

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.04.001

· 专家论坛(专题) ·

成胶质细胞瘤 CAR-T 免疫治疗的研究进展

石璐璐, 韩双印(郑州大学人民医院 干细胞研究中心, 河南 郑州 450003)

[摘要] 成胶质细胞瘤是发病率高、侵袭性强、预后差的中枢神经系恶性肿瘤。自 2005 年 FDA 批准的替莫唑胺后, 再无明显改善疗效的新策略。随着多形性成胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)分子生物学、肿瘤免疫学与免疫治疗技术的发展, 以及分子靶点的发现、中枢免疫“豁免”理论的突破和基因转导与细胞技术的进步, GBM 治疗迎来了免疫治疗的新跨越。以嵌合抗原受体修饰 T 细胞(chimeric antigen receptor-modified T cell, CAR-T)为代表的细胞免疫治疗, 在靶向 EGFRvIII、IL-13R α 2、HER2、促红细胞生成素产生肝细胞受体 A2(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma A2, EphA2)的 GBM 体外实验、动物模型及临床试验中都展示了良好的应用前景。然而, GBM 的分子异质性、免疫抑制微环境、血脑屏障等为 CAR-T 进入一线治疗提出了挑战。研究者们正在探索肿瘤恶性表型所必需的新靶点、防止免疫逃逸的最优靶抗原组合, 致力于提高 CAR-T 血脑屏障穿越和肿瘤组织浸润的能力, 寻找最佳注射途径和治疗方案, 同时逐步完善中枢神经肿瘤免疫治疗评估体系。相信 CAR-T 免疫治疗的突破终将为 GBM 患者向往美好生活圆梦。

[关键词] 成胶质细胞瘤; 免疫治疗; 嵌合抗原受体

[中图分类号] R739.41; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)04-0321-08

Research progress on chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of glioblastoma

SHI Lulu, HAN Shuangyin (Stem Cell Research Center, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China)

[Abstract] Glioblastoma multiforme (GBM) is a malignant tumor of central nervous system with high incidence, aggressive and poor prognosis. Since temozolomide was approved by FDA in 2005, there is no new curative strategy with obvious improvement in therapeutic effect. With the developments in molecular biology, tumor immunology and immunotherapy technology, the discovery of new molecular targets, breakthrough in central immunization exemption theory, and advance in gene transduction and cell technology, GBM immunotherapy ushered in a new breakthrough in immunotherapy. Cellular immunotherapy, presented by chimeric antigen receptor-modified T cell (CAR-T) therapy, has exhibited its prominent application prospect in GBM *in vitro* experiments targeting EGFRvIII, IL-13R α 2, HER2, erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma A2 (EphA2), animal models and early clinical trials. However, the GBM molecular heterogeneity, immunosuppressive microenvironment and blood-brain barrier have presented challenge for CAR-T going into the first-line clinical treatment. Researchers are now exploring key antigens of oncogenic phenotype, designing optimal combination of target antigens to prevent the immune escape, improving CAR-T passing through blood-brain barrier and invading tumor tissue, finding the best route for cell deliver, and optimizing evaluation system for central nervous system (CNS) immunotherapy. It is believed that the breakthrough of CAR-T cell immunotherapy will finally help GBM patients pursuing a beautiful life.

[Key words] glioblastoma; immunotherapy; chimeric antigen receptor

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(4): 321-328. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.001]



韩双印, 郑州大学人民医院主任医师, 博士研究生导师。东北大学(日本)医学院获得博士学位, 斯坦福大学(美国)完成博士后研究。河南省跨世纪学术技术带头人, 河南省肿瘤生物治疗学会副主任委员。《中国肿瘤生物治疗杂志》、《中华实用诊断与治疗杂志》、《世界华人消化杂志》的编委。参加工作以来一直从事肿瘤学基础和临床研究工作, 曾在美国、日本留学 10 年, 研究领域涉及分子肿瘤学、基因修饰 T 细胞肿瘤免疫治疗, 在 SCI 发表文章 30 余篇, 包括 *Cancer Res*、*Oncogene*、*PNAS*、*J*

Biol Chem、*J Hematol Oncol* 等国际主流期刊。目前承担包括国家自然科学基金在内的科研课题 5 项。E-mail: hansyzzu@163.com。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81172415, No. 81372405, No.81772670)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No.81172415, No.81372405, No.81772670)

[作者简介] 石璐璐(1992-), 女, 硕士, 主要从事肿瘤生物治疗研究, E-mail: s11010010992@126.com

[通信作者] 韩双印(HAN Shuangyin, corresponding author), E-mail: hansyzzu@163.com

成胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)是中枢神经系最常见的恶性肿瘤,占胶质瘤的56.1%^[1]。目前其标准治疗包括最大范围的安全手术切除,辅以脑局部放疗和替莫唑胺(temozolomide, TMZ)同步化疗;然而,患者的中位生存期仅为14.6个月,5年生存率仅为5.5%^[1]。传统治疗失败的原因:由于肿瘤呈浸润性生长,为了保护关键脑功能区而难以完全切除;高剂量放射治疗对正常脑组织有潜在损害,因此不能应用;由于血脑屏障的存在,化疗药物不能有效到达肿瘤组织。随着研究的不断深入,发现了GBM肿瘤干细胞的抗放化疗作用、关键信号通路的基因突变、肿瘤免疫抑制微环境等^[2]。昂贵的治疗与悲惨的收益在严峻的医疗环境下对医患都是挑战和考量,期盼更有效和安全的治疗方法。

癌症与肿瘤基因图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)计划和表观组、转录组、蛋白组学研究揭示了GBM的分子基础,基因突变、染色体缺失、甲基化修饰、信号通路异常等^[3-4]的发现不仅加深了对肿瘤病理生理学的认识,也正在重新定义GBM的诊断和分类标准,为其精准治疗提供新的分子靶点,GBM的分子基础和生物学特性与治疗策略越来越趋于密切结合。

肿瘤免疫治疗是近年快速发展的领域之一,助力GBM治疗迈进了一大步^[5]。免疫治疗的特性能够避免对正常脑组织不必要的伤害;效应T细胞在脑实质中的迁移不依靠药物扩散梯度,而能在趋化因子引导下穿越寻觅肿瘤细胞;免疫记忆细胞可以持久追杀逃逸的肿瘤细胞。研究^[6]表明,肿瘤相关抗原可以诱导有效的抗肿瘤免疫反应、抑制/消除小鼠胶质瘤生长。临床前研究的成功推进了多项免疫治疗进入临床试验,例如Rindopepimut/CDX-110多肽疫苗、免疫检查点抑制剂、嵌合抗原受体修饰T细胞(chimeric antigen receptor-modified T cell, CAR-T)等^[7-9]。其中, CAR-T免疫治疗最引人注目,其良好的靶向性、杀伤性和持久性使肿瘤免疫治疗在“冰与火”的轮回中重生,点燃了GBM治疗的希望之火^[10]。

1 中枢神经系统的免疫特点

中枢神经系统(central nervous system, CNS)长期以来被认为是“免疫豁免区”,即CNS是免疫特区,无免疫反应发生。该理论是基于CNS特殊的解剖位置和观察:脑内抗原提呈细胞缺失,淋巴组织及淋巴回流匮乏,血脑屏障限制淋巴细胞出入,脑实质MHC分子表达不足等^[11]。事实上,中枢神经系统的免疫豁免权是有限的,越来越多的证据表明,无论生理或病理状态下CNS都具备免疫功能。

生理条件下, CNS中存在巨噬细胞、小胶质细胞、

T细胞等发挥免疫监视作用^[12]。巨噬细胞分布在软脑膜、脉络膜、血管周隙等处,获取并提呈血管及脑脊液中的抗原;小胶质细胞分布在脑实质,分泌促炎因子和趋化因子发挥免疫监视作用;T细胞少量存在于脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中,以记忆细胞为主,接受巨噬细胞提呈的抗原。病理状态下, CNS免疫应答有赖于抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)、淋巴替代途径和免疫细胞归巢。肿瘤及感染性疾病发生时,树突细胞(dendritic cell, DC)在脑实质和血管周隙中出现并逐渐增多,小胶质细胞激活后表达MHC II抗原和共刺激因子发挥抗原提呈作用^[13]。CSF和间质液(interstitial fluid, ISF)替代淋巴液与外周免疫系统交流, CSF运输APC和可溶性抗原经鼻黏膜或硬脑膜进入淋巴管、ISF运输可溶性抗原沿动脉和毛细血管基底膜回流至颈部淋巴结^[14]。胶质瘤患者中能检测到抗原特异性B和T细胞免疫反应,但与外周恶性肿瘤诱发的免疫反应相比仍较弱。

2 GBM的分子异质性

GBM依据细胞类型和病理特征分级诊断。TCGA揭示了GBM在DNA突变、RNA表达谱、表观修饰等层面的分子异质性,根据*p53*、*EGFR*、异柠檬酸脱氢酶[isocitrate dehydrogenase (NADP⁺) 1, *IDH1*]、*ATRX*和神经纤维瘤蛋白1(neurofibromin 1, *NF1*)基因改变及表达差异,分为经典型、前神经元型、神经元型和间质型等分子亚型^[15]。每个亚型都有独特分子异质特征:经典型常见*EGFR*突变及扩增;前神经元型特征为*IDH1*突变;间质型广泛表达*IL-13R α 2*和平足蛋白(podoplanin, *PDPN*)基因,该型免疫原性强,DC疫苗及Toll样受体(toll-like receptor, TLR)激动剂能明显提高生存期。此外,染色体缺失(1p/19q)、甲基化改变(*MGMT*、*CDKN2A/B*)、*PTEN*突变、*BRAF*融合和点突变、*Ki67*、*Mir-181d*等也引入了胶质瘤的分子分型。这些分子生物学改变导致一些重要信号通路异常(包括RTK/RAS/PI3K, p53和RB通路),与细胞增殖失控、细胞周期检查逃避、凋亡抑制相关^[16]。

GBM的肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)可分为四类^[17]:(1)癌基因的突变、易位或剪接体的抗原,例如EGFRvIII;(2)癌胚系基因编码的抗原,例如黑色素瘤相关抗原(melanoma-associated antigen, MAGE)、肉瘤抗原(sarcoma antigen, SAGE)和滑膜肉瘤X断点(synovial sarcoma X breakpoint, SSX)家族;(3)过表达基因编码的抗原,例如HER2、IL-13R α 2、促红细胞生成素产生肝细胞受体A2(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma A2, EphA2);(4)病毒抗原,例如CMV

pp65 和 CMV IE1。此外,肿瘤脉管系统的血管内皮细胞(例如 VEGFR2)或由其他基质细胞表达的抗原也是 T 细胞治疗的潜在靶点^[18]。

GBM 最频繁的突变发生于 *EGFR* 和 *IDH1*, 突变产生肿瘤特异性抗原 EGFRvIII 和 IDH1R132H。EGFRvIII 是 EGFR 最常见的突变体抗原,由 EGFR 胞外结构域内 267 个氨基酸缺失产生,在约 25%~33% GBM 特异表达^[19]。EGFRvIII 导致酪氨酸激酶组成性激活,与肿瘤发生、侵袭、抗放化疗和凋亡相关。IDH1R132H 是 IDH1 单核苷酸突变使精氨酸被组氨酸取代形成的新蛋白,多发生在青年患者和继发性 GBM(高达 80% 以上),与患者的总生存率呈正相关^[20]。癌胚系基因、过表达基因及病毒整合基因在 GBM 也表达异常。*HER2* 在 40%~80% 的 GBM 患者中呈过表达,通过增加 EGFR/HER2 和 HER2/HER3 异二聚体化,驱动癌细胞增殖、侵袭^[21]。EphA2 属于酪氨酸激酶 Eph 家族 EphA 类受体,60%~90% GBM 中有扩增及过度表达^[22],与调节失调和稳定性改变有关。虽然 EphA2 与配体结合对细胞生长和迁移有负调节作用,肿瘤细胞中分布异常、与配体亲和力下降、磷酸化及激酶活性等导致了肿瘤的恶性表型。IL-13R α 2 是缺乏信号转导链的诱饵受体,竞争抑制 IL-13R α 1 诱导的细胞凋亡,在约 75% GBM 中表达,与侵袭、恶性程度、不良预后相关^[23]。

3 CAR-T 治疗肿瘤的优势

CAR-T 是过继免疫治疗的新策略,由单链抗体、共刺激分子、T 细胞活化基序组成的人工嵌合受体,将抗体的靶向性和 T 细胞的杀伤活性融合为一体^[24]。CAR 通过基因转导修饰 T 细胞,重塑 T 细胞的抗肿瘤活性,具有肿瘤靶向性、杀伤活性和持久性。CAR 已从第一代快速发展到第四代,以增强特异性、实现调控性和实体瘤穿透性等特性。CAR-T 的理论优势:(1)非 MHC 限制性杀伤,克服了肿瘤下调 MHC 的免疫逃逸机制;(2)分子靶点范围广,能够识别蛋白类或糖脂类抗原;(3)活化双信号(共刺激分子和免疫受体酪氨酸激活基序)偶联于同一分子,增强自主性,无需依赖其他辅助免疫细胞;(4)灵活的胞内结构域可以赋予 T 细胞多种功能属性,比如改善细胞因子分泌谱、克服肿瘤免疫抑制微环境、增强实体瘤中归巢等;(5)能够修饰 T 细胞、NK 细胞、CIK 细胞,短期内可获得足够的肿瘤特异性免疫细胞,以满足治疗需要。

CAR-T 首先在血液肿瘤中取得突破性进展。JUNE 等^[25]采用二代 CD19 CAR-T 细胞治疗 3 例 CLL 白血病(CD19scFv-CD137-CD3 ζ ,慢病毒转染自体 T 细胞,1.5 \times 10⁵/kg 细胞输注):2 例完全反应(complete reaction, CR),1 例部分反应(partial reaction,

PR)。不断公布的临床试验结果展示出 CD19 CAR-T 良好的治疗效果,2017 年 8 月 31 日美国 FDA 批准了第一个 CAR-T 药物 tisagenlecleucel(商品名为 Kymriah)^[26]。此外,靶向 CD20、CD30、CD33、CD38、CD123、CD138 等抗原的 CAR-T 在白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤的研究也在进行中^[27]。与此同时,CAR-T 在实体瘤中的研究也在积极推进。以 HER2、EGFRvIII、CEA、PM-SA、间皮素(mesothelin,MSLN)、黏蛋白(mucin 1, MUC1)为靶点,在肺癌、脑胶质瘤、结肠癌、前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌等肿瘤中都进行了积极的探索,取得了可喜的进展^[28]。

4 CAR-T 在 GBM 中的应用

CAR-T 肿瘤免疫治疗的理论优势和临床效果,促使研究者以极大的兴趣开展 GBM 免疫治疗方案,围绕 EGFRvIII、IL-13R α 2、HER2、EphA2 等分子靶点,临床前研究和临床试验都取得了令人鼓舞的结果。

4.1 EGFRvIII CAR-T

EGFRvIII 在 GBM 的高表达率和肿瘤特异性,作为免疫治疗的分子靶点备受关注,治疗性疫苗、抗体和 CAR-T 研究最多。OHNO 等^[29]基于 EGFRvIII 单抗 3C10,构建了第一代 EGFRvIII CAR-T(逆病毒转导健康人 T 细胞),通过尾静脉向 GBM 原位移植 NOD/SCID 小鼠模型输入 4 \times 10⁶ 个 CAR-T,12 d 后肿瘤生长明显被抑制和生存期延长。为了提高安全性,对 3C10 scFv 进行了人源化改造,鼠源和人源化二代 CAR-T(EGFRvIII scFv-4-1BB-CD3 ζ ,逆病毒转导健康人 T 细胞)均能特异性识别 EGFRvIII 阳性肿瘤细胞,GBM 皮下移植小鼠模型尾静脉输入 1.0 \times 10⁶ 个 CAR-T,发现肿瘤体积缩小、小鼠生存期延长^[30]。为了模拟 GBM 患者的免疫状态,SAMPSON 等^[31]采用免疫健全小鼠原位 GBM 模型,对小鼠给予 5 Gy 诱导淋巴衰竭预处理,静脉给予三代 EGFRvIII CAR-T(3.5 \times 10⁶~1.0 \times 10⁷ 个),观察到移植细胞的克隆扩增和整体抗肿瘤反应提高,小鼠展现剂量依赖性抗肿瘤作用和生存期延长。笔者课题组构建的二代 EGFRvIII CAR(EGFRvIII scFv-ICOS-CD3 ζ),体外实验中表现出 EGFRvIII*U87 的特异性杀伤或细胞因子分泌能力,动物实验也表现出肿瘤抑制作用^[32]。

基于 EGFRvIII 临床前研究的良好结果,开启了 EGFRvIII CAR-T 临床试验。最近一项 10 例复发 GBM 患者的二代 CAR 细胞治疗(EGFRvIII scFv-4-1BB-CD3 ζ ,慢病毒转导 T 细胞,静脉输注)结果显示,外周血和肿瘤中均检测出 CAR-T 存在和短暂增殖,术后分析 EGFRvIII 表达,7 例中 5 例下降。MRI 虽然均未显示病灶缩小,但 1 例无进展生存期超过 18 个月^[33]。目

前,EGFRvIII CAR-T治疗复发GBM I/II期研究在美国国家癌症研究所进行。在I期临床试验(NCT02209376)中,采用人源化scFv CAR-T,募集手术切除后残留病灶或初次复发EGFRvIII⁺ GBM患者。残余病灶患者先接受TMZ预处理、再注入EGFRvIII CAR-T,而复发性患者不预处理直接注入EGFRvIII CAR-T。另一临床试验(NCT01454596),患者首先非清髓性预处理(环磷酰胺和氟达拉滨),然后静脉给予逆转录病毒载体转导的第三代EGFRvIII CAR-T。虽然临床结果尚未公布,但靶向EGFRvIII CAR-T在临床前研究中已经展现出肿瘤细胞精确定位、抗肿瘤疗效显著、毒副作用少等优势。

4.2 IL-13R α 2 CAR-T

IL-13R α 2在GBM细胞上表达量是正常脑组织的3万倍,是极有价值的靶抗原。靶向IL-13R α 2 CAR是将IL-13R α 2配体偶联CD3 zetakine(取名为IL-13-zetakine),前者实现靶向性,后者诱导细胞毒性反应。为了提高特异性,通过定点突变法向配体E13Y引入单突变或向E13K/R109K引入双突变,减少对IL-13R α 1/R α 4复合体的识别^[34]。IL-13-zetakine⁺ CTL具有IL-13R α 2特异的和MHC非依赖的抗胶质瘤细胞毒性作用,能够分泌Tc1细胞因子,并以抗原依赖的方式扩增,可介导动物GBM模型的抑制作用。向GBM小鼠原位移植模型颅内单次注入二代IL-13R α 2 CAR-T(IL-13R α 2-CD28-zetakine),MRI检测显示肿瘤出现时间推迟,中位生存期从35 d提高到88 d,28%生存期超过120 d^[35]。

靶向IL-13R α 2 CAR-T最先开展I期临床试验。第一项临床试验(NCT00730613)^[36],3例GBM患者手术残腔通过导管输入高达 1×10^8 个IL-13-zetakine CAR-T(电转自体T细胞),2例患者观察到抗肿瘤反应,生存期超过14个月;其中1例患者细胞输注后IL-13R α 2表达降低,另外1例患者MRI显示细胞灌注部位肿瘤坏死,无不可控的严重CNS炎症反应。第二项临床试验(NCT01082926)^[37],6例患者均展现短暂抗肿瘤反应,副作用轻微;其中1例57岁复发IV级GBM患者、剂量递增方式、手术残腔输入 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 个一代IL-13-zetakine CAR-T,14周后肿瘤体积缩小,输入部位和进展灶内中均有CAR-T存在且持续长达5周。而另一临床试验^[38]中,1例50岁复发多灶GBM患者,手术残腔与脑室双通路输入二代IL-13R α 2 CAR-T(IL-13R α 2-4-1BB-CD3 ζ ,逆转录病毒转导自体T细胞),残余腔输入(6次总剂量 5.2×10^7 个细胞)仅能控制输入部位肿瘤生长,追加10次脑室输入(总剂量 9.2×10^7),脑和新发脊髓病灶均退缩,病情稳定达7.5个月,未见不良反应发生。二代IL-13R α

2 CAR-T相较IL-13-zetakine T显示出更强的体内存活力、增殖力、杀伤力。

4.3 HER2 CAR-T

HER2也是GBM的重要靶点,而且HER2在GBM CD133⁺肿瘤干细胞高表达,后者通常是肿瘤复发、化疗抵抗的重要原因。体外实验^[39]证实二代HER2 CAR-T(EGFRscFv-CD28-CD3 ζ 逆转录病毒转导健康人T细胞)细胞有效杀灭GBM中HER2⁺/CD133⁺肿瘤干细胞。8只人源肿瘤异种移植模型(patient-derived xenograft model,PDX)NOD-SCID小鼠右额叶皮质输入 5×10^4 个患者GBM细胞、颅内注射 2×10^6 个二代HER2 CAR-T,5只CR,3只PR,其中4只荧光成像和组织分析显示肿瘤消失持续6个月,中位生存期为90 d,50%小鼠超过100 d。为增加肿瘤特异性,HEG-DEET等^[40]构建HER2和IL-13R α 2双靶点CAR-T(HER2/IL-13R α 2-CD28-CD3 ζ),体外实验和原位移植GBM小鼠模型中均证实抗肿瘤活性提高,颅内注射 2×10^6 个双靶点CAR-T治疗后,80%小鼠中位生存期超过160 d,而HER2和IL-13R α 2单靶点CAR-T分别为79和84 d。

HER2 CAR-T的I期临床试验^[41]证实了其安全性与有效性。17例HER2⁺进展期GBM患者(11例成人、6例儿童)使用HER2 CAR-T(EGFRscFv-CD28-CD3 ζ)治疗,外周静脉输入 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 个细胞/ m^2 ,12周后仍能在外周血中检测到HER2 CAR-T,未见不良反应发生。参与评估的16例患者中,8例客观反应、8例疾病进展。治疗后平均存活时间为11.6个月,诊断后为24.8个月,成年人的平均生存期为30个月。影响HER2 CAR-T大规模临床试验的原因是,HER2在重要脏器(如心、肺)表达所致的脱靶效应,使患者出现严重心肺功能衰竭致死。评估颅内输入治疗复发/难治性GBM安全性的临床试验在美国贝勒医学院正在开展(NCT02442297),按剂量递增方式输入 1×10^7 、 3×10^7 、 1×10^8 个细胞,以增加安全性。

4.4 EphA CAR-T

靶向EGFRvIII、IL-13R α 2存在治疗中表达下降的逃逸问题,而靶向HER2有安全隐患,EphA作为GBM CAR-T免疫治疗的新靶点被提出,在体外和动物实验中展现了较强的抗肿瘤活性。体外实验^[42]中将EphA2 CAR-T(EphA2scFv-CD28-CD3 ζ 逆转录病毒转导健康人T细胞)与EphA2⁺ U373或EphA2⁺ U87胶质瘤细胞系共同培养,可诱导IFN- γ 和IL-2分泌,还能干扰神经球形成和杀死GBM干细胞。12只原位移植SCID小鼠模型颅内注射 2×10^6 个EphA2 CAR-T,1 d后生物发光成像显示肿瘤信号明显降低,平均生存时间显著延长,6只小鼠出现CR。为评估剂量和输入

方式的影响,输入细胞数降至 0.5×10^6 个,4只小鼠肿瘤体积均缩小,其中1只CR;但尾静脉途径输入未发现抗肿瘤活性。最近发表的EGFRvIII/IL-13R α 2/EphA2三靶点CAR-T PDX小鼠模型实验^[43]中,颅内注射2次 1×10^6 个三靶点CAR-T,展现出持续抗肿瘤反应,小鼠生存期超过60 d。EphA⁺ CAR-T临床试验国内已有完成(NCT02575261),该试验参与患者高达60例,细胞输入6周内评价其安全性,24周内CT、MRI、PET检查评价疗效,具体结果尚未公布。

5 挑战与对策

5.1 不良反应的处理

CAR-T免疫治疗取得惊人效果的同时,其毒副作用也受到关注。细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)是最常见的安全问题,由CAR-T过度激活和大量炎症细胞因子释放入血引起,临床表现包括发热、寒颤、低血压和缺氧,与免疫反应程度及肿瘤负荷相关,输入类固醇皮质激素及IL-6受体拮抗剂能缓解^[44]。脱靶毒性常因CAR-T识别非肿瘤组织的靶抗原产生,GBM的靶点目前只有EGFRvIII、IDH1R132H是肿瘤特异性抗原,其他靶点均在正常组织有表达,存在脱靶风险^[45]。选择肿瘤特异性抗原,如肿瘤特异性的突变抗原(即新抗原),用于构建有效和安全的CAR-T十分必要。IDH1R132H位于细胞内,需要特定免疫系统提呈至细胞表面才能被T细胞识别,因此关于它的相关研究较少。神经毒性也较常见^[46],在早期评估IL-13R α 2 CAR-T治疗GBM时,已经考虑到这种危害而将自杀基因嵌入CAR中。其他不良反应还包括过敏反应、肿瘤溶解综合征、病毒转导的插入突变等。选择直接注入脑部病变而非静脉输入、采用逐步升级的输入剂量、治疗过程中MRI监测等安全措施都在尝试应用之中。

5.2 GBM分子异质性

GBM分子异质性不仅表现在肿瘤内(肿瘤内异质性)和患者之间(肿瘤间异质性),治疗前后、原始与复发病灶也存在不同。TMZ可诱导肿瘤细胞染色体重组,驱动基因组和表观遗传异质,转录组/蛋白质组动态变化导致多种肿瘤细胞表型变异。JOHNSON等^[47]发现肿瘤原始病灶与复发病灶抗原表达存在明显差异,复发前后序贯突变分析揭示治疗对肿瘤细胞施以选择压力,诱导持续性变异。靶向EGFRvIII或IL-13-zetakine的CAR-T治疗后,GBM肿瘤组织分析显示,整体EGFRvIII或IL-13R α 2表达水平下降。为使CAR-T持续发挥抗肿瘤效果,其抗原结合序列必须与肿瘤细胞抗原表达同步发展,每个治疗周期需重新分析肿瘤细胞的基因型和抗原表位,设计并构建

新的CAR-T。适配器肽(adaptor peptides)可以连接肿瘤细胞和CAR,提供无需更新CAR-T谱系的新思路^[48]。利用全外显子组与质谱测序分析寻找具备遗传稳定性新型抗原表位、构建多靶CAR-T,为单靶耐受提供新策略。

5.3 肿瘤免疫抑制微环境

免疫抑制微环境(tumor immunosuppression microenvironment, TME)是GBM的一个显著特征,肿瘤中存在众多免疫逃避机制,包括分泌可溶性免疫抑制细胞因子、诱导或募集免疫抑制细胞[调节T细胞(regulatory T cell, Treg)、髓系来源抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)、肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)]和表达抑制分子^[49]。免疫抑制细胞因子包括IL-10和TGF- β ,削弱T细胞毒性、抑制T细胞及DC成熟和促进Treg增殖。Treg通过直接细胞接触或分泌免疫抑制因子抑制T细胞功能。MDSC通过耗竭精氨酸、产生一氧化氮和活性氧,从而抑制T细胞和NK细胞功能。TAM在肿瘤微环境中产生免疫抑制表型,分泌CCL22募集Treg、抑制吞噬功能和局部T细胞增殖。GBM细胞表达FasL诱导细胞凋亡;CTLA-4抑制CD8⁺和CD4⁺T细胞激活;淋巴细胞激活基因3(lymphocyte activation gene-3, LAG-3)抑制T细胞和NK细胞增殖;PD-1和TIM-3(thioisomescaline-3)诱导激活淋巴细胞耗尽^[50]。随着对GBM免疫微环境研究的深入,多种抵抗免疫抑制策略已经提出,例如通过增加共刺激因子或宿主淋巴细胞耗竭预处理,提高CAR-T扩增和持久性;CAR-T引入细胞因子IL-12或IL-15,以重塑免疫微环境;沉默Fas或TGF- β 受体基因表达,阻断免疫细胞凋亡和功能抑制通路;靶向免疫检查点通路PD-L1、CTLA-4,促进T细胞活化及抑制Treg功能^[51-54]。

5.4 血脑屏障

血脑屏障是GBM的CAR-T免疫治疗必须考虑的一个问题。尽管激活T细胞能通过血脑屏障,但仅有5%~10% T细胞能由外周血进入肿瘤实质。比较GBM和B细胞恶性肿瘤患者静脉输注相同结构的靶向EGFRvIII和CD19的二代CAR-T,尽管都是嵌入4-1BB共刺激分子,但在外周血中的扩增能力后者是前者的50倍,提示抗原介导的扩增远高于毒性信号及共刺激分子^[33]。探索活化的T细胞如何在肿瘤细胞和趋化因子作用下通过血管内皮,是优化CAR-T结构及功能、寻找最优转运路线的关键^[55]。采用神经外科技术(如激光热疗,经颅超声和电穿孔)增加血脑屏障通透性是改善CAR-T转运和提高抗肿瘤活性的策略之一。直接向切除腔、脑室或鼻内输送CAR-T,也能

避免外周静脉输注细胞的血脑屏障通过障碍和脱靶效应, 临床试验已证实切除腔输入及脑室输入细胞的安全性及可行性。

5.5 T细胞归巢

CAR-T归巢到肿瘤组织中是发挥效应功能的先决条件, 也是实体瘤面临的主要障碍, 尤其是CNS肿瘤。研究^[56]发现, 表达整合素 $\alpha 4\beta 1$ 和CXCR3的T细胞具有较强的CNS浸润能力。为了保证CAR-T有足够浸润作用, 通过改变培养条件或转入基因修饰CAR-T来复制归巢表型十分必要。诱导脑归巢表型的具体培养条件尚未确定, 但基因修饰CAR-T促浸润已在非CNS肿瘤临床前试验中初见成效。表达CCR4的CD30 CAR-T通过识别霍奇金淋巴瘤分泌CCL17定位到肿瘤组织并诱导体积减少; 表达CCR2b、靶向MSLN和GD2的CAR-T分别提高恶性胸膜间皮瘤和成神经细胞瘤的抗肿瘤效果; 表达肝素酶CAR-T通过降解细胞外基质中的硫酸肝素蛋白多糖提高实体瘤浸润^[57-58]。尽管CNS中T细胞归巢的具体过程尚未清楚, 但基因修饰CAR-T表达趋化因子、多种黏附因子或基质降解酶极具前景, 为实体瘤CAR-T治疗指明了方向。近年研究^[59]表明, CAR-T联合促归巢药物聚ICLC能诱导趋化因子分泌, 有望应用到GBM治疗中。

5.6 疗效评估体系

传统治疗评估策略即WHO或RECIST标准(response evaluation criteria in solid tumor), 以影像学资料为唯一评价标准, 以近期局部疗效替代长期整体疗效。免疫治疗不同于传统治疗, 需要先激活免疫系统, 才有肿瘤负荷和生存期变化。按照传统治疗策略评估肿瘤免疫治疗疗效, 往往因未观察到实体瘤体积减小或免疫细胞浸润出现的“假性进展”而过早停止实验, 因此WHO标准升级为irRC(immune-related response criteria)。在irRC中至少连续两次观察到总肿瘤负荷较基线肿瘤负荷增加25%以上, 且观察点时间间隔4周才判断为疾病进展, 降低远期获益患者过早停止治疗可能性。然而鉴于脑肿瘤的特殊性, irRC可能并不适合脑肿瘤。RNAO(response assessment in neuro-oncology)应用于恶性胶质瘤患者, 建议治疗12周后评价疾病进展情况。最近, 多国多学科神经肿瘤学免疫专家小组根据irRC和RNAO制定iRANO(immunotherapy response assessment for neuro-oncology), 解释免疫治疗后侵袭性影像变化、确定CNS疾病进展和评估治疗收益^[60]。肿瘤免疫应答的激活诱导血清和细胞指标变化, 但检测结果重复性和可比性差, 与治疗效果关系尚不明确。试验终点指标的设定对判断治疗效果同样举足轻重, 总体生存期(overall survival, OS)较疾病进展时间(time to progression, TTP)更敏感, 在免疫治疗中TTP往往无显著性差异但OS可明显改善。

6 结语

肿瘤免疫治疗经历了免疫检测点抑制剂的进步, 又迎来了CAR-T治疗的新跨越。CAR-T在血液肿瘤治疗中的成功鼓舞着研究者在实体瘤治疗领域砥砺前行。不断积累的研究资料显示了CAR-T免疫治疗与GBM现行标准治疗的协同作用, 未来的治疗采用手术切除、放化疗联合免疫治疗, 实现长期抑制GBM细胞生长、改善中位生存期和降低死亡率。

CAR-T承载着人类战胜肿瘤的美好希望, 但仍存在众多悬而未决的问题。GBM的CAR-T治疗最终成功需要在以下领域取得进展: (1)探索GBM起源与发展中的多种分子机制、通路途径及相互关系, 寻找肿瘤恶性表型所必需的关键突变、免疫治疗的新靶点; (2)基于GBM分子的异质性, 设计防止免疫逃逸的最优靶抗原组合, 构建多靶点CAR-T、开发适配器肽、设计随表型变化序贯更新的CAR-T细胞; (3)增加CAR-T肿瘤组织浸润、添加趋化因子受体以促进归巢作用, 利用神经外科技术如激光、热疗、经颅超声等以增加CAR-T穿越血脑屏障, 比较静脉、鼻内、脑室和残余腔单独或多种联合输入以探索最佳注射途径; (4)完善CNS免疫治疗评估体系, 基于iRANO, 利用先进影像学技术(如质子光谱成像、MR波谱成像)区分免疫相关反应与肿瘤进展、修改治疗剂量和优化方案。

(致谢: 中国医科大学长江学者特聘教授、博士生导师吴安华教授对课题组的大力支持和文稿指导, 特致谢意!)

[参考文献]

- [1] OSTROM Q T, GITTLEMAN H, LIAO P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014[J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(S5): 1-88. DOI:10.1093/neuonc/nox158.
- [2] TOUAT M, IDBAIH A, SANSON M, et al. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(7): 1457-1472. DOI: 10.1093/annonc/mdx106.
- [3] NETWORK T C. Corrigendum: comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways [J/OL]. *Nature*, 2013, 494(7438): 506[2017-11-27]. <https://www.nature.com/articles/nature11903>. DOI:10.1038/nature11903.
- [4] WANG C J, CHOE K S. Genomic landscape of glioblastoma and the potential clinical utility[J]. *CNS Oncol*, 2014, 3(3): 169-172. DOI: 10.2217/ens.14.15.
- [5] SAMPSON J H, MAUS M V, JUNE C H. Immunotherapy for brain tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(21): 2450-2456. DOI: 10.1200/JCO.2017.72.8089.
- [6] Murphy K A, Erickson J R, Johnson C S, et al. CD8⁺ T cell-independent tumor regression induced by Fc-OX40L and therapeutic vaccination in a mouse model of glioma[J]. *J Immunol*, 2014, 192(1): 224-233. DOI: 10.4049/jimmunol.1301633.
- [7] WELLER M, BUTOWSKI N, TRAN D D, et al. Rindopepimut with

- temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(10): 1373-1385. DOI:10.1016/S1470-2045(17)30517-X.
- [8] HUANG B, ZHANG H, GU L, et al. Advances in immunotherapy for glioblastoma multiforme[J/OL]. *J Immunol Res*, 2017, 2017(3): 3597613[2017-11-27]. <https://www.hindawi.com/journals/jir/2017/3597613/>. DOI:10.1155/2017/3597613.
- [9] RODRIGUEZ A, BROWN C, BADIE B. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for glioblastoma[J/OL]. *Transl Res*, 2017, 187:93-102 [2017-11-27]. [http://www.translationalres.com/article/S1931-5244\(17\)30076-2/fulltext](http://www.translationalres.com/article/S1931-5244(17)30076-2/fulltext). DOI:10.1016/j.trsl.2017.07.003.
- [10] SARAH C. Immunotherapy: CAR T cells in glioblastoma[J/OL]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(9): 602[2017-11-27]. <https://www.nature.com/articles/nrd.2017.158>. DOI: 10.1038/nrd.2017.158.
- [11] ENGELHARDT B, VAJKOCZY P, WELLER R O. The movers and shapers in immune privilege of the CNS[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(2): 123-131. DOI: 10.1038/ni.3666.
- [12] 储以微. 脑胶质瘤免疫微环境的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(5): 485-492. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.5.001.
- [13] RANSOHOFF R M, ENGELHARDT B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(9):623-635. DOI:10.1038/nri3265.
- [14] BRITTA E, CARARE R O, INGO B, et al. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system[J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 132(3): 317-338. DOI:10.1007/s00401-016-1606-5.
- [15] VERHAAK R G W, HOADLEY K A, PURDOM E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1[J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(1): 98-110. DOI:10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- [16] VENKATESAN S, LAMFERS M L, DIRVEN C M, et al. Genetic biomarkers of drug response for small-molecule therapeutics targeting the RTK/Ras/PI3K, p53 or Rb pathway in glioblastoma[J]. *CNS Oncol*, 2016, 5(2):77-90. DOI:10.2217/cns-2015-0005.
- [17] LUDWIG K, KORNBLUM H I. Molecular markers in glioma[J]. *J Neurooncol*, 2017, 134(3): 505-512. DOI:10.1007/s11060-017-2379-y.
- [18] KARSY M, GUAN J, COHEN A L, et al. New molecular considerations for glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3 K27M[J/OL]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2017, 17(2):19[2017-11-27]. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11910-017-0722-5>. DOI:10.1007/s11910-017-0722-5.
- [19] VILLA G R, MISCHER P S. Old player, new partner: EGFRvIII and cytokine receptor signaling in glioblastoma[J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(6): 765-767. DOI:10.1038/nn.4302.
- [20] DANG L, YEN K, ATTAR E C. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(4): 599-608. DOI:10.1093/annonc/mdw013.
- [21] ZHANG C, BURGER M C, JENNEWEIN L, et al. ErbB2/HER2-specific NK cells for targeted therapy of glioblastoma[J/OL]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(5): djv375[2017-11-27]. <https://academic.oup.com/jnci/article/108/5/djv375/2412457>. DOI:10.1093/jnci/djv375.
- [22] MIAO H, GALE N W, GUO H, et al. EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells in vivo through cross-talk with Akt and regulates stem cell properties[J]. *Oncogene*, 2015, 34(5): 558-567. DOI:10.1038/ncr.2013.590.
- [23] SATTIRAJU A, SAI K K S, XUAN A, et al. IL13R α 2 targeted alpha particle therapy against glioblastomas[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(26): 2561-2569. DOI:10.1056/NEJMoa1610497.
- [24] FESNAK A D, JUNE C H, LEVINE B L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(9): 566-581. DOI:10.1038/nrc.2016.97.
- [25] PORTER D L, LEVINE B L, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8):725-733. DOI:10.1056/NEJMx160005.
- [26] Brower V. First chimeric antigen receptor T-cell therapy approved [J/OL]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(11): djx251[2017-11-27]. <https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/109/11/djx251/4587937?redirectedFrom=fulltext>. DOI:10.1093/jnci/djx251.
- [27] YE B, STARY C M, GAO Q, et al. Genetically modified T-cell-based adoptive immunotherapy in hematological malignancies [J]. *J Immunol Res*, 2017(7): 1-13. DOI:10.1155/2017/5210459.
- [28] YU S, LI A, LIU Q, et al. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 78 [2017-11-27]. <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0444-9>. DOI:10.1186/s13045-017-0444-9.
- [29] OHNO M, NATSUME A, IWAMI K I, et al. Retrovirally engineered T-cell-based immunotherapy targeting type III variant epidermal growth factor receptor, a glioma-associated antigen[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(12): 2518-2524. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01734.x.
- [30] JOHNSON L A, SCHOLLER J, OHKURI T, et al. Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(275): 275ra22. DOI:10.1126/scitranslmed.aaa4963.
- [31] SAMPSON J H, CHOI B D, SANCHEZPEREZ L, et al. EGFRvIII mCAR-modified T-cell therapy cures mice with established intracerebral glioma and generates host immunity against tumor-antigen loss [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(4): 972-984. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-0709.
- [32] SHEN C J, YANG Y X, HAN E Q, et al. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRvIII expressing glioma [J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 33[2017-11-27]. <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-6-33>. DOI: 10.1186/1756-8722-6-33.
- [33] O'ROURKE D M, NASRALLAH M P, DESAI A, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma [J/OL]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(399): eaaa0984[2017-11-27]. <http://stm.sciencemag.org/content/9/399/eaad0984.short>. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa0984.
- [34] KAHN K S, BROWN C, COOPER L J, et al. Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24):9160-9166. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-04-0454.
- [35] BROWN C E, STARR R, AGUILAR B, et al. Stem-like tumor-initiating cells isolated from IL13-R α 2 expressing gliomas are targeted and killed by IL13-zetakine-redredirected T cells[J]. *Clin Cancer Res*,

- 2012, 18(8): 2199-2209. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-1669.
- [36] BROWN C E, BADIE B, BARISH M E, et al. Bioactivity and safety of IL13R α 2-redirec-ted chimeric antigen receptor CD8⁺ T cells in patients with recurrent glioblastoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(18): 4062-4072. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-15-0428.
- [37] BROWN C E, AGUILAR B, STARR R, et al. Optimization of IL13R α 2-targeted chimeric antigen receptor T cells for improved anti-tumor efficacy against glioblastoma[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(1): 31-44. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.10.002.
- [38] 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): 2561-2569. DOI:10.1056/NEJMoa1610497.
- [39] AHMED N, SALSMAN V S, KEW Y, et al. HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(2): 474-485. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-1322.
- [40] HEGDE M, CORDE A, KEVIN K H, et al. Combinational targeting offsets antigen escape and enhances effector functions of adoptively transferred T cells in glioblastoma[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(11): 2087-2101. DOI:10.1038/mt.2013.185.
- [41] AHMED N, BRAWLEY V, HEGDE M, et al. HER2-specific chimeric antigen receptor-modified virus-specific T Cells for progressive glioblastoma: a phase 1 dose-escalation trial[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(8): 1094-1101. DOI:10.1001/jamaoncol.2017.0184.
- [42] CHOW K K, NAIK S, KAKARLA S, et al. T cells redirected to EphA2 for the immunotherapy of glioblastoma [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(3): 629-637. DOI:10.1038/mt.2012.210.
- [43] BIELAMOWICZ K, FOUSEK K, BYRD T T, et al. Trivalent CAR T-cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma [J/OL]. *Neuro Oncol*, 2017, Epub ahead of print[2017-11-27]. <https://academic.oup.com/neuro-oncology/advance-article-abstract/doi/10.1093/neuonc/nox182/4159414?redirectedFrom=fulltext>. DOI: 10.1093/neuonc/nox182.
- [44] OBSTFELD A E, FREY N V, MANSFIELD K, et al. Cytokine release syndrome associated with chimeric antigen receptor T-cell therapy; clinicopathological insights[J]. *Blood*, 2017, 130(23): 2569-2572. DOI: 10.1182/blood-2017-08-802413.
- [45] BONIFANT C L, JACKSON H J, BRENTJENS R J, et al. Toxicity and management in CAR T-cell therapy[J/OL]. *Mol Ther Oncolytics*, 2016, 3: 16011[2017-11-27]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2372770516300353?via%3Dihub>. DOI:10.1016/j.bbmt.2016.09.002.
- [46] NEELAPU S S, TUMMALA S, KEBRIA EI P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy assessment and management of toxicities [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 15(1): 47-62. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.148.
- [47] JOHNSON B E, MAZOR T, HONG C, et al. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma [J]. *Science*, 2014, 343(6167): 189-193. DOI:10.1126/science.1239947.
- [48] SENGUPTA S, MAO G, GOKASLAN Z S, et al. Chimeric antigen receptors for treatment of glioblastoma: a practical review of challenges and ways to overcome them[J]. *Cancer Gene Ther*, 2016, 24(3): 121-129. DOI:10.1038/cgt.2016.46.
- [49] SEYED-MOSTAFA R, LEE K E, JIN B E, et al. Immune evasion strategies of glioblastoma[J/OL]. *Front Surg*, 2016, 3(32):11[2017-11-27]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsurg.2016.00011/full>. DOI:10.3389/fsurg.2016.00011.
- [50] KAMRAN N, CALINESCU A, CANDOLFI M, et al. Recent advances and future of immunotherapy for glioblastoma[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(10): 1245-1264. DOI:10.1080/14712598.2016.1212012.
- [51] YEKU O O, PURDON T J, KONERU M, et al. Armored CAR T cells enhance antitumor efficacy and overcome the tumor microenvironment[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10541[2017-11-27]. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-10940-8>. DOI:10.1038/s41598-017-10940-8.
- [52] HURTON L V, SINGH H, NAJJAR A M, et al. Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(48): E7788-E7797[2017-11-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5137758/>. DOI:10.1073/pnas.1610544113.
- [53] WANG P, LI S, SIRIWON N, et al. Enhanced cancer immunotherapy by chimeric antigen receptor-modified T cells engineered to secrete checkpoint inhibitors[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(22):6982-6992. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-17-0867.
- [54] SAHA D, MARTUZA R L, RABKIN S D. Macrophage polarization contributes to glioblastoma eradication by combination immunovirotherapy and immune checkpoint blockade[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(2): 253-267. DOI:10.1016/j.cell.2017.07.006.
- [55] RUDOLPH H, KLOPSTEIN A, GRUBER I, et al. Postarrest stalling rather than crawling favors CD8⁺ over CD4⁺ T-cell migration across the blood-brain barrier under flow in vitro[J]. *J Vis Exp*, 2016, 46(9): 2187-2203. DOI:10.3791/54592.
- [56] WOODS A N, WILSON A L, SRIVINISAN N, et al. Differential expression of homing receptor ligands on tumor associated vasculature that control CD8 effector T cell entry[J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(12): 1062-1073. DOI: 10.1158/2326-6066.
- [57] LIN Y, OKADA H. Cellular immunotherapy for malignant gliomas [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(10): 1265-1275. DOI:10.1080/14712598.2016.1214266.
- [58] CARUANA I, SAVOLDO B, HOYOS V, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirec-ted T lymphocytes[J]. *Nat Med*, 2015, 21(5): 524-529. DOI:10.1038/nm.3833.
- [59] OKADA H, KALINSKI P, UEDA R, et al. Induction of CD8⁺ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with α -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethyl-cellulose in patients with recurrent malignant glioma[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(3): 330-336. DOI:10.1200/JCO.2010.30.7744.
- [60] OKADA H, WELLER M, HUANG R, et al. Immunotherapy response assessment in neuro-oncology (iRANO): a report of the RANO working group[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(15): 534-542. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00088-1.

[收稿日期] 2018-02-25

[修回日期] 2018-03-10

[本文编辑] 黄静怡