

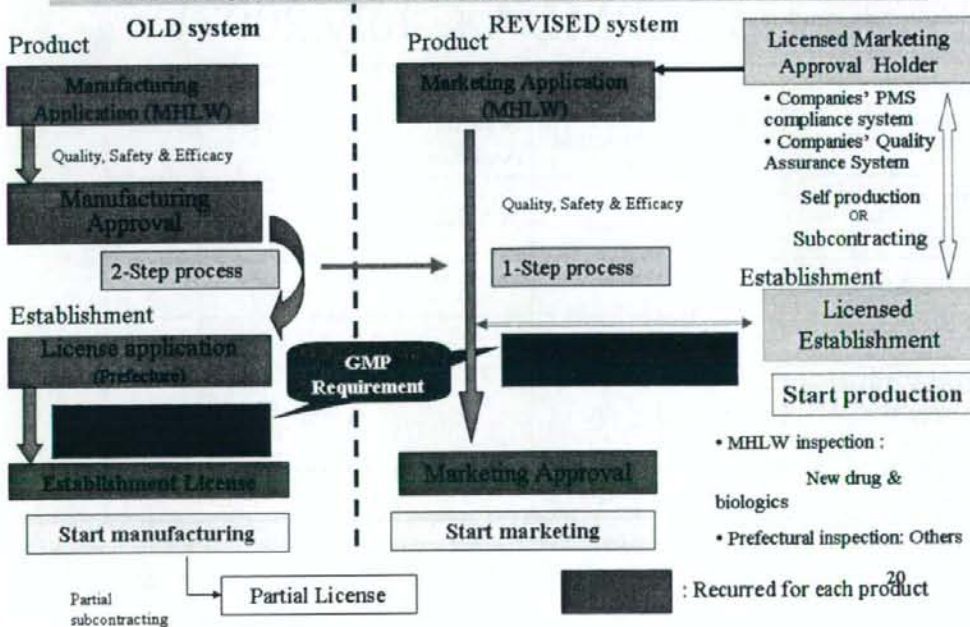
4. Consolidation of the Legal Positioning of GMP

- Became a requirement for product approval
- GMP inspection **prior to approval**, and periodical GMP inspection in post-marketing phase
- GMP inspection **at the time of application for partial change**(pre-approval required) of the approval matters
- GMP inspection **at foreign sites**

19

Comparison Flowcharts of Approval and License

Points: (1) MAH's requirements for PMS system, (2) Allow complete subcontract manufacturing, (3) Introduce marketing approval system



GMP/QMS Inspection for Foreign Sites

- GMP/QMS* inspection for foreign manufacturing facilities started since April, 2005.
 - MRA*: Document check only for pharmaceuticals except sterile products and biologics
 - MOU*: Document check only for Pharmaceuticals
- Number of facilities inspected (~July. 2007)
 - Pharmaceuticals: 75
 - Medical devices: 24

QMS*: Standards for Manufacturing Control and Quality Control for Medical Devices and In-vitro Diagnostic Reagents; MRA* Japan-EU Mutual Recognition Agreement (API: out of scope); MOU* Memorandum of Understanding between Japan and Australia, Germany Sweden, Switzerland)

21

Number of Foreign Facilities inspected by PMDA (~July.2007)

	Europe	North America	Central/ South America	Asia	Others	Total
Sterile products/ Biologics	17	21	0	2	0	40
Oral solid etc	1	7	0	0	0	8
API (Chemical)	10	6	1	3	1	21
Packaging, Labelling, Storage and Laboratory	0	6	0	0	0	6
Total	28	40	1	5	1	75

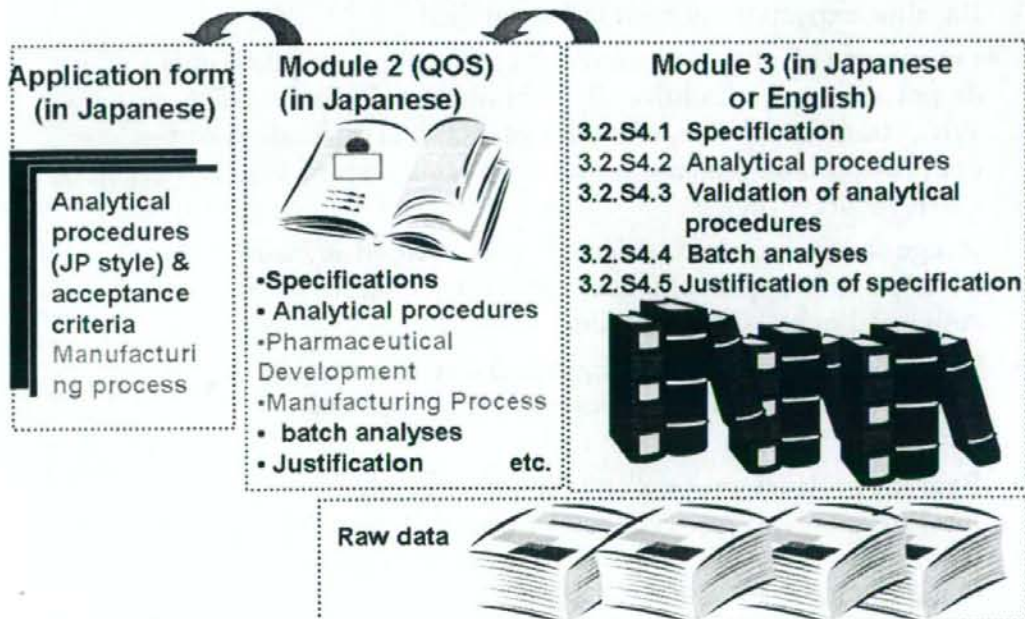
22

Role of Module 2

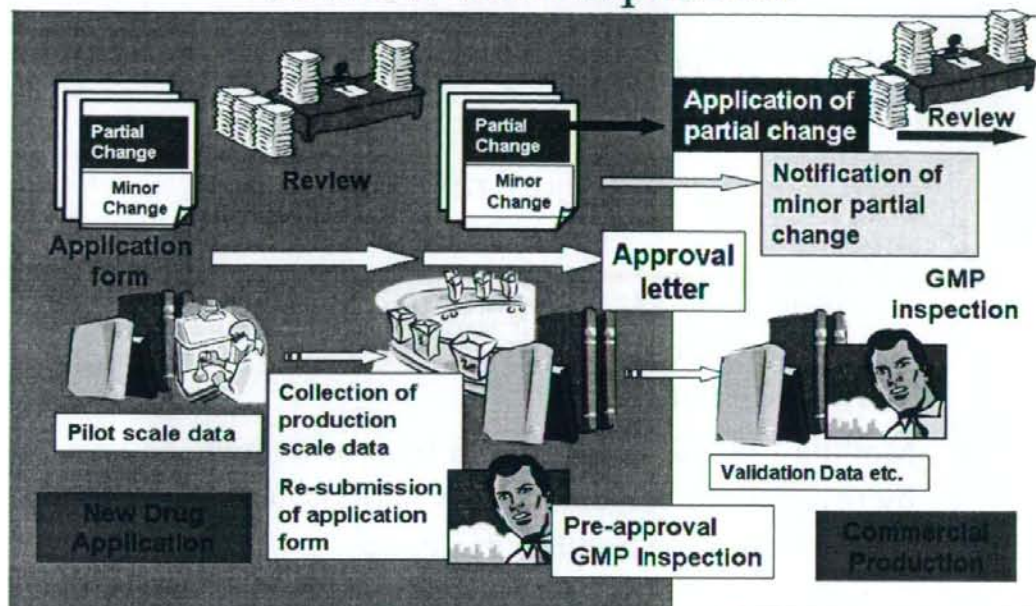
- Module 2 bridges NDA Application Form (approval matters) and Module 3
- Module 2 is one of the key review documents
 - Reviewers evaluate Module 2 and then narrow down into Module 3, 4, or 5 when they need more detailed information.
 - Module 1 and 2 together with reports written by reviewers are evaluated in Pharmaceutical Affairs and Food Sanitation Council.

23

Relationship between Application Form and CTD Documents



Framework for Review and Inspection



Challenges when implementing rPAL regulations with ICH Q8

- Baseline expectations need to be clarified
 “At minimum(identify risks and risks controlled)” expectations do not seem to be traditionally submitted in Japanese NDA. With “traditionally” submitted contents, it is difficult to sort out pre-approval matters, minor change matters. ← expect Q8(R) address this
- Range for excipients as a design space: scientific basis, description in approval letter ← under consideration with “approval matters” study group
- Design spaces with interacting multi-variables and with interacting unit operations: description in approval letter ← see industry’s creativity
- Real time release: process and facility dependence ← Need final scale data to justify. Specification with test method would not go away because of need for later evaluations including generics

Revision Mockup of Japanese QoS

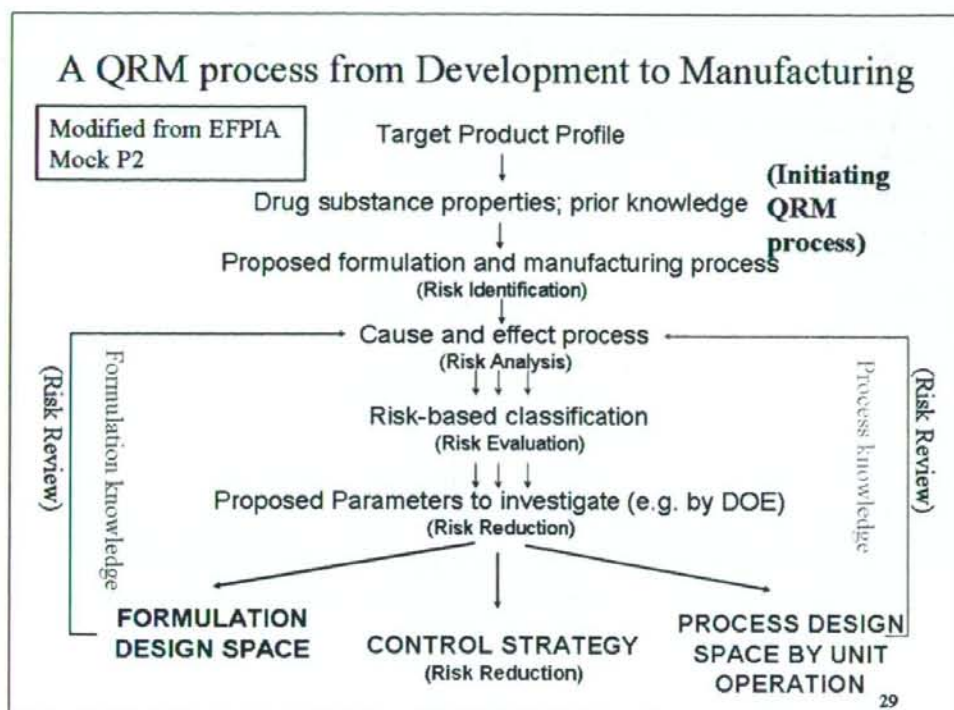
- Old Version was published by Pharmaceutical Manufacturers Association of Tokyo, Osaka Pharmaceutical Manufacturers Association and Japan Health Sciences Foundation in July 2002
- Merely shows an example of description for each module 2 section and just a reference for an applicant to prepare QoS.
- Not covers all information required for each NDA, nor shows acceptance criteria for each categories.
- **NEED more description on pharmaceutical development and on justification of manufacturing process according to ICH Q8 and the revised PAL. ←2006-2008 MHLW “Approval matters” study group**

27

Opportunities by Q9

- Integration to Industry's Pharmaceutical Quality Systems
(ICH Q10 will address this area)
- Integration to Regulatory Authorities' work process (e.g. QS for GMP inspectrate)
- Integration to Guidance Development and Pharmacopoeia Policy (Government and Industry joint effort)

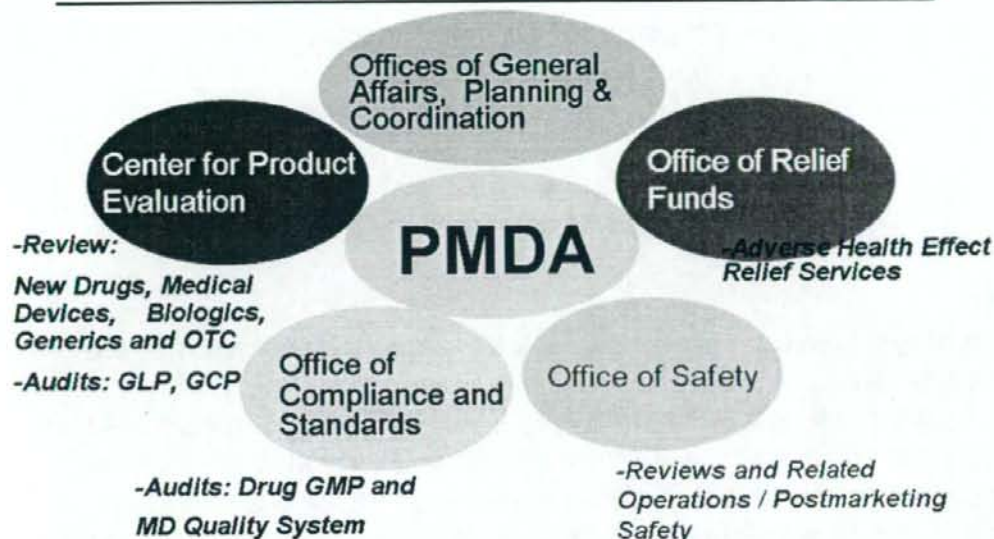
28



6. Establishment Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)

- Reviews and Related Operations
 - Approval reviews of pharmaceuticals and medical devices GMP/QMS audits to assess pharmaceutical and medical device facilities, processes, and quality management systems
 - Re-assessment and re-evaluation based on Pharmaceutical Affairs Law etc.
- Post-marketing Safety Operations
- Adverse Health Effect Relief Services

Organization of PMDA



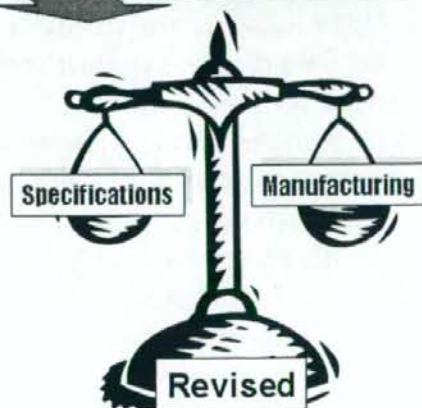
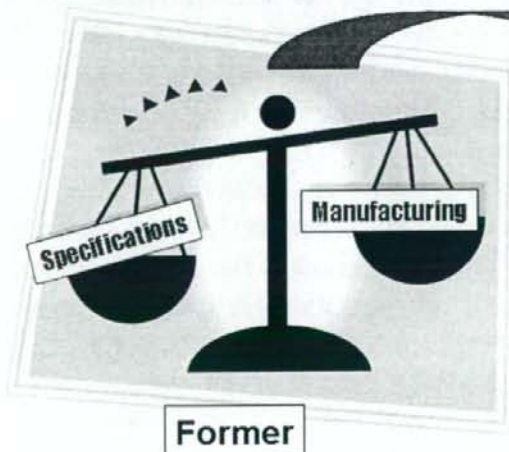
31

Balance between “Specification” and “Control of Manufacturing”

- Implementation of ICH-CTD (July, 2003)
- Revision of Pharmaceutical Affairs Law (April, 2005)

ICH Q8, Q9&Q10

Help us to implement rPAL



新規医薬品の品質基準の評価、特性、品質解析等に関する研究
・抗血管新生治療法の現状と展望・
・RNA interference を用いた医薬品開発の現状と展望・

分担研究者 早川 堯夫 (近畿大学薬学部総合研究所 所長)
協力研究者 櫻井 文教 (独立行政法人医薬基盤研究所)

研究要旨

抗血管新生療法とは血管新生を阻害することにより主に腫瘍に対してその成長および転移を抑制する治療法である。

その主な戦略の一つは腫瘍血管の機能を改善し、化学療法剤の腫瘍細胞に対するデリバリーを改善させるというものである。このような戦略を用いた抗血管新生療法はこれまでの化学療法と違って一般的に細胞傷害性が低く、化学療法と組み合わせると有用であることが示されている。これまでに、数多くの血管新生阻害剤が発見あるいは開発されている。その代表例は抗 VEGF ヒト型抗体でありペバシズマブである。ペバシズマブは化学療法剤と組み合わせた臨床試験において結腸直腸癌患者における生存を延長することが示されたことから、FDAにより最初に認可された。また、ペバシズマブは他の腫瘍患者においても治療効果が示されている。その他にも抗 VEGF 作用とは異なるアプローチを用いた抗血管新生治療薬の候補が臨床試験されており、治療効果が示されているものもある。

もう一つの戦略は血管新生に関与する分子を標的とした低分子化合物の治療薬を用いるというものである。例えば VEGFR チロシンキナーゼおよび EGFR チロシンキナーゼに対する分子標的薬剤はその典型的な例である。これら分子標的薬剤のなかには非臨床試験では有効性を示すことができたが、臨床試験において重篤な有害事象の発現と有効性を示すことができなかったことから開発が中止されたものも多い。一方、数は少ないが承認まで至った薬剤もある。VEGFR ファミリーおよび PDGFR ファミリーのチロシンキナーゼを標的とする Sorafenib は進行性腎癌の患者に対して承認された。PDGFR、VEGFR2 を含む多くのチロシンキナーゼ受容体を標的とする Sunitinib は Imatinib mesylate に耐性の胃腸間質腫瘍の患者に対して承認されている。EGFR チロシンキナーゼを標的とする Gefitinib は進行性非小細胞肺癌の患者に対して承認されている。HER1/EGFR チロシンキナーゼを標的とした Erlotinib は少なくとも過去に 1 回化学療法レジメンが失敗した後の局所進行性あるいは転移性非小細胞癌の患者に対して承認された。接着因子の発現および VEGF の分泌を阻害する Lenalidomide は過去に 1 回治療を受けた多発性骨髄腫の患者に対して Dexamethasone との組み合わせで承認された。これら薬剤は単剤あるいは化学療法等作用機構が異なる薬剤との組み合わせで他の疾患に対する臨床試験が行われている。その他にも承認には至っていないが臨床試験において良好な結果が得られている分子標的薬剤もある。

RNA interference (RNAi) は mRNA の発現を選択的にサイレンシングする機構として生物学における遺伝子抑制に革命をもたらした。ヒトゲノムが完全に同定されその配列が決定されたことにより RNAi を用いると理論的にはどのような疾患の標的に対しても新規な薬剤を迅速に開発

することが可能になった。RNAiの誘導に必要な二重鎖の short interfering RNA (siRNA)は化学合成が可能のため、可逆的に *in vivo* における遺伝子発現を強力にサイレンシングできるため治療薬として適している。現在、比較的単純な生理食塩水で処方した siRNA からリポソーム、ポリマー、コンジュゲート及びコンプレックスのデリバリーで成功例が報告されている。さらに、各種ウイルスベクターを用いた short hairpin RNA (shRNA)などのデリバリー技術も開発されるなど、siRNAを用いた薬剤の開発が急速に進歩しており、現在5件の臨床試験が進められている。今後その数は急速に増加するものと見込まれている。

A. 研究目的

1 抗血管新生治療法の現状と展望

腫瘍が新しい血管の成長を誘導するということはよく知られている事実である。30年前、Judah Folkmanは腫瘍の増殖は血管新生のプロセスに依存していることを示した。腫瘍においてその直径が数ミリ以上の大きさに達して進行するには血液を介した酸素および栄養物の供給が必要であるが、両者の距離が離れているとその供給は困難である。そこで、腫瘍の成長および進行には新しい血管の供給が必要であり、新しい血管新生のブロックにより腫瘍の成長を抑制できることを彼は提唱した。現在この概念は多くの研究により支持されている。その数年後、Gullinoは前癌状態の組織における細胞は血管新生能を獲得して癌になることを示し、血管新生の阻害は癌の抑制に用いることができることを提唱した。

過去30年で、一般的な血管新生、特に腫瘍の血管新生に対する我々の理解は急激に広がっており、ついに進行性の結腸直腸癌の治療に対し最初の抗血管新生治療薬としてベバシズマブが承認され、様々な抗血管新生治療薬を用いた60以上もの臨床試験が行われている。

広く受け入れられている抗血管新生の作用機構は、これら薬剤が新しい血管の形成を阻害することにより腫瘍の成長と転移を抑制するというものである。残念ながら、無作為臨床試験からの結果によると、最近利用が可能な抗血管新生薬剤を単独で用いると中程度の客観的な奏効しか示せず、長期間にわたる生存率を延

長できないことが示された。しかし、化学療法剤と組み合わせると、VEGFに対する抗体であるペバシズマブは転移性の結腸直腸癌の患者において、生存期間を前例のない5ヶ月増加させた。これらのデータは抗血管新生治療と細胞傷害治療の組み合わせにより腫瘍における両方の成分である癌細胞と内皮細胞が破壊されることにより最大の治療効果が得られると仮定したTeicherの初期の予測を支持する。

しかし血管新生治療薬により腫瘍の血管が破壊されれば、化学療法剤および酸素の腫瘍へのデリバリーは傷つけられる。その結果、細胞傷害性が低下し、放射線に対して抵抗性になる。したがって上記の知見はこの説と矛盾しているように思われる。しかし、現在提唱されている血管を正常にするという新たな概念によりこの矛盾が解決する可能性がある。この仮説は、抗血管新生治療薬の妥当な適用は腫瘍血管の機能を改善し、酸素および薬の腫瘍細胞に対するデリバリーを改善するというものである。現在この新しい仮説に基づく抗血管新生治療薬の開発が精力的に行われておりその一部は認可されている。

もう一種類の抗血管新生治療薬は血管新生を主に標的とした低分子化合物の抗癌治療薬である。これら分子標的の特異的な治療は治療上の有効性を最適化できる可能性があるが、正常細胞に対する毒性は最小限にする必要がある。腫瘍における理想的な分子標的は腫瘍と非腫瘍細胞で発現が異なるかあるいは機能が異なる分子である。さらに、分子レベルにおける疫

学によりそのような標的は予後の悪い疾患の結果の有力な予測因子となることが明らかになった。チロシンキナーゼはそのような標的の典型的な例である。チロシンキナーゼの活性化は正常細胞では厳密に制御されているが、腫瘍細胞ではその制御の崩壊により過剰にシグナルが発現しその結果腫瘍が進行する。そのなかで代表的なものが EGFR および VEGFR を介したシグナル伝達である。

EGFR、HER ファミリーのチロシンキナーゼは 4 種類のメンバーすなわち EGFR (HER1 および ERBB1)、HER2/neu (ERBB2)、HER3 (ERBB3) そして HER4 (ERBB4) から成り立っている。EGFR ファミリーのチロシンキナーゼはキナーゼ活性を有しており、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、多機能細胞質尾部を有している。尾部には ATP 結合部位とチロシンキナーゼ活性があり他のタンパク質だけでなく自己もリン酸化できる。

EGFR チロシンキナーゼは多くの腫瘍で変化している。腫瘍における過剰な EGFR シグナルが、EGFR の過剰発現およびその受容体のリガンドの過剰産生および利用の結果として起こる。例えば、神経膠腫、上気道消化管、肺、結腸、膵臓、胸、卵巣、膀胱、腎臓を含む各種ヒトの癌で EGFR mRNA およびタンパク質が過剰発現している。この過剰発現は EGFR 遺伝子の増幅が原因の場合があり、受容体のリガンドである TGF- α 、Amphiregulin の過剰発現と関連している場合も多い。他の異常な EGFR シグナルの機構には、ERBB2 (HER2) のような他の ERBBR とヘテロダイマー形成、異種のシグナルネットワークによるトランス活性化、受容体シグナルの調節機構の欠損および活性変異がある。過剰なシグナルの結果、増殖、血管新生、浸潤/転移の促進およびアポトーシスの阻害などにより腫瘍が進行する。腫瘍における EGFR 変異体の発現は病勢の進行、生存の不良、治療に対する反応の不良、細胞傷

害性薬剤に対する抵抗性の獲得と関連する。

血管新生増殖因子である VEGF ファミリーには VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PlGF-1 および PlGF-2 と呼ばれる 6 種類の分泌糖タンパク質が含まれる。腫瘍細胞により分泌される血管透過性因子として最初に同定された VEGF-A は血管系の発達の最も重要な調節因子であり多様なヒト固形腫瘍で通常過剰発現している。VEGF のリガンドは 3 種類の細胞膜受容体に対する特異的な結合を介して作用する。それには内皮細胞で最初に同定されその後成人の各種造血細胞でも発現することが明らかになった VEGFR-1 (Flt-1)、VEGFR-2 (Flk/KDR) および VEGFR-3 (Flt-4) が含まれる。これら受容体は、特異的な VEGF リガンドと結合する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、チロシンキナーゼを含む細胞内領域から構成される。さらに、NRP-1 および NRP-2 が VEGF ファミリーメンバーの特異的なアイソフォームの共受容体であり、個々の受容体に対するこれらリガンドの結合親和性を増加させる。リガンド受容体の相互作用により VEGFR のチロシンキナーゼドメインの活性化が誘導され、細胞内シグナル伝達経路の活性化が起きる。その経路には Raf/MEK/ERK および PI3K/Akt 経路が含まれる。VEGFR-1 は生理的な発達段階の強力な促進調節因子であり、内皮細胞の遊走および分化に重要であると考えられている

VEGFR-2 は血管の透過性、内皮細胞の増殖、浸潤、遊走、生存等 VEGF-A 下流を介した作用の多くを仲介する。VEGFR-3 はリンパ管形成に関与し、その発現は局所的なリンパ結節に対する腫瘍細胞の播種と関連している。最近、VEGFR-1 がヒト結腸直腸癌に存在し機能を果たしていること、VEGF ファミリーリガンドによる活性化は腫瘍の進行および転移に関与する過程を活性化することも示された。VEGF および VEGFR はその他にも肝細胞癌、

乳癌、子宮内膜癌および急性白血病でも過剰発現する。また、VEGF の発現は結腸直腸癌、乳癌、小細胞および非小細胞肺癌の患者におけるネガティブな予後因子でもある。

以上の知見からVEGFおよびEGFを介したシグナル、特にVEGFRおよびEGFRを分子標的とした薬剤の開発が進んでおり、既に認可されたものもある。

2 RNAiを用いた医薬品開発の現状と展望

RNAiの現象は1998年線虫(*C. elegans*)において遺伝子のノックダウンの誘導に必要な二重鎖のshort interfering RNA (siRNA)の構造及びデリバリーの発見が始まりとなった。その後、哺乳細胞においてRNAiを引き起こすのに必要なsiRNAの構造が示され、その構造は個々の3'末端にオーバーハングを持つ19個と21個のヌクレオチドから構成されることが明らかとなった。これにより研究目的あるいは治療目的で既知の配列を有する事実上どの遺伝子でも効果的に抑制することが可能となった。一番の特徴は簡単に遺伝子発現を抑制することができることである。理論的には以下に示すように標的mRNAに対して完全に相補的な短い二重鎖RNA(dsRNA)を外から導入するか細胞内で発現させるだけで十分抑制できる。RNAiはsiRNAを直接細胞に添加するかあるいはDNAをベースとしたプラスミドから転写され細胞質でDicer RNase IIIによりsiRNAに転換されるshort hairpin RNA(shRNA)により開始される。これらsiRNAのguide鎖はRNAiを引き起こす活性鎖として特定のmRNAと相補的に結合し両者がRNA-induced silencing complex(RISC)と呼ばれる複数のタンパク質複合体に取り込まれる。RISCの主要な成分であるArgonaute-2 protein(Ago-2)が特定の位置で標的mRNAを切断し、その後細胞内RNaseにより分解される。最終的に、これらの過程により特定の遺伝

子発現が非常に配列特異的にノックダウンされる。合成siRNAは製造工程がスケールアップに適していることから大量生産が可能であり、薬剤として適した性状を化学修飾により付与できる。その結果、siRNAは臨床において最も適したRNAi治療薬の候補となっており多くの非臨床試験で有効性が認められている。また、そのいくつかは臨床試験が行われている。一方、siRNAに代わるRNAi治療法としてウイルスをベースにしたベクターも非臨床試験では有効性が示されている。

B. 研究方法

1 抗血管新生治療法の現状と展望

これまで試みられてきた抗血管新生療法として、タンパク質、遺伝子治療、細胞治療、VEGFRおよびEGFRなどを分子標的とした低分子化合物を用いた各種の方法に関する現在の状況や今後の課題とともに、抗血管新生療法の戦略基盤となる病的血管新生のプロセスについての最近の知見について、参考文献を中心に調査および研究を行った。

2 RNAiを用いた医薬品開発の現状と展望

これまで試みられてきたRNAiを用いた治療薬の開発および今後の課題について、参考文献を中心に調査および研究を行った。

C. 研究結果

1 腫瘍の進行における血管新生の役割

成人において、正常におきる新血管形成は女性の生殖器官および創傷治癒に主に限定される。そうでない場合、成人における新血管形成は癌のような病的な状況になる。腫瘍の成長は最初の段階において正常血管の吸収により支持されるが、腫瘍血管が発達する前では腫瘍は休眠している。血管新生が起きるには、血管新生促進因子の効果が抗血管新生因子の効果を上回らなければならない。そのバランスが血

管新生促進に傾くと、新しい血管の発達を促進し、腫瘍の進行を確保させる血管新生スイッチと呼ばれるものを腫瘍が受ける。

一旦血管が発達すると、腫瘍は転移の表現系に向かって急速に増殖し進行する。最近のデータによると、腫瘍において新しく形成された血管系に取り込まれる循環内皮細胞および内皮前駆細胞および腫瘍細胞は、腫瘍細胞が利用する増殖因子、サイトカイン、ホルモンおよび浸潤の促進に関与するタンパク質分解活性を有する因子の供給源としても機能することが示唆されている。さらに、腫瘍の血管系においては、これら細胞が新生血管を介して血管内に入り、その後離れた毛細血管から定着した転移性病巣に対して遊出する際、転移性癌細胞播種のルートを提供する。血管新生が癌の進行において果たす重要で病理的な役割は、腫瘍内の微小血管密度、一定の領域における血管の数がある種の腫瘍型において予後因子となるだけでなく転移の発達とも相関することを示す研究から示されている。

2 腫瘍における血管新生の機構

腫瘍の血管形成は、少なくとも吸収、重積、発芽（血管新生）、脈管形成という四種類の機構により起こる。腫瘍細胞は既存の血管を吸収してその周りで増殖し、血管周囲にカフを形成する。しかし、重要な栄養物が限界以上に拡散するとカフは成長できず、腫瘍細胞の成長により生じる圧縮力により血管が崩壊する。あるいは、腫瘍により放出される増殖因子による既存の血管の肥大、間質組織柱の肥大した管腔における成長、管腔の分割といった一連のプロセスにより拡大した血管ネットワークが形成される。このような重積した微小血管の成長は腫瘍の成長、創傷治癒でも観察される。

血管形成のなかで最も広く研究されている分野は、恐らく血管新生の機構であろう。血管新生の間、既存の血管は正常細胞あるいは癌細

胞から遊離される増殖因子に反応して透過性が亢進し、基底膜および間質マトリックスの分解、周皮細胞の血管からの解離、内皮細胞の遊走および増殖による配置あるいは芽の形成が起き、管腔は芽の中で形成される。芽の集合および吻合により枝およびループが形成され、血流が形成される。これら未熟な血管は基底膜および周皮細胞に注ぎこまれる。このプロセスはカナリゼーションと呼ばれる。正常な生理学的な血管新生の間では、これら血管は成熟細動脈、毛細血管、小静脈に分化する。一方、これら血管は腫瘍において未熟のままである。最終的に、未発達血管叢が内皮前駆細胞から形成される際、胎児の発育中に脈管形成が起こる。骨髄あるいは末梢血から動員される循環内皮前駆細胞は腫瘍および他の組織における生後の脈管形成にも寄与する。しかし、最近のデータによると腫瘍の血管新生におけるこれら細胞の重要性および役割について疑問が投げかけられている。腫瘍の治療における最近の課題は腫瘍の形成に対する血管新生促進の四つの機構それぞれについて相対的な役割を明確に理解し、癌の抗血管新生治療を最適化することである。

3 腫瘍血管の構造と機能

腫瘍の成長と転移において血管が重要な役割を果たしているが、腫瘍血管系の構造および機能は異常である。その内皮内面は不完全であり、開窓および細胞間接合が喪失している。基底膜は不連続なものとして存在するかあるいは消失し、周囲の周皮細胞は欠如している。組織化された血管ネットワークの構造は消失している。血管ネットワークにおいてははっきりとした細動脈、小静脈、毛細血管が欠如しており、血管の間のつながりが不完全な場合がある。血管には拡張および収縮した領域があり、構造上、それらは曲がりくねって横に広がり不規則な形をしている。また異常な分岐およびブライ

ンド様の末端をしている。内皮細胞の配置は異常であり、一つの位置に広い隙間で分かれているか近くでお互い積み重ねられている。内皮細胞は共通の内皮マーカーに対する反応性が消失している。同様に、壁細胞のパターンおよび機能も異常である。腫瘍に関連した周皮細胞は異常なタンパク質発現と形態を示す。興味深いことに、異常な周皮細胞は内皮細胞と弱く結合しており、高い血管透過性の原因となっている。

このような血管の異常により、腫瘍の血流は一様でなく腫瘍の間質液圧は高くなる。高い間質液圧は腫瘍血管の透過性亢進の原因の一つともなる。通常、血管は血管内から外側へ液圧の勾配を維持することができるが、腫瘍ではこの勾配が消失して血管壁の外側と内側の圧力が同じになる。同様に、正常組織では、血管内の膠質浸透圧が外側に比べてはるかに高くなるが、腫瘍では血管の透過性亢進によりほとんど等しくなる。血管と腫瘍の間におけるこれら勾配圧力の欠損により、腫瘍に対する高分子量治療薬のデリバリーが損なわれる。腫瘍の血流が一様でないことにより、化学療法剤だけでなく酸素、栄養物を含む全ての血液により運ばれる分子のデリバリーは損なわれる。腫瘍血管の障害および先に述べた血管構造の異常により、腫瘍血管の透過性が亢進し腫瘍における血流が緩やかになる。その結果、低酸素とアシドーシスが起きる。低酸素は活性酸素種のアベイリビリティを減少させ、薬物および放射線療法に対する抵抗性が増加する。さらに、遺伝子の不安定性が誘導され、血管新生および転移に関与する遺伝子がアップレギュレートされる。さらに、腫瘍に侵入する免疫細胞の細胞傷害性効果が損なわれる。このようにして、病理的な腫瘍血管系により細胞傷害性治療および宿主の免疫細胞から腫瘍が防御される。

4 VEGF の腫瘍における発現

結腸直腸、肝細胞、肺、胸部、子宮内膜癌お

よび急性骨髄白血病を含む多くの癌で VEGF およびその受容体が過剰発現することがわかっているが、その意義については十分な理解がなされていない。VEGF の発現は結腸直腸癌、乳癌、小細胞および非小細胞肺癌の患者におけるネガティブな予後因子であることが示されている。他方、胃癌および子宮内膜腺癌の患者における研究では VEGF 発現と予後に相関はみつかっていない。

5 タンパク質、核酸、細胞を用いた血管新生阻害剤

5-1 抗 VEGF 抗体

Kim らはマウス神経芽種モデルにおける腫瘍の成長を抗 VEGF 中和抗体が完全に阻止することを初めて示した。マウスにおける腫瘍異種移植に対してモノクローナル抗体 (2C3) が抗腫瘍活性を有することが示された。2C3 は VEGFR1 ではなく VEGFR2 と VEGF の相互作用をブロックすることが示された。その後、2C3 の抗腫瘍活性がいくつかの腫瘍モデルにおける非臨床試験で広く示された。これらの研究から、齧歯類モデルに異種移植された多くのヒト腫瘍セルラインについて、2C3 がその腫瘍の増殖を抑制することが示された。なお、その抑制効果は投与ルートあるいは腫瘍の位置に関係なかった。アッセイした腫瘍型には横紋筋肉腫、グリア芽腫、平滑筋肉腫、結腸腺癌、肝芽腫、ウィルムス腫瘍、卵巣、前立腺、乳腺の癌が含まれる。一方、セルラインを用いた *in vitro* の研究では 2C3 は腫瘍細胞の増殖には影響を示さなかった。このことから腫瘍の抑制は血管新生の阻害を介していることが示唆された。また、肝臓に転移性の直腸癌のマウスモデルの評価において、2C3 は肝臓に転移した癌の数および大きさの両方を阻害することが示された。同様な転移抑制がその他にもいくつか報告されている。

5-2 VEGF-Trap

in vivo における半減期を延長しながら、高い親和性を維持するために要求される事柄を決定することにより、薬物学的な性質を顕著に高める非常に強い親和性の VEGF ブロッカーが作られた。VEGF-Trap (Aventis 社、Regeneron 社) は VEGFR1 の誘導体であり、VEGFR1 と VEGFR2 両方の細胞外ドメインを IgG の Fc フラグメントに融合したものである。したがって、ヒトにおける免疫原性の可能性は最小限に抑えられている。ペパシズマブのように、この分子は細胞表面受容体から VEGF を遮蔽するが、ペパシズマブよりも VEGF に対する親和性ははるかに高い。VEGF-Trap はその高い親和性と in vivo における長い半減期から、最も強力な効果的な VEGF ブロッカーの一つであり、マウスおよびヒト VEGF に対する親和性はピコモルである。VEGF-Trap の投与によりマウスメラノーマ、ヒト横紋筋肉腫およびラットグリオーマを含む様々な腫瘍セルラインの増殖および血管新生が顕著に阻害される。神経芽細胞腫の異種移植モデルにおいて、高投与量の VEGF-Trap で処理すると腫瘍の成長が阻害された。腫瘍にはほとんど血液が供給されておらず、非常にまれにしか糸球体が存在しない。実際、最も阻害された腫瘍では基本的に血管がなかった。この知見から VEGF-Trap による血管系の退行は選択的であることが示唆される。この腫瘍成長の阻害は同じ腫瘍の治療に効果的でもある VEGFR2 の中和抗体である DC101 よりも 10 倍低い投与量で得られた。

これら最初の知見は他の腫瘍系で VEGF-Trap の効果を研究している多くの報告で確かめられた。VEGF-Trap はマウス異種移植モデルで神経芽腫の阻害に効果的であり、その効果は VEGF のモノクローナル抗体における治療効果よりも大きかった。VEGF-Trap は既存の腫瘍血管系を縮小させる、定着した原発

性腫瘍と転移性腫瘍が完全に縮小した。

注目すべきことに、VEGF をブロックすると播種性の卵巣癌における血管の劇的な再構成、腹水の蓄積の阻止がおき、播種性の癌の増殖が抑制される。データの中には VEGF のブロックは血管新生の阻止により癌の進行を遅らせるだけでなく、腫瘍の退行も引き起こす可能性を示唆するものもある。VEGF-Trap は生着した異種移植における成熟した既存の血管系を消失させる。血管系の根絶に伴い肺の微小転移巣も含め腫瘍が顕著に退縮する。そのような結果により、VEGF の強力なブロックが転移性の微小残存癌病変だけでなく巨大な癌の患者の治療に効果的であることも示唆された。

5-3 可溶性 VEGF およびアンジオポエチン-1 受容体

先に述べた VEGF-Trap と基本的に同様な戦略が他にも行われている。EGFR2、Tie-2 の細胞外領域をラット皮膚の腫瘍ウインドーチャンバーに投与すると腫瘍細胞のコンディショニング培地により誘導される角膜の血管新生が強く抑制され、乳腺腫瘍の増殖および血管新生が減少した。なお、EGFR2 の細胞外領域は in vitro において高い親和性で VEGF に結合し、濃度依存的に受容体の活性化をブロックし、VEGF による増殖と遊走の誘導を阻害した。可溶性 VEGFR1 をコードするアデノウイルスベクターを導入した癌細胞を免疫不全マウスに移植すると、腫瘍の増殖は有意に抑制された。また、微小血管密度も有意に低かった。さらに、VEGFR1 の全細胞ドメインを発現するアデノウイルスを骨格筋に注射後感染肺癌細胞を皮下注射すると、可溶性受容体が循環血液に検出された。これに伴い、腫瘍の増殖が停止し、その後腫瘍の大きさが低下した。組織学的な観察によると、腫瘍内血管新生は顕著に抑制され、アポトーシスが促進された。これらの結果は遠く離れた器官における可溶性 VEGFR 受容体

のアデノウイルスを介した過剰発現は、癌の治療において効果的な戦略になる可能性が高いことを示唆している。なお、本戦略における欠点はこれらタンパク質の半減期が短いことである。

5-4 VEGFR 抗体

VEGFR1を標的とするMF-1および6.12の両方の抗体はあらかじめ生着した異種移植リンパ腫の増殖を抑制する。bFGFあるいはVEGFに富むマトリゲルプラグあるいはアルギニンに封入された腫瘍細胞を移植したマウスにおいて、VEGFR2に特異的な抗体(DC101)は血管新生を減少させた。また、マウスにマトリゲルを埋め込んだ後DC101で処置し、その後除去した腫瘍には血の気がないことから、血管新生および血管の透過性が低下していることが示された。その他様々な腫瘍細胞を移植したマウスモデルにおいてDC101は腫瘍の増殖を阻害することが示された。また、抗VEGFR1と抗VEGFR2抗体(6.12およびDC101)を組み合わせると単独と比較して異種移植した腫瘍の増殖が大きく阻害された。この結果は二つのVEGFRにより開始される固有の血管新生促進シグナルがあることを示唆している。

ヒト化抗VEGFR2 IMC-1C11(イムクロン社)は内皮細胞表面のVEGFR2細胞外ドメインに特異的に結合し、VEGFとの相互作用をブロックし、細胞内チロシンキナーゼ系のVEGFによる活性化を阻止する。IMC-1C11は*in vitro*においてVEGFにより促進されるヒト内皮細胞の増殖およびVEGFR2陽性の白血球細胞の遊走を阻害する。*In vivo*で投与した場合、これらの抗体はVEGFR2陽性ヒト白血球細胞を接種したNOD-SCIDマウスの生存率を有意に延長した。IMC-1121Bは第二世代の医薬品として作成されたVEGFR2を標的とする完全ヒトモノクローナル抗体であり、

VEGFR2に高親和性で結合してVEGFとの相互作用を効果的にブロックする。IMC-1121BはVEGFにより促進されるVEGFRの活性化、内皮細胞の遊走および増殖も抑制する。

VEGFR2に特異的なIMC-1121BおよびEGFR3に特異的なhF4-3C5の変換領域遺伝子を用いて二重特異性抗体、diabodyが最近構築されている。diabodyはVEGFR2およびVEGFR3両方に対して濃度依存的に結合し、これら受容体とVEGFの相互作用をブロックする。*In vitro*のアッセイにおいて、diabodyはVEGFにより促進される内皮細胞の遊走、内皮細胞の受容体とp42/p44マップキナーゼの活性化を中和した。これらの結果から、VEGFR2とVEGFR3両方の二重ブロックが効果的な癌治療のより有力なアプローチとなることが示唆される。

5-5 毒素をVEGFあるいはその受容体に結合したキメラ分子

毒素をVEGFあるいはその受容体に結合したキメラ分子の開発に取り組む試みがいくつかなされている。標的毒素は組換え法によりVEGF165あるいはVEGF121をジフテリア毒素に融合することにより開発され、血管平滑筋細胞および増殖している内皮細胞に対して極めて強い毒性を示すことが明らかになっている。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。毒素グ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。

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。

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。

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。

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ボ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、 $\alpha\beta_3$

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。

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、cI-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ム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、転写プロファイリ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。カチオニック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が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ピカン-1および-2が含まれる。

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 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 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ボ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。

5-12 ツムカスタチン

ツムカスタチンは 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インの血漿レベルが低く腫瘍の成長速度が増加する。ツムカスタチンは $\alpha v\beta_3$ 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。

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。

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 の増加が多くの変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、 $\alpha_3\beta_1$ 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。

抗血管新生活性に關与する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の抗増殖活性に關与している新規の低分子量の血管新生阻害剤である。

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因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の活性発現に必要なかもしれない。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。

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