

# La rottura della tolleranza nella patologia autoimmune e l'induzione della tolleranza nella medicina trapiantologica

Federica Barzaghi\*<sup>o</sup>, Rosa Bacchetta\*

\*San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (HSR-TIGET), Division of Regenerative Medicine, Stem Cells and Gene Therapy, Istituto Scientifico "San Raffaele", Milano; <sup>o</sup>Università Vita Salute San Raffaele, Milano

## Abstract

### *The breaking of tolerance in autoimmune diseases and its induction in transplantation medicine*

*The two main roles of the immune system are protection from infections and maintenance of immunological tolerance (avoiding "self-aggression"). Impairment of these functions results in the onset of immunodeficiency and/or autoimmunity. Here are summarized the mechanisms of immunological tolerance and the main characteristics of two paradigmatic monogenic diseases due to the loss of a tolerance mechanisms. Finally, three examples are reported regarding how the knowledge acquired on immune tolerance paved the way for the definition of new therapeutic interventions in the context of transplantation and genetic diseases with immune dysregulation.*

Quaderni acp 2014; 21(3): 122-123

*Il sistema immunitario ha un ruolo fondamentale non solo nella difesa contro i patogeni ma anche nel mantenimento della tolleranza immunologica, che protegge l'organismo dalla "autoaggressione" contro antigeni self. Esistono malattie genetiche (e non), in cui queste proprietà vengono meno, determinando l'insorgenza di immunodeficienza e/o autoimmunità. In questo lavoro sono sintetizzati i meccanismi che consentono il mantenimento della tolleranza immunologica e le caratteristiche di due malattie monogeniche paradigmatiche, caratterizzate ciascuna dalla perdita di uno dei due principali meccanismi di tolleranza. Infine, si forniscono tre esempi di come le conoscenze acquisite circa la tolleranza immunologica abbiano dato spunto per nuovi interventi terapeutici nell'ambito dei trapianti e delle malattie genetiche da immunodisregolazione.*

## Introduzione

Il sistema immunitario esercita due attività fondamentali: l'eliminazione dei patogeni e la protezione dell'organismo dalla "autoaggressione" verso antigeni self, cioè espressi dai propri tessuti e organi. L'anomalo funzionamento di tali meccanismi protettivi determina l'insorgenza rispettivamente di immunodeficienza o autoimmunità.

In particolare, per impedire che il sistema immunitario reagisca impropriamente contro antigeni self, esiste un sistema di regolazione definito "tolleranza immunologica", che consiste nel riconoscimento antigenico non seguito da eliminazione dell'antigene stesso [1].

Esistono una tolleranza immunologica centrale e una periferica. Quella centrale ha sede nel timo ed è correlata alla capacità da parte delle cellule epiteliali del timo di esprimere antigeni self, con lo scopo di presentarli ai linfociti T per selezionarli negativamente. Infatti, i linfociti T che legano antigeni self con eleva-

ta affinità vengono eliminati perché considerati potenzialmente autoreattivi. Tale meccanismo non è però infallibile ed è pertanto possibile che alcuni linfociti autoreattivi vengano immessi in circolo. A fronteggiare tale evenienza è chiamato il secondo sistema di controllo immunologico, quello periferico, rappresentato principalmente da una sottopopolazione di linfociti a funzione regolatoria. Tali linfociti T, o cellule T regolatorie, si occupano di spegnere la risposta immune ai patogeni quando questa non sia più necessaria e di eliminare, mediante vari meccanismi soppressivi, i linfociti autoreattivi che erroneamente sono sfuggiti ai meccanismi di tolleranza centrale [2-3].

### La rottura della tolleranza nella patologia autoimmune

La patogenesi delle patologie autoimmuni è ancora oggi oggetto di intenso studio. Si ipotizza che in molte di esse (es. diabete mellito di tipo 1, malattie infiammatorie croniche intestinali, artrite reu-

matoide, ...) ci sia un'interazione tra caratteristiche genetiche e fattori ambientali, che determina un'alterazione della regolazione del sistema immunitario con perdita della tolleranza verso il self [4]. In rari casi tale difetto può essere di origine genetica, dovuto alla mutazione di un singolo gene. In particolare, esistono due patologie monogeniche rappresentative della perdita dei meccanismi di regolazione: Autoimmune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy (APECED) e Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome (IPEX), paradigmi rispettivamente della perdita di tolleranza centrale e periferica. Si tratta di immunodeficienze primitive caratterizzate non tanto da infezioni gravi e frequenti, quanto dall'aumentata incidenza di multiple manifestazioni autoimmuni.

Mutazioni del gene *Autoimmune Regulator* (AIRE), fattore di trascrizione preposto a favorire l'espressione di peptidi self a livello delle cellule timiche, determinano la perdita della tolleranza centrale. Pertanto i linfociti autoreattivi vengono eliminati in maniera meno efficiente a livello timico e mediano l'aggressione autoimmune di molteplici organi. La patologia che ne deriva prende il nome di APECED. Fin dalla prima infanzia i bambini affetti possono sviluppare poliautoimmunità, principalmente caratterizzata da insufficienza surrenalica, ipoparatiroidismo e candidiasi mucocutanea. Recentemente è stato dimostrato che anche quest'ultima manifestazione è di natura autoimmune, in quanto è dovuta alla presenza di anticorpi contro una particolare citochina (IL-17), che ha un ruolo importante nella difesa contro la *Candida* [5]. Durante l'infanzia e l'adolescenza, questi bambini hanno un'elevata probabilità di sviluppare altre patologie autoimmuni quali alopecia, vitiligine, tiroidite, diabete, epatite, gastrite atrofica, insufficienza ovarica e/o testicolare. Al momento non esiste una terapia risolutiva per l'APECED e spesso la diagnosi avviene

Per corrispondenza:  
Federica Barzaghi  
e-mail: barzaghi.federica@hsr.it

aggiornamento avanzato

quando la funzione degli organi bersaglio (es. surrene, paratiroidi, pancreas) è già stata compromessa. Pertanto, i pazienti sono trattati con terapia ormonale sostitutiva, nel caso di endocrinopatia, e con terapia antifungina per la candidiasi.

Mutazioni del gene FOXP3, fattore di trascrizione che regola la funzione delle cellule T regolatorie, determinano la perdita della tolleranza periferica e quindi le cellule T regolatorie non sono più in grado di sopprimere i linfociti autoreattivi circolanti. I bambini affetti sviluppano molto precocemente una malattia autoimmune multisistemica molto grave, definita sindrome IPEX, il cui quadro clinico è caratterizzato dalla triade: enteropatia autoimmune, diabete mellito di tipo 1 ed eczema [6]. L'enteropatia rappresenta il sintomo prevalente nella quasi totalità dei casi e spesso la diarrea insorge in lattanti ancora allattati al seno. Nei più grandi non risponde a variazioni dietetiche e persiste anche in corso di nutrizione parenterale totale. Altre manifestazioni aggiuntive possono essere tiroidite, epatite e citopenie autoimmuni, alopecia, ipereosinofilia e aumento delle IgE sieriche. A oggi, sono riportati in letteratura 138 casi, di cui circa la metà diagnosticata negli ultimi tre anni, forse a testimoniare anche un recente aumento della conoscenza della patologia da parte dei clinici. Una diagnosi precoce è indispensabile per assicurare al bambino l'inizio tempestivo della terapia immunosoppressiva che consenta di superare la fase acuta della malattia e di mantenere sotto controllo l'aggressione autoimmune. L'immunosoppressione non è sufficiente a curare la malattia. L'unica possibilità per impedire l'insorgenza di altre manifestazioni, seppure gravata da elevati rischi, è il trapianto di midollo osseo. Le possibilità terapeutiche sono quindi limitate dalla disponibilità di un donatore compatibile e dalla rapidità con cui si avvia il paziente al trapianto. Bisogna infatti garantire che tale procedura venga avviata prima che il danno d'organo sia troppo avanzato e la funzionalità definitivamente compromessa.

### L'induzione della tolleranza nella medicina trapiantologica

Da quanto detto finora nell'ambito delle patologie autoimmuni, si può dedurre quale possa essere il ruolo fondamentale della tolleranza immunologica in ambito trapiantologico. Il trapianto allogenico è infatti gravato da due principali rischi:

- il rigetto del trapianto, che determina l'aggressione dell'organo trapiantato (nel trapianto di organo solido) oppure delle cellule infuse (trapianto di cellule staminali ematopoietiche = CSE) da parte del sistema immunitario del ricevente;

- la malattia del trapianto contro l'ospite (*Graft Versus Host Disease* = GVHD), che è peculiare del trapianto di CSE, e che consiste nell'aggressione di organi del ricevente (es. cute, intestino, fegato) da parte delle cellule del donatore.

Recentemente, sono state elaborate strategie per la prevenzione della GVHD e del rigetto del trapianto mediante l'utilizzo di una particolare sottopopolazione di cellule T regolatorie (Tr1) che producono una citochina molto immunosoppressiva chiamata IL-10 [7].

Nei trapianti di cellule staminali ematopoietiche per malattie linfoproliferative, l'equilibrio tra *Graft Versus Leukemia* (GVL) e GVHD è un fattore critico per il successo della terapia, in quanto si vogliono eliminare le cellule maligne (GVL) del ricevente senza ledere la funzionalità degli organi (GVHD). Per questo è stato creato un protocollo clinico definito ALT-TEN, nell'ambito del quale cellule T del donatore vengono messe a contatto con cellule presentanti l'antigene del ricevente in presenza di IL-10. Questo ha lo scopo di generare delle cellule T del donatore tolleranti (Tr1) verso antigeni presentati da cellule del ricevente. Le cellule Tr1 vengono infuse nel ricevente dopo il trapianto di CSE in modo da favorire la tolleranza da parte dei linfociti del donatore nei confronti dei tessuti del ricevente. Finora, il numero dei soggetti trattati è stato molto limitato e tuttavia il trattamento è risultato fattibile e alcuni pazienti hanno risolto la malattia completamente, con follow-up di circa 7 anni (Bacchetta et al. *Frontiers in Immunology*, in corso di stampa).

Nell'ambito del trapianto di organo solido, invece, è in corso uno studio collaborativo europeo (*ONE study*), che consiste nella prevenzione del rigetto nel trapianto di rene da donatore vivente, mediante l'utilizzo di diversi tipi di cellule regolatorie in ciascun centro, che hanno in comune l'obiettivo di indurre tolleranza immunologica nel ricevente. Una possibilità implica il prelievo dal ricevente di linfociti T che, *in vitro*, vengono messi a contatto con cellule presentanti l'antigene derivate dal donatore. Questo determina la creazione di cellule Tr1 del ricevente "tollerogeniche" (cioè in grado di mantenere la tolleranza immunologica) nei confronti di antigeni dell'organo trapiantato presentati dalle cellule del donatore [8-9]. Questi studi hanno dato impulso anche alla elaborazione di nuove prospettive terapeutiche per le malattie monogeniche da immunodisregolazione come la sindrome IPEX. Negli ultimi anni la ricerca in questo ambito si è concentrata sulla creazione di un vettore lentivirale contenente il gene FOXP3 con la finalità di

prelevare linfociti T o CSE da pazienti affetti da IPEX e creare delle cellule ingegnerizzate *in vitro*, contenenti il costrutto del gene corretto e quindi in grado di ripristinare una popolazione di cellule T regolatorie FOXP3-positive, capaci di ristabilire la tolleranza periferica [10]. Questa opzione potrebbe dare una possibilità ai bambini affetti che non possono affrontare un trapianto di CSE perché privi di donatore compatibile e rappresenterebbe una terapia mirata e razionale.

### Conclusioni

Lo studio delle malattie autoimmuni e in particolare delle rare malattie monogeniche autoimmuni (come APECED e IPEX) ha notevolmente implementato la conoscenza dei processi fisiologici e patologici inerenti alla tolleranza immunologica. Ciò ha gettato le basi per l'applicazione di nuove strategie terapeutiche mediante cellule indotte o manipolate *in vitro*, non solo nell'ambito trapiantologico (GVHD e rigetto), ma anche nell'ambito di rare malattie genetiche (come la sindrome IPEX) le quali, finora, non conoscevano altra possibilità terapeutica che il trapianto di midollo osseo (se possibile) o lunghi periodi di immunosoppressione gravata da notevoli effetti collaterali. ♦

### Bibliografia

- [1] Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. Elsevier Saunders, 2005.
- [2] Holländer GA, Peterson P. Learning to be tolerant: how T cells keep out of trouble. *J Intern Med* 2009;265(5):541-61. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02093.x.
- [3] Gregori S, Bacchetta R, Passerini L, et al. Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory T cells. *Methods Mol Biol* 2007;380:83-105.
- [4] Westerberg LS, Klein C, Snapper SB. Breakdown of T cell tolerance and autoimmunity in primary immunodeficiency-lessons learned from monogenic disorders in mice and men. *Curr Opin Immunol* 2008;20(6):646-54.
- [5] Browne SK, Holland SM. Immunodeficiency secondary to anticytokine autoantibodies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10(10):534-41. doi: 10.1097/ACI.0b013e3283402b41.
- [6] Barzaghi F, Passerini L, Bacchetta R. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity. *Front Immunol* 2012;3:211. doi: 10.3389/fimmu.2012.00211.
- [7] Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, et al. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:68-79.
- [8] Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 2010;116(6):935-44. doi: 10.1182/blood-2009-07-234872. Epub 2010 May 6.
- [9] Gregori S, Roncarolo MG, Bacchetta R. Methods for *in vitro* generation of human type 1 regulatory T cells. *Methods Mol Biol* 2011;677:31-46. doi: 10.1007/978-1-60761-869-0\_3.
- [10] Passerini L, Mel ER, Sartirana C, et al. CD4<sup>+</sup> T cells from IPEX patients convert into functional and stable regulatory T cells by FOXP3 gene transfer. *Sci Transl Med* 2013;5(215):215ra174. doi: 10.1126/scitranslmed.3007320.