

7. 今後の課題

7.1 抗血管新生治療薬が最大の治療効果をもたらす最適なタイミング

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

7.2 抗VEGF療法における潜在的な落とし穴

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

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

進しているかを考慮に入れる必要がある。

7.3 抗血管新生療法の有効性を増加させる戦略

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

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

7.4 抗血管新生療法に対する抵抗性の獲得

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

7.5 抗血管新生治療薬の有害事象の低減

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

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

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

7.6 適切なエンドポイントの設定

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

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

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

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

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

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

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

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

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

おわりに

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

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

謝 辞

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

文 献

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

癌に対する抗血管新生療法の現状と展望 (その2)

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

(受付:平成20年1月23日, 受理:平成20年5月12日)

State and Perspective of Anti-Angiogenic Therapy to Cancer 2

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

はじめに

血管新生は腫瘍の成長と進行において重要な役割を果たしていることが明らかになり¹⁾, ヒト癌治療の新しい治療法として抗血管新生治療が注目されている。これまで多くの非臨床及び臨床研究が行われているが, 最適な治療法は確立されていない。現在, Bebacizumab に代表される血管新生促進因子に対する抗体による治療とともに注目されているのは遺伝子治療である。遺伝子治療はこれら各種抗体を含めたタンパク質による治療に比べて以下の点で優れた特徴を有することから将来の治療法として期待されている。

- (1) 遺伝子の安定性-内皮細胞は腫瘍細胞よりもはるかに遺伝的に安定であるため, 治療薬に対して抵抗性を与えるような変異の蓄積が起りにくい²⁾。したがって, 遺伝的に安定な内皮細胞をターゲティングして抗血管新生タンパク質を持続的に発現する遺伝子治療の戦略は効果的であると考えられる。
- (2) 選択的な低レベルの持続的な投与-病理的な血管新生を効果的に抑制するには最終的に長期

間にわたる治療が必要となる。抗血管新生タンパク質を投与した場合よりも遺伝子治療薬による抗血管新生タンパク質の発現レベルが低い場合もありうるがその発現は恒常的である。したがって, 遺伝子治療薬のほうがタンパク質よりも治療効果が高い可能性がある^{3,4)}。また, 遺伝子治療は治療が必要とされる組織に対して選択的にデリバリーできるという点でも有用である⁴⁾。特にこの点は小型非開裂細胞リンパ腫及び卵巣癌のような局所的な治療に効果的であり, 抗血管新生効果を限定させることにより生体において必須の生理的な機能の望ましくない抑制を回避し有害効果を減少できる⁵⁾。

- (3) 血管新生のスイッチ-正常細胞が癌細胞に形質転換するには遺伝的及びエピジェネティックな要因が関与する。しかし, これら以外に血管新生のスイッチと呼ばれる腫瘍血管のスイッチが腫瘍の伝搬と進行における重要なステップである⁶⁾。この観点において, 腫瘍が致死的なレベルまで発達するには生体における血管新生の助けが必要となる⁷⁾。したがって, 遺伝子治療は内在性の血管新生防御能を持続的に高めるこ

* 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

とにより腫瘍の発達を抑制することができる。

- (4) 生産コスト-機能を有するタンパク質を組換えにより産生するには多額の費用がかかるため使用に十分な量が供給できない場合がありうる。例えば、非臨床研究において最も広く研究されその有用性が指摘されている血管新生阻害剤である Angiostatin 及び Endostatin はそのため生産が最近中止されている⁹⁾。一方、遺伝子治療では患者自身が抗血管新生タンパク質生産の工場となるためこのような危惧は回避される。
- (5) 正確なフォールディングと安定性-投与された遺伝子治療薬は生理的な条件でタンパク質を発現するため、発現タンパク質は正確なフォールディングを受け *in vivo* において安定であることが期待できる^{9,10)}。

本稿では癌に対する抗血管新生療法としての遺伝子治療の動物モデル及び臨床試験における現状及び今後克服すべき課題について概説する。なお、本総説では遺伝子治療ばかりではなく“small interfering RNA” (siRNA) 及びアンチセンスなどの核酸医薬を用いた治療も含む。本稿ではふれないが、血管新生の詳細及びそれに関与する促進因子、タンパク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抗血管新生療法の非臨床及び臨床研究の現状及び展望、腫瘍における血管新生の詳細については著者の総説を参考にされたい^{11,12)}。なお、本稿は成書を参考にした¹³⁻²¹⁾。

1. 癌に対する抗血管新生療法としての 遺伝子治療の非臨床研究

本稿では“RNA interference” (RNAi) などによる血管新生促進因子の発現及び機能抑制、抗血管新生タンパク質の遺伝子治療及び自殺遺伝子療法などの癌に対する抗血管新生療法の非臨床研究の結果について述べる。以下に示すように各種担癌モデル動物などを用いた試験では多くの場合で有効性を示す結果が得られている。

1.1 VEGF 及び VEGF 受容体を標的とする

RNAi は二本鎖 RNA により誘導される配列特異的な遺伝子のサイレンシングである。21-23 mer の siRNA のヌクレオチドを導入することにより特定の遺伝子の発現をノックダウンできる。VEGF 受容体に対する siRNA は血管新生をブロックするこ

とにより腫瘍の容積を減少できる²²⁾。転写抑制に作用する zinc finger タンパク質の発現と VEGF-A に対する siRNA を組み合わせることにより VEGF-A が転写及び翻訳レベルで抑制される²³⁾。ユーイング肉腫に VEGF “short hairpin RNA” (shRNA) 発現ベクターを導入し、無胸腺マウスに投与すると血管密度が低下する²⁴⁾。腫瘍内にポリエチレンイミン/VEGF siRNA を投与すると腫瘍の成長が抑制される。VEGF siRNA 発現ベクター系の導入によりヒト白血病皮下異種移植モデルマウスにおける腫瘍の血管新生及び腫瘍の成長が劇的に抑制される²⁵⁾。マウスの皮下で生着した腫瘍に対する VEGF siRNA の治療効果が2つのグループにより同じヒト前立腺癌モデルで評価されている。アテアロコラーゲンと複合体を形成させた siRNA を40日にわたり10日ごとに腫瘍内に投与すると、腫瘍の血管新生及び成長が劇的に抑制される²⁶⁾。ヒト線維肉腫細胞を VEGF-A に対する siRNA とともに無胸腺マウスに投与すると、腫瘍の成長が遅くなり、血管密度が減少し、アポトーシスが増加する²⁷⁾。悪性黒色腫細胞に VEGF siRNA 発現プラスミドを導入し、マウスに移植すると、腫瘍の成長が阻害され、微小血管密度が減少し、腫瘍のアポトーシスが増加する²⁸⁾。VEGF-A siRNA を発現する裸のプラスミドを難治性前立腺癌モデルマウスに投与すると、微小血管密度が減少し、腫瘍の成長が長期間にわたり遅くなる²⁹⁾。VEGF siRNA と cholesteryl oligo-d-arginine の非共有結合複合体を皮下腫瘍マウスモデルに投与すると、腫瘍が退行する³⁰⁾。VEGF siRNA を網膜芽腫マウスモデルに投与すると、腫瘍の成長及び血管新生が抑制される³¹⁾。

“Antisense oligodeoxynucleotide” (ASO) は mRNA の翻訳をブロックする合成分子である。VEGF に対する ASO を頭頸部扁平上皮癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が抑制される³²⁾。肝癌の治療薬である lipiodol と VEGF に対する ASO を混合して投与すると、肝癌の成長の抑制、微小血管密度の阻害がそれぞれ単独に比べてより効果的に起きる³³⁾。VEGF に対する ASO をリンパ腫モデルマウスに投与すると、微小血管密度が低下する³⁴⁾。膵臓癌ドナー腫瘍の断片をヌードマウスの膵臓に投与後 VEGF に対する ASO を投与すると、腫瘍の容積及び転移の速度が低下するとともに微小血管密度が低

下する³⁵。カチオニックリポソームで処方した VEGF に対する ASO をルイス肺腫瘍モデルマウスに投与すると、血管新生が阻害され腫瘍の血流が損傷される³⁶。VEGF-C に対する ASO を膵臓癌モデルマウスに投与すると、微小血管密度は低下しないがリンパ管の密度は低下する³⁷。VEGF に対する ASO と低分子ヘパリンを肺腫瘍モデルマウスに投与すると、それぞれ単独に比べて腫瘍の成長速度が遅くなり、微小血管密度が減少する³⁸。VEGF 受容体に対する ASO を docetaxol と共に頭頸部扁平上皮癌モデルマウスに投与すると、それぞれ単独に比べ腫瘍の容積がより抑制される³⁹。VEGF 受容体に対する ASO を腎細胞癌細胞である Caki-1 細胞に導入しヌードマウスに投与すると腫瘍血管の数が半分に低下する⁴⁰。同細胞を用いた腎細胞癌モデルマウスに VEGF 受容体に対する ASO を投与すると、腫瘍の大きさが低下し腫瘍の成長速度が低下する。VEGF の受容体である KDR/Flk-1 に対する ASO を胃癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の腹膜への播種が減少すると共にアポトーシス細胞が増加し微小血管密度が低下する⁴¹。

“Soluble FMS-like tyrosine kinase receptor 1” (sFlt-1) は VEGF の受容体であり、*in vitro* 及び *in vivo* で VEGF を遮蔽し、他の膜貫通 VEGF 受容体と不活性のヘテロダイマーを形成する⁴²。“Adeno-associated virus vector” (AAV) を介して sFlt-1 遺伝子を導入したヒト卵巣癌細胞をヌードマウスの腹腔に投与すると、癌細胞の数が減少し、生存期間も延長する⁴³。“Adenovirus vector” (AV) を介して sFlt-1 遺伝子を導入したヒト卵巣癌細胞を無胸腺マウスの皮下に投与すると、腫瘍小結節が小さくなり、生存期間も延長する⁴⁴。AV を介して sFlt-1 あるいは Flk-1 遺伝子をルイス肺癌、繊維肉腫、膵癌モデルマウスに静脈投与すると、腫瘍の成長が 80% 阻害される⁴⁵。AAV を介して sFlt-1 遺伝子をマウスの骨格筋に投与後卵巣癌細胞を皮下及び腹腔に投与すると、腫瘍の成長が抑制される⁴⁶。sFlt-1 遺伝子を AAV を介してヌードマウスの筋肉内に投与すると、ヒト卵巣癌細胞に対して防御反応を示し、無病生存率を増加させる⁴⁷。pCMV ベクターに組み込んだ sFlt-1 遺伝子と PEI-g-PEG-RGD の複合体を皮下腫瘍モデルに尾静脈投与すると、腫瘍の成長が抑制される⁴⁸。一方、RGD を除いた同様

の複合体ではこの効果は観察されない。多発性骨髄腫モデルマウスに AV を介して sFlt-1 遺伝子を静脈投与すると、骨髄腫の容積及び微小血管密度が低下する⁴⁹。

FLK は VEGF 受容体である。“Retrovirus vector” (RV) を介してドミナントネガティブの FLK 遺伝子をグリア芽腫モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が阻害される⁵⁰。RV を介して可溶性 FLK 遺伝子を S180 及び B16 細胞に導入しマウスに投与すると、腫瘍の重さ及び大きさが小さくなり微小血管密度も低下する⁵¹。RV を介して可溶性 FLK 遺伝子を S180, MCF-7, B16 細胞担癌マウスに局所的に投与すると、腫瘍の大きさ、転移病巣の数、微小血管密度が低下する⁵²。AV を介して可溶性 FLK 遺伝子を卵巣癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長及び微小血管密度が低下する⁵³。この効果は cis-diamminedichloroplatinum の共投与により増強される。

1.2 FGF-4 を標的とする

アテアロコラーゲンと FGF-4 siRNA 複合体を腫瘍内に投与すると、ヒト胚細胞腫瘍の異種移植モデルにおいて腫瘍の成長が効果的に抑制される⁵⁴。

1.3 CD31/Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 を標的とする

CD31/“Platelet endothelial cell adhesion molecule-1” (PECAM-1) は血液循環血漿、単球、好中球、T 細胞の一部の表面に発現する 130-kDa のタンパク質であり、内皮細胞間の接合の主要な構成要素である⁵⁵。二つの異なった異種移植モデルマウスにおいて、生着した腫瘍を有するマウスの皮下に抗 CD31 siRNA lipoplex を投与すると、血管の長さが減少し、リンパ節転移の容積及び腫瘍の成長が抑制される⁵⁶。

1.4 Thrombospondin 1 及び 2

“Thrombospondin 1” (TSP-1) 及び TSP-2 は内在性の血管新生阻害剤である。TSP-1 のフラグメントの遺伝子及び p53 遺伝子をリポソームと複合体を形成させ、大腸癌モデルマウスに投与すると、それぞれ単独に比べて腫瘍の成長が阻害され微小血管密度が低下する⁵⁷。TSP-1 を過剰発現させたヒト扁平上皮癌細胞である A431 及び SCC-13 細胞をマウスに移植し、血管新生の抑制効果が検討されている⁵⁸。その結果、コントロールの細胞と比べ A431

異種移植の腫瘍の成長は阻害され、腫瘍血管の数及び大きさが減少する。SCC-13細胞の腫瘍形成は完全に消失する。TSP-1遺伝子発現ベクターをトランスフェクション試薬であるSOSPERTと混合しヒト膀胱癌異種移植モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の成長の抑制及びアポトーシスの促進が起こり、微小血管密度が低下する⁵⁹⁾。RVを介してTSP-2を繊維芽細胞に導入後細胞を生分解性の高分子足場に播種しヒト扁平上皮癌、悪性黒色腫、ルイス肺腫瘍モデルマウスの腹腔内に投与すると、腫瘍の成長及び血管新生が阻害される⁶⁰⁾。TSP-1遺伝子をLN-229ヒト神経グリオーマ細胞に導入し免疫不全マウスに投与すると、コントロールの細胞と比べ腫瘍の成長が抑制され血管の容積及び血管の数が低下するが、腫瘍へのかん流は変化しない⁶¹⁾。AVを介してTSP-1の抗血管新生フラグメント遺伝子を白血病モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の容積及び微小血管密度が低下する^{62,63)}。RVを介してTSP-2 N末端領域の遺伝子をマウス不死化細胞に導入し腫瘍担癌マウスに投与すると、腫瘍の容積が低下し、腫瘍が40%まで根絶する。AVを介してTSP-2 N末端領域の遺伝子を扁平上皮癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると腫瘍の成長及び容積、腫瘍血管の面積及び大きさが低下する⁶⁴⁾。Salmonella choleraesuisベクターを介してTSP-1遺伝子を原発性黒色腫及び実験的肺転移モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が阻害され腫瘍内微小血管密度が低下し生存期間が延長する⁶⁵⁾。

1.5 Mapsin

Mapsин 遺伝子は p35 及び DNA methyltransferase により転写調節される腫瘍抑制遺伝子である。その発現レベルは悪性腫瘍で減少し、転移性の細胞では消失する^{66,67)}。Mapsин 遺伝子を導入した乳癌細胞をヌードマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍誘導能及び転移能が低下する⁶⁸⁾。また、AAV-2を介してヒト Mapsин 遺伝子を発現すると、前立腺癌における血管新生を阻害され腫瘍の成長が効果的に抑制される⁶⁷⁾。乳癌細胞を乳腺に同種移植して乳腺の中で腫瘍を成長させるとともに他の器官に転移させる同系転移モデルマウスにおいて、非ウイルスリポソームをキャリアとして用いた Mapsин 遺伝子デリバリーの効果が検討されている⁶⁹⁾。その結果、コントロールの細胞に比べて原発

性腫瘍の成長と転移が抑制され、腫瘍のアポトーシスが増加する。AAVを介して Mapsин 遺伝子を前立腺癌モデルマウスの腫瘍内にデリバリーすると、腫瘍の成長が抑制され、生存期間が延長する⁶⁷⁾。

1.6 ヒト ribonuclease inhibitor

ヒト“ribonuclease inhibitor”(RI)は分子量50-kDaの酸性タンパク質であり、膵臓のRNase活性を阻害する⁷⁰⁾。ヒトRIは血管新生促進因子であるAngiostatinと強い複合体を形成し血管新生を阻害すると考えられている⁷¹⁾。RI遺伝子を造血細胞に導入しマウスに移植すると、腫瘍の成長が47%まで阻害され、微小血管密度が低下する⁷⁰⁾。RVを介してRI遺伝子を導入した黒色腫細胞をマウスに投与すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍重量の低下を伴う腫瘍成長の阻害、微小血管密度の低下、潜伏期間の延長、生存期間の延長が観察される⁷²⁾。RVを介してRI遺伝子を黒色腫モデルマウスに投与すると、コントロールの細胞に比べ血管の低下を伴い腫瘍の成長が低下する⁷³⁾。RI遺伝子をpcDNA発現ベクターに組み込み黒色腫細胞に導入しマウスに静脈投与すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の転移性進行が抑制され血管の数が低下し、生存期間が延長する⁷⁴⁾。

1.7 Survivin を標的とする

Survivinは癌及びリンパ種で過剰発現する抗アポトーシス遺伝子である⁷⁵⁾。Survivinは正常皮膚の非増殖性毛細血管の内皮ではほとんど発現しないが、*in vivo*の肉芽組織において新しく形成された血管で高発現している。したがって、内皮にSurvivinを発現させると腫瘍の血管新生が促進される可能性がある⁷⁶⁾。AAVを介してSurvivin Cys84Ala変異体を発現させると結腸癌における血管新生が抑制される⁷⁷⁾。“Lentivirus vector”(LV)を介してSurvivin shRNAを口腔扁平上皮癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が抑制される⁷⁸⁾。膀胱癌モデルマウスの腫瘍内にSurvivin siRNAを投与すると、腫瘍の成長が抑制される⁷⁹⁾。Survivinに対するASOを肝臓癌モデルマウスに静脈内投与すると、腫瘍の成長が抑制される⁸⁰⁾。AVを介してドミナントネガティブSurvivin遺伝子を肝臓癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が阻害され生存期間が延長される⁸¹⁾。プラスミドを介してSurvivin shRNAを横紋筋肉腫モデルマウスに皮下投与する

と、腫瘍の成長が70%低下する⁸²⁾。

1.8 Interferon

“Interferon” (IFN) が血管新生の阻害剤として作用することが明らかになったきっかけは1980年にIFN- α と内皮細胞の傷害の関連が発見されたことであり、その後血管新生の阻害剤としての特性解析がなされた⁸³⁾。

1.8.1 IFN- α

IFN- α 遺伝子をRVの1つであるLXNベクターに挿入し、GP+envAm12パッケージング細胞に導入し、その細胞を高い血管新生能を有するカポジ肉腫細胞と同時にヌードマウスに投与すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が強く抑制される⁸⁴⁾。その効果はIFN- α cDNAを発現させるレトロウイルスを直接投与した場合と同じである。RVを介してIFN- α 遺伝子を発現させたヒト乳癌細胞をヌードマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べて腫瘍の血管新生が低下し腫瘍の成長が長期間阻害される⁸⁵⁾。LVを介してIFN- α 遺伝子を卵巣癌モデルマウスに投与すると、生存が延長される⁸⁶⁾。RVを介してIFN- α 遺伝子を導入した結腸直腸癌細胞を免疫不全マウスに移植すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍原性が低下する⁸⁷⁾。同じ結腸直腸癌細胞を用いて作成された結腸直腸癌モデルマウスに先のIFN- α 遺伝子を導入した細胞を投与すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が抑制される。RVを介してIFN- α を導入した繊維芽細胞あるいはRapamycin類似体であるAP 21967により誘導されるプロモーターでIFN- α 遺伝子を産生する繊維芽細胞を卵巣癌モデルマウスの腫瘍内に投与し、抗腫瘍効果が比較検討されている⁸⁸⁾。IFN- α 遺伝子を恒常的に発現する繊維芽細胞を用いた場合は、腫瘍の血管新生が阻害され生存期間が延長される。一方、誘導性プロモーターでIFN- α を発現する繊維芽細胞ではこれらの効果は弱い。AVを介してIFN- α 遺伝子を肺臓癌モデルハムスターの皮下腫瘍に投与すると、投与部位の腫瘍だけでなく腹膜及び離れた領域における腫瘍も成長が抑制される⁸⁹⁾。

1.8.2 IFN- β

AVを介してIFN- β 遺伝子を乳癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が阻害され多くの場合で腫瘍が完全に退行する⁹⁰⁾。RVを介してIFN- β 遺

伝子を前立腺癌細胞に導入し、ヌードマウスの前立腺あるいは皮下組織に移植すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長及び局所的なリンパ節転移が抑制される⁹¹⁾。また、同細胞によるバイスタンダー効果で、非導入前立腺癌細胞の腫瘍形成も抑制される。AVを介してIFN- β 遺伝子を前立腺癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長及び転移の広がりが抑制され微小血管の数が低下する⁹²⁾。AVを介してIFN- β 遺伝子を結腸直腸癌肝臓転移モデルマウスに投与すると、肝臓の腫瘍のアポトーシスが促進され腫瘍が退行し生存が延長する⁹³⁾。AVを介してIFN- β 遺伝子を膀胱移行上皮癌細胞に導入しヌードマウスの膀胱に移植すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の形成及び突発性リンパ節転移が阻害される⁹⁴⁾。同遺伝子を膀胱移行上皮癌モデルマウスに投与すると、腫瘍のネクロシスが起き微小血管密度が低下する。皮下及び後腹膜神経芽腫細胞をマウスに移植し、5日後にAAVを介してIFN- β 遺伝子を投与すると、腫瘍の発達はみられない⁹⁵⁾。AVを介してIFN- β 遺伝子を5-Fluorouracilとともに結腸直腸癌肝臓転移モデルマウスに投与すると、腫瘍の退行及びアポトーシスが起き生存期間が延長する⁹⁶⁾。この場合、治療効果に必要なベクター量はベクターのみを投与する場合に比べて少ない。AAVを介してIFN- β 遺伝子を神経芽細胞腫の同所局在後腹膜及び播種モデルマウスに投与し肝臓でIFN- β を持続的に発現させると、腫瘍の成長が抑制され微小血管密度が低下し生存期間が延長される⁹⁷⁾。これと併用して低濃度でCyclophosphamideを投与すると腫瘍が退行する。AVを介してIFN- β 遺伝子を前立腺癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の成長が阻害され生存期間が延長する⁹⁸⁾。

1.8.3 IFN- γ

パッケージング細胞を用いてIFN- γ 遺伝子を発現させるレトロウイルスを産生させ、その細胞を頭蓋内神経膠腫モデルマウスに投与すると腫瘍の根絶がみられ生存期間が延長する⁹⁹⁾。

1.9 TNF- α

TNF- α は抗血管新生因子であり抗腫瘍効果を有する¹⁰⁰⁾。AVを介してTNF- α 遺伝子をDoxorubicinとともにDoxorubicinに抵抗性の前立腺癌及び結腸癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の微小血管密度が低下して血管新生が阻害され抗腫瘍効果を

示す¹⁰¹⁾。

1.10 Interleukin-12

“Interleukin-12” (IL-12) は強力な抗血管新生及び抗腫瘍活性を有する^{102,103)}。

セムリキ森林熱ウイルスベクターを介してIL-12遺伝子を黒色腫モデルマウスに投与すると、腫瘍のネクロシスが起きるとともに血管新生が抑制され腫瘍の成長が阻害される¹⁰⁴⁾。AVを介してIL-12遺伝子を乳癌モデルマウスの腫瘍に投与すると、微小血管密度が減少し腫瘍の退行が起きる¹⁰⁵⁾。この効果はAVを介してAngiostatin遺伝子を共投与することにより増強される。AVを介してIL-12遺伝子を肝癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の成長が阻害され腫瘍の50%で完全な退行が起き生存期間が延長される¹⁰⁶⁾。裸のDNAを介してIL-12遺伝子をカポジ肉腫及び乳癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の血管新生及び成長が阻害される¹⁰⁷⁾。発現ベクターを介してIL-12遺伝子をPolyvinylpyrrolidoneとともに肝癌モデルマウスに投与すると、腫瘍血管の数が少なくなりアポトーシスが增加し腫瘍の成長が阻害される¹⁰⁸⁾。この効果は発現ベクターを介してEndostatin遺伝子をPolyvinylpyrrolidoneとともに共投与することにより増強される。エレクトロポレーション法を用いてIL-12遺伝子を免疫不全肝癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、微小血管の数が低下し腫瘍の成長が抑制される¹⁰⁹⁾。この効果は免疫応答性を有するモデルマウスでも同じようにみられる。RVを介してIL-12遺伝子を頭頸部扁平上皮癌モデルマウスに投与すると、血管密度の低下及びアポトーシスの増加を伴い腫瘍が退行し腫瘍の成長が阻害される¹¹⁰⁾。非ウイルスベクターを介してIL-12遺伝子を頭頸部癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、血管密度が減少し腫瘍細胞の増殖が抑制されアポトーシスが增加する¹¹¹⁾。この効果はFlk-1をコードするSalmonella typhimurium DNAワクチンを経口で共投与することにより増強される。エレクトロポレーション法を用いてIL-12遺伝子を転移性乳癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、腫瘍の容積及び微小血管密度が低下しリンパ管及び肺への転移が阻害される¹¹²⁾。

1.11 Tissue inhibitors of metalloproteinase

“Matrix metalloproteinase” (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おり、生理的及び病理的な血管新生、病理的な腫瘍の成長及び転移に必須の成分である¹¹³⁾。“Tissue inhibitors of metalloproteinase” (TIMP) はこれらMMPの作用を阻害する¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾。

パッケージング細胞を用いてTIMP-2遺伝子を発現させるレトロウイルスを産生させ、その細胞と腫瘍原性を有するHa-ras導入ラット胎児繊維芽細胞をともにヌードマウスに移植すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が遅れる¹¹⁷⁾。また、その腫瘍の結合組織皮膜は厚く局所的な浸潤は見られない。AVを介してTIMP-1あるいはTIMP-2遺伝子を腹腔内膵臓癌モデルマウスに投与すると、浸潤が低下し生存期間が延長される¹¹⁸⁾。TIMP-1遺伝子を膵臓癌細胞に導入しその細胞をマウスの皮下あるいは膵臓に投与し抗腫瘍効果が検討されている¹¹⁹⁾。膵臓に投与した場合、コントロールの細胞に比べ移植の効率は低く成長した腫瘍及び転移の数は少ない。また、アポトーシスが增加し、血管新生が減少する。皮下投与した場合は、腫瘍の発現が遅れる。RVを介してTIMP-2遺伝子を乳癌細胞に導入しその細胞をヌードマウスに投与すると、コントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が遅れる¹²⁰⁾。TIMP-2 RV産生細胞を乳癌モデルマウスの腫瘍内に投与すると、肺転移腫瘍の大きさ及び数が劇的に減少する。AVを介してTIMP-3遺伝子を肺癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の成長が阻害される¹²¹⁾。またその治療効果はTIMP-1あるいはTIMP-2遺伝子を用いた場合よりも高い。ヒトカポジ肉腫細胞にAAVを介してTIMP-1遺伝子を導入し、ヌードマウスに移植するとコントロールの細胞に比べ腫瘍の成長が顕著に抑制される¹²²⁾。同様に、腫瘍担癌モデルにおいて直接腫瘍に投与すると腫瘍容積の拡大が顕著に抑制される。

1.12 Platelet factor 4

“Platelet factor 4” (PF4) は*in vitro*で内皮細胞の増殖を阻害し*in vivo*の実験モデルで血管新生及び腫瘍の成長を阻害する¹²³⁻¹²⁵⁾。AVを介して可溶性PF4遺伝子を大脳内神経膠腫モデルマウスに投与すると、腫瘍内の血管が低下し成長が遅くなるとともに血管新生が阻害され生存期間が延長する¹²⁶⁾。RVを介してPF-4遺伝子あるいはPF-4遺伝子の17~70番目までの遺伝子を扁平上皮癌細胞