

长效抑制TIM-3表达增强ROR1嵌合抗原受体 修饰的T细胞的抗肿瘤免疫应答

夏玉龙¹ 蒋继宏² 金昕¹ 师春青¹ 张小冬¹ 蒋金洲¹ 宋启斌^{3*} 陈瑞^{4*} 吴炯^{1*}

(¹苏州恒康生命科学有限公司研发部, 苏州 215000; ²江苏师范大学生命科学学院, 徐州 221116;

³武汉大学人民医院肿瘤中心, 武汉 430060; ⁴首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069)

摘要 该文探讨了T细胞免疫球蛋白黏蛋白3(T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3, *TIM-3*)基因沉默对靶向ROR1的嵌合抗原受体(ROR1-CAR)修饰的T细胞增殖和抗肿瘤免疫应答的影响及其作用机制。通过短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)基因沉默技术长效抑制TIM-3在ROR1-CAR T细胞中的表达, 采用qRT-PCR和Western blot实验检测TIM-3在mRNA和蛋白水平的表达情况; 采用ELISA实验验证TIM-3基因沉默的ROR1-CAR T细胞对靶细胞的杀伤能力的影响; 流式细胞检测进一步评估抑制TIM-3表达对ROR1-CAR T细胞的靶向杀伤和抗原依赖性的增殖能力的影响。结果显示, shRNA可显著抑制TIM-3在ROR1-CAR T细胞中的表达, 但不影响ROR1-CAR T细胞的百分比和增殖活性; 通过检测发现ROR1阳性的人结肠癌细胞系SW620分泌高水平的TIM-3配体——半乳糖素9(Galectin-9), 该配体可直接作用于ROR1-CAR T细胞而发挥免疫负调控作用。另外, 长效抑制TIM-3的表达促进了ROR1-CAR T细胞的抗原依赖性的细胞因子释放和增殖。总之, 消除ROR1-CAR T细胞表面的TIM-3与肿瘤细胞来源的Galectin-9之间的相互作用可有效增强ROR1-CAR T细胞的抗肿瘤活性。

关键词 TIM-3; 短发夹RNA; ROR1-CAR T细胞; 半乳糖素9; 抗肿瘤活性

Long-Term Inhibition of TIM-3 Expression Potentiates Antitumor Immune Responses of ROR1-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells

XIA Yulong¹, JIANG Jihong², JIN Xin¹, SHI Chunqing¹, ZHANG Xiaodong¹, JIANG Jinzhou¹,
SONG Qibin^{3*}, CHEN Rui^{4*}, WU Jiong^{1*}

(¹R & D Department, Suzhou Everhealth Biomedical Co., Ltd., Suzhou 215000, China; ²School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China; ³Cancer Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; ⁴School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract This study aimed to investigate the effects of *TIM-3* (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3) gene silencing on proliferation and antitumor immune responses of ROR1-CAR T cells and its mechanism. shRNA (short hairpin RNA) targeting *TIM-3* was employed to knockdown *TIM-3*, and then the expression of *TIM-3* was detected at the mRNA and protein levels by qRT-PCR and Western blot, respectively. ELISA experiments verified the effector cytokines production and cell killing effects of *TIM-3*-targeted ROR1-CAR T cells on target cells. Finally, antigen-dependent cell proliferation was validated by flow cytometry. The results showed

收稿日期: 2022-04-29 接受日期: 2022-07-05

苏州恒康生命科学有限公司研发经费资助的课题

*通讯作者。Tel: 13517281931, E-mail: qibinsong@whu.edu.cn; Tel: 15805192820, E-mail: nc.ude.umcc@nehciur; Tel: 13961519641, E-mail: xylstar@126.com

Received: April 29, 2022

Accepted: July 5, 2022

This work was supported by the Research and Development Fund of Suzhou Everhealth Biomedical Co., Ltd.

*Corresponding authors. Tel: +86-13517281931, E-mail: qibinsong@whu.edu.cn; Tel: +86-15805192820, E-mail: nc.ude.umcc@nehciur; Tel: +86-13961519641, E-mail: xylstar@126.com

that TIM-3-targeting shRNA could significantly inhibit TIM-3 expression in ROR1-CAR T cells, while *TIM-3* knockdown did not affect the percentage and proliferation of ROR1-CAR T cells. ROR1-expressing SW620 cell, a human colon cancer cell line, secretes high levels of Galectin-9 which could directly inhibit the immune response of ROR1-CAR T cells. In addition, long-term inhibition of TIM-3 promoted ROR1-CAR T cell antigen-dependent cytokine production and proliferation. In conclusion, eliminating the interaction of tumor cell-derived Galectin-9 with TIM-3 on the surface of ROR1-CAR T cells can enhance the antitumor activities of ROR1-CAR T cells.

Keywords TIM-3; short hairpin RNA; ROR1-CAR T cell; Galectin-9; antitumor activity

CAR T细胞治疗是近些年开发出来的新型免疫细胞疗法,在多种恶性血液瘤治疗中取得了巨大突破,显著提高了各种血液肿瘤患者的完全缓解率及长期生存率,被认为是最有前景的肿瘤治疗方式之一^[1]。但是在实体瘤治疗中CAR T细胞的疗效仍然不够理想,其中一个重要原因是没有合适的肿瘤特异性抗原作为安全且有效的治疗靶点^[2]。

受体酪氨酸激酶孤儿受体1(receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, ROR1)是受体酪氨酸家族成员之一,它在胚胎组织中调控骨骼与神经的发育,并在细胞的迁移过程中发挥重要作用^[3]。研究发现, ROR1在多种恶性血液瘤和实体肿瘤中高表达,而在正常的成人器官和组织中几乎不表达^[4-7]。因此, ROR1已经成为免疫治疗最热门的靶点之一,多种基于ROR1靶点开发的抗体药物和CAR T细胞药物已经进入不同的研究阶段。西妥珠单抗(Cimtumumab)是一种靶向ROR1的人源化单克隆抗体药物,一项针对慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)的I期临床研究的数据显示, Cimtumumab可阻断Wnt5a信号通路,抑制肿瘤细胞增殖、迁移和存活,并诱导肿瘤细胞分化^[8]。ROR1-CAR T细胞的抗肿瘤能力也在多个实验模型中被评估。MICHAEL等^[9]在体外构建了原发性肿瘤的微生理三维肺癌和乳腺癌模型来模拟真实的体内肿瘤形态和环境,通过动态的培养观察发现, ROR1-CAR T细胞进入三维肿瘤模型结构的动脉介质流并且贴附到肿瘤组织表面或浸润到肿瘤组织中,从而清除了三维结构中的多层肿瘤细胞,显示出了强大的抗肿瘤作用。ROR1-CAR T细胞在套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)和骨肉瘤动物模型实验中同样能够显著抑制肿瘤的生长,延长荷瘤小鼠的生存期^[3]。此外, ROR1-CAR T细胞联合小分子抑制剂、化疗药物或者免疫检验点抑制剂可以重塑免疫肿瘤微环境,增强CAR T细胞的浸润和抗肿瘤活性,为提高CAR T细胞在实体瘤治疗中的疗效提供

了重要的参考^[10]。CAR T细胞的脱靶毒性一直是研究人员最关心的安全问题,近期的一项研究发现ROR1也在一些正常的内分泌器官组织中表达^[12]。ROR1基因是高度保守的,人和类灵长类动物中的ROR1基因高度同源且组织表达情况非常类似。为了验证ROR1-CAR T细胞治疗的安全性,美国西雅图Fred Hutchinson癌症中心STANLEY实验室^[12]将制备的ROR1-CAR T细胞输注到猕猴体内,发现实验猕猴的体重、全血球计数、血清生化各项指标均在正常范围内,未观察到ROR1-CAR T细胞所导致的明显的细胞毒性,也没有观察到CAR T细胞在骨髓和淋巴结中的聚集,该研究暗示ROR1-CAR T细胞的临床应用足够安全。

限制CAR T细胞在实体瘤中疗效的另外一个重要的因素就是肿瘤微环境中存在大量免疫抑制性细胞和分子^[13-15]。当CAR T细胞浸润到肿瘤组织后,一些免疫抑制性分子可能会直接与CAR T细胞表面的免疫检验点分子结合,诱导CAR T细胞失能甚至凋亡。这其中就包括一种重要的抑制性免疫检验点分子——T细胞免疫球蛋白黏蛋白3(T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3, TIM-3),它在活化的CD4⁺和CD8⁺ T细胞中表达上调,是T细胞耗竭重要的标志分子之一^[16-17]。CAR T细胞在活化和扩增过程中同样伴随着TIM-3分子的表达上调,那么在肿瘤微环境中肿瘤细胞来源的TIM-3配体能否直接对CAR T细胞进行免疫负调控,抑制CAR T细胞表面TIM-3的表达是否会影响CAR T细胞的细胞毒性、细胞增殖以及抗肿瘤效应分子的分泌还不是很清楚。因此,本研究通过重组慢病毒同时携带靶向TIM-3的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)和ROR1-CAR基因制备出TIM-3基因沉默的ROR1-CAR T细胞,探究了TIM-3受体缺失对CAR T细胞增殖、免疫应答和对靶细胞杀伤能力的影响,旨在为CAR T细胞临床应用过程中如何克服肿瘤微环境中TIM-3介导的免疫抑制作用提供有意义的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人类胚胎肾细胞293T和293A、人结肠癌细胞SW620、人非小细胞肺癌细胞A549、人卵巢癌细胞SKOV-3、人非小细胞肺癌细胞NCI-H1975、人结肠癌细胞LoVo购自美国ATCC; 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)来自上海力泉医院的健康捐献者。

1.1.2 主要试剂 小鼠抗人GAPDH单克隆(ZG003)抗体、FITC荧光标记的抗人TIM-3单克隆(1E3)抗体、CellTrace™ CFSE细胞染料、转染试剂Lipofectamine 3000、T细胞活化磁珠CD3/CD28 Dynabeads均购自美国ThermoFisher公司; PE荧光标记的Protein L购自北京义翘神州科技有限公司; PE荧光标记的抗人ROR1单克隆抗体购自美国Biolegend公司; HRP标记的山羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 重组人IL-2购自北京同立海源生物技术有限公司; 人IL-2和IFN γ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司; 乳酸脱氢酶细胞毒性检测(LDH cytotoxicity assay)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; NucleoSpin RNA提取试剂盒购自德国MACHERY NAGEL公司; PCR引物购自苏州泓迅生物科技股份有限公司; PrimeScript RT Master Mix逆转录试剂盒、One Step TB Green PrimeScript实时荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司; ECL化学发光检测试剂盒购自美国Biological Industries公司; pLL3.7质粒购自北京英茂盛业生物技术有限公司; DMEM高糖培养基、RPMI-1640培养基、胎牛血清购自美国Hyclone公司; 淋巴细胞分离液Ficoll-Paque gradient centrifugation购自美国GE Healthcare公司; 小干扰RNA、shRNA以及相关引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 复苏人结肠癌细胞SW620和人胚胎肾细胞293T或293A, 用含有10% FBS和1%青-链霉素的DMEM培养基培养, 人卵巢癌细胞SKOV-3用含10% FBS和1%青-链霉素的McCoy's 5A培养基培养, 人卵巢癌细胞LoVo用含10% FBS和1%青-链霉素的Hank's F12K培养基培养, 人肺癌细胞NCI-H1975用含10% FBS和1%青-链霉素的RPMI-1640培养基培养, 人肺癌细胞A549用含10% FBS和1%青-链霉素的F12K培养基培养, 当细胞密度达到约

80%时, 用胰酶消化, 1:3传代, 置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中孵育。

1.2.2 CAR载体的制备 为了制备靶向ROR1的CAR, 我们通过噬菌体展示技术筛选获得全人源的抗人ROR1单链抗体(ScFV)序列。然后将科扎克(kozak)序列、CD8信号肽序列、ROR1 ScFV序列、CD8铰链区序列、CD28跨膜区和胞内区序列、CD3 ζ 序列依次连接在一起获得ROR1-CAR结构。通过EF1a启动子控制CAR基因表达。为了靶向沉默TIM-3表达, 我们设计并合成了靶向TIM-3基因不同编码区域的shRNA, 并将其插入到EF1a启动子上游。shRNA的表达是通过载体中的U6启动子控制的。将靶向TIM-3的shRNA和ROR1-CAR基因片段克隆至pLL3.7-U6-EF1a-MCS慢病毒载体质粒中。

1.2.3 细胞转染 将293T或293A细胞以 2×10^6 个/mL的密度接种至10 cm细胞培养皿, 待细胞密度达到70%左右时进行转染。按照Lipofectamine 3000说明书步骤转染质粒或siRNA。转染6 h更换为新鲜的完全培养基, 转染24 h或48 h后收集上清或细胞进行后续实验。

1.2.4 慢病毒包装 为了制备ROR1-CAR T、TIM-3沉默ROR1-CAR T细胞以及对照CAR(Mock CAR) T细胞, 用重组慢病毒载体质粒与慢病毒包装质粒pMD2.G、psPAX2共转染293T细胞。分别收取转染48 h和72 h后含重组慢病毒颗粒的培养上清, 通过70 000 r/min超速离心2 h浓缩病毒。慢病毒滴度检测方法为: 用梯度稀释的病毒原液感染HT1080细胞, 通过流式细胞实验检测CAR阳性情况, 选取CAR阳性比例在10%~30%的病毒稀释样本计算病毒滴度。具体计算公式为: 滴度=(HT1080细胞数 $\times$ CAR阳性率)/加入病毒样本的体积(TU/mL)。将病毒分装保存于-80 °C冰箱备用。

1.2.5 CAR T细胞制备 通过密度梯度离心分离健康捐献者的PBMC细胞, 然后通过CD3/CD28磁珠分选和活化T细胞。将结合了CD3/CD28磁珠的T细胞转移至含CAR T细胞培养基(含10% FBS、1%青-链霉素和300 U/mL重组人白介素2的RPMI-1640)的培养瓶中, 并放置于37 °C、5% CO₂的培养箱中孵育24 h。然后, 用浓缩的重组慢病毒按照病毒感染复数为5转导活化的T细胞。为了使细胞密度维持在 1×10^6 个/mL, 需要每隔1~2天补加新鲜的培养基。

1.2.6 流式细胞分析 收集肿瘤细胞或活化的T细胞或慢病毒转导的T细胞, 再将细胞与荧光标记抗体

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称	引物序列(5'→3')
Gene name	Primer sequences (5'→3')
<i>TIM-3</i>	F: GAA GTG GAG GAG CCC AAT GA R: ATG GCA TTG CAA AGC GAC AA
<i>Galectin-9</i>	F: CTT TCA TCA CCA CCA TTC TG R: ATG TGG AAC CTC TGA GCA CTG
<i>GAPDH</i>	F: CTG ATG CCC CCA TGT TCG TG R: CAG GAG GCA TTG CTG ATG A

于4℃孵育30 min,用染色缓冲液洗涤2次后,通过贝克曼流式细胞仪CytoFLEX收集数据。数据的分析通过FlowJo软件完成。所有样本均设计3个重复,数据来源于3次独立重复实验。

1.2.7 细胞因子和乳酸脱氢酶释放量检测 将T细胞、ROR1-CAR T或TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞与SW620或Galectin-9基因敲除的SW620(SW620^{ΔGal-9})细胞按照5:1的比例接种至96孔板中,放置于37℃、5% CO₂的培养箱中孵育24 h。按照ELISA试剂盒和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒说明书中的操作步骤进行样品检测,通过酶标仪读取吸光度(D)值,并且通过标准曲线计算出上清中的IL-2和IFN γ 浓度。根据LDH试剂盒检测获得的D值,通过公式:裂解率(%)=(样品孔D值-最小裂解孔D值)/最大裂解孔D值×100%计算出效应细胞对靶细胞的裂解率。

1.2.8 靶细胞杀伤实验 根据CellTrace™ CFSE细胞染料说明书中的操作步骤标记对数生长期的SW620细胞,再分别将T细胞、ROR1-CAR T和TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞与CFSE标记的SW620按照1:1接种于96孔板中,放置于37℃、5% CO₂的培养箱中孵育。24 h后收集细胞进行PI染色和流式检测,首先通过流式细胞仪的FL1通道分析CFSE标记的SW620细胞,进而在CFSE阳性细胞群中分析PI阳性细胞(CFSE/PI双阳性细胞)所占的比例,该比例即为杀伤细胞所占的百分比。

1.2.9 体外细胞增殖检测 按照CellTrace™ CFSE细胞染料说明书中的操作步骤对ROR1-CAR T或TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞进行染色,再将CSFE标记的ROR1-CAR T或TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞与SW620或SW620^{ΔROR1}细胞按照1:1的比例接种至96孔板中,培养基中不含IL-2,放置于37℃、5% CO₂的培养箱中孵育72 h。收获CSFE标记的CAR T

细胞样品通过流式细胞仪收集数据,分析CAR T细胞的抗原依赖性增殖情况。

1.2.10 qRT-PCR分析 收集不同肿瘤细胞或通过流式分选后扩增的CAR阳性的T细胞,用NucleoSpin RNA试剂盒提取总RNA,按照逆转录试剂盒Prime-Script RT Master Mix说明书中的操作步骤将1 μg RNA逆转录成cDNA,用One Step TB Green Prime-Script试剂盒说明中的qRT-PCR反应程序(95℃变性5 s, 60℃退火和延伸共30 s,重复40个循环)检测Galectin-9和TIM-3的mRNA水平,以GAPDH作为内参。引物序列见表1。

1.2.11 Western blot分析 收集细胞,加入100 μL裂解液提取蛋白质,BCA法检测蛋白质的浓度,取50 μg总蛋白,加入5×蛋白上样缓冲液,100℃煮沸5 min,于10% SDS-PAGE凝胶中分离蛋白,然后在210 mA恒流条件下进行转膜,将蛋白转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h后加入1:2 000稀释的一抗,在4℃孵育过夜,第2天用TBST洗涤3次,每次10 min以去除游离抗体,加入1:20 000稀释的HRP标记的二抗,室温孵育1 h;再用TBST洗涤3次,每次10 min,用ECL化学发光法进行显色。

1.3 统计学分析

两样本均值之间的比较选用t检验,多样本均值之间的比较选用单因素方差分析。所有统计分析使用GraphPad Prism 9.0.0软件(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)进行处理。所有实验均独立重复3次,P<0.05表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 筛选抑制TIM-3表达效果最佳的siRNA序列制备TIM-3沉默的ROR1-CAR T细胞

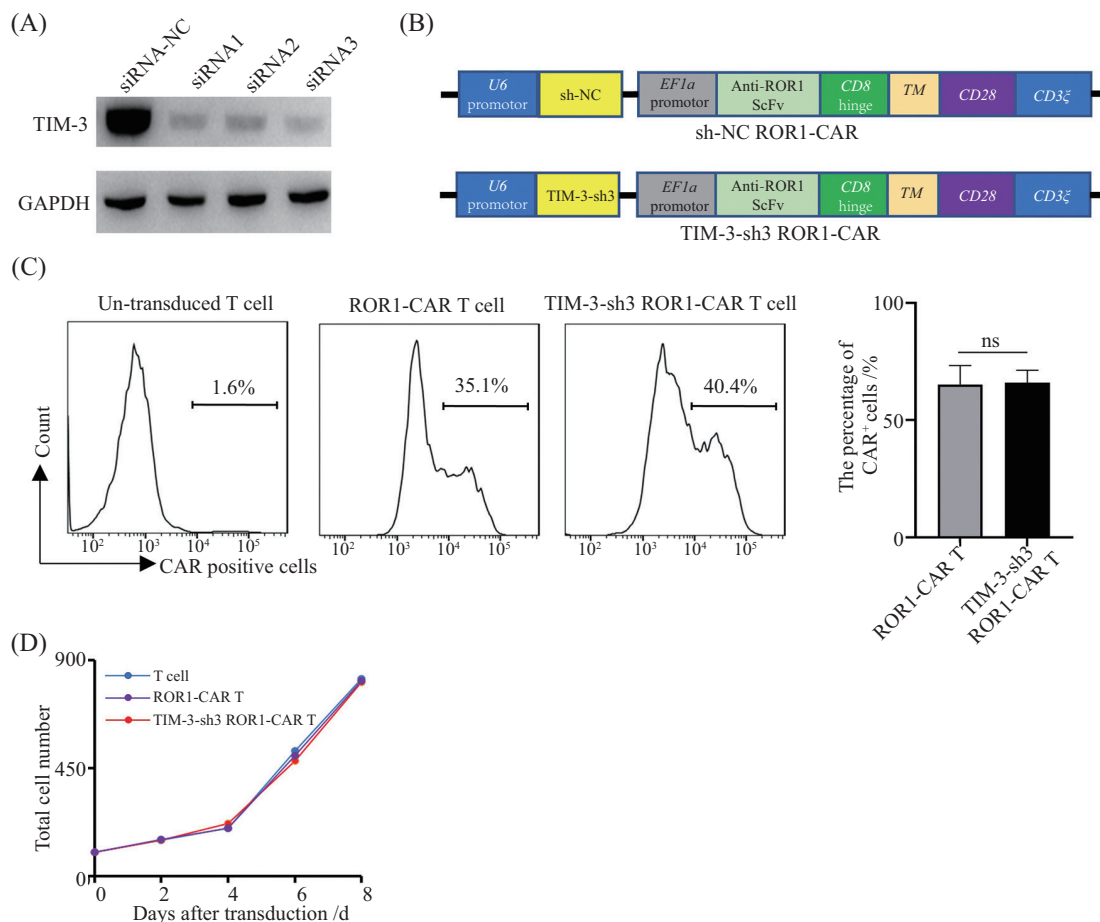
为了消除TIM-3介导的免疫耐受,制备TIM-3基因沉默的ROR1-CAR T细胞。我们首先设计并合成

了三种靶向 *TIM-3* 的 siRNA (TIM-3-siRNA1/2/3), 同时合成对照 siRNA (siRNA-NC) (表2)。通过脂质体转染将设计的 siRNA 递送到稳定表达 *TIM-3* 的 293A 细胞 (293A-TIM-3) 中, 用以验证和对比不同 siRNA 对 *TIM-3* 表达的抑制效果。结果发现, *TIM-3*-siRNA3 对 *TIM-3* 的沉默效果最为明显 (图 1A)。因此, 根据 *TIM-3*-siRNA3 和 siRNA-NC 的序列分别设计了

shRNA, 将其分别命名为 TIM-3-sh3 和 sh-NC (表 3), 并构建了靶向 ROR1 的 CAR 慢病毒载体 (图 1B)。通过慢病毒转导 T 细胞从而制备出表达 sh-NC 和 TIM-3-sh3 的 ROR1-CAR T 细胞。感染后第 6 天检测 CAR 阳性 T 细胞的比例, 发现表达 sh-NC 的 ROR1-CAR T 细胞百分比达到了 35.1%, 而表达 TIM-3-sh3 的 ROR1-CAR T 细胞占比为 40.4%, 多样本重复实验发

表2 小干扰RNA序列
Table 2 Sequence of siRNA

小干扰RNA Small interfering RNA	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
siRNA-NC	TTT GTA CTA CAC AAA AGT ACT G
TIM-3-siRNA1	GGA GCC TG TCC TGT GTT TGA ATT
TIM-3-siRNA2	GCC TCC CTG ATA TAA ATC TAA TT
TIM-3-siRNA3	GCA ACC ATC AGA ATA GGC ATC TAC A



A: 用靶向 *TIM-3* 的 siRNA 或对照 siRNA 转染 293A-TIM-3 细胞, 48 h 后 Western blot 实验检测 *TIM-3* 蛋白表达水平变化; B: 表达 TIM-3-sh3 或对照 sh-NC 的第二代 ROR1-CAR 的结构示意图; C: 流式细胞检测 CAR 阳性细胞比例; D: 细胞增殖曲线。ns: 无显著差异。

A: *TIM-3*-targeting siRNA or control siRNA were transfected into 293A-TIM-3 cells, Western blot experiment was taken to detect the changes of *TIM-3* protein expression levels; B: schematic representation of a second generation ROR1-CAR expressing TIM-3-sh3 or sh-NC; C: the proportion of CAR positive cells was detected by flow cytometry; D: cell proliferation curve. ns: no significant difference.

图1 *TIM-3* 基因沉默的 ROR1-CAR T 细胞制备

Fig.1 Generation of ROR1-CAR T cells with *TIM-3* gene silencing

现两者没有统计学差异(图1C)。细胞增殖实验表明, 表达sh-NC和TIM-3-sh3的ROR1-CAR T细胞和正常T细胞的增殖速度没有明显区别(图1D)。以上实验结果表明, 抑制TIM-3表达不会影响ROR1-CAR T细胞的比例及细胞增殖。

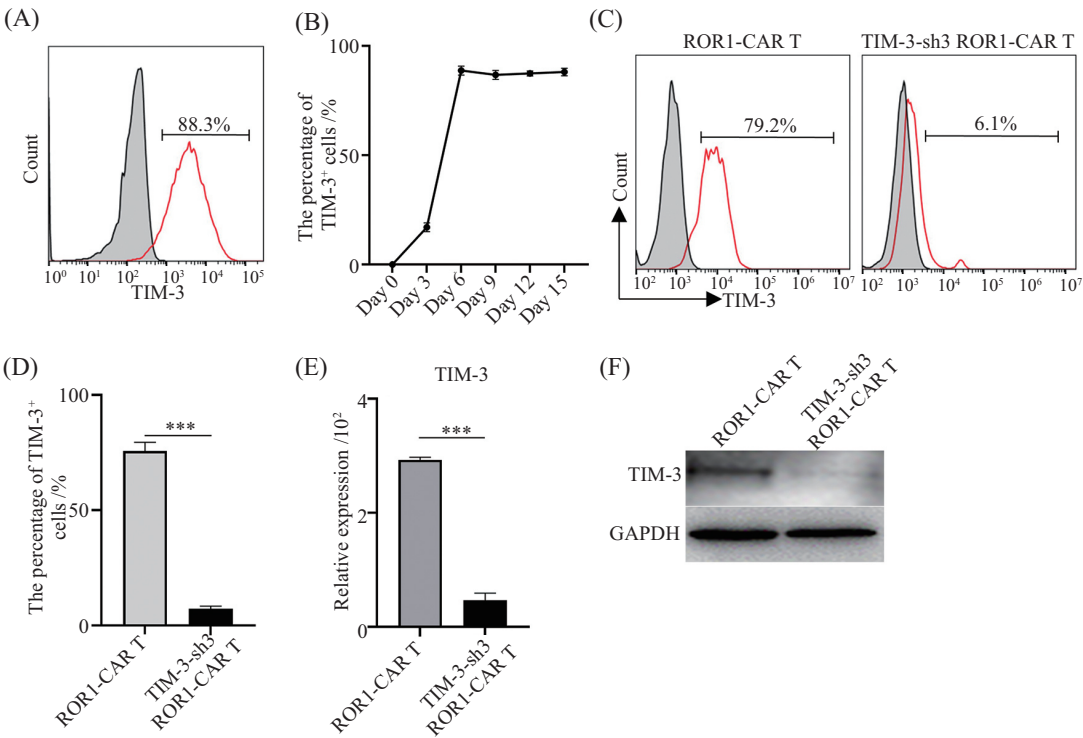
2.2 利用shRNA基因沉默技术可有效抑制TIM-3在ROR1-CAR T细胞中的表达

TIM-3等抑制性免疫检查点分子往往在T细胞活化之后表达开始上调。因此, 我们检测了经过CD3和CD28抗体偶联的磁珠活化的T细胞中TIM-3

的表达情况。结果发现, T细胞活化6天后TIM-3阳性比例达到88%以上, 此后至活化后15天均维持在最高水平(图2A和图2B)。上述T细胞活化过程同样是CAR T细胞制备的过程。因此, 为了评估TIM-3在CAR T细胞表面的表达, 我们用流式细胞实验检测了制备第6天分别表达sh-NC和TIM-3-sh3的ROR1-CAR T细胞。结果显示, 表达TIM-3-sh3的ROR1-CAR T细胞中TIM-3的表达水平明显低于表达sh-NC的ROR1-CAR T细胞, 且表达TIM-3-sh3的ROR1-CAR T中TIM-3阳性细胞的比例显著低于对照组细

表3 靶向TIM-3的短发夹RNA序列
Table 3 Sequences of shRNA for targeting TIM-3

短发夹RNA	序列(5'→3')
Short hairpin RNA	Sequences (5'→3')
shRNA-NC	F: TGG AAA GTT ATT AGG TCT ACC GTA GAT TCA AGA R: GAT CTA CGG TAG ACC TAA TAA CTT TCC TTT TTT
shRNA3	F: TGC AAC CAT CAG AAT AGG CAT CTA CAT TCA AGA R: GAT GTA GAT GCC TAT TCT GAT GGT TGC TTT TTT



A: 流式细胞检测活化后第6天的T细胞中TIM-3的表达情况; B: 活化后T细胞中TIM-3表达的动态变化; C: ROR1-CAR T和TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞中的TIM-3表达水平; D: ROR1-CAR T和TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞中TIM-3阳性细胞的比例; E、F: qRT-PCR和Western blot实验分别检测ROR1-CAR T和TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞中TIM-3的mRNA转录水平和蛋白表达水平; *** $P<0.001$, 与ROR1-CAR T细胞组相比。
A: flow cytometry detection of TIM-3 expression in T cells on day 6 after activation; B: dynamic change of TIM-3 expression in T cells after activation; C: expression levels of TIM-3 in ROR1-CAR T and TIM-3-sh3 ROR1-CAR T cells; D: the proportion of TIM-3 positive cells within ROR1-CAR T or TIM-3-sh3 ROR1-CAR T cells; E,F: the transcription level and protein level of TIM-3 in ROR1-CAR T and TIM-3-sh3 ROR1-CAR T cells was evaluated by qRT-PCR and Western blot, respectively. *** $P<0.001$ compared with ROR1-CAR T group.

图2 靶向TIM-3的shRNA可有效抑制ROR1-CAR T细胞中TIM-3的表达
Fig.2 Efficient TIM-3 inhibition in ROR1-CAR T cells by TIM-3-targeting shRNA

胞(图2C和图2D)。qRT-PCR和Western blot实验结果同样显示表达TIM-3-sh3的ROR1-CAR T细胞中TIM-3的mRNA和蛋白水平均显著降低(图2E和图2F)。以上结果证明,利用shRNA基因沉默技术成功制备出了TIM-3敲降的ROR1-CAR T细胞。

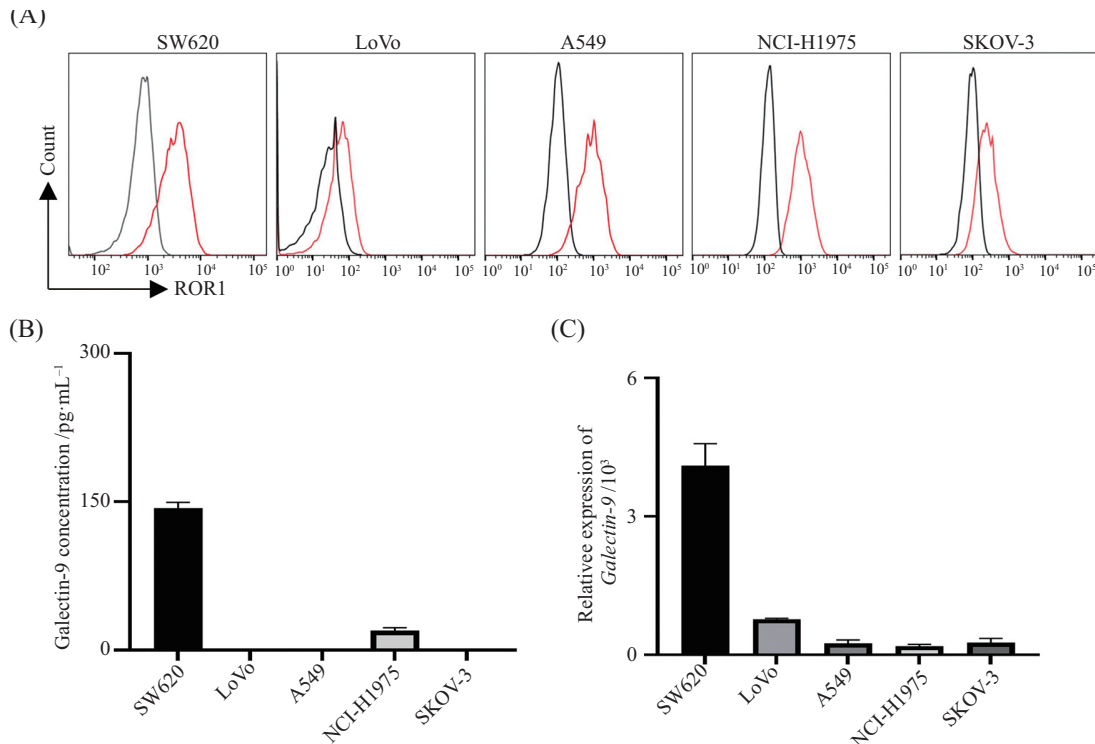
2.3 筛选高表达ROR1和Galectin-9的肿瘤细胞

在验证抑制TIM-3表达是否影响ROR1-CAR T细胞的免疫应答功能之前,我们对多种实体肿瘤细胞系中ROR1和TIM-3相关配体的表达进行了检测。流式细胞检测发现,SW620、NCI-H1975、A549高表达ROR1蛋白,SKOV-3和LoVo表达中等水平的ROR1蛋白(图3A)。TIM-3的配体是一种广泛表达的可溶分子——Galectin-9,其可结合TIM-3分子可变区的寡聚糖从而介导T细胞的免疫耐受和耗竭^[18]。因此,下一步我们开始评估Galectin-9在ROR1阳性肿瘤细胞系中的表达情况。通过收集不同ROR1阳性肿瘤细胞培养上清进行ELISA检测发现,SW620细胞培养上清中的Galectin-9水平最高,NCI-H1975

细胞次之,LoVo、A549和SKOV-3细胞上清中Galectin-9的含量则低于检测下限(图3B)。qRT-PCR检测确认SW620细胞中Galectin-9的mRNA转录水平明显高于其他细胞(图3C)。综上所述,SW620细胞高表达ROR1和Galectin-9,可作为理想的靶细胞用于后续实验,有助于进一步探讨TIM-3信号通路对ROR1-CAR T细胞抗肿瘤活性的影响。

2.4 阻断Galectin-9与TIM-3的相互作用增强了ROR1-CAR T细胞的抗原依赖性免疫应答

为了验证肿瘤细胞来源的Galectin-9是否可直接对CAR T细胞的免疫应答进行负调控,我们将ROR1-CAR T细胞分别与野生型SW620细胞和Galectin-9基因敲除的SW620细胞(SW620^{ΔGal-9})共培养。ELISA检测细胞共培养上清中的效应分子IL-2和IFN γ 的释放水平,结果发现与对照组相比,ROR1-CAR T细胞与SW620^{ΔGal-9}细胞共培养后分泌的IL-2和IFN γ 水平显著升高(图4A)。培养上清中的LDH释放水平可以反映效应细胞对靶细胞的细胞毒性作

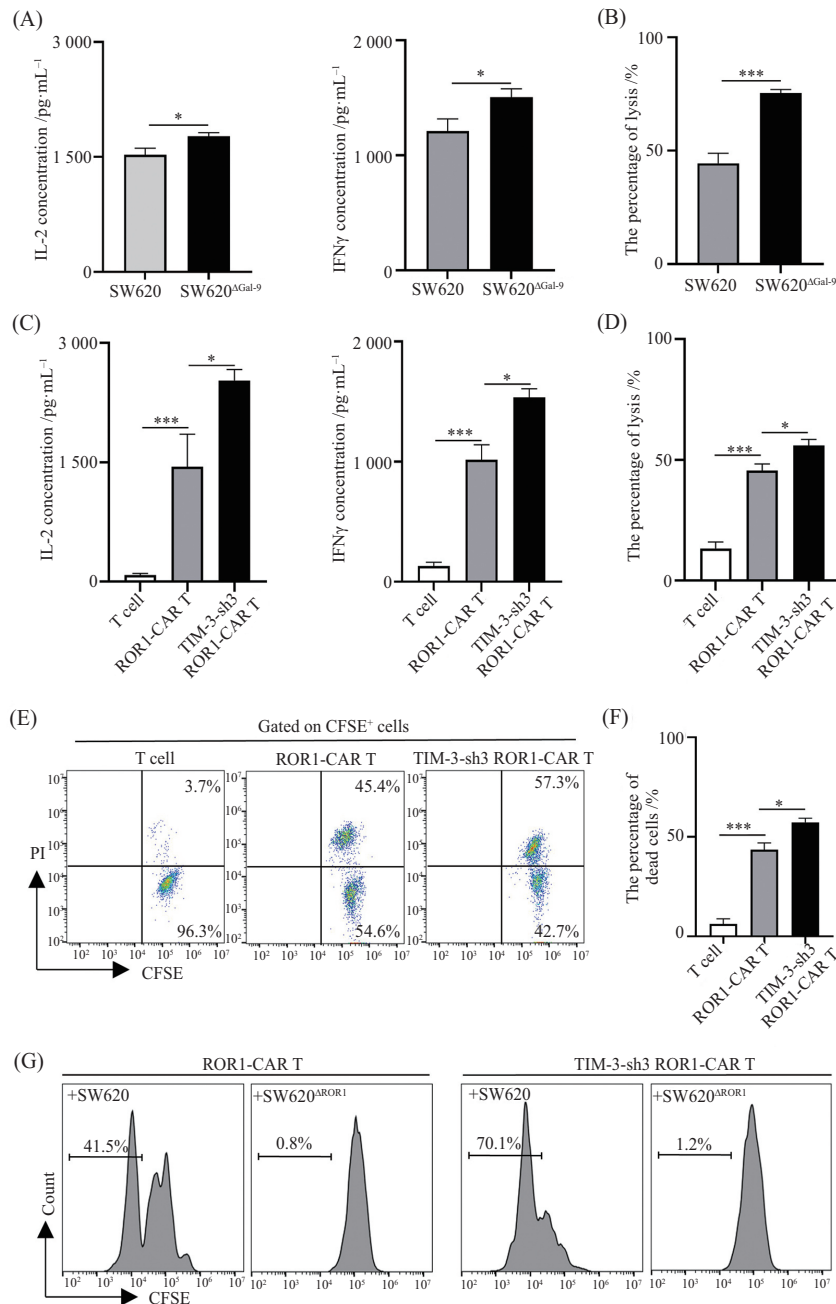


A: 流式细胞检测ROR1在不同肿瘤细胞中的表达水平; B: 不同肿瘤细胞按照 2×10^5 个/孔接种至6孔板中,培养24 h后ELISA检测培养上清中Galectin-9的分泌水平; C: qRT-PCR检测不同肿瘤细胞中Galectin-9的mRNA转录水平。

A: expression level of ROR1 in different tumor cells was determined by flow cytometry; B: different tumor cells were seeded into 6-well plates at 2×10^5 cells/well, and the secretion level of Galectin-9 in the supernatant was detected by ELISA after culture for 24 h; C: mRNA transcription levels of Galectin-9 in different tumor cells were detected by qRT-PCR.

图3 SW620细胞高表达ROR1和Galectin-9

Fig.3 ROR1 and Galectin-9 were highly expressed in SW620 cells



A: 将ROR1-CAR T细胞与SW620或SW620^{ΔGal-9}细胞按照5:1的比例共培养, 24 h后用ELISA检测上清液中的IL-2和IFN γ 的释放水平; B: SW620和SW620^{ΔGal-9}细胞被ROR1-CAR T细胞裂解的百分比; C: 将T细胞、ROR1-CAR T或TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞与SW620细胞按照5:1的比例共培养, 24 h后用ELISA检测上清中的IL-2和IFN γ 的释放水平; D: 评估T细胞、ROR1 CAR-T细胞和TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞对SW620细胞的裂解能力; E: T细胞、ROR1 CAR-T细胞和TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞分别与CFSE标记的SW620细胞按照1:1的比例共培养24 h, 收集孔中靶细胞进行PI染色, 流式细胞检测CFSE标记的靶细胞中PI阳性细胞所占的比例; F: 靶细胞杀伤比例统计分析; G: 将CFSE标记的ROR1-CAR T细胞和TIM-3-sh3 ROR1-CAR T细胞分别与SW620或SW620^{ΔROR1}细胞按照1:1的比例共培养, 72 h后收集细胞并通过流式细胞实验检测细胞的分裂能力。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A: ROR1-CAR T cells were co-cultured with SW620 or SW620^{ΔGal-9} cells at the ratio of 5:1 for 24 h, and then IL-2 and IFN γ in the supernatants was examined by ELISA; B: the percentage of SW620 and SW620^{ΔGal-9} cells lysed by ROR1-CAR T cells; C: T cells, ROR1-CAR T cells or TIM-3-sh3 ROR1-CAR T cells were co-cultured with SW620 cells at the ratio of 5:1 for 24 h, and then IL-2 and IFN γ in the supernatants was determined by ELISA; D: the lysis ability of T cells, ROR1-CAR T cells and TIM-3-sh3 ROR1-CAR T cells against SW620 cells were validated; E: T cells, ROR1-CAR T cells and TIM-3-sh3 ROR1-CAR T cells were co-cultured with CFSE-labeled SW620 cells at a ratio of 1:1 for 24 h, then the target cells in the wells were collected for PI staining, and the percentage of CFSE⁺PI⁺ cells within CFSE⁺ cells was determined by flow cytometry; F: statistical analysis of target cell killing ratio; G: CFSE-labeled ROR1-CAR T cells and TIM-3-sh3 ROR1-CAR T cells were co-cultured with SW620 or SW620^{ΔROR1} cells at the ratio of 1:1 for 72 h, respectively. Then, the ability of cell division were assessed by flow cytometry. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

图4 抑制TIM-3的表达增强了ROR1-CAR T细胞抗原依赖性的免疫应答和增殖活性

Fig.4 Antigen-dependent immune responses and proliferation of ROR1-CAR T cell were augmented by TIM-3 inhibition

用, ROR1-CAR T细胞与SW620^{Gal-9}细胞共培养上清中的LDH水平显著高于ROR1-CAR T细胞与野生型SW620细胞共培养上清中的LDH水平(图4B)。以上结果说明, Galectin-9可直接抑制CAR T细胞的免疫应答, 且其很可能是通过与CAR T细胞表面的TIM-3受体结合而起免疫负调控作用。因此, CAR T细胞表面TIM-3缺失可能会避免肿瘤细胞来源的Galectin-9对其的直接抑制作用。为了验证该推测, 我们将野生型SW620细胞分别与表达sh-NC或TIM-3-sh3的ROR1-CAR T细胞共培养。结果显示, SW620细胞与表达TIM-3-sh3的ROR1-CAR T细胞的共培养上清液中的IL-2、IFN γ 以及LDH含量更高(图4C和图4D)。为了进一步验证抑制TIM-3表达是否增强ROR1-CAR T细胞对靶细胞的杀伤作用, 我们将CFSE标记的SW620细胞分别与表达sh-NC或TIM-3-sh3的ROR1-CAR T细胞共培养后进行PI染色, 结果发现与表达TIM-3-sh3的ROR1-CAR T细胞共培养后, CFSE和PI双阳性SW620细胞比例显著升高(图4E和图4F)。有文献报道, 长效抑制PD-1的表达会损害CAR T细胞的增殖活性^[19]。因此, 紧接着我们验证同样作为抑制性免疫检查点分子的TIM-3, 长效抑制其表达是否影响ROR1-CAR T细胞的抗原依赖性增殖能力。我们将表达sh-NC和表达TIM-3-sh3的ROR1-CAR T细胞分别与野生型SW620细胞或ROR1基因敲除的SW620细胞(SW620^{AROR1})共培养。我们发现与野生型SW620共培养时, 表达TIM-3-sh3的ROR1-CAR T细胞分裂能力明显强于表达sh-NC的ROR1-CAR T细胞(图4G)。无论是表达TIM-3-sh3还是sh-NC的ROR1-CAR T细胞与SW620^{AROR1}细胞共培养均表现出细胞分裂停滞的状态(图4G)。以上结果表明, Galectin-9与TIM-3的相互作用可直接抑制CAR T细胞免疫应答, 抑制CAR T细胞TIM-3表达可增强其细胞毒性作用、效应细胞因子释放以及抗原依赖的细胞增殖能力。

3 讨论

活化的T细胞表达多种抑制性免疫检查点分子, 包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3等, 它们均为T细胞耗竭的标志物。这些免疫抑制性受体可与其配体相互作用导致T细胞功能紊乱、耗竭甚至凋亡。因此, 阻断抑制性受体和配体的结合可有效恢复T细胞的功能。依据该原理多种PD-1/PD-L1抑制

剂已经被成功开发和应用于临床, 并在多种肿瘤的治疗中展现出了显著的疗效^[20]。TIM-3是TIM家族成员之一, 最早被发现于分泌IFN γ 的CD4⁺和CD8⁺ T细胞中^[21-22]。通过对TIM-3功能的研究发现, TIM-3作为免疫抑制性受体在炎症调节、慢性病毒感染以及肿瘤的进展过程中扮演重要的角色^[23-25]。在体内非小细胞肺癌的动物模型实验中, 研究人员发现对PD-1单抗治疗耐药的小鼠体内T细胞的TIM-3表达上调, 联合TIM-3抗体治疗能够克服PD-1抗体的适应性耐药, 从而显著抑制肿瘤的生长并延长小鼠生存期^[26]。以上研究结果充分证明了TIM-3抑制性免疫检查点分子的特性, 因此基于阻断TIM-3信号通路的策略开发抗肿瘤药物前景广阔。目前, 针对TIM-3及其配体开发的药物已经相继进入临床研究阶段, 其中TIM-3抑制剂的研发竞争最为激烈, 使TIM-3成为继PD-1后最受关注的免疫检查点分子^[27]。然而, 近期的临床试验结果和早前的一些临床前研究表明TIM-3抑制剂的单药治疗效果甚微^[28]。其中可能的原因是TIM-3有多种不同的配体, 包括Galectin-9、PtdSer(phosphatidylserine)、CEACAM1以及HMGB1(high mobility group protein B1), 肿瘤微环境中不排除存在多种TIM-3配体共同参与调节TIM-3阳性T细胞的功能的情况, 而TIM-3抑制性单抗药物同时阻断上述四种配体与TIM-3的结合很难实现。研究表明, 实验过程中表现出抗肿瘤免疫应答的TIM-3抑制性单抗均无法阻断Galectin-9与TIM-3的结合^[23]。除了肿瘤微环境中TIM-3与其配体相互作用的复杂性以外, 在特定的组织环境中, 每种配体的分布和表达水平也可能决定了TIM-3的信号传递。本研究中发现我们在体外活化和扩增6天的T细胞中, TIM-3阳性细胞比例超过88%以上, 并且这一比例至少持续至活化后第15天(图2A和图2B)。因此, 体外制备的CAR T细胞很可能由于高表达TIM-3而受到肿瘤微环境中TIM-3配体的免疫负调控, 导致其抗肿瘤能力被削弱。SW620细胞是分泌高水平Galectin-9的ROR1阳性细胞, 敲除SW620细胞中的Galectin-9基因后则可以观察到ROR1-CAR T细胞的免疫应答和体外杀伤能力显著增强(图4A和图4B)。该实验结果说明了肿瘤细胞来源的Galectin-9可直接抑制CAR T细胞的抗肿瘤免疫活性, 也从侧面印证了特定肿瘤细胞表达的TIM-3配体的水平可能对TIM-3信号起到决定性的作用。

到目前为止, 仅仅 Galectin-9 与 TIM-3 相互作用发挥抑制免疫应答的作用被大量研究所证实, 其余配体与 TIM-3 结合对免疫应答产生的影响仍然不太清楚, 其中一些研究结论甚至截然相反。例如 CEACAM1 配体是否通过与 TIM-3 结合而发挥相应的免疫调节作用还不是那么确定^[23,29]。因此, 基于 TIM-3 配体开发的抗肿瘤药物, 其作用机制更为复杂且临床试验疗效更加不可预期。基于上述原因, 我们通过 shRNA 基因沉默技术长效抑制 ROR1-CAR T 细胞表面的 TIM-3 表达, 可以同时阻断多种配体对 CAR T 细胞的干扰, 尤其消除 Galectin-9 通过 TIM-3 介导的免疫抑制, 从而增强 CAR T 细胞的免疫应答。之前有文献报道, 通过 shRNA 抑制靶向间皮素 (mesothelin) 的 CAR (MSLN-CAR) T 细胞中的 PD-1 和 TIM-3 分子表达同样能够增强 MSLN-CAR T 细胞的免疫应答^[30-31]。这些结果表明, 抑制 CAR T 细胞表面免疫负调控检查点分子的表达是一种有效抵御抑制性肿瘤微环境的方法。然而也有研究发现, 长效抑制 PD-1 在 CAR T 细胞中的表达会导致 CAR T 细胞的增殖活性受到抑制, 从而破坏 CAR T 细胞的抗肿瘤功能^[19]。本研究发现, 抑制 TIM-3 的表达并不会影响 CAR-T 细胞的增殖活性, 反而会增强其抗原依赖性的增殖能力 (图 4G)。因此, 在选择阻断某种抑制性受体信号通路之前, 我们还需要充分了解短暂阻断和长效阻断该通路是否可对 CAR T 细胞的增殖活性和抗肿瘤活性造成不利影响, 否则可能会适得其反。

总而言之, 肿瘤微环境中的 Galectin-9 会通过 TIM-3 对 CAR T 细胞产生免疫负调控。通过基因敲除或敲降的方法阻断 TIM-3 信号通路可增强 CAR T 细胞的抗肿瘤活性和抗原依赖性的增殖能力, 这为增强 CAR T 细胞针对实体肿瘤的临床疗效提供了新的依据和思路。

参考文献 (References)

- [1] SINGH A K, MCGUIRK J P. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(3): e168-78.
- [2] MAROFI F, MOTAVALLI R, SAFONOV V R, et al. CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 81.
- [3] STRICKER S, RAUSCHENBERGER V, SCHAMBONY A. ROR-family receptor tyrosine kinases [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 123: 105-42.
- [4] MENCK K, HEINRICHS S, BADEN C, et al. The WNT/ROR pathway in cancer: from signaling to therapeutic intervention [J]. *Cells*, 2021, 10(1): 142.
- [5] ZHANG S, CHEN L, WANG-RODRIGUEZ J, et al. The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(6): 1903-10.
- [6] FUKUDA T, CHEN L G, ENDO T, et al. Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 3047-52.
- [7] ROSENWALD A, ALIZADEH A A, WIDHOPF G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia [J]. *J Exp Med*, 2001, 194(11): 1639-47.
- [8] CHOI M Y, WIDHOPF G F, GHIA E M, et al. Phase I trial: Cirmutuzumab inhibits ROR1 signaling and stemness signatures in patients with chronic lymphocytic leukemia [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6): 951-9.e3.
- [9] WALLSTABE L, GOTTLICH C, NELKE L C, et al. ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models [J]. *JCI Insight*, 2019, 4(18): e126345.
- [10] STUBER T, MONJEZI R, WALLSTABE L, et al. Inhibition of TGF-beta-receptor signaling augments the antitumor function of ROR1-specific CAR T-cells against triple-negative breast cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000676.
- [11] SRIVASTAVA S, FURLAN S N, JAEGER-RUCKSTUHL C A, et al. Immunogenic chemotherapy enhances recruitment of CAR-T cells to lung tumors and improves antitumor efficacy when combined with checkpoint blockade [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(2): 193-208.e10.
- [12] BALAKRISHNAN A, GOODPASTER T, RANDOLPH-HA-BECKER J, et al. Analysis of ROR1 protein expression in human cancer and normal tissues [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(12): 3061-71.
- [13] BERGER C, SOMMERMEYER D, HUDECEK M, et al. Safety of targeting ROR1 in primates with chimeric antigen receptor-modified T cells [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(2): 206-16.
- [14] MIRZAEI H R, RODRIGUEZ A, SHEPPHARD J, et al. Chimeric antigen receptors T cell therapy in solid tumor: challenges and clinical applications [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1850.
- [15] MA S, LI X, WANG X, et al. Current progress in CAR-T cell therapy for solid tumors [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(12): 2548-60.
- [16] SANCHEZ-FUEYO A, TIAN J, PICARELLA D, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(11): 1093-101.
- [17] ACHARYA N, SABATOS-PEYTON C, ANDERSON A C, et al. Tim-3 finds its place in the cancer immunotherapy landscape [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000911.
- [18] SEHRAWAT S, REDDY P B, RAJASAGI N, et al. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(5): e1000882.
- [19] WEI J, LUO C, WANG Y, et al. PD-1 silencing impairs the anti-tumor function of chimeric antigen receptor modified T cells by inhibiting proliferation activity [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 209.
- [20] ROBERT C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer

- therapy [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3801.
- [21] MONNEY L, SABATOS C A, GAGLIA J L, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease [J]. *Nature*, 2002, 415: 536-41.
- [22] KUCHROO V K, DARDALHON V, XIAO S, et al. New roles for TIM family members in immune regulation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 577-80.
- [23] WOLF Y, ANDERSON A C, KUCHROO V K. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(3): 173-85.
- [24] ZHU C, SAKUIISHI K, XIAO S, et al. An IL-27/NFIL3 signaling axis drives Tim-3 and IL-10 expression and T-cell dysfunction [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6072.
- [25] FERRIS R L, LU B, KANE L P. Too much of a good thing? Tim-3 and TCR signaling in T cell exhaustion [J]. *J Immunol*, 2014, 193(4): 1525-30.
- [26] KOYAMA S, AKBAY E A, LI Y Y, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10501.
- [27] ROMERO D. Immunotherapy: PD-1 says goodbye, TIM-3 says hello [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(4): 202-3.
- [28] HARDING J J, MORENO V, BANG Y J, et al. Blocking TIM-3 in treatment-refractory advanced solid tumors: a phase Ia/b study of LY3321367 with or without an anti-PD-L1 antibody [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(8): 2168-78.
- [29] DE SOUSA LINHARES A, KELLNER F, JUTZ S, et al. TIM-3 and CEACAM1 do not interact in cis and in trans [J]. *Eur J Immunol*, 2020, 50(8): 1126-41.
- [30] LIU G, ZHANG Q, LI D, et al. PD-1 silencing improves anti-tumor activities of human mesothelin-targeted CAR T cells [J]. *Hum Immunol*, 2021, 82(2): 130-8.
- [31] JAFARZADEH L, MASOUMI E, MIRZAEI H R, et al. Targeted knockdown of Tim3 by short hairpin RNAs improves the function of anti-mesothelin CAR T cells [J]. *Mol Immunol*, 2021, 139: 1-9.