

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670262

研究課題名(和文) 異常増殖する滑膜細胞が構築する擬似血管を標的とした新規関節リウマチ治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the structuring of vasculogenic mimicry in rheumatoid arthritis synovium for novel therapy.

研究代表者

平田 圭一 (Hirata, Keiichi)

帝京大学・薬学部・助手

研究者番号：80424852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチでは、擬似血管の報告例はない。本研究では、関節リウマチの増殖滑膜に、がんと同様に、新生血管とは異なる、栄養や酸素の供給源として働く擬似血管が存在し、組織の増大や疾患の悪性度に大きく関与していると考えた。そこで、関節リウマチの新たな治療標的として、擬似血管に着目し、ヒトおよびマウスの増殖滑膜で擬似血管が構築されているか、組織学的に評価した。結果、関節リウマチの増殖滑膜に擬似血管が構築されていることが示唆される結果を得た。

研究成果の概要(英文)：The structuring of vasculogenic mimicry (VM) is unknown in rheumatoid arthritis synovium. I propose the hypothesis that VM participates in disease malignancy of rheumatoid arthritis as well as cancer malignancy. And then, I focus on VM in rheumatoid arthritis synovium as the novel therapeutic target for rheumatoid arthritis. I investigated whether VM was assembled in rheumatoid arthritis synovium. The results suggested that VM was assembled in rheumatoid arthritis synovium of both human and mouse.

研究分野：がん免疫

キーワード：擬似血管

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチの多くは、病理所見として、滑膜の異常増殖を伴う関節部位の腫脹および関節炎の憎悪と寛解を繰り返し、関節部位の軟骨および骨組織が破壊されることで、関節機能の喪失など転帰不良に至ることが知られている。その関節破壊の主な要因は、異常増殖する滑膜を構築する滑膜細胞に由来する破骨細胞誘導因子 (matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) や IL-6 など) が滑膜細胞より放出されることで、その影響を受けた破骨細胞が分化誘導されることや活性化された結果と考えられている。従って、関節リウマチに対する有用な治療戦略においては、破骨細胞誘導因子を産生する滑膜における滑膜細胞の異常増殖を阻害することが最も重要と考えられる。しかしながら、現在、臨床における関節リウマチで異常増殖する滑膜増殖阻害を作用機序とする治療法は確立されておらず、その開発は急務とされる。

異常増殖する滑膜では、組織の増大に伴い、盛んに増殖する滑膜細胞に栄養や酸素の供給源として、新たな供給路となる血管新生が誘導されることが知られている。その滑膜細胞は、血管新生により新たに構築された新生血管に依存している。そのことは、関節リウマチモデルマウスを用いた検討において、増殖滑膜部位の新生血管を標的とした、滑膜細胞への栄養や酸素の供給を絶つ、秤量攻めの作用機序による、新生血管阻害剤を用いた抗血管新生療法により、滑膜増殖を効果的に抑制できることが報告されていることから明らかである。また、以前に筆者らも、関節リウマチモデルマウスを用いて、滑膜の新生血管を標的とした抗新生血管療法の検討を行った。すなわち、マウス骨髄細胞から、GM-CSF により強力な抗原提示細胞である樹状細胞を分化誘導し、*in vitro* で調製したマウス新生血管モデルを抗原として、樹状細胞に作用させ、*ex vivo* の系でマウスに新生血管特異的な免疫を誘導させ、関節リウマチの発症を試みた。その結果、関節リウマチの発症を顕著に抑制できることを見出している。そして、さらに高い治療効果を得るためには、関節リウマチの滑膜部位において、血管新生が誘導される以前の、滑膜増殖開始点での滑膜細胞増殖を抑制することが重要であると考えた。

そこで筆者は、関節リウマチにおける抗新生血管療法の概念を提唱する源となった、がんに再び着目した。病巣組織の増大を特徴とする「がん」では、がんの増大に伴い、増殖するがん細胞が栄養や酸素不足となる。そこで、がんの増大や維持に、栄養や酸素の供給源となる新たな脈管形成が必須とされる。新たに構築される脈管の一つは、血管新生であるが、近年、血管内皮細胞より構築される新生血管とは異なり、がん細胞により構築された血管様構造の脈管として、Vasculogenic Mimicry (擬似血管) が報告された。擬似血

管は、血管新生が乏しいがん種において、本来がん内部に壊死が起こる大きさであっても、組織学的な評価において壊死が観察されないなど、新生血管に代わってがん細胞への栄養や酸素の供給源として、血管様の機能を有していることが示唆されている。また、新生血管が誘導される以前の、極めて初期のがん増大において、がん細胞の増殖や維持に重要な働きをしていると考えられている。

筆者は、関節リウマチの増殖滑膜において、がんと同様に、関節リウマチ滑膜部位の異常増殖初期に、血管新生が誘導されるよりも先に、滑膜細胞で構築される擬似血管が存在し、滑膜細胞へ栄養や酸素を供給することで、増殖や維持に重要な働きをしていると考えた。関節リウマチにおける擬似血管の存在を示唆する報告は全くされておらず、関節リウマチにおける擬似血管の存在を明らかにすることで、新たな知見を得ることが可能となる。さらに、関節リウマチ増殖滑膜の組織学的評価において、がんと同様に擬似血管の存在を見出すことで、関節リウマチの新たな治療ターゲットになり得ると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、関節リウマチに対する新規治療法の開発を最終的な目的とし、未だ報告例のない関節リウマチの増殖滑膜における、擬似血管の存在を明らかにすることが目的である。

臨床において、関節リウマチの多くは、主に関節の腫脹を伴う関節炎を症状とし、長期間にわたる関節炎の発症または寛解を繰り返すことで、最終的に非可逆的に関節破壊に至り転帰不良となることが知られている。したがって、非可逆的な関節部位の障害が生じる前に、骨破壊を阻害することが重要と考えられる。その骨破壊の誘導は、滑膜細胞が産生する MMP-3, IL-6, TNF- $\alpha$  などが破骨細胞を活性化することが要因と考えられている。関節リウマチは、長期間にわたる憎悪と寛解を繰り返すため、破骨細胞誘導因子が恒常的に産生されているとは限らない。その破骨細胞誘導因子は、通常の滑膜細胞ではなく、異常増殖する滑膜細胞からの産生であると考えられているため、治療時の副作用など、有害事象を考慮すると、破骨細胞誘導因子を産生する異常増殖する滑膜を抑制することが有用と考えられる。しかしながら、臨床においては、滑膜増殖を阻害する作用機序の治療法は確立されていない。関節リウマチモデルマウスにおいては、抗血管新生療法において、抗関節リウマチ効果が得られることが報告されている。それは、増殖滑膜の抑制には、栄養や酸素の供給を阻害することが効果的であることを示すものである。しかし、近年、関節リウマチ同様に血管新生が誘導され病巣組織の増大が観察されるがんにおいて、新生血管とはことなる栄養や酸素の供給源となる脈管の形成について報告された。その脈

管が擬似血管であり、血管内皮細胞でなく、がん細胞より構築された血管様構造であることが示唆されている。擬似血管は単なる新生血管に付随した血管様構造ではないと考えられる。例えば、ヒトのがんにおいては、擬似血管の形成が可能ながんと形成不可能ながんの間では、擬似血管を形成するがんで優位に生存率が低下する報告がある。また、血管が乏しい眼球内で発症したがんにおいて、本来血管新生が誘導されているにも関わらず、がん内部に壊死が観察される大きさまで増大したがんの組織学的評価では、擬似血管が形成されることで、壊死がほとんど観察されないなど、増大する組織内の細胞において、その生存に大きく関与している結果も報告されている。そこで筆者は、関節リウマチで増大する滑膜に、擬似血管が存在する場合、がんと同様に病状の進行や悪性度に大きく関与すると推察した。すなわち、滑膜が異常に増殖することで、滑膜組織内は低栄養および低酸素状態となるが、擬似血管が構築されていると、血管新生が誘導され既存血管から滑膜内部に伸長する前であっても、栄養や酸素が供給されて、滑膜細胞の増殖は継続すると考えられる。さらに、増殖した滑膜細胞からは、血管新生を誘導する作用もある TNF- $\alpha$  が産生されるため、後の血管新生を促進すると考えられる。したがって、滑膜増殖初期に擬似血管を阻害し抑制する抗擬似血管療法が、滑膜異常増殖を間接的に顕著に抑制すると考えられる。(図1)

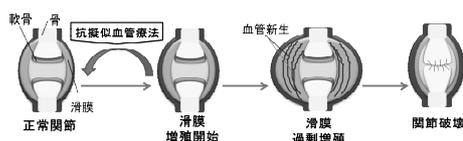


図1 関節リウマチの進行と抗擬似血管療法

したがって、未だ報告例のない、関節リウマチの滑膜細胞により構築される擬似血管の形成について、組織学的方法で、その存在を評価することが重要と考え検討を試みた。

### 3. 研究の方法

#### 1) ヒト関節リウマチ滑膜における擬似血管の組織学的評価

ヒト関節リウマチの滑膜またはヒト正常滑膜を用いて、擬似血管を組織学的評価する(検体は、個人情報および人権が保護されており、また倫理規定に従い提供された組織を入手し実験に供した。)擬似血管の報告されているがんでは、過ヨウ素酸シッフ染色(PAS染色)でがん組織の擬似血管が選択的に染色されることが知られている。そこで、関節リウマチ患者の滑膜について PAS 染色を行った。まず、10%ホルマリン中性緩衝液で固定した後に、コンパウンドで凍結包埋した。クリオスタットで薄切した組織を、PAS 染色した。陰性対照として、正常滑膜を同様の方法

で染色した。染色後、検体は光学顕微鏡で検鏡して評価した。

また、血管内細胞のマーカー分子である CD31 に対する、免疫染色を行い、血管についても組織学的に評価した。PAS 染色の検体と同様の検体を用いて、PAS 染色の切片と連続切片となるような組織切片を調製した。免疫染色は、抗ヒト CD31 抗体を 1 次抗体で使用し、2 次抗体には、Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 で蛍光標識された抗体を使用した。評価は、蛍光顕微鏡を用いて検鏡した。

#### 2) マウス関節リウマチ滑膜における擬似血管の組織学的評価

関節リウマチモデルマウスを作成し、四肢関節部位の擬似血管形成について、PAS 染色により組織学的に評価した。まず、2 型コラーゲン誘導関節炎モデルマウスを作製した。関節炎の誘導は、2 型コラーゲンを合計 2 回マウスにフロイントアジュバントを用いて投与することで行った。関節炎の発症がピークとなった個体から、関節部位を採取した。採取した関節は、10%ホルマリン溶液で固定した後、5%ギ酸溶液で脱灰した。脱灰した検体は、コンパウンドに凍結包埋し、クリオスタットで薄切することで組織切片を作製した。作製した組織切片を、PAS 染色し、検鏡することで、擬似血管を組織学的に評価した。

#### 3) がん細胞を用いた擬似血管解析ツールを目的とした新規 *in vitro* 擬似血管モデルの開発

がんを含めた擬似血管研究は、未だ不明な点も多く、擬似血管特異的な分子マーカーは知られていない。そのため、擬似血管構成細胞の解析は困難な状況であり、擬似血管研究の進展は乏しい。特に、関節リウマチの擬似血管に関する報告はなく、関節リウマチの擬似血管を解析し、治療戦略に適用することは極めて困難である。そのため、関節リウマチの擬似血管構成細胞を単離し、解析する必要があると考えた。しかし、関節リウマチモデルマウスの腫脹が観察される関節部位において、滑膜細胞の初代培養法は確立されていない。そのため、関節の滑膜細胞を採取し、滑膜の擬似血管構成細胞に対する特異的な分子マーカーを探索することは非常に困難である。そこで、*in vitro* 擬似血管モデルの作製方法が報告されているがん細胞に解決の糸口を見出した。現在、一般的に検討されているがん細胞で構築する *in vitro* 擬似血管モデルでは、擬似血管特異的な分子マーカーは同定されていない。その問題点は、既存の *in vitro* 擬似血管モデルにあると考えた。その理由として、既存の *in vitro* 擬似血管モデルは、*in vivo* の擬似血管形成能と相関を示さない点にある。そこで、その問題点を改善し、擬似血管特異的な分子マーカー探索の解析ツールとなる、がん細胞を用いた新規 *in vitro* 擬似血管モデルを開発した。その擬似血管解析モデルより、擬似血管特異的な分子マーカーを同定することで、関節リウマチの擬

似血管解析に応用することが可能と考えた。方法は、一般的に報告されている擬似血管作製方法である、マウス基底膜抽出物で調製したゲル上に、がん細胞を播種して管腔を形成させる、ゲル上培養法を改良した方法を用いた。新規モデルは、がん細胞とマウス基底膜抽出物を混和し、ゲル中でがん細胞を管腔形成させるゲル包埋培養法を用いた。がん細胞をゲルに包埋後、24時間培養し、検鏡にて管腔形成について評価した。

#### 4. 研究成果

##### 1) ヒト関節リウマチ滑膜における擬似血管の組織学的評価

以前の検討では、ヒト関節リウマチの滑膜組織において、PAS染色による組織学的な評価より、擬似血管形成を示唆する結果を得ていた。本検討において、同様にヒト関節リウマチの滑膜組織切片において、PAS染色を行った結果、陽性を示した。また、正常滑膜組織においても、一部陽性部位が観察されたが、抗CD31抗体による連続切片の免疫染色により、CD31が陽性を示したことで、正常組織のPAS染色部位は血管内皮細胞で構成された血管であることが示された。対して、ヒト関節リウマチの滑膜におけるPAS陽性部位では、CD31が陰性であったため、ヒト関節リウマチのPAS染色陽性部位は、血管内皮細胞とは異なる細胞で構築されていることが示された。すなわち、ヒト関節リウマチにおいて、擬似血管の存在が示された。

##### 2) マウス関節リウマチ滑膜における擬似血管の組織学的評価

関節リウマチモデルマウスの関節炎を発症している関節部位を採取し、PAS染色により組織学的な評価を行った結果、滑膜部位にPAS陽性部位が観察された。対して、正常マウスの滑膜では、PAS染色は陰性を示した。このことは、関節炎モデルマウスにおいても、ヒトと同様に、増殖滑膜部位で擬似血管の構築を示す結果となった。

##### 3) がん細胞を用いた擬似血管解析ツールを目的とした新規 *in vitro* 擬似血管モデルの開発

一般的なゲル上培養法で作製される *in vitro* 擬似血管モデルの問題点を改善する目的で考案した、ゲル包埋培養を用いた新規 *in vitro* 擬似血管モデルは、三次元に管腔のネットワークを形成した。また、その擬似血管モデルは、*in vivo* の擬似血管形成能と相関を示した。

以上の検討から、擬似血管に陽性を示すPAS染色の組織学的な評価により、関節リウマチでは未だ報告例のなかった、擬似血管の存在を示唆する新たな知見を得ることができた。今後は、がん細胞の擬似血管モデルなども利用し、擬似血管を解析することで、関節リウマチの新規治療戦略につながる、擬似血管研究の進展を期待する。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

1) がん擬似血管構成細胞の機能解析を目的とした新規 *in vitro* がん擬似血管再構築モデルの開発, 滝本大輔, 平田圭一, 乙黒咲, 石井晶子, 野村 鉄也, 宇都口直樹, 第58回 日本薬学会関東支部大会, 平成26年10月4日, 神奈川県

2) がん擬似血管機能解析ツール開発における新規 *in vitro* 再構築モデルの検討, 石井晶子, 平田圭一, 野村鉄也, 滝本大輔, 宇都口直樹, 日本薬学会 第135年会, 平成27年3月26-28日, 神戸市

3) 擬似血管機能解析を目的とした新規 *in vitro* がん擬似血管モデルの開発, 喜安 望, 平田圭一, 野村鉄也, 松浦将司, 宇都口直樹, 日本薬学会 第136年会, 平成28年3月27日, 横浜市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平田圭一 (Keiichi Hirata)

帝京大学 薬学部 助手

研究者番号: 80424852