



구강암 세포에서 혈관내피성장인자 수용체-3 억제제의 항종양 효과

김찬우 · 김성곤 · 박영욱

강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

Anti-tumor Effects of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 Inhibitor on Oral Cancer Cells

Chan-Woo Kim, Seong-Gon Kim, Young-Wook Park

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Gangneung-Wonju National University College of Dentistry

Purpose: Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a key role in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis including induction of endothelial cell proliferation, migration and capillary tube formation. E7080 (S1164, Selleck chemical, Houston, TX, USA) is a multi-targeted kinase inhibitor, which targets VEGF receptor-2, 3 (VEGFR-2, 3) and inhibits survival and proliferation of tumor cell. The purpose of this study was to determine the anti-tumor effect of E7080 on oral squamous cell carcinoma.

Methods: An oral squamous cell carcinoma cell line, SCC-9 was used in this study. E7080 was applied to SCC-9 cells by 3 different concentrations (1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$). Control means no application of E7080. The cellular growth was evaluated by real-time cell electronic sensing and MTT assay. The signal transduction was evaluated by Western blotting.

Results: In experimental group, SCC-9 cell proliferation was decreased and the VEGFR-3 downstream pathways were inhibited compared with control. Furthermore, increasing the concentration of E7080, the ability of E7080 to disturbance of SCC-9 cell proliferation was increased.

Conclusion: Proliferation of SCC-9 cells was inhibited by E7080, which was through by inhibition of VEGFR-3 downstream pathway. *In vivo* study with E7080 will be required to provide therapeutic benefits in oral squamous cell carcinoma.

Key words: Squamous cell carcinoma, VEGFR-3, E7080

원고 접수일 2012년 7월 11일, 원고 수정일 2012년 7월 13일,
게재 확정일 2012년 7월 13일

책임저자 박영욱
(210-702) 강릉시 죽헌길 7, 강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
Tel: 033-640-3183, Fax: 033-640-3103, E-mail: ywpark@gwnu.ac.kr

RECEIVED July 11, 2012, REVISED July 13, 2012,
ACCEPTED July 13, 2012

Correspondence to Young-Wook Park
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Gangneung-Wonju National
University College of Dentistry
7, Jukheon-gil, Gangneung 210-702, Korea
Tel: 82-33-640-3183, Fax: 82-33-640-3103, E-mail: ywpark@gwnu.ac.kr

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

신생혈관 형성(angiogenesis)과 림프관 신형성(lymphangiogenesis)은 기존에 존재하는 혈관계와 림프관계의 내피세포로부터 새로운 혈관과 림프관이 형성되는 과정으로 세포의 기질의 재형성과 내피세포의 이주 및 증식, 고리 형성, 모세혈관의 분화 및 혈관과 림프관의 문합 그리고 최종적으로 혈관 및 림프관강이 형성되는 단계로 이루어진다[1,2]. 암종(carcinoma)의 신생혈관 형성과 림프관 신형성은 암종의 성장과 전이에 있어서 필수적으로 진행되어야만 하는 과정이다[3,4]. 암종은 새로운 혈관과 림프관의 형성 없이는 2~3 mm 이상의 크기로 성장할 수 없으며 또한 혈관 및 림프관의 형성은 종양세포의 순환계로의 침투를 용이하게 하여 원격전이를 일으키는 통로를 제공한다[5].

암종의 신생혈관 및 림프관형성 능력은 vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β (TGF- β) 등의 혈관형성자극인자의 발현에 의하여 촉진된다[1,2,6]. 그 중 VEGF는 가장 중요한 역할을 하는 성장인자로 종양세포를 포함한 다양한 세포에서 분비되며, 혈관 및 림프관 내피세포에 특이성이 있어 내피세포의 세포핵 분열을 촉진하고, 세포의 기질의 용해와 내피세포의 이동을 통해 혈관 및 림프관 형성에 기여한다고 알려져 있다[7-10]. VEGF의 혈관에 대한 작용은 수용체의 tyrosine kinase인 VEGF receptor (VEGFR)-1과 VEGFR-2를 통하여 매개된다[7]. VEGFR-2를 통한 신호 전달은 암종의 신생혈관 형성에 있어서 중요하다 [7,11,12]. 또 다른 VEGF 수용기인 VEGFR-3는 신생혈관 및 림프관 신형성에 중요한 역할을 하고 두 개의 리간드인 VEGF-C와 VEGF-D에 의해서 활성화된다[13-15].

최근에 암종의 신생혈관 형성 및 림프관 신형성에 초점을 맞추어 이 과정을 방해하는 새로운 항암치료 기법들이 대두되고 있다. 직접적으로 신생혈관 형성을 방해하는 치료제들은 혈관 내피세포를 표적으로 하고, 혈관 내피세포의 분화와 이주 및 새로운 혈관 형성능력을 방해함으로써 그 작용을 나타낸다. 이 중, E7080 (S1164, Selleck chemical, Houston, TX, USA)은 경구로 투여되며 VEGF 수용체 내의 tyrosine kinase를 표적으로 삼는 억제제이다[1,16,17]. 특히 E7080은 VEGFR-2와 VEGFR-3를 억제하며 그 밖에 FGFR, PDGFR, 그리고 c-kit 등에도 억제 작용을 나타낸다[1,16-19]. 기존의 연구에서 E7080은 인간의 이종이식 암종모델에서 신생 혈관 형성 및 림프관 형성 억제제를 통한 항암효과를 나타내었다[7,18]. 또한 기존의 범혈관 형성 억제제를 기반으로 하는 항암제 중 가장 널리 쓰이고 있는 bevacizumab (Avastin, Genentech, San Francisco, CA, USA)에 비해서도 훨씬 더 효과적인 항암효과를 보였음을 나타내는 연구가 발표되었다[18].

악성종양은 다른 조직으로 침습하고 또한 다른 부위로 이주하

는 능력을 가지고 있기에 양성종양과는 다르며, 이는 암의 진행에 중요한 특징 중 하나이다. 암종의 신생 혈관과 림프관 신형성 과정은 종괴의 지속적 증식과 악성 전이에 있어서 반드시 필요한 과정이다[20]. 그러므로 신생혈관 형성 및 림프관 신형성을 방해하는 것은 암종의 치료에 있어서 매우 중요한 전략이 될 수 있다. 저자는 E7080이 구강 편평상피세포암종 세포주인 SCC-9 종양세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 *in vitro* 연구를 통하여 알아보기로 하였다.

연구방법

1. 세포주 및 세포배양

인간의 구강 편평상피세포암종에서 채취한 SCC-9 (human tongue carcinoma; ATCC; Manassas, VA, USA) 세포주가 본 실험에 이용되었다. 세포배양은 10% 우태혈청(fetal bovine albumin, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 units/mL penicillin (invitrogen) 및 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen)을 사용하였다. 모든 세포들은 단일층으로 배양하였으며 55% 습도를 유지하며 37°C의 5% CO₂, 95% 대기하에서 유지되었다.

2. 시약

혈관내피성장인자 수용체 억제제로는 Selleck chemical 회사에서 합성된 S1164, 즉 4-[3-Chloro-4-(N-cyclopropylureido)phenoxy]-7-methoxyquinoline-6-carboxamide (E7080)이 사용되었다. *In vitro*에서 E7080 (10 mmol/L)의 모액(stock solution)은 dimethyl sulfoxide에 준비하였고 -20°C에서 보관하였으며 사용 전에 배지와 함께 희석시켰다.

3. Real time cell electronic sensing (RT-CES) assay

종양세포를 배양액 100 μ L당 2×10^3 개가 되도록 96-well plate에 분주하고 세포 증식을 RT-CES system (ACEA biosciences, San Diego, CA, USA)을 통하여 관찰하였다. 분주 8시간 경과 후 4개의 그룹으로 나누어 대조군과 E7080을 5, 10, 20 μ g/mL의 농도로 투여한 배양액을 첨가하여 37°C에서 56시간 동안 RT-CES system을 통하여 관찰하였다.

4. MTT assay

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)를 이용한 분석법을 사용하여 진행하였다. 우선 종양세포를 배양액 100 μ L당 2×10^3 개가 되도록 각각의 96-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 E7080을 1, 5, 10 μ g/mL 농도로

투여한 배양액을 넣고 37°C에서 두 군으로 나누어 각 군마다 24시간, 48시간 동안 반응하도록 하였다. 배양액을 버리고 phosphate-buffered saline으로 세척한 후 MTT가 50 µg/mL 포함된 배양액에서 추가로 2시간 배양하였다. 배양액을 버린 후 각각의 well plate의 dark blue crystal은 100 µL의 dimethyl sulfide를 통하여 용해시켰다. 그 후 분광광도계로 550 nm의 파장의 흡광도를 측정하였다.

5. Western blotting

종양세포를 ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 용해시켰다. 이때 시약에는 protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 단백 분해를 억제하였다. 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel로 분리한 다음 Polyvinylidene fluoride membranes으로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막은 5% skim milk powder를 Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, pH 7.6)에 녹인 용액을 이용하여 1시간 동안 상온에서 blocking을 시행하였다. Western blot analyses는 anti-phospho-c-jun (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-phospho-Akt (Full Moon bio-systems, Sunnyvale, CA, USA) 및 anti-β-actin (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 항체를 이용하여 시행하였다. 1차 항체 모두 TBS-T buffer에 1:1,000으로 희석한 다음에 상온에서 90분간 배양한 후 HRP-conjugated secondary antibodies (1:5,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 표적 단백질은 ChemiDoc (BioRad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 검출하였다. 마찬가지로 4개의 그룹으로 나누어 아무것도 첨가하지 않은 대조군과 각각 1, 5, 10 µg/mL의 E7080을 첨가한 그룹으로 나누어 검출하였다.

6. 자료 분석 및 통계

RT-CES로 관찰한 세포의 증식은 Microsoft Excel (Microsoft, Seattle, WA, USA) 프로그램을 통하여 그래프로 나타내었다. RT-CES를 통한 분석은 E7080을 투여한 후 12시간 간격으로 측정된 cell index 값을 평균으로 하여 Excel의 independent t-test를 이용하여 통계처리를 하였다. MTT assay 시 흡광도 (optical density)는 550 nm 파장에서 분광광도계를 이용하여 측정하였고, 3번 측정된 값을 수치화한 후 평균값의 비교는 Microsoft Excel의 independent t-test를 이용하여 통계 처리 하였다. 통계 분석 시 0.05 이하의 P값을 유의성 있는 차이로 인정하였다. Western blot 분석법에서 대조군과 실험군들 간의 상대적인 밴드 두께의 비교는 Image Lab software (Bio-Rad)를 통하여 분석하였고 β-actin 밴드의 두께를 기준으로 하여 an-

ti-phospho-c-jun과 anti-phospho-Akt를 항체로 하여 확인된 밴드의 두께를 상대적으로 분석하고 정량화하였다.

결 과

1. RT-CES를 통한 SCC-9 세포의 증식성 평가

E7080을 투여하기 전까지 모든 군의 세포들의 증식은 지속적으로 증가하는 양상을 보였다. 세포 배양 8시간째에 E7080을 투여한 후부터 각 군마다 증식곡선의 차이를 보였는데 약을 투여한 후 12시간째에서는 5, 10, 20 µg/mL를 투여한 세 군 모두에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 cell index 값이 감소하였다. 그러나 약을 투여한 후 24시간째에서는 10, 20 µg/mL를 투여한 군에서만 통계적으로 유의하게 cell index 값의 감소가 관찰되었고 약을 투여한 후 48시간째에는 20 µg/mL를 투여한 군에서만 통계적으로 유의하게 cell index 값의 감소를 보였다. 실험이 종료되었을 때 전반적으로 대조군에 비하여 실험군에서 SCC-9 세포주의 증식이 억제된 양상을 나타내었으나 통계적인 유의성은 20 µg/mL를 투여한 군에서만 나타났다. E7080 농도가 증가할수록 SCC-9 세포주의 증식 억제도 이에 비례하여 증가된 양상을 보였다(Fig. 1).

2. MTT assay를 통한 SCC-9 세포의 증식성 평가

E7080을 투여한 실험군과 대조군에서의 24시간과 48시간에 흡광도를 조사한 결과 대조군에서 실험군에 비하여 높은 흡광도를 보였다. 실험군에서는 E7080의 농도가 증가할수록 이에 반비례하여 흡광도는 낮아지는 양상을 보였는데, 특히 5 µg/mL와 10 µg/mL의 E7080을 투여한 군에서는 통계적으로 유의하게 낮은 흡광도 값을 나타내었다(Fig. 2).

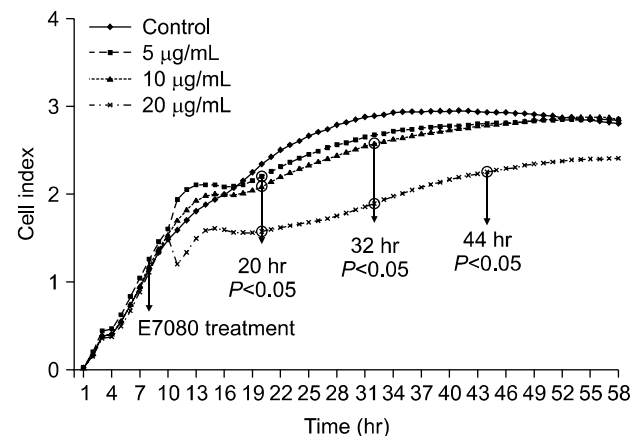


Fig. 1. Cell index of SCC-9 in real time cell electronic sensing image. Mark "O" means cellular proliferation was significantly decreased in each experimental group compared with control.

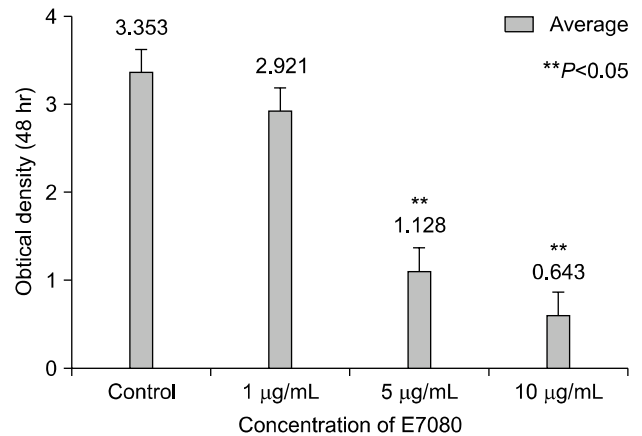
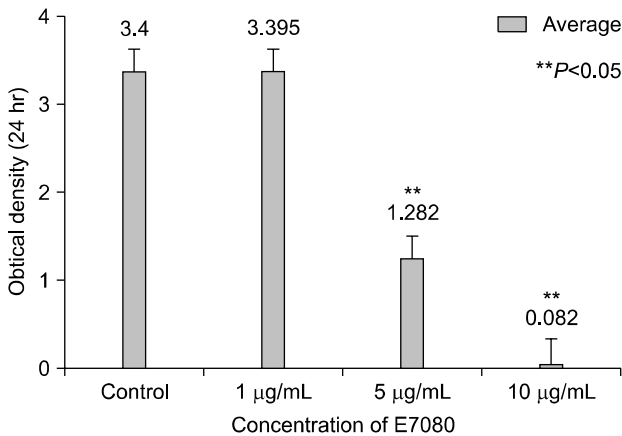


Fig. 2. Optical density of SCC-9 in MTT assay.

3. Western blot을 통한 분석

E7080이 SCC-9 세포주의 VEGFR-3의 downstream pathway에 미치는 영향에 대하여 조사하기 위해 anti-phospho-Akt와 anti-phospho-c-jun 항체로 Western blot을 시행하였다. β-actin을 표준화된 값으로 하여 비교한 결과 akt와 c-jun이 결합된 단백질 밴드의 두께가 대조군에 비하여 실험군에서 더 얇게 나타났다. 또한 E7080의 농도가 증가할수록 phospho-akt와 c-jun 모두에서 밴드의 두께가 점점 얇아지는 것으로 분석되었다(Fig. 3, 4).

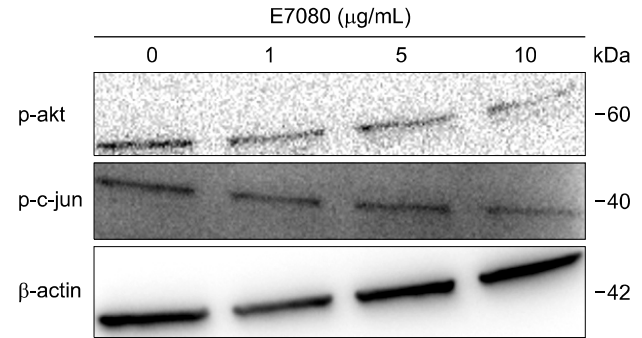


Fig. 3. Western blot assay.

고찰

구강 편평상피세포암은 두경부에서 발생하는 악성종양 중 대표적인 것으로 림프관을 통하여 경부 림프절로의 전이 경향이 강하여 이러한 임상적 특성은 치료 시 매우 불량한 예후를 야기하는 것으로 알려져 있다. VEGFR-3는 특히 신생 림프관 형성에 중요한 역할을 하는 수용체로서 E7080은 VEGFR-3를 차단하여 암종의 신생 림프관 형성을 억제함으로써 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[7,18]. 따라서 림프절로의 전이 성향이 강한 구강 편평상피세포암에 대해서 E7080이 효과를 나타낸다면 이는 새로운 표적치료제로 사용될 수 있을 것이고 구강암의 경부 림프절 전이와 원격 장기로의 전이를 억제시켜서 결국 환자의 생존율을 높이고 삶의 질을 향상시키는 데 기여할 수 있을 것으로 생각한다.

종양이 성장하고 주변조직을 침습하며 원격전이가 이루어지는 다단계 과정에서 신생혈관 형성은 반드시 필요한 조건이다[5]. 혈관형성과 관련된 인자들은 대표적으로 TGF-α, TGF-β, bFGF, VEGF, TNF-α 및 angiogenin 등이 있다[21-29]. 이 중에서 특히 VEGF는 혈관형성에 있어서 가장 중요한 역할을 담당하고 있다고 보고되고 있다[10,30-34]. VEGF는 혈관내피세포의 세포핵 분열을 촉진하고 세포외 기질의 용해 및 이를 통한 내피세포의 이동을 통하여 혈관 형성에 기여한다고 알려져 있다

[7,11,18,31]. VEGF는 VEGF 수용체(VEGFR)를 통하여 그 기능이 발현되며 이러한 수용체들은 혈관내피세포의 세포막에 위치하고 있고, 세포외 기질에 존재하는 VEGF와 결합한 후에 활성화되어 그 고유의 기능을 나타낸다[35,36]. 기존 연구에서 밝혀진 바에 의하면 종양세포에서 VEGF mRNA가 발현되는 것이 관찰되었으며, VEGF 단백질 분비되는 현상도 관찰되었다[37,38]. 또한 종양에서 VEGF의 발현이 증대되면 이와 비례하여 VEGFR의 발현 역시 증가한다는 것이 기존의 연구들에서 보고되었다[39].

E7080은 최근에 임상적인 연구로 합성된 새로운 다표적(multi-targeted) 인산화효소(kinase) 억제제이다. E7080은 경구로 투여하며, 주된 작용부위는 VEGFR-2와 VEGFR-3인 것으로 알려져 있고 이를 통하여 신생 혈관 형성 및 신생 림프관 형성을 억제한다고 알려져 있다. E7080은 다양한 종류의 암종을 이용한 이종이식모델에서 VEGFR의 활성화를 억제하고 최종적으로 신생 혈관형성을 억제함으로써 항암작용을 나타내었다[19].

Ikuta 등[17]은 *in vitro*와 인간 이종이식 모델을 통한 실험에서 E7080이 VEGFR-3와 FGFR-1을 억제하여 내피세포의 증식을 억제하는 작용을 한다는 것을 밝혀내었다. 그 밖에 Matsui 등[18]은 *in vitro*와 이종이식 모델 실험을 통하여 E7080이 MDA-MB-231 종양세포에서 VEGFR-3를 억제하여 림프관의 밀도를 감소시키며

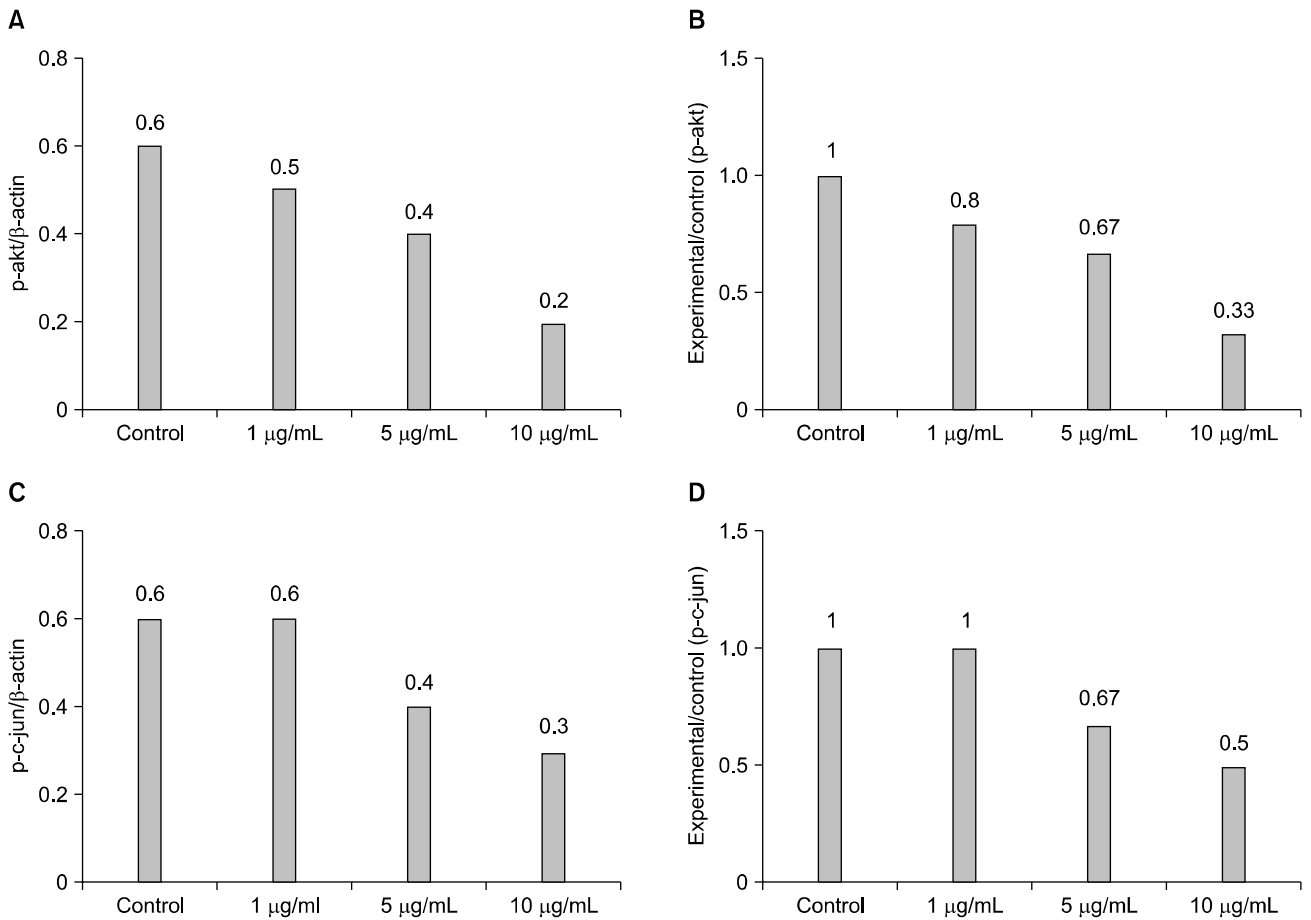


Fig. 4. Quantitative analysis of Western blot assay. (A) Ratio of p-akt to β -actin. (B) Relative value of experimental group on control group in p-akt. (C) Ratio of p-c-jun to β -actin. (D) Relative value of experimental group on control group in p-c-jun.

기존의 항암치료제인 bevacizumab과의 비교 연구를 통하여 E7080이 림프관 밀도를 감소시키는 데 더 효과적임을 입증하였다.

이와 같이 외국의 연구들에서 E7080의 효과와 작용이 입증되어 왔지만, 구강내 편평상피세포암종에 대한 연구는 거의 보고된 바가 없으며 따라서 임상적인 적용 역시 아직 시도되지 않은 실정이다. 본 연구에서는 E7080을 구강 편평상피세포암종 세포주인 SCC-9에 적용하였다. RT-CES와 MTT 분석 결과 E7080 투여 후 SCC-9 세포주의 증식이 억제되는 양상을 관찰할 수 있었고, E7080의 농도가 증가함에 따라 종양세포 증식 억제능이 증가됨이 확인되었다. 추가적으로 E7080이 VEGFR-3의 downstream pathway에도 영향을 주는지 결정하기 위해서 관련 인자들에 대한 Western blot을 시행하였다. VEGFR-3의 인산화는 세포의 생존, 증식, 이주, 세포투과성과 관련된 신호전달체계들을 활성화시키는데 본 연구에서는 특히 세포의 생존과 증식에 관련된 akt와 c-jun 인산화 효소 신호전달체계에 E7080이 어떠한 영향을 주는지에 대하여 확인하였다[40]. 결과적으로 E7080은 akt와 c-jun 인산화 효소 신호전달체계를 억제하였고 농도가 증가할수록 그 억제 능력 역시 증가함을 알 수 있었다.

VEGFR-3는 두 개의 다른 리간드인 VEGF-C와 VEGF-D에 의해서 활성화되며 CRK-1, 2, MAPK, PI-3K 등의 신호전달을 활성화시킨다. 또한 이들에 의해서 akt, erk, PLC γ 1, stat 3과 5, JNK (c-jun NH₂-terminal kinase) 1과 2 등의 신호전달이 활성화되며 이로 인해 세포의 생존과 이주, 증식 및 세포 투과성의 증대를 가져오게 된다. 특히 akt와 JNK의 인산화는 세포의 생존과 증식에 있어서 매우 중요한 요소로 이것의 차단은 세포의 증식억제와 사멸(apoptosis)을 의미한다[40]. 이는 종양의 표적 치료를 위한 중요한 단서를 제공하며 본 실험의 결과를 통해 추론해 보았을 때, 구강암 세포주인 SCC-9 종양 세포막에는 VEGFR이 발현되며 E7080이 구강 편평상피세포암에 대한 항종양 치료제로서 가능성을 보여줄 수 있다고 생각한다.

결론

본 연구는 구강 편평상피세포암 세포주인 SCC-9에 대한 VEGFR 억제제의 영향을 결정하기 위하여 시행되었다. 본 실험에서 E7080을 투여한 군에서는 대조군에 비해서 종양세포의 증식이

억제되는 양상을 보였고, E7080의 농도가 증가함에 따라 세포 증식의 억제 능력도 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 다양한 수용체 인산화효소의 억제효과를 가진 E7080은 특히 VEGFR-3의 downstream pathway를 차단하여 종양세포의 증식을 억제함을 Western blot을 통한 분석에서 추정해 볼 수 있었다. 추후 E7080의 SCC-9에 대한 증식 억제에 관한 *in vivo* 실험 및 다른 구강편평상피세포암종 세포주에 대한 효과와 관련한 추가적인 실험이 필요할 것이라고 생각이 된다. 이와 같은 실험데이터의 축적과 적정 투여 용량에 대한 평가 및 약물의 부작용에 대한 임상실험 등이 시행된다면 앞으로 E7080을 통한 구강암의 항암 치료가 가능하리라고 생각한다.

Acknowledgements

This study was supported by a grant of the Korean Healthcare Technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (A080293).

References

- Glen H, Mason S, Patel H, Macleod K, Brunton VG. E7080, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor suppresses tumor cell migration and invasion. *BMC Cancer* 2011;11:309.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
- Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:624-30.
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000;21:505-15.
- Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;20:4368-80.
- Moser C, Lang SA, Stoeltzing O. The direct effects of anti-vascular endothelial growth factor therapy on tumor cells. *Clin Colorectal Cancer* 2007;6:564-71.
- Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS, Ferrara N. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 1993;133:848-59.
- Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 1993;91:2235-43.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
- Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 2001;98:1904-13.
- Xia G, Kumar SR, Hawes D, *et al.* Expression and significance of vascular endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer. *J Urol* 2006;175:1245-52.
- Su JL, Yen CJ, Chen PS, *et al.* The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 2007;96:541-5.
- Park YW, Kwon KJ, Lee JW. Immunohistochemical study on expression of lymphangiogenic factors in oral cancer. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2010;32:1-8.
- Karkkainen MJ, Mäkinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol* 2002;4:E2-5.
- Matsui J, Yamamoto Y, Funahashi Y, *et al.* E7080, a novel inhibitor that targets multiple kinases, has potent antitumor activities against stem cell factor producing human small cell lung cancer H146, based on angiogenesis inhibition. *Int J Cancer* 2008;122:664-71.
- Ikuta K, Yano S, Trung VT, *et al.* E7080, a multi-tyrosine kinase inhibitor, suppresses the progression of malignant pleural mesothelioma with different proangiogenic cytokine production profiles. *Clin Cancer Res* 2009;15:7229-37.
- Matsui J, Funahashi Y, Uenaka T, Watanabe T, Tsuruoka A, Asada M. Multi-kinase inhibitor E7080 suppresses lymph node and lung metastases of human mammary breast tumor MDA-MB-231 via inhibition of vascular endothelial growth factor-receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 kinase. *Clin Cancer Res* 2008;14:5459-65.
- Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, *et al.* E7080 suppresses hematogenous multiple organ metastases of lung cancer cells with nonmutated epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Ther* 2011;10:1218-28.
- Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994;79:185-8.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133:275-88.
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
- Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987;8:95-114.
- Esch F, Baird A, Ling N, *et al.* Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6507-11.
- Jaye M, Howk R, Burgess W, *et al.* Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* 1986;233:541-5.
- Gospodarowicz D, Thakral KK. Production a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A 1978;75:847-51.
27. Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, *et al.* Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci U S A 1987;84:2292-6.
 28. Matsuzaki K, Yoshitake Y, Matuo Y, Sasaki H, Nishikawa K. Monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor II/basic fibroblast growth factor that block its biological activity: invalidity of the antibodies for tumor angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:9911-5.
 29. Dennis PA, Rifkin DB. Studies on the role of basic fibroblast growth factor in vivo: inability of neutralizing antibodies to block tumor growth. J Cell Physiol 1990;144:84-98.
 30. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. J Clin Invest 1999;103:159-65.
 31. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000;407:242-8.
 32. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. Nat Med 2003;9:685-93.
 33. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. Oncologist 2004;9 Suppl 1:2-10.
 34. Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, *et al.* Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. Clin Cancer Res 1997;3:861-5.
 35. Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 1990;265:19461-6.
 36. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. J Clin Invest 1992;89:244-53.
 37. Volm M, Koomägi R, Mattern J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. Int J Cancer 1997;74:64-8.
 38. Brown LF, Berse B, Jackman RW, *et al.* Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. Cancer Res 1993;53:4727-35.
 39. Brown LF, Berse B, Jackman RW, *et al.* Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. Hum Pathol 1995;26:86-91.
 40. Salameh A, Galvagni F, Bardelli M, Bussolino F, Oliviero S. Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways. Blood 2005;106:3423-31.