

日本臨牀 第62巻・第7号（平成16年7月号）別刷

特集：癌の分子標的治療

血管内皮増殖因子(VEGF)の機能を 標的とした新規血管新生阻害剤

掛谷秀昭 長田裕之

血管内皮増殖因子(VEGF)の機能を 標的とした新規血管新生阻害剤

掛谷秀昭 長田裕之

Development of novel angiogenesis inhibitors targeting VEGF (vascular endothelial growth factor) for cancer chemotherapy

Hideaki Kakeya, Hiroyuki Osada

Antibiotics Laboratory, Discovery Research Institute, RIKEN

Abstract

Recent progress in cancer biology has revealed that angiogenesis is a promising target for new anticancer drugs. Angiogenesis is tightly regulated by the balance between stimulatory and inhibitory angiogenic factors, and the imbalance of these regulators causes dysfunction of angiogenesis. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the best characterized pro-angiogenic factors, and multiple strategies have been studied to inhibit the pathway; *i. e.* production and secretion of VEGF receptor, VEGF binding to its receptor, tyrosine kinase activity of VEGF, and signaling pathway downstream induced by VEGF. In this article, the summary of function of VEGF family as well as recent promising drugs under clinical trials including bevacizumab (Avastin), a humanized monoclonal antibody developed against VEGF, and several small molecule inhibitors targeting VEGF function are described.

Key words: angiogenesis inhibitor, vascular endothelial growth factor (VEGF), molecular target therapy, cancer chemotherapy, drug screening

はじめに

癌の増殖・転移、腫瘍血管新生には様々なシグナル伝達分子が関与し、癌を特徴づけるシグナル伝達分子を標的とした分子標的治療薬の開発研究が世界中で活発に行われている。その中で、腫瘍血管新生および癌の増殖・転移にかかわる重要な血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) を標的とした中和抗体 (bevacizumab/Avastin) の画期的な第 III 相臨床試験成績が、2003 年度米国臨床腫瘍学会

(ASCO 2003) で発表された。これまで多少不安視されていた血管新生過程を標的とした分子標的治療薬が、真に癌化学療法の一つとして臨床の現場に貢献する日は近いと思われる。

I. VEGF の多様な生物学的機能

脊椎動物に特徴的な血管系は、胎生初期の血管発生 (vasculogenesis) とそれ以後の血管新生 (angiogenesis)、および様々な血管のリモデリングによって構築される。癌の進展、糖尿病網膜症などの眼科疾患、リウマチ性関節炎などの

表1 VEGFの多様な生物学的機能

血管内皮細胞の遊走・増殖誘導・生存維持
血管透過性の亢進
プロテアーゼの誘導
血管内皮前駆細胞の誘導
血管発生
正常および病的血管新生
リンパ管新生
樹状細胞の分化抑制
マクロファージに対する走化性誘導
血小板に対する遊走誘導
組織因子の発現誘導
神経システムへの関与

炎症性疾患などにおいては、過度の血管新生が病態の進展と密接に関連している。これらの様々な局面で観察される異常な血管新生を引き起こす重要な蛋白質の一つとしてVEGFが見いだされ、VEGFは内皮細胞膜上に発現する特異的受容体VEGFR(VEGF receptor)を介して作用を発揮する¹⁻³⁾。VEGFは基底膜分解酵素の発現、血管内皮細胞の生存、遊走、増殖、管腔形成といった腫瘍血管新生のほとんどのステップに関与しているのみならず、血管・血液・凝固系に対する多様な生物学的機能を有している(表1)。例えば、VEGFは循環血中の骨髓由来血管内皮前駆細胞の腫瘍局所へのリクルートと分化を誘導する。更には、VEGFは樹状細胞の分化抑制効果やマクロファージに対する走化性誘導効果を有している。一方、凝固系に対してもVEGFは、組織因子(tissue factor: TF)の発現誘導を亢進させたり、血小板に対する遊走誘導効果も有している。VEGFは、脳腫瘍、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、大腸癌、卵巣癌など多くの固形腫瘍で予後因子としても利用され得る⁴⁾。

II. VEGFファミリー

VEGFは、血管透過性亢進因子、および、培養血管内皮細胞に対する増殖因子の2つの性質をもつ物質として単離された糖蛋白質でVEGF-Aとも呼ばれている¹⁻³⁾。VEGFは構造的には血小板由来増殖因子(platelet derived growth factor: PDGF)に近縁でファミリー(VEGF-A, B, C,

D, E, PlGF)を構成するが、いずれもPDGFR(PDGF receptor)には結合しない(図1)。VEGF-Aのサブタイプとして、121, 165, 189のアミノ酸タイプが主に存在するが、なかでも主要なサブタイプであるVEGF-A₁₆₅は塩基性ドメインを介して細胞膜表面や細胞間基質、更には分子量130 kDのニューロピリンと会合しながらVEGFRに作用する。VEGF-Aは特異的レセプターとしてVEGFR-1(Flt-1)とVEGFR-2(KDR/Flk-1)を利用し、内皮細胞の増殖促進、アポトーシス抑制、管腔形成の促進、内皮細胞の遊走、細胞接着分子の内皮細胞上への発現などを誘導する。

胎盤成長因子(placenta growth factor: PlGF)、VEGF-BはそれぞれVEGFR-1のみをレセプターとするが、これらのリガンドの生物学的活性はVEGF-Aと比較すると約1/10程度かそれ以下である。VEGF-C, Dは、一部VEGFR-2を利用するが主としてVEGFR-3(Flt-4)を介して生体にリンパ管を誘導する唯一のシステムである。VEGF-EはVEGFR-2のみに結合してVEGF-Aとほぼ同等の生物活性を有する。

III. VEGFレセプター群の細胞内情報伝達

VEGF-AのレセプターであるVEGFR-1, 2は、レセプター型チロシンキナーゼである。VEGFR-2は、他のチロシンキナーゼ型レセプターとは異なり、Ras系よりも主としてPLC γ -PKC系を介して、Raf-MEK-ERKキナーゼ系の活性化を引き起こすことが渋谷らにより示された⁵⁾。これは、VEGFRの全体の構造は細胞外ドメインに5つのIg様構造を有する点でPDGFR/fms/Kitとよく類似しているが、シグナル伝達に重要なキナーゼドメイン内約70アミノ酸のキナーゼ挿入領域内部のモチーフが両者で大きく異なることなどが一因かもしれない⁶⁾。最近、このVEGFによるRas非依存的なRaf-MEK-ERKの活性化経路を、Rafと結合したSprouty4がネガティブに制御している可能性も示されている⁷⁾。

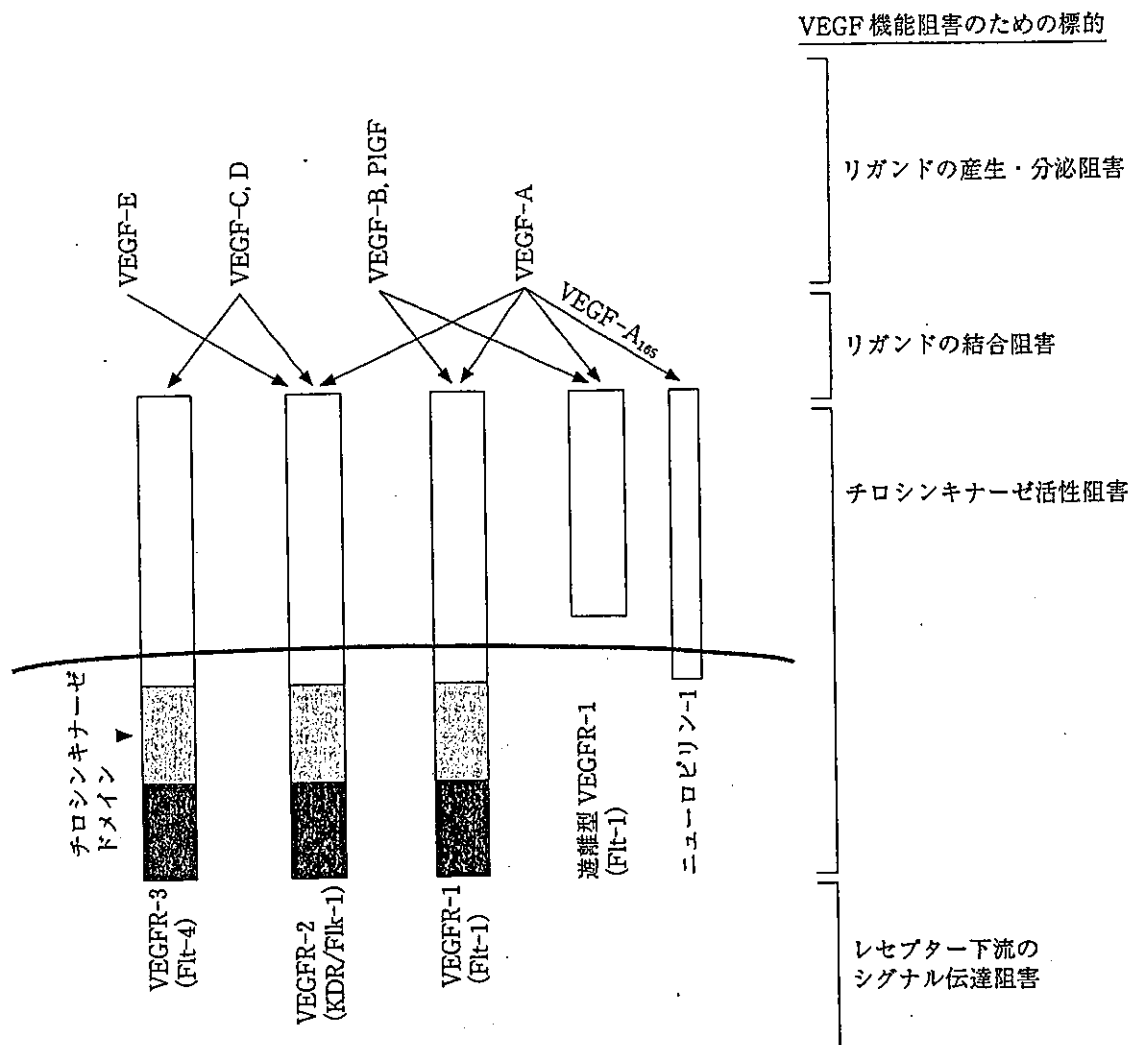


図1 VEGF-VEGFR系システムとVEGF機能阻害のための標的
(文献⁹⁾より改変引用)

IV. VEGFの機能を標的とした抗癌剤 開発の現状

固形癌、腹水癌などの悪性腫瘍の進展においてVEGFの産生増大が認められ、VEGFは腫瘍細胞や腫瘍局所における間質細胞などから放出されて腫瘍部位での血管新生を亢進させる^{1-3,6)}。したがって、VEGFの機能阻害のための戦略としては、①VEGFの産生・分泌の阻害、②VEGFとVEGFRとの結合阻害、③VEGFRの有するチロシンキナーゼ活性の阻害、④VEGFR下流の重要なシグナル伝達分子の阻害、などがあげられる。近年の画期的な分子標的治療薬の代表例としては、imatinib (Gleevec) および gefitinib (Iressa) などがあげられるが、それぞれ Bcr

-Abl, 上皮増殖因子レセプター (epidermal growth factor receptor: EGFR) といったレセプター型チロシンキナーゼの立体構造に基づいた論理的薬剤設計および莫大な構造活性相関研究の結果の成功例であり、阻害標的、化合物、評価系の質の高さの重要性が伺える⁸⁻¹⁰⁾。ここでは、現在臨床試験段階にあるVEGFを標的とした薬剤の中で、特に、VEGFRのチロシンキナーゼ活性阻害剤およびVEGF機能全般を標的とした中和抗体について紹介する(表2, 図2)。

1. PTK787/ZK222584

PTK787/ZK222584は、VEGFR-2を最も強く阻害する経口投与可能な anilinothalazine 骨格を有する化合物である。PTK787/ZK222584は、VEGFR-2を阻害する濃度 (IC₅₀=37 nM) による

表2 代表的な臨床開発中のVEGFを標的とした血管新生阻害剤

薬 剤	分子標的	薬剤の分類	開発段階*	開発会社
bevacizumab (Avastin)	VEGF	抗体	III	Genentech
PTK787/ ZK222584	VEGFR-2, (PDGFR- β)	阻害剤	II/III	Novartis
SU11248	VEGFR-2, PDGFR- β	阻害剤	I/II	Sugen/Pharmacia
ZD6474	VEGFR-2, (EGFR)	阻害剤	I	AstraZeneca
CEP-7055	VEGFR, (MLK)	阻害剤	I	Cephalon
IM862	VEGFR-2, bFGF	産生抑制剤	I	Cytran
血小板第4因子	VEGF, collagenase	阻害剤	I	Repligen

*I, II, IIIは, それぞれ第I, II, III相臨床試験を表す。

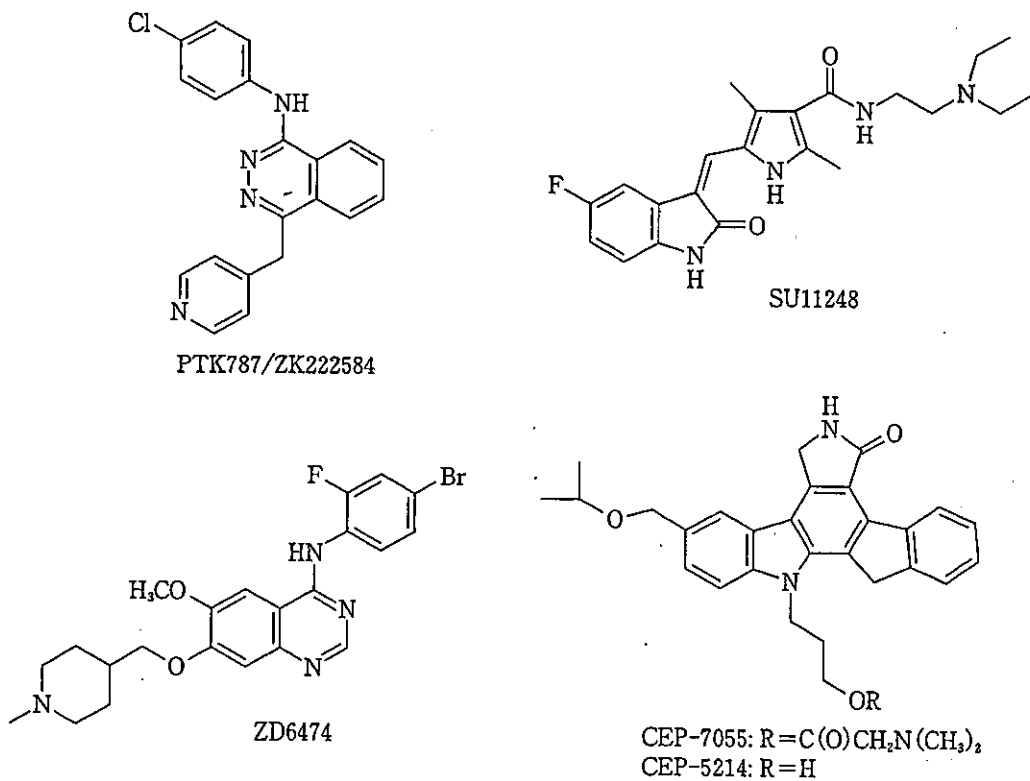


図2 VEGFR阻害剤の化学構造

りやや高い濃度でPDGFR- β , c-Kit, c-Fmsなども阻害するが, EGFR, FGFR-1, c-Met, Tie-2などの他のチロシンキナーゼ活性は阻害しない¹¹⁾. PTK787/ZK222584は, 培養内皮細胞においてもnMレベルでVEGFが誘導するVEGFR-2の自己リン酸化, 遊走, 増殖, 生存を効果的に抑制できる. PTK787/ZK222584をマウスモデルに50mg/kgで投与すると, 血漿中のPTK787/ZK222584の濃度は8時間以上も約1 μ M

の有効濃度が保たれる. PTK787/ZK222584は, 様々なヒト腫瘍を移植したマウス xenograftモデルにおいて25-100mg/kg/dayの投与スケジュールで腫瘍血管新生を減少させ顕著な抗腫瘍効果を示す. 大腸癌, 腎臓癌, グリオブラストーマ, 前立腺癌を対象に行われた第I相臨床試験では, stable disease(SD)の効果が得られ, 現在, 第II/III相臨床試験が行われている.

2. SU11248

SU11248 は indolin-2-one 骨格を有し VEGFR-2, PDGFR- β をそれぞれ 80, 20 nM の濃度 (IC₅₀) で阻害し, かつ Kit, FLT3 などの受容体型チロシンキナーゼもやや高い濃度であるが, 阻害できるいわゆる broad-specificity チロシンキナーゼ阻害剤である。SU11248 をマウスモデルに 50 mg/kg で経口投与すると, 血漿中の SU11248 の濃度は 12 時間以上継続して 50-100 ng/ml の十分な有効濃度が維持されている¹²⁾。SU11248 は, 様々なヒト腫瘍を移植したマウス xenograft モデルにおいて 5-40 mg/kg/day の投与スケジュールで腫瘍血管新生を減少させ顕著な抗腫瘍効果を示す。その際, サロゲートマーカーである VEGFR-2 のリン酸化, PDGFR- β のリン酸化も濃度依存的に抑制されている。難治性転移性腎癌, 脳腫瘍を対象にした第 II 相臨床試験でも, 血漿中の SU11248 の濃度は 50-100 ng/ml を維持し partial response (PR) が得られており, 更なる臨床試験が進行中である。SU11248 は FLT-3 を標的とした急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia: AML) 治療薬としても期待されている¹³⁾。

3. ZD6474

ZD6474 は VEGFR-2 に最も阻害活性の強い化合物として開発中の quinazoline 骨格を有する経口投与可能な化合物である (IC₅₀ = 40 nM)。VEGFR-3, EGFR/HER1, PDGFR- β に対しても ZD6474 は, それぞれ 110 nM, 500 nM, 1,100 nM の阻害活性 (IC₅₀) を有するが, セリン/スレオニンキナーゼに対しては阻害効果がほとんどない¹⁴⁾。ZD6474 は VEGF 依存性のヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) の増殖を, 60 nM (IC₅₀) の濃度で阻害する。ZD6474 は, 様々なヒト腫瘍を移植したマウス xenograft モデルにおいて 50-100 mg/kg/day のスケジュールで投与すると, ZD6474 は腫瘍組織内微小血管密度, 腫瘍血管新生を減少させるとともに顕著な抗腫瘍効果を示し, 現在, 第 I 相臨床試験が行われている。

4. CEP-7055

CEP-7055 は, pyrrolocarbazole 骨格を有する

合成化合物で, VEGFR ファミリーのチロシンキナーゼ活性を broad に阻害する (VEGFR-1, 2, 3 をいずれも約 10 nM (IC₅₀) で阻害する)¹⁵⁾。CEP-7055 のエステル部分が加水分解された化合物 CEP-5214 も同様に, VEGFR-1, 2, 3 をいずれも約 20 nM (IC₅₀) の濃度で阻害する。CEP-5214 および CEP-7055 は, MLK (ミオシン軽鎖キナーゼ: myosin light-chain kinase) 1, 2, 3 に対しても VEGF ファミリーの阻害効果よりはやや弱い阻害効果を示す。CEP-7055 は経口投与可能であり, 様々なヒト腫瘍細胞を用いた前臨床試験で顕著な血管新生阻害効果と抗腫瘍効果を示し, 現在, 第 I 相臨床試験が行われている。

5. Bevacizumab (Avastin)

bevacizumab は VEGF-A のヒト型中和抗体であり, すべてのアイソフォームのレセプターへの結合を阻害する¹⁶⁾。bevacizumab は前臨床試験で広い抗腫瘍活性を示し, 第 II 相臨床試験において結腸癌, 直腸癌, 転移性腎癌をはじめとして多くの腫瘍に対して有望な結果が得られていた¹⁷⁾。Hurwitz らは, 未治療転移性結腸癌を対象に, bevacizumab の IFL 療法 (イリノテカン: CPT-11/5-フルオロウラシル: 5-FU/ロイコボリン: LV) との併用効果を検討する第 III 相臨床試験を行った (表 3)¹⁸⁾。primary end point は生存期間とし, secondary end point は抗腫瘍効果, PFS (progression-free survival), 奏効期間, QOL, 毒性が指標とされた。生存期間中央値は IFL/プラセボ群の 15.6 カ月に対して IFL/bevacizumab 群では 20.3 カ月であり統計学的に有意な結果であった。PFS は, IFL/プラセボ群の 6.2 カ月に対して IFL/bevacizumab 群では 10.6 カ月であり, 同様に統計学的に有意な結果であった。抗腫瘍効果における bevacizumab の奏効率は, IFL/プラセボ群 34.7% (CR 2.2%), IFL/bevacizumab 群 44.9% (CR 3.7%), 奏効期間 (中央値) は IFL/プラセボ群 (7.1 カ月), IFL/bevacizumab 群 (10.4 カ月) で優位に延長した。第 II 相臨床試験より出血, 血栓塞栓症候群, 蛋白尿, 高血圧などの副作用の発現が懸念されたが, bevacizumab は副作用に対して耐容可能

表3 Bevacizumabの第III相臨床試験結果の概要

	IFL/ プラセボ	IFL/ bevacizumab	p-value
n	412	403	
生存期間中央値(月)	15.6	20.3	0.00003
PFS(月)	6.2	10.6	<0.00001
奏効率: ORR(CR+PR)	35%	45%	0.0029
奏効期間(月)	7.1	10.4	0.0014

IFL: irinotecan+5-fluorouracil+leucovorin, PFS: progression-free survival, ORR: overall response rate, CR: complete response, PR: partial response

であり、特に、grade 3/4の副作用発現頻度(出血、蛋白尿、高血圧)は、IFL/bevacizumab群がIFL/プラセボ群よりもやや高い程度であった。本bevacizumabの第III相臨床試験結果は、血管新生阻害剤が臨床において survival benefit をもたらした世界初の画期的な第III相試験成績結果である。

おわりに

VEGFの機能を標的とした分子標的治療薬は、抗癌剤としてだけでなく糖尿病網膜症などの眼科疾患、リウマチ性関節炎などの炎症性疾患、動脈硬化症など病的血管新生を伴う様々な疾患の治療薬としての可能性が期待できる。

本稿では、VEGFR阻害剤、VEGF中和抗体に焦点を絞って概説したが、GlivecやIressaの臨床使用例からも明らかのように、耐性細胞の出現に対する克服法の開発も念頭に置いておく必要がある。更には、今後、ゲノム情報の機能的解析が進展し、VEGFの機能発現に関連した新たな分子標的の登場も期待される。これらの新たな標的分子の立体構造に基づいた抗癌剤開発、あるいは、化合物ライブラリー(天然化合物および合成化合物ライブラリー)を利用したスクリーニング^{19,20)}による新たな標的分子阻害剤開発のための基盤整備は、分子標的治療薬の早期開発のための重要な課題であると思われる。

参考文献

- 1) Shibuya M: Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 33: 409-420, 2001.
- 2) Risau W: Mechanism of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997.
- 3) Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25, 1997.
- 4) Toi M, et al: Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2: 667-673, 2001.
- 5) Takahashi T, et al: A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* 20: 2768-2778, 2001.
- 6) Shibuya M: Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 94: 751-756, 2003.
- 7) Sasaki A, et al: Mammalian sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf-1. *Nat Cell Biol* 5: 427-432, 2003.
- 8) Capdeville R, et al: Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 1: 493-502, 2002.
- 9) Dancey J, Sausville EA: Issues and progress with protein kinase inhibitors for the treatment of

- cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2: 325-334, 2003.
- 10) 掛谷秀昭, 長田裕之: がん征圧と化学—最新抗がん剤事情. *化学と工業* 55: 555-559, 2002.
 - 11) Wood JM, et al: PTK787/ZK222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 60: 2178-2189, 2000.
 - 12) Mendel D, et al: In vivo anti-tumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting VEGF and PDGF receptors: Determination of a pharmacokinetics/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 9: 327-337, 2003.
 - 13) O' Farrell AM, et al: SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 101: 3597-3605, 2003.
 - 14) Wedge SR, et al: ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res* 62: 4645-4655, 2002.
 - 15) Ruggeri B, et al: CEP-7055: a novel, orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models. *Cancer Res* 63: 5978-5991, 2003.
 - 16) Presta LG, et al: Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57: 4593-4599, 1997.
 - 17) Yang JC, et al: A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 349: 427-434, 2003.
 - 18) Hurwitz H, et al: Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) prolongs survival in first-line colorectal cancer (CRC): Results of a phase III trial of bevacizumab in combination with bolus IFL (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) as first-line therapy in subjects with metastatic CRC. ASCO 2003, Abstract No.3646, 2003.
 - 19) Asami Y, et al: Azaspirene: a novel angiogenesis inhibitor containing a 1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4, 6-dione skeleton produced by the fungus *Neosartorya* sp. *Org Lett* 4: 2845-2848, 2002.
 - 20) Kakeya H, et al: Epoxyquinol A, a highly functionalized pentaketide dimer with antiangiogenic activity isolated from fungal metabolites. *J Am Chem Soc* 124: 3496-3497, 2002.

日本臨牀 第62巻・第7号（平成16年7月号）別刷

特集：癌の分子標的治療

癌分子標的治療のための
新しい血管新生阻害剤

長田裕之 掛谷秀昭

癌分子標的治療のための新しい血管新生阻害剤

長田 裕之 掛谷 秀昭

Novel angiogenesis inhibitors for molecular target therapy of cancer

Hiroyuki Osada, Hideaki Kakeya

Antibiotics Laboratory, Discovery Research Institute, RIKEN

Abstract

Angiogenesis, neovascularization from pre-existing vasculature, is essential to allow growth of primary solid tumors and to enable metastasis. Recent biological studies in both tumor and endothelial cells have begun to present a wide variety of molecular targets for developing angiogenesis inhibitors. Therefore, angiogenesis inhibitors including anti-angiogenic agents as well as anti-vascular targeting agents have become promising drugs in cancer chemotherapy. However current unsolved problems in anti-angiogenic therapy are the lack of surrogate markers for therapeutic efficacy, as well as of establishment of effective combinations with other therapeutic approaches including conventional anticancer therapy, radiotherapy, and immunotherapy. This article focuses on the promising drugs with anti-angiogenic activity and their molecular targets under clinical trials, as well as the significance of clinical evaluation for anti-angiogenic therapies.

Key words: angiogenesis inhibitor, molecular target therapy, cancer chemotherapy, drug screening, natural product

はじめに

固形癌がある一定以上より大きくなるためには、癌細胞に栄養や酸素を供給するための血管が新しくできてくる必要がある。その新生血管を攻撃し、癌を兵糧攻めにして治療する血管新生阻害療法の確立および血管新生阻害剤の開発が、癌の化学療法において待望されている。

本稿では、主に腫瘍血管新生を標的とした臨床開発中の分子標的薬剤とその分子標的について概説する。なお、血管内皮増殖因子(vascu-

lar endothelial growth factor: VEGF)を標的分子とした抗癌剤開発研究の詳細については別稿を参照されたい¹⁾。

I. 腫瘍血管新生の概要

腫瘍における血管新生は、①腫瘍による血管増殖因子の産生、②血管増殖因子の刺激を受けた血管内皮細胞によるプロテアーゼの産生、③基底膜の崩壊、④血管内皮細胞の遊走、⑤血管内皮細胞の増殖、⑥血管内皮細胞の管腔形成、という過程を経て血管新生が起こり、更に、⑦腫瘍への新生血管の到達、⑧新たな栄

養と酸素の供給による腫瘍の増殖, という過程に分類できる. いずれかの過程を阻害する薬剤は癌の増殖・転移を抑制すると考えられ, かつ, 各過程には複数の因子が関与しており血管新生阻害の標的となる因子は多い. Folkman らは, 最近, 血管新生阻害剤を direct 血管新生阻害剤と indirect 血管新生阻害剤に分類することを提唱している²⁾. direct 血管新生阻害剤とは内皮細胞の増殖・移動を直接抑制する薬剤であり, indirect 阻害剤とは, 腫瘍に作用し腫瘍からの血管新生因子の放出を抑制したり, 血管新生阻害因子の放出を亢進する薬剤である.

II. 血管新生の調節因子

生体内における血管新生は, 様々な増殖因子やサイトカインをはじめとした促進因子と抑制因子とのバランスによって調節されている(表 1). 通常は, 抑制因子の発現が亢進していると考えられているが, 腫瘍血管新生などの病的血管新生時には, 顕著に促進因子が抑制因子の作用を上回ると考えられている. したがって, これら血管新生促進因子を標的とした新規薬剤の探索および開発研究が, 世界中で活発に行われている.

III. 有望な血管新生阻害剤とその分子標的

現在までに多くの血管新生阻害剤が見いだされ, 抗癌剤としての開発研究が進んでいる. その中で, 現在, 有望な血管新生阻害剤とその分子標的を表 2 に示した. なお, 表中, Iressa (承認済), IFN- α (承認済), TZT-1027 (前臨床試験中), NK4 以外の薬剤はいずれも第 I-III 相臨床試験中の薬剤である. それらの作用機序は, ①マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases: MMPs) の活性を阻害する薬剤, ②血管新生促進因子に直接作用してそのレセプターへの結合を阻害する薬剤, ③血管新生促進因子の細胞内シグナル伝達を抑制する薬剤, ④血管内皮細胞特異的に増殖を抑制する薬剤, などに大別できる. 作用機序が必ずしも明らかでない薬剤もあるが, その分子標的が明らかになれば血管新生阻害剤開発のた

表 1 代表的な生体内における血管新生促進因子と抑制因子

促進因子	抑制因子
VEGF	chondromodulin-1
EGF family	IFN- α/β
FGF family	IFN- γ
HGF	IL-12/18
PDGF-BB	platelet factor-4
erythropoietin	TIMPs
G-CSF/GM-CSF	angiostatin
thymidine phosphorylase (TP)	endostatin
angiopoietin-1	* TGF- β
* TNF- α	* thrombospondin-1, 2

*局所濃度に依存して促進因子/抑制因子として作用する.

めの新たな分子標的になり得る可能性がある. 以下に, 一部の薬剤について概説する(図 1).

1. Iressa (ZD1839, gefitinib)

上皮増殖因子 (epidermal growth factor: EGF) およびその受容体である EGFR (EGF receptor) は多くの上皮組織の増殖に関与しており, 特に, EGFR の過剰発現が様々な固形腫瘍の上皮組織で報告されている. Iressa は EGFR チロシンキナーゼの ATP 結合部位で ATP との競合作用を有し, チロシンキナーゼ活性を抑制する経口投与可能な薬剤であり, 既に 2002 年に手術不能, あるいは再発した非小細胞肺癌の患者を対象に承認された. 臨床における Iressa の感受性は必ずしも EGFR の発現量と相関していない報告もあり³⁾, 他の EGFR ファミリーへの効果や下流のシグナルへの関与が示唆されている.

2. Bay43-9006

MAP キナーゼファミリーの一つである ERK は, VEGF, EGF, 血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factor: PDGF) をはじめとした多くの血管新生促進因子により Raf/MEK/ERK 経路を介して活性化される. Bay43-9006 は, この経路の中のセリン/プロテインキナーゼである Raf を選択的に阻害する経口投与可能な薬剤である⁴⁾. すなわち, 血管内皮細胞のみならず腫瘍細胞における Raf の活性化をも抑制

表2 有望な血管新生阻害剤とその標的分子

標的分子	薬剤の分類	化合物名
MMPs	阻害剤	marimastat
	阻害剤	BMS-275291
	阻害剤	AG3340
	阻害剤	CGS27023A
	阻害剤	S3304
インテグリン	抗体	vitaxin
	阻害剤	EMD121974
増殖因子	結合阻害剤	suramin
EGFR	阻害剤	Iressa
HER2	抗体	Herceptin
VEGFR	阻害剤	ZD6474, SU6668,
		PTK787/ZK222584,
		CEP-7055
PDGFR	阻害剤	SU101
VEGFR, PDGFR	阻害剤	SU11248
VEGF, bFGF	産生抑制剤	IM862
Flt-1 mRNA	阻害剤	angiozyme
VEGF/コラゲナーゼ	阻害剤	血小板第4因子
VEGF	抗体	bevacizumab (Avastin)
bFGFR	阻害剤	PD173074
PKC- β	阻害剤	LY317615
Raf	阻害剤	Bay43-9006
HSP90	阻害剤	17-AAG
ヒストンデアセチラーゼ	阻害剤	FK-228
血管内皮細胞	内皮細胞増殖阻害剤	IFN- α
MetAP-2(?)		TNP-470
CD13/APN		curcumin
	アポトーシス誘導剤 (VTA)	combretastatin A-4,
		ZD6126, TZT-1027
ATP合成酵素, angiomin, annexin II(?)	アポトーシス誘導剤	angiostatin
インテグリン $\alpha_v\beta_1$ (?)		endostatin
?		suqualamine
HGF	阻害剤	NK4
TNF- α (?)	産生抑制剤	thalidomide
腫瘍血管	炎症惹起剤	CM101
?	阻害剤	2-methoxyestradiol

できる。現在、大腸癌、肝臓癌などで臨床試験が行われている。

3. Marimastat

血管新生の初期過程で、血管新生促進因子により刺激を受けた血管内皮細胞は、MMPなどのプロテアーゼを分泌し基底膜を分化して浸潤していく。したがって、このMMP活性を阻害する薬剤は血管新生阻害活性が期待できる。

marimastatは第一世代のMMP阻害剤 batimastatの溶解性を改善し、経口投与可能にしたヒドロキサム酸骨格を有する第二世代のMMP阻害剤であり、各種MMPに対して幅広い阻害スペクトルを示す⁵⁾。現在、グリオーマ、乳癌、卵巣癌、前立腺癌などで臨床試験が行われている。

4. 17-AAG(17-allylamino-geldanamycin)

HSP90は主要な細胞内分子シャペロンの一

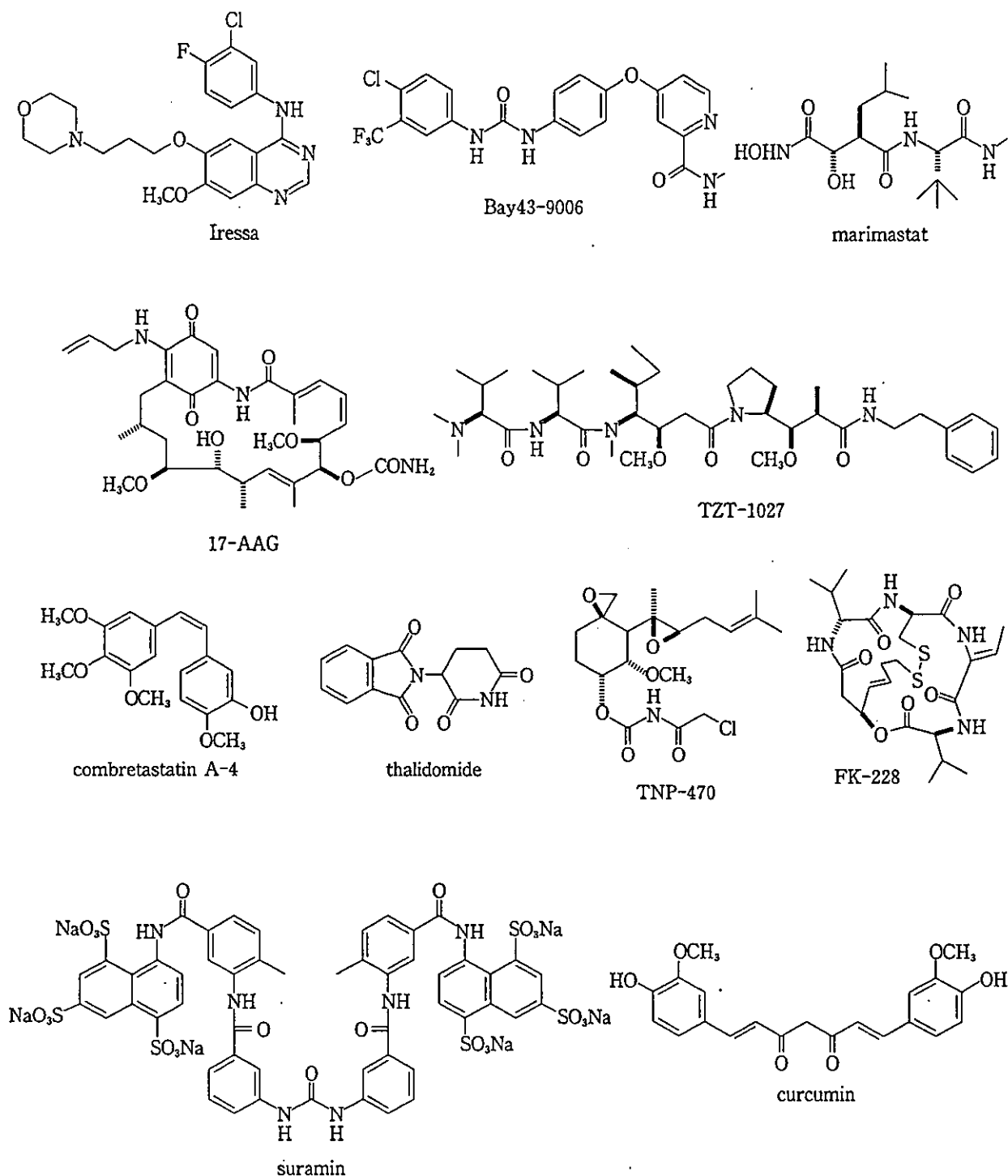


図1 血管新生阻害剤の化学構造

つであり、細胞質に最も多く存在する蛋白質の一つであり、様々な細胞内蛋白質と相互作用してその正確なフォールディングと機能の維持を担っている。HSP90と相互作用するクライアント蛋白質には、プロテインキナーゼやステロイドホルモン受容体などの細胞増殖・癌化に重要

な役割を果たすシグナル伝達分子が多く含まれている。放線菌代謝産物より見いだされたアンサマイシン系骨格を有する geldanamycin の腎毒性・肝毒性を軽減した誘導体 17-AAG は HSP90 依存性のクライアント蛋白質の不活性化・不安定化を誘導し、血管新生促進因子

VEGF, 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF), EGF などの細胞内シグナル伝達系を効果的に抑制し血管新生阻害作用を有することから, 現在臨床試験が行われている⁹⁾. 17-AAG が正常細胞にも癌細胞にも内在性に多く存在する HSP90 を分子標的としているにもかかわらず, 優れた抗癌活性を有する理由は不明であったが, 最近, この効果の一因に癌細胞由来の HSP90 複合体が 17-AAG より高い親和性を示すことが明らかにされた⁷⁾.

5. Combretastatin A-4

近年, 腫瘍内に張り巡らされた血管網を破壊し腫瘍内血流を減少させて腫瘍内への栄養供給を止め, 腫瘍を出血性ネクロシスなどにより壊死に至らしめる抗癌剤 (vascular targeting agent: VTA) の開発概念が確立されつつある. VTA の代表的なものの多くは combretastatin A-4 や paclitaxel などの微小管作用薬である⁸⁾. combretastatin A-4 は現在, 広く固形癌を対象に臨床試験が行われている. 海洋アメフラシ由来の Dolastatin 10 をリード化合物として創製された微小管作用薬 TZT-1027 も, 腫瘍細胞への cytotoxicity と強力な腫瘍組織内における微小血管密度の減少作用が報告されている⁹⁾.

6. Thalidomide

1950 年代後半に精神安定剤・催眠剤として世に出た thalidomide であったが, 新生児の無肢症・アザラシ症などの催奇性を中心とした副作用のために使用が中止されていた. しかし, 近年, thalidomide がウサギの角膜法において bFGF で誘導された血管新生を強力に抑制したことなどから, 妊婦以外に対する使用に限定して, カポジ肉腫, グリオーマ, 乳癌などを対象に臨床試験が行われている¹⁰⁾.

7. TNP-470

TNP-470 は糸状菌から血管新生阻害剤として発見された fumagillin の構造活性相関研究の結果からデザインされた fumagillin 誘導体である. TNP-470 は血管内皮細胞に選択的な増殖抑制効果を示す. TNP-470 の標的蛋白質の一つは, MetAP-2 (methionine aminopeptidase-2) であることが報告されているが, MetAP-2

阻害との詳細な因果関係は不明である. TNP-470 の CDKs 阻害を介した G1 期停止作用が報告されており¹¹⁾, カポジ肉腫, 前立腺癌, 子宮頸癌などを対象に臨床試験が行われている.

8. Suramin

抗原虫薬として古くから使用されてきた suramin は, bFGF などをはじめとした血管新生促進因子とその受容体との結合を阻害することで血管新生阻害活性を有する. 転移性前立腺癌などを対象に臨床試験が行われている. 近年, suramin をリード化合物として抗ヘパリン様活性を有する薬剤開発も盛んに行われている¹²⁾.

9. FK-228

バクテリア由来の抗癌剤 FK-228 (FR901228) は, クラス I に属するヒストンデアセチラーゼ (HDAC1, 2) の阻害活性を有する bicyclic depsipeptide である¹³⁾. 最近, マウス担癌モデルにおいて VEGF や bFGF などの血管新生促進因子の発現を顕著に抑制することで強力な抗癌活性を有することが報告され, 現在, 臨床試験中である¹⁴⁾. 同様に HDAC 阻害剤である trichostatin A も HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) の発現抑制を行うことで血管新生阻害作用を有することから, HDAC 阻害剤の血管新生阻害剤としての開発が注目されている¹⁵⁾.

10. Curcumin

CD13/aminopeptidase N (APN) は, 腫瘍血管新生・癌転移に重要な役割を担っている膜結合型メタロプロテアーゼである. curcumin は, ウコンに含まれる生薬成分の一つで, 従来から癌の化学予防に効果的であることから臨床試験中の化合物であり, かつ, 血管新生阻害効果が報告されている. 最近, curcumin の不可逆的な結合蛋白質として CD13/APN が同定され, 血管新生阻害効果と CD13 阻害との正の因果関係が報告された¹⁶⁾.

11. Vitaxin

インテグリンは細胞膜に存在し, α 鎖と β 鎖が非共有結合したヘテロダイマーを形成し, α 鎖の外側にはカルシウム結合蛋白質と共通の二価イオン結合配列を有する. 現在までに, α 鎖と β 鎖の組み合わせによって 20 種類以上のへ

テロ二量体が存在するが、血管新生に關与するインテグリンとしては $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, α_2 が報告されている。なかでも $\alpha_v\beta_3$ はメラノーマ、乳癌などの転移性の腫瘍で誘導される血管に特異的に発現している。vitaxinは $\alpha_v\beta_3$ に対するマウスのモノクローナル抗体をLM609ヒト型抗体に改善した抗体であり、乳癌、大腸癌、卵巣癌、腎癌、肺癌などを対象に臨床試験が行われている。最近、 $\alpha_v\beta_3$ を標的とした薬剤の効果にアゴニスト的な効果があるのではないかという議論もなされつつある¹⁷⁾。

12. Angiostatin

angiostatinは、プラスミノゲンN末の4つのクリングルドメインを含む分子断片である。血管内皮細胞の増殖・遊走を阻害し、アポトーシスを誘導することにより血管新生抑制作用を示す。ウシ動脈由来血管内皮細胞とangiostatinとの接着に $\alpha_v\beta_3$ 介在シグナルが關与していることが示唆されているのに加えて、angiostatinはATP合成酵素、angiomin, annexin IIへ結合することも報告されており、現在、臨床試験が行われている²⁾。

13. Endostatin

コラーゲンXVIIIの分子断片であるendostatinは、*in vitro*においてFGF-2誘導による血管内皮細胞の遊走と増殖を阻害し、*in vivo*におけるマウス担癌モデルでの抗腫瘍効果を示す。固定化されたendostatinと血管内皮細胞との接着に、 $\alpha_v\beta_1$ インテグリンを介していることが示唆され、現在、広く固形癌を対象に臨床試験が行われている²⁾。

14. NK4

肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)をエラスターゼ消化して得られた分子断片NK4分子は、HGFの α 鎖構造のうち、N末端のヘアピンドメインと4個のクリングルドメインを含む。NK4はc-Metレセプターに結合しHGFの完全なアンタゴニストとして働くことが報告されている。大変興味深いことに、NK4はHGFのみならず、bFGFやVEGFによる血管内皮細胞の増殖や遊走もほぼ完全に抑制する¹⁸⁾。

IV. 血管新生阻害剤の臨床試験における評価法確立の重要性

通常、分子標的抗癌剤の臨床における評価のポイントは、標的分子へ作用することの確認(proof of target)、標的に作用して生物学的な効果が出ること(proof of principle)、抗腫瘍効果が得られること(proof of efficacy)の3点が重要視されている。しかし、血管新生阻害剤の評価においては腫瘍縮小効果がそれほど期待できないと予想されるため、これまでの奏効率に変わる評価法が必要とされている²⁾。現段階では、例えば、検体を直接採取して実際に標的となる分子に対する効果を直接評価するbiological endpointや、time to progression, progression-free survival, PET(positron emission tomography)による画像診断、腫瘍マーカー測定、腫瘍内血流量測定、血管透過性測定、微小血管密度の測定、アポトーシス細胞の割合測定などが用いられている。これらに加えて、血清中の血管新生促進因子レベルの測定や、末梢血中の血管内皮前駆細胞数測定などの評価法も検討されており、早急な確固とした血管新生阻害剤の臨床試験におけるendpointの確立が待望されている。

おわりに

腫瘍血管新生過程を標的とした抗癌剤の分子標的は多岐にわたる。これは、血管内皮細胞・マクロファージ・間質細胞などからなる宿主細胞と癌細胞などからなる腫瘍組織における腫瘍血管新生の過程に複雑なパラクライン機構、およびオートクライン機構が存在することに起因する。いずれの分子標的が抗癌剤開発のための標的として優れているかは、腫瘍組織の微小環境に依存するところが多いと思われ、今後も血管新生阻害剤開発のための更なる新しい分子標的の登場とそれらの機能を阻害する血管新生阻害剤の開発が期待される。bench to bed, bed to benchを基本戦略とした‘トランスレーショナルリサーチ’の進展は、血管新生阻害剤開発のための新しい分子標的と分子標的治療薬の早期開発に不可欠である。

■ 文 献

- 1) 掛谷秀昭, 長田裕之: 血管内皮増殖因子(VEGF)の機能を標的とした新規血管新生阻害剤. 日本臨牀 62: 1264-1270, 2004.
- 2) Kerbel R, Folkman J: Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nat Rev Cancer 2: 727-739, 2002.
- 3) Ciardiello F, et al: Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. Clin Cancer Res 7: 1459-1465, 2001.
- 4) Lee JT, McCubrey JA: Bay-43-9006 Bayer/Onyx. Curr Opin Investig Drugs 4: 757-763, 2003.
- 5) Zucker S, et al: Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. Oncogene 19: 6642-6650, 2000.
- 6) Uehara Y: Natural product origins of Hsp90 inhibitors. Curr Cancer Drug Targets 3: 325-330, 2003.
- 7) Kamal A: A high-affinity conformation of HSP90 confers tumor selectivity of HSP90 inhibitors. Nature 425: 407-410, 2003.
- 8) Yano S, et al: Molecular mechanisms of angiogenesis in non-small cell lung cancer, and therapeutics targeting related molecules. Cancer Sci 94: 479-485, 2003.
- 9) Natsume T, et al: Antitumor activity of TZT-1027 (Soblidotin) against vascular endothelial growth factor-secreting human cancer in vivo. Cancer Sci 94: 826-833, 2003.
- 10) Hashimoto Y: Structural development of biological response modifiers based on thalidomide. Bioorg Med Chem 10: 461-479, 2002.
- 11) Zhang Y, et al: Cell cycle inhibition by the anti-angiogenic agent TNP-470 is mediated by p53 and p21WAF1/CIP1. Proc Natl Acad Sci USA 97: 6427-6432, 2000.
- 12) Fernandez-Tornero C, et al: Leads for development of new naphthalenesulfonate derivatives with enhanced antiangiogenic activity. J Biol Chem 278: 21774-21781, 2003.
- 13) Furumai R, et al: FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. Cancer Res 62: 4916-4921, 2002.
- 14) Sasakawa Y, et al: Antitumor efficacy of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, depends on the effect on expression of angiogenesis factors. Biochem Pharmacol 66: 897-906, 2003.
- 15) Kim MS, et al: Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. Nat Med 7: 437-443, 2001.
- 16) Shim JS, et al: Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin. Chem Biol 10: 695-704, 2003.
- 17) Hynes RO: A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. Nat Med 8: 918-921, 2002.
- 18) Matsumoto K, Nakamura T: NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. Cancer Sci 94: 321-327, 2003.

日本臨牀 第62巻・第7号（平成16年7月号）別刷

特集：癌の分子標的治療

デスレセプター依存性アポトーシス抑制化合物ECHの作用機序および標的分子

三宅靖延 掛谷秀昭 長田裕之

デスレセプター依存性アポトーシス抑制化合物 ECHの作用機序および標的分子

三宅靖延 掛谷秀昭 長田裕之

Mode of action and molecular target of ECH, a specific inhibitor
of death receptor-dependent apoptosis

Yasunobu Miyake, Hideaki Kakeya, Hiroyuki Osada
Antibiotic Laboratory, Discovery Research Institute, RIKEN

Abstract

ECH(epoxycyclohexenone) specifically blocks death receptor-mediated apoptosis induced by anti-Fas antibody, Fas ligand, or TNF- α , whereas it has no effect on death receptor independent apoptosis induced by staurosporine, MG-132, C₂-ceramide, or UV irradiation. ECH blocks the activation of pro-caspase-8 in the death-inducing signaling complex(DISC), even though recruitment of FADD and pro-caspase-8 is not affected. In Fas ligand treated cells, ECH is only able to inhibit the activation of pro-caspase-8 and it has no effect on the already-activated caspase-8. ECH has a relatively higher affinity to pro-caspase-8, although it directly binds both pro- and active-form of caspase-8. In conclusion, ECH targets pro-caspase-8 and blocks the self-activation of pro-caspase-8 in the DISC, and thus selectively inhibits death receptor-mediated apoptosis. Moreover novel non-peptide inhibitors, RKTS-33 & RKTS-34 that are chemically synthesized derivatives of ECH have been developed.

Key words: apoptosis, inhibitor, bioprobe, caspase, DISC (death-inducing signaling complex)

はじめに

アポトーシスは癌の分子標的治療において重要な標的であると考えられる。アポトーシスの研究は1990年代後半に全盛期を迎え、現在ではアポトーシスに関する全体像がかなりはっきりととらえられてきた。その一方で、アポトーシスは非常に複雑に制御されていることも明らかとなった。このような複雑な生命現象を解析するのに有用なツールとなる低分子化合物はバ

イオプローブと呼ばれている¹⁾。アポトーシスの分野においても、現在までに多くのバイオプローブが見いだされており、それらを用いて多くの知見が得られてきた。アポトーシスにおけるバイオプローブは、大きく分けてアポトーシス誘導物質と抑制物質とに分類することができる。このうちアポトーシス誘導物質は抗癌剤開発を含めて、精力的な研究がなされており、数多くの有用なバイオプローブが見いだされている^{2,3)}。その一方で、アポトーシス抑制物質は、

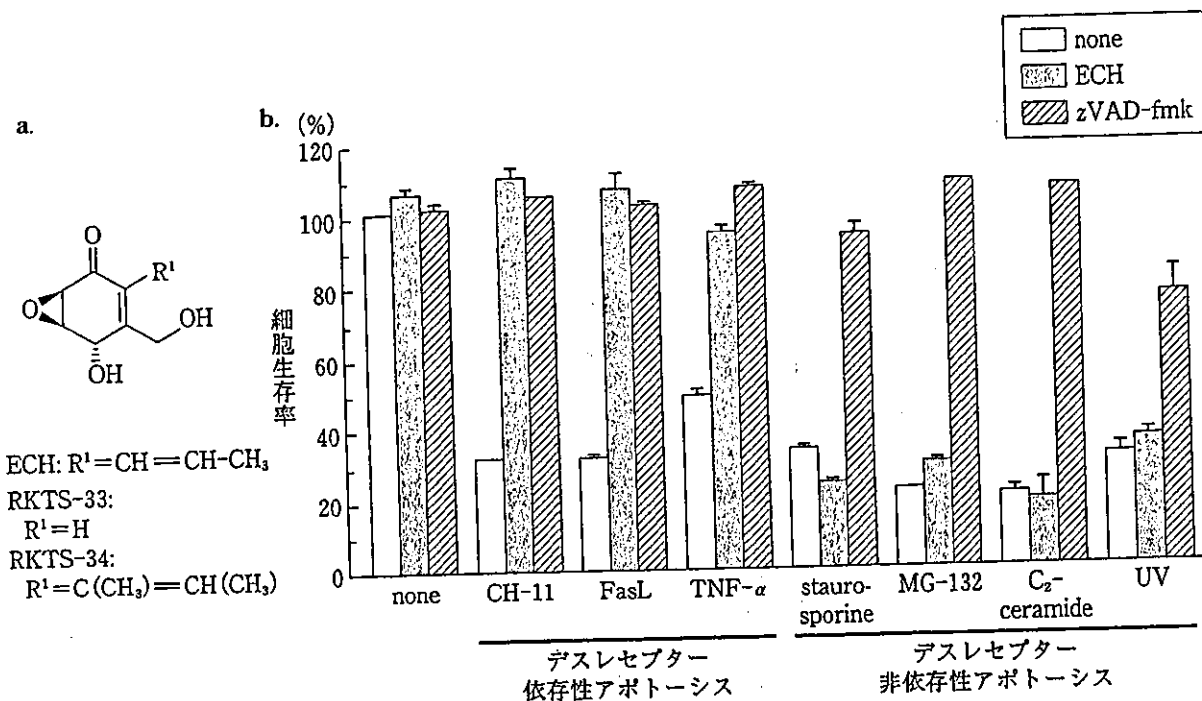


図 1-a ECH, RKTS-33 & 34 の化学構造

-b 様々な因子により誘導されたアポトーシスに対する ECH の抑制効果

細胞を ECH (20 μ M) または zVAD-fmk (20 μ M) で 30 分間前処理後、下記濃度のアポトーシス誘導因子を加えて 8 時間培養後、MTT 試薬を用いて細胞生存率を測定した。

CH-11 100 ng/ml, FasL 300 ng/ml, TNF- α 300 ng/ml (+cycloheximide 10 nM), staurosporine 300 nM, MG-132 3 μ M, C₂-ceramide 100 μ M, UV 10 mJ/cm²

zVAD-fmk に代表される caspase の基質認識配列に基づく基質拮抗型のペプチド性阻害剤⁹⁾が主流であり、非ペプチド性のアポトーシス抑制物質は非常に数が少ない⁹⁾。そこで著者らは、これまでほとんど知られていない非ペプチド性のアポトーシス抑制物質の探索を行い、特異的な caspase-8 活性化阻害剤として ECH を見だし、更に、新規 ECH 誘導体 RKTS-33 & 34 の創製に成功した。

I. Fas 依存性アポトーシス抑制物質の探索

アポトーシスは様々な因子により誘導されるが、生理的条件下におけるアポトーシスの多くはデスレセプターを介して誘導される⁹⁾。デスレセプターの一つである Fas は、発生段階における器官形成から、成熟後の各器官における細胞のターンオーバー、癌細胞など有害細胞の除去といった恒常性維持に至るまで多岐にわたり重要な役割を果たしている⁹⁾。そこで、著者らはこの Fas 依存性アポトーシスを標的として抑

制物質の探索を行った。糸状菌や放線菌などの二次代謝産物を中心に探索を行い、糸状菌培養上清中に活性を見いだした。各種クロマトグラフィーなどにより活性物質を単離精製し、各種機器分析により構造決定を行ったところ、塩野義製薬からアポトーシス抑制物質として特許報告されている化合物と一致した⁹⁾。しかしながら、そのアポトーシス抑制機構に関しては一切不明であり、また数少ない非ペプチド性のアポトーシス抑制物質であったため、この化合物の作用機序について詳細な解析を行った。なお特許中ではこの化合物に名前が付けられていなかったため、著者らは ECH [(2R, 3R, 4S)-2, 3-epoxy-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-6-(1E)-propenyl-cyclohex-5-en-1-one] と呼ぶこととした(図 1-a)。

II. ECH の作用特異性

まずはじめに、種々の因子により誘導されたアポトーシスに対する ECH の抑制効果につい

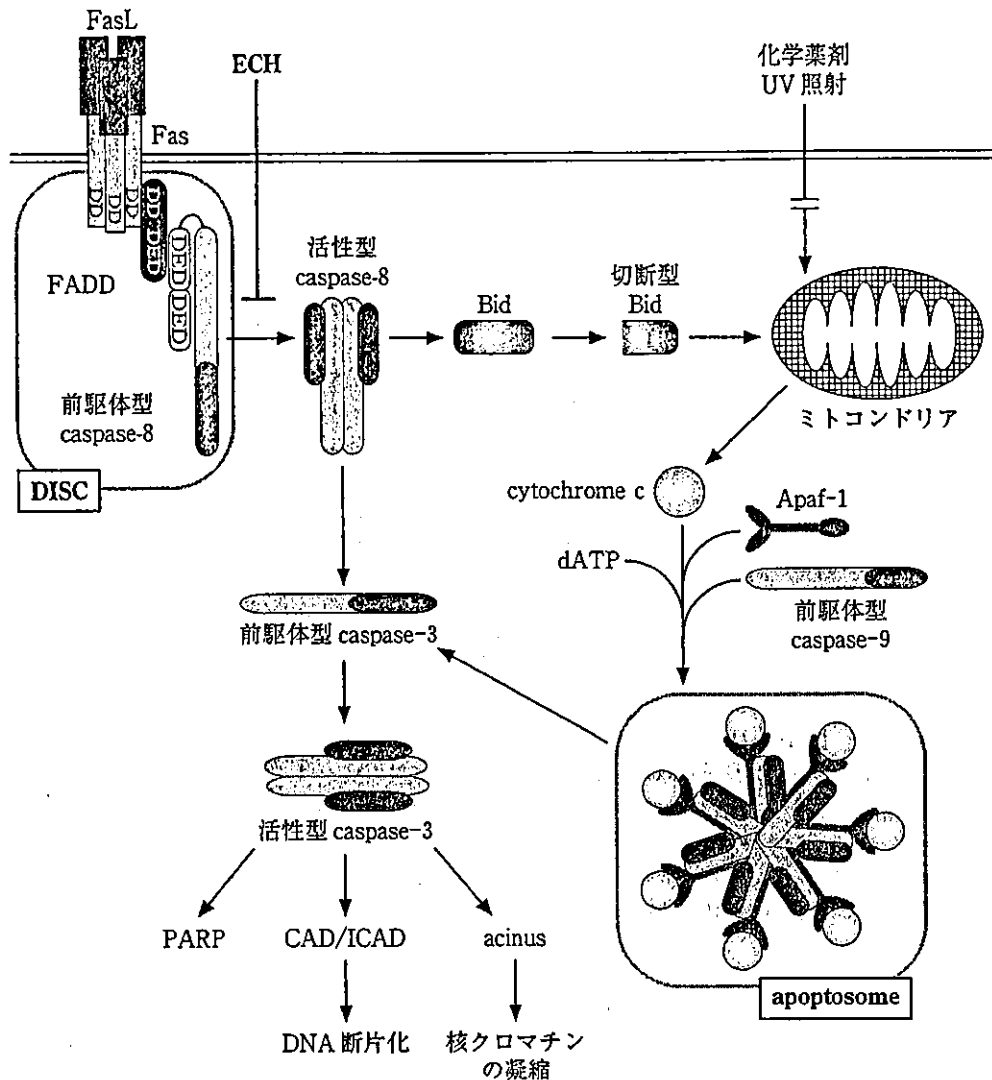


図2 Fas 依存性アポトーシスのシグナル伝達経路と ECH の作用点

て検討を行った(図1-b). その結果, ECH は Fas に対してアゴニスティックに働く抗 Fas 抗体 CH-11⁹⁾や, Fas リガンド(FasL), TNF レセプターに対するリガンドである TNF- α などによるデスレセプター依存性アポトーシスに対してほぼ同程度の抑制効果を示した. 一方, 各種化学薬剤やセラミド, UV 照射によるデスレセプター非依存性アポトーシスに対しては全く抑制効果を示さなかった. ここで, コントロールとして用いた caspase の非特異的な阻害剤である zVAD-fmk はすべてのアポトーシスを抑制した. また, この ECH によるアポトーシス抑制効果は T 細胞や B 細胞などのリンパ球系細胞や肝癌細胞など広い細胞種で認められた.

III. ECH のアポトーシス抑制作用機序

次に, Fas 依存性アポトーシスをモデルに ECH の抑制作用機序について解析を行った. ECH は細胞表面上の Fas 発現量や, Fas と FasL との結合には影響を与えなかったことから, 作用標的は細胞内シグナル伝達経路(図2)にあると推定された. そこで, 細胞内のアポトーシスシグナル伝達経路に関与する蛋白質の活性化をウエスタンブロット法により検出した(図3). 細胞を FasL で処理すると Fas の細胞質領域に DISC(death-inducing signaling complex)と呼ばれる複合体が形成され, それに伴い caspase-8 が活性化される¹⁰⁾. 活性化した caspase-8 は