

固形癌の増殖における血管内皮増殖因子
(V E G F) の役割に関する研究

—中和抗体による固形癌増殖抑制—

1996年

浅野 誠

目 次

略号一覧-----	3
緒 言-----	4
第Ⅰ章 VEGF過剰産生癌細胞株の作製-----	11
Ⅰ-1 材料および実験方法-----	14
Ⅰ-2 結果	
Ⅰ-2-① HeLa/v5細胞培養上清の血管内皮細胞に対する増殖促進 活性および抗ヒトVEGF ₁₂₁ ポリクローナル抗体による抑制-----	16
Ⅰ-2-② HeLa/v5細胞による <i>in vivo</i> 血管新生誘導活性-----	19
Ⅰ-3 考察-----	23
第Ⅱ章 癌細胞培養上清および担癌マウス・癌患者血中VEGFの検出-----	24
Ⅱ-1 実験方法-----	24
Ⅱ-2 結果	
Ⅱ-2-① VEGF検出サンドイッチELISA系の反応性-----	26
Ⅱ-2-② 各種ヒト癌細胞培養上清中のVEGFの検出-----	26
Ⅱ-2-③ 担癌マウス血漿中のVEGFの検出-----	29
Ⅱ-2-④ 癌患者血清中のVEGFの検出-----	29
Ⅱ-3 考察-----	32
第Ⅲ章 固形癌の増殖におけるVEGFの役割-----	35
Ⅲ-1 実験方法-----	35
Ⅲ-2 結果	
Ⅲ-2-① HeLa/v5株およびHeLa/c株の固形癌増殖実験-----	36
Ⅲ-2-② 抗ヒトVEGF ₁₂₁ ポリクローナル抗体による固形癌増殖抑制-----	38
Ⅲ-3 考察-----	41

第Ⅳ章 抗ヒトVEGF ₁₂₁ 中和モノクローナル抗体の作製およびその特性-----	43
Ⅳ-1 材料および実験方法-----	45
Ⅳ-2 結果	
Ⅳ-2-① 血管内皮細胞のヒトVEGF依存性の増殖に対する抗ヒト VEGF ₁₂₁ モノクローナル抗体の影響-----	49
Ⅳ-2-② ¹²⁵ I 標識ヒトVEGF ₁₂₁ のHUVECへの結合に対する 抗ヒトVEGF ₁₂₁ モノクローナル抗体の阻害活性-----	50
Ⅳ-2-③ 抗ヒトVEGF ₁₂₁ モノクローナル抗体の反応特異性-----	50
Ⅳ-2-④ 抗ヒトVEGF ₁₂₁ モノクローナル抗体のエピトープの検討-----	55
Ⅳ-2-⑤ ウェスタンブロッティング解析-----	55
Ⅳ-3 考察-----	58
第Ⅴ章 抗ヒトVEGF ₁₂₁ 中和モノクローナル抗体による固形癌の増殖抑制 および転移阻害-----	60
Ⅴ-1 実験方法-----	60
Ⅴ-2 結果	
Ⅴ-2-① 癌細胞依存性血管新生に対する抗ヒトVEGF ₁₂₁ 中和モノク ローナル抗体(MV303)の影響-----	62
Ⅴ-2-② 抗ヒトVEGF ₁₂₁ 中和モノクローナル抗体投与によるヒト固形 癌増殖抑制-----	62
Ⅴ-2-③ HT-1080細胞を用いた実験転移系に対する抗ヒト VEGF ₁₂₁ 中和モノクローナル抗体(MV303)の影響-----	69
Ⅴ-3 考察-----	74
総合考察と展望-----	77
掲載雑誌-----	82
謝辞-----	83
参考文献-----	84

略号一覧

V E G F : vascular endothelial growth factor
V P F : vascular permeability factor
G S T : glutathion-S-transferase
B S A : bovine serum albumin
P B S : phosphate buffered saline
F B S : featal bovine serum
D - M E M : Dulbecco's modified Eagle's medium
E G F : epidermal growth factor
a F G F : acidic fibroblast growth factor
b F G F : basic fibroblast growth factor
E C G S : endothelial cell growth supplement
H U V E C : human umbilical vein endothelial cell
E L I S A : enzyme-linked immunosorbent assay
P O D : peroxidase
S D S : sodium dodecyl sulfate
P A G E : polyacrylamide gel electrophoresis
I g : immunoglobulin
T A F : tumor angiogenic factor

緒 言

1981年以降、日本人の死亡原因の第一位は、悪性腫瘍である。悪性腫瘍が原因で死亡する人は、全死亡者の約30%にもなる。一昔前までこの悪性腫瘍は、「不治の病」と言われてきたが、近年の早期診断法の確立および治療法の改良から治癒率の向上が見られてきている。その代表的治療法は、外科療法（手術）、放射線療法、化学療法であり、それぞれめざましい進歩を遂げている。特に化学療法においては多くの抗癌剤の発見により非上皮性腫瘍（肉腫、リンパ腫、白血病等）の一部においては、完全治癒が見られるまでになってきており、これらの腫瘍は必ずしも「不治の病」ではなくなっている。一方、悪性腫瘍の中でも多くの患者が患っている上皮性腫瘍（癌腫）においては、今でも外科療法に頼るところが大きい。しかし、外科療法が行えるのは、原発腫瘍の一部といわれており、手術不可能な部位の原発腫瘍および散在してしまった転移巣に対しては、治療不能であり化学療法に依存する部分が多い。しかし、化学療法においてもこれらの癌腫に対して満足のいく治療効果が得られていないのが現状である。

近年、発癌および腫瘍増殖のメカニズムの解明に関する研究が急速に進歩してきている。このような進歩に伴い、今までの抗癌剤とは異なったメカニズムで腫瘍の増殖を抑制する抗癌剤が切望されている。血管新生阻害剤の探索は、そのような要望に応えるために登場してきたテーマとも言える(1-4)。

1970年代にFolkmanによって「固形癌の増殖には、血管新生が必要であり、これを阻害することは、固形癌の治療につながる」という仮説が提唱された(5,6)。固形癌は、1~2 mm³の大きさに至るまでは一時的に増殖するが、更に自律増殖を続けるためには固形癌の組織内部に血管網を新生し、これを介して生体より増殖に不可欠な栄養源および酸素の供給を受けるとともに代謝老廃物の処理を行う必要がある。また、新生血管は、癌の遠隔臓器への転移の際にも利用されている(7,8)。したがって、血管新生を受けた固形癌は、爆発的な増殖を始めるが、血管新生無しには、数mm以上に増殖できないと言われている(8)。

血管新生とは、既存の血管から新しい血管が形成されるというダイナミックな生体組織のカスケード反応である。すなわち、①分化した休止期状態にある血管内皮細胞の活性化、②蛋白質分解酵素活性を発現した血管内皮細胞による基底膜など細胞外マトリックスの破壊、③血管内皮細胞の遊走、④血管

内皮細胞の増殖，⑤分化による血管内皮細胞の管腔化，などの素反応の連続で血管新生は行われると考えられている（図1）。いずれの素反応を阻害しても血管新生は阻害されることが考えられ、多くの研究者が様々なアプローチで研究を重ねてきている(1-3)。

1980年代以降、Folkman自身も幾つかの血管新生阻害剤による固形癌の増殖阻害の報告をしている。その中でIngber等の報告にあるAGM-1470は、抗癌剤としての開発が最も進んでいる血管新生阻害剤の一つであり、現在、米国で臨床試験中である(9)。この物質は、カビの一種の産生するフマギリンという物質の合成誘導体である。その作用メカニズムの詳細は、不明であるが、血管内皮細胞の増殖を強く阻害するのに対して、癌細胞の増殖は阻害しないという特異性を持っている。動物実験にて各種固形癌の増殖を阻害する事が報告されている(9)。このように、作用メカニズムによる探索ではなく、血管内皮細胞の増殖を特異的に阻害するという性質を重視して血管新生阻害剤を探索するのも一つの手段ではあるが、著者等は、この素反応の中で血管新生のきっかけとなる「血管新生因子」の働きに注目して研究を重ねてきた。

固形癌は、自らの増殖のために血管新生を誘導する因子＝「血管新生因子」を分泌し、周囲に血管新生を促していると考えられている(10-14)。1980年代後半からの分子生物学の進歩は、多くの増殖因子の同定・遺伝子単離・大量生産に関して多大なる貢献をしてきた。その結果、「血管新生因子」と呼ばれる一群の増殖因子も発見され研究されてきた（表1）。しかし、これらの因子の中で、固形癌の増殖における血管新生との因果関係について明確な結論が出ている因子はない。その理由として、次のような点が挙げられる。

- ①作用が血管内皮細胞のみに対してではなく他の種類の細胞の増殖にも影響する（多機能な因子）。
- ② *in vitro*にて血管内皮細胞の増殖を刺激しない（直接作用がない。他の因子を介している可能性）。
- ③翻訳産物にシグナルペプチドがない（分泌蛋白質でなく固形癌が能動的に分泌しているとは考えがたい）。

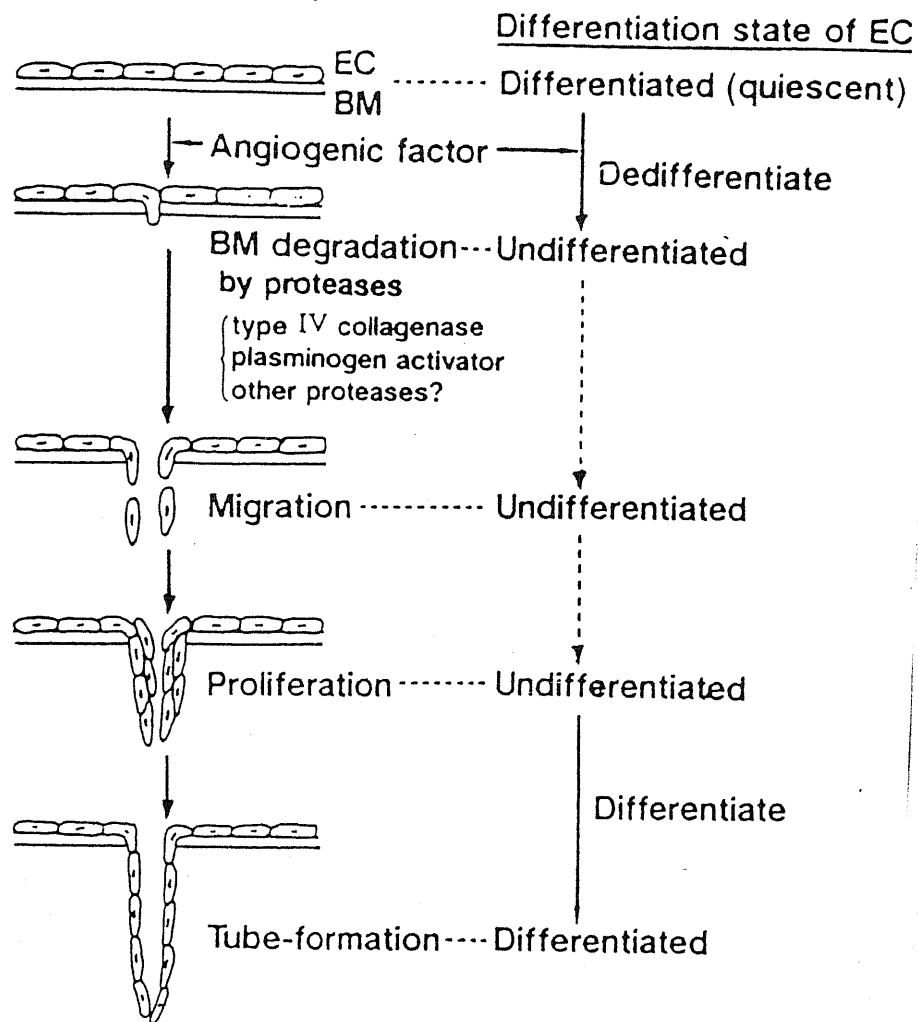


図1 血管新生メカニズムの模式図

EC : 血管内皮細胞

BM : 基底膜

表1 血管新生因子 (文献12からの引用)

因子	血管新生 (<i>in vivo</i>)		血管内皮細胞(<i>in vitro</i>)			文献
			遊走能	増殖能	特異性	
fibroblast growth factor (FGF) transforming growth factor- α (TGF- α) transforming growth factor- β (TGF- β) angiogenin angiotropin	+	+	+	+	o	15-17
	+	+	+	+	o	18
	+	-	-	-	o	19
	+	o	o	o	n d	20
	+	+	+	o	+	21
tumor necrosis factor- α (TNF- α)	+	+	+	-	o	22, 23
platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)	+	+	+	+	+	24, 25
vascular endothelial growth factor (VEGF)	+	+	+	+	+	26

[+] = yes; [o] = no; [-] = inhibitory; [n d] = not determined

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) は、これらの点を全て解決する性質を持っており固形癌の増殖における血管新生因子 (tumor angiogenic factor: TAF) の最有力候補として注目されている。

VEGFは、ウシ脳下垂体の濾胞細胞の培養上清に存在するヘパリンに対して結合する性質を持ち、ホモダイマー構造をとった新規な血管内皮細胞増殖因子として発見された(26-29)。cDNAの塩基配列の解析によりVEGFは、ほぼ同時期にモルモットの肝臓癌 (line 10) 依存性の腹水を誘導する因子として見い出されてきた血管透過性因子 (vascular permeability factor; VPF) と同一物質であることが明らかとなった(30-33)。また、マウスの脳下垂体細胞株 (AtT-20) の培養上清より単離された血管新生因子のvasculotropinも同一物質であることが知られている(34, 35)。発見の経緯から、VEGFには、血管内皮細胞に直接作用して増殖を促進する活性 (VEGF活性) と、その透過性を高める活性 (VPF活性) があることが知られている。また、その作用が血管内皮細胞に対して極めて特異的であることも特徴である。cDNAの解析からは、更に、VEGFがシグナルペプチドを有する蛋白質として翻訳され、古典的経路により細胞外に分泌されることがわかったばかりでなく、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) のB鎖のアミノ酸配列と18%の相同性があることがわかっている(27, 31)。特にPDGFの8個のシステイン残基は全てVEGFにも保存されている。更に、VEGFは、胎盤由来増殖因子 (placenta growth factor; PlGF) とはアミノ酸配列上で53%という高い相同性を示すことが知られている(36)。PlGFもVEGF同様に血管内皮細胞の増殖を刺激する活性を持っている。また、パラポックスウイルスの一種であるorfウイルスがVEGFに非常に良く似た蛋白質 (NZ2およびNZ7) をコードしていることが発見されている(37)。この因子については、蛋白質レベルでの活性の報告はないが、このウイルスに感染すると感染性膿疱性皮膚炎をおこし、皮下の血管の増殖および拡張が観察される点でVEGFと似た活性があると思われる。VEGFは、これら因子とともにPDGFファミリーに属する増殖因子である。

一方、2種類のレセプタータイプのチロシンキナーゼ (Flt-1およびFlk-1/KDR) が、VEGFの高親和性レセプターとして同定されており血管内皮細胞には、これらレセプターを発現していることが知られている(38-42)。VEGFは、血管内皮細胞表面のこれら高親和性レセプターと結合することで増殖刺激シグナルを細胞内へ伝達するものと考えられている。これらVEGFレセプターは、細胞外領域に7個のイムノグロブリン (Ig) 様ドメインを有しており、同様にIg様ドメインを有するPDGFレセプターファミリー

(PDGFR- α , PDGFR- β , kit, fms, Flk-2 : 5個のIg様ドメイン)、FGFレセプターファミリー (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4 : 2~3個のIg様ドメイン) とともにスーパーファミリーを形成している。これらレセプターは、もともと同一遺伝子であって、進化の過程において機能の多様化・細分化がなされたものと思われる (図2)。

著者等は、VEGFのTAFとしての機能を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。その結果、各種癌細胞の培養上清のみならず癌患者血清中にVEGFを検出し、固形癌がVEGFを分泌していることを明らかにした。また、ヒトVEGFに対する中和抗体を作成するとともに、その薬理活性についての研究を行った結果、抗ヒトVEGF中和抗体に固形癌の増殖を強く抑制する活性が有ることを見出した。

以上の研究により、この抗体自身が「血管新生阻害剤」という今までの抗癌剤とは異なったメカニズムで固形癌の増殖を抑制できる、今、求められている抗癌剤のひとつになりうる可能性を示唆することができた。

RECEPTOR TYPE TYROSINE KINASE

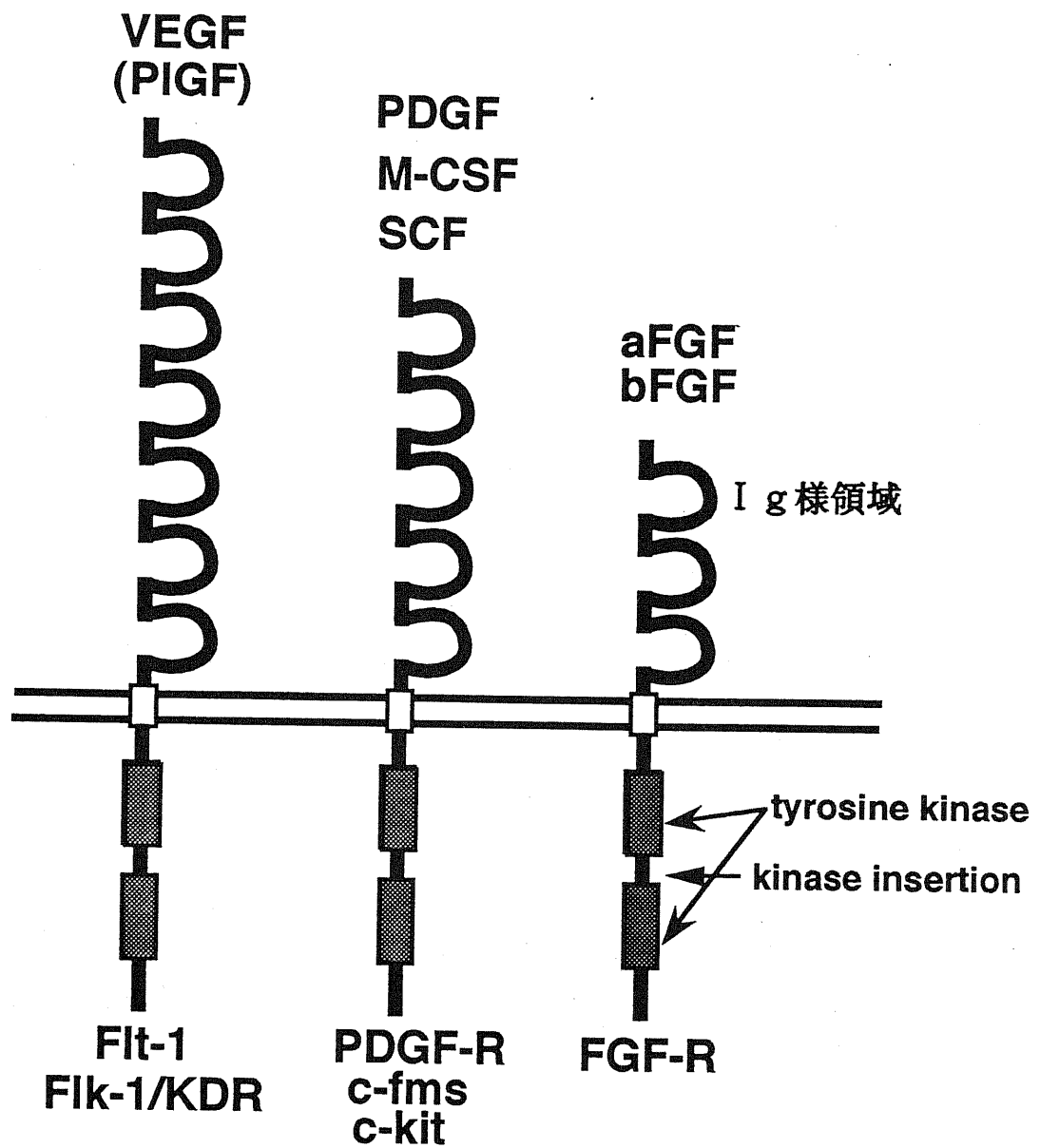


図2 VEGFレセプター

第 I 章 VEGF過剰産生癌細胞株の作製

VEGFは、血管新生因子の一種であり、血管内皮細胞の増殖を促進する活性（VEGF活性）を持つとともに、血管の透過性を亢進させて癌性腹水を誘導する活性（VPF活性）も持っている。VEGFの遺伝子は8個のエクソンと7個のイントロンからなっており、mRNAのalternative splicingにより4種類のアイソフォームが翻訳されることが知られている（図3）（43-45）。これらは、シグナルペプチドが切断された後のアミノ酸残基数が121、165、189および206個のVEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉およびVEGF₂₀₆である。VEGF₁₆₅以上の大きさの分子には、ヘパリン結合性のアミノ酸配列をコードした領域が含まれており、細胞外に分泌された後、細胞表面のヘパリンあるいはヘパラン硫酸プロテオグリカン糖鎖に結合する性質を持っている。VEGF₁₈₉およびVEGF₂₀₆は、更に塩基性に富むアミノ酸配列を含む領域があり、その結合が強固になっている。したがって、VEGF₁₂₁は、そのまま分泌されるが、VEGF₁₈₉とVEGF₂₀₆は、分泌された後に細胞外マトリックスに結合して存在している。また、VEGF₁₆₅は、その中間の性質を持っている（44）。何れの長さのヒトVEGFにもVEGF活性およびVPF活性などのVEGFとしての生物学的活性がある事が知られている（44,46,47）。著者等は、分子レベルでの解析が容易であることから、最も小さいアイソフォームであるVEGF₁₂₁を選び、VEGFのTAFとしての役割について解析することにした。

解析に先立ち、活性のあるヒトVEGF₁₂₁の必要性が生じた。そこでヒトVEGF₁₂₁の生産源として過剰産生癌細胞株を作製することとした。また、同時に家兎を免疫して抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体も作製して実験に用いた（図4）。

Alternative Splicing of VEGF mRNA

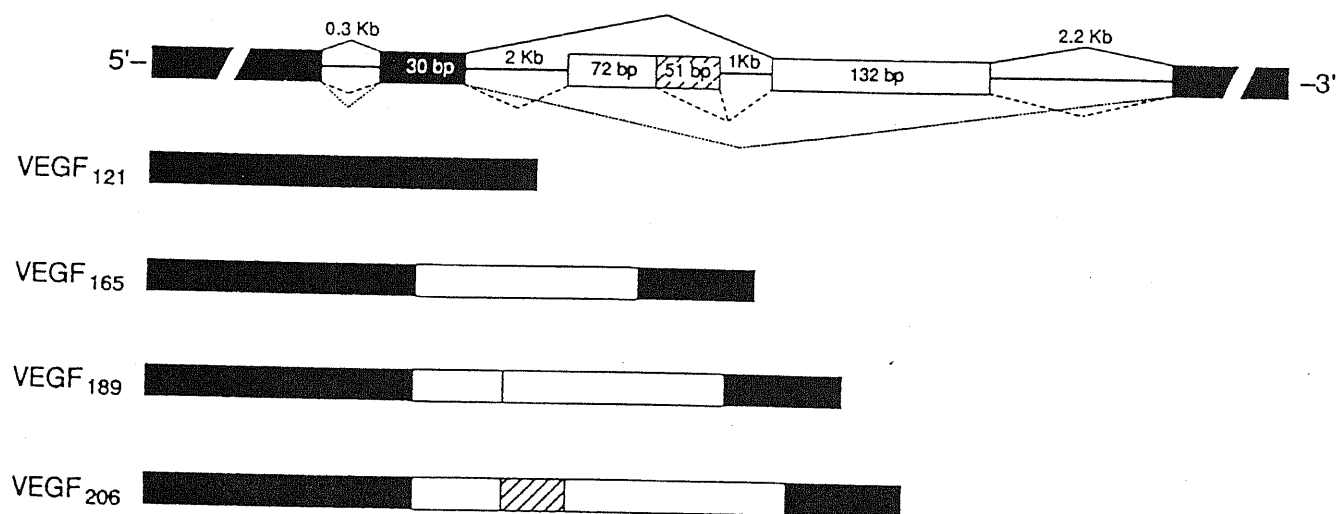


図3 VEGFのmRNAのalternative splicingモデル
(文献43より引用)

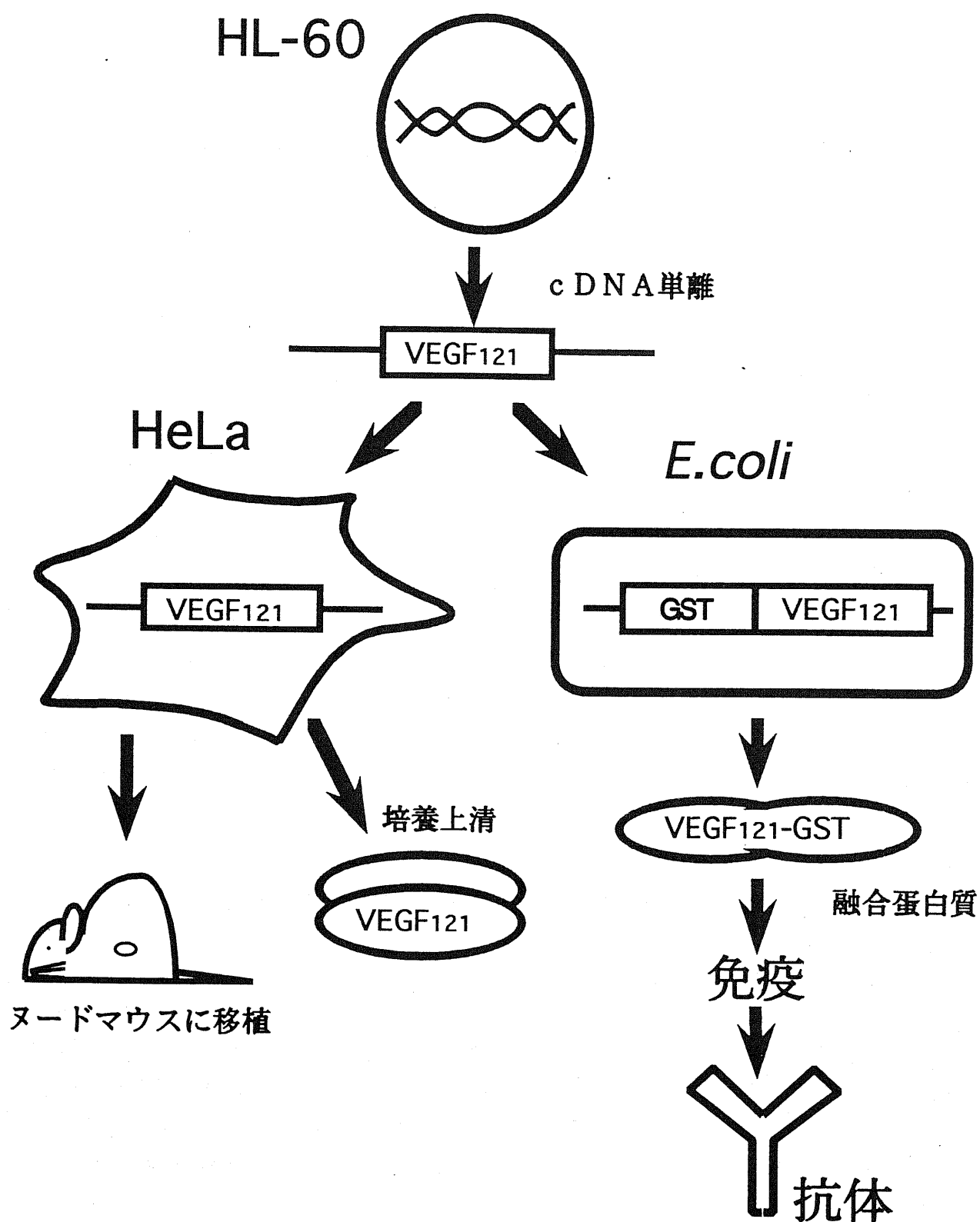


図4 VEGF₁₂₁過剰産生癌細胞株および抗VEGF₁₂₁ポリクローナル抗体の作製

I - 1 材料および実験方法

1) 細胞と動物

ヒト臍帯由来血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) は、クラボウより購入し、増殖培地*を用いて、37℃, 5% CO₂, 飽和水蒸気環境にて培養した。ICRマウス (4週令, ♂) およびニュージーランドホワイト種家兎 (15週令, ♂) は、SLCより購入した。

*増殖培地: 2% FBS, 1 μ g/ml ハイドロコルチゾン, 10 ng/ml EGF, 10 μ g/ml ECGS および 10 μ g/ml ヘパリン含有 MCDB-31 培地

2) 組み換えヒト VEGF₁₂₁ 過剰産生 HeLa 細胞の作製

ヒト VEGF₁₂₁ の cDNA は、ヒト前骨髄芽球性白血病株 HL-60 より単離した。cDNA は、サイトメガロウイルスの転写プロモーターおよびネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現ベクター, pRc/CMV (インヴィトロジェン社) に組み込んでヒト子宮頸部癌細胞株 HeLa を形質転換した。G418 耐性を指標に限界希釈法でクローニングを行いヒト VEGF₁₂₁ を最も生産する株を HeLa/v5 と命名した。また、コントロールとしてヒト VEGF₁₂₁ 遺伝子を組み込んでいないベクターのみで形質転換した HeLa 細胞株を HeLa/c と命名した。

3) *In vitro* 細胞増殖活性測定

HUVEC の増殖促進活性は、Myoken 等の方法に準じた (48)。HUVEC (10⁴ 個) は、アッセイ培地*にて希釈して、コラーゲンコート 12 穴プレートにまき、各種濃度に調製したサンプルを添加して 5 日間培養した。HUVEC の増殖は MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; シグマ社) を用いて比色定量した (49)。

*アッセイ培地: 10% FBS, 10 μ g/ml ウシインスリン, 5 μ g/ml ヒトトランスフェリン, 10 μ M 2-メルカプトエタノール, 10 μ M 2-アミノエタノール, 10 nM 亜セレン酸ナトリウム含有 50% D-MEM-50% RPMI-1640 培地

4) *In vivo* 血管新生アッセイ

In vivo の血管新生試験は、メンブランチャンバー法にて行った(50)。 1×10^7 個の培養細胞 (HeLa/c または HeLa/v5) は、PBS にて希釈してメンブランチャンバー*に封入した。メンブランチャンバーは、ネンブタール (ダイナボット社) にて麻酔された ICR マウスの背部皮膚を切開して、その皮下に埋め込んだ。切開部は連続縫合機 (夏目製作所) にて閉じた。7 日後、マウスを屠殺してメンブランチャンバーに接した部分の皮膚を切り取り、そこに形成された新生血管を実体顕微鏡にて観察した。コントロールとしては、PBS のみを封入したメンブランチャンバーを埋め込んだ。

*メンブランチャンバー：プラスチックリング (ミリポア社; #PR0001401) の両面にセルロースエステルメンブラン (直径 14 mm, ポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$, ミリポア社; #HAWP01400) を張り付けて作製した。

5) ヒト VEGF₁₂₁-GST 融合蛋白質の作製および家兎の免疫

ヒト VEGF₁₂₁ のシグナルペプチド領域を除いた cDNA をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子を含む発現ベクター pGEX-2T (ファルマシア社) に挿入して、ヒト VEGF₁₂₁-GST 融合蛋白質の発現ベクターを作製した。この発現ベクターを用いて大腸菌 HB101 株を塩化カルシウム法を用いて形質転換した。目的遺伝子の導入が確認された大腸菌株は、L 培地にて培養後、15 mM の IPTG にて目的蛋白質の発現を誘導したところヒト VEGF₁₂₁-GST は、大腸菌内でインクルージョンボディーを形成した。その後、ヒト VEGF₁₂₁-GST は、グルタチオンセファロース 4B カラム (ファルマシア社) にて精製した。家兎は、以下のスケジュール・条件にて 3 回免疫した。

- ①: ヒト VEGF₁₂₁-GST ($200 \mu\text{g}$) + フロイント完全アジュバント (Day 0)
- ②: ヒト VEGF₁₂₁-GST ($100 \mu\text{g}$) + フロイント不完全アジュバント (Day 14)
- ③: ヒト VEGF₁₂₁-GST ($100 \mu\text{g}$) + フロイント不完全アジュバント (Day 20)

抗ヒト VEGF₁₂₁ ポリクローナル抗体は、硫安沈殿後、陽イオン交換カラムにて精製した。

I - 2 結果

I - 2 - ① HeLa / v 5 細胞培養上清の血管内皮細胞に対する増殖促進活性および抗ヒト VEGF₁₂₁ ポリクローナル抗体による抑制

ヒト前骨髄性白血病細胞株, HL-60 よりヒト VEGF₁₂₁ の cDNA を単離した。この cDNA を用いてヒト子宮頸部癌細胞株, HeLa を形質転換して HeLa / v 5 株を作製した。また、ベクターのみで形質転換した株, HeLa / c も作製した。HeLa 細胞は、ヒト VEGF₁₂₁ あるいはベクターのみで形質転換しても *in vitro* の細胞増殖速度に変化はなかった（データ省略）。一方、ヒト VEGF₁₂₁ と GST の融合蛋白質 (VEGF₁₂₁-GST) を大腸菌で産生させ、家兎を免疫して抗ヒト VEGF₁₂₁ ポリクローナル抗体を作製した。

HeLa 形質転換株における目的遺伝子の発現は、ノーザンブロッティングにて解析した。HeLa 親株, ベクター形質転換株 (HeLa / c) およびヒト VEGF₁₂₁ 形質転換株 (HeLa / v 5) より mRNA を調製してアガロース電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。ヒト VEGF₁₂₁ の cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行ったところ HeLa / v 5 のみに目的遺伝子の転写産物に相当する約 0.7 kb の強いバンドが検出された（図 5）。また、いずれのレーンにても約 3.7 kb 付近に弱いバンドが検出された。これは HeLa 細胞が元来発現している VEGF の mRNA と考えられた。

次に、目的遺伝子産物が産生されているかを蛋白質レベルで解析するためにウエスタンブロッティングを行った。各細胞株の培養上清をアセトン沈澱して濃縮し 12% SDS-PAGE にて非還元状態で展開した。ナイロン膜に転写後、抗ヒト VEGF₁₂₁ ポリクローナル抗体でヒト VEGF₁₂₁ の検出を行ったところ HeLa / v 5 細胞由来の培養上清を泳動したレーンにのみ約 45 kd のヒト VEGF₁₂₁ に相当するバンドが検出された（図 6）。このことより HeLa / v 5 細胞は、ヒト VEGF₁₂₁ を大量に産生し、分泌していることが明らかとなった。

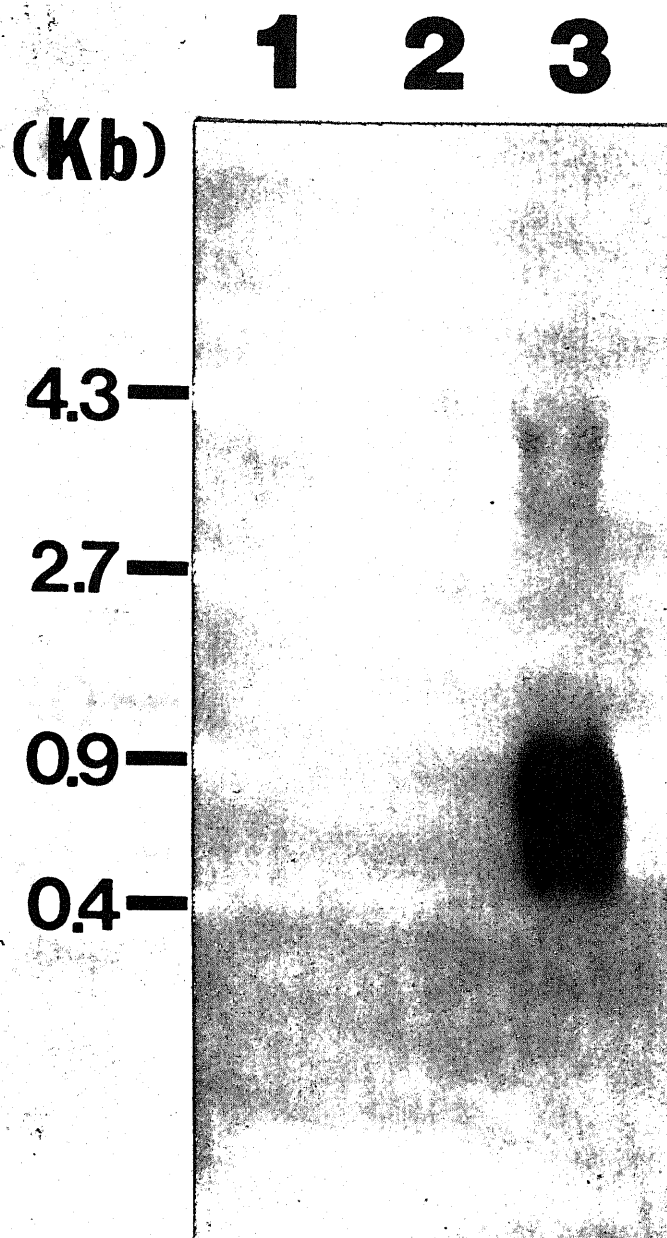


図5 形質転換HeLa細胞におけるヒトVEGF-mRNAの発現

各細胞より調製したmRNAをヒトVEGF₁₂₁のcDNAをプローブにしてノーザンブロッティングを行った。

レーン1: HeLa細胞 (親株)

レーン2: HeLa/c細胞 (ベクター形質転換株)

レーン3: HeLa/v5細胞 (ヒトVEGF₁₂₁形質転換株)

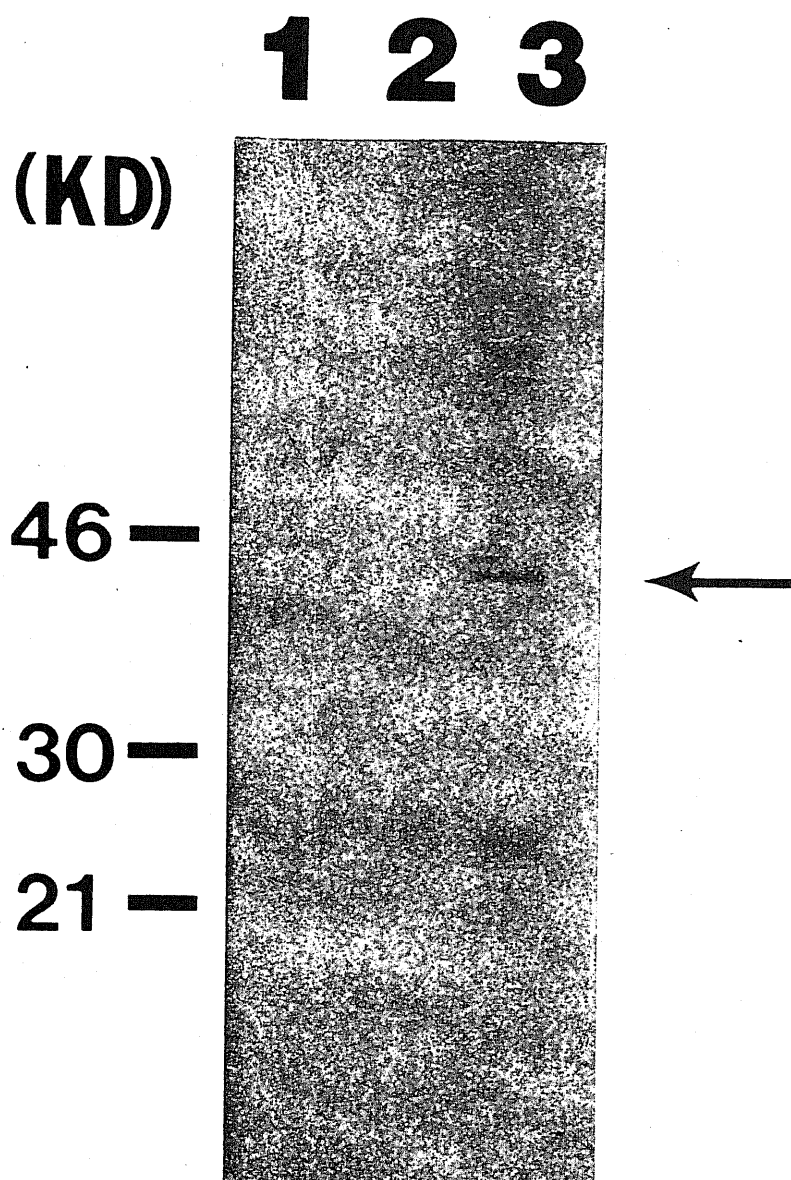


図6 形質転換HeLa細胞の培養上清からのVEGFの検出

各細胞の培養上清をSDS-PAGEにより展開し、ナイロン膜に転写後、
抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体でウェスタンブロッティングを行った。

レーン1：HeLa細胞（親株）

レーン2：HeLa/c細胞（ベクター形質転換株）

レーン3：HeLa/v5細胞（ヒトVEGF₁₂₁形質転換株）

矢印は、ヒトVEGF₁₂₁に相当する蛋白質の分子量を示す。

HeLa/v5細胞が分泌しているヒトVEGF₁₂₁がVEGFとしての活性を持っているかについて検討するために、HUVECの培養系にHeLa/v5細胞の培養上清を添加した。その結果、HeLa/v5細胞の培養上清の用量に依存して、HUVECは増殖が促進された(図7)。一方、HeLa細胞あるいはHeLa/c細胞の培養上清では、調べた濃度範囲では、HUVECの増殖促進するような活性は、ほとんど観察されなかった。わずかながら最高濃度(243 μ l 添加)にて増殖を促進したのは、先のノーザンブロットリングの結果も併せて考えると、HeLa細胞が元来発現しているヒトVEGFまたは他の血管新生因子によるものと思われる。しかし、その活性は、HeLa/v5細胞が産生するVEGFの活性と比べると僅かであった。

また、ここで観察されたHUVECの増殖促進活性は、抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体で培養上清を前処理することで、抗体の用量依存的に阻害された(図8)。

以上の結果より、HeLa/v5細胞の産生するヒトVEGF₁₂₁は、HUVECの増殖を促進する活性(VEGF活性)を有していることが明らかとなったとともに、抗VEGF₁₂₁ポリクローナル抗体に中和活性があることも明らかとなった。

I-2-② HeLa/v5細胞による *in vivo* 血管新生誘導活性

HeLa/v5細胞が分泌しているヒトVEGF₁₂₁が、*in vivo*でも血管新生活性を示すかを調べる目的でメンブランチャンバー法にて解析した。メンブランチャンバーにHeLa/v5細胞あるいはHeLa/c細胞を封入してマウスの背部皮下に埋め込んだ。移植7日後、HeLa/v5細胞を封入したメンブランチャンバーの接した部位に対して周囲の血管から血管新生の誘導が観察された(図9)。一方、HeLa/c細胞を封入したメンブランチャンバーと接した部位の血管新生は、たとえあったとしてもかなり弱くPBSのみを封入したメンブランチャンバーと差はなかった。このことから、HeLa/v5の産生するヒトVEGF₁₂₁は、*in vivo*にても血管新生因子として働くことが明らかとなった。

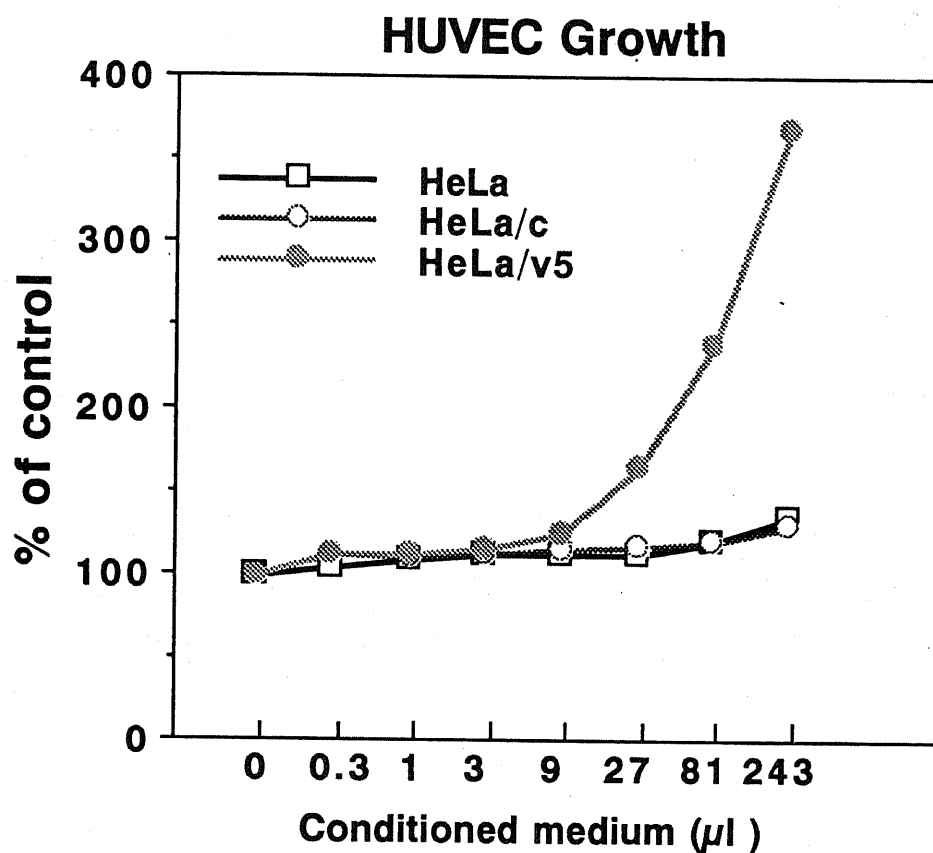


図7 形質転換H e L a細胞培養上清のH U V E Cに対する増殖促進活性

各細胞の培養上清をアッセイ培地に添加してH U V E Cを培養した。
増殖促進活性は、M T T法にて判定した。

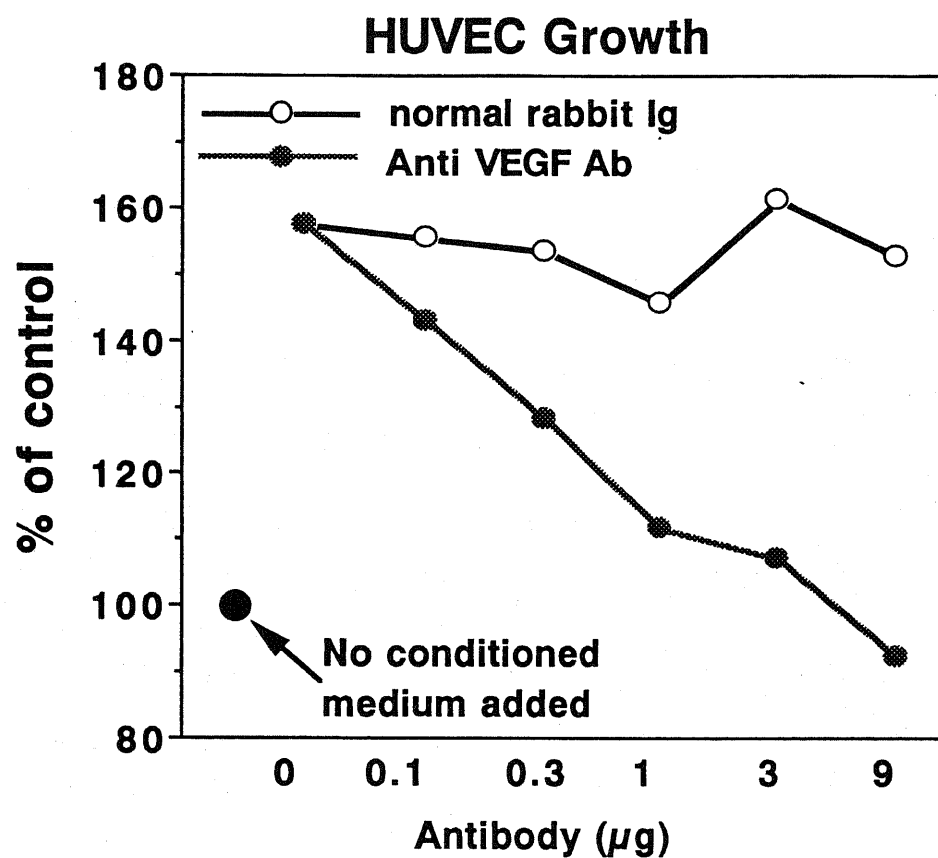


図8 HeLa/v5細胞培養上清のHUVEC増殖促進活性に対する
抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体による阻害

80 μl のHeLa/v5細胞培養上清を様々な濃度の抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体または正常ウサギIgGと前処理してHUVECの培養系に添加した。判定は、MTT法にて行った。

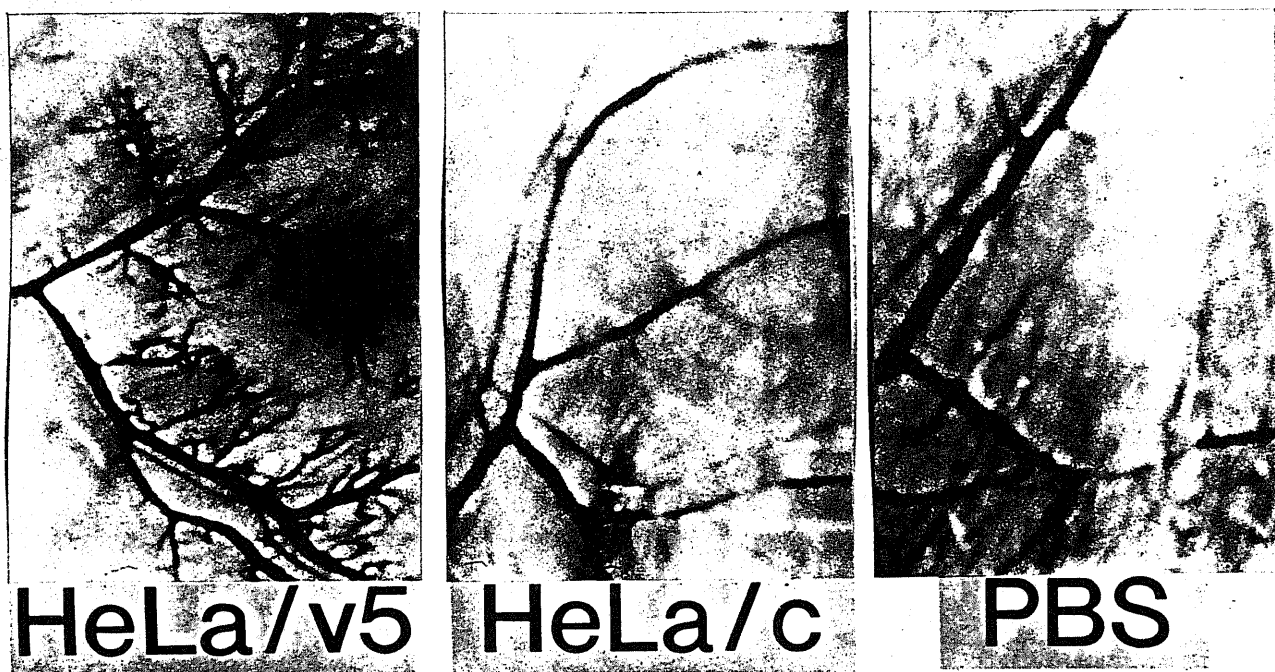


図9 HeLa/v5細胞依存性の血管新生 (*in vivo*)

1×10^7 個の培養細胞 (HeLa/v5 (左) またはHeLa/c (中央)) は、PBSにて希釈してメンブランチャンバーに封入した。メンブランチャンバーは、ICRマウスの背部の皮下に埋め込んだ。7日後、メンブランチャンバーに接した部分の皮膚を切り取り、そこに形成された新生血管を実体顕微鏡にて観察した。コントロールとしては、PBSのみを封入したメンブランチャンバーを埋め込んだ (右)。

I - 3 考 察

著者等は、VEGFに関する研究を行うにあたり、分子レベルでの解析が容易であることから、最も小さいアイソフォームであるVEGF₁₂₁を材料として用いることとした。ヒトVEGF₁₂₁は、市販されている試薬がなかったために自らcDNAを単離して調製した。cDNAのライブラリーには、Leung等がヒトVEGF₁₆₅のcDNAを単離に成功したヒト前骨髄芽球性白血病株、HL-60を用いた(27)。得られたcDNAは、ヒトVEGF₁₂₁蛋白質の調製をするために癌細胞株を形質転換してヒトVEGF₁₂₁過剰産生株を作製することとした。一般的に蛋白質の過剰産生を行う際は、CHO細胞等を用いるのであるが、著者等は、VEGF蛋白質の産生のみならず固形癌の増殖におけるVEGFの役割の解明も目的のひとつであったことから癌細胞株を用いることとした(第Ⅲ章参照)。癌細胞株の選択は、mRNAレベルの解析からVEGFの産生量の少ないと思われたヒト子宮頸部癌細胞株、HeLaを選んだ(データ省略)。ヒトVEGF₁₂₁形質転換HeLa細胞株(HeLa/v5)は、mRNAレベル(図5)のみならず蛋白質レベル(図6)でヒトVEGF₁₂₁を過剰産生していることが明らかとなった。また、ここで産生されたヒトVEGF₁₂₁が、VEGF活性を有しているかを調べる目的でHeLa/v5細胞の培養上清をHUVECの培養系に添加した。その結果、培養上清の用量に依存したHUVECの増殖促進が観察された(図7)。また、この増殖促進活性は、ヒトVEGF₁₂₁とGSTを遺伝子レベルで連結して得たヒトVEGF₁₂₁-GST融合蛋白質を抗原として得た抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体により用量依存的に阻害された(図8)。このことは、HeLa/v5細胞が産生している血管新生因子がVEGF₁₂₁であることの証明であるとともに、抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体に中和活性があることを示している。HeLa/v5細胞の培養上清からのヒトVEGF₁₂₁蛋白質の精製も試みたが、産生量が数10ng/mlと低かったため断念した。後に、ヒトVEGF₁₂₁を酵母で大量に産生させることに成功し、第Ⅳ章以降の抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体に関する実験では、それを使用した(第Ⅳ章参照)(51)。

第Ⅱ章 固形癌細胞培養上清および担癌マウス・癌患者血中 V E G F の検出

固形癌自身が V E G F を分泌していることを明らかにすることは、V E G F が T A F の一つであることの必要条件となると考えた。そこで前章で記した抗ヒト V E G F₁₂₁ポリクローナル抗体を用いて V E G F を簡便に検出するサンドイッチ E L I S A の系を構築し、各種固形癌由来のサンプル中の V E G F の検出を行った。

Ⅱ - 1 実験方法

1) 酵素標識抗体の作製

抗ヒト V E G F₁₂₁ポリクローナル抗体（第Ⅰ章参照）は、0.1 M 酢酸緩衝液（pH 4.3）にて透析した後、ペプシンを用いて消化して F (a b')₂断片を作製した。F (a b')₂断片は、2-メルカプトエタノールアミンで還元して F a b'断片にした後、マレイミド法で t y p e M - P O D （シグマ社）と結合させた（F a b'-P O D）。

2) サンドイッチ E L I S A

①プレート調製：抗ヒト V E G F₁₂₁ポリクローナル抗体は、0.1 M 塩化ナトリウム含有 25 m M 炭酸緩衝液（pH 9.5）にて 2 μ g / m l 溶液を作製し、イムロン 2-マイクロタイターストリップ（ダイナテック社）の各 w e l l に 100 μ l ずつ分注し固相化した。各 w e l l は、200 μ l のブロッキング溶液^{a)}にてブロッキングした。

②アッセイ法：被検サンプルは、サンプル希釈液^{b)}にて希釈し 100 μ l ずつ w e l l に添加して室温（23℃）にて2時間反応させた。各 w e l l は、洗浄液^{c)}にて6回洗浄後、100 μ l の抗ヒト V E G F₁₂₁ポリクローナル抗体の F a b'-P O D 標識蛋白質溶液を添加して更に1時間室温で反応させた。各 w e l l は、洗浄液で9回洗浄後、100 μ l の基質液^{d)}を添加して室温で30分反応させて発色させた。酵素反応は、100 μ l の 2 M 硫酸を添加して

停止し490nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（モレキュラーデヴァイス社）にて測定した。本実験を行った時点で純粋に精製されたヒトVEGFが無かったためHeLa/v5細胞培養上清をヒトVEGF源として使用した。HeLa/v5培養上清は、HUVECに対する増殖促進活性の用量依存性から50%刺激する量を1ユニット（1U）とした。Ferrara等の報告しているヒトVEGFの血管内皮細胞に対する増殖促進活性の用量-反応性曲線より1UのヒトVEGFは約250pgに相当する(26)。

- a) ブロッキング液：1%BSA, 0.1%アジ化ナトリウム, 0.1M塩化ナトリウム含有200mM炭酸緩衝液 (pH9.6)
- b) サンプル希釈液：0.05%Tween-20, 0.25%BSA, 0.1%アジ化ナトリウム含有PBS
- c) 洗浄液：0.1%BSA含有PBS
- d) 基質液：8.3mg/ml o-フェニレンジアミン塩酸塩、0.01%過酸化水素含有0.2Mクエン酸緩衝液 (pH5.2)

II - 2 結果

II - 2 - ① VEGF検出サンドイッチELISA系の反応特異性

抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体を用いて構築したサンドイッチELISA系におけるヒトVEGF₁₂₁の標準曲線を図10に示す。ヒトVEGF₁₂₁のソースとしてHeLa/v5細胞培養上清を用いたためVEGF蛋白濃度は、HUVECの増殖に対する促進活性より求め、0mU (0μg) から1U (250pg) まで調べた。その結果、0mUでの[平均値+2×SD]を検出限界とすると、この系でのVEGFの検出限界は1mU (約0.25pg) となった。また、この標準曲線の回帰式は、以下ようになった。

$$(Y) = -1.77 \times 10^{-8} (X)^2 + 0.005 (X) + 0.0062$$

(相関係数=1.000)

実験内の各ポイントでのCV値は、6.3%以下であり、感度および精度ともに優れた検出系である。また、この検出系におけるVEGFに対する特異性は高く、アミノ酸配列上で相同性があるPDGF-A鎖ホモダイマーおよびPDGF-B鎖ホモダイマーとは、100ng/mlでも全く交叉しなかったうえ、VEGF以外の血管新生因子であるaFGFやbFGFおよびEGFとも100ng/mlで全く交叉しなかった(データ省略)。このことから、この検出系は、VEGFに対する特異性に関しても優れた系であった。

II - 2 - ② 各種ヒト癌細胞培養上清中のVEGFの検出

VEGFに対する簡便且つ高感度な検出系の構築ができたことから、まず、各種癌細胞がVEGFを産生しているかを調べた。9種類の各種ヒト癌細胞株および正常細胞株の代表としてHUVECを選び、各細胞培養上清中のVEGFの検出を先のサンドイッチELISAにて行った。その結果、培地(10%FBS含有D-MEM)およびHUVECの培養上清中にVEGFは検出されなかった(表2)。一方、ヒト癌細胞培養上清中には、量的な差こそあれ全てにVEGFが検出された。表II-1で調べた9種類以外に13種類のヒト癌細胞株の培養上清中のVEGFの検出を行ったところ全てにVEGFが検出された(データ省略)。この結果、全ての固形癌がVEGFを分泌している可能性が示唆された。

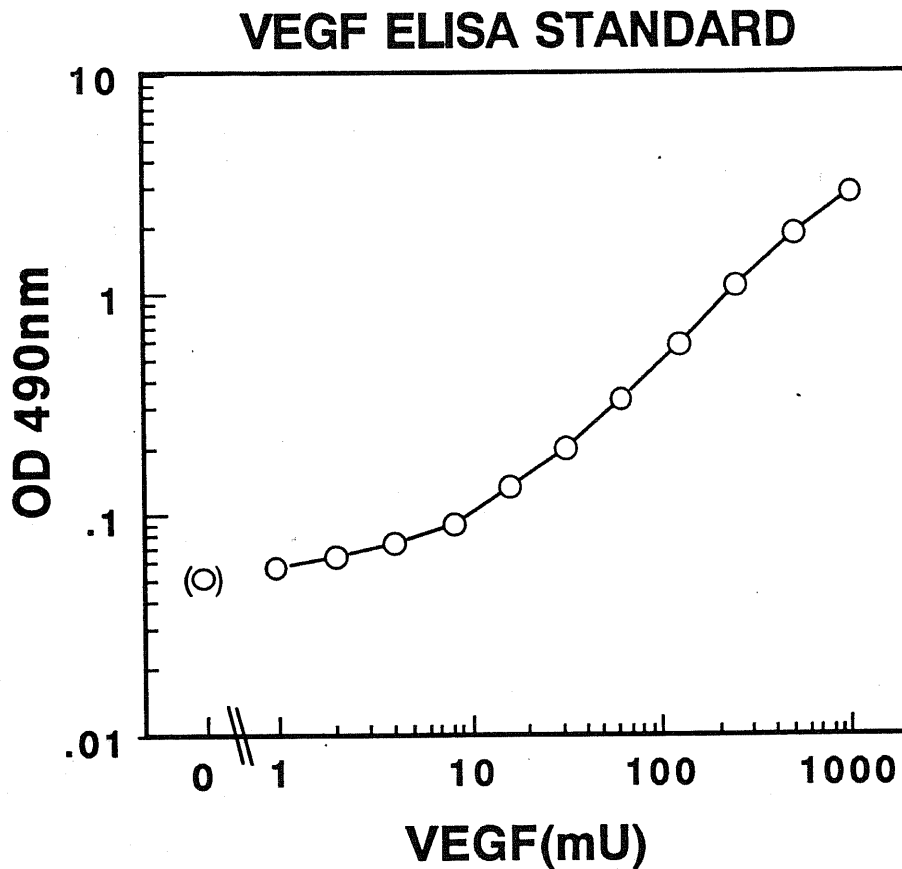


図10 VEGFサンドイッチELISAの標準曲線

0mUから1000mUのVEGFを含むHeLa/v5細胞培養上清を検体としてサンドイッチELISAを行った。各ポイントは、 $n=6$ で行った平均値を示す。各ポイントのSD値は、0mUから1000mUまでそれぞれ、0.003, 0.003, 0.003, 0.004, 0.006, 0.007, 0.009, 0.019, 0.020, 0.041, 0.040, および0.094であった。

表2 各種ヒト癌細胞培養上清からのVEGFの検出

cell lines	VEGF secretion
Pre-conditioned (10%FBS-DMEM)	-
HUVEC; endothelial cell	-
HeLa; cervix carcinoma	+
HeLa/v5; recombinant	++++
A549 ;lung carcinoma	++
PC14; lung carcinoma	+++
HT-1080; fibrosarcoma	+++
A431; epidermoid carcinoma	++
LNcap.FGC; prostate adenocarcinoma	++++
PLC/PRF/5; hapatoma	++
WiDr; colon adenocarcinoma	+++

VEGF濃度は、HeLa/v5培養上清を標準サンプルとして、以下のように記した。

- : 0.05 ng/ml 以下
 + : 0.05 ~ 0.5 ng/ml
 ++ : 0.5 ~ 1.0 ng/ml
 +++ : 1.0 ~ 1.5 ng/ml
 ++++ : 1.5 ng/ml 以上

II-2-③ 担癌マウス血漿中のVEGFの検出

II-2-②の実験結果から癌細胞の培養上清中にVEGFが検出されることがわかった。そこで、次に担癌マウス血中のVEGFの検出を行った。HeLa/v5およびHeLa/cをヌードマウス(BALB/c nu/nu, ♂, 4週令)の皮下に移植して固形癌を作らせた。癌細胞移植前および移植後8週間が経過して、固形癌が増殖した時点で採血しVEGFの検出を行った。その結果、癌細胞移植前の正常ヌードマウス血中のVEGF濃度は、検出限界以下であったのに対して、HeLa/v5を移植し、固形癌が増殖しつつあるヌードマウスの血中には、VEGF濃度が明らかに上昇しており58mU/mlから280mU/mlになっていた(表3)。固形癌の体積と血中VEGF濃度との間には相関はなかった。この結果は、固形癌より分泌されたVEGFは、血流中に移行することを示している。一方、VEGFの産生量の極めて少ないHeLa/c細胞を移植したヌードマウスでは、固形癌の体積が200mm³を越えた個体でも血中のVEGF濃度は検出限界以下であった。

II-2-④ 癌患者血清中のVEGFの検出

ヒト固形癌を移植したヌードマウスの血中にVEGFのが検出されたことから、次に、実際の癌患者の血中にVEGFが検出されるかを検討した。子宮体部癌，子宮頸部癌，卵巣癌および肺癌患者血清および健常人血清中のVEGFの検出を行い、その濃度をプロットした結果が図11である。健常人血清中のVEGF濃度は、若干の例外を除いて全て検出限界以下であった。一方、癌患者血清中VEGF濃度は、全てのタイプの癌種にて高値を示した。Mann-Whitney U検定の結果、子宮体部癌，子宮頸部癌，卵巣癌および肺癌患者血清中のVEGF濃度は、健常人のと比べて、それぞれ $P=0.002$ ， 0.023 ， <0.001 および <0.001 で有意な差と判定された。

表3 ヒト固形癌移植ヌードマウス血中からのVEGFの検出

固形癌		移植前 (mU/ml)	移植後 (mU/ml)	固形癌体積 (mm ³)
1	HeLa/v5	ND	58	334.1
2	HeLa/v5	ND	260	461.7
3	HeLa/v5	ND	92	610.0
4	HeLa/v5	ND	136	268.2
5	HeLa/v5	ND	280	320.0
6	HeLa/v5	ND	196	242.5
7	HeLa/c	ND	ND	206.7
8	HeLa/c	ND	ND	81.5
9	HeLa/c	ND	ND	53.0

HeLa/v5およびHeLa/cの固形癌(3×3×3mm)は、ヌードマウスの皮下に移植した。血中のVEGF濃度は、サンドイッチELISAにて測定した。

ND: not detected

VEGF IN HUMAN SERUM SAMPLES

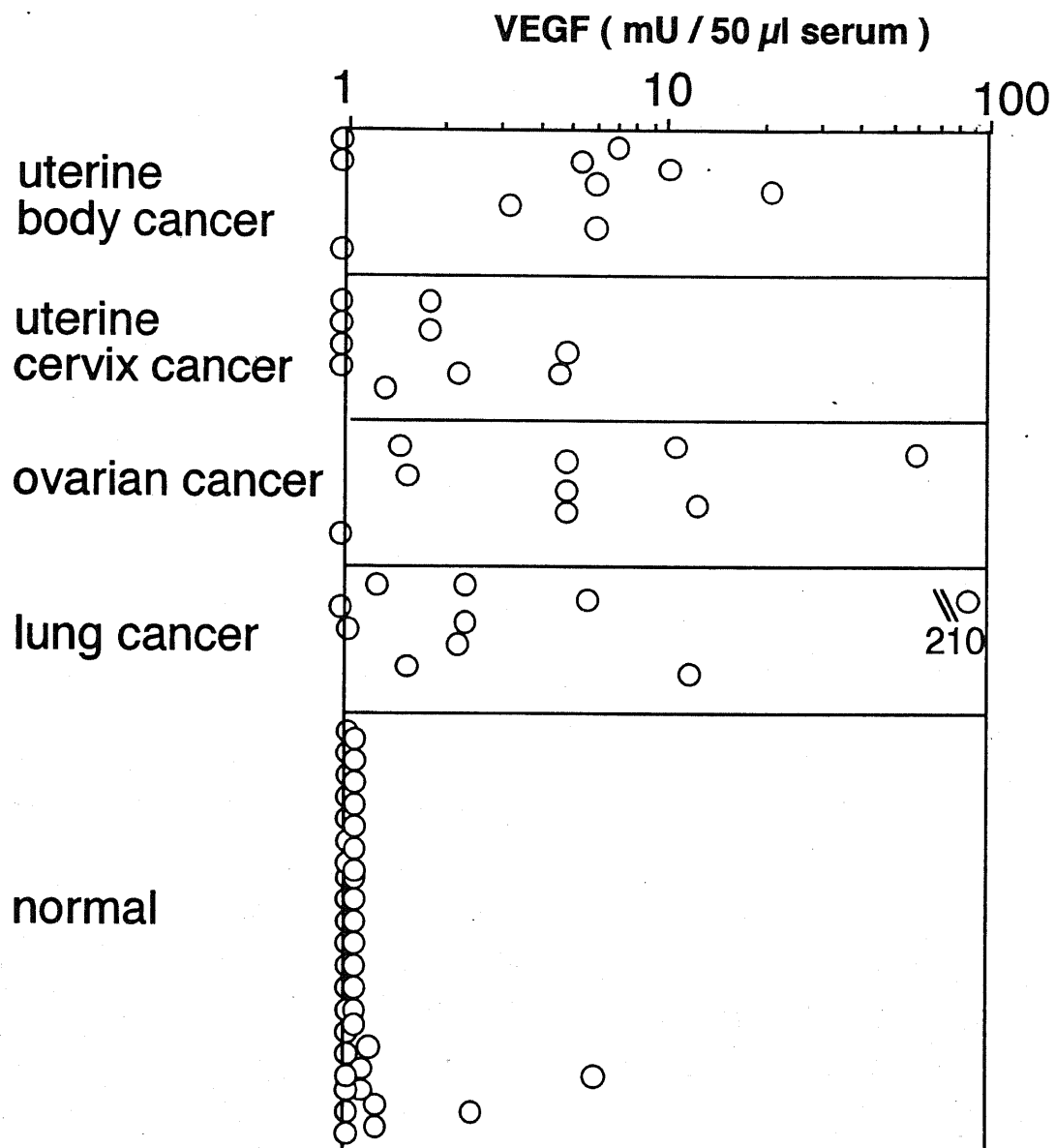


図11 各種ヒト血清サンプル中のVEGF濃度

癌患者および健常人より採取した血清中のVEGF濃度は、
サンドイッチELISAにて測定した。

II - 3 考 察

抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体を使ったサンドイッチELISAの系を構築し、VEGFを簡便・高感度・高精度で検出できるようになった。同様のVEGF検出系は、Ye o等による報告がある(52)。彼らはヒトVEGF₁₆₅のN末部分およびC末部分に相当する合成ペプチドを抗原としてポリクローナル抗体を作製し前者を固相(一次抗体)に、後者のEu³⁺標識体を二次抗体にして免疫蛍光法で検出する系を構築している。彼らの系での検出感度が5.5 pM(約200 pg/ml)と報告されていることから著者等の作製したサンドイッチELISA系の検出感度が優れていることがわかる。VEGFは、その発見の経緯および因子の精製等の報告から幾つかの癌細胞株で発現していることが予想された。しかし、各種培養ヒト癌細胞が皆VEGFを分泌していることを示した報告(表2)はなかった。また、ヒト固形癌を移植したヌードマウスの血中にVEGFが検出されたことは、固形癌より分泌されたVEGFが血流中に移行していることを示している(表3)。更に、調べた範囲では、全ての種類の癌患者の血清中にもVEGFが検出されたことは、癌患者でも同様に固形癌より分泌されたVEGFが血流中に移行していることを示している(図11)。先のYe o等の報告によると担癌マウスおよび癌患者血清中にはVEGFが検出されなかったと記されている。この違いについては、用いている抗体の違いによると考えられる。彼らが用いたのは、ヒトVEGF₁₆₅のN末およびC末に相当する部分のペプチドに対する抗体であるのに対して著者等が用いたのはヒトVEGF₁₂₁の全配列を含む蛋白質に対する抗体であり、彼らの抗体よりVEGF蛋白質の広い範囲を認識しうると考えられる。したがって、血中においてVEGFのN末部分またはC末部分が、他の蛋白質によってブロックされていたり、プロテアーゼにより消化されていた場合には、彼らの検出系では検出できなくなってくる。血中蛋白質である α_2 -マクログロブリンは、VEGFと複合体を形成する性質がある(53)、VEGF₁₆₅以上の大きさのヒトVEGFは、プラスミンによって消化されて、より低分子の蛋白質になるとの報告がある(46)。生体内にて同様の現象が起こっているという報告はないが、十分におこりうると考えられる。また、VEGFの3次構造に関する報告はなく、両アミノ酸末端が表面に露出しているかは不明である。これらの点からしても、血中のVEGFを検出するにあたって、彼らの系より著者等の系が優れていると言える。更に例数を増やして検討して、癌患者の血清中のVEGF濃度が健常人と比して高いことが統計的に証明できれば、この

系で「癌診断」が可能になると考えられる。表2で示したように各種培養ヒト癌細胞がVEGFを分泌しているばかりでなく、現在までに各種培養ヒト癌細胞株のみならず、臨床の場で得られた多くのヒト固形癌の標本にてVEGFを発現していることがノーザンブロットィングやPCRによるVEGF-mRNAの検出および抗VEGF抗体を使った組織染色の結果から明らかになってきている(表4および表5)。このことより、VEGFの検出を目的とした「癌診断」は、広い範囲の癌を対象とできると考えられる。しかし、健常人でも卵巣(54)および胎盤(55,56)においてVEGFが発現しているという報告もあり性周期や妊娠時の血管新生にも関与していると考えられる。また、癌以外でも血管新生を伴う疾患として知られている間接リウマチ(57,58)、糖尿病性網膜症(59,60)、創傷治癒(61)、乾癬(62)および動脈硬化症(63)でのVEGFの高発現の報告がある。これらの場合に、血流中のVEGF濃度が検出できる濃度まで上昇するかは不明であるが、固形癌以外の疾患との区別が血中VEGFの検出による「癌診断」が有用かどうかを見極めるための課題となる。

表4 ヒト癌細胞株におけるVEGFの発現

細胞株	由来	検出法	文献
HT-29	結腸癌	VPF活性 ^{a)} , 精製	64
MNNG-HOS	骨肉腫	VPF活性	65
MNNG-T24	膀胱癌	VPF活性	65
MNNG-J82	膀胱癌	VPF活性	65
U937	リンパ腫	精製	66
U251	脳腫瘍	VPF活性	67
Ishikawa	子宮内膜腫	PCR	68
HEC 1-A	子宮内膜腫	PCR	68
HEC 1-B	子宮内膜腫	PCR	68
T47D	乳癌	PCR	69
MDA231	乳癌	PCR	69
MCF7	乳癌	PCR	69
IF9	黒色腫	N ^{b)} , W ^{c)} ,	70
Me157	黒色腫	N, W,	70
BLM	黒色腫	N, W,	70
MV3	黒色腫	N, W,	70
DLD-1	結腸癌	N, ELISA	71
HCT-116	結腸癌	N, ELISA	71
a) Miles' Assay ⁽⁷²⁾ b) Northern blotting c) Western blotting			

表5 ヒト固形癌におけるVEGFの発現

種類	検出法	文献
脳腫瘍	in situ ^{a)} , N	67
脳腫瘍	in situ, immunostain	73-75
脳腫瘍	in situ	76
脳腫瘍	in situ, N, PCR, W	77
脳腫瘍	immunostain	78
カポシ肉腫	PCR, N	79
血管腫	in situ, N, PCR	80
血管腫	immunostain	81
乳癌	immunostain	82, 83
膀胱癌	N	84
卵巣癌	PCR, N	85
黒色腫	PCR, N	70
非小細胞肺癌	immunostain	86
結腸癌	in situ, immunostain, PCR	87
子宮頸部癌	in situ, immunostain	88
腎臓癌	in situ, immunostain	89

a) in situ hybridization

第Ⅲ章 固形癌の増殖における VEGF の役割

前章までの実験結果より、ヒト VEGF₁₂₁ が *in vitro* および *in vivo* で血管新生活性を示すことと、固形癌が VEGF を分泌していることが明らかとなった。そこで、固形癌の増殖における VEGF の役割についてヌードマウスを使用した *in vivo* の実験を検討した。

Ⅲ - 1 実験方法

1) *In vivo* 固形癌増殖実験および抗体による阻害活性測定

HeLa/v5 細胞および HeLa/c 細胞は、10% FBS 含有 D-MEM で培養し、それぞれ 2×10^7 個の細胞をヌードマウス (BALB/c nu/nu; 日本クレア社) の皮下に移植して、固形癌の増殖速度を比較した。また、抗ヒト VEGF₁₂₁ ポリクローナル抗体の抗癌活性を調べるためには、HeLa/v5 およびヒト肝臓癌 (PLC/PRF/5) の固形癌をそれぞれ 3mm 角の切片に切り出して、別のヌードマウスの腹側部の皮下に移植した。抗ヒト VEGF₁₂₁ ポリクローナル抗体および正常ウサギ Ig (免疫前家兎血清より調製) は、3 mg/kg (約 75 μ g/mouse) の投与量にて皮下に投与した。固形癌の体積は、経時的に長径および短径をノギスで計測して、次式にて算出した。

$$[\text{固形癌の体積 (mm}^3\text{)}] = \frac{[\text{短径 (mm)}]^2 \times [\text{長径 (mm)}]}{2}$$

Ⅲ - 2 結果

Ⅲ-2-① HeLa/v5株およびHeLa/c株の固形癌増殖実験

HeLa/v5細胞およびHeLa/c細胞をヌードマウスの皮下に移植して、それぞれの固形癌の増殖速度を観察した。その結果、HeLa/v5の固形癌の方がHeLa/cに比べて増殖速度が速いことがわかった(図12)。また、別の実験にてHeLa/v5の方がHeLa/cに比べて固形癌の生着率が高かった(データ省略)。HeLa/v5株とHeLa/c株は、*in vitro*にての倍加時間に差がないことより、両細胞の増殖能そのものには違いはない。HeLa/v5がVEGFを過剰産生していることを考えると、この差は、VEGFに起因しており、且つ宿主側の応答に差が出ているとことが示唆された。VEGFが血管新生作用を持つ因子であることをあわせて考えると、固形癌の増殖速度の違いは、両株の血管新生を起こさせる能力の違いによるものであると考えられた。更に、このことは、VEGFが固形癌の増殖に大きく影響していることを示している。

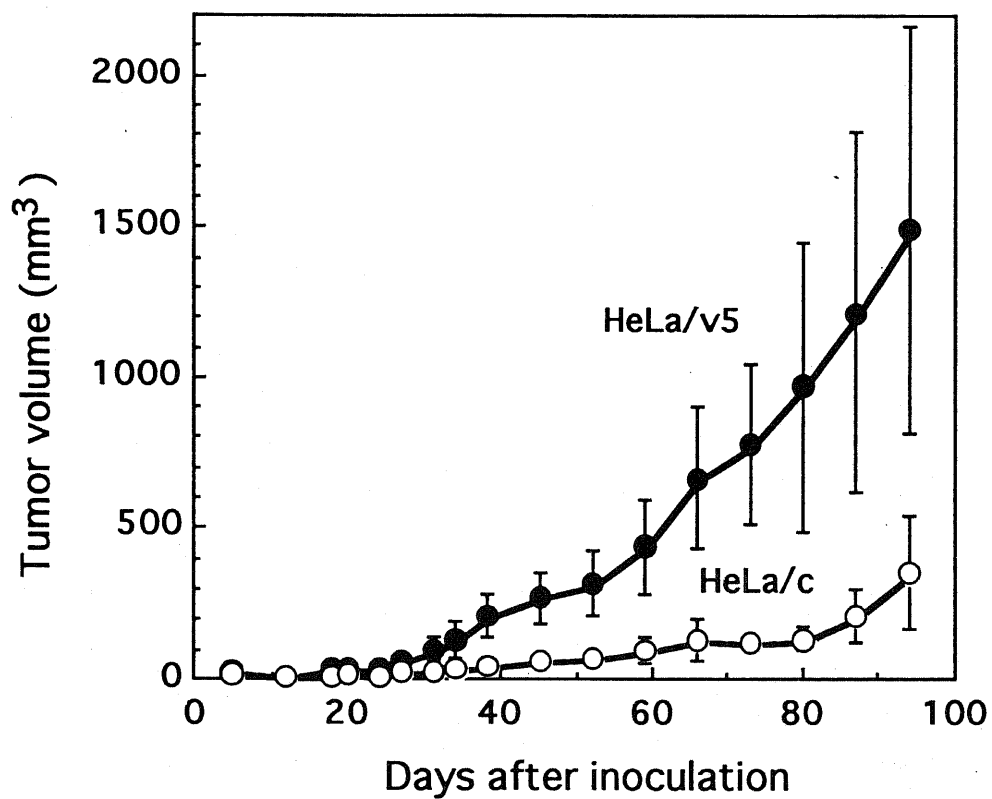


図12 HeLa/v5およびHeLa/cのヌードマウスでの増殖

2×10^7 個のHeLa/v5細胞(●)およびHeLa/c細胞(○)を、ヌードマウスの皮下に移植して経時的に固形癌の体積を測定した。

Ⅲ-2-② 抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体による固形癌増殖抑制

《HeLa/v5株》

Ⅲ-2-①の実験結果より、VEGFの生産量が高いと*in vivo*における固形癌の増殖速度が速くなることが明らかになった。そこで、これを中和抗体を用いて阻害すると、固形癌の増殖速度が変わるかを検討した。HaLa/v5担癌ヌードマウスに対して3mg/kgの抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体を固形癌の移植7日後より15回連続して皮下に投与した。その結果、抗体投与群では、正常ウサギIg投与群に比べて固形癌の増殖が顕著に抑制されることがわかった(図13)。

《PLC/PRF/5株》

先の結果は、人工的に作製したヒトVEGF₁₂₁過剰産生株(HeLa/v5)を用いて行った実験結果であり、特殊な細胞を用いた系である。一方、第Ⅱ章で記したように調べた限りでは、全てのヒト癌細胞株がVEGFを分泌していることが明らかとなっている。そこで、このような株化ヒト癌細胞由来の固形癌の増殖に対して抗ヒトVEGF中和抗体がどのように影響するかを調べた。PLC/PRF/5(ヒト肝臓癌)担癌ヌードマウスに対して3mg/kgの抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体を固形癌の移植翌日より15回連続して皮下に投与した。その結果、PLC/PRF/5の固形癌に対しても、抗体投与群では、正常ウサギIg投与群に比べて固形癌の増殖が顕著に抑制されることがわかった(図14)。

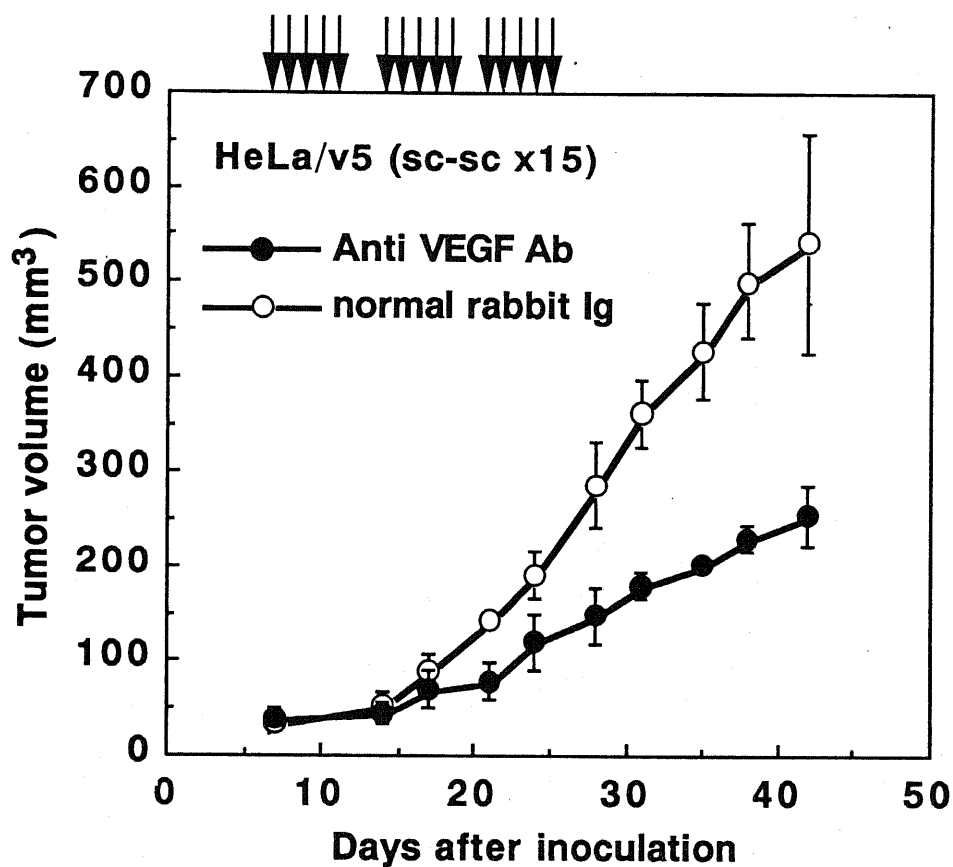


図13 抗VEGF₁₂₁ポリクローナル抗体投与による固形癌の増殖の阻害①

HeLa/v5の固形癌を3mm角の切片に切り出してヌードマウスの皮下に移植した (Day 0)。Day 7~11, 14~18, 21~25に計15回に抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体を3mg/kgの投与量にて皮下投与した (●)。コントロールとしては、正常ウサギIgを投与した (○)。経時的に固形癌の長径および短径を測定して体積を算出した。

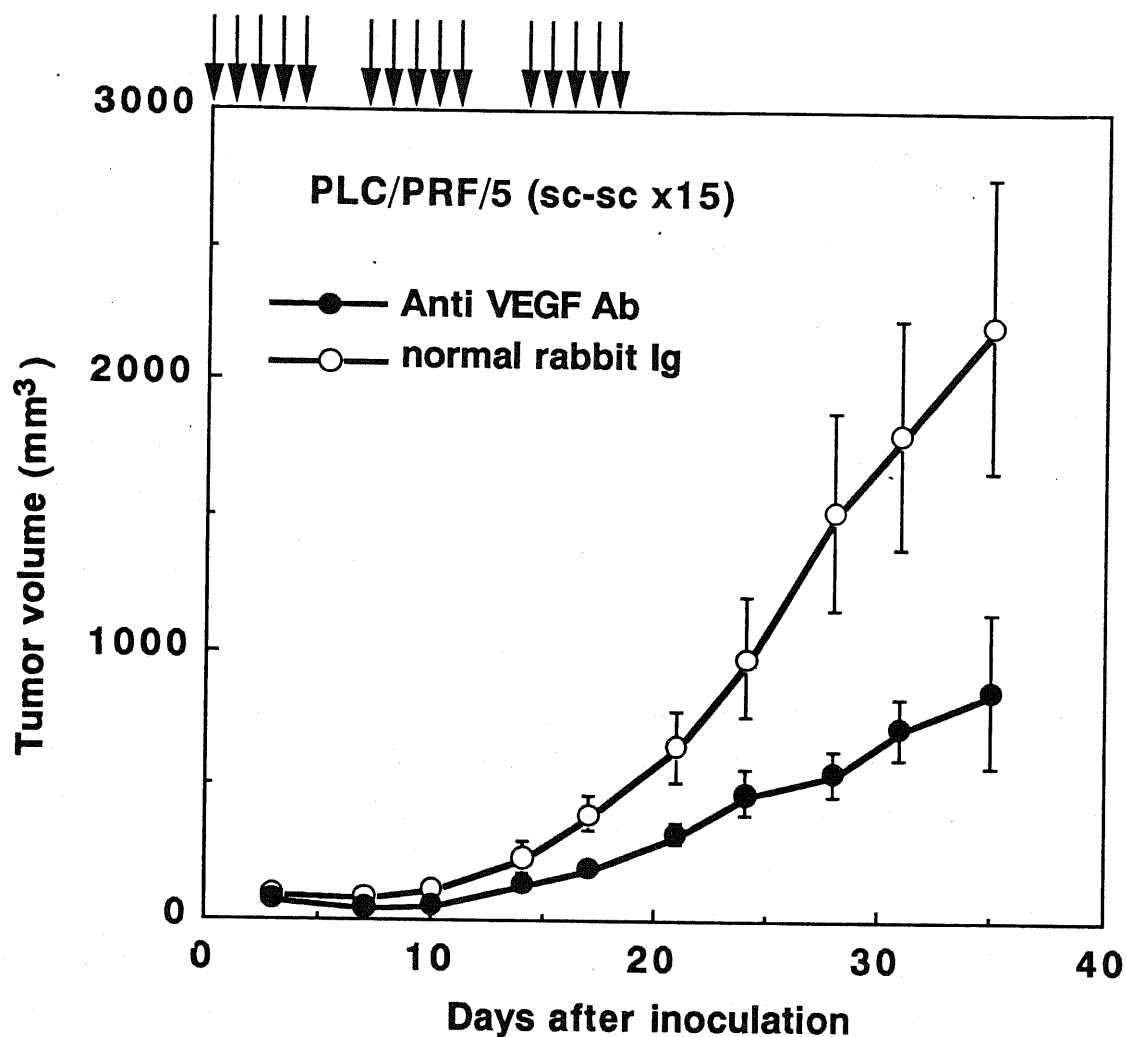


図14 抗VEGF₁₂₁ポリクローナル抗体投与による固形癌の増殖の阻害②

PLC/PRF/5の固形癌を3mm角の切片に切り出してヌードマウス皮下に移植した (Day 0)。Day 0~4, 7~11, 14~18の計15回に抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体を3mg/kgの投与量にて皮下投与した (●)。コントロールとしては、正常ウサギIgを投与した (○)。経時的に固形癌の長径および短径を測定して体積を算出した。

III - 3 考 察

VEGF産生量の異なるHeLa細胞を用いたヌードマウスでの固形癌の増殖速度を調べた結果、VEGF過剰産生株であるHeLa/v5の固形癌の増殖速度がベクターコントロールであるHeLa/cより早かった(図12)。著者等の結果と同様の実験結果は、今までに3箇所の異なるグループにより報告されている。Senger等は、ヌードマウスにて固形癌を形成する能力のないヒト骨肉腫細胞株(HOS)およびヒト膀胱癌株(T24)を材料に選び、各細胞株をMNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)にて処理して得た固形癌形成能を獲得した変異株、MNNG-HOSおよびMNNG-T24にてVEGF産生量が増加していることを報告している(65)。遺伝子操作による形質転換ではなく変異誘導剤を用いているため、VEGF産生量以外にも変異が導入されている可能性は否定できないがVEGF産生量の違いと固形癌の増殖の関係を最初に報告したレポートである。Ferrara等は、ヒトVEGF₁₆₅でCHO細胞を形質転換し、VEGF産生量の異なるクローンを作製してVEGFが癌化因子であるかの検討を報告している(90)。CHO細胞の足場依存性および足場非依存性の増殖は、外部からのVEGFの添加およびVEGFによる形質転換にて影響を受けず*in vitro*の実験結果からは、VEGFが癌化因子ではないと考えている。しかし、ヌードマウスの皮下に、各細胞株を移植した結果、親株およびベクター形質転換株では、全く固形癌形成が観察されなかったのに対してヒトVEGF₁₆₅形質転換株では固形癌が形成された。固形癌は、薄い線維性のカプセルに包まれた状態であり血管新生が亢進されていた。この結果は、VEGFが、癌化因子ではないものの固形癌の形成においては、血管新生因子として機能していることを示しており、VEGFが純粋なパラクリン因子である事の証明である。Zhang等は、ヒト乳癌細胞株(MCF-7)のヒトVEGF₁₂₁にて形質転換した株を作製して著者等と同様の実験を行っている(91)。ヒトVEGF₁₂₁形質転換株はヌードマウスでの固形癌の増殖速度が上昇していた。著者等の行ったHeLa細胞による実験結果、および他の3グループによる実験結果は、全て同一の結論を導き出している。それは、VEGFは、TAFのひとつであり、固形癌の形成のみならず、その増殖速度を促進する活性を有しているということである。

一方、抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体を投与することでVEGF活性を阻害すると、ヒトVEGF₁₂₁形質転換株(HeLa/v5)のみならずヒト肝臓癌株(PLC/PRF/5)による固形癌の増殖を強く抑制することが出来た(図13および図14)。この結果は、逆の面から先の結論をサポートす

るものである。抗VEGF中和抗体の抗癌活性については、第V章で考察する。

VEGFがTAFのひとつであることが明らかとなったばかりでなく、その活性を阻害することで固形癌の増殖を強く抑制することが明らかになった。抗VEGF中和抗体は、「血管新生阻害剤」という新しい作用メカニズムの抗癌剤となりうると考えられた。第II章で記したようにVEGFが、かなり広い範囲の固形癌で発現していることから、抗VEGF中和抗体の抗癌スペクトルは、広いと考えられる。また、VEGFは、健常人において女性の生理期および妊娠期に限ってのみ高発現していると考えられることから、通常時は、生体内で機能していない因子と考えられ、抗VEGF中和抗体は、固形癌に対して選択的に働くことが予想される。このことから、抗VEGF中和抗体が、今までの抗癌剤のように重篤な副作用がない画期的な抗癌剤になりうると考えられた。

第Ⅳ章 抗VEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体の作製およびその特性

第Ⅲ章で記したヒトVEGF₁₂₁過剰産生株 (HeLa/v5) および抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体を用いた実験結果は、VEGFがTAFのひとつであることを示していた。また、抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体の投与によりヌードマウスに移植したヒト固形癌の増殖を顕著に抑制できたことは、抗ヒトVEGF中和抗体が抗癌剤となりうる可能性を示している。抗体を医薬品として開発するためには、免疫原性等を考慮して遺伝子工学的にキメラ化あるいはヒト化という改変を行いヒトIgに近づける必要がある (図15)。そのためにもポリクローナル抗体では不都合であり、モノクローナル抗体の作製が必要となった。また、モノクローナル抗体を作製し利用する利点として、成分の均一性および物質の安定供給があげられる。更に、VEGFの血管新生活性を分子レベルで解析するにあたってモノクローナル抗体の方が有用である。

ヒトVEGF₁₂₁-GSTを用いて免疫して得たポリクローナル抗体に中和活性があったことから、同じ蛋白質を抗原として用いることで中和活性を有するモノクローナル抗体を得ることが可能であると考えた。しかし、ヒトVEGF₁₂₁-GSTを用いてモノクローナル抗体のスクリーニングを行うと、ヒトVEGF₁₂₁に対する抗体のみならず、GST蛋白質に対する抗体も選出されてくるために効率が悪い。そこで当時、酵母を用いてVEGF活性およびVPF活性を持ったヒト組み換えVEGF₁₂₁の大量生産に成功していたことから(51)、このヒト組み換えVEGF₁₂₁を使用してモノクローナル抗体のスクリーニングを行うこととした。また、この酵母産生ヒトVEGF₁₂₁は、以降のヒトVEGF₁₂₁のソースとして利用することとした。

ヒトVEGF₁₂₁-GSTにて免疫したマウスから28クローンの抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体を作製した。HUVECのヒトVEGF₁₂₁依存の増殖に対する阻害活性を指標に全クローンについて中和活性を調べたところMV101 (IgG1, κ) およびMV303 (IgG2a, κ) と命名された2クローンに中和活性を見いだした。以下、この2クローンの性質に関する解析結果を記す。また、中和活性のない抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体としてMV415 (IgG2a, κ) もコントロールとして用いた。

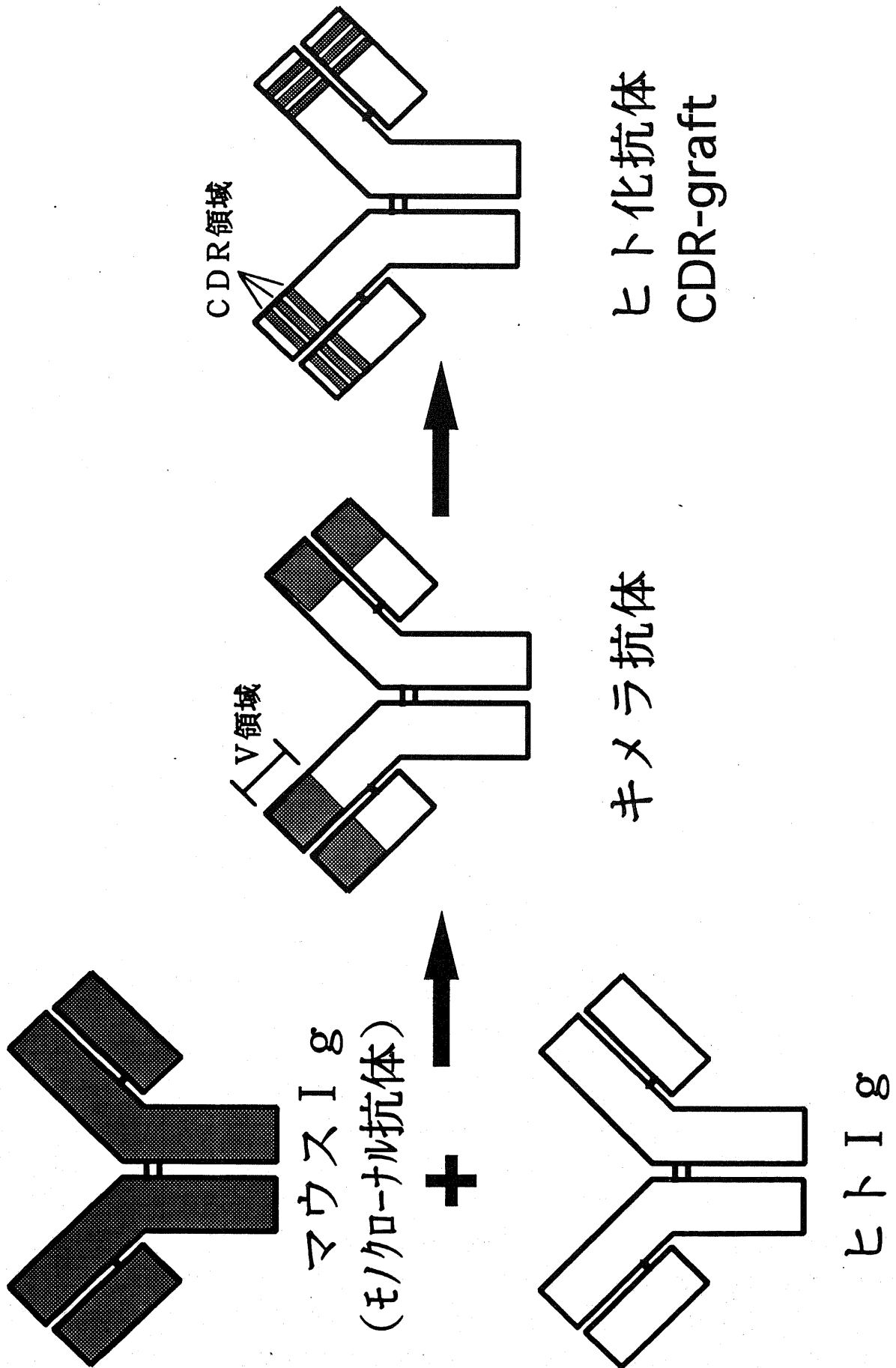


図15 抗体の医薬品化

IV - 1 材料および実験方法

1) 材料

遺伝子組み換えヒトVEGF₁₂₁は、ヒトVEGF₁₂₁のcDNAにて形質転換した酵母の培養液より精製したものを使用した(51)。GST-VEGF₁₂₁は、形質転換した大腸菌の菌体より精製したものを使用した。遺伝子組み換えヒトVEGF₁₆₅は、R&D社より購入して用いた。遺伝子組み換えヒトbFGFは、オンコジンサイエンス社より購入して用いた。

2) マウスの免疫および細胞融合

マウス(BALB/c, ♀, 8週令)は、フロイントの完全アジュバントを用いて乳化したGST-VEGF₁₂₁(100 μ g)を腹腔内に投与して免疫した。免疫は、計3回、2週間毎に行った。最終免疫日の3日後にマウスを屠殺して脾臓を取り出した。脾細胞は、50%ポリエチレングリコール(メルク社)を用いてIg非産生マウスミエローマ細胞株(Sp2/O-Ag14)と融合した。融合細胞は、10%FBSおよびHAT*(ギブコ社)含有RPMI-1640培地にて希釈して、96穴培養プレートに分注した。細胞は、37℃, 5%CO₂, 飽和水蒸気環境にて培養した。抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、限界希釈法にてクローニングを行った。

*HAT: 0.1mMヒポキサンチン、0.4 μ Mアミノプテリン、16 μ Mチミジン

3) ELISAによるハイブリドーマのスクリーニング

96穴イムノプレート(コースター社, #3690)は、ヒトVEGF₁₂₁をコートした後、ブロッキング液にてブロッキングを行った。ブロッキング液を除去後、ハイブリドーマ培養上清をwellあたり100 μ l添加して室温にて1時間反応させた。洗浄液にて6回洗浄後、POD標識抗マウスIg(H+L)鎖(MBL社)を添加して更に室温で1時間反応させた。洗浄液にて9回洗浄し未反応の標識抗体を除いた後、基質液を添加して発色させた。反応停止には2規定の硫酸をwellあたり100 μ l加えた。各wellの吸光度(490nm)はプレートリーダー(モレキュラーデヴァイス社)にて測定した。

Igのサブクラス決定には2次抗体としてマウスIgサブクラス特異的家兎ポリクローナル抗体(バイオラド社)を反応させた後、POD標識抗家

兎 Ig を反応させ同様に発色させた。

4) モノクローナル抗体の調製

抗ヒト VEGF₁₂₁モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞は、ヌードマウス (BALB/c nu/nu, ♀, 8~11週令, 日本クレア社) の腹腔内に移植し、腹水を回収した。モノクローナル抗体は、腹水を50%硫酸沈殿を行った後にプロテインGカラム (ファルマシア社) にて精製した。

5) *In vitro* 血管内皮細胞増殖阻害活性測定

ヒト VEGF₁₂₁依存性の HUVEC の増殖に対するモノクローナル抗体の阻害活性は、第 I 章に記した方法を若干変更して行った。HUVEC (2×10^3 個) は、アッセイ培地にて希釈して、コラーゲンコートしてある96穴プレート (コーニング社) にまき、各種濃度に希釈したモノクローナル抗体および 10 ng/ml のヒト VEGF₁₂₁ を添加して5日間培養した。実験によっては、ヒト VEGF₁₂₁ の代わりに 10 ng/ml のヒト VEGF₁₆₅ あるいは 10 ng/ml の bFGF を使用した。培養終了1日前に $10 \mu\text{l}$ の ^3H -チミジン (1.85 MBq/ml , 925 GBq/mmol , アマシャム社) を添加し増殖中の細胞を標識した。細胞は、トリプシン-EDTA を用いてプレートより剥がした後、セルハーベスター (ケンブリッジテクノロジー社) を使用してガラス繊維フィルター上に回収した。細胞に取り込まれた ^3H -チミジンの放射活性は、液体シンチレーションカウンター (ベックマン社) にて計測した。

6) ^{125}I 標識ヒト VEGF₁₂₁ の HUVEC への結合の測定

ヒト VEGF₁₂₁ は、クロラミン T 法にて ^{125}I 標識した (92)。約 $1 \mu\text{g}$ のヒト VEGF₁₂₁ は、約 $50 \mu\text{l}$ の 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に希釈し $10 \mu\text{l}$ の ^{125}I -ヨウ化ナトリウム溶液 (3.7 MBq , 比放射活性 $644 \text{ MBq}/\mu\text{g}$, アマシャム社) および $10 \mu\text{l}$ の 1 mg/ml クロラミン T (シグマ社) 溶液を添加して室温にて45秒間反応させた。反応を止めるために $50 \mu\text{l}$ の 1.5 mg/ml ヨウ化ナトリウム溶液および $50 \mu\text{l}$ の 2 mg/ml のメタ亜硫酸ナトリウム溶液を添加して5分間放置した。あらかじめ 0.1% BSA 含有 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) にて置換した PD-10 カラム (ファルマシア社) に反応液をアプライ後、同緩衝

液にて溶出し ^{125}I 標識ヒトVEGF₁₂₁と未反応の ^{125}I を分離した。 ^{125}I 標識ヒトVEGF₁₂₁の比放射活性は、約 $1 \times 10^5 \text{ cpm} / \text{ng}$ であった。

ラジオレセプターアッセイは、HUVECに対して行った。HUVECはコラーゲンをコートしてある24穴プラスチックプレート（ファルコン社）にてサブコンフルエント状態になるまで培養した。モノクローナル抗体は、 ^{125}I 標識ヒトVEGF₁₂₁と混合し3時間室温にて反応させた。HUVECは10% FBS含有D-MEM培地にて2回洗浄後、あらかじめモノクローナル抗体と反応させた ^{125}I 標識ヒトVEGF₁₂₁と37℃にて3時間反応させた。未反応の ^{125}I 標識ヒトVEGF₁₂₁は、同培地にて3回洗浄して除去した。HUVECに結合した ^{125}I 標識ヒトVEGF₁₂₁は1% SDS含有PBSにて溶解しガンマカウンター（パッカード社）にて放射活性を測定した。非特異的結合を測定する際には非標識ヒトVEGF₁₂₁を ^{125}I 標識ヒトVEGF₁₂₁の100倍量添加して同様に反応させた。

7) サンドイッチELISA

サンドイッチELISAは、第II章の「実験方法」に記した方法にて行った。抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体を固相化した96穴イムノプレートの各wellに被検サンプルを添加して室温で1時間反応させた。洗浄液にて洗浄後、抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体のFab'-PODを室温で1時間反応させた。未反応の標識抗体を洗浄後、基質溶液を添加して発色させた。

8) 拮抗試験

各モノクローナル抗体のヒトVEGF₁₂₁に対する結合の相互拮抗能を測定するためにMV101およびMV303をビオチン化キット（アマシャム社）にてビオチン修飾を行った。ヒトVEGF₁₂₁をコートした96穴イムノプレートに対して $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ のビオチン修飾モノクローナル抗体と様々な濃度の非修飾モノクローナル抗体の混合液を添加して室温にて1時間反応させた。二次抗体としてPOD結合アビジン（アマシャム社）を使用した。

9) SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティング

SDS-PAGEは15%のアクリルアミドゲルを使用した(93)。ヒトVEGF₁₂₁およびヒトVEGF₁₆₅は2-メルカプトエタノール含有（還元条件）

または不含(非還元条件)のサンプルバッファーにて100℃, 5分間熱処理した後に泳動した。ゲル中の蛋白質はセミドライ-ブロッティングシステム(バイオラド社)にてイムビロンP膜(ミリポア社)に転写した。膜は、2%BSA含有PBSで4℃にて24時間処理してブロッティングを行った。その後、膜はモノクローナル抗体と4℃で2時間反応させ、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(H+L)抗体F(ab')₂断片(ザイメッド社)で膜に結合したモノクローナル抗体を検出した。膜は洗浄後、基質液*を反応させ発色させた。反応停止は水洗にて行った。

*基質液: 100mM 塩化ナトリウム, 5mM 塩化マグネシウム, 0.33mg/ml ニトロブルーテトラゾリウム, 165μg/ml 5-ブロモ-4-クロロ-3-ヨードリン酸含有100mM トリス塩酸緩衝液(pH9.5)

IV - 2 結果

N-2-① ヒト VEGF 依存性血管内皮細胞増殖に対する抗ヒト VEGF₁₂₁モノクローナル抗体の影響

ヒト VEGF₁₂₁-GST を抗原としてマウスを免疫して 28 クロンの抗 VEGF₁₂₁モノクローナル抗体を作製した。その中で 2 クローン (MV101 および MV303) に中和活性があった。また、中和活性のないクロンの代表として MV415 を選び、この 3 クローンを使用して以下の実験を行った。表 6 に各クロンの性質を示す。3 クローンとも VEGF₁₂₁ および VEGF₁₆₅ に pM オーダーの高親和性で結合した。

表 6 抗ヒト VEGF₁₂₁モノクローナル抗体の特性

	MV101	MV303	MV415
サブクラス	IgG1, κ	IgG2a, κ	IgG2a, κ

解離定数 (pM)			
VEGF ₁₂₁	55	76	154
VEGF ₁₆₅	86	144	621

中和活性	あり	あり	なし

HUVEC のヒト VEGF₁₂₁ 依存的な増殖に対する MV101 および MV303 の抑制活性を ³H-チミジン取り込み法にて検討した。その結果、MV101 および MV303 は、ヒト VEGF₁₂₁ (10 ng/ml) 依存的な HUVEC の増殖に伴う ³H-チミジンの取り込みを用量依存的に阻害した。両モノクローナル抗体ともに 1 μ g/ml 以上の濃度にてヒト VEGF₁₂₁ 依存的な増殖を完全に抑制した (図 16)。一方、中和活性のない MV415 は、10 μ g/ml の濃度を添加しても HUVEC の増殖に対して影響しなかった。このことは MV101 および MV303 で観察されたヒト VEGF₁₂₁ 依存的 HUVEC の増殖に対する阻害活性は、マウス Ig 添加による非特異的なもの

でなく、抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体による特異的なものであると考えられた。更に、このモノクローナル抗体のVEGF特異性を調べる目的で、他の因子によるHUVECの増殖促進を調べる系にMV303を作用させた。MV303は、ヒトVEGF₁₂₁のみならずヒトVEGF₁₆₅依存的なHUVECの増殖も用量依存的に阻害したが、bFGF依存的なHUVECの増殖に対しては、10 μ g/mlの濃度でも何等影響しなかった(図17)。これは、MV303がVEGFを特異的に認識していることを中和活性の面から示した結果といえる。

N-2-② ¹²⁵I 標識ヒトVEGF₁₂₁のHUVECへの結合に対する抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体の阻害活性

VEGFは、細胞表面の特異的な高親和性レセプターに結合して情報伝達をする(39,42)。MV101およびMV303によるヒトVEGF₁₂₁依存的なHUVEC増殖の阻害活性が、ヒトVEGF₁₂₁とそのレセプターとの結合阻害によるためかを調べる目的で¹²⁵I 標識ヒトVEGF₁₂₁とHUVECを用いたラジオレセプターアッセイを行った。その結果、MV101およびMV303は用量依的に¹²⁵I 標識ヒトVEGF₁₂₁のHUVECに対する結合を阻害した(図18)。同様の結果は、¹²⁵I 標識VEGF₁₆₅を用いたラジオレセプターアッセイにても得られている(データ省略)。この結果より、MV101およびMV303は、VEGFと免疫複合体を形成して、これが細胞表面に存在するVEGFレセプターに結合できなくなるために増殖のシグナルを伝えるのを阻害すると考えられた。

N-2-③ 抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体の反応特異性

MV101およびMV303をコートしたイムノプレートを用いてサンドイッチELISAを行って、ヒトVEGFの検出を行った。VEGFとしては酵母にて産生させたVEGF₁₂₁と市販されている昆虫細胞(Sf9)にて産生させたヒトVEGF₁₆₅(R&D社)を用いた。その結果、いずれのモノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISAも両VEGF分子種を認識したが、その反応性には差があり、いずれもヒトVEGF₁₂₁の方がヒトVEGF₁₆₅より反応性がよかった(図19)。

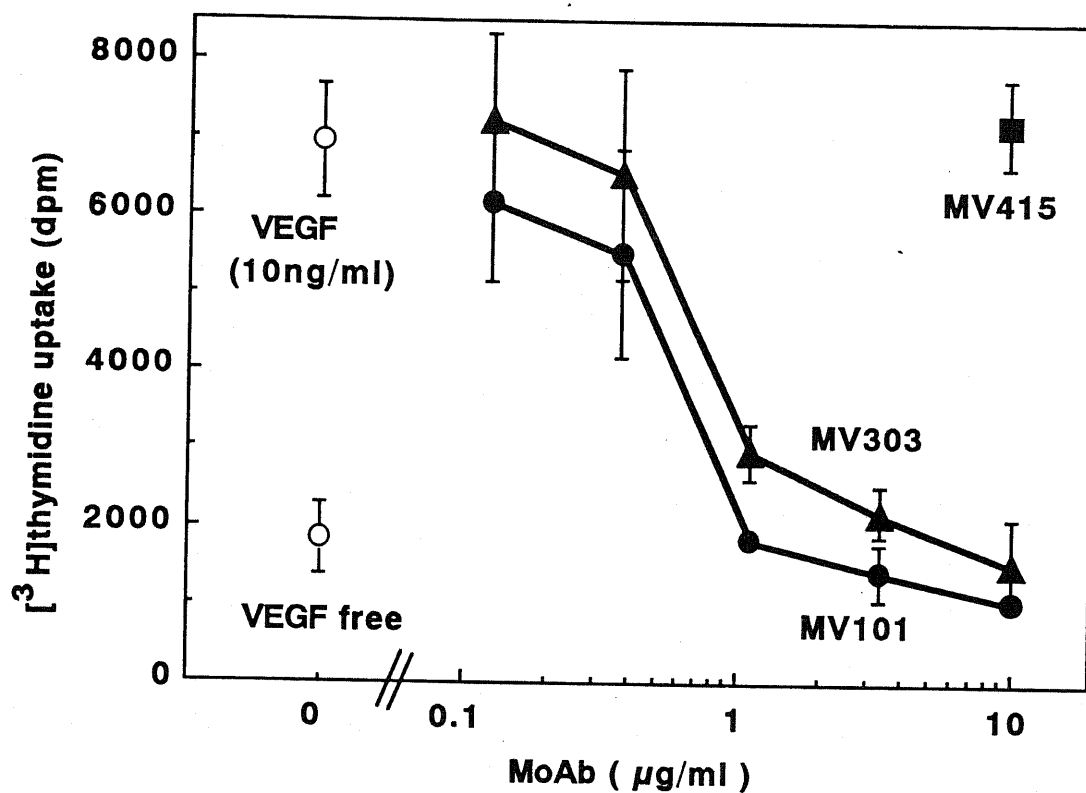


図16 ヒトVEGF₁₂₁依存性のHUVECの増殖に対する抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体の中和活性

HUVEC (2×10^3 個) は、 10 ng/ml のヒトVEGF₁₂₁および各種濃度の抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体と5日間培養した。HUVECの増殖は、 ^3H -チミジンの取り込みにより測定した。

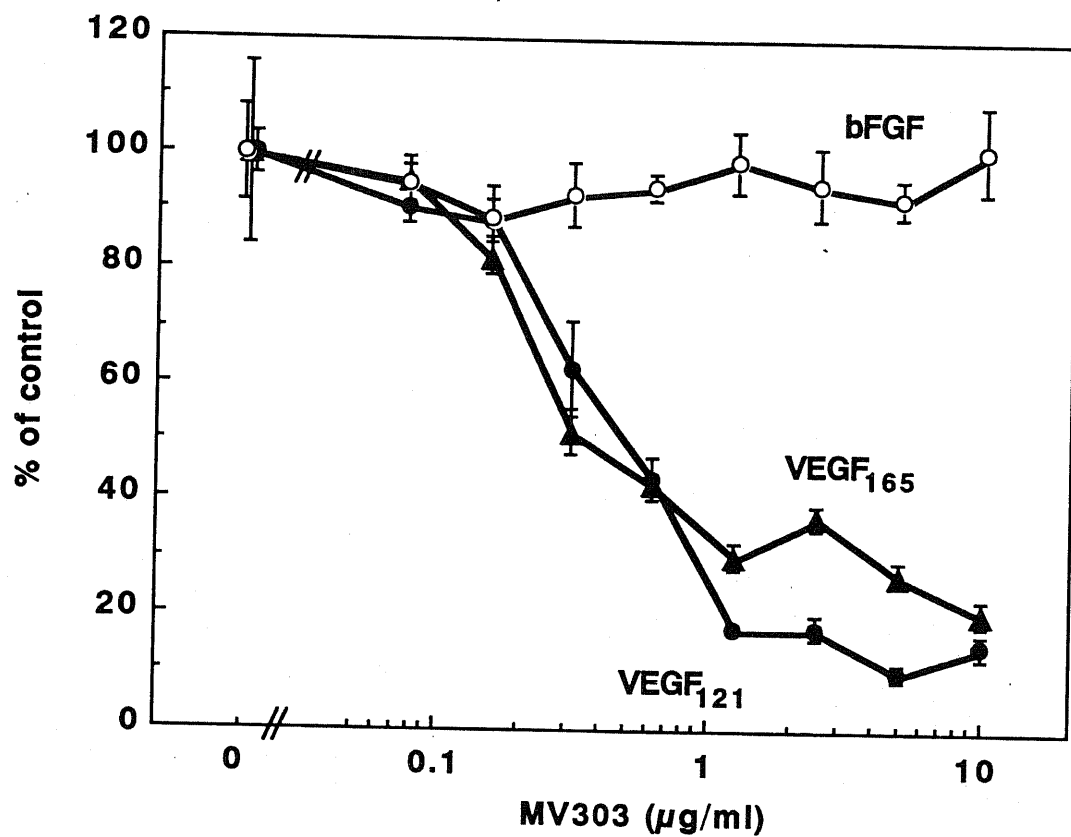


図17 VEGFおよびbFGF依存性のHUVECの増殖に対するMV303の中和活性

HUVEC (2×10^3 個) は、 10 ng/ml のヒト VEGF₁₂₁ (●) ,
ヒト VEGF₁₆₅ (▲) またはヒト bFGF (○) および各種濃度の MV303 と
5日間培養した。HUVECの増殖は、 ^3H -チミジンの取り込みによって測定した。

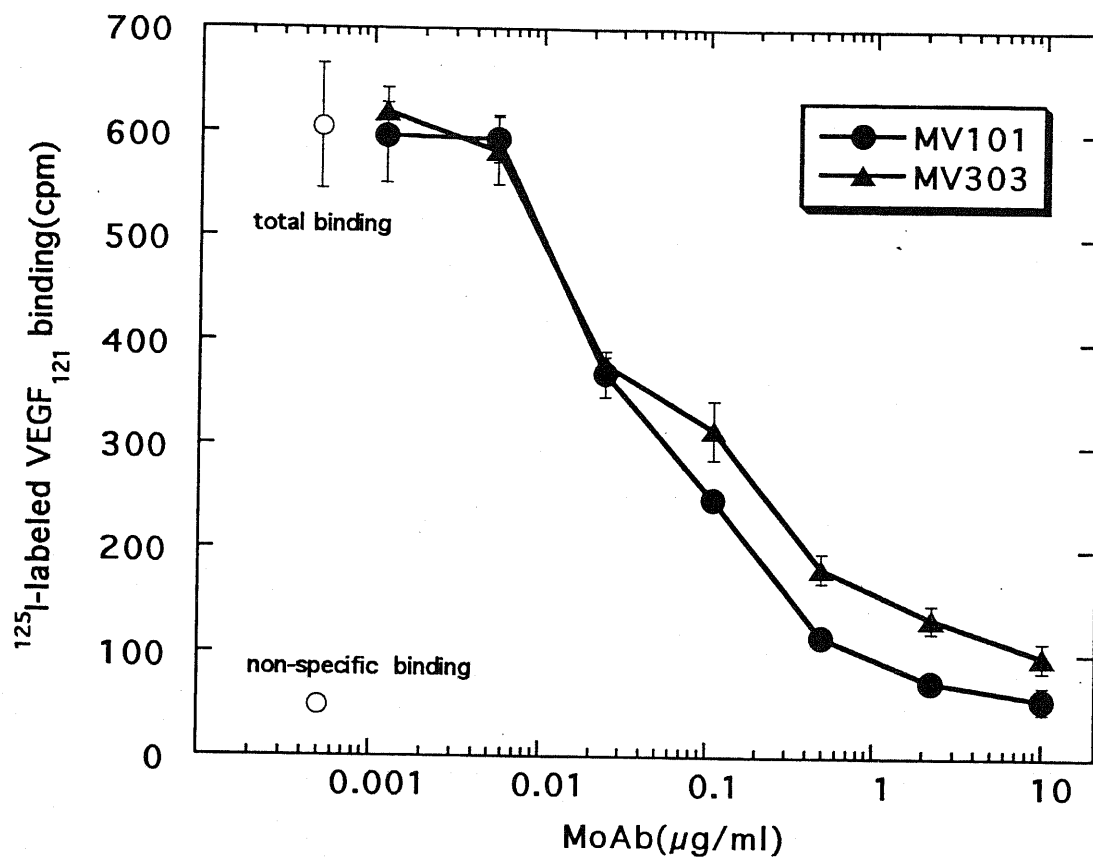


図18 ^{125}I 標識ヒト VEGF_{121} の HUVEC への結合に対する
抗 VEGF_{121} 中和モノクローナル抗体の阻害活性

^{125}I 標識ヒト VEGF_{121} ($6 \times 10^4 \text{ cpm}$) は、様々な濃度の MV101 (●) または MV303 (▲) と 3 時間室温にて反応させた後、HUVEC と 37°C にて 3 時間反応させた。

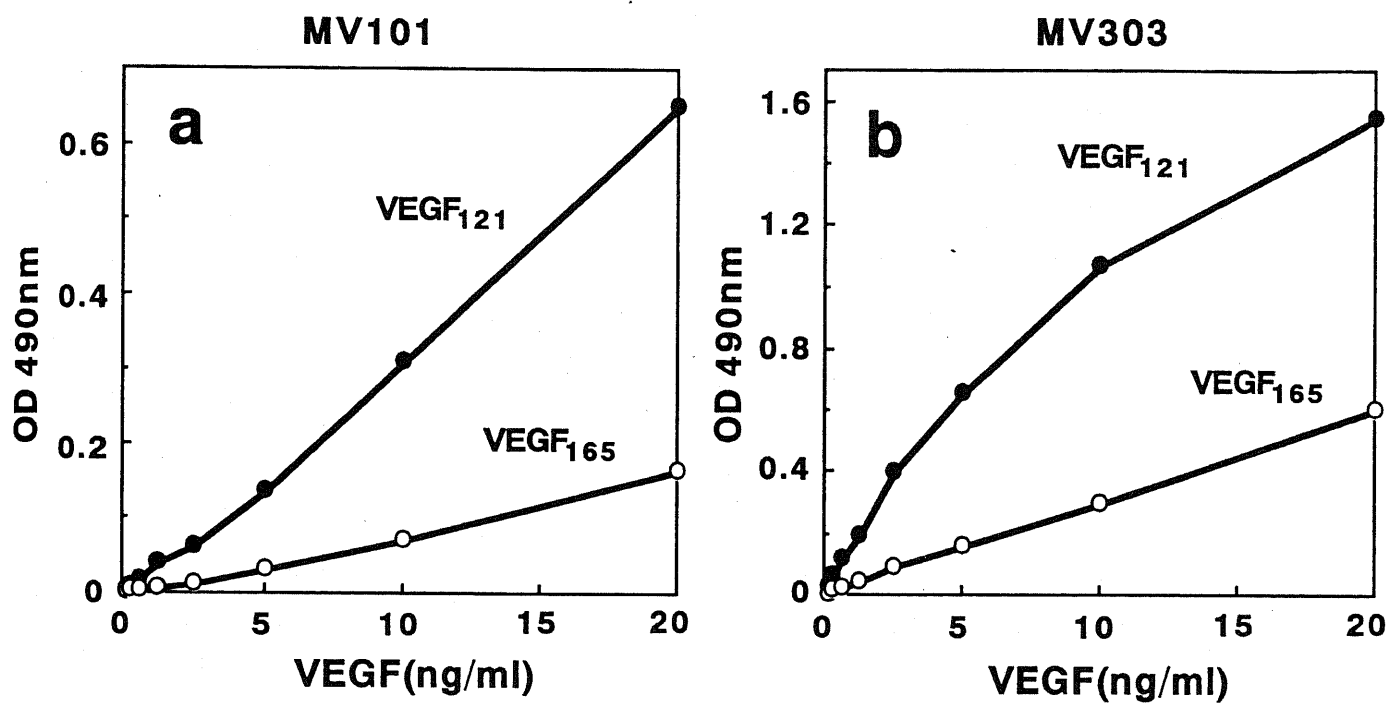


図19 MV101およびMV303のヒトVEGFに対する反応性

イムノプレートは、MV101 (a) またはMV303 (b) でコートした。様々な濃度のヒトVEGF₁₂₁ (●) またはヒトVEGF₁₆₅ (○) をサンドイッチELISAの系にて検出した。二次抗体は、抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体のFab'-POD標識蛋白質を使用した。

N-2-④ 抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体のエピトープの検討

MV101およびMV303は、いずれも中和活性を有しているがその認識部位（エピトープ）は近傍なのか？。この点を調べる目的で拮抗試験を行った。各モノクローナル抗体のビオチン標識体のヒトVEGF₁₂₁に対する結合を、それぞれの非標識体で拮抗阻害して、その強さを比較した。その結果、各ビオチン標識体の結合は両非標識体にて強く阻害された（図20）。しかし、ビオチン化MV101のヒトVEGF₁₂₁に対する結合に対する阻害活性はMV101の方がMV303より強く、ビオチン化MV303の結合の対する阻害活性は、MV303の方がMV101より強かった。このことは、ヒトVEGF₁₂₁の中で両モノクローナル抗体の認識する部位が、かなり近傍に存在しているが一致していないことを示唆している。一方、中和活性のないMV415による両ビオチン化抗体の結合に対する阻害活性は明らかに弱かった。

N-2-⑤ ウェスタンブロッティング解析

MV101およびMV303によるVEGFの検出をウェスタンブロッティングにて行った。ヒトVEGF₁₂₁およびヒトVEGF₁₆₅を還元条件あるいは非還元状態でSDS-PAGEを行った後、イムビロンP膜（ミリポア社）に転写した。この膜上のヒトVEGF分子に対するモノクローナル抗体の反応性を調べたところMV101およびMV303何れも還元体ヒトVEGFとの反応性が極めて弱いことが明らかとなった（図21）。一方、抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体は、還元体ヒトVEGFのみならず非還元ヒトVEGFとも反応した（データ省略）。したがって、MV101およびMV303の反応する部位は、S-S結合により立体構造を保持された部位であることが示唆された。ヒトVEGF分子は、還元されると活性を失うことから、S-S結合が活性に重要であり、中和活性を有するMV101およびMV303がその構造を認識しているものと考えられた。

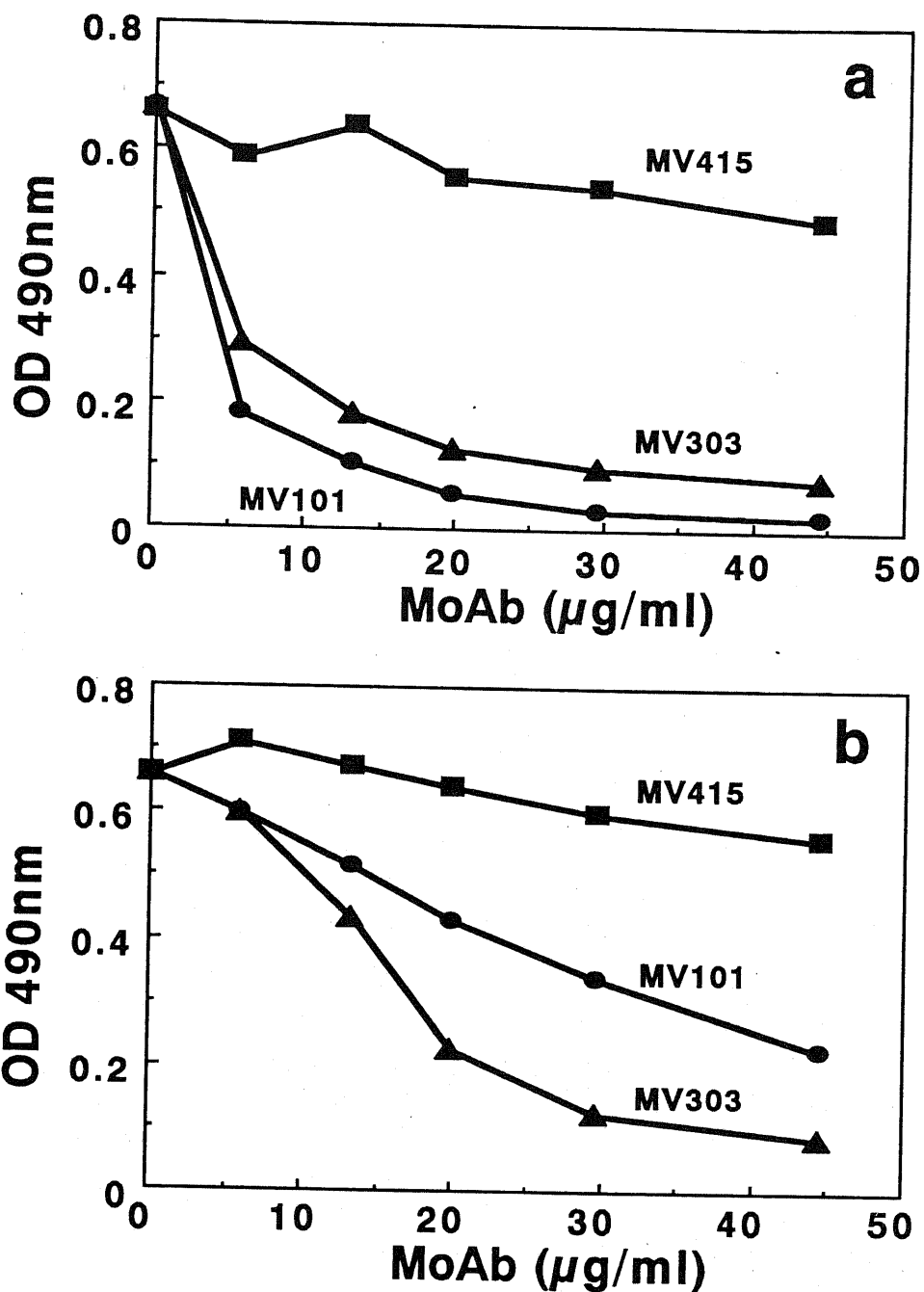


図20 MV101およびMV303のヒトVEGF₁₂₁に対する結合の拮抗試験

10 μg/mlのビオチン化MV101 (a) またはビオチン化MV303 (b) は、各種濃度のMV101 (●), MV303 (▲) あるいはMV415 (■) と混合してヒトVEGF₁₂₁を固相にコートしたイムノプレートに添加した。ビオチン化モノクローナル抗体は、POD結合アビジンで検出した。

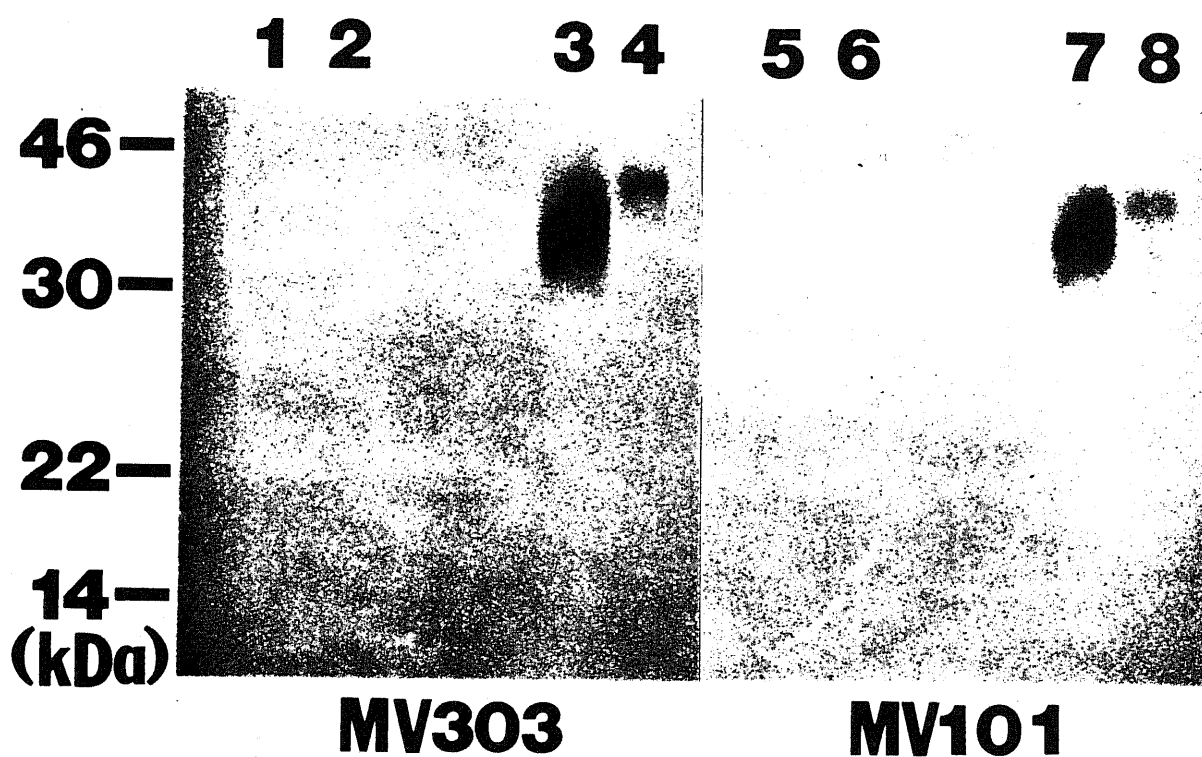


図21 MV101およびMV303のウエスタンブロッティングにおける結合特異性

20 ngのヒトVEGF₁₂₁(レーン1, 3, 5, 7)あるいはヒトVEGF₁₆₅(レーン2, 4, 6, 8)は、還元条件(2-メルカプトエタノール存在下;レーン1, 2, 5, 6)あるいは非還元条件(2-メルカプトエタノール非存在下;レーン3, 4, 7, 8)でSDS-PAGEを行いイムビロンP膜(ミリポア社)に転写した後、MV303(レーン1~4)またはMV101(レーン5~8)と反応させた。

IV - 3 考 察

大腸菌で産生させたヒトVEGF₁₂₁-GST融合蛋白質で免疫したマウスより抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体を作製した。その中で2クローン(MV101およびMV303)が、ヒトVEGF₁₂₁依存性のHUV ECの増殖を中和することが明らかとなった(図16)。他のクローンはヒトVEGF₁₂₁に対する結合能は持っているものの中和活性は無かった(データ省略)。MV303に関して、ヒトVEGF₁₈₅およびbFGF依存性のHUV ECに対する中和活性を調べたところ、前者に対しては、中和活性を示したが、後者については、中和活性を示さなかった(図17)。このことは、MV101およびMV303は、VEGFに対して特異的に作用するとともに、その認識する領域(エピトープ)は、VEGFが活性を発現するのに重要な領域であると考えられる。VEGFは、血管内皮細胞の表面に発現している高親和性レセプター蛋白質であるFlt-1およびKDRに結合して、そのチロシンキナーゼを活性化されている(39, 42)。¹²⁵I標識ヒトVEGF₁₂₁を用いたHUV ECに対するラジオレセプターアッセイによりMV101およびMV303は、¹²⁵I標識ヒトVEGF₁₂₁のHUV ECに対する結合を用量依存的に阻害することが明らかとなった(図18)。両モノクローナル抗体と反応したVEGFは、レセプターに結合することができなくなっていると考えられた。リガンド-レセプター複合体のクロスリンクの実験結果からも、MV303は、¹²⁵I標識ヒトVEGF₁₂₁とレセプターとの複合体の形成を阻害することが明らかとなっている(51)。

ヒトVEGF₁₈₅は、ヒトVEGF₁₂₁のC末領域に44アミノ酸残基の塩基性アミノ酸の挿入がある(43)。血管内皮細胞に対する増殖促進活性は、両VEGFアイソフォームで、ほぼ同等であるとの報告がある(94)。MV101およびMV303が、両VEGFアイソフォームと結合しうること(図19)および両VEGFアイソフォームによるHUV ECの増殖促進活性を中和しうること(図16および図17)は、両モノクローナル抗体のエピトープは、VEGFが活性を発現するのに重要な領域であると考えられる。

MV101およびMV303のヒトVEGF₁₂₁に対する結合は、それぞれ交叉拮抗した(図20)。しかし、中和活性のないモノクローナル抗体であるMV415は、各中和モノクローナル抗体と拮抗しなかった。このことより、MV101およびMV303のエピトープに関して幾つかの可能性が考えられる。第一は、MV101とMV303のエピトープは、全く同一であること。第二は、両モノクローナル抗体のエピトープが、かなり近傍であること。

第三は、両モノクローナル抗体のエピトープが全く異なっているにもかかわらず、片方が結合することでヒトVEGF₁₂₁にアロステリックな構造変化が生じて、他方の結合を阻害した。第一の可能性については、ビオチン化した各モノクローナル抗体の結合に対して、同一クローンの方がより強く拮抗したことから正しくないと思われた。また、第三の可能性については、本実験からのみではモノクローナル抗体と結合した後のVEGF₁₂₁の構造変化の有無の情報が得られないため正しいかは不明である。第二の可能性が最も有力であると考えられる。

ウエスタンブロッティングの結果、S-S結合を還元されたVEGF分子にMV101およびMV303は、ほとんど結合できなかった(図21)。このことからMV101およびMV303のエピトープは、分子内あるいは分子間のS-S結合によって形成される構造が重要であることがわかった。

Kim等が、4種類の抗VEGFモノクローナル抗体に関する報告をしている(95)。それらのモノクローナル抗体は、ヒトVEGF₁₆₅とキーホール・リンペット・ヘモシアニンの複合体を抗原として免疫したマウスより作製された。いずれもIgG1であり、その中で1クローン(A4.6.1)に中和活性があった。中和モノクローナル抗体のA4.6.1は、ヒトVEGF₁₂₁、ヒトVEGF₁₆₅およびヒトVEGF₁₈₉と結合でき、ヒトVEGF₁₆₅に対しては、還元条件でも非還元状態でも結合できることを報告している。このことは、A4.6.1のエピトープは、S-S結合の酸化開裂によって変化を受けないことを示している。つまり、A4.6.1のエピトープは、MV101やMV303のエピトープとは異なっている領域であると考えられる。いずれのクローンも中和活性があることから、VEGFが活性を発現するのに重要な領域は、A4.6.1のエピトープとなっているS-S結合の還元により構造変化を受けにくい部分と、MV101やMV303のエピトープとなっているS-S結合の還元により構造変化を受けやすい部分があると考えられた。両モノクローナル抗体のエピトープの限定については、更なる研究を要す。

第V章 抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体による固形癌の増殖抑制および転移阻害

多くの固形癌がVEGFを分泌し、それがTAFとして働いていることが示唆されたこと（第II章、第III章）と抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体を投与することで固形癌の増殖を強く阻害できることが明らかとなったこと（第III章）から、抗VEGF中和抗体が広範囲の固形癌に有効な抗癌剤となるのではないかと考えられた。抗体を医薬品として開発するには、モノクローナル抗体を作製する必要がある。抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体を作製した結果、その中に中和活性を持ったクローンが見いだされた（第IV章）。そこで、抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体の抗癌活性について検討した。また、癌の転移に対する効果についても検討した。

V - 1 実験方法

1) *In vitro* ヒト癌細胞増殖活性測定

ヒト癌細胞（HT-1080およびPLC/PRF/5）は、10%FBS含有D-MEMにて培養して、96穴プラスチックプレートに 2×10^3 細胞/wellずつまいた。24時間前培養を行った後、各種濃度に希釈したMV101またはMV303を添加して更に3日間培養した。培養終了1日前に $10 \mu\text{l}$ の ^3H -チミジン（ $1.85\text{Mbq}/\text{ml}$, $925\text{GBq}/\text{mmol}$, アマシャム社）を添加して増殖中の細胞を標識した。細胞は、トリプシン-EDTAを用いて剥がした後、セルハーベスター（ケンブリッジテクノロジー社）にてガラス繊維フィルター上に回収した。細胞に取り込まれた ^3H -チミジンの放射活性は、液体シンチレーションカウンター（ベックマン社）にて計測した。

2) *In vivo* 血管新生アッセイ

*In vivo*の血管新生試験は、第I章の「実験方法」に記した方法に準じて行った。 1×10^7 個のHT-1080細胞は、PBSにて希釈してメンブランチャンバーに封入しマウス（BALB/c）の背部皮下に埋め込ん

だ (Day 0)。MV303は、Day 1からDay 3の間、毎日100 μ gを尾静脈より投与した。Day 4にメンブランチャンバーに接した部分の皮膚を切り取り、そこに形成された新生血管を実体顕微鏡にて観察した。コントロールとしては、MV303の代わりにPBSを投与したマウスとPBSのみを封入したメンブランチャンバーを埋め込んだマウスを設定した。

2) 固形癌増殖抑制試験

ヒト固形癌 (HT-1080およびPLC/PRF/5) はヌードマウス (BALB/c nu/nu) の皮下にて移植・継代されたものを使用した。実験の際、固形癌は、2 mm角に切り出しトロアールを用いて別のヌードマウス腹側部皮下に移植した。MV101あるいはMV303はPBSにて希釈してヌードマウスあたり100 μ g投与した。投与ルート・投与スケジュールは図中に示した。固形癌の体積はノギスにて長径および短径を測定し、以下の式にて算出した。コントロール群にはマウスIgまたはPBSを投与した。

$$[\text{固形癌の体積 (mm}^3\text{)}] = \frac{[\text{短径 (mm)}]^2 \times [\text{長径 (mm)}]}{2}$$

3) 実験転移試験

10%FBS含有D-MEMにて培養された対数増殖期のHT-1080細胞は、0.5 mM EDTA含有PBSにて剥がし、同培地にて洗浄した。細胞は、PBSにて 1×10^7 個/mlに調製して0.1 ml (1×10^6 個)をヌードマウス (BALB/c nu/nu) の尾静脈より移植した (Day 0)。マウスあたり100 μ gのMV303をDay 1よりDay 28まで週5日静脈内に投与して延命効果を調べた。肺転移巣を観察するためには、移植14日後にマウスを屠殺して肺を取り出し、形成された転移巣の数を解剖顕微鏡下にてカウントした。また、別の実験では、Day 25に肺を取り出して、その重量を測定して転移巣の増殖の程度を調べた。コントロール群のヌードマウスにはPBSを投与した。

V - 2 結果

V-2-① 癌細胞依存性血管新生に対する抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体(MV303)の影響

癌細胞依存性の血管新生を調べる方法として、第I章で記したメンブランチャンバー法がある。この系にて抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体の血管新生阻害活性を検討した。メンブランチャンバーを移植して4日後、HT-1080細胞を封入したメンブランチャンバーに接した部位(皮膚の裏側)には、血管新生が誘導されていた(図22)。これは癌細胞の代わりにPBSのみを封入したメンブランチャンバーのコントロールと比較すると顕著であることがわかる。この血管新生を誘導する因子がVEGFかを調べるために、抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体であるMV303の投与の影響を調べた。MV303はメンブランチャンバー移植翌日より100 μ gを3日間、毎日静脈内へ投与した。その結果、HT-1080にて誘導される血管新生は、MV303の投与によって完全に抑制された。このことから、HT-1080より分泌された血管新生因子がVEGFであることがわかる。また、これがMV303の投与によって完全に抑制されたことから、HT-1080がVEGF以外のTAFを分泌している可能性は少ないものと考えられた。一方、MV303がHT-1080細胞の増殖に直接影響しないことは、*in vitro*の細胞増殖試験にて確認した(図24)。

V-2-② 抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体投与によるヒト固形癌増殖抑制

抗ヒトVEGF₁₂₁ポリクローナル抗体の抗癌活性は、第III章にて記した。同様の実験を抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体について検討した。PLC/PRF/5(ヒト肝臓癌)およびHT-1080(ヒト線維肉腫)を移植したヌードマウスに対して中和活性のあるMV101, MV303および中和活性のないMV415を連続して皮下に投与した。その結果、いずれの系においても抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体であるMV101またはMV303を投与した群では、コントロール群と比べて固形癌の増殖が明らかに強く抑制されていた(図24)。図V-2の結果より、MV101およびMV303は、PLC/PRF/5細胞およびHT-1080細胞の増殖に対して直接影響しないことから、ここで観察された固形癌の増殖抑制活性は、癌細胞に対す



図22 癌細胞依存性の血管新生に対するMV303の阻害効果

HT-1080細胞を封入したメンブランチャンバーをマウス(BALB/c)の背部皮下に埋め込んだ(Day 0)。PBS(写真左)あるいは $100\mu\text{g}$ のMV303(写真中央)は、3日間連続して静脈内投与した。コントロールメンブランチャンバーは、HT-1080細胞の代わりにPBSを封入した(写真右)。Day 4にマウスを屠殺してメンブランチャンバーに接した皮膚の部分を実体顕微鏡で観察して写真撮影した。

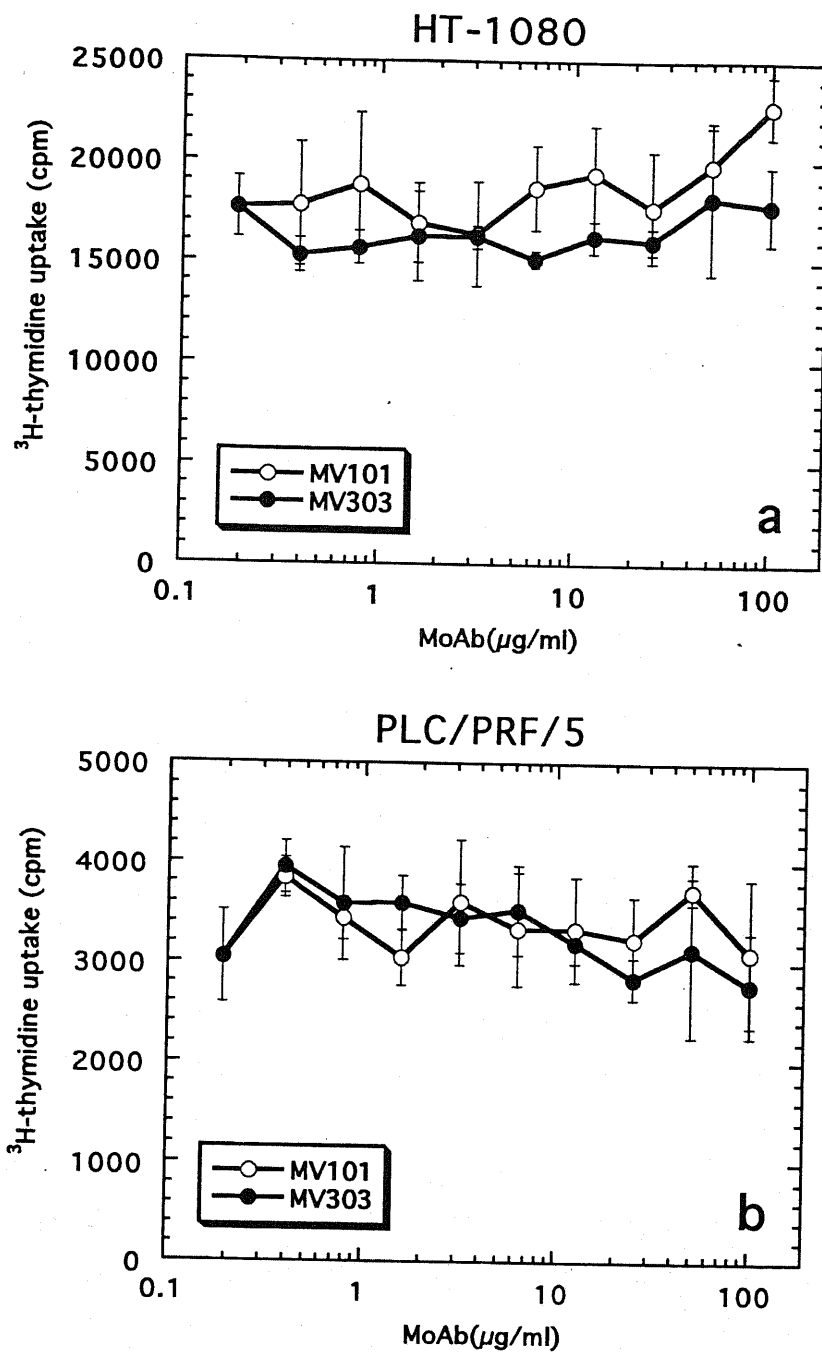


図23 培養ヒト癌細胞の増殖に対するMV101およびMV303の影響

2×10^3 個のHT-1080細胞 (a) あるいはPLC/PRF/5細胞 (b) は、各種濃度のMV101 (○) あるいはMV303 (●) と3日間培養した。細胞の増殖は、 ^3H -チミジンの取り込みによって判定した。

る直接作用ではなく、VEGFの活性を抑制したことによる血管新生阻害による結果と考えられる。このことは、中和活性のない抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体であるMV415を投与した群では、MV101やMV303を投与した群と比べて固形癌の増殖抑制活性が弱かったことからわかる。また、正常マウスIgのコントロールとしてマウスプラズマサイトーマ株、MOPC-31C細胞の分泌するマウスIgG1を調製して同様に実験した結果、HT-1080固形癌の増殖に対して全く影響しなかった(図25)。つまり、以上の実験で観察された抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体による固形癌の増殖阻害活性は、マウスIgの大量投与による非特異的な活性ではなく、VEGFに対する中和活性と相関していた。

抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体が、固形癌の増殖を強く抑制することが明らかとなった。この抗癌活性について、更に、投与ルートおよび投与スケジュールの影響を検討した。抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体としてMV303を、ヒト固形癌としてHT-1080を用いて実験した。その結果、MV303の連続投与は、皮下のみならず静脈内投与にても強い抗癌活性を示すことが明らかとなった(図26)。静脈内投与系での効果は、実際の臨床の場における抗ヒトVEGF中和モノクローナル抗体の有用性を示す結果とも言える。

また、本実験において固形癌の切片は、ヌードマウスの皮下に移植された後、増殖しだす前に移植部位に生着する必要があるばかりでなく、移植直後は、固形癌の大きさも小さい(約10mm³)ことから、移植翌日からの抗体の投与は、効果が出やすい条件であったとも言える。しかし、実際の臨床の場における癌化学療法では、既に生着し増殖しつつある固形癌に対して治療が行われるわけであり、そのような固形癌を想定した実験系での効果も調べる必要があると思われた。そこで、HT-1080の固形癌が、既に生着して増殖している時期からMV303の投与を開始して、その後の増殖に与える影響を調べた。HT-1080は、移植8日目には、既に約400mm³になっており正着のみならず増殖していることがわかる。この時点よりMV303を10回連続して皮下投与したところ、その後の増殖が完全に抑制された(図26)。このように、既に増殖しつつある固形癌に対しても、その増殖を抑制(停止)することができるということも臨床における抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体の有効性を示唆している。

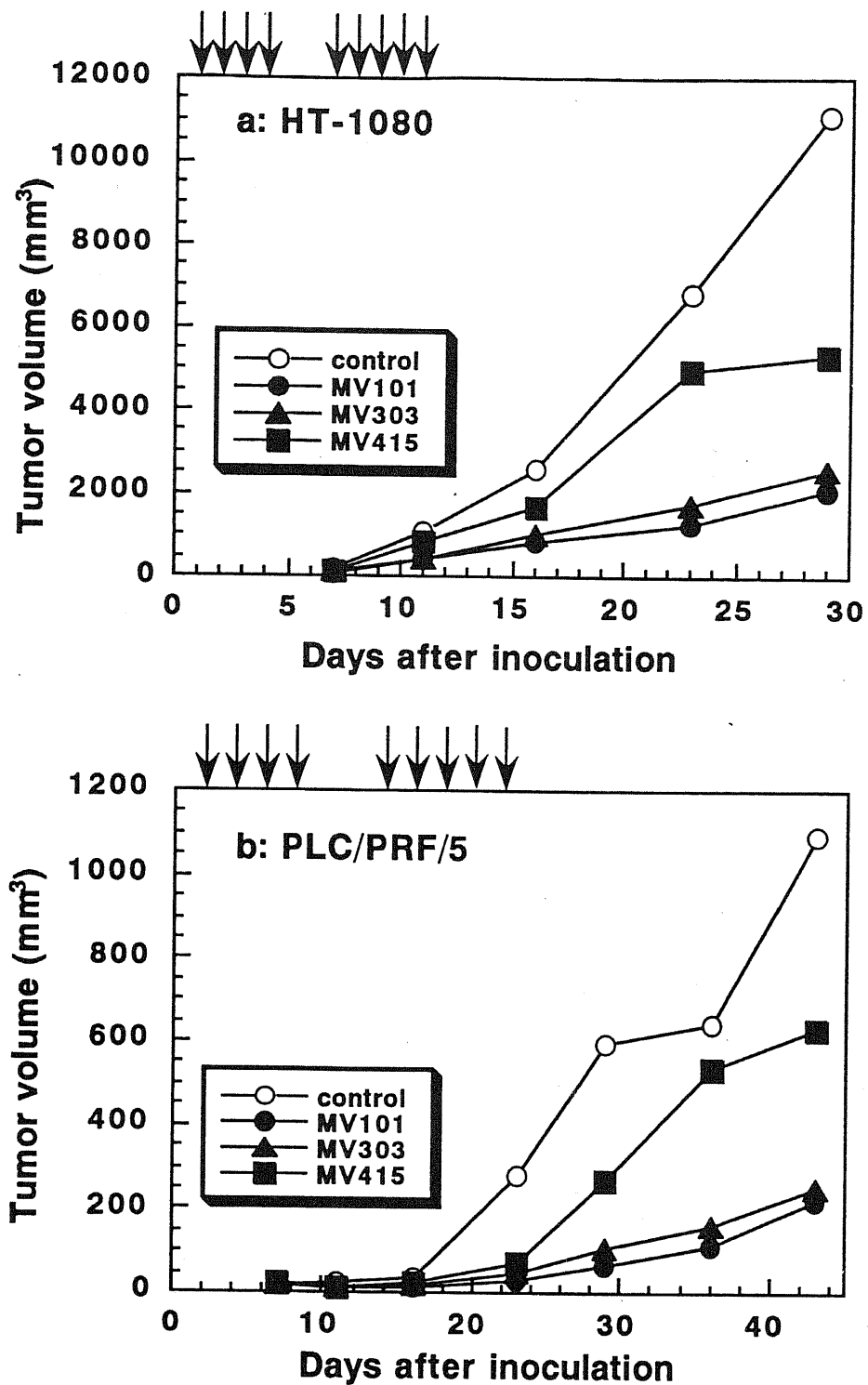


図24 ノードマウスに移植されたヒト固形癌の増殖に対する抗ヒトVEGF₁₂₁モノクローナル抗体の影響

3mm角に切り出したHT-1080 (a) あるいはPLC/PRF/5 (b) の固形癌は、ノードマウス (BALB/c nu/nu) の皮下に移植した (Day 0)。100 μ g のMV101 (●), MV303 (▲) あるいはMV415 (■) は、Day 1~4, 7~11および14に皮下投与した。コントロール群 (○) は、生理食塩水を同じ投与スケジュールで投与した。

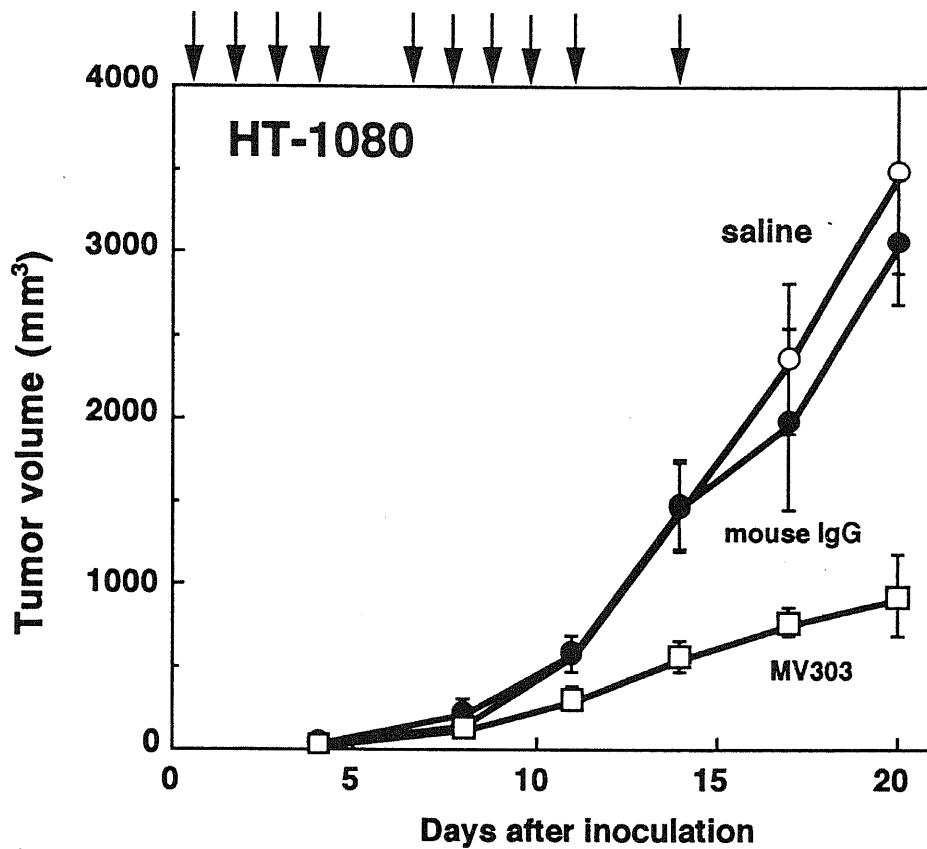


図25 ノードマウスに移植されたHT-1080の増殖に対する正常マウスIgおよびMV303の影響

3mm角に切り出したHT-1080の固形癌は、ヌードマウス (BALB/c nu/nu) の皮下に移植した (Day 0)。100 μ gのMV303 (□) あるいは正常マウスIg (MOPC-31C) (●) は、Day 1~4, 7~11および14に腹腔内投与した。コントロール群 (○) は、生理食塩水を同じ投与スケジュールで投与した。

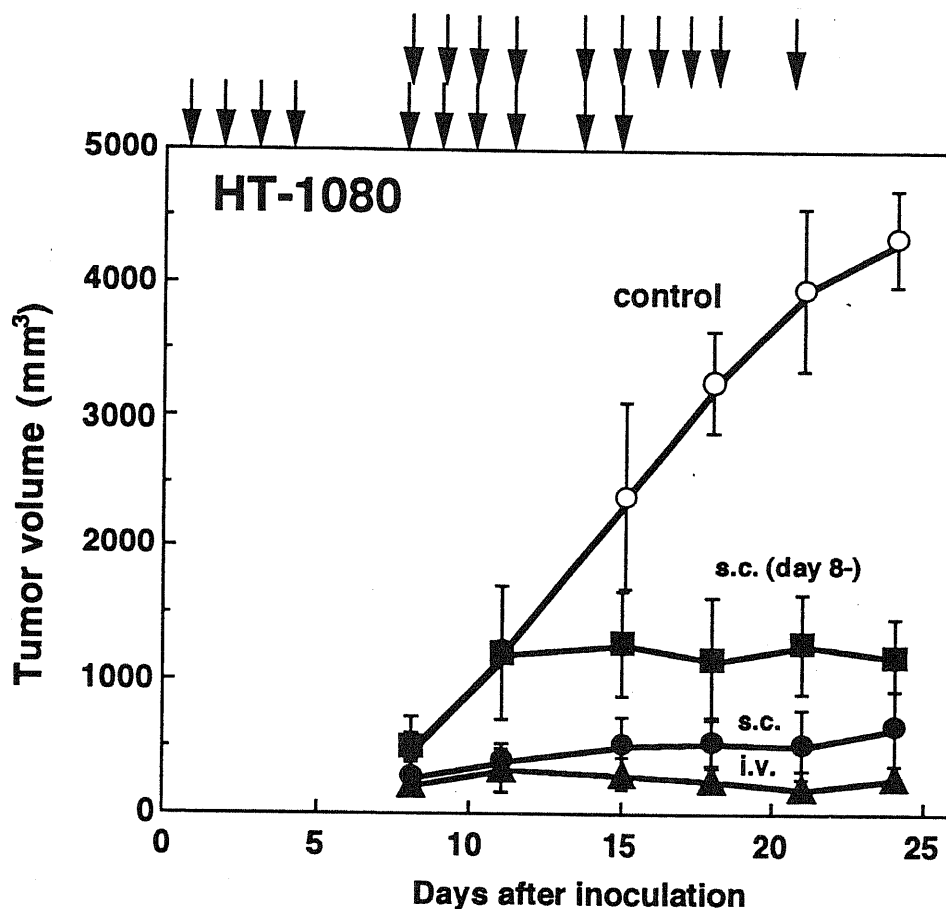


図26 ノードマウスに移植されたHT-1080の増殖に対するMV303の阻害活性

3mm角に切り出したHT-1080の固形癌は、ヌードマウス (BALB/c nu/nu) の皮下に移植した (Day 0)。100 μ g のMV303は、Day 1~4, 8~11, 14 および15に皮下 (●) あるいは静脈内 (▲) 投与した。コントロール群 (○) は、生理食塩水を同じ投与スケジュールで投与した。また、別の群として100 μ g のMV303をDay 8~11, 14~18および21に皮下投与した (■)。

V-2-③ HT-1080細胞を用いた実験転移系に対する抗ヒト
VEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体(MV303)の影響

VEGFがTAFのひとつであり、抗ヒトVEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体にも抗癌活性があることは、今までの実験にて明らかとなった。それならば固形癌の転移巣における増殖にもVEGFが関与しているならば同じ中和抗体により、その増殖も抑制できると考えられる。そこでHT-1080細胞を用いた実験転移系に対するMV303の効果を検討した。

HT-1080細胞は、尾静脈より移植すると、肺に転移巣を形成する。ヌードマウスに 1×10^5 個のHT-1080細胞を尾静脈より移植したところ移植26日目頃から死亡マウスが出てきて32日目までに全例死亡した(図27)。一方、その直前まで $100 \mu\text{g}$ のMV303を17回連続して静脈内に投与(Day1~2, 5~9, 12~16, 19~23)すると最長で70日間生存していた。平均生存日数は、MV303投与群で 46.9 ± 12.9 日であり、コントロール群(28.2 ± 2.1 日)と比べて有意($p < 0.001$: Cox-Mantel検定)な延命効果が得られた。MV303投与群でも投与をやめると死亡マウスが出てきたことは、代謝によりMV303の活性が無くなってから転移巣が増殖し始めてくるためと考えられた。その仮説が正しいならば、血中濃度の維持を考えてMV303の投与を続ければ、更に延命すると思われる。

HT-1080細胞を移植して25日後に肺を取り出して観察したところコントロール群ではHT-1080の転移巣の増殖により個体によっては胸腔大にまで大きくなっていたがMV303投与群の肺は、正常マウスの肺と同じ程度の大きさであった(図28)。肺重量を測定したところコントロール群とMV303投与群では有意($p < 0.01$: t検定)な差が確認されたがMV303投与群と正常マウスの間では有意差はなかった(図29)。

転移抑制実験では、転移巣の大きさのみならず、その数も重要視される。そこでDay14に肺を取り出して転移巣の数を計数した。その結果、MV303投与群の肺転移巣の数は、コントロール群に比べて有意($p < 0.05$: t検定)に少ないことがわかった(表7)。

またMV303の連続投与による副作用を調べる目的でマウスの体重の変化を測定したところDay14でのMV303投与群のマウスの平均体重とコントロール群のマウスの体重に有意差はなく、MV303投与による宿主への毒性は殆どないと考えられた(表7)。

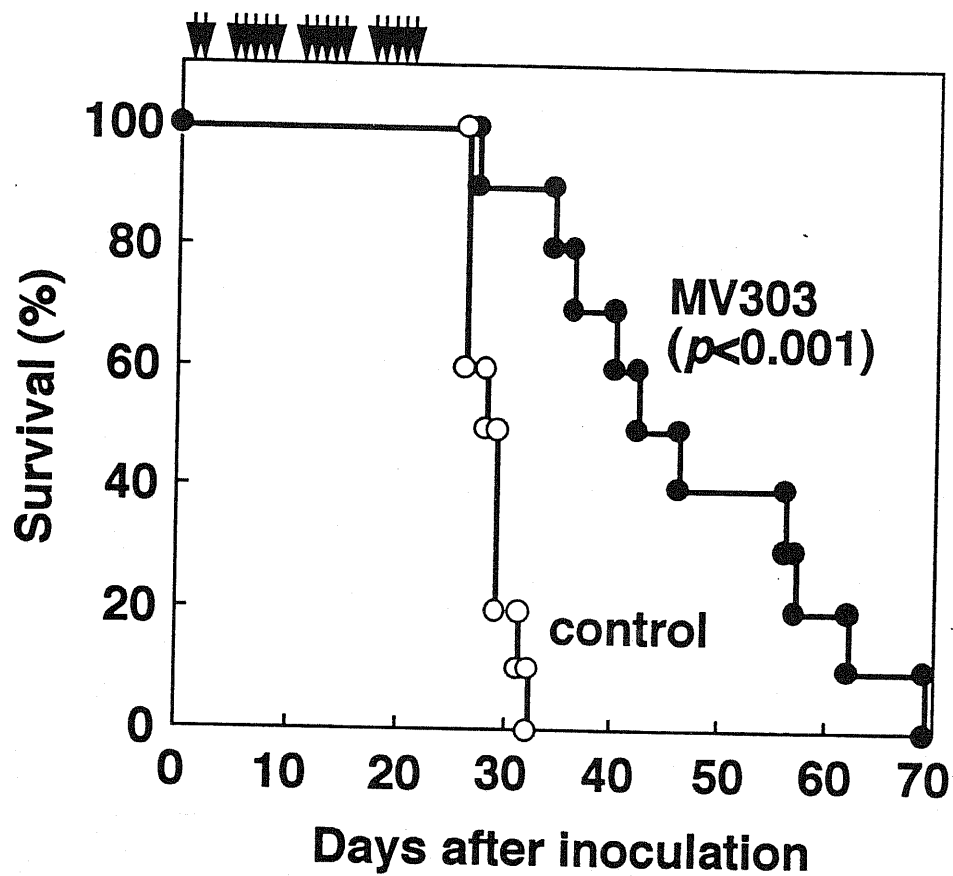


図27 HT-1080静脈内移植ヌードマウスに対するMV303の延命効果

HT-1080細胞 (1×10^6 個) は、ヌードマウス (BALB/c nu/nu) の静脈内へ移植した (Day 0)。生理食塩水 (○) あるいは $100 \mu\text{g}$ のMV303 (●) は、Day 1~2, 5~9, 12~16, 19~23に静脈内投与した。統計解析は、Cox-Mantel検定にて行った。

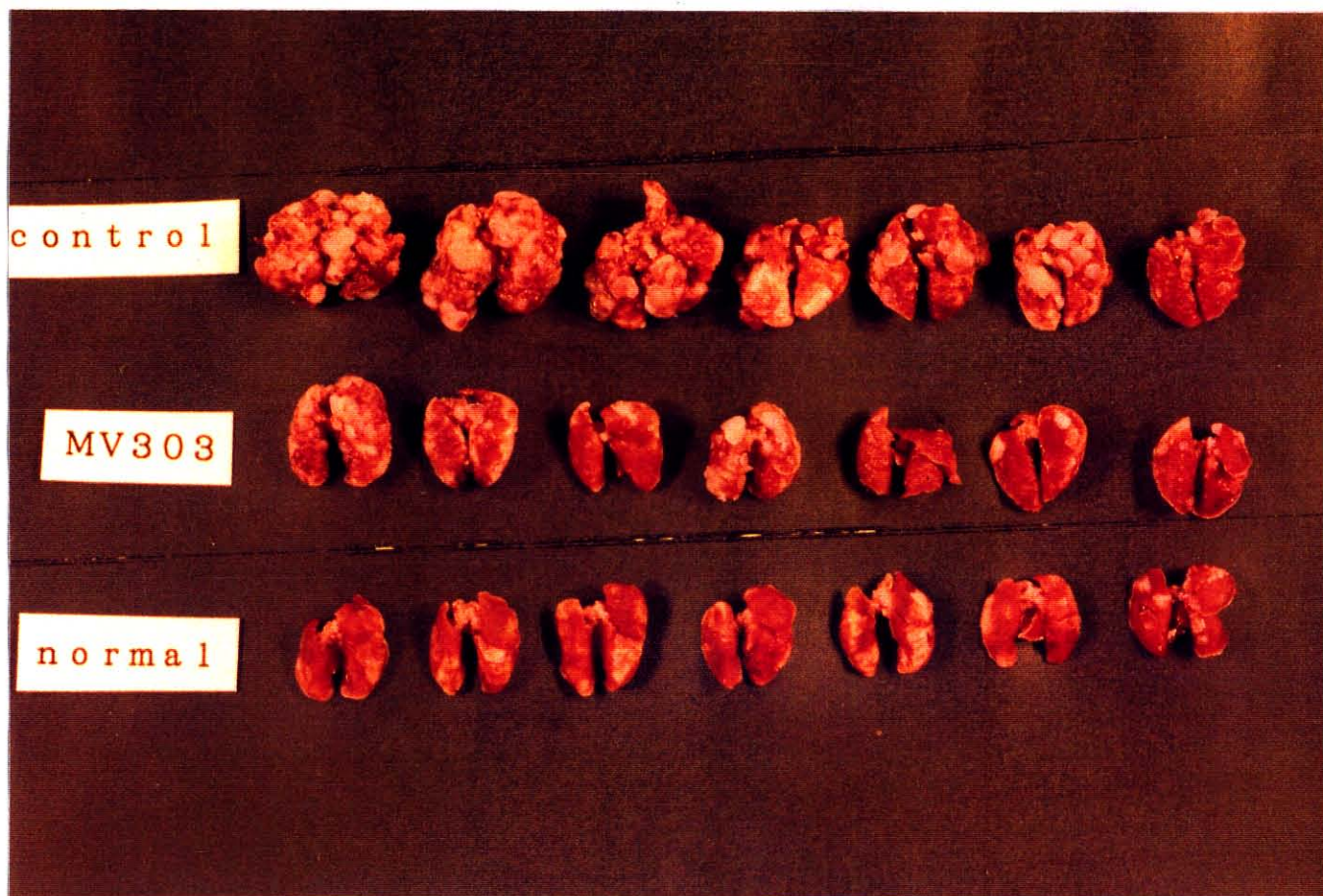


図28 HT-1080静脈内移植ヌードマウスに対するMV303の肺転移巣の増殖抑制効果①

HT-1080細胞 (1×10^6 個) は、ヌードマウス (BALB/c nu/nu) の静脈内へ移植した (Day 0)。生理食塩水 (上段) あるいは $100 \mu\text{g}$ のMV303 (中段) は、Day 1~2, 5~9, 12~16, 19~23に静脈内投与した。Day 25にマウスを屠殺して肺を観察した。下段は、HT-1080細胞を移植していない正常ヌードマウスの肺をコントロールとして配置した。

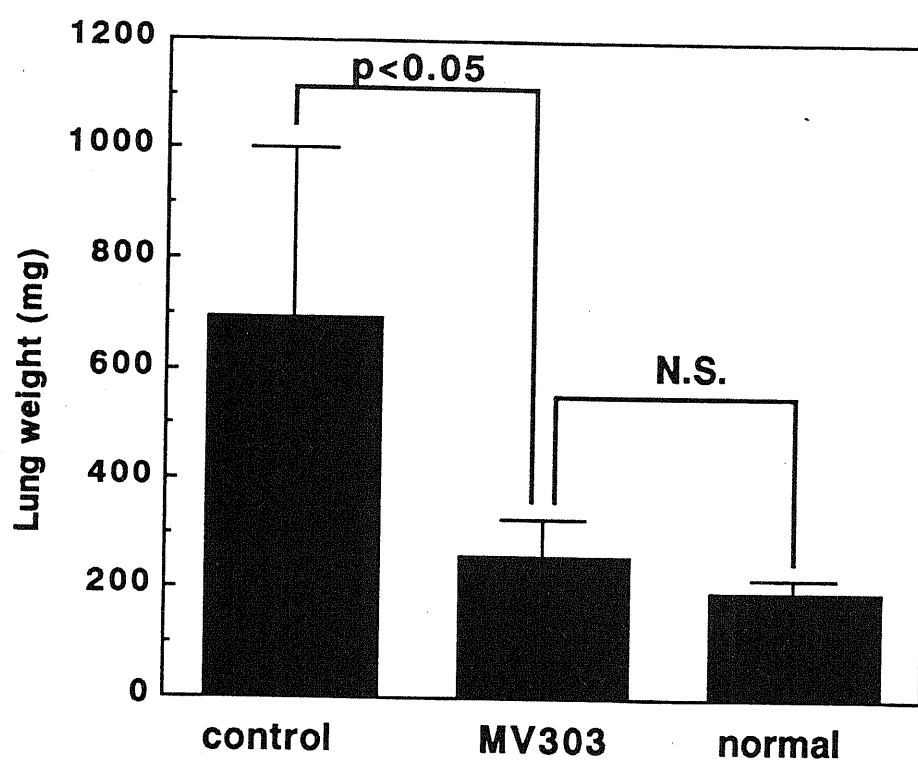


図29 HT-1080 静脈内移植マウスに対するMV303の肺転移巣の増殖抑制効果②

図28と同じ実験系にて取り出した肺の重量を測定した。
統計処理は、t-検定にて行った。

表7 HT-1080実験転移系におけるMV303の影響

	コントロール群	MV303投与群
肺転移巣の数 (個/肺)	152.6 ± 60.0	98.9 ± 33.5 ^(a)
マウスの体重 (g)	25.18 ± 1.30	25.17 ± 1.36 ^(b)

HT-1080細胞 (1×10^6 個) は、ヌードマウス (BALB/c nu/nu) の静脈内へ移植した (Day 0)。生理食塩水あるいは $100 \mu\text{g}$ のMV303は、Day 1~2, 5~9, 12~16, 19~23に静脈内投与した。Day 14にマウスを屠殺して肺の転移巣の数を計測するとともにマウスの体重を測定した。

(a) : $p < 0.05$, t検定

(b) : 有意差なし, t検定

V - 3 考 察

ヒト VEGF₁₂₁-GST 融合蛋白質で免疫したマウスより作製した抗ヒト VEGF₁₂₁モノクローナル抗体の中で2クローン (MV101およびMV303) が VEGF の活性を中和した。抗ヒト VEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体の抗癌活性を調べる前に、作用メカニズムに関する検討を行った。ヒト線維肉腫細胞株, HT-1080 依存的な血管新生は、抗ヒト VEGF₁₂₁中和モノクローナル抗体である MV303 の投与にて完全に抑制された (図22)。また、*in vitro* の実験にて HT-1080 細胞の培養上清は、HUVEC の増殖を促進し、それは、MV303 にて完全に阻害された (データ省略)。このことは、HT-1080 細胞の分泌する血管新生因子が VEGF のみか、他の因子が含まれていても微量であることを意味している。一方、MV101およびMV303に、癌細胞の増殖に対して直接的な抑制活性はなく、これらモノクローナル抗体のターゲットが血管内皮細胞にあることが示された (図23)。

MV101およびMV303は、ヌードマウスに移植されたヒト固形癌の増殖を強く抑制した (図24)。本実験では、ポリクローナル抗体の実験の時に用いたヒト肝臓癌 (PLC/PRF/5) のみならずヒト線維肉腫 (HT-1080) に対しても検討したところ、両モノクローナル抗体の抗癌活性は、いずれの固形癌に対しても強いものであった。著者等の調べた限りでは、全ての癌細胞が VEGF を分泌していたこと (表2) から、MV101およびMV303は、これらの固形癌に対しても抗癌活性を示すと考えられる。一方、中和活性のない抗ヒト VEGF₁₂₁モノクローナル抗体である MV415 にも弱いながら抗癌活性が観察された (図24)。マウス Ig の投与では、固形癌の増殖に影響しないこと (図25) から、MV415 の抗癌活性は、ヒト VEGF に対する抗体であることに起因していると思われた。実験データは無いが、考えられるメカニズムとして、宿主の免疫能を介した抗体依存性細胞障害活性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC) や補体依存性細胞障害活性 (complement-dependent cytotoxicity; CDC) の関与がある。

MV303 を投与することによる固形癌の増殖抑制は、皮下投与や腹腔内投与のみならず静脈内投与でも観察された (図26)。静脈内投与での有効性は、臨床における有用性を示す結果といえる。更に、実際の癌化学療法を想定した実験系での効果も調べた。HT-1080 を移植した後、癌の体積が約 400 mm³ に増殖した状態から MV303 の投与を開始した。その結果、MV303 は、その後の固形癌の増殖が完全に抑制された (図26)。このように、既に増殖しつつある固形癌に対しても、その増殖を抑制 (停止) することがで

きるということも臨床における抗VEGF中和抗体の有用性を示している。

抗VEGF中和モノクローナル抗体に抗癌活性があることは、Kim等も報告している(96)。彼らの作製した抗ヒトVEGF中和モノクローナル抗体(A4.6.1)は、ヒトVEGF₁₆₅を免疫源としておりMV101と同じIgG₁サブクラスである(95)。Kim等は、A673(横紋筋肉腫)、SK-LMS-1(平滑筋肉腫)およびG55(多形性神経膠芽腫)の3種のヒト固形癌の増殖に対するA4.6.1の抗癌活性を報告している(96)。実験系および投与条件に若干の違いはあるが、全く異なるグループが、異なった材料を用いて同様の結果を導き出したことは、抗VEGF中和モノクローナル抗体の抗癌活性が一般化された事象と言える。しかし、何れの場合も固形癌の体積の減少および除去までの活性は観察されていない。彼らは、bFGF等のVEGF以外のTAFの関与を考察していた(96)。

癌による死亡の多くは、「転移」により治療できなくなることにより、「転移」しなければ癌も恐れる病ではないといわれているばかりでなく「転移を制するものが癌を制す」とまで言われている。癌の転移は複雑なステップを経て成立すると考えられている。すなわち転移は、①原発巣内の一部の癌細胞の悪性化、②運動能の獲得と原発巣からの離脱、③蛋白質分解酵素を分泌しつつ細胞外マトリックス内を浸潤、④血管内への侵入、⑤血流に乗って標的臓器まで輸送、⑥標的臓器の毛細血管内皮細胞への接着、⑦再度、蛋白質分解酵素を分泌しつつ血管外へと侵出、⑧再増殖の開始、というステップを経て成立する。この複雑なステップの中で④血管内への侵入、および⑧の標的臓器での再増殖の過程において血管新生が必要となってくる。固形癌における新生血管は、既存血管に比べ基底膜が未成熟なため癌細胞の血管内移行が容易であり、血管密度の高い固形癌では、転移の頻度も高い。血管新生阻害剤は、このようなことから固形癌の転移にも有効と考えられる。

HT-1080を使用した実験転移系にてMV303の効果を検討したところ、肺転移巣の増殖を抑制したばかりでなく転移巣の数も減少させた(図29および表7)。また、転移に伴うヌードマウスの生存率も延長させることができた(図27)。この実験系は、先に記した転移の全てのプロセスを再現しているものでなく、癌細胞が血流中に入った以降のステップ(⑤以降)のみを再現している。転移のプロセスの中で原発巣からの遊離および血管内への浸潤のステップも含めて再現するには、固形癌の同所移植系などにて検討する必要がある。MV303は、HT-1080細胞の増殖に対して直接影響しないこと(図23)および皮下に移植された固形癌を除去する活性がないことから、転移巣の数を減少させたメカニズムは、MV303の血管新生阻害作用に

よるものとは考えがたい。この現象もMV303によって形成された免疫複合体を介した宿主免疫活性によるものと考えている。

抗VEGF中和モノクローナル抗体による転移の阻害に関しては、Warren等の報告もある(97)。彼らは、先のKim等の作製した抗ヒトVEGF₁₆₅中和モノクローナル抗体(A4.6.1)を用いてHM7(結腸癌)の実験転移系で検討していた。彼らは、HM7細胞をヌードマウスの脾臓に移植し、肝臓への転移を観察していた。この系は、著者等が、HT-1080細胞で行った実験転移系とは異なるが、基本的には、癌細胞を直接脈管系へ移植している点で大差はないと考える。彼らの実験結果も、著者等と同様の結果であり、HM7細胞の肝転移巣の増殖を中和抗体の投与で、ほぼ完全に抑制したばかりでなく、転移巣の数も約1割に減少させたというものであった。生存期間の延長に関するデータはなかった。一般に、転移巣数の減少のみでは、明確な延命活性が観察されない場合が多いことから、MV303の投与にて延命効果がみられた点は、注目すべき結果と考える。固形癌の転移についても、抗ヒトVEGF中和モノクローナル抗体が効果的であったことが、独立した2グループにて確認された点も、この抗体の有用性が一般化されたものと考えられる。特に、転移巣の増殖を強く抑制できるということは、固形癌の外科手術後の再発予防に対しても有効であると思われた。

総合考察と展望

1970年代にFolkmanにより、固形癌の増殖において「血管新生」は必須であり、「血管新生を抑制すると固形癌の増殖を抑制できるのではないか」という仮説が提唱された(5,6)。その結果、様々なアプローチで血管新生抑制の研究がなされ、多くの血管新生阻害剤が見いだされてきた(1-3)。著者等は、TAF (tumor angiogenic factor)に着目して、その中和抗体による血管新生阻害、ひいては抗癌効果を考えた。今まで、幾つかの血管新生因子が報告されていたが、TAFといえる因子はなかったが、著者等は、VEGFが、その作用が血管内皮細胞に対して特異的である点と、分泌蛋白質である点から、TAFではないかと考えて研究を開始した。

その研究の結果、以下の点を明らかにした。

- ①調べた限り全ての癌細胞株がVEGFを分泌していること。-----第Ⅱ章
- ②癌患者血清中にVEGFが存在すること。-----第Ⅱ章
- ③VEGF過剰産生株では、固形癌の増殖速度が速くなること。-----第Ⅲ章
- ④抗VEGF中和抗体の投与で固形癌の増殖を抑制できること。-----第Ⅲ,Ⅴ章
- ⑤抗VEGF中和抗体の投与で固形癌の転移を抑制できること。-----第Ⅴ章

これらの結果は、VEGFがTAFであることを証明する大きな要因となった。また、一連の研究の中で、第Ⅱ章で示した結果は、血清中のVEGFの検出が「癌診断」になり、第Ⅲ章および第Ⅴ章で示した結果は、抗VEGF中和抗体が「抗癌剤」となる可能性を示唆するものであった。著者等のグループ（東亜合成株式会社，つくば研究所，MCVプロジェクト）では、両方の可能性について更なる研究を深めており、前者については、VEGF検出系を更に改良し検出感度を上げることで健常人血清中のVEGF濃度も検出できるようになった(96)。このことで、健常者と癌患者との血中VEGF濃度の違いが更に明らかになると思われる。

「VEGFは、TAFである」という結論は、著者等の研究結果以外にも数多くのVEGFに関する研究報告から、ほぼ間違いのない事実であると考ええる。また、「抗VEGF中和抗体には、抗癌活性および抗転移活性がある」という結果についても、全く別のグループの研究(96,97)によって同様の結果が得られていることから一般化された事実といえる。Kim等は、抗VEGF中和抗体のみでは、固形癌の増殖を完全には抑制できなかった理由として他のTAFの関与を考察していた(96)。しかし、実験に用いた固形癌の種類は違うものの、著者等の実験結果は、HT-1080による固形癌の増殖をMV303

を投与することで、ほぼ完全に抑制でき、VEGF以外のTAFの関与は薄いと考えた(図V-5)。他の血管新生因子のTAFとしての可能性を調べるべく、中和抗体による固形癌の増殖阻害活性を検討した結果については、bFGFとアンギオゲニンに関して、以下のような報告がある。

bFGFは、血管内皮細胞に対する増殖促進活性がVEGFより強く、VEGFの研究が始まる以前には、TAFの有力候補のひとつであった。2つのグループより抗bFGF中和ポリクローナル抗体の投与により固形癌の増殖を抑制できたという報告(99, 100)がある一方で、別のグループからは、抗bFGF中和ポリクローナル抗体を投与しても固形癌の増殖を抑制しなかったとの報告もある(101)。抗bFGF中和モノクローナル抗体の抗癌活性に関しては、3H3というクローンの報告がある。堀等は、シグナルペプチドを付加して分泌型にしたbFGFによって形質転換されたマウス線維芽細胞株(BALB/c 3T3)による固形腫瘍の増殖に対して3H3が血管新生を抑制するとともに抗腫瘍活性を示したと報告している(102)。この実験系では、極めて特殊な細胞株を用いているうえ、その細胞が癌細胞でないことからbFGFがTAFであるとは結論できないと思われる。高橋等は、4種類のヒト癌細胞株によって形成される固形癌の中で3種類について3H3の投与で抗癌活性を示したと報告している(103)。しかし、抗癌活性を示した癌細胞株の*in vitro*の増殖に対して3H3は、抑制的に作用しており、これらの癌細胞株では、bFGFがオートクリン増殖因子として働いていると考えていた。また、松崎等は、独自に抗bFGF中和モノクローナル抗体を作製し、その抗体を産生するハイブリドーマ細胞をヌードマウスの皮下に移植して固形癌が形成されるかを観察していた(104)。その結果、100%の率で固形癌が形成され、その切片を組織学的に調べたところヒストサイトーマ様の組織で、特に毛細血管が豊富であったとしている。これらの結果からbFGFがTAFとして働いている可能性は低いと思われる。

アンギオゲニンに関しては、Olsen等による抗アンギオゲニン中和モノクローナル抗体(26-2F)の抗癌活性の報告がある(105-106)。ヒト癌細胞と26-2Fを混ぜてヌードマウスに移植し、その上、更に26-2Fを投与したところ、固形癌の生着および増殖が抑制され延命効果が観察されていた。アンギオゲニンは、膵臓リボヌクレアーゼと35%の相同性を示しその活性中心を保持しているため、血管新生活性以外にRNA分解活性を持った因子である。アンギオゲニンは、血管内皮細胞表面の α アクチン様蛋白質に結合して核に移行する性質があり、他の増殖因子のシグナル伝達とは、かなり異なっている。現時点ではアンギオゲニンの血管新生活性のメカニズムについては不明の点が多い。

また、アンジオゲニンを研究しているグループが少ないうえ、中和抗体の抗癌活性については、Olsenグループからの報告しかない。アンジオゲニンがTAFかどうかについての結論は、更に多くの研究を要すると思われる。

以上の報告からも、現時点でTAFといえる血管新生因子は、VEGF以外にないと思われる。Kim等の指摘した現象については、他のTAFの関与よりモノクローナル抗体の固形癌の細部へのデリバリーに限界があるのではないかと考える。固形癌は、表面には新生血管が豊富であるが、内部は血管に乏しく低酸素状態であり壊死している。一方、VEGFは、そのような壊死した部分で高発現であるとともに低酸素状態で発現が誘導されることが知られている(73,107)。つまり、固形癌の内部でVEGFの発現が高い部分は、血管が乏しく壊死している部分であり、このような部分には血流を介した抗体のデリバリーは、困難であると考えられる。この点は、抗VEGF中和抗体のみで固形癌の治療を行う際の限界となる。

一般的に臨床における癌化学療法では、作用メカニズムの異なる複数の抗癌剤による併用療法が行われる。「血管新生阻害剤」は、その特性から考えて単独では、固形癌の増殖を抑制することは可能であるが、そのサイズの縮小は期待できないと思われる。このことから、従来の抗癌剤に対して対して作成されたガイドラインにある「固形癌のサイズの縮小」で評価すると、「血管新生阻害剤」が抗癌剤として認可されなくなってくる。そこで、抗癌剤としての開発には、他の療法との組み合わせが必要となると考えられる。動物実験の段階であるが血管新生阻害剤と他の抗癌剤との併用により相乗的な効果が得られている例もある(108,109)。そこで抗VEGF中和抗体と既存抗癌剤との併用療法は、それぞれの抗癌活性を上昇させ、固形癌の縮小効果が期待できると思われる。

著者等は、VEGFの活性を阻害する手段として抗ヒトVEGF₁₂₁中和抗体を用いて実験してきた。近年、抗体以外でVEGFの活性を特異的に阻害したという報告がある。Millaer等は、マウスVEGFレセプターであるFlk-1の細胞内部のチロシンキナーゼ領域を欠き情報伝達能を失った変異レセプター遺伝子(Flk-1 TM)をレトロウイルスに組み込んで遺伝子治療実験を行っていた(110)。ヌードマウスに移植したラット脳腫瘍株C6の増殖をFlk-1 TMを組み込んだレトロウイルスを投与することで抑制していた。この結果もVEGFがTAFであり、VEGF-Flk-1の相互作用が固形癌における血管新生に重要であることの証拠である。一方、チロシンキナーゼの基質となるチロシン残基のアナログとなるチルフォスチンと呼ばれる一連のチロシンキナーゼ阻害剤がある。これらは、側鎖や骨格の構造の違いで阻

害するチロシンキナーゼに対する特異性が異なってくるという性質がある(111)。先の Millauer と同じグループの Shawver によると Flk-1 チロシンキナーゼを特異的に阻害するチルフォスチンの合成していた(112)。動物実験のデータはないが、VEGF の活性を特異的に阻害する低分子物質のひとつである。Jellinek 等によると VEGF に対して特異的に結合する RNA オリゴマーをランダムオリゴ RNA ライブラリーより選出し、結合に必要な最小単位まで限定していた(113)。HUVEC に対するレセプターアッセイにて VEGF の結合を阻害したというデータのみであり、VEGF の生物学的活性に対する阻害効果は不明であるが、生体における安定性(ヌクレアーゼ耐性)を考慮して塩基の修飾も行っていることから医薬品としての展開が予想される(114)。同じオリゴ核酸でも VEGF の配列に相補なアンチセンス核酸にて VEGF の発現を抑制したという報告も 2 グループよりある。Saleh 等は、ラットの脳腫瘍株(C6)にアンチセンス VEGF-cDNA を発現させるとヌードマウスでの固形癌の増殖が著しく抑制されたと報告し、このアンチセンス核酸による遺伝子治療の可能性を示唆していた(115)。抗癌活性ではないが Robinson 等によると、新生児マウスを用いた網膜症モデルにて、マウス VEGF の開始コドン付近のアンチセンスオリゴ DNA を眼球内投与することで治療できたと報告している(116)。Alello 等も、同様の網膜症モデルでの治療効果を VEGF レセプター(Flt-1 および Flk-1)の細胞外領域をヒト Ig の Fc 領域に結合した融合蛋白質の眼球内投与の系で報告している(117)。Kendall 等は、VEGF レセプター(Flt-1)の細胞外領域のみでも VEGF の HUVEC に対する増殖促進活性を阻害すると報告している(118)。以上のように、中和抗体以外のアプローチで VEGF の活性を特異的に阻害するも数多くあることがわかる。しかし、医薬品としての開発を考慮すると、これら全てが候補となりうるかについては不明である。

固形癌の増殖を阻害する活性を持つ抗体の報告は多い。それらは、作用メカニズムによって二群に大別される。第一は、著者等のアプローチのように、固形癌の増殖に関係している特定の増殖因子の活性を阻害することを主作用とした抗体である。第二は、固形癌の表面に発現されている特定の因子(癌抗原)を認識し、宿主の免疫能を介した抗癌活性を示す抗体である。何れの場合にも抗原の固形癌に対する特異性が問題のひとつとなる。VEGF に関しては、第 II 章にても考察したように固形癌での発現は、他の部位での発現に比べて高く特異性が高いと考えられる。健常人では、一般に女性の性周期や妊娠以外に恒常性の維持のために血管新生を要する変化は少ないと考えられている。このような状態における VEGF の関与が示唆されている(54-56)ものの、健常

人における V E G F の、他の役割については明らかになっていない。従って、中和抗体を投与することで起こると想定される副作用については、慎重に検討する必要がある。一方、抗体医薬品による治療とは、分子量 15 万 k D の蛋白質 (I g) を生体に投与することであり、マウス I g からなる抗体医薬品をを繰り返して投与すると抗体医薬品自身が異物と認識されて、それに対する抗体 (human anti-mouse antibody; HAMA) ができることが知られている。HAMA は、抗体医薬品と免疫複合体を形成して、その活性を中和するとともにクリアランスを早めてしまうばかりでなく、アナフィラキシー等の高感受性に伴うリスクも生じてくる。この問題点を解消するためには、遺伝子工学的に、マウスモノクローナル抗体の可変部をヒト I g の定常部と結合してマウス-ヒトキメラ I g を作製する手段が採られる (キメラ化) (119-127)。また、可変部中でも抗原結合に関係する最小領域 (complementarily-determining region; CDR) のみを残して、他をヒト I g に置換する手法 (ヒト化; CDR-graft) までも駆使してヒト I g に近づけた例もある (図 15) (128-130)。著者等の作製したヒト V E G F₁₂₁ 中和モノクローナル抗体も「抗癌剤」として開発するためには、このようなキメラ化あるいはヒト化などの改変を行う必要がある。

著者等の作製した抗ヒト V E G F₁₂₁ 中和モノクローナル抗体のような血管新生阻害剤が癌転移に有効であることは、第 V 章にても考察したように十分考えうることであり、実験結果もそれを証明している。しかし、「抗転移剤」の開発に関しては、評価法が問題となってくる。臨床においても「抗転移剤」評価のガイドラインは、現在作成中であるし、評価期間がかなり長くなることが予想される。従って、抗ヒト V E G F₁₂₁ 中和モノクローナル抗体の医薬品としての開発するには、まず「抗癌剤」として開発すべきと考える。

著者等の研究により V E G F が T A F であることが明らかになり、固形癌治療の新たなターゲットとなることが示された。また、著者等の作製した抗ヒト V E G F₁₂₁ 中和モノクローナル抗体が、新たな「抗癌剤」および「抗転移剤」となる可能性が示唆された。T A F をターゲットとした新規な抗癌剤で、人類の課題のひとつとして残された「癌の克服」ができることを期待し、著者等の研究が、その一部にでも貢献できれば幸いである。

掲載雑誌

第1章～第3章の内容は、次の雑誌に掲載された。

Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 1234-1241, (1993)

Kondo, S., Asano, M., and Suzuki, H.,

"Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody."

Biochem. Biophys. Acta, 1221, 211-214, (1993)

Kondo, S., Asano, M., Matsuo, K., Ohmori, I., and Suzuki, H.,

"Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients."

第4章～第5章の内容は、次の雑誌に掲載された。

Hybridoma, 14, 475-479, (1995)

Asano, M., Yukita, A., Matsumoto, T., Matsuo, K., Kondo, S., and Suzuki, H.,

"Isolation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor₁₂₁ (VEGF/VPF₁₂₁)"

Cancer Res., 55, 5296-5301, (1995)

Asano, M., Yukita, A., Matsumoto, T., Kondo, S., and Suzuki, H.,

"Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor₁₂₁"

謝 辞

本研究を行うに当たり、懇切な御指導と御鞭撻を賜り、また本論文の提出の機会を与えてくださるとともに論文を御校閲戴きました千葉大学薬学部の澤井哲夫教授および五十嵐一衛教授に、ここに深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の遂行に当たり、終始、直接御指導、御援助を戴きました東亜合成株式会社／つくば研究所の鈴木日出夫所長に厚く感謝いたします。

さらに、本研究を遂行するに当たり、終始にわたり多大なる協力を戴きました東亜合成株式会社／つくば研究所／バイオサイエンス研究部の幸田綾子研究員および近藤伸一研究員に深く感謝の意を表します。また、一部の研究において協力していただいた同研究部の松尾克彦主任研究員、松本友恵研究員ならびに同研究部内のMCVプロジェクト員各氏にも心から感謝申し上げます。

また、本研究の中で行った動物実験において多大なる協力を戴きました株式会社三幸の尾張隆司、宮原時也両氏に感謝申し上げます。

参考文献

1. Auerbach, W., and Auerbach, R., Angiogenesis inhibition: A review., *Pharmac. Ther.*, 63, 265-311, 1994
2. Sipos, E. P., Tamargo, R. J., Weingart, J. D., and Brem, H., Inhibition of tumor angiogenesis., *Ann. NY. Acad. Sci.*, 732, 263-272, 1994
3. Baillie, C. T., Winslet, M. C., and Bradley, N. J., Tumor vasculature-a potent therapeutic target., *Br. J. Cancer*, 72, 257-267, 1995
4. Rak, J. W., St Croix, B. D., and Kerbel, R. S., Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy., *Anti-cancer Drugs*, 6, 3-18, 1995
5. Folkman, J., Tumor angiogenesis. Therapeutic implications., *New Engl. J. Med.*, 285, 1182-1186, 1972
6. Folkman, J., Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumor., *Ann. Surg.*, 175, 409-416, 1972
7. Folkman, J., Tumor angiogenesis., *Adv. Cancer Res.*, 43, 175-203, 1985
8. Folkman, J., What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 4-6, 1990
9. Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H., and Folkman, J., Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth., *Nature (London)*, 348, 555-557, 1990
10. Folkman, J. and Klagsbrun, M., Angiogenic factors., *Science (Washington DC)*, 235, 442-447, 1987
11. Blood, C. H., and Zetter, B. R., Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis., *Biochim. Biophys. Acta*, 1032, 89-118, 1990
12. Klagsbrun, M. and D'Amore, P. A., Regulation of angiogenesis., *Annu. Rev. Physiol.*, 53, 217-239, 1991
13. Folkman, J. and Shing, Y., Angiogenesis., *J. Biol. Chem.*, 267, 10931-10934, 1992
14. Schott, R. J., and Morrow, L. A., Growth factors and angiogenesis., *Cardiovasc. Res.*, 27, 1155-1161, 1993
15. Thomas, K. A., Rios-Candelore, M., Gimenez-Gallego, G., DiSalvo, J., Bennett, C., Rodkey, J., and Fitzpatrick, S., Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin-1., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6409-6413, 1985
16. Montesano, R., Vassalli, J-D., Baird, A., Guillemin, R. and Orci, L., Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis *in vitro.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7297-7301, 1986
17. Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L. and Neufeld, G., Structural characterization and biologic function of fibroblast growth factor., *Endocr. Rev.*, 8, 95-114, 1987

18. Schreiber, A.B., Winker, M.E. and Derynck, R., Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor., *Science(Washington DC)*, 232, 1250-1253, 1986
19. Robert, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Rosch, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H., and Fauci, A.S., Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4167-4171, 1986
20. Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F., and Vallee, B.L., Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells., *Biochemistry*, 24, 5480-5486, 1985
21. Hockel, M., Jung, W., Vaupel, P., Rabes, H., Khaledpour, C., and Wissler, J.W., Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) induces controlled angiogenesis associated with regulated tissue proliferation in rabbit skin., *J. Clin. Invest.*, 82, 1075-1090, 1988
22. Leibovich, S.J., Polverini, P.J., Shepard, H.M., Wiseman, D.M., Shively, V., and Nuseir, N., Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor- α ., *Nature(London)*, 329, 631-632, 1987
23. Frater-Schroder, M., Risau, W., Hellman, R., Gautschi, R., and Böhlen, P., Tumor necrosis factor type- α , a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5277-5281, 1987
24. Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Takaku, F., and Heldin, C-H., Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets., *J. Biol. Chem.*, 262, 4098-4103, 1987
25. Ishikawa, F., Miyazono, K., Hellman, U., Hannes, D., Wernstadt, C., Hagiwara, K., Usuki, K., Takaku, F., Risau, W., and Heldin, C-H., Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial growth factor., *Nature(London)*, 338, 557-562, 1989
26. Ferrara, N., and Henzel, W.J., Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161, 851-858, 1989
27. Léung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W-J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen., *Science(Washington DC)*, 246, 1306-1309, 1989
28. Conn, G., Soderman, D., Schaeffer, M-T., Wile, M., Hatcher, V.B., and Thomas, K.A., Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma cell line., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1323-1327, 1990
29. Tisher, E., Gospodarowicz, D., Mitchell, R., Silva, M., Schilling, J., Lau, K., Crisp, T., Fiddes, J.C., and Abraham, J.A., Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet derived growth factor family., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165, 1198-1206, 1989
30. Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perrizzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F., Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid., *Science(Washington DC)*, 219, 983-985, 1983

31. Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D.T., Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF., *Science (Washington DC)*, 246, 1309-1312, 1989
32. Connolly, D.T., Hauvelman, D.M., Nelson, R., Holander, J.V., Eppley, B.L., Delfino, J.J., Siegel, R.N., Leimgruber, R.S., and Feder, J., Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis., *J. Clin. Invest.*, 84, 1470-1478, 1989
33. Connolly, D.T., Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function., *J. Cell. Biochem.*, 47, 219-223, 1991
34. Plöuet, J., Schilling, J., and Gospodarowicz, D., Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells., *EMBO. J.*, 8, 3801-3806, 1989
35. Favard, C., Moukadiri, H., Dorey, C., Praloran, V., and Plöuet, J., Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine., *Biol. Cell*, 73, 1-6, 1991
36. Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M.G., Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9267-9271, 1991
37. Lyttle, D.J., Fraser, K.M., Fleming, S.B., Mercer, A.A., and Robinson, A.J., Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus., *J. Virol.*, 68, 84-92, 1994
38. Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushima, H., and Sato, M., Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family., *Oncogene*, 5, 519-524, 1990
39. de Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L.T., The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor., *Science (Washington DC)*, 255, 989-991, 1992
40. Matthews, W., Jordan, C.T., Gavin, M., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Lemischka, I.R., A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hemopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9026-9030, 1991
41. Terman, B.I., Carrion, M.E., Kovacs, E., Rasmussen, B.A., Eddy, R.L., and Shows, T.B., Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase., *Oncogene*, 6, 1677-1683, 1991
42. Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armelino, D.C., Gospodarowicz, D., and Böhlen, P., Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187, 1579-1586, 1992
43. Ferrara, N., Houck, K.A., Jakeman, L.B., Winer, J., and Leung, D.W., The vascular endothelial growth factor family of polypeptide., *J. Cell. Biochem.*, 47, 211-218, 1991
44. Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D.W., The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA., *Mol. Endocrinol.*, 5, 1806-1814, 1991

45. Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., and Abraham, J. A., The human gene for vascular endothelial growth factor: Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing., *J. Biol. Chem.*, 266, 11947-11954, 1991
46. Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., and Ferrara, N., Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms., *J. Bio. Chem.*, 267, 26031-26037, 1992
47. Park, J. E., Keller, G-A., and Ferrara, N., The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF., *Mol. Biol. Cell*, 4, 1317-1326, 1993
48. Myoken, Y., Kayada, Y., Okamoto, T., Kan, M., Sato, G., and Sato, J. D., Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A-431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding site., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5819-5823, 1991
49. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay., *J. Immunol. Method*, 65, 55-63, 1983
50. Tanaka, N., Sakamoto, N., Inoue, K., Korenaga, H., Kadoya, S., Ogawa, H., and Osada, Y., Antitumor effect of an antiangiogenic polysaccharide from an *Arthrobacter* species with or without a steroid., *Cancer Res.*, 49, 6727-6730, 1989
51. Kondo, S., Matsumoto, T., Yokoyama, Y., Ohmori, I., and Suzuki, H., The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF₁₂₁) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability., *Biochim. Biophys. Acta*, 1243, 195-202, 1995
52. Yeo, K-T., Wang, H. H., Nagy, J. A., Sioussat, T. M., Ledbetter, S. R., Hoogewerf, A. J., Zhou, Y., Masse, E. M., Senger, D. R., Dvorak, H. F., and Yeo, T-K., Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in guinea pig and human tumor and inflammatory effusions., *Cancer Res.*, 53, 2912-2918, 1993
53. Soker, S., Svahn, C. M., and Neufeld, G., Vascular endothelial growth factor is inactivated by binding to α_2 -macroglobulin and the binding is inhibited by heparin., *J. Biol. Chem.*, 268, 7685-7691, 1993
54. Ravindranath, N., Little-Ihrig, L., Phillips, H. S., Ferrara, N., and Zeleznik, A. J., Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary., *Endocrinol.*, 131, 254-260, 1992
55. Jackson, M. R., Carney, E. W., Lye, S. J., and Knox Ritchie, J. W., Localization of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placenta throughout gestation., *Placenta*, 15, 341-353, 1994
56. Anthony, F. W., Wheeler, T., Elcock, C. L., Pickett, M., and Thomas, E. J., Identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts., *Placenta*, 15, 557-561, 1994
57. Fava, R. A., Olsen, N. J., Spencer-Green, G., Yeo, K-T., Yeo, T-K., Berse, B., Jackman, R. W., Senger, D. R., Dvorak, H. F., and Brown, L. F., Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): Accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue., *J. Exp. Med.*, 180, 341-346, 1994

58. Koch, A. E., Harlow, L. A., Haines, G. K., Amento, E. P., Umemori, E. N., Wong, W. L., Pope, R. M., and Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor: a cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis., *J. Immunol.*, 152, 4149-4156, 1994
59. Adamis, A. P., Miller, J. W., Bernal, M. T., D'Amico, D. J., Folkman, J., Yeo, T-K., and Yeo, K-T., Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eye with proliferative diabetic retinopathy., *Am. J. Ophthalmol.*, 118, 445-450, 1994
60. Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E., Nguyen, H. V., Aiello, L. M., Ferrara, N., and King, G. L., Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders., *New Engl. J. Med.*, 331, 1480-1487, 1994
61. Brown, L. F., Yeo, K-T., Berse, B., Yeo, T-K., Senger, D. R., Dvorak, H. F., and Van De Water, L., Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocyte during wound healing., *J. Exp. Med.*, 176, 1375-1379, 1992
62. Detmar, M., Brown, L. F., Claffey, K. P., Yeo, K-T., Kocher, O., Jackman, R. W., Berse, B., and Dvorak, H. F., Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis., *J. Exp. Med.*, 180, 1141-1146, 1994
63. Kuzuya, M., Satake, S., Esaki, T., Yamada, K., Hayashi, T., Naito, M., Asai, K., and Iguchi, A., Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization on atherosclerotic plaque., *J. Cell. Physiol.*, 164, 658-667, 1995
64. Lobb, R. R., Key, M. E., Alderman, E. M., and Fett, J. M., Partial purification of a vascular permeability factor secreted by a human colon adenocarcinoma cell line., *Int. J. Cancer*, 36, 473-478, 1985
65. Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Feder, J., and Dvorak, H. F., A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines., *Cancer Res.*, 46, 5629-5632, 1986
66. Connolly, D. T., Olander, J. V., Heuvelman, D., Nelson, R., Monsell, R., Siegel, N., Haymore, B. L., Leimgruber, R., and Feder, J., Human vascular permeability factor, Isolatoin from U937 cells., *J. Biol. Chem.*, 264, 20017-20024, 1989
67. Berkman, R. A., Merrill, M. J., Reinhold, W. C., Monacci, W. T., Saxena, A., Clark, W. C., Robertson, J. T., Ali, I. U., and Oldfield, E. H., Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms., *J. Clin. Invest.*, 91, 153-159, 1991
68. Charnock-Jones, D. S., Sharkey, A. M., Rajput-Williams, J., Burch, D., Schofield, J. P., Fountain, S. A., Boocock, C. A., and Smith, S. K., Identification and localization of alternately spliced mRNA for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines., *Biol. Reprod.*, 48, 1120-1128, 1993
69. Toi, M., Hoshina, S., Takayanagi, T., and Tominaga, T., Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer., *Jpn. J. Cancer Res.*, 85, 1045-1049, 1994

70. Pötgens, A. J. G., Lubsen, N. H., van Altena, M. C., Schoenmakers, J. G. G., Ruiter, D. J., and de Waal, R. M. W., Vascular permeability factor expression influences tumor angiogenesis in human melanoma lines xenografted to nude mice., *Am. J. Pathol.*, 146, 197-209, 1995
71. Rak, J., Mitsuhashi, Y., Filmus, B. J., Shirasawa, S., Sasazuki, T., and Kerbel, R. S., Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: Implication for induction and inhibition of tumor angiogenesis., *Cancer Res.*, 55, 4575-4580, 1995
72. Miles, A. A., and Miles, E. M., Vascular reactions to histamine, histamin-liberator, and leukotaxine in the skin of guinea pigs., *J. Physiol.*, 118, 228-257, 1952
73. Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A., and Risau, W., Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*., *Nature (London)*, 359, 845-848, 1992
74. Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A., Mennel, H. D., and Risau, W., Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis., *Int. J. Cancer*, 59, 520-529, 1994
75. Hatva, E., Kaipainen, A., Mentula, P., Jääskeläinen, J., Paetau, A., Haltia, M., and Alitalo, K., Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors., *Am. J. Pathol.*, 146, 368-378, 1995
76. Phillips, H. S., Armani, M. P., Stavrou, D., Ferrara, N., and Westphal, M., Intense focal expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human intracranial neoplasms: association with regions of necrosis., *Int. J. Oncol.*, 2, 913-919, 1993
77. Weindel, K., Moringlane, J. R., Marme, D., and Weich, H. A., Detection and quantification of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in brain tumor tissue and cyst fluid: The key to angiogenesis?, *Neurosurgery*, 35, 439-449, 1994
78. Strugar, J., Rothbart, D., Harrington, W., and Criscuolo, G. R., Vascular permeability factor in brain metastasis: correlation with vasogenic brain edema and tumor angiogenesis., *J. Neurosurg.*, 81, 560-566, 1994
79. Weindel, K., Marmè, D., and Weich, H. A., AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells in culture express vascular endothelial growth factor., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183, 1167-1174, 1992
80. Morii, K., Tanaka, R., Washiyama, K., Kumanishi, T., and Kuwano, R., Expression of vascular endothelial growth factor in capillary hemangioblastoma., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194, 749-755, 1993
81. Takahashi, K., Mulliken, J. B., Kozakewich, H. P. W., Rogers, R. A., Folkman, J., and Ezekowitz, R. A. B., Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood., *J. Clin. Invest.*, 93, 2357-2364, 1994
82. Toi, M., Hoshina, S., Takayanagi, T., and Tominaga, T., Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer., *Jpn. J. Cancer Res.*, 85, 1045-1049, 1994
83. Toi, M., Inada, K., Suzuki, H., and Tominaga, T., Tumor angiogenesis in breast cancer: Its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression., *Breast Cancer Res. Treat.*, 36, 193-204, 1995
84. O'Brien, T., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R., and Harris, A. L., Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer., *Cancer Res.*, 55, 510-513, 1995

85. Ishii, Y., Expression and subtype analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (flt-1) in human ovarian cancer., *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 47, 133-140, 1995
86. Mattern, J., Koomägi, R., and Volm, M., Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in non-small cell lung carcinoma., *Int. J. Oncol.*, 6, 1059-1062, 1995
87. Shiraishi, A., Ishiwata, T., Shoji, T., and Asano, G., Expressoin of PCNA, basic fibroblast growth factor, FGF-receptor and vascular endothelial growth factor in adenomas and carcinomas of human colon., *Acta Histochem. Cytochem.*, 28, 21-29, 1995
88. Guidi, A. J., Abu-Jawdeh, G., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Dvorak, H. F., and Brown, L. F., Vascular permeability factor (vascular endothelial groth factor) expressoin and angiogenesis in cervical neoplasia., *J. Natl. Cancer Inst.*, 87, 1237-1245, 1995
89. Takahashi, A., Sasaki, H., Kim, S. J., Tobisu, K., Kakizoe, T., Tsukamoto, T., Kumamoto, Y., Sugimura, T., and Terada, M., Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis., *Cancer Res.*, 54, 4233-4237, 1994
90. Ferrara, N., Winer, J., Burton, T., Rowland, A., Siegel, M., Phillips, H. S., Terrell, T., Keller, G. A., Levinson, A. D., Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage *in vivo* to chinese hamster ovary cells., *J. Clin. Invest.*, 91, 160-170, 1992
91. Zhang, H-T., Craft, P., Scott, P. A. E., Ziche, M., Weich, H. A., Harris, A. L., and Bicknell, R., Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells., *J. Natl. Cancer Inst.*, 87, 2131-219, 1995
92. Greenwood, F. C., Hunter, W. H., and Glover, J. S., 125I-labeled growth hormone of high specific radioactivity., *Biochem. J.*, 89, 114-123, 1963
93. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature(London)*, 227, 680-685, 1970
94. Fiebich, B. L., Jäger, B., Schöllman, C., Weindel, J., Kochs, G., Marmé, D., Hug, H., and Welch, H. A., Synthesis and assembly of functionally active human vacular endothelial growth factor homodimers in insect cells., *Eur. J. Biochem.*, 211, 19-26, 1993
95. Kim, J., Li, B., Houck, K., Winer, J., and Ferrara, N., The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevent regions by neutralizing monoclonal antibodies., *Growth Factors*, 7, 53-64, 1992
96. Kim, J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., and Ferrara, N., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*., *Nature(London)*, 262, 841-844, 1993
97. Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Gillett, N. A., and Ferrara, N., Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental metastasis., *J. Clin. Invest.*, 95, 1789-1797, 1995
98. Hanatani, M., Tanaka, Y., Kondo, S., Ohmori, I., and Suzuki, H., Sensitive chemiluminescence enzyme immunoassay for vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human serum., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1958-1959, 1995

99. Baird, A., Mormède, P., and Böhlen, P., Immunoreactive fibroblast growth factor (FGF) in a transplantable chondrosarcoma: Inhibition of tumor growth by antibodies to FGF., *J. Cell. Biochem.*, 30, 79-85, 1986
100. Stan, A. C., Nemati, M. N., Pietsch, T., Walter, G. F., and Dietz, H., In vivo inhibition of angiogenesis and growth of the human U-87 malignant glial tumor by treatment with an antibody against basic fibroblast growth factor., *J. Neurosurg.*, 82, 1044-1052, 1995
101. Dennis, P. A., and Rifkin, D. B., Studies on the role of basic fibroblast growth factor *in vivo*: Inability of neutralizing antibodies to block tumor growth., *J. Cell. Physiol.*, 144, 84-98, 1990
102. Hori, A., Sasada, R., Matsutani, E., Naito, K., Sakura, Y., Fujita, T., and Kozai, Y., Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor., *Cancer Res.*, 51, 6180-6184, 1991
103. Takahashi, J. A., Fukumoto, M., Kozai, Y., Ito, N., Oda, Y., Kikuchi, H., and Hatanaka, M., Inhibition of cell growth and tumorigenesis of human glioblastoma cells by a neutralizing antibody against human basic fibroblast growth factor., *FEBS Let.*, 288, 65-71, 1991
104. Matsuzaki, K., Yoshitake, Y., Matuo, Y., Sasaki, H., and Nishikawa, K., Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor II/ basic fibroblast growth factor that block its biological activity: Invalidity of the antibodies for tumor angiogenesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9911-9915, 1989
105. Olson, K. A., French, T. C., Vallee, B. L., and Fett, J. W., A monoclonal antibody to human angiogenin suppresses tumor growth in athymic mice., *Cancer Res.*, 54, 4576-4579, 1994
106. Olson, K. A., Fett, J. W., French, T. C., Key, M. E., and Vallee, B. L., Angiogenin antagonists prevent tumor growth *in vivo*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 442-446, 1995
107. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E., Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-induced angiogenesis., *Nature (London)*, 359, 843-845, 1992
108. Teicher, B. A., Holden, S. A., Ara, H., Sotomayor, E. A., Huang, Z. D., Chen, Y.-N., and Brem, H., Potentiation of cytotoxic cancer therapy by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agent., *Int. J. Cancer*, 57, 920-925, 1994
109. Kato, T., Sato, K., Kakinuma, H., and Matsuda, Y., Enhanced suppression of tumor growth by combination of angiogenesis inhibitor O-(chloroacetyl-carbamoyl) fumagillol (TNP-470) and cytotoxic agent in mice., *Cancer Res.*, 54, 5142-5147, 1994
110. Millauer, B., Shawver, L. K., Plate, K. H., Risau, W., and Ullrich, A., Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk-1 mutant., *Nature (London)*, 367, 576-579, 1994
111. Levitzki, A., and Gazit, A., Tyrosine kinase inhibition: An approach to drug development., *Science (Washington DC)*, 267, 1782-1788, 1995
112. Shawver, L. K., Inhibition of signal transduction and VEGF., Chembridge Health Inst. Symp.: [Angiogenesis antagonists], 1995

113. Jellinek, D., Green, L. S., Bell, C., and Janjic, N., Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor., *Biochemistry*, 33, 10450-10456, 1994
114. Green, L. S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L. A., Feistner, B. D., Gill, S. C., Jucker, F. M., and Janic, N., Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor., *Chem. Biol.*, 2, 683-695, 1995
115. Saleh, M., Stacker, S. A., and Wilks, A. F., Inhibition of growth of C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence., *Cancer Res.*, 56, 393-401, 1996
116. Robinson, G. S., Rook, S. L., Aiello, L. P., Foley, E. D., Sullivan, R., Pierce, E. A., and Smith, L. E. H., Inhibition of retinal neovascularization using antisense phosphorothioate oligonucleotides against vascular endothelial growth factor (VEGF/VFP) ., Chembridge Health Inst. Symp.: [Angiogenesis antagonists], 1995
117. Aiello, L. P., Pierce, E. A., Foley, E. D., Takagi, H., Chen, H., Riddle, L., Ferrara, N., King, G. L., and Smith, L. E. H., Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, 10457-10461, 1995
118. Kendall, R. L., and Thomas, K. A., Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10705-10709, 1993
119. Miller, R. A., Oseroff, A. R., Stratte, P. T., and Levy, R., Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma., *Blood*, 62, 988-995, 1983
120. Boulianne, G. L., Hozumi, N., and Shulmani, M. J., Production of functional chimeric mouse/human antibody., *Nature (London)*, 312, 643-646, 1984
121. Mirrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., and Oi, V. T., Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6851-6855, 1984
122. Liu, A. Y., Robinson, R. R., Hellström, K. E., Murray, E. D., Chang, C. P., and Hellström, I., Chimeric mouse-human IgG1 antibody that can mediate lysis of cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3439-3443, 1987
123. Heinrich, G., Gram, H., Kocher, H. P., Schreier, M. H., Ryffel, B., Akbar, A., Amlot, P. L., and Janosy, G., Characterization of a human T-cell-specific chimeric antibody (CD7) with human constant and mouse variable regions., *J. Immunol.*, 143, 3589-3597, 1989
124. Gillespie, B. R., Wunderlich, D., Kelley, K., Dzuiba, J., Shedd, D., Cahill, K., and Zerler, B., Differential effects of a murine and chimeric mouse/human anti-interleukin-2 receptor antibody on human T-cell proliferation., *Immunology*, 76, 452-459, 1992
125. Co, M. S., Avdalovic, N. M., Caron, P. C., Avdalovic, M. V., Scheinberg, D. A., and Queen, C., Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen., *J. Immunol.*, 148, 1149-1154, 1992
126. Shitara, K., Kuwana, Y., Nakamura, K., Tokutake, Y., Ohta, S., Miyaji, H., Hasegawa, M., and Hanai, N., A mouse/human chimeric anti-(ganglioside GD3) antibody with enhanced antitumor activities., *Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373-380, 1993

127. Mount, P. F., Sutton, V. R., Li, W., Burgess, J., McKenzie, I. F. C., Pietersz, G. A., and Trapani, J. A., Chimeric (mouse/human) anti-colon cancer antibody c30.6 inhibits the growth of human colorectal cancer xenografts in scid/scid mice., *Cancer Res.*, 54, 6160-6166, 1994
128. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., and Winter, G., Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse., *Nature (London)*, 321, 522-525, 1986
129. Verhoeyen, M., Milstein, C., and Winter, G., Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity., *Science (Washington DC)*, 239, 1534-1536, 1988
130. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H., and Winter, G., Reshaping human antibodies for therapy., *Nature (London)*, 332, 323-327, 1988

主査、副査名

本学位論文の審査は、千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学教授（薬学部） 薬学博士 五十嵐 一衛

副査 千葉大学教授（薬学部） 薬学博士 澤井 哲夫

副査 千葉大学教授（薬学部） 薬学博士 畝本 力

副査 千葉大学教授（薬学部） 薬学博士 今成 登志男

副査 千葉大学教授（薬学部） 薬学博士 斉藤 和季