



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Targeting the humoral immune system of patients with rheumatoid arthritis

Teng, Y.K.O.

### Citation

Teng, Y. K. O. (2008, October 7). *Targeting the humoral immune system of patients with rheumatoid arthritis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13404>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13404>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Samenvatting, conclusies en  
toekomstperspectieven



In het huidige proefschrift zijn de klinische en immunologische effecten beschreven van therapieën gericht op het humorale immuunsysteem van patiënten met reumatoïde artritis (RA). Een algemene introductie over RA en de huidige inzichten over de rol van het humorale immuunsysteem in de pathogenese van RA zijn samengevat in **hoofdstuk 1**. B-cel depletie met monoklonale antilichamen tegen het CD20 membraaneiwit is een nieuwe strategie in de behandeling van RA. In de afgelopen jaren hebben verschillende studies de effectiviteit aangetoond van het anti-CD20 monoklonale antilichaam, rituximab, als behandeling voor RA patiënten die eerder faalden op de anti-tumor necrosis factor (anti-TNF) therapie, zoals in **hoofdstuk 2** wordt beschreven. Het belang van B-cellen in de pathogenese van RA wordt onderkend door de detectie van autoantilichamen in het overgrote deel van RA patiënten en de infiltratie van B-cellen en plasmacellen in het synovium van RA patiënten. Ondanks het relatief lage aantal patiënten dat behandeld is met rituximab, en ontbreken van lange termijn gegevens, wijzen de studies tot nog toe op een relatief goede effectiviteits- en veiligheidsprofiel. Binnen het brede spectrum van antireumatische behandelingen, waartoe de zgn. DMARDs (disease modifying anti-rheumatic drugs) en biologicals (zoals anti-TNF middelen) behoren, is rituximab vooralsnog geïndiceerd bij refractaire RA patiënten die minimaal op 1 anti-TNF middel hebben gefaald.

**Hoofdstuk 3** beschrijft de effecten van behandeling met rituximab op bloed, beenmerg en synovium, namelijk complete depletie van CD20+ B-cellen in bloed, beenmerg en synovium bij het overgrote deel van de behandelde RA patiënten. Echter niet alle B-cellijnen worden compleet gedepleteerd: na rituximab behandeling persisteren CD19+ B-cellen in het beenmerg en CD79a+ B-cellen in het synovium. Daarbij werd ook aangetoond dat rituximab een significante daling veroorzaakte van het serum immunoglobuline met daaraan gekoppeld significante reducties in de serumconcentraties van ACPA-IgG, -IgM en IgM-RF autoantilichamen. Tot slot worden variabelen onderzocht die de respons op rituximab konden voorspellen: een positieve ACPA-IgM status gecombineerd met een hoge synoviale B-cel infiltratie voorspelde een gemiddelde of slechte respons.

In een volgende studie hebben we de relatie tussen synoviale B-cel infiltratie, response op rituximab en de reconstitutie van B-cellen verder geëxploreerd. Reeds eerder toonden we aan dat ACPA-IgM en synoviale B-cel infiltratie in nauwe samenhang met elkaar stonden, ongeacht de aanwezigheid van CD20+

B-cellen. Deze gegevens suggereerden een belangrijke rol voor ACPA-IgM producerende plasmablasten in het onderhouden van RA (hoofdstuk 3). In het verlengde hiervan laten we in **hoofdstuk 4** zien dat een lage ziekteactiviteit na rituximab geassocieerd is met minder infiltratie van CD79a+ CD20- plasma cellen en tragere repopulatie van B-cellen in het bloed. Hiermee suggererend dat rituximab tot een lage ziekteactiviteit leidt in die patiënten die een gereduceerde B-cel proliferatie hebben en tegelijkertijd weinig infiltratie van vroege plasmacellen in het synovium.

In **hoofdstuk 5** tonen we aan dat van alle lymfocyten in bloed en beenmerg alleen de proportie B-cellen verschilt tussen RA patiënten en gezonde controles. De proportie B-cellen is significant lager bij RA patiënten, wat voornamelijk bepaald wordt door een reductie in geheugen B-cellen. Daarnaast zien we ook een hogere fractie immunoglobuline secreterende cellen bij RA patiënten in vergelijking met gezonde controles. De functionele relevantie van deze groep cellen wordt onderstreept door de associatie die gezien wordt tussen de mate van inflammatie en de totale serum concentratie van immunoglobuline alsook van de RA-specifieke autoantilichamen. Hieruit kan men concluderen dat bij RA patiënten ontstekingsgemedieerde uitrijping van B-cellen tot plasmacellen plaatsvindt.

De hypothese dat plasmacellen een belangrijke rol spelen bij refractaire RA wordt verder ondersteund wanneer in **hoofdstuk 6** de effectiviteit en de veiligheid tussen twee B-cel depletende strategieën wordt vergeleken in een groep refractaire RA patiënten: herbehandeling op vaste intervallen van 6 maanden ('fixed') versus herbehandeling op geleide van de kliniek ('on-demand'). Over een follow-up periode van 48 weken hadden zowel 'fixed' herbehandeling als 'on-demand' herbehandeling een vergelijkbare effectiviteit, uitgedrukt in de ACR respons, de EULAR respons, verbetering van DAS<sub>28</sub> scores, HAQ scores en radiografische progressie. Echter bij de post-hoc analyse met betrekking tot de effectiviteit van 'fixed' herbehandeling met rituximab liet de groep die een gemiddelde of slechte respons (volgens de EULAR criteria) hadden op de initiële rituximab behandeling een significant betere respons zien. Als keerzijde werd 15% van de patiënten overbehandeld in de groep met 'fixed' herbehandeling. Betreffende de veiligheid van beide behandelingsstrategieën was de uitkomst vergelijkbaar. Deze klinische data suggereerden dat langdurige B-cel depletie van toegevoegde waarde kan zijn bij refractaire RA patiënten, die een persistent hoge ziekteactiviteit behouden na een eerste rituximab behandeling.

Vanuit methodologisch oogpunt heeft de behandeling van patiënten met rituximab geleid tot de erkenning dat het monitoren van B-cel aantallen bij deze patiënten dient te worden verricht met andere pan B-cel markers dan CD20. In **hoofdstuk 7** laten we zien dat cellen van patiënten behandeld met rituximab vals negatief zijn voor het membraan geassocieerde CD20 eiwit omdat rituximab het CD20 epitoom maskeert. De expressie van CD19 wordt daarentegen niet beïnvloed door rituximab. In **hoofdstuk 8** worden de specificiteit en sensitiviteit van de bekende pan-B-cel markers bestudeerd. De meest belangrijke bevinding is dat slechts 78.1% en 75.2% van de CD22+ cellen positief zijn voor CD19 en CD20, respectievelijk. Dit impliceert dat CD22 een significant lagere specificiteit heeft in vergelijking met de CD19 en CD20 markers.

De productie van antilichamen is een essentieel onderdeel van het humorale immuunsysteem in RA patiënten, niet alleen omdat antilichamen het functionele resultaat zijn van een humorale respons, maar ook omdat de productie van autoantilichamen een bepalende rol spelen in de pathologie van RA. In **hoofdstuk 9** worden langlevende, niet-delende plasmacellen in de tonsil bestudeerd en in het bijzonder de factoren die hun overleving beïnvloeden. Door middel van een kweekmodel tonen we aan dat er in tonsilweefsel een populatie langlevende, niet-prolifererende plasmacellen aanwezig is. Deze plasmacellen overleven in clusters omringd door stroma welke het cel-cel-contact vergemakkelijkt en het optimale gebruik van autocriene en paracriene factoren waarborgt. Daarnaast blijkt een significante proportie van IgA en IgG door deze niet-prolifererende, langlevende plasmacellen te worden geproduceerd, waarbij enkele plasmacellen zelfs een grote hoeveelheid voor hun rekening nemen.

In tegenstelling tot rituximab is een behandeling met hoge dosis chemotherapie (HDC) gevolgd door een autologe hematopoietische stamceltransplantatie (HSCT) een therapie die resulteert in complete lymfoablatie en daardoor het humorale immuunsysteem op een niet-specifieke manier uitschakelt. In **hoofdstuk 10** wordt de gezondheidstoestand van refractaire RA patiënten beschreven gedurende een periode van 5 jaar na HDC+HSCT. Deze studie laat zien dat HDC+HSCT tot een significante verbetering van de gezondheidstoestand leidt, voornamelijk in de eerste 9 maanden na HDC+HSCT. Vervolgens wordt hieruit berekend dat de gewonnen 'quality adjusted life years' (QALYs, een maat voor de gewonnen kwaliteit van leven door HDC+HSCT) in balans zijn met een behandelingsgerelateerde mortaliteit van 2.8% of lager. Daarop voortbordurend hebben we, in **hoofdstuk 11**, onderzocht of de effecten van HDC+HSCT op het

humorale immuunsysteem in 6 refractaire RA patiënten hun klinische respons kan verklaren. Hierbij tonen we aan dat dalingen in ACPA-IgG concentraties geassocieerd zijn met een langdurige klinische respons op HDC+HSCT. Bovendien beïnvloedt HDC+HSCT de concentratie ACPA-IgG indien deze geassocieerd zijn met een hoge graad van inflammatie in het synovium vooraf aan de behandeling en indien deze ACPA-IgG autoantilichamen van een lage aviditeit zijn. Ten slotte, in *hoofdstuk 12*, worden de voor- en tegenargumenten beschouwd van de hypothese dat ACPA autoantilichamen een pathogene rol spelen in RA. We presenteren de hypothese dat autoreactieve plasmacellen een cruciale rol in de pathogenese van RA hebben waardoor een lans gebroken wordt om toekomstig onderzoek te richten op het ontrafelen van de biologie van plasmacellen in RA.

## Conclusie

Het doel van dit proefschrift was om de pathologische rol van het humorale immuunsysteem bij RA patiënten te onderzoeken. Vanuit een klinisch perspectief heeft dit proefschrift het vraagstuk over lange termijn strategieën voor B-cel depletie aangekaart en suggereerde de resultaten van een pilot studie dat zowel ‘fixed’ herbehandeling op vaste tijdstippen dan wel ‘on-demand’ herbehandeling over de periode van 1 jaar even effectief en veilig zijn. Vanuit een biologisch perspectief, heeft dit proefschrift aangetoond dat a) B-cellen van RA patiënten een verhoogde neiging hebben tot het differentiëren in plasma cellen; b) de synoviale ‘load’ van CD79a+ plasmacellen is geassocieerd met klinische ziekte activiteit voor en na rituximab behandeling en c) de concentratie ACPA-IgM tezamen met CD79a+ synoviale infiltratie de respons op rituximab therapie kunnen voorspellen. In zijn geheel ondersteunen deze studies de hypothese dat autoreactieve plasmacellen in synovium verantwoordelijk zijn voor ziekte-activiteit in refractaire RA patiënten. Daarbij komt nog dat wanneer de effecten van immunoablatieve therapie (HDC+HSCT) werden onderzocht, de klinische respons geassocieerd bleek te zijn met de reductie, en in 1 patiënt zelfs eradicatie van, RA-specifieke autoantilichamen, voornamelijk laag aviditeit ACPA-IgG. Geconcludeerd kan worden dat afwijkingen in het humorale immuunsysteem van RA patiënten geconcentreerd zijn rondom de autoreactieve plasmacellen. Deze groep cellen lijken daarom een centrale rol te spelen in de pathologische verstoringen van het humorale immuunsysteem in RA.

## Toekomstperspectieven

De meeste auto-immuunziekten worden gekenmerkt door de aanwezigheid van autoantilichamen en een abnormale B-cel functie. Autoantilichamen kunnen immuuncomplexen vormen die zowel immuuncellen kunnen betrekken bij een ontstekingsproces als dat ze complement kunnen activeren en een inflammatoire respons kunnen opwekken. B-cellen kunnen ook deelnemen aan de immuunrespons door T-cellen te activeren, cytokines te secreteren en de instandhouding van lymfoïde structuren te beïnvloeden. Het analyseren van de onderliggende mechanisme(n) waarmee rituximab de ziekteactiviteit in RA verbetert, vormt een cruciale stap in het ontrafelen van de rol van het humorale immuunsysteem in de pathologie van RA.

Ondanks dat autoantilichamen geassocieerd worden met ziekte-ernst en geselecteerde fenotypes in RA, zijn hun concentraties in het serum geen goede afspiegeling van de ziekteactiviteit. Rituximab behandeling leidt tot variabele dalingen in zowel IgM reumafactor (RF-IgM) als ACPA-IgG, onafhankelijk van de klinische verbetering van de ziekteactiviteit. Echter deze autoantilichamen geven een suboptimale afspiegeling van het autoreactieve plasmacel compartiment aangezien de verschillende isotypes van ACPA en RF niet meegenomen worden. Immers is al langer bekend dat circulerende autoantilichamen van alle isotypes voorkomen in RA patiënten en dat ze continu geproduceerd worden tijdens de ziekte. Bovendien lieten onze eigen studies ook een sterke associatie tussen ACPA-IgM en klinische non-respons op rituximab zien. Daarom kunnen de klinische verbeteringen als gevolg van B-cel depletie niet alleen voortvloeien uit de afremming van autoantilichaamproductie. In een recente studie van Vos et al. werd aangetoond dat rituximab leidde tot een snelle depletie van B-cellen in het synovium van RA patiënten maar dat in een later stadium ook een reductie van andere infiltrerende celpopulaties, waaronder T-cellen, macrofagen en lymfocyttaggregatie, werd gezien. Deze studie impliceerde dat B-cellen de instandhouding van de karakteristieke synoviale infiltraten orkestreren. Toch wordt niet uitgesloten dat andere anti-inflammatoire mechanismen een rol spelen in het verdwijnen van deze synoviale infiltraten. Rituximab heeft namelijk ook invloed op de zogenaamde 'survival factoren' van B-cellen, waardoor rituximab de survival niches voor B-cellen sterk reduceert, voornamelijk in ontstoken weefsels zoals het synovium. Samenvattend kan gesteld worden dat nog

veel werk verzet zal moeten worden om het exacte mechanisme van rituximab in RA patiënten op te helderen.

Autoreactieve plasmacellen zijn resistent tegen de huidige immunosuppressieve therapieën, inclusief de biologicals. Zoals reeds eerder beschreven, zijn plasmacellen cruciaal voor het humorale immuunsysteem en de pathologische mechanismen die leiden tot de vorming en overleving van autoreactieve plasmacellen in RA zijn grotendeels onbekend. Hierdoor zouden plasmacellen wellicht een belangrijkere rol in de pathogenese van RA kunnen hebben dan tot nog toe wordt (h)erkend. Het specifiek eradiceren van deze autoreactieve plasmacellen zal een grote uitdaging zijn aangezien deze cellen noch delen noch prolifereren noch specifieke membraangebonden eiwitten hebben. Omdat plasmacellen een verhoogd eiwitmetabolisme hebben om de grote hoeveelheden antilichamen te produceren, hebben zij ook een verhoogde eiwitdegradatie. Specifieke antilichamen die gericht zijn op het proteasoom, de belangrijkste structuur die eiwitdegradatie medieert, worden onderzocht als potentiële therapie voor RA patiënten in de toekomst. Bovendien, als gevolg van nieuwe inzichten in de moleculaire pathogenese van het multiple myeloom, een plasmacel maligniteit, zijn nieuwe benaderingen ontstaan om pathologisch geactiveerde cascades in plasmacellen als aangrijpingspunt te gebruiken voor nieuwe therapieën. Enkele voorbeelden hiervan zijn de inhibitie van membraanreceptor tyrosine kinases, inhibitie van histone deacetylases, inhibitie van farnesyltransferases, het aangrijpen op moleculaire chaperones en allogene stamceltransplantatie.

Concluderend kan gesteld worden dat de recent ontwikkelde strategieën om (autoreactieve) plasmacellen aan te pakken in de toekomst van toegevoegde waarde kunnen zijn voor de behandeling van RA en andere auto-immuunziekten, waar plasmacellen een rol spelen. Daarom zullen toekomstige studies zich moeten richten op het ontrafelen van de immunobiologie van autoreactieve plasmacellen welke uiteindelijk kunnen leiden tot nieuwe en effectieve behandelingen die een langdurige remissie van ziekteactiviteit in RA kunnen induceren.



