

## —原著—

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における血管内皮細胞増殖因子と血管内細胞増殖因子受容体の相互作用；VEGF-A および VEGF-C 刺激による mRNA 発現レベルの動態

金丸祥平<sup>1)</sup>, 中里隆之<sup>1)</sup>, 北村信隆<sup>2)</sup>, 新垣 晋<sup>1)</sup>, 齊藤 力<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻顎顔面再建学講座  
組織再建口腔外科学分野 (主任: 齊藤 力教授)

<sup>2)</sup> 新潟大学大学院医歯学総合研究科 地域疾病制御医学専攻  
総合医療評価学情報科学・統計学分野 (主任: 赤澤宏平教授)

Analysis of interaction effect between vascular endothelial growth factor and their receptors in human oral squamous cell carcinoma cell lines;

mRNA expression levels for VEGF-A and VEGF-C

Shohei Kanemaru<sup>1)</sup>, Takayuki Nakazato<sup>1)</sup>, Nobutaka Kitamura<sup>2)</sup>, Susumu Shingaki<sup>1)</sup>,  
Chikara Saito<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial Region, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction, Course for Oral Life Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences (Chief: Prof. Chikara Saito)*

<sup>2)</sup> *Division of Information Science and Biostatistics Department of Informatics and Pharmaceutics, Course for Community Disease Control, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences (Chief: Prof. Kohei Akazawa)*

平成 21 年 10 月 28 日受付 12 月 25 日受理

キーワード：口腔扁平上皮癌, VEGF-A, VEGF-C, VEGF 受容体

#### Abstract

Among in human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines HSC2, HSC-3, HSC-4, and OSC-19, HSC-2 and OSC-19 cell lines that were highly expressed VEGF-A mRNA showed high of VEGF-C mRNA expression. The purpose of the present study was to clarify that interaction of VEGF-A, VEGF-C, and VEGF receptors (VEGFR(VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3)) in human OSCC cell lines.

We investigated the expression of VEGFR in human OSCC cell lines (HSC-2, HSC-3, HSC-4, and OSC-19) by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Furthermore, whether the expression levels of VEGF-A, VEGF-C, and VEGFR mRNA may be changed adding the human recombinant VEGF-A and VEGF-C, we examined the expression levels of VEGF-A, VEGF-C, and VEGFR mRNA by real-time RT-PCR in cultured human OSCC cell lines.

In each cell line expression of VEGFR-1 mRNA was detected, however, that of VEGFR-2 and VEGFR-3 mRNA were not detected. Expression levels of VEGF-A, VEGF-C, and VEGFR-1 mRNA when added to human recombinant VEGF-A and VEGF-C did not have statistically significant differences.

In OSCC cell lines, the expression levels of VEGF-A, VEGF-C, and VEGFR did not have any correlations in each other.

Further studies were required to clarify the correlation of VEGF-A, VEGF-C, and VEGFR in human OSCC.

**Keywords:** Oral squamous cell carcinoma, VEGF-A, VEGF-C, VEGF receptors.

抄録：ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, OSC-19) において VEGF-A mRNA 発現量が高い細胞株 (HSC-2, OSC-19) では VEGF-C mRNA 発現量も高いとされている。そこで本研究は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における癌細胞が発現する VEGF-A, VEGF-C, および VEGF 受容体 (VEGFR (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3)) の相互作用を調べることを目的として行った。

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用い、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, OSC-19) における VEGFR 発現の有無を確認した。さらに4種全てのヒト口腔扁平上皮癌細胞株に外部刺激としてヒト recombinant VEGF-A および VEGF-C 添加することによる VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR mRNA 発現量の増加を real-time RT-PCR 法で定量した。

その結果 VEGFR は4種全てのヒト口腔扁平上皮癌細胞株において VEGFR-1 のみ発現しており、またヒト recombinant VEGF-A および VEGF-C 添加による VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR mRNA の発現量に明らかな相互作用はみられなかった。

このことからヒト口腔扁平上皮癌細胞株においては VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR mRNA 発現量に相互作用はないものと考えられた。

今後はヒトにおける口腔扁平上皮癌が発現する VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR の相互作用を明らかにするために、更なる研究が必要である。

## 【緒 言】

がんの増殖、浸潤、および転移には微小血管やリンパ管の増生が不可欠であり<sup>1)</sup>、血管新生およびリンパ管新生には血管内皮細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor-family (VEGF-A, -B, -C, -D), epidermal growth factor, interleukin-8, および angiopoietin などが関与している。なかでも VEGF-family は血管およびリンパ管の新生を制御する因子として中心的な役割を担っており<sup>2, 3)</sup>、その選択的受容体として血管内皮細胞増殖因子受容体 vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3)) が報告されている<sup>4)</sup>。この VEGFR は血管内皮細胞や、リンパ管内皮細胞に特異的に発現するといわれているが、がん細胞にも発現を認めるとの報告もある<sup>5-7)</sup>。また VEGF-A は VEGFR-1 および VEGFR-2 と結合して主に血管新生に関与し、VEGF-C は VEGFR-2 および VEGFR-3 と結合して主にリンパ管新生に関与するとされている<sup>3, 8-10)</sup>。中里ら<sup>11, 12)</sup> は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, OSC-19) において VEGF-A の発現と腫瘍内微小血管密度が、VEGF-C の発現とリンパ節転移が関連し、さらに VEGF-A の発現量が多い癌細胞株 (HSC-2, OSC-19) では VEGF-C の発現量も多い傾向にあることを報告している。

このことからヒト口腔扁平上皮癌において癌細胞が発現する VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR mRNA の間にはお互いの発現量を増加させるような相互作用があるものと考えた。そこでヒト口腔扁平上皮癌細胞株における VEGFR の発現の有無を、さらに VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR の相互作用を調べることを目的に以下の実験を行った。

## 【材料と方法】

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株として HSC-2, HSC-3, HSC-4 (東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより供与)、および OSC-19 (金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん細胞学講座細胞浸潤学分野より供与) を用いた。これらの細胞を  $\phi$  10mm のディッシュに  $2 \times 10^5$  cell を播種し、10% fetal bovine serum を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium 培地を用いて、5% CO<sub>2</sub> 存在下に 37℃ で7日間培養し、これを以下の3群に分けた。すなわち①基本培地のみの control 群 (以降 C 群)、②ヒト recombinant VEGF-A を 20ng/ml の濃度で培地に添加した VA 群、および③ 20ng/ml の濃度のヒト recombinant VEGF-C を培地に添加した VC 群とした。それぞれの細胞株から各10個の資料を作製し、これらを12時間培養した後、ISOGEN<sup>®</sup> (ニッポンジーン) を用いて total RNA の抽出を行い、total RNA 5  $\mu$ g を鋳型としランダムプライマーと逆転写酵素 (SuperScript II<sup>®</sup>, Invitrogen) を用いて cDNA を合成し、VEGF-A および VEGF-C mRNA 発現量の変化、ならびに VEGFR mRNA の発現について検討を行った。

### (1) VEGF-A および VEGF-C mRNA 発現量の変化

real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法 (Smart Cycler<sup>®</sup>, Cepheid) を用い、それぞれの細胞株における C 群, VA 群, および VC 群の VEGF-A, ならびに VEGF-C mRNA の発現量を定量した。PCR 法を用いた増幅は cDNA 2  $\mu$ l を含んだ反応混合物 (1  $\times$  R-PCR buffer (Mg<sup>2+</sup>-free), 3 mM Mg<sup>2+</sup> Solution for R-PCR, 0.3mM 各 dNTP, SYBR Green I, 0.05units/ $\mu$ l taq DNA polymerase (タカラバイオ),

表1 RT-PCR および real-time RT-PCR 用プライマー配列と条件

| Primer             |         | Sequence(5'-3')           | Annealing temperature(°C) | NO. of Cycles | Product Size(bp) |
|--------------------|---------|---------------------------|---------------------------|---------------|------------------|
| VEGF-A             | forward | AAGGAGGAGGGCAGAATCAT      | 68                        | 40            | 220              |
|                    | reverse | TGGTGATGTTTGGACTCCTCA     |                           |               |                  |
| VEGF-C             | forward | GGAGGCTGGCAACATAACAG      | 68                        | 40            | 164              |
|                    | reverse | ACGTCTTGCTGAGGTAGCTC      |                           |               |                  |
| VEGFR-1<br>(FLT-1) | forward | CAAGGAACCTCGGACAAGTCTAAT  | 68                        | 40            | 191              |
|                    | reverse | CGCTCACACTGCTCATCCAAAG    |                           |               |                  |
| VEGFR-2<br>(FLK-1) | forward | ATAGATGGTGTAAACCCGGAGTGAC | 62                        | 40            | 360              |
|                    | reverse | TGGGATTGGTAAGGATGACAGTGT  |                           |               |                  |
| VEGFR-3<br>(FLT-4) | forward | ATCCAGCGATTTCCGGGAGAG     | 68                        | 40            | 183              |
|                    | reverse | GGACAGTGCCTTTCCATCCTTG    |                           |               |                  |

10  $\mu$  M forward primer, 10  $\mu$  M reverse primer) 25  $\mu$  l の反応系で行った。なおプライマー配列および条件は表1に示した<sup>11,12)</sup>。目的遺伝子定量の基準となる標準曲線は目的とするPCR産物を挿入したプラスミドを $10^8 \sim 10^1$  molecules/ $\mu$  lに希釈して作図した。またプラスミドの作製にはTOPO TA クローニングキット<sup>®</sup> (Invitrogen) を使用した。

## (2) VEGFR mRNA の発現

1) HSC-2, HSC-3, HSC-4, および OSC-19 における VEGFR mRNA の発現

RT-PCR 法 (PCR Thermal Cycler 480<sup>®</sup>, タカラバイオ) を用いて, HSC-2, HSC-3, HSC-4 および OSC-19 における VEGFR mRNA 発現の有無を確認した。また PCR 法を用いた増幅は cDNA1  $\mu$  l を含んだ反応混合物 (10  $\times$  PCR Buffer, 2.5mM each dNTP Mixture for PCR, 5units/ $\mu$  l rTaq DNA polymerase (タカラバイオ), 10  $\mu$  M forward primer, 10  $\mu$  M reverse primer) 10  $\mu$  l の反応系で行い, 内部コントロールには GAPDH を用いた。プライマー配列および条件は表1に示した。

2) C 群, VA 群, および VC 群における VEGFR mRNA の発現量

RT-PCR 法で発現を認めた VEGFR mRNA について, real-time RT-PCR 法 (Smart Cycler<sup>®</sup>) を用いて C 群, VA 群, および VC 群における VEGFR mRNA の発現量を定量した。PCR 法を用いた増幅は cDNA2  $\mu$  l を含んだ反応混合物 (1  $\times$  R-PCR buffer (Mg<sup>2+</sup>-free), 3 mM Mg<sup>2+</sup> Solution for R-PCR, 0.3mM 各 dNTP, SYBR Green I, 0.05units/ $\mu$  l taq DNA polymerase (タカラバイオ), 10  $\mu$  M forward primer, 10  $\mu$  M reverse primer) 25  $\mu$  l の反応系で行った。なお real-time RT-PCR 用プライマー配列および条件は表1に示した。また目的遺伝子定量の基準となる標準曲線は目的とする PCR 産物を挿

入したプラスミドを $10^8 \sim 10^1$  molecules/ $\mu$  lに希釈して作図した。なおプラスミドの作製には TOPO TA クローニングキット<sup>®</sup> (Invitrogen) を使用した。

## 【結 果】

(1) VEGF-A および VEGF-C mRNA の発現量について

C 群, VA 群, および VC 群における VEGF-A mRNA の発現量の平均値を比較したところ, VA 群では C 群と比較して HSC-2 と HSC-4 でそれぞれ 1.15 倍, 1.3 倍と VEGF-A mRNA 発現量の軽度の増加を認めたが, HSC-3, および OSC-19 ではいずれも 0.87 倍と VEGF-A mRNA 発現量の減少を認めた。また VC 群では C 群と比較して HSC-2, HSC-4, および OSC-19 でそれぞれ 1.23 倍, 1.05 倍, 1.18 倍と VEGF-A mRNA 発現量の軽度の増加を認めたが, HSC-3 では 0.78 倍と発現量の減少を認めた (図1)。

C 群, VA 群, および VC 群における VEGF-C mRNA の発現量の平均値を比較したところ, VA 群では C 群と比較して HSC-2 と OSC-19 でそれぞれ 1.05 倍, 1.12 倍と VEGF-C mRNA 発現量の軽度の増加を認めたが, HSC-3, HSC-4 ではそれぞれ 0.74 倍, 0.88 倍で発現量の減少を認めた。また VC 群では C 群と比較して HSC-2 は 1.07 倍と VEGF-C mRNA 発現量の軽度の増加を認めたが, HSC-3 と HSC-4 ではそれぞれ 0.6 倍, 0.93 倍と発現量の減少を認めた (図2)。

しかし, すべての細胞株において 3 群間で VEGF-A および VEGF-C mRNA 発現量に有意差は認めなかった。

(2) VEGFR mRNA の発現について

1) HSC-2, HSC-3, HSC-4, および OSC-19 細胞株における VEGFR mRNA の発現について

すべてのヒト口腔扁平上皮癌細胞株において VEGFR-

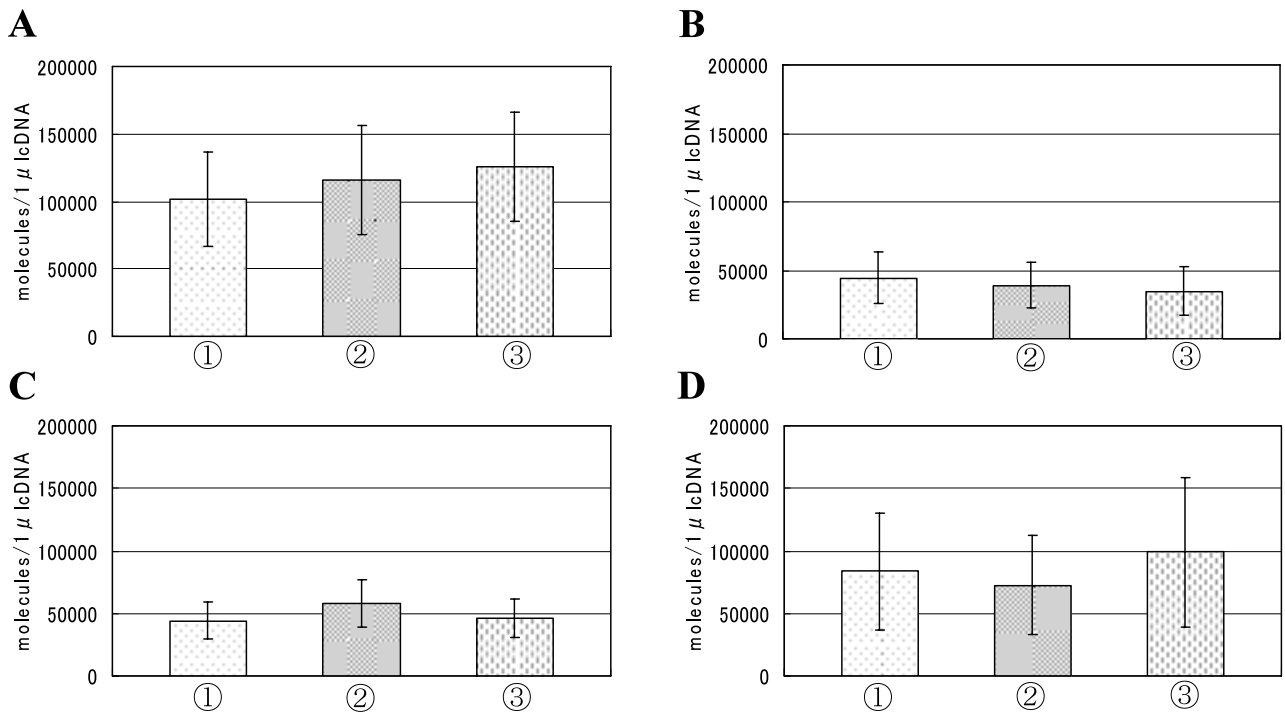


図1 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A,-C) 添加による VEGF-A mRNA 発現状況 (N=10)  
 (A) HSC-2, (B) HSC-3, (C) HSC-4, (D) OSC-19  
 ① Control 群 (C 群), ② VEGF-A 添加群 (VA 群), ③ VEGF-C 添加群 (VC 群)

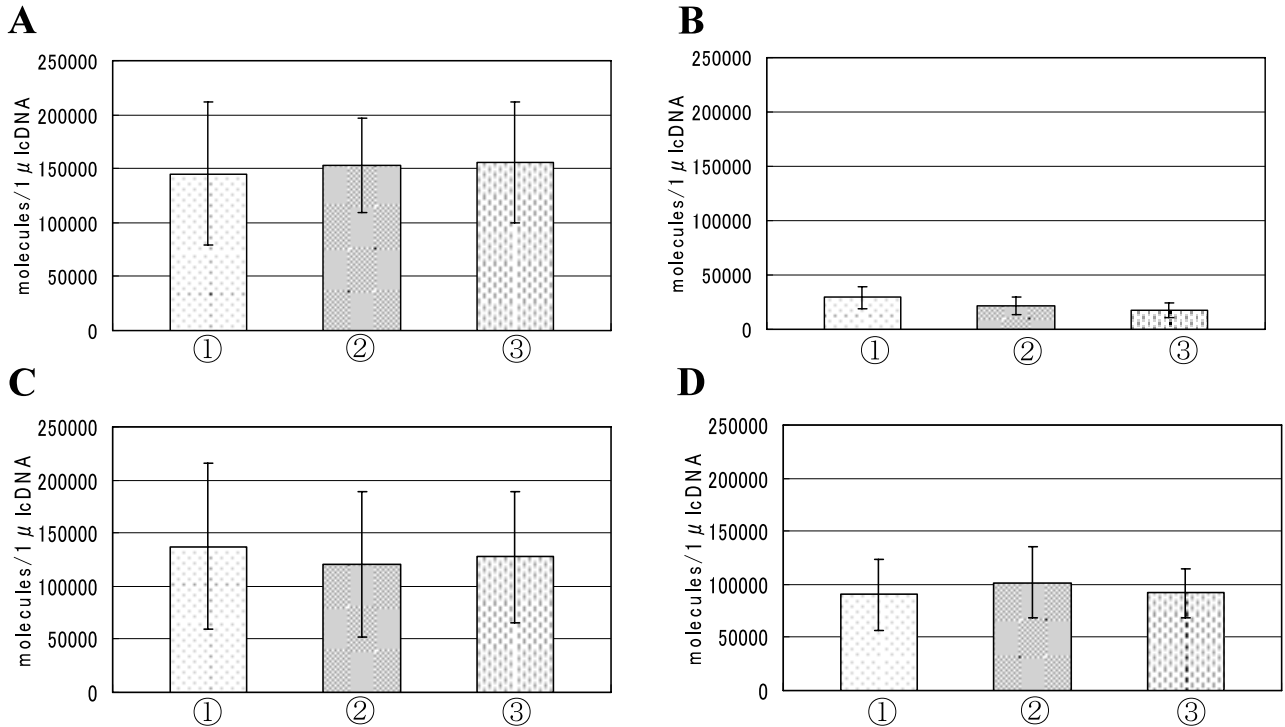


図2 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A,-C) 添加による VEGF-C mRNA 発現状況 (N=10)  
 (A) HSC-2, (B) HSC-3, (C) HSC-4, (D) OSC-19  
 ① Control 群 (C 群), ② VEGF-A 添加群 (VA 群), ③ VEGF-C 添加群 (VC 群)

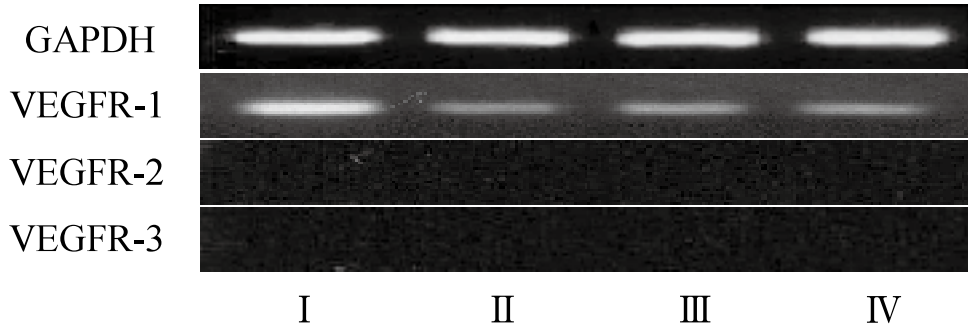


図3 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3mRNA の発現  
Lane. (I) HSC-2 (II) HSC-3 (III) HSC-4 (IV) OSC-19

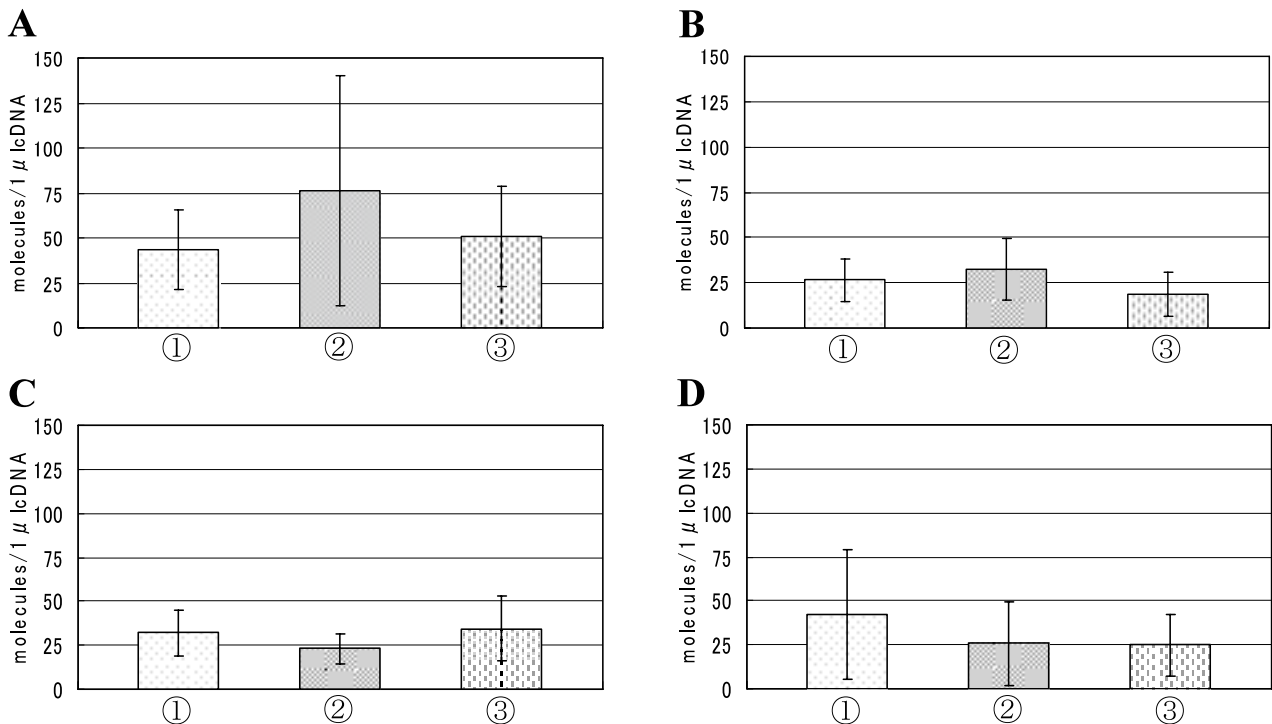


図4 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A,-C) 添加による VEGFR-1mRN 発現状況 (N=10)  
(A) HSC-2, (B) HSC-3, (C) HSC-4, (D) OSC-19  
① Control 群 (C 群), ② VEGF-A 添加群 (VA 群), ③ VEGF-C 添加群 (VC 群)

1m RNA の発現を認めたが、VEGFR-2 および VEGFR-3m RNA の発現はみられなかった (図3)。

2) C 群, VA 群, および VC 群における VEGFR mRNA の発現量について

C 群, VA 群, および VC 群における VEGFR-1 mRNA の発現量の平均値を比較したところ, VA 群では C 群と比較して HSC-2, HSC-3 でそれぞれ 1.76 倍, 1.22 倍と VEGFR-1 mRNA 発現量の軽度の増加を認めたが, HSC-4, OSC-19 ではそれぞれ 0.72 倍, 0.61 倍であり, 発現量の減少を認めた。また VC 群では C 群と比較して HSC-2, HSC-4 でそれぞれ 1.18 倍, 1.07 倍と VEGFR-1 mRNA 発現量の軽度の増加を認めたが, HSC-3, OSC-19 ではそれぞれ 0.7 倍, 0.6 倍であり発現量の減少を認

めた (図4)。しかし VEGFR-1 mRNA の発現量はすべての細胞株において 3 群間で有意差は認めなかった。

【考 察】

本研究ではヒト口腔扁平上皮癌において癌細胞が発現する VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR の相互作用を調べることを目的に, 外部刺激としてヒト recombinant VEGF-A, VEGF-C を添加することによる各因子の mRNA 発現量を定量した。しかし, HSC-2, HSC-3, HSC-4, および OSC-19 のいずれの細胞株においても VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR mRNA の発現量に明らかな相互作用はみられなかった。

外部刺激としてヒト recombinant VEGF-A および VEGF-C を添加による VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR mRNA 発現量の増加を認めなかった原因として、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株の培養条件が考えられた。本研究ではヒト口腔扁平上皮癌細胞株の培養を至適条件下で行っており、癌細胞が必要とする VEGF-A および VEGF-C が過飽和となっていたか、もしくは VEGF-family 発現に関与するとされている他の因子が抑制された可能性がある。VEGF-family は低酸素状態、化学療法や放射線療法などの刺激が加わることにより発現が亢進し、癌細胞が自己保護を行っているとの報告がある<sup>13)</sup>。Mohamed ら<sup>14)</sup> は口腔扁平上皮癌細胞株において、低酸素状態になると VEGF タンパク発現量が上昇すると述べている。また Koukourakis ら<sup>15)</sup> は低酸素状態下での VEGF 発現量の制御には低酸素誘導因子 HIF-1  $\alpha$  が大きく関与するとし、頭頸部扁平上皮癌においてもその発現を認めている。一方、正常酸素分圧下では HIF-1  $\alpha$  が分解されることにより VEGF 発現量も減少するとの報告もある<sup>16)</sup>。さらにヒト recombinant VEGF-A および VEGF-C の添加量の設定は、HSC-2 細胞株を用いた予備実験において 20ng/ml の濃度で VEGF-A および VEGF-C mRNA 発現量の増加を認めたため同濃度に設定したが、添加量を増加することで VEGF-A および VEGF-C mRNA の発現量が増加する可能性も考えられた。

また VEGFR の発現量が極わずかであったことが、ヒト recombinant VEGF-A または VEGF-C 添加による VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR の相互作用を認めなかった原因ではないかと考えられた。Joukov ら<sup>17)</sup> は VEGF-A と VEGF-C が VEGFR-2 と結合することによりそれぞれの発現量が制御されていると報告している。また Weigand ら<sup>6)</sup> は乳癌細胞株を用いた研究において VEGFR-2 が VEGF-A と結合することにより、VEGF-A 発現量が増加するとしており、Villegas ら<sup>18)</sup> は腎臓上皮細胞株を用い同様の報告をしている。さらに Bachelder ら<sup>19)</sup> は乳癌細胞株において VEGF-A は VEGFR-2 に発現するニューロピリン受容体と結合することにより VEGF-A 発現量が増加し、オートクラインを引き起こすと述べている。また Rivet ら<sup>20)</sup> は腎臓癌において VEGFR-1 と VEGF-A は腫瘍細胞で同一部位に発現しており、VEGFR-1 と VEGF-A は相互に関与しているのではないかと報告している。さらに Masood ら<sup>21)</sup> は肺癌細胞株において VEGF-A と VEGF-C は VEGFR の発現量と相関しており、オートクラインを引き起こす可能性を報告している。これらの報告から VEGF-A または VEGF-C 発現の制御には VEGFR の発現量が関与している可能性が考えられた。

以上のことから、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株において

VEGF-A mRNA 発現量の増加が VEGF-C mRNA 発現量の増加を引き起こす、もしくは VEGF-C mRNA 発現量の増加が VEGF-A mRNA 発現量の増加を引き起こすといった相互作用はなく、VEGF-A mRNA と VEGF-C mRNA の発現量は存在環境や腫瘍間質が影響していると考えられた。また、VEGF-A, VEGF-C mRNA, および VEGFR mRNA の関係についても本研究で用いたヒト口腔扁平上皮癌細胞株においては、お互いの発現量を制御するといった相互作用はないものと考えられた。

これらのことから腫瘍間質、および腫瘍周囲組織を含めた生体内における VEGF-A, VEGF-C および VEGFR の発現量ならびに HIF-1  $\alpha$  などの血管新生や、リンパ管新生関連因子についても検討を加えることで、口腔扁平上皮癌における血管新生、リンパ管新生の機序が明らかになるものと考えられた。

## 【結 語】

本研究はヒト口腔扁平上皮癌細胞株において癌細胞が発現する VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR の相互作用を明らかにすることを目的に行った。

外部刺激としてヒト recombinant VEGF-A, VEGF-C を添加した際に癌細胞が発現する VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR mRNA 発現量を定量したが、各因子の mRNA 発現量に変化は認めなかった。

このことからヒト口腔扁平上皮癌細胞株においては VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR mRNA の発現量に相互作用はないものと考えられた。今後はヒトにおける口腔扁平上皮癌が発現する VEGF-A, VEGF-C, および VEGFR の相互作用を明らかにするために、更なる研究が必要である。

本論文の要旨は平成 19 年度新潟歯学会第 2 回例会（平成 19 年 11 月 10 日、新潟）、および第 26 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会（平成 20 年 1 月 24 日、大分）において報告した。

## 【参考文献】

- 1) Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*, 60:203-12, 2000.
- 2) Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1:27-31, 1995.
- 3) Strauss L, Volland D, Kunkel M, Reichert TE: Dual role of VEGF family members in the pathogenesis of head and neck cancer (HNSCC):

- possible link between angiogenesis and immune toleranc. *Med Sci Monit*, 11:280-292, 2005.
- 4) Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT: Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:7533-7537, 1993.
  - 5) Lalla RV and Boisoeneau DS, Spiro JD, Kreutzer DL: Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129:882-888, 2003.
  - 6) Weigand M, Hantel P, Kreienberg R, Waltenberger J: Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. *Angiogenesis*, 8:197-204, 2005.
  - 7) Wu W, Shu X, Hovsepyan H, Mosteller RD, Broek D: VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors. *Oncogene*, 22:3361-3370, 2003.
  - 8) Michi Y, Morita I, Amagasa T, Murota S: Human oral squamous cell carcinoma cell lines promote angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor and upregulation of KDR/flk-1 expression in endothelial cells. *Oral Oncol*, 36:81-88, 2000.
  - 9) Karkkainen MJ and Petrova TV: Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*, 19:5598-5605, 2000.
  - 10) Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH: Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*, 9:777-794, 2005.
  - 11) 中里隆之, 新垣晋, 北村信隆, 船山昭典, 齊藤力: 口腔扁平上皮がん細胞株における VEGF-family の発現とリンパ節転移との関連について. *頭頸部癌*, 31 (1):84-88, 2005.
  - 12) Nakazato T, Shingaki S, Kitamura N, Saito C, Kuwano R, Tachibana M: Expression level of vascular endothelial growth factor-C and -A in cultured human oral squamous cell carcinoma correlates respectively with lymphatic metastasis and angiogenesis when transplanted into nude mouse oral cavity. *Oncol Rep*, 15:825-830, 2006.
  - 13) Harmey JH, Bouchier-Hayes D: Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays*, 24:280-283, 2002.
  - 14) Mohamed KM, Le A, Duong H, Wu Y, Zhang Q, Messadi DV: Correlation between VEGF and HIF-1 $\alpha$  expression in human oral squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*, 76:143-152, 2004.
  - 15) Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Pastorek J, Karapantzios I, Gatter KC, Harris AL: Hypoxia-activated tumor pathways of angiogenesis and pH regulation independent of anemia in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59:67-71, 2004.
  - 16) Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr: HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*, 292:464-468, 2001.
  - 17) Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O, Alitalo K: A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem*, 273:6599-6602, 1998.
  - 18) Villegas G, Lange-Sperandio B, Tufro A: Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int*, 67:449-457, 2005.
  - 19) Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, Mercurio AM: Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 61:5736-5740, 2001.
  - 20) Rivet J, Mourah S, Murata H, Mounier N, Pisonero H, Mongiat-Artus P, Teillac P, Calvo F, Janin A, Dosquet C: VEGF and VEGFR-1 are coexpressed by epithelial and stromal cells of renal cell carcinoma. *Cancer*, 112:433-442, 2008.
  - 21) Masood R, Kundra A, Zhu S, Xia G, Scalia P, Smith DL, Gill PS: Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the VEGF and VEGF-C autocrine loops. *Int J Cancer*, 104:603-610, 2003.