

· 研究论文 ·

靶向MAGE-C2 TCR-T细胞的构建及功能鉴定

杨超¹ 王凯² 潘海婷¹ 武建强^{1*} 苑红^{1*}¹内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010000; ²内蒙古国际蒙医医院, 呼和浩特 010000)

摘要 该研究构建了靶向肿瘤抗原MC2(MAGE-C2)的TCR-T细胞, 评价了其体内、体外特异性抗肿瘤活性, 为MC2阳性肿瘤的过继免疫治疗提供了实验依据。从经MC2多肽刺激培养活化的人CD8⁺ T细胞中筛选获得识别MC2/HLA-A*02:01的特异性TCR, 并通过单细胞测序进行鉴定。筛选得到优势TCR(W2), 经鼠源化改造后将其插入慢病毒载体, 转导至T细胞中; 采用四聚体染色验证TCR的表达水平与抗原特异性。分别以表达MC2的K562细胞和负载多肽的T2细胞为靶细胞, 通过共培养体系检测细胞因子分泌水平及细胞杀伤能力。将W2-TCR-T细胞回输至NCG荷瘤裸鼠模型, 评估其体内抑瘤效果。成功获得具有生物学功能的高亲和力W2-TCR-T细胞。该细胞可特异性识别匹配靶细胞, 促进干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)分泌, 并呈剂量依赖性杀伤肿瘤细胞。体内实验结果显示, W2-TCR-T细胞可显著抑制肿瘤生长, 且抗肿瘤效果随输注细胞剂量升高而增强。优化后的靶向MAGE-C2的W2-TCR-T细胞具备良好的抗原识别能力, 可有效清除抗原阳性肿瘤细胞, 体内抗肿瘤作用显著, 具有良好的应用前景。

关键词 MAGE-C2; TCR-T; 肿瘤免疫治疗; 过继细胞治疗

Construction and Functional Characterization of TCR-T Cells Targeting MAGE-C2

YANG Chao¹, WANG Kai², PAN Haiting¹, WU Jianqiang^{1*}, YUAN Hong^{1*}¹College of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010000, China;²International Mongolia Hospital of Inner Mongolia, Hohhot 010000, China)

Abstract This study aimed to construct engineered TCR-T cells targeting the tumor antigen MC2 (MAGE-C2), evaluate their specific anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo*, and provide experimental evidence for adoptive immunotherapy of MC2-positive tumors. Specific TCRs recognizing MC2/HLA-A*02:01 were screened from activated human CD8⁺ T cells and identified by single-cell sequencing. The dominant TCR (W2) was screened and obtained, and after murineization modification, it was inserted into a lentiviral vector, and transduced into T cells.

收稿日期: 2026-03-25 接受日期: 2026-05-26

内蒙古科技计划(批准号: 2019GG037)和内蒙古自然科学基金(批准号: 2022MS08009)资助的课题

*通信作者。Tel: 13704710565, E-mail: jwu5@wisc.edu; 20080292@immu.edu.com

Received: March 25, 2026 Accepted: May 26, 2026

This work was supported by the Inner Mongolia Science and Technology Plan (Grant No.2019GG037) and the Inner Mongolia Natural Science Foundation (Grant No.2022MS08009)

*Corresponding authors. Tel: +86-13704710565, E-mail: jwu5@wisc.edu; 20080292@immu.edu.com

Tetramer staining was used to verify the expression level and antigen specificity of the TCR. Using MC2-expressing K562 cells and peptide-loaded T2 cells as target cells, cytokine secretion and cytotoxicity were detected in a co-culture system. W2-TCR-T cells were adoptively transferred into NCG tumor-bearing nude mouse models to assess their *in vivo* tumor-suppressive efficacy. High-affinity W2-TCR-T cells with biological functions were successfully obtained. These cells could specifically recognize matched target cells, promote the secretion of IFN- γ (interferon- γ) and TNF- α (tumor necrosis factor- α), and kill tumor cells in a dose-dependent manner. *In vivo* experiments showed that W2-TCR-T cells significantly inhibited tumor growth, and the anti-tumor effect was enhanced with an increase in the infused cell dose. The optimized W2-TCR-T cells targeting MAGE-C2 exhibit favorable antigen recognition ability, can effectively eliminate antigen-positive tumor cells, and exert a remarkable *in vivo* anti-tumor effect, indicating promising application prospects.

Keywords MAGE-C2; TCR-T; tumor immunotherapy; adoptive cell therapy

对于部分肿瘤类型和疾病分期,手术、放疗、化疗等传统抗肿瘤治疗手段疗效有限。近年来,肿瘤免疫治疗通过激活或重编程机体免疫系统靶向杀伤肿瘤细胞,已成为治疗实体瘤和血液系统恶性肿瘤的重大突破。其中,过继细胞治疗(adoptive cell therapy, ACT)有望克服传统治疗存在的诸多不足,展现出良好的应用前景^[1-2]。

在各类过继细胞治疗技术中,T细胞受体工程化T细胞(T cell receptor engineered T cells, TCR-T)通过向T细胞中导入识别肿瘤抗原的特异性TCR基因,实现对肿瘤细胞的精准识别与杀伤。嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cells, CAR-T)疗法虽在急性白血病和淋巴瘤中取得显著疗效,但仅能识别细胞膜表面抗原。相比之下,TCR-T可识别由细胞表面抗原及胞内抗原降解产生的多肽-主要组织相容性复合物(peptide-major histocompatibility complex, pMHC),拓宽了可靶向的肿瘤范围,同时能够以更接近生理性的方式激活T细胞^[3-6]。2024年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准首款用于实体瘤的TCR-T细胞药物afami-cel,用于治疗难治性滑膜肉瘤,标志着TCR-T技术从基础研究迈向临床应用,具有里程碑意义^[7]。上述进展提示,研发安全、高特异性的TCR靶点已成为当前研究的迫切需求。

靶点筛选是决定TCR-T治疗安全性与有效性的关键。癌-睾丸抗原(cancer-testis antigen, CTA)在正常体细胞中几乎不表达,仅表达于免疫豁免的生殖组织及多种肿瘤组织,具有较高的安全性,是理想的免疫治疗靶点^[8-9]。其中,黑色素瘤抗原(melanoma antigen, MAGE)家族是研究最为广泛的一类癌-辜

丸蛋白。MAGE-C2(又称CT10,下文简称MC2)在黑色素瘤、多发性骨髓瘤、肺癌、肝细胞癌等多种恶性肿瘤中高表达,且与肿瘤侵袭进展及不良预后密切相关,适合作为TCR-T的靶向抗原^[6,10-12]。值得注意的是,既往临床研究发现,靶向MAGE-A3的TCR-T因与正常组织发生交叉反应而产生神经毒性。因此,亟需构建特异性更强、脱靶风险更低的MC2靶向工程化TCR^[13]。MC2抗原表位可被人群高频表达的HLA-A*02:01分子呈递,临床适用范围更广。课题组前期研究证实,通过免疫检查点改造(如PD-1敲除)可有效增强传统MC2-TCR-T细胞在微环境中的持续杀伤能力^[6]。然而,复杂的基因编辑过程不仅增加了制备难度,也带来了潜在的脱靶风险。本研究旨在另辟蹊径,利用高通量单细胞TCR测序技术,从临床响应良好的患者体内直接捕获天然存在的优势TCR克隆。我们筛选得到的W2-TCR具有独特的生物学特性:在无需任何额外代谢或检查点通路改造的前提下,其天然序列展现出了极高的抗原识别敏感度。这为开发“简单、高效、安全”的下一代全人源TCR-T疗法提供了新的可能^[6,14-16]。

本研究采用多肽刺激策略,从健康人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中分离并鉴定天然识别MC2/HLA-A*02:01的特异性TCR(W2-TCR)。通过分子改造优化该TCR构建TCR-T细胞,系统评价W2-TCR-T细胞在体外和离体条件下对MC2阳性肿瘤细胞的抗原特异性、细胞因子分泌能力及细胞杀伤活性,并在MC2阳性异种移植小鼠模型中验证其体内抗肿瘤效果。本研究丰富了经过功能验证的MC2特异性TCR序

列, 为进一步开发和优化靶向MC2的TCR-T抗肿瘤疗法奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 样本与细胞株

采用HLA-A*02:01阳性健康人外周血单个核细胞以及细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)患者来源恶性T细胞。实验细胞株包括人慢性髓系白血病细胞K562、TAP缺陷型T2细胞和293T细胞, 均由本实验室保存^[6]。细胞培养采用RPMI-1640培养基和高糖DMEM培养基(美国Gibco公司), 并添加重组人IL-2(美国BioLegend公司)。

1.2 抗体与试剂

抗人CD8-APC流式抗体(货号: 300912)、抗人TCR V β 流式抗体(货号: 360503)、抗人IFN- γ -FITC流式抗体(货号: 506504)购自美国BioLegend公司; MC2(336-344)多肽ALKDVEERV(纯度>98%, 货号: C8881HB190_4)购自吉尔生化(上海)有限公司; MC2/HLA-A*02:01 pMHC四聚体(PE标记, 货号: TS2203)购自日本MBL公司; CD3/CD28免疫磁珠(货号: 11161D)购自美国ThermoFisher Scientific公司; Polybrene(货号: H9268)购自美国Sigma-Aldrich公司; 蛋白转运抑制剂(货号: 555029)购自美国BD公司; 慢病毒载体pHR_LVNS1购自陕西英菲莱特生物科技有限公司; 包装质粒psPAX2(货号: #12260)、包装质粒pMD2.G(货号: #12259)购自美国Addgene非盈利质粒库; 10 \times Genomics单细胞建库试剂盒(货号: 1000291)购自美国10x Genomics公司。

1.3 载体构建、病毒转导与基因敲除

参照文献[6], 将目的基因克隆至pHR_LV-NS1载体并测序验证; 在293T细胞中包装慢病毒。T细胞经600 U/mL重组人IL-2活化后, 转导表达TCR的慢病毒或对照慢病毒; K562细胞转导MC2/HLA-A*02:01慢病毒。在PD-1敲除实验中, 利用脂质纳米颗粒转染Cas9-mRNA与PD-1-sgRNA(500 ng/孔), 24 h后通过流式细胞术检测K562细胞中的敲除效率。

1.4 多肽刺激培养

采用负载多肽的T2细胞刺激CD8⁺ T细胞。将T2细胞与终浓度10 μ mol/L的MC2(336-344)多肽于37 $^{\circ}$ C孵育2 h, 洗涤后备用。从健康人PBMCs中分选CD8⁺ T细胞, 将其与负载多肽的T2细胞按1:1比例在RPMI-1640完全培养基中共培养。24 h后加入

100 U/mL IL-2, 连续培养7 d, 每2~3 d更换培养基和细胞因子。培养结束后, 采用MC2/HLA-A*02:01四聚体和CD8抗体进行流式检测, 并分选阳性细胞用于后续实验。本研究所有涉及人体样本的实验均经内蒙古医科大学医学伦理委员会批准(审批号: 202301150), 实验遵循《赫尔辛基宣言》伦理原则。所有健康捐献者和患者均签署知情同意书, 并严格保护受试者隐私。

1.5 10 \times Genomics单细胞捕获与测序

通过流式分选富集四聚体阳性CD8⁺ T细胞, 采用10 \times Genomics单细胞5' V(D)J测序流程进行单细胞TCR测序。简要步骤: 细胞经PBS洗涤、过滤制备单细胞悬液, 检测活力(>90%)后, 上样至微流控芯片, 生成凝胶珠油包水复合物(gel bead-in-emulsion, GEM)。在GEM中完成逆转录和cDNA扩增, 通过靶向PCR富集TCR V(D)J序列, 构建全长TCR文库, 于Illumina平台测序。采用Cell Ranger软件拼接并注释TCR α 、 β 链克隆序列。

1.6 高亲和力TCR筛选

结合克隆扩增水平、转录表型和序列特异性筛选高亲和力TCR: ①根据TCR测序数据筛选扩增克隆(\geq 3个细胞), 剔除低丰度单克隆; ②基于基因表达谱筛选高表达效应基因(*GZMB*、*IFNG*、*PRF1*)、低表达耗竭基因(*PDCD1*、*CTLA4*)的克隆; ③分析CDR3序列与MC2(336-344)多肽的匹配度。最终筛选获得高亲和力MC2特异性TCR, 并将其命名为W2-TCR_H。

1.7 慢病毒包装与T细胞转导

参照文献[6], 将W2-TCR_H的 α 、 β 链恒定区替换为鼠源序列, 构建人鼠嵌合型TCR(W2-TCR_{HM}), 提高TCR稳定性和亲和力。PCR扩增目的序列, 将其克隆至含*EFl α* 启动子的慢病毒载体pHR_LV-NS1, 测序验证。将重组载体与psPAX2、pMD2.G共转染293T细胞, 48 h和72 h收集病毒上清, 浓缩滴定后备用。PBMCs来源T细胞经CD3/CD28磁珠活化48 h, 在含聚凝胺(polybrene)(8 μ g/mL)条件下, 以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=20离心转导慢病毒。培养72 h后, 采用MC2/HLA-A*02:01四聚体和CD8抗体流式检测TCR表达水平。

1.8 细胞共培养

将W2-TCR_{HM}-T细胞、对照TCR-T细胞分别与MC2-A02-K562靶细胞按1:1、2:1效靶比接种于24孔

板, 每孔总体积1 mL, 置于37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中分别共培养24 h、48 h、72 h。培养至对应时间点, 取各组细胞悬液加入MC2/HLA-A*02:01 pMHC四聚体, 4 °C避光孵育40 min, 流式细胞术检测四聚体阳性CD8⁺ T细胞比例, 以阳性率为基准对各组效应细胞数量进行标准化校正, 消除转导效率差异对实验结果的干扰, 后续采用流式细胞术检测细胞因子分泌水平、细胞表面标志物表达情况及靶细胞杀伤能力。

1.9 细胞内细胞因子染色(intracellular cytokine staining, ICS)检测IFN- γ 水平

将目标细胞与靶细胞按1:1效靶比共培养24 h, 于培养结束前4~6 h加入布雷菲德菌素A(brefeldin A, BFA), 终浓度10 μ g/mL, 抑制细胞内高尔基体介导的细胞因子分泌。1 000 r/min、4 °C离心5 min收集细胞, 弃上清后PBS洗涤2次, 加入PE-Cy7标记的抗人CD8抗体, 4 °C避光孵育30 min进行细胞表面标志物染色; 随后加入固定液室温避光孵育20 min, 破膜缓冲液洗涤后加入破膜液室温避光孵育15 min完成固定破膜; 再加入FITC标记的抗人IFN- γ 抗体, 4 °C避光孵育30 min, 破膜缓冲液洗涤2次后PBS重悬细胞, 1 h内上机流式采集数据, 以CD8⁺ T细胞为门控, 统计IFN- γ 阳性细胞比例。

1.10 ELISA法检测细胞因子TNF- α 的水平

共培养24 h后收集细胞上清, 1 200 r/min、4 °C离心10 min, 去除细胞沉淀后取上清待测或于-80 °C保存(反复冻融不超过3次)。按照ELISA试剂盒说明书操作, 标准品稀释为0、15.625、31.25、62.5、125、250、500、1 000 pg/mL梯度浓度, 每孔加入100 μ L标准品或待测上清, 37 °C孵育2 h; 洗涤后加入检测抗体37 °C孵育1 h, 再加入酶结合物37 °C孵育30 min, TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)底物37 °C避光显色15 min, 加入终止液终止反应, 酶标仪于450 nm波长处测定吸光度(D)值, 以标准品浓度为横坐标、 D 值为纵坐标绘制标准曲线, 计算样本中TNF- α 含量。

1.11 细胞杀伤实验采用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE)标记法

取对数生长期MC2-A02-K562靶细胞, 无血清RPMI-1640培养基重悬至 1×10^6 /mL, 加入CFSE储备液至终浓度1 μ mol/L, 37 °C避光孵育10 min, 每

3 min 轻轻混匀1次; 加入等体积含20% FBS的培养基终止标记, 用含10% FBS培养基洗涤3次去除游离CFSE, 部分K562细胞同时表达GFP, 可通过GFP荧光信号辅助识别靶细胞。将CFSE标记后的靶细胞与对照TCR-T细胞、W2-TCR_{HM}-T细胞按1:1、2:1效靶比共培养最长72 h, 收集细胞后流式细胞术检测CFSE阳性靶细胞比例, 激发波长488 nm, 发射波长520 nm, 每管收集至少 1×10^4 个细胞事件。采用CFSE染色法检测细胞杀伤效率, 计算公式为: $E = [(P_0 - P_1) / P_0] \times 100\%$, 式中 E 为杀伤效率(%), P_0 为空白对照组CFSE阳性细胞比例, P_1 为实验组CFSE阳性细胞比例。

所有流式数据采用FlowJo 10.8.1软件分析, 先以前向散射光(forward scatter, FSC)与侧向散射光(side scattered, SSC)设门排除细胞碎片、死细胞及杂质, 筛选单个活细胞群体后进行目标指标统计。

1.12 动物实验

选用雌性NCG免疫缺陷小鼠(南京吉迈生物科技有限公司)构建异种移植模型。小鼠皮下接种 1×10^6 个MC2/HLA-A*02:01 K562细胞, 成瘤6 d后分组处理: 对照组输注 5×10^6 个对照TCR-T细胞, 低剂量组输注 1×10^6 个W2-TCR-T细胞, 高剂量组输注 5×10^6 个W2-TCR-T细胞, 单次尾静脉注射(100 μ L)。连续观察25 d, 监测肿瘤生长; 实验终点安乐死小鼠, 剥离肿瘤并测量体积。采用CO₂窒息联合颈椎脱臼法安乐死, 符合中国兽医学会标准。所有操作符合动物实验规范。所有动物实验经内蒙古医科大学动物伦理委员会批准(审批号: ZMU21-2301-034)。动物操作符合欧盟实验动物保护指令(2010/63/EU)及ARRIVE 2.0实验动物规范。

1.13 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行 t 检验或单因素方差分析, 组间差异采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。实验重复3次, 数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MC2特异性细胞毒性T淋巴细胞的分离及高亲和力TCR的鉴定

已有研究筛选并鉴定了一种限制性识别HLA-A*02:01、靶向MC2多肽ALKDVEERV(336-344)的重排TCR克隆^[14-15], 本课题组前期也对其进行

了相关研究。为获得更多可供筛选的MC2特异性TCR-T候选序列,本研究利用上述多肽刺激3例HLA-A*02:01阳性健康人外周血单个核细胞,随后采用四聚体结合流式细胞术进行检测(图1)。需要说明的是,本实验筛选的MC2特异性T细胞是天然免疫库中的低频细胞群体,因此仅通过CD8⁺T细胞中tetramer阳性细胞的绝对百分比,无法全面客观反映其生物学特征,流式细胞检测中细胞的分布模式是更关键的判定依据。流式结果显示,经MC2抗原肽刺激及tetramer富集后,实验组CD8⁺T细胞区域内出现了特征性聚集的tetramer阳性细胞群,而对照组tetramer相关信号仅呈离散、随机的背景分布,无明显细胞聚集现象,不存在特异性细胞群。虽然实验组tetramer阳性细胞整体占比偏低,但是区别于背景杂乱的特异性聚集分布特征,排除了非特异性随机染色的可能,证实了该细胞群是抗原刺激后扩增富集、来源一致且可特异性识别MC2/HLA-A*02:01复合物的T细胞亚群。综上,该流式检测结果既印证了MC2特异性T细胞在天然免疫库中低频存在的生物学特性,也充分证实了本实验成功筛选并富集出抗原特异性T细胞群体。在3例供者样本中,pMHC四聚体阳性CD8⁺T细胞比例分别为1.07%、1.15%和0.92%。合并并分选所有供者的四聚体阳性CD8⁺T细胞,最终获得约5×10⁴个活细胞,分选后细胞存活率为92.3%。

采用10× Genomics平台进行单细胞TCR V(D)J测序,共鉴定出128种不同的T细胞克隆型,其中15

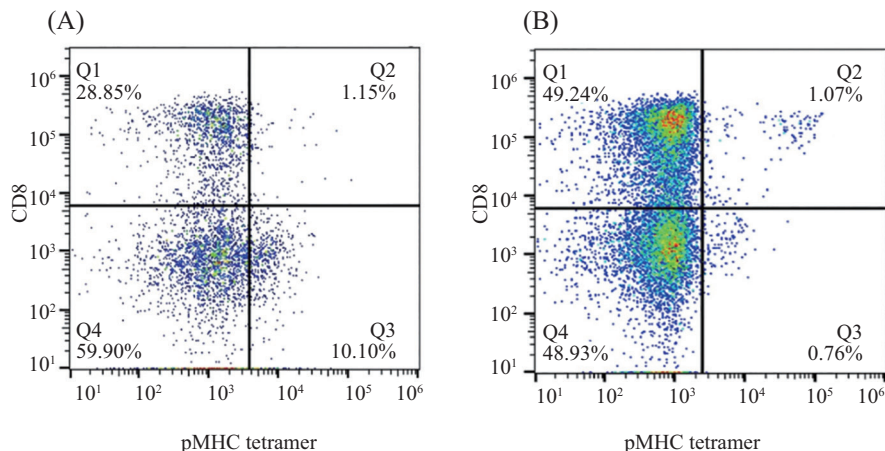
种为扩增克隆(检出细胞数≥3个)。结合克隆丰度与转录组特征综合分析,筛选得到1个优势克隆:该克隆高表达效应相关基因,包括*GZMB*(log₂TPM=4.2)和*IFNG*(log₂TPM=3.8),且耗竭标志物*PDCD1*无高表达。将该克隆确定为高亲和力候选TCR,并将其命名为W2-TCR。同时获得配对的TCR α、β链V(D)J序列,其互补决定区3(complementarity-determining region 3, CDR3)序列分别为TRA-CDR3: CVVSLLNNDMRF; TRB-CDR3: CASSLSVTSN-QPQHF。

上述结果表明,本研究成功诱导获得MC2特异性CD8⁺T细胞,并筛选出具有良好生物学活性的MC2反应型TCR,其可用于后续改造及功能验证。

2.2 靶向MAGE-C2的TCR-T细胞构建与优化

依托本课题组已建立的MC2靶向TCR-T研究平台,将W2-TCR_H序列克隆至慢病毒载体,转染人原代T细胞,获得表达W2-TCR_H的T细胞。为提高TCR的稳定性与功能亲和力,将其α、β链恒定区替换为鼠源同源序列,构建人鼠嵌合型W2-TCR_{HM}表达载体。

为准确比较TCR_H与TCR_{HM}在CD8⁺T细胞中的转染效率与表达水平(图2A~图2C),将对照组(C-TCR)、W2-TCR_H-T组、W2-TCR_{HM}-T组细胞分别与MAGE-C2四聚体-PE共培养,通过流式细胞术检测表型。四聚体具有特殊空间结构,可高亲和力稳定结合T细胞表面多个特异性TCR。为了排除实验背景干扰,本研究同时构建了表达识别无关抗原(HIV-Gag)序列的C-TCR(对照TCR)作为阴性对照。

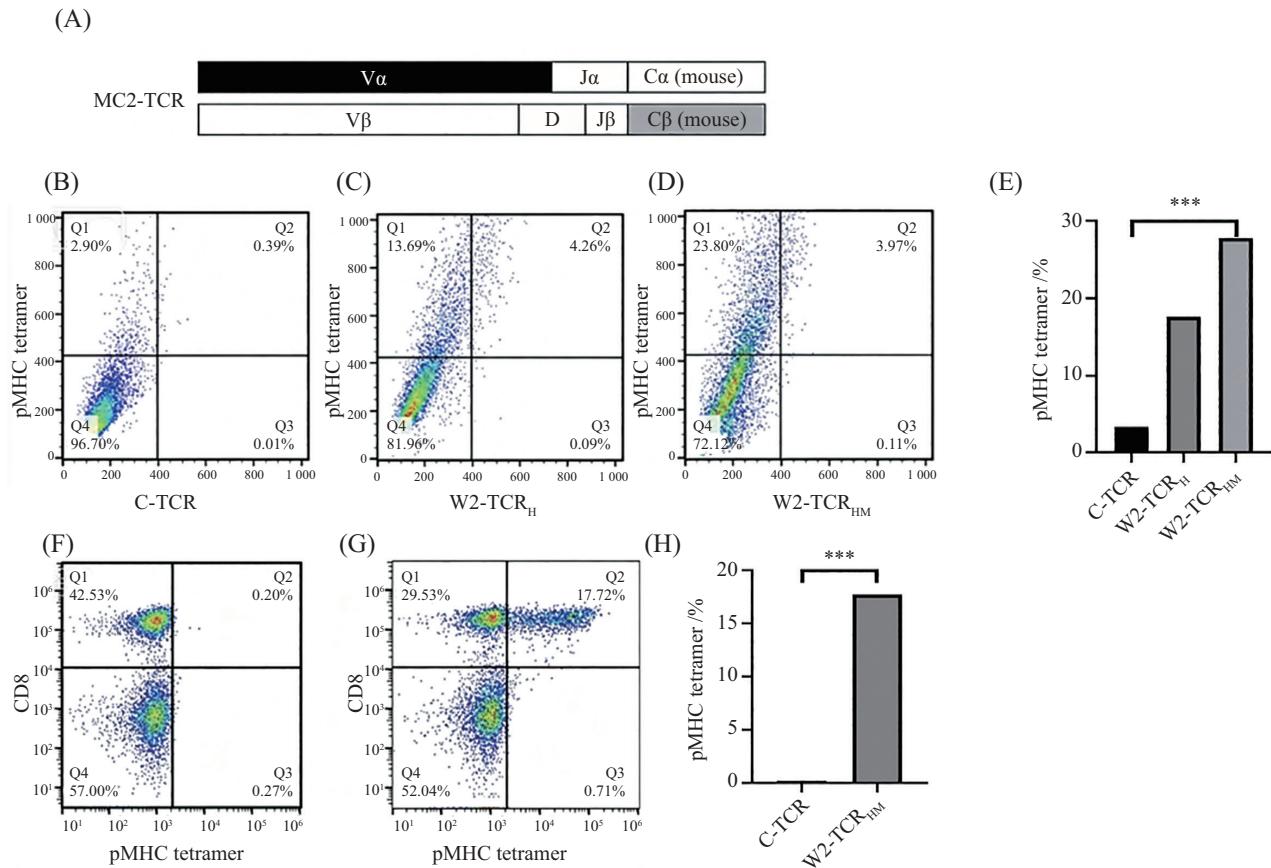


A: 多肽刺激前。B: 刺激1周后流式典型图。

A: before peptide stimulation. B: representative flow cytometry plot after 1 week of stimulation.

图1 多肽刺激诱导获得MC2特异性CD8⁺T细胞

Fig.1 MC2-specific CD8⁺T cells induced by peptide stimulation



A: 人源鼠源杂交序列示意图。B~D: 流式细胞术检测对照C-TCR转染组(B)、W2-TCR_H转染组(C)、W2-TCR_{HM}转染组(D)的TCR表达, 纵坐标表示pMHC四聚体染色荧光强度。E: 量化图。F、G: 通过流式双阳性细胞数量来确定对照C-TCR(F)与W2-TCR_{HM}(G)特异性TCR表达水平。H: 量化图。*** $P < 0.001$ 。

A: schematic diagram of human-mouse chimeric sequences. B-D: flow cytometry analysis of TCR expression in control C-TCR transfection group (B), W2-TCR_H transfection group (C) and W2-TCR_{HM} transfection group (D), the ordinate represents the fluorescence intensity stained by pMHC tetramer. E: quantitative analysis graph. F,G: the expression levels of antigen-specific TCR in control C-TCR (F) and W2-TCR_{HM} (G) were determined by counting double-positive cells via flow cytometry. H: quantitative analysis graph. *** $P < 0.001$.

图2 TCR转导效率及特异性验证

Fig.2 TCR transduction efficiency and specificity verification

流式结果见图2A~图2C(纵坐标为MAGE-C2四聚体-PE荧光强度)。与C-TCR组相比, W2-TCR_H-T组和W2-TCR_{HM}-T组均可检出特异性识别MAGE-C2四聚体的CD8⁺ T细胞, 提示重组TCR成功表达。定量分析显示, W2-TCR_{HM}-T组的四聚体阳性细胞比例显著高于未改造的W2-TCR_H-T组。结果证实: 将TCR α 、 β 链人源恒定区替换为鼠源序列, 可显著提高工程化TCR的细胞表达水平及其与靶pMHC的结合亲和力, 使W2-TCR_{HM}-T细胞具有更高的TCR丰度和抗原靶向能力。

为了进一步确认其特异性, 又进一步做了C-TCR与W2-TCR_{HM}-T分别与MAGE-C2四聚体-PE、CD8-APC荧光抗体孵育(图2F~图2H), 通过检测MAGE-C2四聚体/CD8双阳性细胞比例, 可客观比较

重组TCR的体外表达水平及其与同源pMHC的结合能力。

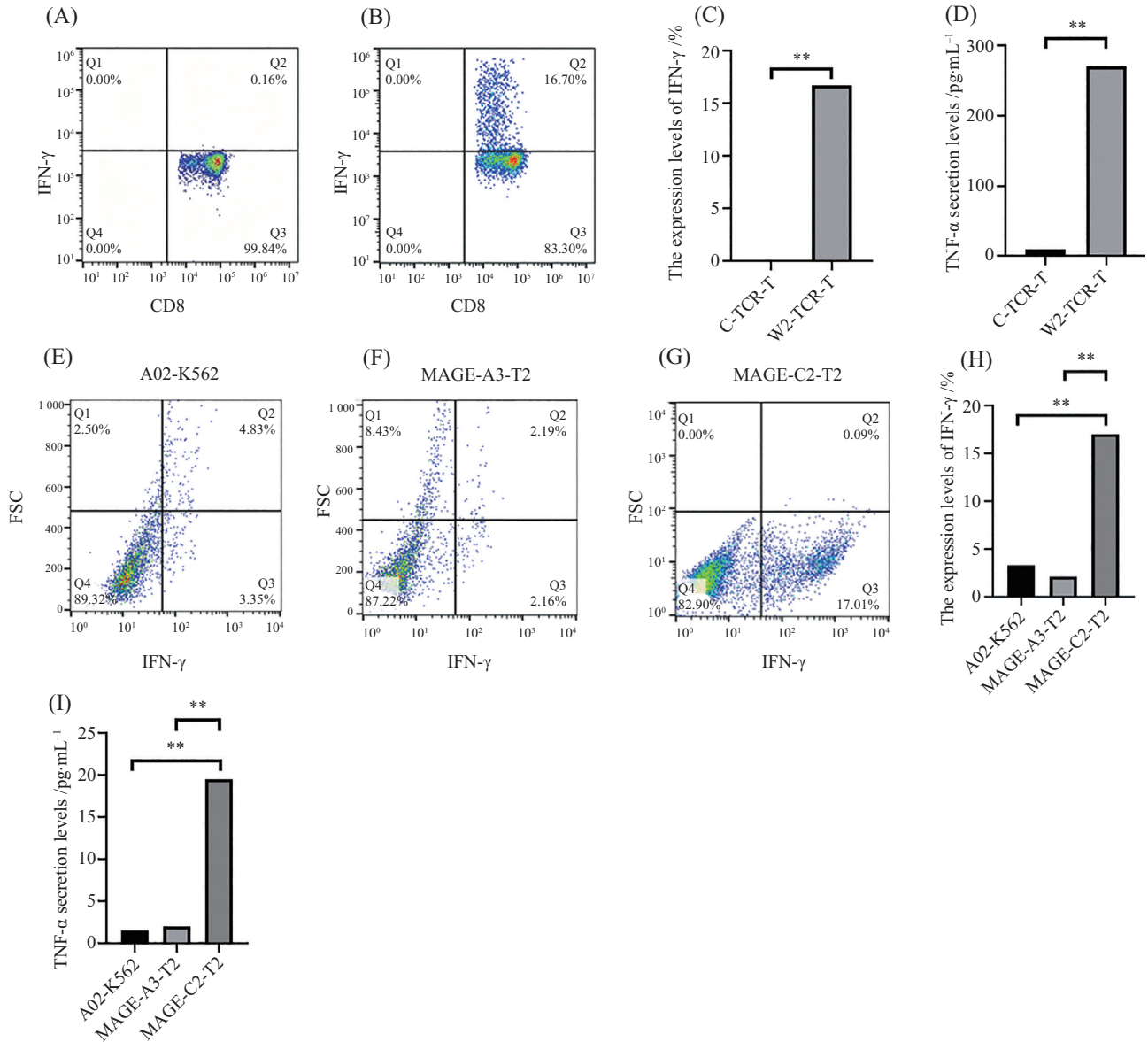
靶细胞制备: 将HLA I类分子缺陷的K562细胞转染, 使其表达MC2(336-344)/HLA-A*02:01复合物, 构建MC2阳性抗原提呈靶细胞(MC2-K562); 同时利用TAP缺陷的T2细胞负载MC2多肽, 构建多肽提呈靶细胞模型(MC2-T2)。以上两种互补模型可用于评价W2-TCR_{HM}-T细胞功能。此外, 选用MC2阳性T淋巴瘤细胞株(HH、Hut78)及2例T淋巴瘤患者来源的原代MC2阳性肿瘤细胞(P1、P2), 进一步验证W2-TCR_{HM}-T的抗肿瘤活性(下文将W2-TCR_{HM}-T简称为W2-TCR-T)。

2.3 W2-TCR-T细胞的体外特异性杀伤活性

本实验采用两类改造型MC2阳性靶细胞: 表

达 MAGE-C2/HLA-A*02:01复合物的 K562细胞 (MAGE-C2-K562)、负载MAGE-C2多肽的T2细胞 (MAGE-C2-T2)。为验证 W2-TCR-T的识别特异性, 我们首先通过 RT-PCR确认了各靶细胞中 MAGE-C2的表达情况。随后将 W2-TCR-T细胞与负载不

同浓度多肽或表达内源性抗原的靶细胞共培养, 采用 ICS检测细胞因子分泌情况。如图 3A和图 3B所示, 经 MAGE-C2阳性靶细胞刺激后, W2-TCR-T细胞可高水平分泌 IFN- γ , ELISA检测其同时产生大量 TNF- α 而对照 TCR-T(C-TCR-T)细胞几乎无细胞



A、B: 经MC2-K562靶细胞刺激后, 对照C-TCR-T细胞(A)和W2-TCR-T细胞(B) IFN- γ 表达水平。C: IFN- γ 百分比柱状汇总图。D: ELISA检测C-TCR-T或W2-TCR-T细胞与靶细胞共培养后, 上清中TNF- α 分泌水平。E-G: W2-TCR-T细胞在A02-K562(E)、MAGE-A3-T2(F)、MAGE-C2-T2(G)刺激下的胞内IFN- γ 表达水平。H: IFN- γ 百分比柱状汇总图。I: ELISA检测A02-K562、MAGE-A3-T2、MAGE-C2-T2细胞与靶细胞共培养后, 上清中TNF- α 分泌水平。** $P < 0.01$ 。

A,B: after stimulation with MC2-K562 target cells, the expression levels of IFN- γ in control C-TCR-T cells (A) and W2-TCR-T cells (B). C: summary bar graph of IFN- γ positive cell percentages. D: ELISA assay TNF- α secretion levels in the supernatant after co-culture of C-TCR-T or W2-TCR-T cells with target cells. E-G: intracellular IFN- γ expression levels in W2-TCR-T cells stimulated with A02-K562 (E), MAGE-A3-T2 (F) and MAGE-C2-T2 cells (G). H: summary bar graph of IFN- γ positive cell percentages. I: ELISA assay TNF- α secretion levels in the supernatant after co-culture of A02-K562, MAGE-A3-T2 or MAGE-C2-T2 cells with target cells. ** $P < 0.01$.

图3 W2-TCR-T细胞可特异性识别MC2⁺ HLA-A*02:01⁺的靶细胞

Fig.3 W2-TCR-T cells specifically recognize MC2⁺ HLA-A*02:01⁺ target cells

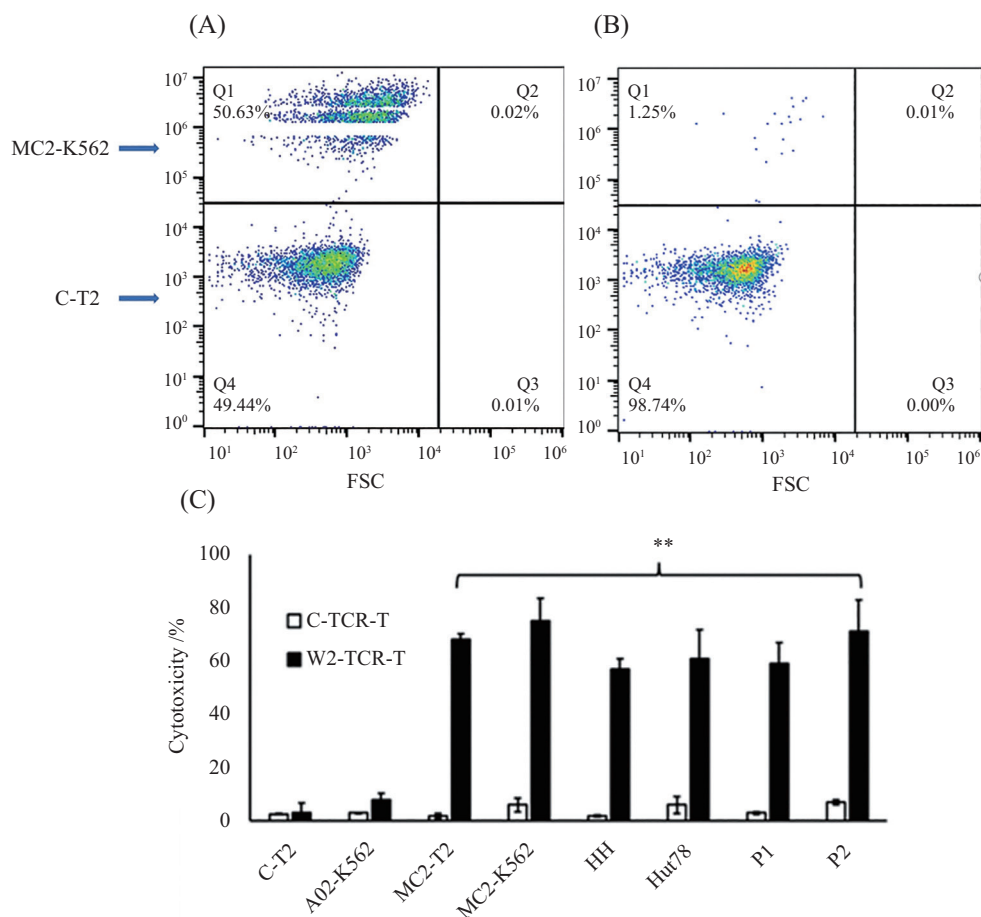
因子应答。胞内细胞因子结果显示,与对照 TCR-T 相比, W2-TCR-T 经 MC2 阳性靶细胞刺激后, IFN- γ 与 TNF- α 比例显著升高,提示细胞发生抗原特异性活化;而抗原阴性靶细胞刺激仅可诱导基础水平的 IFN- γ 、TNF- α 分泌,证实 W2-TCR 具有良好特异性。

为进一步验证 W2-TCR-T 的抗原特异性及潜在脱靶交叉反应,设置 3 组靶细胞:仅表达 MAGE-C2/HLA-A*02:01 的 K562 细胞 (A02-K562)、负载 MAGE-A3 多肽的 T2 细胞 (MAGE-A3-T2)、负载 MAGE-C2 多肽的 T2 细胞 (MAGE-C2-T2)。共培养后检测胞内 IFN- γ 水平 (图 3E~图 3G), ELISA 检测 TNF- α 水平 (图 3I)。如图 3E~图 3I 所示,仅与 MAGE-C2 阳性靶细胞共培养时, W2-TCR-T 发生强烈活化并大量分泌 IFN- γ 、TNF- α ;其他细胞几乎无细胞因子应答。结果显示, W2-TCR-T 只与 MC2 阳性且 HLA-A*02:01

匹配的细胞作用时,分泌高水平的 IFN- γ 和 TNF- α (图 3D 和图 3I)。

2.4 W2-TCR-T 细胞对肿瘤细胞及患者原代细胞的杀伤活性

为了进一步模拟临床环境,本研究纳入了内源性表达 MAGE-C2 的肿瘤细胞株 (HH、Hut78) 以及患者原代恶性 T 细胞 (P1、P2)。如图 4 所示采用 CFSE 标记法验证抗原特异性活化能否转化为有效杀伤作用。流式典型图见图 4A 和图 4B:与 C-TCR-T 相比, W2-TCR-T 共培养后, MAGE-C2-K562 靶细胞数量显著减少。定量分析显示, W2-TCR-T 对 MAGE-C2-K562 和 MAGE-C2-T2 的杀伤能力显著高于对照组 (图 4C);而对对照多肽负载 T2 细胞 (C-T2)、仅表达 HLA-A*02:01 的 K562 细胞 (A02-K562) 等抗原阴性靶细胞几乎不被裂解,证实杀伤作用严格依赖

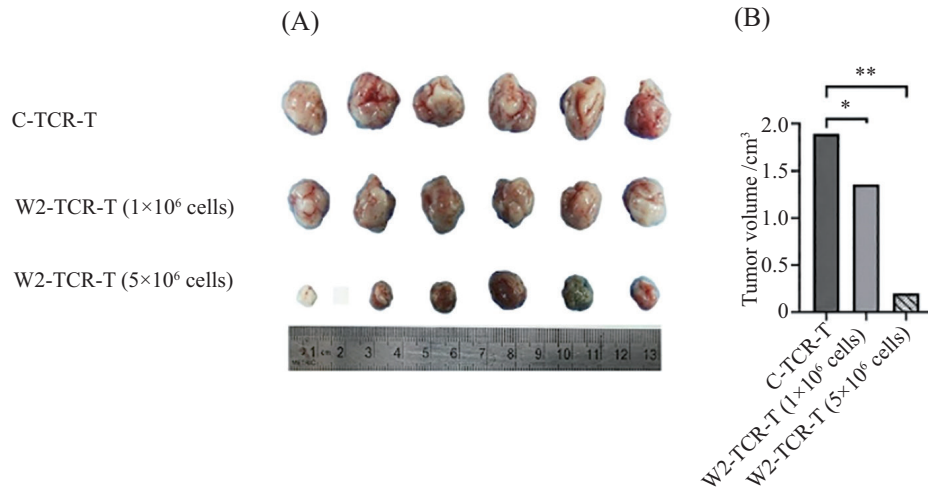


A、B: 对照 C-TCR-T (A)、W2-TCR-T (B) 与靶细胞共培养后流式细胞群分布。C: C-TCR-T 和 W2-TCR-T 与多种抗原细胞共培养 72 h 后各组杀伤率统计结果 [效靶比 (E:T)=2:1], ** $P<0.01$ 。

A,B: flow cytometric population distribution of control C-TCR-T (A) and W2-TCR-T (B) after co-culture with target cells. C: statistical results of cytotoxicity rates for C-TCR-T and W2-TCR-T following 72 h co-culture with various antigen-presenting cells [E:T (effector-to-target)=2:1], ** $P<0.01$.

图 4 W2-TCR-T 细胞在体外和离体条件下具有更强的抗原特异性杀伤活性

Fig.4 W2-TCR-T cells exhibit enhanced antigen-specific cytotoxic activity *in vitro* and *ex vivo*



A: 不同处理组小鼠剥离肿瘤的代表性照片, $n=6$ 。B: 各组平均肿瘤体积(cm^3)对比柱状图。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: representative images of dissected tumors from mice in different treatment groups, $n=6$. B: bar graph showing the average tumor volume (cm^3) of each group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图5 W2-TCR-T细胞具有显著的体内抗肿瘤作用

Fig.5 W2-TCR-T cells exert potent anti-tumor effects *in vivo*

抗原特异性。

此外, W2-TCR-T可高效杀伤MC2阳性淋巴瘤细胞株(HH、Hut78)及患者原代恶性T细胞(P1、P2),而在同样条件下C-TCR-T杀伤能力极弱(图4C)。综上, W2-TCR-T在体外和离体水平均可特异性杀伤改造型及内源性MC2阳性肿瘤细胞,具备临床应用潜力。

本研究在体外杀伤实验中统一将效靶比(E:T)设定为2:1。选择该比例的依据主要基于前期预实验的优化结果:在2:1比例下, W2-TCR-T细胞能够产生稳健且具有统计学意义的特异性杀伤信号,同时能有效降低高倍比(如5:1或10:1)可能产生的非特异性背景杀伤,从而更真实地反映TCR对靶细胞内源性抗原识别的亲合力与效应功能。

2.5 W2-TCR-T细胞的体内抗肿瘤活性

采用MC2-A02-K562细胞构建MC2/HLA-A*02:01阳性异种移植小鼠模型,评价W2-TCR-T的体内疗效。荷瘤小鼠分为3组:对照TCR-T组、低剂量W2-TCR-T组(1×10^6 个)、高剂量W2-TCR-T组(5×10^6 个)。连续观察25 d后,处死小鼠剥离肿瘤组织检测体积。

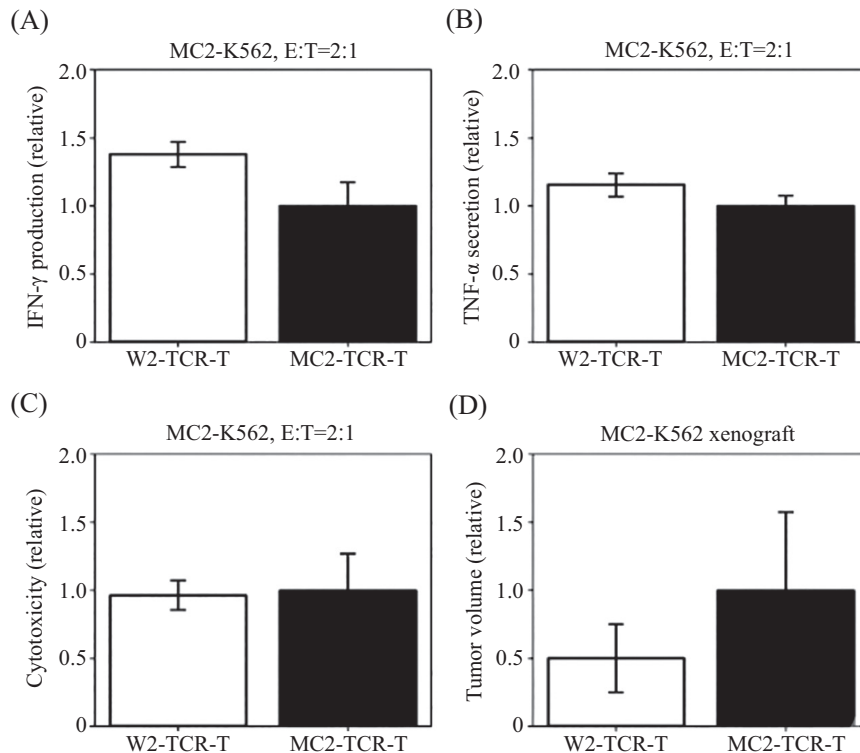
如图5A所示,与对照组相比, W2-TCR-T处理组肿瘤体积显著缩小;其中高剂量组抑瘤效果最优,低剂量组次之,呈剂量依赖性抑瘤效应。肿瘤体积定量结果一致(图5B): W2-TCR-T组平均肿瘤体积显

著低于对照组($P<0.01$)。这提示, W2-TCR-T在体内具有强效抗肿瘤作用,可有效抑制MC2阳性肿瘤生长。

2.6 与已报道MC2靶向TCR-T的对比

本课题组前期构建了3种有效的MC2靶向TCR-T细胞: MC2-TCR-T、MC2-TCR-T^{PD1}、PDL1-MC2-TCR-T^{PD1},证实其具有增强的抗原依赖性效应功能^[6]。本研究筛选获得全新W2-TCR,构建无额外免疫检查点改造的W2-TCR-T细胞。在相同靶模型与功能实验中, W2-TCR-T具有稳定的抗原特异性细胞因子分泌能力、杀伤活性及体内抑瘤效果,与MC2-TCR-T相当。2种TCR-T的核心功能指标对比见图6。在进行功能对比实验前,为排除病毒转导效率差异对结果的影响,本研究利用流式细胞术检测了W2-TCR-T与经典MC2-TCR-T的pMHC四聚体阳性率。随后,使用同来源未转导的T细胞将两组效应细胞的四聚体阳性率校正至同一水平,以确保各组实验体系中具有相同数量的抗原特异性效应细胞。

本研究筛选出的W2-TCR-T具有独特的应用价值。实验对比显示,与前期经过PD-1/PD-L1通路改造的MC2-TCR-T相比, W2-TCR-T虽然保留了全人源原始序列且未进行额外的通路干预,但在特异性细胞因子分泌及内源性肿瘤杀伤方面展现出了较强的功能表现。这说明通过高通量单细胞测序筛



A: 与MC2-K562靶细胞共培养24 h后,通过胞内细胞因子染色(ICS)检测相对IFN- γ 分泌水平。B: 与MC2-K562靶细胞共培养24 h后,通过酶联免疫吸附实验(ELISA)检测相对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)分泌水平。C: 与MC2-K562靶细胞共培养72 h后,基于CFSE杀伤实验检测相对细胞杀伤活性。所有共培养实验的效应细胞:靶细胞(E:T)比例均设为2:1。D: MC2-K562异种移植小鼠模型中第25天的相对肿瘤体积。体外实验数据来源于3次独立重复实验,以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;体内实验每组6只小鼠。为便于横向比较,各项指标均以MC2-TCR-T组为对照(归一化为1.0)进行标准化处理,且两种TCR-T的转导效率均经过校正。

A: relative IFN- γ secretion levels detected by ICS (intracellular cytokine staining) after 24 h co-culture with MC2-K562 target cells. B: relative TNF- α secretion levels measured by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) after 24 h co-culture with MC2-K562 target cells. C: relative cytotoxic activity determined via CFSE-based cytotoxicity assay after 72 h co-culture with MC2-K562 target cells. The E:T (effector-to-target) was set at 2:1 for all co-culture assays. D: relative tumor volume on day 25 in the MC2-K562 xenograft mouse model. *In vitro* data are presented as $\bar{x}\pm s$ deviation from three independent experiments, with 6 mice per group for *in vivo* studies. For cross-group comparison, all indicators were normalized to the MC2-TCR-T group (set as 1.0). The transduction efficiencies of the two TCR-T cell groups were corrected accordingly.

图6 在相同实验条件下W2-TCR-T与MC2-TCR-T的功能对比

Fig.6 Comparison of the functions of W2-TCR-T and MC2-TCR-T under the same experimental conditions

选获得的原始高亲和力TCR,在不经过复杂基因编辑的情况下,依然具备强效的抗肿瘤活性,这为简化TCR-T产品的制备工艺提供了可能。

3 讨论

本课题组前期建立了完整的MC2特异性TCR筛选与功能评价体系,证实了MC2是TCR-T治疗的理想靶点。本研究进一步从人T细胞库中筛选获得全新天然MC2反应型TCR(W2-TCR_H)。与ZHAO等^[6]发表的改造型MC2-TCR-T(MC2-TCR-T^{PD1})相比,W2-TCR在多个功能维度上展现了核心优势。首先是功能强度与结构的平衡:尽管未经PD-1阻断改造,W2-TCR-T在针对内源性高压靶细胞的杀伤实验中,其

细胞因子分泌水平与改造型TCR-T相当($P>0.05$),这暗示W2-TCR序列本身的结合动力学可能更为优化,能够更高效地触发TCR信号转导。其次是全人源序列的生物学稳定性:不同于部分需经过鼠源化恒定区改造才能稳定表达的序列,W2-TCR_H在人T细胞中具有极高的亲和力和配对稳定性。这种基于“天然选择”而非“人工干预”获得的优越功能,不仅降低了临床转化中潜在的免疫原性风险,也证明了从肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)中挖掘高亲和力TCR仍是目前克服肿瘤免疫抑制微环境的最有效途径之一。这也提示MC2靶向TCR-T可采用分步模块化研发策略:首先筛选验证优质天然TCR,再根据肿瘤类型与微环境叠加基因

改造优化疗效。本研究系统评价了W2-TCR-T的特异性、细胞因子水平、杀伤能力及体内疗效,丰富了已验证的MC2特异性TCR资源;后续将参照前期方法叠加PD-1通路改造,进一步提升抗肿瘤治疗潜力。

本研究证实:针对同一肿瘤抗原,筛选并验证多个T细胞克隆具有重要意义。虽然MC2属于经典癌-睾丸抗原,但不同MC2特异性TCR即使识别同一pMHC复合物,其亲和力、信号强度、活化阈值及耗竭敏感性仍存在显著差异。因此,不能依赖单一TCR序列,需多克隆平行筛选^[17-19]。

从转化医学角度,储备多个验证合格的TC克隆具有三重优势:①筛选脱靶风险低、治疗窗口宽的最优序列;②适配不同抗原密度、肿瘤类型与微环境;③便于迭代改造,加快临床转化^[20-21]。

同时,本研究设置两种临床常用输注剂量,证实高剂量W2-TCR-T抑瘤效果更佳,提示效应细胞数量是实体瘤模型中维持长效抗肿瘤活性的关键,这与既往过继细胞治疗研究一致,可为后续临床给药提供参考。

本研究采用免疫缺陷小鼠异种移植模型,虽无法完全模拟人体肿瘤微环境,但可标准化评价TCR-T固有抗肿瘤活性。体内结果与体外、离体结果一致,巩固了MC2-TCR-T的治疗可行性。后续需采用人源化免疫小鼠、原位肿瘤模型,评价细胞归巢、存续及脱靶毒性。

对照实验显示:无PD-1/PDL1改造的W2-TCR-T,体外细胞因子分泌、杀伤活性及体内抑瘤效果略优于经典MC2-TCR-T。这提示优质天然TCR无需叠加复杂改造即可发挥强效作用,为实体瘤TCR-T研发提供新思路。同时印证多序列平行筛选的必要性:同源抗原对应的不同TCR功能差异显著,筛选最优克隆是提升疗效的核心。

本研究仍存在局限性:①仅观察短期安全性,未系统评价长期毒性及正常组织交叉反应(MAGE家族TCR存在固有脱靶风险);②未检测肿瘤微环境相关生物学标志物,无法阐明疗效差异机制。

综上,本研究证实W2-TCR-T具有剂量依赖性体内抑瘤作用,结合前期机制研究,进一步夯实了MC2靶向TCR-T的临床价值。相关数据为后续前置优化、临床转化奠定实验基础,有望推动基于W2-TCR-T的过继免疫治疗走向临床。

参考文献 (References)

- [1] LESCH S, GILL S. The promise and perils of immunotherapy [J]. *Blood Adv*, 2021, 5(18): 3709-25.
- [2] JIANG X T, XU J, LIU M F, et al. Adoptive CD8⁺ T cell therapy against cancer: challenges and opportunities [J]. *Cancer Lett*, 2019, 462: 23-32.
- [3] SUN Y M, LI F, SONNEMANN H, et al. Evolution of CD8⁺ T cell receptor (TCR) engineered therapies for the treatment of cancer [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2379.
- [4] BAULU E, GARDET C, CHUVIN N, et al. TCR-engineered T cell therapy in solid tumors: state of the art and perspectives [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(7): eadf3700.
- [5] GOLIKOVA E A, ALSHEVSKAYA A A, ALRHMOUN S, et al. TCR-T cell therapy: current development approaches, preclinical evaluation, and perspectives on regulatory challenges [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 897.
- [6] ZHAO F X, ZHANG X, TANG Y, et al. Engineered PD-L1 co-expression in PD-1 knockout and MAGE-C2-targeting TCR-T cells augments the cytotoxic efficacy toward target cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 11894.
- [7] DUPONT M, DUFRESNE A, BRAHMI M, et al. An evaluation of afamitresgene autoleucel for the treatment of advanced synovial sarcoma and myxoid round cell liposarcoma [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2026, 26(6): 661-70.
- [8] NIN D S, DENG L W. Biology of cancer-testis antigens and their therapeutic implications in cancer [J]. *Cells*, 2023, 12(6): 926.
- [9] KNAFLER G, HO A L, MOORE K N, et al. Melanoma-associated antigen A4: a cancer/testis antigen as a target for adoptive T-cell receptor T-cell therapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2025, 134: 102891.
- [10] TIO D, KASIEM F R, WILLEMSSEN M, et al. Expression of cancer/testis antigens in cutaneous melanoma: a systematic review [J]. *Melanoma Res*, 2019, 29(4): 349-57.
- [11] DE CARVALHO F, ALVES V L, BRAGA W M, et al. MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 are frequently expressed in multiple myeloma and can be explored in combined immunotherapy for this malignancy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(1): 191-5.
- [12] MA W, VIGNERON N, CHAPIRO J, et al. A MAGE-C2 antigenic peptide processed by the immunoproteasome is recognized by cytolytic T cells isolated from a melanoma patient after successful immunotherapy [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(10): 2427-34.
- [13] MORGAN R A, CHINNASAMY N, ABATE-DAGA D, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy [J]. *J Immunother*, 2013, 36(2): 133-51.
- [14] WARTEWIG T, KURGYIS Z, KEPPLER S, et al. PD-1 is a haploinsufficient suppressor of T cell lymphomagenesis [J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 121-5.
- [15] DU S S, MCCALL N, PARK K, et al. Blockade of tumor-expressed PD-1 promotes lung cancer growth [J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(4): e1408747.
- [16] WARTEWIG T, DANIELS J, SCHULZ M, et al. PD-1 instructs a tumor-suppressive metabolic program that restricts glycolysis and restrains AP-1 activity in T cell lymphoma [J]. *Nat Cancer*, 2023, 4(10): 1508-25.
- [17] CAMPILLO-DAVO D, FLUMENS D, LION E. The quest for

- the best: how TCR affinity, avidity, and functional avidity affect TCR-engineered T-cell antitumor responses [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1720.
- [18] SPEAR T T, EVAVOLD B D, BAKER B M, et al. Understanding TCR affinity, antigen specificity, and cross-reactivity to improve TCR gene-modified T cells for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(11): 1881-9.
- [19] FRANK M L, LU K, ERDOGAN C, et al. T-cell receptor repertoire sequencing in the era of cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2023, 29(6): 994-1008.
- [20] LIU Y T, YAN X, ZHANG F, et al. TCR-T immunotherapy: the challenges and solutions [J]. *Front Oncol*, 2022, 11: 794183.
- [21] PORCIELLO N, FRANZESE O, D'AMBROSIO L, et al. T-cell repertoire diversity: friend or foe for protective antitumor response? [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 356.