

—総説—

## カリジノゲナーゼの血管新生抑制作用

中村信介, 鶴間一寛, 嶋澤雅光, 原英彰\*

**要約** : 現在、異常な網膜血管新生によって、不可逆的な視野欠損あるいは失明に至る患者が増加の一途をたどっている。網膜中の異常な血管新生は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) などの特定のサイトカインによって誘導される。抗 VEGF 治療薬が眼内血管新生疾患をターゲットにした治療薬として硝子体内投与によって使用されている。しかし、硝子体内に対する連続投与は硝子体出血、網膜はく離の危険性があり、さらにコンプライアンスの低下が懸念されている。したがって、末梢投与のような非侵襲的な薬物送達が求められている。近年、カリジノゲナーゼが末梢経路を介して網脈絡膜の循環を改善し、さらには網膜血管透過性亢進を抑制することが報告された。網膜血管新生におけるカリジノゲナーゼの役割を明らかにするために、増殖糖尿病網膜症患者 (PDR) の硝子体液を用いてその濃度を測定し、*in vitro* および *in vivo* 血管新生モデルを用いて抗血管新生作用について検討を行った。硝子体中カリジノゲナーゼおよび VEGF 濃度は、黄斑円孔および黄斑上膜患者に比べ PDR 患者で高値を示した。カリジノゲナーゼは VEGF<sub>165</sub> の切断を介して、*in vitro* 血管新生モデルにおける VEGF<sub>165</sub> 誘発管腔形成、増殖、遊走を抑制した。また、カリジノゲナーゼは皮下投与によってマウス高酸素負荷網膜血管新生モデルにおける病的な血管新生を抑制した。これらの知見はカリジノゲナーゼが増殖糖尿病網膜症の病態に一部関与し、さらに末梢経路によって VEGF<sub>165</sub> 自体を切断する有望な治療薬になり得ることを示唆している。

**索引用語** : カリジノゲナーゼ、増殖糖尿病網膜症、血管新生、血管内皮細胞増殖因子

## Anti-angiogenic Effect of Kallidinogenase

Shinsuke NAKAMURA, Kazuhiro TSURUMA, Masamitsu SHIMAZAWA, Hideaki HARA\*

**Abstract**: Irreversible vision loss and blindness due to abnormal retinal neovascularization has been increasing. An abnormal proliferation of new blood vessels in the retina is induced by a specific cytokine, vascular endothelial growth factor (VEGF). The intravitreal injection of anti-VEGF therapeutic agents has been used in the treatment of ocular neovascular diseases. However, repeated injections are associated with potential risks of vitreous hemorrhage, retinal detachment, and decrease in compliance. Therefore, noninvasive delivery systems, such as peripheral administration, are required. Recently, it has been reported that kallidinogenase improved choroidal and retinal circulation, and prevented the retinal vascular hyperpermeability by the peripheral route. To identify the role of kallidinogenase in retinal neovascularization, we measured the concentrations in vitreous fluid from patients with proliferative diabetic retinopathy, and investigated the anti-angiogenic effect by using *in vitro* and *in vivo* angiogenesis models. Kallidinogenase in vitreous fluid was markedly elevated in proliferative diabetic retinopathy patients compared with that in control patients with macular holes and epiretinal membranes. Kallidinogenase inhibited VEGF<sub>165</sub>-induced tube formation, proliferation, and migration in an *in vitro* angiogenesis model *via* the cleavage of VEGF<sub>165</sub>. When administered subcutaneously, kallidinogenase reduced the pathologic neovascularization in the murine oxygen-induced retinopathy model. These findings indicate that kallidinogenase is partly involved in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy and may be a promising therapeutic agent that could cleave VEGF<sub>165</sub> itself when administered by a peripheral route.

**Key phrases**: kallidinogenase, proliferative diabetic retinopathy, neovascularization, vascular endothelial growth factor

## 1. 緒言

眼球は「ものを見る」ことを目的としている器官であり、光が通過する角膜、前房、水晶体および硝子体には血管が存在せず、透明な組織として維持され、体内において他の器官にはない際立った特徴的な構造を有している。

「ものを見る」場合、光は角膜と前房を通過して瞳孔から眼球内に入り、水晶体で屈折し硝子体を通った後、その光刺激が眼底の網膜から視神経を通過して脳に伝わり、「ものを見る」ということになる。これらの組織はどれも必要な組織であるが、とくに網膜は光を受容し、形態覚、色覚、明暗など「ものを見る」ための重要な役割を果たしている。

視覚障害による失明原因の多くが網膜病変による疾患である。現在、日本における失明原因の第一位は緑内障であるが、異常な血管新生が一因となり発症する糖尿病網膜症と加齢黄斑変性症を合わせるとその割合は最大(28.1%)になる。我が国のみならず先進国において著しい視覚障害をきたす主な原因は眼内血管新生性疾患とされ、代表的なものに、糖尿病網膜症、未熟児網膜症、加齢黄斑変性症、網膜静脈閉塞症および血管新生緑内障などがある。これらは、網膜、脈絡膜、虹彩などに存在する既存の血管から異常な新生血管を生じる。新生血管は正常血管と比べて脆弱で破綻しやすいため、血液成分の血管外への漏出や出血を起こすことにより網膜を障害し、視力の低下を引き起こす。血管新生は、既存の血管から新しい血管が枝分れして次第に大きな血管ネットワークを構築し、生理的には発生、胎盤形成および創傷治癒などに関与している。この現象は、1) タンパク質分解酵素(プラスミノゲンアクチベーター、プラスミンおよびコラゲナーゼなど)による血管基底膜の融解、2) 血管内皮細胞の血管外への遊走、分裂、増殖、および3) 管腔形成の各プロセスからなる(Fig. 1)<sup>(1,2)</sup>。

不妊治療に伴う未熟児の増加および新生児医療の進歩

による超未熟児の死亡率低下により、皮肉にも未熟児網膜症(retinopathy of prematurity: ROP)患者は著明な増加を示す。また食生活のみだれや運動不足などが原因で糖尿病患者は急増しており、それに伴い増殖糖尿病網膜症(proliferative diabetic retinopathy: PDR)患者も増加している。ROPおよびPDRなどの後眼部疾患は、硝子体内に伸展した病的な血管新生が原因で不可逆的な視野欠損や失明を引き起こす。網膜血管新生は、促進因子と抑制因子のバランスによって制御されると考えられている。生理的な血管系の形成が巧妙に調節される一方で、病的状態においてこれらの血管新生調節システムの破綻が網膜血管病変に関与していると考えられる。血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor: TNF)- $\alpha$ などは血管新生促進因子として、そして色素上皮由来因子(pigment epithelium-derived factor: PEDF)、soluble VEGF receptor (sVEGFR)、バソヒピンなどは血管新生抑制因子として同定されている。ROPやPDRの外科的治療法としてはレーザーによる光凝固術が行われており<sup>(3-6)</sup>、網膜の酸素不足を解消し、新生血管の発生の予防や新生血管を減少させる効果がある。しかし、視力障害を誘発する副作用もあり、薬物療法を含めた新たな治療法が望まれている。近年、血管新生を引き起こす因子のなかでもVEGFはROPおよびPDRの病態と関連が深いことが報告され<sup>(7-9)</sup>、実際にVEGFをターゲットとした抗VEGF抗体(ベバシズマブ、Avastin<sup>®</sup>)、VEGFアプタマー(ペガプタニブ、Macugen<sup>®</sup>)および抗VEGF Fab抗体(ラニズマブ、Lucentis<sup>®</sup>)の有効性が確認されている<sup>(10-12)</sup>。ところが、これら製剤は直接眼内に針で注射することから、患者の身体的負担が大きく、また眼内炎などの副作用の危険性もある。したがって、今後期待されている製剤としては、末梢からの投与、あるいは点眼によって、薬物が網膜に到達することにより効果を示すような製剤が望まれている。そこで、著者らは、既に

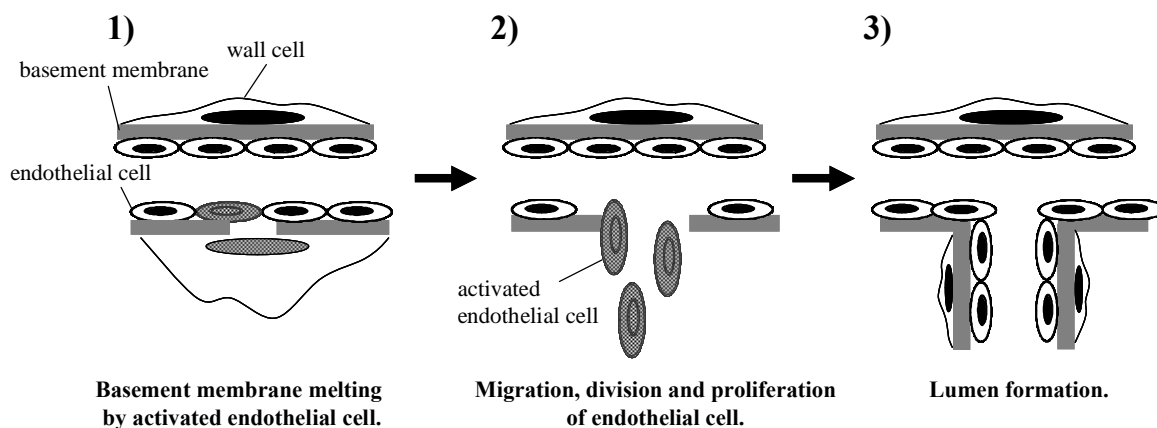


Fig. 1 Formation process of blood vessel.

網脈絡膜の循環障害改善薬として臨床で汎用されているカリジノゲナーゼ (262AA, 28,890 Da, UnitProt: P06870) に着目した。既存薬の中から網膜血管新生に対する有望な薬剤を見出すことができれば、すでに臨床における薬理学的並びに安全性の情報が存在するため、新薬開発とは異なり、開発リスクも少ない。さらに、網膜血管新生の発生機序において、血液循環は重要な因子のひとつであり<sup>(13)</sup>、循環改善薬であるカリジノゲナーゼは血管新生に対して抑制効果を示すことが予想される。また、カリジノゲナーゼは経口投与で既に使用されている医薬品であることから末梢投与による眼への効果が期待できる。以上、カリジノゲナーゼは末梢投与可能で、かつ網膜異常血管新生疾患に対して早期に有用な薬剤になり得る可能性がある。

糖尿病網膜症の発症と進行に高血圧が関与し、またレニン-アンジオテンシン系およびカリジノゲナーゼ (カリクレイン)-キニン系が血圧と血流を制御していることが知られている<sup>(14)</sup>。さらに糖尿病網膜症の病態には、レニン-アンジオテンシン系の活性化が関与しており、その関連因子を抑制することで糖尿病網膜症に効果を示すことがヒトおよび動物モデルにおいて明らかにされている<sup>(15-18)</sup>。またレニン-アンジオテンシン系と拮抗し平衡関係にあるカリクレイン-キニン系は、糖尿病網膜症に対して下方制御している (Fig. 2)。さらに、カリクレイン結合タンパク質として知られているカリスタチンは、糖尿病患者およびラット糖尿病モデルの眼内において低下している<sup>(19, 20)</sup>。カリスタチンはカリジノゲナーゼに結合してその作用を阻害するため、糖尿病網膜症の病態にカリジノゲナーゼが関与していることが考えられるが、これまでにカリジノゲナーゼの関与について報告はない。カリジノゲナーゼは膵由来のタンパク質分解酵素で血漿中の 2-グロブリン分画に属するキニノーゲンを酵素的に分解することでブラジキニンを遊離させる。ブラジキニンは、血管内皮細胞の B2 受容体を刺激して nitric oxide (NO) やプロスタグランジン類の産生を亢進させることで強力な血管拡張作用を示す。また、微小循環速度の亢進作用を介して血流量を増加させ、組織の循環障害を改善する。さらに、ストレプトゾトシン (streptozotocin) 誘発ラット糖尿病モデルにおいて、カリジノゲナーゼの尾静脈内投与は、眼内の VEGF 量を著明に減少させ、網膜血管透過性を低下させる<sup>(21)</sup>。これらの知見から、カリジノゲナーゼは血管および血管新生に対して何らかの作用を有している可能性が考えられる。

上記で述べたように、VEGF は血管新生を促進する強力な因子として広く知られている。VEGF は血管内皮細胞に強い特異性を有するヘパリン結合性の血管新生を促す増殖因子として発見された<sup>(22)</sup>。現在、VEGF ファミリーとして VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E (ウイルス因子)、placental growth factor (PIGF: 胎盤増殖因

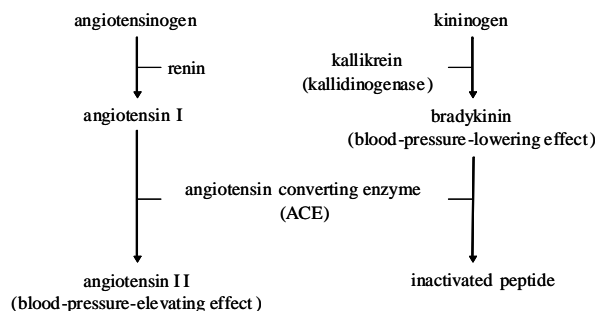


Fig. 2 Renin-angiotensin system and kallikrein-kinin system.

子) および svVEGF (snake venom VEGF) の 7 つのリガンドが同定されている。とくに VEGF-A は血管内皮細胞に選択的に作用し、血管新生に最も深く関与すると考えられている。さらに VEGF-A は、ヒトではアミノ酸数が 121 個 (VEGF<sub>121</sub>)、165 個 (VEGF<sub>165</sub>)、189 個 (VEGF<sub>189</sub>) および 206 個 (VEGF<sub>206</sub>) の 4 種類の主要なアイソフォームが存在する。とくに VEGF<sub>165</sub> は他のアイソフォームと比べて最も多く、生理活性が高いため、病態における血管新生への関与が強いことが示唆されている<sup>(23-25)</sup>。網膜において、生理学的な血管新生に対して VEGF<sub>121</sub> (マウスでは VEGF<sub>120</sub>) が重要な役割を果たしており、一方、病的な血管新生に対して VEGF<sub>165</sub> (マウスでは VEGF<sub>164</sub>) が深く関与していることが最近の研究から明らかになった<sup>(26, 27)</sup>。

そこで本稿では、まずカリジノゲナーゼと網膜血管新生疾患の関連を調べるために、糖尿病網膜症の患者硝子体液を用いてカリジノゲナーゼおよび VEGF の濃度を測定した。また、カリジノゲナーゼが VEGF 誘発管腔形成を抑制するか否かについて検討した。つぎに、カリジノゲナーゼの管腔形成抑制作用の機序を明らかにするために、カリジノゲナーゼの管腔形成における増殖および遊走に関与するシグナル経路に及ぼす影響について検討した。また、カリジノゲナーゼの VEGF<sub>121</sub> あるいは VEGF<sub>165</sub> に対する直接的な作用についても検討した。さらに、網膜において異常血管新生が惹起されるマウス網膜高酸素負荷血管新生モデルを用いて、*in vivo* におけるカリジノゲナーゼの末梢投与による血管新生抑制作用を検討した。

## 2. 硝子体液中カリジノゲナーゼ濃度の定量

硝子体液のサンプリング：本試験は、ヘルシンキ宣言を遵守し、大阪医科大学倫理委員会から承認 (承認番号: 1134) を受けて実施した。対象患者 97 名に対して研究目的および研究方法について説明後、全被験者から同意を得た。被験者は黄斑円孔 (macular hole: MH) 患者 40 名 (男性 9 名、女性 31 名)、黄班上膜 (epiretinal membrane: ERM) 患者 20 名 (男性 7 名、女性 13 名) および増殖糖尿病網膜

症 (proliferative diabetic retinopathy: PDR) 患者 37 名 (男性 19 名、女性 18 名)。MH および ERM は、血管新生を伴わない疾患であり、かつ倫理的に硝子体液を得ることができる疾患として、PDR の対照として試験に用いた。大阪医科大学病院においてそれぞれの疾患に対する治療のため、硝子体切除術を施行し、眼内灌流前に硝子体を切除した。なお、繰り返し硝子体切除術を施行された患者および硝子体中に明らかな出血が認められる患者のサンプルは除外した。採取した硝子体サンプルは 15,000 g、4°C で 10 分間遠心後、上清のみを -80°C で保存した。詳細な患者データは table 1 に示す。

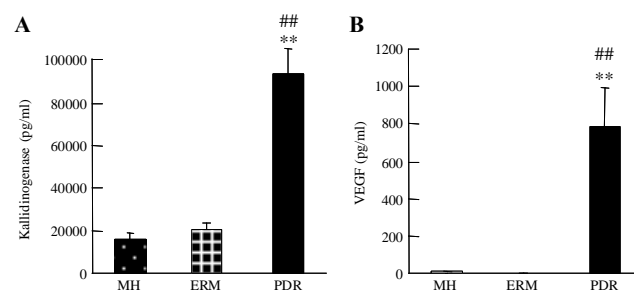
**Table 1. Data from patients with proliferative diabetic retinopathy and other ocular diseases**

Characteristic	Macular hole	Epiretinal membrane	Proliferative diabetic retinopathy
(Number of patients)	(40)	(20)	(37)
Age (years, mean $\pm$ SEM)	66.2 $\pm$ 1.0	67.3 $\pm$ 2.0	56.1 $\pm$ 1.9
Number of female patients	31	13	18
Macular edema	-	-	
+ Proliferative membrane			17
+ Traction membrane			10
Alone			2
Vitreous hemorrhage	-	-	
+ PVD			9
+ CME			15
+ Traction membrane			7
Alone			-
Traction membrane	-	-	
+ CME			9
Alone			-
Proliferative membrane	-	-	
+ Tractional RD			15
Alone			2
Macular hole stage 1B	2	-	-
Macular hole stage 2	10	-	-
Macular hole stage 3	17	-	-
Macular hole stage 4	10	-	-
Lamellar macular hole	1	-	-

Complications of each patient are shown in clinical findings. PVD, posterior vitreous detachment; CME, cystoid macular edema; RD, retinal detachment. The results were cited from ref 28<sup>(28)</sup>.

硝子体中カリジノゲナーゼ濃度と VEGF 濃度の比較：  
患者硝子体液中に含まれるカリジノゲナーゼの濃度をウェスタンブロット解析法により測定した。三和化学研究所にて精製された抗組織カリクレイン (カリジノゲナーゼ) 抗体を一次抗体に用い、ヒト尿カリジノゲナーゼを基準にして定量を行った。濃度測定は、Cs Analyzer software (Atto) を用いて行い、基準として用いたヒト尿カリジノゲナーゼの標準曲線に準拠して算出した。また、患者硝子体液中における VEGF 濃度は、AlphaLISA VEGF kit (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, MA, USA) を用いて測定した。VEGF 濃度が 2.2 pg/mL 以下は検出限界を超えてしまうため、測定数値を 0 として設定した。PDR 患者およびその

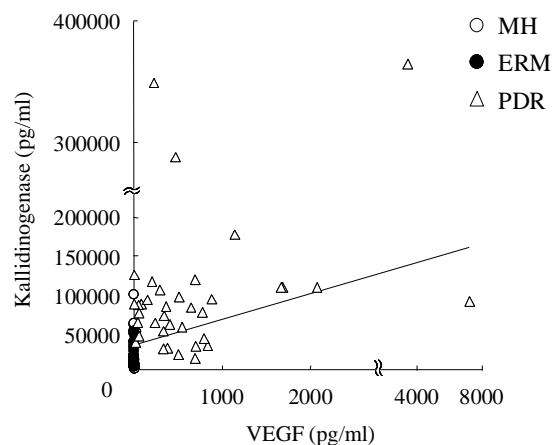
他対照となり得る患者の硝子体液中的カリジノゲナーゼおよび VEGF の濃度を測定した。硝子体中カリジノゲナーゼ濃度は他の疾患 (MH、15,698.8  $\pm$  3,131.4 pg/mL, n = 40; ERM、20,625.7  $\pm$  3,367.9 pg/mL, n = 20) に比べて、PDR 患者 (mean  $\pm$  SEM, 93,821.2  $\pm$  12 pg/mL, n = 37) で有意な高値を示した (Fig. 3A)。一方、VEGF 濃度においても同様に、PDR 患者において顕著な高値を示した (PDR、787.1  $\pm$  208.4 pg/mL, n = 37, versus MH, 4.7  $\pm$  1.1 pg/mL, n = 40, ERM, 0.1  $\pm$  0.1 pg/mL, n = 20) (Fig. 3B)。



**Fig. 3 Kallidinogenase and VEGF in vitreous fluid in MH, ERM, and PDR patients.**

(A, B) Concentrations of both kallidinogenase and VEGF in the vitreous body were higher in PDR patients than in those with other diseases (MH and ERM). Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (MH, n = 40; ERM, n = 20; PDR, n = 37). \*\* and ##, P < 0.001 versus MH and ERM, respectively (Steel, Dwassø multiple-comparison test). MH; macular hole. ERM; epiretinal membrane. PDR; proliferative diabetic retinopathy. The results were cited from ref 28.

硝子体液中に存在するカリジノゲナーゼおよび VEGF の相関関係について検討した。全患者において、硝子体液中カリジノゲナーゼ濃度は VEGF 濃度と正の相関 (Spearman  $\sigma$  = 0.494, P < 0.0001) が認められた (Fig. 4)。



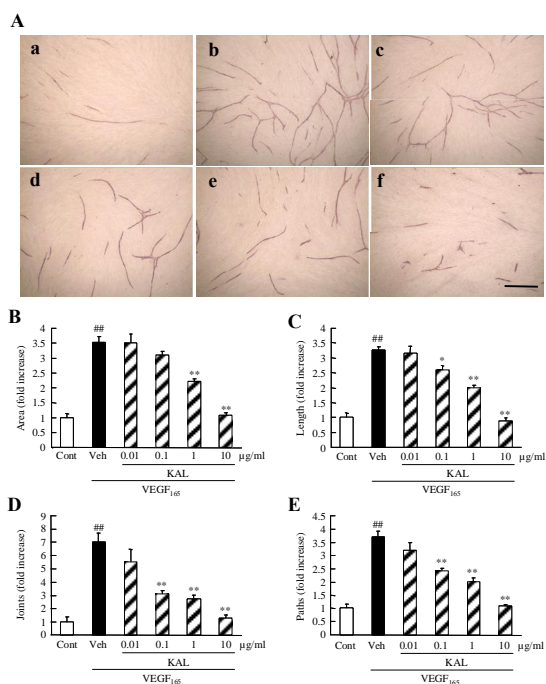
**Fig. 4 The correlation between concentrations of Kallidinogenase and VEGF in vitreous fluid in MH, ERM,**

and PDR patients.

Kallidinogenase showed a significant correlation with VEGF in the vitreous fluid. Open circles (○), closed circles (●), and open triangles (△) represent MH, ERM, and PDR patients, respectively. Spearman's product-moment correlation coefficient was used. MH, n = 40; ERM, n = 20; PDR, n = 37. MH; macular hole. ERM; epiretinal membrane. PDR; proliferative diabetic retinopathy. The results were cited from ref 28.

3. *In vitro* 血管新生モデルを用いた検討

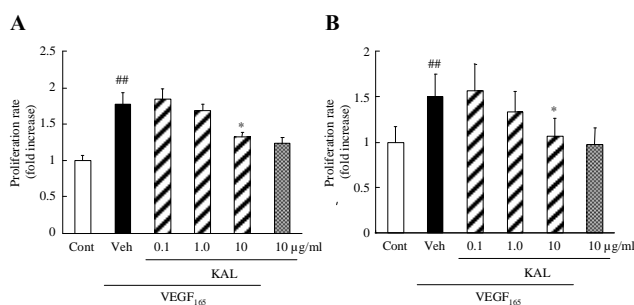
**VEGF 誘発管腔形成に対するカリジノゲナーゼの作用：**  
 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内でカリジノゲナーゼ濃度が上昇したことに起因するカリジノゲナーゼの役割を検討する一環として、カリジノゲナーゼの抗血管新生作用を血管新生キット（倉敷紡績株式会社）を用いて評価した。VEGF<sub>165</sub> 添加により、コントロール（VEGF<sub>165</sub> 非添加）に比べ、微小血管様管腔構造の形成が増加した (Fig. 5A)。微小血管様管腔構造の形成について定量的に解析するために、血管新生定量ソフトウェアを用いて、管腔の面積 (area)、管腔長 (length)、分岐点数 (joints) および枝数 (paths) を測定した。VEGF<sub>165</sub> 添加によって、管腔の面積、管腔長、分岐点数および枝数は、コントロールに比べて、それぞれ 3.5 倍、3.3 倍、7.0 倍および 3.7 倍に増加した。カリジノゲナーゼ (0.01 ~ 10 μg/mL) の添加は、VEGF<sub>165</sub> 誘発 HUVEC 管腔形成に対して濃度依存的な抑制作用を示し、管腔の面積は 1 μg/mL 以上の濃度で、管腔長、分岐点数および枝数は 0.1 μg/mL 以上の濃度で有意に抑制した (Fig. 5B-D)。



**Fig. 5 Kallidinogenase inhibited VEGF<sub>165</sub>-induced tube formation in HUVEC co-cultured with fibroblast.**

(A) HUVECs were co-cultured with human fibroblasts, were incubated with VEGF<sub>165</sub> (10 ng/ml) (b to f), together with tissue kallikrein (0.01, 0.1, 1, and 10 μg/ml) (c to f). Control is shown in (a). Quantitative analysis of the stained tube-like structures was performed (using an angiogenesis imaging analyzer) in five different fields for each well, measurements being made of tube area (B), length (C), joints (D), and paths (E). Data are shown as mean ± S.E.M. (n = 3). Scale bar = 500 μm. \*, P < 0.05, \*\*, P < 0.01 vs. Vehicle (Dunnett's multiple comparison test). ##, P < 0.01 versus Control (Student's *t*-test). Cont : Control. Veh : Vehicle. KAL; kallidinogenase. The results were cited from ref 28.

**HUVEC および HRMEC の VEGF 誘発細胞増殖および細胞遊走に対するカリジノゲナーゼの作用：**  
 VEGF 誘発管腔形成に対するカリジノゲナーゼの抗血管新生作用をより詳細に検討するため、HUVEC およびヒト網膜毛細血管内皮細胞 (human retinal microvascular endothelial cell: HRMEC) の細胞増殖能および細胞遊走能に対するカリジノゲナーゼの作用を評価した。VEGF<sub>165</sub> (10 ng/mL) 添加により、対照群と比較して HUVEC は約 1.8 倍、HRMEC は約 1.5 倍細胞数が増加した。カリジノゲナーゼ (0.01 ~ 10 μg/mL) は VEGF<sub>165</sub> 誘発 HUVEC および HRMEC の増殖に対して濃度依存的な抑制作用を示し、10 μg/mL の濃度で有意であった (Fig. 6A, B)。また、カリジノゲナーゼ 10 μg/mL の単独添加は、両細胞において対照群と比較して明らかな差は認められなかった (Fig. 6A, B)。

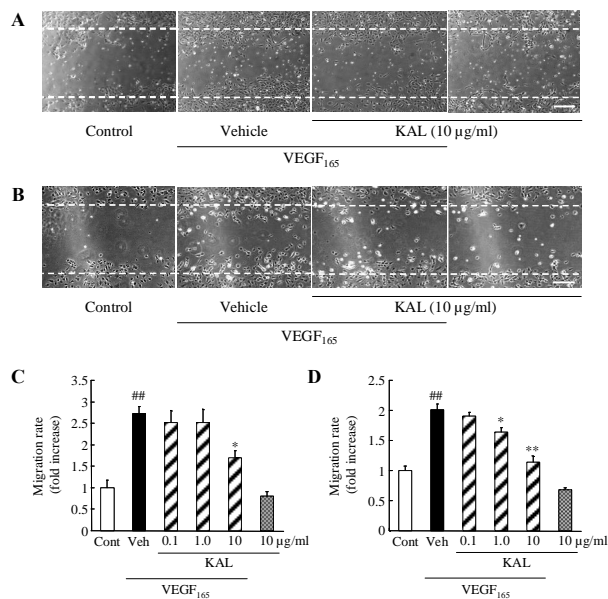


**Fig. 6 Kallidinogenase inhibited proliferation of HUVECs and HRMECs induced by VEGF.**

HUVECs (A) and HRMECs (B) were supplemented with or without VEGF<sub>165</sub> (10 ng/ml) plus various concentrations of kallidinogenase, and proliferation rates were measured using CCK-8 assay. Data are shown as mean ± S.E.M. (n = 5 or 6). \*, P < 0.05 versus Vehicle (Dunnett's multiple comparison test). ##, P < 0.01 versus Control (Student's *t*-test). Cont : Control. Veh : Vehicle. KAL; kallidinogenase. The results were cited from ref 28.

VEGF<sub>165</sub> (10 ng/mL) 添加により、著明な細胞遊走が認められ (Fig. 7A, B)、HUVEC は、対照群と比較して約 2.7

倍、HRMEC は約 2 倍細胞の遊走が認められた (Fig. 7C, D)。HUVEC においてはカリジノゲナーゼの 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加により、また HRMEC においてはカリジノゲナーゼの 1 および 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加により VEGF<sub>165</sub> 誘発遊走に対して有意な抑制作用が認められた (Fig. 7C, D)。HUVEC および HRMEC 両細胞において、カリジノゲナーゼ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の単独添加は対照群と比較して明らかな差は認められなかった (Fig. 7C, D)。

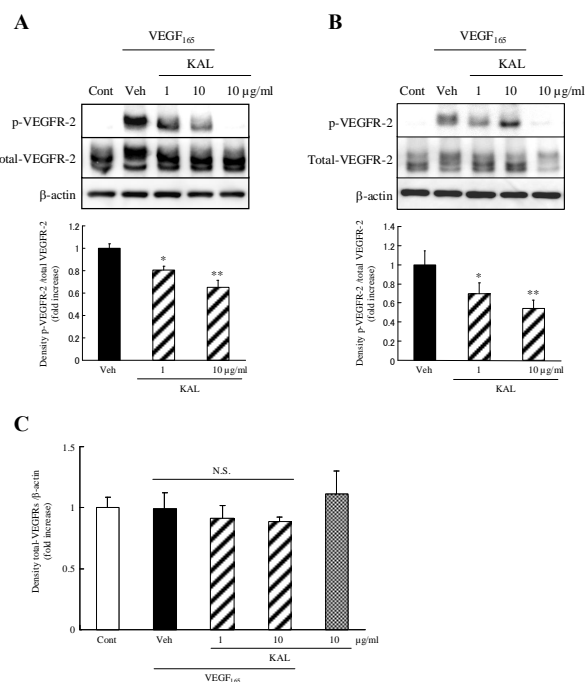


**Fig. 7 Effects of kallidinogenase on VEGF-induced migration of HUVECs and HRMECs.**

HUVECs (A, C) and HRMECs (B, D) migration was assessed using a wound-healing assay. Images of a wounded monolayer of HUVECs and HRMECs taken at times 0 and 24 h after treatment with VEGF (10 ng/ml) and various concentration of kallidinogenase. Wounded region is indicated by broken lines. Scale bar represents 500  $\mu\text{m}$  (A, B). Migration was estimated by measurement of cell numbers within the wounded region (C, D). Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3 or 4). ##, P < 0.01 versus Control (Student's *t*-test). \*, P < 0.05, \*\*, P < 0.01 versus Vehicle (Dunnett's multiple comparison test). Cont : Control. Veh : Vehicle. KAL; kallidinogenase. The results were cited from ref 28.

VEGF<sub>165</sub> 誘発 VEGFR-2 活性化に対するカリジノゲナーゼの作用 : VEGF<sub>165</sub> 誘発細胞増殖および遊走に対するカリジノゲナーゼの作用に関する分子メカニズムを検討するために、VEGF receptor (VEGFR)-2 のリン酸化に対する作用を検討した。HUVEC において VEGF<sub>165</sub> (10 ng/mL) 添加によってリン酸化された p-VEGFR-2 の割合が、カリジノゲナーゼ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  によってそれぞれ約 20% および約 35% 抑制された (Fig. 8A)。同様に HRMEC において VEGF<sub>165</sub> (10 ng/mL) 添加によってリン酸化され

た p-VEGFR-2 の割合が、カリジノゲナーゼ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  によってそれぞれ約 30% および約 45% 抑制された (Fig. 8B)。HUVEC および HRMEC 共にカリジノゲナーゼ単独添加は、VEGFR-2 のリン酸化に対して明らかな作用は示さなかった (Fig. 8A, B)。また、VEGFR-2 の発現に対して、カリジノゲナーゼは作用を示さなかった (Fig. 8C)。



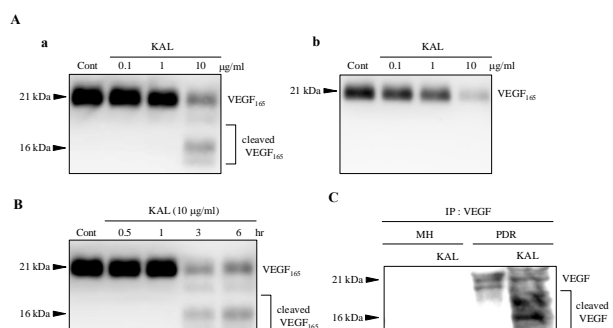
**Fig. 8 Kallidinogenase inhibited phosphorylation of VEGF receptor-2 induced by VEGF<sub>165</sub> in HUVECs and HRMECs.**

Effects of kallidinogenase (1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on VEGF<sub>165</sub> (10 ng/ml)-induced VEGF receptor-2 (VEGFR-2) phosphorylation in HUVECs (A) and HRMECs (B). Quantitative analysis of western blotting of total VEGFR. (C) The data of (B) were analyzed. There were no significant difference between vehicle and kallidinogenase treated group. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 5). Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 5 or 6). \*, P < 0.05, \*\*, P < 0.01 versus Vehicle (Dunnett's multiple comparison test). Cont : Control. Veh : Vehicle. KAL; kallidinogenase. N.S.; not significant. The results were cited from ref 28.

カリジノゲナーゼの VEGF<sub>165</sub> 切断作用 : カリジノゲナーゼの抗 VEGF 作用をより詳細に検討するために、カリジノゲナーゼの VEGF<sub>165</sub> に対する直接的な切断作用について検討した。カリジノゲナーゼの VEGF<sub>165</sub> に対する濃度依存的 (0.1 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) および時間依存的 (0 ~ 6 hr) な切断作用について検討した。一次抗体 [N 末端認識抗 VEGF 抗体および C 末端認識抗 VEGF 抗体] を用いて、ウェスタンブロッティングを行った。N 末端認識および C



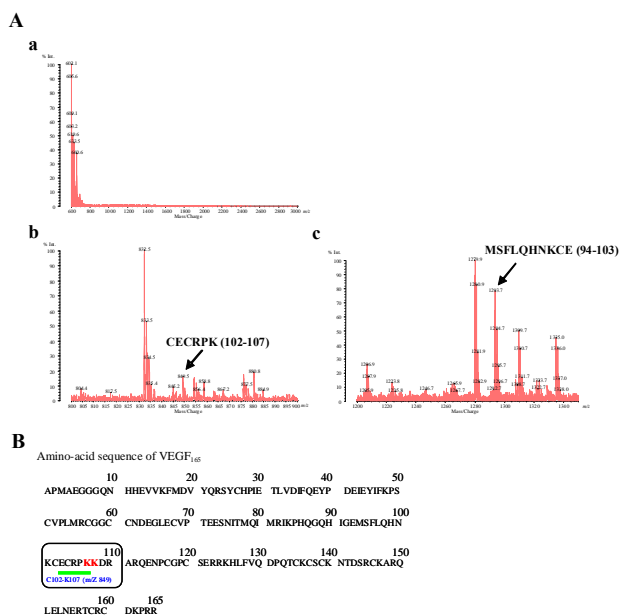
末端認識の2種類の抗 VEGF 抗体を用いて、カリジノゲナーゼの VEGF<sub>165</sub> に対する切断作用を確認した (Fig. 9A)。VEGF の N 末端認識抗体を用いた場合にカリジノゲナーゼによって切断された VEGF<sub>165</sub> が検出されたが (Fig. 9A-a)、一方、C 末端認識抗体を用いた場合、切断された VEGF<sub>165</sub> を検出できなかった (Fig. 9A-b)。また、カリジノゲナーゼの VEGF<sub>165</sub> に対する切断作用は、濃度および反応時間に依存することが明らかとなった (Fig. 9A, B)。MH 患者および PDR 患者硝子体において、切断された VEGF<sub>165</sub> は検出されなかった (Fig. 9C)。患者硝子体中に含まれるカリジノゲナーゼに対して、さらに終濃度が 10 μg/mL になるようにカリジノゲナーゼを硝子体サンプルに添加すると切断された VEGF<sub>165</sub> が検出された (Fig. 9C)。



**Fig. 9 Cleavage action on VEGF<sub>165</sub> by kallidinogenase.** (A) After incubating for 6 h with kallidinogenase (0.1-10 g/ml), the digestion products of VEGF<sub>165</sub> (10 ng/ml) were analyzed by immunoblotting using both anti- N-terminal VEGF antibody (a) and anti- C-terminal VEGF antibody (b). (B) Digested VEGF<sub>165</sub> (10 ng/ml) incubated with kallidinogenase (10 g/ml) for 0-6 h was analyzed by immunoblotting using an anti- N-terminal VEGF antibody. (C) To confirm the cleaved VEGF<sub>165</sub> by using human vitreous fluids, we demonstrated immunoprecipitation of VEGF<sub>165</sub> with vitreous fluids in MH and PDR patients. The results were cited from ref 28.

カリジノゲナーゼによって切断された VEGF<sub>165</sub> の切断部位の同定：カリジノゲナーゼ (10 μg/mL) と VEGF<sub>165</sub> を 37°C で 6 時間反応させ、SDS-PAGE を用いた電気泳動によって、切断された VEGF<sub>165</sub> の分離、検出を行った。Quick CBB-PLUS (Wako) を用いて、泳動を行ったゲルの Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色を行った。染色されたゲルにおいて切断された VEGF<sub>165</sub> のみを採集し、C 末端アミノ酸解析を試みたが、Lys-C および TMPP 処理後に DITC で精製し質量分析を行った結果、全くピークが検出されなかった (Fig. 10A-a)。TMPP 処理後に DITC で精製すると、末端がリジンのペプチドが全て吸着し回収されてしまうため、解析タンパク質の C 末端ペプチドが溶液中に残るはずである。しかし、質量分析による解析タンパク質の C 末端ペプチドのピークが全く検出されなかったことから、解析タンパク質の C 末端ペプチドも TMPP に吸着されて

しまったことが考えられる。したがって、カリジノゲナーゼによって切断された VEGF<sub>165</sub> の C 末端はリジンであることが示唆された。つづいて、Lys-C 処理直後に質量分析を行った結果、切断された VEGF<sub>165</sub> の C 末端ペプチドが CECRPK (iodoacetamide-CECRPK; m/Z 849) であることが明らかとなった (Fig. 10A-b)。同様に Glu-C 処理直後に質量分析を行った結果、切断された VEGF<sub>165</sub> の C 末端ペプチドが MSFLQHNKCE (iodoacetamide-MSFLQHNKCE; m/Z 1293) であった (Fig. 10A-c)。これらの結果は、カリジノゲナーゼによって切断された VEGF<sub>165</sub> の C 末端は VEGF<sub>165</sub> アミノ酸配列における 107 番目あるいは 108 番目のリジンであることを示唆している (Fig. 10B)。

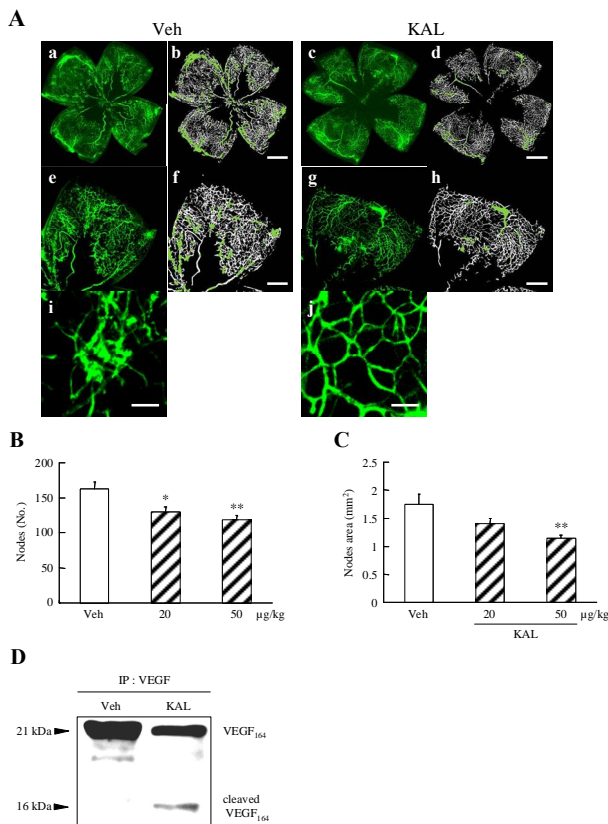


**Fig. 10 The identification of VEGF<sub>165</sub> cleaved by kallidinogenase.**

(A) MALDI-TOF mass spectra after TMPP-Ac modification of peptides digested by Lys-C (a). MS spectrometry results after the Lys-C digestion (b) and Glu-C (c) are indicated. The x-axis and y-axis represent m/z and % intensity, respectively, for all mass spectra. (E) The theoretical fragments on the C-terminal side were not detected beyond Lys 108. The C-terminal amino acid of VEGF<sub>165</sub> cleaved by kallidinogenase was Lys (Lys 107 and/or Lys 108). The results were cited from ref 28.

マウス OIR (高酸素負荷網膜血管新生) モデルにおけるカリジノゲナーゼの作用: 網膜中の異常血管新生に対するカリジノゲナーゼの末梢投与による作用を調べるために、マウス OIR (高酸素負荷網膜血管新生) モデルを用いて検討を行った。本モデルは、Smith らの方法に準じて作製した<sup>(29)</sup>。新生仔マウスは、生後 7 日目 (postnatal day 7: P7) から P12 まで親マウスと共に酸素制御装置によって高酸素 (75 ± 1% O<sub>2</sub>) 状態に制御されたケージ内で飼育し、P12 に新生仔マウスを通常大気条件下 (21% O<sub>2</sub>) に戻すことで

網膜中に異常な血管新生が出現するモデルである。通常大気条件下 (21% O<sub>2</sub>) にマウスを戻した直後から、カリジノゲナーゼ (20 または 50 µg/kg/day) を仔マウスに 1 日 1 回 5 日間皮下投与した。評価はフルオロセインと結合したデキストランを全身灌流することで網膜血管を可視化し、Metamorph 内の Angiogenesis Tube Formation module を用いて定量した。Angiogenesis Tube Formation module によって得られる node および node area をパラメーターとして、P17 における網膜異常血管について薬物非投与 (溶媒投与) 群とカリジノゲナーゼ投与群を比較した。Node は最大血管厚より太い塊数、node area は塊面積を示す。カリジノゲナーゼ投与は、網膜中の異常血管を減少させた (Fig. 11A-a, A-c, A-e, A-g, A-i, A-j)。解析ソフトを用いて作成した解析画像では異常血管の塊を緑色で標識している (Fig. 11A -b, A-d, A-f, A-h)。定量的に解析を行った結果、カリジノゲナーゼ (20 または 50 µg/kg) の皮下投与は、OIR モデルにおける異常血管の塊数 (nodes) を有意に抑制した (Fig. 11B)。また、異常血管の塊面積 (nodes area) は、カリジノゲナーゼ (50 µg/kg) の皮下投与により有意に抑制された (Fig. 11C)。さらに、カリジノゲナーゼ投与により、切断された VEGF<sub>164</sub> (ヒトの VEGF<sub>165</sub> と同等) が検出された (Fig. 11F)。

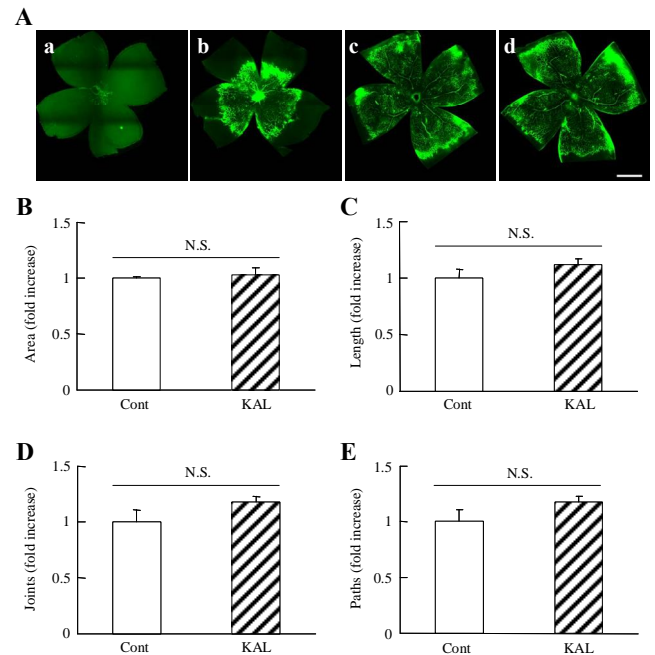


**Fig. 11 The inhibitory effect of kallidinogenase for retinal neovascularization in a murine OIR model.**

Shown are original images (A-a, c, e, g, i, and j), together with

the analyzed images (A-b, d, f, and h) obtained using the Angiogenesis Tube Formation module in Metamorph. Scale bars = 500 µm (A-b and d), 250 µm (A-f and h). Representative photographs show the abnormal blood vessels (A-i) of the vehicle group and the normal vessels (A-j) of tissue kallikrein treated group. Scale bars = 25 µm (A-i and j). Kallidinogenase significantly decreased both the number of nodes (B) and the node areas (C), which are indexes of pathological neovascularization, as calculated using the Angiogenesis Tube Formation module. (D) Immunoblot of VEGF<sub>164</sub> protein shows that tissue kallikrein treatment at 50 µg/kg reduced this expression with no change in the level of β-actin. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 versus vehicle (Dunnett's multiple comparison test). Cont; Control. Veh; Vehicle. KAL; Kallidinogenase. The results were cited from ref 28.

生理的血管新生に対するカリジノゲナーゼの作用：副作用の観点から、仔マウス P3 から P7 までの 5 日間カリジノゲナーゼを投与して、網膜における生理的血管新生に対するカリジノゲナーゼの作用について検討した。マウスは生後すぐから P8 にかけて、視神経乳頭から網膜の外側に向かって、生理的血管新生を生じ、網膜全域に栄養する網目状の毛細血管が形成される (Fig. 12A-a, A-b, A-c)。血管の面積 (area)、長さ (length)、分岐点数 (branch points)、枝数 (segments) の全ての評価項目において、対照群と比較してカリジノゲナーゼ投与群に明らかな差は認められなかった (Fig. 12B-E)。



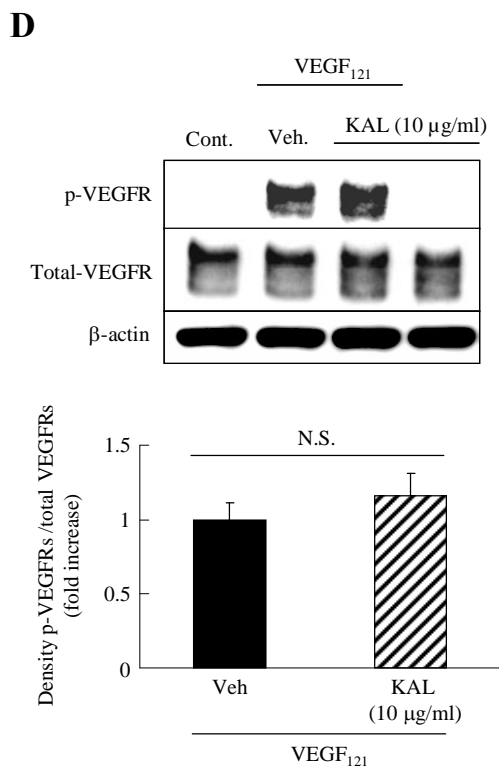
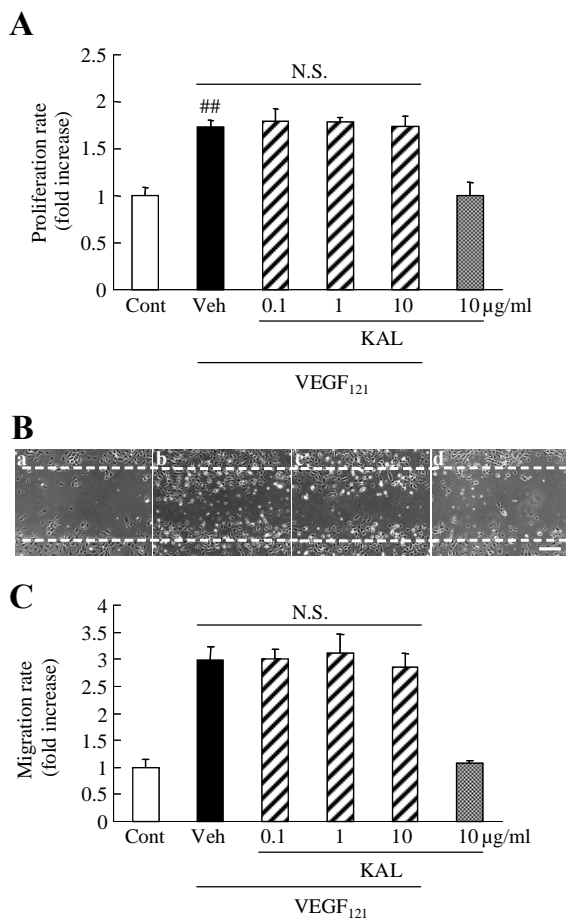
**Fig. 12 The Effect of kallidinogenase on the physiological angiogenesis of mouse.**

Representative images show the retinal flat-mount at P0 (A-a) and at P4 (A-b). Shown are retinal blood vessels of the control group (A-c) and of kallidinogenase treated group (A-d) at P8.



Scale bar = 500  $\mu$ m (A-d). Quantitative analysis of retinal blood vessels was performed (using an angiogenesis imaging analyzer), measurements being made of tube area (B), length (C), joints (D), and paths (E). Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 5). Cont; Control. KAL; Kallidinogenase. N.S.; not significant. The results were cited from ref 28.

**VEGF<sub>121</sub>に対するカリジノゲナーゼの作用:** 生理的血管新生に深く関与している VEGF<sub>121</sub> に対するカリジノゲナーゼの作用について検討した。VEGF<sub>121</sub> (10 ng/mL) 添加により、対照群と比較して HRMEC は約 1.7 倍細胞が増加した。カリジノゲナーゼ (0.1 ~ 10  $\mu$ g/mL) は VEGF<sub>121</sub> 誘発 HRMEC の増殖に対して作用を示さなかった (Fig. 13A)。VEGF<sub>121</sub> (10 ng/mL) 添加により、顕著な細胞遊走が認められ (Fig. 13B)、対照群と比較して約 3.0 倍の遊走が認められた (Fig. 13C)。しかし、増殖試験と同様に、カリジノゲナーゼ (0.1 ~ 10  $\mu$ g/mL) は VEGF<sub>121</sub> 誘発 HRMEC の遊走に対して作用を示さなかった (Fig. 13C)。HRMEC において、VEGF<sub>165</sub> (10 ng/mL) 添加によって VEGFR のリン酸化が認められるが、カリジノゲナーゼ (10  $\mu$ g/mL) 添加による変化は認められなかった (Fig. 13D)。



**Fig. 13 The effect of kallidinogenase on VEGF<sub>121</sub>-induced proliferation, migration, and the phosphorylation of VEGFR-2.**

HRMECs (A) were cultured in a 96-well plate, and proliferation rates induced by VEGF<sub>121</sub> were measured by WST-8 assay. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). Images of wounded monolayer of HRMECs (B) taken at 24 h after treatment with VEGF<sub>121</sub> (10 ng/ml) with or without tissue kallikrein. (C) Migration was estimated by measurement of cell numbers within the wounded region. Scale bar = 500  $\mu$ m. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 3). Kallidinogenase (10  $\mu$ g/ml) did not inhibit VEGFR-2 phosphorylation in HRMECs (D) induced by VEGF<sub>121</sub> (10 ng/ml). Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 5). Cont; Control. Veh; Vehicle. KAL; Kallidinogenase. N.S.; not significant. The results were cited from ref 28.

#### 4. 考 察

カリジノゲナーゼは既に網脈絡膜循環改善薬として臨床応用されている医薬品である。本章では、カリジノゲナーゼの網膜血管新生抑制作用およびその作用機序の検討を行った。患者硝子体液を用いて、カリジノゲナーゼと VEGF が正の相関を示し、かつ PDR 患者特異的にカリジノゲナーゼおよび VEGF が上昇していることが明らかになった。また、*in vitro* モデルにおいて、カリジノゲナーゼは VEGF<sub>165</sub> 切断作用を介して VEGF<sub>165</sub> 誘発管腔形成、内皮細胞の増殖および遊走を抑制した。さらに、*in vivo* モデルにおいて、カリジノゲナーゼは末梢投与により、正

常血管には影響を及ぼさず、網膜における異常血管を減少させた。

生体内に存在するカリジノゲナーゼの網膜血管疾患に対する関与を調べるために、PDR (増殖糖尿病網膜症)、MH (黄斑円孔) および ERM (黄斑上膜) 患者硝子体液中に含まれるカリジノゲナーゼおよび VEGF の濃度を測定した。PDR 患者特異的にカリジノゲナーゼの顕著な増加が認められただけでなく、カリジノゲナーゼと VEGF が正の相関関係を有することを明らかにした。ホメオスタシスの観点から、カリジノゲナーゼの増加は網膜血管新生を抑制する可能性が示唆された。

実際に、VEGF<sub>165</sub>によって惹起された *in vitro* 管腔形成、内皮細胞の増殖および遊走に対して、カリジノゲナーゼは抑制作用を示した。VEGFR-2 のリン酸化を抑制することが明らかになったが、カリジノゲナーゼは VEGFR-2 自体に影響を及ぼしていないことから、著者はカリジノゲナーゼが VEGF<sub>165</sub> に対して直接的に作用していると推察した。カリジノゲナーゼは、キニノーゲンのメチオニン-リジンおよびアルギニン-セリンを切断することが知られているが<sup>(30)</sup>、本研究結果から VEGF<sub>165</sub> の 107 番目あるいは 108 番目のリジンで切断することが明らかになった。VEGF<sub>165</sub> のヘパリン結合部位は 111 番目から 165 番目の C 末端側であることが報告されている<sup>(31)</sup>。カリジノゲナーゼによって切断された VEGF<sub>165</sub> はヘパリン結合部位を持たないペプチドになっていることから、VEGFR-2 に対する生物活性が著明に減少していることが考えられる。カリジノゲナーゼの VEGF<sub>165</sub> に対する切断作用は 0.1 ~ 10 μg/mL において濃度依存的に観察され、*in vitro* における管腔形成、細胞増殖および遊走抑制作用に対する抑制作用も 0.1 ~ 10 μg/mL の間で認められることから、カリジノゲナーゼの VEGF<sub>165</sub> に対する切断作用と抗血管新生作用を示すそれぞれの濃度が一致する。PDR 患者硝子体液中において、カリジノゲナーゼは約 100 ng/mL 含有しているが、著者らの検討結果から推察すると硝子体中に存在する濃度では抗血管新生作用は弱く、網膜異常血管新生に対して作用を示さないと考えられる。すなわち、PDR 患者に対してカリジノゲナーゼが抗血管新生作用の効果を発揮するためには、ホメオスタシスによる上昇だけでは不十分であり、網膜血管新生抑制作用を示すのに十分な濃度のカリジノゲナーゼが必要である。実際に、PDR 患者硝子体サンプルにカリジノゲナーゼを終濃度 10 μg/mL になるように添加すると、ヒト硝子体液中における切断された VEGF が検出され、この結果は *in vitro* VEGF<sub>165</sub> 切断試験結果と一致する。

OIR モデルに対して、カリジノゲナーゼは末梢投与により網膜血管新生を抑制した。また、*in vitro* 試験と同様に、カリジノゲナーゼはマウス OIR モデルにおいて眼内で上昇する VEGF<sub>164</sub> を切断することが明らかになった。

また、近年、カリジノゲナーゼは nitric oxide (NO) の産生増加を介して VEGF<sub>164</sub> の発現を減少させることが報告された<sup>(21)</sup>。以上、カリジノゲナーゼは、眼内の VEGF<sub>164</sub> 切断作用および NO 増加による VEGF の減少作用の“dual action”によって、網膜血管新生を抑制することが示唆された。マウスの網膜血管は生まれてすぐに伸長し始め、P8 頃には網膜全域に網目構造の血管ネットワークが出来上がる<sup>(32)</sup>。マウス網膜における生理的な血管伸長期間において、カリジノゲナーゼを投与したが溶媒投与群と比べ全ての評価項目 (血管面積、長さ、分岐点および枝数) において違いはなかった。これは、カリジノゲナーゼの末梢投与が網膜における生理的な血管新生に対して影響を及ぼさないことを強く示唆している。網膜における生理的な血管の発達に VEGF<sub>121</sub> (マウスでは VEGF<sub>120</sub>) が必要とされ、一方 VEGF<sub>165</sub> (マウスでは VEGF<sub>164</sub>) は網膜における病的な血管新生への関与が示唆されている<sup>(26, 27)</sup>。カリジノゲナーゼは、VEGF<sub>121</sub> 誘発内皮細胞の増殖および遊走に対して抑制作用を示さず、VEGF<sub>121</sub> の生理活性においても影響を及ぼさなかった。VEGF<sub>121</sub> において VEGF<sub>165</sub> において認められたカリジノゲナーゼの切断部位は存在するが、カリジノゲナーゼ添加によって VEGF<sub>121</sub> の生理活性が抑制されないことから、カリジノゲナーゼは VEGF<sub>121</sub> に対して切断活性を示さないと考えられる。VEGF<sub>165</sub> と VEGF<sub>121</sub> のアミノ酸配列は 111 番目以降が異なることから、カリジノゲナーゼの切断認識部位が VEGF<sub>165</sub> の 111 番目以降に存在するのではないかと推察される。これら VEGF 切断活性の有無は、ホメオスタシスの観点から、PDR 患者硝子体内において病的血管新生を抑制するためにカリジノゲナーゼは上昇してくる可能性を支持する結果といえる。

## 5. 結 論

本稿の研究結果から、カリジノゲナーゼは現在使用されている網膜血管新生抑制薬とは異なる作用機序を有し、かつ末梢投与により効果を示すことが明らかになった。既存薬とは異なる作用機序を有することから、臨床現場における治療薬の選択肢が増え、さらに既存薬との併用の可能性が期待できる。さらに、末梢投与による治療が可能になることによって、硝子体内投与による眼内炎などの副作用誘発あるいはコンプライアンスの低下等の問題点を解消できる可能性が考えられる。さらに、カリジノゲナーゼはこれまで 20 年以上服用されてきた医薬品であり、正常血管に対する作用を含めて目立った副作用の報告がなく、安全な医薬品といえることから、臨床応用に対するリスクが少ない。

以上、カリジノゲナーゼは新規作用機序を有し、末梢投与によって効果を示すことが明らかになり、糖尿病網膜

症や未熟児網膜症などの網膜血管新生疾患に対して有望な新規薬剤になり得る可能性が示唆された。

## 6. 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を賜り、また御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授原英彰先生に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、終始御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授嶋澤雅光先生並びに同助教鶴間一寛先生に深謝致します。

また、本研究の遂行にあたり、実験材料の御提供と御助言を賜りました大阪医科大学眼科学教室教授池田恒彦先生並びに株式会社三和化学研究所加藤憲明博士、市川幸宏氏、守本 亘孝氏並びに安田美花氏に深謝致します。

## 7. 参考文献

1. J. Folkman, Y. Shing, *J Biol Chem***267**, 10931 (Jun 5, 1992).
2. H. Yamashita *et al.*, *Comp Biochem Physiol Physiol***109**, 101 (Sep, 1994).
3. C. Y. Hooper, R. H. Guymer, *Clin Experiment Ophthalmol***31**, 376 (Oct, 2003).
4. W. M. Lyle, A. P. Cullen, W. N. Charman, *Optom Vis Sci***70**, 136 (Feb, 1993).
5. M. A. Mainster, *Semin Ophthalmol***14**, 200 (Dec, 1999).
6. J. D. Reynolds, *Paediatr Drugs***3**, 263 (2001).
7. A. P. Adamis *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun***193**, 631 (Jun 15, 1993).
8. D. W. Leung, G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel, N. Ferrara, *Science***246**, 1306 (Dec 8, 1989).
9. J. Pe'er *et al.*, *Lab Invest***72**, 638 (Jun, 1995).
10. D. M. Brown *et al.*, *N Engl J Med***355**, 1432 (Oct 5, 2006).
11. E. S. Gragoudas, A. P. Adamis, E. T. Cunningham, Jr., M. Feinsod, D. R. Guyer, *N Engl J Med***351**, 2805 (Dec 30, 2004).
12. P. J. Rosenfeld *et al.*, *N Engl J Med***355**, 1419 (Oct 5, 2006).
13. T. von Hanno, B. Kinge, K. Fossen, *Acta Ophthalmol***88**, 263 (Mar, 2010).
14. U. P. D. S. Group., *Bmj***317**, 703 (Sep 12, 1998).
15. N. Chaturvedi *et al.*, *Lancet***351**, 28 (Jan 3, 1998).
16. A. A. Franken *et al.*, *J Hypertens Suppl***6**, S461 (Dec, 1988).
17. H. Funatsu *et al.*, *Am J Ophthalmol***133**, 537 (Apr, 2002).
18. H. Funatsu, H. Yamashita, Y. Nakanishi, S. Hori, *Br J Ophthalmol***86**, 311 (Mar, 2002).
19. H. C. Hatcher, J. X. Ma, J. Chao, L. Chao, A. Ottlecz, *Invest Ophthalmol Vis Sci***38**, 658 (Mar, 1997).
20. J. X. Ma *et al.*, *Curr Eye Res***15**, 1117 (Nov, 1996).
21. N. Kato *et al.*, *Eur J Pharmacol***606**, 187 (Mar 15, 2009).
22. N. Ferrara, W. J. Henzel, *Biochem Biophys Res Commun***161**, 851 (Jun 15, 1989).

23. S. Soker, S. Gollamudi-Payne, H. Fidder, H. Charmahelli, M. Klagsbrun, *J Biol Chem***272**, 31582 (Dec 12, 1997).
24. S. Soker, H. Q. Miao, M. Nomi, S. Takashima, M. Klagsbrun, *J Cell Biochem***85**, 357 (2002).
25. S. Soker, S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld, M. Klagsbrun, *Cell***92**, 735 (Mar 20, 1998).
26. S. Ishida *et al.*, *J Exp Med***198**, 483 (Aug 4, 2003).
27. I. Stalmans *et al.*, *J Clin Invest***109**, 327 (Feb, 2002).
28. S. Nakamura *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol***31**, 1041 (May, 2011).
29. L. E. Smith *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci***35**, 101 (Jan, 1994).
30. E. Del Nery, J. R. Chagas, M. A. Juliano, E. S. Prado, L. Juliano, *Biochem J***312** ( Pt 1), 233 (Nov 15, 1995).
31. B. A. Keyt *et al.*, *J Biol Chem***271**, 7788 (Mar 29, 1996).
32. M. Fruttiger, *Invest Ophthalmol Vis Sci***43**, 522 (Feb, 2002).

## 8. 特記事項

本総説は、岐阜薬科大学博士論文（甲 143 号）の内容を中心にまとめたものである。