

血管新生関連因子産生制御による血管新生及び血管退縮の誘導についての研究

著者	平澤 典保
URL	http://hdl.handle.net/10097/41325



血管新生関連因子産生制御による血管新生及び
血管退縮の誘導についての研究

(15390020)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）
研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者 平澤 典保

(東北大学大学院薬学研究科・助教授)

【はしがき】

この研究報告書は、日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）の交付を受けて、平成15年度から平成16年度まで2年間にわたって行われた「血管新生関連因子産生制御による血管新生及び血管退縮の誘導についての研究」の研究成果について、本研究を計画するに至った経緯を含めてまとめたものである。

【研究組織】

研究代表者 平澤典保（東北大学大学院薬学研究科・助教授）

研究分担者 大内和雄（東北大学大学院薬学研究科・教授）

【交付決定額（配分額）】 （金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	6,600	0	6,600
平成16年度	2,500	0	2,500
総計	9,100	0	9,100

【研究発表】

(1) 原著論文

1. Kamei, D., Yamakawa, K., Takegoshi, Y., Mikami-Nakanishi, M., Nakatani, Y., Oh-ishi, S., Yasui, H., Azuma, Y., Hirasawa, N., Ohuchi, K., Kawaguchi, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M. and Kudo, I. (2004) Reduced Pain Hypersensitivity and Inflammation in Mice Lacking Microsomal Prostaglandin E Synthase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 33684-33695.
2. Shibuya, Y., Hirasawa, N., Sakai, T., Togashi, Y., Muramatsu, R., Ishii, K., Yamashita, M., Takayanagi, M. and Ohuchi, K. (2004) Negative regulation of the protein kinase C activator-induced ICAM-1 expression in the human bronchial epithelial cell line NCI-

- H292 by p44/42 mitogen-activated protein kinase. *Life Science* 75: 435-446.
3. Hirasawa, N., Izumi, S., Linwong, W. and Ohuchi, K. (2003) Inhibition by dexamethasone of interleukin 13 production via glucocorticoid receptor-mediated inhibition of c-Jun phosphorylation. *FEBS Lett.* 554: 489-493.
 4. Numahata, K., Komagata, T., Hirasawa, N., Someya, K., Xiao, Y.-Q. and Ohuchi, K. (2003) Analysis of the mechanism regulating the stability of rat macrophage inflammatory protein-2 mRNA in RBL-2H3 cells. *J. Cell. Biochem.* 90: 976-986.

(2) 口頭発表

1. Ghosh, A.K., Hirasawa, N. and Ohuchi, K. : Roles of histamine in the expression of VEGF and angiopoietin-1 in the inflammatory granulation tissue. 6th World Congress on Inflammation, (Vancouver, Canada) (Aug., 2003)
2. Hirasawa, N., Izumi, S. and Ohuchi, K.: The action mechanism of dexamethasone for the inhibition of the antigen-induced interleukin-13 production in RBL-2H3 cells. World Allergy Organization Congress-XVIII, (Vancouver, Canada) (Sept., 2003)
3. Ohuchi, K., Ghosh, A.J., Hirasawa, N.: The role of histamine in the angiogenesis in the inflammatory granulation tissue in mice. International Symposium on Vascular Physiology (Tainan, Taiwan), (Nov., 2003)
4. 平澤典保、Ghosh, A.K.、大内和雄: 肉芽組織における血管新生に対する-ヒスタミン - 血管内皮増殖因子 - アンジオポエチン1 経路の関与 第7回ヒスタミン研究会 (2003年12月)
5. 平澤典保、Ghosh, A.K.、大内和雄: 病的血管新生の進展におけるヒスタミンの役割

第 77 回日本薬理学会年会 (大阪) 2004 年 3 月

6. 平澤典保、大内和雄: JAK3 阻害薬及びステロイド性抗炎症薬のマスト細胞活性化抑制作用機序の解析

第 124 年会日本薬学会 (2004 年 3 月)

7. 平澤典保、Linwong, W., 大内和雄: WHI-P131 及び WHI-P154 のマスト細胞活性化抑制作用機序

第 8 回ヒスタミン研究会 (2004 年 12 月)

(3) 総説・著書

1. 平澤典保、大内和雄 (2005) プロスタグランジンの血管新生制御機構 オレオサイエンス 5: 65-71.

2. Ghosh, A.G., Hirasawa, N. and Ohuchi, K. (2003) Roles of prostaglandin E2 and histamine in angiogenesis in inflammatory granulation tissue. *Inflam. Regener.* 23: 84-92.

3. 平澤典保、大内和雄 (2003) マクロファージのヒスタミン産生とその制御 炎症と免疫 11: 31-37

1. 研究の背景と目的

血管新生は急速な組織増殖を支持するために必須の反応であり、これを人為的にコントロールすることが様々な疾患の治療に有効である。例えば、癌組織や慢性関節リウマチなどに見られる肉芽組織の増殖は血管新生による血管網の形成に大きく依存している (1) ため、血管新生を抑制することにより、これらの増殖を抑制することが可能である。また、逆に血管新生・再生を誘導することは、虚血性疾患における血流の回復、また、損傷治癒の促進に有効である。現在このような血管新生制御療法として、血管新生を制御する蛋白質の遺伝子を患部に導入し、その局所で血管新生制御蛋白質の発現を誘導する遺伝子療法が注目を集めている。しかし、重篤な虚血性疾患において血管新生を遺伝子療法により誘導することは意義が大きいだが、比較的軽度の外傷の治癒を促進するための方策としては適していない。また、増殖因子の作用を抑制する血管新生抑制薬の開発研究においては、期待されたほどの成果は得られていない。これは、単に血管新生を抑制する薬物は、組織中にすでに形成されている血管網に対しては効果を発現できないためであると考えられる。したがって、血管新生機序だけでなく、血管成熟及び退縮の制御機構についても明らかにしていく必要がある。

血管新生は、既存の血管から新生血管が生じる現象である。まず、既存の血管の基底膜が融解し、血管内皮細胞の出芽・遊走・増殖・管腔形成が生じる。さらに、基底膜の形成及び周皮細胞・血管平滑筋細胞の遊走・増殖が生じて新生血管が完成する。このような一連の反応は様々な蛋白性因子により制御されている。血管内皮増殖因子 (vascular endothelial cell growth factor; VEGF) は血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成に関与する最も重要な増殖因子である (2)。また、angiopoietin 1 (Ang1) (3) 及び angiopoietin 2 (Ang2) (4) は血管内皮細胞と周皮細胞・血管平滑筋細胞との相互作用を制御する因子である。Ang1 はこれらの細胞の相互作用を高めて血管の成熟・安定化に関与する。一方、Ang2 は Ang1 の生理的拮抗因子であり、Ang1 の作用を抑制して、血管新生の誘導・リモデリングに関わっていると考えられている。また、VEGF の作用発現を抑制する内因性の蛋白が発見されており、その 1 つに endostatin

がある (5)。近年、このような蛋白性の因子が次々発見され、その生理活性が *in vitro* 及び *in vivo* で確認されているものの、実際の炎症における肉芽組織中の血管新生において、どの因子がどのような時期にどのような機序で産生されるのかについてはほとんど明らかにされていない。

申請者らは、マウスにおいて著しい血管新生を伴う増殖型炎症を誘導する実験モデルを開発した (6)。このモデルでは血管新生、血管の成熟、さらに血管の退縮の過程を詳細に解析できる。これまでこのモデルを活用して、慢性炎症において産生される histamine は、VEGF の産生を誘導し、血管新生に大きく関与していることを明らかにした (6)。また、prostaglandin E₂ (PGE₂) も VEGF 産生を誘導する作用があり、本モデルの血管新生に関与していることが明らかにされている (7)。これらのことから、血管新生に関与する蛋白性の制御因子の産生は、炎症の chemical mediators により制御されている可能性が高く、これらの chemical mediators の産生及び作用発現を制御することにより血管新生を薬物により制御できる可能性がある。そこで本研究では、血管新生・成熟・退縮に関与する蛋白質の産生時期を明らかにし、これらの因子の産生機序を明らかにすることを第 1 の目的とした。

Histamine は *in vitro* で VEGF の産生を誘導する作用を持ち、その作用は H₂ 受容体を介した cAMP 産生亢進によることを明らかにしている (8)。また、PGE₂ は肉芽組織において VEGF 産生を誘導することも報告している (9)。PGE₂ は滑膜由来線維芽細胞においては EP₂ 受容体を介して (10)、また、固形腫瘍周囲の間質細胞においては EP₃ 受容体を介して (11) VEGF 産生を誘導することが報告されている。このように PGE₂ は細胞により異なる EP 受容体を介している可能性があるが、主に cAMP の上昇により VEGF の産生を誘導すると考えられている。しかしこれらの chemical mediators は単独で様々な生理作用を持つため、血管新生制御薬として用いることには多くの問題がある。そこで、これらの chemical mediators と同様に VEGF 産生を誘導する薬物を探索することは、治癒促進薬の開発に貢献すると考えられる。そこで、本研究では、VEGF 産生を誘導する薬物のスクリーニング系を確立し、VEGF 産生を誘導する化合物の探索を行うことを第 2 の目的とした。

これらの研究背景及び目的から、本研究は以下の点について解析した。

(1) マウスの増殖型炎症モデルにおいて、蛋白性の血管新生制御因子、すなわち、VEGF、angiopoietin-1、angiopoietin-2 及び endostatin の産生時期と、血管新生、血管成熟、及び血管退縮の各過程との関連性、及び各血管新生制御因子の産生の相互関係。

(2) In vitro で強い VEGF 産生誘導作用を示す薬物の探索。

以上の研究から、VEGF などの血管新生関連因子の産生を誘導する薬物が血管新生促進薬として有効であることを明確にするとともに、増殖型炎症性疾患や癌などの血管新生が関与する疾患に対して新生血管網の退縮を誘導する因子を用いた新しい攻略法を提言する。

2. 実験方法

2-1. 綿糸誘発増殖型炎症の誘発

129系野生型マウス及びHDC欠損129系マウス(体重25-28g、雄、東北大学大学院工学研究科 大津浩教授より供与)を用いた。なお、動物実験は東北大学大学院薬学研究科動物実験委員会により作成された「実験動物取り扱いに関する指針」に基づいて行った。

綿糸(風糸8号)をエチル酢酸で脱脂した後、乾燥させ、1cm(7mg)に切断し、160℃で2時間乾熱滅菌した。エーテル麻酔下、マウス背部皮下に滅菌した風糸を移植針(13G)を用いて移植した。

2-2. 肉芽重量の測定と血管新生の定量

綿糸を移植してから一定時間後、マウスをエーテル麻酔下、頸椎脱臼により致死させた。綿糸の周囲に形成された肉芽組織を、綿糸ごと摘出し、PBSで洗浄後、重量を測定した。さらに、Vir-Tis homogenizerを用いて、20倍量の0.5mM NaOH中でホモジナイズした。10,000xg、4℃で30分間遠心し、得られた上清をさらに14,000xg、4℃で30分間遠心した。上清中のヘモグロビン量をヘモグロビンアッセイキット(ヘモグロビンBテスト和光、和光純薬)を用いて測定し、血管新生の指標とした。

2-3. VEGF 及び endostatin の測定

2-2.で得られた肉芽組織のホモジネートの上清中のVEGF及びendostatinはELISA kitを用いて測定した。

2-4. Ang1 及び Ang2 の測定

2-2.で得られた肉芽組織のホモジネートの上清中のAng1及びAng2は、抗Ang1(Santa Cruz Biotechnology)及び抗Ang2(Santa Cruz Biotechnology)を用いて、Western blot法により解析した。

2-5. α -Smooth muscle actin (α -SMA) の発現の解析

α -SMA の Western blotting 及び免疫染色は抗 α -SMA マウスモノクローナル抗体 (Sigma) を用いて行った。

2-6. 薬物の投与

Histamine (Sigma)、dimaprit (Research Biochemicals International)、抗 VEGF IgG 及び control goat IgG (R&D System) は滅菌された生理食塩水に溶解した。記載された量の薬物を含む生理食塩水 0.1 ml を、エーテル麻酔下、綿糸移植部位に注射した。対照群には生理食塩水 0.1 ml を同様に注射した。

2-7. 肉芽組織の培養

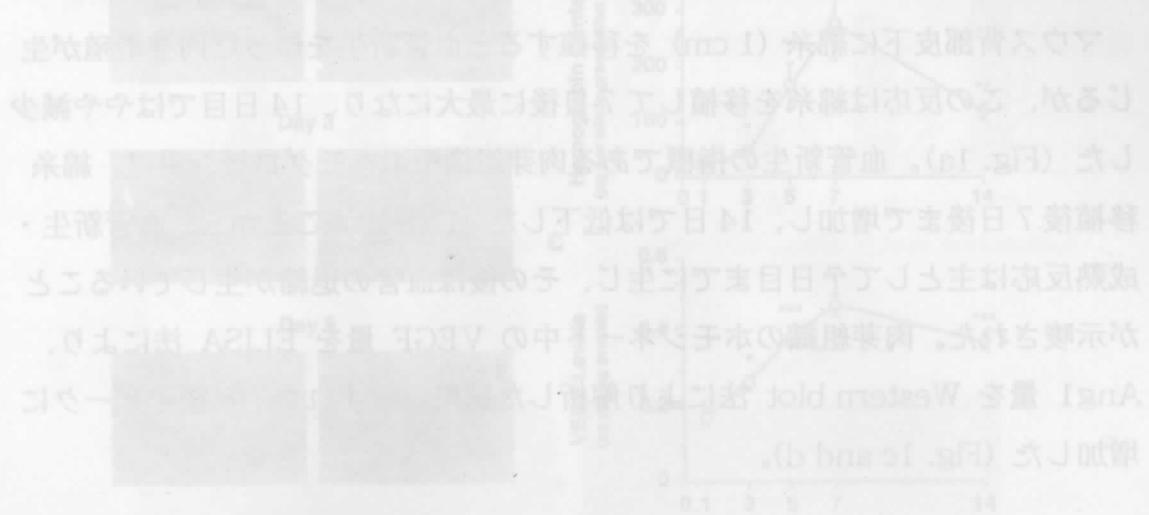
綿糸を移植後 7 日後の肉芽組織を摘出し、1~2 mm 角にミンスした。25 mg を 0.2 ml の 10% (v/v) CS を含む EMEM 中で培養した。Brefeldin A (50 μ M) 存在下、マウスリコンビナント VEGF (10 ng/ml, PeproTech Inc.) を含む medium 中で一定時間培養した。培養終了後、肉芽組織をホモジナイズし、遠心 (14000 xg, 4°C, 30 分間) 上清中の Ang1 及び Ang2 量を Western blot 法で解析した。また、肉芽組織中の総 RNA を抽出し、RT-PCR 法で、Ang1、Ang2 及び GAPDH mRNA 量を解析した。

2-8. 細胞の調製と培養

マウスマクロファージ様株 RAW264 を 5×10^5 cells/ml になるように、FBS を 10% (v/v) および MEM non-essential amino acid solution を 1% (v/v) になるように加えた RPMI-1640 に懸濁し、24-well cluster dish の各 well に 0.4 ml ずつ播種した。20 時間培養後、dish 内を PBS で 3 回洗浄し、各種濃度の薬物、10% (v/v) FBS および 1% (v/v) MEM non-essential amino acid solution を含む medium を添加して一定時間培養した。培養後、培養液を回収し遠心 (430 xg, 3 分間, 4°C) して得た上清中の VEGF 量を ELISA 法により測定した。

PGE₂ (Sigma)、PDE1 阻害薬 8-methoxymethyl-IBMX (Biomol Research Lab.)、PDE2 阻害薬 EHNA (Biomol Research Lab.)、PDE3 阻害薬

quazinsonone (Biomol L Research Lab.), PDE4 阻害薬 rolipram (Biomol Research Lab.) 及び Ro20-1724 (Biomol Research Lab.), 及び PDE5 阻害薬 zaprinast (Biomol Research Lab.) は DMSO に溶解し、medium で 1,000 倍希釈して用いた。対照群にも 同様に DMSO を添加した medium を用いた。DMSO の最終濃度は 0.1% (v/v) である。



(b) HDCA 処理した HDCA 細胞の Ang1 量 (pg/ml) を示す Western blot (Fig. 3b) と、Ang1 量 (pg/ml) を示す line graph (Fig. 3b) の結果を示す。HDCA 処理した HDCA 細胞の Ang1 量は、対照群と比較して、Day 7 から Day 14 にかけて有意に増加した。Ang1 量は、Day 14 において、対照群 (Control) と HDCA 処理群 (HDCA) との間で有意な差を示した。

Figure 3b shows the results of Western blot and line graph analysis of Ang1 levels in HDCA cells. The Western blot (Fig. 3b) shows Ang1 protein levels in HDCA cells at Day 7, comparing a control group (left) and an HDCA-treated group (right). The line graph (Fig. 3b) plots Ang1 levels (pg/ml) on the y-axis against time (days) on the x-axis (0, 1, 2, 3, 7, 14). The HDCA-treated group shows a significant increase in Ang1 levels over time, reaching approximately 1000 pg/ml by Day 14, while the control group remains near 0 pg/ml. The increase in Ang1 levels in the HDCA-treated group is statistically significant compared to the control group at Day 14.

3. 実験結果

3-1. 血管新生・成熟の制御機構

(1) 綿糸誘導増殖型炎症モデルにおける血管新生、及び VEGF と Ang1 産生の経時変化

マウス背部皮下に綿糸 (1 cm) を移植すると血管新生を伴った肉芽増殖が生じるが、この反応は綿糸を移植して7日後に最大になり、14日目ではやや減少した (Fig. 1a)。血管新生の指標である肉芽組織中のヘモグロビン量は、綿糸移植後7日後まで増加し、14日では低下した (Fig. 1b) ことから、血管新生・成熟反応は主として7日目までに生じ、その後は血管の退縮が生じていることが示唆された。肉芽組織のホモジネート中の VEGF 量を ELISA 法により、Ang1 量を Western blot 法により解析した結果、いずれも7日後をピークに増加した (Fig. 1c and d)。

(2) HDC 欠損マウスにおける血管新生

HDC 欠損マウスでは、綿糸移植による VEGF 産生が減弱しており、血管新生反応が弱いことを報告している (6)。そこで、HDC 欠損マウスにおいて、Ang1 産生も変化しているかどうか解析した。HDC 欠損マウスでも、綿糸の移植により肉芽組織中のヘモグロビン量及び Ang1 量は経時的に増加したが、各時点のこれらの値は、野生型マウスに比べて有意に小さい値を示した (Fig. 2)。Ang1 は血管の成熟に関与するため、血管の成熟の指標として周皮細胞・血管平滑筋細胞に発現する α -smooth muscle actin (α -SMA) 量を解析した。野生型マウスでは、肉芽組織中の α -SMA 含量は綿糸を移植して5日後及び7日後で有意に増加したが、HDC 欠損マウスにおける肉芽組織中の α -SMA 量は野生型マウスに比べて有意に低かった (Fig. 3a)。また、Ang1 産生量の変化が、産生細胞である周皮細胞・血管平滑筋細胞数の変化によるものかどうか明らかにするために、Ang1 産生量と α -SMA 発現量の比を算出した。その結果、Ang1/ α -SMA 比は野生型マウスにおいて経時的に増加し、HDC 欠損マウスではその比は野生型マウスに比べて有意に低いことが明らかになった (Fig. 3b)。したがって、Ang1 量の増加には、産生細胞の増加だけではなく、

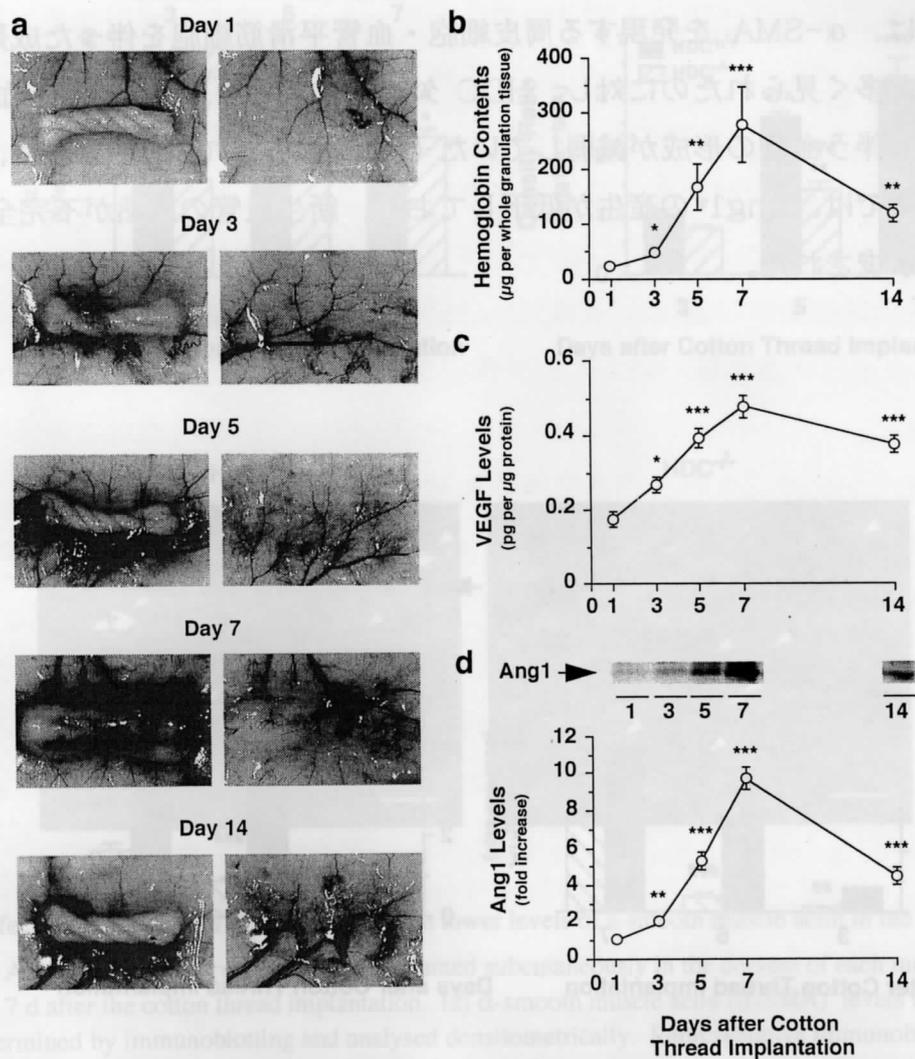


Figure 1. Time-course of angiogenesis, and the levels of VEGF and Ang1 in the granulation tissue. A cotton thread (1 cm, 7 mg) was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. The mice were killed 1, 3, 5, 7 and 14 d after the cotton thread implantation. (a) The vascular network formation around the cotton thread (left) and the subcutaneous tissue beneath the cotton thread (right). (b) Total hemoglobin contents in the granulation tissue. (c) VEGF levels in the granulation tissue determined by ELISA. (d) Ang1 levels in the granulation tissue determined by immunoblotting and analysed densitometrically. Representative immunoblots from one mouse in each group are shown at the top of c. The mean Ang1 level in the granulation tissue at day 1 is set to 1.0. Values are the means from five to six mice with s.e.mean shown by vertical bars. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the values at day 1.

何らかの誘導機構が関与すること、その機構が HDC 欠損マウスで減弱していることが示唆された。

実際に、免疫染色により α -SMA を発現する細胞を検出した結果、野生型マウスでは、 α -SMA を発現する周皮細胞・血管平滑筋細胞を伴った成熟した新生血管が多く見られたのに対し、HDC 欠損マウスでは、周皮細胞・血管平滑筋細胞を伴う血管の形成が減弱していた (Fig. 3c)。これらの結果から、HDC 欠損マウスでは、Ang1 の産生が低下しており、新生血管の成熟が不完全であることが示唆された。

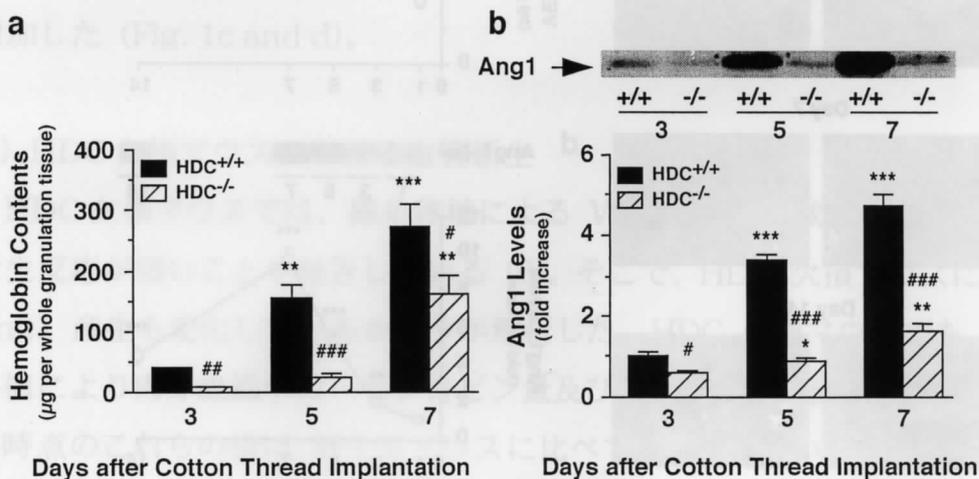


Figure 2. Impairment of angiogenesis and the lower levels of Ang1 in the granulation tissue of HDC^{-/-} mice. A cotton thread (1 cm, 7 mg) was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. The mice were killed 3, 5 and 7 d after the cotton thread implantation. (a) Total hemoglobin contents in the granulation tissue. (b) Ang1 levels in the granulation tissue determined by immunoblotting and analysed densitometrically. Representative immunoblots from one mouse in each group are shown at the top of b. The mean Ang1 level in the granulation tissue at day 3 in HDC^{+/+} mice is set to 1.0. Values are the means from six mice with s.e.mean shown by vertical bars. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the values at day 3, and # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus the values in HDC^{+/+} mice at corresponding days.

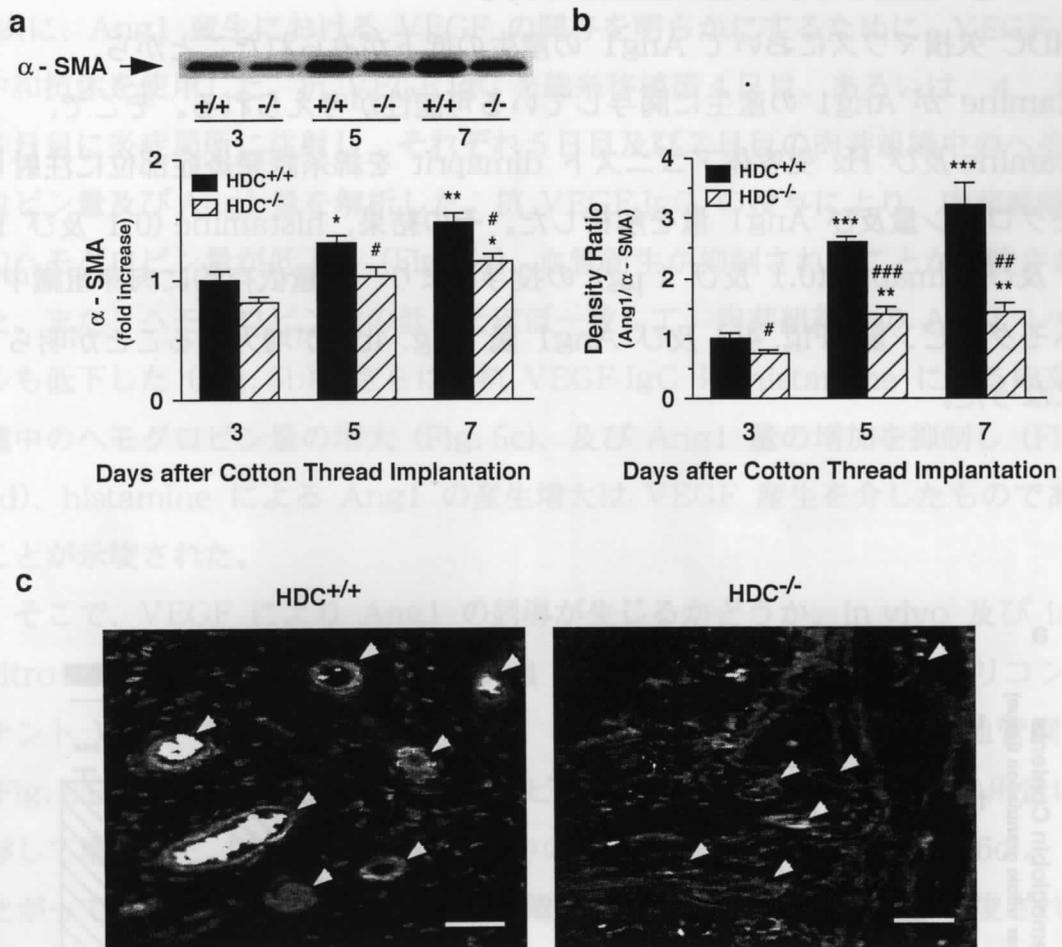


Figure 3. Defective maturation of vasculature and the lower levels of α -smooth muscle actin in the granulation tissue of $HDC^{-/-}$ mice. A cotton thread (1 cm, 7 mg) was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. The mice were killed 3, 5 and 7 d after the cotton thread implantation. (a) α -smooth muscle actin (α -SMA) levels in the granulation tissue was determined by immunoblotting and analysed densitometrically. Representative immunoblots from one mouse in each group are shown at the top of a. The mean α -SMA level in the granulation tissue at day 3 in $HDC^{+/+}$ mice is set to 1.0. (b) The density ratio of Ang1 to α -SMA was calculated. Values are the means from six mice with s.e.mean shown by vertical bars. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the values at day 3, and # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus the values in $HDC^{+/+}$ mice at corresponding days. (c) The granulation tissue was dissected 7 d after the implantation, dehydrated and sliced 5 μ m thick. The tissue sections were immunostained with FITC-conjugated monoclonal anti- α -SMA, and the α -SMA-expressing cells in the granulation tissue were observed with a confocal microscope. Cells expressing α -SMA in the granulation tissue are indicated by white arrows. Representative micrographs are shown from four samples. A scale bar represents 25 μ m.

(3) Ang1 産生における histamine の関与

HDC 欠損マウスにおいて Ang1 の産生の低下がみられたことから、histamine が Ang1 の産生に関与している可能性が考えられる。そこで、histamine 及び H₂ 受容体アゴニスト dimaprit を綿糸誘発炎症部位に注射し、ヘモグロビン量及び Ang1 量を解析した。その結果、histamine (0.1 及び 1 μ g) 及び dimaprit (0.1 及び 1 μ g) の投与により、用量依存的に肉芽組織中のヘモグロビン量 (Fig. 4a) 及び Ang1 量 (Fig. 4b) が増大することが明らかになった。

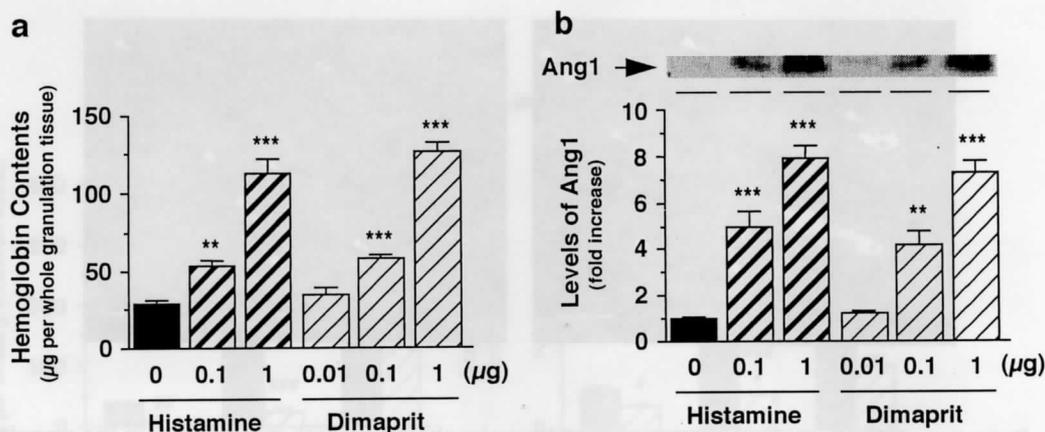


Figure 4. Effects of histamine and dimaprit on Ang1 production. A cotton thread (1 cm, 7 mg) was implanted subcutaneously in the dorsum of each HDC^{-/-} mouse. (a) and (b), histamine (0, 0.1 and 1 μ g) or dimaprit (0.01, 0.1 and 1 μ g) dissolved in 100 μ l of sterile saline was injected subcutaneously at the site of the cotton thread implantation just after the implantation and then once a day for 4 consecutive days. One day after the last injection of histamine or dimaprit (5 d after the cotton thread implantation), the mice were killed, and total hemoglobin contents (a) and Ang1 levels in the granulation tissue (b) were determined. Ang1 levels were determined by immunoblotting and analysed densitometrically. Representative immunoblots from one mouse in each group are shown at the top of b. The mean Ang1 level in the granulation tissue in the control group is set to 1.0. Values are the means from five mice with s.e.mean shown by vertical bars. Statistical significance: ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the values in the corresponding control group.

(4) Ang1 産生における VEGF の関与

次に、Ang1 産生における VEGF の関与を明らかにするために、VEGF の中和抗体を使用した。抗 VEGF IgG を綿糸移植後 4 日目、あるいは、4、5、6 日目に炎症局所に注射し、それぞれ 5 日目及び 7 日目の肉芽組織中のヘモグロビン量及び Ang1 量を解析した。抗 VEGF IgG の投与により、肉芽組織中のヘモグロビン量が低下し (Fig. 5a)、血管新生が抑制されることが示唆された。また、ヘモグロビン量の低下とほぼ一致して、肉芽組織中の Ang1 レベルも低下した (Fig. 5b)。さらに、抗 VEGF IgG は histamine による肉芽組織中のヘモグロビン量の増大 (Fig. 5c)、及び Ang1 量の増加を抑制し (Fig. 5d)、histamine による Ang1 の産生増大は VEGF 産生を介したものであることが示唆された。

そこで、VEGF により Ang1 の誘導が生じるかどうか、*in vivo* 及び *in vitro* で解析した。綿糸を移植して 24 時間後に、その近傍にマウスリコンビナント VEGF (30-300 ng) を注射し、その 24 時間後の綿糸周辺の血管網 (Fig. 6a)、及び肉芽組織中のヘモグロビン量 (Fig. 6b) は、VEGF の用量に依存して増加した。このとき肉芽組織中の Ang1 量も増加した (Fig. 6c)。したがって、VEGF は Ang1 の産生を増大させる作用があることが示唆された、この VEGF による Ang1 の産生増大作用は、血管新生を増大させた結果であるのか、あるいは、Ang1 産生細胞に直接作用して Ang1 の産生を増大させたのかを明らかにするために、*in vitro* の培養系で解析した。綿糸移植後 7 日目に肉芽組織を摘出し、その肉芽組織を VEGF 存在下で培養した。その結果、VEGF (10 ng/ml) を添加して 24 時間培養後の肉芽組織中の Ang1 蛋白量は有意に増加することが明らかになった (Fig. 7a)。VEGF を添加して 2 時間後の Ang1 mRNA レベルも増加した (Fig. 7c) ことから、Ang1 の産生が亢進したことが確認された。この VEGF の Ang1 産生増大作用は VEGFR1 あるいは VEGFR2 のどちらの受容体を介しているかを明らかにするために、VEGF とともに、それぞれの中和抗体を添加した。その結果、VEGF による Ang1 の産生誘導作用は VEGFR2 の中和抗体により抑制され (Fig. 7b)、VEGFR2 を介していることが示唆された。

また、肉芽組織から調製された線維芽細胞をもちいて、VEGF の Ang1 産

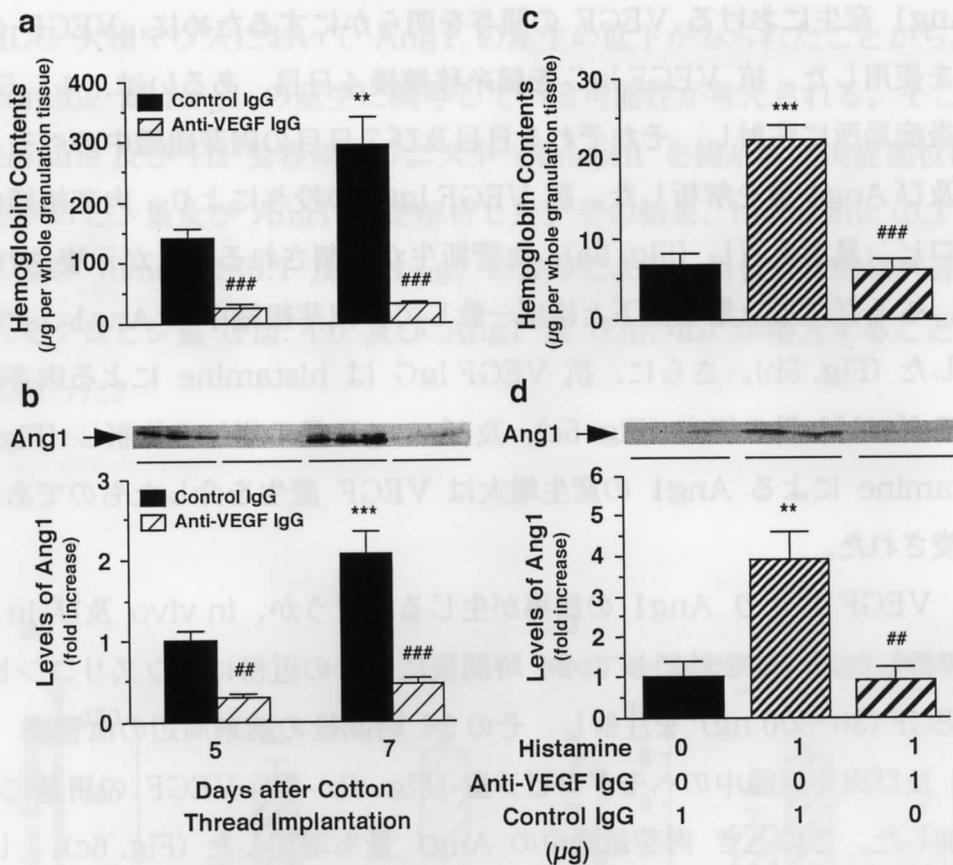


Figure 5. Inhibition by anti-VEGF IgG of histamine-induced Ang1 production. A cotton thread (1 cm, 7 mg) was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. (a) and (b), goat anti-VEGF IgG (1 µg) or control goat IgG (1 µg) dissolved in 100 µl of sterile PBS was injected subcutaneously at the site of the cotton thread implantation in HDC^{+/+} mice just after the implantation and then once a day for 4 and 6 consecutive days. One day after the final injection of anti-VEGF IgG (5 and 7 d after the implantation, respectively), the mice were killed, and total hemoglobin contents (a) and Ang1 levels (b) in the granulation tissue were determined. Ang1 levels were determined by immunoblotting and analysed densitometrically. Representative immunoblots from three mice in each group are shown at the top of b. The mean Ang1 level in the granulation tissue in the control group at day 5 is set to 1.0. Values are the means from six mice with s.e.mean shown by vertical bars. Statistical significance: ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the values at day 5 in the group treated with control goat IgG, and ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus the values in the control goat IgG-treated group at corresponding days. (c) and (d), 24 h after the implantation of a cotton thread, histamine (1 µg), goat anti-VEGF IgG (1 µg) or control goat IgG (1 µg) dissolved in 100 µl of sterile PBS was injected subcutaneously at the site of implantation in HDC^{-/-} mice. The mice were killed 48 h after the implantation, and total hemoglobin contents (c) and Ang1 levels (d) in the granulation tissue were determined. Ang1 levels were determined by immunoblotting and analysed densitometrically. Representative immunoblots from two mice in each group are shown at the top of d. The mean Ang1 level in the granulation tissue in the control group is set to 1.0. Values are the means from six mice with s.e.mean shown by vertical bars. Statistical significance: ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the values in the control goat IgG-treated group, and ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ versus the values in the group treated with histamine and control goat IgG.

生誘導作用を解析した。線維芽細胞においても、VEGF (10 ng/ml) は Ang1 mRNA レベルを有意に増加させた。なお、このとき Ang2 の mRNA は増加せず、VEGF は Ang1 の産生を選択的に増加させることが示唆された (Fig. 7d)。

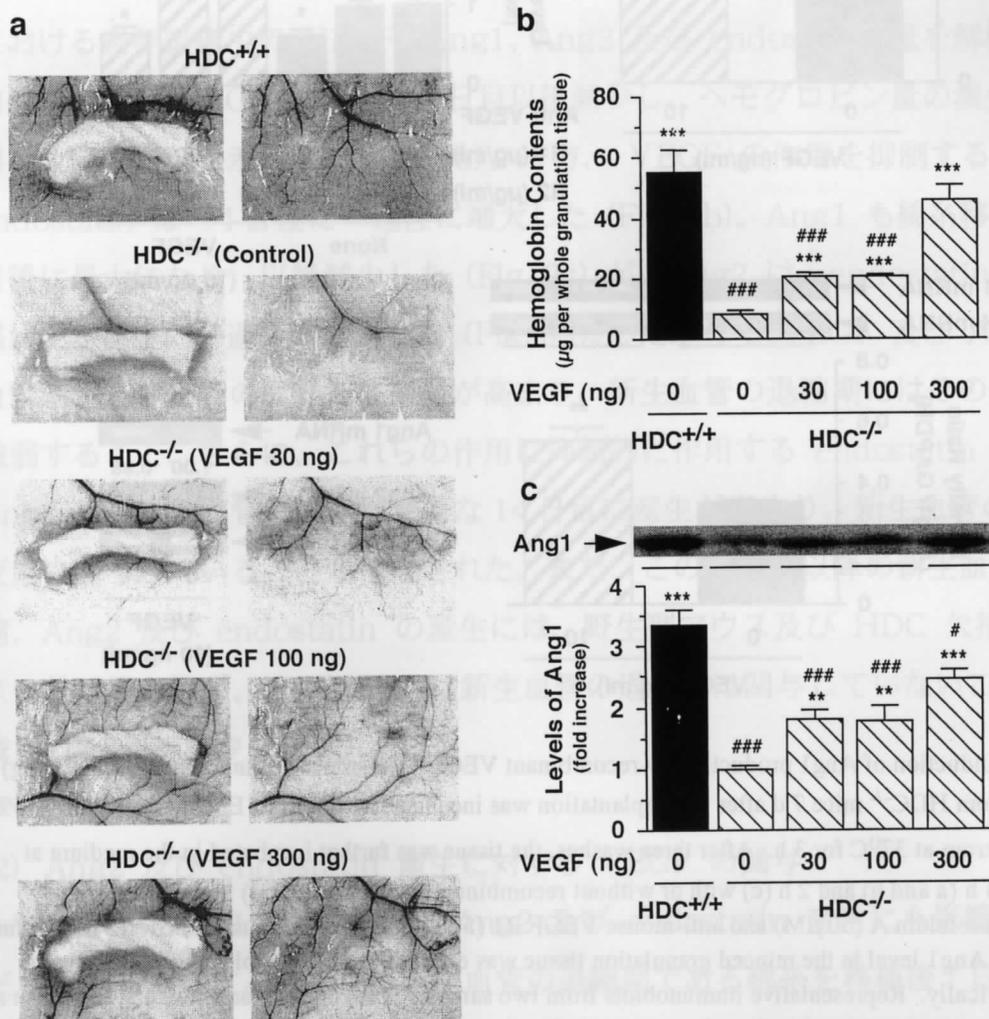


Figure 6. Effects of recombinant VEGF on the levels of Ang1 in the cotton thread-induced granulation tissue of HDC^{-/-} mice. A cotton thread (1 cm, 7 mg) was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. Murine recombinant VEGF (30, 100 and 300 ng) dissolved in 100 µl of sterile saline was injected subcutaneously 24 h after the cotton thread implantation at the site of the implantation. The mice were killed 48 h after the implantation. (a) The vascular network around the cotton thread (left) and the subcutaneous tissue beneath the cotton thread (right). (b) Total hemoglobin contents in the granulation tissue. (c) Ang1 levels in the granulation tissue were determined by immunoblotting and analysed densitometrically. Representative immunoblots from one mouse in each group are shown at the top of c. The mean Ang1 level in the granulation tissue in the control group in HDC^{-/-} mice is set to 1.0. Values are the means from six mice with s.e.mean shown by vertical bars. Statistical significance: ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 versus the values in the control group in HDC^{-/-} mice, and #*P* < 0.05 and ###*P* < 0.001 versus the values in HDC^{+/+} mice.

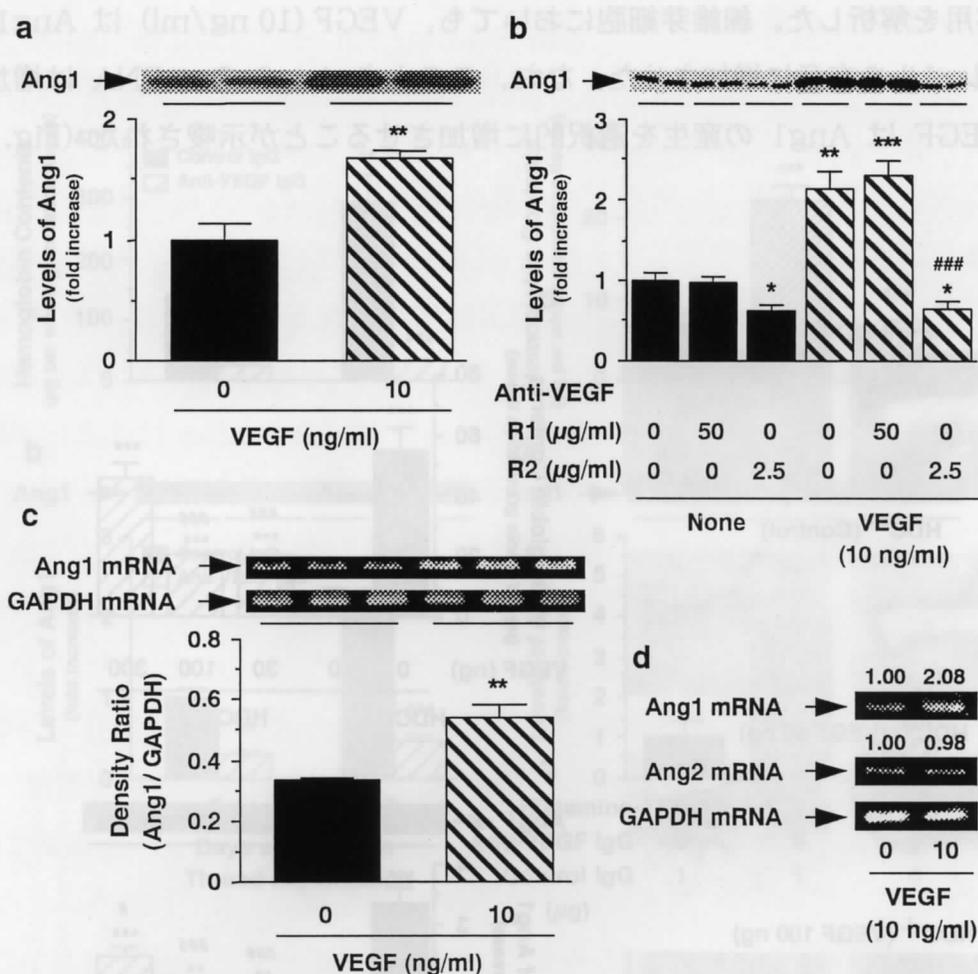


Figure 7. Induction of Ang1 production by recombinant VEGF. The minced granulation tissue (25 mg) dissected from $HDC^{-/-}$ mice 7 d after the implantation was incubated in 200 μ l of EMEM containing 10% (v/v) calf serum at 37°C for 3 h. After three washes, the tissue was further incubated in the medium at 37°C for 24 h (a and b) and 2 h (c) with or without recombinant VEGF (10 ng/ml) in the presence or absence of brefeldin A (50 μ M) and anti-mouse VEGF R1 (50 μ g/ml) or anti-mouse VEGF R2 (2.5 μ g/ml). (a) and (b), Ang1 level in the minced granulation tissue was detected by immunoblotting and analysed densitometrically. Representative immunoblots from two samples in each group are shown at the top in a and b. The mean Ang1 level in the minced granulation tissue in the control group is set to 1.0. (c) Ang1 mRNA levels in the minced granulation tissue were determined by RT-PCR and analysed densitometrically. Representative Ang1 mRNA bands from three samples in each group are shown at the top of c. (d) Fibroblasts (5×10^6 cells) isolated from the minced granulation tissue were incubated in a 60-mm tissue culture dish at 37°C for 2 h in 4 ml of DMEM containing 10% (v/v) FBS. The cells were then washed three times and incubated at 37°C for 2 h in 4 ml of DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS in the presence or absence of recombinant VEGF (10 ng/ml). Ang1 and Ang2 mRNA levels in the fibroblasts were determined by RT-PCR and analysed densitometrically. Representative bands from one sample in each group are shown at the top of d. The numbers above the bands indicate the density ratio of Ang1 and Ang2 mRNA with GAPDH mRNA, respectively. Values are the means from four samples with s.e.mean shown by vertical bars. Statistical significance: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the values in the corresponding control group, and ### $P < 0.001$ versus the values in the recombinant VEGF-treated group.

3-2. 血管退縮の制御機構

(1) 新生血管の退縮と Ang1、Ang2 及び endostatin 産生の経時変化

綿糸誘導増殖型炎症モデルでは、綿糸を移植して7日後に肉芽重量及びヘモグロビン含量が最大となり、以下減少した (Fig. 8)。したがって、7日目以降には新生血管の退縮が生じていると考えられる。そこで、この新生血管退縮期における肉芽組織中の VEGF、Ang1、Ang2 及び endostatin 量を解析した。肉芽組織中の VEGF レベルは7日目以後減少し、ヘモグロビン量の減少と類似した経時変化を示した (Fig. 9a)。一方、VEGF の作用を抑制する endostatin は 14 日後に一過性に増大した (Fig. 9b)。Ang1 も綿糸移植後7日後に最大になり、以後減少した (Fig. 9c) が、Ang2 は、endostatin と同様に、14 日後に一過性に増大した (Fig. 9d)。したがって、VEGF 及び Ang1 は血管新生及び血管の成熟期に産生が高まり、新生血管の退縮期にはその産生が減弱すること、さらに、これらの作用に抑制的に作用する endostatin 及び Ang2 は、新生血管の退縮が顕著な 14 日目に産生が高まり、新生血管の退縮反応に関与していることが示唆された。また、この7日目以降の新生血管の退縮、Ang2 及び endostatin の産生には、野生型マウス及び HDC 欠損マウスに差は見られず、histamine は新生血管の退縮には関与していないことが示唆された (データ未掲載)。

(2) Ang2 及び endostatin 産生に対する VEGF の関与

VEGF が Ang1 だけでなく、Ang2 及び endostatin 産生にも影響するかどうか明らかにするために、新生血管の退縮期である綿糸を移植後7日目から13日目まで1日1回 VEGF を綿糸移植部位近傍に注射した。その結果、14 日後の肉芽組織中のヘモグロビン量及び肉芽重量は増加した (Fig. 10) ことから、VEGF の注射により新生血管の退縮が抑制され、血管新生が促進されたと考えられる。このとき、VEGF の用量に依存して、肉芽組織中の Ang1 量が増加した (Fig. 11a) が、Ang2 及び endostatin 量は逆に低下した (Fig. 11b and c)。したがって、VEGF レベルが亢進し、血管新生が促進されている状態では、新生血管の退縮に関与する Ang2 及び endostatin の産生が減弱することが示唆された。

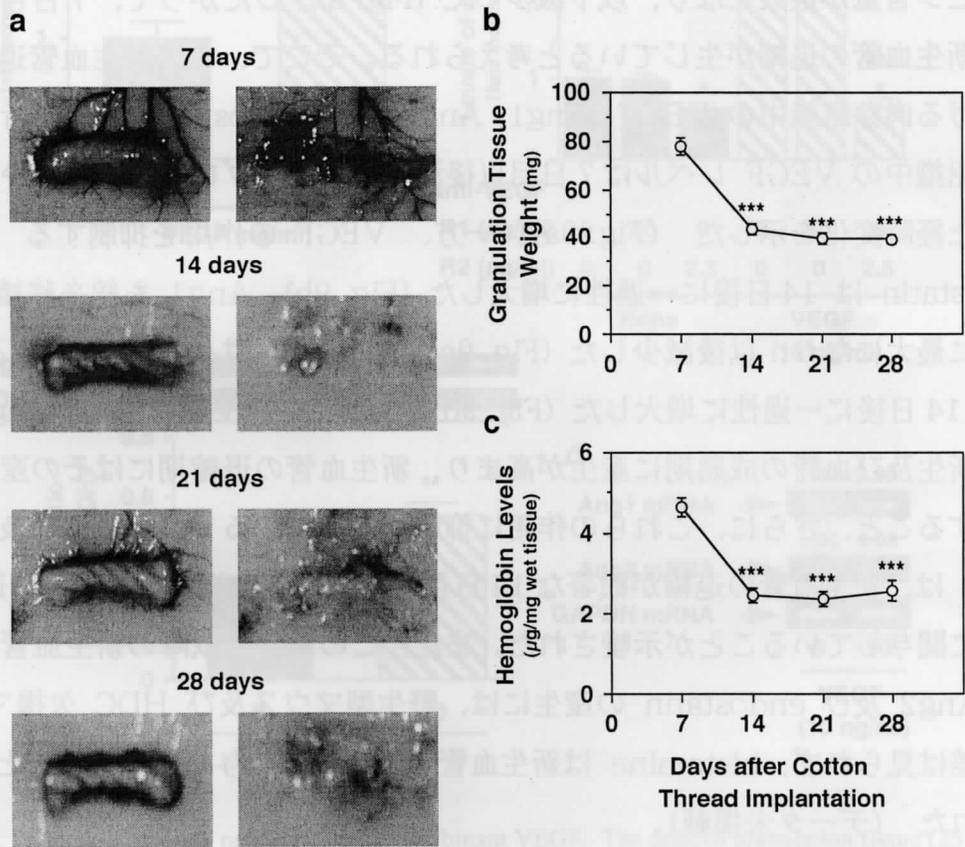


Figure 8. Time changes of granulation tissue weight and angiogenesis in the granulation tissue after implantation of a cotton thread. A cotton thread (1 cm, 7 mg) was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. The mice were sacrificed 7, 14, 21 and 28 d after the cotton thread implantation. (a) The vascular network formation around the cotton thread (left) and the subcutaneous tissue beneath the cotton thread (right). (b) The granulation tissue weight. (c) Hemoglobin contents in the granulation tissue. Values are the means from four mice with SEM shown by vertical bars. *** $P < 0.001$ compared with values at day 7 after the implantation.

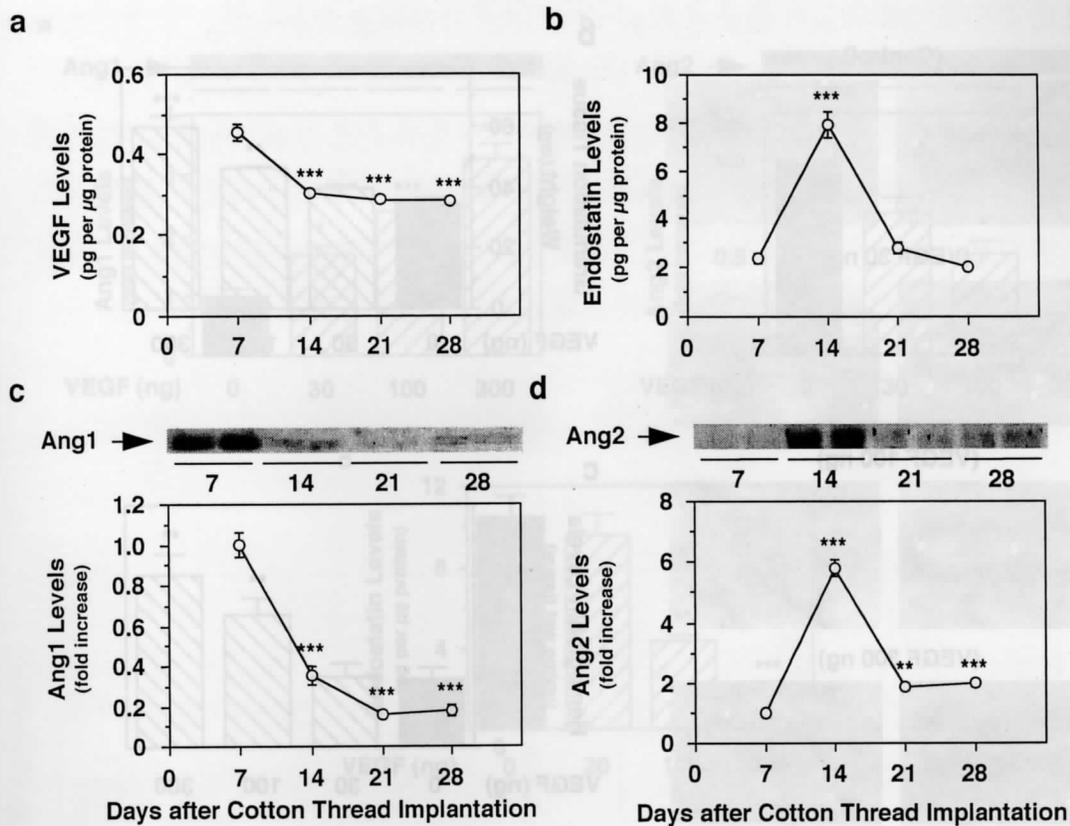


Figure 9. Time changes of VEGF, Ang1, Ang2 and endostatin protein levels in the cotton thread-induced granulation tissue. A cotton thread (1 cm, 7 mg) was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. The mice were sacrificed 7, 14, 21 and 28 d after the implantation. (a) VEGF protein levels in the granulation tissue were determined by ELISA. (b) Endostatin protein levels in the granulation tissue were determined by ELISA. (c and d) Ang1 and Ang2 protein levels in the granulation tissue were determined by immunoblotting and analyzed densitometrically. Representative immunoblots from two mice in each group are shown at the top of c and d, respectively. The mean Ang1 and Ang2 protein levels in the granulation tissue at day 7 after the implantation is set to 1.0, respectively. Values are the means from four mice with SEM shown by vertical bars. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with values at day 7 after the implantation.

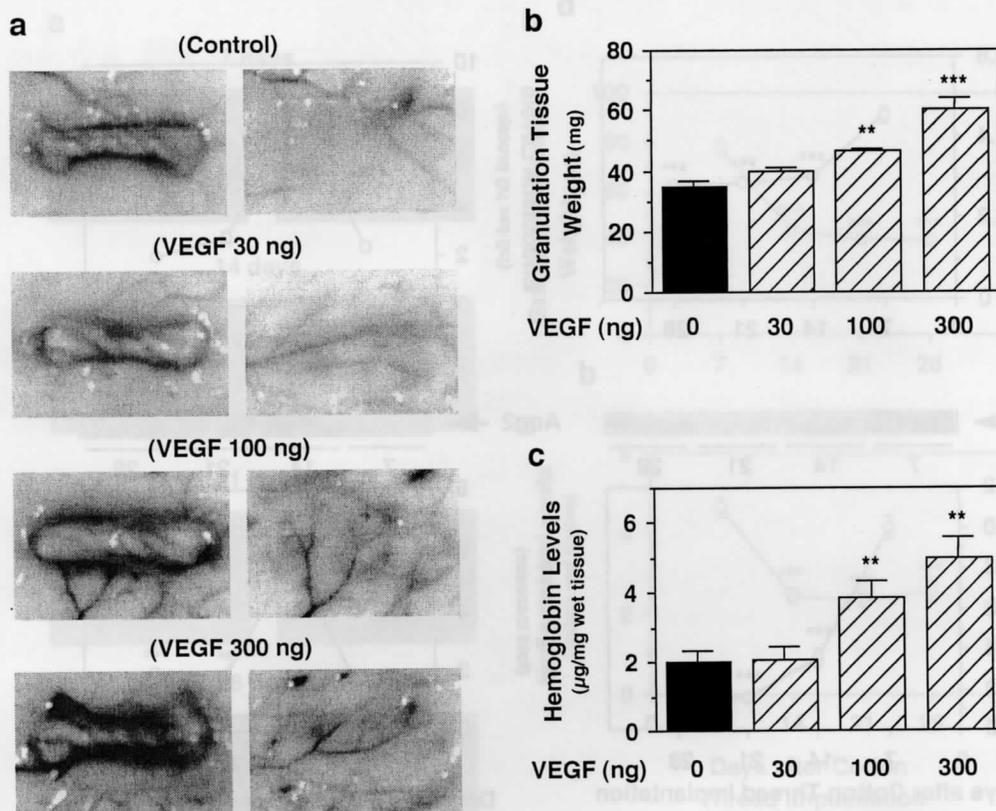


Figure 10. Effects of murine recombinant VEGF on granulation tissue formation and angiogenesis in the granulation tissue in HDC^{+/+} mice. A cotton thread (1 cm, 7 mg) was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. Murine recombinant VEGF (30, 100 and 300 ng) dissolved in 100 μ l of sterile saline was injected subcutaneously at the site of the implantation at 7 d after the implantation and then once a day for 6 consecutive days. The mice were sacrificed 14 d after the implantation. (a) The vascular network formation around the cotton thread (left) and the subcutaneous tissue beneath the cotton thread (right). (b) The granulation tissue weight. (c) Hemoglobin contents in the granulation tissue. Values are the means from four mice with SEM shown by vertical bars. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with values in the control groups.

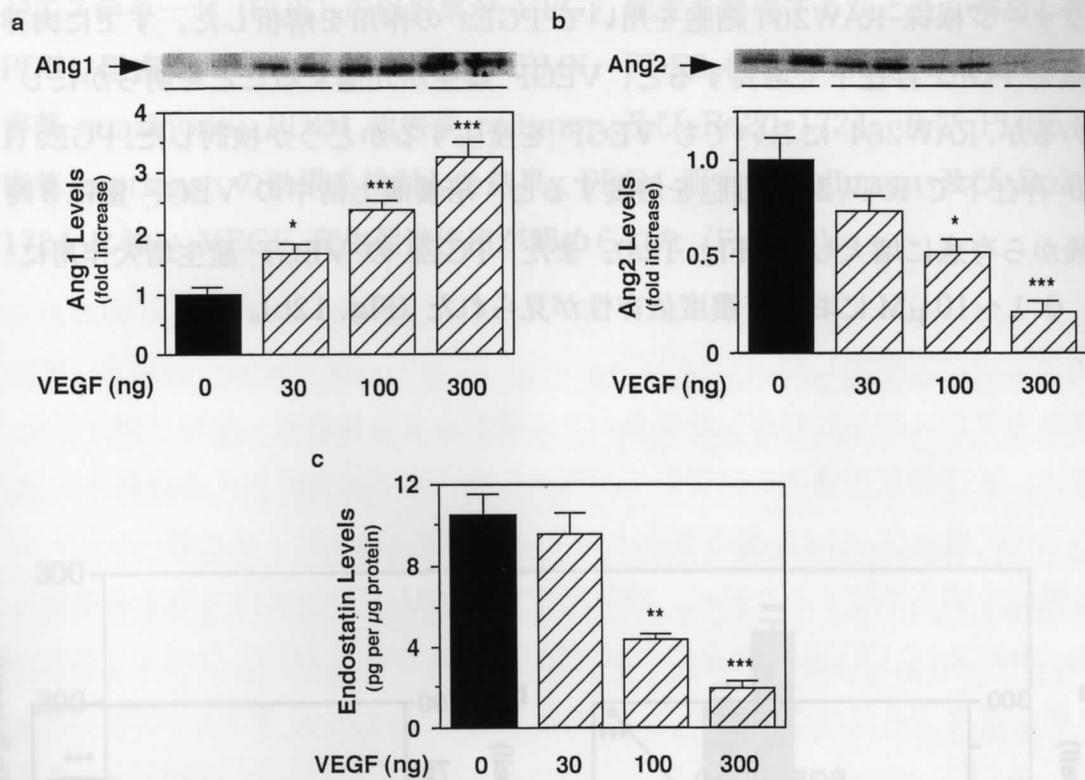


Figure 11. Effects of murine recombinant VEGF on the levels of Ang1, Ang2 and endostatin in the granulation tissue in HDC^{+/+} mice. A cotton thread (1 cm, 7 mg) was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. Murine recombinant VEGF (30, 100 and 300 ng) dissolved in 100 µl of sterile saline was injected subcutaneously at the site of the implantation at 7 d after the implantation and then once a day for 6 consecutive days. The mice were sacrificed 14 d after the implantation. (a and b) Ang1 and Ang2 protein levels in the granulation tissue were determined by immunoblotting and analyzed densitometrically. Representative immunoblots from two mice in each group are shown at the top of A and B, respectively. The mean Ang1 and Ang2 protein levels in the granulation tissue in the control group is set to 1.0, respectively. (c) Endostatin protein levels in the granulation tissue were determined by ELISA. Values are the means from four mice with SEM shown by vertical bars. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with values in the control groups.

3-3. 血管新生誘導薬物の探索

(1) PGE₂による VEGF 産生誘導

血管新生を増加させる薬物を探索する実験系を確立するために、マウスマクロファージ様株 RAW264 細胞を用いて PGE₂ の作用を解析した。すでに肉芽組織を PGE₂ 存在下で培養すると、VEGF 産生が亢進することを明らかにしているが、RAW264 においても VEGF を産生するかどうか検討した。PGE₂ (1 μ M) 存在下で RAW264 細胞を培養すると、培養液上清中の VEGF 量は3時間後から有意に増大した (Fig. 12a)。また、PGE₂ の VEGF 産生増大作用には、0.1 ~ 10 μ M において濃度依存性が見られた (Fig. 12b)。

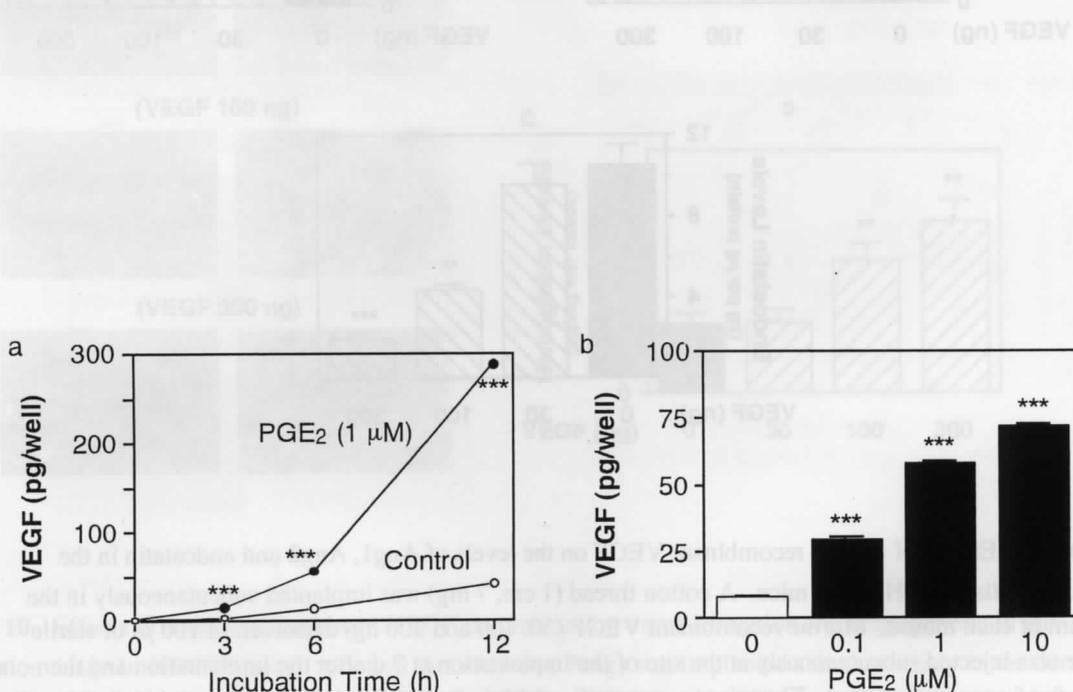


Figure 12. Effects of PGE₂ on VEGF production. RAW264 cells (2×10^5 cells) were incubated for 20 h in 0.4 ml of medium. After 3 washes, cells were incubated for the periods indicated in 0.4 ml of medium in the presence or absence of PGE₂ (1 μ M) (a), or for 6 h in 0.4 ml of medium in the presence of the indicated concentrations of PGE₂ (b). VEGF in the conditioned medium was then determined by ELISA. Values are the means \pm S.E.M. from 4 samples. In Fig. 12a, S.E.M. are too small to depict; they are within each symbol. Statistical significance: *** $p < 0.001$ versus the corresponding control.

(2) ホスホジエステラーゼ阻害薬による VEGF 産生誘導

PGE₂ や histamine による VEGF 産生亢進には細胞内 cAMP 量の増加が関与していることが報告されている。そこで、cAMP の分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) の阻害薬が VEGF 産生を誘導するかどうか解析した。PDE1 阻害薬 8-methoxymethyl-IBMX、PDE2 阻害薬 EHNA、PDE3 阻害薬 quazinone、PDE4 阻害薬 rolipram 及び Ro20-1724、及び PDE5 阻害薬 zaprinast の効果を検討した結果、PDE4 阻害薬 rolipram 及び Ro20-1724 に強い VEGF 産生促進作用が認められた (Fig. 13)。

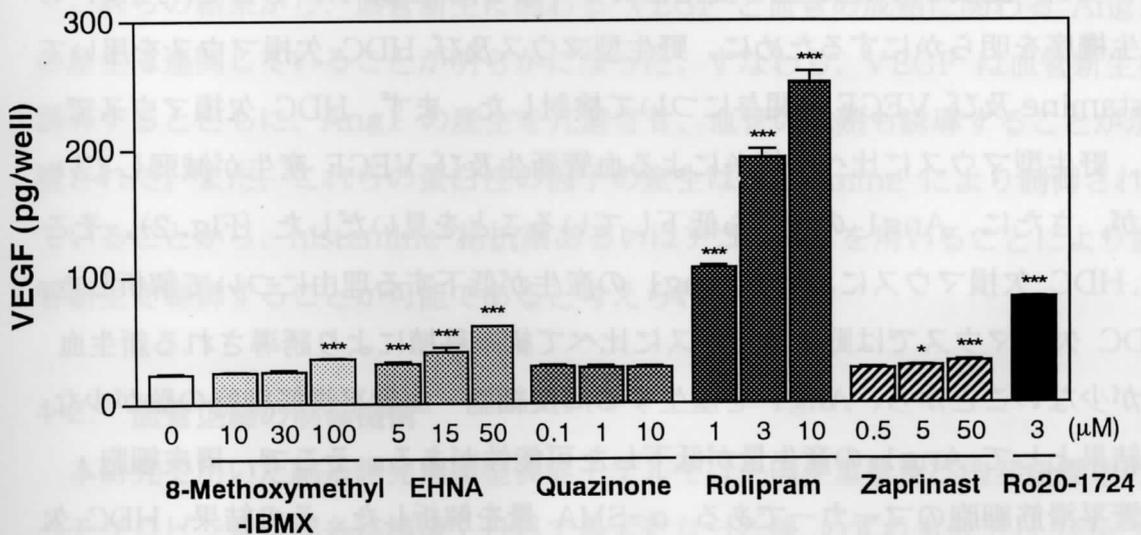


Figure 13. Induction of VEGF production by PDE inhibitors. RAW264 cells (2×10^5 cells) were incubated for 20 h in 0.4 ml of medium. After 3 washes, the cells were incubated for 6 h in 0.4 ml of medium containing the indicated concentrations of the PDE1 inhibitor 8-methoxymethyl-IBMX, the PDE2 inhibitor EHNA, the PDE3 inhibitor quazinone, the PDE4 inhibitors rolipram and Ro20-1724, and the PDE5 inhibitor zaprinast. VEGF in the conditioned medium was then determined by ELISA. Values are the means \pm S.E.M. from 3 samples. Statistical significance: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ versus the unstimulated control.

4. 考察

4-1. 血管新生・成熟の制御機構

慢性炎症における急速な肉芽増殖は、血管新生に依存した反応であり、血管新生を抑制することは、慢性関節リウマチのような増殖型炎症を抑制する1つの有効な方法論である。これまで野生型マウス及びHDC欠損マウスにおける綿糸誘発増殖型炎症を解析し、肉芽組織中で産生された histamine は VEGF の産生を亢進して、血管新生反応を増大させることを報告した (6)。そこで今回、この炎症モデルを用いて、血管の成熟に関与する Ang1 の産生制御機構について解析した。

綿糸をマウス皮下に移植した場合、3日後から7日後まで、急速に肉芽組織の形成、及び肉芽組織中の血管新生が亢進した。この血管新生反応の経時変化は VEGF 量及び Ang1 量の変化と良く一致した (Fig. 1)。そこで、Ang1 の産生機序を明らかにするために、野生型マウス及び HDC 欠損マウスを用いて histamine 及び VEGF の関与について検討した。まず、HDC 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて綿糸による血管新生及び VEGF 産生が減弱しているが、さらに、Ang1 の産生も低下していることを見いだした (Fig. 2)。そこで、HDC 欠損マウスにおいて Ang1 の産生が低下する理由について解析した。HDC 欠損マウスでは野生型マウスに比べて綿糸移植により誘導される新生血管が少ないことから、Ang1 を産生する周皮細胞・血管平滑筋細胞の数が少ない結果として Ang1 の産生量が低下した可能性がある。そこで、周皮細胞・血管平滑筋細胞のマーカーである α -SMA 量を解析した。その結果、HDC 欠損マウスにおいて、肉芽組織中の α -SMA 量は低下していること (Fig. 3a)、免疫組織学的にも成熟した血管が減少していること (Fig. 3c) が確認された。しかし、Ang1 量と α -SMA 量との比を計算した結果、野生型マウスで顕著に増加したが、HDC 欠損マウスではこの増加が小さいことが判明した (Fig. 3b)。この結果から、Ang1 の産生は何らかの制御因子により誘導されており、HDC 欠損マウスではこの制御因子の産生が低下している可能性が考えられた。そこで、histamine あるいは VEGF が Ang1 の産生に影響を与えているかどうか解析した。その結果、histamine あるいは H₂ 受容体アゴニスト

dimaprit を綿糸移植部位に注射した場合、血管新生が増加するとともに、Ang1 量も増加することが明らかになり (Fig. 4)、histamine が Ang1 の産生に関与していることが示唆された。また、抗 VEGF IgG は綿糸により誘発される Ang1 の産生を抑制し、さらに histamine による Ang1 の産生増大も抑制した (Fig. 5)。したがって、histamine は VEGF 産生を介して Ang1 の産生を亢進させることが示唆された。さらに、VEGF は直接 Ang1 の産生を亢進させているかどうか明らかにするために、肉芽組織の培養系で解析した。その結果、VEGF は添加後 2 時間で Ang1 の mRNA レベルを増加させ (Fig. 7)、直接的に Ang1 の産生を増加させることが示唆された。また、肉芽組織から調製した線維芽細胞においても、VEGF は Ang1 mRNA 量を増加させたが、Ang2 mRNA 量を増加させなかったこと (Fig. 7d) から、VEGF は Ang1 を選択的に誘導していることが明らかになった。

これらの結果から、血管新生に関わる VEGF と血管の成熟に関わる Ang1 の産生は連関していることが明らかになった。すなわち、VEGF は血管新生を誘導するとともに、Ang1 の産生を亢進させ、血管の成熟も誘導することが示唆された。また、これらの蛋白性の因子の産生は histamine により制御されていることから、histamine 拮抗薬あるいはアゴニストを用いることにより血管新生を制御することが可能であると考えられる。

4-2. 血管退縮の制御機構

本研究で用いた綿糸誘発増殖型炎症モデルでは、肉芽重量及び肉芽組織中のヘモグロビン量は綿糸移植後 7 日目で最大になった後、いずれも低下し (Fig. 8)、血管退縮を解析できるモデルであると考えられる。ヘモグロビン量の低下に伴い、肉芽組織中の VEGF 量及び Ang1 量が低下し、逆に、Ang2 及び endostatin 量が増加した (Fig. 9)。その増加は特にヘモグロビン量が顕著に低下する時期と一致し、しかも endostatin は VEGF の作用発現を抑制し、Ang2 は Ang1 と拮抗する作用を持つことから、これらの蛋白の産生亢進が血管退縮に関与している可能性が考えられる。血管退縮及び Ang2 と endostatin の産生には、野生型マウスと HDC 欠損マウスで差が見られなかったことから (データ未掲載)、血管新生には histamine が促進的に作用して

いるものの、血管退縮にはほとんど影響していないと考えられる。一方、血管退縮期に VEGF を投与し、VEGF の低下を抑制した場合、血管新生が持続し、Ang2 及び endostatin の産生が抑制された。したがって、血管新生・成熟及び血管退縮はいずれも VEGF レベルにより制御されていることが示唆された。しかし、Ang2 及び endostatin の産生誘導機序は不明であり、今後、これらの因子の産生機序を解明する *in vitro* の実験系の確立が必要である。

4-3. 薬物による血管新生の誘導

マウスマクロファージ様株 RAW264 細胞が PGE₂ に応答して VEGF を産生することが明らかになり (Fig. 12)、VEGF 産生を誘導する薬物のスクリーニング系として、また、VEGF の産生を抑制する薬物のスクリーニング系として利用できると考えられる。PGE₂ や histamine は細胞内 cAMP を増加させて、VEGF 産生を増加させることが報告されている (11)。しかし、PGE₂ には4種の受容体があり、様々な生理活性を示し、また、histamine は H₂ 受容体を介して VEGF 産生を高めるが、H₁ 受容体を介してアレルギー反応を誘発し、H₂ 受容体を介して胃酸分泌を亢進する。このように様々な生理作用を持つために、これらの chemical mediators を VEGF 誘導剤として用いることは副作用の点から問題が多い。そこで、cAMP を増加させ、臨床的に用いられている薬物として PDE 阻害薬があることに着目し、これらの薬物が VEGF 産生を亢進するかどうか解析した。その結果、PDE4 阻害薬が VEGF 産生を強く促進することが明らかになり (Fig. 13)、これらの薬物は治癒促進剤としても使用できることが示唆された。今後、これらの薬物が動物実験モデルにおいて血管新生を増加させ、損傷治癒を促進するかどうか解析する必要がある。

5. 結論と今後の展望

慢性炎症における肉芽組織の形成における血管新生の誘導及び新生血管の成熟には VEGF 及び Ang1 が関与すること、さらに VEGF は Ang1 の産生を亢進することが明らかになった。これまで、VEGF をアデノウイルスで発現する試みがなされているが、この場合、血管の成熟が不完全で、血管透過性が亢進することが示されている。本研究では、VEGF は Ang1 を誘導し、血管の成熟も誘導することが示唆された。したがって、ウイルスなどにより強制的に VEGF を発現させる場合には、内因性の Ang1 の産生量に比べて VEGF の産生が過剰になったために血管の成熟が不完全であった可能性が考えられる。この観点から、内因性の VEGF の産生を高める薬物は VEGF を発現するアデノウイルスを用いる場合より効果的であると考えられる。VEGF の産生を高める薬物の1つとして、本研究では PDE4 阻害薬を明らかにした。今後、動物レベルでの解析により、その有効性を明らかにすることが必要である。

また、血管退縮には Ang2 及び endostatin が関与していることが示唆された。Ang2 は Ang1 に拮抗し、endostatin は VEGF の作用を抑制する作用を持つため、血管の不安定化、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する。そこで、VEGF の産生阻害薬や拮抗薬とともに、Ang2 及び endostatin、あるいはこれらの産生を亢進させる薬物を併用することにより、既存の新生血管の退縮を誘導することが可能であると考えられる。これらの産生は、VEGF により抑制されることが示唆されたが、どのような機序により産生が亢進するかは明らかではない。今後、Ang1 や Ang2 を発現する低分子化合物のスクリーニング系を確立し、これらの蛋白質の産生を制御する薬物を開発することは、血管新生を薬物で制御する上で極めて重要であると考えられる。

6. 引用文献

- 1) Griffioen, A.W. and Molema, G. (2000) Angiogenesis : potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.*, 52: 237-268.
- 2) Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, 18: 4-25.
- 3) Davis, S., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Acheson, A., Compton, D.L., Jain, V., Ryan, T.E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C. and Yancopoulos, G.D. (1996) Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 87: 1161-1169.
- 4) Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N. and Yancopoulos, G.D. (1997) Angiopoietin 2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277: 55-60.
- 5) O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., and Folkman, J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88: 277-285.
- 6) Ghosh, A.K., Hirasawa, N., Ohtsu, H., Watanabe, T., and Ohuchi, K. (2002) Defective angiogenesis in the inflammatory granulation tissue in histidine decarboxylase-deficient mice but not in mast cell deficient mice. *J. Exp. Med.* 195: 973-982.
- 7) Kamei, D., Yamakawa, K., Takegoshi, Y., Mikami-Nakanishi, M., Nakatani, Y., Oh-ishi, S., Yasui, H., Azuma, Y., Hirasawa, N., Ohuchi, K., Kawaguchi, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M. and Kudo, I. (2004) Reduced Pain Hypersensitivity and Inflammation in Mice Lacking Microsomal Prostaglandin E Synthase-

1. J. Biol. Chem. 279: 33684-33695.
- 8) Ghosh, A.K., Hirasawa, N. & Ohuchi, K. (2001) Enhancement by histamine of vascular endothelial growth factor production in granulation tissue *via* H₂ receptors. Br. J. Pharmacol., 134: 1419-1428.
- 9) Ghosh, A.K., Hirasawa, N., Niki, H. and Ohuchi, K. (2000) Cyclooxygenase-2-mediated angiogenesis in carrageenin-induced granulation tissue in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther., 295: 802-809.
- 10) Ben-Av, P., Crofford, L. J., Wilder, R. L. and Hla, T. (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. FEBS Lett. 372: 83-87.
- 11) Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., Narita, M., Sugimoto, Y., Murata, T., Yoshimura, H., Narumiya, S. and Majima, M. (2003) Host prostaglandin E₂-EP₃ signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. J. Exp. Med., 197: 221-232.