

CTD 第 2 部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

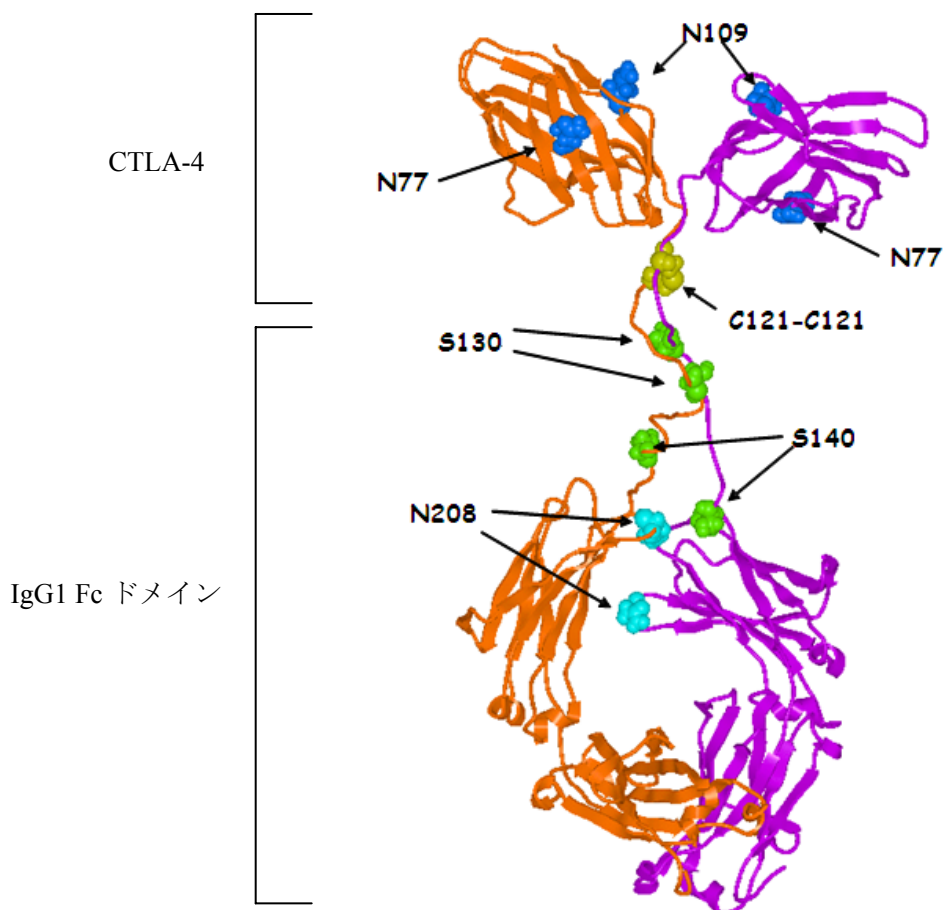
ブリistol・マイヤーズ株式会社

緒言

アバタセプト (BMS-188667) は、ヒト CTLA-4 の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc ドメイン (ヒンジ-CH2-CH3 ドメイン) より構成された遺伝子組換え可溶性融合蛋白である。本薬は Fc γ 受容体に結合するが (表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-13)、ヒト IgG1 のヒンジドメインに変異を有し、補体結合反応が誘導される可能性は低い (表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-11)。

ヒト CTLA-4 とヒト IgG1 の結晶構造を用いたアバタセプトの構造を図 1-1 に示す。本薬は二量体構造であり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量約 100 kDa (非還元型) と約 50 kDa (還元型) の蛋白に分離される。ヒト IgG1 遺伝子に変異を有するため、Fc 鎖間でジスルフィド結合が形成されない。そのため、本薬は CTLA-4 の一カ所のジスルフィド結合のみで二量体構造をとっている。また、CTLA-4 及び IgG1 にそれぞれ糖鎖付加位置を有する。

図 1-1: アバタセプトの構造



N77, N109 及び N208 : N-結合型糖鎖付加位置

S130 及び S140 : O-結合型糖鎖付加位置

C121-C121 : ジスルフィド結合位置

本薬は CD28 共刺激シグナルを選択的かつ抑制的に調節することで、*in vitro* において抗原特異的な T 細胞の増殖及びサイトカインの産生を抑制する。また、*in vivo* においても T 細胞依存性の抗体産生を抑制し、関節リウマチなどの各種病態モデルに対して有効性を示す。

関節リウマチは関節滑膜での自己免疫の破綻を特徴とする慢性の炎症疾患であり、病態発症において活性化 T 細胞が重要な役割を担っていると考えられている。そこで、アバタセプトの新規関節リウマチ治療薬としての開発を開始し、その有用性が確認されたため、今回、下記の内容で製造販売承認申請を行うに至った。

申請品目	オレンシア点滴静注用 250 mg		
効能・効果	関節リウマチ（既存治療で効果不十分な場合に限る）		
用法・用量	通常、成人にはアバタセプト（遺伝子組換え）として以下の用量を 1 回の投与量とし点滴静注する。初回投与後、2 週、4 週に投与し、以後 4 週間の間隔で投与を行うこと。		
	患者の体重	投与量	バイアル数
	60 kg 未満	500 mg	2 バイアル
	60 kg 以上 100kg 以下	750 mg	3 バイアル
	100 kg を超える	1 g	4 バイアル

CTD 第 2 部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

ブリistol・マイヤーズ株式会社

用語及び略語一覧

APC	Antigen presenting cell	抗原提示細胞
BMS	Bristol-Myers Squibb	ブリistol・マイヤーズ スクイブ
CD	Cluster designation	-
CIA	Collagen-induced arthritis	コラーゲン誘発関節炎
Cmin	Trough serum concentration	血清中トラフ濃度
CMV	Cytomegalovirus	サイトメガロウイルス
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4	-
CTLA4Ig	A fusion protein formed by fusing the extracellular domain of human CTLA-4 to the hinge and constant regions of human IgG1	ヒト CTLA-4 の細胞外ドメインとヒト IgG1 のヒンジ領域及び定常領域との融合蛋白
CT	Computed tomography	コンピュータ断層撮影
dsDNA	Double-strand deoxyribonucleic acid	二本鎖デオキシリボ核酸
EBV	Epstein Barr Virus	エプスタインバーウイルス
ECG	Electrocardiogram	心電図
Fc	Fragment crystalline of an antibody	-
foxp3	Forkhead box P3	フォークヘッド P3 遺伝子産物
GITR	Glucocorticoid-induced TNF receptor	-
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR	ヒト白血球抗原-DR
HSV	Herpes simplex virus	単純ヘルペスウイルス
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Resistration of Pharmaceuticals for Human Use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
ICOS	Inducible costimulator	-
IDO	Indoleamine dioxygenase	インドールアミンジオキシゲナーゼ
IFN	Interferon	インターフェロン
Ig	Immunoglobulin	免疫グロブリン
IL	Interleukin	インターロイキン
Kd	Dissociation constant	結合解離定数
KLH	Keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
LCMV	Lymphocytic choriomeningitis virus	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス
LPS	Lipopolysaccharide	リポ多糖
MHC	Major histocompatibility complex	主要組織適合遺伝子複合体
MLR	Mixed lymphocyte response	混合リンパ球反応
MLV	Murine leukemia virus	マウス白血病ウイルス
MMF	Mycophenolate mofetil	ミコフェノール酸モフェチル
MMP	Matrix metalloprotease	マトリックスメタロプロテアーゼ

MMTV	Mouse mammary tumor virus	マウス乳癌ウイルス
NK	Natural killer	ナチュラルキラー
NOD	Non-obese diabetic	非肥満性糖尿病
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PC	Pneumocystis carinii	カリニ真菌
PFU	Plaque-forming unit	プラーク形成単位
PD-1	Programmed death-1	-
RA	Rheumatoid arthritis	関節リウマチ
RANK	Receptor activator of NFκB	NFκB 活性化受容体
RANKL	Receptor activator of NFκB ligand	破骨細胞分化誘導因子
RF	Rheumatoid factor	リウマチ因子
SD	Standard deviation	標準偏差
SEM	Standard error of the mean	平均値の標準誤差
SLE	Systemic lupus erythematosus	全身性エリテマトーデス
SRBC	Sheep red blood cells	ヒツジ赤血球
TCR	T-cell receptor	T 細胞受容体
TGF	Transforming growth factor	トランスフォーミング増殖因子
TNF	Tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
VSV	Vesicular stomatitis virus	水疱性口内炎ウイルス

目次

1	まとめ	9
2	効力を裏付ける試験	10
2.1	作用機序	10
2.1.1	関節リウマチにおける T 細胞の役割	10
2.1.2	T 細胞活性化における共刺激シグナルの役割	12
2.1.2.1	CD28 共刺激シグナル	13
2.1.2.2	共刺激シグナルの複雑性	13
2.1.2.3	ナイーブ T 細胞の共刺激シグナル依存性	13
2.1.2.4	その他の共刺激シグナル	14
2.1.2.5	CD4 陽性 T 細胞の共刺激シグナル依存性	14
2.1.3	アバタセプトの CD28 共刺激シグナルに対する作用	16
2.1.3.1	構造と結合性	16
2.1.3.2	T 細胞の増殖及びサイトカイン産生に対する作用 (<i>in vitro</i>)	20
2.1.3.3	T 細胞依存性抗体産生に対する作用 (<i>in vivo</i>)	32
2.1.3.4	関節炎モデルに対する作用 (<i>in vivo</i>)	36
2.1.3.5	他の T 細胞関連疾患に対する作用 (<i>in vivo</i>)	42
2.1.3.6	CD80/CD86 を介したアバタセプトの作用機序のまとめ	42
2.1.4	アバタセプトのその他の作用	43
2.1.4.1	制御性 T 細胞	43
2.1.4.2	抗原提示細胞 (APC)	46
2.2	感染防御機構に及ぼす影響	46
2.2.1	ウイルス	48
2.2.1.1	CD4 陽性 T 細胞に低依存性のウイルス感染	48
2.2.1.2	CD4 陽性 T 細胞に高依存性のウイルス感染	50
2.2.1.3	慢性ウイルス感染	50
2.2.2	細胞内細菌	51
2.2.3	真菌	52
2.2.4	寄生虫	53
2.2.5	悪性腫瘍	53
2.2.6	自己免疫疾患	54
3	副次的薬理試験	55
4	安全性薬理試験	56
4.1.1	サルにおける 1 ヶ月間間歇静脈内投与毒性試験	56
4.1.2	サルにおける 6 ヶ月間間歇静脈内投与毒性試験 (belatacept)	56
4.1.3	サルにおける 1 年間間歇静脈内投与毒性試験	57

5	薬力学的薬物相互作用試験	58
6	考察及び結論	59
7	参考文献	60

表一覧

表 2-1:	ヒトナイーブ T 細胞の増殖に対するアバタセプトの作用－E-PBMC－	21
表 2-2:	ヒトナイーブ T 細胞の増殖に対するアバタセプトの作用－PM-LCL－	21
表 2-3:	投与群の内訳	36
表 2-4:	感染防御機構に対するアバタセプトの作用	47
表 2-5:	mCMV 感染マウスにおける各組織のウイルス量 (\log_{10} pfu/g) に対するアバタセプトの影響	49
表 2-6:	PC 感染マウスにおけるアバタセプト及びデキサメタゾンの影響	52

図一覧

図 2-1:	関節リウマチにおける T 細胞の役割.....	11
図 2-2:	マクロファージ由来細胞 U937 におけるアバタセプトの結合性	17
図 2-3:	ヒト B リンパ芽球腫細胞 Raji におけるアバタセプトの結合性	17
図 2-4:	補体依存性細胞傷害活性に対するアバタセプトの作用	18
図 2-5:	共刺激シグナルに対するアバタセプトの作用	19
図 2-6:	ヒトナイーブ T 細胞に対するアバタセプトの作用.....	22
図 2-7:	T 細胞に対する抗原提示細胞の割合とヒトナイーブ T 細胞増殖に対するアバタセ プトの作用の関係.....	23
図 2-8:	ヒトナイーブ T 細胞によるサイトカイン産生に対するアバタセプトの作用	23
図 2-9:	ヒトメモリーT 細胞の増殖に対するアバタセプトの作用.....	25
図 2-10:	ヒトメモリーT 細胞に対するアバタセプトの作用.....	26
図 2-11:	ヒトメモリーT 細胞によるサイトカイン産生に対するアバタセプトの作用.....	27
図 2-12:	CD8 陽性 T 細胞による細胞傷害活性に対する CTLA4Ig の作用.....	28
図 2-13:	ヒト単球における TNF- α 産生に対するアバタセプトの作用	29
図 2-14:	ヒト単球における TNF- α 産生に対するアバタセプトの作用	30
図 2-15:	免疫複合体存在下でのヒト単球における TNF- α 産生に対するアバタセプトの作用....	31
図 2-16:	一次抗体及び二次抗体産生に対するアバタセプトの作用	33
図 2-17:	T 細胞依存性の抗体産生に対するアバタセプトの作用.....	34
図 2-18:	CIA ラットにおけるアバタセプトの足浮腫に対する予防効果	37
図 2-19:	抗コラーゲン抗体の産生に対するアバタセプトの作用	38
図 2-20:	CIA ラットにおけるアバタセプトのサイトカインに対する作用	39
図 2-21:	CIA ラットにおけるアバタセプトの骨破壊に対する組織学的評価.....	40
図 2-22:	CIA マウスにおけるマウス CTLA4Ig の病態進行に対する治療効果.....	41
図 2-23:	活性化 T 細胞に対するアバタセプトの作用.....	44
図 2-24:	活性化 T 細胞表面での CTLA-4 (CD152) 発現に対するアバタセプトの作用.....	45

1 まとめ

アバタセプト (BMS-188667) は、ヒト CTLA-4 の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc ドメイン (ヒンジ-CH2-CH3 ドメイン) より構成された遺伝子組換え可溶性融合蛋白である。本薬は Fc γ 受容体に結合するが、ヒト IgG1 のヒンジドメインに変異を有し、補体結合反応が誘導される可能性は低い。

静止期にある T 細胞の活性化には少なくとも 2 種類のシグナルが必要であり、第一シグナル (抗原特異的シグナル) は T 細胞受容体 (TCR) により伝達され、第二シグナル (共刺激シグナル) は共刺激分子を介する。共刺激分子は複数存在するが、T 細胞表面の CD28 と抗原提示細胞 (APC) 表面の CD80/CD86 との相互作用が T 細胞の活性化に最も重要な共刺激シグナルである。アバタセプトは CD80/CD86 に高い親和性を示し、T 細胞の活性化を選択的かつ抑制的に調節する。

アバタセプトはヒト及びげっ歯類の CD80/CD86 に結合することから、げっ歯類及びサルを用いて本薬の薬理作用を検討した。その結果、本概要文に示すようにアバタセプトは CD28 共刺激シグナルを阻害することで、*in vitro* において抗原特異的な T 細胞の増殖を減弱し、炎症性サイトカインの産生を抑制した。また、*in vivo* において、本薬は T 細胞に依存した抗体産生を抑制し、関節リウマチ (RA) や全身性エリテマトーデス (SLE) などの T 細胞関連疾患モデルに対して有効性を示した。さらに、アバタセプトは感染防御機構にはほとんど作用せず、病原体に対する自然免疫は大部分が維持されることが示された。

2 効力を裏付ける試験

アバタセプトはヒト CTLA-4 の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc ドメインより構成された遺伝子組換え可溶性融合蛋白であり、CD28 共刺激シグナルを選択的かつ抑制的に調節する。本概要文では、本薬を RA 治療薬として開発する科学的妥当性について検討した。2.6.2.2.1.1 では RA における T 細胞の役割について要約し、本薬を RA 治療薬として開発する根拠を示した。2.6.2.2.1.2 では T 細胞活性化における共刺激シグナル、特に CD28 共刺激シグナルの役割について記載した。続く 2.6.2.2.1.3 においてアバタセプトの CD28 共刺激シグナルに対する作用、*in vitro* 及び *in vivo* での T 細胞に対する作用について検討した。2.6.2.2.2 では、CD28 共刺激シグナル阻害の感染防御機構に及ぼす影響について考察した。その結果、以下の 4 点が示された。

- (1) 活性化 T 細胞は RA の治療標的となる
- (2) アバタセプトは CD28 共刺激シグナルを選択的に阻害することで T 細胞の活性化を調節する
- (3) アバタセプトは T 細胞の活性化を抑制することで RA 病態モデルにおいて有効性を示す
- (4) 感染防御機構はおおむね維持されている

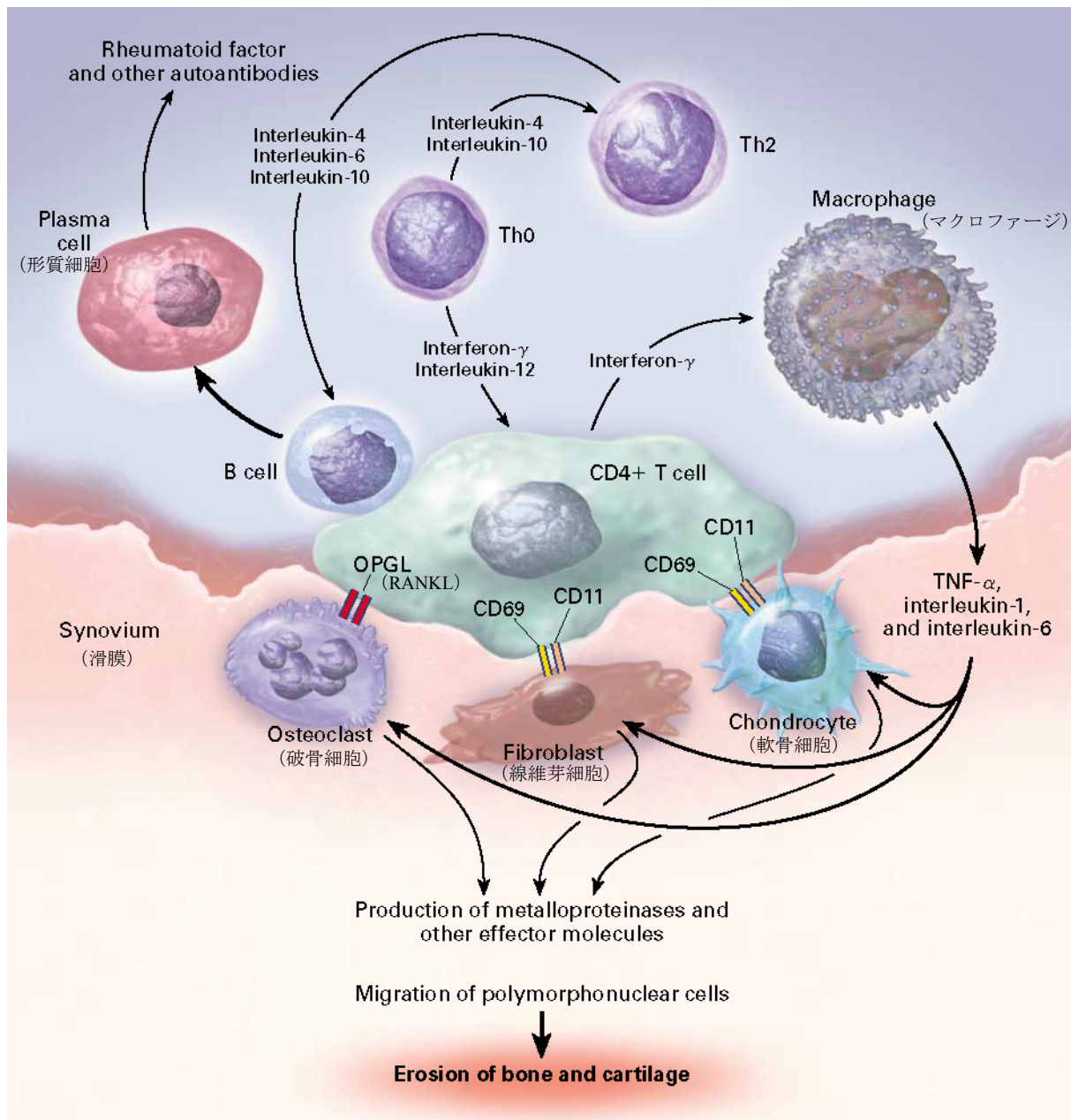
したがって、アバタセプトを RA 治療薬として開発することは科学的に妥当と判断した。

2.1 作用機序

2.1.1 関節リウマチにおける T 細胞の役割

現在用いられている RA 病態モデルの多くは、炎症及び関節破壊において T 細胞が重要な役割を担っている^{1),2),3)}。病態発症初期に T 細胞を活性化する抗原は同定されていないが、抗原特異的な T 細胞により免疫応答が誘導されると考えられている⁴⁾。T 細胞は関節内で他の炎症細胞や結合組織細胞を活性化し、可溶性の炎症性メディエーター及び蛋白分解酵素が産生され、最終的に骨、軟骨及び周辺軟部組織の破壊がおこると報告されている⁵⁾。これらの一連のカスケードを図 2-1 に示す。

図 2-1: 関節リウマチにおける T 細胞の役割



出典：参考文献³⁾改変

T 細胞により産生されたインターフェロン (IFN) γ は滑膜マクロファージを刺激し、腫瘍壊死因子 (TNF) α 、インターロイキン (IL) -1 及び IL-6 などの産生を誘導する。これらの炎症性サイトカインにより全身性の炎症反応が起こり、線維芽細胞様滑膜細胞及び軟骨細胞からマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が産生される。また、T 細胞は膜結合型受容体とリガンドの相互作用により単球/マクロファージを活性化させる^{6,7)}。さらに、活性化 T 細胞は B 細胞の分化及び増殖を増強し、その結果、リウマチ因子 (RF) などの自己抗体の産生が亢進する。自己抗体

は標的抗原と結合して免疫複合体を形成し、補体経路を活性化させると考えられている。RA 患者由来の RF は、親和性成熟及び IgM から IgG へのクラススイッチを受けるため、T 細胞依存性抗体としての特性を有している⁸⁾。

分子機構は不明であるが、T 細胞は関節内の結合組織と直接相互作用する。その結果、炎症性カスケードが増強され、MMP などの関節破壊メディエーターが産生されたと考えられている⁹⁾。T 細胞と滑膜内の線維芽細胞との相互作用により TNF- α などの炎症性サイトカインの産生が亢進する^{9),10)}。また、活性化 T 細胞は単球/マクロファージ系由来の大型で多核の破骨細胞との相互作用により RA 患者での関節破壊にも関与している。すなわち、活性化 T 細胞（及びその他の細胞）は破骨細胞分化誘導因子（RANKL）を発現し、破骨細胞の分化を誘導する。破骨細胞の形成は NF κ B 活性化受容体（RANK）と RANKL の相互作用に完全に依存している¹¹⁾。したがって、RANKL を発現する活性化 T 細胞と破骨前駆細胞の相互作用は RA での関節破壊に直接関与していると考えられる。

また、RA 発症機序及び免疫遺伝学的見地から T 細胞を介した免疫応答は関節炎症を促進することが強く示唆されている^{12),13)}。T 細胞は RA 患者の関節滑液中に存在しており¹⁴⁾、大部分が活性化したメモリー T 細胞である¹⁵⁾。IL-17 などの T 細胞特異的な炎症性サイトカインについても RA 患者の滑液から検出される。IL-17 は軟骨及び骨破壊に関与しており、滑膜細胞からの MMP 産生及び破骨細胞分化を増強し^{16),17)}、さらに内皮細胞及び滑膜細胞からのサイトカイン産生を亢進させる¹⁸⁾。早期 RA 患者では滑液への T 細胞の浸潤の程度は予後不良と相関し¹⁵⁾、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラス II ヒト白血球抗原-DR（HLA-DR）遺伝子と RA との密接な遺伝的相関が報告されている^{19),20)}。HLA-DR は主に CD4 陽性 T 細胞に抗原を提示するが、RA 発症に関与が示唆されている抗原は共通かつ特有のアミノ酸配列を有している¹³⁾。HLA-DR 対立遺伝子は、より重篤で骨びらん性の RA と関連しているが、その機序については不明である¹³⁾。したがって、RA（特に重篤で骨びらん性の RA）における炎症及び関節破壊は、活性化された抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞により誘導されることが示唆された。

2.1.2 T 細胞活性化における共刺激シグナルの役割

RA における T 細胞の役割を明確にするためには、T 細胞の活性化機構を理解することが重要である。T 細胞の活性化機構として「2 シグナル」モデルが提唱されており、T 細胞の活性化には APC からの抗原特異的な第一シグナル及び非特異的な第二シグナル（共刺激シグナル）が必要である^{21),22)}。まず、第一シグナルでは APC は細胞内に抗原を取り込み、MHC に結合できるように処理（プロセッシング）し、MHC を介して T 細胞表面の TCR に抗原蛋白由来のペプチドを提示する。このとき、直接的な細胞間接着が必要である。しかし、第一シグナルのみでは T 細胞は活性化されず、さらに共刺激シグナルが必要となる。共刺激シグナルは共刺激分子を介し、APC 表面の膜貫通型糖蛋白とそれに対応する T 細胞表面受容体との相互作用により伝達される。

2.1.2.1 CD28 共刺激シグナル

共刺激分子の一つである CD28 は APC 表面の CD80 (B7-1) 及び CD86 (B7-2) に対する受容体であり、T 細胞表面にホモ二量体として常に発現している。CD28 と CD80/CD86 との相互作用は T 細胞の活性化初期において最も重要な共刺激シグナルであり²³⁾、第一シグナルとともに抗原特異的な T 細胞の活性化シグナルを伝達する。T 細胞の活性化により細胞増殖及び生存が增强されるが、CD28 共刺激シグナルは少なくとも以下の 3 種類の細胞内変化に関与している。

- (1) T 細胞の増殖・分化、クローン増大に必要な T 細胞増殖因子である IL-2 の産生を誘導する^{24),25)}
- (2) 抗アポトーシス蛋白 Bcl-xL の発現を誘導することでアポトーシスを抑制し、細胞の生存を維持させる²⁶⁾
- (3) TCR を介する細胞内シグナルにおいて重要な蛋白の特定のチロシン残基のリン酸化を促進することで TCR シグナルを増強する^{27),28)}

チロシン残基のリン酸化については、部分的又は一時的なリン酸化では十分な T 細胞の活性化が誘導されないことが知られており、抗原認識後の T 細胞の十分な増殖・分化にはリン酸化の閾値を超える必要がある。CD28 共刺激シグナルはリン酸化の程度及び時間を増強すると考えられ、低濃度の抗原や TCR に対する結合性が弱い抗原では特に CD28 共刺激シグナルに依存している^{29),30)}。したがって、CD28 共刺激シグナルは T 細胞活性化の閾値を下げるという、T 細胞に対して重要な機能を有している。

アバタセプトは CD28 と CD80/CD86 との相互作用を物理的に阻害する。その結果、IL-2 の産生が低下し、新たに活性化した T 細胞の生存が阻害され、さらに活性化の閾値が高くなり、T 細胞の活性が減弱されることが期待される。

2.1.2.2 共刺激シグナルの複雑性

抗原提示を始めて受けるナイーブ T 細胞の活性化機構の大部分は、前述の「2 シグナル」モデルにより説明される。しかし、T 細胞の活性化では細胞表面及び細胞内シグナルにおいて様々な因子が複雑に相互作用しており、T 細胞の分化段階、複数の共刺激因子の存在、T 細胞の機能状態、さらに抗原刺激（シグナル強度）などによりそれぞれの共刺激シグナルへの T 細胞の依存性が決定される。これらはアバタセプトの T 細胞に対する選択性及び作用を理解する上で重要である。

2.1.2.3 ナイーブ T 細胞の共刺激シグナル依存性

共刺激シグナルに対する T 細胞の依存性は、ナイーブ T 細胞と既に抗原提示を受けたメモリー T 細胞では異なる。ナイーブ T 細胞では CD28 が主要な共刺激因子であるのに対し、メモリー T 細胞は CD28 共刺激シグナルにはほとんど依存していない²⁹⁾。ただし、一部のメモリー T 細胞はエフェクター機能の発現に際して CD28 共刺激シグナルに依存している場合があり、T 細胞依存性疾患である慢性ベリリウム症患者由来の末梢循環メモリー T 細胞の抗原特異的な増殖は CTLA4Ig の *ex vivo* 処理により阻害された³¹⁾。このとき、肺から採取したメモリー T 細胞の増殖は

阻害されなかった。したがって、組織固有のメモリーT細胞と異なり、ヒト末梢循環メモリーT細胞は自身の増殖及びIFN- γ などのエフェクターサイトカイン産生において、CD28共刺激シグナルに依存していると考えられる。

以上の点から、アバタセプトはメモリーT細胞/エフェクターT細胞と比較してナイーブT細胞に強い阻害作用を有し、さらに末梢循環メモリーT細胞のエフェクター機能を部分的に阻害することが示唆された。これらに関する試験成績は、2.6.2.2.1.3.2に記載した。

2.1.2.4 その他の共刺激シグナル

ナイーブT細胞又はメモリーT細胞/エフェクターT細胞の活性化において、CD28以外の受容体とリガンドの相互作用により共刺激シグナルが伝達される可能性がある。共刺激シグナルとしては、T細胞の活性化を促進するシグナルのほか、抑制するシグナルがあり、CTLA-4 (CD152)はナイーブT細胞の活性化を抑制する重要な共刺激因子である^{23),101)}。CD28がナイーブT細胞表面に常に発現しているのに対し、CTLA-4はT細胞活性化の24~48時間後に発現する。CTLA-4もCD28と同様にCD80/CD86に結合するが、CD28と比較して270~2500倍親和性が高く、発現増加によりCD28と競合し、CD28共刺激シグナルが阻害される。さらに、CTLA-4とCD80/CD86との相互作用により抑制シグナルが伝達される。これらの作用により、T細胞の活性化が抑制され、T細胞の増殖及びサイトカイン産生が低下する²²⁾。なお、アバタセプトはCD28のCD80/CD86への結合を阻害するが、本薬自身が抑制シグナルをT細胞に直接伝達することはない。

CD28以外の共刺激分子による活性化シグナルとして、ICOSリガンドとICOSの相互作用が挙げられる。ICOSは活性化後のT細胞表面に発現するが、その発現はCD28共刺激シグナルに部分的に依存している^{32),33)}。ICOS共刺激シグナルはIL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α , 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)などのサイトカイン産生を誘導する³⁴⁾。一方、IL-2はほとんど産生されないことから、T細胞の活性化は増強されない。したがって、ICOS共刺激シグナルはT細胞の機能分化やエフェクター機能の発現に重要であると考えられる。ICOSIgは抗原特異的及び多クローン性のT細胞による免疫応答を阻害したが、CTLA4Igと比較して作用は弱かった³⁵⁾。

また、PD-1リガンドとPD-1を介するシグナルは、T細胞の活性化を抑制する。PD-1は活性化T細胞のほか、B細胞及び単球に発現する。PD-1リガンドはB7ファミリーにも属するが、アバタセプトとは結合しない。最近、ヒトB7-H3分子がB7ファミリーとして同定されたが、詳細な機能については明らかにされていない³⁶⁾。

以上のように共刺激シグナルは多数存在することから、シグナル伝達には一つ以上の共刺激分子が関与していると考えられる²¹⁾。

2.1.2.5 CD4陽性T細胞の共刺激シグナル依存性

T細胞の共刺激シグナルへの依存性は、細胞自身の機能によっても異なる。T細胞はその機能により細胞表面にT細胞共受容体CD4を発現した「ヘルパー」T細胞 (CD4陽性T細胞)とCD8を発現した「細胞傷害性」T細胞 (CD8陽性T細胞)に大別される。CD4陽性T細胞は炎症反応、

マクロファージの活性化、蛋白抗原に応じた B 細胞による抗体産生、さらに感染防御機構に関与している。一方、CD8 陽性 T 細胞は細胞内病原体、特にウイルスに感染した細胞の除去や腫瘍免疫に関与する。CD4 陽性 T 細胞からのヘルパー機能が必要な場合もあるが、一般的には CD8 陽性 T 細胞は CD4 陽性 T 細胞と比較して CD28 共刺激シグナルへの依存性が低い²³⁾。したがって、アバタセプトは CD8 陽性 T 細胞に対する作用が弱いと予想される。

T 細胞活性化に関する生物学的複雑性の一つとして、T 細胞の反応性は TCR シグナルの強さに依存していることが挙げられ、シグナル強度は抗原の濃度、TCR の抗原への親和性及び抗原への曝露時間によって決定される。T 細胞がペプチド-MHC 複合体に対して親和性が高い場合や高濃度の抗原に曝露された場合には共刺激シグナルへの依存度が低いことが示されている。また、蛋白抗原の性状が T 細胞の反応性を決定する重要な因子であることが示唆されている。さらに、CTLA-4 は外来抗原と比較して自己抗原に対する抑制シグナルとしてより重要である可能性がマウスにおいて示唆されている³⁷⁾。これは自己免疫反応や感染防御機構に対するアバタセプトの薬理作用を理解する上で非常に重要な意義を有する。したがって、これらの因子をすべて考慮し、アバタセプト及び他の CD28 共刺激シグナルを調節する薬剤の作用を解釈する必要がある。

前述の T 細胞活性化における「2 シグナル」モデルは、大部分が正常マウスから得られた知見を基に提唱された。そのため、RA などの慢性炎症疾患における T 細胞の共刺激シグナルへの依存性は完全には解明されておらず、「2 シグナル」ではない可能性がある³⁸⁾。RA 患者の滑液中の T 細胞は活性型であり、抗原感作を受けている。CD28 ノックアウト (CD28^{-/-}) マウスでは RA と類似した慢性の関節破壊が起こらなかったことから、RA における T 細胞の多くが CD28 共刺激シグナル依存性であることが示唆されている (2.6.2.2.1.3.4)³⁹⁾。しかし、RA 患者の 64%及び健康成人の 45%で CD28 を発現していない T 細胞が滑液又は末梢血中から検出されている^{40),41)}。これらの細胞の RA 発症における役割は不明であるが、CD28 を発現していない T 細胞の割合は平均 7.1%であることから⁴¹⁾、多くの RA 患者において、末梢循環する CD4 陽性 T 細胞は CD28 を発現していると考えられる。また、CD28 の消失は、CD4 陽性 T 細胞と比較して CD8 陽性 T 細胞においてより頻繁に起こると考えられている⁴²⁾。

2.1.3 アバタセプトの CD28 共刺激シグナルに対する作用

2.1.3.1 構造と結合性

アバタセプトはヒト CTLA-4 の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc ドメイン（ヒンジ-CH2-CH3 ドメイン）より構成された遺伝子組換え可溶性融合蛋白である。そこで、本薬の CD80/CD86 及び Fc 受容体に対する結合性及び補体依存性細胞傷害活性に対する作用について検討した。

実験 1 CD80/CD86 及び Fc 受容体に対するアバタセプトの結合性

（表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-13）

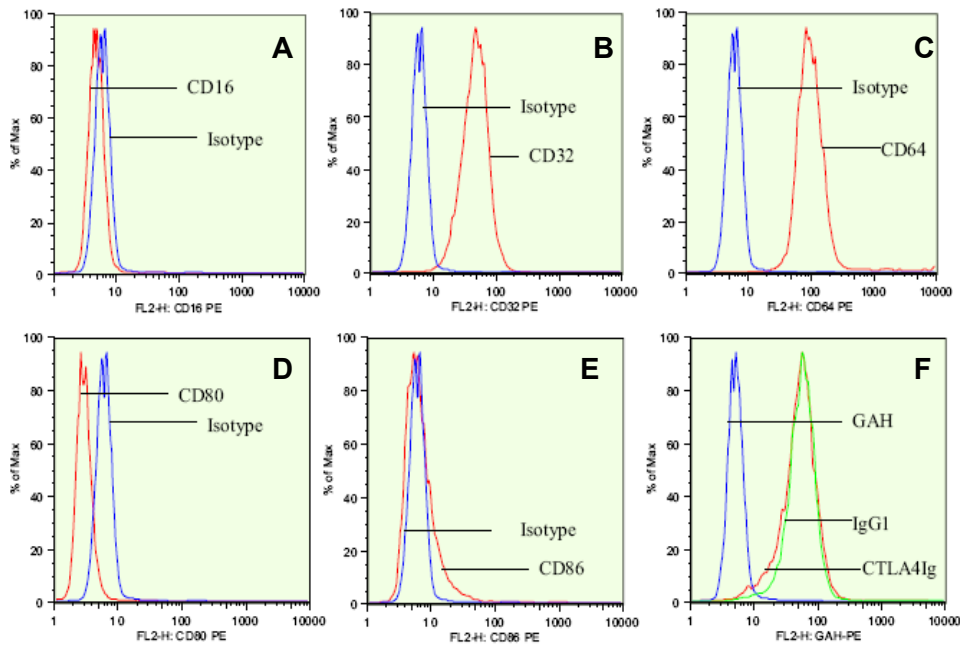
方法

マクロファージ由来細胞 U937 (CD32 及び CD64 発現) 及びヒト B リンパ芽球腫細胞 Raji (CD80 及び CD86 発現) を 5 µg/mL のアバタセプト又はヒト IgG1 存在下で 4°C、30 分間培養後、フィコエリトリン (PE) 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (GAH) と反応させ、蛍光強度を測定した。

結果

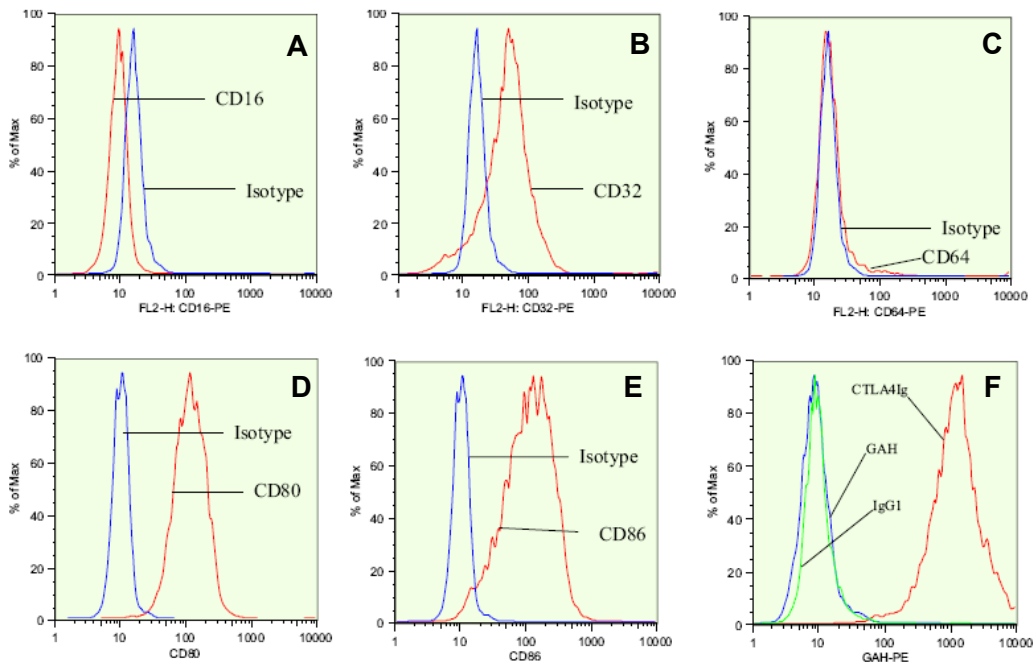
図 2-2 にマクロファージ由来細胞 U937、図 2-3 にヒト B リンパ球芽腫細胞 Raji における細胞表面分子の発現及びアバタセプトの結合性を示す。アバタセプト及びヒト IgG1 は U937 (CD32 及び CD64 発現) に結合した。一方、アバタセプトは Raji (CD80 及び CD86 発現) に結合したが、ヒト IgG1 は結合しなかった。したがって、アバタセプトは CTLA-4 を介して CD80/CD86 と、IgG1 を介して Fc γ 受容体 CD64 と結合することが示された。

図 2-2: マクロファージ由来細胞 U937 におけるアバタセプトの結合性



A~E : マクロファージ由来細胞 U937 における CD16, CD32, CD64, CD80 及び CD86 の発現を示す。
 F : アバタセプト (CTLA4Ig) 又は IgG1 の結合性を示す。
 出典 : 4.2.1.1-13

図 2-3: ヒト B リンパ芽球腫細胞 Raji におけるアバタセプトの結合性



A~E : ヒト B リンパ芽球腫細胞 Raji における CD16, CD32, CD64, CD80 及び CD86 の発現を示す。
 F : アバタセプト (CTLA4Ig) 又は IgG1 の結合性を示す。
 出典 : 4.2.1.1-13

実験 2 補体依存性細胞傷害活性に対するアバタセプトの作用

(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-11)

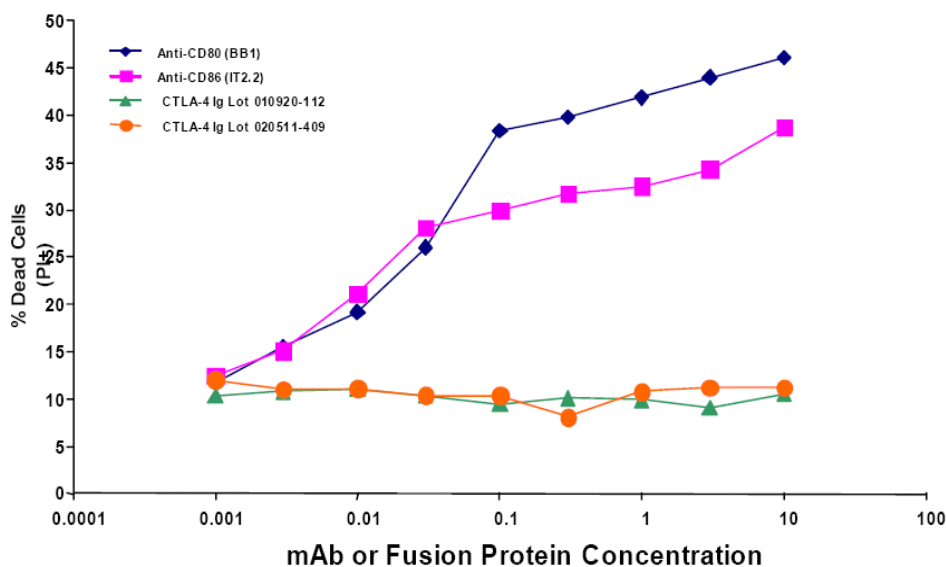
方法

標的細胞としてエプスタインバーウイルス (EBV) により形質転換した CD80/CD86 陽性ヒト B リンパ芽球細胞 (PM-LCL) を用いた。1 × 10⁶ cells の PM-LCL を 0.001~10 µg/mL のアバタセプト存在下で 4°C、1 時間前培養し、さらにウサギ補体を加えて 37°C、5%CO₂ 下で 2 時間培養した。その後、ヨウ化プロピジウム (PI) で染色し、フローサイトメトリーにより死細胞の割合 (%) を算出した。

結果

図 2-4 に示すように、陽性対照である抗 CD80 抗体及び抗 CD86 抗体は 0.01 µg/mL 以上の濃度で補体依存性細胞傷害活性を誘導したが、アバタセプトは 10 µg/mL までの濃度で補体依存性細胞傷害活性を誘導しなかった。

図 2-4: 補体依存性細胞傷害活性に対するアバタセプトの作用

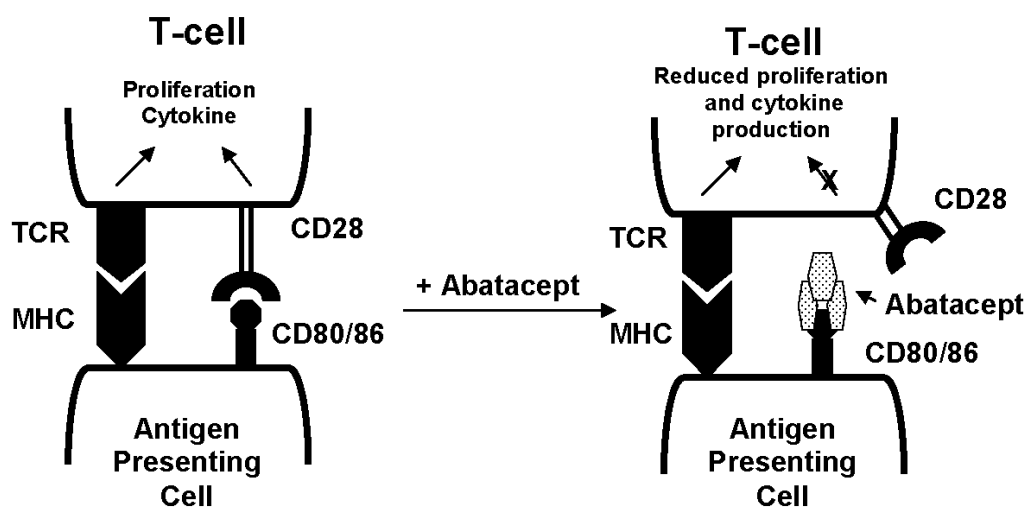


0.001~10 µg/mL のアバタセプト (▲ ; CTLA-4Ig Lot 010920-112 及び ● ; CTLA-4Ig Lot 020511-409)、抗 CD80 抗体 (◆) 及び抗 CD86 抗体 (■) 存在下での死細胞 (PI 陽性細胞) の割合 (%) を示す。

出典 : 4.2.1.1-11

これらの試験成績から、図 2-5 に示すように、アバタセプトは APC 表面の CD80/CD86 に結合することで、CD28 共刺激シグナルを阻害し、T 細胞の活性化を抑制することが示された。また、本薬は Fc γ 受容体に結合するが (4.2.1.1-13)、補体依存性細胞傷害活性は誘導されなかった (4.2.1.1-11)。これはヒト IgG1 のヒンジドメインに変異を導入したことに起因すると考えられる。

図 2-5: 共刺激シグナルに対するアバタセプトの作用



アバタセプトは APC 表面の CD80/CD86 に結合することで CD28 を介した共刺激シグナルを阻害する。

また、CD80/CD86 に対するアバタセプトの結合親和性については、以下の公表論文においても考察されている。

放射標識したアバタセプトを用いた生化学試験においてアバタセプトの CD80/CD86 に対する親和性を検討した結果、本薬の CD80 に対する親和性は CD86 と比較して約 2 倍高かった⁴³⁾。しかし、アバタセプトによる T 細胞の増殖阻害は、本薬と CD80 の結合を介した場合の方が CD86 と比較して約 100 倍強かった⁴³⁾。結合親和性と *in vitro* 阻害活性に解離がみられた理由として多価相互作用が挙げられ、細胞では CD28 と CD80/CD86 との間に多価相互作用が起こり、結合親和性の 2 倍の差が細胞表面分子の発現量により増強された可能性が考えられる。したがって、CD28 と CD86 の相互作用を阻害するためには CD28 と CD80 の場合と比較して 100 倍高濃度のアバタセプトが必要となる。また、アバタセプトは CD28Ig と比較して CD80/CD86 に対する親和性が約 100 倍高いことから⁴³⁾、CD28 と CD80/CD86 との相互作用に対する有効な競合薬となると考えられる。さらに、IgG ドメインを持たない CTLA-4 二量体の CD80Ig に対する結合親和性は、CD28 二量体と比較して高結合定数で 2500 倍、低結合定数で 270 倍高かった⁴⁴⁾。CTLA-4 の CD80/CD86 に対する結合親和性は、単量体の場合は低く急速に解離するが、ホモ二量体では高いことから⁴⁴⁾、アバタセプトは CTLA4Ig のホモ二量体構造として設計された。

2.1.3.2 T細胞の増殖及びサイトカイン産生に対する作用 (*in vitro*)

(1) CD4 陽性 T 細胞に対するアバタセプトの作用

CD28 共刺激シグナルを介した CD4 陽性 T 細胞の増殖及びサイトカイン産生に対するアバタセプトの作用について、混合リンパ球反応 (MLR) を用いて検討した。

実験 1 ヒトナイーブ T 細胞の増殖に対するアバタセプトの作用

(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-1)

方法

4 例のドナーから末梢血単核細胞 (PBMC) を分離・精製し、異なるドナーからそれぞれ T 細胞及び APC (E-PBMC) を調整した。96 ウェルプレートに T 細胞と E-PBMC が細胞数 3 : 1 になるよう播種し、0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアバタセプト存在下で 37°C、5%CO₂ 下で 5 日間培養した。培養終了 16 時間前に 1 ウェルあたり 1 μCi の ³H-チミジンを追加し、細胞内への ³H-チミジンの取り込み量を測定することでヒトナイーブ T 細胞の増殖に対するアバタセプトの作用を評価した。データは対照群 (アバタセプト無処置群) に対するアバタセプト処置群の細胞増殖阻害率 (%) として示し、Student's t 検定により各濃度のアバタセプト処置群と対照群及びアバタセプト最大濃度処置群の細胞増殖阻害率を比較した (P vs 0 及び P vs 100)。また、E-PBMC の代わりに B リンパ芽球細胞 (PM-LCL) を用いて同様の試験を行った。このとき、T 細胞と PM-LCL は細胞数が 5 : 1 となるよう播種した。

結果

E-PBMC の場合、アバタセプトは 3.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度においてヒトナイーブ T 細胞の増殖を有意に阻害し、アバタセプト濃度を上昇させても作用の増強は認められなかった (表 2-1)。一方、PM-LCL では、アバタセプトは 0.316 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度でヒトナイーブ T 細胞の増殖を有意に阻害し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では作用の増強は認められなかった (表 2-2)。

表 2-1: ヒトナイーブ T 細胞の増殖に対するアバタセプトの作用－E-PBMC－

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	測定 1			測定 2			測定 3			測定 4		
	阻害率 (%)	P vs		阻害率 (%)	P vs		阻害率 (%)	P vs		阻害率 (%)	P vs	
		0	100		0	100		0	100		0	100
0	0 ± 8	1.000	0.013	0 ± 12	1.000	0.016	0 ± 5	1.000	0.002	0 ± 3	1.000	0.005
0.1	31 ± 5	0.037	0.205	17 ± 12	0.375	0.056	1 ± 9	0.936	0.011	10 ± 3	0.089	0.009
0.316	18 ± 9	0.220	0.069	10 ± 4	0.454	0.002	18 ± 3	0.030	0.005	24 ± 4	0.009	0.029
1	23 ± 5	0.082	0.055	29 ± 3	0.074	0.014	30 ± 1	0.004	0.018	30 ± 3	0.002	0.041
3.16	45 ± 1	0.006	0.719	47 ± 8	0.032	0.742	34 ± 7	0.014	0.261	41 ± 11	0.024	0.243
10	42 ± 3	0.009	0.881	48 ± 6	0.022	0.770	37 ± 7	0.011	0.396	37 ± 8	0.012	0.135
31.6	44 ± 4	0.008	0.776	47 ± 4	0.021	0.570	32 ± 8	0.027	0.228	47 ± 6	0.002	0.284
100	42 ± 5	0.013	1.000	50 ± 4	0.016	1.000	44 ± 3	0.002	1.000	62 ± 10	0.005	1.000

阻害率＝増殖阻害率（平均値±SEM）

P vs 0 及び P vs 100 : Student's t 検定により各濃度のアバタセプト処置群と対照群及びアバタセプト最大濃度処置群の細胞増殖阻害率を比較したときの P 値

出典 : 4.2.1.1-1

表 2-2: ヒトナイーブ T 細胞の増殖に対するアバタセプトの作用－PM-LCL－

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	測定 1			測定 2			測定 3		
	阻害率 (%)	P vs		阻害率 (%)	P vs		阻害率 (%)	P vs	
		0	100		0	100		0	100
0	0 ± 11	1.000	0.002	0 ± 5	1.000	0.002	0 ± 0	1.000	0.000
0.1	34 ± 2	0.035	0.000	11 ± 3	0.125	0.001	23 ± 1	0.000	0.000
0.316	50 ± 1	0.010	0.000	24 ± 2	0.014	0.004	36 ± 1	0.000	0.000
1	68 ± 5	0.004	0.080	27 ± 2	0.008	0.009	59 ± 5	0.000	0.089
3.16	75 ± 0	0.002	0.035	38 ± 4	0.005	0.730	67 ± 4	0.000	0.368
10	80 ± 2	0.002	0.892	41 ± 2	0.002	0.620	71 ± 4	0.000	0.999
31.6	83 ± 1	0.002	0.207	41 ± 3	0.002	0.630	73 ± 1	0.000	0.184
100	80 ± 2	0.002	1.000	39 ± 1	0.002	1.000	71 ± 1	0.000	1.000

阻害率＝増殖阻害率（平均値±SEM）

P vs 0 及び P vs 100 : Student's t 検定により各濃度のアバタセプト処置群と対照群及びアバタセプト最大濃度処置群の細胞増殖阻害率を比較したときの P 値

出典 : 4.2.1.1-1

実験 2 ヒトナイーブ T 細胞の増殖及びサイトカインの産生に対するアバタセプトの作用

(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-3)

方法

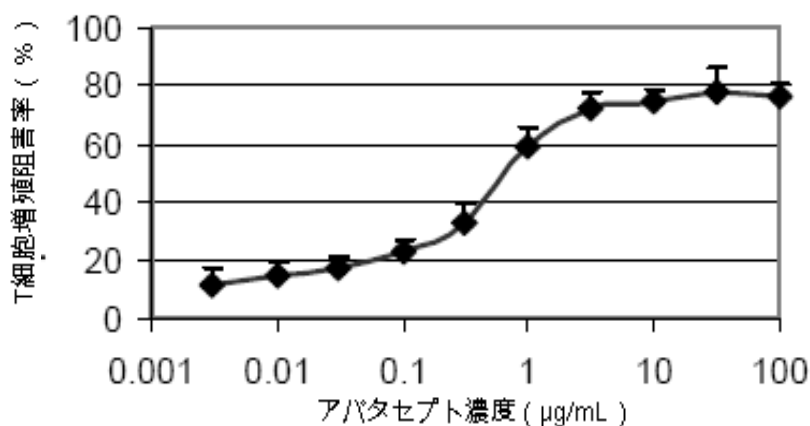
T 細胞として末梢血 T 細胞、APC として同種異系 B リンパ芽球細胞 (PM-LCL) を用いた。96 ウェルプレートに APC と T 細胞が細胞数 1 : 50 となるよう播種し、0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアバタセプト存在下で 37°C、5 日間培養した。培養終了 6 時間前に ^3H -チミジンを添加し、 ^3H -チミジンの取り込み量を測定することでヒトナイーブ T 細胞の増殖に対するアバタセプトの作用を評価した。

サイトカインの測定では、APC と T 細胞が IL-2 及び TNF- α の場合には細胞数 1 : 10、IFN- γ では 1 : 50 となるよう播種し、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアバタセプト又は Ig 存在下で培養後、培養液中のサイトカイン濃度を ELISA 法により測定した。

結果

ヒトナイーブ T 細胞の増殖に対するアバタセプトの作用を図 2-6 に示す。アバタセプトは 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において T 細胞の増殖を有意に阻害した ($P < 0.001$)。最大阻害作用は 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で認められ、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで濃度を上昇させても作用の増強は認められなかった。

図 2-6: ヒトナイーブ T 細胞に対するアバタセプトの作用

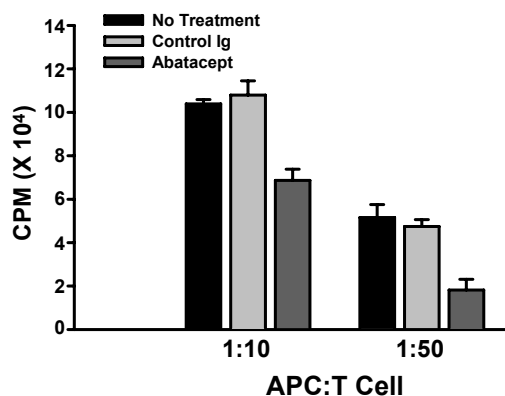


0.003~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアバタセプト存在下におけるヒトナイーブ T 細胞の増殖阻害率 (平均値 \pm SD) を示す。

出典 : 4.2.1.1-3 改変

T 細胞によるサイトカインの産生量は APC と T 細胞の割合によって異なるため、APC と T 細胞の割合を IL-2 及び TNF- α では 1 : 10、IFN- γ では 1 : 50 とした。図 2-7 に示すように、APC と T 細胞の割合が 1 : 10 及び 1 : 50 のとき、アバタセプトはヒトナイーブ T 細胞の増殖を Ig と比較してそれぞれ約 40%及び約 60%阻害した。このとき、アバタセプトは、図 2-8 に示すように 72 時間後まで IL-2、TNF- α 及び IFN- γ の産生を有意に阻害し ($P < 0.001$)、阻害強度は IL-2 > TNF- α \geq IFN- γ の順であった。

図 2-7: T 細胞に対する抗原提示細胞の割合とヒトナイーブ T 細胞増殖に対するアバタセプトの作用の関係

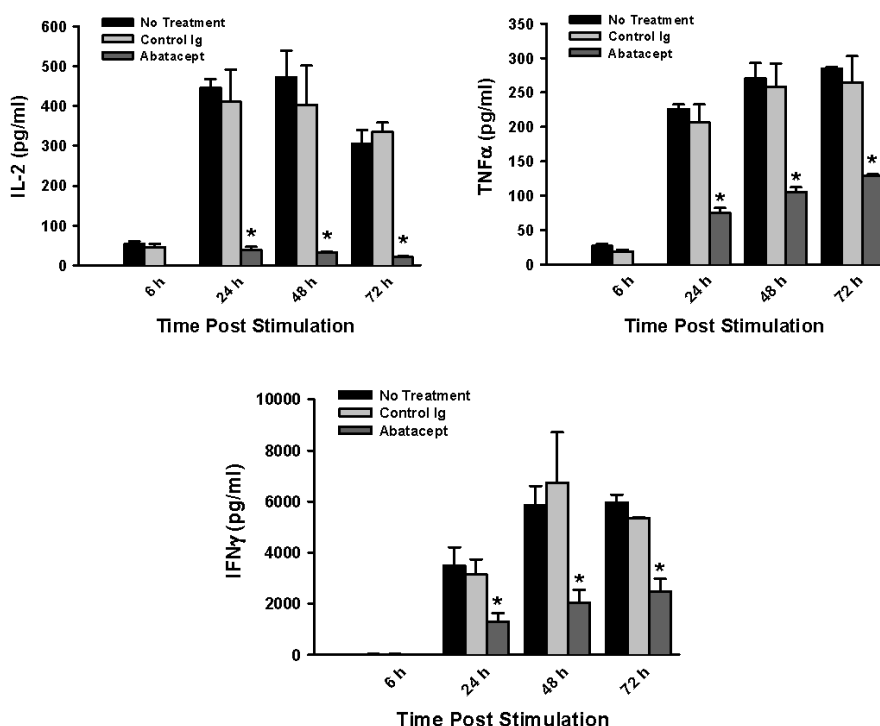


APC の 1 に対し、ヒトナイーブ T 細胞の割合をそれぞれ 10 及び 50 としたときの 30 µg/mL のアバタセプト存在下における T 細胞の増殖阻害作用を示す。

CPM = 放射性チミジンの 1 分あたりのカウント数 (平均値±SD)

出典 : 4.2.1.1-3

図 2-8: ヒトナイーブ T 細胞によるサイトカイン産生に対するアバタセプトの作用



30 µg/mL のアバタセプト存在下における刺激後 6、24、48 及び 72 時間目の IL-2, TNF-α 及び IFN-γ の産生量 (平均値±SD) を示す。

* P < 0.001

出典 : 4.2.1.1-3

これらの試験成績から、アバタセプトは0.3~30 µg/mLの濃度範囲でヒトナイーブ T 細胞の増殖を40%~80%阻害することが示された。阻害作用は約10~30 µg/mLで最大となり、100 µg/mLまで濃度を上昇させても作用の増強は認められなかった(4.2.1.1-2、4.2.1.1-3)。これはRA患者に本薬10 mg/kgを点滴静脈内投与したときのトラフ値(Cmin; 約20~30 µg/mL)以下の薬物濃度であった(5.3.5.1-2)⁴⁵⁾。T細胞の増殖が完全には阻害されなかった理由として、CD28以外の共刺激分子を介したT細胞の増殖が考えられる。また、T細胞に対するAPCの割合が少ない方がアバタセプトのT細胞増殖阻害作用は強かった。したがって、抗原の濃度又はTCRに対する抗原の結合力が低下することでT細胞活性化シグナルが減弱した結果、本薬のT細胞に対する作用が増強されると考えられる。さらに、アバタセプトはヒトナイーブ T細胞による抗原特異的なIL-2、IFN-γ及びTNF-αの産生を有意に阻害した(P<0.001)。

その他、公表文献においてもアバタセプトのナイーブ T細胞に対する作用が検討されている。抗原感作された細胞をアバタセプト存在下でアロ抗原に曝露した場合、免疫応答が低下し、T細胞の低活性化状態がアバタセプト処理後、数日間持続することが報告されている⁴⁶⁾。ただし、外因性のIL-2により免疫応答が回復したことから、アバタセプトは抗原特異的なT細胞のアポトーシスを誘導しないことが示唆された。また、アバタセプトはヒトナイーブ T細胞と同様に抗原特異的なマウス T細胞の増殖を抑制した^{47),102)}。

実験3 ヒトメモリーT細胞の増殖に対するアバタセプトの作用

(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-2)

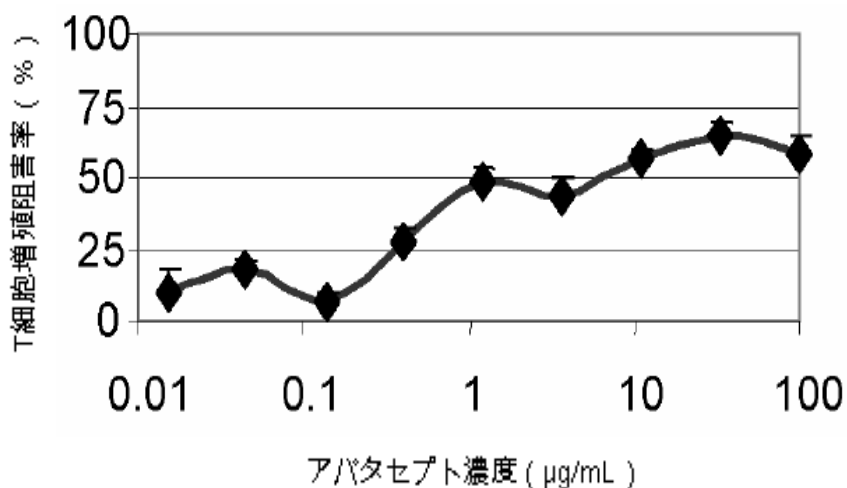
方法

3例のドナーから分離・精製したPBMCを 2×10^5 cellsとなるよう96ウェルプレートに播種し、0~100 $\mu\text{g/mL}$ のアバタセプト又はIgG存在下で500 ng/mLの破傷風毒素により刺激し、37°C、5%CO₂下で6日間培養した。培養終了18時間前に³H-チミジンを添加し、³H-チミジンの取り込み量を測定することで、ヒトメモリーT細胞の増殖に対するアバタセプトの阻害率(%)を算出した。

結果

ヒトメモリーT細胞の増殖に対するアバタセプトの作用について、図2-9に示す。アバタセプトは0.41 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度においてヒトメモリーT細胞の増殖を著しく阻害した。一方、1.23 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では最高濃度100 $\mu\text{g/mL}$ と比較して阻害作用に有意な差は認められなかった。

図 2-9: ヒトメモリーT細胞の増殖に対するアバタセプトの作用



0.015~100 $\mu\text{g/mL}$ のアバタセプト存在下におけるヒトメモリーT細胞の増殖阻害率(平均値 \pm SEM)を示す。

出典: 4.2.1.1-2 改変

実験 4 ヒトメモリーT細胞の増殖及びサイトカインの産生に対するアバタセプトの作用

(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-3)

方法

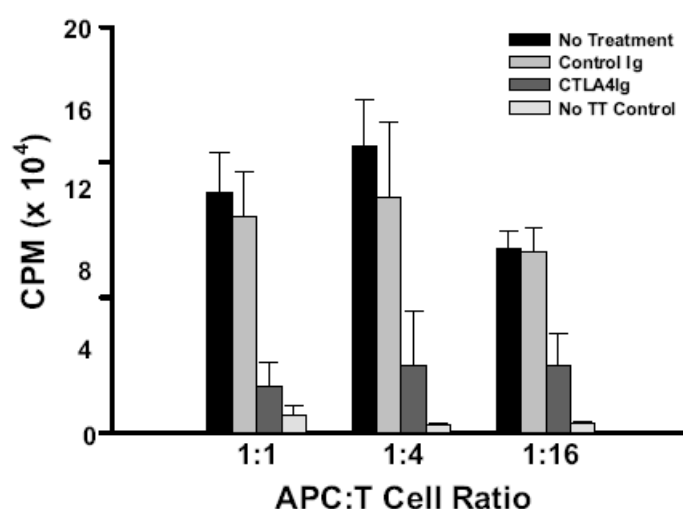
単一ドナーから PBMC を分離・精製し、さらに骨髓細胞（主に単球）から T 細胞を調整した。96 ウェルプレートに APC と T 細胞が細胞数 1 : 1、1 : 4 又は 1 : 16 となるよう播種し、30 µg/mL のアバタセプト又は Ig 存在下で 250 ng/mL の破傷風毒素により刺激し、37°C で 5 日間培養した。培養終了 6 時間前に ³H-チミジンを添加し、³H-チミジンの取り込み量を測定することでヒトメモリーT細胞の増殖に対するアバタセプトの作用を評価した。

サイトカインの測定では、APC と T 細胞が細胞数 1 : 4 となるよう播種し、30 µg/mL のアバタセプト又は Ig 存在下で破傷風毒素により刺激し、1, 2 及び 4 日目の培養液中のサイトカイン濃度を ELISA 法により測定した。

結果

ヒトメモリーT細胞の増殖に対するアバタセプトの作用について図 2-10 に示す。アバタセプトは 30 µg/mL の濃度においてヒトメモリーT細胞の増殖を 60%~80%阻害し、APC と T 細胞の割合を変化させても阻害率に変化はみられなかった。さらに、サイトカイン産生に対するアバタセプトの作用について検討した結果、図 2-11 に示すように、30 µg/mL のアバタセプトは 24 時間目に IL-2、48 時間目に IL-2 及び IFN-γ、96 時間目に IL-2、IFN-γ 及び TNF-α の産生を有意に阻害した (P<0.01 又は P<0.001)。このとき、阻害強度は IL-2>IFN-γ>TNF-α の順であった。

図 2-10: ヒトメモリーT細胞に対するアバタセプトの作用

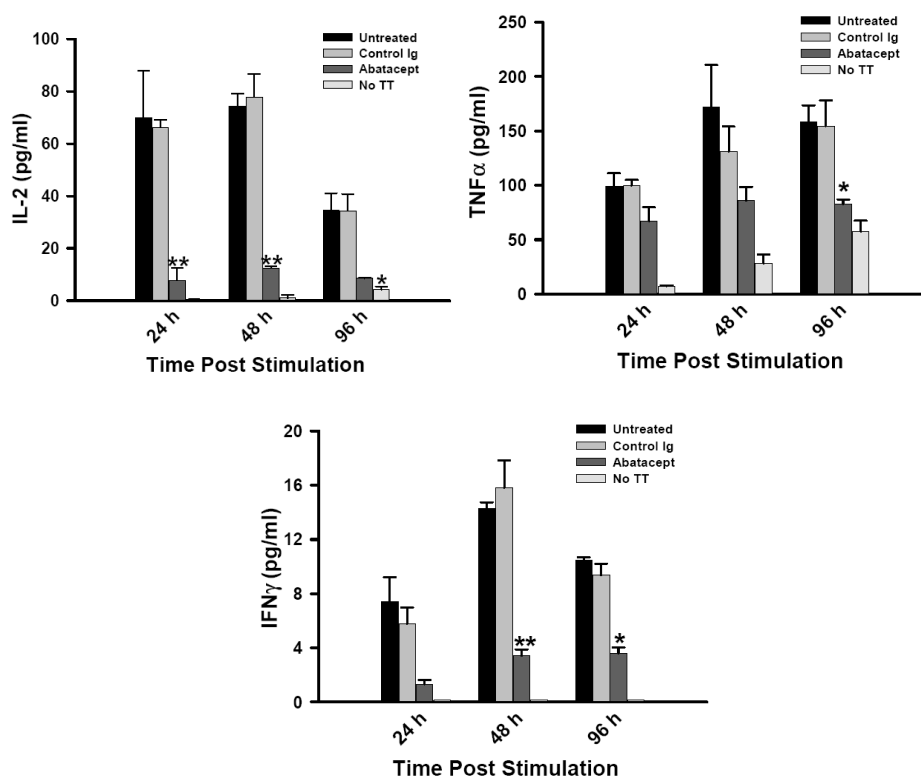


APC と T 細胞の割合が 1 : 1、1 : 4 又は 1 : 16 のときの 30 µg/mL のアバタセプト存在下におけるヒトメモリーT細胞の増殖阻害作用を示す。

CPM = 放射性チミジンの 1 分あたりのカウント数 (平均値±SD)。

出典 : 4.2.1.1-3

図 2-11: ヒトメモリーT細胞によるサイトカイン産生に対するアバタセプトの作用



30 $\mu\text{g/mL}$ のアバタセプト又は Ig 存在下における刺激後 24、48 及び 96 時間目の IL-2、TNF- α 及び IFN- γ の産生量 (平均値 \pm SD) を示す。APC と T 細胞の割合は 1 : 4 とした。

* $P < 0.01$ 、** $P < 0.001$ 。

出典 : 4.2.1.1-3

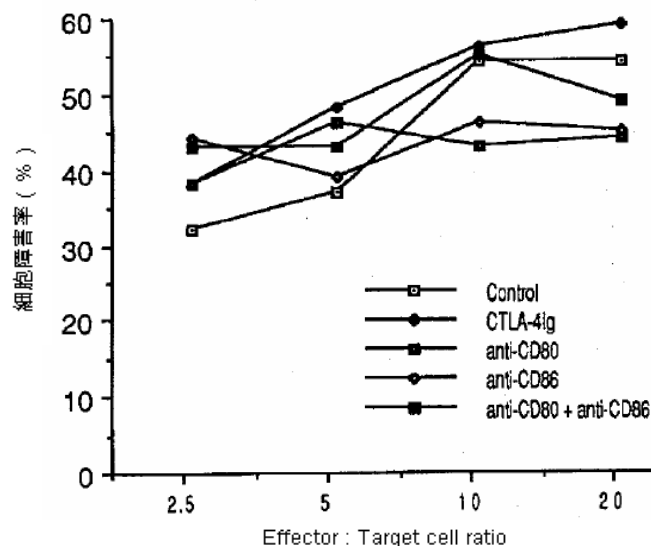
これらの試験成績から、アバタセプトは破傷風毒素に対するヒトメモリーT細胞の増殖をヒトナイーブT細胞と同じ濃度範囲(約 10~30 $\mu\text{g/mL}$)で最大 60%~80%阻害し(4.2.1.1-2)、IL-2、IFN- γ 及び TNF- α の産生を抑制することが示された(4.2.1.1-3)。また、CTLA4Ig はインフルエンザ HA 蛋白に対するメモリーT細胞の増殖を阻害し³⁵⁾、さらに T 細胞依存性疾患である慢性ベリリウム症患者由来の末梢循環メモリーT細胞の増殖を阻害することが報告されている(2.6.2.2.1.2.3)³¹⁾。したがって、アバタセプトはヒトナイーブT細胞に加え、ヒトメモリーT細胞の増殖及びサイトカイン産生を抑制することが確認された。なお、ヒトでのメモリーT細胞の増殖はげっ歯類と比較して CD28 共刺激シグナルに依存していることが示唆されている。

(2) CD8 陽性 T 細胞に対するアバタセプトの作用

CD8 陽性 T 細胞は、ウイルス感染及び腫瘍免疫に関与する。CD8 陽性 T 細胞に対するアバタセプト又は CTLA4Ig の作用については、以下の公表論文において報告されている。

EBV は、がん原性が確認されている数少ない腫瘍ウイルスの一つであり、B 細胞を形質転換 (不死化) させるが、通常、EBV により形質転換された B 細胞は CD8 陽性 T 細胞により除去される。図 2-12 に示すように、CTLA4Ig は EBV により形質転換された B 細胞に対する CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害活性を阻害しなかった⁴⁸⁾。しかし、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を含む培養系において、アバタセプトはアロ抗原による CD8 陽性 T 細胞の増殖を約 50%以上抑制した⁴⁶⁾。したがって、CD8 陽性 T 細胞による細胞傷害活性は CD28 共刺激シグナルとは独立した反応であるが、CD8 陽性 T 細胞の増殖は CD4 陽性 T 細胞に依存していることが示唆された。

図 2-12: CD8 陽性 T 細胞による細胞傷害活性に対する CTLA4Ig の作用



10 µg/mL の CTLA4Ig (●)、抗 CD80 抗体 (□)、抗 CD86 抗体 (○)、抗 CD80 抗体及び抗 CD86 抗体 (■) 又はコントロール (□) 存在下における CD8 陽性 T 細胞による細胞傷害率を示す。

出典：参考文献⁴⁸⁾

(3) 単球／マクロファージに対する作用

自然免疫に関与する単球／マクロファージに対するアバタセプトの作用について検討した。

実験 1 単球でのリポ多糖刺激 TNF- α 産生に対するアバタセプトの作用

(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-4)

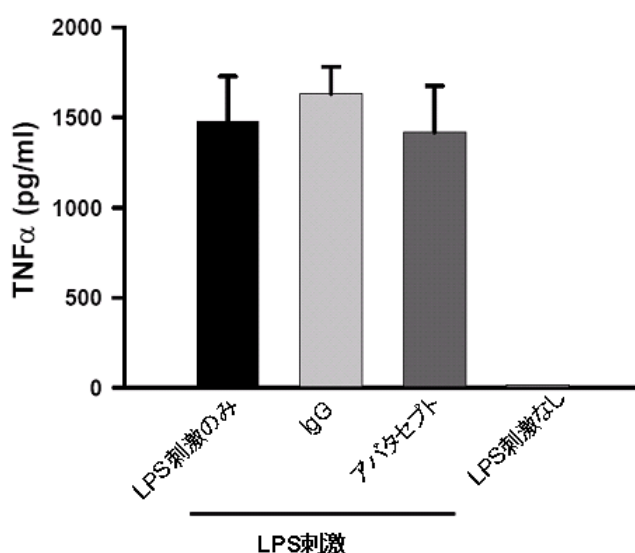
方法

30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアバタセプト又は IgG 存在下でヒト単球を 100 ng/mL のリポ多糖 (LPS) で刺激し、6 時間後の培養液中の TNF- α 濃度 (pg/mL) を ELISA 法により測定した。

結果

LPS 刺激 6 時間後の培養液中の TNF- α 濃度を図 2-13 に示す。30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアバタセプト存在下では、TNF- α の産生量は変化しなかった。

図 2-13: ヒト単球における TNF- α 産生に対するアバタセプトの作用



30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアバタセプト又は IgG 存在下での LPS 刺激 6 時間後のヒト単球による TNF- α の産生量を示す。

出典：4.2.1.1-4

実験 2 単球での TNF- α 産生に対するアバタセプトの作用

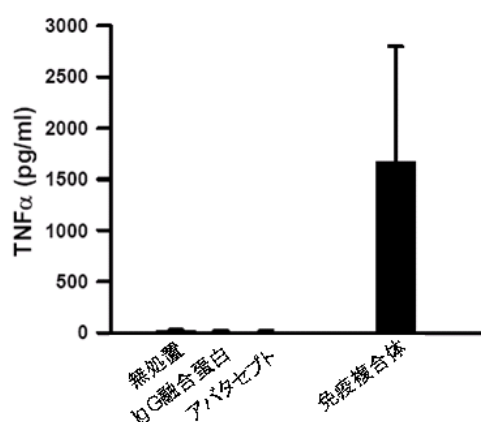
(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-14)

方法

30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアバタセプト又は IgG 融合蛋白 (マウス L6 モノクローナル抗体の可変部とヒト IgG1 の定常部との融合蛋白) と 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の不溶性免疫複合体 (ヒト IgG とヤギ抗ヒト IgG 抗体との複合体) 存在下あるいは非存在下でヒト単球を 4~6 時間培養し、培養液上清中の TNF- α 濃度 (pg/mL) を ELISA 法により測定した。

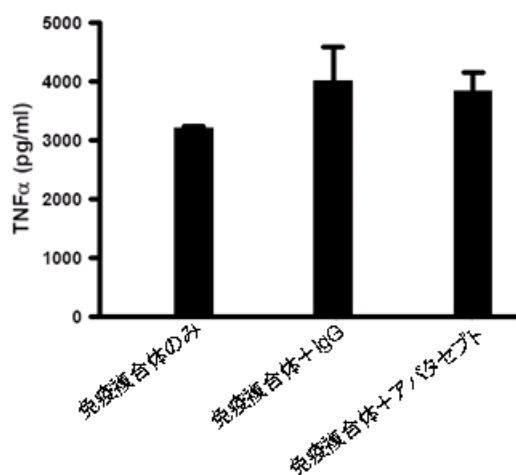
結果

免疫複合体非存在下あるいは免疫複合体存在下における培養液上清中の TNF- α 濃度を図 2-14 及び図 2-15 に示す。図 2-14 で示すように、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアバタセプト単独処理では TNF- α の産生はほとんど誘導されず (0~17 pg/mL)、培養液上清中の TNF- α 濃度は IgG 融合蛋白単独処理 (0~17 pg/mL) 及び無処置の場合 (0~27 pg/mL) と同程度であった。また、図 2-15 で示すように、免疫複合体存在下におけるアバタセプト処理は免疫複合体刺激による TNF- α 放出に対して明らかな作用を示さなかった。

図 2-14: ヒト単球における TNF- α 産生に対するアバタセプトの作用

免疫複合体非存在下で、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアバタセプト又は IgG 融合蛋白処理後のヒト単球による TNF- α 産生量 (平均値 \pm SD) を示す。また、同実験系で検討した免疫複合体刺激による TNF- α 産生量 (平均値 \pm SD) を示す。

出典: 4.2.1.1-14

図 2-15: 免疫複合体存在下でのヒト単球における TNF- α 産生に対するアバタセプトの作用

免疫複合体存在下で、30 $\mu\text{g/mL}$ のアバタセプト又は IgG 融合蛋白処理後のヒト単球による TNF- α 産生量（平均値 \pm SD）を示す。

出典：4.2.1.1-14

これらの試験成績から、アバタセプトは LPS による単球での TNF- α の産生を阻害しないことが示された (4.2.1.1-4)。このとき、アバタセプトは Fc 受容体を介した TNF- α の産生を促進せず、さらに免疫複合体を介した TNF- α の産生にも競合しなかった (4.2.1.1-14)。したがって、アバタセプトは APC を介した TNF- α 産生を阻害することから、本薬は自然免疫 (LPS 又は Fc 受容体を介した単球の活性化) ではなく、T 細胞依存性の獲得免疫 (APC と T 細胞の相互作用) により誘導されるサイトカイン産生を選択的に阻害することが明らかとなった。

2.1.3.3 T細胞依存性抗体産生に対する作用 (*in vivo*)

T細胞依存性の抗体産生に対するアバタセプトの作用について検討した。

実験1 T細胞依存性抗体産生に対するアバタセプトの作用

(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-10)⁵⁰⁾

方法

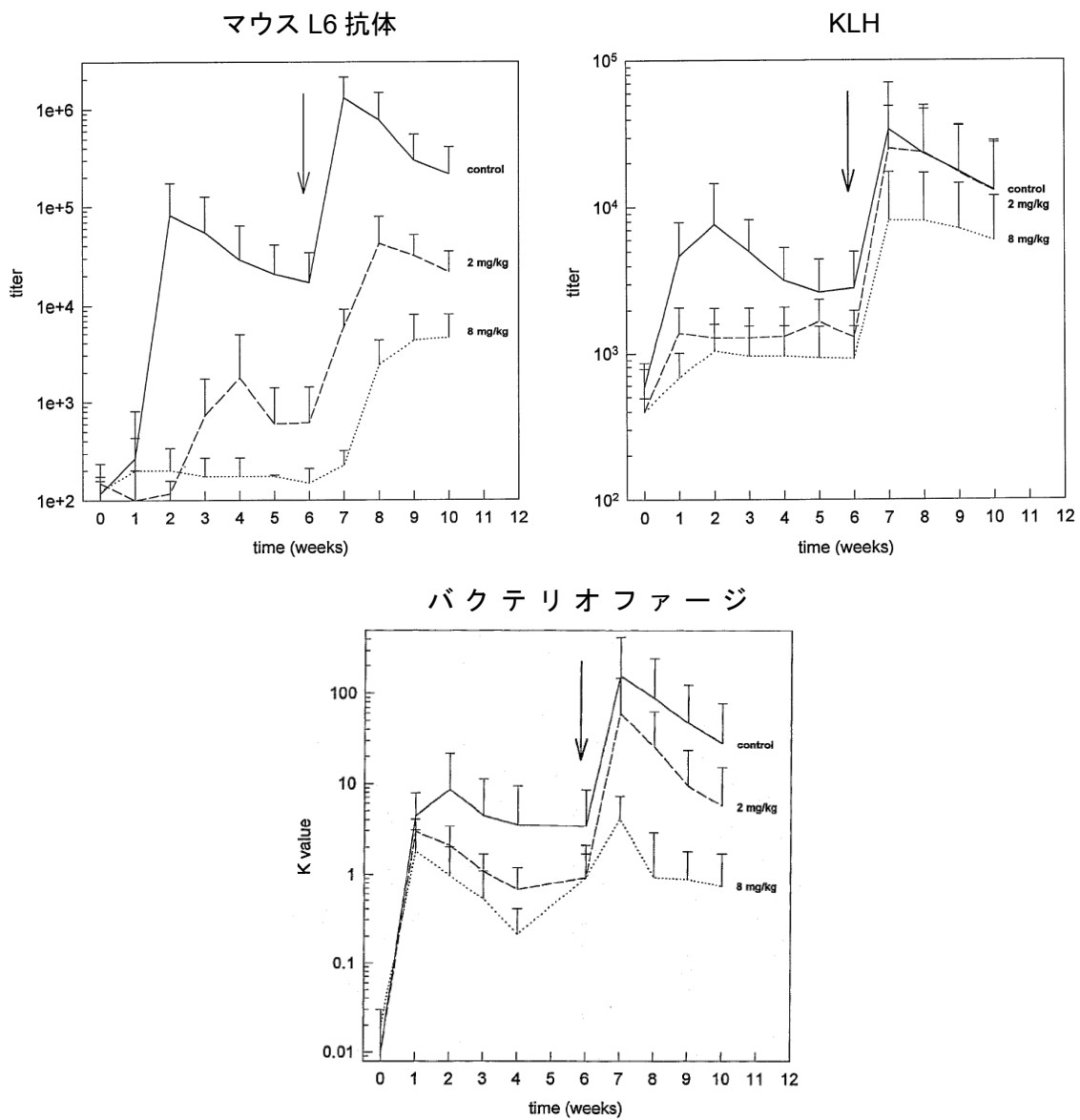
麻酔下の雌雄カニクイザル [アバタセプト 2 mg/kg 投与群は 6 例 (雌雄各 3)、アバタセプト 8 mg/kg 投与群は 4 例 (雌雄各 2)、IgG 投与群は 6 例 (雌雄各 3)] を T細胞依存性抗原であるマウス L6 モノクローナル抗体 (5 mg/kg、静脈内)、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) (5 mg、筋肉内) 及びバクテリオファージ φX174 (5×10^{10} PFU/kg、静脈内) で免疫した (1 日目)。アバタセプトは 2 又は 8 mg/kg を抗原免疫直後に静脈内投与し、週 2 回、7 週間投与した。また、対照群として 8 mg/kg の IgG を同様の投与スケジュールで静脈内投与した。投与終了時 (43 日目) に同一抗原で二次免疫を行った。

各抗原に対する抗体をマウス L6 抗体及び KLH が ELISA 法、バクテリオファージ φX174 がファージ中和試験を用いて 10 週間測定した。

結果

T細胞依存性の抗体産生に対するアバタセプトの作用を図 2-16 に示す。IgG 投与群では、一次抗体産生のピークは 2 週目、二次抗体産生のピークは 7 週目にみられた。アバタセプトは両投与群ともにマウス L6 抗体に対する一次抗体及び二次抗体産生を 99%以上抑制した ($P < 0.001$)。KLH に対しても、一次抗体の産生を 2 mg/kg 投与群では 83%、8 mg/kg 投与群では 86%抑制した ($P < 0.01$)。二次抗体産生については用量依存的であり、8 mg/kg 投与群では 87%抑制したが ($P < 0.01$)、2 mg/kg では抑制されなかった。バクテリオファージ φX174 に対してもアバタセプトは一次抗体及び二次抗体の産生を抑制したが、二次抗体に対する抑制作用の方が強かった。また、8 週目において 8 mg/kg 投与群では IgG 抗体の産生が有意に抑制された ($P < 0.01$)。

図 2-16: 一次抗体及び二次抗体産生に対するアバタセプトの作用



雌雄カニクイザルに 0, 2 又は 8 mg/kg のアバタセプトを週 2 回、7 週間静脈内投与したときのマウス L6 抗体、KLH 又はバクテリオファージ φX174 に対する抗体産生の経時変化を示す。カニクイザルはそれぞれの抗原で 1 日目に初回免疫、投与終了時（43 日目）に二次免疫した。

出典：4.2.1.1-10

実験 2 アバタセプトの免疫寛容誘発の可能性に関する検討

(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-6)

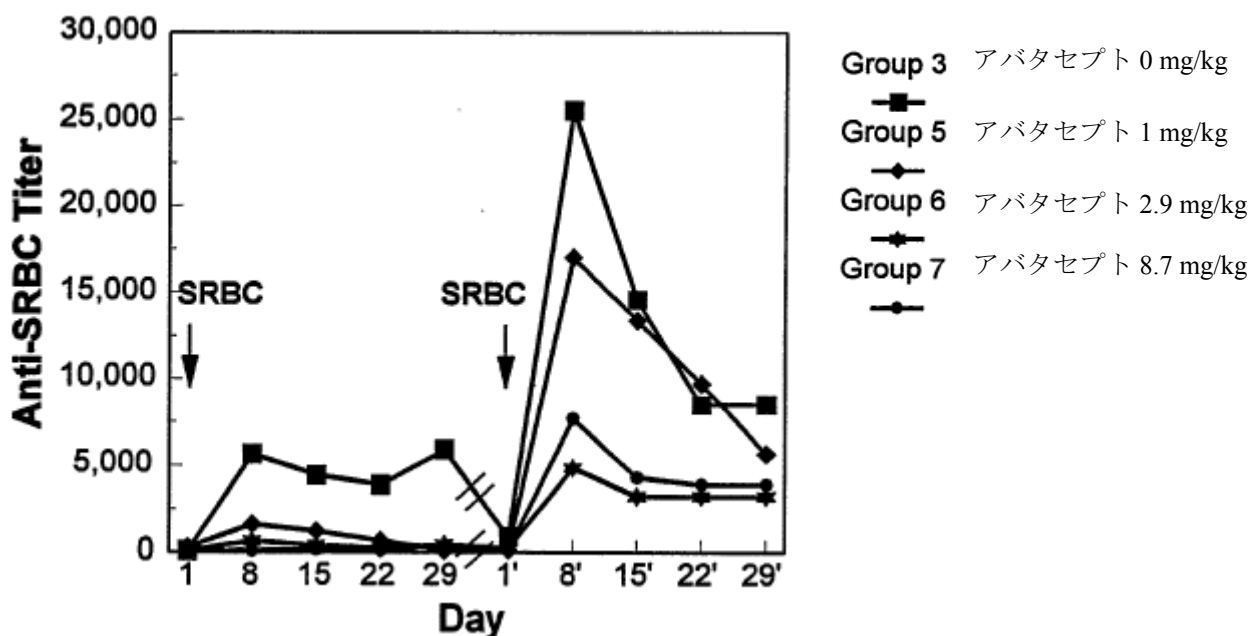
方法

1群あたり雌雄各2例のカニクイザルをT細胞依存性抗原であるヒツジ赤血球 (SRBC ; 10%懸濁液 1.7 mL/kg、静脈内) で初回免疫し (1日目)、0, 1, 2.9 又は 8.7 mg/kg のアバタセプトを 1, 4, 8, 11, 15 及び 18 日目に静脈内投与した。経時的に血清を採取し、抗原に対して産生された抗体の力価を ELISA 法により測定した。アバタセプト 1~8 mg/kg 投与群では 102 日目、アバタセプト 0 mg/kg 投与群では 144 日目に二次免疫を行い、初回免疫時と同様に抗体産生能を測定した。

結果

T細胞依存性の抗体産生に対するアバタセプトの作用について図 2-17 に示す。アバタセプト投与群では SRBC に対する一次抗体産生が用量依存的に 71%~98%抑制され、最大抑制作用は 8 日目に認められた。一方、血中からアバタセプトが消失した後の 102 日目に二次免疫を行った結果、アバタセプト投与群では二次抗体産生が 33%~81%抑制された。ただし、高用量 (アバタセプト 8.7 mg/kg) における二次抗体産生が対照群 (アバタセプト 0 mg/kg) の一次抗体産生と同程度に認められたことから、免疫寛容は誘導されなかったと考えられる。

図 2-17: T細胞依存性の抗体産生に対するアバタセプトの作用



1群あたり雌雄各2例のカニクイザルに0, 1, 2.9 又は 8.7 mg/kg のアバタセプトを 1, 4, 8, 11, 15 及び 18 日目に静脈内投与したときの抗 SRBC 抗体の力価の経時変化を示す。カニクイザルは SRBC で 1 日目に初回免疫、102 又は 144 日目 (1'日目) に二次免疫した。

出典: 4.2.1.1-6

これらの試験成績から、アバタセプトはサルにおいて2及び8 mg/kg 投与により KLH 及びバクテリオファージ ϕ X174 に対する一次抗体産生を80%以上抑制し、二次抗体産生についても同程度に抑制することが示された(4.2.1.1-10)⁵⁰⁾。一方、アバタセプトは SRBC に対する一次抗体産生を抑制したが、薬物消失後に同一抗原に再曝露した結果、抗体産生が認められ、免疫寛容は誘導されなかった(4.2.1.1-6)。また、サルにおけるアバタセプトの1年間静脈内反復投与毒性試験において、脾臓及びリンパ節の胚中心の直径及び数が軽度～中等度に減少した(4.2.1.3-2)。これは T 細胞に依存した B 細胞の活性化に対するアバタセプトの作用と一致するものであった。

T 細胞依存性の抗体産生に対するアバタセプトの作用については、サルのほか、マウスを用いた検討が報告されており、アバタセプトはマウスにおいて KLH 及び SRBC に対する一次抗体産生を抑制した⁴⁹⁾。このとき、KLH に対する一次抗体産生は、2.9 mg/kg のアバタセプトにより完全に抑制された。SRBC に対しては、2.9～11.4 mg/kg の用量範囲で一次抗体産生を最大で95%以上抑制した。一方、アバタセプトの二次抗体に対する作用は用量により異なり、抑制作用も一次抗体と比較して弱かった。SRBC に対する二次抗体産生は10 mg/kg のアバタセプトにより約80%抑制されたが、5 mg/kg では抑制されなかった。

さらにヒトでの作用について、尋常性乾癬患者を対象とした第1相臨床試験 IM101-001 において検討した(2.7.2.2.5、5.3.5.4-1)⁵¹⁾。プラセボ投与群又はアバタセプト投与群(0.5～50 mg/kg) に対し、 ϕ X174 及び KLH の2種類の抗原で免疫した結果、本薬8、16及び25 mg/kg 投与群の大部分において、一次抗体及び二次抗体産生がプラセボ投与群と比較して80%以上抑制された。1 mg/kg 投与群以上では抗 ϕ X174 IgG 抗体(一次抗体及び二次抗体)の産生が抑制された。また、アバタセプト最終投与後に3及び4回目(アバタセプト投与後42及び121日目)の免疫を行った結果、抗体産生能が回復しており、可溶性蛋白抗原に対する免疫寛容は認められなかった。

したがって、アバタセプトは T 細胞依存性抗原に対する一次抗体及び二次抗体の産生を抑制することが示された。これは、T 細胞依存性抗原に対する抗体産生には CD4 陽性 T 細胞の作用が必要であることと一致している。アバタセプトが T 細胞を選択的に調節し、メモリー T 細胞や B 細胞の機能を完全には阻害しないことは、抗原特異的抗体産生抑制において重要な特徴と考えられる。

2.1.3.4 関節炎モデルに対する作用 (*in vivo*)

RA に対するアバタセプトの作用について、ラットのコラーゲン誘発関節炎 (CIA) モデルを用いて検討した。

実験 コラーゲン誘発関節炎モデルに対するアバタセプトの作用

(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-5)

方法

雌の DA ラットの尾根部皮内にフロイントの不完全アジュバントと共に乳化したウシ II 型コラーゲン 300 µg を投与し (0 日目)、CIA モデルを作製した。表 2-3 に示すグループ A~E の CIA ラットに 1 mg/kg のアバタセプト又はヒト IgG1 を腹腔内投与した。なお、正常ラットを病態発症の比較対照として設定した (グループ F)。試験期間中、プレチスモメーターを用いて定期的に後肢容積を mL 単位で測定し、0 日目から各測定日の後肢容積の変化量を足浮腫として関節炎の発症及び進行を評価した。また、27 日目 (試験終了時) に血清サンプルを採取し、抗コラーゲン IgG 抗体の力価、サイトカイン、ケモカイン又は可溶性受容体の濃度を測定した。さらに、足関節及び膝関節をホルマリン固定し、6 段階による病理組織学的評価 (炎症、パンス、軟骨障害及び骨吸収) 及びマイクロ CT による画像解析を行った。

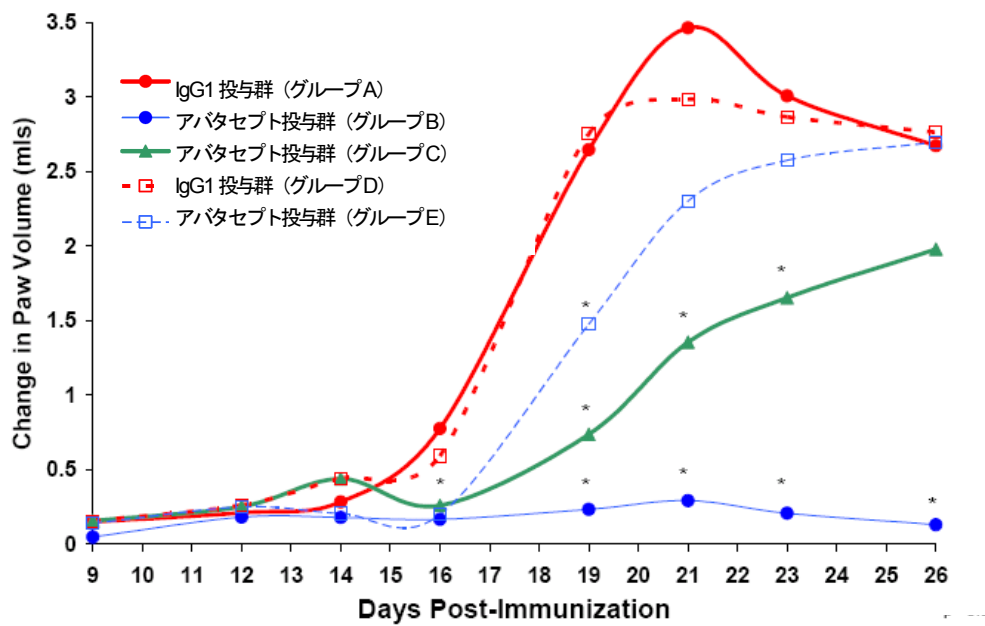
表 2-3: 投与群の内訳

投与群 (グループ)	例数	コラーゲン 惹起日 (日目)	投与		
			投与物質	濃度 (mg/kg)	投与日 (日目)
A	8	0	ヒト IgG1	1	-1, 0, 2, 4, 6, 8, 10
B	8	0	アバタセプト	1	-1, 0, 2, 4, 6, 8, 10
C	8	0	アバタセプト	1	4
D	6	0	ヒト IgG1	1	10, 12, 14, 16, 18, 20
E	7	0	アバタセプト	1	10, 12, 14, 16, 18, 20
F	3	-	-	-	-

結果

足浮腫に対するアバタセプトの作用について図 2-18 に示す。IgG1 を投与したグループ A 及び D では 16 日目から足浮腫が認められ、21 日目に最大となった (約 3~3.5 mL)。一方、アバタセプトを-1 日目から投与したグループ B では足浮腫は認められず、16 日目以降、グループ A と比較して足浮腫が有意に抑制された ($P < 0.05$)。このとき、コラーゲンと免疫複合体を形成することで関節破壊を誘導すると考えられている、抗コラーゲン抗体の産生も抑制された (図 2-19)。

図 2-18: CIA ラットにおけるアバタセプトの足浮腫に対する予防効果

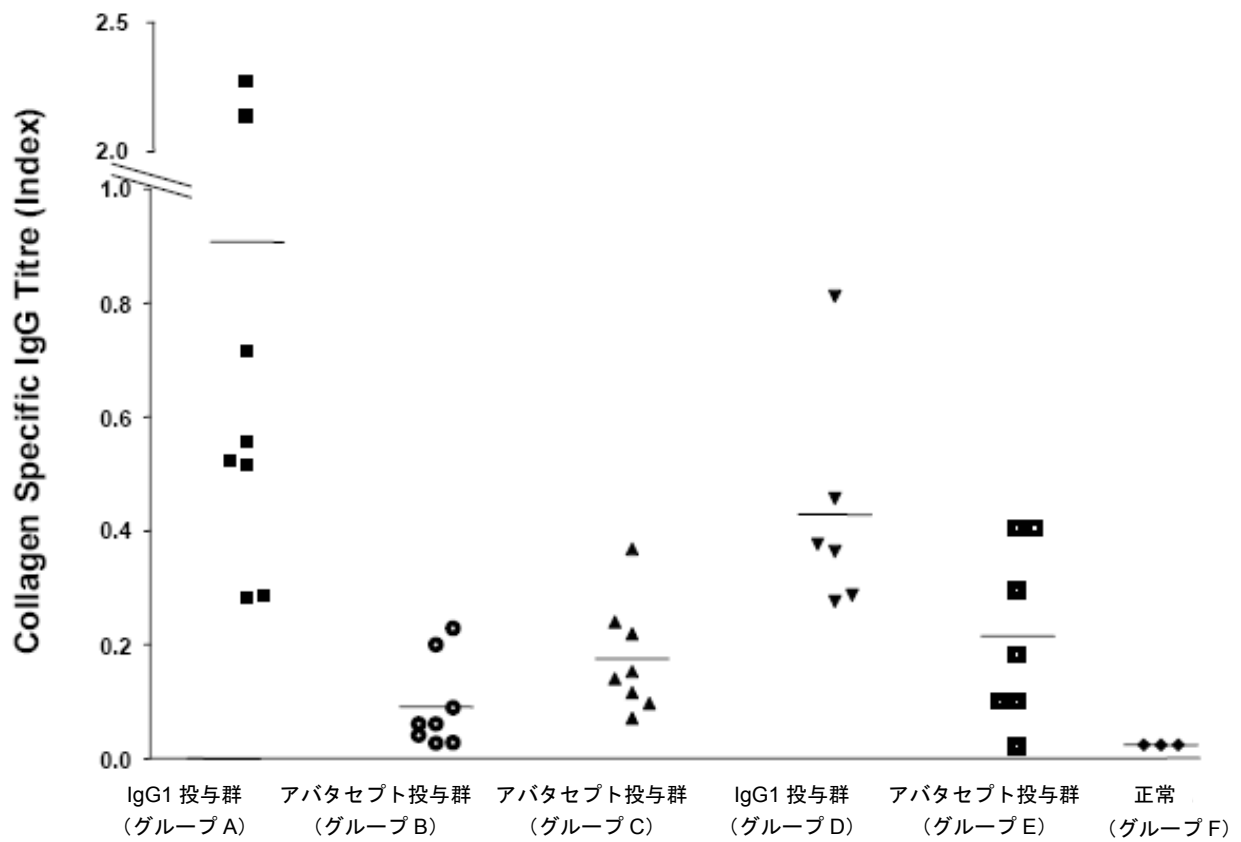


CIA ラットに 1 mg/kg のアバタセプト又はヒト IgG1 を腹腔内投与したときの足浮腫の経時変化を示す。

* P < 0.05

出典：4.2.1.1-5

図 2-19: 抗コラーゲン抗体の産生に対するアバタセプトの作用

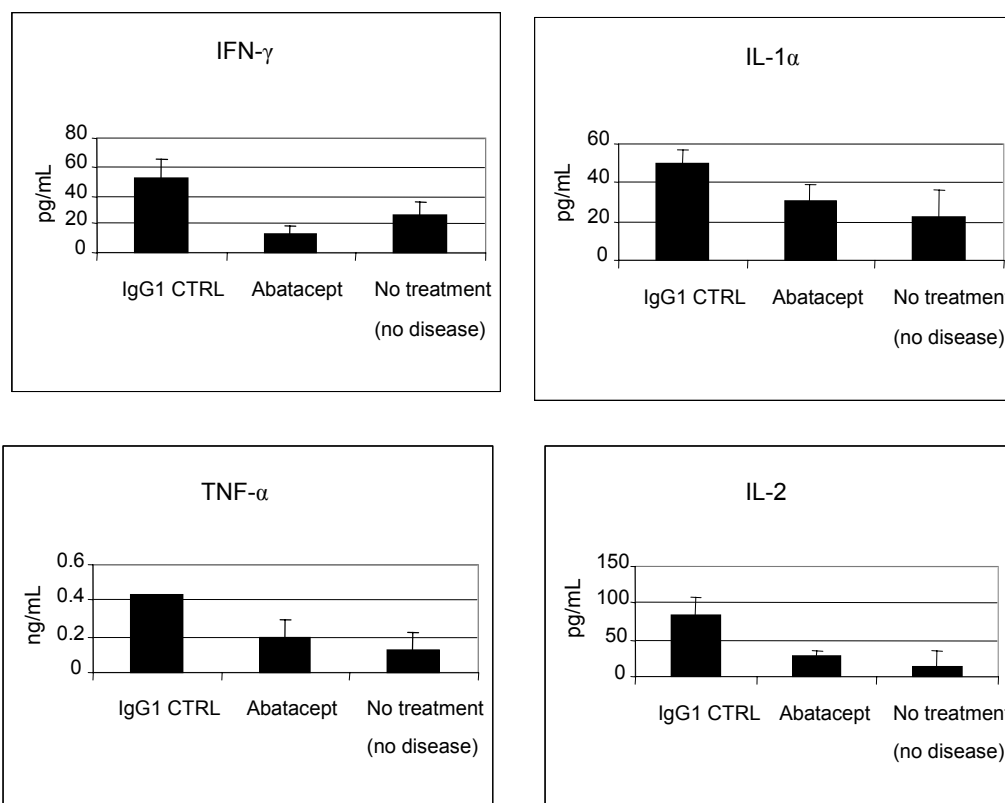


CIA ラットに 1 mg/kg のアバタセプト又はヒト IgG1 を腹腔内投与したときの 27 日目（試験終了時）の抗コラーゲン抗体の力価を示す。

出典：4.2.1.1-5

サイトカイン、ケモカイン及び可溶性受容体に対しては、図 2-20 に示すように IgG1 投与群では正常ラットと比較して IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-2 など多数が関節炎の発症/進行により上昇したが、これらのサイトカインの上昇はアバタセプト投与群では有意に抑制された ($P < 0.05$)。

図 2-20: CIA ラットにおけるアバタセプトのサイトカインに対する作用

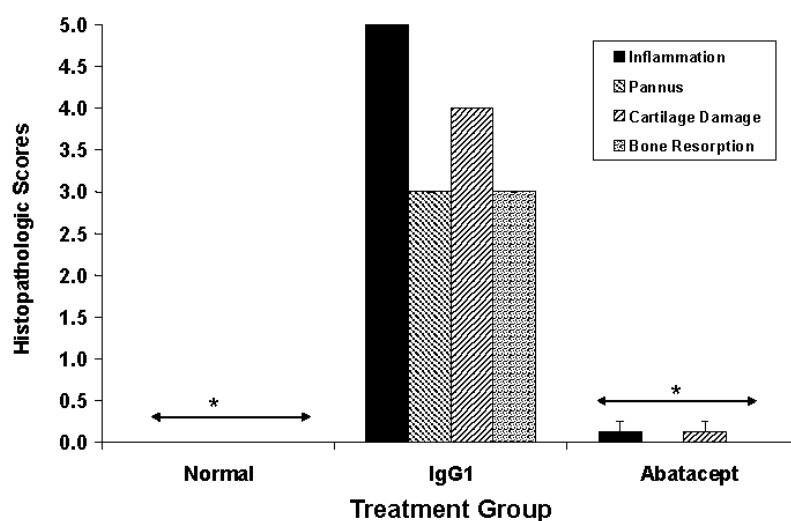


CIA ラットに 1 mg/kg のアバタセプト又はヒト IgG1 を-1 (コラーゲン惹起前日)、0 (惹起日)、2, 4, 6, 8 及び 10 日目に腹腔内投与したときの 27 日目 (試験終了時) の IFN- γ , TNF- α , IL-1 α 及び IL-2 の血清中濃度 (平均値 \pm SEM) を示す。

出典: 4.2.1.1-5 改変

また、組織学的評価及びマイクロ CT 検査によりアバタセプトの骨破壊に対する予防的効果を検討した結果、図 2-21 に示すように、アバタセプト投与群では組織学的評価スコア (炎症、パンス、軟骨障害及び骨吸収) が有意に低下した ($P < 0.05$)。したがって、アバタセプトの予防投与により骨破壊が抑制されることが示された。

図 2-21: CIA ラットにおけるアバタセプトの骨破壊に対する組織学的評価



CIA ラットに 1 mg/kg のアバタセプト又はヒト IgG1 を-1 (コラーゲン惹起前日)、0 (惹起日)、2, 4, 6, 8 及び 10 日目に腹腔内投与したときの 27 日目 (試験終了時) の組織学的評価スコアを示す。評価は炎症、パヌス、軟骨障害及び骨吸収の程度をスコア化して行った。

* $P < 0.05$

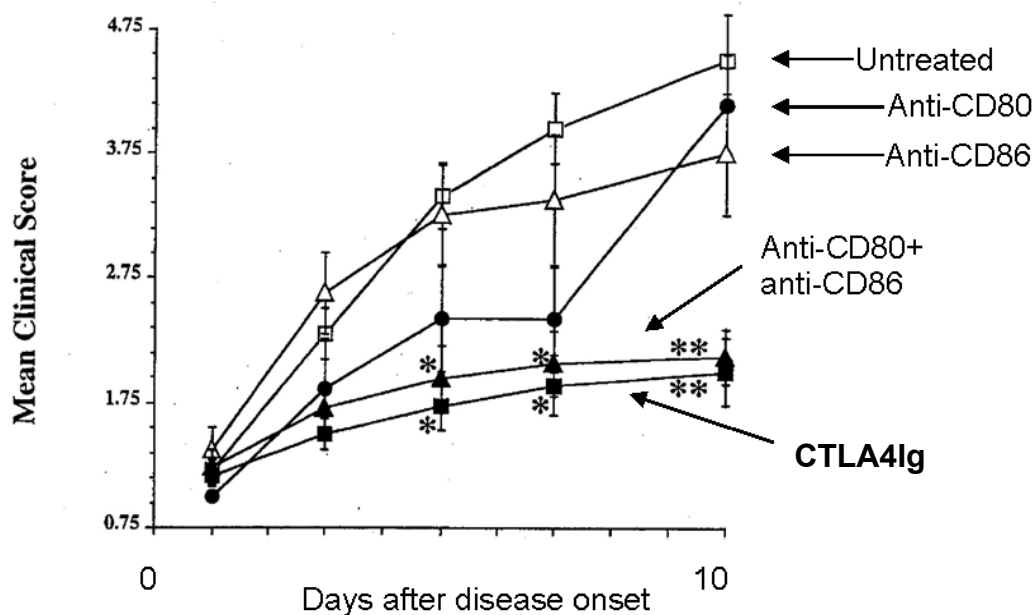
出典: 4.2.1.1-5 改変

上記の試験成績から、CIA ラットへのアバタセプトの予防投与により足浮腫が減弱し、病態の発症が抑制され、病因である抗コラーゲン抗体を始め、炎症性サイトカイン及びケモカインの産生が阻害されることが示された。さらに組織学的評価及びマイクロ CT 検査において、骨破壊の抑制が認められた (4.2.1.1-5)。一方、コラーゲンで惹起した後 (病態発症後) の CIA ラットに 1 mg/kg のアバタセプトを腹腔内投与し、本薬の治療効果を検討した結果、病態の進行は遅延したが、試験終了時には対照群と同程度の足浮腫が認められた (4.2.1.1-5)。現時点では、足浮腫に対して治療効果が認められなかった理由は不明である。なお、関節炎に対する治療効果が認められたとの報告もある⁵²⁾。

BMS 社以外の研究機関において、アバタセプトのマウス相同体であるマウス CTLA4Ig の関節炎モデルに対する予防及び治療効果が検討されている⁵²⁾。CIA マウスにコラーゲンにより関節炎を惹起する当日から 100 µg のマウス CTLA4Ig を腹腔内投与した結果、20 例中 19 例において病態の発症が抑制された。関節炎を発症した 1 例についても発症は遅延し、病態の重症度 (臨床スコア、足浮腫、影響の認められた関節数) も低かった。また、抗コラーゲン IgG1 及び IgG2a 抗体の抗体価は、マウス CTLA4Ig 投与群で有意に減少し ($P < 0.00001$)、検出限界未満となる場合もあった。組織学的評価において、マウス CTLA4Ig 投与群では対照群と異なり関節破壊は認められなかった。さらに、マウス CTLA4Ig 投与群ではリンパ節細胞が有意に減少した ($P < 0.05$)。関節炎発症後のマウスに 100 µg のマウス CTLA4Ig を腹腔内投与した結果、図 2-22 に示す臨床評価スコアの低下を始め、足浮腫の有意な抑制 ($P < 0.0001$ 又は $P < 0.00001$) 及び影響の生じた関節

数の減少が認められた。したがって、上述の CIA ラットとは異なり、CIA マウスでは病態の進行及び重症度に対する治療効果が認められ、これらの有効性は投与開始 1 週間以内に確認された。マウス CTLA4Ig 投与群における臨床評価スコアの低下は組織学的評価においても確認され、対照群と比較して関節破壊が軽減された。

図 2-22: CIA マウスにおけるマウス CTLA4Ig の病態進行に対する治療効果



病態発症後の CIA マウスにマウス CTLA4Ig (■)、抗 CD80 抗体 (●)、抗 CD86 抗体 (△)、抗 CD80 抗体及び抗 CD86 抗体 (▲) をそれぞれ 100 µg、又は PBS (□) を 1 日おきに腹腔内投与したときの臨床評価スコア (平均値 ± SEM) の経時変化を示す。

* P < 0.0001

** P < 0.00001

出典：参考文献⁵²⁾

さらに、CD80/CD86 に対する抗体を用いて、CD28 と CD80/CD86 との相互作用を特異的に阻害した場合の影響についても検討されている⁵²⁾。その結果、抗 CD80 抗体と抗 CD86 抗体の併用投与により関節炎の進行が抑制され、抗コラーゲン抗体の産生低下及び病態重症度の軽減が認められ、図 2-22 に示すように臨床評価スコアはマウス CTLA4Ig と同程度の有効性であった。抗 CD80 抗体又は抗 CD86 抗体の単独投与では、抑制作用は弱かった。また、CD28^{-/-} DBA/1 マウスを用い、関節炎発症における CD28 共刺激シグナルの役割が検討されている³⁹⁾。その結果、CD28^{-/-} DBA/1 マウスは、コラーゲン惹起による関節炎発症に対して抵抗性を示した。CIA モデルでは CD4 陽性 T 細胞が病態発症に関与しており、IL-12 は CD4 陽性 T 細胞を介する免疫応答を促進することが知られている。そこで、IL-12 存在下でコラーゲン惹起を行ったが、IL-12 の有無にかかわらず、CD28^{-/-} マウスでの病態発症率は低く、発症した場合でも軽症であった。抗コラーゲン IgG1 及び

IgG2a 抗体の産生は著しく低下し、抗原特異的な IFN- γ の産生も減少した。したがって、関節炎発症においては CD28 と CD80、CD28 と CD86 の両相互作用の阻害が重要であることが示唆された。

以上の試験成績から、CD28 と CD80/CD86 との相互作用を阻害することにより関節炎の発症が軽減されることが示され、CIA モデルにおいて、アバタセプト又は CTLA4Ig は予防的及び治療的効果のいずれについても有効性を示した。これは、末梢リンパ系器官又は炎症部位での抗原依存性の T 細胞活性化の抑制、炎症性サイトカイン及びケモカイン、さらに病因である抗コラーゲン抗体の産生抑制に起因すると考えられる。

2.1.3.5 他の T 細胞関連疾患に対する作用 (*in vivo*)

SLE は重篤な自己免疫疾患であり、約半数の患者が糸球体腎炎（ループス腎炎）を発症する。SLE の病態モデルの一つである NZB×NZW F1 マウスは、ヒトのループス腎炎と類似した病態を 8 ヶ月齢で自然発症する。これらのマウスでは免疫複合体を介した重篤な増殖性糸球体腎炎を発症し、抗二本鎖（ds）DNA 抗体の抗体価が高く、致死率が非常に高い。SLE の特徴として、CD4 陽性 T 細胞に依存した自己抗体の産生が挙げられる^{53),54)}。ループス腎炎に対するアバタセプトの作用については、複数の公表論文により報告されている。NZB×NZW F1 マウスに 50 μ g のマウス CTLA4Ig を病態発症前の 5 ヶ月齢から 9 ヶ月齢まで腹腔内投与した結果、抗 dsDNA 抗体の産生が完全に抑制されたことにより糸球体腎炎の重症度が軽減し、93%が 12 ヶ月齢まで生存した⁵⁵⁾。一方、対照群では 12 ヶ月齢までに全例が死亡した。病態発症後の 8 ヶ月齢から 50 μ g のマウス CTLA4Ig を腹腔内投与した場合においても抗 dsDNA 抗体の産生が抑制され、腎機能の改善及び生存期間の延長が認められた。8 ヶ月齢の時点で 40%が糸球体腎炎により死亡しており、対照群では 12 ヶ月までに全例が死亡した。また、他の SLE 自然発症モデルである BXSB マウスにおいても、マウス CTLA4Ig の有効性が認められている⁵⁶⁾。さらに、NZB×NZW F1 マウスへのマウス CTLA4Ig 遺伝子の導入により T 細胞依存性の B 細胞の成熟が抑制されたとの報告がある⁵⁷⁾。

その他、アバタセプトは [REDACTED]、[REDACTED]、[REDACTED] などの T 細胞関連疾患モデルにおいても有効性が認められている（4.2.1.1-8）。

2.1.3.6 CD80/CD86 を介したアバタセプトの作用機序のまとめ

アバタセプトは CD80/CD86 に対する選択性が高く、これまでに同定されている他の共刺激分子とは結合しないことが報告されている^{58),101),103)}。アバタセプトは CD80/CD86 に結合し、CD28 又は CTLA-4 依存性の免疫応答を阻害する。CD28 共刺激シグナルは T 細胞に対してポジティブに作用するが、CTLA-4 は T 細胞の活性化を減弱し、ネガティブに作用する。また、CTLA-4 ノックアウト（CTLA4^{-/-}）マウスは多クローン性の T 細胞の活性化による致死的なリンパ球増殖性疾患を発症する⁵⁹⁾。そのため、アバタセプトが CTLA-4 と CD80/CD86 との相互作用に競合的に作用することで T 細胞の反応性を増強することが懸念される。しかし、上記の *in vitro* 及び *in vivo* 試験などから、アバタセプトは T 細胞の活性化を増強せず、抑制することが証明されている⁶⁰⁾。さらに、CTLA-4 シグナルは CD80/CD86 と独立して生じることが報告されており⁶¹⁾、アバタセ

トが内因性 CTLA-4 と CD80/CD86 との相互作用を阻害しても T 細胞の活性化を減弱させるシグナルは別に存在する。また、アバタセプトを長期投与したマウス (2.6.6.3.1.1) と CTLA4^{-/-}マウスの表現型は全く異なっている。以上の点からアバタセプトが T 細胞の反応性を増強する可能性は低いと考えられる。

2.1.4 アバタセプトのその他の作用

アバタセプトは CD28 共刺激シグナルの直接阻害以外の作用機序を有する可能性が *in vitro* 及び *in vivo* 試験において示唆されている。その候補として、制御性 T 細胞や APC が挙げられていることから、これらに対する作用について検討した。

2.1.4.1 制御性 T 細胞

制御性 T 細胞はヒト及びげっ歯類において確認されており、近年、精力的に研究が行われている^{62),63),64)}。制御性 T 細胞は IL-10 及びトランスフォーミング増殖因子 (TGF) - β などのサイトカイン産生又は細胞間シグナルを介して他の T 細胞の増殖を阻害し、大部分が CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞であり、forkhead box P3 (foxp3)、glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR)、CTLA-4 のいずれかを発現する。げっ歯類では慢性消化管炎症の予防や食物抗原に対する免疫寛容の維持に関与していることから⁶⁵⁾、制御性 T 細胞は自己反応性 T 細胞の活性を低下させ、自己免疫疾患を抑制すると考えられている。実際、CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の減少が自己免疫疾患患者において確認されている⁶⁶⁾。反対に、CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の増加は癌に対する免疫応答を低下させる可能性がある。最近、制御性 T 細胞に対する特異的マーカーが同定されたが⁶⁷⁾、ヒトにおける制御性 T 細胞の役割は未だ不明である。

CD28 共刺激シグナルは CTLA-4 の発現に必要であると考えられており、CTLA-4 は制御性 T 細胞にも発現することから、アバタセプトが制御性 T 細胞の数及び活性を減弱させる可能性がある。そこで、アバタセプトの CTLA-4 に対する作用について MLR を用いて検討した。

実験 活性化 T 細胞表面での CTLA-4 発現に対するアバタセプトの作用

(表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-12)

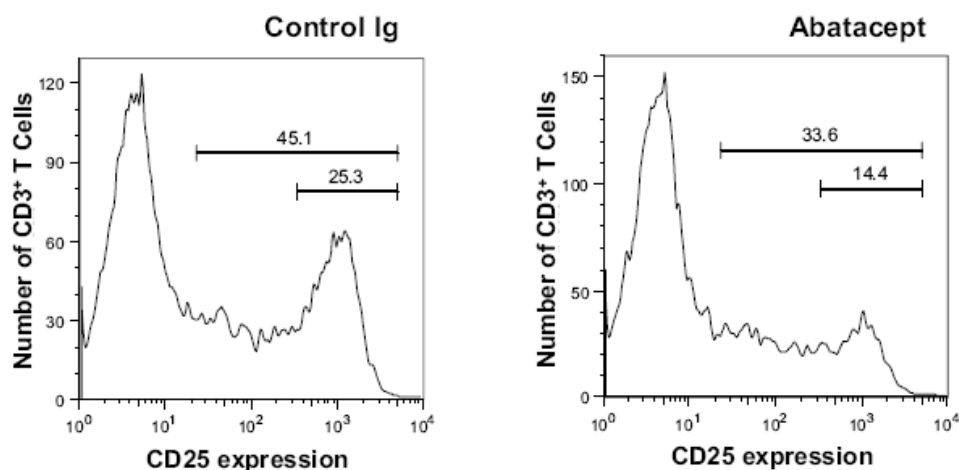
方法

T 細胞はドナーの PBMC から分離・精製し、標的細胞として EBV により形質転換させた CD80/CD86 陽性 B 細胞を用いた。4 × 10⁶ cells の T 細胞と EBV 形質転換 CD80/CD86 陽性 B 細胞を 30 μg/mL のアバタセプト又は IgG 存在下で培養し、MLR を行った。細胞を洗浄後、蛍光標識された抗 CD3 抗体、抗 CD25 抗体、抗 CD69 抗体又は抗 CD152 抗体と 4°C、1 時間反応させた。その後、フローサイトメトリーにより標識抗体の蛍光強度を測定し、CD25、CD69 及び CTLA-4 (CD152) の発現量を解析した。

結果

CD3 陽性 T 細胞における CD25 の発現量を図 2-23 に示す。30 μg/mL のアバタセプトにより CD3 陽性 CD25 陽性 T 細胞は IgG と比較して最大 43%減少した。しかし、図 2-24 に示すように、CD25 陽性 T 細胞における CTLA-4 (CD152) の発現量はアバタセプトにより変化しなかった (図 2-24A)。CD25 陰性 T 細胞 (アバタセプトにより活性化が阻害された T 細胞) においても同様の結果が得られた (図 2-24B)。

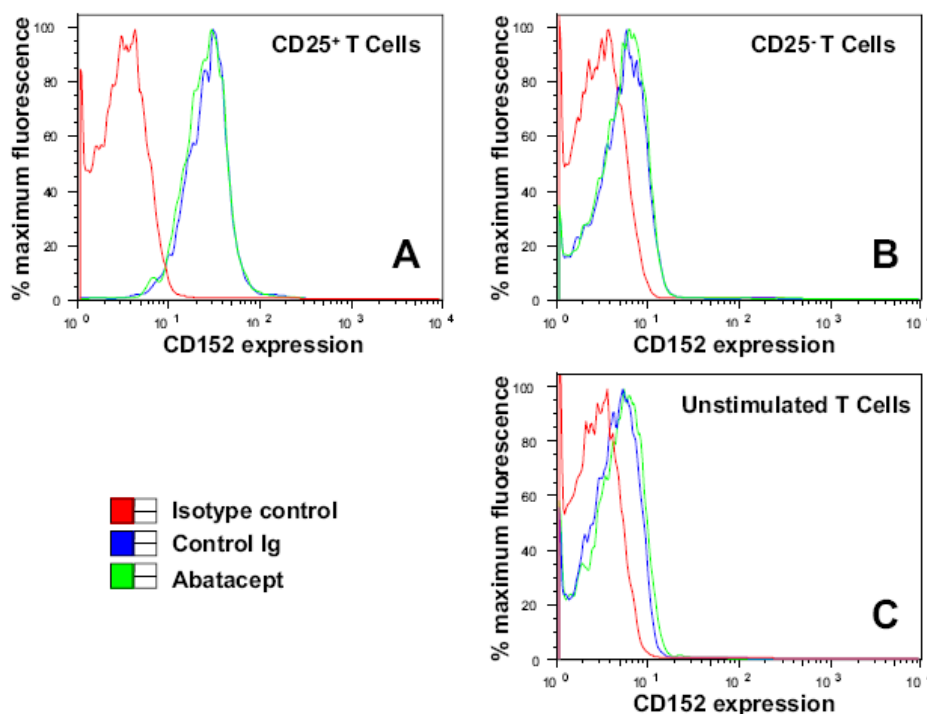
図 2-23: 活性化 T 細胞に対するアバタセプトの作用



30 μg/mL のアバタセプト (右) 又は IgG (左) 存在下での CD3 陽性 T 細胞における CD25 の発現量を示す。

出典: 4.2.1.1-12

図 2-24: 活性化 T 細胞表面での CTLA-4 (CD152) 発現に対するアバタセプトの作用



30 µg/mL のアバタセプト (緑) 又は IgG (青) 存在下での CTLA-4 (CD152) の発現量を示す。

- A. CD25 陽性 T 細胞
- B. アバタセプトにより活性化が阻害された CD25 陰性 T 細胞
- C. リンパ球混合反応を行わなかった T 細胞

出典 : 4.2.1.1-12

上記の試験成績から、アバタセプトにより活性化 T 細胞が約 30%~40%減少したが、活性化 T 細胞表面での CTLA-4 の発現量は減少せず、アバタセプト存在下においても活性を有することが示唆された。さらに、アバタセプトの 1 年間までの反復投与毒性試験において、本薬投与群に自己免疫疾患の発症は認められなかった (2.6.6.3)。また、CTLA4Ig 投与後に新規の自己免疫疾患が発症したとの *in vivo* 試験成績は報告されていないことから、遺伝的素因がない場合には、CTLA4Ig は自己免疫疾患を誘導しないと考えられる。ただし、CTLA4Ig 投与により自己免疫疾患が増悪したとの報告がある⁶⁸⁾。本報告では自己免疫性糖尿病を自然発症する NOD マウスに糖尿病 (高血糖) の発症以前からマウス CTLA4Ig を反復投与した結果、脾臓及びリンパ節内の CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の比率 (1%~2%) が対照群 (3%~6%) と比較して減少した。なお、糖尿病発症後にマウス CTLA4Ig を投与した場合には検討されていない。

さらに、アバタセプトと類似構造を有する belatacept (BMS-224818) の制御性 T 細胞に対する作用が検討されている。Belatacept は CD80/CD86 結合ドメインのアミノ酸がアバタセプトとは 2 残基異なり、霊長類の CD86 に対する結合力がアバタセプトと比較して有意に強く、強力な生物

活性を有する (4.2.1.1-7)。抗 CD25 モノクローナル抗体、副腎皮質ステロイド、ミコフェノール酸モフェチル (MMF) 及び belatacept 又はシクロスポリンを投与された腎移植患者と健康成人少数例の血中の CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の数を測定した結果、腎移植後 6~30 ヶ月の末梢血中の CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の割合は belatacept 投与群で 4.3%、シクロスポリン投与群で 4.2%、健康成人では 4.5%であった⁶⁹⁾。また、belatacept 投与群の CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞は、*in vitro* において CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞の増殖を阻害した。これは予備的な試験成績ではあるが、アバタセプトが末梢血中の制御性 T 細胞の数を変化させず、活性を阻害しない可能性が示唆された。

2.1.4.2 抗原提示細胞 (APC)

CTLA4Ig はげっ歯類の樹状細胞において、インドールアミンジオキシゲナーゼ (IDO) の発現を誘導する。これは CD80/CD86 への結合及びシグナル伝達に起因することが示唆されている。IDO の発現増加により T 細胞周辺の微小環境、すなわち APC との境界面において、T 細胞の増殖に必要なアミノ酸であるトリプトファン濃度が低下し、その結果、T 細胞の増殖が減弱すると考えられている^{70),71),72)}。したがって、アバタセプトは APC によるトリプトファンの防御機能を介して T 細胞の増殖に間接的に作用している可能性がある。

2.2 感染防御機構に及ぼす影響

ウイルス、細胞内細菌、真菌、寄生虫などの病原体に対する感染防御機構へのアバタセプトの影響について検討した。マクロファージなどの貪食細胞は CD28 を発現していないことから、感染防御機構は CD28 共刺激シグナルに直接依存してはいない²³⁾。試験成績を表 2-4 に要約する。これらの試験では、アバタセプトのほか、BMS 社以外から提供された CTLA4Ig、CD28^{-/-}マウスなどが用いられている。その結果、多くの病原体に対する感染防御機構は維持されていた。しかし、CD4 陽性 T 細胞を介した免疫応答に特に依存している病原体では、アバタセプト投与による感染リスクの増大が懸念される。

表 2-4: 感染防御機構に対するアバタセプトの作用

感染の種類		CD28 共刺激シグナル阻害方法	生存期間 ○：短縮 ×：変化せず	病原体のクリアランス ○：遅延 ×：変化せず	T細胞の増殖 ○：抑制 △：わずかに抑制 ×：変化せず	抗体産生 ○：抑制 ×：変化せず	出典
ウイルス							
マウスサイトメガロウイルス	急性	アバタセプト	×	×	ND	ND	4.2.1.1-9
リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス	急性	CTLA4Ig	×	×	△ (CD8 陽性が 2 倍抑制)	○ (3~20 倍抑制)	参考文献 ⁷⁹⁾
ワクシニアウイルス	急性	CTLA4Ig	ND	ND	△ (CD8 陽性が 3 倍抑制)	ND	参考文献 ⁷⁹⁾
インフルエンザウイルス	急性	CTLA4Ig	×	○ (3 日遅延)	○ (ほぼ完全に抑制)	○ (7~30 倍抑制)	参考文献 ⁸⁰⁾
水疱性口内炎ウイルス	急性	CD28 ^{-/-} マウス	ND	ND	ND	○ (50%抑制)	参考文献 ⁸¹⁾
単純ヘルペスウイルス	急性	CTLA4Ig	○	○	○ (CD8 陽性と比較して CD4 陽性がより抑制)	ND	参考文献 ⁸³⁾
マウス白血病ウイルス	慢性	CTLA4Ig	×	×	ND	ND	参考文献 ⁸⁶⁾
細胞内細菌							
リステリア菌	急性	CD28 ^{-/-} マウス	○ (20~25%死亡)	○	○ (CD8 陽性が 80%抑制)	ND	参考文献 ⁸⁸⁾
結核菌	慢性	アバタセプト	×	×	ND	ND	4.2.3.7.2-3
真菌							
カリニ真菌	急性	アバタセプト	×	×	ND	ND	4.2.1.1-9
寄生虫							
リーシュマニア	急性	CD28 ^{-/-} マウス	×	×	ND	ND	参考文献 ⁹⁴⁾
	慢性	アバタセプト	ND	ND	○ (CD4 陽性)	ND	参考文献 ⁹⁵⁾

ND = 検討せず

2.2.1 ウイルス

ウイルスに対する感染防御機構では、ウイルス特異的な CD8 陽性 T 細胞による感染細胞の細胞傷害が重要である。CD8 陽性 T 細胞は活性化及び増殖の初期において共刺激シグナルを必要とするが、CD28 以外の共刺激シグナルを介することが多く²⁹⁾、TNF 受容体ファミリーに属する 4-1BB (CD137) と 4-1BB リガンドとの相互作用に依存している^{73),74),75)}。また、通常、ウイルス (他の病原体も含む) は共刺激分子を発現させるために APC を直接刺激している⁷⁶⁾。なお、4-1BB と 4-1BB リガンドとの相互作用は CD4 陽性 T 細胞の活性化にはほとんど関与していない。

しかし、CD4 陽性 T 細胞が感染防御機構に関与している場合があり、CD4 陽性 T 細胞は APC を刺激することで CD8 陽性 T 細胞を間接的に活性化する。また、CD4 陽性 T 細胞は B 細胞に抗ウイルス抗体を産生させるようなヘルパー機能を有し、さらに、IL-2 を産生して CD8 陽性 T 細胞を増殖させる。したがって、機能面から CD4 陽性 T 細胞に依存性が低いウイルスと高いウイルスに分類されるため⁷⁷⁾、分類ごとにアバタセプトの影響について検討した。

2.2.1.1 CD4 陽性 T 細胞に低依存性のウイルス感染

マウスサイトメガロウイルス (mCMV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、ワクシニアウイルス、インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV) などは CD4 陽性 T 細胞に対する依存性が低いことが知られている。そこで、mCMV への一次感染時の免疫応答に対するアバタセプトの影響について、免疫能が正常なマウスを用いて検討した。

実験 mCMV に対するアバタセプトの影響 (表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-9)

方法

雌の BDF1 マウス 18 例に 200 µg のアバタセプト又はヒト IgG を週 2 回、2 週間静脈内投与し (アバタセプトの総投与量 800 µg/例)、14 日目に 2.5×10^6 PFU の mCMV を腹腔内接種した。mCMV 接種 4, 7, 15 及び 21 日目に肝臓、肺、脾臓及び唾液腺を採取し、各組織のウイルス量 [\log_{10} PFU/組織重量 (g)] を測定した。

結果

免疫能が正常なマウスに mCMV を感染させたとき、アバタセプト投与群及びヒト IgG 投与群では、mCMV 感染による死亡は認められなかった。mCMV 接種 5~7 日目にアバタセプト投与群 18 例中 2 例で感染症状を示したが、8 日目までに全例が完全に回復した。各組織のウイルス量に対するアバタセプトの影響を表 2-5 に示す。アバタセプト投与群では mCMV 接種 4 及び 21 日目にそれぞれ肝臓及び唾液腺のウイルス量がヒト IgG 投与群と比較して軽微ではあるが、有意に上昇した ($P < 0.02$)。このとき、他の臓器ではウイルス量に有意な差は認められず、さらに mCMV 接種 21 日目までに肺及び脾臓のウイルス量は検出限界未満となった。

表 2-5: mCMV 感染マウスにおける各組織のウイルス量 (\log_{10} pfu/g) に対するアバタセプトの影響

	ウイルス量 (平均値 \pm SD) (\log_{10} PFU/g)							
	4 日目		7 日目		15 日目		21 日目	
	アバタ (n=4)	ヒト IgG (n=4)	アバタ (n=4)	ヒト IgG (n=4)	アバタ (n=5)	ヒト IgG (n=5)	アバタ (n=5)	ヒト IgG (n=5)
肝臓	3.87 \pm 0.76*	2.64 \pm 0.15	3.42 \pm 0.26	3.51 \pm 0.99	2.62 \pm 0.14	3.09 \pm 0.46	3.91 \pm 0.29	4.22 \pm 0.25
肺	3.31 \pm 0.56	3.00 \pm 0.35	3.34 \pm 0.46	2.90 \pm 0.47	< 2.52	< 2.52	< 2.52	< 2.52
脾臓	3.85 \pm 1.07	3.39 \pm 0.32	2.75 \pm 0.39	3.18 \pm 0.78	2.95 \pm 0.53	3.30 \pm 0.56	< 2.52	< 2.52
唾液腺	2.63 \pm 0.22	< 2.52	3.66 \pm 0.23	3.92 \pm 0.23	4.74 \pm 0.29	4.76 \pm 0.55	4.69 \pm 0.47*	4.04 \pm 0.37

アバタセプト: mCMV 接種前に 200 μ g のアバタセプトを週 2 回、2 週間投与

ヒト IgG: mCMV 接種前に 200 μ g のヒト IgG を週 2 回、2 週間投与

*: ANOVA 検定によりヒト IgG 投与群との比較により $P < 0.02$ で有意差あり

出典: 4.2.1.1-9

CMV は細胞性免疫能を欠損した患者での罹患率及び死亡率が高く、感染防御機構において CD8 陽性 T 細胞及びナチュラルキラー (NK) 細胞による細胞傷害が必須である。免疫能が正常なマウスでは、脾臓及びその他の器官への mCMV 感染は認められなかったが、唾液腺への潜伏感染がみられ⁷⁸⁾、CD4 陽性 T 細胞の関与が示唆されている。上記の試験において、mCMV 接種前に 200 μ g のアバタセプトを週 2 回、2 週間静脈内投与したマウスでは、無処置群と同様に脾臓への mCMV 感染は認められなかった (4.2.1.1-9)。唾液腺への潜伏感染もコントロール可能であり、アバタセプト投与群の唾液腺でのウイルス量は無処置群のわずか 1.2 倍であった。これらの試験成績から、アバタセプトは mCMV に対する CD8 陽性 T 細胞/NK 細胞又は CD4 陽性 T 細胞による感染防御機構には作用しないことが示された。

また、LCMV、ワクシニアウイルス、インフルエンザウイルス及び VSV 感染に対する CD28 阻害の影響について以下の文献報告がされている。

LCMV 及びワクシニアウイルス感染に対する CD28 阻害の影響については、可溶性ヒト CTLA4Ig トランスジェニックマウスを用いた検討が行われている⁷⁹⁾。CTLA4Ig トランスジェニックマウスは、急性 LCMV 感染に対して抵抗性を示し、*in vitro* においてウイルス感染細胞に対するほぼ正常 (野生型との差が 2 倍以下) な CD8 陽性 T 細胞による細胞傷害活性が認められた。このとき、LCMV に対する中和 IgG 抗体及び非中和 IgG 抗体の産生が著しく抑制されたにもかかわらず、感染がコントロールされていた。ワクシニアウイルス感染後の CD8 陽性 T 細胞による細胞傷害活性についても、野生型マウスと同様に維持されていた。

インフルエンザウイルスに対しては、ウイルスを経鼻感染させたマウスにマウス CTLA4Ig を投与した結果、ウイルス特異的な IgG1 及び IgG2a 抗体の産生、細胞傷害活性、IFN- γ 産生及び T 細胞の増殖が阻害されたにもかかわらず、肺ではウイルスが消失した⁸⁰⁾。このとき、1 例では正常に消失したが、他の 4 例では対照群と比較してウイルスの消失が 3 日間遅延した。したがって、アバタセプトによりウイルスの消失が遅延する可能性はあるが、消失能は維持されることが示さ

れた。

さらに、VSV 感染に対する CD28 阻害の影響について、CD28^{-/-}マウス及び CD80/CD86 ノックアウト (CD80^{-/-}/CD86^{-/-}) マウスを用いた検討が行われている^{81),82)}。これらのノックアウトマウスの違いは、CD28^{-/-}マウスでは CD80/CD86 と CTLA-4 が相互作用するが、CD80^{-/-}/CD86^{-/-}マウスでは相互作用できない。CD28^{-/-}マウスでは、VSV に対する中和 IgG 抗体の産生が減少したが、IgM の産生は阻害されなかった⁸¹⁾。CD80^{-/-}/CD86^{-/-}マウスでは VSV 特異的な細胞傷害活性が低下したが、VSV の消失及び生存については報告されていない⁸²⁾。

これらの試験成績から、ウイルス特異的な中和 IgG 抗体の産生が阻害されたにもかかわらず、CD4 陽性 T 細胞に依存性が比較的低いウイルスに対する感染防御機構はおおむね維持されることが示された。また、ウイルスによっては *in vitro* において CD8 陽性 T 細胞による細胞傷害活性の増強が認められた。

2.2.1.2 CD4 陽性 T 細胞に高依存性のウイルス感染

単純ヘルペスウイルス (HSV) に対する感染防御機構では、CD4 陽性 T 細胞への依存性が高いことが知られている。HSV に対するアバタセプトの影響については、以下の文献報告がされている⁸³⁾。HSV に急性感染したマウス (無処置群) は、60%が麻痺により死亡した。一方、感染前後にマウス CTLA4Ig を投与した場合には、HSV 特異的な CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞による免疫応答が無処置群と比較して低下し、90%が死亡した。また、HSV 角膜炎マウスにおいて、CTLA4Ig により HSV 特異抗体の産生、脾細胞の増殖及び IFN- γ の産生が抑制された⁸⁴⁾。したがって、アバタセプトにより HSV への感染リスクが高くなる可能性が考えられる。なお、現時点では、潜伏 HSV 感染の再燃に対するアバタセプトの作用については検討されていない。

2.2.1.3 慢性ウイルス感染

非増殖性のマウス白血病ウイルス (MLV) への感染により、マウスはリンパ球増殖性疾患 (マウス後天性免疫不全症) を発症し、特徴的な症状として脾腫、全身性リンパ節腫大、高グロブリン血症、細胞分裂刺激によるリンパ球応答の低下などが挙げられる。本疾患の発症機序は不明だが、CD4 陽性 T 細胞に依存していることが報告されている⁸⁵⁾。慢性ウイルス感染に対するアバタセプトの影響については、以下の検討が行われている。

MLV 感染後のキメラ型 CTLA4Ig (マウス CTLA-4 とヒト IgG の融合蛋白) トランスジェニックマウス及び野生型マウスから脾臓を摘出し、ウイルス特異的 mRNA 量を比較した結果、両マウスともに MLV の持続感染が認められたが、キメラ型 CTLA4Ig トランスジェニックマウスではリンパ球増殖性疾患の発症は認められず、LPS などの分裂促進因子に対する反応性は維持されていた⁸⁶⁾。したがって、CTLA4Ig は慢性のレトロウイルス感染に対する防御機構を抑制せず、バクテリア分裂促進因子に対する反応性は維持されることが示された。

また、慢性 LCMV 感染に対する影響を CTLA4Ig と抗 CD40 リガンドモノクローナル抗体の併用により検討している⁸⁷⁾。ただし、本試験では CTLA4Ig を単独投与した場合については検討されていない。LCMV 接種後に併用投与した群ではウイルス血症を呈し、無処置群 (血中ウイルス

が検出下限値未満)と比較して脾臓内のウイルス特異的な CD8 陽性 T 細胞が 3~4 倍減少した。現時点では、LCMV や EBV などの慢性ウイルス感染に対する CTLA4Ig 単独投与の影響については報告されていない。

2.2.2 細胞内細菌

リステリア菌に対する CD28 共刺激シグナル阻害の影響について、以下の検討が報告されている。

リステリア菌を静脈内投与により感染させた CD28^{-/-}マウスでは、肝臓及び脾臓における菌数が野生型マウスと比較して 10~100 倍高かった⁸⁸⁾。大部分の野生型マウスでは感染 9 日目までにリステリア菌が消失したが、CD28^{-/-}マウスでは感染 13 日目までに消失した。さらに、CD28^{-/-}マウスではリステリア菌に特異的な CD8 陽性 T 細胞が野生型と比較して減少した(脾臓の全 CD8 陽性 T 細胞に対する割合は CD28^{-/-}マウスで 0.6%、野生型マウスで 3.1%)。二次感染時には、CD8 陽性メモリー T 細胞による免疫応答が認められたが、一次感染と同様に野生型と比較して弱かった。

また、抗 CD80 モノクローナル抗体及び抗 CD86 モノクローナル抗体の併用により CD28 共刺激シグナルを阻害した場合についても検討されている⁸⁹⁾。一次感染前に両抗体を併用投与されたマウスでは、リステリア菌の消失は無処置群と同程度であった。二次感染時においても同様の結果が得られたことから、CD28 共刺激シグナルを阻害しても二次応答は維持されていることが示された。リステリア菌に特異的な IFN- γ 及び IL-2 の産生は阻害されたが、リステリア菌に対する感染防御機構は維持されていた。これらの試験成績から、CD28 共刺激シグナルは、リステリア菌などの細胞内細菌に対する CD8 陽性 T 細胞による一次応答及び二次応答が最大限に機能するために必要であることが示された。なお、TNF- α はリステリア菌に対する感染防御において必須であることが示されており、TNF- α 受容体 p55 遺伝子を欠損したマウスは、リステリア菌に一次感染後 7 日目までに全例が死亡した⁹⁰⁾。

さらに、慢性の潜伏結核菌感染の再燃に対するアバタセプトの作用について検討した(4.2.3.7.2-3)。結核菌を気道感染させ、4 ヶ月後に肺で慢性肉芽腫が確認された C57BL/6 マウスに、20 mg/kg のアバタセプト又は溶媒を週 1 回、あるいは 0.5 mg の抗マウス TNF- α 抗体を週 2 回、16 週間皮下投与した。アバタセプト投与群及び溶媒投与群は試験終了時まで全例生存し、結核菌に対して抵抗性を示した。一方、抗マウス TNF- α 抗体投与群は結核菌感染により 9 週目までに全例が死亡した。また、投与 16 週目ではアバタセプト投与群の肺、リンパ節又は脾臓における結核菌の菌数は溶媒投与群と比較して有意な差は認められなかった。8 週目での肺及びリンパ節における結核菌特異的な IFN- γ の産生はアバタセプト投与群と溶媒投与群で同程度であった。以上の試験成績から、抗 TNF- α 抗体とは異なり、アバタセプトを投与しても潜伏結核菌感染に対する感染防御機構は維持されていた。なお、慢性の潜伏結核菌感染の再燃に対するアバタセプトの影響についての詳細な考察は、2.6.6.8.2.3 に記載した。

2.2.3 真菌

ニューモシスチス肺炎は、CD4 陽性 T 細胞の機能が低下した患者における主な死亡原因である。そこで、カリニ真菌（PC）への一次感染時の免疫応答に対するアバタセプトの作用について、免疫能が正常なマウスを用いて検討した。

実験 カリニ真菌に対するアバタセプトの作用（表 2.6.3.2-1 薬理試験の概要表、4.2.1.1-9）

方法

雌の BDF1 マウス 10 例に 200 µg のアバタセプト又はヒト IgG を週 2 回、3 週間静脈内投与し、21 日目に PC 感染マウスの肺ホモジェネート 50 µL を気管支内接種した。その後、さらに 200 µg のアバタセプト又はヒト IgG を週 2 回、4 週間静脈内投与した（アバタセプトの総投与量 2800 µg/例）。陽性対照として 12 例のマウスに PC 接種前に 1.2 mg/kg/日のデキサメタゾンを飲水中に混入して 2 週間摂取させた。また、5 例のマウスでは薬剤を投与せず、PC 接種のみを行った。PC 接種後の各マウスから経時的に肺の塗抹標本を作製し、PC の栄養体及び嚢胞を染色した。

結果

PC 感染に対するアバタセプト及びデキサメタゾンの影響を表 2-6 に示す。デキサメタゾン投与群では投与期間中に体重が 15%~20%低下し、PC 接種以降も持続的な体重低下が認められた。最終的には 12 例中 10 例がカリニ肺炎により死亡し、肺組織内に大量の PC が観察された。一方、アバタセプト投与群は薬剤投与を行わなかった無処置群と同様に体重低下及び感染症状を示すことなく、全例が生存した。さらに、肺組織の塗抹標本で PC の栄養体及び嚢胞は観察されなかった。

表 2-6: PC 感染マウスにおけるアバタセプト及びデキサメタゾンの影響

	例数	肺組織内の PC	感染症状	体重減少	死亡例
無処置群 (免疫能正常)	5	—	なし	有意差なし	0/5
デキサメタゾン投与群 (免疫能低下)	12	++++	あり	有意差あり	10/12
アバタセプト投与群	10	—	なし	有意差なし	0/10

無処置群：薬剤を投与せず、PC 接種のみ

デキサメタゾン投与群：PC 接種前に 1.2 mg/kg/日のデキサメタゾンを飲水中に混入して 2 週間摂取

アバタセプト投与群：PC 接種前に 3 週間、接種後に 4 週間、200 µg のアバタセプトを週 2 回、静脈内投与（総投与量 2800 µg/例）

++++：大量の PC が観察

出典：4.2.1.1-9

したがって、アバタセプト投与群では感染症状を示すことなく全例が生存したことから、アバタセプトは副腎皮質ステロイドの全身投与に特有な全身性の免疫抑制作用を惹起しないことが示された（4.2.1.1-9）。なお、本試験以外に真菌に対する感染防御機構におけるアバタセプトの影響

を検討した試験はない。

また、PC に対する TNF- α 阻害の影響についても報告されている。免疫能が正常なマウスでは抗 TNF- α 抗体、又はヒト TNF- α 受容体 p55 とマウス IgG をコードしたアデノウイルスにより PC に対する免疫応答が低下した^{91),92)}。一方、TNF- α 受容体 p55 及び p75 遺伝子を欠損したマウスでは、免疫応答の低下はみられなかった⁹³⁾。これらの矛盾する試験成績が得られた理由は不明である。

2.2.4 寄生虫

寄生虫に対する感染防御機構におけるアバタセプトの影響に関する報告は、限られている。細胞内に寄生するリーシュマニアの消失には、CD4 陽性 T 細胞に依存した感染マクロファージの活性化が必要であり、遺伝的に CD4 陽性 T 細胞を欠損したマウスは致死感染を受ける。一方、CD28^{-/-}マウスのリーシュマニアに対する感受性は、C57BL/6 マウス（リーシュマニア抵抗性）及び BALB/c マウス（リーシュマニア感受性）ともに野生型と同程度であった⁹⁴⁾。また、感染時からのアバタセプト投与により IFN- γ の産生及び CD4 陽性 T 細胞の増殖が抑制された⁹⁵⁾。現時点では、これらの試験成績が感染防御機構においてどのような意味を持つかは明らかにされていない。

感染マクロファージ内での寄生虫の消失は、CD4 陽性 T 細胞により産生された IFN- γ のほか、TNF- α に依存する⁹⁶⁾。TNF- α はリーシュマニアに対する感染防御機構に重要であり、マウスの皮膚リーシュマニアモデルにおいて、抗 TNF- α 抗体による TNF- α の阻害により皮膚内にリーシュマニアが多数集積した大型皮膚病変の出現が報告されている⁹⁷⁾。また、遺伝的に TNF- α を産生できないマウスはリーシュマニアに対する抵抗性が低下し、野生型では全例が生存したのに対し、致死感染を発症した⁹⁶⁾。

2.2.5 悪性腫瘍

アバタセプトのがん原性試験において、リンパ腫及び乳腺腫瘍の発生率の上昇が認められた（2.6.6.5.1）。がん原性試験に用いられた CD-1 マウスでは、ゲノム内に内在性のエコトロピックかつ特異的な MLV DNA が検出され、アバタセプト投与群及び対照群から摘出した乳腺腫瘍を透過型電子顕微鏡及び免疫組織化学染色により評価した結果、MMTV の存在が確認された。これらのレトロウイルスは悪性リンパ腫及び乳腺腫瘍を惹起することが報告されている。したがって、アバタセプトにより免疫機能が長期間抑制されたことで内在性レトロウイルスが活性化し、リンパ腫及び乳腺腫瘍の発生率が上昇したと考えられる。これは MMTV に対する中和抗体が MMTV への感染防御に関与していることから支持される^{98),99)}。

MMTV に対する感染防御機構における CD28 共刺激シグナルの役割は、CD28^{-/-}マウスにおいても検討されている¹⁰⁰⁾。CD28^{-/-}マウスは MMTV に感染し、さらに感染ウイルスは伝染可能であった。MMTV 感染後の CD28^{-/-}マウスでは IFN- γ 産生細胞や MMTV 中和抗体の産生低下など T 細胞及び B 細胞による免疫応答の低下が認められた。また、可溶性 CTLA4Ig を発現したトランスジェニックマウスでは、MMTV による T 細胞及び B 細胞の活性化や増殖、それに伴う全身性の感

染低下が認められた。これらの試験では、腫瘍発生率についての検討は行われていない。

サルにおけるアバタセプトの1年間反復投与毒性試験において、投与開始前に採取したリンパ球では、40例中38例がリンホクリプトウイルス DNA に対して陽性であったが、アバタセプトの治療量又は過剰量を投与してもリンパ系組織に増殖性病変、前癌病変及び腫瘍性病変は認められなかった (4.2.1.3-2)。

なお、悪性腫瘍に対するアバタセプトの影響についての詳細な考察は、2.6.6.5.1に記載した。

2.2.6 自己免疫疾患

糖尿病自然発症モデルである NOD マウスにおいて、CTLA4Ig により糖尿病が増悪することが報告されている (2.6.2.2.1.4.1)⁶⁸⁾。本試験では糖尿病発症前の NOD マウスにマウス CTLA4Ig を反復投与した結果、脾臓内の CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の割合が約 5%から約 1%に低下した。また、マウス CTLA4Ig を投与された NOD マウスは、対照群と比較して早期に糖尿病を発症し、その原因として CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の減少が挙げられた。活性化した CD4 陽性 T 細胞も CD25 を発現することから、CD4 及び CD25 を発現した T 細胞がすべて制御性 T 細胞ということではないが、RA 患者において、アバタセプトにより制御性 T 細胞が減少した結果、自己免疫疾患が発症又は増悪する可能性が懸念される。しかし、実際には下記の 2 点からその可能性は低いと考える。第一に、アバタセプト又は CTLA4Ig を用いた多数の *in vivo* 試験において、自己免疫疾患の発症又は増悪は報告されていない。第二に、2.6.2.2.1.4.1 に記載したように、belatacept を投与された腎移植患者では、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞は減少せず、活性も維持されていた。

3 副次的薬理試験

該当するアバタセプトの副次的薬理試験はない。

4 安全性薬理試験

ICH ガイドラインに準拠し、GLP 適合下で実施したサルを用いた 1 ヶ月間及び 1 年間間歇静脈内投与毒性試験の一環として、アバタセプトの心血管系、中枢/末梢神経系及び呼吸器系に対する影響を検討した (4.2.1.3-1、4.2.1.3-2)。なお、アバタセプトの長期投与時の安全性を担保するために、サルを用いた belatacept の 6 ヶ月間間歇静脈内投与毒性試験についても記載した (4.2.3.2-4)。

4.1.1 サルにおける 1 ヶ月間間歇静脈内投与毒性試験

(表 2.6.3.4-1 薬理試験の概要表、4.2.1.3-1)

方法

1 群あたり雌雄各 3 例のカニクイザルにアバタセプトを 10, 22.4 及び 50 mg/kg の用量で 1 日おきに 1 ヶ月間 (計 15 回) 静脈内投与した。対照群には 25 mM リン酸ナトリウム及び 50 mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液 (pH 7.5) を同様の条件下で投与した。

安全性薬理の評価パラメータとして、聴診による心音及び呼吸音、心拍数、大腿部脈拍数、行動、運動協調性/平衡性、筋緊張、脊髄反射、呼吸数を観察した。さらに、覚醒下にて第 10 誘導心電図 (ECG) 検査を行い、波形、振幅及び間隔における薬剤に起因した変化を評価した。これらの評価は初回投与前、アバタセプトの投与終了時及び休薬約 6 週間又は 11 週後に実施した。

結果

心血管系、神経系及び呼吸器系の各機能において、薬剤に起因した変化はみられなかった。

4.1.2 サルにおける 6 ヶ月間間歇静脈内投与毒性試験 (belatacept)

(表 2.6.3.4-1 薬理試験の概要表、4.2.3.2-4)

方法

1 群あたり雌雄各 5 例のカニクイザルに belatacept を 10, 22 及び 50 mg/kg の用量で週 1 回、6 ヶ月間静脈内投与した。対照群には 0.9%塩化ナトリウム注射液を同様の条件下で投与した。

安全性薬理の評価パラメータとして、聴診による心音及び呼吸音、心拍数、大腿部脈拍数、行動、運動協調性/平衡性、筋緊張、脊髄反射及び呼吸数を観察した。また、覚醒下にて第 10 誘導 ECG 検査を行い、波形、振幅及び間隔における薬剤に起因した変化を評価した。これらの評価は初回投与前、3 ヶ月間投与の 3 時間後及び剖検前に実施した。さらに、投与 1 日目、4, 8 及び 25 週目の投与前及び投与直後にヒスタミン、補体 (C3a)、TNF- α 及び IL-6 の血漿中又は血清中濃度を測定した。

結果

心血管系、神経系及び呼吸器系の各機能において、薬剤に起因した変化はみられなかった。また、血漿中又は血清中のヒスタミン、C3a, TNF- α 及び IL-6 濃度についても、薬剤に起因した変化

はみられなかった。

4.1.3 サルにおける 1 年間間歇静脈内投与毒性試験

(表 2.6.3.4-1 薬理試験の概要表、4.2.1.3-2)

方法

1 群あたり雌雄各 5 例のカニクイザルにアバタセプトを 10, 22 及び 50 mg/kg の用量で週 1 回、12 ヶ月間静脈内投与した。対照群には 0.9%塩化ナトリウム注射液を同様の条件下で投与した。

安全性薬理の評価パラメータとして、聴診による心音及び呼吸音、心拍数、大腿部脈拍数、血圧、体温、行動、運動協調性/平衡性、筋緊張、脊髄反射及び呼吸数を観察した。また、覚醒下にて第 10 誘導 ECG 検査を行い、波形、振幅及び間隔における薬剤に起因した変化を評価した。これらの評価は初回投与前、1, 4, 16, 24, 39 及び 52 週目の投与 3 時間後、並びに休薬 13 週目に実施した。さらに、投与 1 日目、16, 32 及び 52 週目の投与前及び投与直後にヒスタミン、C3a, TNF- α 及び IL-6 の血漿中又は血清中濃度を測定した。

結果

心血管系、神経系及び呼吸器系の各機能において、薬剤に起因した変化はみられなかった。また、血漿中又は血清中のヒスタミン、C3a, TNF- α 及び IL-6 濃度についても、薬剤に起因した変化はみられなかった。

これらの試験において、アバタセプトあるいは belatacept を 50 mg/kg (ヒトに臨床用量 10 mg/kg を投与した場合の曝露量のそれぞれ 9.5 及び 13.5 倍に相当) までを投与した結果、薬物投与に起因した心血管系、中枢/末梢神経系及び呼吸器系の変化は認められなかった。さらに、投与直後の血漿中又は血清中のヒスタミン、C3a, TNF- α , IL-6 などに薬物投与に関連した量的変化はみられなかった。これらの因子又はサイトカイン濃度の上昇は、複数の蛋白製剤の静脈投与時にみられる血行動態変化あるいはアナフィラキシー様反応との関連性が指摘されている。したがって、ヒトにアバタセプトを投与した場合、薬理的又は心電図検査において望ましくない作用が発現する可能性はほとんどないと考えられた。

5 薬力学的薬物相互作用試験

アバタセプトの薬物相互作用試験は、非臨床試験では検討されていない。

6 考察及び結論

RA は関節滑膜での自己免疫の破綻を特徴とする慢性の炎症疾患であり、病態発症において活性化 T 細胞が重要な役割を担っていると考えられている。T 細胞は RF などの T 細胞依存性自己抗体の産生を促進し、マクロファージ、樹状細胞及び B 細胞による抗原提示、並びに炎症性サイトカイン及びケモカインの産生を増強する。さらに、T 細胞は結合組織細胞と直接相互作用することで炎症を持続させ、関節破壊を促進する。

CD28 共刺激シグナルは CD4 陽性ナイーブ T 細胞のみならず、抗原提示された CD4 陽性メモリー T 細胞の活性化に必須であり、CD80/CD86 との相互作用により細胞内シグナルが増幅され、その結果、細胞増殖及びサイトカインの産生が亢進する。さらに、CD28 共刺激シグナルは T 細胞のアポトーシス抑制にも関与している。T 細胞の活性化には複数の共刺激分子が関与しており、これらは獲得免疫において特異的かつ相乗的な役割を担っている。また、CD28 共刺激シグナルは好中球、単球及びマクロファージなどの自然免疫における貪食細胞の直接的な活性化には関与していない。

アバタセプトはヒト CTLA-4 の細胞外ドメインとヒト IgG1 の Fc ドメイン（ヒンジ-CH2-CH3 ドメイン）より構成された遺伝子組換え可溶性融合蛋白であり、CD80/CD86 に結合することで CD28 との相互作用を阻害し、CD28 共刺激シグナルを選択的かつ抑制的に調節する。本概要において、アバタセプトの薬理作用に関して下記の *in vitro* 及び *in vivo* 試験成績が得られた。

- 抗原特異的なヒトナイーブ T 細胞の増殖を 40%~80%抑制し、IL-2, IFN- γ , TNF- α などのサイトカインの産生を阻害
- 抗原特異的なヒトメモリー T 細胞の増殖を最大 60%~80%抑制し、サイトカインの産生を阻害
- CD8 陽性 T 細胞を介した細胞傷害活性は維持される
- げっ歯類及びサルにおいて、T 細胞依存性抗原に対する抗体産生を抑制
- CIA モデルにおいて、病態の発症・進行、抗コラーゲン抗体の産生及び関節破壊を抑制

病原体及び腫瘍に対する防御機構は、自然免疫及び獲得免疫に依存する。細胞外細菌などの病原体に対する一次防御機構である自然免疫には T 細胞ではなく、主にマクロファージや好中球が関与し、獲得免疫と比較して CD28 共刺激シグナルに対する依存度が低い。CD8 陽性 T 細胞や抗体による獲得免疫は、様々な病原体に対する感染防御機構において重要な役割を担っている。アバタセプトの感染防御機構に及ぼす影響について検討した結果、多くの病原体に対する感染防御機構は維持されていた。しかし、CD4 陽性 T 細胞が感染防御に関与している一部の病原体では、アバタセプトにより感染リスクが増大する可能性がある。ウイルス誘導性腫瘍に対しても同様と考えられる。

以上の *in vitro* 及び *in vivo* 試験成績から、アバタセプトは CD28 共刺激シグナルを選択的かつ抑制的に調節することが明らかにされた。また、本薬は RA 病態モデルに対して有効性を示し、感染防御機構に対してはほとんど作用しないことが示された。したがって、アバタセプトを RA 治療薬として開発することは科学的に妥当と判断した。

7 参考文献

- 1) Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423: 356-361. (4.3-47)
- 2) Fox DA. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: New perspectives. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 598-609. (4.3-50)
- 3) Choy EHS and Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344: 907-916. (4.3-27)
- 4) Li NL, Zhang DQ, Zhou KY et al. Isolation and characteristics of autoreactive T cells specific to aggrecan G1 domain from rheumatoid arthritis patients. *Cell Res.* 2000; 10: 39-49. (4.3-85)
- 5) Klimiuk PA, Yang H, Goronzy JJ et al. Production of cytokines and metalloproteases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin Immunol* 1999; 90: 65-78. (4.3-76)
- 6) Burger D and Dayer JM. The role of human T-lymphocyte-monocyte contact in inflammation and tissue destruction. *Arthritis Res* 2002; 4: S169-S176. (4.3-20)
- 7) Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , by human macrophages. *J. Immunol* 1998; 160: 3513-3521. (4.3-73)
- 8) Sutton B, Corper A, Bonagura V et al. The structure and origin of rheumatoid factors. *Immunol Today* 2000; 21: 177-183. (4.3-159)
- 9) Crowston JG, Salmon M, Khaw PT et al. T-lymphocyte-fibroblast interactions. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 529-531. (4.3-30)
- 10) Bombara MP, Webb DL, Conrad P et al. Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. *J Leuk. Biol* 1993; 54: 399-406. (4.3-12)
- 11) Hofbauer LC and Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79: 243-253. (4.3-63)
- 12) Konttinen YT, Reitamo S, Ranki A et al. Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 71-79. (4.3-78)
- 13) Nepom GT, Byers P, Seyfried C et al. HLA genes associated with rheumatoid arthritis: Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 15-21. (4.3-112)
- 14) Van-Boxel JA and Paget SA. Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes. *N Engl J Med* 1975; 293: 517-520. (4.3-170)
- 15) Kraan MC, Haringman JJ, Weedon H et al. T cells, fibroblast-like synoviocytes, and granzyme B+ cytotoxic cells are associated with joint damage in patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 483-488. (4.3-80)
- 16) Chabaud M, Garnero P, Dayer JM et al. Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2000; 12: 1092-1099. (4.3-23)
- 17) Kotake S, Udagawa N, Takahashi N et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 1999; 103: 1345-1352. (4.3-79)

- 18) Janeway CA, Travers P, Walport M et al. Appendix III. In, Immunobiology, 5th edition. Garland Publishing. 2001; 679. (4.3-71)
- 19) Weyand CM, Hicok KC, Conn DL et al. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 801-806. (4.3-180)
- 20) Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1976; 57: 1148-1157. (4.3-156)
- 21) Carreno BM and Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 29-53. (4.3-22)
- 22) Salomon B and Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 225-252. (4.3-149)
- 23) Sharpe AH, Latchman Y and Greenwald RJ. Chapter 13: Accessory molecules and co-stimulation. In, *Fundamental Immunology*, 5th edition. Paul WE ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2003; 393-417. (4.3-153)
- 24) Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD et al. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991; 147: 2461-2466. (4.3-72)
- 25) Norton SD, Zuckerman L, Urdahl KB et al. The CD28 ligand, B7, enhances IL-2 production by providing a costimulatory signal to T cells. *J Immunol* 1992; 149: 1556-1561. (4.3-113)
- 26) Boise LH, Minn AJ, Noel PJ et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-x_L. *Immunity* 1995; 3: 87-98. (4.3-11)
- 27) Viola A. The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains. *Trends in Immunol* 2001; 22: 322-327. (4.3-175)
- 28) Acuto O, Mise-Omata S, Mangino G et al. Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: The mechanism of CD28 costimulatory receptor. *Immunol Rev* 2003; 192: 21-31. (4.3-3)
- 29) Schwartz JC, Zhang X, Nathenson SG et al. Structural mechanisms of costimulation. *Nat Immunol* 2002; 3: 427-434. (4.3-150)
- 30) Germain RN and Stefanova I. The dynamics of T cell receptor signaling: Complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 467-522. (4.3-55)
- 31) Fontenot AP, Gharavi L, Bennett SR et al. CD28 costimulation independence of target organ versus circulating memory antigen-specific CD4⁺ T cells. *J Clin Invest* 2003; 122: 776-784. (4.3-48)
- 32) Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999; 397: 263-266. (4.3-67)
- 33) Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C et al. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 2000; 13: 95-105. (4.3-29)
- 34) Sharpe AH and Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 116-126. (4.3-154)
- 35) Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA et al. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol* 2000; 164: 4689-4696. (4.3-4)

- 36) Chapoval AI, Ni J, Lau JS et al. B7-H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN- γ production. *Nat Immunol* 2001; 2: 269-274. (4.3-24)
- 37) Lohr J, Knoechel B, Jiang S et al. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol* 2003; 4: 664-669. (4.3-88)
- 38) Mestas J and Hughes CCW. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004; 172: 2731-2738. (4.3-101)
- 39) Tada Y, Nagasawa K, Ho A et al. CD28-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1999; 162: 203-208. (4.3-160)
- 40) Pawlik A, Ostanek L, Brzosko I et al. The expansion of CD4⁺CD28⁻ T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: R210-R213. (4.3-119)
- 41) Martens PB, Goronzy JJ, Schaid D et al. Expansion of unusual CD4⁺ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1106-1114. (4.3-93)
- 42) Goronzy JJ and Weyand CM. Aging, autoimmunity and arthritis: T cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arth Res Ther*. 2003; 5: 225-234. (4.3-59)
- 43) Linsley PS, Greene JL, Brady W et al. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994; 1: 793-801. (4.3-87)
- 44) Greene JL, Leytze GM, Emswiler J et al. Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. *J Biol Chem* 1996; 271: 26762-26771. (4.3-60)
- 45) Nadler S, Townsend R, Mikesell G et al. Abatacept (CTLA4Ig; BMS-188667) significantly inhibits T-cell proliferation in vitro at clinically relevant concentrations. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: Abst THU0103. (4.3-108)
- 46) Tan P, Anasetti C, Hansen JA et al. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 1993; 177: 165-173. (4.3-162)
- 47) Najafian N and Sayegh MH. CTLA4-Ig: A novel immunosuppressive agent. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9: 2147-2157. (4.3-110)
- 48) Van Gool SW, Zhang Y, Kasran A et al. T helper-independent activation of human CD8⁺ cells: The role of CD28 costimulation. *Scand J Immunol* 1996; 44: 21-29. (4.3-173)
- 49) Linsley PS, Wallace PM, Johnson J et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 1992; 257: 792-795. (4.3-86)
- 50) Cabrian KM, Berry KK, Shuford WW et al. Suppression of T-cell-dependent immune responses in monkeys by CTLA4Ig. *Transplant Proc* 1996; 28: 3261-3262. (4.3-21)
- 51) Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* 1999; 103: 1243-1252. (4.3-1)

- 52) Webb LMC, Walmsley MJ and Feldmann M. Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: Requirement for both B7-1 and B7-2. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2320-2328. (4.3-177)
- 53) Steinberg AD, Gourley MF, Klinman DM et al. NIH Conference. Systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1991; 115: 548-559. (4.3-157)
- 54) Wofsy D and Seaman WE. Successful treatment of autoimmunity in NZB/NZW F₁ mice with monoclonal antibody to L3T4. *J Exp Med* 1985; 161: 378-391. (4.3-185)
- 55) Finck BK, Linsley PS and Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science* 1994; 265: 1225-1227. (4.3-45)
- 56) Chu EB, Hobbs MV, Wilson CB et al. Intervention of CD4⁺ cell subset shifts and autoimmunity in the BXSb mouse by murine CTLA4Ig. *J. Immunol* 1996; 156: 1262-1268. (4.3-28)
- 57) Mihara M, Tan I, Chuzhin Y et al. CTLA4Ig inhibits T cell-dependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 2000; 106: 91-101. (4.3-102)
- 58) Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM et al. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* 2000; 30: 3707-3717. (4.3-8)
- 59) Tivol EA, Boyd SD, McKeon S et al. CTLA4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice. *J. Immunol* 1997; 158: 5091-5094. (4.3-165)
- 60) Emery P. The therapeutic potential of costimulatory blockade with CTLA4Ig in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12: 673-681. (4.3-41)
- 61) Chikuma S, Abbas AK and Bluestone JA. B7-independent inhibition of T cells by CTLA-4. *J Immunol* 2005; 175: 177-181. (4.3-26)
- 62) Nagler-Anderson C, Bhan AK, Podolsky DK and Terhorst C. Control freaks: Immune regulatory cells. *Nat Immunol* 2004; 5: 119-122. (4.3-109)
- 63) Hori S, Nomura T and Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor *Foxp3*. *Science* 2003; 299: 1057-1061. (4.3-65)
- 64) Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY. *Foxp3* programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336. (4.3-48)
- 65) Nakamura K, Kitani A, Fuss I et al. TGF- β 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 2004; 172: 834-842. (4.3-111)
- 66) Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F et al. Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 617-627. (4.3-191)
- 67) Baecher-Allan C and Hafler DA. Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med* 2004; 200: 273-276. (4.3-6)

- 68) Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12: 431-440. (4.3-148)
- 69) Hirose K, Posselt AM, Stock PG et al. Treatment of kidney transplant patients with the novel co-stimulatory blocker LEA29Y (BMS-224818) and anti-IL2 receptor antibody does not impede the development of regulatory T cells. Abstract 1036, American Transplant Congress 2004. (4.3-62)
- 70) Mellor AL and Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: Immunosuppression by starvation? *Immunol Today* 1999; 20: 469-473. (4.3-98)
- 71) Mellor AL and Munn DH. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J Immunol* 2003; 170: 5809-5813. (4.3-100)
- 72) Mellor AL, Baban B, Chandler P et al. Induced indoleamine 2, 3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* 2003; 171: 1652-1655. (4.3-99)
- 73) Dawicki W and Watts TH. Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* 2004; 34: 743-751. (4.3-32)
- 74) Kim YJ and Broxmeyer HE. Therapeutic potential of 4-1BB (CD137) as a regulator for effector CD8⁺ T cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10: 441-449. (4.3-74)
- 75) Vinay DS and Kwon BS. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol* 1998; 10: 481-489. (4.3-174)
- 76) Bachmann MF, Zinkernagel RM and Oxenius A. Immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. *J Immunol* 1998; 161: 5791-5794. (4.3-5)
- 77) Whitmire JK and Ahmed R. Costimulation in antiviral immunity: Differential requirements for CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 448-455. (4.3-181)
- 78) Mocarski Jr ES. Chapter 76: Cytomegaloviruses and their replication. In, *Fields Virology*, 3rd edition. Fields BN, Knipe DM, Howley PM ed. Lippincott-Raven Publishers. 1996; 2447-2492. (4.3-104)
- 79) Zimmermann C, Seiler P, Lane P et al. Antiviral immune responses in CTLA4 transgenic mice. *J Virol* 1997; 71: 1802-1807. (4.3-193)
- 80) Lumsden JM, Roberts JM, Harris NL et al. Differential requirement for CD80 and CD80/CD86-dependent costimulation in the lung immune response to an influenza virus infection. *J Immunol* 2000; 164: 79-85. (4.3-89)
- 81) Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993; 261: 609-612. (4.3-152)
- 82) McAdam AJ, Farkash EA, Gewurz BE and Sharpe AH. B7 costimulation is critical for antibody class switching and CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte generation in the host response to vesicular stomatitis virus. *J Virol* 2000; 74: 203-208. (4.3-95)

- 83) Edelman KH and Wilson CB. Role of CD28/CD80-86 and CD40/CD154 costimulatory interactions in host defense to primary herpes simplex virus infection. *J Virol* 2001; 75: 612-621. (4.3-35)
- 84) Gangappa S, Manickan E and Rouse BT. Control of herpetic stromal keratitis using CTLA4Ig fusion protein. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 86: 88-94. (4.3-52)
- 85) Yetter RA, Buller RML, Lee JS et al. CD4⁺ T cells are required for development of a murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome (MAIDS). *J Exp Med* 1988; 168: 623-635. (4.3-190)
- 86) De Leval L, Debrus S, Lane P et al. Mice transgenic for a soluble form of murine cytotoxic T lymphocyte antigen 4 are refractory to murine acquired immune deficiency syndrome development. *Immunology* 1999; 98: 630-638. (4.3-33)
- 87) Williams MA, Onami TM, Adams AB et al. Persistent viral infection prevents tolerance induction and escapes immune control following CD28/CD40 blockade-based regimen. *J Immunol* 2002; 169: 5387-5391. (4.3-183)
- 88) Mittrucker HW, Kursar M, Kohler A et al. Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 2001; 167: 5620-5627. (4.3-103)
- 89) Zhan Y and Cheers C. Either B7-1 or B7-2 is required for *Listeria monocytogenes*-specific production of gamma interferon and interleukin-2. *Infect Immun* 1996; 64: 5439-5441. (4.3-192)
- 90) Endres R, Luz A, Schulze H et al. Listeriosis in *p47^{phox}*^{-/-} and *TRp55*^{-/-} mice: Protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI. *Immunity* 1997; 7: 419-432. (4.3-42)
- 91) Chen W, Havell EA and Harmsen AG. Importance of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in host resistance against *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 1992; 60: 1279-1284. (4.3-25)
- 92) Kolls JK, Lei D, Vazquez C et al. Exacerbation of murine *Pneumocystis carinii* infection by adenoviral-mediated gene transfer of a TNF inhibitor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 112-118. (4.3-77)
- 93) Rudmann DG, Preston AM, Moore MW et al. Susceptibility to *Pneumocystis carinii* in mice is dependent on simultaneous deletion of IFN- γ and type 1 and 2 TNF receptor genes. *J Immunol* 1998; 161: 360-366. (4.3-144)
- 94) Brown DR, Green JM, Moskowitz NH et al. Limited role of CD28-mediated signals in T helper subset differentiation. *J Exp Med* 1996; 184: 803-810. (4.3-19)
- 95) Elloso MM and Scott P. Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *J Immunol* 1999; 162: 6708-6715. (4.3-36)
- 96) Wilhelm P, Ritter U, Labbow S et al. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol* 2001; 166: 4012-4019. (4.3-182)

- 97) Titus RG, Sherry B and Cerami A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1989; 170: 2097-2104. (4.3-164)
- 98) Finke D, Luther SA and Acha-Orbea H. The role of neutralizing antibodies for mouse mammary tumor virus transmission and mammary cancer development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 199-204. (4.3-46)
- 99) Purdy A, Case L, Duvall M et al. Unique resistance of I/LnJ mice to a retrovirus is due to sustained interferon γ -dependent production of virus-neutralizing antibodies. *J Exp Med* 2003; 197: 233-243. (4.3-142)
- 100) Palmer LD, Saha B, Hodes RJ and Abe R. The role of CD28 costimulation in immune-mediated responses against mouse mammary tumor viruses. *J Immunol* 1996; 156: 2112-2118. (4.3-117)
- 101) Linsley PS, Brady W, Urnes M et al. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991; 174: 561-569. (4.3-195)
- 102) Pearson TC, Alexander DZ, Corbascio M et al. Analysis of the B7 costimulatory pathway in allograft rejection. *Transplantation* 1997; 93: 1463-1469. (4.3-196)
- 103) Davis PM, Abraham R, Xu L et al. Abatacept binds to the Fc receptor CD64 but does not mediate complement-dependent cytotoxicity or antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Rheumatol* 2007; 34: 2204-2210. (4.3-194)

CTD 第 2 部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

ブリistol・マイヤーズ株式会社

目 次

2.6.3.1	薬理試験：一覧表.....	5
表 2.6.3.1-1:	薬理試験：一覧.....	5
2.6.3.2	効力を裏付ける試験.....	7
表 2.6.3.2-1:	効力を裏付ける試験.....	7
2.6.3.3	副次的薬理試験.....	11
2.6.3.4	安全性薬理試験.....	12
表 2.6.3.4-1:	安全性薬理試験.....	12
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	13

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

表 2.6.3.1-1: 薬理試験：一覧

試験の種類	試験系	使用細胞/動物	実施施設	試験番号	記載場所
効力を裏付ける試験					
Fc 受容体に対する結合性	<i>in vitro</i>	ヒト細胞	BMS	930011015	4.2.1.1-13
補体依存性細胞傷害活性に対する作用	<i>in vitro</i>	ヒト細胞	BMS	930006519	4.2.1.1-11
ナイーブ及びメモリーT 細胞の増殖及びサイトカイン産生に対する作用	<i>in vitro</i>	ヒト細胞	BMS	930007790	4.2.1.1-3
ナイーブ T 細胞の増殖に対する作用	<i>in vitro</i>	ヒト細胞	BMS	930006438	4.2.1.1-1
メモリーT 細胞の増殖に対する作用	<i>in vitro</i>	ヒト細胞	BMS	KAR092302	4.2.1.1-2
単球における LPS 刺激 TNF- α 産生に対する作用	<i>in vitro</i>	ヒト細胞	BMS	930007832	4.2.1.1-4
	<i>in vitro</i>	ヒト細胞	BMS	930010937	4.2.1.1-14
T 細胞依存性の抗体産生に対する作用	<i>in vivo</i> (静脈内投与)	サル	BMS	910044483	4.2.1.1-10
免疫寛容誘発の可能性に関する検討	<i>in vivo</i> (静脈内投与)	サル	BMS	94648	4.2.1.1-6
コラーゲン誘発関節炎モデルに対する作用	<i>in vivo</i> (腹腔内投与)	DA ラット	BMS	930008117	4.2.1.1-5
CTLA-4 の発現に対する作用	<i>in vitro</i>	ヒト細胞	BMS	930012251	4.2.1.1-12
マウスサイトメガロウイルス及びカリニ肺炎に対する感染防御機構への影響	<i>in vivo</i> (静脈内投与)	BDF1 マウス	BMS	910044345	4.2.1.1-9
潜伏結核菌感染の再燃への影響	<i>in vivo</i>	C57BL/6 マウス		DS04081	4.2.3.7.2-3
副次的薬理試験					
該当なし					

表 2.6.3.1-1: 薬理試験：一覧（続き）

試験の種類	試験系	使用細胞/動物	実施施設	試験番号	記載場所
安全性薬理試験					
1 ヶ月間間歇静脈内投与毒性試験（GLP 適合）	<i>in vivo</i> （静脈内投与）	サル	BMS	94704	4.2.1.3-1
6 ヶ月間間歇静脈内投与毒性試験（GLP 適合） ^a	<i>in vivo</i> （静脈内投与）	サル	BMS	99655	4.2.3.2-4
1 年間間歇静脈内投与毒性試験（GLP 適合）	<i>in vivo</i> （静脈内投与）	サル	BMS	DS02008	4.2.1.3-2
薬力学定薬物相互作用試験					
該当なし					

^a Belatacept（BMS-224818）を使用。Belatacept は CD80/CD86 結合ドメインのアミノ酸がアバタセプトとは 2 残基異なり、霊長類の CD86 に対する結合力がアバタセプトと比較して有意に強く、強力な生物活性を有する。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2-1: 効力を裏付ける試験

評価対象	使用細胞/動物	投与方法	濃度/用量	性別/例数	特記すべき所見	試験番号 (記載場所)
Fc 受容体への結合性	ヒト B リンパ芽球腫細胞及びマクロファージ由来細胞	<i>in vitro</i>	5 µg/mL	NA	アバタセプトは Fcγ 受容体 CD64 には結合したが、CD16 には結合しなかった。	930011015 (4.2.1.1-13)
補体依存性細胞傷害活性	ヒト B 細胞	<i>in vitro</i>	0.001-10 µg/mL	NA	アバタセプトは補体依存性細胞傷害を誘導しなかった。	930006519 (4.2.1.1-11)
ナイーブ T 細胞の増殖及びサイトカイン産生	ヒト T 細胞	<i>in vitro</i>	0-100 µg/mL	NA	アバタセプトはナイーブ T 細胞の増殖を最大 40%~80%阻害した。	930006438 (4.2.1.1-1)
	ヒト T 細胞	<i>in vitro</i>	0-100 µg/mL	NA	アバタセプトは 0.3~30 µg/mL の濃度範囲でナイーブ T 細胞の増殖を 40%~80%阻害した。	930007790 (4.2.1.1-3)
			30 µg/mL	NA	アバタセプトは T 細胞による抗原特異的な IL-2, IFN-γ, TNF-α の産生を阻害した。	
メモリー T 細胞の増殖及びサイトカイン産生	ヒト T 細胞	<i>in vitro</i>	0-100 µg/mL	NA	アバタセプトは約 10~30 µg/mL の濃度範囲でメモリー T 細胞の増殖を最大 60%~80%阻害した。	KAR092302 (4.2.1.1-2)
	ヒト T 細胞	<i>in vitro</i>	30 µg/mL	NA	アバタセプトは IL-2, IFN-γ, TNF-α の産生を阻害した	930007790 (4.2.1.1-3)

略語：IFN = インターフェロン、IL = インターロイキン、NA = 該当せず、TNF = 腫瘍壊死因子

表 2.6.3.2-1: 効力を裏付ける試験 (続き)

評価対象	使用細胞/動物	投与方法	濃度/用量	性別/例数	特記すべき所見	試験番号 (記載場所)
TNF- α 産生	ヒト単球	<i>in vitro</i>	0-30 μ g/mL	NA	アバタセプトは LPS による単球での TNF- α の産生を阻害しなかった。	930007832 (4.2.1.1-4)
	ヒト単球	<i>in vitro</i>	30 μ g/mL	NA	アバタセプトは Fc 受容体を介した TNF- α の産生を促進せず、免疫複合体を介した TNF- α の産生にも競合しなかった。	930010937 (4.2.1.1-14)
T 細胞依存性抗体	サル	静脈内、週 2 回、 7 週間	2, 8 mg/kg	雌雄/10	アバタセプトは KLH 及びバクテリオファージ ϕ X174 に対する一次抗体産生を 80%以上阻害し、2 及び 8 mg/kg 投与により一次抗体及び二次抗体産生は同程度に阻害された。	910044483 (4.2.1.1-10)
免疫寛容	サル	静脈内、1, 4, 8, 11, 15, 18 日目	0, 1, 2.9, 8.7 mg/kg	雌雄/4	アバタセプトは SRBC に対する一次抗体産生を抑制したが、薬物消失後に SRBC で二次免疫を行った結果、抗体産生が認められ、免疫寛容は誘導されなかった。	94648 (4.2.1.1-6)

略語 : KLH = キーホールリンペットヘモシアニン、LPS = リポ多糖、NA = 該当せず、SRBC = ヒツジ赤血球、TNF = 腫瘍壊死因子

表 2.6.3.2-1: 効力を裏付ける試験 (続き)

評価対象	使用細胞/動物	投与方法	濃度/用量	性別/例数	特記すべき所見	試験番号 (記載場所)
CIA ラット	DA ラット	腹腔内、-1, 0, 2, 4, 6, 8, 10 日目	1 mg/kg	雌/8	アバタセプトを予防的投与した CIA ラットでは、足浮腫が減弱し、病態の発症が抑制され、抗コラーゲン抗体、IL-1 α , IL-2, IFN- γ , TNF- α などの産生が抑制された。さらに組織学的検査及びマイクロ CT 検査において、骨破壊の抑制が認められた。	930008117 (4.2.1.1-5)
		腹腔内、10, 12, 14, 16, 18, 20 日目			アバタセプトを治療投与した CIA ラットでは、病態の進行は遅延したが、試験終了時には対照群と同程度の足浮腫が認められた。	
CTLA-4 の発現	ヒト T 細胞	<i>in vitro</i>	30 μ g/mL	NA	アバタセプトは活性化 T 細胞での内因性 CTLA-4 の発現を阻害しなかった。	930012251 (4.2.1.1-12)
mCMV 感染	BDF1 マウス	静脈内、週 2 回、 2 週間	200 μ g	雌/18	mCMV 接種前にアバタセプトを投与したマウスでは、無処置群と同様に脾臓への mCMV 感染は認められず、唾液腺への潜伏感染もコントロール可能であった。	910044345 (4.2.1.1-9)

略語：CIA = コラーゲン誘発関節炎、CT = コンピュータ断層撮影、IFN = インターフェロン、IL = インターロイキン、mCMV = マウスサイトメガロウイルス、NA = 該当せず、TNF = 腫瘍壊死因子

表 2.6.3.2-1: 効力を裏付ける試験 (続き)

評価対象	使用細胞/動物	投与方法	濃度/用量	性別/例数	特記すべき所見	試験番号 (記載場所)
潜伏結核菌感染の再燃	C57BL/6 マウス	皮下、週 1 回、 16 週間	20 mg/kg	雌/44	アバタセプトを投与したマウスでは、溶媒投与群と同様に全例が生存し、潜伏結核菌に対して抵抗性を示した。	DS04081 (4.2.3.7.2-3)
PC 感染	BDF1 マウス	静脈内、週 2 回、 PC 接種前に 3 週間、接種後に 4 週間	200 µg	雌/10	PC 接種前後にアバタセプトを投与したマウスでは、無処置群と同様に感染症状を示すことなく生存した。	910044345 (4.2.1.1-9)

略語：PC = カリニ真菌

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当するアバタセプトの副次的薬理試験はない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4-1: 安全性薬理試験

評価対象	動物種/系統	投与方法	用量 (mg/kg)	性別/例数	特記すべき所見	GLP	試験番号 (記載場所)
心血管系 中枢/末梢神経系 呼吸器系	サル/ カニクイザル	静脈内、隔日、 1 ヶ月間	アバタセプト 0, 10, 22.4, 50	雌雄/各 3	アバタセプトに関連する変化は認められなかった。	適	94704 (4.2.1.3-1)
	サル/ カニクイザル	静脈内、週 1 回、 6 ヶ月間	Belatacept 0, 10, 22, 50	雌雄/各 5	Belatacept に関連する変化は認められなかった。	適	99655 (4.2.3.2-4)
	サル/ カニクイザル	静脈内、週 1 回、 1 年間	アバタセプト 0, 10, 22, 50	雌雄/各 5	アバタセプトに関連する変化は認められなかった。	適	DS02008 (4.2.1.3-2)
ケミカルメディ エーター	サル/ カニクイザル	静脈内、週 1 回、 6 ヶ月間	Belatacept 0, 10, 22, 50	雌雄/各 5	血漿中又は血清中のヒスタミン、 C3a, TNF- α 及び IL-6 濃度にアバ タセプトに関連する変化は認め られなかった。	適	99655 (4.2.3.2-4)
	サル/ カニクイザル	静脈内、週 1 回、 1 年間	アバタセプト 0, 10, 22, 50	雌雄/各 5	血漿中又は血清中のヒスタミン、 C3a, TNF- α 及び IL-6 濃度にアバ タセプトに関連する変化は認め られなかった。	適	DS02008 (4.2.1.3-2)

略語：IL = インターロイキン、TNF = 腫瘍壊死因子

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当するアバタセプトの薬力学的薬物相互作用試験はない。