

Celična terapija z regulatornimi limfociti T – celice kot zdravila

Cell therapy using regulatory T cells - cells playing the role of drugs

Urban Švajger, Matjaž Jeras

Povzetek: V zadnjih letih je prišlo do velikega napredka v razumevanju biologije regulatornih celic T in načina njihovega delovanja v fizioloških in patofizioloških pogojih. Regulatorne celice T danes uvrščamo med ključne akterje v vzdrževanju imunske homeostaze pri čemer je njihova vloga pri oblikovanju imunskega odziva neizpodbitna. Številna odkritja glede različnih vrst, mehanizmov delovanj, kot tudi razvoj na področju pridobivanja ter manipulacije regulatornih celic T v laboratorijskih pogojih, so sprožila zanimanje za morebitno uporabo regulatornih celic T v terapevtske namene. Imunoterapija z regulatornimi celicami T bi v primerjavi s klasičnimi načini imunosupresije lahko nudila številne prednosti. Kljub obetom, ki jih prikazujejo živalski modeli, pa čakajo prenos tega znanja na ljudi in posledično klinično uporabnost številne prepreke. V tem preglednem članku podajamo najnovejša dognanja na področju regulatornih celic T v smislu njihove uporabnosti za celične terapije.

Ključne besede: Regulatorne celice T, Tr1, Treg, celična terapija

Abstract: In recent years there has been a major progress in understanding the biology of regulatory T cells and the way they function in physiological and pathophysiological conditions. Today, regulatory T cells are considered crucial players in the maintenance of immune homeostasis and carry an indisputable role in shaping the immune response. Numerous findings revealing various types, mechanisms of action, as well as improved methods of obtaining and manipulating regulatory T cells in laboratory environments, have raised interest in the possibility of using regulatory T cells for therapeutic purposes. Immunotherapy using regulatory T cells could hold many advantages over conventional immunosuppression treatments. Despite promising results obtained using animal models, there are still many obstacles in the way of transferring this knowledge to human studies and consequently to clinical use. In this review we summarize the latest findings on regulatory T cells in context of their use for cellular therapies.

Keywords: Regulatory T cells, Tr1, Treg, cell therapy

1 Uvod

V imunologiji poznamo regulatorne limfocite T že dobri dve desetletji. V zadnjih desetih letih pa se je razumevanje biologije teh celic poglobilo do te mere, da jih danes obravnavamo kot enega od temeljnih dejavnikov, ki so ključni za vzdrževanje imunske homeostaze, in sicer tako v fizioloških kot patofizioloških pogojih. S številnimi raziskavami so nedvoumno dokazali, da sta neustrezno delovanje ali celo odsotnost regulatornih celic T v človeškem organizmu jasno povezana s pojavom avtoimunskih obolenj, medtem ko njihova neokrnjena prisotnost zagotavlja vzpostavitev in vzdrževanje imunske tolerance na telesu lastne in tuje antigene (1-3). Poznamo številne podvrste regulatornih celic T, ki sodijo tako v populacijo CD4⁺ kakor tudi CD8⁺ limfocitov T (4). V tem preglednem članku se bomo zaradi obsežnosti področja osredotočili predvsem na dve poglavitni in hkrati najbolj raziskani vrsti regulatornih celic T, ki sta še posebej zanimivi zaradi njune potencialne uporabe za imunske celične terapije. To so CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorni limfociti T (Treg), ki se med odraščanjem razvijajo v priželjcu kot samostojna celična vrsta in so v posamezniku prisotne že od njegovega rojstva. Prepoznavnost celic

Treg je vezana predvsem na njihovo konstitutivno izražanje transkripcijskega dejavnika FoxP3. Druga vrsta regulatornih celic T se oblikuje v periferiji iz naivnih (neaktiviranih, nespominskih) limfocitov CD4⁺, in sicer pod točno določenimi pogoji. Te tako imenovane regulatorne celice Tr1 so sposobne proizvajati velike količine imunosupresivnega interlevkina-10 (IL-10), ki igra poglavitno vlogo v zaviranju imunskih odzivov. Obe vrsti celic, Treg in Tr1, lahko pridobimo in namnožimo v pogojih *in vitro* oziroma *ex vivo*, seveda v specifičnih okoljih, ki jih lahko vzpostavimo v celičnih kulturah. To pa pomeni, da bi tako pripravljene celice ob upoštevanju zahtev dobre proizvodne prakse (GMP), lahko uporabili za terapevtske namene. Prednosti tovrstnih celičnih terapij bi lahko bile, v primerjavi z običajno imunosupresijo, kot jo poznamo danes, številne. Antigensko specifične regulatorne celice bi namreč lahko zavrle prekomerne imunske odzive (kronična vnetna stanja), natanko tam, kjer se dogajajo, torej na točno določenem mestu v telesu, s čimer bi se izognili nespecifični sistemski imunosupresiji, ki povzroča številne neželene učinke. S takšno terapijo različnih avtoimunskih obolenj ter uporabo regulatornih celic T pred in po alogenskih presaditvah tkiv in organov, bi lahko vzpostavili dolgotrajno imunsko regulacijo/toleranco *in vivo*. Ker bi bile regulatorne

celice T pripravljene iz bolnikov oziroma transplantirančevih lastnih celic, bi s tem odpadla nevarnost aloreaktivnosti in alosenzibilizacije in tako kot smo že omenili, ne bi bilo potrebno uporabljati klasičnih imunosupresivov. Uporabnost imunosupresivnih celičnih terapij je zaradi številnih spodbudnih rezultatov preiskav v živalskih modelih več kot očitna, vendar zaenkrat še vedno obstajajo številne nejasnosti, kdaj in v kolikšni meri bi lahko izsledke tovrstnih predkliničnih študij uporabili pri človeku. Najpomembnejša vprašanja, ki se ob tem porajajo so namreč naslednja: katera vrsta regulatornih limfocitov T bi bila najprimernejša za uporabo v humani celični terapiji, kateri postopek priprave takšnih celic *in vitro* oz. *ex vivo* bi bil najvarnejši in najučinkovitejši ter katere človeške bolezni bi bile najprimernejše in najdovzjetnejše za takšno obliko zdravljenja.

2 Regulatorne celice T in mehanizmi njihovega delovanja

Limfocite T delimo v dve osnovni skupini, in sicer celice CD4⁺ in CD8⁺, znane tudi kot celice pomagalke (CD4⁺) in celice ubijalke (CD8⁺). Obe skupini vsebujeta številne celične podvrste. Med njimi razlikujemo naivne, ki še niso prišle v stik z antigenom, spominske, aktivirane oziroma efektorske in supresorske oz. regulatorne celice T. Prav zadnje so zaradi sposobnosti nadzorovanja imunskih odzivov v fizioloških in bolezenskih stanjih že nekaj let v središču pozornosti številnih raziskovalcev. Poznamo več vrst regulatornih celic, ki sodijo v obe osnovni skupini limfocitov T, CD4⁺ in CD8⁺ (tabela 1). V nadaljevanju bomo podrobneje opisali dve najbolj raziskani vrsti omenjenih celic, in sicer naravno prisotne limfocite Treg, ki jih opredeljuje prisotnost površinsko izraženih molekul CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ ter celice Tr1, ki lahko nastanejo na periferiji iz naivnih CD4⁺ limfocitov T in katerih poglobljena značilnost je obsežno proizvajanje IL-10. Celice Treg nastanejo pri ljudeh po rojstvu v priželjcu in pri odraslem človeku predstavljajo le 5-10 % vseh CD4⁺ limfocitov T (5). Ob izplavitvi v periferijo je repertoar njihovih T-celičnih receptorjev (TCR) usmerjen v prepoznavanje organizmu lastnih antigenov. Njihovo proliferacijo v telesu omogoča specifično prepoznavanje lastnih antigenov ob hkratni stimulaciji kostimulatorne molekule CD28 in prisotnosti interlevkina 2 (6,7). Za Treg celice je značilno izražanje naslednjih površinskih molekul: CD62L (L-selektin), CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen) ter GITR (Glucocorticoid-Induced Tumour-Necrosis factor Receptor-related protein). Specifični transkripcijski dejavnik FoxP3⁺ je ključnega pomena za imunosupresorsko delovanje celic Treg. V miših, ki so jim odstranili gen za FoxP3, je prišlo do drastičnega upada celic Treg in posledično do hitrega razvoja hude oblike limfoproliferativnega avtoimunskega sindroma. Podobno bolezensko stanje razvijajo posamezniki, ki trpijo za redko recesivno genetsko motnjo imenovano IPEX (Immunedysregulation, Polyendocrinopathy and Enteropathy, X-linked syndrome). Bolezenski znaki pri takšnih bolnikih se kažejo v zelo agresivnem razvoju avtoimunskih obolenj, ki vodijo v zgodnjo smrt. Vse to pa je posledica različnih mutacij v genu za FoxP3 (8). Mehanizem delovanja limfocitov Treg naj bi bil v veliki meri odvisen od tesnih medceličnih stikov, poleg tega pa tudi od sposobnosti Treg, da proizvajajo in izločajo topne imunosupresivne molekule. Danes vemo, da igrata poglobljeno vlogo pri zaviranju imunskih odzivov, s strani Treg,

CTLA-4 in površinsko vezani transformirajoči rastni dejavnik b (TGF- β) (9,10).

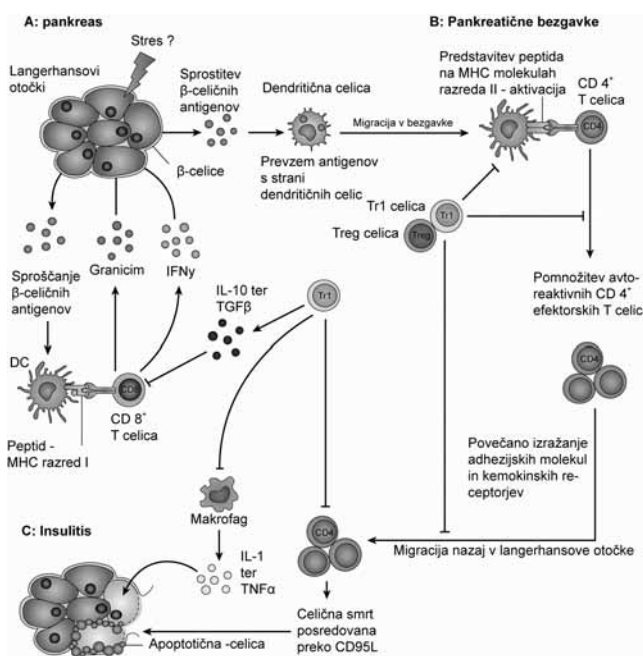
Tabela 1: Različni podtipi CD4⁺ in CD8⁺ regulatornih celic T

Table 1: Various subtypes of CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells

Celični tip	Mesto izvora	Predlagan mehanizem supresije
CD4⁺ celice T		
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ (Treg) celice	Priželjc	<i>In vitro</i> : celični kontakt <i>In vivo</i> : različni mehanizmi delovanja
CD4 ⁺ IL-10 ⁺ FoxP3 ⁻ (Tr1) celice	Periferija	IL-10, TGF- β (ne nastane v vseh primerih)
CD4 ⁺ TGF β ⁺ (Th3) celice	Periferija	TGF- β
CD8⁺ celice T		
CD8 ⁺ CD25 ⁺ celice T	Priželjc	TGF- β in CTLA-4
CD8 ⁺ CD28 ⁻ celice T	Periferija	ILT3, ILT4
CD8 ⁺ CD62 ⁺ CD122 ⁺ celice T	Ni definirano	Ni definirano
CD8 ⁺ IL-10 ⁺ celice T	Periferija	IL-10

Celice Tr1, za razliko od Treg nastanejo v periferiji iz naivnih CD4⁺ limfocitov T, za kar pa so potrebni točno določeni pogoji. Eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vpliva na razvoj celic Tr1 je citokinsko mikrokolje. Osrednjo vlogo pri tem igra IL-10. Sprva so ga uvrščali med citokine, ki so jih sposobne proizvajati le celice pomagalke vrste Th2 in ob tem ugotovili, da zavira odzive celic pomagalke vrste Th1 (11). Danes vemo, da igra IL-10 osrednjo vlogo pri nadzoru poteka vnetnih procesov, saj zavira imunske odzive limfocitov T in ohranja vzpostavljeno imunsko toleranco (12). Celic Tr1 zaenkrat ne moremo opredeliti s pomočjo značilnih površinskih molekulskih označevalcev, saj jih do sedaj še niso odkrili, zato pa imajo zelo specifičen profil proizvodnje citokinov. Tako je za celice vrste Th1 značilno izločanje IL-2 in drugih pro-vnetnih citokinov, med katere sodi interferon- γ (IFN- γ), ki je med drugim močan aktivator makrofagov. Nasprotno pa celice vrste Th2 proizvajajo citokine, ki ključno vplivajo na razvoj protitelesne (humoralne) imunosti: IL-4, IL-5, IL-13 in IL-10. Limfociti Tr1 tvorijo zelo malo oziroma nič IL-4 in IL-2, imajo pa veliko sposobnost proizvajanja IL-10 in v določenih okoliščinah tudi TGF- β (tabela 1) (13). IL-10 predstavlja osrednji mehanizem imunosupresivnega delovanja celic Tr1. Svoj delež k temu prispeva tudi TGF- β , za katerega pa še ni povsem jasno ali ga celice Tr1 lahko proizvajajo v vseh primerih.

Imunosupresorski mehanizmi delovanja celic Treg in Tr1 se med seboj sicer razlikujejo, nikakor pa se ne izključujejo. Vezani so na površinsko izražene molekule in biološko aktivne dejavnike, ki jih omenjene celice izločajo v okolje, kot na primer avtokrino in parakrino delujoči citokini, ki delujejo na vrsto imunskih in tkivnih celic v različnih stopnjah njihove aktivacije, kot je v primeru avtoimunega diabetesa prikazano na sliki 1.



Slika 1: Imunska regulacija patologije diabetesa tipa 1 z regulatornimi celicami T. β -celične antigene privzamejo dendritične celice in jih posledično predstavijo celicam T v bezgavkah. CD4⁺ in CD8⁺ celice T, specifične za omenjen antigen se aktivirajo ter migrirajo nazaj v Langerhansove otočke kjer poškodujejo pankreatične celice. Tako Tr1 kot Treg celice lahko kontrolirajo patološko aktivnost efektorskih celic T in dendritičnih celic na mnogih stopnjah razvoja bolezni.

Figure 1: The pathogenesis of type 1 diabetes and its control by regulatory T cells. β -cell antigens are taken up by dendritic cells which subsequently present these antigens to T cells in the lymph nodes. CD4⁺ and CD8⁺ T cells specific for these antigens are activated and afterwards migrate to Langerhans islets where they cause pathology. Tr1 as well as Treg cells are able to control the pathological activity of effector T cells and dendritic cells through multiple stages of disease development.

3 Celične imunske terapije

Celične terapije lahko definiramo kot uporabo živih človeških ali živalskih celic za popravilo oziroma nadomestilo okvarjenega tkiva. O celični terapiji je pred 500 leti, v svoji knjigi *Die Grosse Wundartznei*, govoril že Paracelsus. V prakso jo je leta 1931 vpeljal dr. Paul Niehans, ko je namesto transplantacije paratiroidne žleze junca v bolnico zaradi pomanjkanja časa presadek razkosal na drobne delce ter ga dispergirane v sterilni slanici neposredno injiciral v umirajočo bolnico. Zdravje se ji je hitro izboljšalo in živega je še nadaljnih 30 let. Imunski odzivi so rezultat kompleksnega delovanja različnih vrst celic, makrofagov, dendritičnih celic, CD4⁺ in CD8⁺ limfocitov T, limfocitov B, itd. Te medsebojno komunicirajo preko številnih citokinov, kemokinov, hormonov in ostalih sporočilnih oziroma signalizacijskih

biomolekul ter tako bodisi pospešujejo ali zavirajo imunski odziv. Imunski odzivi lahko organizmu varujejo pred nevarnimi dejavniki kot so bakterije, virusi in rakave celice, lahko pa organizmu tudi škodijo, v kolikor se usmerijo proti telesu lastnim antigenom (avtoimunost, kronična vnetja). Tudi v primeru alogenske transplantacije pretirana aloimunska odzivnost organizma na presadek ali presadka na prejemnika nikakor ni zaželena, saj lahko resno ogrozi bolnikovo življenje. Pri zdravih ljudeh obstajajo številni mehanizmi takoimenovane osrednje imunske tolerance, ki poskrbijo, da se potencialno nevarni limfociti, tisti katerih T-celični receptor (TCR) prekomerno prepozna telesu lastne antigene, odstranijo že med samim nastajanjem repertoarja omenjene celične vrste v priželjcu. Navkljub temu pa se v periferijo vedno izplavi nekaj takšnih celic, ki kažejo določeno zvišano mero avtoaktivnosti. Njihovo aktivacijo imunski sistem preprečuje predvsem z vzpostavljanjem periferne tolerance, s kompleksnim procesom, v katerem igrajo osrednjo vlogo regulatorne celice T.

V okviru imunskega sistema torej delujejo različne vrste celic in drugih dejavnikov, ki omogočajo njegovo aktivacijo ali supresijo. Celična terapija z bolnikovimi regulatornimi limfociti T, predhodno pripravljenimi v dovolj velikih količinah *in vitro* ter nato prenesenimi nazaj v njegov organizem, ne bi predstavljala le nadomestila njihovega premajhnega števila, pač pa tudi dodatno imunsko celično komponento, ki bi lahko uravnotežila prekomerne lokalne ali sistemske imunske odzive. Celice kot terapevtsko sredstvo, bi torej lahko učinkovito in brez neželenih vplivov nadomestile določene farmakološke učinkovine oziroma bi lahko služile kot dopolnilo klasičnim oblikam zdravljenja (adjuvantna terapija).

4 Načini pridobivanja regulatornih celic Tr1 in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ limfocitov Treg

Za osamitev limfocitov T iz vzorcev periferne krvi ter nato pripravo zelenih celic *in vitro* za njihovo kasnejšo uporabo *in vivo*, moramo nujno zagotoviti pogoje dobre proizvodne prakse. Vse korake proizvodnje celičnih pripravkov pa morajo spremljati tudi najvišji standardi kontrole kakovosti, vključno s popolno sledljivostjo (slika 2).

4.1 Pomnoževanje celic Treg *in vitro*

Poglavitna ovira pri pridobivanju limfocitov Treg je njihovo zelo majhno število v periferni krvi vsakega posameznika. Celice Treg predstavljajo namreč le 5-10 % celokupnega števila celic CD4⁺. Najbolj razširjen postopek za izolacijo specifičnih vrst imunskih celic iz periferne krvi je izolacija s pomočjo feromagnetnih kroglic, na katere so vezana specifična protitelesa, ki prepoznajo značilne površinske molekule na tarčnih celicah. Po dodatku omenjenega reagenta v celično suspenzijo le-to spustimo skozi kolono, ki jo postavimo v močno magnetno polje. To nato zadrži le ciljno populacijo imunskih celic. Odvisno od namena lahko nato uporabimo bodisi zadržane, na feromagnetne kroglice vezane celice, ali pa tiste, ki so neovirano zapustile kolono. Pri osamitvi limfocitov Treg je bistvenega pomena njihova čistost, ki mora biti nad 99%. V nasprotnem primeru namreč obstaja tveganje, da so v pridobljeni celični suspenziji prisotni tudi pred kratkim aktivirani naivni in spominski limfociti T, ki prav tako izražajo

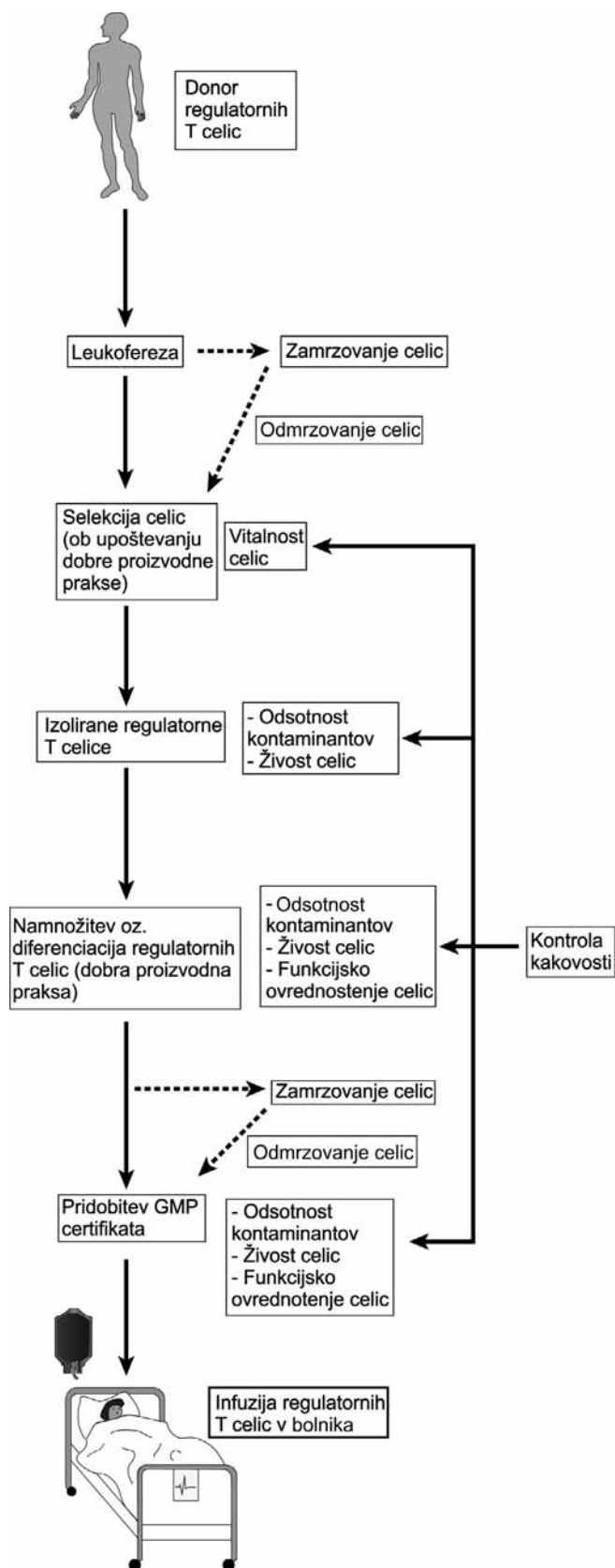
CD25. Kadar torej uspemo osamiti ustrezno čisto populacijo celic Treg, jih lahko ustrezno namnožimo *in vitro*. Značilnost omenjenih celic je, da se v pogojih *in vitro* precej nerade množijo. Ta problem lahko rešimo tako, da njihove T-celične receptorje (TCR) poliklonsko stimuliramo s protitelesi proti molekulam CD3 in CD28, ki predstavljajo najpomembnejše elemente v kompleksu aktivacijskih molekul T celičnega receptorja, ob tem pa uporabimo zelo visoke koncentracije IL-2. Tako namnoženi limfociti Treg obdržijo svoje imunosupresivne lastnosti ter izražajo pomembne površinske molekule kot sta L-selektin in kemokinski receptor CCR7, ki omogočajo potovanje celic v bezgavke, potem ko jih vrnemo bolniku. Z opisanim postopkom pa žal lahko poleg celic Treg učinkovito namnožimo tudi morebiti prisotne aktivirane in spominske limfocite T, s čimer seveda zmanjšujemo imunosupresivno učinkovitost takšnega pripravka. V prizadevanjih, da bi to preprečili, so do danes uspeli razviti en sam postopek, s katerim so uspeli doseči selektivno proliferacijo celic Treg, in sicer v prisotnosti rapamicina. Rapamicin je imunosupresivna učinkovina, za katero so ugotovili, da v ustreznih koncentracijah omogoča selektivno namnoževanje limfocitov Treg, medtem ko zavira proliferacijo efektorskih in spominskih celic CD4⁺CD25⁺T (14).

4.2 In vitro priprava celic Tr1, ki proizvajajo interlevkin-10

Za pripravo celic Tr1 *in vitro* potrebujemo naivne CD4⁺CD45RA⁺ limfocite T, osamljene iz periferne krvi darovalca oziroma bolnika. To je populacija celic T brez aktiviranih efektorskih CD4⁺CD25⁺ in spominskih CD4⁺CD45RO⁺ limfocitov T. Poglavitna prednost priprave celic Tr1 pred pripravo limfocitov Treg je v tem, da je v periferni krvi prisotno veliko večje število izhodnih naivnih celic T (do 30% vseh mononuklearnih krvnih celic) kot pa Treg (le okoli 5% vseh CD4⁺ T limfocitov). Večina CD4⁺ limfocitov T v periferiji je naivnih, kar pomeni da še niso prišli v stik z antigenom, ki bi ga lahko prepoznali s svojimi specifičnimi TCR. Če želimo iz naivnih limfocitov celic T pripraviti bodisi efektorske ali regulatorne (imunosupresivne) celice Tr1, moramo zagotoviti ustrezne specifične pogoje *in vitro*, s pomočjo katerih lahko usmerjamo njihovo preobrazbo. Pri tem je odločilen izbor citokinov, ki jih med aktivacijo izhodne populacije celic T dodamo v kulturo. Medtem ko razvoj efektorskih celic T pomagalk vzpodbujajo pro-vnetni citokini kot je na primer IL-12, nastanku limfocitov Tr1 celic botruje zlasti

Slika 2: Celosten prikaz razvoja in vrednotenja pridobivanja regulatornih celic T za uporabo v terapiji. Prikazani so potrebni koraki za pridobitev regulatornih celic T v obliki medicinskega pripravka. Izolacija, diferenciacija, njihova pomnožitev ter končna infuzija v pacienta morajo biti opravljene ob upoštevanju pravil dobre proizvodne prakse.

Figure 2: General display of development and assesement of preparation of regulatory T cells for use in cell therapy. The necessary steps for generation of regulatory T cells in terms of a medicinal product are shown. Cell isolation, differentiation, expansion along with the final infusion into the patient should be preformed in accordance with good manufacturing practice (GMP).



prisotnost IL-10. V splošnem obstajajo trije različni načini priprave regulatornih celic Tr1 *in vitro*:

1. S poliklonskim draženjem TCR s protitelesi proti ko-aktivacijskim molekulam CD3 in CD28, ob prisotnosti interleukina-10 in interferona alfa (IFN- α) (15). V tem primeru se izognemo predhodni pripravi antigen-predstavljaljočih celic (APC), konkretno najučinkovitejših med njimi, dendritičnih celic.
2. Z nezrelimi dendritičnimi celicami (DC). Dendritične celice so najpomembnejše APC in lahko v neaktiviranem oziroma nezrelem stanju vzpodbudijo nastanek regulatornih limfocitov T *in vitro*. Za ta proces potrebujemo 3 do 4 tedne, znotraj katerih v definiranih pogojih gojimo naivne limfocite CD4⁺ T v prisotnosti nezrelih DC. Tako pripravljene celice Tr1 proizvajajo velike količine IL-10 (16). V nasprotju s prej omenjenim postopkom takšen način indukcije limfocitov Tr1 ni poliklonski. Kadar izberemo dražilne nezrele DC in odzivne naivne celice T različnih oseb, takšne DC aktivirajo le aloantigensko specifične limfocite T, ki proliferirajo in ustrezno diferencirajo, medtem ko ostale celice propadejo. V primeru, da so dražilne in odzivne celice avtologne, kar pomeni, da pripadajo istemu darovalcu, moramo nezrelim DC dodati specifičen peptid, ki ga nato predstavijo naivnim limfocitom T in pri tem aktivirajo le tiste odzivne klonke, ki so sposobni prepoznati takšen antigen, vezan na lastne molekule poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti razreda II (HLA- II). Na takšen način so že uspešno pripravili regulatorne limfocite Tr1, ki so specifično zavrlj imunske odzive na točno določene avtoantigene, kot sta naprimer GAD65 (diabetes) ali mielinski bazični protein (multipla skleroza) (17,18).
3. S tolerogenimi DC. Na dendritične celice lahko med njihovo diferenciacijo vplivamo z dodatkom različnih imunosupresivnih citokinov, predvsem IL-10, TGF- β ali pa učinkovin kot so kortikosteroidi, vitamin D₃ in njegovi derivati (19) ter drugimi protivnetno delujočimi učinkovinami (20) in s tem pridobimo takšne APC, ki imajo izrazite imunosupresivne lastnosti. Z njimi lahko učinkovito izzovemo nastanek potentnih in antigensko-specifičnih regulatornih limfocitov T. Takšen način priprave celic Tr1 je vedno bolj aktualen, saj omogoča njihovo pridobitev v mnogo krajšem času kot ob uporabi nezrelih DC.

5 Bolezni, ki bi jih lahko zdravili z regulatornimi limfociti T

Predklinične študije na živalih nazorno kažejo, da si v prihodnosti lahko od uporabe regulatornih limfocitov T veliko obetamo, saj so sposobni uravnavati pretiran obseg imunskih odzivov. Dandanes se v kliniki pogosto srečujejo z neželenimi imunskimi odzivi, še posebej pri avtoimunskih obolenjih in alogenskih presaditvah tkiv in organov. Večino predkliničnih študij so do sedaj opravili na miših, in sicer v okviru različnih modelov avtoimunskih obolenj in transplantacij organov ali kostnega mozga (tabela 2). V okviru tovrstnih raziskav so uspešno preprečili nastanek diabetesa tipa 1, multiplo sklerozo oziroma EAE - eksperimentalno izzvani encefalomyelitis, revmatoidni artritis, vnetne črevesne bolezni, sistemski lupus eritematosus in številna druga obolenja (17,18,21-28). Enako uspešen je bil prenos regulatornih limfocitov Tr1 oz. Treg v miši, ki so jim presadili alogenski kostni mozeg ali organe (29-32). Na osnovi uspešnih poskusov na živalih si danes

prizadevamo za razvoj takšnih protokolov, ki bi omogočali zdravljenje enakih bolezni tudi pri ljudeh. Ovire, s katerimi se srečujemo na poti k temu cilju pa so predvsem tehnične narave in so vezane na razvoj optimiziranih postopkov, ki bi nam omogočali pridobivanje dovolj velikih količin regulatornih limfocitov T v okviru pogojev, ki jih narekuje dobra proizvodna praksa.

Alogenska transplantacija kostnega mozga oziroma krvotvornih matičnih celic (KMC) je primer, v okviru katerega številni imunologi predvidevajo uspešno uporabo regulatornih celic T za ublažitev intenzivnih aloimunskih reakcij, ki lahko nastanejo ob takšnem posegu. Gre za tako imenovano reakcijo GvHD (Graft versus Host Disease), ko efektorske aloimunske celice, ki se nahajajo v presajenem darovalčevem kostnem mozgu prepoznajo prejemnikov organizem kot tuj in ga zato napadejo. Za zdravljenje takšnega stanja v tekočih eksperimentalnih kliničnih študijah preučujejo delovanje in učinkovitost poliklonskih regulatornih celic Treg. Tovrstne limfocite T lahko uporabimo tudi za zdravljenje avtoimunskih bolezni, pri čemer pa so tiste, ki so antigensko specifične, dejansko najučinkovitejše, saj lahko z njimi ne le izboljšamo, ampak celo ozdravimo tovrstna patološka stanja. Antigensko-specifične regulatorne celice Tr1, pripravljene v pogojih *in vitro*, učinkovito zavirajo avtoimunske reakcije zoper naslednje avtoantigene: inzulin in GAD65, ki sta ključna tarčna antigena pri diabetesu tipa I, mielinski bazični protein pri multipli sklerozi ter kolagen vrste II pri revmatoidnem artritisu (33). Zlasti pri diabetesu bi bila takšna zgodnja imunoregulatorna intervencija, ko je delovanje pankreatičnih β -celic še prisotna, ključnega pomena za ohranitev njihove aktivnosti.

Uporaba regulatornih limfocitov T bi bila zaradi njihove netoksičnosti oziroma varnosti zelo primerna tudi v primeru alogenskih presaditev organov. Na takšen način bi namreč lahko vzpostavili dolgotrajno imunsko toleranco na presajene aloantigene in s tem zagotovili popoln sprejem transplantov. Večina danes uporabljenih imunosupresivnih učinkovin zaradi svojih nespecifičnih sistemskih učinkov izzove številne nežele reakcije. S pripravo aloantigensko-specifičnih regulatornih limfocitov T *in vitro* (predvsem Tr1) pa bi lahko doživljenjsko zavirali škodljive aloimunske odzive na različne presadke. Tako naprimer v znanstvenem inštitutu San Raffaele v Italiji preiskujejo možnost imunosupresivnih intervencij z antigensko-specifičnimi limfociti Tr1, in sicer v kombinaciji z imunosupresivi, ki ne vplivajo na aktivnost omenjenih celic (34).

Genetske bolezni, ki pogojujejo zmanjšano sposobnost zaviranja imunskih odzivov so prav tako željeni cilj zdravljenja z imunoregulatornimi limfociti T. V primeru recesivne motnje IPEX, kjer gre za mutacije v genu FoxP3, je vzdrževanje imunske homeostaze v telesu močno okrnjeno. V miših s podobnim sindromom so s prenosom avtolognih limfocitov Treg, pripravljenih *in vitro*, uspešno omilili nastanek številnih avtoimunskih obolenj. Pri ljudeh pa je omenjena situacija veliko bolj zapletena, saj FoxP3 ne izražajo le regulatorne celice T, temveč tudi aktivirani efektorski limfociti T. Podrobnejše poznavanje takšnih in podobnih mehanizmov imunogenetskih motenj je vsekakor bistveno za uspešne terapije na tem področju (35).

Tabela 2: Celična terapija imunsko posredovanih bolezni z regulatornimi celicami T je uspešna v številnih živalskih modelih.

Table 2: Cell therapy of immune-mediated diseases using regulatory T cells has met with success in many animal models.

Bolezen	Vrsta regulatornih celic T	Živalski model	Učinek na bolezen	Viri
Avtoimune bolezni				
Diabetes tipa 1	CD4+CD25+FoxP3+ celice specifične za BDC2.5 antigen Tr1 celice specifične za GAD65 antigen	NOD.Rag ^{-/-} miši s prenesenimi diabetogenimi celicami T	Preprečitev bolezni	21
		NOD.SCID miši s prenesenimi diabetogenimi celicami T	Preprečitev bolezni	17
Multipla skleroza	OVA-specifične Tr1 celice	Miši, imunizirane s homogenatom hrbtnjače	Preprečitev inducirane bolezni	18
Revmatoidni artritis	CD4+CD25+FoxP3+ celice	Miši – artritis inducirani s kolagenom	Preprečitev napredovanja bolezni v zgodnji fazi	25
Vnetne črevesne bolezni	CD4+CD25+FoxP3+ celice OVA-specifične Tr1 celice	Imunokompromirane miši s prenesenimi patološkimi celicami T	Ozdravitev že vzpostavljene bolezni	27
		Imunsko oslABLJENE miši s prenesenimi patološkimi celicami T	Preprečitev nastanka bolezni	26
Sistemska lupus eritematozus	Iz priželjca izolirane CD4+CD25+FoxP3+ celice	Mišji model	Vzpostavljen nadzor nad patološkim procesom	28
Transplantacije				
Graft-versus-host-disease (GVHD)	CD4+CD25+FoxP3+ celice	Presaditev alogenskega kostnega mozga pri miših	Preprečitev smrti zaradi GVHD	29
	Aloantigensko-specifične Tr1 celice	Presaditev alogenskega kostnega mozga pri miših	Preprečitev smrti zaradi GVHD	30
Zavrnitev presajenega organa	CD4+CD25+FoxP3+ celice pomnožene <i>ex vivo</i>	Presaditev alogenih pankreasnih otočkov pri miših	Preprečena zavrnitev presadka	32
	Tr1 celice inducirane <i>in vivo</i>	Presaditev alogenih pankreasnih otočkov pri miših	Preprečena zavrnitev presadka	31

6 Zaključek

Regulatorni limfociti T so bili na področju imunologije še nedolgo tega deležni le malo zanimanja, v zadnjih letih pa so se uveljavili kot pglavilni regulatorji imunskih odzivov in danes predstavljajo obetajoče dejavnike, namenjene zdravljenju imunsko pogojenih bolezni. Celične terapije avtoimunskih in kroničnih vnetnih bolezni, kakor tudi imunomodulacije poteka alogenskih transplantacij predstavljajo nove terapevtske pristope, ki bi lahko v mnogočem presegle ustaljene načine zaviranja neželenih oziroma prekomernih učinkov delovanja imunskega sistema. Pglavilna slabost uporabe klasičnih imunosupresivov, kot so kortikosteroidi, ciklosporin, rapamicin in ostalih je namreč v tem, da poleg številnih ostalih stranskih učinkov, nespecifično in na splošno zavirajo imunsko reaktivnost, kar lahko vodi v večjo dovzetnost za infekcije in večje tveganje za nastanek malignih obolenj. Z uporabo antigensko specifičnih, avtogenih, torej posameznemu bolniku ali prejemniku presadka lastnih regulatornih celic T, pripravljenih *in vitro*, pa bi se v celoti izognili vsem omenjenim neželenim učinkom. Kljub

tako obetajočim napovedim oziroma pričakovanjem pa še vedno obstajajo številna vprašnja, na katera bomo morali odgovoriti, preden bomo začeli regulatorne limfocite T uporabljati v humani medicini. Eno od najpomembnejših je vsekakor tehnična izvedba priprave tovrstnega celičnega terapevtskega sredstva. Tako bo naprimer osamitev zadostne izhodne količine CD4+CD25+FoxP3+ limfocitov Treg, zaradi njihovega zelo omejenega števila v perifernih krvi vedno težavna, še zlasti pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi, pri katerih naj bi bilo njihovo število še manjše. Regulatorne celice Tr1 lahko, kot smo že omenili, pridobimo iz naivnih CD4+ limfocitov T, ki jih je v perifernem krvnem obtoku dovolj, vendar pa zaenkrat še nimamo na razpolago dovolj učinkovitih protokolov, s katerimi bi lahko v razmeroma kratkem časovnem obdobju pripravili obsežne populacije tovrstnih antigensko-specifičnih celic *in vitro*. Ne glede na vrsto in začetno število izhodnih populacij limfocitov T, jih bo v vsakem primeru potrebno zelo učinkovito gojiti, funkcijsko usmerjati in pomnoževati ter pri tem ves čas izpolnjevati zahteve in pogoje, ki jih narekuje dobra proizvodna praksa. Poleg tega je, v nasprotju s transgenimi mišmi, pri ljudeh prisotna

izrazita inter-individualna biološka variabilnost. Pri tem moramo omeniti zlasti razlike v izjemno polimorfni genih in molekulah HLA (Human Leukocyte Antigens), ki sodijo v poglavitni kompleks tkivne skladnosti in ki pogojujejo učinkovitost predstavljanja, tako telesu lastnih kot tujih antigenov, limfocitom T. To dejstvo seveda še dodatno povečuje zahtevnost priprave učinkovitih antigensko-specifičnih regulatornih celic T. In nenazadnje, laboratorijska oprema, visoko izobraženo in specializirano osebje in vsi potrebni reagenti, ki jih potrebujemo za izdelavo celičnih terapevtikov, predstavljajo velik finančni zalogaj. Kljub številnim zahtevnim izzivom pa ostaja področje raziskav optimalne priprave, delovanja in potencialne klinične uporabe regulatornih limfocitov T še naprej zelo aktualna tema. O tem priča izjemno veliko število znanstvenih publikacij, ki so bile na tem področju objavljene v zadnjih nekaj letih. K temu pa je in bo tudi v prihodnje, po svojih najboljših močeh, prispevala tudi naša raziskovalna skupina.

Avtorji se želijo zahvaliti Tomažu Dolinarju za grafično oblikovanje prispevka.

7 Literatura

1. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12: 431-440
2. Malek TR, Bayer A. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature Rev. Immunol.* 2004; 4: 665-674
3. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 2001; 27: 68-73
4. Schevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195-201
5. Sakaguchi S, Setoguchi R, Yagi H et al. Naturally arising FoxP3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006; 305: 51-66
6. Lerman MA, Larkin J, Cozzo C et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell repertoire formation in response to varying expression of a neo-self-antigen. *J. Immunol.* 2004; 173: 236-244
7. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK et al. CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2003; 171: 3348-3352
8. Walker MR, Kasprowitz DJ, Gersuk VH et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁺ T cells. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1437-1443
9. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 253-257
10. Tanq Q, Boden EK, Henriksen KJ et al. Distinct roles of CTLA-4 and TGF- β in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 2996-3005
11. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990; 248: 1230-1234
12. Moore KW, de Waal-Malefyt R, Dang MN et al. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 683-765
13. Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R et al. Tr1 cells: From discovery to their clinical application. *Semin. Immunol.* 2006; 18: 120-127
14. Battaglia M, Stabili A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Blood* 2005; 105: 4743-4748
15. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F et al. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunol.* 2000; 166: 5530-5539
16. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 1213-1222
17. Chen C, Lee WH, Yun P et al. Induction of autoantigen-specific Th2 and Tr1 regulatory T cells and modulation of autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 2003; 171: 733-744
18. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A et al. *In Vitro* generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 603-616
19. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 610-621
20. Svajger U, Vidmar A, Jeras M. NFA renders dendritic cells tolerogenic and up-regulates inhibitory molecules ILT3 and ILT4. *International Immunopharmacology* 2008; 8: 997-1005
21. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M et al. *In Vitro*-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 2004; 199: 1455-1465
22. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K et al. CD25⁺CD4⁺ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 2004; 199: 1467-1477
23. Masteller EL, Warner MR, Tang Q et al. Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 2005; 175: 3053-3059
24. Ding Q, Lu L, Wang B et al. B7H1-Ig fusion protein activates the CD4⁺IFN- γ receptor⁺ type 1 T regulatory subset through IFN- γ -secreting Th1 cells. *J. Immunol.* 2006; 177: 3606-3614
25. Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25⁺ regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 2212-2221
26. Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742
27. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2003; 170: 3939-3943
28. Scalapino KJ, Tang Q, Bluestone JA et al. Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of *ex vivo* expanded regulatory T cells. *J. Immunol.* 2006; 177: 1451-1459
29. Taylor PA, Lees CJ, Blaazar BR. The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; 99: 3493-3499
30. Zeller JC, Panoskaltis-Mortari A, Murphy WJ et al. Induction of CD4⁺ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF- β . *J. Immunol.* 1999; 163: 3684-3691
31. Battaglia M, Stabili A, Draghici E et al. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes* 2006; 55: 40-49
32. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S et al. Regulatory T cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J. Immunol.* 2001; 167: 1945-1953
33. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 585-598
34. Spletna stran: <http://www.sanraffaele.org/static/upl/Sc/SciRep2007.pdf>
35. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 1713-1722.