

## **ZNACZENIE KOMÓREK T REGULATOROWYCH W ROZWOJU TOLERANCJI NA NOWOTWÓR\***

SIGNIFICANCE OF REGULATORY T CELLS  
IN THE DEVELOPMENT OF TOLERANCE TO TUMOR

Joanna BUDNA, Mariusz KACZMAREK, Jan SIKORA

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej,  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

*Streszczenie:* Mimo że komórki układu odpornościowego naciekające guz stanowią istotną składową wielokomórkowego mikrośrodowiska raka, układ odpornościowy często zawodzi w zakresie przeciwdziałania tworzeniu i progresji nowotworu. Jedną z możliwości wyjaśnienia tego paradoksu jest obecność promujących tolerancję regulatorowych komórek T (Tregs). Komórki te są odpowiedzialne za utrzymywanie tolerancji na własne antygeny. Badania z wykorzystaniem modeli mysich wykazały ich zdolność do promowania tolerancji na nowotwór. Naciekanie przez te komórki ludzkich nowotworów i ich obecność w wysiękach nowotworowych są związane z gorszym przebiegiem klinicznym różnych typów raka. Celem pracy jest omówienie komórkowych i molekularnych mechanizmów, z których udziałem Tregs wpływają na immunologiczną odpowiedź przeciwnowotworową, a także przedyskutowanie sposobów wykorzystania tych mechanizmów dla rozwoju innowacyjnych metod immunoterapii nowotworów.

*Słowa kluczowe:* komórki T regulatorowe, tolerancja, mikrośrodowisko nowotworu.

*Abstract:* Immune cells infiltrate tumors and make up a significant component of the multicellular cancer microenvironment, yet the immune system often fails to prevent tumor formation and progression. One explanation for this paradox is the presence of tolerance-promoting regulatory T cells (Tregs). Tregs were known to be essential for maintaining self-tolerance. Tregs have been found to promote tolerance to tumors in mouse models. Treg infiltration in human tumors and malignant ascites is associated with worse clinical outcomes for various types of cancers. This review focuses on the cellular and molecular mechanisms by which Tregs influence antitumor immune responses, and also discusses how these mechanisms might be exploited to develop innovative immune-based approaches that can improve cancer therapy.

*Keywords:* regulatory T cells, tolerance, tumor microenvironment.

### **WPROWADZENIE**

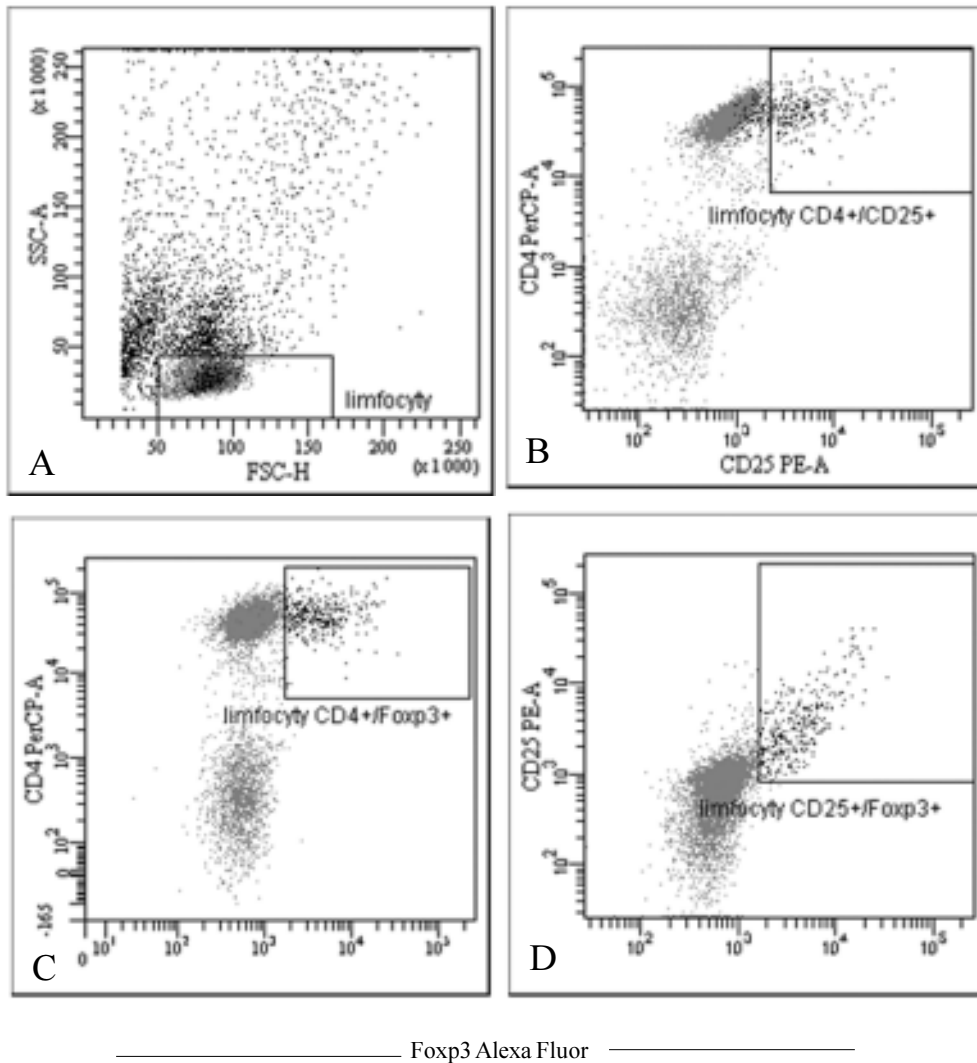
W ostatniej dekadzie określono kluczową rolę komórek T regulatorowych (Tregs) w indukcji i rozwoju obwodowej tolerancji na własne antygeny [10, 36]. Wyeliminowano

\*Praca finansowana z grantu KBN nr N N402 428839.

wanie tych komórek u myszy może indukować różne choroby o podłożu autoimmunizacyjnym, czemu można zapobiec drogą rekonstrukcji CD25<sup>+</sup> Tregs [37,52]. Liczne badania wiążą też Tregs z indukcją tolerancji na nowotwór [3, 52, 57]. Ponieważ antygeny nowotworowe pochodzą od gospodarza i wiele antygenów związanych z nowotworem to także antygeny własne, komórki Treg rozpoznają nowotwór jako własny, co aktywnie promuje tolerancję. Badania na mysich nowotworach wykazały, że deplecja Treg może znamienne nasilić odrzucanie guza i odwrotnie, transfer tych komórek może zablokować przeciwnowotworową odpowiedź z udziałem swoistych komórek CD8<sup>+</sup> [1]. Tregs są też zdolne do wzbudzania supresji komórek NK, które kontrolują wzrost guza *in vivo* [21]. Wykazano, że Tregs mogą wywoływać supresję zarówno odpowiedzi wrodzonej, jak i nabytej. Dużą liczbę Tregs stwierdza się również w krążeniu chorych na różne typy nowotworów [57]. Wzrost nacieków z komórek Tregs w guzach, jak i wysiękach nowotworowych jest związany z gorszym rokowaniem w wielu nowotworach nabłonkowych, takich jak: rak sutka, jajnika i rak wątrobowokomórkowy [13]. Celem pracy jest zebranie informacji na temat znaczenia Tregs w rozwoju tolerancji na nowotwór, komórkowych i molekularnych mechanizmów, za pomocą których Tregs zaburzają przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną oraz możliwości wykorzystania tych mechanizmów w immunoterapii nowotworów.

## TYPY KOMÓREK T REGULATOROWYCH

Komórki T ograniczające odpowiedź autoimmunizacyjną odkryto ok. 40 lat temu na podstawie stwierdzenia, że noworodkowa tymektomia myszy indukuje choroby autoimmunizacyjne, a rekonstrukcja komórek T, głównie CD4<sup>+</sup>, chroni przed nimi [11]. Nazwano je supresorowymi komórkami T. Później zidentyfikowano CD25 (łańcuch  $\alpha$  receptora dla IL-2) jako powierzchniowy marker tych komórek. Zaczęto też używać nazwy komórki T regulatorowe. Wykazano, że czynnik transkrypcyjny Foxp3 jest swoisty dla komórek T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i jest głównym regulatorem ich rozwoju i funkcji. Komórki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> zakwalifikowano jako naturalne, dojrzewające w grasicy Tregs, migrujące na obwód i stanowiące 10–15% limfocytów T CD4<sup>+</sup>. Stwierdzono, że zaburzenia w rozwoju lub funkcji tych komórek są przyczyną chorób autoimmunizacyjnych u ludzi i zwierząt. Mutacje w ludzkim genie *FOXP3* występującym na chromosomie X są przyczyną ciężkiego płodowego zaburzenia autoimmunizacyjnego zwanego IPEX (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome*). Usunięcie naturalnych Tregs z użyciem przeciwciał monoklonalnych przeciw CD25 indukuje u myszy choroby o podłożu autoimmunizacyjnym i zapalnym. Oprócz naturalnych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs, które podobnie jak inne limfocyty T dojrzewają w grasicy, Tregs mogą być także indukowane w krwi obwodowej pod wpływem różnych czynników. Po pierwsze, antygenowa stymulacja w obecności IL-10 naiwnych komórek T *in vitro* indukuje powstanie Tregs typu 1 (Tr1). Komórki Tr1 nie wykazują ekspresji Foxp3,



RYCINA 1. Komórki T regulatorowe wśród limfocytów nowotworowego wyсіęku opłucnowego: A – bramka dla limfocytów wśród komórek wyсіęku, B – limfocyty CD25+/CD4+, C, D – limfocyty CD4+ i CD25+ wykazują ekspresję Fxp3

FIGURE 1. T regulatory cells between lymphocytes of malignant pleural effusions: A – gate on lymphocytes, B – lymphocytes CD25+/CD4+, C, D – lymphocytes CD4+ and CD25+ express Fxp3

ale produkują IL-10 i TGF- $\beta$  jako główne czynniki immunosupresyjne [47]. Po drugie, antygenowa stymulacja naiwnych komórek T w obecności TGF- $\beta$  indukuje powstanie komórek pomocniczych T 3 (Th3) *in vivo* i *in vitro*, które następnie produkują TGF- $\beta$  [8]. Przynajmniej niektóre komórki Th3 nabywają ekspresję Fxp3 pod wpływem TGF- $\beta$ . Wykazano również, że IL-4 i IL-13 mogą indukować Fxp3+ Tregs z naiwnych komórek T CD4+ w procesie, który jest niezależny od IL-10 lub TGF- $\beta$  [40]. Inne komórki T mogą również wykazywać aktywność immunosupresyjną. W

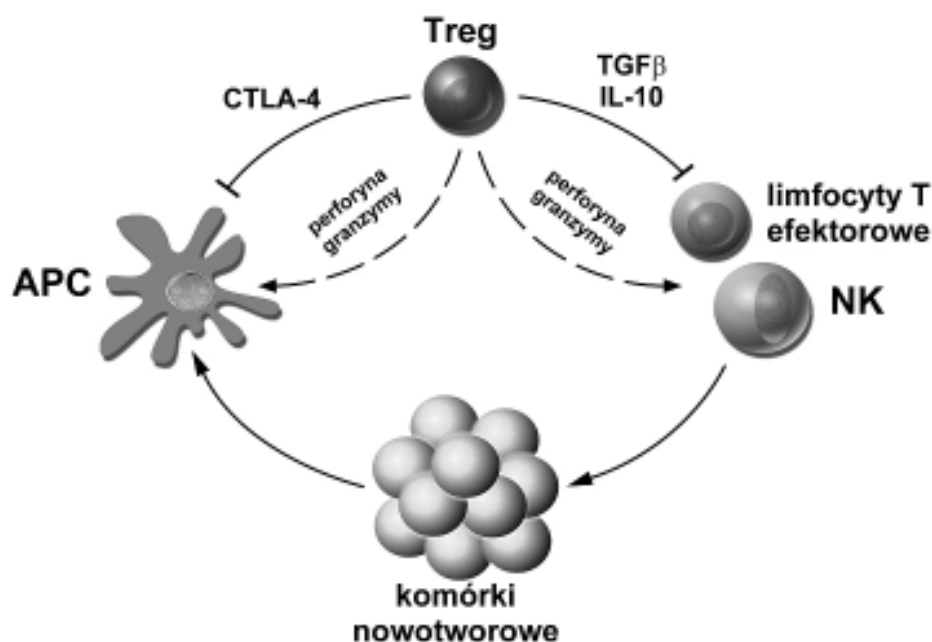
kilku pracach opisano Tregs CD8+. Niektóre spośród nich mogą produkować IL-10 lub TGF- $\beta$  ograniczające aktywację i proliferację naiwnych komórek T CD8+ [24, 49]. Antygenowa immunizacja powoduje rozrost zarówno CD4+Foxp3+ Tregs, jak i CD8+Foxp3+ Tregs *in vivo* [25]. Podwójnie ujemne CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (DN) Tregs stanowią 1–3% obwodowych limfocytów u myszy. DN Tregs są zdolne do supresji allogenicznej odpowiedzi komórek T *in vitro* i do przedłużenia przeżycia przeszczepu allogenicznego *in vivo* [8]. Podobną populację DN Tregs zidentyfikowano również u ludzi. Komórki te mogą ograniczać wywołaną antygenem aktywację i proliferację komórek T [17]. Zidentyfikowano również populację ludzkich komórek T $\gamma\delta$  zdolnych do supresji odpowiedzi naiwnych i efektorowych komórek T i do blokowania dojrzewania i funkcji komórek dendrytycznych. T $\gamma\delta$  Tregs mogą naciekać guzy sutka i odpowiadać za ich aktywność immunosupresyjną *in vivo* [19, 33].

## **MECHANIZMY BLOKOWANIA ODPOWIEDZI PRZECIWNOWOTWOROWEJ Z UDZIAŁEM KOMÓREK T REGULATORYWYCH**

Określono różne mechanizmy aktywności immunosupresyjnej komórek Tregs, w tym: przebiegające z udziałem czynników rozpuszczalnych oraz blokowanie limfocytów T zależne od cząsteczek powierzchniowych i komórek prezentujących antygen [3, 57].

### Cytokiny blokujące

Tregs mogą wydzielać cytokiny blokujące, takie jak: IL-10, TGF- $\beta$  i IL-35 i wykorzystywać je jako główne czynniki wzbudzania immunosupresji. Znaczenie IL-10 i TGF- $\beta$  w regulacji odpowiedzi immunologicznej określono na modelach zwierzęcych. Myszy *IL10*<sup>-/-</sup> i *TGF $\beta$* <sup>-/-</sup> rozwijają choroby zapalne z niekontrolowaną odpowiedzią immunologiczną. Udział tych cytokin w funkcjonowaniu Tregs udokumentowano na podstawie stwierdzenia, że CD4+CD25+ Tregs uzyskane z myszy *IL10*<sup>-/-</sup> lub *TGF $\beta$* <sup>-/-</sup> były mniej skuteczne niż naturalne Tregs w zapobieganiu rozwojowi choroby zapalnej jelit (IBD), która może być indukowana przez adoptywny transfer naiwnych CD4+CD25<sup>-</sup> komórek T do myszy limfopenicznych *Rag*<sup>-/-</sup> lub SCID. Oprócz tego IL-10 i TGF- $\beta$  odgrywają istotną rolę w kontrolowaniu reakcji alergicznych z udziałem Tregs. Wydaje się też, że IL-10 i TGF- $\beta$  są ważnymi mediatorami w ochronie przeciw eksperymentalnej autoimmunologicznej encephalomyelitis (EAE) [51], mysim modelu używanym do badań ludzkiego stwardnienia rozsianego (MS). Badania przeprowadzone na myszach NOD wykazały, że Tregs wykorzystują TGF- $\beta$  do ograniczania rozwoju cukrzycy typu I [53, 54]. Ponieważ Tregs są zaangażowane w indukcję tolerancji na nowotwór [3, 52, 57], znaczenie IL-10 i TGF- $\beta$  dla funkcji Tregs badano zarówno u chorych na nowotwór, jak i na modelach mysich nowotworów. W badaniach wykorzystujących model nowotworów indukowanych UV i myszy *IL10*<sup>-/-</sup> [29] wykazano, że IL-10 odgrywa kluczową rolę w supresji mediowanej przez CD4+CD25+ Tregs.



RYCINA 2. Mechanizmy supresji odpowiedzi przeciwnowotworowej z udziałem Tregs: Komórki te mogą wykorzystywać cytokiny blokujące (IL-10, TGF- $\beta$ ) do ograniczania aktywacji i funkcji efektorowych limfocytów T i komórek NK. Wykazujące ekspresję CTLA-4 Tregs mogą ograniczać sygnał kostymulacyjny w interakcjach z komórkami prezentującymi antygen (APC). Mogą też wykorzystywać drogę perforynowo-granzymową do zabijania APC lub limfocytów efektorowych

FIGURE 2. Mechanisms for Treg-mediated suppression of tumor immunity: Tregs can use inhibitory cytokines (IL-10, TGF- $\beta$ ) to suppress the activation and function of effector T cells and NK cells. Tregs expressing cell surface CTLA-4 can downregulate the costimulatory molecules on antigen-presenting cells to suppress the activation of effector lymphocytes. Tregs may use the perforin/granzyme pathway to kill APC or effector lymphocytes

W badaniach wykorzystujących antygenowo swoisty model mysiego raka jelita grubego wykazano, że CD4+CD25+ Tregs znoszą odrzucenie guza z udziałem CD8+ komórek T przez swoistą supresję cytotoxyczności nowotworowo swoistych komórek CD8+ [9]. TGF- $\beta$  wydaje się być niezbędny dla supresji, ponieważ ekspresja dominująco-negatywnego receptora TGF- $\beta$  przez komórki CD8+ powoduje ich oporność na supresję zależną od Tregs. Te odporne na Tregs komórki CD8+ cechuje niezaburzona cytotoxyczność, co jest związane z nasiloną zdolnością do niszczenia komórek nowotworowych [9]. Wykazano też, że peptyd blokujący, który wiąże TGF- $\beta$  z powierzchnią Treg, może nasilać odpowiedź przeciwnowotworową przez blokowanie funkcji Tregs [22]. Zaobserwowano również odwrotną zależność między aktywacją komórek NK i ekspansją Tregs u chorych z GIST (*gastrointestinal stromal tumor*). Stwierdzono, że ludzkie Treg wykorzystują błonowe wiązanie TGF- $\beta$  do

bezpośredniego blokowania funkcji efektorowych komórek NK i blokowania receptorów NKG2D na powierzchni tych komórek [21]. Mogą więc Tregs wykorzystywać TGF- $\beta$  do eliminowania zarówno komórek T CD8+, jak i NK z odpowiedzi przeciwnowotworowej. Badania nad Tregs uzyskanymi od chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi wykazały, że ludzkie Tregs są zdolne do supresji odpowiedzi przeciwnowotworowej z udziałem mechanizmów zależnych od IL-10, jak i TGF- $\beta$  [41]. W uzupełnieniu do nich wykazano, że mysie Tregs produkują nową blokującą cytokinę IL-35. Odgrywa ona ważną rolę w przebiegającym z udziałem Tregs łagodzeniu IBD [16]. Nie jest jednak konstytutywnie ekspozowana przez ludzkie Tregs [2]. Myszy z niedoborem IL-35 nie wykazują objawów chorób zapalnych lub autoimmunizacyjnych [12]. Nie ukazały się doniesienia na temat znaczenia IL-35 w funkcjonowaniu Treg w przebiegu chorób nowotworowych.

### Cytotoksyczność

Komórki T CD8+ i komórki NK na drodze perforynowo/granzymowej eliminują komórki zakażone przez wewnątrzkomórkowe patogeny lub komórki nowotworowe. Te cytotoksyczne limfocyty wykorzystują perforynę do transportu granzymów do komórek docelowych, gdzie granzymy A i B indukują apoptozę na drodze degradacji DNA. Myszy z niedoborem perforyny (*Prfl*<sup>-/-</sup>) są bardziej podatne na spontaniczne chłoniaki, co sugeruje, że droga perforynowo/granzymowa odgrywa istotną rolę w nadzorze immunologicznym w niektórych typach nowotworów. Jednak ostatnie badania sugerują, że Tregs mogą wykorzystywać cytotoksyczność z udziałem perforyny i granzymów jako mechanizm supresji. Wykazano, że ludzkie Tregs aktywowane przez przeciwciała przeciw CD3 i przeciw CD46 wykazują ekspresję granzymów A i B i mogą zabijać autologiczne komórki układu odpornościowego. To zabijanie z udziałem Tregs jest zależne od perforyny i niezależne od FasL. Komórki CD4+ i CD8+ stymulowane przez przeciwciała monoklonalne przeciw CD3/CD28 (jak też niedojrzałe mieloidalne komórki dendrytyczne i monocyty) są szczególnie wrażliwe na lizę zależną od Treg. Podobnie aktywowane Tregs blokują proliferację limfocytów B stymulowanych LPS i indukują ich śmierć. Komórki te wykazują ekspresję granzymu B i perforyn [55]. W badaniach *in vivo*, z wykorzystaniem systemu inokulacji guza i adoptywnego transferu Tregs wykazano, że droga perforynowo-granzymowa odgrywa kluczową rolę w supresji odpowiedzi na nowotwór z udziałem Treg. Wykazano również, że o ile granzym B jest nieobecny w spoczynkowych Tregs u myszy, to jest indukowany przez lokalne czynniki w mikrośrodowisku guza [6]. Oprócz perforyn i granzymów wykazano, że Tregs CD4+CD25+Foxp3+ uzyskane od chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi, w przeciwieństwie do izolowanych od zdrowych dawców, wykazują ekspresję FasL. Komórki te pod wpływem aktywacji i wysokich dawek IL-2, mogą eliminować autologiczne komórki CD8+ (ale nie CD4+) na drodze apoptozy z udziałem Fas/FasL [42]. Wykazano również, że aktywowane *in vitro* mysie Tregs mogą indukować apoptozę komórek efektorowych CD4+ z udziałem TRAIL/DR5 (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand/death receptor 5*) [35].

### Blokowanie komórek prezentujących antygen

W uzupełnieniu do bezpośredniego blokowania efektorowych limfocytów przez cytokiny immunosupresyjne i cząsteczki cytotoksyczne, Tregs mogą także ograniczać odpowiedź immunologiczną przez wpływ na komórki prezentujące antygen (APC). W badaniach wzajemnych oddziaływań Tregs, komórek T efektorowych (Tef) i komórek dendrytycznych (DC) w środowisku węzłów chłonnych wykazano z zastosowaniem mikroskopii przyżyciowej, że o ile aktywność Tef jest ograniczana w obecności wzrastającej liczby Tregs, to nie stwierdzono stabilnych asocjacji między tymi komórkami. Przeciwnie, Tregs są zdolne do bezpośrednich interakcji z DC wiążącymi antygen. Wydaje się, że stały kontakt między Tregs i DC prowadzi do zablokowania aktywacji Tef [45]. Tregs ograniczają tworzenie się stabilnych związków między Tef i DC w czasie prezentacji antygeny w węzłach chłonnych [43]. Na poziomie molekularnym wykazano, że antygen cytotoksycznych limfocytów T (CTLA-4), konstytutywnie ekspozowany przez Tregs pod kontrolą Foxp3, może obniżać ekspresję cząsteczek kostymulujących (CD80, CD86) na komórkach prezentujących antygen, co prowadzi do ograniczania aktywacji komórek T [31]. Z wykorzystaniem systemu Foxp3-Cre X Floxed CTLA-4 wykazano, że swoisty niedobór CTLA-4 w Tregs jest przyczyną spontanicznego rozwoju systemowych chorób limfoproliferacyjnych i autoimmunizacyjnych u myszy. Niedobór CTLA-4 w obrębie Tregs może także indukować silną odpowiedź przeciwnowotworową przez osłabienie supresyjnych właściwości Tregs. Jest więc CTLA-4 podstawową cząsteczką efektorową odpowiedzialną za wzbudzenie tolerancji, w tym także tolerancji na nowotwór [50]. Oprócz ograniczania zdolności APC do aktywowania innych komórek T, interakcje między Tregs i APC z udziałem CTLA-4 mogą prowadzić do wzrostu produkcjiIDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) przez APC. Jest to enzym niezbędny do degradacji tryptofanu. IDO powoduje supresję komórek T i promuje tolerancję guza. Wzrost aktywności IDO może obniżać poziom tryptofanu, dlatego prowadzi do blokowania proliferacji komórek T. Oprócz tego degradacja tryptofanu z udziałem IDO może generować toksyczne metabolity powodujące apoptozę limfocytów Th1. Plazmocytoidalne komórki dendrytyczne produkujące IDO izolowane z zajętych przez nowotwór węzłów chłonnych są zdolne do bezpośredniego aktywowania Tregs w warunkach restrykcji MHC na drodze zależnej od CTLA-4 [39]. Aktywowane Tregs powodują wzrost ekspresji ligandu programowanej śmierci 1 (PD-L1) i PD-L2 na komórkach dendrytycznych, co prowadzi do blokowania odpowiedzi ze strony efektorowych komórek T [39]. Te badania sugerują, że dodatnie sprzężenie zwrotne między komórkami dendrytycznymi wykazującymi ekspresję IDO i Tregs wykazującymi ekspresję CTLA-4 może prowadzić do zablokowania efektorowych komórek T i spowodować immunotolerancję guza.

### INNE MECHANIZMY

W uzupełnieniu do omówionych wcześniej, obecnie proponuje się też inne mechanizmy supresji przebiegające z udziałem Tregs. Na przykład, Tregs wykazują ekspresję ektoenzymów CD39 i CD73, które mogą rozszczepiać zewnątrzkomórkowe

kowy ATP, co generuje immunosupresyjną adenozyne blokującą funkcje efektorowych komórek T przez aktywację adenozyнового receptora 2A [46]. Tregs wykazują wysoki poziom cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP). W czasie kontaktu z efektorowymi komórkami T, Tregs mogą dostarczać cAMP do komórek efektorowych, co potencjalnie blokuje syntezę IL-2 i proliferację komórek T [4]. Tregs nie wpływają na wczesną aktywację lub proliferację efektorowych komórek CD4+. Jednak wykazując wysoką ekspresję receptora dla IL-2 mogą funkcjonować jako „zmiatacz” IL-2 pozbawiający efektorowe komórki CD4+ tej cytokiny. Brak IL-2 aktywuje proapoptotyczne białko Bim, co prowadzi efektorowe komórki T do apoptotycznej śmierci [32].

### AKTYWACJA Tregs INDUKOWANA PRZEZ NOWOTWÓR

Istnieje wiele dowodów na to, że guz może wpływać na swoje środowisko komórkowe w celu ograniczenia odpowiedzi immunologicznej. Dużą liczbę CD4+CD25+Foxp3+ Tregs znaleziono w krążeniu i w mikrośrodowisku guza chorych na raka płuc, sutka, jelita grubego, żołądka, wątroby, trzustki, jajnika oraz na białaczkę, chłoniaka i czerniaka [57]. Zwiększone naciekanie guza nowotworowego przez Tregs jest związane z gorszym przebiegiem klinicznym nowotworów pochodzenia nabłonkowego, takich jak: rak jajnika, sutka czy rak wątrobowo-komórkowy [13]. Co więcej, o ile nacieki z komórek CD8+ są związane z korzystną prognozą, to wzrost stosunku Tregs do komórek CD8+ pozwala przewidywać skrócenie czasu przeżycia u chorych z rakiem jajnika [38]. Sugeruje to, że zależność między Tregs i limfocytami efektorowymi w mikrośrodowisku raka kształtuje równowagę między odpornością i tolerancją. Wyniki wielu badań sugerują, że nowotwór może ograniczać odpowiedź immunologiczną przez promowanie rekrutacji, ekspansji i aktywacji Tregs [34]. W przypadku raka jajnika wykazano, że komórki nowotworowe i makrofagi w mikrośrodowisku guza produkują chemokinę CCL22, która rekrutuje Tregs do masy guza. Ta swoista rekrutacja Tregs może tłumaczyć mechanizm, za pomocą którego guz tworzy miejsce immunologicznie uprzywilejowane. Badania chorych z rakiem przewodu pokarmowego wykazały, że ekspresja chemokin CCL17 i CCL22 w obrębie guza koreluje ze wzrostem naciekania przez Tregs [30]. Wykazano, że Tregs są selektywnie rekrutowane i aktywowane w obrębie nacieków limfocytarnych otaczających pierwotne guzy sutka [23]. Ich ocena *ex vivo* sugeruje, że te CD4+CD25+Foxp3+ komórki mogą być naturalnymi Tregs wykazującymi ekspresję receptora chemokinowego CCR4 i są selektywnie rekrutowane do mikrośrodowiska guza przez interakcje CCR4/CCL22. Komórki te mogą być wybiórczo aktywowane przez komórki dendrytyczne, prezentujące antygeny związane z guzem, które indukują proliferację Treg w środowisku guza, co pociąga za sobą blokowanie aktywacji efektorowych komórek, ucieczkę immunologiczną i w końcu progresję nowotworu [23]. Tregs indukowane przez guz mogą powstawać zarówno z naturalnych Tregs, jak i z naiwnych komórek T [56]. Sygnały płynące z interakcji TCR-antygen są



determinantami grasiczej selekcji i różnicowania Tregs [26]. Kontrolują też ich obwodową aktywację [27]. Stosowanie szczepionek antygenowych w leczeniu nowotworów jednocześnie wzbudza Tregs i komórki efektorowe. Jednak Tregs mogą mieć relatywnie wyższe powinowactwo do antygeny w porównaniu z komórkami efektorowymi [37]. W rezultacie ekspansja Tregs może być dominującym elementem odpowiedzi na szczepionki nowotworowe, tłumiąc ekspansję swoistych nowotworowo efektorowych komórek T i prowadząc do wzrostu tolerancji na antygeny nowotworowe [56]. Dodatkowo, sygnał cytokinowy także reguluje rozwój, funkcje i homeostazę komórek Tregs. IL-2 jest niezbędna dla ich ekspansji i aktywacji [18]. IL-4, IL-7 i IL-15 mogą również wspierać ich rozwój i funkcje [5, 28]. Pozostaje niewyjaśnione, czy któraś z cytokin z rodziny IL-2 jest włączona w aktywację Treg indukowaną przez nowotwór. Wiele guzów i związanych z guzem komórek układu odpornościowego produkuje IL-10 i TGF- $\beta$ , które promują proliferację naturalnych Tregs, a także konwersję nieregulatorowych komórek T w Tregs [3, 57]. Podobnie jak inne komórki CD4+, Tregs są aktywowane w warunkach restrykcji MHC klasy II. Jednak większość guzów nie wywodzi się z komórek prezentujących antygen, nie wykazuje ekspresji antygenów MHC klasy II i nie może prezentować antygenów bezpośrednio komórkom Treg CD4+. W konsekwencji antygeny nowotworowe z większym prawdopodobieństwem są krzyżowo prezentowane przez APCs podczas indukowanej przez guz aktywacji Tregs. Wykazano, że komórki dendrytyczne wykazujące fenotyp niedojrzałych komórek mieloidalnych są rekrutowane do drenujących węzłów chłonnych w czasie progresji guza i że te DC selektywnie promują proliferację naturalnych Treg na drodze zależnej od TGF- $\beta$  [20]. Plazmocytoidalne DCs izolowane z drenujących guz węzłów chłonnych aktywują Tregs w procesach wykorzystujących MHC II, CTLA-4 iIDO [39].

Podsumowując, mechanizmy aktywacji Treg indukowane przez guz wymagają bardziej jednoznacznego wyjaśnienia. Jest to proces wielostopniowy i przebiegający z udziałem wielu sygnałów. Sygnał chemokinowy wydaje się być ważny dla migracji Treg do mikrośrodowiska nowotworu, gdzie APCs mogą wykorzystywać cząsteczki MHC II do prezentacji antygenów związanych z guzem. Prezentacja antygeny i kostymulacja mogą indukować proliferację Tregs. Cytokiny produkowane przez guz lub komórki układu odpornościowego także mogą promować ekspansję naturalnych Tregs i konwersję innych komórek T w Tregs. Cytokiny i inne czynniki białkowe mogą być włączane w nasilanie supresyjnych funkcji Tregs związanych z nowotworem.

## **Tregs CELEM IMMUNOTERAPII NOWOTWORÓW**

Immunosupresja z udziałem Tregs pozostaje jedną z głównych przeszkód dla efektywnej immunoterapii nowotworów. Szczepionki oparte na antygenach nowotworowych są efektywne w ograniczonym zakresie [15], ponieważ mogą aktywować Tregs i znacznie tłumić odpowiedź przeciwnowotworową [56]. Denileukin diftitox (Ontak) jest rekombinowanym białkiem fuzyjnym składającym się z toksyny

diphtheria i ludzkiej IL-2 [16]. Początkowo stosowano je w leczeniu skórnych chłoniaków T komórkowych charakteryzujących się wysoką ekspresją łańcucha  $\alpha$  receptora dla IL-2 (CD25) w błonie komórkowej. Ontak wiąże się z receptorem dla IL-2, jest internalizowany na drodze endocytozy i blokuje syntezę białek powodując śmierć komórki [16]. Badania kliniczne wykazały, że Ontak cechuje selektywna toksyczność wobec Tregs. Obiektywną odpowiedź kliniczną uzyskano w leczeniu chorych z przerzutami czerniaka, raka jajnika i nowotworów układu krwiotwórczego [14, 16]. Przeciwciała monoklonalne przeciw CTLA-4 (ipilimumab i tremelimumab) są w trakcie badań fazy I i fazy II u chorych z przerzutami czerniaka [48]. Ponieważ CTLA-4 jest eksponowana zarówno na efektorowych komórkach T, jak i na Tregs, dokładny mechanizm efektu blokady tej cząsteczki nie jest całkowicie poznany [15]. Obecne badania wykazują, że deplecja Tregs lub zablokowanie ich funkcji może nasilić odpowiedź przeciwnowotworową na modelu mysim i u chorych na raka. Jednak ten sposób postępowania może także wyindukować choroby o podłożu autoimmunizacyjnym. [37, 52]. Blokada CTLA-4 u chorych jest związana z zapaleniem jelita grubego, skóry i pęcherzyków płucnych [15]. Lepsze zrozumienie mechanizmów aktywacji Tregs indukowanej przez guzy i ich wpływu na funkcje tych komórek może stanowić główny kierunek rozwoju innowacyjnych podejść selektywnie przełamujących tolerowanie guza z udziałem Tregs, bez eliminacji tolerancji na własne antygeny. Tregs można aktywować na różnych poziomach i wykorzystując różne mechanizmy wzbudzania odpowiedzi immunologicznej [44]. Ostatnie badania wykazały, że spoczynkowe Tregs nie wykazują ekspresji granzymu B. Jest on indukowany w Tregs związanych z nowotworem [6]. Ponadto, w przeciwieństwie do myszy *Foxp3*<sup>-/-</sup>, *TGF $\beta$* <sup>-/-</sup> lub *CTLA4*<sup>-/-</sup>, które zawsze ulegają chorobom autoimmunizacyjnym, myszy pozbawione obydwu kopii genu kodującego granzym B (*GzmB*<sup>-/-</sup>) wykazują znamienne nasiloną zdolność do odrzucania nowotworów przeszczepialnych [6]. Ustalenia te mogą mieć poważne konsekwencje dla immunologii nowotworów. Na przykład, blokowanie granzymu B w Tregs może być skuteczniejsze od globalnej delecji tych komórek. Oznacza to, że hamowanie granzymu B może poprawić odporność przeciwnowotworową, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności Tregs do zapobiegania procesom autoimmunizacyjnym.

## PODSUMOWANIE

W ostatnich latach nastąpił ogromny postęp w zakresie zrozumienia funkcji Tregs w odpowiedzi przeciwnowotworowej. Badania prowadzone na modelach mysich i na materiale ludzkim dostarczyły wielu dowodów na poparcie tezy, że Tregs promują tolerancję na guz. Manipulowanie Tregs stanowi zatem obiecującą strategię immunoterapii nowotworów. Rzeczywiście, kilka sposobów postępowania mających na celu eliminację Tregs lub hamowanie ich funkcji daje wymierne, znajdujące odzwierciedlenie w badaniach przedklinicznych i klinicznych, korzyści. Ponieważ jednak Tregs są istotne w kontroli tolerancji na własne antygeny, takie podejście może spowodo-

wać szkodliwe efekty uboczne, w tym choroby autoimmunizacyjne. Wydaje się więc, że selektywna eliminacja Tregs związanych z nowotworem może być lepszą strategią niż całkowita deplecja tych komórek. Najnowsze badania wskazują kilka krytycznych punktów w zakresie indukowanej przez guz aktywacji Treg, takich jak: rekrutacja z udziałem chemokin, stymulowana przez APC proliferacja i indukowana przez cytokiny proliferacja i/lub różnicowanie. Badania na zwierzętach sugerują istnienie wielu mechanizmów wzbudzania tolerancji z udziałem Tregs. Mechanizmy te obejmują udział cytokin, cząsteczek powierzchniowych i cytotoksycznych oraz komórki prezentujące antygen. Są one intensywnie badane u chorych na raka i na mysich modelach raka. Kluczową kwestią jest to, czy Tregs związane z nowotworem tłumią odpowiedź przeciwnowotworową przy pomocy mechanizmów innych niż te, które przeciwdziałają autoimmunizacji. Ich określenie może doprowadzić do wprowadzenia strategii leczenia opartych na swoistych dla guza funkcjach komórek T regulatorowych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANTONY PA, PICCIRILLO CA, AKPINARLI A, FINKELSTEIN SE, SPEISS PJ, SURMAN DR, et al. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 2005; **174**: 2591–2601.
- [2] BARDEL E, LAROUSSIERE F, CHARLOT-RABIEGA P, COULOMB-L'HERMINE A, DEVERGNE O. Human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* 2008; **181**: 6898–6905.
- [3] VON BOEHMER H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; **6**: 338–344.
- [4] BOPPT, BECKER C, KLEIN M, KLEIN-HESSLING S, PALMETSHOFER A, SERFLING E et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007; **204**: 1303–1310.
- [5] BURCHILL MA, YANG J, VANG KB, MOON JJ, CHU HH, LIO CW et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 2008; **28**: 112–121.
- [6] CAO X, CAI SF, FEHNIGER TA, SONG J, COLLINS LI, PIWNICA-WORMS DR et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007; **27**: 635–646.
- [7] CARRIER Y, YUAN J, KUCHROO VK, WEINER HL. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol* 2007; **178**: 172–178.
- [8] CHEN W, ZHOU D, TORREALBA JR, WADDELL TK, GRANT D, ZHANG L. Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells. *J Immunol* 2005; **175**: 3409–3416.
- [9] CHEN ML, PITTET MJ, GORELIK L, FLAVELL RA, WEISSLEDER R, VON BOEHMER H et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 419–424.
- [10] CHORAŻY-MASSALSKA M, KONTNY E, MAŚLIŃSKI W. Kontrola odpowiedzi immunologicznej przez naturalne (CD4+CD25+) komórki regulatorowe. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 771–789.
- [11] CHORAŻY-MASSALSKA M, KONTNY E, MAŚLIŃSKI W. Naturalne komórki regulatorowe (CD4+CD25+). *Post Biol Kom* 2006; **33**: 71–80.
- [12] COLLISON LW, WORKMAN CJ, KUO TT, BOYD K, WANG Y, VIGNALI KM et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; **450**: 566–569.
- [13] CURIEL TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1167–1174.
- [14] DANNULL J, SU Z, RIZZIERI D, YANG BK, COLEMAN D, YANCEY D et al. Enhancement of vaccinemeditated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2005; **115**: 3623–3363.

- [15] DOUGAN M, DRANOFF G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 83–117.
- [16] DUVIC M, TALPUR R. Optimizing denileukin diftitox (Ontak) therapy. *Future Oncol* 2008; **4**: 457–469.
- [17] FISCHER K, VOELKL S, HEYMANN J, PRZYBYLSKI GK, MONDAL K, LAUMER M et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha  $\beta$ + CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* 2005; **105**: 2828–2835.
- [18] FONTENOT JD, RASMUSSEN JP, GAVIN MA, RUDENSKY AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; **6**: 1142–1151.
- [19] GAJEWSKI TF. The expanding universe of regulatory T cell subsets in cancer. *Immunity* 2007; **27**: 185–187.
- [20] GHIRINGHELLI F, PUIG PE, ROUX S, PARCELLIER A, SCHMITT E, SOLARY E et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 2005; **202**: 919–929.
- [21] GHIRINGHELLI F, MENARD C, TERME M, FLAMENT C, TAIEB J, CHAPUT N et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005; **202**: 1075–1085.
- [22] GIL-GUERRERO L, DOTOR J, HUIBREGTSE IL, CASARES N, LOPEZ-VAZQUEZ AB, RUDILLA F et al. *In vitro* and *in vivo* down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta 1. *J Immunol* 2008; **181**: 126–135.
- [23] GOBERT M, TREILLEUX I, BENDRISS-VERMARE N, BACHELOT T, GODDARD-LEON S, ARFI V et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009; **69**: 2000–2009.
- [24] HAHN BH, SINGH RP, LA CAVA A, EBLING FM. Tolerogenic treatment of lupus mice with consensus peptide induces Foxp3-expressing, apoptosis-resistant, TGFbeta-secreting CD8+ T cell suppressors. *J Immunol* 2005; **175**: 7728–7737.
- [25] HARIBHAI D, LIN W, RELAND LM, TRUONG N, WILLIAMS CB, CHATILA TA. Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J Immunol* 2007; **178**: 2961–2972.
- [26] HSIEH CS, ZHENG Y, LIANG Y, FONTENOT JD, RUDENSKY AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 2006; **7**: 401–410.
- [27] JAECKEL E, VON BOEHMER H, MANNS MP. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 306–310.
- [28] LIO CW, HSIEH CS. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 2008; **28**: 100–111.
- [29] LOSER K, APELT J, VOSKORT M, MOHAUPT M, BALKOW S, SCHWARZ T et al. IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *J Immunol* 2007; **179**: 365–371.
- [30] MIZUKAMI Y, KONO K, KAWAGUCHI Y, AKAIKE H, KAMIMURA K, SUGAI H, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer* 2008; **122**: 2286–2293.
- [31] ODERUP C, CEDERBOM L, MAKOWSKA A, CILIO CM, IVARS F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006; **118**: 240–249.
- [32] PANDIYAN P, ZHENG L, ISHIHARA S, REED J, LENARDO MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007; **8**: 1353–1362.
- [33] PENG G, WANG HY, PENG W, KINIWA Y, SEO KH, WANG RF. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity* 2007; **27**: 334–348.
- [34] RABINOVICH GA, GABRILOVICH D, SOTOMAYOR EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 267–296.
- [35] REN X, YE F, JIANG Z, CHU Y, XIONG S, WANG Y. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 2076–2084.
- [36] RYBA M, MYŚLIWSKA J. Biologia naturalnych limfocytów regulatorowych CD4+CD25+. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 427–436.
- [37] SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, NOMURA T, ONO M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; **133**: 775–787.
- [38] SATO E, OLSON SH, AHN J, BUNDY B, NISHIKAWA H, QIAN F et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 18538–18543.

- [39] SHARMA MD, BABAN B, CHANDLER P, HOU DY, SINGH N, YAGITA H et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007; **117**: 2570–2582.
- [40] SKAPENKO A, KALDEN JR, LIPSKY PE, SCHULZE-KOOPS H. The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead fox P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *J Immunol* 2005; **175**: 6107–6116.
- [41] STRAUSS L, BERGMANN C, SZCZEPANSKI M, GOODING W, JOHNSON JT, WHITESIDE TL. A unique subset of CD4+CD25 high Foxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 4345–4354.
- [42] STRAUSS L, BERGMANN C, WHITESIDE TL. Human circulating CD4+ CD25+ high Foxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 2009; **182**: 1469–1480.
- [43] TADOKORO CE, SHAKHAR G, SHEN S, DING Y, LINO AC, MARAVER A et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells *in vivo*. *J Exp Med* 2006; **203**: 505–511.
- [44] TANG Q, BLUESTONE JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008; **9**: 239–244.
- [45] TANG Q, ADAMS JY, TOOLEY AJ, BI M, FIFE BT, SERRA P et al. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 2006; **7**: 83–92.
- [46] VIGNALI DA, COLLISON LW, WORKMAN CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 523–532.
- [47] WAN YY, FLAVELL RA. TGF- $\beta$  and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol* 2008; **28**: 647–659.
- [48] WEBER J. Overcoming immunologic tolerance to melanoma: targeting CTLA-4 with ipilimumab (MDX-010). *Oncologist* 2008; **13**(Suppl 4): 16–25.
- [49] WEI S, KRYCZEK I, ZOU L, DANIEL B, CHENG P, MOTTRAM P et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2005; **65**: 5020–5026.
- [50] WING K, ONISHI Y, PRIETO-MARTIN P, YAMAGUCHI T, MIYARA M, FEHERVARI Z et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; **322**: 271–275.
- [51] WORKMAN CJ, SZYMCAK-WORKMAN AL, COLLISON LW, PILLAI MR, VIGNALI DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 2603–2622.
- [52] YAMAGUCHI T, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; **16**: 115–123.
- [53] YOU S, ALYANAKIAN MA, SEGOVIA B, DAMOTTE D, BLUESTONE J, BACH JF et al. Immunoregulatory pathways controlling progression of autoimmunity in NOD mice. *Ann NY Acad Sci* 2008; **1150**: 300–310.
- [54] YOU S, LEFORBAN B, GARCIA C, BACH JF, BLUESTONE JA, CHATENOUUD L. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 6335–6340.
- [55] ZHAO DM, THORNTON AM, DiPAOLO RJ, SHEVACH EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006; **107**: 3925–3932.
- [56] ZHOU G, DRAKE CG, LEVITSKY HI. Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood* 2006; **107**: 628–636.
- [57] ZOU W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 295–307.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 14.02.2011

Przyjęto: 15.03.2011.

Jan Sikora, Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

60-806 Poznań, ul. Rokietnicka 5D

e-mail: jan-sikora@wp.pl