

甲状腺乳頭癌のリンパ行性転移に関する
血管内皮細胞増殖刺激因子mRNA発現機構

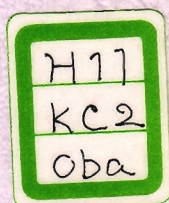
課題番号10671139

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金
基盤研究(C)(2)
研究成果報告書



平成12年3月

研究代表者 小原孝男
(東京女子医科大学医学部教授)



はしがき

血管内皮細胞増殖因子-C (Vascular Endothelial Growth Factor-C: VEGF-C)は、リンパ管の発達に関与していることが知られている。主に、甲状腺乳頭癌はリンパ行性転移をする一方、濾胞癌は血行性に転移をする。本研究では、この2つの甲状腺癌の異なった転移形式がVEGF-C遺伝子の発現と関連があるかどうかを検討した。

15例の甲状腺乳頭癌と4例の濾胞癌を材料とし、VEGF-C遺伝子の発現をノーザンブロット法とin situ ハイブリダイゼーションによって解析した。VEGF-C蛋白の局在は、免疫組織化学染色法により検討を加えた。

ノーザンブロット法による解析では、VEGF-C遺伝子の発現率は、乳頭癌組織では濾胞癌組織よりも有意に高値を示した。非腫瘍部の甲状腺組織を比べても、VEGF-C遺伝子の発現率は、濾胞癌患者の組織よりも乳頭癌患者の組織の方が高かった。in situ ハイブリダイゼーションでは乳頭癌の細胞でVEGF-C遺伝子の発現が観察されたが、濾胞癌では認められなかった。VEGF-Cに対する抗体を用いた免疫組織化学染色検査でも、乳頭癌細胞では陽性となった。

甲状腺乳頭癌患者では、腫瘍細胞及び非腫瘍甲状腺組織のいずれにもVEGF-C遺伝子の過剰発現が認められた。リンパ行性の腺内転移や所属リンパ節転移にVEGF-Cが関与していると考えられた。

研究組織

研究代表者 : 小原孝男 (東京女子医科大学医学部教授)
研究分担者 : 佐藤幹二 (東京女子医科大学医学部助教授)
研究分担者 : 岡本高宏 (東京女子医科大学医学部講師)
研究分担者 : 飯原雅季 (東京女子医科大学医学部助手)
研究分担者 : 田中礼子 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費

平成10年度	2,200千円
平成11年度	1,500千円
計	3,700千円

研究発表

- (1)論文発表 : 1) Peter Fellmer, Kanji Sato, Reiko Tanaka, Takahiro Okamoto, Yoichiro Kato, Makio Kobayashi, Masabumi Shibuya, Takao Obara. Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas. 1999;Surgery126(6): 1056-1062.
- 2)Takao Obara, Reiko Tanaka, Takahiro Okamoto, Masako Kanbe, Masatoshi Iihara. Management of anaplastic thyroid carcinoma: current strategic trends in Japan. 1998;Thyroidol Clin Exp 10:51-57.
- 3)Takao Obara. Advances and problems in the treatment of thyroid cancer. 1998;Asian Med J 41(10): 488-494.
- 3)Huagang Zhu, Yoichiro kato, Reiko Tanaka, Takao Obara, Kanji Sato, Makio Kobayashi. Osteopontin expression in papillary thyroid carcinoma. 1999;Acta Histochem 32(3): 281-285.

(2)口頭発表: Peter Fellmer, Kanji Sato, Reiko Tanaka, Takahiro Okamoto, Yoichiro Kato, Makio Kobayashi, Masabumi Shibuya, Takao Obara.

Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas.

20th annual meeting of the American association of endocrine surgeons 1999 5.2-4

はじめに

血管新生は、既存の血管から新しい血管網が形成される現象である。これは胎生期の血管形成には不可欠な生理的現象で、成熟期にも、子宮内膜、卵胞、創傷治癒などの部位では通常に観察されるものである。また、最近、この血管新生は、癌の発育と転移において重要な役割を演じていることが知られてきた¹⁾。なお、癌転移には、血行性とリンパ行性とがあり、リンパ管新生が癌のリンパ行性の進展・転移にかかわっていることが十分考えられるが、いままでにその詳細な機構についての研究は、あまり行われてきていない²⁾。実際、癌の進展形式には、血管新生とリンパ管新生の両機構が関係していることは明らかであり、主として血行性転移をするものも多いが、多くの癌が主としてリンパ行性に転移している。

血管新生は抑制因子と促進因子によって制御されている。これらの因子は、それぞれ単一ではなく作用の異なる複数の因子が共同的に作用するものと考えられている。促進因子としては、血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF)、アンジオポエチン、インターロイキン-8などが、また、抑制因子としてはエンドスタチン、トロンボスポンジン-1、アンジオスタチンなどの関与が指摘されている。

血管内皮細胞増殖因子は、腫瘍細胞の分泌する血管透過性亢進因子として、また、下垂体濾胞細胞培養上清中の内皮細胞に特異的な増殖因子として単離、同定されたものである。³⁾。いままでにさまざまな研究が行われてきた結果、多くの腫瘍における病的な血管新生に、このVEGFが主要な役割を果たしていることが明らかとなってきた³⁾。最近、VEGF(VEGF-Aとも称される)の中に、それと類似した構造をもつ新しい血管内皮細胞増殖因子として、VEGF-B、-C、-D及び-Eが発見されている。これらのなかで、VEGF-Cは、VEGF-Aと構造の30%が共通であり、特定のリンパ管内皮増殖を促進しリンパ管脈管系の過形成をひきおこす増殖因子であることが判明した^{4, 5)}。実際には、VEGF-CはVEGF受容体3(VEGFR-3)(Flt-4と

も呼ばれる)のリガンドである。これは、チロシンキナーゼであって、主にリンパ管内皮内で発現する^{4、5、7、8)}。トランジェニックマウスを使った実験では、基底層内にあるケラチノサイトでVEGF-Cが過剰発現し、皮内リンパ管の過形成を促進することが明らかとなった⁹⁾。さらに、ヒヨコ絨毛尿膜において精製されたVEGF-Cはリンパ管増殖を促進するが、毛細血管系にはほとんど影響を及ぼしていない¹⁰⁾。腫瘍が新しいリンパ管造成を刺激するという確固とした証拠は示されていないが、VEGF-Cが腫瘍のリンパ管新生に関与しているであろうことは推測されている。VEGF-Cは原発腫瘍巣のみならずその隣接した正常組織内でも、腫瘍細胞とリンパ管内皮細胞間で相互のパラクリン系を調整する重要な因子である可能性が指摘されている。

甲状腺濾胞上皮細胞起源の甲状腺分化癌の大部分は、乳頭癌と濾胞癌の二つに大別される。乳頭癌は、リンパ行性転移が顕著であるが、血行性転移が少ないという特徴がある。一方、濾胞癌は、血行性転移が特徴でリンパ行性転移は少ない¹¹⁻¹³⁾。これら2つの腫瘍の性質が、何によって特徴づけられているのかは、不明である。われわれは、主にリンパ行性転移をする乳頭癌で、VEGF-C遺伝子の発現が多く認められるのではないかと推論し、これを検証するために実験を組み立てた。すなわち、今回の研究では、1)甲状腺分化癌におけるVEGF-C遺伝子発現の有無。2)乳頭癌と濾胞癌の二つ異なった転移形態をとる甲状腺癌におけるVEGF-C遺伝子発現の差異。の2点について検討した。

研究材料及び研究方法

材料

東京女子医科大学内分泌外科にて、手術を施行した甲状腺癌19例を対象とした。その内訳は、乳頭癌15例、濾胞癌4例である。癌組織とともに同時に摘出された肉眼的に正常と判断された部位の組織も

実験材料とした。すべての症例の病理組織診断は、病理医によって確定された。

ヒト VEGF-C に特異的な cDNA のクローニング

RT-PCR(reverse transcription -polymerase chain reaction)は、PC3細胞から調整した1 μ g の全 RNA を、Moloney murine leukemia virus の reverse transcriptase 200U を用いて、37°C 1時間の条件下に逆転写した。PCRにあたっては、20 μ l の全逆転写反応容量について1 μ l の鋳型DNAを使用した。PCRは、ヒト VEGF-C に特異的なプライマーを使って、熱変性94°C、1分、プライマーのアニーリング72°C、1.5分、伸長72°C、10分の条件で30サイクル行った。50 μ l の全PCR反応物のうち10 μ l をアガロースゲルに電気泳動しエチジウムブロマイド染色し紫外線にて可視化した。正確にPCRが行われたかどうかを判断するために、PCR産物を適当な制限酵素によって切断し、クローン化したPCR産物のシーケンスをおこなった。PCR産物は、TA cloning kit (Invitrogen, San Diego, Calif)を使用してクローニングを行った。オートマチックシーケンサー(M13forward M13reverse)(Abi Prism 377; Perkin Elmer, Norfork, Conn)にてDNA塩基配列を決定した。シーケンスの解析には、BLASTN 1.4.9MP software (Altschul)を用いた。

RNA の分離、調整

RNA分析を行う甲状腺検体は、腫瘍部と非腫瘍部とに分けた。分別は、肉眼的に腫瘍部から少なくとも3 cm離れた部分を非腫瘍部とした。検体は、分別した後、それぞれ直ちに液体窒素で凍結させ、-80°Cの冷凍庫または液体窒素中で保存した。凍結標本はQuiagen RNase Kit (quiagen, Hilden, Germany) の溶解液中でPolytrn homogenizer (Kinematica, Littau, Switzerland)を用いてホモジナイズした。このホモジネートから、Kit製造会社のプロトコールに従

いRNAを調整した。

ノーザンブロット法による解析

前述のように調整した全RNAを、ノーザンブロット法によって解析した。0.37キロベース(kb)のヒトVEGF-C cDNA断片をプローブとして、8 μ lの全RNAサンプルを解析した。泳動で流れたRNA量は、ethidium bromideによる染色を行いさらに、0.5kbのglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) cDNA fragmentとリハイブリダイゼーションさせて換算した。全RNAをアガロース-ホルムアルデヒドゲル上で電気泳動し、これをニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)にトランスファーし、フィルターに固定した。RNAの固定処理を行ったフィルターを、VEGF-CとGAPDHとにそれぞれ特異的なcDNAプローブで、ハイブリダイゼーションした。cDNAは、ペアレントプラスミドから適切な制限酵素(*Eco* R1)を使い、アガロースゲル上で分離したものをQuiagen DNA Extraction Kit (Quiagen)で回収した。このcDNAプローブは³²P-deoxycytidine triphosphateでラベリングし、ランダムプライミングしたものである(DNA Labeling Kit; Boehringer Mannheim Biochemical, Mannheim, Germany)。cDNAプローブのシンチレーションカウンターで取り込まれた³²Pを測定し、約10000000cpmをハイブリダイゼーションに用いることとした。ハイブリダイゼーションはQuick Hyb Kit (Stragene, La Jolla, Calif)を使用し、68°C、1時間の条件で行った。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、0.1% sodium dodecylsulphateを含む2倍希釈のsaline sodium citrateで室温下15分の条件で2回おこなった。ナイロンフィルターは、X-omat (Kodak, New York, NY)のX線フィルムに-80°Cで20時間露出させた。

デンストメトリー解析

mRNAシグナルの定量化は、オートラジオグラフィーをスキャンす

ることで行った(Hewlett Packard, Greeley, Colo)。デンシトメトリ解析には、NIH Image Software(National Institute of Health, Bethesda, Md)を用いた。VEGF-Cのシグナルは各々のサンプルごとにGAPDHシグナルに対しての比率として標準化し、VEGF-CをGAPDHで割った数字で表した。

in situ ハイブリダイゼーション

甲状腺乳頭癌、濾胞癌のパラフィン包埋切片を使って、In Situ ハイブリダイゼーションを行った。前述した条件でPCRを行い、ヒトVEGF-C cDNAプローブをdigoxigeninでラベリングした。ヒトVEGF-C cDNAの遺伝子座は、塩基配列の1055から1425とした⁵⁾。これらを用いて、以前の文献に述べられている方法でin situ ハイブリダイゼーションを行った¹⁴⁾。要約すると、以下のごとくである。まず、1 μ g/mL digoxigeninでラベリングされたプローブを含む200 μ Lのハイブリダイゼーション溶液を各切片にひたし、42°Cで16時間インキュベーションした。DNA-RNAハイブリッドはalkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody (1 : 500希釈)を用いて製造会社Boehringer Mannheim Biochemical, Mannheim, Germany)のプロトコールに沿って検出した。非ラベルcDNAを過剰に加えインキュベートした組織切片を陰性コントロールとした。

免疫組織学的解析

免疫組織反応の前に、すべての切片は0.01mol/Lクエン酸緩衝液(pH6.0)に浸し、10分間オートクレーブした。1:100に希釈したヤギ抗VEGF-Cポリクローナル抗体(N-19; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif)を第一次抗体として使用した。抗体を加えなかった切片を、陰性反応のコントロールとした。免疫組織反応産物を、アビジン-ビオチン-イムノペルオキシダーゼ複合体の呈色反応を

利用したVectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, Calif)を用いて視覚化して、評価した。

統計解析

2グループ間のパラメーターの差異を、unpaired student t testを用いて検定し、 $P < 0.01$ を有意差ありとした。

結果

ノーザンブロット法による解析

甲状腺乳頭癌の検体はすべてVEGF-Cに特異的な2.4kbのバンドの中で中等度から高度のシグナルを示した。このシグナルは腫瘍部と正常部では、殆ど同じ程度の強さを示していた。一方、濾胞癌の検体では、4例すべてでVEGF-Cは、非常に低いシグナルしか示さなかった(図1)。全RNAを20 μ l使ってノーザンブロットを行っても、一つの検体はシグナルを示さないほどであった。濾胞癌患者の甲状腺非腫瘍部組織でも、VEGF-Cの遺伝子発現は弱かった。

VEGF-C/GAPDH比(平均 \pm 標準偏差)をみると、乳頭癌では 0.82 ± 0.03 、濾胞癌では 0.57 ± 0.02 であった。統計処理を行い両群を比較すると、 $P < 0.01$ で乳頭癌のVEGF-C発現は濾胞癌よりも高いことがわかった(図2)。非腫瘍部組織でのVEGF-C/GAPDH比を比較しても、やはり、濾胞癌患者よりも乳頭癌患者のほうが高かった(乳頭癌 0.90 ± 0.04 、濾胞癌 0.53 ± 0.04 、 < 0.001)。

in situ Hybridizationと免疫組織化学

VEGF-C mRNAと蛋白の局在はin situ Hybridizationと免疫組織化学法によって乳頭癌と濾胞癌についてそれぞれ1例ずつ調べた。乳頭癌では、VEGF-C mRNAは癌細胞の細胞質内に発現した(図3)。

そしてまた、隣接する非腫瘍組織でも検出された。

免疫組織化学法で染色すると、VEGF-C蛋白はVEGF-C mRNAと同じく乳頭癌細胞の細胞質で観察された(図4)が、濾胞癌細胞では検出されなかった。興味深いことに、どちらの甲状腺癌でも、血管およびリンパ管を裏打ちしている内皮細胞はVEGF-Cの免疫組織染色で陽性を示した。

考察

甲状腺癌において、非腫瘍部と腫瘍部をくらべると、VEGF-A mRNAの発現が腫瘍部で強く表れ、また免疫組織染色でも抗VEGF-A抗体が強く染まること示されてきた^{15,16)}。甲状腺以外の固形腫瘍で示されているように³⁾、VEGF-Aはおそらく甲状腺癌の増殖や浸潤に大きな役割を示していると考えられている^{15, 16)}。本研究では、ノーザンブロットィングとin situ Hybridization法を用いて、甲状腺分化癌、特に乳頭癌でVEGF-C mRNAの発現が強く認められることが示された。VEGF-Cの発現については、いまだ限られた情報しか得られていない。しかし、最近になってリンパ腫、メラノーマ、線維肉腫、扁平上皮癌、乳癌などのさまざまなヒトの腫瘍でVEGF-C mRNAが発現していることが明らかとなってきた¹⁸⁾。VEGF-Cはまた、ヒトの心臓、胎盤、筋肉、卵巣、小腸でも発現していることが分かっている⁵⁾。本研究は、VEGF-Cが、リンパ管系の発達した臓器である甲状腺において、発現がみられたことを最初に示したものである。さらにわれわれは、VEGF-C遺伝子発現が乳頭癌のほうに濾胞癌よりも強く認められることを見出した。興味あることに、乳頭癌では腫瘍部と非腫瘍部とで同じようにVEGF-C mRNAの発現が強く認められた。乳頭癌が、主として甲状腺内のリンパ管系に浸潤し豊富にはりめぐらされているリンパ管を伝わって甲状腺内に広がり、多発腺内転移巣を形成することは、よく知られている^{11, 12, 19)}。甲状腺乳頭癌患者の約80%では、顕微鏡下で頸部リンパ節転移がみられる²⁰⁾。腫瘍部のみならず、腫瘍周囲の正常組織でもVEGF-C 遺伝子の発現がみられたのはリンパ管を通

じた甲状腺内進展によるものかもしれない。本研究で、乳頭癌は濾胞癌と異なり、VEGF-Cはリンパ管内皮に特異的な増生を促してリンパ管の過形成をひき起こすことで、腫瘍の進展と転移に重要な役割を果たしていると考えられる。

VEGF-C mRNAレベルは血小板増殖因子、外皮増殖因子、等のいろいろな因子によって調節されている。ごく最近では、実験系の中ではインターロイキン(IL)-1 α 、IL-1 β また、腫瘍壊死因子 α などもVEGF-Cの調節に関わっていることが示された。濾胞癌とは異なり、乳頭癌がIL-1を産生しているという報告があり、サイトカインがこれら2つの甲状腺癌におけるVEGF-C mRNA発現の強さの違いに関与していることが考えられる。低酸素状態はVEGF-A発現を強力な誘導するが、VEGF-C mRNAには関与しない。従って、2種類の甲状腺癌の間での遺伝子発現の違いが認められたが、手術方法や手術時間による細胞の低酸素状態の違いが影響しているとは考えにくい。

いままでの文献や今回の実験データから、われわれは次のような推論をたてた。すなわち、VEGF-Cはなんらかのメカニズムによって乳頭癌で過剰に産生され、その受容体であるVEGFR-3 (Flt-4)をパラクリン作用で刺激し内皮細胞で発現される。一方、VEGFR-3自体はリンパ管内皮を活性化し、乳頭癌細胞の甲状腺への浸潤、続いてリンパ行性転移を促している。

最近、抗血管新生剤が癌治療のなかで、期待されている。内皮細胞を標的とするため、腫瘍血管新生に依存している癌であれば種類と無関係に効果を発揮し、また、薬剤耐性が生じにくいと考えられ、開発がすすめられている²⁴⁾。今回のVEGF-Cの乳頭癌細胞のリンパ行性浸潤、転移への関与を示唆する研究結果から、VEGFR-3をブロックする抗体を利用して、乳頭癌のリンパ管浸潤を阻止する新しい治療法が期待できるのではないかと考える。

結語

今回の研究で、VEGF-C 遺伝子発現は濾胞癌に比べ乳頭癌で強く発現していることが示された。VEGF-C 遺伝子は甲状腺乳等癌の腫瘍部のみならず、その周囲の非腫瘍組織でも過剰発現しており、このことは領域リンパ節転移や、甲状腺内のリンパ管浸潤に、この遺伝子が関与していると考えられた。

図 1

甲状腺分化癌における VEGF-C mRNA の発現。乳頭癌検体では高、あるいは中間レベルの濃度で現れている。VEGF-C に特異的配列をもつ断片は、腫瘍組織(T1, T2)と、おのおの同じ患者の腫瘍周囲の肉眼的、顕微鏡下で正常と判断された組織(N1, N2)から検出された。濾胞癌患者の検体からは非常に微弱なレベルの VEGF-C mRNA しか検出されなかった(T3, N3)。

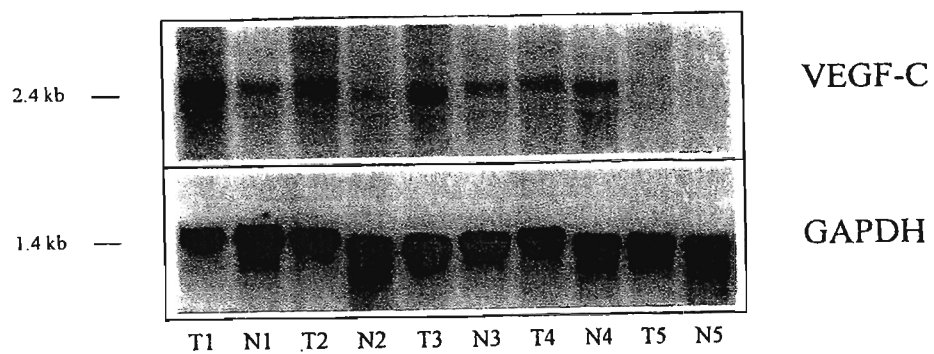


図 2

VEGF-Cに特異的甲状腺乳頭癌患者のほうが濾胞癌患者の方により高レベルで認められる。

A. 甲状腺乳頭癌と濾胞癌組織におけるVEGF-C/GAPDH比

B. 腫瘍周囲の正常組織におけるVEGF-C/GAPDH比

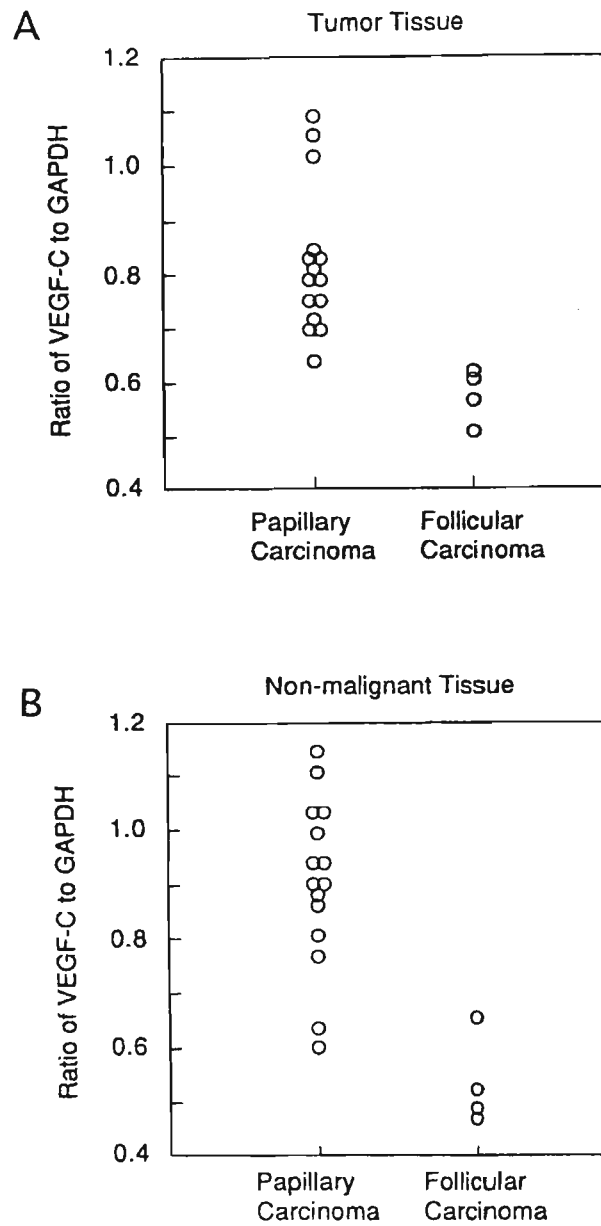
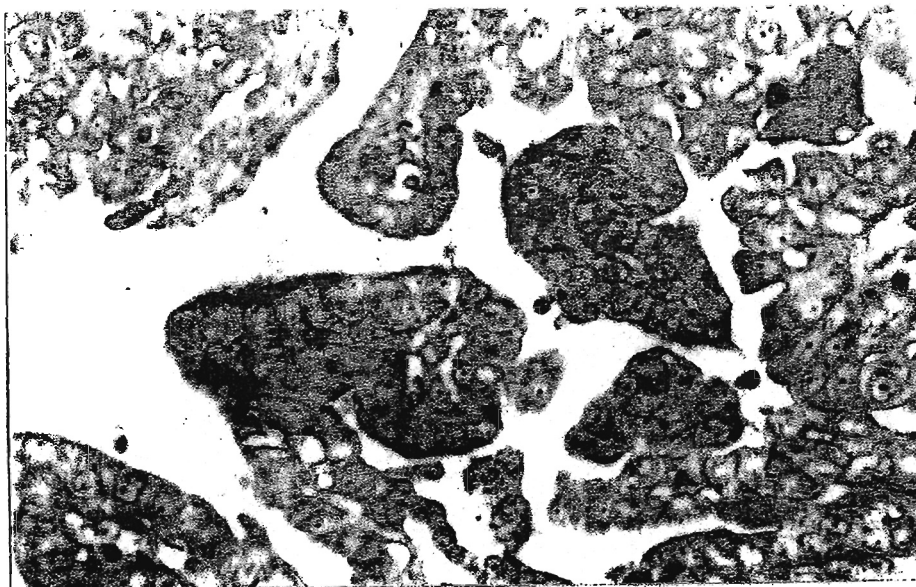


図3

甲状腺乳頭癌と濾胞癌組織における VEGF-C mRNA の in situ hybridization

乳頭癌細胞では VEGF-C mRNA の発現が認められているが(A)、濾胞癌では認められていない(B)。

(A)



(B)

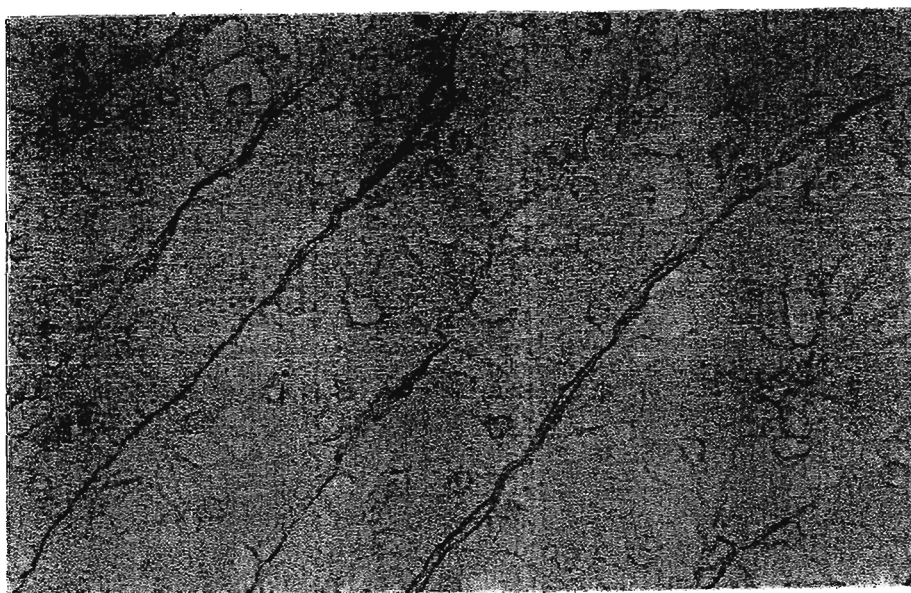
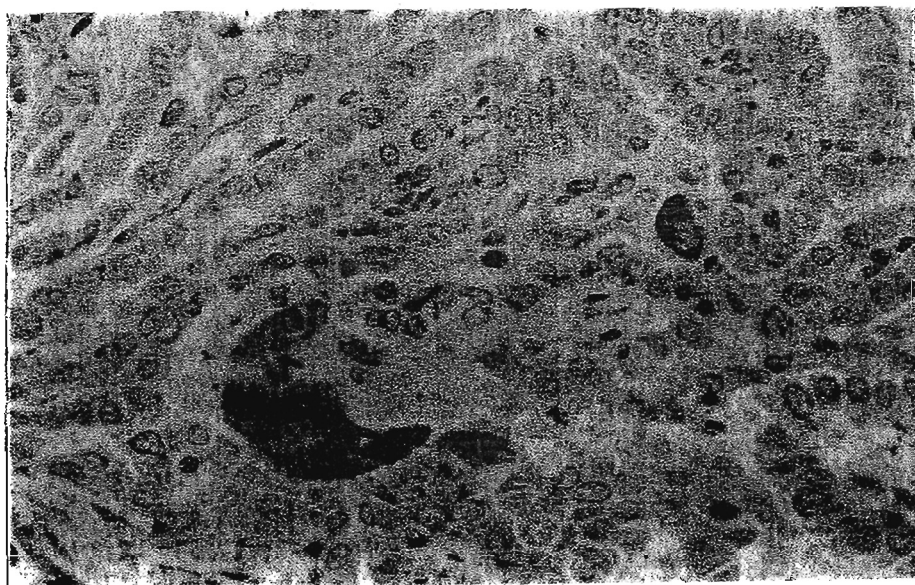


図 4

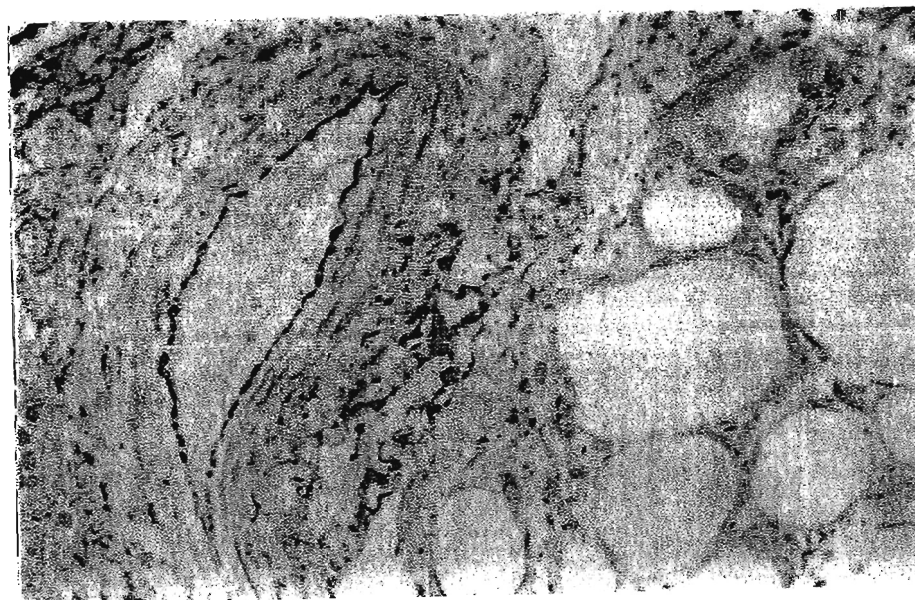
免疫組織化学染色

ヤギ抗VEGF-Cポリクローナル抗体を使用し、甲状腺乳頭癌を染色。
癌細胞の細胞質内(A)と癌周囲の正常甲状腺細胞内の微小血管内皮
にVEGF-C蛋白が検出される(B)。

(A)



(B)



文献

1. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J. Med* 1995;333:1757-63.
2. Folkman J. Angiogenesis and tumor growth. *N Engl J Med* 1996;334:921.
3. Ferrara N. Vascular endothelial growth factors:molecular and biological aspects. In: Claesson-Welsh L, editor. *Vascular growth factors and angiogenesis*. Berlin: Springer-Verlag;1999. p. 1-30.
4. Eriksson U, Alitalo K. Structure,expression and receptor binding properties of novel vascular endothelial growth factors. In: Claesson-Welsh L, editor. *Vascular growth factors and angiogenesis*. Berlin: Springer-Verlag;1999. p. 41-57.
5. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGF-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15:290-8.
6. Ogawa D, Oku A, Sawano A, Yazaki Y, Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factors, VEGF-E (NA-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:31273-82.
7. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGF-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996;122:3829-37.
8. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3566-70.

9. Jeltsh M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276:423-5.
10. Oh SJ, Jeltsch M, Birkebhager R, et al, VEGF and VEGF-C; specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1997;188:96-109.
11. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. WHO international classification of tumours, histological typing of thyroid tumours. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1988.
12. Fujimoto Y, Obara T, Yamashita T. Papillary thyroid carcinoma: rationale for hemithyroidectomy and regional node dissection. In: Clark OH, Duh Q-Y, editors. *Textbook of endocrine surgery*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1997. p.82-9.
13. Doherty GM. Follicular neoplasms of the thyroid. In: Clark OH, Duh Q-Y, editors. *Textbook of endocrine surgery*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1997. p.95-102.
14. Kato Y, Igarashi N, Hirasawa A, Tsujimoto G, Kobayashi M, Distribution and developmental changes in vasopressin V2 receptor mRNA in rat brain. *Differentiation* 1995;59:163-9.
15. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995;11:1569-79.
16. Sato K, Yamazaki K, Shizume K, et al. Stimulation of thyroid stimulating hormone and Graves' immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in vivo and in the rat thyroid in vivo. *J Clin Invest* 1995;96:1295-302.
18. Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, et al. Vascular

endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998;153:103-8.

19. Russell WO, Ibanez MI, Clark RL, White EC.

Thyroid carcinoma: classification, intraglandular dissemination, and clinicopathological study based upon whole organ sections of 80 glands. *Cancer* 1963;16:1425-60.

20. Noguchi S, Noguchi A, Murakami N. Papillary carcinoma of the thyroid. I. Developing pattern of metastasis.

Cancer 1970;26:1053-60.

21. Enholm B, Paavonen K, Ristimaki A, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 1997;14:2475-83.

22. Ristimaki A, Kirsi N, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factors. *J Biol Chem* 1998;273:8413-8.

23. Kayser L, Broholm H, Francis D, et al.

Immunocytochemical localization of interleukin-1 α and interleukin-6 in thyroid tissues from patients with neoplastic or autoimmune thyroid disorders. *Autoimmunity* 1995;20:75-82.

24. Griffith EC, Su Z, Turk BE, et al.

Methionine aminopeptidase type 2 is the common target for angiogenesis inhibitors AGM-1470 and ovalicin. *Chem Biol* 1997; 4 :461-470.