

# T细胞直接重编程为其他免疫细胞的研究现状

张艳<sup>1\*</sup> 郭小刚<sup>2</sup> 吴东颖<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>山东荆卫生物科技有限公司, 潍坊市抗衰老研究重点实验室, 潍坊 261000;

<sup>2</sup>潍坊市第五人民医院医美中心, 潍坊 261045)

**摘要** T细胞是一种终末分化的循环淋巴细胞,其目前常被用于细胞免疫疗法。在目前的细胞免疫疗法中,患者的T细胞在体外活化、扩增或基因工程改造后被回输到患者体内。虽然这种策略已被证明对黑色素瘤、淋巴细胞白血病和B细胞淋巴瘤等癌症有效,但是体外扩增的大部分T细胞是效应T细胞。效应T细胞生存能力有限,难以长期维持抗肿瘤作用。因此,低分化的T细胞是提高细胞免疫疗法的关键。目前,高分化的T细胞通过细胞重编程可以直接被诱导为低分化的T细胞和非T谱系的免疫细胞。同时,诱导的免疫细胞具有较强的增殖和抗肿瘤等能力,有助于开发新的和更有效的细胞免疫疗法。该文首先介绍了T细胞发育和分化过程,重点综述了T细胞直接被诱导为不同免疫细胞的研究进展,进一步阐述了诱导的免疫细胞功能,为促进细胞免疫治疗领域的深入研究和应用提供参考。

**关键词** T细胞; 重编程; 免疫细胞; 低分化的T细胞

## Research Status of T Cells Directly Reprogramming to Other Immune Cells

ZHANG Yan<sup>1\*</sup>, GUO Xiaogang<sup>2</sup>, WU Dongying<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Weifang Key Laboratory of Anti-Aging Research, Shandong Jingwei Biotechnology Co.,Ltd., Weifang 261000, China;

<sup>2</sup>Weifang Fifth People's Hospital Medical Beauty Center, Weifang 261045, China)

**Abstract** The T cells, which are often applied to cellular immunotherapy, are terminally differentiated circulating lymphocytes. In current cellular immunotherapy, the patient's T cells, which are activated, amplified or genetically engineered *in vitro*, are injected back into the patient. Although this strategy have been proved effective in cancers such as melanoma, lymphocytic leukemia and B-cell lymphoma, the majority of T cells amplified *in vitro* are effector T cells. The effector T cells have limited viability and are difficult to maintain their antitumor effects for a long time. Therefore, less differentiated T cells are the key to improving cellular immunotherapy. At present, highly differentiated T cells can be directly induced into less differentiated T cells and non-T lineage immune cells through cell reprogramming. At the same time, the induced immune cells have strong proliferation and antitumor ability, which is helpful to develop new and more effective cellular immunotherapy. This article firstly introduces the development and differentiation of T cells, focuses on the research progress on direct reprogramming of T cells into different immune cells, and further expounds the functions of the induced immune cells, so as to provide a reference for the further in-depth research and application in cellular immunotherapy.

**Keywords** T cell; reprogramming; immune cells; less differentiated T cells

一直以来,已分化的体细胞被认定为细胞发育的最终阶段,不会转化为低分化的细胞。但是,细胞重编程技术打破了传统的思维。2006年,TAKA-

HASHI和YAMANAKA<sup>[1]</sup>将小鼠成纤维细胞重编程为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。随后,人角质形成细胞、人胚胎肾皮质细

收稿日期: 2022-06-02

接受日期: 2022-09-29

\*通讯作者。Tel: 15614611965, E-mail: zy15614611965@163.com

Received: June 2, 2022

Accepted: September 29, 2022

\*Corresponding author. Tel: +86-15614611965, E-mail: zy15614611965@163.com

胞、输卵管上皮细胞等被重编程为iPSCs<sup>[2-5]</sup>。但是这些供体细胞取材不便、获取不易、创伤大,在体外扩增极易造成基因突变,并且异体来源的供体细胞会引起免疫排斥反应。而T细胞作为供体细胞,可避免上述缺点,具有创伤小、采集方便、细胞亚群多、安全性高等优势。因此,T细胞目前常被用作细胞重编程的供体细胞,其已成为细胞重编程领域新的研究热点。

近几年,不同类型的T细胞被重编程为iPSCs,T细胞衍生的iPSCs能再分化为不同的T细胞亚群或非T谱系的体细胞<sup>[6-14]</sup>。这种重编程方法虽然能够获得不同的体细胞,但存在耗时长、成本高和操作复杂等缺点。此外,高分化的T细胞(分化程度高于中央记忆性T细胞的T细胞)还能不经多能性干细胞的中间过程被直接重编程为非T谱系的免疫细胞,也可以被直接重编程为低分化的T细胞(分化程度低于中央记忆性T细胞的T细胞)<sup>[15-16]</sup>。此重编程方法具有成本低、时间短和操作简单等优势,既可避免干细胞使用引发的伦理争议,还可降低肿瘤形成的风险。同时,诱导的免疫细胞在体内外具有较强的增殖和抗肿瘤等能力,允许进一步的基因改造,有助于开发新的和更有效的细胞免疫治疗方法。因此,本文现就T细胞为供体细胞直接诱导为免疫细胞的相关研究进展作一综述。

## 1 T细胞发育与分化

### 1.1 T细胞发育和成熟

T细胞是一种终末分化的循环淋巴细胞,起源于造血干细胞,成熟于胸腺。造血干细胞可产生所有血细胞谱系,可在骨髓中分化为淋巴样祖细胞<sup>[17-18]</sup>。淋巴样祖细胞经血液运输到达胸腺,开始T细胞发育,经过Notch信号刺激产生双阴性T细胞<sup>[19-20]</sup>。随后,双阴性T细胞经过T细胞受体(T cell receptor, TCR)重排产生双阳性T细胞<sup>[20-22]</sup>。双阳性T细胞通过主要组织相容性复合体与阴性选择成为CD4<sup>+</sup>初始T细胞(naïve T cells, T<sub>N</sub> cells)和CD8<sup>+</sup> T<sub>N</sub>细胞<sup>[23-24]</sup>(图1)。

### 1.2 T细胞分化

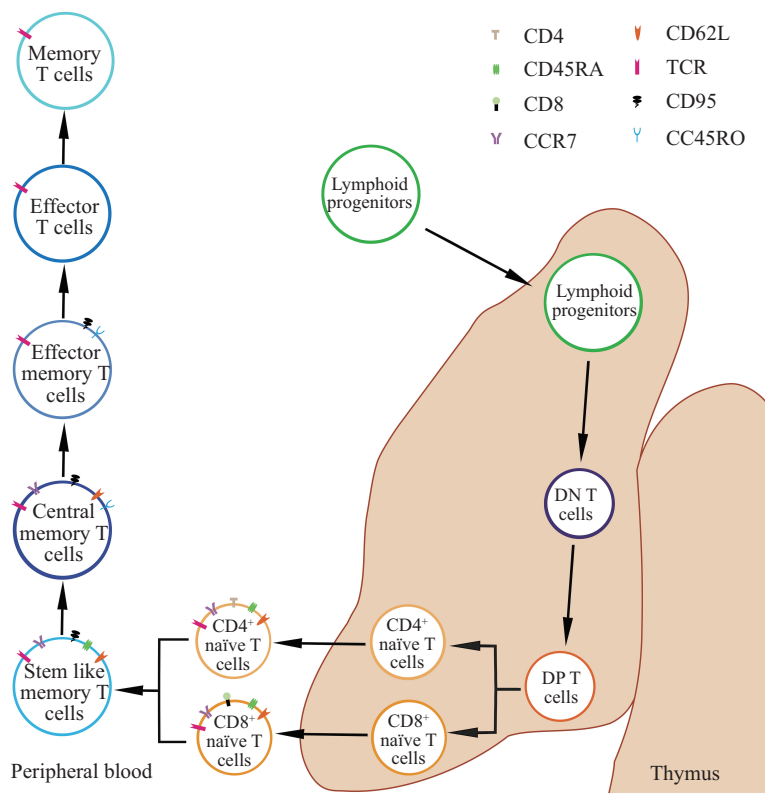
一直以来,T<sub>N</sub>细胞被认为可直接分化为效应T细胞(effector T cells, T<sub>EFF</sub> cells)。但是,近几年,T细胞渐进分化模型被提出,打破了传统的思维。T细胞渐进分化模型认为,T<sub>N</sub>细胞经抗原激活后逐步分化为干细胞样记忆性T细胞(stem like memory T cells, T<sub>SCM</sub>

cells)、中枢记忆性T细胞(central memory T cells, T<sub>CM</sub> cells)、效应记忆性T细胞(effector memory T cells, T<sub>EM</sub> cells)和T<sub>EFF</sub>细胞<sup>[19,25-29]</sup>(图1)。另外,T<sub>N</sub>细胞在没有抗原和共刺激配体条件下保持静止状态,经血液运输到身体各个器官和组织,暂存于淋巴组织中<sup>[21]</sup>。激活的T<sub>N</sub>细胞最终分化为辅助性T细胞(helper T cells, Th)、调节性T细胞和细胞毒性T淋巴细胞等T<sub>EFF</sub>细胞。少部分T<sub>EFF</sub>细胞还能去分化为记忆T细胞<sup>[30]</sup>。随着T细胞逐渐分化,T细胞的生存能力、增殖潜能和治疗效果逐渐下降,效应功能不断增强。因此,维持T细胞低分化状态是提高T细胞增殖能力和治疗效果的关键。

## 2 以T细胞为供体细胞的重编程方法

然而,低分化的T细胞在外周血中数目相对较少,其中,人T<sub>SCM</sub>细胞只占有循环T细胞的2%~3%<sup>[31]</sup>。另外,T细胞通过TCR识别和其他炎症信号的共同作用建立抗原特异性反应,不能对广泛的危险信号作出反应<sup>[32]</sup>。上述因素限制了T细胞在细胞免疫和肿瘤治疗等方面的应用,导致科研工作者探索获取低分化T细胞或其他免疫细胞的重编程方法。

目前,病毒载体、编码转录因子的信使RNA(messenger RNA, mRNA)、小分子化合物和细胞因子等已被用于以T细胞为供体细胞的重编程。逆转录病毒和慢病毒载体在以T细胞为供体细胞的重编程过程中被用来传递目的基因,并将目的基因整合到细胞基因组中<sup>[33]</sup>。这两种病毒载体介导的目的基因随细胞内源基因表达而表达,对T细胞进行重编程,但其残留活性或重新激活可能会影响细胞的发育过程和功能,并可能导致肿瘤的形成。为了产生基因非整合的诱导细胞,可以使用细胞质mRNA、小分子化合物和细胞因子,对T细胞进行重编程,或者促进诱导的免疫细胞生成。体外转录的mRNA能通过电穿孔技术被导入到T细胞中,并且有效表达目的基因<sup>[29]</sup>。mRNA不具有插入突变的风险,在生成具有更安全的诱导细胞方面相对有优势,但是mRNA介导的重编程也存在一定的弊端,比如mRNA具有降解迅速和价格昂贵等缺点。然而,小分子化合物和细胞因子有效地避免了mRNA的缺点,还能有效地对T细胞进行重编程,获得诱导的免疫细胞。组蛋白去乙酰酶抑制剂和IL-2联合应用能



DN T cells: 双阴性T细胞; DP T cells: 双阳性T细胞。

DN T cells: double-negative T cells; DP T cells: double-positive T cells.

图1 人T细胞的发育和分化

Fig.1 The development and differentiation of the human T cell

对T细胞进行直接重编程<sup>[34]</sup>。此外, IL-2能显著促进诱导的免疫细胞增殖, 能增加约十倍的诱导细胞数目<sup>[35]</sup>。同样, IL-7和IL-15也能促进诱导的免疫细胞生成, 能增加数倍的诱导细胞数目<sup>[36]</sup>。与其他重编程方法相比, 小分子化合物和细胞因子易于大量制备、剂量调控和时间控制等, 具有一些独特的优势。因此, 小分子化合物和细胞因子也许是建立T细胞直接诱导为其他免疫细胞的有力平台。

### 3 高分化的T细胞诱导为低分化的T细胞

T细胞的生存能力和增殖潜能随分化程度而变化, 低分化的T细胞增殖和分化能力强于高分化的T细胞, 更有利于细胞免疫治疗。因此, 为了获取低分化的T细胞, 科研人员逆T细胞分化方向, 利用细胞因子、小分子化合物和转录因子等将高分化的T细胞直接重编程为低分化的T细胞<sup>[29,37]</sup>(表1)。

2020年, FRUMENTO等<sup>[37]</sup>发现, IL-7改变了体外分化的人脐带血T细胞RUNX、STAT和BATF表观遗传修饰, 使最近分化的CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>细胞重新

表达CD45RA、CD62L和CCR7, 还使细胞丢失了CD45RO, 将CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>细胞直接重编程为诱导的干细胞样记忆性T细胞(简称为iT<sub>SCM</sub>细胞)。为了验证该方法不局限于脐带血T细胞, 他们对体外培养的成人外周血T细胞进行重编程, 发现IL-7只能将来自成人外周血最近分化的T<sub>EM</sub>细胞重编程为iT<sub>SCM</sub>细胞, 并且重编程效率不同。重编程效率不同的原因可能是人外周血T细胞的染色质状态不同于脐带血T细胞。同样, KONDO等<sup>[16,38]</sup>利用表达人Notch配体的OP9细胞将体外激活培养的人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>细胞重编程为iT<sub>SCM</sub>, 发现表达人Notch配体的OP9细胞激活T细胞Notch信号通路, 增加了Notch靶基因叉头框蛋白M1表达量, 诱导了供体细胞表达CD45RA、CD95和CCR7, 使供体细胞下调了程序性死亡受体-1和细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4表达。该团队还发现表达人Notch配体的OP9细胞能将体外激活培养的人T细胞重编程为诱导的中枢记忆性T细胞(简称为iT<sub>CM</sub>细胞), 表达小鼠Notch配体的OP9细胞也能将小鼠Th2和Th17等效应T细胞重编程为iT<sub>SCM</sub>细胞<sup>[38]</sup>。

$T_{\text{EFF}}$ 细胞不仅能被直接重编程为 $iT_{\text{SCM}}$ 细胞, 而且还能被直接重编程为 $iT_{\text{CM}}$ 细胞和双阴性T细胞等低分化的T细胞。2020年, WANG等<sup>[34]</sup>发现, 组蛋白去乙酰酶抑制剂可增加细胞毒性T淋巴细胞组蛋白乙酰化水平, 为IL-21激活的STAT3提供启动子结合位点, 从而促进CD28表达。组蛋白去乙酰酶抑制剂和IL-21联合作用增强了淋巴增强子结合因子1、CD62L和CCR7等中央记忆性T细胞相关基因和蛋白质的表达能力, 减少了 $T_{\text{EFF}}$ 细胞相关基因的表达量, 将细胞毒性T淋巴细胞重编程为 $iT_{\text{CM}}$ 细胞。与细胞毒性T淋巴细胞相似, 组蛋白去乙酰酶抑制剂和IL-2联合作用也能上调肿瘤浸润性淋巴细胞CD28和CD62L的表达, 将细胞重编程为 $iT_{\text{CM}}$ 细胞。此外, 2022年, YAN团队<sup>[33]</sup>发表了关于 $T_{\text{EFF}}$ 重编程的最新研究成果, 发现BCL6、Eomes和FOXP1等转录因子上调ACTN1、CD62L和CCR7等早期相关基因和蛋白质表达, 下调颗粒酶B和CD45RO等晚期相关基因和蛋白质表达, 将 $T_{\text{EFF}}$ 细胞重编程为早期T细胞。早期研究还发现, Sox2、Oct4和Nanog蛋白质使小鼠肿瘤浸润细胞毒性T淋巴细胞表达CD44、CD62L和CD27, 导致细胞丢失CD8, 将细胞转化为双阴性T细胞<sup>[39]</sup>。

高分化T细胞向低分化T细胞的重编程现象不仅存在于体外, 也存在于体内。 $T_{\text{EM}}$ 细胞亚群向 $T_{\text{CM}}$ 细胞亚群逆转的现象已在小鼠体内被发现, 并且也存在于造血干细胞移植后的患者体内。同样,  $T_{\text{EM}}$ 细胞亚群向 $T_{\text{SCM}}$ 细胞亚群和 $T_{\text{CM}}$ 细胞亚群向 $T_{\text{SCM}}$ 细胞亚群逆转的现象也在造血干细胞移植后的患者体内被发现<sup>[40-41]</sup>。

上述重编程具有广泛的应用前景和价值, 能应用到嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T, CAR-T)细胞疗法中, 为CAR-T细胞疗法提供低分化的T细胞, 并赋予CAR-T细胞更强的增殖和分化能力。然而, 迄今为止, 只有Notch信号通路介导的T细胞重编程被应用于CAR-T细胞疗法, 将CAR-T细胞转变为CAR- $iT_{\text{SCM}}$ 细胞, 提高了CAR-T细胞的增殖和抗肿瘤等能力。小分子化合物和细胞因子等介导的T细胞重编程在CAR-T细胞疗法方面未进行相关研究和应用, 但已被证实能提高T细胞增殖和抗肿瘤能力。此外, 细胞因子、小分子化合物或转录因子等皆能将高分化的T细胞重编程为低分化的T细胞, 但是细胞因子的作用能被细胞因子信号转导抑制因子

减弱; 有效小分子化合物的筛选非常耗费成本、时间和精力等; 转录因子的应用涉及基因突变、基因插入、表观遗传改变等。另外, 同一细胞因子在不同的T细胞重编程体系中可能发挥不同的作用, 例如, IL-7在Notch信号通路介导的T细胞重编程中发挥维持T细胞增殖的作用, 不发挥细胞重新编程的作用<sup>[38]</sup>。因此, 细胞因子和小分子化合物等介导的重编程在高分化T细胞直接诱导为低分化T细胞方面还需进一步完善和优化。

#### 4 T细胞直接诱导为非T谱系的免疫细胞

T细胞不仅可以被直接重编程为低分化T细胞, 而且还能被直接重编程为非T谱系的免疫细胞。2006年, LAIOSA团队<sup>[42]</sup>发现, CCAAT/增强子结合蛋白 $\alpha$ 基因能促进髓系基因表达, 抑制T细胞相关基因表达, 将小鼠双阴性T细胞重编程为巨噬细胞。自此之后, 以T细胞为供体细胞的直接重编程研究相继被报道。2010年, LI等<sup>[35]</sup>敲除小鼠T细胞*BCL11b*, 发现BCL11b缺失导致双阴性、双阳性、CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>等T细胞获得自然杀伤细胞(natural killer cells, NK cells)的特性, 使细胞表达NKp46和CD122等, 并导致T细胞丢失或抑制了CD3、*Notch1*和*TCF1*等T细胞相关基因表达, 将T细胞重编程为诱导性T样自然杀伤细胞(induced T-to-natural killer cells, ITNKs)。此外, 2022年, JIANG团队<sup>[15]</sup>以人外周血或脐带血T细胞为供体细胞进行了相似的重编程研究, 通过CRISPR/Cas9基因编辑技术成功地敲除体外培养的人T细胞*BCL11B*, 发现人T细胞中BCL11B的急性失活, 能诱导T细胞表达NKp30、NKp46和CD56等NK细胞受体, 减少了*TCF7*和*LEF1*等T细胞相关基因表达量, 将人CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和 $\gamma\delta$ 等T细胞诱导为ITNKs(表1)。

目前, 通过上述重编程体系诱导的细胞主要是ITNKs和巨噬细胞, 且保留了*TCR*基因重排的特征。*TCR*基因重排的存在可能限制或影响诱导的免疫细胞功能, 甚至有可能使诱导的细胞重新恢复为T细胞。然而, *TCR*基因重排是从双阴性T细胞形成时期出现, 一般长久存在于外周血T细胞中。因此, 只要使用外周血T细胞作为供体细胞, *TCR*基因重排就可能存在于诱导的非T谱系的免疫细胞中, 并且不易被去除。此外, 虽然CRISPR/Cas9技术成功敲除了T细胞*BCL11B*, 成功诱导出ITNKs, 但*BCL11B*敲除的脱

表1 以T细胞为供体细胞的直接重编程结果  
Table 1 Results of direct reprogramming using T cells as donors

| 供体细胞<br>Donor cells                                            | 诱导的细胞<br>Induced cells            | 共培养或处理<br>Coculture or operation            | 物种<br>Species | 供体细胞特征<br>Characterization of donor cells                             | 诱导的细胞特征<br>Characterization of induced cells                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Recently differentiated CD8 <sup>+</sup> T <sub>EM</sub> cells | Induced stem like memory T cells  | IL-7                                        | Human         | CD45RA, CD62L and CCR7 weren't expressed and CD45RO was expressed     | Co-expression of CD45RA, CCR7, CD62L and CD27. They didn't express CD45RO                                                          |
| Activated T cells                                              | Induced stem like memory T cells  | OP9-hDL1 cells                              | Human         | Co-expression of CD45RO and CD95. They didn't express CD45RA and CCR7 | Co-expression of CD45RA, CCR7 and CD95. They didn't express CD45RO, and exhibited stronger proliferative ability                   |
| Activated T cells                                              | Induced stem like memory T cells  | OP9-DL1 cell                                | Mice          | They were high expression of CD44                                     | They expressed naïve marks, CD-44 <sup>lo</sup> CD62L <sup>hi</sup>                                                                |
| Activated T cells                                              | Induced central memory T cells    | OP9-hDL1 cells                              | Human         | Co-expression of CD45RO and CD95. They didn't express CD45RA and CCR7 | Co-expression of CD45RO, CCR7 and CD95. They didn't express CD45RA                                                                 |
| Tumor-infiltrating lymphocytes                                 | Induced central memory T cells    | Histone deacetylase inhibitors and IL2      | Human         | Low expression of CD62L and CD28                                      | Compared with donor cells, they increased expression of CD28 and CD62L                                                             |
| Cytotoxic T lymphocyte cells                                   | Induced central memory T cells    | Histone deacetylase inhibitors and IL2      | Human         | They didn't express CD62L and CD28, and expressed CD45RO              | They expressed CD28 and CD62L, highly expressed central memory-associated genes, and low expressed effector function-related genes |
| Tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes                     | Double-negative T cell            | Overexpressed Sox2, Oct4 and Nanog proteins | Mice          | They was responsive to antigen stimulation and expressed CD8          | They was unresponsive to antigen stimulation, had Stronger ability of survival and proliferation, and didn't express CD8           |
| T cells                                                        | Induced T-to-natural killer cells | BCL11b deletion                             | Mice          | They had T cell properties                                            | They had NK and T cells properties                                                                                                 |
| CD8 <sup>+</sup> T, CD4 <sup>+</sup> T, γδ T, and MAIT cells   | Induced T-to-natural killer cells | BCL11b deletion                             | Human         | They had T cell properties                                            | They had NK and T cells properties                                                                                                 |

NK cell: 自然杀伤细胞; OP9-hDL1 cells: 表达人Delta-like 1的OP9细胞; OP9-DL1 cells: 表达鼠Delta-like 1的OP9细胞; PD-1: 程序性死亡-1。  
NK cells: natural killer cells; OP9-hDL1 cells: human delta-like 1 expressing-OP9 cells; OP9-DL1 cells: mouse delta-like1 expressing-OP9 cells; PD-1: programmed death-1.

靶现象有可能存在于细胞重编程过程中。所以, T细胞直接诱导为非T谱系的免疫细胞的重编程, 仍然存在许多问题与挑战。

5 诱导的免疫细胞功能

随着年龄的增长, 免疫系统的大量重塑导致其先天免疫(NK细胞、巨噬细胞)和适应性免疫(T细胞、具有抑制活性的调节性T细胞)功能活性下降, 增加慢性疾病、感染、肿瘤发生和疫苗接种失败的风险<sup>[43]</sup>。然而, 细胞免疫治疗有可能缓解癌症和传染病等疾病进程, 提高患者生活质量。但是, 体外扩增的免疫效应细胞不能持久地发挥作用, 缺乏按需应变的可用性<sup>[44]</sup>。T细胞诱导的免疫细胞有望解决这些局

限性, 并发挥强大的免疫功能。目前, T细胞诱导的免疫细胞有iT<sub>SCM</sub>细胞、iT<sub>CM</sub>细胞和ITNKs等。其中, iT<sub>SCM</sub>细胞和ITNKs的功能被了解和认识地比较全面, 在体内外皆具有抗肿瘤作用。

5.1 诱导的干细胞样记忆性T细胞功能

诱导的干细胞样记忆性T细胞(简写为iTscm细胞)是一种独特的T细胞, 即具有T<sub>N</sub>和T<sub>SCM</sub>细胞的部分特征, 也具有不同于T<sub>N</sub>和T<sub>SCM</sub>细胞的特征。iTscm细胞与T<sub>N</sub>和T<sub>SCM</sub>细胞相同, 表达CD45RA、CD62L和CCR7等, 不表达CD45RO。它还高表达CD25, 低表达CD127, 但是T<sub>N</sub>和Tscm细胞低表达CD25, 高表达CD127<sup>[19,37]</sup>。另外, iTscm细胞在体外再次被激活后能比T<sub>N</sub>细胞更快地增殖, 并迅速地分化为功能效应细胞, 而且由iTscm细

胞分化而来的效应记忆性 T 细胞表达穿孔素和颗粒酶 B, 并对靶细胞发挥杀伤作用<sup>[37-38]</sup>。同样, iT<sub>SCM</sub> 细胞被移植到小鼠体内, 20 天后大量的 iT<sub>SCM</sub> 细胞被检测到, 其分裂能力也明显强于 T<sub>N</sub> 和 T<sub>CM</sub> 等细胞, 并且约 70% 来自 iT<sub>SCM</sub> 细胞的 T 细胞保留了 T<sub>SCM</sub> 表型特征。iT<sub>SCM</sub> 细胞连续在 3 只小鼠体内移植, 由 iT<sub>SCM</sub> 细胞衍生的 T 细胞在第 3 只小鼠的次级淋巴器官中被检测到, 但是 T<sub>N</sub> 细胞在第 2 只小鼠和第 3 只小鼠体内均未被检测到<sup>[38]</sup>。这些研究结果表明 iT<sub>SCM</sub> 细胞能快速地增殖和分化, 具有自我更新能力。

iT<sub>SCM</sub> 细胞不仅表现出较强的增殖和自我更新能力, 而且对细胞周期阻滞和凋亡具有抵抗性, 这提示 iT<sub>SCM</sub> 细胞更有可能应用于过继性肿瘤免疫治疗<sup>[38,45-46]</sup>。研究也发现, T 细胞淋巴瘤特异性 iT<sub>SCM</sub> 细胞在小鼠 T 细胞淋巴瘤模型中抑制肿瘤细胞生长, 且其抑制效果明显强于 T 细胞淋巴瘤特异性 T<sub>N</sub> 细胞和活化的 T 细胞<sup>[38]</sup>。同样, 在人源化 EB 病毒转化肿瘤模型中, EB 病毒特异性 iT<sub>SCM</sub> 细胞对淋巴母细胞系具有抑制作用, 而且其抑制效果明显强于 EB 病毒特异性 T<sub>CM</sub> 和 T<sub>EM</sub> 细胞<sup>[36]</sup>。因此, iT<sub>SCM</sub> 细胞具有强大的抗肿瘤作用, 提高了肿瘤小鼠的存活率, 适合用于过继性癌症免疫治疗。

基于 iT<sub>SCM</sub> 细胞的特性, iT<sub>SCM</sub> 细胞已被应用到 CAR-T 细胞治疗领域, 被赋予进一步识别肿瘤的能力。CAR-iT<sub>SCM</sub> 细胞能显著减少小鼠外周血中的人急性淋巴细胞白血病细胞数量, 在细胞移植后 7~10 天几乎完全消除了小鼠体内的人急性淋巴细胞白血病细胞, 但是 CAR-T 细胞不能达到此效果。另外, 移植 CAR-iT<sub>SCM</sub> 细胞的小鼠体内存在 70% 以上的 T<sub>SCM</sub> 细胞表型特征的 T 细胞, 然而, 移植 CAR-T 细胞的小鼠体内仅存在约 16% 的 T<sub>SCM</sub> 细胞表型特征的 T 细胞<sup>[16]</sup>。这些数据表明, CAR-iT<sub>SCM</sub> 细胞比传统 CAR-T 细胞具有更高的抗肿瘤能力, 具有长期存在于体内的潜力。

根据目前 iT<sub>SCM</sub> 细胞所了解的特性和功能, iT<sub>SCM</sub> 能解决体外长期培养的 T 细胞生存能力低下和 T 细胞衰竭等问题, 为细胞免疫治疗提供了一种有前景的治疗策略。它还能被应用于 CAR-T 细胞疗法、癌症治疗和疫苗研发等, 具有较好的治疗或预防目的。然而, 关于 iT<sub>SCM</sub> 细胞用于过继性癌症免疫治疗的研究还未达到临床试验阶段, 而且大多数研究仅在动物模型中进行。此外, iT<sub>SCM</sub> 细胞在细胞免疫治疗中可能提供长期的免疫作用, 这就有可能导致部分

iT<sub>SCM</sub> 细胞识别自身抗原, 在极端情况下打破免疫耐受。因此, 科研工作者还需要解决 iT<sub>SCM</sub> 细胞在自身免疫中的作用以及在体内的作用机制等问题, 才有可能在临床应用中更好地发挥 iT<sub>SCM</sub> 的作用。

## 5.2 诱导性 T 样自然杀伤细胞 (ITNKs) 功能

目前, ITNKs 可由人和小鼠 T 细胞诱导而来, 是一种具有 T 细胞和 NK 细胞特征的免疫细胞。人 ITNKs 表达锌指蛋白基因、CD56 和 NKp30 等 NK 细胞相关基因和蛋白质, 还表达细胞周期素基因、JUN、CD3 和 CD4 等 T 细胞相关基因和蛋白质; 在抗 CD3/CD28、抗 NKp30 或抗 NKp46 抗体等刺激下皆能分泌 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  等促炎细胞因子。人 ITNKs 还能在体外有效地裂解 K562 细胞、人卵巢癌细胞、海拉细胞系和肝癌细胞等, 但对人前 B 急性淋巴细胞白血病细胞表现出有限的细胞毒性。人 ITNKs 不仅在体外具有杀伤肿瘤细胞的作用, 而且在体内也能杀伤肿瘤细胞。人 ITNKs 移植到 K562 细胞处理的免疫受损小鼠中, 降低了小鼠肿瘤负担, 并延长了小鼠存活时间。与 K562 细胞处理的免疫受损小鼠相似, ITNKs 能抑制肝细胞癌人源异种移植模型的实体肿瘤细胞, 而且 ITNKs 的治疗效果优于 T 细胞和 NK 细胞<sup>[15]</sup>。同样, 小鼠 ITNKs 在体外识别和杀伤小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 和人淋巴瘤细胞, 在体内减少了小鼠黑色素瘤转移瘤, 并且不攻击正常细胞<sup>[35]</sup>。这些研究结果证明 ITNKs 兼具 T 细胞与 NK 细胞的生物学表型及相应的细胞学功能, 能识别并选择性杀伤肿瘤细胞, 有效地抑制血源性和实体肿瘤。

此外, ITNKs 已被应用到嵌合抗原受体疗法中, 进一步提高了 ITNKs 识别和杀伤肿瘤的能力。研究也发现, 与 ITNKs 或表达特异抗原的 CAR-T 细胞相比, 表达 CAR-GPC3 或 CAR-CD19 的 ITNKs 在体内对肝癌细胞或表达人 CD19 的 K562 细胞的裂解效率更高, 而且表达 CAR-CD19 的 ITNKs 在体外对 NALM-6 细胞具有杀伤作用, 但是 ITNKs 不能杀伤该细胞系<sup>[15]</sup>。因此, 用 CAR 分子靶向特异性肿瘤抗原设计的 ITNKs 不仅提高了 ITNKs 识别肿瘤的特异性, 而且还进一步增强了 ITNKs 的细胞毒性。另外, ITNKs 已被应用到一项临床研究中, 被评估在晚期恶性实体瘤患者中的安全性和有效性。2022 年, JIANG 等<sup>[15]</sup>发现, 回输的自体 ITNKs 稳定了 5 名晚期实体瘤患者的病情, 减小了 1 名晚期实体瘤患者的肿瘤病灶, 最终稳定了约 66.6 % 的晚期实体瘤患者病

情,且在所有患者中均未出现严重的不良反应。此临床研究结果为细胞免疫疗法提供了一个新的选择,也为诱导的免疫细胞临床应用提供了可行性依据。

与目前正在临床测试的免疫细胞相比,ITNKs可以大量增殖,广泛且有效地杀伤血源性和实体肿瘤,没有明显的严重副作用,并允许进一步的基因工程改造。ITNKs还具有较高的慢病毒转导效率,易于生成表达特异抗原的ITNKs,并能被导入自杀基因,避免潜在的淋巴细胞白血病发生。所以,ITNKs在用于多种类型的血液或实体肿瘤方面可能是一种更可行和更强大的选择。然而,不同T细胞亚群来源的ITNKs具有不同的表面标记,对肿瘤的作用也不同,例如CD8<sup>+</sup>T细胞来源的ITNKs表达NKp46,并且能有效地裂解K562细胞,但CD4<sup>+</sup>T细胞来源的ITNKs不具有这些特性<sup>[15]</sup>。ITNKs还存在体内外抗肿瘤效果的差异,在体外裂解K562细胞和肝癌细胞方面弱于NK细胞,但在体内抑制K562细胞和多种类型的实体瘤生长方面具有优势。因此,关于ITNKs的进一步研究和应用需要根据不同的肿瘤疾病确定最有效的ITNK亚群,还需探究ITNKs被激活以及其在体内微环境中消除肿瘤的机制等。

## 6 总结与展望

综上所述,淋巴组细胞在胸腺中逐渐分化为T<sub>N</sub>细胞,T<sub>N</sub>细胞在外周血中经抗原刺激后逐渐分化为T<sub>EFF</sub>细胞。基于T细胞作为供体细胞的优势,目前许多重编程方法被应用于以T细胞作为供体细胞的直接重编程。转录因子、细胞因子和小分子化合物等能经过多能干细胞中间过程,将T细胞直接重编程为低分化的T细胞和非T谱系的免疫细胞。虽然许多团队在该方面的研究取得了一定的研究成果,但我们对以T细胞为供体细胞的重编程机制了解地不够全面,并且每种以T细胞为供体细胞的重编程方法皆存在自身的局限性。同时,诱导的免疫细胞具有比供体细胞更强的抗肿瘤作用,还避免了T细胞衰老、衰竭和生存能力低下等问题。诱导的免疫细胞也已被应用到嵌合抗原受体治疗方面,甚至还进行了初步的临床研究。

基于诱导的免疫细胞的生物学特征,诱导的免疫细胞有望成为细胞免疫治疗方面新的细胞来源,为细胞免疫治疗提供新思路 and 选择。然而,如何使

诱导的免疫细胞在体内产生稳定、安全的抗肿瘤作用,并且避免发生功能障碍,是需要突破的技术难点。此外,随着对不同情况下诱导的免疫细胞认识的加深,再加上单细胞测序技术、组学技术和基因编辑技术等新理论和新技术的发展,对诱导免疫细胞的研究将进一步深化,使其进入一个全新的阶段,其应用前景也必将更加广阔。

## 参考文献 (References)

- [1] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 51(4): 2346-51.
- [2] BINDHYA S, SIDHANTH C, KRISHNAPRIYA S, et al. Development and *in vitro* characterisation of an induced pluripotent stem cell model of ovarian cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021, 138: 106051.
- [3] EL AYACHI I, ZHANG J, ZOU X Y, et al. Human dental stem cell derived transgene-free iPSCs generate functional neurons via embryoid body-mediated and direct induction methods [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(4): e1836-51.
- [4] YAO L, CHEN R, WANG P, et al. Generation of induced pluripotent stem cells with high efficiency from human embryonic renal cortical cells [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11): 4982-93.
- [5] AASEN T, RAYA A, BARRERO M J, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1276-84.
- [6] MAEDA T, NAGANO S, KASHIMA S, et al. Regeneration of tumor-antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from iPSCs transduced with exogenous TCR genes [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2020, 19: 250-60.
- [7] VIZCARDIO R, MASUDA K, YAMADA D, et al. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8<sup>+</sup> T cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(1): 31-6.
- [8] KASHIMA S, MAEDA T, MASUDA K, et al. Cytotoxic T lymphocytes regenerated from iPSCs have therapeutic efficacy in a patient-derived xenograft solid tumor model [J]. *iScience*, 2020, 23(4): 100998.
- [9] IIZUKA-KOGA M, ASASHIMA H, ANDO M, et al. Functional analysis of dendritic cells generated from T-iPSCs from CD4<sup>+</sup> T cell clones of sjögren's syndrome [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(5): 1155-63.
- [10] MAKINO K, LONG M D, KAJIHARA R, et al. Generation of cDC-like cells from human induced pluripotent stem cells via Notch signaling [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(1): e003827.
- [11] IRIGUCHI S, YASUI Y, KAWAI Y, et al. A clinically applicable and scalable method to regenerate T-cells from iPSCs for off-the-shelf T-cell immunotherapy [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 430.
- [12] ZEHRABI M, WAHID M, ASHRAF J. Episomal reprogramming of duchenne muscular dystrophy patients derived CD3<sup>+</sup> T cells towards induced pluripotent stem cells [J]. *Pak J Med Sci*, 2021, 37(2): 432-8.
- [13] KHAN M, ZENDE S, VAIDYANATH A, et al. Generation of two induced pluripotent stem cell lines NCCSi005A and NCCSi006A from CD4<sup>+</sup> T cells of healthy individuals of Indian origin [J]. *Stem Cell Res*, 2019, 39: 101506.

- [14] WATANABE D, KOYANAGI-AOI M, TANIGUCHI-IKEDA M, et al. The generation of human  $\gamma\delta$ T cell-derived induced pluripotent stem cells from whole peripheral blood mononuclear cell culture [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(1): 34-44.
- [15] JIANG Z, QIN L, TANG Y, et al. Human induced-T-to-natural killer cells have potent anti-tumour activities [J]. *Biomark Res*, 2022, 10(1): 13.
- [16] KONDO T, ANDO M, NAGAI N, et al. The NOTCH-FOXM1 axis plays a key role in mitochondrial biogenesis in the induction of human stem cell memory-like CAR-T cells [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(3): 471-83.
- [17] LAIOSA C V, STADTFELD M, GRAF T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 705-38.
- [18] LEE B J, MACE E M. From stem cell to immune effector: how adhesion, migration, and polarity shape T-cell and natural killer cell lymphocyte development *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Biol Cell*, 2020, 31(10): 981-91.
- [19] MOUSSET C M, HOBO W, WOESTENENK R, et al. Comprehensive phenotyping of T cells using flow cytometry [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(6): 647-54.
- [20] HARMAN B C, JENKINSON E J, ANDERSON G. Microenvironmental regulation of Notch signalling in T cell development [J]. *Semin Immunol*, 2003, 15(2): 91-7.
- [21] KUMAR B V, CONNORS T J, FARBER D L. Human T cell development, localization, and function throughout life [J]. *Immunity*, 2018, 48(2): 202-13.
- [22] SUN V, SHARPLEY M, KACZOR-URBANOWICZ K E, et al. The metabolic landscape of thymic T cell development *in vivo* and *in vitro* [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 716661.
- [23] NETSRITHONG R, WATTANAPANITCH M. Advances in adoptive cell therapy using induced pluripotent stem cell-derived T cells [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 759558.
- [24] HINTERBERGER M, AICHINGER M, PRAZERES DA COSTA O, et al. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4<sup>+</sup> T cell tolerance [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(6): 512-9.
- [25] BEVINGTON S L, CAUCHY P, WITHERS D R, et al. T cell receptor and cytokine signaling can function at different stages to establish and maintain transcriptional memory and enable T helper cell differentiation [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 204.
- [26] DUREK P, NORDSTRÖM K, GASPARONI G, et al. Epigenomic profiling of human CD4<sup>+</sup> T cells supports a linear differentiation model and highlights molecular regulators of memory development [J]. *Immunity*, 2016, 45(5): 1148-61.
- [27] ABDELSAMED H A, MOUSTAKI A, FAN Y, et al. Human memory CD8 T cell effector potential is epigenetically preserved during *in vivo* homeostasis [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(6): 1593-606.
- [28] MOSKOWITZ D M, ZHANG D W, HU B, et al. Epigenomics of human CD8 T cell differentiation and aging [J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(8): eaag0192.
- [29] LU H, WANG H, YAN L, et al. Overexpression of early T cell differentiation-specific transcription factors transforms the terminally differentiated effector T cells into less differentiated state [J]. *Cell Immunol*, 2020, 353: 104118.
- [30] YOUNGBLOOD B, HALE J S, KISSICK H T, et al. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells [J]. *Nature*, 2017, 552(7685): 404-9.
- [31] MAHNKE Y D, BRODIE T M, SALLUSTO F, et al. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(11): 2797-809.
- [32] CHEN L, FLIES D B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(4): 227-42.
- [33] YAN L, OU Y, XIA S, et al. Combined overexpression of four transcription factors promotes effector T cell dedifferentiation toward early phenotypes [J]. *Immunogenetics*, 2022, 74(2): 231-44.
- [34] WANG J, HASAN F, FREY A C, et al. Histone deacetylase inhibitors and IL21 cooperate to reprogram human effector CD8<sup>+</sup>T cells to memory T cells [J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(6): 794-805.
- [35] LI P, BURKE S, WANG J, et al. Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion [J]. *Science*, 2010, 329(5987): 85-9.
- [36] KONDO T, IMURA Y, CHIKUMA S, et al. Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(7): 2130-40.
- [37] FRUMENTO G, VERMA K, CROFT W, et al. Homeostatic cytokines drive epigenetic reprogramming of activated T cells into a "naive-memory" phenotype [J]. *iScience*, 2020, 23(4): 100989.
- [38] KONDO T, MORITA R, OKUZONO Y, et al. Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15338.
- [39] BHADURIHAUCK A, LI L, LI Q, et al. Transient exposure to proteins SOX2, Oct-4, and NANOG immortalizes exhausted tumor-infiltrating CTLs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 1255-60.
- [40] WHERRY E J, TEICHGRÄBER V, BECKER T C, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(3): 225-34.
- [41] CIERI N, OLIVEIRA G, GRECO R, et al. Generation of human memory stem T cells after haploidentical T-replete hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Blood*, 2015, 125(18): 2865-74.
- [42] LAIOSA C V, STADTFELD M, XIE H, et al. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors [J]. *Immunity*, 2006, 25(5): 731-44.
- [43] ŠTERZL I, ABSOLONOVÁ K, FIŠEROVÁ A. Immune response to vaccination in the elderly [J]. *Vnitr Lek*, 2021, 67(E-8): 14-8.
- [44] WOAN K V, KIM H, BJORDAHL R, et al. Harnessing features of adaptive NK cells to generate iPSC-derived NK cells for enhanced immunotherapy [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(12): 2062-75.e5.
- [45] SABATINO M, HU J, SOMMARIVA M, et al. Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8<sup>+</sup> memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies [J]. *Blood*, 2016, 128(4): 519-28.
- [46] HINRICHS C S, BORMAN Z A, GATTINONI L, et al. Human effector CD8<sup>+</sup> T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy [J]. *Blood*, 2011, 117(3): 808-14.