

## Mini Review

# エンドスタチンの関節炎抑制効果

黒坂大太郎, 吉田 健

東京慈恵会医科大学リウマチ・膠原病内科

### *Arthritis-inhibiting effect of endostatin*

Neovascularization observed in the synovial tissue of rheumatoid arthritis is essential for the nutrition of proliferating synovial tissue; therefore, attempts have recently been made to use angiogenesis-inhibiting drugs for the treatment of arthritis. Endostatin is a C-terminal noncollagen-region fragment of type XVIII collagen, and has a potent angiogenesis-inhibiting effect. Recently, we have systemically administered endostatin to arthritic mice to investigate its arthritis-inhibiting effect. We induced the development of arthritis in 6-week-old female Balb/c mice by administering four kinds of monoclonal anti-type II collagen antibodies followed by LPS 3 days later. Three endostatin groups of mice received 0.2 mg/kg/day, 2 mg/kg/day, or 10 mg/kg/day for 13 days before the development of arthritis, and a control group received PBS. Arthritis was evaluated by arthritis scores and hind paw thickness. In addition, the left and right foot joints were collected on the 22nd day of administration of monoclonal anti-type II collagen antibody, and histopathological preparations were made. Arthritis scores and hind paw thickness were lower in the 10 mg/kg/day group than in the control group. Histopathological examination showed that pannus formation and bone destruction were suppressed in the endostatin group compared with the control group. No severe side effects occurred in the endostatin-administered mice. These results suggest that endostatin is a promising new antiarthritic drug with few side effects and a novel mechanism of action.

Rec.12/3/2003, Acc.1/28/2004, pp107-112

Daitaro Kurosaka, Ken Yoshida

Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine,  
Jikei University School of Medicine

**Key words** endostatin arthritis angiogenesis collagen drug

## はじめに

関節リウマチ (RA: rheumatoid arthritis) は関節滑膜組織を病変の主座とした慢性炎症性の疾患である。RAの炎症滑膜組織には、多数の血管新生、炎症細胞浸潤を認める。炎症性滑膜組織に観察される新生血管は、増殖する滑膜組織を栄養するために必須のものである。新生血管の増殖を抑制すれば関節炎が抑制されるという仮説に基づいてRAの動物モデルに血管新生阻害薬を投与し、関節炎に対する抑制効果を観察した報告がいくつかなされている。エンドスタチンは血管内皮腫細胞の培養上清から単離された強力な血管新生阻害作用を持つ物質である。我々は最近、このエンドスタチンを関節炎マウスに全身投与し、関節炎が著明に抑制されたことを報告した。そこで本稿においては我々のデータを紹介し、関節炎治療薬としてのエンドスタチンの可能性について述べたい。

## エンドスタチンによる関節炎の治療

関節炎の治療薬としてエンドスタチンの可能性を探る上で今までに興味深い報告がなされている。Matsunoらは、SCIDマウスに埋め込んだヒト関節リウマチ由来滑膜組織がエンドスタチンの局所投与によって著明に退縮することを報告した<sup>1)</sup>。Yinらはエンドスタチン遺伝子が発現するように調整したlentiviralベクターを直接、関節炎マウスの関節部に注入し、関節炎が改善されたと報告した<sup>2)</sup>。我々も実用化に向けて最も可能性の高い投与方法と考えられるリコンビナントエンドスタチンを全身投与する方法により、関節炎マウスの関節炎が抑制されたことを報告した<sup>3)</sup>。

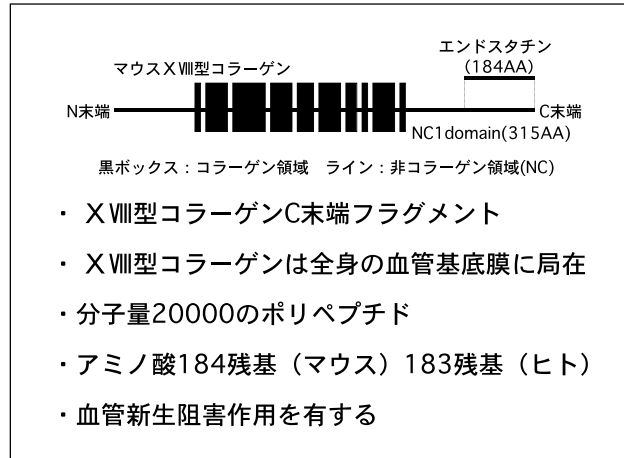


図1 エンドスタチンの構造と生理活性

## 関節リウマチ患者におけるエンドスタチンの動向

NagashimaらはRA患者における末梢血と関節液のエンドスタチン濃度を検討した<sup>4)</sup>。この報告によると、RA患者におけるエンドスタチン濃度は末梢血、関節液とも変形性関節症患者を含む非RA患者と比べて変わらなかった。それに対して血管新生促進因子であるVEGF(vascular endothelial growth factor)は、RA患者において末梢血、関節液とも上昇していた。また、VEGFは治療により減少傾向を示すのに対し、エンドスタチンは治療により増加傾向を示した。このことから彼らは、RAにおいてはVEGFなどの血管新生促進因子とエンドスタチンなどの血管新生抑制因子のバランスが重要と考えた。そしてRA活動期は、このバランスが血管新生促進因子に傾いていると考えた。RAにおいて炎症が拡大していくとき、血管が新生され、その働きを抑制するためbio-feedback作用によりエンドスタチンが増加している可能性も考えられたが、実際は増加していなかった。この点は重要と考えられる。なぜなら、もしエンドスタチンがRAにおいて不変あるいは減少していれば、投与することにより病態が改善することが期待できるが、すでに増加していた場合、さらに投与して効果があるかどうかは疑問が残るからである。

## 血管新生阻害による関節炎の治療

エンドスタチン以外、関節炎の抑制効果が報告された血管新生阻害薬としては真菌由来の物質であるTNP-470<sup>5-7)</sup>、インテグリンV3アンタゴニスト<sup>8)</sup>などがある。また、血管新生促進因子と考えられているVEGFをブロックすることによって関節炎を抑制させた報告もある<sup>9,10)</sup>。さらに、最近強力な血管新生阻害作用を示すアンギオスタチンの遺伝子をレトロウイルスのベクターに組み込み、

これを用いたRAの動物モデルの遺伝子治療が報告された<sup>11)</sup>。一方、現在のRA治療の中心となっている抗リウマチ薬の多くは、その作用機序の一部に血管新生阻害作用を持つ。例えば、メトトレキサートは家兎角膜にECGF(endothelial cell growth factor)を添加することにより誘導される血管新生を抑制すると報告されている<sup>12)</sup>。

## エンドスタチンの構造と生理活性

エンドスタチンは血管内皮細胞の増殖阻害活性を指標として、腫瘍細胞が産生する内因性の血管新生阻害因子をスクリーニングする過程でマウス血管内皮腫細胞の培養上清から単離された<sup>13)</sup>。そのアミノ酸配列からXV型コラーゲンのC末端非コラーゲン領域のフラグメントと同定された<sup>13)</sup>(図1)。XV型コラーゲンの機能はまだ十分には解明されていないが、血管や上皮下の広汎な基底膜層に分布している<sup>14)</sup>。エンドスタチンの分子量は20,000でアミノ酸184残基(マウス)ないしは、アミノ酸183残基(ヒト)からなる。エンドスタチンは同定された経緯からも分かるよう、血管内皮細胞に対して主に作用すると考えられている。例えば、大腸菌由来の組み換えエンドスタチンはマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍血管の新生を阻害することが報告されている<sup>13)</sup>。このため抗腫瘍薬として注目され、現在、抗癌薬としての治験が米国において進行中である。また、*in vitro*の系においても例えば、HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)アッセイ系においてVEGFによって起こる血管内皮細胞の遊走を阻害する<sup>15)</sup>(図2)。

## 全身投与法によるエンドスタチンの関節炎抑制効果

エンドスタチンは血管内皮細胞に対する作用以外、特

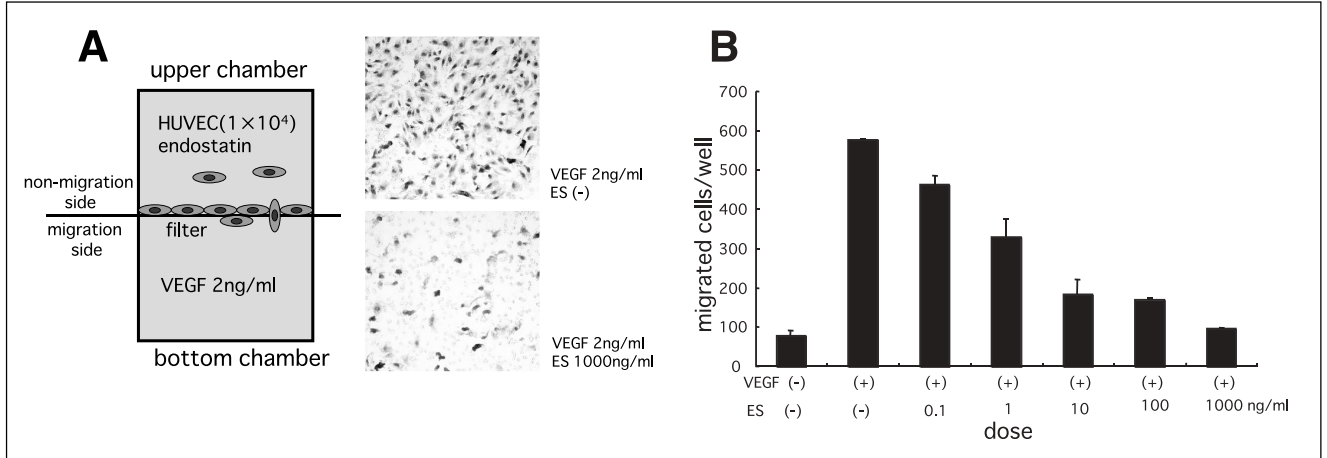


図2 ヒト臍帯静脈血管内皮細胞遊走アッセイ系におけるエンドスタチンの効果

- A: ケモタキスチャンバーの上層チャンバーと下層チャンバーの間に型コラーゲンでコートしたポリカーボネイトフィルターを挟んだ。上層チャンバーには、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞浮遊液を入れた。下層チャンバーの培養液にはVEGFを添加した。6時間培養後、フィルターを通過し、フィルターの反対側に付着した細胞を観察した。エンドスタチンを培養液に加えた場合、遊走した細胞が減少していた。
- B: 縦軸には1ウェルあたりの遊走した血管内皮細胞数を示した。0.1ng/mlから10ng/mlまでの間はエンドスタチンは濃度依存的にVEGFによって促進される血管内皮細胞の遊走を抑制した。

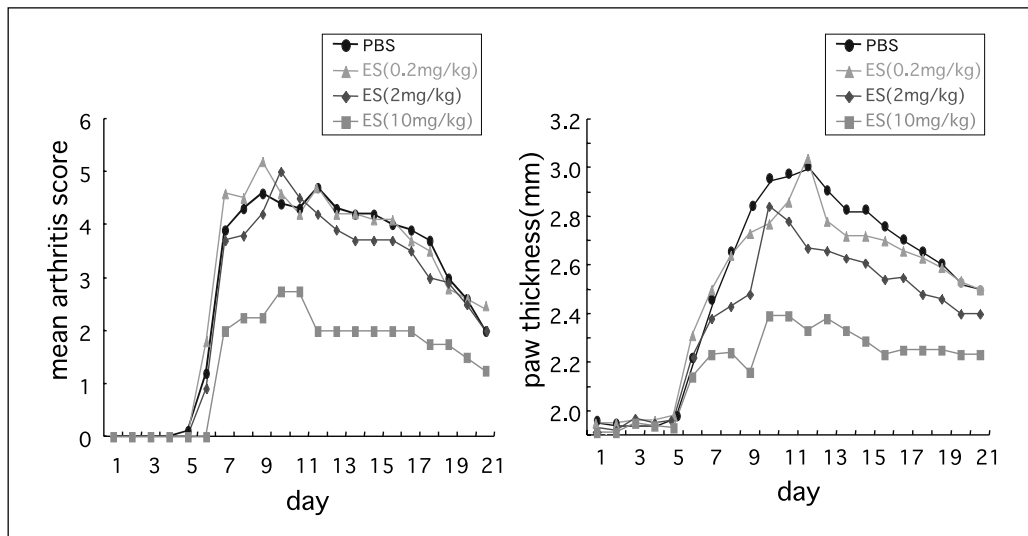


図3 関節炎点数と後肢の腫脹の時間的推移

関節炎点数は、0点;腫脹なし,1点;軽度の腫脹と発赤,2点;著明な腫脹(浮腫),3点;関節の強直,の4段階で前後と後肢の計4関節の合計で評価した。関節炎点数は、エンドスタチン10mg/kg/day投与群においてコントロール群と比べて低く推移した。後肢の厚さにおいても同様の傾向がみられた。

に免疫系細胞に対する作用はほとんど調べられていない。そのため、今回エンドスタチンの関節炎に対する薬効を評価する上で、関節炎発症の際、なるべく免疫細胞の関与が少ないと考えられるpassiveな実験的関節炎モデルを選択した。6週令雌のBalb/cマウスに4種類の抗型コラーゲンモノクローナル抗体を投与し、その3日後LPSを投与し関節炎を発症させた。エンドスタチン投与群は0.2mg/kg/day,2mg/kg/day,10mg/kg/dayの3群に分け検討

した。投与方法としては背部皮下に1日2回に分け投与した。コントロール群にはPBSを投与した。投与は関節炎発症前から13日間行った。関節炎の評価は、関節炎点数および後肢の厚さにより行った(図3)。関節炎点数は、エンドスタチン10mg/kg/day投与群においてコントロール群と比べて統計学的に有意に低く推移した。後肢の厚さにおいても同様の傾向がみられた。0.2mg/kg/dayの量では関節炎抑制効果は認められなかった。2mg/kg/dayの量では

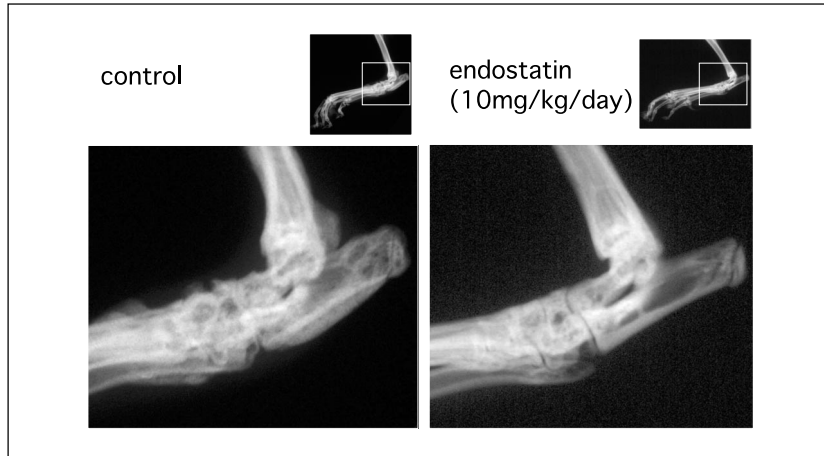


図4 エンドスタチン投与群とコントロール群の後肢のX線所見の比較  
 エンドスタチン投与群(10mg/kg/day)はコントロール群と比べてX線所見における骨破壊像が抑制されていた。

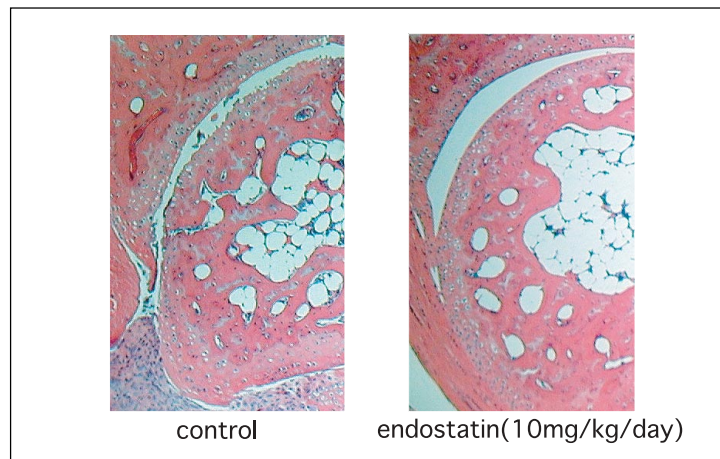


図5 エンドスタチン投与群とコントロール群の足関節の病理組織学的所見の比較

コントロール群に認められた軟骨や骨の侵食像およびパンヌスの形成はエンドスタチン投与群(10mg/kg/day)においてはかなり抑えられていた。

ある程度、関節炎抑制効果はあると考えられた。実験最終日の後肢のX線像を図4に示した。X線像においても10mg/kg投与群ではコントロール群と比べて骨破壊像が抑制されていた。

### エンドスタチンの関節炎抑制効果における病理組織学的検討

実験最終日に足関節の病理組織学的観察を行った。図5にPBSを投与した関節炎マウスとエンドスタチンを10mg/kg/day投与した関節炎マウスの足関節の病理組織像を示した。コントロール群(PBS投与群)では、軟骨や骨の侵食像、炎症性滑膜肉芽組織(パンヌス)の形成などが認められた。一方、エンドスタチン10mg/kg/day投与群で

は、これらの変化はかなり抑えられていた。

### エンドスタチンの関節炎抑制における作用機序

エンドスタチンの全身投与が関節炎を抑制することを今回確認することができたが、関節炎抑制機序について今後、解明すべき点は多い。エンドスタチンの血管内皮細胞の遊走阻害に関しては、エンドスタチンが血管内皮細胞膜上の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンと結合することにより、遊走が抑制されると報告がなされている<sup>16)</sup>。RA関節炎モデルマウスに対して、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンアンタゴニストを投与し、関節炎が抑制されたとする報告がある。このようなことから、エンドスタチンが血管内皮細胞上のイン

テグリンに対して作用し、血管新生が阻害され、その結果、関節炎が抑制された可能性はありとされる。また、エンドスタチンはプロ MMP-2 (MMP: matrix metallo proteinase) を活性化する MT1-MMP (MT: membrane type) を阻害し、さらに活性化された MMP-2 も阻害すると報告されている<sup>17)</sup>。MT1-MMP は血管内皮細胞の線溶活性に寄与し、血管新生を調節する重要な物質である。また、MMP-2 も細胞外マトリックス分解酵素として重要な酵素で関節炎の進行に関与することはよく知られている。したがって、投与したエンドスタチンがこれら MMP の阻害を介して関節炎を抑制した可能性も考慮すべきである。さらに最近、エンドスタチンは VEGF のレセプターである KDR/Flt-1 に直接的に作用し、VEGF の細胞内シグナルをブロックすると報告された<sup>18)</sup>。VEGF は関節炎の病態に重要な働きをする物質である。したがって、投与したエンドスタチンが VEGF の働きを阻害することにより関節炎を抑制した可能性もある。

## 血管新生阻害療法におけるリコンビナントエンドスタチン投与の利点

関節炎治療薬としてのリコンビナントエンドスタチンの最も優れた点は副作用が少ないことである。今回我々が行った実験においても、リコンビナントエンドスタチンを投与したマウスを観察した範囲では、重篤な副作用は起きていなかった。リコンビナントエンドスタチンは抗癌薬として米国で治験が行われているが、今のところヒトへの投与においても重篤な副作用は報告されていない<sup>19-21)</sup>。エンドスタチンは生体内に存在し、ある程度血中で測定できる物質である。今までに試みられた血管新生阻害による関節炎の治療方法のほとんどは、生体に存在していない物質の投与であった。TNP-470 は真菌由来の物質である。インテグリンの 5V 3 アンタゴニストは cyclic peptide である。また、抗体療法の場合は異種タンパクの問題が残り、遺伝子治療の場合はベクターの安全性の問題が残る。

このようにエンドスタチンは比較的副作用の少ない安全な薬剤と考えられるが、血管内皮細胞の遊走を抑え、血管新生を抑制する因子であるので、動脈硬化性病変の悪化を招く可能性はありとされる。また、エンドスタチンが、血漿中で増加している疾患に全身性強皮症が報告されており、エンドスタチンがその血管病変に関与している可能性が示唆された<sup>22)</sup>。動脈硬化病変を有する高齢者や末梢の血流障害がある RA 患者は、けっして少なくはなく、今後、全身投与を実現するためには血管障害性の検討は必要であろう。

2 点目としては、作用機序に関する点があげられる。最近 RA の治療として抗サイトカイン療法が注目されている。しかしながら、これらの薬物では血管新生抑制が主たる作用機序ではない。一方、エンドスタチンによる治療は、正確な作用機序は不明な点が多いが、主に血管新生そのものをターゲットとした機序と考えられている。エンドスタチンは RA の治療薬として抗サイトカイン薬とは異なる作用機序を持った治療薬であると考えられる。言い換えるとエンドスタチンは、抗サイトカイン療法では解決できない病態へ応用できる可能性を持った薬剤である。さらに、エンドスタチンと抗サイトカイン薬と併用療法などの可能性も考えられる。

## おわりに

エンドスタチンは、従来開発されてきた薬物とは異なるユニークな作用機序を持つ関節炎治療薬となる可能性がある。しかしながら、エンドスタチンの血管新生阻害における作用機序についてはまだ不明な点も多い。さらに炎症性疾患における血管新生の病態についてもまだ十分に解明されていない。今後、この分野の発展を期待したい。

本研究は東京医科歯科大学 山口典子先生、国立佐倉病院 城謙輔先生との共同研究であります。両先生に感謝致します。また、当研究に対して御指導をいただいている山田昭夫教授に深謝します。

## 文 献

- 1) Matsuno H, Yudoh K, Uzuki M, Nakazawa F, Sawai T, Yamaguchi N, Olsen BR, Kimura T: Treatment with the Angiogenesis Inhibitor Endostatin: A Novel Therapy in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*, 29: 890-895, 2002.
- 2) Yin G, Liu W, An P, Li P, Ding I, Planelles V, Schwarz EM, Min W: Endostatin Gene Transfer Inhibits Joint Angiogenesis and Pannus Formation in Inflammatory Arthritis. *Mol Ther*, 5: 547-554, 2002.
- 3) Kurosaka D, Yoshida K, Yasuda J, Yokoyama T, Kingetsu I, Yamaguchi N, Joh K, Matsushima M, Saito S, Yamada A: Inhibition of arthritis by systemic administration of endostatin in passive murine collagen induced arthritis. *Ann Rheum Dis*, 62: 677-679, 2003.
- 4) Nagashima M, Asano G, Yoshino S: Imbalance in Production Between Vascular Endothelial Growth Factor and Endostatin in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*, 27: 2339-2342, 2000.
- 5) Peacock DJ, Banquerigo ML, Brahn E: Angiogenesis In-

- hibition Suppresses Collagen Arthritis. *J Exp Med*, 175: 1135-1138, 1992.
- 6) Oliver SJ, Banquerigo ML, Brahn E: Suppression of Collagen-Induced Arthritis Using an Angiogenesis Inhibitor, AGM-1470, and a Microtubule Stabilizer, Taxol. *Cell Immunol*, 157: 291-299, 1994.
  - 7) Bandt MD, Grossin M, Weber AJ, Chopin M, Elbim C, Pla M, Gougerot-Pocidallo M-A, 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*, 43: 2056-2063, 2000.
  - 8) Storgard CM, Stupack DG, Jonczyk A, Goodman SL, Fox RI, Cheresch DA: Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an  $\alpha$ 3 antagonist. *J Clin Invest*, 103: 47-54, 1999.
  - 9) 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*, 164: 5922-5927, 2000.
  - 10) Miotla J, Maciewicz R, Kendrew J, Feldmann M, Paleolog E: Treatment with Soluble VEGF Receptor Reduces Disease Severity in Murine Collagen-Induced Arthritis. *Lab Invest*, 80: 1195-1205, 2000.
  - 11) Kim J-M, Ho S-H, Park E-J, Hahn W, Cho H, Jeong J-G, Lee Y-W, Kim S: Angiostatin Gene Transfer as an Effective Treatment Strategy in Murine Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis Rheum*, 46: 793-801, 2002.
  - 12) Hirata S, Matsubara T, Sakura R, Tateishi H, Hirohata K: Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularization by low-dose methotrexate. *Arthritis Rheum*, 32: 1065-1073, 1989.
  - 13) O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J: Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell*, 88: 277-285, 1997.
  - 14) Halfter W, Dong S, Schurer B, Cole GJ: Collagen XVIII Is A Basement Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan. *J Biol Chem*, 273: 25404-25412, 1998.
  - 15) Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, Sasaki T, Fukai N, Shapiro R, Que I, Lowik C, Timpl R, Olsen BR: Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J*, 18: 4414-4423, 1999.
  - 16) Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, Nakamura H, Ilmonen M, Lombardo CR, Pihlajaniemi T, Alitalo K, Vuori K: Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 1024-1029, 2001.
  - 17) Kim Y-M, Jang J-W, Lee O-H, Yeon J, Choi E-Y, Kim K-W, Lee S-T, Kwon Y-G: Endostatin Inhibits Endothelial and Tumor Cellular Invasion by Blocking the Activation and Catalytic Activity of Matrix Metalloproteinase 2. *Cancer Res*, 60: 5410-5413, 2000.
  - 18) Kim Y-M, Hwang S, Kim Y-M, Pyun B-J, Kim T-Y, Lee S-T, Gho Y-S, Kwon Y-G: Endostatin Blocks Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Signaling via Direct Interaction with KDR/Fik-1. *J Biol Chem*, 277: 27872-27879, 2002.
  - 19) Eder JP Jr, Supko JG, Clark JW, Puchalski TA, Garcia-Carbonero R, Ryan DP, Shulman LN, Proper J, Kirvan M, Rattner B, Connors S, Keogan MT, Janicek MJ, Fogler WE, Schnipper L, Kinchla N, Sidor C, Phillips E, Folkman J, Kufe DW: Phase I Clinical Trial of Recombinant Human Endostatin Administered as a Short Intravenous Infusion Repeated Daily. *J Clin Oncol*, 20: 3772-3784, 2002.
  - 20) Herbst RS, Hess KR, Tran HT, Tseng JE, Mullani NA, Charnsangavej C, Madden T, Davis DW, McConkey DJ, O'Reilly MS, Ellis LM, Pluda J, Hong WK, Abbruzzese JL: Phase I Study of Recombinant Human Endostatin in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol*, 20: 3792-3803, 2002.
  - 21) Thomas JP, Arzooonian RZ, Alberti D, Marnocha R, Lee F, Friedl A, Tutsch K, Dresen A, Geiger P, Pluda J, Fogler W, Schiller JH, Wilding G: Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Recombinant Human Endostatin in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol*, 21: 223-231, 2003.
  - 22) Hebbar M, Peyrat J-P, Hornez L, Hatron P-Y, Hachulla E, Devulder B: Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 43: 889-893, 2000.