



Title	Studies on establishment of novel experimental model of human angiosarcoma and VEGF-targeting therapeutic experiment
Author(s)	保科, 大地
Description	配架番号 : 2058
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11042号
Issue Date	2013-06-28
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11042
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53201
Type	doctoral thesis
File Information	Daichi_Hoshina.pdf



学 位 論 文

Studies on establishment of novel experimental model of human
angiosarcoma and VEGF-targeting therapeutic experiment

(新規ヒト血管肉腫の実験モデルの樹立と血管内皮増殖因子標的治療
の検討)

2013 年 6 月

北 海 道 大 学

保 科 大 地

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Daichi Hoshina, Riichiro Abe, Naoya Yoshioka, Nao Saito,
Hiroo Hata, Yasuyuki Fujita, Satoru Aoyagi, Hiroshi Shimizu

Establishment of novel experimental model of human angiosarcoma and
VEGF-targeting therapeutic experiment

Journal of Dermatological Science, doi:10.1016/j.jdermsci.2013.02.008,

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 保科大地, 阿部理一郎, 秦 洋郎, 藤田靖幸, 青柳 哲, 清水 宏
ヒト血管肉腫実験モデルを用いた抗ヒト VEGF 抗体(bevacizumab)の抗腫瘍効果の検討
第 16 回分子皮膚科学フォーラム 札幌, 2009.11.
2. Hoshina D, Abe R, Hata H, Fujita Y, Yoshioka N, Aoyagi S, Shimizu H
Establishment of a novel experimental model of human angiosarcoma
The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
Fukuoka, 2009.12.
3. Hoshina D, Abe R, Hata H, Fujita Y, Aoyagi S, Shimizu H
Remarkable tumor disruption induced by anti-angiogenic receptor tyrosine kinase inhibitor in a novel experimental model of human angiosarcoma
The 70th annual meeting of the Society for Investigative Dermatology
Atlanta, USA, 2010.5.
4. Hoshina D, Abe R, Yoshioka N, Hata H, Fujita Y, Aoyagi S, Shimizu H
Investigation of VEGF signaling on human angiosarcoma using a novel experimental model
The 40th annual meeting of the European Society for Investigative Dermatology
Helsinki, Finland, 2010.9.
5. Hoshina D, Abe R, Yoshioka N, Hata H, Fujita Y, Aoyagi S, Shimizu H
Evaluation of anti-tumor efficacy of sunitinib malate in a novel experimental model of human angiosarcoma
The 69th annual meeting of the Japanese Cancer Association
Osaka, 2010.9.

緒言

血管肉腫は、比較的まれな、最も悪性度の高い間葉系悪性腫瘍のひとつである (Coindre et al., 2001)。血管肉腫は様々な臓器に発生しうるが、最も頻度の高い発生部位は皮膚であり、特に高齢者の頭頸部皮膚に生じる (Rouhani et al., 2008)。治療としては、放射線療法や化学療法が施行されているが、しばしば高頻度に再発や転移を起こし、死の転帰を辿る。予後は不良であり、生存期間に関しては、5年生存率35% (Fayette et al., 2007)、もしくは生存期間の中央値は7ヶ月 (Abraham et al., 2007) と報告されている。

血管肉腫の病態は解明されていないことが多いが、その原因のひとつにヒト血管肉腫の実験モデルが非常に限られている点があげられる。ヒト血管肉腫の培養細胞は、過去にISO-HAS (Masuzawa et al., 1999) およびAS-M (Krump-Konvalinkova et al., 2003) の2つの培養細胞が報告されているのみである。ISO-HASは、マウス血管肉腫の培養上清がその細胞培養には必要であり、管理がやや煩雑であるという欠点がある。また、AS-Mは*in vivo*での血管肉腫の組織を形成できないという欠点がある。なお、ヒト血管肉腫の*in vivo*の実験モデルを用いた治療実験はほとんど行われていない。このような状況が、ヒト血管肉腫に対する有効な治療の確立のための障壁となっているものと考えられる。

血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) は最も強力な血管新生誘導因子である。悪性腫瘍には、自らを栄養する血管を誘導する腫瘍血管新生という病態が存在するが、VEGFはその病態に関与しており、腫瘍の生存に大きな役割を果たしている増殖因子の1つと考えられている (Hicklin and Ellis, 2005)。腫瘍の血管新生を阻害することで腫瘍の増大を抑制するという想定のもと、VEGFシグナルを標的とした様々な薬剤が開発され、腎細胞癌など一部の腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている (Motzer et al., 2006)。

血管肉腫は、血管内皮細胞由来の間葉系悪性腫瘍と考えられており、VEGFはその病態に大きく関与していると考えられている (Park et al., 2010)。実際、血管肉腫の組織ではVEGFやVEGF受容体 (VEGF receptors: VEGFRs) が発現しており、血管肉腫の増殖や浸潤、転移にはVEGFシグナルが関与していると想定されている (Itakura et al., 2008; Tokuyama et al., 2010)。このことから、

VEGF シグナルを標的とした治療薬は、血管肉腫に対して有望な治療薬になりうるものと期待されている。

そこで、血管肉腫に対して VEGF シグナルを標的とした薬剤が有効なのではないか、という仮説を立て、この仮説を検証するため実験を行った。

まず、ヒト血管肉腫の切除検体を免疫抑制マウスへ移植して **xenograft** を作成した。この **xenograft** からヒト血管肉腫の培養細胞を樹立した。また、**xenograft** 由来のヒト血管肉腫組織を免疫抑制マウスで継代維持することで、*in vivo* 実験モデルとして使用した。培養細胞を用いた検討から、VEGF は血管肉腫の増殖を促進する効果があることが示された。よって、VEGF シグナルを標的とした治療実験として、抗 VEGF 抗体(**bevacizumab**)および受容体型チロシンキナーゼ阻害剤(**sunitinib malate**)を用いた。しかし、これらの薬剤は、単剤では *in vitro* および *in vivo* とともに抗腫瘍効果を示さなかった。

血管肉腫組織では VEGF と VEGF 受容体の発現が見られることから、VEGF が **autocrine** および **paracrine** により制御され、その増殖や生存に関与していると考えられている。そこで、**sunitinib malate** にて VEGF 受容体を阻害すると、代償的に VEGF の産生が亢進する可能性について検討を加えた。しかし、**sunitinib malate** を投与しても代償的な VEGF の産生亢進は確認されなかった。

以上の結果から、今回用いた **bevacizumab** および **sunitinib malate** は、単剤使用においては血管肉腫に対する抗腫瘍効果を示さない可能性が高いことが示された。また、**sunitinib malate** が無効であった理由は、代償的な VEGF シグナルの活性化によるものではないと考えられた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

Ab	antibody
b-FGF	basic-fibroblast growth factor
EGF	epidermal growth factor
FBS	fetal bovine serum
HMVEC	human microvessel endothelial cells
IGF-1	insulin-like growth factor-1
RTK	receptor tyrosine kinase
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

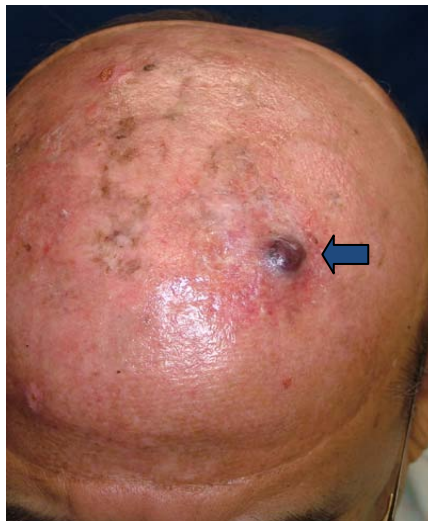
実験方法

1. ヒト血管肉腫組織の採取

血管肉腫の実験モデルは非常に限られているため、ヒト血管肉腫組織からの新規実験モデルの作成を試みた。

まず、インフォームド Consentのもと、81 歳日本人男性の頭部に生じた皮膚血管腫組織の一部を採取した(図 1、矢印)。

図 1

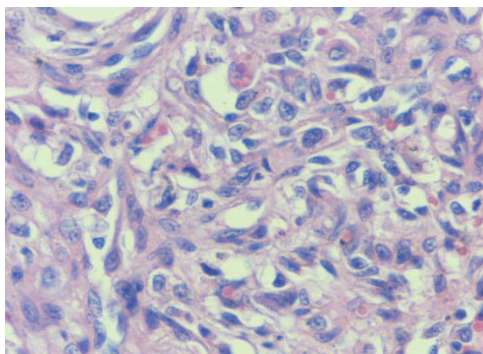


本症例は今回の切除前に、外科的切除および放射線照射療法を施行されていた。今回採取した病変は再発性の病変であり、外科的加療として切除された組織の一部を提供していただいたものである。

手術場にて、病理診断に支障をきたさない部位および大きさの腫瘍組織を切り分け、1%penicillin-amphotericin B を添加した PBS に保存し、氷冷して培養室へ輸送した。

摘出した腫瘍の病理組織所見を以下に示す(図 2)。

図 2



大小の不規則な血管腔で構成される腫瘍組織を認める。epithelial hemangioendothelioma 様の所見であるが、血管腔を構成する内皮細胞様細胞には異形成が見られ、臨床経過から放射線照射により修飾を受けた再発性血管肉腫と診断した。

2. 免疫抑制マウスへのヒト血管肉腫組織の移植：xenograft の作成

採取した血管肉腫組織を 5 x 5 x 5mm 大に細切し、マトリゲル (BD Bioscience、Franklin Lakes、NJ) とともに NOD/*Scid* マウス(4-5 週齢、雌、Clea、Tokyo、Japan)の脇腹の皮下に移植した。移植の実際の作業は、脇腹の皮膚を切開した後、マトリゲルをまとわせた腫瘍組織を皮下へ充填し、6-0 バイクル系にて縫合して終了とした。作業は、「北海道大学動物実験に関する規定」に則り行った。

3. ヒト血管肉腫細胞株の樹立

Xenograft として維持・増大させたヒト血管肉腫の腫瘍を再び取り出し、メスを用いてクリーンベンチ内で粒状になるまで細切した。1%penicillin-amphotericin B を加えた PBS を用いて洗浄後、コラゲナーゼ (Roche、Basel、Switzerland)を加え、一晚インキュベーター(37℃)で反応させた。翌日、懸濁液を 115- μ m 孔大のメッシュで濾過し、その濾過液を遠心、沈殿

物を血管内皮細胞用培地(EBM-2: ClontheC、Mountain View、CA) に懸濁し、コラーゲンで表面処理した培養皿 (Iwaki、Tokyo、Japan)に播種した。血管内皮細胞用培地には、添加物としてハイドロコルチゾン、VEGF、アスコルビン酸、b-FGF、IGF-1、ヘパリン、FBS を加えた。安定した細胞増殖が得られた後、限界希釈法を用いて細胞クローンを作成した。

4. 培養細胞の免疫抑制マウスへの再移植

約 3×10^6 個の培養細胞を、マトリゲルとともに NOD/Scid マウスの脇腹皮下へ移植した。移植 2 ヶ月後、形成された腫瘍を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色および蛍光抗体法を施行し、腫瘍の性状を確認した。

5. 培養細胞の管腔形成能の評価

培養細胞の管腔形成能の有無を評価するため、*in vitro* angiogenesis assay kit (Chemicon、Billerica、MA) を用いた実験を行った。まず、氷冷した 96 ウェルの培養皿に matrix solution をまき、1 時間後に matrix が固まったことを確認した後、培地に懸濁させた 1×10^4 個の細胞を matrix の表層にまきインキュベータ(37℃)で培養した。培養開始後、7 時間後および 22 時間後の細胞の様子を観察した。対照群として、ヒト微小血管内皮細胞株(human microvascular endothelial cell(HMVEC)、Takara Bio、Shiga、Japan) を用いて同様の実験を行った。

6. 培養細胞の VEGFR2 の発現解析：フローサイトメトリー

サンプルとして、ヒト血管肉腫培養細胞、およびコントロールの細胞として HMVEC を使用した。FACS バッファーとして 1%FBS および 0.3%アジ化ナトリウムを添加した PBS を使用した。ヤギ血清にてブロッキングを行った後、一次抗体として mouse anti-human VEGFR2 monoclonal Ab (Abcam、Cambridge、MA)、二次抗体に FITC-conjugated goat anti-mouse polyclonal Ab (Jackson、Bar Harbor、Maine)を用いた。抗体の陽性コントロールとして mouse anti-human CD31 monoclonal Ab (Abcam、Cambridge、MA) を用いた。フ

ローサイトメトリーは FACS-Aria(BD Bioscience)を使用し、FACS DiVa software を用いて解析した。

7. 培養細胞の VEGFR2 発現解析：ウエスタンブロッティング

Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)を用いて細胞抽出液を採取した。ATTO 社(Tokyo, Japan)の泳動槽に、ゲル NPU-5L(ATTO)を使用した。サンプルをアプライし、20mA(C.C.)、80min の条件で電気泳動を行った。BIORAD 社(Tokyo, Japan)の TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRASFER CELL を用いて、20V、200mA、25 分でニトロセルロース膜（アドバンテック東洋株式会社、Tokyo, Japan）に転写を行った後、5%BSA 含有 TBS にて blocking を施行した。Rabbit anti-human VEGFR2 Ab (Cell Signaling Technology) を一次抗体として使用し、二次抗体には HRP-conjugated anti-rabbit IgG を使用した。Lumiglo 発色を行い、LAS4000 にて撮影を行った。

8. VEGF 添加による細胞増殖の評価、および bevacizumab および sunitinib malate を用いた阻害実験(*in vitro*)

培地（EBM-2）に懸濁した培養細胞を collagen-coated 96-well plate (Iwaki) にまき(1×10^4 per well)、細胞の接着を確認した後、培地を除去し、PBS にて洗浄後、VEGF のみを除去した培地に変更して培養を行った。16 時間後、50 ng/ml recombinant VEGF (Sigma, St. Louis, MO) を添加した。4 日後、細胞の増殖を Cell Proliferation ELISA、BrdU (Roche) を用いて評価した。490 nm のレーザー波長を用いて吸光度を測定し、Mithras LB940 (Berthold, Tokyo, Japan)を用いて解析した。

続いて、薬剤を用いた細胞増殖の阻害実験を行った。

96well プレートに 10×10^3 個/100 μ l 培地/well でまき、細胞接着を確認後、以下のように薬剤を添加した。

《bevacizumab による治療実験》

薬剤は中外製薬(東京)より提供されたものを使用した。原液(25mg/ml)を PBS で希釈し、100ng/ml、200ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml になるように培地に添加した。コントロールとして ChromPure Human IgG、whole molecule

(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)を 1000ng/ml になるように調整し添加した。添加後 4 日後に Cell Proliferation ELISA、BrdU を用いて細胞増殖を評価した。

《sunitinib malate による治療実験》

薬剤は LC Laboratories(Woburn, MA)から購入し、クエン酸バッファーに溶解して使用した。

まず、予備実験として、sunitinib malate が培養細胞の VEGFR2 タンパクのリン酸化を阻害することを確認するため、次のような実験を行った。通常の EBM-2 に懸濁した 2×10^6 個の細胞を 6well の dish にまき、2 日間培養した。その後、50ng/ml の VEGF(Cell Signaling Technology)を添加した。一部の dish にはその 1 分後にさらに 100nM になるよう調整した sunitinib malate を添加し、さらに 1 分後には培地を回収して PBS 洗浄、細胞の lysate を抽出した。抽出した lysate をサンプルとして、PathScan Phospho-VEGFR2 (Tyr1175) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling)を用いてリン酸化 VEGFR2 タンパクを測定した。Mithras LB940 (Berthold, Japan)を用いて 490nm のレーザー吸光度を測定した。

次に、sunitinib malate 溶液をそれぞれ 1nM、10nM、100nM、1 μ M になるように調整し添加した。コントロールとしてクエン酸バッファーのみを添加した群を作成した。添加後 4 日後に Cell Proliferation ELISA、BrdU を用いて細胞増殖を評価した。

9. xenograft 動物モデルを用いた治療実験

4-6 週齢の NOD/Scid マウスの皮下に 5 x 5 x 5mm 大のヒト血管肉腫組織を移植した。腫瘍の体積が約 200 mm³ (腫瘍体積は以下の計算式を用いて概算: (腫瘍の長径) x (腫瘍の短径)² / 2 (mm³))に到達したところで薬剤の投与を開始した。

《bevacizumab による治療実験》

PBS を用いて 5 mg/kg および 10 mg/kg となるように調整した bevacizumab を週 1 回腹腔内に局注投与した。1 週毎に腫瘍のサイズを測定し、7 週間投与した後、腫瘍を摘出して投与終了とした。

《sunitinib malate による治療実験》

40 mg/kg および 120 mg/kg の sunitinib malate を 200 μ l のクエン酸バッファーに溶解し、連日経口投与した。隔日で腫瘍のサイズを測定し、2 週間投与後、腫瘍を摘出して投与終了とした。

いずれの実験も 1 群につき NOD/*Scid* マウス 4 匹を用いた。

1 0. Real-time PCR を用いた VEGF mRNA 発現の評価

Sunitinib malate 投与後の、代償的な *VEGF* 遺伝子の発現亢進の有無を確認するため、real-time PCR による評価を行った。100 nM の sunitinib malate を 1×10^6 個の培養細胞に添加し、30 分後に PBS にて洗浄後、RNeasy Mini Kit (Qiagen、Valencia、CA)を用いて細胞由来の RNA を抽出した。プライマーは Applied Biosystems 社に発注して作成した：VEGF (Hs00900055_m1)、GAPDH Endogenous Control (4326317E)。プライマーと抽出した RNA、および TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) を混和し、ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems、Carlsbad、CA)を用いて real-time PCR を施行した。

1 1. 代償的な VEGF タンパクの産生亢進、およびリン酸化 VEGFR2 の有無に関する評価

《VEGF タンパク分泌に関して》

100nM の sunitinib malate を 2×10^5 個の培養細胞に添加し、1 時間後、2 時間後、6 時間後、12 時間後、18 時間後および 24 時間後の培養上清を回収した。回収した培養上清を ELISA キット(Quantikine Human VEGF (Roche))を用いて測定した。

《リン酸化 VEGFR2 に関して》

同様に、100nM の sunitinib malate を 2×10^5 個の培養細胞に添加し、15 分後、30 分後、60 分後、90 分後、120 分後に細胞のライセートを抽出、PathScan Phospho-VEGFR2 (Tyr1175) Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling)を用いてリン酸化 VEGFR2 タンパクを測定した。Mithras LB940 (Berthold、Japan)を用いて 490nm のレーザー吸光度を測定した。

1 2. Bevacizumab および sunitinib malate を用いた治療実験における腫瘍内低酸素状態の評価

HypoxiprobeTM-1 kit (Hypoxiprobe Inc., Burlington, MA)を用いて実験を行った。ヒト血管肉腫の xenograft マウスを作成した後、10mg/kg/week の bevacizumab もしくは 120mg/kg/day の sunitinib malate をマウスに投与した。投与1日後、hypoxyprobe -1 を腹腔内へ投与し、30 分後に腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍はホルマリン固定し、切片を作成した。1 次抗体として anti-pimonidazole mouse IgG1 monoclonal Ab (kit に含有)を用いて染色した。2 次抗体として Biotin-conjugated anti-mouse IgG Ab を用い、3 次抗体として HRP-linked anti-biotin Ab を用いて染色した。染色した切片を顕微鏡にて観察・撮影して所見を確認した。

1 3. 受容体型チロシンキナーゼの活性化に関するスクリーニング解析

The Human Phospho-RTK Array Kit (R&D Systems) および PathScan RTK Signaling Antibody Array Kit (Cell Signal Technology) を用いて、受容体型チロシンキナーゼの活性化に関してスクリーニング解析を行った。①血管肉腫培養細胞に sunitinib malate を添加した群、および添加していない群との比較、②血管肉腫培養細胞と HMVEC(正常コントロール)との間の比較、を行った。lysate を抽出したのち、濃度を測定しタンパク量が 25 μ g となるよう diluent buffer で希釈してメンブレンに添加した。抗体反応を行ったのち、Lumiglo 発色を行い、LAS4000 を用いて写真を撮影した。

1 4. 統計処理

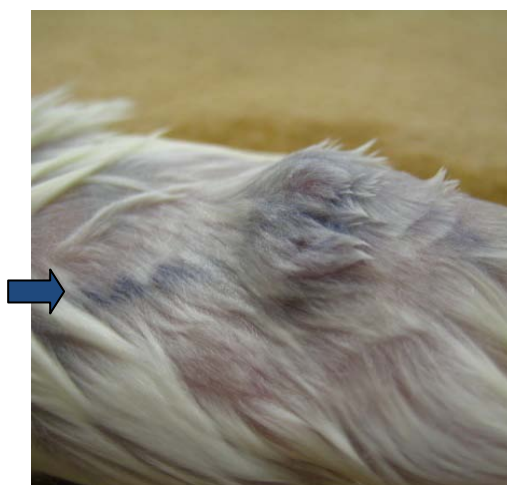
実験データは t 検定を用いて統計処理を行った。P < 0.05 を有意差ありとみなした。データの一部は平均 $\pm$ 標準誤差で表示を行った。

実験結果

1. ヒト血管肉腫組織の採取、および免疫抑制マウスを用いた **xenograft** の作成

外科的に切除された血管肉腫の腫瘍組織の一部を採取し、1% penicillin-amphotericin B を加えた PBS にてクリーンベンチ内で洗浄した後、高濃度マトリゲルに混和した。NOD/*Scid* マウスの脇腹に切開を入れ、マトリゲルとともに腫瘍組織を移植し、6-0 バイクリル糸を用いて閉創した。6 ヶ月後、NOD/*Scid* マウスの大腿部には暗赤色調の皮下腫瘍の形成が確認された (図 3)。

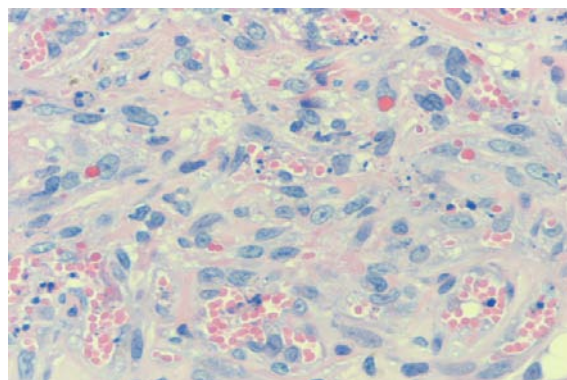
図 3



マウスの大腿部の皮下に暗赤色調の腫瘍形成が確認できる。腫瘍の左手には腫瘍と交通していると考えられる怒張した血管 (矢印) が確認できる。

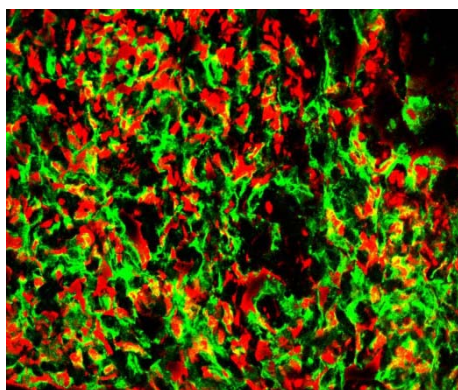
形成された腫瘍を摘出し、再び細切し、NOD/*Scid* マウスへの再移植、組織染色、凍結保存に用いた。ヘマトキシリン・エオジン染色では、異形成を伴った血管内皮細胞により構成される大小不同の血管腔からなる腫瘍組織の所見であり、ヒトから採取した腫瘍組織と類似の所見を呈していたことから、血管肉腫の組織所見と考えた (図 4)。

図 4

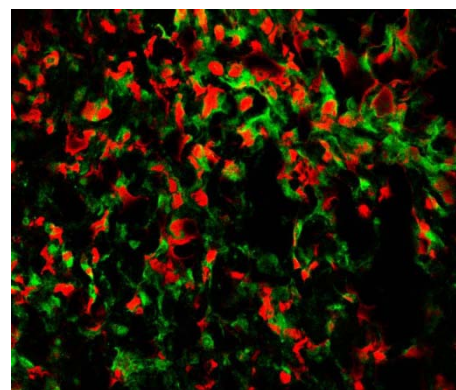


また免疫染色蛍光法にてヒト CD31 およびヒト CD34 の発現を確認したところ、形成された腫瘍はヒト CD31 およびヒト CD34 を発現していた（図 5）。

図 5



ヒト CD31(緑色) 核(赤色)



ヒト CD34(緑色) 核(赤色)

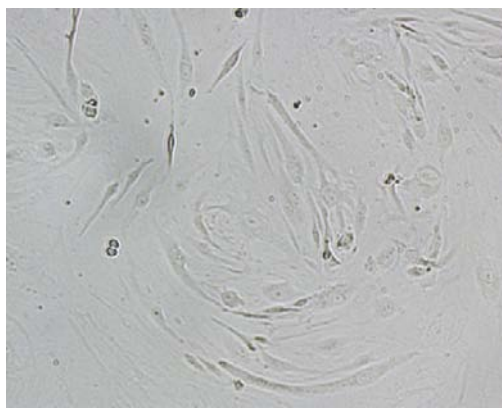
以上の結果から、NOD/*Scid* マウスに形成された腫瘍はヒト血管肉腫として矛盾しないことが確認できた。

2. ヒト血管肉腫細胞株の樹立

NOD/*Scid* マウスに形成されたヒト血管肉腫の腫瘍塊の一部を顆粒状に細切しコラゲナーゼ(Roche)に反応させた。115 μ m フィルターで粗大な組織を除去し

た後、血管内皮細胞用培地を用いて細胞培養を行った。その結果、紡錘系の細胞の接着および増生が確認された（図6）。

図6

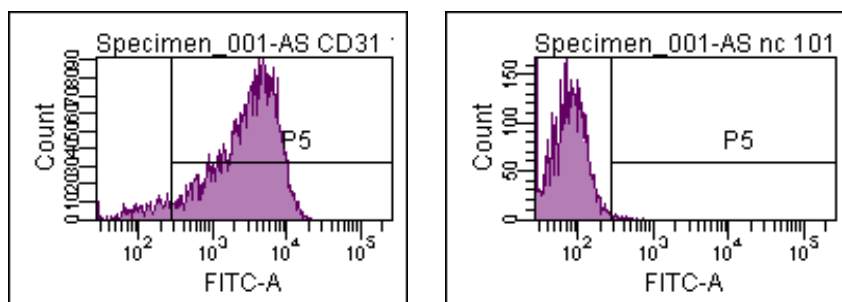


培養細胞がヒト血管肉腫の性質を持っているものか確認するため、以下の実験を行った。

《フローサイトメトリー》

培養細胞を回収し、FACS バッファーに懸濁後、ヤギ血清でブロッキングを行った後、一次抗体として mouse anti-human CD31 Ab、二次抗体として FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG を用いて染色しフローサイトメトリーにて解析を行った。その結果、培養細胞はヒト CD31 を発現していることが確認された（図7）。

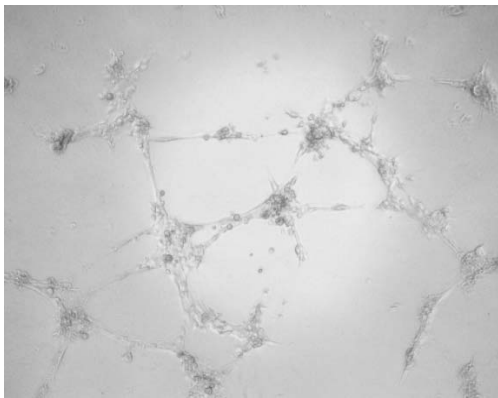
図7



《*in vitro* tube formation assay

培養細胞の血管腔形成能を確認するため、*in vitro* tube formation assay kit(Chemicon)を用いて、tube formation assay を行った。正常コントロールとして HMVEC を使用した。その結果、培養細胞は HMVEC と同様の管腔様構造の形成を示した (図 8)。

図 8



培養細胞

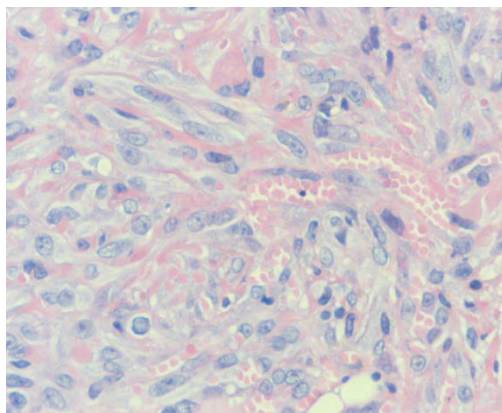


HMVEC

《培養細胞の NOD/*Scid* マウスへの再移植》

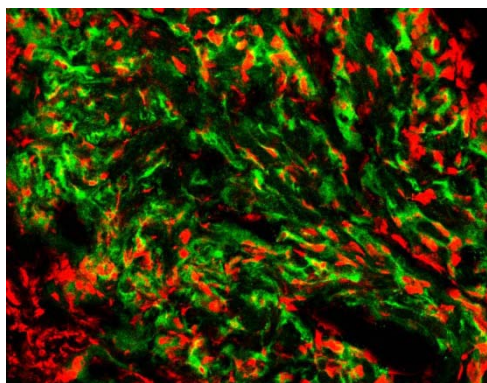
約 3×10^6 個の培養細胞をマトリゲルと混和し NOD/*Scid* マウスの脇腹皮下に移植した。2 ヶ月後に皮下の結節を摘出して、ヘマトキシリン・エオジン染色および免疫染色蛍光法にてヒト CD31 およびヒト CD34 の発現を検証した。その結果、ヘマトキシリン・エオジン染色では、提供されたヒト血管肉腫の腫瘍組織同様、異形成を伴う血管内皮細胞から構成される大小の血管からなる腫瘍組織の形成が確認された (図 9)。

図 9

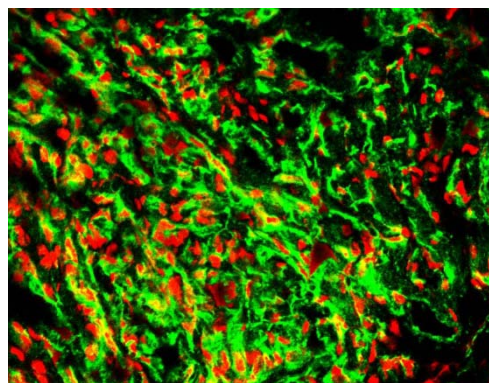


免疫染色蛍光法ではヒト CD31 およびヒト CD34 の発現が確認された (図 10)。

図 10



ヒト CD31(緑色) 核(赤色)



ヒト CD34(緑色) 核(赤色)

以上の結果から、今回樹立した培養細胞はヒト血管肉腫の細胞株と判断した。以下、今回樹立した新規のヒト血管肉腫のセルラインを HAMON(human angiosarcoma、monoclonal)と命名した。

3. ヒト血管肉腫の *in vivo* 実験モデルの確立

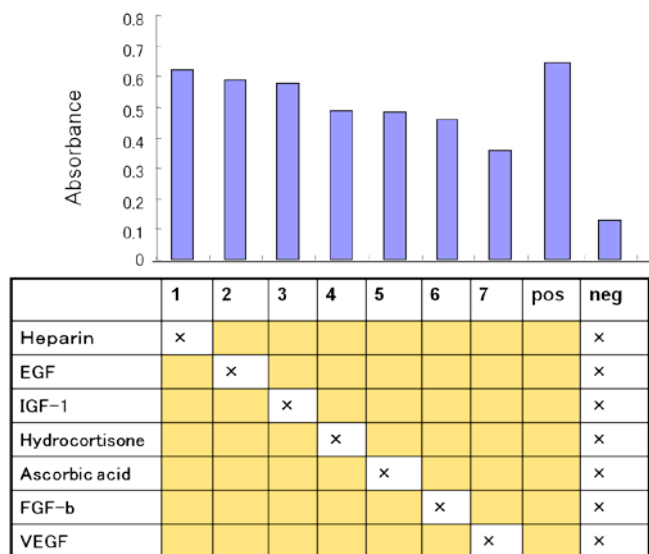
今回樹立した血管肉腫のセルラインは、NOD/Scid マウスに移植することで、ヒト血管肉腫組織を形成することを確認できたが、腫瘍形成効率は必ずしも高くはなかった。そのため、ヒト血管肉腫の腫瘍組織そのものを NOD/Scid マウスの体内で継代維持したものを摘出・細切して再移植する系を *in vivo* の実験モデルとして使用することとした。5x5x5mm の組織を移植すると、ヒト血管肉腫が生着・増大した場合には、2 ヶ月程で 10x10x10mm 程の容積の腫瘍形成(後述する治療実験のスタートラインの容積)が得られる。ときに、急速に増大する腫瘍が形成されることもあったが、そのような腫瘍を摘出して組織学的所見を確認すると、マウス由来のリンパ腫様の組織などが確認されることもあり、そのような腫瘍は実験対象からは除いた。治療実験を行う際には、腫瘍増大の速度のほか、暗赤色調の腫瘍の外観、摘出した際の易出血性、および組織学的所見により、腫瘍がヒト血管肉腫であることを総合的に判定して、実験データの対象とした。このような heterotransplantation の系は過去にも報告があり、その有用性が報告されている(Lopez-Barcons, 2010; Press et al., 2008)。

4. HAMON における VEGF シグナルの解析

血管肉腫は、大小の血管腔で構成される組織学的所見や、免疫染色による解析から、その病態に血管増殖因子、とくに VEGF によるシグナルが、その病態に関与していることが想定されている。免疫染色による解析がなされており (Itakura et al., 2008; Tokuyama et al., 2010)、これらのなかで血管肉腫には VEGF の autocrine や paracrine 分泌による制御が存在することが推察されている。

実際、今回の HAMON の培養において培地に添加した増殖因子を 1 つずつ除いた培地を用いて proliferation assay を行くと、VEGF を取り除いた培地で、HAMON の増殖が最も抑制された (図 1 1)。

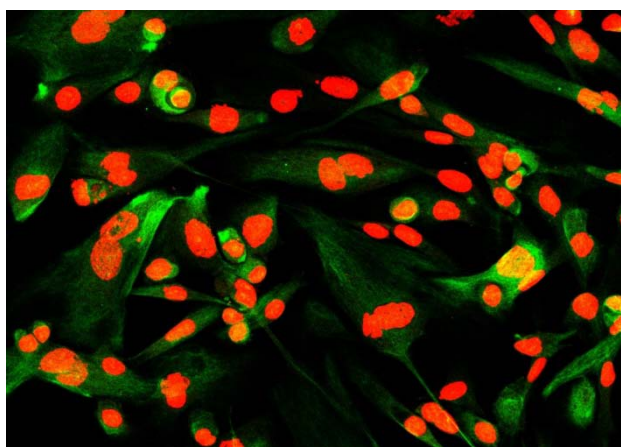
図 1 1



そこで、HAMON を用いて、VEGF シグナルの検証を行うこととした。

HAMON をスライドカルチャーにて免疫染色を行うと、細胞質が VEGF で染色された (図 1 2)。

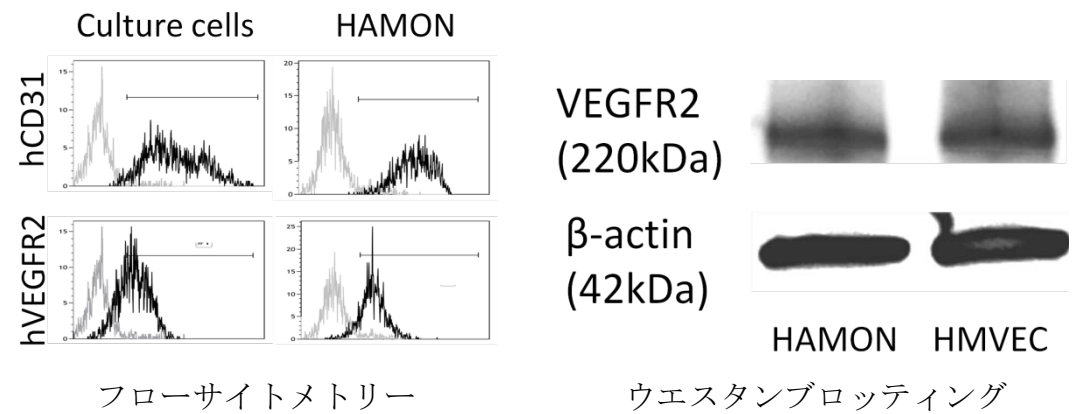
図 1 2



VEGF(緑色), 核(赤色)

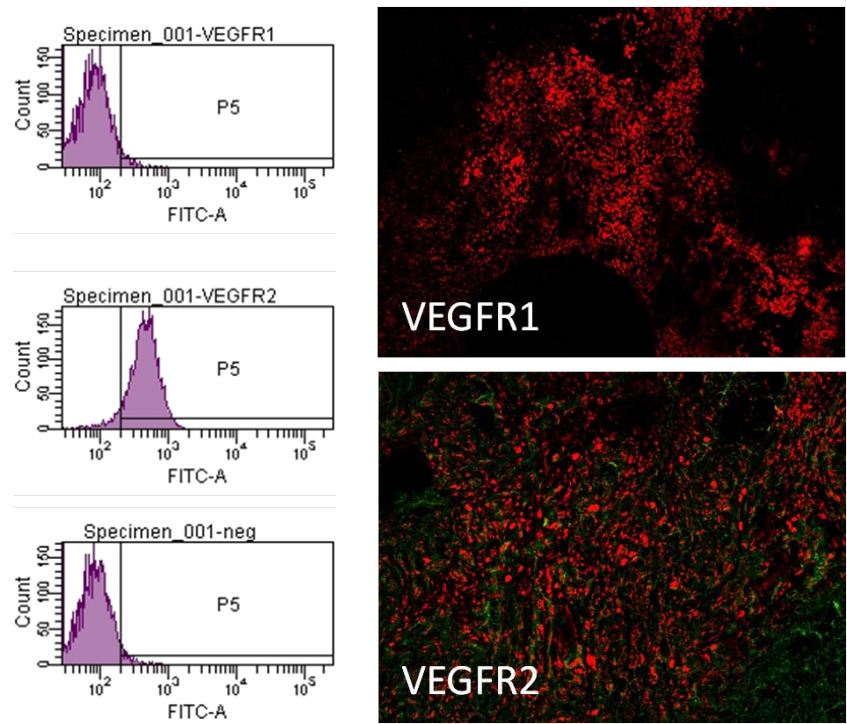
また、フローサイトメトリーおよびウエスタンブロッティングによる解析にて、HAMON は VEGFR2 を発現していることが確認された（図 1 3）。

図 1 3



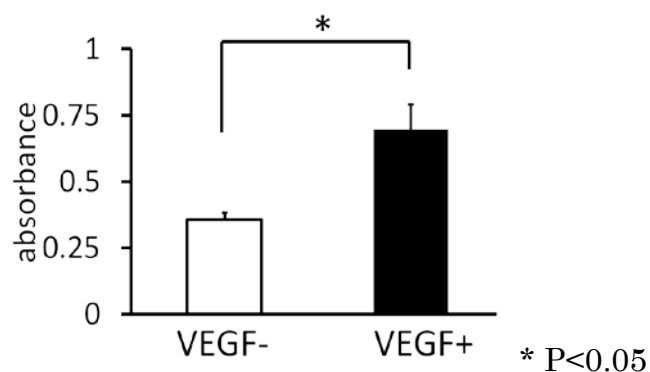
なお、VEGFR1 はフローサイトメトリー、免疫染色蛍光法にて評価したが、発現が確認できなかった（図 1 4）。

図 1 4



そこで、VEGFR2 が機能的に発現しているかどうか確認するため、HAMON に VEGF を添加すると細胞増殖が促進されるかどうかの検証を行った。その結果、VEGF は HAMON の増殖を有意に促進した（図 1 5）。

図 1 5



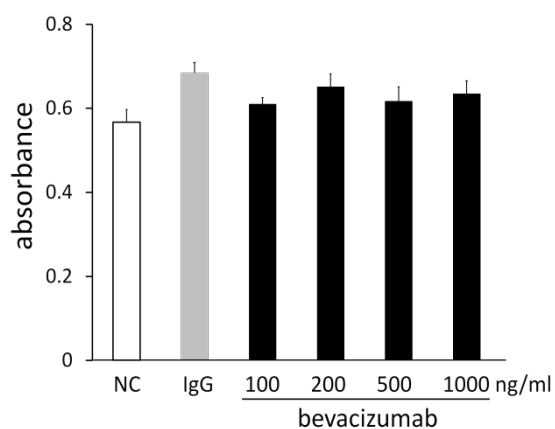
以上の結果から、VEGF は HAMON の増殖に促進的に作用することが示された。

5. VEGF シグナル阻害による治療実験 1 : bevacizumab

bevacizumab はリコンビナント抗ヒト VEGF 抗体であり、進行期の大腸癌などに対して臨床応用されている。単独で使用されることは少ないものの、血管肉腫が VEGF シグナルに大きく依存していることも想定されたため、今回は bevacizumab 単独での治療実験を行うこととした。

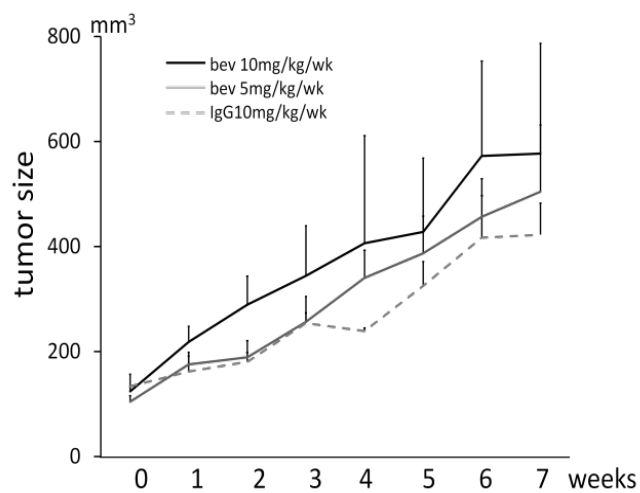
100ng/ml から 1000ng/ml の濃度で添加して増殖抑制効果を検証したが、*in vitro* においては有意な増殖抑制効果を示さなかった（図 1 6）。

図 1 6



また、*in vivo*の実験モデルを用いて 5mg/kg/週および 10mg/kg/week にて投与を行ったが、やはり抗腫瘍効果を示さなかった (図 1 7)。

図 1 7



以上の結果から、bevacizumab は単独では血管肉腫に抗腫瘍効果を示さないことが推察された。

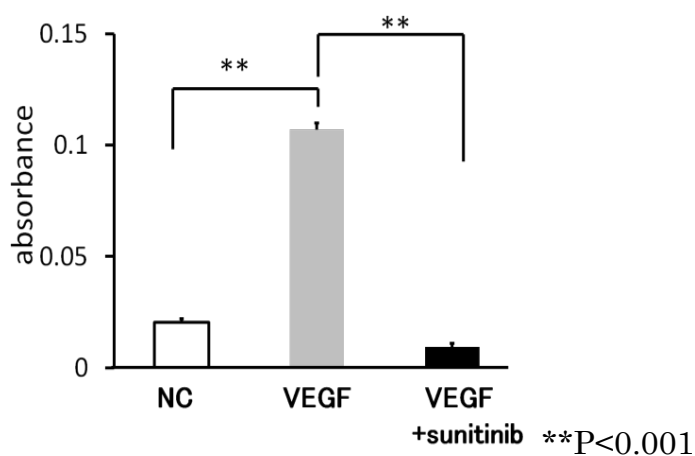
6. VEGF 阻害による治療実験 2 : sunitinib malate

Sunitinib malate は受容体型チロシンキナーゼ阻害薬である。阻害する受容体には VEGFRs、PDGFRs、c-kit などがあり、転移性腎細胞癌および消化管間葉系腫瘍(gastrointestinal stromal tumor: GIST)などに臨床応用されている。

HAMON および *in vivo* 実験モデルとしてのヒト血管肉腫の組織はヒト VEGFR2 を発現しているため、sunitinib malate 投与により抗腫瘍効果が得られることが期待された。

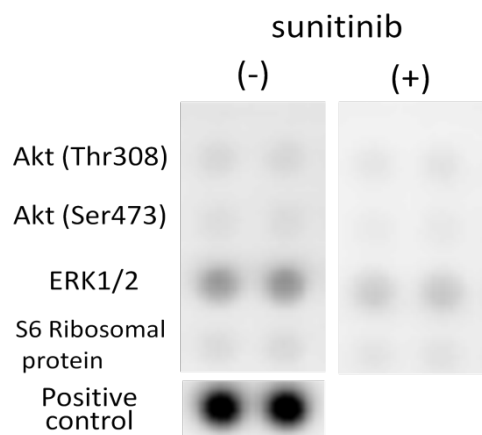
治療実験にさきがけて、sunitinib malate の VEGFR2 の阻害効果につき検討を行った。HAMON に recombinant VEGF を投与すると VEGFR2 のリン酸化が亢進するが、sunitinib malate を併用することで、VEGFR2 のリン酸化は阻害された (図 18)。

図 18



また、RTK tyrosine kinase array を用いた検討により、sunitinib malate 投与により、VEGFR2 の下流のシグナルとしての ERK1/2 のリン酸化が低下した (図 19)。

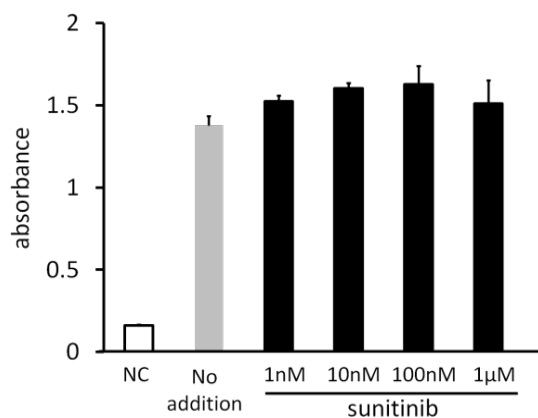
図 19



以上の結果は、sunitinib malate が HAMON の VEGFR2 を機能的にも阻害する効果があることを示すデータと考えられる。

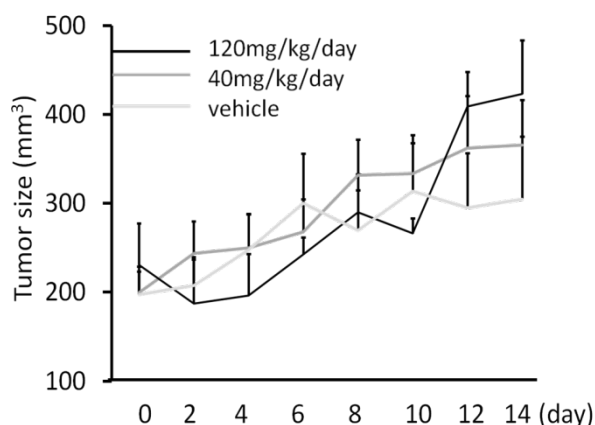
次に、HAMON に対する sunitinib malate の増殖抑制効果を検討した。1nM から 1 μ M の濃度で sunitinib malate を添加し、BrdU ELISA を用いて増殖抑制効果を検討したが、増殖抑制効果は確認できなかった (図 20)。

図 20



また、*in vivo* 実験モデルを用いて治療実験を行ったが、*in vivo* においても sunitinib malate は抗腫瘍効果を示さなかった (図 2 1)。

図 2 1



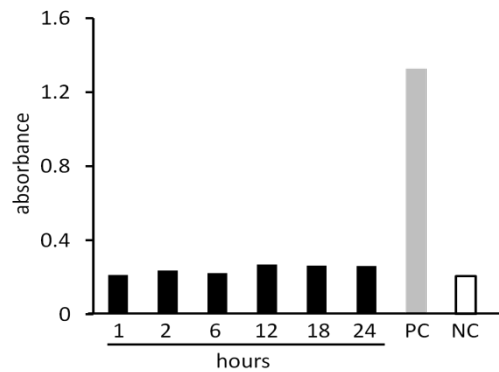
以上の結果から、sunitinib malate は単独では血管肉腫に抗腫瘍効果を示さないことが推察された。

7. 血管肉腫における VEGF シグナルについての検討

過去の報告において、血管肉腫における VEGF や VEGFR2 の発現から、その病態に autocrine や paracrine による VEGF シグナルが介在していることが想定されている (Itakura et al., 2008; Tokuyama et al., 2010)。今回の bevacizumab および sunitinib malate による治療実験の結果を受け、VEGFR2 阻害による代償的な VEGF 分泌亢進および VEGF シグナルの活性化が存在するかどうかにつき検討を加えた。

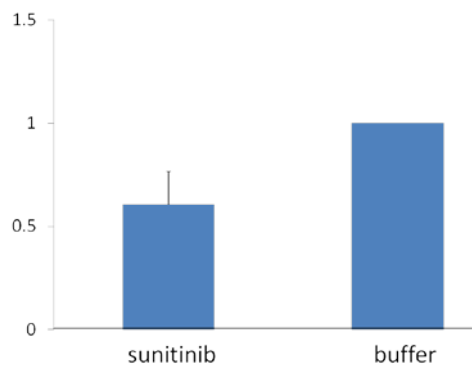
まず、HAMON に対して一定量の sunitinib malate を添加して 1 時間から 24 時間まで段階的に培養上清を回収し、VEGF の濃度を比較したところ、観察した範囲では sunitinib malate を添加しても VEGF の分泌量は変化しなかった (図 2 2)。

図 2 2



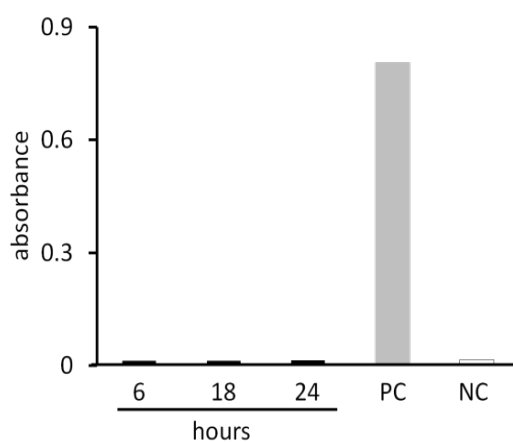
また、sunitinib malate 投与群と非投与群で VEGF の mRNA を real-time PCR を用いて定量的に比較したところ、VEGF mRNA の量は sunitinib malate 投与によっても影響を受けず、代償性の増加は認められなかった (図 2 3)。

図 2 3



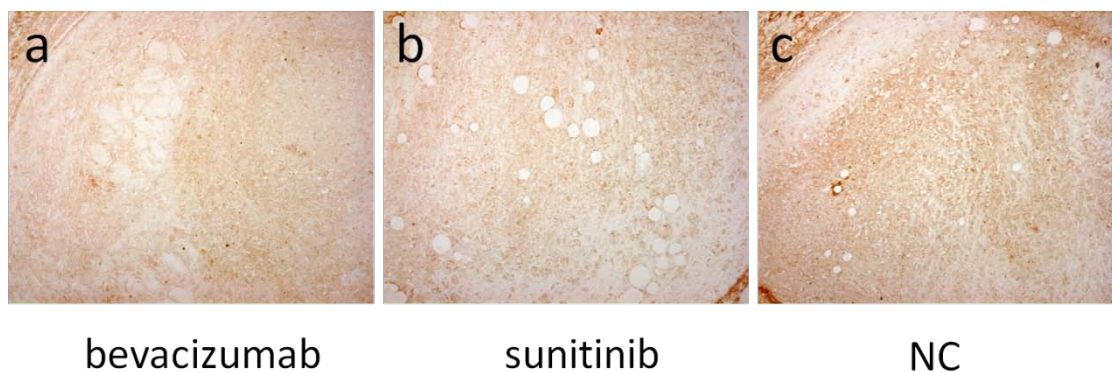
さらに、sunitinib malate 投与下で VEGFR2 のリン酸化を継時的に比較したところ、VEGFR2 のリン酸化も代償性の増加は認められなかった (図 2 4)。

図 2 4



また、bevacizumab および sunitinib malate により、腫瘍内の低酸素の程度に差があるか検証したところ、低酸素の程度には差を認めなかった (図 2 5)。

図 2 5

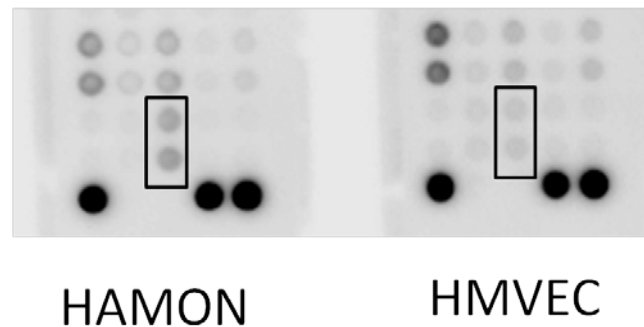


以上の結果から、sunitinib malate による VEGFR2 の阻害は、autocrine や paracrine による代償的な VEGF の産生をもたらさないことが推察された。

8. VEGF シグナル以外の活性化シグナルに関する検討

今回、VEGF および VEGFR2 を標的とした治療実験を行ったものの、予想に反し抗腫瘍効果を証明することはできなかった。そこで、本研究ですでに使用した RTK signaling array analysis を用いて、VEGF シグナル以外の活性化シグナルの有無につき検討を加えた。今回は、HAMON と正常コントロールとしての HMVEC を、増殖因子(VEGF を含む)を加えない培地にて培養し、その後回収した細胞抽出液を用いて実験を行った。その結果、HAMON は HMVEC と比較して Src を強発現していた (図 2 6、囲み部位)。

図 2 6



考察

血管肉腫は悪性度の高い間葉系腫瘍であるが、実験モデルは非常に数が少なく、このことが病態の解明や新規治療の遅れにつながっている。今回、本研究において新規のヒト血管肉腫の培養細胞を樹立したが、過去に報告されている培養細胞と比較すると(Krump-Konvalinkova et al., 2003; Masuzawa et al., 1999)、1) 放射線照射後の再発病変を由来としている、2) 免疫抑制マウスにおいてヒト血管肉腫を形成できる、3) 市販の血管内皮細胞様培地(EBM-2)で培養可能である、といった性質が特筆すべき点である。

一方、*in vivo*の実験モデルには、HAMONから腫瘍を形成する方法をとらず、免疫抑制マウスの皮下にヒト血管肉腫組織を移植し、増大させた後に再度摘出して、分割して再移植するという系を用いた。このような腫瘍組織の継代(heterotransplantation)は過去にも報告があり(Lopez-Barcons, 2010; Press et al., 2008)、セルライン由来の腫瘍や遺伝子操作を行った腫瘍モデルよりも、より臨床での病態を反映したモデルとみなされているようである。なお、今回の組織継代においては、感染など二次的な影響を極力排除するため、潰瘍形成をきたす手前の段階で摘出し、再移植に使用した。ヒトの腫瘍を提供していただいてから、4年以上が経過しているが、ヒト血管肉腫組織は概ね一定の速度で腫瘍の増大を繰り返している。また、一般的には血管肉腫は肺転移をきたすことで知られているが、これまでの組織継代を通じて観察した限り、今回の *in vivo* 実験モデルではヒト血管肉腫の転移性病変は確認されなかった。

腫瘍には、その旺盛な増殖能力を維持するため、自己の周囲に血管を新生させて自らを栄養するという病態が存在している。VEGFが、この腫瘍の血管新生における key molecule の一つであることはよく理解されているところである(Roodink and Leenders, 2010)。そのため、この腫瘍を栄養する新生血管を標的とすれば、腫瘍を兵糧攻めにし、抗腫瘍効果を得られるというコンセプトが提唱されるようになった。こうして、抗腫瘍薬としての血管新生阻害薬の開発は10年程前から進んでいる(Cao et al., 2009)。

リコンビナント抗ヒト VEGF 抗体である bevacizumab は、上記のコンセプトのもと開発された初めての血管新生阻害薬であり、現在でも進行期の大腸癌などに対して、化学療法の補助薬剤として使用されることが多い(Kabbinavar et al., 2003)。一方で、固形腫瘍に対して、bevacizumab 単剤での有効性も少数ながら報告されている(Li et al., 2007)。血管肉腫は、その病態に VEGF が大きく関与していることが想定されたため、bevacizumab の単剤投与であっても抗腫瘍効果を示すであろうことが期待された。しかし、今回の実験においては、bevacizumab 単剤投与では血管肉腫の抗腫瘍効果は得られなかった。

Sunitinib malate は数種類の受容体型チロシンキナーゼを阻害する薬剤であり、腫瘍血管を抑制するだけでなく、直接的な腫瘍抑制効果があると考えられている(Chow and Eckhardt, 2007)。臨床では経口薬剤として、進行期の腎細胞癌などに投与されている。標的となる受容体型チロシンキナーゼには VEGFR1、VEGFR2、PDGFRs、c-kit および Flt1 が含まれている。これらの標的受容体の中では、VEGFR2 を介したシグナル伝達が、もっとも血管新生においては重要であると考えられる(Hicklin and Ellis, 2005)。したがって、本研究において sunitinib malate により VEGFR2 を阻害することが血管肉腫の増大を抑制することが期待された。しかし、1 μ M という高濃度の sunitinib malate であっても HAMON の増殖を抑制しなかった。また、*in vivo* の実験においても、120 mg/kg/日という高用量でさえ sunitinib malate はヒト血管肉腫組織の増大を抑制しなかった。

臨床では、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤は様々な腫瘍に対して使用されている。一方で、いくつかの動物実験においては、これらの阻害剤が腫瘍の浸潤や転移を促進した、という報告がある(Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009)。このような相矛盾した治療効果の報告があることは、VEGF やその受容体を介する血管新生阻害の効果が、想定されているよりも複雑な系であることを示しているのかもしれない。血管肉腫に関しては、VEGF シグナルを標的とした薬剤は血管肉腫の治療に有望であるとする報告がいくつかある(Antonescu et al., 2009; Park et al., 2010)。事実、これらの薬剤が有効であったとする症例報告は存在する(Ono et al., 2012)。しかし、肉腫を対象としたこれらの薬剤の臨床研究においては、その有効性は当初の期待を裏切るものであった(Maki et al., 2009; Yoo et al., 2009)。血管肉腫を対象とした bevacizumab や受容体型チロシンキナーゼ阻害剤の臨床研究は進行中であり、その有効性は今のところ実証されていない。基礎研究の報告としては、Antonescu らは VEGFR2 の遺伝子異常を伴った血管肉腫は VEGFR2 タンパクを過剰発現しており、そのような症例では VEGFR2 を標的とした分子標的治療薬が有効であろうと提言している(Antonescu et al., 2009)。今回、私が樹立した培養細胞である HAMON およびマウスで継代した血管肉腫組織から VEGFR2 遺伝子の変異は検出されなかったが、そのような変異が存在する症例においては、VEGFR2 を標的とした分子標的治療薬が奏功するのかもしれない。

血管肉腫における VEGF と VEGFR の発現に関する検討は、少数ながら報告がある(Itakura et al., 2008; Tokuyama et al., 2010)。その報告の中では、血管肉腫の多くが VEGF および VEGFR を発現しており、その結果から、血管肉腫には VEGF の autocrine および paracrine 分泌による制御が存在することが示唆されてきた。一方、正常の血管内皮細胞の研究では、血管内皮細胞は VEGF を自己分

泌し、autocrineによる制御がなされているという報告がなされている(Lee et al., 2007)。Leeらは、血管の恒常性維持におけるVEGFシグナルの意義に関する研究を行っており、ヒト血管内皮細胞が外因性のVEGFの刺激がなくてもVEGFR2の恒常的なリン酸化が認められたことを報告している(Lee et al., 2007)。さらに、Antonescuらは*VEGR2*遺伝子を強制発現したCOS-7細胞が、VEGFが存在しない状況下でもVEGFR2タンパクのチロシンリン酸化を示すことを明らかにした(Antonescu et al., 2009)。この論文の中で、この細胞のVEGFR2のリン酸化は、VEGFを添加することでわずかに減少したため、この現象をネガティブフィードバックによる反応と考察を加えている。しかし、いずれの研究も、血管肉腫以外の細胞を用いた実験であり、血管肉腫におけるVEGFシグナルの意義に関しては不明な点が多い。

本研究では、VEGFはHAMONの増殖を促進するものの、HAMONにおけるVEGFシグナルが必ずしもautocrineやparacrineといったシステムで調整されているわけではないことが示された。これは、正常の血管内皮細胞や遺伝子改変によりVEGFR2を過剰発現させた培養細胞とは異なる点である。さらに、VEGFをbevacizumabにより阻害しても、VEGFR2をsunitinibにより阻害しても血管肉腫の増大を抑制しなかった。以上の結果から、①血管肉腫におけるVEGFシグナルは正常の血管内皮細胞におけるそれとは異なる制御を受けている可能性がある、②血管肉腫においては別の血管新生シグナルや細胞増殖シグナルが機能している可能性がある、といったことが示唆された。

実験の最後に施行したRTK arrayを用いた活性化シグナルの検討の結果、HAMONではHMVECと比較してSrc pathwayが活性化している可能性があることが示された。Src pathwayは肉腫において活性化されていることが知られており(Bovee et al., 2010)、Srcを標的としたチロシンキナーゼ阻害剤dasatinibは軟骨肉腫の培養細胞の増殖活性を低下させたという報告がある(Schrage et al., 2009)。また、Srcはトリ胚において、転移能を有する肉腫や、易出血の病変、血管肉腫を引き起こすという報告もあり(Morgan et al., 2005)、Srcが血管肉腫の病態に関与している可能性があるが、この点に関しては今後のさらなる検討が必要である。

なお、今回の実験モデルの由来となったヒト血管肉腫腫瘍は外科的切除および放射線照射後に生じた再発性の病変であり、これらの治療侵襲によりVEGFシグナル以外の増殖シグナルが活性化された可能性は否定できない。今後は、再発前後の腫瘍組織のシグナル発現を比較することで、治療抵抗性の血管肉腫の病態解明や治療薬の選択の一助となる可能性がある。

総括および結論

本研究の結果、以下の結果を得ることができた。

- ・ヒト血管肉腫の新規実験モデル(*in vitro* および *in vivo*)の作成に成功した。
- ・血管肉腫は VEGF および VEGFR2 を発現しており、外因性の VEGF は血管肉腫の増殖を促進する効果があった。
- ・しかし、抗 VEGF 抗体(bevacizumab)および VEGFR2 を阻害する受容体型チロシンキナーゼ阻害剤(sunitinib malate)は *in vitro*、*in vivo* ともに血管肉腫の増殖・増大を抑制する効果を示さなかった。
- ・bevacizumab および sunitinib malate による治療効果が乏しい理由として、血管肉腫における VEGF の autocrine や paracrine による代償性機構が関与している可能性は低いものと考えられた。

今回の研究は、治療後に再発した血管肉腫由来の実験モデルを用いた実験系であり、通常の血管肉腫と比較すると元々治療抵抗性であった可能性がある。そのため、本研究の結果から、血管肉腫に対する VEGF を標的とした治療の可能性を否定することはできない。一方、臨床研究においては、今回の研究結果と同様に、分子標的治療薬の効果が限定的であったという事実もあることから、血管肉腫に対する VEGF を標的とした治療を行う際には、より一層の症例の選別が必要となってくるものと思われる。

いずれにせよ、血管肉腫が悪性度が高い疾患であるにもかかわらず、希少な疾患であるがゆえに、その情報が不足しているという点が、この疾患を治療する上で最も困難な側面であると考えられる。本研究および今回作成した実験モデルが、血管肉腫の病態解明の一助となることを期待するとともに、多施設共同での疾患情報の収集・集約によるさらなる病態解明の推進および新規治療法の開発を期待する。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、多くの御指導と御助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 清水 宏教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導いただきました北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 阿部理一郎准教授に心より深謝いたします。また検体の提供にご協力をいただきました北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 青柳 哲講師、そして本研究にご協力いただきました血管肉腫の患者様に深く御礼申し上げます。最後になりましたが、北大皮膚科教室員、技術員、秘書各位に心より御礼申し上げます。

引用文献

- Abraham, J.A., Hornicek, F.J., Kaufman, A.M., Harmon, D.C., Springfield, D.S., Raskin, K.A., Mankin, H.J., Kirsch, D.G., Rosenberg, A.E., Nielsen, G.P., *et al.* (2007). Treatment and outcome of 82 patients with angiosarcoma. *Ann Surg Oncol* *14*, 1953-1967.
- Antonescu, C.R., Yoshida, A., Guo, T., Chang, N.E., Zhang, L., Agaram, N.P., Qin, L.X., Brennan, M.F., Singer, S., and Maki, R.G. (2009). KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors. *Cancer Res* *69*, 7175-7179.
- Bovee, J.V., Hogendoorn, P.C., Wunder, J.S., and Alman, B.A. (2010). Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* *10*, 481-488.
- Cao, Y., Zhong, W., and Sun, Y. (2009). Improvement of antiangiogenic cancer therapy by understanding the mechanisms of angiogenic factor interplay and drug resistance. *Semin Cancer Biol* *19*, 338-343.
- Chow, L.Q., and Eckhardt, S.G. (2007). Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* *25*, 884-896.
- Coindre, J.M., Terrier, P., Guillou, L., Le Doussal, V., Collin, F., Ranchere, D., Sastre, X., Vilain, M.O., Bonichon, F., and N'Guyen Bui, B. (2001). Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Cancer* *91*, 1914-1926.
- Ebos, J.M., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., and Kerbel, R.S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* *15*, 232-239.
- Fayette, J., Martin, E., Piperno-Neumann, S., Le Cesne, A., Robert, C., Bonvalot, S., Ranchere, D., Pouillart, P., Coindre, J.M., and Blay, J.Y. (2007). Angiosarcomas, a heterogeneous group of sarcomas with specific behavior depending on primary site: a retrospective study of 161 cases. *Ann Oncol* *18*, 2030-2036.
- Hicklin, D.J., and Ellis, L.M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* *23*, 1011-1027.
- Itakura, E., Yamamoto, H., Oda, Y., and Tsuneyoshi, M. (2008). Detection and characterization of vascular endothelial growth factors and their receptors in a series of angiosarcomas. *J Surg Oncol* *97*, 74-81.
- Kabbinavar, F., Hurwitz, H.I., Fehrenbacher, L., Meropol, N.J., Novotny, W.F., Lieberman, G., Griffing, S., and Bergsland, E. (2003). Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with

metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21, 60-65.

Krump-Konvalinkova, V., Bittinger, F., Olert, J., Brauninger, W., Brunner, J., and Kirkpatrick, C.J. (2003). Establishment and characterization of an angiosarcoma-derived cell line, AS-M. *Endothelium* 10, 319-328.

Lee, S., Chen, T.T., Barber, C.L., Jordan, M.C., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., Nagy, A., Roos, K.P., and Iruela-Arispe, M.L. (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 130, 691-703.

Li, Q., Yano, S., Ogino, H., Wang, W., Uehara, H., Nishioka, Y., and Sone, S. (2007). The therapeutic efficacy of anti vascular endothelial growth factor antibody, bevacizumab, and pemetrexed against orthotopically implanted human pleural mesothelioma cells in severe combined immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 13, 5918-5925.

Lopez-Barcons, L.A. (2010). Serially heterotransplanted human prostate tumours as an experimental model. *J Cell Mol Med* 14, 1385-1395.

Maki, R.G., D'Adamo, D.R., Keohan, M.L., Saulle, M., Schuetze, S.M., Undevia, S.D., Livingston, M.B., Cooney, M.M., Hensley, M.L., Mita, M.M., *et al.* (2009). Phase II study of sorafenib in patients with metastatic or recurrent sarcomas. *J Clin Oncol* 27, 3133-3140.

Masuzawa, M., Fujimura, T., Hamada, Y., Fujita, Y., Hara, H., Nishiyama, S., Katsuoka, K., Tamauchi, H., and Sakurai, Y. (1999). Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS). *Int J Cancer* 81, 305-308.

Morgan, J.C., Majors, J.E., and Galileo, D.S. (2005). Distinct and opposite roles for SH2 and SH3 domains of v-src in embryo survival and hemangiosarcoma formation. *Clin Exp Metastasis* 22, 167-175.

Motzer, R.J., Michaelson, M.D., Redman, B.G., Hudes, G.R., Wilding, G., Figlin, R.A., Ginsberg, M.S., Kim, S.T., Baum, C.M., DePrimo, S.E., *et al.* (2006). Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 16-24.

Ono, S., Tanioka, M., Fujisawa, A., Tanizaki, H., Miyachi, Y., and Matsumura, Y. (2012). Angiosarcoma of the Scalp Successfully Treated With a Single Therapy of Sorafenib. *Arch Dermatol* 148, 683-685.

Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15, 220-231.

Park, M.S., Ravi, V., and Araujo, D.M. (2010). Inhibiting the VEGF-VEGFR pathway in angiosarcoma, epithelioid hemangioendothelioma, and hemangiopericytoma/solitary fibrous

tumor. *Curr Opin Oncol* 22, 351-355.

Press, J.Z., Kenyon, J.A., Xue, H., Miller, M.A., De Luca, A., Miller, D.M., Huntsman, D.G., Gilks, C.B., McAlpine, J.N., and Wang, Y.Z. (2008). Xenografts of primary human gynecological tumors grown under the renal capsule of NOD/SCID mice show genetic stability during serial transplantation and respond to cytotoxic chemotherapy. *Gynecol Oncol* 110, 256-264.

Roodink, I., and Leenders, W.P. (2010). Targeted therapies of cancer: angiogenesis inhibition seems not enough. *Cancer Lett* 299, 1-10.

Rouhani, P., Fletcher, C.D., Devesa, S.S., and Toro, J.R. (2008). Cutaneous soft tissue sarcoma incidence patterns in the U.S. : an analysis of 12,114 cases. *Cancer* 113, 616-627.

Schrage, Y.M., Briaire-de Bruijn, I.H., de Miranda, N.F., van Oosterwijk, J., Taminiau, A.H., van Wezel, T., Hogendoorn, P.C., and Bovee, J.V. (2009). Kinome profiling of chondrosarcoma reveals SRC-pathway activity and dasatinib as option for treatment. *Cancer Res* 69, 6216-6222.

Tokuyama, W., Mikami, T., Masuzawa, M., and Okayasu, I. (2010). Autocrine and paracrine roles of VEGF/VEGFR-2 and VEGF-C/VEGFR-3 signaling in angiosarcomas of the scalp and face. *Hum Pathol* 41, 407-414.

Yoo, C., Kim, J.E., Yoon, S.K., Kim, S.C., Ahn, J.H., Kim, T.W., Suh, C., and Lee, J.L. (2009). Angiosarcoma of the retroperitoneum: report on a patient treated with sunitinib. *Sarcoma* 2009, 360875.