



Samenvatting proefschrift Hans Koenen

'Allo-specific immunosuppression by regulatory T cells

**Promotie 12 november 2004
Universiteit van Nijmegen**

Transplantatie van een donor orgaan of weefsels is vaak de laatste mogelijkheid om een falend orgaan of andere ernstige aandoening te genezen. Het grote probleem bij donor orgaan transplantatie is de afstotingsreactie door het immuun systeem van de ontvanger.

Bij de afstoting van een getransplanteerd orgaan spelen met name witte bloedcellen zoals T en B lymfocyten (T cel en B cel) een belangrijke rol. Hoewel antilichaam producerende B cellen zeker een rol spelen in transplantatie, richten de studies in dit proefschrift zich met name op T cellen.

T cellen hebben een sturende rol in de immunologische afstoting van een getransplanteerd orgaan. Er bestaan verschillende groepen effector T cellen; T helper cellen (CD4+ T cel) bieden hulp aan de verschillende onderdelen van afweersysteem en cytotoxische T cellen (CD8+) die het ware toxisch zijn en het donor orgaan direct aanvallen. Lijnrecht tegenover de effector cellen staan de immunoregulatorische suppressor T cellen die ervoor zorg dragen dat immuunreacties door bijvoorbeeld de effector T cellen niet uit de hand lopen. In dit proefschrift staan de suppressor T cellen centraal.

Ontvanger T cellen worden geactiveerd door weefselantigenen, de zogenaamde 'Human Leucocyte Antigens' HLA-moleculen, die aanwezig zijn op het donor orgaan. T cellen die reageren op HLA-moleculen van een ander individu worden allo-reactieve T cellen genoemd. Iedere persoon heeft een bepaalde HLA typering, hoe beter de ontvanger en de donor qua HLA typering op elkaar lijken des te kleiner is de kans op een immuunrespons door de ontvanger. De T cellen van de ontvanger herkennen de donor HLA-moleculen met hun T cel receptor. Deze eerste herkenning (Signaal 1) zet de T cel op scherp, volgen er na deze eerst herkenning costimulatoire signalen (Signaal 2) dan zal de T cel compleet geactiveerd raken en vervolgens gaan delen en functioneel actief worden.

Vandaag de dag worden organen zoals donor nieren met redelijk groot succes getransplanteerd. Dit succes is met name te danken aan de ontwikkeling van immunosuppressieve medicijnen die in de meeste gevallen de celdeling van allo-reactieve T cellen remmen. Helaas werken de meeste immunosuppressiva niet-specifiek en onderdrukken zij ook T cel immuun responsen die gericht zijn tegen pathogenen zoals virussen.



Daarnaast vertoont de overgrote meerderheid van de immunosuppressiva nadelige bijwerkingen, zoals nierschade, bloeddruk problemen en een verhoogd risico op het ontwikkelen van tumoren. Het is dus van cruciaal belang een immunosuppressieve therapie te ontwikkelen die donor (HLA) specifiek is en waarbij zo weinig mogelijk of liefst geen immunosuppressieve medicijnen meer nodig zijn. Indien transplantatie van een donor orgaan kan worden bewerkstelligd in complete afwezigheid van immunosuppressieve medicijnen, is er sprake van transplantatie tolerantie.

Transplantatie tolerantie wordt voor een belangrijk deel bepaald door de balans tussen agressieve alloreactieve T cellen en alloreactieve suppressor T cellen. Teveel agressieve effector T cellen zal leiden tot transplantaat afstoting. Voldoende suppressor T cellen daar in tegen, verhoogd de kans op transplantatie tolerantie. Manipulatie van de balans tussen effector T cellen suppressor T cellen is dan ook van groot belang bij de ontwikkeling van nieuwe immunosuppressieve therapieën die er op gericht zijn donor specifiek transplantaat tolerantie te bewerkstelligen.

Het algemene uitgangspunt in het huidige proefschrift is een omslag in de balans tussen agressieve en suppressor T cel populaties te genereren zodat transplantatie tolerantie kan ontstaan. Dit zou enerzijds kunnen plaats vinden door de activatie en groei van de effector T cellen te remmen en anderzijds door het aantal suppressor T cellen te verhogen via immuun celtherapie met suppressor cellen die in het laboratorium gekweekt zijn. Dit laatste betekent dat er voorafgaand aan de transplantatie, in het laboratorium en dus buiten het lichaam (ex-vivo), immunoregulatorie suppressor T cellen gegenereerd moeten worden die afkomstig zijn van de ontvanger en die hun remmende werking alleen kunnen uitoefenen indien zij in contact komen donor HLA-moleculen. Het genereren van ontvanger immunoregulatorie T cellen die specifiek HLA moleculen herkennen van de donor, zogenaamde donor specifiek regulatorie T cellen staat centraal in dit proefschrift. Het ligt voor de hand dat de klinische toepassing van regulatorie T cellen grote hoeveelheden cellen vereist, en het is dus van belang dat deze in het laboratorium gemaakt en opgekweekt kunnen worden. Daarnaast zal de klinische toepassing van dit soort nieuwe cellulaire therapieën gestart worden in aanwezigheid van bestaande immunosuppressieve protocollen, om elk risico op transplantaat afstoting te voorkomen. Daarom zijn in dit proefschrift de volgende vragen gesteld; I.) is het mogelijk om suppressor cellen ex vivo te laten expanderen met behoud van donor-specifieke suppressor functie en II.) hebben immunosuppressieve drugs een effect op regulatorie T cellen.

Hoofdstuk 2 beschrijft zowel de reductie van alloreactieve effector cellen alsmede de inductie van regulatorie suppressor T cellen. Met behulp van antilichamen gericht tegen costimulatorie moleculen CD40 en CD86 wordt voorkomen dat T cellen het zogenaamde signaal 2 ontvangen. Het gevolg is dat effector T cellen niet goed kunnen groeien en er geen cytotoxische T cellen geïnduceerd worden. Bovendien, leidt de costimulatorie blokkade tot regulatorie T cellen. Deze regulatorie T cellen vertonen geen groei na activatie, echter wanneer er groeifactoren zoals interleukine(IL)-2 worden toegevoegd dan zijn deze cellen wel in staat tot groei.



Deze eigenschap wordt aangeduid als T cel anergie en speelt een belangrijke rol bij transplantatie tolerantie. Daarnaast remmen deze cellen groei van effector T cellen, en kunnen dus beschouwd worden als suppressor cel. Dus, door costimulatie blokkade wordt de balans tussen effector en suppressor T cellen zodanig gewijzigd dat deze doorslaat richting suppressor cel.

Het gebruik van meerdere antilichamen tegelijkertijd voor één klinische toepassing is niet erg aantrekkelijk omdat er voor iedere component afzonderlijk tijdrovende en kostbare primaten studies noodzakelijk zijn. Bovendien dienen dit soort studies ook uitgevoerd toe worden voor de combinatie therapie. Voor een snelle klinische introductie van een costimulatie blokkade protocol waarin zowel CD40 en CD86 de therapeutisch target zijn, is de biochemische constructie van een fusie-eiwit dat de eigenschappen van zowel het anti-CD40 en anti-CD86 mAb herbergt een pre. In hoofdstuk 3 wordt de constructie en functie van een CD40/CD86 fusie-eiwit beschreven. Dit fusie-eiwit bleek functioneel vergelijkbaar met het effect dat de twee gecombineerde antilichamen vertonen. Het is te verwachten dat dit CD40/CD86 fusie-eiwit de klinische introductie van een gecombineerd anti-CD40 en anti-CD86 therapie bespoedigt.

Hoofdstuk 4 beschrijft de ex-vivo expansie (groei) van regulatoire CD4+ T cellen die zijn geïnduceerd door costimulatie blokkade. Met name is het verschil tussen de groeifactoren IL-2 en IL-15 is bestudeerd. IL-15 bleek superieur; IL-15 resulteerde in een betere groei van de regulatoire T cellen die bovendien een hoger suppressieve capaciteit vertoonde dan wanneer IL-2 werd gebruikt. De toename in groei door IL-15 was te verklaren door een verhoogde celdeling en overlevings capaciteit. IL-15 is dus een potentiële groeifactor in de ex-vivo expansie van regulatoire T cellen voor toekomstig regulatoire T cel immunotherapie in transplantatie.

Hoofdstuk 6 beschrijft het effect dat hedendaags klinisch gebruikte immunosuppressieve drugs hebben op immunoregulatoire T cellen die geïnduceerd zijn met costimulatie blokkade. Ten eerst werd het immunosuppressieve effect van de drugs rapamycine, cyclosporine A (CsA) en Tacrolimus (FK506) alleen of in combinatie geëvalueerd in het door ons gebruikte experimentele systeem (hoofdstuk 5). Geen van deze drugs resulteerde in T cel anergie. Vervolgens hebben we uitgezocht of het mogelijk is T cel anergie te induceren door costimulatie blokkade in aanwezigheid van de genoemde immunosuppressiva. Geen van de bestudeerde drugs staan de inductie van T cel anergie door costimulatie blokkade toe. Het is dus belangrijk om eerst T cel anergie te induceren alvorens de behandeling met drugs te starten. In het laatste geval bleek alleen CsA de T cel anergie ongemoeid te laten.

Met het oog op klinische gebruik van costimulatie blokkade om transplantatie tolerantie te induceren is het van groot belang het gebruik van conventionele immunosuppressiva uit te stellen zodat de inductie van tolerantie eerst plaats kan vinden. Bovendien blijkt het type drug bepalend of T cel anergie gehandhaafd blijft.

Het T cel immuunsysteem wordt in balans gehouden door een juiste verhouding tussen effector T cellen en natuurlijk voorkomende regulatoire CD4+CD25+ suppressor T cellen. (CD4+CD25+ Treg). Deze natuurlijk voorkomende CD4+CD25+ Treg bleken cruciaal in het genereren van regulatoire T cellen door costimulatie blokkade (Hoofdstuk 5).



In hoofdstuk 7 laten we zien dat de natuurlijk voorkomende CD4+CD25+ Treg bij uitstek geschikt zijn voor ex-vivo manipulatie en voor toekomstig gebruik als donor specifieke immunotherapie. Activatie van vers geïsoleerde CD4+CD25+ regulatoire T cellen afkomstig van de ontvanger met donor HLA-moleculen en T cel groeifactoren leidt er toe dat de CD4+CD25+ Treg die het donor HLA-molecuul herkennen specifiek gaan groeien. Er treed dus expansie en selectie op van donor(HLA)-specifieke CD4+CD25+ Treg. Wij hebben een methode ontwikkeld om donor(HLA)-specifieke regulatoire T cellen te isoleren en te expanderen. Tijdens het ontwikkelen van deze methode kwamen we tot de ontdekking dat er twee duidelijke verschillende subsets van regulatoire T cellen aanwezig zijn die te onderscheiden zijn door de aan- of afwezigheid van CD27 oppervlakte marker. Hoewel beide regulatoire subsets hoge suppressieve capaciteit hebben bleken met name de CD27+ regulatoire cellen heel erg krachtig, terwijl de CD27- subset een betere groei capaciteit heeft. De mogelijkheid om donorspecifieke regulatoire T cellen te isoleren is van groot belang voor donorspecifieke immunotherapie met regulatoire T cellen.

De generatie, selectie en expansie van immunosuppressieve regulatoire T cellen zoals beschreven in dit proefschrift, is een eerste stap op weg naar een donorspecifieke regulatoire T cel gemedieerde immunotherapie. Hopelijk zal het gebruik een dergelijke donorspecifieke therapie er toe leiden dat het levens lange gebruik van aspecifieke immunosuppressieve drugs kan worden verminderd, en indien er sprake is van transplantatie tolerantie kan worden gestopt.