

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Abatacept Downregulates Fcγ Receptor I on Circulating Monocytes: A Potential Therapeutic Mechanism in Patients with Rheumatoid Arthritis

アバタセプトによる末梢血単球上の Fcγ 受容体Iの発現抑制：関節リウマチ患者に対する治療メカニズムの可能性

日本医科大学大学院医学研究科 アレルギー膠原病内科学分野
大学院生 福榮 亮介
Arthritis Research & Therapy 24 巻 1 号（2022 年）掲載
DOI: [org/10.1186/s13075-022-02886-8](https://doi.org/10.1186/s13075-022-02886-8)

アバタセプトは細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (CTLA4) の細胞外ドメインと免疫グロブリン G1 (IgG1) の Fc 部分を融合したリコンビナント蛋白で、関節リウマチ (RA) 治療薬として広く用いられている。アバタセプトの作用機序は、T 細胞活性化に必須な抗原提示細胞上の CD80/CD86 と T 細胞上に発現される共刺激分子 CD28 との結合の競合的阻害と考えられ、T 細胞共刺激阻害薬に分類されている。一方、CTLA4 は CD80、CD86 への結合を介して B 細胞、マクロファージ、破骨細胞前駆細胞などに直接作用し、T 細胞非依存的に獲得免疫応答、炎症、細胞分化に対して抑制的に作用することが報告されている。本研究では、アバタセプトが末梢血単球の短期培養に与える影響を調べることで、RA 病態におけるアバタセプトの T 細胞非依存的な作用機序を追究することを目的とした。

米国リウマチ学会/欧州リウマチ学会による分類基準を満たし、疾患活動性を有する RA 患者 57 例を対象とし、健常者や非炎症性骨関節疾患から構成される 12 例を対照とした。末梢血から比重遠心法で単核球を分離し、MACS[®]磁気ビーズを用いて高純度 CD14 陽性単球を精製した。末梢血単球をアバタセプトまたは CD28 と IgG1 の Fc 部分を融合したリコンビナント蛋白 (CD28-Ig) 存在下で 37°C、24 時間培養し、既報で RA 病態との関連が示されている単球由来因子の発現変動を調べた。細胞表面マーカーの発現強度、サイトカイン/ケモカイン濃度はフローサイトメトリーで測定した。また、末梢血単球の全細胞溶解液を抗原とした免疫ブロットでは、目的とする分子の発現レベルを β-actin に対するシグナル強度比で表した。さらに、シトルリン化したフィブリノゲンを抗シトルリン化蛋白抗体 (ACPA) 高力価陽性 RA 患者血清由来 IgG と反応させることで ACPA 免疫複合体を作成し、アバタセプト存在下での末梢血単球培養に添加し、上清中のサイトカイン/ケモカイン

濃度を測定した。本研究は日本医科大学付属病院倫理委員会で承認を受け、全ての被験者から研究参加前に文書によるインフォームドコンセントを取得した。

まず、RA 患者、対照各 5 例を用いて 20 膜表面分子と 8 サイトカイン/ケモカインの発現変動をスクリーニングし、アバタセプトまたは CD28-Ig 存在下で発現が変動する候補分子として CD64/Fcγ 受容体 I (FcγRI)、CD80、CD86、CXCR2 が抽出された。これら候補分子の発現変動について RA 患者 20 例と対照 8 例の末梢血単球を用いて検証したところ、アバタセプト存在下で CD28-Ig 存在下と異なる発現変動を示す分子として CD64/FcγRI が同定された。CD64/FcγRI の発現は、RA 群、対照群いずれにおいてもアバタセプト添加によって減少したが、CD28-Ig 添加で有意な変動はなかった。アバタセプトによる CD64/FcγRI 発現抑制作用は末梢血単球全細胞溶解液を抗原とした免疫ブロットでも確認された。アバタセプトによる CD64/FcγRI 発現低下は培養 6 時間後で見られ、少なくとも 48 時間後まで持続した。また、アバタセプトの IgG1-Fc 部分のみで CD64/FcγRI 発現低下は観察されず、発現変動は CTLA4 部分を介していた。CTLA4 が結合する単球上の受容体を同定するため、アバタセプト存在下での末梢血単球培養に抗 CD80 抗体、抗 CD86 抗体、または両抗体を加えたところ、抗 CD86 抗体存在下でのみ CD64/FcγRI 発現低下が阻害された。最後に、ACPA 陽性未治療 RA 患者 19 例の末梢血単球をアバタセプト添加および非添加の条件下で ACPA 免疫複合体と 24 時間培養したところ、ACPA 免疫複合体刺激により誘導された IL-1β、IL-6、CCL2、TNFα の産生はアバタセプト添加により抑制された。

本研究では、アバタセプトが末梢血単球上の CD86 に結合し、CD64/FcγRI の発現を速やかに低下させることにより、ACPA 免疫複合体により誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制する新たな作用機序を見出した。アバタセプトが RA 病態を改善する機序として、T 細胞共刺激阻害だけでなく、T 細胞非依存的な作用を含めた多面的なメカニズムを介することが示された。アバタセプトと TNF 阻害薬の効果を比較した無作為化二重盲検比較試験では、両薬剤とも速やかな作用発現を示した。直接的な抗サイトカイン作用を持たないアバタセプトにみられる迅速な効果発現機序として、今回見出された末梢血単球における CD64/FcγRI 発現抑制を介した迅速な炎症性サイトカイン産生抑制で説明が可能である。また、アバタセプトの臨床効果が ACPA 高値陽性例で高い知見も、ACPA 免疫複合体が誘導する単球活性化の抑制機序で説明が可能である。本研究により TNF 阻害薬、IL-6 阻害薬と異なるアバタセプトの多面的な作用機序の一つが解明された。本成果は RA 患者における生物学的製剤の使い分け、効果予測などに役立つものと考えられる。

第二次審査では、使用した細胞分離や免疫ブロットの実験手技、統計解析方法の妥当性、CTLA4 が CD86 に結合後に CD64/FcγRI の発現を低下させる分子メカニズム、本研究成果の将来的な応用について質問があったが、いずれも本研究から得られた知見や文献的考察からの確かな回答が得られた。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。