

领域前沿 · 中国



赵允, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(生物化学与细胞生物学研究所)二级研究员, 副主任(副所长), 细胞生物学国家重点实验室副主任, 中国科学院特聘核心骨干研究员, 上海科技大学特聘教授, 中国科学院大学杭州高等研究院双聘教授, 国家重点研发计划首席科学家。1992年于山东大学微生物系微生物学专业毕业, 获理学学士学位; 2001年于北京大学生命科学学院分子细胞生物学专业毕业, 获理学博士学位; 2001—2004年在美国哈佛大学医学院从事博士后研究工作; 2004—2008年在美国德州大学西南医学中心从事博士后研究工作。2008年6月起任中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所(现中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)研究员, 研究组长。赵允研究员长期致力于细胞内信号转导研究, 尤其关注信号通路的异常与疾病发生的分子基础, 取得了一系列原创性科学发现, 在*Nature*、*Dev Cell*、*Nat Metab*、*Nat Commun*和*PLoS Biol*等学术期刊上发表了90余篇研究论文。近年来赵允研究员聚焦于肿瘤浸润免疫细胞与肿瘤免疫治疗的基础研究, 取得了一系列进展。

病理激活的中性粒细胞上表达的CD300ld参与肿瘤免疫抑制

王超雄 郑培宣 赵允*

(细胞生物学国家重点实验室, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 中国科学院大学, 上海 200031)

摘要 通过靶向免疫检查点分子进而增强免疫效应细胞的肿瘤细胞杀伤能力是近年来肿瘤治疗领域的重大突破。然而, 肿瘤内部高度免疫抑制性的肿瘤微环境使得现有的免疫检查点阻断疗法效果不佳。肿瘤的微环境高度异质, 而大量浸润的髓系细胞在免疫抑制微环境的建立上发挥关键作用, 其中病理激活的中性粒细胞[也被称为多形核髓系来源的抑制细胞(polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell, PMN-MDSC)]是微环境的重要组分。不同于正常的中性粒细胞, PMN-MDSC具有强烈的抑制淋巴细胞杀伤功能的作用。因此, 寻找特异且高效地阻断PMN-MDSC的靶点是当前免疫治疗研究中的热点。该文总结了该团队发现PMN-MDSC上表达的膜蛋白CD300ld参与肿瘤发展的过程, 并详细描述了CD300ld通过下游S100A8/A9发挥功能的信号转导机制。靶向CD300ld有可能成为一种有潜力的肿瘤治疗手段, 为后续的免疫治疗提供了新思路。

关键词 免疫检查点阻断疗法; 肿瘤微环境; PMN-MDSC; CD300ld

国家自然科学基金(批准号: 32270137、32130025、32293232)和国家重点研发计划(批准号: 2020YFA0509000)资助的课题

*通讯作者: Tel: 021-54921618, E-mail: yunzhao@sibcb.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32270137, 32130025, 32293232) and the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2020YFA0509000)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921618, E-mail: yunzhao@sibcb.ac.cn

The CD300ld Receptor on Pathologically Activated Neutrophils is Required for Tumor-Driven Immune Suppression

WANG Chaoxiong, ZHENG Peixuan, ZHAO Yun*

(State Key Laboratory of Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Targeting immune checkpoint proteins to enhance the cytotoxic ability of immune effector cells represents a breakthrough in cancer therapy and has achieved promising results in clinical treatments. However, a significant proportion of cancer patients do not respond to existing immune checkpoint inhibitor therapy due to the highly immunosuppressive tumor microenvironment. This microenvironment is heterogeneous, and myeloid cells play a key role in its establishment, particularly pathologically activated neutrophil, also known as PMN-MDSC (polymorphonuclear myeloid-derived suppressive cell), which is recognized as the major immune suppressor. Unlike normal neutrophils, PMN-MDSC has a strong suppressive ability to lymphocytes. Therefore, identifying specific and effective targets to block PMN-MDSC in the tumor microenvironment is an important avenue of immunotherapy research. This article summarizes the team's discovery of the membrane protein CD300ld expressed on PMN-MDSC involved in tumor development, and describes in detail the signal transduction mechanism by which CD300ld functions through downstream S100A8/A9. Targeting CD300ld may potentially become a promising tumor treatment approach, providing new insights for subsequent immunotherapy.

Keywords immune checkpoint therapy; tumor microenvironment; PMN-MDSC; CD300ld

1 PMN-MDSC是肿瘤免疫治疗中重要的抑制性细胞

肿瘤免疫治疗是癌症治疗领域革命性的进展,免疫治疗明显提高了临床肿瘤治疗的效果,并显著延长了癌症患者的生存期^[1-2]。但即便如此,现阶段肿瘤免疫治疗存在的问题仍然需要获得持续广泛的关注,其中最引人瞩目的问题和挑战就是免疫检查点阻断疗法仅对部分癌种中的部分患者响应,这极大地限制了免疫检查点阻断疗法的适用范围^[3]。而大量的实验和临床数据显示,高度免疫抑制性的肿瘤微环境是造成癌症患者不响应或部分响应检查点抑制剂的重要原因^[4-5]。抑制性的肿瘤微环境会导致具有杀伤能力的免疫效应细胞(如T细胞和NK细胞)很难存留在肿瘤中,即使存在于肿瘤当中其活性也会被大幅度抑制,其通常会处于耗竭或失活的状态从而无法发挥杀伤肿瘤的功能^[6]。因此寻找新的靶向分子从而改善肿瘤的免疫微环境是目前肿瘤免疫治疗领域的重大挑战。

借助单细胞测序、单细胞成像系统以及质谱细胞分析等技术,肿瘤微环境的复杂性正在逐步被揭示^[7],而其中的一类关键细胞:病理激活的中

性粒细胞[也被称为多形核髓系来源的抑制细胞(polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell, PMN-MDSC)]引起了大家的广泛关注。作为机体的第一道防线,中性粒细胞在天然免疫中发挥着重要且关键的作用^[8],但在肿瘤负荷的情况下,这群细胞的状态发生转变,从免疫激活转变为免疫抑制,主要起抑制T淋巴细胞活化的作用,并参与到肿瘤发展的各个阶段^[7,9-10]。但由于这群细胞本身的特性(半衰期很短,通常不到24小时,且成熟后无法继续增殖),使得研究者对PMN-MDSC本身的复杂性缺乏足够认识,中性粒细胞转化成PMN-MDSC的确切机制仍不是特别清楚,在临床环境中准确地鉴定和分析PMN-MDSC的标准有待建立^[11]。因此,探究中性粒细胞与PMN-MDSC的分化途径,并针对其在肿瘤中的募集和抑制功能寻找特异且安全的靶点,是目前亟待解决的关键问题。

2 通过筛选鉴定出CD300ld参与肿瘤进程

如前所述,肿瘤中浸润的髓系细胞深度参与肿瘤进程,同时由于膜蛋白具有良好的靶向性和成药性,因此我们希望筛选到表达在髓系细胞上的并且在肿

瘤的发生过程中起到关键作用的膜蛋白。为此我们设计了一套基于CRISPR-Cas9的体内筛选系统, 基于这样的筛选体系, 我们发现了一个之前未被报道的膜蛋白CD300ld^[12-13]。CD300ld是一类单次跨膜蛋白, 隶属于CD300蛋白家族, 之前被报道可能是小鼠诺如病毒入侵细胞的靶点, 并且可能参与中性粒细胞的活化过程; 但在肿瘤的发生过程中, CD300ld的功能还未被研究。我们的检测发现, CD300ld主要在中性粒细胞中高表达, 并且在荷瘤后产生的PMN-MDSC中表达上调, 这表明CD300ld可能参与肿瘤进程^[14]。

为了进一步阐明CD300ld在肿瘤进展中的作用, 我们制备了全身性CD300ld基因敲除小鼠, 随后在野生型小鼠和CD300ld缺失小鼠上皮下接种了黑色素瘤细胞, 并分析了肿瘤的生长速度。令人惊讶的是, CD300ld基因缺失小鼠中的肿瘤生长速度要明显慢于野生型小鼠, 同时在多种肿瘤模型中我们都看到了这一现象。此外, 我们还尝试在不同基因型的小鼠中构建了原发性肝癌模型, 结果也显示CD300ld基因缺失小鼠有更少的肿瘤负荷和更长的生存时间, 这证实CD300ld可能是重要的免疫抑制基因^[14]。

为了探究CD300ld是通过何种细胞影响肿瘤进程的, 我们首先采用骨髓移植后对小鼠再荷瘤的方法, 证明了免疫系统中表达的CD300ld在肿瘤生长中起关键作用。随后, 我们构建了条件性CD300ld基因敲除小鼠, 使其分别与Lyz2-Cre小鼠和S100A8-Cre小鼠杂交, 得到了在髓系细胞和中性粒细胞中特异性敲除CD300ld的小鼠, 随后的成瘤实验以及后续抗体清除实验也进一步证实, 中性粒细胞中表达的CD300ld对肿瘤进程尤为关键^[14]。

3 CD300ld的缺失减弱了肿瘤微环境的免疫抑制特性

由于PMN-MDSC是肿瘤免疫微环境的组成成分, 发挥重要的免疫抑制作用, 在确定了CD300ld的缺失会通过一种PMN-MDSC依赖的方式抑制肿瘤进展之后, 我们想进一步探究CD300ld的缺失对肿瘤微环境的影响。通过流式染色的分析, 我们发现CD300ld基因缺失小鼠的肿瘤中有更少的PMN-MDSC的积累, 同时CD4阳性T细胞、CD8阳性T细胞和NK细胞等免疫效应细胞的数量明显增加, 随后的免疫荧光染色结果也支持了这一观点。为了更加深刻地揭示CD300ld缺失对整个肿瘤微环境的影响,

我们将野生型和CD300ld基因缺失小鼠肿瘤中的免疫细胞分选出来进行了单细胞测序, 随后我们获得了与之前类似的结果, CD300ld基因缺失小鼠肿瘤中促进肿瘤生长的免疫抑制性细胞在整个免疫细胞中的比例整体降低, 而抑制肿瘤细胞的比例则整体增加, 这表明CD300ld的缺失重塑了肿瘤微环境, 大大减弱了肿瘤微环境的免疫抑制特性^[14]。

4 CD300ld影响PMN-MDSC的迁移和抑制功能

为了探究PMN-MDSC中CD300ld信号通过何种分子机制影响肿瘤进程, 我们对野生型和CD300ld基因缺失小鼠的PMN-MDSC进行了转录组测序, 我们发现CD300ld基因缺失小鼠的PMN-MDSC中与中性粒细胞招募和趋化相关的信号通路涉及的基因明显表达下调, 这提示CD300ld可能影响了PMN-MDSC的迁移能力。随后我们利用经典的Transwell实验和更能模拟生理状态的体内迁移实验证实了这一点, 即CD300ld缺失的PMN-MDSC被募集到肿瘤的能力较野生型更弱。由于PMN-MDSC在肿瘤中的重要功能之一就是参与免疫抑制, 因此我们也想探究CD300ld是否也能调控PMN-MDSC的免疫抑制活性, 通过T细胞增殖的抑制实验, 我们证实, 相较于野生型来说, CD300ld缺失的PMN-MDSC对T细胞的抑制能力明显下降^[14]。

为了揭示CD300ld下游更加具体的分子机制, 通过进一步分析转录组测序数据, 我们找到了一对在中性粒细胞中发挥关键作用的蛋白S100A8和S100A9。S100A8/A9是中性粒细胞特异性表达的一类钙连蛋白, 通常会形成异源二聚体参与细胞进程, 并且被报道在中性粒细胞的迁移和活化过程中发挥重要作用^[15-16]。我们首先证实CD300ld基因缺失小鼠中确实有更低的S100A8/A9蛋白表达水平, 随后通过回补该蛋白或者加入抑制剂的方式, 证实CD300ld通过影响S100A8/A9蛋白的表达进而影响PMN-MDSC的迁移和抑制能力^[14]。

5 靶向CD300ld能延缓肿瘤进程

为了进一步探究CD300ld作为药物靶点的潜力, 我们构建了时间可控的条件性敲除CD300ld基因的小鼠。我们发现在肿瘤已经成型后再去敲除这一基因仍然能够抑制肿瘤的进程。CD300ld是一类单次跨膜蛋白, 因此我们猜测如果将其蛋白胞外区纯

化出来打入荷瘤小鼠体内,过量的可溶性蛋白胞外区(extracellular domain, ECD)就可以竞争性地结合CD300ld潜在的配体,从而阻断CD300ld识别潜在的配体,模拟CD300ld缺失的效果,达到延缓肿瘤进程的效果。随后的结果也证实了我们的猜测,在多种肿瘤模型当中CD300ld蛋白胞外区展现出了非常好的抗肿瘤效果,更令人兴奋的是,CD300ld蛋白胞外区与PD-1抗体疗法产生了明显的协同效应^[14]。

在通过一系列的小鼠和细胞实验验证在小鼠中CD300ld影响PMN-MDSC的迁移能力和免疫抑制活性,靶向CD300ld显示了非常好的抗肿瘤效果之后,我们想进一步探究人中的CD300LD是否具有与小鼠中CD300ld类似的功能。我们发现,与小鼠中的表达情况相类似,人的CD300LD主要在中性粒细胞中高表达,同时肿瘤患者外周血中的CD300LD表达水平明显高于健康人。同时,对数据库进行进一步分析后我们发现,在大部分癌种中,CD300LD的表达量都要高于正常组织,同时在黑色素瘤病人当中,CD300LD表达量高的病人有更短的生存期。为了进一步分析人CD300LD的功能,我们构建了人源化CD300ld小鼠,成瘤实验表明人源化CD300ld小鼠中肿瘤生长速度与野生型小鼠没有明显

差异,同时在人源化小鼠中,人CD300LD的蛋白胞外区也表现出了非常好的抗肿瘤效果。这表明人CD300LD与小鼠CD300ld具有功能上的保守性,靶向CD300LD是一种有潜力的治疗肿瘤的方式^[14]。

6 总结与展望

在此项研究中,我们筛选并鉴定出了一种在中性粒细胞或PMN-MDSC中特异性高表达的膜蛋白分子CD300ld,并且该分子深度参与了肿瘤进程。当CD300ld存在时,其会介导下游S100A8/A9蛋白的表达,从而促进PMN-MDSC的迁移,使得肿瘤中有更多浸润的PMN-MDSC;此外,激活的CD300ld还可以通过下游S100A8/A9影响PMN-MDSC的免疫抑制活性,使得PMN-MDSC的免疫抑制活性更强。更强的免疫抑制活性也使得肿瘤浸润的杀伤性CD8阳性T细胞数量大为减少,最终表现出来的结果是促进肿瘤进程。而当我们敲除CD300ld或者使用药物阻断相应的信号通路之后,PMN-MDSC的迁移能力降低,其免疫抑制的活性也降低,最终使得肿瘤微环境的免疫抑制能力大幅降低,同时使得CD8阳性T细胞的浸润增加,最终使得肿瘤生长变缓(图1)。CD300ld

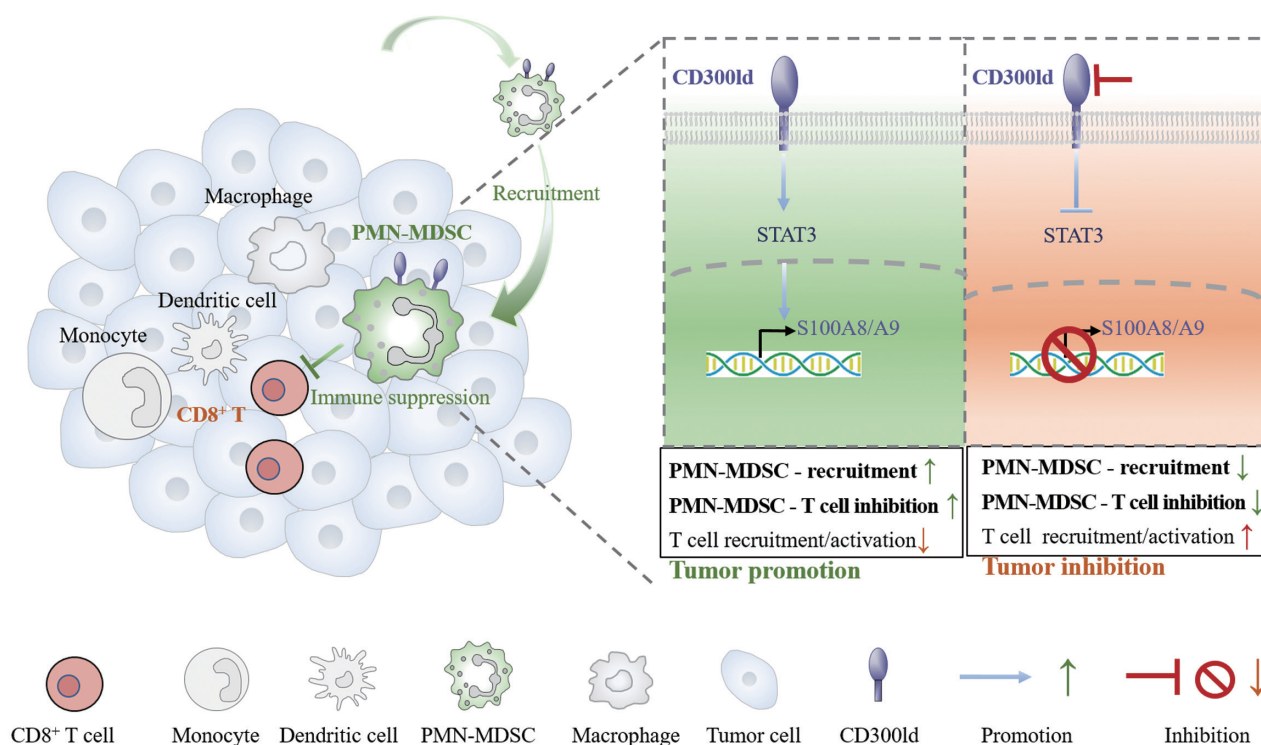


图1 CD300ld作为PMN-MDSC上的抑制分子参与肿瘤介导的免疫抑制(根据参考文献[14]修改)

Fig.1 CD300ld is involved in tumor-driven immune suppression as an immune suppressor on PMN-MDSC (modified from the reference [14])

的发现为后续的肿瘤治疗和药物研发提供了新思路,可能会对将来的免疫治疗产生积极的影响。

参考文献 (References)

- [1] ZHANG Y, ZHANG Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(8): 807-21.
- [2] DRAKE C G, LIPSON E J, BRAHMER J R. Reply: regulatory T cells-an important target for cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(6): 307.
- [3] MAO Y, XIE H, LÜ M, et al. The landscape of objective response rate of anti-PD-1/L1 monotherapy across 31 types of cancer: a system review and novel biomarker investigating [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2023, 72(7): 2483-98.
- [4] BENAVENTE S, SÁNCHEZ-GARCÍA A, NACHES S, et al. Therapy-induced modulation of the tumor microenvironment: new opportunities for cancer therapies [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 582884.
- [5] MARZAGALLI M, EBELT N D, MANUEL E R. Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 236-50.
- [6] THOMMEN D S, SCHUMACHER T N. T cell dysfunction in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(4): 547-62.
- [7] QUAIL D F, AMULIC B, AZIZ M, et al. Neutrophil phenotypes and functions in cancer: a consensus statement [J]. *J Exp Med*, 2022, 219(6): e20220011.
- [8] XIE X, SHI Q, WU P, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(9): 1119-33.
- [9] HEGDE S, LEADER A M, MERAD M. MDSC: markers, development, states, and unaddressed complexity [J]. *Immunity*, 2021, 54(5): 875-84.
- [10] MANTOVANI A, CASSATELLA M A, COSTANTINI C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(8): 519-31.
- [11] ZHOU J, NEFEDOVA Y, LEI A, et al. Neutrophils and PMN-MDSC: their biological role and interaction with stromal cells [J]. *Semin Immunol*, 2018, 35: 19-28.
- [12] BORREGO F. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system [J]. *Blood*, 2013, 121(11): 1951-60.
- [13] HAGA K, FUJIMOTO A, TAKAI-TODAKA R, et al. Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(41): E6248-E55.
- [14] WANG C X, ZHENG X C, ZHANG J L, et al. CD300ld on neutrophils is required for tumour-driven immune suppression [J]. *Nature*, 2023, 621(7980): 830-9.
- [15] PRUENSTER M, KURZ A R, CHUNG K J, et al. Extracellular MRP8/14 is a regulator of $\beta 2$ integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6915.
- [16] PRUENSTER M, VOGL T, ROTH J, et al. S100A8/A9: from basic science to clinical application [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 167: 120-31.