

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：34533  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21590187  
 研究課題名（和文）HGFアンタゴニスト（NK4）による滑膜増殖の制御  
 研究課題名（英文）Regulation of synovial cell proliferation by HGF antagonist, NK4.  
 研究代表者  
 岩崎 剛（IWASAKI TSUYOSHI）  
 兵庫医療大学・薬学部・教授  
 研究者番号：10151721

## 研究成果の概要（和文）：

NK4遺伝子を、RAモデルマウス（SKGマウス）に導入すると関節炎抑制効果が認められた。関節組織の病理組織学的検査では、滑膜組織の血管新生、炎症細胞浸潤が著明に減少し、骨X線検査でも骨破壊が抑制され、滑膜組織のIL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインや破骨細胞分化誘導に密接に関与するRANKLの発現も抑制された。NK4は新規関節リウマチの治療薬として期待できる。

## 研究成果の概要（英文）：

Intravenous injection of AdCMV.NK4 into SKG mice suppressed the progression of  $\beta$ -glucan induced arthritis. Bone destructions were also inhibited by NK4 treatment. Histopathological findings of the foot joints revealed that angiogenesis, inflammatory cytokines, and RANKL expressions in synovial tissues were significantly inhibited by NK4 treatment. Molecular targeting of HGF by NK4 can therefore be potentially applied as a novel therapeutic approach for the treatment of RA.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000円	570,000円	2,470,000円
2010年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
2011年度	700,000円	210,000円	910,000円
総計	3,600,000円	1,080,000円	4,680,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：関節リウマチ、滑膜、血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞増殖因子（HGF）は強力な組織再生・血管新生作用を持ち、劇症肝炎や閉塞性動脈

硬化症の治療に応用されている。NK4はHGFの分子中のN末端ヘアピンとそれに続く4コのクリングルドメインを持つ分子内断片で、

HGFレセプター (c-Met) に結合しHGF受容体アンタゴニストとして働くのみならず、VEGFやbFGFの作用も抑制し、血管新生を強力に阻害する。我々はマウス移植片対宿主病 (GVHD) に対するHGFを用いた遺伝子治療を確立し、HGFの組織再生作用により急性GVHDが防御され (*J Clin Invest* 107, 2001)、移植片対白血病 (GVL) 効果が維持され、T細胞免疫能の回復が促進されること (*Blood* 104, 2004)、HGFの免疫制御作用・抗線維化作用によりSLEモデルマウス・強皮症モデルマウスの臓器障害や皮膚硬化が改善することを明らかにしてきた (*Arthritis Res Ther* 8, 2006)。また、HGF受容体アンタゴニスト、NK4をマウス腫瘍モデルに投与すると腫瘍血管新生が抑制され、抗腫瘍効果が認められることも明らかにしてきた (*J Hepatol* 45, 2006)。関節リウマチは増殖した滑膜が関節を破壊する自己免疫疾患である。滑膜組織には新生血管が豊富に存在し、滑膜の増殖に血管新生が重要な役割を果たしていることが推測される。また、滑膜組織にHGFやVEGFなどの血管新生因子が強発現していることも明らかになっている (*Arthritis Rheum* 39, 1996; *J Exp Med* 180, 1994)。これらの研究結果から、HGF受容体アンタゴニスト、NK4が滑膜組織の血管新生を抑制し、滑膜増殖を制御できる可能性が示唆される。今回は、血管新生因子受容体シグナルをNK4を用いて遮断し、滑膜の増殖を制御する新しい関節リウマチの治療法を確立し、将来の臨床応用への可能性を検証する。

## 2. 研究の目的

研究目的達成のため、関節炎モデルを作成し、NK4遺伝子の治療効果を検討する。

(1) 関節炎モデルは自然発症型関節リウマチモデル・SKGマウス (*Nature* 426, 2003)

を用いる。

(2) NK4遺伝子導入の方法はアデノウイルスベクターを用い、マウスに静脈内投与する。現在この方法により、ラットおよびマウス腫瘍モデルで恒常的にNK4蛋白の血中濃度が維持でき、抗腫瘍効果も確認されている (*J Hepatol* 45, 2006)。

(3) 治療効果は関節腫脹、病理組織学的解析、サイトカイン発現の解析を用いて判定する。

## 3. 研究の方法

自然発症型関節炎モデル動物の作成 (岩崎・佐野): SKGマウスはconventionalな環境下において生後8週齢ごろから関節炎を発症する自然発症型関節炎モデルマウスである (*Nature* 426, 2003)。SKGマウスはSPF環境下で関節炎を発症しないため、 $\beta$ -グルカンを投与し関節炎を誘発し、治療効果を検討する。現在SKGマウスをSPF環境下で飼育し、生後8週で $\beta$ -グルカンを投与し、均一な関節炎誘発を確認している。

NK4の投与 (藤元・松本): NK4遺伝子をアデノウイルスベクターを用いて導入する。遺伝子導入方法は静脈内投与および関節内投与を用いて行う。現在我々は静脈内投与で高濃度のNK4蛋白が血中に認められること、また腫瘍内局所投与においても抗腫瘍効果が認められることを確認している (*J Hepatol*. 45, 2006)。アデノウイルスベクターを用いたNK4遺伝子導入は、現在NK4の開発者である金沢大学松本邦夫博士との共同研究により肝癌に対する治療のための基礎的研究を行っている。

効果判定 (岩崎・佐野): 関節炎モデルにおいて、1) 非治療群、2) NK4遺伝子治療 (静脈内投与) 群、の2群に分けて関節炎抑制効

果を判定する。効果の判定は、1) 関節腫脹スコア、2) 関節腫脹容積の測定、3) 病理組織学的解析、4) 組織サイトカイン遺伝子発現の解析にて判定する。これまで我々はラット関節炎モデルを用いて、種々の関節炎抑制物質の効果を検討してきた。そして、関節腫脹スコアや腫脹関節容積を定量的に解析することにより、より客観的・評価してきた。

#### 4. 研究成果

##### AdCMV. NK4 による NK4 タンパク発現

SKG マウスに AdCMV. NK4 (1 x 10<sup>9</sup> pfu) 静脈注射 1 日後の血中 NK4 濃度と肝臓組織における NK4 タンパクの発現を解析した。その結果、肝臓組織に NK4 タンパクが発現され、高濃度の NK4 タンパクが血中に検出された。

##### AdCMV. NK4 による関節炎抑制効果

SKG マウスに  $\beta$ -glucan laminarin (45 mg) を腹腔内投与し、関節炎を誘導した。 $\beta$ -glucan laminarin 投与と同時期に、AdCMV. NK4 (1 x 10<sup>9</sup> pfu)、コントロール処置として、AdCMV. LacZ (1 x 10<sup>9</sup> pfu)、経静脈投与し、関節炎スコア (0, 腫脹なし; 0.1, 1 足指関節腫脹; 0.5, 軽度の膝関節腫脹、1.0, 高度の膝関節腫脹) と膝関節腫脹容積の測定を施行した。その結果、AdCMV. NK4 投与により、有意に関節炎が抑制されることが明らかになった。

##### AdCMV. NK4 による関節組織への効果

関節炎誘導後 60 日の非治療 SKG マウスの関節組織は、マクロファージや好中球などの炎症性細胞浸潤と滑膜細胞増殖を認めたが、NK4 治療 SKG マウスの関節組織は、これらの病理組織学的変化は抑制されていた。関節炎誘導後 60 日の非治療 SKG マウスの関節 X 線所見では、骨破壊が顕著に認められたが、NK4

治療 SKG マウスでは、これらの変化は抑制されていた。これらの SKG マウス関節炎所見は NK4 投与により、有意に抑制されていることが明らかになった。

##### AdCMV. NK4 による関節組織の炎症性細胞浸潤、炎症性サイトカイン発現、RANKL 発現の抑制効果

関節炎誘導後 60 日の非治療 SKG マウスでは、関節組織の IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CD31、IL-17、RANKL が強発現していたが、NK4 治療 SKG マウスでは、これらの発現が抑制されていた。以上の実験結果より、NK4 は炎症性サイトカイン、血管新生、そして破骨細胞分化因子である RANKL 発現を抑制することが明らかになった。

##### NK4、HGF の CD4<sup>+</sup> T 細胞の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 産生への効果

マウス脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞 (4 x 10<sup>6</sup>/ml/well) を 20 Gy 照射 C57/BL6 (H-2<sup>b</sup>) マウス脾細胞 (1 x 10<sup>6</sup>/ml/well) で 72 時間培養後、抗 CD3 mAb (5  $\mu$ g/ml) で刺激し、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17 の産生能を測定した。その結果、HGF、NK4 共存下でこれらのサイトカイン産生が抑制されることが明らかになった。

##### NK4、HGF の滑膜細胞の IL-6、VEGF、bFGF 産生への効果

滑膜細胞株、MH7A 細胞 (2 x 10<sup>4</sup>) を 100 ng/ml TNF- $\alpha$  存在下で 72 h 培養し、VEGF、bFGF、IL-6 の産生能を測定した。その結果、NK4 は VEGF、bFGF の産生を有意に抑制することが明らかになった。

##### NK4、HGF の骨芽細胞分化への効果

筋芽細胞株、C2C12 細胞 (2 x 10<sup>4</sup>) を BMP-2 存在下で 5 日間 培養し、培養上清中

のオステオカルシンを測定し、骨芽細胞分化における HGF、NK4 の効果を検討した。その結果、NK4 は骨芽細胞分化を有意に促進することが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

① Tsunemi S, Iwasaki T, Kitano M, K. Matsumoto K, Sano H. Role of HGF-c-Met signaling pathways in synovial cells for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. European League Against Rheumatism (EULAR) June 24, 2011, London

② Tsunemi S, Iwasaki T, Kitano S, Sano H. HGF antagonist, NK4, inhibits Th1 immune response, RANKL expression on synovial fibroblasts. 第 39 回日本免疫学会総会、大阪 2009 年 12 月 3 日

③ Tsunemi S, Iwasaki T, Kitano S, Matsumoto K, Sano H. HGF antagonist, NK4, inhibits Th1 immune response, RANKL expression on synovial fibroblasts and enhances osteoblast generation. ACR/ARHP Scientific Meeting. September 20, 2009, Philadelphia.

④ 常見 幸、岩崎 剛、今戸健人、神田ちえり、北野幸恵、佐野 統 : HGF アンタゴニスト NK4 投与による SKG マウスにおける関節炎抑制機構の解析、第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会、品川、2009 年 4 月 23 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岩崎 剛 (IWASAKI TSUYOSHI)  
兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 1 0 1 5 1 7 2 1

##### (2) 研究分担者

佐野 統 (SANO HAJIME)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 0 0 1 9 6 3 0 4  
藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 9 0 1 9 9 3 7 3

##### (3) 連携研究者

松本 邦夫 (MATSUMOTO KUNIO)  
金沢大学・がん研究所・教授  
研究者番号 : 9 0 2 0 1 7 8 0