

# 種々の正常細胞および腫瘍細胞における Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 受容体の発現ならびにヘパリンの同受容体機能に及ぼす影響

越 智 康

## Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Receptors on Various Normal Cells and Tumor Cells, and Effects of Heparin on the Receptor Function

Yasushi Ochi

(平成7年3月31日受付)

### 緒 言

腫瘍の増殖や転移の過程において血管新生は中心的な役割を演じている<sup>1-3)</sup>。この血管新生には、腫瘍細胞が自ら産生する腫瘍由来の血管新生因子が深く関与している。血管内皮細胞の増殖を促進する因子として、fibroblast growth factor-1, -2 (FGF-1, -2)<sup>1)</sup>, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>4-6)</sup>等が報告されており、特に FGF-1, -2 は有力な腫瘍性血管新生因子と考えられている<sup>1,7)</sup>。しかし FGF-1, -2 はシグナル配列を欠く非分泌型因子<sup>8-11)</sup>であること、さらに内皮細胞に対する特異性が低く、その活性を示す細胞が多種にわたること<sup>12)</sup>などから、腫瘍細胞は FGF 以外の分泌型血管新生因子を産生している可能性が考えられる<sup>13,14)</sup>。

著者の所属する研究室では、悪性腫瘍における血管新生機構を明らかにする目的で、ヒト扁平上皮癌細胞株 A431 由来の無蛋白無脂質条件で培養可能な細胞株 A431-AJC の培養上清から、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) の増殖促進活性を指標に蛋白因子を精製し、その N 末端アミノ酸配列から vascular endothelial growth factor (VEGF) であることを明らかに

した。また、その生物学的性質の検討および血管内皮細胞における受容体の解析を行った<sup>15)</sup>。

本研究においては、アミノ酸残基165個からなる遺伝子組換え型 VEGF (rVEGF<sub>165</sub>) を、バキュロウィルス発現系を用いて作製し、非内皮系細胞を含めた種々の細胞における VEGF 受容体の発現およびその機能解析を行った。

### 材料および方法

#### I. 細胞培養法

##### 1. 培地

RPMI 1640 培地<sup>16)</sup> とダルベッコ改変イーグル培地<sup>17)</sup> (DMEM) を 1 対 1 で配合した培地<sup>18,19)</sup> (以下 RD と略す), DMEM とハム F12 培地<sup>20)</sup> を 1 対 1 で配合した培地<sup>21,22)</sup> (以下 DF と略す), modified MCDB 153 培地<sup>23)</sup> (以下 mMCD 153 と略す) を用いた (以上極東製薬)。以上の粉末培地を脱イオン化および逆浸透により純化した水 (Puric model-S, オルガノ) に溶解後、アンピシリンナトリウムを 90 mg/L, 硫酸カナマイシンを 90 mg/L (以上明治製薬), ビルビン酸ナトリウムを 110 mg/L, さらに炭酸水素ナトリウム (以上和光純薬) を RD, DF に 2 g/L, mMCD 153 に 1.2 g/L 添加した。また N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes, 同仁化学) を RD に 15 mM, DF に 20 mM, mMCD 153 に 30 mM 添加し, pH 7.4 に調節した後, 0.2  $\mu$ m フィルター (Acrocap, Gelman Science Inc.) で濾過滅菌した。これらの基礎培地に、2-メルカプトエタノールを 10  $\mu$ M, 2-アミノエタノールを 10  $\mu$ M, セレン酸ナトリウムを 10

広島大学歯学部口腔外科学第一講座 (主任: 高田和彰教授) 本論文の要旨は平成5年10月の第46回日本細胞生物学会, 平成5年10月の第38回日本口腔外科学会総会, 平成5年12月の第16回日本分子生物学会, 平成6年4月の第67回日本組織培養学会, 平成6年10月の第53回日本癌学会総会, 平成6年11月の第39回日本口腔外科学会総会において発表した。

nM (以上片山化学), ウシインスリンを 10  $\mu\text{g/ml}$ , ヒトトランスフェリンを 5  $\mu\text{g/ml}$  加えた無血清培地 (以下 RD5F, DF5F, mMCDB 153 5F と略す) を用いた。

## 2. 細胞の培養法

### 1) 血管内皮細胞の分離および培養法

帝王切開時に得られたヒト臍帯 (広島記念病院野村博士より供与) より, 0.04%トリプシン (Difco), 0.05%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA; 同仁化学) による酵素剥離法<sup>24,25)</sup> にて臍帯静脈由来血管内皮細胞 (以下 HUVEC と略す) を分離し, Type-I コラーゲン (Cell-matrix type I-A, 新田ゼラチン) コートした 60 mm プラスチックディッシュ (60×15 mm Tissue

Culture Dish Falcon 3002, Becton Dickinson) に, RD5F に仔ウシ血清 (CS; HyClone Laboratories Inc.) を 10%, ウシ脳抽出液 (bovine brain extract; BBE)<sup>26)</sup> を 5  $\mu\text{g/ml}$ , ヘパリン (Hep; Sigma) を 10  $\mu\text{g/ml}$  添加した条件で初代培養を行った。実験には継代数 4 代から 6 代の細胞を用いた。

### 2) 種々の細胞の培養法

正常細胞としてヒト口腔粘膜由来上皮細胞 HK<sup>27)</sup>, ヒト歯肉由来線維芽細胞 HF を用いた。ヒト癌細胞として外陰部由来扁平上皮癌細胞 A431<sup>28)</sup>, および A431 のクローン A431-4<sup>29)</sup>, 無蛋白無脂質培養可能な A431 のクローン A431-AJC<sup>30)</sup>, 当科で樹立した口腔由来扁平上皮癌細胞 Kan<sup>30)</sup>, Nak<sup>31)</sup>, Ued<sup>31)</sup>, Nis, Kon を,

表 1 用いた細胞および培養液

Cells and Cell lines	Medium and Factors	
	Culture	Experiments
Human epithelial cell		
HK (oral keratinocyte)	mMCDB153 5F BBE	mMCDB153 5F
Human vascular endothelial cell		
HUVEC (umbilical vein)	RD 5F 10% CS BBE Hep	RD 5F 10% CS
Human fibroblast		
HF (oral)	RD 5% CS	RD 5F
Human squamous cell carcinoma		
A431 (vulval)	DF 5% CS	DF 5F
A431-4 (vulval)	DF 5% CS	DF 5F
A431-AJC (vulval)	DF	DF
Kan (oral)	RD 5% CS	RD 5F
Nak (oral)	RD 5% CS	RD 5F
Ued (oral)	RD 5% CS	RD 5F
Kon (oral)	DF	DF
Nis (oral)	RD 5% CS	RD 5F
Human adenocarcinoma		
HSY (salivary gland)	RD 5% CS	RD 5F
HSG (salivary gland)	RD 5% CS	RD 5F
MCF-7 (mammary)	DF 5% CS	DF 5F
ACC (oral)	RD/mMCDB153 (1/1)5F	RD/mMCDB153 (1/1)5F
Human hepatocarcinoma		
HepG2 (liver)	DF 5% CS	DF 5F
Human malignant melanoma		
MM (oral)	DF 5F 2% CS	DF 5F
Mouse fibroblast		
Balb/c 3T3 A31-1-1	DF 5% CS	DF 5F
TR-4	DF 5% CS	DF 5F

実験に用いた細胞を示し, ( ) 内にその細胞の由来を示す。継代培養は Culture に示した条件で行い, 実験は Experiments に示す培養条件で行った。

RD; RPMI1640培地/ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (1:1). DF; ハム F12 培地/DMEM (1:1). mMCDB153; modified MCDB153 培地。

5F; 10  $\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノール, 10  $\mu\text{M}$  2-アミノエタノール, 10 nM セレン酸ナトリウム, 10  $\mu\text{g/ml}$  ウシインスリン, 5  $\mu\text{g/ml}$  ヒトトランスフェリン。

CS; ウシ血清. BBE; 5  $\mu\text{g/ml}$  ウシ脳抽出液. Hep; 10  $\mu\text{g/ml}$  ヘパリン。

唾液腺由来腺癌細胞として顎下腺由来 HSG<sup>32)</sup> および耳下腺由来 HSY<sup>33)</sup> (徳島大学口腔外科学第二講座佐藤光信教授より供与)、当科で樹立した腺様嚢胞癌由来細胞株 ACC、悪性黒色腫由来細胞株 MM、乳腺由来腺癌 MCF-7<sup>34)</sup>、また肝癌細胞 HepG2<sup>35,36)</sup> (Texas A & M University、菅幹雄博士より供与) を用いた。マウス細胞株として Balb/c 3T3 A31-1-1 (A31-1-1)<sup>37,38)</sup> およびその変異株 TR-4<sup>39)</sup> を用いた。これらの細胞の継代は CS 添加あるいは無血清培養条件で行い、実験は無血清条件で行った (表 1)。静置培養は TE HER 型 CO<sub>2</sub> インキュベーター (平沢製作所) 中、5% CO<sub>2</sub> 37°C の条件で行った。

## II. ヒト遺伝子組換え型 VEGF (rVEGF<sub>165</sub>) の作製

VEGF の cDNA の塩基配列<sup>13,40)</sup> をもとに、全てのスプライシングバリエーションに保存されている 5' 末端と 3' 末端配列に対応するプライマーを ABI-381A (Applied Biosystems) により合成した。5' 末端側は (5'-CGT GGA TCC GCA CCC ATG GCA GAA GGA GG-3') で BamHI 制限酵素切断部位を付加した。3' 末端側は (5'-GAT GAA TTC CTC ACC GCC TCG GCT TGT CAC-3') で EcoRI 制限酵素切断部位を付加した。A431-AJC 細胞からの全 RNA の抽出は以下の方法で行った。A431-AJC 細胞を 4 M チオシアン化グアニジン (Fluka) で処理後、2 M 酢酸ナトリウム (pH 4) を 0.1 倍量 (0.1 vol) 加え、さらに 1 vol フェノール、0.2 vol クロロホルム、0.004 vol イソアミルアルコールを加え遠心した。次に水相に 1 vol イソプロパノールを加えてさらに遠心後、その沈殿物を 75% エタノール (以上和光純薬) で洗浄し total RNA を調整した<sup>41)</sup>。1 μg の total RNA を GeneAmp TMRNA PCR Kit (宝酒造)、DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Cetus) を用いて 42°C 15分で逆転写した後、先のプライマーを用いて 95°C 1分 (1 サイクルのみ 2分)、55°C 1分、70°C 1分 (最後のサイクルのみ 7分) にて 40 サイクル Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)<sup>42)</sup> を行った。得られた PCR 産物から、165 個のアミノ酸残基からなる VEGF をコードする cDNA をクローニングし、バキュロウイルストランスファクター pVL 1392 (BACULO GOLD Transfection Kit, PharMingen) に組み込み、昆虫細胞 Sf9 (PharMingen) を用いてヒト遺伝子組換え型 VEGF (rVEGF<sub>165</sub>) を発現させた。同 Sf9 の培養上清をヘパリンセファロース CL-6B (Pharmacia) を用いたヘパリンセファロースアフィニティークロマトグラフィーおよび逆相系高速液体クロマトグラフィー

(Vydac C<sub>4</sub> HPLC column 0.45 × 25 cm, Vydac the Separation Group、液体クロマトグラフシステム L-6200、日立) にて精製した。

## III. sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) による解析

サンプルを、非還元および 0.1 M ジチオトトレイ トール (DTT) による還元下にて、サンプルバッファー (0.0625 M Tris-HCl; pH 6.8, 2% 硫酸ドデシルナトリウム, 10% グリセリン, 0.001% ブロムフェノールブルー) (以上和光純薬) を添加し、100°C 4 分間処理した後、電気泳動 (SDS-PAGE)<sup>43)</sup> を行った。

## IV. 増殖促進活性試験

HUVEC を RD5F 10% CS の条件で、Type-I コラーゲンコートした 24 well プラスチックプレート (24 well Multiwell Tissue Culture Plate Falcon 3047, Becton Dickinson) に 1 × 10<sup>4</sup>/well の細胞密度で植え込み、5% CO<sub>2</sub> 37°C の条件下静置培養を行った。24 時間後、各サンプルを添加し、5% CO<sub>2</sub> 37°C の条件下さらに 4 日間静置培養した。細胞数は 0.04% トリプシン、0.05% EDTA にて細胞を分散後、コールターカウンター (Coulter Electronics) にて計測した。

rVEGF<sub>165</sub> ならびに FGF-2 (UBI)、ヘパリン (Sigma) をサンプルとして使用した。

## V. 細胞膜のヘパリンおよびヘパリン様分子の酵素処理

24 well プラスチックプレートに HUVEC, HK, HF, A431-4, Nak, MM を 1.5 × 10<sup>4</sup>/well の細胞密度でそれぞれの無血清培養条件で植え込み (表 1)、2 日後 RD バッファー (RD 培地, 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA; bovine serum albumin fraction V, Sigma), 25 mM HEPES; pH 7.4) にて 3 回洗浄後、RD バッファーに溶解した 0.05 U/ml ヘパリナーゼあるいは 0.05 U/ml ヘパリチナーゼ (以上生化学工業) で 37°C 1 時間処理し、実験に用いた。

## VI. rVEGF<sub>165</sub> の放射性ヨード標識

rVEGF<sub>165</sub> の放射性ヨード化は以下に示すクロラミン T 変法<sup>44)</sup> にて行った。

1 μg の rVEGF<sub>165</sub>, 37 MBq Na- [125I] (643.8 GBq/mg, Iodine-125 Radionuclide NEZ-033A10, NEN Research Products) を 10 μl の 0.5 M リン酸バッファー; pH 7.5 に加え 30 μl に調整後 100 μg/ml のクロラミン T (片山化学) を 5 μl 添加し、さらに 2 分後同クロラミン T を 5 μl 添加、さらに 1.5 分後同クロラミン

T を  $5 \mu\text{l}$  添加した。1 分後に  $50 \text{ mM}$  N-アセチルチロシン ( $0.01 \text{ M}$  Tris-HCl; pH 8.4) を  $20 \mu\text{l}$ ,  $60 \text{ mM}$  ヨウ化カリウム ( $0.05 \text{ M}$  リン酸バッファー; pH 7.5) を  $200 \mu\text{l}$ ,  $1.2 \text{ g/ml}$  尿素 ( $1 \text{ M}$  酢酸) を  $200 \mu\text{l}$  添加した。5 分後  $4 \text{ mM}$  塩酸,  $75 \text{ mM}$  塩化ナトリウム,  $0.1\%$  BSA で平衡化したセファデックス G-25 (Pharmacia) カラムにて放射性ヨード標識 rVEGF<sub>165</sub> (以下標識 rVEGF<sub>165</sub> と略す) を精製した。標識 rVEGF<sub>165</sub> の比活性は  $1.5 \times 10^5 \text{ cpm/ng}$  であった。

### VII. 受容体結合試験

Type-I コラーゲンコートした 48 well プラスチックプレート (48 well Multi Plate 48F, MS-80480, 住友ベメディカル) に細胞を  $1.5 \times 10^4/\text{well}$  の細胞密度で各無血清培養条件 (表 1) にて植え込み, 2 日後結合試験を行った。

種々の濃度の標識 rVEGF<sub>165</sub> およびヘパリンを加えて 4 時間氷上にて結合試験を行った。反応終了後, 細胞を RD バッファーにて洗浄し,  $1\%$  TritonX-100 (和光純薬) にて可溶化し, その放射活性をガンマカウンター (オートウェルガンマシステム, ARC-600, Aloka) にて測定した。

100 倍量の未標識 rVEGF<sub>165</sub> を加えた条件での結合を非特異的結合とし, 全結合量と非特異的結合量の差を特異的結合量として Scatchard 解析<sup>45)</sup> を行った。

### VIII. 標識 rVEGF<sub>165</sub> と受容体の架橋実験

Type-I コラーゲンコートしたプラスチックディッシュ ( $35 \times 14 \text{ mm}$  Sumiron Dish MS-10350, 住友ベメディカル) に, 各細胞を無血清培養条件 (表 1) で植え込み, 2 日後架橋実験<sup>46,47)</sup> を行った。

$10 \text{ ng/ml}$  の標識 rVEGF<sub>165</sub> を含む RD バッファーで細胞を 3 時間室温にてインキュベートした後, 細胞を RD バッファーで洗浄後,  $0.5 \text{ mM}$  disuccinimidyl suberate (DSS; Pierce) を含む  $20 \text{ mM}$  Hepes バッファー (pH 7.4) で 15 分間室温で架橋反応を行った。反応終了後, 反応停止バッファー ( $200 \text{ mM}$  グリシン,  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $1 \text{ mM}$  phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma),  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl; pH 7.4) にて反応停止し, 可溶性バッファー ( $1\%$  TritonX-100,  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $1 \text{ mM}$  PMSF,  $20 \text{ mM}$  Hepes; pH 7.4) で可溶化した。これを  $7.5\%$  SDS-PAGE 後, オートラジオグラフィーにて解析を行った。また VEGF-受容体複合体の放射活性をイメージスキャナー (BAS-2000, Fujix) により測定した。さらに, 同実験時に種々の濃度 (0, 1, 10,  $100 \mu\text{g/ml}$ ) のヘパリンを添加し比較検討を行った。

## 結 果

### I. rVEGF<sub>165</sub> の作製とその生物学的活性

バキュロウイルス発現系を用いて作製した rVEGF<sub>165</sub> は, ヘパリンセファロースアフィニティークロマトグラフィーおよび逆相系高速液体クロマトグラフィーで精製し, その挙動は A431-AJC 由来の VEGF と一致した。

その分子量は  $12\%$  SDS-PAGE の結果, 還元下で  $22 \text{ kDa}$ , 非還元下で  $44 \text{ kDa}$  を示し,  $22 \text{ kDa}$  のサブユニットからなる  $44 \text{ kDa}$  のホモダイマーであることが確認された (図 1)。

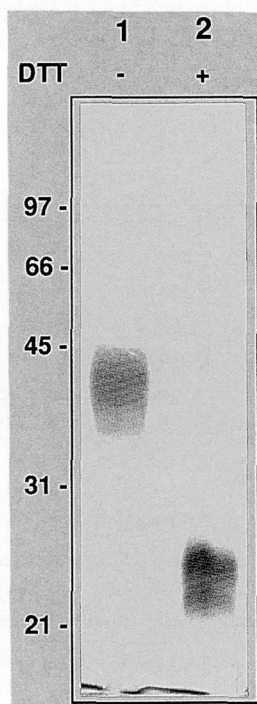


図 1 rVEGF<sub>165</sub> の SDS-PAGE よる解析結果。

rVEGF<sub>165</sub> ( $200 \text{ ng}$ ) を非還元下 (lane-1), および  $0.1 \text{ M}$  DTT 還元下 (lane-2) で  $12\%$  SDS-PAGE を行った後, silver stain を行った。左側数値は分子量マーカー (kDa) を示す。非還元下では  $44 \text{ kDa}$ , 還元下では  $22 \text{ kDa}$  を示した。

rVEGF<sub>165</sub> は濃度依存的に HUVEC の増殖を促進し,  $2.5 \text{ ng/ml}$  ( $57 \text{ pM}$ ) で  $\text{ED}_{50}$  を,  $10 \text{ ng/ml}$  ( $227 \text{ pM}$ ) で最大増殖促進活性を示した (図 2)。しかし, 正常上皮細胞, 線維芽細胞, 各種腫瘍細胞に対しては増殖活性を認めず, その活性は HUVEC に特異的であった (未発表データ)。

Scatchard 解析の結果, HUVEC では解離定数  $K_d$

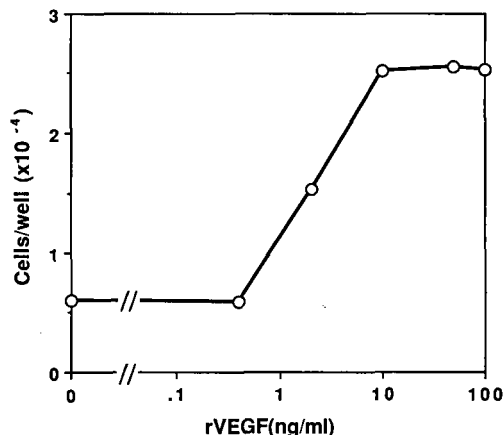


図2 rVEGF<sub>165</sub> の HUVEC に対する増殖促進活性。  
 $1 \times 10^4$ /well の HUVEC を植え込み、RD 5F 10% CS の条件下、0, 0.4, 2, 10, 50, 100 ng/ml の rVEGF<sub>165</sub> を添加して増殖促進活性試験を行い、1 well あたりの細胞数を示した。

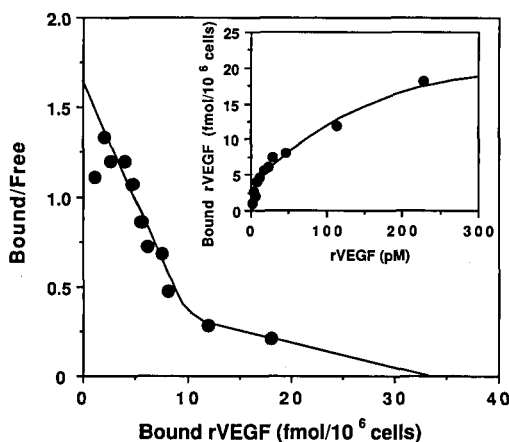


図3 rVEGF<sub>165</sub> の HUVEC における VEGF 受容体との結合能。

HUVEC に 0 ng/ml から 100 ng/ml (227 pM) の標識 rVEGF<sub>165</sub> を添加して結合試験を行った。また標識 rVEGF<sub>165</sub> に 100 倍量の未標識 rVEGF<sub>165</sub> を加えた条件での結合を非特異的結合とし、全結合と非特異的結合の差を特異的結合とし、rVEGF<sub>165</sub> の特異的結合飽和曲線を挿入図に示した。これを基に Scatchard 解析を行い、図に示した。

19pM を示す高親和性受容体が  $6.8 \times 10^3$ /cell, Kd 200pM を示す低親和性受容体が  $2.1 \times 10^4$ /cell 存在した (図3)。

これらの結果から、rVEGF<sub>165</sub> は A431-AJC より精製した VEGF と同様の生物学的活性を示すことが明らかとなった。

## II. rVEGF<sub>165</sub> の HUVEC 増殖促進活性における FGF-2 とヘパリンの相互作用

rVEGF<sub>165</sub> の HUVEC に対する増殖促進活性は、FGF-2 を 1 ng/ml あるいは 5 ng/ml 添加することにより相対的に増強された (図4-A)。また FGF-2 の HUVEC に対する増殖促進活性も、rVEGF<sub>165</sub> を 6 ng/ml あるいは 30 ng/ml 添加することにより、相対的に増強された (図4-B)。したがって、VEGF と FGF-2

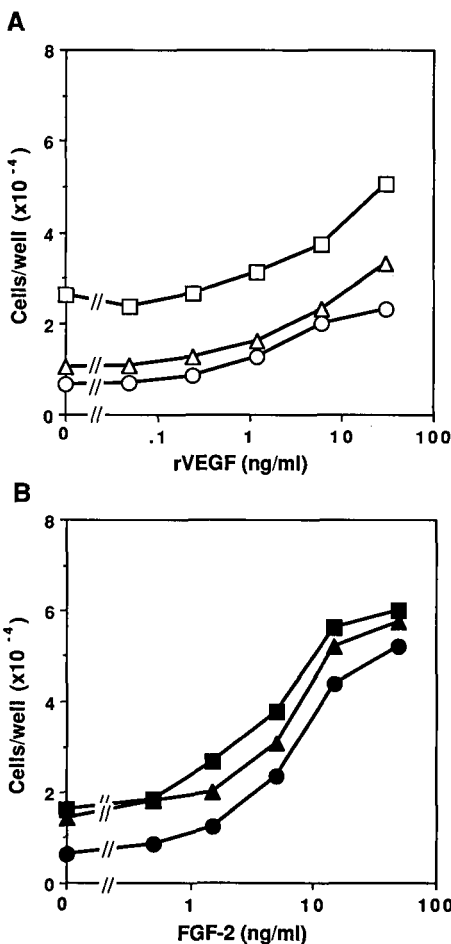


図4 rVEGF<sub>165</sub> の HUVEC 増殖促進活性に及ぼす FGF-2 の影響。

$1 \times 10^4$ /well の HUVEC を植え込み、RD 5F 10% CS の条件下、(A) 0, 0.048, 0.24, 1.2, 6, 30 ng/ml の rVEGF<sub>165</sub> にそれぞれ 0 ng/ml (○), 1 ng/ml (△), 5 ng/ml (□) の FGF-2 を添加、あるいは (B) 0, 0.5, 1.5, 5, 15, 50 ng/ml の FGF-2 にそれぞれ 0 ng/ml (●), 6 ng/ml (▲), 30 ng/ml (■) の rVEGF<sub>165</sub> を添加して増殖促進活性試験を行い、1 well あたりの細胞数を示した。

の血管内皮細胞に対する増殖促進活性は異なった系で作用していることが判明した。

また rVEGF<sub>165</sub> の HUVEC に対する増殖促進活性は、0.03 μg/ml, 3 μg/ml, 300 μg/ml のヘパリンで影響を受けなかった (図5)。したがって、ヘパリンは VEGF の HUVEC 増殖促進活性には直接関与していないことが判明した。

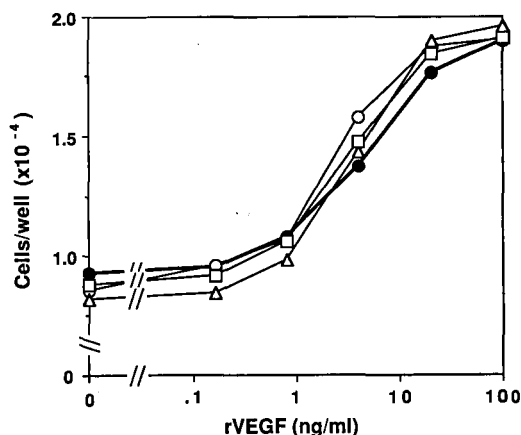


図5 rVEGF<sub>165</sub> の HUVEC 増殖促進活性に及ぼすヘパリンの影響。

1×10<sup>4</sup>/well の HUVEC を植え込み、RD 5F 10% CS の条件下、0, 0.16, 0.8, 4, 20, 100 ng/ml の rVEGF<sub>165</sub> にそれぞれ 0 ng/ml (●), 0.03 μg/ml (○), 3 μg/ml (△), 300 μg/ml (□) のヘパリンを添加して増殖促進活性試験を行い、1 well あたりの細胞数を示した。

### Ⅲ. 標識 rVEGF<sub>165</sub> と受容体との結合に及ぼすヘパリンの影響

HUVEC に対して種々の濃度のヘパリンを添加し、3 ng/ml の標識 rVEGF<sub>165</sub> と受容体との結合試験を行った結果、0.01 μg/ml のヘパリン添加で VEGF の結合能の増強を認め、1 μg/ml から 10 μg/ml のヘパリンでそれは最大に達した (図6)。さらに HK, HF, A31-1-1, TR-4, A431, A431-4, Kan, Nak, Ued, Kon, MM 細胞においても同様の結果を得た (図6, 表2)。

### Ⅳ. 標識 rVEGF<sub>165</sub> の結合に及ぼす細胞表面のヘパリンおよびヘパリン様分子の影響

各細胞をヘパリナーゼあるいはヘパリチナーゼ処理し、標識 rVEGF<sub>165</sub> と受容体との結合試験を行った結果、ヘパリナーゼ処理により HUVEC に対する rVEGF<sub>165</sub> の結合能は低下した。しかし結合試験パツ

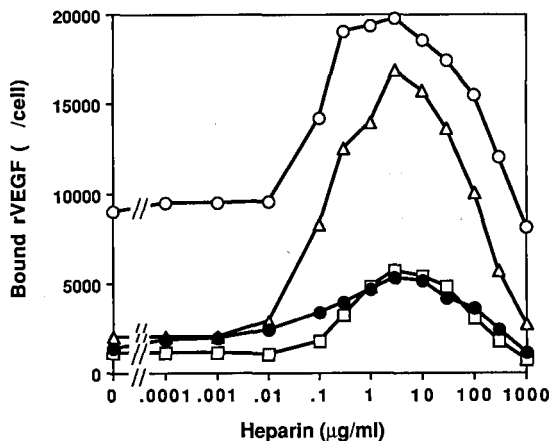


図6 rVEGF<sub>165</sub> の受容体への結合に及ぼすヘパリンの影響。

3.3 ng/ml の標識 rVEGF<sub>165</sub> および 0 μg/ml から 1,000 μg/ml の種々の濃度のヘパリンを添加した条件で結合試験を行い、1細胞あたりの標識 rVEGF<sub>165</sub> の特異的結合数を示した。標識 rVEGF<sub>165</sub> に100倍量の未標識 rVEGF<sub>165</sub> を加えた条件での結合を非特異的結合とし、全結合と非特異的結合の差を特異的結合とした。○; HUVEC. △; HF. □; MM. ●; A431-4.

表2 ヘパリンによる rVEGF<sub>165</sub>-受容体結合数の増加

Cell	Bound rVEGF
HK	2.00
HUVEC	2.20
HF	8.24
A31-1-1	4.23
TR-4	2.50
A431	2.00
A431-4	3.80
Kan	4.49
Nak	2.41
Ued	1.39
Kon	6.00
MM	5.02

種々の細胞を用いて、3.3 ng/ml の標識 rVEGF<sub>165</sub> および 0 μg/ml から 1,000 μg/ml の種々の濃度のヘパリンを添加した条件で結合試験を行い、ヘパリン非添加条件での特異的 rVEGF<sub>165</sub> 結合放射活性を1として、ヘパリン添加により増加した特異的 rVEGF<sub>165</sub> 結合放射活性の最大値 (1 μg/ml から 10 μg/ml のヘパリン添加時) を示した。

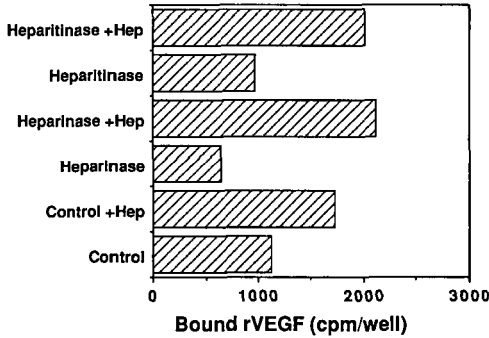


図7 rVEGF<sub>165</sub>のHUVECの受容体への結合に及ぼすヘパリンナーゼおよびヘパリンチナーゼ処理の影響。

細胞表面を未処理、ヘパリンナーゼ処理またはヘパリンチナーゼ処理したHUVECに、3.3 ng/mlの標識rVEGF<sub>165</sub>およびヘパリン非添加あるいは添加条件で結合試験を行い、1 wellあたりの特異的rVEGF<sub>165</sub>結合放射活性を示した。Control; 細胞表面未処理。Heparinase; 0.05 U/mlのヘパリンナーゼによる細胞表面処理。Heparitinase; 0.05 U/mlのヘパリンチナーゼによる細胞表面処理。+Hep; 結合バッファー中に1 μg/mlのヘパリン添加条件での結合試験。

表3 細胞表面のヘパリンおよびヘパリン様分子のrVEGF<sub>165</sub>-受容体結合に及ぼす影響

Treat	Control		Heparinase		Heparitinase	
	-	+	-	+	-	+
HUVEC	1	1.54	0.57	1.88	0.85	1.79
HK	1	1.79	0.75	1.80	0.74	1.75
HF	1	4.26	0.58	2.39	0.72	5.43
A431-4	1	2.68	0.75	2.94	0.51	4.35
Nak	1	1.79	0.18	1.90	0.59	2.09
MM	1	4.83	0.23	6.09	0.26	5.84

細胞表面を未処理、ヘパリンナーゼ処理またはヘパリンチナーゼ処理した種々の細胞に、3.3 ng/mlの標識rVEGF<sub>165</sub>およびヘパリン非添加あるいは添加条件で結合試験を行い、細胞表面を未処理かつヘパリン非添加条件での特異的rVEGF<sub>165</sub>結合放射活性を1として、各条件での特異的rVEGF<sub>165</sub>結合放射活性を示した。

Treat; Controlは細胞表面未処理群、Heparinaseは0.05 U/mlのヘパリンナーゼによる細胞表面処理群、Heparitinaseは0.05 U/mlのヘパリンチナーゼによる細胞表面処理群を示す。

Hep; (-)はヘパリン非添加、(+)は1 μg/mlのヘパリン添加条件での結合試験を示す。

ファー中に1 μg/mlのヘパリンを添加することによりrVEGF<sub>165</sub>の結合能は対照値まで回復した。またヘパリンチナーゼ処理によっても同様の結果を得た(図7)。HK, HF, A431-4, Nak, MMにおいても同様の結果を得た(表3)。

#### V. 種々の細胞におけるVEGF受容体の解析

受容体結合試験の結果をScatchard解析した結果、HUVECでKd 140 pMを示す受容体はヘパリン非添加では $1.4 \times 10^4$ /cell存在したが、1 μg/mlのヘパリン添加により $3.7 \times 10^4$ /cellに増加した。一方0.05 U/mlのヘパリンナーゼ処理により受容体数は減少したが、1 μg/mlのヘパリンを結合バッファー中に添加することでヘパリン添加時の受容体数に回復した。しかしKd値はいずれの条件でも変化しなかった(図8)。またHUVECのみならず、HF, A431-4, UedにおいてもVEGF受容体が存在することが判明した(図8)。

さらにHK, A31-1-1, TR-4, A431-AJC, Kan, Nak, Kon, MMにおいてもKd 130 pMから300 pMを示す受容体が存在することが判明した(表4)。HFとMMにはそれぞれKd 21 pMと38 pMの高親和性受容体が存在した。また、1 μg/mlのヘパリンによりこれら細胞のKd 130 pMから300 pMを示す受容体数

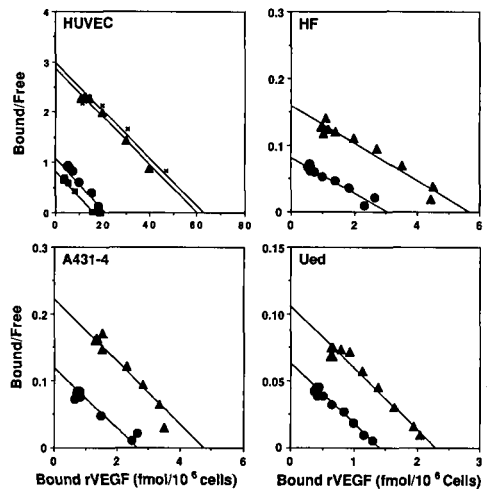


図8 標識rVEGF<sub>165</sub>を用いたVEGF受容体解析とそれに及ぼすヘパリンの影響。

HUVEC, HF, A431-4, Uedにおいて標識rVEGF<sub>165</sub>を用いた結合試験によるScatchard解析を行い、図に示した。

●, ▲; 細胞表面未処理群。■, ×; 0.05 U/mlのヘパリンナーゼによる細胞表面処理群。●, ■; ヘパリン非添加結合条件での結合試験群。▲, ×; 1 mg/mlのヘパリン添加条件での結合試験群。

表4 VEGF 受容体の標識 rVEGF<sub>165</sub> に対する親和性および受容体数とそれに及ぼすヘパリンの影響

	Affinity (Kd; pM)		Numbers (/cell)	
	High	Low	Hep(-)	Hep(+)
HK		303	4580	9910
HUVEC	19	140	13850	36720
HF	21	233	1810	3370
A31-1-1		277	120	1090
TR-4		160	570	1800
A431-4		142	1570	2830
A431-AJC		200	2400	1000
Kan		146	2700	5000
Nak		280	1500	2750
Ued		139	840	1390
Kon		250	1700	2390
MM	38		1000	1000

種々の細胞における Scatchard 解析の結果、およびヘパリン非添加あるいは添加 (1 μg/ml) 条件での低親和性受容体数を示した。

Affinity; High は高親和性受容体の Kd 値, Low は低親和性受容体の Kd 値を示す。

Numbers; Hep(-) は結合バッファー中にヘパリン非添加時, Hep(+) は結合バッファー中に 1 μg/ml のヘパリン添加時の 1 細胞あたりの低親和性受容体数を示す。

の増加を認めたが、その親和性は変化しなかった (表 4)。

#### VI. 標識 rVEGF<sub>165</sub> と各種細胞の VEGF 受容体との架橋実験

標識 rVEGF<sub>165</sub> を用いて各種細胞における VEGF 受容体との架橋実験を行った結果、HUVEC、MM では 230 kDa、190 kDa、140 kDa の、HF では 140 kDa の rVEGF<sub>165</sub>-受容体複合体を認めた (図 9)。さらに他の扁平上皮癌細胞および A31-1-1、TR-4 においても 140 kDa の rVEGF<sub>165</sub>-受容体複合体を認めた (非提示)。

同実験を 1 μg/ml のヘパリン添加条件で行った結果、これら複合体の放射活性の増加を認め (図 6-9, 表 2-4), 特にそれは 140 kDa の複合体において顕著であった (図 10)。

#### 考 察

腫瘍性血管新生は、腫瘍細胞の増殖や転移に重要な役割を果たしている<sup>1-3)</sup>。

著者の所属する研究室では、血管内皮細胞の増殖促進活性を指標に、外陰部由来扁平上皮癌細胞 A431-AJC の無蛋白無脂質培養上清より vascular endothelial

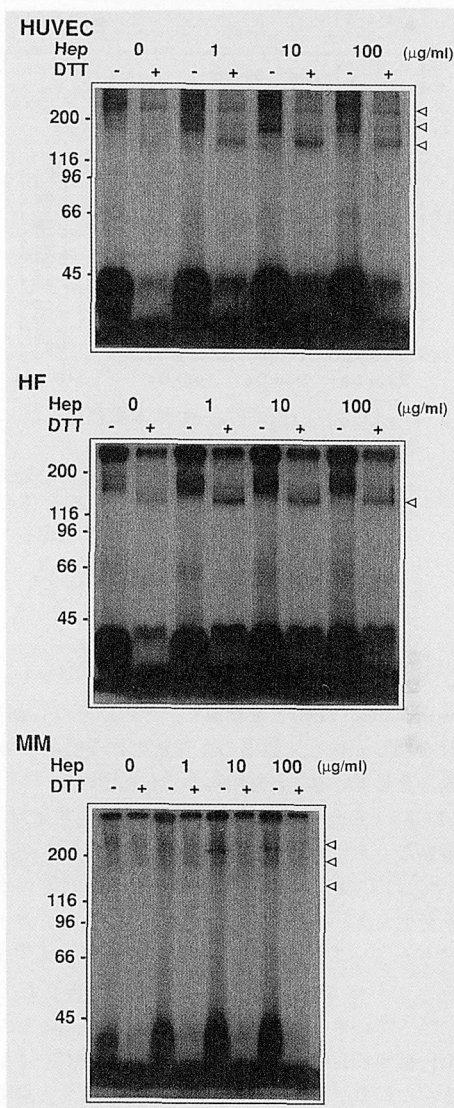


図 9 種々の細胞における架橋実験。

無血清培養条件で植え込んだ HUVEC、HF、MM に 10 ng/ml の標識 rVEGF<sub>165</sub> および種々の濃度のヘパリンを添加して架橋実験を行い、7.5% SDS-PAGE 後オートラジオグラフィーを行った結果を示した。

左側数値は分子量マーカー (kDa) を示し、還元下 HUVEC では 230, 190, 140 kDa, HF では 140 kDa, MM では 230, 190, 140 kDa を示す rVEGF<sub>165</sub>-受容体複合体を認め、ヘパリン添加によりこれら rVEGF<sub>165</sub>-受容体複合体、特に 140 kDa を示す rVEGF<sub>165</sub>-受容体複合体が増加した。

Hep; 数値は結合バッファー中に添加したヘパリンの濃度 (0, 1, 10, 100 μg/ml) を示す。DTT; (-) は非還元下, (+) は 0.1 M DTT による還元下での SDS-PAGE を示す。



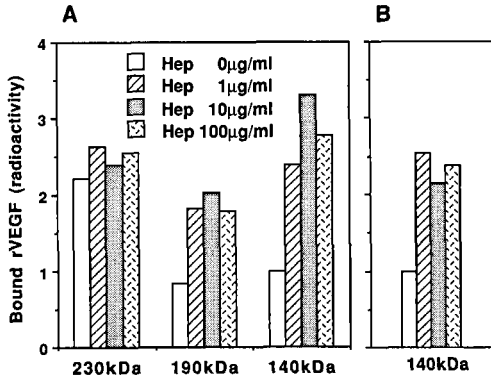


図10 ヘパリンの rVEGF<sub>165</sub>-受容体複合体に及ぼす影響。

HUVEC (A) および HF (B) を用いた架橋実験において、各 rVEGF<sub>165</sub>-受容体複合体の放射活性をイメージスキャナーにより測定し、ヘパリン非添加時での 140 kDa を示す rVEGF<sub>165</sub>-受容体複合体の放射活性を 1 とし、各条件での放射活性を示した。

growth factor (VEGF) を精製し、さらにその生物学的活性を明らかにし、腫瘍の血管新生に VEGF が重要な働きをしていることを明らかにした<sup>15)</sup>。

VEGF は Ferrara ら<sup>3)</sup> および Connolly ら<sup>48)</sup> より、分離精製された血管新生因子<sup>13,14)</sup> であり、*in vitro* においては内皮細胞の増殖を促進、*in vivo* においては血管新生および血管の透過性を亢進させることが明らかにされている。現在 VEGF には 5 種類のスプライシングバリエーションが存在することが報告されている<sup>13,40,49,50)</sup>。そのうち 165 個のアミノ酸残基よりなる VEGF は A431-AJC より分離精製した VEGF に相当する。これらバリエーションはそれぞれヘパリンに対する親和性が異なるが、血管内皮細胞の増殖促進活性を持ち<sup>51)</sup>、N 末端側にシグナル配列を有する分泌型の蛋白である。

今回作製した 165 個のアミノ酸残基からなるヒト遺伝子組換え型 VEGF (rVEGF<sub>165</sub>) は HUVEC に対して A431-AJC 由来 VEGF と同等の生物学的活性を示した。rVEGF<sub>165</sub> の HUVEC 増殖促進活性と FGF-2 のそれとは相加的であることが明らかとなり、VEGF は FGF とは独立して血管内皮細胞に働いていることが考えられた。

VEGF は内皮細胞に対して特異的に作用することから、その受容体は内皮系細胞に特異的に存在することが考えられたが、結合試験および架橋実験の結果から、内皮細胞の他に線維芽細胞、正常上皮細胞、各種扁平上皮癌細胞、各種腺癌細胞、悪性黒色腫細胞、

Balb/c3T3 細胞においても受容体が存在することが明らかとなった。しかしこれらの細胞に対して VEGF は増殖促進活性、DNA 合成促進活性を示さなかった。これらの結果は、細胞種によって VEGF 受容体の活性化機構および細胞内でのシグナル伝達機構が異なる可能性、さらに VEGF が増殖促進活性以外の未知の生物学的活性を持つ可能性を示唆している。

HUVEC をはじめ他の正常細胞および腫瘍細胞において、1 μg/ml から 10 μg/ml のヘパリンは VEGF の受容体への結合を増強し、さらにそれは親和性の変化を起さず受容体数のみを増加させた。Goren ら<sup>52,53)</sup> も悪性黒色腫細胞、HeLa 細胞、NIH3T3 において同様の結果を報告している。さらに Vaisman<sup>54)</sup> らはトニカマイシン処理により血管内皮細胞の VEGF 結合能が低下することを明らかにし、内皮細胞表面の糖鎖あるいは VEGF 受容体の糖鎖が VEGF と受容体の結合に関与している可能性を報告している。今回、HUVEC、MM、HF をヘパリナーゼあるいはヘパリチナーゼ処理することにより VEGF の結合能の低下を認めた。しかし酵素処理後ヘパリンを添加するとその結合能は回復した。これらの結果は、VEGF と受容体との結合に細胞表面のヘパリンあるいはヘパリン様分子が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

近年 colony stimulate factor-1 受容体<sup>55)</sup> および platelet derived growth factor (PDGF) 受容体<sup>56)</sup> をコードする *fms*<sup>57)</sup> と類似した *fms*-like tyrosine kinase (*flt*)<sup>58,59)</sup> がコードする蛋白 (FLT) が VEGF との結合能を有すること<sup>60)</sup> が報告された。さらに内皮系細胞よりクローニングされた *KDR/Flk-1*<sup>61,62)</sup> がコードする蛋白 KDR/FLK-1 も VEGF 受容体であることが報告された<sup>63,64)</sup>。FLT は細胞外領域に 7 つの immunoglobulin-like loops (IgLs) を持ち<sup>58,59)</sup>、さらに膜貫通領域に続いて細胞内領域に 2 つの tyrosine kinase domain、その間に kinase insert domain を持つ。著者は *flt* および *KDR*-mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて検討し、内皮細胞のみならず線維芽細胞や扁平上皮癌細胞、乳癌細胞、肝癌細胞、ACC、悪性黒色腫細胞も *flt* あるいは *KDR*-mRNA を発現していることを認めている (未発表データ)。これらの結果は VEGF 受容体が非内皮系の細胞にも存在することを強く示唆している。

FLT の細胞外領域の 7 つの IGLs のうち、1 番目から 5 番目までの IGLs は PDGF 受容体の IGLs と類似性が高い<sup>57,65)</sup>。また Kerdall ら<sup>66)</sup> は FLT の 1 番目から 6 番目の IGLs に相当する遺伝子組換え型 IGLs は VEGF の受容体結合を阻害し、さらにヘパリンと親和性を持つことを報告した。これらの報告は、細胞表面

のヘパリンおよびヘパリン様分子が VEGF 受容体の機能発現に重要な働きをしていること、さらに6番目の IgL が VEGF の結合に重要であることを示唆している。

VEGF 受容体が多種の細胞において存在することから、VEGF は細胞増殖促進活性以外に何らかの機能を有していることが考えられた。榎本ら<sup>67)</sup>は *v-src* 導入により癌化すると肺転移能の著しく異なる Balb/c3T3 A31-1-1 およびその変異株 TR-4 を用いて、*v-src* 導入前の両細胞における VEGF の作用を比較検討し、PDGF、インスリン等により誘導される細胞膜運動 (ruffling) の抑制の相違、細胞形態の変化 (rounding) の相違を示した。また彼らは VEGF が濃度依存的あるいは反応時間依存的に 160 kDa の蛋白のチロシンリン酸化を起こすことを明らかにした。

また著者は悪性黒色腫においても、VEGF 刺激により細胞の遊走能が亢進すること、さらに同細胞が *flt* および *KDR*-mRNA を発現していることを明らかにしている (未発表データ)。Clauss ら<sup>68)</sup>は VEGF がマクロファージや組織球の細胞遊走能および血液凝固に関与する蛋白因子の産生を促進することを報告している。また Brock ら<sup>69)</sup>は VEGF が HUVEC に対して Von Willebrand 因子の分泌を促進すること、Pepper ら<sup>70)</sup>は VEGF が HUVEC における plasminogen activator や plasminogen activator inhibitor-1 の産生を調節していることを報告している。以上の結果から、VEGF は血管新生因子として以外に、細胞骨格の変化や細胞運動に関与する motogen<sup>71,72)</sup> として、さらにそれ以外の未知の機能を有する増殖因子として働いていることが強く示唆された。

## 総 括

本研究により次の結論を得た。

1. バキュロウイルス発現系を用いて A431-AJC 由来 VEGF に相当する、アミノ酸残基165個からなるヒト遺伝子組換え型 VEGF (rVEGF<sub>165</sub>) を作製した。rVEGF<sub>165</sub> は A431-AJC 由来の VEGF と同等の HUVEC に対する増殖促進活性および受容体結合能を示した。

2. 放射性ヨード標識 rVEGF<sub>165</sub> を用いた受容体結合試験および架橋実験の結果、血管内皮細胞のみならず正常上皮細胞、線維芽細胞、扁平上皮癌細胞、唾液腺癌細胞、悪性黒色腫細胞でも VEGF 受容体が発現されていることが明らかになった。

3. ヘパリンは VEGF と同受容体との結合において、受容体の親和性を変化させず、その受容体数を増加させた。またヘパリナーゼおよびヘパリチナーゼ処

理により受容体数の減少を認めたことから、細胞表面のヘパリンあるいはヘパリン様分子が受容体の機能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

VEGF は、血管新生因子として以外に未知の機能を有していることが示唆された。

## 謝 辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った広島大学歯学部口腔外科学第一講座高田和彰教授に深厚なる謝意を表します。また、本研究において、始終御助言、御校閲を賜った本学歯科薬理学講座、土肥敏博教授ならびに本学口腔生化学講座、加藤幸夫教授に心から御礼申し上げます。

なお、本研究を進めるに際し多大の御配慮、御指導賜りました本学口腔外科学第一講座岡本哲治講師に深謝致します。また終始御協力を頂いた尾崎輝彦博士および坂本哲彦博士に心から御礼申し上げます。

最後に、本学口腔外科学第一講座の諸先生方に感謝致します。

## 文 献

- 1) Folkman, J. and Klagsbrun, M.: Angiogenic factors. *Science*, **235**, 442-447, 1987.
- 2) Folkman, J. and Shing, Y.: Angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10931-10934, 1992.
- 3) 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.
- 4) Plouët, J. and Gospodarowicz, D.: Transforming growth factor- $\beta_1$  positively modulates the bioactivity of fibroblast growth factor on corneal endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, **141**, 392-399, 1989.
- 5) Myoken, Y., Kan, M., Sato, G.H., McKeehan, W.L. and Sato, J.H.: Bifunctional effects of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) on endothelial cell growth correlate with phenotypes of TGF- $\beta$  binding sites. *Exp. Cell. Res.*, **191**, 299-304, 1990.
- 6) Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H. and Fauci, A.S.: Transforming growth factor type- $\beta$ : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4167-4171, 1986.
- 7) Schulze-Osthoff, K., Risau, W., Vollmer, E. and Sorg, C.: *In situ* detection of basic fibroblast growth factor by highly specific antibodies. *Am. J. Pathol.*, **137**, 85-92, 1990.

- 8) Wang, W.-P., Lehtoma, K., Varban, M.L., Krishnan, I. and Chiu, I.-M.: Cloning of the gene coding for human class I heparin-binding growth factor and its expression in fetal tissues. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 2387-2395, 1989.
- 9) Abraham, J.A., Whang, J.L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedman, J., Gospodarowicz, D. and Fiddes, J.C.: Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.*, **5**, 2523-2528, 1986.
- 10) Abraham, J.A., Mergia, A., Whang, J.L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K.A., Gospodarowicz, D. and Fiddes, J.C.: Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science*, **233**, 545-548, 1986.
- 11) Mignatti, P. and Rifkin, D.B.: Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism? *J. Cell. Biochem.*, **47**, 201-207, 1991.
- 12) Burgess, W.H. and Maciag, T.: The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 575-606, 1989.
- 13) Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.-J., Goeddel, D.V. and Ferrara, N.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, **246**, 1306-1309, 1989.
- 14) 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. *Science*, **246**, 1309-1312, 1989.
- 15) Myoken, Y., Kayada, Y., Okamoto, T., Kan, M., Sato, G.H. and Sato, J.D.: Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A-431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5819-5823, 1991.
- 16) Moore, G.E., Germer, R.E. and Franklin, H.A.: Culture of normal human leukocyte. *JAMA*, **199**, 519-524, 1967.
- 17) Dulbecco, R. and Freeman, G.: Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, **8**, 396-397, 1959.
- 18) Sato, J.D., Kawamoto, T. and Okamoto, T.: Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-Ag 8.653 mouse myeloma cells for growth in vitro. *J. Exp. Med.*, **165**, 1761-1766, 1987.
- 19) Myoken, Y., Okamoto, T., Osaki, T., Yabumoto, M., Sato, G.H., Takada, K. and Sato, J.D.: An alternative method for the isolation of NS-1 hybridoma using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse myeloma cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **25**, 477-480, 1989.
- 20) Ham, R.G.: An improved nutrient solution for diploid chinese hamster and human cell line. *Exp. Cell. Res.*, **29**, 515-526, 1963.
- 21) Barnes, D. and Sato, G.H.: Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*, **22**, 649-655, 1980.
- 22) Darmon, M., Serrero, G., Rizzino, A. and Sato, G.H.: Isolation of myoblastic, fibro-adipogenic and fibroblastic clonal cell lines from a common precursor and study of their requirements for growth and differentiation. *Exp. Cell. Res.*, **132**, 313-327, 1980.
- 23) Tsao, M.C., Walthall, B.J. and Ham, R.G.: Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. Cell. Physiol.*, **110**, 219-229, 1982.
- 24) Gimbrone, M.A. Jr., Cotran, R.S. and Folkman, J.: Human vascular endothelial cell in culture. *J. Cell. Biol.*, **60**, 673-684, 1974.
- 25) Maciag, T., Hoover, G.A., Stemerman, M.B. and Weinstein, R.: Serial propagation of human endothelial cell *in vitro*. *J. Cell. Biol.*, **91**, 420-426, 1981.
- 26) Crabb, J.W., Armes, L.G., Johnson, C.M. and McKeehan, W.L.: Characterization of multiple forms of prostatropin (prostate epithelial cell growth factor) from bovine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**, 1155-1161, 1986.
- 27) Osaki, T., Okamoto, T., Yabumoto, M., Myoken, Y. and Takada, K.: Effects of epidermal growth factor and fibroblast growth factor on the growth of normal epithelial cells and oral cancer cells in serum-free culture and the expression of growth factor receptor on the cells. *Jap. J. Oral-Maxillofacial Surg.*, **37**, 1454-1465, 1991.
- 28) Fabricant, R.N., DeLarco, J.E. and Todaro, G.J.: Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 565-569, 1977.
- 29) Buss, J.E., Kudlow, J.E., Lazar, C.S. and Gill, G.N.: Altered epidermal growth factor (EGF)-stimulated protein kinase activity in variant A431 cells with altered growth responses to EGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2574-2578, 1982.
- 30) Wu, D., Kan, M., Sato, G.H., Okamoto, T. and Sato, J.D.: Characterization and molecular cloning of binding protein for heparin-binding growth factors. *J. Biol. Chem.*, **266**, 16778-16785, 1991.
- 31) Miyauchi, S., Moroyama, T., Kyoizumi, S., Asakawa, J., Okamoto, T. and Takada, K.: Malignant tumor cell line produce interleukin-1-like factor. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **24**, 753-758, 1988.
- 32) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T.: A

- neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer*, **54**, 745-752, 1981.
- 33) Yanagawa, T., Hayashi, Y., Nagamine, S., Yoshida, S., Yura, Y. and Sato, M.: Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonal cells grown in athymic nude mice. *Virchows Arch. [B]*, **51**, 185-195, 1986.
  - 34) Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M.: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 1409-1416, 1973.
  - 35) Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. and Knowles, B.B.: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, **282**, 615-616, 1979.
  - 36) Kan, M., DiSorbo, D., Hou, J., Hoshi, H., Mansson, P.-E. and McKeehan, W.L.: High and low affinity binding of heparin-binding growth factor to a 130-kDa receptor correlates with stimulation and inhibition of growth of a differentiated human hepatoma cell. *J. Biol. Chem.*, **263**, 11306-11313, 1988.
  - 37) Enomoto, T. and Yamasaki, H.: Phorbol ester-mediated inhibition of intercellular communication in Balb/c 3T3 cells: relationship to enhancement of cell transformation. *Cancer Res.*, **45**, 2681-2688, 1985.
  - 38) Kakunaga, T. and Crow, J.D.: Cell variants showing differential susceptibility to ultraviolet light-induced transformation. *Science*, **209**, 505-507, 1980.
  - 39) Enomoto, T., Ayaki, H., Nakamori, S., Enomoto, Y., Inoue, H. and Kakunaga, T.: Novel non-tumorigenic cell variants showing potentially different susceptibility to v-src-induced metastasis. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 501-505, 1990.
  - 40) Tisher, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C. and Abraham, J.A.: The human gene for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **266**, 11947-11954, 1991.
  - 41) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159, 1987.
  - 42) Kawasaki, E.S., Clark, S.S., Coyne, M.Y., Smith, S.D., Champlin, R., Witte, O.N. and McCormick, F.P.: Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5698-5702, 1988.
  - 43) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685, 1970.
  - 44) Frolik, C.A., Wakefield, L.M., Smith, D.M. and Sporn, M.B.: Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor- $\beta$  in normal rat kidney fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **259**, 10995-11000, 1984.
  - 45) Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.*, **51**, 660-672, 1949.
  - 46) Massague, J.: Subunit structure of a high-affinity receptor for type  $\beta$ -transforming growth factor (evidence for a disulfide-linked glycosylated receptor complex). *J. Biol. Chem.*, **260**, 7059-7066, 1985.
  - 47) Massague, J. and Like, B.: Cellular receptors for type  $\beta$  transforming growth factor (ligand binding and affinity labeling in human and rodent cell lines). *J. Biol. Chem.*, **260**, 2636-2645, 1985.
  - 48) 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, isolation from U937 cells. *J. Biol. Chem.*, **246**, 20017-20024, 1989.
  - 49) Ferrara, N., Houck, K.A., Jakeman, L. and Leung, D.W.: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Reviews*, **13** (1), 18-32, 1992.
  - 50) 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.
  - 51) 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. Biol. Chem.*, **267**, 26031-26037, 1992.
  - 52) Gitay-Goren, H., Soker, S., Vlodavsky, I. and Neufeld, G.: The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J. Biol. Chem.*, **267**, 6093-6098, 1992.
  - 53) Gitay-Goren, H., Halaban, R. and Neufeld, G.: Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 702-709, 1993.
  - 54) Vaisman, N., Gospodarowicz, D. and Neufeld, G.: Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19461-19466, 1990.
  - 55) Yarden, Y., Kuang, W.-J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E.,

- Schlessinger, J., Francke, U. and Ullrich, A.: Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.*, **6**, 3341–3351, 1987.
- 56) Matsui, T., Heidaran, M., Miki, T., Popescu, N., Rochelle, W.L., Kraus, M., Pierce, J. and Aaronson, S.: Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science*, **243**, 800–804, 1989.
- 57) Hampe, A., Gobet, M., Sherr, C.J. and Galibert, F.: Nucleotide sequence of the feline retroviral oncogene *v-fms* shows unexpected homology with oncogenes encoding tyrosine-specific protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 85–89, 1984.
- 58) Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, 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.
- 59) Satoh, H., Yoshida, M.C., Matsushime, H., Shibuya, M. and Sasaki, M.: Regional localization of the human *c-ros-1* on 6q22 and *flt* on 13q12. *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 772–775, 1987.
- 60) Vries, C.D., 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*, **255**, 989–991, 1992.
- 61) 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.
- 62) Oelrichs, R.B., Reid, H.H., Bernard, O., Ziemiecki, A. and Wilks, A.F.: NYK/FLK-1: a putative receptor protein tyrosine kinase isolated from E10 embryonic neuroepithelium is expressed in endothelial cells of the developing embryo. *Oncogene*, **8**, 11–18, 1993.
- 63) Millauer, B., Wизigmann-Voos, S., Schnürch, H., Martinez, R., Mfler, N.P.H., Risau, W. and Ullrich, A.: High affinity VEGF binding and developmental expression suggest *Flk-1* as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, **72**, 835–846, 1993.
- 64) Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, 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.
- 65) Galland, F., Karamysheva, A., Pebusque, M.-J., Borg, J.-P., Rottapel, R., Dubreuil, P., Rosnet, O. and Birnbaum, D.: The *Flt-4* gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene*, **8**, 1233–1240, 1993.
- 66) Kerdall, 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.
- 67) Enomoto, T., Okamoto, T. and Sato, J.D.: Vascular endothelial growth factor induces the disorganization of actin stress fibers accompanied by protein tyrosine phosphorylation and morphological change in Balb/c3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 1716–1723, 1994.
- 68) Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Berett, J., Wang, F., Familletti, P.C., Pan, Y.-C.E., Olander, J.V., Connolly, D.T. and Stern, D.: Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.*, **172**, 1535–1545, 1990.
- 69) Brock, T.A., Dvorak, H.F. and Senger, D.R.: Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic  $Ca^{2+}$  and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am. J. Pathol.*, **138**, 213–221, 1991.
- 70) Pepper, N.S., Ferrara, N., Orchi, L. and Montesano, R.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 902–906, 1991.
- 71) Furlong, R.A., Takehara, T., Taylor, W.G., Nakamura, T. and Rubin, J.S.: Comparison of biological and immunochemical properties indicates that scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable. *J. Cell Sci.*, **100**, 173–177, 1991.
- 72) Weidner, K.M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandeckerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y. and Birchmeier, W.: Evidence for the identify of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7001–7005, 1991.