

# 総 説

## 血管内皮増殖因子 (VEGF)

奈良県立医科大学第3内科学教室

吉 治 仁 志, 福 井 博

### VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

HIROSHI YOSHIJI and HIROSHI FUKUI

*Third Department of Internal Medicine,  
Nara Medical University*

Received February 2, 2004

抄録：血管新生は個体の発生や発育にとって必要不可欠の生命現象であるが、通常の成体ではごく限られた部位で行われているだけである。ところが、癌の発育や糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、臓器の線維化進展など多くの病的状態においては異常に亢進した血管新生が生じ、この異常な血管新生がそれぞれの病態進展と密接に関連することが近年の研究より明らかにされている。生体における血管新生は血管新生因子と抑制因子とのバランスにより規定されている。これまでに多くの血管新生因子が見いだされているが、これらの中で最も重要、かつ中心的な役割を持つものとして血管内皮増殖因子 (VEGF) がある。本稿では、病的血管新生のうち臨床上最も問題となるであろう腫瘍血管新生について、臨床的に血管新生が極めて亢進していることが古くから知られている肝癌を中心に、VEGF の役割、及び VEGF 制御による病態制御の可能性などについて概説したい。

**Key words** : VEGF, angiogenesis, hepatocellular carcinoma

### はじめに

血管新生は個体の発生のための胎生期における血管形成や発育にとって必要不可欠の現象であるが、通常成熟した個体における血管新生は女性性周期における卵胞や子宮内膜などのごく限られた部位で生体におけるホメオスタシスを保つために行われているだけである。ところが、癌の発育や糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、さらには臓器の慢性炎症などによる線維化の進展など多くの病的状態においては異常に亢進した血管新生が生じ、この異常な血管新生がそれぞれの病態進展と密接に関連することが近年の研究より明らかになり、血管新生のメカニズムおよび血管新生制御に基づく各種病態の治療法開発などの研究が世界中で精力的に行われている<sup>1)</sup>。

病的な血管新生のうちでも臨床的に最も問題となるのが腫瘍血管新生であろう。正常の細胞が癌化していく過程には癌遺伝子の変異や癌抑制遺伝子の欠損、酸化ストレス、テロメラーゼなど多くの因子が複合的に作用することは広く知られている。しかしこの複雑なステップを経て癌化した細胞が臨床的に診断し得る固形癌となるには血管新生が必須であるとされている<sup>2)</sup>。腫瘍血管新生の研究は1970年代のFolkmanらの先駆的な仮説の提唱に始まる。彼らは血管から酸素が拡散によって供給される距離はたかだか200から250 $\mu$ mであり、これより離れた腫瘍細胞は新生血管の誘導がなければ壊死することを示した<sup>3)</sup>。すなわち、腫瘍細胞が生存し、増殖していくためには既存の血管のみでは不十分であり、新たな血管新生がなければ腫瘍は数mm以上に成長することは

きず、休眠状態(tumor dormancy)の状態を保っているとされる。実験的にも、アンジオスタチンなどの内因性血管新生阻害因子を投与することにより、腫瘍が休眠状態に留まりそれ以上には成長しないことが報告されている<sup>9)</sup>。これまでの抗癌剤は遺伝的に極めて不安定な癌細胞を標的としていたため、容易に薬剤耐性が生じ、数度の治療後に効果が著しく減弱することがしばしば認められた。これに対し、抗血管新生療法は遺伝的に安定な血管内皮細胞をターゲットとしているために、薬剤耐性などは極めて生じにくいとされている。さらに癌細胞は深部に存在するのに対して、内皮細胞は投薬されたものが最初に接する部分であり、有効投与量も少なく済み、抗癌剤の大量投与時に認められる骨髄抑制などの副作用も極めて生じにくい。さらに、通常の抗癌剤との比較において、動物実験レベルではあるが、抗癌剤は数度の治療にて不応性となるのに対し、血管新生阻害剤では耐性は全く生じず、さらに何度か治療を続けていくうちに、血管新生阻害剤の投与を中止しても腫瘍発育が起こってこないということが報告されている<sup>10)</sup>。従って、癌に対する血管新生をターゲットとする治療法の開発はこれまでの既存の癌治療とは異なったコンセプトに基づく新しいタイプの治療法として世界中で現在精力的に研究が行われている。また、血管新生阻害剤は既存の抗癌剤や、放射線治療と併用することにより増感効果を示し、それぞれの単独作用を加えた相加作用よりも強い相乗治療効果を示すことが報告されている<sup>7-10)</sup>。

腫瘍を含む生体内での血管新生は Vascular endothelial growth factor (VEGF: 血管内皮増殖因子) や Basic fibroblast growth factor (bFGF) などに代表される血管新生因子とアンジオスタチンなどの血管新生阻害因子とのトータルでのバランスによって規定されている。これまでに多くの血管新生因子が見いだされているが、これらの中で VEGF は中心的な役割を果たす因子として知られている<sup>11-14)</sup>。本稿では、臨床的にも血管新生が亢進していることが古くから知られている肝癌を中心に、我々の研究結果を含めて VEGF の役割、及び VEGF 制御による腫瘍制御の可能性などについて概説したい。

### VEGF とその受容体

VEGF は Senger らによって 1983 年に腫瘍細胞の腹水貯留因子として同定され、当初その強力な血管透過性から VPF (vascular permeability factor) と命名された。その後、血管内皮細胞に特異的な増殖因子として VEGF が同定され、この 2 つの遺伝子はクローニングの結果、同一のものであることが確認され、以後 VPF/VEGF とま

とめられている。VEGF には現在 VEGF-A から VEGF-E までのサブファミリーが同定されている。未だ生体内での役割が明らかでないものもあるが、腫瘍発達においては VEGF-A が中心的役割を果たしているものと考えられている。現在一般的に VEGF と呼ばれているものは、この VEGF-A である(以後 VEGF と表記する)。VEGF はそのスプライシングの違いからヒトでは 5 つのアイソフォームが知られている (VEGF<sub>121, 145, 165, 189, 206</sub>) (図 1)。VEGF は酸に安定なホモダイマーであり、活性化にはダイマー化が必要である。他の代表的な血管新生因子である bFGF と異なり、26 のアミノ酸からなるシグナルペプチド配列を持っているため分泌されるが、その性質はアイソフォームによって異なっており、VEGF<sub>121</sub> と VEGF<sub>165</sub> はそのまま分泌されるものの、VEGF<sub>189, 206</sub> はヘパリン親和性が強く、細胞表面の細胞外基質に結合してほとんど分泌されず、リガンドの貯蔵や細胞間のシグナル伝達に関わっているとされている。これらのアイソフォームのうち VEGF<sub>165</sub> が腫瘍で産生されるものとして最もポピュラーである。

VEGF は基本的には内皮細胞に存在する受容体に対しパラクライン的に作用する(図 2)。VEGF の作用は大別すると、内皮細胞に対するものと、それ以外のマクロファージなどの細胞に対するものがあるが、その大部分は内皮細胞に対するものである。現在までに報告されている VEGF の生物学的作用は極めて多岐にわたっている。血管内皮細胞に対する作用としては、血管の増殖、遊走、分化や透過性の亢進に加えて、凝固、線溶系蛋白、一酸化窒素(Nitric oxide) の産生促進などの作用を持つこ

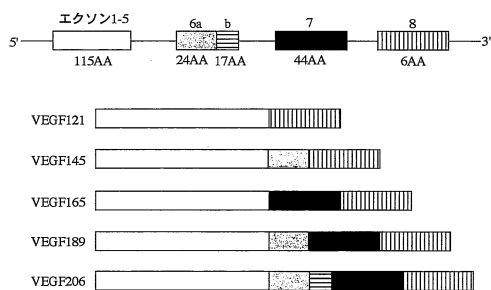


図 1. VEGF のサブファミリータイプ  
VEGF はスプライシングの違いからヒトにおいては 5 つのアイソフォームが知られている。VEGF<sub>121, 145, 165, 189, 206</sub> のなかでは VEGF<sub>121, 165</sub> がおもに分泌され、腫瘍から産生されるものとしては VEGF<sub>165</sub> が最もポピュラーである。VEGF<sub>189, 206</sub> は細胞表面に結合しており、リガンドの貯蔵や細胞間のシグナル伝達に関与していると考えられている。(文献 32 から一部改変)

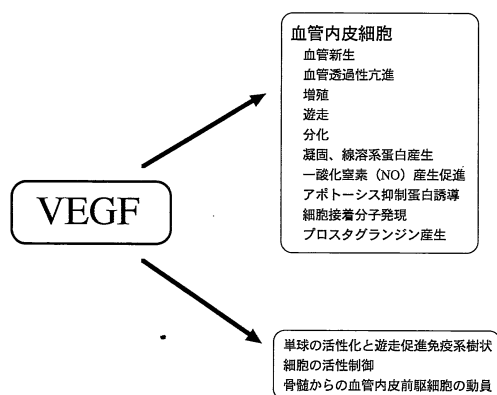


図2. VEGFの多彩な生物学的活性

VEGFは主に内皮細胞に存在する受容体を介してパラクライン的に作用する。その多彩な生物活性は血管新生 (Angiogenesis) および血管形成 (Vasculogenesis) において不可欠な役割を果たしている。(文献13から一部改変)

とが示されている。さらに VEGF は他の血管新生因子と異なり、内皮細胞にとって生存に必須の因子であることが報告されており、この作用は bFGF などの他の因子では置き換えることができないとされている<sup>19)</sup>。当初、この内皮細胞の生存因子としての作用は発生段階のみのことと考えられていたが、最近になり、腫瘍が発育していく際の腫瘍内の内皮細胞にも同様の作用を持つことが報告された。また VEGF 以外の HGF や bFGF, EGF などの血管新生因子は血管内皮細胞由来の内因性 VEGF が存在することにより初めて血管新生作用を発揮し、VEGF 非存在下では血管新生作用を示さないことが報告されている<sup>19)</sup>。内皮細胞以外に対しても、単球の活性化と遊走促進、免疫系樹状細胞の活性制御、さらに血管内皮前駆細胞の骨髄からの動員などの作用をも示すとされている。これら多彩な生物学的作用から、VEGF/ 受容体系は血管新生において不可欠な役割を果たしているものと考えられている。

VEGF の受容体としては、現在までに flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk-1 (VEGFR-2) 受容体型チロシンキナーゼが報告されている (図3)。flt-4 (VEGFR-3) は VEGF-C, D と結合するとされている。最近、VEGF<sub>165</sub> と結合して VEGFR-2 との親和性を増強させるものとしてニューロピリンが報告された<sup>17)</sup>。ニューロピリン-1 はもともと神経の走行を制御するものとして同定されたが、VEGF を細胞膜に結合し VEGFR-2 に引き渡す機能を持っていると考えられており、ニューロピリン-1 のノックアウトマ

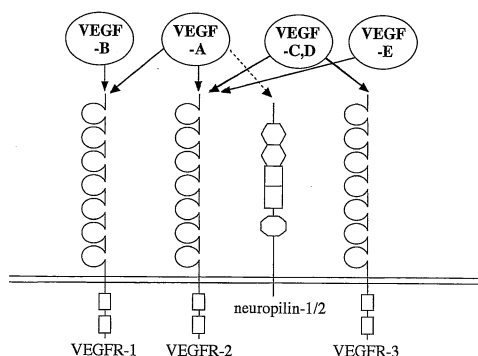


図3. VEGF 受容体ファミリー

VEGF (VEGF-A) は、VEGFR-1 (flt-1) または VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 受容体型チロシンキナーゼと結合して生物学的活性を示す。VEGF-B は選択的に VEGFR-1 と結合する。VEGF-C,D はともに VEGFR-2 あるいは VEGFR-3 (flt-4) と結合するが、プロセッシングされたものは VEGFR-2 と結合しやすい。VEGF-E は選択的に VEGFR-2 と結合し、VEGFR-1 とは結合しない。また、neuropilin-1 は VEGF-A のうち VEGF<sub>165</sub> と特異的に結合し、VEGFR-2 との親和性を増加させて、より強いシグナル伝達を引き起こす。VEGFR-1, VEGFR-2 の VEGF に対する結合には 7 つある免疫グロブリン様ドメインのうちループ 2, 3 が関与するとされる。(文献33から一部改変)

ウスは心血管系の異常をきたすことが報告されている。VEGF (VEGF-A) と結合する VEGFR-1 と VEGFR-2 は両者とも同じタイプの受容体型チロシンキナーゼであるが、それぞれの血管新生における役割や作用は異なったものであることが、ノックアウトマウスを用いた研究などから明らかにされている<sup>18,19)</sup>。VEGF に対する親和性は VEGFR-1 の方が高いが、血管新生においては *in vitro*, *in vivo* ともに VEGFR-2 の方がより重要な役割を果たしていると考えられている<sup>11-14)</sup>。VEGFR-1 は、胎生期の血管形成において過剰な VEGF を捕捉することで VEGF 発現を適切な量に調節することは知られていたが、成体における血管新生にはほとんど役割を持たないと考えられていた。しかし最近になり、VEGFR-1 に関しても VEGFR-2 に加えて腫瘍発育などの病的な状態では成体でも VEGFR-2 とは独立した一定の重要な役割を果たしているという報告がなされつつある<sup>20,21)</sup>。血管新生にはこれまで考えられてきた既存血管の血管内皮細胞の増殖・遊走により成立するもの (angiogenesis) とは異なる、胎児期にのみ存在すると考えられていた骨髄から血管内皮前駆細胞が未分化のまま血管形成部分に到達することにより血管を構築する vasculogenesis といわれる血管形成が成体においても存在することが近年明らかにされつ

つある。VEGF 受容体のうち VEGFR-1 は後者の成体における vasculogenesis の過程に重要な役割を果たしていることが示唆されており、さらに腫瘍の実験的肺転移過程には VEGFR-2 よりむしろ VEGFR-1 の方が重要であるとの報告もなされるなど両受容体の役割については今後さらに検討する必要があると考えられる<sup>21,22)</sup>。

ヒトの癌の手術標本などを用いた臨床的検討において、固形癌に加え白血病などの血液系の腫瘍を含む多くの種類の癌において VEGF および受容体(主に VEGFR-2)の発現亢進が報告され、悪性度や生命予後と相関することが報告されている<sup>11-14)</sup>。また動物実験においても、VEGF を高発現することにより腫瘍の増大を認め、逆に発現を阻害することによって腫瘍が縮小することが報告されており、腫瘍発育における VEGF の重要性が示されている。その他、腫瘍発育に関与するとされる VEGF ファミリーとして VEGF-C, VEGF-D がある。VEGF-C は血管内皮細胞の増殖に加えて、著明なリンパ管新生を促進する因子として注目されている。実際いくつかの種類のカにおいて VEGF-C の発現とリンパ節転移の頻度が相関することが報告されており、また VEGF-C を腫瘍内で高発現させるとリンパ節転移が生じることが実験的に報告されている<sup>23)</sup>。VEGF-D は腫瘍発育における役割は明らかでなかったが、近年 VEGF-C と同様に腫瘍内での高発現が予後不良の独立した因子となり得ることが示され、さらに VEGF-C 同様、腫瘍内で高発現させることによりリンパ節転移が増加することが実験的に報告されている<sup>24)</sup>。

一般に腫瘍の転移は多くのステップを経て進行するが、このうち血管新生は、原発巣から周囲の結合組織への浸潤という最初のステップ、および転移の最終段階である転移巣での腫瘍の増殖、という一連の過程における最初と最後の段階に必要なものとされている。腫瘍血管が豊富なほど腫瘍細胞は宿主の血中に流出しやすく、血管新生の強いものほど転移巣での腫瘍血管新生誘導により転移巣の形成が早いものと考えられる。近年の研究から VEGF は基底膜の破壊、内皮細胞の遊走、管腔形成などこれらすべてのステップに関与している可能性が示唆されている。

癌の転移には遠隔転移と共に、直接浸潤による癌性腹水の形成というものが臨床的にもしばしば認められている。VEGF は強力な血管透過性作用を持つことが知られており、癌性腹水生成への関与が示唆されている<sup>25)</sup>。肝癌においても、VEGF(-A)と VEGF-C が VEGFR-2 を主に介して癌性腹水生成に重要な役割を持つことが我々の研究より明らかになっている<sup>26)</sup>。このように VEGF は腫瘍の発育のみならず、転移の過程においても極めて重要

な役割を果たしていると考えられている。

なお VEGF/ 受容体系については他に優れた総説があるので詳しくはそちらを参照されたい<sup>11,12,14,27,28)</sup>。

## 肝癌における VEGF の役割

肝癌は臨床的にも、腫瘍の発達につれ新生血管の増加を認めることは広く知られており、肝動脈からの栄養血管がきわめて発達した hypervascular tumor であることは肝癌の代表的な生物学的特徴の 1 つとされている<sup>29)</sup>。実際の臨床における肝癌の代表的な治療法の 1 つである肝動脈塞栓術(TAE)もこの性質を利用したものである。また、TAE を繰り返しているうちに新たな側副血行路が形成され、腫瘍が新しい血管によって栄養されているような症例も少なからず経験する。このように肝癌の発達過程に血管新生因子が深く関与していることは想像に難くない。

実際ヒトの肝癌組織標本における検討においても、VEGF が癌部では非癌部に比べ高発現していることや腫瘍内における微小血管密度の亢進が報告されており、VEGF を中心とした血管新生が肝癌の病態形成に重要な役割を果たしていることが強く示唆されている<sup>30-33)</sup>。しかし、これまで肝癌の発達過程における VEGF の生体内で果たす直接的役割については不明であった。

近年の分子生物学の進歩により、目的物質の機能を探索するために遺伝子を導入し解析する方法が広く用いられている。しかし通常これまでの遺伝子導入実験は、それが高発現であれ、anti-sense gene を用いた抑制であれ、その発現レベルは一定であり、実験の間で変化させることはできなかった。Tetracycline-regulated gene expression system (Tet-system) は、生体内で自在に遺伝子発現を変化させることができるシステムとして最近開発されたものである<sup>34)</sup>。通常 Tet-system は tTA (tetracycline-controlled transcriptional activator) および TRE (tetracycline responsive element) という 2 つの発現カセットを別々に細胞に導入し、安定形質発現株を作製するのであるが、我々が用いている Retro-Tet system は、レトロウイルスベクターを用い、これら 2 つのカセットを 1 つのベクターに反対方向に挿入することにより、通常の Tet-system に比べてより厳密な制御が可能となるように設計されたものである<sup>35)</sup>。我々はこの Retro-Tet system を用いて肝癌発達過程における VEGF の生体内における役割について検討した。その結果、VEGF は肝癌発達の各過程において極めて重要な役割を果たしており、VEGF 非存在下では肝癌はほとんど発育できないことが明らかとなった<sup>36)</sup>。

実際の生体内では VEGF を含むいくつかの因子が複合的に作用しているものと考えられる。bFGF は *in vitro* において VEGF との相互作用が知られているものの、実際の腫瘍発育過程における検討は肝癌を含めてなされていなかった。そこで我々は、Retro-Tet system により VEGF ならびに bFGF の発現を生体内調節し、肝癌発育に対する両因子の複合的作用について検討した<sup>39)</sup>。その結果、VEGF、bFGF の両者を共発現させたところ、肝癌の発育は腫瘍内の血管新生増加を伴って著明に促進し、その程度は VEGF、bFGF 単独作用を加えたよりも大きい、相乗作用とも言えるものであった。この相乗効果の作用機序を検討したところ、bFGF の血管新生促進作用の一部は腫瘍内において VEGF を誘導することによるものであることが判明した。以上の結果より VEGF に加えて bFGF も VEGF と協調することで肝癌の発育過程において重要な役割を果たしたものと考えられた。

血管新生はこれまでに述べてきたような腫瘍の発育、進展のみならず発癌過程そのものにも重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。実験的にも膀胱癌、皮膚癌、リンパ腫などの発癌過程において標的臓器における血管新生が増加することが示されている<sup>38,39)</sup>。肝癌においても慢性肝炎の段階からヒト肝組織においてすでに血管新生亢進が生じていることや、慢性肝炎、肝硬変と病期が進展するにつれて肝内における血管密度が増加することが報告されている<sup>40,41)</sup>。実際我々もラット肝発癌モデルにおいて VEGF と受容体の役割について検討したところ、肝発癌過程の進行につれ肝内の VEGF の発現が上昇し、逆に VEGF のシグナル伝達を遮断すると肝発癌そのものが著明に抑制され、さらに発生した肝癌からの自然肺転移頻度も著しく低下することを見いだしている<sup>4)</sup>。

肝癌は多くの場合肝硬変などの線維化が進展した状態を発生母地としている。肝線維症が基盤病変として存在する条件下においては実験的肝発癌が有意に促進されることが報告されており、臨床的にも肝硬変などの線維化が進展した状態ほど累積肝発癌発生率が高いことが知られている<sup>42)</sup>。これまで線維化の進展と血管新生についてはほとんど関連づけて考えられていなかったが、近年の研究より心、腎などを含めた臓器の線維化の進展に血管新生が深い関わりを持つことが明らかになってきている<sup>43)</sup>。我々も肝線維化進展過程における血管新生の関与について基礎的検討を行ったところ、肝線維化の進展に伴い肝内 VEGF 発現および血管新生は亢進し、逆に VEGF のシグナル伝達を阻害すると実験的肝線維化が著明に抑制されることを見いだしている<sup>44)</sup>。即ち、血管新生は肝線維化、

肝発癌、肝癌発育、そして転移、という慢性肝疾患における一連の病態推移の全ての過程に重要な役割を持つものと考えられる。

### 肝癌における各受容体の役割と細胞内情報伝達

これまで腫瘍発育などの病的血管新生においては VEGFR-2 が主要な役割を果たしており、VEGFR-1 はほとんど病的血管新生には関与しないものと考えられていた。しかし、先に述べたように最近の研究から VEGFR-2 に加えて VEGFR-1 も胎児期の血管形成期のみならず腫瘍発育などの病的血管新生においてもある一定の役割を果たしていることが明らかにされつつある。しかし肝癌を含め腫瘍の発育過程における VEGF 各受容体の役割についてはあまり解析がされていなかった。そこで我々は VEGF と各受容体の肝癌における役割について検討を加えた。まず肝癌発達の異なる段階における VEGFR-2 の役割について検討した結果、VEGF による腫瘍発育増大は、VEGF と VEGFR-2 の経路を遮断することによって血管新生阻害を伴って著明に抑制されることを見いだした<sup>45)</sup>。VEGFR-2 阻害による肝癌発育抑制のメカニズムとしては、VEGF による VEGFR-2 を介した血管内皮細胞の増殖を阻害することにより腫瘍内の血管新生を抑制し、最終的に腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することが考えられた(図 4)。同様に、VEGFR-1 の肝癌発育における役割について検討したところ、VEGFR-2 の阻害に比べて効果は弱いものの、VEGFR-1 シグナル伝達のみを阻害することによっても有意に血管新生阻害を伴って肝癌発育が抑制され、VEGFR-2 に加え VEGFR-1 も肝癌発育過程に重要な役割を果たしていることが示された<sup>39)</sup>。

一般的に EGF 受容体をはじめ、受容体型チロシンキナーゼによる細胞内情報伝達は Ras の活性化に続く MAP キナーゼカスケードの活性化を経ることが明らかにされているが、Takahashi らは、*in vitro* の実験系において、VEGF は例外的に Ras を使わずに、プロテインキナーゼ C (PKC) 系に依存して VEGFR-2 を介した細胞増殖シグナルを送るということを報告している<sup>46)</sup>。我々は、この細胞内伝達経路が生体内でも認められるかどうかについて、PKC 特異的阻害剤(PKC-I)を Retro-Tet system の実験系に投与して検討した<sup>47)</sup>。その結果、VEGF によって増加した腫瘍の大部分は PKC-I の投与によって血管新生阻害を伴って抑制され、この抑制効果は PKC アイソフォームのうち PKC- $\beta$  を特異的に阻害する低濃度においても認められた。さらに、腫瘍が形成された後に PKC-I の投与を行ってもその抑制効果は同様であった。

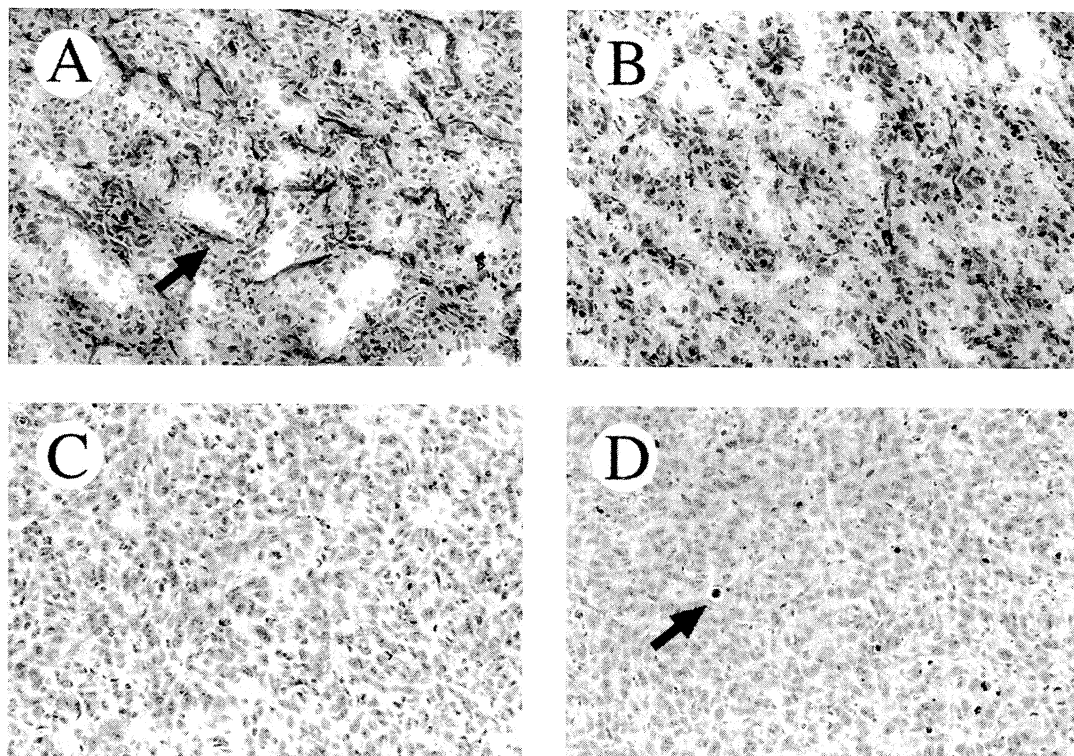


図4. VEGFR-2抑制による血管新生阻害とアポトーシスの増加

VEGF遺伝子導入による腫瘍内の血管新生(A)はVEGFR-2特異的の中和抗体の投与によって、著明に抑制されている(B)。一方、腫瘍内のアポトーシスはVEGFR-2中和抗体の投与群(D)においてVEGF群(C)に比べ増加している。A,Bは血管新生の指標として広く用いられているCD31の免疫染色、C,DはTUNEL染色によるアポトーシス像を示している(倍率×200)。矢印は(A)CD31陽性新生血管、(D)腫瘍内アポトーシス細胞を示している。(文献45から一部改変)

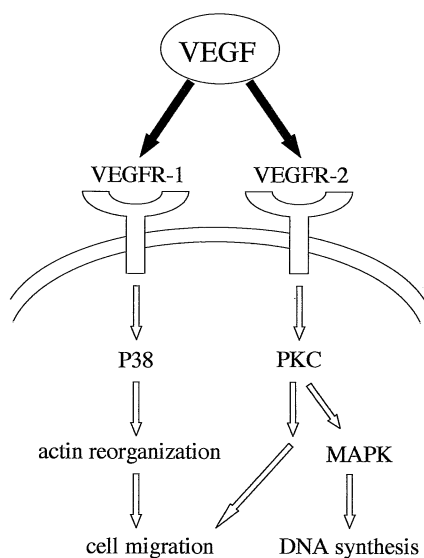


図5. VEGF受容体のシグナル伝達経路

一般的にEGF受容体をはじめ、受容体型チロシンキナーゼによる細胞内情報伝達はRasの活性化に続くMAPキナーゼカスケードの活性化を経ることが明らかにされているが、VEGFは例外的にRasを使わずに、プロテインキナーゼC(PKC)からMAPキナーゼ(MAPK)という経路に依存してVEGFR-2を介した細胞増殖シグナルを送るとされている。一方、VEGFR-1はPKCではなくp38を介して細胞の遊走などに関与するとされている。その他、VEGFR-1は血管内皮前駆細胞(EPC)による血管形成過程に重要な役割を果たしていることが近年明らかにされてきているがEPCにおけるシグナル伝達の解析は未だ明らかではなく今後の課題である(文献18から一部改変)。

MAP キナーゼに関しても、PKC-1 の投与によって、腫瘍内の p44/42 MAP キナーゼ活性は著明に抑制された。興味深いことに腫瘍内の PKC 活性は VEGFR-2 のシグナル伝達阻害により著明に低下したが、VEGFR-1 の阻害では変化を認めなかった。即ち VEGFR-2 はそのシグナル下流に PKC が存在するが VEGFR-1 は別の経路を利用していていると考えられた。In vitro の実験系では VEGFR-1 は p38 を介してアクチン再構成などの細胞骨格変化に関与して cell migration に関与することが報告されており(18)、同様のシグナル伝達経路が腫瘍発育においても認められるか否かについては今後の検討課題である(図5)。

### VEGF 制御の治療への応用

VEGF を含め血管新生が腫瘍発育に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになるにつれ、血管新生をターゲットとする抗癌治療法の研究・開発が精力的に行われるようになり、現在世界中で多くの臨床試験が行われている。VEGF に関しては、VEGF の中和抗体や VEGFR-2 の kinase inhibitor, 中和抗体が欧米において、担癌患者に対する臨床試験が行われており、その有効性が認められつつある。しかし、これら抗血管新生剤の開発は極めて精力的に行われているものの、その作用機序の性質上、長期間の投与が必要であるため、ヒト毒性判定には通常の薬よりも時間がかかる。さらに、抗血管新生薬は腫瘍を休眠状態に保つといういわゆる cytostatic な薬剤であり、これまでの抗癌剤のような cytotoxic な薬剤の効果判定基準はそのままでは当てはめにくく、現時点では統一された基準がないのが現状である。これらの理由で残念ながら現時点で広く臨床応用されている抗血管新生剤はなく、また一般臨床医が使用できるようになるには未だしばらく時間がかかるものと考えられる。そこですでに臨床で使用されている薬剤で抗血管新生剤となり得るものを検索するというも行われており、抗潰瘍薬のイルソグラジンや高脂血症剤のプラバスタチンが血管新生阻害作用を持ち、腫瘍発育を抑制するという報告などがなされている。しかしこれらの薬剤の投与量は文献的に換算すると実際の臨床でヒトに投与されている量よりもかなり多いものであり、そのままヒトに臨床応用できるかどうかについては不明である。

近年、降圧剤として広く用いられている ACE 阻害剤の投与によって癌の発生やがんによる死亡率が低下する、という大規模疫学調査の結果報告が Lancet 誌に報告された<sup>48)</sup>。これまでもある種の ACE 阻害剤には血管新生阻害作用があるとする報告もなされていたことより、

我々は ACE 阻害剤に注目し肝癌に対する作用について実験を行った<sup>49,50)</sup>。まず、肝癌の発育に対する様々な ACE 阻害剤の腫瘍発育に対する影響を検討したところ、ACE 阻害剤の中で perindopril (PE) が臨床に使用されている濃度に匹敵する低濃度においてマウス肝癌発育を著明に抑制することを見いだした。AT-II は VEGF の誘導作用を持つことも報告されており<sup>51)</sup>、腫瘍抑制作用に VEGF 低下が関与している可能性もあると考え、VEGF 発現について検討したところ、PE は腫瘍内の新生血管の著明な抑制とともに VEGF 低下作用を認めていた。血管新生阻害剤は併用による増感効果が報告されていることより、PE の他の薬剤との併用による増感効果についても検討を加えた。インターフェロン(IFN)は慢性肝炎の治療に用いられている抗ウイルス剤であるが、ある条件下では血管新生阻害作用をも示すことが報告されている。実際にこの性質を利用して小児の海綿状血管腫などの治療に用いられており、その有効性が示されている。我々は、単独では抗腫瘍効果を認めない低濃度の IFN と PE を併用してその影響を検討したところ、IFN 単独では抗腫瘍効果を認めなかったが、低濃度の IFN と PE を併用することにより著明な治療増感効果を認め、ほぼ完全な腫瘍発育の抑制が認められることを見いだした<sup>52)</sup>。同じように癌細胞には影響を与えないような低濃度の抗ガン剤(5-FU)と PE の併用効果を検討したところ、著明な併用効果が認められた。いずれの薬ともすでに臨床で広く使用されており、ヒトでの使用量に対応する低濃度で強い抑制効果が見られたことより、将来の臨床応用も可能であると考えられた<sup>53,54)</sup>。

さきに述べたように血管新生は完成された腫瘍の発育のみならず発癌などの早期の段階にも重要な役割を有することを示唆する報告がなされている。そこでラット肝発癌モデルにおける PE 投与の影響を観察したところ、PE は腫瘍発育モデルと同様に臨床濃度に匹敵する低濃度において、内因性、外因性肝発癌モデルの両方において肝発癌過程における VEGF 発現増加の低下を伴う有意な肝前癌病変の発生抑制効果を認めた<sup>55)</sup>。ACE 阻害剤は通常の抗癌剤に見られる骨髄抑制などの重篤な副作用も少ないとされており、新規開発品が使用できるようになるまでの間、このような薬剤が血管新生阻害剤として使用できれば放射線や抗癌剤との併用による治療増感効果により癌患者の生命予後が改善されるかもしれない。逆に VEGF を治療に利用する試みが循環器系の分野で行われている。心筋梗塞などの虚血性心疾患の治療法は抗凝固剤などの薬物療法と、経皮的冠動脈形成術(PTCA)やバイパス術などの血行再建術に大別される。

薬物療法に関しては現時点で虚血解除に対して明らかに有効なものは少なく、血行再建術に関しても慢性期における再狭窄など未だ解決されるべき問題も少なくはない。このような虚血性心疾患に対する治療の現状のなか、遺伝子導入などで VEGF を投与して側副血行路を人工的に作成し、虚血を解除しようという試みが行われてきている。同様の試みが閉塞性動脈硬化症 (ASO) などの末梢動脈閉塞症に対しても試みられており、良好な臨床成績が得られ始めている<sup>56)</sup>。

## お わ り に

VEGF を中心とする血管新生制御に基づく治療はこれまでの抗癌剤や放射線による治療とは全く異なるコンセプトの治療法として注目され精力的な研究が行われており、その臨床応用が近い将来可能となることが期待される。しかし強調しておきたいのは、抗血管新生療法はこれまでの既存の治療に取って代わると言う性質のものではないと言うことである。本文でも述べたが、血管新生阻害剤と既存の抗癌剤や放射線治療併用による著明な治療効果の増感作用、および放射線治療の耐性に対する感受性回復効果などが報告されており、実際の臨床応用に際してはこれら既存の治療法と抗血管新生療法を組み合わせる。これらの増感効果をうまく併用することにより、癌を tumor dormancy (休眠状態) に保ち続け、腫瘍発育をコントロールすることにより、抗癌剤の QOL を向上させることも可能であると考えられる。この分野における研究が今後更に発展していくことが期待される。

## 文 献

- Hlatky, L., Hahnfeltd, P and Folkman, J. : Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. J. Natl. Cancer Inst. 94 : 883-93, 2002.
- Scappaticci, F. A: Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. J. Clin. Oncol. 20 : 3906-27, 2002.
- Carmeliet P : Angiogenesis in health and disease. Nat. Med. 9 : 653-60, 2003.
- Folkman, J. : Tumor angiogenesis : therapeutic implications. N Engl J. Med. 285 : 1182-6, 1971.
- Fox, S. B., Gatter, K. C., and Harris, A. L. : Tumour angiogenesis. J. Pathol. 179 : 232-7, 1996.
- Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., et al : Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature 390 : 404-7, 1997.
- Grisicelli, F., Li, H., Cheong, C., et al : Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97 : 6698-703., 2000.
- Lee, C. G., Heijn, M., di Tomaso, E., et al : Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. Cancer Res. 60 : 5565-70., 2000.
- Geng, L., Donnelly, E., McMahon, G., et al : Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. Cancer Res 61 : 2413-9., 2001.
- 吉治仁志, 栗山茂樹, 福井 博 : 血管新生の阻害と癌治療増感 放射線生物研究 36 375-391, 2001.
- Ferrara, N., Gerber, H. P., and LeCouter, J. : The biology of VEGF and its receptors. Nat. Med. 9 : 669-76, 2003.
- 渋谷正史 : 血管内皮増殖因子 VEGF. 実験医学 17 : 721-726, 1999.
- 吉治仁志, 福井 博 : 血管内皮増殖因子と転移. 肝胆臓 45 : 483-490, 2002.
- Shibuya, M. : Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. Cell Struct. Funct. 26 : 25-35, 2001.
- Bruns, C. J., Liu, W., Davis, D. W., et al : Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. Cancer 89 : 488-99., 2000.
- Saito, M., Hamasaki, M., and Shibuya, M. : Induction of tube formation by angiopoietin-1 in endothelial cell/fibroblast co-culture is dependent on endogenous VEGF. Cancer Sci. 94 : 782-90, 2003.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., et al : Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell 92 : 735-45, 1998.
- Kanno, S., Oda, N., Abe, M., et al : Roles of two



- VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* **19** : 2138-46, 2000.
- 19) Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., et al : Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem* **269** : 26988-95, 1994.
  - 20) Hiratsuka, S., Maru, Y., Okada, A., et al : Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res.* **61** : 1207-13, 2001.
  - 21) Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., et al : MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* **2** : 289-300, 2002.
  - 22) Luttun, A., Tjwa, M., Moons, L., et al : Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat. Med.* **8** : 831-40, 2002.
  - 23) Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D. G., et al : Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* **7** : 192-8, 2001.
  - 24) White, J. D., Hewett, P. W., Kosuge, D., et al : Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res.* **62** : 1669-75, 2002.
  - 25) Nagy, J. A., Masse, E. M., Herzberg, K. T., et al : Pathogenesis of ascites tumor growth : vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Res* **55** : 360-8, 1995
  - 26) Yoshiji, H., Kuriyama, S., Hicklin, D. J, et al : The vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 is a major regulator of malignant ascites formation in the mouse hepatocellular carcinoma model. *Hepatology* **33** : 841-7., 2001.
  - 27) Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., et al : Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407** : 242-8., 2000
  - 28) Karkkainen M J, Petrova, TV : Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* **19** : 5598-605., 2000.
  - 29) Befeler, A. S., Di Bisceglie, A. M. : Hepatocellular carcinoma : diagnosis and treatment. *Gastroenterology* **122** : 1609-19, 2002.
  - 30) Suzuki, K., Hayashi, N., Miyamoto, Y., et al : Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **56** : 3004-9, 1996.
  - 31) Yamaguchi, R., Yano, H., Iemura, A., et al : Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **28** : 68-77, 1998.
  - 32) 吉治仁志, 栗山茂樹, 福井 博 : 肝癌の診断と治療 : VEGF 日本臨床 **59** 189-194, 2001.
  - 33) 吉治仁志, 栗山茂樹, 福井 博 : 肝癌の発達と VEGF/ 受容体 分子がん治療 **1** 1-12, 2000.
  - 34) Gossen, M., Bujard, H. : Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89** : 5547-51, 1992.
  - 35) Paulus, W., Baur, I., Boyce, F. M, et al : Self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells. *J. Virol.* **70** : 62-7, 1996
  - 36) Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., et al : Vascular endothelial growth factor tightly regulates In vivo development of murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **28** : 1489-96, 1998.
  - 37) Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., et al : Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **35** : 834-42, 2002.
  - 38) Kerbel, R. S. : Tumor angiogenesis : past, present and the near future. *Carcinogenesis* **21** : 505-15., 2000.
  - 39) Bergers, G., Javaherian, K., Lo KM, et al : Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* **284** : 808-12, 1999.
  - 40) Frachon, S., Gouysse, G., Dumorti, J., et al : Endothelial cell marker expression in dysplastic le-

- sions of the liver : an immunohistochemical study. *J Hepatol* **34** : 850-7., 2001.
- 41) **Park, Y. N., Kim, Y. B., Yang, K. M., et al** : Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124** : 1061-5, 2000.
  - 42) **Shiratori, Y., Imazeki, F., Moriyama, M., et al** : Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann. Intern. Med.* **132** : 517-24, 2000.
  - 43) **Kalluri, R. and Sukhatme, V. P.** : Fibrosis and angiogenesis. *Curr Opin. Nephrol. Hypertens* **9** : 413-8, 2000.
  - 44) **Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., et al** : Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* **52** : 1347-54, 2003.
  - 45) **Yoshiji, H., Kuriyama, S., Hicklin, D. J., et al** : KDR/Flk-1 is a major regulator of vascular endothelial growth factor-induced tumor development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **30** : 1179-86, 1999.
  - 46) **Takahashi, T., Ueno, H., Shibuya, M.** : VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* **18** : 2221-30, 1999.
  - 47) **Yoshiji, H., Kuriyama, S., Ways, D. K., et al** : Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Res.* **59** : 4413-8, 1999.
  - 48) **Lever, A. F., Hole, D. J., Gillis, C. R., et al** : Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* **352** : 179-84, 1998.
  - 49) **Yoshiji, H., Kuriyama, S., Kawata, M., et al** : The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis : possible role of the vascular endothelial growth factor. *Clin. Cancer Res.* **7** : 1073-8., 2001.
  - 50) **Yoshiji, H., Yoshii, J., Ikenaka, Y., et al** : Suppression of the renin-angiotensin system attenuates vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **20** : 1227-31, 2002.
  - 51) **Williams, B., Baker, A. Q., Gallacher, B., et al** : Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **25** : 913-7, 1995.
  - 52) **Noguchi, R., Yoshiji, H., Kuriyama, S., et al** : Combination of interferon-beta and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates murine hepatocellular carcinoma development and angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* **9** : 6038-45, 2003.
  - 53) **Yoshiji, H., Kuriyama, S. and Fukui, H.** : Perindopril : possible use in cancer therapy. *Anticancer Drugs* **13** : 221-8, 2002.
  - 54) **Yoshiji, H., Kuriyama, S. and Fukui, H.** : Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors may be an alternative anti-angiogenic strategy in the treatment of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. Possible role of vascular endothelial growth factor. *Tumour Biol* **23** : 348-56, 2002.
  - 55) **Yoshiji, H., Yoshii, J., Ikenaka, Y., et al** : Inhibition of renin-angiotensin system attenuates liver enzyme-altered preneoplastic lesions and fibrosis development in rats. *J. Hepatol.* **37** : 22-30, 2002.
  - 56) **Losordo, D. W., Vale, P. R., Symes, J. F., et al** : Gene therapy for myocardial angiogenesis : initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* **98** : 2800-4, 1998.
- A) **Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., et al** : Halting the vascular endothelial growth factor and receptor interaction attenuates the liver carcinogenesis in mice. *Hepatology* 2004 in press.
  - B) **Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., et al** : Involvement of the vascular endothelial growth factor receptor-1(VEGFR-1) in murine hepatocellular carcinoma development. *J. Hepatol.* 2004 in press.