

## Feasibility of $^{19}\text{F}$ -NMR for Assessing the Molecular Mobility of Flufenamic Acid in Solid Dispersions

Yukio Aso,\* Sumie YOSHIOKA, Tamaki MIYAZAKI, and Toru KAWANISHI

National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan.  
Received September 9, 2008; accepted October 22, 2008; published online October 23, 2008

The purpose of the present study was to clarify the feasibility of  $^{19}\text{F}$ -NMR for assessing the molecular mobility of flufenamic acid (FLF) in solid dispersions. Amorphous solid dispersions of FLF containing poly(vinylpyrrolidone) (PVP) or hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) were prepared by melting and rapid cooling. Spin-lattice relaxation times ( $T_1$  and  $T_{1\rho}$ ) of FLF fluorine atoms in the solid dispersions were determined at various temperatures ( $-20$  to  $150^\circ\text{C}$ ). Correlation time ( $\tau_c$ ), which is a measure of rotational molecular mobility, was calculated from the observed  $T_1$  or  $T_{1\rho}$  value and that of the  $T_1$  or  $T_{1\rho}$  minimum, assuming that the relaxation mechanism of spin-lattice relaxation of FLF fluorine atoms does not change with temperature. The  $\tau_c$  value for solid dispersions containing 20% PVP was 2–3 times longer than that for solid dispersions containing 20% HPMC at  $50^\circ\text{C}$ , indicating that the molecular mobility of FLF in solid dispersions containing 20% PVP was lower than that in solid dispersions containing 20% HPMC. The amount of amorphous FLF remaining in the solid dispersions stored at  $60^\circ\text{C}$  was successfully estimated by analyzing the solid echo signals of FLF fluorine atoms, and it was possible to follow the overall crystallization of amorphous FLF in the solid dispersions. The solid dispersion containing 20% PVP was more stable than that containing 20% HPMC. The difference in stability between solid dispersions containing PVP and HPMC is considered due to the difference in molecular mobility as determined by  $\tau_c$ . The molecular mobility determined by  $^{19}\text{F}$ -NMR seems to be a useful measure for assessing the stability of drugs containing fluorine atoms in amorphous solid dispersions.

**Key words**  $^{19}\text{F}$ -NMR; molecular mobility; stability; crystallization; solid dispersion

Amorphous solid dispersions are used for improving the dissolution rate and solubility of poorly soluble drugs. However, drugs in amorphous form are generally less stable than crystalline drugs because of their higher energy state and higher molecular mobility. It is well known that polymeric excipients can reduce the crystallization rate of many amorphous drugs.<sup>1–12</sup> This stabilization by poly(vinylpyrrolidone) (PVP) is partly attributable to its ability to decrease molecular mobility, as indicated by increases in the glass transition temperature ( $T_g$ ).<sup>9</sup> Therefore, it is of great interest to estimate the molecular mobility of drugs in solid dispersions. Although  $^{13}\text{C}$ -NMR relaxation measurements are useful for assessing the molecular mobility of drugs in solid dispersions,<sup>13</sup> the low sensitivity of  $^{13}\text{C}$  because of its low natural abundance is a drawback of  $^{13}\text{C}$ -NMR. In contrast to  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  has very favorable sensitivity in NMR experiments, since it is present in 100% natural abundance, is second only to the proton in its resonance frequency (except  $^1\text{H}$ ) and has a spin quantum number of 1/2. The receptivity for  $^{19}\text{F}$  is 83% of that for  $^1\text{H}$  and 4700 times of that for  $^{13}\text{C}$ .<sup>14</sup> Many drugs containing fluorine atoms are listed in The Japanese Pharmacopoeia. In contrast, almost all pharmaceutical excipients do not contain fluorine atoms.  $^{19}\text{F}$ -NMR may therefore have an advantage over  $^{13}\text{C}$ -NMR or  $^1\text{H}$ -NMR for selectivity and sensitivity when assessing the molecular mobility of drugs containing fluorine atoms in pharmaceutical dosage forms such as solid dispersions.

The orientations and molecular mobility of flufenamic acid (FLF)<sup>15</sup> and  $^{19}\text{F}$ -labeled  $\alpha$ -tocopherol<sup>16</sup> in a lipid bilayer were studied using  $^{19}\text{F}$ -NMR. Structures and molecular mobility of  $^{19}\text{F}$ -labeled peptides and proteins in biological membranes were also investigated.<sup>17–20</sup> To the authors' knowledge, application of  $^{19}\text{F}$ -NMR to studies of drug molecular mobility in solid dispersions has not been reported.

This paper describes the feasibility of  $^{19}\text{F}$ -NMR for assessing the molecular mobility of FLF in PVP or hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) solid dispersions, and discusses the effect of polymer excipients on the crystallization tendency of FLF in solid dispersions in terms of differences in molecular mobility.

### Experimental

**Materials** FLF (Fig. 1) was purchased from Wako Pure Chemical Industry (Osaka), and PVP and HPMC were from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). FLF solid dispersions with PVP or HPMC were prepared by melting and cooling of mixtures of FLF with PVP or HPMC. The solid dispersions obtained were confirmed to be amorphous from microscopic observation under polarized light.

**Nuclear Magnetic Relaxation Measurements**  $^{19}\text{F}$ -NMR measurements were carried out using a model JNM-MU25 pulsed NMR spectrometer (JEOL DATUM, Tokyo) operating at a resonance frequency of 25 MHz. Time profiles of spin-spin relaxation of the  $^{19}\text{F}$  atoms of FLF were measured using the "solid echo" pulse sequence to overcome the dead time of the instrument. Spin-lattice relaxation time in the laboratory frame ( $T_1$ ) was measured using the inversion recovery pulse sequence. Spin-lattice relaxation time in the rotating frame ( $T_{1\rho}$ ) was measured at spin locking intensity of 10 G.

**DSC Measurements**  $T_g$  of FLF-PVP and FLF-HPMC solid dispersions was measured by DSC using a model 2920 differential scanning calorimeter and a refrigerator cooling system (TA Instruments, Newcastle, DE, U.S.A.). Approximately 5 mg of each solid dispersions was put into an aluminum sample pan and then sealed hermetically.  $T_g$  was measured at a heating rate of  $20^\circ\text{C}/\text{min}$ . Temperature calibration of the instrument was carried out using indium.

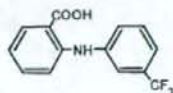


Fig. 1. Structure of FLF

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: aso@nihs.go.jp

## Results and Discussion

**Molecular Mobility of FLF as Measured by  $^{19}\text{F}$ -NMR Spin-Lattice Relaxation Time  $T_1$  and  $T_{1\rho}$**  of fluorine atoms of FLF in PVP and HPMC solid dispersions were measured using a pulsed NMR spectrometer in the temperature range from  $-20$  to  $150^\circ\text{C}$ .  $T_1$  is sensitive to the molecular motion on the time scale of the resonance frequency (MHz order). On the other hand,  $T_{1\rho}$  is sensitive to the molecular motion with a frequency equivalent to the intensity of spin locking field (typically mid kHz order).<sup>21</sup> The temperature dependence of  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  exhibits minimum at a specific temperature at which the molecules of interest have molecular motion with MHz time scale or mid kHz time scale predominantly. The resonance frequency of 25 MHz, lower than that of a conventional high resolution NMR spectrometer, was used to observe  $T_1$  minimum in the temperature range studied. Figure 2 shows the temperature dependence of  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  of FLF fluorine atoms in PVP and HPMC solid dispersions. For FLF-PVP solid dispersions (7:3), the minimum of  $T_1$  or  $T_{1\rho}$  was observed at about  $90^\circ\text{C}$  and  $60^\circ\text{C}$ , respectively (Fig. 2A). When the PVP content decreased to 20% (w/w),  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  of FLF at temperatures above  $70^\circ\text{C}$  could not be determined due to rapid crystallization. Similar temperature dependence of  $T_1$  or  $T_{1\rho}$  was observed for the FLF-HPMC solid dispersions (Fig. 2B). The temperature difference between  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  minimum is considered to be due to the difference in the time scale of molecular motion reflected on  $T_1$  (MHz order) and  $T_{1\rho}$  (mid kHz order). Since the molecular motion on MHz time scale becomes predominant at higher temperature than molecular motion on mid kHz time scale,  $T_1$  minimum is observed at higher tempera-

ture than  $T_{1\rho}$  minimum.

We made following assumptions in order to estimate the molecular mobility of FLF from  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  of FLF fluorine atoms: first, we assumed that FLF fluorine atoms in the solid dispersions relaxes mainly via dipolar interaction, and that the contribution of the spin-rotation interaction mechanism<sup>21</sup> is negligible. While relaxation via the spin-rotation interaction mechanism has been reported for liquid sample,<sup>22-24</sup> complete domination of dipolar interactions has been reported for fluorine atoms for polycrystalline van der Waals molecular solid.<sup>25</sup> We also made an assumption that the contribution of the cross-relaxation between fluorine and proton atoms can be considered small. It is known that relaxation is not intrinsically single-exponential when cross-relaxation between fluorine and proton atoms takes place.<sup>14</sup> However, we assumed small contribution of the cross-relaxation, because the relaxation of FLF fluorine atoms in the solid dispersions was exponential within experimental uncertainty. In studies of molecular motions, a large number of models describing molecular motions have been proposed for calculation of the spectrum density function.<sup>26</sup> We used a simple model that the molecular motion reflected on  $T_1$  or  $T_{1\rho}$  is represented by single correlation time for the purpose of comparing the mobility of FLF in the PVP and HPMC solid dispersions. According to the above assumptions,  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  are described by Eqs. 1 and 2.<sup>21</sup>

$$\frac{1}{T_1} = \frac{6}{20} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left\{ \frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega_1^2 \tau_c^2} \right\} \quad (1)$$

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{3}{20} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left\{ \frac{3\tau_c}{1 + 4\omega_1^2 \tau_c^2} + \frac{5\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega_2^2 \tau_c^2} \right\} \quad (2)$$

where  $\tau_c$  is the correlation time that characterizes molecular reorientations, and  $\omega_0$  and  $\omega_1$  are the resonance frequencies of fluorine atoms in the static magnetic field and spin locking field, respectively.  $\gamma$ ,  $r$  and  $\hbar$  are the gyromagnetic ratio of fluorine, the distance of neighboring fluorine atoms, and the Planck constant divided by  $2\pi$ , respectively. Equations 1 and 2 infer that  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  become minimal when  $\omega_0 \tau_c$  is approximately 0.62<sup>27</sup> and  $\omega_1 \tau_c$  is approximately 0.52,<sup>21</sup> respectively. When the minimum of  $T_1$  or  $T_{1\rho}$  is observed, we can calculate the unknown value,  $r$ , in Eqs. 1 and 2. If  $r$  is known, the  $\tau_c$  value can be calculated from the observed  $T_1$  or  $T_{1\rho}$  value, assuming that  $r$  does not change with temperature.

The values of  $r$  calculated from the  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  minimum observed for the FLF-PVP solid dispersion (7:3) were 2.3 and 2.4 Å, respectively, and similar  $r$  values were obtained for the FLF-HPMC solid dispersion (7:3). These values are comparable to the reported value (2.174 Å) for 3-(trifluoromethyl)phenanthrene,<sup>25</sup> indicating that dipole interaction between neighboring fluorine atoms can be considered the predominant relaxation mechanism of FLF fluorine atoms in the solid dispersions. The difference between the  $r$  values obtained in this work and the reported value suggests that the possibility of the spin-rotation interaction mechanism and/or dipole interaction between fluorine and proton atoms cannot be excluded as a relaxation mechanism of FLF fluorine atoms.

Figure 3 shows the temperature dependence of  $\tau_c$  calculated from  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  for FLF fluorine atoms in the solid dis-

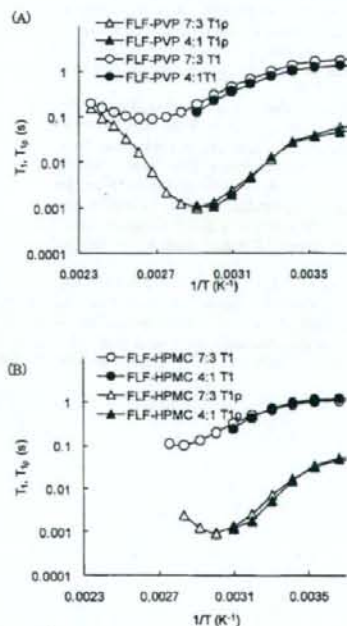


Fig. 2. Temperature Dependence of  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  of FLF Fluorine Atoms in PVP (A) and HPMC (B) Solid Dispersions

persions. The  $\tau_c$  of FLF fluorine atoms in PVP solid dispersions calculated from  $T_{1p}$  was  $8.2 \mu\text{s}$  at  $50^\circ\text{C}$ , which was about 3 times larger than that in HPMC solid dispersions ( $2.6 \mu\text{s}$ ), indicating that the molecular mobility of FLF was lowered more strongly by PVP than by HPMC.

The  $\tau_c$  values calculated using  $T_1$  values differ from those calculated from  $T_{1p}$  values. The slope of temperature dependence of  $\tau_c$  changed around  $T_g$ . These findings suggest that the assumption that the molecular motion reflected on  $T_1$  and  $T_{1p}$  is represented by a single  $\tau_c$  may be too simple to describe the molecular motion of FLF in the solid dispersions at temperatures studied, and that two or more molecular motions, such as rotation of trifluoromethyl group and motions with larger scales than rotation of trifluoromethyl group, may be reflected on  $T_1$  and  $T_{1p}$ . Further studies including  $^1\text{H-NMR}$  relaxation measurement and dielectric relaxation measurements will be needed to identify the detailed molecular motion of FLF in the solid dispersions.

**Correlation between Crystallization Tendency and Molecular Mobility of FLF in Solid Dispersions** Crystallization proceeds via formation of crystal nuclei and crystal growth. As a measure of the crystallization tendency of amorphous FLF in solid dispersions, the overall crystallization rate of amorphous FLF in the solid dispersions was estimated from the time profiles amorphous FLF remaining in the solid dispersions instead of measuring the nucleation rate and growth rate. Amorphous FLF remaining in the solid dispersions was estimated by analyzing solid echo signals of FLF fluorine atoms. Figure 4 shows the solid echo signal of

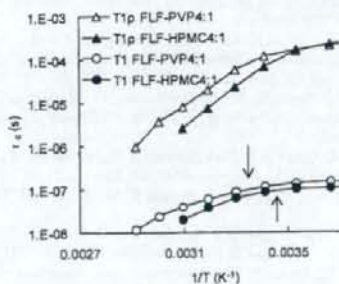


Fig. 3. Temperature Dependence of  $\tau_c$  of FLF Fluorine Atoms in PVP and HPMC Solid Dispersions

Arrows in the figure represent  $T_g$ .

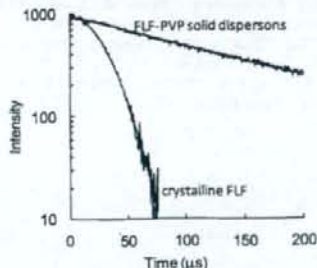


Fig. 4. Typical Solid Echo Signal of Fluorine Atoms of FLF in the Freshly Prepared Solid Dispersion Containing 20% (w/w) PVP and That of Fluorine Atoms of Crystalline FLF

fluorine atoms of FLF in solid dispersions containing 20% (w/w) PVP and that of fluorine atoms of crystalline FLF. The signal for the solid dispersions was describable by the Lorentzian relaxation equation (Eq. 3), and its relaxation time ( $T_{2L}$ ) was approximately  $140 \mu\text{s}$ . Crystalline FLF exhibited Gaussian relaxation signals (Eq. 4), and its relaxation time ( $T_{2G}$ ) was approximately  $30 \mu\text{s}$ . These results indicate that amorphous FLF in solid dispersions is considered to exhibit Lorentzian relaxation signals.

$$I = I_0 \exp(-t/T_{2L}) \quad (3)$$

$$I = I_0 \exp(-t^2/2T_{2G}^2) \quad (4)$$

where  $I_0$  and  $I$  represent the signal intensities at time 0 and  $t$ , respectively. Figure 5 shows solid echo signals for the fluorine atoms of FLF in the solid dispersions stored at  $60^\circ\text{C}$ . Samples stored at  $60^\circ\text{C}$  exhibited biphasic decay signals, and signals were describable by summation of the Gaussian (solid line) and Lorentzian (dashed line) equations (Eq. 5).

$$I = I_0 \{ P_L \exp(-t/T_{2L}) + P_G \exp(-t^2/2T_{2G}^2) \} \quad (5)$$

where  $P_L$  and  $P_G$  are the ratio of fluorine atoms exhibiting Lorentzian and Gaussian relaxation process, respectively, and  $P_L + P_G = 1$ . Assuming that the  $T_{2L}$  and  $T_{2G}$  values are  $140$  and  $30 \mu\text{s}$ , respectively,  $P_L$  values of FLF in the solid dispersions were estimated by curve fitting.  $P_L$  values of the solid dispersions decreased with increasing storage time, indicating that crystallization of amorphous FLF in solid dispersions takes place during storage at  $60^\circ\text{C}$ . To certify the reliability of the  $P_L$  values obtained by  $^{19}\text{F-NMR}$  measurements, change in the heat capacity at  $T_g$  ( $\Delta C_p(T_g)$ ) was determined for the solid dispersions stored at  $60^\circ\text{C}$  for various periods as a measure of amorphous FLF remaining, and was compared with the value of  $P_L$ . As shown in Fig. 6, the  $P_L$  value was proportional to the  $\Delta C_p(T_g)$  value, and was considered to be a useful measure of amorphous FLF remaining in the solid dispersions.

Figure 7 shows the time profiles of the  $P_L$  values for FLF solid dispersions containing 20% (w/w) PVP or HPMC at  $60^\circ\text{C}$ . The decrease in the ratio of Lorentzian fluorine atoms was faster for HPMC solid dispersions than for PVP solid dispersions, indicating that the overall crystallization rate of FLF in HPMC solid dispersions is larger than that in PVP solid dispersions. The overall crystallization rate depends on both molecular mobility (the rate of diffusion across the interface between crystalline and amorphous phase) and ther-

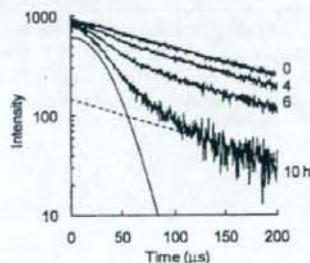


Fig. 5. Typical Solid Echo Signals of Fluorine Atoms of FLF in the Solid Dispersions Containing 20% (w/w) PVP Stored at  $60^\circ\text{C}$

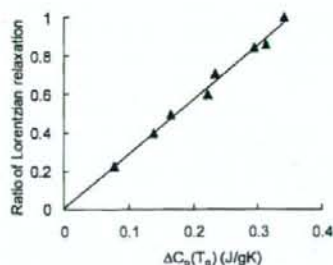


Fig. 6. The Ratio of FLF Fluorine Atoms Exhibiting Lorentzian Relaxation as a Function of Changes in the Heat Capacity at  $T_g$ .

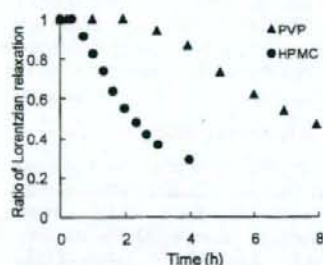


Fig. 7. Time Profiles of the Ratio of FLF Fluorine Atoms Exhibiting Lorentzian Relaxation in PVP and HPMC Solid Dispersions Stored at 60 °C

modynamic factors, such as free energy difference between crystalline and amorphous form.<sup>2,3,10</sup> Differences in the overall crystallization rate of amorphous FLF are consistent with those in the molecular mobility (Fig. 3), suggesting that the molecular mobility as determined by the  $^{19}\text{F}$ -NMR spin-lattice relaxation times may be one of the factors determining crystallization rate, and useful as a measure of the physical stability of FLF in solid dispersions. The  $T_g$  values of the solid dispersions containing 20% PVP and 20% HPMC were 23 °C and 15 °C, respectively, indicating that molecular mobility reflected on  $T_g$  is higher for the solid dispersion containing HPMC than for that containing PVP. The  $T_g$  data seem to support the speculation obtained from NMR data. However, the scale of molecular mobility reflected on  $T_g$  is considered to be larger than that reflected on  $\tau_c$ . Further studies should be conducted to elucidate the quantitative correlation between the physical stability of amorphous FLF and the molecular mobility determined by  $^{19}\text{F}$ -NMR.

In conclusion,  $^{19}\text{F}$ -NMR is useful for elucidating the molecular mobility of drugs containing fluorine atoms in amorphous solid dispersions.  $\tau_c$  values of FLF fluorine atoms were calculated from the  $^{19}\text{F}$ -NMR spin-lattice relaxation data. The  $\tau_c$  value for solid dispersions containing 20% PVP

was 2–3 times longer than that for solid dispersions containing 20% HPMC at 50 °C. Molecular mobility of FLF in the solid dispersions containing 20% PVP was lower than in those containing 20% HPMC, and this was consistent with the fact that the overall crystallization rate of amorphous FLF in the solid dispersion containing PVP was smaller than in that containing HPMC. The molecular mobility determined by  $^{19}\text{F}$ -NMR seems to be useful as a measure of the physical stability of an amorphous drug in solid dispersions.

**Acknowledgements** Part of this work was supported by a Grant-in-aid for Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices from The Japan Health Sciences Foundation.

#### References

- Yoshioka M., Hancock B. C., Zografi G., *J. Pharm. Sci.*, **84**, 983–986 (1995).
- Matsumoto T., Zografi G., *Pharm. Res.*, **16**, 1722–1728 (1999).
- Crowley K. J., Zografi G., *Pharm. Res.*, **20**, 1417–1422 (2003).
- Shamblin S. L., Huang E. Y., Zografi G., *J. Therm. Anal.*, **47**, 1567–1579 (1996).
- Shamblin S. L., Zografi G., *Pharm. Res.*, **16**, 1119–1124 (1999).
- Zeng X. M., Martin G. P., Marriott C., *Int. J. Pharm.*, **218**, 63–73 (2001).
- Miyazaki T., Yoshioka S., Aso Y., Kojima S., *J. Pharm. Sci.*, **93**, 2710–2717 (2004).
- Khougaz K., Clas S., *J. Pharm. Sci.*, **89**, 1325–1334 (2000).
- Berggren J., Alderborn G., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **21**, 209–215 (2004).
- Aso Y., Yoshioka S., Kojima S., *J. Pharm. Sci.*, **93**, 384–391 (2004).
- Miyazaki T., Yoshioka S., Aso Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 1207–1210 (2006).
- Konno H., Taylor L. S., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 2692–2705 (2006).
- Aso Y., Yoshioka S., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 318–325 (2006).
- Harris R. K., Monti G. A., Holstein P., "Solid State NMR of Polymers," Chap. 6, ed. by Ando I., Asakura T., Elsevier, Amsterdam, 1998, pp. 351–414.
- Grage S. L., Ulrich A. S., *J. Magn. Reson.*, **146**, 81–88 (2000).
- Urano S., Matsuo M., Sakanaka T., Uemura I., Koyama M., Kumadaki I., Fukuzawa K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **303**, 10–14 (1993).
- Afonin S., Glaser R. W., Berdichevskaya M., Wadhvani P., Gührs K. H., Möllmann U., Perner A., Ulrich A. S., *ChemBioChem*, **4**, 1151–1163 (2003).
- Salgado J., Grage S. L., Kondziejewski L. H., Hodges R. S., McElhany R. N., Ulrich A. S., *J. Biomol. NMR*, **21**, 191–208 (2001).
- Williams S. P., Haggie P. M., Brindle K. M., *Biophys. J.*, **72**, 490–498 (1997).
- Quint P., Ayala I., Busby S. A., Chalmers M. J., Griffin P. R., Rocca J., Nick H. S., Silverman D. N., *Biochemistry*, **45**, 8209–8215 (2006).
- Farrar T. C., Brecker E. D., "Pulse and Fourier Transform NMR," Academic Press, New York and London, 1971.
- Namgoong H., Lee J. W., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **14**, 91–95 (1993).
- Huang S.-G., Rogers M. T., *J. Chem. Phys.*, **68**, 5601–5606 (1978).
- Gutowsky H. S., Lawrence J. I., Shimomura K., *Phys. Rev. Lett.*, **6**, 349–351 (1961).
- Beckmann P. A., Rosenberg J., Nordstrom K., Mallory C. W., Mallory F. B., *J. Phys. Chem. A*, **110**, 3947–3953 (2006).
- Horii E., "Solid State NMR of Polymers," Chap. 3, ed. by Ando I., Asakura T., Elsevier, Amsterdam, 1998, pp. 51–82.
- Ruan R. R., Chen P. L., "Water in Foods and Biological Materials," Chap. 7, Technomic Publishing Co., Lancaster Basel, 1998, pp. 253–278.

## 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望 (その1)

新見 伸吾\*, 原島 瑞\*, 日向 昌司\*, 山口 照英\*, 早川 堯夫\*\*

## State and Perspective of Anti-Angiogenic Therapy to Cancer 1

Shingo NIIMI\*, Mizuho HARASHIMA\*, Masashi HYUGA\*,  
Teruhide YAMAGUCHI\* and Takao HAYAKAWA\*\*

## はじめに

血管新生は固形腫瘍の成長と進展において必須のステップであり、癌の主な死亡原因である。約30年前、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<sup>1)</sup>。腫瘍が数ミリ以上の直径に達して進行するには血液を介した酸素及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、腫瘍の成長及び進行には新しい血管の供給が必要であり、新しい血管新生のプ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<sup>2)</sup>。また、血管新生阻害療法が癌の治療法として有用であると考えられている理由は以下の点である。1個の腫瘍血管内皮細胞により約100個の腫瘍細胞が養われている。したがって、1個の腫瘍内皮細胞を死なせることにより、100個の腫瘍細胞を死なすことができる。腫瘍血管内皮細胞は正常細胞なので薬剤耐性を獲得

しないため、治療を中止後再発した場合でも最初と同じ血管新生阻害剤が有効なはずである。腫瘍細胞は多様であるため多種類の抗癌剤が必要であるが、血管内皮細胞は基本的に同じ性質をもつ正常細胞であるので、1種類の有効な阻害剤があらゆる腫瘍に有効である可能性がある。

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Bevacizumabが承認された。また、様々な抗血管新生治療薬を用いた60以上の臨床試験が行われている<sup>3-7)</sup>。

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、最近の無作為臨床試験からの結果によると、利用可能な抗血管新生治療薬を単独で用いても中程度の客観的な奏功しか示せず、生存率を長期間にわたり延長できなかった<sup>8-10)</sup>。しかし、化学療法剤との併用により、VEGFに対する抗体であるBevacizumabは転移性の結腸直腸癌の患者において、生存期間を5箇月も増加させた<sup>11)</sup>。

- \* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)  
Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1  
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
- \*\* 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞ヶ関 3-3-2 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)  
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shinkasumigaseki Bldg. 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku  
Tokyo 100-0013, Japan

このように血管新生治療薬と化学療法剤との併用が癌の治療法として有用であるのは、抗血管新生治療薬が腫瘍血管を正常な血管に改善し、酸素及び薬の腫瘍細胞に対するデリバリーを改善することによるという仮説が提唱されている。本稿ではこの新しい仮説に基づく抗血管新生治療として、たん白質及びペプチド単独あるいは化学療法剤との併用を用いた非臨床及び臨床研究の現状及び展望として腫瘍における血管新生に関する知見について概説する。なお、本稿は成書を参考にした<sup>3,4,7,12-17</sup>。

### 1. 腫瘍の進行における血管新生の役割

成人において、正常に起きる新血管形成は女性の生殖器官及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理的な状況になる。最初の段階における腫瘍の成長には正常血管の取り込みが必要であるが、腫瘍血管が発達する以前には腫瘍は休眠している<sup>18</sup>。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、新しい血管の発達が促進され、腫瘍において血管新生を進行させるスイッチが入る<sup>19</sup>。

いったん血管が発達すると、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、循環内皮細胞、内皮前駆細胞及び腫瘍細胞<sup>20,21</sup>は増殖因子、サイトカイン、ホルモン<sup>22</sup>及び浸潤促進活性を有する因子<sup>23,24</sup>を遊離し、それらの因子により腫瘍の成長及び転移が促進されることが示唆されている。更に、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移動する際、転移性癌細胞播種のルートを提供する<sup>25-27</sup>。癌の進行における血管新生の役割は、腫瘍内の微小血管密度及び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進展とも相関することを示す研究から明らかになっている<sup>28</sup>。

### 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、陥入、出芽（血管新生）、脈管形成という4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、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、陥入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<sup>29-32</sup>。

血管形成のなかで最も広く研究されている分野は、血管新生の機構であると考えられる。血管新生の機構及び血管新生促進因子の詳細については成書<sup>33</sup>を参考にされたい。以下に血管新生の機構の要約を示す。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、基底膜及び間質マトリックスの分解、周皮細胞の血管からの解離、内皮細胞の遊走及び増殖により血管の配列あるいは出芽が形成され、管腔は出芽の中で形成される。出芽の集合及び吻合により枝及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及び周皮細胞に取り込まれ、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<sup>34-37</sup>。最終的に、内皮前駆細胞から形成された血島が互いに連絡しあい、胎児の発育中に原始的な血管網が形成される。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及び他の組織における生後の脈管形成にも寄与する<sup>38-40</sup>。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<sup>41</sup>。

### 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は重要な役割を果たしている。そして腫瘍血管系の構造及び機能は異常である。その内皮内面は不完全であり、開窓及び細胞間接合は喪失している。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。

血管には拡張及び収縮した領域があり、構造上、それらは蛇行状に横に広がり不規則な形をしている。また異常な分枝及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、壁細胞のパターン及び機能も異常である。腫瘍に関連した周皮細胞は異常なたん白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、腫瘍の灌流は一樣でなく腫瘍の間質内圧は高くなる<sup>42,43</sup>。高い間質内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。このような正常時とは逆の血管と腫瘍の間の勾配圧力の形成により、血管から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。また、腫瘍の灌流が一樣でないことにより、化学療法剤だけでなく酸素、栄養物を含むすべての血液により運ばれる分子のデリバリーが損なわれる。腫瘍血管の障害及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。低酸素は活性酸素のアペイラビリティを減少させ、薬物及び放射線療法に対する抵抗性が増加する。更に、遺伝子の不安定性が誘導され、血管新生及び転移に関与する遺伝子がアップレギュレートされる<sup>44,45</sup>。更に、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、病的な腫瘍血管系により細胞傷害性治療及び宿主の免疫細胞から腫瘍が防御される。

#### 4. 腫瘍における VEGF の発現

結腸直腸、肝細胞、肺、胸部、子宮内膜癌及び急性骨髄性白血病を含む多くの癌で VEGF 及びその受容体が過剰発現することがわかっているが<sup>46-49</sup>、その意義については十分に理解されていない。VEGF の発現は結腸直腸癌、乳癌、小細胞及び非小

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<sup>50-53</sup>。他方、胃癌及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<sup>54,55</sup>。

#### 5. 血管新生阻害剤

様々な種類の血管新生阻害剤が発見あるいは開発されており、非臨床試験においてその有効性が示されている。以下にその血管新生阻害剤の非臨床試験の結果及びその作用機構について紹介する。なお、その中の主なものについて血管新生における作用部位を Fig. 1 に示す。

##### 5.1 抗 VEGF 抗体

Kim らはマウス神経芽腫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<sup>56</sup>。モノクローナル抗体 (2C3) はマウスにおける腫瘍異種移植に対して抗腫瘍活性を有する。2C3 は VEGFR1 ではなく VEGFR2 と VEGF の相互作用をブロックする。2C3 は、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おいてその腫瘍の増殖を抑制する<sup>57</sup>。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い。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、ウイルス腫瘍、卵巣、前立腺、乳腺のがんが含まれる。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いことから、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<sup>58</sup>。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を低下し大きさも小さくする<sup>59</sup>。Bevacizumab は組換えヒト化抗 VEGF 抗体であり、VEGF のすべてのアイソフォームに対して強い親和性を有する<sup>60</sup>。Bevacizumab は内皮細胞において増殖、血管の透過性、血管新生を含む VEGF により誘導される様々な作用を阻害する。Bevacizumab は数々の *in vivo* の腫瘍モデルにおいて腫瘍の成長を抑制し<sup>56,58,60,61</sup>、特定の化学療法剤と相乗性を示す<sup>60,62</sup>。

##### 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条件を満たすことにより、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-

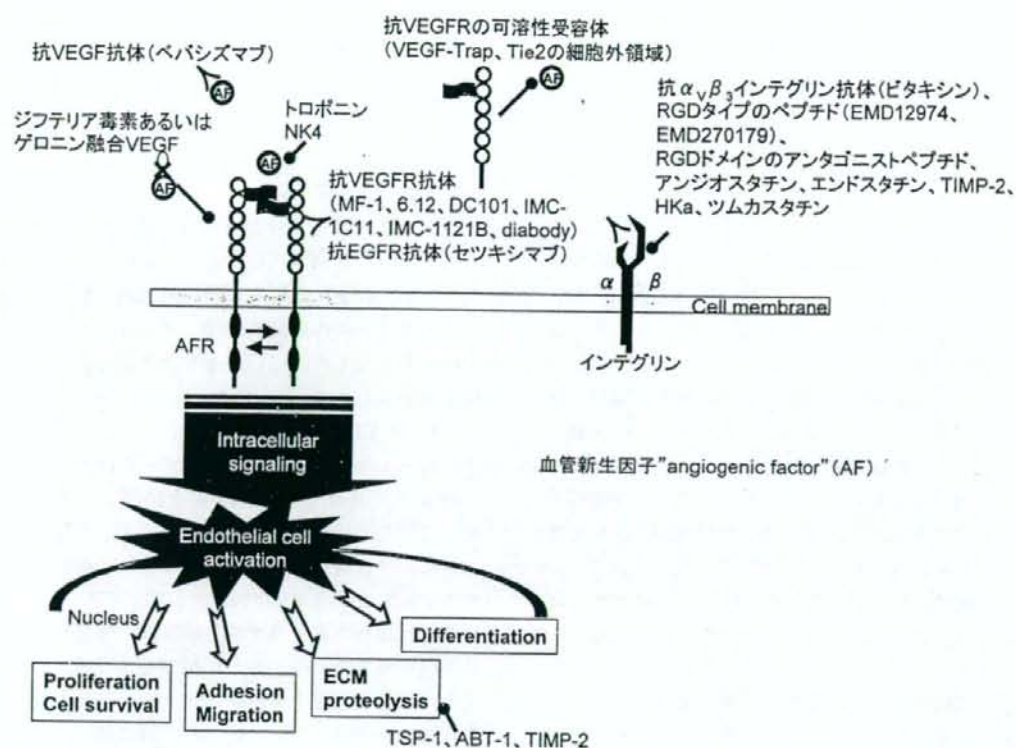


Fig. 1 血管新生阻害剤の作用部位

Trap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<sup>63)</sup>。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。この分子はBevacizumabと同様に細胞表面受容体からVEGFを遮蔽するが、BevacizumabよりもVEGFに対する親和性ははるかに高い<sup>63,64)</sup>。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、マウス及びヒトVEGFに対する親和性はピコモルオーダーである<sup>63)</sup>。VEGF-Trapの投与によりマウスメラノーマ、ヒト横紋筋肉腫及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及び血管新生が顕著に阻害される<sup>65)</sup>。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る<sup>65)</sup>。その場合、腫瘍にはほとんど血液が供給されておらず、最も強く阻害された腫瘍では基本的に血管がなかった。腫瘍が形成される際、糸球体から構

成される球状の構造が血管枝に形成され、血液を供給することにより腫瘍の形成を促進すると考えられている。高濃度のVEGF-Trapはこの球状構造をアポトーシスにより退行させるが、低濃度のVEGF-Trap及び抗VEGF抗体では起こらない。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る<sup>63)</sup>。

これら最初の知見はVEGF-Trapの効果を他の腫瘍系で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い<sup>65)</sup>。VEGF-Trapは既存の腫瘍血管系を縮小させ、その結果、定着した原発性腫瘍と転移性腫瘍は完全に縮小する<sup>66-70)</sup>。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<sup>67)</sup>。このような結果から、VEGFの強力なブロックは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<sup>66)</sup>。

### 5.3 可溶性 VEGF 及び Angiopoietin-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。EGFR1, EGFR2, Angiopoietin-1 の受容体である 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で評価すると腫瘍細胞のコンディション培地により誘導される角膜の血管新生が強く抑制され、乳腺腫瘍の増殖及び血管新生が減少した<sup>71,72)</sup>。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する。

### 5.4 VEGFR 抗体

VEGFR1 を標的とする抗体である MF-1 及び 6.12 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<sup>73)</sup>。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 (DC 101) は血管新生を減少させた<sup>74)</sup>。また、同じ研究において DC 101 で処置後除去した腫瘍には血流が著しく低下していることから、血管新生及び血管の透過性が低下していることが示された。また、抗 VEGFR1 と抗 VEGFR2 抗体 (6.12 及び DC 101) を併用す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る<sup>75)</sup>。この結果から二つの 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された。

ヒト化抗 VEGFR2 抗体である IMC-1C11 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の活性化を阻止する<sup>75)</sup>。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及び VEGFR2 陽性の白血病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 陽性ヒト白血病細胞を接種した NOD-SCID マウスの生存率を有意に延長する。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、内皮細胞の遊走及び増殖も抑制する<sup>76,77)</sup>。

VEGFR2 に特異的な IMC-1121B 及び EGFR3 に特異的な hF4-3C5 の可変領域遺伝子を用いて二重特異性抗体である diabody が構築されている<sup>78)</sup>。Diabody は VEGFR2 及び 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 MAP キナーゼの活性化を中和する。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た。

その他にも異なった VEGF 受容体に対して作成されたモノクローナル抗体が免疫不全マウスにおいて腫瘍の血管新生及びヒト腫瘍の成長を抑制する<sup>79-82)</sup>。

### 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なされてきている。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、血管平滑筋細胞及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。この融合たん白質は 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する。更に、この融合毒素はマウスにおけるカポジ肉腫腫瘍の成長を顕著に後退させる<sup>83)</sup>。毒素ゲロニンを連結させた VEGF121 を含む融合たん白質が細胞の増殖及びたん白質合成に及ぼす作用を検討した結果、その抑制作用は VEGFR1 及び VEGFR2 を過剰発現して増殖している内皮細胞と比べると HUVEC のほうが高い。VEGFR1 及び VEGFR2 を発現していない血管平滑筋細胞ではこのたん白質による抑制作用はみられない。ヒトメラノーマ及びヒト前立腺異種移植を融合たん白質で処理すると、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す<sup>84)</sup>。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たん白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と思われる<sup>85)</sup>。

### 5.6 Angiostatin

AngiostatinはPlasminogenの38 kDaの断片であり、マウス腫瘍モデルで血管新生を阻害する<sup>86)</sup>。Angiostatinは内皮細胞の増殖阻害及びアポトーシスの増加を介して腫瘍を休眠させる<sup>87)</sup>。Angiostatinはマウスにおいて抗腫瘍及び抗血管新生の機能を有しており、これらの作用発現はアポトーシスの誘導を介している<sup>88,89)</sup>。Angiostatinは“chorioallantoic membrane” (CAM) 漿尿膜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る<sup>90)</sup>。

Angiostatinの抗血管新生作用は、内皮細胞における受容体の候補である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<sup>91-94)</sup>。Angiostatinは内皮細胞の細胞周期のG2/M移行を抑制していることを示唆する研究もある<sup>95)</sup>。Angiostatinはc-metに対する結合においてHGFと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<sup>96)</sup>。

### 5.7 Endostatin

Endostatinはエラスターゼ及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20 kDaの断片であり、強力な血管新生の阻害剤である。

Endostatinは内皮細胞の増殖、遊走を特異的に阻害し、Bcl-2及びBcl-XL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<sup>97-99)</sup>。Endostatin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する<sup>100)</sup>。Endostatin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<sup>101)</sup>。

組換えEndostatinは腫瘍細胞のアポトーシスの増加及び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<sup>97,102)</sup>。そして、Endostatinの繰り返し投与により、腫瘍の成長が投与期間内で阻害され、その後腫瘍は寛解に入る<sup>103)</sup>。この結果から、Endostatinは薬剤耐性を誘導しない効果的な抗血管新生治療薬になる可能性が示唆された。

Endostatinの主要な活性の一つは内皮細胞の遊

走の阻害作用である<sup>104)</sup>。これに関連し、Endostatinは内皮細胞の運動性に重要であるmatrix metalloprotease-2 (MMP-2) 前駆体の活性化、MMP-2及びMT1-MMPの触媒活性も阻害する<sup>105,106)</sup>。

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おいて、Endostatinは細胞の遊走に関連したc-myc及び他の遺伝子発現を抑制することにより内皮細胞の遊走を阻害する<sup>98,107)</sup>。

EndostatinはVEGF発現及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及び*in vivo*のマウス腫瘍モデルにおいて、EndostatinはVEGF mRNA及びたん白質を顕著にダウンレギュレーションする<sup>107)</sup>。EndostatinはVEGFR2と直接的に相互作用し<sup>101)</sup>、VEGFによる走化性の促進をブロックする<sup>108)</sup>。

マウス循環内皮細胞におけるVEGF及びEndostatinの効果も解析されている<sup>109)</sup>。アデノウイルスを用いて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Endostatinにより低下する。また、Endostatinはマウスにおいて内皮細胞のアポトーシスを増加させる<sup>97,109)</sup>。Endostatinは*in vitro*において内皮細胞の増殖、遊走及びコラーゲンに対する接着を阻害する<sup>110,111)</sup>。これらの知見を総合的に考えると、Endostatinは*in vivo*において内皮細胞に直接作用することによりアポトーシスを誘導し殺細胞効果を有することが示唆された。

Endostatinはヘパリン結合たん白質であり、抗血管新生活性はヘパリン結合能を介している。Endostatin内のヘパリン結合モチーフが、Endostatin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及び*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関与する<sup>112)</sup>。

細胞表面におけるVEGFR2以外に、Endostatinの内皮細胞表面受容体の可能性がある分子として $\alpha_5\beta_1$  インテグリン<sup>113)</sup>及びヘパリン硫酸プロテオグリカンであるグリピカン-1及び-4<sup>114)</sup>が同定されている。

### 5.8 Thrombospondin-1

Thrombospondin-1 (TSP-1) は最初に同定され

た内在性の血管新生阻害剤である<sup>115-117</sup>。TSP-1は繊維芽細胞及び内皮細胞を含む様々な種類の細胞により産生される420 kDaのホモ三量体の分泌性糖たん白質であり、細胞表面あるいは細胞外マトリックスに結合する<sup>118</sup>。

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。TSP-1あるいはTSP-1フラグメントは、*in vitro*における増殖、遊走、内皮細胞に対する接着をブロックし<sup>119-122</sup>、内皮細胞のアポトーシスを誘導する<sup>123,124</sup>。これら内皮細胞におけるTSP-1の作用は、TSP-1のCD36<sup>125,126</sup>あるいは $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_3\beta_1$ インテグリン<sup>127,128</sup>に対する結合あるいはインテグリン結合たん白質(IAP)との複合体形成<sup>129,130</sup>を介している。TSP-1のシグナル伝達系には細胞質のチロシンキナーゼp-59fynの動員及びp-59fyn依存的でありp38-MAPKの活性化が含まれる。p38MAPKがいったん活性化されると、カスパーゼ-3の活性化が導かれ、最終的に内皮細胞のアポトーシスが起きる<sup>132</sup>。TSP-1のアポトーシス効果は活性化された内皮細胞に限定され、休止期の血管では起きない。

*In vivo*の腫瘍モデルのデータからも、TSP-1が血管新生及びその後の腫瘍の成長を阻害するという証拠が得られている。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<sup>131</sup>。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乳癌の増殖速度及び血管が過剰増殖すると共に腫瘍の出現が増加する。興味深いことに、血管新生において内皮細胞の遊走及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るTSP-1は*in vitro*においてMMP-9前駆体から活性型MMP-9の産生を阻する<sup>132</sup>。また、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<sup>133</sup>。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ことが示された。

ABT-1はTSP-1のタイプ-1リヒートから由来

するフラグメントを模倣して作成された7個のペプチドの非ペプチド類似化合物であり、TSP-1と同様な抗血管新生活性及び抗腫瘍活性を有する<sup>134</sup>。

### 5.9 Tumstatin

TumstatinはMMP-9によりコラーゲンIVの $\alpha_3$ 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、抗血管新生及びアポトーシス促進のメディエーターである<sup>135</sup>。MMP-9を欠損するマウスはTumstatinの血漿レベルが低く腫瘍の成長速度が増加する<sup>136</sup>。Tumstatinは $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに結合し、focal adhesion kinase/PI3K/Akt/mTOR系の活性化を抑制し、内皮細胞のDNA合成がストップする<sup>137,138</sup>。

### 5.10 Troponin I

Troponin I (Tn I)は*in vitro*においてbFGF及びVEGFによる内皮細胞の増殖促進を阻害すると共に、*in vivo*の鶏絨毛尿膜アッセイにおける胎児の血管新生及びマウス角膜のポケットアッセイにおけるbFGFによる血管新生の誘導を阻害する<sup>139</sup>。Tn Iは内皮細胞においてbFGFの受容体に結合しbFGFと競合することにより、bFGFによる血管新生の誘導を阻害する<sup>140</sup>。Tn Iの30アミノ酸ペプチドはVEGFによる内皮細胞の増殖及び管腔形成の促進そして膵臓癌セルラインCAPAN-1におけるVEGF発現も阻害し、Tn Iの30アミノ酸ペプチドで処理したCAPAN-1をマウスの膵臓に投与すると肝臓に転移した癌細胞の数が減少する<sup>141</sup>。

### 5.11 TIMP-2/Loop 6

細胞外マトリックス及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、MMPは細胞外マトリックスの再構成に重要な役割を果たしている。MMPは金属依存性のエンドプロテアーゼのファミリーであり、腫瘍の転移、進行及び血管新生において重要な役割を果たしている<sup>133,142-145</sup>。また、多くの異なるヒト腫瘍でMMP-2の発現が増加する<sup>146</sup>。

Mosesiらは*in vivo*においてMMP活性のtissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)による阻害により血管新生が阻害されることを最初に示した<sup>147,148</sup>。その後、この知見は多くの研究者により確かめられ、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4種類が同定された。これらすべてのTIMPがMMP活性を阻害し、MMPを介した内皮細胞及び腫瘍細胞の遊走の阻止により、血管新生を抑制する<sup>149</sup>。しかし、TIMP-1が内皮細胞及び腫瘍細胞を含む多くのタイプの細胞の増殖を促進するのに対し<sup>150,151</sup>、TIMP-2は内皮細胞の増殖を抑制する<sup>152</sup>。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及び遊走を阻害することにより血管新生を抑制する。

TIMP-2の抗増殖活性は細胞における $\beta_1$ インテグリンの発現に依存しており<sup>153</sup>、 $\alpha_3\beta_1$ 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<sup>154</sup>。

抗血管新生活性に関与するTIMP-2の領域を明らかにすることを目的とした構造活性相関に関する研究が行われている。その結果以下のことが明らかになった。TIMP-2のN末端ドメイン(T2N)がMMP阻害活性を有する<sup>155-157</sup>。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TIMP-2のC末端ドメイン(T2C)が抗増殖活性を有する<sup>157</sup>。また、T2Cドメインの抗増殖、抗血管新生領域はTIMP-2分子のC末端領域のLoop 6に位置する<sup>157</sup>。

Loop 6はin vitroにおいて内皮細胞増殖の強力な阻害剤であり、CAM及び角膜ポケットアッセイにおいてin vivoの血管新生を阻害する<sup>157</sup>。したがって、TIMP-2にはT2NにおけるMMP阻害活性及び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。更に、Loop 6はT2Cの抗増殖活性に関与している新規の低分子量血管新生阻害剤である。

### 5.12 MMP

MMPが血管新生を促進することは前の章で述べたが、MMPの活性の中には腫瘍の成長及び進行に対して防御的な機能がある。これまで非特異的なMMP阻害剤を用いた抗血管新生療法の臨床試験では期待はずれの結果が得られているが、この結果はMMPが血管新生の促進及び抑制の両方に働くという事実から説明できるかもしれない<sup>145,149,158-160</sup>。

MMPは大きなたんぱく質分子を切断し、Angio-

statin<sup>160</sup>及びEndostatin<sup>161</sup>のような内在性血管新生阻害剤を生成する。MMP-2はFGFR1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<sup>162</sup>。MMP活性は内皮細胞の増殖に対し抑制作用を有するTNF- $\alpha$ <sup>163</sup>の活性型への変換にも必要である<sup>164</sup>。

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する<sup>165</sup>。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンと活性型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<sup>166</sup>。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<sup>165</sup>。

### 5.13 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及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。更に、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<sup>167</sup>。ヒトモノクローナル抗体であるCetuximab(IMC-225)はEGFR(HER1)の細胞外ドメインに対して結合してEGFの結合を競合的に阻害し、EGFRの二量体化及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<sup>168,169</sup>。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インヒビターp27<sup>KIP</sup>の増加によりG1における細胞周期の停止も導き<sup>170</sup>、Bax及び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及び誘導を介して細胞のアポトーシスを開始する<sup>171</sup>。

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た非臨床試験で、Cetuximab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<sup>167</sup>。Cetuximabは細胞培養及び動物モデルにおいてVEGFの産生を抑制し、腫瘍微小血管密度を低下させ、場合によっては腫瘍の退行を引き起こす<sup>172,173</sup>。これらの結果は、CetuximabとVEGF

あるいは VEGF 受容体の機能を阻害するアプローチを併用した治療戦略が有効となる可能性を示唆している。

#### 5.14 内皮細胞の接着を阻害する薬剤

他の抗血管新生療法の戦略の一つは内皮細胞が遊走する際に内皮細胞の接着相互作用を阻害することである。インテグリンは  $\alpha$  及び  $\beta$  サブユニットから構成されるヘテロダイマーの膜貫通たん白質であり、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、分化及び増殖をコントロールする。 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンはアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 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り、休止期の内皮細胞及び他の細胞には存在せず、活性化された内皮細胞の細胞表面にのみ存在することから、抗血管新生療法の有力な標的である。RGD ドメインのアンタゴニストである数種類のペプチド及び  $\alpha_v\beta_3$  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る腫瘍の急速な退行を導く<sup>174)</sup>。 $\alpha_v\beta_3$  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、腫瘍の増殖が阻止され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が顕著に低下する<sup>23)</sup>。これら LM609 で処置した腫瘍ではヒト血管が顕著に少なく、腫瘍の浸潤も低い。なお、 $\alpha_v\beta_1$  インテグリンをブロックする抗体でも同様な結果が得られている<sup>175)</sup>。Vitaxin は LM609 のヒト化抗体であり、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<sup>23,176)</sup>。なお、 $\alpha_1$  及び  $\alpha_2$  をブロックする抗体との併用はコラーゲン I 及び 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、既存の血管には全く影響を与えない<sup>177)</sup>。

$\alpha_v\beta_3$  インテグリン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作成が容易であり、プロテアーゼ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 (cilengtide, RGDf-NmeVal) 及び EMD270179 (RGDf-ACHA) 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<sup>178)</sup>。

#### 5.15 NK4

NK4 は四つのクリングルドメインを有する 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。NK4 はヒト臍帯静脈内皮細胞において HGF による管腔形成の誘導を阻害する<sup>179)</sup>。

#### 5.16 Kallikrein-Kinin 系を標的とする

Kallikrein による高分子量 Kininogen (HK) の切断により、切断 Kininogen (HKa) 及び 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ホ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<sup>180)</sup>。特に HKa のドメイン 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 による新血管形成の誘導を阻害する<sup>181,182)</sup>。

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 Kininogen 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する。また、CAM アッセイで FGF-2 あるいは VEGF による新血管形成の誘導をブロックし、関節炎の動物モデルにおいて治療効果を示す<sup>183,184)</sup>。更に、抗癌治療における BK アンタゴニストであるペプチドの使用が広く研究されている<sup>185)</sup>。なお、BK の受容体は血管系及び内皮細胞でも発現する<sup>186,187)</sup>。

#### 5.17 Vasohibin

Vasohibin 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を阻害する分泌たん白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<sup>188)</sup>。Vasohibin の作用機構は不明であり、増殖因子受容体に対してアンタゴニストとしては作用しない。

#### 5.18 Aplidine

Aplidine はペプチドであり、白血病細胞である MOLT-4 において VEGF の分泌を抑制してオート

クラインによる VEGF の作用を低下させることにより、増殖を阻害すると共にアポトーシスを誘導する<sup>189)</sup>。Aplidine は CAM アッセイにおいて VEGF 及び FGF-2 による血管新生の誘導を抑制する<sup>190)</sup>。

## 6. 臨床研究

### 6.1 Bevacizumab

Bevacizumab を組み入れたフェーズ I 試験が 2001 年に公表された<sup>191)</sup>。この試験で、Bevacizumab は単独あるいは Doxorubicin, Carboplatin + Paclitaxel, Fluorouracil (5-FU) + Leucovorin (LV) との併用で投与された。登録された 25 人の患者に対して Bevacizumab 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 の有害事象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) 症状が安定であることが報告された。

化学療法剤 (Doxorubicin, Carboplatin + Paclitaxel 5-FU + LV) と併用した Bevacizumab の臨床試験では、全ての治療群において Bevacizumab の投与量は 8 週間 3 mg/kg/週に設定された。登録された 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<sup>192)</sup>。なお、これらの毒性発現は Bevacizumab によるものとは考えられなかった。それぞれの治療群の 1 人 (全部で 3 人の患者) で抗腫瘍奏効性が示された。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、Bevacizumab は無作為臨床試験が続けられた。なお、主な臨床試験の結果をまとめたものを Table 1 に示す。

### 6.2 結腸直腸癌における Bevacizumab

VEGF の発現は結腸癌の血管新生及び増殖の予測因子と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いる<sup>193,194)</sup>。更に、先に示したように非臨床試験で良好な結果が得られたことから、結腸直腸癌における Bevacizumab の有効性を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 Bevacizumab + 5-FU/LV の比較が開始された<sup>195)</sup>。この試験においては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 名に対して無作為に次のうちの一つの治療がなされた。

1. Rosewell Park レジメンに従い、8 週間のうち 6 週間で週 1 回 5-FU/LV (LV 500 mg/m<sup>2</sup> 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/m<sup>2</sup> 投与) (コントロール治療群)

2. 5 mg/kg の投与量で 2 週間ごとに 5-FU/LV + Bevacizumab 投与

3. 10 mg/kg の投与量で 2 週間ごとに 5-FU/LV + Bevacizumab 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 Bevacizumab 単独 (2 週間ごとに 10 mg/kg) の投与が許された。

1 番目の有効性のエンドポイントは増殖抑制期間及び腫瘍の奏功率、2 番目は全生存期間及び奏功期間が含まれた。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 箇月、Bevacizumab 5 mg/kg 治療群で 9.0 箇月 (5-FU/LV と比較して  $p=0.005$  で有意)、Bevacizumab 10 mg/kg 治療群で 7.2 箇月 (5-FU/LV と比較して  $p=0.217$  で有意) であった。奏功率はコントロール治療群で 17%、Bevacizumab 5 mg/kg 治療群で 40% ( $p=0.029$ )、Bevacizumab 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 箇月、Bevacizumab 5 mg/kg 治療群で 21.5 箇月 ( $p=0.137$ )、Bevacizumab 10 mg/kg 治療群で 161.1 箇月 ( $p=0.582$ ) 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 (Bevacizumab 5 mg/kg 治療群) が呼吸困難、1 人 (Bevacizumab 10 mg/kg 治療群) が肺塞栓症であった。Bevacizumab の患者でみられた有害事象には血栓症の割合の増加 (Bevacizumab 5 mg/kg 治療群で九つの事象、Bevacizumab 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 (Bevacizumab 5 mg/kg 治療群で 46%、Bevacizumab 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Bevacizumab投与患者においてたん白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/Bevacizumabを併用した患者において奏功率の増加、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に続いて塩酸イリノテカンIrinotecan, 5-FU, LV (IFL) に対してIFL及びBevacizumab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<sup>11,196</sup>。この試験には登録された923人の患者が、三つの治療群 (IFL, IFL+Bevacizumab, 5-FU/LV+Bevacizumab) のうちの一つに無作為に割り振られた。最初300人の患者が無作為に割り振られた後、IFL+Bevacizumab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/m<sup>2</sup>, 5-FU 500 mg/m<sup>2</sup>, LV 20 mg/m<sup>2</sup>) 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週間ごとにプラセボあるいはBevacizumab (5 mg/kg) が併用された。5-FU/LV/Bevacizumab治療群はRosewell Parkレジメンに従い、5-FU/LVを2週間おきにBevacizumab (5 mg/kg) と併用した。

313人の患者が無作為に割り振られた後、5-FU/LV/Bevacizumab投薬計画が中止され、IFLを含む治療群としてその患者に対して臨床試験が続けられた。無作為に割り振られた患者923人のうち、402人がIFL/Bevacizumab, 411人がIFL/プラセボの治療を受けた。最初のエンドポイントとして全生存率が測定された。1番目のエンドポイントには無増悪生存率、多角的な奏功率、奏功期間、生活の質が含まれた。IFL/Bevacizumab治療群及びIFL/プラセボにおける全生存期間は、それぞれ20.3箇月及び15.6箇月であった ( $p < 0.001$ )。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箇月であったのに対して、IFL/Bevacizumab治療を受けた患者では25.1箇月に増加した。無増悪生存率はIFL/プラセボを受けた患者で6.2箇月であったのに対して、IFL/Bevacizumab治療を受けた患者では10.6箇月であった ( $p < 0.001$ )。奏功率はIFL/Bevacizumab及び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箇月対10.4箇月

( $p = 0.001$ )であった。Bevacizumab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及び4の白血球減少及び下痢の増加が含まれた。注目すべきことに、IFL/Bevacizumab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併用したレジメンとしてBevacizumabが2004年2月FDAにより承認された。

先に示した最近のフェーズII及びIII試験の結果と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<sup>197</sup>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箇月であるのに対し、5-FU/LV及びBevacizumab (5 mg/kg) で治療した患者では17.9箇月であった ( $p = 0.008$ )<sup>198</sup>。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及びBevacizumab (5 mg/kg) で治療した患者では34.1%であった ( $p = 0.019$ )。

Bevacizumabを用いた結腸直腸癌の臨床試験は更に続いている。転移性結腸直腸癌における奏功率及び奏功期間は、FOLFOXレジメン (5-FU/LV+Oxaliplatin) が5-FU/LV静注単独及びIFLレジメンよりも優れていることが示された<sup>199,200</sup>。米国東海岸癌臨床試験グループの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+Bevacizumabを2週間ごとに10 mg/kgで比較した無作為にフェーズIII試験である<sup>201</sup>。全部で829人の患者がこの研究に登録された。最初、患者はBevacizumab単独から構成される三つの治療群に無作為に割り振られたが、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。その後の試験結果では、平均生存率はFOLFOX-4+Bevacizumab治療を受けた患者で12.9箇月であり、FOLFOX単独治療を受けた患者では10.8箇月であった ( $p = 0.0018$ )。多角的な奏功率は、FOLFOX-4+Bevacizumabを受けた患者では21.8%であり、FOLFOX単独治療

Table 1 Bevacizumabを用いた癌の臨床試験

レジメン	フェーズ	化学療法による治療歴	対象疾患	結果	文献
BV BV+Doxorubicin BV+Carboplatin+Paclitaxol BV+5-FU+LV	I	未治療	結腸直腸癌	グレード4の毒性無し, 評価可能な患者23人のうち12人でBV単独で病勢の安定	191
5-FU+LV 5-FU+LV+BV	II	未治療	結腸直腸癌	21.5 箇月対 13.8 箇月(生存期間の中央値), 40%対 17% (奏功率), BV が有効	195
IFL IFL+BV 5-FU+LV+BV	III	未治療	結腸直腸癌	20.3 箇月対 15.6 箇月(生存期間の中央値), 10.6 箇月対 6.2 箇月(無増悪期間の中央値), 40%対 17% (奏功率), BV が有効	11, 196
FOLFOX-4 FOLFOX-4+BV	III	治療歴あり	結腸直腸癌	12.9 箇月対 10.8 箇月(生存期間の中央値), BV が有効	201
ブラセボ BV	II	IL-2により治療ありあるいはIL-2禁忌	腎細胞癌	4.8 箇月対 2.5 箇月(無増悪期間の中央値), BV が有効	10
BV + Erlotinib	II	不明	腎細胞癌	59人のうち15人(客観的な奏功), 14人(部分寛解), 1人(完全寛解), 36人(病勢の安定)	209
BV	II	治療歴あり	乳癌	75人のうち7人(客観的な奏功), 5 箇月(奏功の継続期間の中央値), 17% (154 日における病勢の安定), 7% (1 年における病勢の安定)	8
Cepecitabine Cepecitabine+BV 5-FU/LV+BV	III II	治療歴あり 治療歴あり	乳癌 結腸直腸癌	19.8%対 9.1% (全奏功率), BV が有効 4% (客観的な奏功率), 3.5 箇月(無増悪生存期間の中央値), 9.0 箇月(全生存期間の中央値)	215 204

ベバシズマブ "Bebacizumab" (BV)



Table 1 続き

レジメン	フェーズ	化学療法による治療歴	対象疾患	結果	文献
Paclitaxel Paclitaxel+BV	III	未治療	乳癌	13.3 箇月対 6.7 箇月(無増悪期間の中央値), 2>(奏効率の比), BV が有効	216
Carboplatin+Paclitaxel Carboplatin+Paclitaxel+BV	II	未治療	非小細胞 肺癌	7.4 箇月対 4.2 箇月(無増悪期間の中央値), 31.5%対 18.8%(奏効率), BV が有効	219
Carboplatin/Paclitaxel Carboplatin/Paclitaxel+BV	II, III	不明	非小細胞 肺癌	12.3 箇月対 10.3 箇月(生存期間の中央値), 35% 対 16%(奏効率), 6.2 箇月対 4.5 箇月(無増悪期 間の中央値), BV が有効	220
Gemcitabine+BV	II	未治療	膵臓癌	52 人の患者のうち 9 人(部分寛解), 24%(病勢 の安定), 77%(6 箇月の生存率), 8.8 箇月(生存 期間の中央値), 5.4 箇月(無増悪期間の中央値)	225
BV	II	治療歴あり	卵巣癌	16%(奏効率), 62.5%(病勢の安定), 6.9 箇月(生 存期間の中央値), 6.9 箇月(無増悪期間の中央 値)	226
5-FU/Capecitabine+BV	II	治療歴あり	子宮頸癌	67%(完全寛解, 部分寛解あるいは病勢の安定), 4.3 箇月(無増悪期間の中央値)	227
Docetaxel+BV	II	不明	乳癌	52%(全奏効率), 6.0 箇月(奏効期間の中央値), 7.5 箇月(無増悪生存期間の中央値)	217
Ironotecan+5-FU+LV+BV(高 濃度)	II	未治療	結腸直腸 癌	26.3 箇月(全生存期間の中央値), 10.7 箇月(無増 悪生存期間の中央値), 49.4%(全奏効率), 6.2%( 完全寛解), 85%(1 年の生存率)	205
Gemcitabine/Oxaline+BV	II	2 回以下の治 療歴ありある いは未治療	肝臓癌	20%(客観的な奏効), 27%(安定した病勢), 9.6 箇月(生存期間の中央値), 5.3 箇月(無増悪期間 の中央値)	228

を受けた患者では9.2%であった ( $p < 0.0001$ )。グレード3の高血圧及び神経障害の増加がFOLFOX-4及びBevacizumabの治療を受けた患者でみられた。腸せん孔の罹患率はBevacizumabを受けた患者において1.1%であった。同様に、転移性結腸直腸癌の患者53人においてFOLFOX-4レジメン単独とFOLFOX-4+BevacizumabのフェーズII試験が行われた<sup>202</sup>。完全及び部分寛解がそれぞれ8人及び28人でみられた。腫瘍進行までの期間は11箇月であった。

抗血管新生治療薬で治療した患者において出血及び創傷の遅延が懸念されたことから、手術を受ける患者においてBevacizumabの効果が評価されている<sup>203</sup>。IFL, IFL/Bevacizumab, 5-FU/LV/Bevacizumabのいずれかの治療を受けている間に手術を行った患者の解析から、Bevacizumabの治療を受けた患者は化学療法剤を受けた患者に比べて創傷離脱及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、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/Bevacizumab, 5-FU/LV/Bevacizumabを受けた患者において創傷離脱及び出血の合併症における有意な違いは示されなかった。Irinotecan及びOxaliplatinによる治療後進行した再発性結腸癌の患者350人における5-FU/LV+BevacizumabのフェーズII試験が行われた<sup>204</sup>。客観的奏効率は4%であり無増悪生存期間及びすべての生存の中央値はそれぞれ3.5箇月及び9.0箇月であった。無処置の進行性結腸直腸癌の患者92人におけるIrinotecan, 5-FU, LV+高濃度のBevacizumab (10 mg/kg)のフェーズII臨床試験が行われた<sup>205</sup>。全生存期間及び無増悪生存期間の中央値はそれぞれ26.3箇月及び10.7箇月であり1年の生存は85%であった。全奏効率は49.4%であり完全寛解は6.2%であった。

### 6.3 他の腫瘍タイプにおけるBevacizumab

#### 6.3.1 腎細胞癌

フォン・ヒッペル・リンドウ病“von-Hippel Lindau” (VHL)は腎臓、中枢神経系、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常染色体優性遺伝病であり、腎細胞癌と関連する場合が多い<sup>206</sup>。VHL腫瘍抑制遺伝子の変異が腎細胞癌の患者で見られ、VEGFのような低酸素誘

導性遺伝子の転写を促進するHif-1 $\alpha$ の恒常的な活性化によりVEGFの発現が増加する<sup>207</sup>。VHL遺伝子の変異は、細胞組織学的に明らかに特異性（非家族性）の腎細胞癌のほとんどに存在することも示されている<sup>208</sup>。

腎細胞癌治療におけるBevacizumab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人の腎細胞癌で臨床試験が行われた<sup>9</sup>。患者は無作為に割り振られ、2週間ごとにプラセボ、2週間ごとにBevacizumab (3 mg/kg)、2週間ごとにBevacizumab (10 mg/kg)の投与を受けた。無増悪及びすべての奏効率が主要なエンドポイントであった。無増悪期間の中央値は、10 mg/kg Bevacizumab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箇月対2.5箇月,  $p < 0.001$ )。しかし、3 mg/kg Bevacizumabが投与された患者では無増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箇月,  $p < 0.041$ )。4人の患者 (すべて高投与量Bevacizumabグループの39人の患者に由来) において部分寛解があった。生存期間はグループ間において有意な差はなかった。Bevacizumab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たん白尿であった。

この臨床研究において高投与量のBevacizumabが投与された患者における疾患の無増悪期間が長くなったことから、Cancer and Leukemia Group B (CALGB)により転移性あるいは切除できない腎臓癌の患者についてBevacizumabの無作為フェーズIII試験が行われた<sup>209</sup>。この試験には過去に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- $\alpha$  (1週間に3回900万単位)単独あるいはBevacizumab (2週間ごとに10 mg/kg)+低投与量IFN- $\alpha$ 治療に無作為に割り振られた。なお、この試験結果はまだ報告されていない。BevacizumabとEGFRチロシンキナーゼのインヒビターであるErlotinibの併用のフェーズII臨床試験が複数の医療機関で行われた<sup>210</sup>。16箇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Bevacizumab (10 mg/kg 静注2週間ごと)とErlotinib (150 mg/日経口)の併用で治療された。59人の評価可能な患者のうち15人で (25%)客観的な奏効、14人で部分寛解、1人で完全寛解が得られた。全部

で36人の患者（61%）が安定した症状を示した。中間無増悪生存期間は11箇月であり、患者の60%が18箇月間生存した。グレード3の毒性には下痢、発疹、吐き気/嘔吐、高血圧、出血、たん白尿が含まれた。

### 6.3.2 乳癌

VEGFは乳癌細胞において発現しており<sup>211,212</sup>、VEGFレベルの測定が治療に対する予後診断及び奏効率のマーカーとして有用であることを示唆する証拠がある<sup>213,214</sup>。過去に治療を受けたことのある転移性乳癌の患者合計75人がBevacizumab単独治療のフェーズI/II臨床試験で治療された<sup>9</sup>。用いた投与量は2週間ごとに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、客観的な奏効が75人のうち7人でみられ、確認された奏効の中央値は5.5箇月であった。Bevacizumab 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人が高血圧性脳症、ネフローゼ症候群、たん白尿、吐き気及び嘔吐を伴う頭痛を含む有害事象により中断した。

BevacizumabのフェーズIII試験が過去にシステムチックな治療を受けた転移性乳癌の462人の患者で行われた<sup>215</sup>。患者は無作為にCepecitabineあるいはCepecitabine+Bevacizumabに割り振られた。Cepecitabineは3週間のうち2週間2回に分けて投与された。Bevacizumab（15 mg/kg）は3週間ごとに投与された。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。全奏効率はCepecitabine+Bevacizumabの方が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箇月：Cepecitabine+Bevacizumab対4.2箇月：Cepecitabine）あるいは全生存率（15.1箇月：Cepecitabine+Bevacizumab対14.5箇月：Cepecitabine）では有意な差はなかった。

E2100研究の結果が公表された<sup>216</sup>。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の無作為複数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振られPaclitaxel±Bevacizumabの治療を受けた。無増悪生存期間の中央値はPaclitaxel+Bevacizu-

mabを投与された患者で13.3箇月であるのに対し、Paclitaxel単独を投与された患者では6.7箇月であった。全生存期間の中央値はPaclitaxel+Bevacizumabを受けた患者で25.7箇月であるのに対し、Paclitaxel単独では23.8箇月であった。Paclitaxel+Bevacizumabを受けた患者とPaclitaxelを単独投与された患者における奏効率の比は2以上であった。Bebacizumab+DocetaxelのフェーズII試験が転移性乳癌の27人の患者で行われた<sup>217</sup>。全奏効率は52%であった。奏効期間及び無増悪生存期間の中央値はそれぞれ6.0箇月と7.5箇月であった。新しい補助としてDocetaxel及びDoxorubicinと併用した臨床研究、Trastuzumab及びErlotinibのような他の生物学的な治療薬との併用でBevacizumabの治療効果を検討する臨床試験及びBevacizumabとホルモン療法を併用した臨床試験が進行中である<sup>218</sup>。

### 6.3.3 非小細胞肺癌

非小細胞肺癌におけるBevacizumabを用いた臨床研究が行われている。無作為フェーズII試験において、Bevacizumab+Carboplatin+Paclitaxel、Carboplatin+Paclitaxelで局所に進行したあるいは転移性の非小細胞肺癌の治療が比較された<sup>219</sup>。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振られた。その組み合わせは3週間ごとにCarboplatin（AUG=6）及びPaclitaxel（200 mg/m<sup>2</sup>）（n=32）、3週間ごとにCarboplatin、Paclitaxel、Bevacizumab（15 mg/kg）の併用（n=35）、3週間ごとに先の投与量のCarboplatin、Paclitaxel、Bevacizumab（7.5 mg/kg）の併用であった。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及び腫瘍反応率であり、2番目のエンドポイントは全生存期間及び奏効期間であった。すべての治療群でCarboplatin及び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Bevacizumab（15 mg/kg）の方が、コントロール治療群（Carboplatin+Paclitaxel）よりも優っていた（7.4箇月対4.2箇月、p=0.023）。低投与量のBevacizumab（7.5 mg/kg）の無増悪期間は4.3箇月であった。奏効率は、コントロール治療群で18.8%、低投与量Be-

vacizumab 治療群で 28.8%，高投与量 Bevacizumab 治療群で 31.5%であった。生存期間について高投与量 Bevacizumab 治療群とコントロール治療群を比較すると、高投与量 Bevacizumab 治療群が優っているが（17.7 箇月対 14.9 箇月、 $p=0.63$ ）、統計的には有意ではない。なお、低投与量 Bevacizumab 治療群における生存期間は 11.6 箇月であった。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 Bevacizumab 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 箇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 Bevacizumab 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 Bevacizumab 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、そして原因不明であった。高投与量 Bevacizumab 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及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、化学療法剤及び Bevacizumab を投与された患者では起こらなかった。しかし、高血圧及びたん白尿は Bevacizumab 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。Bevacizumab 治療と関連した出血事象は注意深く調べられた。6 人の患者すべてで生命を脅かすほどの強い出血が起こり、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 人で扁平上皮癌の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+Bevacizumab の併用で臨床研究を進めた<sup>220</sup>。この研究では、進行性非小細胞肺癌の患者（扁平上皮癌の組織像は除外）に対し無作為に同じ投与量及び上記フェーズ II 試験と同じスケジュールで Paclitaxel/Carboplatin が割り振られた。また、434 人の患者が Paclitaxel/Carboplatin+Bevacizumab を 3 週間に 1 回静注で投与するよう無作為に割り振られた。最初のエンドポイントは全生存期間であり、2 番目のエンドポイ

ントは奏効率、無増悪生存期間及び耐容性であった。Bevacizumab を投与した患者で生存期間の中央値が有意に増加した（12.3 箇月対 10.3 箇月、 $p=0.003$ ）。奏効率は化学療法剤のみを投与した患者で 15%であるのに対し、Bevacizumab を投与した患者では 35%であった（ $p<0.001$ ）。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 箇月であるのに対し、Bevacizumab を投与した患者では 6.2 箇月であった（ $p<0.001$ ）。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 Bevacizumab を投与した患者のグループで好中球減少及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 0.7%であるのに対し、Bevacizumab を投与した患者では 4.4%であった。

Erlotinib のような他の生物学的な薬剤及び新しい補助を用いた Bevacizumab の試験が進行中である<sup>221,222</sup>。

#### 6.3.4 膵臓癌

VEGF の存在は膵臓癌細胞でも確認されており<sup>223</sup>、その発現の増加はより不良な予後と関連している<sup>224</sup>。進行性膵臓癌について Gemcitabine と Bevacizumab を併用して用いるフェーズ II 試験が行われた<sup>225</sup>。28 日を 1 サイクルとして Gemcitabine (1000 mg/m<sup>2</sup>) が 1, 8, 15 日に投与され、Bevacizumab (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 箇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 箇月であった。全体として、無増悪期間の中央値は 5.4 箇月であり、生存期間の中央値は 8.8 箇月、6 箇月の生存率は 77%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 Bevacizumab+Gemcitabine を比較する無作為フェーズ III 試験を進めている。

#### 6.3.5 卵巣癌

過去に複数の化学療法剤による治療を受け病態の改善がみられなかった難治性の上皮性卵巣癌の患者について Bevacizumab のフェーズ II 試験が行われた<sup>226</sup>。3 週間ごとに Bevacizumab (15 mg/kg) が 23 人の患者に投与された。16%の奏効率を示し、62.5%の患者が安定した症状を示した。生存期間の中央値は 6.9 箇月、無増悪期間の中央値は 6.9 箇月