

「Effects of certolizumab pegol on human monocytes」

(単球に対するセルトリズマブペゴルの効果の検討)

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 膠原病・感染内科学
星山 隆行

[研究背景]

関節リウマチ(RA)は関節破壊を引き起こす慢性炎症性疾患である。炎症性サイトカインの中でも TNF- α は、RA において中心的な役割を果たすことが知られており、実際に TNF- α 阻害薬は RA の治療にパラダイムシフトを起こした。

セルトリズマブペゴル(CZP)は抗 TNF- α モノクローナル抗体の Fab'領域をポリエチレングリコール(PEG)化した薬剤である。CZP による RA 治療は従来の TNF- α 阻害剤に匹敵する有益な効果を示してきた。CZP は Fc 領域の欠如により、Fc を介する補体依存性細胞障害(CDC)や抗体依存性細胞障害(ADCC)などを最小限に抑えていることが他の TNF- α 阻害剤と異なる。

我々は以前にエタネルセプトおよびインフリキシマブ(IFX)がヒト単球のアポトーシスを促進させるだけでなく、IL-6 の mRNA の発現を抑制させることを明らかにした。さらに重要なことは、これらの効果は過剰な IgG の添加により減弱するが過剰な IgG の F(ab')₂ の添加によっては変化がなかったことであり、これはエタネルセプトおよび IFX がヒト単球に与える効果の中で Fc 受容体との相互作用が重要であることを示している。

CZP は Fc 領域を欠いているので、ヒト単球に対する効果は IFX などの Fc 構造を有する他の TNF 阻害剤とは異なる可能性がある。本研究はヒト単球に対する CZP と IFX の効果を比較検討したものである。

[方法]

健康人ボランティアより末梢血を採取し、Ficoll 比重遠心法にて末梢血単核球を分離した。その後、磁気分離カラムを用いて negative selection により単球を単離した。

細胞培養は精製された単球(1×10^6 /well)に CZP、IFX、IgG もしくは PEG を臨床的濃度(0.1~100 μ g/ml)で添加し、24 穴平底プレートで培養した。培養液はペニシリン G(100 U/ml)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml)、L-グルタミン(0.3 mg/ml)及び 10%ウシ胎児血清(FBS)または 10%自家正常ヒト血清(NHS)を添加した RPMI 1640 を使用した。24 時間後に上清を新鮮な培養液と交換し、LPS(0.5 μ g/ml)を添加してさらに 24 時間後に上清を回収した。PCR での mRNA 分析のために用いる細胞は、上清交換した 1 時間後に回収した。回収した培養上清中の TNF- α および IL-6 の濃度は、ELISA 法で測定した。

また、TNF- α に対する中和作用を検討するため、リコンビナント TNF- α (1 ng/ml)を溶解した培養液に 10 μ g/ml の CZP、IFX、対照として IgG もしくは PEG を加えて 2 時間静置後の TNF- α 濃度を ELISA 法で測定した。

ISOGEN を用いて回収した単球から総 RNA を単離した。1 μ g の総 RNA からランダムプライマーおよび M-MLV 逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を用いて分析を行った。得られた結果は、同じ cDNA 試料から得られた β -actin のコピー数で較正した。

統計的有意性は、Wilcoxon 符号付き順位検定、対応のある t 検定を用いて評価した。

[結果]

CZP の TNF- α 中和作用

培養液中の既知の濃度のリコンビナント TNF- α に対する CZP と IFX の中和能力を比較した。対照の IgG および PEG は ELISA 法による TNF- α の測定値に影響を与えなかったが、CZP と IFX は TNF- α の測定値を減少させており、その効果は CZP の方が IFX より強かった。

CZP のヒト単球に対する炎症性サイトカイン産生への効果

CZP と IFX は培養液中のリコンビナント TNF- α を中和することが示されたので、方法に記載した 2 段階の培養系を使用して単球の TNF- α 産生に対する CZP と IFX の効果を比較した。CZP および IFX の両者において培養上清中の TNF- α は用量依存的に低下していた。

さらに CZP と IFX の臨床的濃度(10 $\mu\text{g/ml}$)における複数の健常人から分離した単球からの TNF- α および IL-6 産生に対する効果を調べた。CZP も IFX もそれぞれ対照 PEG または IgG と比較して TNF- α および IL-6 の産生を有意に阻害していた。

TNF- α の mRNA 発現に対する CZP の効果

同様な 2 段階の培養系において、CZP は PEG と比較して、複数の健常人から分離した単球の TNF- α の mRNA 発現を有意に抑制していた。

自家血清もしくはウシ血清による CZP および IFX のヒト単球に対する効果の相違

同様な 2 段階の培養系において、NHS を含む培養液で培養すると、FBS を含む培養液で培養した場合に比べ、IFX による単球の TNF- α 産生抑制効果は減弱したが、CZP による TNF- α 産生抑制効果は減弱しなかった。

[考察]

CZP と IFX は TNF- α 阻害剤として RA の治療において同等の有益な効果を有している。本研究において CZP は IFX とはいくつか異なる特徴を持つことがわかった。まず、CZP の可溶性 TNF- α に対する中和作用は同一濃度では IFX より強力だった。IFX と CZP の分子量はそれぞれ約 144kDa と 90kDa であるため、同一質量ではほぼ同数の TNF- α 結合部位を含んでいる。従って、CZP は IFX より強い結合活性を有する可能性が示唆された。実際には、PEG 化がタンパク質分解を阻害することによって Fab '分子の循環半減期を有意に延長させることが実証されており、CZP は TNF- α を中和する能力で IFX より優れている可能性が高い。

CZP の存在下における単球の 2 段階培養後の上清中 TNF- α 濃度は、PEG と比較して有意に低かった。培養液の交換により上清中の CZP は完全に除去されているため、上

清中 TNF- α 濃度の低下は、CZP による TNF- α の中和作用では説明することができない。むしろ、CZP が直接単球に作用して TNF- α の産生を阻害することが強く示唆される。実際に、CZP と IFX は他の炎症性サイトカイン IL-6 の産生を抑制した。また、CZP は LPS 刺激単球における TNF- α の mRNA の発現を抑制した。単球からの炎症性サイトカイン産生を抑制する直接的な効果は、IFX と同様に CZP でも確認できた。

IFX はヒト単球からの炎症性サイトカインの産生を抑制することは知られている。単球表面の Fc 受容体は、単球に対する IFX の産生抑制効果に関与していることが重要である。我々は以前に、IFX の TNF- α 産生抑制効果は過剰な IgG 存在下では減弱するものの、過剰な F(ab')₂ 存在下では変化しないことを報告した。本研究においても、NHS 存在下の培養では IFX の TNF- α 産生抑制効果は減弱した。一方、CZP の TNF- α 産生抑制効果は NHS 存在下の培養では減弱せず、むしろ増強される傾向にあったのは特記すべきことである。この結果は、CZP は IFX とは異なる機構を介してヒト単球の TNF- α の産生を抑制している可能性を示唆している。

CZP によるヒト単球のサイトカイン産生抑制の正確なメカニズムはまだ解明されておらず、Fab'だけでは全て説明できない可能性がある。一方、PEG は単球と相互作用することが見出されており、条件によっては単球の機能を刺激することが示されている。他の条件では、PEG はヒト血液単球由来のマクロファージのアポトーシスを促進することが示されている。CZP は膜結合型 TNF- α と PEG の相互作用を介して単球の機能に影響を与える可能性がある。ヒト単球に対する CZP の作用を解明するためにさらなる研究が望まれる。

本研究は *in vitro* でヒト単球に対する CZP の抑制効果を明らかにした。CZP の特徴は、可溶性 TNF- α に対する強力な中和作用と TNF- α の mRNA 発現の抑制である。また、CZP は IFX と異なり、過剰な IgG の存在下でも TNF- α 産生抑制効果に影響を及ぼさなかったことは注目すべきである。CZP の作用を完全に解明するためには、PEG の役割を明らかにするさらなる研究が必要であると考えられる。