

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20068

研究課題名(和文)変形性関節症に伴う関節破壊および疼痛に対するVEGF受容体阻害薬の効果検証

研究課題名(英文)Anti-VEGF therapy for osteoarthritis and the related pain

研究代表者

長尾 雅史(Nagao, Masashi)

順天堂大学・革新的医療技術開発研究センター・講師

研究者番号：50384110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変マウスの研究から、成長段階においてVEGFは軟骨細胞の生存因子として機能することが明らかとなった。一方、外傷性変形性関節症(OA)モデルを用いた研究の結果、OAに対してVEGF促進的に働き、成長段階は異なることが明らかとなった。抗VEGF抗体の関節内投与ではOA進行の抑制効果が見られ、2型VEGF受容体のリン酸化が抑制されたことからOAにおけるVEGFシグナルは2型VEGF受容体を介す可能性が示唆された。2型VEGF受容体阻害薬の経口投与によりOA進行の抑制効果が見られたが、抗VEGF抗体関節内投与と比べ、その効果は少なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症(OA)は関節軟骨の変性と摩耗を経て、関節の変形をきたす疾患である。様々なOA発症の分子機構への理解が深まっているが、現在用いられる薬剤は消炎鎮痛を目的とするものであり、OA進行の抑制あるいは改善をもたらす治療薬の開発が期待されている。本研究を通じて、マウスモデルにおいて、VEGFは膝OAの進行に促進的に働き、抗VEGFの抗体やVEGF阻害薬の投与により膝OAの進行を抑制することが可能であった。今後ヒトにおける膝OAの治療法の候補となりえると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previous study indicate that vascular endothelial growth factor A (VEGF) is associated with osteoarthritis (OA). In this study, we find that VEGF acts as a survival factor in growth plate chondrocytes during development but only up until a few weeks after birth in mice. It is also required for postnatal differentiation of articular chondrocytes and the timely ossification of bones in joint regions. In surgically induced knee OA in mice, a model of post-traumatic OA in humans, increased expression of VEGF is associated with catabolic processes in chondrocytes and synovial cells. Conditional knock-down of Vegf attenuates induced OA. Intra-articular anti-VEGF antibodies suppress OA progression, reduce levels of phosphorylated VEGFR2 in articular chondrocytes and synovial cells and reduce levels of phosphorylated VEGFR1 in dorsal root ganglia. Finally, oral administration of the VEGFR2 kinase inhibitor Vandetanib attenuates OA progression.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：変形性膝関節症 血管因子増殖因子 軟骨代謝

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は関節軟骨の変性と摩耗を経て、関節の変形をきたす疾患である。様々な滑膜関節に発症するが、中でも手指の関節、股関節そして膝関節に多い。変形性膝関節症(膝OA)では軟骨下骨や半月板、滑膜などにも変化が起こり、膝の可動域制限や運動時の疼痛により日常生活動作が著しく低下する。細胞老化、骨棘形成などの内軟骨骨化、アポトーシス、軟骨下骨の骨代謝回転異常などのOA発症の分子機構への理解が深まっているが、現在のOA保存療法に用いられる薬剤は消炎鎮痛を目的とするものであり、OA進行の抑制あるいは改善をもたらす治療薬、**DMOADs(Disease Modifying OA Drugs)**の開発が期待されていた。

<血管内皮増殖因子 VEGF>

VEGFファミリーは**VEGF-A, -B, -C, -D**の4つの糖蛋白から構成され、中でも**VEGF-A**は、最も広く研究されていることから、しばしば**VEGF**と称される。**VEGF**は多種多様な細胞に作用し、様々な機能を有する。代表的なものとしては血管新生や単球の走化性促進、血管の透過性亢進、血管拡張作用が挙げられる。胎生期において**VEGF**は広範囲に発現し、骨形成の重要なメディエーターである。成人においては、創傷治癒や骨折後の骨リモデリングプロセスにおける血管新生等に役割を果たしている(1)。

<変形関節症と VEGF>

ゲノム連鎖解析(**GWAS**)のメタ解析により、**VEGF**は**XI型コラーゲン**、**GDF-5**と並びOAの感受性遺伝子であることが示されていた(2)。成人の正常膝関節において、**VEGF**の発現は抑制されている一方、末期OAでは関節軟骨や滑膜、関節液、軟骨下骨、血清にて発現上昇が観察されている。**VEGF**受容体である**VEGFR-1**と**VEGFR-2**は正常関節軟骨には発現しないが、OA関節軟骨にて発現する(3)。関節液中の**VEGF**レベルは疾患重症度だけでなく、疼痛とも相関していることも示されていた。さらには実験動物への抗**VEGF**抗体(**VEGFab**)投与により関節軟骨変性および疼痛が抑制されることが先行研究によって示されていた(4)。**VEGF**には3つの受容体(**VEGFR1, R2, R3**)があり、中でも**VEGFR2**は**VEGF**シグナルトランスダクションに最も重要である。生理的な状態にある軟骨細胞では**VEGFR2**はほとんど発現していないが、OA進行と共にその発現が上昇する。そのため、OA進行における**VEGF**シグナルは、**VEGF**受容体を介する可能性が考えられていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は**VEGF**シグナル抑制が関節破壊と関節痛の軽減をもたらすかどうかについて、マウスモデルを用いて検討し、**VEGF**受容体阻害薬を用いた臨床応用へ展開するための基盤となる研究を行うことである。

3. 研究の方法

VEGF欠失マウス及び表現型の確認

膝関節における**VEGF**の機能を観察するにあたり、軟骨系譜細胞で**VEGF**を欠失したマウス(*Col2-Cre;Vegf^{fl/fl}*)を作成した。本マウスは成長段階で骨格の形成異常が見られたため、ヘテロ欠失マウス(*Col2-Cre;Vegf^{fl/+}*)も同時に解析をおこなった。また、対象となる**VEGF**を欠失した細胞を限定するために、タモキシフェン誘導性Creマウス(*Col2Cre-ER;Vegf^{fl/fl}*)及び血管内皮細胞系譜で**VEGF**を欠失したマウス(*Fli1-Cre;Vegf^{fl/fl}*)を用いた。

VEGF欠失マウスOAモデルによるOA抑制効果の検証

上記マウスに外科手術(DMM)によるOAを作成した。DMMはヒトOAに近い緩徐なOAを誘導できるOAモデルである。8-9週齢マウスにDMMを施し、8-12週後に解析を行った。組織染色標本作製後、OARSIスコアによりOA重症度を評価し、蛍光免疫組織染色により血管新生や軟骨変性、疼痛関連分子の発現定量を行った。

抗VEGF抗体投与によるOA抑制および疼痛軽減効果の検証

抗**VEGF**抗体はヒトでは黄斑変性症の治療などに使われている。本研究ではDMM手術を施し、1週間後より4週間関節内投与を行なった。経時的に疼痛評価及び体重測定を行ない、手術12週後に解析を行った。組織染色標本作成後、OARSIスコアを用いてOA重症度を評価した。蛍光免疫組織染色による血管新生や軟骨変性、関連分子の発現定量も行なった。

VEGF受容体阻害薬投与によるOA抑制および疼痛軽減効果の検証

ZD6474/Vandetanib(VEGF-receptor 2/3チロシンキナーゼ阻害薬)は経口投与が可能な分子標的薬で、ヒトでは抗腫瘍薬として承認されている**VEGF**受容体阻害薬である。

マウスにDMM手術を施し、1週間後より4週間経口投与を行なった。経時的に疼痛評価及び体重測定を行ない、DMM手術12週後に解析を行った。組織染色標本作成後、OARSIスコアを用いてOA重症度を評価した。蛍光免疫組織染色による血管新生や軟骨変性、腰関連分子の発現定量を行なった。

4. 研究成果

VEGF欠失マウスに対する外科的OAモデルによるOA抑制効果

軟骨系譜細胞で**VEGF**を欠失したマウス *Col2-Cre;Vegf^{fl/fl}*(*CKO^{Col2}*)はコントロール(*Col2-Cre*)比較して成

獣でも小さく、内軟骨骨化の遅延がみられた(図1)。8週齢においても脛骨の二次骨化の遅延が著明であり、関節軟骨の低形成に加え、配列も不均一であった。成長軟骨の一部には軟骨細胞のアポトーシスが見られたことから、VEGFは成長軟骨の生存因子として機能することが明らかとなった。一方ヘテロ欠失マウス(*Col2-Cre; Vegf^{f1/+}*)は野生型マウスと比較して形態学的な相違はなかった。

そのため、*Col2-Cre; Vegf^{f1/+}*とコントロールにDMM手術を施し、解析を行った。8週および12週後のOAスコアはヘテロ欠失マウスで低かった。

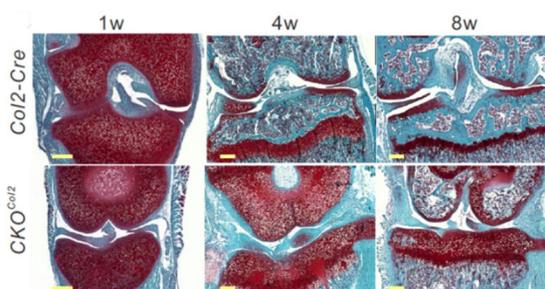


図 1

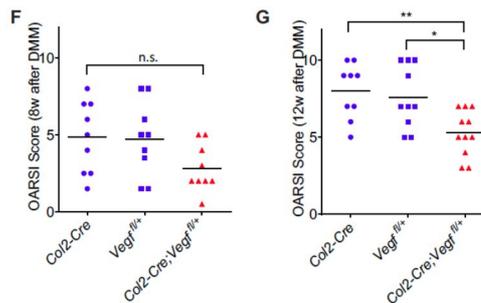


図 2

上記研究より、VEGFはOAの増悪因子であることが明らかとなった。しかし、VEGFを発現する細胞が骨、軟骨、滑膜、靭帯など多岐にわたることから、どの細胞による寄与が大きいのか評価する必要があった。そのため、主に軟骨細胞でのVEGFを欠失する*Col2-CreER; Vegf^{f1/f1}*マウス(*CKO^{Col2ER}*)及び主に血管内皮細胞でVEGFを欠失する*Fli1-Cre; Vegf^{f1/f1}*マウスを用いることとした。本マウスおよびコントロールにDMM手術を施し、同様の評価を行ったが、OA進行に対する抑制効果はなかった。この結果から、軟骨や血管内皮細胞に限定したVEGF抑制はOA進行抑制効果が得られないと考えられた。

抗VEGF抗体投与によるOA抑制および疼痛軽減効果の検証

上記結果から、VEGF抑制によるOA進行抑制効果を得るためには、膝関節の幅広い組織を対象とする必要がある可能性が示唆された。そこで主に関節内に分泌されたVEGFを中和抗体によって抑制することにより、OA進行抑制効果が得られるかを検討した。

DMM手術あるいは偽手術が施された野生型マウスに、中和抗体あるいはPBSを投与して比較した。中和抗体は週1回計4回ほど膝関節に注射投与された。その結果、コントロールと比較して、OA進行が抑制されていた。また、抗体を投与されたマウスの関節軟骨ではリン酸化された2型VEGF受容体の発現が低下していたことから、抗VEGF抗体によるOA抑制作用は2型VEGF受容体を介している可能性が示唆された。

本研究において抗VEGF抗体投与による疼痛改善効果についても検討を行った。

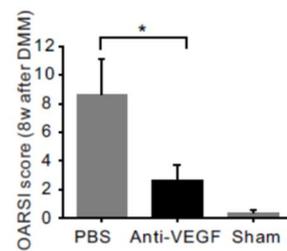


図 3

VEGF受容体阻害薬投与によるOA抑制および疼痛軽減効果の検証

上記結果により、抗VEGFシグナルによるOA抑制効果は、2型VEGF受容体を介する可能性が示唆されたことから、2型VEGF受容体阻害薬により、OA進行を抑制することができるかどうかを実験を行った。

マウスにDMM手術あるいは偽手術を施し、1週間後より4週間経口投与(50mg/kg/day、週5回)を行なった。経時的に疼痛評価及び体重測定を行ない、DMM手術12週後に解析を行った。その結果、阻害剤投与群では体重減少が見られたため、安全性上の問題があると判断し、50mg/kg/dayを週3日減量した。その結果、体重減少は見られなかったことから、この用量にて実験を行った。その結果、VEGF受容体阻害薬投与群でコントロールと比較してOA進行が抑制されていた。

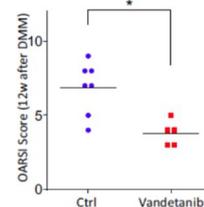
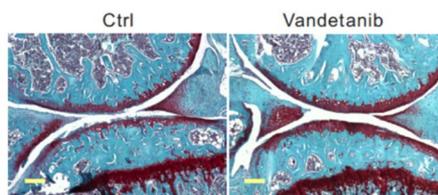


図 4

以上の結果より、VEGFはOAに促進的に機能している事が明らかとなった。また、幅広い間葉系細胞を対象としたVEGFの抑制はOA進行抑制に有用であったが、軟骨や血管内皮由来細胞をターゲットとしたVEGF抑制はOA進行抑制に十分な効果は上げられなかった。抗VEGF抗体の関節内投与はOA進行抑制のみならず、アロデ

インシアも抑制したことから、疼痛増悪抑制についても一定の効果があると考えられた。最後に VEGF のシグナルトランスダクションに関わる主な受容体である VEGFR2 を標的とした研究では、VEGFR2 阻害薬の経口投与により、一定の OA 進行抑制効果が得られたが、抗 VEGF 抗体の関節内投与に比して効果が劣るという結果であった。以上より、OA に対する抗 VEGF 治療は関節内組織を直接ターゲットとする抗 VEGF 抗体の関節内投与が現時点で有力であるが、今後ヒトを対象とした臨床試験の結果が待たれる。

1. Zelzer E, Olsen BR. Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Curr Top Dev Biol.* 2005;65:169-87.
2. Rodriguez-Fontenla C, Calaza M, Evangelou E, Valdes AM, Arden N, Blanco FJ, et al. Assessment of osteoarthritis candidate genes in a meta-analysis of nine genome-wide association studies. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(4):940-9.
3. Enomoto H, Inoki I, Komiya K, Shiomi T, Ikeda E, Obata K, et al. Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol.* 2003;162(1):171-81.
4. Nagai T, Sato M, Kobayashi M, Yokoyama M, Tani Y, Mochida J. Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, inhibits osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(5):427.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 石島 旨章, 金子 晴香, 清村 幸雄, 劉 立足, 有田 均, 羽田 晋之介, 青木 孝子, 西尾 啓史, 塩澤 淳, 根岸 義文, 百枝 雅裕, 長尾 雅史, 永山 正隆, 斎田 良知, 高澤 祐治, 池田 浩, 岡田 保典, 黒澤 尚, 金子 和夫	4. 巻 17
2. 論文標題 変形性膝関節症の運動療法 その意義と実際	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ペインクリニック	6. 最初と最後の頁 326-332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石島 旨章, 羽田 晋之介, 金子 晴香, 劉 立足, 青木 孝子, 根岸 義文, 百枝 雅裕, 久保田 光昭, 長尾 雅史, 斎田 良知, 高澤 祐治, 池田 浩, 岡田 保典, 金子 和夫	4. 巻 32
2. 論文標題 【変形性膝関節症の早期病変の診断から治療まで】 早期OAの病態 早期膝OAの臨床病態 軟骨成分を加味した骨棘と半月板逸脱の関連	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 THE BONE	6. 最初と最後の頁 45-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagao Masashi, Hamilton John L., Kc Ranjan, Berendsen Agnes D., Duan Xuchen, Cheong Chan Wook, Li Xin, Im Hee-Jeong, Olsen Bjorn R.	4. 巻 7
2. 論文標題 Vascular Endothelial Growth Factor in Cartilage Development and Osteoarthritis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-13417-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagao M, Ishijima M, Kaneko H, Takazawa Y, Ikeda H, Kaneko K.	4. 巻 1
2. 論文標題 Physical activity for knee osteoarthritis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Calcium	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) CliCa17012530	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamilton JL, Nagao M, Levine BR, Chen D, Olsen BR, Im HJ	4. 巻 5
2. 論文標題 Targeting VEGF and Its Receptors for the Treatment of Osteoarthritis and Associated Pain	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Bone Miner Res	6. 最初と最後の頁 911-924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.2828	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 石島 旨章(順天堂大学 大学院医学研究科整形外科・運動器医学), 金子 晴香, 羽田 晋之介, 劉 立足, アヌワル・ジャン・ユユブ, 清村 幸雄, 木下 真由子, 有田 均, 塩澤 淳, 青木 孝子, 長尾 雅史, 高澤 祐治, 池田 浩, 岡田 保典, 金子 和夫	4. 巻 56
2. 論文標題 変形性膝関節症の疼痛と関連する病態	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 リウマチ科	6. 最初と最後の頁 632-640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 632-640	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 長尾 雅史, 石島 旨章, 木下 真由子, 金子 和夫
2. 発表標題 骨粗鬆症治療における treat-to-target (T to T) 骨粗鬆症治療における treat-to-target 骨吸収抑制剤(BP製剤)の視点から
3. 学会等名 関東整形災害外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長尾雅史 他
2. 発表標題 変形性膝関節症における血管内皮間葉分化転換 (EndMT) の関与について
3. 学会等名 日本整形外科学会 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長尾雅史
2. 発表標題 変形性関節症における血管内皮増殖因子VEGFの役割
3. 学会等名 日本関節病学会 2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長尾雅史
2. 発表標題 軟骨発生および変形性関節症における異なる血管内皮増殖因子の役割
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長尾雅史、Bjron Olsen、Hee-Jeong Im
2. 発表標題 変形性膝関節症と血管内皮増殖因子VEGF
3. 学会等名 Orthopedic Research Club (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 長尾雅史、Bjron Olsen
2. 発表標題 軟骨発生と変形性関節症における血管内皮増殖因子 (VEGF) の役割
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----