

# Úloha regulačních T buněk v protinádorové imunitní odpovědi

## The Role of Regulatory T-cells in Antitumor Immune Response

Klabusay M.

Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno  
Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

Regulační T lymfocyty (Treg) jsou nezbytné v regulaci imunitní homeostázy a prevenci rozvoje autoimunitních reakcí. Regulační T buňky zabraňují vzniku autoimunitních nemocí, udržují imunitní homeostázu a modulují imunitní odpověď během infekce. Jejich aktivita je precizně kontrolována. Regulační T buňky jsou jednou ze skupin imunitních buněk, jež mohou podporovat růst nádoru. Svou funkci uskutečňují skrze inhibici efektorových T buněk a regulaci nádorového mikroprostředí pomocí produkce řady solubilních faktorů. Řada prací prokázala, že množství Treg buněk je zvýšeno u solidních nádorů i u hematologických malignit. Nicméně stále je málo známo o mechanismech, které vedou ke zvýšení a udržení zvýšených hladin Treg buněk u nádorových onemocnění. V tomto přehledu se mimo jiné zaměříme na popis funkce a fenotypu Treg buněk, jejich modulaci humorální imunitní odpovědi a interakci s nádorovými kmenovými buňkami. Nové možnosti ovlivnění účinků Treg buněk mimo jiné dovoluje i současný rozvoj moderní imunoterapie nádorů.

### Klíčová slova

regulační T lymfocyty – Foxp3 – fenotyp – humorální imunita – nádorové kmenové buňky

### Summary

Regulatory T-lymphocytes (Treg) are essential for regulation of immune homeostasis and prevention of autoimmune disease development. Regulatory T-cells prevent the onset of autoimmune diseases; they keep immune homeostasis and modulate immune response during infection. Their activity is precisely controlled. Regulatory T-cells belong to one group of immune cells, which can support tumor survival and growth. They realize their function through inhibition of effector T-cells and by regulation of tumor microenvironment through production of various soluble factors. Many publications have proven that the amount of Treg cells is elevated in both solid tumors and in hematologic malignancies. Nevertheless, little is known about mechanisms, which allow increase and maintenance of elevated Treg cells in cancer patients. In this review, we will focus, among others, on the description of function and phenotype of Treg cells, their modulation of humoral immune response and interaction with cancer stem cells. Current development of modern tumor immunotherapy allows new possibilities of influencing Treg cells function.

### Key words

regulatory T-cells – Foxp3 – phenotype – humoral immunity – cancer stem cells

Tato práce byla podpořena projektem VaVpl RECAMO – CZ.1.05/2.1.00/03.010.

This work was supported by project VaVpl RECAMO – CZ.1.05/2.1.00/03.010.

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares he has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.  
Klinika komplexní onkologické péče  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: martin.klabusay@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 2. 9. 2015

Přijato/Accepted: 10. 11. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S23>

## Úvod

Relevantní výzkum, který se zabýval supresorovými T buňkami, započal začátkem 70. let 20. století. V roce 1971 byly identifikovány tzv. supresorové buňky [1], řada problémů však zpomalila další pokrok na tomto poli. Především bylo obtížné nalézt znaky, které by odlišily regulační T buňky (Treg) od ostatních T buněk. Molekulární mechanismus imunologické suprese regulačními T buňkami tak nebyl velmi dlouho pochopen. Ačkoliv v 80. letech 20. století zůstal koncept T supresorových buněk stále zahalen rouškou tajemství, identifikace CD4<sup>+</sup> T klonů, které potlačovaly autologní protinádorovou odpověď, naznačovala, že mechanismus celulórní imunoprese stimulovaný nádorem *in vivo* musí existovat [2]. V 80. letech 20. století byly také popsány významné funkce různých cytokinů, včetně IL-10 [3]. V roce 1995 byla následně objevena koexprese antigenu CD25, a řetězce receptoru IL-2, na Treg [4]. Byly identifikovány T buňky CD4<sup>+</sup> fenotypu vysoce exprimující nízkofinitní receptor IL-2 CD25, které zabraňovaly vzniku autoimunity na zvířecím modelu. Následně byly popsány rozdílné T subpopulace zahrnující přirozené CD4<sup>+</sup>25<sup>hi+</sup> Treg buňky, indukované Treg (Tr1 a Th3 buňky) a CD4<sup>+</sup>25<sup>hi+</sup> vznikající v periférii z CD4<sup>+</sup>25<sup>-</sup> buněk [5]. U člověka není CD25 antigen zcela specifický pro Treg buňky a je exprimován v různé intenzitě také na efektorových T buňkách. Při hledání více specifického znaku byl identifikován transkripční faktor Foxp3. Charakteristickou vlastností CD4<sup>+</sup>25<sup>hi+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg buněk je schopnost aktivně inhibovat CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buňky, dendritické buňky, NK buňky, NKT buňky a B buňky při mezibuněčném kontaktu, a to také v závislosti na jejich množství.

## Funkce Treg buněk

Forkhead box P3 (Foxp3<sup>+</sup>) Treg buňky regulují mimo jiné (prevence vzniku autoimunitních chorob, regulace odpovědi na infekce virové, bakteriální a parazitické) protinádorovou a transplantační imunitní odpověď [6,7]. Treg buňky ve zdravém organismu musí navíc umožnit funkci protektivní protinádorové imu-

nity. Tyto buňky tedy modulují aktivity řady buněčných komponent, což závisí na jejich migraci do specifických tkání a mikroprostředí, aby se dostaly do kontaktu se svými cílovými buňkami. Treg buňky mohou být rozděleny do několika podskupin. Ačkoliv se Treg vyskytují v sekundárních lymfatických tkáních, mohou být nalezeny prakticky ve většině nelymfatických orgánů, dokonce bez přítomnosti zánětu [8]. Navíc se Treg buňky nacházejí v nádorové tkáni, kde mohou narušit efektivní protinádorovou odpověď [7].

Pro správnou distribuci a funkci exprimují Treg homing receptory, např. CD103 a chemokinový receptor CCR4. Ztráta exprese CCR7 např. blokuje migraci Treg do lymfatických uzlin. Treg buňky využívají pro své funkce celou řadu homing receptorů, včetně molekul CCR1 až CCR9, CXCR3 až CXCR6, integriny a ligandy P- a E-selektinu.

Existují také značné rozdíly mezi Treg v lymfatických a nelymfatických tkáních s velkou funkční i fenotypovou variabilitou. Vyvíjející se Treg v thymu jsou relativně homogenní populací CD25<sup>hi+</sup>62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> buněk. Jakmile se buňka dostane do periferie, stává se CD44<sup>hi+</sup> a zvyšuje expresi homing receptorů. CD44<sup>hi+</sup> buňky také vykazují rychlejší proliferaci; IL-10 je rovněž produkován CD44<sup>hi+</sup> Treg buňkami. Treg buňky mohou indukovat perforin dependentní cytolýzu dendritických buněk v sentinelové lymfatické uzlině nádoru [9]. Treg buňky využívají také více mechanismů, které omezují aktivitu dendritických buněk v sekundárních lymfatických tkáních.

## Fenotyp Treg buněk

Fenotyp této subpopulace T lymfocytů je nejčastěji definován jako CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Treg lymfocyty tvoří přibližně 10 % periferních CD4<sup>+</sup> T lymfocytů. CD25 se svou afinitou k IL-2 plní důležitou biologickou roli: normálně je trvale exprimován na Treg buňkách, zatímco je variabilně exprimován na aktivovaných T buňkách. Tento fakt činí antigen CD25 problematickým pro identifikaci Treg buněk. Dalším znakem Treg buněk je TNF receptor typu 2 (TNFR2). Znak CD103 je rovněž exprimován na Treg.

Skutečným strukturním znakem Treg buněk je forkhead box P3 (Foxp3) popsáný v roce 2003, který je i molekulou zprostředkující Treg funkce [10,11]. Foxp3 je extenzivně exprimován přirozenými Treg buňkami a je v současnosti jejich nejvíce specifickým markerem [12].

Glukokortikoid-induced TNF receptor-related gene (*GITR*, CD357) patří do TNFR superrodiny je exprimován v Treg buňkách ve zvýšené míře. Regulace *GITR* řídí pro- i antiapoptotické efekty a u Treg buněk ukončuje jejich supresivní aktivitu [13]. *GITR* hraje důležitou úlohu v diferenciaci přirozených Treg buněk a v expanzi přirozených i indukovaných Treg buněk [14].

Expresí transkripčního faktoru Helios z rodiny Ikaros je důležitým znakem přirozených Treg buněk [15]. Faktor Helios se váže na faktor Foxp3. Potlačení faktoru Helios významně oslabuje supresivní funkci Treg. Bylo nicméně prokázáno, že faktor Helios se vyskytuje také u indukovaných Treg buněk [16].

Metodou detekce Treg buněk je multiparametrická průtoková cytometrie zaměřená na expresi jednotlivých CD antigenů. Alternativní možností je využití metylačně senzitivní PCR, která je zacílena na demetylované oblasti TSDR regionu genu *Foxp3* [17].

## Subtypy Treg buněk

Často bývají rozlišovány přirozené Treg (nTreg) a indukované Treg (iTreg). Pro diverzitu fenotypu, secernovaných cytokinů a mechanismů suprese však musíme rozlišit nejméně čtyři (nejspíše však více než čtyři) subtypy Treg: přirozené Treg, Tr1, Th3 a Tr1-like buňky. Treg lymfocyty ve folikulárních centrech jsou označovány jako T<sub>f</sub>reg buňky [18]. Tr1, Th3 a Tr-like buňky vyžadují opakovanou antigenní stimulaci k tomu, aby mohly být generovány. Tr1 buňky produkují abundantně IL-10, který potlačuje imunitní reakci spolu s Tr1 buňkami [19–21]. Supresivní úloha Th3 buněk je zprostředkována sekrecí TGF-β, IL-4 a IL-10, zatímco Tr1-like buňky regulují nezralé dendritické buňky [22–24].

## nTreg lymfocyty

Přirozené Treg lymfocyty se vytvářejí v časných stádiích embryonálního

a neonatálního vývoje T lymfocytů. Tyto buňky se vytvářejí v thymu a poté se dostávají do periferních tkání, kde plní svou funkci. nTreg buňky jsou CD4<sup>+</sup>, exprimují vysokou úroveň CD25, CTLA-4, *GITR* a Foxp3. nTreg jsou normálně se vyskytující subpopulací T lymfocytů [25].

### iTreg lymfocyty

Klasický fenotyp této subpopulace T lymfocytů je CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Treg lymfocyty hrají podstatnou roli v zachování imunologické self-tolerance [26,27]. Funkce Treg buněk je kontrolována jednak expresí transkripčního faktoru Foxp3 [28–30] regulujícího expresi CTLA-4 a snižujícího produkci IL-2 a udržováním epigenetické specifické DNA hypometylace, která je potřeba pro stabilitu a plnou funkčnost T buněk [31].

### Tfreg lymfocyty

Kritickým faktorem v regulaci germinálních center je pomoc T lymfocytů [32,33]. Tfh buňky mají specializovanou funkci poskytující pomoc folikulárním B buňkám [34,35]. Treg buňky fenotypu CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>69<sup>-</sup> mají schopnost downregulace CCR7 a simultánní upregulace CXCR5, což jim dovoluje migrovat do B buněčné zóny [36]. V důsledku toho mohou být tyto Tfreg buňky zobrazeny v germinálních centrech [36,37]. Tfreg buňky suprimují T dependentní produkci protilátek a inhibují produkci protilátek CD40 stimulovalými B buňkami v nepřítomnosti Th buněk [36,37]. Tfreg buňky exprimují vysokou úroveň CXCR5, PD-1 a ICOS, neexprimují IL-4, IL-21 a CD40L, ale exprimují vysoké úrovně CTLA-4 a IL-10 [38]. Tfreg se diferencují z Treg buněk. Bylo také prokázáno, že Tfreg buňky kontroly expanzi Tfh buněk.

### Treg a modulační humorální imunity

Treg buňky disponují řadou mechanismů, kterými mohou modulovat humorální imunitu. Treg buňky mají široký repertoár supresivních mechanismů, který závisí na úrovni stimulů, jimž byly Treg buňky vystaveny [39]. Některé z těchto mechanismů jsou popsány v dalších odstavcích.

### CTLA-4

Inhibiční molekula CTLA-4 je vysoce exprimována na povrchu Treg buněk a hraje klíčovou úlohu v jejich inhibiční funkci limitací dostupnosti CD80 a CD86. CD80 a CD86 jsou exprimovány na antigen prezentujících buňkách (antigen presenting cells – APC) a poskytují kostimulační signály T buňkám ligací CD28 společně se signalizací skrze T buněčný receptor (TCR) [40]. Mechanizmy deplece molekul CD80 a CD86 byly recentně objasněny: CTLA-4 je schopno transendocytovat CD80/CD86 z povrchu APC do Treg buněk, kde jsou pak tyto molekuly degradovány [41]. CTLA-4 vázající se na CD80/CD86 na B buňkách může přímo ovlivňovat produkci protilátek v germinálních centrech.

### PD-1

Inhibiční receptor PD-1 je důležitým regulátorem řady imunitních regulačních drah [42]. PD-1 je upregulován na Tfh a Tfreg buňkách. PD-1 rovněž reguluje humorální imunitu. Jeho exprese je kritická pro udržení normální funkce Tfreg buněk. Za přítomnosti PD-1 mají Tfreg buňky zvýšený supresivní potenciál a zvýšenou schopnost inhibice produkce protilátek [43]. Exprese PD-1 ligandů na Treg buňkách může také hrát roli v jejich supresivní funkci. Treg specifická exprese PD-1 ligandu 1 a ligandu 2 přímo inhibuje funkci autoreaktivních B buněk s expresí PD-1 bez nutnosti zprostředkované interakce s Th buňkami [44].

### IL-10

Tento pleiotropní cytokin má komplexní úlohu v humorální imunitě a jeho funkcí je inhibovat nebo posilovat protilátkovou odpověď. Treg buňky samy vyžádají IL-10 signalizaci k udržení své funkce a kontroly IL-17 produkujících buněk [45]. Role IL-10 je komplexní, neboť B buňky, dendritické buňky, efektorové T buňky i Treg buňky exprimují IL-10R a také samy mohou produkovat IL-10.

### TGF-β

Supresivní cytokin TGF-β hraje roli v potlačení protilátkové odpovědi Treg buňkami. Membránově vázaný TGF-β zprostředkovává kontakt de-

pendentní supresi produkce protilátek B buňkami [46].

### IFN-γ a IL-12

IFN-γ a IL-12 podporují diferenciaci a funkci Th1 buněk. IFN-γ aktivně inhibuje generaci Foxp3<sup>+</sup> Treg z naivních CD4<sup>+</sup> buněk [47]. IFN-γ a IL-12 mohou jak podporovat, tak i inhibovat funkci Treg buněk v závislosti na síle cytokinové odpovědi a jejím kontextu.

### IL-6

IL-6 je široce exprimovaný cytokin s mnohočetnými funkcemi, který ovlivňuje rovněž Treg vývoj a aktivitu. IL-6 zabraňuje vzniku TGF-β indukovaných Treg buněk a místo toho spolu s TGF-β indukuje Th17 diferenciaci [48].

### Indukce apoptózy B buněk

Přímým mechanismem regulace B buněk je indukce jejich apoptózy Treg buňkami. *In vitro* aktivované Treg buňky preferenčně zabíjejí antigen prezentující B buňky. Navíc může docházet ke granzyme indukované apoptóze a Fas-FasL indukované lýze B buněk pomocí Treg buněk [49].

### Treg a nádorové kmenové buňky

Koncept nádorových kmenových buněk (cancer stem cells – CSC) by mohl být jedním z klíčů k léčbě nádorových onemocnění v budoucnu. Teorie, že CSC nebo nádor iniciující buňky (cancer initiating cells – CIC) jsou typem buněk zodpovědných za vznik a růst nádorů, získala v posledních letech značnou pozornost. Pro jejich vysokou rezistenci a potenciál iniciace nádorového růstu jsou CSC považovány za kritický faktor spojený s relapsem nádoru [50].

V hierarchickém modelu jsou nádory, podobně jako fyziologické tkáně, organizovány rozdílnými buňkami s různou schopností sebeobnovy, úrovní diferenciaci a rezistencí k léčbě. CSC, skupina buněk na vrcholu pyramidu, tvoří minoritní populaci buněk, které iniciují nádor a udržují jeho růst. Ke své definici podle koncepce kmenových buněk obecně musí CSC splňovat nejméně dvě kritéria: 1. mít schopnost iniciovat růst nádoru a 2. mít schopnost asymetrické sebeobnovy. V roce 1994 byla popsána skupina

leukemii iniciujících buněk [51]. O více než 10 let později byla prokázána kapacita CD44<sup>+</sup>24<sup>+</sup> buněk nádoru prsu iniciovat nový tumor [52]. Bohužel jednoznačné specifické markery CSC nebyly dosud identifikovány. V úloze mechanismů regulujících CSC buňky byly kromě mikroprostředí (stem-cell niche) prokázány tři dráhy: Wnt, Hedgehog a Notch. Podle stochastického modelu CSC představují volatilní kompartment, do něhož náhodně vstupují non-CSC buňky, a narušují tak představu klasického hierarchického modelu [53].

Regulační T lymfocyty zprostředkovávají svou funkci pomocí inhibice efektorových T buněk a regulací nádorového mikroprostředí sekrecí řady solubilních faktorů. Zde je možno sledovat styčné plochy Treg a CSC. Některé práce uvádějí přítomnost Treg jako nezávislý prognostický faktor u některých typů nádorů. Analýza interakce mezi Treg buňkami a CSC je předmětem současného výzkumu.

#### Kontrola CSC Treg buňkami prostřednictvím angiogeneze

Angiogeneze se podílí na působení Treg buněk na CSC. Je zde především důležitý vliv cévního niche a VEGF na regulaci kmenových vlastností CSC. Erlotinib, her-2 blokátory a bevacizumab inhibují CSC v nádorech se sníženou cévní denzitou. Protilátka anti-CD25 redukuje mikrovaskulární denzitu nádoru [54]. TGF- $\beta$  exprimovaný Treg buňkami je rovněž zahrnut do tohoto regulačního procesu. Přežití při antiangiogenní léčbě metastatického karcinomu ledviny sunitinibem koreluje s poklesem Treg buněk. VEGF indukuje zvýšení Treg buněk. Ačkoliv je angiogeneze slibným zprostředkovatelem interakce mezi CSC a Treg, stále chybí dostatek přesvědčivých důkazů jak *in vivo*, tak *in vitro* pro komplikovanost Treg interakcí.

#### Foxp3 IL-17 T buňky a CIC

Foxp3<sup>+</sup> Treg buňky za určitých podmínek exprimují IL-17, který spolu s hypoxií hraje roli v regulaci nádor iniciujících buněk [55]. Foxp3<sup>+</sup> IL-17 buňky např. stimulují vývoj markerů asociovaných s kolorektálním karcinomem v mononukleárních buňkách kostní dřeně.

Hypoxie posiluje přechod Treg buněk do Foxp3<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> buněk. Tyto buňky dále exprimují TGF- $\beta$ , CXCR3 a CCR6.

#### Makrofágy zprostředkovaný nepřímý efekt na CSC

Makrofágy jsou modulovány mechanismy zprostředkovanými molekulami CTLA-4, IL-10 a TGF- $\beta$ . V časných fázích vývoje nádoru M1 typ makrofágů infiltruje tumor a produkuje pro-inflamatorní molekuly. V pozdějších fázích růstu v hypoxických podmínkách dochází k tranzici do M2 typu. M2 makrofágy produkují chemokinové ligandy CCL17, CCL22 a CCL24, které přitahují Treg buňky. Diferenciace M2 makrofágů je indukována CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> Treg buňkami, zatímco M1 makrofágy mohou být indukovány CD4<sup>+</sup>25<sup>-</sup> T efektorovými buňkami. Diferenciace M1/M2 je tedy modifikována přítomností Treg.

#### Modulace Treg CSC buňkami

Na druhé straně rovněž CSC ovlivňují Treg buňky rozličnými mechanismy. Navíc k solubilním faktorům, které jsou produkovány CIC, CSC také regulují Treg pomocí přímého kontaktu indukovaného PD-L1.

#### Závěry

Treg buňky mají vitální úlohu v kontrole T dependentní protilátkou odpovědi. Treg buňky preferenčně kontrolují expanzi autoreaktivních T a B buněčných klonů. Nicméně Treg buňky se mohou podílet i na kontrole non-self odpovědi. Modulace humorální imunity Treg buňkami je komplexní proces zahrnující několik mechanismů reagujících synergisticky nebo redundantně. CTLA-4 je klíčovým mechanismem, kterým Treg buňky regulují formaci germinálních center. Treg buňky mohou využívat celou škálu dalších supresivních mechanismů (jako jsou IL-10 a TGF- $\beta$ ), kterými mohou jemně ladit odpovědi germinálního centra.

Kvůli nedostatku znaků charakterizujících CSC a jejich vzájemný překryv zůstává specifická identifikace těchto buněk problematická. Experimentální výsledky ukazují na jejich vysokou rezistenci k chemoterapii a radioterapii, tedy zřejmý klinický význam jako terapeutický cíl v léčbě a prevenci recidivy

nádoru. Na druhé straně, vzhledem ke klinické korelaci mezi Treg a špatnou prognózou pacientů s nádory, jsou nezbytné studie objasňující mechanismus jejich interakcí. Existují přímé i nepřímé vazby mezi CSC a Treg. M2 typ makrofágů indukovaný Treg buňkami, který koreluje se špatnou prognózou některých nádorů, může hrát roli v regulaci CSC.

Četnost a funkce Treg u nádorů je významná, neboť zvýšený počet Treg buněk může podporovat rozvoj a růst nádoru. První práce přinesly informace o zvýšeném zastoupení Treg buněk u nemalobuněčného karcinomu plic a ovariálního karcinomu [56]. Tyto buňky produkovaly TGF- $\beta$  a vykazovaly vysokou expresi CTLA-4. Zvýšený počet Treg buněk byl sledován u maligního melanomu [57] a u ovariálního karcinomu [58]. Totéž bylo prokázáno i u jiných typů nádorů. Tento fakt vyvolává další otázky: Je zvýšená frekvence Treg buněk časnou událostí při vzniku nádoru, nebo je pozdní reakcí organismu na existující nádor? Jak současná terapie ovlivňuje množství Treg buněk? Existuje možnost deplece Treg buněk *in vivo* bez rizika indukce autoimunitní odpovědi?

Z myších modelů vyplývá, že k indukci tumor specifických Treg buněk dochází velmi časně ve vývoji nádoru [59]. Tento fakt může mít značný klinický význam, neboť k indukci Treg buněk dojde pravděpodobně před stanovením diagnózy nádoru u většiny pacientů. Selektivní akumulace Treg buněk byla studována na myších modelech. Blokáda IL-10 a FGF- $\beta$  částečně obrátila supresi indukovanou Treg buňkami. Dále pak místní deplece CD4<sup>+</sup> buněk vedla k eradikaci tumoru a rozvoji dlouhodobé protinádorové paměti [60]. To naznačuje, že suprese protinádorové odpovědi Treg buňkami se odehrává především v místě nádoru a že lokální ovlivnění může být velmi efektivní. Deplece Treg buněk může vést k obnovení protinádorové imunitní odpovědi. Tento směr výzkumu naznačuje velmi slibné výsledky v budoucnu.

#### Literatura

1. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971; 21(6): 903–914.

2. Chakraborty NG, Twardzik DR, Sivanandham M et al. Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response. *J Immunol* 1990; 145(7): 2359–2364.
3. O'Garra A, Murphy K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(3): 458–466.
4. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3): 1151–1164.
5. Beyrer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006; 108(3): 804–811.
6. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(11): 875–888.
7. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 2010; 127(4): 759–767. doi: 10.1002/ijc.25429.
8. Sather BD, Treuting P, Perdue N et al. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med* 2007; 204(6): 1335–1347.
9. Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blanc V et al. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumordraining lymph nodes. *Immunity* 2010; 32(2): 266–278. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.015.
10. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609): 1057–1061.
11. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4): 330–336.
12. Roncador G, Brown PJ, Maestre L et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005; 35(6): 1681–1691.
13. Nocentini G, Riccardi C. GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol* 2005; 35(4): 1016–1022.
14. Ronchetti S, Ricci E, Petrillo MG et al. Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related protein: a key marker of functional regulatory T cells. *J Immunol Res* 2015; 2015: 171520. doi: 10.1155/2015/171520.
15. Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Mol Immunol* 2010; 47(7–8): 1595–1600. doi: 10.1016/j.molimm.2010.02.001.
16. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2012; 188(3): 976–980. doi: 10.4049/jimmunol.1102964.
17. Tatura R, Zeschnigk M, Hansen W et al. Relevance of Foxp3+ regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology* 2015; 146(1): 144–156. doi: 10.1111/imm.12490.
18. Wing JB, Sakaguchi S. Foxp3+ Treg cells in humoral immunity. *Int Immunol* 2013; 26(2): 61–69. doi: 10.1093/intimm/dxt060.
19. Den Haan JM, Kraal G, Bevan MJ. Cutting edge: lipopolysaccharide induces IL-10-producing regulatory CD4+T cells that suppress the CD8+ T cell response. *J Immunol* 2007; 178(9): 5429–5433.
20. Gregori S, Bacchetta R, Passerini L et al. Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory cells. *Methods Mol Biol* 2007; 380: 83–105.
21. Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389(6652): 737–742.
22. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265(5176): 1237–1240.
23. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K et al. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 2002; 169(8): 4183–4189.
24. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192(9): 1213–1222.
25. de Rezendes LC, Silva IV, Rangel LB et al. Regulatory T cell as a target for cancer therapy. *Arch Immunol Ther Exp* 2010; 58(3): 179–190. doi: 10.1007/s00005-010-0075-0.
26. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133(5): 775–787. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009.
27. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; 11(1): 7–13. doi: 10.1038/ni.1818.
28. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609): 1057–1061.
29. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4): 330–336.
30. Khattry R, Cox T, Yasayko SA et al. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4): 337–342.
31. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 2012; 37(5): 785–799. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.010.
32. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 2010; 143(4): 592–605. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.032.
33. Allen CD, Okada T, Tang HL et al. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 2007; 315(5811): 528–531.
34. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 2000; 192(11): 1545–1552.
35. Schaefer P, Willmann K, Lang AB et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 2000; 192(11): 1553–1562.
36. Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest* 2004; 114(11): 1640–1649.
37. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH et al. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175(7): 4180–4183.
38. Linterman MA, Pierson W, Lee SK et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 2011; 17(8): 975–982. doi: 10.1038/nm.2425.
39. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol* 2011; 23(6): 424–430. doi: 10.1016/j.jsim.2011.10.002.
40. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/ B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 233–258.
41. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K et al. Transendocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011; 332(6029): 600–603. doi: 10.1126/science.1202947.
42. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 2006; 27(4): 195–201.
43. Sage PT, Francisco LM, Carman CV et al. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat Immunol* 2013; 14(2): 152–161. doi: 10.1038/ni.2496.
44. Gotot J, Gottschalk C, Leopold S et al. Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(26): 10468–10473. doi: 10.1073/pnas.1201131109.
45. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P et al. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 2011; 34(4): 566–578. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.018.
46. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194(5): 629–644.
47. Caretto D, Katzman SD, Villarino AV et al. Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *J Immunol* 2010; 184(1): 30–34. doi: 10.4049/jimmunol.0903412.
48. Bettelli E, Carrier Y, Gao W et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441(7090): 235–238.
49. Janssens W, Carlier V, Wu B et al. CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J Immunol* 2003; 171(9): 4604–4612.
50. Yu X, Li H, Ren X. Interaction between regulatory T cells and cancer stem cells. *Int J Cancer* 2012; 131(7): 1491–1498. doi: 10.1002/ijc.27634.
51. Lapidot T, Sirad C, Vormoor J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367(6464): 645–648.
52. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(7): 3983–3988.
53. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011; 146(4): 633–644. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.026.
54. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nature* 2011; 475(7355): 226–230. doi: 10.1038/nature10169.
55. Yang S, Wang B, Guan C et al. Foxp3+HL-17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. *J Leukoc Biol* 2011; 89(1): 85–91. doi: 10.1189/jlb.0910506.
56. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ et al. Regulatory CD4(+)/CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61(12): 4766–4772.
57. Javala LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother* 2003; 26(1): 85–93.
58. Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10(9): 942–949.
59. Peng L, Kjaergaard J, Plautz GE et al. Tumor induced L-selectin high suppressor T cells mediate potent effector T cell blockade and cause failure of otherwise curative adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2002; 169(9): 4811–4821.
60. Yu P, Lee Y, Liu W et al. Intratumor depletion of CD4 cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med* 2005; 201(5): 779–791.