

エンドスタチンの全身投与による 血管新生阻害作用を介した関節炎抑制効果

吉 田 健

東京慈恵会医科大学内科学講座リウマチ・膠原病内科

(受付 平成 16 年 6 月 15 日)

SYSTEMIC ADMINISTRATION OF ENDOSTATIN INHIBITS ARTHRITIS BY BLOCKING ARTICULAR ANGIOGENESIS

Ken YOSHIDA

Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine

I investigated the arthritis-inhibiting effects of systemic administration of recombinant endostatin in 2 arthritis models. In the first model, arthritis was induced in 6-week-old female Balb/c mice with injections of lipopolysaccharide and 4 monoclonal antibodies against type II collagen. Mice received subcutaneous injections of endostatin (0.2, 2, or 10 mg/kg/day) or phosphate-buffered saline (control) for 13 days, starting before arthritis developed. In mice receiving 10 mg/kg/day endostatin, arthritis scores were lower and hind paw thickness was less than in control mice. Histologic examination 21 days after antibody injection showed that synovial thickening and subchondral bone erosion improved more in mice receiving endostatin than in control mice. In a second model, arthritis was induced in 6-week-old male DBA/1J mice by injections of bovine type II collagen emulsified in complete and incomplete Freund's adjuvant. Endostatin, 10 mg/kg/day, was given for 14 days, starting before arthritis developed. Arthritis scores were lower and hind paw thickness was less in mice receiving endostatin than in control mice. Immunostaining for CD31 showed that neovascularization in the synovial tissue of arthritis was less in mice receiving endostatin than in control mice. These results suggest that endostatin is a promising antiarthritic drug with a novel mechanism of action.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2004; 119: 315-29)

Key words: endostatins, angiogenesis inhibitors, arthritis, collagen, vascular endothelial growth factors

I. 緒 言

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は、関節滑膜を病巣の主座とした原因不明の慢性炎症性自己免疫疾患である¹⁾。RA では、発症初期より炎症性滑膜組織に血管新生や炎症細胞浸潤が認められ²⁾、慢性期にはパンプスといわれる炎症性滑膜肉芽組織が形成される³⁾。RA の骨関節破壊にはパンプスが重要な役割を果たしている³⁾。その形

成には新生血管からの栄養が必須である²⁾。このことから、滑膜の血管新生を阻害することが関節炎の制御につながると考えられ、今までにいくつかの血管新生阻害物質を関節炎モデルに投与した実験がなされた⁴⁾⁻⁹⁾。

エンドスタチンは近年、マウス内皮腫細胞の培養上清から単離された血管新生阻害物質である¹⁰⁾。その構造は XVIII 型コラーゲンの C 末端フラグメントであり、アミノ酸 184 残基(マウス)な

いは183残基(ヒト)からなる分子量20,000のポリペプチドである¹⁰⁾。

最近、エンドスタチンを関節炎モデルマウスに投与し、エンドスタチンによる関節炎の治療応用についての可能性を検討した成績がいくつか報告された。松野らはRA患者の滑膜組織をsevere combined immunodeficient (SCID) マウスの皮下に移植し、その周囲にヒト組み換えエンドスタチンを投与した結果、滑膜組織が縮小したことを報告した¹¹⁾。また、Yinらは関節炎を発症するtumor necrosis factor (TNF) トランスジェニックマウスの関節にエンドスタチンの遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを直接注入し、関節炎が抑制されたことを報告した¹²⁾。これらはすべてエンドスタチンの局所投与による効果を検討したものである。しかし、RAは多発性関節炎を発症する全身性疾患であるため、エンドスタチンの局所投与では疾患を十分にコントロールできない可能性がある。したがって、この疾患をコントロールするためにはエンドスタチンの全身投与が必要となる可能性が高い。そこで本研究では、急性および慢性関節炎モデルマウスを作製し、マウス組み換えエンドスタチンを全身投与し、エンドスタチンの関節炎に及ぼす効果を検討した。

II. 実験方法

1. 細胞培養

マウスエンドスタチン遺伝子およびpuromycin耐性遺伝子を導入した293-EBNA細胞を225 cm² アングルネックフラスコ (Coring, NY) 10個に3×10⁶個ずつ播き、コンフルエントになるまで37°C, 5%CO₂の条件下で培養した。これらの遺伝子を導入した293-EBNA細胞は東京医科歯科大学山口典子博士から供与されたものを用いた¹³⁾。培養液として、ウシ胎児血清(Hyclone, Logan, Utah)を10%となるように加えたDulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen Co., Grand Island, NY) に puromycin (SIGMA, St. Louis, MO) 0.5 μg/ml, penicillinG sodium 5 units/ml, streptomycin sulfate 5 μg/ml, (Invitrogen Co.) となるように添加したものをを用いた。

2. マウス組換えエンドスタチンの精製

マウスエンドスタチンの遺伝子を導入した293-EBNA細胞がフラスコ内でコンフルエントになった時点で培養液を取り除き、phosphate buffered saline (PBS) 40 mlで細胞を1回洗浄した。その後、フラスコに無血清のDulbecco's Modified Eagle Mediumを30 ml入れた。この状態で24時間培養し、エンドスタチンが分泌された培養上清を回収した。この回収した培養上清に以下の試薬を加え、コンディションメディウムとして4°Cに保存した。試薬の種類とその濃度は2.5 mM EDTA, 1 mM N-ethylmaleimide, 2 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride, 0.02% NaN₃である。次に、このコンディションメディウムを10倍以上に濃縮するため、低温室にて分子量カットが10,000のUltrafiltration Membrane (Millipore Co., Bedford, MA)を用いて限外濾過を行った。濃縮したコンディションメディウムを分子量カット12,000-14,000の透析膜(Sanko Junyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて3回透析した。透析に用いたバッファーは0.02 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl溶液である。透析終了後のサンプルを高速遠心(9,000 rpm, 4°C, 30 min)して、上清のみを回収した。次に、アフィニティークロマトグラフィーを行うため、ヘパリンがコートされたHiTrap heparin HPカラム(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)を用いた。このカラムに回収したサンプルを添加し、カラムに吸着した蛋白質をgradienterを用い0.15 Mから0.8 Mの塩化ナトリウム0.02 M Tris-HCl (pH 7.5)溶液で濃度勾配をかけて溶出させ、フラクションコレクターで回収した。回収したサンプルのSDS-polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE)を行い、20 KDa付近のバンドを明瞭に確認できる分画を回収した。次に、HiPrep 16/60 sephacryl S-200 High Resolutionカラム(Amersham Biosciences)を使用し、このサンプルのゲル濾過を行った。アフィニティークロマトグラフィーと同様な方法でゲル濾過後のサンプルのSDS-PAGEを行い、分離を確認して回収した。回収したサンプルをPBSで3回透析し、透析後のサンプルを限外濾過にて濃縮した。最終的に得られたマウス組換えエンドスタ

チン溶液を濾過滅菌し、BCA Protein Assay Kit (PIERCE, Rockford) を用い蛋白濃度を測定し、 -80°C で保存した。

3. エンドスタチン活性の測定 (HUVEC migration assay)

bovian serum albumin を 0.1% となるように加えた血管内皮細胞基礎培養液である HuMedia-EB2 (KURABO Industries Ltd, Osaka, Japan) に VEGF₁₆₅ (R & D systems, Minneapolis, MN) を 2 ng/ml となるように添加した。次にこの培養液を 48 ウェルケモタキシスチャンパー (Neuroprobe Inc., Gaithersburg, MD) の下層チャンパーに 30 μl ずつ入れた。上層チャンパーと下層チャンパーの間にラットのタイプ I コラーゲン (BD Biosciences, Bedford, MA) をコートしたポリカーボネイトフィルター (Corning, Cambridge, MA) を挿入した。細胞浮遊液として HuMedia-EB2 でヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) を 2×10^5 cells/ml に調整したものを用いた。この細胞浮遊液に最終濃度がそれぞれ 0.1, 1, 10, 100, 1,000 ng/ml となるようにエンドスタチンを加えた。コントロールとしてはエンドスタチン無添加の細胞浮遊液を用意した。これらの細胞浮遊液を 30 分間、CO₂ インキュベーターで培養した後、上層チャンパーにこれらの細胞浮遊液を 50 μl ずつ入れた。これを 37°C で 6 時間、培養した後、フィルターを取り外した。vascular endothelial growth factor (VEGF) 刺激によってフィルターを通過し、フィルターの反対側面に付着した細胞を Diff-Quick (International Reagents Co., Hyogo, Japan) を用い染色した。なお、VEGF 添加、エンドスタチン無添加の群をポジティブコントロールとし、VEGF とエンドスタチンともに無添加の群をネガティブコントロールとした。%inhibition はポジティブコントロールを 0%、ネガティブコントロールを 100% としたときの各群における遊走を阻害された細胞数の割合とした。つまり、 $\{1 - (A - B / C - B)\} \times 100 (\%)$ で算出した。A は各群の 1 ウェルあたりの遊走した細胞数、B はネガティブコントロールの平均値、C はポジティブコントロールの平均値を表している。

4. 関節炎モデルの作製

1) 抗体誘導性関節炎

day 0 に 6 週齢雌の Balb/c (Charles River Japan, Inc, Kanagawa, Japan) に 4 種類の抗 II 型コラーゲンモノクローナル抗体 (IBLCo, Gunma, Japan) 2 mg を経静脈投与し、day 3 に LPS 50 μg を腹腔内投与した。

2) コラーゲン誘導性関節炎 (collagen induced arthritis: CIA)

氷上で、0.3% ウシ II 型コラーゲン溶液 (COSMO BIO Co, Tokyo, Japan) と完全フロイントアジュバント (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) を 1:1 の割合で混和し、エマルジョンを作製した。day 0 に初回免疫としてこのエマルジョンを 6 週齢雄の DBA/1J (Seac Yoshitomi, Ltd, Fukuoka, Japan) の背側尾根部皮内に 100 μl ずつ投与した。day 21 にブースターとして 0.3% ウシ II 型コラーゲン溶液と不完全フロイントアジュバントで作製したエマルジョンを同様に投与した。

5. エンドスタチンの投与方法

1) のモデルにおいては、エンドスタチンの用量により治療群を 0.2, 2, 10 mg/kg/day の 3 群に分けた。マウス 1 匹あたりの体重は 20 g として投与量を決定し、1 日 2 回 (朝、夕) に分け、day 0 から 13 日間、マウスの背部皮下に 100 μl ずつ投与した。コントロール群には PBS を同様の方法で投与した。コントロール群とエンドスタチン 0.2, 2 mg/kg/day 群のマウスはそれぞれ 10 匹ずつとした。エンドスタチン 10 mg/kg/day 群のマウスは 4 匹とした。

2) のモデルにおいては、治療群をエンドスタチン 10 mg/kg/day の 1 群とし、1 日 1 回、day 21 から 14 日間、マウスの腹腔内に 200 μl ずつ投与した。コントロール群には同様の方法で PBS を投与した。コントロール群と治療群のマウスは 5 匹ずつとした。

6. 関節炎の評価

1) 肉眼的検討

関節炎の重症度に関しては、関節炎点数と後ろ足の厚さで評価した。抗体誘導性関節炎に関しては、関節炎点数を 0 点; 正常, 1 点; 軽度の腫脹, 2 点; 著明な腫脹, 3 点; 関節の強直, に設定し

た¹⁴⁾。そして、左右の手および足関節の計4関節の合計点数で評価した。CIAにおいては、関節炎点数を0点；正常，1点；指のみの腫脹あるいは手および足関節の軽度の腫脹，2点；手および足関節の明瞭な腫脹，3点；手および足関節の重度の腫脹，4点；手および足関節の強直あるいは変形，に設定した¹⁵⁾。そして、左右の手および足関節の計4関節の合計点数で評価した。後ろ足の厚さに関しては、両モデルとも足の中央部をノギスで測定した。

2) 病理組織学的検討

day 21 に、不安を与えない状況下で、過剰なジエチルエーテル吸入麻酔下において抗体誘導性関節炎マウスを安楽死させ、後肢を足関節より約5 mm 中枢側で切断した。切断した検体を10%中性緩衝ホルマリン液で2日間固定し、その後K-CX脱灰液 (Fujisawa Pharmaceutical Co, Osaka, Japan) で24時間脱灰した。この検体でパラフィンブロックを作製し、HE染色標本を作製した。組織学的評価法としては炎症細胞浸潤、滑膜肥厚、骨びらんについてそれぞれ0点；正常，1点；軽度，2点；中等度，3点；重度とスコア化した¹⁵⁾。これら3つの因子の合計を histological score とした。

3) 足関節滑膜組織における CD31 の免疫染色 CIA モデルにおいて、day 35 に足関節より約5 mm 中枢側で切断した検体を IHC Zinc Fixative (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) で24時間固定し、その後10%EDTA溶液 (pH 7.0) で48時間脱灰した。この検体でパラフィン切片を作製した。切片中の内因性パーオキシダーゼのブロッキングには、Peroxidase Blocking Regent (DakoCytomation Co., Ltd., Kyoto, Japan) を用いた。10分間のブロッキング後、切片を Tris Buffered Saline (TBS) で1回洗浄した。一次抗体の反応としては、抗マウス CD31 抗体 (BD Biosciences Pharmingen) 溶液を10倍希釈したものを切片に滴下し、60分間室温で反応させた後、TBSで3回洗浄した。ビオチン標識二次抗体の反応として、ビオチン標識ラット抗マウス IgG グロブリン抗体溶液 (DakoCytomation Co., Ltd.) を100倍希釈したものを切片に滴下し、30分間室温で反応させた後、TBSで3回洗浄した。

この切片にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (DakoCytomation Co., Ltd.) を滴下し、30分間室温で反応させた後、TBSで3回洗浄した。発色には、DAB基質キット (DakoCytomation Co., Ltd.) を用い発色させた。最後にヘマトキシリンで対比染色した。

7. 統計学的解析

関節炎点数と後ろ足の厚さの経時的変化パターンの群間差についての統計学的検定には repeated measure ANOVA 法を用いた。抗体誘導性関節炎においては、さらに、各時点間の差を検出するための統計学的検査には多重性を考慮し Scheffe 法を用いた。4群間の histological score の比較には Kruskal-Wallis test を用いた。対照群の PBS 群と各投与群間の比較のための post-hoc test には Bonferroni 法を用いた。この際の有意水準は $0.05/3=0.017$ とした。

III. 結 果

1. マウス組み換えエンドスタチンの精製

今回実験に使用したマウス組換えエンドスタチンの生産法は山口らによって報告されている方法を用いた¹³⁾。エンドスタチンを発現する 293-EBNA 細胞からの培養上清の SDS-PAGE より、その生産の確認をしたところ、分子量 20,000 付近に明瞭なバンドが確認された (Fig. 1)。エンドスタチンの分子量は 20,000 と報告されており¹⁰⁾、このバンドがエンドスタチンと考えられた。

エンドスタチンと考えられるバンド以外にも種々の分子量のバンドが認められたため、このサンプルからエンドスタチンを精製する必要があると考えた。そこで、ヘパリンをコートしたカラムを用いて、アフィニティークロマトグラフィーを行った。アフィニティークロマトグラフィー後のサンプルはコンディションメディウムと比較し、エンドスタチン以外のバンドは薄くなり、またバンドの数も減少した (Fig. 1)。しかし、エンドスタチンより分子量の大きい位置に認められるバンドは消失しなかった。これは、エンドスタチン以外のヘパリン親和性のある蛋白質と考えられた。そのため、エンドスタチンの純度をさらに高くする必要があると考え、さらにゲルクロマトグラフィーを行った。ゲルクロマトグラフィー後のサ

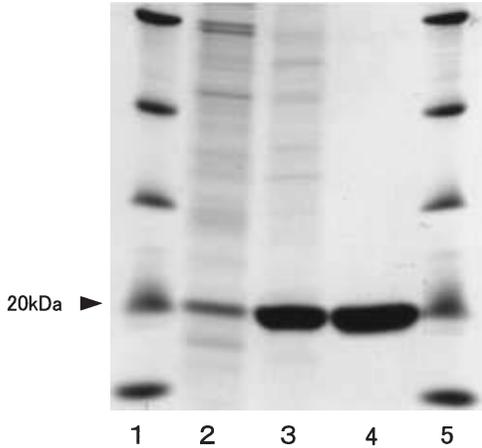


Fig. 1. SDS-PAGE of endostatin samples from each step of purification. Samples (10 μ l) from each step of purification were subjected to SDS-PAGE, and the polyacrylamide gel was stained with coomassie blue. Lane 1, molecular weight markers; Lane 2, a sample of conditioned medium from 293-EBNA cells expressing mouse endostatin; Lane 3, a sample after affinity chromatography; Lane 4, a sample after gel filtration; Lane 5, molecular weight markers (arrowhead indicates 20 kDa).

ンプルにおいてはアフィニティークロマトグラフィ後と比較し、分子量 20,000 以上の蛋白質がクマジー染色による検出範囲内では認められなくなった (Fig. 1). そして、エンドスタチンと考えられる単一のバンドがより明瞭に認められた。以上より、純度の高いエンドスタチンが得られたと判断した。

2. HUVEC migration assay によるエンドスタチンの HUVEC 遊走能阻害実験

エンドスタチンは VEGF に依存した血管内皮細胞の遊走を阻害する。そこで HUVEC migration assay を用い、今回精製したエンドスタチンが、VEGF に依存した HUVEC の遊走をどの程度阻害するか検討した。HuMedia-EB2 に何も添加しない場合(ネガティブコントロール)の 1 well あたりの遊走した HUVEC 数は 78.0 ± 13.5 (mean \pm SEM) であった (Fig. 2A)。HuMedia-EB2 に VEGF を添加した場合 (ポジティブコントロール) の 1 well あたりの遊走した HUVEC 数は 577.2 ± 2.2 (mean \pm SEM) と増加した (Fig. 2A)。このことから HUVEC の遊走は VEGF により促進されることが確認された。VEGF の存在

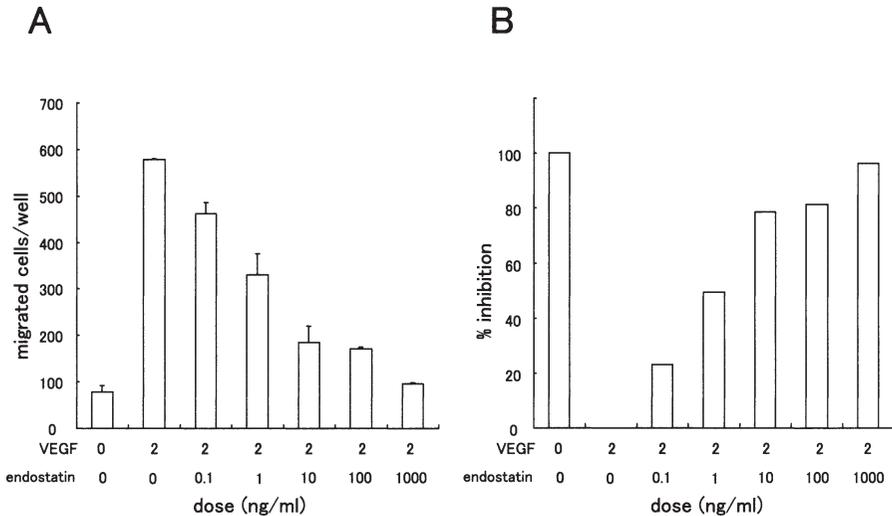


Fig. 2. Inhibitory effect of purified endostatin on the migratory activity of human umbilical vein endothelial cells. Five different concentrations (0.1, 1, 10, 100, 1,000 ng/ml) of purified endostatin were assayed for migration inhibitory activity on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). In this assay, the migration of HUVECs is induced in a VEGF-dependent manner. An assay mixture containing neither VEGF nor endostatin served as a negative control, and that containing VEGF and no endostatin served as a positive control. A, the number of migrated cells/well. B, the mean percentage of cells, the migration of which was inhibited by endostatin (% inhibition). The % inhibitions of the negative and positive control were defined as 100% and 0%, respectively, to calculate that of the test sample.

下にエンドスタチンをそれぞれ 0.1, 1.0, 10, 100, 1,000 ng/ml の濃度で添加したところ、遊走した HUVEC 数はそれぞれ 462.7 ± 22.6 , 329.7 ± 46.3 , 184.3 ± 36.8 , 170.7 ± 3.9 , 96.3 ± 2.2 (mean \pm SEM) となった (Fig. 2A). このことから今回精製したエンドスタチンは用量依存性に HUVEC 遊走能を阻害することが確認された. %inhibition はエンドスタチンにより遊走を阻害された HUVEC の数の割合を示した. この際, ネガティブコントロールを 100% とし, ポジティブコントロールを 0% とした. エンドスタチンの濃度が 10 ng/ml の % inhibition は約 80% であった (Fig. 2B). エンドスタチンの濃度を 1,000 ng/ml にまで増量する

と, %inhibition はほぼ 100% であった (Fig. 2B). 以上のことより, 今回の生産法および精製法により HUVEC 遊走阻害活性が十分ある純度の高いエンドスタチンが得られることが確認できた. それゆえ, 以後の実験に用いたエンドスタチンはすべてこの方法により生産し精製したものをを用いた.

3. 関節炎モデルにおけるエンドスタチンの関節炎抑制効果

エンドスタチンの関節炎抑制効果を評価する上で 2 種類の関節炎モデルマウスを用いた. 1 つは世界的に最も広く用いられている CIA である. このモデルは異種の II 型コラーゲンをマウスに免

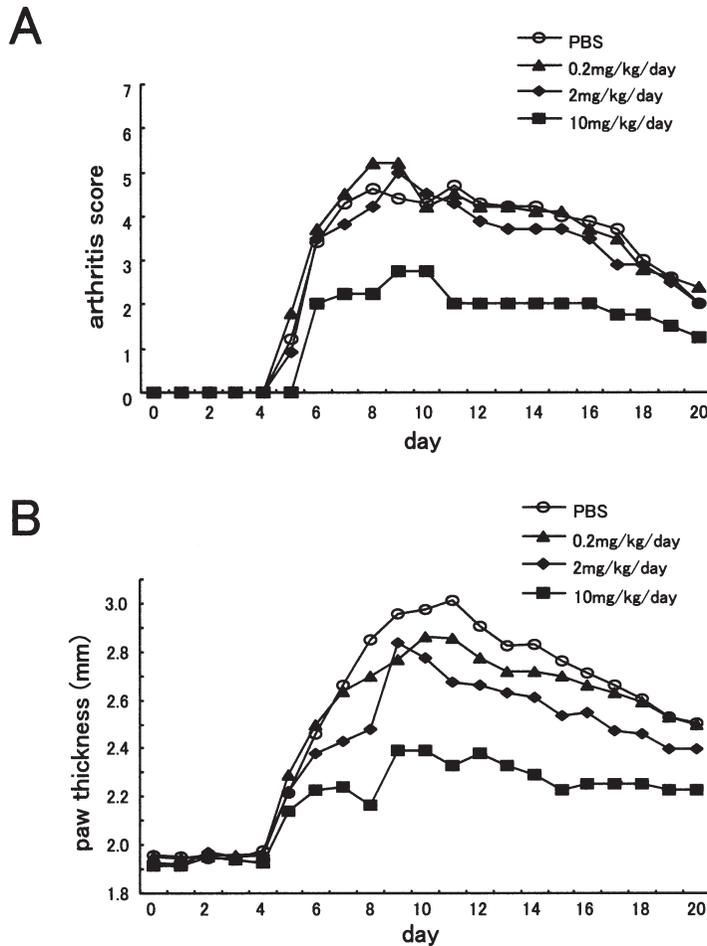


Fig. 3. Arthritis-inhibiting effect of endostatin in mouse models of antibody-induced arthritis. Endostatin-administered mice were divided into 0.2 mg/kg/day (▲), 2 mg/kg/day (◆), and 10 mg/kg/day (■) groups according to the dosage. These doses were administered to the mice subcutaneously twice daily for days 0-12. The control group was similarly administered PBS (○). A, time-dependent changes in the mean arthritis score. B, time-dependent changes in the mean paw thickness.

疫することにより関節炎を発症させる¹⁶⁾¹⁷⁾。免疫された異種のII型コラーゲンは抗原提示細胞によりT細胞に抗原提示される。抗原提示を受けたT細胞は活性化し、B細胞に抗II型コラーゲン抗体を産生させる。産生された抗II型コラーゲン抗体は関節部に集積する。その結果、関節滑膜に炎症細胞の浸潤や血管新生が起これ、関節炎が惹起される。つまり、CIAの関節炎発症機序は大きく分けて、抗体産生までの免疫反応の相と抗体産生後の炎症反応の相の2つの相から構成されている¹⁸⁾。

もう1つのモデルは寺戸らが開発した抗体誘導性関節炎である¹⁹⁾。このモデルは抗II型コラーゲン抗体をマウスに直接投与し、関節炎を惹起させる。そのため、CIAモデルのような抗II型コラーゲン抗体を産生させるまでのT細胞とB細胞の免疫反応をスキップしている。つまり、CIAモデルと比較してより免疫反応の関与が少なく、炎症反応が主体となったモデルである¹⁹⁾。

これらモデルの関節炎発症機序とエンドスタチンの作用機序を考慮し、以下の順序で薬効を評価することにした。エンドスタチンは血管新生阻害作用の研究がおもになされており、抗原提示細胞やリンパ球などの免疫系細胞に及ぼす影響についてはまだ十分に検討されていない。よって、最初に薬効評価をするための関節炎モデルとしては、免疫反応があまり関与せず、炎症反応が主体の抗体誘導性関節炎モデルの方が適切であると考えた。

しかし、抗体誘導性関節炎モデルでは関節炎点数がピークに達した後、関節炎点数が急激に減少する。つまり、この関節炎は急性炎症が主体である¹⁹⁾。一方、CIAモデルでは関節炎点数がピークに達した後しばらくの間、関節炎点数が維持される。つまり、この関節炎は慢性炎症が主体である¹⁸⁾。ヒトの関節リウマチも、長年にわたり関節炎が持続する慢性炎症が主体の関節炎である。以上のことから、慢性炎症を主体とする関節炎においても薬効を評価する必要があると考えた。そこで、慢性炎症の薬効評価をするためにはCIAモデルを用い、実験を行った。



Fig. 4. X-rays of the foot joint of antibody-induced arthritis mice in the endostatin and control groups.

The foot joint was examined by X-ray on day 21. A, X-ray of the foot joint in the normal mouse. B, X-ray of the foot joint in the control group. C, X-ray of the foot joint in the endostatin (10 mg/kg/day) group. The arrowhead indicates the joint space. The arrow indicates an area of bone destruction.

1) 抗体誘導性関節炎モデルマウスにおけるエンドスタチンの効果

LPS 投与3日後より明瞭な関節炎が発症した。関節炎点数の経時点変化パターンについて repeated measure ANOVA 法を用い解析した。結果は PBS 投与群とエンドスタチン投与3群の4群間に有意差が認められた (Fig. 3A)。さらに、4群について各時点間の差を検出するため Sheffe 法を用いて解析したところ、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群のみ各時点間の差が認められなかった (Fig. 3A)。すなわち、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群においては、他の3群間と異なり平均関節点数の経時点変化が乏しかった (Fig. 3A)。後ろ足の厚さの経時点変化パターンについても平均関節点数と同様の統計学的解析を行った結果、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群にのみ経時点変化が認められなかった (Fig. 3B)。なお、関節炎の発症率はコントロール群とエ

ンドスタチン投与群間に有意な差はなかった。また、エンドスタチン投与期間中を通じて、死亡したマウスや明らかな副作用が出現したマウスは認められなかった。

day 21 の後肢足関節のレントゲン像においては、コントロール群で関節裂隙の狭小化と骨破壊像が認められた (Fig. 4B)。一方、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群ではこれらの所見が軽減されていた (Fig. 4C)。

day 21 の後肢足関節の病理組織学的所見においては、コントロール群では好中球を主体とした炎症細胞浸潤、乳頭状増生を伴った滑膜増生、パヌス形成、滑膜下間質における間葉系細胞の増殖と毛細血管増生、骨破壊などの所見が著明であった (Fig. 5A)。一方、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群ではこれらの所見が軽減されていた (Fig. 5B)。

次に、これらの病理組織学的所見をスコア化し、

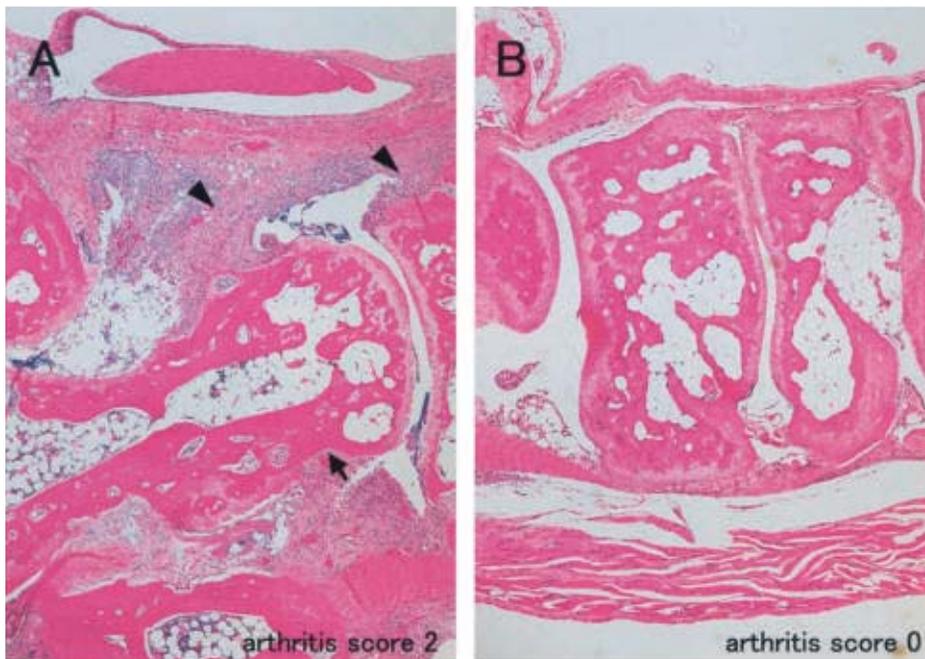


Fig. 5. Histopathology of the foot joint of antibody-induced arthritis mice in the endostatin and control groups.

The mouse foot joint was examined histopathologically on day 21. Histopathology in HE-stained sections is shown. A, histopathology of the foot joint in the control group, showing hyperplasia of synovial tissue and pannus formation (arrowhead). Bone destruction by hyperplastic synovial tissue was also seen (arrow). B, histopathology of the foot joint in the endostatin (10 mg/kg/day) group. Hyperplasia of synovial tissue, pannus formation and bone destruction were inhibited in comparison with those in the control group.

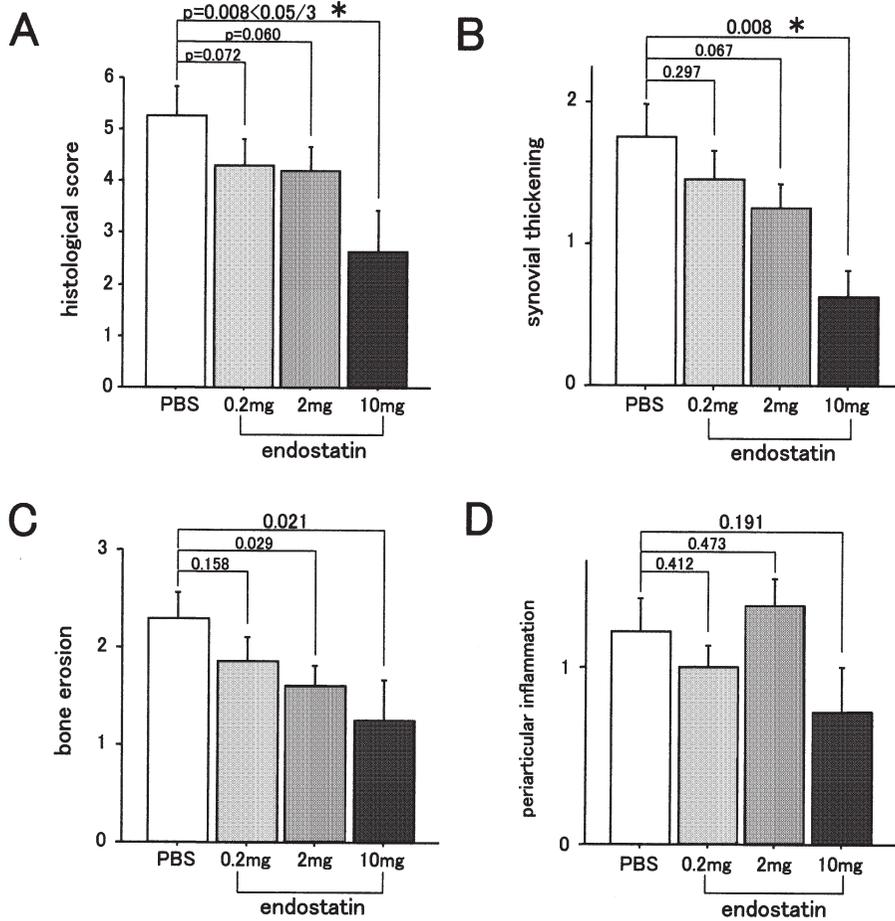


Fig. 6. Histopathological scores of antibody-induced arthritis mice in the endostatin and control groups. Histopathological features of the foot joint on day 21 were scored for synovial thickening, bone erosion, and periarticular inflammation. A, the total of the scores for these 3 factors. B, synovial thickening score. C, bone erosion score. D, periarticular inflammation score. Data are expressed as mean \pm SEM.

検討した。histological score は、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群で PBS 投与群と比較して統計学的に有意に低下していた ($p=0.008$) (Fig. 6A)。次に histological score を構成する各要素についても検討した。滑膜肥厚 (パンヌス形成) のスコアは、PBS 投与群と比較してエンドスタチンの用量に依存して低下していた (Fig. 6B)。さらに、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群においては PBS 投与群と比較して統計学的にも有意に低下していた ($p=0.008$) (Fig. 6B)。骨びらんのスコアは、PBS 投与群と比較してエンドスタチンの用量に依存して低下していた傾向があった (Fig. 6C)。炎症細胞浸潤のスコアは、PBS 投与群とエ

ンドスタチン投与群間に明らかな差は認められなかった (Fig. 6D)。

2) コラーゲン誘導性関節炎モデルにおけるエンドスタチンの関節炎抑制効果

ブースターを投与した日 (day 21) から、エンドスタチン投与群には 10 mg/kg/day の用量を、コントロール群には PBS を腹腔内に投与した。関節炎点数と後ろ足の厚さの経時点変化パターンについて repeated measure ANOVA 法を用い解析した。結果は PBS 投与群とエンドスタチン投与群の 2 群間の経時点変化パターンに有意差が認められた (Fig. 7A, B)。また、この系でも観察期間中に明らかな副作用と思われる症状は認められな

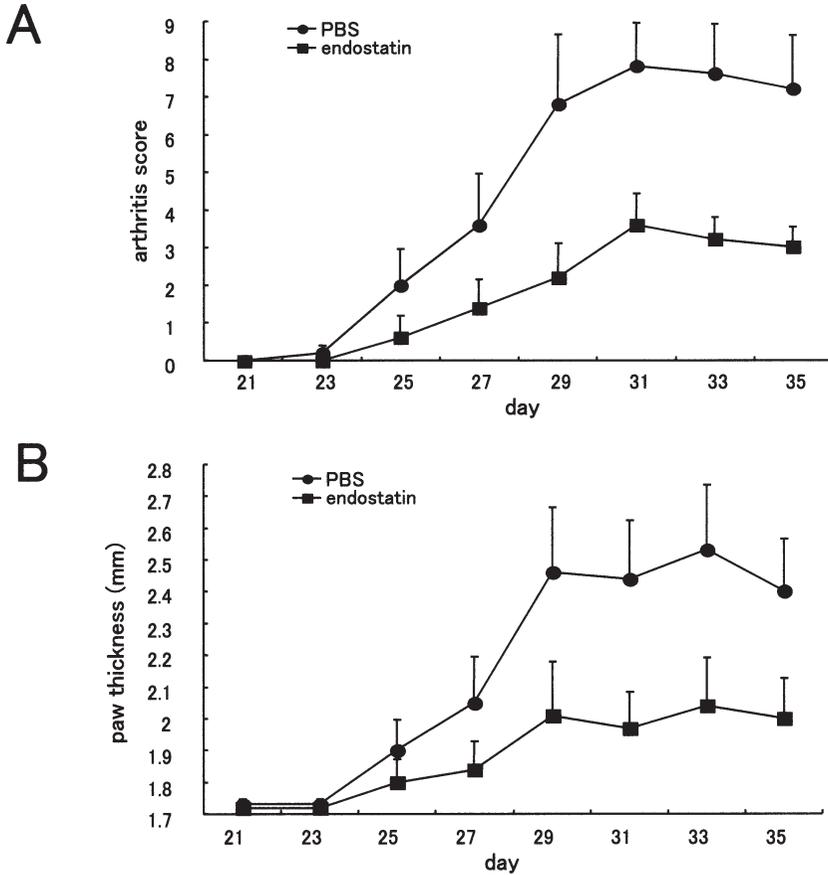


Fig. 7. Arthritis-inhibiting effect of endostatin in collagen induced arthritis mice.

The endostatin group (■) was administered intraperitoneally at a dose of 10 mg/kg/day for 2 weeks from day 21. The control group (●) was similarly administered PBS. A, time-dependent changes in the mean arthritis score. B, time-dependent changes in the mean paw thickness. Data are expressed as mean \pm SEM.

かった。

次に足関節の病理組織学的検討を行った。エンドスタチン投与群においては、足関節の乳頭状増生を伴った滑膜増生と骨破壊の所見はコントロール群と比較して少なかった (Fig. 8A, B)。また、同切片上において抗 CD31 抗体を用いて免疫染色を行った結果、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群において、CD31 に染まる血管内皮細胞の数はコントロール群と比較して減少していた (Fig. 8C, D)。

IV. 考 察

エンドスタチンは、血管内皮細胞の増殖阻害活性を指標として、腫瘍細胞が産生する内因性の血

管新生阻害因子をスクリーニングする過程で、マウス血管内皮腫細胞の培養上清から単離された¹⁰⁾。そのアミノ酸配列から XVIII 型コラーゲンの C 末端非コラーゲン領域のフラグメントと同一化された¹⁰⁾。XVIII 型コラーゲンの機能はまだ十分に解明されていないが、血管や上皮下の広汎な基底膜層に分布している²⁰⁾。エンドスタチンの分子量は 20,000 でアミノ酸 184 残基 (マウス) ないしは、183 残基 (ヒト) からなるポリペプチドである。エンドスタチンは同一化された経緯からも分かるように、おもに血管内皮細胞に対して作用すると考えられている。たとえば、大腸菌由来の組み換えエンドスタチンはマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍血管の新生を阻害することが報告されてい

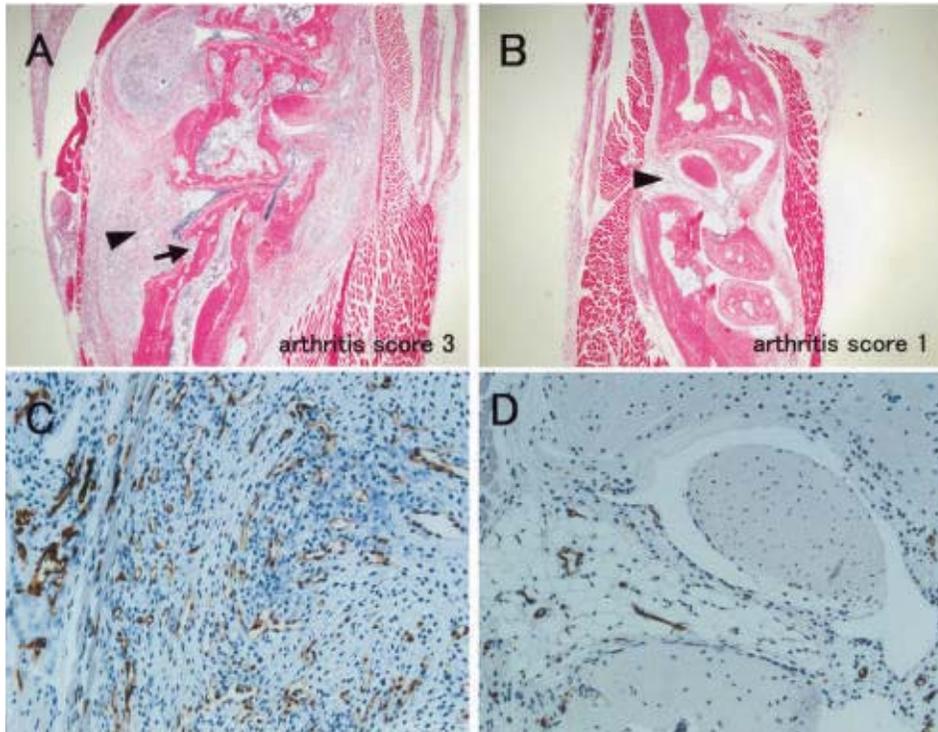


Fig. 8. Histopathology of the foot joint of collagen-induced arthritis mice in the endostatin and control groups.

The foot joint was examined histopathologically on day 35. A, histopathology of the foot joint in the control group (HE staining). The arrowhead and arrow indicate hyperplastic synovial tissue and bone destruction, respectively. B, histopathology of the foot joint in the endostatin (10 mg/kg/day) group (HE staining). The arrowhead indicates synovial tissue. Synovial hyperplasia was inhibited in comparison with that in the control group. C, histopathology of the foot joint in the control group (CD31 immunostaining). The anti-CD31 antibody-stained portion appeared brown: a magnification of the area indicated by the arrowhead in Fig. 1A. D, histopathology of the foot joint in the endostatin (10 mg/kg/day) group (CD31 immunostaining): a magnification of the area indicated by the arrowhead in Fig. 1B.

る¹⁰⁾。このため抗腫瘍薬として注目され、現在、抗癌薬としての治験が米国において進行中である。

関節炎の治療薬としてエンドスタチンの可能性を探る上で今までに興味深い報告がなされている。Matsunoらは、SCIDマウスに埋め込んだヒト関節リウマチ由来滑膜組織がエンドスタチンの局所投与によって著明に退縮することを報告した¹¹⁾。Yinらはエンドスタチン遺伝子が発現するように調整した lentiviral ベクターを直接、関節炎マウスの関節部に投与し、関節炎が改善されたと報告した¹²⁾。

しかし、これらはエンドスタチンを関節炎モデルに局所投与した報告である。一方、ヒトの関節リウマチは全身性に多発性関節炎を引き起こすた

め、薬物の関節への局所投与のみですべての病態を制御するには困難かつ不十分と考えられる。それゆえ、今回、関節炎モデルにリコンビナントエンドスタチンを全身投与し検討した。

関節炎モデルマウスとしては抗体誘導性関節炎マウスと CIA マウスの2種類を用いた。エンドスタチンの用量に関しては、関節炎モデルで全身投与を試みた報告がないため、腫瘍モデルの報告を参考にした。O'Reillyらは腫瘍モデルマウスに種々の用量のエンドスタチンを全身投与し、腫瘍の増殖抑制効果を報告した¹⁰⁾。この報告によるとエンドスタチン 10 mg/kg/day 以上の全身投与が血管新生を阻害し、腫瘍の増殖を抑制した。よって、本実験のエンドスタチンの最高用量を 10 mg/

kg/day に設定した。

抗体誘導性関節炎モデルにおいて、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群の関節炎点数および後足の厚さは、PBS 投与群と比較して、有意に低く推移した (Fig. 3A, B)。また、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群においては、組織学的スコアも、PBS 投与群と比較して統計学的に有意に低下した (Fig. 6A)。組織学的スコアを構成する 3 つの因子のうち、とくに、滑膜増生のスコアは、10 mg/kg/day 投与群において PBS 投与群と比較して統計学的にも有意に低下した (Fig. 6B)。以上のことから、エンドスタチン 10 mg/kg/day の全身投与は関節炎抑制効果を示したと考えた。

Kisker らの報告によると、腫瘍モデルマウスにおいて、抗腫瘍効果はエンドスタチン 20 mg/kg/day の腹腔内連続投与により認められた。この時の定常状態に達したエンドスタチンの血中濃度は 990 ng/ml と報告されている²¹⁾。我々が行った HUVEC migration assay の結果でも、10 ng/ml から 1,000 ng/ml の濃度で HUVEC の遊走を 80% 以上阻害した。これらのことより、*in vivo* における血管新生を抑えるエンドスタチンの血中濃度と *in vitro* における血管内皮細胞の遊走を抑えるエンドスタチンの濃度はおおそ一致していると考えられた。したがって、関節炎モデルにおいても、10 mg/kg/day の投与量は関節滑膜の血管新生を阻害し、関節炎を抑制する十分な投与量と考えられた。

各用量における関節炎抑制効果については以下のように考えた。後ろ足の厚さは、エンドスタチン投与群において、用量に依存して低下している傾向があった (Fig. 3B)。また、組織学的スコアのうち、滑膜増生のスコアと骨びらんのスコアはエンドスタチンの用量に依存して低下している傾向があった (Fig. 6B, C)。これらの結果から、エンドスタチンの関節炎抑制効果は、ある程度用量に依存している傾向があると考えた。

しかし、関節炎点数は、エンドスタチン 0.2 mg/kg/day および 2 mg/kg/day 投与群において、PBS 投与群と比較して明らかな差がみられなかった。これは、関節炎点数の測定法と後ろ足の厚さの測定法の感度の違いによる可能性が考えられた。後ろ足の厚さは、ノギスで測定するため、連

続変数で評価される。そのため、わずかな関節の腫脹の差が検出されやすい。一方、関節炎点数は非連続変数である。さらに、このモデルの関節炎は骨性強直に至らないため、関節の腫脹を 1 点か 2 点の 2 段階でしか評価できない。そのため、わずかな関節の腫脹の差は検出されにくい可能性がある。後ろ足の厚さの結果から考えても、エンドスタチン 0.2 mg/kg/day および 2 mg/kg/day 投与群における関節炎抑制効果の差は、PBS 投与群と比較して、わずかであった。このわずかな関節炎抑制効果の差は関節炎点数の差に反映されなかった可能性がある。

また、組織学的スコアを構成する 3 因子のうち、炎症細胞浸潤のスコアは、PBS 投与群とエンドスタチン投与群との間に明らかな差が認められなかった (Fig. 6D)。その原因としては次の 2 つの可能性が考えられた。1 つは、エンドスタチンに炎症細胞の浸潤を抑制する効果がない可能性である。もう 1 つは、day 21 まで経過すると、炎症が消退し、終息に近づいていた可能性である。今回使用したモデルは急性炎症主体のモデルであるため、炎症は比較的早期に消退する。後ろ足の厚さの経過からも分かるように、day 11 以降、関節の腫脹は減少傾向となった。そのため、組織学的評価を行った day 21 においては、炎症細胞浸潤が消退している時期である可能性がある。実際、day 21 において、PBS 投与群の炎症細胞浸潤のスコアも低値であった。したがって、day 21 まで経過すると、炎症細胞浸潤の所見は乏しくなり、各投与群間のスコアに明らかな差がみられなくなったと考えた。一方、滑膜増生や骨びらんの所見は、炎症が消退しても改善されない不可逆的变化があることを示唆している。そのため、day 21 までに生じた変化が改善されず、各投与群間にスコアの差として示されたと考えた。

次に、慢性炎症の薬効評価のため CIA モデルの実験を行った。抗体誘導性関節炎の実験結果より、統計学的に有意に関節炎抑制効果を示したエンドスタチンの用量は 10 mg/kg/day であった。そのため、CIA モデルでは、エンドスタチン投与群は 10 mg/kg/day の 1 群とした。コントロール群には前実験と同様に PBS を投与した。CIA モデルにおいても、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与

群の関節炎点数は、PBS 投与群と比較して統計学的に有意に低く推移した。また、後ろ足の厚さの経時変化も同様に低く推移した (Fig. 7A, B)。以上のことより、慢性炎症の関節炎モデルにおいても、エンドスタチンの全身投与は関節炎抑制効果があると考えられた。

次に、重要なこととして、本実験中に観察した範囲内でマウスに重篤な副作用は認められなかったことを挙げたい。このことからエンドスタチンは毒性の低い物質である可能性が示唆された。実際、悪性腫瘍の分野において、エンドスタチンの臨床治験が行われているが、重篤な副作用はほとんど報告されていない²²⁾。

今回エンドスタチンが関節炎抑制効果を示したことを確認できたが、実際に病変部の血管新生が阻害されているかどうかを確認するために、抗 CD31 抗体を用いて関節滑膜組織の血管内皮細胞を免疫染色した。その結果、関節滑膜組織の CD31 陽性血管内皮細胞は、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群において PBS 投与群と比較して減少していた (Fig. 8C, D)。つまり、エンドスタチン 10 mg/kg/day 投与群において、関節滑膜組織の血管新生が阻害されていることが示唆された。エンドスタチンは血管内皮細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている²³⁾。今後は、本モデルにおいても血管内皮細胞にアポトーシスが誘導されているかどうか検討し、エンドスタチンが関節滑膜の血管内皮細胞に作用しているかどうか検討する必要があると考えられた。

本実験でエンドスタチンが血管新生を阻害し、関節炎を抑制したことを確認できたが、その詳細な作用機序については今後検討すべき点が多い。エンドスタチンの血管内皮細胞の遊走阻害に関しては、エンドスタチンが血管内皮細胞膜上の α_5 , α_v インテグリンと結合することにより、遊走が抑制されると報告されている²⁴⁾。RA 関節炎モデルマウスに対して、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンアンタゴニストを投与し、関節炎が抑制されたとする報告がある⁷⁾。このようなことから、エンドスタチンが血管内皮細胞上のインテグリンに対して作用し、血管新生が阻害され、その結果、関節炎が抑制された可能性はあると考えられた。また、エンドスタチンはプロ MMP-2 (matrix metalloproteinase:

MMP) を活性化する MT1-MMP (membrane type) を阻害し、さらに活性化された MMP-2 も阻害すると報告されている²⁵⁾。MT1-MMP は血管内皮細胞の線溶活性に寄与し、血管新生を調節する重要な物質である。また、MMP-2 も細胞外マトリックス分解酵素として重要な酵素であり、関節炎の進行に関与することはよく知られている。したがって、投与したエンドスタチンがこれら MMP の作用を阻害し、関節炎を抑制した可能性も考慮すべきである。さらに最近、エンドスタチンは VEGF のレセプターである KDR/Flt-1 に直接的に作用し、VEGF の細胞内シグナル伝達をブロックすると報告された²⁶⁾。VEGF は関節炎の病態に重要な働きをする物質である。したがって、投与したエンドスタチンが VEGF の働きを阻害することにより関節炎を抑制した可能性もある。

作用機序以外でも投与量や投与方法についても検討する必要がある。今回の実験において、エンドスタチンの最大投与量は 10 mg/kg/day であり、それ以上の投与量による関節炎抑制効果は不明である。しかし、エンドスタチンは用量依存性に関節炎を抑制する傾向が認められたため、投与量を増加することで関節炎抑制効果がより強くなる可能性がある。投与方法に関しては、最近 Kisker らが Drug Delivery System を工夫することにより、エンドスタチンの効果を増強させた。具体的には浸透圧ポンプによるエンドスタチンの持続投与はエンドスタチンの 1 日 1 回連続投与より、抗腫瘍効果が強いと報告した²¹⁾。今後、効果的な臨床応用に向けて、エンドスタチンの関節炎抑制効果をさらに検討していく必要がある。

V. 結 語

2 種類の関節炎モデルにおいてエンドスタチンの全身投与を初めて試みた。エンドスタチン 10 mg/kg/day の全身投与により関節炎は肉眼的にも組織学的にも統計学的に有意に抑制された。この関節炎抑制効果は急性炎症モデルおよび慢性炎症モデルともに認められた。

また、病理組織学的所見においては、とくに滑膜増生抑制効果と骨破壊抑制効果が認められた。これらの効果はエンドスタチンの血管新生阻害作用による可能性が示唆された。

今後、エンドスタチンは関節リウマチの新しい治療薬の候補の1つになりうると思われた。

稿を終えるに臨み、ご校閲を賜った東京慈恵会医科大学内科学講座糖尿病・代謝・内分泌内科 田嶋尚子教授に厚く感謝いたします。また、終始ご指導を賜りました東京慈恵会医科大学内科学講座リウマチ・膠原病内科 山田昭夫教授、東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所分子免疫学研究部 斎藤三郎助教授、国立病院機構千葉東病院臨床研究センター免疫病理研究部 城謙輔先生に深く感謝致します。さらに、本研究において、ご指導ご協力を頂きました下記の諸先生方に深謝致します。東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野 山口典子先生。東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所分子免疫学研究部 大野裕治講師、池島宏子助手。東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター臨床研究開発室 松島雅人講師。東京慈恵会医科大学内科学講座リウマチ・膠原病内科 安田淳医員、安田千穂医員、金月勇助手、横山徹助手、黒坂大太郎講師。

文 献

- 1) O'Dell AL. Rheumatoid arthritis: The clinical picture. In: Koopman WJ, editor. Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology. 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Press; 2001. p. 1153.
- 2) Colville-Nash PR, Scott DL. Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 919-25.
- 3) Zvaifler NJ, Firestein GS. Pannus and pannocytes: alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 783-9.
- 4) Peacock DJ, Banquerigo ML, Brahn E. Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis. *J Exp Med* 1992; 175: 1135-8.
- 5) Oliver SJ, Banquerigo ML, Brahn E. Suppression of collagen-induced arthritis using an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, and a microtubule stabilizer, Taxol. *Cell Immunol* 1994; 157: 291-9.
- 6) Bandt M de, Grossin M, Weber AJ, Chopin M, Elbim C, Pla M, et al. Suppression of arthritis and protection from bone destruction by treatment with TNP-470/AGM-1470 in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2056-63.
- 7) Storgard CM, Stupack DG, Jonczyk A, Goodman SL, Fox RI, Cheresch DA. Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an $\alpha_v\beta_3$ antagonist. *J Clin Invest* 1999; 103: 47-54.
- 8) Miotla J, Maciewicz R, Kendrew J, Feldmann M, Paleolog E. Treatment with soluble VEGF receptor reduces disease severity in murine collagen-induced arthritis. *Lab Invest* 2000; 80: 1195-205.
- 9) Lu J, Kasama T, Kobayashi K, Yoda Y, Shiozawa F, Hanyuda M, et al. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2000; 164: 5922-7.
- 10) O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-85.
- 11) Matsuno H, Yudoh K, Uzuki M, Nakazawa F, Sawai T, Yamaguchi N, et al. Treatment with the angiogenesis inhibitor endostatin: a novel therapy in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29: 890-5.
- 12) Yin G, Liu W, An P, Li P, Ding I, Planelles V, et al. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther* 2002; 5: 547-54.
- 13) Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, Sasaki T, Fukai N, Shapiro R, et al. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J* 1999; 18: 4414-23.
- 14) Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulation both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 2001; 7: 563-8.
- 15) Iyama S, Okamoto T, Sato T, Yamaguchi N, Sato Y, Sasaki K, et al. Treatment of murine collagen-induced arthritis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2160-7.
- 16) Holmdahl R, Andersson ME, Goldschmidt TJ, Jansson L, Karlsson M, Malmström V, et al. Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. *APMIS* 1989; 97: 575-84.
- 17) Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang

- AH. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci* 1997; 61: 1861-78.
- 18) 菊川忠裕, 関節炎モデル: II型コラーゲン関節炎モデルマウス. 東京: 日本医学館; 2000. p. 62-8.
- 19) Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH, Stuart JM. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol* 1992; 148: 2103-8.
- 20) Halfter W, Dong S, Schurer B, Cole GJ. Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 1998; 273: 25404-12.
- 21) Kisker O, Becker CM, Prox D, Fannon M, D'Amato R, Flynn E, et al. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res* 2001; 61: 7669-74.
- 22) Herbst RS, Hess KR, Tran HT, Tseng JE, Mullani NA, Charnsangavej C, et al. Phase I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3792-803.
- 23) Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, Lu H, Knebelmann B, Segal M, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 11721-6.
- 24) Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, Nakamura H, Ilmonen M, Lombardo CR, et al. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1024-9.
- 25) Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase 2. *Cancer Res* 2000; 60: 5410-3.
- 26) Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 27872-9.