

# Regnase-1敲除对脐血来源CAR-T细胞的生物学功能影响

刘佳慧<sup>1,2</sup> 冉凤萍<sup>3</sup> 蒙露<sup>4</sup> 赵日<sup>5</sup> 李华<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>成都中医药大学, 基础医学院, 成都 610075; <sup>2</sup>西部战区总医院, 肿瘤科, 成都 610083;

<sup>3</sup>成都京东方医院, 妇产科, 成都 610200;

<sup>4</sup>成都医学院, 科研实验中心, 成都 610500; <sup>5</sup>西南交通大学, 医学院, 成都 610031)

**摘要** 嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor-T, CAR-T)细胞治疗虽然在血液肿瘤治疗中疗效显著, 但仍面临CAR-T细胞体内持续性短的问题, 后者与疗效密切相关。Regnase-1具有核糖核酸酶作用, 负向调控免疫应答。该研究在脐血T(cord blood T)细胞上成功敲除Regnase-1, 制备Regnase-1缺陷的靶向CD19的脐血CAR-T细胞Regnase-1<sup>-</sup> CAR-T, 发现敲除Regnase-1不影响脐血T细胞表达CAR分子, 也不影响CAR-T细胞体外增殖和分化, 在CAR-T体外生长早期可显著抑制CD39耗竭分子, 并且显著增强CAR-T特异性持续杀伤能力和扩增能力, 有助于改善脐血CAR-T细胞持续性, 为CAR-T细胞药物的优化奠定基础。

**关键词** Regnase-1; 脐带血; CAR-T细胞治疗

## The Effect of *Regnase-1* Knockout on the Function of Cord Blood-Derived CAR-T Cells

LIU Jiahui<sup>1,2</sup>, RAN Fengping<sup>3</sup>, MENG Lu<sup>4</sup>, ZHAO Ri<sup>5</sup>, LI Hua<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; <sup>2</sup>Department of Oncology,

Western Theater General Hospital, Chengdu 610083, China; <sup>3</sup>Department of Gynaecology and Obstetrics, Chengdu BOE hospital,

Chengdu 610200, China; <sup>4</sup>Scientific Research and Experimental Center, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China;

<sup>5</sup>Medical College of Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

**Abstract** Although CAR-T (chimeric antigen receptor-T) cell therapy is effective in the treatment of hematologic tumors, it still faces the problem of short persistence of CAR-T cells *in vivo*, which is closely related to the clinical efficacy. Regnase-1 has a ribonuclease effect and negatively regulates the immune response. In this study, regnase-1-deficient CAR-T cells delivered from cord blood T cells were prepared. The *Regnase-1* deletion did not affect either the expression of CAR molecules of cord blood T cells or the proliferation or the differentiation of CAR-T cells *in vitro*. CD39, an exhausted T cell marker, could be significantly inhibited at the early stage of CAR-T growth *in vitro*. *Regnase-1* knockout enhanced the specific killing ability and increased amplification of CAR-T, which helps to improve cord blood-derived CAR-T cell persistence and lays a foundation for the optimization of CAR-T cell drugs.

**Keywords** Regnase-1; UCB (umbilical cord blood); CAR-T cell therapy

收稿日期: 2023-07-05

接受日期: 2023-09-14

四川省科技厅应用基础研究项目(批准号: 19YYJC0242)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 17311079545, E-mail: 1749775313@qq.com

Received: July 5, 2023

Accepted: September 14, 2023

This work was supported by the Applied Basic Research Project of Science and Technology Department of Sichuan Province (Grant No.19YYJC0242)

\*Corresponding author. Tel: +86-17311079545, E-mail: 1749775313@qq.com

嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor-T, CAR-T)细胞治疗<sup>[1-2]</sup>以T细胞为原料,通过基因修饰技术使T细胞表达CAR分子,使之无需MHC限制特异性识别靶抗原,也无需第2活化刺激信号而被直接活化,因此T细胞的杀伤靶细胞能力直接而高效。虽然近年来CAR-T细胞治疗在白血病<sup>[3-5]</sup>和淋巴瘤等B细胞恶性血液肿瘤<sup>[2-6]</sup>治疗中取得了令人瞩目的疗效<sup>[7-8]</sup>,但疗效不能持久<sup>[9]</sup>,特别是对于实体瘤的治疗<sup>[10-11]</sup>,CAR-T细胞体内扩增能力弱,抗肿瘤能力不足。由于CAR-T细胞治疗的疗效与CAR-T细胞体内的扩增能力及持续性密切相关,因此,如何利用基因编辑及修饰技术改造CAR-T细胞的特性,增强其体内抗肿瘤活性,是亟待解决的问题<sup>[12-13]</sup>。

单核细胞趋化蛋白诱导蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-induced protein-1, MCP1, 也叫Regnase-1)由*ZC3H12A*基因编码,以核糖核酸酶依赖和非依赖方式广泛降解多种蛋白(包括炎症因子和共刺激分子)的mRNA,严格调控免疫应答<sup>[14-15]</sup>。在T细胞中,Regnase-1与Roquin相互依赖,协同下调一系列基因表达,包括T细胞扩增所需的*IL-2*<sup>[16]</sup>,活化相关的共刺激分子受体*ICOS*、*TNFR2*、*Ox40*,T细胞活化标志物*CD44*<sup>[17]</sup>,一些趋化因子*CXCL1*、*CXCL2*和*CXCL3*<sup>[18]</sup>,因而Regnase-1可抑制T细胞活化<sup>[19]</sup>。WEI等<sup>[20]</sup>利用CRISPR/Cas9突变技术筛选T细胞抗肿瘤的代谢相关分子时,发现Regnase-1是抗肿瘤效应的主要负调控因子;Regnase-1敲除的T细胞呈现出较高幼稚/记忆细胞相关的基因表型。随后,ZHENG等<sup>[21]</sup>进一步在证实Regnase-1缺失促进同时具有记忆型和耗竭型标志物表达的TCF-1<sup>+</sup>前体耗竭T细胞(precursor exhausted T cells, T<sub>PEX</sub>)形成,因而促进CAR-T细胞记忆型细胞形成,增强抗白血病肿瘤细胞的清除能力。

然而,脐血(umbilical cord blood, UCB) T细胞与外周血T细胞在特性上有很大不同<sup>[22]</sup>,不仅具有干样特性<sup>[23]</sup>,且幼稚型T细胞占比高达90%,具有更强的抗肿瘤活性<sup>[24]</sup>。Regnase-1在T细胞中的表达呈动态变化,广泛参与T细胞发育和功能发挥<sup>[15]</sup>。Regnase-1敲除对于脐血T细胞的影响尚未见报道。前期课题组采用脐血T细胞成功制备了脐血CAR-T(cord blood-derived CAR-T)细胞<sup>[25]</sup>。以往在Regnase-1对T细胞生物学活性影响的研究中所采用的T细胞均为健康成人T细胞<sup>[20-21]</sup>,对于偏干性的脐血T细胞,特别

是脐血CAR-T细胞是否也能增强其增殖和杀伤作用,尚未见报道。本研究利用CRISPR/Cas9技术,敲除脐血CAR-T细胞的Regnase-1,探究Regnase-1缺陷对脐血CAR-T细胞的CAR分子表达,CAR-T细胞增殖、分化、耗竭以及多次靶细胞刺激的持久杀伤能力的影响,为今后脐血CAR-T细胞治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞株 脐带血为成都医学院第一附属医院健康产妇捐赠,她们均签署了知情同意书,伦理批准号为2018CYFYHEC-047-02。Jurkat细胞和293FT细胞(人胚肾细胞)购自美国ATCC;含荧光素酶的Namalwa(人Burkitt's淋巴瘤细胞)和Nalm-6(人B-ALL急性淋巴细胞白血病细胞)购自中国科学院细胞库,经本实验室改造为HLA阴性细胞作为本研究的靶细胞;质粒pLP1、pLP2、pLP-VSVG及pHAGE-SFFV-GFP购自美国Addgene公司;pHAGE-SFFV-CAR19重组质粒为西部战区总医院实验室保存;靶向Regnase-1的gRNA序列为:5'-AAC ACG GGA CAG CCA CCG AG-3'。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640购自美国Hyclone公司;胎牛血清购自澳大利亚Bovogen Biologicals公司;淋巴细胞分离液购自挪威Axis-shield公司;Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 Transfection Reagent购自美国ThermoFisher Scientific公司;CD4-Microbeads与CD8-Microbeads购自德国MACS公司;细胞因子IL-7、IL-15购自德国Cellgenix公司;小鼠抗人CD3单抗、小鼠抗人CD4单抗、小鼠抗人CD8单抗、小鼠抗人CD39单抗、小鼠抗人CD69单抗等流式荧光抗体购自美国Biolegend公司。

### 1.2 方法

1.2.1 分离T细胞 使用Lymphoprep淋巴分离液从脐血中分离出单个核细胞,按MACS说明书用CD4及CD8磁珠纯化脐血T细胞。

1.2.2 细胞培养 脐血T细胞在含5 ng/mL IL-7、5 ng/mL IL-15的RPMI-1640完全培养液(10% FBS)中培养。靶细胞HLA<sup>-</sup> Nalm-6和HLA<sup>-</sup> Namalwa细胞在RPMI-1640完全培养基中培养。

1.2.3 Regnase-1的敲除 脐血T细胞经Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28活化24 h,将Cas9蛋白按照1:1摩尔比与Regnase-1 gRNA混合,室温放置15 min,

合成核糖核蛋白复合物 (ribonucleoprotein complex, RNP)。将  $1 \mu\text{mol/L}$  *Regnase-1*-RNP 与  $1 \times 10^6$  个脐血 T 细胞混合, 在电压 560 V、脉冲 20 ms 条件下进行电转, 随即将电转后的细胞进行铺板培养。

1.2.4 CAR-T 细胞制备 脐血 T 细胞或 *Regnase-1*<sup>-</sup> T 细胞分别按特定感染复数加入慢病毒感染, 培养 96 h, 流式细胞仪检测表达 CAR 分子的 T 细胞比例。

1.2.5 脐血来源 CAR-T 细胞体外杀伤靶细胞 按效靶比为 1:3 的比例将靶细胞 HLA<sup>-</sup> Nalm-6、HLA<sup>-</sup> Namalwa 分别与 CAR-T 细胞和 *Regnase-1*<sup>-</sup> CAR-T 细胞共孵育 24 h, 流式绝对计数法检测效应细胞和靶细胞数量。通过以下公式计算杀伤率: 杀伤率 (%) = [(空白组靶细胞数 - 实验组靶细胞数) / 空白组靶细胞数] × 100%。

1.2.6 数据处理及统计学分析 每组实验在相同条件下重复 3 次, 用 GraphPad Prism 7.0 进行统计分析处理, 数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析 One-Way ANOVA 和 *t* 检验进行组间比较;  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义差异。

## 2 结果

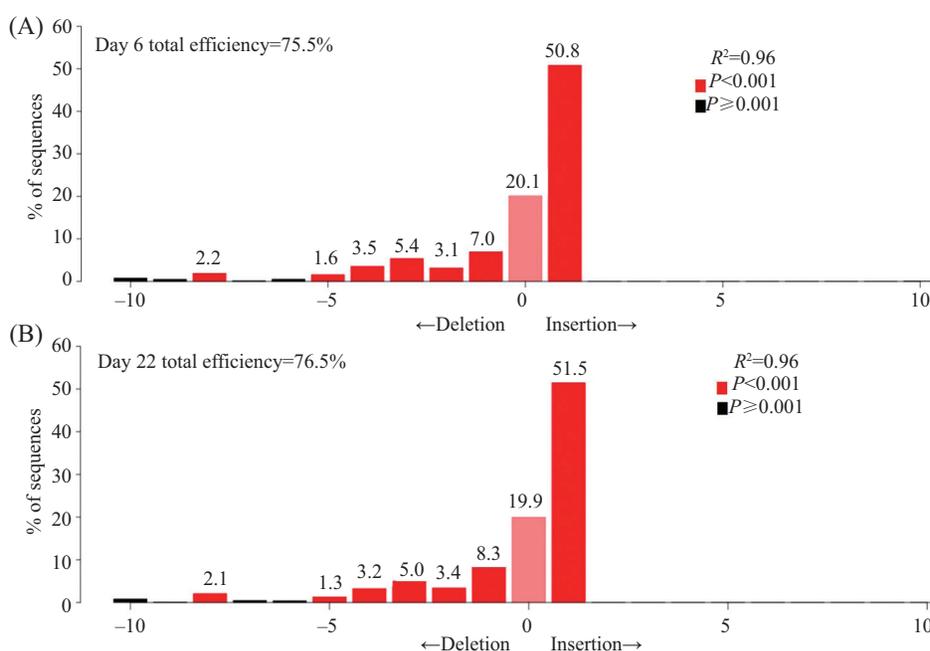
### 2.1 成功敲除 *Regnase-1* 及敲除效率测定

经电转 *Regnase-1* 敲除的细胞样本进行一代

测序, 在线 (<https://tide.nki.nl/#about>) 进行 TIDE 分析 (tracking of indels by decomposition, TIDE), *Regnase-1* 阴性细胞所占比例为敲除效率。结果如图 1 所示: 基因敲除后细胞培养 6 天的敲除效率为 75.5% (图 1A), 培养 22 天后的敲除效率为 76.5% (图 1B), 二者之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 说明 T 细胞的 *Regnase-1* 已成功被敲除, 并且 *Regnase-1* 敲除细胞的比例在体外培养过程中经过多次增殖分化仍保持相对稳定。后续实验均以此份脐血 (敲除组和未敲除正常组) 为原材料进行研究。

### 2.2 *Regnase-1* 敲除不影响 CD19.CAR<sup>+</sup> 的表达

CD19.CAR 慢病毒感染 *Regnase-1* 敲除的脐血 T 细胞和模拟电穿孔脐血 T 细胞, 将正常脐血 T 细胞、未敲除组 CAR-T 细胞及敲除组 *Regnase-1*<sup>-</sup> CAR-T 细胞体外培养 7 天, 流式细胞仪分别检测各组脐血 T 细胞表面 CD19.CAR 分子的阳性表达率。重复 3 次感染实验, 结果如图 2B 所示: 对于未敲除组的正常脐血 T 细胞, CD19.CAR 慢病毒感染效率为  $(64.37 \pm 4.09)\%$ , *Regnase-1* 敲除组 CAR 阳性 T 细胞比例为  $(64.53 \pm 1.86)\%$ , 与未敲除组相比, CD19.CAR 阳性表达的 T 细胞比例无显著差别 ( $P = 0.95$ ), 结果提示 *Regnase-1* 敲除并不影响 CD19.CAR 慢病毒感染以及 CD19.CAR 分子的转导与表达。



A: 第6天细胞的全基因组测序数据的TIDE分析; B: 第22天细胞的全基因组测序数据的TIDE分析。

A: TIDE with the sample at day 6; B: TIDE with the sample at day 22.

图1 CRISPR基因组编辑技术敲除 *Regnase-1* 的效率测定

Fig.1 The efficacy of *Regnase-1* mutant by CRISPR genome editing

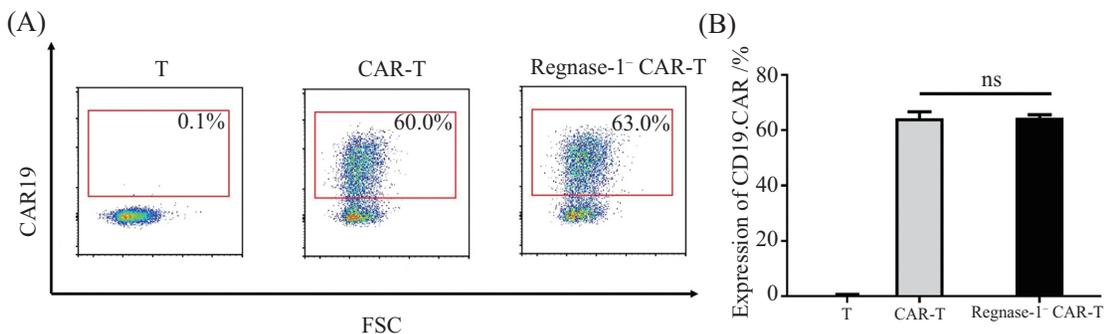
### 2.3 *Regnase-1* 敲除不影响脐血来源CAR-T细胞的体外增殖能力

*Regnase-1* 敲除后体外培养7天, 每天流式绝对计数监测 *Regnase-1* 敲除组与未敲除对照组的细胞增殖数量倍增情况, 发现两组数据即便在第7天也未达到统计学意义的显著差异 ( $1\ 143.63 \pm 172.24$ ) vs ( $1\ 345.93 \pm 111.94$ ) ( $P=0.21$ , 图3), 提示 *Regnase-1* 敲除不影响脐血来源CAR-T细胞的体外增殖能力。

### 2.4 *Regnase-1* 敲除不影响脐血来源CAR-T细胞的活化及分化亚群比例

CD69是T细胞活化后最早表达的细胞表面分子, 可作为T淋巴细胞早期活化的标志; 而CD25则是T淋巴细胞中期活化的表面分子, 活化的T淋巴细胞大量表达CD69和CD25。脐血T细胞经CD3/CD28磁珠刺激活化24 h后流式细胞仪检测脐血T细胞中CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞比例, 未活化空白组的CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞比例为(0.15±0.11)%, 经刺激活化的敲除组与非敲除组的CD25和CD69阳性表达率比例分别为(81.43±8.65)%

和(82.81±8.57)%, 两组无显著差别( $P=0.85$ ), 提示 *Regnase-1* 敲除并不影响脐血CAR-T细胞的活化(图4A和图4B)。体外培养9天, 流式检测各组初始T细胞(naïve T cell, T<sub>N</sub>), 即(CD45RO<sup>-</sup>/CD62L<sup>+</sup>)细胞比例、中央记忆型T细胞(central memory T cell, T<sub>CM</sub>), 即(CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>)细胞比例和效应性T细胞亚群(ef-fector memory T cell, T<sub>EM</sub>), 即(CD45RO<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup>)细胞比例。结果显示: T<sub>N</sub>细胞亚群比例在未刺激活化组中为(61.29±14.65)%, 在刺激活化的未敲除组与 *Regnase-1* 敲除组CAR-T细胞中分别为(39.99±1.27)%和(39.87±4.31)%, 两者无显著性差异( $P>0.05$ ); T<sub>CM</sub>细胞亚群比例在未刺激活化组中为(11.46±6.53)%, 在刺激活化的未敲除组和 *Regnase-1* 敲除组中分别为(59.07±1.47)%和(59.02±4.31)%, 两者无显著性差异( $P>0.05$ ); T<sub>EM</sub>细胞亚群比例在未刺激活化组中为(6.02±5.19)%, 在刺激活化的未敲除组和 *Regnase-1* 敲除组中分别为(0.32±0.15)%和(0.22±0.04)%, 两者无显著性差异( $P>0.05$ ), 可见 *Regnase-1* 缺陷对于脐

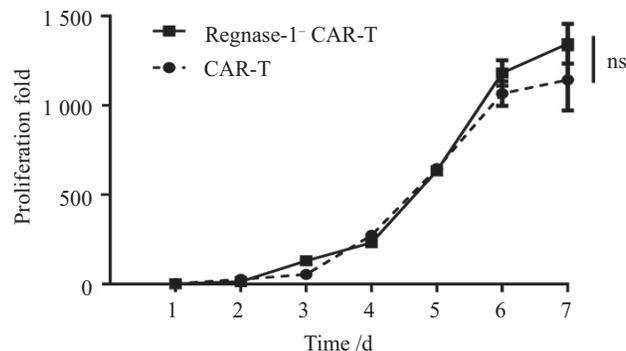


A: 各组CAR19阳性细胞比例; B: 流式数据统计结果。n=3, ns:  $P>0.05$ 。

A: the proportion of CAR19 positive cells in groups; B: FCM data statistics results. n=3, ns:  $P>0.05$ .

图2 *Regnase-1* 敲除对CAR-T细胞CAR分子表达的影响

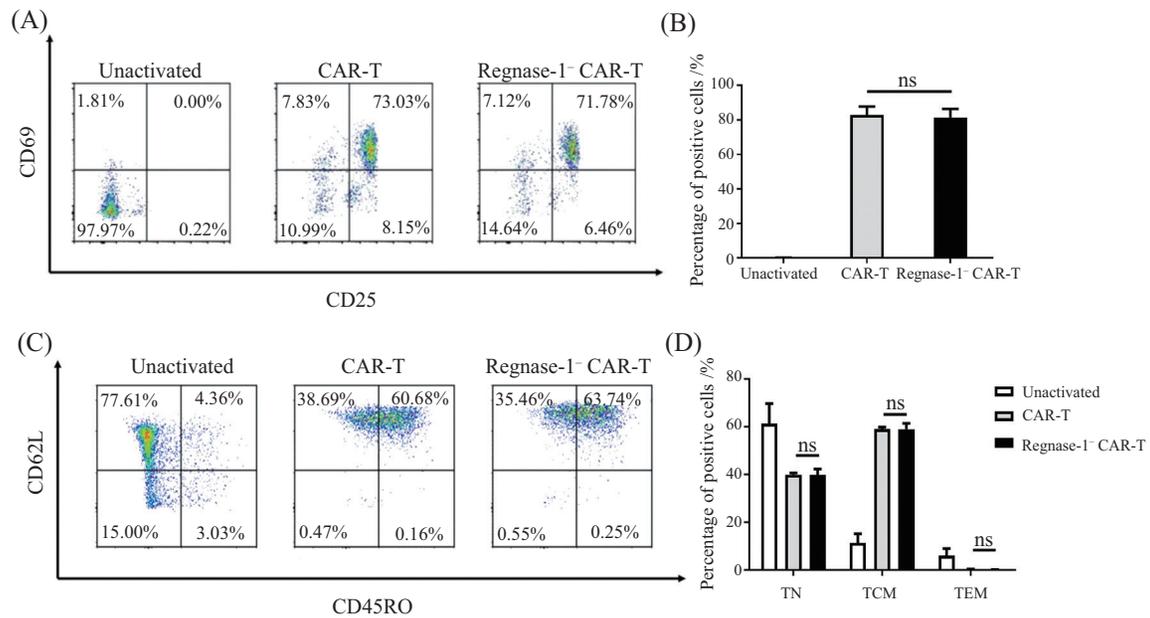
Fig.2 Effect of *Regnase-1* knockout on the expression of CAR molecular in CAR-T cells



ns:  $P>0.05$ .

图3 *Regnase-1* 缺陷对脐血CAR-T细胞体外增殖的影响

Fig.3 Effect of *Regnase-1* deficiency on the proliferation of cord blood-derived CAR-T cells *in vitro*



A: 流式散点图——各组活化细胞CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T细胞比例; B: 柱状图——各组活化细胞CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T细胞比例; C: 流式散点图——各组分化亚群细胞比例; D: 柱状图——各组分化亚群细胞比例。n=3, ns: P>0.05。

A: flow cytometry scatter plot: the ratio of CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells to total T cells; B: bar chart of FCM data statistics results: the ratio of CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells to total T cells; C: flow cytometry scatter plot: the percentage of TN, TCM, TEM subsets cells; D: bar chart of FCM data statistics results: percentage of TN, TCM, TEM subsets cells. n=3, ns: P>0.05.

图4 *Regnase-1* 敲除对脐血CAR-T细胞活化及分化亚群比例的影响

Fig.4 Effect of *Regnase-1* knockout on the activation and differentiation of cord blood-derived CAR-T cells

血来源的CAR-T细胞活化后第9天的T<sub>N</sub>、T<sub>CM</sub>、T<sub>EM</sub>各亚群分化比例均未产生显著性影响(图4C和图4D),提示*Regnase-1*缺陷对于脐血CAR-T细胞的活化及其分化状态并无影响。可见,*Regnase-1*敲除所获得的*Regnase-1*缺陷型CAR-T细胞在活化后的分化发育与脐血来源的正常CAR-T细胞中无异(图4),仍保持了脐血CAR-T分化后产生较高T<sub>CM</sub>比例的特性。

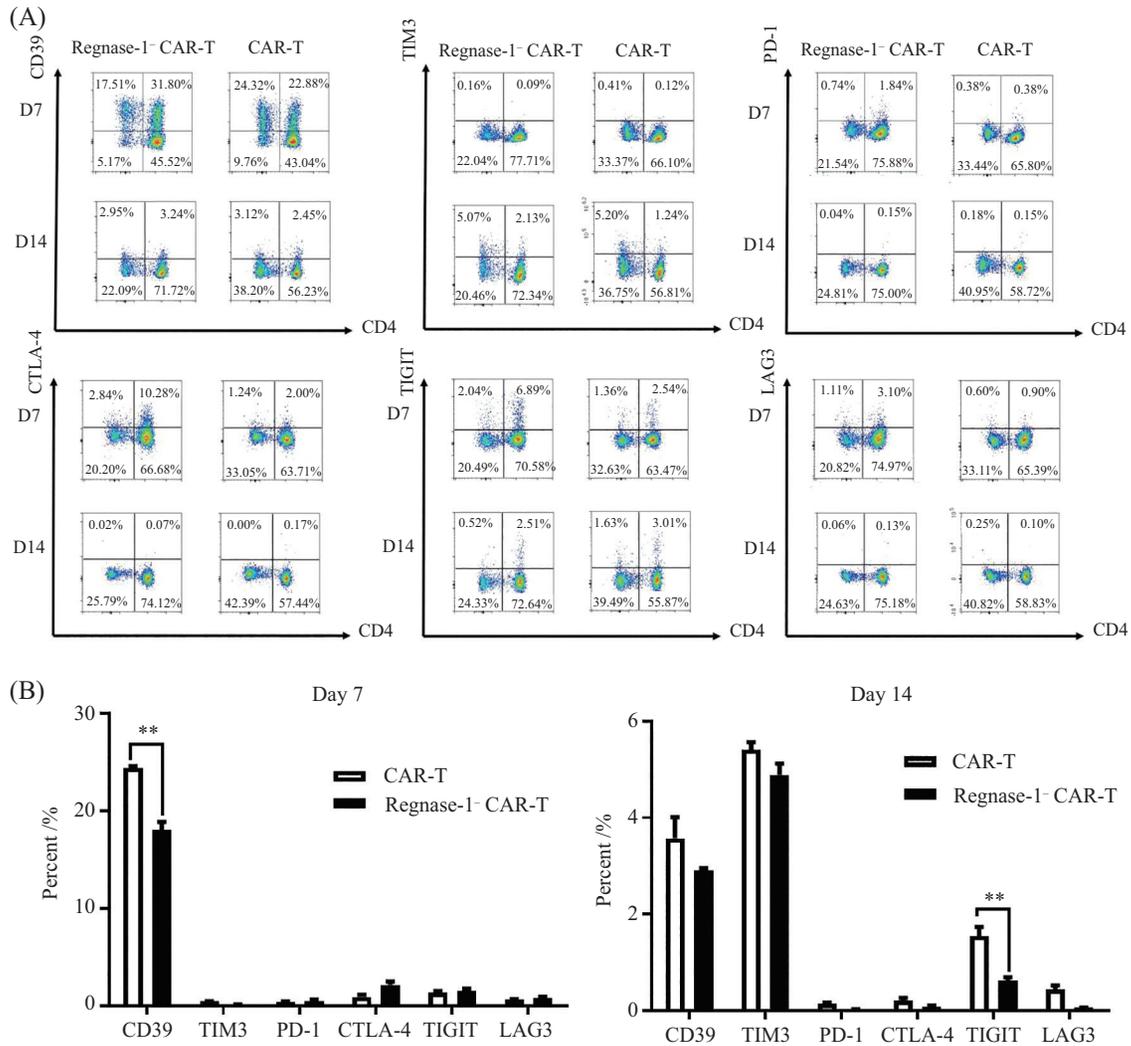
## 2.5 *Regnase-1*敲除抑制脐血CAR-T细胞耗竭分子的表达

将*Regnase-1*<sup>-</sup> CAR-T细胞和CAR-T细胞分别体外培养,于第7天和第14天时用流式细胞仪检测各组CAR-T细胞耗竭分子(包括CD39、TIM-3、PD-1、CTLA-4、TIGIT、LAG3)表达比例。结果显示在体外培养第7天时,*Regnase-1*<sup>-</sup> CAR-T细胞和CAR-T细胞的CD39阳性细胞比例分别为(18.06±1.09)%和(24.45±0.22)%,敲除组显著低于对照组(P=0.001 7,图5B),其他耗竭分子在两组中的表达比例无显著差异(P>0.05);在体外培养第14天时,TIGIT阳性表达细胞比例在*Regnase-1*<sup>-</sup> CAR-T组显著低于CAR-T组[(0.62±0.08)% vs (1.55±0.24)%,P=0.010 6,图5B],其他耗竭分子,包括CD39,两组相比差异无统计学

意义(P>0.05),提示*Regnase-1*敲除对于脐血CAR-T早期主要抑制耗竭分子CD39的表达,后期主要抑制耗竭分子TIGIT的表达(图5)。

## 2.6 *Regnase-1*敲除增强脐血CAR-T细胞的持久增殖能力

为考察*Regnase-1*敲除对脐血CAR-T细胞在靶细胞多次刺激下的增殖影响,以不同效靶比3:1、1:1、1:3将靶细胞HLA<sup>-</sup> Nalm-6、HLA<sup>-</sup> Namalwa分别与*Regnase-1*<sup>-</sup> CAR-T细胞和CAR-T细胞混合培养,6天后每3天各组持续按恒定效靶比添加靶细胞,检测效靶细胞剩余数量,考察杀伤率随时间的变化情况。效靶比3:1时,第12天靶细胞HLA<sup>-</sup> Nalm-6和HLA<sup>-</sup> Namalwa中的*Regnase-1*<sup>-</sup> CAR-T细胞增殖倍数分别为62.3±2.4和25.0±2.6,显著高于CAR-T细胞增殖倍数(23.7±4.3和16.9±1.0),均具有显著性差异(P<0.000 1,图6A)。当效靶比1:1时,不同靶细胞组的*Regnase-1*敲除组细胞增殖倍数也显著高于未敲除组[Nalm-6:(204.3±39.8) vs (90.3±9.6),P=0.008 5和Namalwa:(287.3±44.1) vs (162.7±8.3),P=0.008 6,图6B]。加大靶细胞比例至效靶比为1:3时,不同靶细胞组的*Regnase-1*敲除组细胞增殖倍数也显著高于未敲除组



A、B: CAR-T和Regnase-1<sup>-</sup> CAR-T培养7天和14天时的耗竭表型细胞比例差异(A: 流式散点图; B: 柱状图)。n=3, \*\*P<0.01。

A,B: exhausted phenotypes of CAR-T cell and Regnase-1<sup>-</sup> CAR-T cells were analyzed by FACS after 7 days or 14 days of culture (A: flow cytometry scatter dots; B: bar chart of flow cytometry data). n=3, \*\*P<0.01.

图5 Regnase-1敲除对脐血CAR-T细胞耗竭分子表达的影响

Fig.5 Effect of Regnase-1 knockout on the molecular signatures of cord blood-derived CAR-T cells exhaustion

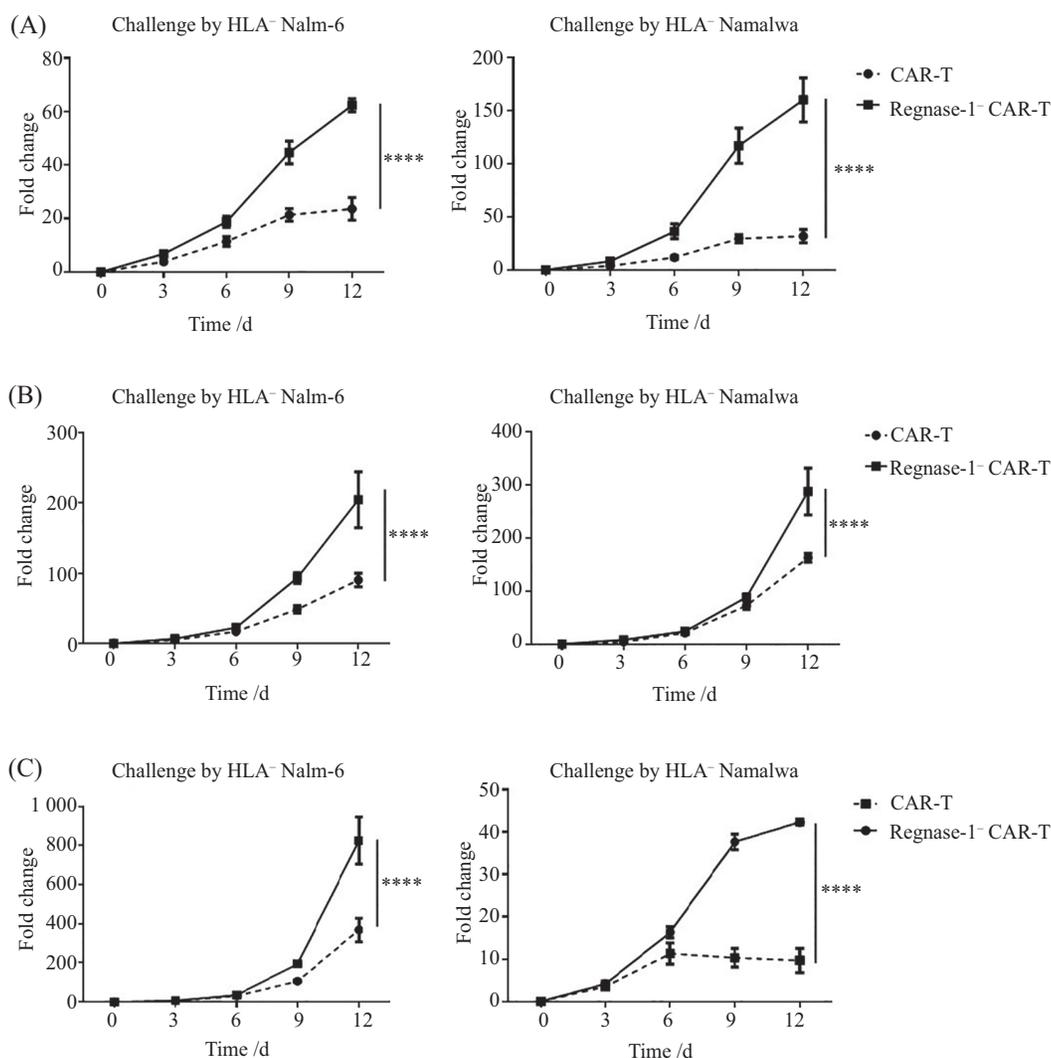
[Nalm-6: (825.7±119.9) vs (368.3±60.6), P=0.004 1和 Namalwa: (42.3±0.7) vs (9.7±2.9), P<0.000 1, 图6C]。结果表明在不同效靶比组中,靶细胞HLA<sup>-</sup> Nalm-6组和HLA<sup>-</sup> Namalwa组, Regnase-1<sup>-</sup> CAR-T细胞的杀伤率均显著高于CAR-T细胞(图6)。

### 3 讨论

本研究在脐血CAR-T细胞基因组上成功敲除Regnase-1基因,发现当CAR-T细胞Regnase-1蛋白表达缺陷,胞内无法参与广泛的多种蛋白mRNA降解时,CAR-T细胞的生物学活性的增殖、活化和分化状态并未受到显著影响,但对于CAR-T耗竭表型表达调控方面有一定的变化:早期显著降低CD39的表

达,晚期显著降低TIGIT的表达。我们特地设计了连续添加靶细胞以维持恒定效靶比的特异性杀伤细胞模型,以更真实模拟体内肿瘤细胞持续存在情况下,考察Regnase-1<sup>-</sup> CAR-T细胞的持续性。结果发现无论效靶比高还是低,靶细胞是白血病肿瘤细胞还是淋巴瘤细胞,Regnase-1<sup>-</sup> CAR-T细胞均表现出显著增强的持续活化和杀伤力。Regnase-1<sup>-</sup> CAR-T细胞在不断杀伤靶细胞、不断自我损失的情况下,其细胞数量仍能持续增加,扩增倍数最高可达800倍(图6C),体现出强大的持续增殖能力和抗肿瘤作用。

Regnase-1的表达并非固有表达,在各种感染、炎症因子等刺激下短暂诱导性表达,在不同的细胞中通过其核糖核酸酶降解不同基因的mRNA以发挥调



*Regnase-1*敲除对脐血CAR-T暴露于靶细胞Nalm-6或Namalwa下持久增殖能力的影响。A: 效靶比3:1, B: 效靶比1:1, C: 效靶比1:3, \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。Effect of *Regnase-1* knockout on the sustained proliferation of CAR-T cells exposed to target cells (Nalm-6 cells or Namalwa cells) with different effector (E) to target (T) ratios. A: 3:1, B: 1:1, C: 3:1, \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

图6 *Regnase-1*敲除对脐血CAR-T细胞在靶细胞连续刺激下的持久增殖能力的影响

Fig.6 Effect of *Regnase-1* knockout on the sustained proliferation of cord blood-derived CAR-T cells under continuous stimulation of target cells

控作用<sup>[26]</sup>。在T细胞中, *Regnase-1*蛋白影响T细胞发育分化<sup>[15]</sup>, 通过降解c-Rel、OX40和IL-2限制T细胞活化<sup>[27]</sup>。*Regnase-1*在CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>造血干细胞, 包括多潜能祖细胞中也广泛高表达, 有研究发现*Regnase-1*敲除会导致造血干细胞分化异常<sup>[28]</sup>。脐血T细胞偏干样特性, 在脐血CAR-T制备中T细胞遭受CD3/CD28磁珠及电转刺激, *Regnase-1*是否会影响脐血T细胞CAR分子的表达以及增殖和发育分化? *Regnase-1*对于CAR-T细胞的影响, 之前WEI等<sup>[20]</sup>及ZHENG等<sup>[21]</sup>直接在小鼠肿瘤模型上考察小鼠T细胞制备的CAR-T抗肿瘤作用, 并未报道*Regnase-1*对人脐血T细胞在未受靶细胞刺激下的增殖影响。本研究成

功制备了*Regnase-1*敲除的CAR-T, 与未敲除的正常CAR-T进行对比, 发现*Regnase-1*敲除后并不会影响CD19.CAR分子的表达(图2); 虽然体外培养7天的*Regnase-1*<sup>-</sup> CAR-T增殖曲线略高于CAR-T组, 但不具有显著差异(图3), 说明*Regnase-1*敲除不影响CAR-T的制备与产量。脐血T细胞富含初始T细胞, 经CD3/CD28磁珠刺激24 h后, 检测其活化T细胞CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T细胞比例, 发现*Regnase-1*敲除不影响脐血T细胞的活化, 体外培养9天后, T<sub>N</sub>和T<sub>CM</sub>亚群比例并不受*Regnase-1*缺陷的影响(图4)。延长体外培养时间至14天, 观察脐血T细胞耗竭及相关抑制分子的表达, 发现*Regnase-1*敲除可在早期(第7天)显

著下调耗竭标志物CD39表达的阳性细胞比例,说明Regnase-1在脐血T细胞生长分化早期促进更多细胞表达耗竭分子CD39,当培养再过7天时对CD39表达的促进作用减弱,与未敲除组相比虽然有所降低,但已变得无显著差异(图5B),提示Regnase-1对于脐血T细胞的长期增殖无显著影响。虽然第14天时,Regnase-1敲除可显著下调TIGIT分子表达的阳性细胞比例,提示Regnase-1在脐血T细胞生长培养中可能促进更多T细胞表达耗竭抑制性受体TIGIT,但两组的流式散点图检测值均很低,有可能存在检测偏差,因此对于TIGIT分子表达的影响还需今后证实。

对于增殖失控快速的肿瘤细胞,CAR-T的持久杀伤能力是决定CAR-T细胞治疗疗效的关键。本研究在T细胞特异性杀伤模型基础上,设计连续添加恒定比例的靶细胞,考察CAR-T在多次连续接触靶细胞情况下的杀伤率。当CAR-T持续暴露于靶细胞中时,CAR-T细胞不断被刺激活化而扩增,同时也在不断杀伤而损耗。流式绝对计数监测的各组各培养孔中的CAR-T细胞数量,其实是扩增数量减去损耗数量的剩余CAR-T细胞数量,这也反映了CAR-T持续存在的能力。结果显示低效靶比情况下,Regnase-1敲除均可显著增强脐血CAR-T的持续扩增能力,有望增强CAR-T在体内的持续性,有助于CAR-T细胞治疗疗效提升。

总之,Regnase-1敲除不但影响脐血CAR-T细胞的制备与产量,而且可增加CAR-T细胞持续增殖能力和靶细胞杀伤效率,发挥更为有效的抗肿瘤作用,可望为新型的脐血CAR-T细胞药物研发奠定基础。

### 参考文献 (References)

- [1] SINGH A K, MCGUIRK J P. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(3): e168-e78.
- [2] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-5.
- [3] GRUPP S A, KALOS M, BARRETT D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia [J]. 2013, 368(16): 1509-18.
- [4] PORTER D L, LEVINE B L, KALOS M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. 2011, 365(8): 725-33.
- [5] KORKMAZ S. Clinical use of CAR T-cells in treating acute lymphoblastic leukemia [J]. *Transfus Apher Sci*, 2023, 62(2): 103666.
- [6] NAKAZAWA Y. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies [J]. *Rinsho Ketsueki*, 2019, 60(9): 1351-7.
- [7] ABRAMSON J S. Anti-CD19 CAR T-cell therapy for B-cell non-hodgkin lymphoma [J]. *Transfus Med Rev*, 2020, 34(1): 29-33.
- [8] YING Z, HUANG X F, XIANG X, et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy [J]. *Nat Med*, 2019, 25(6): 947-53.
- [9] APARICIO-PEREZ C, CARMONA M, BENABDELLAH K, et al. Failure of ALL recognition by CAR T cells: a review of CD 19-negative relapses after anti-CD 19 CAR-T treatment in B-ALL [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1165870.
- [10] CZAJKA-FRANCUZ P, PRENDES M J, MANKAN A, et al. Mechanisms of immune modulation in the tumor microenvironment and implications for targeted therapy [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1200646.
- [11] DAGAR G, GUPTA A, MASOODI T, et al. Harnessing the potential of CAR-T cell therapy: progress, challenges, and future directions in hematological and solid tumor treatments [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 449.
- [12] DIMITRI A, HERBST F, FRAIETTA J A. Engineering the next-generation of CAR T-cells with CRISPR-Cas9 gene editing [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 78.
- [13] GHAFARI S, KHALILI N, REZAEI N. CRISPR/Cas9 revitalizes adoptive T-cell therapy for cancer immunotherapy [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 269.
- [14] MUSSON R, SZUKALA W, JURA J. MCP1 RNase and its multifaceted role [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7183.
- [15] KONG G, DOU Y, XIAO X, et al. Transgenic expression of a mutant ribonuclease Regnase-1 in T cells disturbs T cell development and functions [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 682220.
- [16] LI M, CAO W, LIU H, et al. MCP1 down-regulates IL-2 expression through an ARE-independent pathway [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49841.
- [17] UEHATA T, IWASAKI H, VANDENBON A, et al. Malt1-induced cleavage of regnase-1 in CD4<sup>+</sup> helper T cells regulates immune activation [J]. *Cell*, 2013, 153(5): 1036-49.
- [18] MINO T, MURAKAWA Y, FUKAO A, et al. Regnase-1 and roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1058-73.
- [19] JELTSCH K M, HEISSMEYER V. Regulation of T cell signaling and autoimmunity by RNA-binding proteins [J]. *Curr Opin Immunol*, 2016, 39: 127-35.
- [20] WEI J, LONG L, ZHENG W, et al. Targeting REGNASE-1 programs long-lived effector T cells for cancer therapy [J]. *Nature*, 2019, 576(7787): 471-6.
- [21] ZHENG W, WEI J, ZEBLEY C C, et al. Regnase-1 suppresses TCF-1<sup>+</sup> precursor exhausted T-cell formation to limit CAR-T-cell responses against ALL [J]. *Blood*, 2021, 138(2): 122-35.
- [22] SZABOLCS P, PARK K D, REESE M, et al. Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood [J]. *Exp Hematol*, 2003, 31(8): 708-14.
- [23] HARRIS D T, SCHUMACHER M J, LOCASCIO J, et al. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10006-10.

- [24] HIWARKAR P, QASIM W, RICCIARDELLI I, et al. Cord blood T cells mediate enhanced antitumor effects compared with adult peripheral blood T cells [J]. *Blood*, 2015, 126(26): 2882-91.
- [25] 蒙露, 赵日, 周丹, 等. 通用型CD19 CAR-T的体外构建及初步功能鉴定[J]. *中国细胞生物学学报*(MENG L, ZHAO R, ZHOU D, et al. *In vitro* construction and preliminary functional identification of universal CD19 CAR-T [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2021, 43(2): 311-8.
- [26] MATSUSHITA K, TAKEUCHI O, STANDLEY D M, et al. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay [J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1185-90.
- [27] MAO R, YANG R, CHEN X, et al. Regnase-1, a rapid response ribonuclease regulating inflammation and stress responses [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(5): 412-22.
- [28] KIDOYA H, MURAMATSU F, SHIMAMURA T, et al. Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1072.