

6.10 Endostatin

組換えヒト Endostatin のフェーズ I 臨床試験では、組換えヒト Endostatin が 28 日を 1 サイクルとして 15~600 mg/m² で、進行性の固形腫瘍の患者 25 人に毎日投与された²⁶¹⁾。2 人の患者に抗腫瘍活性を示す知見が得られたが、寛解はみられなかった。他の組換えヒト Endostatin のフェーズ I 臨床試験では、組換えヒト Endostatin が 28 日を 1 サイクルとして 30~600 mg/m² で進行性固形腫瘍の患者 21 人に毎日投与された²⁶²⁾。処置は十分耐容性であり、投与量に限定された有害事象はみられなかった。また、寛解はみられなかった。

進行性神経内分泌腫瘍の患者 42 人において組換えヒト Endostatin のフェーズ II 臨床試験が行われた²⁶³⁾。組換えヒト Endostatin は 1 日当たり 60~90 mg/m² 投与された。最小限の有害事象しかみられなかった。また、部分寛解はみられなかった。進行性癌の患者 32 人に対して組換えヒト Endostatin のフェーズ I 臨床試験が行われた²⁶³⁾。客観的な寛解はみられなかったが、2 人の患者で病勢の安定が長期間みられた。

6.11 ABT-510

ABT-510 は TSP-1 の抗血管新生活性を模倣した非ペプチド類似化合物である。ABT-510 のフェーズ I 臨床試験について三つの報告がある。1 番目の報告では、進行性固形腫瘍の患者 39 人に 28 日を 1 サイクルとして ABT-510 が持続注入 (100 mg/時間) 及びボーラス注入 (1 日 1 回 100~260 mg, 1 日 2 回 50, 100 mg) により皮下に投与された²⁶⁴⁾。2 番目の報告では、進行性固形腫瘍の患者 12 人に 5-FU+LV と ABT-510 の併用で行われた²⁶⁵⁾。1 日当たり 5-FU は 90 mg/m², LV は 425 mg/m² が 4 週間ごとに 5 日間投与された。ABT-510 は 2 日目から 1 日に 2 回投与された。この併用は十分耐容性であり、毒性のプロフィールは 5-FU と LV の組み合わせと同等であった。3 番目の報告では進行性固形腫瘍の患者 13 人に Gemcitabine+Cisplatin と ABT-510 の併用で行われた²⁶⁶⁾。3 週間で 1 サイクルとして Gemcitabine (425 mg/m²) は 1 日と 8 日目、Cisplatin (425 mg/m²) は 1 日目、ABT-510 は 50 mg あるいは 100 mg で 1 日に 2 回投与された。この併用における毒性のプロフィールは Gemcitabine+Cisplatin+5-FU の併用と同等であった。部

分寛解がそれぞれ 1 人ずつ頭頸部癌、メラノーマ、非小細胞肺癌でみられた。

6.12 VEGF-Trap

VEGF-Trap の癌に対する臨床試験の結果はまだ報告されていないので、その他の血管新生亢進により生じる疾患の治療結果について述べる。VEGF-Trap のフェーズ I 試験が黄斑変性症による脈絡膜血管新生の患者 25 人に対して行われた²⁶⁷⁾。VEGF-Trap は 0.3, 1.0, あるいは 3.0 mg/kg を単回投与後 4 週間経過観察し、その 2 週間後 3 回投与した。主要な有害事象は軽度から中程度の重症化であった。過度の網膜厚は投与量に依存して低下し、1 mg/kg の単回及び複数回投与で 40% になった。なお、視力は変化しなかった。

6.13 Aplidine

Aplidine のフェーズ I 試験が二つ報告されている。1 番目では進行性悪性腫瘍の患者 67 人に 2 週間ごとに 0.2 から 8 mg/m² で投与された²⁶⁸⁾。用量を制限する筋毒性が 6 mg/m² 投与した患者 6 人のうち 2 人でみられ、それにはグレード 2 から 3 のクレアチン・ホスホキナーゼの上昇及びグレード 1 から 2 の筋痛症、筋衰弱であった。心臓に対する有害事象はみられず、ミオシンの太いフィラメントが消失した。グレード 3 の筋肉に対する有害事象が推奨投与量である 8 mg/m² で 14 人の患者のうち 3 人でみられたが、カルニチン 1 g/kg の経口投与で容易に回復した。他の有害事象は吐き気、嘔吐、下痢、無力症そして弱い血液毒性を伴うトランスアミナーゼの上昇であった。弱い奏功及び腫瘍の安定の延長が甲状腺髄様癌の患者でみられた。2 番目では難治性固形腫瘍の患者 37 人に 3 週間ごとに 5 日間 80~1500 µg/m² が投与された²⁶⁹⁾。1350 µg/m² 及び 1500 µg/m² で用量を制限する有害事象がみられ、それには吐き気、嘔吐、筋痛症、倦怠感、皮膚発疹、下痢が含まれた。複数のサイクル投与した患者において軽度から中程度の筋肉痛、筋衰弱が見られたが、有意な神経毒性はみられなかった。試験時において病勢が進行した 9 人の患者で病勢が安定化し、非小細胞肺癌及び結腸直腸癌の患者それぞれ 1 人でやや寛解がみられた。

7. 今後の課題

7.1 抗血管新生治療薬が最大の治療効果をもたらす最適なタイミング

抗血管新生治療薬のデリバリーに伴い血管の正常化が起きる。しかし、その治療期間が短ければ治療効果が低く、逆に長ければ有害事象が発現する。したがって、最適の治療期間が存在することに注意する必要がある。VEGFR2に対する抗体を評価するマウスの研究で、血管の正常化が起きる最適な期間は約6日間続き、腫瘍の酸化及び血管周皮細胞の被覆の増加が特徴であった²⁷⁰⁾。この考えを裏付けるように、VEGF及びbFGFのシグナルをブロックする薬剤であるThalidomideで動物をその最適な期間に処理すると、腫瘍の酸化及びマウス繊維肉腫の放射線に対する反応性が増加することが示された²⁷¹⁾。このように最大限の治療効果を得るため、将来の研究は化学療法剤あるいは放射線と共に抗血管新生治療薬を投与する最適なタイミングの特定に焦点を合わせる必要がある。

7.2 抗VEGF療法における潜在的な落とし穴

VEGFを分子標的とする臨床における成功から、この治療はヒト癌の治療において有効であることが立証されている。しかし、広範囲のヒト癌に対してこの戦略が一般的に適用できるかどうかについては問題が残る。難治性乳癌におけるBevacizumab治療の有効性を調べるフェーズIII臨床試験²⁷²⁾、VEGFRチロシンキナーゼインヒビターであるSU516の臨床試験^{273,274)}でみられるように、VEGFを標的とすることはすべてのタイプの癌について十分な治療効果を得るという観点では単純に満足できるものではないかもしれない。

VEGFはヒト癌の約60%で発現するかアップレギュレートされている。しかし、残りの約40%のVEGFを発現していない場合では抗VEGF療法は有効ではない²⁷⁵⁾。癌はbFGF, PDGF, EGFのようなVEGF以外の血管新生促進因子を発現して血管新生を促進する場合もある。更に、ほとんどのタイプの癌は1種類以上の血管新生促進因子を発現し、腫瘍の進行の過程においてこれら血管新生促進因子の発現が変化する²¹²⁾。VEGFを分子標的として成功している場合はあるが、抗腫瘍療法及び単独の抗VEGF療法を用いる場合には先に述べたような血管新生促進因子のうちのどれが癌において発現が亢

進しているかを考慮に入れる必要がある。

7.3 抗血管新生療法の有効性を増加させる戦略

先に述べたことと関連するが、血管新生は多くの分子が関与する複雑なプロセスである。更に、そのプロセスには複数の分子が関与する可能性があり、血管が発達する間に様々な因子が異なった時間で作用する。腫瘍の血管新生におけるVEGFの重要性から、最近の治療はVEGFのブロックに主に焦点が合わされてきた。しかし、今後は他の血管新生経路も標的にすることを考える必要がある。例えば、抗HER2抗体であるTrastuzumabは複数の血管新生経路をブロックすることが最近示された²⁷⁶⁾。また、単一の増殖因子のみを標的として治療した患者では腫瘍内に変異が生じ、他の血管新生たん白質の活性化を導く。その結果、治療に対して抵抗性が生じる²⁷⁵⁾。したがって、複数の血管新生メディエーターの機能を同時に標的とする戦略が必要である。

化学療法剤による抗腫瘍効果を増大させる方法としてメトロノーム療法が注目されている。この療法は腫瘍内皮細胞に対する感受性を高めるために、化学療法剤をメトロノームのようにあるいは少量を再度にわたって投与すると、抗血管新生効果が増強されるというものである²⁷⁷⁾。このようなより治療効果の高い化学療法と抗血管新生治療薬の組み合わせにより、有害事象を最小限にした状態で最大限の治療効果が得られる可能性がある²⁷⁸⁾。

7.4 抗血管新生療法に対する抵抗性の獲得

内皮細胞は腫瘍細胞よりも遺伝的に安定であり変異が少ないため、抗血管新生療法ではこれまでの細胞傷害性化学療法を悩ませてきた遺伝子変異による抵抗性は起こりにくい。しかし、他の機構により抵抗性が起こりうる²⁷⁹⁾。これに関連して興味深い知見は、p53たん白質の変異がヒト癌の50%で観察され²⁸⁰⁾、その変異により癌が抗血管新生治療に対して抵抗性を示すようになることである²⁸¹⁾。いくつかの非臨床試験から、一つの抗血管新生治療薬よりも異なった機構を有する抗血管新生治療薬の組み合わせのほうがより効果的であり、抵抗性を抑制あるいは無効にできることが示唆されている²⁷⁹⁾。

7.5 抗血管新生治療薬の有害事象の低減

今後化学療法と抗血管新生治療薬のより治療効果の高い組み合わせが開発されると思われる。その際、安全性上の懸念（例、創傷治癒の遅延、腎臓、甲状腺

腺、肺、脳及び心臓における有害事象)が生じない程度に血管新生をブロックすることが重要となる。これまでに述べたように腫瘍における血管新生のプロセスは非常に複雑であることから、複数の経路を標的として抗血管新生治療薬を投与することが有効と思われる。また、その投与スケジュール及び投与量等については慎重に設定することにより、有害作用を誘導しないで最適な治療効果を得ることが可能になるとと思われる。

抗血管新生治療の最適な投薬量は将来の研究において重要な問題である。最大耐量を用いるという概念は先に述べた治療法には適用できないことが非臨床のデータから示唆されている。ある研究では、VEGF活性を抑制すると複数の器官における正常血管に有害作用が及ぼされる²⁸²⁻²⁸⁵。VEGFブロックの初期の用量漸増臨床試験では用量の増加により抗血管新生活性に直接関連する有害事象が増加する場合のあることが示唆されている^{8,9}。

7.6 適切なエンドポイントの設定

これまでの抗血管新生臨床試験において成功に導く妨げとなっている原因の一つは、投薬及び有効性を評価できる信頼性の高いエンドポイントが不足していることである。

化学療法剤の場合とは異なり生体由来の抗血管新生治療薬では投与量を制限するような毒性はほとんどみられず、その最適な有効投与量はそれまでに検討した最大投与量よりも低い可能性がある²⁸⁶。血管新生阻害により増殖を抑制しても短期間では腫瘍のサイズは低下しない。病勢の安定及び無増悪期間は妥当なエンドポイントであるが、このようなエンドポイントは長いインターバルでは示されても初期の臨床試験では示すことはできない。したがって生体由来の抗血管新生治療薬において推定される生物学至適用量はフェーズIで決定され、有効性は無増悪期間及び生存に関するデータが得られる前にフェーズII/III試験で示される。そこで有効性の指標となるサロゲートマーカーが必要となるが、そのようなサロゲートマーカーに関する検討が最近行われている。

抗血管新生治療薬の投与前及び投与後組織におけるバイオマーカーの発現を調べることにより抗血管新生治療薬の有効性を調べることができると可能性がある。レーザー・スキャニングサイトメトリー

“Laser scanning cytometry” (LSC) は研究治療薬の標的である特定のたん白質の発現、アポトーシスを受けた内皮細胞の割合、腫瘍血管密度などの血管新生に関連した組織バイオマーカーの定量的な評価に用いられる。LSCを用いたEndostatinのフェーズI臨床試験で、中間の投与レベルで治療した患者において内皮細胞死及び微小血管密度の統計的に有意な変化が起こり、その中の2人は軽微な抗腫瘍反応を示した^{261,287}。しかし、繰り返しの生検を行う場合、生検を腫瘍から採取することは必ずしも容易ではないこと、生検に固有のリスクが患者にあることから非侵襲性の方法を考案する必要性が指摘されるようになった。

血管新生促進因子は癌患者の血清、血漿及び尿において検出可能であり、抗血管新生治療における血管新生促進因子の発現の変化は有効性を示す指標となる可能性がある。しかし、3例のEndostatinのフェーズI試験では、血漿あるいは尿におけるELISAを用いたVEGF, bFGF, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)あるいはE-selectinの測定値と治療効果の推移とは関連しなかった^{261,262,287,288}。血漿VEGFにおける有意な低下が転移性腎臓癌のIM862のフェーズII試験で示されたが、奏功とは相関しなかった²⁸⁹。したがって、現時点ではこれらサロゲートマーカーにより治療効果を判定することは妥当ではないように思われる。これは血管新生の不均一性によるもので、腫瘍により血管新生促進たん白質の依存度が異なり、血管新生が起こる系及びその能力も異なる。腫瘍の血管新生状態を正確に把握するには、このような個別のマーカーよりもむしろ血管新生に関与する一連のメディエーターを測定する必要がある。これは全たん白質のプロファイルが分析できるようなプロテオミクスを用いたアプローチが進歩すれば達成可能と思われる²⁹⁰。

これに関連し、血清プロテオミクスの変化によりAngiostatin, Carboplatin, Paclitaxelを用いた非小細胞肺癌の治療効果を予測する試みとして、“Surface Enhanced Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry” (SELDI-TOF MS)の有用性が報告されている²⁹¹。また、同様なプロテオーム研究で、“a disintegrin and metalloproteinase 12” (ADAM-12)のようなMMP

のレベルと疾患の程度との間に直接的な相関があり²⁹²⁾、尿中のMMPを治療の有効性のモニタリングに用いることができることが示された²⁹³⁾。

VEGFにより誘導される血液循環内皮前駆細胞の動員は腫瘍の新しい血管形成に重要な役割を果たしている^{20,294,295)}。血管新生の阻害剤は血液循環内皮前駆細胞の数を減少させ、傷害を受けた腫瘍内皮の脱落により遊離される血液循環内皮細胞を増加させる²⁹⁶⁾。これら細胞型のフローサイトメーターを用いた測定により抗血管新生治療薬の有効性が示されるかもしれない。EndostatinのフェーズII試験において、7人の患者のうち6人で、最初の2箇月以内に血液循環内皮細胞が2倍以上に増加し、そのうち5人で病勢が安定化し1人で軽微な奏功を示した。このように、進行中の生体由来の抗血管新生治療薬の試験において血液循環内皮前駆細胞及び血液循環内皮細胞数の増減が有効性の指標として有用であることが示されている。放射断層撮影法“positron emission tomography” (PET)、動的造影増強磁気共鳴イメージング“dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging” (DCE-MRI)、三次元超音波のような非侵襲的なイメージング技術により腫瘍の血流、血管の透過性の変化が解析できる。また、PETにより代謝の変化の解析ができる。フェーズI試験においてDCE-MRI及びPETによりCA4Pの抗血管新生活性が確認できた^{297,298)}。PETはEndostatinのフェーズI試験において腫瘍の血流及び腫瘍の代謝の変化の測定にも用いられたが、その有用性について統一的な見解は得られていない^{262,287,288)}。

症状の安定、無増悪期間、最終的には患者の生存のような根拠のある結果とバイオマーカーの比較によりこれら予備的な知見を確認し、バイオマーカーの候補の妥当性を綿密に評価する努力が今後も更に必要である。

おわりに

腫瘍の成長と進行において血管新生が重要な役割を果たしていることはよく知られている。それに基づいて抗血管新生治療に関する多くの非臨床及び臨床研究が行われてきた。そのなかでもBevacizumabと化学療法の組み合わせによる結腸直腸癌患者の生存の延長は典型的な成功例である。また、そ

他の血管新生阻害剤についても一部は臨床上的有効性が認められており、また、非臨床研究から多くの抗血管新生治療薬の候補が見つまっている。これら抗血管新生治療薬の候補は薬剤抵抗性をほとんど誘導しないで一般的に低毒性であることから、抗血管新生治療は長期にわたる治療法として理想的なものの一つであると考えられる。今後の課題としては、異なった血管新生の阻害剤及びアプローチを組み合わせた治療法の確立、適切なエンドポイントの設定などがあげられる。これらの点が解決されれば、癌を末期の病気というよりは慢性の病気と考えることも可能になると思われる。今後の抗血管新生治療の発展に期待したい。

謝 辞

本研究の一部は厚生科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業(H18-医薬-002)として実施されたものである。

文 献

- 1) Folkman, J.: *N Engl J Med*, 285(21), 1182-6 (1971).
- 2) Gullino, P. M.: *J Natl Cancer Inst*, 61(3), 639-43 (1978).
- 3) Fayette, J., Soria, J. C. and Armand, J. P.: *Eur J Cancer*, 41(8), 1109-16 (2005).
- 4) Rhee, J. and Hoff, P. M.: *Expert Opin Pharmacother*, 6(10), 1701-11 (2005).
- 5) Gasparini, G., Longo, R., Toi, M. and Ferrara, N.: *Nat Clin Pract Oncol*, 2(11), 562-77 (2005).
- 6) Zakarija, A. and Soff, G.: *Curr Opin Oncol*, 17(6), 578-83 (2005).
- 7) Quesada, A. R., Munoz-Chapuli, R. and Medina, M. A.: *Med Res Rev*, 26(4), 483-530 (2006).
- 8) Cobleigh, M. A., Langmuir, V. K., Sledge, G. W., Miller, K. D., Haney, L., Novotny, W. F., Reimann, J. D. and Vassel, A.: *Semin Oncol*, 30(5 Suppl 16), 117-24 (2003).
- 9) Yang, J. C., Haworth, L., Sherry, R. M., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Steinberg, S. M., Chen, H. X. and Rosenberg, S. A.: *N Engl J Med*, 349(5), 427-34 (2003).
- 10) Mayer, R. J.: *N Engl J Med*, 350(23), 2406-8 (2004).

- 11) Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R. and Kabbinavar, F.: *N Engl J Med*, **350**(23), 2335-42 (2004).
- 12) Hudis, C. A.: *Oncology (Williston Park)*, **19** (4 Suppl 3), 26-31 (2005).
- 13) Lenz, H. J.: *Oncology (Williston Park)*, **19**(4 Suppl 3), 17-25 (2005).
- 14) Jain, R. K.: *Oncology (Williston Park)*, **19**(4 Suppl 3), 7-16 (2005).
- 15) Benouchan, M. and Colombo, B. M.: *Int J Oncol*, **27**(2), 563-71 (2005).
- 16) Harper, J. and Moses, M. A.: *Exs*, (96), 223-68 (2006).
- 17) Milkiewicz, M., Ispanovic, E., Doyle, J. L. and Haas, T. L.: *Int J Biochem Cell Biol*, **38** (3), 333-57 (2006).
- 18) Folkman, J. and Kalluri, R.: *Nature*, **427** (6977), 787 (2004).
- 19) Hanahan, D. and Folkman, J.: *Cell*, **86**(3), 353-64 (1996).
- 20) Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M. and Isner, J. M.: *Circ Res*, **85** (3), 221-8 (1999).
- 21) Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., Wu, Y., Hicklin, D., Zhu, Z., Hackett, N. R., Crystal, R. G., et al.: *Nat Med*, **7**(11), 1194-201 (2001).
- 22) Rak, J., Filmus, J. and Kerbel, R. S.: *Eur J Cancer*, **32A**(14), 2438-50 (1996).
- 23) Brooks, P. C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F. H. and Cheresch, D. A.: *J Clin Invest*, **96**(4), 1815-22 (1995).
- 24) Skobe, M., Rockwell, P., Goldstein, N., Vosseler, S. and Fusenig, N. E.: *Nat Med*, **3**(11), 1222-7 (1997).
- 25) Folkman, J.: *Adv Cancer Res*, **43**, 175-203 (1985).
- 26) Cavallaro, U. and Christofori, G.: *J Neurooncol*, **50**(1-2), 63-70 (2000).
- 27) Fidler, I. J.: *J Natl Cancer Inst Monogr*, (28), 10-4 (2001).
- 28) Hasan, J., Byers, R. and Jayson, G. C.: *Br J Cancer*, **86**(10), 1566-77 (2002).
- 29) Dvorak, H. F.: *J Clin Oncol*, **20**(21), 4368-80 (2002).
- 30) Patan, S., Munn, L. L. and Jain, R. K.: *Microvasc Res*, **51**(2), 260-72 (1996).
- 31) Patan, S., Tanda, S., Roberge, S., Jones, R. C., Jain, R. K. and Munn, L. L.: *Circ Res*, **89** (8), 732-9 (2001).
- 32) Patan, S., Munn, L. L., Tanda, S., Roberge, S., Jain, R. K. and Jones, R. C.: *Circ Res*, **89** (8), 723-31 (2001).
- 33) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 野間誠司, 川西 徹, 早川堯夫: *医薬品研究*, **37**(10), 641-670 (2006).
- 34) Jain, R. K.: *Nat Med*, **7**(9), 987-9 (2001).
- 35) Carmeliet, P.: *Nat Med*, **6**(4), 389-95 (2000).
- 36) Jain, R. K., Schlenger, K., Hockel, M. and Yuan, F.: *Nat Med*, **3**(11), 1203-8 (1997).
- 37) Jain, R. K.: *Nat Med*, **9**(6), 685-93 (2003).
- 38) Isner, J. M.: *Nature*, **415**(6868), 234-9 (2002).
- 39) Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K. and Heissig, B.: *Nat Rev Cancer*, **2**(11), 826-35 (2002).
- 40) Duda, D. G., Cohen, K. S., Scadden, D. T. and Jain, R. K.: *Nat Protoc*, **2**(4), 805-10 (2007).
- 41) Stoll, B. R., Migliorini, C., Kadambi, A., Munn, L. L. and Jain, R. K.: *Blood*, **102**(7), 2555-61 (2003).
- 42) Jain, R. K.: *Science*, **307**(5706), 58-62 (2005).
- 43) Jain, R. K.: *Sci Am*, **271**(1), 58-65 (1994).
- 44) Bottaro, D. P. and Liotta, L. A.: *Nature*, **423** (6940), 593-5 (2003).
- 45) Semenza, G. L.: *Nat Rev Cancer*, **3**(10), 721-32 (2003).
- 46) Ferrara, N.: *Oncologist*, **9**, Suppl 1, 2-10 (2004).
- 47) Padro, T., Bieker, R., Ruiz, S., Steins, M., Retzlaff, S., Burger, H., Buchner, T., Kessler, T., Herrera, F., Kienast, J., Muller-Tidow, C., Serve, H., Berdel, W. E. and Mesters, R. M.: *Leukemia*, **16**(7), 1302-10 (2002).
- 48) Yoshiji, H., Gomez, D. E., Shibuya, M. and Thorgeirsson, U. P.: *Cancer Res*, **56**(9), 2013-6 (1996).
- 49) Guidi, A. J., Abu-Jawdeh, G., Tognazzi, K., Dvorak, H. F. and Brown, L. F.: *Cancer*, **78** (3), 454-60 (1996).
- 50) Harada, Y., Ogata, Y. and Shirouzu, K.: *Int J Clin Oncol*, **6**(5), 221-8 (2001).
- 51) Fontanini, G., Faviana, P., Lucchi, M., Boldrini, L., Mussi, A., Camacci, T., Mariani, M. A., Angeletti, C. A., Basolo, F. and Pingitore,

- R.: *Br J Cancer*, **86**(4), 558-63 (2002).
- 52) Yuan, A., Yu, C. J., Kuo, S. H., Chen, W. J., Lin, F. Y., Luh, K. T., Yang, P. C. and Lee, Y. C.: *J Clin Oncol*, **19**(2), 432-41 (2001).
- 53) Bando, H., Weich, H. A., Brokelmann, M., Horiguchi, S., Funata, N., Ogawa, T. and Toi, M.: *Br J Cancer*, **92**(3), 553-61 (2005).
- 54) Tanigawa, N., Amaya, H., Matsumura, M. and Shimomatsuya, T.: *J Clin Oncol*, **15**(2), 826-32 (1997).
- 55) Fine, B. A., Valente, P. T., Feinstein, G. I. and Dey, T.: *Gynecol Oncol*, **76**(1), 33-9 (2000).
- 56) Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S. and Ferrara, N.: *Nature*, **362**(6423), 841-4 (1993).
- 57) Gerber, H. P. and Ferrara, N.: *Cancer Res*, **65**(3), 671-80 (2005).
- 58) Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Gillett, N. A. and Ferrara, N.: *J Clin Invest*, **95**(4), 1789-97 (1995).
- 59) Ignoffo, R. J.: *Am J Health Syst Pharm*, **61**(21 Suppl 5), S21-6 (2004).
- 60) Borgstrom, P., Gold, D. P., Hillan, K. J. and Ferrara, N.: *Anticancer Res*, **19**(5B), 4203-14 (1999).
- 61) Presta, L. G., Chen, H., O'Connor, S. J., Chisholm, V., Meng, Y. G., Krummen, L., Winkler, M. and Ferrara, N.: *Cancer Res*, **57**(20), 4593-9 (1997).
- 62) Fernando, N. H. and Hurwitz, H. I.: *Semin Oncol*, **30**(3 Suppl 6), 39-50 (2003).
- 63) Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S. D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J. P., et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(17), 11393-8 (2002).
- 64) Konner, J. and Dupont, J.: *Clin Colorectal Cancer*, **4**, Suppl 2, S81-5 (2004).
- 65) Kim, E. S., Serur, A., Huang, J., Manley, C. A., McCrudden, K. W., Frischer, J. S., Soffer, S. Z., Ring, L., New, T., Zabski, S., Rudge, J. S., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Kandel, J. J. and Yamashiro, D. J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(17), 11399-404 (2002).
- 66) Huang, J., Frischer, J. S., Serur, A., Kadenhe, A., Yokoi, A., McCrudden, K. W., New, T., O'Toole, K., Zabski, S., Rudge, J. S., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Yamashiro, D. J. and Kandel, J. J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(13), 7785-90 (2003).
- 67) Byrne, A. T., Ross, L., Holash, J., Nakanishi, M., Hu, L., Hofmann, J. I., Yancopoulos, G. D. and Jaffe, R. B.: *Clin Cancer Res*, **9**(15), 5721-8 (2003).
- 68) Fukasawa, M. and Korc, M.: *Clin Cancer Res*, **10**(10), 3327-32 (2004).
- 69) Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H., Baffert, F., Haskell, A., Baluk, P., Hu-Lowe, D. D., Shalinsky, D. R., Thurston, G., Yancopoulos, G. D. and McDonald, D. M.: *Am J Pathol*, **165**(1), 35-52 (2004).
- 70) Frischer, J. S., Huang, J., Serur, A., Kadenhe-Chiweshe, A., McCrudden, K. W., O'Toole, K., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Yamashiro, D. J. and Kandel, J. J.: *Int J Oncol*, **25**(3), 549-53 (2004).
- 71) Lin, P., Polverini, P., Dewhirst, M., Shan, S., Rao, P. S. and Peters, K.: *J Clin Invest*, **100**(8), 2072-8 (1997).
- 72) Lin, P., Sankar, S., Shan, S., Dewhirst, M. W., Polverini, P. J., Quinn, T. Q. and Peters, K. G.: *Cell Growth Differ*, **9**(1), 49-58 (1998).
- 73) Wang, E. S., Teruya-Feldstein, J., Wu, Y., Zhu, Z., Hicklin, D. J. and Moore, M. A.: *Blood*, **104**(9), 2893-902 (2004).
- 74) Prewett, M., Huber, J., Li, Y., Santiago, A., O'Connor, W., King, K., Overholser, J., Hooper, A., Pytowski, B., Witte, L., Bohlen, P. and Hicklin, D. J.: *Cancer Res*, **59**(20), 5209-18 (1999).
- 75) Zhu, Z., Rockwell, P., Lu, D., Kotanides, H., Pytowski, B., Hicklin, D. J., Bohlen, P. and Witte, L.: *Cancer Res*, **58**(15), 3209-14 (1998).
- 76) Lu, D., Shen, J., Vil, M. D., Zhang, H., Jimenez, X., Bohlen, P., Witte, L. and Zhu, Z.: *J Biol Chem*, **278**(44), 43496-507 (2003).
- 77) Zhu, Z., Hattori, K., Zhang, H., Jimenez, X., Ludwig, D. L., Dias, S., Kussie, P., Koo, H., Kim, H. J., Lu, D., Liu, M., Tejada, R., Friedrich, M., Bohlen, P., Witte, L., et al.: *Leukemia*, **17**(3), 604-11 (2003).
- 78) Jimenez, X., Lu, D., Brennan, L., Persaud, K., Liu, M., Miao, H., Witte, L. and Zhu, Z.: *Mol Cancer Ther*, **4**(3), 427-34 (2005).
- 79) Brekken, R. A., Overholser, J. P., Stastny, V. A., Waltenberger, J., Minna, J. D. and Thorpe, P. E.: *Cancer Res*, **60**(18), 5117-24 (2000).

- 80) Kunkel, P., Ulbricht, U., Bohlen, P., Brockmann, M. A., Fillbrandt, R., Stavrou, D., Westphal, M. and Lamszus, K.: *Cancer Res*, **61**(18), 6624-8 (2001).
- 81) Hicklin, D. J., Witte, L., Zhu, Z., Liao, F., Wu, Y., Li, Y. and Bohlen, P.: *Drug Discov Today*, **6**(10), 517-528 (2001).
- 82) Zhu, Z., Bohlen, P. and Witte, L.: *Curr Cancer Drug Targets*, **2**(2), 135-56 (2002).
- 83) Arora, N., Masood, R., Zheng, T., Cai, J., Smith, D. L. and Gill, P. S.: *Cancer Res*, **59**(1), 183-8 (1999).
- 84) Veenendaal, L. M., Jin, H., Ran, S., Cheung, L., Navone, N., Marks, J. W., Waltenberger, J., Thorpe, P. and Rosenblum, M. G.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(12), 7866-71 (2002).
- 85) Frankel, A. E.: *Clin Cancer Res*, **8**(4), 942-4 (2002).
- 86) O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H. and Folkman, J.: *Cell*, **79**(2), 315-28 (1994).
- 87) Holmgren, L., O'Reilly, M. S. and Folkman, J.: *Nat Med*, **1**(2), 149-53 (1995).
- 88) Claesson-Welsh, L., Welsh, M., Ito, N., Anand-Apte, B., Soker, S., Zetter, B., O'Reilly, M. and Folkman, J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(10), 5579-83 (1998).
- 89) Lucas, R., Holmgren, L., Garcia, I., Jimenez, B., Mandriota, S. J., Borlat, F., Sim, B. K., Wu, Z., Grau, G. E., Shing, Y., Soff, G. A., Bouck, N. and Pepper, M. S.: *Blood*, **92**(12), 4730-41 (1998).
- 90) Parsons-Wingerter, P., Lwai, B., Yang, M. C., Elliott, K. E., Milaninia, A., Redlitz, A., Clark, J. I. and Sage, E. H.: *Microvasc Res*, **55**(3), 201-14 (1998).
- 91) Moser, T. L., Stack, M. S., Asplin, I., Enghild, J. J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H. W. and Pizzo, S. V.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(6), 2811-6 (1999).
- 92) Moser, T. L., Kenan, D. J., Ashley, T. A., Roy, J. A., Goodman, M. D., Misra, U. K., Cheek, D. J. and Pizzo, S. V.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(12), 6656-61 (2001).
- 93) Tarui, T., Miles, L. A. and Takada, Y.: *J Biol Chem*, **276**(43), 39562-8 (2001).
- 94) Troyanovsky, B., Levchenko, T., Mansson, G., Matvijenko, O. and Holmgren, L.: *J Cell Biol*, **152**(6), 1247-54 (2001).
- 95) Griscelli, F., Li, H., Bencecure-Griscelli, A., Soria, J., Opolon, P., Soria, C., Perricaudet, M., Yeh, P. and Lu, H.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(11), 6367-72 (1998).
- 96) Wajih, N. and Sane, D. C.: *Blood*, **101**(5), 1857-63 (2003).
- 97) O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. and Folkman, J.: *Cell*, **88**(2), 277-85 (1997).
- 98) Shichiri, M. and Hirata, Y.: *Faseb J*, **15**(6), 1044-53 (2001).
- 99) Dhanabal, M., Ramchandran, R., Waterman, M. J., Lu, H., Knebelmann, B., Segal, M. and Sukhatme, V. P.: *J Biol Chem*, **274**(17), 11721-6 (1999).
- 100) Yamaguchi, N., Anand-Apte, B., Lee, M., Sasaki, T., Fukai, N., Shapiro, R., Que, I., Lowik, C., Timpl, R. and Olsen, B. R.: *Embo J*, **18**(16), 4414-23 (1999).
- 101) Kim, Y. M., Hwang, S., Kim, Y. M., Pyun, B. J., Kim, T. Y., Lee, S. T., Ghoo, Y. S. and Kwon, Y. G.: *J Biol Chem*, **277**(31), 27872-9 (2002).
- 102) Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K. M., Folkman, J. and Hanahan, D.: *Science*, **284**(5415), 808-12 (1999).
- 103) Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. and O'Reilly, M. S.: *Nature*, **390**(6658), 404-7 (1997).
- 104) Dixelius, J., Cross, M. J., Matsumoto, T. and Claesson-Welsh, L.: *Cancer Lett*, **196**(1), 1-12 (2003).
- 105) Kim, Y. M., Jang, J. W., Lee, O. H., Yeon, J., Choi, E. Y., Kim, K. W., Lee, S. T. and Kwon, Y. G.: *Cancer Res*, **60**(19), 5410-3 (2000).
- 106) Lee, S. J., Jang, J. W., Kim, Y. M., Lee, H. I., Jeon, J. Y., Kwon, Y. G. and Lee, S. T.: *FEBS Lett*, **519**(1-3), 147-52 (2002).
- 107) Abdollahi, A., Hahnfeldt, P., Maercker, C., Grone, H. J., Debus, J., Ansoerge, W., Folkman, J., Hlatky, L. and Huber, P. E.: *Mol Cell*, **13**(5), 649-63 (2004).
- 108) Eriksson, K., Magnusson, P., Dixelius, J., Claesson-Welsh, L. and Cross, M. J.: *FEBS Lett*, **536**(1-3), 19-24 (2003).
- 109) Schuch, G., Heymach, J. V., Nomi, M., Machluf, M., Force, J., Atala, A., Eder, J. P.,

- Jr., Folkman, J. and Soker, S.: *Cancer Res*, **63**(23), 8345-50 (2003).
- 110) Taddei, L., Chiarugi, P., Brogelli, L., Cirri, P., Magnelli, L., Raugei, G., Ziche, M., Granger, H. J., Chiarugi, V. and Ramponi, G.: *Biochem Biophys Res Commun*, **263**(2), 340-5 (1999).
- 111) Furumatsu, T., Yamaguchi, N., Nishida, K., Kawai, A., Kunisada, T., Namba, M., Inoue, H. and Ninomiya, Y.: *J Biochem (Tokyo)*, **131**(4), 619-26 (2002).
- 112) Olsson, A. K., Johansson, I., Akerud, H., Einarsson, B., Christofferson, R., Sasaki, T., Timpl, R. and Claesson-Welsh, L.: *Cancer Res*, **64**(24), 9012-7 (2004).
- 113) Wickstrom, S. A., Alitalo, K. and Keski-Oja, J.: *Cancer Res*, **62**(19), 5580-9 (2002).
- 114) Karumanchi, S. A., Jha, V., Ramchandran, R., Karihaloo, A., Tsiokas, L., Chan, B., Dhanabal, M., Hanai, J. I., Venkataraman, G., Shriver, Z., Keiser, N., Kalluri, R., Zeng, H., Mukhopadhyay, D., Chen, R. L., et al.: *Mol Cell*, **7**(4), 811-22 (2001).
- 115) Lawler, J. W., Slayter, H. S. and Coligan, J. E.: *J Biol Chem*, **253**(23), 8609-16 (1978).
- 116) Rastinejad, F., Polverini, P. J. and Bouck, N. P.: *Cell*, **56**(3), 345-55 (1989).
- 117) Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A. and Bouck, N. P.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(17), 6624-8 (1990).
- 118) Lawler, J.: *J Cell Mol Med*, **6**(1), 1-12 (2002).
- 119) Taraboletti, G., Roberts, D., Liotta, L. A. and Giavazzi, R.: *J Cell Biol*, **111**(2), 765-72 (1990).
- 120) Bagavandoss, P. and Wilks, J. W.: *Biochem Biophys Res Commun*, **170**(2), 867-72 (1990).
- 121) Taraboletti, G., Belotti, D. and Giavazzi, R.: *Exs*, **61**, 210-3 (1992).
- 122) Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazier, W. A., Polverini, P. J. and Bouck, N.: *J Cell Biol*, **122**(2), 497-511 (1993).
- 123) Jimenez, B., Volpert, O. V., Crawford, S. E., Febbraio, M., Silverstein, R. L. and Bouck, N.: *Nat Med*, **6**(1), 41-8 (2000).
- 124) Nor, J. E., Mitra, R. S., Sutorik, M. M., Mooney, D. J., Castle, V. P. and Polverini, P. J.: *J Vasc Res*, **37**(3), 209-18 (2000).
- 125) Asch, A. S., Liu, I., Briccetti, F. M., Barnwell, J. W., Kwakye-Berko, F., Dokun, A., Goldberger, J. and Pernambuco, M.: *Science*, **262**(5138), 1436-40 (1993).
- 126) Dawson, D. W., Pearce, S. F., Zhong, R., Silverstein, R. L., Frazier, W. A. and Bouck, N. P.: *J Cell Biol*, **138**(3), 707-17 (1997).
- 127) Lawler, J., Weinstein, R. and Hynes, R. O.: *J Cell Biol*, **107**(6 Pt 1), 2351-61 (1988).
- 128) Ashton, A. W., Cheng, Y., Helisch, A. and Ware, J. A.: *Circ Res*, **94**(6), 735-42 (2004).
- 129) Gao, A. G., Lindberg, F. P., Finn, M. B., Blystone, S. D., Brown, E. J. and Frazier, W. A.: *J Biol Chem*, **271**(1), 21-4 (1996).
- 130) Freyberg, M. A., Kaiser, D., Graf, R., Vischer, P. and Friedl, P.: *Biochem Biophys Res Commun*, **271**(3), 584-8 (2000).
- 131) Lawler, J., Miao, W. M., Duquette, M., Bouck, N., Bronson, R. T. and Hynes, R. O.: *Am J Pathol*, **159**(5), 1949-56 (2001).
- 132) Rodriguez-Manzaneque, J. C., Lane, T. F., Ortega, M. A., Hynes, R. O., Lawler, J. and Iruela-Arispe, M. L.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(22), 12485-90 (2001).
- 133) Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. and Hanahan, D.: *Nat Cell Biol*, **2**(10), 737-44 (2000).
- 134) Haviv, F., Bradley, M. F., Calvin, D. M., Schneider, A. J., Davidson, D. J., Majest, S. M., McKay, L. M., Haskell, C. J., Bell, R. L., Nguyen, B., Marsh, K. C., Surber, B. W., Uchic, J. T., Ferrero, J., Wang, Y. C., et al.: *J Med Chem*, **48**(8), 2838-46 (2005).
- 135) Maeshima, Y., Manfredi, M., Reimer, C., Holthaus, K. A., Hopfer, H., Chandamuri, B. R., Kharbanda, S. and Kalluri, R.: *J Biol Chem*, **276**(18), 15240-8 (2001).
- 136) Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J. C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R. O., Werb, Z., Sudhakar, A. and Kalluri, R.: *Cancer Cell*, **3**(6), 589-601 (2003).
- 137) Maeshima, Y., Sudhakar, A., Lively, J. C., Ueki, K., Kharbanda, S., Kahn, C. R., Sonenberg, N., Hynes, R. O. and Kalluri, R.: *Science*, **295**(5552), 140-3 (2002).
- 138) Sudhakar, A., Sugimoto, H., Yang, C., Lively, J., Zeisberg, M. and Kalluri, R.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(8), 4766-71 (2003).
- 139) Moses, M. A., Wiederschain, D., Wu, I., Fernandez, C. A., Ghazizadeh, V., Lane, W.

- S., Flynn, E., Sytkowski, A., Tao, T. and Langer, R.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96** (6), 2645-50 (1999).
- 140) Feldman, L. and Rouleau, C.: *Microvasc Res*, **63**(1), 41-9 (2002).
- 141) Kern, B. E., Balcom, J. H., Antoniu, B. A., Warshaw, A. L. and Fernandez-del Castillo, C.: *J Gastrointest Surg*, **7**(8), 961-8; discussion 969 (2003).
- 142) Egeblad, M. and Werb, Z.: *Nat Rev Cancer*, **2**(3), 161-74 (2002).
- 143) Fang, J., Shing, Y., Wiederschain, D., Yan, L., Butterfield, C., Jackson, G., Harper, J., Tamvakopoulos, G. and Moses, M. A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(8), 3884-9 (2000).
- 144) Heissig, B., Hattori, K., Friedrich, M., Rafii, S. and Werb, Z.: *Curr Opin Hematol*, **10**(2), 136-41 (2003).
- 145) Mook, O. R., Frederiks, W. M. and Van Noorden, C. J.: *Biochim Biophys Acta*, **1705** (2), 69-89 (2004).
- 146) Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L. and Matrisian, L. M.: *J Clin Oncol*, **18**(5), 1135-49 (2000).
- 147) Moses, M. A., Sudhalter, J. and Langer, R.: *Science*, **248**(4961), 1408-10 (1990).
- 148) Moses, M. A. and Langer, R.: *J Cell Biochem*, **47**(3), 230-5 (1991).
- 149) Moses, M. A.: *Stem Cells*, **15**(3), 180-9 (1997).
- 150) Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K. and Hayakawa, T.: *Biochem Biophys Res Commun*, **171**(3), 1264-71 (1990).
- 151) Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. and Iwata, K.: *FEBS Lett*, **298** (1), 29-32 (1992).
- 152) Murphy, A. N., Unsworth, E. J. and Stetler-Stevenson, W. G.: *J Cell Physiol*, **157**(2), 351-8 (1993).
- 153) Stetler-Stevenson, W. G. and Seo, D. W.: *Trends Mol Med*, **11**(3), 97-103 (2005).
- 154) Seo, D. W., Li, H., Guedez, L., Wingfield, P. T., Diaz, T., Salloum, R., Wei, B. Y. and Stetler-Stevenson, W. G.: *Cell*, **114**(2), 171-80 (2003).
- 155) Murphy, G., Houbrechts, A., Cockett, M. I., Williamson, R. A., O'Shea, M. and Docherty, A. J.: *Biochemistry*, **30**(33), 8097-102 (1991).
- 156) Muskett, F. W., Frenkiel, T. A., Feeney, J., Freedman, R. B., Carr, M. D. and Williamson, R. A.: *J Biol Chem*, **273**(34), 21736-43 (1998).
- 157) Fernandez, C. A., Butterfield, C., Jackson, G. and Moses, M. A.: *J Biol Chem*, **278**(42), 40989-95 (2003).
- 158) O'Reilly, M. S., Wiederschain, D., Stetler-Stevenson, W. G., Folkman, J. and Moses, M. A.: *J Biol Chem*, **274**(41), 29568-71 (1999).
- 159) Zucker, S., Cao, J. and Chen, W. T.: *Oncogene*, **19**(56), 6642-50 (2000).
- 160) Coussens, L. M., Fingleton, B. and Matrisian, L. M.: *Science*, **295**(5564), 2387-92 (2002).
- 161) Wen, W., Moses, M. A., Wiederschain, D., Arbiser, J. L. and Folkman, J.: *Cancer Res*, **59**(24), 6052-6 (1999).
- 162) Levi, E., Fridman, R., Miao, H. Q., Ma, Y. S., Yayon, A. and Vlodavsky, I.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(14), 7069-74 (1996).
- 163) Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P. and Bohlen, P.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(15), 5277-81 (1987).
- 164) Gearing, A. J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L. and *et al.*: *Nature*, **370**(6490), 555-7 (1994).
- 165) Brooks, P. C., Silletti, S., von Schalscha, T. L., Friedlander, M. and Cheresch, D. A.: *Cell*, **92**(3), 391-400 (1998).
- 166) Silletti, S., Kessler, T., Goldberg, J., Boger, D. L. and Cheresch, D. A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(1), 119-24 (2001).
- 167) Ciardiello, F. and Tortora, G.: *Clin Cancer Res*, **7**(10), 2958-70 (2001).
- 168) Kim, E. S., Khuri, F. R. and Herbst, R. S.: *Curr Opin Oncol*, **13**(6), 506-13 (2001).
- 169) Mendelsohn, J.: *J Clin Oncol*, **20**(18 Suppl), 1S-13S (2002).
- 170) Wu, X., Rubin, M., Fan, Z., DeBlasio, T., Soos, T., Koff, A. and Mendelsohn, J.: *Oncogene*, **12**(7), 1397-403 (1996).
- 171) Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J. and Kumar, R.: *Oncogene*, **17**(8), 999-1007 (1998).
- 172) Petit, A. M., Rak, J., Hung, M. C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B. and Kerbel, R. S.: *Am J Pathol*, **151**(6), 1523-30 (1997).

- 173) Prewett, M. C., Hooper, A. T., Bassi, R., Ellis, L. M., Waksal, H. W. and Hicklin, D. J.: *Clin Cancer Res*, **8**(5), 994-1003 (2002).
- 174) Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G. and Cheresch, D. A.: *Cell*, **79**(7), 1157-64 (1994).
- 175) Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A. and Varner, J. A.: *Am J Pathol*, **156**(4), 1345-62 (2000).
- 176) Sipkins, D. A., Cheresch, D. A., Kazemi, M. R., Nevin, L. M., Bednarski, M. D. and Li, K. C.: *Nat Med*, **4**(5), 623-6 (1998).
- 177) Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Streit, M., Kotliansky, V. E., de Fougères, A. R. and Detmar, M.: *Am J Pathol*, **160**(1), 195-204 (2002).
- 178) Mitjans, F., Meyer, T., Fittschen, C., Goodman, S., Jonczyk, A., Marshall, J. F., Reyes, G. and Piulats, J.: *Int J Cancer*, **87**(5), 716-23 (2000).
- 179) Matsumoto, K. and Nakamura, T.: *Cancer Sci*, **94**(4), 321-7 (2003).
- 180) Cao, D. J., Guo, Y. L. and Colman, R. W.: *Circ Res*, **94**(9), 1227-34 (2004).
- 181) Colman, R. W., Jameson, B. A., Lin, Y., Johnson, D. and Mousa, S. A.: *Blood*, **95**(2), 543-50 (2000).
- 182) Zhang, J. C., Claffey, K., Sakthivel, R., Darzynkiewicz, Z., Shaw, D. E., Leal, J., Wang, Y. C., Lu, F. M. and McCrae, K. R.: *Faseb J*, **14**(15), 2589-600 (2000).
- 183) Colman, R. W., Pixley, R. A., Sainz, I. M., Song, J. S., Isordia-Salas, I., Muhamed, S. N., Powell, J. A., Jr. and Mousa, S. A.: *J Thromb Haemost*, **1**(1), 164-70 (2003).
- 184) Espinola, R. G., Uknis, A., Sainz, I. M., Isordia-Salas, I., Pixley, R., DeLa Cadena, R., Long, W., Agelan, A., Gaughan, J., Adam, A. and Colman, R. W.: *Am J Pathol*, **165**(3), 969-76 (2004).
- 185) Stewart, J. M.: *Peptides*, **25**(3), 527-32 (2004).
- 186) Wohlfart, P., Dedio, J., Wirth, K., Scholkens, B. A. and Wiemer, G.: *J Pharmacol Exp Ther*, **280**(2), 1109-16 (1997).
- 187) Figueroa, C. D., Marchant, A., Novoa, U., Forstermann, U., Jarnagin, K., Scholkens, B. and Muller-Esterl, W.: *Hypertension*, **37**(1), 110-120 (2001).
- 188) Watanabe, K., Hasegawa, Y., Yamashita, H., Shimizu, K., Ding, Y., Abe, M., Ohta, H., Imagawa, K., Hojo, K., Maki, H., Sonoda, H. and Sato, Y.: *J Clin Invest*, **114**(7), 898-907 (2004).
- 189) Broggin, M., Marchini, S. V., Galliera, E., Borsotti, P., Taraboletti, G., Erba, E., Sironi, M., Jimeno, J., Faircloth, G. T., Giavazzi, R. and D'Incalci, M.: *Leukemia*, **17**(1), 52-9 (2003).
- 190) Taraboletti, G., Poli, M., Dossi, R., Manenti, L., Borsotti, P., Faircloth, G. T., Broggin, M., D'Incalci, M., Ribatti, D. and Giavazzi, R.: *Br J Cancer*, **90**(12), 2418-24 (2004).
- 191) Gordon, M. S., Margolin, K., Talpaz, M., Sledge, G. W., Jr., Holmgren, E., Benjamin, R., Stalter, S., Shak, S. and Adelman, D.: *J Clin Oncol*, **19**(3), 843-50 (2001).
- 192) Margolin, K., Gordon, M. S., Holmgren, E., Gaudreault, J., Novotny, W., Fyfe, G., Adelman, D., Stalter, S. and Breed, J.: *J Clin Oncol*, **19**(3), 851-6 (2001).
- 193) Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C. D., Cleary, K. R. and Ellis, L. M.: *Cancer Res*, **55**(18), 3964-8 (1995).
- 194) Takahashi, Y., Tucker, S. L., Kitadai, Y., Koura, A. N., Bucana, C. D., Cleary, K. R. and Ellis, L. M.: *Arch Surg*, **132**(5), 541-6 (1997).
- 195) Kabbinnavar, F., Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L., Meropol, N. J., Novotny, W. F., Lieberman, G., Griffing, S. and Bergsland, E.: *J Clin Oncol*, **21**(1), 60-5 (2003).
- 196) Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirodda, N., Elfring, G. L. and Miller, L. L.: *N Engl J Med*, **343**(13), 905-14 (2000).
- 197) Kabbinnavar, F. F., Schulz, J., McCleod, M., Patel, T., Hamm, J. T., Hecht, J. R., Mass, R., Perrou, B., Nelson, B. and Novotny, W. F.: *J Clin Oncol*, **23**(16), 3697-705 (2005).
- 198) Kabbinnavar, F. F., Hambleton, J., Mass, R. D., Hurwitz, H. I., Bergsland, E. and Sarkar, S.: *J Clin Oncol*, **23**(16), 3706-12 (2005).
- 199) de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., de Braud, F., et al.: *J Clin Oncol*, **18**(16), 2938-47 (2000).
- 200) Goldberg, R. M., Sargent, D. J., Morton, R.

- F., Fuchs, C. S., Ramanathan, R. K., Williamson, S. K., Findlay, B. P., Pitot, H. C. and Alberts, S. R.: *J Clin Oncol*, **22**(1), 23-30 (2004).
- 201) Giantonio, B. J., Catalano, P. J., Meropol, N. J., O'Dwyer, P. J., Mitchell, E. P., Alberts, S. R., Schwartz, M. A. and Benson, A. B., 3rd: *J Clin Oncol*, **25**(12), 1539-44 (2007).
- 202) Emmanouilides, C., Sfakiotaki, G., Androulakis, N., Kalbakis, K., Christophylakis, C., Kalykaki, A., Vamvakas, L., Kotsakis, A., Agelaki, S., Diamandidou, E., Touroutoglou, N., Chatzidakis, A., Georgoulas, V., Mavroudis, D. and Souglakos, J.: *BMC Cancer*, **7**, 91 (2007).
- 203) Scappaticci, F. A., Fehrenbacher, L., Cartwright, T., Hainsworth, J. D., Heim, W., Berlin, J., Kabbinavar, F., Novotny, W., Sarkar, S. and Hurwitz, H.: *J Surg Oncol*, **91**(3), 173-80 (2005).
- 204) Chen, H. X., Mooney, M., Boron, M., Vena, D., Mosby, K., Grochow, L., Jaffe, C., Rubinstein, L., Zwiebel, J. and Kaplan, R. S.: *J Clin Oncol*, **24**(21), 3354-60 (2006).
- 205) Giantonio, B. J., Levy, D. E., O'Dwyer P. J., Meropol, N. J., Catalano, P. J. and Benson, A. B., 3rd: *Ann Oncol*, **17**(9), 1399-403 (2006).
- 206) Lonser, R. R., Glenn, G. M., Walther, M., Chew, E. Y., Libutti, S. K., Linehan, W. M. and Oldfield, E. H.: *Lancet*, **361**(9374), 2059-67 (2003).
- 207) Rini, B. I. and Small, E. J.: *J Clin Oncol*, **23**(5), 1028-43 (2005).
- 208) Shuin, T., Kondo, K., Torigoe, S., Kishida, T., Kubota, Y., Hosaka, M., Nagashima, Y., Kitamura, H., Latif, F., Zbar, B., *et al.*: *Cancer Res*, **54**(11), 2852-5 (1994).
- 209) Rini, B. I., Halabi, S., Taylor, J., Small, E. J. and Schilsky, R. L.: *Clin Cancer Res*, **10**(8), 2584-6 (2004).
- 210) Hainsworth, J. D., Sosman, J. A., Spigel, D. R., Edwards, D. L., Baughman, C. and Greco, A.: *J Clin Oncol*, **23**(31), 7889-96 (2005).
- 211) Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Guidi, A. J., Dvorak, H. F., Senger, D. R., Connolly, J. L. and Schnitt, S. J.: *Hum Pathol*, **26**(1), 86-91 (1995).
- 212) Relf, M., LeJeune, S., Scott, P. A., Fox, S., Smith, K., Leek, R., Moghaddam, A., Whitehouse, R., Bicknell, R. and Harris, A. L.: *Cancer Res*, **57**(5), 963-9 (1997).
- 213) Sledge, G. W., Jr.: *Semin Oncol*, **29**(3 Suppl 11), 104-10 (2002).
- 214) Foekens, J. A., Peters, H. A., Grebenchtchikov, N., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., Geurts-Moespot, A., van der Kwast, T. H., Sweep, C. G. and Klijn, J. G.: *Cancer Res*, **61**(14), 5407-14 (2001).
- 215) Miller, K. D., Chap, L. I., Holmes, F. A., Cobleigh, M. A., Marcom, P. K., Fehrenbacher, L., Dickler, M., Overmoyer, B. A., Reimann, J. D., Sing, A. P., Langmuir, V. and Rugo, H. S.: *J Clin Oncol*, **23**(4), 792-9 (2005).
- 216) Scott, L. J.: *Drugs*, **67**(12), 1793-9 (2007).
- 217) Ramaswamy, B., Elias, A. D., Kelbick, N. T., Dodley, A., Morrow, M., Hauger, M., Allen, J., Rhoades, C., Kendra, K., Chen, H. X., Eckhardt, S. G. and Shapiro, C. L.: *Clin Cancer Res*, **12**(10), 3124-9 (2006).
- 218) Rugo, H. S.: *Oncologist*, **9**, Suppl 1, 43-9 (2004).
- 219) Johnson, D. H., Fehrenbacher, L., Novotny, W. F., Herbst, R. S., Nemunaitis, J. J., Jablons, D. M., Langer, C. J., DeVore, R. F., 3rd, Gaudreault, J., Damico, L. A., Holmgren, E. and Kabbinavar, F.: *J Clin Oncol*, **22**(11), 2184-91 (2004).
- 220) Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilienbaum, R. and Johnson, D. H.: *N Engl J Med*, **355**(24), 2542-50 (2006).
- 221) Herbst, R. S. and Sandler, A. B.: *Oncologist*, **9**, Suppl 1, 19-26 (2004).
- 222) Herbst, R. S., Johnson, D. H., Mininberg, E., Carbone, D. P., Henderson, T., Kim, E. S., Blumenschein, G., Jr., Lee, J. J., Liu, D. D., Truong, M. T., Hong, W. K., Tran, H., Tsao, A., Xie, D., Ramies, D. A., *et al.*: *J Clin Oncol*, **23**(11), 2544-55 (2005).
- 223) Itakura, J., Ishiwata, T., Shen, B., Kornmann, M. and Korc, M.: *Int J Cancer*, **85**(1), 27-34 (2000).
- 224) Seo, Y., Baba, H., Fukuda, T., Takashima, M. and Sugimachi, K.: *Cancer*, **88**(10), 2239-45 (2000).
- 225) Kindler, H. L., Friberg, G., Singh, D. A., Locker, G., Nattam, S., Kozloff, M., Taber, D. A., Karrison, T., Dachman, A., Stadler,

- W. M. and Vokes, E. E.: *J Clin Oncol*, **23** (31), 8033-40 (2005).
- 226) Monk, B. J., Han, E., Josephs-Cowan, C. A., Pugmire, G. and Burger, R. A.: *Gynecol Oncol*, **102**(2), 140-4 (2006).
- 227) Wright, J. D., Viviano, D., Powell, M. A., Gibb, R. K., Mutch, D. G., Grigsby, P. W. and Rader, J. S.: *Gynecol Oncol*, **103**(2), 489-93 (2006).
- 228) Zhu, A. X., Blaszkowsky, L. S., Ryan, D. P., Clark, J. W., Muzikansky, A., Horgan, K., Sheehan, S., Hale, K. E., Enzinger, P. C., Bhargava, P. and Stuart, K.: *J Clin Oncol*, **24**(12), 1898-903 (2006).
- 229) Shah, M. A., Ramanathan, R. K., Ilson, D. H., Levnor, A., D'Adamo, D., O'Reilly, E., Tse, A., Trocola, R., Schwartz, L., Capanu, M., Schwartz, G. K. and Kelsen, D. P.: *J Clin Oncol*, **24**(33), 5201-6 (2006).
- 230) Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Herndon, J. E., 2nd, Dowell, J. M., Reardon, D. A., Quinn, J. A., Rich, J. N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Wagner, M., Bigner, D. D., Friedman, A. H. and Friedman, H. S.: *Clin Cancer Res*, **13**(4), 1253-9 (2007).
- 231) Hainsworth, J. D., Spigel, D. R., Farley, C., Thompson, D. S., Shipley, D. L. and Greco, F. A.: *J Clin Oncol*, **25**(13), 1747-52 (2007).
- 232) Posey, J. A., Ng, T. C., Yang, B., Khzaeli, M. B., Carpenter, M. D., Fox, F., Needle, M., Waksal, H. and LoBuglio, A. F.: *Clin Cancer Res*, **9**(4), 1323-32 (2003).
- 233) Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I. and Van Cutsem, E.: *N Engl J Med*, **351**(4), 337-45 (2004).
- 234) Saltz, L. B., Meropol, N. J., Loehrer, P. J., Sr., Needle, M. N., Kopit, J. and Mayer, R. J.: *J Clin Oncol*, **22**(7), 1201-8 (2004).
- 235) Folprecht, G., Lutz, M. P., Schoffski, P., Seufferlein, T., Nolting, A., Pollert, P. and Kohne, C. H.: *Ann Oncol*, **17**(3), 450-6 (2006).
- 236) Vincenzi, B., Santini, D., Rabitti, C., Coppola, R., Beomonte Zobel, B., Trodella, L. and Tonini, G.: *Br J Cancer*, **94**(6), 792-7 (2006).
- 237) Gebbia, V., Del Prete, S., Borsellino, N., Ferrau, F., Tralongo, P., Verderame, F., Leonardi, V., Capasso, E., Maiello, E., Bordonaro, R., Stinco, S., Agostara, B. and Barone, C.: *Clin Colorectal Cancer*, **5**(6), 422-8 (2006).
- 238) Meyerhardt, J. A., Heseltine, D., Oginio, S., Clark, J. W., Enzinger, P. C., Ryan, D. P., Earle, C. C., Zhu, A. X. and Fuchs, C. S.: *Clin Colorectal Cancer*, **6**(1), 59-65 (2006).
- 239) Lenz, H. J., Van Cutsem, E., Khambata-Ford, S., Mayer, R. J., Gold, P., Stella, P., Mirtsching, B., Cohn, A. L., Pippas, A. W., Azarnia, N., Tsuchihashi, Z., Mauro, D. J. and Rowinsky, E. K.: *J Clin Oncol*, **24**(30), 4914-21 (2006).
- 240) Souglakos, J., Kalykaki, A., Vamvakas, L., Androulakis, N., Kalbakis, K., Agelaki, S., Vardakis, N., Tzardi, M., Kotsakis, A. P., Gioulbasanis, J., Tsetis, D., Sfakiotaki, G., Chatzidaki, D., Mavroudis, D. and Georgoulas, V.: *Ann Oncol*, **18**(2), 305-10 (2007).
- 241) Xiong, H. Q., Rosenberg, A., LoBuglio, A., Schmidt, W., Wolff, R. A., Deutsch, J., Needle, M. and Abbruzzese, J. L.: *J Clin Oncol*, **22**(13), 2610-6 (2004).
- 242) Chan, A. T., Hsu, M. M., Goh, B. C., Hui, E. P., Liu, T. W., Millward, M. J., Hong, R. L., Whang-Peng, J., Ma, B. B., To, K. F., Mueser, M., Amellal, N., Lin, X. and Chang, A. Y.: *J Clin Oncol*, **23**(15), 3568-76 (2005).
- 243) Herbst, R. S., Arquette, M., Shin, D. M., Dicke, K., Vokes, E. E., Azarnia, N., Hong, W. K. and Kies, M. S.: *J Clin Oncol*, **23**(24), 5578-87 (2005).
- 244) Baselga, J., Trigo, J. M., Bourhis, J., Tortochaux, J., Cortes-Funes, H., Hitt, R., Gascon, P., Amellal, N., Harstrick, A. and Eckardt, A.: *J Clin Oncol*, **23**(24), 5568-77 (2005).
- 245) Burtness, B., Goldwasser, M. A., Flood, W., Mattar, B. and Forastiere, A. A.: *J Clin Oncol*, **23**(34), 8646-54 (2005).
- 246) Bourhis, J., Rivera, F., Mesia, R., Awada, A., Geoffrois, L., Borel, C., Humblet, Y., Lopez-Pousa, A., Hitt, R., Vega Villegas, M. E., Duck, L., Rosine, D., Amellal, N., Schueler, A. and Harstrick, A.: *J Clin Oncol*, **24**(18), 2866-72 (2006).
- 247) Vermorken, J. B., Trigo, J., Hitt, R., Koralowski, P., Diaz-Rubio, E., Rolland, F., Knecht, R., Amellal, N., Schueler, A. and Basel-

- ga, J.: *J Clin Oncol*, **25**(16), 2171-7 (2007).
- 248) Hanna, N., Lilenbaum, R., Ansari, R., Lynch, T., Govindan, R., Janne, P. A. and Bonomi, P.: *J Clin Oncol*, **24**(33), 5253-8 (2006).
- 249) Thienelt, C. D., Bunn, P. A., Jr., Hanna, N., Rosenberg, A., Needle, M. N., Long, M. E., Gustafson, D. L. and Kelly, K.: *J Clin Oncol*, **23**(34), 8786-93 (2005).
- 250) Robert, F., Blumenschein, G., Herbst, R. S., Fossella, F. V., Tseng, J., Saleh, M. N. and Needle, M.: *J Clin Oncol*, **23**(36), 9089-96 (2005).
- 251) Pinto, C., Di Fabio, F., Siena, S., Cascinu, S., Rojas Llimpe, F. L., Ceccarelli, C., Mutri, V., Giannetta, L., Giaquinta, S., Funaioli, C., Berardi, R., Longobardi, C., Piana, E. and Martoni, A. A.: *Ann Oncol*, **18**(3), 510-7 (2007).
- 252) Kollmannsberger, C., Schittenhelm, M., Honecker, F., Tillner, J., Weber, D., Oechsle, K., Kanz, L. and Bokemeyer, C.: *Ann Oncol*, **17**(6), 1007-13 (2006).
- 253) Graeven, U., Kremer, B., Sudhoff, T., Killing, B., Rojo, F., Weber, D., Tillner, J., Unal, C. and Schmiegel, W.: *Br J Cancer*, **94**(9), 1293-9 (2006).
- 254) Gutheil, J. C., Campbell, T. N., Pierce, P. R., Watkins, J. D., Huse, W. D., Bodkin, D. J. and Cheresch, D. A.: *Clin Cancer Res*, **6**(8), 3056-61 (2000).
- 255) Posey, J. A., Khazaeli, M. B., DelGrosso, A., Saleh, M. N., Lin, C. Y., Huse, W. and LoBuglio, A. F.: *Cancer Biother Radiopharm*, **16**(2), 125-32 (2001).
- 256) McNeel, D. G., Eickhoff, J., Lee, F. T., King, D. M., Alberti, D., Thomas, J. P., Friedl, A., Kolesar, J., Marnocha, R., Volkman, J., Zhang, J., Hammershaimb, L., Zwiebel, J. A. and Wilding, G.: *Clin Cancer Res*, **11**(21), 7851-60 (2005).
- 257) Eskens, F. A., Dumez, H., Hoekstra, R., Perschl, A., Brindley, C., Bottcher, S., Wynendaele, W., Dreves, J., Verweij, J. and van Oosterom, A. T.: *Eur J Cancer*, **39**(7), 917-26 (2003).
- 258) Friess, H., Langrehr, J. M., Oettle, H., Raedle, J., Niedergethmann, M., Dittrich, C., Hossfeld, D. K., Stoger, H., Neyns, B., Herzog, P., Piedbois, P., Dobrowolski, F., Scheithauer, W., Hawkins, R., Katz, F., et al.: *BMC Cancer*, **6**, 285 (2006).
- 259) Beerepoot, L. V., Witteveen, E. O., Groenewegen, G., Fogler, W. E., Sim, B. K., Sidor, C., Zonnenberg, B. A., Schramel, F., Gebbink, M. F. and Voest, E. E.: *Clin Cancer Res*, **9**(11), 4025-33 (2003).
- 260) Kurup, A., Lin, C. W., Murry, D. J., Dobrolecki, L., Estes, D., Yiannoutsos, C. T., Mariano, L., Sidor, C., Hickey, R. and Hanna, N.: *Ann Oncol*, **17**(1), 97-103 (2006).
- 261) Herbst, R. S., Hess, K. R., Tran, H. T., Tseng, J. E., Mullani, N. A., Charnsangavej, C., Madden, T., Davis, D. W., McConkey, D. J., O'Reilly, M. S., Ellis, L. M., Pluda, J., Hong, W. K. and Abbruzzese, J. L.: *J Clin Oncol*, **20**(18), 3792-803 (2002).
- 262) Thomas, J. P., Arzoomanian, R. Z., Alberti, D., Marnocha, R., Lee, F., Friedl, A., Tutsch, K., Dresen, A., Geiger, P., Pluda, J., Fogler, W., Schiller, J. H. and Wilding, G.: *J Clin Oncol*, **21**(2), 223-31 (2003).
- 263) Kulke, M. H., Bergsland, E. K., Ryan, D. P., Enzinger, P. C., Lynch, T. J., Zhu, A. X., Meyerhardt, J. A., Heymach, J. V., Fogler, W. E., Sidor, C., Michelini, A., Kinsella, K., Venook, A. P. and Fuchs, C. S.: *J Clin Oncol*, **24**(22), 3555-61 (2006).
- 264) Hoekstra, R., de Vos, F. Y., Eskens, F. A., Gietema, J. A., van der Gaast, A., Groen, H. J., Knight, R. A., Carr, R. A., Humerickhouse, R. A., Verweij, J. and de Vries, E. G.: *J Clin Oncol*, **23**(22), 5188-97 (2005).
- 265) Hoekstra, R., de Vos, F. Y., Eskens, F. A., de Vries, E. G., Uges, D. R., Knight, R., Carr, R. A., Humerickhouse, R., Verweij, J. and Gietema, J. A.: *Eur J Cancer*, **42**(4), 467-72 (2006).
- 266) Gietema, J. A., Hoekstra, R., de Vos, F. Y., Uges, D. R., van der Gaast, A., Groen, H. J., Loos, W. J., Knight, R. A., Carr, R. A., Humerickhouse, R. A. and Eskens, F. A.: *Ann Oncol*, **17**(8), 1320-7 (2006).
- 267) Nguyen, Q. D., Shah, S. M., Hafiz, G., Quinlan, E., Sung, J., Chu, K., Cedarbaum, J. M. and Campochiaro, P. A.: *Ophthalmology*, **113**(9), 1522 e1-1522 e14 (2006).
- 268) Faivre, S., Chieze, S., Delbaldo, C., Ady-Vago, N., Guzman, C., Lopez-Lazaro, L., Lozahic, S., Jimeno, J., Pico, F., Armand, J. P., Martin, J. A. and Raymond, E.: *J Clin*

- Oncol*, **23**(31), 7871-80 (2005).
- 269) Maroun, J. A., Belanger, K., Seymour, L., Matthews, S., Roach, J., Dionne, J., Soulières, D., Stewart, D., Goel, R., Charpentier, D., Goss, G., Tomiak, E., Yau, J., Jimeno, J. and Chiritescu, G.: *Ann Oncol*, **17**(9), 1371-8 (2006).
- 270) Winkler, F., Kozin, S. V., Tong, R. T., Chae, S. S., Booth, M. F., Garkavtsev, I., Xu, L., Hicklin, D. J., Fukumura, D., di Tomaso, E., Munn, L. L. and Jain, R. K.: *Cancer Cell*, **6**(6), 553-63 (2004).
- 271) Ansiaux, R., Baudelet, C., Jordan, B. F., Beghein, N., Sonveaux, P., De Wever, J., Martinive, P., Gregoire, V., Feron, O. and Gallez, B.: *Clin Cancer Res*, **11**(2 Pt 1), 743-50 (2005).
- 272) Miller, K. D.: *Breast Cancer Res Treat*, **75**, Suppl 1, S45-50; discussion S57-8 (2002).
- 273) Garber, K.: *Nat Biotechnol*, **20**(11), 1067-8 (2002).
- 274) Stadler, W. M., Cao, D., Vogelzang, N. J., Ryan, C. W., Hoving, K., Wright, R., Karrison, T. and Vokes, E. E.: *Clin Cancer Res*, **10**(10), 3365-70 (2004).
- 275) Folkman, J.: *Apmis*, **112**(7-8), 496-507 (2004).
- 276) Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D. and Jain, R. K.: *Nature*, **416**(6878), 279-80 (2002).
- 277) Kerbel, R. S. and Kamen, B. A.: *Nat Rev Cancer*, **4**(6), 423-36 (2004).
- 278) Bergsland, E. and Dickler, M. N.: *Oncologist*, **9**, Suppl 1, 36-42 (2004).
- 279) Bergers, G. and Benjamin, L. E.: *Nat Rev Cancer*, **3**(6), 401-10 (2003).
- 280) de Fraipont, F., Nicholson, A. C., Feige, J. J. and Van Meir, E. G.: *Trends Mol Med*, **7**(9), 401-7 (2001).
- 281) Yu, J. L., Rak, J. W., Coomber, B. L., Hicklin, D. J. and Kerbel, R. S.: *Science*, **295**(5559), 1526-8 (2002).
- 282) Sugimoto, H., Hamano, Y., Charytan, D., Cosgrove, D., Kieran, M., Sudhakar, A. and Kalluri, R.: *J Biol Chem*, **278**(15), 12605-8 (2003).
- 283) Kasahara, Y., Tuder, R. M., Taraseviciene-Stewart, L., Le Cras, T. D., Abman, S., Hirth, P. K., Waltenberger, J. and Voelkel, N. F.: *J Clin Invest*, **106**(11), 1311-9 (2000).
- 284) Baffert, F., Thurston, G., Rochon-Duck, M., Le, T., Brekken, R. and McDonald, D. M.: *Circ Res*, **94**(7), 984-92 (2004).
- 285) Zelzer, E., Mamluk, R., Ferrara, N., Johnson, R. S., Schipani, E. and Olsen, B. R.: *Development*, **131**(9), 2161-71 (2004).
- 286) Brewer, G. J., Dick, R. D., Grover, D. K., LeClaire, V., Tseng, M., Wicha, M., Pienta, K., Redman, B. G., Jahan, T., Sondak, V. K., Strawderman, M., LeCarpentier, G. and Merajver, S. D.: *Clin Cancer Res*, **6**(1), 1-10 (2000).
- 287) Herbst, R. S., Mullani, N. A., Davis, D. W., Hess, K. R., McConkey, D. J., Charnsangavej, C., O'Reilly, M. S., Kim, H. W., Baker, C., Roach, J., Ellis, L. M., Rashid, A., Pluda, J., Bucana, C., Madden, T. L., et al.: *J Clin Oncol*, **20**(18), 3804-14 (2002).
- 288) Eder, J. P., Jr., Supko, J. G., Clark, J. W., Puchalski, T. A., Garcia-Carbonero, R., Ryan, D. P., Shulman, L. N., Proper, J., Kirvan, M., Rattner, B., Connors, S., Keogan, M. T., Janicek, M. J., Fogler, W. E., Schnipper, L., et al.: *J Clin Oncol*, **20**(18), 3772-84 (2002).
- 289) Deplanque, G., Madhusudan, S., Jones, P. H., Wellmann, S., Christodoulos, K., Talbot, D. C., Ganesan, T. S., Blann, A. and Harris, A. L.: *Br J Cancer*, **91**(9), 1645-50 (2004).
- 290) Wulfkühle, J., Espina, V., Liotta, L. and Petricoin, E.: *Eur J Cancer*, **40**(17), 2623-32 (2004).
- 291) Aubert, B., Barate, R., Boutigny, D., Couderc, F., Gaillard, J. M., Hicheur, A., Karyotakis, Y., Lees, J. P., Tisserand, V., Zghiche, A., Palano, A., Pompili, A., Chen, J. C., Qi, N. D., Rong, G., et al.: *Phys Rev Lett*, **92**(22), 221803 (2004).
- 292) Roy, R., Wewer, U. M., Zurakowski, D., Pories, S. E. and Moses, M. A.: *J Biol Chem*, **279**(49), 51323-30 (2004).
- 293) Chan, L. W., Moses, M. A., Goley, E., Sproull, M., Muanza, T., Coleman, C. N., Figg, W. D., Albert, P. S., Menard, C. and Camphausen, K.: *J Clin Oncol*, **22**(3), 499-506 (2004).
- 294) Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K. and Nishikawa, S.: *Nature*, **408**(6808), 92-6 (2000).

- 295) Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H. and Verfaillie, C. M.: *J Clin Invest*, **109**(3), 337-46 (2002).
- 296) Bertolini, F., Mingrone, W., Alietti, A., Ferrucci, P. F., Cocorocchio, E., Peccatori, F., Cinieri, S., Mancuso, P., Corsini, C., Burlini, A., Zucca, E. and Martinelli, G.: *Ann Oncol*, **12**(7), 987-90 (2001).
- 297) Dowlati, A., Robertson, K., Cooney, M., Petros, W. P., Stratford, M., Jesberger, J., Rafie, N., Overmoyer, B., Makkar, V., Stambler, B., Taylor, A., Waas, J., Lewin, J. S., McCrae, K. R. and Remick, S. C.: *Cancer Res*, **62**(12), 3408-16 (2002).
- 298) Stevenson, J. P., Rosen, M., Sun, W., Gallagher, M., Haller, D. G., Vaughn, D., Giantonio, B., Zimmer, R., Petros, W. P., Stratford, M., Chaplin, D., Young, S. L., Schnall, M. and O'Dwyer, P. J.: *J Clin Oncol*, **21**(23), 4428-38 (2003).



Induction of human adiponectin gene transcription by telmisartan, angiotensin receptor blocker, independently on PPAR- γ activation

Akie Moriuchi ^{a,b}, Hironori Yamasaki ^{a,c,*}, Mika Shimamura ^d, Atsushi Kita ^a, Hironaga Kuwahara ^a, Keiichiro Fujishima ^{a,b}, Tsuyoshi Satoh ^a, Keiko Fukushima ^{a,b}, Tetsuya Fukushima ^a, Takao Hayakawa ^e, Hiroyuki Mizuguchi ^e, Yuji Nagayama ^f, Norio Abiru ^a, Eiji Kawasaki ^b, Katsumi Eguchi ^a

^a Department of Endocrinology and Metabolism, Unit of Translational Medicine, Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University, Japan

^b Department of Metabolism/Diabetes and Clinical Nutrition, Nagasaki University, Hospital of Medicine and Dentistry, Nagasaki, Japan

^c Health Center, Nagasaki University, Japan

^d Course of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University, Japan

^e Project III, National Institute of Health Sciences, Osaka Branch, Fundamental Research Laboratories for Development of Medicine, Japan

^f Department of Medical Gene Technology, Atomic Bomb Disease Institute, Graduate School of Biochemical Sciences, Nagasaki University, Japan

Received 14 March 2007

Available online 26 March 2007

Abstract

Adiponectin, an adipose tissue-specific plasma protein, has been shown to ameliorate insulin resistance and inhibit the process of atherosclerosis. Recently, several reports have stated that angiotensin type 1 receptor blockers (ARBs), increase adiponectin plasma level, and ameliorate insulin resistance. Telmisartan, a subclass of ARBs, has been shown to be a partial agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ , and to increase the plasma adiponectin level. However, the transcriptional regulation of the human adiponectin gene by telmisartan has not been determined yet. To elucidate the effect of telmisartan on adiponectin, the stimulatory regulation of human adiponectin gene by telmisartan was investigated in 3T3-L1 adipocytes, utilizing adenovirus-mediated luciferase reporter gene-transferring technique. This study indicates that telmisartan may stimulate adiponectin transcription independent of PPAR- γ .
© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Adiponectin; Telmisartan; PPAR- γ

Adiponectin has been shown to improve insulin sensitivity and inhibit the process of atherosclerosis [1]. Recently, a metabolic syndrome characterized by an excess accumulation of visceral fat associated with insulin resistance and leading to atherosclerotic vascular events has been on the increase. However, these patients exhibit the lower plasma concentration of adiponectin [2,3]. Weight gain with visceral fat accumulation, is associated with a decrease in mRNA expression and plasma level of adiponectin [4–6]. Tumor necrosis factor- α , proinflammatory cytokine

secreted from adipocytes suppressed adiponectin expression and secretion [7–9]. In contrast, reducing body weight by diet and exercise therapy stimulates an increase in adiponectin concentration [10,11]. Recently the anti-diabetic drug thiazolidinediones, an insulin sensitizer, has been shown to increase adipocytes mRNA expression of adiponectin and plasma concentration [9,12]. Several years ago, the human adiponectin promoter sequence was cloned, and analyzed to identify the critical responsive element for transcriptional regulation [13,14]. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ has been shown to play an important role in the up-regulation of adiponectin expression [15]. Recently, a number of reports have been published which indicate that angiotensin II type 1

* Corresponding author.

E-mail address: f1195@cc.nagasaki-u.ac.jp (H. Yamasaki).

receptor (AT1R) blockers (ARBs), commonly used to treat hypertension, reduced insulin resistance [16,17], lowered the risk for type 2 diabetes [18,19] and, increased the plasma level of adiponectin [17,20,21]. Telmisartan, a subclass of ARBs has been reported to associate with PPAR- γ as a partial agonist [22,23]. These observations allowed the speculation that telmisartan could stimulate adiponectin via PPAR- γ . Therefore, the transcriptional regulation of human adiponectin by telmisartan in 3T3-L1 adipocytes was examined. In order to increase the assay sensitivity, an adenovirus-mediated luciferase reporter vector containing human adiponectin 2.1 kb promoter region was created.

Materials and methods

Materials. Pioglitazone and candesartan were kindly provided by Takeda Pharmaceutical Company (Osaka, Japan), Telmisartan by Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). PD98059 and LY294002 were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), GW9662 from CALBIOCHEM (Darmstadt, Germany).

Isolation of human adiponectin promoter and luciferase construct (pAdp-LUC). The 5' product of the human adiponectin gene, spanning 2.1 kb of the genomic sequence, was amplified [24], and subcloned into PGL3-Basic Vector. The resultant luciferase reporter construct was designated pAdp-LUC as previously described [8].

Modification of the shuttle vector and adenoviral vectors. A pHMCMV6 is a shuttle vector for constructing adenoviral vectors [25]. In order to

evaluate the promoter activity by adenoviral vectors, a modification was made in pHMCMV6. A sequence-including CMV promoter multiple cloning sites, and a polyA region were deleted from pHMCMV6 by digesting pHMCMV6 with *Bgl*II (*Bgl*II-*Bgl*II-pHMCMV6). By digesting pGL3-Basic Vector with *Not*I and *Bam*HI, the 2.1 kb fragment was excised; this fragment included multiple cloning sites and luciferase coding and PolyA regions. This fragment and *Bgl*II-*Bgl*II-pHMCMV6 were blunted and ligated to provide an original shuttle vector for an adenovirus-mediated luciferase reporter. The resultant plasmid was designated p0-LUC-Shuttle.

A 2.1 kb promoter fragment subcloned into p0-LUC-Shuttle. The resultant plasmid, pAdp-LUC-Shuttle, was then digested with *I-Ceu*I and *PI-Sce*I and ligated into an adenoviral vector, pAdHM15 [26]. This resultant adenoviral DNA, fmAd-pAdp-LUC, provides for luciferase reporter expression regulated by the human adiponectin promoter, illustrated in Fig. 1A. An fmAd-pAdp-LUC was linearized with *Pac*I and transfected into HEK293 cells to produce the adenoviruses, fmAd-pAdp-LUC.

In order to verify PPAR- γ activity, luciferase reporter vector driven by PPAR responsive element (PPRE) was prepared. Translucent Reporter Vectors containing PPAR responsive element (PPRE, 3 time tandem repeat of TGAACTAGGGTAAAGTTCA, from Panomics (Fremont, CA), and this tandem repeat was subcloned into p0-LUC-Shuttle, designated PPRE-LUC.

A Renilla luciferase-expression adenovirus vector was also prepared to serve as an internal control. By digesting with *Bgl*II and *Bam*HI, a 2.2-kb fragment was excised from pRLTK-Vector (Promega). This fragment and *Bgl*II-*Bgl*II-pHMCMV6 were blunted and ligated (pRLTK-LUC-Shuttle). Then, as described above, control adenovirus was created, designated fmAd-phRLTK-LUC.

Cell culture and infection with adenovirus. 3T3-L1 preadipocytes purchased from ATCC were differentiated according to previously described

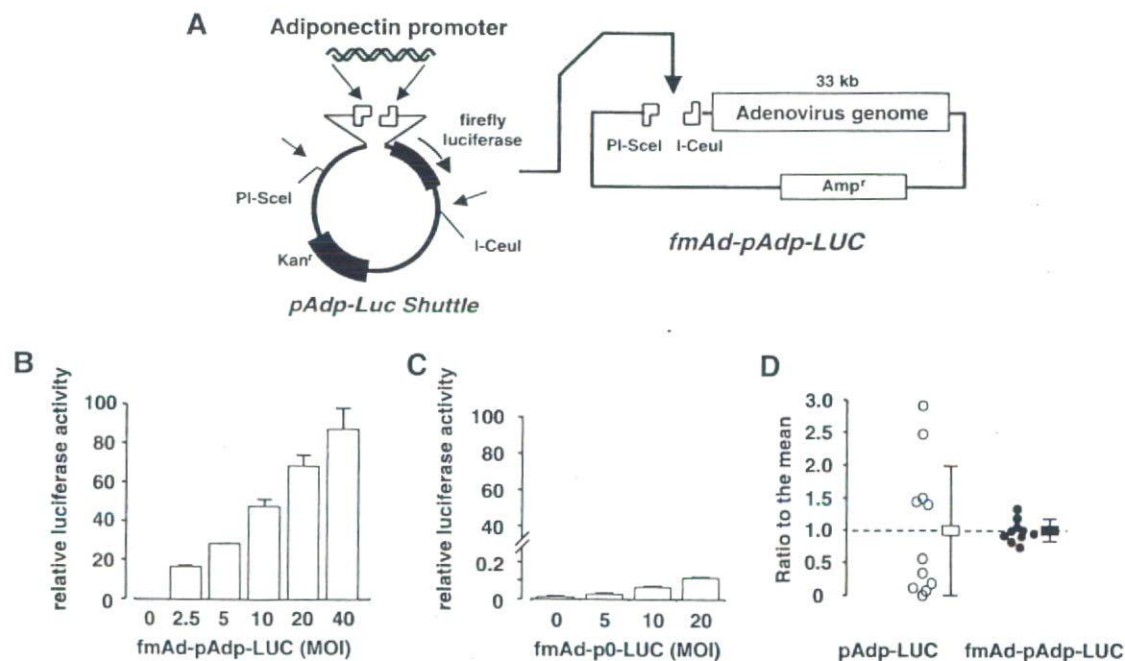


Fig. 1. Generation of fmAd-pAdp-LUC and efficacies of gene transfer using conventional luciferase vector (pAdp-LUC) and adenovirus-mediated luciferase vector (fmAd-pAdp-LUC) in 3T3-L1 adipocytes. (A) The 2.1 kb human adiponectin promoter was subcloned into the shuttle vector to drive firefly luciferase. This promoter-luciferase unit was excised and subjected to in vitro ligation to adenovirus vector (fmAd-pAdp-LUC). (B,C) 10 MOI of fmAd-pAdp-LUC (B) or 10 MOI of fmAd-p0-LUC (C) were infected into 3T3-L1 adipocytes. After 3 h of infection, cells were incubated for another 24 h. Cells were lysed and assayed using the luciferase assay. Results are expressed as relative light unit of firefly luciferase. Each bar represents mean \pm SD ($n = 3$). (D) 2 μ g/well of pAdp-LUC and 10 MOI of fmAd-pAdp-LUC were infected. Each plot is expressed as a ratio to the mean, which was adjusted to 1.

methods [27]. Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were transfected with fmAd-pAdp-LUC with an adenovirus concentration of 10 MOI.

Transient transfection with the plasmid of PPRE-LUC. HEK293 cells were transiently transfected with 500 ng/well of PPRE-LUC, 600 ng/well of pCMV6-PPAR- γ 2 kindly provided by Ogawa MD (Kobe University) and 20 ng/well of pSV40 as an internal control. Transient transfection was done by SuperFect Transfection Reagent, purchased from QIAGEN.

Luciferase assay. The luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) and Turner Designs Lumimeter model TD-20/20 (Promega).

Statistical analysis. Differences in the luciferase activity were assessed by unpaired *t* testing. *p* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Construction of adenovirus-mediated luciferase reporter vector and its functional property in 3T3-L1 adipocytes

Due to the low transfection efficiency of 3T3-L1 adipocytes using conventional method of transfection, an adenovirus-mediated luciferase reporter vector was created, in which the luciferase gene was driven by the human adiponectin promoter. The resultant adenovirus, fmAd-pAdp-LUC, was infected into 3T3-L1 adipocytes. The luciferase activity was detected in the fmAd-pAdp-LUC-infected cells in a dose-dependent manner (Fig. 1B). However, negligible luciferase activity was detected in the cells infected with promoter-less adenovirus vectors, designated fmAd-p0-LUC (Fig. 1C). Furthermore, the pAd-LUC to fmAd-

pAd-LUC was compared, with regard to reproducibility of luciferase assay. The luciferase activity from fmAd-pAdp-LUC infection was more consistent than that from pAdp-LUC vector transfection (Fig. 1D). These data suggest that fmAd-pAdp-LUC facilitates sensitive and reproducible analysis of the promoter activity in 3T3-L1 adipocytes.

Telmisartan stimulated the human adiponectin transcription as well as pioglitazone

A culture of fmAd-pAdp-LUC-infected 3T3-L1 adipocytes were treated with 10 μ M pioglitazone and increasing concentrations of telmisartan. Fig. 2A demonstrates that adiponectin promoter activity was stimulated at 2.9-fold by 10 μ M pioglitazone, which was sufficient for maximal stimulation of adiponectin transcription (data of dose-dependent experiment is not shown). The promoter activity was stimulated by telmisartan in a dose-dependent manner, up to 5 μ M. The maximal stimulation was 2.1-fold, which was lower than that of 10 μ M pioglitazone. The promoter activity was appeared to decline when exposed to >10 μ M telmisartan. This could suggest that high concentration of the drug has a toxic effect. In determine if this stimulation was specific to telmisartan, candesartan, the other subclass of ARBs, was used (Fig. 2B). In contrast to telmisartan, candesartan induced no significant alteration, even at the higher concentrations.

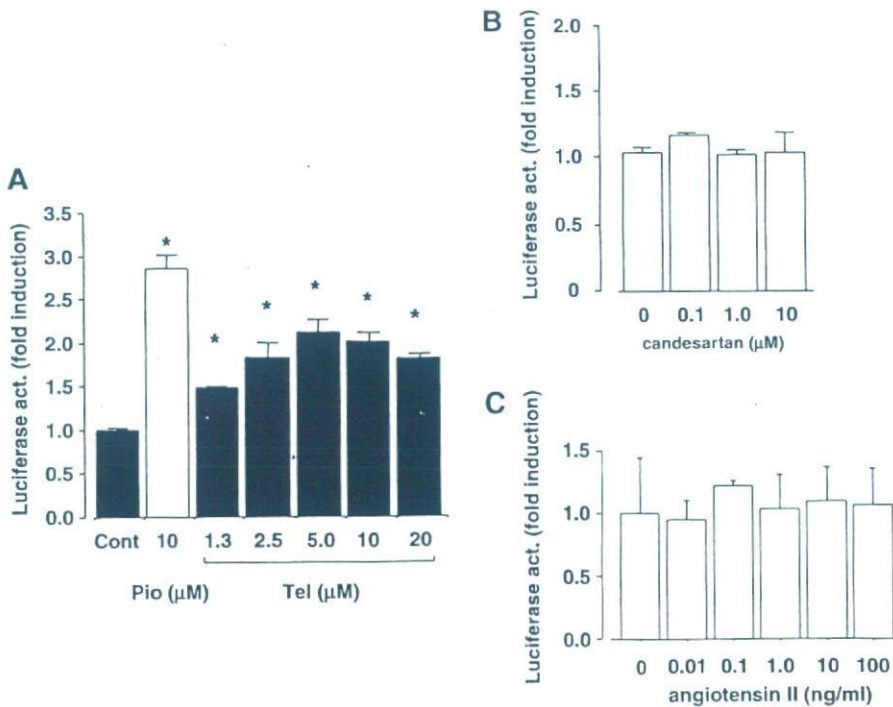


Fig. 2. Effect of pioglitazone, candesartan, telmisartan and angiotensin II on adiponectin transcription. Cells were infected with fmAd-pAdp-LUC, stimulated by Pio (pioglitazone), Tel (telmisartan) (A), candesartan (B) and angiotensin II (C). After 24 h, cells were assayed using the luciferase assay. Results are expressed as fold induction compared to control. Each bar is mean \pm SD (*n* = 3). **p* < 0.05 basal versus treatment.

Angiotensin II did not regulate adiponectin transcription

Since telmisartan essentially blocks the angiotensin II receptor, it is important to investigate the association of angiotensin II receptor activation with adiponectin transcription.

Presuming that angiotensin II receptor activation by angiotensin II suppresses adiponectin transcription then blocking of the receptor by telmisartan could have restored the suppressed transcription. Fig. 2C demonstrates that the angiotensin II neither suppressed nor stimulated the adiponectin transcription. These data suggest that telmisartan's stimulatory activity is evoked via a mechanism independent of the receptor.

MAP kinase pathway and PI-3 kinase pathway did not mediate the telmisartan's stimulation of adiponectin transcription

To investigate the contribution of insulin signaling pathways to telmisartan's stimulation, inhibitors of MEK and PI3 kinase were employed. Neither MEK inhibitor, PD98059 nor PI3 kinase inhibitor, LY294002 could prevent the stimulation by telmisartan shown in (Fig. 3A and B). These data indicate that neither the MAP kinase nor PI3 kinase pathways contribute to the stimulatory effect of telmisartan.

Telmisartan-stimulated adiponectin transcription is independent of PPAR- γ activation

Recently, telmisartan has been reported to be a partial agonist to PPAR- γ . In addition, a PPAR responsive element (PPRE) is present on the human adiponectin promoter sequence. However, there is no evidence that the telmisartan's stimulatory effect of adiponectin transcription is mediated by PPAR- γ . To investigate the role of PPAR- γ

in the telmisartan activity, fmAd-pAdp-LUC-infected 3T3-L1 adipocytes were cultured with or without PPAR- γ inhibitor, GW9662, and incubated with pioglitazone and telmisartan. The stimulation by pioglitazone was completely blunted by GW9662 pretreatment (Fig. 4A). In contrast, the stimulation by telmisartan was still observed even with GW9662 pretreatment. These data suggest that the telmisartan's stimulation of adiponectin is independent of PPAR- γ regulation.

PPAR- γ responsive element (PPRE) is stimulated by both pioglitazone and telmisartan

The ability of telmisartan to stimulate PPAR- γ was also investigated using PPRE-LUC. PPRE-LUC-transfected HEK293 cells were cultured with or without GW9662 and incubated with pioglitazone and telmisartan. Fig. 4B shows that the transactivation of PPRE was induced 3.3-fold by 10 μ M pioglitazone and 1.6-fold by 5 μ M telmisartan. Pretreatment with GW9662 completely blocked the transactivation of PPRE by both drugs. This indicates that telmisartan is apparently a PPAR- γ agonist, although the stimulatory activity was lower than with pioglitazone. In addition, the observation that GW9662 blocks the telmisartan stimulation of PPAR- γ , confirms the fact that telmisartan stimulates PPAR- γ .

Discussion

In this study, human adiponectin gene transcription was analyzed in 3T3-L1 adipocytes, utilizing an adenovirus-mediated luciferase reporter gene-transferring technique. Adiponectin transcription was stimulated by pioglitazone as well as telmisartan. Furthermore, the inhibitor experiments showed that the pioglitazone's effect was PPAR- γ -

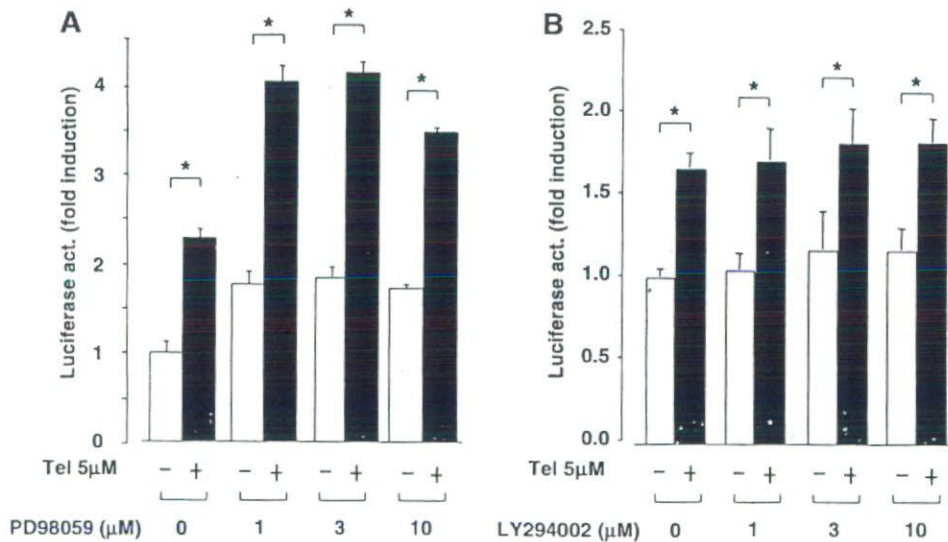


Fig. 3. Effects of inhibitors of MAP kinase and PI3 kinase on telmisartan-induced stimulation of adiponectin. Cells were infected with fmAd-pAdp-LUC, followed by 1 h incubation with PD98059 (A) or LY 294002 (B). Then, cells were treated with telmisartan. Results are expressed as fold induction over each untreated group. Each bar is mean \pm SD ($n = 3$). * $p < 0.05$ basal versus treatment at each concentration of inhibitor.

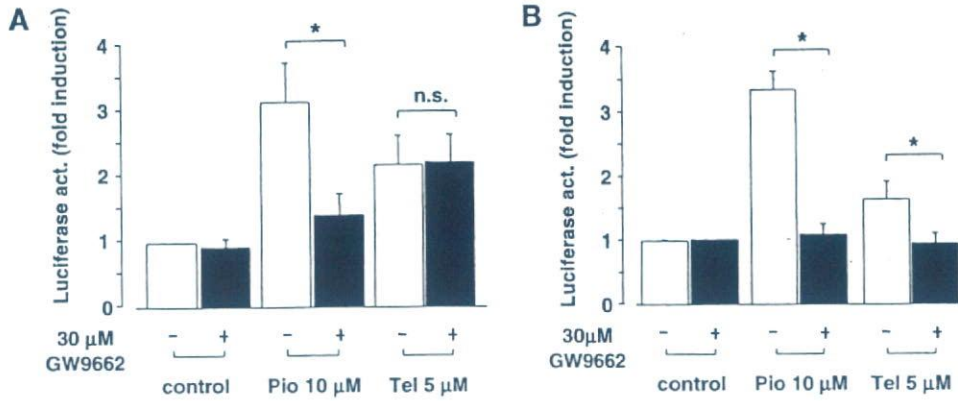


Fig. 4. Effect of PPAR- γ inhibition on pioglitazone- and telmisartan-induced stimulation of adiponectin and PPAR- γ . (A) 3T3-L1 adipocytes were infected with fmAd-pAdp-LUC followed by pretreatment with GW9662 for 1 h. (B) HEK 293 cells were transiently co-transfected with fmAd-PPRE-LUC and CMV6-PPAR- γ 2 together with pSV40-LUC as an internal control for 3 h. Results are expressed as fold induction over the untreated group. Each bar is mean \pm SD from four independent experiments. * p < 0.05, GW9662 treatment versus untreated.

dependent, while the telmisartan's effect was PPAR- γ -independent.

PPAR- γ has shown to be a master regulator for adipocyte differentiation. Attenuating PPAR- γ expression and activity result in impaired adipocyte differentiation [28–30]. Activation of PPAR- γ is required for the expression of adipocyte-specific markers, including fatty acid binding protein 3, GLUT 4, insulin receptors, insulin receptor substrate (IRS), and C/EBP α [30,31]. The adiponectin gene is also adipocyte-specific, and the expression of this gene increases with adipocyte differentiation. Several groups have investigated the transcriptional regulation of adiponectin, showing that SP1/SP3 [13], SREBP-1c [14] and C/EBP- β [8] are crucial transcription factors for constitutive or ligand-dependent expression. Osaka University has recently identified a PPAR- γ responsive element in the region –285 to –273 (5'-TGACTTTTGCCCC-3') in the adiponectin gene, and demonstrated that mutation of that sequence abolishes pioglitazone-induced stimulation of adiponectin transcription [15]. These data suggest that the elevation of serum adiponectin concentration, observed in clinical use of pioglitazone, may in part, resulted from transcriptional regulation. The assay system used in this study also demonstrated that adiponectin transcription is directly stimulated via PPAR- γ activation (Fig. 4A). Interestingly, under basal conditions (absence of pioglitazone), pretreatment with a PPAR- γ inhibitor do not change the level of adiponectin transcription. These data suggest that basal transcriptional activity is dependent upon transcription factors other than PPAR- γ .

Recent studies have demonstrated that telmisartan act as a partial agonist of PPAR- γ [22,23]. It has been suggested that telmisartan-bound PPAR- γ shows conformational change different to that elicited by rosiglitazone [32]. The present study produced similar data by utilizing a reporter vector containing PPAR- γ consensus sequences (Fig. 4B). Treatment with telmisartan increased the PPAR- γ activity, and that stimulation was blocked by a

PPAR- γ inhibitor, GW9662. Surprisingly, that pretreatment with PPAR- γ inhibitor failed to prevent telmisartan's stimulatory effect on adiponectin transcription (Fig. 4A). These data suggest that telmisartan enhances the adiponectin transcription, independent of PPAR- γ activation.

Induction of PPAR- γ -dependent gene expression by telmisartan has been recently studied on RAGE mRNA. Telmisartan suppressed RAGE protein synthesis in Hep3B cells, and this was blocked by PPAR- γ inhibitor, GW9662 [33]. If telmisartan, like pioglitazone acts only as a PPAR- γ agonist, identical regulation of gene expression should be observed with all PPAR- γ -target genes. Micro-array analysis, however, shows that the gene expression profiles induced by pioglitazone and by telmisartan are not the same [32], suggesting that telmisartan may have a different signaling mechanism than pioglitazone.

The results presented here demonstrated that adiponectin transcription showed PPAR- γ -dependence when it was stimulated by pioglitazone, not by telmisartan. Why has adiponectin transcription developed PPAR- γ -independence? There are possible explanations that would account for these results. First, it is possible that the PPAR- γ inhibitor, GW9662 concentration used in this study was too small to sufficiently inhibit the effect of telmisartan. This is, however, unlikely because the same concentration of GW9662 almost completely inhibited PPAR- γ activation by telmisartan (Fig. 4B). Second, telmisartan-bound PPAR- γ may not be associated with the PPAR- γ responsive element on the human adiponectin promoter that was identified by Iwaki et al. [15]. If not, telmisartan may activate other known or unknown transcription factor(s) which regulate the human adiponectin transcription. There are two reasons why telmisartan-activated PPAR- γ does not associate with PPAR- γ responsive element on human adiponectin promoter. The sequence previously reported shows little homology to the PPAR- γ consensus sequence, and is located on an anti-sense strand of the gene. Binding of telmisartan to PPAR- γ may result in a different protein