疫细胞治疗

刘鑫男¹, 赵彬彬^{1,2}, 成浩¹, 李斌^{1,2*}

1. 上海交通大学医学院, 上海市免疫学研究所, 上海 200025

2. 中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200025

摘要 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节性T细胞(Treg)负责维持机体免疫稳态、调节免疫耐受。Treg细胞通过调控机体对外来或自身抗原的免疫应答水平,在抗自身免疫及抗肿瘤免疫中均发挥重要作用。深入分析了Treg细胞功能的分子机理,通过FOXP3⁺Treg细胞体外扩增或对其进行修饰改造,可以使其在不同组织及炎症微环境下特异性促进对机体的有益作用,减少副作用,这一现象会为免疫细胞治疗提供新思路与新策略。

关键词 调节性T细胞;细胞修饰;免疫细胞治疗;Car-Treg;FOXP3

调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)通常是指具有免疫应答无能(nergy)和免疫抑制(suppression)两大基本免疫特性的T细胞亚型,通过抑制效应性T细胞、肥大细胞、树突状细胞及B细胞等免疫细胞介导的免疫反应及组织微环境中特定非免疫细胞的代谢及增殖等生理功能,精确调控机体对外来或自身抗原的应答水平以维持机体的免疫耐受状态^[1]。Treg细胞维持外周免疫耐受,调控免疫系统对外来抗原及体内突变产生的肿瘤抗原的识别及反应强度,因而与自身免疫病、急慢性病原感染性疾病和炎性肿瘤等类重大疾病的发生发展密切相关。

体内组织微环境中Treg细胞亚群功能稳定性及其调控是免疫学研究前沿^[2]。随着免疫细胞疗法的蓬勃发展,在自身免疫疾病治疗以及抗宿主免疫排斥临床防治中,人们期待具有免疫抑制功能的Treg细胞群可以更加稳定且发挥有效的免疫抑制功能。与之相反的是在抗肿瘤免疫中,人们期待阻滞宿主抗肿瘤杀伤性

免疫细胞功能的Treg细胞功能被抑制。近期研究显示,CAR-T免疫疗法在白血病等血液肿瘤中体现了一定疗效^[3]。在一些实体瘤,如胶质母细胞瘤^[4],扩散性大型B细胞淋巴瘤患者脑内肿瘤^[5]也显示具有治疗效果。CAR修饰的造血干细胞能够检测被HIV感染的细胞,并给T细胞提供活化信号,使其杀死被HIV感染的细胞^[6]。此外,研究人员利用CAR-T原理设计人工受体对T细胞进行修饰,使其特异性识别自身免疫相关的B细胞从而治疗寻常型天疱疮(pemphigus vulgaris, PV)。以上研究成果均显示嵌合抗原受体修饰技术不仅能够应用于肿瘤临床治疗,还在自身免疫性疾病等临床治疗上具有潜在应用前景。那么,能否在深入理解Treg功能稳定性分子机理的基础上,对Treg细胞进行嵌合抗原受体修饰,使其在自身免疫病及肿瘤疾病临床治疗中特异性发挥作用,具备更好的治疗效果是值得深入研究的基础及临床课题。本文综述FOXP3⁺Treg细胞的发育分化、生理功能及其在免疫细胞治疗中的应用。

收稿日期:2018-03-11;修回日期:2018-10-08

基金项目:国家自然科学基金杰出青年基金项目(31525008)

作者简介:刘鑫男,博士研究生,研究方向为分子免疫学,电子信箱:liu_xjll@163.com;李斌(通信作者),教授,研究方向为分子免疫学,电子信箱:bin-li@shsmu.edu.cn

引用格式:刘鑫男,赵彬彬,成浩,等. FOXP3⁺调节性T细胞与免疫细胞治疗[J]. 科技导报, 2019, 37(5): 72-80; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2019.05.010

1 FOXP3⁺Treg 细胞的发育及功能调控

1.1 FOXP3⁺Treg 细胞的产生与发育

FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺Treg 是维持外周免疫耐受的关键性免疫细胞^[7]。Treg 细胞的缺失和功能障碍可导致突发的自身免疫损伤,多器官功能衰竭,严重者可导致患者死亡^[8]。在正常小鼠和健康人中,Treg 细胞占外周 CD4⁺T 细胞的 5%~10%,根据其发育分化,抗原特异性与效应机制的不同,可将其分为产生自胸腺的胸腺源性 Treg 细胞(thymus derived Treg, tTreg)、由初始 T 细胞在外周组织中或体外诱导分化而来的表达 FOXP3 的诱导性 Treg 细胞(induced Treg, iTreg, 或 peripheral derived Treg, pTreg)^[9]。pTreg 是由 CD4⁺T 细胞在多种条件下经过抗原刺激发育而来。除了表达 FOXP3 的 pTreg 外,其他已报道的具有免疫调节活性的 T 细胞还包括另外两类细胞,即不表达 FOXP3 但表达 IL-10 的 Tr1 细胞^[10]和表达 TGF- β 的 Th3 细胞^[11]。FOXP3 作为 Treg 分化发育的关键转录因子,定义我们通常所说的 FOXP3⁺Treg 谱系^[12]。FOXP3 蛋白表达、转录复合体动态组装及其稳定性,对自身免疫性等炎性疾病的发生、发展及易感性都至关重要。

1.2 FOXP3⁺Treg 细胞功能机理研究

FOXP3⁺Treg 细胞发挥免疫抑制功能有多种机理,涉及到细胞细胞接触性抑制机制以及分泌可溶性免疫抑制分子,其分子通路包括诱导抑制性细胞因子产生途径,调节抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APC)途径,细胞溶解途径及破坏细胞代谢途径等(图 1)。

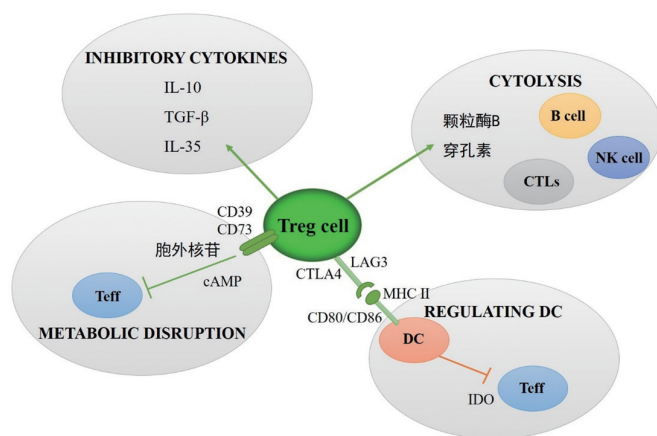


图 1 FOXP3⁺Treg 细胞介导免疫抑制功能示意

Fig. 1 Molecular mechanism underlying the immunosuppressive function of FOXP3⁺Treg cells

1.2.1 诱导抑制性细胞因子产生的途径

现有研究表明,FOXP3⁺Treg 细胞可以分泌抑制性细胞因子 IL-10, TGF- β 和 IL-35^[13]。TGF- β 对机体多种免疫细胞的分化发育及功能具有重要的调节作用。TGF- β 可以抑制 IL-1 和 IL-2 的分泌,进而抑制 T 细胞增殖。IL-10 可以通过抑制 IL-2 并下调单核细胞上 MHC-II 类分子表达,抑制 Th1/Th2 的功能从而起到免疫抑制的作用^[10,14]。Frimpong-Boateng 等^[15]发现,Treg 细胞可通过分泌 TGF- β 与 IL-10 抑制自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的杀伤功能,而 Treg 细胞阻断 DNA 疫苗激活免疫反应过程也与 TGF- β 分泌相关。IL-35 是 IL-12 异二聚体细胞因子家族的新成员,是由 EBi3 (Epstein-Barr virus-induced gene3, 编码 IL-12) 和 IL-12(编码 IL-12/p35)两个亚基组成的异二聚体^[16]。研究显示,Ebi3^{-/-}和 IL-12^{-/-}细胞的体外免疫抑制活性显著下降,并且在体内不能维持机体免疫稳态并抑制炎症性肠病。因为这些表型特征与其他 IL-12 家族成员不同,因此这种新型的 Ebi3-IL-12 α 异二聚体细胞因子被新命名为白细胞介素-35(IL-35)。IL-35 的异位表达赋予初始 T 细胞调节活性,而重组 IL-35 抑制 T 细胞增殖。因而将 IL-35 鉴定为新的抑制性细胞因子,其主要由 FOXP3⁺tTreg 细胞表达并发挥其抑制活性^[16]。

1.2.2 调节抗原递呈细胞功能的途径

Treg 细胞组成性表达细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA4)^[17],现有研究表明 CTLA4 的缺失使得 Treg 通过树突状细胞途径介导的效应 T 细胞的抑制效应降低^[18]。高水平表达的 Treg 细胞可以通过 CTLA4 和树突状细胞(dendritic cells, DC)表面的 CD80 以及 CD86 相互作用,促使树突状细胞表达吲哚胺 2,3 双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)。IDO 可诱导色氨酸的分解,色氨酸的缺失会抑制 T 细胞活化,进而导致 T 细胞凋亡^[19]。因此 CTLA4 可以促进 DC 的促凋亡代谢导致效应 T 细胞的抑制。此外,研究表明淋巴细胞活化基因 3(lymphocyte activation gene 3, LAG3 /CD233)与 Treg 调节 APC 途径相关。LAG3 是表达于 Treg 细胞上的跨膜蛋白,也是 CD4 分子相关黏附蛋白,可与 APC 的 MHC-II 结合并具有高亲和力^[20]。LAG3 与 MHC-II 结合后会诱导免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM)介导的抑制信号通路,招募 Fc γ R 和 ERK 介导的蛋白酪氨酸磷酸酶(protein phosphotyrosine phosphatase, SHP1)可抑制树突状

细胞成熟,下调其免疫激活能力^[21]。

1.2.3 介导免疫细胞凋亡的途径

Treg 细胞可以通过释放颗粒酶 A/B、穿孔素等杀死 B 细胞进而导致 B 细胞功能的抑制^[22]。Treg 细胞也能够以类似方式杀死自然杀伤性细胞 (natural killer cell, NK cell) 和细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic lymphocyte, CTL) 从而造成抗肿瘤免疫的功能抑制。此外,有研究表明 Treg 细胞可以通过肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)/死亡受体 5 (death receptor 5, DR5) 途径诱导效应 T 细胞凋亡^[23]。

1.2.4 干扰细胞代谢的途径

已知 Treg 细胞通过代谢阻断来介导免疫抑制,其分子机制包括:1) Treg 细胞能够介导细胞生长因子竞争导致 T 细胞因缺乏 IL-2 而发生细胞凋亡^[24]。2) CD39 与 CD73 的酶学活性可以产生胞外核苷,激活腺苷 A2A 受体抑制效应 T 细胞功能^[25]。此外,腺苷与 A2A 受体的结合不仅抑制效应性 T 细胞功能,还能在抑制 IL-6 表达的同时促进 TGF- β 的分泌^[26]。3) Treg 细胞可以促进抑制性第二信使 cAMP 通过缝隙连接转移至效应性 T 细胞 (effector T cell, Teff) 并直接抑制 Teff 的免疫功能^[27]。

1.3 FOXP3⁺Treg 细胞功能调控机理

1.3.1 FOXP3 转录水平的调控

在 FOXP3 转录水平的调控中,TCR 信号通路起到了主导性作用,此外,共刺激受体 CD28 及其配体 CD80 和 CD26 也扮演着重要角色^[28]。TCR/CD28 下游的 NF- κ B 通路中,转录因子 c-Rel 蛋白能够直接结合到 FOXP3 基因的顺式作用元件,包括启动子和保守的非编码 DNA 序列 (conserved non-coding sequence 1, CNS1) 上,从而调控 FOXP3 基因转录^[29]。此外,TCR/CD28 信号通路可以激活下游转录因子 AP-1 (activator protein 1, AP-1) 和 CREB (cAMP response element-binding protein) 也参与调控 FOXP3 基因的表达^[30]。除了 TCR/CD28 通路, γ -chain (γ c) 细胞因子也参与调节 iTreg 细胞分化^[31],由 γ c 细胞因子所激活的 STAT5 (signal transducers and activators of transcription, STAT5) 能够结合到 FOXP3 基因启动子及其 CNS2 元件,进而激活 FOXP3 转录^[32]。

此外,IL-2 与 TGF- β 下游通路也对 FOXP3 表达具有调控作用。TGF- β 受体信号可以招募转录因子 SMAD3

结合到 FOXP3 基因的 CNS 区并促进 FOXP3 转录^[33]。IL-2 信号可以促进 TGF- β 介导的 iTreg 的诱导,此外,IL-2 也可能通过减少 Th17 的分化从而形成一个更适宜向 Treg 分化的条件,从而间接性促进 iTreg 细胞的分化^[34]。

1.3.2 FOXP3 蛋白翻译后调控

FOXP3 蛋白翻译后修饰包括 FOXP3 蛋白磷酸化、乙酰化、泛素化及 ADP 核糖化等。组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferases, HAT) TIP60 和 p300 能结合并乙酰化 FOXP3 蛋白。乙酰化修饰不仅稳定了 FOXP3 蛋白,也促进了 FOXP3 的转录活性和功能^[35-36]。

人源 FOXP3 蛋白的第 418 位点丝氨酸上可以发生磷酸化,同时 TNF α -NF- κ B 信号通路上调的磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1) 能够去磷酸化修饰 FOXP3 蛋白进而抑制其功能^[37]。FOXP3 蛋白 N 端也能被细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclindependent kinase 2, CDK2) 磷酸化,使其不稳定并减弱 Treg 的抑制活性^[38]。此外,炎症条件下 PIM1 激酶可以通过特异性促进转录因子 FOXP3 蛋白丝氨酸第 422 位点的磷酸化负向调控其转录调节活性。PIM 激酶家族的另一个蛋白 PIM2 也可以通过磷酸化 FOXP3 N 端结构域进而下调 Treg 功能^[39]。研究显示,致炎性细胞因子以及病原性细胞脂多糖可以诱导 E3 泛素连接酶 STUB1 (STIP1 homology and U-box containing protein 1) 表达并促进 FOXP3 的多泛素化修饰及 Hsp70 (heat shock protein 70) 蛋白依赖性降解^[40]。另一方面,在 FOXP3⁺Treg 细胞中,去泛素化酶 USP7, USP21 等能通过去泛素化修饰转录因子 FOXP3, GATA3 来稳定其蛋白水平^[41],进而影响 Treg 细胞可塑性及其免疫抑制功能。

多聚 ADP 核糖化酶 (poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP-1) 能通过对靶蛋白的多聚 ADP 核糖化修饰来调控蛋白的定位、稳定性、蛋白间相互作用以及靶蛋白的转录活性。本课题组以往研究发现,PARP-1 可以和 FOXP3 相互作用,诱导 FOXP3 的多聚 ADP 核糖化修饰,并促进 STUB1 介导的 FOXP3 泛素化降解。PARP-1 抑制剂可以稳定 FOXP3 并促进 Treg 细胞免疫抑制功能^[42]。

2 FOXP3⁺Treg 细胞与人类疾病

2.1 FOXP3⁺Treg 细胞与自身免疫病

人类 X 染色体上 FOXP3 蛋白编码基因突变使

FOXP3⁺Treg 功能紊乱, 导致人 X 染色体连锁的先天免疫缺陷综合征 (immunodysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy, X-linked syndrome, IPEX) 发生。在呼吸系统疾病哮喘病患者中, FOXP3 基因表达明显低于正常对照人群, 其程度与疾病的严重性相关, 利用高压气管内喷雾将经过化学修饰的 FOXP3 mRNA 运送至肺部, 可通过降低 IL-10, 下调嗜中性粒细胞, 抑制 Th17 引起的免疫反应降低哮喘的发生率^[43]。在过敏性鼻炎患者中也发现类似的 FOXP3 基因低表达^[44]。银屑病是典型的自身免疫性皮肤病, 其发生及病变程度与 FOXP3 mRNA 水平降低有关。此外, 类风湿性关节炎患者体内检测发现 FOXP3 低表达, 重症肌无力的发病与 FOXP3 基因表达调控障碍有关。多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 为脱髓鞘性自身免疫性疾病, 复发-缓解型 MS 患者 Treg 中 FOXP3 信号传导和蛋白表达异常导致 Treg 功能下降, 促进疾病发生^[45] (图 2)。

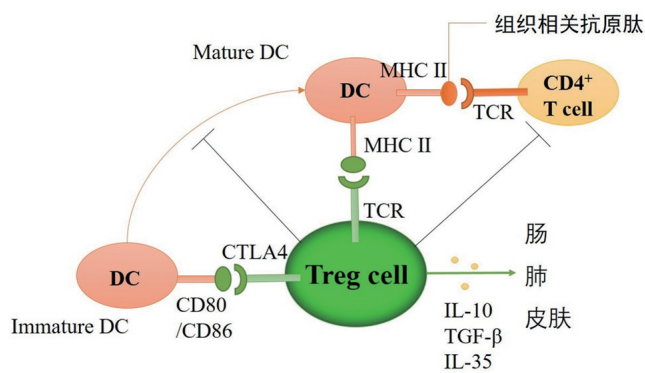


图 2 FOXP3⁺Treg 细胞与自身免疫

Fig. 2 Functional role of FOXP3⁺Treg cells in autoimmunity

2.2 FOXP3⁺Treg 细胞与肿瘤性疾病

Woo 等^[46]首次报道在非小细胞肺癌和卵巢癌患者肿瘤组织中有大量调节性 T 细胞浸润。随后, 一系列报道表明 Treg 细胞在黑色素瘤、乳腺癌、结直肠癌、肺癌和胰腺癌等多种肿瘤癌旁和癌组织中聚集^[47]。最新研究也显示, 在 CAR-T 细胞疗法治疗神经胶质瘤的临床实验中, 肿瘤微环境中的免疫抑制效应是限制治疗效果的一大因素^[4]。大量实验表明, Treg 增多有利于肿瘤的免疫逃逸。一方面过继输入不含 Treg 细胞的 T 细胞能显著提高机体抗肿瘤免疫反应; 另一方面, FOXP3⁺CD25⁺CD4⁺ Treg 细胞的扩增或者激活严重抑制肿瘤免疫^[48]。就临床病例, 乳腺癌、胃癌、卵巢癌、胰腺癌和肝癌等肿瘤微环境中 Treg 细胞的增多和预后不良相关,

从机制上说, Treg 细胞不仅有能力抑制广泛的抗肿瘤免疫反应, 同时还可以促进肿瘤微环境血管再生^[49]。作为 Treg 细胞的主要标志物, FOXP3 基因在诸多肿瘤性疾病中高表达。老年人肺癌病变的发生与 FOXP3 基因表达上调的相关性已得到证实^[50], 在乳腺癌、食管癌患者中也发现 FOXP3 基因呈高水平表达^[51]。FOXP3 通过抑制前哨淋巴结免疫功能及 RANK 蛋白的 (receptor activator of NF- κ B, RANK) 的中介作用参与肿瘤转移。FOXP3 基因通过 miR-7、miR-155 等调节抑制癌基因 SATB1 表达, 直接发挥抗肿瘤作用, 激活 FOXP3 沉默基因进而上调 FOXP3 表达水平已尝试用于乳腺癌治疗^[52]。此外, FOXP3 表达与不同肿瘤化疗疗效有关并影响肿瘤患者预后 (图 3)。

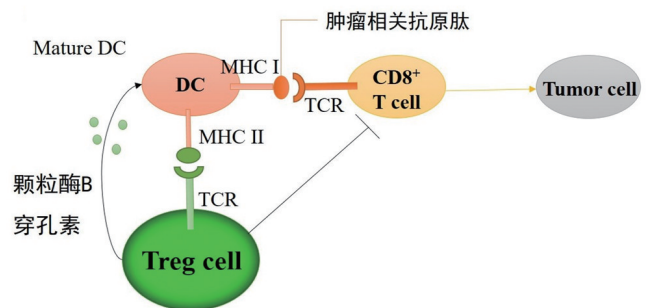


图 3 FOXP3⁺Treg 细胞与肿瘤免疫

Fig. 3 Functional role of FOXP3⁺Treg cells in anti-tumor immunity

3 FOXP3⁺Treg 细胞与免疫细胞治疗

3.1 FOXP3⁺Treg 细胞体外扩增与免疫治疗

异基因造血干细胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) 依靠移植抗白血病 (graft-versus-leukemia, GVL) 效应而清除残存的白血病细胞, 从而使患者长期无病存活。然而严重的移植排斥相关并发症如移植物抗宿主病 (graft versus-host disease, GVHD) 限制了这一治疗方法的广泛应用。临床研究表明, Treg 细胞疗法对 HSCT 引起的 GVHD 具有良好的治疗作用^[53-54], 但是同时也会伴随着免疫抑制带来的病毒感染率增高等风险^[55]。此外, Treg 细胞也被用于治疗 1 型糖尿病小儿患者, 可以抑制或延缓胰岛 β 细胞的破坏, 且 Treg 细胞能够有效保护移植入体内的胰岛细胞^[56]。

3.2 FOXP3⁺Treg 细胞修饰与细胞治疗

3.2.1 FOXP3⁺Treg 细胞联合 PIM1 抑制剂与免疫治疗

磷酸激酶原癌基因丝氨酸/苏氨酸激酶 (proto-on-

cogeneserine/threonine-protein kinase Pim-1, PIM1) 能与人源 FOXP3 相互结合促进 FOXP3 蛋白 C 端丝氨酸 422 位点的磷酸化, 此过程显著降低 FOXP3 蛋白的转录活性进而降低 Treg 细胞的免疫抑制功能, 而 PIM1 抑制剂的使用则能增强 FOXP3 下游靶基因的表达并促进 Treg 细胞的功能^[57]。山奈酚可以通过抑制 PIM1 介导的 FOXP3 S422 磷酸化促进 FOXP3 的转录活性, 进而促进 Treg 细胞免疫抑制功能^[58]。同时, PIM 激酶家族的另一个蛋白 PIM2 也可以通过磷酸化 FOXP3 N-端结构域而下调 Treg 细胞的抑制功能^[59], 提示 PIM1 与 PIM2 的抑制剂有可能可以作为 Treg 细胞免疫治疗的联合剂或增强剂, 增强体内 Treg 细胞免疫抑制功能并增强体外输入的 Treg 细胞的体内免疫抑制功能。

3.2.2 特异性嵌合抗原受体修饰 Treg 细胞与免疫治疗

目前, 研究人员通过多种特异性嵌合抗原受体修饰 Treg 细胞进行免疫治疗(图 4)。最早关于 CAR-Treg 的报道来自结肠炎的治疗研究^[60]。2, 4, 6-三硝基苯酚(TNP)为结肠炎小鼠特有的抗原。在 ERAN ELINAV 等^[60]2008 年的研究中, 在转基因小鼠中分离得到表达嵌合受体(CR)的 TNP 特异性 Treg 细胞, 该嵌合受体由抗体可变区域与 T 细胞共刺激阈(CD28 与 FcR γ 受体)共同构成。实验结果显示, 在 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)引起的肠炎小鼠体内, 移植入 TNP 特异性 Treg 细胞, 在缺乏 CD28 的刺激情况下, 小鼠肠炎症状得到显著改善。通过铬标记, 观察到植入肠炎小鼠体内的 TNP 特异性 Treg 细胞优先迁移到 TNBS 诱导的肠粘膜病变区域。此外, 在非 TNBS 引起的肠炎中, TNP 特异性 Treg 细胞植入无治愈作用, 但在注射微量 TNBS 后, TNP-

specific-CR-bearing Treg 产生了对非 TNBS 肠炎的治疗作用。

多发性硬化(multiple sclerosis, MS) 是以中枢神经系统(central nervous system, CNS) 白质炎症脱髓鞘病变为主要特点的 T 细胞介导的自身免疫性疾病^[61]。实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)是利用髓鞘蛋白, 如髓鞘碱性蛋白、少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendroglia glycoprotein, MOG) 或实验性动物致病性 T 细胞被动转移, 诱导 CNS 内血管周围出现炎性细胞浸润、脱髓鞘性脑脊髓炎的动物模型, 其临床表现、组织病理和免疫病理等与 MS 十分类似, 可用于研究免疫细胞在 MS 发病和预后中的作用。Fransson 等^[62]在 2012 年的研究中, 利用慢病毒载体系统表达联合 FOXP3 的 MOG 特异性嵌合抗原受体(CAR), 目的在于将 Treg 细胞靶向与 MOG 高表达的少突胶质细胞使其免受自身免疫攻击。改造后的细胞在体外进行抑制能力评估并在 C57BL/6 小鼠进行鼻饲实验。体外结果显示 CAR-Treg 细胞具有免疫抑制作用且能有效进入大脑各个区域。体内实验显示, CAR-Treg 细胞降低脑组织内 IL-12 与 IFN- γ 表达水平, 显著降低疾病症状并具有持续效果。

MacDonald 等^[63]将靶向抗原 HLA-A2 的 CAR-Treg 细胞用于皮肤移植中, 实验结果显示 CAR-Treg 细胞在体外和体内都具有稳定的免疫抑制功能和表型, 产生良好治疗效果。这也为 CAR-Treg 用于抗宿主移植免疫排斥提供了实验证据。

Treg 细胞有能力抑制广泛的抗肿瘤免疫反应, 因而, Treg 细胞在肿瘤治疗中的应用主要途径为降低肿瘤附近 Treg 细胞对肿瘤免疫的抑制作用。嵌合抗原受体(CAR)基因的表达将它们重定向到自身免疫活动的位点, 从而提高了它们的抑制效率, 同时避免了系统的免疫抑制。

癌胚抗原(CEA)在人类结肠炎和结直肠癌中均表现出过度表达, Dan Blat 等^[64]利用 CEA 转基因的结肠炎模型小鼠获得 CEA 特异性 Treg 细胞。应用于 T 细胞转移性结肠炎与结直肠癌中, 在两种模型系统中, 与对照组相比, CEA 特异性 Treg 细胞降低了结肠炎的严重程度且显著降低了随后的结肠直肠癌负荷。

Helen 等^[65]研究表明, LAGE1 蛋白是源于肿瘤患者 tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) 的肿瘤特异性 CD4⁺Treg 细胞的配体。表型和功能分析表明, LAGE1

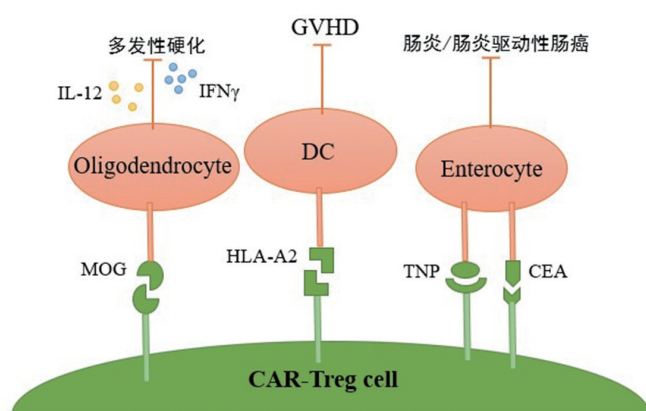


图 4 特异性嵌合抗原受体修饰 Treg 细胞免疫治疗模式

Fig. 4 Working model underlying CAR-Treg mediated anti-inflammatory disease related immunotherapy

蛋白对 CD3 抗体刺激的 CD4⁺T 细胞增殖反应具有抑制活性。提示肿瘤特异性 CD4⁺Treg 细胞可能对 T 细胞对癌症的抑制有深远的影响。因此可以推断, LAGE1 可作为癌症相关 Treg 细胞靶向肿瘤细胞并发挥抑制作用的识别位点。

在一项新的研究中^[65], 来自美国弗雷德-哈金森癌症研究中心和华盛顿大学的研究人员开发出生物可降解的纳米颗粒, 并利用 T 细胞对标记性纳米颗粒的吞噬完成对 T 细胞的修饰, 从而完成 T 细胞对癌细胞的靶向作用。这为 CAR-T 细胞免疫治疗及未来 CAR-Treg 的临床设计应用提供了新思路。此外, 来自美国斯隆凯特林癌症纪念中心的研究人员在实验中^[66]利用 CRISPR/Cas9 技术运送 CAR 基因到 T 细胞基因组的特定位点中, 从而更精准地构建出强效的 CAR-T 细胞, 这也提示人们应在 CAR-Treg 的设计中可以联系基因编辑技术提高 CAR-Treg 的治疗效率。

3.2.3 TCR-Treg 细胞与免疫治疗

TCR-T 是指通过基因工程技术, 用已识别特定肿瘤抗原的 TCR 修饰 T 细胞, 可使 T 细胞拥有预设抗原特异性, 赋予 T 细胞识别杀伤肿瘤的能力。TCR 修饰 T 细胞治疗肿瘤患者的第一次成功报道于 2006 年, 利用靶向 MART-1 的常规 $\alpha\beta$ T 细胞治疗黑色素瘤患者^[67]。之后, 临床试验包括针对 Gp100 的 TCR-T 细胞治疗应用于黑色素瘤、针对 CEA 的 TCR-T 细胞治疗应用于肠癌、针对 NY-ESO-1 的 TCR-T 细胞治疗应用于多种肿瘤(多发性骨髓瘤、黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等), 获得了 19%~56% 的临床反应率^[68-70]。TCR-T 细胞治疗能够解决自身 T 细胞无法识别肿瘤抗原的难题, 但也因脱靶效应带来了极大的毒副作用, 会对正常组织细胞产生杀伤作用。现有研究正在通过肿瘤组织特有的肿瘤新抗原(tumor neoantigen, Tn)实现 TCR-T 细胞治疗的特异性, 降低其毒副作用。Rosenberg 团队通过此原理获得的 TCR-T 细胞在抗肿瘤治疗中能够显著降低脱靶效应带来的毒副作用^[71]。

现有研究中, TCR 转基因 Treg 细胞已用于探究 CD28, IL-2, CTLA4 在 Treg 稳态调节中的应用^[72], 对于 Treg 细胞的功能调节具有重要意义, 同时为 TCR 修饰 Treg 细胞提供了可能。提示人们可以利用 TCR 修饰 Treg 细胞将其用于免疫细胞治疗。而 TCR 修饰 Treg 细胞如何解决其非特异性的问题, 也是需要努力探究的研究新方向。

4 结论

免疫系统是把双刃剑, 一方面, 免疫系统通过免疫防御, 免疫清除, 免疫监视清除外来病原体和体内衰老及癌变的细胞。另一方面, 过度的免疫反应又会引起组织损伤, 甚至造成机体死亡。效应 T 细胞与调节性 T 细胞在调节免疫系统的功能上互相协调并相互制约, 只有二者平衡才能维持免疫系统的正常功能。随着免疫疗法的发展, 通过现有技术根据机体需要调控免疫系统的功能, 将有助于推动自身免疫病、感染、移植排斥和肿瘤的免疫治疗。现有研究表明, 利用抗原嵌合型受体对 T 细胞进行修饰能够有效治疗某些肿瘤, 这提示人们可以对 Treg 细胞进行抗原特异性修饰以达到对免疫系统功能的特异性调节。解决这一问题的关键在于深入理解 Treg 在自身免疫与肿瘤免疫的调控机制并发掘其相关的特异性配体。此外, 如何能在自身免疫反应、移植排斥中上调 Treg 功能而不影响机体肿瘤免疫, 如何在肿瘤免疫中下调 Treg 功能而不影响 Treg 的抑炎作用也是亟待解决的问题。

最后, 针对炎性驱动肿瘤的免疫治疗问题, 理论上假设如果输入具有免疫抑制功能的 FOXP3⁺Treg 细胞, 并在体内特别是炎症微环境下依然能够维持其抑制炎症的作用, 则极有可能阻滞炎性驱动肿瘤的发生发展。这是一个非常值得重视并进行深入实验性研究验证的新领域。

随着生物学交叉领域的快速发展, 各种新技术层出不穷, CRISPR/Cas9 全基因组功能筛选、单细胞测序等新兴技术的使用将会进一步加深人们对 Treg 稳定性调控机制的理解, 并促进 Treg 细胞特异性表面标志物的鉴定。CAR-T, 单克隆抗体类免疫检查点抑制等快速发展的免疫治疗新方法也为 FOXP3⁺Treg 特异性修饰提供了新的应用前景。期待免疫学基础研究的原创发现, 能够进一步促进免疫治疗的发展并推动其向临床转化, 用于治疗救人, 为广大患者带来福音。

参考文献(References)

- [1] Li Z, Li D, Tsun A, et al. FOXP3⁺ regulatory T cells and their functional regulation[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2015, 12(5): 558-565.
- [2] Sakaguchi S, Vignali D A, Rudensky A Y, et al. The plasticity

- and stability of regulatory T cells[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13(6): 461–467.
- [3] Avci C B, Dodurga Y, Gundogdu G, et al. Regulation of URG4/URGCP and PPARalpha gene expressions after retinoic acid treatment in neuroblastoma cells[J]. *Tumour Biology*, 2013, 34(6): 3853–3857.
- [4] O'Rourke D M, Nasrallah M P, Desai A, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma[J]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(399): eaaa0984.
- [5] Abramson J S, McGree B, Noyes S, et al. Anti-CD19 CAR T cells in CNS diffuse large-B-Cell lymphoma[J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377(8): 783–784.
- [6] Zhen A, Peterson C W, Carrillo M A, et al. Long-term persistence and function of hematopoietic stem cell-derived chimeric antigen receptor T cells in a nonhuman primate model of HIV/AIDS[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(12): e1006753.
- [7] Zhou Z C, Wang J, Cai Z H, et al. Association between vitamin D receptor gene Cdx2 polymorphism and breast cancer susceptibility[J]. *Tumour Biology*, 2013, 34(6): 3437–3441.
- [8] Geiger T L, Tauro S. Nature and nurture in Foxp3(+) regulatory T cell development, stability, and function[J]. *Human Immunology*, 2012, 73(3): 232–239.
- [9] Shevach E M, Thornton A M. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences[J]. *Immunological Reviews*, 2014, 259(1): 88–102.
- [10] Vieira P L, Christensen J R, Minaee S, et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. *Journal of Immunology*, 2004, 172(10): 5986–5993.
- [11] Weiner H L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells[J]. *Immunological Reviews*, 2001, 182(207–214).
- [12] Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: A critical regulator of the development and function of regulatory T cells [J]. *Microbes and Infection*, 2004, 6(8): 745–751.
- [13] Tang Q, Bluestone J A. The Foxp3⁺ regulatory T cell: A jack of all trades, master of regulation[J]. *Nature Immunology*, 2008, 9(3): 239–244.
- [14] Ostmann A, Paust H J, Panzer U, et al. Regulatory T cell-derived IL-10 ameliorates crescentic GN[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2013, 24(6): 930–942.
- [15] Frimpong-Boateng K, Van Rooijen N, Geiben-Lynn R. Regulatory T cells suppress natural killer cells during plasmid DNA vaccination in mice, blunting the CD8⁺ T cell immune response by the cytokine TGFbeta [J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12281.
- [16] Collison L W, Workman C J, Kuo T T, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function[J]. *Nature*, 2007, 450(7169): 566–569.
- [17] Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory cells that control intestinal inflammation[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2000, 192(2): 295–302.
- [18] Oderup C, Cederbom L, Makowska A, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression[J]. *Immunology*, 2006, 118(2): 240–249.
- [19] Mellor A L, Munn D H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism[J]. *Nature Reviews: Immunology*, 2004, 4(10): 762–774.
- [20] Huang C T, Workman C J, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells[J]. *Immunity*, 2004, 21(4): 503–513.
- [21] Liang B, Workman C, Lee J, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II[J]. *Journal of Immunology*, 2008, 180(9): 5916–5926.
- [22] Zhao D M, Thornton A M, Dipaolo R J, et al. Activated CD4⁺ CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes[J]. *Blood*, 2006, 107(10): 3925–3932.
- [23] Ren X, Ye F, Jiang Z, et al. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2007, 14(12): 2076–2084.
- [24] Oberle N, Eberhardt N, Falk C S, et al. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4⁺CD25⁺ T cells by CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 179(6): 3578–3587.
- [25] Deaglio S, Dwyer K M, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(6): 1257–1265.
- [26] Zarek P E, Huang C T, Lutz E R, et al. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells[J]. *Blood*, 2008, 111(1): 251–259.
- [27] Bopp T, Becker C, Klein M, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(6): 1303–1310.
- [28] Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, et al. CD28 costimulation of

- developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2 [J]. *Nature Immunology*, 2005, 6(2): 152–162.
- [29] Long M, Park S G, Strickland I, Et Al. Nuclear factor- κ B modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor[J]. *Immunity*, 2009, 31(6): 921–931.
- [30] Mantel P Y, Ouaked N, Ruckert B, et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells[J]. *Journal of Immunology*, 2006, 176(6): 3593–3602.
- [31] Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Et Al. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3[J]. *Blood*, 2007, 109(10): 4368–4375.
- [32] Burchill M A, Yang J, Vogtenhuber C, et al. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. *Journal of Immunology*, 2007, 178(1): 280–290.
- [33] Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate[J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 808–812.
- [34] Laurence A, Tato C M, Davidson T S, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation [J]. *Immunity*, 2007, 26(3): 371–381.
- [35] Liu Y, Wang L, Predina J, et al. Inhibition of p300 impairs Foxp3(+) T regulatory cell function and promotes antitumor immunity[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(9): 1173–1177.
- [36] Van Loosdregt J, Brunen D, Fleskens V, et al. Rapid temporal control of Foxp3 protein degradation by sirtuin-1 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19047.
- [37] Nie H, Zheng Y, Li R, Et Al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(3): 322–328.
- [38] Chunder N, Wang L, Chen C, et al. Cyclin-dependent kinase 2 controls peripheral immune tolerance[J]. *Journal of Immunology*, 2012, 189(12): 5659–5666.
- [39] Bayer A L, Pugliese A, Malek T R. The IL-2/IL-2R system: from basic science to therapeutic applications to enhance immune regulation[J]. *Immunologic Research*, 2013, 57(1–3): 197–209.
- [40] Chen Z, Barbi J, Bu S, et al. The ubiquitin ligase Stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3[J]. *Immunity*, 2013, 39(2): 272–285.
- [41] Van Loosdregt J, Fleskens V, Fu J, et al. Stabilization of the transcription factor Foxp3 by the deubiquitinase USP7 increases Treg-cell-suppressive capacity[J]. *Immunity*, 2013, 39(2): 259–271.
- [42] Luo X, Nie J, Wang S, Et Al. Poly(ADP-ribose)ylation of FOXP3 protein mediated by PARP-1 regulates the function of regulatory T cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(3): 1201.
- [43] Mays L E, Ammon-Treiber S, Mothes B, et al. Modified Foxp3 mRNA protects against asthma through an IL-10-dependent mechanism[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(3): 1216–1228.
- [44] Mo J H, Chung Y J, Kim J H. T cell transcriptional factors in allergic rhinitis and its association with clinical features[J]. *Asia Pacific Allergy*, 2013, 3(3): 186–193.
- [45] Yin Y, Wu M, Nie G, et al. HtrA3 is negatively correlated with lymph node metastasis in invasive ductal breast cancer [J]. *Tumour Biology*, 2013, 34(6): 3611–3617.
- [46] Kabbage M, Trimeche M, Ben Nasr H, et al. Tropomyosin-4 correlates with higher SBR grades and tubular differentiation in infiltrating ductal breast carcinomas: an immunohistochemical and proteomics-based study[J]. *Tumour Biology*, 2013, 34(6): 3593–3602.
- [47] Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy [J]. *Nature Reviews: Immunology*, 2006, 6(4): 295–307.
- [48] Nishikawa H, Kato T, Tawara I, et al. Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2005, 201(5): 681–686.
- [49] CHAUDARY N, HILL R P. Hypoxia and metastasis [J]. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13(7): 1947–1949.
- [50] Pan X D, Mao Y Q, Zhu L J, et al. Changes of regulatory T cells and FoxP3 gene expression in the aging process and its relationship with lung tumors in humans and mice[J]. *Chinese Medical Journal (Engl.)*, 2012, 125(11): 2004–2011.
- [51] Ye L, Guan S, Zhang C, et al. Circulating autoantibody to FOXP3 may be a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biology*, 2013, 34(3): 1873–1877.
- [52] McInnes N, Sadlon T J, Brown C Y, et al. FOXP3 and FOXP3-regulated microRNAs suppress SATB1 in breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2012, 31(8): 1045–1054.
- [53] Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juscinska J, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4⁺CD25⁺CD127⁻T regulatory cells[J]. *Clinical Immunology*, 2009, 133(1): 22–26.
- [54] Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation[J]. *Blood*, 2011, 117(14): 3921–3928.
- [55] Brunstein C G, Blazar B R, Miller J S, et al. Adoptive transfer of umbilical cord blood-derived regulatory T cells and early viral reactivation[J]. *Biology of Blood and Marrow Trans-*

- plantation, 2013, 19(8): 1271–1273.
- [56] Marek-Trzonkowska N, Mysliwec M, Siebert J, et al. Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes [J]. *Pediatric Diabetes*, 2013, 14(5): 322–332.
- [57] Ji W W, Li R P, Li M, et al. Antidepressant-like effect of essential oil of *Perilla frutescens* in a chronic, unpredictable, mild stress-induced depression model mice [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2014, 12(10): 753–759.
- [58] Lin F, Luo X, Tsun A, et al. Kaempferol enhances the suppressive function of Treg cells by inhibiting FOXP3 phosphorylation[J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 28(2): 859–865.
- [59] DENG G, NAGAI Y, XIAO Y, et al. Pim-2 Kinase Influences Regulatory T Cell Function and Stability by Mediating Foxp3 Protein N-terminal Phosphorylation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(33): 20211–20220.
- [60] Elinav E, Waks T, Eshhar Z. Redirection of regulatory T cells with predetermined specificity for the treatment of experimental colitis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(7): 2014–2024.
- [61] Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis[J]. *The Lancet Neurology*, 2015, 14(4): 406–419.
- [62] Liu Y, Yang N, Zuo P. cDNA microarray analysis of gene expression in the cerebral cortex and hippocampus of BALB/c mice subjected to chronic mild stress[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2010, 30(7): 1035–1047.
- [63] Macdonald K G, Hoeppli R E, Huang Q, et al. Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126(4): 1413–1424.
- [64] Blat D, Zigmund E, Alteber Z, et al. Suppression of murine colitis and its associated cancer by carcinoembryonic antigen-specific regulatory T cells[J]. *Molecular Therapy*, 2014, 22(5): 1018–1028.
- [65] Smith T T, Stephan S B, Moffett H F, et al. In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nano-carriers[J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(8): 813–820.
- [66] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection[J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 113–117.
- [67] Pogulis R J, Pease L R. A retroviral vector that directs simultaneous expression of alpha and beta T cell receptor genes [J]. *Human Gene Therapy*, 1998, 9(15): 2299–2304.
- [68] Gulley J L, Arlen P M, Tsang K Y, et al. Pilot study of vaccination with recombinant CEA-MUC-1-TRICOM poxviral-based vaccines in patients with metastatic carcinoma[J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14(10): 3060–3069.
- [69] Robbins P F, Morgan R A, Feldman S A, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2011, 29(7): 917–924.
- [70] Bilusic M, Heery C R, Arlen P M, et al. Phase I trial of a recombinant yeast-CEA vaccine (GI-6207) in adults with metastatic CEA-expressing carcinoma[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2014, 63(3): 225–234.
- [71] Klebanoff C A, Rosenberg S A, Restifo N P. Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers[J]. *Nature Medicine*, 2016, 22(1): 26–36.
- [72] Attridge K, Walker L S. Homeostasis and function of regulatory T cells (Tregs) in vivo: lessons from TCR-transgenic Tregs [J]. *Immunological Reviews*, 2014, 259(1): 23–39.

FOXP3⁺ Treg cells and immune cell therapy

LIU Xinnan¹, ZHAO Binbin^{1,2}, CHENG Hao¹, LI Bin^{1,2*}

1. Medicine Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School, Shanghai 200025, China
2. Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China

Abstract Regulatory T(Treg) cells play a key role in the maintenance of immune homeostasis and immune tolerance. Treg cells can suppress the immune response to neoantigen and autologous antigen to control anti-tumor immunity and autoimmunity. *In vitro* proliferated natural or modified Treg cells can be adoptively transferred into host to promote beneficial effect or reduce side effect in different inflammatory tissue microenvironments, which may provide new approach and strategy for treating inflammatory diseases.

Keywords regulatory T cells; Cell modification; immune cell therapy; Car-Treg; FOXP3 ●



(责任编辑 田恬)