

结直肠 CAR-T 细胞治疗相关肿瘤靶点的筛选:CEA、EGFR、HER2、Mesothelin、MUC1 和 EpCAM 的表达及共表达状况

胡阿锦,张畅,龚苗子,王云帆,王跃,王淑芳,张雨,缪琦,崔朝丽,张晋夏

北京大学首钢医院病理科,北京 100144

【摘要】 目的 分析 CEA、EGFR 等肿瘤相关抗原作为 CAR-T 治疗靶点在结直肠癌中的分布。方法 回顾并选取 2014 年-2017 年的 122 例结直肠癌病例,应用免疫组织化学法检测肿瘤相关抗原 CEA、EGFR、HER2、Mesothelin、MUC1 和 EpCAM 在结直肠癌组织中蛋白表达范围和强度。结果 除 HER2(37.5%)外,其它肿瘤相关抗原在结直肠癌中表达阳性率均在 50%以上,EpCAM(100%)、CEA(99.1%)、EGFR(96%)、Mesothelin(67.9%)、MUC1(67%)。CEA(94.6%)和 EpCAM(100%)强表达的比例较高,EGFR 和 Mesothelin 分别在 10.7%和 31.2%的病例中强表达,HER2 和 MUC1 均未见强表达病例。EpCAM(99.1%)、CEA(98.2%)、EGFR(56.2%)在结直肠癌中的表达范围较广(大于 50%的肿瘤细胞表达),Mesothelin 和 MUC1 均灶状表达。除 EpCAM 外,其它肿瘤相关抗原特异性均较好。仅 28.6%的病例共表达 CEA/EGFR/HER2/Mesothelin。64.3%的病例共表达 CEA/EGFR/Mesothelin。其余三抗原共表达的病例均少于 50%。高达 95.5%的结直肠癌病例共表达 CEA/EGFR。除 CEA/Mesothelin(67%)及 Mesothelin/HER2(65.2%)外,其余两抗原共表达的病例均少于 50%。结论 肿瘤相关抗原 CEA 和 EGFR 可作为结直肠癌 CAR-T 治疗多靶点组合方案的选择。

【关键词】 结直肠癌; CAR-T; 肿瘤相关抗原; 免疫组织化学法

Cancer antigen profiling for colorectal cancer CAR-T therapy: expression and coexpression of CEA, EGFR, HER2, Mesothelin, MUC1 and EpCAM

HU A-jin, ZHANG Chang, GONG Miao-zi, WANG Yun-fan, WANG Yue, WANG Shu-fang, ZHANG Yu, MIAO Qi, CUI Zhao-li, ZHANG Jin-xia

Department of Pathology, Shougang Hospital, Peking University, Beijing 100144, China

【Abstract】 Objective To develop cancer antigen-targeted CAR-T therapeutic strategies for colorectal cancer, we investigated the individual and coexpressions of the tumor-associated antigens CEA, EGFR, HER2, Mesothelin, MUC1 and EpCAM in colorectal cancer. **Methods** All available hematoxylin and eosin-stained slides from patients who were diagnosed with colorectal cancer (2014-2017) were reviewed. Intensity and distribution for each antigen were assessed by immunohistochemistry in 122 of colorectal cancer cases. **Results** Positive expression of EpCAM, CEA, EGFR, Mesothelin, MUC1 and HER2 were demonstrated in 100%, 99.1%, 96%, 67.9%, 67% and 37.5% of colorectal cancer cases, respectively. Strong expression of CEA, EpCAM, EGFR and Mesothelin were found in 94.6%, 100%, 10.7% and 31.2% of colorectal cancer cases, while neither HER2 nor MUC1 was strong expression. Distribution $\geq 50\%$ of EpCAM, CEA and EGFR positive tumor cells were observed in 99.1%, 98.2% and 56.2% of colorectal cancer cases, respectively, while both mesothelin and MUC1 were multifocal express in all of colorectal cancer. In addition to EpCAM, specificity of all the other tumor-associated antigens was much better. CEA/EGFR/HER2/Mesothelin was coexpressed in only 28.6% of colorectal cancer cases. Coexpression of CEA/EGFR/Mesothelin was demonstrated in 64.3% of colorectal cancer cases. All the other triple antigen coexpression was demonstrated in less than 50% of colorectal cancer cases. CEA /EGFR were coexpressed in 95.5% of colorectal cancer cases.

第一作者:胡阿锦,主治医师,E-mail: ajinhu2011@126.com

通讯作者:张晋夏,主任医师,硕士生导师,E-mail: Jx_5286@126.com

Except CEA/Mesothelin (67%) and Mesothelin/HER2 (65.2%), the other double antigen coexpression was demonstrated in less than 50% of colorectal cancer cases. **Conclusions** Tumor-associated antigens CEA and EGFR can be choose for developing multi-targeted CAR-T therapeutic strategies for colorectal cancer patients.

【Key words】 Colorectal cancer; CAR-T; Tumor-associated antigens; Immunohistochemistry

结直肠癌是全球肿瘤相关性死亡的主要原因之一^[1]。近年来,肿瘤免疫治疗在癌症研究中取得了突飞猛进的发展,在恶性肿瘤治疗方面显示出巨大的潜能^[2,3]。利用表达嵌合抗原受体的T细胞(chimeric antigen receptor-modified T-cell, CAR-T)进行的T细胞过继性治疗取得了激动人心的革命性突破^[4]。CAR-T疗法是通过将患者的T细胞体外重新编程,能够特异性的识别肿瘤细胞的表面抗原,体外扩增后回输至患者体内,通过CAR-T细胞靶向性的杀灭肿瘤细胞^[5]。为筛选出结直肠癌患者敏感性且特异性较高的CAR-T治疗相关肿瘤靶点,我们检测了肿瘤相关抗原癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、人类上皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、间皮素(mesothelin)、粘蛋白1(mucin1, MUC1)和上皮细胞粘附分子(epithelial cellular adhesion molecular, EpCAM)在结直肠癌中的表达及共表达状况。

1 材料与方法

1.1 材料 收集北京大学首钢医院病理科2014-2017年结直肠癌手术切除标本共112例。标本均经4%甲醛固定、石蜡包埋,常规苏木精-伊红(HE)染色。所有病例经由两名病理医师独立阅片,选取肿瘤组织丰富的蜡块和正常组织蜡块用于后续实验。

1.2 免疫组织化学染色 采用EnVision二步法,DAB显色。第一抗体CEA(COL-1)、EGFR(UMAB96)、Mesothelin(EP140)、MUC1(MRQ-17)、EpCAM(MOC31)、MLH1(ES05)、PMS2(EP51)、MSH2(RED2)及MSH6(EP49)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;HER2(EP1045Y)购自Abcam公司。鼠兔通用型EnVision试剂盒购自丹麦Dako公司。

1.3 结果判读标准 HER2、Mesothelin、MUC1及EpCAM均为肿瘤细胞膜着色,CEA、EGFR为肿瘤细胞胞浆着色。评估阳性细胞的表达和分布状况,在高倍镜下与周围间质相比,无着色记为0分,浅褐色

记为1分,褐色记为2分,深褐色记为3分;阳性细胞百分率 $\leq 5\%$ 记为0分,6-25%记为1分,26-50%记为2分,51-75%记为3分, $>75\%$ 记为4分。

1.4 MSI状态检测方法 免疫组织化学法检测MLH1、MSH2、MSH6、PMS2蛋白表达状况,肿瘤细胞核无着色时计为阴性,着色细胞比例 $<5\%$ 计为局灶阳性。四个DNA错配修复蛋白免疫组织化学染色均为阳性时判为微卫星稳定(MSS)。对于任何一种蛋白表达阴性、局灶阳性或免疫组织化学染色不满意的病例进一步采用PCR-毛细管电泳法检测肿瘤MSI状态,若有 ≥ 2 个标准微卫星位点发生改变,则判为高频度微卫星不稳定(MSI-H),若有1个发生改变,则判为低频度微卫星不稳定(MSI-L),若均未发生改变,则判为MSS。

1.5 统计学方法 SPSS Statistics17软件(SPSS软件公司)以及GraphPad Prism 5.01用于所有统计学分析及表格制作。

2 结果

2.1 结直肠癌患者的临床病理资料 112例结直肠癌病例中一半以上为直肠癌,左半结肠癌(25.9%)和右半结肠癌(27.7%)比例相当。患者的中位年龄为63岁(范围为24-93岁),多数患者为男性(58.1%),术前未接受放疗(89.3%),术后分期以II期(41.1%)和III期(29.5%)居多。大部分病例组织学亚型为普通腺癌(86.6%),组织学分级为中分化(72.3%)。淋巴管间隙受累和淋巴结转移率分别为25%和32.1%。微卫星不稳定(MSI)的结直肠癌病例占14.3%,其中MSI-H占11.6%,MSI-L占2.7%。(表1、图1-b-c)。

2.2 肿瘤相关抗原表达的强度和分布 肿瘤相关抗原CEA、EGFR、HER2、Mesothelin、MUC1和EpCAM在右半结肠、左半结肠和直肠中的阳性率无统计学差异(图1-a)。在112例结直肠癌组织中,除HER2(37.5%)外其它抗原表达阳性率均在50%以上,其中EpCAM阳性率高达100%,CEA、EGFR、Mesothelin和MUC1分别为99.1%、96%、67.9%和67%。在表达强度方面,CEA和EpCAM强着色的比例较高,分别为94.6%和100%。EGFR

表1 结直肠癌患者的临床病理特点

项目	结直肠癌 n=112(%)
年龄(中位数,范围)	63(24-93)
性别	
男	65(58.1)
女	47(41.9)
部位	
左半结肠	29(25.9)
右半结肠	31(27.7)
直肠	52(46.4)
术前放化疗	
是	11(9.8)
否	100(89.3)
未知	1(0.9)
术后分期	
I	14(12.5)
II	46(41.1)
III	33(29.5)
IV	19(17.0)
组织学亚型	
腺癌	97(86.6)
粘液腺癌	13(11.6)
印戒细胞癌	2(1.8)
组织学分级	
G1	7(6.3)
G2	81(72.3)
G3	24(21.4)
淋巴脉管间隙受累	
是	28(25)
否	84(75)
淋巴结转移	
是	36(32.1)
否	76(67.9)
MSI 状态	
MSI-H	13(11.6)
MSI-L	3(2.7)
MSS	96(85.7)

在 10.7% 的病例强着色, 35.7% 中度着色。Mesothelin 在 31.2% 的病例强着色, 22.3% 中度着色。HER2 和 MUC1 表达强度均较低, 二者均未见强着色病例。表达分布方面, 在 99.1%、98.2%、56.2%、18.8%、5.4% 和 4.5% 的病例中大于 50% 的肿瘤细胞表达 EpCAM、CEA、EGFR、HER2、Mesothelin 和 MUC1 (表 2)。在特异性方面, 除 EpCAM 在正常肠粘膜有较高表达外(图 2), 其余肿瘤相关抗原在正常组织中表达水平均较低。

2.3 CEA、EGFR、HER2 和 Mesothelin 在结直肠癌中的共表达情况 100% 的结直肠癌病例表达 CEA、EGFR、HER2 或 Mesothelin 任一抗原。28.6% 的病例四个抗原均表达。CEA/EGFR/Mesothelin 在 64.3% 的结直肠癌病例中共表达。其余三抗原共表达的病例均少于 50% (分别为 EGFR/Mesothelin/HER2, 29.2% ; CEA/EGFR/HER2, 35.7% ; CEA/Mesothelin/HER2, 29.5%)。高达 95.5% 的结直肠癌病例共表达 CEA/EGFR。67% 和 65.2% 的病例分别共表达 CEA/Mesothelin 和 Mesothelin/HER2。少于 50% 的病例共表达其它两抗原的组合 (分别为 CEA/HER2, 36.6% ; EGFR/Mesothelin, 30.4% ; EGFR/HER2, 36.6%) (表 3)。

3 讨论

结直肠癌是一种常见的胃肠道恶性肿瘤, 男性患者多于女性患者, 其发病年龄呈现年轻化趋势。虽然早期结直肠癌患者的预后较好, 5 年存活率超过 50%。然而多数患者发现时已至中、晚期, 转移性患者的 5 年存活率则不足 12%^[6]。

免疫疗法为难治性结直肠癌患者的治疗提供了新思路^[7]。已有文献报道在不同的恶性肿瘤治疗中, 抗原特异性免疫反应均有受益^[8]。多项研究

表2 结直肠癌肿瘤相关抗原表达的强度和分布

	CEA	EGFR	HER2	Mesothelin	MUC1	EpCAM
表达						
阳性	111(99.1%)	108(96.4%)	42(37.5%)	76(67.9%)	75(67%)	112(100%)
阴性	1(0.9%)	4(3.6%)	70(62.5%)	36(32.1%)	37(33%)	0
强度						
强	106(94.6%)	12(10.7%)	0	35(31.2%)	0	112(100%)
中	5(4.5%)	40(35.7%)	18(16.1%)	25(22.3%)	6(5.4%)	0
弱	0	56(50%)	24(21.4%)	16(14.3%)	69(61.6%)	0
分布						
>50%	110(98.2%)	63(56.2%)	21(18.8%)	6(5.4%)	5(4.5%)	111(99.1%)
>0, ≤50%	1(0.9%)	45(40.2%)	21(18.8%)	70(62.5%)	70(62.5%)	1(0.9%)

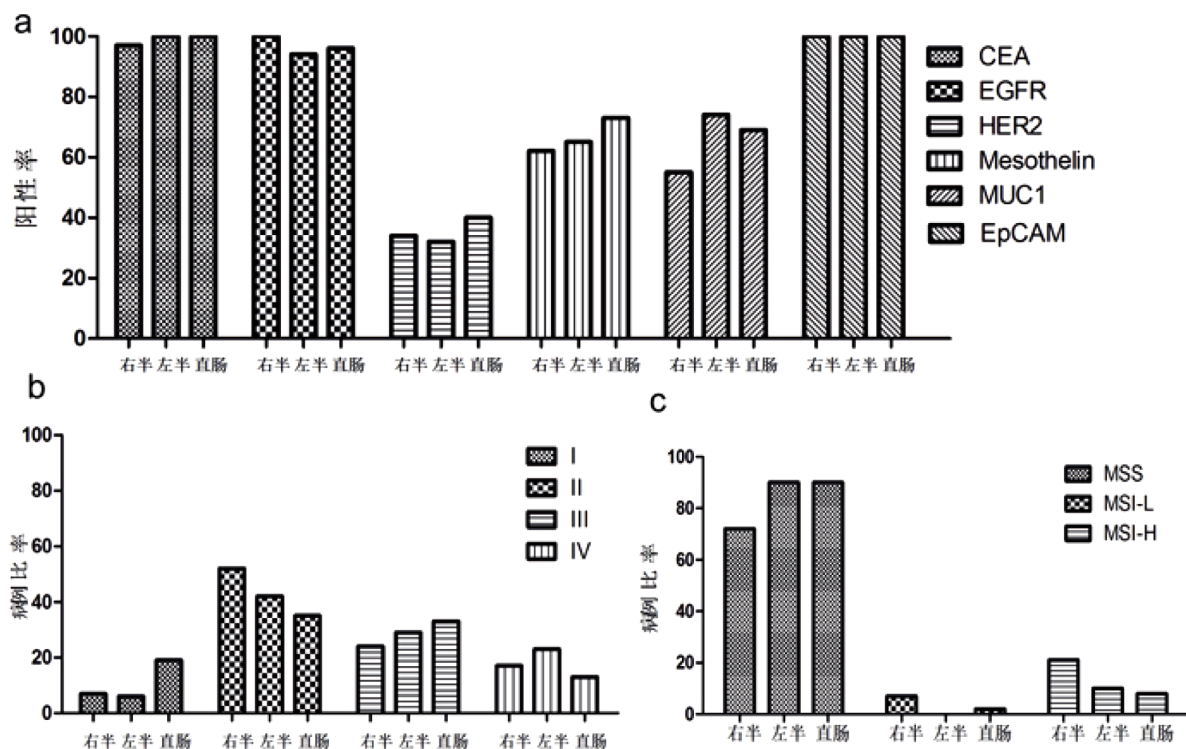


图1 a. 肿瘤相关抗原 CEA、EGFR、HER2、Mesothelin、MUC1 和 EpCAM 在右半结肠癌、左半结肠癌和直肠癌中的阳性率相似。b.c. 右半结肠癌、左半结肠癌和直肠癌的临床肿瘤分期及 DNA 错配修复状态均无统计学差异。

表3 CEA、EGFR、HER2 和 Mesothelin 在结直肠癌中的共表达情况

	结直肠癌 n=112(%)
任一抗原表达	112(100)
四个抗原均表达	32(28.6)
三个抗原共表达	
CEA/EGFR/Mesothelin	72(64.3)
EGFR/Mesothelin/HER2	33(29.2)
CEA/EGFR/HER2	40(35.7)
CEA/Mesothelin/HER2	33(29.5)
两个抗原共表达	
CEA/EGFR	107(95.5)
CEA/Mesothelin	75(67)
CEA/HER2	41(36.6)
EGFR/Mesothelin	34(30.4)
EGFR/HER2	41(36.6)
Mesothelin/HER2	73(65.2)

证实了 CAR-T 细胞对 CD19 阳性的复发难治性白血病细胞的靶向杀伤作用以及高缓解率 (80%~90%)^[9]。Mesothelin 在恶性间皮瘤和胰腺癌中^[10], EpCAM 在腹膜癌中^[11], MUC1 在胰腺癌中^[12], 以及 HER2 在胃癌、乳腺癌、卵巢癌、胰胆管癌、胶质瘤、骨肉瘤等肿瘤模型中作为 CAR-T 治疗靶抗原均有研究, 其中一些已进入临床 I 或 II 期实验^[13]。以 CEA^[14], EGFR^[15]等为靶点的 CAR-T 治疗也取

得了一定的疗效。然而适合结直肠癌 CAR-T 治疗的靶抗原尚不明确。

本研究中检测了结直肠癌肿瘤相关抗原在肿瘤细胞中的表达及分布特点, 以及表达和共表达的比例。我们研究发现 100% 的结直肠癌病例中肿瘤相关抗原 CEA、EGFR、HER2、Mesothelin、MUC1 和 EpCAM 至少 1 个阳性表达。EpCAM 在 112 例结直肠癌中均过表达。然而 EpCAM 抗原特异性较差, 在正常肠上皮中也有较高水平表达 (图 1)。CAR-T 细胞在清除表达相应抗原的肿瘤细胞同时, 也可能攻击表达相同抗原的正常组织, 导致局部脏器的免疫损伤, 引发严重甚至致死性不良事件。所以 EpCAM 作为结直肠癌 CAR-T 治疗靶抗原结果将不甚理想。除 EpCAM 外, 其余肿瘤相关抗原在正常组织中的表达水平较低。95% 以上的结直肠癌病例过表达 CEA 和 EGFR, 且一半以上为弥漫性表达。三分之二的结直肠癌病例表达 MUC1 和 Mesothelin, 然而 90% 以上的病例均为局灶性表达, 且 MUC1 几乎均为弱表达。既往研究结果显示结直肠癌中 HER2 过表达的比例从 2% 到 11%^[16]。本研究中 HER2 在 37.5% 的结直肠癌病例中表达, 且阳性病例中 50% 以上为弱表达。不同研

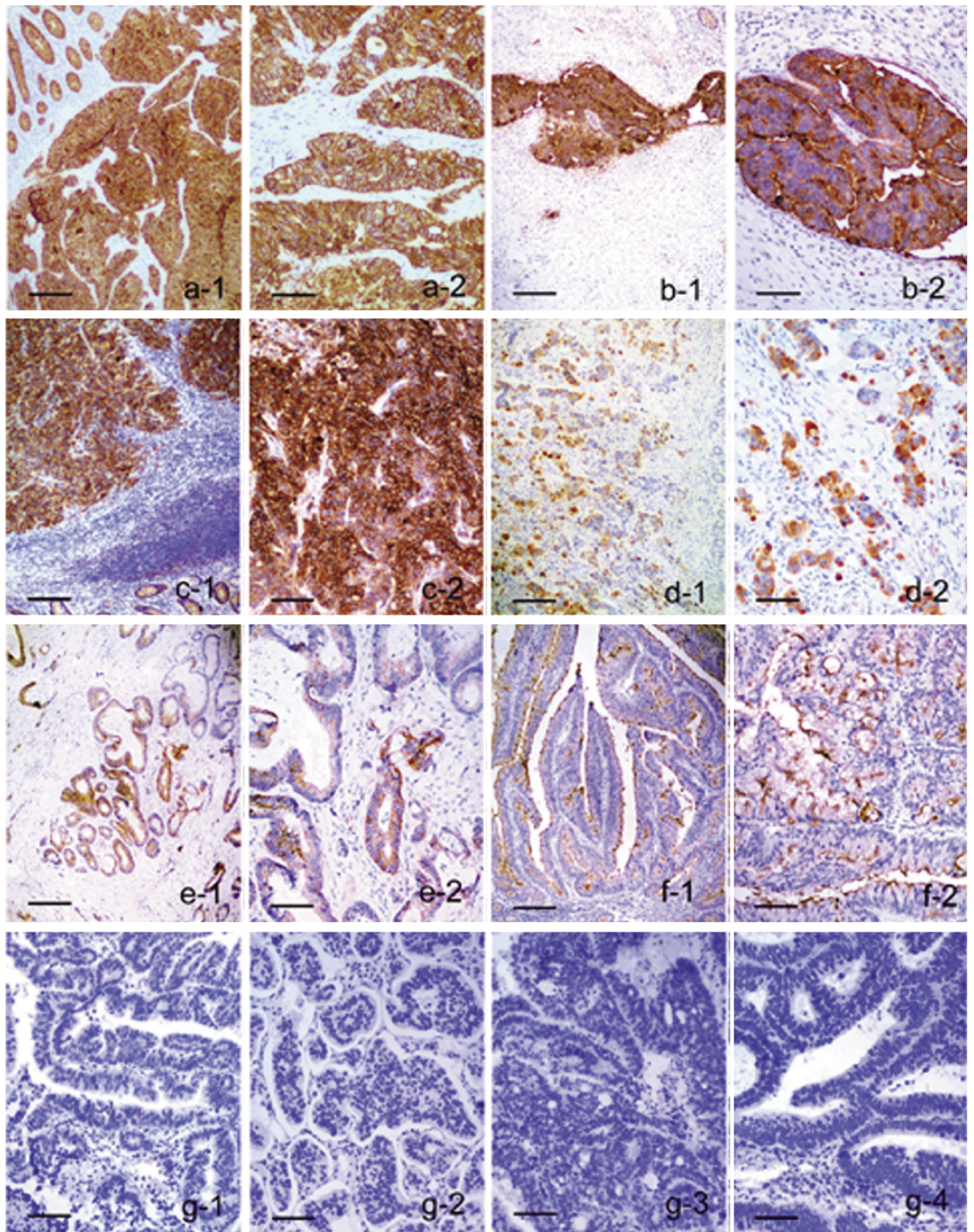


图2 EpCAM免疫组织化学染色在癌细胞和正常肠上皮中均强着色(a-1 40 \times , a-2 100 \times)。CEA(b-1 40 \times , b-2 100 \times)和EGFR(c-1 40 \times , c-2 100 \times)免疫组织化学染色在癌细胞中强着色,在正常肠上皮中均弱着色。Mesothelin(c-1 40 \times , c-2 100 \times)和HER2(d-1 40 \times , d-2 100 \times)免疫组织化学染色在癌细胞中中度着色。MUC1(f-1 40 \times , f-2 100 \times)免疫组织化学染色在癌细胞中弱着色。g1-g4(100 \times)EGFR、Mesothelin、HER2和MUC1免疫组织化学染色的阴性病例。

究结果的差异可能和免疫组化评分标准、抗体类型或肿瘤的异质性相关。

虽然免疫治疗前景乐观,但在实体瘤中疗效不尽如人意,主要表现为实体瘤的高度异质性导致的脱靶效应^[17,18]。EGFR为靶点的CAR-T临床研究数据显示:在非小细胞肺癌的病例中,即使病理结果证实EGFR阳性的肿瘤细胞已被大量清除,10例患者中仅2例达到部分缓解,疗效维持时间分别为2个月和10个月^[19]。既往研究数据表明,单一靶点的CAR-T治疗难以给实体肿瘤带来更有效率和更长的无进展生存时间。筛选出特异性的肿瘤靶点抗原,设计双靶抗原或多靶抗原是提高CAR-T治疗实体瘤的有效率的关键^[20]。本研究分析了CEA、EGFR、HER2和Mesothelin在结直肠癌中的共表达状况,发现三分之二以上的病例共表达CEA/EGFR/Mesothelin,共表达CEA/EGFR的病例高达95%。这些研究结果支持我们在结直肠癌中选择以CEA和EGFR为靶抗原的CAR-T治疗,提示发展CEA/EGFR双靶抗原或CEA/EGFR/Mesothelin多靶抗原组合提高结直肠癌CAR-T治疗效率的可行性。

另外,本研究中发现,各个肿瘤靶点的表达状况与肿瘤临床分期及DNA错配修复状态均未存在明显的相关性。

总之,本研究结果证实,虽然能用于所有结直肠癌患者CAR-T治疗的肿瘤相关抗原数量有限。但90%以上的结直肠癌患者可能适合以CEA和EGFR为组合靶点的CAR-T治疗体系。

参考文献

- [1] Van der Jeught K, Xu H, Li Y, et al. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2018,24(34):3834-3848.
- [2] Kirkwood J M, Butterfield L H, Tarhini A A, et al. Immunotherapy of Cancer in 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012,62(5):309-335.
- [3] Galluzzi L, Vacchelli E, Pedro J B, et al. Classification of current anticancer immunotherapies [J]. *Oncotarget*, 2014,5(24):12472-12508.
- [4] Filley A C, Henriquez M, Dey M. CART Immunotherapy: Development, Success, and Translation to Malignant Gliomas and Other Solid Tumors[J]. *Frontiers in Oncology*, 2018,8(453):1-19.
- [5] Han X, Wang Y, Han W. Chimeric antigen receptor modified T-cells for cancer treatment [J]. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 2018,4(2018):225-243.
- [6] Bupathi M, Wu C. Biomarkers for immune therapy in colorectal cancer: mismatchrepair deficiency and others [J]. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2016,5(7):713-720.
- [7] Wagner S, Michael C S M. Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens [J]. *World J Gastroenterol*, 2018,24(48):5418-5432.
- [8] Pang Y, Hou X, Yang C, et al. Advances on chimeric antigen receptormodified T-cell therapy for oncotherapy [J]. *Molecular Cancer*, 2018,19(17):1-10.
- [9] Zhang T, Cao L, Xie J, et al. Efficiency of CD19 chimeric antigen receptor -modified T cells for treatment of B cell malignancies in phase I clinical trials: a meta-analysis. [J]. *Oncotarget*, 2015,6(32):33961-33971.
- [10] Watanabe K, Luo Y, Da T, et al. Pancreatic cancer therapy with combined mesothelin -redirected chimeric antigen receptor T cells and cytokine armed oncolytic adenoviruses[J]. *JCI Insight*, 2018,3(7):1-17.
- [11] Ang W X, Li Z, Chi Z, et al. Intraperitoneal immunotherapy with T cells stably and transiently expressing anti-EpCAM CAR in xenograft models of peritoneal carcinomatosis [J]. *Oncotarget*, 2017,8(8):13545-13559.
- [12] Jr A D P, Schwab R D, Boesteanu A C, et al. Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer -Associated TnGlycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma [J]. *Immunity*, 2016,44(6):1444-1454.
- [13] Han Y, Liu C, Li G, et al. Antitumor effects and persistence of a novel HER2 CAR T cells directed to gastric cancer in preclinical models[J]. *Am J Cancer Res*, 2018,8(1):106-119.
- [14] Katz S C, Burga R A, McCormack E, et al. Phase I Hepatic Immunotherapy for Metastases study of intraarterial chimeric antigen receptor modified T cell therapy for CEA + liver metastases[J]. *Clin Cancer Res*, 2015,21(14):3149-3159.
- [15] Kaichao, Fengyelei, Guohanren, et al. Chimeric antigen receptor -modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer[J]. *Sci China Life Sci*, 2016,59(5):468-479.
- [16] Siena S, Sartore-Bianchi A, Marsoni S, et al. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer[J]. *Annals of Oncology*, 2018,29(5):1108-1119.
- [17] Yan L, Liu B. Critical factors in chimeric antigen receptormodified T-cell (CAR-T) therapy for solid tumors[J]. 2019(12):193-204.
- [18] Heyman, Benjamin, Yang Y. Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Solid Tumors: Current Status, Obstacles and Future Strategies[J]. *Cancers*, 2019,191(11).
- [19] Feng K, Guo Y, Dai H, et al. Chimeric antigen receptor -modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer[J]. *Sci China Life Sci*, 2016,59(5):468-479.
- [20] Xu D, Jin G, Chai D, et al. The development of CAR design for tumor CAR-T cell therapy[J]. *Oncotarget*, 2018,9(17):13991-14004.