

進行した肝癌の治療

# 化学療法 (5-FU+IFNを含めて)

## KEY WORDS

- 肝細胞癌
- 門脈内腫瘍栓
- 5-FU
- インターフェロン  
併用化学療法

大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科学講座

中村 将人, 永野 浩昭, 左近 賢人  
門田 守人

## はじめに

肝細胞癌は世界的に予後の悪い癌である。特に腫瘍が門脈一次分枝や門脈本幹内に進展し腫瘍栓を形成する(Vp3,4)と、非常に予後不良であり、その多くは数ヶ月で死に至る。肝細胞癌に対する治療として、根治的な治療は切除であるが、癌の進展や肝機能により切除不能である症例に対しては動脈塞栓術(TAE), ラジオ波焼灼術(RFA), 経皮的エタノール注入療法(PEIT)などが適応となる。しかし前述したVp3,4症例に対してはこれら局所治療は適応外である。肝細胞癌の予後改善のためには、これらVp3,4症例に対する有効なmodalityが不可欠である。現在までにわれわれは、これら予後不良なVp3,4症例に対して、イン

ターフェロン- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )の皮下投与と5-フルオロウラシル(5-FU)の肝動脈内投与を併用することにより、良好な治療成績を得たことを報告してきた<sup>1)</sup>。本稿では、このIFN/5-FU併用動注化学療法を中心として述べたい。

## I. 肝細胞癌に対する 化学療法の歴史

一般に、固形癌に対する化学療法は血液の癌などと比較しその効果は低い。特に肝細胞癌に対する化学療法についてみると、5-FUによる治療は、スケジュールや投与量を調節しても、奏効率は10%内外、生存期間中央値は3~5ヶ月であり、有効といえるものではない<sup>2)</sup>。その他にドキソルビシン、シスプラチン(CDDP), エトポシドな

Combined chemotherapy of  
intraarterial fluorouracil  
and subcutaneous interferon-  
alpha for advanced hepatocellular  
carcinoma.

Masato Nakamura  
Hiroaki Nagano  
Masato Sakon(助教授)  
Morito Monden(教授)

どが報告されているが、それらも無治療より予後を延長するという結果でしかなかった。また、複数の抗癌剤を組み合わせる併用療法についても、単剤の結果を超えるものではなかった<sup>3)</sup>。他方、肝細胞癌に対するIFNによる治療は奏効率0~7%と全く効果を認めなかった。その後Urabeらが、IFNとCDDP、メトトレキサート(MTX)、5-FUの肝動注の併用療法にて46.7%の奏効率と有効例での予後延長効果という画期的な結果を報告したが、残念ながら、この治療法はgrade 3以上の有害事象を60%以上の症例に認めた<sup>4)</sup>。そこでわれわれは、5-FU単剤の持続動注とIFNの全身皮下投与を施行した。その結果、奏効率は63%と遜色なく、有害事象はgrade 3以上のleucopeniaを13%に認めたのみであった<sup>5)</sup>。

## II. IFN併用動注化学療法の対象と方法

当科においては、既存の治療法が無効な門脈一次分枝または門脈本幹に肉眼的腫瘍栓(Vp3以上)を伴う高度進行肝細胞癌症例を対象としている。適応基準としては70歳未満、T-bilが正常、GOT、GPTがともに100未満、血小板80,000以上、血清Cr 1.5未満、PS 0.1としている。

実際の方法であるが、動注チューブを、非手術症例においてはSeldinger法にて、肝切除施行例では術中に留置する。5-FUは300mg/m<sup>2</sup>/日にて2週間投薬、2週間休薬の4週間を1クールとし、カテーテルより持続投与する。同時にIFN-αを5×10<sup>6</sup>単位/回、3回/週、4週間を通じて皮下投与する(図1)。

## III. IFN併用動注化学療法の治療成績

治療成績について以下に述べる。現在までに、門脈内腫瘍栓を伴う進行肝細胞癌82例に対してIFN併用動注化学

療法を施行してきた。これらIFN併用動注化学療法の施行例を、病変の局在により、門脈内腫瘍栓に全肝多発病変を伴う症例(1型)、門脈内腫瘍栓に片葉の主腫瘍を伴う症例(2型)、門脈内腫瘍栓に片葉の主腫瘍と対側葉の多発

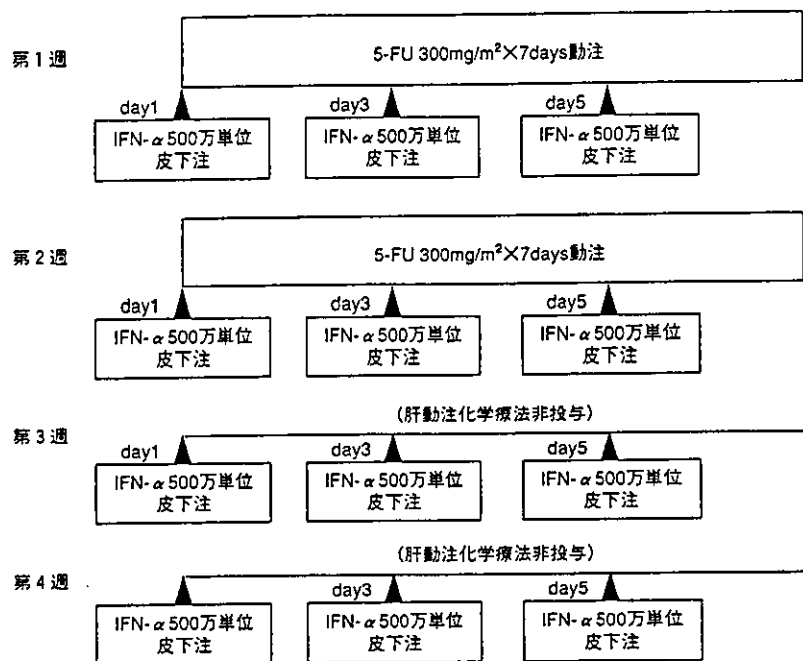


図1. IFN併用動注化学療法治療プロトコル

治療は4週間を1クールとして行う。

5-FUは300mg/m<sup>2</sup>/日を2週間、連日持続動注し、2週間休薬する。IFNは500万単位/日を4週間隔日投与する。

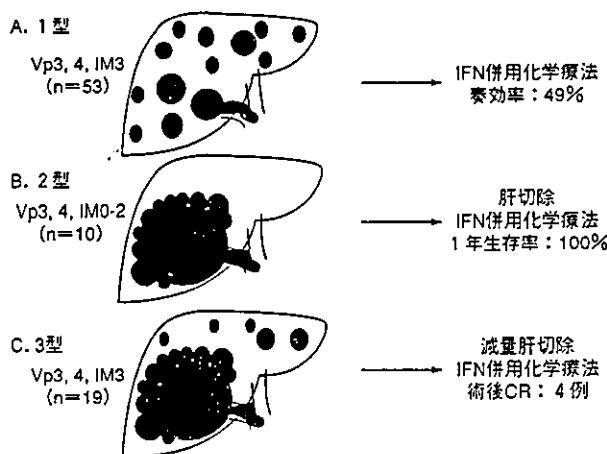


図2. IFN/5-FU併用化学療法の治療成績

病変を伴う症例(3型)の3型に分類した。1型についてはIFN併用動注化学療法を53例に施行し、49%の奏効率をえた(図2A)。2型については肉眼的な根治肝切除術(旧取り扱い規約:根治度B)と術後補助療法としてのIFN併用動注化学療法を3クール、10例に対して施行した。これらの症例の1年生存率、3年生存率はそれぞれ100%、74%であった(図2B)。これに対して、同一ステージで同様の肝切除術を施行し術後にIFN併用動注化学療法を施行しなかった15例の成績は、それぞれ41%、22%であった。3群においては、減量肝切除(主腫瘍の切除と門脈内腫瘍栓の摘出)と術後に対側葉の残存肝病変に対するIFN併用動注化学療法を19例に施行した。現在観察期間は短いものの、4例において残存肝病巣のCR(完全効果)を得た。今後の治療成績が期待される。

#### IV. IFN併用動注化学療法の作用機序

5-FUは、1957年にHeidelbergerらによって発見されてから、50年が経過しようとしている。この間、5-FUは消化器癌をはじめとする各種固形癌の治療に用いる基本薬剤として、広く臨床に使用されており、現在、なお固形癌に対する抗腫瘍薬の主流をなすといっても過言ではない。他方、IFNは1954年に長野らによりウイルス抑制因子として発見され、1957年にIssacsらによりウイルス増殖に干渉(Interference)する因子として命名された。その後、マウス白血病の自然発症を抑制することを契機として、多種類の癌に直接、あるいは免疫系を介して働きかけ、癌

の増殖を抑制することが明らかとなった<sup>5)</sup>。IFNの抗腫瘍効果の機序としては、直接効果として、腫瘍細胞の増殖抑制、分化誘導、apoptosisの増加、間接効果として細胞障害性T細胞、NK細胞などの免疫系の活性化、血管系への影響、間質細胞と腫瘍細胞の細胞相互作用への影響などが報告されている<sup>6)</sup>。以上をふまえてIFN併用動注化学療法の作用機序につき、われわれは以下のように仮説をたて、検証を進めている。

##### 1. IFNによる直接的な抗腫瘍効果

IFNが腫瘍細胞の増殖に影響を与える機序として細胞周期遅延作用が報告されているが、われわれの肝癌細胞株を用いた検討でも両薬剤の併用による増殖抑制効果の増強、細胞周期遅延作用および細胞周期関連蛋白の発現変化を確認した。さらにこの効果は、肝癌細胞株のIFN受容体の発現の強弱が関与していることが明らかとなっている<sup>7)</sup>。

##### 2. biochemical modulatorとしてのIFNによる5-FUの効果増強作用

IFNが5-FUの抗腫瘍効果を増強させ、その代謝への影響として、DPD(dihydropyrimidine dehydrogenase)、TS(thymidylate synthase)の阻害、TP(thymidine phosphrylase)の増加などが報告されている。

##### 3. IFN/5-FUによる血管新生抑制作用

肝細胞癌は豊富な血管を必要とする腫瘍であり、腫瘍内のmicro vessel density(MVD)が腫瘍の進展、予後に影響を与えるといわれている。われわれはIFNと5-FUの併用により、VEGF

(Vascular Endothelial Growth Factor: 血管内皮増殖因子)の発現量がIFN単剤と比較し、低下していることを確認した。現在、ヌードマウスを用いた動物実験の系でIFN/5-FU併用療法の抗腫瘍効果と血管新生因子の関係につき検討を進めている。

#### 4. IFN/5-FUによる腫瘍免疫賦活作用

IFNは細胞障害性T細胞、NK細胞などを介して、強力な免疫賦活作用を有することが知られている<sup>8)</sup>。われわれの検討でもIFN、5-FUにより、Tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand(TRAIL)を介した腫瘍免疫作用が増強されることを報告してきた。現在われわれは、さらに別の腫瘍免疫を担当するFas/Fas ligandの系についても検討を進め、IFNと5-FUの併用により、それぞれ単剤で使用したときと比較しFas/Fas ligand systemを介した細胞死が増えることを確認している。

#### おわりに

以上、述べたようにIFN/5-FU併用動注化学療法は、これまで有効な治療法がなかった門脈腫瘍塞栓を伴う高度進行肝細胞癌に対して、CRを含む約50%の奏効率と、有効症例における予後の延長という画期的な臨床効果を示した。さらに本治療は外来での投与を基本としているため、予後が限られると予想される高度進行肝細胞癌症例においても、患者のQOLを大きく損なわない可能性がある。今後、プロトコルのmodifyや、手術、肝臓移植との併用、対象症例の臨床病理学的因子あるいは遺伝子的背景を考慮にいた

order made治療への展開など、さらなる効果と発展を期待できるとわれわれは考えている。

## 文 献

- 1) Sakon M, Nagano H, Dono K, et al : Combined intraarterial fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94 : 435-442, 2002
- 2) Lin DY, Lin SM, Liaw YF : Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 12 : S319-S328, 1997
- 3) Simonetti RG, Liberati A, Angiolini C, et al : Treatment of hepatocellular carcinoma : a systemic review of randomized controlled trials. *Ann Oncol* 8 : 117-136, 1997
- 4) Urabe T, Kaneko S, Matsushita E, et al : Clinical pilot study of intrahepatic arterial chemotherapy with methotrexate, 5-fluorouracil, cisplatin and subcutaneous interferon-alpha-2b for patients with locally advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology* 55 : 39-47, 1998
- 5) Brassard DL, Grace MJ, Borden RW : Interferon- $\alpha$  as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol* 71 : 565-581, 2002
- 6) 今西二郎 編 : インターフェロン. その研究の歩みと臨床応用への可能性. 東京, ライフ・サイエンス, 132-139, 1998
- 7) Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H, et al : Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon  $\alpha$  is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6 : 2881-2890, 2000
- 8) 永野浩昭, 左近賢人, 門田守人 : 肝細胞癌に対する新治療法の開発研究-インターフェロンとフルオロウラシルの併用を中心に-. *日本臨床* 60 : 2237-2244, 2002
- 9) Liang S, Wei H, Sun R, et al : IFN- $\alpha$  regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway. *Cytokine* 23 : 190-199, 2003



ない。そこで、本研究ではヌードマウス可移植性ヒト肝癌細胞株を用いて IFN- $\alpha$  の 5-FU 代謝関連酵素に及ぼす影響を検討した。

## I. 材料および方法

### 1. 動物と細胞株

4週齢の BALB/c nu/nu 雌マウス (日本チャールス・リバー (株)) を 1週間予備飼育した後、実験に用いた。ヒト肝癌細胞株 HuH 7 および PLC/PLF/5 (PLC) (American Tissue Culture Collection) は、37°C, 5% CO<sub>2</sub>存在下にて、10%FBS 含有 MEM 培地にて培養維持継代し用いた。

### 2. 抗腫瘍実験

ヌードマウス背部皮下に HuH 7 および PLC 細胞を  $1 \times 10^7$  個移植して腫瘍を作製し、腫瘍径が約 10 mm になった時点で、腫瘍より 3 mm<sup>2</sup> 大の腫瘍フラグメントを作製し、準備したヌードマウス背部皮下に移植した。移植後、腫瘍が直径約 5 mm になった時点から実験を行った。腫瘍径は週 1 回計測し、推定腫瘍重量を  $W = a \times b^2 / 2$  ( $W$ : 推定腫瘍重量 (mg),  $a$ : 長径 (mm),  $b$ : 短径 (mm)) の式より求めた。実験群は、無処置群、5-FU 単独投与群、IFN- $\alpha$  単独投与群、5-FU + IFN- $\alpha$  併用群の 4 群を作製した。5-FU (協和発酵工業 (株) より供与) は 0.5 mg/匹腹腔内投与、IFN- $\alpha$  (大塚製薬 (株) より供与) は 10 万 IU/匹皮下注射にて投与し、3 回/週のスケジュールで連続 6 週間続けた。

### 3. 5-FU 代謝関連酵素活性の測定

5-FU の代謝に関連するピリミジン代謝酵素として、thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidine phosphorylase (TP), orotate phosphoribosyl transferase (OPRT), uridine phosphorylase (UP), uridine kinase (UK) 活性を測定した。

抗腫瘍実験と同じスケジュールで各群 3 匹のヌードマウスを用いて薬剤の投与を行い、投与開始 1 週目にてヌードマウスより腫瘍を摘出、その腫瘍を緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF) を用いてホモジネートを作製した。それを腫瘍粗酵素液として各酵素活性を測定した。

#### 1) Thymidylate synthase (TS) 活性

Spears らの方法<sup>9)</sup> に準じて、粗酵素液および [5-<sup>3</sup>H] dUMP (ICN biomedical Inc.) を反応液 (0.3 mM tetrahydrofolate, 1.75 mM HCHO, 1.25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 6.25 mM 2-Mercaptoethanol, 1.25 mg/ml ウシ血清アルブミン, 12.5 mM NaF, 50 mM リン酸バッファー pH

7.5) 中で反応させた後、20% 活性炭懸濁液を加え遠心分離し、上清の放射活性を測定した。

#### 2) Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) 活性

Ikenaka らの方法<sup>10)</sup> に準じて、粗酵素液および [6-<sup>3</sup>H] 5-FU (MORAVEK BIOCHEMICALS INC.) を反応液 (1 mM  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 5 mM ATP, 50 mM Nicotinamide, 25 mM NaF, 50 mM リン酸バッファー pH 7.5) 中で反応させ、反応液の一部と 5-FU, F- $\beta$ -alanine をシリカゲル薄層クロマトプレートにスポットし、プレート上にて展開、紫外線ランプ下で 5-FU と原点 (分解物) の分画を掻き取り、掻き取った各分画の放射活性を測定した。

#### 3) Thymidine phosphorylase (TP) 活性

糠塚らの方法<sup>11)</sup> に準じて、粗酵素液および [6-<sup>3</sup>H] 5-FU (MORAVEK BIOCHEMICALS INC.) を反応液 (4 mM deoxyribose-1-phosphate, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 100 mM Tris-HCl pH 8.0) 中で反応させ、反応液の一部と 5-FU, FdUrd をシリカゲル薄層クロマトプレートにスポットし、プレート上にて展開、紫外線ランプ下で 5-FU と FdUrdR の分画を掻き取り、掻き取った各分画の放射活性を測定した。

#### 4) Orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) 活性

Shirasaka らの方法<sup>12)</sup> に準じて、粗酵素液および [6-<sup>3</sup>H] 5-FU (MORAVEK BIOCHEMICALS INC.) を反応液 (4 mM phosphoribosyl pyrophosphate, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) 中で反応させ、反応液の一部と 5-FU, FUMP をシリカゲル薄層クロマトプレートにスポットし、プレート上にて展開、紫外線ランプ下で 5-FU と FUMP の分画を掻き取り、掻き取った各分画の放射活性を測定した。

#### 5) Uridine phosphorylase (UP) 活性

糠塚らの方法<sup>13)</sup> に準じて、粗酵素液および [6-<sup>3</sup>H] FUrd (MORAVEK BIOCHEMICALS INC.) を反応液 (25 mM KPB pH 7.5) 中で反応させ、反応液の一部と 5-FU, FUrd をシリカゲル薄層クロマトプレートにスポットし、プレート上にて展開、紫外線ランプ下で 5-FU と FUrd の分画を掻き取り、掻き取った各分画の放射活性を測定した。

#### 6) Uridine kinase (UK) 活性

粗酵素液および [6-<sup>3</sup>H] FUR (MORAVEK BIOCHEMICALS INC.) を反応液 (10 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 100 mM Tris-HCl pH 8.0) 中で反応させ、反応液の一部を 5-FU, FUrd をスポットし乾燥させたシリカゲル薄層クロマトプレートにスポットし、プレート上にて展開、紫外線ランプ下で FUrd と

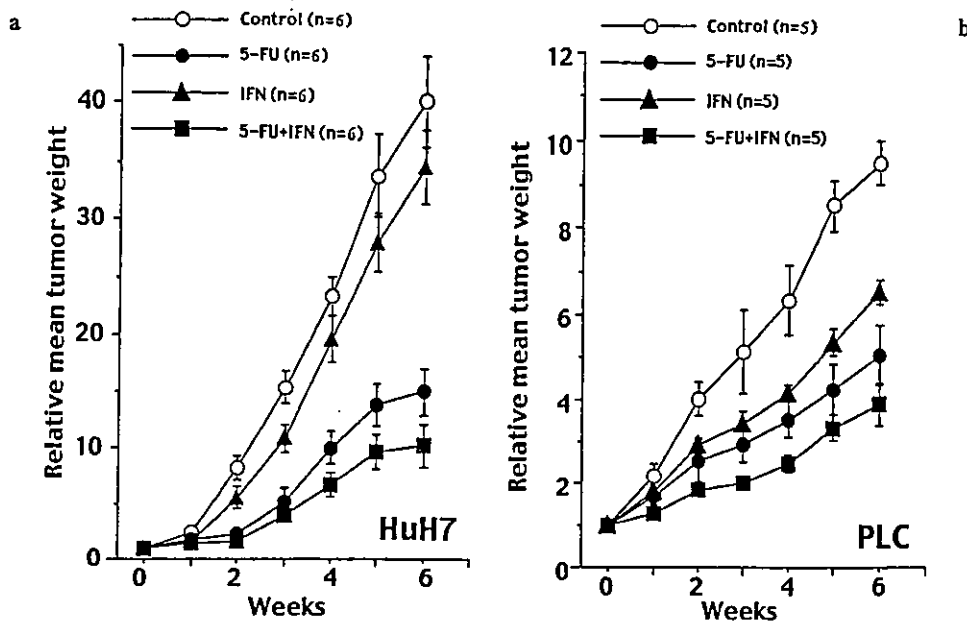


図1 ヒト肝癌細胞ヌードマウス移植腫瘍に対する抗腫瘍活性  
 a: HuH7細胞における抗腫瘍活性。b: PLC/PLE/5 (PLC)細胞における抗腫瘍活性。治療開始時の腫瘍重量に対する各時点における各腫瘍の重量を相対的腫瘍重量 (relative tumor weight) として、各時点で平均 (relative mean tumor weight) し、腫瘍増殖曲線を作成した。

FUMPの分画を掻き取り、掻き取った各分画の放射活性を測定した。

4. 統計学的解析

腫瘍重量の比較および5-FU代謝関連酵素に関する比較は student の t 検定にて行い、 $p < 0.05$  である場合に有意差があると判定した。

II. 結果

図1に各実験群の腫瘍増殖曲線を治療開始時の推定腫瘍重量に対する各測定時点における相対的推定腫瘍重量の平均 (relative mean tumor weight) の推移として示した。細胞株の違いにより、腫瘍増殖速度および薬剤による抗腫瘍効果は異なっていた。5-FU単独の抗腫瘍効果は、HuH7細胞、PLC細胞ともに認められ、対照群と比較して有意な増殖抑制効果が認められた ( $p < 0.05$ )。一方、IFN- $\alpha$  単独での抗腫瘍効果は、HuH7細胞においては対照群との有意な違いは認められなかったが、PLC細胞では5-FUほどではないものの対照群に比べ有意な増殖抑制効果が認められた ( $p < 0.05$ )。5-FUおよびIFN- $\alpha$  併用による抗腫瘍効果は、HuH7細胞およびPLC細胞ともに対照群および各薬剤単独群に比べ有意な抑制効果が認められた ( $p < 0.05$ ) のものの、併用による効果は相加的なものであった。

各群における腫瘍の5-FU代謝に関する各酵素活性を図2に示した。各酵素の活性を無処置の対照群間で比較すると細胞間に大きな違いが認められ、TS、DPD、OPRT活性はHuH7細胞で高かった。特にDPD活性

はHuH7細胞で有意にPLC細胞より高かった ( $p < 0.001$ )。一方、PLC細胞ではTP、UP、UK活性がHuH7細胞より高く、TP、UP活性は統計学的にも有意であった ( $p < 0.05$ )。これら酵素活性に対する5-FUおよびIFN- $\alpha$  投与の及ぼす影響は、HuH7細胞においては対照群と比べ有意に変化するものはなかったが、PLC細胞においてはTP活性が薬剤単独では有意な違いは認められないものの、5-FU+IFN- $\alpha$  併用投与により対照群に比べ有意に上昇した ( $p < 0.05$ )。さらに、UK活性はIFN- $\alpha$  投与によりPLC細胞で低下する傾向にあったが、対照群、5-FU投与群と比較して有意なものではなかった。

III. 考察

IFNは5-FUのbiochemical modulatorとして、あるいはそれ自体に抗腫瘍作用をもつこと<sup>13)</sup>から、様々な癌種において5-FUと併用して臨床応用されている。この併用療法的作用機序は、いまだ明らかでない点が多い。作用機序の検討の多くは5-FUのbiochemical modulationを検討したものであり、5-FUの代謝に関与する酵素へのIFNの影響を調べている。実際、5-FUの生体内での活性化や代謝にかかわる酵素として、TPやUPの活性増強<sup>4,5)</sup>、TS活性の増強<sup>6)</sup>やDPD活性の阻害<sup>7)</sup>などが大腸癌細胞を主として用いた *in vitro* および *in vivo* の研究で報告されており、これらの影響によって5-FU治療におけるIFN併用化学療法の抗腫瘍効果が増強されている可能性は高い。肝細胞癌においても、IFNと5-

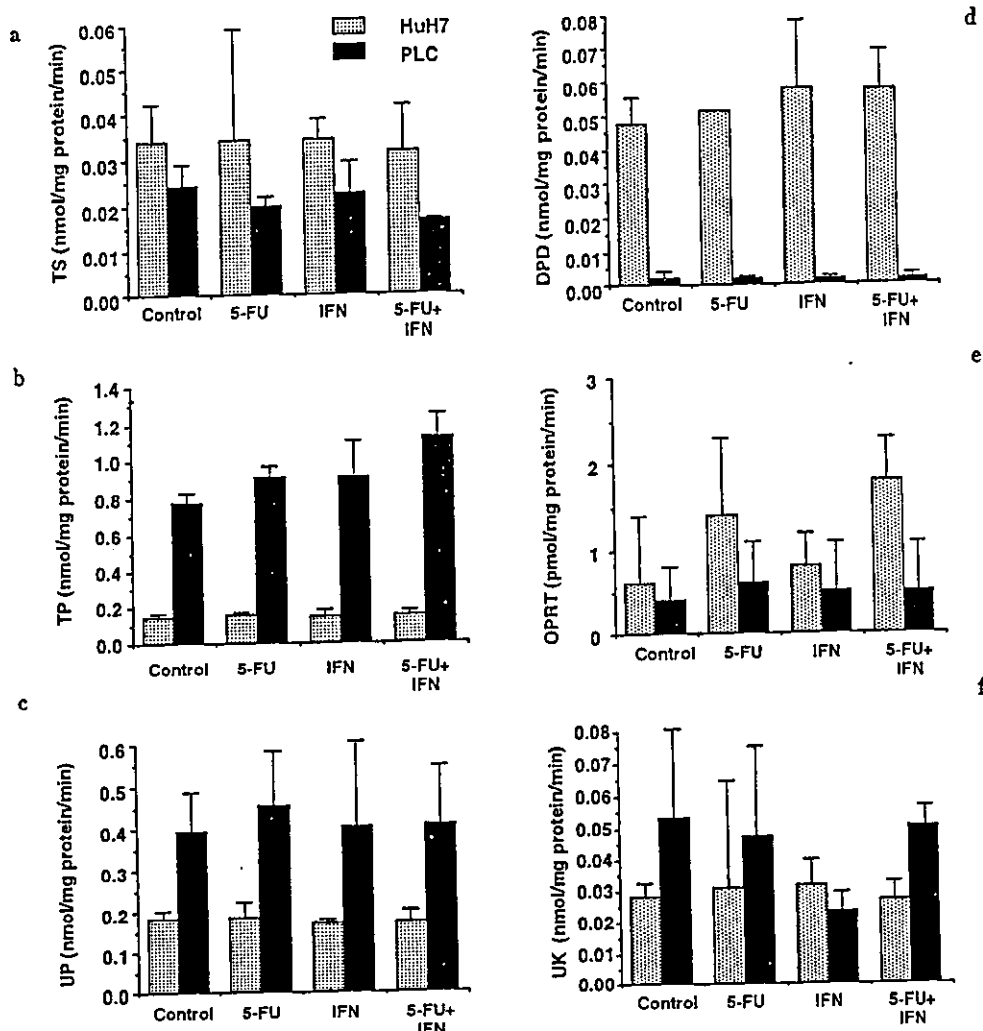


図2 ノードマウス移植腫瘍における5-FU代謝関連酵素活性  
 a: thymidylate synthase (TS), b: dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), c: thymidine phosphorylase (TP), d: orotate phosphoribosyl transferase (OPRT), e: uridine phosphorylase (UP), f: uridine kinase (UK)。

FU併用療法の臨床効果は、われわれをはじめいくつかの報告<sup>1,2,14-16)</sup>が認められるが、その作用機序の検討はこれまでほとんどなく<sup>3)</sup>、特にIFNの5-FU代謝関連酵素のbiochemical modulationの面からの検討は行われていない。そこで本研究では、ヒト肝細胞癌を癌移植した*in vivo*のモデルを用いて、5-FU代謝関連酵素への影響を検討した。

本研究において、これまでにヒト肝細胞癌を用いた*in vitro*モデルで報告された5-FU+IFN- $\alpha$ の併用による抗腫瘍効果<sup>9)</sup>を*in vivo*モデルでも明らかにした。しかし、*in vitro*モデルで認められたPLC細胞での5-FUとIFN- $\alpha$ の抗腫瘍活性にかかわる相乗効果は認められず、HuH7細胞とともに相加的な効果としか判断できないものであった。この違いは、実験系の違いによる薬剤到達度や組織内濃度の違いによる可能性があり、本研究では*in vitro*の結果に基づき5-FUやIFN- $\alpha$ の投与量や

投与スケジュールを固定した検討であったためとも考えられる。また、過去の*in vitro*の研究<sup>3)</sup>においては、癌細胞のみを対象としたために薬剤が直接的に細胞に作用し、相互効果が反映されやすく抗腫瘍効果が相乗効果として認められた可能性が高いが、今回の*in vivo*の検討では、同一肝癌細胞株を用いているが宿主の様々な因子が影響し、単なる相加効果としてしか認められなかった可能性がある。いずれにしても、今後のさらなる*in vivo*の研究が必要と考えられる。ただし、*in vitro*モデルでの検討でも明らかにされた肝癌細胞株のIFN受容体の発現レベルとIFN直接の抗腫瘍効果<sup>9)</sup>に関しては、IFN受容体の発現性が高いPLC細胞でのIFN- $\alpha$ 単剤による抗腫瘍効果は、IFN受容体発現のほとんどみられないHUH7細胞に比べて高かったことから、今回の*in vivo*モデルの実験系の示す結果はIFN受容体発現量を反映したものである可能性は高い。



5-FU代謝関連酵素として、本研究では6種類の酵素活性を測定した。これらの酵素活性の変化は、すでに大腸癌細胞などを用いた *in vitro* および *in vivo* の検討で、抗腫瘍効果の発現との関連性およびIFNにより変化がみられることが報告<sup>4-7)</sup>されたものである。残念ながら本研究では、用いた2種類のヒト肝癌細胞株において併用療法の抗腫瘍効果向上に結び付くような代謝酵素の変化は認められなかった。したがって本研究の結果からは、現在臨床において高度進行肝癌に対する新たな治療法として期待されている5-FU+IFN- $\alpha$ の併用療法<sup>1,2)</sup>の抗腫瘍効果が、IFN- $\alpha$ による5-FUのbiochemical modulationの効果なのかは否定的である。しかしながら、IFNの5-FUに対する抗腫瘍効果と代謝酵素の影響は細胞や癌種によつての差異は大きく<sup>17,18)</sup>、本研究のみで安易にヒト肝癌治療におけるIFN- $\alpha$ の5-FUのbiochemical modulation効果を否定できるものではないと考えられる。実際、ヒト肝細胞癌における5-FU代謝関連酵素の異常が報告されている<sup>19,20)</sup>。

今回の肝癌細胞2株を用いた *in vivo* 研究ではbiochemical modulation効果に関しては否定的な結果しか得られなかったが、投与量や投与方法についてはまだまだ解決すべき問題もあり、IFN- $\alpha$ の5-FUのbiochemical modulation効果に関してさらなる検討が必要であろう。

#### 文 献

- Miyamoto A, Umeshita K, Sakon M, *et al*: Case Report: Advanced hepatocellular carcinoma with distant metastases, successfully treated by a combination therapy of interferon-alpha and oral tegafur/uracil (UFT). *J Gastroenterol Hepatol* 15: 1447-1451, 2000.
- Sakon M, Nagano H, Dono K, *et al*: Combined intraarterial fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94: 435-442, 2002.
- Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H, *et al*: Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon  $\alpha$  is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6: 2881-2890, 2000.
- Eda H, Fujimoto K, Watanabe S, *et al*: Cytokines induce uridine phosphorylase in mouse colon 26 carcinoma cells and make the cells more susceptible to 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Jpn J Cancer Res* 84: 341-347, 1993.
- Eda H, Fujimoto K, Watanabe S, *et al*: Cytokines induce thymidine phosphorylase expression in tumor cells and make them more susceptible to 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 333-338, 1993.
- Chu E, Koeler DM, Johnston PG, *et al*: Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma. *Mol Pharmacol* 43: 527-533, 1993.
- Milano G, Fischel J-L, Etienne M-C, *et al*: Inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase by  $\alpha$ -interferon: experimental data on human tumor cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 34: 147-152, 1994.
- Longly DB, Harkin DP and Johnston PG: 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Rev Cancer* 3: 330-338, 2003.
- Spears CP, Gustavsson BG, Mitchell MS, *et al*: Thymidylate synthetase inhibition in malignant tumors and normal liver of patients given intravenous 5-FU. *Cancer Res* 44: 4144-4150, 1984.
- Ikenaka K, Shirasaka T, Kitano S, *et al*: Effect of uracil on metabolism of 5-fluorouracil *in vitro*. *Jpn J Cancer Res* 70: 353-359, 1979.
- 榎塚 守, 藤岡秋生, 中川文雄・他: 同所移植ヒト乳癌株の肺転移モデルの作製とフッ化ピリミジン薬剤の抗腫瘍効果. *癌と化学療法* 29: 95-101, 2002.
- Shirasaka T, Shimamoto Y and Fukushima M: Inhibition by oxonic acid of gastrointestinal toxicity of 5-fluorouracil without loss of its antitumor activity in rats. *Cancer Res* 53: 4004-4009, 1993.
- Ozaki Y, Edelstein MP and Duch DS: Induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon  $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1242-1246, 1989.
- Patt YZ, Yoffe B, Charnsangavej C, *et al*: Low serum alpha-fetoprotein level in patients with hepatocellular carcinoma as a predictor of response to 5-FU and interferon-alpha-2 b. *Cancer* 72: 2574-2582, 1993.
- Urabe T, Kaneko S, Matsushita E, *et al*: Clinical pilot study of intrahepatic arterial chemotherapy with methotrexate, 5-fluorouracil, cisplatin and subcutaneous interferon-alpha-2 b for patients with locally advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology* 55: 39-47, 1998.
- Leung TW, Patt YZ, Lau WY, *et al*: Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 1676-1681, 1999.
- Kubota T, Inada T and Ogata Y: Interferon alpha-2 a shows antitumor activity in combination with 5-fluorouracil against human colon carcinoma xenografts: a study in reference to thymidylate synthetase activity inhibition. *Jpn J Surg* 22: 481-483, 1992.
- Houghton JA, Morton CL and Adkins DA: Locus of the interaction among 5-fluorouracil, leucovorin, and interferon- $\alpha$  2 a in colon carcinoma cells. *Cancer Res* 53: 4243-4250, 1993.
- Baba H, Teramoto K, Kawamura T, *et al*: Dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase activities in hepatocellular carcinomas and in diseased livers. *Cancer Chemother Pharmacol* 52: 469-476, 2003.
- Ezaki T, Ikegami T, Ishida T, *et al*: Significance of thymidine phosphorylase in HCC with chronic liver disease for long-term postoperative recurrence. *J Surg Oncol* 83: 173-179, 2003.



## 腫瘍血管新生と血管新生阻害薬

*Mechanism of tumor angiogenesis and angiogenic inhibitors*

和田 浩志

WADA Hiroshi

永野 浩昭

NAGANO Hiroaki

山本 浩文

YAMAMOTO Hirofumi

門田 守人\*

MONDEN Morito

### はじめに

固形腫瘍において、酸素および栄養分を拡散により供給されるのは、せいぜい250~300  $\mu\text{m}$  であり、新たな血管形成がなければ1~2 mm以上に増大しないことを示し、腫瘍の転移・増大には血管新生が不可欠であるという概念が1970年代に Folkman らによって提唱された<sup>1)</sup>。これに引き続き、さまざまな悪性腫瘍について、腫瘍血管密度(MVD)や VEGF, TP などの血管新生因子の発現と予後との関連が相次いで報告された<sup>2)</sup>。このことより、腫瘍血管新生を制御することが、新たな抗腫瘍療法として発展することになる。この項では、まず腫瘍血管新生の概説とそれに関する諸因子について述べ、次に、固形腫瘍に対する血管新生阻害薬の現況を報告する。

### I. 腫瘍血管新生の概説

生体内における血管の形成様式は、Vasculogenesis(脈管形成)と Angiogenesis(血管新生)の2つがある。

Vasculogenesis の過程は、主に胎生期にみられ、中胚葉由来の細胞集団である hemangioblast

の外周に位置する細胞が血管内皮細胞に分化し、その周囲に平滑筋細胞や周皮細胞などの壁細胞が動員され成熟血管が形成される。一方、成人における血管の形成の多くは、既存の血管から新しく血管が形成され、Angiogenesis と呼ばれる。腫瘍における血管形成も Angiogenesis が中心であり、多段階的な過程を経て形成されていく。その過程は、①腫瘍細胞、周囲の間質やマクロファージなどによる血管増殖因子の産生、②血管内皮細胞に存在する各レセプターの刺激、③基底膜の局所的な破壊と細胞間接着性の低下、④血管内皮細胞の増殖と遊走、⑤血管内皮細胞の管腔形成と壁細胞の導入による血管の安定化といった、段階に分けることができる(図1, 2)<sup>3)</sup>。このような多段階の過程を経て、腫瘍に血流がもたらされると、飛躍的に腫瘍の増大速度は加速すると考えられる。この腫瘍血管新生の最初の過程では、低酸素刺激や腫瘍自体から分泌される血管新生因子として、VEGF, アンジオポエチンが重要な役割を担っていると考えられる。

表1, 2に代表的な血管新生の調節因子とその働きを示す。腫瘍血管新生における多段階的な過程の中で、これらの血管新生因子の正と負のバラ

大阪大学大学院医学系研究科病態制御外科学教室 \*教授

Key words: 血管新生/VEGF/MMP/血管新生阻害薬

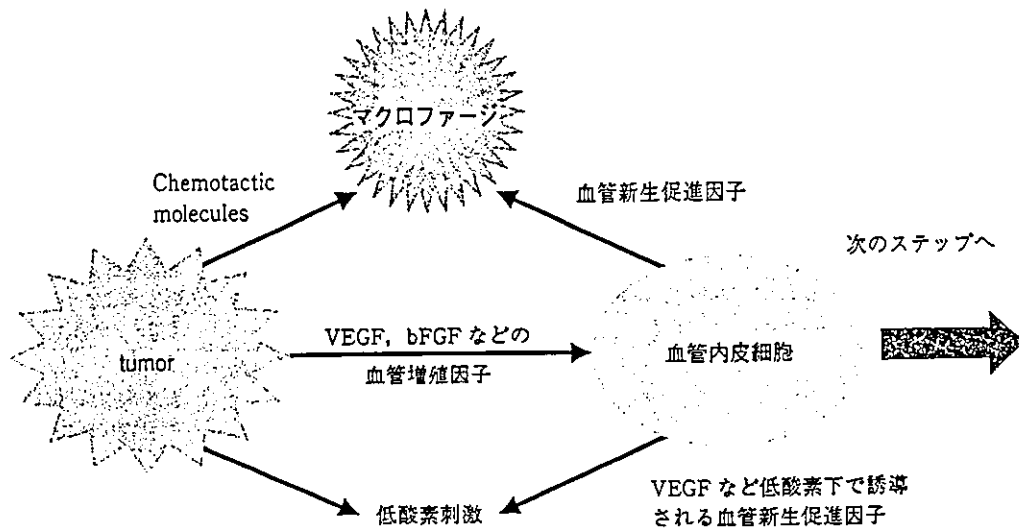


図1 腫瘍血管新生のステップ1

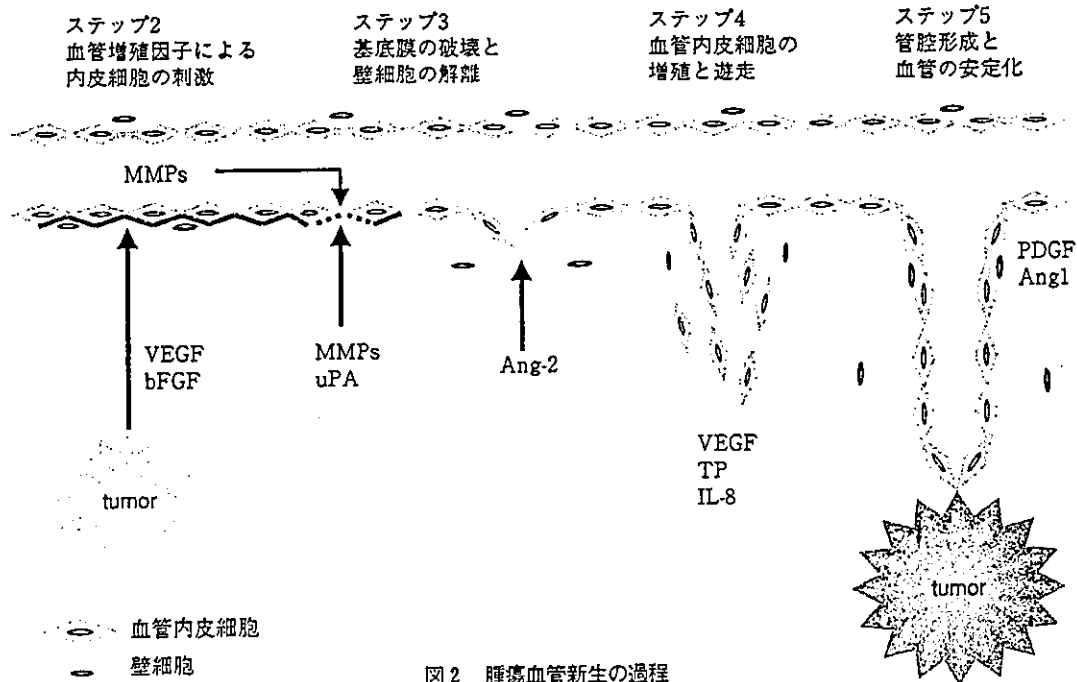


図2 腫瘍血管新生の過程

ンスにより、血管の形成や退縮が生じていると考えられる。

## II. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) と VEGF-R (VEGF receptor)

### 1. VEGF とは

VEGF は血小板由来増殖因子 PDGF と類似性の高く、分子量約20kDa のサブユニットが二量

体を形成した蛋白であり、1980年代に血管透過性を亢進および血管内皮細胞の増殖を促進する因子として単離された。VEGF には、スプライシングのちがいで、アミノ酸タイプの異なる4つのサブタイプ (VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206) が存在する。その中でも VEGF165 が、正常および腫瘍組織内で最も多く発現している。VEGF は、血管内皮細胞に対し特異的に作用し、内皮細胞の増殖・遊走・管腔形

表1 血管新生の調節因子

促進因子	抑制因子
VEGF	Angiostatin
Angiopoietin	Endostatin
FGF family	Thrombospondin
PDGF-BB	TIMP
TGF- $\beta$	IFN- $\alpha$
HGF	IL-4, -12, -18
IL-8	16K Prolactin Fragment
TP / PD-ECGF	Platelet Factor 4
integrin $\alpha\beta 3$	
MMP	
uPA	
Ephrins	
iNOS	
Cox-2	
uPA	

表2 代表的な血管新生促進因子とその働き

促進因子	機能
血管増殖因子	
VEGF family	血管新生全般にわたり刺激, 血管透過性の亢進
bFGF, HGF	血管新生の促進
基底膜破壊と壁細胞の解離	
uPA, MMPs	基底膜の破壊
Integrin- $\alpha\beta 3$	内皮細胞と基底膜の接着に関与
Ang1, 2 and Tie-2	血管の安定化と壁細胞の導入に関与
血管内皮細胞の増殖・遊走	
IL-8	血管内皮細胞の増殖
TP/PD-ECGF	血管内皮細胞の遊走
管腔形成と安定化	
PDGF-BB	平滑筋細胞の導入
Ephrin	動静脈への分化を誘導
TGF beta	細胞外マトリックス産生刺激

成など血管新生のさまざまな段階において、血管新生を促進する。

2. VEGF の発現調節

低酸素刺激によりさまざまな遺伝子の発現が調節を受けるが、VEGF mRNA の発現量は低酸素状態では10~20倍に上昇することが報告されている<sup>9)</sup>。低酸素刺激による遺伝子発現を調節する転写因子として HIF-1 (Hypoxia Induced Factor-1) が、最近注目を集めている。HIF-1は、 $\alpha$  および  $\beta$  の2つのサブユニットからなるヘテロ2量体であり、HIF-1 $\alpha$  は、通常酸素化では、

p53および Mdm2と結合し速やかにユビキチン化されプロテアソームにより分解を受ける。しかし、低酸素化ではこの結合が阻害され HIF-1 $\alpha$  が安定化することによって、ARNT (HIF-1 $\beta$ ) と接合することにより、転写活性を獲得し、VEGF を含むさまざまな遺伝子の発現に関与する(図3)。それ以外に、VEGF の発現を調節する因子として、EGF (epidermal growth factor), TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ , IGF-1 (insulin like growth factor-1), FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) などの増殖因子や、IL-

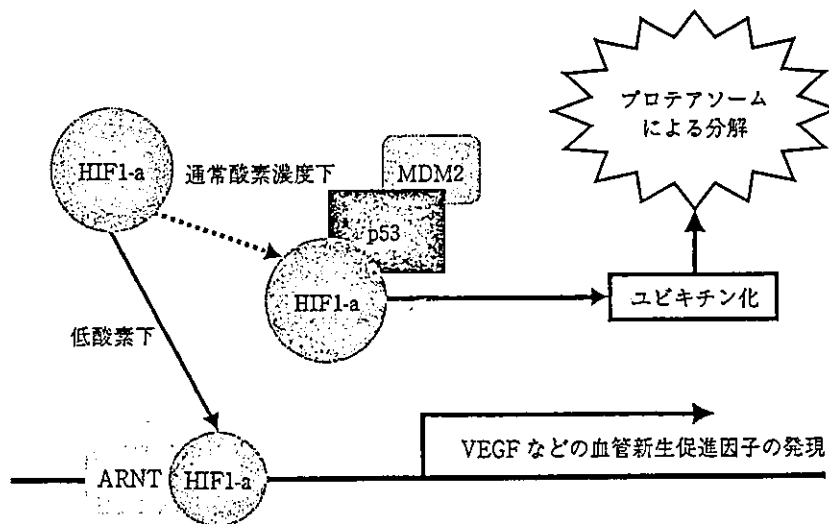


図3 低酸素刺激による HIF-1 $\alpha$  転写活性

1 $\alpha$ , IL-6などのサイトカインがある。

### 3. VEGF レセプター

VEGF は、その特異的レセプターとして、VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(KDR/Flk-1)と VEGFR-3(Flt-4)が存在する。これらは、典型的な膜貫通型チロシンキナーゼレセプターであり、VEGFR-2が血管新生の中心的な役割を果たすことが、VEGFR-2(-/-)のホモ接合体のマウスが胎性8.5~9.5日齢に血島形成全体が障害され死亡することよりも考えられる<sup>9)</sup>。一方、VEGFR-1は、VEGFR-2より10倍以上高いVEGF結合能を持つが、キナーゼ活性はきわめて弱く VEGF をトラップする Decoy 的な調節因子として機能していると考えられる<sup>9)</sup>。

### 4. VEGF/VEGF レセプター系に働く血管新生阻害薬

癌細胞では、正常組織よりも VEGF の産生が増大しており、その発現量が悪性度と相関するという報告が多くなされている。また、腫瘍血管内皮では正常血管内皮よりも VEGF レセプターの遺伝子発現が亢進しており、正のフィードバックがかかっているものと推察できる。このことより、VEGF/VEGF レセプターは腫瘍血管新生の中心

的な役割を担うと考えられ、病的血管障害の標的とした薬剤の開発が進んでいる。VEGF に対する中和抗体、VEGF レセプターに対する中和抗体、レセプターチロシンキナーゼの特異的阻害剤、VEGF との強い結合力を有する遊離型 VEGF レセプターなどがあり、種々の固形癌に対する臨床治験を行っている段階である。

### III. Angiopoietin と Tie-2レセプター

血管内皮細胞の細胞膜表面上における新規のレセプター型チロシンキナーゼとしてクローニングされた Tie-2に対するリガンドとして、アンジオポエチン(Ang)が発見された。現在までに、アンジオポエチンには4つのサブタイプが同定されており(Ang-1, 2, 3, 4)、いずれも Tie-2に結合する。血管内皮細胞では、Ang-1, -4は、Tie-2のリン酸化を誘導するのに対して、Ang-2, -3は、Tie-2に結合するがアンタゴニストとして作用し、リン酸化を誘導しない。

Ang-1は周皮細胞や平滑筋細胞と血管内皮細胞との結合を促進し、血管の維持・安定化に作用する。反対に Ang-2存在下では、壁細胞は血管内皮細胞より解離し、血管は不安定とある。このときに、VEGF などの血管増殖因子が発現してい

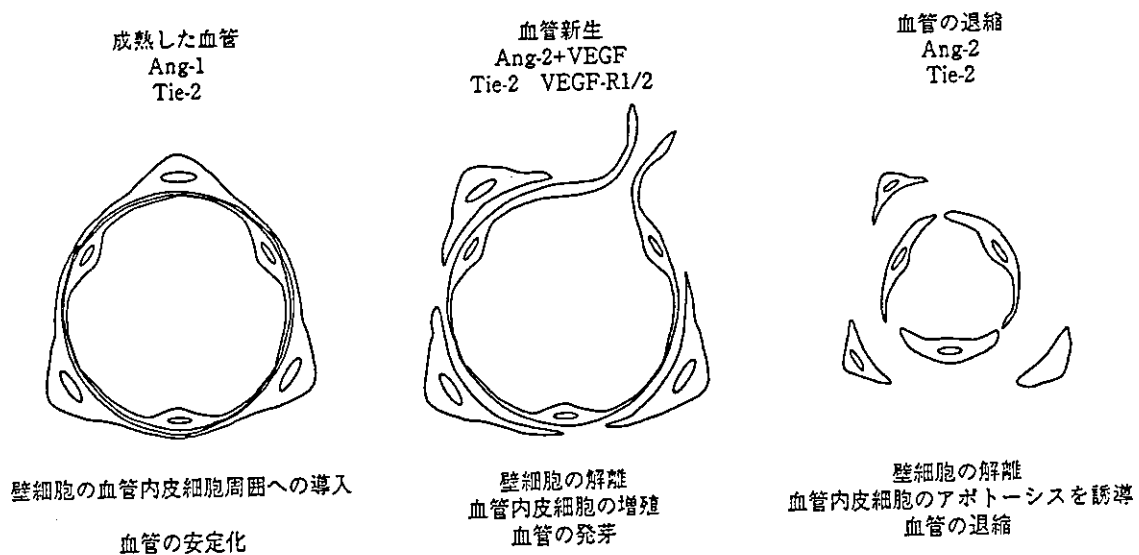


図4 VEGF と Ang-1, -2の働き

ると、血管内皮細胞の増殖・遊走などが生じ、血管枝を伸張させる。しかし、VEGFの非存在下で、Ang-2の産生が持続すると、血管内皮細胞に壁細胞が導入されず、アポトーシスをきたし、血管は退縮する(図4)。

正常組織では、Ang-1の発現が見られるのに対し、消化器癌、肺癌、甲状腺癌などの多くの腫瘍で、Ang-1よりもAng-2が高発現していることが報告されている。また、Ang-2を遺伝子導入することによりAng-2を高発現する胃癌細胞株を用いた実験では、腫瘍血管数が増加することが示された<sup>7)</sup>。これらのことより、腫瘍血管新生にアンジオポエチン/Tie-2システムが重要な役割を果たしていると考えられる。

#### IV. MMP(matrix metalloproteinase)

##### 1. MMPとは

腫瘍血管新生における多段階的な過程のうち、前述の③段階における基底膜の破壊が生じなければならぬ。これら細胞外マトリックスや基底膜の構成成分であるIV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの分解には、MMPs(matrix metalloproteinases)が必要である。

MMPとは、Zn<sup>2+</sup>の結合部位をもち、その酵素活性にCa<sup>2+</sup>が必要な細胞外マトリックスを基質とする酵素の総称であり、細胞外に分泌される分泌型と、細胞膜貫通ドメインをもち細胞膜表面に発現する膜型酵素(MT-MMP; membrane-type MMP)が存在する。分泌型のMMPには、間質型MMP(MMP-1, 8, 13)、ゼラチナーゼ(MMP-2, 9)、ストロムライシン(MMP-3, 10)、マトリライシン(MMP-7)のタイプに分けられる。その中でも、基底膜を構成するIV型コラーゲンを分解するMMP-2(ゼラチナーゼA)、MMP-9(ゼラチナーゼB)が、腫瘍の血管新生および増殖・浸潤・転移に密接に関わっていると考えられる。

##### 2. MMPと血管新生

腫瘍の増殖・浸潤・転移するには、基底膜の破壊が必須であり、その構成因子である細胞外マトリックスを分解する酵素が癌細胞より分泌されていることが、1980年にLiottaらにより報告された<sup>8)</sup>。さらにさまざまな癌細胞株や腫瘍において、MMPの発現亢進が報告されている<sup>9)</sup>。MMPと腫瘍血管新生の関係については、①培養血管内皮細胞は、MMP-1, 2, 3, 7, 9, 14およびその阻害因子であるTIMP(tissue inhibitors of matrix metalloproteinase)-1, 2を発現しており、その発現は、VEGFなどの血管増殖因子により調節を受けること<sup>10)</sup>、②特異的MMP阻害剤であるBHAPにより、MMP阻害作用と血管数および血管断面積の増加抑制が一致したこと<sup>11)</sup>、③MMP-2ノックアウトマウスを用い皮下に癌細胞をいれたチェンバーを移植した実験において、正常マウスに比べて、MMP-2ノックアウトマウスでは、血管新生が有意に遅れたこと<sup>12)</sup>、などの報告がされており、MMPの発現と血管新生に強い相関が示唆される。

##### 3. MMP阻害薬

MMP阻害薬はその投与方法および阻害活性の特徴により三つに分類される。第1世代は、非選択性MMP阻害作用を有し、癌性胸膜炎などを適用として、静脈内投与、胸腔内投与がなされた。第2世代は、経口投与可能な非選択性MMP阻害薬であり、非小細胞肺癌、卵巣癌、消化器癌などに対して臨床治験が行われている。しかし、非選択性であるため、筋痛や関節痛などの副作用の問題がある。第3世代は、ある種のサブクラスのMMPのみを阻害するものであり、とくに悪性腫瘍の増殖・浸潤・転移に深く関与するMMP-2, -9を阻害する薬剤である。

#### V. 臨床治験に入っている血管新生阻害薬 (Angiogenesis inhibitor)

前述の腫瘍血管新生の過程を阻害する薬剤が、

表3 血管新生阻害薬と臨床治験

血管新生阻害薬	標的分子	臨床治験段階
VEGF モノクローナル抗体 Bevacizumab	VEGF	Phase III
レセプターチロシンキナーゼ阻害薬		
SU5416	VEGFR-2	Phase III
SU6668	VEGFR-2, bFGFR, PDGFR	Phase III
ZD6474	VEGFR-2, EGFR	Phase II
血管内皮細胞の増殖抑制薬		
ABT-510	Endothelial CD36	Phase II
Angiostatin	多様	Phase I
Endostatin	多様	Phase I
TNP-470	メチオニンアミノペプチダーゼ, CDK2	Phase I
Thalidomide	TNF- $\alpha$ 産生抑制	Phase III
細胞間接着因子阻害薬		
Vitaxin	インテグリン $\alpha v \beta 3$	Phase II
Medi-522	インテグリン $\alpha v \beta 3$	Phase I
Vascular Targeting Agents		
Combretastatin A4	チューブリン	Phase I
AVE8062A	チューブリン	Phase I
ZD6126	チューブリン	Phase I

表4 Bevacizumab の無作為比較試験の治療成績

報告	治療	症例数	奏効率 (%)	1年生存率 (%)	p value
大腸癌		813			
New Engl J Med 2004	IFL+プラセボ	411	34.8	63.4	<0.001
	IFL+Bevacizumab	402	44.8	74.3	
腎癌		116			
New Engl J Med 2003	プラセボ	40	5**	3	<0.001
	Low dose (3 mg/kg)	37	14**	8	
	High dose (10 mg/kg)	39	30**	20	
非小細胞肺癌		99			
J Clin Oncol 2004	Carboplatin, Paclitaxel + プラセボ	32	18.8	26	n.s.
	+ Low dose (7.5 mg/kg)	32	28.1	21	
	+ High dose (15 mg/kg)	40	31.5	18	

\*IFL: irinotecan, fluorouracil, Leucovorin \*\* : no tumor progression (NC 含む) for 8 months

血管新生阻害薬としての効果を有することになるが、その阻害過程を中心に分類する(表3)<sup>13)</sup>と、以下のようなになる。

### 1. 血管新生因子およびその受容体の阻害薬

血管新生の最初のステップである、腫瘍および周囲間質細胞より分泌される血管新生因子の阻害と、それらの血管内皮細胞の受容体への結合およ

び結合後の細胞内シグナル伝達を阻害する薬剤がこの中に分類される。腫瘍血管新生にもっとも深く関与していると考えられる VEGF, FGF の作用を阻害する薬剤として、VEGF モノクローナル抗体である Bevacizumab や、VEGFR-2レセプター抗体である IMC-ICII, VEGFR のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害する SU5416, VEGFR, PDGF レセプターのチロシンキナーゼ

表5 MMP阻害薬の臨床第III相無作為比較試験

MMP阻害薬	原発腫瘍	抗癌剤の併用	比較治療	結果
第2世代				
Marimostat (BB-2561)	膵癌	なし	vs. gemcitabine	延命効果なし
	膵癌	Gemcitabin	vs. プラセボ	延命効果なし
	胃癌	なし	vs. プラセボ	延命効果なし*
	脳腫瘍	なし	vs. プラセボ	延命効果なし
	小細胞肺癌	なし	vs. プラセボ	延命効果なし
	非小細胞肺癌	なし	vs. プラセボ	延命効果なし
	卵巣癌	Carboplatin	vs. プラセボ	奏効率に差なし
第3世代				
Prinomastat (AG3340)	非小細胞肺癌	Carboplatin+paclitaxel	vs. プラセボ	延命効果なし
	非小細胞肺癌	Cisplatin+gemcitabin	vs. プラセボ	中止**
	前立腺癌	Mitoxantrone+prednisone	vs. プラセボ	症状緩和認めず
Tanomastat (BAY12-9566)	小細胞肺癌	なし	vs. プラセボ	中止***
	膵癌	なし	vs. gemcitabin	中止***

\* No or modest survival benefit ( $p < 0.07$ ) \*\* 治療効果を認めなかったため臨床試験早期に中止

\*\*\* tanomastat 投与群の予後が不良であったために臨床試験中止

活性を阻害するSU6668などがあげられる。それ以外に、インターフェロン- $\alpha$  は、腫瘍細胞のFGFおよびVEGFの産生と内皮細胞上のFGFレセプターの発現低下に作用する。

この中で、VEGF抗体であるBevacizumabは、乳癌、腎癌、大腸癌に対して無作為比較試験(RCT)が行われている。乳癌では、paclitaxelに加えてBevacizumabの投与の有用性が検討されたが、有意な効果は認められなかった<sup>14)</sup>。しかし、腎癌では、Bevacizumabの単剤投与で、有意な腫瘍増大時間の延長が認められ<sup>15)</sup>、また、大腸癌では、irinotecan, 5-FU, leucovorinにBevacizumabを投与することにより、奏効率、生存率ともに改善することが、臨床第III相試験で証明された(表4)<sup>16)</sup>。一方、VEGFRのチロシンキナーゼ阻害薬であるSU5416の大腸癌に対する臨床第III相試験は、irinotecan, 5-FU, leucovorinにSU5416を付加投与しても、予後改善効果が認められず、中断されることとなった。

## 2. 内皮細胞の基底膜の分解や細胞間接着因子を阻害する薬剤

前述のMMP阻害薬がその代表であり、現在までに行われたMMP阻害薬に対する臨床第III相無作為比較試験の結果を表5に示す<sup>17)</sup>。

第2世代の非選択式MMP阻害薬であるmarimostatは、膵癌、胃癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌などに対して、単剤投与および抗癌剤の併用投与の第III相無作為比較試験が行われたが、いずれも十分な効果を認めなかった。同様に、MMP-1の阻害活性は低く、MMP-2, -9を特異的に阻害する第3世代の選択的MMP阻害薬であるprinomastat(AG-3340), tanomastat(BAY-12-9566)に対する第III相無作為比較試験でも、いずれも予後改善効果を認めなかった。また、サメ軟骨より抽出されたNeovastat(BMS-275291)は、MMP-2, -3, -9を特異的に阻害するが、現在、第III相無作為比較試験を実施中である(表5)。それ以外に、血管新生が促進している血管内皮細胞に特異的に発現している細胞間接着因子であるインテグリン $\alpha v \beta 3$ の阻害薬であるヴィタキシンやEMD-121974は、インテグリンとマトリックスの接着を阻止し、血管内皮細胞の遊走を阻害する。これらの薬剤について、臨床第I相試験が行われている。

## 3. 血管内皮細胞の増殖、遊走を抑制する物質

生体内における血管内皮細胞の増殖抑制因子であるTSP-1(thrombospondin-1)のN末端断片類似物質であるABT-510、生体内において血管



新生抑制作用を有する因子として発見された endostatin (分子量20kDa のコラーゲン XVIII の C 末端断片), angiostatin (分子量38kDa の プラスミノゲン断片) などの第1層臨床試験が行われている。また, アスペルギルスより抽出された フマジリン由来の TNP-470 は, 内皮細胞中のメチオニンアミノペプチダーゼ2, CDK2 (Cyclin Dependent Kinase 2) の阻害により, 特異的に血管内皮細胞の増殖と遊走を抑制する。

#### 4. 血管内皮細胞に直接作用をおよぼす薬剤

血管内皮細胞のチューブリン等に直接作用し, アポトーシスの誘導, 管腔形成を阻害する薬剤は VTA (Vascular Targeting Agents) と呼ばれ,

#### 用語集

##### 血管新生 (angiogenesis)

既存の血管から新たに血管が形成されてくる過程。血管新生の形式としては, 無血管野へ, 既存の血管から新しい枝が発芽 (sprouting) するように伸びていく発芽型と, 血管の乏しい組織で, 既存の太い血管の血管内部に隔壁を形成し複数に分かれて血管野を拡張する嵌入型の2種類がある。

##### 脈管形成 (vasculogenesis)

血管発生ともいわれる。おもに胎生期における血管新生に関与する。中胚葉由来の血管内皮前駆細胞 (hemangioblast) が, 増殖し, 血管内皮細胞に分化することによって, 血管を形成する過程。

##### 血管新生因子

個体レベルで血管新生を促進する因子。血管内皮細胞の増殖, 遊走, 管腔形成のいずれかを促進する因子が含まれる。VEGF, FGF, EGF, HGF, アンジオポエチンなどがその代表である。

##### 壁細胞

壁細胞は, 周皮細胞 (ペリサイト) と平滑筋細胞からなり, 血管内皮細胞の周囲を裏打ちする。とくに, 周皮細胞は血管内皮細胞とともに基底膜で包まれており, 基底膜や細胞外マトリックスの産生や血管透過性に関与する。その周囲を平滑筋細胞が取り囲み, 血管の収縮を調節する。

##### VEGF

血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor)。内皮細胞に対する特異性が最も強く, 血管新生の中心的な役割を果たす。In vitro の実験では, 血管内皮細胞の増殖・遊走・管腔形成のいずれも促進する作用を有する。

##### FGF

線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor), Acidic FGF (aFGF), basic FGF (bFGF) を代表として14種類のプロトタイプが存在する。aFGF, bFGF ともに血管内皮細胞の増殖を促進し, uPA やコラゲナーゼの発現を上昇させるとともに, 遊走・管腔形成を促進する。とくに,

Combretastatin A4, AVE8062, ZD6126 などの薬剤で, 臨床第I相試験が行われている。

#### さいごに

腫瘍血管新生の概説とその中心となる分子, 血管新生阻害薬の現況について述べた。理想的な血管新生阻害薬とは, 腫瘍血管に対して選択的に作用し, 既存の血管網には作用せず, 副作用が少なく, 長期間投与可能なものであると考えられる。VEGF 抗体である Bevacizumab が, 腎癌および大腸癌でその効果が示されたことは, 血管新生阻害薬の研究・開発において, 非常に大きな進歩である。今後, さらなる薬剤における臨床治験の結果が待たれる。

bFGFは多くの腫瘍で産生が確認されている。

##### TP / PD-ECGF

チミジンホスホリラーゼ (TP; Thymidine Phosphorylase) は, ピリミジンヌクレオシド代謝に関与する酵素であり, 5'-デオキシフルオロウリジンをフルオロウラシルに変換する。以前に発見された血小板由来内皮細胞増殖因子 (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor) と同一のものである。血管内皮細胞に対する増殖効果は有しないが, 遊走を促進することに血管新生を誘導すると考えられる。

##### PDGF

血小板由来増殖因子 (Platelet-derived Growth Factor)。血小板より精製された中胚葉系に対する増殖因子。PDGF-AA, BB, AB の3種類のアイソフォームが存在する。とくに PDGF-BB は, 血管内皮細胞に対して, 増殖, 遊走, 管腔形成のいずれも促進する。

##### HGF

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor)。線維芽細胞, マクロファージ, 血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞などから産生され, 上皮系細胞の増殖, 運動性を促進する。血管平滑筋細胞での VEGF の発現を増加させ, 血管内皮細胞に対しては増殖, 遊走, 管腔形成を促進する働きをもつ。

##### Angiopoietin

血管内皮細胞に発現しているレセプター型チロシンキナーゼ TIE2 のリガンドとして, 同定されたアンジオポエチンは, Ang-1-4 の4種類あり, Ang-1, -4 は, TIE2 のリン酸化を誘導するが, Ang-2, -3 は, TIE2 と結合するが, リン酸化を誘導せず, アンタゴニストの働きをする。

##### レセプター型チロシンキナーゼ

細胞外にリガンド (血管新生因子など) と結合するレセプタードメインをもち, 細胞膜貫通ドメインと細胞内にチロシンキナーゼドメインをもつ膜タンパク。一般的にレセプター型チロシンキナーゼのシグナル伝達は, ①リガンド結合による

レセプターの2量体化, ②レセプターの自己リン酸化, ③シグナル伝達物質のレセプターへの結合とチロシンのリン酸化, ④細胞内にシグナル伝達が生じる。

#### HIF-1

HIF-1 (Hypoxia Induced Factor-1)は $\alpha$ ,  $\beta$ の2つのサブユニットよりなるヘテロ接合2量体であり, 低酸素刺激によ

る VEGF などの遺伝子発現に関する転写因子である。通常酸素下では, HIF-1 $\alpha$  は, ユビキチン化され, 速やかにプロテアソームによる分解をうけるが, 低酸素状態では, この分解が抑制され細胞内の HIF-1 $\alpha$  は安定化する。これが, 核内に移行し, 血管新生因子の転写が促進される。

#### 文 献

- 1) Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186, 1971.
- 2) Poon RT, Fan ST, Wong J: Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers: a target for novel prognostic and therapeutic approaches. *Ann Surg* 238: 9-28, 2003.
- 3) 江口英利, 門田守人: 腫瘍増殖と血管新生の概説. *臨床科学* 35: 133-139, 1999.
- 4) Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845, 1992.
- 5) Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66, 1995.
- 6) Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, et al: Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9349-9354, 1998.
- 7) Etoh T, Inoue H, Tanaka S, et al: Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res* 61: 2145-2153, 2001.
- 8) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284: 67-68, 1980.
- 9) McCawley LJ, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 6: 149-156, 2000.
- 10) Moses MA: The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 15: 180-189, 1997.
- 11) Maekawa R, Maki H, Yoshida H, et al: Correlation of antiangiogenic and antitumor efficacy of N-biphenyl sulfonyl-phenylalanine hydroxiamic acid (BPHA), an orally-active, selective matrix metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res* 59: 1231-1235, 1999.
- 12) Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58: 1048-1051, 1998.
- 13) Eskens FA: Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *Br J Cancer* 90: 1-7, 2004.
- 14) Miller KD: E2100: a phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel/bevacizumab for metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 3: 421-422, 2003.
- 15) Yang JC, Haworth L, Sherry RM, 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.
- 16) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-2342, 2004.
- 17) Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM: Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295: 2387-2392, 2002.

## 多発肺転移後長期生存を得た肝細胞癌の1例

中村 将人 永野 浩昭 左近 賢人 近藤 礎 山本 為義  
 太田 英夫 和田 浩志 Damdinsuren Bazarragchaa 楊 玉波  
 丸橋 繁 宮本 敦史 堂野 恵三 梅下 浩司 中森 正二  
 門田 守人\*

(*Jpn J Cancer Chemother* 31(11):1939-1942, October, 2004)

A Case of Long-Term Survivor with Multiple Pulmonary Metastases of HCC after Hepatic Resection: Masato Nakamura, Hiroaki Nagano, Masato Sakon, Motoi Kondo, Tameyoshi Yamamoto, Hideo Ota, Hiroshi Wada, Bazarragchaa Damdinsuren, Yubo Yang, Shigeru Marubashi, Atsushi Miyamoto, Keizo Dono, Koji Umeshita, Shoji Nakamori and Morito Monden (*Dept. of Surgery and Clinical Oncology, Graduate School of Medicine, Osaka University*)

## Summary

A 52-year-old male was admitted to our hospital with huge hepatoma of the right lobe. He underwent a right lobectomy of the liver in July 1999. After five months from the surgery, multiple recurrences in the liver and lung were revealed with Computed tomography (CT). TAE was performed for intrahepatic recurrence and a combination therapy, consisting of UFT and interferon- $\alpha$ , was started for pulmonary metastasis. Then 5-FU/CDDP/interferon- $\alpha$  therapy was given in 2001 and TS-1/interferon- $\beta$  therapy was given thereafter in 2002. Consequently, the patient survived for 31 months with no disturbance in quality of life. No intrahepatic recurrence was also detected during the survival period. It was suggested that a good prognosis may be expected, even in the HCC case with distant metastasis after hepatic resection, if the primary site was curatively treated. Key words: Hepatoma, Distant metastasis, Hepatic resection, Long survival, Interferon

要旨 症例は52歳、男性。1999年7月29日に13×10×10 cmのHCCに対して肝右葉切除術と横隔膜合併切除を施行した。AFP 180,000 ng/ml, PIVKA-II 1,430 mAU/ml。術後5か月目に残肝の多発再発に対してTAEを施行したが、同時に両肺に15 mm大の多発性の転移を認め、UFT+interferon (IFN)- $\alpha$ 併用化学療法を開始した。その後、5-FU/CDDP/IFN- $\alpha$ 併用療法、TS-1/IFN- $\beta$ 療法と治療regimenを交代したが、AFPの増加とともに肺の転移巣は増大し続けた。しかしながら、2002年7月10日に死亡するまで残肝への再発を認めず2年7か月間の長期予後を得ることができた。本症例は肝細胞癌切除症例において、両肺への多発転移巣が存在しても肝内の病変が十分に制御されていれば長期予後を得る可能性があることを示唆する症例であると思われた。

## はじめに

肝細胞癌(HCC)切除後遠隔転移症例の予後は極めて不良である<sup>1)</sup>。今回われわれは、肝右葉切除後5か月目に残肝再発に加えて、両肺に多発転移を来したにもかかわらず、転移後2年7か月の長期生存を得た症例を経験した。切除後肝細胞癌多発肺転移症例における治療経過と予後に関して興味ある知見を得たので報告する。

## I. 症 例

患者: 52歳、男性。HBs-Ag (+)。

既往歴: 特記すべきことなし。

家族歴: 兄がHCC。

現病歴: 1999年、人間ドックの腹部USにて肝右葉をほぼ占める巨大なSOLを認めた。肝動脈造影下CT(CTA)では早期相にて強く濃染される13×10×10 cmの境界明瞭、辺縁不正で内部不均一なtumorを認め、一部横隔膜との境界が不鮮明であり横隔膜への浸潤が疑われた。同腫瘍は経動脈性門脈造影下CT(CTAP)にてperfusion defectを示し、MRIでは横隔膜に接するhuge tumorとして認められた。肝動脈造影検査では腫瘍血管を豊富に認め、門脈造影では明らかな門脈内腫瘍栓は認めなかつ

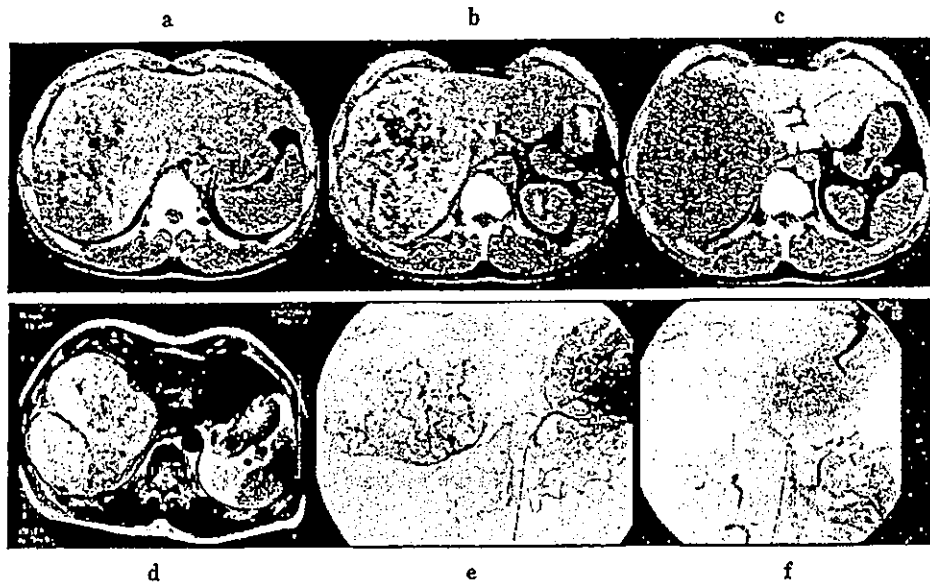


図1 初診時画像検査所見

a: CT, b: CTA, c: CTAP, d: MRI, e: angiography, f: portography

た(図1)。腫瘍マーカーはAFP 180,000 ng/ml, PIVKA-II 1,430 mAU/mlといずれも高値であった(表1)。以上の結果より肝細胞癌と診断し、手術目的のため入院となった。

手術所見: 1999年7月29日に肝右葉切除術と横隔膜合併切除を施行した。

切除標本の肉眼, 病理学的所見: 切除標本の腫瘍径は13.7×8.8×10 cmであり, 切除肝重量は1,420 gであった。肉眼的にEg, Fc(+), Fc-inf(+), Sf(+), massive typeと診断した。TNM分類ではT2N0M0, stage II, Cur Bであった。

病理学的診断はmoderately hepatocellular carcinoma (Edmondson II), fc(+), fc-inf(+), sf(+), vv0, vp0, b0, s0で, 横隔膜への浸潤は認めなかった。背景肝はchronic persistent hepatitis with C-P and P-P bridging fibrosisという診断であった(図2)。

術後経過: 術後外来にて経過観察中, PIVKA-IIは正常化したが, AFPは減少した後2,200(9/1), 3,700(11/12)と漸増していた。1999年12月, 経過観察のための画像検査にて残肝に多発する腫瘍を認めたためTAEを施行した(図3)。同時に両肺に15 mm大の陰影を多発性に認め, 肝細胞癌の肺転移と診断し, UFT+interferon(IFN)- $\alpha$ 併用化学療法を開始した。AFPの増加とともに肺の転移巣は増大を続けたが, 2001年7月より5-FU/CDDP/IFN- $\alpha$ 併用療法, 2002年5月よりTS-1/IFN- $\beta$ 療法と治療regimenを交代し, 同年7月10日に最終的に癌死するまで2年7か月の長期予後を得ることができた(図4)。この間, 多発肺転移巣については増大を続けたが, 残肝への再々発は画像上指摘されなかった。ま

表1 初診時および再発時血液検査所見

	1999年 7月9日 (手術前)	1999年 11月2日 (TAE前)	
WBC	4,220	6,760	/ $\mu$ l
RBC	576×10 <sup>4</sup>	525×10 <sup>4</sup>	/ $\mu$ l
Hb	16.6	15.4	g/dl
Ht	50.4	47	%
Plt	21.3×10 <sup>4</sup>	18.6×10 <sup>4</sup>	/ $\mu$ l
TP	8	8.2	g/dl
Alb	3.8	4	g/dl
T-Bil	0.5	0.4	mg/dl
D-Bil	0.1	0.2	mg/dl
AST	24	31	IU/l
ALT	15	33	IU/l
ALP	149	273	IU/l
Ch-E	2,564	3,070	IU/l
Na	142	142	mEq/l
K	4	4	mEq/l
Cl	104	104	mEq/l
ICG-15	12		%
PT	94	83	%
PT-INR	1.02	1.1	
APTT	30		%
HPT	88	68	%
HBs-Ag	(+)		
HBs-Ab	(-)		
HBe-Ag	(-)		
HBe-Ab	(+)		
HBc-Ab	(+)		
HCV-Ab	(-)		
AFP	180,000	3,700	ng/ml
PIVKA-II	1,430	40>	mAU/ml