



陈莎莎, 2017年于清华大学获得生物学博士学位, 之后在清华大学医学院/免疫学研究所开展博士后研究。2020年8月被聘为复旦大学基础医学院免疫学系青年研究员, 2022年6月入职安徽医科大学第一附属医院/安徽医科大学临床免疫学研究所, 被聘为安徽医科大学特聘教授。以第一作者和通讯作者(含共同)身份在*Immunity*、*Sci Immunol*、*J Exp Med*、*Nat Commun*等杂志上发表多篇研究论文。现主持国家自然科学基金委面上项目、安徽省高校优秀青年科研项目, 作为骨干成员参与科技部重大研发计划和安徽省高校优秀科研创新团队项目。曾主持国家自然科学基金委青年项目、博士后创新人才支持计划, 获博士后科学基金面上资助一等资助, 参与国家自然科学基金委重点项目和重大研究计划等。主要研究方向: NK细胞发育、活化和耐受调控机制; 肿瘤免疫微环境诱导NK细胞耐受机制; 激活或调节NK细胞抗肿瘤活性的新方法。

## NK细胞生物特性及抗肿瘤治疗研究进展

陈莎莎<sup>1,2\*</sup> 权雨荷<sup>3,4</sup> 董忠军<sup>3,4</sup>

(<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院, 合肥 230032; <sup>2</sup>安徽医科大学临床免疫学研究所, 合肥 230032;

<sup>3</sup>清华大学医学院, 北京 100084; <sup>4</sup>清华大学免疫学研究所, 北京 100084)

**摘要** 自然杀伤(natural killer, NK)细胞是体内的关键先天淋巴细胞, 具有抗肿瘤和抗感染等功能。与适应性免疫细胞不同, NK细胞缺乏特异性抗原受体, 在发育、分化和激活方面具有明显的生物学特性。NK细胞与多种疾病(包括癌症和感染性疾病)的发生和发展相关。目前, 主动修复肿瘤患者NK细胞功能缺陷或被动输入高活性NK细胞已成为基于NK细胞的治疗的两种主要策略。前者包括NK细胞免疫检查点抑制剂、细胞因子激活剂和特异性NK细胞活化性受体衔接器等方法; 后者则包括同种异体NK细胞和嵌合抗原受体修饰的NK(chimeric antigen receptor engineered NK, CAR-NK)细胞治疗等。该文将介绍NK细胞的生物学特性以及近期在基于NK细胞的生物治疗方面的一些新进展。

**关键词** 自然杀伤细胞; 肿瘤; 免疫治疗

## Research Progresses in Biological Characteristics of NK Cells and Anti-Tumor Therapy

CHEN Shasha<sup>1,2\*</sup>, QUAN Yuhe<sup>3,4</sup>, DONG Zhongjun<sup>3,4</sup>

(<sup>1</sup>the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, China; <sup>2</sup>Institute of Clinical Immunology,

Anhui Medical University, Hefei 230032, China; <sup>3</sup>School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

<sup>4</sup>Institute for Immunology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

收稿日期: 2023-11-14 接受日期: 2023-12-08

国家自然科学基金(批准号: 32330034、82371734)、科技部重大研发计划(批准号: 2022YFF0710600)和安徽高校自然科学基金研究项目(批准号: 2023AH010085、2022AH030114)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18911821640, E-mail: chenshasha.26@163.com

Received: November 14, 2023 Accepted: December 8, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32330034, 82371734), the National Key Research & Developmental Program of China (Grant No.2022YFF0710600), and the Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (Grant No.2023AH010085, 2022AH030114)

\*Corresponding author. Tel: +86-18911821640, E-mail: chenshasha.26@163.com

**Abstract** NK (natural killer) cells are key innate lymphocytes in the body that perform functions such as anti-tumor and anti-infection. NK cells, unlike adaptive immune cells, lack antigen-specific receptors, giving them distinct biological properties in terms of development, differentiation, and activation. NK cells are linked to a variety of disorders, including cancer and infection diseases. Active restoration of NK cell function in tumor patients or passive transfer of highly active NK cells have emerged as two major approaches in NK cell-based therapies. The former includes NK cell immune checkpoint inhibitors, cytokine activators, and NK cell engager specific for activating receptors. The latter includes allogeneic NK cell therapy and CAR-NK (chimeric antigen receptor engineered NK) cell therapy. This article will go over the biology of NK cells as well as some recent breakthroughs in NK cell-based biologic therapeutics.

**Keywords** NK cells; tumor; immunotherapy

自然杀伤(natural killer, NK)细胞是一类重要的固有淋巴细胞,具有识别受压应激细胞(如肿瘤细胞和某些感染细胞)的能力,并能够自发地对肿瘤细胞进行杀伤。NK细胞通过表达多种活化性和抑制性受体,识别与肿瘤相关的配体来实现对肿瘤细胞的识别和杀伤。与CD8<sup>+</sup> T细胞相比,NK细胞的识别机制更为灵活,不依赖于MHC-I(major histocompatibility complex class I)分子。NK细胞可以杀伤缺乏MHC-I的肿瘤细胞,并且高表达活化配体的肿瘤细胞通常也会被NK细胞杀伤。这种非特异性的识别机制和高效的抗肿瘤活性,使得NK细胞具有作为抗癌“活体药物”的潜力。

免疫治疗作为一种新兴的癌症治疗模式在近年来迅速发展。尽管免疫检查点阻断和CAR-T细胞疗法已经取得了显著的成功,但也带来了新的挑战。MHC-I表达丧失是肿瘤细胞获得抗肿瘤CD8<sup>+</sup> T细胞反应耐药性的重要机制。而NK细胞具有MHC-I非限制性识别和迅速杀伤肿瘤细胞的能力,因此利用NK细胞进行治疗可能补充抗肿瘤T细胞疗法的不足。此外,同种异体NK细胞输注不会引起移植宿主病(graft-versus-host disease, GVHD),NK细胞可以作为“即用型”细胞疗法产品,并减轻与CAR-T细胞疗法相关的毒性效应。

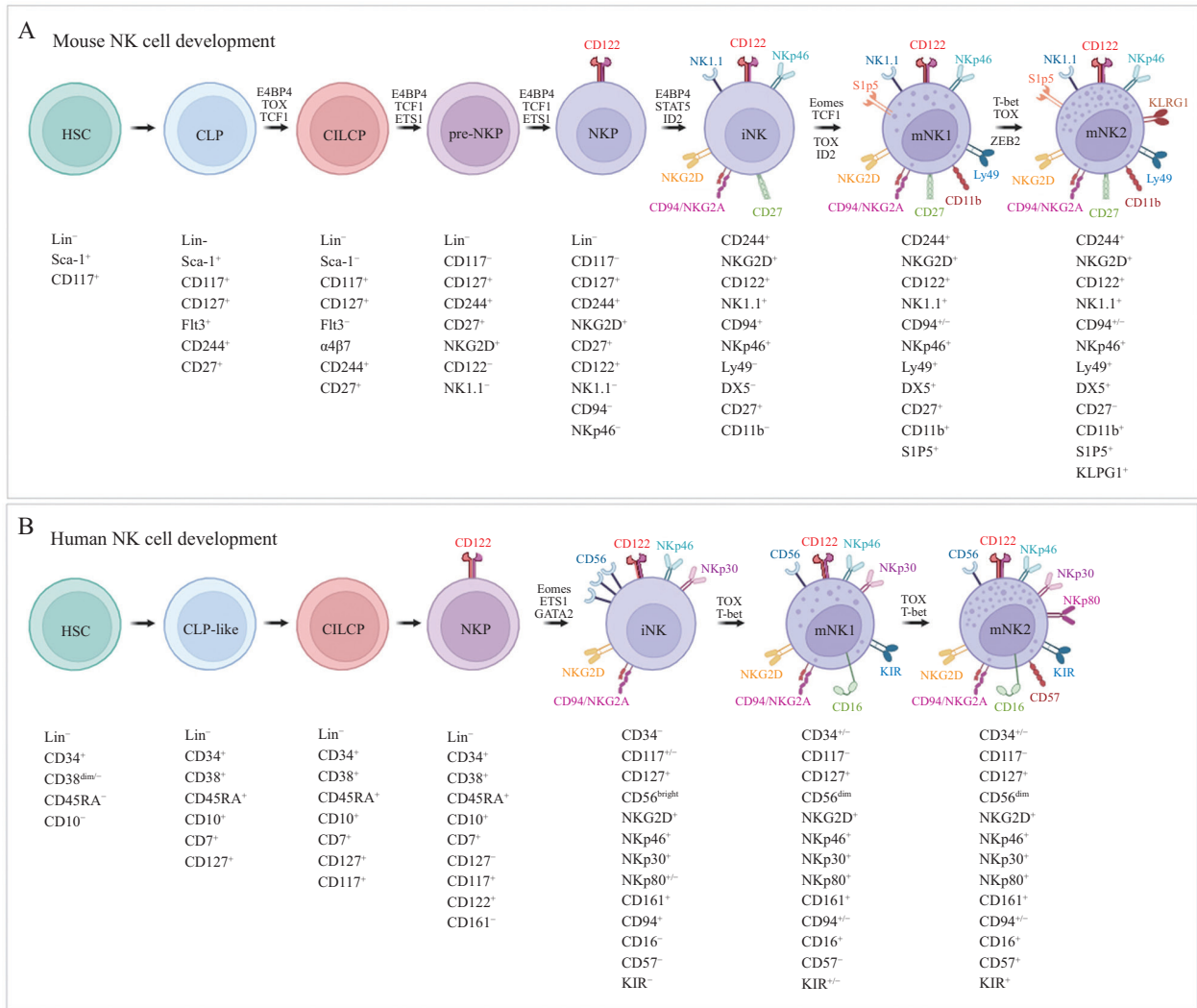
在这个背景下,NK细胞成为癌症治疗领域的重要研究对象。增强NK细胞抗肿瘤反应的免疫治疗策略得到了快速发展并进入了临床试验。例如,将通过工程化改造的NK细胞(如CAR-NK)作为细胞治疗药物,以及利用细胞因子、免疫检查点抑制剂、NK细胞衔接器等方法激活和动员内源性NK细胞。这些方法通过加强NK细胞的抗肿瘤反应,有望开辟

新的免疫治疗途径,为癌症患者带来更好的治疗效果。在本综述中,我们介绍了这些基于NK细胞的免疫治疗方法的生物学基础,并讨论了NK细胞治疗策略的最新进展。

## 1 NK细胞的发育和分类

NK细胞源自骨髓中的造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC),经共同淋巴祖细胞(common lymphoid progenitor, CLP)逐步分化而来。近年来,使用谱系命运追踪技术在小鼠模型中明确了NK细胞谱系分化的过程。CLP在E4BP4(E4 promoter-binding protein 4)、TOX(thymocyte selection-associated HMG-box)和TCF1(T cell factor 1)等转录因子的调控下分化为共同先天淋巴前体(common innate lymphoid cell precursor, CILCP)<sup>[1-5]</sup>。CILCP具有双分化潜能,可以生成先天性淋巴细胞(innate lymphoid cells, ILCs)和NK细胞谱系。在TCF1和ETS1(ETS proto-oncogene 1)等转录因子的调控下,CILCP进一步分化为前NK细胞前体(pre-NK cell precursor, pre-NKP)<sup>[6-8]</sup>。随后,这些前体细胞通过表达IL-15受体β链(即CD122),分化为NK细胞前体(NK cell precursor, NKP)(图1A)。CD122是NK细胞谱系承诺过程的标志,其表达使得前体细胞对于NK细胞发育和存活所需的细胞因子IL-15产生反应。IL-15及其受体IL-15R(由α、β和γ链三个亚基组成)任何一条链基因缺失,都可以导致NK细胞发育缺陷。

NKP细胞是一类早期NK细胞前体,随后进展到未成熟NK(immature NK, iNK)细胞阶段。在这个阶段,iNK细胞表达了一系列特征分子,包括NK1.1(只在少数品系小鼠表达,如C57BL/6背



A: 小鼠NK细胞发育与NK细胞成熟的转录调控示意图; B: 人类NK细胞发育与NK细胞成熟的转录调控示意图。对于每个发育阶段, 显示了区分NK发育中间群体体的每个表面抗原的表达情况。在特定阶段中, 每个抗原的表达被标记为“+”(表达)、“-”(不表达)、“+/-”(部分表达)、“bright”(高表达)或“dim”(低表达)。

A: schematic diagram of mouse NK cell development and transcriptional regulation of NK cell maturation; B: schematic diagram of human NK cell development and transcriptional regulation of NK cell maturation. For each developmental stage, the expression status of each surface antigen that distinguishes NK cell developmental intermediates is shown. The expression of each antigen is indicated as “+” (with expression), “-” (without expressed), “+/-” (with partial expression), “bright” (with high expression), or “dim” (with low expression).

图1 小鼠和人类NK细胞发育与NK细胞成熟的转录调控示意图

Fig.1 Schematic representation of mouse and human NK cell development and transcriptional regulation of NK cell maturation

景小鼠)、NKG2D(natural killer group 2 member D)、CD94、NKp46和CD27, 并下调了CD127的表达。尽管它们获得了这些表面标记, 但iNK细胞在功能上尚未完全成熟。随着发育的进行, iNK细胞开始表达Ly49家族受体, 黏附分子DX5、CD43以及CD11b, 并下调了CD27的表达, 进一步分化为成熟NK(mature NK, mNK)细胞。这些细胞在获得衰老相关的标记KLRG1(killer-cell lectin like receptor G1)后终止分化。根据CD27和CD11b表达强度的不同, 可以将NK细胞的发育过程细分

为: CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>(DN)、CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>(CD27 SP)、CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>(DP)和CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>(CD11b SP)四个依次成熟的分化阶段<sup>[9]</sup>。这些阶段代表了NK细胞从未成熟到成熟的连续分化过程(图1A)。

NK细胞的发育和成熟受到多个转录因子(主要包括E4BP4、T-bet和Eomes)的时序性调控(图1A)。E4BP4是迄今唯一被鉴定的对NK细胞谱系承诺至关重要的转录因子。它的表达始于CLP阶段, 促进CLP细胞向pre-NKP和NKP细胞分化<sup>[10]</sup>。E4BP4缺陷小鼠实验数据表明, E4BP4对IL-15受体的表达是



必需的,其表达受到IL-15/PI3K/PDK1/mTORC1信号通路的调控,该通路形成一个自我强化的正反馈回路,推动NK谱系的承诺<sup>[10-12]</sup>。E4BP4通过控制Eomes和ID2的表达来指导NK细胞发育<sup>[10]</sup>。T-bet和Eomes是控制NK细胞发育成熟的关键调控因子。Eomes在CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> NK细胞中占主导地位,维持未成熟NK细胞的存活,促进其向CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>群体分化<sup>[13]</sup>。Eomes对诱导Ly49家族受体、DX5等特征受体的表达以及细胞毒活性的形成至关重要<sup>[14-15]</sup>。T-bet在成熟NK细胞中占主导地位,抑制未成熟NK细胞的转录特征,促进CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>向CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>群体的终末分化<sup>[10,13]</sup>。此外,T-bet还可以调节鞘氨醇-1磷酸受体5(sphingosine-1-phosphate receptor 5, S1PR5)的表达,控制NK细胞由骨髓向外周迁移<sup>[16]</sup>。NK细胞终末分化还受到TCF1、ID2、TOX和ZEB2等多个转录因子的调控。TCF1可促进CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>细胞的扩增,抑制其向终末成熟NK细胞分化<sup>[6]</sup>。转录抑制因子ID2通过调控TCF1表达来支持未成熟和终末分化NK细胞的平衡<sup>[17]</sup>。ID2还可以通过抑制SOCS3(suppressor of cytokine signaling-3)的表达来维持IL-15受体下游的信号强度,促进NK细胞存活<sup>[18]</sup>。TOX在iNK和mNK中表达上调,促进NKP向上述两个亚群分化,调控NK细胞成熟<sup>[19]</sup>。ZEB2在成熟NK细胞中上调表达,促进NK细胞的终末分化<sup>[20]</sup>。

NK细胞分化伴随着功能成熟。研究人员利用不同发育时期的标志来界定小鼠NK细胞功能成熟的阶段,发现在CD11b<sup>+</sup>阶段以及获得CD94之后的较晚阶段,NK细胞获得产生IFN- $\gamma$ (interferon-gamma)的能力和细胞毒活性<sup>[21]</sup>。在这些阶段,NK细胞开始表达识别经典MHC-Ia的Ly49家族抑制性受体以及识别经典MHC-Ib的NKG2A<sup>[21]</sup>。如果NK细胞表达了这些抑制性受体,它们则会经历依赖于MHC-I类分子的功能成熟过程(被称为“教育”),并获得更强的功能反应性;而不表达这些受体的NK细胞因为未接受“教育”,其功能反应性则相对较弱。因此,成熟的NK细胞(无论是DP还是CD11b SP)的细胞毒活性比未成熟的NK细胞更强。DP细胞在单核细胞刺激后产生相对更多的细胞因子,并且与CD11b SP细胞相比,它们还显示出了更强的细胞毒性。

与小鼠NK细胞发育途径类似,在人类的骨髓、脐血、扁桃体和胎儿组织中也发现了一群类似CLP(common lymphoid progenitor like, CLP-like)的多能

祖细胞<sup>[22]</sup>。这些CLP-like细胞逐渐分化为具有产生所有ILC亚群和NK细胞谱系潜力的多能性CILCP<sup>[23]</sup>。这群细胞具有Lin<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>表型,存在于脐带血和外周血,以及胎肝、肺脏、扁桃体、淋巴结等组织中。对于人类NK细胞谱系前体细胞的认识不断发展,其中最主要的进展是在脐血和骨髓中鉴定出一群Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>的NK谱系限定前体细胞(图1B)。这群细胞在体内外都具有强大的NK细胞分化潜能<sup>[22]</sup>。IL-15已被确认为对人类NK细胞的体内和体外分化均至关重要的关键细胞因子,但在上述细胞表面并未检测到CD122的表达。然而,在存在细胞因子的培养条件下,这群细胞能诱导CD122的表达,表明它们可能位于NKP的上游<sup>[22]</sup>。

人类NK细胞的成熟过程涉及CD34和CD117表达的逐渐下调,以及随后的CD56、CD94、CD16和KIRs(killer cell immunoglobulin like receptors)表达的依次上调。根据CD117和CD94的表达情况,可将NK细胞分为CD117<sup>hi</sup>CD94<sup>-</sup>与CD117<sup>low</sup>CD94<sup>+</sup>两个依次成熟的分化阶段,其中只有CD117<sup>low</sup>CD94<sup>+</sup>亚群显示细胞毒效应和IFN- $\gamma$ 产生能力<sup>[24]</sup>。根据CD56和CD16的表达水平,可以将人类NK细胞分为CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>与CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>两个具有不同成熟度和功能特性的亚群。获得CD94标志着NK细胞进入未成熟的CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>阶段,这些细胞主要产生细胞因子,其细胞毒效应较弱<sup>[25]</sup>。随着CD56的逐渐下调,大部分CD56<sup>bright</sup> NK细胞转变为CD56<sup>dim</sup> NK细胞,并开始表达可以识别MHC-I分子的抑制性KIR家族受体(inhibitory killer cell immunoglobulin like receptor, iKIR)和Fc受体Fc $\gamma$ RIII(也称为CD16)。这标志着NK细胞进一步发育成熟,呈现为CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>的状态<sup>[26-27]</sup>。这些细胞的增殖能力降低,分泌促炎细胞因子IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的能力也降低,但细胞毒效应增强,在受体介导的激活后能迅速释放细胞性毒介质(颗粒酶和穿孔素)<sup>[26-27]</sup>。CD56<sup>dim</sup>细胞中KIR、CD94、NKG2A、CD62L和CD57等分子的表达具有异质性,这些分子的表达水平提示了细胞的成熟状态。通过对造血干细胞移植后NK细胞再构成的分析发现,随着CD56<sup>dim</sup> NK细胞的成熟,它们下调NKG2A和CD62L的表达,并逐渐上调KIR和CD57的表达。CD57在NK细胞表面开始表达标志着NK细胞进入终末分化状态<sup>[28-30]</sup>。根据CD56、CD16和CD57

分子的表达强度,可以将人类NK细胞的发育分为CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup>、CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>和CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>三个依次成熟的阶段(图1B)<sup>[31]</sup>。

目前对于人类NK细胞发育转录调控机制的研究尚处于起始阶段。已经发现了多个与CD56<sup>bright</sup>和CD56<sup>dim</sup>细胞的发育和功能相关的转录因子(图1B)。先天性T-bet缺陷患者的CD56<sup>bright</sup>和CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>细胞数量显著降低<sup>[32]</sup>。在人类造血祖细胞中,过表达T-bet和Eomes可以抑制非NK细胞谱系分化基因,激活NK细胞特异性的转录程序,加速NK细胞分化,增强NK细胞产生IFN- $\gamma$ 的能力和细胞毒活性<sup>[33]</sup>。T-bet和Eomes的缺失导致CD56<sup>bright</sup> NK细胞表型类似于固有淋巴细胞前体(ILCP-like),表明这些转录因子可以抑制其他ILC谱系分化基因的表达,促进NK细胞分化<sup>[34]</sup>。在NK细胞发育过程中,Eomes的表达先于T-bet,Eomes可以诱导NKp46、NKp30、NKG2A和CD16的表达,促进CD16<sup>+</sup> NK细胞的分化<sup>[33,35]</sup>。随后,Eomes的表达下调,T-bet的表达上调,促进KIR的表达,推动NK细胞的终末分化和成熟<sup>[33,35]</sup>。TOX在成熟的人类NK细胞中优先表达,并在NK细胞体外分化过程中上调表达。通过基因沉默和过表达实验证实,TOX可以通过上调T-bet的表达来促进NK细胞的终末分化和成熟<sup>[36]</sup>。ETS1可以通过诱导与NK细胞分化相关的转录因子E4BP4、GATA3以及抗凋亡基因的表达来促进人类NK细胞的发育和终末分化<sup>[37]</sup>。GATA2突变患者缺乏CD56<sup>bright</sup>细胞,但CD56<sup>dim</sup> NK细胞水平正常,这表明GATA2在人类NK细胞的成熟和外周CD56<sup>bright</sup>细胞群的维持中起着关键作用<sup>[38]</sup>。

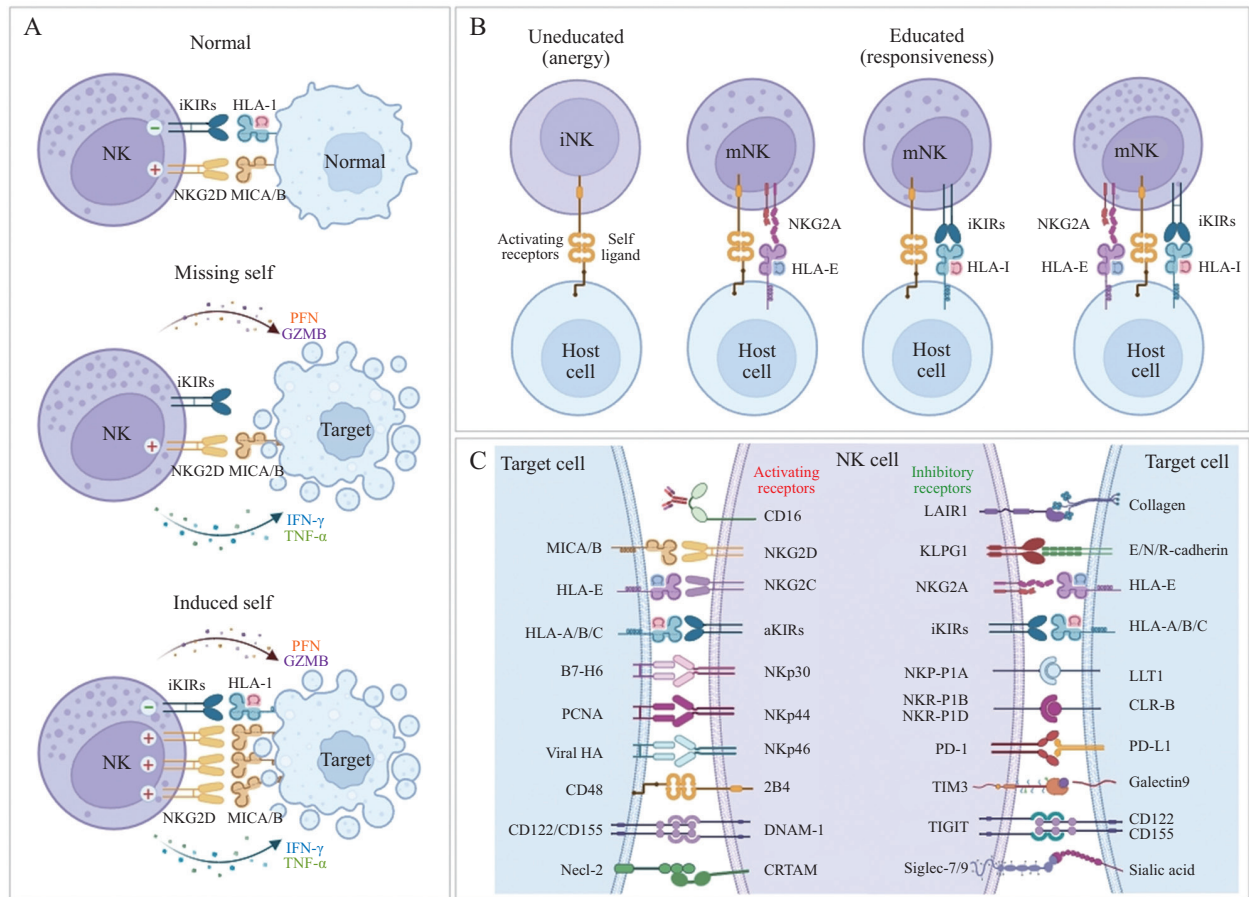
## 2 NK细胞识别机制和功能调节

NK细胞是一类重要的免疫细胞,具有自然杀伤活性和调节免疫应答的能力。与T细胞和B细胞不同,NK细胞不表达抗原特异性的识别受体(如T细胞受体 and B细胞受体),而是组成性地表达由胚系基因编码的一系列活化性受体和抑制性受体。NK细胞通过上述受体与相邻细胞表面的配体结合,通过整合两类受体下游的信号,实现对“自我”和“非我”的识别以及功能调控。

上世纪科研人员通过肿瘤细胞随机突变的研究发现,NK细胞可以高效地杀死MHC-I分子丢失的肿瘤细胞,由此最早提出了NK细胞“丢失自我”的

识别模式<sup>[39-40]</sup>。健康有核细胞均表达丰富的MHC-I,这些MHC-I分子被视为“自我”标记物。它们可以被NK细胞表面的抑制性受体识别,从而触发优势抑制信号,阻止NK细胞活化受体的激活,并使NK细胞对其产生耐受性(图2A)。在异基因骨髓移植时,由于MHC-I不匹配,NK细胞可以快速介导急性移植排斥反应<sup>[39]</sup>。此外,病毒感染细胞和肿瘤细胞有时会主动下调MHC-I分子表达,以逃避CD8<sup>+</sup>细胞毒性T淋巴细胞的免疫监视。在上述情况下,靶细胞上MHC-I分子的减少或缺失可降低源于NK细胞的抑制性信号的强度,使NK细胞的平衡向激活倾斜,这种识别机制被称为“丢失自我”的识别模式<sup>[41-42]</sup>(图2A)。NK细胞可识别并杀伤的靶细胞不一定会丢失或下调表达MHC-I分子。在病毒感染、恶性转化以及应激情况下,靶细胞表面有时可以上调表达应激诱导分子,如人类的MHC-I类链相关蛋白A/B(MHC class I chain-related protein A/B, MICA/B)和小鼠的Rae1,它们可以引发优势活化性信号,使NK细胞激活,这种识别机制被称为“诱导自我”(induced-self)的识别模式<sup>[41-42]</sup>(图2A)。

当NK细胞与易感靶细胞接触时,NK细胞表面的黏附分子[如淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1)]、活化性受体以及一系列信号分子会形成激活性的免疫突触,导致NK细胞活化。NK细胞可以通过释放包含颗粒酶、穿孔素和颗粒溶素的细胞毒性颗粒,诱导靶细胞死亡。活化的NK细胞会上调表达肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族成员,例如FasL(Fas ligand)和TRAIL(tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand),这些分子可以与它们相应的受体(如Fas或TRAILR)结合,通过死亡受体介导的途径激活靶细胞内的凋亡机制,诱导靶细胞凋亡。NK细胞表面的Fc受体CD16可以介导抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC),破坏被IgG抗体包被的肿瘤细胞或病毒感染细胞,这也是目前热门抗体药物发挥临床效果的重要作用机制之一。活化的NK细胞具有强大的细胞因子分泌功能,可以合成和分泌多种细胞因子(如IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10、GM-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、XCL1等)。这些细胞因子可以促进NK细胞与树突状细胞、巨噬细胞和T细胞之间的相互作用,从而促进免疫应答。



A: NK细胞“丢失自我”和“诱导自我”识别模式; B: NK细胞功能获得机制; C: 人类NK细胞活化性受体和抑制性受体。“+”(活化信号)、“-”(抑制信号)。PFN: 穿孔素; GZMB: 颗粒酶B。

A: “missing self” and “induced self” recognition of NK cells; B: functional acquisition of NK cells; C: activating receptors and inhibitory receptors in human NK cells. “+” (activating signal), “-” (inhibitory signal). PFN: perforin; GZMB: granzyme B.

图2 人类NK细胞受体表达、活化与功能获得机制

Fig.2 Mechanisms of human NK cells receptor expression, activation, and functional acquisition

细胞表面的活化性受体和抑制性受体之间的动态平衡是保证NK细胞效应功能调节的关键。在效应阶段, 机体正常有核细胞广泛表达MHC-I分子, 这可以阻止NK细胞攻击自身。然而, 在MHC-I缺失的小鼠中, NK细胞不会过度活化或自我攻击。目前有“licensing”和“disarming”两种假说解释上述的现象。“licensing”假说认为, 识别MHC-I的抑制性受体在NK细胞克隆中以随机方式表达。在NK细胞的发育过程中, 存在一个依赖宿主MHC-I类分子的功能成熟阶段。如果NK细胞表达了能够识别MHC-I的抑制性受体, 则会获得抑制性信号, 并发展成为功能成熟的NK细胞(被称为“受教育”)。由于受到自身MHC-I的抑制, 这些NK细胞在效应阶段不会攻击自身。而那些不表达能够识别MHC-I的抑制性受体的NK细胞, 因为没有获得抑制性信号的“教育”,

因此在效应阶段不具备功能反应性(图2B)<sup>[41]</sup>。另一种假设是“disarming”假说, 它认为所有的NK细胞最初都具有功能。如果没有表达能够识别MHC-I的抑制性受体, 长期处于激活状态的信号则会导致NK细胞的反应性降低<sup>[42]</sup>。

随着对NK细胞活化性和抑制性受体的深入研究, 我们对于NK细胞识别和功能调节机制的理解也在逐渐加深。NK细胞组成性地表达多种活化性和抑制性受体, 并且这些受体以随机的方式表达在NK细胞表面, 形成一个多样性的NK细胞库(图2B)。其中, 识别自身MHC-I的抑制性受体对于NK细胞的识别、功能获取和自身耐受起着关键作用。这些抑制性受体包括人类KIRs家族或小鼠Ly49家族的成员, 以及CD94/NKG2A受体。

人类的KIRs是由位于19号染色体上的至少



15个多态基因编码的受体家族组成,包括抑制性和激活性KIRs。其中,KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DL4、KIR2DL5、KIR3DL1、KIR3DL2和KIR3DL3具有长的胞质区域,该区域含有免疫受体酪氨酸基抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIMs)以介导抑制功能<sup>[43]</sup>。而KIR2DL4的跨膜区还有一个带电荷的精氨酸残基,使其既具有抑制性特征,又具有激活性特征。其他的KIRs成员(如KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5和KIR3DS1)则具有短的胞质区域,通过跨膜区带正电荷的氨基酸与DAP12关联从而转导激活信号<sup>[43]</sup>。KIR受体可以识别不同的人类经典MHC-I分子亚类,如HLA-A、HLA-B和HLA-C,通过转导激活或抑制信号来控制NK细胞的反应。小鼠Ly49家族受体则由位于6号染色体上的NK细胞受体复合物(NK cell complex, NKC)中的Klra基因家族编码,C57BL/6小鼠含有15个Ly49家族成员,包括激活性和抑制性受体。典型的Ly49家族抑制性受体成员包括Ly49A、Ly49C和Ly49I,这些受体的胞内区域含有ITIM以介导抑制功能<sup>[43]</sup>。这些受体的主要配体是经典MHC-Ia类分子,它们对H-2基因复合体中不同基因编码的MHC-I配体具有不同的亲和力和特异性,例如Ly49C和Ly49I对B6小鼠(H-2K<sup>b</sup>、H-2D<sup>b</sup>)体内的H-2K<sup>b</sup>具有较强的亲和力,而Ly49A对Balb/c小鼠(H-2K<sup>d</sup>、H-2D<sup>d</sup>)体内的H-2D<sup>d</sup>具有较强的亲和力<sup>[44]</sup>。另外,典型的活化性受体成员包括Ly49H和Ly49P,它们分别能够识别小鼠巨细胞病毒(mouse cytomegalovirus, MCMV)基因产物m157或m04,并以DAP12依赖的方式激活NK细胞来清除MCMV感染细胞<sup>[43-44]</sup>。还有一个Ly49家族成员Ly49D通过识别MHC-I类分子H2-D<sup>d</sup>后以DAP12依赖的方式激活NK细胞<sup>[43-44]</sup>。人和小鼠的NKG2A与CD94形成异二聚体,可以识别非经典MHC-I分子人HLA-E和小鼠Qa-1b<sup>[45]</sup>。

除了上述识别MHC-I的抑制性受体外,人类NK细胞还组成性地表达其他类型的抑制性受体,包括NKR-P1A、NKR-P1B、NKR-P1D、KLRG1、Siglec-7、Siglec-9、CEACAM1、LAIR-1和IRp60等<sup>[46]</sup>。NKR-P1A在NK细胞早期成熟阶段表达,在与激活的B细胞表面表达的LLT1(lectin-like transcript 1)糖蛋白结合后抑制NK细胞的细胞毒性和细

胞因子分泌<sup>[45-46]</sup>。而NKR-P1B和NKR-P1D具有类似于凝集素的细胞外区域结构,可以识别C型凝集素受体(C-type lectin receptor, CLR)家族成员CLR-B并传递抑制信号<sup>[45-46]</sup>。作为NK细胞衰老标记物,KLRG1是一种抑制性凝集素样II型跨膜受体,能够识别和结合E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和R-钙黏蛋白(R-cadherin),从而抑制细胞周期进程和NK效应功能<sup>[47]</sup>。而Siglec-7和Siglec-9则在人类NK细胞上表达,它们可以与唾液酸聚糖结合,促进免疫耐受性并降低抗肿瘤活性<sup>[48]</sup>。CEACAM1以自身识别的方式介导同型识别,或与糖磷脂酰肌醇(glycophosphatidylinositol, GPI)偶联分子CEACAM5进行异型识别,通过介导抑制信号可以补偿TAP2缺失患者中MHC-I类分子依赖的抑制信号的缺失,从而避免NK细胞对自身的攻击<sup>[49]</sup>。此外,LAIR-1是在NK细胞表面表达的免疫抑制性受体,它可以与胶原蛋白结合发挥免疫调节功能<sup>[46]</sup>。而IRp60则能够识别暴露在感染、转化或凋亡细胞质膜上的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)和磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE),从而抑制NK细胞介导的细胞毒性<sup>[46]</sup>。

在许多癌症患者中,外周血和肿瘤浸润性NK细胞上会诱导表达PD-1、TIM-3、TIGIT、CD96、CD200R、SIRP $\alpha$ 等抑制性受体。这些受体与它们的配体结合后会通过抑制NK细胞来诱导免疫耐受。PD-1及其配体PD-L1和PD-L2在多种癌症中上调表达,在许多癌症患者和病毒感染患者中,NK细胞的PD-1表达上调。它们之间的相互作用会导致NK细胞功能衰竭,细胞毒性和细胞因子生成能力受损,以及增殖能力降低<sup>[50]</sup>。TIM-3被认为是晚期肿瘤中NK细胞耗竭的标志物,它所识别的主要配体半乳糖凝集素9(galectin-9)在各种癌症和慢性感染中上调表达<sup>[51]</sup>。TIGIT和CD96可以与活化性受体DNAM-1竞争性地结合脊髓灰质炎病毒受体(poliovirus receptor, PVR/CD155)和连接蛋白2(nectin-2/CD112),从而抑制NK细胞介导的抗肿瘤免疫<sup>[52]</sup>。许多肿瘤细胞系和原发性恶性肿瘤高表达CD155,通过诱导NK细胞抑制来逃避抗肿瘤免疫。最近的研究发现,细胞因子刺激可以上调NK细胞表面SIRP $\alpha$ 的表达,使其与靶细胞上的CD47相互作用,并以阈值依赖的方式抑制NK细胞介导的抗肿瘤效应<sup>[53]</sup>。在肿瘤患者中,CD200R在NK细胞表面

上调表达,并在识别其配体CD200后产生多重免疫抑制信号,抑制NK细胞的增殖和细胞毒性活性<sup>[54]</sup>。最新的研究显示,NgR1在免疫突触(immunological synapse, IS)的形成中作为免疫检查点发挥作用,通过破坏IS的形成来调节NK细胞介导的杀伤作用<sup>[55]</sup>(图2C)。

NK细胞的识别和功能调节不仅需要通过抑制性受体来检测靶细胞表面的配体,还需要通过活化性受体来激活NK细胞。NK细胞组成性地表达多种活化性受体,包括人类KIR家族成员(用于识别人类经典MHC-I分子)或小鼠Ly49家族活化性受体成员(例如Ly49H和Ly49P,分别用于识别MCMV病毒基因产物m157和m04)<sup>[43-44]</sup>。此外,活化性受体还包括自然细胞毒性受体(包括NKp46、NKp30和NKp44,用于识别肿瘤和应激细胞上的各种配体)、NKG2D(识别人类MICA/B和ULBP家族,或小鼠RAE1蛋白家族、MULT1和H-60应激分子)、NKG2C/CD94异二聚体(用于识别人类HLA-E或小鼠Qa-1b)、DNAM-1(用于识别病毒感染或恶性转化细胞表面上表达的PVR和Nectin-2)、CD16(用于介导ADCC作用)以及SLAM家族受体(用于介导同源识别)等<sup>[45-56]</sup>。此外,在NK细胞被激活后,它们可以诱导CRTAM的表达,从而增强NK细胞的黏附作用和细胞毒性,并触发对表达Necl-2的靶细胞的排斥反应<sup>[57]</sup>(图2C)。

### 3 肿瘤微环境抑制NK细胞活性的机制

NK细胞常见于人类肿瘤微环境(tumor micro-environment, TME),包括原发性肿瘤、转移瘤和肿瘤浸润淋巴结,它们也很容易进入外周血中的造血性肿瘤。临床数据表明,TME中NK细胞的丰度与多种癌症(包括肝细胞癌、黑色素瘤、乳腺癌和肺癌等)的预后和生存率相关。NK细胞通过多种机制限制肿瘤的生长和扩散。在将人和鼠NK细胞募集到TME的过程中,有几个趋化因子-趋化因子受体轴起着重要作用,包括CCL5-CCR5、CCL27-CCR10和CX3CL1-CX3CR1。当NK细胞到达肿瘤部位时,来自多个配体-受体相互作用的复杂信号以及TME中产生的促炎细胞因子、损伤相关的分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)等细胞接触非依赖信号的整合,会导致NK细胞的识别和激活。其中,肿瘤细胞上MHC-I分子

的缺失或异常表达是NK细胞识别的最重要信号。激活的NK细胞可以直接释放穿孔素和颗粒酶,通过FasL或TRAIL诱导肿瘤细胞凋亡来消灭它们。此外,NK细胞还能分泌细胞因子IFN- $\gamma$ ,诱导树突状细胞(dendritic cell, DC)成熟、激活巨噬细胞等,从而塑造天然免疫反应,进而启动和促进适应性免疫反应,以增强抗肿瘤免疫。在消除癌细胞后,NK细胞会释放肿瘤抗原、趋化因子和危险相关分子模式,进一步刺激先天性和适应性免疫反应,促进抗肿瘤免疫的进行。

NK细胞的活性容易受到肿瘤微环境中多种免疫抑制机制的影响。肿瘤能够利用NK细胞抑制性受体进行免疫逃逸。肿瘤微环境会诱导NK细胞表面免疫检查点受体PD1、NKG2A、TIGIT、CD96、SIRP $\alpha$ 等的表达,或上调这些受体的配体,从而使NK细胞陷入耗竭状态,抑制了NK细胞介导的抗肿瘤效应。另一种逃避机制是肿瘤内的NK细胞通常处于脱敏的低反应状态。许多癌细胞会下调MHC-I分子的表达以逃避CD8<sup>+</sup>T细胞的免疫监视。尽管这些癌细胞被NK细胞识别为“丢失自我”的细胞,但它们无法被NK细胞有效清除。研究发现,MHC-I低表达的肿瘤浸润NK细胞通常表现出脱敏的低反应状态,类似于不表达MHC-I特异性抑制性受体的小鼠中NK细胞的低反应性状态<sup>[58]</sup>。MICA和MICB是许多人类癌症中的应激蛋白,它们可以与NKG2D受体结合并触发NK细胞介导的细胞毒性效应。然而,当NK细胞在体内持续暴露于上述活化性配体时,其会发生脱敏性反应,导致肿瘤的免疫逃逸<sup>[59]</sup>。此外,晚期癌症经常通过去整合素和金属蛋白酶(a disintegrin and metallo-proteinase, ADAM)或基质金属蛋白酶(matrix metallo-proteinase, MMP)家族的蛋白酶解并释放NKG2D的可溶性配体,从而限制NK细胞的识别和激活,并导致NKG2D的表达下调。高水平的MICA和MICB在血清中与多种人类癌症的疾病进展有关。

除了上述依赖细胞接触的免疫抑制机制之外,肿瘤微环境中产生的许多分子也具有广泛的免疫抑制作用。其中,转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )是最受关注的免疫抑制分子之一,它主要由肿瘤微环境中的调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)、骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)、肿瘤相

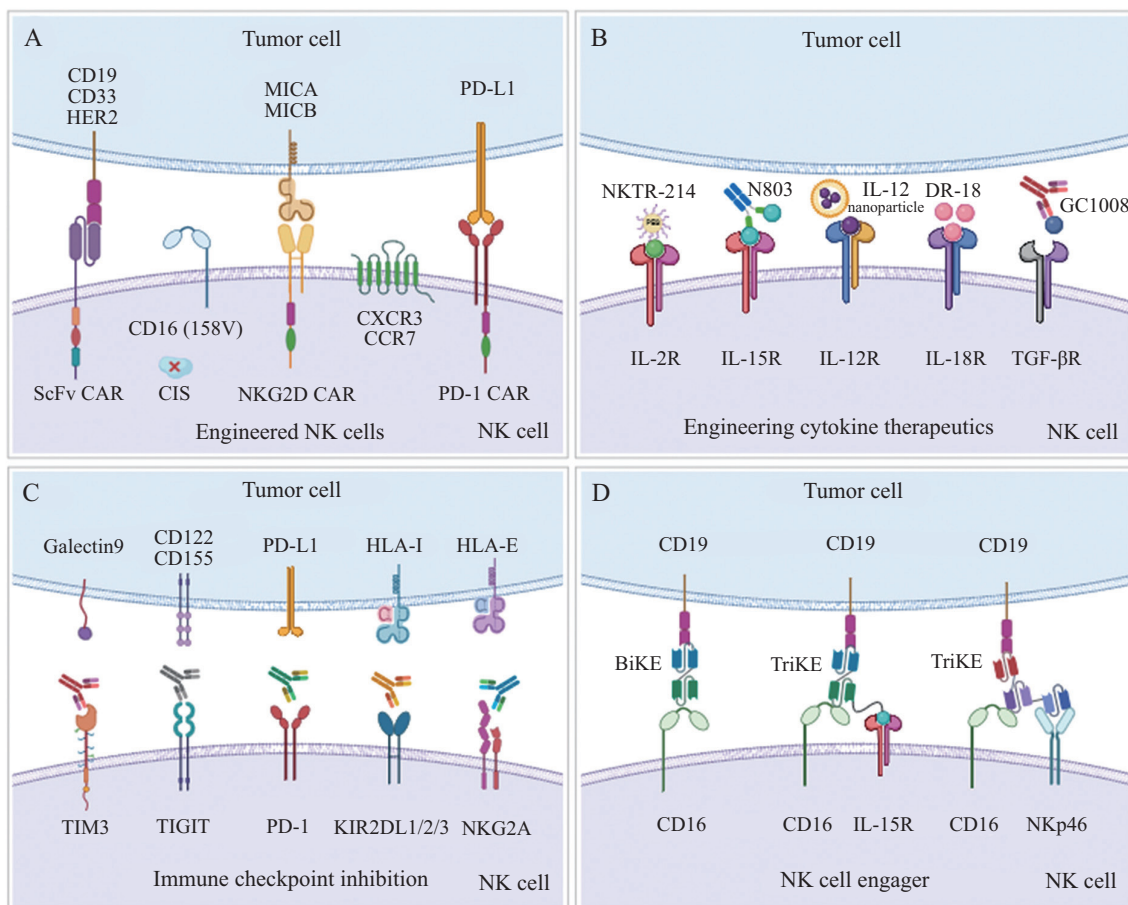


关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 以及癌细胞产生。TGF- $\beta$  可以通过抑制活化性受体 NKG2D 和 NKp30 的表达, 降低细胞因子的分泌, 减少颗粒的释放, 影响代谢和 mTOR 信号转导等方式来抑制 NK 细胞的功能<sup>[60]</sup>。此外, TGF- $\beta$  还能促使 NK 细胞分化为对肿瘤的溶解能力较弱的 I 型固有淋巴细胞 (type 1 innate lymphoid cell, ILC1)<sup>[61]</sup>。细胞外腺苷和前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 也是常见的在肿瘤微环境中产生的小分子, 它们明显抑制 NK 细胞的活性。在肿瘤微环境中, 缺氧是限制 NK 细胞细胞毒活性的另一个重要障碍。缺氧会导致肿瘤微环境中 TGF- $\beta$ 、吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 和 PGE2 等分子的高表达, 从而抑制 NK 细胞的细胞毒性<sup>[62]</sup>。此外, 在缺氧条件下, 肿瘤细胞通过糖酵解代谢产生大量乳酸, 导致肿瘤组织的酸化。酸化的环境会影响 NK

细胞的线粒体功能, 抑制葡萄糖摄取和三磷酸腺苷 (adenosine 5'-triphosphate, ATP) 产生, 从而降低 NK 细胞的活性和抗肿瘤效应<sup>[62]</sup>。

#### 4 基于NK细胞的免疫治疗进展

NK 细胞识别靶细胞无 MHC 限制性, 其具有广谱的抗肿瘤作用, 并在同种异体环境下表现出较高的安全性, 因此被视为极具前景的抗癌药物。在晚期白血病患者中, NK 细胞介导的免疫疗法已成为一种安全有效的治疗方式。近年来, 在抗癌研究方面对 NK 细胞的兴趣呈指数增长, 推动了 NK 细胞免疫疗法的创新。其中, 使用体外扩增的 NK 细胞或经过工程改造的 NK 细胞作为细胞治疗药物, 以及利用细胞因子、免疫检查点抑制剂、NK 细胞衔接器等来激活和动员内源性 NK 细胞, 是目前 NK 细胞免疫疗法中重要的策略 (图 3)。



A: 基因修饰NK细胞; B: 工程化细胞因子治疗; C: 免疫检查点抑制疗法; D: NK细胞衔接器。

A: engineered NK cells; B: engineering cytokine therapeutics; C: immune checkpoint inhibition; D: NK cell engagers.

图3 增强NK细胞抗肿瘤效力的策略

Fig.3 Strategies to enhance NK cell anti-tumour efficacy

#### 4.1 过继性NK细胞疗法

过继性NK细胞疗法是指将经过体外扩增或基因工程改造的自体或异体来源的NK细胞输注给癌症患者,以增加患者体内NK细胞的数量和抗肿瘤活性。这种疗法最早在造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)的临床研究中得到应用。RUGGERI等<sup>[63-64]</sup>的研究首次揭示了供体和受体之间存在的一定程度的KIR-HLA不匹配,可以激发供体的NK细胞发挥细胞毒作用,从而产生移植抗白血病(graft-versus-leukemia, GVL)效应。这些研究为异基因NK细胞过继疗法奠定了基础。

过继性疗法中使用的NK细胞来源多种多样,包括外周血、脐带血、经诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)分化得到的NK细胞,以及永生化的NK细胞系。外周血来源的NK细胞易于从患者或捐赠者中获得。这些NK细胞,特别是异基因来源的NK细胞,在体外通过IL-2和IL-15刺激后快速活化和扩增,之后被转输至肿瘤患者体内,显示出强大的抗肿瘤效果。最新研究表明,在体外使用细胞因子IL-12、IL-15和IL-18联合刺激后,NK细胞可以产生细胞因子诱导的记忆样(cytokine-induced memory-

like, CIML) NK细胞。CIML NK细胞经历了转录、表观遗传和代谢的重编程,具有更长的寿命和更强的抗癌功能,并且CIML NK细胞功能反应的触发不受KIR与KIR配体相互作用的影响,在临床和临床前的研究中都显示出良好的抗肿瘤效果<sup>[65]</sup>。目前已经有几项正在进行的临床试验(例如NCT01898793、NCT03068819、NCT04024761、NCT04290546、NCT04354025、NCT04634435和NCT04893915),评估CIML NK细胞在不同恶性肿瘤(包括急性髓系白血病、多发性骨髓瘤和头颈部鳞状细胞癌等)患者中的安全性和治疗效果(表1)。相较于外周血,脐带血富含NK细胞(约占淋巴细胞的30%),脐带血来源NK细胞分泌细胞因子的能力与外周血NK细胞相当,但细胞毒性相对较弱,这些细胞更容易在培养中生长和受刺激<sup>[66]</sup>。此外,脐带血中还含有一定比例的NK细胞前体,NK细胞前体具有分化为成熟NK细胞的潜力。因此,脐带血也成为强大的异基因NK细胞来源。目前有几项临床试验(例如NCT01619761和NCT02280525)正在评估脐带血NK细胞的治疗效果。

尽管外周血和脐带血是NK细胞丰富的来源,但它们存在一些缺点,如采集延迟、供体血液中白细胞的异质性和高昂的费用。脐带血干细胞或

表1 代表性NK细胞抗肿瘤免疫治疗临床试验

Table 1 Selected clinical trials of NK cell-based cancer immunotherapy

药物/制剂 Agent	治疗方案 Treatment	疾病 Disease	阶段 Phase	临床试验识别号 Trial identifiers
CIML NK cell	CIML NK cell adoptive therapy	Relapsed AML after allogeneic hematopoietic cell transplant	Recruiting	NCT03068819
	CIML NK cells in combination with IL-2	Relapsed AML, MDS and myeloproliferative neoplasms (MPN)	I	NCT04024761
	Chemotherapy, CIML NK cells in combination with IL-2	Relapsed/refractory AML and MDS	II	NCT04893915 NCT04354025
	CIML NK cells plus KP1237 and low dose IL-2	MM	I	NCT04634435
	Chemotherapy, CIML NK cells in combination with IL-2 or ALT-803	AML and MDS	I/II	NCT01898793
	CIML NK cells, N803 in combination with ipilimumab or cetuximab	Advanced head and neck cancer	I	NCT04290546
Cord blood NK cell	Chemotherapy, with or without total body irradiation, cord blood NK cell transplant	Leukemia and lymphoma	I	NCT01619761 NCT02280525 NCT01619761
hetIL-15 (NIZ985)	NIZ985 alone and in combination with PDR001	Metastatic and advanced solid tumors	I/Ib	NCT02452268
	NIZ985 plus spartalizumab	Relapsed advanced solid tumors and lymphoma	I	NCT04261439

续表1

药物/制剂 Agent	治疗方案 Treatment	疾病 Disease	阶段 Phase	临床试验识别号 Trial identifiers
ALT-803 (N803)	ALT-803 in conjunction with rituximab	Relapse/refractory indolent B cell non-Hodgkin lymphoma	I/II	NCT02384954
	ALT-803 in combination with nivolumab	Pretreated, advanced, or meta-static non-small cell lung cancer	I/II	NCT02523469
	ALT-803 activated, haploidentical donor NK cells and subcutaneous ALT-803 given after chemotherapy	Relapsed/refractory AML	II	NCT03050216
	NK-92 in combination with ALT-803	Stage III (IIIB) or stage (IV) merkel cell carcinoma (MCC)	II	NCT02465957
	Combination therapy of avelumab, haNK and N-803	MCC who have progressed on or after checkpoint inhibitor therapy	II	NCT03853317
	IL15 superagonist, N-803, and anti-PD-L1 NK cell therapy	Advanced pancreatic cancer	II	NCT04390399
	Combination treatment of PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitor plus N-803	Patients who have previously received treatment with PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors	II	NCT03228667
Simcha IL-18 (ST-067)	ST-067 with or without obinutuzumab pre-treatment, and ST-067 in combination with pembrolizumab	Advanced solid malignancies	Ia/II	NCT04787042
IPH2101 IPH2102 (anti-KIR2DL1/2/3 mAb)	IPH2101	MM, smoldering multiple myeloma	I/II	NCT00552396 NCT00999830 NCT01222286 NCT01248455
	IPH2102	AML	II	NCT01687387
	IPH2102 in combination with elotuzumab	MM	I	NCT2252263
IPH4102 (anti-KIR3DL2 mAb)	IPH4102/lacutamab alone or in combination with chemotherapy	Advanced T-cell lymphoma	II	NCT03902184
IPH2201 (anti- NKG2A mAb)	IPH2201 (monalizumab)	Gynecologic malignancies	I	NCT02459301
	IPH2201	Squamous cell carcinoma of the oral cavity	I/II	NCT02331875
	IPH2201 in combination with durvalumab	Recurrent or metastatic colorectal cancer	I/II	NCT02671435
	IPH2201 in combination with ibrutinib	Relapsed, refractory or previously untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL)	I/II	NCT02557516
	IPH2201 plus cetuximab	Recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck	I/II III	NCT02643550 NCT04590963
	Durvalumab in combination with oleclumab or IPH2201	Stage III unresectable non-small cell lung cancer	III	NCT05221840
AFM13	AFM13 (anti-CD30/CD16A monoclonal antibody)	Recurrent of refractory CD30 positive Hodgkin or non-Hodgkin lymphomas	I/II	NCT04074746
AFM24	AFM24 (a tetravalent bispecific anti-EGFR/ CD16 antibody)	Advanced solid tumor	I/II	NCT04259450
TriKE	GTB-3550 (CD16/IL-15/CD33) tri-specific killer cell engager	CD33 <sup>+</sup> high risk MDS, refractory/relapsed AML or advanced systemic mastocytosis	I/II	NCT03214666



iPSC经过体外分化成为异基因NK细胞,成为另一个重要的来源。通过这些方法得到的NK细胞可以作为“即用型”产品,并作为标准化的治疗方案用于任何患者。此外,在这些细胞中更容易进行基因操作。目前正在对多个脐带血干细胞或iPSC来源的NK细胞产品进行临床测试,以评估其安全性和有效性。永生化的NK细胞系,如NK-92和YT-S,是异基因NK细胞的另一个来源。这些细胞系在体外经过规范化培养,并经过辐照处理后输注到患者体内,可以杀死癌症患者的肿瘤细胞。然而,辐照限制了这些细胞在体内的扩增,这对持久的临床疗效构成了潜在障碍。

随着嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)工程在过继T细胞疗法中的成功以及临床获批,工程化改造NK细胞作为免疫治疗候选细胞,使得过继性NK细胞疗法重新焕发生机。目前的研究主要集中在提高NK细胞的活性、靶向性和持久性。CAR修饰的同种异体NK(CAR-NK)细胞成为最有希望的免疫治疗候选细胞。类似于CAR-T细胞,CAR-NK细胞可以通过CAR结构的单链抗体可变区(single-chain fragment variable, scFv)识别肿瘤抗原,以增强NK细胞的特异性。CAR-NK细胞还具有通过活化性受体(如NKG2D、NKp46、DNAM-1等)识别和靶向肿瘤细胞的固有能力,以及通过CD16介导的ADCC作用杀伤癌细胞的能力。因此,CAR-NK细胞可以通过使用CAR依赖和非依赖机制来识别和杀伤肿瘤细胞,具有在MHC-I表达下调、肿瘤抗原丢失或突变的情况下高效根除肿瘤细胞的能力。这种效应可以克服抗原丢失导致的CAR-T细胞疗法的耐药性,并降低因为CAR靶向特异性肿瘤抗原丢失而导致的复发风险。与CAR-T细胞相比,CAR-NK细胞具有更低的细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)风险。CAR-NK细胞的来源多样化,可产生适用于临床规模癌症治疗的“即用型”细胞制剂。目前已经进行了几项针对CD19、CD33、CD7、MUC1和HER2的CAR-NK细胞的临床试验,以评估其在治疗血液恶性肿瘤和实体肿瘤方面的安全性和有效性<sup>[67-68]</sup>。

NK细胞受体(NK cell receptor, NKR)是基因修饰NK细胞的靶点。经过基因工程改造的NKR-NK细胞通过过表达NK细胞受体的胞外区能够靶

向表达相应配体的癌细胞,并利用胞内区传递的激活信号来激活NK细胞。根据所修饰的NKR类型的不同,NKR-NK细胞可以分为“激活型”和“抑制型”两类。前者主要靶向广泛表达在大多数实体肿瘤和血液恶性肿瘤上的活化型受体配体,例如通过NKG2D、NKp30和DNAM-1修饰的NK细胞,这些工程化的NK细胞可以针对多种肿瘤类型<sup>[69]</sup>。而“抑制型”NKR-NK细胞则通过基因工程将检查点受体(如PD-1)的胞内结构域替换成共刺激结构域,以传递激活信号,逆转肿瘤微环境介导的免疫抑制,从而靶向表达抑制性配体(如PD-L1)的肿瘤<sup>[70]</sup>。

除了CAR修饰和NKR修饰的NK细胞外,还有其他基因修饰产品正在被探索。其中一种方法是通过表达膜结合型IL-15受体信号复合物来促进NK细胞的持久性和存活。另一种方法是通过表达趋化因子受体或黏附受体(如CXCR3或CCR7)来增强NK细胞的肿瘤浸润能力<sup>[71-72]</sup>。对CD16a分子的158位氨基酸进行突变,可防止ADAM17蛋白酶的切割,从而增强ADCC作用<sup>[73]</sup>。利用CRISPR-Cas9基因编辑技术,可删除iPSC来源NK细胞中的负调节因子CIS(cytokine-inducible SH2-containing protein),以增强NK细胞的抗肿瘤活性<sup>[74]</sup>。此外,利用基因编辑技术从NK细胞中去除CD38,可以避免治疗性抗CD38抗体达雷木单抗(daratumumab)介导的NK细胞的“自相残杀”行为<sup>[75]</sup>。还可以引入可诱导的caspase-9自杀开关基因,在肿瘤消退后通过给予小分子二聚化剂在体内清除遗传工程细胞<sup>[76]</sup>。将转基因和现代基因编辑技术应用于NK细胞的修饰,为过继性NK细胞治疗产品的开发提供了广泛的可能性。

#### 4.2 细胞因子疗法

细胞因子在调节NK细胞免疫反应方面起着重要作用。使用细胞因子促进内源性NK细胞的动员这一免疫疗法在癌症治疗的临床研究中显示出了令人鼓舞的结果。IL-2、IL-12、IL-15、IL-18和TGF- $\beta$ 等细胞因子已经显示出对NK细胞介导的抗肿瘤免疫应答具有调节作用,并在作为癌症治疗临床药物的开发方面取得了快速进展。这些细胞因子可以通过调节NK细胞的功能和活性来为免疫治疗提供新的策略和选择。

IL-2最初被描述为一种T细胞生长因子,但它也可以刺激NK细胞的激活和增殖。高剂量的IL-2

体外刺激或体内注射可以有效产生淋巴因子活化杀伤(lymphokine-activated killer, LAK)细胞, 其中的主要成分是NK细胞<sup>[77]</sup>。LAK细胞表现出强大的抗肿瘤活性, 使得部分转移性肾癌和转移性黑色素瘤患者实现了长期生存。虽然IL-2已经被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准作为一线免疫治疗药物用于治疗上述适应症, 但由于其严重的副作用, 其应用受到限制。目前已开发了多种策略来提高IL-2治疗的疗效并降低毒性。其中一种策略是基于IL-2/IL-2R结合结构进行分子改造筛选出的“超级IL-2”。这种“超级IL-2”显著增强了与IL-2R $\beta$ 的结合亲和力, 在刺激CD8<sup>+</sup> T细胞和NK细胞方面显示出非常强的活性, 并减少了Treg细胞的积累, 降低了毒性。它可以通过NK依赖方式控制MHC-I缺陷型小鼠肿瘤的生长。将“超级IL-2”与聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)偶联后形成的聚乙二醇化IL-2(被称为NKTR-214), 可以选择性地遮盖“超级IL-2”与IL-2R $\alpha$ 的结合, 并延长其在体内的半衰期。NKTR-214在小鼠黑色素瘤转移模型以及晚期或转移性实体肿瘤患者中显示出更高的单药疗效<sup>[78-79]</sup>。在小鼠模型和临床试验中, NKTR-214与抗CTLA-4或抗PD-L1单抗联合应用产生了协同和持久的抗肿瘤效应<sup>[78,80]</sup>。此外, 将IL-2或其突变体与白蛋白或抗体的Fc区域融合可以显著延长其在体内的半衰期。将针对成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)和癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的抗体与IL-2或其突变体融合, 可以增强其对肿瘤的靶向性, 更有效地诱导CD8<sup>+</sup> T细胞和NK细胞介导的抗肿瘤免疫反应, 并减少因IL-2滞留在外周血液中而引起的细胞毒性<sup>[81-82]</sup>。

IL-15与IL-2共享相同的受体 $\beta$ 链和 $\gamma$ 链。IL-15可以激活和扩增NK细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞, 但不会激活Treg细胞, 因此被认为是最有前景的IL-2替代物。体外研究表明, IL-15处理可以恢复肿瘤微环境中耗竭NK细胞线粒体的完整性, 增强细胞毒性和促进IFN- $\gamma$ 产生。重组IL-15(rIL-15)在多种移植瘤小鼠模型中促进了肿瘤(包括黑色素瘤、结直肠癌和淋巴瘤)退缩并减少了其转移。rIL-15已经在多项临床试验中作为单药治疗或用于辅助细胞免疫治疗。除了rIL-15外, 还有一种名为hetIL-15(也被称为NIZ985)的融合蛋白由IL-15与IL-15R $\alpha$ 构建而成, 在

临床前研究中显示出可减缓肿瘤生长以及增加NK细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞的肿瘤浸润, 并促进IFN- $\gamma$ 、细胞毒性颗粒产生和抗凋亡蛋白BCL-2的表达<sup>[83]</sup>。目前, hetIL-15正处于I/II期临床试验阶段, 用于治疗转移性癌症患者(例如NCT02452268和NCT04261439)。另外, 一种名为N-803的IL-15“超激动剂”, 由含有N72D突变的rIL-15与IL-15R $\alpha$  sushi结构域-IgG1-Fc融合蛋白组成, 在大量的癌症小鼠模型中引起了肿瘤退缩并延长了小鼠存活时间<sup>[84]</sup>。N803已经与NK细胞免疫治疗、免疫检查点抑制剂单独或联合治疗在多个临床试验(例如NCT01898793、NCT02384954、NCT02465957、NCT02523469、NCT02782546、NCT02890758、NCT03050216、NCT03228667、NCT03853317、NCT04390399和NCT04290546)中得到应用(表1)。

促炎细胞因子IL-12和IL-18可以刺激NK细胞的活化, 增强NK细胞产生IFN- $\gamma$ 的能力和细胞毒活性。由于这些有益的功能, 一些研究正在探索IL-12和IL-18作为内源性NK细胞激活剂的疗效。然而, 全身给予IL-12会引起许多不良反应。为了更有效地激活肿瘤部位的T细胞和NK细胞, 并显著减少不良反应, 研究人员将IL-12与肿瘤靶向抗体结构域进行了融合。此外, 通过瘤内注射编码IL-12的DNA或RNA, 以及通过纳米颗粒、外泌体等给药系统递送重组IL-12, 将细胞因子定位于注射部位, 可以大大减少系统毒性<sup>[85]</sup>。这些替代给药方法增加了肿瘤浸润NK细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞的数量, 增强了抗肿瘤免疫反应。IL-18的输注治疗癌症显示出了可耐受的毒性, 但其疗效有限。肿瘤中诱导表达分泌型IL-18拮抗剂IL-18BP(IL-18 binding protein)限制了IL-18的免疫治疗效果。通过蛋白质定向进化和酵母展示技术, 研究人员筛选获得了与IL-18R $\alpha$ 结合但不与IL-18BP结合的突变体DR-18(decoy-resistant IL-18)<sup>[86]</sup>。使用DR-18治疗增加了瘤内CD8<sup>+</sup> T细胞和NK细胞的数量, 增强了IFN- $\gamma$ 的产生和细胞毒活性, 并产生了强大的肿瘤生长抑制效应。此外, DR-18治疗还可以显著恢复NK对MHC-I缺陷肿瘤的杀伤功能。目前, 针对DR-18(simcha IL-18)正在进行临床试验, 以评估其在肿瘤免疫治疗中的安全性和有效性(NCT04787042)。

抑炎细胞因子TGF- $\beta$ 通过多种机制抑制NK细胞介导的抗肿瘤免疫效应。因此, 抑制TGF- $\beta$ 的策略具有恢复NK细胞功能并抑制肿瘤生长的潜力。外源性

TGF- $\beta$ I型受体小分子抑制剂 galunisertib(LY2157299)可以上调人体外活化的NK(activated NK, aNK)细胞表面的激活性受体DNAM-1、NKp30和NKG2D,以及死亡配体TRAIL的表达,从而增强aNK细胞对神经母细胞瘤细胞的细胞毒性和ADCC<sup>[87]</sup>。Galunisertib可以促进aNK细胞与dinutuximab结合,提高神经母细胞瘤的治疗效果。临床研究显示,galunisertib治疗可以提高肝癌和胰腺癌患者的总体生存率,但其对患者NK细胞活性和功能的影响还需要进一步研究。目前,TGF- $\beta$ 受体的中和抗体 fresolimumab(GC1008)已经进入临床试验阶段。放疗与fresolimumab联合应用可以增加乳腺癌转移患者中循环NK细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞的数量。这表明 fresolimumab可能在增强免疫治疗效果方面具有潜力。

### 4.3 免疫检查点抑制剂

NK细胞表面的活化性受体和抑制性受体下游信号的整合决定了NK细胞的功能反应性。因此,利用抑制性受体的阻断抗体来激发NK细胞的抗肿瘤活性为NK细胞免疫疗法提供了一种有吸引力的策略。目前,正在进行针对抑制性KIRs、NKG2A、PD-1、TIM-3、TIGIT、CD96、SIRP $\alpha$ 等免疫检查点的阻断抗体的临床评估和开发。

作为免疫检查点阻断抗体开发的首要靶点,NK细胞固有地表达的KIR家族抑制性受体被广泛研究。阻断这类受体可以模拟“丢失自我”的识别,从而激活NK细胞的抗肿瘤活性。目前,正在进行多个针对抑制性KIRs的单克隆抗体的临床评估和开发,例如针对KIR2DL1/2/3的人源IgG4单克隆抗体IPH2101(1-7F9)和lirilumab(IPH2102/BMS-986015)。尽管这些抗体在临床前研究中显示出了抗肿瘤治疗潜力,但作为单药治疗在I期(例如NCT00552396)和II期(例如NCT00999830、NCT01222286、NCT01248455、NCT01687387)临床研究中并未取得令人满意的效果<sup>[88-90]</sup>(表1)。这可能是由于阻断KIR2DL1/2/3破坏了NK细胞的“教育”过程,从而使NK细胞恢复到一种低反应状态,无法有效清除肿瘤。目前正在进行的一项I期临床研究(NCT2252263)显示,lirilumab增强了elotuzumab介导的细胞杀伤作用<sup>[91]</sup>。此外,几项临床试验(例如NCT03902184)正在评估IPH4102联合PD-1、CTLA-4阻断或联合化疗对治疗T细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)的安全性和疗效。另一个有吸引力的靶点是抑制性受体复

合物CD94/NKG2A。近50%的外周血NK细胞表达NKG2A,它识别非经典MHC-I分子HLA-E。NKG2A及其配体HLA-E的上调表达与多种癌症的不良预后相关。目前已经开发出针对NKG2A的人源化IgG4阻断抗体 monalizumab(IPH2201)。临床前研究显示,通过阻断NKG2A的抑制功能,monalizumab可以增强NK细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞的抗肿瘤活性<sup>[92]</sup>。类似于lirilumab,monalizumab作为单药治疗的疗效有限。然而,与单药治疗相比,monalizumab与cetuximab或durvalumab联合应用取得了令人鼓舞的疗效<sup>[92]</sup>。

针对PD-1、TIGIT和TIM-3的免疫检查点阻断在克服T细胞耗竭、重新激活T细胞的抗肿瘤反应能力方面取得了突破性进展。这些受体在多种癌症患者的外周血和肿瘤浸润NK细胞中上调表达,关于它们对NK细胞的功能有何影响的研究正在临床前模型中进行。在自发性肿瘤、诱发性肿瘤和移植瘤小鼠模型中,PD-1在NK细胞上表达,而癌细胞中PD-L1的表达会导致NK细胞反应减弱,并导致体内产生更具侵袭性的肿瘤。PD-1和PD-L1的阻断可以解除NK细胞的抑制,从而增强其抗肿瘤免疫功能<sup>[50]</sup>。此外,PD-1和PD-L1的阻断抗体还可以通过增强NK细胞的ADCC效应来诱导抗肿瘤功能<sup>[93]</sup>。

TIGIT是一种在NK细胞上诱导表达的免疫抑制性受体,通过与CD155和CD112结合,抑制NK细胞功能,从而帮助肿瘤在体内生长。TIGIT与荷瘤小鼠和结肠癌患者的NK细胞耗竭有关,TIGIT的阻断可以逆转NK细胞的耗竭,激发强大的抗肿瘤免疫<sup>[52]</sup>。同时,TIGIT与PD-L1的联合阻断可以更有效地逆转荷瘤小鼠和结肠癌患者的NK细胞衰竭<sup>[52]</sup>。TIM-3在静息状态下的CD56<sup>bright</sup> NK细胞群中表达,且这群NK细胞在受到IL-12、IL-15和IL-18的刺激后显著上调表达TIM-3。TIM-3在多种癌症和慢性感染中上调,导致NK细胞的耗竭。体外的TIM-3阻断可以逆转来自转移性黑色素瘤患者的NK细胞的耗竭,促进NK细胞增殖、增加IFN- $\gamma$ 产生和增加细胞毒性<sup>[51]</sup>。目前,TIGIT和TIM-3的阻断抗体已经用于针对T细胞的癌症治疗的临床试验,这为研究它们对患者NK细胞反应的影响提供了机会。同时,这些靶点阻断抗体与其他检查点联合使用的潜力也有待进一步探索。

SIRP $\alpha$ 、LIRB1、Siglec-7/9和CD200R也是极具潜力的免疫治疗靶点。SIRP $\alpha$ 在NK细胞介导的



抗病毒或抗肿瘤细胞毒性中起到抑制作用。其配体CD47在多种肿瘤细胞中上调表达,导致肿瘤细胞免疫逃逸。阻断SIRP $\alpha$ 或CD47抗体可以增加NK细胞对HNSCC和K562细胞系的细胞毒性。选择性耗竭NK细胞显著削弱了抗SIRP $\alpha$ 抗体的抗肿瘤效果<sup>[53]</sup>。因此,阻断SIRP $\alpha$ -CD47免疫检查点的抗体可能增强NK细胞的抗肿瘤能力。LIRB1在部分静息状态的NK细胞表面表达,其配体HLA-G在多种原发性肿瘤和转移性恶性肿瘤中表达,并与多种癌症中NK功能下降相关。膜结合和可溶性HLA-G与LIRB1的相互作用已被证明可抑制NK功能,包括细胞毒性、细胞因子产生和趋化因子分泌功能,因此被视为潜在的免疫治疗靶点<sup>[94]</sup>。Siglec-7/9是近年来NK细胞疗法中备受关注的靶点。天然的Siglec-7/9配体可以抑制NK细胞的激活,而癌细胞高唾液酸化有助于逃避NK细胞的免疫监视。使用唾液酸酶或唾液酸转移酶抑制剂来抑制唾液酸化已被证明是增强NK细胞介导的细胞毒性的有效策略。阻断Siglec-7/9的抗体可以提高NK细胞对体外肿瘤细胞的细胞毒性<sup>[48]</sup>。此外,敲除Siglec-7的NK-92细胞系对白血病细胞表现出高度和持久的细胞毒性<sup>[95]</sup>。这些数据表明,抗Siglec-7/9阻断抗体可以用于癌症免疫治疗。CD200-CD200R抑制途径也被认为是一个潜在的免疫治疗靶点。在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者中,CD200的过度表达抑制了NK细胞的抗肿瘤反应,从而增加了这些患者复发的风险。阻断CD200的抗体可以恢复NK细胞的活性<sup>[54]</sup>。

#### 4.4 NK细胞衔接器

多种免疫逃逸机制限制了NK细胞与肿瘤细胞的结合,这是开发有效的NK细胞疗法面临的主要障碍。为了克服这一问题,许多研究小组已经开发出能够使肿瘤浸润性NK细胞以抗原特异性方式与肿瘤细胞接触的衔接器。这些衔接器能够将NK细胞定向到肿瘤细胞,通过触发NK细胞上的激活受体来引发强大的NK细胞介导的抗肿瘤反应。最初,NK细胞衔接器是由两个抗原靶向结构域(通常是scFv)组成的双特异性衔接蛋白。其中一个结构域靶向NK细胞激活受体,而另一个结构域与特定的肿瘤相关抗原结合。在此基础上,进一步连接多个抗原或细胞因子,这些分子形成了三特异性或四特异性的衔接蛋白,衔接蛋白进而增强了NK细胞的

抗肿瘤作用,并支持了NK细胞的增殖和存活。在多项临床前研究中,NK细胞衔接器用于治疗血液瘤和实体肿瘤,且展现出了强大的抗肿瘤疗效。

目前,针对肿瘤抗原CD19、CD20、CD30、CD33、HER2等的NK细胞衔接器已经在临床前研究和早期临床试验中展示出了潜力。这些衔接器主要通过CD16、NKp46或NKp30来激活NK细胞,从而诱导NK细胞的完全活化和肿瘤细胞的溶解<sup>[96]</sup>。其中,AFM13是临床进展最快的靶向CD30的CD16双特异性抗体。AFM13在与脐带血来源的NK细胞联合应用于治疗复发或难治性霍奇金淋巴瘤(relapsed/refractory Hodgkin lymphoma, RR-HL)的患者中,几乎达到了100%的客观缓解率(NCT04074746)<sup>[97]</sup>。目前,AFM13已被授予孤儿药物认定,用于外周T细胞淋巴瘤的治疗。另一个靶向EGFR的CD16双特异性抗体AFM24目前正处于I/II期临床试验阶段,用于治疗转移性结直肠癌和非小细胞肺癌(NCT04259450)。其他针对CD16的双特异性或三特异性衔接蛋白,如针对EpCAM、CD19、CD33、CD133、HER2、BCMA(AFM26)、CD123以及同时靶向CD19/CD22、CD200/BCMA和EGFR/PD-1的衔接蛋白,正处于多个肿瘤的临床前研究阶段<sup>[96]</sup>。另外,通过在CD16和靶向肿瘤抗原的Fv结构域之间插入IL-15构建的三特异杀伤活化因子(tri-specific NK Cell engagers, TriKEs),可以进一步增强NK细胞的抗肿瘤效应<sup>[98]</sup>。目前,针对CD133、CD19和CLEC12A的TriKEs正处于临床前研究阶段。此外,针对CD33的TriKE作为单药治疗中等度或重度骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)、难治性或复发性AML或晚期系统性肥大细胞病的方法,正处于I/II期临床试验(NCT03214666)阶段。还有其他先进的三特异抗体正在进行工程设计,以增强NK细胞介导的抗肿瘤反应。例如,基于CD16和NKp46的衔接蛋白(IPH6101/SAR443579)在临床前研究中展示出强大的抗肿瘤活性<sup>[99]</sup>。除了基于CD16的衔接器外,基于NKp46、NKp30或NKG2D的多种衔接蛋白也展示出了令人印象深刻的临床前活性。激活多个NK细胞受体的潜力使得NK细胞衔接器成为引人注目的免疫治疗策略,但仍需要进一步研究来确定哪些激活受体能够最佳地增强抗肿瘤反应。

## 5 展望

NK细胞疗法作为癌症治疗的有希望领域,已

经取得了一系列令人振奋的进展。通过了解NK细胞的基础生物学特性,并通过解除免疫检查点引起的免疫功能抑制、增强细胞活性和存活能力等方式,已经开发出多种有效的NK细胞免疫疗法。转基因NK细胞疗法在一些癌症类型中显示出初步的疗效迹象,而即用型产品可以克服传统转基因NK细胞来源所面临的障碍。此外,通过靶向肿瘤细胞表面受体的CAR和抗体工程技术,以及联合其他治疗方法,如免疫细胞连接剂,有望进一步增强NK细胞疗法的疗效。虽然该领域仍处于起步阶段,但展望未来,NK细胞疗法有望成为与T细胞相辅相成的治疗模式,并在某些适应症中取代T细胞疗法。

### 参考文献 (References)

- [1] YU X, WANG Y, DENG M, et al. The basic leucine zipper transcription factor NFIL3 directs the development of a common innate lymphoid cell precursor [J]. *eLife*, 2014, 3: e04406.
- [2] XU W, CHERRIER D E, CHEA S, et al. An id2RFP-reporter mouse redefines innate lymphoid cell precursor potentials [J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 1054-68.e3.
- [3] SERAFINI N, VOSSHENRICH C A J, DI SANTO J P. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(7): 415-28.
- [4] YANG Q, LI F, HARLY C, et al. TCF-1 upregulation identifies early innate lymphoid progenitors in the bone marrow [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(10): 1044-50.
- [5] SEEHUS C R, ALIAHMAD P, DE LA TORRE B, et al. The development of innate lymphoid cells requires TOX-dependent generation of a common innate lymphoid cell progenitor [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(6): 599-608.
- [6] JEEVAN-RAJ B, GEHRIG J, CHARMOY M, et al. The transcription factor Tcf1 contributes to normal nK cell development and function by limiting the expression of granzymes [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(3): 613-26.
- [7] RAMIREZ K, CHANDLER KATHERINE J, SPAULDING C, et al. Gene deregulation and chronic activation in natural killer cells deficient in the transcription factor ETS1 [J]. *Immunity*, 2012, 36(6): 921-32.
- [8] FATHMAN J W, BHATTACHARYA D, INLAY M A, et al. Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow [J]. *Blood*, 2011, 118(20): 5439-47.
- [9] YU J, FREUD A G, CALIGIURI M A. Location and cellular stages of natural killer cell development [J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(12): 573-82.
- [10] MALE V, NISOLI I, KOSTRZEWSKI T, et al. The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression [J]. *J Exp Med*, 2014, 211(4): 635-42.
- [11] GASCOYNE D M, LONG E, VEIGA-FERNANDES H, et al. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(10): 1118-24.
- [12] YANG M, LI D, CHANG Z, et al. PDK1 orchestrates early NK cell development through induction of E4BP4 expression and maintenance of IL-15 responsiveness [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(2): 253-65.
- [13] ZHANG J, LE GRAS S, POUXVIELH K, et al. Sequential actions of EOMES and T-BET promote stepwise maturation of natural killer cells [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5446.
- [14] WAGNER J A, WONG P, SCHAPPE T, et al. Stage-specific requirement for Eomes in mature NK cell homeostasis and cytotoxicity [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(9): 107720.
- [15] GORDON SCOTT M, CHAIX J, RUPP LEVI J, et al. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation [J]. *Immunity*, 2012, 36(1): 55-67.
- [16] JENNE C N, ENDERS A, RIVERA R, et al. T-bet-dependent SIP5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(11): 2469-81.
- [17] LI Z Y, MORMAN R E, HEGERMILLER E, et al. The transcriptional repressor ID2 supports natural killer cell maturation by controlling TCF1 amplitude [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(6): e20202032.
- [18] DELCONTE REBECCA B, SHI W, SATHE P, et al. The helix-loop-helix protein ID2 governs NK cell fate by tuning their sensitivity to interleukin-15 [J]. *Immunity*, 2016, 44(1): 103-15.
- [19] ALIAHMAD P, DE LA TORRE B, KAYE J. Shared dependence on the DNA-binding factor TOX for the development of lymphoid tissue-inducer cell and NK cell lineages [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(10): 945-52.
- [20] VAN HELDEN M J, GOOSSENS S, DAUSSY C, et al. Terminal NK cell maturation is controlled by concerted actions of T-bet and Zeb2 and is essential for melanoma rejection [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(12): 2015-25.
- [21] YU J, WEI M, MAO H, et al. CD94 defines phenotypically and functionally distinct mouse NK cell subsets [J]. *J Immunol*, 2009, 183(8): 4968-74.
- [22] RENOUX VIRGINIE M, ZRIWIL A, PEITZSCH C, et al. Identification of a human natural killer cell lineage-restricted progenitor in fetal and adult tissues [J]. *Immunity*, 2015, 43(2): 394-407.
- [23] LIM A I, LI Y, LOPEZ-LASTRA S, et al. Systemic human ILC precursors provide a substrate for tissue ILC differentiation [J]. *Cell*, 2017, 168(6): 1086-100.e10.
- [24] GRZYWACZ B, KATARIA N, SIKORA M, et al. Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells [J]. *Blood*, 2006, 108(12): 3824-33.
- [25] YU J, MAO H C, WEI M, et al. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> human NK-cell subsets [J]. *Blood*, 2010, 115(2): 274-81.
- [26] ROMAGNANI C, JUELKE K, FALCO M, et al. CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> killer Ig-like receptor<sup>-</sup> NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56<sup>dim</sup> NK cells upon activation [J]. *J Immunol*, 2007, 178(8): 4947-55.
- [27] CHAN A, HONG D L, ATZBERGER A, et al. CD56<sup>bright</sup> human NK cells differentiate into CD56<sup>dim</sup> cells: role of contact with peripheral fibroblasts [J]. *J Immunol*, 2007, 179(1): 89-94.
- [28] DULPHY N, HAAS P, BUSSON M, et al. An unusual CD-

- 56<sup>bright</sup>CD16<sup>low</sup> NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation [J]. *J Immunol*, 2008, 181(3): 2227-37.
- [29] LOPEZ-VERGÈS S, MILUSH J M, PANDEY S, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK-cell subset [J]. *Blood*, 2010, 116(19): 3865-74.
- [30] BJÖRKSTRÖM N K, RIESE P, HEUTS F, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56<sup>dim</sup> NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education [J]. *Blood*, 2010, 116(19): 3853-64.
- [31] COLLINS P L, CELLA M, PORTER S I, et al. Gene regulatory programs conferring phenotypic identities to human NK cells [J]. *Cell*, 2019, 176(1-2): 348-60.e12.
- [32] YANG R, MELE F, WORLEY L, et al. Human T-bet governs innate and innate-like adaptive IFN- $\gamma$  immunity against mycobacteria [J]. *Cell*, 2020, 183(7): 1826-47.e31.
- [33] KIEKENS L, VAN LOOCKE W, TAVEIRNE S, et al. T-BET and EOMES accelerate and enhance functional differentiation of human natural killer cells [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 732511.
- [34] WONG P, FOLTZ J A, CHANG L, et al. T-BET and EOMES sustain mature human NK cell identity and antitumor function [J]. *J Clin Investig*, 2023, 133(13): e162530.
- [35] COLLINS A, ROTHMAN N, LIU K, et al. Eomesodermin and T-bet mark developmentally distinct human natural killer cells [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(5): e90063.
- [36] VONG Q P, LEUNG W H, HOUSTON J, et al. TOX2 regulates human natural killer cell development by controlling T-BET expression [J]. *Blood*, 2014, 124(26): 3905-13.
- [37] TAVEIRNE S, WAHLEN S, VAN LOOCKE W, et al. The transcription factor ETS1 is an important regulator of human NK cell development and terminal differentiation [J]. *Blood*, 2020, 136(3): 288-98.
- [38] MACE E M, HSU A P, MONACO-SHAWVER L, et al. Mutations in *GATA2* cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56<sup>bright</sup> subset [J]. *Blood*, 2013, 121(14): 2669-77.
- [39] KARRE K. Natural killer cell recognition of missing self [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(5): 477-80.
- [40] KARRE K, LJUNGGREN H G, PIONTEK G, et al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy [J]. *Nature*, 1986, 319(6055): 675-8.
- [41] ELLIOTT J M, YOKOYAMA W M. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education [J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(8): 364-72.
- [42] RAULET D H, VANCE R E. Self-tolerance of natural killer cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(7): 520-31.
- [43] MOUSSA P, MARTON J, VIDAL S M, et al. Genetic dissection of NK cell responses [J]. *Front Immunol*, 2013, 3: 425.
- [44] SCHENKEL A R, KINGRY L C, SLAYDEN R A. The Ly49 gene family. A brief guide to the nomenclature, genetics, and role in intracellular infection [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 90.
- [45] BARTEL Y, BAUER B, STEINLE A. Modulation of NK cell function by genetically coupled C-type lectin-like receptor/ligand pairs encoded in the human natural killer gene complex [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 362.
- [46] KUMAR V, MCNERNEY M E. A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(5): 363-74.
- [47] LI Y, HOFMANN M, WANG Q, et al. Structure of natural killer cell receptor KLRG1 bound to E-cadherin reveals basis for MHC-independent missing self recognition [J]. *Immunity*, 2009, 31(1): 35-46.
- [48] JANDUS C, BOLIGAN K F, CHIJOKE O, et al. Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance [J]. *J Clin Investig*, 2014, 124(4): 1810-20.
- [49] MARKEL G. The mechanisms controlling NK cell autoreactivity in TAP2-deficient patients [J]. *Blood*, 2004, 103(5): 1770-8.
- [50] HSU J, HODGINS J J, MARATHE M, et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade [J]. *J Clin Investig*, 2018, 128(10): 4654-68.
- [51] DA SILVA I P, GALLOIS A, JIMENEZ-BARANDA S, et al. Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade [J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(5): 410-22.
- [52] ZHANG Q, BI J, ZHENG X, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(7): 723-32.
- [53] DEUSE T, HU X, AGBOR-ENOH S, et al. The SIRP $\alpha$ -CD47 immune checkpoint in NK cells [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(3): e20200839.
- [54] COLES S J, WANG E C Y, MAN S, et al. CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2011, 25(5): 792-9.
- [55] OH S C, KIM S E, JANG I H, et al. Ngr1 is an NK cell inhibitory receptor that destabilizes the immunological synapse [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(3): 463-73.
- [56] KOCH J, STEINLE A, WATZL C, et al. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection [J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(4): 182-91.
- [57] BOLES K S, BARCHET W, DIACOVO T, et al. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8<sup>+</sup> T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM [J]. *Blood*, 2005, 106(3): 779-86.
- [58] ARDOLINO M, AZIMI C S, IANNELLO A, et al. Cytokine therapy reverses NK cell anergy in MHC-deficient tumors [J]. *J Clin Investig*, 2014, 124(11): 4781-94.
- [59] FERRARI DE ANDRADE L, TAY R E, PAN D, et al. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity [J]. *Science*, 2018, 359(6383): 1537-42.
- [60] TAURIELLO D V F, SANCHO E, BATLLE E. Overcoming TGF $\beta$ -mediated immune evasion in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 22(1): 25-44.
- [61] GAO Y, SOUZA-FONSECA-GUIMARAES F, BALD T, et al. Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(9): 1004-15.
- [62] NI J, WANG X, STOJANOVIC A, et al. Single-cell RNA sequencing of tumor-infiltrating NK cells reveals that inhibition of transcription factor HIF-1 $\alpha$  unleashes NK cell activity [J]. *Immunity*, 2020, 52(6): 1075-87.e8.



- [63] RUGGERI L, CAPANNI M, CASUCCI M, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Blood*, 1999, 94(1): 333-9.
- [64] RUGGERI L, CAPANNI M, URBANI E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants [J]. *Science*, 2002, 295(5562): 2097-100.
- [65] ROMEE R, ROSARIO M, BERRIEN-ELLIOTT M M, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(357): 357ra123.
- [66] LUEVANO M, DARYOUZEH M, ALNABHAN R, et al. The unique profile of cord blood natural killer cells balances incomplete maturation and effective killing function upon activation [J]. *Hum Immunol*, 2012, 73(3): 248-57.
- [67] LIU E, MARIN D, BANERJEE P, et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(6): 545-53.
- [68] ZHANG C, HU Y, XIAO W, et al. Chimeric antigen receptor- and natural killer cell receptor-engineered innate killer cells in cancer immunotherapy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2083-100.
- [69] LEIVAS A, VALERI A, CORDOBA L, et al. NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma [J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(8): 146.
- [70] GUO C, WANG X, ZHANG H, et al. Structure-based rational design of a novel chimeric PD1-NKG2D receptor for natural killer cells [J]. *Mol Immunol*, 2019, 114: 108-13.
- [71] CARLSTEN M, LEVY E, KARAMBELKAR A, et al. Efficient mRNA-based genetic engineering of human NK cells with high-affinity CD16 and CCR7 augments rituximab-induced ADCC against lymphoma and targets NK cell migration toward the lymph node-associated chemokine CCL19 [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 105.
- [72] BONANNI V, ANTONANGELI F, SANTONI A, et al. Targeting of CXCR3 improves anti-myeloma efficacy of adoptively transferred activated natural killer cells [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 290.
- [73] ZHU H, BLUM R H, BJORDAHL R, et al. Pluripotent stem cell-derived NK cells with high-affinity noncleavable CD16a mediate improved antitumor activity [J]. *Blood*, 2020, 135(6): 399-410.
- [74] ZHU H, BLUM R H, BERNAREGGI D, et al. Metabolic reprogramming via deletion of CISH in human iPSC-derived NK cells promotes *in vivo* persistence and enhances anti-tumor activity [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(2): 224-37.e6.
- [75] NAEIMI KARAROUDI M, NAGAI Y, ELMAS E, et al. CD38 deletion of human primary NK cells eliminates daratumumab-induced fratricide and boosts their effector activity [J]. *Blood*, 2020, 136(21): 2416-27.
- [76] LIU E, TONG Y, DOTTI G, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity [J]. *Leukemia*, 2017, 32(2): 520-31.
- [77] ROSENBERG S A, MULE J J, SPIESS P J, et al. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2 [J]. *J Exp Med*, 1985, 161(5): 1169-88.
- [78] CHARYCH D H, HOCH U, LANGOWSKI J L, et al. NKTR-214, an engineered cytokine with biased IL2 receptor binding, increased tumor exposure, and marked efficacy in mouse tumor models [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(3): 680-90.
- [79] BENTEBIBEL S E, HURWITZ M E, BERNATCHEZ C, et al. A first-in-human study and biomarker analysis of NKTR-214, a novel IL2R $\beta$ -biased cytokine, in patients with advanced or metastatic solid tumors [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(6): 711-21.
- [80] DIAB A, TANNIR N M, BENTEBIBEL S E, et al. Bempegaldesleukin (NKTR-214) plus nivolumab in patients with advanced solid tumors: phase I dose-escalation study of safety, efficacy, and immune activation (PIVOT-02) [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(8): 1158-73.
- [81] KLEIN C, WALDHAEUER I, NICOLINI V G, et al. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(3): e1277306.
- [82] WALDHAEUER I, GONZALEZ-NICOLINI V, FREIMOSER-GRUNDSCHOBBER A, et al. Simlukafusp alfa (FAP-IL2v) immunocytokine is a versatile combination partner for cancer immunotherapy [J]. *MAbs*, 2021, 13(1): 1913791.
- [83] BERGAMASCHI C, PANDIT H, NAGY B A, et al. Heterodimeric IL-15 delays tumor growth and promotes intratumoral CTL and dendritic cell accumulation by a cytokine network involving XCL1, IFN- $\gamma$ , CXCL9 and CXCL10 [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000599.
- [84] RHODE P R, EGAN J O, XU W, et al. Comparison of the superagonist complex, ALT-803, to IL15 as cancer immunotherapeutics in animal models [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(1): 49-60.
- [85] NGUYEN K G, VRABEL M R, MANTOOTH S M, et al. Localized interleukin-12 for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575597.
- [86] ZHOU T, DAMSKY W, WEIZMAN O E, et al. IL-18BP is a secreted immune checkpoint and barrier to IL-18 immunotherapy [J]. *Nature*, 2020, 583(7817): 609-14.
- [87] TRAN H C, WAN Z, SHEARD M A, et al. TGF $\beta$ 1 blockade with galunisertib (LY2157299) enhances anti-neuroblastoma activity of the anti-GD2 antibody dinutuximab (ch14.18) with natural killer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(3): 804-13.
- [88] KOHRT H E, THIELENS A, MARABELLE A, et al. Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies [J]. *Blood*, 2014, 123(5): 678-86.
- [89] ROMAGNÉ F, ANDRÉ P, SPEE P, et al. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells [J]. *Blood*, 2009, 114(13): 2667-77.
- [90] CARLSTEN M, KORDE N, KOTECHA R, et al. Checkpoint inhibition of KIR2D with the monoclonal antibody IPH2101 induces contraction and hyporesponsiveness of NK cells in patients with myeloma [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(21): 5211-22.
- [91] SOLA C, BLERY M, BONNAFOUS C, et al. Lirilumab enhances anti-tumor efficacy of elotuzumab [J]. *Blood*, 2014, 124(21): 4711.
- [92] ANDRÉ P, DENIS C, SOULAS C, et al. Anti-NKG2A mAb is

- a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1731-43,e13.
- [93] BOYERINAS B, JOCHEMS C, FANTINI M, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of a novel anti-PD-L1 antibody avelumab (MSB0010718C) on human tumor cells [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(10): 1148-57.
- [94] CAROSELLA E D, GREGORI S, TRONIK-LE ROUX D. HLA-G/LILRBs: a cancer immunotherapy challenge [J]. *Trends Cancer*, 2021, 7(5): 389-92.
- [95] HUANG C H, LIAO Y J, FAN T H, et al. A developed NK-92MI cell line with Siglec-7neg phenotype exhibits high and sustainable cytotoxicity against leukemia cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1073.
- [96] ZHANG M, LAM K P, XU S. Natural killer cell engagers (NK-CEs): a new frontier in cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1207276.
- [97] NIETO Y, BANERJEE P P, KAUR I, et al. Innate cell engager AFM13 combined with preactivated and expanded cord blood-derived NK cells for patients with double refractory CD30<sup>+</sup>lymphoma [J]. *Blood*, 2022, 140: 415-6.
- [98] VALLERA D A, FELICES M, MCELMURRY R, et al. IL15 tri-specific killer engagers (TriKE) make natural killer cells specific to CD33<sup>+</sup> targets while also inducing persistence, *in vivo* expansion, and enhanced function [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(14): 3440-50.
- [99] GAUTHIER L, MOREL A, ANGERIZ N, et al. Multifunctional natural killer cell engagers targeting NKp46 trigger protective tumor immunity [J]. *Cell*, 2019, 177(7): 1701-13,e16.