

癌抑制遺伝子 p53 と血管新生抑制因子の制御による
慢性関節リウマチの治療戦略

課題番号 11670460

平成 11～12 年度科学研究費補助金（基盤研究 C 2）研究成果報告書



平成 13 年 3 月

研究代表者 山中 寿
(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター)



癌抑制遺伝子 p53 と血管新生抑制因子の制御による
慢性関節リウマチの治療戦略

課題番号 11670460

平成 11～12 年度科学研究費補助金（基盤研究 C 2）研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 山中 寿
(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター)

はしがき

慢性関節リウマチ (RA) の滑膜組織においては早期から血管新生が認められ、滑膜増殖に重要な役割を演じていると考えられている。我々は、RA の滑膜組織においては血管新生増殖因子と抑制因子の不均衡が認められるために血管新生が増強していることが明らかになった。特に、活動性の高い滑膜炎を有する滑膜では、主要な血管新生抑制因子である thrombospondin-1 (TSP-1) の発現が減少していた。そこで我々は主要な血管新生抑制因子である TSP-1 を過剰発現させることにより実験的関節炎が抑制しうるかどうかをコラーゲン誘発関節炎マウスを用いて検討した。その結果、発症の予防実験、治療実験ともに軽度の関節炎抑制効果が認められた。この一連の研究により、RA 治療における新たな可能性が示された。

研究組織

- 研究代表者 山中 寿 (東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター)
研究分担者 谷口敦夫 (東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター)
研究分担者 仙道和子 (東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター)
研究分担者 中島 洋 (東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター)

研究経費

平成 11 年度 1,400 千円

平成 12 年度 1,400 千円

計 2,800 千円

研究発表

学会発表抄録

- 1) 中島 洋、谷口敦夫、山中 寿、桃原茂樹、斉藤聖二、井上和彦、鎌谷直之：慢性関節リウマチ滑膜における血管新生抑制因子 TSP-1 の発現 リウマチ 39(2):314, 1999
- 2) 中島 洋、谷口敦夫、田中栄一、仙道和子、山中 寿、桃原茂樹、斉藤聖二、戸松泰介、中沢俱子、相川英三、鎌谷直之：慢性関節リウマチ滑膜における血管新生促進および抑制因子の発現 リウマチ 40(2):414, 2000

課題名

癌抑制遺伝子 p53 と血管新生抑制因子の制御による慢性関節リウマチの治療戦略

目次

1. はじめに
2. 慢性関節リウマチの滑膜組織における血管新生促進因子と抑制因子
3. 慢性関節リウマチの滑膜組織における thrombospondin-1 (TSP-1) の発現
4. ヒト TSP-1 遺伝子のクローニング
5. コラーゲン誘発関節炎マウスにおける TSP-1 遺伝子導入の治療効果

1. はじめに：

慢性関節リウマチ（以下 RA）は関節滑膜の増殖性疾患であり、増殖の結果として形成されたパンヌスが関節軟骨や骨を侵食し、非可逆性の骨関節病変を形成する。滑膜の増殖が維持されるためには滑膜組織における血管新生が重要な役割を担っていることが示されている。早期 RA の滑膜組織を検討した報告は多くないが、滑膜表層細胞の重層化、炎症細胞の浸潤、血管新生が特徴的な所見である。

我々はこのうちの血管新生に着目し、血管新生を制御することによる滑膜炎治療の可能性を検討することを試みた。

当初の計画は、以下の4つの項目につき、検討することであった。

- 1) 慢性関節リウマチ（以下 RA）の関節滑膜における癌抑制遺伝子 p53、血管新生抑制因子 Thrombospondin-1 (TSP-1) の発現を検討する。
- 2) RA 患者滑膜組織における癌抑制遺伝子 p53 の変異を検出し、その頻度を検討する。
- 3) 血管新生抑制因子 TSP-1 の導入による RA 治療の可能性を検討する第 1 段階として、関節炎モデル動物を対象に TSP-1 を過剰発現させることによる滑膜増殖の抑制効果を実験的に検討する。
- 4) 可能であれば、p53 による RA の遺伝子治療の可能性についての検討を行う。

近年、RA 患者の滑膜において癌抑制遺伝子として知られる p53 遺伝子の変異が高率に見られることが明らかになった (1)。p53 は多くの生理的作用を持った蛋白質であるが、血管新生に対して抑制的に働いていることが明らかになってきた。この機序として p53 は血管新生促進因子 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の転写を増強し、血管新生抑制因子 Thrombospondin-1 (TSP-1) の転写を抑制することが考えられている (2)。p53 はアポトーシスにも深く関与しており、変異 p53 遺伝子をもつ腫瘍細胞に正常 p53 遺伝子を導入すればアポトーシスを誘導することにより腫瘍を退縮させうることが報告されている (3,4)。RA 患者の関節に p53 遺伝子を導入すれば、滑膜の血管新生を抑制する一方でアポトーシスを誘導するために滑膜炎を抑制できる可能性が考えられる。このようなことから、p53 を標的とした治療は RA における複数の病態を改善させる可能性が考えられる (5)。

しかしながら、前述の p53 遺伝子の変異は慢性炎症の結果として蓄積された変異であると考えられており (1)、p53 遺伝子の変異をもつ RA 患者はかなり病歴の長い患者である可能性が高く、すべての RA 患者に変異が認められるかどうかについては情報が不

足している。また、p53 は多くの生理的現象に関与していると考えられているため、RA のような非致命的疾患に対する遺伝子治療の対象として適切であるかについても疑問が大きい。実際、遺伝子治療の対象としては、さまざまなカスケードのできる限り下流にある分子が標的として適切であると考えられている。

そこで、本研究においては、まずRA の滑膜炎における血管新生の意義を明らかにし、その上で、血管新生抑制因子である TSP-1 の導入による RA 治療の可能性を検討することにした。

血管新生は多くの疾患の治療面で注目されている。TSP-1 は多くの細胞が常に分泌する血管新生抑制因子であるが、多くの研究が増殖因子に対して行われており、関節炎における TSP-1 の検討は現在まで多くない。Koch らはラットのアジュバント関節炎に対して TSP-1 を関節内に投与したところ、期待に反して炎症の増強をみたと報告した (6) 。しかし、局所投与で炎症を増強し、全身投与で炎症を抑制することは TGF- β においても認められており (7)、遺伝子の導入方法と経路が問題がある可能性が考えられており、本研究においてもウイルスベクターを用いずに、プラスミド DNA を筋肉内注射により全身投与する事を計画した。

2. 慢性関節リウマチの滑膜組織における血管新生促進因子と抑制因子の発現

【緒言】

血管新生は RA の滑膜炎の進行に不可欠であると考えられている。一般に、血管新生の抑制や活性化がおこるためには、促進因子と抑制因子のバランスが重要な作用を持つと考えられている (8,9)。近年、vascular endothelial growth factor (VEGF) を始めとする各種血管新生促進因子の存在も明らかとなり、実際、RA 滑膜における VEGF の発現の増加も報告されている。そこで、この研究においては、血管新生抑制因子の Thrombospondin-1 (TSP-1) と現在血管新生促進因子として認識されている VEGF、hepatocyte growth factor (HGF)、platelet derived growth factor (PDGF)、fibroblast growth factor (FGF)、tumor necrosis factor α (TNF- α)、angiopoietin-1 の滑膜での発現を連続切片による免疫組織化学染色法を用いて検討することを試みた。

【目的】

RA の滑膜組織の増殖に重要な役割を演じていると考えられている血管新生の病態を明らかにし、血管新生の制御による RA の新しい治療手段を検討する事を目的とした。

【対象と方法】

1. 対象 当科において人工関節置換術ないし関節鏡視下滑膜切除術を施行した患者の手術時に得られた滑膜組織を試料として検討した。得られた滑膜組織は2つに分け、一方を H-E 染色による病理学的検索に、もう一方は、液体窒素ですみやかに凍結し、免疫組織化学染色に用いた。

2. 免疫組織化学染色 市販の TSP-1 および各種血管新生促進因子の抗体を使用し、Labelled Streptavidin Biotin 法にてその発現を検討した。

3. 電子顕微鏡による TSP-1 発現の局在の検討 滑膜炎における TSP-1 の局在を電顕酵素抗体法にて検討した。Pre-embedding 法を用い、定法に従い凍結切片をスライドガラス上にて labelled streptavidin Biotin 法を用いた免疫組織化学染色を行った。その上で樹脂包埋を行い超薄切片を作成して電顕的に観察した。

【結果】

1. 症例の背景

検討した全 12 例の患者背景を表 2 - 1 に示す。症例 1 から 4 は病理学的に滑膜炎の活動性ありと判断された症例で、5 から 12 は活動性が乏しいと判断された症例である。活動性の有無で、両群を比較すると、年齢、性別、罹病期間、CRP、RAPA において両群において差はなかったが、活動性がある群において、Stage 分類上、若干進行例が少なく、また、術式も関節鏡下滑膜切除術および滑膜切除例が多い傾向があった。

治療については、活動性が乏しい群において MTX の使用例が多くみられたが、ステロイド投与量に差は認めなかった。

表 2 - 1 患者背景

症例	年齢	性別	罹病年	Stage	病理的			治療	術式
					活動性	CRP	RAPA		
1	37	F	13	III	active	0.7	640×	BUC 100 mg, PSL 4 mg	肘滑膜切除
2	55	F	7	II	active	0.5	-	D-PC 100 mg, PSL 2 mg	膝 ASS
3	68	F	21	IV	active	7.3	640×	SASP 1000 mg, PSL 5 mg	TKA
4	52	M	5	II	active	0.7	640×	SASP 1000 mg, PSL 5 mg	膝 ASS
5	52	F	7	II	inactive	1.3	1280×	MTX 4 mg, PSL 5 mg	膝 ASS
6	57	F	13	IV	inactive	0.2	-	MTX 5 mg, PSL 5 mg	TKA
7	59	M	8	III	inactive	1.5	-	SASP 1000 mg, PSL 5 mg	TKA
8	68	F	10	IV	inactive	2.4	640×	MTX 5mg, SASP 1000mg, PSL5 mg	TKA
9	39	F	16	IV	inactive	1.2	80×	MTX 5 mg, PSL 4 mg	膝 ASS
10	67	F	25	IV	inactive	5.3	1280×	SASP 1000 mg, PSL 5 mg	TKA
11	69	F	40	IV	inactive	1.3	640×	SASP 1000 mg, PSL 5 mg	TKA
12	58	F	4	IV	inactive	4.6	320×	MTX 5 mg	THA

年 mg/dl

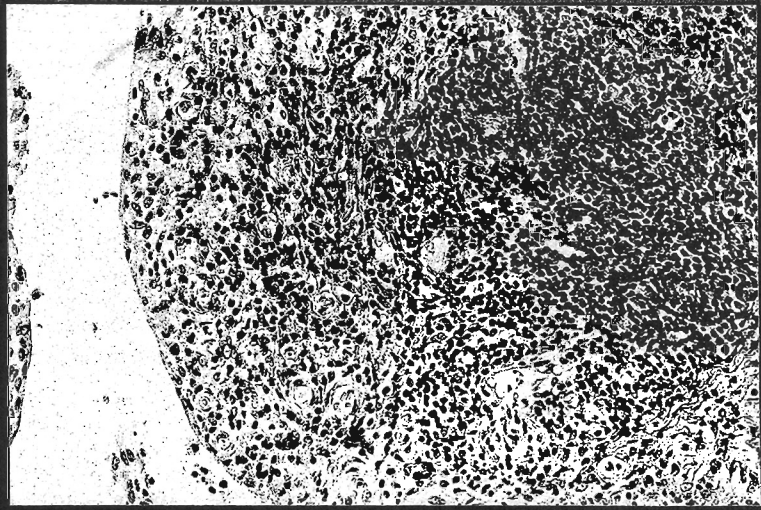
2. 滑膜組織における各種因子の免疫組織化学染色

図 2 - 1 は、活動性の高い滑膜炎を有する症例における TSP-1、VEGF、HGF、PDGF、FGF、TNF- α 、Ang-1 に対する抗体と、対照を用いた免疫組織化学染色の結果を示す。活動性を有する症例においては、VEGF の発現が強く認められ、また HGF および PDGF の発現も強くみられた。FGF、TNF- α および Ang-1 の発現も中等度に認められた。しかし TSP-1 の発現はこれらに比して少なかった。

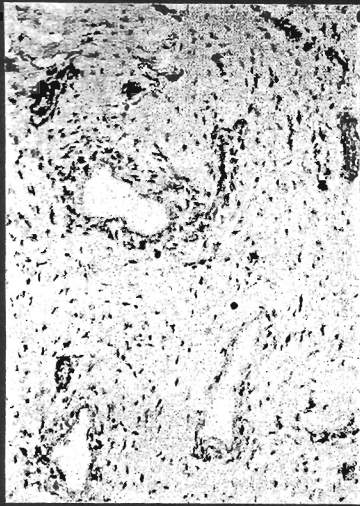
図 2 - 2 は、活動性の乏しい滑膜における免疫組織化学染色の結果である。活動性の高い滑膜に比して VEGF の発現は弱かったが、HGF、PDGF、FGF、TNF- α および Ang-1 の発現は中等度に認められた。しかし TSP-1 の発現はこれらと比較しても、活動性の高い症例と比較しても明らかに多かった。

Active Rheumatoid Synovitis

H-E staining



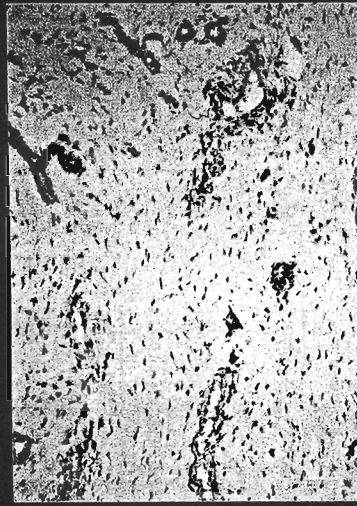
Immunohistochemical staining



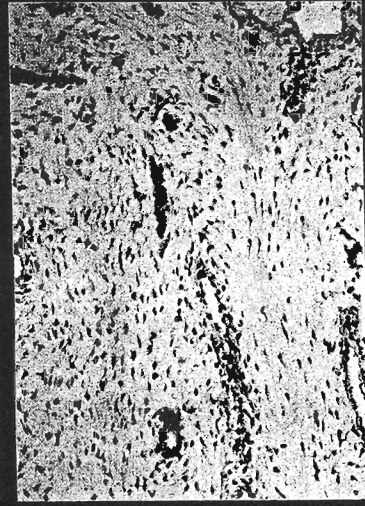
TSP-1, grade 1



VEGF, grade 3



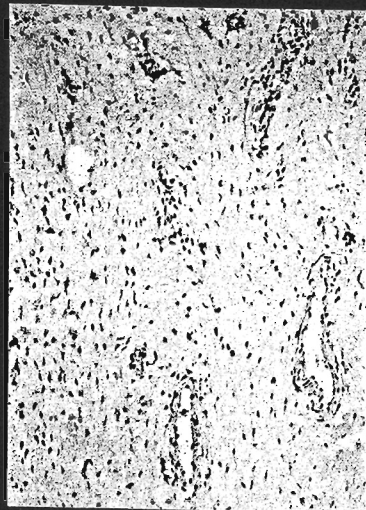
HGF, grade 3



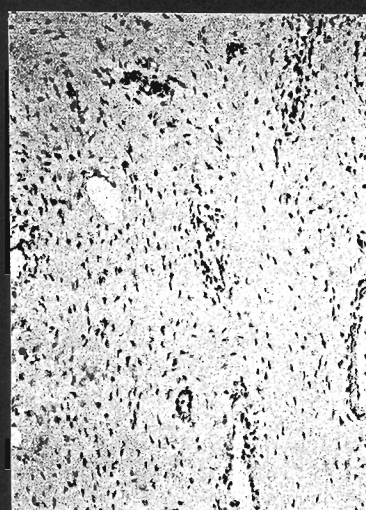
PDGF, grade 3



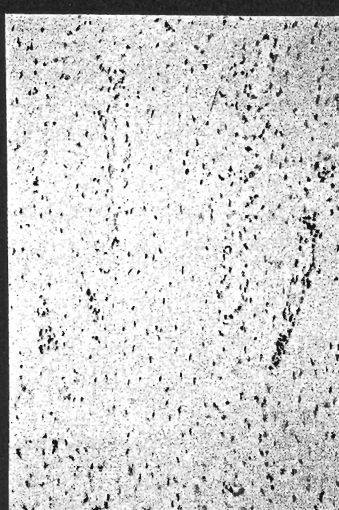
FGF, grade 1



TNF α , grade 1



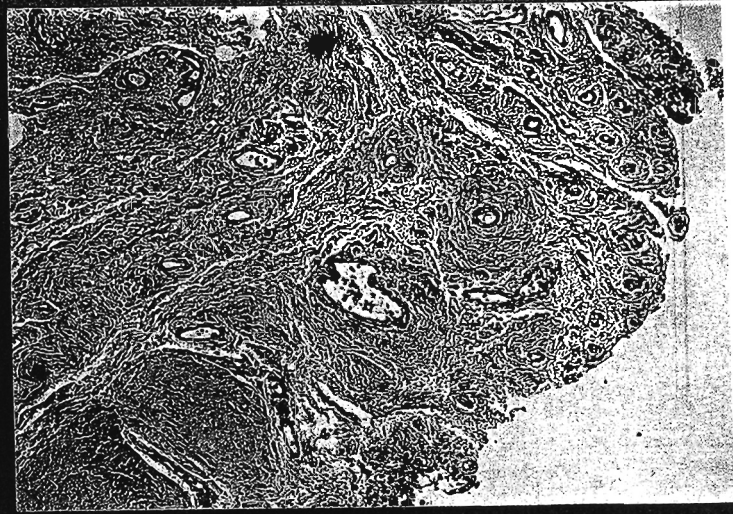
Ang-1, grade 1



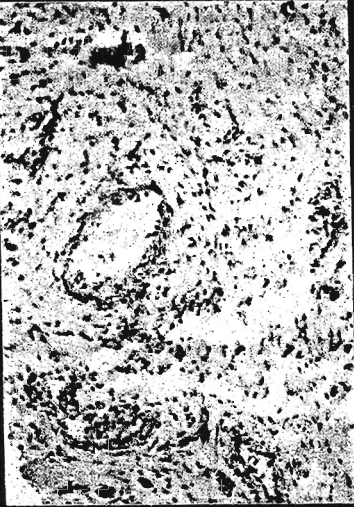
Control

Inactive Rheumatoid Synovitis

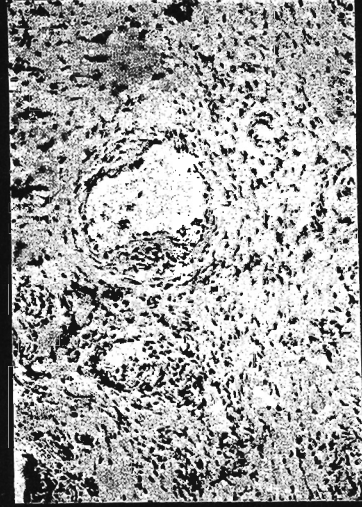
H-E staining



Immunohistochemical staining



TSP-1, grade 2



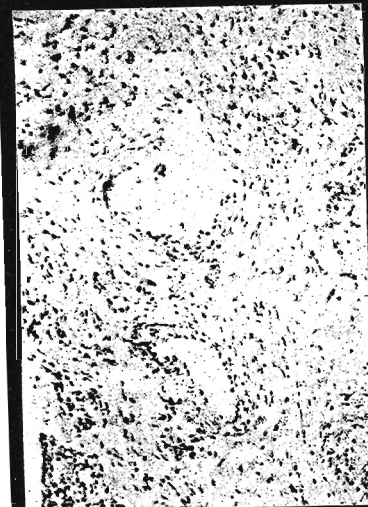
VEGF, grade 1



HGF, grade 3



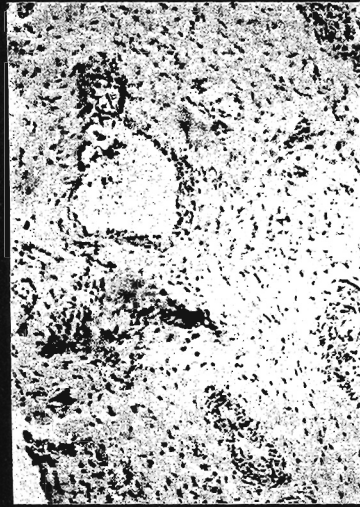
PDGF, grade 3



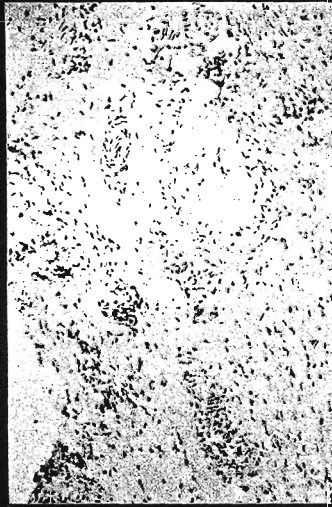
FGF, grade 1



TNF α , grade 2



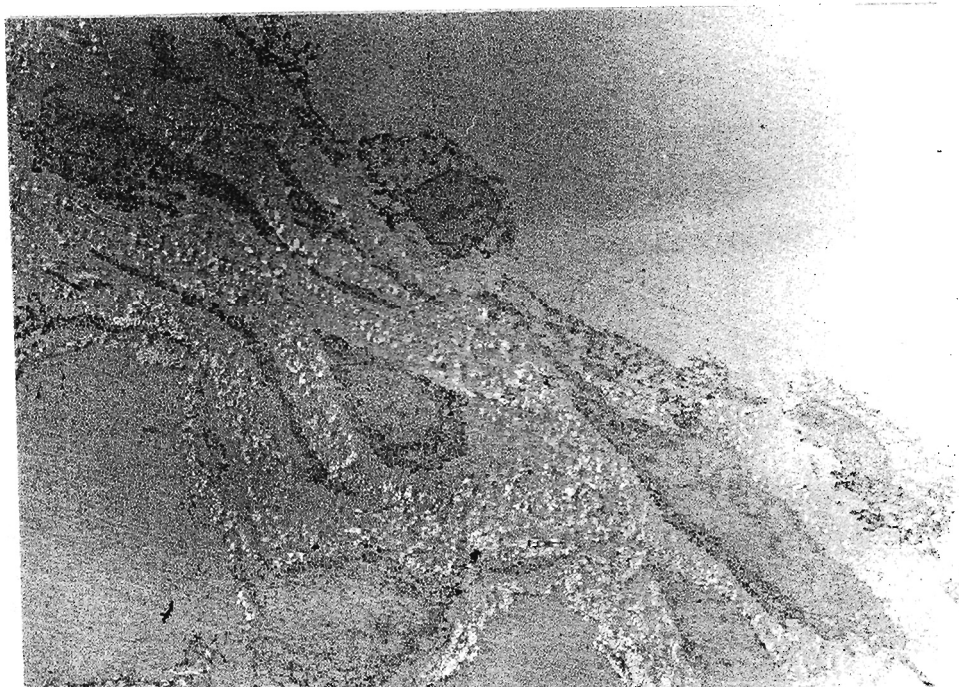
Ang-1, grade 1



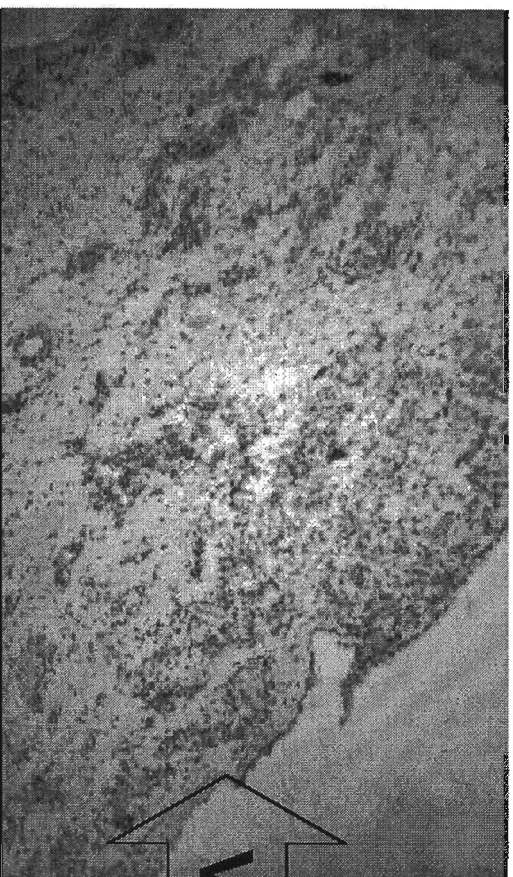
Control

4. 電子顕微鏡を用いた TSP-1 の局在に関する検討

滑膜炎におけるTSP-1の局在を電顕酵素抗体法にて検討した。Pre-embedding 法を用い、定法に従い凍結切片をスライドガラス上にて labelled streptoavidin Biotin 法を用いた免疫組織化学染色を行った。その上で樹脂包埋を行い超薄切片を作成して電顕的に観察した。写真の右上は血管内腔であるが、TSP-1 は血管内皮細胞や血管周囲の線維芽細胞に発現していること、また核周囲の細胞質に染色が認められた (図 2 - 3)

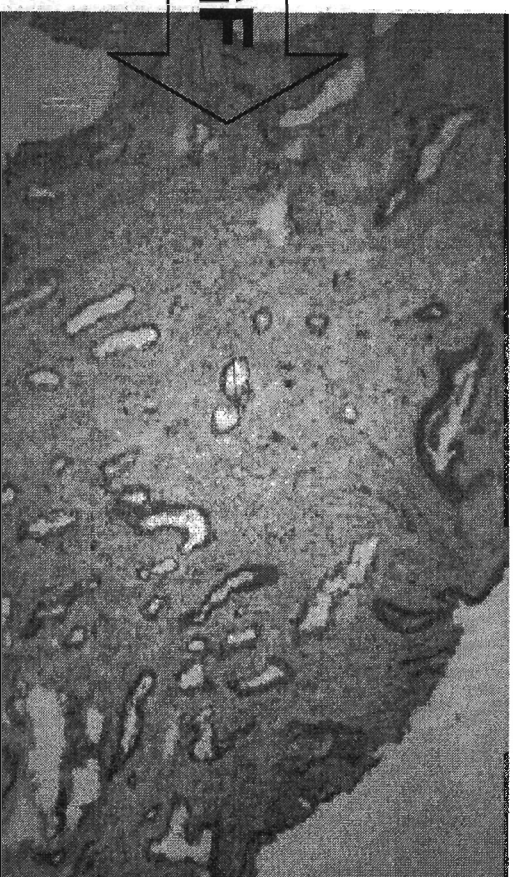


Inactive synovitis

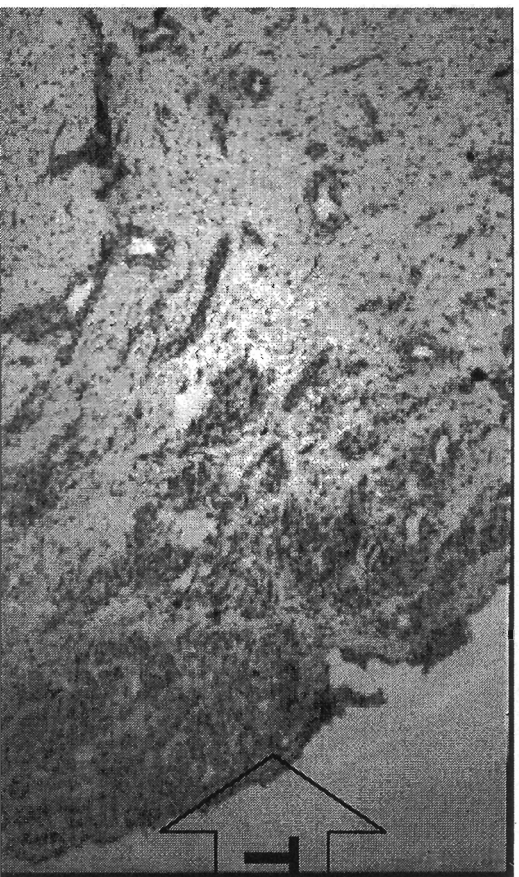


VEGF

Active synovitis



TSP-1



3. 慢性関節リウマチの滑膜組織における thrombospondin-1 (TSP-1) の発現

【緒言】

前述した検討により、RAの滑膜組織においては血管新生促進因子と血管新生抑制因子の不均衡が生じ、血管新生が促進していることが明らかになった。この事実をRAの治療に応用することを考えた場合、促進因子の発現を抑制する、抑制因子の発現を増強させる、の2つの方向性がある。前者の場合には血管新生促進因子に対する抗体の投与や、アンチセンス療法などが考えられ、後者の場合には遺伝子導入による遺伝子治療が考えられる。しかし、血管新生抑制因子は複数の分子が存在し、またそれら複数の分子が過剰に発現していると考えられるため、例えばVEGFの発現を抑制したとしても十分な血管新生抑制効果が得られるかどうかははなはだ疑問である。したがって、血管新生抑制因子の発現増強が選択すべき方向性であると考えた。

Thrombospondin-1(TSP-1)は主要な血管新生抑制因子であり、活動性の滑膜炎では発現が十分でないことを免疫組織化学で示したが、次にそのことをより定量的な方法により検討することを試みた。

【目的】

RA滑膜におけるTSP-1の発現を定量的に測定し、滑膜の病理学的所見との関連を検討する。

【対象と方法】

1. 対象 当センターを受診中のRA患者で、関節鏡下滑膜切除術および人工関節置換術を施行した際に得られた滑膜組織を試料として検討した。滑膜組織は2つに分け、一方は病理組織的検索に用い、もう一方からはmRNAを抽出した。そしてTSP-1 mRNAの発現量をcompetitive PCR法により定量化して検討した。

2. TSP-1 mRNAの定量(10)

1) Total RNAの抽出とcDNA合成

TSP-1 mRNAの発現はcompetitive PCRを用いて定量的に解析した。RA患者の手術(関節鏡視下滑膜切除術あるいは人工関節置換術)時に得られた関節滑膜を液体窒素を用いて可及的速やかに冷凍した後、ホモゲナイザーにTRIzol(Life Technologies Inc, Grand Island, NY)を加えて組織を粉碎し、total RNAを抽出した。5 mgのtotal RNAから oligo

dT、SUPERSCRIPT II reverse transcriptase (Life Technologies Inc, Grand Island, NY) を用いて cDNA を合成した。cDNA は RNase H で処理した後、-20°C で保存した。

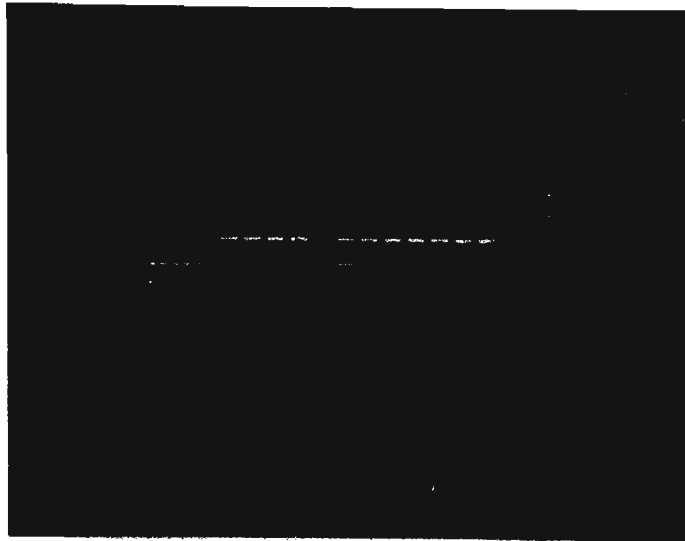
2) Competitor の作成

TSP-1 cDNA の competitor は IL-1 β MIMIC (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて作成した。まず、IL-1 β MIMIC に特異的な 18 ヌクレオチドの 5' 側にさらに TSP-1 に特異的な 20 ヌクレオチドを持つ 38 mer のセンス、アンチセンスプライマーを 1 組作成した

(sense: 5'- TGTCAACTGTGATCCTGGACCGTCCCAAGTTTCGTGAG -3', antisense: 5'- TTTCTCAAGCCCATAGTTCCCCCTGCCCATTTCTGTC-3')。これらを用いて IL-1 β MIMIC を鋳型にして PCR を行うことにより、IL-1 β MIMIC の 5' 端と 3' 端に 20bp の TSP-1 特異的配列を持つ 337bp の PCR 産物が増幅された。これを精製して、TSP-1 cDNA の competitor として使用した。したがって、TSP-1 特異的なプライマー (sense: 5'- TGTCAACTGTGATCCTGGAC-3', antisense: 5'- TTTCTCAAGCCCATAGTTCC-3') を用いて PCR を行うと、TSP-1 cDNA からは 664 bp の、competitor からは 337bp の PCR 産物が増幅され、2.0%アガロースゲル上で両者の判別が可能であった。Competitor は 1/2 希釈系列を用いて希釈した後、-20°C で保存した。

3) Competitive PCR と定量

competitor の希釈系列に一定量の cDNA を加え、TSP-1 特異的プライマー (上記) をもちいて PCR を行った (95° C denaturing temperature : 30 秒、55° C annealing temperature : 30 秒、72° C extension temperature : 1 分、35 cycles)。PCR 産物を 2.0%アガロースゲル上で電気泳動し、画像を Adobe PhotoShop 3.0J (Adobe systems Japan, Tokyo, Japan) で取り込み、National Institute of Health Image (version 1.55) を用いて、各々の PCR 産物に由来するバンドを定量化した。次いで、X 軸に PCR 鋳型中の competitor 量 (log)、Y 軸に PCR 産物の比 (log) をプロットしてグラフを作成した。TSP-1 cDNA に由来する PCR 産物と competitor に由来する PCR 産物の比が等しい時の competitor 量が TSP-1 cDNA 量に等しいことを利用して、このグラフから TSP-1 cDNA 量 (すなわち TSP-1 mRNA 量) を算出した。



3. 滑膜炎の病理学的診断

滑膜炎の程度を病理像の光顕的に評価するため、Papillary proliferation、Lymphoplasmacytic infiltration、Lymph follicle formation、Angiogenesis の4項目について、各々0~3点とし、合計点数で滑膜炎の活動性をスコア化した。

【結果】

1. 患者背景との関連

表3-1に各症例の患者背景とTSP-1 mRNAの発現量を示す。TSP-1 mRNAの発現量は0~281.5 zmole/mgRNAと症例により大きな差があった。

TSP-1 mRNAの発現がみられなかった滑膜は、2例目の56才、女性で、罹病期間は短く、Stage IIで、膝関節に関節液の貯留を繰り返し、関節鏡下滑膜切除術を施行したRA疾患活動性の非常に高い症例である。一方、罹病期間が最も長いStage IVの人工関節置換術を施行した症例ではTSP-1 mRNAの発現は281.5 zmole/ μ gRNAとその発現量はかなり増加していた。しかし、全体としては罹病期間、年齢、CRP値、Stageなどの指標とTSP-1 mRNAの発現量には有意な相関は認められなかった。

表3-1 患者背景とTSP-1 mRNA

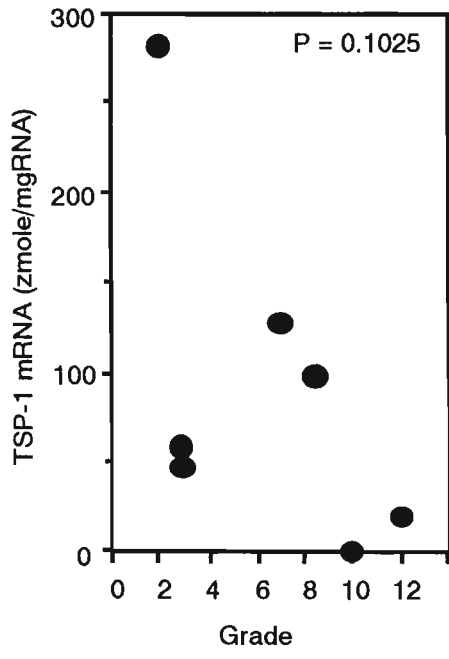
	年齢	罹病	CRP	Stage	術式	TSP-1 mRNA
H.A.	51歳	5年	0.7	II	膝ASS	126.1
K.S.	56歳	6年	2.6	II	膝ASS	0
O.S.	68歳	11年	0.3	IV	TKA	49.4
H.M.	37歳	13年	0.7	III	肘滑膜切除	21.9
K.K.	67歳	22年	7.3	IV	TKA	97.5
N.Y.	65歳	28年	0.1	IV	THA	56.2
F.T.	67歳	34年	1.1	IV	TKA	281.5

2. 顕微鏡的に検討した滑膜炎の程度との相関

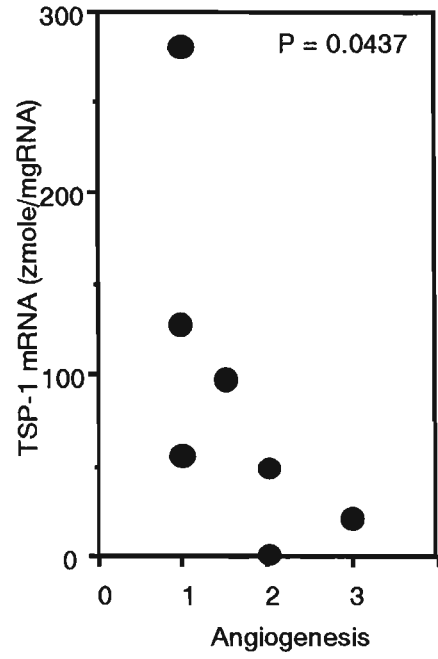
次に、TSP-1 mRNAの発現量が顕微鏡的に検討した滑膜炎の程度との相関を有するかどうかを検討した。図3-2は、横軸に、滑膜の活動性を顕微鏡所見上、リンパ球浸潤、リンパ濾胞形成、血管形成および乳頭状の増殖の4項目で、各々0~3点とし、合計点数で滑膜炎の活動性をスコア化したもの、立軸にTSP-1 mRNAの発現量をプロットしたものである。症例数が少ないために統計学的に有意な相関は認めなかったが、活動性のスコアが高いと、TSP-1 mRNAの発現量が減少する傾向がみられる。

そこで、顕微鏡的に検討した血管新生の程度のみに着目し、TSP-1 mRNAの発現量との関連をプロットしたところ、血管新生の強い滑膜では、TSP-1 mRNAの発現量が少なく、両者に逆比例の関係があり、Spearman's rank correlation testにて両者は統計学的にも有意であった。すなわち、血管新生が強い滑膜ではTSP-1の発現量が減少していることが定量的にも証明された。

滑膜炎の程度とTSP-1 mRNA



血管新生の程度とTSP-1 mRNA



4. ヒト TSP-1 遺伝子のクローニング

1. ヒト TSP-1cDNA クローニング

PHA で 1 時間刺激したヒト末梢血単核球から total RNA を調製し、RT-PCR 法により TSP-1 coding region を含む 3.7kb の領域を増幅した。

(PCR プライマーの配列)

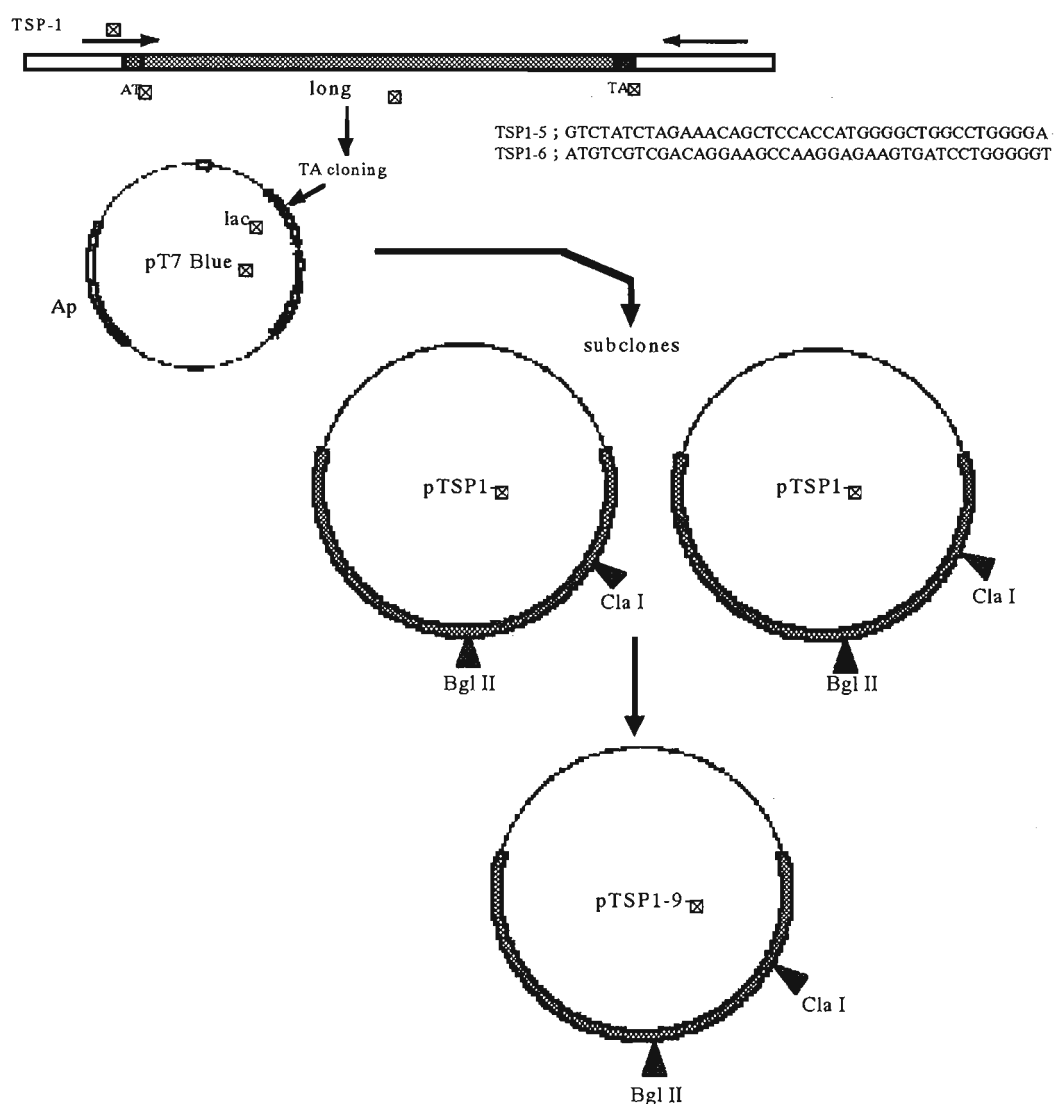
TSP1-5 ; GTCTATCTAGAAACAGCTCCACCATGGGGCTGGCCTGGGGA

TSP1-6 ; ATGTCGTCGACAGGAAGCCAAGGAGAAGTGATCCTGGGGGT

この RT-PCR 産物を pT7Blue T-Vector (宝酒造製) に TA クローニングした。

dye-terminator 法で塩基配列を確認し (ABI PRISM model377, Applied Biosystems 製)、S.W.Hennesy らが報告した TSP-1 cDNA と一致した塩基配列をもつクローン TSP-1-9-5 を得た (11)。

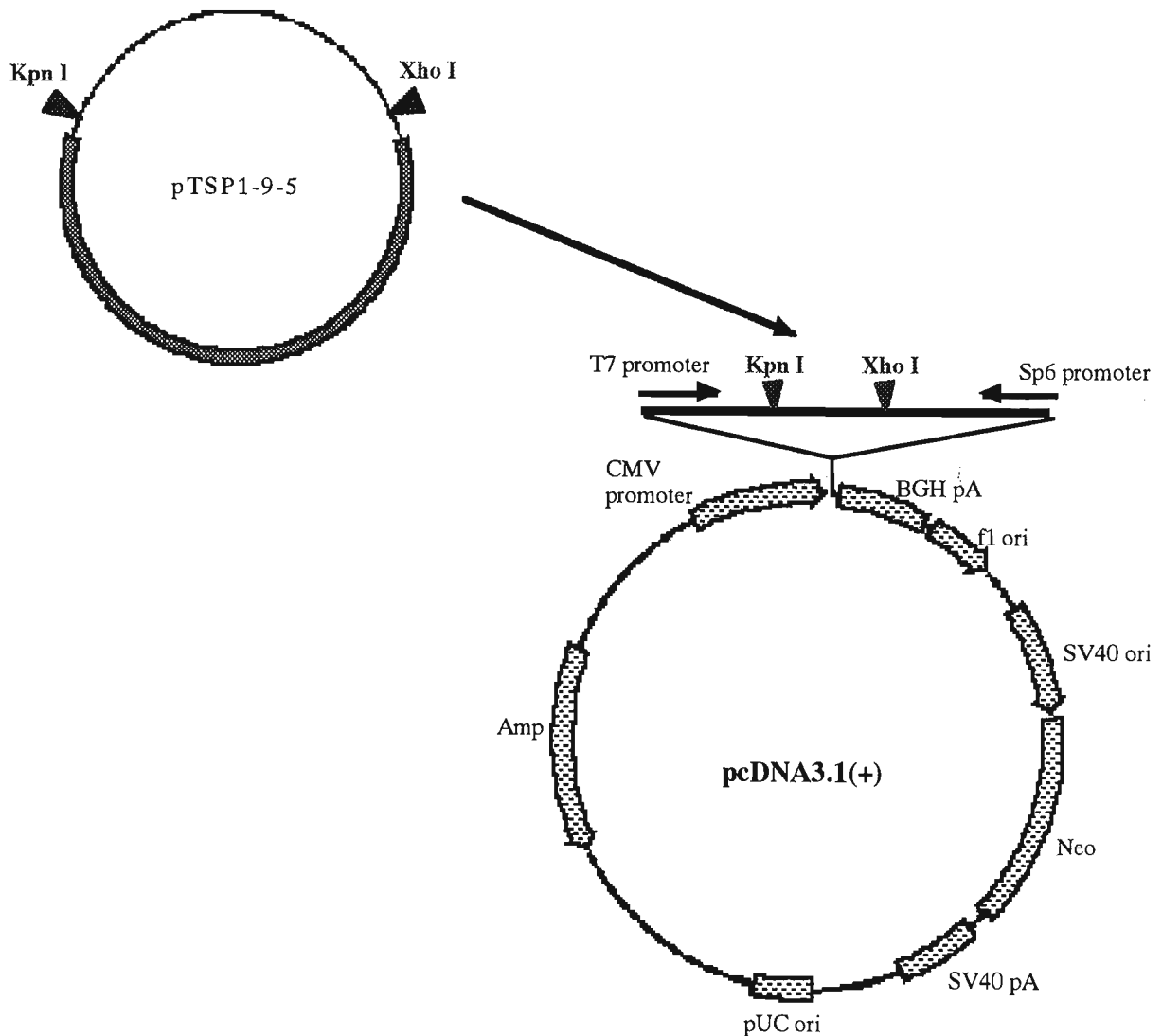
図 4-1 ヒト TSP-1 遺伝子のクローニング



2. 発現プラスミドの作成

TSP1-9-5 を制限酵素 KpnI と SalI (共に宝酒造製) で二重消化し、TSP-1 遺伝子を含む 3.7kbDNA 断片を回収した。発現ベクター pcDNA3.1(+) (Invitrogen 製) を KpnI と XhoI (共に宝酒造) で二重消化し、先の TSP-1 遺伝子断片と連結した。作成した発現プラスミドは CMV プロモーターの下流に TSP-1 遺伝子が連結されている。

図 4-2 TSP-1 plasmidの作成



5. コラーゲン誘発関節炎マウスにおける TSP-1 遺伝子導入の治療効果

前述した一連の研究にて、RAの滑膜炎においては血管新生促進因子と抑制因子の不均衡が生じており、特に血管新生抑制因子 TSP-1 の発現が低下していることが明らかになった。この知見を RA の新たな治療に応用する一手段として、我々はマウスのコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて TSP-1 遺伝子を導入し、過剰発現させることによる効果を検討することとした。遺伝子導入法としては、ウイルスベクターを用いずに TSP-1 遺伝子を含む発現プラスミドを直接投与する方法を用いた。

要約

血管新生抑制作用を有するヒト thrombospondin-1 (TSP-1) の遺伝子を導入した plasmid を DBA/1J マウスに移入し、II 型コラーゲン誘発関節炎に対する抑制作用を評価した。TSP-1 導入 plasmid の予防効果の評価に際しては、ウシ II 型コラーゲンとフロイントの完全アジュバントとのエマルジョンを、DBA/1J マウスの尾根部皮下に免疫した 18 日後に plasmid を 500 mg/mouse で投与し、その 3 日後に追加免疫することによって関節を発症させた。追加免疫のみを実施した群では、関節炎スコアおよび四肢の厚さが経時的に増加し、control plasmid を投与した群もほぼ同様の経時変化を示した。これに対して、TSP-1 導入 plasmid を投与した群では、初回免疫の 28 日後には、関節炎スコアおよび四肢の厚さが control plasmid 投与群に比べて有意に低い値を示し、関節炎の初期に発症が遅延される傾向を示した。また、治療効果の評価に際しては、DBA/1J マウスにウシ II 型コラーゲンとアジュバントを免疫した 8 週間後に、関節炎の発症が確認されたマウスに 500 mg/mouse で plasmid を投与し、その後の関節炎への影響を経時的に観察した。その結果、TSP-1 導入 plasmid 投与群の関節炎スコアおよび四肢の厚さは、有意差はなかったが、control plasmid 投与群に比べて低い値を推移した。以上の結果は、ヒト TSP-1 遺伝子の導入によって、マウスのコラーゲン誘発関節炎が、初期相あるいは進行期において抑制される可能性を示唆している。

緒言

慢性関節リウマチ (RA) においては、滑膜の増殖および血管新生が著明に認められることから、病態の進行に深く関与してると考えられている。特に、血管新生を抑制する作用を有する thrombospondin-1 (TSP-1) の発現の抑制が滑膜の増殖に関与してると可能性

が示唆されている。そこで、今回は、DBA/1J マウスの II 型コラーゲン誘発関節炎モデルを使用して、ヒト TSP-1 遺伝子導入 plasmid を投与し、TSP-1 を生体内で過剰に発現させた場合の関節炎への影響を明らかにすることを目的とした。

実験方法および材料

1. ヒト TSP-1 遺伝子導入 plasmid および control plasmid

ヒト TSP-1 遺伝子導入 plasmid および control plasmid (約 1 mg/mL) は、株式会社宝酒造において作製されたものを試験に使用した。なお、これらの plasmid は、マウス 1 匹あたり 500 mg を、4 分割し、四肢の筋肉内に投与した。

2. 使用動物および飼育条件

近交系の雄性 DBA/1JNCrj マウスを、5 週齢で日本チャールズリバー株式会社より購入して、6 週齢で初回免疫に使用した。動物は、温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、換気回数 12 回/時間、照明時間 12 時間 (午前 6 時～午後 6 時) に設定されたバリアシステム内の飼育室で飼育した。なお、1 群の動物数を 5 匹として、プラスチックケージ (CL-0104-2, 日本クレア株式会社) で飼育した。

3. コラーゲン誘発関節炎の惹起および評価

ウシ II 型コラーゲン (3 mg/mL, コラーゲン技術研究会) と結核死菌 H 37Ra を含むフロイント完全アジュバント (Sigma Chemicals Co.) とを等比で混合し、エマルジョンを作製したのち、DBA/1JNCrj マウスの尾根部皮下に、ウシ II 型コラーゲンとして 200 mg/mouse を免疫した。予防実験に際しては、初回免疫の 21 日後に再度追加免疫することによって関節炎を発症させた。また、治療実験においては、ウシ II 型コラーゲン とアジュバントで免疫した 8 週間後に、関節炎を発症したマウスをプールし、関節炎のスコアが均一になるように群分けした後に試験を開始した。四肢の関節炎の症状については、報告済みの判定基準に基づいて 0 から 4 のスコアで評価した (13-15)。なお、それぞれのマウスの関節炎のスコアは、四肢のスコアの合計で表し (最大: 16 点)、総合スコアが 1 点以上の場合に、関節炎を発症したと判定した。また、マウスの四肢の厚さを、ノギスを使用して測定し、四肢の厚さの合計を求めて、関節炎の指標とした。

5. 統計学的処理方法

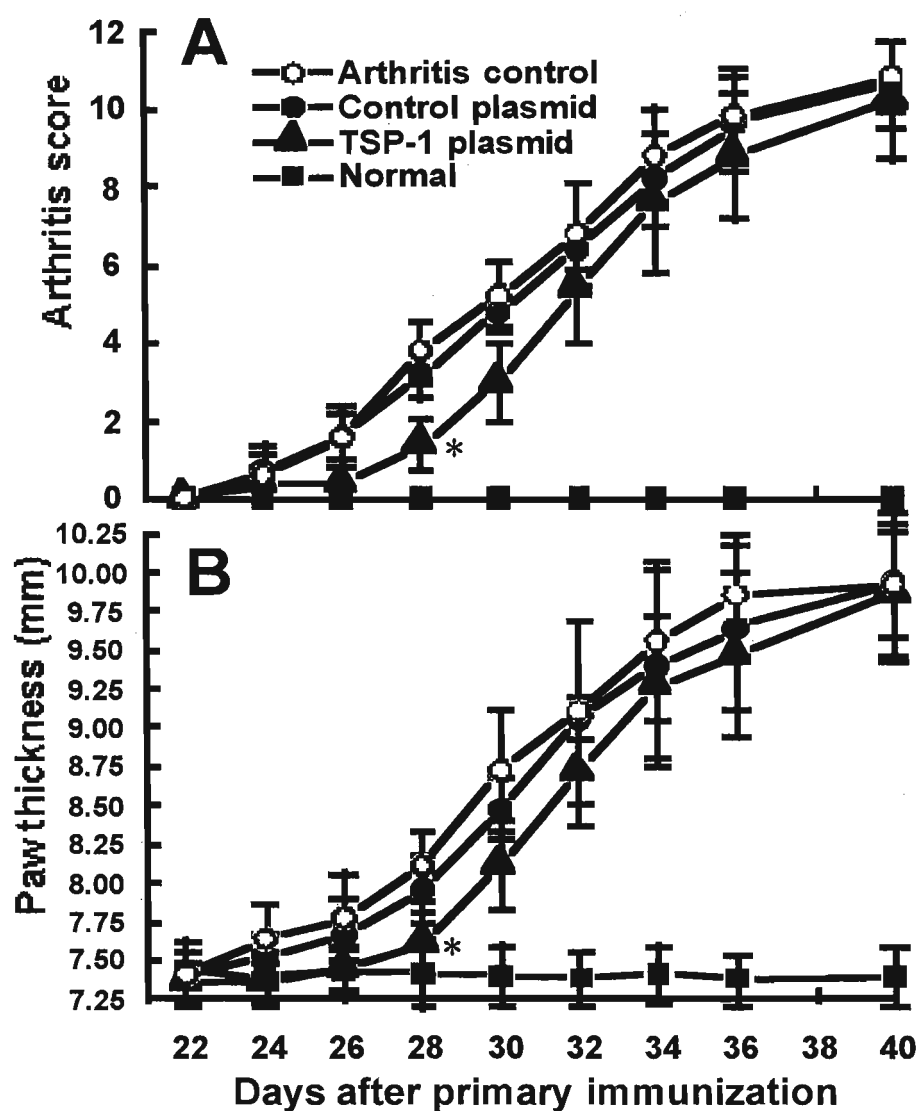
関節炎のスコアは、四肢のスコアの合計について各群ごとに平均値および標準誤差で表し、control plasmid 投与群を対照として、Mann Whitney U-test で統計解析した。四肢の厚さの合計については、各群ごとに平均値および標準誤差で表し、control plasmid 投与群を対照として、Student's t-test で統計解析した。なお、有意水準は両側 5%とした。

結果および考察

血管新生抑制作用を有するヒト thrombospondin-1 (TSP-1) の遺伝子を導入した plasmid を DBA/1J マウスに移入し、II 型コラーゲン誘発関節炎に対する抑制作用を評価した。TSP-1 導入 plasmid の予防効果の評価に際しては、ウシ II 型コラーゲンとフロイントの完全アジュバントとのエマルジョンを、DBA/1J マウスの尾根部皮下に免疫した 18 日後に plasmid を 500 mg/mouse で投与し、その 3 日後に追加免疫することによって関節を発症させた。関節炎スコアおよび四肢の厚さの経時変化を図 5-1 に示す。追加免疫のみを実施した群では、関節炎スコアおよび四肢の厚さが追加免疫の 3 日後から経時的に増加し、36 日後以降は、ほぼプラトーに達した。また、control plasmid を投与した群におけるこれらの値は、追加免疫した群とほぼ同様の経時変化を示した。これに対して、TSP-1 導入 plasmid を投与した群では、関節炎の初期に発症が遅延される傾向を示し、初回免疫の 28 日後には、関節炎スコアおよび四肢の厚さが control plasmid 投与群に比べて有意に低い値を示した。しかし、関節炎が進行するにつれて、control plasmid 群との間に明確な差は認められなくなった。

☒5-1

Prophylactic effect of TSP-1 plasmid to the type II collagen induced arthritis in DBA/1J mice.



☒ 5-1 : Prophylactic effect of TSP-1 plasmid on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice.

DBA/1J mice were immunized with type II collagen twice between 21 days interval.

TSP-1 plasmid or control plasmid was administered on day 18 after primary immunization.

Each symbol represents the mean \pm SE of arthritis score (A) or total paw thickness (B) of

5 mice. Statistical significance TSP-1 plasmid group versus control plasmid group was calculated by Mann Whitney U-test (A) or Student's t-test (B). (*: $p < 0.05$)

治療効果の評価に際しては，DBA/1J マウスにウシ II 型コラーゲンとアジュバントを免疫した 8 週間後に，関節炎の発症が確認されたマウスに 500 mg/mouse で plasmid を投与し，その後の関節炎への影響を週 1 回の頻度で 4 週間，経時的に観察した．関節炎スコアおよび四肢の厚さの経時変化を図 5-2 に示す．TSP-1 導入 plasmid 投与群の関節炎スコアおよび四肢の厚さは，有意差はなかったが，control plasmid 投与群に比べて低い値を推移した．

図 5 - 2

Therapeutic effect of TSP-1 plasmid to the type II collagen induced arthritis in DBA/1J mice.

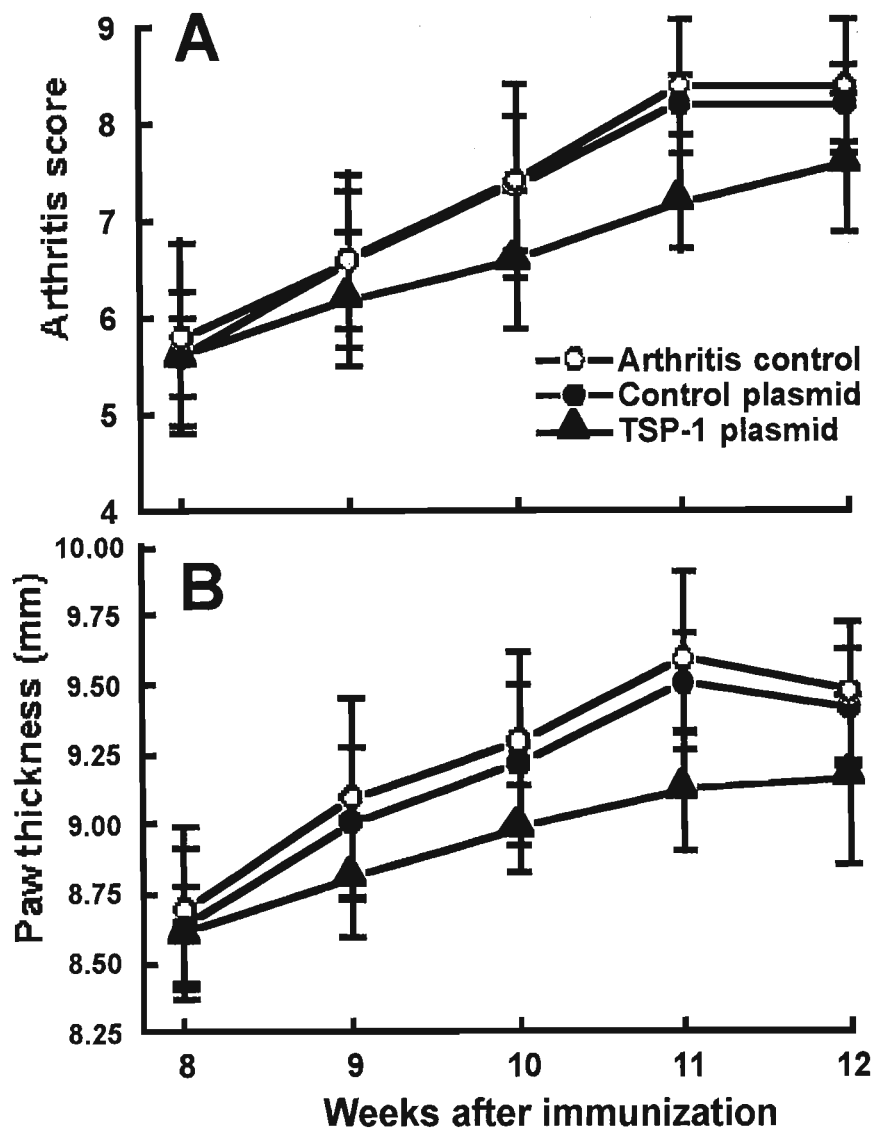


図 5-2 Therapeutic effect of TSP-1 plasmid on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice.

TSP-1 plasmid or control plasmid was administered to DBA/1J mice after 8 weeks of the

immunization with type II collagen. Each symbol represents the mean \pm SE of arthritis score (A) or total paw thickness (B) of 5 mice. There was no significant difference between TSP-1 plasmid group and control plasmid group by Mann Whitney U-test (A) or Student's t-test (B).

以上の結果は、ヒト TSP-1 遺伝子の導入によって、ヒト TSP-1 がマウスの生体内で過剰に発現し、TSP-1 によって関節部位の血管新生が抑制されたために、コラーゲン誘発関節炎の初期あるいは進行期において発症が抑制された可能性を示唆している。

Prophylactic effect: Arthritis score (n=5)

Day	Normal		Arthritis control		Control plasmid		TSP-1 plasmid	
	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE
22	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0.6	0.6	0.7	0.7	0.4	0.4
26	0	0	1.6	0.6	1.6	0.8	0.4	0.4
28	0	0	3.8	0.8	3.2	0.6	1.4	0.7
30	0	0	5.2	0.9	4.8	0.4	3.0	1.0
32	0	0	6.8	1.3	6.4	0.5	5.4	1.4
34	0	0	8.8	1.2	8.2	1.2	7.6	1.8
36	0	0	9.8	1.2	9.6	1.2	8.8	1.6
40	0	0	10.8	0.9	10.6	1.1	10.2	1.5

Prophylactic effect: Total paw thickness (mm) (n=5)

Day	Normal		Arthritis control		Control plasmid		TSP-1 plasmid	
	mean	SE	mean	SE	mean	SE	mean	SE
22	7.42	0.20	7.410	0.200	7.400	0.160	7.360	0.120
24	7.39	0.17	7.638	0.234	7.522	0.153	7.360	0.116
26	7.43	0.14	7.772	0.280	7.660	0.239	7.440	0.142
28	7.41	0.22	8.104	0.227	7.954	0.214	7.608	0.200
30	7.40	0.19	8.724	0.388	8.470	0.204	8.116	0.295
32	7.38	0.17	9.102	0.588	9.056	0.138	8.716	0.358
34	7.41	0.18	9.558	0.508	9.390	0.637	9.260	0.469
36	7.38	0.16	9.854	0.388	9.640	0.535	9.464	0.521
40	7.40	0.18	9.918	0.338	9.928	0.458	9.866	0.439

Therapeutic effect: Arthritis score (n=5)

Week	Arthritis control		Control plasmid		TSP-1 plasmid	
	mean	SE	mean	SE	mean	SE
8	5.8	1.0	5.6	0.7	5.6	0.4
9	6.6	0.9	6.6	0.7	6.2	0.7
10	7.4	1.0	7.4	0.7	6.6	0.7
11	8.4	0.7	8.2	0.3	7.2	0.5
12	8.4	0.7	8.2	0.4	7.6	0.7

Therapeutic effect: Total paw thickness (mm) (n=5)

Week	Arthritis control		Control plasmid		TSP-1 plasmid	
	mean	SE	mean	SE	mean	SE
8	8.690	0.293	8.638	0.268	8.604	0.174
9	9.090	0.356	9.000	0.275	8.808	0.213
10	9.292	0.319	9.214	0.285	8.978	0.154
11	9.586	0.317	9.500	0.180	9.118	0.220
12	9.470	0.247	9.412	0.212	9.160	0.301

【考察】

近年、血管新生は各種疾患の治療の標的として研究が進んでいる。血管新生を用いた治療は、虚血性疾患のような血管新生を増強させるものと、癌や関節炎のように血管新生を抑制して組織の増殖を阻止しようとするものがある。関節炎においても血管新生の制御による治療への可能性が検討されてきている(16-19)。これらは、血管新生促進因子の発現や作用を低下せしめるもの、血管新生の機序に関与する分子の発現や作用を抑制するもの、血管新生抑制因子を発現させて血管新生を抑制するものの3つの戦略が考えられている。

本研究で我々が示したように、RAの滑膜組織においては血管新生促進因子と血管新生抑制因子の不均衡が生じ、血管新生が促進している。この事実をRAの治療に応用することを考えた場合、促進因子の発現を抑制する、抑制因子の発現を増強させる、の2つの方向性がある。前者の場合には血管新生促進因子に対する抗体の投与や、アンチセンス療法などが考えられ、後者の場合には遺伝子導入による遺伝子治療が考えられる。しかし、血管新生抑制因子は複数の分子が存在し、またそれら複数の分子が過剰に発現していると考えられるため、例えばVEGFの発現を抑制したとしても十分な血管新生抑制効果が得られるかどうかははなはだ疑問である。したがって、血管新生抑制因子の発現増強が選択すべき方向性であると考えた。

Thrombospondin-1(TSP-1)は450kDaの糖蛋白で、好中球、線維芽細胞、血管内皮細胞などの多くの細胞で産生される(20,21)。Extracellular matrixを構成する蛋白の一つであり、細胞間の様々な情報伝達にも作用することが知られている。たとえばCD36の関与するシグナル伝達によると血管新生を抑制するが、CD47の関与するシグナル伝達によればT細胞を活性化する作用も有することが知られている。

TSP-1が血管新生を抑制していることは、以下の複数の根拠による。例えば、Wild type p53はTSP-1発現を増強して血管新生を抑制する(22)、TSP-1はCD36を介するシグナルで新生血管の内皮細胞のapoptosisを誘導する(23)、Smad4/DCP-4はVEGF発現を抑制し、TSP-1発現を増強させることにより血管新生を抑制する(24)、HypoxiaはVEGF発現を増強し、TSP-1発現を抑制することにより血管新生を増強する(25)、TSP-1は各種の癌細胞で発現が低下している、などがそうである。このことからTSP-1は各種の固形癌に対する遺伝子治療の標的として検討されてきた(26-29)。

一方、TSP-1が血管新生を増強するとする意見もある。アジュバント関節炎ラットの

関節内に TSP-1 を投与すると関節炎が増強した (6) とか、TSP-1 は CD47 を介して T 細胞を活性化し、pro-angiogenic に作用する (30) などの報告がある。

今回の我々の検討によると、コラーゲン誘発マウスモデルにおいては少なくとも発症の遅延や炎症の抑制効果があることが確認された。したがって、TSP-1 を全身投与すれば滑膜炎を抑制することが明らかになった。TGF- β においても、局所投与したところ予想に反して炎症を増強したが、全身投与すると炎症を抑制することが報告されており (7)、遺伝子の導入方法と経路が問題がある可能性が考えられている。前述の Koch の知見 (6) との相違は、本研究がプラスミド DNA を筋肉内注射により全身投与したことによる可能性が高い。

ただし、TSP-1 導入による滑膜炎抑制効果は、決して十分なものではなかった。RA の病態には非常に多くの要因が関与していると考えられており、血管新生を抑制するのみでは滑膜炎を十分に制御することが出来ないことが考えられる。

しかしながら、RA 患者の中には初期から非常に強い滑膜炎があり、関節破壊が急速に進行する症例がある。そのような症例は通常、各種の抗リウマチ薬に対して抵抗性であり、患者の予後も悪いことが示されている。そのような例において、滑膜の血管新生を抑制することができれば、抗リウマチ薬による治療効果を増強させることになる可能性は十分に考えられる。今後、このような組み合わせによる相加・相乗効果についての検討も行っていきたいと考える。

以上のことから、TSP-1 導入による血管新生抑制は、進行性の RA の治療手段の一つとして、RA の治療体系の中に組み入れる価値があると考えられ、今後の研究が期待される。

【文献】

1. Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR : Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. Proc Natl Acad Sci USA. 94: 10895-10900, 1997.
2. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA and Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Science. 256: 1582-1584, 1994.

3. Albelda SM, Wiewrodt R, Zuckerman JB. Gene therapy for lung disease: hype or hope? *Ann Intern Med.* 132:649-660, 2000.
4. Boulay JL, Perruchoud AP, Reuter J, Bolliger C, Herrmann R, Rochlitz C.: P21 gene expression as an indicator for the activity of adenovirus-p53 gene therapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Gene Ther.* 7:1215-1219, 2000.
5. Kullmann F, Judex M, Neudecker I, Lechner S, Justen HP, Green DR, Wessinghage D, Firestein GS, Gay S, Scholmerich J, Muller-Ladner U.: Analysis of the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 42:1594-1600, 1999.
6. Koch AE, Szekanecz Z, Friedman J, Haines GK, Langman CB, Bouck NP : Effects of thrombospondin 1 on disease course and angiogenesis in rat adjuvant-induced arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 86:199-208, 1998
7. Song XY, Gu M, Jin WW, Klinman DM, Wahl SM: Plasmid DNA encoding transforming growth factor- β 1 suppresses chronic disease in a streptococcal cell wall-induced arthritis model. *J Clin Invest* 101:2615-2621,1998
- 8 : Folkman J : Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nature Med* 1:27-31, 1995
- 9: Koch AE : Angiogenesis Implications for rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 41:951-962, 1998
10. Taniguchi A, Kohsaka H, Carson DA.:Competitive RT-PCR ELISA: a rapid, sensitive and non-radioactive method to quantitate cytokine mRNA. *J Immunol Methods.* 169:101-109,1994
11. S.W.Hennesy et al., *J.Cell Biol.*108, 729-736, 1989 、 GenBank ; NM_003246

13. W. Paska, K. J. McDonald, and M. Croft. Studies on type II collagen-induced arthritis in mice. *Agent and Action*, 18, 413-4220, 1986.
14. K. Nemoto, T. Mae, F. Abe, and T. Takeuchi. Successful treatment with a novel immunosuppressive agent, deoxyspergualin, in type II collagen-induced arthritis in mice. *Immunomodulating Drugs* Annals of the New York Academy of Sciences 685, 148-154, 1993.
15. H. Kamada, and K. Nakagami. Effect of mizoribine on collagen-induced arthritis in mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 70, 169-175, 1996.
16. Storgard CM, Stupack DG, Jonczyk A, Goodman SL, Fox RI, Cheresch DA. Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an alphavbeta3 antagonist. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(1):47-54.
17. Brenchley PE. Angiogenesis in inflammatory joint disease: a target for therapeutic intervention. *Clin Exp Immunol*. 2000 Sep;121(3):426-9
18. de Bandt M, Grossin M, Weber AJ, Chopin M, Elbim C, Pla M, Gougerot-Pocidal MA, Gaudry M. 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 Sep;43(9):2056-63.
19. Lu J, Kasama T, Kobayashi K, Yoda Y, Shiozawa F, Hanyuda M, Negishi M, Ide H, Adachi M. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5922-7.
20. Vacca A, Di Marcotullio L, Giannini G, Farina M, Scarpa S, Stoppacciaro A, Calce A, Maroder M, Frati L, Screpanti I, Gulino A.: Thrombospondin-1 is a mediator of the neurotypic differentiation induced by EGF in thymic epithelial

- cells. *Exp Cell Res.* 1999 Apr 10;248(1):79-86.
21. Chen H, Herndon ME, Lawler J.: The cell biology of thrombospondin-1
Matrix Biol. 2000 Dec;19(7):597-614.
 22. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N.: Control of angiogenesis
in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.* 1994 Sep
9;265(5178):1582-4.
 23. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N :
Signal leading apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by
thrombospondin 1. *Nature Med* 6:41-48, 2000.
 24. Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory
S, Luttes J, Kloppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A,
Schmiegel W: Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression
of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9624-9.
 25. Laderoute KR, Alarcon RM, Brody MD, Caloagan JM, Chen EY, Knapp
AM, Yun Z, Denko NC, Giaccia AJ.: Opposing effects of hypoxia on
expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic
inducer vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res.* 2000
Jul;6(7):2941-50.
 26. Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, Frazier WA, Roberts
DD, Steeg PS. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a
human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic
potential, and angiogenesis. *Cancer Res.* 1994 Dec 15;54(24):6504-11.
 27. Roberts, D.D. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1.
FASEB J. 10, 1183-1191, 1996
 28. Xu M, Kumar D, Stass SA, Mixson AJ. : Gene therapy with p53 and a
fragment of thrombospondin I inhibits human breast cancer in vivo. *Mol*

Genet Metab. 1998 Feb;63(2):103-9.

29. Guo N, Templeton NS, Al-Barazi H, Cashel JA, Sipes JM, Kruttsch HC, Roberts DD: Thrombospondin-1 promotes alpha3beta1 integrin-mediated adhesion and neurite-like outgrowth and inhibits proliferation of small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000 Jan 15;60(2):457-66.
30. Vallejo AN, Mugge LO, Klimiuk PA, Weyand CM, Goronzy JJ.: Central role of thrombospondin-1 in the activation and clonal expansion of inflammatory T cells. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):2947-54.

3. 各因子の発現と光顯的所見の関連

まず、各症例の滑膜炎の程度を光顯的に半定量化した。滑膜炎の活動性を表層細胞の重層化、血管形成、リンパ球浸潤の3項目につき各々0~3点とし、合計点数で滑膜炎の活動性をスコア化した。

次に、各症例における血管新生抑制因子、促進因子の免疫化学染色の強度を0~3点として表し、光顯における滑膜炎のスコアと対比した(表2-2)。

表 2-2

Relationship between the histological activity and the expression of angiogenesis-related proteins in rheumatoid synovium

	Scores of synovial histology				Scores of immunoreactions						
	Lining cel hyperplasia	Vascular changes	Leukocyte infiltrates	Total score	TSP-1	VEGF	HGF	PDGF	FGF	TNF- α	Ang-1
#1	3	2	2	7	1	3	3	3	1	1	1
#2	3	2	2	7	1	2	3	3	0	1	1
#3	3	2	2	7	1	3	3	3	3	3	3
#4	2	2	1	5	2	2	2	3	1	1	1
#5	2	2	1	5	2	1	3	3	1	2	1
#6	1	2	1	4	1	1	3	3	1	1	1
#7	1	2	1	4	2	1	3	3	1	1	1
#8	1	1	1	3	2	1	3	3	1	2	1
#9	1	1	1	3	2	1	3	3	0	1	1
#10	1	1	1	3	2	1	3	3	1	1	0
#11	1	1	1	3	2	1	3	3	0	2	2