

血管新生因子 VEGF

新谷 理 室原 豊明

要 旨：血管新生は、もともとFolkmanらが提唱し始めた腫瘍発育における栄養血管の新生に関する研究という形で学問が進歩してきた。その後、複数のグループによって血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が発見・同定され、さらにIsnerらがVEGF 遺伝子を用いた虚血部血管新生療法を臨床応用したことにより、循環器領域にも急速に普及した。
(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 289-295)

Key words: angiogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF), gene therapy

はじめに

近年、わが国においても食生活の欧米化・社会の高齢化に伴い、動脈硬化を基礎とする閉塞性動脈硬化症や虚血性心筋症が増加している。薬物療法や経皮経管的血管形成術やバイパス手術といった既存の治療法では下肢切断を余儀なくされる重症虚血下肢患者や難治性のうっ血性心不全を繰り返す末期虚血性心疾患患者も多い。最近では、このような症例に対し遺伝子や幹細胞を用いて、虚血部周辺の組織からの血管新生や側副血行の発達を促進することにより組織障害や壊死を軽減させ、組織もしくは臓器の機能保護をしようとする試みがなされている。これら一連の戦略は、治療的血管新生 (therapeutic angiogenesis) と呼ばれ、これらに関する研究および臨床応用が急速に増え、今も持続していることは言うまでもない。血管新生は、もともとFolkmanら¹⁾が提唱し始めた腫瘍発育における栄養血管の新生に関する研究という形で学問が進歩してきたと理解している。その後、血管新生に関する研究が循環器領域にも急速に普及した要因は、まず1980年代後半に、複数のグループによって血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が発見・同定されたこと、さらに1995年から米国ボストン、タフツ大学のIsnerら²⁾がVEGF 遺伝子を用いた虚血部血管新生療法を、度重なる動物実験を経て臨床応用し始めたこと

との2点につきるのである。この項では、VEGFが今後、血管新生治療薬として生き残るかについて、最近の知見を交えて検討したい。

VEGFファミリー

VEGFは、血管形成の一連の過程で血管内皮細胞に特異的に作用する重要な増殖因子であり、また、血管透過性亢進因子の2つの性質をもつ物質である。さらにVEGFは、管腔形成の促進や内皮細胞の遊走、腫瘍血管における病的血管新生などの作用がある。VEGFにはスプライシングの違いによるサブタイプが存在するほか、異なる遺伝子にコードされるいくつかのアイソフォームが報告されている。

VEGF-Aの重要な特徴は、塩基性ドメインの有無によるサブタイプの存在であり、121, 165, 189アミノ酸タイプが主なものである。サブタイプVEGF₁₆₅は量的にも最も多く、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130kDaのニューロピリン-1と会合しながらVEGFR-2に作用する。マウス個体レベルの実験では、サブタイプのなかでVEGF₁₆₅が最も効率よく腫瘍血管を誘導できるといわれている。VEGF-Aと受容体系は腫瘍血管形成に深く関わることから、抗VEGF-A中和抗体による癌治療が試みられてきた。すでに米国Genentech社でモノクローナル抗VEGF-A抗体 (Avastin®) が開発され、進行性大腸癌患者を対象とした

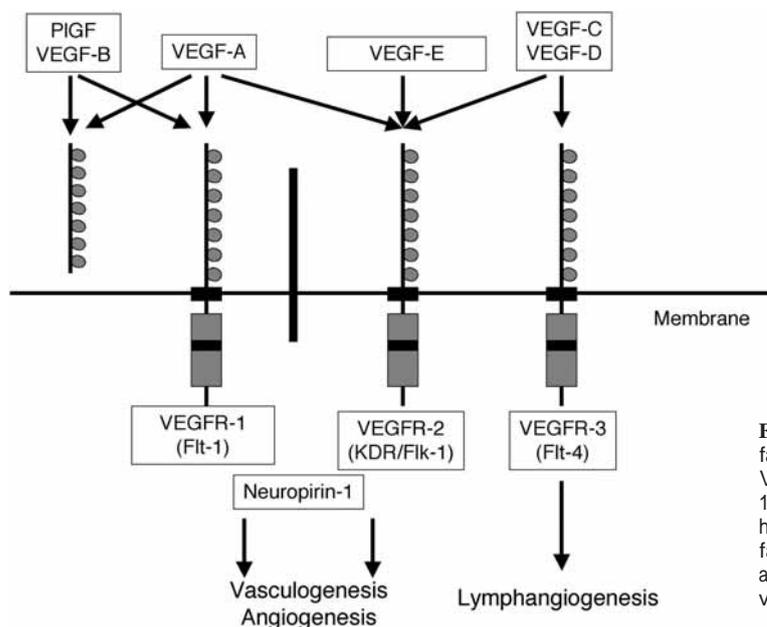


Figure 1 Vascular endothelial growth factor (VEGF) families and their receptors. VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), VEGFR-3 (Flt-4), and neuropirin-1 have been identified as receptors of VEGF families. These receptors are involved in angiogenesis, lymphangiogenesis, and vascular permeability respectively.

第III相臨床試験が行われた結果、著しい延命効果をもつことが明らかとなり、2004年2月米国で新規制薬として認可された。

VEGF-Bは、VEGFR-1のみを受容体とする。VEGFR-1のキナーゼ活性が低いことを反映して、これらの生物学的活性は弱く、内皮細胞増殖、透過性亢進活性はVEGF-Aの1/10か、それ以下である。

VEGF-C、VEGF-Dは、VEGFR-3に結合してリンパ管新生を誘導する。特にVEGF-C遺伝子は胎生期より発現し、胎生中期の血管系とリンパ管の発生に、その後はリンパ管新生に重要な役割を果たす。

VEGF-EはVEGFR-2のみに結合して強い血管新生活性をもつことが明らかにされた。さらに個体レベルではVEGF-Aの副作用と考えられる血管透過性が低いことが示された(Fig. 1)。

つまり、VEGFファミリーの受容体としては、チロシンキナーゼ型受容体であるVEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(KDR/Flk-1)、VEGFR-3(Flt-4)、ニューロピリン-1が同定されている。VEGF受容体ファミリーは、血管新生、リンパ管新生、血管透過性のシグナルを伝達する。その分子機構は興味ある特徴を示す。なかでもVEGF-Aに結合するVEGFR-1とVEGFR-2は、胎生前期の血管形成においてVEGFR-2は血球血管芽細胞あるいはそれ以

前の段階の未分化細胞に作用し、内皮細胞と血球系細胞の両方への分化に必須な因子である、つまりポジティブシグナルである。一方、VEGFR-1は血管形成の段階ではVEGF結合蛋白として、VEGFレベルのネガティブな調節といった相反する役割を呈することが示されている。すなわち、胎生期におけるVEGFのレベルとそのシグナルの受容は、きわめて厳密に調整されていると考えられる。さらに、VEGFはVEGFR-2に結合するとERKの活性が上昇するが、典型的なチロシンキナーゼ型受容体とは異なり、Ras系を介さずにPLC- γ からPKCを介したERKの活性化がみられることも特徴の1つといえる。

血管新生

循環器・脈管系は脊椎動物の個体発生過程において、胚(embryo)の急速な成長に必要とされ、最初に機能し始める器官である。したがって、広義の血管新生(neovascularization)は、胎生前期の心臓をはじめとする循環器・脈管系の形成や各組織の形態形成に密接に関与する。ヒトにおいては、身体の成長とともに血管系も増殖・進展するが、思春期以降、男性では恒常的な血管新生は観察されない。しかし、女性においては性周期に伴う卵巣の黄体形成や子宮内膜の発育の際に、一過性の強い血管新生が認められる。さらに、妊娠の

際に胎児と母胎の接点として作られる胎盤は、両者の血管系のネットワークともいえる組織であり、劇的な血管新生と維持、物質交換の場である。したがって、生理的な条件においてもさまざまな時期、組織において、血管新生はダイナミックに行われているといえる。

発生学や組織学の視点から、広義の血管新生は以下の2種に大別される。その1つとして、胎児初期、血管形成は造血幹細胞と血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)より構成された血島から始まる。これらは互いに融合し外側が血管に、内側が血液細胞に分化していくことから、造血幹細胞とEPCは共通の幹細胞を有すると考えられてきた^{3,4)}。つまり、EPCが未分化のまま増殖、分化することで血管構築するまったく新しい脈管系の発生で、脈管形成(vasculogenesis)と呼ばれるものであり、もう1つのタイプは、すでに組織に存在する隣接血管系の血管内皮細胞からの増殖、遊走を基本とした新しい血管枝の形成で、狭義の血管新生(angiogenesis)と呼ばれるものである⁵⁾。最近まで、胎生期の後期以降および生後すべての時期における血管新生は、既存の血管内皮細胞の増殖と遊走によるもののみと考えられてきたが、1997年に成人末梢血中の単核球の分画中に血管内皮細胞に分化しうる幹細胞(EPC)が存在することが発見された⁶⁾。以上より成人における血管新生には、既存の毛細血管内皮細胞の増殖や遊走のみではなく、流血中のEPCの分化という脈管形成型の血管新生も関与する可能性があることが示唆された。

一方、血管新生は多くの疾患と関係している。増殖性糖尿病性網膜症は、網膜内で血管新生と出血が繰り返され、失明に至る危険性の高いきわめて重要な疾患である。網膜症の基本病変は、血管の透過性亢進、血管の内腔閉塞、血管新生の3つに要約される。現在、網膜症の病態像と最も関連が深く、治療応用へのターゲットとして注目されているサイトカインがVEGFである。しかし、網膜症に伴う血管新生は、透明性を最大の特長とする眼組織にとっては阻止したい病変であると同時に、動脈硬化に起因する冠動脈や四肢主要血管の閉塞にとって、VEGFはその予後を左右する側副血行路の発達に不可欠な物質である。つまり糖尿病にとって血管新生をターゲットとする治療概念は、部位により阻害と促進という相反する二面性をもつため、基礎疾患の治療だけでなく、患者の病態把握と適

応基準の決定が重要である。また、糖尿病以外にも、いろいろな炎症性疾患(たとえば慢性関節リウマチの滑膜炎)、外傷における創傷治癒過程、心筋虚血における側副血行路発達、消化性潰瘍の再生機転や悪性腫瘍の本質である増殖・浸潤・転移といった増悪機能の発現に深く関わっている⁷⁾。

VEGFを用いた治療的血管新生療法

現在、循環器病(心血管病)領域においては、まず確立された有効な治療法であるPCIが試みられるが、一定の率(30~40%)で拡張した血管の再閉塞がみられる。繰り返しPCIを施行する患者も多く、現在の臨床上の限界と考えられている。このような症例に対して、虚血周囲の健常組織からの血管新生や側副血行の発達を血管新生に対する正の因子を利用することにより人為的に促進し、虚血組織の傷害・壊死を軽減させようとする試みがなされている。これら一連の戦略は治療的血管新生と呼ばれ、虚血組織の機能を回復する面においても大変重要である。

1994年、Takeshitaら⁸⁾は、ウサギの片側大腿動脈を外科的に切離し、慢性虚血下肢を作成し、腸骨動脈内に投与された500~1,000 μ gのVEGF-Aが、内腸骨動脈から派生する側副血行の発達を促進させることを報告した。この実験では、組織学的にも虚血組織内の毛細血管数が治療群において有意に増加していた。さらに、このような解剖学的な所見の改善に加え、下肢血圧の上昇や実際の血流量の増加などの血行動態の改善も確認された。1994年、Banaiら⁹⁾は、ameroid constrictorを用いてイヌの冠動脈回旋枝領域に心筋梗塞を作成し、1カ月間にわたって閉塞部より遠位部の冠動脈内に留置したカテーテルを用いてVEGF₁₆₅(45 μ g/day)を投与したところ、心筋梗塞部の血流量は非治療群に比較して40%の増加、また、毛細血管数も約2倍に増加したと報告した。以上のように動物実験においては、血管新生増殖因子であるVEGF₁₆₅を用いることにより、側副血行を有効に増強させ、かつ機能を回復させることが証明されてきた。

VEGFのリコンビナント蛋白や遺伝子を用いた血管新生治療は、欧米ではすでに臨床の場に移行している。いくつかの報告では、VEGF蛋白の投与や遺伝子導入はヒトの虚血組織において血管新生を増強させ、機能回復に貢献することが明らかにされている。

タフツ大学のIsnerらの研究グループは、上記のような度重なる慎重な動物実験の後に、VEGFの遺伝子導入によるヒト閉塞性動脈硬化症治療の研究プロトコルを米国FDA(食品・医薬品局)から承認された¹⁰⁾。その後1996年にはVEGF₁₆₅の遺伝子を含む発現プラスミドベクターを下肢虚血患者の血管内にカテーテルを用いて投与し、有意な側副血行の改善が認められたことを報告した²⁾。この報告は、循環器領域では世界初のヒト遺伝子治療の症例報告となった。当初VEGFの遺伝子導入は、このように経血管的に試みられていたが、カテーテルが閉塞部位に到達するまでのルートに強い狭窄病変が存在したり、血管壁の石灰化を伴っていたりすることから、カテーテルによる遺伝子デリバリーの限界がみられた。その後、VEGF₁₆₅プラスミドの遺伝子導入は、直接、骨格筋内に注入しても同等の血管新生増強効果が得られることが動物実験で明らかにされ¹¹⁾、Isnerらは、ヒトへのVEGF遺伝子導入を骨格筋内注射に切り替えた。1998年には、彼ら¹²⁾は、虚血性皮膚潰瘍もしくは安静時疼痛を伴う9人の重症閉塞性動脈硬化症患者(10病変)に対して、VEGF₁₆₅プラスミド遺伝子(計4mg/4カ所)を筋肉内に投与し、側副血行促進作用を検討した結果を報告した。遺伝子導入後、血中のVEGF蛋白量が増加することがELISA法により確認された。虚血の指標であるankle-brachial indexは約45%改善し、70%の病変で血管造影上の新しい側副血行が、また80%にMR angiography上の末梢血流の改善が認められた。さらに難治性皮膚潰瘍を有する症例の57%に改善を認め、さらに膝以下の切断を勧められていた3人の患者の脚は、この遺伝子治療によりすべて切断を免れたと報告した。副作用として、6人の患者に一過性の下肢の浮腫がみられたが、これはVEGF-Aの血管透過性促進因子としての生物学的機能を現しているものと考えられた。

1998年、Isner、Losordoら¹³⁾の研究グループは、狭心症患者に対しVEGF₁₆₅プラスミド遺伝子導入の単独療法を行った成績を発表した。対象は16例で、全員が心筋梗塞既往および狭心症による重度の機能低下や生活障害を有し、PCI(冠動脈インターベンション: percutaneous coronary intervention)やCABG(冠動脈バイパスグラフト術: coronary artery bypass grafting)が適応とならなかった患者である。彼らはVEGF₁₆₅のプラスミド遺伝子を胸部小切開法により直接心筋内に注入する方法を採用し

た。VEGF遺伝子発現の確認のためELISA法を用いて血中VEGF濃度を測定した結果、治療後に上昇が認められ、平均12日でピークに達した。手術後90日間の追跡期間において、狭心症症状は全例で著明に改善し、発作回数は治療前の平均50回/週から、3回/週にまで減少し、10例で左心室駆出率の改善も認められた。心筋シンチグラフィによる心筋血液灌流スコアは、治療後60日で有意に改善した。またRentrop scoreを用いた側副血行の評価では、治療後60日で12例においてスコアの改善がみられた。現在、彼らは胸部小切開を行わず、血管内を經由して心内膜側から虚血部位をマッピングし、カテーテルによって遺伝子を虚血心筋内に注入する技術 NOGAシステム、Cordis社製)を開発し、VEGF、EPCを問わず、このNOGAシステムを用いて血管新生療法を行っている¹⁴⁾。

プラスミド以外のベクターによる血管新生増強因子の遺伝子治療はどうであろうか。1999年、Crystalら¹⁵⁾の研究グループは、21人の狭心症患者に対して、通常CABGの補助療法として、または単独治療として、VEGF₁₂₁遺伝子を含むアデノウイルスベクターを、直接胸部小切開法により心筋内に投与した。この結果、遺伝子導入30日後、冠動脈造影上のRentrop scoreが約80%の患者において、また^{99m}Tc-sestamibiストレスシンチグラムから計測した左心室の壁運動が66%の患者において改善していた。21例すべての患者において狭心症症状の改善を認め、単独遺伝子治療を行った5人の患者では、トレッドミル運動負荷テスト上の運動時間、ダブルプロダクト(血圧×心拍数)、ST下降度/心拍数比がともに50~75%の症例で改善した。アデノウイルスベクター導入に伴う副作用は特に認められなかった。このようにVEGFの遺伝子をヒトの虚血心筋または虚血骨格筋内に導入することにより、良好な側副血行の発達と組織血流の改善が認められることが明らかにされた。しかし残念なことに、これらの報告では、動物実験や1施設での第I、IIa相試験では有望な成績が得られているが、多施設(第IIb相試験以降)では必ずしも有効な結果が得られていない。2003年に報告されたVIVAトライアル¹⁶⁾では、狭心症患者に対するVEGF蛋白投与群とプラセボ群との間に60日後では有意差が認められないが、120日後には胸痛の頻度の減少がみられたと報告されており、今後のフォローアップの結果が待たれる。さらに遺伝子欠損症の患者の肝臓にアデノウイルス

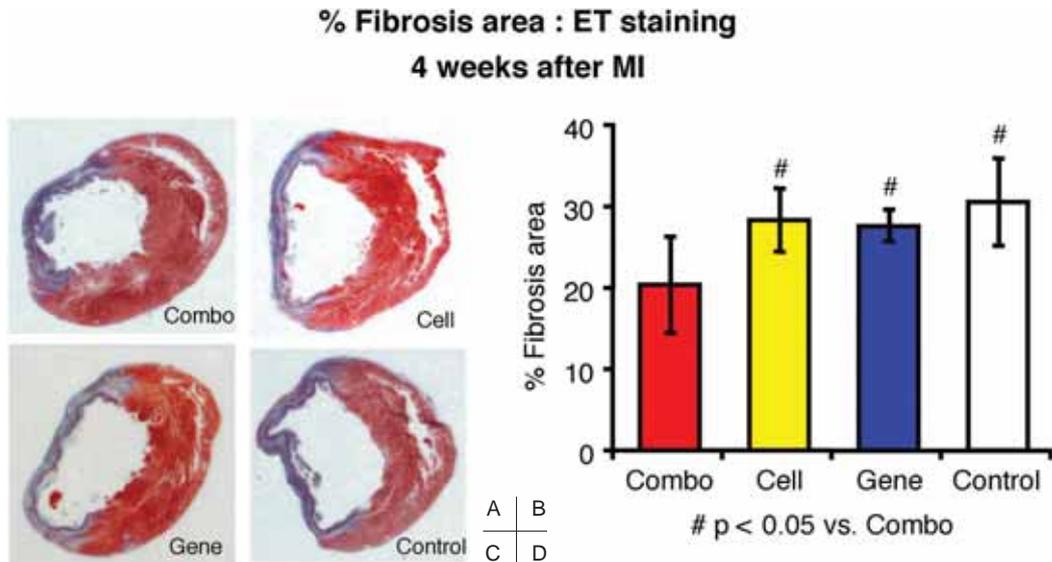


Figure 2 Therapeutic effects of combined cell and gene therapy. Nude rats were subjected to MI and were randomly divided into 4 groups. The combo therapy group (A) received 1×10^4 human CD34⁺ cells and 50 μ g phVEGF-2 resuspended with 100 μ L of saline. The cell therapy group (B) received 1×10^4 CD34⁺ cells and 50 μ g empty plasmid. The gene therapy group (C) received 1×10^4 CD34⁺ cells and 50 μ g phVEGF-2. The control group (D) received 1×10^4 CD34⁻ cells and 50 μ g empty plasmid. The ratio of percent fibrosis area to the entire LV area was significantly lower in rats in the combo therapy group than in the other three groups (combo vs. cell vs. gene vs. control, 19.9 ± 6 vs. 27.9 ± 3.9 vs. 27.2 ± 2 vs. 30.1 ± 5.4 %, #; p < 0.01 vs. combo group). Modified from reference 20.

スペクターによる遺伝子治療を行ったところ、劇症肝炎を発症し死亡に至ってしまったというショッキングな報告もあった。

VEGFを用いた冠動脈形成術

2003年、フィンランドのクオピオ大学のYla-Herttualaらは、VEGF₁₆₅遺伝子を含むアデノウイルスベクターあるいはVEGF₁₆₅遺伝子を含むプラスミドを用いた遺伝子治療をKuopio Angiogenesis Trial (KAT)として報告した¹⁷⁾。彼らは、PTCA直後の冠動脈にDispatch catheter (SciMed Lifesystem社製)を用いて遺伝子導入を行った。6カ月後の血管造影では、コントロール群を含む3群間に血管新生における有意差は認められなかった。しかし、ストレスシンチグラムでは、アデノウイルスベクターを用いた治療群で心筋灌流改善がみられた。また、死亡、心筋梗塞、脳血管障害といった合併症は3群とも皆無であった。このようにKAT試験では、遺伝子導入の安全性は確認されたが、VEGF₁₆₅遺伝子においてはアデノウイルスベクターを用いた十分な導入効率が必要であることも示された。

VEGF-Aは、血管透過性の亢進をきたすのみでなく、冠動脈ステント留置後の再狭窄率を上げるのではないかとされている。これは、VEGF-Aがプラーク内で血管新生を増強させ、プラーク量が増加することによる。最近、タフツ大学のLosordoらの研究グループは、VEGF-C溶出ステントはPTCA後の再狭窄率を低下させるという動物実験結果を報告している¹⁸⁾。現在、彼らは重症虚血性心疾患に対し、VEGF-AでなくVEGF-Cを用いた血管新生療法を行っている。

まとめ

成人における血管新生には、既存の血管内皮細胞の増殖と遊走によるもののみだけではなく、流血中のEPCの分化という脈管形成型の血管新生も関与する可能性があることが示唆され、VEGFやbFGF等の成長因子やEPCを利用した、虚血組織に対する血管新生療法の基礎的および臨床的研究が盛んである。しかし、単独のサイトカインを用いる血管新生療法は、EPCを含む自己細胞移植による血管新生療法に比べると非生理的であり、長期予後を含めた成績は低下するのではな

いかとも考えられる。われわれはすでにVEGF-CとG-CSF (granulocyte colony stimulating factor)⁹⁾またはVEGF-Cと低容量EPC²⁰⁾を組み合わせたハイブリッド療法を報告している(Fig. 2)。今後、臨床の場面においては、VEGFの種類やベクターの選択および遺伝子導入効率の改善が重点項目となろう。さらに、いかなるサイトカインもしくは細胞を組み合わせた治療的血管新生が、重症虚血性疾患の血行再建の補助的治療、あるいは血行再建困難な症例においての次世代の治療法となりうるだろうか。同時に解決されなければならない問題点も多く、さらなる研究成果が待たれる分野である。

文 献

- 1) Folkman J, Merler E, Abernathy C et al: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, 1971, **133**: 275–288.
- 2) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R et al: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*, 1996, **348**: 370–374.
- 3) Risau W, Sariola H, Zerwes HG et al: Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*, 1988, **102**: 471–478.
- 4) Flamme I, Risau W: Induction of vasculogenesis and hematopoiesis *in vitro*. *Development*, 1992, **116**: 435–439.
- 5) Risau W: Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. In Feinberg RN, Sherer GK, Auerbach R (eds): *The development of the vascular system (Issues in Biomedicine, Vol.14)*, Karger, Basel, 1991, 58–68.
- 6) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
- 7) Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995, **1**: 27–31.
- 8) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E et al: Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 662–670.
- 9) Banai S, Jaklitsch MT, Shou M et al: Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*, 1994, **89**: 2183–2189.
- 10) Isner JM, Walsh K, Symes J et al: Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*, 1995, **91**: 2687–2692.
- 11) Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D et al: Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*, 1996, **94**: 3281–3290.
- 12) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O et al: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 1998, **97**: 1114–1123.
- 13) Losordo DW, Vale PR, Symes JF et al: Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, 1998, **98**: 2800–2804.
- 14) Vale PR, Losordo DW, Tkebuchava T et al: Catheter-based myocardial gene transfer utilizing nonfluoroscopic electro-mechanical left ventricular mapping. *J Am Coll Cardiol*, 1999, **34**: 246–254.
- 15) Rosengart TK, Lee LY, Patel SR et al: Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation*, 1999, **100**: 468–474.
- 16) Henry TD, Annex BH, McKendall GR et al: The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*, 2003, **107**: 1359–1365.
- 17) Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M et al: Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation*, 2003, **107**: 2677–2683.
- 18) Walter DH, Cejna M, Diaz-Sandoval L et al: Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis. *Circulation*, 2004, **110**: 36–45.
- 19) Kawamoto A, Murayama T, Kusano K et al: Synergistic effect of bone marrow mobilization and vascular endothelial growth factor-2 gene therapy in myocardial ischemia. *Circulation*, 2004, **110**: 1398–1405.
- 20) Shintani S, Kusano K, Li M et al: Synergistic effect of combined intramyocardial CD34⁺ cells and VEGF2 gene therapy after MI. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006, **Suppl 1**: S123–S128.

Angiogenic Cytokine: VEGF

Satoshi Shintani and Toyoaki Murohara

Department of Cardiology, Nagoya University, Graduate School of Medicine, Aichi, Japan

Key words: angiogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF), gene therapy

The concept of angiogenesis was borne out of observations made by Folkman and colleagues regarding the enhanced vascularity of tumors. Thereafter, vascular endothelial growth factor (VEGF) families have been identified as angiogenic cytokines by more than one institute. In addition, Isner and colleagues have reported the safety and efficacy data of gene therapy using naked VEGF plasmid DNA for patients with severe ischemic limb who are not optimal candidates for surgical nor percutaneous revascularization. By these novel and intriguing reports, studies of VEGF were spreading rapidly in the cardiovascular field. (J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 289–295)