

## ヒト卵巣腫瘍ならびに類腫瘍病変における血管内皮増殖因子(VEGF)の発現とそのサブタイプの発現様式およびその受容体について

埼玉医科大学医学部産婦人科学教室 (主任: 畑 俊夫教授)

石 井 康 徳

### Expression and Subtype Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (flt-1) in Human Ovarian Tumors

Yasunori ISHII

*Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Saitama Medical School, Saitama  
(Director : Prof. Toshio Hata)*

**概要** 血管新生は個体の発生や創傷の治癒などに重要であるばかりでなく、腫瘍組織への酸素や栄養供給などの点から、腫瘍の増大にも関与していることが知られている。そこでわれわれは種々ある血管新生関連因子の中でも血管内皮細胞に特異的に作用するとされている VEGF に注目し、卵巣腫瘍13例および正常卵巣3例より抽出した Total RNA を用いて PCR 解析および Northern blot 解析にてその発現を調べた。また、VEGF は現在までにアミノ酸数121(I)・165(II)・189(III)・206(IV)の四つのサブタイプが報告されているので、その発現様式も検討した。正常卵巣および卵巣腫瘍における VEGF の発現量を Northern blot 解析でみると卵巣腫瘍では13例中10例(約77%)に正常卵巣よりも明らかに高い VEGF の発現が認められた。またサブタイプの発現は、I型、II型、III型、を認めたがIV型は認められず、その量を比較するとI型>II型>III型の順であった。また、VEGF の受容体である flt-1は卵巣腫瘍の Total RNA による Northern blot 解析ではほとんど検出されず、PCR 解析において検出・確認された。一方、VEGF 関連の新しいリガンドである PlGF や flt 関連の新しい受容体である KDR/flk-1も Northern blot 解析ではほとんど検出されず、PCR 解析において検出・確認された。これらの結果は卵巣腫瘍血管新生に VEGF/flt-1パラクライン系が関与していることを示唆するものと思われる。

**Synopsis** Angiogenesis is very important not only for embryogenesis and wound healing but also for tumor growth in vivo because vessels supply oxygen and nutrition to the tumor mass. In this study, we focused on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), a newly characterized endothelial-specific growth factor and investigated the expression of VEGF in 13 ovarian tumors and 3 normal ovaries by using polymerase chain reaction (PCR) analysis and Northern blot analysis. Further, we examined the expression pattern of 4 alternatively spliced forms of VEGF in these tissues. The level of VEGF mRNA was higher in 77% of ovarian tumors when compared with that in normal ovaries. Among subtypes of VEGF, 121-, 165- and 189-amino acid types were detected but 206-amino acid type was not observed in ovarian tumors. The most abundant form of VEGF was 121-amino acid type and the relative amounts of the various forms of VEGF were 121-amino acid type>165-amino acid type>189-amino acid type. Expression of flt-1, a receptor for VEGF was detectable by PCR but not by Northern blot analysis. These results suggest that like other epithelial cell-derived carcinomas, ovarian tumors use the VEGF/flt-1 system for tumor angiogenesis.

**Key words:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) • Placenta growth factor (PlGF) • fms like tyrosin kinase-1 (flt-1) • Kinase insert domain-containing receptor (KDR) • Ovarian tumor

## 緒言

血管新生は、以前は動物の発生や成長に伴う血管網の発達、また月経における子宮粘膜での周期的な血管網の増生や退縮、胎盤形成や組織の再生に伴う血管網の発達など、生理的な現象においてのみ重要なものと考えられていた<sup>1)2)</sup>。ところが、1971年に Folkman が“腫瘍組織が一定の大きさを超えて発育増殖して行くためには栄養血管が侵入してくることが必須であり、さらにこのためには腫瘍由来の生理活性物質が重要な役割を果たしている”ことを示して以来、腫瘍における血管新生の重要性が注目を浴びるようになった<sup>3)</sup>。さらに、1972年にヒト臍帯静脈由来の内皮細胞の培養が紹介されてからは、内皮細胞の機能を *in vitro* で研究することが可能となり血管新生に関する研究は飛躍的な進歩を遂げてきており、現在までに数々の増殖因子が見つかり、また解析されてきている。そしてこれらのなかでも特に内皮細胞にだけ特異的に作用するとされているのが血管内皮増殖因子 (VEGF) である<sup>4)~11)</sup>。これはウシ下垂体の星状濾胞細胞から分泌される内皮細胞の増殖因子として、また腫瘍細胞を腹腔内に注入した実験動物の腹水の中から血管の透過性を亢進させる因子として報告されたもので<sup>6)7)</sup>、各細胞株や組織における発現が詳しく調べられている<sup>8)</sup>。現在ヒトの腫瘍では脳腫瘍(多型膠芽腫)などに発現していることが判明しており、*in vivo* においてその増殖に関与していることがすでに報告されている<sup>9)</sup>。しかし、婦人科領域における腫瘍での発現報告はいまだなく、われわれはこれが卵巣腫瘍の血管新生にも関与しているのではないかと考え、手術により摘出された卵巣腫瘍組織をもとに、この VEGF とその受容体である flt-1, ならびにそれらに関連する新しいリガンドである PIGF, KDR/flk-1 の発現について、以下の方法にて解析を行った。

## 研究対象および方法

### I. 対象

対象は、関連施設病院にて開腹手術が施行され、病理組織学的に確定診断が得られた表層上皮性・間質性腫瘍10例、性索間質性腫瘍1例、胚細胞腫

表1 対象として用いた卵巣腫瘍ならびに類腫瘍病変患者13名の病理組織診断およびその病期を示す。

No.	Pathological Diagnosis	Stage
1	Fibroma	
2	Clear cell adenocarcinoma	IIc
3	Clear cell adenocarcinoma	Ia
4	Mucinous cystic tumor, LPM	Ia
5	Endometrioid adenocarcinoma	Ib
6	Malignant mixed epithelial tumor	IIIc
7	Serous papillary cystic tumor, LPM	Ia
8	Carcinoid, with cystic teratoma	Ia
9	Clear cell adenocarcinoma	Ic
10	Endometrial cyst	
11	Serous papillary cystic tumour (LPM)	Ic
12	Serous cystadenocarcinoma	Ib
13	Serous papillary cystadenocarcinoma	IV

瘍1例、類腫瘍病変1例、および広汎性子宮全摘術により摘出された卵巣で肉眼的に明らかに正常と思われる部位より採取した正常卵巣3例である。卵巣組織の使用にあたっては日本産科婦人科学会倫理規定に従った。各症例の組織型は表1に示す。

### II. RNA 抽出

手術摘出材料は、液体窒素にて瞬時に凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザーに保存したのち、グアニン・チオシアネート・フェノール・クロロホルム法により RNA を抽出した<sup>10)</sup>。

### III. Northern blot 解析

Total RNA は各試料とも  $20\mu\text{g}$  を用い、1%アガロース・ホルムアルデヒドゲルにて電気泳動し変性分離したのち、ナイロンシートに転写し UV イルミネーター (302nm) でクロスリンクさせた。ハイブリ液 ( $3\times\text{SSC}$ ,  $0.05\text{M}$  Tris-HCl pH 7.5,  $1\times\text{Denhardt}$ ,  $20\mu\text{g}$  キャリア-DNA,  $20\mu\text{g}$  キャリア-tRNA,  $1\text{mM}$  EDTA, 50%フォルムアミド) で1晩プレ・ハイブリダイゼーションを行い、その後プローブを加えたハイブリ液で2昼夜ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションの後、 $2\times\text{SSC}/1\times\text{Denhardt}/1\%\text{SDS}$  液で  $37^{\circ}\text{C}$  1時間、次に、 $0.1\times\text{SSC}/1\%\text{SDS}$  液で  $50^{\circ}\text{C}$  1時間シートを洗う。さらに  $0.1\times\text{SSC}$  で軽く洗った後フィルターを乾燥させ、増感紙とともにフィルムをセットして  $-70^{\circ}\text{C}$  で1~7日間感光した<sup>11)</sup>。

VEGF のポジティブコントロールとして正常組織では胎盤, また細胞株ではヒト白血病細胞株 HL-60での発現が報告されており, これらを用いた。ネガティブコントロールとしてヒト白血病細胞株 K562を用いた。VEGF のプローブは VEGF cDNA の上流側約0.56kbp を用いた。

#### IV. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析

1 $\mu$ g の Total RNA に PCR buffer 10 $\times$  (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 100ng random hexmer (Boehringer Mannheim Yamanouchi, Tokyo), 80U RNase inhibitor (Promega, Madison, WI), 200U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (B, R, L), 40ng dNTPs Mixture を加えて42°C 1時間反応させる。さらにそこへ100 ng のプライマー, Taq polymerase を加え30サイクル (94°C 90sec, 55°C 90sec, 72°C 90sec) 反応させる。反応物質の1/10量を3%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドにて染色する。

VEGF プライマー: 5'-CCTCCGAAACCA-TGAACTTT-3', 5'-TTCCTGGTGAGAGATCTGG-3'

PIGF プライマー: 5'-GTGGTACCCTT-CCAGGAA-3', 5'-CTGCATGGTGACATTGGC-3'

flt-1 プライマー: 5'-ACTGGCTTCTACAGCTGCAA-3', 5'-AGAGTATGGCCTCTAAGTAA-3'

KDR プライマー: 5'-GAAGAGGATTC-TGGACTCTCTCT-3', 5'-AACAGGAGGAGAGCTCAGTGTGG-3'

#### V. オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション

RT-PCR 解析の反応物質を電気泳動したアガロースゲルからナイロンシートにDNAをうつし, UV イルミネーター (302nm) に照射しDNAをクロスリンクさせる。ハイブリ液で1晩プレ・ハイブリダイゼーションし, さらにハイブリ液にプローブを加え1晩ハイブリダイゼーションを行

う。プローブはまず VEGF のシーケンスをもとにして各エクソン内で20塩基対のオリゴヌクレオチドを合成し, その50ng を polynucleotide kinase 反応を用いて <sup>32</sup>P で5'末端に標識する。ハイブリダイゼーションの後のフィルターの洗浄およびフィルムの感光は Northern blot 解析のそれに従う。

### 結 果

#### I. VEGF の発現の解析

VEGF の発現を調べた Northern blot 解析の結果を示す。図1は正常組織5例, 図2は卵巣腫瘍13例の結果であり, どちらも上が VEGF を示している。どちらのシートも最も右側のレーンはポ

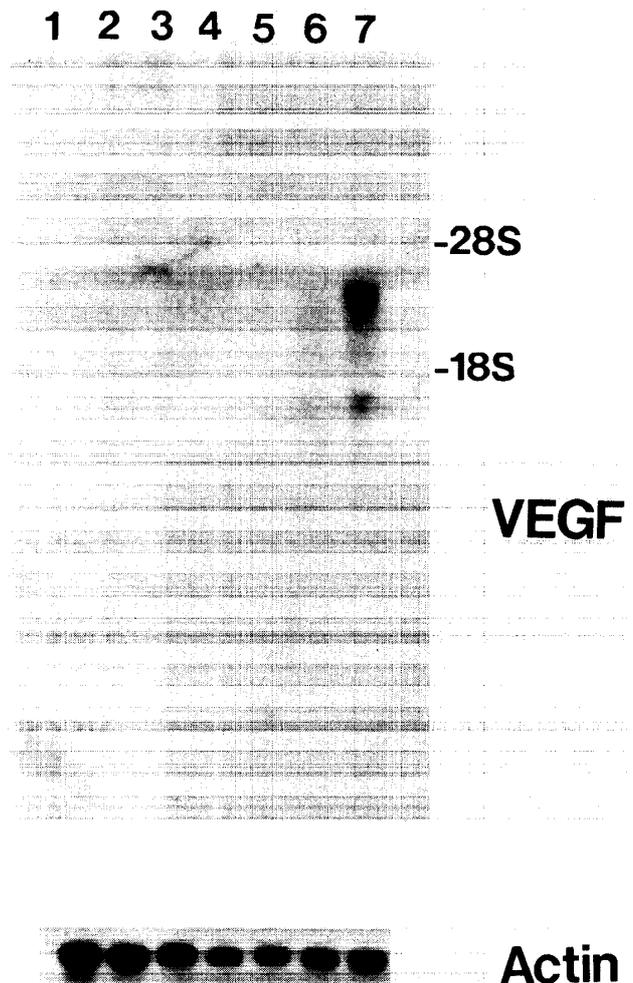


図1 正常組織における VEGF の Northern blot 解析。レーン1~2:ヒトの正常脳, レーン3~5:ヒトの正常卵巣, レーン6:ヒトの正常胎盤, レーン7:ヒト白血病細胞株 HL-60。写真上が VEGF を, 写真下が  $\beta$ -actin を示している。

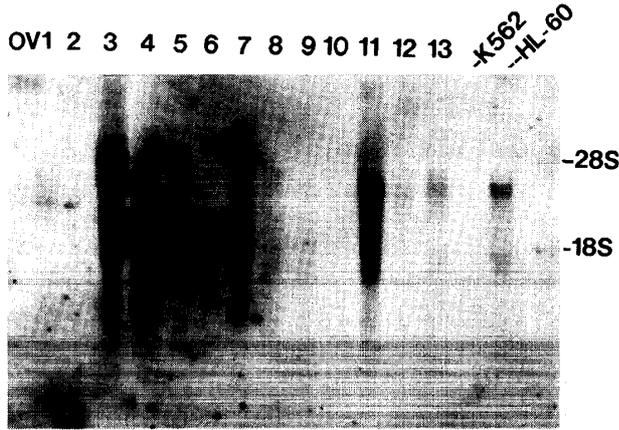


図2 卵巣腫瘍組織における VEGF の Northern blot 解析. レーン1~13はヒトの卵巣腫瘍を示す(組織型は表1). 写真上が VEGF の発現を表わし, 写真下は RNA をゲルにて変性分離した後, エチジウムブロマイドで染色したものを示す.

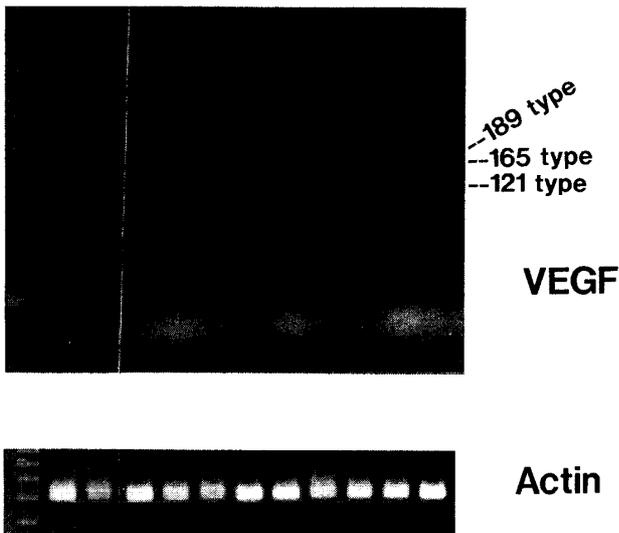


図3 卵巣腫瘍11例における VEGF の RT-PCR 解析. 上が VEGF を, 下が  $\beta$ -actin を示す. プライマーは, VEGF の5'側および3'側を用いた. レーン左は DNA ラダーで左より卵巣腫瘍の No. 1~11の結果を示す.

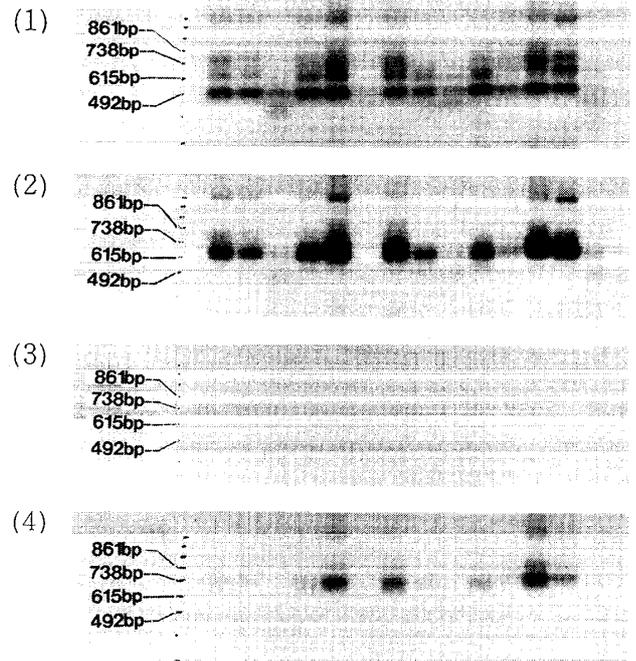


図4 オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション解析. エクソン6~9の各エクソンをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った結果を示す. (1) エクソン9, (2) エクソン8, (3) エクソン7, (4) エクソン6を示している.

ジタイプコントロールであり, HL-60細胞より抽出した Total RNA を20 $\mu$ g 用いた. これと同様の RNA を1 $\mu$ g 用いて行った RT-PCR 解析を図3に示す. 各レーンとも三つずつフラグメントが観察できる. 最も左側のレーンは123bp の DNA ラダーでそのサイズより, 三つのフラグメントはそれぞれ上段より約738, 615, 492bp 前後の長さのフラグメントであることが分かる. 次に, 発現しているサブタイプを明らかにするために行ったオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション解析の結果を図4に示す. (1)は VEGF のシーケンスをもとにエクソン9内で20塩基対のオリゴヌクレオチドを合成しそれを標識しプローブとしてハイブリダイゼーションを行ったもの, (2)はエクソン8を, (3)はエクソン7を, (4)はエクソン6をそれぞれ同様にプローブとしたものでハイブリダイゼーションしたものである.

## II. VEGF 関連遺伝子 PlGF の発現の解析

VEGF 関連の新しいリガンドとして最近報告された PlGF について行った Northern blot 解析

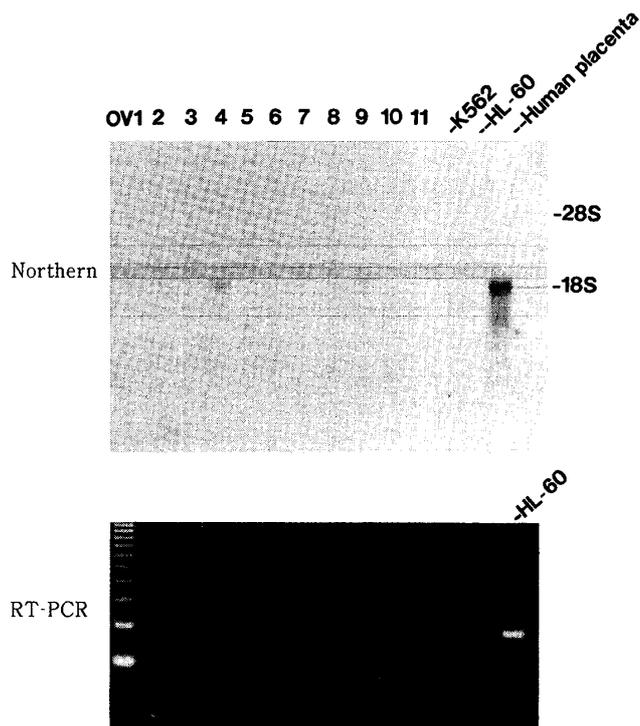


図5 卵巣腫瘍組織における PIGF の発現。写真上が Northern blot 解析で、写真下が RT-PCR 解析の結果を示す。レーン 1~11 が卵巣腫瘍で (組織型は表 1), コントロールとして K562, HL-60 そしてヒトの胎盤を用いた。

の結果を図 5 の上段に示す。プローブは PIGF の全長約 0.6kb を用い最も右側にはポジティブコントロールとしてヒトの胎盤の Total RNA を 20  $\mu$ g 流してある。Northern blot 解析と同様の RNA を 1  $\mu$ g 用いて行った RT-PCR 解析の結果を下段に示す。約 0.2kb の PIGF のバンドを全例において認めることができる。

### III. VEGF 受容体 flt-1 および KDR の発現の解析

次に VEGF の受容体である flt-1 および flt-1 関連の新しい受容体として最近報告された KDR/flk-1 について調べた。先に示した Northern blot 解析のシートを今度は flt-1 および KDR の細胞外領域をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行ったが、バンドはほとんどなにも検出されなかった。そこでこの RNA を 1  $\mu$ g 用いて RT-PCR 解析を行った結果を図 6 に示す。上段が flt-1 について行ったもので、下段が KDR について行ったものである。どちらもほぼ全例において

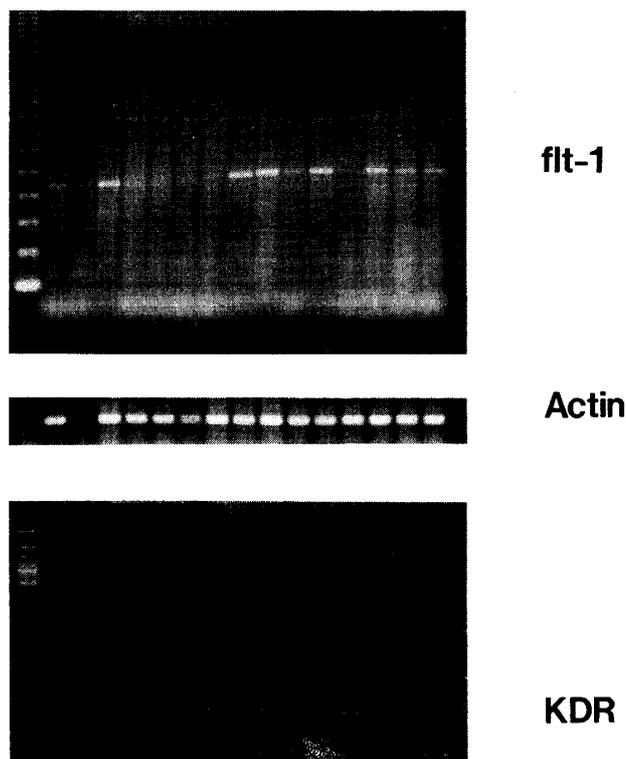


図6 卵巣腫瘍ならびに類腫瘍病変15例における flt-1 および KDR の RT-PCR 解析。写真上が flt-1 を、写真下が KDR を示す。写真中は、 $\beta$ -actin を示している。レーン左は 123bp の DNA ラダーで左より卵巣腫瘍の No. 1~11 の結果を示す。さらに右 2 レーンは clear cell adenocarcinoma 2 例を加えて検討した。

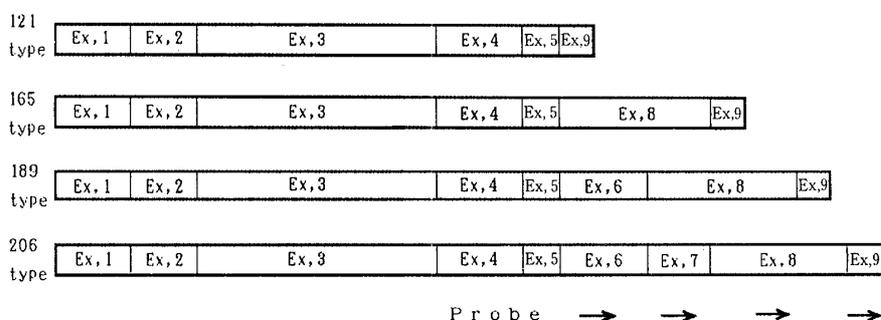
その発現が確認された。

### 考 察

Northern blot 解析の結果より、正常卵巣および卵巣腫瘍ともに VEGF が発現していることが分かるが、コントロールとしておいた HL-60 と比較することによって明らかに腫瘍組織での VEGF の発現が正常卵巣よりも高いことが分かる。これは全症例に対してではなかったが、13 例中 10 例 (約 77%) と高い割合で発現量が高値となっていること、また、そのなかでも類腫瘍病変である endometrial cyst (Case No. 10) や良性腫瘍である Fibroma (Case No. 1) での発現が低いことから *in vivo* における卵巣の腫瘍化、特に悪性化に VEGF が関与していることが強く示唆される。しかし、組織型と発現量の関係は明らかなのは認められず、境界悪性 3 例中 3 例 (Case No. 4, 7, 11) で悪性例よりもむしろ高い発現を認める

表2 VEGF の四つのサブタイプを模式的に示した。上段より、121アミノ酸タイプ、165アミノ酸タイプ、189アミノ酸タイプ、206アミノ酸タイプを表わしている。

## VEGF Subtype



ことから、VEGF の発現量は一般的な悪性度の指標にはならないものと思われる。

VEGF は alternative splicing によりサブタイプを持っているといわれており、現在までに四つのタイプが報告されている<sup>12)</sup>。卵巣腫瘍の RNA を用いた RT-PCR 解析ではどの症例もバンドは 3 本観察される。ここで用いた 5' 側および 3' 側プライマーは VEGF のサブタイプをそれぞれ、206 アミノ酸タイプは 768bp、189 アミノ酸タイプは 717bp、165 アミノ酸タイプは 645bp、121 アミノ酸タイプは 513bp のサイズのフラグメントとして検出することができる。このことよりおそらく最下段より 121 アミノ酸タイプ、165 アミノ酸タイプ、189 アミノ酸タイプと考えられるが、これだけでは断言できない。この 3 本が VEGF のサブタイプであることを確認するために行ったのがオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションである。表 2 に VEGF の四つのサブタイプを模式的に表わした。これをみて分かるように、VEGF のエクソン 9 は四つのサブタイプすべてに共通しており、このエクソン 9 内で作成したプローブと三つのバンドすべてがハイブリダイゼーションしていることから、これら三つのバンドは VEGF に間違いなことが分かる。同様に VEGF のエクソン 8 は、四つのサブタイプのうち 121 アミノ酸タイプだけが持っておらず、このエクソン 8 内で作成したプローブと上の二つのバンドだけがハイブリダイゼーションしていることより最下段のバンドが

121 アミノ酸タイプであることが分かる。エクソン 7 は四つのサブタイプのうち最長の 206 アミノ酸タイプだけがこれを持っておりこのエクソン 7 内で合成したプローブとハイブリダイゼーションしているバンドは観察されないことから、三つのバンドには 206 アミノ酸タイプは存在していないことが分かる。エクソン 6 は長い二つのサブタイプ、つまり 206 アミノ酸タイプと 189 アミノ酸タイプが持っており、このエクソン 6 内で合成したプローブとハイブリダイゼーションしているのは三つのバンドのうち最上段のバンドのみである。しかし、前述より三つのバンドの中には 206 アミノ酸タイプは存在していないことが分かっており、これらることより最上段のバンドは 189 アミノ酸タイプであることが分かる。以上の結果より卵巣腫瘍には 206 アミノ酸タイプを除く、189 アミノ酸タイプ、165 アミノ酸タイプ、121 アミノ酸タイプの三つのサブタイプが発現していることが判明した。さらにこれら三つのバンドは最下段が最もハイブリダイゼーションが強く次に中段が、そして最上段が最も弱くなっている傾向にあることが分かる。ハイブリダイゼーションによるバンドの強弱がサブタイプ間の発現量の比を表わすと考えられ、このことより卵巣腫瘍での VEGF のサブタイプの発現量の比は 121 アミノ酸タイプ > 165 アミノ酸タイプ >> 189 アミノ酸タイプであることが判明した。

ところが、このサブタイプ間での発現量の比較は、われわれがほかに行った脳腫瘍や甲状腺腫瘍

での実験結果とわずかながら違いが認められる。このような腫瘍系の違いによるサブタイプ間の発現量の比の違いは何を意味するのか、またこれら四つの VEGF のサブタイプは長さの違いによって生物活性に違いがあるのかなど詳しいことはまだ解明されておらず、これらは今後の研究課題である。

一方、VEGF 関連の新しいリガンドとして PlGF が<sup>13)14)</sup>、flt-1 関連の新しい受容体として KDR/flk-1 が報告されている<sup>15)~18)</sup>。これらの相互関係についても解明されておらず今後の研究課題であるが、これらの卵巣腫瘍における発現量を前述と同様の方法で調べてみたが、レセプターである flt-1, KDR は Northern blot 解析ではほとんど発現が認められず、RT-PCR 解析でのみ発現が認められた。flt-1 を初めとする VEGF 受容体の発現は内皮細胞に限局していることを考えると flt-1 や KDR などの受容体の発現量が低いのは予想された結果といえる。また、PlGF は VEGF と違い腫瘍においても発現量は非常に低いものであった。卵巣腫瘍11例中2例(約18%)でプローブとのハイブリダイゼーションを認めることができるものの、1例は非常に弱いものであるのに対して、コントロールのヒトの胎盤では非常に高い発現が認められる。このことは、PlGF が卵巣腫瘍の血管新生には関与していないことを強く示唆するものである。

現在までに VEGF は、多形膠芽腫や髄膜腫など腫瘍血管の豊富な癌を初めとして、多くの癌細胞から産生が認められている。また、腫瘍の産生する VEGF を抗体などで不活化し、それによって個体レベルの腫瘍の増殖を抑えようという試みがすでに始まっており、一定の効果のあることが報告されている<sup>19)20)</sup>。われわれの実験結果は、卵巣腫瘍の血管新生に VEGF/flt-1 パラクライン系が関与していることを示唆しており、このことは VEGF の抗体などを使った卵巣腫瘍の新しい治療方法としての可能性を意味するものと思われる。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜った畑 俊夫教授に深謝致しますとともに、本研究を遂行するうえで御協力を頂いた東京大学医科学研究所細胞遺伝学研究所の木

戸道子先生、山口幸子技官、沢野朝子技官、並びに御指導賜りました東京大学医科学研究所細胞遺伝学研究所教授の渋谷正史先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の一部は、第46回日本産科婦人科学会学術講演会、第52回日本癌学会学術講演会において発表した。

## 文 献

1. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 217—239
2. Bassett DL. The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am J Anat* 1943; 73: 251—291
3. Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182—1186
4. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculostellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7311—7315
5. Senger DR, Connolly DT, Van De Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and N-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990; 50: 1774—1778
6. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparinbinding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851—858
7. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983—985
8. Berse B, Brown LF, Van De Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 211—220
9. Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali U, Oldfield EH. Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 1993; 91: 153—159
10. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction.

- Analytical Biochemistry 1987 ; 162 ; 156—159
11. 北村忠久, 木村 穰, 小路武彦, 渋谷正史, 中根一穂. 改定版 *In situ* ハイブリダイゼーション手法. 東京: 学際企画, 1992 ; 40—63
  12. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Bing L, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family : Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991 ; 5 : 1806—1814
  13. Maglione DV, Guerriero V, Viglietto G, Bovi PD, Persico MG. Isolation of human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 9267—9271
  14. Maglione DV, Guerriero V, Viglietto G, Ferrare MG, Aprelikova O, Alitalo K, Vecchio SD, Lei KJ, Chau JY, Persico MG. Two alternative mRNA coding for the angiogenic factor placenta growth factor (PlGF) are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993 ; 8 : 925
  15. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushima H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosin kinase gene (flt) closely related to the *fms* family. *Oncogene* 1990 ; 5 : 519—524
  16. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosin kinase. *Oncogene* 1991 ; 6 : 1677—1683
  17. Terman BI, Vermazen MD, Camon Dimitrov D, Armellino DC, Gospodawicz D, Böhlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 187 : 1579
  18. Millauer B, Witzigmann S, Schnürch H, Martinez R, Møller N, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993 ; 72 : 835—846
  19. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*. *Nature* 1993 ; 362 : 841—844
  20. Kondo S, Asano M, Suzuki H. Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; 194 : 1234—1241

(No. 7575 平6・10・14受付)