

## · 实验室介绍 ·



周欣, 首都医学科学创新中心(CIMR)研究员, 博士生导师。2019年于中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(原生物化学与细胞生物学研究所)获得博士学位。2019年至2025年在北卡罗来纳大学教堂山分校从事博士后研究, 其间曾获得享有盛誉且极具竞争力的美国国家癌症研究所(NCI) K99基金资助资格, 并获北卡罗来纳大学JOSEPH S. PAGANO奖。2025年加入CIMR, 实验室专注于开发新型CAR-T/NKT细胞疗法以突破现有免疫细胞疗法在实体肿瘤中疗效有限的困境。实验室主要贡献有: (1) 成功构建了小鼠CAR-NKT细胞平台, 并证明了其可以通过调控肿瘤微环境在多种实体肿瘤中展现出更强的抗肿瘤效果(*Nat Cancer*, 2024; *Clin Cancer Res*, 2025); (2) 通过优化CAR分子结构以及联合其他策略来增强CAR-T治疗疗效(*J Immunother Cancer*, 2021; *Nat Cancer*, 2021; *Cell Mol Immunol*, 2024; *J Clin Invest*, 2025; 专利, WO2023199069A1); (3) 探索调控巨噬细胞中炎症产生的新分子机制以及在炎症相关疾病中的作用和功能(*Cell Rep*, 2019、2020)。  
<https://www.cimrbj.ac.cn/channel/1897895692970627072.html>

## NKT细胞疗法应用现状及前景

赵方浩<sup>1,2#</sup> 陈梦情<sup>1,2#</sup> 陈雪娇<sup>1,2\*</sup> 周欣<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>首都医科大学基础医学院, 北京 100069; <sup>2</sup>自身免疫病机制研究与新药研发北京市重点实验室, 首都医学科学创新中心免疫研究所, 首都医科大学, 北京 100069)

**摘要** 自然杀伤T细胞(natural killer T cell, NKT)是跨越先天免疫和适应性免疫的一群特殊T细胞亚群, 既表达T细胞受体又表达自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)相关受体; 根据其T细胞受体表达的不同, NKT细胞可分为三种类型。其中恒定自然杀伤T细胞(invariant natural killer T cell, iNKT)表达半恒定T细胞受体, 可通过CD1d依赖性途径识别肿瘤细胞发挥杀伤作用, 同时iNKT被激活后会快速分泌细胞因子, 调节多种免疫细胞共同抵抗肿瘤, 因此是抗肿瘤免疫的重要成员。针对CAR-T细胞疗法在实体肿瘤中疗效有限的困境及未来对通用现货型免疫细胞治疗产品的需求, 具有低致移植物抗宿主病(graft versus-host disease, GVHD)发生风险的iNKT, 为突破上述困境提供了CAR工程化免疫细胞疗法的新策略。该文将介绍NKT细胞特征及功能, 并重点阐述iNKT抗肿瘤特点及优势, 以及基于iNKT、CAR-iNKT的抗肿瘤治疗临床转化现状及未来发展。

**关键词** 实体瘤; 肿瘤免疫微环境; NKT细胞; 现货型免疫细胞疗法

## Current Progress and Prospects of NKT Cell Therapy

收稿日期: 2025-11-06

接受日期: 2025-12-01

\*共同第一作者

\*通信作者。Tel: 010-86738999, E-mail: chenxuejiao@cimrbj.ac.cn; zhouxin@cimrbj.ac.cn

Received: November 6, 2025

Accepted: December 1, 2025

#These authors contributed equally to this work

\*Corresponding authors. Tel: +86-10-86738999, E-mail: chenxuejiao@cimrbj.ac.cn; zhouxin@cimrbj.ac.cn

ZHAO Fanghao<sup>1,2#</sup>, CHEN Mengqing<sup>1,2#</sup>, CHEN Xuejiao<sup>1,2\*</sup>, ZHOU Xin<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>*School of Basic Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;*<sup>2</sup>*Beijing Key Laboratory of Autoimmune Disease Mechanism Research and Novel Drug Development, Chinese Institute for Immunology, Chinese Institutes for Medical Research, Capital Medical University, Beijing 100069, China)*

**Abstract** NKTs (natural killer T cells) are a unique T cell subset that bridges innate and adaptive immunity. They express both TCRs (T cell receptors) and receptors associated with NKs (natural killer cells). Based on their TCR forms, they are classified into three types. Among them, iNKTs (invariant natural killer T cells) express a semi-invariant TCR and can recognize and kill tumor cells through the CD1d-dependent pathway. Simultaneously, iNKT cells can boost an anti-tumor response by rapidly secreting large quantities of cytokines to stimulate various immune cells after activation. Thus, iNKT cells are crucial players in anti-tumor immunity. Given the limited efficacy of CAR-T cell therapy in solid tumors and the growing demand for universal off-the-shelf immunotherapies, iNKT cells—which pose a low risk of GVHD (graft versus-host disease)—represent a promising cell source for engineered CAR-based cellular therapies. This review will summarize the characteristics and functions of NKT cells, the anti-tumor features of iNKT cells, and the current clinical translation and future developments of iNKT-based and CAR-iNKT cell therapies for cancer.

**Keywords** solid tumor; tumor immune microenvironment; NKT cell; off-the-shelf immunotherapies

以嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR)-T为代表的细胞免疫治疗在临床上取得了令人瞩目的疗效。目前,全球已经有10余款产品上市,彻底改变了血液系统肿瘤的临床治疗格局<sup>[1-2]</sup>。然而,目前该疗法价格高昂且主要对淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤等血液系统肿瘤有效,而在实体肿瘤中疗效十分有限,这一现状制约了CAR-T细胞疗法的发展<sup>[2-3]</sup>。如何降低治疗成本、提升实体瘤应答率是细胞免疫治疗领域最为重要的两个方向<sup>[4-5]</sup>。

自然杀伤T细胞(natural killer T cell, NKT)是一类特殊的T淋巴细胞亚群,其既表达T细胞受体(T cell receptor, TCR)又表达自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)相关受体<sup>[6]</sup>。其中I型即恒定自然杀伤T细胞(invariant natural killer T cell, iNKT)在肿瘤免疫监视和抗肿瘤免疫中发挥着重要的作用,且不同于T细胞通过主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)识别抗原发挥功能,iNKT不依赖于MHC(人类中为HLA基因复合体),而通过MHC-I样分子CD1d呈递的方式识别内源性和外源性糖脂<sup>[6]</sup>。基于上述特点,以iNKT为基础的过继性细胞疗法导致移植物抗宿主病(graft versus-host disease, GVHD)的风险低,对于开发“现货型(off-the-shelf)”免疫细胞疗法以降低CAR-T疗法价格和缩短患者等待时间至关重要。

此外,iNKT不仅能通过其相对恒定TCR(invariant T cell receptor, iTCR)识别CD1d提呈的脂质抗原,直接杀伤肿瘤细胞;更能作为先天与适应性免疫的“桥梁”,通过快速分泌细胞因子,广泛激活NK、树突状细胞(dendritic cell, DC)、T细胞、B细胞等多种免疫细胞和转化肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)、髓系来源免疫抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs),重塑抗肿瘤免疫微环境<sup>[7]</sup>。多项临床研究数据表明,体内iNKT数量多的肿瘤患者,相对于iNKT数量少的患者具有更好的预后<sup>[8-10]</sup>,也充分提示了iNKT对于杀伤肿瘤的重要作用。因此,基于iNKT的细胞免疫治疗在以免疫抑制微环境为重要特点的实体肿瘤中可能具有更大的治疗潜力<sup>[11]</sup>。本文旨在回顾NKT研究历史以及基于iNKT疗法的研究进展。同时总结目前CAR-iNKT疗法在临床上遇到的挑战以及优化方向和策略,以期为基础研究和临床转化研究提供参考。

## 1 NKT基本特征及功能

### 1.1 NKT的起源、分化和发育

NKT最早于1986年由日本科学家谷口克(Masatoshi TANIGUCHI)团队<sup>[12]</sup>报道,是一类异质的先天性T淋巴细胞亚群,主要分布于肝脏和骨髓等组织,

在人类外周血 T 细胞中占比不足 1%<sup>[13-14]</sup>。它们与 T 细胞来源于相同的淋巴前体细胞,并在胸腺中完成成熟过程<sup>[15]</sup>。与通过 MHC-I 或 MHC-II 类分子识别肽段抗原的常规 T 细胞不同, NKT 主要识别由 CD1d 分子呈递的脂质抗原。CD1d 属于 CD1 家族(包括 CD1a、CD1b、CD1c、CD1d 和 CD1e 5 个成员),是一种非经典的 MHC-I 类分子,能够呈递多种内源性 & 外源性脂质抗原<sup>[14]</sup>。在表型特征上, NKT 既表达 NK 相关标志物(如 NKp46、NK1.1、CD16、CD56),具备典型的 NK 功能特性,同时也保留 T 细胞的相关受体表达,因而在免疫应答中表现出独特的双重功能<sup>[16]</sup>。

在胸腺内,大多数 NKT 在 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 双阳性(double positive, DP)阶段通过 TCR 识别由 CD1d 呈递的内源性脂质抗原(如 pLPE 或 eLPA)而被正向选择,少数可能更早从 TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 双阴性(double negative, DN)阶段分化而来<sup>[17]</sup>。成熟 NKT 依据转录因子表达分为三大功能亚群: PLZF<sup>lo</sup>T-bet<sup>hi</sup> 的 NKT1(主要分泌 IFN- $\gamma$ )、PLZF<sup>hi</sup> 的 NKT2(主要分泌 IL-4)和 PLZF<sup>im</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> 的 NKT17(主要分泌 IL-17)<sup>[18]</sup>。其中 NKT1 多在胸腺内成熟并驻留, NKT2 和 NKT17 则多以 NK1.1<sup>-</sup> 状态输出至外周<sup>[19]</sup>。在 NKT 发育过程中, PLZF、Egr2、RUNX1、ROR $\gamma$ t、NF- $\kappa$ B 等转录因子及 miRNA(如 miR-150、miR-155、miR-181 等)也发挥关键调控作用<sup>[20-21]</sup>。人源 NKT 发育路径与鼠源相似,但在外周比例更低、异质性更高,并存在 CD8<sup>+</sup> 亚群<sup>[22]</sup>。

## 1.2 NKT 的分类和功能

依据 TCR 类型,目前研究者大多将 NKT 分为三大类: I 型 NKT、II 型 NKT 和 NKT 样细胞(NKT-like, 亦称 III 型 NKT)<sup>[23]</sup>。I 型 NKT(即 iNKT)表达恒定的 TCR $\alpha$  链(人源为 V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18, 鼠源为 V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18)和限定数量的 TCR $\beta$  链(人源为 V $\beta$ 11, 鼠源为 V $\beta$ 2、V $\beta$ 7 和 V $\beta$ 8.2)<sup>[24]</sup>。在成熟过程中, iNKT 持续表达 CD4 或 CD8 共受体,据此 iNKT 可进一步划分为 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>、CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> 及 DN 三种功能亚型。CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> 与 DN 亚型以分泌 Th1 型细胞因子为主,表现出显著的细胞毒性效应;而 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> 亚型则主要产生 IL-4、IL-13 等 Th2 型细胞因子,更多发挥免疫辅助与调节功能。值得注意的是, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> 亚型表现出更强的细胞毒性,并高表达 CD16、NKG2C 及 NKG2D 等细胞毒性相关受体<sup>[25]</sup>。iNKT 高度保守的 TCR 结

构使其专一性地识别由 CD1d 分子提呈的具有  $\alpha$ -糖苷键的糖脂抗原,其中最典型的抗原是从海洋海绵中提取的  $\alpha$ -半乳糖神经酰胺( $\alpha$ -galactosylceramide,  $\alpha$ -GalCer, 又称 KRN7000)<sup>[24]</sup>。 $\alpha$ -GalCer 与 CD1d 结合后能强烈激活 iNKT,导致细胞因子的大量爆发性分泌,是研究 iNKT 的重要工具和免疫佐剂。此外,某些病原体(如鞘氨醇单胞菌、伯氏疏螺旋体)的细胞壁成分也包含这类糖脂,可激活 iNKT 以抵抗感染<sup>[26]</sup>。人体自身也能产生一些较弱的脂质抗原,如异三己糖神经酰胺(isoglobotrihexosylceramide, iGb3)和  $\beta$ -葡萄糖神经酰胺。这些自身抗原可能在稳态维持或应激状态下低水平激活 iNKT,参与免疫监视<sup>[26]</sup>。

不同于 iNKT 的 TCR 特征, II 型 NKT 的 TCR 库具有高度多样性,不表达恒定的 V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 链,不被  $\alpha$ -GalCer 激活。其 *TRAV* 基因重排呈现较高多样性(包括 *TRAV7*、*TRAV9* 及 *TRAV12* 等),从而使其能够识别更广泛的抗原<sup>[27]</sup>。目前鉴定明确的 II 型 NKT 抗原并不多,代表性抗原是硫酸脂(sulfatide),一种广泛分布于自身组织(如神经系统、胰腺、肝脏)的脂质。有研究报道 II 型 NKT 在肿瘤中的作用为免疫抑制,作用途径包括经由 IL-13 激活 MDSC 细胞释放 TGF- $\beta$  抑制 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)<sup>[28-29]</sup>,以及抑制 iNKT 介导的抗肿瘤免疫效应等<sup>[30-31]</sup>。部分临床研究发现 II 型 NKT 识别的一些脂质配体(如溶血磷脂酰胆碱)在癌症患者外周血中水平增加,可能与免疫抑制相关<sup>[32]</sup>。而 ZHAO 等<sup>[33]</sup>则报道 CpG 寡核苷酸激活的 II 型 NKT 产生 IFN- $\gamma$  而不产生 IL-13,这一特性有助于 CpG 抗肿瘤作用。因此, II 型 NKT 在肿瘤患者体内的作用及机制,仍有待在不同临床场景下开展系统性分析。III 型 NKT 细胞(CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T 细胞)囊括了区别于 I 型(CD1d 依赖并表达半恒定 TCR)和 II 型(CD1d 依赖表达多样性 TCR)但同时表达  $\alpha\beta$  或  $\gamma\delta$  TCR 并携带 NK 标志物(CD56/CD16)的 NKT。此类细胞兼具 T 细胞抗原特异性与 NK“自我缺失(missing-self)”杀伤功能,通过 NKG2D、DNAM-1 等受体快速识别应激诱导配体,释放穿孔素、颗粒酶等效应分子以及干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )等细胞因子参与 Th1 介导的免疫应答调控<sup>[34]</sup>。目前研究认为, III 型 NKT 细胞具有抗肿瘤潜力,但对其发育来源、TCR 抗原识别方式及抗原识别类型等知之甚少,亟待深入探索。在 NKT 的各亚群中, iNKT 因其具有明确的鉴定、培养、

分析工具,且在肿瘤免疫监视和抗肿瘤免疫中的重要作用,成为NKT中研究最为深入的类型。因此本文将重点讨论iNKT的抗肿瘤机制、特点及基于此类细胞的免疫疗法。值得注意的是,虽然iNKT表达相对恒定的TCR受体,可识别特异性CD1d复合物,但是也有报道表明,定位于不同器官的iNKT所表达的TCR CDR3存在个体异质性<sup>[35]</sup>。上述特征可能影响iNKT的应用开发,其对抗肿瘤效应、作用机制及治疗相关不良反应的潜在影响,仍有待于进一步研究。

## 2 iNKT用于抗肿瘤免疫治疗的特点及优势

iNKT可通过TCR-CD1d信号直接杀伤肿瘤细胞、TAM和MDSC细胞并通过快速分泌细胞因子激活NK、DC、T细胞、B细胞等免疫细胞,重塑抗肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME),进而发挥多重抗肿瘤作用(图1)。此外,iNKT因其TCR限定性,在应用于同种异体治疗时可极大降低由TCR不匹配而引起的GVHD发生的风险。因此,基于iNKT的CAR-iNKT疗法不仅增强了对肿瘤细胞的精准靶向性和杀伤能力(图1),同时也是极具潜力的“off-the-shelf”免疫细胞疗法<sup>[11]</sup>。

### 2.1 iNKT活化和抗肿瘤作用机制

iNKT可以被IL-12、IL-18和IFN- $\gamma$ 等炎症细胞因子活化,多见于细菌感染<sup>[36]</sup>;也可以像T细胞一样,通过iTCR和CD1d的识别途径活化<sup>[37]</sup>;另外,还可通过NK类似的NK相关受体途径活化<sup>[38]</sup>。iNKT识别抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APCs)或肿瘤细胞上的CD1d/脂质复合物,从而被激活,尤其是对CD1d/ $\alpha$ -GalCer复合物的响应最为显著<sup>[16]</sup>,这一机制在小鼠和人类中高度保守<sup>[16,39]</sup>。iNKT也可识别内源性脂抗原,在部分肿瘤类型中,iNKT在识别CD1d阳性肿瘤细胞后,会释放颗粒酶B、穿孔素等效应分子,从而发挥直接杀伤作用(图1A)<sup>[40-41]</sup>。活化后的iNKT还可以利用FasL和TRAIL两种死亡配体与肿瘤细胞上相应受体(Fas与DR4/5)结合,诱导肿瘤细胞发生程序性凋亡<sup>[42]</sup>。此外,iNKT还表达部分NK相关受体(例如NKG2D),识别肿瘤细胞上多种配体分子(例如MICA/MICB等),进而发挥杀伤作用(图1A)<sup>[43-44]</sup>。

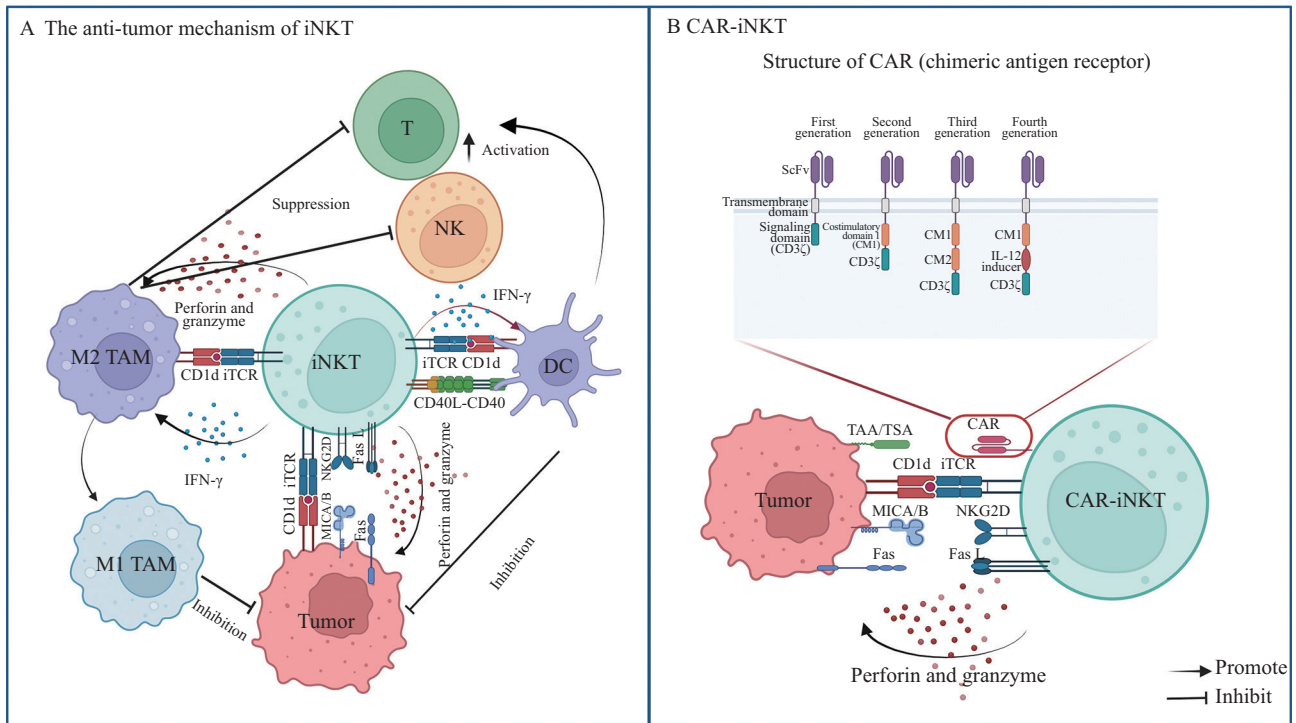
作为先天与适应性免疫的桥梁,活化后的iNKT能通过快速分泌细胞因子和细胞间接触激活多种免疫细胞。iNKT在被激活后能迅速通过IFN- $\gamma$ 依赖性途径促进NK、T细胞的增殖并增强细胞毒

性,这一过程对于 $\alpha$ -GalCer介导的抗肿瘤效应至关重要<sup>[45-46]</sup>。另外,iNKT通过CD40L-CD40相互作用可以驱动DC成熟,从而增强其激活T细胞免疫的能力(图1A)<sup>[47]</sup>。浸润至TME后,iNKT被证实可与表达CD1d的TAM共定位,并直接清除其中的M2型亚群<sup>[48]</sup>。此外,iNKT还能将促肿瘤的M2型TAM功能性重编程为具有抗肿瘤活性的M1样表型<sup>[49]</sup>,使TME的免疫平衡从抑制向激活状态倾斜(图1A)。综上所述,iNKT通过快速激活NK、促进DC成熟以及调控巨噬细胞功能等多重机制,系统地调节免疫微环境并发挥抗肿瘤作用。

### 2.2 基于CAR-iNKT的细胞疗法及优势

iNKT凭借其直接杀伤作用和重塑肿瘤免疫微环境的能力,在抗肿瘤免疫中展现出巨大潜力。然而,其功效在很大程度上受限于TCR对CD1d/脂质抗原的识别。虽然CD1d表达与很多肿瘤预后有关<sup>[41,50]</sup>,但并不是所有肿瘤都表达CD1d分子。为了充分利用iNKT固有的特性,研究者们将目光投向了CAR基因工程技术。利用CAR-iNKT实现iNKT固有优势与精准靶向的强强联合(图1B),为下一代细胞免疫治疗开辟新路径。

CAR是一种通过基因工程构建的合成受体,其典型结构包括一个能够特异性识别肿瘤表面抗原的胞外单链抗体可变区(single-chain variable fragment, scFv),一个连接胞内外区域的铰链区和跨膜区,以及一个或多个胞内信号域(如CD28、4-1BB、CD3 $\zeta$ 等)<sup>[4,51]</sup>(图1B)。该设计使经CAR修饰的免疫细胞能够以非MHC依赖的方式识别并精准杀伤肿瘤,目前在临床治疗中取得了卓越成效<sup>[2,52-53]</sup>。CAR-T细胞的问世与应用无疑是肿瘤免疫治疗领域的一个里程碑。然而,尽管其在肿瘤治疗中取得的成果令人鼓舞,但是该疗法引发的严重副作用仍是一个持续存在的问题。无论在血液肿瘤还是实体瘤中,CAR-T疗法均面临由T细胞过度活化引发的细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)与免疫效应细胞相关神经毒性综合征(immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS)等安全风险,其机制与活化的CAR-T细胞触发宿主先天免疫细胞(如单核/巨噬细胞)大量产生IL-6等炎症因子密切相关<sup>[54-55]</sup>。在实体瘤中,这一问题尤为复杂——致密的TME不仅阻碍CAR-T细胞浸润,更迫使浸润的细胞持续高强度工作,从而加剧其功能耗



A: 直接杀伤肿瘤机制, 通过iTCR-CD1d以及NKG2D识别肿瘤, 释放颗粒酶B、穿孔素, 从而发挥杀伤效应; 间接杀伤肿瘤机制, 通过iTCR-CD1d和CD40L-CD40信号途径活化DC, 后者进一步激活肿瘤微环境T细胞和NK细胞; 此外, iNKT还通过iTCR-CD1d直接杀伤M2型TAM, 并通过释放IFN- $\gamma$ 将M2型TAM转化成M1型TAM。B: CAR-iNKT除依靠iNKT固有抗肿瘤机制外, 进一步通过CAR分子识别肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)或肿瘤特异性抗原(tumor-specific antigen, TSA)直接杀伤肿瘤。

A: direct antitumor mechanism, iNKT cells recognize tumor cells via the iTCR-CD1d interaction and NKG2D, releasing granzyme B and perforin to directly kill tumor cells. Indirect antitumor mechanism, iNKT activate DCs (dendritic cells) through the iTCR-CD1d and CD40-CD40L signaling and activated DCs subsequently stimulate T cells and NK cells within the tumor microenvironment. Additionally, iNKT directly kill M2-type TAM via iTCR-CD1d and release IFN- $\gamma$  to convert M2-type TAMs to M1-type TAMs. B: in addition to leveraging the inherent antitumor mechanisms of iNKT, CAR-iNKT further directly kill tumor cells by recognizing TAAs (tumor-associated antigens) or TSAs (tumor-specific antigens) through their CAR molecules.

图1 iNKT及CAR-iNKT的抗肿瘤作用机制

Fig.1 Mechanisms of the anti-tumor effects of iNKT and CAR-iNKT

竭并增加毒性风暴的风险<sup>[56]</sup>。

与面临CRS和ICANS风险的CAR-T细胞相比, 基于先天性免疫细胞的CAR疗法整体安全性更优, 但不同细胞类型间存在差异(表1)。CAR-NK在临床试验中展现出较低的治疗相关毒性, 一项关键研究报道其未引发高级别CRS或ICANS<sup>[57]</sup>, 但其抗肿瘤效果及瘤内存活能力有待加强<sup>[58]</sup>。CAR- $\gamma\delta$ T细胞同样显示出可控的安全性, 但其细胞来源及抗肿瘤效果等问题还亟待解决<sup>[59]</sup>。CAR-iNKT在规避CRS与ICANS方面展现出独特优势, 其核心机制在于, iNKT在被激活后, 其细胞因子分泌谱与常规 $\alpha\beta$ T细胞存在根本差异: 它们能够迅速产生IFN- $\gamma$ 和IL-4, 但不大量产生驱动CRS的核心细胞因子IL-6<sup>[60-61]</sup>, 这从源头上降低了引发细胞因子风暴的风险。

除此之外, CAR-iNKT在实体肿瘤治疗方面具

有独特优势。CAR-iNKT展现出优于CAR-T细胞的实体肿瘤浸润能力, 能有效清除脑部淋巴瘤; 同时, 其活化和分泌多种效应分子(如IFN- $\gamma$ 、穿孔素、颗粒酶B)的速度更快、能力更强, 从而介导了更强大的早期抗肿瘤反应<sup>[62]</sup>。与仅依赖单一信号通路的CAR-T细胞不同, 在部分肿瘤类型和临床情景下, CAR-iNKT具有双重靶向能力: 一方面通过CAR识别肿瘤相关抗原, 另一方面通过内源性TCR识别CD1d呈递的脂质抗原<sup>[62-63]</sup>。这种双途径激活机制可产生协同效应, 降低肿瘤免疫逃逸的风险<sup>[11,62,64]</sup>。

### 2.3 iNKT作为“off-the-shelf”细胞疗法的优势

目前获批上市的过继性细胞疗法均为采用患者自体免疫细胞的个体化疗法, 此种策略虽然具有较高的安全性, 但制备成本高、用药等待时间长

表1 不同CAR工程化免疫细胞疗法的差异

Table 1 Overview of the differences among various CAR-engineered immune cell therapies

特征 Characteristics	CAR-T	CAR-NK	CAR- $\gamma\delta$ T	CAR-iNKT
Cell type	$\alpha\beta$ T cell	NK	$\gamma\delta$ T cell	iNKT
Antigen recognition	MHC-restricted	Non-MHC restricted	Non-MHC restricted	Non-MHC restricted
Anti-tumor mechanism	CAR	CAR+NK receptors	CAR+ $\gamma\delta$ TCR [65]	CAR+iTCR+NK receptors [62,64,66-67]
Cell source	PBMC, UCB, iPSC	PBMC, UCB, cell lines, iPSC, HSC	PBMC, UCB, HSC	PBMC, UCB, iPSC, HSC
Persistence <i>in vivo</i>	Long	Short	Moderate	Long
Toxicity	CRS, ICANS [54-55,62]	Low CRS, ICANS and GVHD [57]	Low CRS, ICANS and GVHD [68]	Low CRS, ICANS and GVHD [23,60-62]
Anti-tumor potential	Weak (in solid tumor) [56]	Moderate	Moderate [68]	Strong (in solid tumor) [48,62]
Off-the-shelf	Low	High	High	High [69]

PBMC: 外周血单核细胞; UCB: 脐带血; iPSC: 诱导多能干细胞; HSC: 造血干细胞。

PBMC: peripheral blood mononuclear cell; UCB: umbilical cord blood; iPSC: induced pluripotent stem cell; HSC: hematopoietic stem cell.

且存在制备失败风险,这不仅在一定程度上限制了细胞疗法的发展,也缩小了能够获益的患者群体。“Off-the-shelf”治疗策略则是采用健康供者或干细胞来源的免疫细胞,经大规模标准化生产制备后作为商品药物储存,患者经临床评估后可即时接受治疗。“Off-the-shelf”细胞疗法首先要解决的便是GVHD风险问题。 $\alpha\beta$ T细胞是同种异体细胞移植中引发GVHD的主要因素<sup>[70]</sup>,其具有高度多样性的TCR且同时识别MHC分子和MHC呈递的抗原,而MHC在人群中具有高度多态性, $\alpha\beta$ T细胞的TCR会将MHC不匹配的宿主识别为“异己”,进而对宿主广泛的组织、器官进行无差别免疫攻击。目前基于常规CAR-T开发“off-the-shelf”疗法的策略,绝大多数都需要敲除供体内源TCR<sup>[71]</sup>,而实验表明这会极大地缩短回输CAR-T细胞在体内的存活时间<sup>[72]</sup>。

不同于 $\alpha\beta$ T细胞,iNKT TCR不识别MHC/多肽复合物,仅专一识别CD1d/脂质复合物。CD1d分子结构类似于MHC-I类分子,具有疏水性抗原结合裂缝,适合结合脂类抗原<sup>[73]</sup>。同时,iNKT的TCR对CD1d/脂质复合物的识别也不同于 $\alpha\beta$ T细胞TCR识别MHC/多肽复合物。基于人源和鼠源的iNKT TCR-抗原-CD1d复合物的结构研究显示,iNKT TCR以一种保守的平行对接方式与CD1d/脂抗原复合物结合,且不依赖于脂质抗原化学结构的多样性<sup>[74]</sup>,表明iNKT TCR功能类似于一种模式识别受体,主要识别CD1d分子本身<sup>[73]</sup>。CD1d基因多态性非常有限且在人群中高度保守<sup>[75]</sup>。因此,向患者输注大量同种

异体iNKT,引发GVHD的风险较低。与此同时,在同种异体造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)治疗中观察到iNKT数量与GVHD效应呈负相关,表明iNKT可通过抑制GVHD效应发挥免疫保护作用<sup>[69]</sup>。基于鼠源的研究则发现CD4<sup>+</sup> iNKT能够通过诱导Treg细胞扩增等途径消除潜在的致命GVHD反应且保留移植抗肿瘤效应<sup>[76]</sup>。此外,目前研究表明,iNKT TCR的CDR2 $\beta$ 和CDR3 $\alpha$ 环在iNKT TCR-CD1d相互作用中具有关键作用<sup>[77-78]</sup>,而来自人源和鼠源iNKT TCR的CDR3 $\alpha$ 和CDR2 $\beta$ 之间环具有高度的序列一致性,不仅表明iNKT TCR-CD1d相互作用在进化上的高度保守性,也支持了基于鼠源模型的研究结果与人源的高度相关性,有利于更系统地研究iNKT潜在的GVHD风险。

“Off-the-shelf”细胞疗法面临的另一挑战则是排斥风险,即在大量输入“off-the-shelf”细胞产品后患者自体免疫系统会识别这些细胞为“异己”,进而产生宿主抗移植反应(host versus graft reaction, HVGR)。虽然参考iNKT在GVHD中的免疫调节性保护作用 and 少量临床探索研究<sup>[79]</sup>,iNKT相较于 $\alpha\beta$ T细胞的免疫排斥效应更低,但iNKT组成型表达MHC-I类分子,激活后可诱导表达MHC-II类分子,使得其仍然面临HVGR风险,进而影响其体内持续性和疗效<sup>[80]</sup>。目前,可采用基因编辑敲除B2M、CIITA等基因以降低MHC-I/II类分子表达水平,同时过表达HLA-E或CD47的策略,规避来自 $\alpha\beta$ T细胞和

天然免疫细胞(NK和巨噬细胞)的排斥。

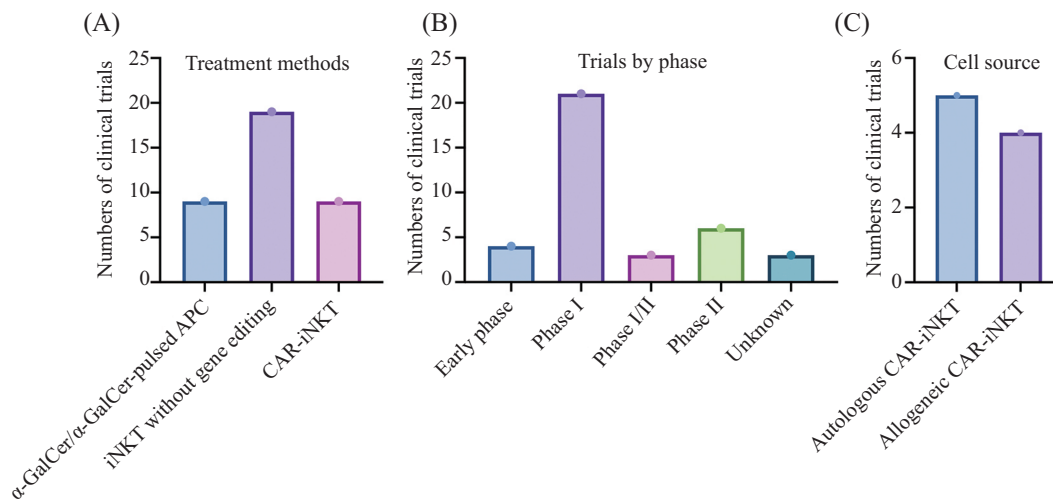
### 3 基于iNKT的抗肿瘤疗法临床应用现状

较多临床前研究数据已证实iNKT具有较高的抗肿瘤潜力,为其转化应用于临床抗肿瘤免疫治疗提供了有力支撑。基于iNKT开展抗肿瘤治疗的临床策略包括:(1)给予 $\alpha$ -GalCer或者 $\alpha$ -GalCer处理过的APC细胞(主要为DC)等,以激活患者内源性iNKT;(2)过继性回输体外活化、扩增后的iNKT;(3)过继性回输体外活化、扩增同时经过基因编辑的CAR-iNKT。国内外公开资料可查询的临床试验数量近40项,大多数研究尚处于I期临床试验阶段(图2A和图2B)。目前已有部分研究致力于开发“off-the-shelf”CAR-iNKT的细胞疗法,以满足临床对通用型免疫细胞疗法的迫切需求(图2C)。

#### 3.1 激活内源性iNKT的抗肿瘤免疫治疗

$\alpha$ -GalCer因其与CD1d结合后能够快速激活iNKT并引发抗肿瘤免疫响应,成为激活iNKT的理想激动剂。一项在实体肿瘤患者中开展的I期临床试验显示,通过静脉注射给予患者50~4 800 mg/m<sup>2</sup>的 $\alpha$ -GalCer,未观察到剂量限制性毒性(dose-limiting toxicity, DLT),且部分患者血清中IFN- $\gamma$ 、IL-12和GM-CSF水平升高<sup>[81]</sup>。该研究首次确认了激活内源性iNKT治疗肿瘤的可行性,但 $\alpha$ -GalCer单药

疗效有限。随后研究者发现在小鼠体内 $\alpha$ -GalCer激活iNKT后会诱导iNKT长期无能(anergy),这不仅导致iNKT进一步激活的效率降低,还可能加剧肿瘤发生发展<sup>[82]</sup>。而将 $\alpha$ -GalCer加载到DC后再注射到体内,能够诱导更强、更持久且更有效的iNKT激活反应<sup>[83]</sup>。因此更多研究者采用荷载 $\alpha$ -GalCer的DC,激活内源性iNKT以引发抗肿瘤免疫响应。NIEDA等<sup>[84]</sup>首次报道采用 $\alpha$ -GalCer荷载DC治疗转移性实体肿瘤的临床研究,观察到此类疗法能够诱导体内iNKT扩增,使血清IFN- $\gamma$ 、IL-12水平升高,并促进外周血NK、T细胞活化,同时在部分患者中观察到肿瘤血清标志物水平降低。随后研究者在晚期肺癌患者中开展了多项 $\alpha$ -GalCer荷载DC的临床试验<sup>[85-88]</sup>,在这些临床研究中均未观察到治疗相关严重不良事件(serious adverse event, SAE),但观察到TME中iNKT数量增加和IFN- $\gamma$ 水平上调,部分患者获得疾病缓解。RICHTER等<sup>[89]</sup>在骨肉瘤中也开展了类似的临床试验,发现6例患者对治疗具有良好的耐受性,且在4例疾病可测量患者中观察到有3例肿瘤相关单克隆免疫球蛋白水平降低。此外,其他一些活化iNKT的激动剂,如ABX196和7DW8-5也在临床上表现出安全性,目前正在I期临床验证有效性中<sup>[90-91]</sup>。这一系列基于iNKT固有抗肿瘤机制的探索性临床研究,证明了iNKT抗肿瘤疗法的安全性和有效性,为过继性iNKT/CAR-iNKT疗法奠定了基础。



A: 不同治疗策略的iNKT临床试验统计; B: iNKT临床试验分期统计; C: 不同细胞来源CAR-iNKT临床试验统计。

A: classification of clinical trials based on iNKT by intervention measures; B: distribution of clinical trials based on iNKT by phase; C: classification of clinical trials of CAR-iNKT by cell source.

图2 基于iNKT开展的临床试验汇总

Fig.2 Summary of clinical trials based on iNKT

### 3.2 过继性iNKT抗肿瘤治疗

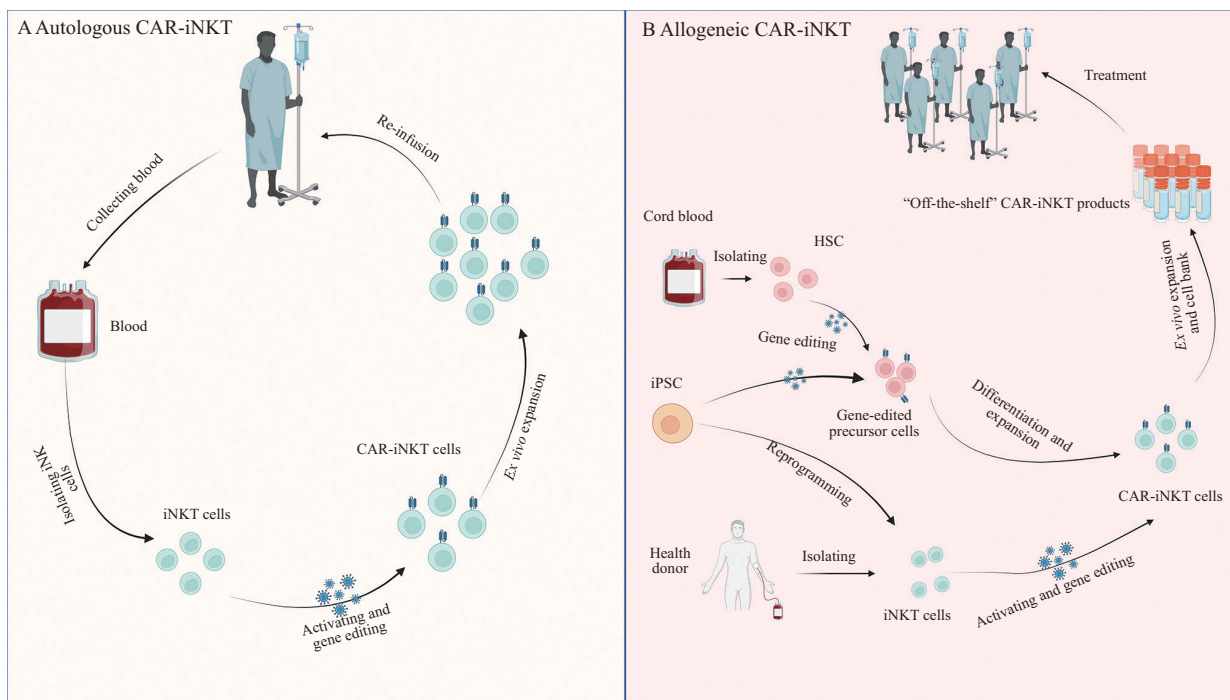
$\alpha$ -GalCer除作为激动剂应用于临床治疗外,也是体外大量扩增iNKT的常用刺激物<sup>[92]</sup>。癌症患者常存在iNKT比例较少或功能受损的情况,并且这一现象与较差的临床预后相关<sup>[8-9,93-94]</sup>,因此将体外大量扩增后的iNKT回输患者体内的过继性细胞疗法,是基于iNKT抗肿瘤的另一治疗策略。自2006年报道首个自体iNKT过继性治疗非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)临床研究至今<sup>[95]</sup>,国内外相继开展了二十多项基于iNKT过继性疗法的临床试验,涉及NSCLC、头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)、肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、胰腺癌、黑色素瘤等晚期实体肿瘤<sup>[7]</sup>。已公布临床试验结果显示,采用自体iNKT的过继性疗法在患者体内具有良好的耐受性<sup>[7]</sup>。虽然在接受iNKT联合 $\alpha$ -GalCer荷载DC的临床试验中,44%(8/18)的HNSCC患者

在治疗后获得部分缓解(partial response, PR)<sup>[96-97]</sup>,但多数基于iNKT治疗肿瘤的临床疗效仍十分有限。尽管如此,一项经标准化制备和冻存的同种异体iNKT(agentT-797)治疗复发/难治性多发性骨髓瘤(NCT04754100)和实体肿瘤(NCT05108623)的临床研究结果显示,接受治疗的患者(包括2例未经过淋巴清除的患者)均未发生GVHD、CRS和ICANS,且未出现DLT<sup>[79]</sup>。该项研究明确了iNKT作为一种“off-the-shelf”免疫细胞产品的临床安全性,其在体内的持续性有待进一步的临床验证。

### 3.3 过继性CAR-iNKT抗肿瘤治疗

CAR-iNKT疗法是改善过继性iNKT疗法的有效方法,同时“off-the-shelf”CAR-iNKT疗法相较于自体CAR-iNKT疗法可缩短治疗周期、降低治疗成本、提高临床转化效率(图3)。

目前国内外临床试验注册中心已有9项基于CAR-iNKT治疗肿瘤的研究在开展,其中5项基于



A: 自体CAR-iNKT细胞疗法通过分离患者外周血iNKT, 随后经基因编辑、体外扩增制备成CAR-iNKT后回输患者进行治疗。B: 同种异体CAR-iNKT疗法可通过健康供者外周血、iPSC和HSC经分离或定向分化为iNKT, 并经过基因编辑和体外大量扩增获得冻存CAR-iNKT产品, 患者经临床评估后即可接受CAR-iNKT治疗。

A: autologous CAR-iNKT therapy: iNKTs are isolated from the patient's own peripheral blood. Following genetic editing to express the CAR and *in vitro* expansion, the CAR-iNKTs are infused back into the same patient for treatment. B: allogeneic CAR-iNKT therapy: iNKTs can be derived from healthy donors via isolation from peripheral blood, or through directed differentiation of iPSCs (induced pluripotent stem cells) or HSCs (hematopoietic stem cells). These cells then undergo genetic editing and large-scale *in vitro* expansion to generate cryopreserved, off-the-shelf CAR-iNKT products. Eligible patients can receive this therapy after clinical evaluation.

图3 自体CAR-iNKT细胞疗法和同种异体CAR-iNKT疗法流程  
Fig.3 Processes of autologous and allogeneic CAR-iNKT therapies

自体 CAR-iNKT 技术, 4 项基于同种异体 CAR-iNKT 技术 (表 2)。这些临床试验都尚在进行阶段, 包括靶向 GD2 的自体 CAR-iNKT 治疗复发/难治性神经母细胞瘤, 靶向 CD70 的自体 CAR-iNKT 治疗复发或转移肾细胞癌、实体肿瘤, 以及靶向 CD19 的同种异体 CAR-iNKT 治疗 B 细胞恶性肿瘤。2020 年, HECZEY 团队<sup>[98]</sup>公布了自体 GD2 CAR-iNKT 治疗复发/难治性儿童神经母细胞瘤的早期临床试验 (NCT03294954) 结果, 为维持 CAR-iNKT 在体内的持续性, 研究者在表达 CAR 分子的同时共表达细胞因子 IL-15 (GD2-CAR.15 NKT)。他们在 3 例接受治疗的患者中未观察到 DLT, 回输后 4 周内外周血中可检测到 GD2-CAR.15 NKT 细胞的扩增, 同时观察到 GD2-CAR.15 NKT 细胞能够浸润到肿瘤组织, 且

1 例患者出现骨转移病灶的消退。该研究随后更新的临床结果进一步证实了 GD2-CAR.15 NKT 细胞的安全性, 12 例接受治疗的患者中 1 例患者经历 2 级 CRS, 客观响应率 (objective response rate, ORR) 为 25% (3/12), 其中 2 例患者获得 PR, 1 例患者获得完全缓解 (complete response, CR); 同时发现回输细胞中 CD62L<sup>+</sup> NKT 比例与 GD2-CAR.15 NKT 细胞的体内扩增和治疗响应呈正相关<sup>[99]</sup>。这项研究结果证实了 CAR-iNKT 的细胞治疗实体肿瘤的临床有效性。

CD19 CAR-T 细胞疗法在 B 细胞恶性肿瘤中取得了巨大的成功, 但已上市相应产品均基于自体 T 细胞。目前也有 4 项同种异体 CAR-iNKT 治疗 B 细胞恶性肿瘤的临床试验正在开展, 均靶向 B 细胞表面抗原 CD19。其中 2 项临床研究 (NCT03774654、

表 2 基于 CAR-iNKT 的临床试验项目  
Table 2 Clinical trials utilizing CAR-iNKT

自体或异体 Autologous or allogeneic	临床注册号 Trial ID	题目 Title	靶点 Target	疾病类型 Disease indication	阶段 Phase	目前状态 Current stage
Autologous	NCT03294954	GD2 specific CAR and interleukin-15 expressing autologous NKTs to treat children with neuroblastoma	GD2	Relapsed/refractory high-risk neuroblastoma	I	Recruiting
	NCT06182735	CD70-targeted CAR-NKT (CGC729) therapy in the renal cell carcinoma	CD70	Relapsed/metastatic advanced renal cell carcinoma	I	Recruiting
	NCT06394622	A clinical research about CD70-targeted CAR-NKTs therapy advanced malignant solid tumors	CD70	Advanced malignant solid tumor	I	Recruiting
	NCT06728189	A clinical research about CD70-targeted CAR-NKTs therapy in subjects with advanced malignant solid tumors	CD70	Advanced malignant solid tumors	I	Recruiting
	NCT06870279	A clinical research of CD70-targeted CAR-NKTs (CGC738) therapy in RCC	CD70	Advanced clear cell renal cell carcinoma	I	Not yet recruiting
Allogeneic	NCT05487651	Allogeneic NK T-cells expressing CD19 specific CAR in B-cell malignancies	CD19	Refractory/relapsed B cell lymphoma or leukemia	I	Recruiting
	NCT03774654	CD19.CAR allogeneic NKT for patients with relapsed or refractory B-cell malignancies (ANCHOR)	CD19	Refractory/relapsed B cell lymphoma or leukemia	I	Not yet recruiting
	NCT04814004	Clinical study of CAR-iNKTs in the treatment of relapsed/refractory/high-risk B-cell tumors	CD19	Refractory, relapsed, or high-risk B cell tumors	I	Unknown
	ChiC-TR2500109007	Efficacy and safety of a universal CAR19 iNKTs injection in adult patients with relapsed/refractory CD19-positive B-cell hematological malignancies	CD19	Relapsed/refractory CD19-positive B-cell hematological malignancies	0	Recruiting

NCT05487651)在表达CD19 CAR分子的同时过表达IL-15,并通过shRNA干扰B2M和CD74的表达以降低HLA-I和HLA-II水平,从而增强CAR-iNKT在体内的持续性并降低排斥风险。初步临床结果显示,接受CAR-iNKT回输后无SAE发生,仅1例患者发生1级CRS,7例接受治疗的非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)患者中3例获得PR,2例接受治疗的B细胞急性淋巴细胞白血病(B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)患者中1例获得CR<sup>[100]</sup>。这些临床研究的进展将为“off-the-shelf”CAR-iNKT疗法提供现实依据。

#### 4 CAR-iNKT临床转化面临的挑战及应对策略

尽管CAR-iNKT是一种有前景的免疫细胞疗法,但真正将其转化应用于临床仍面临诸多挑战。CAR-iNKT整体制备流程与CAR-T细胞类似,包括免疫细胞采集、体外活化扩增、CAR基因转导、细胞冻存及复苏(图3A和图3B)。但由于iNKT与T细胞所依赖的活化信号不同,两者体外活化扩增的关键环节存在较大技术差异。与CAR-T细胞相比,制备符合临床标准的CAR-iNKT面临更为严峻的挑战。其根本原因在于iNKT在外周血的稀缺性与“off-the-shelf”疗法对细胞的大量需求之间存在着根本矛盾,这极大地限制了iNKT临床转化与规模化生产。此外,CAR-iNKT抗肿瘤作用途径和分子机制较CAR-T复杂(尤其针对实体肿瘤),构建有效的临床前研究模型对于CAR-iNKT疗法至关重要。而如何提高CAR-iNKT的体内持续性、肿瘤杀伤能力等,也是临床转化中重点关注的因素。

##### 4.1 CAR-iNKT制备策略及改进方向

iNKT在人外周血中非常稀少,仅占总T细胞的0.01%~1.00%<sup>[25]</sup>,这一生理特性给其体外大规模扩增带来了严峻挑战,难以直接获得满足临床治疗所需的细胞数量。而较多研究报道相较于健康人,在癌症患者中观察到iNKT数量减少及功能受损<sup>[8,93]</sup>,进一步增加了自体CAR-iNKT的制备难度。在首个自体iNKT过继性细胞治疗NSCLC临床研究中,研究者采用 $\alpha$ -GalCer联合细胞因子IL-2扩增iNKT,培养3周获得的iNKT纯度仅在0.3%到21.5%<sup>[95]</sup>。目前采用磁珠分选方式从外周血中分离iNKT,随后用 $\alpha$ -GalCer荷载的PBMC、APC细胞或者CD3/CD28抗体联合IL-2、

IL-7、IL-15、IL-21等细胞因子刺激扩增,可获得大量高纯度iNKT。CAR-iNKT的制备则还需要对iNKT进行基因编辑,通常采用病毒感染方式实现。

基于患者细胞来源的自体CAR-iNKT扩增、培养周期至少需要20天,相较于自体CAR-T进一步延长了患者等待时间,增加了疾病进展风险。目前虽然有少量建立NKT细胞株的研究报道,但关于其直接转化应用还研究较少<sup>[101-102]</sup>。因此基于健康供者、造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)以及诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)的“off-the-shelf”CAR-iNKT成为更优策略(图3B)<sup>[103]</sup>。采用健康供者外周血构建同种异体CAR-iNKT与自体CAR-iNKT制备流程类似,但不同供者iNKT存在较大异质性,导致临床标准化制备不可控因素较多。为解决外周血中iNKT含量少、难以搭建标准化“off-the-shelf”CAR-iNKT平台的问题,更多研究者转向采用HSC以及iPSC开发同种异体CAR-iNKT疗法。近年来,LI研究团队<sup>[80,104]</sup>利用造血干/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)基因编辑技术和无需饲养细胞的体外培养技术,建立了能满足临床需要的高纯度、大量同种异体CAR-iNKT制备方法。该方法采用冷冻脐带血分选获得CD34<sup>+</sup>HSPC细胞,随后采用包含人*iNKT-TCR*、*CAR*以及其他优化基因(例如*IL-15*等)的慢病毒感染48 h,基因编辑后的细胞经过扩增(2周)、分化(1周)、深度分化(1周)和扩增(2周)4个阶段的培养,可从一个供者脐带血(约 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  CD34<sup>+</sup> HSPC细胞)获得高达 $10^{12}$ 的高纯度CAR-iNKT,满足临床1 000~10 000次的治疗剂量(约 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ /剂量)<sup>[80,104]</sup>。目前,基于该方法的同种异体CAR-iNKT,包括BCMA CAR-iNKT<sup>[104]</sup>、CD19 CAR-iNKT<sup>[104]</sup>、GPC3 CAR-iNKT<sup>[104]</sup>、GD2 CAR-iNKT<sup>[104]</sup>、MSLN CAR-iNKT<sup>[66-67]</sup>、CD33 CAR-iNKT<sup>[105]</sup>、EGFRVIII CAR-iNKT<sup>[106]</sup>以及CD70 CAR-iNKT<sup>[107]</sup>的抗肿瘤疗效和安全性已在广泛的实体肿瘤和血液肿瘤临床前研究中得到验证。同时LI等<sup>[80]</sup>的研究报道,这种CAR-iNKT培养方法也适用于人外周血来源的CD34<sup>+</sup> HSPC细胞。此外,URAKAMI等<sup>[108]</sup>则基于iPSC开发了靶向HER2的CAR-iNKT,且他们在小动物移植瘤模型中验证了其有效的抗肿瘤能力。利用HSPC和iPSC诱导iNKT的技术不同于激活、扩增内源性iNKT(CDR3 $\beta$ 序列可能面临潜在的多样性),此类技术基于基因编辑方

式可明确TCR序列并实现克隆性扩增,有利于提高iNKT在同种异体应用中的安全性。因此,这些基于HPSC和iPSC开发的CAR-iNKT扩大培养技术,将有力推动CAR-iNKT作为一种“off-the-shelf”免疫细胞治疗产品的临床转化。

#### 4.2 CAR-iNKT临床前研究模型及技术平台发展

尽管人源CAR-iNKT系统在临床前体外、体内模型中都显示了卓越的肿瘤杀伤效果,但在靶向GD2的胶质瘤CAR-iNKT临床试验(GINAKIT2、NCT03294954)中,还是有7例患者出现肿瘤抗原表达阳性但对治疗不响应的情况<sup>[99]</sup>。一个主要原因在于目前大多数人源CAR-iNKT临床前研究为避免免疫排斥,多采用免疫缺陷小鼠(例如NSG等)为动物模型,而此类模型由于缺乏免疫系统和TME难以综合评价CAR-iNKT体内功能及潜在缺陷。因此,开发鼠源CAR-iNKT平台并建立基于免疫健全小鼠的体内评价体系,对优化CAR-iNKT功能和临床前疗效评价尤为关键。然而小鼠体内iNKT含量极低(血和脾脏中比例均<1%)<sup>[109]</sup>,如何构建鼠源CAR-iNKT平台一直是这一领域亟待突破的方向。目前,我们团队通过一系列探索,开发出了C57小鼠CAR-iNKT平台,并在多个免疫健全小鼠肿瘤(原位黑色素瘤、肠癌、膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤肺转移肿瘤)模型中证明了相较于CAR-T细胞,CAR-iNKT有更加卓越的抗肿瘤效果。我们从机制上明确CAR-iNKT不仅可以杀伤肿瘤细胞,并且可以靶向清除TAM,还可以通过促进DC成熟和活化,诱发体内T细胞对肿瘤相关抗原的杀伤作用。但是我们也发现在免疫健全模型中,CAR-iNKT在回输25天左右出现耗竭表型,极大地影响了其持续杀伤能力。为此我们证明联合anti-PD1或肿瘤疫苗等可以进一步提高CAR-iNKT杀伤肿瘤效果<sup>[63]</sup>。此外,iNKT还被证明可以构建TCR-iNKT,在小鼠黑色素瘤模型中通过更快速地浸润肿瘤组织并杀伤MDSC,从而实现更优的肿瘤杀伤效果<sup>[110]</sup>。鼠源CAR-iNKT平台也是验证同种异体CAR-iNKT疗法安全性和有效性的重要手段。在利用FVB小鼠来源的CAR-iNKT治疗免疫健全小鼠BALB/c的B细胞淋巴瘤模型中,研究发现CAR-iNKT可以有效杀伤肿瘤,无GVHD风险;同时,CAR-iNKT还可以通过促进自体CD8活化,起到间接杀伤肿瘤的效果<sup>[111]</sup>。如前所述,鉴于iNKT TCR-CD1d相互作用在人类

与小鼠之间高度保守,鼠源CAR-iNKT平台的建立,不但为CAR-iNKT疗法的临床转化提供了理论支持,还为进一步优化CAR-iNKT以抵抗免疫抑制微环境、增强肿瘤浸润和持续抗肿瘤能力、提升治疗响应带来了可能<sup>[11]</sup>。

#### 4.3 CAR-iNKT疗法优化方向及策略

目前包括CAR-T在内的大多数CAR工程化免疫细胞疗法在临床治疗中都面临体内持续性较差的问题<sup>[112]</sup>,因此通过基因编辑表达额外基因以增强CAR-iNKT在患者体内的持续性,是目前正在探索的方向。IL-15在iNKT的发育、存活和功能发挥中都发挥了至关重要的作用<sup>[113-114]</sup>,GD2 CAR-iNKT的临床前研究已证实,共表达IL-15能够增强CAR-iNKT的体内持续性和抗肿瘤能力,并抑制细胞耗竭<sup>[115]</sup>。因此,目前正在临床转化的CAR-iNKT疗法大多在表达CAR分子的同时共表达IL-15以增强CAR-iNKT的体内持续能力。IL-12也被发现可以通过上调*FOXO1*表达而增加CD62L阳性细胞比例来增强CAR-iNKT的杀伤能力<sup>[116]</sup>。NGAI等<sup>[117]</sup>则发现,IL-21是保护CD62L<sup>+</sup>iNKT亚群的关键细胞因子。在T细胞中,CD62L是中央记忆T细胞的关键表面标志分子,与更持久的细胞存活和功能效应相关。因此,研究者不仅通过在CAR-iNKT培养中补充IL-21细胞因子来优化CAR-iNKT记忆表型,还通过CAR分子与IL-21共表达的方式来增强B7H3 CAR-iNKT在小鼠体内的扩增和抗肿瘤能力<sup>[118]</sup>。此外,NGAI等<sup>[119]</sup>还明确了转录因子编码基因如*LEF1*是维持CD62L<sup>+</sup>iNKT亚群的关键基因,并在小鼠模型中证实了过表达*LEF1*的GD2 CAR-iNKT显示出对胶质瘤更强的控制能力并延长荷瘤小鼠生存期。近期,TIAN等<sup>[120]</sup>进一步通过CRISPR/Cas9基因筛选文库筛选到影响iNKT和CAR-iNKT中央记忆表型的关键调节基因*PRDMI*,并在小鼠胶质瘤模型中证实,GD2 CAR-iNKT联合干扰*RPDMI*表达能够促进CAR-iNKT向中央记忆性细胞分化、增强体内抗肿瘤活性。

除此之外,由于CAR-T细胞疗法中针对CAR结构设计已积累大量研究结果且临床应用也较为成熟<sup>[1-4,67]</sup>,且目前CAR-iNKT研究中CAR结构设计更多参考CAR-T细胞的相关研究,但iNKT与T细胞的胞内信号调控途径存在一定的差异,因此寻找更适合iNKT的CAR分子结构(尤其是胞内刺激信号)也是待探索的方向。部分临床前研究发现,在

CAR-iNKT中采用4-1BB共刺激信号相较于CD28共刺激信号可使CAR-iNKT趋向Th1型,并表现出更强的扩增能力<sup>[121-122]</sup>。而iNKT具有部分与NK类似的抗肿瘤信号途径,在CAR-NK疗法中涉及的信号分子(例如2B4、DAP12、DAP10、NKG2D等)或许也可为CAR-iNKT疗法提供借鉴。

## 5 总结与展望

iNKT凭借其固有肿瘤杀伤能力、抗肿瘤微环境调节能力、低GVHD风险,以及在CAR修改后可精准靶向肿瘤的多重协同抗肿瘤效应,具备良好的同种异体移植应用潜力,成为抗肿瘤免疫细胞疗法的重要细胞类型。在CAR-T疗法兴起前,基于 $\alpha$ -GalCer或 $\alpha$ -GalCer联合DC的iNKT抗肿瘤免疫疗法已开展较多临床探索;这些研究虽然未能取得显著疗效,但已经证实了iNKT相关疗法的安全性和有效性。目前基于未经基因编辑的iNKT的过继性疗法仍在多种实体肿瘤中积极开展临床探索。在CAR-T疗法于血液肿瘤取得巨大成功,但同时在实体瘤疗效及“off-the-shelf”商业化进程中遭遇瓶颈的背景下,具有独特免疫调节特性的CAR-iNKT疗法,特别是其“off-the-shelf”策略,近年来正逐渐成为研究的新焦点。目前CAR-iNKT疗法仍处于临床转化的早期阶段,未来针对实体肿瘤的CAR-iNKT疗法也将面临体内持续时间短、肿瘤浸润后的功能耗竭等问题,因此包括我们团队在内的一些研究者已在积极搭建相关技术平台,探索影响调节CAR-iNKT杀伤活性、体内持续性以及耗竭表型的关键基因,以期解决以上问题。此外,与放化疗、免疫检查点抑制剂药物、免疫激动剂及 $\alpha$ -GalCer的联合使用,也将是未来优化CAR-iNKT临床疗效的探索方向<sup>[38]</sup>。

除抗肿瘤功能外,iNKT在抵抗微生物感染、诱导移植耐受以及调节自身免疫性疾病等方面也发挥着重要作用<sup>[123-124]</sup>。目前,作为免疫细胞治疗药物先驱的CAR-T疗法已在肿瘤以外的自身免疫性疾病(包括系统性红斑狼疮、重症肌无力等)中取得了突破性进展<sup>[125-126]</sup>。这一趋势提示,兼具天然免疫调节功能与“off-the-shelf”优势的CAR-iNKT,有望在肿瘤之外的多类疾病治疗中开辟更广阔的空间,其潜在优势包括缩短治疗周期、降低治疗成本和减少副作用。

## 参考文献 (References)

- [1] ZUGASTI I, ESPINOSA-AROCHA L, FIDYT K, et al. CAR-T cell therapy for cancer: current challenges and future directions [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 210.
- [2] JANDOVA M, LANSKA M, SYKOROVA A, et al. Current role of CAR-T therapy in haematological care [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2025, 1486: 193-216.
- [3] STERNER R C, STERNER R M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies [J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(4): 69.
- [4] CHEN Z, ZHOU X. Decoding signaling architectures: CAR versus TCR dynamics in solid tumor immunotherapy [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2025, 58(1): 3-24.
- [5] ZHU Z C, ZHOU X, XU M, et al. Molecular glue degrader function of SPOP enhances STING-dependent immunotherapy efficacy in melanoma models [J]. *J Clin Invest*, 2025, 135(24): e191772.
- [6] TOGNARELLI E I, GUTIERREZ-VERA C, PALACIOS P A, et al. Natural killer T cell diversity and immunotherapy [J]. *Cancers*, 2023, 15(24): 5737.
- [7] NIEDZIELSKA M, CHALMERS A, POPIS M C, et al. CAR-iNKT cells: redefining the frontiers of cellular immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1625426.
- [8] MOLLING J W, LANGIUS J A, LANGENDIJK J A, et al. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(7): 862-8.
- [9] TACHIBANA T, ONODERA H, TSURUYAMA T, et al. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(20): 7322-7.
- [10] METELITSA L S, WU H W, WANG H, et al. Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2 [J]. *J Exp Med*, 2004, 199(9): 1213-21.
- [11] COURTNEY A N, ZHOU X, TIAN G, et al. Facts and hopes of chimeric antigen receptor-redirectioned natural killer T cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2025, 31(24): 5137-44.
- [12] TANIGUCHI M, HARADA M, DASHTSOODOL N, et al. Discovery of NKT cells and development of NKT cell-targeted anti-tumor immunotherapy [J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2015, 91(7): 292-304.
- [13] VOGT S, MATTNER J. NKT cells contribute to the control of microbial infections [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 718350.
- [14] GODFREY D I, ULDRICH A P, MCCLUSKEY J, et al. The burgeoning family of unconventional T cells [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(11): 1114-23.
- [15] MAKINO Y, KANNO R, ITO T, et al. Predominant expression of invariant V alpha 14<sup>+</sup> TCR alpha chain in NK1.1<sup>+</sup> T cell populations [J]. *Int Immunol*, 1995, 7(7): 1157-61.
- [16] KAWANO T, CUI J, KOEZUKA Y, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides [J]. *Science*, 1997, 278(5343): 1626-9.
- [17] BENDELAC A. Positive selection of mouse NK1<sup>+</sup> T cells by CD1-expressing cortical thymocytes [J]. *J Exp Med*, 1995, 182(6): 2091-6.
- [18] BENLAGHA K, WEI D G, VEIGA J, et al. Characterization of

- the early stages of thymic NKT cell development [J]. *J Exp Med*, 2005, 202(4): 485-92.
- [19] MAAS-BAUER K, LOHMEYER J K, HIRAI T, et al. Invariant natural killer T-cell subsets have diverse graft-versus-host-disease-preventing and antitumor effects [J]. *Blood*, 2021, 138(10): 858-70.
- [20] KIM E Y, LYNCH L, BRENNAN P J, et al. The transcriptional programs of iNKT cells [J]. *Semin Immunol*, 2015, 27(1): 26-32.
- [21] JAYASINGHE R G, HOLLINGSWORTH D, SCHEDLER N C, et al. Single-cell transcriptomic profiling reveals diversity in human iNKT cells across hematologic tissues [J]. *Cell Rep*, 2025, 44(5): 115587.
- [22] 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.
- [23] GODFREY D I, MACDONALD H R, KRONENBERG M, et al. NKT cells: what's in a name [J]? *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(3): 231-7.
- [24] ROSSJOHN J, PELLICCI D G, PATEL O, et al. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(12): 845-57.
- [25] MONTROYA C J, POLLARD D, MARTINSON J, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11 [J]. *Immunology*, 2007, 122(1): 1-14.
- [26] ZHOU D, MATTNER J, CANTU C, 3rd, et al. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells [J]. *Science*, 2004, 306(5702): 1786-9.
- [27] MARICIC I, GIRARDI E, ZAJONC D M, et al. Recognition of lysophosphatidylcholine by type II NKT cells and protection from an inflammatory liver disease [J]. *J Immunol*, 2014, 193(9): 4580-9.
- [28] TERABE M, MATSUI S, NOBEN-TRAUTH N, et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(6): 515-20.
- [29] TERABE M, MATSUI S, PARK J M, et al. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(11): 1741-52.
- [30] TERABE M, KHANNA C, BOSE S, et al. CD1d-restricted natural killer T cells can down-regulate tumor immunosurveillance independent of interleukin-4 receptor-signal transducer and activator of transcription 6 or transforming growth factor-beta [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3869-75.
- [31] AMBROSINO E, TERABE M, HALDER R C, et al. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis [J]. *J Immunol*, 2007, 179(8): 5126-36.
- [32] DASGUPTA S, KUMAR V. Type II NKT cells: a distinct CD1d-restricted immune regulatory NKT cell subset [J]. *Immunogenetics*, 2016, 68(8): 665-76.
- [33] ZHAO J, WENG X, BAGCHI S, et al. Polyclonal type II natural killer T cells require PLZF and SAP for their development and contribute to CpG-mediated antitumor response [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(7): 2674-9.
- [34] GUMPERZ J E, MIYAKE S, YAMAMURA T, et al. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining [J]. *J Exp Med*, 2002, 195(5): 625-36.
- [35] MATSUDA J L, GAPIN L, FAZILLEAU N, et al. Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor beta repertoire and small clone size [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(22): 12636-41.
- [36] BRIGL M, TATITURI R V, WATTS G F, et al. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(6): 1163-77.
- [37] GODFREY D I, KRONENBERG M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(10): 1379-88.
- [38] HADILOO K, TAHMASEBI S, ESMAEILZADEH A. CAR-NKT cell therapy: a new promising paradigm of cancer immunotherapy [J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1): 86.
- [39] BROSSAY L, CHIODA M, BURDIN N, et al. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution [J]. *J Exp Med*, 1998, 188(8): 1521-8.
- [40] METELITSA L S, NAIDENKO O V, KANT A, et al. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells [J]. *J Immunol*, 2001, 167(6): 3114-22.
- [41] SHYANTI R K, HAQUE M, SINGH R, et al. Optimizing iNKT-driven immune responses against cancer by modulating CD1d in tumor and antigen presenting cells [J]. *Clin Immunol*, 2024, 269: 110402.
- [42] CHAVEZ-GALAN L, ARENAS-DEL ANGEL M C, ZENTENO E, et al. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes [J]. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6(1): 15-25.
- [43] KUYLENSTIERNA C, BJORKSTROM N K, ANDERSSON S K, et al. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(7): 1913-23.
- [44] REN H, ELLIOTT N, LYE B, et al. Off-the-shelf dual CAR-iNKT cell immunotherapy eradicates medullary and leptomeningeal high-risk KMT2A-rearranged leukemia [J]. *Blood*, 2026, 147(2): 180-96.
- [45] CARNAUD C, LEE D, DONNARS O, et al. Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells [J]. *J Immunol*, 1999, 163(9): 4647-50.
- [46] SMYTH M J, CROWE N Y, PELLICCI D G, et al. Sequential production of interferon-gamma by NK1.1<sup>+</sup> T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide [J]. *Blood*, 2002, 99(4): 1259-66.
- [47] FUJII S, SHIMIZU K, SMITH C, et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells *in vivo* and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(2): 267-79.
- [48] SONG L, ASGHARZADEH S, SALO J, et al. Valpha24-invari-

- ant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1524-36.
- [49] CORTESI F, DELFANTI G, GRILLI A, et al. Bimodal CD40/Fas-dependent crosstalk between iNKT cells and tumor-associated macrophages impairs prostate cancer progression [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(11): 3006-20.
- [50] CHONG T W, GOH F Y, SIM M Y, et al. CD1d expression in renal cell carcinoma is associated with higher relapse rates, poorer cancer-specific and overall survival [J]. *J Clin Pathol*, 2015, 68(3): 200-5.
- [51] WANG G M, ZHOU X, FUCA G, et al. Fully human antibody V(H) domains to generate mono and bispecific CAR to target solid tumors [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(4): e002173.
- [52] MAUDE S L, FREY N, SHAW P A, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(16): 1507-17.
- [53] DOU Z, BONACCI T R, SHOU P, et al. 4-1BB-encoding CAR causes cell death via sequestration of the ubiquitin-modifying enzyme A20 [J]. *Cell Mol Immunol*, 2024, 21(8): 905-17.
- [54] ZHANG X D, GUO Y Y, JI Y H, et al. Cytokine release syndrome after modified CAR-NK therapy in an advanced non-small cell lung cancer patient: a case report [J]. *Cell Transplant*, 2022, 31: 9636897221094244.
- [55] NORELLI M, CAMISA B, BARBIERA G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells [J]. *Nat Med*, 2018, 24(6): 739-48.
- [56] BROWN C E, ALIZADEH D, STARR R, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(26): 2561-9.
- [57] LIU E L, 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.
- [58] GONG Y, KLEIN WOLTERINK R G J, WANG J X, et al. Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 73.
- [59] LÜ J Z, LIU Z, REN X T, et al.  $\gamma\delta$ T cells, a key subset of T cell for cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1562188.
- [60] COQUET J M, CHAKRAVARTI S, KYPARISSOUDIS K, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> NKT cell population [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(32): 11287-92.
- [61] BENDELAC A, SAVAGE P B, TEYTON L. The biology of NKT cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 297-336.
- [62] ROTOLO A, CAPUTO V S, HOLUBOVA M, et al. Enhanced anti-lymphoma activity of CAR19-iNKT cells underpinned by dual CD19 and CD1d targeting [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(4): 596-610.e11.
- [63] ZHOU X, WANG Y, DOU Z Q, et al. CAR-redirectioned natural killer T cells demonstrate superior antitumor activity to CAR-T cells through multimodal CD1d-dependent mechanisms [J]. *Nat Cancer*, 2024, 5(11): 1607-21.
- [64] TIAN G, COURTNEY A N, JENA B, et al. CD62L<sup>+</sup> NKT cells have prolonged persistence and antitumor activity *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(6): 2341-55.
- [65] CAPSOMIDIS A, BENTHALL G, VAN ACKER H H, et al. Chimeric antigen receptor-engineered human gamma delta T cells: enhanced cytotoxicity with retention of cross presentation [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(2): 354-65.
- [66] LI Y R, SHEN X, ZHU Y, et al. Targeting triple-negative breast cancer using cord-blood CD34<sup>+</sup> HSPC-derived mesothelin-specific CAR-NKT cells with potent antitumor activity [J]. *J Hematol Oncol*, 2025, 18(1): 86.
- [67] LI Y R, LI Z, ZHU Y, et al. Overcoming ovarian cancer resistance and evasion to CAR-T cell therapy by harnessing allogeneic CAR-NKT cells [J]. *Med*, 2025, 6(10): 100804.
- [68] SEBESTYEN Z, PRINZ I, DECHANET-MERVILLE J, et al. Translating gammadelta (gammadelta) T cells and their receptors into cancer cell therapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(3): 169-84.
- [69] RUBIO M T, MOREIRA-TEIXEIRA L, BACHY E, et al. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival [J]. *Blood*, 2012, 120(10): 2144-54.
- [70] HOROWITZ M M, GALE R P, SONDEL P M, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation [J]. *Blood*, 1990, 75(3): 555-62.
- [71] PEREZ C, GRUBER I, ARBER C. Off-the-shelf allogeneic T cell therapies for cancer: opportunities and challenges using naturally occurring "Universal" donor T cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 583716.
- [72] LU J R, JIANG G. The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 194.
- [73] BARRAL D C, BRENNER M B. CD1 antigen presentation: how it works [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(12): 929-41.
- [74] BORG N A, WUN K S, KJER-NIELSEN L, et al. CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor [J]. *Nature*, 2007, 448(7149): 44-9.
- [75] AURELI A, OUMHANI K, DEL BEATO T, et al. CD1A, D and E gene polymorphisms in a North African population from Morocco [J]. *Hum Immunol*, 2016, 77(7): 566-70.
- [76] SCHNEIDAWIND D, BAKER J, PIERINI A, et al. Third-party CD4<sup>+</sup> invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality [J]. *Blood*, 2015, 125(22): 3491-500.
- [77] WUN K S, BORG N A, KJER-NIELSEN L, et al. A minimal binding footprint on CD1d-glycolipid is a basis for selection of the unique human NKT TCR [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(4): 939-49.
- [78] SCOTT-BROWNE J P, MATSUDA J L, MALLEVAEY T, et al. Germline-encoded recognition of diverse glycolipids by natural killer T cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(10): 1105-13.
- [79] STENVENS D M C, GARMEZY B. 647 Phase I studies of Agent-797, a novel allogeneic invariant natural killer T (iNKT) cell therapy, for the treatment of patient with solid tumors or multiple myeloma [J]. *J Immuno Therapy* 2022, 10: A678-8.
- [80] LI Y R, ZHOU K, LEE D, et al. Generating allogeneic CAR-NKT cells for off-the-shelf cancer immunotherapy with genetically engineered HSP cells and feeder-free differentiation culture [J]. *Nat Protoc*, 2025, 20(5): 1352-88.
- [81] GIACCONE G, PUNT C J, ANDO Y, et al. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*,

- 2002, 8(12): 3702-9.
- [82] PAREKH V V, WILSON M T, OLIVARES-VILLAGOMEZ D, et al. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(9): 2572-83.
- [83] FUJII S, SHIMIZU K, KRONENBERG M, et al. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(9): 867-74.
- [84] NIEDA M, OKAI M, TAZBIRKOVA A, et al. Therapeutic activation of Valpha24<sup>+</sup>Vbeta11<sup>+</sup> NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity [J]. *Blood*, 2004, 103(2): 383-9.
- [85] ISHIKAWA A, MOTOHASHI S, ISHIKAWA E, et al. A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(5): 1910-7.
- [86] NAGATO K, MOTOHASHI S, ISHIBASHI F, et al. Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after alpha-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells [J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(5): 1071-81.
- [87] TOYODA T, KAMATA T, TANAKA K, et al. Phase II study of alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000316.
- [88] ISHIBASHI F, SAKAIRI Y, IWATA T, et al. A phase I study of loco-regional immunotherapy by transbronchial injection of alpha-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells in patients with lung cancer [J]. *Clin Immunol*, 2020, 215: 108457.
- [89] RICHTER J, NEPARIDZE N, ZHANG L, et al. Clinical regressions and broad immune activation following combination therapy targeting human NKT cells in myeloma [J]. *Blood*, 2013, 121(3): 423-30.
- [90] PADTE N N, LI X, TSUJI M, et al. Clinical development of a novel CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant [J]. *Clin Immunol*, 2011, 140(2): 142-51.
- [91] TEFIT J N, CRABE S, ORLANDINI B, et al. Efficacy of ABX196, a new NKT agonist, in prophylactic human vaccination [J]. *Vaccine*, 2014, 32(46): 6138-45.
- [92] HARADA Y, IMATAKI O, HEIKE Y, et al. Expansion of alpha-galactosylceramide-stimulated Valpha24<sup>+</sup> NKT cells cultured in the absence of animal materials [J]. *J Immunother*, 2005, 28(4): 314-21.
- [93] CROUGH T, PURDIE D M, OKAI M, et al. Modulation of human Valpha24<sup>+</sup>Vbeta11<sup>+</sup> NKT cells by age, malignancy and conventional anticancer therapies [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(11): 1880-6.
- [94] TAHIR S M, CHENG O, SHAULOV A, et al. Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer [J]. *J Immunol*, 2001, 167(7): 4046-50.
- [95] MOTOHASHI S, ISHIKAWA A, ISHIKAWA E, et al. A phase I study of *in vitro* expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20 Pt 1): 6079-86.
- [96] KUNII N, HORIGUCHI S, MOTOHASHI S, et al. Combination therapy of *in vitro*-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(6): 1092-8.
- [97] YAMASAKI K, HORIGUCHI S, KUROSUKI M, et al. Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy [J]. *Clin Immunol*, 2011, 138(3): 255-65.
- [98] HECZEY A, COURTNEY A N, MONTALBANO A, et al. Anti-GD2 CAR-NKT cells in patients with relapsed or refractory neuroblastoma: an interim analysis [J]. *Nat Med*, 2020, 26(11): 1686-90.
- [99] HECZEY A, XU X, COURTNEY A N, et al. Anti-GD2 CAR-NKT cells in relapsed or refractory neuroblastoma: updated phase I trial interim results [J]. *Nat Med*, 2023, 29(6): 1379-88.
- [100] RAMOS C A, COURTNEY A N, LULLA P D, et al. Off-the-shelf CD19-specific CAR-NKT cells in patients with relapsed or refractory B-cell malignancies [J]. *Transplant Cell Ther*, 2024, 30: S41-S42.
- [101] LI X M, TSUJI M, SCHNECK J, et al. Generation of mouse iNKT cell lines [J]. *Bio Protoc*, 2013, 3(6): e419.
- [102] WATARAI H, RYBOUCHKIN A, HONGO N, et al. Generation of functional NKT cells *in vitro* from embryonic stem cells bearing rearranged invariant Valpha14-Jalpha18 TCRalpha gene [J]. *Blood*, 2010, 115(2): 230-7.
- [103] ROTOLO A, MASON N J, EXLEY M A. Innate iNKT cells: from biological insight to clinical impact [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1653183.
- [104] LI Y R, ZHOU Y, YU J, et al. Generation of allogeneic CAR-NKT cells from hematopoietic stem and progenitor cells using a clinically guided culture method [J]. *Nat Biotechnol*, 2025, 43(3): 329-44.
- [105] LI Y R, FANG Y, NIU S, et al. Allogeneic CD33-directed CAR-NKT cells for the treatment of bone marrow-resident myeloid malignancies [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 1248.
- [106] LI Y R, ZHU Y, LI Z, et al. Allogeneic stem cell-engineered EGFRvIII-specific CAR-NKT cells for treating glioblastoma with enhanced efficacy and safety [J]. *Mol Ther*, 2025, 33(12): 6041-62.
- [107] LI Y R, HU J, LI Z, et al. Multimodal targeting of metastatic renal cell carcinoma via CD70-directed allogeneic CAR-NKT cells [J]. *Cell Rep Med*, 2025, 6(9): 102321.
- [108] URAKAMI A, SHIOYA K, SHIGEURA T, et al. iPSC-derived CAR-iNKT cells targeting HER2 show prolonged tumor control and promote durable survival in a tumor xenograft model [Abstract] [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(Suppl 1): A358.
- [109] CHIU Y H, PARK S H, BENLAGHA K, et al. Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(1): 55-60.
- [110] DELFANTI G, CORTESI F, PERINI A, et al. TCR-engineered iNKT cells induce robust antitumor response by dual targeting cancer and suppressive myeloid cells [J]. *Sci Immunol*, 2022, 7(74): eabn6563.
- [111] SIMONETTA F, LOHMEYER J K, HIRAI T, et al. Allogeneic CAR invariant natural killer T cells exert potent antitumor effects through host CD8 T-cell cross-priming [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(21): 6054-64.
- [112] MUELLER K P, GRENIER J M, WEBER E W. CAR T cell persistence in cancer [J]. *Trends Cancer*, 2025, 11(10): 1005-18.
- [113] MATSUDA J L, GAPIN L, SIDOBRE S, et al. Homeostasis of

- V alpha 14i NKT cells [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(10): 966-74.
- [114] BAEV D V, PENG X H, SONG L, et al. Distinct homeostatic requirements of CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans [J]. *Blood*, 2004, 104(13): 4150-6.
- [115] XU X, HUANG W, HECZEY A, et al. NKT cells coexpressing a GD2-specific chimeric antigen receptor and IL15 show enhanced *in vivo* persistence and antitumor activity against neuroblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(23): 7126-38.
- [116] LANDONI E, WOODCOCK M G, BARRAGAN G, et al. IL-12 reprograms CAR-expressing natural killer T cells to long-lived Th1-polarized cells with potent antitumor activity [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 89.
- [117] NGAI H, TIAN G, COURTNEY A N, et al. IL-21 selectively protects CD62L<sup>+</sup> NKT cells and enhances their effector functions for adoptive immunotherapy [J]. *J Immunol*, 2018, 201(7): 2141-53.
- [118] LIU Y L, DANG Y Y, ZHANG C H, et al. IL-21-armored B7H3 CAR-iNKT cells exert potent antitumor effects [J]. *iScience*, 2024, 27(1): 108597.
- [119] NGAI H, BARRAGAN G A, TIAN G, et al. LEF1 drives a central memory program and supports antitumor activity of natural killer T cells [J]. *Cancer Immunol Res*, 2023, 11(2): 171-83.
- [120] TIAN G, BARRAGAN G A, YU H, et al. PRDM1 is a key regulator of the NKT-cell central memory program and effector function [J]. *Cancer Immunol Res*, 2025, 13(4): 577-90.
- [121] HECZEY A, LIU D F, TIAN G W, et al. Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy [J]. *Blood*, 2014, 124(18): 2824-33.
- [122] POELS R, DRENT E, LAMERIS R, et al. Preclinical evaluation of invariant natural killer T cells modified with CD38 or BCMA chimeric antigen receptors for multiple myeloma [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1096.
- [123] LYU G H, WANG X, LI X X, et al. NKT cells-a generalist in disease treatment and a new key to unlock immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2025, 17(9): 667-83.
- [124] LI W O, JI F, ZHANG Y, et al. Cooperation of invariant NKT cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in prevention of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice treated with alpha-galactosylceramide [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2008, 40(5): 381-90.
- [125] MACKENSEN A, MULLER F, MOUGIAKAKOS D, et al. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus [J]. *Nat Med*, 2022, 28(10): 2124-32.
- [126] GRANIT V, BENATAR M, KURTOGLU M, et al. Safety and clinical activity of autologous RNA chimeric antigen receptor T-cell therapy in myasthenia gravis (MG-001): a prospective, multicentre, open-label, non-randomised phase 1b/2a study [J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22(7): 578-90.