Mediators of Angiogenesis: The Role of Cellular Adhesion Molecules*

血管造成の仲介者：細胞性接着分子の役割

Szekanecz, Zoltan^{1,2}; Halloran, Margaret M.¹; Haskell, Catherine J.¹;
Shah, Manisha R.¹; Polverini, Peter J.³; and Koch, Alisa E.^{1,4}

¹Department of Medicine, Section of Arthritis and Connective Tissue Diseases, Northwestern University Medical School, Chicago, IL 60611, USA

²Third Department of Medicine, University Medical School, Debrecen, H-4004, Hungary

³The Laboratory of Molecular Pathogenesis, University of Michigan Dental School, Ann Arbor, MI 48109, USA

⁴The Veteran's Administration, Lakeside Medical Center, Chicago, IL 60611, USA

FAX: 1-312-503-0994, E-mail:ae-koch@nwu.edu

Key Words : angiogenesis, angiogenic factors, cellular adhesion molecules, extracellular matrix, rheumatoid arthritis

Abstract

Angiogenesis, the production of new blood vessels, plays an important role in a number of physiological and pathological processes, such as development, tissue repair, inflammation, atherosclerosis and tumor progression. A number of mediators including cytokines, growth factors and others, have been implicated in angiogenesis. During tissue neovascularization, endothelial cells (EC) adhere to extracellular matrix (ECM) components and other ECs, which is an essential process in angiogenesis. Thus, in addition to soluble mediators mentioned above, ECM macromolecules and cellular adhesion molecules (CAMs) may also act as angiogenic factors. Among CAMs, E-selectin, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, CD31, and some integrins may facilitate capillary formation both *in vivo* and *in vitro*. CAMs, as well as other angiogenic mediators may play a role in the pathogenesis of "angiogenic diseases". Targeting of any of these factors may have potential therapeutic relevance in such disorders.

要約

新しい血管を作り出す血管造成は発生、組織修復、炎症、動脈硬化症や腫瘍の進展など数多くの生理的、病理的過程で重要な役割を果たしている。サイトカイン、成長因子、その他の多くのメディエーターが血管造成に関与している。組織の血管新生の間、内皮細胞(endothelial cells、これ以降ECと呼ぶ)は細胞外マトリックス(ECM)成分や他のECsに接着するが、これは血管造成には必須の過程である。上に述べた可溶性のメディエーター以外にもECM巨大分子と細胞接着分子(CAMs)もまた血管造成因子として働く。CAMsの中ではE-セレクトリン、脈管細胞接着分子(VCAM)-1、CD-31、やインテグリンが*in vivo*でも*in vitro*でも毛細管形成を促進する。CAMsや他の血管造成メディエーターは「血管造成病」の病因として働いている。このような因子のどれかを標的とすることがこれらの病気に適切で、かつ強力な治療となるかも知れない。

A. Introduction

Angiogenesis plays an important role in reproduction, development and tissue repair. In addition, neovascularization is involved in a number of pathological conditions, such as tumor growth and metastasis, inflammatory conditions, and atherosclerosis. "Angiogenic diseases" include rheumatoid arthritis (RA), scleroderma, psoriasis, atherosclerosis and aortic aneurysm formation, diabetic angiopathy, vascular tumors, a number of eye disorders and others. There have been several attempts to control angiogenesis and thus influence the progres-

A. はじめに

血管造成は再生、発生そして組織修復において重要な働きをしている。その上血管新生は腫瘍の成長や転移、炎症状態、動脈硬化のような多くの病的な状態に関係している。「血管造成病」とは、リュウマチ(RA)、強皮症、乾癬、アテローム性動脈硬化症、大動脈瘤の形成、糖尿病性血管病、血管腫瘍、多くの眼病、その他を指す。血管造成をコントロールしてこれらの

*Supported by the Hungarian National Scientific Research Fund No. T 013239 (Z.S.), the Medical Research Council Fund No. 156/93 (Z.S.), NIH grants AR-30692 and AR-41492 (A.E.K.), funds from the Veterans' Administration Research Service (A.E.K.), and the Dr. Ralph and Marion Falk Challenge Prize of the Arthritis Foundation, Illinois Chapter (A.E.K.).

Corresponding author : Alisa E. Koch, M.D., Department of Medicine, Division of Arthritis and Connective Tissue Diseases, Northwestern University Medical School, Ward Building, 3-315, 303 East Chicago Avenue, Chicago, IL 60611, USA

sion of these diseases (1-15).

New vessels are generated following a programme of several distinct steps. First, ECs are activated by different angiogenic stimuli. In response, ECs secrete proteases, which degrade the underlying basement membrane and ECM. The linear emigration of ECs results in the formation of primary capillary sprouts. ECs then further proliferate, migrate and synthesize new basement membrane. This is followed by the lumenation of the sprout. Two sprouts then link to form capillary loops. Finally, the emigration of ECs out of these sprouts results in the development of second and further generation of capillary sprouts (1, 7).

Neovascularization may be induced by a number of mediators, including cytokines, growth factors, angiogenin or ECM components. Most of these factors have been characterized and their role in angiogenesis has been extensively discussed (1-7, 13, 16, 17). EC adhesion to other cells or to ECM components, mediated by CAMs, is also important during the neovascularization process (18-33). We have recently reported the angiogenic effects of certain soluble CAMs (34). In addition, CAMs may also interact with other angiogenic mediators during neovascularization (35-40).

CAMs include integrins, the immunoglobulin superfamily, selectins, cadherins, and other molecules (35-38, 41). The role of CAMs in development, wound healing, blood coagulation, tumor progression and inflammation has been elucidated (9, 35-38). Regarding angiogenesis, high expression of some CAMs on ECs has been described in "angiogenic diseases", such as RA (42-50), atherosclerosis (8) and tumors (9-11, 51). In addition, as some angiogenic factors influence EC CAM expression, interactions between CAMs and other mediators may also play a role in blood vessel growth (35-40).

In this review, we summarize our current understanding of angiogenesis and many of its mediators, including growth factors, cytokines, ECM components and others. The involvement of CAMs in this process will be more extensively discussed, also highlighting our recently published data on soluble CAM-induced angiogenesis. A short overview will also be given on the practical aspects of angiogenesis research.

B. Models of Angiogenesis

There are several models for angiogenesis. *In vitro* systems include EC cultures, also grown on or within ECM-containing substrata (2, 19, 52-56), vascular tissue cultures (40, 57), and EC chemotaxis assays (34, 40, 56-58). Several aspects of angiogenesis, including EC migration and proliferation, cytokine and protease production, basal lamina synthesis and capillary formation can be studied (13). *In vivo* angiogenesis models include the rat, mouse, rabbit or guinea pig corneal micropocket (2, 4, 13, 34, 56, 58-60), the chick embryo chorio-allantoic membrane (2, 13, 56, 61), the hamster cheek pouch

病気の進行を左右するいくつかの試みがなされている(1-15)。

新しい血管は幾つかの段階を含むプログラムに従って作られる。まず最初にECsが数種の異なる血管造成刺激によって活性化される。活性化によりECsはプロテアーゼを分泌し、血管を裏打ちしている基底膜とECMを分解する。ECsの直線的な移住によって最初の毛細管の芽が形成される。ECsはそれからさらに増殖し移動し、新しい基底膜を合成する。この過程には、芽のところで管腔形成が続く。二つの芽がつながって毛細管のループが作られ、最後にこれらの芽からECsが移住して2度目の伸展が起こり、さらに毛細管の芽が作られて行く(1, 7)。

血管新生はサイトカイン、成長因子、アンジオジェニンやECM成分など多くのメディエーターによって誘導される。これらのファクターは性質が調べられ血管造成における役割が非常によく議論されている(1-7, 13, 16, 17)。ECが他の細胞やECM成分と接着する過程はCAMsによって仲介されるが、これは血管新生過程で重要である(18-33)。我々は最近ある可溶性のCAMsの血管造成効果を報告した(34)。さらにCAMsは血管新生の際、別の血管造成メディエーターと相互作用もするようである(35-40)。

CAMsには、インテグリン、免疫グロブリンスーパーファミリー、セレクチン、カドヘリンなどがある(35-38, 41)。発生、創傷治癒、血液凝固、腫瘍の進行や炎症におけるCAMsの役割は明らかにされている(9, 35-38)。血管造成について見ればECs上のCAMsの高い発現が、RA(42-50)、アテローム性動脈硬化症(8)、腫瘍(9-11, 51)のような「血管造成病」で報告されている。さらに数種の血管造成因子がはECのCAMの発現に影響を与えるので、CAMsと他のメディエーターの間の相互作用は血管の伸長にも役割を果たしているようである(35-40)。

この総説では、血管造成についての最近の知見と、成長因子、サイトカイン、ECM成分その他多くの血管造成メディエーターについて分かっていることをまとめる。この過程におけるCAMsの関与について特に詳しく議論するつもりである。また我々の可溶性CAM-誘導血管造成についての公表された最近のデータについても詳しく取り上げよう。血管造成研究の実際的情勢についても短く触れる。

B. 血管造成のモデル

血管造成についていくつかのモデルがある。*in vitro*の系としてはECの培養やECM含有基質上かあるいはECM内でのECの成育(2, 19, 52-56)、血管組織の培養(40, 57)、ECの走化性測定(34, 40, 56-58)などがある。ECの移動、増殖、サイトカインとプロテアーゼの産生、基底層の合成や毛細管形成などの血管造成のいくつかの側面が研究されている(13)。*in vivo*の血管造成のモデルとしては、ラット、マウス、ラビット、またはモルモットを用いての角膜ミクロポケット法(2, 4, 13, 34, 56, 58-60)、ニワトリ胎児の尿漿膜(2, 13, 56, 61)、ハムスターの

Table I. Some mediators of angiogenesis¹.

1. Growth factors	bFGF aFGF/ECGF PD-ECGF VEGF/VPF EGF	TGF- α PDGF IGF-1 TGF- β^2	(1-6, 13, 14, 64, 65, 67)
2. Cytokines	TNF- α^2 IL-1 α , β^2 G-CSF	IL-6 ² IL-8 GM-CSF	(1-6, 13, 14, 57, 58, 62, 69, 73-75)
3. ECM macromolecules	Type I collagen Fibronectin Heparin Heparan sulfate	Tenascin Laminin Angiogenin	(1-3, 18-20, 52, 53, 56, 61, 85, 97, 98, 100)
4. Cell adhesion molecules (CAM)	1 integrins 3 integrins CD31 sLx	E-selectin VCAM-1 CD34 MUC-18	(18-34, 104)
5. Other mediators	Angiogenin Angiotropin Substance P HAF Copper Lipids Fibrinogen etc.	PAF Histamine Erythropoetin Nicotinamide Adenosine Lactic acid ACE	(1-7, 13, 14, 17, 76-78)

¹ See text for abbreviations.

² Exhibits variable stimulatory and inhibitory activity (see text).

(13), the anterior eye chamber (13), the mesenteric (13), the implanted matrix (2, 13) assays and sponge models (62).

C. Regulation of the Angiogenic Process

Angiogenesis may be induced by a number of mediators, but probably independent of the source of the stimuli. Angiogenic factors activate ECs, which, in turn, will secrete proteolytic enzymes, such as metalloproteinases (MMP) including collagenase (MMP-1) and gelatinase (MMP-2), as well as plasminogen activators (PA). The degradation of basement membrane results in the migration and sprouting of ECs, followed by the lumination of the growing sprout. Two sprouts form a capillary loop, and ECs can be released from this loop to form further sprouts, as described above (1-3, 13, 14, 52).

Angiogenesis is well-regulated by a number of stimulatory and inhibitory factors. Angiogenic mediators include growth factors, cytokines, and other molecules (Table I). ECM components and CAMs have also been recently implicated in neovascularization. Most of these factors are produced by ECs and macrophages, and their role in neovascularization has been extensively discussed in a number of reviews (1-7, 13, 14). A

チークポーチ(13)、前眼房(13)、腸間膜(13)、移植されたマトリックス検定(2, 13)とスポンジモデルなどである。

C. 血管造成過程の調節

血管造成は数多くの、しかし刺激の源は多分別々の、メディエーターによって誘導される。血管造成因子がECsを活性化すると、ECsはコラゲナーゼ(MMP-1)やゼラチナーゼ(MMP-2)などのマトロプロテアーゼ(MMP)やプラスミノゲンアクチベーター(PA)のようなタンパク質分解酵素を分泌する。基底膜を分解するとECsは移動し血管から芽を出すようになる。続いてその芽が育って管腔が作られる。二つの芽が毛細管ループを作りECsはこのループから離れ、先に述べたように次の芽を作ることが出来るようになる(1-3, 13, 14, 52)。

血管造成は沢山の活性化因子と阻害因子によって厳密に調節されている。血管造成メディエーターとしては、成長因子、サイトカインなどが挙げられる(表 I)。ECM成分とCAMsもまた、最近では血管新生に働いていることが分かった。これらの因子の大部分はECsとマクロファージが産生し、その血管新生における働きは多くの総説で非常に良く議論されている(1-7, 13, 14)。阻害成長因子、サイトカイン、ステロイド、抗生物質

Table II. Some inhibitors of angiogenesis¹.

1. Growth factors	TGF- β^2		(1-6, 12, 14)
2. Cytokines	IL-1 α^2 IL-1 β^2 IL-6 ² IL-12	IFN- α IFN- γ IP-10 LIF	(1, 3-6, 12-14, 79-82)
3. Antibodies	Anti-bFGF, -VEGF		(12, 15, 71)
4. Steroids, antiestrogens	MOPA	Tamoxifen	(5, 12, 14, 89)
5. Heparin-binding factors	Protamine Thrombospondin-1 MECIF bFGF, VEGF receptor antagonists	PF4 Suramin MD-ECI	(5, 12-15, 35, 41, 55, 72, 83-88)
6. Protease inhibitors	TIMP-1 TIMP-2	PAI-1 PAI-2	(12-16, 90)
7. Antibiotics	Fumagillin Bleomycin Minocycline	Eponemycin Rapamycin etc.	(12, 91)
8. Antirheumatic drugs	Gold salts Chloroquine D-penicillamine	Dexamethasone Methotrexate Sulfasalazine	(1-5, 12-15)
9. Tissue-derived inhibitors			(12, 15)
10. Cytoskeleton disrupting agents	Taxol Vinblastine	Colchicine Nocodazole	(12, 15)
11. Other compounds	Activin A Retinoids Oxazolone Cholera toxin etc.	SPARC Angiostatin Chitins Prolactin	(1, 3, 5, 7, 12-16)

¹ See text for abbreviations.

² Exhibits variable stimulatory and inhibitory activity (see text).

number of compounds, including inhibitory growth factors, cytokines, steroids, antibiotics and others interfere with angiogenesis (1-6, 12-15) (Table II). As discussed later, these angiostatic factors can potentially be used in the therapy of "angiogenic diseases".

D. Mediators of Angiogenesis

D-1. Growth Factors

A distinct group of angiogenic mediators are the heparin binding growth factors, which include basic fibroblast growth factor (bFGF), acidic FGF (aFGF)/endothelial cell growth factor (ECGF) and related mediators. These substances are bound to heparin and heparan sulfate in the ECM, which prevents their degradation by proteolytic enzymes. In addition, heparin stimulates the angiogenic activity of these factors, their release from the ECM, and it also facilitates their interaction with ECs (13).

その他多くの化合物が血管造成を妨害する(1-6、12-15)(表 II)。後で取り上げるように、これらの血管造成阻害因子は「血管造成病」の治療に用いることが出来るだろう。

D. 血管造成メディエーター

D-1. 成長因子

血管造成メディエーターのはっきりした一グループはヘパリン結合成長因子である。これには塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)、酸性FGF(aFGF)/内皮細胞成長因子(ECGF)などのメディエーターが含まれる。これらの物質はECMのヘパリンとヘパラン硫酸と結合し、それによってタンパク質分解酵素による分解が防がれている。さらにヘパリンはこれらの因子の血管造成活性、ECMからの放出を刺激し、ECsとの相互作用を促進する(13)。血管新生の間、これら成長因子はECsから分泌されるヘ

During neovascularization these growth factors are mobilized by heparanase and plasmin secreted by ECs (1-7, 13).

bFGF and aFGF/ECGF share a 55% sequence homology. However, aFGF and its variants, isolated from the retina and the eye, are anionic polypeptides, and they are also termed as class I heparin binding factors. In contrast, bFGF and related polypeptides, isolated from the pituitary gland, brain, hypothalamus, kidney, macrophages, placenta and tumor cells, are highly cationic (class II heparin binding factors). Both types of growth factors are produced by macrophages and ECs and deposited in the ECM. bFGF, a classical angiogenic factor, promotes almost every step of angiogenesis *in vitro*. Both bFGF and aFGF/ECGF are angiogenic in *in vivo* bioassays (5, 6). Anti-bFGF antibodies inhibit neovascularization (5). FGFs/ECGFs share several receptors (5). The transmembrane signaling pathways for these growth factors involve protein kinase C activation, *c-fos* mRNA expression and other mechanisms (6). ECGFs have been isolated from a number of tissues. ECGF is a precursor of aFGF and thus acts similarly to aFGF during angiogenesis (1-6, 13, 14).

Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF), which also binds to heparin, is highly specific mitogen for ECs showing about 20% structural homology to platelet-derived growth factor (PDGF). However, while PDGF seems to be an indirect angiogenic factor, VEGF/VPF is a direct mediator: it induces neovascularization *in vivo*, stimulates EC proliferation *in vitro* and enhances vascular permeability (1, 3, 5, 6, 13, 14). We have reported data on the role of VEGF in EC migration, proliferation and chemotaxis associated with RA (63).

Other angiogenic growth factors, which do not bind to heparin, include platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF)- α , and hepatocyte growth factor (HGF), which are mitogens for ECs (1, 3-6, 13, 63-66). These growth factors may stimulate angiogenesis both *in vitro* and *in vivo* as shown in several known experimental systems. In addition, PDGF, insulin-like growth factor (IGF)-1 and TGF- β may also play a role in neovascularization, although their direct angiogenic effect is not fully clear (1-6, 12, 14, 65).

The structure of PD-ECGF is similar to that of FGFs (5). PD-ECGF is a specific EC mitogen, which stimulates EC chemotaxis *in vitro*, and it is also angiogenic *in vivo* assays (3, 5, 13).

EGF and TGF- α share 30-40% structural homology, and they both bind to the EGF receptor. Both growth factors stimulate EC proliferation *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. However, the angiogenic potential of TGF- α *in vivo* is an order of magnitude greater than that of EGF. Both mediators are less effective, than heparin-binding growth factors or angiogenin (1-6, 14).

パラナーゼとプロテアーゼによって動けるようになる(1-7, 13)。

bFGF と aFGF/ECGF では配列が55% 相同である。しかし、aFGF と眼の網膜から取られているその変異体は酸性ポリペプチドで、クラスIヘパリン結合因子と名付けられている。これに対し、bFGF と下垂体、脳、視床下部、腎臓、マクロファージ、胎盤、腫瘍細胞から単離された関連ポリペプチドは塩基性が強い(クラスIIヘパリン結合因子)。どちらの成長因子もマクロファージとECsで産生されECMに沈着している。古典的な血管造成因子であるbFGFは*in vitro*で血管造成のほとんどすべての過程を促進させる。bFGFもaFGF/ECGFも、*in vivo*での解析で血管造成活性を示している(5、6)。抗bFGF抗体は血管新生を阻害する(5)。FGFs/ECGFsは数種の共通の受容体を持つ(5)。これらの成長因子の膜貫通シグナルの経路には、プロテインキナーゼCの活性化、*c-fos* mRNA発現、その他の機構が関係している(6)。ECGFsは多くの組織から単離されている。ECGFはaFGFの前駆体であり、それ故に血管造成の間aFGFに似た働きをする(1-6、13、14)。

ヘパリンに同じように結合する血管内皮成長因子/血管浸透因子(VEGF/VPF)はECsに特異的な分裂誘導物質であり、血小板由来成長因子(PDGF)と約20%構造上の相同性を示す。しかし、PDGFが間接的な血管造成因子であると思われるのに対しVEGF/VPFは直接的メディエーターである。*in vivo*で血管新生を誘導し、*in vitro*ではECの増殖を促進し、血管の浸透性を高める(1、3、5、6、13、14)。我々はRAに関連したECの移動、増殖、走化性におけるVEGFの役割について報告している(63)。

ヘパリンに結合しない他の血管造成成長因子には、血小板由来内皮細胞成長因子(PD-ECGF)、上皮細胞成長因子(EGF)、形質転換成長因子(TGF)- α 、肝細胞成長因子(HGF)があり、これらはECsの分裂誘導物質でもある(1、3-6、13、63-66)。これらの成長因子はいくつかのよく知られた実験系で観察されているように、*in vitro*でも*in vivo*でも血管造成を活発にする。その上、PDGF、インシュリン様成長因子(IGF)-1、TGF- β もまた、血管造成に対しての直接的効果は十分に明らかになってはいないが、血管新生において働いている(1-6、12、14、65)。

PD-ECGFの構造はFGFsに似ている(5)。PD-ECGFはEC特異的な細胞分裂誘導物質であり、*in vitro*でECの走化性を活発にし、*in vivo*測定でも血管造成活性を示している(3、5、13)。

EGFとTGF- α には30-40%構造の相同性があり、どちらもEGF受容体に結合する。どちらの成長因子も、*in vitro*でECの増殖を、*in vivo*で血管造成を活発化させる。*in vivo*におけるTGF- α の血管造成の能力はEGFに較べて一桁大きい。しかし、どちらのメディエーターもヘパリン-結合成長因子やアンジオジェニンに較べると弱い効果しか示さない(1-6、14)。

PDGF, as described above, is structurally related to VEGF. However, purified PDGF differs from VEGF in being a smooth muscle cell, but not an EC mitogen (5, 6, 14). PDGF is produced by platelets, monocytes and ECs (1, 6). In addition, while mediators described above, such as FGFs and VEGF express direct angiogenic activity as shown both *in vivo* and *in vitro*, PDGF seems to act indirectly on angiogenesis (65, 67). In an *in vitro* tissue culture system, PDGF induces the proliferation of myofibroblasts, as well as the production of ECGF and type I collagen by these cells (65).

IGF-1 increases the DNA synthesis of retinal ECs. It also promotes EC chemotaxis and tube formation on EC culture (6, 14).

TGF- β has a bifunctional regulatory effect on angiogenesis. At low concentrations *in vivo* it stimulates macrophage-mediated capillary formation, ECM production and wound repair. It also promotes tube formation *in vitro*. TGF- β is also involved in inflammation-associated angiogenesis. In contrast, TGF- β inhibits EC proliferation *in vitro*, especially at higher concentrations: it delays EC mitosis, and blocks EC proliferation on collagen gels. The effects of TGF- β on angiogenesis appear to be dose-dependent (1-6, 12, 14).

D-2. Cytokines

Among proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, IL-8, and possibly IL-6 play a role in angiogenesis. These cytokines are produced by macrophages, and thus they, especially TNF- α , account for the macrophage-derived angiogenic activity seen in a number of inflammatory diseases (4-6, 12, 14, 56, 58, 68, 69).

TNF- α , similarly to TGF- β , has both stimulatory and inhibitory effects on angiogenesis. TNF- α stimulates angiogenesis *in vivo*, especially in low doses. In fact, it may account for a large portion of macrophage-derived angiogenic activity. Its efficacy is comparable to that of FGF or angiogenin. TNF- α also stimulates capillary formation on collagen gels and EC chemotaxis in a number of *in vitro* systems. However, it can also inhibit EC mitogenesis *in vitro*. It is possible, that TNF- α , as well as TGF- β influence angiogenesis by promoting EC differentiation rather than proliferation. This cytokine may also act indirectly, as it has been shown to increase bFGF production by ECs (1, 3-5, 12-14, 56, 70).

The effects of IL-1 α and IL-1 β on angiogenesis are in many ways similar to that of TNF- α . These cytokines inhibit the growth of cultured ECs *in vitro* (6). The proliferation of ECs could be extended by the application of an IL-1 α antisense oligonucleotide. In contrast, IL-1 is mitogenic for vascular smooth muscle cells and fibroblasts, probably *via* FGF- and PDGF-dependent mechanisms. The *in vivo* effect of IL-1 is also controversial, as some groups found this cytokine to promote angiogenesis in the rabbit cornea assay, as well as when IL-1 was injected into mammalian brains, while other investigators have

先に述べたようにPDGFは構造的にVEGFに似ている。精製したPDGFは平滑筋細胞の分裂誘導物質であるけれど、ECの分裂誘導物質ではないという点でVEGFとは異なる(5、6、14)。PDGFは血小板、単球、ECsで産生される(1、6)。その上、FGFsやVEGFのような先に述べたメディエーターは、*in vivo*でも*in vitro*でも、直接血管造成活性を発現するのに対し、PDGFは血管造成に間接的に働いているらしい(65、67)。*in vitro*での組織培養系でPDGFは筋繊維芽細胞の増殖を誘導し、これらの細胞によるECGFとI型コラーゲンの産生も誘導する(65)。

IGF-1は網膜のECsのDNA合成を増加させる。またEC培養上でのECの走化性と管腔形成を促進させる(6、14)。

TGF- β は血管形成に対し二面的調節効果を示す。*in vivo*の低濃度ではマクロファージを介した毛細管形成、ECM産生、創傷治癒を活性化させる。また*in vitro*で管状構造の形成を促進する。TGF- β は炎症に関連した血管造成の際にも働く。これに対し特に高濃度では、TGF- β は*in vitro*でECの分裂を遅らせ、コラーゲンゲル上でのECの増殖を妨害する。血管造成へのTGF- β の効果は量依存的らしい(1-6、2、14)。

D-2. サイトカイン

炎症性サイトカインのうち腫瘍壊死因子(TNF- α)、インターロイキン(IL-1)、IL-8、そして多分IL-6が血管造成において働いている。これらのサイトカインはマクロファージで作られ、特にTNF- α は数多くの炎症性疾患で見られるマクロファージ由来血管形成活性を担っている(4-6、12、14、56、58、68、69)。

TGF β と同様に、TNF- α は血管形成に対し促進的と阻害的の両面を持つ。*in vivo*でTNF- α は、特に低濃度で血管形成を活性化する。実際、マクロファージ由来の血管造成活性の大部分を担っているようである。その効果はFGFやアンジオジェニンに匹敵する。TNF- α はまた多くの*in vitro*系で、コラーゲンゲル上での毛細管形成とECの移動を活性化する。しかしながら*in vitro*においてECの細胞分裂を阻害することもできる。TNF- α もTGF β もECの増殖より分化を促進することで血管造成に影響を与えている可能性がある。このサイトカインはECsによるbFGF産生を増加させるので、このサイトカインは間接的にも働いているようである(1、3-5、12-14、56、70)。

IL-1 α 、IL-1 β の血管造成への効果はTNF- α の効果と多くの点で似ている。これらのサイトカインは*in vitro*で培養されたECsの生育を阻害する(6)。IL-1 α のアンチセンスオリゴヌクレオチドを与える事によってECsの増殖が伸びる。これに対しIL-1は血管平滑筋細胞と繊維芽細胞に対し分裂誘導的であり、それは恐らくFGFおよびPDGF依存的機構を介したものである。IL-1の*in vivo*での効果もまた論議的である。いくつかのグループはこのサイトカインがウサギの角膜の実験や哺乳類の脳へIL-1を注入した実験から血管造成を促進する事を見出しているが、一方では、他の研究者達は両方の系で阻害的に働くことを

showed its inhibitory action in both systems (6, 14).

IL-8, a C-X-C chemokine, has been shown by us and others to induce neovascularization *in vivo*, as well as EC proliferation and chemotaxis *in vitro* (14, 58, 62, 69). It has been implicated in tumor-associated angiogenesis as well (71, 72). We have suggested that both IL-8 and TNF- α may be involved in the angiogenic process underlying atherosclerosis (57).

IL-6 stimulates the migration but inhibits the proliferation of ECs *in vitro*. However, other studies showed no response at all (14, 73, 74). *In vivo*, correlation between neovascularization and transient IL-6 mRNA expression during embryonic development in mice has been reported (14, 73, 75). Thus, IL-6 may be indirectly associated with neovascularization (14, 73-75).

Granulocyte- (G-CSF) and granulocyte-monocyte colony stimulating factors (GM-CSF) stimulate the migration and proliferation of ECs. G-CSF may bind to heparin. Yet, the effect of these factors is modest compared to that of bFGF, and little is known about their direct *in vivo* angiogenic activity (5, 6, 14).

D-3. Other Angiogenic Mediators

Angiogenin, a cationic polypeptide produced by a number of cell types, stimulates angiogenesis *in vivo* more effectively than other growth factors, such as EGF or TGF- α . However, it will not bind to heparin, and it is also non-mitogenic for ECs. In addition, unlike FGF or VEGF, it does not appear to stimulate EC proliferation or migration *in vitro*. Its mode of action is not clear, although it is structurally related to a family of ribonucleases, and has a unique ribonucleic activity essential for neovascularization. Angiogenin may also stimulate other EC functions, or alternatively, it may also act indirectly on angiogenesis (1-3, 5, 13).

The monocyte-derived angiotropin stimulates EC migration *in vitro* and neovascularization *in vivo*. It is not mitogenic, but stimulates the random migration of isolated capillary cells, as well as tube formation. Its effects are specific for capillary ECs. Angiotropin, however, does not seem to directly stimulate angiogenesis *in vivo* (5, 6, 14).

Human angiogenic factor (HAF) was originally isolated from a melanoma cell line. It is also produced by macrophages. HAF stimulates EC migration and it is also angiogenic *in vivo* (14).

Substance P is also released by macrophages. It stimulates EC migration and proliferation *in vitro*, as well as angiogenesis *in vivo* (14).

Lipid derivatives, such as prostaglandins of the E series stimulate angiogenesis *in vivo*. They are chemotactic, but not mitogenic for ECs *in vitro*. Prostaglandin E1 is the most effective among these mediators. Monobutyrin, okadaic acid and hydroxyeicosatrienoic acid also exhibit angiogenic activity (1,

示している(6, 14)。

C-X-CケモカインであるIL-8は私達や他の研究者達によって *in vivo* の血管新生と *in vitro* でのECの増殖と走化性を誘導する事が示されている(14, 58, 62, 69)。これはまた腫瘍関連血管造成でも働いている(71, 72)。我々はIL-8、TNF- α の両者がアテローム性動脈硬化症の下地にある血管造成過程に関与しているのではないかと主張している(57)。

IL-6は *in vitro* におけるECsの移動と増殖を阻害する。しかし他の研究では全く応答しないことが示されている(14, 73, 75)。 *in vivo* ではマウスの発生の時に血管新生とIL-6 mRNAとの間に関連がある(14, 73, 75)。このようにIL-6は血管新生に間接的に関係しているようである(14, 73-75)。

顆粒球(G-CSF)と顆粒球-単球コロニー刺激因子(GM-CSF)はECsの移動と増殖を活性化する。G-CSFはヘパリンと結合するらしい。これらの因子の効果はbFGFの効果に比べると控えめで、直接的な *in vivo* での血管造成活性についてはほとんど知られていない(5, 6, 14)。

D-3. 他の血管造成メディエーター

アンジオジェニンとは数多くの種類の細胞が産生する塩基性ポリペプチドであるが、 *in vivo* においてはEGFやTGF- α のような成長因子よりもずっと効果的に血管造成を活性化させる。けれどもこれはヘパリンと結合せず、ECsの分裂を誘導しない。その上、 *in vitro* ではFGFやVEGFとは異なり、ECの増殖や移動を活性化するには見えない。その働きかたははっきりしないが構造的にはリボヌクレアーゼファミリーと関係があり、血管新生に必須の独特のリボヌクレアーゼ活性をもっている。アンジオジェニンはまた他のECの機能を活性化し、あるいはまた血管造成に間接的にも働いているようである(1-3, 5, 13)。

単球由来アンジオトロピンは *in vitro* ではECの移動を、 *in vivo* では血管新生を活性化する。これには分裂誘導性はなく、単離された毛細管細胞のランダムな移動と管腔形成を活性化させる。この効果は毛細管のECsに特異的である。しかしアンジオトロピンは *in vivo* において直接的に血管造成を活性化させてはいないらしい(5, 6, 14)。

ヒト血管造成因子(HAF)は最初はメラノーマ細胞から単離された。これはマクロファージによっても産生される。HAFはECの移動を活性化させ、 *in vivo* でも血管造成活性を示す(14)。

サブスタンスPもまたマクロファージから放出される。これは *in vitro* でECの移動と増殖を、そして *in vivo* で血管形成を活性化させる(14)。

Eシリーズのプロスタグランジンのような脂質誘導体は *in vivo* において血管造成を活性化させる。それらは *in vitro* で、ECsに対し走化性であるが細胞分裂誘起的ではない。プロスタグランジンE1はこれらのメディエーターの中で最も効果的である。モノブチリン、オカダ酸、ヒドロキシエイコサトリエン酸もま

2, 13).

There are several other factors shown to participate in capillary formation *in vitro* or *in vivo*. Fibrinogen is chemotactic and chemokinetic for ECs. Platelet-activating factor (PAF) stimulates angiogenesis *via* a heparin-dependent mechanism (76). Other molecules with direct or indirect angiogenic activity include copper, histamine, erythropoietin, nicotinamide, adenosine, other cyclic nucleotides, lactic acid, proteolytic enzymes, such as angiotensin-converting enzyme (ACE) and other low molecular weight factors (1-7, 13, 14, 17, 76-78). The classification of angiogenic mediators is demonstrated in Table I.

E. Angiogenesis Inhibitors

Some mediators have bifunctional effects on angiogenesis. For example, TGF- β , IL-1 α , IL-1 β and IL-6, as discussed above, can stimulate or inhibit neovascularization under different circumstances (1-6, 12-14, 56, 70). Antibodies to angiogenic mediators, such as bFGF and VEGF inactivate these factors in various assays (15).

Among cytokines, IL-1 α and IL-1 β inhibit the growth of cultured ECs. The proliferation of ECs could be extended by the application of an IL-1 α antisense oligonucleotide. The *in vivo* effect of IL-1 is controversial, as some groups found this cytokine to promote angiogenesis in two models, while others have showed its inhibitory action in both systems (6). Interferon (IFN)- γ and IFN- α have been shown to block FGF-, VEGF- and ECGF-induced EC proliferation *in vitro*. They also inhibit EC migration, FGF-induced EC mitogenesis and capillary formation. Dramatic results have been obtained in the treatment of hemangioendotheliomas, when using IFN- α (1, 5, 6, 12-15). IL-12 inhibits angiogenesis *in vivo* *via* an IFN- γ -mediated pathway (79). The chemokine IP-10 also suppresses angiogenesis *in vivo* (80, 81), and leukemia inhibitory factor (LIF) blocks capillary formation in collagen gel (82).

Heparin-binding molecules block the binding or prevent oligomerization of receptors of angiogenic mediators, such as FGFs, and thus inhibit the action of growth factors. These inhibitors include protamine, platelet factor IV (PF4), thrombospondin-1, suramin, monocyte-derived EC inhibitory factor (MECIF), macrophage-derived EC inhibitor (MD-ECI), as well as bFGF and VEGF receptor antagonists (5, 12-15). Protamine binds to and neutralizes the action of heparin. Its specific anti-angiogenic activity has been shown in the chorio-allantoic membrane assay. Systemic administration of protamine blocked tumor growth and metastasis in animal models (5, 12, 13). PF4 has a high affinity for heparin. It is, similarly to IL-8, a C-X-C chemokine, but, unlike IL-8, is a potent anti-angiogenic factor and inhibits growth factor-induced EC proliferation. PF4 also suppresses the growth of solid tumors (5, 12-14, 35, 41, 72, 83). Thrombospondin-1, an ECM component,

た血管造成活性を示す(1, 2, 13)。

In vitro および *in vivo* で毛細管形成に関与していることが示されている何種類かの因子がまだある。フィブリノーゲンはECsに対し走化性であり、またケモカインेटイック(化学物質の刺激による細胞移動の活性化)である。血小板-活性化因子(PAF)はヘパリン依存的機構を介して血管造成を活性化する(76)。直接的あるいは間接的血管造成活性をもつ他の分子には、銅、ヒスタミン、エリスロポイエチン、ニコチンアミド、アデノシン、サイクリックヌクレオチド類、乳酸、アンジオテンシン-変換酵素(ACE)のようなタンパク質分解酵素、や他にも低分子因子などがある(1-7, 13, 14, 17, 76-78)。血管造成メディエーターの分類を表Iに示した。

E. 血管造成阻害物質

ある種のメディエーターは血管造成に対し二面的な機能を持っている。例えば、TGF- β 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6などで先に論じたが、異なる環境のもとでは血管新生を活性化させたり、阻害したりすることができる(1-6, 12-14, 56, 70)。bFGFやVEGFのような血管造成メディエーターに対する抗体は、種々の反応系でこれらの因子の活性を失わせるさせる(15)。

サイトカインの中でIL-1 α とIL-1 β は培養ECsの生育を阻害する。IL-1 α のアンチセンスオリゴヌクレオチドを加えることでECsの増殖が盛んになった。IL-1の*in vivo*での効果は論議的である。いくつかのグループはこのサイトカインは二つのモデル系で血管造成を促進させることを見出したのに対し、他のグループは両方の系で阻害することを示した(6)。*in vitro*で、インターフェロン(IFN)- γ とIFN- α がFGF、VEGF、ECGFで誘導されるECの増殖を妨げることが示されている。これらはまたECの移動、FGFで誘導されるECの有糸分裂と毛細管形成を阻害する。血管内皮腫の処理にINF- α を用いたとき、劇的な結果が得られた(1, 5, 6, 12-15)。IL-12はINF- γ を介する経路を経て*in vivo*で血管造成を阻害する(79)。ケモカインIP-10もまた*in vivo*において血管造成を抑制し(80, 81)、白血病阻害因子(LIF)はコラーゲンゲル内での毛細管形成を抑える(82)。

ヘパリン結合分子はFGFのような血管造成メディエーターの受容体の結合や、受容体のオリゴマー形成を防ぐことで成長因子の作用を阻害する。これらの阻害物質としてはプロタミン、血小板因子IV(PF4)、トロンボスポンジン-1、スラミン、単球由来EC阻害因子(MECIF)、マクロファージ由来EC阻害物質(MD-ECI)のほか、bFGFやVEGF受容体の拮抗剤などがある(5, 12-15)。プロタミンはヘパリンに結合し、ヘパリンの作用を中和する。その特異的な抗血管造成活性は尿管膜の実験で示された。動物モデルではプロタミンの全身的な投与によって腫瘍の成長と転移が抑えられた(5, 12, 13)。PF4はヘパリンに強い親和性を持っている。これはIL-8に似てC-X-Cケモカインであるが、IL-8と違って強い抗血管造成因子であり、成長因子で誘導されるECの増殖を阻害する。PF4はまた固形腫瘍の増殖を抑える(5, 12-14, 35, 41, 72, 83)。ECMの成分であるトロンボスポンジン-1は後で詳細に述べるように血管造成を阻害する。こ

can inhibit angiogenesis, as discussed in detail below. It has been implicated in tumor-associated neovascularization (3, 5, 12-14, 55, 83-88). The angiostatic effects of suramin are based on its antagonistic action to heparin, IL-1 and IL-6 (12).

Angiostatic steroids act by various mechanisms (1, 5, 12). Medroxyprogesterone acetate (MPA) inhibits basement membrane degradation, and 2-methoxyestradiol suppresses the proliferation of bFGF-stimulated ECs (12). A variety of antiestrogens including tamoxifen, clomiphene, nafoxidine and others could also block neovascularization *in vivo* (12). Cortisone was found to inhibit EC migration and proliferation. However, the combination of heparin and cortisone was more effective than cortisone alone (1, 5, 12). This combination could block angiogenesis in *in vivo* assays, inhibit tumor growth and metastasis (5, 12, 89).

Protease inhibitors, such as tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and -2) and plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and -2) also maintain the integrity of the endothelium by preventing the breakdown of ECM proteins. Amiloride is also an inhibitor of PA and thus suppresses angiogenesis (12). Interestingly, both TNF- α and IL-1 have been shown to increase TIMP production at low concentrations. TNF- α , however, reduces TIMP at higher doses, which could explain the paradoxical effects of this cytokine on angiogenesis (1-6, 12, 90).

A number of antimicrobial agents are angiogenesis inhibitors. Minocycline exhibits anti-collagenase activity. Rapamycin inhibits EC proliferation. Analogues of fumagillin are angiostatic and suppress tumor growth. Others like distamycin A, eponemycin, herbamycin, bleomycin, erbstatin, staurosporine and 15-deoxyspergualin have similar activities (12, 91).

Tissue-derived inhibitors have been isolated from the cartilage, vitreous, lens, epithelia and other tissues. Many of these are capable of inhibiting EC migration and proliferation (12, 15).

Taxol, nocodazole, colchicine and vinblastine target the EC itself. They affect cytoskeletal reorganization and thus EC movement (12).

A number of anti-rheumatic drugs including gold compounds, D-penicillamine, dexamethasone and sulfasalazine act *via* different mechanisms. The action of corticosteroids is described above. The effects of gold compounds have been ascribed, in part, to their effect on macrophages, but they also inhibit EC proliferation *in vivo* (12-15).

The effects of phorbol esters on angiogenesis seem to be paradoxical. Phorbol myristate acetate and many other phorbol esters stimulate collagenase and PA and thus they are able to induce angiogenesis *in vivo*. However, they also inhibit EC proliferation *in vitro* by suppressing the expression of the cyclin A gene. This latter inhibitory effect seems to be specifically lim-

iteは腫瘍に伴う血管新生に関わっている(3, 5, 12-14, 55, 83-88)。スラミンの血管造成に対する効果はヘパリン、IL-1、IL-6に対する拮抗作用に基づいている(12)。

血管造成抑制ステロイドは種々の機構によって働く(1, 5, 12)。メドロキシプロゲステロンアセテート(MPA)は基底膜の分解を阻害する。そして2-メトキシエストラジオールはbFGFで活性化されたECsの増殖を抑制する(12)。タモキシフェン、クロミフェン、ナフォキシジン、などの色々な抗エストロゲンもまた*in vivo*で血管新生を妨げる事が出来る(12)。コルチゾンがECの移動と増殖を阻害することが見出されている。しかしヘパリンとコルチゾンを組み合わせるとコルチゾンだけに較べてより効果的であった(1, 5, 12)。この組み合わせによって*in vivo*実験での血管造成は妨害され、腫瘍の増殖と転移が阻害された(5, 12, 89)。

マトロプロテアーゼの組織性阻害物質(TIMP-1と-2)とプラスミノゲンアクチベーター阻害物質(PAI-1と-2)のようなプロテアーゼ阻害物質もまたECMタンパク質の分解を防ぐことによって内皮を完全な形に保っている。アミロライドもまたPAの阻害物質で、血管造成を抑制する(12)。面白い事にはTNF- α とIL-1は低濃度でTIMP産生を増加させることが示されている。TNF- α は高濃度ではTIMPを抑える。このことでこのサイトカインの血管造成に対する理屈に合わない効果を説明できるのかもしれない(1-6, 12, 90)。

多くの抗生物質が血管造成阻害物質である。ミノサイクリンは抗コラゲナーゼ活性を示す。ラバマイシンはECの増殖を阻害する。フマジリンの類似物質は血管造成抑制的で腫瘍の増殖を抑える。デイスタマイシンA、エポネマイシン、ハーバマイシン、プレオマイシン、エルブスタチン、スタウロスポリン、15-デオキシスペルグアリンなども同様な活性を持っている(12, 91)。

組織由来の阻害物質が軟骨、硝子体、水晶体、上皮などの組織から取られている。これらの多くはECの移動や増殖を阻害できる(12, 15)。

タキソール、ノコダゾール、コルヒチン、ビンブラスチンはECそれ自身を標的としている。それらは細胞骨格の再構成に影響を与え、そのためにECの動きにに影響を与える(12)。

金化合物、D-ペニシラミン、デキサメタゾン、スルファサラジンなどの数多くの抗リウマチ薬は異なる機構で働く。コルチコステロイドの作用は先に述べてある。金化合物の効果は一部はマクロファージへの効果によると思われるが、*in vivo*でECの増殖もまた阻害する(12-15)。

血管造成に対するホルボールエステルの効果は論議的である。ホルボールミリステートアセテートと多くの他のホルボールエステルはコラゲナーゼとPAを活性化し、それによって*in vivo*での血管造成を誘導することが出来る。しかし、これらは*in vitro*ではサイクリンA遺伝子の発現を抑えることでEC増殖を阻止する。この後者の阻止効果は、毛細管のECsに特に限

ited to capillary ECs. As capillary ECs are highly responsible for neovascularization, phorbol esters may be specific and very promising anti-angiogenic agents (12).

Additional anti-angiogenic factors include prolactin fragments, glycosaminoglycans, cholera toxin, activin-A, Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), PAF inhibitors, ornithine decarboxylase inhibitors, retinoids, the AGM-1470 compound, angiostatin, genistein, chitin derivatives, magnosalin, opioids, oxazolone and others (1, 3, 5, 7, 12-16).

In summary, angiostatic factors interfere with different steps of the angiogenic process. Basement membrane degradation can be inhibited by protease inhibitors, tissue-derived inhibitors, some steroids and antibiotics (12). EC migration is blocked by taxol, interferons, TGF- β , cholera toxin, heparin-binding inhibitors of growth factors, SPARC and gold (12). EC proliferation can be suppressed by various FGF inhibitors including antibodies, TGF- β , TNF- α , IL-1, thrombospondins, retinoids, SPARC, suramin and other agents (12). Finally, the three-dimensional organization of blood vessels is disrupted by TGF- β , interferons, oxazolone or any inhibitors of basement membrane biosynthesis (12) (Table II). As described below, some of these angiostatic factors may be useful in the therapy of "angiogenic diseases", especially in tumors and inflammatory diseases, such as RA (1, 3, 5, 7, 12).

F. The Regulation of Neovascularization by Angiogenic Cells and Mediators

There is a difference between physiological angiogenesis during reproduction, development, tissue repair and pathological neovascularization seen in "angiogenic diseases". Normally angiogenesis is balanced by angiogenic and angiostatic factors leading to the controlled production of new capillaries. The balance described here reflects a biological safety mechanism. This guarantees the vital process of angiogenesis in different physiological situations.

In "angiogenic diseases", such as inflammatory disorders, angiopathies, tumors, there is a redundancy of angiogenic cells and an imbalance between angiogenic and angiostatic mediators at the site of aberrant neovascularization. Macrophages found in high quantity in these areas, and many angiogenic factors produced by these cells play essential role in pathological angiogenesis (1-7, 12, 56). However, a number of other cells, such as ECs (IL-1, IL-6, bFGF, PDGF), platelets (PDGF, TGF- β), keratinocytes (IL-1, bFGF, TGF- α), can secrete mediators and thus influence the angiogenic process (1-7).

The imbalance between angiogenic and angiostatic factors that favors net neovascularization would promote inflammation or tumor growth. These factors form a complex regulatory network. In addition, some mediators, such as IL-1, IL-6, and TGF- β , can both stimulate or inhibit angiogenesis (1-

られているように見える。毛細管のECsが血管新生に責任を負っているため、ホルボールエステルは特異的で、かつ有望な抗血管造成剤となるかもしれない(12)。

抗血管造成因子としては他にもプロラクチンの断片、グリコサミノグリカン、コレラ毒素、アクチビン-A、SPARC(Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine)、PAF阻害剤、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤、レチノイド、AGM-1470化合物、アンジオスタチン、ジェニステイン、キチン誘導体、マグノサリン、オピオイド、オキサゾロンなどがある(1、3、5、7、12-16)。

まとめると、血管新生阻止因子は血管造成過程の様々な段階に作用する。基底膜の分解はタンパク質分解酵素の阻害剤、組織由来の阻害剤、ある種のステロイド、抗生物質で妨害される(12)。ECの移動はタキソール、インターフェロン、TGF β 、コレラ毒素、成長因子のヘパリン結合性阻害剤により邪魔される(12)。ECの増殖は抗体、TGF- β 、TNF- α 、IL-1、トロンボスポンジン、レチノイド、SPARC、スラミン、および金により抑制される(12)。最終段階である血管の三次元的構成は、TGF- β 、インターフェロン、オキサゾリン、基底膜合成の阻害剤により破壊される(12)(表 II)。あとで述べるように、これらの血管新生阻害因子のいくつかは、「血管造成病」、特に腫瘍およびRAのような炎症病の治療に役立つであろう(1、3、5、7、12)。

F. 血管造成の細胞とメディエーターによる血管新生の制御

生殖、発生、組織修復のような生理的な血管造成と、「血管造成病」に見られるような病理的な血管新生との間には違いがある。正常な血管造成では血管造成因子と血管新生抑制因子との間の厳密なバランスが、新しい毛細管の良く制御された形成を可能にしている。ここで書いたバランスは生体の安全機構を反映している。これこそが様々な生理的条件下での血管造成の大事な過程を保証している。

炎症反応、脈管障害、腫瘍などの「血管造成病」では、異常な血管新生の場に血管造成細胞が多重に出現し、血管造成因子と血管新生抑制因子の間のバランスの崩れが顕著になる。このような場所にはマクロファージが高頻度で見出され、これらの細胞で生産される血管造成因子が病理的な血管造成において本質的な役を果たしている(1-7、12、56)。しかし、ECs(IL-1、IL-6、bFGF、PDGF)とか、血小板(PDGF、TGF- β)とか、ケラチノサイト(IL-1、bFGF、TGF- α)などはメディエーターを分泌し、このようにして血管造成過程に影響する(1-7)。

血管造成因子と血管新生抑制因子の間のバランスが崩れて血管新生の方向に傾くと、炎症や腫瘍の成長が促進される。これらの因子は複雑な調節ネットワークを形成し、さらに、IL-1、IL-6、TGF- β の様なメディエーターは血管造成の促進と阻害の両方に関わる(1-6)。C-X-Cケモカインの中では、IL-8は血管

6). Among C-X-C chemokines, IL-8 is angiogenic, while PF4 was found to be angiostatic. It has been suggested, that a small structural difference, namely an ELR (Glu-Leu-Arg) motif would account for the functional differences (72).

Regarding "angiogenic diseases", in RA, several angiogenic cytokines and growth factors including TNF- α , IL-8, VEGF, aFGF/ECGF, bFGF, EGF and PDGF have been detected in the RA synovium *in situ*. Some of these mediators have been associated, to some extent, with areas of neovascularization. These factors may control neovascularization within the pannus (1, 64, 69, 92-94). In psoriasis, an increased secretion of IL-8 and a reduced production of thrombospondin-1 is observed leading to dermal neovascularization (95). As described above, many angiogenic and angiostatic factors have been associated with tumor growth and metastasis (1-6).

G. Adhesive Mechanisms in Angiogenesis

G-1. The Role of Extracellular Matrix Components in Capillary Formation

In the capillaries, ECs are attached to the basal lamina, which contains various ECM components synthesized by the endothelium. These macromolecules include mainly type IV collagen and laminin, but also fibronectin, proteoglycans, entactin and thrombospondin-1 (1, 13, 52, 96). EC adhesion to the ECM stimulates their mitogenesis, proliferation, migration and chemotaxis (13). ECM components play a role in the direction of ECs during capillary formation (13, 16, 52, 53). In addition, as described above, heparin, which is also an ECM component, is involved in the regulation of angiogenic growth factor release (1, 3, 13, 16).

The ECM surrounding the newly formed capillaries contains mainly type I collagen, as well as other ECM components including fibronectin, fibrinogen, vitronectin, tenascin and thrombospondin-1 (13, 52, 85). It has been shown that EC migration is stimulated by type I, but inhibited by type IV collagen (1, 61). The importance of type I collagen in angiogenesis has been demonstrated using the collagen gel model (19, 20, 52, 53, 56). Capillary ECs adhere to collagen, acquire elongated morphology, begin to produce ECM components, and form tubular structures when placed within, but not when layered onto the gel. Cell invasion requires matrix-degrading proteolytic enzymes, such as MMPs and PA. The angiogenic mediator bFGF stimulates ECs to secrete PA. The EC release of these enzymes promote the degradation of basement membrane during sprout formation (1, 52, 67). TIMP-1, an angiostatic compound mentioned above, exhibits its inhibitory activity by blocking the action of MMP in this process (1, 91).

Fibronectin is chemotactic for ECs and promotes the elongation of microvessels in explant cultures *in vitro* (1, 97). Laminin and proteoglycans are secreted during EC proliferation (1, 13). These ECM components are involved in EC attach-

ment and, PF4 is angiostatic and suppresses angiogenesis. The difference, namely, ELR (Glu-Leu-Arg) motif of this functional difference can be explained (72).

"Vascular disease" means that, in RA, several angiogenic cytokines and growth factors including TNF- α , IL-8, VEGF, aFGF/ECGF, bFGF, EGF, PDGF, etc. such as cytokines or growth factors are found *in situ* in the synovial membrane. Some of these mediators have been associated, to some extent, with areas of neovascularization. These factors may control neovascularization within the pannus (1, 64, 69, 92-94). In psoriasis, an increased secretion of IL-8 and a reduced production of thrombospondin-1 is observed leading to dermal neovascularization (95). As described above, many angiogenic and angiostatic factors have been associated with tumor growth and metastasis (1-6).

G. Vascular Formation and Adhesive Mechanisms

G-1. The Role of Extracellular Matrix Components in Capillary Formation

In the capillaries, ECs are attached to the basal lamina, which contains various ECM components synthesized by the endothelium. These macromolecules include mainly type IV collagen and laminin, but also fibronectin, proteoglycans, entactin and thrombospondin-1 (1, 13, 52, 96). EC adhesion to the ECM stimulates their mitogenesis, proliferation, migration and chemotaxis (13). ECM components play a role in the direction of ECs during capillary formation (13, 16, 52, 53). In addition, as described above, heparin, which is also an ECM component, is involved in the regulation of angiogenic growth factor release (1, 3, 13, 16).

The ECM surrounding the newly formed capillaries contains mainly type I collagen, as well as other ECM components including fibronectin, fibrinogen, vitronectin, tenascin and thrombospondin-1 (13, 52, 85). It has been shown that EC migration is stimulated by type I, but inhibited by type IV collagen (1, 61). The importance of type I collagen in angiogenesis has been demonstrated using the collagen gel model (19, 20, 52, 53, 56). Capillary ECs adhere to collagen, acquire elongated morphology, begin to produce ECM components, and form tubular structures when placed within, but not when layered onto the gel. Cell invasion requires matrix-degrading proteolytic enzymes, such as MMPs and PA. The angiogenic mediator bFGF stimulates ECs to secrete PA. The EC release of these enzymes promote the degradation of basement membrane during sprout formation (1, 52, 67). TIMP-1, an angiostatic compound mentioned above, exhibits its inhibitory activity by blocking the action of MMP in this process (1, 91).

Fibronectin is chemotactic for ECs and promotes the elongation of microvessels in explant cultures *in vitro* (1, 97). Laminin and proteoglycans are secreted during EC proliferation (1, 13). These ECM components are involved in EC attach-

ment to the basement membrane and EC adhesion to the interstitial ECM, and thus these molecules have regulatory role during vascular morphogenesis (1, 13, 16). Matrigel, a laminin-rich reconstituted basement membrane, induces the formation of new vascular structures (98). Angiogenesis during melanoma progression has been correlated with the expression of the 67 kD, non-integrin laminin receptor (99). Tenascin is also an important stimulator of endothelial sprouting, and its expression correlates with angiogenesis scores in brain tumors (85, 100). Interestingly, angiogenin can serve as an ECM substrate for EC adhesion and spreading (17). Both processes can be blocked by RGD (Arg-Gly-Asp)-containing peptides, a sequence found in many ECM macromolecules (17).

Heparin and heparan sulphate proteoglycans are essential in the regulation of angiogenesis. As described above, a number of angiogenic growth factors, as well as G-CSF bind to heparin (1-7, 13). FGF-heparan sulphate interaction is necessary for the attachment of growth factors to their endothelial receptors (1-3). Basic FGF also contains the DGR (inverse RGD) sequence (54). A number of heparin-binding proteins may serve as angiogenesis inhibitors (12, 15). These data support the important role of heparin/heparan sulfate-growth factor interactions in the regulation of angiogenesis.

Thrombospondin-1 interacts with a number of other ECM components, such as heparin, fibronectin, fibrinogen and collagen. It inhibits angiogenesis both *in vivo* and *in vitro*, in part, by modulating bFGF activities on ECs (3, 5, 12, 53, 55, 84, 85, 88). Thrombospondin-1 is a modulating factor in certain "angiogenic diseases". The down-regulation of its production, which is observed during tumorigenesis, enhances angiogenesis (3, 87). In contrast, stimulation of the thrombospondin-1 gene, or its transfection into cancer cell lines leads to the inhibition of neovascularization and tumor growth (84, 86). We have detected thrombospondin-1 in the RA synovium, which is rich in newly formed vessels (88).

The EC cytoskeleton is reorganized during capillary formation on Matrigel (101). *In vitro* angiogenesis can be blocked by cytochalasin D, colchicin and cycloheximide indicating the involvement of microfilaments, microtubules and active protein synthesis, respectively (101).

In conclusion, ECM components play an important role in the regulation of angiogenesis. Macromolecules, such as fibronectin, laminin, proteoglycans are involved in EC adhesion to the basement membrane, as well as to the underlying ECM. In addition, heparin plays a role in the regulation of angiogenic mediator release. Thrombospondin-1 and cytoskeletal elements are also involved in neovascularization. The disruption of the basement membrane or the ECM may be a potential approach to anti-angiogenesis.

程と、ECが間質性のECMに接着する過程に関わり、かくしてこれらの巨大分子は血管系の形態形成時には調節的役割を持っている(1, 13, 16)。マトリゲルはラミニンを多く含む人工的再構成基底膜であるが、新たな管状構造の形成を誘導する(98)。メラノーマの進行時の血管造成には、67 kDaの非インテグリンであるラミニン受容体が発現している(98)。テネイシンもまた血管内皮の発芽を刺激する大事な因子であり、その発現は脳腫瘍における血管造成頻度と深く関連している(85, 100)。面白いことには、アンジオジェニンECにとってはECM基質みたいなもので、ECはこれに接着し伸展する(17)。この両方の過程は、多くのECM巨大分子が持っているRGD配列(Arg-Gly-Asp)を含むペプチドにより阻害される(17)。

ヘパリンとヘパラン硫酸プロテオグリカンは血管造成においては欠かせない役者である。前述のように、血管造成性を持つ多くの成長因子や、G-CSFがヘパリンに結合する(1-7, 13)。FGF-ヘパラン硫酸の間の相互作用は成長因子が内皮細胞上の受容体に結合するために必須である(1-3)。塩基性FGFはDGR(RGDの逆である)配列を持っている(54)。多くのヘパリン結合性タンパク質は血管造成の阻害剤として機能する(12, 15)。これらの結果は血管造成の制御においてヘパリン/ヘパラン硫酸プロテオグリカンと成長因子との相互作用が重要な役割を果たしていることを示している。

トロンボスポンジン-1は、ヘパリン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン及びコラーゲンのようなECM成分と相互作用する。*in vivo*および*in vitro*の両方で、一部はECsに対するbFGFの作用を変えてしまうことで、トロンボスポンジン-1は血管造成を阻害する(3, 5, 12, 53, 55, 84, 85, 88)。トロンボスポンジン-1はある種の「血管造成病」での変調因子である。腫瘍の進行時に見られるが、トロンボスポンジン-1の産生が低下すると血管造成が亢進する(3, 87)。これとは対比的に、トロンボスポンジン-1遺伝子を活性化するか、あるいはその遺伝子を癌細胞にトランスフェクトすると、血管新生と腫瘍の成長の両者が阻害される(84, 86)。新しく形成された毛細血管に富んだRAの滑膜内にトロンボスポンジン-1を我々は見出している(88)。

ECの細胞内骨格はマトリゲル中での血管形成の最中に再編成される(101)。*in vitro*の血管造成はサイトケラシンD、コルヒチン、シクロヘキシミドで阻害されるが、これは、それぞれ微小繊維、微小管、タンパク質合成が必要なことを意味している(101)。

まとめると、ECM成分は血管造成を調節する上で非常に重要である。フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカンなどの巨大分子はECが基底膜、および、それを裏打ちするECMに接着する過程に重要である。さらに、ヘパリンは血管造成性のメディエーターの放出を制御するのに大事である。トロンボスポンジン-1と細胞内骨格成分もまた血管新生に関わっている。基底膜やECMを破壊することで、抗血管造成に近づけるかも知れない。

G-2. Cellular Adhesion Molecules in Angiogenesis

CAMs play an important role in EC adhesion to ECM components and to other interacting cells. Cell-ECM interactions are mostly mediated by integrins, while CAMs mediating cell-to-cell adhesion include the $\alpha 4 \beta 1$ integrin (VLA-4), 2 (leukocyte) integrins, members of the immunoglobulin superfamily of CAMs, selectins and other CAMs (12, 35–37, 41).

As neovascularization is blocked by RGD-containing peptides both *in vivo* and *in vitro*, interactions between EC integrins and ECM components are important in this process (21, 32). The $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$ integrins mediate EC adhesion to types I and IV collagen, as well as to laminin (18, 102). Their high affinity laminin receptor, however, is $\alpha 6 \beta 1$. There are two high-affinity receptors for fibronectin, the RGD-dependent $\alpha 5 \beta 1$, as well as $\alpha 4 \beta 1$ (18). The former is present on most ECs (18), while we and others have confirmed that $\alpha 4 \beta 1$ is expressed by some ECs (34, 103). Another fibronectin, laminin and collagen receptor, $\alpha 3 \beta 1$ is also present on ECs (18, 102). Integrins containing the $\beta 3$ subunit are involved in EC adhesion to fibronectin, vitronectin, thrombospondin-1 and fibrinogen. The αV integrin subunit can be associated with several β chains ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 8$), and mediates EC adhesion to a variety of ECM components, depending on the β subunit (18, 35, 36, 41, 102).

A number of EC integrins, mainly $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins have been implicated in angiogenesis (18, 19, 27, 104). ECM binding integrins can be classified into subgroups of “basement membrane” (collagen-laminin)-binding integrins ($\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 1$) and “inflammatory matrix”-binding integrins (fibronectin-fibrinogen receptors: $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, αV and $\beta 3$). While microvessels express the former, but not the latter type of integrins *in situ*, CAMs belonging to both subgroups are present on capillary ECs *in vitro* (18). These data suggest that ECs have a potential to alter their CAM profile during vascular morphogenesis (18). Additional studies have shown that the $\alpha 2 \beta 1$ molecule is involved in type I collagen-induced angiogenesis (19, 20). $\alpha V \beta 3$ is necessary for capillary formation in tumors and wound granulation tissue and promotes EC cord formation *in vitro* (28, 29, 33, 104). It has recently been shown that the $\alpha V \beta 3$ integrin is required for the survival and maturation of new blood vessels (104). Antibodies to $\alpha 2 \beta 1$ and $\alpha V \beta 3$ inhibited EC proliferation, but promoted capillary tube formation on collagen and fibrin gels, respectively suggesting, that signalling through these integrins convert ECs from a proliferative to a differentiating phenotype (20). Antibodies to the $\alpha 6 \beta 1$ integrin also blocked Matrigel-induced capillary tube formation *in vitro* (30).

ECs may interact with other cells during angiogenesis. Endothelial CAMs mediating intercellular adhesion include VCAM-1, intercellular adhesion molecules (ICAM)-1 and -2, CD31, E- and P-selectin, CD34 and other carbohydrate ligands

G-2. 血管造成における細胞接着分子

CAMs は、EC が ECM 成分や、ほかの相互作用する細胞に接着する時に重要な役を果たしている。細胞-ECM 間の結合は殆どの場合インテグリンを介して行われるが、細胞-細胞間結合には $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン (VLA-4)、 $\beta 2$ (白血球) インテグリン、CAMs ではイムノグロブリンスーパーファミリー、セレクトリンなどが関わっている (12, 35-34, 41)。

血管新生は RGD を含むペプチドにより、*in vivo* および *in vitro* の両方で阻害を受けるので、EC のインテグリンと ECM 成分との間の相互作用がこの過程で重要であることが分かる (21, 32)。 $\alpha 1 \beta 1$ 、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンは EC と I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、ラミニンとの結合に関わっている (18, 102)。しかし、ラミニンの高親和性受容体は $\alpha 6 \beta 1$ である。フィブロネクチンは 2 種類の高親和性受容体があり、RGD 依存性の $\alpha 5 \beta 1$ と $\alpha 4 \beta 1$ である (18)。 $\alpha 5 \beta 1$ は殆どの ECs にあるが、我々及び他の研究者は $\alpha 4 \beta 1$ がある種の ECs で発現していることを調べた (34, 103)。フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンの別の受容体である $\alpha 3 \beta 1$ も ECs 上に発現している (18, 102)。 $\beta 3$ サブユニットを含むインテグリンは EC がフィブロネクチン、ピトロネクチン、トロンプスポンジン-1、フィブリノーゲンに接着するときに役立っている。 αV インテグリンサブユニットは数種類の β 鎖 ($\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 8$) とインテグリン分子を形成し、 β サブユニットに依存して様々な ECM 成分に EC が結合するのを仲介している (18, 35, 36, 41, 102)。

EC のインテグリンの中でも主として $\beta 1$ 、 $\beta 3$ インテグリンが血管造成に関わっていると思われる (78, 19, 27, 104)。ECM に結合するインテグリンは「基底膜」コラーゲン-ラミニン-結合性インテグリン ($\alpha 1 \beta 1$ 、 $\alpha 2 \beta 1$ 、 $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 1$)、および「炎症性マトリックス」結合性インテグリン (フィブロネクチン-フィブリノーゲン受容体: $\alpha 4 \beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 αV 、 $\beta 3$) に分けることが出来る。毛細血管は前者を発現していて、後者のインテグリンを *in situ* で発現していないが、*in vitro* では両者のグループに属している CAMs が毛細血管の ECs 上に発現している (18)。これらの結果は毛細管の形態形成の間に、ECs はは自分の ECMs を変える能力があることを示唆している (18)。もっと調べると、 $\alpha 2 \beta 1$ 分子が I 型コラーゲンで誘導される血管造成に関与していることが分かった (19, 20)。 $\alpha V \beta 3$ は腫瘍や創傷肉芽組織が毛細管を形成する際に必須であり、*in vitro* では EC がひも状の形を作ることを促進している (28, 29, 33, 104)。 $\alpha \beta$ インテグリンが新生の毛細血管の生存と成熟に役立つことが分かってきた (104)。抗 $\alpha 2 \beta 1$ および抗 $\alpha V \beta 3$ 抗体は EC の増殖を抑えたが、それぞれコラーゲングルおよびフィブリングル中での毛細管状構造の形成を促進したので、これらのインテグリンを経由するシグナルが ECs を増殖型から分化表現型に変えたものと推察される (20)。抗 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンもまた、*in vitro* でのマトリゲルによる毛細管環状構造の形成を阻害した (30)。

ECs は血管造成の際に他の細胞とも相互作用すると思われる。細胞間の接着を仲立ちする内皮細胞系の CAMs には VCAM-1、ICAM-1、ICAM-2、CD31、E-セレクトリン、P-セレクト

for L-selectin, vascular adhesion protein (VAP)-1 and endoglin (or CD105) (23, 35-37, 41, 105, 106). Antibodies to E-selectin, as well as to its ligands sialyl Lewis-X (sLx) and sialyl Lewis-A inhibit tube formation of capillary ECs (22). CD31 is involved in tumor stromal angiogenesis, and its expression on ECs correlates with metastatic potential and prognostic indices in breast cancer (24, 31). In neovascularization sites within melanomas CD31 exhibits an EC expression different from that on normal vessels (28). The L-selectin ligand CD34 is strongly expressed by vascular ECs in developing tissues, as well as in tumors and healing wounds (23). The expression of both CD31 and CD34 is increased on sinusoidal ECs in hepatocellular cancer compared to normal liver (25). A novel melanoma pregression-associated molecule, MUC 18, a member of the immunoglobulin superfamily of CAMs, is expressed by ECs of capillaries, but not those of larger vessels in the tumor (26).

In summary, a number of CAMs are involved in the adhesive events underlying neovascularization. Integrins including laminin, fibronectin and collagen receptors play a role in the attachment of endothelium to the surrounding ECM. Other CAMs, including members of the immunoglobulin superfamily and selectins, may be involved in EC adhesion to other cells during the regulated process of angiogenesis. Some CAMs have been associated with tumorigenesis, and they may also have diagnostic or prognostic value in the case of certain malignancies.

G-3. Soluble Endothelial Adhesion Molecules in Angiogenesis

We have recently shown the possible role of certain soluble endothelial CAMs in neovascularization. Soluble VCAM-1 and soluble E-selectin have been tested in both *in vitro* and *in vivo* models for angiogenesis involving EC cultures and rat corneas, respectively (34).

Recombinant soluble E-selectin and soluble VCAM-1 dose-dependently stimulated the chemotaxis of human umbilical vein ECs (HUVECs) and human dermal microvascular ECs. The chemotactic action of these two soluble CAMs was comparable to that of bFGF. Both soluble E-selectin and soluble VCAM-1 were chemotactic rather than chemokinetic for ECs. These soluble CAMs possibly showed direct effects in this assay, as they did not stimulate HUVECs to produce bFGF, TNF- α or IL-8 (34).

In addition, monoclonal antibodies to the E-selectin ligand sLx and to the VCAM-1 counterreceptor $\alpha 4\beta 1$ integrin, significantly reduced soluble CAM-mediated HUVEC chemotaxis (34). We and others have detected both sLx and $\alpha 4\beta 1$ on HUVEC by immunohistochemistry (34, 104). As sLx has been implicated in bovine capillary morphogenesis *in vitro* (22), our novel results suggest the role of the soluble E-selectin-sLx and the soluble VCAM-1- $\alpha 4\beta 1$ adhesion pathways in angiogenesis (34, 64).

チン、CD34、および、L-セレクトチン、VAP-1、エンドグリン (CD105) に対する糖鎖リガンドがある (23, 35-37, 41, 105, 106)。E-セレクトチンに対する抗体や、そのリガンドであるシアリル Lewis-X (sLx) や Lewis-A は毛細管 ECs の管状構造形成を阻害する (22)。CD31 は腫瘍の間質系の血管造成に役立ち、ECs 上の発現は乳癌の転移能および予後の指標と関わっている (24, 31)。メラノーマの血管新生部位での CD31 発現は正常な血管での発現とは異なっている (28)。L-セレクトチンのリガンドである CD34 は、発生途上の組織、腫瘍、創傷では脈管系の ECs により強く発現されている (23)。CD31 と CD34 両者は正常な肝臓に比べると肝臓では類洞の ECs に強く発現している (25)。メラノーマの進行に関連する新しい分子である MUC-18 はイムノグロブリンスーパーファミリーの一員であり、毛細管の ECs には発現しているが、腫瘍中のより太い血管では発現していない (26)。

まとめると、多くの ECMs が血管新生に関わる接着現象に関わっている。ラミニン、フィブロネクチン、およびコラーゲンの受容体であるインテグリンは、内皮細胞が周囲の ECM に接着する際に重要な役割を演じている。イムノグロブリンスーパーファミリーやセレクトチンなどの他の CAMs は、血管造成が調節下に進行する時に EC を他の細胞に接着させる過程に関わっているのだろう。ある種の CAMs は腫瘍形成に深く関わっていて、腫瘍の種類によっては診断や予後診断役立つ可能性がある。

G-3. 血管造成における可溶性の内皮系細胞接着因子

我々は最近、可溶性となった内皮系 CAMs が血管新生に関わっている可能性について調べた。可溶性の VCAM-1 と可溶性の E-セレクトチンを用いて、*in vitro* EC 培養系及び *in vivo* としてはラット角膜でそれぞれ血管新生に対する効果を調べた (34)。

組み替え体の可溶性 E-セレクトチンと可溶性の VCAM-1 は、ヒトの臍帯静脈 ECs (HUVECs)、およびヒト真皮の大きな血管の ECs の走化性を濃度依存的に刺激した。これらの 2 種の CAMs による走化性は bFGF に匹敵した。可溶性 E-セレクトチンと可溶性の VCAM-1 は、ECs にとってケモカインエティックというよりは走化性であった。これらの CAMs が HUVECs を刺激して bFGF、TNF- α 、IL-8 を生産させたわけではないので、これらの可溶性の CAMs はこの検定では直接効果を現したと思われる (34)。

さらに、E-セレクトチンのリガンド sLx に対する単クローン抗体や、VCAM-1 の受容体である $\alpha 4\beta 1$ インテグリンに対する単クローン抗体は、可溶性の CAM で引き起こされる HUVEC の走化性を著しく阻害した (34)。我々や他の研究室では HUVEC 上に sLx および $\alpha 4\beta 1$ があることを免疫組織染色で見つけている (34, 104)。sLx がウシの毛細管形成時に *in vitro* で存在すると主張されているので (22)、我々の新事実は血管造成時の可溶性の E-セレクトチン-sLx 間、および可溶性の VCAM-1- $\alpha 4\beta 1$ 間の結合経路の大事な役割を示唆している (34, 64)。

In the rat corneal neovascularization assay both soluble CAMs induced an angiogenic response at low concentrations in most experiments indicating that these molecules are angiogenic *in vivo*. We have also shown, that RA synovial fluids, which are chemotactic for HUVECs, contain soluble E-selectin and soluble VCAM-1. In addition, neutralization studies using antibodies to these two soluble CAMs showed that soluble E-selectin and soluble VCAM-1 account for a portion of the RA synovial fluid-mediated chemotactic activity (34).

In summary, we have shown using *in vitro* and *in vivo* models, that soluble E-selectin and soluble VCAM-1 may act as proangiogenic factors. They may directly trigger neovascularization by binding to their respective EC ligands and recruit adjacent ECs (34, 64).

H. Signalling Pathways in Angiogenesis

A number of signalling mechanisms are involved during angiogenesis. Phorbol esters, which activate protein kinase C (PKC), can induce the release of MMPs and PAs, and lead to tube formation in collagen gels (52). Integrin $\alpha\beta 1$ - and $\alpha V\beta 3$ -mediated capillary tube formation could be blocked by PKC antagonists (19, 29). Basic FGF-induced EC proliferation is also accompanied by PKC activation, tyrosine phosphorylation and calcium influx (52, 107, 108). TNF- α -induced angiogenesis involves protein tyrosine kinase (109). Thrombospondin-integrin adhesion is calcium dependent (83). Capillary formation on Matrigel involves G-protein mediated signals (30).

In conclusion, the interaction of ECs with ECM components or other cells is important during neovascularization. The stimulation of ECs by angiogenic mediators or the adhesion of ECs *via* CAMs result in various transmembrane signalling mechanisms, which, in turn may lead to capillary tube formation. Blocking such mechanisms, *e.g.* by using PKC antagonists, may be useful to understand the molecular mechanisms of angiogenesis.

I. Interactions between Angiogenic Mediators, Adhesion Molecules and Matrix Components in "Angiogenic Diseases"

The complexity of cell-to-cell and cell-ECM interactions can be demonstrated when studying tumor progression or inflammatory diseases, such as RA. In this section we will discuss various aspects of the interactions between ECs, angiogenic mediators, ECM components and CAMs. This well-coordinated network is important during the neovascularization process.

A number of EC CAMs, including integrins, ICAM-1 and -2, VCAM-1, CD31, CD34, CD44 and selectins show differential expression in solid, including vascular tumors, as well as lymphomas compared to normal tissues. It is difficult to assess which are the predominant adhesive pathways utilized dur-

ラットの角膜を用いる血管新生検定では、この両者の可溶のCAMsがほとんどの実験において低い濃度でも血管造成応答を引き起こしたので、*in vivo*でもこれらの分子は血管造成性であると思われる。RAの滑液はHUVECsに対して走化性であり、E-セレクトインと可溶性のVCAM-1を含んでいることを我々は見つけている。さらに、これらの可溶性のECMsに対する抗体を用いて中和実験を行うことで、可溶性のE-セレクトインと可溶性のVCAM-1がRA滑液中の液性の走化性因子の少なくとも一部であることが示された(34)。

まとめると、*in vitro*と*in vivo*モデルを用いて可溶性のE-セレクトインと可溶性のVCAM-1が血管造成性因子として働いているらしいことを我々は示した。これらの因子はそれぞれのECリガンドに結合して血管新生を直接誘導し、隣のECsを引きつけていると思われる(34, 64)。

H. 血管新生におけるシグナル経路

血管新生には多くのシグナル伝達機構がある。タンパク質キナーゼC(PKC)を活性化化するホルボールエステルはMMPsやPAsの遊離を引き起こし、コラーゲンゲル中で管状構造を形成する(52)。インテグリン $\alpha\beta 1$ および $\alpha V\beta 3$ を介する毛細血管形成はPKC拮抗阻害剤で阻害される(19, 29)。塩基性FGFで誘導されるEC増殖は、PKC活性化、チロシンリン酸化、及びカルシウムの流入を伴っている(52, 107, 108)。TNF- α で誘導される血管新生にはタンパク質チロシンキナーゼが働いている(109)。トロンボスポンジン-インテグリンの接着はカルシウム依存性であり(83)、マトリゲル中での毛細管形成にはG-タンパク質を経由するシグナルが含まれる(30)。

まとめると、ECsとECM成分あるいは他の細胞との相互作用は血管新生にとって重要である。血管新生のメディエーターによるECsの刺激、あるいはCAMsを経由するECsの接着は細胞膜を貫通する様々のシグナル伝達メカニズムを活性化し、次いで毛細管形成を引き起こす。例えばPKC拮抗阻害剤によってこれらの機構を妨害すると、血管新生の機構を分子レベルで理解するのに役立つであろう。

I. 「血管造成病」における血管新生のメディエーター、接着分子、およびマトリックス成分の間の相互作用

細胞-細胞間相互作用および細胞-ECM間相互作用の複雑さは、腫瘍の亢進や、RAのような炎症を研究すると良く分かる。ここでは、ECs、血管新生のメディエーター、接着分子とCAMsの間の相互作用を様々の角度から論じてみたい。この互いに相関し協調的なネットワークは血管新生の過程で大変重要である。

インテグリン、ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1、CD31、CD34、CD44及びセレクトインなどのECのCAMsは、脈管系の腫瘍のような固形癌や、リンフォーマでは正常組織とは異なる発現をしている。腫瘍の悪性化および転移に伴う血管新生で、最も主要

ing tumor progression and metastasis (9-11, 23, 51).

In RA, EC CAMs, such as ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, CD31, $\beta 3$ integrins, VAP-1 and the RGD-containing endoglin are present on the synovial endothelium, and most show strong expression in the angiogenesis-rich inflammatory sites (43-50, 105, 106). Fibronectin and its $\alpha 4 \beta 1$ -binding CS1 domain were also detected on the luminal surface of synovial ECs (110). We have suggested, that thrombospondin-1 may modulate EC adhesion to other ECM components, and thus angiogenesis in the RA synovial tissue (88).

The effect of cell-to-cell contact on CAM expression has been demonstrated, when monocytes layered on synovial cell culture induced ICAM-1 and VCAM-1 expression and cytokine production by the latter cells. This interaction was in part TNF- α -dependent (111). These data suggest, that intercellular contact mediated by CAMs may further stimulate CAM expression and the production of soluble mediators. Thus, not only soluble, but also cell surface CAMs may regulate EC adhesion during angiogenesis.

Soluble angiogenic mediators may interact with CAMs and ECM macromolecules during neovascularization. In fact, bFGF treatment of ECs *in vitro* resulted in an increased expression of the integrin subunits $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ and $\beta 5$, as well as in stronger adherence to type I collagen, fibronectin, laminin and vitronectin compared to untreated cells (112, 113). Interactions between bFGF, thrombospondin-1 and CAMs have also been demonstrated. Thrombospondin-1 inhibits angiogenesis by blocking the effects of bFGF on ECs (55). In addition, thrombospondin receptors, such as the $\alpha V \beta 3$ integrin, has been implicated in neovascularization (20, 102, 104). TGF- β induces $\alpha 2$, $\alpha 5$ and $\beta 1$ expression on ECs, suggesting that various growth factors can selectively alter the pattern of integrin expression on these cells (113). Treatment of ECs with TNF- α stimulates $\alpha 1 \beta 1$ expression and adhesion to laminin, while the combination of TNF- α and IFN- γ down-regulates $\alpha V \beta 3$ expression on these cells suggesting the complex interactions of angiogenic and angiostatic mediators in endothelium-ECM interactions (102, 114). TNF- α can also induce the expression of ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and some integrins on synovial and other types of microvascular ECs (5, 18, 35, 36, 38, 39, 102). This may result in the increased shedding of these CAMs from the EC surface. In fact, high levels of soluble ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin have been found in the synovial fluids of RA patients (115-118). As described above, some of these soluble CAMs may have proangiogenic activity (34).

In conclusion, in "angiogenic diseases" CAMs may be involved in EC adhesion to ECM components, as well as endothelial interactions with other cells. A number of soluble mediators secreted mostly by macrophages and ECs may directly induce neovascularization by various signals described before. Some of these factors, such as TNF- α , may act indirectly by

な接着経路を同定するのは難しい(9-11, 23, 51)。

RAの時には、ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトリン、CD31、CD34、 $\beta 3$ インテグリン、VAP-1、RGC含有エンドグリンが滑膜上皮にあり、血管造成の盛んな炎症部位では最も強く発現している(43-50, 105, 106)。フィブロネクチンとその $\alpha 4 \beta 1$ 結合CS1ドメインは滑膜ECの内腔側表面に検出できる(110)。トロンスポンジン-1はECが他のECM成分に接着するのを調節し、こうしてRAの滑膜組織における血管造成を制御しているのだろうと考えている(88)。

滑膜の細胞培養上に単球を広げて培養すると、滑膜細胞によるICAM-1およびVCAM-1の発現と、サイトカイン生産が誘導されるが、この時に細胞-細胞間の接触がCAMの発現に影響することが分かっている。この相互作用の一部はTNF- α 依存的である(111)。このことから、CAMsにより仲介される細胞間の接触が更にCAM発現と可溶性のメディエーターの生産を引き起こし、可溶性の因子は勿論、細胞表面にあるCAMsも、血管造成時にEC接着を調節するであろう。

血管の新規形成時に、可溶性の血管造成メディエーターはCAMsやECM巨大分子と相互作用すると思われる。実際、*in vitro*でECsをbFGFで処理すると、インテグリンのサブユニット、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ の発現が増加し、同時に、未処理細胞に比べるとI型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン及びビトロネクチンに対する強い接着が見られる(112, 113)。bFGF、トロンスポンジン-1、CAMs間の相互作用も示されている。トロンスポンジン-1は、ECsに対するbFGFの効果を妨害することにより血管新生を阻害する(55)。つけ加えると、 $\alpha V \beta 3$ インテグリンのようなトロンスポンジン受容体が血管新生に関わっていると思われる(20, 102, 104)。TGF- β はECs上に $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ を発現させるので、様々な成長因子はこれらの細胞におけるインテグリンの発現パターンを選択的に変えるのではないと思われる(113)。ECsをTNF- α で処理すると $\alpha 1 \beta 1$ 発現とラミニンへの接着が刺激されるが、一方、TNF- α とIFN- γ と一緒に与えると $\alpha V \beta 3$ 発現が抑制されるので、上皮-ECM間相互作用においては血管新生因子と形成阻害因子間の複雑な作用があることが想像される(102, 114)。TNF- α は滑膜および他の毛細血管系ECsの表面に、ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトリン、数種のインテグリンの発現を誘起する(5, 18, 35, 36, 38, 39, 102)。この結果、これらのCAMsのEC表面からの離脱・放出が高まるであろう。実際に、可溶性のICAM-1、VCAM-1、E-セレクトリンがRA患者の滑液中に見付かっている(115-118)。すでに書いたように、これらの可溶性のCAMsのうち幾つかには、血管新生性の活性がある(34)。

まとめると、「血管造成病」において、CAMsはECM成分へのEC接着だけでなく、他の細胞との血管内皮性の相互作用にも関わっている。主としてマクロファージにより分泌される可溶性の多種類のメディエーターとECsはすでに記載した様々のシグナルによる毛細血管新生を直接引き起こすと思われる。これらの因子の中のTNF- α のようなあるものは、EC細胞における

inducing the expression of CAMs on and shedding them from the EC surface. Increased CAM expression may result in stronger EC adhesion to ECM components. Cell-ECM and cell-cell interactions may further trigger EC CAM expression and cytokine production. As suggested by our and other groups, soluble, and possibly surface-bound endothelial CAMs can act as direct mediators of angiogenesis. In addition, as one of the possible ligands for E-selectin is closely related to FGF, these CAMs may also participate in neovascularization-associated signalling triggered by other mediators (34). Thus, the complex interactions between ECs, ECM macromolecules, CAMs and other angiogenic factors may lead to the perpetuation of angiogenesis.

J. Practical Aspects of Angiogenesis Studies

Angiogenesis research may have important relevance for clinical diagnosis and treatment. The assessment of neovascularization in biopsy specimens may be a prognostic marker in certain "angiogenic diseases" (3, 7). For example, significantly higher vessel density is found in RA than in normal synovial tissues (43). Also, vessel density may provide a marker for metastatic potential and prognosis in various tumors as described above (3, 7, 23-26, 31).

Regarding applications for therapy, in certain conditions the stimulation of physiological angiogenesis may be beneficial. Local or oral treatment with bFGF promoted wound and duodenal ulcer healing, respectively (3, 7). However, blocking pathological neovascularization would be of even greater importance in inflammatory diseases, as well as in tumors.

Regarding anti-cancer treatment, efforts have been made to develop new therapeutic strategies based on our current knowledge on angiogenesis and its mediators. Solid malignant tumors are primary targets for anti-angiogenic therapy (15). A number of phase I/II clinical trials are underway using angiogenesis inhibitors, such as PF4, MMP inhibitors, peptidoglycans, AGM-1470 and other compounds in patients with various tumors (15). Life-threatening hemangiomas in babies have been treated with IFN- α (3, 7). IFN- α is also able to suppress ocular neovascularization in animal models (7). Anti-bFGF, -VEGF, and -IL-8 antibodies inhibited angiogenesis, while anti-bFGF and -VEGF also suppressed the growth of various tumors (15, 71). VEGF receptor antagonists, such as antibodies or ligands, have been used to block VEGF receptor overexpression on tumor ECs (15). As described above, angiostatic steroids, PF4 and protamine have been found to suppress tumor growth and metastasis in various models (5, 83). The angiostatic effect thrombospondin-1 has been inversely correlated with tumor growth (83, 84, 86). Tenascin expression has been correlated with neovascularization in brain tumors (100). Among CAMs, CD31 expression has been de-

CAMsの発現や、EC細胞からのCAMsの離脱を誘導するのに間接的に関わっているらしい。CAM発現が亢進するとECはECM成分に強く接着するであろう。細胞-ECM、および細胞-細胞間相互作用の起こることで、さらにECにおけるCAM発現や、サイトカイン生産が盛んになると思われる。我々や他の研究グループが主張しているように、可溶性のCAMs、および細胞表面に結合している内皮性のCAMsが血管造成の直接のメディエーターとして作用できるであろう。さらに、E-セレクチンのリガンドの候補の一つはFGFと関連しているので、これらのCAMsは他のメディエーターにより刺激される血管新生に関わるシグナルとなるとと思われる(34)。したがって、ECs、ECM高分子、CAMs、その他の血管造成に関わる多くの因子の間の複雑な相互作用が血管造成を続けさせるのだろう。

J. 血管造成研究の実際の側面

血管造成の研究は臨床診断や処置に重要な関係があるに違いない。生検試料を使って血管新生が起こっているかどうかを調べることは「血管造成病」における予後の指標となるかも知れない(3, 7)。たとえば、正常組織と比べてRAでは血管密度が異常に亢進している(43)。血管密度は、すでに述べたように、腫瘍における転移の可能性を示すマーカーや予後診断に使えるだろう(3, 7, 23-26, 31)。

治療への応用としては、ある条件下では生理的に血管造成を刺激することは意味があるだろう。bFGFの局所的な投与あるいは経口的な摂取は、それぞれ創傷、十二指腸潰瘍の治療に有効であった(3, 7)。しかし、病理的な血管新生を阻止することは、炎症病や腫瘍においてもっと有意義であろう。

抗腫瘍治療においては、血管造成とそのメディエーターについての現在の知見に基づき、新しい治療上の戦略を開発する努力が払われている。固形悪性腫瘍は抗腫瘍治療上の最初の標的である(15)。種々の腫瘍患者に対して、PF4のような血管造成阻害剤、MMP阻害剤、ペプチドグリカン、AGM-1470、などを用いてフェーズI/IIの臨床試験が行われている(15)。新生児において生命の危険のある血管腫にはIFN- α が用いられた(3, 7)。IFN- α は眼の血管新生を、動物実験では抑えることが出来る(7)。抗bFGF、抗VEGF、抗IL-8抗体は血管造成を抑え、抗bFGF、抗VEGF抗体は数種の腫瘍の生育を阻止した(15, 71)。抗体やリガンドのようなVEGF受容体拮抗剤が、ECs腫瘍でのVEGF受容体の過剰発現を阻害するために用いられている(15)。すでに述べたように、さまざまなモデル実験では血管新生抑制的ステロイドであるPF4およびプロタミンが、腫瘍の成長と転移を抑えている(5, 83)トロンボスポンジン-1の血管新生抑制効果は、腫瘍の成長を逆に抑えている(83, 84, 86)。テネascin発現は脳腫瘍における血管新生と密接に関わっている(100)。CAMsの中ではCD31の発現が転移能の良い指標とされており、乳癌におけ

scribed as a good indicator of metastatic potential, and thus has prognostic value in breast cancer (24, 31). Antibodies to the $\alpha V\beta 3$ integrin caused regression of different human tumors in the chorioallantoic membrane assay (104). Targeting any of these angiogenic or angiostatic factors may be useful in controlling tumor growth and progression.

A number of anti-inflammatory agents currently used in rheumatic diseases, such as RA, exhibit angiostatic activities (1, 15). Indomethacin, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, inhibits angiogenesis in *in vivo* assays, possibly by suppressing the production of the angiogenic prostaglandin E2 (1). Methotrexate blocks neovascularization both *in vivo* and *in vitro* (1). Sulfasalazine, gold compounds, azathioprine, cyclophosphamide, and chloroquine are able to inhibit EC proliferation and migration *in vitro* (1). We have also shown, that gold and thiol-containing compounds inhibit the production of macrophage-derived angiogenic activity (59, 60). Type II collagen-induced arthritis in rats could be suppressed by a fumagillin-derivative and taxol (42, 119). Additional compounds with angiostatic activity mentioned above may also be included in future therapeutic strategies (1, 3, 5, 12-15, 89-91, 119-123).

As CAMs have been recently implicated in angiogenesis, inhibition of their expression on the endothelial surface may be useful for more specific modulation of neovascularization. For example, fibronectin peptides containing the RGD sequence, which is recognized by several $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins, suppress tumor-associated angiogenesis (21), as well as arthritis in rats (124). Gold compounds and glucocorticoids suppressed the expression of E-selectin and ICAM-1 in the RA synovium, respectively (125, 126), while cyclosporine A was able to down-regulate ICAM-1 expression by papillary ECs in psoriatic patients (127). Cytokine-induced EC ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression was diminished by their antisense oligonucleotides (128). We have shown, that some soluble CAMs are able to induce angiogenesis both *in vivo* and *in vitro* (34). Thus, the suppression of the cell surface expression, followed by the shedding of these CAMs may lead to the inhibition of CAM-mediated capillary formation. In conclusion, apart from currently used angiostatic drugs, other anti-angiogenic agents may potentially be included in the treatment of certain "angiogenic diseases".

る予後診断に使われる。 $\alpha v\beta 3$ インテグリンに対する抗体は、尿漿膜を用いる検定では数種のヒトの腫瘍を縮退させた(104)。これらの血管造成あるいは血管新生抑制因子のどれかを標的にすれば、腫瘍の成長と進行を抑制するのに役立つであろう。

RA の様なリウマチ性の病気で現在使われている抗炎症薬の幾つかは血管新生抑制作用を持っている(1, 15)。非ステロイド系の抗炎症剤であるインドメタシンは、恐らく血管造成性のプロスタグランジンE2の生産を抑えることにより、*in vivo* 検定で血管造成を抑える(1)。メトトレキセートは*in vivo* と *in vitro* の両方で血管新生を抑える(1)。スルファサラジン、金化合物、アザチオプリン、シクロホスファミド、クロロキンは*in vitro* でECの増殖と移動を阻害する(1)。我々は、金及びチオール含有化合物がマクロファージ由来の血管造成活性の生産を阻害することを見出した(59, 60)。II型のコラーゲンで誘導されるラットの動脈硬化はフマジリン誘導体とタクソールにより抑制できる(42, 119)。ここで述べてきた血管新生抑制活性のある化合物は、将来は治療戦略に組み込まれるであろう(1, 3, 5, 12-15, 89-91, 119-123)。

CAMs は最近になって血管造成に組み込まれていることが分かってきたので、内皮細胞表面上のCAMsの発現を阻害することは、血管新生のみを特異的に抑えるためには有効かも知れない。たとえば、RGD配列を含んでいるフィブロネクチンペプチドは $\beta 1$ 、 $\beta 3$ インテグリンにより認識されるが、腫瘍成長に絡んだ血管造成(21)ならびにラットにおける関節炎 (124)を抑える。金化合物およびグルココルチコイドは、それぞれRA滑膜でのE-セレクトインとICAM-1の発現を抑制した(125, 126)が、一方サイクロスポリンAは、乾癬患者で乳頭状のECsによるICAM-1発現を抑制した(127)。サイトカインで誘導されるECのICAM-1、VCAM-1、およびE-セレクトインの発現はこれらに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処理で低下した(128)。可溶性になったECMsは*in vivo* と *in vitro* の両方で血管造成を誘導する(34)。したがって、細胞表面での発現と引き続くCAMsの遊離を抑制すると、CAM誘導性の毛細血管の形成を阻害できるだろう。つまり、現在使われている血管新生抑制の薬から離れて、それ以外の抗血管造成薬がある種の「血管造成病」で使われても良い気がする。

(財)日本皮革研究所・糖鎖情報工学部門

山形 貞子 訳

(財)日本皮革研究所・糖鎖情報工学部門

山形 達也 監訳

References

1. Colville-Nash, P.R., and Scott, D.L. (1992) Ann. Rheum. Dis. **51**, 919-925
2. Folkman, J., and Klagsbrun, M. (1987) Science **235**, 442-447
3. Folkman, J., and Shing, Y. (1992) J. Biol. Chem. **267**, 10931-10934
4. Polverini, P.J. (1989) In Macrophage-derived cell regulatory factors. Cytokines (Sorg, C. ed.), vol. 1., pp. 54-73, Basel, Switzerland, Karger
5. Klagsbrun, M., and D'Amore, P.A. (1991) Annu. Rev. Physiol. **53**, 217-239
6. Sunderk tter, C., Goebeler, M., Schulze-Osthoff, K., Bhardwaj, R., and Sorg, C. (1991) Pharmac. Ther. **51**, 195-216
7. Folkman, J. (1991) EXS **59**, 4-13

8. Kahlon, R., Shapero, J., and Gotlieb, A.I. (1992) *Can. J. Cardiol.* **8**, 60–64
9. Albelda, S.M. (1993) *Lab. Invest.* **68**, 4–17
10. Roos, E. (1991) *Cancer Metast. Rev.* **10**, 33–48
11. Ruoslahti, E., and Giancotti, F.G. (1989) *Cancer Cells* **1**, 119–126
12. Auerbach, W., and Auerbach, R. (1994) *Pharmacol. Ther.* **63**, 265–311
13. Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., and Varela, H. (1994) *Histol. Histopathol.* **9**, 807–843
14. Sunderkatter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R., Sorg, C. (1994) *J. Leuk. Biol.* **55**, 410–422
15. Schweigerer, L. (1995) *J. Mol. Med.* **73**, 497–508
16. Sage, E.H., and Vernon, R.B. (1994) *J. Hypertens. Suppl.* **12**, S145–S152
17. Soncin, F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2232–2236
18. Albelda, S.M. (1991) *EXS* **59**, 188–192
19. Jackson, C.J., Jenkins, K., and Schrieber, L. (1991) *EXS* **59**, 198–204
20. Gamble, J.R., Matthias, L.J., Meyer, G., Kaur, P., Russ, G., Faull, R., Berndt, M.C., and Vadas, M.A. (1993) *J. Cell. Biol.* **121**, 931–943
21. Saiki, I., Murata, J., Makabe, T., Nishi, N., Tokura, S., and Azuma, I. (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 668–675
22. Nguyen, M., Strubel, N.A., and Bischoff, J. (1993) *Nature* **365**, 267–269
23. Ito, A., Nomura, S., Hirota, S., Suda, J., Suda, T., and Kitamura, Y. (1995) *Lab. Invest.* **72**, 532–538
24. Charpin, C., Devictor, B., Bergeret, D., Andrac, L., Boulat, J., Horschowski, N., Lavaut, M.N., and Piana, L. (1995) *Am. J. Clin. Pathol.* **103**, 443–448
25. Ruck, P., Xiao, J.C., and Kaiserling, E. (1995) *Arch. Pathol. Lab. Med.* **119**, 173–178
26. Sers, C., Riethmuller, G., and Johnson, J.P. (1994) *Cancer Res.* **54**, 5689–5694
27. Lusinskas, F.W., and Lawler, J. (1994) *FASEB J.* **8**, 929–938
28. Berger, R., Albelda, S.M., Berd, D., Ioffreda, M., Whitaker, D., and Murphy, G.F. (1993) *J. Cutan Pathol.* **20**, 399–406
29. Davis, C.M., Danehower, S.C., Laurenza, A., and Molony, J.L. (1993) *J. Cell Biochem.* **51**, 206–218
30. Bauer, J., Margolis, M., Schreiner, C., Edgell, C.J., Azizkhan, J., Lazarowski, E., and Juliano, R.L. (1992) *J. Cell Physiol.* **153**, 437–449
31. Horak, E.R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniewska, K., and Harris, A.L. (1992) *Lancet* **340**, 1120–1124
32. Nicosia, R.F., and Bonanno, E. (1991) *Am. J. Pathol.* **138**, 829–833
33. Brooks, P.C., Clark, R.A., and Cheresch, D.A. (1994) *Science* **264**, 569–571
34. Koch, A.E., Halloran, M.M., Haskell, C.J., Shah, M.R., and Polverini, P.J. (1995) *Nature* **376**, 517–519
35. Albelda, S.M., and Buck, C.A. (1990) *FASEB J.* **4**, 2868–2880
36. Springer, T.A. (1990) *Nature* **346**, 425–433
37. Carlos, T.M., and Harlan, J.M. (1994) *Blood* **84**, 2068–2101
38. Harlan, J.M., and Liu, D.Y. eds. (1992) *Adhesion: its role in inflammatory disease*, New York, W.H. Freeman Co.
39. Abbot, S.E., Kaul, A., Stevens, C.R., and Blake, D.R. (1992) *Arthritis Rheum.* **35**, 401–406
40. Szekanecz, Z., Shah, M.R., Pearce, W.H., and Koch, A.E. (1994) *Clin. Exp. Immunol.* **98**, 337–343
41. Szekanecz, Z., and Szegedi, G. (1992) *Orv. Hetil.* **133**, 135–142
42. Peacock, D.J., Banquerigo, M.L., and Brahn, E. (1992) *J. Exp. Med.* **175**, 1135–1138
43. Szekanecz, Z., Haines, G.K., Lin, T.R., Harlow, L.A., Goerdts, S., Rayan, G., and Koch, A.E. (1994) *Arthritis Rheum.* **37**, 221–231
44. Koch, A.E., Burrows, J.C., Haines, G.K., Carlos, T.M., Harlan, J., and Leibovich, S.J. (1991) *Lab. Invest.* **64**, 313–320
45. Szekanecz, Z., Haines, G.K., Harlow, L.A., Shah, M.R., Fong, T.W., Fu, R., Lin, S.J.-W., and Koch, A.E. (1995) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **76**, 180–186
46. Johnson, B., Haines, G.K., Harlow, L.A., and Koch, A.E. (1993) *Arthritis Rheum.* **36**, 137–146
47. van Dinther-Janssen, A.C.H.M., Horst, E., Koopman, G., Newmann, W., Scheper, R.J., Meijer, C.J., and Pals, S.T. (1991) *J. Immunol.* **147**, 4207–4210
48. Wilkinson, L.S., Edwards, J.C.W., Poston, R.N., and Haskard, D.O. (1993) *Lab. Invest.* **68**, 82–88
49. Haskard, D.O. (1995) *Curr. Opin. Rheumatol.* **7**, 229–234
50. Jalkanen, S. (1989) *Springer Semin. Immunopathol.* **11**, 187–198
51. Kuzu, I., Bicknell, R., Fletcher, C.D.M., and Gatter, K.C. (1993) *Lab. Invest.* **69**, 322–328
52. Montesano, R., Pepper, M.S., Vassalli, J.-D., and Orci, L. (1991) *EXS* **59**, 129–136
53. Canfield, A.E., Sutton, A.B., Schor, S.L., Grant, M.E., and Schor, A.M. (1991) *EXS* **59**, 158–166
54. Presta, M., Rusnati, M., Urbinati, C., Tanghetti, E., Statuto, M., Pozzi, A., Gualandris, A., and Ragnotti, G. (1991) *EXS* **59**, 205–209
55. Tarabozetti, G., Belotti, D., and Giavazzi, R. (1991) *EXS* **59**, 210–213
56. Leibovich, S.J., Polverini, P.J., Shepard, H.M., Wiseman, D.M., Shively, V., and Nuseir, N. (1987) *Nature* **329**, 630–632
57. Szekanecz, Z., Shah, M.R., Harlow, L.A., Pearce, W.H., and Koch, A.E. (1994) *Pathobiology* **62**, 134–139
58. Koch, A.E., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G., and Strieter, R.M. (1992) *Science* **258**, 1798–1801
59. Koch, A.E., Burrows, J., Cho, M., Polverini, P.J., and Leibovich, S.J. (1991) *Agents Actions* **34**, 350–357
60. Koch, A.E., Cho, M., Burrows, J., Leibovich, S.J., and Polverini, P.J. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 205–212
61. Madri, J.A., and Williams, K.S. (1983) *J. Cell Biol.* **97**, 153–165
62. Hu, D.E., Hori, Y., and Fan, T.-P.D. (1993) *Inflammation* **17**, 135–143
63. Koch, A.E., Harlow, L.A., Haines, G.K., Amento, E.P., Unemori, E.N., Wong, W.L., Pope, R.M., and Ferrara, N. (1994) *J. Immunol.* **152**, 4149–4156
64. Ferrara, N. (1995) *Nature* **376**, 467
65. Sato, N., Beitz, J.G., Kato, J., Yamamoto, M., Clark, J.W., Calabresi, P., and Frackelton jr., A.R. (1993) *Am. J. Pathol.* **142**, 1119–1130
66. Rosen, E.M., Grant, D.S., Kleinman, H.K., Goldberg, I.D., Bhargava, M.M., Nickoloff, B.J., Kinsella, J.L., and Polverini, P. (1993) *Symp. Soc. Exp. Biol.* **47P**, 227–234

67. Montesano, R., Vassalli, J.D., Baird, A., Guillemin, R., and Orci, L. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7297–7301
68. Koch, A.E., Polverini, P.J. and Leibovich, S.J. (1986) *Arthritis Rheum.* **29**, 471–479
69. Koch, A.E., Kunkel, S.L., Burrows, J.C., Evanoff, H.L., Haines, G.K., Pope, R.M., and Strieter, R.M. (1991) *J. Immunol.* **147**, 2187–2195
70. Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P., and Bohlen, P. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5277–5281
71. Smith, D.R. Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Orringer, M.B., Whyte, R.I., Burdick, M.D., Wilke, C.A., and Strieter, R.M. (1994) *J. Exp. Med.* **179**, 1409–1415
72. Strieter, R.M., Polverini, P.J., Arenberg, D.A., Walz, A., Opdenakker, G., Van Damme, J., and Kunkel, S.L. (1995) *J. Leukoc. Biol.* **57**, 752–762
73. Sachs, L. (1991) *EXS* **59**, 20–22.
74. Rosen, E.M., Liu, D., Setter, E., Bhargava, M., and Goldberg, I.D. (1991) *EXS* **59**, 194–205
75. Motro, B., Itin, A., Sachs, L., and Keshet, E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3092–3096
76. Camussi, G., Montrucchio, G., Lupia, E., De Martino, A., Perona, L., Arese, M., Vercellone, A., Toniolo, A., and Bussolino, F. (1995) *J. Immunol.* **154**, 6492–6501
77. Carlini, R.G., Reyes, A.A., and Rothstein, M. (1995) *Kidney Int.* **47**, 740–745
78. Odedra, R., and Weiss, J.B. (1991) *Pharmacol. Ther.* **49**, 111–124.
79. Voest, E.E., Kenyon, B.M., O'Reilly, M.S., Truitt, G., D'Amato, and R.J., Folkman, J. (1995) *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 581–586
80. Angiolillo, A.L., Sgadari, C., Taub, D.D., Liao, F., Farber, J.M., Maheshwari, S., Kleinman, H.K., Reaman, G.H., and Tosato, G. (1995) *J. Exp. Med.* **182**, 155–162
81. Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., and Polverini, P.J. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 51–57
82. Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 73–83
83. Walz, D.A. (1992) *Cancer Metast. Rev.* **11**, 313–324
84. Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A., and Bouck, N. (1994) *Science* **265**, 1582–1584
85. Canfield, A.E., and Schor, A.M. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 797–809
86. Weinstat-Saslow, D.L., Zabrenetzky, V.S., VanHoutte, K., Frazier, W.A., Roberts, D.D., and Steeg, P.S. (1994) *Cancer Res.* **54**, 6504–6511
87. DiPietro, L.A., Nebgen, D.R., and Polverini, P.J. (1994) *J. Vasc. Res.* **31**, 178–185
88. Koch, A.E., Friedman, J., Burrows, J.C., Haines, G.K., and Bouck, N.P. (1993) *Pathobiology* **161**, 1–6
89. Crum, R., Szabo, S., and Folkman, J. (1985) *Science* **230**, 1375–1378
90. Johnson, M.D., Kim, H.R., Chesler, L., Tsao-Wu, G., Bouck, N., and Polverini, P.J. (1994) *J. Cell Physiol.* **160**, 194–202
91. Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H., and Folkman, J. (1990) *Nature* **348**, 555–557
92. Koch, A.E., Kunkel, S.L., and Strieter, R.M. (1995) *J. Invest. Med.* **43**, 28–38
93. Brennan, F.M., Field, M., Chu, C.Q., Feldmann, M., and Maini, R.N. (1991) *Br. J. Rheumatol.* **30**, 76–80
94. Lipsky, P.E., Davis, L.S., Cush, J.J., and Oppenheimer-Marks, N. (1989) *Springer Semin. Immunopathol.* **11**, 123–162
95. Nickoloff, B.J., Mitra, R.S., Varani, J., Dixit, V.M., and Polverini, P.J. (1994) *Am. J. Pathol.* **144**, 820–828
96. Jaffe, E.A. (1988) in *Inflammation: basic principles and clinical correlates* (Gallin, J.I., Goldstein, I.M., and Snyderman, R., eds.), pp. 559–576, New York, Raven Press
97. Nicosia, R.F., Bonanno, E., and Smith, M. (1993) *J. Cell Physiol.* **154**, 654–661
98. Schnaper, H.W., Kleinman, H.K., and Grant, D.S. (1993) *Kidney Int.* **43**, 20–25
99. Vacca, A., Ribatti, D., Roncali, L., Lospalluti, M., Serio, G., Carrel, S., and Dammacco, F. (1993) *Cancer* **72**, 455–461
100. Zagzag, D., Friedlander, D.R., Miller, D.C., Dosik, J., Cangiarella, J., Kostianovsky, M., Cohen, H., Grumet, M., and Greco, M.A. (1995) *Cancer Res.* **55**, 907–914
101. Grant, D.S., Lelkes, P.I., Fukuda, K., and Kleinman, H.K. (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* **27A**, 327–336
102. Defilippi, P., Bozzo, C., Geuna, M., Rossino, P., Silengo, L., and Tarone, G. (1991) *EXS* **59**, 193–197
103. Massia, S.P., and Hubbell, J.A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 14019–14026
104. Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., and Cheresch, D.A. (1994) *Cell* **79**, 1157–1164
105. Salmi, M., Kalimo, K., and Jalkanen, S. (1993) *J. Exp. Med.* **178**, 2255–2260
106. Szekanecz, Z., Haines, G.K., Harlow, L.A., Shah, M.R., Fong, T.W., Fu, R., Lin, S.J-W., Rayan, G., and Koch, A.E. (1995) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **76**, 187–194
107. Kohn, E.C., Alessandro, R., Spoonster, J., Wersto, R.P., and Liotta, L.A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1307–1311
108. Daviet, I., Herbert, J.M., and Maffrand, J.P. (1990) *FEBS Lett.* **259**, 315–317
109. Pandey, A., Shao, H., Marks, R.M., Polverini, P.J., and Dixit, V.M. (1995) *Science* **268**, 567–569
110. Elices, M.J., Tsai, V., Strahl, D., Goel, A.S., Tollefson, V., Arrhenius, T., Wayner, E.A., Gaeta, F.C., Fikes, J.D., and Firestein, G.S. (1994) *J. Clin. Invest.* **93**, 405–416
111. Blue, M.L., Conrad, P., Webb, D.L., Sarr, T., and Macaro, M. (1993) *Lymphokine Cytokine Res.* **12**, 213–218.
112. Klein, S., Giancotti, F.G., Presta, M., Albelda, S.M., Buck, C.A., and Rifkin, D.B. (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 973–982
113. Enenstein, J., Walehm N.S., and Kramer, R.H. (1992) *Exp. Cell Res.* **203**, 499–503
114. Santala, P., and Heino, J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 23505–23509
115. Mason, J.C., Kapahi, P., and Haskard, D.O. (1993) *Arthritis Rheum.* **36**, 519–527
116. Cush, J.J., Rothlein, R., Lindsley, H.B., Mainolfi, E.A., and Lipsky, P.E. (1993) *Arthritis Rheum.* **36**, 1098–1102
117. Koch, A.E., Turkiewicz, W., Harlow, L.A., and Pope, R.M. (1993) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **69**, 29–35
118. Koch, A.E., Shah, M.R., Harlow, L.A., Lovis, R.M., and Pope, R.M. (1994) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **71**, 208–215
119. Oliver, S.J., Banquerigo, M.L., and Brahn, E. (1994) *Cell. Immunol.* **157**, 291–299
120. Takano, S., Gately, S., Neville, M.E., Herblin, W.F., Gross, J.L., Engelhard, H., Perricone, M., Eidsvoog, K., and Brem, S. (1994) *Cancer Res.* **54**, 2654–2660
121. Alliegro, M.C., Alliegro, M.A., Cragoe Jr, E.J., and Glaser, B.M. (1993) *J. Exp. Zool.* **267**, 245–252
122. Oikawa, T., Hasegawa, M., Morita, I., Murota, S., Ashino, H., Shimamura, M., Kiue, A., Hamanaka, R., Kuwano, M., and Ishizuka, M.

- (1992) *Anticancer Drugs* **3**, 293–299
123. Oikawa, T., Hasegawa, M., Shimamura, M., Ashino, H., Murota, S., and Morita, I. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1070–1076
124. Wahl, S.M., Allen, J.B., Hines, K.L., Imamichi, T., Wahl, A.M., Furcht, L.T., and McCarthy, J.B. (1994) *J. Clin. Invest.* **94**, 655–662
125. Corkill, M.M., Kirkham, B.W., Haskard, D.O., Barbatis, C., Gibson, T., and Panayi, G.S. (1991) *J. Rheumatol.* **18**, 1453–1460
126. Tessier, P., Audette, M., Cattaruzzi, P., and McColl, S.R. (1993) *Arthritis Rheum.* **36**, 1528–1539
127. Petzelbauer, P., Stingl, G., Wolff, K., and Volc-Platzer, B. (1991) *J. Invest. Dermatol.* **96**, 362–369
128. Bennett, C.F., Condon, T.P., Grimm, S., Chan, H., and Chiang, M-Y. (1994) *J. Immunol.* **152**, 3530–3540

Profile of the Author

Dr. Alisa Koch is currently the Gallagher Research Professor of Medicine at Northwestern University Medical School, Chicago, IL, USA. Dr. Koch graduated from the Six Year Honors Program in Medical

Education at Northwestern University receiving a BS degree combined with an MD degree in six years. She went to do a residency in Internal Medicine at Loyola University, Maywood, IL, followed by a fellowship in Rheumatology at Northwestern University where she became faculty in 1986. She rose through the ranks at

Northwestern University becoming professor in 1995, and Gallagher Research Professor of Medicine in 1997. She has also served as the chief of Rheumatology at the Veteran's Administration Chicago Health Care System Lakeside Division since 1991. Dr. Koch has served on review panels for the National Institutes of Health and Veteran's Administration, among others. She is a reviewer for a number of journals including the *Journal of Immunology*, *Science*, *Arthritis and Rheumatism*, and the *New England Journal of Medicine*. Dr. Koch's research focus on the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. Her laboratory examines several areas of arthritis research including gene therapy, mechanisms of angiogenesis in the arthritic joint, and mechanisms of inflammation mediated by cell adhesion molecules.