

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591448

研究課題名(和文) VEGFRチロシンキナーゼ阻害薬スニチニブ, ソラフェニブの関節炎抑制効果の検討

研究課題名(英文) Arthritis-inhibiting effects of sunitinib and sorafenib, inhibitors of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase.

研究代表者

黒坂 大太郎 (Kurosaka, Daitaro)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：10277030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮増殖因子受容体VEGFRチロシンキナーゼに対する阻害剤スニチニブの関節炎抑制効果を関節炎モデルマウスで確かめた。

関節炎を誘導したマウスにスニチニブを0, 30, 60mg/kg/day発症直前から14日間連日腹腔投与し, 各群間で関節炎の発症率と肉眼的, 病理組織学的重症度, 関節滑膜の微小血管密度を比較した。

スニチニブは, 関節炎の発症率と重症度を用量依存性に低下させた。病理組織学的重症度も, 60mg投与群において, 0mg投与群に比べ有意に低値であった。滑膜の血管密度は, スニチニブ治療群では0mg投与群に比べ著明に低いだけでなく, 非関節炎群とほぼ変わらなかった。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the inhibitory effects of sunitinib, a inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, on murine arthritis model.

Sunitinib at a concentration of 0, 30 or 60mg/kg/day was intraperitoneally administrated to mice with collagen-induced arthritis. We compared the changes in arthritis score over time, pathological score, microvascular density in synovial membrane between the vehicle and treatment groups.

In the sunitinib-treated groups, the arthritis score decreased in a dose-dependent manner in comparison with that in the vehicle group. Furthermore, improvement in the pathological score, and a decrease in the synovial microvascular density were also observed in the sunitinib-treated groups.

研究分野：リウマチ膠原病内科学

キーワード：関節炎 関節リウマチ スニチニブ 血管新生 血管内皮増殖因子 チロシンキナーゼ阻害剤

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍など増殖性病変の内部では、組織を栄養し増殖を促すために新生血管が発達していることが多い。この病的血管の新生を阻害することで腫瘍の増殖抑制を試みる研究が、今までに数多くなされ、近年になり血管新生阻害作用に特化した薬剤が臨床の場で用いられているようになってきた。

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) においても、炎症性に増殖している関節滑膜内で、組織栄養のほか炎症細胞を組織に供給するために、多くの腫瘍病変と同様に病的新生血管が豊富に存在する。前臨床研究レベルでは、動物の関節炎モデルに血管新生阻害薬を投与し、関節炎抑制効果を確認した報告が多く存在する。しかしまだ関節炎分野では血管新生阻害薬の臨床応用まで到達していない。

血管新生には、多数の生体内因子が複雑に関わっている。そのなかで中心的役割を果たしているのは、血管新生促進作用をもつ血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) という糖蛋白とその受容体 (VEGF receptor, VEGFR) のシグナル伝達系である。RA 患者の関節局所や血液中では VEGF が強発現あるいは高濃度に検出される。また、血清 VEGF レベルと RA の疾患活動性は相関関係にある。実験的関節炎モデルにおいても、抗 VEGFR 抗体や可溶性 VEGFR といった VEGF/VEGFR シグナルを阻害する物質が関節炎抑制効果を示すことが明らかになっている。

血管新生の研究は年々進歩しているが、VEGF に対するヒト化モノクローナル抗体製剤であるベバシズマブが世界初の血管新生阻害薬として大腸癌に対し米国で承認されたのは 2004 年、本邦では 2007 年と、つい最近のことである。そしてその後を追うように、VEGFR ファミリーへ高い親和性を持つ受容体型チロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブ、ソラフェニブが相次いで承認された。しかしいずれの薬剤も腫瘍性疾患への適応のみである。関節リウマチに対しての効果も期待されるが、まだ臨床試験すら行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

スニチニブをコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) モデルマウスに投与し、関節炎抑制効果の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスへのスニチニブの投与

CIA の誘導は、標準的な方法で行った。すなわち、一週間動物舎で馴化させた 6 週齢 DBA/1j 雄マウスの尾根部皮内に、0.3% ウシ

型コラーゲンと 2 倍濃縮した完全フロイントアジュバントの 1:1 エマルジョンを投与し、初回免疫とした (day0)。9 週齢目 (day21) に 0.3% ウシ型コラーゲンと不完全フロイントアジュバントの 1:1 エマルジョンを同様に投与した。また、関節炎を誘導しない未処置の同週齢 DBA/1j 雄マウスを、naïve 群として用意した。なお、全ての動物実験は、本学の実験動物委員会の承認を得て行った。

スニチニブの投与方法については Nagengast らの実験を参考にした。彼らは A2780 ヒト卵巣癌および colo205 ヒト直腸癌を移植したヌードマウスに 60mg/kg/day のスニチニブを連日腹腔投与し、腫瘍増大抑制効果を観察した。そこで我々も、スニチニブを CIA マウスに、30、60mg/kg/day で 1 日 1 回連日腹腔投与した。試験的に 100mg/kg/day 投与を数例行ったが、腹水貯留、皮膚の黄色変化、衰弱、致死などの症状が現れるケースがあったためこの容量での実験は中止した。一方、60mg/kg/day 以下の投与量ではこのような有害兆候は一例も認めず、非投与群と比しても活動性や体重の低下はみられなかった。スニチニブの 60mg/kg/day 以下の腹腔投与は CIA マウスにおいても許容範囲であると考えられた。

スニチニブ (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) はジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解し、最終的にスニチニブの濃度が 0.30、60mg/kg/day、溶媒が 5%DMSO となるよう生理食塩水で希釈調製し、1 日 1 回経腹的に投与した。CIA 誘導マウスは、(i) 関節炎誘導処置開始日より 21 日目 (追加免疫日) から 34 日目まで連日 (全期間投与群)、(ii) 21 日目から 27 日目まで連日 (前半投与群)、(iii) 28 日目から 34 日目まで連日 (後半投与群) の 3 群に分けて投与実験を行った (n=12/群)。

21 日目から 35 日目まで毎日、四肢を観察し、関節炎の視覚的重症度を点数化して連日計測した。すなわち、0 点: 腫脹なし、1 点: 指のみの腫脹ないし前肢/後肢関節の軽度腫脹、2 点: 前肢/後肢関節の中等度腫脹、3 点: 全指の腫脹かつ前肢/後肢関節の高度腫脹、の 4 段階とし、四肢の点数の合計をその個体の関節炎点数 (0-12 点/個体) とした。スコアの測定は盲検化して行った。また、各グループにおける関節炎の発症率を連日測定した。

なお、以下の実験に関しては全て全期間投与群のマウスのみで解析しており、前半投与群と後半投与群のマウスは解析に用いていない。

(2) 病理学的評価

スニチニブ全期間投与実験で使用したマウスを 35 日目にジエチルエーテル吸入で安楽死させ、四肢を前肢/後肢関節より約 5mm 中枢側で切断して採取し、4%パラホルムアルデヒド・燐酸緩衝液で固定したのち、100% エタノールで脱脂し、10% エチレンジアミン

四酢酸二水素二ナトリウム・0.1M トリス緩衝液(pH 7.0)で脱灰した。この検体をパラフィン包埋し、切片をヘマトキシリン-エオジン染色標本とし顕微鏡下で観察した。組織学的な関節炎の重症度は以下のようにスコア化した。すなわち; 0点: 正常, 1点: 滑膜増殖や炎症細胞浸潤, 関節腔内へのフィブリンの析出がみられるが軽度で, 骨破壊も骨表面の軽度糜爛にとどまるもの, 2点: パンヌスの浸食による骨破壊が明らかであり, 滑膜が関節腔を埋めるように増殖し, 炎症細胞浸潤が顕著にみられるもの, の3段階で採点した。採点は盲検化して行った。集計した各肢のスコアは, 治療処置群毎に平均を算出し比較した。

(3) CTによる骨密度の評価

35日目に摘出した四肢を, 小動物用 CT Latheta LCT-100 Lite (日立アロカメディカル株式会社, 東京, 日本) で撮影し (ピクセルサイズ 48 μ m, スライス厚 48 μ m, スライス間隔 72 μ m), 各肢の骨について付属画像解析ソフトにて骨解析を行って骨密度を算出し, 各治療処置群と関節炎非誘導群 (naïve 群) 毎の平均を比較した。

(4) 滑膜微小血管密度の評価

四肢関節切片は, 10%正常ヤギ血清で二次抗体の非特異的結合反応を阻害したのち, 一次抗体としてウサギ抗 CD31 抗体 (BD pharmingen, San Diego, CA, USA) を反応させた。2次抗体としては EnVision™+, Rabbit/HRP (Dako Cytomation Co., Ltd, Kyoto, Japan) を用いた。発色系には Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を使用した。

微小血管密度の測定には Vascular Hot Spot 法を採用した。すなわち, 顕微鏡で1肢あたり wrist/ankle 関節滑膜で視覚的に Vector® Red に染まった血管の密度が高い3視野 (1/200x) を選び, 滑膜単位面積当たりの Vector® Red 陽性部分の面積を測定し, 微小血管密度 (microvascular density; MVD) とした。視野毎の%MVDの平均値を, 各群間で比較した。

(5) 統計学的解析

関節炎点数の経時的変化パターンの群間差についての検定には repeated measure ANOVA 法を用いた。Post-hoc test としては Bonferroni's method を採用し, 非治療処置群との差を比較した。病理学的スコア, 骨密度, 滑膜内微小血管密度の比較には Kruskal-Wallis 検定を用い, post-hoc テストによる群間比較には Dunn's method を使用した。

4. 研究成果

(1) スニチニブ投与による関節炎重症度の変化

スニチニブを21日目から34日目まで連日

腹腔投与した実験系では, 30, 60mg/kg/day 投与群いずれも関節炎スコアは 0mg/kg/day 投与群 (vehicle 群) に比べ27日目の時点で既に有意に低値 ($p < 0.01$) となった。その後 30mg/kg/day 投与群は関節炎スコア増加傾向を示すも, 観察最終日 35日目のスコアも有意低値を維持した ($p < 0.001$)。60mg/kg/day 投与群では 28日目以降関節炎スコアはほとんど上昇がみられず, 35日目のスコアは 30mg/kg/day 群と比しても有意差を示した ($P < 0.05$)。35日目における関節炎の発症率は, 30, 60mg/kg/day 投与群で, それぞれ 83.3%, 50.0%であった (図1)。

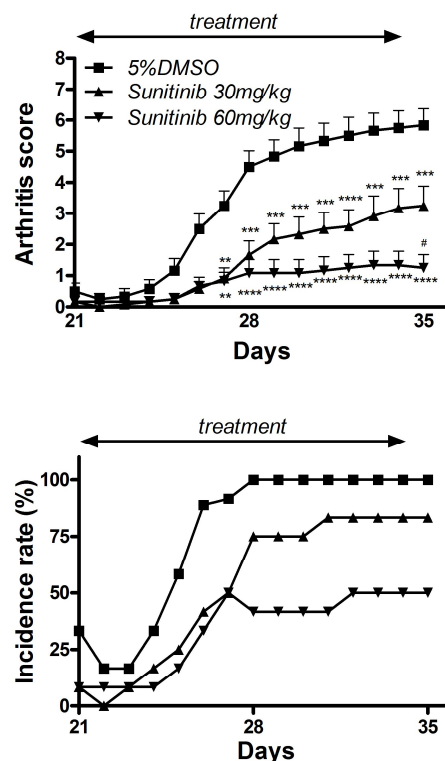


図1. スニチニブの関節炎抑制効果

スニチニブを前半の21日目から27日目まで投与した実験系では, スニチニブ 60mg/kg/day 投与群では, vehicle 群と比較して 27日目から関節炎スコアの差が有意となり, 最終観察日まで有意低値を維持した点は全期間投与した系と同様であったが, スニチニブ投与終了後関節炎が悪化傾向となったのが異なる点であった。しかし 35日目の時点でも vehicle 群との有意差は維持されていた。30mg/kg/day 投与群では vehicle 群と比較し全期間を通じて関節炎スコアは低い傾向にあったが, 有意差は認めなかった。35日目における発症率は 30, 60mg/kg/day 投与群でそれぞれ 100%, 91.7%であった。

次に, スニチニブを後半の22日目から34日目まで投与する実験を行った。スニチニブ

投与群と vehicle 群との間において関節炎スコアは統計学的に有意差が検出されなかった。しかし、スニチニブ 30,60mg/kg/day 投与群両群とも投与開始後から関節炎スコアの上昇が止まった。35 日目における関節炎の発症率は、スニチニブ 30,60mg/kg/day 投与群ではそれぞれ 83.3%, 91.7%であった。

(2) 関節の炎症と破壊の評価

35 日目、観察終了日の四肢関節の病理学的所見としては、vehicle 群では炎症細胞浸潤、滑膜増生、パンヌス形成、骨軟骨の破壊がみられたが、スニチニブ投与群ではその所見が減弱していた。関節炎スコア計測の結果、vehicle 群と 60mg/kg/day 投与群の間に統計学的有意差を認めた ($P < 0.05$) (図 2)。

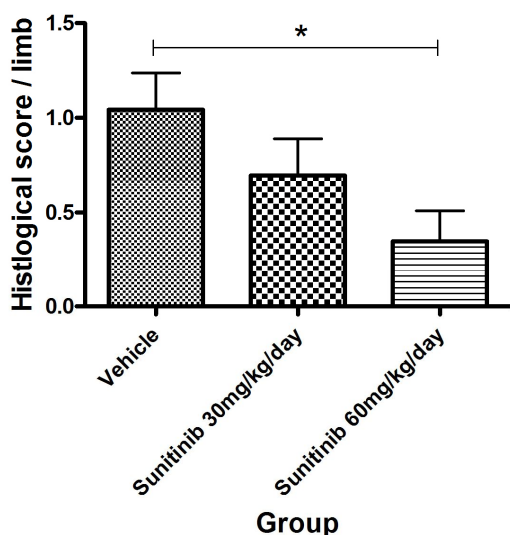


図 2 . スニチニブ投与による病理組織学的変化

骨 CT 検査で測定した骨密度は、vehicle 群は naïve 群と比べ、有意差は認めなかったものの、低い傾向にあった。一方スニチニブ投与群は 30, 60mg/kg/day 投与群両群とも骨密度は naïve 群とほとんど変化がなかった。

(3) 滑膜微小血管密度の比較

vehicle 群は、増大した滑膜内に CD31 陽性微小血管が密に増生していたが、naïve 群の滑膜内には血管増生が殆ど見られなかった。MVD を比較したところ両者には有意差がみられた ($p < 0.001$)。スニチニブ 30,60mg/kg/day 投与群は、vehicle 群と比較すると両群とも統計学的に有意に血管密度が低かった ($p < 0.001$)のみならず、naïve 群とほぼ同水準であった (図 3)。

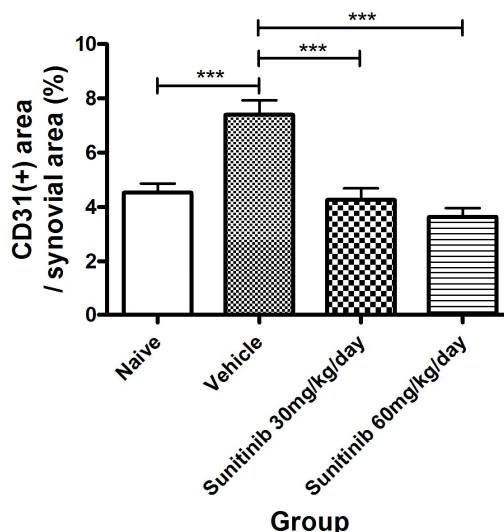


図 3 . スニチニブ投与による滑膜内微小血管密度の変化

今回我々は、マウス CIA モデルにおいて、チロシンキナーゼ阻害薬スニチニブが関節炎を抑制することを確認した。

特に滑膜中の血管密度に関しては、スニチニブ投与群は低用量群高用量群ともに正常群と同程度であったことから、血管新生が殆ど起きていなかったと考えられる。スニチニブは受容体型チロシンキナーゼのうち、血管新生に中心的な役割を果たす VEGFR1,2 や、壁細胞に発現し血管新生に補助的にはたらく PDGFR に強い親和性をもつ薬剤である。この血管新生阻害作用が、特に強く効果として表れている可能性がある。

ただ、実際には関節炎重症度、病理組織学的変化に関しては、用量依存性の効果を示した。このことから、より高用量では単に血管新生阻害作用だけでなく、肥満細胞に発現する c-kit, 樹状細胞などに発現する Flt-1, マクロファージ刺激因子受容体 CSF-1R らの阻害等の機序も関わっているからかもしれない。

本研究は、今回は病理組織学的検証が中心であったが、ここから更に分子生物学的解析へと発展させ、より詳細な検証を行うことが今後の課題であると考えられる。

Peacock DJ, Banquerigo ML, Brahn E. Angiogenesis inhibition suppresses collagen arthritis. *J Exp Med.* 1992;175:1135-8.

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.

de Bandt M, 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.

Kurosaka D, Yoshida K, Yasuda J, Yasuda C, Noda K, Furuya K, et al. The effect of endostatin evaluated in an experimental animal model of collagen-induced arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2007;36:434-41.

Kurosaka D, Yoshida K, Yasuda J, Yokoyama T, Kingetsu I, Yamaguchi N, et al. Inhibition of arthritis by systemic administration of endostatin in passive murine collagen induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:677-9.

Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, et al. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 1994;152:4149-56.

Lee SS, Joo YS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Park SH, et al. Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2001;19:321-4.

Giatromanolaki A, Sivridis E, Athanassou N, Zois E, Thorpe PE, Brekken RA, et al. The angiogenic pathway "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR)-receptor" in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Pathol.* 2001;194:101-8.

Kurosaka D, Hirai K, Nishioka M, Miyamoto Y, Yoshida K, Noda K, et al. Clinical significance of serum levels of vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1, and angiopoietin-2 in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2010;37:1121-8.

Manley PW, Martiny-Baron G, Schlaeppli JM, Wood JM. Therapies directed at vascular endothelial growth factor. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002;11:1715-36.

Nagengast WB, Lub-de Hooge MN, Oosting SF, den Dunnen WF, Warnders FJ, Brouwers AH, et al. VEGF-PET imaging is a noninvasive biomarker showing differential changes in the tumor during sunitinib treatment. *Cancer Res.* 2011;71:143-53.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1991;324:1-8.

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)

Furuya K, Kaku Y, Yoshida K, Joh K, Kurosaka D. Therapeutic effects of sunitinib, one of the anti-angiogenetic drugs, in a murine arthritis. *Mod Rheumatol.* 2014 May;24(3):487-91. doi: 10.3109/14397595.2013.844295.

〔学会発表〕(計5件)

Furuya K, Kaku Y, Yoshida K, Joh K, Kurosaka D. Therapeutic effects of sunitinib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, in a murine arthritis model. *European League Against Rheumatism (EULAR) Congress.* June 2012. Berlin(Germany).

古谷和裕, 胡瑩, 吉田健, 城謙輔, 黒坂大太郎. コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスにおける sunitinib の関節炎抑制効果. 第33回日本炎症・再生学会. 2012年7月5日. ホテル日航福岡(福岡県福岡市).

古谷和裕, 浮地太郎, 野田健太郎, 安田千穂, 吉田健, 黒坂大太郎. マルチターゲット受容体型チロシンキナーゼ阻害薬 sunitinib の関節炎抑制効果. 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2013年4月18日. 国立京都国際会館(京都府京都市).

古谷和裕, 浮地太郎, 野田健太郎, 吉田健, 黒坂大太郎. マウス関節炎モデルにおける受容体型チロシンキナーゼ阻害薬 Sunitinib の効果検討. 第34回日本炎症・再生学会. 2013年7月3日. 国立京都国際会館(京都府京都市).

古谷和裕, 浮地太郎, 野田健太郎, 安田千穂, 吉田健, 黒坂大太郎. コラーゲン誘導性関節炎マウスに対する受容体型チロシンキナーゼ阻害薬 sunitinib の効果. 第130回成医会総会. 2013年10月11日. 東京慈恵会医科大学(東京都港区).

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒坂 大太郎 (KUROSAKA, Daitaro)
東京慈恵会医科大学・リウマチ膠原病内科・教授

研究者番号: 10277030

(2)研究協力者

古谷 和裕 (FURUYA, Kazuhiro)
東京慈恵会医科大学・リウマチ膠原病内科・助教

胡 瑩 (KAKU, Ying)
東京慈恵会医科大学・リウマチ膠原病内科・研究技術職