

## マウス急性膵炎進展における $\alpha 2$ アンチプラスミンノックアウトの効果

里井俊平

近畿大学医学部外科学教室

### 抄 録

急性膵炎発症後の壊死病変の成立と進展機序には様々な因子が関与している。最近の研究では、膵壊死は活性化膵酵素による膵の融解壊死ではなく、膵微小循環障害、虚血・再灌流障害、好中球浸潤と好中球エラスターゼや活性酸素による障害などと考えられている。なかでも膵微小循環障害の修飾因子として凝固・線溶系の関与が予想されている。そこで、 $\alpha 2$  アンチプラスミン遺伝子欠損 ( $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>) マウスを用い、膵壊死と血管内皮細胞障害の程度を検討した。その結果、 $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>によりプラスミン活性が亢進すると、膵腺房細胞は壊死からの修復が促進され、その機序の一つとして、プラスミンが血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) を誘導することにより血管新生を促進し、血管内皮細胞が修復され、膵微小循環が回復したとと考えられた。しかし、VEGF 受容体を阻害しても、壊死面積は変わらなかったことから、プラスミンによる微小血栓溶解や障害された細胞外基質の除去などの作用で、組織再構築がなされたことが示唆される。

**Key words :** acute necrotizing pancreatitis, caerulein-induced pancreatitis,  $\alpha 2$ -antiplasmin-deficient mice, re-endothelialization

### 緒 言

急性膵炎において凝固・線溶系異常が重症化に大きく関与していることはよく知られている<sup>1</sup>。急性膵炎発症後の膵壊死病変の進展に微小循環動態が影響することが示唆されており<sup>2,3</sup>、膵局所における微小循環の修飾因子として凝固・線溶系の関与が予想される。さらに全身性の変化として、重症急性膵炎では、各種メディエーターが血管透過性亢進や過凝固から、しばしば播種性血管内凝固症候群を合併することが知られている。

線溶系は、プラスミンを中心として血管内で生じたフィブリンを溶解し、 $\alpha 2$  アンチプラスミン ( $\alpha 2$ -AP) のような阻害因子によって制御され、血液の流動性のバランスを維持する。 $\alpha 2$ -AP は主に肝臓で合成され、プラスミンやプラスミノゲンと結合することにより、これらのフィブリンとの結合を阻害する<sup>4,5</sup>。また、線溶系は排卵・血管新生・アテローム性動脈硬化・腫瘍の浸潤・転移などの様々な現象に関与していると報告されている<sup>6-9</sup>。

急性膵炎の病態進展における凝固線溶系の関与については、Yamanel らが活性化 protein C は急性壊死性膵炎において膵組織の重症度・血清炎症マーカーを改善すると報告している<sup>10</sup>。さらに、Lugea らは plasminogen/plasmin 欠損マウスに caerulein 膵炎を惹起した場合、間質の萎縮や繊維化のような慢性膵炎に見られる所見が誘導されたと報告している<sup>11</sup>。

一方、線溶亢進モデルとして  $\alpha 2$ -AP 遺伝子欠損 ( $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>) マウスを用いた様々な研究が報告されている。 $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスは線溶活性が亢進しているモデルであるが、顕著な出血傾向は示さず<sup>12</sup>、出産、成長、健康状態とも正常である。さらに、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) は extracellular matrix (ECM) に捕捉されプラスミンにより切断され活性化を受けることが知られている<sup>13</sup>。Kanno らは  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスで皮膚創傷部位において VEGF の過剰発現が起こり、周囲の血管新生を誘導し創閉鎖を活性化することを示し<sup>14</sup>、Matsuno らは  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> マウスの血管

内皮細胞傷害モデルで、プラスミンが傷害部位周囲のECMや血管平滑筋に接着しているVEGFを活性化し、VEGF受容体(fms-like tyrosine kinase: Flt-1)を介してre-endothelializationを進行すると報告している<sup>15</sup>。

これらの報告をもとに、我々は急性膵炎においても、プラスミンの活性化は、VEGFを介してre-endothelializationを促進し組織修復に寄与すると仮定した。この仮定を証明するため、 $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群及びその野生型マウス( $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群)にcaerulein膵炎<sup>16</sup>を誘導し、膵壊死と血管内皮細胞障害の程度を比較検討した。

## 方 法

### 実験動物

8週齢、24~28gの $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>マウス及び $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>マウスを用いた。動物実験は動物の愛護及び管理に関する法律、基本指針に基づいて作成された近畿大学医学部動物実験規定に準じて行った。

### 使用薬剤

使用した薬剤について以下に述べる。caeruleinはSigma社(St. Louis, Mo, USA)から、rabbit anti-human von Willbrand Factor polyclonal antibodyとApop Tag<sup>®</sup> Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection KitはCHMICON international社(Temecula, CA, USA)から購入したものを使用した。anti-mouse VEGF antibodyとanti-mouse VEGF R1(Flt-1) antibodyはR&D systems社(Minneapolis, MN, USA)から、抗体希釈液はDAKO社(Glostrup, Denmark)から購入したものをを使用した。

### 急性膵炎の作成

$\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群及び $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群にcaerulein(1回投与量50  $\mu$ g/kgを生理食塩水0.25 mlで溶解)を1時間間隔に7回腹腔内投与しcaerulein膵炎を惹起した。対照群には生理食塩水0.25 mlを同様に投与した。マウスは両群各時間で無作為に5~6匹に分けられ、最初のcaerulein投与から8・12・24時間経過した時に、sodium pentobarbital(50 mg/ml)を10倍希釈し0.25 mlを腹腔内投与による全身麻酔後犠牲死させ、迅速に下大静脈からの採血と膵臓摘出を行った。血清アミラーゼ値とリパーゼ値の測定を行った。膵臓は摘出後すぐに2分割し、ホルマリン固定もしくは液体窒素で凍結し-80°Cで保存した。

### 組織学的検討

ホルマリン固定された膵組織をパラフィン包埋し、4  $\mu$ m厚にスライスしhematoxylin and eosin(HE)染色した。光学顕微鏡下(倍率100倍)でマウ

ス1匹につき無作為に3か所選択し、膵腺房細胞の細胞質が退色し、核が凝集していれば、壊死と判断した。膵腺房細胞組織全体に対する膵腺房細胞壊死の割合を面積計算ソフトSigmaScan Pro 5.0を用いて計測した。

膵組織のアポトーシスはterminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL)法を行い、Apop Tag<sup>®</sup> Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kitを用いて計測した。そのプロトコールを簡潔に以下に述べる。ホルマリン固定後パラフィン包埋し、4  $\mu$ m厚にスライスした膵組織は、脱パラフィンし脱水後プロテナーゼKで処理した。3.0%過酸化水素/PBSで内因性ペルオキシダーゼを除去し、equilibration buffer次にTdT enzymeを添加し1時間インキュベートした。Stop/wash bufferで攪拌・10分間インキュベートし、抗ジゴキシゲニン結合抗体を添加した。PBSで洗浄しペルオキシダーゼ基質で5分間発色させた。蒸留水で洗浄後、メチルグリーンで対比染色した。

von Willebrand Factor(vWF)及びVEGFの免疫染色はDAKO社のプロトコールに従って行った。すなわち、ホルマリン固定後パラフィン包埋し、4  $\mu$ m厚にスライスした膵組織を、脱パラフィンし脱水後、抗原賦活化し3.0%過酸化水素/メタノールでブロッキングした。洗浄後、抗体希釈液でbiotinラベルの一次抗体(rabbit anti-human von Willbrand Factor polyclonal antibody, 1:1000もしくはanti-mouse VEGF antibody, 15  $\mu$ g/ml)を希釈し、12時間インキュベートした。HRP-streptavidinを標識した二次抗体を添加後1時間インキュベートし、diaminobenzidine(DAB)で発色させた。蒸留水で洗浄後、hematoxylinで対比染色した。

### Plasminogen activator 活性の測定

液体窒素固定した膵組織をサンプルバッファー(150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 0.2% sodium azideを含む10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2)中ですり潰し、13,000 rpm・20分間の遠心分離後上清を抽出液とした。これを用いelectrophoretic enzymographyを行いplasminogen activator活性を測定した<sup>17,18</sup>。プロトコールを簡潔に以下に述べる。1.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.8): 3.75 ml, 蒸留水: 5.4 ml, bovine plasminogen-rich fibrinogen: 8 mg, 30% acrylamide+1% bisacrylamide: 5 ml, thrombin (10 NIH u/ml): 81  $\mu$ l, 10% SDS: 150  $\mu$ l, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED): 15  $\mu$ l, 10% ammonium peroxydisul-

fate (APS) : 150  $\mu$ l をよく混ぜて separation gel を作製した。次に、0.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) : 2.06 ml, 30% acrylamide + 1 % bisacrylamide :

1.2 ml, 蒸留水 : 4.78 ml, 10% SDS : 82  $\mu$ l, TEMED : 16.5  $\mu$ l, 10% APS : 55  $\mu$ l をよく混ぜて stacking gel を作製し separation gel に重層した。電気泳動後、ゲルを2.5% Triton X-100 で1時間洗浄し、0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 8.4) で37°C・12時間インキュベートした。ゲルは Coomassie brilliant blue で染色し、7% acetic acid で脱色して、フィブリン溶解域を可視化した。溶解域は Lumino Imaging Analyzer LAS-1000 plus (Toyobo, Osaka, Japan) で測定した。

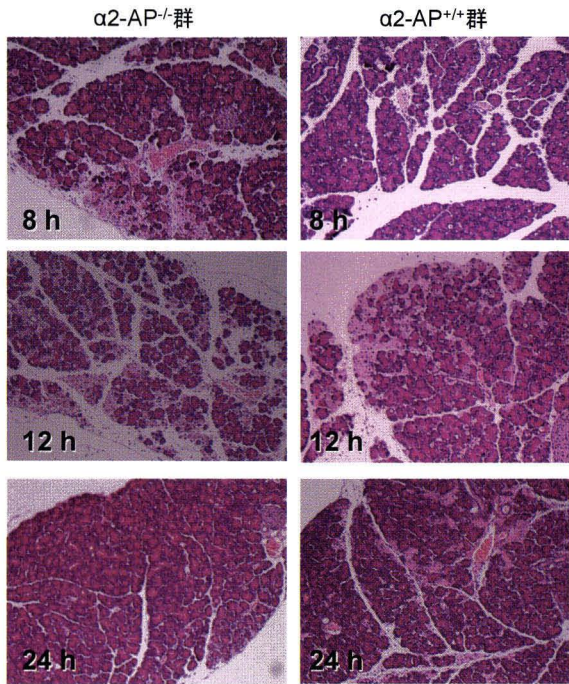


図1  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群および $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群の caerulein 膵炎作成後 8・12・24時間後における膵の HE 像。(HE 染色, 100倍)

抗 Flt-1 抗体投与の効果

$\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群に VEGF 受容体の抗体である抗 Flt-1 抗体 (25  $\mu$ g per body) を全身麻酔下 (sodium pentobarbital を10倍希釈し、0.15 ml を腹腔内投与) に陰茎静脈から注射後、前述した通り caerulein 膵炎を誘導し、24時間後に犠牲死させ、同様の方法で血清アミラーゼ値及び膵腺房細胞の壊死面積割合を測定した。

統計処理

結果は mean  $\pm$  SD 示し、2 群間の比較は

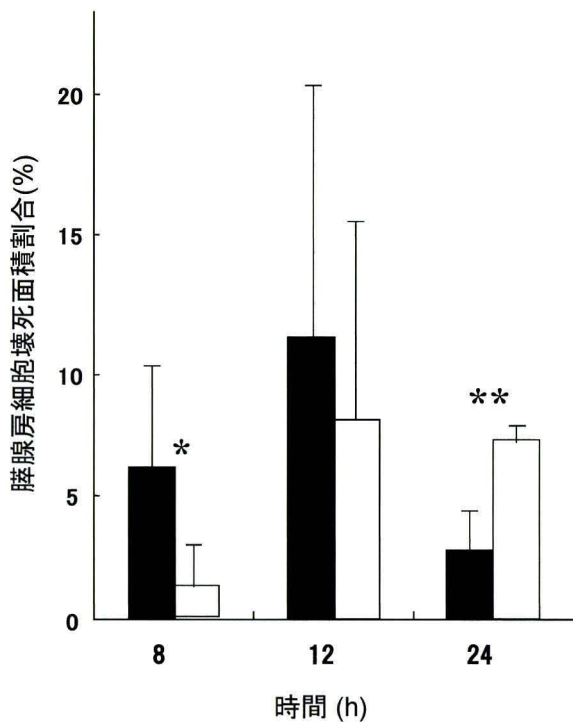


図2  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群および $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群の caerulein 膵炎作成後 8・12・24時間後における膵腺房細胞壊死面積比率。■ :  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> 群, □ :  $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup> 群, (\*p=0.08) (\*\*p<0.001)

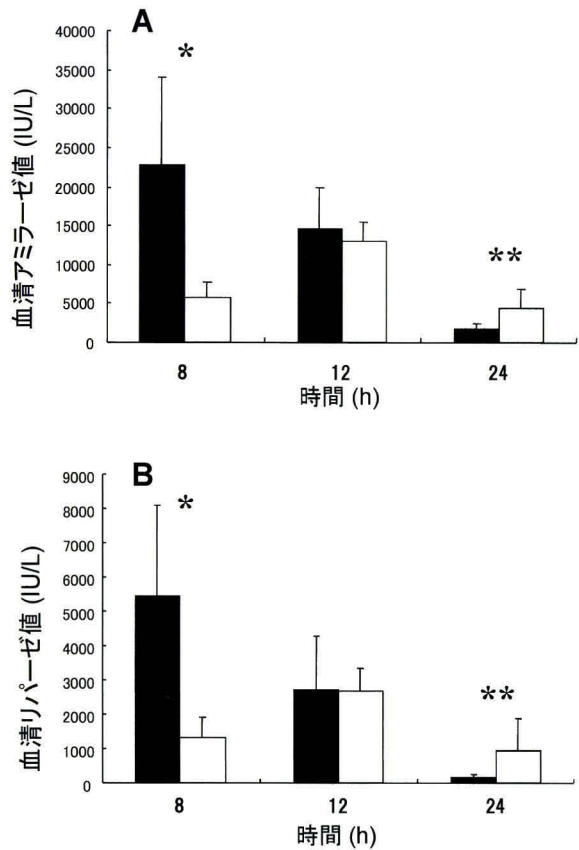


図3  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群および $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群の caerulein 膵炎作成後 8・12・24時間後における血清アミラーゼ値(A), 血清リパーゼ値(B)。■ :  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> 群, □ :  $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup> 群, (\*p<0.001) (\*\*p<0.05)

Student's t test を行った。P<0.05を有意差ありとした。

### 結 果

両群の典型的な膵組織 HE 染色を図 1 に示す。膵腺房細胞壊死の面積割合において、 $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> 群は  $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup> 群に比べ caerulein 膵炎誘導 8 時間後で早く始まる傾向にあったが (p=0.08), 24 時間後で有意に減少していた (p<0.001) (図 2)。

壊死面積の結果を反映するように、 $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> 群では血清アミラーゼ値は, caerulein 膵炎誘導 8 時間後で早くも最高値に達し,  $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup> 群に比べて有意に増加していたが (p<0.001), その後直線的に低下し, 24 時間後では有意に低下していた (p<0.05)。これとは対照的に,  $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup> 群では血清アミラー

ゼ値は 12 時間後で最高値に達した。血清リパーゼ値も, 両群ともに血清アミラーゼ値と同様の経過を示した (図 3)。

TUNEL 染色で検出されるアポトーシスは, 両群とも膵全体に分布し, 壊死部分への偏在は認めなか

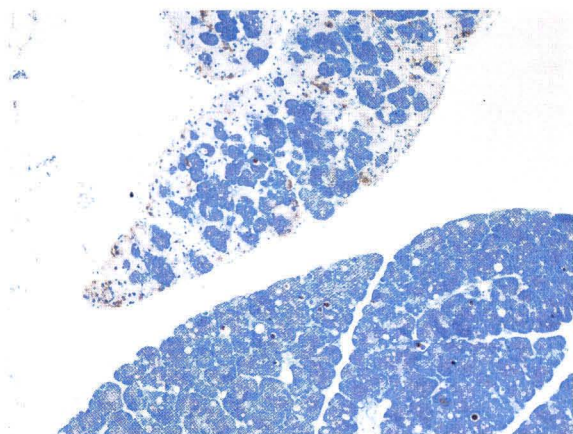


図 4  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> 群における caerulein 膵炎作成後 12 時間後の典型的な TUNEL 染色像。(TUNEL 染色, 100 倍)

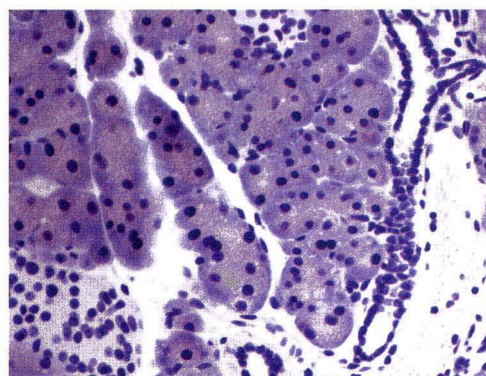
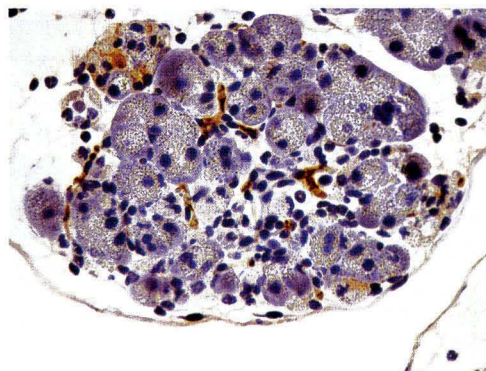


図 5  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> 群および  $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup> 群における caerulein 膵炎作成後 24 時間後の vWF 発現。A:  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> 群, B:  $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup> 群, (200 倍)

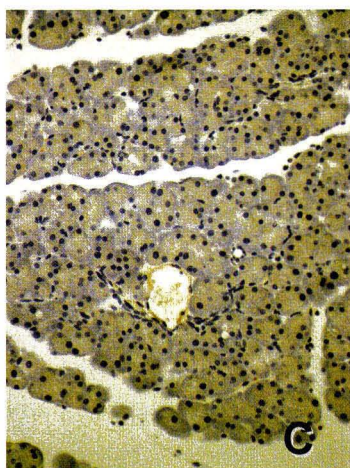
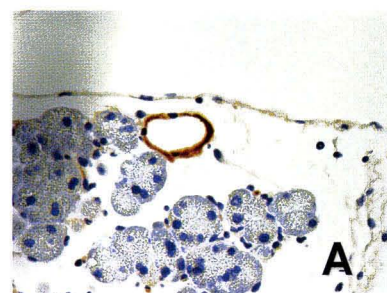


図 6  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> 群および  $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup> 群における caerulein 膵炎作成後 24 時間後の VEGF 発現。A, B:  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup> 群, C:  $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup> 群, (200 倍)

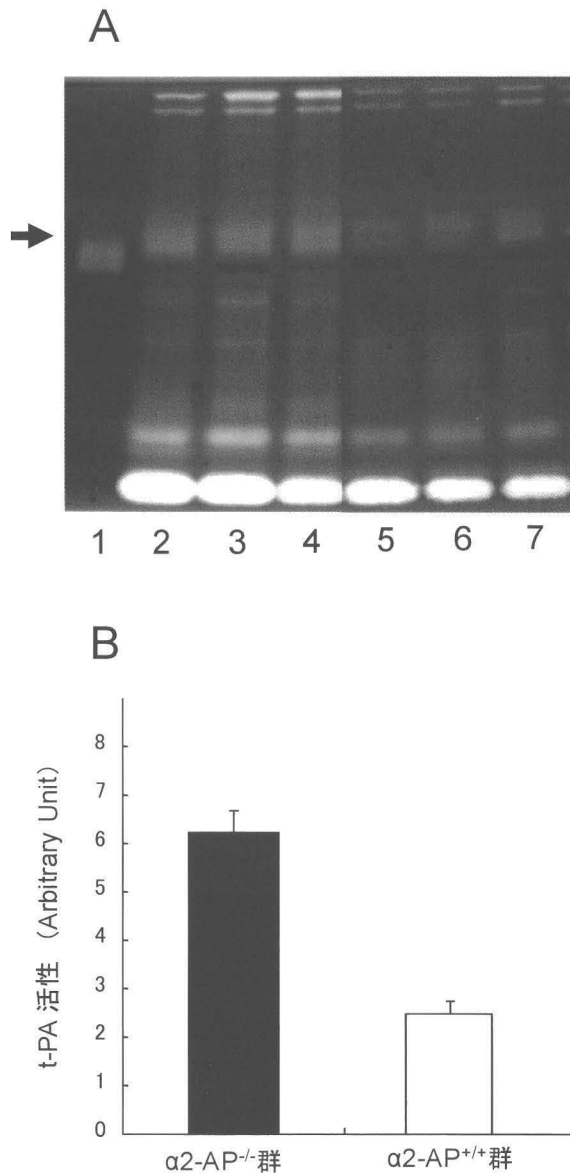


図7  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群および $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群におけるcaerulein膵炎作成後8時間後のplasminogen activator活性. A: electrophoretic enzymography (→: t-PAの部位, 1: t-PA control, 2-4:  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群, 5-7:  $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群), B: t-PA活性 (p<0.001) (t-PA controlはヒト由来)

った(図4).

vWFの免疫染色では, 8時間後および12時間後で両群ともvWFの発現はなかったが, 24時間後の $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群においてのみ小葉内にまでvWFの発現がみられた(図5).

VEGFの免疫染色も同様に, 8時間後および12時間後で両群ともVEGFの発現はなかったが, 24時間後の $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群においてのみ小葉内にまでVEGFの発現がみられた(図6).

plasminogen activator活性はelectrophoretic

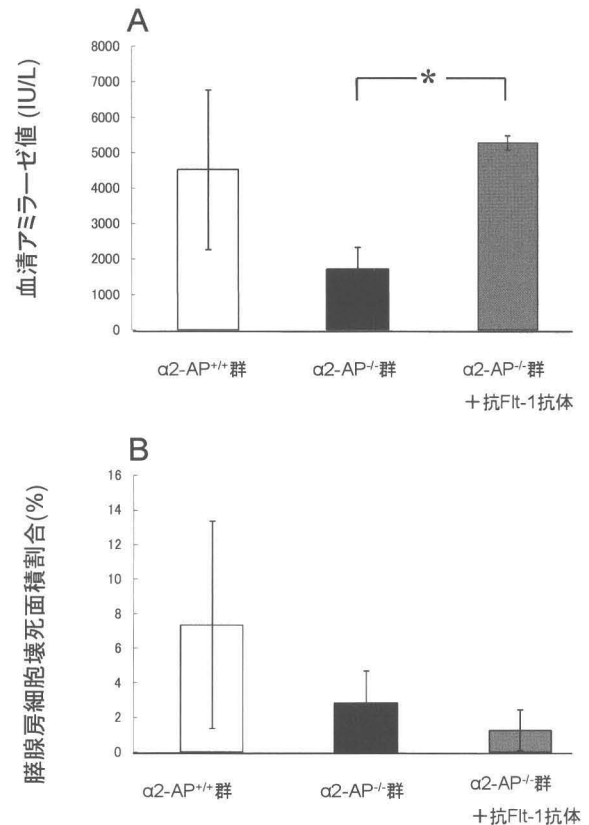


図8  $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群に対する抗Flt-1抗体静脈投与の効果. caerulein膵炎誘導24時間後の(A)血清アミラーゼ値 (\*p<0.001), (B)膵腺房細胞壊死の面積割合

enzymographyで測定し, t-PAを同定した. $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群において, caerulein膵炎誘導8時間後のt-PAは $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群に比べて有意(p<0.001)に増加していた(図7).

$\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群に抗Flt-1抗体を静脈投与したモデルでは, 非投与群に比べ, caerulein膵炎誘導24時間後の血清アミラーゼ値は有意に増加していたが(p<0.001), 膵腺房細胞壊死の面積割合は変化しなかった(図8).

## 考 察

急性膵炎を増悪させる因子の1つとして, 膵炎の発症に伴って早期から起こる微小循環障害が考えられている. 膵における虚血・再灌流障害が活性酸素を産生し, 血管内皮細胞障害, 好中球の誘導・接着が惹起されるとされている<sup>19</sup>. 急性膵炎における血管内皮細胞障害の機序については多くの報告があるが, 血管内皮細胞の修復機序に関する報告はない. 今回の研究で, 我々はマウスのcaerulein急性膵炎において, 膵組織が回復する変化はアポトーシスではなく, また, $\alpha 2$ -AP欠損は膵微小循環障害による血管内皮の修復を促進し, 膵腺房細胞壊死からの再

構築を促進することを示した。以下にこの現象の発現機構につき考察する。

膵腺房細胞壊死の進展と膵酵素の逸脱は、 $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群は $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群に比べ、caerulein 膵炎誘導8時間後で増加していた。プラスミンの活性化は実験急性膵炎だけでなく<sup>20</sup>、ヒトにおける急性膵炎でも報告されている<sup>21</sup>。また、膵組織中のt-PAとu-PAの増加はこの研究の比較モデルであるプラスミン遺伝子欠損マウスのcaerulein膵炎モデルにおいても報告されている<sup>11</sup>。Enzymographyの結果で示したように、膵組織中のt-PAは $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群において8時間後で有意に増加していた。従って、膵炎発症後早期に増加したt-PAによりさらにプラスミンが活性化されると考えられる。t-PA活性が増強した理由は明らかではないが、caeruleinの刺激によりトリプシノーゲンを含む膵酵素の活性化が膵組織で起こり、 $\alpha 2$ -AP欠損により蛋白分解酵素でもあるプラスミンの活性増強が、早期の急性膵炎および膵腺房細胞壊死をさらに促進したと考えられる。

caerulein膵炎誘導12時間後で、 $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群においては血清膵酵素の増加と膵腺房細胞壊死の進展は最高値に達し、対照的に $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群は同時期にすでに低下していた。さらに24時間後では、 $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群は $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群に比べ明らかに血清膵酵素が低下し、膵腺房細胞壊死が減少していた。これらの結果から、 $\alpha 2$ -AP欠損により膵腺房細胞壊死からの修復が促進されたと考えることができる。この現象の理由として、2つの可能性がある。

第一に、caerulein膵炎誘導24時間後の $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群のみに、vWFとVEGFが免疫染色で発現した。vWFは血管内皮細胞障害の有無を、VEGFは血管新生した内皮細胞を検出できることから、VEGFが障害膵のre-endothelializationを促進した可能性がある。Matsunoらは $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>マウスにおける血管内皮細胞障害後の動脈血流は $\alpha 2$ -AP<sup>+/+</sup>群に比べ維持されたままであり、また、持続的に活性化されているプラスミンによる局所VEGFのover-releaseが血管障害後のre-endothelializationを促進すると報告している<sup>15</sup>。また、急性膵炎において血清VEGFは増加し、実験重症急性膵炎でrecombinant VEGFを静脈投与した場合、肝不全・腎不全を改善し、回腸の微小循環を維持することによりバクテリアルトランスロケーションを防ぐことが知られている<sup>22,23</sup>。これらの傍証から、 $\alpha 2$ -AP欠損によりVEGFがさらに活性化されたので、 $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群は膵腺房細胞壊死から早期に回復したと推察できる。

第二に、膵末梢循環における微小血栓の影響を考える必要がある。循環障害や過凝固に起因した微小血栓は、重症急性膵炎における膵の虚血や壊死を引き起こすことが知られているが<sup>24</sup>、 $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群では線溶現象が亢進しており、微小血栓が形成され難く、膵虚血が減弱した可能性がある。

今回の研究で、VEGF受容体を阻害することにより膵腺房細胞壊死の回復が抑制されるかどうかの検証を、caerulein膵炎誘導24時間後の $\alpha 2$ -AP<sup>-/-</sup>群で行った。VEGF受容体を阻害すると、血清アミラーゼ値は増加したが膵腺房細胞壊死には影響がなかった。急性膵炎における膵腺房細胞障害過程では、膵腺房細胞からの酵素逸脱が膵腺房細胞壊死に先行すると考えられる。VEGF受容体の阻害では、壊死部分以外の膵腺房細胞障害を助長し、酵素逸脱は促進するものの、壊死範囲の拡大にまでは至らなかったものと考えられる。壊死範囲の拡大のためには、VEGF受容体を阻害するだけでなく、プラスミン活性そのものをも阻害することが必要であった可能性もある。

Yamanelらは、凝固系を阻害し線溶系を促進することで知られている活性化protein Cは急性壊死性膵炎において、膵組織の重症度、炎症度合い、血清炎症マーカーを改善したと報告しているが<sup>10</sup>、これは、線溶系は急性膵炎における組織学的変化を回復するという仮定を支持するものである。一方、現在日本ではgabexate mesilateのような蛋白分解酵素阻害薬が臨床使用され、急性膵炎の予後を改善するとされている<sup>24</sup>。また、同様の蛋白分解酵素阻害薬であるnafamostat mesilateや抗菌薬の膵局所動注療法は感染性膵壊死の進展を防ぎ、壊死性膵炎の臨床予後を改善すると報告されている<sup>25,26</sup>。蛋白分解酵素阻害薬はアンチプラスミン活性を含めたanti-protease活性に対し幅広いスペクトラムを持っていることを考慮すると、急性膵炎の初期治療としての抗凝固療法の可能性を示唆する結果と考えられた。

今回の検討により、 $\alpha 2$ -AP遺伝子欠損マウスにおけるcaerulein急性膵炎で、プラスミンの活性化は、VEGFを介してre-endothelializationを促進し組織修復に寄与すると示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導・後校閲をいただいた大柳治正教授および松尾理教授に深甚なる謝意を表しますとともに、終始直接ご指導とご助言をいただいた岡田清孝講師、ならびにご協力いただいた外科学教室、第2生理学教室の各位に心から感謝いたします。

## 文 献

1. Radenkovic D, Bajec D, Karamarkovic A, Stefanovic B, Milic N, Ignjatovic S, Gregoric P, Milicevic M (2004) Disorders of hemostasis during the surgical management of severe necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 29: 152-156
2. Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B (1996) Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats. *Dig Dis Sci* 41: 823-830
3. Cuthbertson CM, Christophi C (2006) Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg* 93: 518-530
4. Carmeliet P, Collen D (1995) Gene targeting and gene transfer studies of the plasminogen/plasmin system: implications in thrombosis, hemostasis, neointima formation, and atherosclerosis. *Faseb J* 9: 934-938
5. Carmeliet P, Collen D (1996) Gene manipulation and transfer of the plasminogen and coagulation system in mice. *Semin Thromb Hemost* 22: 525-542
6. Praus M, Wauterickx K, Collen D, Gerard RD (1999) Reduction of tumor cell migration and metastasis by adenoviral gene transfer of plasminogen activator inhibitors. *Gene Ther* 6: 227-236
7. Plow EF, Hoover-Plow J (2004) The functions of plasminogen in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 14: 180-186
8. Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ (2000) Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res* 60: 5839-5847
9. Pepper MS (2001) Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1104-1117
10. Yamanel L, Mas MR, Comert B, Isik AT, Aydin S, Mas N, Devci S, Ozyurt M, Tasci I, Unal T (2005) The effect of activated protein C on experimental acute necrotizing pancreatitis. *Crit Care* 9: 184-190
11. Lugea A, Nan L, French SW, Bezerra JA, Gukovskaya AS, Pandol SJ (2006) Pancreas recovery following cerulein-induced pancreatitis is impaired in plasminogen-deficient mice. *Gastroenterology* 131: 885-899
12. Lijnen HR, Okada K, Matsuo O, Collen D, Dewerchin M (1999) Alpha2-antiplasmin gene deficiency in mice is associated with enhanced fibrinolytic potential without overt bleeding. *Blood* 93: 2274-2281
13. Park JE, Keller GA, Ferrara N (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4: 1317-1326
14. Kanno Y, Hirade A, Ishisaki A, Nakajima K, Suga H, Into T, Matsushita K, Okada K, Matsuo O, Matsuno H (2006) Lack of alpha2-antiplasmin improves cutaneous wound healing via over-released vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in wound lesions. *J Thromb Haemost* 4: 1602-1610
15. Matsuno H, Ishisaki A, Nakajima K, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Kozawa O (2003) Lack of alpha2-antiplasmin promotes re-endothelialization via over-release of VEGF after vascular injury in mice. *Blood* 102: 3621-3628
16. Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH (1985) Cerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology* 88: 1192-1204
17. Matsuo O, Bando H, Okada K, Nakajima S, Takagi O, Izaki S, Sakai S (1986) Plasminogen activator in bronchoalveolar fluid. *Haemostasis* 16: 43-50
18. Matsumoto H, Ueshima S, Fukao H, Mitsui Y, Matsuo O (1996) Effects of lipopolysaccharide on the expression of fibrinolytic factors in an established cell line from human endothelial cells. *Life Sci* 59: 85-96
19. Kusterer K, Poschmann T, Friedemann A, Enghofer M, Zandler S, Usadel KH (1993) Arterial constriction, ischemia-reperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis. *Am J Physiol* 265: G165-171
20. Kruse P, Lasson A, Hage E (1999) Proteases and protease inhibitors in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* 85: 294-300
21. Segal I, Chaloner C, Douglas J, John KD, Zaidi A, Cotter L, Appelros S, Borgstrom A, Braganza JM (2002) Acute pancreatitis in Soweto, South Africa: relationship between trypsinogen load, trypsinogen activation, and fibrinolysis. *Am J Gastroenterol* 97: 883-889
22. Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Matsumura N, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y (2006) Vascular endothelial growth factor increases in serum and protects against the organ injuries in severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 134: 223-230
23. Nakajima T, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Sawa H, Kuroda Y (2007) Protective effects of vascular endothelial growth factor on intestinal epithelial apoptosis and bacterial translocation in experimental severe acute pancreatitis. *Pancreas* 34: 410-416
24. Chen HM, Chen JC, Hwang TL, Jan YY, Chen MF (2000) Prospective and randomized study of gabexate mesilate for the treatment of severe acute pancreatitis with organ dysfunction. *Hepatogastroenterology* 47: 1147-1150
25. Takeda K, Matsuno S, Sunamura M, Kakugawa Y (1996) Continuous regional arterial infusion of protease inhibitor and antibiotics in acute necrotizing pancreatitis. *Am J Surg* 171: 394-398
26. Takeda K, Yamauchi J, Shibuya K, Sunamura M, Mikami Y, Matsuno S (2001) Benefit of continuous regional arterial infusion of protease inhibitor and antibiotic in the management of acute necrotizing pancreatitis. *Pancreatol* 1: 668-673