

血管新生阻害剤における抗腫瘍効果の予測因子と 耐性獲得因子のバイオマーカー解析

がん研究会有明病院 消化器センター

末永 光邦

はじめに

目的：

Bevacizumab (BV) は選択的にVascular endothelial growth factor (VEGF) に結合し、血管内皮細胞に発現する受容体 (VEGFR-1, VEGFR-2) とVEGF との結合を阻害するヒト化モノクローナル抗体 (血管新生阻害剤) であるが、その耐性機序はまだ解明されておらず、臨床においては投与期間がしばしば論点となる。本研究でバイオマーカー、治療効果、有害事象の発症状況を総合的に解析することにより、不明瞭であった血管新生阻害剤の作用機序解明と最良なBVの使用方法を提案する。

背景：

Bevacizumab (BV) は2007年に進行結腸直腸癌を適応症として本邦で最初に承認された血管新生阻害剤であり、選択的にVEGFに結合し、血管内皮細胞に発現する受容体 (VEGFR-1, VEGFR-2) とVEGF との結合を阻害するヒト化モノクローナル抗体である。進行結腸直腸癌における臨床試験の結果、5-fluorouracil (5-FU)、capecitabine、irinotecan、oxaliplatin、leucovorin からなるFOLFOX、FOLFIRIあるいはXELOX療法との併用においてPFS (無増悪生存期間)、OS (全生存期間) の改善が証明され、初回標準療法として国内外ガイドラインに位置づけられている (Saltz et al. J Clin Oncol 2008)。また特有の重篤な有害事象には、血栓塞栓症があり、急性発症から重篤な合併症に至る危険性がある。FOLFOX、FOLFIRI療法には5-FUの持続静脈注入があり、鎖骨下静脈に埋め込み型の中心静脈留置カテーテル (implantable central venous access system: CVAS) が増設される。CVASは、担癌血栓症のリスク因子として知られており、実際に当施設でもBV併用化学療法導入後にCVAS関連の深部静脈血栓症を治療開始初期に経験した。

そこで、重篤な静脈血栓塞栓症の発症を予防することを目標として単施設で「臨床研究1：大腸癌患者に対するBV投与に関連して発生する静脈血栓症のマネジメントの検討」を行った。

次に治療効果と効果予測因子に関する臨床研究として「臨床研究2：1st-line FOLFOX+BVにおける治療効果予測因子の検討」、「臨床研究3：2nd-line FOLFIRI+BVにおける治療効果予測因子の検討」を単施設で行った。臨床研究1の結果から、BVが血栓形成に少な

らず関与していることが示された (Suenaga et al. Medical Oncology, 2010)。VEGF もしくはcyclooxygenase (COX) -2 dependent prostacyclin (PGI₂) biosynthesisの阻害は、持続性の防御経路を廃絶することで、血栓症の危険性が増加する可能性がある。VEGF は主な内皮受容体であるkinase insert domain-containing receptor (KDR) もしくは VEGF receptor-2に結合し、nitric oxideとPGI-2の産生の媒介酵素であるendothelial nitric oxide synthase (eNOS) やCOX-2を活性化させる引き金となる (Barnard K et al. Circulation 2006)。Bevacizumabは、NOとPGI₂が血小板凝集と血管平滑筋細胞の増殖を阻害する経路を阻止することで、血栓症や動脈壁肥厚のリスクを高めると考えられている (Zachary I et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000)。Fibroblast growth factor (FGF-2) は創傷治癒過程においてすぐに遊離され、受傷直後の急性期段階で早期に血管内皮細胞増殖を促す。FGF-2はVEGF産生を増加することが分かっており、また相乗的に血管新生を刺激するように働く。Platelet-derived growth factor、transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3)や局所低酸素状態もまたVEGF産生を促進するとされている。従って、VEGFは損傷を受けてから3日目以降に徐々に増加していき、血管内皮細胞の遊走や新たな毛細血管への分化を持続的に促す (Nissen NN et al. Am J Pathol 1998)。これらの結果に基づくと、CVAS造設後の急性期のbevacizumab導入は、VEGF産生が低下していることから、血栓形成のリスクが高める可能性が高いと考えられる。

よって血栓症（ここではCVカテ関連血栓）の予測因子としては、通常のpracticeで測定するd-dimer以外にFGF-2, VEGF, placental growth factor (PlGF), TGF- β 3を候補として測定することとした。さらに臨床研究2, 3から、凝固線溶系マーカーと効果予測との関連が示唆された。臨床研究3において2nd-line FOLFIRI+BV療法の解析を行った結果、単変量解析では、凝固線溶系としてD-dimer、TAT (thrombin-antithrombin complex)、また腫瘍マーカーとしても使用されるmucin family glycoproteinsのMUC16 (CA125) がPFSの効果予測因子として抽出された。また多変量解析では、治療前に測定したCA125がPFS (progression-free survival)、OS (overall survival) に関する効果予測因子として抽出された。よって、血管新生阻害剤に治療では、血栓形成に関与する凝固線溶マーカーやmucinは効果予測因子の候補として考えた (Suenaga et al. Surgery Today 2011)。

その他の基礎研究における報告では、血管新生に関連する因子として腫瘍から産生されるVEGF-A, bFGF, angiopoietins, interleukin-8, PlGF, VEGF-Cがある。また Tumour-associated fibroblasts (TAF) などの間質細胞に由来する SDF-1があり、これは bone-marrow-derived angiogenic cells (BMC) を動員する働きがある。BMCは腫瘍内の血管新生を促進することがわかっている。VEGF-A, PlGFもBMCを導入することが分かっており、近年BMCとして血管新生ペプチドであるBV8 (別名プロキネチシン-2) が注目されている。顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、血液細胞の増殖分化に関与するが、骨髄でのBV8の産生を増大する。BV8に対する抗体は血管新生を抑制すると考えられている。血管内皮細胞はPDGF-Bを産生し、微細血管に血管周皮細胞を動員することが分かっている (Ferrara et

al. Nature 2005, Shojaei et al. Cancer Res 2008)。

臨床においては、MD Anderson Cancer Centerから進行再発結腸直腸癌に対する1st-line FOLFIRI+bevacizumab療法Phase II試験における血漿のサイトカインや血管新生因子の測定結果が報告された。その結果、RECIST評価による原病増悪が確定される以前にbasic FGF, HGF (hepatocyte growth factor), PlGF, stromal cell-derived factor (SDF)-1が治療開始前と比較して有意に測定値が上昇していたことが判明し、bevacizumabの耐性機序の解明に関する報告として注目されている(Kopetz S et al. J Clin Oncol 2010)。

これらから血管新生阻害剤においては、血液凝固関連の有害事象と抗腫瘍効果は密接な関連があり、共通した作用機序を解明することが本試験の新規性であり、今まで不明瞭であった血管新生阻害剤の作用機序に新たな展開を見せると考えた。また有害事象管理、抗腫瘍効果の双方の観点からbevacizumab (BV) の最適な投与方法、期間を選定し、効果予測マーカーと耐性獲得のマーカーの決定に及ぶことを目標とすることから、学術的にBVを含めた血管新生阻害剤の今後の臨床研究の基盤にもなりうると考えられる。

対象：

当院で進行再発結腸・直腸癌患者と診断されており、以下の基準を満たす。

選択基準

1. 組織学的に大腸癌と診断された症例。
2. 初回治療としてbevacizumabを含む化学療法が予定されている症例。
3. 測定可能病変を有する症例(RECIST ver. 1.1.に準拠:10mm $\leq$ またはヘリカルCTで5mm $\leq$)。
4. 投与開始日から12週以上の生存が期待される症例。
5. 試験参加について患者本人から文書による同意が得られた症例。

除外基準

1. 活動性の重複癌を有する症例（同時性重複癌または無病期間が5年以内の異時性重複癌。ただし局所治療により治癒と判断されるCarcinoma in situ（上皮内癌）または粘膜内癌相当の病変は活動性の重複癌に含めない）。
2. 臨床上問題となる精神・神経症状等により試験への参加が困難と判断される症例。
3. 医師が登録には不相当と判断した症例

方法：

本研究は血管新生阻害剤における抗腫瘍効果の予測因子と耐性獲得因子のバイオマーカー解析を目的とした単施設における探索的臨床研究である。

治療内容：

初回治療としてmFOLF0X6（5-FU/LV/L-OHP）もしくはXELOX（capecitabine/L-OHP）とbevacizumabとの併用を原病増悪、調節困難な有害事象発現まで継続する。

検査法：

i. 血清学的測定項目と測定法

初回化学療法の基本ライン（治療開始前）、第2サイクル開始前、第4サイクル開始前、効果判定時、治療中止判定時、また血栓塞栓症発症時に約15mLの血液を採取する。候補とした血管新生因子をELISAで測定する。

ii. 病理免疫組織化学検査

手術切除検体のパラフィンブロックを用いて、血管新生に関与する免疫組織化学検査を行う。

iii. RECISTによる抗腫瘍評価

6週間毎にCT等の画像検査により、RECIST ver. 1.1で評価する。

iv. 中心静脈カテーテル関連血栓塞栓症のスクリーニング

化学療法の投与経路として中心静脈カテーテルが挿入された上肢の深部静脈系に対して、基本ライン（治療開始前）、化学療法第2サイクル開始前、第4サイクル開始前にドップラーエコーで深部静脈血栓のスクリーニングを施行する。

エンドポイント：

得られた検査結果をもとに抗腫瘍効果、静脈血栓との関連を総合的に解析することで、有効性と有害事象の予測に関わるバイオマーカーを抽出する。この結果をもとにbevacizumabの最適な投与方法、期間を選定し、効果予測マーカーと耐性獲得のマーカーの決定に及ぶ。

結 果

2012年3月から2013年3月までに39名の患者を本研究に登録した。

登録患者で以下の患者を今回の解析の対象とした。①予定サンプルが採取されている、②原病増悪まで治療が継続できている、③bevacizumabが一定期間併用されている、などを条件とした。

その結果、今回の解析対象は14例であった。除外となった主な理由は手術による治療中断や有害事象による早期bevacizumab中止によるものなどであった。

本報告では、ELISAにおける測定結果について述べる。血管新生因子として、VEGF, SDF-1等を測定し、経時的な変化と画像評価による腫瘍奏効の有無について解析を行った。連続変数の平均値の差についてはStudent's t-testを用いて解析した。時間の変化に伴う連続変数の差の評価は、Two-way repeated-measures ANOVAを用いて解析した。

奏効率は57%であった。血清SDF-1値は奏効例が非奏効例に対して、基本ライン($p=0.045$)と第2サイクル前($p=0.049$)に有意に低値であり、第4サイクル開始前でより高い傾向が見られた。

Two-way repeated-measures ANOVAの結果、VEGF-C ($p=0.043$)とSDF-1 ($p=0.02$)において抗腫瘍効果による有意な経時的変化が認められた。血清SDF-1値は、第2サイクル前に

増加し、第4サイクル前に減少する傾向が見られた。一方、VEGF-Cは、第2サイクル前、第4サイクル前に減少する傾向を認めた。

考 察

進行結腸直腸癌の初回治療を対象にしたバイオマーカー研究の一部を報告した。

初回治療の治療期間は当院の報告でも1年半に及ぶため (Suenaga et al. Asia Pac J Clin Oncol 2013)、今回の解析では原病増悪までの血清マーカー測定の解析までには至っていない。

しかし、今後の研究に十分繋がる結果が得られた。**Bevacizumab**に対する抗腫瘍効果と血管新生因子の一部に関連性を確認することができた。これらは、**bevacizumab**を使用することで一定の変化を示すことから、血管新生阻害の状態を反映していることが予想される。現在も本研究は症例集積を行い、今後は原病増悪時の測定結果を加えた解析を行う予定である。さらに評価項目としては腫瘍奏効に加えて、無増悪生存期間、全生存期間、さらには有害事象のデータをもとに解析を行う予定である。最終的にbevacizumabの最適な投与方法、期間を選定し、効果予測マーカーと耐性獲得のマーカーの決定に及び、二次治療におけるbevacizumab継続投与の意義についても調査を検討している。

要 約

今回の報告では、bevacizumabの抗腫瘍効果（有効性）と血管新生因子（バイオマーカー）を解析し、今後のbevacizumabの効果予測マーカーと耐性獲得のマーカーの決定に至るために初段階の研究成果を報告した。本件研究は途中段階であり、長期の期間を要するため、意義のある結論を導き出すにはさらなる期間を要するが、今後の研究に十分繋がる結果を得ることができた。すなわち、血清SDF-1値とVEGF-C値は、血管新生阻害の状況を反映している可能性が示唆された。今後の拡大した解析により、より明確な結果が得られるものと思われる。さらにbevacizumabは初回治療から二次治療までを継続して投与することが大腸癌においては標準療法とされているため、血管新生阻害剤の効果予測のみならず、耐性機序についても本研究の結果が糸口になる可能性は高い。臨床レベルで血管新生阻害を継続し続けた場合の血管新生系マーカーの変化を長期的に観察した研究はほとんどないため、今後の本研究の最終解析に期待した。

文 献

1. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. J Clin Oncol 26: 2013-9,

2008

2. Suenaga M, Mizunuma N, Kobayashi K et al. Management of venous thromboembolism in colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Medical Oncology* 27: 807-14, 2010
3. Barnard K. Viewpoint: an explanation for the cardiovascular effects of bevacizumab and rofecoxib? *Circulation* 114: 173-5, 2006
4. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin J. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1512-20, 2000
5. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE et al. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 152: 1445-52, 1998
6. Suenaga M, Matsusaka S, Ueno M et al. Predictors of the efficacy of FOLFIRI plus bevacizumab as second-line treatment in metastatic colorectal cancer patients. *Surgery Today* 41: 1067-74, 2011
7. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438: 967-74, 2005
8. Shojaei F, Ferrara N. Refractoriness to antivascular endothelial growth factor treatment: role of myeloid cells. *Cancer Res* 68: 5501-4, 2008
9. Kopetz S, Hoff PM, Morris JS et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol* 28: 453-9, 2010
10. Suenaga M, Mizunuma N, Matsusaka S et al. Retrospective analysis on the efficacy of bevacizumab with FOLFOX as a first-line treatment in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* 2013, doi: 10.1111/ajco.12094.