Platelet-Derived Growth Factor and Angiogenesis

血管新生における血小板由来増殖因子(PDGF)の役割

^{1,2}Battegay, Edouard J., ¹Thommen, Regula ; and ¹Humar, Rok

Departments of ¹Research and ²Internal Medicine, University Hospitals, CH-4031 Basel, Switzerland,

FAX: 41-61-265-23-50, E-mail: Battagay@ubaclu.unibas.ch

Key Words: angiogenesis, angiogenesis factor, cellular phenotype, endothelium, platelet-derived growth factor

Abstract

Angiogenesis, the formation of new vessels from existing microvessels, is important in embryogenesis, wound healing, inflammation, ischemic heart- and peripheral vascular disease, myocardial infarction, diabetic retinopathy, and cancer. Platelet-derived growth factor (PDGF) has been implicated in most of these processes and can induce the generation of a vascularized connective tissue stroma.

PDGF homo- and heterodimers, composed of a PDGF A- and/or B-chain, and PDGF receptor subunits (α - and β) are widely expressed upon tissue injury and repair. Hypoxia and other angiogenesis-related stimuli can induce expression of the PDGF B-chain. PDGF may modulate angiogenesis by attracting inflammatory or connective tissue cells which in turn control angiogenesis. Additionally, PDGF may act directly on specific phenotypes of endothelial cells that are engaged in angiogenesis or that are of microvascular origin and that express PDGF receptor β -subunits. PDGF induces the formation of a vascularized connective tissue stroma upon exogenous administration or local overexpression. The presence of PDGF and its receptors in angiogenesis-related processes or diseases such as placenta formation, embryogenesis, wound healing, atherosclerosis, and cancer is consistent with a role for PDGF in angiogenesis.

Thus, PDGF-BB can elicit the formation of a vascularized connective tissue stroma. New vessel formation in response to PDGF-BB may be partially due to its direct effects on endothelial cells that express PDGF receptor β -subunits.

要約

血管新生、すなわち既に存在する微小血管から新たな血管を形成する過程は胚発生や創傷治癒、炎症、心臓や末梢血管の虚血性疾患、心筋梗塞、糖尿病性網膜症、そして癌などにおいて重要な機能を果たしている。血小板由来増殖因子 (PDGF) はこれらの過程のほとんどに関与しており、血管網の発達した結合組織の形成を誘導する。

PDGF-A鎖、-B鎖から成るPDGFのホモあるいはヘテロの二量体と、PDGFレセプターのサブユニット (α 型、 β 型) は、組織の損傷や修復の際には広く発現される。低酸素状態などの血管新生を誘導するような刺激はPDGF-B鎖の発現を促す。PDGFは血管新生を直接制御するような炎症性のあるいは結合組織の細胞を引き寄せ、これによって間接的に血管新生を制御する。また、血管を形成しつつある内皮細胞や微小血管由来の内皮細胞は、 β 型PDGFレセプターを発現するという特徴ある性質を示し、PDGFはこのような細胞には直接作用する。PDGFを外から投与したり局所的に過剰発現したりすると、血管網の発達した結合組織が形成される。胎盤形成、胚形成、創傷治癒、動脈硬化、癌といった血管新生が関与する過程やその疾患の際には、PDGFとそのレセプターが発現されることから、血管が形成される際にはPDGFが実際に機能していると考えられる。

このように、PDGF-BBは血管網の発達した結合組織間質の形成を促す。PDGF-BBに応答した新たな血管の形成は、 β 型レセプターを発現している内皮細胞に対する直接作用によるものもある。

A. Introduction

Angiogenesis or neovascularization is the formation of new capillary blood vessels from existent microvessels by sprouting, *i.e.*, cellular outgrowth. In contrast, the development of new vessels from committed stem cells in early embryogenesis is termed vasculogenesis (1, 2). Vasculogenesis shows some similarities to angiogenesis (2) but it takes no part in tissue remodeling in post-embryonic life. In contrast, angiogenesis is a morphogenetic process that generates a vascular supply in adult tissue remodeling and disease. Angiogenesis is

A. はじめに

血管新生あるいは脈管新生は、既に存在する微小血管から細胞の増殖によって、出芽するようにして新しい毛細血管を形成する過程である。これに対し、胚形成の初期において既に運命づけられた幹細胞から新しい血管が伸展していく過程は管腔形成と呼ばれている (1, 2)。管腔形成は血管新生に似ている点もあるが (2)、発生後の生体で組織の再構成を行う際には生じ得ない。一方、血管新生は成体の組織再構成や疾患の際に血管の供給を行う形態形成過程である。生殖、創傷治癒、骨の修復、

critical in reproduction, wound healing, bone repair, rheumatoid arthritis, ischemic heart disease, ischemic peripheral vascular disease, diabetic retinopathy, tumor growth, and tumor metastazation [reviewed in (3-9)]. Furthermore, angiogenesis, together with vasculogenesis, plays a role in embryogenesis. In some of these processes neovascularizations are an element of reparative tissue remodeling and preservation of vitally important ischemic tissue. In other situations angiogenesis contributes to tissue destruction and promotes disease.

Platelet-derived growth factor (PDGF) is widely expressed in embryogenesis, tissue injury, inflammatory responses, and diseases with connective tissue deposition. In these processes the formation of an inflammatory or connective tissue containing newly formed vessels, *i.e.*, a vascularized stroma, is a prominent feature to which PDGF may contribute. The association of angiogenesis with PDGF have lent support to a potential role for PDGF in new vessel formation. This review summarizes current evidence that links PDGF and angiogenesis, specifically; (i) Cells and stimuli that are associated with angiogenesis and PDGF release, (ii) PDGF and experimental angiogenesis, and (iii) PDGF and angiogenesis in tissue remodeling and disease.

B. PDGF Structure

PDGF is composed of two distinct but highly homologous polypeptide chains, designated the PDGF A-chain and the PDGF B-chain [reviewed in (10-12)]. The PDGF A-chain and the B-chain are encoded by two different genes. The gene product of the latter is 93% homologous to p28^{sis}, the *v-sis* transforming protein of simian sarcoma virus (10, 12). The PDGF A-chain and B-chain genes have a number of structural similarities such as size (approximately 24kb), structure, the number of seven exons, and the use of exon 6 (10, 13, 14). Translation of exon 6 of the A- or B-chain results in compartmentalization of these forms of PDGF with matrix- or cell-associated heparan-sulfate proteoglycans, whereas forms lacking this sequence are secreted freely (13, 14). The two PDGF A-chain transcripts, which arise from alternative usage of exon 6 and exon 7, give rise to two forms of the PDGF A-chain. No differences in their biological activities have been identified so far.

PDGF A- and B-chains form disulfide-linked homo- and heterodimers. PDGF can therefore be assembled into at least three isoforms with an approximate molecular weight of 28kD called PDGF-AA, PDGF-AB, and PDGF-BB (10). The cellular response to each of these isoforms depends on the presence of specific, high affinity receptors.

Two distinct receptor subtypes have been identified, the PDGF receptor α -subunit and the PDGF receptor β -subunit (10-12). Cloning, sequencing, and expression of the PDGF receptor α -subunit and PDGF receptor β -subunit yielded two structurally related products of different genes (10-12). Both

リュウマチ性関節炎、虚血性心疾患、虚血性末梢血管疾患、糖尿病性網膜症、癌の成長、癌の転移などにおいて、血管新生は重要な役割を果たしている [総説 (3-9) 参照]。また胚形成過程でも、管腔形成のみならず血管新生も生じている。なかでも、修復した組織を再構成したり重篤な虚血組織を保護したりする際に、新たな血管が形成される。逆に、新たな血管が生じることによって組織が破壊されたり疾患が進行したりすることもある。

血小板由来増殖因子 (PDGF) は胚形成、組織の損傷、炎症性の反応、結合組織の沈着を伴う疾患の際に広く発現される。PDGF が関与した際には、血管網が発達した炎症性組織や結合組織が形成される点が特徴的である。血管新生に PDGF が関わっていることから、新たな血管を形成する際に PDGF が何らかの役割を果たしていると考えられる。この総説では、特に PDGF と血管新生とが結びついていることを示す最新の証拠をまとめた。

- (i) 血管の形成や PDGF の遊離に関わる細胞と刺激。
- (ii) PDGF と実験的な血管の形成。
- (iii) 組織再構成や疾患の際の PDGF と血管新生。

B. PDGF、PDGF レセプターの構造

PDGF は非常に相同性の高い 2 種のポリペプチド (PDGF-A 鎖、PDGF-B 鎖) から成っている [総説 (10-12) 参照]。A 鎖と B 鎖は異なる遺伝子にコードされており、B 鎖遺伝子の産物はサル肉腫ウイルスの発癌遺伝子 (*v-sis*) 産物である p28^{sis} と 93 % のホモロジーがある (10, 12)。A 鎖、B 鎖の遺伝子は約 24 kb といったサイズ、構造、7 つのエキソンからなる点、第 6 エキシソンの使い方など、構造的に多くの類似点がある (10, 13, 14)。第 6 エキシソンが翻訳された形の PDGF はマトリックスや細胞の近傍に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンと相互作用する形で存在し、一方第 6 エキシソンを欠く PDGF は細胞外に分泌される (13, 14)。A 鎖については第 6 エキシソンを用いるか、第 7 エキシソンを用いるかで 2 種の mRNA が作られ、その結果 2 種類のタンパク質が生成されている。しかし現在のところこれらの生物活性には差がないと考えられている。

A 鎖、B 鎖はジスルフィド結合で分子量 約 28 kD のホモダイマー、ヘテロダイマーを形成する。すなわち PDGF には PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB と呼ばれる少なくとも 3 種のアイソフォームが存在する (10)。これらのアイソフォームそれぞれに対する細胞の反応性は、細胞の側にそれぞれのアイソフォーム特異的な高親和性レセプターが存在するか否かに依存している。

PDGF のレセプターについてはこれまでに、2 つのサブタイプが同定されており、PDGF レセプターの α 型、 β 型と呼ばれている (10-12)。両者の遺伝子解析の結果、これらは構造的に非常に似たタンパク質でありながら、異なる遺伝子の産物であることが明らかとなった (10-12)。いずれもチロシンキナーゼ型

PDGF receptor subunits belong to the tyrosine kinase receptor family (11) and consist of a large extracellular domain with five immunoglobulin-like subdomains, a transmembrane region, and two intracellular kinase domains. The PDGF receptor α -subunit shows approximately 30% homology of the extracellular and 80% homology of the kinase domain with the PDGF receptor β -subunit. A lower level of homology exists with *c-kit*, *c-fms*, and *flt*, one of the receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) (10, 15).

The two PDGF receptor subunits exhibit different binding specificities for the three PDGF isoforms. Each of the receptor subunits interacts with high affinity with one chain of a PDGF dimer. The PDGF receptor α -subunit can bind either the PDGF A- or the B-chain, the PDGF receptor β -subunit binds only the PDGF B-chain (16). Two PDGF receptor subunits are usually necessary for a PDGF ligand dimer to bind and create isoform-specific PDGF receptors (16). Accordingly, PDGF $\alpha\alpha$ -receptors can bind all three isoforms of PDGF, PDGF $\alpha\beta$ -receptors can bind PDGF-AB and PDGF-BB, and PDGF receptor β -subunits can bind PDGF-BB only (10-12). In other words, PDGF-AA requires the presence of PDGF $\alpha\alpha$ -receptors to induce a cellular response whereas PDGF-BB can induce cellular responses via any constellation of PDGF receptors (10-12). A recent revision of the model of PDGF ligand-receptor interactions has reconciled some earlier contradictory findings (17) but its description would be outside the scope of this review. Binding of PDGF homo- or heterodimers induces dimerization of the receptor subunits. This is followed by a signaling cascade initiated by autophosphorylation of the intracellular tyrosine kinase domains and subsequent association of a number of proteins with the receptors (11).

C. PDGF Expression in Cells that Drive Angiogenesis

Monocytes/macrophages, mast cells, lymphocytes, connective tissue cells, pericytes, endothelial cells, and tumor cells affect the formation of new vessels by secreting angiogenic and anti-angiogenic molecules, extracellular matrix, and proteolytic enzymes. Most of these cells normally express PDGF at undetectable or very low levels. "Injuries" such as perturbations of the extracellular milieu, growth-regulatory molecules, cytokines, and inflammatory mediators can induce the expression of PDGF.

PDGF was originally discovered and isolated from platelets as a major mitogen for mesenchymal cells such as glial cells, fibroblasts, and smooth muscle cells (10, 12). Accordingly, it was named platelet-derived growth factor, an inaccurate term because "platelet-derived" growth factor A- and/or B-chain can originate from many different cells (10, 12).

PDGF is expressed at low or almost undetectable levels in normal cells and its generation is tightly regulated (10). PDGF is stored in the platelet α -granule (18) and is released

の受容体ファミリーに属し (11)、5 個の免疫グロブリン様ドメインを含む細胞外領域、膜貫通領域、2 個のチロシンキナーゼを含む細胞内領域から成っている。 α 型と β 型の間には、細胞外領域で約 30 %、キナーゼ領域で約 80 % の相同性がある。また、*c-kit* や *c-fms*、さらには血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) のレセプターの一つである *flt* との間にも相同性がある (10, 15)。

α 型、 β 型の PDGF レセプターは、3 種の PDGF アイソフォームに対する結合特異性が異なり、PDGF 2 量体のうち一方のポリペプチドに対して強い親和性を持つ。 α 型レセプターは PDGF の A 鎖にも B 鎖にも結合するが、 β 型レセプターは B 鎖しか結合しない (16)。いずれのレセプターもリガンドと結合するには、PDGF が 2 量体であることが必要であり、これによって PDGF のアイソフォームそれぞれに特異的なレセプターの 2 量体が形成される (16)。すなわち、 $\alpha\alpha$ レセプターは 3 種のアイソフォームすべてに結合し、 $\alpha\beta$ レセプターは PDGF-AB と PDGF-BB に、 $\beta\beta$ レセプターは PDGF-BB にのみ結合する (10-12)。言い換えれば、PDGF-AA が標的細胞に反応を起こさせるためには $\alpha\alpha$ レセプターが必要であり、逆に PDGF-BB の場合にはいずれのレセプターでも構わない (10-12)。PDGF のリガンドとレセプターの関係については近年新たなモデルが提唱されこれまでの問題点が解決されたが (17)、その詳細について他書を参照して頂きたい。PDGF はホモダイマーであれヘテロダイマーであれレセプターに結合することによってレセプターの 2 量体化を引き起こす。続いて細胞内キナーゼ領域での自己リン酸化を生じ、レセプター近傍に存在する多くのタンパク質を介した情報伝達系が動き始める (11)。

C. 血管新生を誘導する細胞での PDGF の発現

単球、マクロファージ、肥満細胞、リンパ球、結合組織細胞、周皮細胞、血管内皮細胞、癌細胞など多くの細胞が、血管形成因子、血管形成阻害因子、細胞外マトリックス、タンパク質分解酵素などを分泌することによって新たな血管の形成に影響を与えている。たいていの細胞は通常の状態では検出できない程の低いレベルでしか PDGF を発現していない。しかし、傷などによって細胞外環境が乱れたり、増殖制御因子、サイトカイン、炎症性伝達物質などが与えられると PDGF の発現は誘導される。

元来、PDGF はグリア細胞、繊維芽細胞、平滑筋細胞などの間葉系細胞の増殖を促進する物質として血小板から発見され、また単離された (10, 12)。それゆえ血小板由来増殖因子と名付けられたのだが、実際には PDGF-A 鎖、-B 鎖ともさまざまな細胞から得られており、「血小板由来」という名称は正確ではない (10, 12)。

細胞における PDGF の発現は厳密に制御されており、正常な細胞での発現量は非常に低くほとんど検出できない程度である (10)。PDGF は血小板の α 顆粒に蓄えられ (18)、トロンビン

upon platelet degranulation, *e.g.* in response to thrombin and other stimuli (10). All three isoforms of PDGF can be released from human platelets (18, 19). Activated, but not unactivated, monocytes and macrophages express and secrete PDGF, mainly the PDGF B-chain (10). Macrophage-associated PDGF B-chain expression *in vivo* has been demonstrated in various forms of tissue remodeling including dermal wounds (20, 21), granulomatous tissues (22), atherosclerotic lesions (23), and tumor-associated inflammatory responses (24).

PDGF is not expressed in appreciable amounts in unstimulated cultured fibroblasts or smooth muscle cells. Also, PDGF B-chain transcripts and PDGF B-chain containing proteins are not generally found in either fibroblasts or smooth muscle cells. However, various stimuli such as transforming growth factor- β (TGF- β) (25), tumor necrosis factor- α (TNF- α) (26), Interleukin 1 (27), angiotensin II (28-31), and PDGF itself (32) can induce expression of PDGF A-chain and/or secretion of PDGF-AA protein in fibroblasts or smooth muscle cells. Concomitant expression of PDGF-AA and PDGF receptor α -subunits in connective tissue cells can result in autocrine stimulation of proliferation. Thus, induction of endogenous PDGF-AA in response to Interleukin 1 (27), TGF- β (25, 26, 33, 34), TNF- α (26), and angiotensin II (29-31) was partially responsible for the proliferative response of connective tissue cells. In addition, TGF- β simultaneously controlled expression of PDGF-AA and the corresponding receptor, the PDGF receptor α -subunit (25).

The PDGF A-chain (35, 36) and PDGF-AA homodimer (37) are present in neurons of embryonic and adult mice. Furthermore, PDGF B-chain-containing proteins are ubiquitously expressed in neurons and principal dendrites in the brains of non-human primates and in a transgenic model under the transcriptional control of the PDGF B-chain promoter (36). Intense PDGF B-chain immunoreactivity was found in developing and adult rat brains (38). All three PDGF isoforms were demonstrated in the developing mouse brain (37). Transcripts for the two forms of the PDGF receptor have been shown in neurons of non-human primates (36). PDGF receptor α -subunit (39) and β -subunit (37) immunoreactivity was detected in the developing mouse central nervous system. PDGF and both PDGF receptors were expressed in neural grafts (40, 41) and the peripheral nervous tissue (42) in rats. A deletion of the gene encoding for the PDGF receptor α -subunit in mice perturbed the development of a non-neuronal subset of neural crest-derived cells suggesting that PDGF brain receptors can be functional (39).

Endothelial expression of the PDGF B-chain is tightly regulated. Cultured endothelial cells that grow in monolayers can express both the PDGF A- and the PDGF B-chain at a low level (10). Freshly isolated endothelial cells express substantially less PDGF B-chain transcripts as compared with cultured endothelial cells (10). Furthermore, endothelial cells organiz-

などによる刺激に応答して生じる血小板の脱顆粒によって細胞外に放出される (10)。ヒトの血小板からは3種のアイソフォームすべてが遊離される (18, 19)。また単球やマクロファージでは活性化された細胞に限ってPDGFを発現し分泌するが、そのほとんどはPDGF-B鎖である (10)。実際に *in vivo* でマクロファージがPDGF-B鎖を発現することは皮膚の創傷 (20, 21)、肉芽腫組織 (22)、アテロノーム性動脈硬化症 (23)、癌性免疫反応 (24) など様々な組織の再構成過程で実証されている。

PDGFは培養繊維芽細胞や平滑筋細胞では刺激しない限りほとんど発現されておらず、これらの細胞ではmRNA、タンパク質ともにほとんど検出されていない。しかし形質転換成長因子 (TGF) - β (25)、腫瘍壊死因子 (TNF) - α (26)、インターロイキン (IL) -1 (27)、アンジオテンシン II (28-31)、またPDGFそのもの (32) といった様々な刺激を与えることによって、これらの細胞でもPDGF-A鎖を発現しPDGF-AAを分泌するようになる。また結合組織の細胞にPDGF-AAと α 型レセプターを同時に発現させると、オートクラインに増殖を刺激することができる。このように結合組織の細胞の増殖は、IL-1 (27)、TGF- β (25, 26, 33, 34)、TNF- α (26)、アンジオテンシン II (29-31) に応答した内在性PDGF-AAの誘導に担われている可能性もある。また、TGF- β はPDGF-AAとその受容体である α 型レセプターの発現を同時に調節していると考えられる (25)。

胎児や成長したマウスの神経細胞にはPDGF-A鎖 (35, 36) やそのホモダイマー (37) が存在している。また、ヒト以外の霊長類やPDGF-B鎖のプロモーターで転写制御を受けるトランスジェニック動物では脳の神経細胞や1次樹状細胞において、PDGF-B鎖を含むタンパク質が広く発現されている (36)。ラットの脳は発生途上であれ成長したものであれ、PDGF-B鎖に対する抗体と強く反応する (38)。また発生途上のマウスの脳には3種のPDGFアイソフォームのすべてが存在することが示されている (37)。PDGFレセプターについては、ヒト以外の霊長類の神経細胞では、 α 型、 β 型ともにそのmRNAが存在し (36)、実際発生途上のマウスの中樞神経系には両レセプターの存在が抗体染色によって (39, 37)、また、ラットでは移植神経 (40, 41) や末梢神経組織において (42) リガンドと共に両レセプターが存在することが示されている。 α 型レセプターの遺伝子を欠失したマウスでは、神経冠に由来する細胞のうち神経細胞以外の発生が影響を受け、これは脳においてもPDGFレセプターが実際に機能していることを示唆している (39)。

内皮細胞におけるPDGF-B鎖の発現は厳密に制御されており、単層培養された内皮細胞はわずかではあるがPDGF-A鎖、-B鎖とともに発現している (10)。単離された直後の内皮細胞は培養されているものに比べて、PDGF-B鎖のmRNAが少ない (10)。また3次元的に管状構造 (43) や帯状構造 (44) を形成した

ing into three dimensional tubular structures (43) or into cords (44) do not constitutively express the PDGF B-chain. Stimuli associated with an inflammatory response or other tissue injuries that induce PDGF A- and/or PDGF B-chain expression include thrombin and other products of the coagulation cascade (45-50), fibroblast growth factor (FGF) (51), TNF- α (52), TGF- β (50, 53), lysophosphatidylcholine (54), interleukin 6 (55), nuclear factor-kappa B (56), and fluid shear stress (56-58). *In vivo* expression of PDGF A- and -B chains in endothelial cells was found at the wound edge in a model of vascular injury in the rat, but no expression was detectable in uninjured endothelium (59). Thus, PDGF expression in endothelial cells can be controlled by cellular interactions, perturbations within the microenvironment, and extraneous stimuli.

Expression of PDGF and corresponding receptors is likely involved in the growth of certain tumors (12). As already mentioned the PDGF B-chain is highly homologous to the *v-sis* oncogene (10, 12). Correspondingly, the normal PDGF B-chain and, to some extent, also the PDGF A-chain gene have transforming properties (12). Various tumor cell lines express PDGF A-chain and B-chain genes (10, 12). For example, human glioblastomas, tumors with a high vascularity, expressed the PDGF A- and B-chain (60) and also the PDGF receptor α - and β -subunits (61). PDGF ligands and receptors were more-over expressed in tumors of mesenchymal origin (10, 62) and tumors derived from the neural crest (63). In glioblastomas PDGF receptor α -subunits were mainly expressed in the tumor cells, whereas the PDGF receptor β -subunits were expressed in the tumor stroma (12, 64, 65). Similarly, PDGF receptor β -subunits were expressed at high levels in the stroma of carcinoid tumors (66). Thus, PDGF receptor β -subunits are associated with the tumor stroma and might be relevant for the development of a vascularized connective tissue (12, 67).

D. PDGF Release in Response to Hypoxia and Other Angiogenesis-related Stimuli

It is not entirely clear how cells and tissues are activated to release angiogenic molecules. Hypoxia, resulting from deficient vascular supply, might reasonably be assumed to drive angiogenesis (68, 69). Rapidly expanding tumors, inflammatory foci, and ischemic tissues in coronary heart disease and infarctions become hypoxic due to the inability of the vasculature to meet perfusion demands. Correspondingly, hypoxia has been found to induce the release of some angiogenic molecules. Hypoxia leads to the release of the active form of TGF- β from smooth muscle cells (70). It induces or is associated with expression or secretion of VEGF (68), a well-characterized angiogenic molecule, in heart myocytes (71, 72), endothelial cells (73, 74), smooth muscle cells (75-77), ocular angiogenesis (68, 78, 79), different tumor cell lines and tumors (80-82). It may be interesting to note that VEGF and PDGF

内皮細胞は、もはや PDGF-B 鎖を発現してない。免疫反応に伴う刺激や組織の損傷の際には、トロンビンなどの血液凝固因子 (45-50) に加え、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) (51)、TNF- α (52)、TGF- β (50, 53)、リゾフォスファチジルコリン (54)、IL-6 (55)、核因子カッパー B (56)、さらに血流のずり応力までも (56-58) が PDGF-A 鎖、-B 鎖の発現を誘導する。血管内皮細胞の *in vivo* での PDGF の発現はモデルラットを用いて研究されており、損傷部位の末端の内皮細胞でのみ PDGF-A 鎖、-B 鎖が発現され、無傷の内皮細胞では検出されていない (59)。このように内皮細胞における PDGF の発現は細胞同士の相互作用や微小環境の変化など細胞外からの刺激によって制御されている。

PDGF や PDGF レセプターの発現は、ある種の癌の増殖にも関わっているらしい (12)。既に述べたように、PDGF-B 鎖は癌遺伝子 *v-sis* と非常に高い相同性がある (10, 12)。それゆえ PDGF の遺伝子は A 鎖、B 鎖ともにある程度の癌原性がある (12)。実際、様々な株化癌細胞は PDGF の遺伝子を発現している (10, 12)。たとえば、非常に血管浸潤性の高い癌であるヒトのグリオブラストーマは PDGF-A 鎖、-B 鎖 (60) および α 、 β 両型のレセプターを発現している (61)。また間充織 (10, 62) や神経冠細胞に由来する癌 (63) では、リガンド、レセプターともに強く発現している。グリオブラストーマの場合、 α 型レセプターは主に癌細胞そのものに発現され、一方 β 型レセプターは間質に発現されている (12, 64, 65)。腫瘍性の癌細胞の場合も同様に、 β 型レセプターはその間質で非常に強く発現されている (66)。このように β 型レセプターは細胞の間質で機能し、結合組織内での血管新生に関与しているものと思われる (12, 67)。

D. 酸素欠乏などの血管新生を促す刺激による PDGF の遊離

細胞や組織がどのように活性化されて血管新生誘導分子を遊離するのかについては十分には理解されていない。血管の不足によって生じる酸素欠乏が血管新生を誘導することは理にかなっており、理解に難くない (68, 69)。急速に増殖する癌組織や局所の炎症部位、冠動脈疾患や梗塞による心臓の貧血組織は、血管の伸展が足りないために酸素の要求に追いつかず酸素欠乏状態になる。このことから酸素欠乏状態が血管新生誘導分子を遊離すると考えられる。またこのような状況では平滑筋細胞から活性型の TGF- β が遊離され (70)、それが刺激となって血管新生誘導分子である VEGF が発現、分泌される (68)。このように TGF- β の刺激によって VEGF が発現されるという系は、心筋 (71, 72)、血管内皮 (73, 74)、平滑筋の細胞 (75-77) で示されており、また角膜の血管新生 (68, 78, 79) や様々な癌細胞、癌組織での血管新生 (80-82) も同様であることが示されている。VEGF と PDGF が遺伝子上で低いながらも有意な相同性を持つ

share a low but significant sequence homology (15) and that hypoxia increases expression of PDGF B-chain (83) and secretion of PDGF-like activity (84) from endothelial cells and mononuclear phagocytes (85).

It is not yet known in detail how hypoxia translates into expression of the PDGF B-chain. Perhaps hypoxia-sensing and associated intracellular signaling in PDGF is similar to various other oxygen-responsive and angiogenic molecules such as erythropoietin (80,86), placental growth factor (87), active TGF- β 1 (70), and VEGF (74, 78, 82, 86-90). Much less is known about PDGF and hypoxia-sensing as compared with VEGF. Regulation of PDGF B-chain expression in response to hypoxia was similar to erythropoietin (87) and VEGF (68, 72, 80, 82) and required transcriptional activation (83). NO a potent vasodilator repressed PDGF B-chain expression at the level of transcriptional activation (91). Recently, a hypoxia-specific enhancer element of the VEGF promoter has been identified (90). It is not yet clear whether the PDGF B-chain promoter (10, 92) contains similar structures that are associated with the gene's response to hypoxia.

Hypoxia or associated intermediary products are not the sole forces that drive the release of PDGF (see also section C of this review). Angiogenesis is initiated by endothelial cells from the parent vessel that degrade and pierce the basal lamina. The cells subsequently invade the surrounding interstitial extracellular matrix (5, 9) by expressing proteolytic enzymes (5, 93, 94). When newly forming vessels penetrate tissues, extracellular matrix-associated growth-regulatory molecules including PDGF may therefore be released or their activity modulated.

Both PDGF-AA and PDGF-BB can bind to extracellular matrix. Compartmentalization of PDGF on extracellular matrix sites depends on a highly basic C-terminal stretch of 16 amino acids in PDGF-AA and a corresponding sequence in PDGF B-chain (13, 14, 95). As mentioned in section B these sequences are generated due to alternative splicing and divergent usage of exon-6-encoded sequences and lead to the release of the short versus long form of PDGF-AA (13, 14, 95). PDGF-BB binds with much higher affinity to extracellular matrix molecules including fibronectin, laminin, and type III collagen than the short form PDGF-AA (96). This differential association of PDGF isoforms with components of the extracellular matrix may serve to modulate their effects (96). All isoforms of PDGF can bind to the serum protein α_2 -macroglobulin (97) and PDGF-AB and -BB can bind to the extracellular glycoprotein SPARC (98). PDGF B-chain-containing molecules bound to SPARC are inactive (98). Thus, coordinate expression of SPARC and PDGF-AB and -BB following vascular injury may regulate the activity of these specific ligands *in vivo* (98). Furthermore, PDGF B-chain-containing molecules bound to extracellular matrix substrata may be released by proteolytic enzymes such as thrombin (45). Association and dissociation of

ていること (15)、そしてまた酸素欠乏によって内皮細胞や単核の貪食細胞に PDGF-B 鎖の発現が誘導され (83)、活性物質の分泌が促進される (84) ことは興味深い (85)。

酸素が不足するとどの様にして PDGF-B 鎖の発現が促されるのか、その詳細は明らかではない。おそらく、EPO (エリスロポエチン) (80、86)、PlGF (胎盤由来成長因子) (87)、活性型 TGF- β 1 (70)、VEGF (74、78、82、86-90) 等、他の酸素応答性の血管新生誘導分子に似た機構によって酸素不足を感知し、細胞内に情報を伝達しているのであろう。酸素欠乏による PDGF の誘導については VEGF ほどは明らかになっていない。酸素欠乏に応答した PDGF-B 鎖の発現には EPO (87) や VEGF (68、72、80、82) と同じく転写の活性化が必要である (83)。非常に強い血管拡張作用のある一酸化窒素 (NO) は、転写活性化という点では PDGF-B 鎖の発現を抑制する (91)。最近、VEGF のプロモーター領域に低酸素状態に特異的なエンハンサー領域が見いだされた (90)。これと同じ様な構造が PDGF-B 鎖のプロモーター (10、92) に存在するかどうかはまだわかっていない。

PDGF は酸素不足あるいはその結果生じる中間生成物のみによって遊離されるわけではない (C 節参照)。血管新生は元の血管が崩壊し内皮細胞が基底膜を作ることから始まる。内皮細胞は自身が分泌するタンパク質分解酵素 (5、93、94) によってまわりの間質の細胞外マトリックス (5、9) に浸潤する。こうして新たな血管が組織中に伸展する際には、マトリックス中にトラップされていた PDGF などの増殖制御分子が遊離され、その活性が修飾される。

PDGF-AA も PDGF-BB も細胞外マトリックスに結合することができるが、マトリックス中での分布は PDGF-AA の C 端に存在する 16 アミノ酸の塩基性領域に依存している (13、14、95)。B 節で述べたように、この領域は alternative splicing で、エクソン 6 の配列を使うか使わないかによって作られる部分であり、これによって short type PDGF-AA と long type PDGF-AA が生成される (13、14、95)。フィブロネクチン、ラミニン、III 型コラーゲンなどの細胞外マトリックスに対しては、PDGF-BB は short type PDGF-AA よりも強く結合する (96)。このようにアイソフォームによってマトリックスの各構成成分と異なった親和性で結合する点は、PDGF の効果を制御するのに役立っているものと思われる (96)。PDGF のすべてのアイソフォームは血清タンパク質 α_2 マクログロブリンに (97)、また、PDGF-AB と PDGF-BB は分泌糖タンパク質 SPARC に結合し得る (98)。そして、SPARC に結合して存在する PDGF は不活性である (98)。こうして血管の損傷に引き続いて生じる SPARC と PDGF-AB、-BB の協調的な発現によって、これらの分子の *in vivo* での活性が制御されているものと思われる (98)。また、マトリックスに捕捉されて存在する PDGF はトロンビンのようなタンパク質分解酵素によって遊離される (45)。このように細胞外マトリックスに

growth-regulatory molecules from extracellular matrices in response to proteolysis may therefore serve to control the activity of angiogenic molecules (8) including extracellularly stored PDGF.

Cells die in situations leading to angiogenesis because of ischemic damage and for other reasons such as programmed cell death. Cell death can promote the release of stored angiogenic molecules. For example, FGF can be released from cells upon mechanical cell injury and from dying cells *in vitro* (7, 99). Similarly, PDGF can be released from platelets by mechanical damage (10). Whether PDGF can be released upon cell damage, non-programmed cell death, or apoptosis is not known.

Some of the molecules that can induce the secretion of PDGF in vascular wall and inflammatory cells have already been briefly summarized in section C of this review. Additional stimuli that may be more specifically associated with angiogenesis include advanced glycation endproducts. These accumulate in diabetes mellitus (100), a disease that is strongly associated with ocular angiogenesis, *i.e.*, diabetic retinopathy. A macrophage-monocyte receptor system mediates the uptake of advanced glycation endproducts-modified proteins by a process that also induces the secretion of PDGF (100). High glucose levels and hyperosmolarity, two conditions that are also associated with diabetes mellitus, can induce the expression of PDGF B-chain and protein in endothelial cells (101).

E. Biological Functions of PDGF and Neovascularization

Neovascularizations arise from the microvasculature (6), *i.e.*, capillaries and small venules (7), and develop into complex capillary and vascular networks. Microvessels consist of pericytes and quiescent endothelial cells (capillaries) or smooth muscle cells and endothelial cells (arterioles, venules).

To form new vessels various processes occur at different stages of angiogenesis. Early in vessel formation, before the outgrowth of capillary sprouts, the parent vessels dilate (7). PDGF-BB exerted contractile effects on rat (102) and rabbit (103) aortic rings. Contrariwise, PDGF-BB has recently been found to elicit endothelium-dependent relaxation of rat aortic rings via nitric oxide (104). None of the PDGF isoforms elicited vasomotor effects on penetrating intracerebral arterioles (105). Thus, the effects of PDGF on vasomotion are not yet fully understood. Perhaps the activities of PDGF depend on the vascular bed examined (10) or other variables that are as yet unidentified. At any rate, it is unknown whether angiogenesis and PDGF-related vasomotion interact with each other.

Pericytes, cells that resemble vascular smooth muscle and glomerular mesangial kidney cells closely envelop endothelial cells in capillaries and may serve to keep the vessels in a quiescent, non-proliferating state (7, 106). They become sparse or absent in growing vessels but reappear in mature, non-grow-

備蓄された血管形成因子は、マトリックスに捕捉されたりタンパク質分解酵素によって遊離されたりすることでその活性が制御されているものと思われる (8)。

新たな血管形成が生じるような状況では、組織の細胞は酸素欠乏による損傷を受けたり programmed cell death のような原因によって死ぬ。そして細胞が死ぬことによって備蓄された血管新生因子が遊離される。たとえば、*in vitro* では物理的障害を受けた細胞や瀕死の状態にある細胞からは FGF が遊離されることが知られている (7, 99)。同じように血小板も物理的な障害を受けると PDGF を遊離する (10)。しかしこれが、細胞の損傷によるものなのか、(programmed cell death ではない) 死によるものなのか、あるいはアポトーシスによるものなのかは明らかでない。

PDGF の分泌を誘導する分子のうち血管壁や炎症性の細胞に由来するものについては既に C 節に記した。ここではより特異的に血管の新生を誘導しうる刺激として、高度に糖付加が生じた生成物を取りあげる。糖尿病は目の血管新生、すなわち糖尿病性網膜症を極めて併発しやすい病気であるが、この場合にはこのような糖付加生成物が集積している (100)。糖付加によって修飾を受けたタンパク質の取り込みはマクロファージ/単球のレセプター系を介して生じており、この過程でも PDGF の分泌が促進される (100)。糖尿病でみられるようなグルコース濃度が高く、浸透圧が高いといった条件のもとでは、内皮細胞に PDGF-B 鎖の mRNA もタンパク質もその発現が誘導されている (101)。

E. PDGF の生物学的機能と脈管形成

脈管形成は毛細血管や細静脈 (7) といった微小血管系 (6) から始まり、複雑な毛細管や血管のネットワークへと成長する。この毛細血管は周細胞と静止内皮細胞から、細動脈や細静脈は平滑筋細胞と内皮細胞から成りたっている。

新しい血管が形成されるためには血管新生の段階に応じて様々なプロセスが生じている。まず最初に微小血管の突出に先立ってもとの血管がひろがる (7)。PDGF-BB はラット (102) やウサギ (103) の大動脈環を収縮させる効果を持つが、逆に一酸化窒素 (NO) を介して内皮細胞依存的な弛緩も生じることが最近示された (104)。PDGF のいずれのアイソフォームも脳内に広がった細動脈に対する血管運動効果はもたない (105)。このように、PDGF の血管運動作用については十分には理解されておらず、おそらくその活性は調べられた血管床によっているのか (10) あるいは未同定の他の因子に依存していると思われる。とにかく血管新生のための血管運動と PDGF による血管運動とが関係あるのかどうかは明らかではない。

周細胞は血管平滑筋細胞や糸球体脈管膜の細胞と同じように毛細血管の内皮細胞をしっかりと覆っている。そして血管を増殖しない静止状態に保っておくために作用している (7, 106)。

ing capillaries where they down-regulate endothelial proliferation (7, 106), possibly via the action of growth-inhibiting, active TGF- β (107, 108). Microvascular pericytes expressed PDGF receptor β -subunits in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma in the presence of juxtaposed PDGF B-chain expressing cells (109). Furthermore, PDGF-BB elicited DNA synthesis (110) and cellular proliferation in pericytes (111). Pericytes also expressed PDGF-AA in surgical human wounds that had been treated with PDGF-BB and were actively healing (21). Thus, pericytes behave as to PDGF like smooth muscle cells or mesangial cells. However, it is not clear whether PDGF plays a role in the control of vascular homeostasis by pericytes.

While pericytes disappear from growing new vessels endothelial cells penetrate the basement membrane which separates them from the underlying tissue. Proteolytic enzymes such as plasminogen-activators (tPA and uPA) (5) and possibly other proteases (94) are required for this process and subsequent breakdown of surrounding matrix, tissue invasion and, possibly, the formation of a new capillary lumen. Proteolytic activity enables endothelial cells to migrate along a chemotactic gradient towards the source of angiogenic stimuli. PDGF increased the expression of plasminogen activator activity in fetal rat osteoblasts (112) and tPA in baboon smooth muscle cells (113) but affected neither tPA nor uPA in rat astrocytes (114). Furthermore, PDGF increased plasminogen activator inhibitor-I in vascular smooth muscle cells (115). It is not known whether PDGF affects the balance of proteolytic enzymes and their inhibitors in angiogenesis.

In active angiogenesis, proliferation of endothelial cells increases from almost complete quiescence to very rapid proliferation (6). Furthermore, cells migrate along a chemotactic gradient (6) and tracks of extracellular matrix (9, 116) towards a source of angiogenic molecules. PDGF can elicit proliferation and migration of several cell types *in vitro* and *in vivo* (see also section G) including endothelial cells. *In vitro*, different cells such as vascular smooth muscle cells, monocytes, granulocytes, and fibroblasts proliferate or migrate in response to PDGF (10). Porcine endothelial cells transfected with PDGF β -receptors responded to PDGF-BB with a strong, dose-dependent chemotactic response which included a rapid reorganization of actin and the formation of membrane ruffles (117). An increase in cellular movement upon addition of PDGF has also been shown for rat brain capillary endothelial cells (118) and rabbit retinal endothelial cells (119). Fibroblasts were attracted *in vitro* (120) or *in vivo* to the site of injury by PDGF during wound healing (121) and smooth muscle cells migrated after balloon angioplasty of carotid arteries in response to PDGF (122). Furthermore, PDGF-BB induced new tissue *de novo* in an *in vivo* growth chamber, presumably by recruiting highly proliferative mesenchymal progenitor cells, smooth muscle

増殖中の血管ではこの周細胞はまばらになるかあるいは消失する。そして成熟しもはや増殖しないような毛細血管では再び現れ、おそらくは増殖阻害効果のある活性型TGF- β の作用によって (107, 108) 血管内皮細胞の増殖を抑制するように働く (7, 106)。ヒトの創傷治癒の際や結腸腺癌の細胞では、微小血管の周細胞はPDGF-B鎖を発現している細胞の近傍で β 型PDGFレセプターを発現している (109)。またPDGF-BBは周細胞に対してDNA合成を誘導し (110) 細胞の増殖をもたらし (111)。一度PDGF-BBで処理された傷は治癒が早く、このような部位の周細胞はPDGF-AAも発現している (21)。このように周細胞は、PDGFについていえば平滑筋細胞や脈管膜の細胞のように働く。しかしながら周細胞による血管の恒常性の維持にPDGFがどの様に働いているのかは明らかでない。

新たに血管が形成される際には、周細胞が存在しない間に、血管内皮細胞が自身と基底組織とを仕切っている基底膜を貫通して浸潤する。この過程及び引き続いて生じるまわりのマトリックスの分解、組織の浸潤、そして新たな微小血管腔の形成には、プラスミノゲンアクチベーター (tPA, uPA) (5) 他のタンパク質分解酵素 (94) が必要である。タンパク質を分解することによって内皮細胞は血管新生をもたらし刺激の源に向かう化学物質の濃度勾配に沿って移動することができる。PDGFによる刺激によって、胎児ラットの骨芽細胞ではPAの (112)、ヒトの平滑筋細胞ではtPAの発現が増大することが示されているが (113)、ラットの星状細胞ではtPAにもuPAにも影響を与えなかった (114)。またPDGFは血管平滑筋細胞においてプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1を増大させることも知られている (115)。血管新生過程の中でPDGFがタンパク質分解酵素とそのインヒビターのバランスに影響を与えるのかどうかについてはわかっていない。

活発な血管新生の際には内皮細胞はほぼ完全な休止状態から非常に急速な増殖を行い細胞数が増大する (6)。また細胞は血管新生誘導分子の発生源に向かう化学的な濃度勾配 (6) に沿って細胞外マトリックス (9, 116) 上を移動する。内皮細胞を含むいくつかの細胞は*in vitro*でも*in vivo*でもPDGFによって増殖、移動が促進される (G節参照)。 *In vitro*では血管平滑筋細胞、単球、顆粒球、繊維芽細胞などの細胞がPDGFに反応して増殖、移動する (10)。 β 型レセプターをトランスフェクトしたブタの内皮細胞にPDGF-BBを添加すると用量依存的に走化性の反応を示し、急速なアクチンの再構成と膜の攪乱が引き起こされる (117)。PDGFを添加することによって細胞の運動性が高まることは、ラット脳の毛細血管細胞 (118) やウサギの網膜の血管内皮細胞 (119) でも示されている。創傷治癒の過程では繊維芽細胞は*in vitro*でも (120) *in vivo*でもPDGFによって創傷部位に引き寄せられ (121)、頸動脈の血管形成術のあとには平滑筋細胞はPDGFに応答して移動する (122)。またPDGF-BBは*in vivo*で、*de novo*での新しい組織の生合成を誘導する。これはおそらく非

cells, and perhaps endothelial cells (123). Several *in vivo* studies have suggested the possibility that PDGF might induce the migration of endothelial cells (20, 118, 123), a prerequisite for angiogenesis (4, 6).

Endothelial cells also contribute to tissue remodeling and morphogenesis by depositing extracellular matrix (9) and forming tubular networks (5, 9). Endothelial cells may migrate, elongate, and rearrange along extracellular matrix structures (9). Extracellular matrix proteins may assist endothelial cells to reorganize into three-dimensional structures and form fresh endothelial capillary tubes (9). Furthermore, newly formed endothelial tubes are surrounded by a basal lamina composed of extracellular matrix (5). PDGF-BB markedly stimulated the expression of spliced variants of tenascin, a protein that is associated with cell migration (124). PDGF stimulated incorporation of a proteoglycan, aggrecan, into the extracellular matrix of cultured chondrocytes (125) and increased transcripts for collagen type IV and fibronectin in glomerular mesangial cells in culture (126). PDGF increased acute inflammation, fibroblast recruitment, collagen, and hyaluronic acid deposition in wound implants in rabbit fetuses (127). Mesangial proliferation and matrix deposition was inhibited by an antibody to PDGF in a model of glomerulonephritis in rats (128). Functional PDGF receptor β -subunits have been identified on a variety of microvascular endothelial cells (44, 129, 130) but there is no evidence so far that the production of extracellular matrix can be affected by PDGF in these cells.

Molecules that are involved in the adhesion of cells to the extracellular matrix or in intercellular adhesion such as integrin $\alpha_v\beta_3$ (131,132) or sialyl Lewis^x and Lewis^a glycoconjugates as well as a corresponding ligand, E-selectin, are also involved in capillary morphogenesis (133). PDGF induced integrin- β_1 (134) and integrin- α_2 (135) synthesis in human fibroblasts. However, PDGF-induced effects on integrin expression in angiogenesis have not yet been analysed.

Apoptosis can be a prominent feature of angiogenesis *in vivo* (131,136,137) and *in vitro* (138). Both PDGF-AA and PDGF-BB can induce apoptosis in growth-arrested murine fibroblasts (139). At the same time PDGF has been identified as a survival factor of growth-stimulated human vascular smooth muscle cells (140) and PC-12 cells (141). Thus, the relation of PDGF and apoptosis in angiogenesis are unclear.

As further discussed in the next section the sum of such PDGF-induced developments is a morphogenic process that results in a vascularized connective tissue stroma.

F. PDGF and Angiogenesis *in Vivo*

A multitude of angiogenic and anti-angiogenic molecules have been characterized [reviewed in (3–5, 7, 8)]. Their angiogenic/anti-angiogenic potential has primarily been characterized in angiogenesis assays *in vivo* such as the chick chori-

常に増殖能の高い原間充織細胞や平滑筋細胞そして内皮細胞を動員して生じているものと思われる (123)。いくつかの *in vivo* での研究によって血管新生に先立って必要な内皮細胞の移動 (20, 118, 123) がPDGFによって誘導されている可能性が示唆されている (4, 6)。

内皮細胞は細胞外マトリックスを分泌し (9) 管状のネットワークを形成することによって (5, 9)、組織の再構成や形態形成過程においても機能している。内皮細胞は細胞外マトリックスの構造に沿って移動、伸長し、整列する (9)。マトリックスのタンパク質は内皮細胞が3次元的構造を認識し新たな毛細血管を形成するのを助ける働きをしているのかも知れない (9)。また新たに形成された血管は細胞外マトリックスで構成される基底膜に取り囲まれる (5)。PDGF-BBによって細胞の移動を司るタンパク質のひとつであるテネシンの splicing variant はその発現が強く増強される (124)。培養軟骨細胞においてはPDGF刺激によってプロテオグリカンの1種であるアグリカンが細胞外マトリックスに取り込まれるようになる (125)。また、培養された糸球体脈管膜細胞の場合にはPDGF刺激によってIV型コラーゲンやフィブロネクチンの mRNA が増加する (126)。ウサギの胎児ではPDGFによって、移植組織での急性炎症、線維芽細胞の動員、コラーゲンやヒアルロン酸の沈着が促進される (127)。糸球体腎炎のモデルラットではPDGFに対する抗体を用いることによって、脈管膜細胞の増殖と細胞外マトリックスの沈着が阻害される (128)。様々な微小血管内皮細胞において β 型レセプターが機能していることが示されているが (44, 129, 130)、この時、PDGFによって細胞外マトリックスの産生が影響されるかどうかは今のところわからない。

細胞と細胞外マトリックス、あるいは細胞同士での接着に関与する分子はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ (131, 132) や、シアリルルイス X, ルイス a を持つ複合糖質とそのリガンドである E-セレクチンなどが知られているが、これらもまた毛細血管の形態形成に関わっている (133)。ヒトの線維芽細胞ではPDGFはインテグリン β_1 (134) やインテグリン α_2 (135) の生合成を誘導する。しかしながら、血管新生過程でのPDGFによるインテグリンの発現に対する影響は解析されていない。 *In vivo* (131, 136, 137) でも *in vitro* (138) でも血管新生の際にはアポトーシスが生じている。PDGF-AA も PDGF-BB も増殖抑制のかかったマウスの線維芽細胞に対してアポトーシスを誘導する (139)。また逆に、増殖刺激されたヒトの血管平滑筋細胞 (140) や PC-12 細胞 (141) に対してはPDGFはサバイバル因子として働いていることが示された。このように血管新生におけるPDGFとアポトーシスの関係は不明瞭である。

次の節で詳しく述べるように、PDGFに誘導される作用は結局は形態的な変化であり、その結果血管網の発達した結合組織が形成される。

F. PDGF と *in vivo* での血管新生

血管新生因子、血管新生阻害因子についてはすでに多くの分子が研究されている [総説 (3–5, 7, 8) 参照]。これらの血管

onic allantoic membrane assay (CAM-assay) or various cornea micropocket assays (3); a substance is applied onto the CAM or implanted in the cornea of a rabbit, mouse, or rat where new vessel formation or its inhibition can be assessed, *i.e.*, ingrowth of new capillary vessels can be quantified on the CAM or the primarily avascular cornea. In these types of assays and also in most experiments *in vivo* it is impossible to readily distinguish between direct effects of molecules on the relevant vascular cells, *i.e.*, endothelial cells and pericytes/smooth muscle cells, versus the recruitment or stimulation of inflammatory and connective tissue cells which in turn release angiogenic factors (3, 5).

Directly-acting angiogenic molecules such as VEGF and FGF elicit angiogenesis and vascular remodeling via their endothelial receptors (6, 7). VEGF, for example, has an exclusive specificity for endothelial cells, *i.e.*, only endothelial cells express VEGF receptors (15). PDGF receptors, however, are expressed on a wide spectrum of cells (10). Because PDGF did not affect macrovascular endothelial proliferation it has been assumed to be an indirectly acting angiogenic molecule until recently (10, 44, 142). In consequence, all angiogenic properties of PDGF were ascribed to the chemoattraction of other cells such as monocytes and fibroblasts. The latter cells were understood to promote angiogenesis by secreting angiogenic molecules that act directly on endothelial cells. An additional potential way to explain how PDGF might affect angiogenesis may be based on the finding that endothelial cells that form new capillary tubes can display distinct phenotypes with distinct responses to PDGF (44) (see also section G).

There is no doubt that PDGF-BB can promote angiogenesis *in vivo*, *i.e.*, the formation of a vascularized tissue stroma. For example, application of PDGF-BB to dermal wounds (143), soft tissue appendages (123), and to chick chorio-allantoic membranes (144,145) lead to the development of new vessels within a connective tissue stroma. Likewise, transfection of the PDGF B-chain gene into human melanoma cells and subsequent growth of these cells in recipient animals, demonstrated a substantial increase of vascularized connective tissue stroma in the resultant tumors (67). PDGF-BB promoted the appearance of new vessels in a rat model of hind limb ischemia (146, 147). Similarly, PDGF-BB rescued ischemic rat skin flaps by inducing the emergence of a new and patent vasculature (148). In the same experimental series, new functional vessels also developed between the severed ends of rat femoral arteries in response to PDGF-BB (148). Interestingly, all these changes took place without a sustained inflammatory response or granulation tissue (148). Hence, PDGF is a morphogen that supports the formation of a connective tissue stroma containing a functional vascular system *in vivo*.

Obviously, PDGF receptor expression is required for PDGF to elicit a direct endothelial response in angiogenesis.

新生あるいは血管新生阻害活性はまず、絨毛尿膜や角膜を用いた *in vivo* のアッセイによって解析されてきた (3)。すなわち、トリの絨毛尿膜に試料を載せたり (CAM-assay)、ウサギ、マウス、ラットの角膜に移植したりして新たな毛細血管の伸び方を定量することによってその効果を評価する方法である。このようなアッセイ法は、*in vivo* の実験はたいがいそうであるように、試料が標的となる血管細胞すなわち内皮細胞、周細胞、平滑筋細胞に直接作用した結果なのか、あるいは炎症性の結合組織の細胞が動員され刺激することによって二次的に血管新生因子を遊離した結果なのかは容易には判断が付かない (3、5)。

VEGFやFGFのような血管新生因子は内皮細胞に存在するレセプターに直接作用して血管の形成や再構成をもたらしている (6、7)。たとえば VEGF は内皮細胞に対して強い特異性を持つが、これは血管内皮細胞だけが VEGF レセプターを発現しているからである (15)。しかしながら PDGF レセプターは多くの細胞に広く発現されている (10)。PDGF は大動脈の内皮細胞の増殖には影響を与えないので、最近までは PDGF は間接的に作用する血管新生因子であると考えられていた (10、44、142)。そして PDGF の血管新生活性は単球や線維芽細胞など、内皮細胞に直接作用する因子を分泌する他の細胞を引き寄せることで発揮されると理解されていた。最近、新たな毛細血管を形成している内皮細胞は形態も PDGF に対する反応性も異なっていると報告され、PDGF の作用機構について新たな考えも出されている (44) (G 節参照)。

PDGF-BB が *in vivo* で血管網の張り巡らされた間質組織を形成し血管新生を促進することは間違いがない。例えば、皮膚の傷 (143) や軟組織の付属物 (123)、トリの絨毛尿膜 (144、145) に PDGF-BB を作用させると、結合組織の基底膜中に新しい血管が形成されてくる。同じように、PDGF-B 鎖の遺伝子を導入したヒトのメラノーマ細胞や、この細胞を移植した動物においては、その結果生じる腫瘍の中に血管網の発達した結合組織が増加する (67)。後肢を阻血されたラットは PDGF-BB の投与によって新たな血管の出現が促進される (146、147)。同様に皮膚弁を阻血されたラットでも PDGF-BB を投与すると新たな血管系が誘導される (148)。一連の研究の中で大腿動脈を切断されたラットでは PDGF-BB に応答してその両端から新たな血管が形成され機能するようになることも示され (148)、このような変化は持続的な免疫応答や顆粒組織がなくても生じた (148)。それゆえ、PDGF は *in vivo* で機能する血管系を含む結合組織の形成を促す一種の形態形成因子でもある。

当然のことであるが、PDGF が内皮細胞に直接作用して血

However, macrovascular endothelial cells in culture are generally thought to lack PDGF receptors (10, 44). Hence, PDGF does not induce a proliferative response in these cells (10). Still, PDGF B-chain and PDGF receptor β -subunits were spatiotemporally coexpressed in placental microcapillary endothelium (149). Similarly, several strains of microvascular endothelial cells (129, 150, 151), capillaries in the rat brain (151), proliferating capillaries in glioblastomas (64, 152), and in wounds (20) expressed PDGF receptor β -subunits. But these data do not allow to determine whether endothelial PDGF receptor expression is specifically associated with angiogenesis.

G. PDGF and Angiogenesis *in Vitro*

In vivo assays yield valuable information about overall angiogenic or anti-angiogenic potential of a substance. Yet they do not produce much information on the cells that are involved in mediating the effects of a molecule. Different *in vitro* assays have therefore been developed to analyze direct effects of angiogenic molecules on endothelial and other vascular wall cells. These assays facilitate the detailed molecular study of endothelial functions that are essential for new blood vessel formation.

Most *in vitro* models of angiogenesis use extracellular matrix substrata as a support system for endothelial cord and tube formation. Extracellular matrices in turn can contain contaminating or bound growth-regulatory molecules including PDGF (153) (see also section D). This can disturb experimental procedures and their interpretation (153). Furthermore, many assay systems require exogenous stimuli such as phorbol esters, angiogenic molecules, or serum to induce the formation of endothelial cords and tubes. Hence, results often depend on the specific conditions and circumstances of the *in vitro* experiments.

In an *in vitro* model of angiogenesis cocultures of microvascular fragments and myofibroblast were induced by PDGF to form capillary-like structures (154). In this system myofibroblasts were found to induce capillary-like tubes via secretion of an unidentified endothelial cell growth factor and type I collagen (154). No evidence of direct action of PDGF on rat epididymal endothelial cells used in these experiments were found and thus all the actions of PDGF could be attributed to the effects of PDGF on myofibroblasts (154). Correspondingly, PDGF-BB, together with hypoxia, has been found to upregulate VEGF expression in rabbit (76) and human (75) smooth muscle cells. These experiments demonstrate that PDGF can enhance angiogenesis indirectly via action on other cells that subsequently affect endothelial cells. Rat epididymal endothelial cells used in the above-mentioned experiments did not proliferate to PDGF. Some other endothelial cells, however, express PDGF receptor β -subunits and respond to PDGF.

Recently, we (44) and others (142) have shown that

管新生をもたらすためには内皮細胞にレセプターの発現が必要である。しかしながら、培養に用いられるような大血管由来の内皮細胞はPDGFレセプターを持たないと考えられており (10, 44)、このような細胞に対してはPDGFは増殖促進作用がない (10)。しかし胎盤の微小毛細血管の内皮細胞ではPDGF-B鎖と β 型PDGFレセプターが同じ場所で同時に発現されており (149)、またいくつかの微小毛細血管の内皮細胞 (129, 150, 151) やラット脳の毛細血管 (151)、グリオブラストーマや創傷部位の中で増殖中の毛細血管 (64, 152, 20) では、 β 型レセプターが発現されている。しかしこのようなデータがあるからといって、内皮細胞でのPDGFレセプターの発現の有無が特異的にPDGFの血管新生への関与を規定している訳ではない。

G. PDGF と *in vitro* での血管新生

In vivo でのアッセイは試料の血管新生あるいは血管新生阻害活性について貴重な情報を与える。しかし作用を受ける細胞についてはそれほど情報は得られない。そこで内皮細胞や他の血管壁構成細胞に対する血管新生因子の直接作用を解析するため、様々な *in vitro* でのアッセイ系が開発された。このようなアッセイで、新しい血管の形成に必要な内皮細胞の機能についても詳細な分子レベルでの研究が可能になった。

内皮細胞が帯状組織や管腔構造を形成しやすくするために、たいていの *in vitro* モデルでは細胞外マトリックスが用いられている。この細胞外マトリックスはその中に混じったあるいは結合したPDGFのような増殖制御分子を含み得るため (D節参照)、実験系が複雑になり解釈が困難になる。さらに、多くのアッセイ系では内皮細胞に帯状組織や管腔構造を形成させるためには、フォルボールエステルや血管新生因子あるいは血清といった外来性の刺激を与えなければならず、このため *in vitro* で実験する際の特定の条件や環境に結果が支配されることが多い。

血管新生の *in vitro* モデルの1つに、微小血管の断片と筋芽細胞とをco-cultureしてここにPDGFを添加して毛細血管様構造を作らせるといふものがある (154)。この系では筋芽細胞が未知の内皮細胞成長因子とI型コラーゲンを分泌して毛細管様の管状構造を形成することが知られている (154)。この実験に用いられたラットの副睾丸内皮細胞に対してはPDGFが直接作用するとの証拠がないため、PDGFは筋芽細胞にのみ作用していると考えられている (154)。また、ウサギ (76) やヒト (75) の平滑筋細胞に低酸素条件下でPDGF-BBを作用させるとVEGFの発現が促進されることが知られている。これらの実験の結果、PDGFは内皮細胞以外の細胞に作用しその結果内皮細胞に影響を与えて間接的に血管新生を促進していることが示された。先に述べた実験で用いられたラットの副睾丸内皮細胞はPDGFによっては増殖を促進されないが、内皮細胞によっては β 型レセプターを発現しPDGFに反応するものもある。

PDGF receptor β -subunits are modulated during angiogenesis *in vitro*. As a model of angiogenesis *in vitro* we used cloned strains of bovine aortic endothelial cells that spontaneously form cords in the presence of serum through consecutive stages of development (44). This model offers the advantage that no exogenous extracellular matrix substrata that can contain growth-regulatory molecules (153) are needed. PDGF-BB directly induced endothelial cell proliferation (44) and migration (manuscript submitted) *via* PDGF receptor β -subunits exclusively expressed on developing endothelial cords. Furthermore, PDGF-BB but not PDGF-AA enhanced cord formation, *i.e.*, angiogenesis *in vitro* (44). Accordingly, we did not find any PDGF receptor α -subunit expression (44). PDGF-BB also induced movements of entire cord structures (manuscript submitted). Such movements in response to PDGF-BB would be impossible without the generation of active or passive traction forces and a strong interconnecting network of cell-cell and cell-matrix interactions (9, 116). In this model of angiogenesis endothelial cords emerge from a monolayer of more quiescent endothelial cells and develop into endothelial cords around extracellular matrix components (44). Cells engaged in the formation of cords differ from the cells in the underlying endothelial monolayer in cell shape, spatial organization, the nature of the substrate, the extracellular matrix in their microenvironment, and PDGF receptor β -subunit expression (44). Endothelial cells within the monolayer of the same cultures that were not organized in cords or identically-derived bovine endothelial cells that were unable to differentiate into cords did not respond to PDGF and did not appreciably express any PDGF receptors (44).

PDGF receptor α - and β -subunit expression was observed in microvascular endothelial cells grown on cell culture dishes by an other group (142). When these endothelial cells differentiated into cords and tubes in a 3-dimensional gel composed of extracellular matrices, PDGF receptor expression was downregulated (142). In yet another model of angiogenesis *in vitro* PDGF-BB stimulated the outgrowth of microvessels together with fibroblast-like cells from rat aortic rings cultured in collagen gels (155).

Consequently, some new questions arise from these studies (44, 142, 154, 155). Which factors and mechanisms control the expression of PDGF receptors and correspondingly the cellular phenotype in endothelial cells? Potential variables include spatial organization of cellular structures, cellular polarity and interactions with specific extracellular matrix components and other elements of the microenvironment, the functional state (quiescence versus proliferation) as well as the specific phenotype of endothelial cells. At present, it is legitimate to conclude that PDGF-BB can directly affect endothelial cell proliferation (44, 142) and can contribute directly and indirectly to formation of capillary-like endothelial structures *in vitro* in

最近我々は、*in vitro*での血管新生過程では β 型レセプターの発現が調節されていることを示した(44, 142)。我々は*in vitro*の血管新生モデルとしてクローン化したウシの大動脈血管内皮細胞を用いているが、これは発生過程のどの段階のものであっても血清が存在すると自然に帯状構造を形成する(44)。この系は増殖制御分子を含んでいる可能性のある細胞外マトリックスを加える必要がないという利点がある(153)。帯状構造を形成しつつある内皮細胞には β 型レセプターが発現されておりこれによってPDGF-BBは内皮細胞に直接作用しその増殖や移動を促進する(44)。PDGF-BBは帯状構造の形成すなわち*in vitro*(44)での血管新生を促進するが、PDGF-AAにはそのような活性はなく、従って α 型レセプターは全く検出されない(44)。PDGF-BBは帯状構造全体の移動をも誘導するが、このような移動は能動的あるいは受動的な牽引力や細胞と細胞のあるいは細胞とマトリックスが綿密に結びついたネットワークがなければ不可能である(9, 116)。この系では内皮細胞は比較的静止している単層状態から帯状の構造を形成しマトリックスのまわりを覆うように成長して帯状構造を形成する(44)。このような構造を形成した細胞と単層で静止している細胞とでは、細胞の形、空間的な配置、基質の性質、細胞のまわりの環境を形作るマトリックス、そして β 型レセプターの発現など多くの点で性質が異なっている(44)。同じ条件で培養しても、単層に広がり帯状構造を作っていない内皮細胞、あるいは同じウシに由来する内皮細胞でも帯状構造に分化し得ないものなどは、PDGFに反応することもないし有意なPDGFレセプターの発現も見られない(44)。

培養皿で培養している時の微小血管由来の内皮細胞について、 α 、 β 両型のPDGFレセプターの発現が調べられ(142)、このような内皮細胞は細胞外マトリックスで構成された3次元ゲルの中で帯状あるいは管状に分化するとPDGFレセプターの発現量が減少することが示された(142)。一方、コラーゲンゲル中で培養したラットの動脈環からの血管新生を調べるアッセイ系を用いた時には、PDGF-BBは微小血管が線維芽細胞様の細胞と共に伸展することを促進する(155)。

これらの研究の結果、当然ながら新たな疑問がいくつか生じた(44, 142, 154, 155)。内皮細胞ではいかなる因子がいかなるメカニズムでPDGFレセプターの発現を、そしてその結果細胞の性質を制御しているのであろうか？細胞の空間的な配置、極性、微小環境下でのマトリックス構成成分等との相互作用の状態、機能的な状態(休止期か増殖期か)、内皮細胞の性質など、様々な要因が考えられる。現在のところ、PDGF-BBは内皮細胞の増殖には直接作用し(44, 142)、*in vitro*での毛細管様の構造

dependence of the experimental conditions and the specific endothelial cell phenotypes (44).

H. Angiogenesis and PDGF in Tissue Remodeling and Disease

H-1. Placental Development and Embryogenesis

The placental circulation develops from the anastomosis of uterine capillaries from maternal tissue and cytotrophoblastic lacunae from the embryo (156). PDGF B-chain containing proteins (157, 158) and both PDGF receptors were expressed in cytotrophoblasts (157). Furthermore, PDGF B-chain and PDGF receptor β -subunit expression were spatiotemporally coexpressed in placental microcapillary endothelium (149).

In the embryo blood vessels mature from stem cells that develop into endothelial cells. These join into long tubes, which coalesce into networks. Up to that stage of development the formation of new vessels is called vasculogenesis. Subsequently the vascular networks spread by angiogenesis throughout the embryo and into organs, *e.g.* the kidney and the brain (159,160). Several lines of evidence suggest a role for PDGF in embryogenesis (10, 37-39, 161-165), vasculogenesis (165), and developmental angiogenesis (165). In developing mice the PDGF A-chain is expressed in neuronal and glial elements of the central nervous system (35). PDGF receptor α -subunit deficient mice, so called patch mice, have mainly a deficient development of the a non-neural subset of neural crest-derived cells, mesoderm, visceral endoderm, and the heart (39,162). Thus, there are no data available yet that would suggest a major role for PDGF receptor α -subunits in vasculo- or angiogenesis. In contrast, PDGF receptor β -subunit mRNA was highly expressed in the mesenchymal component of many developing tissues and organs, for example in the mesenchyme surrounding the endothelium of large vessels (165). PDGF receptor β -subunit transcripts were also highly expressed in the endothelium of small vessels (165). Mirroring these patterns of tissue expression, mice deficient for the corresponding ligand, the PDGF B-chain, showed an abortive development of kidney glomerula, *i.e.*, only single or few distended capillary loops could be found (164). Furthermore, the heart and large vascular structures developed incompletely (164). These observations suggest an important role for PDGF B-chain and the PDGF receptor β -subunit in placental and embryonic angiogenesis.

H-2. Wound Repair

Neovascularizations are conspicuous constituents of wound healing. Newly grown capillaries may serve to transport cells, nutrients, and debris in or out of wounds. Only little PDGF can be found in normal skin (20, 21). In wound repair platelets accumulate and release their contents in response to mechanical damage, thrombin, and other factors present in the blood coagulum (10). Released PDGF, together with other

を形成するのには、実験条件や細胞の性質に依存して直接的あるいは間接的に作用していると考えるのが合理的である (44)。

H. 組織再構成や病態における血管新生と PDGF

H-1. 胎盤の発達と胚形成

胎盤周期は母体の子宮毛細血管と胎児の細胞栄養層の裂孔が吻合して始まる (156)。細胞栄養層はPDGF-B鎖および兩型のPDGF レセプターを発現しており (157, 158)、また子宮毛細血管の内皮細胞はPDGF-B鎖と β 型レセプターを同時に発現している (149)。

胎児の血管は幹細胞から内皮細胞へと発達することによって成熟する。これらが集まって長い管を形成し、さらに癒合してネットワークを形成する。新しい血管が形成するまでの段階を脈管形成 (vasculogenesis) と呼ぶ。その後、血管新生 (angiogenesis) によって血管網は胚全体に広がり腎臓や脳といった臓器の中に入り込む (159, 160)。一連の研究の結果、胚形成 (10, 37-39, 161-165) や脈管形成 (160)、そして発生段階での血管新生 (165) でもPDGFが何らかの機能を果たしていることが示唆されている。発生途上のマウスでは中枢神経系の神経細胞やグリア細胞でPDGF-A鎖が発現されている (35)。いわゆる patch マウスと呼ばれる α 型レセプターを欠損したマウスでは、神経冠に由来する細胞のうち非神経細胞、中胚葉、内臓内胚葉、心臓細胞でその発達に影響が見られる (39, 162)。しかし α 型レセプターが脈管や血管の形成に大きな役割を果たすというデータは今のところ得られていない。これとは対照的に β 型レセプターのmRNAは多くの発生途上の組織や臓器の間充織組織、例えば大きな血管の内皮細胞を取り囲んでいる間充織などで強く発現されている (165)。このmRNAは微小血管の内皮細胞でも強く発現されている (165)。このような組織分布パターンを反映して、そのリガンドであるPDGF-B鎖を欠損したマウスでは腎の糸球体が未発達であり数少ない膨張した毛細血管係蹄が見られるのみである (164)。また心臓や大きな血管構造の発達が不完全である (164)。このような報告から、子宮や胚の血管新生過程ではPDGF-B鎖と β 型レセプターが重要な役割を果たしていると考えられている。

H-2. 創傷治癒過程

創傷が治癒する際には必ず新たな血管が形成される。新しく成長した毛細血管は細胞や栄養を傷の部位に送り込み、また老廃物を運び出すのに働いている。正常な皮膚にはPDGFはほとんど検出されない (20, 21)。傷が治る過程では、血小板が傷の部位に集積し、物理的な損傷やトロンピン他の血液凝固因子

growth-regulatory molecules may attract monocyte/macrophages, fibroblasts, and new vessels (10). In addition, keratinocytes (166), fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle cells, and monocytes/macrophages (10, 20) can secrete either A-chain or B-chain-containing PDGF molecules. Correspondingly, PDGF A-chain (167) or PDGF-AA (21, 168) can be present in endothelial cells, pericytes, smooth muscle cells, and fibroblasts of human healing wounds. PDGF B-chain containing molecules, both PDGF-AB and PDGF-BB (21), have been demonstrated in monocytes/macrophages of human healing wounds (20, 21). Furthermore, PDGF receptor β -subunits have been shown to be expressed in wounds (20,21). The simultaneous presence of PDGF-BB and PDGF receptor β -subunits in smooth muscle cells and cells of the capillary walls (20) suggest a potential role of PDGF in wound-associated angiogenesis.

PDGF has shown promising effects in accelerating impaired wound healing. PDGF increased the thickness of granulation tissue in guinea pig excisional wounds (169) and accelerated the formation of granulation tissue in rats (170,171). PDGF-BB accelerated dermal wound healing in rabbits (143) and humans (21) possibly via effects on the deposition of extracellular matrix (143), the induction of endogenous PDGF-AA, and angiogenesis (21).

Only little PDGF can be detected in chronic non-healing wounds (21). In line with these observations, PDGF improved wound healing in diabetic mice (172) and chronic pressure ulcers in humans healed faster with the application of high doses of recombinant PDGF-BB (173). Hence, PDGF-induced neovascularizations may have supported and accelerated impaired wound healing.

H-3. Inflammatory Diseases

Angiogenesis is a decisive element of chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (8). Hyperplastic synovial tissue that contains neovascularizations and granulomatous tissue invades joint surfaces and degrades cartilage by extensive proteolytic activity. Angiogenesis and endothelial cells may thereby decisively contribute to the accumulation and proliferation of inflammatory synovial tissue, to the production of proteolytic enzymes, and in consequence to invasion and destruction of joint surfaces. Interestingly, PDGF has been found in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis (10), and PDGF receptor β -subunits were demonstrated in association with inflammatory cells in chronic synovial inflammation (174). Furthermore, PDGF B-chain colocalized with phosphotyrosine staining, a potential activation marker of PDGF receptor tyrosine kinase, in synovial tissues of rats with streptococcal cell wall - and adjuvant arthritis as well as patients with rheumatoid arthritis (175). In another example of inflammatory tissue repair, PDGF has been immunolocalized to macrophages in an experimental rat model of chronic

に応答してその内容物を遊離する(10)。遊離された PDGF は他の増殖制御分子と共に単球やマクロファージ、線維芽細胞を引き寄せ、新たな血管の形成を促進する(10)。それに加え、角質細胞(166)、線維芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、単球やマクロファージ(10, 20)は、A鎖あるいはB鎖から成るPDGF分子を分泌する。ヒトの傷が治るときには内皮細胞や周細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞にPDGF-A鎖(167)あるいはPDGF-AA(21, 168)が出現する。PDGF-ABやPDGF-BBといったB鎖を含む分子は(21)、単球やマクロファージに発現し(20, 21)、また β 型レセプターも傷の部位に発現することが示されていた(20, 21)。平滑筋細胞や毛細血管壁の細胞にPDGF-BBと β 型レセプターが同時に存在すること(20)は、傷の治癒に関係した血管新生においてPDGFが何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。

PDGFには傷が治るのを早める効果もあるようである。PDGFはモルモットの外傷部位での肉芽組織の厚さを増したり(169)、ラット肉芽組織の形成を早めたりする(170, 171)。ウサギ(143)やヒト(21)の皮膚の傷でも、PDGF-BBは細胞外マトリックスの沈着(143)や内因性PDGF-AAの誘導、血管の形成などをもたらすことによって(21)傷が治るのを早める。

慢性的に治らない傷の部位ではPDGFはほとんど検出できない(21)。これに一致して、糖尿病マウスの傷はPDGFで改善されるし(172)、ヒトの慢性圧力潰瘍もリコンビナントPDGF-BBを大量に投与することによって治癒が早まる(173)。それゆえ、PDGFによって誘導される新たな血管の形成は傷ついた部位の治癒を助け、またそれを早める効果があるようである。

H-3. 炎症性疾患

リュウマチのような慢性炎症性疾患では、常に血管新生が生じている(8)。異常に増殖した滑液組織は新たに形成された血管や肉芽腫組織を含み、タンパク質分解活性の亢進によって関節の表面を侵襲し軟骨組織を崩壊させる。それゆえ血管新生と内皮細胞は炎症性滑液組織の蓄積と増殖、タンパク質分解酵素の産生、そして関節表面の浸潤と崩壊に重要な役割を果たしていると考えられる。リュウマチ患者の滑液中にはPDGFが見いだされており(10)、慢性滑液性炎症における炎症性細胞には β 型PDGFレセプターが関与していることが示されている(174)。さらにPDGFレセプターのチロシinkinase活性のマーカーであるホスホチロシンに対する抗体で染色してみると、連鎖球菌の細胞壁やアジュバントによって関節炎となったラットやリュウマチ性関節炎の患者の滑液組織では、PDGF-B鎖はホスホチ

granulomatous tissue (22). However, it is not clear whether angiogenesis is related to PDGF in inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and similar processes.

H-4. Angiogenesis in the Ischemic Heart and Ischemic Vascular Disease

Myocardial ischemia necessitates an improvement of the vascular supply by emerging collaterals which protect the myocardium from ischemic damage (176-178). In myocardial infarction new vessels penetrate the necrotic area and the surrounding ischemic tissue. These neovascularizations engage in tissue remodeling and myocardial scar formation. Additionally, they may help to preserve ischemic tissue and myocardial pump function in evolving myocardial necrosis (179, 180). Analogous studies in peripheral ischemic vascular disease in animals have demonstrated that the therapeutic induction of collaterals and neovascularizations with VEGF (181, 182) and also PDGF-BB (148) protected ischemic limbs.

H-5. Angiogenesis in Atherosclerotic Lesions

Interesting questions have arisen lately because of the (re)detection of microvessels within atherosclerotic lesions. Some recent papers describe neovascularizations and their association with different elements of the atherosclerotic lesion (183-186). Formation of neovascularizations in ischemic zones of atherosclerotic lesions could potentially contribute to lesional growth because of the influx of nutrients (187) and recruitment of cells (184). Conversely, the removal of debris and cellular elements may promote regression of atherosclerotic lesions. Similar to ocular neovascularizations in diabetic retinopathy (see below), newly grown vessels may tend to rupture and hemorrhage. Moreover, expression of proteolytic enzymes by neovascularizations and by adjacent cells may facilitate rupture of both neovessels and the atherosclerotic plaque (183). At the same time, PDGF B-chain is a well-known element of atherosclerotic lesions (10, 23, 188-190). The presence of a connective tissue stroma with smooth muscle cells, monocytes/macrophages, and extracellular matrix is clearly compatible with the effects of PDGF (189). Whether PDGF can contribute to vessel formation within atherosclerotic lesions is not known.

H-6. Angiogenesis in Diabetic Retinopathy and Other Eye Diseases

Neovascularizations occur in diabetic retinopathy, ischemic retinal-vein occlusion, retinopathy of prematurity, corneal transplantation, ocular trachoma, and many other eye diseases (191). In diabetes, local ischemia due to the closure of microvessels in small sections of the retina stimulates the growth of neovascularizations that can invade the vitreous (191). The new vessels leak blood components and rupture easily. Furthermore, increasing amounts of connective tissue consisting of fibroblasts, glial cells, and cords of extracellular matrix surround neovascularizations and proliferate as the disease

ロシンで染色される部位と同じ部位に存在する(175)。またラットの慢性肉芽腫組織を免疫染色してみるとPDGFはマクロファージに局在して存在することが示されている(22)。しかし、リュウマチ性関節炎などの炎症性疾患における血管新生にPDGFがどの程度関与しているのかは明確ではない。

H-4. 心臓や血管系の虚血性疾患における血管新生

心筋が虚血した際にはその損傷から心筋を保護するために側副血行によって血管を供給し血行を改善しなければならない(176-178)。心筋梗塞では、新たに形成された血管が壊死した領域やその周辺の貧血部位を貫通して広がる。このようにして新たな血管が作られると、組織が再構成されて心筋内に瘢痕が形成される。これらの血管は貧血組織を保護し壊死した部分にポンプとしての機能を持たせることに役立っている(179, 180)。末梢血管での虚血についてもモデル動物を用いて同じ様な研究がなされており、VEGF(181, 182)やPDGF-BB(148)を用いて側副血行を形成し血管新生を促すような治療を施すと、虚血した肢が保護されることが示されている。

H-5. 動脈硬化症における血管新生

最近、動脈硬化を生じた部位に再び微小血管が形成されていることが観察されて注目されており、動脈硬化での血管新生に関わる因子として様々なものが報告されている(183-186)。動脈硬化を生じて虚血した領域に新たな血管を形成することは、ある意味では病変細胞に栄養分を供給し(187)さらに硬化細胞を増やす(184)ことにもなるために硬化部位の拡大をもたらし可能性もある。逆にこのような血管の形成は老廃物や硬化細胞の除去にも働くため動脈硬化の退行にも働く。糖尿病性網膜症(次項参照)における目の血管新生と同じように、新しく形成された血管は破裂したり出血しやすい。加えて新たに血管を形成するに伴いその周辺の細胞で発現されるタンパク質分解酵素はさらに血管の破裂をもたらしこともあれば、動脈硬化斑の除去を促進することもある(183)。動脈硬化に関与する因子としてPDGF-B鎖はよく知られており(10, 23, 188-190)、実際動脈硬化部位には結合組織に加えて平滑筋細胞、単球、マクロファージ、細胞外マトリックスが集積しており、これはPDGFの効果と合致する(189)。しかし、PDGFが実際に動脈硬化部位での血管の形成に寄与しているのか否かはわからない。

H-6. 糖尿病性網膜症などの目の疾患における血管新生

糖尿病性網膜症、虚血性網膜静脈の閉塞、早熟性網膜症、角膜移植、結膜炎など、多くの目の疾患において新たな血管の新生が生じる(191)。糖尿病では網膜の狭い領域で微小血管が閉塞して局所的虚血を生じ、その結果新たな血管の新生を刺激してこれが水晶体を浸潤する(191)。新しく作られた血管はその成分が漏れやすく、また容易く破裂する。さらに疾患の進行に伴って、線維芽細胞、グリア細胞、細胞外マトリックスからな

progresses (191). This scar tissue can subsequently elicit traction on the retina, distorting it, or even causing retinal detachment (191). Thus, bleeding from the neovascularizations and concurrent tissue remodeling can cause blindness (191). There is evidence that angiogenic growth factors such as VEGF (78, 192, 193), FGF (191, 194), insulin-like growth factor I and II (191, 194, 195) might be implicated in the pathogenesis of diabetic retinopathy. In addition, the described phenomena are also compatible with known effects of PDGF. Correspondingly, PDGF and its receptors have been demonstrated in the developing rodent retina (196) and in proliferative retinal diseases (197). Once more PDGF and its receptors can be found in processes that are associated with angiogenesis.

H-7. Cancer

Tumor-associated neovascularization is a prerequisite of rapid tumor growth and metastasis (6, 7). The induction of tumor-associated new vessels allows tumor cells to tap into a source of blood-borne nutrients and, possibly, growth-regulatory molecules. Moreover, metastasis can result from the newly-established contacts of tumor cells with the circulation. The emergence of neovascularizations is therefore a decisive step in tumor development. Tumor neovascularizations are not principally different from other neovascularizations and originate from the non-transformed host tissue. As mentioned in section C and F PDGF and its receptors have been prominently associated with both tumorigenesis (10, 12) as well as the generation of a vascularized connective tissue stroma (12, 67).

I. Conclusions: Is PDGF an Angiogenic Molecule?

Any inflammatory mediator, morphogenic or growth-regulatory molecule, including PDGF, that induces an inflammatory or connective tissue stroma is likely to drive a concurrent vascular supply, be it indirectly or directly. To conclude our discussion about PDGF and angiogenesis we therefore suggest the following criteria to define the term "direct angiogenic molecule": (i) The molecule elicits an effect on angiogenesis *in vivo* upon exogenous administration or overexpression. (ii) The molecule has an effect on relevant endothelial cells *in vitro* that is compatible with angiogenesis. (iii) The relevant vessels *in vivo* can respond to the molecule (e.g. corresponding receptor expression). (iv) The molecule's role in angiogenesis is established in a process or disease and can be blocked with an antagonist.

For example, according to these criteria VEGF can be defined as a directly acting angiogenic molecule. For PDGF these criteria can be summarized as follows: (i) PDGF-BB can elicit the formation of a connective tissue stroma that contains neovascularizations *in vivo*. However, it is not yet entirely clear whether PDGF-BB elicits these effects indirectly via action on connective tissue and inflammatory cells which in turn drive angiogenesis or whether PDGF can also induce

る結合組織の量が増大し新しい血管のまわりを包んで増殖する (191)。このような瘢痕組織は網膜の収縮を引き起こし、これを破壊してさらには網膜剥離を引き起こす (191)。このように新しい血管からの出血と組織の再構成によって盲目になることもある (191)。VEGF (78, 192, 193)、FGF (191, 194)、IGF (インスリン様増殖因子) I、II (191, 194, 195) といった血管新生因子が糖尿病性網膜症の病因に深く関係していることはよく知られており、このような現象は既にわかっている PDGF の作用とも矛盾しない。また発生途上のネズミの網膜 (196) や増殖性の網膜の疾患 (197) においても PDGF とそのレセプターが存在することが知られている。つまり新たに血管が形成される過程では PDGF とそのレセプターが機能している。

H-7. 癌

腫瘍のまわりに新たな血管が形成されることは癌の急速な成長や転移に必須である (6, 7)。このような血管が形成されてはじめて癌細胞は血流によって運ばれる栄養分や増殖制御分子に出会うことができる。また癌細胞が血流と接することではじめて癌の転移が生じ得る。このように新たな血管の形成は癌の成長には必須である。腫瘍による血管新生も他の血管新生と基本的にはなんら変わりはなく、生じる血管も宿主の組織の正常な細胞から生じている。C 節、F 節で述べたように PDGF とそのレセプターは腫瘍の形成ばかりでなく (10, 12)、血管網の発達した結合組織の形成にも深く関与している (12, 67)。

I. 結論：PDGF は本当に血管新生因子だろうか？

炎症性メディエーターや PDGF などの形態、増殖の制御因子は、炎症や結合組織の形成を誘導すると共に、直接的にしろ間接的にしろ同時に血管の供給を誘導する。PDGF と血管新生に関するこの論文を終えるにあたって、“直接的な血管新生因子”という用語を定義するために次のような基準を提案したい。

(i) 外から投与することにより、あるいは過剰発現することによって、*in vivo* での血管新生に何らかの効果をもたらす分子。

(ii) *In vitro* の血管内皮細胞に対して生理的な血管新生と矛盾しない効果をもたらす分子。

(iii) *In vivo* で血管が応答できるような分子 (例えば、対応するレセプターが発現していること)。

(iv) 血管新生の過程、あるいは病態においてその分子の機能が確立されていて、アンタゴニストによってその作用が阻害できるような分子。

このような評価基準をもってすると、例えば VEGF は直接的に作用する血管新生因子といえることができる。PDGF については次のようにまとめることができる。

(i) PDGF-BB は *in vivo* で新しい血管を含む結合組織の形成を促す。しかし、PDGF-BB が結合組織や炎症性細胞に作用して、次にこれらの細胞が血管新生を誘導するといった系で間接的にこのような効果をもたらしているのか、あるいは PDGF も

angiogenesis directly via PDGF receptor β -subunit-expressing endothelial cells. (ii) Microvascular endothelial cells can express PDGF receptor β -subunits and can proliferate and migrate in response to PDGF-BB. Furthermore, PDGF-BB can enhance cord formation, i.e., angiogenesis *in vitro*, in distinct phenotypes of cord-forming endothelial cells via PDGF receptor β -subunits. Intrinsic or acquired properties of neovascularizing endothelial cells may determine PDGF receptor β -subunit expression and thus their responses to PDGF-BB. It is not yet known which variables affect endothelial PDGF receptor β -subunit expression. (iii) Microvessels *in vivo* can express PDGF receptor β -subunits. However, It is not yet fully known how they respond to PDGF-BB. (iv) PDGF expression in tissues and endothelial PDGF receptor β -subunit expression has been demonstrated in several angiogenesis-related processes and diseases *in vivo*. Furthermore, PDGF B-chain deficient mice show abnormalities that corroborate an angiogenic role of PDGF-BB (164).

In conclusion, significant but as yet incomplete evidence points to PDGF-BB as a directly-acting angiogenic molecule.

Acknowledgments

E. J. Battagay is supported by a SCORE fellowship of the Swiss National Science Foundation (32-31948.91). Research performed in the author's laboratory is supported by Swiss National Science Foundation grant 32-42566.94, a grant from the Roche Research Foundation, Basel, Switzerland, and a grant from Hoffmann-La Roche, Inc., Basel, Switzerland.

References

1. Palis, J., McGrath, K.E., and Kingsley, P.D. (1995) *Blood* **86**, 156-163
2. Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995) *Nature* **376**, 62-66
3. Klagsbrun, M., and Folkman, J. (1990) in *Peptide Growth Factors and Their Receptors II* (Sporn, M. B., and Roberts, A. B. eds.) pp. 549-574, Berlin, Springer Verlag
4. Risau, W. (1990) *Prog. Growth Fact. Res.* **2**, 71-79
5. Montesano, R. (1992) *Eur. J. Clin. Invest.* **22**, 504-515
6. Folkman, J., and Shing, Y. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10931-10934
7. Folkman, J. (1995) *Nature Med.* **1**, 27-31
8. Battagay, E.J. (1995) *J. Mol. Med.* **73**, 333-346
9. Vernon, R.B., and Sage, E.H. (1995) *Am. J. Pathol.* **147**, 873-883
10. Raines, E.W., Bowen-Pope, D.F., and Ross, R. (1990) in *Peptide Growth Factors and Their Receptors II* (Sporn, M.B., and Roberts, A. B. eds.) pp. 173-262, Berlin, Springer Verlag
11. Claesson Welsh, L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 32023-32026
12. Heldin, C. (1992) *EMBO. J.* **11**, 4251-4259
13. Raines, E.W., and Ross, R. (1992) *J. Cell. Biol.* **116**, 533-543
14. Khachigian, L.M., and Chesterman, C.N. (1994) *Peptides* **15**, 133-137
15. Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., and Dvorak, A.M. (1995) *Am. J. Pathol.* **146**, 1029-1039
16. Seifert, R.A., Hart, C.E., Phillips, P.E., Forstrom, J.W., Ross, R., Murray, M.J., and Bowen Pope, D.F. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 8771-8778
17. Herren, B., Rooney, B., Weyer, K.A., Iberg, N., Schmid, G., and Pech, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15088-15095
18. Hart, C.E., Bailey, M., Curtis, D.A., Osborn, S., Raines, E.W., Ross, R., and Forstrom, J.W. (1990) *Biochemistry* **29**, 166-172
19. Hammacher, A., Hellman, U., Johnsson, A., Ostman, A., Gunnarsson, K., Westermark, B., Wasteson, A., and Heldin, C. H. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16493-16498
20. Reuter Dahl, C., Sundberg, C., Rubin, K., Funa, K., and Gerdin, B. (1993) *J. Clin. Invest.* **91**, 2065-2075
21. Pierce, G.F., Tarpley, J.E., Tseng, J., Bready, J., Chang, D., Kenney, W.C., Rudolph, R., Robson, M.C., Vande Berg, J., and Reid, P. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 1336-1350

β 型PDGFレセプターを発現している内皮細胞に作用して直接的に血管新生を誘導しているのかという問題はいまだ完全には解決していない。

(ii) 微小血管の内皮細胞は β 型PDGFレセプターを発現していて、PDGF-BBに応答して増殖、移動することができる。またPDGF-BBは*in vitro*での血管新生である帯状組織の形成を促進する働きがあり、これは β 型レセプターを介して生じる内皮細胞の独特な形態である。新しく形成された血管の内皮細胞が本来的に備えているものかあるいはあとで獲得したものなのかはわからないが、その性質が β 型レセプターの発現を決定し、これによってPDGF-BBに対する応答性が決まる。たくさんある性質のうち何が内皮細胞の β 型レセプターの発現を決定しているのかは不明である。

(iii) *In vivo*で微小血管は β 型PDGFレセプターを発現している。しかしこれらがどのようにしてPDGF-BBに応答するのかわかっていない。

(iv) *In vivo*での血管新生や疾患の際に、組織ではPDGFが、内皮細胞では β 型レセプターが発現されていることは既に知られている。またPDGF-B鎖の欠損マウスが異常を示すことによってPDGF-BBが血管新生過程において機能していることがわかる。

結論として、PDGF-BBが直接的な血管新生因子であることは非常に強く示唆されるが、しかし未だ完全には証拠が出そろってはいないと言えるだろう。

工業技術院生命工学工業技術研究所細胞機能研究室
浅田 眞弘、岡 修一 訳

22. Appleton, I., Tomlinson, A., Colville Nash, P.R., and Willoughby, D.A. (1993) *Lab. Invest.* **69**, 405-414
23. Ross, R., Masuda, J., Raines, E.W., Gown, A.M., Katsuda, S., Sasahara, M., Malden, L.T., Masuko, H., and Sato, H. (1990) *Science* **248**, 1009-1012
24. Vignaud, J.M., Marie, B., Klein, N., Plenat, F., Pech, M., Borrelly, J., Martinet, N., Duprez, A., and Martinet, Y. (1994) *Cancer. Res.* **54**, 5455-5463
25. Battegay, E.J., Raines, E.W., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., and Ross, R. (1990) *Cell* **63**, 515-524
26. Battegay, E.J., Raines, E.W., Colbert, T., and Ross, R. (1995) *J. Immunol.* **154**, 6040-6047
27. Raines, E.W., Dower, S.K., and Ross, R. (1989) *Science* **243**, 393-396
28. Nakahara, K., Nishimura, H., Kuro, M., Takewaki, S., Iwase, M., Ohkubo, A., Yazaki, Y., and Nagai, R. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 811-818
29. Berk, B.C., and Rao, G. (1993) *J. Cell. Physiol.* **154**, 368-380
30. Itoh, H., Mukoyama, M., Pratt, R.E., Gibbons, G.H., and Dzau, V.J. (1993) *J. Clin. Invest.* **91**, 2268-2274
31. Weber, H., Taylor, D.S., and Molloy, C.J. (1994) *J. Clin. Invest.* **93**, 788-798
32. Paulsson, Y., Bywater, M., Heldin, C.H., and Westermark, B. (1987) *Exp. Cell Res.* **171**, 186-194
33. Stouffer, G.A., and Owens, G. K. (1994) *J. Clin. Invest.* **93**, 2048-2055
34. Seifert, R.A., Coats, S.A., Raines, E.W., Ross, R., and Bowen Pope, D.F. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13951-13955
35. Yeh, H.J., Ruit, K.G., Wang, Y.X., Parks, W.C., Snider, W.D., and Deuel, T. F. (1991) *Cell* **64**, 209-216
36. Sasahara, M., Fries, J.W., Raines, E.W., Gown, A.M., Westrum, L. E., Frosch, M. P., Bonthron, D. T., Ross, R., and Collins, T. (1991) *Cell.* **64**, 217-227
37. Hutchins, J.B., and Jefferson, V.E. (1992) *Brain Res. Dev. Brain Res.* **67**, 121-135
38. Sasahara, A., Kott, J.N., Sasahara, M., Raines, E.W., Ross, R., and Westrum, L. E. (1992) *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* **68**, 41-53
39. Morrison Graham, K., Schattman, G.C., Bork, T., Bowen Pope, D. F., and Weston, J. A. (1992) *Development* **115**, 133-142
40. Smits, A., Odin, P., Duan, W.M., Brundin, P., Widner, H., Heldin, C. H., Lindvall, O., and Funa, K. (1993) *Cell Transplant.* **2**, 151-162
41. Ballagi, A.E., Odin, P., Othberg Cederstrom, A., Smits, A., Duan, W.M., Lindvall, O., and Funa, K. (1994) *Cell Transplant.* **3**, 453-460
42. Eccleston, P.A., Funa, K., and Heldin, C.H. (1993) *Dev. Biol.* **155**, 459-470
43. Jaye, M., McConathy, E., Drohan, W., Tong, B., Deuel, T., and Maciag, T. (1985) *Science* **228**, 882-885
44. Battegay, E.J., Rupp, J., Iruela Arispe, L., Sage, E.H., and Pech, M. (1994) *J Cell Biol* **125**, 917-928
45. Soyombo, A.A., and DiCorleto, P. E. (1994) *J Biol Chem* **269**, 17734-17740
46. Shankar, R., de la Motte, C.A., Poptic, E.J., and DiCorleto, P.E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13936-13941
47. Harlan, J.M., Thompson, P.J., Ross, R.R., and Bowen Pope, D.F. (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 1129-1133
48. Gajdusek, C., Carbon, S., Ross, R., Nawroth, P., and Stern, D. (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 419-428
49. Daniel, T.O., Gibbs, V.C., Milfay, D.F., Garovoy, M. R., and Williams, L.T. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 9579-9582
50. Starksen, N.F., Harsh, G.R., 4th, Gibbs, V.C., and Williams, L.T. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14381-14384
51. Gay, C.G. and Winkles, J.A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3284-3292
52. Hajjar, K.A., Hajjar, D.P., Silverstein, R.L., and Nachman, R.L. (1987) *J. Exp. Med.* **166**, 235-245
53. Kavanaugh, W.M., Harsh, G.R., 4th, Starksen, N.F., Rocco, C.M., and Williams, L. T. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 8470-8472
54. Kume, N., and Gimbrone, M.A., Jr. (1994) *J. Clin. Invest.* **93**, 907-911
55. Calderon, T.M., Sherman, J., Wilkerson, H., Hatcher, V.B., and Berman, J. W. (1992) *Cell Immunol.* **143**, 118-126
56. Khachigian, L.M., Resnick, N., Gimbrone, M.A., Jr., and Collins, T. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 1169-1175
57. Mitsumata, M., Fishel, R.S., Nerem, R.M., Alexander, R.W., and Berk, B.C. (1993) *Am. J. Physiol.* **265**, H3-8
58. Resnick, N., Collins, T., Atkinson, W., Bonthron, D.T., Dewey, C.F., Jr., and Gimbrone, M. A., Jr. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4591-4595
59. Lindner, V. and Reidy, M.A. (1995) *Am. J. Pathol.* **146**, 1488-1497
60. Nister, M., Libermann, T.A., Betsholtz, C., Pettersson, M., Claesson Welsh, L., Heldin, C.H., Schlessinger, J., and Westermark, B. (1988) *Cancer Res.* **48**, 3910-3918
61. Nister, M., Claesson Welsh, L., Eriksson, A., Heldin, C.H., and Westermark, B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16755-16763
62. Palman, C., Bowen Pope, D.F., and Brooks, J.J. (1992) *Lab. Invest.* **66**, 108-115
63. Matsui, T., Sano, K., Tsukamoto, T., Ito, M., Takaishi, T., Nakata, H., Nakamura, H., and Chihara, K. (1993) *J. Clin. Invest.* **92**, 1153-1160
64. Hermanson, M., Funa, K., Hartman, M., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H., Westermark, B., and Nister, M. (1992) *Cancer. Res.* **52**, 3213-3219
65. Hermansson, M., Nister, M., Betsholtz, C., Heldin, C. H., Westermark, B., and Funa, K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7748-7752
66. Funa, K., Papanicolaou, V., Juhlin, C., Rastad, J., Akerstrom, G., Heldin, C.H., and Oberg, K. (1990) *Cancer Res.* **50**, 748-753
67. Forsberg, K., Valyi-Nagy, I., Heldin, C.H., Herlyn, M., and Westermark, B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 393-397
68. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992) *Nature.* **359**, 843-845
69. Plate, K.H., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A., and Risau, W. (1993) *Cancer. Res.* **53**, 5822-5827
70. Sakuda, H., Nakashima, Y., Kuriyama, S., and Sueishi, K. (1992) *Am. J. Pathol.* **141**, 1507-1516
71. Ladoux, A. and Frelin, C. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 1005-1010
72. Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S., and Goldberg, M.A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13333-13340
73. Thieme, H., Aiello, L.P., Takagi, H., Ferrara, N., and King, G.L. (1995) *Diabetes* **44**, 98-103
74. Shima, D.T., Deutsch, U., and D'Amore, P.A. (1995) *FEBS Lett.* **370**, 203-208
75. Brogi, E., Wu, T., Namiki, A., and Isner, J.M. (1994) *Circulation.* **90**, 649-652
76. Stavri, G.T., Hong, Y., Zachary, I.C., Breier, G., Baskerville, P.A., Yla, H.S., Risau, W., Martin, J.F., and Erusalimsky, J.D. (1995) *FEBS Lett.* **358**, 311-315
77. Stavri, G.T., Zachary, I.C., Baskerville, P.A., Martin, J. F., and Erusalimsky, J.D. (1995) *Circulation* **92**, 11-14
78. Miller, J.W., Adamis, A.P., Shima, D.T., D'Amore, P.A., Moulton, R.S., O'Reilly, M.S., Folkman, J., Dvorak, H.F., Brown, L.F., Berse, B., Yeo, T.-K., and Yeo K.-T. (1994) *Am. J. Pathol.* **145**, 574-584

79. Pe er, J., Shweiki, D., Itin, A., Hemo, I., Gnessin, H., and Keshet, E. (1995) *Lab. Invest.* **72**, 638–645
80. Minchenko, A., Bauer, T., Salceda, S., and Caro, J. (1994) *Lab. Invest.* **71**, 374–379
81. Potgens, A. J., Lubsen, N. H., van Altena, M.C., Schoenmakers, J. G., Ruiter, D.J., and de Waal, R.M. (1995) *Am. J. Pathol.* **146**, 197–209
82. Ikeda, E., Achen, M.G., Breier, G., and Risau, W. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 19761–19766
83. Kourembanas, S., Hannan, R.L., and Faller, D.V. (1990) *J. Clin. Invest.* **86**, 670–674
84. Dawes, K.E., Peacock, A.J., Gray, A.J., Bishop, J.E., and Laurent, G. J. (1994) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**, 552–559
85. Kuwabara, K., Ogawa, S., Matsumoto, M., Koga, S., Clauss, M., Pinsky, D.J., Lyn, P., Leavy, J., Witte, L., Joseph Silverstein, J., Furie, M.B., Torcia, G., Cozzolino, F., Kamada, T., and Stern, D.M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4606–4610
86. Goldberg, M.A. and Schneider, T.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4355–4359
87. Gleadle, J.M., Ebert, B.L., Firth, J.D., and Ratcliffe, P.J. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, C1362–C1368
88. Levy, A.P., Levy, N.S., Loscalzo, J., Calderone, A., Takahashi, N., Yeo, K.T., Koren, G., Colucci, W.S., and Goldberg, M.A. (1995) *Circ. Res.* **76**, 758–766
89. Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., Zhou, X.M., Foster, D., Brugge, J.S., and Sukhatme, V.P. (1995) *Nature* **375**, 577–581
90. Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., and Kourembanas, S. (1995) *Circ. Res.* **77**, 638–643
91. Kourembanas, S., McQuillan, L.P., Leung, G.K., and Faller, D.V. (1993) *J. Clin. Invest.* **92**, 99–104
92. Khachigian, L.M., Fries, J.W., Benz, M.W., Bonthron, D.T., and Collins, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22647–22656
93. Pepper, M.S., Sappino, A.P., Stocklin, R., Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, J. (1993) *J. Cell. Biol.* **122**, 673–684
94. Carmeliet, P., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., De Vos, R., van den Oord, J.J., Collen, D., and Mulligan, R. C. (1994) *Nature* **368**, 419–424
95. Pollock, R.A., and Richardson, W.D. (1992) *Growth Factors* **7**, 267–277
96. Pekny, M., Ostman, A., Hermansson, A., Nister, M., Heldin, C. H., and Westermark, B. (1994) *Growth Factors* **10**, 77–87
97. Bonner, J.C. and Osornio Vargas, A.R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 16236–16242
98. Raines, E.W., Lane, T.F., Iruela-Arispe, M. L., Ross, R., and Sage, E. H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1281–1285
99. McNeil, P.L., Muthukrishnan, L., Warder, E., and D'Amore, P. A. (1989) *J. Cell. Biol.* **109**, 811–822
100. Vlassara, H. (1992) *Diabetes* **41** Suppl. 2, 52–56
101. Mizutani, M., Okuda, Y., Yamaoka, T., Tsukahara, K., Isaka, M., Bannai, C., and Yamashita, K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 664–669
102. Berk, B.C., Alexander, R.W., Brock, T.A., Gimbrone, M.A., Jr., and Webb, R.C. (1986) *Science* **232**, 87–90
103. deBlois, D., Drapeau, G., Petitclerc, E., and Marceau, F. (1992) *Br. J. Pharmacol.* **105**, 959–967
104. Cunningham, L.D., Brecher, P., and Cohen, R.A. (1992) *J. Clin. Invest.* **89**, 878–882
105. Bassett, J.E., Bowen Pope, D.F., Takayasu, M., and Dacey, R.G., Jr. (1988) *Microvasc. Res.* **35**, 368–373
106. Antonelli-Orlidge, A., Smith, S. R., and D'Amore, P.A. (1989) *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**, 1129–1131
107. Antonelli-Orlidge, A., Saunders, K.B., Smith, S.R., and D'Amore, P.A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4544–4548
108. Sato, Y. and Rifkin, D.B. (1989) *J. Cell. Biol.* **109**, 309–315
109. Sundberg, C., Ljungstrom, M., Lindmark, G., Gerdin, B., and Rubin, K. (1993) *Am. J. Pathol.* **143**, 1377–1388
110. Li, W., Liu, X., and Yanoff, M. (1995) *Microvasc. Res.* **49**, 350–363
111. D'Amore, P.A. and Smith, S.R. (1993) *Growth Factors* **8**, 61–75
112. Pfeilschifter, J., Krempien, R., Naumann, A., Gronwald, R.G., Hoppe, J., and Ziegler, R. (1992) *Endocrinology* **130**, 2059–2066
113. Kenagy, R.D., and Clowes, A.W. (1995) *Thromb. Res.* **77**, 55–61
114. Tranque, P., Naftolin, F., and Robbins, R. (1994) *Endocrinology* **134**, 2606–2613
115. van Leeuwen, R. T., Kol, A., Andreotti, F., Kluft, C., Maseri, A., and Sperti, G. (1994) *Circulation* **90**, 362–368
116. Vernon, R.B., Angello, J.C., Iruela-Arispe, M.L., Lane, T.F., and Sage, E.H. (1992) *Lab. Invest.* **66**, 536–547
117. Westermark, B., Siegbahn, A., Heldin, C. H., and Claesson-Welsh, L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 128–132
118. Risau, W., Drexler, H., Mironov, V., Smits, A., Siegbahn, A., Funa, K., and Heldin, C. (1992) *Growth Factors* **7**, 261–266
119. Koyama, N., Watanabe, S., Tezuka, M., Morisaki, N., Saito, Y., and Yoshida, S. (1994) *J. Cell Physiol.* **158**, 1–6
120. Soma, Y., Takehara, K., and Ishibashi, Y. (1994) *Exp. Cell Res.* **212**, 274–277
121. Schreier, T., Degen, E., and Baschong, W. (1993) *Res. Exp. Med. Berl.* **193**, 195–205
122. Ferns, G.A., Raines, E.W., Sprugel, K.H., Motani, A.S., Reidy, M.A., and Ross, R. (1991) *Science* **253**, 1129–1132
123. Khouri, R.K., Hong, S.P., Deune, E.G., Tarpley, J.E., Song, S.Z., Serdar, C.M., and Pierce, G.F. (1994) *J. Clin. Invest.* **94**, 1757–1763
124. LaFleur, D.W., Fagin, J.A., Forrester, J.S., Rubin, S.A., and Sharifi, B. G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 20757–20763
125. Harvey, A.K., Stack, S.T., and Chandrasekhar, S. (1993) *Biochem. J.* **292**, 129–136
126. Hansch, G.M., Wagner, C., Burger, A., Dong, W., Staehler, G., and Stoeck, M. (1995) *J. Cell Physiol.* **163**, 451–457
127. Haynes, J.H., Johnson, D.E., Mast, B.A., Diegelmann, R. F., Salzberg, D.A., Cohen, I.K., and Krummel, T.M. (1994) *J. Pediatr. Surg.* **29**, 1405–1408
128. Johnson, R. J., Raines, E.W., Floege, J., Yoshimura, A., Pritzl, P., Alpers, C., and Ross, R. (1992) *J. Exp. Med.* **175**, 1413–1416
129. Beitz, J.G., Kim, I.S., Calabresi, P., and Frackelton, A.R.J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2021–2025
130. Beitz, J.G., Kim, I.S., Calabresi, P., and Frackelton, A.R., Jr. (1992) *EXS.* **61**, 85–90
131. Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., and Cheresch, D. A. (1994) *Cell* **79**, 1157–1164
132. Brooks, P.C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F.H., and Cheresch, D.A. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 1815–1822
133. Nguyen, M., Strubel, N.A., and bischoff, J. (1993) *Nature* **365**, 267–269
134. Kirchberg, K., Lange, T.S., Klein, E.C., Jungtaubl, H., Heinen, G., Meyer Ingold, W., and Scharffetter Kochanek, K. (1995) *Exp. Cell Res.* **220**, 29–35
135. Ahlen, K., and Rubin, K. (1994) *Exp. Cell Res.* **215**, 347–353
136. Augustin, H.G., Braun, K., Telemenakis, I., Modlich, U., and Kuhn, W. (1995) *Am. J. Pathol.* **147**, 339–351
137. O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., and Folkman, J. (1994) *Cell* **79**, 315–328

138. Choi, M.E., and Ballermann, B.J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21144–21150
139. Kim, H.R., Upadhyay, S., Li, G., Palmer, K.C., and Deuel, T.F. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9500–9504
140. Bennett, M.R., Evan, G.I., and Schwartz, S.M. (1995) *J. Clin. Invest.* **95**, 2266–2274
141. Yao, R., and Cooper, G.M. (1995) *Science* **267**, 2003–2006
142. Marx, M., Perlmutter, R.A., and Madri, J.A. (1994) *J. Clin. Invest.* **93**, 131–139
143. Pierce, G.F., Tarpley, J.E., Yanagihara, D., Mustoe, T.A., Fox, G.M., and Thomason, A. (1992) *Am. J. Pathol.* **140**, 1375–1388
144. Risau, W., Drexler, H., Mironov, V., Smits, A., Siegbahn, A., Funa, K., and Heldin, C. H. (1992) *Growth Factors* **7**, 261–266
145. Oikawa, T., Onozawa, C., Sakaguchi, M., Morita, I., and Murota, S. (1994) *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1686–1688
146. Martins, R.N., Chleboun, J.O., Sellers, P., Sleight, M., and Muir, J. (1994) *Growth Factors* **10**, 299–306
147. Shaish, A., Daugherty, A., O Sullivan, F., Schonfeld, G., and Heinecke, J.W. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 2075–2082
148. Brown, D.M., Hong, S.P., Farrell, C.L., Pierce, G.F., and Khouri, R.K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5920–5924
149. Holmgren, L., Glaser, A., Pfeifer Ohlsson, S., and Ohlsson, R. (1991) *Development* **113**, 749–754
150. Bar, R.S., Boes, M., Booth, B.A., Dake, B.L., Henley, S., and Hart, M. N. (1989) *Endocrinology* **124**, 1841–1848
151. Smits, A., Hermansson, M., Nister, M., Karnushina, I., Heldin, C.H., Westermark, B., and Funa, K. (1989) *Growth Factors* **2**, 1–8
152. Plate, K.H., Breier, G., Farrell, C.L., and Risau, W. (1992) *Lab. Invest.* **67**, 529–534
153. Vukicevic, S., Kleinman, H. K., Luyten, F. P., Roberts, A. B., Roche, N. S., and Reddi, A.H. (1992) *Exp. Cell. Res.* **202**, 1–8
154. Sato, N., Beitz, J.G., Kato, J., Yamamoto, M., Clark, J.W., Calabresi, P., Raymond, A., and Frackelton, A.R., Jr. (1993) *Am. J. Pathol.* **142**, 1119–1130
155. Nicosia, R. F., Nicosia, S. V., and Smith, M. (1994) *Am. J. Pathol.* **145**, 1023–1029
156. O’Rahilly, R., and Müller, F. (1992) in *Human Embryology and Teratology* (O’Rahilly, R., and Müller, F. eds.) pp. 43–54, New York, Wiley-Liss
157. Holmgren, L., Claesson Welsh, L., Heldin, C. H., and Ohlsson, R. (1992) *Growth Factors* **6**, 219–231
158. Mochizuki, M. (1992) *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* **44**, 918–928
159. Larsen, W.J. (1993) in *Human Embryology* (Larsen, W.J. ed.) pp. 435–452, New York, Churchill Livingstone
160. Risau, W. (1991) *Pharmacol. Ther.* **51**, 371–376
161. Mercola, M., Wang, C.Y., Kelly, J., Brownlee, C., Jackson-Grusby, L., Stiles, C., and Bowen-Pope, D. (1990) *Dev. Biol.* **138**, 114–122
162. Orr Urtreger, A., Bedford, M.T., Do, M.S., Eisenbach, L., and Lonai, P. (1992) *Development* **115**, 289–303
163. Schattelman, G.C., Morrison Graham, K., van Koppen, A., Weston, J. A., and Bowen Pope, D. F. (1992) *Development* **115**, 123–131
164. Leveen, P., Pekny, M., Gebre Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., and Betsholtz, C. (1994) *Genes Dev.* **8**, 1875–1887
165. Shinbrot, E., Peters, K. G., and Williams, L. T. (1994) *Dev. Dyn.* **199**, 169–175
166. Ansel, J.C., Tiesman, J.P., Olerud, J.E., Krueger, J.G., Krane, J.F., Tara, D.C., Shipley, G.D., Gilbertson, D., Usui, M. L., and Hart, C. E. (1993) *J. Clin. Invest.* **92**, 671–678
167. Golden, M.A., Au, Y.P., Kirkman, T.R., Wilcox, J.N., Raines, E. W., Ross, R., and Clowes, A.W. (1991) *J. Clin. Invest.* **87**, 406–414
168. Dvonch, V.M., Murphey, R.J., Matsuoka, J., and Grotendorst, G. R. (1992) *Surgery* **112**, 18–23
169. LeGrand, E.K., Burke, J. F., Costa, D.E., and Kiorpes, T.C. (1993) *Growth Factors* **8**, 307–314
170. Lepisto, J., Kujari, H., Niinikoski, J., and Laato, M. (1994) *Eur. Surg. Res.* **26**, 267–272
171. Lepisto, J., Laato, M., Niinikoski, J., Lundberg, C., Gerdin, B., and Heldin, C.H. (1992) *J. Surg. Res.* **53**, 596–601
172. Brown, R.L., Breiden, M.P., and Greenhalgh, D.G. (1994) *J. Surg. Res.* **56**, 562–570
173. Robson, M.C., Phillips, L.G., Thomason, A., Robson, L.E., and Pierce, G.F. (1992) *Lancet* **339**, 23–25
174. Rubin, K., Tingstrom, A., Hansson, G. K., Larsson, E., Ronnstrand, L., Klareskog, L., Claesson Welsh, L., Heldin, C.H., Fellstrom, B., and Terracio, L. (1988) *Aust. N. Z. J. Med.* **1**, 1353–1356
175. Sano, H., Engleka, K., Mathern, P., Hla, T., Crofford, L.J., Remmers, E.F., Jelsema, C.L., Goldmuntz, E., Maciag, T., and Wilder, R.L. (1993) *J. Clin. Invest.* **91**, 553–565
176. Sasayama, S., and Fujita, M. (1992) *Circulation* **85**, 1197–1204
177. Schaper, W., Sharma, H.S., Quinkler, W., Markert, T., Wünsch, M., and Scharper, J. (1990) *J. Am. Coll. Cardiol.* **15**, 513–518
178. Tomoike, H., Inoue, T., Watanabe, K., Mizukami, M., Kikuchi, Y., and Nakamura, M. (1983) *Circulation* **67**, 1001–1008
179. Harada, K., Grossman, W., Friedman, M., Edelman, E.R., Prasad, P.V., Keighley, C.S., Manning, W. J., Sellke, F. W., and Simons, M. (1994) *J Clin Invest* **94**, 623–630
180. Yanagisawa-Miwa, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Tomaru, T., Kido, H., Kamijo, T., Sugimoto, T., Kaji, K., Utsuyama, M., Kurashima, C., and Itoh, H. (1992) *Science* **257**, 1401–1403
181. Takeshita, S., Zheng, L.P., Brogi, E., Kearney, M., Pu, L.Q., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J.F., and Isner, J.M. (1994) *J. Clin. Invest.* **93**, 662–670
182. Pu, L. Q., Sniderman, A.D., Brassard, R., Lachapelle, K. J., Graham, A. M., Lisbona, R., and Symes, J. F. (1993) *Circulation* **88**, 208–215
183. Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M. W., and Libby, P. (1994) *J. Clin. Invest.* **94**, 2493–2503
184. O’Brien, K.D., Allen, M.D., McDonald, T.O., Chait, A., Harlan, J.M., Fishbein, D., McCarthy, J., Ferguson, M., Hudkins, K., Benjamin, C. D., Lobb, R., and Alpers, C.E. (1993) *J. Clin. Invest.* **92**, 945–951
185. Sueishi, K., Kumamoto, M., Sakuda, H., and Tanaka, K. (1993) *Curr. Top. Pathol.* **87**, 47–58
186. Kuzuya, M., Satake, S., Esaki, T., Yamada, K., Hayashi, T., Naito, M., Asai, K., and Iguchi, A. (1995) *J. Cell Physiol.* **164**, 658–667
187. Zhang, Y., Cliff, W. J., Schoeffl, G. I., and Higgins, G. (1993) *Am. J. Pathol.* **143**, 164–172
188. Cimminiello, C., Arpaia, G., Aloisio, M., Uberti, T., Rossi, F., Pozzi, F., and Bonfardeci, G. (1994) *Angiology* **45**, 289–293
189. Ross, R. (1993) *Nature* **362**, 801–809
190. Katsuda, S., Coltrera, M. D., Ross, R., and Gown, A.M. (1993) *Am. J. Pathol.* **142**, 1787–1793
191. Frank, R.M. (1994) *N. Engl. J. Med.* **331**, 1519–1520
192. Adamis, A.P., Miller, J.W., Bernal, M.T., D’Amico, D.J., Folkman, J., Yeo, T.-K., and Yeo, K.-T. (1994) *Am. J. Ophthalmol.* **118**, 445–450

193. Aiello, L.P., Avery, R.L., Arrigg, P.G., Keyt, B.A., Jampel, H.D., Shah, S.T., Pasquale, L.R., Thieme, H., Iwamoto, M.A., Park, J.E., Nguyen, H.V., Aiello, L.M., Ferrara, N., and King, G.L. (1994) *N. Engl. J. Med.* **331**, 1480–1487
194. Grant, M. B., Mames, R.N., Fitzgerald, C., Ellis, E.A., Aboufrikha, M., and Guy, J. (1993) *Diabetologia* **36**, 282–291
195. Meyer-Schwickerath, R., Pfeiffer, A., Blum, W.F., Freyberger, H., Klein, M., Lösche, C., Röhlmann, R., and Schatz, H. (1994) *J. Clin. Invest.* **92**, 2620–2625
196. Mudhar, H.S., Pollock, R.A., Wang, C., Stiles, C.D., and Richardson, W. D. (1993) *Development* **118**, 539–552
197. Robbins, S.G., Mixon, R.N., Wilson, D.J., Hart, CE., Robertson, J.E., Westra, I., Planck, S.R., and Rosenbaum, J.T. (1994) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 3649–3663

Received on March 5, 1996, accepted on April 29, 1996