

# Ruolo delle T regolatorie nel trapianto delle malattie autoimmuni

F. Lanza, A.L. Pasini, E. Mauro

U.O. Complessa di Ematologia e Centro Trapianto di Cellule Staminali, Istituti Ospitalieri di Cremona

## Riassunto

È noto che il subset di cellule T regolatorie (T-reg) svolge un ruolo fondamentale nel modulare la risposta immune. Le T-reg possono essere caratterizzate immunofenotipicamente attraverso la co-espressione di CD4/CD25<sup>high</sup> e FOXP3 intracitoplasmatico. Il trapianto di cellule staminali è entrato nella pratica comune del trattamento delle malattie autoimmuni refrattarie alla terapia convenzionale. L'effetto terapeutico del trapianto è dovuto almeno in parte alla differenziazione dei linfociti T in T-reg. Dopo espansione in vitro l'infusione di una quantità adeguata di cellule T-reg, potrebbe pertanto essere considerata un'interessante opzione terapeutica in questi pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali.

## Summary

### Role of T regulatory cells in transplantation of autoimmune diseases

It is known that subset of T regulatory (T-reg) lymphocyte plays a role in modulating immune answer. T-reg can be immunophenotypically characterized by co-expression of CD4/CD25<sup>high</sup> and intracytoplasmatic FOXP3. In medical practice bone marrow transplantation is routinely employed in the treatment of immune diseases refractory to conventional therapy. The therapeutic effect of stem cell transplantation is due to differentiation of T lymphocytes in T-reg cells. After in vitro expansion, infusion of adequate amount of T reg cells might be considered a therapeutic choice in patients with autoimmune disease treated by bone marrow transplantation.

*Key-words:* T-regulatory, FOXP3, stem cell transplantation, autoimmune disease.

La medicina rigenerativa si presenta come un settore della medicina traslazionale il cui obiettivo è rappresentato dalla ricostruzione di tessuti danneggiati da patologie, traumi, o a causa dell'invecchiamento attraverso l'uso di cellule staminali. L'impiego di cellule staminali in medicina rigenerativa si esplica attraverso tre strategie principali:

1. trapianto di cellule staminali o loro derivati;
2. uso di cellule staminali o loro derivati per la costruzione di tessuti bio-artificiali da impiantare nell'organismo (ingegneria tissutale);
3. induzione in vivo della proliferazione e differenziazione delle cellule staminali residenti, con lo scopo di rigenerare i tessuti nel sito del danno.

Le sorgenti principali di cellule staminali adulte utilizzate sono midollo osseo, sangue periferico e tessuto adiposo.

Numerosi studi hanno individuato nelle cellule T regolatorie (T-reg), grazie al loro potenziale differenziativo, alla facilità con cui crescono in coltura, una sorgente ideale di

cellule da utilizzare nella terapia cellulare<sup>1</sup>. Le T-reg sono definite come cellule T che possiedono capacità modulatoria nella risposta immune influenzando l'attività di altre cellule (cellule APC, cellule T effettrici); in particolare sono implicate nelle risposte immunitarie agli agenti infettivi, ai tumori, ai trapianti, alla gravidanza svolgendo un ruolo cruciale sia in oncologia, dove una loro deplezione rende la chemioimmunoterapia più efficace, ma anche nella terapia cellulare propriamente detta dove, al contrario, una loro implementazione potrebbe giocare un ruolo fondamentale nelle malattie autoimmuni sottoposte a trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSC)<sup>2</sup>.

Da un punto di vista fenotipico le cellule T-reg sono identificate attraverso la co-espressione del CD4/CD25<sup>high</sup>; le cellule T reg sono quindi valutabili anche nel sangue periferico grazie a metodiche immunocitofluorimetriche. Tuttavia, la sola espressione combinata CD4/CD25<sup>high</sup> non permette di individuare con precisione tale subset di cellu-

le T. Recentemente<sup>3</sup> è stata individuata l'espressione di un fattore trascrizionale, anche circolante, definito FOXP3 che viene espresso all'interno delle T-reg e che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione di IL2 e G-CFS inibendone la sintesi. A conferma di ciò mutazioni del fattore FOXP3 sono state trovate in numerose patologie a genesi autoimmune come il diabete di tipo 1, l'encefalomielite, la colite e l'artrite autoimmune<sup>4-6</sup>. La cellula in esame può essere quindi individuata attraverso l'espressione di superficie di CD4/CD25<sup>high</sup> e di FOXP3 a livello intracellulare richiedendo tuttavia quest'ultimo la fissazione e la permeabilizzazione della cellula con conseguente possibile deterioramento del segnale di fluorescenza degli altri coniugati nelle misure a più colori.

Possiamo quindi affermare che le T-reg sono un subset di cellule T che costituiscono solo il 5% circa delle cellule CD4 totali, che circolano nel sangue e sono residenti nei linfonodi, se attivate hanno la capacità di migrare nei tessuti, sono sottoposte a loro volta ad uno stretto controllo omeostatico e possiedono la capacità di sopprimere l'attività immunitaria delle altre cellule T, delle cellule B e delle cellule NK. Da quanto esposto finora si desume come le T-reg possano essere un elemento importante nell'armamentario terapeutico delle malattie auto-immuni data la loro attività immunomodulante. È ormai consolidato il ruolo del trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSC) nel trattamento di malattie autoimmuni avanzate e refrattarie alle cure convenzionali, con lo scopo di resettando il sistema immunitario generando spazio per un nuovo repertorio immunologico indotto dall'infusione delle cellule staminali emopoietiche (HSC). In particolare recentemente de Kleer e collaboratori<sup>7</sup> hanno dimostrato come l'autotrapianto nell'artrite giovanile induca sia una riprogrammazione delle cellule T reattive infiammatorie inducendole ad un fenotipo "tollerante", sia un ripristino delle cellule T-reg grazie ad una preferenziale espansione omeostatica delle cellule CD4/CD25<sup>high</sup> nella fase linfopenica post trapianto. Nell'ambito dell'utilizzo delle T-reg nel trapianto allogenico inoltre, si è potuto dimostrare come queste cellule non inducano la cosiddetta Graft Versus Host Disease (GVHD) bensì sopprimono proprio le cellule T non regolatorie del donatore senza interferire con l'attaccamento delle cellule staminali e senza abrogare l'attività antitumorale benefica delle cellule T del donatore infuse (Graft Versus Leukemia GVL)<sup>8</sup>. A tale scopo le cellule T-reg possono essere espansive in vitro per l'ottenimento di un numero, utile a fini clinici, e quindi somministrate al paziente, per via sistemica o mediante infusione locale. L'espansione policlonale in vitro delle T-reg è stata tentata in passato con la somministrazione esogena di IL2 nelle colture cellulari specifiche senza però ottenere una linea efficiente di tipo long-term. In particolare i primi tentativi richiedevano l'incubazione con cellule mononucleari allojeniche combinate con anticorpi anti CD3, IL2 e cellule linfoblastiche o attraverso l'incubazione in vitro delle cellule linfocitarie con cellule APC dendritiche autologhe associate ad IL2 e IL7<sup>9</sup>.

Anche nella nostra esperienza abbiamo dimostrato come l'incubazione di elementi CD4+ e di MSCs permetta un'au-

mentata espressione del CD25 e del FOXP3 e quindi un "viraggio fenotipico" del T CD4+ verso un habitus T-reg.

Più recentemente, Hoffmann e collaboratori hanno messo a punto una metodica di espansione in vitro valida che permette di avere un numero congruo di cellule T-reg anche utilizzabili a fini terapeutici. In particolare le cellule T-reg venivano separate da sangue intero attraverso centrifugazione con Fycoll e successivamente sottoposte a sorting immunomagnetico sfruttando l'espressione dei marcatori CD25<sup>high</sup> e CD4 quindi sottoposte ad incubazione di RPMI 1640 con FCS al 10% (Fetal Calf Serum). Le cellule così incubate venivano poste a contatto con IL2 ad alti dosaggi, anticorpi anti CD3 e anti CD28, ottenendo in 3-4 settimane un'espansione policlonale di circa 40.000 volte di elementi cellulari che conservavano le caratteristiche immunofenotipiche peculiari delle cellule T-reg<sup>10</sup>. La necessità di standardizzare i protocolli per l'isolamento, la manipolazione e la espansione di cellule T-reg per l'uso clinico è di estrema importanza sia nel trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSC) sia nel campo della medicina rigenerativa. In particolare l'implementazione della regolamentazione sempre più stringente sulla manipolazione di cellule per la terapia cellulare ha aumentato la richiesta di operare in sistemi chiusi completamente automatizzati.

## Bibliografia

1. Wing K, Fehérvári Z, Sakaguchi S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol* 2006; 18:991-1000.
2. Hoffman P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Pishesha B, Andreesen R, et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25<sup>high</sup> T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines in vitro expansion. *Blood* 2006; 108:4260-7.
3. DeJaco C, Duftner C, Loebenstein BG, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunol* 2005; 117:289-300.
4. Furtado GC, Olivares-Villagómez D, Curotto de Lafaille MA, Wensky AK, Latkowski JA, Lafaille JJ. Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Rev* 2001; 182:122-34.
5. Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY. CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL10, TGF beta, and CTLA4. *J Immunol* 2003; 171:5012-7.
6. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003; 170:3939-43.
7. de Kleer I, Vastert B, Klein M, Teklenburg G, Arkesteijn G, Yung GP, et al. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. *Blood* 2006; 107:1696-702.
8. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor type CD4(+)CD25(+)regulatory T cells suppress lethal acute graft versus host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002; 196:401-6.
9. Jiang S, Camara N, Lombardi G, Lechler RI. Induction of allopeptide specific human CD4(+)CD25(+)regulatory T cells ex vivo. *Blood* 2003; 102:2180-6.
10. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schugart LA, Andreesen R, Edinger M. Large scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25<sup>high</sup> regulatory T cells. *Blood* 2004; 104:895-903.