



Research
Immunology—Review

免疫调节细胞生物学及其在急性移植物抗宿主病预防或治疗中的临床应用

Bruce R. Blazar

Masonic Cancer Center & Division of Blood and Marrow Transplantation, Department of Pediatrics, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2018

Accepted 15 November 2018

Available online 30 December 2018

关键词

移植物抗宿主病 (GVHD)

免疫调节细胞

细胞疗法

摘要

预防和治疗移植物抗宿主病 (GVHD) 最常见的方法是尝试耗竭或抑制能介导或支持同种异体反应的 T 细胞; 但这会导致 T 细胞受体功能缺陷, 并因此对感染和肿瘤复发高度敏感。通常通过广泛使用反应性抗体来实现耗竭, 而功能损坏通常在使用需长期给药 (一般为 6 个月或更长时间) 且具有明显副作用的药物后发生, 这种药物可能不会导致供体 T 细胞对耐调节方案且携带宿主同种抗原的细胞产生耐受性 (即无反应性)。随着对免疫系统稳态认识的深化, 我们已能鉴定和表征具有免疫调节功能的细胞群。虽然这种细胞群通常比较少见, 但可通过分离和扩增此类细胞的方法在移植后晚期增补供体移植物或进行输注, 来抑制 GVHD。本文将探讨 GVHD 模型中的生物学和临床前概念验证, 以及现已发展至临床测试阶段的免疫调节细胞疗法对 GVHD 的疗效。

© 2018 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

自1968年首例纠正免疫缺陷的骨髓移植 (bone marrow transplant, BMT) 实施[1]以来, 如今已有超过100万患者接受了造血干细胞移植[2]。尽管过去50多年已进行了广泛的临床前研究和临床试验, 这些年来在急性移植物抗宿主病的发病率 (20%~70%的异基因造血干细胞移植患者) 和严重程度方面有所改善, 但移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 仍然是导致异基因造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplant, HSCT) 后发病和死亡的主要原因 (约20%) [3]。

2. GVHD 的生物学、预防和治疗

2.1. GVHD 发病机制

GVHD是一种因供体T细胞对宿主靶组织 (特别是具有丰富的上皮细胞的器官及直接接触或清除外来环境抗原和病原体的器官) 起反应而引起的医源性并发症。这种宿主靶组织主要包括皮肤、消化道、肝和肺。在急性GVHD期间, 致病性溶细胞性供体T细胞引起的组织浸润和破坏最常见, 但并不局限于移植后的早期 (1~3个月) [3]。急性GVHD也被称为小鼠继发病或矮小病, Barnes和Loutit于1955年首次报道了这种疾病[4]。Billingham[5]曾指出, 急性GVHD的产生需满足三个原

* Corresponding author.

E-mail address: blaza001@umn.edu

则性要求：① 移植物必须含有免疫活性细胞；② 受体必须表达移植供体中不存在的组织抗原；③ 受体必然不能清除移植的细胞。

2.2. 通过供体移植物 T 细胞耗竭预防急性 GVHD

小鼠骨髓移植研究表明，供体T细胞是引起急性GVHD的主要原因[6]。因此，大约40年前人们就已经开始使用大豆凝集素、E-玫瑰花环、抗体和补体耗竭以及与毒素结合的抗体进行了一系列试验[6]。总体而言，移植体外预处理耗竭T细胞方案显著降低了急性GVHD的发生率。但该方案于20世纪80年代也继发了多种并发症，包括高死亡率的宿主抗供体介导的移植物排斥，因胸腺和淋巴器官受损导致周围供体T细胞恢复缓慢而引起的感染性，以及疾病复发率升高，特别是骨髓性白血病[6]。其他技术包括在与凝集素结合或与表达T细胞配体的细胞反应的基础上，从供体移植物中物理分离T细胞，或活体外接触T细胞溶细胞药物[6]。

2.3. 预防急性 GVHD 的药物治疗方法

甲氨蝶呤是一种二氢叶酸拮抗剂，从20世纪70年代中期至今均为预防急性GVHD的主要药物。体内抗T细胞抗体[如抗胸腺细胞或抗淋巴细胞球蛋白，抗CD52单克隆抗体（mAb）]和强的松的单独或联合用药已广泛用于预防急性GVHD。从20世纪80年代初开始，作为钙调磷酸酶抑制剂之一的环孢菌素进入了人们的视线，此后一直被作为常用的预防疗法[7]。FK506是另一种钙调磷酸酶抑制剂，它对HSCT患者能产生类似于环孢菌素的疗效[8]。近来，抗增殖霉酚酸酯与钙调磷酸酶抑制剂（环孢菌素A；FK506，他克莫司）或雷帕霉素（西罗莫司）联合用药已成为首选给药方案之一[9]。在HSCT后的第一周内，两次给予环磷酰胺（cytoxan），大大降低了单倍体相合T细胞移植和其他移植源的严重急性和慢性GVHD的发生率[10-13]。虽然已通过合并上述联合给药方案降低了急性GVHD的整体严重程度，但经常发现药物毒性，并且疗效也并不一致。

2.4. 预防急性 GVHD 的免疫细胞疗法的基本原理

20世纪80年代有关小鼠混合供体和宿主骨髓（bone marrow, BM）源的研究表明，宿主骨髓成分抑制了原本具有免疫活性的移植物，使其免于引起急性GVHD[14]，并且移植的宿主细胞在骨髓移植后被清除，GVHD得到缓解[15]。在其他研究中，在半相合或胎肝干细胞移植

的受体中，发现白细胞介素（IL）-10产生的CD4 T细胞抑制了供体抗宿主同种反应性T细胞[16]。这些抑制细胞随后被鉴定为1型调节性T（Tr1）细胞[17]。总之，这些数据提供了以下基本信息：患者缺乏GVHD和耐受性诱导可能不依赖于供体抗宿主同种反应性T细胞的缺失，而可能是一个活跃的、持续的细胞免疫调节过程。

此外，在部分接受了人类白细胞抗原（human leukocyte antigen, HLA）错配或分次全身淋巴照射的患者中，确认了可抑制供体抗宿主同种反应性T细胞的调节性细胞群（恒定自然杀伤T细胞，iNKT），从而预防急性GVHD[18,19]。这些研究暗示了以下双重含义：① 因供体抗宿主同种反应性T细胞持续存在，所以激活触发点（如病毒感染或紫外线）可提高其出现率并导致急性GVHD；② 细胞免疫机制足够强大，无需全身抑制或供体T细胞耗竭，即针对有害同种异体反应提供持续保护。这种耐受诱导的细胞机制提高了抗肿瘤和抗病原体反应的可能性，并使此类高危患者群避开了大多数药物常见的副作用。

3. 临床使用的适应性免疫系统调节细胞产品

尽管细胞疗法预防或治疗GVHD的基本原理在于利用此类疗法的免疫调节性，但其中部分产品具有免疫调节和组织修复的双重功能。例如，抑制生产性同种异体反应的适应性免疫系统细胞[包括调节性T细胞（Tregs）]也会分泌一种蛋白质，即双调蛋白。这种蛋白质促进表皮生长因子受体表达的上皮细胞有丝分裂，从而刺激它们从调节和GVHD诱导的组织损伤中恢复，尤其是消化道[20]。相比之下，Tr1细胞被归因于通过IL-10和转化生长因子 β （TGF- β ）分泌而不是直接通过组织修复抑制GVHD[17]。间充质干细胞（mesenchymal stromal cell, MSC）等非造血细胞也具有免疫调节和组织修复性[21]。

3.1. 胸腺衍生的调节性 T 细胞

对于调节免疫反应至关重要的特异性CD4⁺ T细胞亚群的鉴定和表征是免疫学领域在过去25年内最重要的发现之一[22]。胸腺衍生的调节性T细胞（tTregs）也称为天然调节性T细胞，可共同表达CD4、CD25和作为主调节因子的叉头框蛋白P3（forkhead box P3, FOXP3）转录因子，FOXP3转录因子对scurlin（一种属于叉头/翼状螺旋家族的蛋白质）进行编码[23]。这些CD4⁺CD25⁺

调节性T细胞对抑制自身反应性淋巴细胞的活化和自身免疫性必不可少[24]，同时限制了对慢性病原体 and 肠道共生细菌的免疫反应[25]。调节性T细胞对维持免疫稳态至关重要；在已打破对自身抗原的耐受性，并且发生了自身免疫性疾病的啮齿动物模型中，调节性T细胞的过继转移能恢复免疫稳态。在这些开创性研究中，对移植耐受的小鼠模型的调节性T细胞进行了检测。

调节性T细胞调节T细胞对同种抗原的反应，并对活体外耐受诱导起关键性作用[26]。调节性T细胞减轻GVHD的机制包括释放再生细胞因子（如双调蛋白）[20]，抑制抗原呈递细胞（antigen-presenting cell, APC）功能[如通过细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4（CTLA4）进行抑制]，以及通过释放抑制分子（如腺苷、TGF- β 、IL-35和IL-10）[27]和（或）通过消耗IL-2[28]和维持稳态[28]来抑制T-传统细胞（Tcons）。在2002年，有三篇报告显示活体外扩增、分离和输注调节性T细胞可以抑制小鼠的GVHD[29-31]。有两项研究显示，骨髓移植时给予的新鲜纯化的供体调节性T细胞在与T细胞等量输注时能适度抑制GVHD，而活体外活化和扩增可获得大量调节性T细胞，这不仅增加了调节性T细胞的数量，还增加了抑制功能[29,31]。当与T细胞等量输注时，观察到能明显抑制快速致死的GVHD[29]。或者，在调节诱导的淋巴细胞减少后和骨髓移植前数天，可通过输注调节性T细胞使转基因小鼠骨髓移植受体体内发生调节性T细胞活化和扩增[30]。

分离高纯调节性T细胞时产生的实际问题阻碍了调节性T细胞疗法在临床的快速发展。人体内存在大量重叠的CD25^{dim}效应/记忆T细胞群；因此，使用免疫磁珠偶联CD4和CD25抗体从外周血（peripheral blood, PB）中分离的胸腺衍生的调节性T细胞也包含CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺细胞，并且在体外扩增时不能始终保持FOXP3表达或抑制功能[32,33]。与磁珠纯化的外周血调节性T细胞相反，因为胚胎接触的环境抗原比成人少，脐带血（umbilical cord blood, UCB）中所含CD25^{dim}非调节性T细胞相对较少，所以很容易从脐带血中纯化出胸腺衍生的调节性T细胞[32,34]。从脐带血纯化的细胞含少量CD4⁺CD25^{dim}细胞，可以在使用CD3/CD28 mAb抗体偶联磁珠和IL-2实现活体外扩增的同时维持FOXP3表达和抑制功能[32,33]。

根据2009年的数个初步临床研究报告，一名患有严重难治性急性GVHD的患者接受了调节性T细胞输注，此类调节性T细胞来自家属供体，并通过流式细胞术分选为

CD4⁺CD25⁺CD127⁻，然后活体外扩增了2~4周。据称，尽管最终依然罹患GVHD，但该患者的临床情况出现了短暂的中度改善[35]。我们于2007年启动的临床试验中纳入了23名患者，这些患者通过双脐带血移植提供转基因造血干细胞和成熟T细胞，以及由第三份脐带血[36]扩增、剂量为 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$ 的胸腺衍生的调节性T细胞。这导致调节性T细胞与T细胞的比例约为1:6，远低于保护小鼠免于罹患致命GVHD所需的最佳1:1的比例。研究对7名患者体内来自同一份独立脐带血的胸腺衍生的调节性T细胞进行了跟踪[36]，经检测该细胞仅在人体血液循环中停留约14 d，并且在脐带血移植后的第二天观察到该细胞的出现率最高。没有观察到作为主要终点的输注毒性。次要终点提示，因为与108例除补充调节性T细胞外，其他治疗方式均相同的历史对照相比，输注了胸腺衍生的调节性T细胞的患者的类固醇治疗类急性GVHD发生率（43% versus 61%， $P=0.05$ ）减少，所以输注了胸腺衍生的调节性T细胞的患者疗效优于历史性对照。感染、复发或早期死亡的风险未增加[36]。

在后续研究中，重新刺激Treg的时间和使用KT64/86代替基于CD3/CD28抗体偶联磁珠的人工抗原呈递细胞的扩增方案明显提高了Treg的产率，平均扩增至13 000倍以上，相比之下，磁珠法的扩增倍数为200~400倍[37]。一项包含12名双脐带血移植患者（这些患者已接受含雷帕霉素GVHD预防治疗并单独补充了一剂剂量为 $3 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8 \text{ kg}^{-1}$ 的胸腺衍生的调节性T细胞）的临床试验显示，这些患者的急性GVHD明显减少。仅一名患者可能患有急性GVHD（活组织检查未确定结果，并且该患者仅治疗三周），相比之下，19名接受了相同的调节和GVHD预防治疗，但未输注胸腺衍生的调节性T细胞的当前对照患者的发病率为48%。

曾有意大利研究人员[38]基于磁珠纯化的新鲜胸腺来源的调节性T细胞评估了移植前增加调节性T细胞对预防GVHD和免疫重建的影响。在使用没有移植后免疫抑制性的冷冻/解冻的成熟供体T细胞补充HLA-半相合CD34⁺细胞前3天，将胸腺衍生的调节性T细胞输注到患者体内。纯化结果具有高度一致性，该研究入选的28名患者中，仅两名因纯度低而没有输注胸腺衍生的调节性T细胞（ $\geq 50\% \text{ FOXP3}^+$ ）。这些研究证实了活体外纯化胸腺衍生的调节性T细胞的安全性，还发现它们能促进淋巴重组，并且没有明显削弱共同转移的成熟T细胞[38]的移植植物抗白血病效应。实际上，在脊髓发育不良和急性骨髓性白血病患者的随访研究中发现复发率明显降低，这可能是由于

没有GVHD诱导和治疗诱导的免疫抑制。虽然 $5 \times 10^5 \text{ kg}^{-1}$ 或 $1 \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$ T细胞以及 $2 \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$ 胸腺衍生的调节性T细胞剂量组均未发现GVHD,但在接受了剂量为 $2 \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$ T细胞和 $4 \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$ 胸腺衍生的调节性T细胞的5名患者中,有2名罹患GVHD。这一发现表明,除非给出增加的调节性T细胞数量,否则 $1 \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$ T细胞为最大剂量[39]。

在不久的将来可能会采用新方法启动临床试验,使用突变的IL2受体 β 链表达Tregs和突变的IL2蛋白[40]或IL-2/抗IL-2复合物更好地靶向IL-2至Treg的新方法,其优先结合IL-2受体 β 链[41],从而刺激高表达高亲和力和IL-2受体复合物。第二种方法涉及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体-2激动剂,并已证明这种激动剂可以扩增受体而非供体的调节性T细胞,以缓解急性GVHD[42]。目前的临床试验[44]中采用的方法会对破坏调节性T细胞分化的细胞因子造成抑制[43](如IL-6)。尽管未来的随机试验还需评估胸腺衍生的调节性T细胞的疗效以及对抗病原体 and 抗肿瘤反应的影响,但总体而言,这些研究均有前景。

3.2. 诱导性调节性 T 细胞

诱导性调节性T细胞(iTregs)的命名原因在于它们作为初始T细胞离开胸腺,随后在外围诱导FOXP3表达和抑制功能。外周耐受以及预防淋巴增殖性疾病均需具备诱导性调节性T细胞[25]。其中一种诱导性调节性T细胞为CD8⁺和HLA-I类限制细胞[45],在稳态下不表达FOXP3,但在使用IL-2和TGF- β 进行体内刺激[46,47]或体外刺激[45]后可以表达FOXP3。虽然这些CD8⁺诱导性调节性T细胞可以在体外抑制效应T细胞(Teff)反应,但它们本身并不稳定,可能回复效应T细胞,从而加重小鼠GVHD[45]。但因为这些诱导性调节性T细胞尚未在临床上出现,所以在此不作进一步讨论。第二种包括可使用TGF- β 或全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)刺激CD4⁺CD25⁻T细胞体外诱导和扩增的调节性T细胞;与胸腺衍生的调节性T细胞相似,这些诱导性调节性T细胞的过继转移可抑制疾病[48,49]。TGF- β 或ATRA在刺激了初始人T细胞后还可诱导FOXP3表达;但是,尽管有项研究显示这些细胞具有抑制性[50],但在其他研究中,即使使用TGF- β 和ATRA刺激CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺T细胞获得了稳定的抑制功能[54],依然只能观察到轻度抑制性或没有观察到抑制性[51–53]。同样的,雷帕霉素增强了TGF- β

依赖的FOXP3表达,诱导初始T细胞[55]中的有效抑制功能,并诱导未分离T细胞中的抑制功能,在提高产率的同时降低成本,这是该疗法的优点。雷帕霉素/TGF- β 诱导性调节性T细胞表达CD25的水平等于或高于扩增的胸腺衍生的调节性T细胞;此外,它们含有少量IL-2、干扰素 γ (interferon gamma, IFN γ)或IL-17分泌细胞,并且在GVHD的异种模型中按照与胸腺衍生的调节性T细胞[55]相似的方式抑制疾病。

由于外周血中CD4⁺CD25⁻T细胞数比脐带血多,同时脐带血难以获得,所以诱导性调节性T细胞可以大量制备获得,并回输患者,使调节性T细胞与T细胞的比达到1:1或更高,这对含有大量非调节性T细胞[56]的外周血干细胞(PB stem cell, PBSC)移植特别有效。大规模实验表明,一份单采产品可以产生 2.2×10^{11} 个诱导性调节性T细胞,比初始胸腺衍生的调节性T细胞临床试验中的数量高50倍以上。与胸腺衍生的调节性T细胞在使用雷帕霉素后的扩增方式相同,在雷帕霉素/TGF- β 诱导性调节性T细胞培养物中,分泌IFN γ 或IL-17的细胞不足4%。该领域的热点之一在于胸腺衍生的调节性T细胞——尤其是诱导性调节性T细胞——是否会丧失稳定性,并重新编码成效应T细胞,同时失去抑制功能[57]。在某些疾病模型中,胸腺衍生的调节性T细胞可产生致病性效应T细胞的细胞因子,如IFN γ 或IL-17,并具有与胸腺衍生的调节性T细胞相关,但与诱导性调节性T细胞或外周调节性T细胞抑制功能无关的甲基化调节性T细胞特异性脱甲基化区域[58–60]。不稳定性可能需在高度炎症性局部环境下形成,调节性T细胞存在的时间足以使其在合适的环境下丧失稳定性,有明显迹象表明产生的效应细胞具有致病性以及抑制功能的减弱或丧失[61]。对于扩增至高倍数的iTreg细胞,目前尚无证据证明其转化为效应T细胞。尽管为期82 d的检测分析显示异种GVHD模型的调节性T细胞特异性脱甲基化区域发生甲基化是导致其稳定性降低的最重要机制之一[56]。根据掌握的疗效数据,我们最近完成了一项诱导性调节性T细胞I期剂量递增($3 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9 \text{ kg}^{-1}$)研究并正在进行分析。该研究针对14名同胞相合供体粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)动员的外周血干细胞移植非清髓性移植受体进行,这些受体已采用诱导性调节性T细胞以及霉酚酸酯+环孢菌素进行预防(我机构预防此类患者群罹患GVHD的治疗标准)。[†]

[†] See clinicaltrials.gov study NCT01634217.

3.3. Tr1 细胞

Tr1细胞在外周环境形成，不需要通过FOXP3表达产生抑制功能。就表型而言，Tr1细胞表征为共同表达整合素 α -2 (CD49b)和淋巴细胞激活基因-3 (lymphocyte-activating gene-3, LAG-3) [62]。Tr1细胞产生IL-10、TGF- β 和IFN γ ，并且已证明由IL-10和TGF- β 分泌形成抑制作用；这种分泌物在CD49b⁺LAG-3⁺细胞中的含量最高，同时也最具抑制性[63]。Tr1细胞通过与抗原特异性T细胞受体结合而触发，并且可在使用IL-27后为响应受体树突细胞(dendritic cell, DC)的有效同种抗原刺激而产生。IL-27主要由小鼠的供体单核细胞/巨噬细胞分泌[64]。Tr1细胞的稳定持续时间取决于转录因子脱中胚蛋白[64]。从机制上看，Tr1细胞可以以抗原特异性方式以及通过接触依赖性过程、CD8 T细胞增殖和IFN γ 的产生直接抑制辅助性T细胞(Th) 17和Th1效应细胞。Tr1细胞也可以通过调节或杀死引发GVHD引起的T细胞反应的关键性抗原呈递细胞(树突细胞或巨噬细胞)间接抑制效应T细胞。或者，Tr1细胞可以使树突细胞产生致耐受性并使巨噬细胞偏向抗炎M2巨噬细胞，这种巨噬细胞本身支持体内Tr1细胞和外周调节性T细胞世代[63]。

在急性GVHD中，供体胸腺衍生的调节性T细胞严重缺失，并且Tr1细胞是小鼠的移植后主要调节性T细胞群[64]。此外，Tr1细胞缺失加重了GVHD[64]。这些数据和第2.4节所述的发现，证明Tr1细胞能抑制患者体内的供体抗宿主同种反应性T细胞。在高风险恶性肿瘤患者中进行Tr1细胞输注临床试验，这些患者接受中高剂量CD34富集移植物的半相合移植物，其中包含从家属供体粒细胞集落刺激因子动员的单采产品中分离出的少量补充T细胞(10^4 kg^{-1}) [65]。为了产生Tr1细胞，用外源性IL-10处理从未动员单采血中获得的受体单核细胞源树突细胞，以诱导树突细胞产生IL-10，然后将产生的IL-10与供体外周血单核细胞共培养10 d[65]。此时，从表型上看约有1/7的培养物为CD49b⁺LAG⁺，并能在体外有效抑制供体抗宿主反应，但不抑制抗第三方T细胞反应。含Tr1细胞的培养细胞在移植后不早于1个月并仅在中性粒细胞移植后，方可以半对数方式按照 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6 \text{ kg}^{-1}$ 的递增剂量作为新鲜或冷冻产品输注。在入选的19名患者中，有17名患者接受了HSCT，12名接受了含Tr1细胞的产品治疗。在接受 $1 \times 10^5 \text{ kg}^{-1}$ 剂量的11名患者中，有4名出现复发或移植物排斥，3名未能重建免疫功能并因感染而死亡，4名重建免疫功能并在本文发表时健康存活。有一名接受 $3 \times 10^5 \text{ kg}^{-1}$ 剂

量治疗的患者重建了免疫功能，但罹患严重的GVHD。共有5名患者重建免疫功能，T细胞出现增殖，但对携带宿主同种抗原的刺激因子反应低下。目前有一项试验正在检测这种方法的安全性和耐受性，以防接受配型相合或配型不合的未经处理供体造血干细胞移植的成人和儿童患者罹患恶性血液病。

4. 临床非造血系统免疫调节细胞产品

首个成功应用于临床治疗重症急性GVHD的细胞产品是间充质干细胞。多能成体祖细胞(multi-potent adult progenitor cell, MAPC)既区别于间充质干细胞，又与之具有共同点，并具有更强的增殖能力[66]。两者均为具有基质细胞特征，符合间充质干细胞公认定义并且具有免疫调节和组织修复特性的黏附骨髓祖细胞。然而，多能成体祖细胞具有包括三个生殖细胞层的更广泛的分化潜力[66]。

4.1. 间充质干细胞

在适当的诱导条件下，间充质干细胞可以分化成包含软骨细胞、成骨细胞和脂肪细胞的间充质细胞系[67,68]。公认的定义包括它们的黏附性，分化成多个间充质谱系(如骨、软骨、肌肉、脂肪细胞、肌腱和基质)的能力，以及各自的表型(CD105⁺、CD166⁺、CD73⁺、CD90⁺和CD29⁺，以及不表达造血抗原的CD34、CD45和CD14) [69]。间充质干细胞出现率较低(在骨髓中与细胞的比例大约为1:10 000)，但在大多数组织中处于分化状态[70]。它们的广泛分布(如骨髓、脂肪和胚胎组织)和快速增殖表明可以通过这些细胞保护组织、器官或机体免受伤害。

因为间充质干细胞具有免疫抑制性而非免疫刺激性，所以可以预防而不是支持可能有害于机体的过激性免疫反应。例如，间充质干细胞表达低水平的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) I类以及少量/缺失的主要组织相容性复合体II类和共刺激分子。人们已经提出了多种机制来抑制适应性和先天性免疫反应，并在最近发布的一篇综述中进行了总结[21]。这些机制包括上调抑制型酶吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)，以代谢必要的氨基酸色氨酸；上调一氧化氮，抑制T、B和自然杀伤细胞功能；细化和分泌TGF- β 、可溶性HLA-G和前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)等参与支持调节性T细胞生成，及通过IL-10抑制辅助性T细胞17的生成[72-74]的抑制分子[71]。IL-6与PGE₂

共同作用，产生抗炎M2巨噬细胞[75]并抑制树突细胞成熟[76,77]。间充质干细胞表达IFN γ 诱导的程序性细胞死亡配体-1 (PD-L1) 等共同抑制分子，并产生可溶性PD-L1和PD-L2[78,79]。间充质干细胞通过下调T细胞和单核细胞/巨噬细胞的趋化因子以及趋化因子受体表达来限制效应T细胞向靶组织的迁移[80]。

间充质干细胞外来体尺寸小 (50~200 nm) 并且源于核内体，其中包含可以影响细胞信号转导、通信和代谢的细胞因子、生长因子、信号脂质、信使RNA (mRNA) 和调节性miRNA[81]。间充质干细胞外来体通过所含的CD73对T、B和NK细胞发挥免疫抑制作用，在其他抑制分子中，已证明CD73能增加CD39⁺辅助性T细胞1凋亡、PD-L1和IL-10 mRNA，从而抑制人/小鼠异基因GVHD[82-85]。研究者还观察到供体CD8⁺细胞毒性T细胞诱导间充质干细胞凋亡，其出现率与急性GVHD反应相关[86]。其结果是受体吞噬细胞吞噬凋亡的间充质干细胞，产生IDO，并抑制宿主免疫。尽管组织中难以发现间充质干细胞，但这些数据可以综合解释如何改善GVHD。间充质干细胞可以通过结缔组织生长因子、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) - α 、角质细胞生长因子、血管生成素-1和基质细胞衍生因子-1实现再生、重塑和血管生成，以促进组织修复[87-89]。

Le Blanc等[90]首次使用半相合同间充质干细胞治疗罹患严重类固醇难治性急性GVHD的儿童患者，并迅速而明显地减少了GVHD的症状。这一发现导致出现了大量采用自体、半相合或第三方人类白细胞抗原配型不合的间充质干细胞治疗类固醇难治性急性GVHD的临床研究和报道[91-98]。例如，在大型欧洲II期合作研究中，有49名成人和儿童患者接受了一或两次剂量，6名患者接受了3~5次剂量的辅助治疗。据报道，总缓解率为70.9%，包括完全缓解以及54.5%的患者的所有症状均消失[93]。Osiris Therapeutics, Inc.生产的Prochymal已在美国、加拿大和新西兰批准用于治疗儿童患者的GVHD[99]。此外，用间充质干细胞 (每剂1亿个细胞) 治疗罹患类固醇难治性急性GVHD的儿童III期临床试验在第28天达到总疗效的主要终点，并且高于历史对照[†]。但是，另一项使用Prochymal产品的III期随机双盲研究[‡]显示，对照组和异基因间充质干细胞组之间的临床结果并无明显差异。欧洲正在进行一项双盲安慰剂对照多中心III期临床试验，其中使

用了间充质干细胞治疗类固醇难治性急性GVHD。最近对各项间充质干细胞治疗研究的元分析显示，用间充质干细胞治疗类固醇难治性急性GVHD患者有利于提高总体存活率[100]。

最后，值得注意的是，骨髓本身的间充质干细胞的基质细胞特征显示其支持造血作用，并通过间充质干细胞的联合移植加以证实。这能增强人脐带血造血细胞植入免疫缺陷小鼠[101]。这些发现导致后来又进行了几项临床试验，以检测间充质干细胞加速体内造血功能恢复的能力。根据具体环境，在亲代半相合CD34⁺外周血干细胞移植环境中，移植物排斥似乎减少，而造血或淋巴细胞恢复增强[101]。在一项涉及脐带血受体中亲代半相合同间充质干细胞的研究中，尽管重症急性GVHD已明显降低[102]，但并未发现所述优点；但在另一项研究中，中性粒细胞恢复的中位时间似乎更快[103]。这两项研究均有少量患者入选 (分别为13名和8名)。对比结果归因于移植物排斥机制的差异。

4.2. 多能成体祖细胞

多能成体祖细胞是从成体来源分离出的CD45阴性细胞，并在低血清和补充生长因子 (如表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 和白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 中培养。多能成体祖细胞中，已报道的表型为阴性CD34和干细胞因子，少量/缺失的主要组织相容性复合体I类和II类，以及阳性Oct4和Rex1。多能成体祖细胞是无免疫原性扩增骨髓成体干细胞，具有免疫调节、免疫抑制和组织再生能力，并且表现出比间充质干细胞更广泛的分化能力，包括间充质、内皮和内胚层谱系[104,105]，并且具有更高的扩增潜力。因此，它们允许基于单一供体大规模开发成可用产品，以降低产品变异性[106,107]。多能成体祖细胞能通过PGE2和IDO介导的增殖抑制和致病性细胞因子生成细胞[75,108,109]抑制异基因T细胞反应的非接触机制，还能产生IL-10或TGF- β ，形成调节性T细胞，从而进行抑制[75,108]。在使用商用多能成体祖细胞产品MultiStem (Athersys, Inc.) 的I期剂量递增研究 (1、3或5次剂量，每次 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞 \cdot kg⁻¹) 中，确定了可行性和安全性。此外，有报告显示了振奋人

[†] See clinicaltrials.gov study NCT00366145.

[‡] See clinicaltrials.gov study NCT02652130.

心的GVHD疗效，II~IV级GVHD为37% ($n=36$)，重度GVHD为14%，而使用最高剂量组的发病比例更低（分别为11%和0%， $n=9$ ）[110]。

5. 总结

自从首次报道细胞疗法，即非造血细胞产品间充质干细胞治疗类固醇难治性急性GVHD以来，已过去近15年[90]。目前有三种调节性T细胞产品（胸腺衍生的调节性T细胞、诱导性调节性T细胞和Tr1细胞）以及一种次级非造血细胞产品（多能成体祖细胞）已完成了I期研究。总体而言，这些试验强调了利用人体自然免疫调节机制提供可按需分离、扩增和分化的细胞来源的可能性。这些不同的产品之间存在有趣的相似之处，即低出现率（对于诱导性调节性T细胞，我们将外周调节性T细胞视为体内对应物）以及免疫抑制/调节和组织修复的双重功能。此外，在输注所述产品后，如何检测该产品在GVHD患者血液中的长期存在性也面临挑战。

以调节性T细胞进行说明，限制其更广泛应用的因素包括遵守现行《药品生产质量管理规范》（Current Good Manufacturing Practices, CGMP）以生产用于临床试验或用作治疗的细胞[111]；需生成患者特异性产品[112]；制造成本；输注细胞在外周血中的短期持久性，以及无法准确追踪注入GVHD组织部位的细胞，这不利于以输注细胞谷值作为触发点选择精确时间进行多次输注[36]；以及未知的复发和感染风险。就理论上而言，非造血细胞经长期培养也有致癌性转化的可能，如啮齿动物模型所见[113]。与此同时，骨髓移植学会正在深入参与其他免疫调节/修复产品的开发和测试，这些产品已在临床前急性GVHD模型中显示疗效，并已于最近发表综述[114]。这些产品包括CD8调节性T细胞[45,47,115–117]；髓源性抑制细胞（myeloid-derived suppressor cell, MDSC）[118–120]；能迅速释放抗炎性和免疫调节细胞因子，并能刺激髓源性抑制细胞[122]和调节性T细胞[19,123]的恒定NK T细胞[18,19,121]；先天淋巴细胞（如经证明可以预防和治疗肠道GVHD的2型先天淋巴细胞）[124]；致耐受性树突细胞[125–128]和单核细胞/巨噬细胞[129]。

急性GVHD细胞治疗领域的近期目标是确定治疗指标、患者群和可能受益于细胞输注的疾病。中期目标包括优化关键GVHD靶器官的细胞分布，在延长寿命的同时维持谱系保真度和功能性，并且增强免疫调节能力和

组织修复性。长期目标将包括创造现成可用、可出口且成本较低的产品；评估短期和长期疗效；针对所需靶抗原开发具有特异性抑制功能的产品；以及确定最佳环境，以便利用所述细胞功能治疗类固醇难治性急性GVHD预后不良的患者。在本文结束前相关研究已取得了长足进展。在药物和抗体治疗均失败，迫切需要新治疗方法的患者中，细胞治疗概念已得到验证，该疗法的应用前景光明。

Acknowledgements

This work was supported by grants from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (R37 AI34495), National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health (R01 HL56067 and R01 HL11879), and National Cancer Institute, National Institutes of Health (P01 CA142106 and P01 CA065493).

The author thanks Drs. Geoff Hill and Kelli MacDonald for their collaboration in assembling literature related to this topic area, to colleagues and laboratory members who have moved the cell therapy field forward, and to patients and families for their participation in clinical trials.

References

- [1] Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;292(7583):1366–9.
- [2] Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, Atsuta Y, Baldomero H, Foeken L, et al. One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol* 2015;2(3):e91–100.
- [3] Zeiser R, Blazar BR. Acute graft-versus-host disease—biologic process, prevention, and therapy. *N Engl J Med* 2017;377(22):2167–79.
- [4] Barnes DW, Loutit JF. The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes technique. *J Natl Cancer Inst* 1955;15(4):901–5.
- [5] Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 1966–1967;62:21–78.
- [6] Blazar BR, Korngold R, Valleria DA. Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunol Rev* 1997;157(1):79–109.
- [7] Tutschka PJ, Beschornner WE, Hess AD, Santos GW. Cyclosporin-A to prevent graft-versus-host disease: a pilot study in 22 patients receiving allogeneic marrow transplants. *Blood* 1983;61(2):318–25.
- [8] Fay JW, Wingard JR, Antin JH, Collins RH, Piñeiro LA, Blazar BR, et al. FK506 (tacrolimus) monotherapy for prevention of graft-versus-host disease after histocompatible sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87(8):3514–9.
- [9] Cutler C, Antin JH. Sirolimus immunosuppression for graft-versus-host disease prophylaxis and therapy: an update. *Curr Opin Hematol* 2010;17(6):500–4.
- [10] Luznik L, Bolaños-Meade J, Zahurak M, Chen AR, Smith BD, Brodsky R, et al. High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. *Blood* 2010;115(16):3224–30.
- [11] Luznik L, Jones RJ, Fuchs EJ. High-dose cyclophosphamide for graft-versus-host disease prevention. *Curr Opin Hematol* 2010;17(6):493–9.
- [12] Luznik L, O'Donnell PV, Fuchs EJ. Post-transplantation cyclophosphamide for tolerance induction in HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Semin Oncol* 2012;39(6):683–93.
- [13] Kanakry CG, Tsai HL, Bolaños-Meade J, Smith BD, Gojo I, Kanakry JA, et al.

- Single-agent GVHD prophylaxis with posttransplantation cyclophosphamide after myeloablative, HLA-matched BMT for AML, ALL, and MDS. *Blood* 2014;124(25):3817–27.
- [14] Ildstad ST, Sachs DH. Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* 1984;307(5947):168–70.
- [15] Sykes M, Sheard M, Sachs DH. Effects of T cell depletion in radiation bone marrow chimeras. I. Evidence for a donor cell population which increases allogeneic chimerism but which lacks the potential to produce GVHD. *J Immunol* 1988;141(7):2282–8.
- [16] Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, et al. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1994;179(2):493–502.
- [17] Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M. Tr1 cells and the counterregulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014;380:39–68.
- [18] Kohrt HE, Turnbull BB, Heydari K, Shizuru JA, Laport GG, Miklos DB, et al. TLI and ATG conditioning with low risk of graft-versus-host disease retains antitumor reactions after allogeneic hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *Blood* 2009;114(5):1099–109.
- [19] Schneidawind D, Pierini A, Negrin RS. Regulatory T cells and natural killer T cells for modulation of GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2013;122(18):3116–21.
- [20] Arpaia N, Green JA, Molledo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A distinct function of regulatory T cells in tissue protection. *Cell* 2015;162(5):1078–89.
- [21] Fibbe WE, Rabelink TJ. Lupus nephritis: mesenchymal stromal cells in lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol* 2017;13(8):452–3.
- [22] Shevach EM. Mechanisms of FOXP3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30(5):636–45.
- [23] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10(7):490–500.
- [24] Bluestone JA, Tang Q, Sedwick CE. T regulatory cells in autoimmune diabetes: past challenges, future prospects. *J Clin Immunol* 2008;28(6):677–84.
- [25] Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive FOXP3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009;30(5):626–35.
- [26] Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 2001;193(11):1311–8.
- [27] Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* 2012;3:51.
- [28] McNally A, Hill GR, Sparwasser T, Thomas R, Steptoe RJ. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control CD8⁺ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(18):7529–34.
- [29] Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99(10):3493–9.
- [30] Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002;196(3):389–99.
- [31] Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002;196(3):401–6.
- [32] Godfrey WR, Ge YG, Spoden DJ, Levine BL, June CH, Blazar BR, et al. In vitro expanded human CD4⁺CD25⁺ T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood* 2004;104(2):453–61.
- [33] Hippen KL, Harker-Murray P, Porter SB, Merkel SC, Londer A, Taylor DK, et al. Umbilical cord blood regulatory T-cell expansion and functional effects of tumor necrosis factor receptor family members OX40 and 4-1BB expressed on artificial antigen-presenting cells. *Blood* 2008;112(7):2847–57.
- [34] Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, Baker SR, Liu B, Levine BL, et al. Cord blood CD4⁺CD25⁺-derived T regulatory cell lines express FOXP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 2005;105(2):750–8.
- [35] Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Jus'cin' ska J, Dobyszuk A, Krzystyniak A, Marek N, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4⁺CD25⁺CD127⁺ T regulatory cells. *Clin Immunol* 2009;133(1):22–6.
- [36] Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 2011;117(3):1061–70.
- [37] Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH, Hippen KL, DeFov TE, Sumstad D, et al. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood* 2016;127(8):1044–51.
- [38] Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117(14):3921–8.
- [39] Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, et al. HLAhaploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood* 2014;124(4):638–44.
- [40] Sockolosky JT, Trotta E, Parisi G, Picton L, Su LL, Le AC, et al. Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes. *Science* 2018;359(6379):1037–42.
- [41] Trotta E, Bessette PH, Silveria SL, Ely LK, Jude KM, Le DT, et al. A human anti-IL-2 antibody that potentiates regulatory T cells by a structure-based mechanism. *Nat Med* 2018;24(7):1005–14.
- [42] Chopra M, Biehl M, Steinfatt T, Brandl A, Kums J, Amich J, et al. Exogenous TNFR2 activation protects from acute GVHD via host Treg cell expansion. *J Exp Med* 2016;213(9):1881–900.
- [43] Chen X, Das R, Komorowski R, Beres A, Hessner MJ, Mihara M, et al. Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood* 2009;114(4):891–900.
- [44] Kennedy GA, Varelias A, Vuckovic S, Le Texier L, Gartlan KH, Zhang P, et al. Addition of interleukin-6 inhibition with tocilizumab to standard graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(13):1451–9.
- [45] Zhang P, Tey SK, Koyama M, Kuns RD, Oliver SD, Lineburg KE, et al. Induced regulatory T cells promote tolerance when stabilized by rapamycin and IL-2 in vivo. *J Immunol* 2013;191(10):5291–303.
- [46] Robb RJ, Lineburg KE, Kuns RD, Wilson YA, Raffelt NC, Oliver SD, et al. Identification and expansion of highly suppressive CD8⁺FOXP3⁺ regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2012;119(24):5898–908.
- [47] Beres AJ, Haribhai D, Chadwick AC, Gonyo PJ, Williams CB, Drobyski WR. CD8⁺FOXP3⁺ regulatory T cells are induced during graft-versus-host disease and mitigate disease severity. *J Immunol* 2012;189(1):464–74.
- [48] Selvaraj RK, Geiger TL. Mitigation of experimental allergic encephalomyelitis by TGF- β induced FOXP3⁺ regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance. *J Immunol* 2008;180(5):2830–8.
- [49] Godebu E, Summers-Torres D, Lin MM, Baaten BJ, Bradley LM. Polyclonal adaptive regulatory CD4 cells that can reverse type 1 diabetes become oligoclonal long-term protective memory cells. *J Immunol* 2008;181(3):1798–805.
- [50] Kang SG, Lim HW, Andrisani OM, Broxmeyer HE, Kim CH. Vitamin A metabolites induce gut-homing FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;179(6):3724–33.
- [51] Golovina TN, Mikheeva T, Brusko TM, Blazar BR, Bluestone JA, Riley JL. Retinoic acid and rapamycin differentially affect and synergistically promote the ex vivo expansion of natural human T regulatory cells. *PLoS ONE* 2011;6(1):e15868.
- [52] Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* 2008;322(5907):1562–5.
- [53] Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4⁺FOXP3⁺ T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor- β dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 2007;110(8):2983–90.
- [54] Lu L, Zhou X, Wang J, Zheng SG, Horwitz DA. Characterization of protective human CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells generated with IL-2, TGF- β and retinoic acid. *PLoS ONE* 2010;5(12):e15150.
- [55] Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, Sieben CM, Sumstad D, Kadidlo DM, et al. Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (Tregs) with minimal loss of in vivo functional activity. *Sci Transl Med* 2011;3(83):83ra41.
- [56] Hippen KL, O'Connor RS, Lemire AM, Saha A, Hanse EA, Tennis NC, et al. In vitro induction of human regulatory T cells using conditions of low tryptophan plus kynurenes. *Am J Transplant* 2017;17(12):3098–113.
- [57] Bailey-Bucktrout SL, Bluestone JA. Regulatory T cells: stability revisited. *Trends Immunol* 2011;32(7):301–6.
- [58] Zhou X, Bailey-Bucktrout S, Jeker LT, Bluestone JA. Plasticity of CD4⁺FOXP3⁺ T cells. *Curr Opin Immunol* 2009;21(3):281–5.
- [59] Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of FOXP3⁺ T cells into Th17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014;20(1):62–8.
- [60] Hua J, Inomata T, Chen Y, Foulsham W, Stevenson W, Shiang T, et al. Pathological conversion of regulatory T cells is associated with loss of allotolerance. *Sci Rep* 2018;8(1):7059.
- [61] McClymont SA, Putnam AL, Lee MR, Esensten JH, Liu W, Hulme MA, et al. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J Immunol* 2011;186(7):3918–26.
- [62] Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 2013;19(6):739–46.
- [63] Gregori S, Roncarolo MG. Engineered T regulatory type 1 cells for clinical application. *Front Immunol* 2018;9:233.
- [64] Zhang P, Lee JS, Gartlan KH, Schuster IS, Comerford I, Varelias A, et al. Eomesodermin promotes the development of type 1 regulatory T (TR1) cells. *Sci Immunol* 2017;2(10):eaah7152.
- [65] Bacchetta R, Lucarelli B, Sartirana C, Gregori S, Lupo Stanghellini MT, Miqueu P, et al. Immunological outcome in haploidentical-HSC transplanted patients treated with IL-10-nergized donor T cells. *Front Immunol* 2014;5:16.
- [66] Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30(8):896–904.
- [67] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276(5309):71–4.
- [68] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al.

- Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-7.
- [69] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
- [70] Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146⁺ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* 2008;36(5):642-54.
- [71] Auletta JJ, Eid SK, Wuttisarnwattana P, Silva I, Metheny L, Keller MD, et al. Human mesenchymal stromal cells attenuate graft-versus-host disease and maintain graft-versus-leukemia activity following experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Stem Cells* 2015;33(2):601-14.
- [72] Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103(12):4619-21.
- [73] Duffy MM, Pindjakova J, Hanley SA, McCarthy C, Weidhofer GA, Sweeney EM, et al. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell-differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur J Immunol* 2011;41(10):2840-51.
- [74] Qu X, Liu X, Cheng K, Yang R, Zhao RC. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Exp Hematol* 2012;40(9):761-70.
- [75] Highfill SL, Kelly RM, O'Shaughnessy MJ, Zhou Q, Xia L, Panoskaltis-Mortari A, et al. Multipotent adult progenitor cells can suppress graft-versus-host disease via prostaglandin E2 synthesis and only if localized to sites of allopriming. *Blood* 2009;114(3):693-701.
- [76] Wang D, Yu Y, Haarberg K, Fu J, Kaosaard K, Nagaraj S, et al. Dynamic change and impact of myeloid-derived suppressor cells in allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(5):692-702.
- [77] Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008;2(2):141-50.
- [78] Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunol Cell Biol* 2010;88(8):795-806.
- [79] Davies LC, Heldring N, Kadri N, Le Blanc K. Mesenchymal stromal cell secretion of programmed death-1 ligands regulates T cell mediated immunosuppression. *Stem Cells* 2017;35(3):766-76.
- [80] Lim JY, Ryu DB, Lee SE, Park G, Min CK. Mesenchymal stem cells (MSCs) attenuate cutaneous sclerodermatous graft-versus-host disease (Scl-GVHD) through inhibition of immune cell infiltration in a mouse model. *J Invest Dermatol* 2017;137(9):1895-904.
- [81] Phinney DG, Pittenger MF. Concise review: MSC-derived exosomes for cellfree therapy. *Stem Cells* 2017;35(4):851-8.
- [82] Di Trapani M, Bassi G, Midolo M, Gatti A, Kamga PT, Cassaro A, et al. Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Sci Rep* 2016;6(1):24120.
- [83] Mokarizadeh A, Delirezh N, Morshedi A, Mosayebi G, Farshid AA, Mardani K. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunol Lett* 2012;147(1-2):47-54.
- [84] Amarnath S, Foley JE, Farthing DE, Gress RE, Laurence A, Eckhaus MA, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells harness purinergic signaling to tolerate human Th1 cells in vivo. *Stem Cells* 2015;33(4):1200-12.
- [85] Ragni E, Banfi F, Barilani M, Cherubini A, Parazzi V, Larghi P, et al. Extracellular vesicle-shuttled mRNA in mesenchymal stem cell communication. *Stem Cells* 2017;35(4):1093-105.
- [86] Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, Lomas C, Dolcetti L, Cheung TS, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med* 2017;9(416):eaam7828.
- [87] Alfaro MP, Deskins DL, Wallus M, DasGupta J, Davidson JM, Nanney LB, et al. A physiological role for connective tissue growth factor in early wound healing. *Lab Invest* 2013;93(1):81-95.
- [88] Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE* 2008;3(4):e1886.
- [89] Reiter J, Drummond S, Sammour I, Huang J, Florea V, Dornas P, et al. Stromal derived factor-1 mediates the lung regenerative effects of mesenchymal stem cells in a rodent model of bronchopulmonary dysplasia. *Respir Res* 2017;18(1):137.
- [90] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363(9419):1439-41.
- [91] Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006;81(10):1390-7.
- [92] Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc* 2007;39(10):3358-62.
- [93] Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371(9624):1579-86.
- [94] Von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Hölig K, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant* 2009;43(3):245-51.
- [95] Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15(7):804-11.
- [96] Pérez-Simon JA, López-Villar O, Andreu EJ, Rifón J, Muntion S, Campelo MD, et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica* 2011;96(7):1072-6.
- [97] Herrmann R, Sturm M, Shaw K, Purtill D, Cooney J, Wright M, et al. Mesenchymal stromal cell therapy for steroid-refractory acute and chronic graft versus host disease: a phase 1 study. *Int J Hematol* 2012;95(2):182-8.
- [98] Muroi K, Miyamura K, Ohashi K, Murata M, Eto T, Kobayashi N, et al. Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. *Int J Hematol* 2013;98(2):206-13.
- [99] Kurtzberg J, Prockop S, Teira P, Bittencourt H, Lewis V, Chan KW, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(2):229-35.
- [100] Hashmi S, Ahmed M, Murad MH, Litzow MR, Adams RH, Ball LM, et al. Survival after mesenchymal stromal cell therapy in steroid-refractory acute graft-versus-host disease: systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematol* 2016;3(1):e45-52.
- [101] Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007;110(7):2764-7.
- [102] Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, Roelofs H, Zecca M, Avanzini MA, et al. Confusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2011;46(2):200-7.
- [103] MacMillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 2009;43(6):447-54.
- [104] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002;109(3):337-46.
- [105] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109(10):1291-302.
- [106] Boozer S, Lehman N, Lakshminpathy U, Love B, Raber A, Maitra A, et al. Global characterization and genomic stability of human multistem, a multipotent adult progenitor cell. *J Stem Cells* 2009;4(1):17-28.
- [107] Jacobs SA, Pinxteren J, Roobrouck VD, Luyckx A, van't Hof W, Deans R, et al. Human multipotent adult progenitor cells are nonimmunogenic and exert potent immunomodulatory effects on alloreactive T-cell responses. *Cell Transplant* 2013;22(10):1915-28.
- [108] Reading JL, Vaes B, Hull C, Sabbah S, Hayday T, Wang NS, et al. Suppression of IL-7-dependent effector T-cell expansion by multipotent adult progenitor cells and PGE2. *Mol Ther* 2015;23(11):1783-93.
- [109] Kovacs-Bankowski M, Streeter PR, Mauch KA, Frey MR, Raber A, van't Hof W, et al. Clinical scale expanded adult pluripotent stem cells prevent graft-versus-host disease. *Cell Immunol* 2009;255(1-2):55-60.
- [110] Maziarz RT, Devos T, Bachier CR, Goldstein SC, Leis JF, Devine SM, et al. Single and multiple dose MultiStem (multipotent adult progenitor cell) therapy prophylaxis of acute graft-versus-host disease in myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation: a phase 1 trial. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(4):720-8.
- [111] Riley JL, June CH, Blazar BR. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 2009;30(5):656-65.
- [112] McKenna DH Jr, Sumstad D, Kadidlo DM, Batdorf B, Lord CJ, Merkel SC, et al. Optimization of cGMP purification and expansion of umbilical cord blood-derived T-regulatory cells in support of first-in-human clinical trials. *Cytotherapy* 2017;19(2):250-62.
- [113] Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007;25(2):371-9.
- [114] Blazar BR, MacDonald KPA, Hill GR. Immune regulatory cell infusion for graft-versus-host disease prevention and therapy. *Blood* 2018;131(24):2651-60.
- [115] Agle K, Vincent BG, Piper C, Belle L, Zhou V, Shlomchik W, et al. Bim regulates the survival and suppressive capability of CD8⁺FOXP3⁺ regulatory T cells during murine GVHD. *Blood* 2018;132(4):435-47.
- [116] Belle L, Agle K, Zhou V, Yin-Yuan C, Komorowski R, Eastwood D, et al. Blockade of interleukin-27 signaling reduces GVHD in mice by augmenting Treg reconstitution and stabilizing FOXP3 expression. *Blood* 2016;128(16):2068-82.
- [117] Heinrichs J, Li J, Nguyen H, Wu Y, Bastian D, Daethanasanmak A, et al. CD8⁺

- Tregs promote GVHD prevention and overcome the impaired GVL effect mediated by CD4⁺ Tregs in mice. *Oncolimmunology* 2016;5(6):e1146842.
- [118] Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, Veenstra R, et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 2010;116(25):5738–47.
- [119] Koehn BH, Apostolova P, Haverkamp JM, Miller JS, McCullar V, Tolar J, et al. GVHD-associated, inflammasome-mediated loss of function in adoptively transferred myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 2015;126(13):1621–8.
- [120] Zhou Z, French DL, Ma G, Eisenstein S, Chen Y, Divino CM, et al. Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2010;28(3):620–32.
- [121] Leveson-Gower DB, Olson JA, Segal EI, Luong RH, Baker J, Zeiser R, et al. Low doses of natural killer T cells provide protection from acute graft-versus-host disease via an IL-4-dependent mechanism. *Blood* 2011;117(11):3220–9.
- [122] Schneidawind D, Baker J, Pierini A, Buechele C, Luong RH, Meyer EH, et al. Third-party CD4⁺ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality. *Blood* 2015;125(22):3491–500.
- [123] Du J, Paz K, Thangavelu G, Schneidawind D, Baker J, Flynn R, et al. Invariant natural killer T cells ameliorate murine chronic GVHD by expanding donor regulatory T cells. *Blood* 2017;129(23):3121–5.
- [124] Bruce DW, Stefanski HE, Vincent BC, Dant TA, Reisdorf S, Bommasamy H, et al. Type 2 innate lymphoid cells treat and prevent acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2017;127(5):1813–25.
- [125] Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* 2003;101(9):3581–9.
- [126] Sato K, Yamashita N, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity* 2003;18(3):367–79.
- [127] MacDonald KP, Rowe V, Clouston AD, Welpley JK, Kuns RD, Ferrara JL, et al. Cytokine expanded myeloid precursors function as regulatory antigenpresenting cells and promote tolerance through IL-10-producing regulatory T cells. *J Immunol* 2005;174(4):1841–50.
- [128] Yang J, Li R, Ren Y, Yang Y, Xie R, Fan H. Third-party tolerogenic dendritic cells reduce allo-reactivity in vitro and ameliorate the severity of acute graft-versus-host disease in allo-bone marrow transplantation. *Scand J Immunol* 2013;78(6):486–96.
- [129] D'Aveni M, Rossignol J, Coman T, Sivakumaran S, Henderson S, Manzo T, et al. G-CSF mobilizes CD34⁺ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* 2015;7(281):281ra42.