



Title	非感染性ぶどう膜炎に対する新規治療標的の検討
Author(s)	鈴木, 佳代
Description	配架番号 : 2802
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15576号
Issue Date	2023-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15576
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90411
Type	doctoral thesis
File Information	SUZUKI_Kayo.pdf



学位論文

非感染性ぶどう膜炎に対する 新規治療標的の検討

(Examination of novel therapeutic targets
for non-infectious uveitis)

2023 年 6 月

北海道大学

鈴木 佳代

学位論文

非感染性ぶどう膜炎に対する 新規治療標的の検討

(Examination of novel therapeutic targets
for non-infectious uveitis)

2023 年 6 月

北海道大学

鈴木 佳代

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1 頁
要旨.....	2 頁
略語表.....	5 頁
緒言.....	6 頁
第 1 章	
緒言.....	11 頁
実験方法.....	15 頁
実験結果.....	20 頁
考察.....	26 頁
第 2 章	
緒言.....	30 頁
実験方法.....	32 頁
実験結果.....	36 頁
考察.....	41 頁
結論および総括.....	44 頁
謝辞および利益相反.....	46 頁
引用文献.....	47 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kayo Suzuki, Daiju Iwata, Kenichi Namba, Keitaro Hase, Miki Hiraoka, Miyuki Murata, Nobuyoshi Kitaichi, Richard Foxton, Susumu Ishida. Angiopoietin 2 and vascular endothelial growth factor are proinflammatory factors in uveitis. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2022/12/1 投稿済み.
2. Kayo Suzuki, Daiju Iwata, Kenichi Namba, Keitaro Hase, Miki Hiraoka, Miyuki Murata, Nobuyoshi Kitaichi, Shigeaki Ohno, Susumu Ishida. Plasminogen activator inhibitor-1 is a proinflammatory factor in uveitis. Heliyon. 2022/12/20 投稿済み.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 鈴木佳代, 岩田大樹, 南場研一, 荻野陽, 長谷敬太郎, 水内一臣, 平岡美紀, 北市伸義, 石田晋. Angiopoietin-Tie2 経路を標的とした眼炎症性疾患における新規治療法の開発. 第 41 回日本眼薬理学会. 2021/11/6-7.
2. 鈴木佳代, 岩田大樹, 南場研一, 長谷敬太郎, 平岡美紀, 村田美幸, 北市伸義, Richard Foxton, 石田晋. Angiopoietin 2 と vascular endothelial growth factor の眼炎症への関与. 第 126 回日本眼科学会総会. 2022/4/14-17.
3. 鈴木佳代, 岩田大樹, 南場研一, 長谷敬太郎, 平岡美紀, 村田美幸, 北市伸義, 大野重昭, 石田晋. Plasminogen activator inhibitor-1 阻害薬による実験的自己免疫性ぶどう膜炎の軽症化. 第 55 回日本眼炎症学会. 2022/7/8-10.

要旨

非感染性ぶどう膜炎の治療には、主としてステロイド薬、免疫抑制薬などが用いられてきた。近年、本邦では難治例には tumor necrosis factor (TNF) 阻害薬が使用される。しかしながら、これらの治療薬でも重篤な視力障害に陥る症例がみられ、新薬の開発が今も強く望まれている。そこで新たな治療標的として、第 1 章では angiopoietin(Ang)2 と vascular endothelial growth factor(VEGF)A に、第 2 章では plasminogen activator inhibitor(PAI)-1 に着目した。

第 1 章: 非感染性ぶどう膜炎における Ang2 と VEGFA の炎症への関与の検討

【背景と目的】Ang2 は、様々な炎症刺激により血管内皮細胞から分泌され、発現が豊富になると、Ang1 の tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domain(Tie)2 受容体への結合が競合的に阻害され、結果として内皮細胞上の白血球接着分子が増加することが報告されている。一方、VEGFA には、Ang2 の細胞外への分泌を促進させる働きがあることが知られている。本研究では Ang2 と VEGFA の眼炎症病態への関与を検討することを目的とした。

【対象と方法】特発性ぶどう膜炎患者 16 名(ぶどう膜炎群)、非炎症性眼疾患患者 16 名(対照群)を対象として、硝子体液中の Ang1, Ang2, VEGFA のタンパク濃度を測定した。また、実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎(EAU)マウスを用いた検討では、B10.BR マウスにヒト網膜視細胞間レチノイド結合蛋白由来ペプチド(K2 ペプチド)と complete Freund's adjuvant の懸濁液を皮下に免疫し、EAU を惹起した。免疫後、11, 16, 21 日目のマウスから網脈絡膜を摘出し、Ang1, Ang2 と VEGFA の mRNA 発現を測定し、K2 ペプチドを除いて免疫した対照群と比較した。また、EAU マウスに対して、それぞれ抗 Ang2 抗体、抗 VEGFA 抗体、抗 Ang2 抗体と抗 VEGFA 抗体の同時投与、抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体、そして非特異的抗体(対照)を免疫の前日から 5 日毎に計 5 回投与した群を作製し、臨床的重症度を経時的(3-4 日毎)に観察し、21 日目に眼球を摘出して病理組織学的重症度を評価した。

【結果】硝子体液中の Ang1, Ang2, VEGFA のタンパク濃度はぶどう膜炎群において対照群と比べ、有意に高値を示した($p<0.05$)。また、Ang1 と Ang2 のタンパク濃度を比べると、ぶどう膜炎群で Ang2 が有意に高値であった($p<0.05$)。EAU マウスを用いた検討では、免疫後 16 日目の網脈絡膜組織で、

EAU 群では Ang2 と VEGFA の mRNA 発現が対照群と比べて亢進していた ($p<0.05$). EAU マウスの臨床的重症度と病理組織学的重症度は、抗 Ang2 投与群では対照群と比較して有意に低下し ($p<0.05$), 二重阻害群である抗 Ang2 抗体と抗 VEGF 抗体の同時投与群と抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体投与群ではさらに重症度は低下した ($p<0.01$).

【考察】本研究では、非感染性ぶどう膜炎患者の硝子体液において Ang2 および VEGFA のタンパク濃度が上昇すること, EAU の網脈絡膜組織において Ang2 および VEGFA の mRNA 発現が亢進すること, Ang2 と VEGFA の阻害で EAU の臨床的重症度と病理組織学的重症度が低下することを明らかにした. Ang2 と VEGFA を阻害したことで Ang 1 優位となり, 内皮細胞上の白血球接着分子が減少し, 炎症が軽減したと考えられる. 加えて, VEGFA には炎症性サイトカインの産生を増幅する働きや白血球遊走を促進する働きがあり, これらも炎症が軽減した 1 つの要因と考えられる.

【結論】Ang2 と VEGFA が非感染性ぶどう膜炎の炎症の進展に関与しており, Ang2 と VEGFA の二重阻害が非感染性ぶどう膜炎の治療に有効である可能性が示された.

第 2 章：非感染性ぶどう膜炎における PAI-1 の炎症への関与の検討

【背景と目的】PAI-1 は線溶系の生理的阻害因子の一つであるが、近年、PAI-1 は活性化マクロファージの遊走に不可欠なタンパクとして機能していることが明らかとなり、炎症と線維化を呈する疾患の新たな治療標的分子として注目されている。そこで、本研究では PAI-1 の眼炎症病態への関与について検討することを目的とした。

【対象と方法】特発性ぶどう膜炎患者 16 名(ぶどう膜炎群)、非炎症性眼疾患患者 16 名(対照群)を対象とし、硝子体手術時に採取された硝子体液中の PAI-1 のタンパク濃度を測定した。EAU マウスを用いた検討では、免疫後、11, 16, 21 日目のマウスの網脈絡膜組織から、PAI-1 の mRNA 発現を測定し、対照群と比較した。EAU マウスに対する PAI-1 阻害の効果を検討するため、PAI-1 阻害剤(IMD4482)もしくは溶媒のみ(対照群)を免疫の 3 日後から 20 日目まで連日投与した群を作製し、臨床的重症度を経時的(3-4 日毎)に観察した。

【結果】硝子体液中の PAI-1 はぶどう膜炎群において対照群と比べ、有意に高値を示した($n=16$, $p<0.05$). EAU マウスを用いた検討では、免疫後 16 日目の網脈絡膜組織において、EAU 群で PAI-1 の mRNA 発現が対照群と比べ

て有意に亢進していた($p<0.05$). EAU マウスの臨床的重症度は, IMD4482 投与群では対照群と比較して, 免疫後 14, 17, 21 日目で有意に低下した($p<0.05$).

【考察】本研究では, 非感染性ぶどう膜炎患者において PAI-1 の硝子体液中のタンパク濃度が上昇していること, EAU の網脈絡膜組織において PAI-1 の mRNA 発現が亢進していること, そして PAI-1 阻害剤である IMD4482 により EAU の臨床的重症度が低下することが示された. PAI-1 は low-density lipoprotein receptor-related protein を介したマクロファージの遊走に関与することや, toll like receptor-4 を介してマクロファージを活性化することが報告されており, これらの機序が炎症を軽減させた要因として考えられる.

【結論】PAI-1 が非感染性ぶどう膜炎の炎症の進展に関与しており, PAI-1 が非感染性ぶどう膜炎に対する新たな治療標的となる可能性が示された.

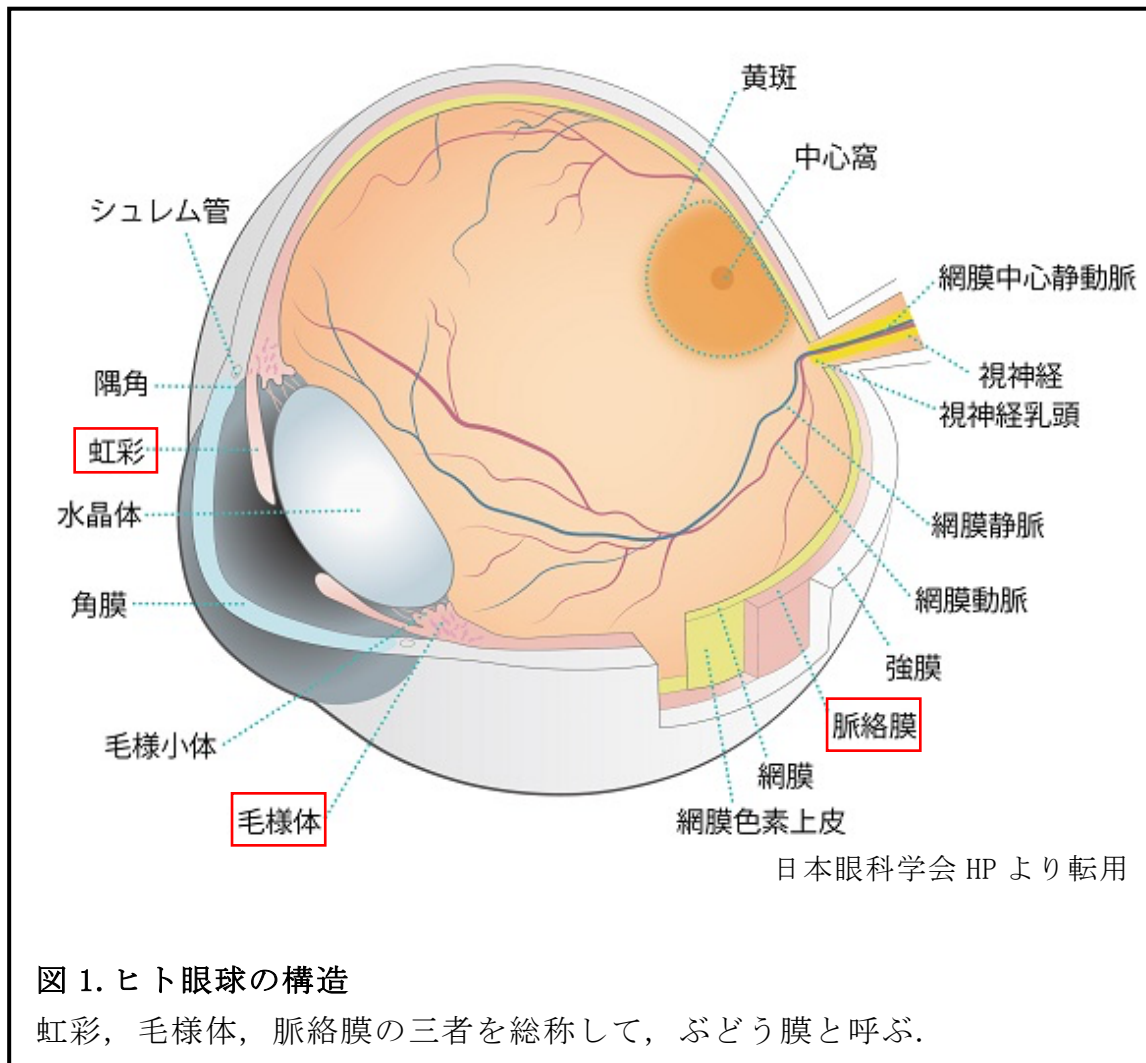
略語表

本文中で使用した略語は以下のとおりである.

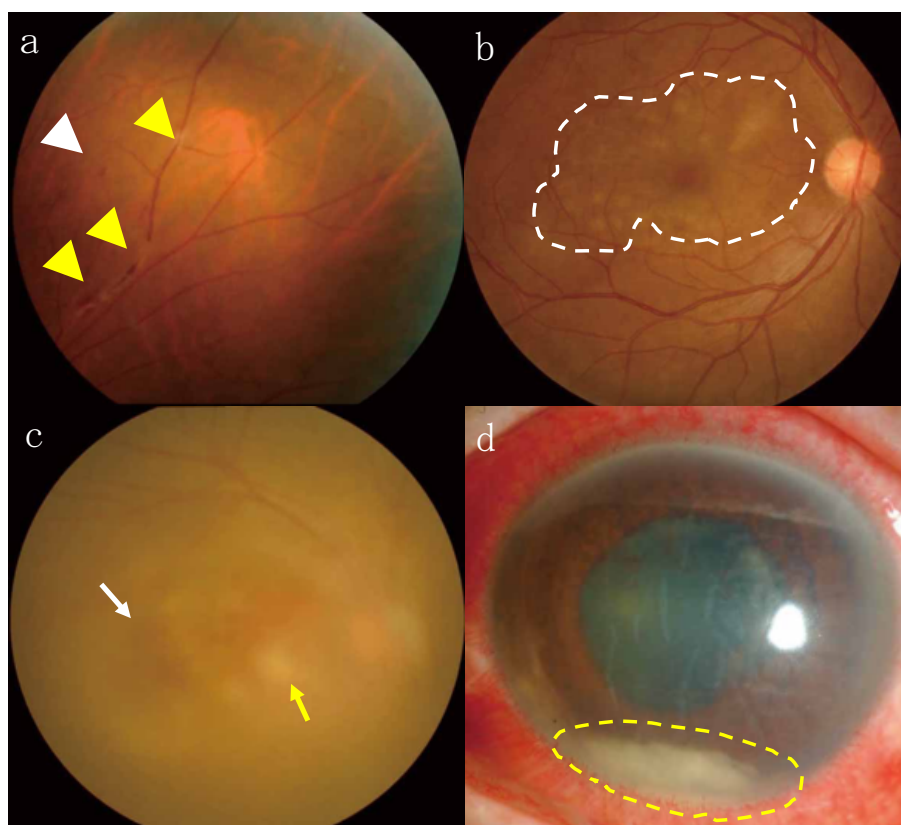
Ang	angiopoietin
ACTB	actin beta
CFA	complete Freund's adjuvant
CMC-Na	carboxymethylcellulose sodium salt
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EAU	experimental autoimmune uveoretinitis
Fc γ R	Fc gamma receptor
FcRn	neonatal Fc receptor
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
ICMA	intercellular adhesion molecule
IFN	interferon
IL	interleukin
IRBP	interphotoreceptor retinoid-binding protein
LDLR	low-density lipoprotein receptor
LRP	LDLR-related protein
MHC	major histocompatibility complex
NF- κ B	nuclear factor-kappa B kinase
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PAI	plasminogen activator inhibitor
PBS	phosphate-buffered saline
PTX	pertussis toxin
Tie	tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domain
TNF	tumor necrosis factor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGFA	vascular endothelial growth factor A

緒言

眼球は前後径が約 24mm で外壁と内容物から構成される(図 1). 外壁は三層構造をなし, 外層は角膜と強膜からなり, 内層は網膜である. この外層と内層の間にある中間層は虹彩, 毛様体, 脈絡膜からなり, これら三者を総称してぶどう膜と呼ぶ. 虹彩はその内部にある瞳孔散大筋や括約筋の働きにより, 周囲の明るさに合わせて瞳孔の大きさを調節する働きをしている. 毛様体は筋の収縮/弛緩によって水晶体の厚みを変えることで, ピントの調整を行っている. 一方, 脈絡膜は膜状の組織であり, 内部には有窓性の血管が豊富に存在し, 網膜に酸素や栄養を送り届ける働きをしている.



ぶどう膜炎とは、この虹彩、毛様体、脈絡膜から構成されたぶどう膜に生じる炎症性疾患である。ぶどう膜炎は、先進国において 40 歳以上の中途失明原因の約 10%を占めており、特に青壮年期での発症が多いことから、社会的、経済的にも極めて重要な問題となっている(Kitamei *et al*, 2009)。ぶどう膜炎の原因疾患は約 50 種類程あり、感染性、非感染性に分けられる。また、炎症部位によっても前部、中間部、後部、汎ぶどう膜炎に分けられ、その眼所見は多岐にわたる。本邦におけるぶどう膜炎の原因疾患の統計では、非感染性ぶどう膜炎であるサルコイドーシス(図 2a)、Vogt-小柳-原田病(図 2b)、Behçet 病(図 2c)、急性前部ぶどう膜炎(図 2d)などが多くを占めている(Iwata *et al*, 2017; Sonoda *et al*, 2021)。



日本眼炎症学会ぶどう膜炎診療ガイドラインより転用

図 2.非感染性ぶどう膜炎の眼所見

a.サルコイドーシスの眼底写真:網膜静脈周囲炎(黄矢頭)と網膜出血(白矢頭)がみられる. b.Vogt-小柳-原田病の眼底写真:眼底後極部に滲出性の網膜剥離(白点線)がみられる. c.Behçet 病の眼底写真:硝子体混濁に加え、網膜出血(白矢印)と網膜滲出斑(黄色矢印)がみられる. d. 急性前部ぶどう膜炎の前眼部写真:強い結膜毛様充血とともに前房蓄膿(黄点線)がみられる.

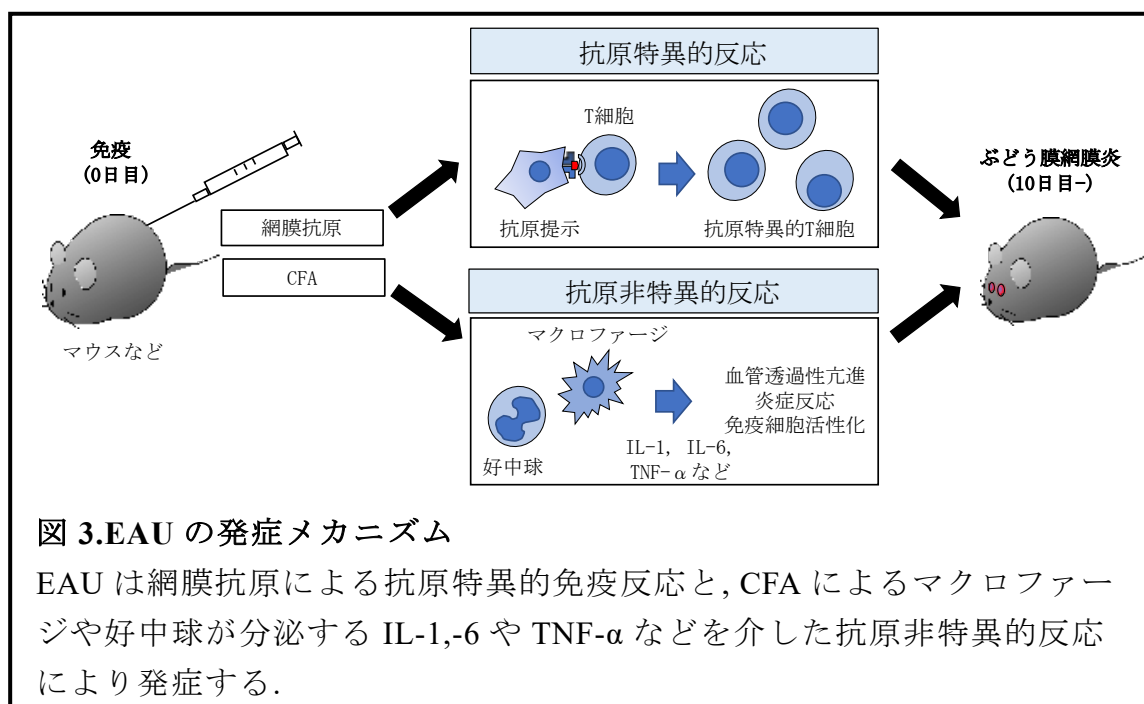
非感染性ぶどう膜炎の多くは再発を繰り返す可能性のある疾患であり、炎症に伴う網脈絡膜萎縮により不可逆的な視機能障害に陥るだけではなく、併発白内障や続発緑内障などの眼合併症により、手術加療を要する症例も多く存在する。そのため、眼炎症をコントロールするだけではなく、長期的な観点から視機能の維持を考え、治療を行っていく必要がある。

非感染性ぶどう膜炎の治療には主としてステロイド薬, non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs), 免疫抑制薬が用いられてきた。また、近年、本邦では 2007 年に Behçet 病に対してインフリキシマブが、2016 年に非感染性の中間部、後部又は汎ぶどう膜炎に対してアダリムマブが保険適応となり、これらの tumor necrosis factor(TNF)阻害薬により多くの非感染性ぶどう膜炎の患者がその恩恵を受けることができるようになった。しかしながら、治療抵抗例はいまだに存在し、これらの治療薬を用いても重篤な視力障害に陥る症例や、全身的な副作用により治療を中断せざるを得ない症例もみられる。そのため、新たな治療薬の開発が今もなお強く望まれている。また、全身への影響を懸念せずに、より効果の高い治療法を開発するためには、眼局所で炎症を制御する因子をターゲットとすることが重要と考えられる。

ヒトの難治性非感染性ぶどう膜炎の動物モデルとして、experimental autoimmune uveoretinitis(EAU)が知られている。1965 年に Wacker らが網膜抗原に強いぶどう膜網膜炎の惹起能があることを報告し(Wacker & Lipton, 1965), その後、網膜抗原である arrestin-1 や interphotoreceptor retinoid binding protein(IRBP)が精製され、これらを免疫強化剤である complete Freund's adjuvant(CFA)とともに感受性の高い動物に免疫すると高頻度にぶどう膜網膜炎を発症することが報告され、EAU と名付けられた(De Kozak *et al*, 1976)。

EAU の炎症反応は、網膜抗原による抗原特異的免疫反応と、CFA による抗原非特異的免疫反応を惹起させることに始まる(図 3)。抗原特異的免疫反応は、マクロファージ、好中球の産生するサイトカインで活性化した抗原提示細胞が網膜抗原を取り込み、輸入リンパ管を介して、免疫部位の所属リンパ節、または脾臓に達する(Cravens & Lipsky, 2002)。取り込まれた抗原は、蛋白分解酵素でペプチドに分解され、major histocompatibility complex(MHC)クラスII分子とともに、細胞表面に提示される。細胞表面に提示された網膜抗原ペプチド-MHC クラスII分子複合体は、その複合体と結合することができる T 細胞受容体を有する CD4 陽性ヘルパーT 細胞により認識される(Glimcher *et al*, 1982; Yano *et al*, 1977)。網膜抗原ペプチド-MHC クラスII分子複合体を認識したヘルパーT 細胞は活性化し、分化/増殖する(McAdam *et al*,

1998). 一方、抗原非特異的免疫反応はマクロファージ、好中球などの免疫担当細胞により担われ、これらの細胞は interleukin(IL)-1, IL-6, TNF- α , interferon(IFN)- γ などの炎症性サイトカインと呼ばれる液性因子を産生し、血管の透過性亢進、炎症反応、他の免疫担当細胞の活性化を促すと考えられている(Dick *et al*, 2004; Luna *et al*, 1997; Ohta *et al*, 2002).



EAU の病態では、網膜血管炎を伴うぶどう膜網膜炎が惹起され、特に網膜血管や視細胞層に炎症反応が強く生じ、最終的には視細胞が破壊され、網脈絡膜萎縮へと至る(Chan *et al*, 1985; Nussenblatt *et al*, 1981). 非感染性ぶどう膜炎であるサルコイドーシス, Vogt-小柳-原田病, Behçet 病などでも、網膜血管や視細胞層に炎症を生じ、無治療下では最終的に視細胞が障害され、不可逆的な視機能障害に至ることもある(Kim, 1997; Suzuki *et al*, 2022). EAU はその免疫反応や病態の類似性から、ヒトのぶどう膜炎の病態解明や新規治療法の開発に用いられてきた(Chan *et al.*, 1985; Dick *et al.*, 2004; Dong *et al*, 2014; Iwata *et al*, 2010; Namba *et al*, 2000).

第 1 章では angiopoietin(Ang)2 と vascular endothelial growth factor(VEGF)A, 第 2 章では plasminogen activator inhibitor(PAI)-1 に着目した. これらの分子のぶどう膜炎における炎症への関与を検討するため、炎症局所における変化を非感染性ぶどう膜炎患者の臨床検体とその動物モデルである EAU マウ

スを用いて検討した。また，新たな治療標的となりうるか検討するため，これらの分子を阻害することで EAU の重症度に影響を及ぼすかを検討した。

第 1 章

非感染性ぶどう膜炎における Ang2 と VEGFA の炎症への関与の検討

1. 緒言

Ang1 と Ang2 は, tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domain(Tie)2 受容体のリガンドである. Ang/Tie2 受容体シグナル経路は, 内皮細胞に特異的に働く受容体型チロシンキナーゼシステムとして同定された.

Ang1 は血小板やペリサイト, 造血幹/前駆細胞より分泌され(Sundberg *et al*, 2002; Takakura *et al*, 2000), Tie2 受容体のアゴニストとして, 内皮細胞の結合強化, ペリサイトの被覆を促すことで, 微小血管の安定性を維持すると考えられている(図 4)(Davis *et al*, 1996; Iurlaro *et al*, 2003; Lee *et al*, 2014; Saharinen *et al*, 2017).

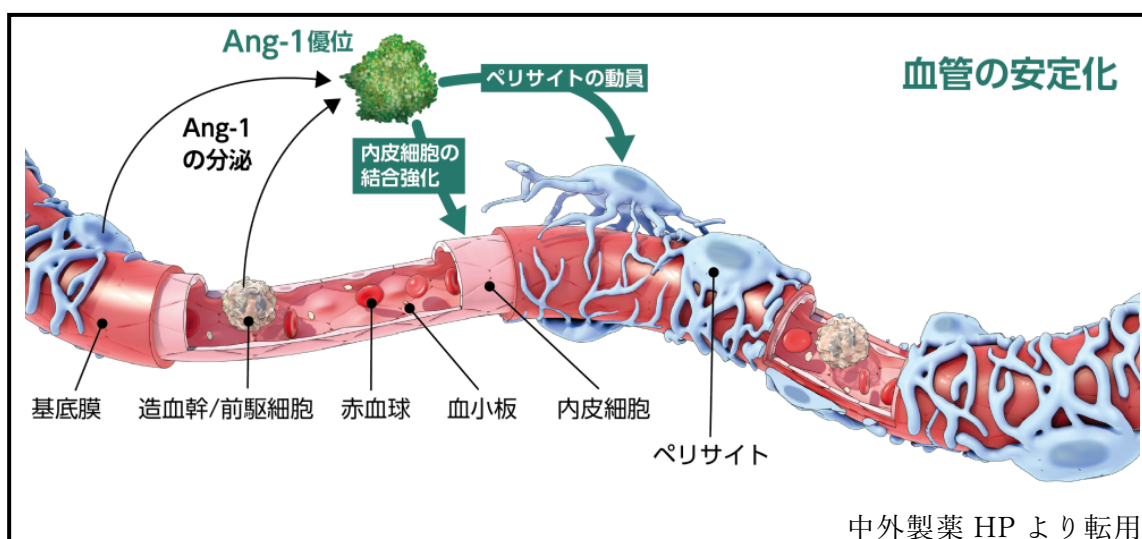
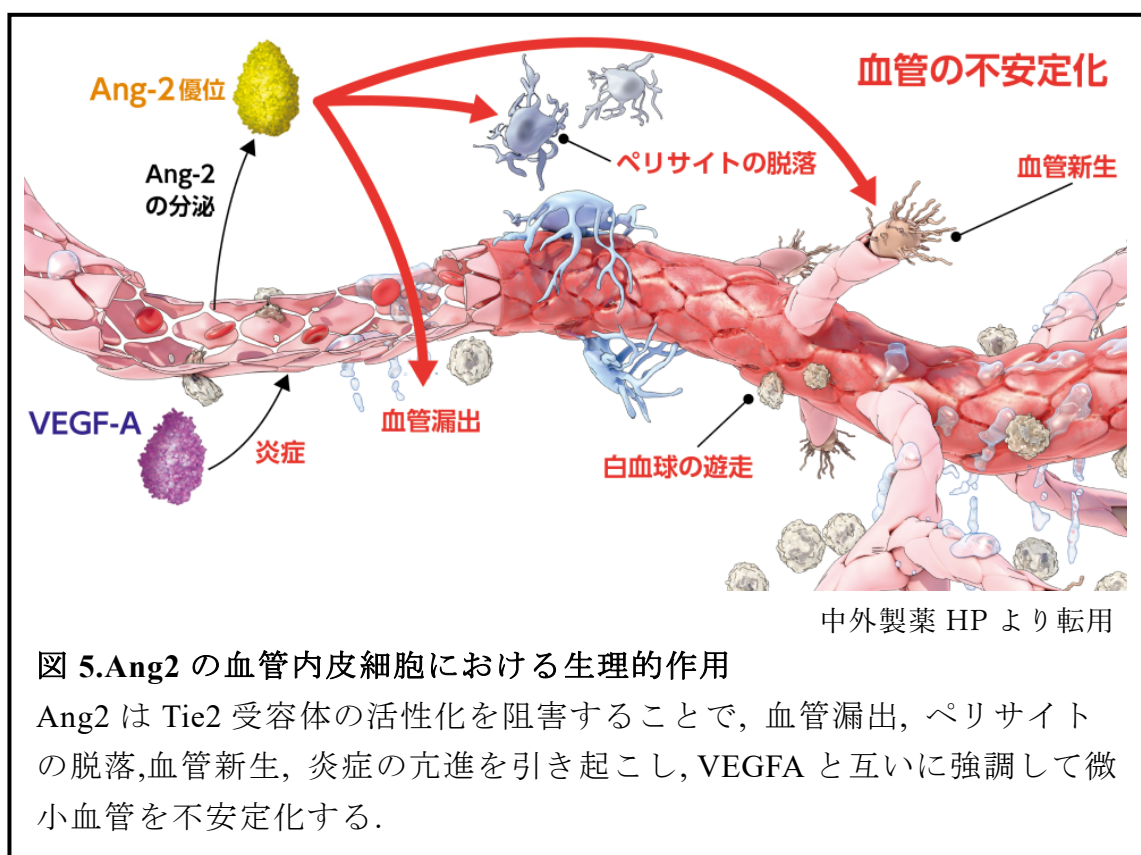


図 4. Ang1 の血管内皮細胞における生理的作用

Ang1 は血小板やペリサイト, 造血幹/前駆細胞より分泌され, Tie2 受容体のアゴニストとして, 内皮細胞の結合強化, ペリサイトの被覆を促す.

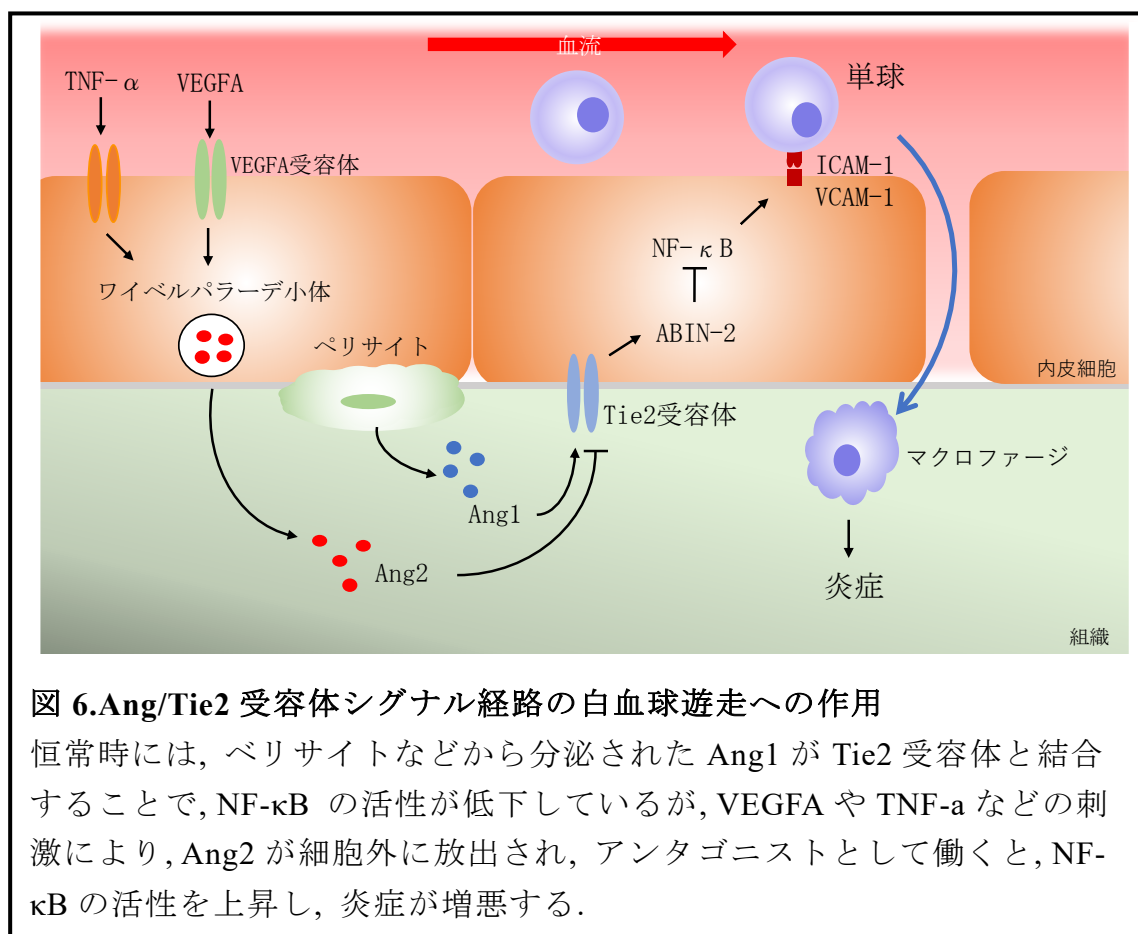
一方, Ang2 は内皮細胞より分泌され, Ang1 の競合的アンタゴニストとして Tie2 受容体に結合し, Tie2 受容体の活性化を阻害することで, 血管漏出, ペリサイトの脱落, 血管新生, 炎症の亢進などを引き起こし, 微小血管の不安定化をもたらすと考えられている(Fiedler *et al*, 2004; Gale *et al*, 2002; Hammes *et al*, 2004; Maisonpierre *et al*, 1997; Saharinen *et al*, 2017).

また、VEGFA/VEGF 受容体シグナル経路は、Ang/Tie2 受容体シグナル経路と同じく内皮細胞に特異的に働く受容体型チロシンキナーゼシステムとして知られている。Ang/Tie2 受容体シグナル経路が発生期の脈管のリモデリングや成熟化、生体での血管の安定化に関わるのに対して、VEGFA/VEGF 受容体シグナル経路は血管/リンパ管内皮細胞の分化および発生や病態時の血管新生に関わる(Hanahan, 1997)。さらに、VEGFA は Ang2 の分泌を促進し、Ang2 は VEGFA の感受性を亢進することで、互いに協調して血管不安定化の病態進展をもたらすと報告されている(図 5)(Oshima *et al*, 2004; Peters *et al*, 2007)。



近年、Ang/Tie2 受容体シグナル経路は血管の安定化に関する働きの他に、急性炎症においては白血球の血管外遊走へ関与していることが報告され、炎症性疾患において注目されている(図 6)(Imhof & Aurrand-Lions, 2006)。恒常時には、ペリサイトなどから分泌された Ang1 が Tie2 受容体と結合することで、nuclear factor-kappa B kinase(NF- κ B)の活性を低下させ、intercellular adhesion molecule(ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1 を介した白血球の血管外への遊走は抑制されている。VEGFA や TNF- α などの刺激により、Ang2 が内皮細胞のワイベルパラーデ小体とよばれる顆粒から細胞

外に放出されると, Ang1 の競合的アンタゴニストとして Tie2 受容体に結合することで, NF- κ B の活性を上昇させ, ICAM-1, VCAM-1 を介した血管外への白血球遊走が活性化し, 炎症が増悪すると考えられている (Imhof & Aurrand-Lions, 2006; Scholz *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2003). 実際に, 関節リウマチや敗血症, 癌などの炎症がその病態に関与する疾患において, Ang2 の関与が報告されている (Saharinen *et al*, 2017).



加えて, VEGFA/VEGF 受容体シグナル経路には, Ang2 の細胞外への分泌を促進させる働きの他, IL-1, IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を亢進させる働きや白血球遊走を促進させる働きがあることも知られており, 炎症病態において, 血管の不安定化のみならず, その炎症の進展にも関与していると考えられている (Heil *et al*, 2000; Jeltsch *et al*, 2013; Koch & Claesson-Welsh, 2012; Murakami *et al*, 2006).

しかしながら, 非感染性ぶどう膜炎においては Ang2 と VEGFA の病態への関与については未だ明らかにされていない. そこで, 本研究では非感染性ぶどう膜炎患者の臨床検体ならびにその動物モデルである EAU マウスを用

いて,Ang2 と VEGFA の眼炎症病態への関与について検討することを目的とした.

2. 実験方法

2.1. 臨床検体

対象は 2014 年から 2019 年の間に北海道大学病院眼科を初診し、非感染性ぶどう膜炎と診断された患者とし、硝子体手術時に得られた硝子体液と初診時に採取された血清を用いた。非感染性ぶどう膜炎の診断は、眼所見、臨床経過、眼外症状の有無、ならびに血液検査結果や胸部レントゲンなどの全身検査結果により、日本眼炎症学会ぶどう膜炎診療ガイドラインに基づいて行った(大野他.2019)。その結果、原因疾患が確定できない非感染性ぶどう膜炎患者を特発性ぶどう膜炎と診断した。

硝子体液は、特発性ぶどう膜炎患者 16 例(男性 6 例、女性 10 例、平均年齢 71.9 ± 12.1 歳)ならびに対照群として非炎症性眼疾患(網膜前膜もしくは黄斑円孔)患者 16 例(男性 8 例、女性 8 例、平均年齢 64.5 ± 9.6 歳)の硝子体液を用いた。

また、血清は、ぶどう膜炎患者 32 例(男性 18 例、女性 14 例、平均年齢 52.9 ± 9.1 歳)ならびに対照群として非炎症性眼疾患(網膜前膜もしくは黄斑円孔)患者 8 例(男性 3 例、女性 5 例、平均年齢 56.4 ± 8.4)の血清を用いた。また、非感染性ぶどう膜炎患者の原因疾患は、サルコイドーシス 8 例、Vogt-小柳-原田病 8 例、Behçet 病 8 例、HLA-B27 関連急性前部ぶどう膜炎 8 例であり、原因疾患別の検討も行なった。

本研究に使用した臨床検体は全て書面により同意を得た患者より採取しており、臨床検体の扱いはヘルシンキ宣言のガイドラインに従って実施された。また、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認(承認番号 019-0173)を受け、「北海道大学病院における臨床研究の取り扱いに関する指針」に準じて行われた。

2.2. Magnetic Luminex Assay

硝子体液(500-1000 μ l)は既報に則り、硝子体手術中、眼還流液注入前に採取した(Kase *et al*, 2020)。また、血清は初診時に採取した。それぞれ-80°Cで保存し、保存された硝子体液ならびに血清を解凍し、800 $\times$ g で 10 分間遠心分離した後、上清を Magnetic Luminex Assay に使用した。

硝子体液および血清中の Ang1, Ang2, VEGFA, TNF- α , IFN- γ および IL-17 タンパク濃度を、磁性ビーズによる Magnetic Luminex Assay(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を用いて測定した。

2.3. 実験動物

メスの 6-8 週齢の B10.BR(H-2^k)マウス(Japan SLC, Hamamatsu, Japan)を使用した。すべてのマウスに、12 時間昼夜サイクル、温度制御された環境下で、餌と水を自由摂取させた。本実験におけるマウスの扱いは、Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research ならびに「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規約」で定められたガイドラインを準拠し、北海道大学動物実験倫理審査委員会(第 16-0082 号)の承認を得て実施された。

2.4. 試薬

B10.BR マウスの網膜自己抗原である K2 ペプチド(ADKDVVLTSSRTGGV; 分子量 1603.78)は、IRBP のアミノ酸配列 201-216 であり、Sigma-Genosys Japan 社(Tokyo, Japan)に合成/精製を依頼した。Bordetella pertussis toxin(PTX)は Sigma-Aldrich 社(St.Louis, MO, USA)により精製された。CFA と結核死菌(Mycobacterium tuberculosis strain H37Ra)は Difco 社(Detroit, MI, USA)より入手した。

2.5. EAU の作製

EAU の作製は既報に則り、2.5 mg/ml の結核死菌を含む CFA で乳化した 100nmol の K2 ペプチドを B10.BR マウスの後頸部と背部に 200μl 皮下注射して免疫し、EAU を惹起した(Namba *et al*, 1998)。同時に 100 μl の phosphate-buffered saline(PBS)で希釈した 0.1μg の PTX を腹腔内注射し、炎症をさらに惹起した(EAU マウス)。免疫から約 10 日後に EAU が発症し、約 21 日後に炎症はピークに達する(Kitamura *et al*, 2007)。

また EAU の網膜絡膜における mRNA の発現を評価するためのコントロールマウス(対照群)には、2.5 mg/ml の結核死菌を含む CFA と PBS の乳化剤を皮下注射した。同時に 100 μl の PBS で希釈した 0.1μg の PTX を腹腔内注射した。

2.6. 抗体

EAU マウスに対する治療として、抗 VEGFA 抗体、抗 Ang2 抗体、抗 Ang2 抗体と抗 VEGFA 抗体の併用、抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体、または対照群として非特異的 IgG 抗体を投与する群を作成し、免疫の前日から 5 日毎に 5 回、20mg/kg(体重)で腹腔内投与した。抗 VEGFA 抗体、抗 Ang2 抗体、抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体、および非特異的 IgG 抗体は、Roche 社(Basel, Switzerland)より提供された。

2.7. リアルタイム定量 PCR 法

EAU マウスと、網膜抗原 (K 2 ペプチド) をのぞいて免疫したコントロールマウス(対照群)を安楽死させ、免疫後 11, 16, 21 日目に網脈絡膜組織を抽出した。網脈絡膜組織における Ang1, Ang2, VEGFA の mRNA 発現量をリアルタイム定量 PCR 法を用いて検討した。また、内在性コントロールとして、hypoxanthine phosphoribosyltransferase(HPRT)1 mRNA を使用した。NucleoSpin® RNA plus(Macherey-Nagel, Germany)を用いて細胞から mRNA を抽出し、GoScript reverse transcriptase(Promega, USA)を用いて cDNA に逆転写し、プロトコールにしたがって解析した。mRNA 発現の解析は、GoTaq qPCR Master Mix(Promega, USA)を用いて、StepOnePlus Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific, Japan)で実施した。なお、用いたプライマー配列は表 1 の通りである。

表 1.リアルタイム定量 PCR 法で用いたプライマー配列一覧

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	
Mouse Ang1	Forward	ACCATTTCGAGACTGTGCAGAT
	Reverse	CTGTCCAACCTCCCCCATTC
Mouse Ang2	Forward	CATCAGCCAACCAGGAAGTG
	Reverse	AAGGACCACATGCGTCAAAC
Mouse VEGFA	Forward	CCACGACAGAAGGAGAGCAGA
	Reverse	GCAGTAGCTTCGCTGGTAGAC
Mouse HPRT1	Forward	TGCCGAGGATTTGGAAAAAGTG
	Reverse	TGGCCTCCCATCTCCTTCAT

2.8. EAU の重症度評価

EAU の臨床的重症度は、EAU 免疫後 7 日目から 3, 4 日毎に 21 日目まで、麻酔下で散瞳薬ミドリン P®(Santen Pharmaceutical, Osaka, Japan)を点眼し、検眼鏡を用いて経瞳孔的にマウスの眼底検査を行い、評価した。臨床的重症度は、血管炎、滲出斑、網膜出血および網膜剥離の程度に基づいて 2 名の眼科医が評価した(図 7)(Namba *et al.*, 2000; Thureau *et al.*, 1997)。

また EAU 免疫後 21 日目にマウスを安楽死させ、眼球を摘出し、SUPER FIX®(Katayama chemical industries, Osaka, Japan)で固定し、パラフィン切片を作製した。固定した組織はヘマトキシリン・エオジン染色し、観察した。病理組織学的重症度は、網膜皺襞や網膜剥離(図 8A)、血管周囲炎(図 8B)、網脈

絡膜肉芽腫(図 8C)の程度により, 0-4 のスコアで評価した(表 2)(Caspi *et al*, 1988).

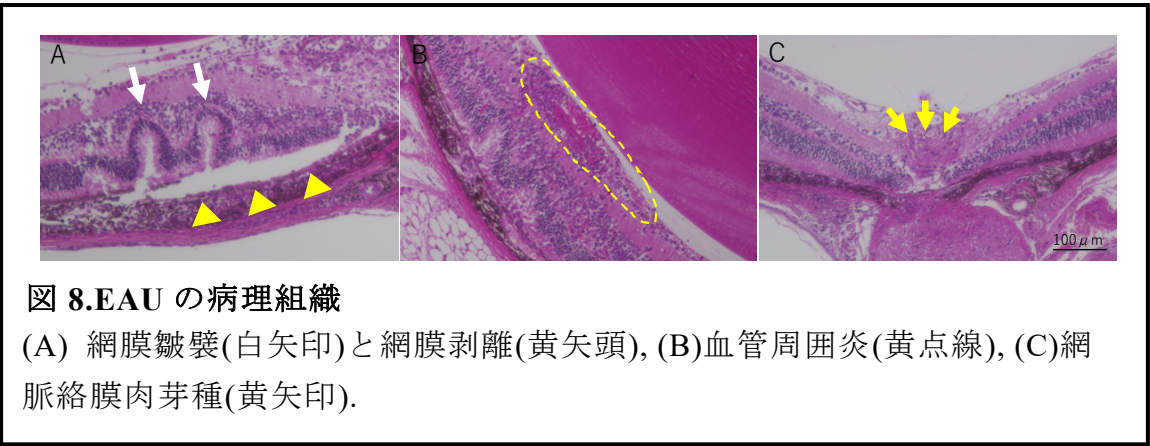
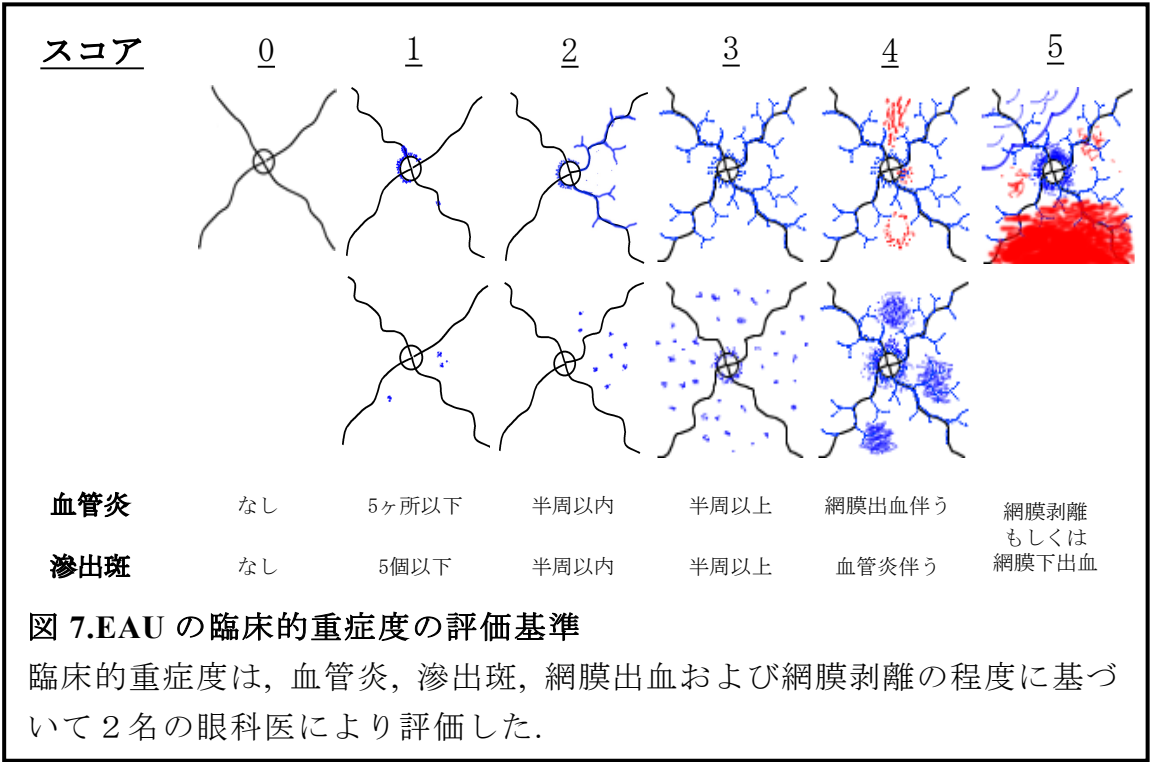


表 2.EAU の病理組織学的重症度の評価基準

スコア	基準
0	変化なし
0.5	軽微な炎症細胞浸潤
1	局所的な網膜皺襞や網膜剥離, 網脈絡膜の小型肉芽腫, 血管周囲炎
2	網膜皺襞や網膜剥離, 局所的な視細胞障害, 網脈絡膜の小-中型肉芽腫, 血管炎
3	広範囲の網膜皺襞や網膜剥離, 視細胞障害, 網脈絡膜の中型肉芽腫, 網膜下新生血管
4	漿液性滲出液や網膜下出血を伴うびまん性網膜剥離, 広範囲の視細胞障害, 大型肉芽腫

2.9. 統計解析

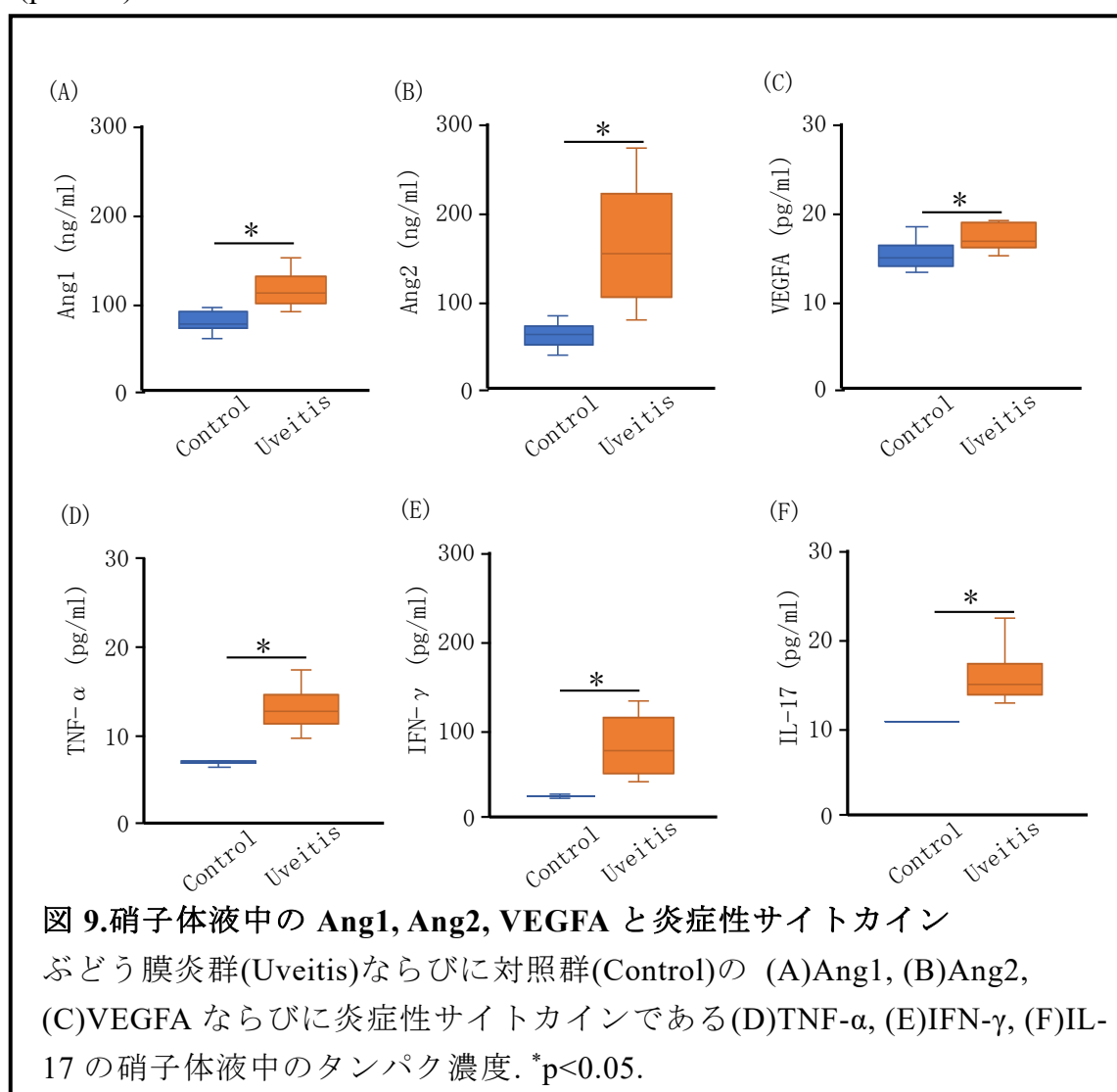
本研究では, 2 群間の有意差検定には Mann-Whitney U 検定を, 3 群間の有意差検定には Kruskal-Wallis 検定および Dunn 解析を用いた. また, EAU マウスの網脈絡膜組織における標的 mRNA 発現は, HPRT1 の mRNA 発現を正規化対照として, $\Delta\Delta C_t$ 法により算出し, Mann-Whitney U 検定により統計的に解析した. すべてのデータは, StatPlus software version v7 (AnalystSoft Inc.), もしくは IBM SPSS Statistics (IBM Corp.)を使用して解析した. p 値は 0.05 未満のものを有意とした.

3. 実験結果

3.1. 硝子体液中の Ang1, Ang2, VEGFA のタンパク濃度

非感染性ぶどう膜炎の病態における Ang2 と VEGFA の関与を明らかにするために、非感染性ぶどう膜炎患者ならびに対照群として非炎症性眼疾患患者の硝子体液中の Ang1, Ang2, VEGFA, 炎症性サイトカインである TNF- α , IFN- γ , IL-17 のタンパク濃度を測定した。

ぶどう膜炎群の硝子体液中の Ang1, Ang2, VEGFA, TNF- α , IFN- γ , IL-17 タンパク濃度(117.2 $\pm$ 26.9ng/ml, 194.4 $\pm$ 122.6ng/ml, 38.0 $\pm$ 73.5pg/ml, 13.0 $\pm$ 2.1pg/ml, 80.77 $\pm$ 30.4pg/ml, 15.7 $\pm$ 2.5pg/ml)は、対照群(78.4 $\pm$ 9.7ng/ml, 60.6 $\pm$ 11.79ng/ml, 17.0 $\pm$ 6.0pg/ml, 6.9 $\pm$ 0.3pg/ml, 23.4 $\pm$ 1.1pg/ml, 10.4 $\pm$ 0.2pg/ml)と比べて、有意に高かった(図 9; $p<0.05$). また、ぶどう膜炎群の Ang2 は Ang1 よりも有意に高かった($p<0.05$)のに対して、対照群では Ang2 が Ang1 よりも有意に低かった($p<0.01$).



3.2. 血清中の Ang1, Ang2, VEGFA のタンパク濃度

硝子体液と同様に、血清中の Ang1, Ang2, VEGFA, ならびに炎症性サイトカインである TNF- α , IFN- γ , IL-17 のタンパク濃度を測定した。

ぶどう膜炎群の血清中の Ang1, IFN- γ , IL-17(6.9 ± 5.8 ng/ml, 89.9 ± 21.3 pg/ml, 12.0 ± 1.8 pg/ml)は、対照群(2.5 ± 1.3 ng/ml, 75.2 ± 14.8 pg/ml, 10.5 ± 0.9 pg/ml)と比べて、有意に高かった(図 10; $p < 0.05$). 一方、血清中 Ang2, VEGFA, TNF- α については、両群間で有意差はなかった($p = 0.16-0.91$). また、Ang1 と Ang2 を比較すると、ぶどう膜炎群では Ang1 が Ang2 よりも有意に高値を示したが($p < 0.05$), 対照群では差はみられなかった。

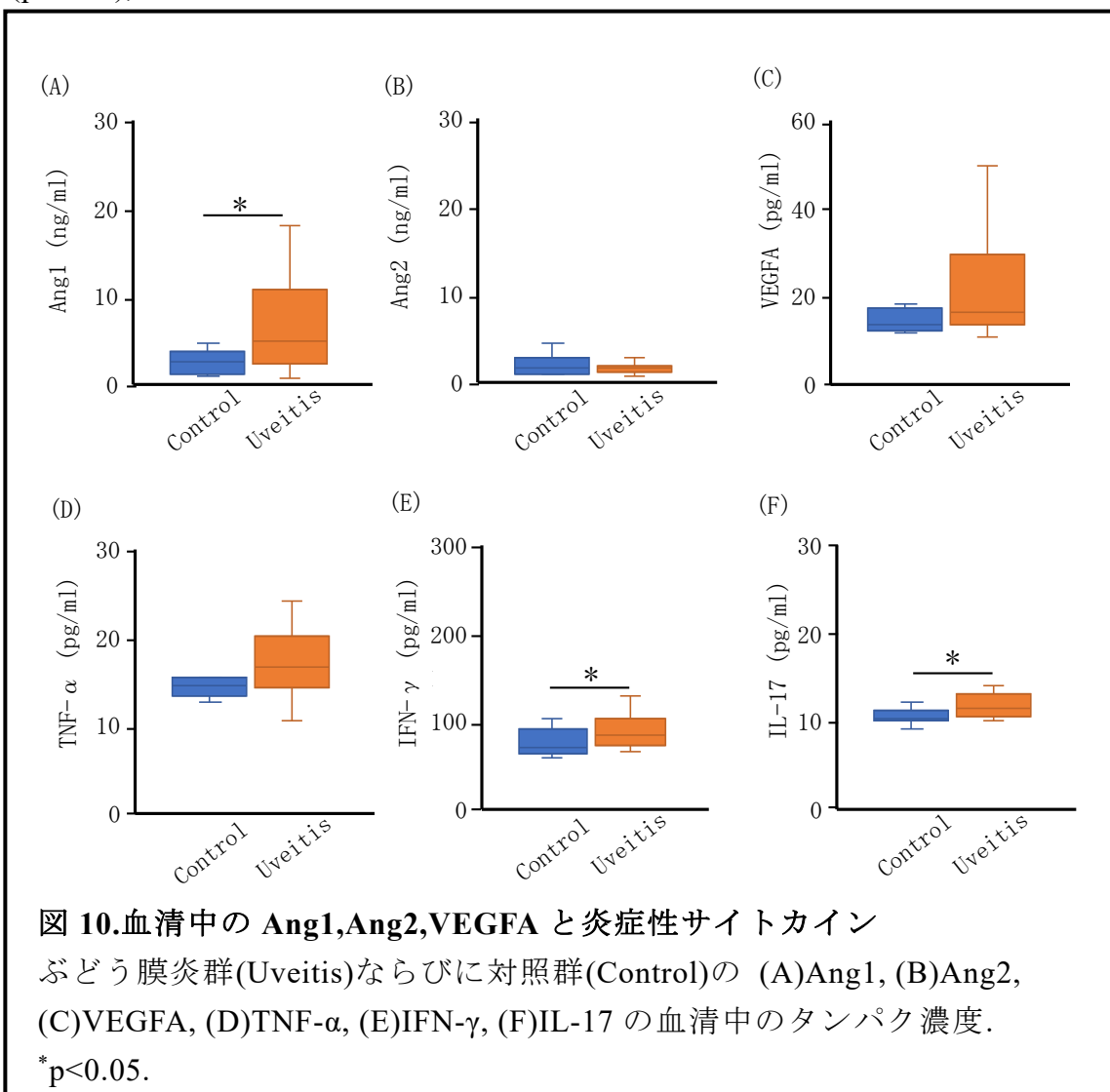
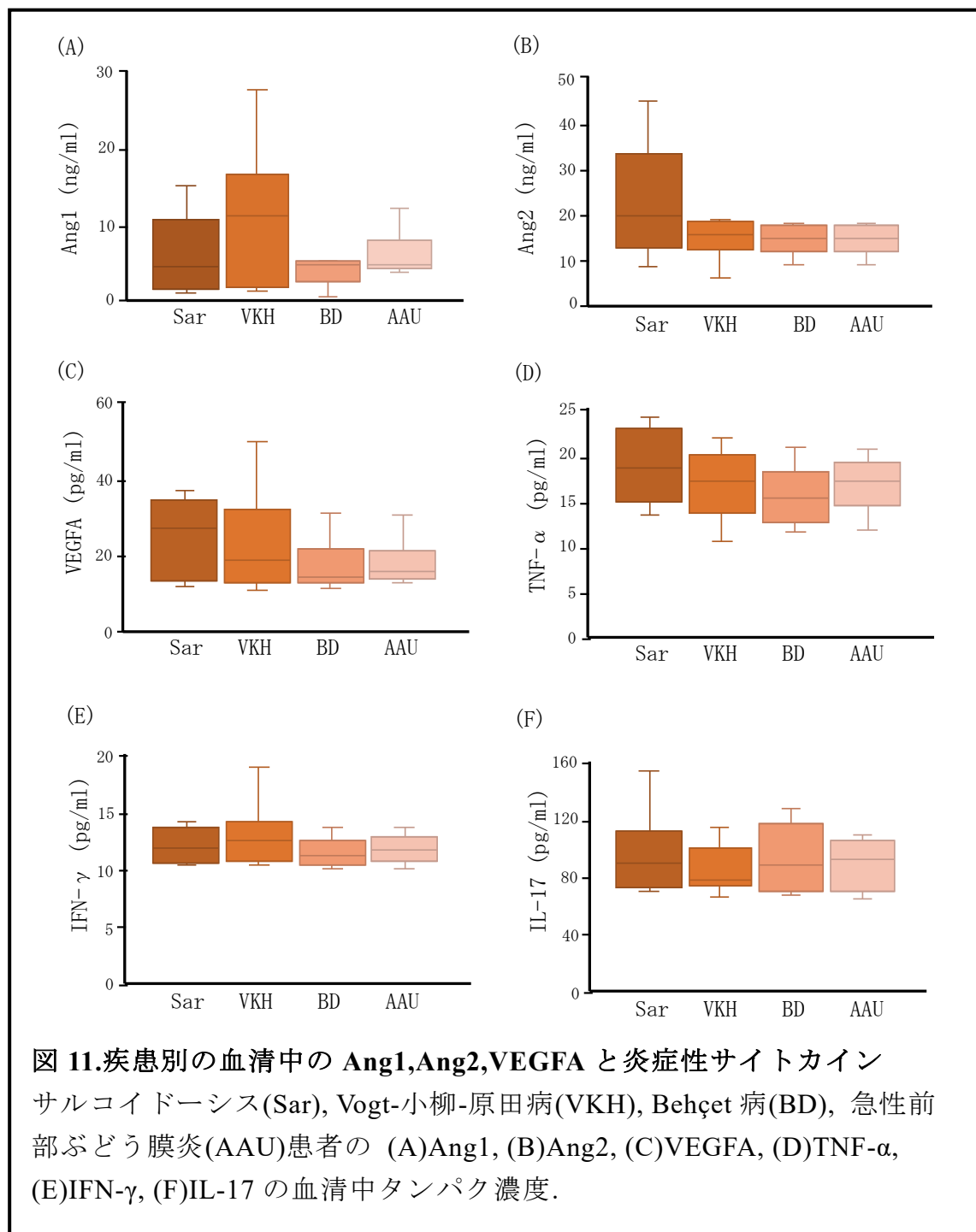


図 10.血清中の Ang1,Ang2,VEGFA と炎症性サイトカイン

ぶどう膜炎群(Uveitis)ならびに対照群(Control)の (A)Ang1, (B)Ang2, (C)VEGFA, (D)TNF- α , (E)IFN- γ , (F)IL-17 の血清中のタンパク濃度.

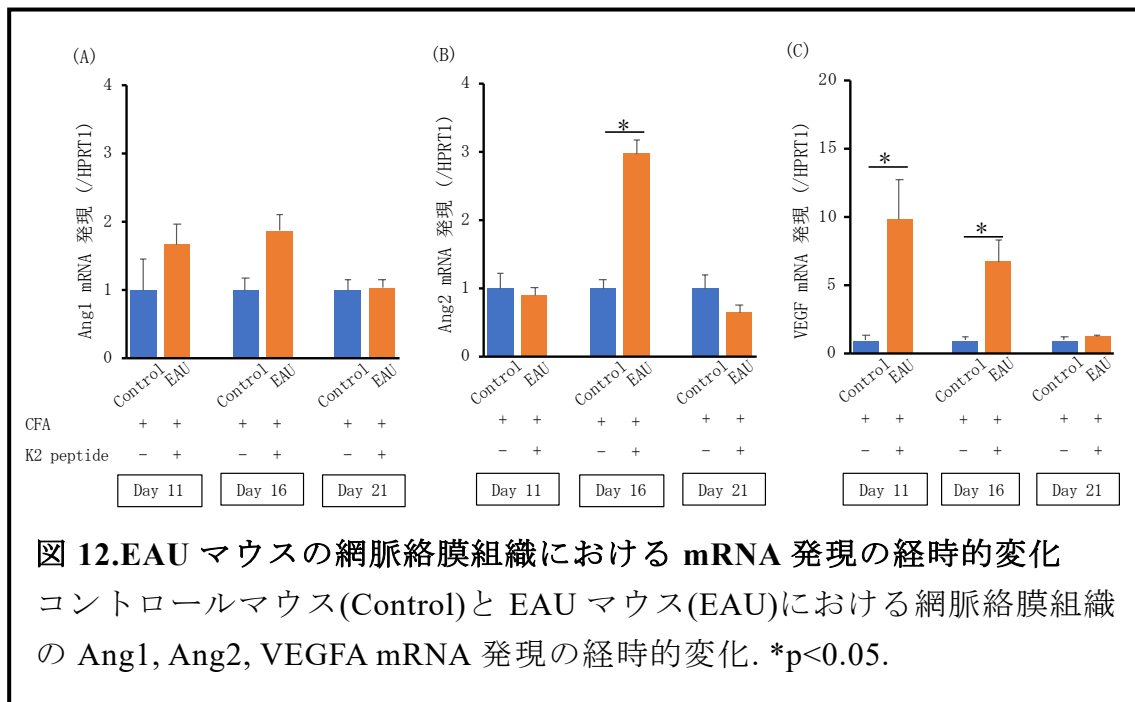
* $p < 0.05$.

さらに、血清中の Ang1, Ang2, VEGFA, TNF- α , IFN- γ , IL-17 のタンパク濃度を非感染性ぶどう膜炎の原因疾患別に検討してみたものの、群間に有意差はみられなかった(図 11; $p=0.07-0.71$).



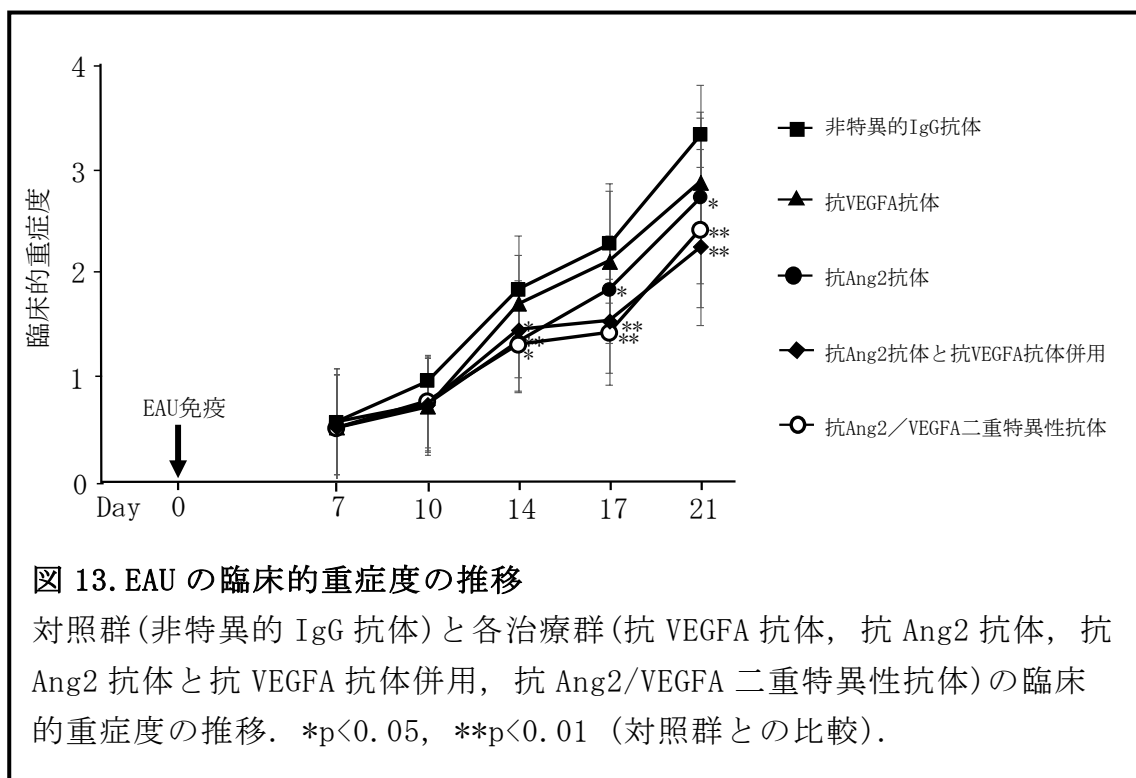
3.3. EAU の網脈絡膜組織における Ang1, Ang2, VEGFA mRNA 発現

EAU マウスおよび網膜抗原をのぞいて免疫したコントロールマウス(対照群)由来の網脈絡膜組織の Ang1, Ang2 および VEGFA の mRNA 発現の EAU 経過中の経時的変化を検討した(n=6). Ang1 の mRNA 発現には, EAU 経過中に EAU 群と対照群の間で有意差は認められなかった(図 12A; $p=0.06-0.85$). 一方, Ang2 の mRNA 発現は, 免疫後 16 日目において EAU 群が対照群よりも有意に亢進した(図 12B, $p<0.05$). VEGFA の mRNA 発現は, 免疫後 11 日目および 16 日目に EAU 群で対照群と比べ有意に亢進した(図 12C; $p<0.05$).

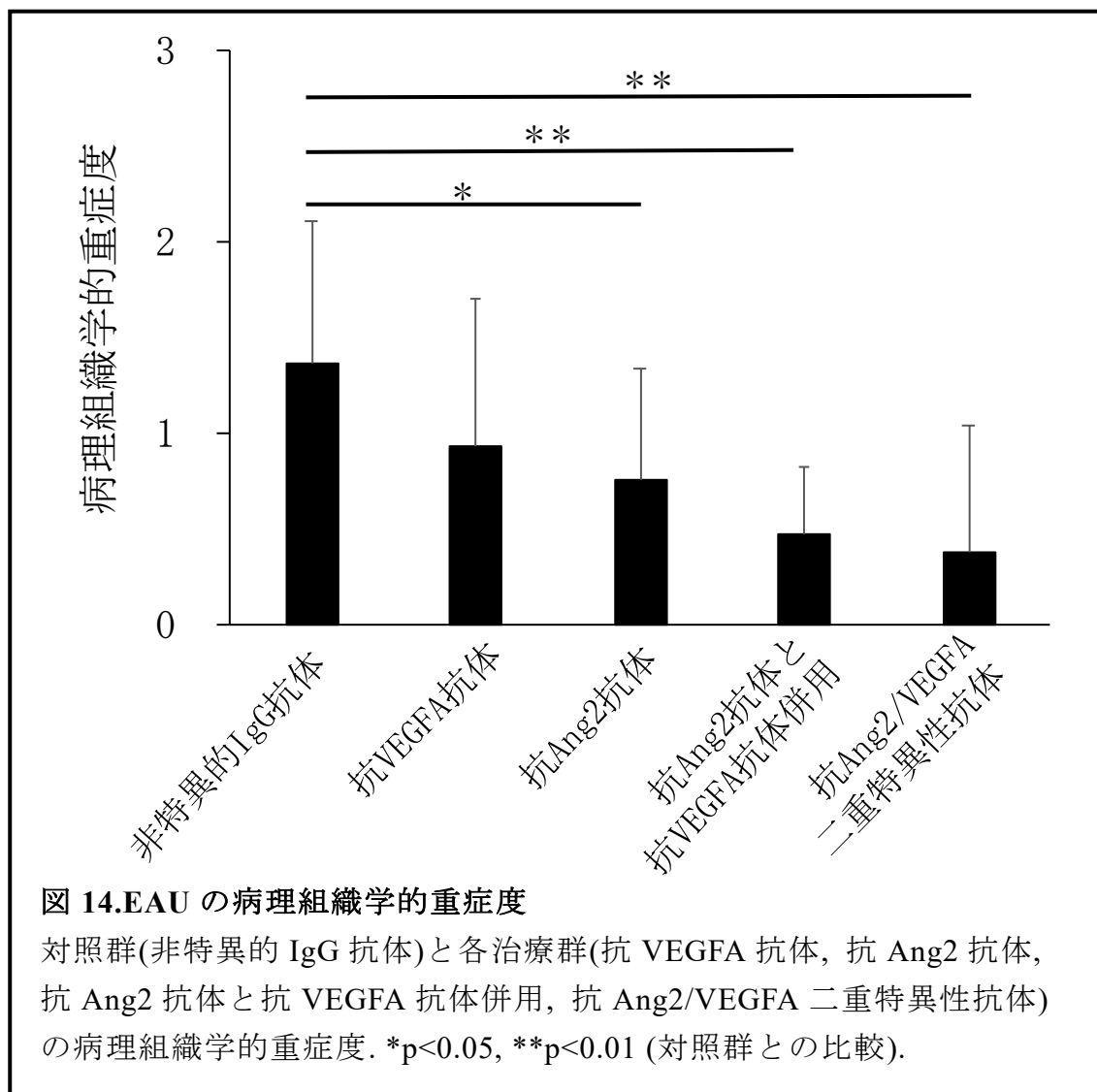


3.4. Ang2 と VEGFA の阻害による EAU の重症度の変化

EAU に対する Ang2 と VEGFA の阻害による炎症抑制効果を検討するため、それぞれの抗体の投与群での臨床的重症度の検討を行った。EAU の経過中の各治療群の臨床的重症度を図 13 に示す(n=18-20)。抗 VEGFA 抗体投与群では、対照群である非特異的 IgG 抗体投与群の臨床的重症度より、有意な変化ではなかったものの、低い傾向を示した。抗 Ang2 抗体投与群では、14 日目($p<0.01$), 17 日目($p<0.05$), 21 日目($p<0.05$)において対照群よりも有意に低値であった。さらに、二重阻害群(抗 Ang2 抗体と抗 VEGFA 抗体の併用投与群および抗 Ang2/VEGFA bispecific 抗体投与群)は、EAU 経過中に類似した臨床経過を示し、これらの臨床的重症度は 14 日目($p<0.05$), 17 日目($p<0.01$), 21 日目($p<0.01$)に対照群より有意に低く、それぞれの単独阻害群よりも低い傾向にあった。



次に、それぞれの治療群の病理組織学的重症度の評価を行った。結果を図14に示す(n=18-20)。抗 VEGFA 抗体投与群(0.9 ± 0.8)では、対照群(1.4 ± 0.7)と比べ、低い傾向にあったが、有意な差は認められなかった ($p=0.12$)。抗 Ang2 抗体投与群(0.8 ± 0.6)は対照群に比べ、有意に低かった($p<0.05$)。また、二重阻害群(抗 Ang2 抗体と抗 VEGFA 抗体治療群; 0.5 ± 0.4 , 抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体治療群; 0.4 ± 0.6)では、対照群(1.4 ± 0.7)よりも有意に低く ($p<0.01$)、それぞれの単独阻害群よりも低い傾向にあった。



4. 考察

本研究では, Ang2 および VEGFA の眼炎症病態への関与について検討し, (1) 非感染性ぶどう膜炎患者の硝子体液において Ang2 および VEGFA のタンパク濃度が上昇していること, (2) EAU マウスの網脈絡膜組織において Ang2 および VEGFA の mRNA 発現が亢進していること, そして, (3) Ang2 と VEGFA の阻害により EAU の重症度が低下することが示された.

まず, 非感染性ぶどう膜炎患者の硝子体液では, Ang1, Ang2, VEGFA, そして炎症性サイトカインのタンパク濃度が, 非炎症性眼疾患の硝子体液よりも上昇していることが明らかとなった. また, 非炎症性眼疾患患者では硝子体液中の Ang2 のタンパク濃度が Ang1 よりも低値であるのに対し, 非感染性ぶどう膜炎患者では硝子体液中の Ang2 タンパク濃度が Ang1 よりも高値となることが示された. 既報では, 未熟児網膜症や糖尿病網膜症などの網膜疾患患者の硝子体液中で VEGFA や Ang2 のタンパク濃度が上昇していることが報告されている(Regula *et al*, 2016; Sato *et al*, 2011; Watanabe *et al*, 2005). また, 加齢黄斑変性症患者の前房水中でも VEGFA や Ang2 のタンパク濃度が上昇していることが報告されている(Cabral *et al*, 2018; Ng *et al*, 2017). これらの疾患は, 血管透過性亢進や血管新生がその病態に関与する疾患であり, そのために VEGFA と Ang2 のタンパク濃度が上昇していると考えられる. 非感染性ぶどう膜炎患者においても, 硝子体液中の VEGFA のタンパク濃度が上昇していることがすでに報告されている(Weiss *et al*, 2009). しかしながら, 非感染性ぶどう膜炎患者の硝子体中で Ang2 が高濃度であることを明らかにした報告はなく, 本報告が初めてとなる. 非感染性ぶどう膜炎の病態形成にこれらの分子が眼局所で関与している可能性が示された.

血清については, 非感染性ぶどう膜炎患者の Ang1 のタンパク濃度は, 非炎症性眼疾患の患者と比べ, 有意に高かった. 一方で, 血清中の Ang2 のタンパク濃度は非炎症性眼疾患患者との間に有意な差は認められなかった. Choe らの既報でも, Behçet 病患者において同様の結果が報告されているが(Choe *et al*, 2010), この血清中の Ang1 と Ang2 の変化の原因については明らかとなっていない. 局所炎症が起きている患者では, 局所で Ang2 が上昇する一方で, その反応を競合的に抑制するために血清中で Ang1 が生成されている可能性は考えられる. また, 関節リウマチ, 敗血症, 癌など, 炎症がその病態に関与する疾患において, 血清中の Ang2 のタンパク濃度の上昇が報告されている(Saharinen *et al*, 2017). これらの疾患においては, 血清中 Ang2 タンパク濃度は, 全身の炎症の程度と相関するとされている. これらの疾患と比べて, ぶどう膜炎は眼という小さな臓器に局所的に起こる炎症性疾

患であり、そのために血清中 Ang2 のタンパク濃度の上昇がみられなかった可能性は考えられる。

次に、非感染性ぶどう膜炎患者の眼局所でみられた Ang2 と VEGFA の変化が、その動物モデルである EAU においてもみられるかを確認するため、EAU の網脈絡膜組織における Ang2 および VEGFA の mRNA 発現を検討した。その結果、Ang2 および VEGFA の発現が有意に亢進していることが明らかとなった。VEGFA の発現は、炎症がみられ始める免疫後 11 日目に有意に亢進し、16 日目にピークを示した。また、Ang2 の発現は炎症がさらに強くなる免疫後 16 日目に亢進した。Ang2-Tie2 受容体シグナル経路では、VEGFA や TNF- α などの刺激により、血管内皮細胞から Ang2 が放出されることが報告されており (Fiedler *et al*, 2006; Zhang *et al.*, 2003), 今回の結果は、これらの既報で示されているシグナル伝達のメカニズムと一致している。

さらに、Ang2 および VEGFA が非感染性ぶどう膜炎の治療標的となるかを検討するため、EAU マウスにそれぞれの抗体による治療介入を行い、炎症抑制効果を検討した。その結果、抗 Ang2 抗体を投与することにより、EAU の炎症が有意に抑制されることが確認された。多発性硬化症の動物モデルである experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE) において、抗 Ang2 抗体により炎症が抑制されることが報告されているが、その炎症抑制のメカニズムについては明らかとされていない (Fearon *et al*, 2003; Li *et al*, 2020; Westra *et al*, 2011)。

Ang1-Tie2 受容体シグナルは NF- κ B を阻害することにより内皮細胞上の白血球接着分子の発現を低下させることで炎症を抑制し、Ang2 は Ang1-Tie2 受容体シグナルを競合的に阻害することにより炎症を増悪させると考えられている (Imhof & Aurrand-Lions, 2006; Reiss *et al*, 2007)。NF- κ B は、炎症の重要な制御因子として知られており、接着分子である ICMA-1, VCAM-1 など、炎症に関与する様々な分子をコードする遺伝子を制御する転写因子である。これらの接着分子は、炎症部位に白血球が最初に動員される際に重要な役割を担っており、そのため、NF- κ B は炎症性疾患の治療標的としても注目されている分子である (Hughes *et al*, 2003)。また Ang2 はこの Ang/Tie2 受容体シグナル経路の他に、 β 1 インテグリンを介した Tie2 受容体非依存的なシグナル経路を持ち、この経路も炎症に関係していると考えられている (Akwii *et al*, 2019)。Ang2 は focal adhesion kinase リン酸化と Rac1 活性化により細胞移動と発芽血管新生を誘導し、 β 1 インテグリンにより内皮を不安定にすると報告されている (Felcht *et al*, 2012; Hakanpaa *et al*, 2015)。Ang2 を介したこれ

らの経路も、炎症の進展に関連している可能性があり、シグナル伝達経路の解明にはさらなる検討が必要である。

一方で、抗 VEGFA 抗体の投与では、有意ではなかったがその重症度は低い傾向を示していた。VEGFA/VEGF 受容体シグナル経路については、炎症病態において IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインにより VEGFA や VEGF 受容体の発現が亢進し、病的な血管新生や血管透過性亢進に関与していると考えられている (Shibuya, 2015; Uemura *et al*, 2021). 加えて、VEGF 受容体の活性化は、単球やマクロファージからの IL-1, IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインの分泌を促進させる働きや、phosphoinositide 3-kinase/Akt/NF- κ B や β 2 インテグリンを介して白血球遊走を促進させる働きがあることも報告されている (Heil *et al.*, 2000; Jeltsch *et al.*, 2013; Koch & Claesson-Welsh, 2012; Murakami *et al.*, 2006). 乾癬のマウスモデルにおいては、抗 VEGF 抗体の投与により、血管やリンパ管の新生だけでなく、炎症細胞数の減弱もみられ、白血球遊走が低下したことが示されている (Schonthaler *et al*, 2009). 本研究では EAU の発症前に抗体治療を開始しているが、今後異なる時点での治療介入による効果も検討する必要があるものと考ええる。

また、Ang2 と VEGFA を二重阻害した抗 Ang2 抗体と抗 VEGFA 抗体の併用群と、抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体投与群においては、EAU の臨床的重症度ならびに病理組織学的重症度ともにそれぞれの単一阻害群に比べ低い値を示した。Tie2 受容体および VEGFA の二重阻害は、関節リウマチの動物モデルにおいて、それぞれの単独阻害よりも疾患の重症度を低下させ、マクロファージの浸潤を減少させたことも報告されている (Hah *et al*, 2013). Tie2 受容体の阻害は、Ang2 シグナルと Ang1 シグナルの両方の遮断を引き起こす。Tie2 受容体ではなく Ang2 のみを阻害すると、炎症を抑制する Ang1-Tie2 受容体シグナルは阻害されない。そのため、Ang2 のみを阻害する方が Tie2 受容体の阻害より理想的な炎症抑制効果が得られる可能性がある。

Ang2 と VEGFA は、病的な血管新生と血管透過性亢進において重要かつ協調的な役割を果たす血管成長因子としてよく知られている (Hanahan, 1997). この Ang2 と VEGFA の 2 つの標的を有する二重特異性抗 Ang2/VEGFA 抗体であるファリシマブは、近年、眼新生血管疾患患者の治療用に開発された (Regula *et al.*, 2016). 現在、中心下脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性症や糖尿病黄斑浮腫に対する有効性が確立され、2022 年より臨床使用が始まっている (Khanani *et al*, 2020; Sahni *et al*, 2019). ファリシマブは、その治療用抗体そのものや融合するタンパク質に対する不要な炎症反応を回避するため、その Fc 領域は、すべての Fc gamma receptor (Fc γ R) および neonatal Fc receptor

(FcRn) との結合相互作用が起こらないよう設計されている. Fc γ R との相互作用に必要なアミノ酸を変換し, 細胞傷害や細胞貪食などを来さないようにすることで, 副作用の発現を抑えている. さらに, FcRn 結合部位をなくしたことで, IgG の再取り込みが起こらないよう設計され, 全身半減期が短くなっている. ファリシマブは, この特性により眼局所のみで有効性を発揮し, 全身の副作用を起こしにくいと考えられている. 今回この実験に使用した抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体は, このような Fc 領域の修飾はされていないが, 十分な抗炎症効果を示しており, 同じ治療標的を持ち, 眼科用に最適化されたファリシマブは, 非感染性ぶどう膜炎に対する有望な治療薬となり得ると考えられる.

また, TNF- α と非感染性ぶどう膜炎の関係は以前より報告されており (Dick *et al.*, 2004), インフリキシマブやアダリムマブなどの TNF 阻害薬は非感染性ぶどう膜炎の治療薬としてすでに臨床使用されており, その有用性が報告されている (Okada *et al.*, 2012; Shinagawa *et al.*, 2022; Takeuchi *et al.*, 2014). 本研究では EAU の網脈絡膜における TNF- α の発現やその阻害による炎症抑制効果は検討しなかったが, Ang2 や VEGFA とともに TNF- α を阻害することで, さらに炎症の抑制が期待できるかもしれない.

本研究により, Ang2 と VEGFA が非感染性ぶどう膜炎の炎症の進展に関与しており, Ang2 と VEGFA の二重阻害が非感染性ぶどう膜炎の治療に有効である可能性が示された. このことから, 抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体であるファリシマブが非感染性ぶどう膜炎に対する新たな治療戦略となりうることが示唆された.

第2章

非感染性ぶどう膜炎における PAI-1 の炎症への関与の検討

1. 緒言

PAI-1 は, serine protease inhibitor ファミリータンパク質の一種で, 従来内因性線溶経路の主要な阻害因子として広く受け入れられてきた(De Taeye *et al*, 2005). PAI-1 は, 線溶系においてプラスミノゲンをプラスミンに変換する tissue-type plasminogen activator や urokinase-type plasminogen activator と結合することでそれらの酵素活性を抑制する. その結果として PAI-1 はプラスミンの生成を抑制してフィブリン塊の分解を抑制して血栓形成傾向を進行させる.

一方で, PAI-1 の発現は炎症性サイトカインによって制御され, 近年, PAI-1 は low-density lipoprotein receptor(LDLR)-related protein(LRP)1 を介したマクロファージの遊走に関与することが明らかとなり (Degryse *et al*, 2004; Ichimura *et al*, 2013; Park *et al*, 2020), 全身性エリテマトーデス, 関節炎, 多発性硬化症などのマクロファージ浸潤を伴う炎症と線維化を呈する疾患において, その炎症の進展への関与が報告されている(図 15)(de Sá *et al*, 2018; East *et al*, 2008; Yousef *et al*, 2020).

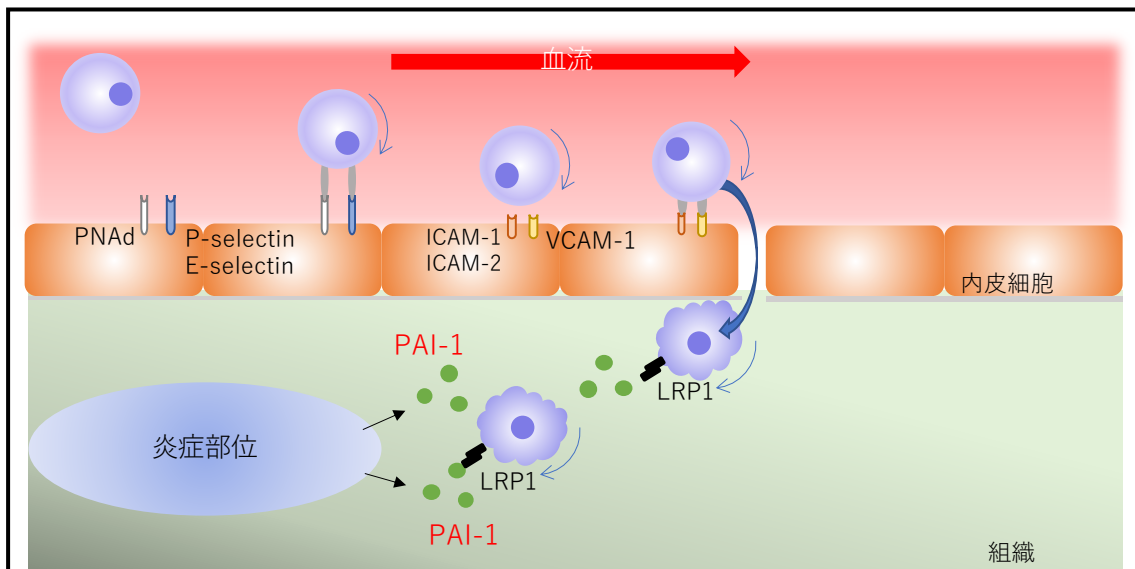


図 15. PAI-1 によるマクロファージ遊走への影響

PAI-1 とマクロファージ上の細胞膜表面に存在する LRP1 の相互作用によりマクロファージの遊走が惹起される.

また, PAI-1 または LRP1 を遺伝的に欠損したマウス由来のマクロファージの遊走が低下することが報告され(Cao *et al*, 2006), PAI-1 阻害剤が炎症性疾患における新たな治療薬として注目されている.

しかしながら, 非感染性ぶどう膜炎においては PAI-1 の眼炎症への関与についてはまだ明らかにされていない. 本研究では非感染性ぶどう膜炎患者の臨床検体ならびにその動物モデルである EAU マウスを用いて, PAI-1 の眼炎症への関与について検討することを目的とした.

2. 実験方法

2.1. 臨床検体

対象は 2014 年から 2019 年の間に北海道大学病院眼科を初診し、非感染性ぶどう膜炎と診断された患者とし、硝子体手術時に得られた硝子体液と初診時に採取された血清を用いた。非感染性ぶどう膜炎の診断は、眼所見、臨床経過、眼外症状の有無、ならびに血液検査結果や胸部レントゲンなどの全身検査結果により、日本眼炎症学会ぶどう膜炎診療ガイドラインに基づいて行った(大野他.2019)。その結果、原因疾患が確定できない非感染性ぶどう膜炎患者を特発性ぶどう膜炎と診断した。

硝子体液は、特発性ぶどう膜炎患者 16 例(男性 6 例, 女性 10 例, 平均年齢 71.9 ± 12.1 歳)ならびに対照群として非炎症性眼疾患(網膜前膜もしくは黄斑円孔)患者 16 例(男性 8 例, 女性 8 例, 平均年齢 64.5 ± 9.6 歳)の硝子体液を用いた。

また、血清は、ぶどう膜炎患者 32 例(男性 18 例, 女性 14 例, 平均年齢 52.9 ± 9.1 歳)ならびに対照群として非炎症性眼疾患(網膜前膜もしくは黄斑円孔)患者 8 例(男性 3 例, 女性 5 例, 平均年齢 56.4 ± 8.4)の血清を用いた。また、非感染性ぶどう膜炎患者の原因疾患は、サルコイドーシス 8 例, Vogt-小柳-原田病 8 例, Behçet 病 8 例, HLA-B27 関連急性前部ぶどう膜炎 8 例であり、原因疾患別の検討も行った。

本研究に使用した臨床検体は全て書面により同意を得た患者より採取しており、臨床検体の扱いはヘルシンキ宣言のガイドラインに従って実施された。また、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認(承認番号 019-0173)を受け、「北海道大学病院における臨床研究の取り扱いに関する指針」に準じて行われた。

2.2. Magnetic Luminex Assay

硝子体液(500-1000 μ l)は既報に則り、硝子体手術中、眼還流液注入前に採取した(Kase *et al.*, 2020)。また、血清は初診時に採取した。それぞれ-80°Cで保存し、保存された硝子体液ならびに血清を解凍し、800 $\times$ g で 10 分間遠心分離した後、上清を Magnetic Luminex Assay に使用した。

硝子体液および血清中の PAI-1 ならびに炎症性サイトカインである TNF- α , IFN- γ および IL-17 のタンパク質濃度を、磁性ビーズによる Magnetic Luminex Assay(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を用いて測定した。

2.3. 実験動物

メスの 6-8 週齢の B10.BR(H-2^k)マウス(Japan SLC, Hamamatsu, Japan)を使用した。すべてのマウスに、12 時間昼夜サイクル、温度制御された環境下で、餌と水を自由摂取させた。本実験におけるマウスの扱いは、Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research ならびに「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規約」で定められたガイドラインを準拠し、北海道大学動物実験倫理審査委員会(第 19-0165 号)の承認を得て実施された。

2.4. 試薬

B10.BR マウスにおける EAU の網膜自己抗原である K2 ペプチド(ADKDVVLTSRTGGV; 分子量 1603.78)は、IRBP のアミノ酸配列 201-216 であり、Sigma-Genosys Japan 社(Tokyo, Japan)に合成/精製を依頼した。PTX は Sigma-Aldrich 社(St.Louis, MO, USA)により精製された。CFA と結核死菌は Difco 社(Detroit, MI, USA)より入手した。Phorbol 12-myristate-13-acetate(PMA)ならびに組換えヒト PAI-1 は Merck 社(Darmstadt, Germany)から入手した。

2.5. EAU の作製

EAU の作成は既報に則り、2.5 mg/ml の結核死菌を含む CFA で乳化した 100nmol の K2 ペプチドを B10.BR マウスの後頸部と背部に 200 μ l 皮下注射して免疫して、炎症を惹起した(Namba *et al.*, 1998)。同時に 100 μ l の PBS で希釈した 0.1 μ g の PTX を腹腔内注射し、炎症をさらに惹起した。免疫から約 10 日後に EAU が発症し、約 21 日後に炎症はピークに達する(Kitamura *et al.*, 2007)。

また EAU の網脈絡膜における mRNA 発現を評価するために使用された対照群のコントロールマウスには、2.5 mg/ml の結核死菌を含む CFA と PBS の乳化剤を皮下注射することにより免疫した。同時に 100 μ l の PBS で希釈した 0.1 μ g の PTX を腹腔内注射した。

2.6. IMD4482

合成 PAI-1 阻害剤である IMD4482; 3-[3-(4-tert-butylphenoxy)-4'-trifluoromethoxy]BIPHENYL-4-YL] propanoic acid は、医薬分子設計研究所(Tokyo, Japan)より供給された。EAU マウスを免疫した 3 日後から 18 日間、IMD4482 (5mg/ml) を 0.5%Carboxymethylcellulose sodium salt(CMC-Na) に懸濁

したもの、または溶媒の CMC-Na のみを腹腔内投与した. IMD4482 の投与は、既報(Nakatsuka *et al*, 2017)に準じて行った.

2.7. リアルタイム定量 PCR 法

EAU マウスと、網膜抗原である K2 ペプチドを除いて免疫したコントロールマウス(対照群)を安楽死させ、免疫後 11, 16, 21 日目に網脈絡膜組織を抽出した. 網脈絡膜組織における PAI-1 の mRNA の発現量をリアルタイム定量 PCR 法を用いて検討した. また、内在性コントロールとして、HPRT1 の mRNA を使用した. NucleoSpin® RNA plus (Macherey-Nagel, Germany)を用いて細胞から mRNA を抽出し、GoScript reverse transcriptase (Promega, USA)を用いて cDNA に逆転写し、プロトコールにしたがって解析した. mRNA 発現の解析は、GoTaq qPCR Master Mix (Promega, USA) を用いて StepOnePlus Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific, Japan)上で実施した. なお、用いた PAI-1 のプライマー配列は、5'- CGCCTCCTCATCCTGCCTAA-3' (forward) と 5'- AGCTGCTCTTGGTCGGAAG -3' (reverse); 134bp である.

2.8. EAU の重症度評価

EAU の臨床的重症度は、免疫後 7 日目から 3, 4 日おきに 21 日目まで、麻酔下で散瞳薬ミドリン P®(Santen Pharmaceutical, Osaka, Japan)を点眼し、検眼鏡を用いて経瞳孔的にマウスの眼底検査を行い、評価した. 臨床的重症度は、血管炎、滲出斑、網膜出血および網膜剥離の程度に基づいて 2 名の眼科医が評価した(図 7)(Namba *et al.*, 2000; Thureau *et al.*, 1997).

2.9. 細胞株および細胞培養

THP-1 ヒト単球 JCRB0112.1 は、Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Tokyo, Japan) から購入した(Tsuchiya *et al*, 1980). THP-1 細胞は、10%ウシ胎児血清を添加した RPMI-1640 培地中で培養された. この THP-1 ヒト単球を 2 日間 PMA 処理を行い、マクロファージに分化させた. 誘導された THP-1 マクロファージを 0.05%トリプシン-EDTA を用いて回収し、RPMI-1649 培地で洗浄した.

2.10. Transwell Assay

THP-1 マクロファージ (5×10^4 個) を無血清培地に懸濁し、孔径 $8.0 \mu\text{m}$ の 24 ウェルトランスウェル (Corning Costar, Lowell, MA, USA) の上部ウェルに播種した. IMD4482 ($0 \mu\text{M}$, $0.1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$) と組換えヒト PAI-1

(5 μ M) を添加した無血清培地を下部チャンバーに入れ, 37°Cで 24 時間静置させた. 次に, インサート上面の内容物を除去し, インサート下面の細胞を 100%メタノールで固定し, トルイジンブルー (10 mg/ml) で染色し, 4 つのランダムな高倍率フィールド (1360 x 1024 nm) で計数した.

2.11. 統計解析

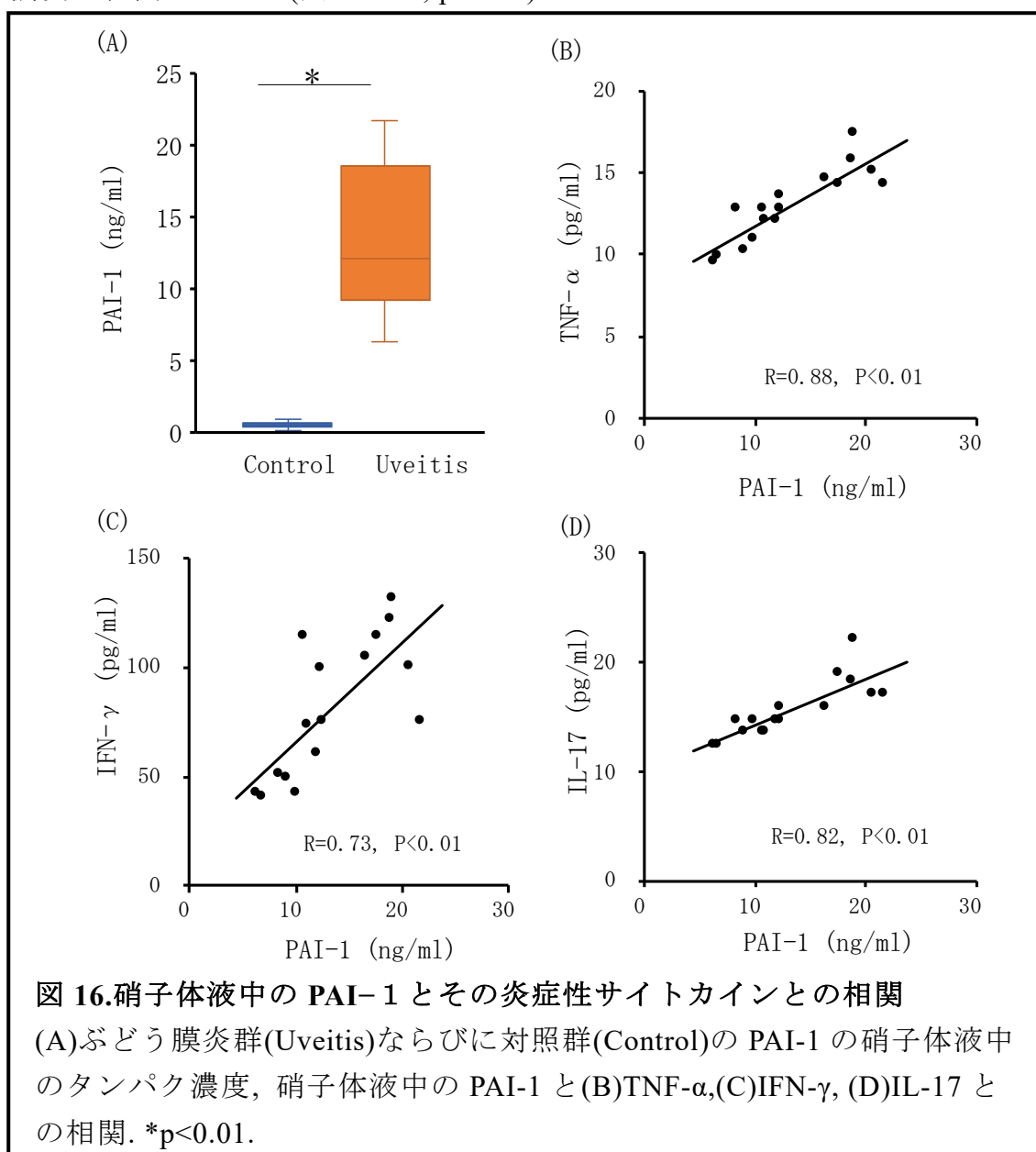
本研究では, 2 群間の有意差検定には Mann-Whitney U 検定を, 3 群間の有意差検定には Kruskal-Wallis 検定および Dunn 解析を用いた. また, EAU マウスの網脈絡膜組織における標的 mRNA 発現は, HPRT1 mRNA 発現を正規化対照として, $\Delta\Delta C_t$ 法により算出し, Mann-Whitney U 検定により統計的に解析した. すべてのデータは, StatPlus software version v7 (AnalystSoft Inc.) もしくは IBM SPSS Statistics (IBM Corp.) を使用して解析した. p 値は 0.05 未満のものを有意とした.

3. 実験結果

3.1. 硝子体液中の PAI-1 のタンパク濃度

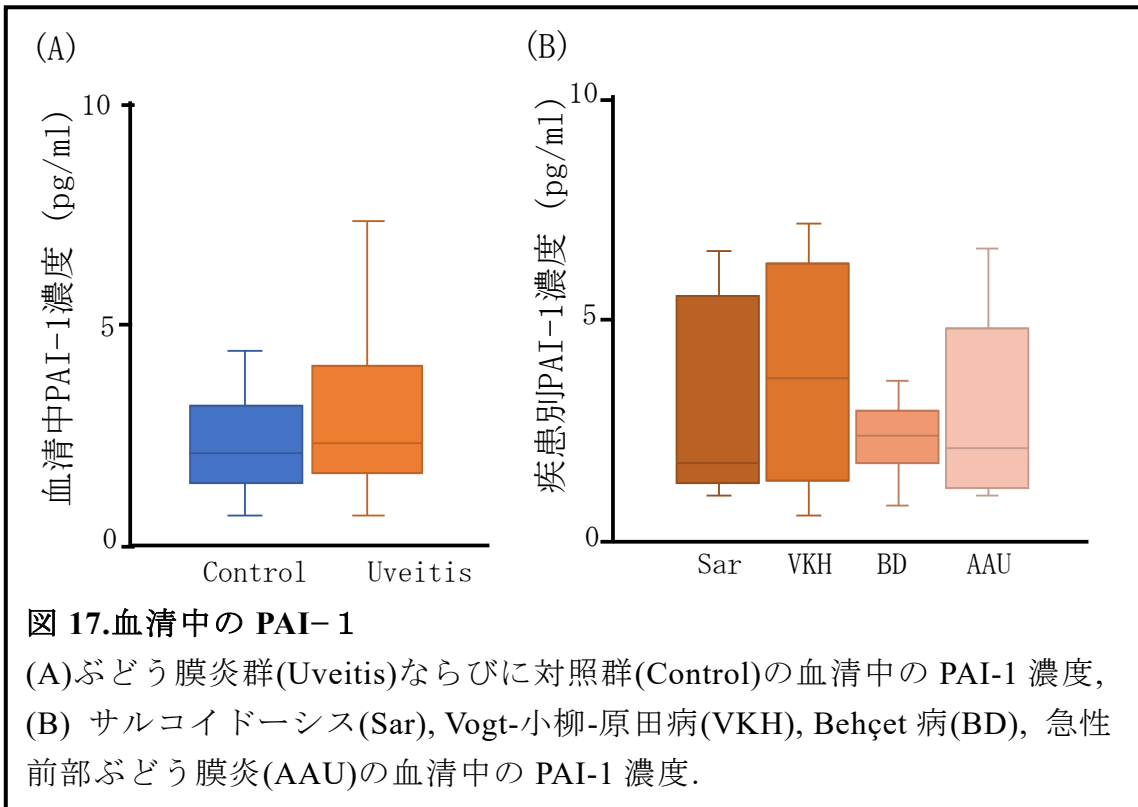
非感染性ぶどう膜炎の病態における PAI-1 の関与を調べるため、硝子体液中の PAI-1 と炎症性サイトカインである TNF- α , IFN- γ , IL-17 のタンパク濃度を測定した。

ぶどう膜炎群の硝子体液中の PAI-1 濃度($12.32 \pm 4.88 \text{ ng/ml}$)は、対照群($0.50 \pm 0.30 \text{ ng/ml}$)と比べ有意に高かった(図 16A; $p < 0.01$)。また、ぶどう膜炎群の硝子体液中の PAI-1 濃度は、TNF- α , IFN- γ , IL-17 の硝子体液中のタンパク濃度と相関を示した(図 16B-D; $p < 0.01$)。



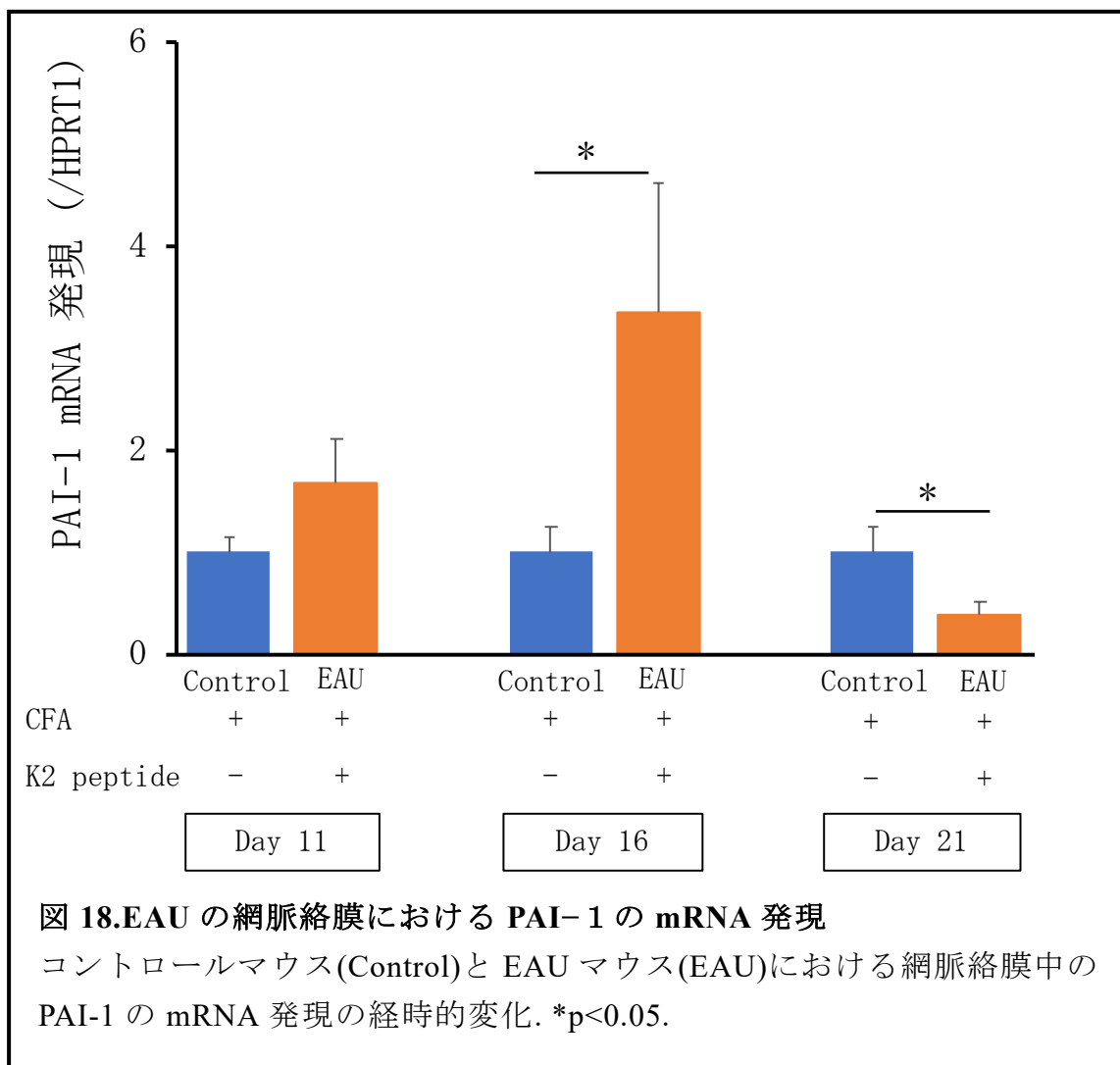
3.2. 血清中の PAI-1 のタンパク濃度

次に、硝子体液と同様に、血清中の PAI-1 のタンパク濃度を測定し、比較した。ぶどう膜炎群の血清中の PAI-1 濃度 ($3.09 \pm 1.95 \text{ pg/ml}$) は、対照群 ($2.24 \pm 1.10 \text{ pg/ml}$) と比べ、有意な差はなかった (図 17A; $p=0.41$)。また、ぶどう膜炎の原因疾患別に比較しても有意差はみられなかった (図 17B; $p=0.63$)。



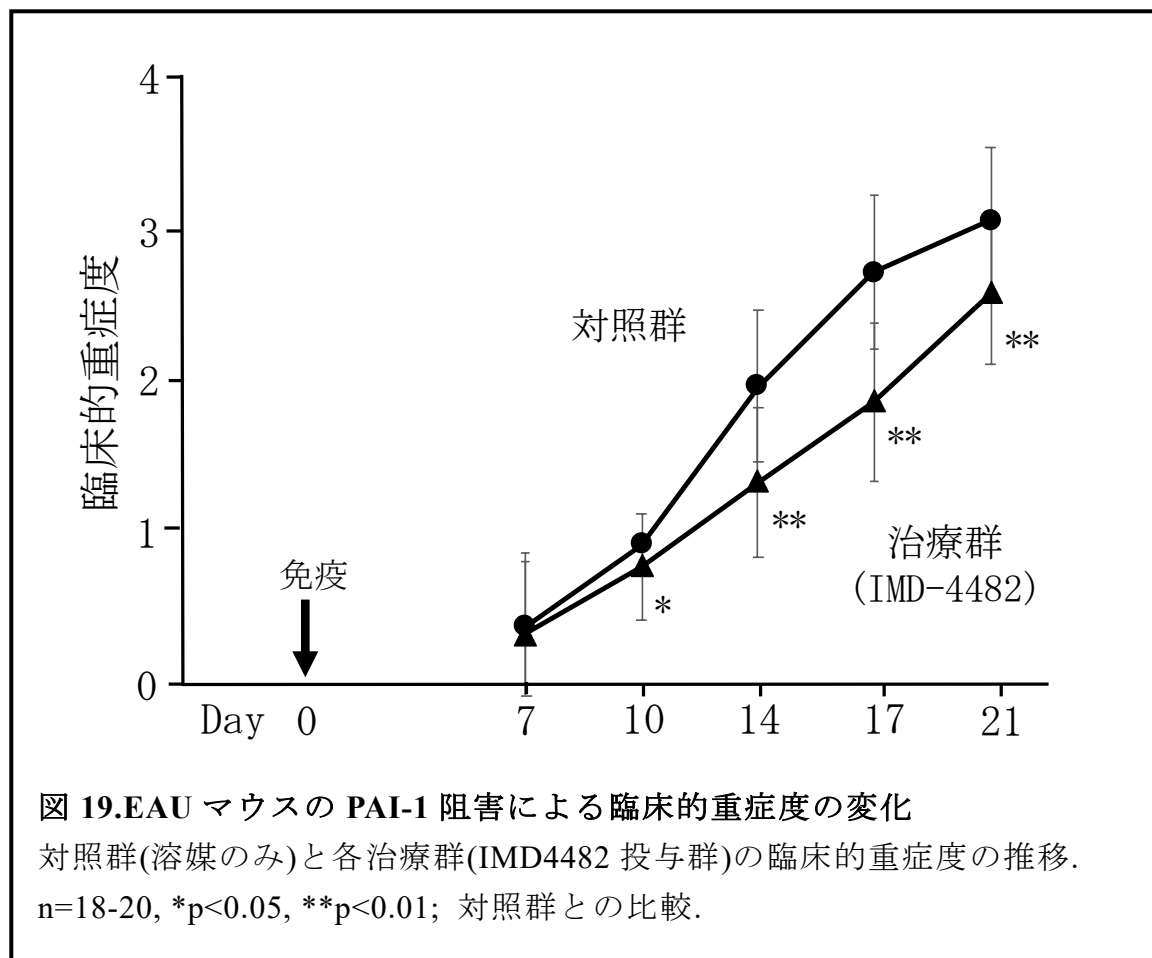
3.3. EAU 網脈絡膜中の PAI-1 の mRNA 発現

EAU マウスおよびその対照群として網膜抗原をのぞいて免疫したコントロールマウス由来の網脈絡膜組織の PAI-1 の mRNA 発現の EAU 経過中の変化を検討した(n=6). PAI-1 の mRNA 発現は, EAU 群で対照群と比べて, 免疫後 16 日目において有意に高く ($p<0.05$), 21 日目では有意に低かった(図 18; $p<0.05$).



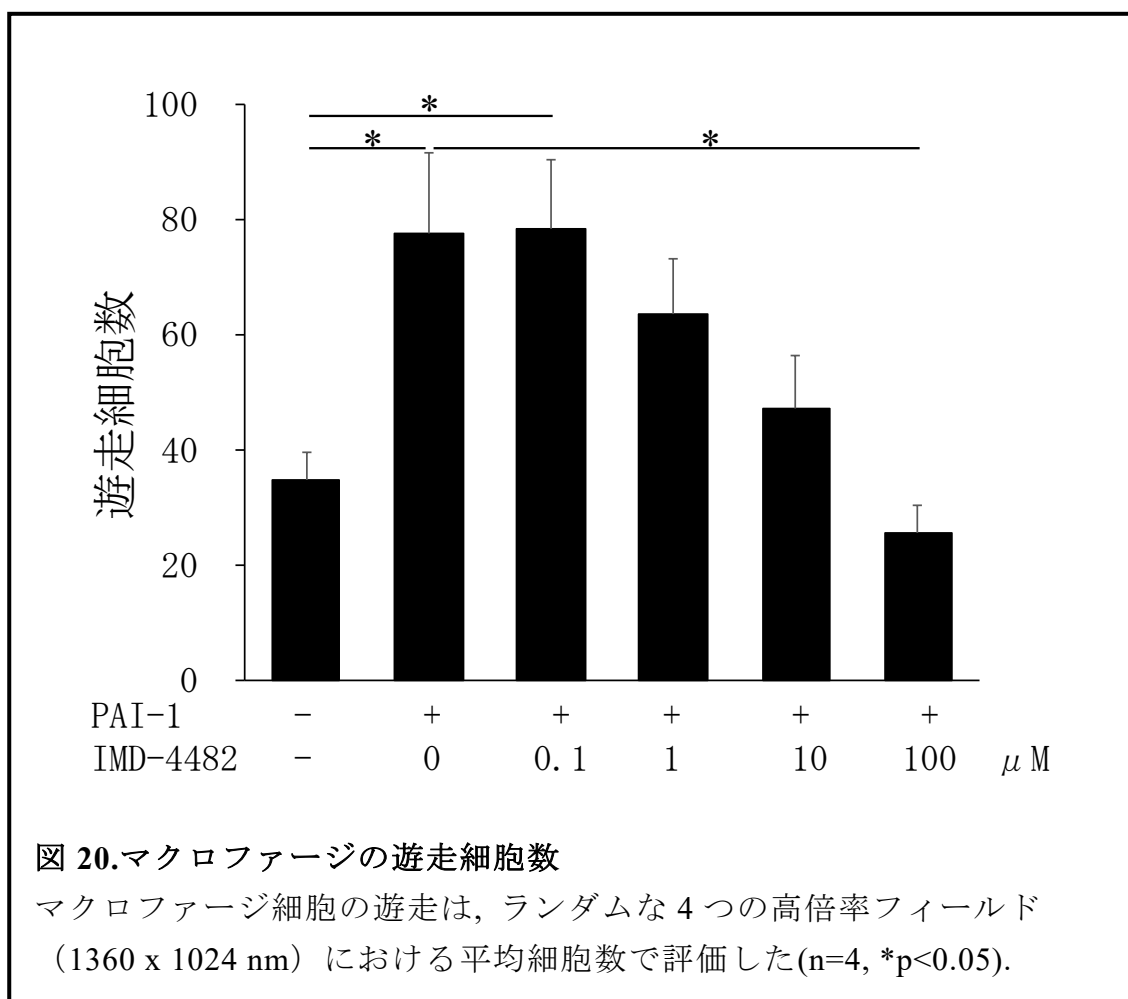
3.4. PAI-1 阻害による EAU の重症度の変化

PAI-1 阻害による EAU の眼炎症の抑制効果を検討した(n=18-20). EAU マウスに PAI-1 阻害剤である IMD4482 を投与し、対照群の EAU マウスと比較した. IMD4482 投与群の臨床的重症度は、免疫後 10 日目(p<0.05), 14 日目(p<0.01), 17 日目(p<0.01), および 21 日目(p<0.01)に対照群よりも有意に低かった(図 19; p<0.05).



3.5. PAI-1 阻害によるマクロファージ遊走への影響

PAI-1 阻害剤である IMD4482 のマクロファージ遊走に対する効果を検討した(図 20; n=4). THP-1 マクロファージを PAI-1 なしで培養した場合, 遊走した細胞数は 34.9 ± 9.4 個/視野であったが, PAI-1 刺激により, 遊走細胞数は有意に増加した(77.8 ± 28.0 個/視野)($p < 0.05$). 一方, PAI-1 とともに IMD4482 を培地に添加した場合, その濃度依存的に遊走細胞数の減少がみられ, IMD4482 を $100 \mu\text{M}$ 添加した群においては, その遊走細胞数は PAI-1 刺激のみを行った群と比べて有意に減少した(25.7 ± 9.8 個/視野)($p < 0.05$).



4. 考察

本研究では、PAI-1 の眼炎症病態への関与について検討して、(1)非感染性ぶどう膜炎患者において硝子体液中の PAI-1 濃度が上昇していること、(2)EAU の網脈絡組織において PAI-1 の mRNA 発現が亢進していること、(3)PAI-1 阻害剤である IMD4482 により EAU の臨床的重症度が低下すること、そして、(4) Transwell Assay で IMD4482 によりマクロファージの遊走が低下することが示された。

まず、非感染性ぶどう膜炎患者の硝子体液中において、PAI-1 濃度が非炎症性眼疾患の患者の硝子体液よりも上昇していることを明らかにした。眼内液の解析については、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液で PAI-1 のタンパク濃度が上昇するが(Qin *et al*, 2022)、一方で、加齢黄斑変性症患者の前房水では PAI-1 が検出されないことが報告されている(Bertelmann *et al*, 2013)。しかしながら、非感染性ぶどう膜炎患者の硝子体液中の PAI-1 のタンパク濃度の上昇を明らかにした報告はなく、本研究が最初の報告である。

さらに、この PAI-1 タンパク濃度の上昇は炎症性サイトカインである TNF- α 、IFN- γ 、IL-17 のそれぞれのタンパク濃度と相関を示した。Sillen と Declerck は PAI-1 の発現と放出が成長因子、ホルモン、グルコース、エンドトキシンなど様々な因子によって制御されていること(Sillen & Declerck, 2021)、また、Yamamoto らや Rabieian らは TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインが PAI-1 の発現を上昇させることを報告している(Rabieian *et al*, 2018; Yamamoto *et al*, 2002)。本研究の結果においても PAI-1 と炎症性サイトカインとの相関が示されており、これらの既報と矛盾しない結果である。PAI-1 が非感染性ぶどう膜炎において、炎症性サイトカインとともにその炎症増悪に関与している可能性が示された。

一方、非感染性ぶどう膜炎患者の血清中の PAI-1 の濃度は、対照群と比較して有意な差はみられなかった。血清中 PAI-1 の増加は、Behçet 病、関節リウマチや敗血症など、いくつかの全身性炎症疾患で報告されている(Chi *et al*, 2015; de Sá *et al.*, 2018; Oztürk *et al*, 2004)。血清中の PAI-1 のタンパク濃度の上昇は、全身性炎症疾患の患者にみられているが、ぶどう膜炎患者のような局所炎症では、全身循環中の炎症性分子のレベルを上昇させず、そのために血清中 PAI-1 タンパク濃度に変化がみられなかった可能性が考えられる。

次に、非感染性ぶどう膜炎患者の眼局所でみられたような PAI-1 の変化が、その動物モデルである EAU においてもみられるかを確認するため、EAU の網脈絡膜組織を用いて PAI-1 の mRNA 発現の変化を検討した。EAU マウス

の網脈絡膜では PAI-1 の発現が有意に亢進しており, PAI-1 が EAU の病態に関与していることが示唆された. 多発性硬化症の動物モデルである EAE は EAU と類似したメカニズムを有する動物モデルであるが, この EAE においても, Pelisch らはその炎症部位である脊髄で PAI-1 の mRNA の発現が亢進することを報告しており (Pelisch *et al.*, 2015), 今回の結果はこれに矛盾しないものであった.

次に, PAI-1 がぶどう膜炎の治療標的となり得るかどうかを検討するために, EAU マウスを用い, PAI-1 阻害剤 IMD4482 の有効性を評価した. その結果, IMD4482 により EAU の臨床的重症度が有意に低下することが確認された. EAE マウスにおいては, PAI-1 ノックアウトマウスでその重症度が低下することが報告されている (Lebas *et al.*, 2022). また, PAI-1 阻害剤である TM5484 の経口投与により, EAE の臨床的重症度が低下したことが報告されている (Pelisch *et al.*, 2015).

しかしながら, PAI-1 阻害剤がどのようなメカニズムで炎症反応を抑制しているのかは, その詳細なメカニズムはまだ明らかになっていない. PAI-1 は, ビトロネクチンや LDLR ファミリーのメンバーを含む非プロテイナーゼリガンドと相互作用することができる. いくつかの研究で, PAI-1 が LRP1 を介してマクロファージの移動に関与することが報告されている (Degryse *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2020). また, PAI-1 は中枢神経系の常在マクロファージであるマイクログリア細胞の遊走を, LRP1 依存的に促進することが示されている (Jeon *et al.*, 2012). さらに, PAI-1 が toll-like receptor-4 を介してマクロファージを活性化することも報告されており (Gupta *et al.*, 2016), 様々な機序で炎症の進展に関与している可能性が考えられる.

本研究では, これらの既報を踏まえ, マクロファージの遊走に対する PAI-1 阻害剤 IMD4482 の効果を *in vitro* で検討した. その結果, PAI-1 刺激により亢進されるマクロファージ遊走が, IMD4482 により低下することが明らかとなった. マクロファージ遊走の低下は, PAI-1 阻害剤の EAU の重症化を抑制するメカニズムの一つである可能性が示された.

PAI-1 阻害剤は, バイアスピリンやワーファリンなどの既存薬に比べて, 出血性副作用が少なく腎臓保護作用が期待される抗血栓治療薬として期待され, 特に心血管疾患の予防または治療のために開発されてきた. また, 近年, PAI-1 は細胞の接着, 剥離, ならびに移動にも大きく影響することが示され, 炎症性疾患や腫瘍性疾患の治療薬としても注目されている. 今回使用した IMD4482 も新規の PAI-1 阻害剤の 1 つである. IMD4482 は低分子量であることから, ドラッグデリバリーに優れているという特徴を有している. 中塚

らはこの IMD4482 が PAI-1 活性を阻害することにより、がん細胞の細胞接着やがんの転移を抑制することを報告している(Nakatsuka *et al.*, 2017).

本研究により、PAI-1 が非感染性ぶどう膜炎の炎症の進展に関与しており、PAI-1 が非感染性ぶどう膜炎に対する新たな治療標的となる可能性が示された。非感染性ぶどう膜炎の治療に関しては、これまでマクロファージの遊走を標的とした薬剤はなく、PAI-1 阻害剤が新しい治療戦略として期待される。

結論および総括

本研究では以下の新しい知見が得られた.

第 1 章

- (1) 非感染性ぶどう膜炎患者の硝子体液において Ang2 および VEGFA のタンパク濃度が上昇している.
- (2) EAU マウスの網脈絡膜組織において Ang2 および VEGFA の mRNA 発現が亢進している.
- (3) Ang2 と VEGFA の阻害により EAU の臨床的重症度ならびに病理組織学的重症度が低下する.

これらの結果から, Ang2 と VEGFA が非感染性ぶどう膜炎の炎症の進展に関与しており, 非感染性ぶどう膜炎の治療標的となる可能性が示された. Ang2 と VEGFA の二重阻害が非感染性ぶどう膜炎に有効であり, 抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体であるファリシマブが非感染性ぶどう膜炎に対する新たな治療戦略となりうると考えられた.

第 2 章

- (1) 非感染性ぶどう膜炎患者の硝子体液において PAI-1 のタンパク濃度が上昇し, 炎症性サイトカインである TNF- α , IFN- γ , IL-17 と相関する.
- (2) EAU マウスの網脈絡膜組織において PAI-1 の mRNA 発現が亢進している.
- (3) PAI-1 の阻害である IMD4482 の投与により, EAU の臨床的重症度が低下する.
- (4) IMD4482 の投与により, Transwell Assay でマクロファージの遊走が低下する.

これらの結果から, PAI-1 が非感染性ぶどう膜炎の進展に関与しており, 非感染性ぶどう膜炎の治療標的となる可能性が示された. 非感染性ぶどう膜炎に対する新たな治療戦略として, PAI-1 阻害剤である IMD4482 の可能性を提示した.

非感染性ぶどう膜炎の治療には従来ステロイド薬や NSAIDs, 免疫抑制薬が用いられてきた. しかしながら, これらの治療をおこなっても炎症が遷延し, 炎症に伴う網脈絡膜萎縮だけでなく, 併発白内障や続発緑内障などの眼合併症により重篤な視機能障害に陥いる症例がみられていた(Suzuki *et*

al., 2022). 近年、アダリムマブやインフリキシマブなどの TNF 阻害薬に代表される生物学的製剤の出現により、非感染性ぶどう膜炎の治療戦略は劇的に変化し、多くの患者がその恩恵を受けられるようになった。しかしながら、これらの生物学的製剤を併用しても炎症が遷延しステロイド薬の併用を要したり、全身の副作用により治療継続が困難となる症例がみられている(Okada *et al.*, 2012; Shinagawa *et al.*, 2022; Takeuchi *et al.*, 2014)。そのため、眼内での炎症を制御する因子を治療標的とした、全身への影響を懸念せずに用いられる新たな治療薬の開発が今もなお強く望まれている。

本研究では新しい治療標的として Ang2 と VEGFA、そして PAI-1 に着目し、非感染性ぶどう膜炎の臨床検体ならびにその動物モデルである EAU マウスを用いて、その標的分子の眼局所での発現とその阻害による炎症抑制効果を示した。

眼科領域において、ラニズマブやアフリベルセプトなどの抗 VEGFA 抗体の硝子体内投与は、以前よりすでに加齢黄斑変性症や糖尿病網膜症など病的な血管新生や血管透過性亢進を伴う疾患に対して臨床使用がなされている。また、抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体であるファリシマブの硝子体内投与も、中心下脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性症や糖尿病黄斑浮腫の治療薬として、2022 年に臨床使用が開始された。本研究により、これらの治療薬が非感染性ぶどう膜炎の新規治療薬となる可能性が示され、特にぶどう膜炎により惹起される血管透過性亢進を伴う難治性黄斑浮腫などには良い効果が期待される。

また、線溶系の異常と炎症が関連する病態はぶどう膜炎も含め、様々な炎症性疾患でしばしばみられる。眼内では炎症が増強するとともにフィブリンが析出し、それにより虹彩前癒着、虹彩後癒着、そしてそれらを契機とした続発緑内障などの眼合併症を併発し、不可逆的な視機能障害をきたすことがある。線溶系に関してもフィブリンを溶解する働きを呈する PAI-1 阻害剤は、この線溶系の異常と炎症を合併している病態において有効な働きを呈することが期待される。

抗 Ang2/VEGFA 二重特異性抗体、PAI-1 阻害剤ともに、今後の臨床使用が期待される薬剤である。その実用化のためには、それらの炎症病態における詳細な作用機序の解明や副作用についてなどの検討が必要と考えられ、今後さらに研究を進めていきたい。

謝辞

稿を終えるにあたり、研究の機会をくださった北海道大学大学院医学研究院眼科学教室・石田晋教授に深い謝意を表します。

本研究全般にわたりご指導ご教鞭を賜りました北海道大学大学院医学研究院眼科学教室・南場研一診療教授，北海道医療大学予防医療学センター眼科学系・北市伸義教授，同・平岡美紀准教授に深い謝意を表します。また，直接のご指導をいただきました北海道大学大学院医学研究院眼科学教室・岩田大樹講師に心より感謝致します。

さらに，研究材料のご提供をいただきました Roche Innovation Center, Roche Pharma Research and Early Development・Richard Foxton 先生，医薬分子設計研究所・板井昭子先生に深く感謝いたします。

最後に，本研究を遂行するにあたり，数々のご助言，ご協力，ご支援いただきました北海道大学大学院医学研究院眼科学教室の皆様，臨床検体をご提供いただきました患者の皆様に心より御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

参考文献

- Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM (2019) Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells* 8
- Bertelmann T, Spychalska M, Kohlberger L, Strodthoff S, Witteborn M, Kicova N, Sachs U, Irle S, Mennel S (2013) Intracameral concentrations of the fibrinolytic system components in patients with age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 251: 2697-2704
- Cabral T, Lima LH, Mello LGM, Polido J, Correa É, Oshima A, Duong J, Serracarbassa P, Regatieri CV, Mahajan VB *et al* (2018) Bevacizumab Injection in Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration Increases Angiogenic Biomarkers. *Ophthalmol Retina* 2: 31-37
- Cao C, Lawrence DA, Li Y, Von Arnim CA, Herz J, Su EJ, Makarova A, Hyman BT, Strickland DK, Zhang L (2006) Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration. *EMBO J* 25: 1860-1870
- Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA, Lando Z, Nussenblatt RB (1988) A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* 140: 1490-1495
- Chan CC, Mochizuki M, Palestine AG, BenEzra D, Gery I, Nussenblatt RB (1985) Kinetics of T-lymphocyte subsets in the eyes of Lewis rats with experimental autoimmune uveitis. *Cell Immunol* 96: 430-434
- Chi YF, Chai JK, Yu YM, Luo HM, Zhang QX, Feng R (2015) Association between PAI-1 polymorphisms and plasma PAI-1 level with sepsis in severely burned patients. *Genet Mol Res* 14: 10081-10086
- Choe JY, Park SH, Kim SK (2010) Serum angiopoietin-1 level is increased in patients with Behçet's disease. *Joint Bone Spine* 77: 340-344
- Cravens PD, Lipsky PE (2002) Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol* 80: 497-505
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC *et al* (1996) Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161-1169
- De Kozak Y, FRE, Usui M, Faure JP (1976) [Experimental autoimmune

uveoretinitis. Ultrastructure of chorioretinal lesions induced in guinea pigs by immunization against the outer rods of the bovine retina]. *Arch Ophthalmol (Paris)* 36: 231-248

de Sá MC, Simão ANC, de Medeiros FA, Iriyoda TMV, Costa NT, Alfieri DF, Flauzino T, Sekiguchi BA, Lozovoy MAB, Reiche EMV *et al* (2018) Cell adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in patients with rheumatoid arthritis: influence of metabolic syndrome. *Clin Exp Med* 18: 495-504

De Taeye B, Smith LH, Vaughan DE (2005) Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 5: 149-154

Degryse B, Neels JG, Czekay RP, Aertgeerts K, Kamikubo Y, Loskutoff DJ (2004) The low density lipoprotein receptor-related protein is a motogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 279: 22595-22604

Dick AD, Forrester JV, Liversidge J, Cope AP (2004) The role of tumour necrosis factor (TNF-alpha) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Prog Retin Eye Res* 23: 617-637

Dong Z, Iwata D, Kitaichi N, Takeuchi M, Sato M, Endo N, Iwabuchi K, Ando R, Fukuhara J, Kinoshita S *et al* (2014) Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by inhibition of glyceraldehyde-derived advanced glycation end-product formation. *J Leukoc Biol* 96: 1077-1085

East E, Gverić D, Baker D, Pryce G, Lijnen HR, Cuzner ML (2008) Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) in plasminogen activator inhibitor-1 knockout mice: the effect of fibrinolysis during neuroinflammation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34: 216-230

Fearon U, Griosios K, Fraser A, Reece R, Emery P, Jones PF, Veale DJ (2003) Angiopoietins, growth factors, and vascular morphology in early arthritis. *J Rheumatol* 30: 260-268

Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, Bartol A, Kienast Y, Vettel C, Loos EK *et al* (2012) Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J Clin Invest* 122: 1991-2005

Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witzenzrath M, Rosseau S, Suttorp N *et al* (2006) Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 12: 235-239

Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, Kriz W, Thurston G, Augustin HG (2004) The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* 103: 4150-4156

Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D *et al* (2002) Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3: 411-423

Glimcher LH, Kim KJ, Green I, Paul WE (1982) Ia antigen-bearing B cell tumor lines can present protein antigen and alloantigen in a major histocompatibility complex-restricted fashion to antigen-reactive T cells. *J Exp Med* 155: 445-459

Gupta KK, Xu Z, Castellino FJ, Ploplis VA (2016) Plasminogen activator inhibitor-1 stimulates macrophage activation through Toll-like Receptor-4. *Biochem Biophys Res Commun* 477: 503-508

Hah YS, Koh YJ, Lim HS, Kim HO, Cheon YH, Noh HS, Jang KY, Lee SY, Lee GM, Koh GY *et al* (2013) Double-antiangiogenic protein DAAP targeting vascular endothelial growth factor A and angiopoietins attenuates collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 15: R85

Hakanpaa L, Sipila T, Leppanen VM, Gautam P, Nurmi H, Jacquemet G, Eklund L, Ivaska J, Alitalo K, Saharinen P (2015) Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin β 1 activation. *Nat Commun* 6: 5962

Hammes HP, Lin J, Wagner P, Feng Y, Vom Hagen F, Krzizok T, Renner O, Breier G, Brownlee M, Deutsch U (2004) Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* 53: 1104-1110

Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277: 48-50

Heil M, Clauss M, Suzuki K, Buschmann IR, Willuweit A, Fischer S, Schaper W (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. *Eur J Cell Biol* 79: 850-857

Hughes DP, Marron MB, Brindle NP (2003) The antiinflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2. *Circ Res* 92: 630-636

Ichimura A, Matsumoto S, Suzuki S, Dan T, Yamaki S, Sato Y, Kiyomoto H, Ishii

- N, Okada K, Matsuo O *et al* (2013) A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 935-942
- Imhof BA, Aurrand-Lions M (2006) Angiogenesis and inflammation face off. *Nat Med* 12: 171-172
- Iurlaro M, Scatena M, Zhu WH, Fogel E, Wieting SL, Nicosia RF (2003) Rat aorta-derived mural precursor cells express the Tie2 receptor and respond directly to stimulation by angiopoietins. *J Cell Sci* 116: 3635-3643
- Iwata D, Kitaichi N, Miyazaki A, Iwabuchi K, Yoshida K, Namba K, Ozaki M, Ohno S, Umezawa K, Yamashita K *et al* (2010) Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis with nuclear factor- κ B Inhibitor dehydroxy methyl epoxyquinomicin in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 2077-2084
- Iwata D, Mizuuchi K, Aoki K, Horie Y, Kase S, Namba K, Ohno S, Ishida S, Kitaichi N (2017) Serial Frequencies and Clinical Features of Uveitis in Hokkaido, Japan. *Ocul Immunol Inflamm* 25: S15-S18
- Jeltsch M, Leppänen VM, Saharinen P, Alitalo K (2013) Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5
- Jeon H, Kim JH, Lee WH, Lee MS, Suk K (2012) Plasminogen activator inhibitor type 1 regulates microglial motility and phagocytic activity. *J Neuroinflammation* 9: 149
- Kase S, Namba K, Kanno-Okada H, Onozawa M, Hidaka D, Iwata D, Mizuuchi K, Fukuhara T, Fukuhara J, Kitaichi N *et al* (2020) Immunohistochemical and Immunocytochemical Analyses in Patients with Vitreoretinal Lymphoma. *Ocul Immunol Inflamm* 28: 147-155
- Khanani AM, Patel SS, Ferrone PJ, Osborne A, Sahni J, Grzeschik S, Basu K, Ehrlich JS, Haskova Z, Dugel PU (2020) Efficacy of Every Four Monthly and Quarterly Dosing of Faricimab vs Ranibizumab in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: The STAIRWAY Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol* 138: 964-972
- Kim HB (1997) Ophthalmologic manifestation of Behçet's disease. *Yonsei Med J* 38: 390-394
- Kitamei H, Kitaichi N, Namba K, Kotake S, Goda C, Kitamura M, Miyazaki A, Ohno S (2009) Clinical features of intraocular inflammation in Hokkaido, Japan. *Acta Ophthalmol* 87: 424-428
- Kitamura M, Iwabuchi K, Kitaichi N, Kon S, Kitamei H, Namba K, Yoshida K,

Denhardt DT, Rittling SR, Ohno S *et al* (2007) Osteopontin aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *J Immunol* 178: 6567-6572

Koch S, Claesson-Welsh L (2012) Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006502

Lebas H, Guérit S, Picot A, Boulay AC, Fournier A, Vivien D, Cohen Salmon M, Docagne F, Bardou I (2022) PAI-1 production by reactive astrocytes drives tissue dysfibrinolysis in multiple sclerosis models. *Cell Mol Life Sci* 79: 323

Lee J, Park DY, Park I, Chang W, Nakaoka Y, Komuro I, Yoo OJ, Koh GY (2014) Angiopoietin-1 suppresses choroidal neovascularization and vascular leakage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55: 2191-2199

Li Z, Korhonen EA, Merlini A, Strauss J, Wihuri E, Nurmi H, Antila S, Paech J, Deutsch U, Engelhardt B *et al* (2020) Angiopoietin-2 blockade ameliorates autoimmune neuroinflammation by inhibiting leukocyte recruitment into the CNS. *J Clin Invest* 130: 1977-1990

Luna JD, Chan CC, Derevjaniuk NL, Mahlow J, Chiu C, Peng B, Tobe T, Campochiaro PA, Vינוres SA (1997) Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *J Neurosci Res* 49: 268-280

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N *et al* (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60

McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH (1998) The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunol Rev* 165: 231-247

Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, Iwakura Y, Shibuya M (2006) Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* 108: 1849-1856

Nakatsuka E, Sawada K, Nakamura K, Yoshimura A, Kinose Y, Kodama M, Hashimoto K, Mabuchi S, Makino H, Morii E *et al* (2017) Plasminogen activator inhibitor-1 is an independent prognostic factor of ovarian cancer and IMD-4482, a novel plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor, inhibits ovarian cancer peritoneal dissemination. *Oncotarget* 8: 89887-89902

Namba K, Ogasawara K, Kitaichi N, Matsuki N, Takahashi A, Sasamoto Y, Kotake S, Matsuda H, Iwabuchi K, Ohno S *et al* (1998) Identification of a peptide inducing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in H-2Ak-carrying mice. *Clin Exp Immunol* 111: 442-449

Namba K, Ogasawara K, Kitaichi N, Morohashi T, Sasamoto Y, Kotake S, Matsuda H, Iwabuchi K, Iwabuchi C, Ohno S *et al* (2000) Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by pretreatment with a pathogenic peptide in liposome and anti-CD40 ligand monoclonal antibody. *J Immunol* 165: 2962-2969

Ng DS, Yip YW, Bakthavatsalam M, Chen LJ, Ng TK, Lai TY, Pang CP, Brelén ME (2017) Elevated angiopoietin 2 in aqueous of patients with neovascular age related macular degeneration correlates with disease severity at presentation. *Sci Rep* 7: 45081

Nussenblatt RB, Kuwabara T, de Monasterio FM, Wacker WB (1981) S-antigen uveitis in primates. A new model for human disease. *Arch Ophthalmol* 99: 1090-1092

Ohta K, Yamagami S, Wiggert B, Dana MR, Streilein JW (2002) Chemokine gene expression in iris-ciliary body during experimental autoimmune uveoretinitis. *Curr Eye Res* 24: 451-457

Okada AA, Goto H, Ohno S, Mochizuki M, Japan OBsDRGO (2012) Multicenter study of infliximab for refractory uveoretinitis in Behçet disease. *Arch Ophthalmol* 130: 592-598

Oshima Y, Oshima S, Nambu H, Kachi S, Hackett SF, Melia M, Kaleko M, Connelly S, Esumi N, Zack DJ *et al* (2004) Increased expression of VEGF in retinal pigmented epithelial cells is not sufficient to cause choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 201: 393-400

Oztürk MA, Ertenli I, Kiraz S, C Haznedaroğlu I, Celik I, Kirazli S, Calgüneri M (2004) Plasminogen activator inhibitor-1 as a link between pathological fibrinolysis and arthritis of Behçet's disease. *Rheumatol Int* 24: 98-102

Park HJ, Chi GY, Choi YH, Park SH (2020) Lupeol suppresses plasminogen activator inhibitor-1-mediated macrophage recruitment and attenuates M2 macrophage polarization. *Biochem Biophys Res Commun* 527: 889-895

Pelisch N, Dan T, Ichimura A, Sekiguchi H, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T (2015) Plasminogen Activator Inhibitor-1 Antagonist TM5484 Attenuates Demyelination and Axonal Degeneration in a Mice Model of Multiple

Sclerosis. *PLoS One* 10: e0124510

Peters S, Cree IA, Alexander R, Turowski P, Ockrim Z, Patel J, Boyd SR, Jousen AM, Ziemssen F, Hykin PG *et al* (2007) Angiopoietin modulation of vascular endothelial growth factor: Effects on retinal endothelial cell permeability.

Cytokine 40: 144-150

Qin Y, Zhang J, Babapoor-Farrokhran S, Applewhite B, Deshpande M, Megarity H, Flores-Bellver M, Aparicio-Domingo S, Ma T, Rui Y *et al* (2022) PAI-1 is a vascular cell-specific HIF-2-dependent angiogenic factor that promotes retinal neovascularization in diabetic patients. *Sci Adv* 8: eabm1896

Rabieian R, Boshtam M, Zareei M, Kouhpayeh S, Masoudifar A, Mirzaei H (2018) Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 as a Regulator of Fibrosis. *J Cell Biochem* 119: 17-27

Regula JT, Lundh von Leithner P, Foxton R, Barathi VA, Cheung CM, Bo Tun SB, Wey YS, Iwata D, Dostalek M, Moelleken J *et al* (2016) Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAb optimized for neovascular eye diseases.

EMBO Mol Med 8: 1265-1288

Reiss Y, Droste J, Heil M, Tribulova S, Schmidt MHH, Schaper W, Dumont DJ, Plate KH (2007) Angiopoietin-2 impairs revascularization after limb ischemia.

Circ Res 101: 88-96

Saharinen P, Eklund L, Alitalo K (2017) Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway. *Nat Rev Drug Discov* 16: 635-661

Sahni J, Patel SS, Dugel PU, Khanani AM, Jhaveri CD, Wykoff CC, Hershberger VS, Pauly-Evers M, Sadikhov S, Szczesny P *et al* (2019) Simultaneous Inhibition of Angiopoietin-2 and Vascular Endothelial Growth Factor-A with Faricimab in Diabetic Macular Edema: BOULEVARD Phase 2 Randomized Trial.

Ophthalmology 126: 1155-1170

Sato T, Shima C, Kusaka S (2011) Vitreous levels of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in eyes with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 151: 353-357.e351

Scholz A, Plate KH, Reiss Y (2015) Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1347: 45-51

Schonthaler HB, Huggenberger R, Wculek SK, Detmar M, Wagner EF (2009) Systemic anti-VEGF treatment strongly reduces skin inflammation in a mouse model of psoriasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21264-21269

Shibuya M (2015) VEGF-VEGFR System as a Target for Suppressing

Inflammation and other Diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 15: 135-144

Shinagawa M, Namba K, Mizuuchi K, Iwata D, Hase K, Suzuki K, Hirooka K, Kitaichi N, Hiraoka M, Ishida S (2022) The Steroid-Sparing Effect of Adalimumab in the Treatment for the Recurrent Phase of Vogt-Koyanagi-Harada Disease. *Ocul Immunol Inflamm*: 1-5

Sillen M, Declerck PJ (2021) A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target? *Int J Mol Sci* 22

Sonoda KH, Hasegawa E, Namba K, Okada AA, Ohguro N, Goto H, Group JJOISUSW (2021) Epidemiology of uveitis in Japan: a 2016 retrospective nationwide survey. *Jpn J Ophthalmol* 65: 184-190

Sundberg C, Kowanetz M, Brown LF, Detmar M, Dvorak HF (2002) Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest* 82: 387-401

Suzuki K, Ishihara M, Namba K, Ohno S, Goto H, Takase H, Kawano S, Shibuya E, Hase K, Iwata D *et al* (2022) Clinical features of ocular sarcoidosis: severe, refractory, and prolonged inflammation. *Jpn J Ophthalmol*

Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y, Satake M, Suda T (2000) A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 102: 199-209

Takeuchi M, Kezuka T, Sugita S, Keino H, Namba K, Kaburaki T, Maruyama K, Nakai K, Hijioka K, Shibuya E *et al* (2014) Evaluation of the long-term efficacy and safety of infliximab treatment for uveitis in Behçet's disease: a multicenter study. *Ophthalmology* 121: 1877-1884

Thurau SR, Chan CC, Nussenblatt RB, Caspi RR (1997) Oral tolerance in a murine model of relapsing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU): induction of protective tolerance in primed animals. *Clin Exp Immunol* 109: 370-376

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26: 171-176

Uemura A, Fruttiger M, D'Amore PA, De Falco S, Joussen AM, Sennlaub F, Brunck LR, Johnson KT, Lambrou GN, Rittenhouse KD *et al* (2021) VEGFR1

signaling in retinal angiogenesis and microinflammation. *Prog Retin Eye Res* 84: 100954

Wacker WB, Lipton MM (1965) Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature* 206: 253-254

Watanabe D, Suzuma K, Suzuma I, Ohashi H, Ojima T, Kurimoto M, Murakami T, Kimura T, Takagi H (2005) Vitreous levels of angiopoietin 2 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 139: 476-481

Weiss K, Steinbrugger I, Weger M, Ardjomand N, Maier R, Wegscheider BJ, Wedrich A, El-Shabrawi Y (2009) Intravitreal VEGF levels in uveitis patients and treatment of uveitic macular oedema with intravitreal bevacizumab. *Eye (Lond)* 23: 1812-1818

Westra J, de Groot L, Plaxton SL, Brouwer E, Posthumus MD, Kallenberg CG, Bijl M (2011) Angiopoietin-2 is highly correlated with inflammation and disease activity in recent-onset rheumatoid arthritis and could be predictive for cardiovascular disease. *Rheumatology (Oxford)* 50: 665-673

Yamamoto K, Takeshita K, Shimokawa T, Yi H, Isobe K, Loskutoff DJ, Saito H (2002) Plasminogen activator inhibitor-1 is a major stress-regulated gene: implications for stress-induced thrombosis in aged individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 890-895

Yano A, Schwartz RH, Paul WE (1977) Antigen presentation in the murine T-lymphocyte proliferative response. I. Requirement for genetic identity at the major histocompatibility complex. *J Exp Med* 146: 828-843

Yousef AA, Mohamed FY, Boraey NF, Akeel NE, Soliman AA, Waked NM, Hashem MIA, Shehata H, Fahmy DS, Ismael A *et al* (2020) Association of Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) 4G/5G Polymorphism and Susceptibility to SLE in Egyptian Children and Adolescents: A Multicenter Study. *J Inflamm Res* 13: 1103-1111

Zhang L, Yang N, Park JW, Katsaros D, Fracchioli S, Cao G, O'Brien-Jenkins A, Randall TC, Rubin SC, Coukos G (2003) Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res* 63: 3403-3412

大野 重昭, 岡田 アナベルあやめ, 後藤 浩, 南場 研一, 北市 伸義, 有賀 俊英, 石原 麻美, 臼井 嘉彦, 大黒 伸行, 蕪城 俊克, 慶野 博, 杉田 直,

鈴木 潤, 園田 康平, 堤 雅幸, 中尾 久美子, 堀江 幸弘, 水木 信久, 八代 成子, 横井 克俊, 日本眼炎症学会ぶどう膜炎診療ガイドライン作成委員会. (2019) ぶどう膜炎診療ガイドライン. 日本眼科学会雑誌 123 巻 6 号 635-696