

Review Article

血管新生とその制御 —VEGFと受容体を中心に—

渋谷正史

東京大学医科学研究所 癌・細胞増殖大部門腫瘍抑制分野

Molecular Basis of Angiogenesis

Angiogenesis is an important biological process not only under physiological conditions but also in a variety of diseases including cancer, diabetic retinopathy and rheumatoid arthritis. Among angiogenic factors, vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and its receptors appear to mediate the basic signaling for endothelial cell growth and survival, whereas Angiopoietin-Tie system regulates interaction between vascular endothelial cell and smooth muscle cell (pericyte). Furthermore, EphrinB2-EphB4 system determines arterial-venous differentiation. VEGF-A activates two tyrosine kinase receptors, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR/Flk-1 in mice). VEGFR-2 is specifically expressed on endothelial cells and is directly involved in angiogenesis. On the other hand, VEGFR-1 is expressed not only on endothelial cells but also on monocyte-macrophages and trophoblasts in placenta, regulating angiogenesis, inflammation and pregnancy. Furthermore, VEGF-C,D and their receptor VEGFR-3 have recently been shown to regulate lymphangiogenesis. Thus, VEGF family and receptor system may be an important target for anti-inflammatory therapy. To regenerate blood vessels in ischemic diseases, VEGF and other angiogenic factors as well as endothelial progenitor cells are thought to be useful, and some are under clinical trial. VEGF-E, novel member of VEGF family, showed an efficient angiogenesis *in vivo* without side effects such as edema and hemorrhage, suggesting that VEGF-E is also a good candidate for regeneration therapy.

Rec.4/15/2004, pp144-153

Masabumi Shibuya

Institute of Medical Science, University of Tokyo, Division of Genetics

Key words angiogenesis, VEGF, tyrosine kinase receptor, VEGF-E, Ang1

はじめに

血管新生の機構を明らかにすることは、我々の生理的な循環系の理解に役立つばかりでなく、腫瘍血管新生や糖尿病性網膜症、炎症性疾患などにみられる異常な血管新生の制御法を開発する上で、また人為的な血管再生療法を行う上で極めて重要である。最近の研究から、血管新生には VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor 血管内皮増殖因子) とその受容体、アンジオポエチン-Tie 受容体、Ephrin-EphB4 受容体などの多くのシグナル伝達系が関与することが明らかになってきた(図1)。中でも VEGF と受容体は血管新生制御機構の上で中心的な役割を果たすことが多くの研究から示されており¹⁻³⁾、抗 VEGF 抗体は血管新生阻害剤として臨床に登場しようとしている。

さらに最近の研究から、リンパ管新生は主には VEGF-C,D とその受容体により制御されることも示された。この項では、VEGF の概略と VEGF 受容体のシグナル伝達を中心に、血管形成の機構と炎症、再生について考えてみたい。

胎生期血管網およびリンパ管の形成

血管の発生を観察すると、マウスでは胎生 7.0 日頃、まず後部中胚葉に帯状に VEGF 受容体 -1, -2 を発現する細胞が現れる。この細胞は、血管内皮細胞と造血細胞の両方に分化する前駆細胞(いわゆるヘマンジオブラスト)と考えられ(図2)、卵黄嚢に移動して血島を形成する。血島は外側の内皮細胞と中心部の血球細胞からなり、血島同士でネットワークを形成して初期血管網を作り上げる。

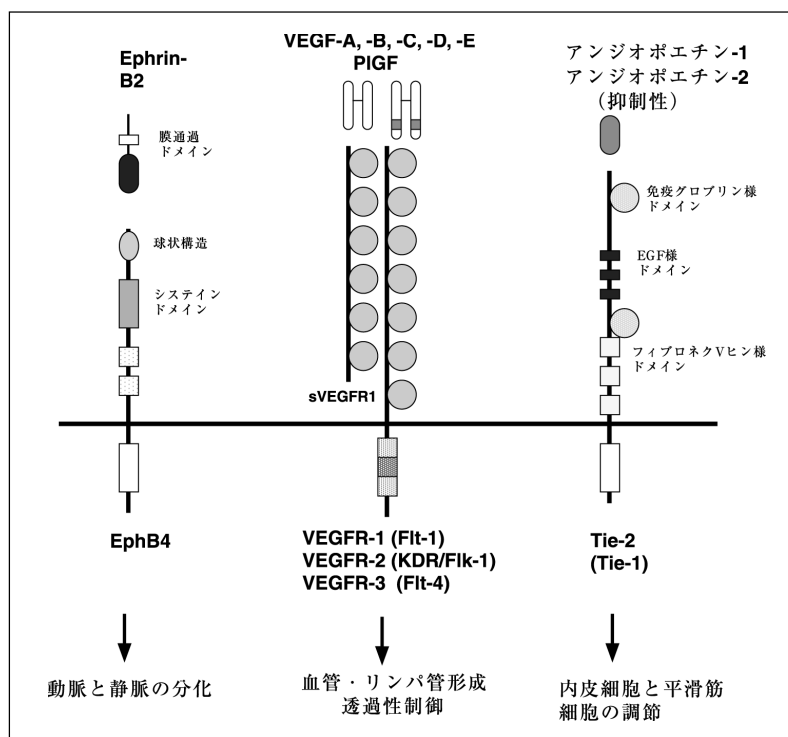


図1 血管新生に関わる主な受容体型チロシンキナーゼ群
これ以外にも、PDGF受容体は平滑筋細胞の分化に重要な役割を果たす。

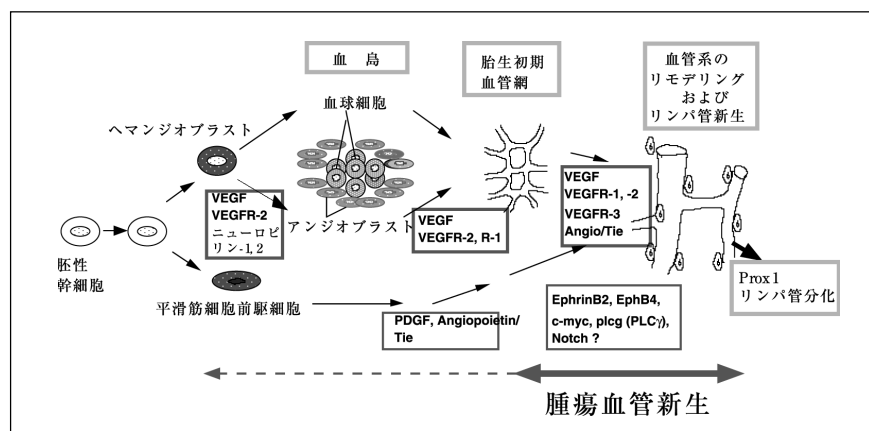


図2 胎生期の血管発生・新生およびリンパ管新生に関わる主なシグナル伝達系

腫瘍血管は、主には既存の血管からの血管新生とリモデリングである。

また、ヘマンジオブラストの一部は胎児内の全身に移動し、背側大動脈 (dorsal aorta) をはじめとする胎生期血管系を構築すると考えられる。卵黄囊血管網と胎児側血管網、および胎児側血管網と心臓が結合し、血液循環が始まるとともに、血管網の著しい再構築と動・静脈形成・分化(いわゆる血管系のリモデリング)が生じる。これら全体の過程に VEGF と受容体系が関与し、さらに後半のリモデリング期には、アンジオポエチンその他多くの遺伝子群が関与して、血管内皮細胞と平滑筋細胞による成熟

した血管網を完成させる。

一方、リンパ管はE9.0頃、静脈系の一部に VEGFR-3 を発現する血管内皮細胞が出現し、これらの細胞がリンパ管内皮に分化してリンパ管網を形成していく。この VEGFR-3 遺伝子発現とリンパ管内皮への分化には、転写因子 Prox1 が必須の役割を果たす。VEGFR-3 のリガンド VEGF-C は主に血管内皮細胞から分泌される。

VEGF-A と3種類の VEGFR のノックアウトマウスはいずれも血管形成の早期において重大な障害を引き起こし、

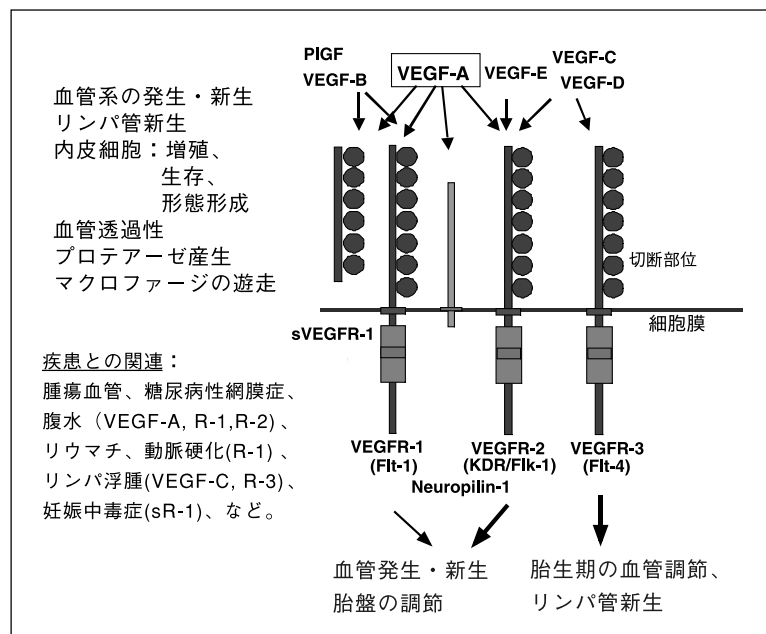


図3 VEGFファミリーとその受容体群

VEGFR-1とVEGFR-2は血管新生に、VEGFR-3はリンパ管新生に関与する。

マウスは胎生致死となり、また VEGF-C 欠損も出生前後で致死となる。以下、VEGF を中心に述べる。

VEGFファミリーの構造と性質

1) VEGF-A とそのサブタイプ

VEGFは培養血管内皮細胞に対する増殖因子、および血管透過性亢進因子の2つの性質を持つ糖タンパク質で、VEGFあるいはVEGF-Aと呼ばれる（以後はVEGF-Aと略す¹⁾。その構造的特徴は分子量約20,000のサブユニットによる二量体形成、また血小板由来増殖因子PDGFとの類似性であり、コア領域における8個のシステインの配置はVEGFとPDGFの間で完全に保存されている。

VEGF-Aの他の特徴は塩基性ドメインの有無によるサブタイプの存在で、121, 165, 189アミノ酸タイプが主なものである。中でも主要なサブタイプであるVEGF-A₁₆₅は塩基性ドメインを介して細胞膜表面や細胞間基質、さらには分子量13万のニューロピリン-1と会合しながらVEGFRに作用する⁴⁾。VEGF-Aは、特異的レセプターとしてVEGFR-1 (Flt-1)とVEGFR-2 (KDR/Flk-1)を利用する^{5,6)}。

VEGF-Aは、*in vitro*では内皮細胞の増殖を引き起こし、個体レベルでは血管新生、血管透過性亢進を誘導する^{1,2)}。さらに、管腔形成の促進、内皮細胞の遊走、内皮細胞からの組織因子、マトリックスメタロプロテアーゼなど凝固・線溶系タンパク質や間質分解酵素の産生、細胞接着分子の内皮細胞上への発現などを誘導する。他の細胞種に関

しては、末梢血単球・マクロファージの遊走促進や凝固系組織因子産生促進、免疫系樹状細胞の活性制御などが報告されている。

2) VEGF-C, D

VEGF-Cは、胎生期には血管系に、その後はリンパ管内皮細胞の増殖に関与すると考えられる。受容体としては主にVEGFR-3 (Flt-4)を、一部VEGFR-2を利用する。これらの遺伝子のトランスジェニックマウスでは、皮下にリンパ管が誘導される⁷⁾。

3) VEGF-E

最近我々は、Parapox ウイルスの一つOrf ウイルス NZ-7株にコードされるVEGF関連タンパク質がVEGFR-2のみに結合して強い血管新生活性、中等度の透過性亢進活性を持つことを明らかにし、VEGF-E (VEGF-E_{NZ-7})の名称で報告した⁸⁾。その後2種類のVEGF-E_{NZ-2}とVEGF-E_{D1701}が欧米から報告されている。VEGF-E_{NZ-7}の解析から、ニューロピリン-1との会合なしにVEGFR-2単独の刺激でVEGFとほぼ同程度の内皮細胞増殖シグナルを発信できること、K14プロモーターを利用したトランスジェニックマウスの解析ではVEGF-Aの副作用と考えられる血管透過性が極めて低いこと、などが明らかにされた⁹⁾。さらに、ドメイン構造の解析から、VEGF-Eのループ-1とループ-3が血管新生活性に重要で、それ以外はヒト型化できることが明らかとなった¹⁰⁾。したがって、VEGF-Eは血管再生へ向けて、将来の臨床応用が期待される。

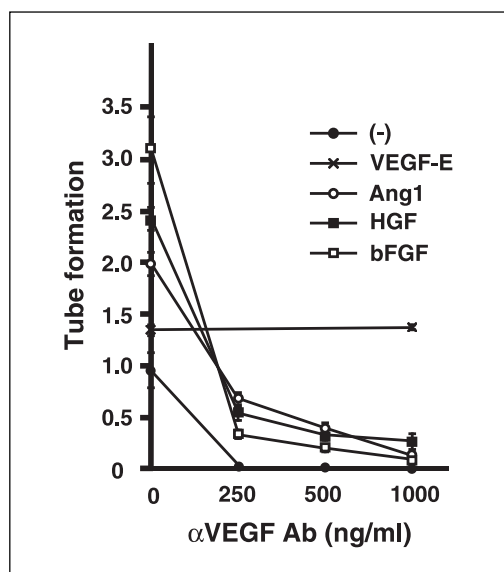


図4 内皮細胞・線維芽細胞共培養系によるチューブ形成法と、それによる血管新生因子間の関係

VEGFが基本的シグナル伝達系として働いており、VEGF中和抗体でチューブ形成は強く阻害される。VEGF-EはこのVEGF中和抗体では阻害されない。

VEGF-Aの胎生期における役割

ジーンターゲットングによる解析では、非常に興味あることに VEGF-A (-/-) ホモ接合マウスのみならず、VEGF-A (+/-) ヘテロ接合マウスでも血管系の多様な異常により胎生10～11日で致死となることが見出された^{1,11)}。その異常としては、心臓と大動脈の結合不全や背側動脈の形成不全などが挙げられる。このようにヘテロ接合マウスで胎生致死となる遺伝子は極めて稀で、この結果は胎生期における VEGF-A の濃度調節が正常な血管系を構築する上で非常に重要であることを強く示唆している。

さらに、VEGF-A のサブタイプの意義を明らかにするため、VEGF-A₁₂₀のみを持つマウスが作出された(マウスでは1アミノ酸が短いため、120タイプとなる)。VEGF-A₁₂₀のみを発現するマウスは、胎生期の血管はほぼ形成されるものの、出生前後で心臓、大血管などの異常で死亡することが示された¹²⁾。ニューロピリン-1の欠損マウスも同様の性質を示すことから、VEGF-A₁₆₅とニューロピリン-1の相互作用も血管新生の制御に必須である。VEGF-A₁₆₄のみを持つマウスはほぼ正常に発育する。

一方、PlGF、VEGF-Bのノックアウトマウスは、胎生期には特に異常を示さない。したがって、これらの遺伝子産物は胎生期の血管形成には少なくとも単独では強い作用を持っていないと考えられる。ただし、成熟期における種々の疾患の進展においては、様々な段階で関与する。

VEGF-Cノックアウトマウスでは、リンパ管形成不全により出生前後で致死となることが最近報告された¹²⁾。

内皮細胞・線維芽細胞共培養系によるチューブ形成と血管新生因子

近年、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と正常ヒト線維芽細胞の共培養による血管様チューブ形成法が開発された。この系は、現時点で最も安定な内皮によるチューブ形成システムであり、チューブ様構造は10日から2週間のあいだ、着実に増大する。この系を用いて解析したところ、線維芽細胞が内因性に VEGF-A を産生してチューブ形成に関与していること、血管新生活性を持つといわれる因子群の Ang1、FGF、HGF などは明らかにチューブ形成を促進すること、しかし、それらの作用は VEGF-A の存在に強く依存し、VEGF-A を中和抗体や遊離型 VEGFR-1 で抑制すると Ang1、FGF、HGF 存在下にもまったくチューブが形成されないこと、が明らかとなった¹³⁾(図4)。このことは、*in vivo*に近い系では VEGF-A が血管新生に中心的役割を果たしており、血管阻害剤開発には VEGF 系を標的とするのが最も有効であることを強く示唆している。

VEGF受容体(Fltチロシンキナーゼ群)

1) VEGFRキナーゼ群の構造

VEGF-A は、受容体として VEGFR-1 (Flt-1) と VEGFR-2 (KDR/Flk-1) チロシンキナーゼを利用する^{2,15)}(図3)。VEGFR-1 (Flt-1) は1990年に我々が初めて単離した遺伝子で、構造類似性から fms-like tyrosine kinase (flt-1) と名付けた。VEGFR-3 (Flt-4) は VEGF-C、D の特異的受容体である。VEGFR-1、-2、-3 は細胞外ドメイン内に7個の免疫グロブリン様構造を、またキナーゼドメイン内には約70アミノ酸の挿入領域(KI = kinase insert region)を持つ。

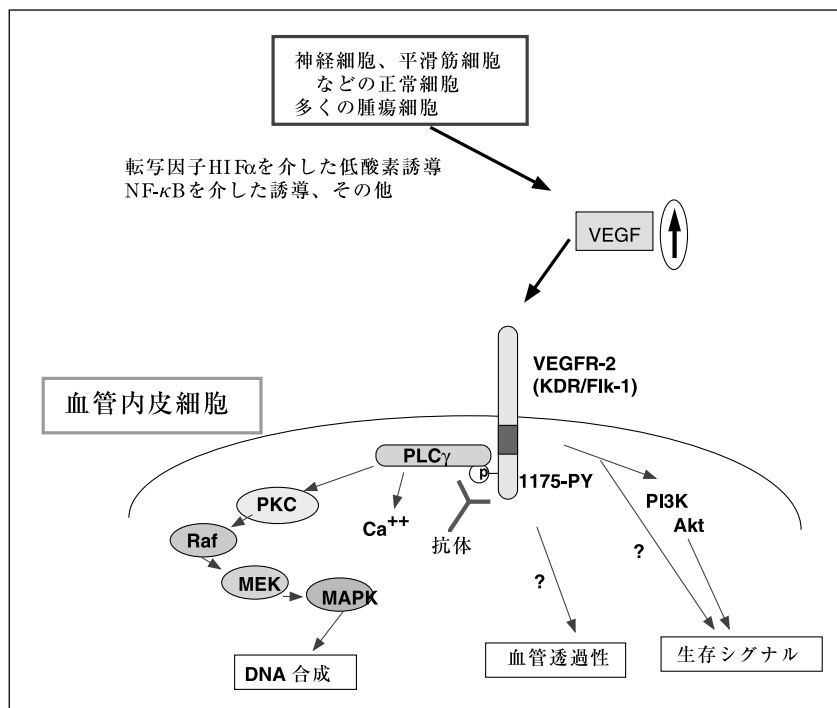


図5 VEGF-VEGFR-2のシグナル伝達の特徴

VEGF-Aは低酸素条件下には、転写因子HIF1 α の活性化を介して発現誘導を受ける。ポジティブシグナルは主にVEGFR-2により発信され、PLC γ -PKC-MAPキナーゼを介することが特徴である。

これらの点は5-Ig タイプ受容体 (Fms, Kit, PDGFR) と基本構造上非常に類似し、両者で遺伝子スーパーファミリーを形成する。しかし、VEGFRにはPI3キナーゼ結合のための典型的な自己リン酸化モチーフは存在しないことから、Fltキナーゼ群とFmsキナーゼ群ではシグナル伝達機構がかなり異なることが示唆される。

2) VEGF-VEGFR系の特徴的なシグナル伝達 (図5)

VEGFR-1は、VEGF-AとKd = 1 ~ 10pMの高親和性で結合し二量体を形成するが、VEGFによるVEGFR-1の自己リン酸化のレベルは、他の受容体型チロシンキナーゼに比べてかなり弱い^{2, 5, 6)}。また、その自己リン酸化能を反映してMAPキナーゼの活性化はかなり低い。

一方、VEGFR-2はVEGFR-1に比べて10分の1以下の親和性でVEGF-Aと結合するが、VEGF-Aによる自己リン酸化は高レベルで生じ、キナーゼ活性は他の代表的な受容体キナーゼとほぼ同程度である⁶⁾。さらに、VEGFR-2を内因性に発現している内皮細胞においては、VEGF-Aの刺激によりMAPキナーゼの活性化は速やかに、かつ強く引き起こされた。しかし、大変驚いたことに、Rasへ向かうShc, Grb2の活性化、PI3キナーゼの活性化はほとんど認められず、それらに代わってフォスホリパーゼC γ , PKC (特にPKC β) が活性化され、それに引き続いてRaf-

MEK (MAPKK)-MAPキナーゼの活性化とDNA合成が誘導された¹⁶⁾。受容体型チロシンキナーゼが、ほとんどRas系を使わずPKC系に依存して細胞増殖シグナルを送る例は知られておらず、VEGF受容体と内皮細胞の重要な特徴が明らかとなった。さらに、VEGFR-2の1175-チロシン残基がこのシグナル伝達に必須の役割を果たす¹⁷⁾ (図5)。

VEGFRのノックアウトマウスによる解析

これまでに、3種のVEGF受容体遺伝子いずれも、ホモ接合型の欠損マウスで血管系の異常により胎生早期に致死となることが報告されている^{18, 19)}。その際VEGFR-2 (KDR/flk-1) (-/-) では内皮細胞、造血細胞の形成が著しく阻害されること、一方、VEGFR-1 (flt-1) (-/-) では内皮細胞の過増殖が生じ、両者とも胎生8.5日ごろ致死となる。このことから、VEGFR-2は主にポジティブシグナルを出し、VEGFR-1はこの胎生前期にはブレーキ的な役割を担っていると考えられる (図6)。

また、VEGFR-3のノックアウトマウスでは、VEGFR-1, -2よりも1~2日程度遅れるものの、血管系の異常により胎生致死となった。このことは、VEGFR-3はリンパ管形成のみならず、それより早期の血管形成に重要であることを示している。ただし、VEGFR-3が腫瘍などの病的血

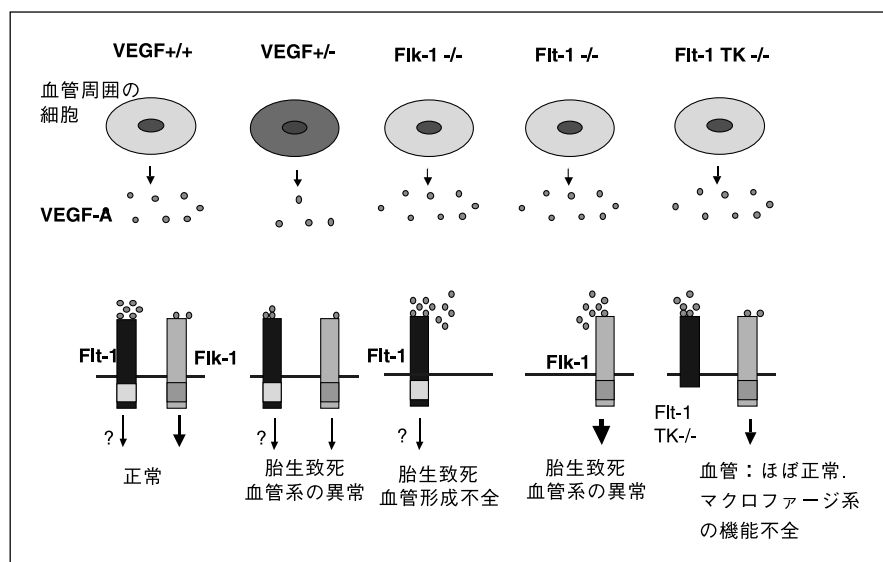


図6 VEGF 受容体のノックアウト変異マウスおよびVEGFR-1 チロシンキナーゼドメイン欠損マウスにおける血管形成

VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1) とともにノックアウト変異では胎生致死となるが, VEGFR-1 TK^{-/-} マウスでは血管を形成し, ほぼ正常に発育する.

管新生に重要な役割を果たしているかは, まだ十分明らかでない.

VEGFR-1 は, 活性は弱いものの, シグナルを伝達するチロシンキナーゼドメインを持つ. VEGFR-1 の胎生期におけるブレーキ的な作用がキナーゼからのシグナルによるものか, 強い VEGF-A 結合ドメインによるのかは, 不明であった. そこで, これらを明らかにするため, 我々は VEGFR-1 キナーゼドメイン欠損マウス (以下 VEGFR-1 TK^{-/-} マウス) を作成した. その結果, このマウスはほぼ正常な血管形成を示し, 生育できることが明らかとなった²⁰⁾ (図6). このことは, 胎生期における VEGFR-1 の抑制的作用は VEGFR-1 キナーゼによる特殊な抑制シグナルの発信ではなく, 主に VEGF-A を結合することによる濃度の低下や調節であると考えられる.

VEGF系と炎症性疾患

VEGF系が腫瘍血管形成, 腹水貯留に中心的役割を果たすことはほぼ確実であり, 抗 VEGF 中和抗体による第3相臨床試験では進行大腸癌患者に強い延命効果を示した. 一方, 関節リウマチのマウスモデルや, 動脈硬化モデルなどにおいても, VEGF系の関与が示されつつある. VEGF 中和抗体や遊離型受容体によるブロックでマウスにおける動脈硬化モデルの進行がある程度抑制できることが報告された²¹⁾. また, 関節リウマチモデルでは, VEGF 受容体のうち VEGFR-1 を抑制する方が治療的効果が著しいこ

とが報告されている²²⁾. これらのことは, 病的血管新生に直接関わる VEGFR-2 は炎症性疾患の進展にはあまり強く関与せず, 単球・マクロファージ系に発現する VEGFR-1 がこれら炎症細胞の動員や機能活性化を介して炎症に深く関わることを示唆している. VEGFR-1 と VEGFR-2 の役割を区別した詳細な解析が期待される.

VEGFとその受容体システムの系統発生的解析

血管形成の制御機構に関する系統発生的進化を明らかにすることは, 哺乳類における血管形成の制御系を理解する上で重要である. VEGFR-1 (Flt-1) は, ごく最近までは哺乳類でのみ遺伝子が見出され, また胎盤で発現が強いことから進化的に哺乳類の成体期に遺伝子重複によって形成された遺伝子ではないか, と考えられた. しかし, 我々は哺乳類と全く同じように受容体型および遊離型両者をコードする VEGFR-1 遺伝子が, 鳥類にも正確に保存されていることを見出した²³⁾. VEGFR-2, VEGFR-3 はすでに鳥類で単離されているので, 3種類の VEGFR をセットとする血管形成の制御系は, 哺乳類・鳥類の分離する以前の爬虫類の時代にすでに完成していたと考えられる (図7). 両生類 (アフリカツメガエル) でも, 最近 VEGFR-2 と VEGFR-1 の一部が報告された.

一方, 魚類においては, これまでのゲノム解析などの情報から判断すると VEGFR の3種は正確には確立していな

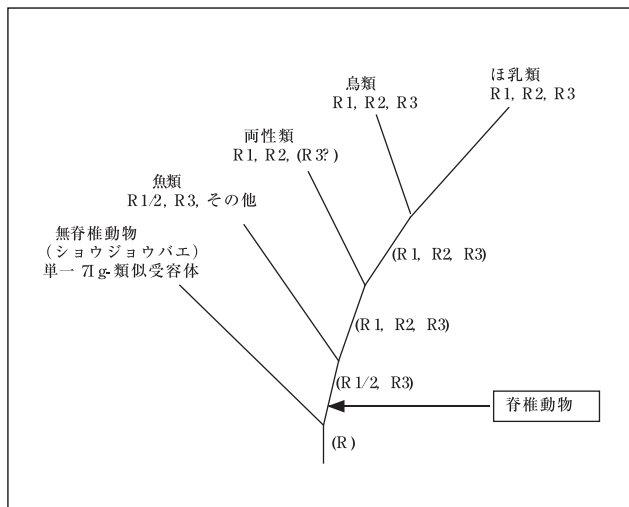


図7 VEGF受容体(7lg-TKR)の系統発生的進化(モデル)

い。ゼブラフィッシュは血管発生の研究にもよく利用されるはじめているが、魚類と哺乳類・鳥類の間には、部分的には重要な差もあることが予想され、それらを明らかにすることにより哺乳類の血管形成制御をより良く理解できると期待される。

無脊椎動物(ショウジョウバエ)では、VEGFRとよく似た受容体遺伝子は1個存在する。ただし、この受容体(D-VEGFR)は“border cell”と呼ばれる細胞の卵細胞への遊走、また血球様細胞の遊走にのみ利用されている^{24, 25)}。このことは、進化的にもVEGFRは強い増殖シグナルを送らないタイプの受容体チロシンキナーゼであったことを強く示唆している。系統発生のどの時代からVEGFRが血管新生と結びついたのかは、生物学的に興味ある検討課題である。

組織特異的な血管内皮増殖因子

VEGFは全身の血管系にほぼ共通した内皮細胞増殖・分化因子であるが、組織特異的な調節因子が存在するか否かは、長い間不明であった。しかし、ごく最近、米国のFerraraらは、内分泌組織の内皮細胞に特異的に増殖・遊走活性を示すEG-VEGFを見出した。受容体はVEGFRとは異なりG-タンパク結合型のタイプが示唆されている。EG-VEGF遺伝子についてはまだノックアウトマウスが作出されておらず、胎生期の血管形成における役割は不明である。

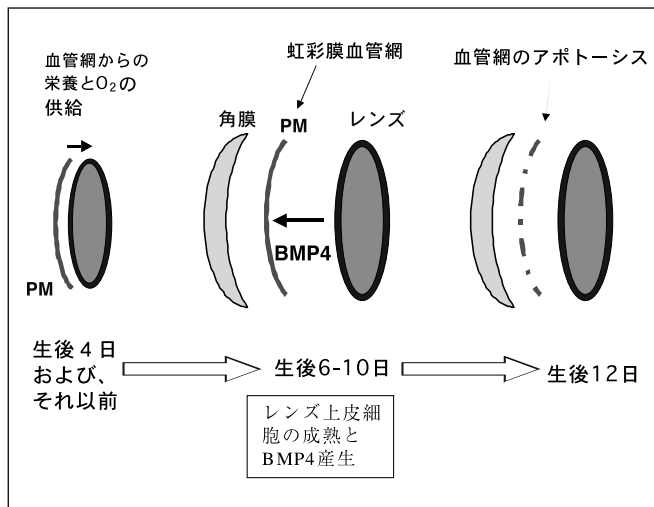


図8 マウスやラットの眼球虹彩膜血管網に関する制御機構

この血管網の消失には、レンズ上皮から分泌されるBMP4が関与し、内皮細胞のアポトーシスを誘導する。

血管形成を負に制御する機構

ある組織に形成された血管網全体を消失させる現象は、あまり多くは知られていないが、その一つは、ラットやマウスで生後1週間以内に消失する眼球虹彩膜血管網(PM; pupillary membrane blood vessel)である。この消失機構については、血中VEGF濃度の低下が原因ではないか、との論文が発表されていた。我々は別の機構の存在を検討した結果、TGFβファミリーの一つBMP4タンパクが、成熟したレンズ上皮細胞から分泌され、パラクリン機構で虹彩膜血管網の内皮細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした²⁶⁾(図8)。BMP4は眼球発生の初期には誘導物質の一つとして働き、眼球形成にポジティブに作用する。したがって、時期により、ポジティブとネガティブの両方の生理的役割を果たすことは、非常に興味深い。

VEGF以外の血管新生因子とその血管形成に対する作用

1) アンジオポエチンとTie受容体

VEGFとその受容体系はいわゆるVasculogenesis(血管発生)と呼ばれる血管の初期発生からその後の血管新生(Angiogenesis)に至るまで非常に広い範囲の血管系形成に関与するのに対して、別のチロシンキナーゼ型受容体Tieとそのリガンドであるアンジオポエチンは、胎生中期・後期の内皮細胞と平滑筋細胞(および周皮細胞)の相互作用に重要と考えられている。特にTie2はノックアウトでも表現型が強く、マウスではE11頃で致死に至り、またヒトでは点突然変異による活性化Tie2キナーゼは“静

脈異形成症候群”を引き起こす。

アンジオポエチンファミリーには、現在4種類知られているが、アンジオポエチン-1 (Ang1) とアンジオポエチン-2 (Ang2) がよく解析されている。両者ともに内皮細胞に発現する受容体 (Tie2) のリガンドであるが、興味深いことに、VEGFと異なり両者ともに細胞増殖は誘導しない。また、Tie2チロシンキナーゼに対してAng1は自己リン酸化を誘導するのに対し、Ang2は結合するが自己リン酸化を誘導せず、Ang1に阻害的に作用する²⁷⁾。この結果は、Ang2はAng1の生理的拮抗物質ではないか、との仮説を立てる根拠となっている。しかし、最近のVEGFとAng1同時投与実験の報告では、Ang1は平滑筋細胞増加を含む血管の成熟に、Ang2は内皮細胞の遊走やリモデリングに作用する、というように各々独自の作用も認められており、さらなる解析が必要である²⁸⁾。

2) エフリン B2 と EphB4 受容体

血管系形成過程の中で、動脈系と静脈系の分化は何によって規定されるかは、まだ十分解明されていない。これについては、ごく最近、VEGFR、Tieとは別のチロシンキナーゼ型受容体であるEph-B4とそのリガンドであるエフリン B2が深く関与することが示された²⁹⁾。すなわち、リガンドは胎生早期の動脈側内皮細胞に、一方、Eph-B4受容体は静脈系内皮細胞に特異的に発現し、これらの相互作用を介して動脈系・静脈系への分化が行われる。これらのどちらかが失われても胎生早期 (E8.5 頃) に形成された血管網は正常な動・静脈へ分化しない。このシグナル伝達の分子機構も興味深い問題であるが、まだ十分解析されていない。

おわりに

血管形成の過程には、上記の遺伝子産物以外にも、VE-カドヘリン³⁰⁾、インテグリン、ケモカインレセプター系やPDGFとそのレセプター、NDF (ニューレギュリン) と c-ErbB3,4, Shc アダプター、RECK (マトリックスメタロプロテアーゼファミリー阻害タンパク)³¹⁾、WAVE2³²⁾ など多彩な分子が関与する。一方、血管内皮前駆細胞は胎生期のみならず、成熟期の末梢血や骨髄中にも存在することが報告され、vasculogenesis が成熟期にも一部存在することが考えられる。これらの細胞が骨髄に存在することを想定して骨髄細胞を血管再生に利用する試みも始まっている。今後、胎生期の血管形成と成熟期の血管新生がどの程度類似し、また異なっているのか、また、癌や炎症の病的血管新生は生理的血管形成とどのように類似しているか、さらに多くの研究が必要である。

文 献

- 1) Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev*, 18: 4-25, 1997.
- 2) Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L: Structure and function of VEGF Receptor-1 and -2. *Curr Top Micro Immunol*, 237: 59-83, 1999.
- 3) Mustonen T, Alitalo K: Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol*, 129: 895-898, 1995.
- 4) Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M: Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92: 735-745, 1998.
- 5) Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C-H: Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for Vascular Endothelial Growth Factor. *J Biol Chem*, 269: 26988-26995, 1994.
- 6) Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma T, Shibuya M: Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for Placenta Growth Factor (PlGF), which is related to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *Cell Growth Diff*, 7: 213-221, 1996.
- 7) Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K: Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J*, 20: 1223-1231, 2001.
- 8) Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M: A novel type of Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF-E (NZ-7 VEGF) preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*, 273: 31273-31282, 1998.
- 9) Kiba A, Sagara H, Hara T, Shibuya M: VEGFR-2-specific ligand VEGF-E induces non-edematous hyper-vascularization in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 301: 371-377, 2003.
- 10) Kiba A, Yabana N, Shibuya M: A set of loop-1 and -3 structures in the novel VEGF family member, VEGF-E_{NZ-7}, is essential for the activation of VEGFR-2 signaling. *J Biol Chem*, 278: 13453-13461, 2003.
- 11) Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenshtein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D,

- Risau W, Nagy A: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380: 435-439, 1996.
- 12) Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K: Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*, 5: 74-80, 2004.
 - 13) Saito M, Hamasaki M, Shibuya M: Tubular Formation by Angiopoietin-1 in Endothelial Cell/Fibroblast Co-culture is Dependent on Endogenous VEGF. *Cancer Sci*, 94: 782-790, 2003.
 - 14) Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT: Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*, 5: 495-502, 1999.
 - 15) Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy R, Shows TB: Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 6: 1677-1683, 1991.
 - 16) Takahashi T, Ueno H, Shibuya M: VEGF activates Protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*, 18: 2221-2230, 1999.
 - 17) Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M: A Single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*, 20: 2768-2778, 2001.
 - 18) Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X-F, Breitman ML, Schuh AC: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376: 62-66, 1995.
 - 19) Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML: Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376: 66-70, 1995.
 - 20) Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M: Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 9349-9354, 1998.
 - 21) Zhao Q, Egashira K, Inoue S, Usui M, Kitamoto S, Ni W, Ishibashi M, Hiasa Ki K, Ichiki T, Shibuya M, Takeshita A: Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting/activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *Circulation*, 105: 1110-1115, 2002.
 - 22) Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P: Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature Med*, 8: 831-840, 2002.
 - 23) Yamaguchi S, Iwata K, Shibuya M: Soluble Flt-1 (soluble VEGFR-1), a potent natural anti-angiogenic molecule in mammals, is phylogenetically conserved in avians. *Biochem Biophys Res Commun*, 291: 554-559, 2002.
 - 24) Ducheck P, Somogyi K, Jekely G, Beccari S, Rorth P: Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor. *Cell*, 107: 17-26, 2001.
 - 25) Cho NK, Keyes L, Johnson E, Heller J, Ryner L, Karim F, Krasnow MA: Developmental control of blood cell migration by the Drosophila VEGF pathway. *Cell*, 108: 865-876, 2002.
 - 26) Kiyono M, Shibuya M: Bone morphogenetic protein 4 mediates apoptosis of capillary endothelial cells during rat pupillary membrane regression. *Mol Cell Biol*, 23: 4627-4636, 2003.
 - 27) Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277: 55-60, 1997.
 - 28) Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM: Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res*, 83: 233-240, 1998.
 - 29) Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ: Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, 93: 741-753, 1998.
 - 30) Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compennolle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angelillo A, Mattot V, Nuyens

- D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E: Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 98: 147-157, 1999.
- 31) Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M: The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, 107: 789-800, 2001.
- 32) Yamazaki D, Suetsugu S, Miki H, Kataoka Y, Nishikawa S, Fujiwara T, Yoshida N, Takenawa T: WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature*, 424: 452-456, 2003.