

る。この融合タンパク質は CAM アッセイにおいて bFGF による新しい血管の増殖の誘導を完全に阻害した。さらに、この融合毒素はマウスにおけるカボジ肉腫腫瘍の成長を顕著に後退させた。毒素ゲロニンを連結させた VEGF121 を含む融合タンパク質に対する感受性は、VEGFR2 を過剰発現して増殖している内皮細胞において約 60 倍高いことが報告されている。VEGFR1 を過剰発現する内皮細胞はこのタンパク質に対する感受性がなかった。ヒトメラノーマおよびヒト前立腺異種移植を融合タンパク質で処理すると、腫瘍の容積が低下し、腫瘍床の赤血球細胞が溢出した腫瘍血管に対して血栓障害を起こした。これらの基礎的研究は血管新生が関与する各種の疾患に対して融合タンパク質が治療薬として有望である可能性を示しているが、抗体の産生と非標的に対する毒性作用を発現する可能性が問題となる。今後、免疫原性の少ない抗毒素の開発により繰り返し投与、治療効果の改善が可能になる。

C. 1. 5. 6 VEGF に対するリボザイム

受容体の発現を抑制する一つの方法は特異的なリボザイムを用いることである。リボザイムは特定の RNA を加水分解できる触媒 RNA である。その特異性はリボザイムの結合アームと標的 RNA における回裂部位に介在する配列の間のマッチングから由来する。臨床に使用するためのリボザイムはヌクレアーゼが豊富な組織や生体液中で抵抗性となるようデザインされている。これらリボザイムは適切な薬物動態プロファイルを有し、*in vitro* および *in vivo* の非臨床研究においてその効果を示した。VEGFR1 および VEGFR2 両方に対するリボザイムは血管新生を顕著に阻害することが報告されている。動物腫瘍モデルにおいて、アン

ジオザイム (リボザイム社) として知られている抗 VEGFR1 リボザイムで抗腫瘍効果が最も顕著であった。アンジオザイムは VEGF 誘導性血管新生のラット角膜モデルにおいて抗血管新生効果、様々なマウス腫瘍モデルにおいて抗腫瘍および抗血管新生活性を示した。マウスおよびサルにおける広範囲にわたる非臨床試験ではアンジオザイムの有意な毒性は示されなかった。

C. 1. 5. 7 VEGFR-1 変異体を用いた遺伝子治療

細胞内チロシンキナーゼドメインの端を欠損している VEGFR-1 変異体のレトロウイルスを介した遺伝子導入により異種移植 C6 神経膠腫および同種マウス BFS 繊維肉腫における腫瘍の成長および血管新生が強く低下した。

C. 1. 5. 8 VEGFR およびアンジオポエチンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド

Flk-1 および Flt-1 のタンパク質発現をダウンレギュレートできるそれぞれの VEGFR に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドにより、VEGF の血管新生活性が顕著に低下した。アンジオポエチン-1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは *in vitro* において HeLa セルの増殖を顕著に抑制した。

C. 1. 5. 9 アンジオスタチン

アンジオスタチンはプラスミノゲンの 38kDa の断片であり、マウス腫瘍モデルで血管新生を阻害したことから、抗血管新生の性状を有することが最初に決定された。アンジオスタチンは内皮細胞の増殖阻害およびアポトーシスの増加を介して腫瘍を休眠させる。アンジオスタチンはマウスにおいて抗腫瘍および抗

血管新生の機能を有している。これらの抗血管新生の性状はアポトーシスの誘導を介している。アンジオスタチンはCAM アッセイにおける胎児の血管新生の阻害においても効果的であった。さらに、アンジオスタチンは様々な *in vivo* のヒト腫瘍モデルにおける原発腫瘍および転移腫瘍の成長を阻害することが示された。別の報告では、アンジオスタチンはこれら腫瘍におけるアポトーシスの割合を増加させることにより微小転移巣の成長を制限することが示された。

アデノ随伴ウイルスおよびリポソームのような非ウイルスを用いたアンジオスタチンの遺伝子治療において、*in vivo* における発現は持続して上昇し、腫瘍の成長は阻害された。

アンジオスタチンが抗血管新生効果を及ぼす機構については十分な解明が行われていないが、その作用は内皮細胞における受容体と考えられる ATP 合成酵素、アンジオモチン、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの相互作用を介している。アンジオスタチンは内皮細胞のセルサイクルの G2/M 移行を抑制していることを示唆する研究もある。最近、アンジオスタチンは *c-met* に対する結合において競合することにより HGF/*c-met* のシグナリングをブロックすることが示された。

C. 1. 5. 10 エンドスタチン

エンドスタチンはエラスターゼおよび他のプロテアーゼの作用によるコラーゲン XVIII の C 末端における 20kDa 断片であり、強力な血管新生の阻害剤である。

エンドスタチンは内皮細胞の増殖、遊走を特異的に阻害し、*cl-2* および *Bcl-VL* のダウンレギュレーションにより内皮細胞のアポトーシスを誘導することが示された。エンドスタチン

はヒト臍静脈内皮細胞の VEGF により誘導される遊走を阻害した。エンドスタチンは VEGFR2 と直接的に相互作用し、VEGF による VEGFR2 シグナルの促進を妨害する。

組換えエンドスタチンのシステマチックな投与により腫瘍細胞のアポトーシスの増加と共に血管新生の低下を介して多数の種類の腫瘍の成長を劇的に阻害することが示された。しかし、最も注目すべきことは、一連のエンドスタチン処置の繰り返しにより、処置の期間腫瘍の成長が阻害され、その後腫瘍は寛解に入った。この結果から、エンドスタチンは薬剤耐性を誘導しない効果的な抗血管新生癌治療になりうることを示唆された。

かなりのデータから、エンドスタチンの主要な活性の一つは内皮細胞の遊走の阻害であるように思われる。これに関連し、エンドスタチンは内皮細胞の運動性に重要である MMP-2 前駆体の活性化、MMP-2 および MT1-MMP の触媒活性も阻害する。

最近、転写プロファイルング実験と組み合わせた *in vitro* の内皮細胞アッセイにより、エンドスタチンは細胞の遊走に関連した *c-myc* および他の遺伝子を抑制することにより内皮細胞の遊走を阻害することが示された。

エンドスタチンは VEGF 発現およびその活性をネガティブに調節することにより内皮細胞の遊走も阻害する。*in vitro* のマウス大動脈リングアッセイおよび *in vivo* のマウス腫瘍モデルにおいてエンドスタチンにより VEGF mRNA およびタンパク質が有意にダウンレギュレーションされた。エンドスタチンと VEGFR2 の直接的な相互作用により VEGF による走化性の促進がブロックされる。

アデノ随伴ウイルスを用いたエンドスタチン遺伝子治療では *in vivo* における発現が持続

して上昇し腫瘍の成長が阻害された。カチオンリポソームと複合体を形成したエンドスタチンプラスミドDNAを静脈内に投与すると、ヌードマウスの胸部脂肪体におけるヒト乳癌セルライン MDA-MB-435 の増殖が阻害された。

マウス循環内皮細胞における VEGF およびエンドスタチンの効果も解析されている。アデノウイルスを介した VEGF を発現させたマウスでは内皮細胞の数が上昇し、その上昇は組換えエンドスタチンにより低下する。この結果からエンドスタチンは内皮細胞に対して直接的なアポトーシスを介した殺細胞効果を有することが示唆された。

エンドスタチンはヘパリン結合タンパク質であり、抗血管新生活性はヘパリン結合能を介している。最近、エンドスタチンによる *in vitro* の VEGF あるいは bFGF による内皮細胞遊走促進の阻害および *in vivo* の CAM アッセイにおける VEGF あるいは bFGF による血管新生のブロックにおけるエンドスタチンのヘパリン結合モチーフの関与が報告された。

細胞表面における VEGFR2 以外に、エンドスタチンの内皮細胞表面受容体の可能性のある多くの分子が同定されている。それには $\alpha_5\beta_1$ インテグリンおよびヘパリン硫酸プロテオグリカングリビカン-1 および-2 が含まれる。

C. 1. 5. 11 トロンボスポンジン

トロンボスポンジン-1 (TSP-1) は繊維芽細胞および内皮細胞を含む様々な種類の細胞により産生される大きな複数のドメインを有する 420kDa のホモ三量体の分泌性糖タンパク質であり、細胞表面あるいは細胞外マトリックスに結合する。

TSP-1 は *in vivo* だけでなく *in vitro* におけ

る強力な血管新生の阻害剤である。 *in vitro* における増殖、遊走、内皮細胞に対する接着は全て TSP-1 あるいは TSP-1 フラグメントによりブロックされ、TSP-1 あるいはそのフラグメントは内皮細胞のアポトーシスを誘導できる。これら内皮細胞における TSP-1 の作用は TSP-1 の CD36 あるいは $\alpha_5\beta_3$ 、 $\alpha_3\beta_1$ インテグリンに対する結合あるいはインテグリン結合タンパク質(IAP)とのコンプレックス形成を介している。TSP のシグナル伝達系には細胞質のチロシンキナーゼ p-59fyn の動員および p-59fyn 依存的である p38MAPK の活性化が含まれる。p38MAPK が一旦活性化されると、カスパーゼ-3 の活性化が導かれ、最終的に EC のアポトーシスが起きる。TSP-1 のアポトーシス効果は活性化された EC に限定され、休止期の血管ではおきない。

アデノウイルスを介した TSP-1 の遺伝子導入はヌードマウスにおける K562 異種移植の成長を劇的に阻害した。さらに、コントロールと比較してアデノウイルスを介した TSP-1 処理腫瘍では微小血管密度がはるかに低かった。p53 はトランスフェクションアッセイにより示されるように TSP-1 遺伝子の発現を促進する。悪性腫瘍細胞増殖の典型的な特徴である p53 腫瘍抑制遺伝子の野生型対立遺伝子の欠損が起きる時、TSP-1 の発現は繊維芽細胞でダウンレギュレーションされる。p53 および TSP-1 と複合体を形成したりポソームの静脈内共投与によりヌードマウスにおけるヒト乳癌セルライン MDA-MB-435 の成長の阻害において相乗的な効果を持つことが示された。

TSP-1 の転写は p53 および PTEN のような腫瘍抑制遺伝子により活性化されることから、TSP-1 の癌における役割がさらに示唆されている。逆に、TSP-1 の発現は Id1 転写因子だ

けでなく c-myc, v-src, c-jun, ras を含む複数のオンコジーンによりダウンレギュレーションされる。TSP-1 発現をネガティブに調節する Id1 の役割の根拠は Id1 ノックアウトマウスで、TSP-1 の発現が顕著に増加しており、腫瘍の増殖は血管新生の強力な阻害により顕著に低下する。

いくつか腫瘍モデルからの免疫組織化学的なデータから、TSP-1 タンパク質は周囲に隣接する正常組織には豊富に存在しているが、腫瘍組織において顕著に低下しているか存在しないことが示された。このことから腫瘍に隣接した組織における TSP-1 の発現は抗血管新生のバリアの一つを形成していることが示唆された。

in vivo の腫瘍モデルのデータから、TSP-1 が血管新生およびその後の腫瘍の成長を阻害するという証拠がさらに提供されている。TSP-1 不全マウスを p53 欠損マウスと交配させて作成したダブルノックアウトマウスにおけるメラノーマ腫瘍の増殖速度は p53 単独欠損に比べて 2 倍高い。乳腺腫瘍になりやすい乳腺における特異的な TSP-1 の過剰発現により血管が低下し腫瘍の成長が顕著に阻害されるかあるいはなくなった。逆に、同じマウスにおいて TSP-1 遺伝子を乳腺特異的にノックダウンすると、VEGF/VEGFR2 相互作用の増加により腫瘍の増殖速度および血管が過剰増殖すると共に腫瘍の出現が増加した。興味深いことに、血管新生において内皮細胞の遊走および腫瘍の浸潤に関与する活性化 MMP、亜鉛依存性プロテアーゼレベルの上昇がこれらの動物で観察された。一方、乳腺上皮細胞における TSP-1 の過剰発現は MMP の活性を抑制した。これらマウスから由来する細胞を用いたその後の研究で TSP-1 と MMP-9 の前駆体の相互

作用によりその潜在型から酵素を活性化するのに必要な MMP-9 タンパク質分解が阻止されることが示された。MMP-9 は VEGF のようなヘパリン結合性増殖因子を細胞外マトリックスから遊離することが示されている。以上の結果から、TSP-1 による抗血管新生の機構には内皮細胞の遊走、増殖、接着の阻害、MMP-9 活性化の抑制、次に細胞外マトリックスに保存されている血管新生促進因子の遊離の阻止が含まれる。

C. 1. 5. 12 ツムスタチン

ツムスタチンは MMP-9 によりコラーゲン IV の α_3 鎖から遊離される 232 個のアミノ酸からなるペプチドであり、抗血管新生およびアポトーシス促進のメディエーターである。MMP-9 を欠損するマウスはツムスタチンの血漿レベルが低く腫瘍の成長速度が増加する。ツムスタチンは $\alpha_v\beta_3$ に結合し、この相互作用により focal adhesion kinase/PI3K/Akt/mTOR 系の活性化が抑制され、その結果内皮細胞の DNA 合成がストップする。

C. 1. 5. 13 トロポニン 1

トロポニン 1 (Tn1) は内皮細胞の増殖抑制を指標に牛肩甲骨の軟骨から精製されたタンパク質である。Tn1 が同定はアミノ酸配列により同定された後、ヒト Tn1 がクローン化され発現タンパク質が得られた。ヒト Tn1 は *in vitro* において bFGF および VEGF による内皮細胞の増殖促進を阻害した。Tn1 は *in vivo* の血管新生の強力な阻害剤でもあり、鶏絨毛尿膜アッセイにおける胎児の血管新生およびマウス角膜のポケットアッセイにおいて bFGF による血管新生を誘導した。

Tn1 は bFGF の受容体に結合し、内皮細胞

に発現する血管新生促進因子である bFGF の受容体に対して bFGF と競合し bFGF による血管新生の誘導を阻害する。Tn1 の 30 アミノ酸ペプチドが *in vitro* における内皮細胞の増殖および管腔形成を阻害することが最近示された。このペプチドは膵臓癌セルライン CAPAN-1 における VEGF 発現も阻害し、Tn1 で処理した CAPAN-1 をマウスに注射するとコントロールの動物に比べて肝臓に転移した数が有意に減少した。これらの報告に基づいて、Tn1 は固形腫瘍の増殖と転移の阻害剤として近々臨床研究に用いられる予定である。

C. 1. 5. 14 TIMP-2/Loop6

細胞外マトリックスおよび基底膜の分解は血管新生における最初のステップの一つであり、matrix metalloproteinase (MMP) は細胞外マトリックスの再構成に鍵となる役割を果たしていることが示されている。MMP はメタル依存性のエンドプロテアーゼの多重遺伝子族であり、腫瘍の転移、進行および血管新生において重要な役割を果たしている。また、MMP-2 の増加が多くの異なったヒト腫瘍で示されている。

最初に、*in vivo* において MMP の tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) により MMP 活性を阻害することにより、血管新生を阻害できることが最初に示されて以来、多くの他の研究者によりこの知見が確かめられ、MMP 活性が血管新生の達成に役割を果たしていることが示された。

TIMP は MMP の重要な内在性のネガティブ調節因子である。最近、TIMP ファミリーメンバーとして、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4 の四種類が同定された。これら全ての TIMP が MMP の活性を阻害し、MMP を介し

た内皮細胞および腫瘍細胞の遊走の阻止により、血管新生を抑制する。しかし、TIMP-1 が内皮細胞および腫瘍細胞を含む多くのタイプの細胞の増殖を穏やかに促進するのに対し、TIMP-2 は内皮細胞の増殖を抑制するという点でユニークである。したがって、TIMP-2 はその MMP 阻害活性に加えて内皮細胞の増殖および遊走を阻害することにより血管新生を阻害する。最近、AAV ベクターによりデリバリーされた TIMP-1 の遺伝子導入がマウス異種移植モデルにおいて腫瘍の成長を阻害することが示された。

TIMP-2 が内皮細胞の増殖を阻害する機構はほとんど不明である。可能性の一つは TIMP-2 が VEGF の発現を阻害するという点である。乳癌細胞における TIMP-2 の過剰発現は *in vitro* および *in vivo* 両方における VEGF 発現のダウンレギュレーションと関連しており、血管新生および腫瘍の増殖が阻害される。

TIMP-2 による内皮細胞の増殖抑制は受容体を介しており、最近の研究は TIMP-2 の内皮細胞受容体の同定に焦点が置かれている。TIMP-2 の抗増殖活性は細胞における β_1 インテグリンの発現に依存しており、 $\alpha\beta_1$ インテグリンが内皮細胞における機能的な TIMP-2 受容体であることが示された。

抗血管新生活性に関与する TIMP-2 の領域を決定するため、構造活性相関に関する研究が行われた。その結果、*in vitro* の内皮細胞増殖アッセイ、CAM アッセイ、マウス角膜ポケットアッセイにおいて MMP 阻害活性を欠損している C 末端ドメイン (T2C) が抗増殖活性を有することが発見された。さらに、C 末端領域の構造活性マッピングにより、T2C ドメインの抗増殖、抗血管新生領域は TIMP-2 分子の

Loop 6 に位置することが示された。

Loop 6 は *in vitro* の内皮細胞増殖の強力な阻害剤であり、CAM および角膜ポケットアッセイにおいて *in vivo* の血管新生を阻害した。したがって、TIMP-2 には T2N における MMP 阻害活性および T2C における抗増殖活性というお互いに無関係な二つの抗血管新生活性が含まれる。さらに、Loop 6 は T2C の抗増殖活性に関与している新規の低分子量の血管新生阻害剤である。

C. 1. 5. 15 MMP

MMP が血管新生を促進することは前の章で述べたが、MMP の活性のなかには腫瘍の成長および進行に対して防御的な機能を果たすものもある。MMP が血管新生の促進および抑制に働くという事実により、非特異的な MMP 阻害剤を用いた臨床試験で期待はずれの結果が得られたことが説明できるかもしれない。

MMP は大きな分子を分解し、アンジオスタチンおよびエンドスタチンのような内在性血管新生阻害剤を生成する。MMP-9 ではなく、MMP-2 は EGF 受容体 1 から細胞外ドメインを遊離させ、bFGF シグナリングの阻害剤として作用する活性型可溶性受容体を産生する。MMP 活性は内皮細胞の増殖に対し抑制作用を有する TNF- α の活性型への変換にも必要である。

MMP-2 分子それ自体は触媒ドメインとは無関係な他の抗血管新生活性を有している。MMP-2 の C 末端にある hemopexin 様 (PEX) ドメインは内皮細胞表面において活性型 MMP-2 と $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの相互作用をブロックできる。 $\alpha_v\beta_3$ と活性型 MMP-2 の相互作用は血管新生において内皮細胞に対する MMP-2 の活性発現に必要かもしれない。したがって、

PEX ドメインは MMP-2 活性の阻害剤として作用する可能性がある。

C. 1. 5. 16 EGFR に対する抗体

EGF あるいはその受容体の過剰発現は細胞増殖、アポトーシス、転移のような腫瘍の進行に必須のプロセスおよび抗腫瘍薬剤に対する抵抗性において主要な役割を果たしている。さらに、いくつかの実験的知見から、EGF による VEGF の産生促進により血管新生が促進される可能性が示唆されている。ヒト化モノクローナル抗体であるセツキシマブ (IMC-225、erbitux、インクロンシステム社) は EGFR (HER1) の細胞外ドメインへの結合により、受容体の二量体化およびインターナリゼーションを誘導し、EGF のシグナリングを阻止する。また、セツキシマブは EGFR に対する EGF の競合的なアンタゴニストでもある。EGFR のその後のインターナリゼーションは、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 p27^{KIP} の増加により G1 における細胞周期の停止も導き、Bax および Caspase-8 のようなアポトーシス促進因子のアップレギュレーションおよび誘導を介して細胞のアポトーシスを開始する。

ヌードマウスに対して同所性あるいは皮下で成長させたヒト癌異種移植を用いて非臨床試験で、セツキシマブは腫瘍の増殖を抑制し、マウスの生存率を増加し、腫瘍により誘導される血管新生を抑制することが示された。IMC-225 の臨床効果はアポトーシスの誘導、血管新生の阻害、転移の阻害、化学療法および放射線療法に対する反応性の促進を含む複数の機構が含まれるように思われる。ごく最近、セツキシマブは細胞培養および動物モデルにおいて VEGF の分泌を阻害し、この阻害は hypoxia inducing factor (HIF) $\cdot 1\alpha$ レベルの

低下に反応して転写レベルで起きる。その結果、腫瘍の微小血管密度の減少あるいは腫瘍の退行がおきる。これらの結果はセツキシマブと VEGF あるいは VEGF 受容体の機能を阻害するアプローチを組み合わせた治療戦略が有効となる可能性を示唆するものである。

C. 1. 5. 17 内皮細胞の接着を阻害する薬剤

抗血管新生療法の他の戦略はその遊走の間における内皮細胞の接着相互作用の阻害から成り立つ。インテグリンは α および β サブユニットから構成されるヘテロダイマーの膜貫通タンパク質であり、血管新生において細胞外マトリックスに対する接着を介して内皮細胞の運動性、分化および増殖をコントロールする。アルギニン-グリシン-アスパラギン酸のペプチドモチーフを含む細胞外マトリックス成分の受容体である $\alpha_v\beta_3$ インテグリンは活性化された内皮細胞の細胞表面にのみ存在し、休止期の内皮細胞および他の細胞には存在しないため、抗血管新生療法の魅力的な標的である。RGD ドメインのアンタゴニストであるいくつかのペプチドおよび $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対して作成されたモノクローナル抗体 (LM609) は CAM における進行中の血管新生を破壊し、CAM に移植した組織学的に異なった腫瘍の急速な退行を導く。LM609 は bFGF による $\alpha_v\beta_3$ インテグリン陰性のヒト乳癌腫瘍細胞を含むヒト皮膚を移植した SCID マウス/ヒトキメラモデルに LM609 を静脈内投与すると、腫瘍の増殖を阻止するかあるいはヒト皮膚の微小環境における腫瘍細胞の増殖を顕著に低下させた。これら LM609 で処置した腫瘍においてはヒトの血管が顕著に少なく、腫瘍の浸潤も低かった。ピタキシンは LM609 抗体のヒト化であり、発芽している血管に選択的に結合し、いく

つかの動物モデルで腫瘍の増殖を抑制する。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは導入したヒト臍帯静脈内皮細胞では血管新生が低下した。

$\alpha_v\beta_3$ 受容体をブロックする他の方法は RGD タイプのペプチドを用いることである。このペプチドは抗体と比べれば、生成が容易である、タンパク分解に対する抵抗性が高く、免疫原性が低いといった利点がある。このようなペプチドとして環状ペプチド EMD12974 (cilengitide、RGDf-NmeVal) そして EMD270179 (RGDf-ACHA) (メルク社) がある。EMD12974 はメラノーマ腫瘍において単独薬剤として有効性を示す。これを放射線免疫療法と組み合わせると毒性の増加が無い状態で有効性を示し、腫瘍および内皮細胞のアポトーシスが有意に増加した。

α_1 および α_2 をブロックする抗体の組み合わせはコラーゲン I および IV、ラミニン I に対する内皮細胞の接着を阻止し *in vivo* において VEGF による血管新生を阻害し、既存の血管に全く影響を与えない。 $\alpha_3\beta_3$ に対する抗体は FGF による血管新生の誘導をブロックするが、既存の血管に対しては影響を及ぼさなかった。 α_v をブロックする抗体はニワトリ胎児およびマウスのモデルにおいて VEGF による腫瘍の血管新生の誘導を抑制した。

C. 1. 5. 18 インターフェロン

インターフェロン (IFN) は抗腫瘍活性を有し、細胞増殖、分化、宿主の免疫のような複数の生物学的活性の調節因子であるが、抗血管新生作用も有する。

その機構の一つは腫瘍細胞から分泌される血管新生促進因子のダウンレギュレーションである。IFN- α および IFN- β は bFGF の発現

を低下させ内皮細胞のアポトーシスを誘導することが示されている。また、IFN- α は血管腫におけるbFGFの発現を非常に広範囲に阻害し、Sp1の転写あるいはVEGFプロモーター活性のSp3依存的な阻害を介してVEGFの転写を阻害する。内皮様Eahy 926細胞に対してIFN- α 1およびIFN- β マウスcDNAをレトロウイルスを介して導入すると、マトリゲルにおける内皮様Eahy 926細胞の毛細血管様構造の形成が阻害されるだけでなく遊走および浸潤が阻害された。カボジ肉腫セルラインとIFN- α あるいはIFN- β を産生するパッケージングセルラインと一緒に接種するとヌードマウスにおける腫瘍の成長が顕著に低下した。

C. 1. 5. 19 NK-4

NK-4は四つのクリングドメインを有するHGFの分子内フラグメントであり、HGFRに対してHGFと競合するHGFRシグナリングのアンタゴニストである。NK-4はヒト臍帯静脈内皮細胞においてHGFにより誘導される管腔形成を阻害した。*in vivo*の異種移植の実験で、NK-4を含むアデノウイルスベクターを導入すると有意に腫瘍の増殖が遅れ腫瘍内の微小血管密度が低下した。

C. 1. 5. 20 カリクライン-キニン系を標的とする

カリクラインによる高分子量キノーゲン(HK)の切断により、切断キノーゲン(HKa)およびBKペプチドが遊離される。HKaは分解によりドメインの露出を含むコンフォメーション変化が起こり、HKではみられない抗血管新生作用を示す。HKa特にドメイン5領域はインテグリンを介した接着を破壊し、細胞のアポトーシスを促進する。培養内皮細胞におい

て、VEGF、HGF、PDGFにより誘導される増殖をHKaはブロックし、*in vivo*においてFGF-2により誘導される新血管形成を阻害した。

逆に、BKを介したシグナリングの阻害は抗癌治療において臨床上有望である。BKは血管新生を促進するペプチドであり、その受容体は多くの癌細胞で発現する。BK前駆体であるキノーゲンを標的とするモノクローナル抗体(C11C1)は*in vitro*における血管新生を阻害した。また、CAMアッセイでFGF-2あるいはVEGFにより誘導される新血管形成をブロックし、関節炎の動物モデルにおいて治療効果を示した。さらに、抗癌治療におけるBKアンタゴニストの使用が広く研究されている。

C. 1. 5. 21 パソヒビン

パソヒビンはVEGFにより刺激した内皮細胞において誘導される遺伝子として最近発見された。その遺伝子は腫瘍の血管新生の阻害剤である分泌タンパク質をコードしており、血管新生のネガティブフィードバック調節因子として期待されるいくつかの特徴を有しているように思われる。パソヒビンの作用機構は不明であり、増殖因子受容体に対するアンタゴニストとしては作用しない。

C. 1. 5. 22 アブリジン

アブリジンはVEGFR1の発現を抑制し、G1期において細胞周期停止を誘導すると思われるシクロペプチドであり、*in vitro*でいくつかのヒト腫瘍において有望な活性が示された。

C. 1. 5. 23 転写因子を標的にする

腫瘍の血管新生に特に関連する二つの転写

因子は Ets ファミリーの転写因子および HIF-1 α である。ドミナントネガティブの Ets-1 (転写活性化ドメインを欠失) はマウスにおいて bFGF および腫瘍により誘導される血管新生を顕著に抑制した。また、アンチセンス HIF-1 α の遺伝子導入により VEGF の産生および腫瘍の血管が低下した。EC-4 腫瘍細胞マウスにおいてアンチセンス HIF-1 α の投与により腫瘍の急速な退行 (1 週間以内) が起こり、最初の退行後 3 週間マウスには腫瘍がない状態が続いた。

C. 1. 5. 24 Raf-1 ファミリー

$\alpha v\beta_3$ は新しく形成された血管の内皮に選択的に発現し、遺伝子治療の有力な標的である。脂質ナノ粒子に $\alpha v\beta_3$ リガンドおよび遺伝子を結合させると、その脂質ナノ粒子は $\alpha v\beta_3$ 産生細胞に特異的にデリバリーできる。本研究で用いた遺伝子は RAF の変異型であり、VEGF および bFGF による血管新生の誘導を阻害する。メラノーマあるいはヒト結腸腫瘍異種移植細胞マウスにおける実験において、デリバリーされた変異 Raf-1 遺伝子による非常に高い抗血管新生活性が $\alpha v\beta_3$ 発現内皮細胞で示され、急速で劇的な腫瘍の退行がみられた。ナノ粒子はウイルスベクターよりもはるかに免疫原性が低く、繰り返しおよび持続的な治療が可能である。

C. 1. 5. 25 遺伝子指向性酵素プロドラッグ療法 (GDEPT)

自殺遺伝子治療としても知られている GDEPT は癌に対する最新の遺伝子治療の一つである。このアプローチは非毒性プロドラッグを細胞傷害性ドラッグに転換することができる酵素をコードする遺伝子をデリバリーするものである。いくつかの酵素/プロドラッグ

が *in vitro* および *in vivo* において検討されている。

癌治療において最も広く用いられる酵素/プロドラッグの組み合わせは抗ウイルス剤 ganciclovir (GCV) と単純ヘルペスウイルスタイプ 1 チミジンキナーゼ酵素である。他の組み合わせも使用され、その中に 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954) とニトロリダクターゼをコードする大腸菌の遺伝子がある。CB1954 は NADPH 依存性 thioredoxin reductase (ntr) より還元される単一機能の弱いアルキル化剤であり、細胞において修復が困難な鎖間 DNA 架橋を形成する。HSV-tk/GCV と比較して ntr/CB1954 の利点は活性化された CB1954 の毒性が細胞周期に依存せず、非複製細胞においても見られるということである。

治療用自殺遺伝子は容易には全ての腫瘍細胞に移行しないため (標的細胞の 10% 以下が治療用の遺伝子を発現)、バイスタンダー効果と呼ばれる現象により遺伝的に改変された細胞から周囲の非改変細胞へ毒性を有する代謝物の局所的な拡散がおきるかあるいはアポトーシスシグナルを伝える。毒性を有する代謝産物はギャップジャンクションを介して拡散し、アポトーシス小胞の遊離、可溶性の毒性を有する代謝産物の拡散がおきる。

in vivo における離れたバイスタンダー効果は免疫機構の誘導を介している。このバイスタンダー効果は免疫欠損無胸腺マウスでは顕著に低下する。バイスタンダー効果はギャップジャンクションを構成する connexin-43 の過剰発現により促進される。毒性を有する代謝産物の移行を促進させる別の方法は細胞間の輸送能力が高い HSV-1 の構造タンパク質である VP22 をコードする遺伝子を自殺遺伝子と融

合して導入することである。バイスタンダーによる細胞殺傷は、ギャップジャンクションがない状態でも細胞膜を自由に通過できるCB1954のヒドロキシアミン誘導体が局所で拡散するため ntr/CB1954系を起こすことができる。この戦略は癌細胞の標的として広く用いられており、内皮細胞を標的として腫瘍の移行を間接的に引き起こす目的にも用いることができる。最近、*in vitro*の内皮細胞における ntr/CB1954系の効果が解析された結果、ヒト臍帯静脈内皮細胞の単層培養においてアポトーシスを介した細胞死を ntr/CB1954系が誘導できることが示された。この効果はNADPH依存性 thioredoxin reductase を導入したヒト臍帯静脈内皮細胞と B16 マウスメラノーマ細胞から構成される三次元マルチ細胞系でより顕著であった。

三次元共培養は寿命の短い毒性の代謝産物が容易に拡散し単層培養を覆う培地の中で希釈されるため、バイスタンダー効果に伴うGDEPT系の細胞傷害活性の評価に有用である。

C. 1. 5. 26 遺伝子治療における内皮前駆細胞の使用

いくつかの生理的および化学的な方法が遺伝子治療に用いられており、最も広く用いられているものは裸のDNA、脂質、そしてウイルスである。しかし、これら全てのベクターは *in vivo* において標的細胞に効率良く導入遺伝子をデリバリーするには限界がある。別の方法としては部位特異的にターゲティングができる細胞を用いることである。

末梢血から循環しているEPCの単離が最初に報告されたのは1997年であった。それ以来、内皮前駆細胞は骨髄、末梢循環、臍帯血から効

率良く得られ、活発に血管新生を起こしている領域に対する自然な指向性を有し、*in vitro*および *in vivo* で血管を形成できることが示された。虚血組織に対して応答性があるサイトカインおよび VEGF のような増殖因子によりこれら内皮前駆細胞は骨髄から動員される。内皮前駆細胞はこのような特徴を有することから、細胞傷害性遺伝子のデリバリーにおいて血管新生選択的な標的ベクターとして用いることができる。その結果、抗腫瘍効果が期待される。内皮前駆細胞は *in vitro* におけるウイルスベクターの導入により遺伝的に改変され動物の血液循環に再導入される。内皮前駆細胞はデリバリーされた後、新しい血管に統合される。Vajkoczyらはマウス胎児から分離した内皮前駆細胞を静脈注射すると腫瘍血管新生にホーミングして接着し、新しく形成された芽の近くの間質マトリックスおよびクラスターに組み込まれることを示した。新しく形成された腫瘍血管系において内皮前駆細胞の集積による寄与は12%であった。実際、骨髄由来の内皮前駆細胞の動員をブロックすると腫瘍の血管新生および腫瘍の増殖が減少した。マーカー遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを感染させた後増殖させた内皮前駆細胞をマウスに投与すると、急速に分裂している腫瘍に局在し、分裂していない脾臓および肝臓は投与後3日間ウイルスフリーのままであった。このように、内皮前駆細胞が腫瘍血管系にホーミングし取り込まれることにより、内皮前駆細胞を用いた遺伝子の腫瘍微小環境へのデリバリーが新規治療法として有望であることが示唆された。Ferrariらは内皮前駆細胞を *ex vivo* で遺伝的に改変したレトロウイルスを介した遺伝子導入を用いてチミジンキナーゼを発現させた。GCVを投与すると、体系的な毒性を示さない

で、TK を発現する EPC を過去に投与した動物において顕著な腫瘍のネクロシスが起きた。彼らは内皮前駆細胞を腫瘍担癌動物の体系的な循環に再導入すると腫瘍の新血管形成に顕著に寄与することを示した。Davidoff らは可溶性の切断型 Flk-1 をコードする遺伝子を、レトロウイルスを用いてマウス骨髄由来細胞に導入した。それにより同種マウス神経芽種モデルおよび Wilm 腫瘍異種移植モデルにおいて腫瘍の成長が制限できることが示された。単純ヘルペスウイルスベクターを導入した CD34+細胞はアカゲザルモデルにおいて腫瘍の血管新生の領域にホーミングし、その後 GCV を投与すると腫瘍の死が起こった。CD/URPT のような自殺遺伝子の肺癌のマウスモデルの腫瘍血管系へのデリバリーにも胎児内皮前駆細胞が用いられている。その後マウスを 5-fluorocytosine で処置すると、CD/URPT を発現している細胞にいて 5-fluorouracyl が形成され腫瘍の死が起こった。胎児 EPC 治療を受けたマウスはコントロールよりも若干長く生きたが、病態は回復しなかった。

今後この領域の研究が進歩することにより、ヒトにおける腫瘍血管系を標的とする新しいアプローチが提供されるかもしれない。

C. 1. 6 タンパク質およびペプチド単独、タンパク質およびペプチドと化学療法剤を併用した抗血管新生治療

C. 1. 6. 1 ベバシズマブ

ベバシズマブは先に述べた抗 VEGF マウスモノクローナル抗体 2C3 の組換えヒト化抗体である。ベバシズマブを組み入れたフェーズ I 試験が 2001 年に公表された。この試験で、ベバシズマブは単独あるいは doxorubicin、carboplatin+ paclitaxel、fluorouracil

(5-FU)+ leucovorin (LV) との組み合わせで投与された。登録された 25 人の患者に対してベバシズマブが単独で 0、28、35、42 日に投与され、10 mg/kg までの投与量でグレード 3 あるいは 4 の有害効果は報告されなかった。評価が可能な 23 人の患者の中で、12 人は臨床試験の期間 (70 日) 安定期間を有することが報告された。

化学療法剤 (doxorubicin、carboplatin + paclitaxel 5-FU+ LV) と組み合わせたベバシズマブの臨床試験において、全ての治療群においてベバシズマブの投与量は 8 週間 3 mg/kg/週に設定された。参加した 12 人の患者 (それぞれの化学療法剤の治療計画で 4 名) のうち、1 人でグレード 3 の下痢 (5-FU/LV との併用)、2 人でグレード 3 白血球減少 (carboplatin / paclitaxel との併用) が起こった。なお、これらの毒性の原因はベバシズマブによるものとは思われなかった。それぞれの治療群の 1 人 (全部で 3 人の患者) で抗腫瘍反応が示された。これらの患者はそれぞれ 20、36、40 週引き続いて治療を受け、遅発性あるいは蓄積の毒性の報告はなかった。これらフェーズ I の結果に基づき、ベバシズマブは無作為臨床試験が続けられた。

C. 1. 6. 2 結腸直腸癌におけるベバシズマブ

VEGF の発現は結腸癌の血管新生および増殖の予測因子そしてリンパ節転移陰性の結腸癌から離れた場所における再発の予後因子となることが示されてきた。さらに、肝臓に転移性の直腸癌のマウスモデルの評価において、抗 VEGF モノクローナル抗体の投与により肝臓に転移した癌の数および大きさが阻害されることが示された。これらの発見により結腸直腸癌におけるベバシズマブの有効性をさらに調

べる多くの臨床研究が行われるようになった。フェーズⅡの無作為臨床試験が転移性結腸直腸癌の患者の治療において5-FU/LV単独とペバシズマブ+5-FU/LVの比較が開始された。過去に治療を受けていない転移性結腸直腸癌の患者全104名で無作為に次のうちの一つの治療がなされた。

1. Rose Well 計画投与を用いて8週間のうち6週間の間週一回5-FU/LV (LV 500 mg/m² 2時間静脈内注射、LV注射開始1時間後静脈内ボラスとして5-FU 500 mg/m²投与)
2. 5 mg/kgの投与量で2週間毎に5-FU/LV+ペバシズマブ投与
3. 10 mg/kgの投与量で2週間毎に5-FU/LV+ペバシズマブ投与 5-FU/LV単独(コントロール治療群)の投与を受け、病態が進行した患者はクロスオーバーしてペバシズマブ単独(2週間毎に10 mg/kg)の投与が許された。

1番目の有効性の評価項目は増殖抑制期間および腫瘍の奏効率、2番目は全生存期間および奏効期間が含まれた。このフェーズⅡ試験において、増殖抑制期間はコントロール治療群(5-FU/LV)で5.2ヶ月、ペバシズマブ5 mg/kg治療群で9.0ヶ月(5-FU/LVと比較して $p=0.005$ で有意)、ペバシズマブ10 mg/kg治療群で7.2ヶ月(5-FU/LVと比較して $p=0.217$ で有意)であった。奏効率はコントロール治療群で17%、ペバシズマブ5 mg/kg治療群で40%($p=0.029$)、ペバシズマブ10 mg/kg治療群で24%($p=0.434$)であった。生存期間の中央値はコントロール治療群で13.8ヶ月、ペバシズマブ5 mg/kg治療群で21.5ヶ月($p=0.137$)、ペバシズマブ10 mg/kg治療群で161.1ヶ月($p=0.582$)であった。病態が進行した患者のうち、61%がクロスオーバー治療を受けた。病気の進行以外の原因で死亡した3人の患者は、

1人(コントロールグループ)が粘膜炎/下痢/好中球減少、1人(ペバシズマブ5 mg/kg治療群)が呼吸困難、1人が(ペバシズマブ10 mg/kg治療群)が肺塞栓症であった。ペバシズマブの患者でみられた有害事象には血栓症の割合の増加(ペバシズマブ5 mg/kg治療群で九つの事象、ペバシズマブ10 mg/kg治療群で四つの事象、コントロール治療群で三つの事象)、鼻血(ペバシズマブ5 mg/kg治療群で46%、ペバシズマブ10 mg/kg治療群で53%、コントロール治療群で11%)があった。コントロール投与患者に比べてペバシズマブ投与患者においてタンパク尿が多少高いことも指摘された。これらの結果から5-FU/LV単独に比べて5-FU/LV/ペバシズマブを組み合わせた患者において奏効率の増加、増殖抑制期間の延長、生存率の増加が確認された。

フェーズⅡに続いてirinotecan、5-FU、LV(IFL)に対してIFLおよびペバシズマブを含む投与計画を比較するフェーズⅢ臨床試験が行われた。この試験には923人の患者が登録され、三つの治療群(IFL、IFL+ペバシズマブ、5-FU/LV+ペバシズマブ)のうちの一つに無作為に最初割り付けられた。最初300人の患者が無作為に割り付けられた後、IFL/ペバシズマブの安全性を評価する暫定的な安全性分析が行われた。IFL(irinotecan 125 mg/m²、5-FU 500 mg/m²、LV 20 mg/m²)が6週間のレジメンのうち4週間毎週投与された。これに対して2週間毎にプラセボあるいはペバシズマブ5 mg/kgが組み合わせられた。5-FU/LV/ペバシズマブ治療群はRosewell Parkレジメンに従い、5-FU/LVを2週間おきにペバシズマブ5 mg/kgと組み合わせた。

313人の患者が無作為に割り付けられた後、5-FU/LV/ペバシズマブ投薬計画が中止され、

その患者が IFL を含む治療群として臨床試験が続けられた。無作為に割り付けられた患者 923 人のうち、402 人が IFL/ペバシズマブ、411 人が IFL/プラセボの治療を受けた。最初の評価項目として全生存率が測定された。二番目の評価項目には無増悪生存率、多角的な奏功率、奏功期間、生活の質が含まれた。IFL/ペバシズマブ治療群および IFL/プラセボにおける全生存期間は、それぞれ 20.3 ヶ月および 15.6 ヶ月であった ($p < 0.001$)。第二選択治療薬として oxaliplatin を受けた少数のサブグループのレトロスペクティブ分析の結果、全生存期間は IFL/プラセボ治療を受けた患者で 22.2 ヶ月であったのに対して、IFL/ペバシズマブ治療を受けた患者では 25.1 ヶ月に増加した。無増悪生存率は IFL/プラセボを受けた患者で 6.2 ヶ月であったのに対して、IFL/ペバシズマブ治療を受けた患者では 10.6 ヶ月であった ($p < 0.001$)。奏功率は IFL/ペバシズマブおよび IFL/プラセボで、それぞれ 34.8% 対 44.8% ($p = 0.004$)、奏功期間は 7.1 ヶ月対 10.4 ヶ月 ($p = 0.001$) であった。ペバシズマブの使用に関連した毒性には、グレード 3 の高血圧、グレード 3 および 4 の白血球減少および下痢の増加が含まれた。注目すべきことに、IFL/ペバシズマブの治療を受けた 6 人の患者 (1.5%) で胃腸せん孔が起きた。入院、治療の中断、60 日における死亡率に関連する多くの有害事象の数は治療グループ間で統計的に有意な差はなかった。この試験の結果に基づき、転移性結腸直腸癌の患者の一次治療として 5-FU を用いる化学療法と組み合わせたレジメンとしてペバシズマブが 2004 年 2 月 FDA により承認された。

高齢あるいは一般状態不良の結腸直腸癌患者における追加のフェーズ II 試験、先に示した最近フェーズ II および III 試験の結果を組み合わせると、

平均生存期間は IFL あるいは 5-FU/LV 単独治療の患者で 14.6 ヶ月であるのに対し、5-FU/LV およびペバシズマブ 5 mg/kg で治療した患者では 17.9 ヶ月であった ($p = 0.008$)。患者の奏功率は IFL あるいは 5-FU/LV 単独治療の患者で 24.5% であるのに対し、5-FU/LV およびペバシズマブ 5 mg/kg で治療した患者では 34.1% であった ($p = 0.019$)。

ペバシズマブを用いた結腸直腸癌の臨床試験はさらに続いている。転移性結腸直腸癌における奏功率および奏功期間は、FOLFOX レジメン (5-FU/LV+oxaliplatin) が 5-FU/LV 静注単独および IFL レジメンよりも優れていることが示された。米国東海岸癌臨床試験グループ (ECOG) E3220 試験は、過去に転移性結腸直腸癌の治療を受けた患者について、FOLFOX-4 レジメン単独と FOLFOX-4+ペバシズマブを二週間毎に 10 mg/kg で比較した無作為フェーズ III 試験である。全部で 829 人の患者がこの研究に登録された。最初、患者はペバシズマブ単独から構成される三つの治療群に無作為に割り当てられたが、暫定的な分析によるとこの治療群では他の二つよりも臨床効果が低下することを示されたため中止された。最新の試験結果が最近 2005 年に米臨床腫瘍学会の年次会で公表された。平均生存率は FOLFOX-4+ペバシズマブ治療を受けた患者で 12.9 ヶ月であり、FOLFOX 単独治療を受けた患者では 10.8 ヶ月であった ($p = 0.0018$)。多角的な奏功率は、FOLFOX-4+ペバシズマブを受けた患者では 21.8% であり、FOLFOX 単独治療を受けた患者では 9.2% であった ($p < 0.0001$)。グレード III の高血圧および神経障害の増加が FOLFOX-4 およびペバシズマブの治療を受けた患者でみられた。腸せん孔の罹患率はペバシズマブを受けた患者において 1.1%

であった。

抗血管新生治療薬で治療した患者において出血および創傷治癒が懸念されたことから、手術を受ける患者においてペバシズマブの効果の評価されている。IFL、IFL/ペバシズマブ、5-FU/LV/ペバシズマブのいずれかの治療を受けた患者の解析から、ペバシズマブの治療を受けた患者はこれまでの化学療法剤を受けた患者に比べて創傷離開および出血の合併症のリスクが少し増加することが示唆された。しかし、システマチックな治療を行う 28-60 日前に原発性結腸直腸癌が除去された患者における解析では、IFL、IFL/ペバシズマブ、5-FU/LV/ペバシズマブを受けた患者において創傷離開および出血の合併症における有意な違いは示されなかった。

現在行われているかあるいは計画されている試験には二つの補助の試験が含まれている。一つは National Surgical and Bowel Project (NSABP)であり、ペバシズマブ±FOLFOX 化学療法治療が切除段階 II あるいは III の結腸癌の患者に行われた。もう一つは、AVANT 国際試験であり、それには同じ比較が含まれるが、capecitabine、oxaliplatin (XELOX)およびペバシズマブを用いた三番目の治療群もある。転移しており過去に治療を受けていない患者および治療を受けた患者について数多くの試験が計画あるいは行われている。他にも世界中で多くの重要な臨床試験が行われているが、その主な結果はまだ報告されていない。

C. 1. 6. 3 他の腫瘍タイプにおけるペバシズマブ

C. 1. 6. 3. 1 腎細胞癌

フォン・ヒッペル・リンドウ病 (VHL) は腎臓、CNS、副腎、生殖器官を含む様々な腫

瘍を進行させるリスクを増加させるものとして発現する常染色体優性病であり、腎細胞癌と関連する場合が多い。VHL 腫瘍抑制遺伝子の変異が腎細胞癌の患者で発見され、VEGF のような低酸素誘導性遺伝子の転写を促進する Hif 1 α の恒常的な活性化により VEGF の発現が増加する。腎細胞癌は VHL と関連している。VHL 遺伝子の変異は、細胞組織学的に明らかな特発性 (非家族性) 腎細胞癌のほとんどに存在することも示されている。

腎細胞癌治療におけるペバシズマブのフェーズ II 試験は 2003 年に公表された。IL-2 治療を受けたあるいは禁忌の 116 名の腎細胞癌で臨床試験が行われた。患者は無作為に分割され、2 週間毎にプラセボ、2 週間毎にペバシズマブ (3 mg/kg)、2 週間毎にペバシズマブ (10 mg/kg) の投与を受けた。無憎悪および全ての奏功率が主要エンドポイントであった。試験の最後で、無憎悪期間の中央値は、10 mg/kg ペバシズマブが投与された患者の方がプラセボを投与された患者よりも長かった (4.8 ヶ月対 2.5 ヶ月、 $p < 0.001$)。しかし、3 mg/kg ペバシズマブが投与された患者では無憎悪期間の中央値は若干短くボーダーラインで有意であった (3.0 ヶ月、 $p < 0.041$)。4 人の患者 (全て高投与量ペバシズマブグループの 39 人の患者に由来) において部分反応があった。生存期間はグループ間において有意な差はなかった。ペバシズマブに関連したグレード 4 の毒性あるいは死亡は記録されていない。他の有害作用は高血圧とタンパク尿であった。

この臨床研究において高投与量のペバシズマブが投与された患者における疾患の無憎悪期間が長くなったことから、Cancer and Leukemia Group B (CALGB) は転移性あるいは切除できない腎臓癌の患者についてペバシ

ズマブの無作為フェーズⅢ試験を行っている。この試験には以前にシステマチックな治療を受けていない患者が含まれる。患者は低投与量の IFN- α (1 週間に 3 回 900 万単位) 単独あるいはペバシズマブ (2 週間毎に 10 mg/kg) + 低投与量 IFN- α 治療に無作為に割り付けられた。EGFR チロシンキナーゼの阻害剤である erlotinib とペバシズマブの組み合わせも腎臓癌の治療レジメンとして臨床試験された。ペバシズマブと erlotinib の組み合わせのフェーズⅡの複数の医療機関の結果が 2005 年の ASCO 年会議で示された。16 ヶ月の中間フォローアップの 63 名の患者の臨床研究で、患者はペバシズマブ (10 mg/kg 静注 2 週間毎) と erlotinib (150 mg/日経口) の組み合わせで治療された。59 人の評価可能な患者のうち 15 人 (25%) 客観的な奏功、14 人で部分寛解、一人で完全寛解が得られた。全部で 36 人の患者 (61%) が安定した症状であった。中間無増悪生存期間は 11 ヶ月であり、患者の 60% が 18 ヶ月間生存した。グレードⅢの毒性には下痢、発疹、吐き気/嘔吐、高血圧、出血、タンパク尿が含まれた。

C. 1. 6. 3. 2 乳癌

VEGF は乳癌細胞において発現しており、治療に対する予後診断および奏功率のマーカーとして VEGF レベルの測定が有用であることを示唆する証拠がある。以前治療を受けたことのある転移性乳癌の患者合計 75 人がペバシズマブ単独治療のフェーズⅢ臨床試験で治療された。用いた投与量は 2 週間毎に 3、10、20 mg/kg で、ほとんどの患者 (n=41) は 10 mg/kg で治療された。この研究で、客観的な奏功が 75 名のうち 7 名でみられ、確認された奏功の中央値は 5.5 ヶ月であった。ペバシズマブ 10

mg/kg で治療した患者のうち、17% が 154 日で症状の安定を示し、7% が 1 年間症状の安定を示した。75 人の患者のうち 4 名が高血圧性脳症、ネフローゼ症候群、タンパク尿、吐き気および嘔吐を伴う頭痛を含む有害事象により中断した。

ペバシズマブのフェーズⅢ試験が過去にシステマチックな治療を受けた転移性乳癌の 462 名の患者で行われた。患者は無作為に cepecitabine あるいは cepecitabine+ペバシズマブに割り当てられた。cepecitabine は 3 週間のうち 2 週間 2 回に分けて投与された。ペバシズマブ (15 mg/kg) は 3 週間毎に投与された。最初のエンドポイントは総合的な効果であり、二番目のエンドポイントは無増悪生存率であった。全奏功率は cepecitabine+ペバシズマブのほうが cepecitabine 単独に比べて統計的に優っていた (19.8%対 9.1%)。しかし、無増悪生存率 (4.9 ヶ月: cepecitabine+ペバシズマブ対 4.2 ヶ月: cepecitabine) あるいは全生存率 (15.1 ヶ月: cepecitabine+ペバシズマブ対 14.5 ヶ月: cepecitabine) では有意な差はなかった。

米国国立癌協会 (NCI) と ECOG は E2100 研究の暫定的な結果を公表した。この研究は過去に転移性乳癌の治療を受けたことがない 722 人の女性が登録されたフェーズⅢの無作為複重治療機関試験である。この臨床試験の患者は無作為に割り付けられ paclitaxel±ペバシズマブの治療を受けた。暫定的な分析において、無増悪生存期間中央値は paclitaxel±ペバシズマブを投与された患者で 11 ヶ月であるのに対し、paclitaxel 単独を投与された患者では 6 ヶ月であった。全奏功率は paclitaxel±ペバシズマブを受けた患者で 28% であるのに対し、paclitaxel 単独では 14% であった。新しい補

助として docetaxel および doxorubicin と組み合わせた臨床研究、トラスツマブおよび erlotinib のような他の生物学的な治療薬との組み合わせでベバシズマブの治療効果を検討する臨床試験およびベバシズマブとホルモン療法を組み合わせた臨床試験が進行中である。

C. 1. 6. 3. 3 非小細胞肺癌

非小細胞肺癌におけるベバシズマブを用いた臨床研究が行われている。無作為フェーズII試験が、局所に進行したあるいは転移性の非小細胞肺癌の治療においてベバシズマブ+carboplatin、paclitaxel+carboplatin、paclitaxel 単独が比較された。全部で 99 人の患者が無作為に三つの治療群のうちの一つに無作為に割り当てられた。その組み合わせは 3 週間毎に carboplatin (AUG=6) および paclitaxel (200 mg/m²) (n=32)、3 週間毎に先の投与量の carboplatin、paclitaxel、ベバシズマブ (15 mg/kg) の組み合わせ(n=35)、3 週間毎に先の投与量の carboplatin、paclitaxel、ベバシズマブ (7.5 mg/kg) の組み合わせであった。患者は治療を受ける前に化学的あるいは生物学的な治療を受けていなかった。腫瘍反応は 3、6、10、14、18 サイクル後に評価された。最初のエンドポイントは無増悪期間および腫瘍反応率であり、二番目のエンドポイントは全生存および奏功期間であった。全ての治療群で carboplatin および paclitaxel が中間投与量で 6 サイクル投与された。無増悪期間の中央値は高投与量のベバシズマブ (15 mg/kg) のほうが、コントロールの治療群 (carboplatin および paclitaxel 単独) よりも優っていた (7.4 ヶ月対 4.2 ヶ月、p=0.023)。低投与量のベバシズマブ (7.5 mg/kg) の無増悪期間は 4.3 ヶ月であった。奏功率は、コントロール治療群で

18.8%、低投与ベバシズマブ治療群で 28.8%、高投与ベバシズマブ治療群で 31.5%であった。生存期間について高投与ベバシズマブ治療群とコントロール治療群を比較すると、高投与ベバシズマブ治療群で優っているが (17.7 ヶ月対 14.9 ヶ月、p=0.63)、統計的には有意ではない。なお、低投与ベバシズマブ治療群における生存期間は 11.6 ヶ月であった。コントロール治療群のうち全部で 19 人の患者が病態進行時にベバシズマブ単独治療に変えられ、19 人のうち 5 人で病状が安定化した。12 ヶ月における生存期間はクロスオーバー治療の後 47.4%であった。

それぞれのベバシズマブ治療群において 4 人の患者が有害事象により死亡した。低投与量ベバシズマブ治療群で記録された死亡原因は出血 (おそらく咯血)、咯血、肝臓障害、そして原因不明の理由であった。高投与量ベバシズマブで記録された死亡原因は誤嚥、肺炎、肺出血、アスペルギルス肺膿瘍および慢性閉塞性肺疾患であった。コントロール治療群における 1 人の死亡原因は敗血症に由来するものであった。化学療法剤単独において予想される有意な有害事象の変化は、化学療法剤およびベバシズマブを投与された患者では起こらなかった。しかし、高血圧およびタンパク尿はベバシズマブを含む他の臨床研究において副作用として報告されている。ベバシズマブ治療と関連した出血事象は注意深く調べられた。6 人の患者全てで生命を脅かすほどの出血事象があり、これら患者のうち 4 人が死亡した。そのような出血事象があった 6 人の患者のうち 4 人で扁平細胞組織像が観察された。出血は局所的な腫瘍、主要な血管に近接した腫瘍、空洞を作っている病変とも関連があるように思われる。

以上の試験の結果に基づき、ECOG はフェ

ーズⅡ/Ⅲ試験において paclitaxel/carboplatin 単独に対して paclitaxel/carboplatin+ペバシズマブの組み合わせで臨床研究が進められた。暫定的な結果は2005年ASCO年会で報告された。この研究では、進行性非小細胞肺癌の患者（扁平細胞組織像は除外）に対し無作為に同じ投与量および上記フェーズⅡ試験と同じスケジュールで paclitaxel/carboplatin が割り当てられた。また、434人の患者が paclitaxel/carboplatin+ペバシズマブを3週間に1回静注で投与するよう無作為に割り当てられた。最初のエンドポイントは全生存期間であり、二番目のエンドポイントには奏効率、無増悪生存期間および耐性であった。暫定分析の時期において、ペバシズマブを投与した患者で生存期間の中央値が有意に増加した（12.5ヶ月対10.2ヶ月、 $p=0.0075$ ）。奏効率は化学療法剤のみを投与した患者で10%であるのに対し、ペバシズマブを投与した患者では27%であった（ $p<0.0001$ ）。無増悪生存期間は、化学療法剤のみを投与した患者で4.5ヶ月であるのに対し、ペバシズマブを投与した患者では6.4ヶ月であった（ $p<0.0001$ ）。化学療法剤のみを投与した患者のグループと比較するとペバシズマブを投与した患者のグループで好中球減少および出血の増加があった。出血の割合は化学療法剤のみを投与した患者で1%であったのに対し、ペバシズマブを投与した患者では4.1%であった。

erlotinibのような他の生物学的な薬剤および新しい補助を用いたペバシズマブの試験が進行中である。

C. 1. 6. 3. 4 前立腺癌

VEGF は前立腺癌細胞において発現し、VEGF の発現は前立腺腫瘍のグレードと相関

すると考えられている。非臨床試験において VEGF の阻害を用いることの有用性が確立されたことから、アンドロゲン非依存性前立腺癌の患者においてペバシズマブのフェーズⅡ試験が行われた。測定可能な疾患を有する8人を含む全部で15人の患者が評価された。同様な6回の治療を1サイクルとしてペバシズマブが2週間置きに10 mg/kg 投与された。投与した平均の数は10回であり、7人の患者に7回あるいはもっと少ない回数投与された。治療に対する反応は報告されていない。患者の前立腺特異抗原は50%以上で減少しなかった。前立腺特異抗原進行の中央値は57日であり、測定可能な病態の進行の中央値は118日であった。治療に関連した死亡は報告されておらず、有害効果には重大な低ナトリウム血症（2人の患者）があり、その原因は不明である。CALGBにより設定されたペバシズマブの他のフェーズⅡ試験がホルモン抵抗性の前立腺癌について、docetaxel および estramustine との組み合わせで研究されているが、試験の結果はまだ得られていない。

C. 1. 6. 3. 5 膵臓癌

VEGF の存在は膵臓癌細胞でも確認されており、発現の増加はより不良な予後と関連している。2004年のASCO年会で、進行性膵臓癌について gemcitabine とペバシズマブを組み合わせで用いるフェーズⅡ臨床研究が発表された。28日を1サイクルとして Gemcitabine 1000 mg/m² が1、8、15日に投与され、ペバシズマブ 10 mg/kg が1、15日に投与された。部分寛解が9例確認され、無増悪期間が中央値で9.4ヶ月間続くことが報告された。全部で19人の患者が安定した症状を示し、その無増悪期間の中央値は5.4ヶ月であった。全体と

して、無増悪期間の中央値は 5.8 ヶ月であり、生存期間の中央値は 9 ヶ月、6 ヶ月の生存率は 74%であった。死亡原因として 1 つは胃腸の出血でもう 1 つは腸せん孔であった。CALGB は進行性の膵臓癌の患者に対して gemcitabine 単独とベバシズマブおよび gemcitabine を比較する無作為フェーズ III 試験を進めている。

C. 1. 6. 3. 6 他の腫瘍型

他の腫瘍型におけるベバシズマブの有効性は無作為フェーズ II/III 試験で確認されていないが、かなりの臨床研究が多くの異なる他の悪性腫瘍で行われている。婦人科腫瘍学グループ Gynecologic Oncology group (GOG) は卵巣癌および頭部癌においてベバシズマブによる治療を単独あるいは標準的な化学療法剤との組み合わせで行うことを検討している。頭頸部癌において、ベバシズマブおよび化学放射線を用いたフェーズ I が行われており、erlotinib とベバシズマブの組み合わせが検討されている。肝細胞癌、カボジ肉腫、カルチノイド、中皮腫、小細胞肺癌の臨床研究においてベバシズマブは単独あるいは組み合わせ治療で用いられている。血液悪性腫瘍においては、ベバシズマブが非ホジキンスリンパ腫、急性転化期の慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫で臨床研究されている。

C. 1. 6. 4 IMC-1C11

IMC-1C11 は VEGFR2 に対するキメラ抗体である。転移性結腸直腸癌の患者 14 名におけるフェーズ I 試験では安定の延長がみられたが、7 人の患者で抗キメラ抗体の存在 (2 人は中和抗体) がみられた。

C. 1. 6. 5 アンジオザイム

アンジオザイムは抗 VEGFR1 リボザイムである。再発性固形腫瘍の 28 人の患者が登録されたフェーズ I/II 臨床試験で、アンジオザイムは毎日皮下に投与された。耐容性は投与部位における若干の反応を除いて良好であった。17 名の安定期間が 1-6 ヶ月続き、2 人にやや有効であった。アンジオザイム単独あるいは化学療法と組み合わせたフェーズ II 試験が待たれる。

C. 1. 6. 6 セツキシマブ

EGFR(HER1)の細胞外ドメインに対するヒト化モノクローナル抗体であるセツキシマブ (IMC-225, erbitux, インクローンシステム社) は単独あるいはこれまでの化学療法あるいは放射線療法と組み合わせたセツキシマブのフェーズ I の臨床研究において、セツキシマブには免疫原性がないことが確かめられた。また、一般的に良好な耐容性を示し、皮膚発疹およびアレルギー反応が報告されたなかで最も臨床重要な有害事象であった。セツキシマブはフェーズ II/III の試験において、癌細胞の化学療法および放射線療法に対する感受性を高めることが示された。大規模フェーズ II 試験においてイリノテカンと組み合わせると、イリノテカン不応性の EGFR 発現患者の 57 名のうち 5 人で腫瘍容積がわずかに低下した。一方、21 人の他の患者は安定した症状あるいはやや有効であった。また、セツキシマブに関連した毒性はほとんど示されず、十分な耐容性が示された。セツキシマブはアメリカ FDA によりこの適応症で 2004 年 2 月認可された。そしてスイス、アイスランド、ノルウエイ、欧州連合の国でも認可された。

ごく最近、セツキシマブと carboplatin との

組み合わせのフェーズII試験で、過去にプラチナによる治療が失敗した再発性あるいは転移性の鼻咽腔癌の患者に対し大量に前治療したところ臨床活性および許容できる安全性プロフィールが示された。他のフェーズIIおよびIIIの臨床研究においてセツキシマブと化学療法剤の組み合わせを最初あるいは二番目に用いた場合、腎臓癌、鼻咽腔癌、非小細胞肺癌、膵臓癌などの様々な比率の患者の治療において有意な奏功を示した。進行性鼻咽腔癌で放射線療法±セツキシマブの治療を受けた424人の患者の国際的な無作為フェーズIII臨床試験の結果では、放射線療法+セツキシマブで治療した患者は放射線療法のみで治療した患者に比べ、平均生存期間が約2倍になることが示された(54ヶ月対28ヶ月)。このように、セツキシマブは一連の固形腫瘍の治療における既存の療法と組み合わせ使用する非常に期待できる新しい治療法として浮上している。セツキシマブは腎臓癌および膵臓癌における標準的な化学療法と組み合わせたフェーズIII、結腸直腸癌から肝臓に転移し切除不能な患者においてフェーズII/III、非小細胞肺癌、腎臓癌、卵巣癌および転移性膵臓癌においてフェーズIIで最近評価されている。

C. 1. 6. 7 ビタキシン

ビタキシンは $\alpha\text{v}\beta_3$ インテグリンに対して作成されたヒト型抗体である。ビタキシンはフェーズIの臨床試験で治療した14人の患者のうち1人で部分寛解し、7人の患者で病状は安定化した。また、ビタキシンに関連した毒性はごくわずかしか示されなかった。ごく最近、複数のセンターにおける比較を用いないフェーズII試験で、転移性メラノーマの患者におけるdecarbazine±ビタキシンの治療で臨床生活上性

を有する可能性のあることが示唆された。平滑筋肉腫の患者の治療のフェーズII臨床研究および炎症性疾患および関節リウマチの治療について他の臨床試験が現在行われている。

C. 1. 6. 8 Medi-552

Medi-552はビタキシンとは異なる $\alpha\text{v}\beta_5$ を標的とするヒト化IgG1である。フェーズIで19人の患者で臨床試験され13人が評価された。耐容性は許容できる程度であり、7人の患者で安定期間が延長し、その安定期間は2人で9ヶ月以上続いた。

C. 1. 6. 9 EMD 12974

EMD 12974は $\alpha\text{v}\beta_3$ および $\alpha\text{v}\beta_5$ を阻害する環状ヌクレオチドである。フェーズI臨床試験では異なった投与量における評価がなされた。その結果、投与量に限定された毒性は示されなかった。EMD12974は非小細胞肺癌、膵臓癌、グリア芽腫においてフェーズIIに達した。2004年1月に、オーファンドラッグとしての指定がEMD12974のグリア芽腫の治療がMerck KGaA社に対して欧州委員会により与えられた。この薬剤は進行性腫瘍およびリンパ腫の患者および再発性の原発脳腫瘍の子供でフェーズI、転移性前立腺癌および再発性の多形グリア芽腫の患者のフェーズIIで最近評価されている。

C. 1. 6. 10 組換えヒトアンジオスタチン

組換えヒトアンジオスタチン単独のフェーズIの臨床試験が行われ、患者に28日連続皮下注射された。6ヶ月における成長が25%以下であるということにより示されるような長期間における病態の安定性は24名の患者のうち6名でみられた。有害事象はほとんどなく、主

にグレード 1 あるいは 2 の投与部位反応であった。中枢神経系転移における出血が 2 人の患者でおき、深部静脈血栓症が 2 人の患者でみられた。長期間投与（5 人の患者で 1 年以上）ではさらに治療に関連した有害事象はなかった。

非小細胞肺癌の患者において paclitaxel および carboplatin と組換えヒトアンジオスタチンを組み合わせた暫定的なフェーズ II の試験結果では、23 名のうち部分寛解が 39%、安定期間が 39%であった。寛解の継続期間は 4 人の患者で 8 ヶ月あるいはそれ以上であった。奏功継続時間は 4 人の患者で 8 ヶ月かそれ以上であった。最も共通な有害事象は発疹（75% でグレード 1）であり、患者の 92%にみられた。進行性神経内分泌腫瘍の患者のフェーズ II 試験では適度な治療効果が得られ、患者の 62% で安定期間が示された。唯一の重篤な有害事象は治療前に冠動脈疾患であった患者における心筋梗塞であった。

C. 1. 6. 11 組換えヒトエンドスタチン

組換えヒトエンドスタチンのフェーズ I 臨床試験では、組換えヒトエンドスタチンが 28 日をサイクルとして毎日静脈注射により投与された。組換えヒトエンドスタチンに関連した毒性は非常に低かった。数名の患者で VEGF レベルが低下したが、治療した 21 人の患者では臨床的な効果は得られなかった。

フェーズ II 研究に登録された進行性神経内分泌腫瘍の患者の治療において、適度な治療効果と症状の安定の延長がみられた。全部で 41 人の患者（25 人が癌腫、16 人が臓器腫瘍）に対し、組換えヒトエンドスタチンが 1 日当たり 60 mg/m²、12 時間毎に分割して皮下に自己投与された。この治療期間において毒性はほとんど観察されなかった。病状が進行せず治療効果

が不十分な場合、投与量を段階的に増大した。3 分の 2（62%）で安定期間、12 人（32%）で部分寛解がみられた。無増悪期間の平均値は 39 週であり、中間生存期間は得られなかった。

C. 1. 6. 12 ABT-510

ABT-510 は TSP-1 の抗血管新生活性を模倣した置換ナノペプチドである。36 人の様々な腫瘍の患者が登録したフェーズ II で ABT-510 が臨床試験され、34 人が評価された。ABT-510 の用量を増加させ皮下に毎日投与した患者は許容できる耐容性を示した。軟部組織肉腫において、1 人で部分寛解、14 人（41%）および 5 人（15%）で症状の安定がそれぞれ 8 週および 16 週でみられた。症状の安定の延長（>24 週）が非小細胞肺癌で一人、軟部組織肉腫で一人みられた。

C. 1. 6. 13 VEGF-Trap

VEGF-Trap の有効性は進行性癌および非ホジキンリンパ腫を含む再発性あるいは難治性の患者に対するフェーズ I の臨床試験で評価された。本試験では、14 人の患者に対して VEGF Trap が 4 種類の投与レベル（25, 50, 100, 200 mcg/kg）で週に 6 回の投与後 4 週間続けて投与された。血漿中における VEGF-VEGF Trap 複合体の見かけ上の半減期は 17 日であった。グレード 3 および 4 の毒性は見られず、抗 VEGF Trap 抗体は検出されなかった。グレード 1 および 2 の毒性には可逆性のタンパク尿、疲れ、便秘が含まれた。症状の安定が腎あるいは結腸癌の患者でみられた。

C. 1. 6. 14 Veglin

Veglin は VEGF に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、VEGF-A、-C、-D