

특집: 생리활성물질의 최근 연구동향(IV)

혈관신생 저해물질의 개발 동향

이정준 · 이정형
생명공학연구소

새로운 항암제개발 Target으로서 혈관신생

지금까지의 항암제의 개발경향은 주로 세포독성, DNA합성 저해, RNA합성저해, protein합성저해 등의 암세포를 target으로 하였으나, 기존의 항암제와는 다른 type의 항암제 개발의 필요성이 제기되고 있으며[1], 미국 NCI(National Cancer Institute)의 The Cancer therapy Evaluation Program(CTEP)의 항암제개발을 위한 새로운 target을 보면 세포독성 등의 단순한 target를 벗어나 혈관신생저해 등의 최근 진보된 암세포생물학을 새로운 탐색계로 적용하고 있다[2].

혈관신생 저해제의 개발현황

혈관신생은 1차 암의 성장이나 암의 전이에 필수적인 현상으로, 혈관신생 저해제(anti-angiogenic agent)는 aneuploid 인 암세포가 아니라 정상 diploid인 혈관내피세포를 표적으로 하고, 또한 혈관신생은 정상 성인에게는 몇몇 특별한 경우, 즉 상처의 치유, 여성의 생리 등을 제외하고는 매우 드문 현상으로 알려져 있으므로 기존의 항암제에서 볼 수 있는 부작용이 크게 감소할 것이다[3].

선택적인 혈관신생저해제를 천연물 등으로부터 개발은 현재 세계각국의 주요 제약기업의 R&D 목표가 되고 있다. 혈관신생저해제의 연구 및 개발 현황을 표 2에 요약하였다[1, 5].

암의 성장에 혈관형성이 필수적이라는 가설이 1971년 미국

의 Judah Folkman[6]에 의해 제창된 이후 혈관신생 저해제가 암의 치료제로써 주목의 대상이 된 것은 1990년에 천연물로부터 선택적인 혈관신생 저해제인 fumagillin[7]의 발견과 최근에 발견된 angiostatin[8], endostatin[9] 등의 내인성 혈관신생 저해제가 실험동물모델에서 항암제로서 우수한 효능이 입증되었기 때문이다. 천연물로부터 발견된 최초의 혈관신생 저해제인 fumagillin은 혈관내피세포의 배양 flask에 우연히 오염된 곰팡이(*Aspergillus fumigatus*)로부터 발견되었다. 오염된 곰팡이 주위에 혈관내피세포의 증식이 강력히 억제되는 것을 관찰하고 그 곰팡이로부터 활성물질 fumagilin 분리 동정하였다. 그 후 수많은 fumagilin유도체들이 합성되었는데 fumagilin보다 부작용이 적고 활성이 강력한 TNP-470(AGM-1470)을 얻어 현재 임상실험 phase II 중에 있는데 새로운 항암제로서의 가능성이 매우 높은 것으로 알려져 있다[10].

1994년에 보고된 angiostatin[8]은 최초로 발견된 내인성 혈관신생 저해제로서 Lewis Lung Carcinoma를 이식한 C57BL/J 마우스의 뇨에서 분리된 plasminogen의 37 kDa fragment로 혈관내피세포의 증식을 강력히 억제하는 것으로 알려져 있다. 이후 마우스 hemangioendothelioma 세포주인 EOMA로부터 collagen 18의 20 kDa fragment인 endostatin이 1997년에 보고되었다[9]. Endostatin, angiostatin 모두 *in vitro* 및 *in vivo*에서 강력한 혈관신생 저해작용과 더불어 동물모델에서 내성을 보이지 않고 우수한 항암효과를 나타내어 현재 임상실험을 준비하고 있는 것으로 알려져 있다. 이외에 MMP-2의 C-말단의

표 1. 새로운 항암제개발을 위한 미국 NCI CTEP의 중점 Target

Target	내 용
Angiogenesis	Angiogenesis inhibitors Disruption of matrix-vasculature interactions Destruction of tumor vasculature
Invasion and metastasis	Modulation of adhesion molecules Matrix metalloproteinase inhibitors
Cell cycle control/cell signaling	Modulation of cell cycle checkpoints and cell signaling Modulation of gene expression
Mechanisms of apoptosis	Modulation of bcl-2
Immunological recognition and response	Induction of immune response to tumor antigens Immunotoxins and targeted reagents

표 2. 현재 항암제로 개발중인 혈관신생저해제(Phase II and III only)

Drug	Sponsor	Trial	Mechanism
Marimastat	British Biotech	Phase III	Synthetic MMP inhibitor
Bay 12-9566	Bayer	Phase III	Synthetic MMP inhibitor
Ag3340	Agouron	Phase III	Synthetic MMP inhibitor
Platelet factor-4	Repligen	Phase II	Inhibit endothelial cell growth
Interleukin 12	Genetics Institute	Phase I/II	Inhibit endothelial cell growth
RhuMad VEGF	Genetech	Phase II	Monoclonal antibody to VEGF
SU5416	Sugen, Inc.	Phase II	Inhibit KDR tyrosine kinase
Interferon-alpha	Commercially available	Phase I/II	Inhibit release of endothelial growth factor
ZD0101	Zeneca	Phase II	Bacterial toxin that binds to new blood vessels and induces inflammatory response
TNP-470	TAP Pharmaceuticals, Inc.	Phase II	Inhibit endothelial cell growth--synthetic analogue of fungal metabolite
Thalidomide	Entremed, Inc.	Phase II	Unknown
CAI	NCI	Phase I/II	Ca channel blocker
Suramin	Park-Davis	Phase II/III	Non-specific multi-site effect
IM862	Cytran	Phase II	Unknown

PEX(hemopexin-like domain)가 integrin α V β 3의 기능을 억제(MMP-2의 활성저해)함으로써 혈관형성을 저해한다[11]. 혈관신생과정중에 활성화된 혈관내피세포는 많은 matrix metalloprotease를 분비하여 matrix를 분해하는 과정이 필수적이는데 이 metalloprotease의 저해제가 우수한 혈관신생 저해활성을 갖는 것으로 알려져 있다[5]. 현재 합성품인 batimastat(BB-94)나 marimastat(BB-2516) 등은 임상실험 중에 있다. Heparan sulfate proteoglycans는 angiogenic factor인 VEGF나 bFGF의 활성을 나타내는 데에 필수 불가결한 macromolecules인데, 여기에 착안하여 heparan sulfate proteoglycans의 기능을 저해하는 미생물유래의 sulfated polysaccharide peptidoglycan complex류인 tecogalan(SP-PG, DS-4142) 등이 혈관신생저해활성이 있는 것으로 알려져 현재 임상실험 중에 있다[5, 7]. 그 밖에 1950년대에 비극의 진정제로 알려진 thalidomide나, 칼슘 channel blocker인 CAI, cytokine인 IL-12 등이 혈관형성저해활성이 있는 것으로 알려져 현재 임상실험 중에 있으며, phosphatidyl inositol-3 kinase inhibitor인 wortmanin, tyrosine kinase inhibitor로 cell cycle의 G1-arrest를 유도하는 것으로 알려진 radicicol과, 다른 몇종의 tyrosine kinase inhibitor 등이 *in vivo* 및 *in vitro*에서 혈관신생저해활성이 있는 것으로 보고되었다.

혈관신생의 기전[12-14]

지난 수년간의 분자세포생물학 및 제반학문의 발전과 더불어 혈관신생에 대한 연구도 활발히 진행되었다. VEGF(vascular endothelial growth factor), bFGF(basic fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), EGF(epithelial growth factor), TNF(tumor necrosis factor), TGF(transforming growth factor)

등의 혈관신생인자(angiogenic factor)들과 FGFR, Flk-1/KDR, Flt-1, Flt-3, Tie-1, Tie-2/Tek 등과 같은 tyrosine kinase활성을 갖는 혈관신생인자들의 receptor들의 확인 및 cloning, 또한 angiostatin이나 endostatin과 같은 내인성 혈관신생 저해제(endogeneous antiangiogenic agent) 등의 발견으로 혈관신생의 기전에 대하여 한층 더 이해하게 되었다.

혈관신생(angiogenesis 또는 neovascularization)은 혈관신생인자, 기질분자, 관련된 세포들의 시간, 공간적인 정교하고, 협동적인 조화에 의해 이루어지는 생체반응으로서 성인 조직에서 새로운 혈관이 형성되는 것을 말한다(발생과정에서 혈관이 형성되는 것을 vasculogenesis라 함). 그림 1에 보인 바와 같이 혈관신생의 과정은 Initiation단계, Invasion/proliferation단계, maturation/differentiation단계로 3단계로 나눌 수 있다. initiation은 염증세포, mast 세포, macrophage, 암세포 등으로부터 유래된 혈관신생인자들에 의해 유도된다. 정상적으로 quiescent인 혈관내피세포(endothelial cell)에 VEGF, FGF, HGF 등의 혈관신생인자들이 혈관내피세포에 발현된 각각의 receptor에 결합하면, receptor의 tyrosine kinase의 활성화와 autophosphorylation이 일어난다, 연속적인 신호전달경로를 거쳐, 결국 혈관내피세포가 활성화(activation)되게 된다. 이 활성화된 혈관내피세포는 증식과 더불어, 세포접착분자들의 발현증가, 각종 protease의 생산증가, migration 및 invasion능의 증가, capillary tube로 분화 등의 과정을 거쳐 새로운 혈관이 형성되게 된다.

혈관신생은 wound healing, 발생, trophoblast implantation 등의 정상생리기능에 아주 중요한 역할을 하고 있으나, 비정상적으로 조절된 무절제한 혈관신생은 인류의 심각한 질병, 특히 고형암의 성장과 전이(metastasis), 류마티스(Rheumatoid arthritis), 안구질환(diabetic retinopathy) 등과 같은 소위 "angio-

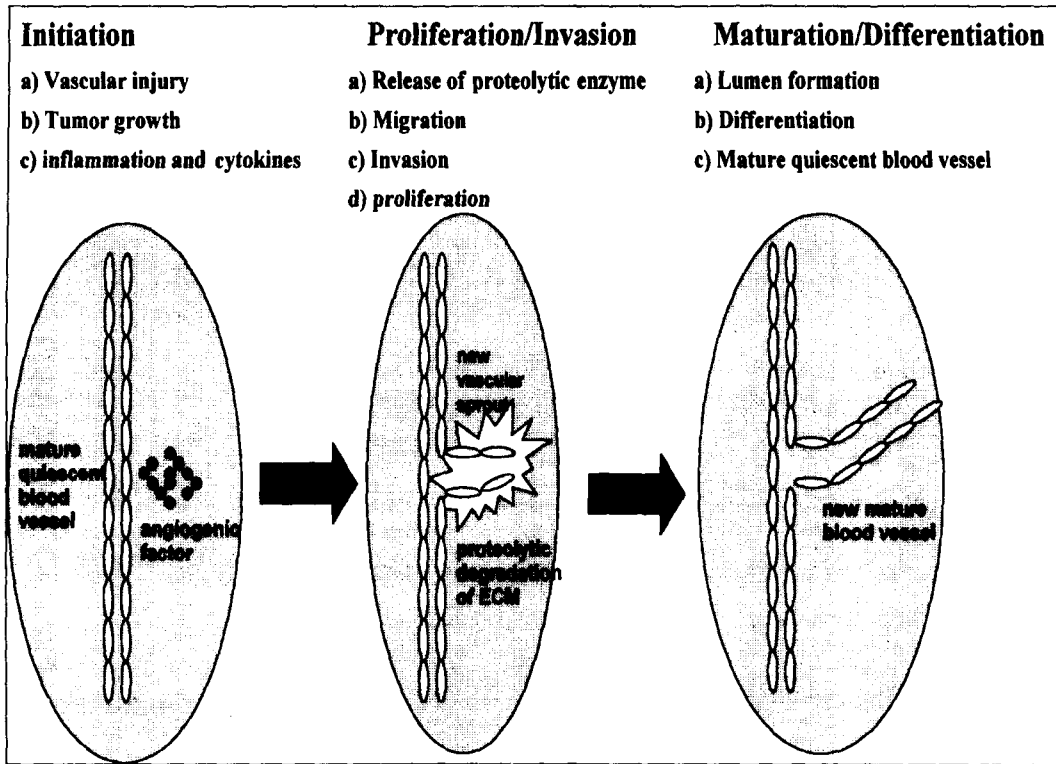


그림 1. 혈관신생 과정.

genic disease”를 유발시키는 것으로 알려져 있다[15]. 따라서 혈관신생저해제는 암 등의 angiogenic disease를 치료하는 데에 매우 유용할 것으로 기대된다.

암의 성장 및 전이와 혈관신생

암, 특히 고형암에 있어서 혈관신생은 암의 성장에 필수 불가결한 것이다. 고형암의 크기가 약 2-3 mm³까지는 diffusion에 의해 성장에 필요한 growth factor, 산소와 영양분을 공급받을 수 있으나(보통 1 mm³ 정도를 임상적으로 암을 검출할 수 있는 최소크기라고 함), 그 이상 성장하기 위해서는 암세포는 새로운 혈관형성을 통해서 성장에 필요한 growth factor, 산소, 영양분 등을 계속 공급받아야 한다. 실제로 암조직을 조직학적으로 보았을 때, 암세포와 혈관내피세포의 비율이 약 1:100에서 1:1000의 비율로 알려져 있다. 이는 암세포와 혈관내피세포가 서로 밀접하게 관계하고 있음을 말하는데, 암세포는 VEGF, FGF, EGF 등의 angiogenic factor들을 분비하여 혈관내피세포로부터 혈관을 형성을 유도하는 반면, 혈관내피세포들은 반대로 암의 성장에 필요한 interleukin-6, insulin-like growth factor-1 등의 growth factor와, 산소, 영양분 등을 암세포에 공급하는 등의 혈관내피세포와 암세포와는 상호 공생(symbiosis)의 관계에 있는 것이다[16]. 실제로 암 조직으로부터 혈관을 제거했을 경우 암세포에 ischemic death를 유발시키

생물산업

며, 반대로 암 조직에 혈관내피세포를 주사하면 암의 성장속도가 촉진된다고 알려져 있다. 이와 같이 혈관신생은 암세포와 혈관내피세포와의 상호협동에 의해 유도되며 암의 성장에는 혈관신생이 필수적으로 필요한 것이다.

고형암의 혈관신생의 과정은 서로 상반되게 작용하는 angiogenic factor 등의 positive regulators와 IL-12, endostatin, angiostatin 등의 negative regulators의 균형에 의해 조절된다(표 3). 암조직이 2-3 mm³이상으로 자라기 위해서는 암세포는 혈관형성을 유도할 수 있는 “angiogenic switch”를 하게 되는데 이는 positive regulators의 양이 negative regulators의 양보다 많아졌음을 의미한다. 현재까지 이 스위치를 유도하는 인자들은 아직 잘 알려지지 않았으나, 암세포의 유전자의 변화와 생리적인 반응 등으로 설명된다. 암 억제유전자인 p53의 변이나 oncogene인 ras 유전자의 활성화가 혈관형성을 유도한다. 예를 들어, 정상 p53 유전자 산물은 강력한 angiogenesis inhibitor로 알려진 당단백질인 thrombospondin-1의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 반면에 암세포의 p53 유전자의 기능상실로 인하여 thrombospondin-1의 발현이 감소되어 혈관신생을 유도하게 된다. 또 고형암 그 자체의 환경은 stressed-condition(hypoxia와 low glucose)인데 이 조건에서 암세포는 생리적 요구에 반응하여 VEGF 등의 angiogenic factor의 생산을 증가시켜 혈관신생을 유도하는데, 이 유도에는 oncogene인 src kinase가 관여하는 것으로 알려져 있다[17, 18].

표 3. 혈관신생 조절인자들[19]

Positive regulators (stimulators)	Negative regulators (stimulators)
Fibroblast growth factor	Angiostatin
Vascular endothelial growth factor	Endostatin
Angiogenin	Interleukin-12
Transforming growth factor- α	Interferons
Tumor necrosis factor- α	Platelet factor-4
Platelet-derived endothelial cell growth factor	Thrombospondin
Interleukin-8	Prolactin
Hepatocyte growth factor	Transforming growth factor- β
Platelet-derived growth factor	bFGF soluble receptor
Granulocyte colony-stimulator factor	Tissue inhibitors of metalloproteinase
Proliferin	Placental-proliferin-related peptide
Prostaglandins (E1, E2)	Glioma-derived angiogenesis inhibitory factor

혈관신생은 암의 성장뿐만 아니라 암의 전이(metastasis)에도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 암조직내에 형성된 혈관은 암세포가 전이할 수 있는 중요한 route를 제공하며, 일단 다른 조직에 전이한 암세포도 계속 성장하기 위해서는 새로운 혈관형성이 필수적이다. 전이한 암세포도 혈관신생을 하지 않고서는 산소, 영양분, growth factor등이 충분히 공급되지 않기 때문에 세포사(apoptosis)와 세포증식(proliferation)이 균형을 이루어, 총 암세포의 수가 일정하게 되어 암의 크기가 증가하지 않는 "dormant state"로 남아있게 된다.

세포접착과 혈관신생[20, 21]

혈관내피세포와 extracellular matrix와의 세포접착분자를 통한 상호작용은 직접, 간접적으로 혈관신생과정에 관계하고 있다. 세포접착분자에 의해 유도되는 반응은 세포접착, invasion, migration등이 관여하는 invasion/proliferation단계 뿐만 아니라, maturation/differentiation 단계에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 세포접착분자는 크게 selectin family, cadherin family, integrin family, immunoglobulin superfamily 등으로 나누는데, 이들 세포접착분자들은 collagen laminin, fibronectin, vitronectin 등의 extracellular matrix의 receptor로 작용하여 세포의 접착, 분화, 증식 등에 중요한 역할을 한다. 이들 중 angiogenesis와의 관련성이 가장 잘 연구된 세포접착분자는 integrin류이다. Integrin류는 α chain과 β chain으로 구성된 heterodimer로 지금까지 약 15종 이상의 α chain과 약 8종 이상의 β chain이 확인되었고, 그 heterodimer의 형태에 따라 collagen type I, IV, fibrinogen, laminin, vitronectin 등의 다양한 extracellular와의 접착을 하게된다. 특히 integrin $\alpha V\beta 3$ 와 $\alpha V\beta 5$ 와의 혈관신생과의 관계가 가장 잘 알려져 있다. 보통 resting 상태의 혈관내피세포는 integrin $\alpha V\beta 3$ 을 발현이 매우 낮은 것으로 알려져 있으나 angiogenic factors의 자극을 받으면 세포표면에 이 세포접착분자의 발현을 유도하는 것으로 알

려져 있으며, $\alpha V\beta 3$ 의 monoclonal 항체나, antagonist(RGD peptide)로 그 기능을 차단하면 혈관내피세포는 apoptosis로 사멸하여 *in vivo* 및 *in vitro* 혈관신생이 억제되는 것으로 알려져 있다[22]. 또한 최근의 보고에 의하면 $\alpha V\beta 3$ 는 MMP-2와 결합하여 invasion, migration하는 부위에서 MMP-2에 의해 matrix를 분해할 수 있도록 하는 기능이 있는 것으로 알려졌으며, MMP-2의 nonproteolytic 부위인 $\alpha V\beta 3$ 와의 결합부위 PEX domain으로 angiogenesis가 저해됨이 보고되었으며 이 PEX는 자연상태에서 체내에 존재하는 것으로 알려져 있다. 이는 integrin $\alpha V\beta 3$ 가 세포접착 뿐만 아니라 matrix의 분해에도 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다. 이밖에도 integrin $\beta 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ 류 들과 E-selectin, VE-cadherin, VCAM 등이 angiogenesis와 관계하는 것으로 알려져 있다[23].

항암제로서의 혈관신생 저해제의 장점

지금까지의 adriamycin, cisplatin, taxol 등의 기존의 항암제는 대부분의 경우가 암세포에 직접 작용하여 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나, 이들 암화학요법제의 가장 큰 문제점은 암세포가 유전학적으로 불안정(genetic instability)하고 heterogeneity하기 때문에 각각의 암세포의 항암제에 대한 감수성이 다르게 되거나, 또한 항암제에 대한 내성(drug resistance)세포들이 빈번하게 출현하게 되어 항암제가 효과를 발휘할 수 없게 된다. 더구나 이들 항암제들은 선택성이 결여되어 정상세포나 암세포 모두에 독성을 나타내어 심각한 부작용을 나타내게 된다. 반면 혈관형성 저해제는, 기존의 항암제와는 다른 양식의 항암제로서 다음과 같은 장점들을 지니게 될 것이다.

첫째, 혈관신생은 1차암의 성장이나 암의 전이에 필수불가결하기 때문에 암의 성장과 전이를 동시에 치료할 수 있을 것이다.

둘째, 혈관형성 저해제는 aneuploid 인 암세포가 아니라 정

상 diploid인 혈관내피세포를 표적으로 하기 때문에 암세포와는 달리 heterogeneity와 genetic instability로 인한 내성 등의 문제점이 일으키지 않을 것이다.

셋째, 혈관형성 저해제는 기존의 항암제와는 달리 특정, 또는 몇몇의 암에만 효능을 나타내는 것이 아니라 혈관형성이 필수 불가결한 모든 고형암에 유효할 것이다. 넷째, 혈관신생은 정상 성인의 경우 몇몇 특별한 경우, 즉 상처의 치유, 여성의 생리 등을 제외하고는 매우 드문 현상으로 알려져 있다. 따라서 기존의 항암제에서 볼 수 있는 부작용이 크게 감소할 것이다.

이상에서 살펴본 바와 같이 혈관신생은 암의, 특히 고형암의 성장이나 전이에 필수 불가결한 현상이며 항암제로서의 혈관신생 저해제는 기존의 항암제의 가장 큰 문제인 내성, 부작용 등의 문제를 해결하여 인류의 난치병중의 하나인 암, 특히 고형암을 보다 효과적으로 치료할 수 있는 매우 희망적인 치료제이므로, 현재 세계각국에서 angiostatin이나 endostatin과 같은 선택적인 혈관신생 저해제의 개발에 많은 노력을 하고 있다.

혈관신생 저해활성 검색법

지금까지 개발된 *in vitro* 혈관신생 저해활성 검색법[24, 25]은 *in vivo*에서와 같이 angiogenesis의 전과정을 설명할 수 있는 방법은 없지만 angiogenesis의 각 단계를 간접적으로 측정하는 방법이다. 그러나, *in vitro* 방법은 대부분의 경우 *in vivo*의 결과와 일치하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 angiogenesis의 과정은 3개의 기본적인 단계로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 1) 혈관내피세포의 활성화, 2) 기저막(basement membrane)의 분해, 혈관내피세포의 adhesion, migration, invasion, 3) 혈관내피세포의 proliferation과 capillary tube로의 분화(differentiation) 등이다. 따라서 이들 각 단계를 *in vitro*에서 측정함으로써 혈관신생 저해활성을 간접적으로 측정할 수 있다.

널리 이용되는 *in vitro* 활성검색법중 하나는 extracellular matrix상에서 혈관내피세포의 capillary tube로의 분화를 이용하는 방법이다. 혈관내피세포들은 collagen, fibrin, Matrigel 등과 같은 extracellular matrix에서 angiogenic factors에 반응하여 capillary tube를 형성하는데 이런 현상은 혈관내피세포의 특징으로 혈관신생 과정중의 후기단계의 반응이라고 알려져 있다. 따라서 Matrigel과 같은 Matrix로 하여 혈관내피세포의 capillary tube로의 분화저해제를 탐색할 수 있다.

또한 활성화된 혈관내피세포와 Matrix와의 접착저해를 이용한 탐색법도 이용되고 있는데, angiogenic factors에 의해 활성화된 혈관내피세포는 각각 특이한 세포접착분자를 발현시켜 matrix와 접착하게 된다. 이 혈관내피세포와 Matrix와의 접

착은 혈관신생과정중 invasion/proliferation 단계뿐만 아니라 분화에도 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 angiogenic factors에 의해 활성화된 혈관내피세포와 collagen, laminin, fibronectin, vitronectin 등의 matrix와 접착저해제를 탐색할 수 있다.

이상의 *in vitro* 방법으로 검색된 화합물은 *in vivo* angiogenesis assay[26]방법으로 그 활성을 확인하여야만 된다. *in vivo* angiogenesis assay방법으로는 수정란을 이용한 CAM(chorioallantoic membrane) assay, corneal micropocket assay, tumor tissue를 직접 immunostaining하여 혈관수를 측정하는 방법, Matrigel plug assay 등 여러 방법이 개발되어 사용되고 있다.

참고문헌

1. M. Barinaga. 1997. Designing Therapies that target tumor blood vessels. *Science* **275**: 484-484.
2. M. C. Cristin, J. M. Pluda, P. T. C. Ho, S. G. Arbuck, A. J. Murgu, and E. A. Sausville. 1997. Promising New Agents under development by the Division of Cancer Treatment, Diagnosis, and Centers of the National Cancer Institute. *Seminars in Oncology* **24**(2): 219-240.
3. R. S. Kerbel. 1991. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anticancer therapeutic agents. *BioEssay* **13**: 31-36.
4. T. Boehm, J. Folkman, T. Browder, and M. O'Reilly. 1997. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390**: 404-407.
5. J. M. Pluda. 1997. Tumor-Associated Angiogenesis: Mechanisms, Clinical Implications and Therapeutic Strategies. *Seminars in Oncology* **24**(2): 203-218.
6. J. Folkman. 1971. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine* **285**: 1182-1186.
7. D. Ingber, T. Fujita, et al. 1990. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* **348**: 555-557.
8. M. S. O'Reilly, L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R. A. Rosenthal, M. Moses, W. S. Lane, Y. Cao, E. H. Sago, and J. Folkman. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis Lung Carcinoma, *Cell* **79**: 315-328.
9. M. S. O'Reilly, T. Boehm, C. Chen, et al. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**: 277-285.
10. V. Catronovo, and D. Belotti. 1996. TNP-470(AGM-1470): Mechanisms of action and early clinical development. *European Journal of Cancer*, **32**(A)(14): 2520-2527.
11. P. C. Brooks, S. Silletti, T. L. von Schalscha, M. Friedlander, and D. A. Cheresh. 1998. Disruption of Angiogenesis by PEX, a noncatalytic Metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* **92**, 391-400.
12. W. Risau. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**,

- 671-674.
13. P. C. Brooks. 1996. Role of integrins in angiogenesis. *European Journal of Cancer* **32A**(14): 2423-2429.
 14. D. R. Senger. 1996. Molecular framework for angiogenesis. *American Journal of Pathology* **149**: 1-7.
 15. J. Folkman. 1995. Clinical application research on angiogenesis. *New England Journal of Medicine* **333**: 1757-1763.
 16. P. A. D'Amore, and D. T. Shima. 1996. Tumor-angiogenesis: a physiological process or genetically determined? *Cancer Metastasis Review* **15**: 205-212.
 17. D. Mukhopadhyay, L. Tsiojas, X-M. Zhou, D. Foster, J. S. Brogge, and V. P. Sukhatme. 1995. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-src activation. *Nature* **375**: 577-581.
 18. L. M. Ellis, C. A. Stanley, W. Liu, R. Y. D. Fleming, et al. 1998. Down-regulation of vascular growth factor in a human colon carcinoma cell lines transfected with an antisense expression vector specific for c-src. *J. Biol. Chem.* **273**(2): 1052-1057.
 19. G. Gastl, T. Hermann, M. Steurer, J. Zmija, C. Unger, and A. Kraft. 1997. Angiogenesis as a target tumor treatment. *Oncology* **54**, 177-184.
 20. S. Stromblad, and D. A. Cheresh. 1996. Cell adhesion and angiogenesis. *Trends in Cell Biology* **6**: 462-468.
 21. P. C. Brooks. 1996. Cell adhesion molecules in Angiogenesis. *Cancer Metastasis Review* **15**: 187-194.
 22. P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Rosenfeld, T. Hu, G. Klier, and D. A. Cheresh. 1994. Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessel. *Cell* **79**: 1157-1164.
 23. P. C. Brooks. 1996. Role of integrins in angiogenesis. *European Journal of Cancer* **32(A)**(14): 2423-2429.
 24. R. Auerbach, W. Auerbach, and I. Polakowski. 1991, Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacology and Therapy* **51**: 1-11.
 25. S. Baatout. 1997. Endothelial differentiation using Matrigel (review). *Anticancer Research* **17**: 451-456.
 26. R. K. Jain, K. Schlenger, M. Hockel, and F. Yuan. 1997. Quantitative angiogenesis assays: Progress and Problems. *Nature Medicine* **3**(11): 1203-1208.