

NK 细胞过继免疫治疗 HIV 感染研究进展

张秋月, 粟 斌, 张 欣, 吴 昊, 张 彤

[摘要] NK 细胞是天然免疫中的重要效应细胞, 在机体早期抗病毒、抗肿瘤的免疫应答中起关键作用。NK 细胞因其主要组织相容性复合体非限制性、泛特异性识别和杀伤靶细胞及快速应答等特点成为免疫治疗研究热点。随着对 NK 细胞表型、功能及作用机制研究的不断深入, NK 细胞过继免疫治疗也被尝试应用于 HIV 感染治疗。本文从 NK 细胞生物学特性、NK 细胞在 HIV 感染中的作用以及 NK 细胞过继免疫治疗等方面来阐述 NK 细胞过继治疗在 HIV 感染领域应用的机遇与挑战。

[关键词] HIV 感染; NK 细胞; 过继治疗; 免疫治疗

[中国图书资料分类号] R512.91

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2019)06-0505-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2019.06.005

Research progress on NK cell-based adoptive immunotherapy for HIV infection

ZHANG Qiu-yue, SU Bin, ZHANG Xin, WU Hao, ZHANG Tong*

Center for Infectious Diseases, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing Key Laboratory for HIV/AIDS Research, 100069, China

*Corresponding author, E-mail: zt_doc@ccmu.edu.cn

[Abstract] NK cells are important effector cells in the innate immunity and they play a key role in the early antiviral and anti-tumor immune responses. NK cells have become the focus of immunotherapy study due to their major histocompatibility complex non-restriction, pan specific recognition, elimination of target cells and rapid immune responses. With the advanced understanding of NK cell phenotype, function and mechanism, NK cell-based adoptive immunotherapy has been applied to treat HIV infection. This review will discuss the opportunities and challenges of NK cell-based adoptive immunotherapy in the field of HIV infection through the analysis on the biological characteristics of NK cells, the role of NK cells in HIV infection and the NK cell-based adoptive immunotherapy.

[Key words] HIV infection; NK cells; adoptive therapy; immunotherapy

1 NK 细胞生物学特性

NK 细胞占外周血淋巴细胞总数的 5%~15%, 由造血干细胞发育而来, 经历最前体 NK 细胞到前体 NK 细胞, 逐渐发育为未成熟 NK 细胞, 然后在物理接触和骨髓基质中细胞因子环境诱导下, 逐步发育为功能完整的成熟 NK 细胞, 最后获得细胞溶解潜力^[1]。不同组织或器官中的 NK 细胞, 因生理微环境不同导致 NK 细胞发育分化差异, 可表现出不同表型和功能。

NK 细胞既不表达 T 细胞表型 (T 细胞受体或 CD3), 又不表达 B 细胞表型 (B 细胞受体或 CD19), 根据 CD56/CD16 的表达, NK 细胞可分为 CD3⁺CD56^{bright}、CD3⁺CD56^{dim} 和 CD3⁺CD56^{neg}CD16⁺ 3 个亚群^[2]。CD3⁺CD56^{bright} 细胞亚群约占外周血 NK 细胞的 5%~10%, 主要发挥重要的调节功能, 可分泌细胞因子, 如 INF、TNF 和集落刺激因子等。相反, CD3⁺CD56^{dim} 细胞亚群约占外周血 NK

细胞的 90%, 优先迁移至炎症部位发挥天然细胞毒性效应, 也被认为是 NK 细胞的成熟阶段。CD3⁺CD56^{neg}CD16⁺ 细胞亚群比例很低, 以表达高密度的 CD16 分子、低细胞毒活性和低细胞因子产生为特征^[3]。

此外, NK 细胞表达一系列活化或抑制性受体, 通过抑制性信号和活化性信号之间的整合决定 NK 细胞与靶细胞之间相互作用结果。正常情况下, NK 细胞表面抑制性受体与靶细胞表面自身主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子结合传导抑制性信号, 当感染或肿瘤发生时, 细胞表面 MHC I 类分子水平下调, 导致抑制性信号减弱, 从而诱导 NK 细胞活化, 这种识别方式也是经典的 NK 细胞 “missing-self” 免疫识别活化机制^[4]。因此, 基于 NK 细胞 MHC 非限制性、泛特异性识别和杀伤靶细胞及快速应答的特点, 使其成为免疫治疗研究热点。

2 NK 细胞在 HIV 感染中的作用

在 HIV 感染的早期阶段, 被感染的细胞释放细胞因子, 将 NK 细胞募集到感染部位, NK 细胞同时接受相应细胞因子的刺激, 而成为能发挥功

[基金项目] “十三五” 国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治” 科技重大专项 (2017ZX10202101-004-001, 2017ZX10202102-005-003); 艾滋病研究北京市重点实验室 (BZ0089)

[作者单位] 100069, 首都医科大学附属北京佑安医院感染中心 艾滋病研究北京市重点实验室 (张秋月、粟斌、张欣、吴昊、张彤)

[通信作者] 张彤, E-mail: zt_doc@ccmu.edu.cn

能的“致敏 NK 细胞”^[5]。活化的 NK 细胞通过：① CD56^{dim}/CD16⁺ NK 细胞分泌细胞毒性穿孔素和颗粒酶诱导细胞凋亡；②通过膜肿瘤坏死因子家族分子（FasL、TRAIL、mTNF 等）与靶细胞相关受体结合诱导细胞凋亡；③ NK 细胞膜上表达抗体 IgG Fc 受体（FcγR III，即 CD16 分子），可以通过抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用特异性溶解被抗体包被的靶细胞^[6]。此外，NK 细胞具有分泌细胞因子调节适应性免疫的能力，如通过 IFN-γ 和 TNF 来促进 Th1 CD4⁺ T 细胞和巨噬细胞向感染部位募集，增强对感染细胞的炎症反应和吞噬作用^[7]。

前期研究表明，NK 细胞在 HIV 感染机制中具有至关重要的作用^[8]。例如，HIV 通过病毒 nef 蛋白下调 MHC I 类分子从而避免病毒特异性 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞的监控。但是，感染细胞因为 NK 细胞抑制性信号减弱，就容易被 NK 细胞识别并杀死。因此，NK 细胞和细胞毒性 T 细胞之间的配合对感染早期控制病毒起到了重要作用^[9]。但是，在慢性 HIV 感染病程中，NK 细胞会出现不同程度亚群紊乱、数量减少和功能缺损^[10]。例如，在 HIV 感染的早期，分泌细胞因子的 CD56^{bright}CD16⁺ NK 细胞早期被消耗，随后细胞毒性 CD56^{dim}CD16⁺ NK 细胞减少，而病理性 NK 细胞亚群 CD56^{neg}CD16⁺ NK 细胞扩增^[7]。然而，抗反转录病毒治疗（antiretroviral therapy, ART）只能部分恢复 NK 细胞表型和功能^[7, 11]。

当前，来源于自体或同种异体 NK 细胞，经体外培养扩增或经基因工程改造来增强 NK 细胞效功能的策略广泛应用于血液系统恶性肿瘤和实体瘤的临床试验中^[12-14]。借鉴 NK 细胞在肿瘤领域的成功应用，科研人员已经开始尝试通过 NK 细胞过继免疫治疗（NCT03346499, NCT03899480, ChiCTR1900021008），改善 NK 细胞数量减少及功能障碍等问题。

3 NK 细胞过继免疫治疗应用于 HIV-1 感

目前基于 NK 细胞的抗 HIV-1 感染的免疫治疗大多通过直接或间接增强 NK 细胞功能来实现^[15]：①利用细胞因子刺激、Toll 样受体激动剂诱导、阻断 NK 细胞抑制性信号等来增强 NK 细胞效应功能；②基因修饰 NK 细胞 Fc 受体、嵌合抗原受体 -NK 细胞技术增强 NK 细胞的靶向性；③ NK 细胞的过继性免疫治疗。

前期研究证明，源自人胚胎干细胞和诱导多能干细胞的 NK 细胞在体外和体内均可有效抑制

HIV-1 在 CD4⁺ T 细胞中复制^[16]，这为 NK 细胞过继性免疫治疗应用于 HIV-1 感染奠定了基础。目前，NK 细胞过继免疫治疗对艾滋病患者安全性和耐受性的评估，在国际临床试验注册网站上有 2 项临床试验，分别为：①经 IL-2 刺激的人类白细胞抗原（human leukocyte antigen, HLA）半相合 NK 细胞过继治疗（NCT03346499）；② HLA 半相合 NK 细胞联合 IL-15 超级激动剂 ALT-803 的过继治疗（NCT03899480）。IL-15 超级激动剂 ALT-803 可激活 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞的功能，据报道 ALT-803 与 PD-1 联合用药可在经 PD-1 治疗失败的转移性非小细胞肺癌中重新诱导机体抗肿瘤反应^[17]。目前，IL-15 给药在 HIV 感染中已被认为是“shock and kill”艾滋病功能性治愈策略的一部分，Garrido 等^[18]在体外研究中发现，IL-15 可以增强健康对照组和 ART 下的 HIV 感染者的 NK 细胞杀伤功能，更重要的是经 IL-15 处理后的 NK 细胞能够清除经潜伏库激动剂伏立诺他刺激 HIV 潜伏感染细胞，这为实现艾滋病的功能性治愈提供了新的思路。

然而，NK 细胞过继免疫治疗在艾滋病患者中的应用仍是一个崭新的项目，需要更多的临床试验来证明其安全性和有效性。NK 细胞应用于临床仍须克服供者选择、细胞来源、体外培养扩增以及细胞纯度、活性等一系列技术难题。

4 NK 细胞过继免疫治疗应用于临床的挑战

4.1 供体选择 早在 2005 年，一项对 43 例晚期癌症患者进行异体来源 HLA 半相合 NK 细胞过继治疗的研究证实，NK 细胞过继免疫治疗具有良好的安全性和耐受性，并且没有引起严重不良反应和移植物抗宿主反应（graft-versus-host disease, GVHD）。而目前，多种来源的（外周血、脐带血、胚胎干细胞等）异体 NK 细胞也被广泛用于白血病、卵巢癌、胰腺癌等多种肿瘤治疗的临床研究中^[4]。实际上，自体来源 NK 细胞的临床研究结果显示其抗肿瘤效果非常有限^[19]。自体 NK 细胞进入体内后，其表面杀伤细胞免疫球蛋白样受体（killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR）与肿瘤细胞 HLA 相匹配，“自我”识别信号抑制 NK 细胞活化，难以发挥较好的杀伤功能。相反，当供者 NK 细胞的抑制性 KIR 在受者细胞上没有相应的配体时，模拟 KIR-HLA 错配即形成 NK 细胞“missing-self”免疫识别模式，有助于取得更好的临床疗效。因此异体来源 NK 细胞似乎是过继免疫治疗的恰当选择。

但是，供者和受者之间基因型匹配的不同模式（KIR-配体不匹配、KIR-KIR 不匹配和配体-

配体不匹配) 均对预后有不同影响^[13]。大量流行病学研究表明, KIR 及其配体 HLA-I 类分子是影响 HIV 感染后疾病进程的重要因素, 宿主的 KIR 和 HLA 基因型亦影响 NK 细胞对 HIV 的免疫应答^[20-22]。本研究团队前期发现在 HIV 感染急性期队列的研究中, HLA-B 携带 Bw4/Bw4 纯合子的 HIV-1 感染者病毒调定点低, 较少的感染者在 HIV-1 感染 3 年后 CD4⁺ T 细胞计数下降到 350 个/μl 以下。然而, HLA-B 携带 Bw6/Bw6 纯合子的感染者病毒调定点低, 有更多的感染者在 HIV-1 感染 3 年后 CD4⁺ T 细胞计数下降到 350 个/μl 以下^[23]。最近本研究团队又首次在国际上揭示了 Bw4 纯合子 HIV-1 感染者的 KIR3DL1-NK 细胞的功能, 与早期 HIV-1 感染的病毒复制被抑制有关, Bw4 纯合子 HIV-1 感染者 NK 细胞的活化与 CD4⁺ T 细胞计数呈正相关^[24]。基于以上背景, 在 HIV 感染情况下, 我们认为应将供、受者之间 KIR 与 HLA 基因型匹配情况纳入免疫治疗预后参考指标。

4.2 NK 细胞的体外培养扩增 NK 细胞的发育和功能成熟受到多种细胞因子的调控。IL-2 通过与异源三聚体 IL-2 受体结合来激活、诱导 NK 细胞增殖, 是体外扩增 NK 细胞体系中较为常用的细胞因子^[25]。IL-2 的异源三聚体受体由亚基 α(CD25) 和 β(CD122) 以及共同的 γ 链(CD132) 组成。IL-15 在刺激 NK 细胞增殖及活化等方面与 IL-2 有许多相似性, 这与两者都可与 IL-2 受体复合体的 β、γ 链结合有关。然而, IL-15R 还包括独特的 IL-15Rα(CD215) 亚基^[26]。在骨髓微环境中 IL-15 主要由骨髓基质细胞产生, 对 NK 细胞发育成熟起关键作用, 最终可促进 CD56 的表达, 形成 CD3⁺CD56⁺ NK 细胞^[5]。此外, 研究表明, 成熟的 NK 细胞在转移至 IL-15^{-/-} 小鼠后无法维持, 说明 IL-15 对维持 NK 细胞长期存活发挥重要作用^[27]。IL-18 刺激 NK 细胞产生 IFN-γ, 而 IL-21 能够增强 NK 细胞的成熟但不促进增殖^[4]。这些细胞因子单独或组合在促进 NK 细胞的分化成熟、活化、增殖及细胞毒性过程中发挥重要的作用。借助细胞因子刺激, 可进一步扩增 NK 细胞数量及增强 NK 细胞功能, 有助于为过继性 NK 细胞治疗创造更好的疗效^[27]。

前期多项研究已经提出了过继转移免疫疗法中 NK 细胞“最佳剂量”的概念^[28], 各种混杂因素也导致从不同供体、不同组织来源的 NK 细胞数量及效应功能高度可变。Romee 等^[29]通过联合 IL-12、IL-15、IL-18 刺激外周血单个核细胞来源的 NK 细胞, 可扩增 NK 细胞数量至 1.0×10⁷/kg,

其中超过 90% 为 CD56⁺/CD3⁻ 细胞。而在当前同种异体 NK 细胞治疗的临床试验中, 输注的 NK 细胞数量从 1.0×10⁵/kg 到 1.0×10⁹/kg 不等^[4], 研究者们也着眼于为各种癌症患者选择优化的 NK 细胞剂量^[30]。但总体而言, 这些尝试多在肿瘤患者中进行, 且未标准化或不可复制。因此, 须要进行更多的研究来确定用于 NK 细胞输注的最佳剂量、预处理和扩增方案, 尤其是在 HIV 感染背景下。

5 结 语

随着对 NK 细胞发育、增殖、凋亡等机制的深入研究, 相信会有更多利用 NK 细胞效应功能的免疫疗法走进临床。如何获得“足够”数量以及高质量的 NK 细胞用于临床, 如何选择供体及细胞来源, 既能规避 GVHD 等潜在风险, 又能使 NK 细胞发挥最大功效, 以及如何延长外源性 NK 细胞在体内存活时间, 都是 NK 细胞过继免疫治疗应用于临床所面临的相关挑战。在 HIV 研究领域, NK 细胞过继免疫治疗仍是一个亟待开发的新项目, 相信随着免疫治疗技术的快速发展, NK 细胞过继免疫治疗艾滋病的疗效令人期待。

【参考文献】

- [1] 王学富, 田志刚. NK 细胞发育分化分子机制及其相关疾病研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(5):577-584.
- [2] Jacobson A, Bell F, Lejarcegui N, *et al*. Healthy neonates possess a CD56-negative NK cell population with reduced anti-viral activity [J]. PLoS One, 2013, 8(6):e67700.
- [3] Moretta L. Dissecting CD56^{dim} human NK cells [J]. Blood, 2010, 116(19):3689-3691.
- [4] Lupo KB, Matosevic S. Natural killer cells as allogeneic effectors in adoptive cancer immunotherapy [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(6):pii:e769.
- [5] 魏海明, 田志刚. NK 细胞的发育分化与功能极化 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(1):14-17.
- [6] Mayr LM, Su B, Moog C. Non-neutralizing antibodies directed against HIV and their functions [J]. Front Immunol, 2017, 8:1590.
- [7] Florez-Alvarez L, Hernandez JC, Zapata W. NK cells in HIV-1 infection: from basic science to vaccine strategies [J]. Front Immunol, 2018, 9:2290.
- [8] Elemans M, Boelen L, Rasmussen M, *et al*. HIV-1 adaptation to NK cell-mediated immune pressure [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(6):e1006361.
- [9] Weiler AM, Das A, Akinyosoye O, *et al*. Acute viral escape selectively impairs nef-mediated major histocompatibility complex class I downmodulation and increases susceptibility to antiviral T cells [J]. J Virol, 2016, 90(4):2119-2126.
- [10] 曾永泰, 逢晓莉, 汪笛, 等. NK 细胞在 HIV 感染中的作用: 进展和展望 [J]. 传染病信息, 2018, 31(6):566-571.
- [11] Mikulak J, Oriolo F, Zaghi E, *et al*. Natural killer cells in HIV-1 infection and therapy [J]. AIDS, 2017, 31(17):2317-2330.
- [12] Sivori S, Meazza R, Quintarelli C, *et al*. NK cell-based immunotherapy for hematological malignancies [J]. J Clin Med, 2019, 8(10):pii:e1702.
- [13] Oh S, Lee JH, Kwack K, *et al*. Natural killer cell therapy: a new treatment paradigm for solid tumors [J]. Cancers (Basel), 2019,

- 11(10):pii:e1534.
- [14] Sansevierio E. NK cell-fc receptors advance tumor immunotherapy [J]. J Clin Med, 2019, 8(10):pii:e1667.
- [15] Ram DR, Manickam C, Lucar O, *et al.* Adaptive NK cell responses in HIV/SIV infections: a roadmap to cell-based therapeutics? [J]. J Leukoc Biol, 2019, 105(6):1253–1259.
- [16] Ni Z, Knorr DA, Bendzick L, *et al.* Expression of chimeric receptor CD4 ζ by natural killer cells derived from human pluripotent stem cells improves *in vitro* activity but does not enhance suppression of HIV infection *in vivo* [J]. Stem Cells, 2014, 32(4):1021–1031.
- [17] Wrangle JM, Velcheti V, Patel MR, *et al.* ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial [J]. Lancet Oncol, 2018, 19(5):694–704.
- [18] Garrido C, Abad-Fernandez M, Tuyishime M, *et al.* Interleukin-15-stimulated natural killer cells clear HIV-1-infected cells following latency reversal *ex vivo* [J]. J Virol, 2018, 92(12):pii:e00235–18.
- [19] Hu W, Wang G, Huang D, *et al.* Cancer immunotherapy based on natural killer cells: current progress and new opportunities [J]. Front Immunol, 2019, 10:1205.
- [20] Mori M, Leitman E, Walker B, *et al.* Impact of HLA allele-KIR pairs on HIV clinical outcome in South Africa [J]. J Infect Dis, 2019, 219(9):1456–1463.
- [21] Lisovsky I, Kant S, Tremblay-McLean A, *et al.* Differential contribution of education through KIR2DL1, KIR2DL3, and KIR3DL1 to antibody-dependent (AD) NK cell activation and ADCC [J]. J Leukoc Biol, 2019, 105:551–563.
- [22] Hens J, Jennes W, Kestens L. The role of NK cells in HIV-1 protection: autologous, allogeneic or both? [J]. AIDS Res Ther, 2016, 13:15.
- [23] Zhang X, Huang X, Xia W, *et al.* HLA-B star 44 is associated with a lower viral set point and slow CD4 decline in a cohort of Chinese homosexual men acutely infected with HIV-1 [J]. Clin and Vaccine Immunol, 2013, 20(7):1048–1054.
- [24] Zhang X, Lu X, Moog C, *et al.* KIR3DL1-negative CD8 T cells and KIR3DL1-negative natural killer cells contribute to the advantageous control of early human immunodeficiency virus type 1 infection in HLA-B Bw4 homozygous individuals [J]. Front Immunol, 2018, 9:1855.
- [25] Wrangle JM, Patterson A, Johnson CB, *et al.* IL-2 and beyond in cancer immunotherapy [J]. J Interferon Cytokine Res, 2018, 38(2):45–68.
- [26] Chen Z, Yang Y, Liu LL, *et al.* Strategies to augment natural killer (NK) cell activity against solid tumors [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(7):pii:e1040.
- [27] Wu Y, Tian Z, Wei H. Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines [J]. Front Immunol, 2017, 8:930.
- [28] Lemoli RM, Parisi S, Curti A. Novel strategies of adoptive immunotherapy: how natural killer cells may change the treatment of elderly patients with acute myeloblastic leukemia [J]. Exp Hematol, 2017, 45:10–16.
- [29] Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, *et al.* Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia [J]. Sci Transl Med, 2016, 8(357):357ra123.
- [30] Lee J, Thall PF, Rezvani K. Optimizing natural killer cell doses for heterogeneous cancer patients on the basis of multiple event times [J]. J R Stat Ser C Appl Stat, 2019, 68(2):461–474.

(2019-11-14 收稿 2019-12-10 修回)
(本文编辑 揣征然)

(上接第 504 页)

- [43] Crowe S. Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication, by Martinez *et al* [J]. AIDS, 2003, 17(Suppl 4):S103–S105.
- [44] Choi JG, Bharaj P, Abraham S, *et al.* Multiplexing seven miRNA-based shRNAs to suppress HIV replication [J]. Mol Ther, 2015, 23(2):310–320.
- [45] Silva BF, Peixoto G, da Luz SR, *et al.* Adverse effects of chronic treatment with the main subclasses of highly active antiretroviral therapy: a systematic review [J]. HIV Med, 2019, 20(7):429–438.
- [46] Katz IT, Maughan-Brown B. Improved life expectancy of people living with HIV: who is left behind? [J]. Lancet HIV, 2017, 4(8):e324–e326.
- [47] Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, *et al.* Gene therapy in patients with transfusion-dependent beta-thalassemia [J]. N Engl J Med, 2018, 378(16):1479–1493.
- [48] Russell S, Bennett J, Wellman JA, *et al.* Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial [J]. Lancet, 2017, 390(10097):849–860.
- [49] Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, *et al.* Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy [J]. N Engl J Med, 2017, 377(18):1713–1722.
- [50] Pavel-Dinu M, Wiebking V, Dejene BT, *et al.* Gene correction for SCID-X1 in long-term hematopoietic stem cells [J]. Nat Commun, 2019, 10(1):1634.
- [51] Booth C, Romano R, Roncarolo MG, *et al.* Gene therapy for primary immunodeficiency [J]. Hum Mol Genet, 2019, 28(R1):R15–R23.
- [52] Zhang L, Zhong P, Zhai X, *et al.* Open letter from Chinese HIV professionals on human genome editing [J]. Lancet, 2019, 393(10166):26–27.
- [53] Wang C, Zhai X, Zhang X, *et al.* Gene-edited babies: Chinese academy of medical sciences' response and action [J]. Lancet, 2019, 393(10166):25–26.
- [54] Reardon S. Gene edits to 'CRISPR babies' might have shortened their life expectancy [J]. Nature, 2019, 570(7759):16–17.

(2019-11-13 收稿 2019-12-19 修回)
(本文编辑 揣征然)