

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461472

研究課題名(和文)血管新生阻害による関節リウマチの新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment of rheumatoid arthritis by inhibition of angiogenesis

研究代表者

野沢 和久 (NOZAWA, Kazuhisa)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30398680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、すでに間質性肺炎の治療薬として治験中であり、直接、臨床応用可能な抗 human CTGF抗体をRAモデルマウスであるCIAマウスに投与して関節炎の抑制効果を調べた。本実験に用いた抗体はマウスCTGFと交差反応性を持ち、この抗体をCIAモデルマウスに投与する事で関節炎の抑制効果が認められる事を発見した。さらにHUVECを用いたin vitroの実験系においてCTGFは血管新生作用を有する事も確認した。滑膜組織の血管新生はRA発症の重要な因子のひとつであるが、生物学的製剤によるCTGF阻害は、新しい機序でRAに対して治療効果を発揮する可能性が高く、新規治療の標的分子として重要である。

研究成果の概要(英文)：We found that treatment with anti-CTGF antibodies, which have been already used for clinical trials for patients with pulmonary fibrosis and are ready for clinical trial for patients with rheumatoid arthritis (RA), prevented the development of arthritis in collagen induced arthritis (CIA) mice in vivo. Moreover, we found that CTGF promoted angiogenesis to human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) in vitro. Although angiogenesis is one of important factors for pathogenesis of RA, biologics for direct inhibition of angiogenesis is not available for the treatment of RA. Therefore, CTGF is involved in the important therapeutic target of RA and the treatment with biologics aiming inhibition of CTGF pathway can be considered as a useful treatment of RA.

研究分野：リウマチ膠原病内科額

キーワード：CTGF 関節リウマチ 血管新生 生物学的製剤

1. 研究開始当初の背景

最近、関節リウマチ (RA) の治療はめざましい進歩をとげており、その最大の要因は生物学的製剤の登場である。他の抗リウマチ剤と比較してこの生物学的製剤の大きな特徴はその優れた関節炎抑制効果にあるが、既存の生物学的製剤 (+ MTX) を使用しても全ての RA 患者に治療目標の寛解または低疾患活動性を達成出来ず、約 30% 程度の患者は既存の治療だけでは RA をコントロールする事が不可能であり新規治療法の開発が必要である。加えて RA には間質性肺炎、心血管病変などの関節外病変を認める事が多くこれらの関節外病変の有無にて患者の生命予後が左右される。既存の生物学的製剤ではこれら関節外病変に対する効果は明確でないので、RA の関節病変と関節外病変の両者を抑制出来る治療法が開発される事が、理想的な治療といえる。そこで我々は今まで行ってきた一連の研究により、RA の病態形成に深く関与する分子として CTGF の存在に注目し、CTGF が新規生物学的製剤の治療標的分子になると考えた事が本研究を立案するに至った背景である。

2. 研究の目的

CTGF は multiple functional なサイトカインであり、複数の受容体と結合する事が知られており標的細胞の違いにより様々な機能を持つ事が知られている。我々は、以前の研究にてヒト滑膜組織及び血清中に CTGF が過剰発現し、関節リウマチの病態形成に深く関与している事をつきとめた。(Nozawa et al, Arthritis Res Ther. 2009; 11:R174) さらに、我々は RA モデルマウスである Collagen induced arthritis (CIA) の実験系を用いて、抗 CTGF 抗体による CTGF 阻害が Th-17 誘導や関節炎を抑制する事も報告している (Nozawa et al, Arthritis Rheum. 2013 Jun; 65:1477-86.) この事は CTGF が RA 患者の新規の治療標的

分子になりうる可能性を示唆している。しかしながら、我々が以前に invitro で使用した抗体や CIA マウスに投与した抗体は、そのままヒトに転用する事は出来ないため、ヒトに投与可能な抗体の開発が最大の問題である。この問題に関しては、すでに間質性肺炎の治療薬としてヒトにも臨床的に使用可能な別の抗 human CTGF 抗体がすでに開発されて現在治験中の状態である。我々は抗 human CTGF 抗体リウマチがマウス CTGF と交差反応性を持つ事を確認しているため (引用文献 2) この抗 CTGF 抗体を RA モデルマウスに投与して関節炎抑制効果を明らかに出来れば、将来的に抗 CTGF 抗体が RA 患者の新規治療法に臨床応用可能になり得る。さらに CTGF は血管新生作用を持つことが報告されている。血管新生は RA 発症の重要な因子のひとつであるが、直接的に血管新生阻害を治療目標とする既存の生物学的製剤は存在せず、この点においても従来の生物学的製剤とは別の新しい機序で治療効果を発揮する可能性が高く、新規治療の標的分子として重要であると考えられる。そこで、この抗 CTGF 抗体を入手して関節リウマチモデルマウスに投与してその関節炎抑制効果に対する有効性を確認する。さらに、CTGF による血管新生作用についても明らかにする。

3. 研究の方法

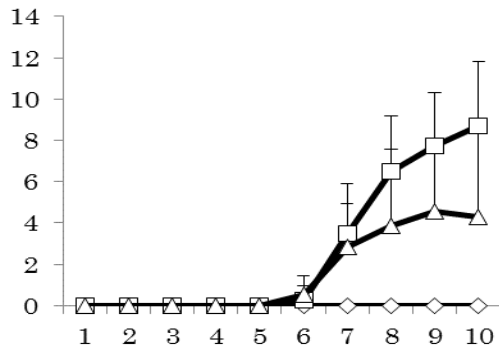
(1) 関節リウマチモデルマウス (CIA マウス) にマウス CTGF と交差反応性を持つ抗 human CTGF 抗体を投与して、関節炎の阻害効果について調べる。

(2) ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて CTGF が血管新生作用を有するかを調べる。

(3) CTGF の血管新生作用についての詳細な機序について解析する。

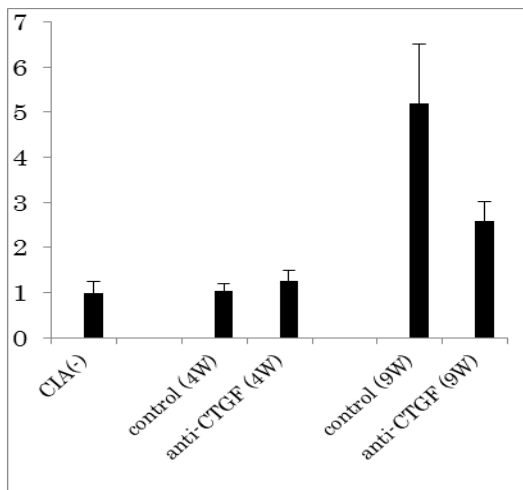
4. 研究成果

(1)



(縦軸：関節炎点数、横軸：関節炎誘導後週数、□:Control Ig 投与群、△:抗 CTGF 抗体投与群、◇:関節炎誘導なし)

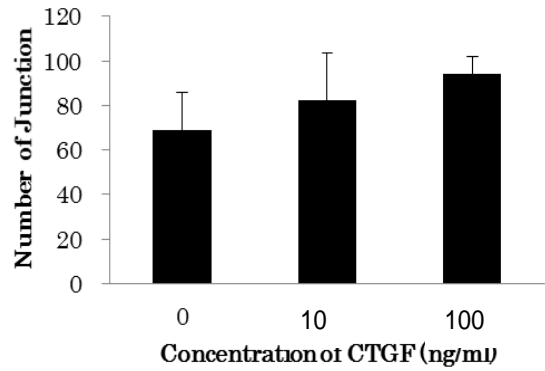
上記は CIA マウスに抗 CTGF 抗体および control Ig を投与して関節炎抑制効果を見たものである。Control Ig 投与群では関節炎誘導後 5 週くらいから関節炎を発症し、その後 10 週にかけて関節炎は悪化していくのに対して、抗 CTGF 抗体投与群は関節炎誘導後 8 週後より有意差をもって関節炎点数を減少させ、関節炎抑制効果を有する事を確認した。



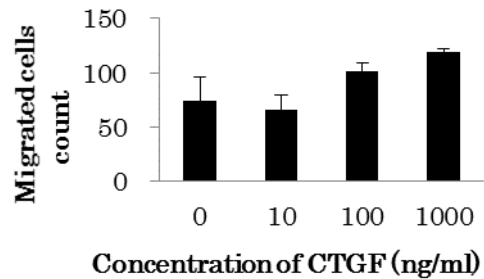
(縦軸：血清中 MMP-3 濃度 ng/ml)

上記は関節炎程度の有用な指標である血清中の MMP-3 の濃度について比較した物である。上記の関節炎点数の減少に加えて、血清中 MMP-3 に関して、抗 CTGF 抗体投与群は Control Ig 投与群に比べて優位に MMP-3 の産生を抑制していることが確認された。

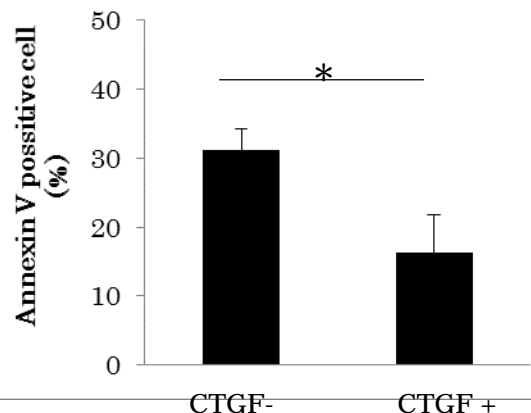
(2)



上記は、HUVEC の通常培養条件下に CTGF を加えて、CTGF の血管新生作用について tube formation 法で調べた結果である。CTGF 添加において、有意に新生血管の junction 数が増加している事が示された。

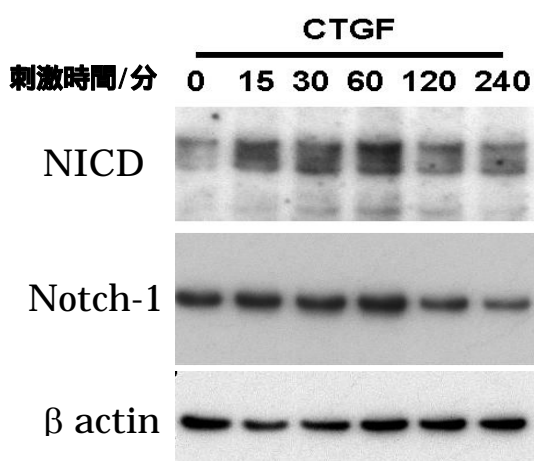


新生血管には、血管新生増加のみならず面積を拡大するため血管内皮細胞の局所への移動が必要である。上記は、HUVEC における CTGF の遊走能について Boyden-Chamber 法にて測定して結果である。CTGF 濃度依存的に化学遊走する細胞数が増加しており、CTGF はケモカイン活性を持ち血管内皮細胞を局所へ引き寄せて血管新生を増強させる作用を有する事が示された。



さらに、上図は HUVEC における CTGF の抗アポトーシス作用をフローサイトメトリーにて解析した物である。増殖因子の枯渇によるアポトーシスの誘導系において CTGF 添加によりアポトーシス細胞数の減少 (Annexin V 陽性細胞) が認められ CTGF の抗アポトーシス作用が確認された。上記の一連の研究結果は、CTGF は血管内皮細胞に対して、血管新生、化学遊走、抗アポトーシス作用を有して関節リウマチ患者活膜における血管新生に深く寄与していることを示唆している。

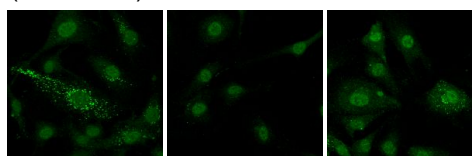
(3)



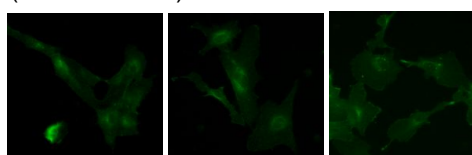
Notch-1 は血管内皮細胞をはじめとして様々な細胞の表面に発現して、そのリガンドとの結合を介して血管新生作用などに関与する分子である。興味深い事に Notch-1 は関節リウマチの病態において血管新生に関与する分子として報告されており (Gao et al. Ann Rheum Dis 2013;72;1080-1088)、関節リウマチの新規の治療標的として注目されている。そこで、CTGF と Notch-1 作用の関連について着目して解析を進めた。上図は HUVEC の培養系に CTGF を添加して Notch-1 の活性化が起るかどうかにについて免疫プロット法にて解析したものである。CTGF 添加 15 分後より Notch-1 が活性化した際に検出される Notch1 intracellular domain (NICD) の発現が CTGF 添加前と比べて発現が増強しており、CTGF による Notch-1 の活性化を確認する事ができた。

さらに CTGF による Notch-1 の活性化作用について、免疫蛍光染色による解析を施行した。

(NICD 染色)



(Notch-1 染色)



Control CTGF CTGF+DAPT

上図は HUVEC の Notch-1 および NICD の細胞内の分布に関して、免疫蛍光染色を用いて解析した物である。NICD は CTGF 刺激の無い状態の細胞 (Control) は細胞質内に均一に点在しているが、CTGF 刺激により細胞室内に点在していた NICD の消失を認め、このことは CTGF 刺激により細胞内の NICD は核内に移動して転写因子として作用して Notch-1 刺激に関わる様々な分子の発現を調整する結果であると思われる。この CTGF の作用は Notch-1 の活性化を特異的に阻害する DAPT の添加より消失する事、さらに、この現象は活性化されていない通常型の Notch-1 にはみとめられない事より、CTGF は直接的に Notch-1 を活性化させる事が確認された。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Nozawa K, Fujishiro M, Takasaki Y, Sekigawa I. Inhibition of rheumatoid arthritis by blocking connective tissue growth factor. World J Orthop. 査読有 2014Nov18;5(5):653-9.doi:10.5312/wjo.v5.i5.653. eCollection 2014 Nov 18. PubMed PMID: 25405094; PubMed Central PMCID: PMC4133473.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 日本リウマチ学会総会学術集会 (第 58 回) 平成 26 年 4 月 東京
2. 日本リウマチ学会総会学術集会 (第 59 回) 平成 27 年 4 月 名古屋
3. 米国リウマチ学会 2014 年 11 月 米国 ボストン
4. 米国リウマチ学会 2015 年 11 月 米国 サンフランシスコ
5. 米国リウマチ学会 2016 年 11 月 米国 ワシントン D C

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野澤和久 (NOZAWA, Kazuhisa)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 30398680

(2) 研究協力者

蛭間香織 (HIRUMA, Kaori)
順天堂大学・医学部・
大学院生(膠原病内科学講座)

松木祐子 (MATSUKI, Yuko)
順天堂大学・医学部・
大学院生(膠原病内科学講座)

梶原真央 (KAJIWARA, Mao)
順天堂大学・医学部・
実験助手(膠原病内科学講座)