

「血管新生阻害因子と細胞外マトリックス」

秋田大学大学院医学系研究科医学専攻細胞生物学講座

山口典子

細胞外マトリックスは細胞間隙を埋め、細胞を支持して組織や器官の形状を維持する力学的な機能を有することは普遍的に知られているが、近年細胞の増殖、分化、遊走などを制御する生物学的機能に関する知見が蓄積されつつある。細胞マトリックスの新しい生物学的機能の一つとして、コラーゲンやフィブロネクチン、パルカンのカルボキシル末端フラグメント、fibulin, thrombospondin 分子に血管新生阻害作用が検出されている。

1. コラーゲンと血管新生阻害因子

細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲンは cDNA クローニング法により現在29タイプ(型)の存在が報告されており、多様な分子種を包括するスーパーファミリーを構成していることが明らかにされている。コラーゲンの中でも豊富に存在し、典型的なコラーゲンとみなされている線維形成コラーゲンは3本の α 鎖がらせん構造を形成する棒状の分子である。その他に基底膜を構成し、シート状に会合するIV型コラーゲンや3本

鎖らせん構造が分断されている FACIT, Multiplexin というサブファミリーが存在する。図1に主なサブファミリーと含まれるコラーゲン分子を示した。血管新生阻害活性はIV型, VIII型, IX型, XVIII型コラーゲンのカルボキシル末端フラグメントに認められている。

2. 血管新生

血管の形成には、正常個体内の胎生期における血管発生、循環器系の形成を示す「脈管形成」と既存の血管の内皮細胞が血管新生刺激に反応して増殖、遊走し新しい管腔が形成される「血管新生」という2つの機構が存在する。血管新生は生理的条件下並びに病理的条件下で認められる現象で、生理的条件下では発生、組織再生、創傷治癒、月経において、病理的条件下では慢性関節リウマチ、乾癬、糖尿病性網膜症、アテローム性動脈硬化症、がんなどにおいて観察される。従って血管新生はこれらの疾患における一つの治療ターゲットと考えられ、血管新生阻害因子の治療への応用が考案された。特にがんの増殖、浸潤、転移には血管新生が深く関与しており、血管内皮細胞をターゲットとした阻害因子は、がん細胞の多様な特性に関係なく応用できることから有用であると考えられた。

3. エンドスタチン

1971年にボストン子供病院の Folkman 博士は、原発巣のがん細胞が転移がんの増殖を制御する因子を産生していると推定し、その内因性の増殖阻害因子はがん治療に有効であるとする仮説を提唱した。長らくその仮説は支持されなかったが、1994年にアンジオスタチン¹⁾、1997年にエンドスタチン²⁾が発見され彼の仮説は証明された。エンドスタチンは、当初マウス血管内皮腫細胞の培養上清から血管内皮細胞の増殖抑制活性を指標として単離された。分子量は約22キロダルトンでそ

Collagen superfamily	
Fibrillar collagen	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
Short chain collagen	VIII, X
FACIT (Fibril-associated collagens with interrupted triple helices) collagen	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI
Basement membrane collagen	IV (XV, XVIII)
Transmembrane collagen	XIII, XVII, XXIII, XXV
Multiplexin (Multiple triple helix domains and interruptions) collagen	XV, XVIII
Others	VI, VII, XXII

図 1

のアミノ酸配列を決定した結果、XVIII型コラーゲンのフラグメントであり、コラーゲンのカルボキシル末端に由来することが明らかにされた。XVIII型コラーゲンのcDNA配列を基に大腸菌に発現させた組換えマウスエンドスタチンは、マウスに移植したLewis肺がん、T241線維肉腫並びにB16F10メラノーマの増殖を抑制し、がんの退縮も観察された。さらにB16F10メラノーマの肺転移も抑制した。我々のグループはヒトXVIII型コラーゲンのcDNA配列に基づき、マウスエンドスタチンに相当するシークエンスを有する組換えヒトエンドスタチンを293細胞（ヒト胎児由来腎臓細胞）に発現させ調製した。この組換えヒトエンドスタチンはミリリットルあたりナノグラムのオーダーでHUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞）のVEGF（血管内皮細胞増殖因子）に対する遊走を阻害し、またヌードマウスに移植したヒト腎細胞がんの増殖を抑制した³⁾。

4. エンドスタチンと慢性関節リウマチ

内因性の血管新生阻害因子であるエンドスタチンは、タンパク分解酵素によりXVIII型コラーゲンから遊離され、血管新生が顕著である種々の疾患において生体防御反応の一翼を担うと考えられる（図2）。そこで、慢性関節リウマチに対する組換えエンドスタチンの効果をリウマチモデル動物を用いて検討した。軟骨に局在するII型コラーゲンを特定の種のマウスやラットに感作することにより、コラーゲン誘導性関節炎を惹起することが出来る。またII型コラーゲンの抗体を血中に導入

することによっても関節炎が惹起され、II型コラーゲン抗体をマウスに導入して約1週間で関節の腫脹が始まり顕著な腫脹は10日から15日に顕著に認められる。従ってマウス組換えエンドスタチンを2週間投与し、関節炎に対する効果を評価した。エンドスタチン投与群では明らかな関節腫脹の軽減がみられ、関節の組織像においても滑膜に炎症性細胞の浸潤が認められず、関節軟骨表面の浸食像も認められなかった^{4,5)}。慢性関節リウマチの手術時に切除された滑膜組織を細片化し、免疫不全マウス（SCIDマウス）に移植すると6週間後には明らかな滑膜組織の増殖が観察される。慢性関節リウマチは滑膜組織の増殖と関節軟骨の破壊が主徴であることから、このマウスモデルにおけるヒト組換えエンドスタチンの効果を、増殖した滑膜組織周囲に1週間投与することにより検討した。エンドスタチン投与群では著明な滑膜組織増殖抑制が認められ、滑膜組織における血管新生も抑制されていた。また炎症性細胞の浸潤が軽減され、がん細胞のアポトーシス像が観察された⁶⁾。従って2つの関節炎モデル動物においてエンドスタチンは明らかな炎症反応の抑制作用を示し、慢性関節リウマチへの適用の可能性が示唆された。

5. エンドスタチンの臨床試験

酵母に発現させた組換えヒトエンドスタチンの臨床試験は、1999年にボストンDana-Farber Cancer Centerにおいてがん患者を対象に開始された。表1に示すように米国では第I相、第II相臨床試験ともに副作用は認められなかったものの殆ど抗がん作用が観察されず、組換えタンパク質の調製に莫大な費用を要することから第II相臨床試験をもって抗がん剤としての開発は終了した。一方中国では組換えヒトエンドスタチンのアミノ末端に9アミノ酸（アミノ酸配列MGGSHHHHH）を伸長させたエンドスターを開発し、エンドスターは抗がん剤として2005年にThe State Food and Drug Administration of Chinaの承認を受けた。中国における第I相から第III相臨床試験の結果は表に示す通りである。既存の抗がん剤との併用によりエンドスター投与量の削減が可能になり、抗がん剤との相乗効果が認められている。第I相臨床試験は2001年に開始されたが、特に非

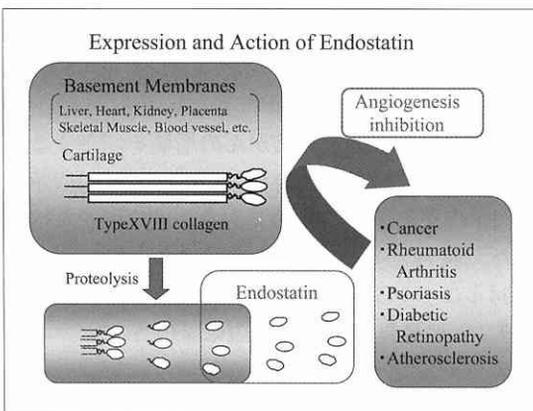


図2

表 1. Comparison of the clinical trials of rhEndostatin and ZBP-endostatin

	Ph	N pts	Treatment	ORR (%)	CBR (%)
Clinical trials of rhEndostatin in the USA					
Advanced solid tumor	I	15	20-min daily <i>i.v.</i> infusion 15 to 240 mg/m ² /d	0.0	20.0
Advanced solid tumor	I	26	20-min daily <i>i.v.</i> infusion 15 to 600 mg/m ² /d	0.0	8.0
Advanced solid tumor	I	21	1-hour daily <i>i.v.</i> infusion 30 to 300 mg/m ² /d	0.0	0.0
Advanced solid tumor	I	32	<i>i.v.</i> or <i>s.c.</i> injection 3.75 to 120 mg/m ² /d	0.0	25.0
Advanced neuroendocrine tumor	II	42	a bid <i>s.c.</i> injection 60 mg/m ² /d	0.0	80.0
Clinical trials of ZBP (Zinc-binding peptide)-endostatin in China					
Solid tumor	I	22	20-min daily <i>i.v.</i> infusion 30 to 210 mg/m ² /d	4.5	27.3
Nonsmall cell lung cancer	IIa	68	3-hour <i>i.v.</i> infusion of 7.5 mg/m ² /d	3.2	67.7
			3-hour <i>i.v.</i> infusion of 15 mg/m ² /d	3.4	65.5
Nonsmall cell lung cancer	IIb	54	7.5 mg/m ² /d ZBP-endostatin, 25 mg/m ² /d NVB, 30 mg/m ² /d DDP	37.0	87.0
			25 mg/m ² /d NVB, 30 mg/m ² /d DDP	24.2	72.7
Nonsmall cell lung cancer	III	493	7.5 mg/m ² /d ZBP-endostatin, 25 mg/m ² /d NVB, 30 mg/m ² /d DDP	35.4	73.3
			25 mg/m ² /d NVB, 30 mg/m ² /d DDP	19.5	64.0

ORR, overall response rate; CBR, clinical benefit rate; NVB, vinorelbine; DDP, cisplatin.
ZBP-endostatin, Zinc-binding peptide (MGGSHHHHH)-endostatin

Fu Y et al. IUBMB Life 2009;61:613-626

小細胞性肺癌に対する抗がん作用が顕著なことから、第Ⅱ相臨床試験からは非小細胞性肺癌を対象に試験が行われた⁷⁾。

エンドスタチンは残念なことにかんモデル動物における抗腫瘍作用を臨床試験では再現することが出来ず、米国では抗がん剤としての開発が見送られたが、がんを始めとする血管新生が顕著な種々の疾病に対して阻害剤が有効であるという基本的な概念は普遍性を得たと思われる。エンドスタチンの詳しい性状については拙文を参照して頂ければ幸いです^{8,9,10)}。

参考文献

- 1) O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y. *et al.* : Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79** ; 315-328 1994.
- 2) O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y. *et al.* : Endostatin : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88** ; 277-285 1997.
- 3) Yamaguchi, N., Anand-Apte, B., Lee, M. *et al.* : Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth inde-

pendently of zinc binding. *EMBO J* **16** : 4414-4423 1999.

- 4) Kurosaka, D., Yoshida, K., Yasuda, J. *et al.* : Arthritis-inhibiting effect of systemic administration of endostatin in passive murine collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* **62** : 677-679 2003.
- 5) Kurosaka, D., Yoshida, K., Yasuda, J. *et al.* : The effect of endostatin evaluated in an experimental animal model of collagen-induced arthritis. *Scand J Rheumatol* **36** ; 434-441 2007.
- 6) Matsuno, H., Yudoh, K., Uzuki, M. *et al.* : Treatment with the angiogenesis inhibitor endostatin : A novel therapy in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **29** ; 890-895 2002.
- 7) Fu, Y., Tang, H., Huang, Y., Song, N., Luo, Y. : Unraveling the mysteries of endostatin. *IUBMB Life* **61** ; 613-626 2009.
- 8) 山口典子 : XⅧ型コラーゲン/エンドスタチンの構造と機能 *生化学* **73** ; 1239-1245 2001.
- 9) 山口典子, 二宮善文 : 基底膜コラーゲンのフラグメントによる血管新生阻害 *Connective Tissue* **34** ; 165-173 2002.
- 10) Yamaguchi, N. : An analysis of the functional mechanisms of endostatin. -The anti-angiogenic activity of endostatin is mediated by its multiple binding ability- *Connective Tissue* **36** ; 171-178 2004.