

## 第101回 日本眼科学会総会 特別講演II

## 眼内血管新生

猪俣 孟

九州大学医学部眼科学教室

## 共同研究者

石橋 達朗, 村田 敏規, 岩崎 雅行<sup>1)</sup>, 田原 昭彦<sup>2)</sup>, 畑 快右, 吉田 綾子  
 吉田 茂生, 大西 克尚<sup>2)</sup>, 村上 雅一, 山本 正洋, 久保田敏昭, 川野 庸一  
 菅井 滋, 坂本 泰二, 岡田 豊和, 石本 聖一, 藤澤 公彦, 本多 貴一  
 坂本 真紀, 重藤真理子, 辻 勇夫, 西岡木綿子, 上野 暁史, 大原 進  
 中村多賀雄, 栗原かすみ, 鬼木 隆夫, 吉川 洋, 園田 康平, 廣石 悟朗  
 山中 一郎, 本多 薫, 中村 隆彦, 吉武 良浩, 大島 裕司, 竹ノ内弘昌  
 田原 義久, 中村 武彦, 本田 祐恵, Ahmad K Khalil, 川崎 貴子  
 張 旭, 永富 由佳

<sup>1)</sup>福岡大学理学部生物学教室<sup>2)</sup>和歌山県立医科大学眼科学教室

## 要 約

眼内血管新生の機序を明らかにする目的で、低酸素刺激で誘導される代表的なサイトカイン vascular endothelial growth factor (VEGF) と interleukin-8 (IL-8) が眼内でどのように発現し、眼内血管新生にどのように関与しているのかについて検討した。眼内血管の消長を直接演じているのは血管内皮細胞であるが、それを制御しているのは周囲の環境である。すなわち、血管周皮細胞、網膜グリア細胞、神経節細胞、毛様体上皮細胞などが低酸素状態をいち早く認識して、VEGF や IL-8 などのサイトカインを発現し、それがパラクライン的に血管内皮細胞に働いて内皮細胞の増殖を促す。その場合、VEGF messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現には転写

因子 activator protein-1 (AP-1) の活性化が関係し、IL-8 mRNA の発現には転写因子 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) の活性化が関係する。しかし、VEGF や IL-8 の発現は眼内血管新生機序の一面を示したに過ぎない。今後血管新生の機構がさらに解明され、臨床的に眼内血管新生の抑制または治療が可能になることを期待する。(日眼会誌 101: 906-926, 1997)

キーワード: 血管新生, Vascular endothelial growth factor (VEGF), Interleukin-8 (IL-8), Activator protein-1 (AP-1), Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)

## Intraocular Neovascularization

Hajime Inomata

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University

## Abstract

To investigate the mechanism of intraocular neovascularization, we studied how vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) are expressed in the ocular tissues under hypoxic

conditions. Prior to proliferation of vascular endothelial cells resulting in neovascularization, the retinal tissues such as pericytes, retinal glial cells, ganglion cells, and ciliary epithelium react directly

別刷請求先: 812-82 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 九州大学医学部眼科学教室 猪俣 孟

(平成9年8月4日受付, 平成9年8月7日受理)

Reprint requests to: Hajime Inomata, M.D., Ph.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka-ken 812-82, Japan

(Received August 4, 1997 and accepted August 7, 1997)

to hypoxia expressing VEGF and/or IL-8 and stimulate endothelial cell proliferation in a paracrine manner. We demonstrated that transcription factor activator protein-1 (AP-1) is activated for expression of VEGF messenger ribonucleic acid (mRNA) and in a similar way nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) is activated for expression of IL-8 mRNA. However, hypoxia-induced expression of VEGF and/or IL-8 is only one aspect of the complicated processes in intraocular neovascularization. We hope that

further detailed analysis of the mechanism will make it possible to inhibit and treat clinically intraocular neovascularization in the near future. (J Jpn Ophthalmol Soc 101 : 906—926, 1997)

**Key words:** Neovascularization, Vascular endothelial growth factor (VEGF), Interleukin-8 (IL-8), Activator protein-1 (AP-1), Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)

## I 緒 言

眼球の組織構築で最も重要な特徴は組織の透明性であり、その透明性を損なう代表的な病変が血管新生である。視覚器としての眼球内に血管新生が生じた場合、それによる視機能障害の重篤さと治療の困難さについては周知のことである。

眼球は光受容組織である網膜の機能が最も能率良く発揮できるように構築されている。網膜、毛様体上皮、虹彩上皮および水晶体の基本構造は、いずれも2層の上皮性細胞が互いに細胞の先端部を向かい合わせた状態で並んでいる。その外側が上皮細胞の基板で境された結合組織である<sup>1)</sup>(図1)。角膜の表面は上皮細胞で覆われているが、その基板から深層の角膜実質、内皮細胞、前房、虹彩実質まではいずれも結合組織である。結合組織である眼房(前房と後房)や硝子体に血管が存在せず、透明に維持されていることが眼球構築のきわだった特徴のひとつ

である。眼球は胎生期では水晶体の周囲に水晶体血管膜が存在し、硝子体内に硝子体血管が存在するが(図2)、胎生期の終期近くになると、光の通路になる眼房および硝子体から血管が退縮消失する。このように、正常状態では眼内組織の血管の消長を制御し、透明性を維持する重要な機構、つまり眼内に血管新生を抑制する因子が働いている。

ところが、眼内に病変が起これば、再び眼内に血管が新生されやすい。眼内血管新生は、糖尿病網膜症、網膜中心静脈閉塞症、未熟児網膜症、あるいは内頸動脈狭窄による眼虚血症候群などのように、眼組織の虚血または低酸素によって誘導されることが多い。原因の如何にかかわらず、眼内に血管新生が起こった場合には、新生血管は網膜内や虹彩実質内にとどまらず、網膜内から網膜面へ、さらに硝子体内へ、同様に虹彩実質内から虹彩面上へ、さらに前房内へと伸展する。これは前房や硝子体がかつて胎生期に血管が存在した結合組織であることに基因してい

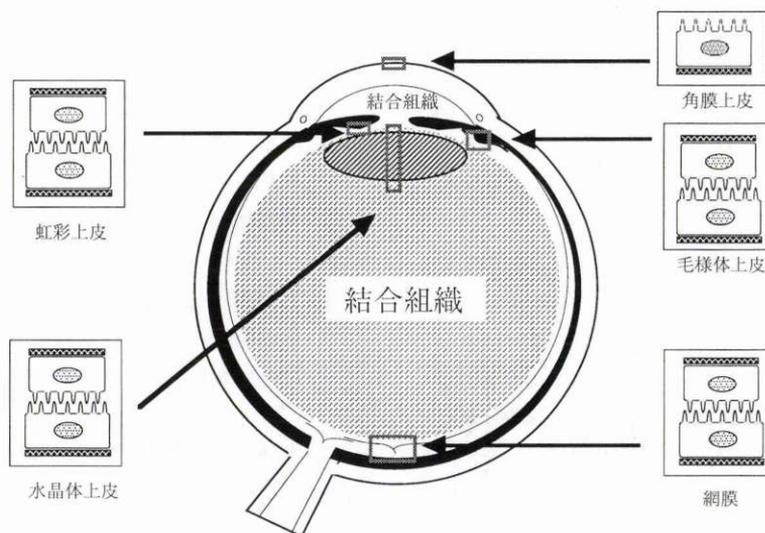


図1 眼球の基本構造。

眼球は、発生学的に、細胞の先端を向かい合わせた2層の上皮性の神経外胚葉に由来する細胞から成る網膜と、その延長である毛様体上皮細胞層、虹彩上皮細胞層を主体にした構造を持つ。その周囲はすべて結合組織である。角膜は表層外胚葉由来の上皮細胞で覆われ、それより深層はすべて結合組織である。このように、硝子体も前房も上皮細胞の基板で取り囲まれた結合組織である。表層外胚葉由来の2層の上皮細胞から成る水晶体は眼球の大きな結合組織の中に陥入したものである。しかも、眼球は角膜実質、前房、硝子体という結合組織に血管が存在せずに透明に維持されているというきわめて特異な構造である。

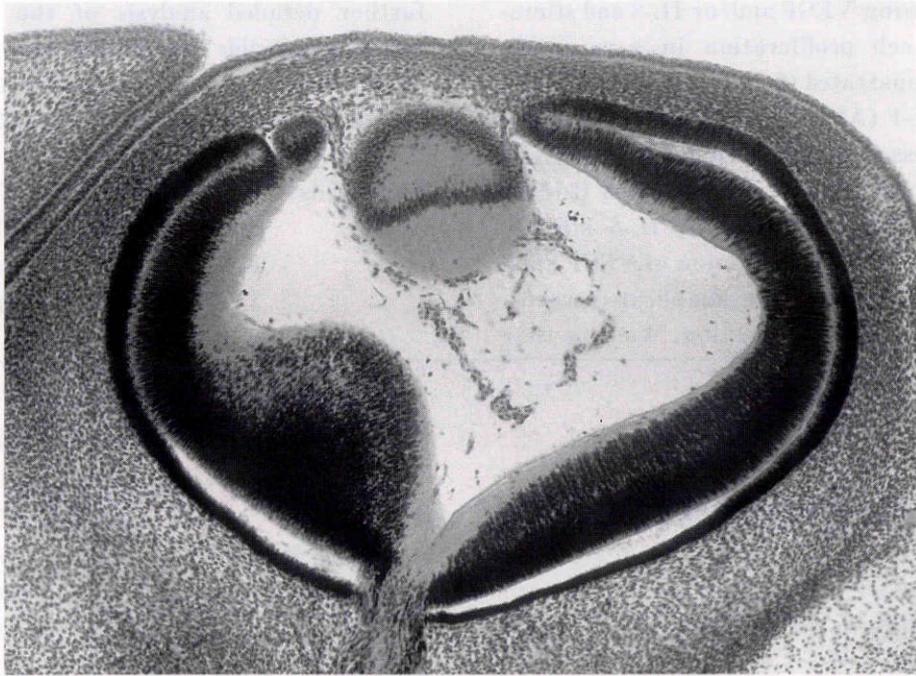


図2 2か月胎児眼球断面の光学顕微鏡写真.

胎生期には、前房には前部水晶体血管膜が、また硝子体内には後部水晶体血管膜および硝子体血管が存在し、前房や硝子体という結合組織に血管が存在している。これらの結合組織内の血管が出生近くになると消退する。その場合に、血管の存在を抑制する何らかの情報が発信されていることが推測される。また種々の疾患で、眼内血管新生を生じる場合には、血管は硝子体内あるいは虹彩表面に進展しやすいこともこの図は示唆している。ヘマトキシリン・エオジン染色，×100

る。

血管新生は血管内皮細胞の増殖によるものであるので、直接に眼内血管の消長を演じているのは血管内皮細胞に他ならない。しかし血管内皮細胞の動きを左右しているのは、生理学的にも病理学的にも、血管内皮細胞を取り囲む周囲の環境である。周囲の細胞が血管内皮細胞の増殖またはその抑制に関する情報を発信して、血管新生を制御している。それ故に、血管の周皮細胞も含めて、血管内皮細胞を取り巻く周囲の眼組織構成要素が血管内皮細胞にどのように働いているかを明らかにすることは眼内血管新生の機序を知る上で極めて大切である。

眼内血管新生は組織の低酸素が引き金になり、それによって誘導される代表的なサイトカイン vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) (以下、VEGF と略記) や interleukin-8 (IL-8) の発現がその主因の一つになっている。網膜血管内皮細胞も VEGF を産生し、オートクライン的に血管内皮細胞を刺激するが<sup>2)</sup>、それだけでなく、同時に周皮細胞や網膜グリア細胞からのサイトカインがパラクライン的に働いて血管内皮細胞の増殖を制御する。どちらかといえば、血管内皮細胞を取り巻く周囲の細胞からのパラクライン的な働きの方がより重要である。

そこで本論文では、眼内組織の低酸素刺激によって眼内組織構成細胞に VEGF や IL-8 がどのように発現し、それらが血管内皮細胞の増殖、すなわち血管新生にどの

ように関与しているかについて記す。

まず、「眼内血管新生研究の概要」について下記の事項を記す。

1. 眼内血管の発生と血管新生制御因子
2. 網膜の低酸素刺激による眼内血管新生
3. 血管新生制御因子
4. 新生血管の形成過程

次に、「低酸素刺激によって生じる眼内血管新生と VEGF または IL-8 の関与」に関する我々の研究として、下記の事項について記す。

1. 網膜血管発生と網膜組織構成細胞における VEGF 発現との関係
2. 成人網膜の組織構築と血管構築の関係
3. 前眼部虚血による前眼部血管新生と VEGF の発現
4. 低酸素刺激状態での周皮細胞における VEGF の発現
5. 低酸素刺激状態での網膜グリア細胞における VEGF の発現
6. 低酸素刺激状態の網膜グリア細胞における転写因子 activator protein-1 (AP-1) の活性化を介する VEGF messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現
7. 低酸素刺激状態の網膜グリア細胞における転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) の活性化を介する IL-8 mRNA の発現
8. 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液中の IL-8 の濃度

## II 眼内血管新生研究の概要

### 1. 眼内血管の発生と血管新生制御因子

網膜組織内に血管新生を制御する因子が存在することを最初に予測したのは Michaelson<sup>3)</sup>である。Michaelson は墨汁注入法でヒト胎児の網膜血管の発生を検討し、下記の点を明らかにした。胎生期に硝子体動脈から伸びる芽が乳頭近くの神経線維層に現れ、これに管腔ができて網膜動脈となり、網膜動脈が分枝して細動脈ができる。同じような発芽が網膜中心静脈から起こり、毛細血管ができる。つまり網膜血管は、動脈およびその分枝の細動脈から成る動脈系と、静脈およびその分枝の毛細血管から成る静脈系の2つの系統から成っている。動脈と静脈は網膜の周辺部へと伸び、胎生8か月で鋸状縁に達して網膜血管網が完成する。次に、毛細血管は神経線維層から網膜深層に広がる。この場合も毛細血管は静脈から生じ、細動脈は動脈から生じる。網膜深層では、内顆粒層の外側まで毛細血管が到達し、それより視細胞側には進入しない。静脈から毛細血管が分枝する場合、静脈が動脈の近くにあるときには、毛細血管は動脈の反対側へ伸びる。静脈が動脈と交叉する場合には、動脈を十分に越えた所で、静脈から毛細血管が生じる。動脈の周囲には約120 $\mu$ m幅の無血管域 capillary-free zone ができる。これらの事実は、動脈には毛細血管の発育を抑制する働きがあるため、網膜内には新生血管形成を刺激する物質、すなわち血管新生制御因子が存在することを示唆する。しかも血管新生を制御する物質は血管内にあるのではなく、網膜内に存在する。網膜内の環境によって血管の発生が制御され、動脈周囲の無血管域、鋸状縁の無血管域、中心窩の無血管域、網膜外層の無血管域ができる。

要するに、網膜には血管新生を制御する因子が存在すること、網膜の血管構築は網膜の組織代謝と関係すること、胎生期における血管の発育過程は糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症などの各種病態の血管新生機序の解明に役立つものであることを明記した Michaelson のこの論文は現在からちょうど半世紀も前に発表された。これは眼内血管新生の機序解明への端緒となった素晴らしい業績であり、特筆に値する。

### 2. 網膜の低酸素刺激による眼内血管新生

眼疾患における眼内血管新生の機序についての研究は、未熟児網膜症の発症機序に関する実験的な研究が最初である。網膜血管がまだ十分に発育していない仔猫に高濃度の酸素を与えると、網膜血管が収縮または閉塞する。次いで、網膜血管の閉塞部またはその付近から硝子体内に新生血管が生じる。Ashton ら<sup>4)~7)</sup>はこの実験から網膜が低酸素状態になると何らかの血管新生因子が出現することを推定した。Wise<sup>8)</sup>は未知の血管新生因子を factor x と名付けた。虹彩ルベオースや網膜前新生血管を伴った網膜中心静脈閉塞症では、網膜毛細血管が広範

困にわたって閉塞し、低酸素または虚血が起こっていることが後に蛍光眼底検査で明らかにされ、Ashton<sup>4)</sup>の予測が実証された。さらにまた虹彩ルベオースでも、網膜の虚血部位から血管新生を刺激する物質が出て、虹彩や隅角に血管新生が生じることが示唆された。

### 3. 血管新生制御因子

血管新生の機序と抑制に関する研究は腫瘍学の立場からも積極的に進められた。その理由は腫瘍が増大する場合に血管新生を伴うからである。血管新生を抑制することによって腫瘍の進行を防止できないかと考えられた。腫瘍をはじめ、糖尿病網膜症など血管新生によって病変が憎悪する疾患を血管新生病 (angiogenic diseases) とも呼ぶ<sup>9)10)</sup>。角膜は透明組織で、しかもその新生血管を臨床的に観察し、評価することが容易であるので、血管新生の研究の場としてしばしば用いられる。Ausprunk<sup>11)</sup>は家兎の角膜に腫瘍を移植して、角膜輪部から角膜内への血管新生を調べた。腫瘍を移植すると角膜輪部の血管内皮細胞に<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みがみられること、内皮細胞から発芽が起こり、内皮細胞の移動が起こることを観察した。Federman<sup>12)</sup>は正常家兎の網膜、脈絡膜、虹彩を反対眼の角膜実質に移植したところ、角膜輪部結膜血管が角膜内に進入して移植片の血管と癒合した。このことから、虚血網膜だけでなく正常眼組織にも血管新生因子が存在することが明らかになった。Folkman<sup>13)</sup>は腫瘍抽出液を加えて毛細血管内皮細胞を培養し、内皮細胞の毛細血管様構造の管形成 (tube formation) を観察した。1990年代に入り、眼内血管新生に関係する細胞成長因子 (またはサイトカイン) として、insulin-like growth factor-I (IGF-I), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), VEGF, IL-8 などが同定された。

VEGF は下垂体の濾胞細胞から分泌され、血管内皮細胞と親和性のある新しい heparin-binding growth factors (HBGFs) のひとつとして発見された<sup>14)</sup>。この物質は血管内皮細胞を増殖させるが、他のサイトカインと異なって、水晶体上皮細胞、角膜内皮細胞、角膜実質細胞、線維芽細胞などに対しては増殖作用がない。Leung<sup>15)</sup>はこれを vascular endothelial growth factor と名付けた。VEGF は血小板由来成長因子群 platelet-derived growth factor (PDGF) family のひとつである<sup>16)</sup>。VEGF の受容体が *in situ* hybridization<sup>17)</sup> や放射性同位元素を用いた研究<sup>18)</sup> で血管内皮細胞にあることが明らかにされた。VEGF は虚血によって誘導される血管新生に関係し<sup>19)</sup>、低酸素状態が VEGF mRNA の発現を高めることもわかってきた<sup>20)</sup>。上記の研究とは全く別に、Senger<sup>21)</sup>は腫瘍細胞が血管透過性を高めて腹水の貯留を促進する物質 vascular permeability factor (VPF) を分泌することを報告した。Keck<sup>22)</sup>は VPF が血管透過性を亢進させるだけではなく、PDGF に類似した血管内皮細胞増殖因子

であることを報告した。さらに、VEGF の complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) の塩基配列<sup>15)</sup>と VPF の cDNA の塩基配列<sup>22)</sup>が同じものであることがわかり、この物質は、現在では一括して vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor と呼ばれている。VEGF/VPF (略して VEGF) は網膜動脈の平滑筋細胞、毛細血管内皮細胞、毛細血管周皮細胞、網膜グリア細胞に発現する。

血管新生を促進する VEGF などの血管新生促進因子は正常眼球にも存在するが、正常状態で眼内に血管新生が起らないのは血管新生抑制因子が存在するためである。生理的に、網膜色素上皮細胞<sup>23)</sup>や硝子体内<sup>24)</sup>に血管新生を抑制する物質が存在し、しかも血管新生抑制因子が血管新生促進因子よりも優位の状態にある。さらに網膜毛細血管では、周皮細胞が内皮細胞と接触を保つことによって活性化された TGF- $\beta$  が作用して、内皮細胞の増殖を抑制している<sup>25)</sup>。ところが、サル網膜血管を光凝固で閉塞させて実験的網膜静脈閉塞症を起こさせて網膜を虚血状態にすると<sup>26)27)</sup>、網膜内に VEGF が増加し、眼内血管新生が起こる<sup>28)</sup>。また、増殖糖尿病網膜症や網膜中心静脈閉塞症で眼内血管新生が活発な場合では、網膜内における VEGF の産生が亢進する<sup>29)</sup>。実験的にはサルの硝子体内に VEGF を注入することによって糖尿病網膜症やその他の血管新生を伴う増殖性網膜症と類似の病変も作ることできる<sup>30)</sup>。

一方、IL-8 は単球、マクロファージ、血管内皮細胞によって産生され、血管内皮細胞に対して走化活性を持ち血管新生を促す。IL-8 は 1987 年にヒト末梢血の単球をリポ多糖で刺激した培養上清から、好中球に対して走化活性を有するポリペプチドが精製され<sup>31)</sup>、その cDNA がクローニングされた<sup>32)</sup>。IL-8 によって実験的に角膜に血管新生を起こすことも証明された<sup>33)34)</sup>。さらに、IL-8 が多くの増殖糖尿病網膜症患者や増殖性硝子体網膜症患者の硝子体液中に認められ、IL-8 は増殖糖尿病網膜症や増殖性硝子体網膜症の病因に関係していることも示された<sup>35)</sup>。

#### 4. 新生血管の形成過程

血管新生は次の 4 つの過程を経て形成される<sup>36)</sup>。すなわち、基底膜の崩壊、内皮細胞の遊走、内皮細胞の増殖、血管腔および血管網形成である。内皮細胞の形態変化と基底膜の形態変化が血管新生の初期変化である。内皮細胞の肥厚部位から細胞突起が現れて発芽し、基底膜が断裂する。これはサイトカインが基底膜の主要構成要素である IV 型および V 型コラーゲンを破壊するためである。サイトカインによって内皮細胞がプロテアーゼを産生して基底膜を消化し<sup>37)</sup>、血管内皮細胞が基底膜を破って、周囲の組織への進入に必要な蛋白消化を促す。基底膜と周囲の組織が破壊されると、それに引き続いて内皮細胞が血管壁から遊走する。細胞成長因子が毛細血管内皮細胞を静止状態の丸い形から活動性の紡錘形に変形させ、細

胞の遊走を促す。血管新生に際して、新生血管の先端から少し離れた後方にある新生血管の根元で、内皮細胞の分裂増殖像がみられる<sup>11)</sup>。細胞増殖は血管の基底膜が蛋白分解作用を受け、それによって内皮細胞が血管外に移動して細胞間結合が緩慢になったときに起こる。内腔形成は個々の内皮細胞内における自己融解による空胞形成が最初である<sup>13)38)</sup>。これらの空胞が融合して血管腔として連続する。また発芽した血管内皮細胞は、はじめは内腔を持たない紐状の細胞集塊を形成するが、細胞集塊の細胞間隙が開くことによって内腔が形成される<sup>39)</sup>。できて間もない新生血管は内皮細胞相互間の接着構造が脆弱で、血管内の血液成分が血管外へ漏出しやすい。増殖糖尿病網膜症などでは硝子体出血が起こりやすい所以である。

周皮細胞は内皮細胞の増殖を抑制して血管新生の広がりを制限するのに役立っている。周皮細胞は多量のフィブロネクチンやプロテオグリカンを産生する。これらの基質が内皮細胞の運動を制限し、内皮細胞の癒着を促進して、内皮細胞の血管形成を調整する。また、脳や網膜の毛細血管形成には血管周囲のグリア細胞、特にアストロサイトの働きが重要である<sup>40)</sup>。

### III 低酸素刺激によって生じる眼内血管新生と VEGF または IL-8 の関与

#### 1. 眼内血管の発生と VEGF の発現

血管新生 (neovascularization または angiogenesis) には、広義と狭義の 2 通りがある。広義の血管新生は血管発生 (vasculogenesis) と狭義の血管新生 (angiogenesis) を含む。血管発生は血管内皮細胞の前駆細胞である血管芽細胞 (angioblasts) の分化によって全く新しく血管ができるもので、胎生期の血管の初期発生がこれに相当する<sup>41)</sup>。これに対して、狭義の血管新生は既存の血管から内皮細胞の発芽によって血管が形成されるもので、胎生期の既存の血管からの血管新生や腫瘍内の血管新生および糖尿病網膜症などに際して出現する病的眼内新生血管がこれに相当する。一般に、特にことわらずに血管新生という言葉を用いた場合には、狭義の血管新生を意味する。

胎生期から新生児にかけての網膜血管の発育には、血管発生 (vasculogenesis) と狭義の血管新生 (angiogenesis) の両者が関係する<sup>42)</sup>。網膜血管発生では、まず網膜内層に間葉系細胞由来の紡錘形前駆細胞 (spindle precursor cells) が出現し、それが毛細血管様の網目を形成し、その網目から太い血管と毛細血管が分化する。これらの新しい血管は視神経乳頭から出現して網膜周辺部へと広がる。その他に、既存の血管から毛細血管の太さのものが発芽して新たな血管が形成される過程もある<sup>43)</sup>。網膜の血管発生に際して、Michaelson<sup>3)</sup>がその存在を予測した血管新生を制御する因子のひとつに VEGF がある。そこで、我々はラット新生仔ラット網膜の血管発生と VEGF 発現との関係を免疫組織化学的に検討した<sup>44)</sup>。

ラット網膜では、出生後に血管が発育するので、網膜血管発生の研究に都合が良い。

なお、本論文に記載した我々の研究では、動物実験は九州大学医学部実験動物取扱規定を遵守して行ったものであり、人体材料を用いた研究は患者および家族に説明し、同意を得て行ったものである。

出生直後の Wistar-King A ラットの生後 3, 7, 14, 30 日目に眼球を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで固定して、組織学的に検討した。全身麻酔下にラットの左心室に墨汁を注入した後に、屠殺して眼球を摘出した。血管発生の免疫組織化学的研究には、von Willebrand 因子に対する抗体を用い、avidin-biotin complex method<sup>(45)</sup>で検索して、内皮細胞の指標とした。VEGF 蛋白の免疫組織化学的検索には、ヒト VEGF に対する家兎抗 VEGF IgG を用いた。In situ hybridization には、ヒト悪性グリオーマ cell line mRNA から得たヒト VEGF<sub>165</sub> cDNA probe を用いた。グリア細胞の同定には glial fibrillary acidic protein (GFAP) を、網膜血管内皮細胞の同定には von Willebrand 因子を用いた。

成獣ラット網膜血管は、主として神経節細胞層に分布する内層血管網と内顆粒層外側に分布する外層血管網の2層から成っている。生後 3 日目では、内層血管網が後極部網膜にすでに形成されているが、まだ周辺部網膜まで

は達していなかった。生後 7 日目になると、網膜血管は内層血管網も外層血管網も周辺部網膜まで到達していた。生後 14 日目では、内層血管網はほぼ完成し、外層血管網では血管の数がまだ増加しつつあった。生後 30 日目では、内層血管網も外層血管網もいずれもほぼ完成されていた(図 3)。生後 3 日目では、VEGF 蛋白は神経節細胞層と内顆粒層のミュラー細胞に発現していた。VEGF mRNA は神経節細胞に極めて強く発現していた。生後 7 日目では、VEGF 蛋白は網膜内層の血管芽細胞、神経節細胞層および内顆粒層のミュラー細胞に発現していた。VEGF mRNA は神経節細胞とミュラー細胞に強く発現していた(図 4)。生後 14 日目では、VEGF 蛋白の発現は減少し、神経節細胞層および内顆粒層のミュラー細胞にみられた。VEGF mRNA の発現は、神経節細胞とミュラー細胞にみられたが発現は減少していた。生後 30 日目では、VEGF 蛋白の発現は極めて弱く、わずかに内境界膜下の血管周囲にみられた。VEGF mRNA の発現も著しく減少して、神経節細胞とミュラー細胞にかすかに発現していた。このように、VEGF 蛋白および VEGF mRNA の発現は、血管の発生が活発になる少し前に著明になり、血管がほぼ完成する生後 14 日および生後 30 日では著しく低下する(図 5)。網膜血管の発生と VEGF 蛋白および VEGF mRNA の発現が密接に関係し、

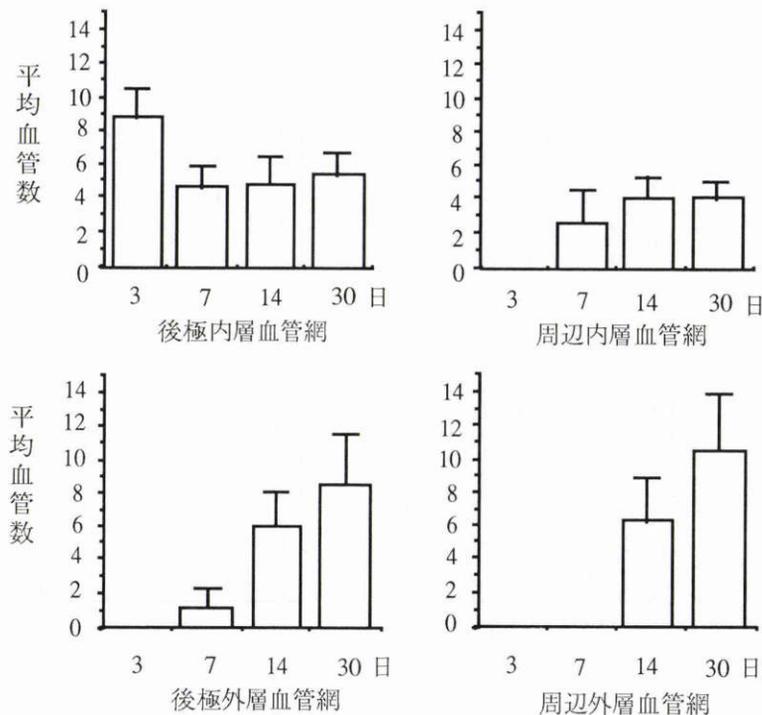


図3 ラット出生後の日数と網膜の平均血管数の関係。

ラットの網膜血管は内層血管網と外層血管網から成る。後極の内層血管網に比較して、周辺の血管網あるいは外層の血管網はやや遅れて血管が発育する。しかし内層および外層とも、生後約 14 日で網膜の血管はほぼ完成する。

(Courtesy of Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K: The temporal and spatial vascular endothelial growth factor expression in the retinal vasculogenesis of rat neonates. Lab Invest 74: 68-77, 1996)

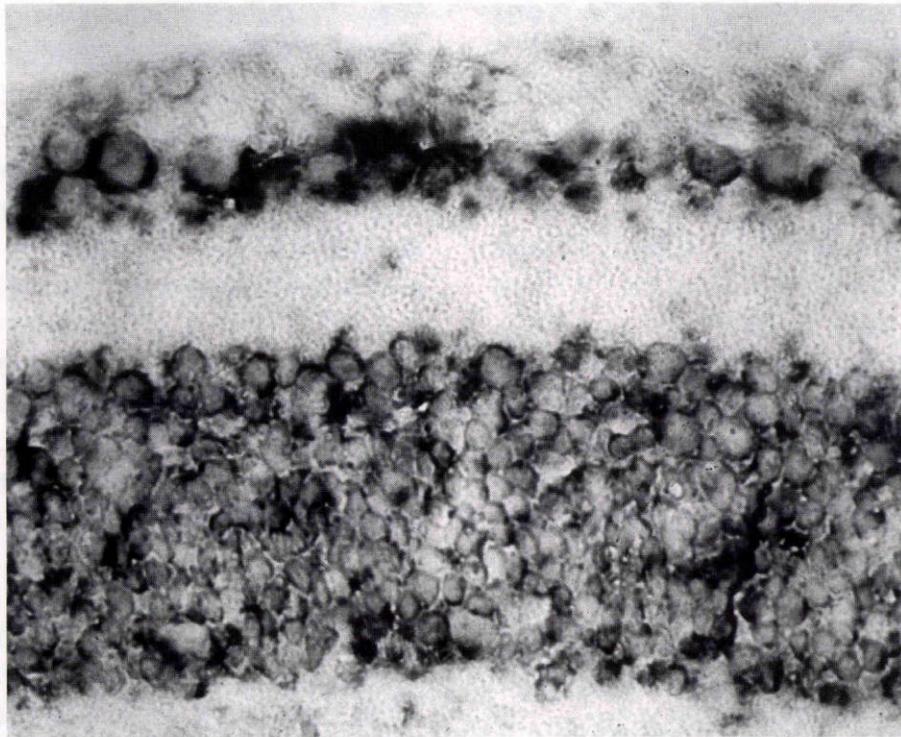


図4 生後7日目ラット網膜の VEGF mRNA の *in situ* hybridization の光学顕微鏡写真。

Vascular endothelial growth factor (VEGF) messenger ribonucleic acid (mRNA) は神経節細胞および内顆粒層のミュラー細胞に強く発現している。×130

(Courtesy of Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K: The temporal and spatial vascular endothelial growth factor expression in the retinal vasculogenesis of rat neonates. Lab Invest 74: 68-77, 1996)

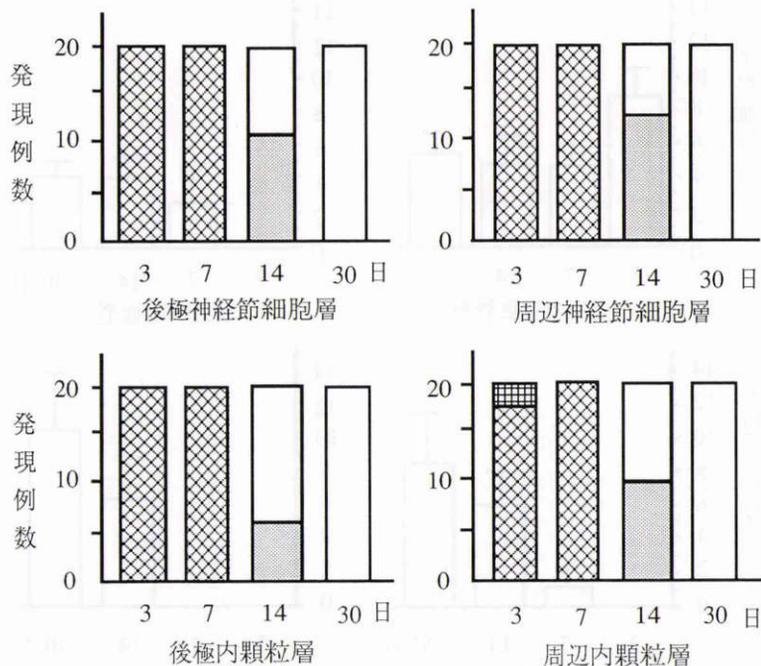


図5 ラット出生後の日数と網膜における VEGF 蛋白の発現頻度との関係。

VEGF 蛋白の発現頻度は、神経節細胞層、内顆粒層、後極、周辺のいずれにおいても、血管の発生が未完成な時期に強く発現する。血管がほぼ完成する14日以降になると、VEGF 蛋白の発現はむしろ減弱または消失する。つまり、VEGF 蛋白の発現は血管の発生に先行する。☒：50%以上陽性、☑：20~50%、☐：20%以下、□：なし

(Courtesy of Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K: The temporal and spatial vascular endothelial growth factor expression in the retinal vasculogenesis of rat neonates. Lab Invest 74: 68-77, 1996)

VEGFの発現の消長が血管新生に先行してみられるのが特徴である。

網膜組織の低酸素状態がVEGFの発現を亢進させ、網膜血管発生を誘導する<sup>46)</sup>。網膜の発生が進むにつれて、感覚網膜の細胞層が厚くなり、その結果、組織が比較的低酸素の状態になるとVEGF蛋白およびVEGF mRNAが発現し、それに引き続いて血管が発生する。網膜血管の発生に際して、組織の低酸素をいち早く感知するのは、低酸素に極めて敏感な神経節細胞、網膜内層のアストロサイト、および内顆粒層のミュラー細胞で、これらの細胞がVEGFを発現する<sup>47)</sup>。実験的未熟児網膜症の研究によると、発育中の組織では、低酸素状態になると神経要素よりも血管周囲グリア組織を構成しているアストロサイトが先に変性して、血液-網膜関門が破綻するという<sup>48)</sup>。VEGFとVPFは同じものであるため、血液-網膜関門の破綻、すなわち網膜血管の透過性亢進は同時にVEGFの発現を意味する。我々の研究では、胎仔あるいは出生直後の網膜血管の発達は組織の酸素要求(低酸素状態)によって誘導され、血管が成熟して低酸素状態が解消されると血管発生が停止することを示したものである。このように、組織の酸素需要が網膜血管網の構築を制御している<sup>49)</sup>。

## 2. 成人網膜の組織構築と血管構築の関係

成人網膜では血管がどのような分布をしているかを組織学的に検討した。眼窩内悪性腫瘍などのために摘出された眼球をグルタルアルデヒドで固定し、エポンに包埋して、半超薄切片を作製して、アズールII染色を行った。標本は網膜面に対して垂直および水平切片を作製して、光学顕微鏡で観察した。

網膜血管の主幹部は神経節細胞層にある。網膜中心動脈、網膜細動脈、網膜中心静脈、網膜細静脈の大中血管はいずれも網膜神経節細胞層に位置する。感覚網膜が最も厚い部位では、毛細血管は、乳頭周囲放射状毛細血管網(radial peripapillary capillary, RPC)、表層毛細血管網、中層毛細血管網、深層毛細血管網の4層に分布している。この4層の毛細血管網のうち、主幹となるのは表層毛細血管網で、大中血管と同様に神経節細胞層に位置する<sup>50)</sup>(図6)。RPCは網膜神経線維層のほぼ中央に存在する(図7)。神経線維層が厚い場合には2~3層のRPCが存在する<sup>51)</sup>。中層毛細血管網は内顆粒層の表層側に、深層毛細血管網は内顆粒層の外層側に位置している。中心窩の中央、すなわち中心小窩では、内顆粒層から内側網膜を欠いているので網膜血管は存在しない。中心窩の斜台(clivus)の部分では、中心小窩の辺縁に最初の内顆粒層細胞がみられ、辺縁から0.12 mmの位置で神経節細胞がみられる。辺縁から約0.2 mmの位置で最初の毛細血管がみられる<sup>52)</sup>。

以上のように、網膜毛細血管の分布と網膜神経要素の構築とは密接な関係にあり、しかも毛細血管は神経要素

の酸素需要に対して必要最小限に分布している。つまり、血管は組織内の光の通過を阻害する構造であるので、神経要素を栄養する網膜血管は必要最小限の分布にとどめられている。このことはきわめて合目的的であるが、その結果、網膜はごく軽度の循環障害が生じても容易に低酸素または虚血に陥るといった弱点をもっていることになる。

## 3. 前眼部虚血による前眼部血管新生とVEGFの発現

糖尿病網膜症や網膜中心静脈閉塞症などのように、網膜が虚血または低酸素状態に陥ると虹彩ルベオ-シスを生じ、血管新生緑内障を合併する。血管新生緑内障の発症と進展にもVEGFが関係する<sup>28)53)54)</sup>。低酸素状態とVEGFの発現には密接な関係があり<sup>55)56)</sup>、前眼部の血管新生には虚血網膜から放出されるVEGFが関係する<sup>28)57)</sup>。しかし、前眼部だけの虚血で血管新生が起こるか否かについてはまだ明らかにされていない。そこで、白色家兎の長後毛様動脈を焼灼して前眼部だけの虚血を作り、血管新生が起こり得るか否かを検討した<sup>58)</sup>。家兎の前眼部脈絡膜は血液供給を短後毛様動脈と長後毛様動脈の枝から受け、網膜は網膜動脈と毛様網膜動脈から受けている<sup>59)</sup>。長後毛様動脈の血流を遮断しても網膜や脈絡膜には虚血を生じないので、家兎眼球では長後毛様動脈を閉塞させることによって前眼部のみの虚血を実験的につくり出すことができる。

家兎の長後毛様動脈を焼灼して閉塞させると、3日目には角膜に浮腫が起こり、結膜が充血した。7日目には角膜に血管新生が観察された。眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋して、病理組織学的に検討した。焼灼の翌日から角膜血管新生が生じ、虹彩は萎縮または壊死に陥った。虹彩の表面には線維性膜が形成され、虹彩と水晶体との癒着が生じていた。しかし、網膜や脈絡膜には血管形成、組織の萎縮や壊死はみられなかった。この実験では後眼部の虚血は起こらなくても前眼部のみの虚血で前眼部に血管新生が起こり得ることを示した。次に、植物レクチン griffonia simplicifolia (GS-1)で免疫染色を行って<sup>60)</sup>、虹彩表面および隅角に生じる増殖組織が新生血管を伴っていることを確認した。さらに、avidin-biotin complex method<sup>45)</sup>で抗ヒトVEGF抗体を使用した免疫組織化学染色を行い、VEGF蛋白の発現を調べた。長後毛様動脈焼灼の翌日には、抗ヒトVEGF抗体に陽性に染色されるVEGF蛋白が毛様突起に近い部位の虹彩上皮細胞および虹彩血管の内皮細胞に観察された。同じ眼球の後眼部では、網膜にも脈絡膜にもVEGF蛋白は染色されなかった。次に、*in situ hybridization*でVEGF mRNAの発現を調べた。対照眼では、前眼部にはVEGF mRNAの発現はみられなかったが、網膜の神経節細胞および内顆粒層の細胞にVEGF mRNAが弱く発現した。長後毛様動脈を焼灼した実験眼では、焼灼翌日の家兎眼球の毛様体上皮細胞にVEGF

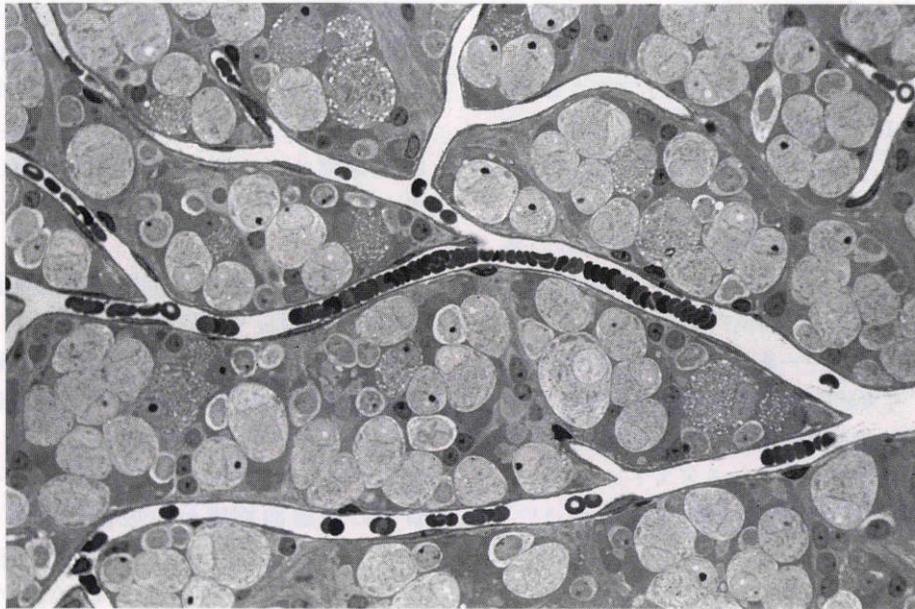


図6 ヒト網膜神経節細胞層の水平断切片の光学顕微鏡写真。

神経節細胞は低酸素あるいは虚血の影響を受けやすい細胞であるので、網膜毛細血管の主幹は神経節細胞層にあり、表層毛細血管網が分布する。アズール II 染色，×400

(Courtesy of Iwasaki M, Inomata H: Relation between superficial capillaries and foveal structures in the human retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1698-1705, 1986)



図7 ヒト網膜神経線維層の水平断切片の光学顕微鏡写真。

網膜神経線維層には乳頭周囲放射状毛細血管網(RPC)が分布する。しかも、血管は神経線維束のほぼ中央に配置されている。このように、網膜毛細血管は網膜の組織構築に対して必要最小限の分布になっている。これは網膜の透明性維持という観点からきわめて合目的的ではあるが、反面少しの循環障害でも容易に低酸素または虚血に陥りやすい弱点にもなっている。アズール II 染色，×640

mRNA が非常に強く発現していた(図8)。しかし、焼灼4日目の前眼部には VEGF mRNA の発現はみられなかった。術翌日の家兎でも、また焼灼4日後の家兎でも、網膜の神経節細胞および内顆粒層の細胞に VEGF mRNA が弱く発現していた。本実験は前眼部の VEGF 蛋白は網膜から前眼部に移動したのではなく、毛様体

上皮細胞で合成されたものであることを示している。長後毛様動脈から血液供給を受けている毛様体上皮細胞が前眼部の虚血を認識して VEGF mRNA が発現したものである。しかも VEGF mRNA の発現は VEGF 蛋白の発現よりも数日間早い。この間隔は、網膜光凝固後の網膜下血管新生における VEGF mRNA の発現と VEGF 蛋

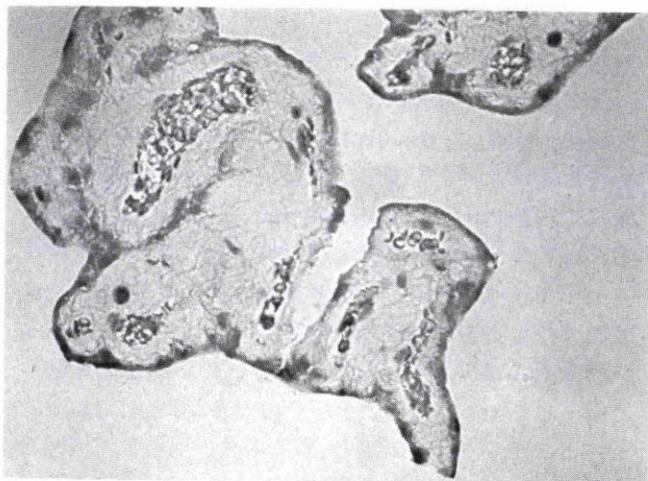


図8 家兎長後毛様動脈焼灼後4日目毛様体の VEGF mRNA の *in situ* hybridization の光学顕微鏡写真。

毛様体上皮細胞に VEGF mRNA が発現している。前眼部の虚血だけで前眼部の血管新生が生じるが、この血管新生には毛様体上皮細胞に発現する VEGF mRNA が関係する。×300

白の発現の間隔とほぼ一致する<sup>61)</sup>。

#### 4. 低酸素刺激状態での周皮細胞における VEGF の発現

血管新生の機序は、生体内ではいろいろな因子が関係して、きわめて複雑である。できる限り単純化して解析するには *in vitro* の実験が必要である<sup>62)</sup>。糖尿病網膜症では、血管周皮細胞が選択的に失われることから、網膜血管内皮細胞と周皮細胞との関係が注目された<sup>63)~66)</sup>。*In vitro* の研究で、周皮細胞の培養上清が内皮細胞の増殖を活発にするという報告<sup>67)</sup>がある。しかし逆に、内皮細胞と周皮細胞の共培養では、周皮細胞は内皮細胞の増殖や遊走を阻止するとの報告<sup>68)69)</sup>もあり、血管内皮細胞と周皮細胞の関係はまだ明確でない。

そこで、我々は低酸素刺激によって周皮細胞が血管内皮細胞の増殖にどのように影響するかについて検討した<sup>70)</sup>。

ウシ網膜から血管内皮細胞と周皮細胞を10%のウシ胎仔血清を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) でそれぞれ分離培養した。培養細胞の同定には、内皮細胞は von Willebrand 因子を、周皮細胞は  $\alpha$ -smooth muscle actin を用いた。Fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識した抗家兎 IgG 抗体または FITC で標識した抗マウス IgG 抗体と一緒に細胞を培養し、蛍光顕微鏡で観察した。I 型コラーゲンゲル上に血管内皮細胞を散布し、内皮細胞による毛細血管様管形成を位相差顕微鏡で観察した。この方法は、Folkman<sup>9)13)</sup> によって開発され、*in vitro* 血管新生の定量的測定法として確立されているものである。我々はこの方法を用いて、100  $\mu$ m 以上に伸びた管構造について単位面積当

りの長さを計測した。さらに、コラーゲンゲル内の毛細血管様管構造の組織切片を作製し、光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。

培養ウシ網膜血管内皮細胞は von Willebrand 因子に陽性に染色され、細胞内に多数の顆粒状蛍光点が見られた。一方、培養ウシ網膜の周皮細胞は  $\alpha$ -smooth muscle actin に陽性に染まり、細胞内に細線維状の蛍光が見られた。コラーゲンゲル内の毛細血管様管構造の組織標本では内皮細胞が互いに接着し、その間に毛細血管様の管腔が形成されていた。それを電子顕微鏡で観察すると、細胞塊の周囲には基板様構造が形成され、細胞間には密着結合が形成されていた<sup>38)</sup>。

網膜血管内皮細胞と周皮細胞を共培養して、その培養上清をコラーゲンゲル内の血管内皮細胞の培養液に添加した場合、毛細血管様管形成の長さは酸素分圧が20%では共培養の培養上清を加えない対照の際の長さに比較して有意に抑制された ( $p < 0.01$ )。しかし、前もって抗 TGF- $\beta$  抗体を添加した場合には血管内皮細胞と周皮細胞の共培養の培養上清を加えた時の管形成抑制効果は有意に減少した。酸素分圧が1%または5%の低酸素状態では、いずれも20%酸素の状態あるいは新鮮培養の時に比較して管形成は促進された ( $p < 0.01$ ) (図9)。周皮細胞だけの培養上清を添加した場合には、酸素分圧が20%では培養上清を添加しない対照と比較して有意の差はなかった。酸素分圧が5%と酸素分圧が1%の低酸素状態では、酸素分圧が20%の新鮮培養と比較して有意に管形成が促進された ( $p < 0.01$ ) (図9)。これに対して内皮細胞だけの培養上清を添加した場合には、酸素分圧が20%と低酸素分圧とでは、内皮細胞による管形成に有意の差はなかった。このように、ウシ網膜血管内皮細胞によるコラーゲンゲル内の毛細血管様管形成は、周皮細胞と内皮細胞の共培養の培養上清を添加した場合、正常酸素状態では内皮細胞の増殖を抑制するように働き、低酸素状態では逆に内皮細胞の増殖を促進するように働いている。

上記の結果は、正常酸素状態では周皮細胞や平滑筋細胞が TGF- $\beta$  を産生して血管内皮細胞の増殖や遊走を抑制するという報告<sup>25)68)69)71)</sup>と一致するものである。我々の研究は周皮細胞が正常酸素状態では、血管内皮細胞の増殖を抑制しているが、低酸素状態では周皮細胞が内皮細胞の増殖を促進していることを示した。血管平滑筋細胞と血管内皮細胞を用いた実験でも同様の関係であったと報告<sup>72)</sup>されている。上記は *in vitro* の実験結果であるが、*in vivo* では血管内皮細胞による VEGF や TGF- $\beta$  だけでなく、グリア細胞などの血管内皮細胞を取り巻く周囲の環境の状態によって種々の影響が考えられるので、*in vitro* とは様子がかなり異なる可能性がある。

#### 5. 低酸素刺激状態でのグリア細胞における VEGF の発現

血管内皮細胞とグリア細胞の相関が血管内皮細胞の分

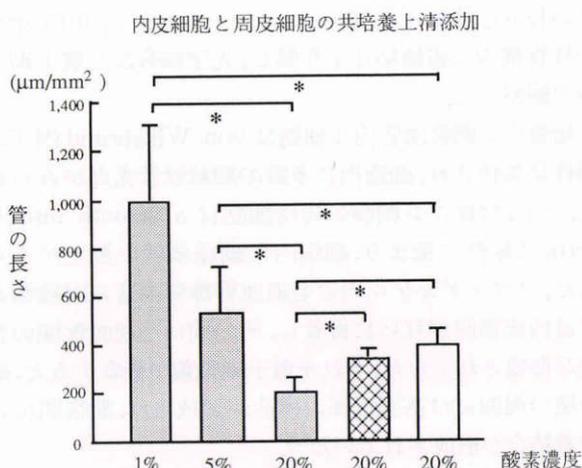


図9 培養ウシ網膜血管内皮細胞による毛細血管様管形成.

網膜毛細血管周皮細胞培養上清を添加した場合、正常酸素分圧では管形成は対照と比較して有意に低下し、周皮細胞は抑制効果をもつ。周皮細胞の作用を抑制する意味で抗 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 抗体を加えると、周皮細胞の抑制効果は減弱する。ところが、低酸素状態では内皮細胞による管形成は周皮細胞培養上清を添加することによって有意に上昇する。周皮細胞は正常酸素分圧では内皮細胞の増殖を抑制し、低酸素状態では逆に亢進させることを示す。■: 抗 TGF- $\beta$  抗体添加 □: 対照 \* :  $p < 0.01$

(Courtesy of Murata T, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K: Media conditioned by coculture of pericytes and endothelial cells under a hypoxic state stimulate *in vitro* angiogenesis. Ophthalmic Res 26: 23-31, 1994)

化に重要である<sup>40)73)</sup>。すでに記したごとく、組織の虚血もしくは低酸素が血管新生と密接な関係にあり、血管内皮細胞の増殖を促す物質である VEGF の発現は低酸素で誘導される。糖尿病網膜症では、網膜の血管新生に網膜グリア細胞が関係している<sup>74)</sup>。ストレプトゾトシン糖尿病ラットでは、飼育6か月から血管透過性亢進がみられるが、この時期には網膜内における VEGF の発現が増加し、網膜血管壁に VEGF が検出される<sup>75)76)</sup>。このように、血管透過性亢進と内皮細胞の増殖が網膜血管新生の重要な過程である。そこで、我々は低酸素刺激によって網膜グリア細胞が VEGF の発現にどのように関係しているかについて検討した<sup>77)</sup>。

まず、ウシ網膜から血管内皮細胞とグリア細胞を分離培養した。von Willebrand 因子陽性で多角形もしくは紡錘形の細胞を血管内皮細胞と同定し、GFAP 陽性で星状構造をもった細胞をグリア細胞と同定した。In vitro における血管内皮細胞の増殖能は内皮細胞の<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みを測定することによって判定した。また、内皮細胞を I 型コラーゲンゲル内で培養して、単位面積当たりの毛細血管様管形成の長さを測ることによって内皮細胞の増殖状態を定量的に測定した。

ウシ網膜グリア細胞を 2% の低酸素分圧で培養した培養上清を添加すると、培養血管内皮細胞による<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みは対照とした新鮮培養の時の約 2.2 倍に増加した ( $p < 0.01$ )。これに対して、グリア細胞を正常酸素分圧で培養した培養上清を加えた場合には、血管内皮細胞による<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みは新鮮培養の時とほとんど変化がなかった。前もって培養上清を抗 bFGF 抗体で処理した培養上清を加えた場合には、低酸素分圧による培養上清を加えた場合の<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みが抗 bFGF 抗体で処理しない場合に比較して低下した ( $p < 0.02$ )。しかしそれでも、内皮細胞による<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みは、新鮮培養の場合や正常酸素分圧の培養上清を添加した場合に比較して、まだ 1.5 倍高かった ( $p < 0.01$ )。前もって培養上清を抗 VEGF 抗体で処理した培養上清を加えた場合には、低酸素分圧による培養上清を添加した場合の<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みの増加がほとんどみられなくなってしまった ( $p < 0.01$ )。さらに、前もって培養上清を抗 bFGF 抗体と抗 VEGF 抗体の両方で同時に処理した培養上清を加えた場合には、<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みは新鮮培養の時の取り込みよりもむしろ低下してしまった ( $p < 0.02$ )。

次に、血管内皮細胞によるコラーゲンゲル内の毛細血管様管形成について検討した。グリア細胞を 2% の低酸素分圧で培養した培養上清を添加すると、網膜血管内皮細胞による管形成は新鮮培養および正常酸素分圧の培養上清添加の場合と比較して有意に亢進した。つまり、低酸素分圧の培養上清添加では正常酸素分圧の培養上清添加に比較して 2.4 倍 ( $p < 0.01$ )、新鮮培養に比較して 6.2 倍の亢進であった ( $p < 0.01$ ) (図 10)。前もって培養上清を抗 bFGF 抗体で処理したものを加えた場合には、管形成の亢進は正常酸素分圧の培養上清添加ではほとんどみられなくなり、低酸素分圧で培養した培養上清添加では bFGF を加えない場合よりも低下した ( $p < 0.01$ )。前もって培養上清を抗 VEGF 抗体で処理したものを加えた場合には、管形成の亢進はほとんどみられなくなった ( $p < 0.01$ )。前もって培養上清を抗 bFGF 抗体と抗 VEGF 抗体の両方で同時に処理した培養上清を加えた場合には、管形成は低下し、特に低酸素分圧で培養した培養上清を添加した場合には新鮮培養の時の管形成よりもむしろ低下してしまった ( $p < 0.01$ )。

次に、northern blot 法によって検討すると、培養ウシ網膜グリア細胞は VEGF mRNA と bFGF mRNA を発現していた。網膜グリア細胞を正常酸素分圧と 2% の低酸素分圧で培養した時の VEGF mRNA の発現を比較すると、低酸素分圧で培養した場合には正常酸素分圧で培養した場合より著明に亢進した。これに対して、bFGF mRNA の発現は低酸素分圧で培養した場合と正常酸素分圧で培養した場合とで著しい違いはなかった。上記の結果は、血管内皮細胞の増殖促進には培養網膜グリア細胞

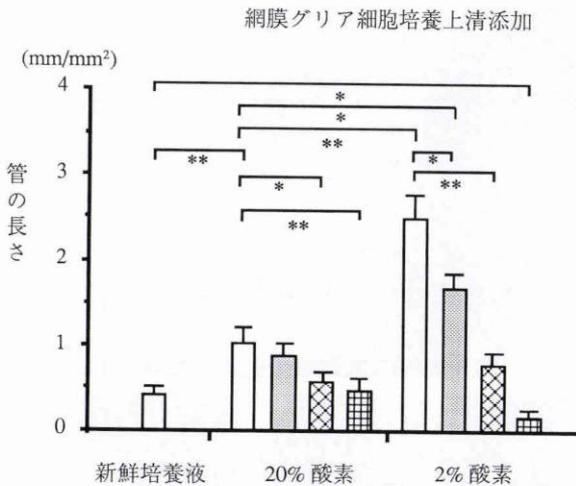


図10 培養ウシ網膜血管内皮細胞による毛細血管様管形成。

網膜グリア細胞培養上清を添加した場合、正常酸素分圧では、血管内皮細胞による管形成は促進され、しかもそれは抗 VEGF 抗体または抗 VEGF 抗体と抗 bFGF 抗体を共に添加した場合に有意に抑制される。低酸素状態では内皮細胞の管形成の亢進状態も著しくなり、また抗 VEGF 抗体または抗 VEGF 抗体と抗 bFGF 抗体を共に添加した場合の抑制効果も顕著である。つまり、網膜グリア細胞は血管内皮細胞の管形成を低酸素状態で著しく亢進されるが、それには basic fibroblast growth factor (bFGF) よりも VEGF の発現がより深く関係していることを示す。\*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$  □: 対照 ▨: 抗 bFGF 抗体添加 ▩: 抗 VEGF 抗体添加 ▧: 抗 bFGF 抗体と抗 VEGF 抗体添加

(Courtesy of Hata Y, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H, Ueno H, Sueishi K: Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal glial cells promotes *in vitro* angiogenesis. *Virchows Arch* 426: 479-486, 1995)

胞による VEGF の合成が主として関与してすることを示したものである。このように、網膜グリア細胞が特に低酸素刺激によって血管内皮細胞の増殖を促進させる。

#### 6. 低酸素刺激の網膜グリア細胞における転写因子 AP-1 活性化を介する VEGF mRNA の発現

低酸素刺激によってサイトカインの遺伝子発現が亢進する<sup>78)79)</sup>。これは低酸素刺激で phospholipase C (PLC)、さらに protein kinase C (PKC) を介する細胞内シグナル伝達が促進されて転写因子の活性化が起こることによる。

VEGF 遺伝子の転写開始上流のプロモーター領域には 4 か所の、転写因子 AP-1 の認識配列 (5'TGACTCA 3') が存在することが知られている。転写因子の結合部位として、Sp-1, AP-1, AP-2 があるが<sup>80)</sup>、低酸素刺激による VEGF mRNA の発現は AP-1 の活性化を介して起こる<sup>81)</sup>。転写因子 AP-1 は JUN 蛋白と FOS 蛋白のヘテロダイマーあるいはホモダイマーから成る転写活性化

因子である。Jun はトリ肉腫ウイルスがもつがん遺伝子として発見されたもので、その産物である JUN 蛋白はもう一つのがん遺伝子 fos の産物 FOS 蛋白とヘテロダイマーを作る。FOS・JUN 蛋白複合体は DNA 結合蛋白で、腫瘍プロモーターによって転写促進結合因子として精製された AP-1 と同一のものである。AP-1 は、細胞内シグナル伝達システムの PLC および PKC を介する遺伝子の転写活性化に関するシグナルの核内の受け取り手である<sup>82)83)</sup>。FOS・JUN 蛋白はロイシンジッパー構造を介してヘテロダイマーを形成し、転写因子 AP-1 として機能して遺伝子の AP-1 認識配列に結合する。JUN 蛋白はホモダイマーとして転写促進活性をもつが、JUN・FOS 蛋白のヘテロダイマーに比較すると、DNA 結合の親和性も転写促進活性も著しく弱い。FOS 蛋白は単独またはホモダイマーとして DNA に結合できない<sup>84)</sup>。

低酸素刺激によって AP-1 蛋白の核への集積がみられることが知られている。しかし、AP-1 蛋白と低酸素刺激による VEGF mRNA 発現との関連性はまだ明らかにされていない。我々は、AP-1 の活性阻害作用を有することが知られている合成糖質コルチコイドである dexamethasone (DEX) が、グリア細胞における VEGF mRNA 発現にどのように関係しているかについて検討した。ウシ網膜から分離したグリア細胞を正常酸素分圧および 1% の低酸素分圧で 24 時間培養した。低酸素刺激 3 時間前に DEX を  $10^{-6}$ ~ $10^{-8}$ nM の濃度で添加しておく、いずれの濃度でも低酸素による VEGF mRNA 発現亢進が抑制された。抑制作用は 100 nM の濃度までほぼ濃度依存性に抑制し、それ以上の濃度では抑制作用はやや低下した。次に、DEX 非添加群と添加群で 1, 3, 6, 12, 24 時間後に northern blot 法で VEGF mRNA の発現を検討した。非添加群では時間依存性に発現の亢進を認めたが、DEX 添加群ではほぼ対照のレベルのままであった。

そこで我々は、ウシ網膜培養グリア細胞における AP-1 蛋白が低酸素刺激によって核への集積がみられるか否かを免疫組織化学的に検討した。同条件で JUN 蛋白と FOS 蛋白の発現および局在を免疫蛍光抗体法で検出し、蛍光顕微鏡で観察した。いずれの蛋白も、正常酸素分圧では細胞の胞体に蛍光色素の発色が集積し、2% の低酸素分圧では低酸素刺激後に核への蛍光色素の集積が認められた (図 11)。すなわち、網膜グリア細胞においても低酸素刺激によって転写因子 AP-1 の活性化が起こっていることを示した (図 12)。

次に、低酸素刺激における VEGF mRNA の安定性について検討した。低酸素環境で 12 時間刺激後に転写阻害剤である Actinomycin D (ACT D) を添加した群と、正常酸素状態に ACT D を添加した群の間で、ACT D 添加後の VEGF mRNA の安定性を northern blot 法で検討した。その結果、正常酸素分圧では ACT D を添加し

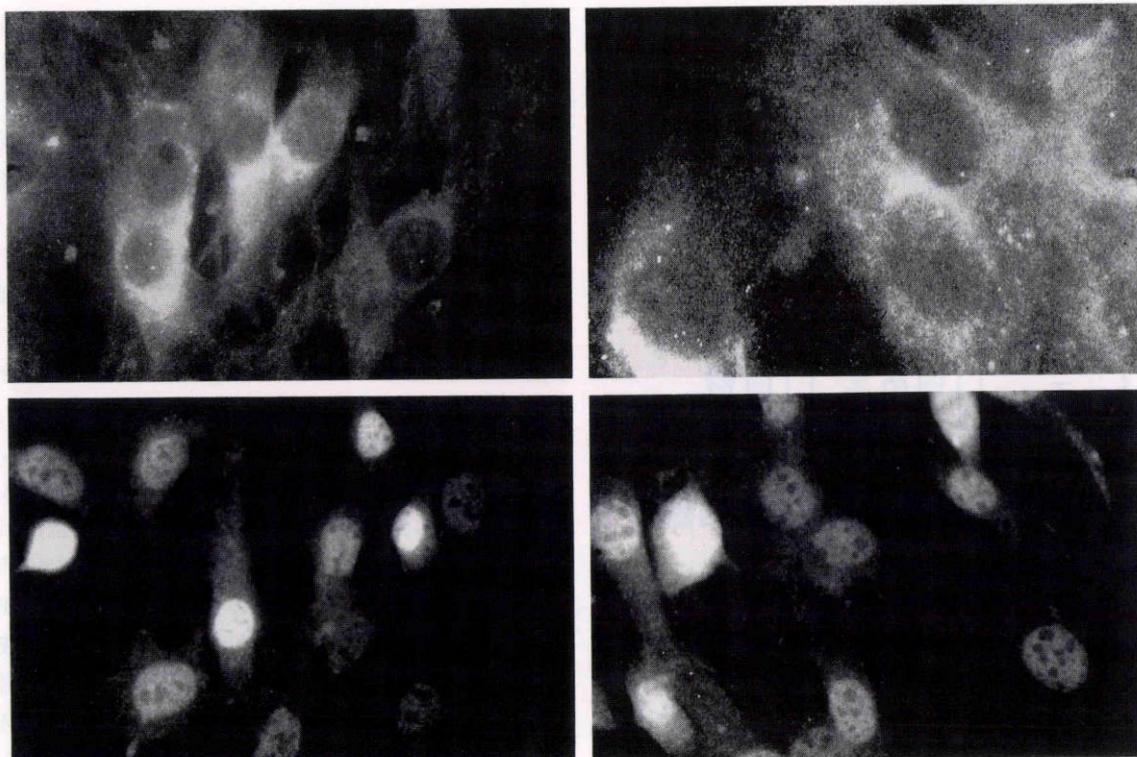


図11 培養ウシ網膜グリア細胞における低酸素刺激による転写因子 AP-1 活性化を示す蛍光抗体光学顕微鏡写真.

正常酸素状態では, JUN 蛋白は胞体に染まり(左上), 低酸素状態では核により顕著に染まるようになる(左下). 同様に FOS 蛋白も, 正常酸素状態では胞体に染まり(右上), 低酸素状態では核により顕著に染まるようになる(右下). これは VEGF mRNA の発現に必要な転写因子 AP-1 が活性化していることを示す. 転写因子 AP-1 は主として JUN 蛋白および FOS 蛋白のヘテロダイマーからなり, AP-1 がグリア細胞の胞体内から核内に移動し, 核内の AP-1 結合部位と結合していることを意味する. ×850

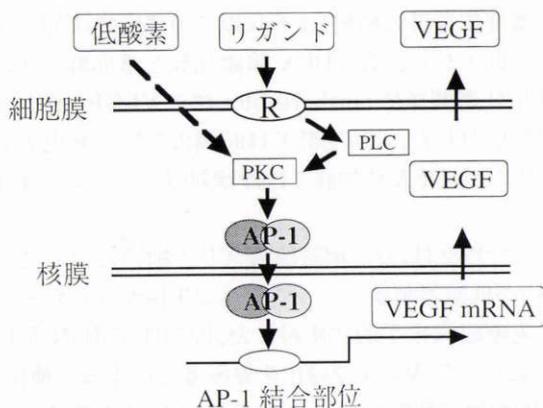


図12 低酸素刺激による転写因子 AP-1 活性化の制御機構模式図.

低酸素刺激によって細胞内の phospholipase C (PLC) および protein kinase C (PKC) を介する細胞内シグナル伝達機構を経て, 転写因子 AP-1 は核内の AP-1 結合部位に結合して VEGF mRNA の発現が亢進する. AP-1 は JUN 蛋白と FOS 蛋白のヘテロダイマーから成る.

R: receptor

て転写を阻害した場合には, VEGF mRNA はほぼ3時間で発現がみられなくなった. これに対し, 1%の低酸素状態では転写を阻害すると VEGF mRNA の発現は

徐々に低下するが, 約9時間まで発現が持続した(図13). このことから, 低酸素刺激後では VEGF mRNA の安定性が亢進することがわかった. このように, 網膜グリア細胞において, 低酸素刺激時の VEGF mRNA 発現亢進には転写活性化の亢進と, 同時に VEGF mRNA の安定性が関係していた<sup>85)</sup>. その経路には転写因子 AP-1 の活性化が関係する.

眼組織における VEGF の発現が血管新生に重要な働きをなしているので, 近年 VEGF の抗体を用いた治療が試みられている<sup>86)</sup>. また, 低酸素刺激によって網膜血管内皮細胞に VEGF の受容体の mRNA が発現する<sup>87)</sup>. そこで, VEGF 受容体のキメラ(chimera)を用いて血管新生を抑制する治療の実験的研究が行われている<sup>88)</sup>. その臨床応用がやがて可能になることを期待したい.

### 7. 低酸素刺激の網膜グリア細胞における転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を介する IL-8 の発現

未熟児網膜症は網膜血管の発育が未熟な段階で高酸素状態にさらされると, 網膜血管が極度に収縮または閉塞して起こる血管新生性の疾患である. 血管が閉塞すると, 網膜は低酸素または虚血に陥り, 反応性に網膜血管新生を生じ, 硝子体内増殖性変化を伴って牽引性網膜剥離が起こる. 未熟児網膜症の実験モデルとして, 出生直後の動

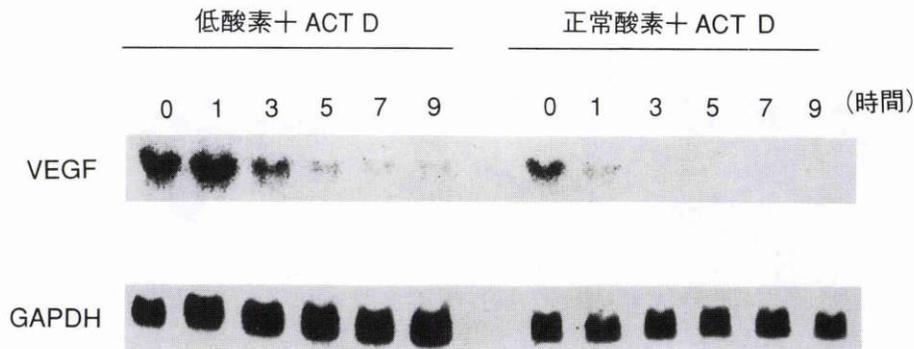


図13 転写阻害薬 Actinomycin D (ACT D) を添加した場合の低酸素刺激培養ウシ網膜グリア細胞における VEGF mRNA の発現持続時間。

低酸素状態では、VEGF mRNA は時間経過によって徐々に減弱するが、約9時間まで発現がみられる。一方、正常酸素状態では VEGF mRNA の発現は約1時間でみられなくなる。つまり、低酸素状態では正常酸素状態に比較して VEGF mRNA の発現持続時間が長く、血管内皮細胞に対するパラクライン的作用の持続が長いことを示す。

GAPDH : glyceraldehyde phosphate dehydrogenase

物に 80% 酸素を 2 週間負荷した後、大気中に戻して飼育する方法が確立されている<sup>3)-6)</sup>。これを酸素負荷網膜症 (oxygen-induced retinopathy) と呼ぶ。このような低酸素刺激によって発現するサイトカインとして、VEGF<sup>89)</sup>の他に IL-8 がある。IL-8 は血管内皮細胞の走化性を亢進させて血管新生を促進する<sup>33)34)</sup>。

IL-8 mRNA の発現には転写因子 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) の活性化を伴う<sup>90)</sup>。ウイルス、サイトカイン、ストレスなどが NF- $\kappa$ B を誘導し<sup>91)</sup>、NF- $\kappa$ B がその発現制御に関係する遺伝子群として、TNF- $\alpha$ 、IL-8、IL-1 $\beta$ <sup>92)</sup>、IFN- $\beta$ 、VCAM-1 および ICAM-1<sup>93)</sup>などが知られている。通常、NF- $\kappa$ B は inhibitor kappa B (I $\kappa$ B) と呼ばれる因子が結合し、NF- $\kappa$ B の核移行シグナルを覆い隠すことにより、NF- $\kappa$ B は細胞質に拘束されている。細胞が低酸素などの刺激を受けると I $\kappa$ B が分解され、NF- $\kappa$ B は速やかに核へ移行し、標的遺伝子に対して転写活性化因子として働く。すなわち、NF- $\kappa$ B の活性化は I $\kappa$ B の分解でもたらされる。さまざまな刺激が NF- $\kappa$ B の活性化を誘導するが、それに伴い I $\kappa$ B のリン酸化が亢進することが知られている<sup>94)95)</sup>。IL-8 mRNA の転写開始上流のプロモーター領域には転写因子 NF- $\kappa$ B が結合する  $\kappa$ B 様部位が存在する。 $\kappa$ B 様部位には、NF- $\kappa$ B と呼ばれる p50 と p65 のヘテロダイマーが結合する。

ヒト血管内皮細胞を低酸素で培養すると、IL-8 mRNA が発現する。IL-8 mRNA の発現は低酸素培養血管内皮細胞の核抽出液で NF- $\kappa$ B 様部位に対する結合活性が亢進することによる<sup>79)</sup>。過酸化水素は、2つの転写因子 AP-1 や NF- $\kappa$ B の活性化を高め、VEGF mRNA や IL-8 mRNA の産生を亢進させて、血管新生を促進する<sup>96)</sup>。また、NF- $\kappa$ B のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは過酸化水素による IL-8 の発現を完全に抑制する<sup>96)</sup>。

そこで、我々はラットの酸素負荷網膜症を作製し、転写

因子 NF- $\kappa$ B の活性化を介して IL-8 の発現と網膜血管新生が関係しているか否かを検討した<sup>97)</sup>。なお、ラットではヒトの IL-8 に相当するものは cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) と呼ばれる。CINC の塩基配列はヒト IL-8 の塩基配列と 47% の相同性があることが知られ<sup>98)</sup>、小腸では虚血および再灌流後には血清中の IL-8 (CINC) が上昇する<sup>99)</sup>。

出生直後の brown Norway ラットを 2 週間 80% 酸素で飼育した後、大気中に戻して飼育すると、2 週間後には網膜血管新生が起こり、硝子体内に血管増殖組織が形成される。大気中に戻した直後には網膜血管新生はみられないが、戻して 2 日目から網膜から血管が出現し、これが内境界膜を穿破して、硝子体中に進展した。網膜血管の形成は大気中に戻して 2 週間目が最高で、それから徐々に減衰し、6 か月後にはみられなくなった。網膜および硝子体内血管新生が最も顕著な時期、すなわち大気中に戻して 2 週間目に眼球を摘出して組織学的に調べると、硝子体内に管腔を形成した血管網がみられた (図 14)。免疫組織化学的に VEGF 蛋白の局在を調べると、感覚網膜の広い範囲にわたって VEGF が検出された。特にミュラー細胞の胞体および網膜面に垂直方向に広がる細胞突起に強い反応がみられた。

大気中に戻して 2 週間目には、NF- $\kappa$ B は視神経および視神経乳頭、さらに網膜内境界膜下の細胞、神経線維層、表層血管網の周囲に検出された。同様に CINC (IL-8) も視神経および視神経乳頭、さらに網膜内境界膜下の細胞に検出された (図 15)。次に、NF- $\kappa$ B および CINC (IL-8) の陽性細胞を同定するために、GFAP、von Willebrand 因子、および  $\alpha$ -smooth muscle actin で免疫染色を行った。その結果、NF- $\kappa$ B および CINC (IL-8) 陽性細胞は GFAP に陽性であった。また、内境界膜に垂直方向に並ぶ細胞にも陽性であった。以上の結果から、NF- $\kappa$ B

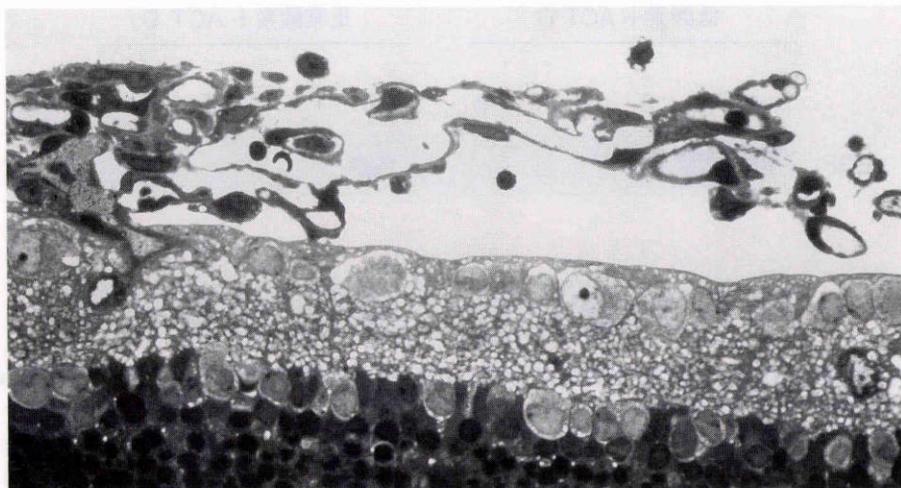


図14 ラット酸素負荷網膜症の光学顕微鏡写真.

網膜血管から新生血管が生じ,硝子体内に伸展している.新生仔ラット80%酸素で2週間飼育し,その後大気中に戻して2週間を経過したもの.アズールII染色,×700

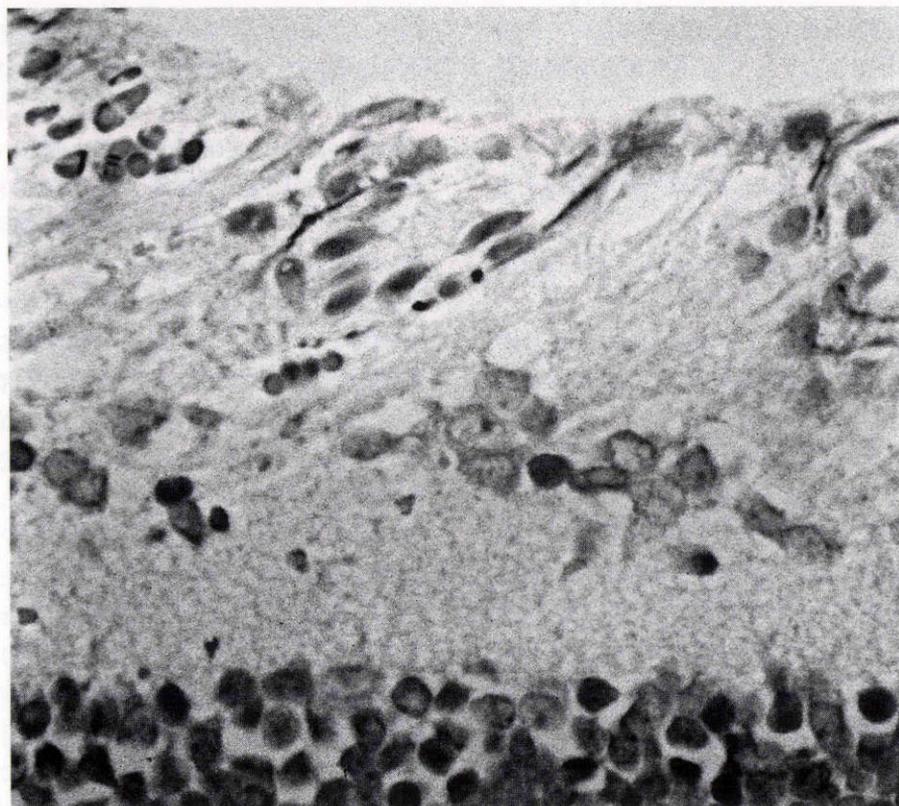


図15 ラット酸素負荷網膜症における cytokine-induced neutrophil chemoattractant(CINC)の発現を示す免疫組織化学光学顕微鏡写真.

内境界膜付近に濃く染まっているのがCINCが発現した細胞で,網膜のアストロサイトとミュラー細胞の分布とほぼ一致する.ラットでCINCと呼ばれるサイトカインは,ヒトの interleukin-8(IL-8)に相当する.×1,800

およびCINC(IL-8)陽性細胞はアストロサイトおよびミュラー細胞であると同定した.硝子体内に進展した血管膜は von Willebrand 因子に陽性で,血管内皮細胞を含んでいた.この実験では,血管新生は大気中に戻して14日目に最大に達したが,NF- $\kappa$ B およびCINC(IL-8)の発現は大気中に戻して2日目が最大で,しかもNF-

$\kappa$ Bの発現がCINC(IL-8)のそれよりわずかに先行していた.これは,CINC(IL-8)の発現はNF- $\kappa$ Bの活性化を介して起こるための時間差である.

ウシ網膜グリア細胞を低酸素状態において0,1,3,6時間後に細胞を回収し,細胞膜および核膜を順次破壊することによって細胞質と核質の分画に分離した.各分

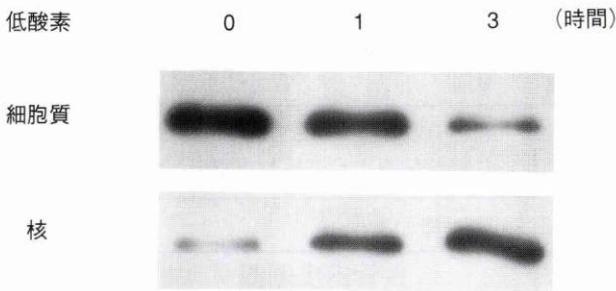


図 16 低酸素刺激によるウシ網膜グリア細胞内の NF-κB 蛋白の局在を示す western blot 法。  
低酸素 1 時間までは NF-κB は細胞質に主に発現しているが、低酸素 3 時間では細胞質よりも核質に強く発現している。

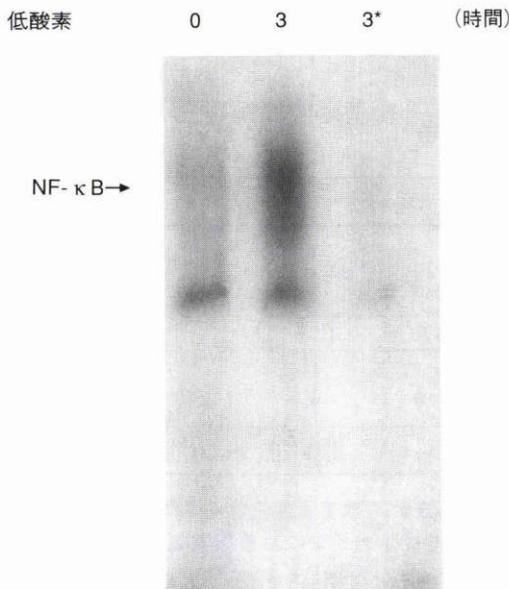


図 17 低酸素刺激によるウシ網膜グリア細胞核蛋白のゲルシフト。  
低酸素 3 時間で NF-κB の DNA 結合能が増加している。  
NF-κB : nuclear factor-kappa B  
\* : competitor を加えたレーンを示す。

画の蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、western blot 法で NF-κB に特異的なバンドを検出した。その結果、ウシ網膜グリア細胞の NF-κB は低酸素後 1 時間までは主に胞体内に検出されるが、3～6 時間になると胞体内よりも核内により多く検出された(図 16)。さらに核蛋白のゲルシフト法を行うと、低酸素により NF-κB の DNA 結合能の増加がみられた(図 17)。つまり、活性化された NF-κB が細胞質から核へ移動し、κB 様部位と結合して IL-8 mRNA の発現を促した(図 18)。

この実験モデルでは酸素負荷で血管が収縮または閉塞して網膜は比較的低酸素の状態になり、それが刺激となって NF-κB および CINC(IL-8)が発現したものである。低酸素刺激に基づいて、網膜に血管新生を伴った増殖

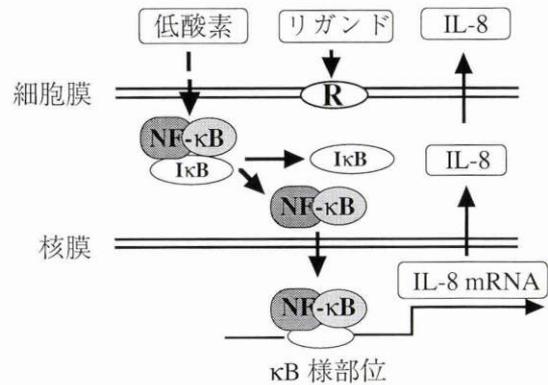


図 18 低酸素刺激による転写因子 NF-κB 活性化の制御機構模式図。

低酸素刺激によって IκB が転写因子 NF-κB から離れる。その結果、NF-κB は拘束が解除され、細胞内から核内に移動して、核内の κB 様部位に結合し、IL-8 mRNA の発現が亢進する。NF-κB は p50 と p65 のヘテロダイマーからなる。  
R : receptor

組織が形成されることが証明されている<sup>26)27)</sup>。

今回の実験から低酸素刺激によって、網膜グリア細胞に VEGF だけでなく CINC(IL-8)も発現することがわかった。VEGF と CINC(IL-8)は同時に働いて、網膜血管内皮細胞に対してパラクライン的に作用して、血管新生を促進する。網膜構成細胞の中で、低酸素刺激によって VEGF を発現しやすい細胞と IL-8 を発現しやすい細胞がある。ヒト glioma cell line では、血管内皮細胞による毛細血管様管形成には、細胞の種類によって VEGF または bFGF によって制御されるものや IL-8 によって制御されるものがある<sup>100)</sup>。網膜の構成細胞でも VEGF または bFGF によって制御されるものと、IL-8 によって制御されるものがあるかも知れない。

8. 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液中の IL-8 濃度

酸素負荷網膜症では、網膜に VEGF だけでなく IL-8 の発現も亢進するので、増殖糖尿病網膜症患者における硝子体液中の IL-8 濃度を調べた。増殖糖尿病網膜症 35 眼、増殖性硝子体網膜症 6 眼、対照例として、黄斑円孔 7 眼、網膜前線維症 6 眼の手術時に硝子体液を採取し、硝子体液中の IL-8 を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。硝子体液サンプルに抗ヒト IL-8 ポリクローナル抗体を反応させ、硝子体液中に含まれる IL-8 と抗ヒト IL-8 ポリクローナル抗体を結合させた後、これに酵素標識抗ヒト IL-8 モノクローナル抗体を加えて抗ヒト IL-8 ポリクローナル抗体—IL-8—酵素標識抗ヒト IL-8 モノクローナル抗体の複合体を形成させた。複合体中の酵素活性を測定することによって硝子体中の IL-8 の濃度を測定した。

硝子体液中の IL-8 濃度が測定可能であったもの(3 pg/ml 以上)は、増殖糖尿病網膜症 24 眼(69%)、増殖性硝子体網膜症で 1 眼(17%)、対照群 1 眼(8%)であった。

増殖糖尿病網膜症の症例の IL-8 濃度は対照群に比較して有意に高かった ( $p < 0.01$ )。また、増殖性硝子体網膜症では対照群との間に有意差はなかった。さらに、増殖糖尿病網膜症のうち活動性の高い網膜症では、沈静化した網膜症に比較して硝子体液中の IL-8 の濃度は高い傾向にあった。つまり、血管新生が活発な増殖糖尿病網膜症では、硝子体液中の IL-8 の含有量が高いことがわかった。

#### IV 結 論

血管新生は血管内皮細胞の前駆細胞または既存の血管内皮細胞の増殖によって起こるが、血管周皮細胞を含めて、血管周囲組織の細胞群が血管内皮細胞の増殖を制御している。血管内皮細胞からのサイトカインがオートクライン的に働いて、内皮細胞の増殖や遊走などの血管形成のすべての過程に関係する。同時に血管内皮細胞を取り巻く周囲の組織構成細胞に発現したサイトカインがパラクライン的に働いて、血管新生を促す(図19)。したがって、眼内血管新生の機序について、眼内の血管内皮細胞を取り巻く環境、すなわち眼内組織構成要素との関係を無視して考えることはできない。血管新生は低酸素や酸化など種々の刺激によって誘導される。

本論文では、糖尿病網膜症、網膜血管閉塞症、未熟児網膜症およびその合併症である血管新生緑内障など、臨床上去わめて重要な眼科疾患の病因に関係する低酸素刺激と眼内血管新生の関係について記した。特に、低酸素刺激によって誘導されるサイトカイン、VEGF と IL-8 が眼組織構成細胞にどのように発現し眼内血管新生に関与しているかに注目し、下記の結論を得た(図20)。

1. 網膜の血管発生に先立って網膜神経節細胞やミュラー細胞、アストロサイトなどに VEGF mRNA または VEGF 蛋白が発現し、血管が完成するとその発現は減少ないし消退する。
2. 網膜の血管構築は、網膜の組織構成に基づく酸素要求に応じて形成され、血管の分布は必要最小限にとどめられている。このことは組織の透明性維持の観点から極めて合目的であるが、反面わずかな循環障害によっても低酸素あるいは虚血に陥りやすい危険性をもっている。
3. 前眼部の血管新生は網膜など後眼部の虚血によって起こる。しかし、前眼部の虚血だけでも、毛様体上皮細胞に VEGF mRNA が発現して、前眼部の血管新生が起こり、血管新生緑内障の原因になり得る。
4. 網膜血管内皮細胞と周皮細胞は密接な関係にある。正常酸素状態では周皮細胞が内皮細胞の増殖を抑制し、低酸素状態では周皮細胞は内皮細胞の増殖を助長する。
5. 網膜のグリア細胞は低酸素刺激によって VEGF を発現して、血管内皮細胞の増殖を促進する。低酸素刺激状態におけるグリア細胞の VEGF の発現の亢進には、転写因子 AP-1 の活性化と VEGF mRNA の安定化が関係

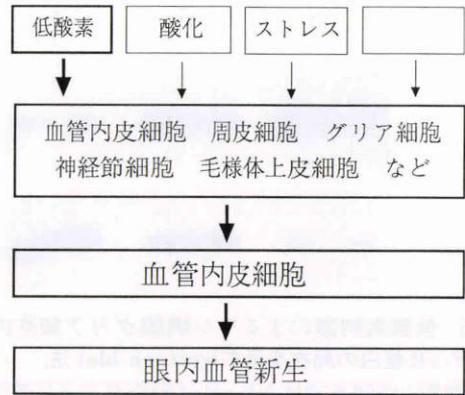


図19 低酸素などの刺激による眼内血管新生機序。低酸素刺激によって血管内皮細胞およびその周囲の細胞にサイトカインが発現し、血管内皮細胞ではオートクライン的に、その他の細胞からはパラクライン的にサイトカインが血管内皮細胞に作用して血管新生を促す。血管内皮細胞を取り囲む周囲の環境からのパラクライン的作用の方がより重要である。

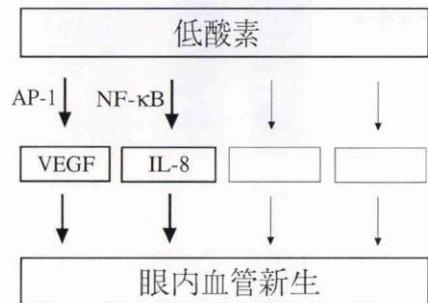


図20 低酸素刺激で活性化する転写因子を介して発現するサイトカインによる眼内血管新生機序。低酸素刺激で活性化する転写因子 AP-1 を介してサイトカイン VEGF が発現し、同様に転写因子 NF-κB を介してサイトカイン IL-8 が発現する。しかし、その他にも血管新生を誘導するサイトカインは数多く存在することを示す。

6. 酸素負荷網膜症に際して、網膜には VEGF だけでなく IL-8 も発現して硝子体内に血管新生が起こる。
  7. IL-8 の発現に先行して転写因子 NF-κB の活性化がみられる。
  8. 増殖糖尿病網膜症では硝子体液中の IL-8 含有量が対照に比較して有意に増加する。しかも血管新生が活発な増殖糖尿病網膜症では、硝子体液中に IL-8 の含有量が非活動性の例に比較して有意に増加する。
- 以上、血管新生を促す各種の細胞成長因子が眼内血管新生にどのように関与しているかについて記した。血管新生の機序は単一ではなく、もっと多くの因子が複雑に交錯している。本論文に記した低酸素によって誘導される眼内血管新生機序はその一面に過ぎない。今後、血管新生の機構がさらに解明され、眼内血管新生の抑制または治療が可能になることを期待する。

## 文 献

- 1) 猪俣 孟: 眼内血管新生の意義. あたらしい眼科 12: 1-3, 1995.
- 2) Simorre-Pinatel V, Guerrin M, Chollet P, Penary M, Clamens S, Malecaze F, et al: Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 3393-3400, 1994.
- 3) Michaelson IC: The mode of development of the vascular system of the retina, with some observations on its significance for certain retinal diseases. Trans Ophthalmol Soc UK 68: 137-180, 1948.
- 4) Ashton N, Ward B, Serpell G: Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. Br J Ophthalmol 38: 397-432, 1954.
- 5) Ashton N, Blach R: Studies on developing retinal vessels. VIII. Effect of oxygen on the retinal vessels of the ratling. Br J Ophthalmol 45: 321-340, 1961.
- 6) Ashton N: Oxygen and the growth and development of retinal vessels. *In vivo* and *in vitro* studies. The XX Francis I. Proctor Lecture. Am J Ophthalmol 62: 412-435, 1966.
- 7) Ashton N: Some aspects of the comparative pathology of oxygen toxicity in the retina. Donders Lecture. 1967. Br J Ophthalmol 52: 505-531, 1968.
- 8) Wise GN: Retinal neovascularization. Trans Am Ophthalmol Soc 54: 729-826, 1956.
- 9) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. Science 235: 442-447, 1987.
- 10) 石橋達朗: 眼内血管新生とは, 石橋達朗(編): 眼科 New Insight 第3巻 眼内血管新生性疾患, メジカルビュー社, 東京, 2-5, 1994.
- 11) Ausprunk DH, Folkman J: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc Res 14: 53-65, 1977.
- 12) Federman JL, Brown GC, Felberg NT, Felton SM: Experimental ocular angiogenesis. Am J Ophthalmol 89: 231-237, 1980.
- 13) Folkman J, Haudenschild C: Angiogenesis *in vitro*. Nature 288: 551-556, 1980.
- 14) Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 161: 851-858, 1989.
- 15) Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246: 1306-1309, 1989.
- 16) Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, et al: Vascular endothelial growth factor: A new member of the platelet-derived growth factor gene family. Biochem Biophys Res Commun 165: 1198-1206, 1989.
- 17) Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. J Cell Biochem 47: 211-218, 1991.
- 18) Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N: Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. J Clin Invest 89: 244-253, 1992.
- 19) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 359: 843-845, 1992.
- 20) Ladoux A, Frelin C: Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. Biochem Biophys Res Commun 195: 1005-1010, 1993.
- 21) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219: 983-985, 1983.
- 22) Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science 246: 1309-1312, 1989.
- 23) Glaser BM, Campochiaro PA, Davis Jr JL, Sato M: Retinal pigment epithelial cells release an inhibitor of neovascularization. Arch Ophthalmol 103: 1870-1875, 1985.
- 24) Jacobson B, Basu PK, Hasany SM: Vascular endothelial cell growth inhibitor of normal and pathologic human vitreous. Arch Ophthalmol 102: 1543-1545, 1984.
- 25) Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA: An activated form of transforming growth factor  $\beta$  is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. Proc Natl Acad Sci USA 86: 4544-4548, 1989.
- 26) Pournaras CJ, Tsacopoulos M, Strommer K, Gilodi N, Leuenberger PM: Experimental retinal branch vein occlusion in miniature pigs induces local tissue hypoxia and vasoproliferative microangiopathy. Ophthalmology 97: 1321-1328, 1990.
- 27) Pournaras CJ, Tsacopoulos M, Strommer K, Gilodi N, Leuenberger PM: Scatter photocoagulation restores tissue hypoxia in experimental vasoproliferative microangiopathy in miniature pigs. Ophthalmology 97: 1329-1333, 1990.
- 28) Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, et al: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. Am J Pathol 145: 574-584, 1994.
- 29) Pe'er J, Shweiki D, Itin A, Hemo I, Gnessin H,

- Keshet E**: Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab Invest* 72: 638—645, 1995.
- 30) **Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, Flynn E, Chatzistefanou K, et al**: Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 103: 1820—1828, 1996.
- 31) **Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, et al**: Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9233—9237, 1987.
- 32) **Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, et al**: Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 167: 1883—1893, 1988.
- 33) **Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, et al**: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258: 1798—1801, 1992.
- 34) **Strieter RM, Kunkel SL, Elnor VM, Martonyi CL, Koch AE, Polverini PJ, et al**: Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol* 141: 1279—1284, 1992.
- 35) **Elnor SG, Elnor VM, Jaffe GJ, Stuart A, Kunkel SL, Strieter RM**: Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res* 14: 1045—1053, 1995.
- 36) **Folkman J**: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? -G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 46: 467—473, 1986.
- 37) **佐藤靖史**: 血管新生のメカニズム. *眼紀* 48: 425—428, 1997.
- 38) **Ishibashi T, Murata T, Sueishi K, Inomata H**: Morphologic study of angiogenesis *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol* 29 A: 91—93, 1993.
- 39) **Inomata H, Smelser GK, Polack FM**: Corneal vascularization in experimental uveitis and graft rejection. *Invest Ophthalmol* 10: 840—850, 1971.
- 40) **Laterra J, Guerin C, Goldstein GW**: Astrocytes induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structures *in vitro*. *J Cell Physiol* 144: 204—215, 1990.
- 41) **Risau W, Sariola H, Zerwes H-G, Sasse J, Ekbom P, Kemler R, et al**: Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102: 471—478, 1988.
- 42) **Gariano RF, Iruela-Arispe ML, Hendrickson AE**: Vascular development in primate retina: Comparison of lamellar plexus formation in monkey and human. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3442—3455, 1994.
- 43) **Chan-Ling T, Halasz P, Stone J**: Development of retinal vasculature in the cat: Processes and mechanisms. *Curr Eye Res* 9: 459—478, 1990.
- 44) **Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K**: The temporal and spatial vascular endothelial growth factor expression in retinal vasculogenesis of rat neonates. *Lab Invest* 74: 68—77, 1996.
- 45) **Hsu S-M, Raine L, Fanger H**: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577—580, 1981.
- 46) **Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J**: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. *Lab Invest* 71: 374—379, 1994.
- 47) **Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, et al**: Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neuroscience* 15: 4738—4747, 1995.
- 48) **Chan-Ling T, Stone J**: Degeneration of astrocytes in feline retinopathy of prematurity causes failure of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2148—2159, 1992.
- 49) **Phelps DL**: Oxygen and developmental retinal capillary remodeling in the kitten. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 2194—2200, 1990.
- 50) **Iwasaki M, Inomata H**: Relation between superficial capillaries and foveal structures in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1698—1705, 1986.
- 51) **Iwasaki M, Inomata H**: Regional variation of superficial and radial peripapillary capillaries in the human retina. *Microcirculation -an update*, vol 2, In: Tsuchiya M, et al. (Eds), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 73—76, 1987.
- 52) **猪俣 孟, 岩崎 雅行**: 黄斑部の名称. *日眼会誌* 101: 201—208, 1997.
- 53) **Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, Mathis A, Chollet P, Favard C, et al**: Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 112: 1476—1482, 1994.
- 54) **Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LEH**: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 905—909, 1995.
- 55) **Finkenzeller G, Marmé D, Weich HA, Hug H**: Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C $\beta$ . *Cancer Res* 52: 4821—4823, 1992.

- 56) **Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD**: Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells: Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 92: 11—14, 1995.
- 57) **Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al**: Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *New Eng J Med* 331: 1480—1487, 1994.
- 58) **Tawara A, Kubota T, Takenouchi T, Sakamoto T, Hata Y, Inomata H**: Iris and trabecular neovascularization caused by anterior segment ischemia in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (suppl): s 824, 1996.
- 59) **Ruskell GL**: Anterior communications between the intrinsic and extrinsic arteries of the rabbit eye. *Anat Rec* 142: 147—154, 1962.
- 60) **Alroy J, Goyal V, Skutelsky E**: Lectin histochemistry of mammalian endothelium. *Histochemistry* 86: 603—607, 1987.
- 61) **Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H, Nakagawa K, Sueishi K, Inomata H**: Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 235: 159—167, 1997.
- 62) 坂本泰二, 石橋達朗, 猪俣 孟: 眼科領域の *In Vitro* 血管新生. *眼紀* 48: 435—442, 1997.
- 63) **Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T**: Retinal vascular pattern. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 66: 366—378, 1961.
- 64) **Kuwabara T, Cogan DG**: Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of the retinal capillaries. *Arch Ophthalmol* 69: 492—502, 1963.
- 65) **Kuwabara T, Cogan DG**: Retinal vascular patterns. VII. Acellular change. *Invest Ophthalmol* 4: 1049—1058, 1965.
- 66) **de Oliveira F**: Pericytes in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 50: 134—143, 1966.
- 67) **Wong HC, Boulton M, Marshall J, Clark P**: Growth of retinal capillary endothelia using pericyte conditioned medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1767—1775, 1987.
- 68) **Sato Y, Rifkin DB**: Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transforming growth factor- $\beta$  1-like molecule by plasmin during coculture. *J Cell Biol* 109: 309—315, 1989.
- 69) **Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB**: Characterization of the activation of latent TGF- $\beta$  by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: A self-regulating system. *J Cell Biol* 111: 757—763, 1990.
- 70) **Murata T, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K**: Media conditioned by coculture of pericytes and endothelial cells under a hypoxic state stimulate *in vitro* angiogenesis. *Ophthalmic Res* 26: 23—31, 1994.
- 71) **Orlidge A, D'Amore PA**: Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 105: 1455—1462, 1987.
- 72) **Sakuda H, Nakashima Y, Kuriyama S, Sueishi K**: Media conditioned by smooth muscle cells cultured in a variety of hypoxic environments stimulates *in vitro* angiogenesis: A relationship to transforming growth factor- $\beta$  1. *Am J Pathol* 141: 1507—1516, 1992.
- 73) **Penfold PL, Provis JM, Madigan MC, van Driel D, Billson FA**: Angiogenesis in normal human retinal development: The involvement of astrocytes and macrophages. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 228: 255—263, 1990.
- 74) **Nork TM, Wallow IHL, Sramek SJ, Anderson G**: Müller's cell involvement in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 105: 1424—1429, 1987.
- 75) **Murata T, Ishibashi T, Khalil A, Hata Y, Yoshikawa H, Inomata H**: Vascular endothelial growth factor plays a role in hyperpermeability of diabetic retinal vessels. *Ophthalmic Res* 27: 48—52, 1995.
- 76) **Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K**: The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retina. *Lab Invest* 74: 819—825, 1996.
- 77) **Hata Y, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H, Ueno H, Sueishi K**: Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal glial cells promotes *in vitro* angiogenesis. *Virchows Arch* 426: 479—486, 1995.
- 78) **Blanchard KL, Acquaviva AM, Galson DL, Bunn HF**: Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: Cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol Cell Biol* 12: 5373—5385, 1992.
- 79) **Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan S-D, Anderson M, et al**: Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 93: 1564—1570, 1994.
- 80) **Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al**: The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 266: 11947—11954, 1991.
- 81) **Goldberg MA, Schneider TJ**: Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* 269: 4355—4359, 1994.
- 82) **Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M**: The *jun* proto-oncogene is positively autoregulated by its products, Jun/AP-1. *Cell* 55: 875—885, 1988.
- 83) 奥田昌彦, 今川正良, 村松正実: 情報伝達系の中での

- jun, fos* 蛋白質の役割. 実験医学 7: 1075-1078, 1989.
- 84) 酒井正春: JUN ファミリータンパク質とその転写調節機構. 生化学 63: 1196-1201, 1991.
- 85) Carter BZ, Malter JS: Biology of disease. Regulation of mRNA stability and its relevance to disease. Lab Invest 65: 610-621, 1991.
- 86) 浅野 誠, 幸田綾子, 鈴木日出夫: 血管内皮増殖因子阻害と血管新生抑制. 眼紀 48: 443-447, 1997.
- 87) Takagi H, King GL, Ferrara N, Aiello LP: Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor *KDR/Flk* gene expression through adenosine A<sub>2</sub> receptors in retinal capillary endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 37: 1311-1321, 1996.
- 88) Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, et al: Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. Proc Natl Acad Sci USA 92: 10457-10461, 1995.
- 89) Pierce EA, Foley ED, Smith LEH: Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. Arch Ophthalmol 114: 1219-1228, 1996.
- 90) Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, et al: Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor- $\kappa$ B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. J Biol Chem 269: 13289-13295, 1994.
- 91) Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. Ann Rev Immunol 12: 141-179, 1994.
- 92) Hiscott J, Marois J, Garoufalos J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, et al: Characterization of a functional NF- $\kappa$ B site in the human interleukin 1 $\beta$  promoter: Evidence for a positive autoregulatory loop. Mol Cell Biol 13: 6231-6240, 1993.
- 93) Lindner V, Collins T: Expression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B- $\alpha$  by aortic endothelium in an arterial injury model. Am J Pathol 148: 427-438, 1996.
- 94) Lenardo MJ, Baltimore D: NF- $\kappa$ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. Mini review. Cell 58: 227-229, 1989.
- 95) Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ: Hypoxia causes the activation of nuclear factor  $\kappa$ B through the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  on tyrosine residues. Cancer Res 54: 1425-1430, 1994.
- 96) Shono T, Ono M, Izumi H, Jimi S, Matsushima K, Okamoto T, et al: Involvement of the transcription factor NF- $\kappa$ B in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. Mol Cell Biol 16: 4231-4239, 1996.
- 97) Yoshida A, Yoshida S, Hata Y, Ishibashi T, Inomata H: Expression of NF- $\kappa$ B in retinal neovascularization: Possible involvement of interleukin-8. Invest Ophthalmol Vis Sci 38 (suppl): s 611, 1997.
- 98) Blackwell TS, Holden EP, Blackwell TR, DeLarco JE, Christman JW: Cytokine-induced neutrophil chemoattractant mediates neutrophilic alveolitis in rats: Association with nuclear factor  $\kappa$  B activation. Am J Respir Cell Mol Biol 11: 464-472, 1994.
- 99) Tsuruma T, Yagihashi A, Hirata K, Matsuno T, Zou XM, Sasaki K, et al: Evaluation of plasma IL-8 (CINC) concentration during ischemia and after reperfusion in the small intestine. Transplantation Proceedings 28: 1917-1918, 1996.
- 100) Wakabayashi Y, Shono T, Isono M, Hori S, Matsushima K, Ono M, et al: Dual pathways to tubular morphogenesis of vascular endothelial cells by human glioma cells: Vascular endothelial growth factor/ basic fibroblast growth factor and interleukin-8. Jpn J Cancer Res 86: 1189-1197, 1995.