

Z Rheumatol 2009 · 68:337–339  
 DOI 10.1007/s00393-009-0458-y  
 Online publiziert: 2. April 2009  
 © Springer Medizin Verlag 2009

#### Redaktion

A. Radbruch, Berlin  
 H. Schulze-Koops, München

K. Thümmel · A. Ramming · H. Schulze-Koops · A. Skapenko  
 Rheumaeinheit, Medizinische Poliklinik, Klinikum der Universität München

# Zelluläre Therapie von Autoimmunerkrankungen

Um die Toleranz gegen körpereigene Antigene aufrecht zu erhalten und überschießende Immunreaktionen zu vermeiden, ist die Regulation der spezifischen Immunantwort entscheidend. Sie erfolgt einerseits im Sinne einer zentralen Toleranz durch klonale Deletion im Thymus, andererseits im Sinne einer peripheren Toleranz u. a. durch immunregulatorische Zellen. Als von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz haben sich regulatorische T-Zellen (Tregs) erwiesen. Dies wird insbesondere daran deutlich, dass Polymorphismen und Mutationen in Treg-assoziierten Genen wie *foxp3* („forkhead box P3“), *ctla4* („cytotoxic T lymphocyte activation-associated protein 4“), *il2* oder *cd25* zu einer erhöhten Prädisposition für Autoimmunerkrankungen führen.

## Immunregulatorische T-Zellen

Mitte der 1990er Jahre wurde durch Transfer von  $CD25^+CD4^+$ -depletierten T-Zellen in Nacktmäuse und die sich daraufhin entwickelnden Autoimmunerkrankungen der Mäuse die heute bedeutendste Treg-Subpopulation entdeckt. Diese  $CD4^+CD25^+$ -regulatorischen T-Zellen reifen im Thymus heran und sind durch eine hohe Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 gekennzeichnet. Außerdem gibt es Tregs, die in der Peripherie aus zirkulierenden T-Zellen entstehen können, beispielsweise im Verlauf entzündlicher Prozesse aufgrund von Infektionen. Solche induzierten Tregs entstehen z. B. in Tieren nach oral induzierter Toleranz gegenüber einem bestimmten Proteinantigen oder werden *in vitro* durch Antigenstimulation von

naiven T-Zellen in Gegenwart der suppressiven Zytokine Interleukin- (IL-)10, IL-4 oder TGF („Transforming Growth Factor-“)β induziert [1]. Induzierte Tregs bilden eine heterogene Gruppe von immunregulatorischen Zellen, die je nach *In-vivo*-Lokalisation oder experimentellem System unterschiedliche Phänotypen aufweisen [2].

### Der immunmodulierende Effekt von Tregs wurde in Tiermodellen bereits nachgewiesen

Sie spielen insbesondere in der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen, beispielsweise eines Diabetes, oder einer Transplantatabstoßung eine Rolle. Kürzlich konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Tregs auch zur Behandlung einer bereits etablierten Autoimmunerkrankung eingesetzt werden können. Dabei wurden antigenspezifische *in vitro* expandierte  $CD4^+CD25^+$ -Tregs in Mäuse injiziert, die sich bereits in einer späten Phase eines klinisch manifesten Diabetes befanden. Aufgrund der Injektion dieser Zellen kam es bei den meisten Tieren zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptomatik. Interessanterweise konnten nach der Behandlung größere Mengen FOXP3<sup>+</sup>-Tregs in den Tieren nachgewiesen werden, die nicht durch Expansion aus den injizierten Tregs entstanden waren. Daraus wurde geschlossen, dass die verabreichten Tregs die Entstehung endogener Tregs induzieren [3].

Ein weiterer Wirkmechanismus von Tregs, der auf homotypischen Wechselwirkungen zwischen T-Zellen beruht, wurde kürzlich von unserer Gruppe im

Zusammenhang mit der physiologischen Immunantwort beschrieben [4].

## Bedeutung der homotypischen T-Zell/T-Zell-Wechselwirkungen

Bereits 1990 wurden T-Zell/T-Zell-Wechselwirkungen *in vitro* nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass aktivierte und anschließend bestrahlte humane T-Zellen in Co-Kultur mit autologen T-Zell-Klonen eine Proliferation der Klone induzieren. Diese T-Zell/T-Zell-Wechselwirkung wurde auch bei allogenen T-Zellen beobachtet. Sie ist MHC- („Major Histocompatibility Complex“) unabhängig, durch Adhäsionsmoleküle vermittelt und erfordert die autokrine IL-2-Sekretion der Responder-T-Zellen [5]. Kürzlich konnten solche T-Zell/T-Zell-Wechselwirkungen auch *in vivo* in der Maus mittels Scanning-Mikroskopie nachgewiesen werden. Dabei wurden lang anhaltende Kontakte zwischen aktivierten T-Zellen vor allem in der Entzündungssituation beobachtet. *In vitro* wurde vor Kurzem eine Adhäsionsmolekül-abhängige stabile T-Zell/T-Zell-Wechselwirkung mit lokaler IL-2-Sekretion beobachtet [6].

Zur näheren Charakterisierung der funktionellen Konsequenz einer homotypischen T-Zell/T-Zell-Wechselwirkung haben wir Versuche mit humanen T-Zell-Co-Kulturen durchgeführt. Dabei wurden T-Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern isoliert und unter Th1-induzierenden Bedingungen mittels Antikörpern gegen CD3 und CD28 sowie Zugabe des Zytokins IL-12 aktiviert und anschließend fixiert, um eine weitere Differenzierung der Zellen zu verhindern.

Z Rheumatol 2009 · 68:337–339  
DOI 10.1007/s00393-009-0458-y  
© Springer Medizin Verlag 2009

K. Thümmeler · A. Ramming ·  
H. Schulze-Koops · A. Skapenko  
**Zelluläre Therapie von  
Autoimmunerkrankungen**

### Zusammenfassung

Neben den natürlichen regulatorischen T-Zellen (Tregs) aus dem Thymus sind eine Vielzahl peripher induzierter Tregs von zentraler Bedeutung für die Immunhomöostase. Durch homotypische Wechselwirkungen zwischen aktivierten Effektor-T-Zellen und ruhenden Gedächtnis-T-Zellen konnten *in vitro* Tregs induziert werden, die sowohl Interleukin-10 als auch Interferon- $\gamma$  produzieren. Dieser Mechanismus in der Treg-Entstehung erlaubt neue Einblicke in die Grundlagen der T-Zell-Vakzinierung, die bereits erfolgversprechend in Pilotstudien bei Patienten mit multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis eingesetzt wurde.

### Schlüsselwörter

Homotypische T-Zell-Wechselwirkungen · Regulatorische T-Zellen · T-Zell-Vakzinierung · Autoimmunerkrankungen · Zelluläre Immuntherapie

### Cellular therapy in autoimmune disease

#### Abstract

In addition to natural thymus-derived regulatory T-cells (Tregs), peripherally-induced Tregs are of central importance in immune homeostasis. Homotypic interactions between activated effector T-cells and resting memory T-cells induced the generation of IL-10 and IFN $\gamma$  producing Tregs *in vitro*. This mechanism in Treg development allows new insights into T-cell vaccination, which has been employed in pilot trials of multiple sclerosis and rheumatoid arthritis with promising results.

#### Keywords

Cell-to-cell interaction · Regulatory T-cell · Vaccination · Autoimmune disease · Adoptive cellular immunotherapy

Diese aktivierten fixierten Effektorzellen wurden anschließend für einige Tage mit frisch isolierten Memory-T-Zellen co-kultiviert. Es zeigte sich, dass Th<sub>1</sub>-Effektor-Zellen die Proliferation und Produktion von Interferon- (IFN-) $\gamma$  und IL-10 in den ruhenden Memory-T-Zellen auslösten (■ **Abb. 1 a**).

Da IL-10 als potentes immunmodulierendes Zytokin bekannt ist, untersuchten wir die durch Kontakt mit aktivierten T-Zellen entstandenen IL-10-produzierenden T-Zellen auf deren potenzielle regulatorische Funktion hin. Die IL-10 sezernierenden, durch Kontakt mit aktivierten T-Zellen geprimten T-Zellen blockierten die Proliferation von CD25<sup>-</sup>-Effektor-T-Zellen (■ **Abb. 1 b**). Damit konnten wir erstmals zeigen, dass homotypische T-Zell/T-Zell-Wechselwirkungen zur Entstehung von induzierten Tregs führen. Dieser Mechanismus könnte als physiologische Selbstregulation als Schutz vor überschießenden T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen. In jedem Fall gibt er einen Einblick in die Mechanismen, die der T-Zell-Vakzinierung (TZV) zugrunde liegen.

### T-Zell-Vakzinierung

Bereits in den 1980er Jahren entstand das Konzept der TZV. Im Rahmen der TZV wird bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen mit autologen autoreaktiven T-Zellen vakziniert, die vorher *in vitro* expandiert und aktiviert wurden. Damit sich die Erkrankungsaktivität nicht weiter verstärkt, wird die immunogene Aktivität der Zellen zunächst mittels Bestrahlung abgeschwächt. Welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, dass eine TZV erfolgreich verläuft, ist momentan noch nicht bekannt. Man weiß allerdings, dass eine TZV *in vivo* sowohl eine spezifische (anti-idiotypisch) als auch eine unspezifische (anti-ergotypisch) T-Zell-Antwort induziert.

Ein Beispiel für eine erste konkrete Anwendungen der TZV ist die Vakzinierung von Ratten mit bestrahlten Myelin-spezifischen T-Zellen. Sie führt zur Toleranz gegenüber der Entwicklung einer mittels Myelinpeptid experimentell ausgelösten autoimmunen Enzephalitis (EAE). In

diesem *In-vivo*-Modell konnte sowohl die anti-idiotypische als auch die anti-ergotypische T-Zell-Antwort aufgeschlüsselt werden. Im Sinne einer anti-idiotypischen T-Zell-Antwort werden zunächst antigenspezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen induziert, die über den T-Zell-Rezeptor autoimmuner T-Zellen aktiviert werden. Anschließend induzieren diese anti-idiotypischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, was dazu führt, dass diese autoimmune T-Zellen supprimieren. Darüber hinaus werden im Sinne einer unspezifischen T-Zell-Antwort antigenspezifische anti-ergotypische T-Zellen durch das Erkennen von Ergotypen (Signalgeber wie beispielsweise der IL-2-Rezeptor CD25) auf autoimmunen T-Zellen induziert. Die immunmodulatorische Wirkung anti-ergotypischer T-Zellen beruht vor allem auf deren Sekretion von IL-10 und/oder TGF- $\beta$  [7].

### Die besten Erfahrungen zur TZV liegen für Patienten mit multipler Sklerose (MS) vor.

In diesem Fall werden autoreaktive pathogene T-Zellen, die gegen Myelin-Antigene gerichtet sind, durch Bestrahlung abgeschwächt und als Vakzin benutzt. Verschiedene Pilot- und Phase-I-Studien haben bereits gezeigt, dass die TZV nur mit minimalen Nebenwirkungen verbunden ist. Sie deuten auch auf eine mögliche klinische Relevanz hin [8]. So konnten beispielsweise bei 54 Patienten, die eine schubförmig remittierende MS hatten, durch Vakzinierung mit autologen Myelin-Basis-Protein- (MBP-) reaktiven T-Zellen die Hirnläsionen stabilisiert und die Rückfallrate reduziert werden [9]. Allerdings sind solche Studien nur bedingt aussagekräftig, da diese nicht doppelblind und placebokontrolliert erfolgten. Immerhin konnte durch Co-Kultur von T-Zellen aus MS-Patienten nach erfolgreicher TZV und MBP-reaktiven T-Zellen gezeigt werden, dass mehr CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatorische T-Zellen entstehen als vor der TZV. Interessanterweise exprimiert ein Teil dieser Tregs FOXP<sub>3</sub> und sezerniert IL-10 und IFN- $\gamma$ , während ein anderer Teil mit sehr geringer FOXP<sub>3</sub>-Expression nur IL-10 sezerniert [10]. Es induzieren also aktivierte abgeschwächte T-Zellen *in vivo* die Entwicklung von Tregs, die IL-10 und/oder

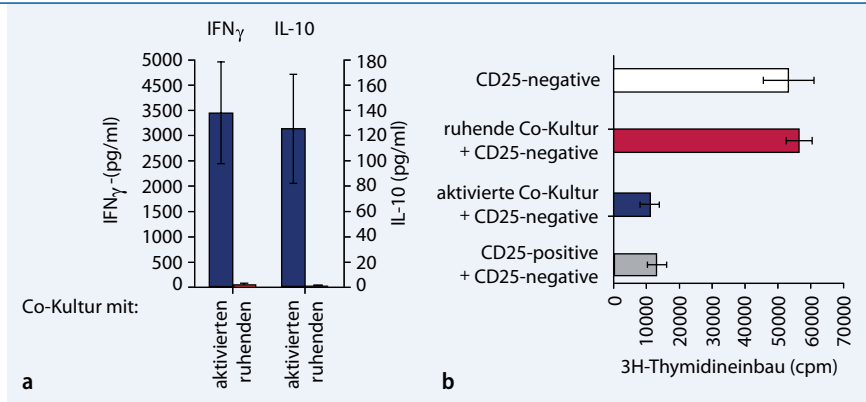
IFN- $\gamma$  sezernieren. Auch in unseren Versuchen konnten aktivierte, fixierte T-Zellen die Entwicklung von IL-10/IFN- $\gamma$ -positiven Tregs induzieren [4].

Erst kürzlich wurde eine TZV-Studie bei 16 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) durchgeführt, der genau diese anti-ergotypischen Mechanismen zugrunde liegen. Da hier kein dominantes Autoantigen bekannt ist, wurden synoviale T-Zellen *in vitro* expandiert, aktiviert und anschließend durch Bestrahlung inaktiviert, um sie dann als Vakzin zu benutzen. Auch bei den RA-Patienten kam es nur zu minimalen Nebenwirkungen. Die Wirksamkeit war dagegen eindrucksvoll: 66,7% der Patienten erreichten nach einem Jahr ein ACR-50-Ansprechen. Die Analyse der induzierten regulatorischen Mechanismen ergab, dass die TZV nicht nur zur Entwicklung CD8<sup>+</sup>-anti-idiotypischer T-Zellen, sondern auch zur Entstehung von anti-ergotypischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Tregs geführt hatte. Die anti-ergotypischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Tregs waren wiederum FOXP3- und IL-10-positiv [11].

Neben der MS und RA werden auch bei anderen Autoimmunerkrankungen erste Versuche mit der TZV unternommen. So konnte beispielsweise auch beim Krankheitsbild des systemischen Lupus erythematodes bei einigen Patienten eine klinische Verbesserung nach der TZV erreicht werden [12].

## Fazit für die Praxis

Die Untersuchung von zellulären regulatorischen Mechanismen hat nicht nur zu einem tieferen Verständnis der Physiologie des Immunsystems beigetragen, sondern auch neue Wege zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eröffnet. Inwiefern diese ersten präklinischen Studien zur TZV in alltägliche Therapien übertragbar sein werden, hängt neben der Entwicklung einer optimierten, sicheren und kostengünstigen *In-vitro*-Handhabung der zellulären Vakzine auch vom tiefen Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen ab. Homotypische T-Zell/T-Zell-Wechselwirkungen sind ein möglicher Mechanismus, bei dem antigenunabhängige Oberflächenmarker (Ergotypen) auf aktivierten T-Zellen eine Rolle spielen.



**Abb. 1** ▲ Aktivierte Th1-Effektor-T-Zellen induzieren die IFN- $\gamma$ - und IL-10-Produktion in ruhenden Gedächtnis-Effektor-Zellen. Die aus dieser T-Zell/T-Zell-Wechselwirkung resultierenden Zellen inhibieren die Proliferation von CD25<sup>-</sup>-T-Zellen. **a** IFN- $\gamma$  und IL-10 wurden mittels ELISA aus Co-Kultur-Überständen von fixierten, Effektor-T-Zellen und frisch isolierten Gedächtnis-T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der absoluten Zytokinmenge von 11 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SEM („standard error of the mean“) nach 48 Stunden Co-Kultur von T-Zellen mit fixierten, aktivierten Th1-Zellen (*blau*) oder fixierten, ruhenden Gedächtnis T-Zellen (*rot*). Aktivierte Th1-Effektor-T-Zellen induzieren eine signifikant höhere Menge an IFN- $\gamma$  und IL-10 als ruhende Effektor-T-Zellen ( $p=0,006$  für IFN- $\gamma$  und  $p=0,016$  für IL-10). **b** Der Effekt von Th1-Co-Kultur-T-Zellen auf die Proliferation von mit anti-CD3 stimulierten CD25<sup>-</sup>-T-Zellen (*weiß*) wurde mittels <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau in 4 unabhängigen Experimenten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte des <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus  $\pm$  SEM. Ruhende Co-Kultur-Zellen (*rot*) haben keinen Einfluss auf die Proliferation der CD25<sup>-</sup>-Zellen, während Th1-aktivierte Co-Kultur-Zellen (*blau*) die Proliferation der CD25<sup>-</sup>-T-Zellen signifikant ( $p=0,0052$  im Vergleich zu ruhenden Co-Kultur-Zellen) inhibieren. Die durch homotypische T-Zell/T-Zell-Wechselwirkung induzierten Zellen zeigen eine ebenso stark inhibierende Wirkung wie konventionelle CD25<sup>+</sup>-Tregs (*grau*)

## Korrespondenzadresse

### K. Thümmeler

Rheumaeinheit, Medizinische Poliklinik, Klinikum der Universität München Pettenkoferstr. 8a, 80336 München katja.thuemmler@med.uni-muenchen.de

**Interessenkonflikt.** Die korrespondierende Autorin gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

## Literatur

1. Skapenko A, Kalden JR, Lipsky PE et al (2005) The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *J Immunol* 175:6107–6116
2. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T et al (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775–787
3. Tarbell K, Petit L, Zuo X et al (2007) Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* 204:191–201
4. Thümmeler K, Ramming A, Schulze-Koops H et al (2008) Generation of regulatory T cells by homotypic T cell/T cell interaction. In: Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI). Springer, Wien
5. Brod SA, Purvee M, Benjamin D et al (1990) T-T cell interactions are mediated by adhesion molecules. *Eur J Immunol* 20:2259–2268
6. Sabatos CA, Doh J, Chakravarti S et al (2008) A synaptic Basis for paracrine interleukin-2 signaling during homotypic T cell interaction. *Immunity* 29:238–248

7. Cohen IR, Quintana FI, Mimran A (2004) Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. *J Clin Invest* 114:1227–1232
8. Achiron A, Mandel M (2004) T-cell vaccination in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 3:25–32
9. Zhang JZ, Rivera VM, Tejada-Simon MV et al (2002) T cell vaccination in multiple sclerosis: results of a preliminary study. *J Neurol* 249:212–218
10. Hong J, Zang YC, Nie H et al (2006) CD4+ regulatory T cell responses induced by T cell vaccination in patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5024–5029
11. Chen G, Li N, Zang YC et al (2007) Vaccination with selected synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56:453–463
12. Li ZG, Mu R, Dai ZP et al (2005) T cell vaccination in systemic lupus erythematosus with autologous activated T cells. *Lupus* 14:884–889