

JAX[®] MICE, CLINICAL AND RESEARCH SERVICES

用于免疫肿瘤学研究的 人源化 NSG[™] 小鼠

摘要

经实验证明，植入人源造血干细胞后的人源化 NSG[™] 小鼠，可作为人源肿瘤植入或人源免疫系统重建的宿主。当治疗策略是基于防止肿瘤逃逸被免疫细胞识别和改善细胞毒性反应时，了解人源免疫细胞-肿瘤之间的相互作用就至关重要。我们在本文提供实验数据表明，人源化 NSG 小鼠可以支持同种异体植入的人源肿瘤的生长，这些人源肿瘤对标准化学疗法和免疫检查点抑制剂都有反应，临床试验也证明这些抑制剂可以对肿瘤产生细胞毒活性。荷瘤人源化 NSG 小鼠是一种新的、极具应用价值的免疫肿瘤学临床前评估平台。

*NSG 是 The Jackson Laboratory 的注册商标。

内容目录

免疫肿瘤学:肿瘤治疗的新纪元	3
肿瘤逃逸被人体免疫系统识别	3
免疫肿瘤新疗法的流程	6
开发免疫肿瘤新疗法的挑战	7
用人源化NSG 小鼠满足您的需求	8
人源化NSG 小鼠植入非HLA 匹配人源肿瘤	12
人源化NSG 小鼠人源肿瘤对治疗的反应	15
获取人源化NSG 小鼠和PDX 肿瘤模型	20
参考文献	22

免疫肿瘤学： 肿瘤治疗的新 纪元

临床前平台为免疫肿瘤治疗带来极大前景。

肿瘤对人体免疫系统的逃逸

免疫系统是肿瘤免疫疗法相关反应和抗性的主要调节因子。许多早期肿瘤，免疫细胞在识别肿瘤细胞表面表达的独特抗原之后是可以将其(宿主)根除的。免疫细胞如何参与在很大程度上取决于肿瘤的类型和分子特征。(Coffelt and de Visser,2015)。确实，晚期患者来源的肿瘤样本通常携带人免疫效应细胞(作为随附体)。肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)便是一类这样的免疫细胞，最典型是CD8+ 细胞

这些结果表明使用人源化NSG小鼠可作为临床前评估平台为免疫肿瘤治疗带来极大前景。

传统的癌症治疗方法使用的化学药物，对快速分裂的细胞有广谱毒性。这种化学治疗方法可能成功，但可能因各种脱靶毒性而使结果难以预测并具有诱导耐药性的风险。哺乳动物免疫系统已经进化出许多有效的、高度特异性的机制来消灭靶细胞(包括感染病原体的细胞和已经癌变的细胞)。作为应对，肿瘤细胞也演化了自己的一套机制来逃避免疫检测。利好的是，科研工作者正在更好地了解免疫细胞与肿瘤细胞之间的相互作用。刺激持久的、免疫介导的肿瘤退缩是一种新的、具有前景的治疗策略，目前已被用到临床上。虽然这些新的免疫肿瘤学策略非常令人鼓舞，它们并非100%有效，还需要做更多的工作。开发免疫肿瘤学相关新疗法的研究将受益于基于人源化、基于小动物模型的体内代谢评估平台。该平台不仅会让科学家对人类免疫系统和肿瘤细胞相互作用有更好的生物学理解，并且还能够对新疗法进行临床前评估，以保证其转化为临床应用时具有更高的成功可性。源化NSG小鼠可作为

毒性T淋巴细胞 (CTLs)。人们将TILs 从人体肿瘤中分离出来, 离体扩增, 然后再继转移回患者体内, 以利用其肿瘤特异性杀伤能力 (Restifo et al., 2012)。过继免疫治疗方法已成功用于治疗部分转移性黑色素瘤患者 (Rosenberg et al., 2011), 并现已扩展到常见上皮癌的治疗 (Rosenberg and Restifo, 2015)。然而, 它用于根除肿瘤并不普遍有效。过继转移前后的肿瘤杀伤活性的缺失或丧失可以通过多种免疫抑制模式来解释。

两种已鉴定的TIL免疫抑制途径是由细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 和程序性死亡1 (PD-1) 介导的 (Ahmadzadeh et al., 2009; Baitsch et al., 2011)。两者都被称为“检查点”途径, 它们对于防止正常条件下免疫耐受性的丧失很重要。

人类单克隆抗体Ipilimumab 和 Tremelimumab 被用于结合CTLA-4 并防止其与抗原呈现细胞上CD80 或CD86 的相互作用, 从而使得T细胞抑制信号传导阻断。目前的共识是, CTLA-4 阻断使得CD80 或CD86 可与CD28 结合, 从而激活关键的T细胞共刺激途径。Ipilimumab 和Tremelimumab 是首批进入临床试验的治疗黑色素瘤“检查点抑制剂” (Pardoll, 2012)。这两种抗体都帮助一小部分患者实现了长期存活, 这一事实激发了人们对激活天然免疫方法的广泛兴趣, 并试图激活其他天然免疫模式从而靶向攻击肿瘤。

PD-1/PD-L1(PD-1 配体)是另一个关键的检查点通路, 已被人为调控从而加强CTL介导的肿瘤攻击 (Ostrand-Rosenberg et al., 2014; Pauken and Wherry, 2015)。三篇关键的文献大大推进了工程化抗PD-1 阻断抗体的发展: 1、PD-1 无

效突变的小鼠患有自身免疫综合征 (Nishimura et al., 1999)。2、TILs 正调控PD-1 并随后变得免疫无能 (Ahmadzadeh et al., 2009)。3、许多类型的肿瘤都有PD-L1 表达 (Zou et al., 2008)。在早期临床试验中, 28%的抗CTLA-4 抗体治疗无效的晚期黑色素瘤患者对抗PD-1 单克隆抗体有反应 (Hamid et al., 2013)。此外, 结合使用两种检查点抑制剂 (抗-PD-1 和抗-CTLA-4), 53%的患者反应良好 (Wolchok et al., 2013)。抑制免疫负调控途径的免疫治疗药, 如抗-CTLA-4 和抗-PD-1, 开创了治疗癌症的新纪元 (Coffert and de Visser, 2015)。截至2015年, 有超过7种抗PD-1 / PD-L1 抗体已在进行临床试验 (Miller and Sadelain, 2015)。其中两种抗PD-1 检测点抑制剂被批准用于美国市场: Pembrolizumab (Keytruda) 和 Nivolumab (Opvivo)。目前两者都正在临床试验, 评估它们对多种肿瘤类型的疗效。由于CTLA-4 和PD-1 调节不同的抑制途径, 因此同时联合两种药通常会得到比单独使用更好的效果 (Sharma and Allison, 2015)。

除CTLA-4 和PD-1 介导的机制外, 肿瘤还通过其他机制来逃避免疫反应。例如, 肿瘤的高度炎性微环境可积聚组织内的巨噬细胞和外周血单核细胞。骨髓细胞可接受许多肿瘤衍生的信号, 这些信号可改变基因表达和表型 (Gabrilovich et al., 2012 and Ostuni et al., 2015)。在肿瘤中发展一种骨髓细胞亚群是肿瘤特定巨噬细胞 (TAMs)。TAMs 是广泛存在于实体瘤中白细胞群。在许多情况下, TAM 会加速而不是限制肿瘤的进展 (Ostuni et al., 2015)。

TAMs 通过表1中所示的机制抑制TIL 活性并增加肿瘤血管生成,从而产生有利于癌症生长的微环境。由TAMs 促进的调节性T 细胞 (Treg) 和T辅助细胞2 (TH2),对肿瘤可产生强烈的免疫抑制作用。这些细胞还通常与免疫耐受的维持有关。在肿瘤中发现的其他骨髓细胞包括髓源性抑制细胞 (MDSCs) 。

MDSC 属于一组异质的未成熟细胞,包括巨噬细胞、粒细胞和树突状细胞的前体。它们的共同特性是有抑制T细胞增殖和促进血管生成的能力 (Coffelt and de Visor,2015) 。如表2所示,MDSCs 使用一系列免疫抑制机制来帮助肿瘤逃避被人体免疫系统识别。它们的大多数作用都是针对抑制T细胞的。

表 1.肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 免疫抑制

TAM 表型	功效
上调的PD-L1	抑制的CTL活性
上调的IL-10	激发 T _H 2 细胞
下调的IL-12	抑制 T 细胞
上调的CCL22	T _{Reg} 细胞的吸附
上调的Tek (TIE2)	上调的血管生成水平

表 2.髓系衍生抑制细胞 (MDSC)对免疫的抑制

MDSC 表型	功效
上调的ARG1 和 NOS2 (iNOS)	抑制的 CTL 激活; TCR下调, 增殖减少
上调的活性氧物种(ROS)	抑制的CTL激活; TCR下调, 下调的IL-2R信号
上调的 ADAM17	下调的CD4/CD8T细胞上的CD62L水平, 受损的淋巴结转运
共刺激与可溶性因子	T _{Reg} 细胞的激活和扩增

免疫肿瘤新疗法的流程

在肿瘤免疫中其他重要的免疫细胞群包括树突细胞 (DCs) 和自然杀伤细胞(NK)。DCs 被认为是“专职的抗原呈递细胞 (APC)”，并且能够处理特异肿瘤特异性抗原以激活T和B细胞。因此，DC 成为了研究的重点。科研工作者致力于开发肿瘤疫苗并体外扩增肿瘤特异性CTL 用于随后的过继免疫治疗 (Palucka et al., 2012)。NK 细胞具有独特的细胞表面受体，其对自身组织有重要的免疫监视作用。NK 细胞的活性是通过与肿瘤上具有的HLA I 类抗原呈递分子(存在于大多数正常细胞和肿瘤)的结合来介导的。保持有HLA I 类表达的肿瘤可逃避NK 细胞介导的细胞毒性，但那些不表达的肿瘤不再被NK 细胞识别为“自身”，并被杀死。促进NK 细胞活性和使用同种异体NK 细胞的化合物是临床前和临床研究的活跃领域 (Vivier et al., 2012)。

如上述信息所示，我们对免疫细胞功能和与肿瘤细胞相互作用的了解正在加强。对这些相互作用基本机制的研究催生了几种可能的策略，它们可以操纵免疫细胞以增强其抗肿瘤活性。表3中列出了一些令人鼓舞的例子。单克隆抗体可以阻断或增强细胞间的配体-受体相互作用(作为激发剂或拮抗剂)。它们通过抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 实施靶向细胞破坏，并将结合的药物有效传递到特定的靶细胞。通过遗传工程，修饰的淋巴细胞可表达常规T细胞受体或嵌合抗原受体 (CARs)，这扩展了过继细胞在转移免疫疗法中的应用 (Rosenberg and Restifo, 2015)。例如，编码抗癌相关抗原抗体的

表 3. 目前新的免疫肿瘤学治疗方法

单克隆抗体	阻断细胞之间的配体和受体
	结合受体激活通路
	ADCC靶向破坏细胞
	抗体-药物偶联物
双特异性T细胞衔接 (BiTE) 抗体	促进T细胞杀死目标
嵌合抗原受体 (CARs)	促进T细胞杀死目标
过继细胞转移	肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)
	TCR 基因治疗
	异基因供体淋巴细胞输注 (DLI)
	同种异体NK细胞输注
疫苗接种	携带抗原的树突细胞
	肿瘤特异性抗原刺激

基因被与编码跨膜和信号结构域的基因连接。然后该CAR 被导入到T细胞中进行过继性T细胞治疗 (Stone, et al., 2012) 。双特异性T细胞衔接体(BiTE) 疗法利用了融合成单个分子的两个抗体的结合特异性区域。这些分子直接将CTL与肿瘤细胞上的抗原结合,以增强肿瘤杀伤能力 (Laszlo et al., 2014) 。

尽管TIL的离体 扩增和再输注方法仅取得了有限的成功,但是这种治疗方法目前得到了改进。通过将特异于单一肿瘤抗原的基因工程T细胞受体(TCR)引入TILs,该方法有了更好的效果。这种方法在使得各种癌症中有了显著的衰退,包括宫颈癌,淋巴瘤和白血病 (Rosenberg and Restifo, 2015) 。相关研究目前正在以确定将TIL过继转移与检查点抑制剂治疗相结合是否会改善疗效(Vanneman and Dranoff, 2012) 。同种异体(即错配)供体淋巴细胞输注(DLI)产生“移植抗肿瘤”效应,并且这已成功用于治疗许多白血病患者。类似的,使用同种异体NK细胞的方法目前也在研究之中 (Vivier et al., 2012) 。我们已了解肿瘤特异性抗原很多知识。利用这些知识,肿瘤抗原肽被用于引发DC,从而在过继转移之前刺激其适应性免疫应答。或者,这些抗原可以作为潜在疫苗直接注射,以增强内源性肿瘤特异性T细胞应答 (Miller and Sadelain, 2015) 。所有这些新方法都需要在人体测试之前进行适当的体内 临床前评估,以验证其作用机制,功效和安全性。

开发免疫肿瘤新疗法的挑战

实验室小鼠是用于模拟体内免疫-肿瘤相互作用和评估新疗法的最有价值的研究平台之一。具有完整免疫系统的小鼠可以通过基因工程诱发产生肿瘤,或者它们也可以植入同类供体或肿瘤细胞。小鼠的遗传免疫和肿瘤发展特性与人类有许多相似之处,但也存在明显差异。例如,人体和小鼠的外周血淋巴细胞分布不同,且它们的中性粒细胞对先天性和适应性免疫刺激的反应存在差异(Mestas and Highes, 2004) 。小鼠中的MDSCs主要是免疫抑制性较弱的多形核变种,而人体中的MDSCs通常是抑制性较强的单核细胞类型(Gabrilovich et al., 2012) 。这两个物种的肿瘤发展的病因学也不甚相同 (Rangarajan and Weinberg, 2003) 。

正如人们预期的那样,小鼠和人类在受体-配体同源性和亲和力上有差异。也就是说在小鼠上显示功效的试剂在临床中施用时不一定会表现出相同的功效。近交系小鼠具有遗传上的一致性,这大大提高了其在研究药物特异性和治疗可重复性等方面的应用。但是,人类在遗传上是具有多样性的。人类的遗传多样性可以降低治疗功效或导致以前未观察到的

脱靶毒性。在某些情况下,在小鼠中开发的治疗剂可能需要在更具人类特异性的系统中重新设计和重新测试。这样的努力可能是昂贵且耗时的。

The Jackson Laboratory 的研究人员创造了一种高度免疫缺陷的小鼠,称为NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, 005557)。它能够移植人类造血干细胞 (HSCs) 并支持人源免疫系统的分化和功能 (<http://jaxmice.jax.org/nod-scid-gamma/nsgbreakthroughs-and-references.html#immunity>)。这一小鼠模型也被用于多种人源肿瘤异种移植(PDX) (<http://jaxmice.jax.org/nod-scid-gamma/nsgbreakthroughs-and-references.html#cancer>)。由JAX In Vivo Pharmacology Services 产生的新证据表明,这些小鼠能够支持人源免疫细胞和人源肿瘤的共同植入。在这种情况下生长的肿瘤对标准治疗化学疗法和检查点抑制剂Pembrolizumab (Keytruda) 都有响应,因此人源化NSG小鼠可作为用于测试人特异性免疫肿瘤学治疗剂的新临床前平台。

用人源化NSG小鼠满足您的需求

创建人源化NSG小鼠(hu-CD34NSG™)的最简单方法是用亚致死剂量(~2 cGy)的铯或X-辐射处理3周龄的小鼠。通过细胞表面标记物CD34,初代HSC可从脐带血、胎儿肝脏或流动的外周血(PBL)中分离提取。人源CD34+HSC被静脉注射到小鼠尾静脉中,并在12周后验证植入。在这期间里,人源HSC注入到宿主骨髓、分化和成熟为髓系和淋巴系,然后迁移到适当的器官和组织。

人源HSC成功植入的标志是多谱系人源免疫细胞分化和融入小鼠的骨髓、胸腺、脾脏和PBL中。NSG小鼠支持多谱系植入,免疫细胞融入几乎所有适当的器官和组织中。图1和表4汇总了在hu-CD34NSG小鼠中检测到的全部人源免疫细胞群(Ishikawa et al., 2005; Tanaka et al., 2012)。

A. 小鼠骨髓

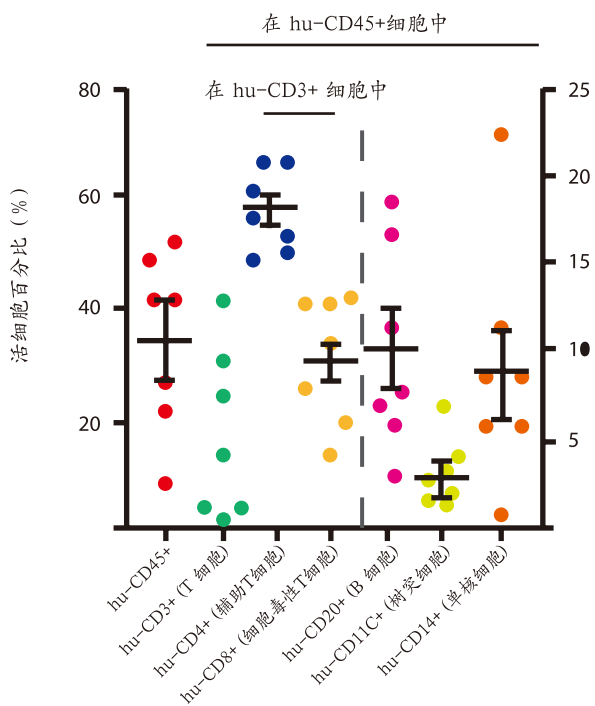
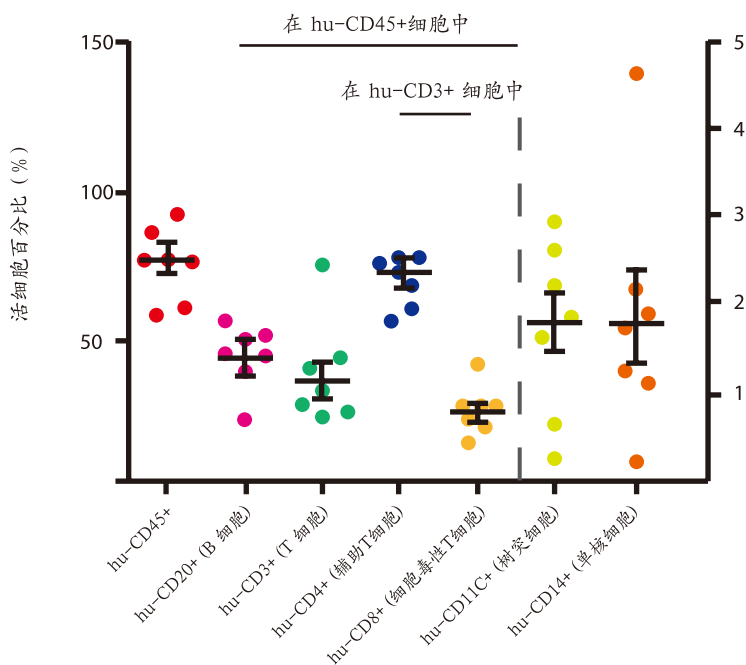


图 1. 人源化 CD34+NSG 小鼠支持多谱系人源细胞的植入, 包括B 细胞、T细胞、树突状细胞和单核细胞。

通过流式细胞仪, 使用人源白细胞的细胞特异性标记物来测量 [A] 小鼠骨髓中人存活细胞的百分比和 [B] 小鼠脾脏中人源存活细胞的百分比作为表征, 人源造血干细胞HSC 注射过的NSG 小鼠显示出非常强的植入效率。数据由 JAX™ In Vivo Pharmacology Services 提供。

B. 小鼠脾脏



骨髓细胞	淋巴细胞
巨噬细胞	CD4+ & CD8+ T 细胞
单核细胞	调节性T 细胞
中性粒细胞	B 细胞
嗜碱性粒细胞	NK 细胞
肥大细胞	
红细胞祖细胞	

表4. 人类多谱系植入 hu-CD34 NSG

数据由 JAX® InVivo Pharmacology Services, The Jackson Laboratory 提供。

确定hu-CD34 NSG 小鼠能够发展适当的人源免疫细胞群当然是有价值的,但是验证这些免疫细胞的实际功能性则更为重要。在hu-CD34 NSG小鼠的胸腺中发现了产生于骨髓未成熟人源T细胞祖细胞(CD4 + CD8 + 双阳性细胞)以及成熟CD4 + 和CD8 + 单阳性T细胞 (Ishikawa et al., 2005)。成熟的CD4+T 辅助细胞和CD8+CTLs 随后离开胸腺并融入PBL 和脾脏。总之,这些观察结果表明细胞正在进行胸腺TCR 选择(自我与非自身)并融入到适当的组织。为了证实人源T细胞的细胞毒活性,从移植小鼠的脾脏中收获这些细胞,通过同种异体靶细胞的生长离体扩增,然后在铬释放细胞毒性测定中用同种异体靶细胞攻击 (Ishikawa et al.,2005)。CD4+T 细胞识别靶细胞受MHC II 类的限制;CD8+T 细胞识别靶细胞受MHC I 类的限制,如正常、成熟的人源T细胞的预期。此外 hu-CD34 NSG 小鼠表现出迟发型超敏反应(DTH)。本实验用二硝基氟苯(DNBF)两次腹腔注射致敏hu-CD34 NSG 小鼠,并且一周后通过将DNBF 局部施用于耳廓来诱发免疫。通过测量耳廓肿胀来观察体内T细胞介导的促炎反应。此外,该反应可被氢化可的松阻断 (JAX In Vivo Pharmacology Services; 数据未显示)。

通过用卵清蛋白免疫来检查hu-CD34 NSG 小鼠中的B细胞功能以刺激免疫球蛋白的产生。人源B细胞通过产生卵清蛋白特异性IgM 而应答,但仅产生最少量的IgG (Ishikawa et al., 2005)。该平台当前的限制是外周淋巴结内的人源细胞群缺乏和生发中心(GC)的发育不良。这两者对于免疫球蛋白类型转

换(CSR)产生IgG 类记忆B细胞和浆细胞至关重要。

请注意,NSG 小鼠也有C5补体缺陷。虽然溶血补体活性的缺乏使得NSG支持更稳定的人细胞植入,但它也可以防止抗体与靶细胞结合所刺激的补体依赖性细胞毒性(CDC)反应。

hu-CD34 NSG 小鼠体内产生了具有适当功能活性的全谱髓样细胞谱系 (Tanaka et al., 2012)。从移植小鼠的骨髓和肺中分离的人源巨噬细胞能够吞噬荧光珠,并且对鼠伤寒沙门菌具有细胞毒性,当用干扰素 γ 刺激时。巨噬细胞通过Toll样受体产生对细菌脂多糖(LPS)的促炎反应。Hu-CD34NSG 中的人单核细胞/巨噬细胞表达TLR2 和TLR4;当用LPS 攻击小鼠时,在血浆中检测到多种人源促炎分子,这证明了其拥有的体内功能反应。(Tanaka et al.,2012)。

中性粒细胞在先天免疫和肿瘤生物过程中发挥着重要作用(通过发展成MDSC)。由标志物CD15+, CD33low 和HLA-DR- 定义的人源嗜中性粒细胞占骨髓中人源细胞的35%和hu-CD34 NSG 小鼠脾脏中的1-5%。(Tanaka et al.,2012)。人源CD66b + 中性粒细胞在PBL 中占不到1%,但经粒细胞集落刺激因子体内治疗后增加至2.6% (Coughlin et al., 2012)。标记物CD63在嗜中性粒细胞的嗜天青颗粒中表达;用LPS 处理的小鼠中的人源嗜中性粒细胞可增加CD63 的表达,这表明了其脱粒活性。

LPS 还激发呼吸反应增强并导致人源中性粒细胞在小鼠肺部的积聚,这模仿了细菌诱导的败血症。这些结果证明 hu-CD34 NSG 小鼠中的人源嗜中性粒细胞是具有功能的。

hu-CD34 NSG 小鼠具有 CD3-NKp46 + NK 细胞,它们分别占脾脏和肺部中人源细胞的 1-3 % 和 7% (Strowig et al., 2010)。这些 NK 细胞中的大多数是未成熟的 NKp46 + CD56⁻ 细胞,但当用白细胞介素 15 (IL-15) 处理时,它们可被诱导成熟为 NKp46 + CD56⁺ 细胞。人源 NK 细胞从 hu-CD34 NSG 脾脏中分离出来,经过 IL-15 处理并供以 K562 细胞为靶细胞,脱颗粒即产生 IFN- γ 于体外。K562 是人源红白血病细胞系,其表达 NK 识别分子 NCR,

NKG2D 和 DNAM。这些数据提供了人源化 NSG 小鼠产生 NK 细胞的证据,且这些 NK 细胞可被激活和响应那些非自身的细胞。

鉴于 hu-CD34 NSG 小鼠中有多种具有功能的人源免疫细胞,我们预测这些小鼠将快速排斥任何皮下共同植入的、非 HLA 匹配的人源 PDX 肿瘤。然而,如上所述,有大量的证据显示肿瘤逃避免疫具有多种机制。以下数据提供了明确的证据,即 hu-CD34 NSG 小鼠可以有效地被植入人源癌细胞系和多种人源 PDX 肿瘤,这些 PDX 肿瘤与用于 NSG 宿主人源化造血供体细胞非 HLA 匹配。

人源化NSG小鼠植入非HLA匹配的人源肿瘤

评估hu-CD34 NSG 小鼠中人源肿瘤生长的初步实验旨在解决两个问题:首先,异种植入的人源肿瘤是否生长? 第二,人源化小鼠的免疫系统的成熟是否会抑制肿瘤的生长?将人源乳腺癌、肺癌和膀胱肿瘤PDX 皮下植入hu-CD34 NSG 小鼠中,其中已建立的和功能成熟的人源免疫细胞来源于HLA 不匹配的人源HSC 供体。所有三种肿瘤均显示出强劲的生长

并且没有明显的排斥反应(图2)。为了更直接地解决免疫细胞成熟对肿瘤细胞植入的影响的问题,在人源CD34 + HSC 植入后2周或12 周,将人SKOV3 卵巢癌细胞皮下植入hu-CD34 NSG 受体中。在植入后2周,人体免疫力尚未发展。实际上,成熟的人源T细胞和B细胞需要至少12周才能在hu-CD34 NSG 小鼠的PBL 中检测到。在肿瘤移植研究中,两组肿瘤摄取均为100% (两者均为N = 7),2周组肿瘤体积随时间的增加略微超过12周组 (图3)。在癌细胞接种后50天测试小鼠的人源造血细胞嵌合体,并且在PBL 中均显示25-50%huCD45+ 细胞,表明植入成功(数据未显示)。

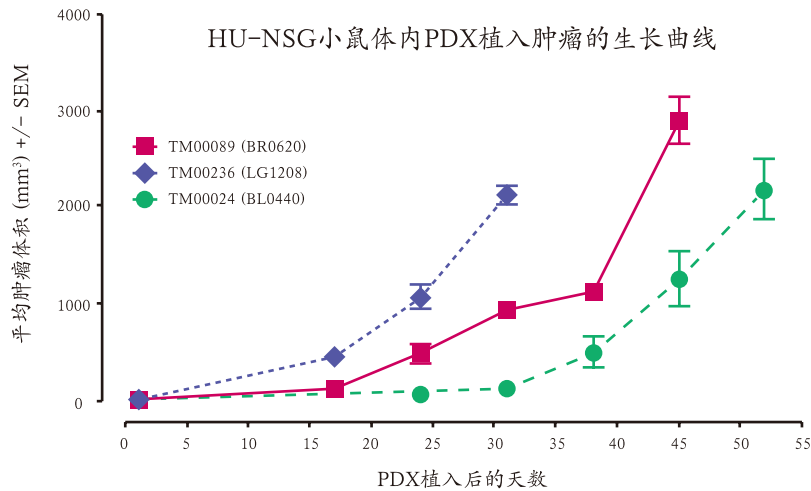


图 2. 人源化NSG 小鼠体内PDX 肿瘤的生长曲线。将乳腺癌,肺癌和膀胱肿瘤的新鲜细胞皮下植入hu-CD34 NSG 小鼠中并随时间检测肿瘤体积。在肿瘤植入时 (20-30% 的 hu-CD45+ 细胞),接受者已完全发育出人源造血移植植物。数据由 JAX™ Vivo Pharmacology Services 提供。

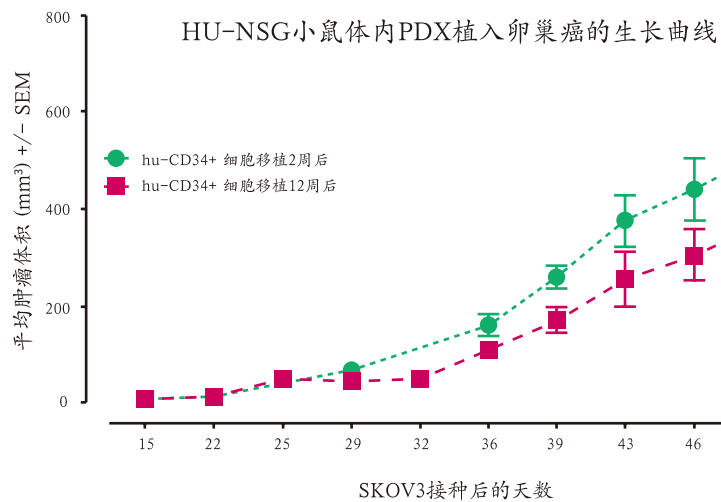


图3. 人体免疫细胞的成熟度不会显著影响人体肿瘤的生长。当用hu-CD34 + 细胞进行造血植入2 或12 周后, 人源SKOV3 卵巢癌细胞以相似的速率生长 (n = 7)。数据由JAX™ InVivo Pharmacology Services 提供。

这些早期vs晚期的实验未解决的一个重要问题是:与正常非人源化NSG小鼠中的生长速率相比,人源免疫细胞的存在是否影响肿瘤生长速率。因此,将三组肿瘤(乳腺癌,肺癌和软组织肉瘤)平行独立地PDX植入NSG或hu-CD34 NSG受体小鼠中。在每个移植的宿主中发展出肿瘤,但只有乳腺肿瘤在NSG受体比在hu-CD34 NSG受体的生长速度略快;另外两组肿瘤在两种宿主中的生长速率相同(图4)。在肿瘤生长实验结束时,收集肿瘤并通

过流式细胞仪分析TIL的存在。所有三种肿瘤均含有人源CD4 + 和CD8 + T细胞,但检测到的CD19 + B细胞很少(图5)。在hu-CD34 NSG受体中,TIL不能减缓肿瘤生长,这表明识别肿瘤的T细胞可能已经变得无反应性。总结:这些结果证明hu-CD34 NSG小鼠支持非HLA匹配的肿瘤生长,并且人源免疫细胞的存在不会显著影响肿瘤的植入或肿瘤的生长速率。

A. 乳腺癌

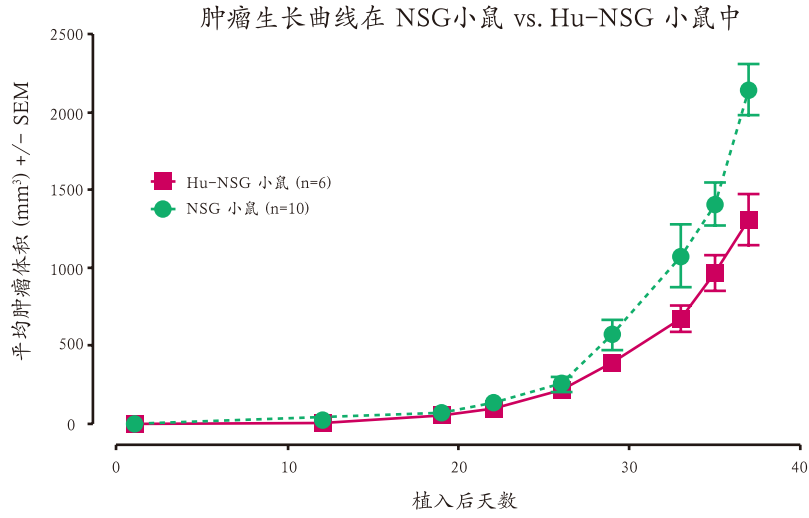
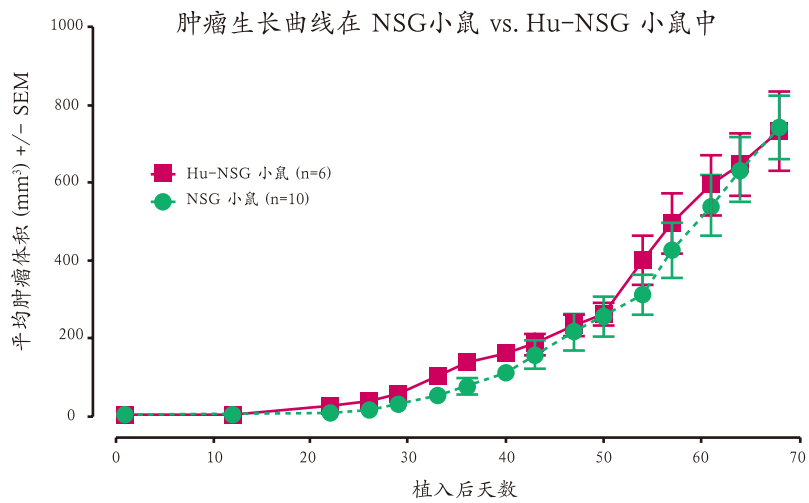
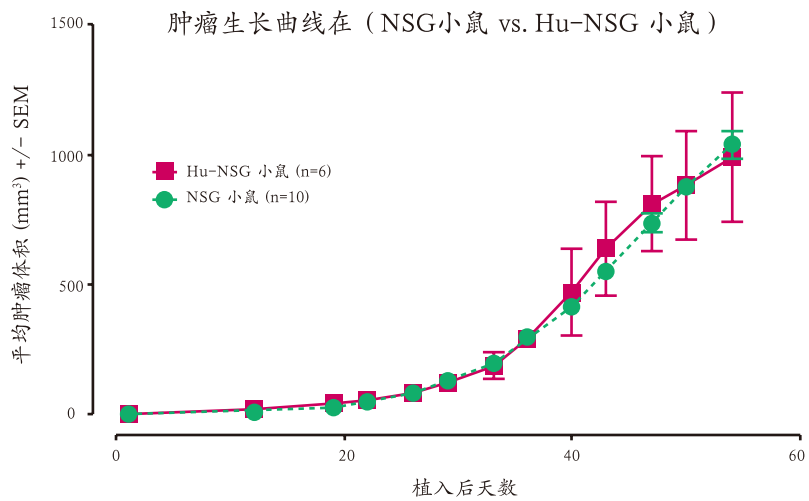


图4. 人源免疫细胞的存在不会影响到人源肿瘤的生长。[A] 乳腺癌 (TM00090), [B] 肺癌 (TM00213), 和 [C] 软组织肉瘤 (TM00381)PDX 在 NSG 和人源化 NSG 受体内的生长速率相似。PDX 肿瘤与供体造血细胞不是 HLA 匹配的。数据由 JAX™ VivoPharmacology Services 提供。

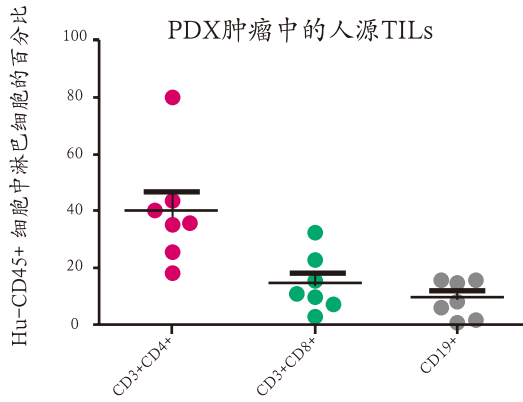
B. 肺癌



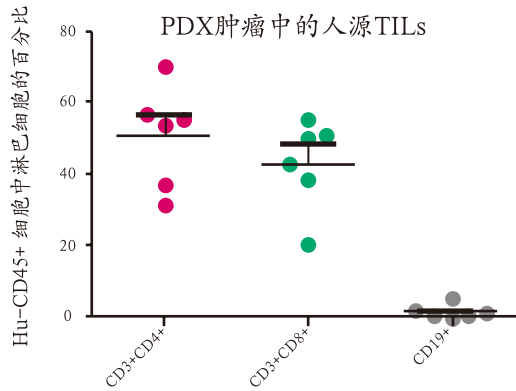
C. 软组织肉瘤



A. 乳腺癌



B. 肺癌



C. 软组织肉瘤

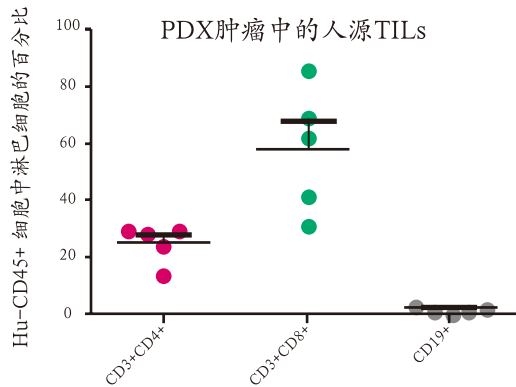


图 5. 在hu-CD34 NSG 小鼠中生长的PDX 肿瘤含有肿瘤浸润淋巴细胞TILs。[A] 乳腺癌 (TM00090), [B] 肺癌 (TM00213), 和 [C] 软组织肉瘤 (TM00381) PDX 含有CD4 + 和CD8 + T细胞, 及少量的CD19 + B 细胞。TIL的存在几乎不影响肿瘤生长。数据由JAX™ VivoPharmacology Services 提供。

人源化NSG 小鼠人源肿瘤 对治疗的反应

人源化NSG 小鼠支持非HLA 匹配人源肿瘤生长的能力是该临床前测试平台开发中的重要发现。接下来, 我们想知道的是, 移植肿瘤是否会对临床相关的标准治疗产生反应, 以及免疫肿瘤学检查点抑制剂是否可以重新激活人源免疫细胞中的抗肿瘤反应。

在第一个实验中, 在hu-CD34NSG 小鼠体内植入MDA-MB-231 人源乳腺癌细胞系。该细胞系在肿瘤细胞表面上表达非常大量的PD-L1, 其可以与T 细胞上的PD-1 结合并诱导无反应性。然后再用载体、顺铂或Pembrolizumab (Keytruda) 处理肿瘤移植的人源化小鼠。顺铂是一种含铂的化学治疗剂, 可在快速分裂的细胞中引

起DNA 交联和凋亡。顺铂治疗仅略微降低了人源化小鼠中MDA MB-231 肿瘤的生长速率。相反, Keytruda 在治疗开始后约2周内显著延迟了肿瘤的生长 (图 6)。

在生长实验结束时, 收集肿瘤并测定人源CD4 + 和CD8 + 浸润性T细胞 (图 7)。对于任何一种处理, 所有三个治疗组都显示出相似的这些细胞百分比。在Keytruda 治疗的肿瘤中不存在额外的TIL, 这表明较慢肿瘤生长是由于驻留TIL的再激活, 而不是来自PBL 或脾的TIL 浸润的额外刺激。需要进一步的研究来证实这一假设。

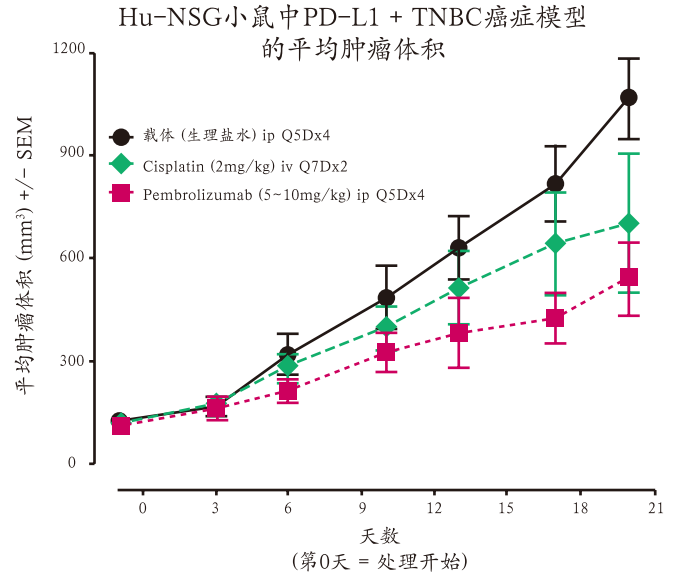
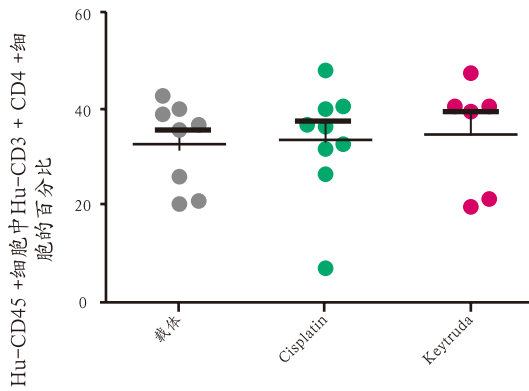


图 6. 表达PD-L1 的人三阴性乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231) 对检查点抑制剂Keytruda 有反应。在hu-NSG 中, 具有>25 % 的 hu-CD34 + MDA-MB-231 显示出对顺铂有微弱的响应, 但当用PD-1 检查点抑制剂 pembrolizumab (Keytruda) 处理时, 肿瘤的生长有显著的减弱。

A. 具有MDA-MB-231肿瘤的Hu-NSG小鼠肿瘤中的HuCD3 + CD4 + T细胞



B. 具有MDA-MB-231肿瘤的Hu-NSG小鼠肿瘤中的HuCD3 + CD8 + T细胞

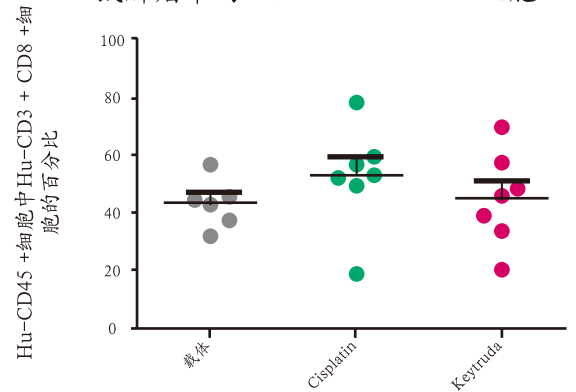


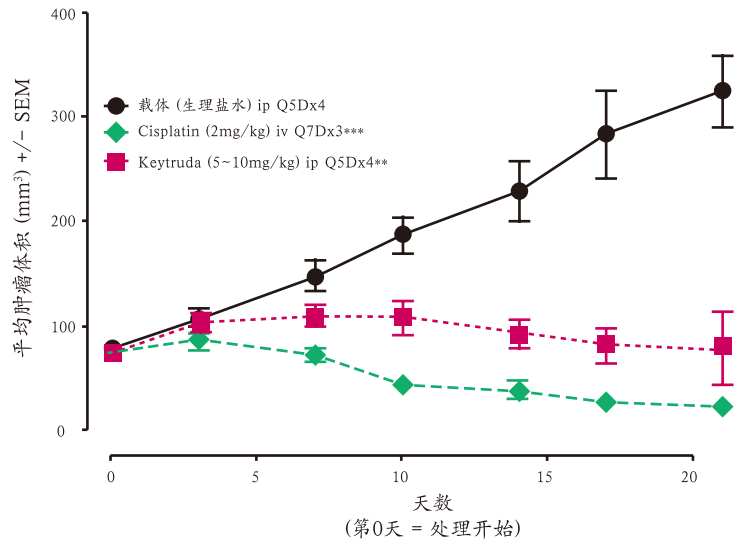
图 7. 当用Keytruda处理时, 人乳腺癌细胞系MDA-MB-231显示人淋巴细胞的浸润。[A]辅助T细胞。 [B]细胞毒性T细胞。 药物治疗组中肿瘤的淋巴细胞浸润与载体处理的对

在第二组实验中, 将人源乳腺肿瘤片段PDX植入hu-CD34 NSG 小鼠体内。随后用载体, 顺铂或Keytruda 治疗小鼠 (图 8)。通过流式细胞仪, 该乳腺肿瘤的56.9% 细胞上有PD-L1 的表面表达。与载体对照相比, 顺铂和Keytruda 均显著抑制肿瘤生长。在研究结束时收集来自Keytruda 治疗的小鼠的肿瘤并检查淋巴细胞浸

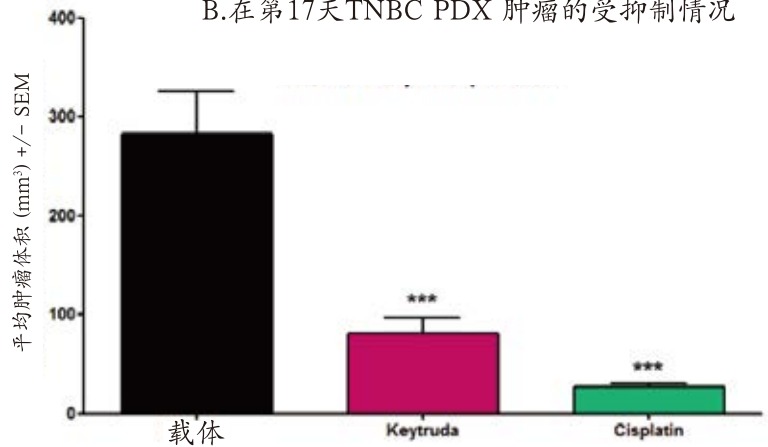
润TILs。与癌细胞系实验一样, 肿瘤也被人源CD4 + 和CD8 + T 细胞以及人源B 细胞浸润。与载体治疗的小鼠相比, 用Keytruda 治疗并未增加肿瘤浸润TILs, 这再次表明较慢的肿瘤生长是由驻留免疫效应细胞的重新激活引起的 (图 9)。

图8. 表达PD-L1 的异源PDX 三阴性乳腺癌BR1126 (TM00098) 对顺铂和Keytruda 有反应。[A] 人PDX 乳腺肿瘤在荷瘤小鼠体内生长并给予顺铂或Keytruda 治疗后, 与载体组相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。单因素方差分析遵循Dunnett 的多重比较检验。[B] 与载体组相比, 研究第17天两种处理均展现出受抑制的肿瘤生长 ($P < 0.05$)。单因素方差分析和Dunnett's 多重比较检验。

A. 在Hu-NSG小鼠内TNBC PDX 肿瘤的反应



B. 在第17天TNBC PDX 肿瘤受抑制情况



最后一组实验用于确定对hu-CD34 NSG小鼠的肿瘤实施组合治疗是否显示出比单药治疗更大的功效。人源肺癌细胞被PDX植入hu-CD34 NSG小鼠,PD-L1的细胞表面表达率89.1%。用Keytruda单独治疗或Keytruda+Docetaxel联合治疗小鼠(图10)。只用Keytruda治疗的小鼠的肿瘤与载体治疗的对照相比显示生长减少,但是由于10只小鼠中的一只对Keytruda没有反应,它们的反应不稳定性很大。用Keytruda+Docetaxel组合治疗,肿瘤生长在10天内被完全抑制,仅有非常小的鼠-鼠间差异(肿瘤-肿瘤)。当一只没有响应Keytruda的小鼠被从计算中剔除后,Keytruda和组合处理之间没有区别。两组均显示肿瘤生长明显减少,并且在组合Keytruda+Docetaxel时未观察到累加效应。

图9. 用Keytruda治疗的TNBC PDX肿瘤被人源淋巴细胞浸润。人源T细胞和B细胞存在于用Keytruda和载体对照治疗的人源化NSG小鼠中的人源乳腺癌PDX肿瘤中。[A] CD4 + T辅助细胞。[B] CD8 + 细胞毒性T细胞。[C] CD19+ B细胞。

人源TILs在TNBC PDX-人源化NSG模型

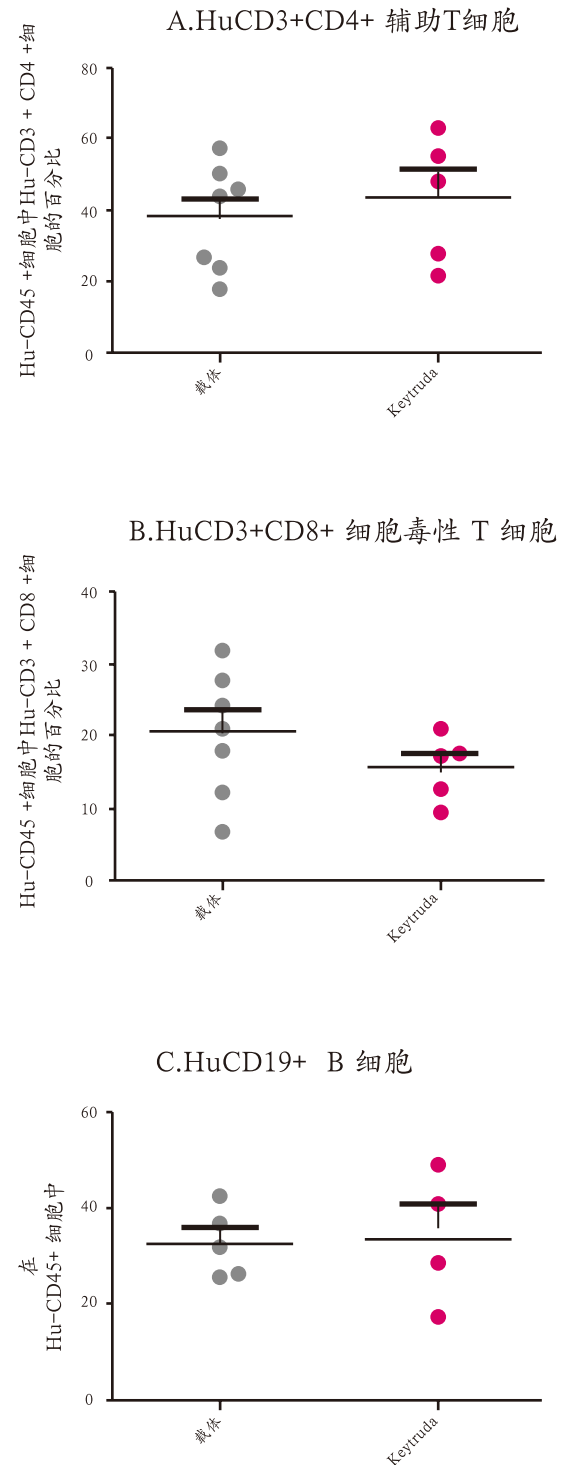
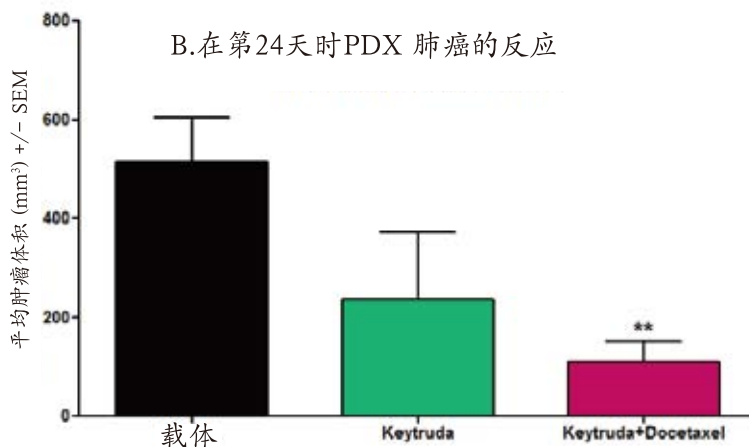
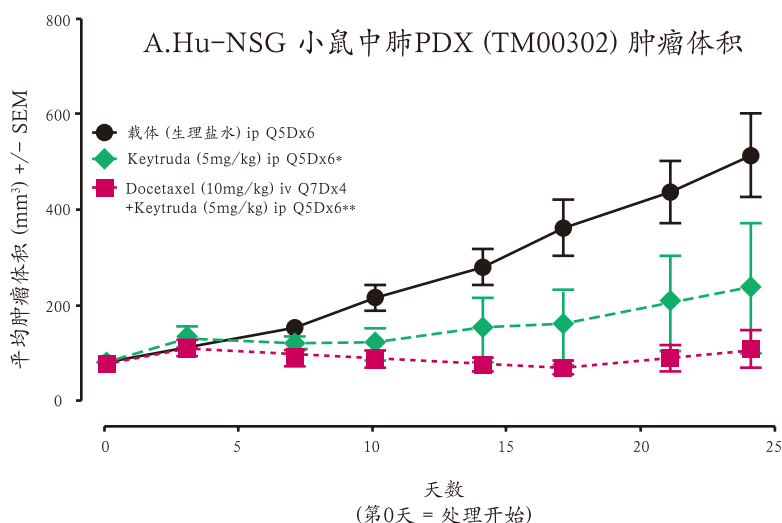


图10. 人源化NSG小鼠中的PDX肺癌对单独使用Keytruda和与Docetaxel组合治疗有响应。

[A] 与载体组相比, 在人源化小鼠中生长的人源PDX乳腺癌肿瘤TM00302对Keytruda或Docetaxel加Keytruda的治疗有响应 ($P < 0.05$)。单因素方差分析和Dunnett的多重比较检验。

[B] 与载体组相比, 研究第24天检测到统计学意义上显著的肿瘤生长抑制 ($P < 0.05$)。单因素方差分析和Dunnett's多重比较检验。



上述这三个实验证明, 植入 hu-CD34 NSG 小鼠的人源肿瘤能够对标准化学疗法起反应。然而, 更重要的发现是, 移植的肿瘤似乎可以完全像在患者体内一样的逃避人体免疫攻击。此外, 用TIL检查点抑制剂治疗可能刺激无反应T细胞, 使它们产生对肿瘤的细胞毒性。因为这些都是非常初步的实验, 仍需进行更多的工作来验证 Keytruda 处理的样品中TIL

介导的细胞毒性的增加。总之, 这些数据验证了hu-CD34NSG小鼠是一个强大的平台, 它可以让我们获得人类免疫细胞和肿瘤相互作用的新知识, 从而帮助我们评估免疫肿瘤学疗法和其他联合疗法。

获取人源化 NSG 小鼠和 PDX 肿瘤模型

如何方便有效地获得人源造血干细胞 hu-HSC 和患者组织来源, 仍然是这些有价值的人源化动物模型能被广泛获取和生产的巨大障碍。类似地, hu-HSC 和患者组织的质量可以在供体-供体之间有着显著的变化, 会很大程度上影响植入效率并且最终影响所产生的人源化小鼠的质量。为了帮助科学家们方便地获取这些人源化小鼠模型, 美国杰克森实验室 JAX 开发了一系列的人源化小鼠资源。我们可以提供:

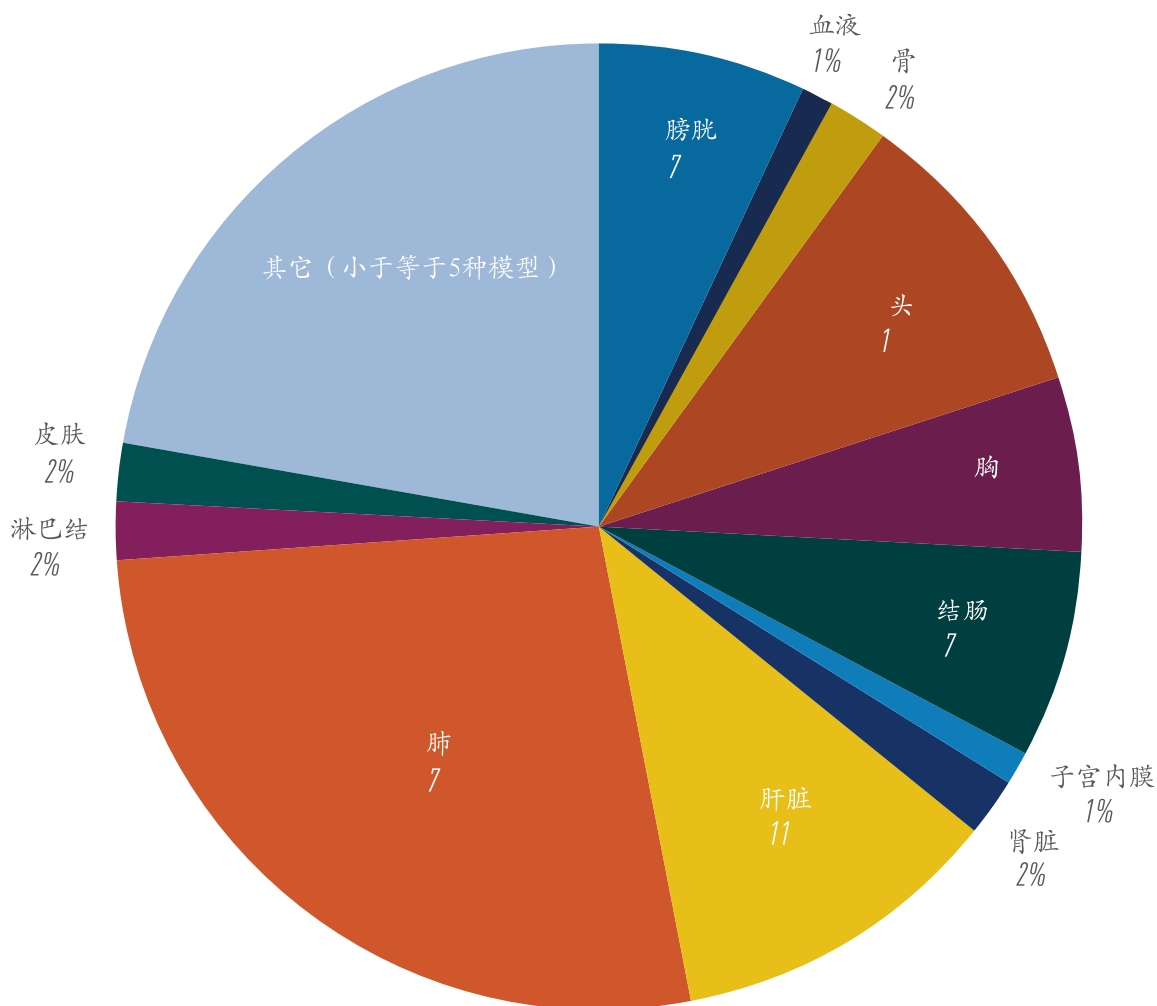
- 可立刻用于研究的 hu-CD34NSG™ 人源化小鼠, 有现货库存可立即运送到您所在的研究机构。
- 植入人源外周血单核细胞的NSG 小鼠 (hu-PBMC NSG™ 人源化小鼠)。
- 以及由JAX 体内代谢服务部科学家为您定制执行的药物疗法功效评估。

hu-PBMC NSG 小鼠尚未进行人源肿瘤生长试验, 它们在开发基于免疫肿瘤学的治疗方法可能具有重大意义。来自JAX™ 人源化小鼠可以直接进入您的小鼠饲养房, 经过1-2周适应期后

即可用于您的实验。植入的人源 HSC 经检测无 HIV、无乙肝病毒 (HBV)、无丙肝病毒 (HCV) 和无淋巴细胞绒毛膜脑膜炎病毒 (LCMV)。

此外, JAX 还与美国 20 多个癌症诊所结成伙伴关系, 可比任何其他商业 PDX 储存库在更早的时间里提供多样的患者来源的异种移植物 (PDX) 癌症模型。目前, 我们已经在高度免疫缺陷的 NSG 小鼠品系中建立了 400 多种独特的 PDX 肿瘤模型, 它们来自于治疗初期或治疗抵抗患者体内 (图 11)。NSG 小鼠植入原发性人源肿瘤, 由于其低传代保留了人源癌症中常见的遗传和表型异质性, 提供了优于其他 PDX 宿主的明显优势。该临床前平台可用于评估预测治疗癌症患者新疗法的有效性。我们可以在 JAX 实验室使用任何 PDX 癌症模型为您进行新疗法功效评估, 或者将肿瘤小鼠运送到您的实验室。这些肿瘤的详细描述有助于模型选择。您可查阅小鼠肿瘤生物学网站上的“癌症患者衍生异种移植搜索表”。(<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/pdxSearch.do>).

图 11.PDX 肿瘤类型可从The Jackson Laboratory 获得。在NSG 小鼠中收集并培养了超过400个种传代肿瘤。肿瘤的基因表达、基因缺失和拷贝数变异等特征都有被考察。生长特性和组织学特性也有记录。



利用免疫细胞对抗癌症的想法并不新鲜,但只有在过去的几年里,科学家证明了在临床上改变癌症的免疫疗法具体是怎样的 (Mueller 2015)。目前,只有一部分患者对免疫疗法有反应。了解原因至关重要。荷瘤人源化NSG小鼠出现为解决这一突出问题提供了契机,也为这一迅速发展

的领域提供了价值极高临床前测试平台:1) 哪种肿瘤类型对免疫治疗反应最敏感,其潜在机制是什么?2) 如何确定个体患者的最佳治疗组合?3) 免疫治疗和免疫调节剂的耐受机制是什么?4) 如何预测和防止耐受?新的信息和知识将为改进现有疗法和开发新疗法开辟道路。

参考文献

- Ahmadzadeh, M., *et al.*(2009)."Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired." *Blood* 114(8):1537-1544.PMID:19423728
- Baitsch, L., *et al.*(2011)."Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients." *J Clin Invest* 121(6):2350-2360.PMID:21555851
- Coffelt S.B., de Visser K.E.(2015)."Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies." *Trends Immunol.*36(4):198-216.PMID:25857662
- Coughlan, A. M., *et al.*(2012)."Humanised mice have functional human neutrophils." *J Immunol Methods* 385(1-2):96-104.PMID:22917930
- Gabrilovich, D. I., *et al.*(2012)."Coordinated regulation of myeloid cells by tumours." *Nat Rev Immunol* 12(4): 253-268.PMID:22437938
- Hamid, O., *et al.*(2013)."Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma." *N Engl J Med* 369(2):134-144.PMID:23724846
- Ishikawa, F., *et al.*(2005)."Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice." *Blood* 106(5):1565-1573.PMID:15920010
- Laszlo, G. S., *et al.*(2014)."Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML." *Blood* 123(4):554-561.PMID:24311721
- Mestas, J. and C. C.Hughes (2004)."Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." *J Immunol* 172(5):2731-2738.PMID:14978070
- Miller J.F., Sadelain M.(2015)."The Journey from Discoveries in Fundamental Immunology to Cancer Immunotherapy." *Cancer Cell* 27(4):439-449.PMID:25858803
- Mueller K.L.(2015)."Realizing the Promise".*Science* 348(6230):55.
- Nishimura, H., *et al.*(1999)."Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." *Immunity* 11(2):141-151.PMID:10485649
- Ostrand-Rosenberg, S., *et al.*(2014)."The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity." *J Immunol* 193(8):3835-3841.PMID:25281753

- Ostuni R., Kratochvill F., Murray P.J., Natoli G.(2015). "Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications." *Trends Immunol.*36(4):229-239.PMID:25770924
- Palucka, K. and J. Banchereau (2012). "Cancer immunotherapy via dendritic cells." *Nat Rev Cancer* 12(4):265-277.PMID:22437871
- Pardoll, D. M.(2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* 12(4):252-264.PMID:22437870
- Pauken K.E., Wherry E.J.(2015). "Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer." *Trends Immunol* 36(4):265-276.PMID:25797516
- Rangarajan, A. and R. A.Weinberg (2003). "Opinion:Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice." *Nat Rev Cancer* 3(12):952-959.PMID:14737125
- Restifo, N. P., et al.(2012). "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response." *Nat Rev Immunol* 12(4):269-281.PMID:22437939
- Rosenberg S.A., Restifo N.P.(2015). "Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer." *Science* 348(6230):62-8.PMID:25838374
- Rosenberg, S. A., et al.(2011). "Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy." *Clin Cancer Res* 17(13):4550-4557.PMID:21498393
- Sharma P., Allison J.P.(2015). "Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential." *Cell.*161(2):205-14.PMID:25860605
- Stone J.D., Aggen D.H., Schietinger A., Schreiber H., Kranz D.M.(2012). "A sensitivity scale for targeting T cells with chimeric antigen receptors (CARs) and bispecific T-cell Engagers (BiTEs). *Oncoimmunology* 1(6):863-873.PMID:23162754
- Strowig, T., et al.(2010). "Human NK cells of mice with reconstituted human immune system components require preactivation to acquire functional competence." *Blood* 116(20):4158-4167.PMID:20671122
- Tanaka, S., et al.(2012). "Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2rgammaKO mice." *J Immunol* 188(12):6145-6155.PMID:22611244
- Vanneman, M. and G. Dranoff (2012). "Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment." *Nat Rev Cancer* 12(4):237-251.PMID:22437869

Vivier, E., *et al.* (2012). "Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer." *Nat Rev Immunol* 12(4):239-252. PMID:22437937

Wolchok, J. D., *et al.* (2013). "Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma." *N Engl J Med* 369(2):122-133. PMID:23724867

Zou, W. and L. Chen (2008). "Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment." *Nat Rev Immunol* 8(6):467-477. PMID:18500231

注意事项







杰克森实验室 The Jackson Laboratory

上海市浦东新区金科路 2889 弄 3 号长泰广场 C 座 629 室

技术支持

电话: 400-001-2626
邮件: micetech@jax.org.cn
网站: www.jax.org/cn

询价下单:

电话: 400-693-5700
邮件: orderquest@jax.org.cn
网站: jax.ibiocard.com



扫码关注官方微信