

第 103 回 日本眼科学会総会 宿題報告Ⅲ

眼内循環

眼内血管病変の細胞生物学

石 橋 達 朗

九州大学大学院医学系研究科眼科学教室

共同研究者

猪俣 孟, 川野 庸一, 久保田敏昭, 坂本 泰二, 藤澤 公彦, 村田 敏規
畑 快右, 山中 一郎, 吉川 洋, 広石 悟朗, 高田 陽介, 原田 宗明
大島 裕司, 田原 義久, 吉田 茂生, 吉田 綾子, 本田 祐恵, 伊藤 慎二
塩瀬 聡美, 岡田 勇次, 佐々由季生, 武田 篤信, 久富 智朗 (九州大学大学院医学系研究科眼科学教室)

Stephen J Ryan (University of Southern California)

Lloyd P Aiello (Harvard Medical School)

研究協力者

大島 健司 (福岡大学医学部眼科学教室)

荻野 誠周 (新城眼科)

大西 克尚 (和歌山県立医科大学眼科学教室)

永井 竜児, 堀内 正公 (熊本大学医学部第二生化学教室)

桑野 信彦 (九州大学大学院医学系研究科医化学教室)

梅田 文夫, 名和田 新 (九州大学大学院医学系研究科病態制御内科学教室)

居石 克夫 (九州大学大学院医学系研究科病理病態学教室)

要 約

眼内血管病変の中で、最も患者数が多く、また失明率が高いのが糖尿病網膜症(以下、網膜症)である。治療法として現在までに網膜光凝固術、硝子体手術などが確立され、治療成績が年々向上しているが、未だ全体的な失明率の低下には至っていない。さらなる病態の解明と、より有効な治療法の確立が今や社会的課題となっている。

我々はまず、細胞生物学的立場からその病態解明を行った。網膜症の本態は持続する高血糖に起因する血管原性病変である。その病態形成には、高血糖に伴う代謝異常を基盤にして血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)をはじめとしたサイトカインの関与が明らかにされつつあるが、詳細は不明な点が多い。そこで、VEGFと網膜症の基本病態となる網膜血管の透過性亢進、網膜血管の内腔閉塞および血管新生との関わりに着目し、*in vivo*, *in vitro* の系を用いてその病態形成メカニズムについて詳細に検討した。

網膜症における網膜血管の透過性亢進の病理組織学的所見として、内皮細胞間を介する経路(細胞間輸送 inter-

cellular or paracellular transport)と、細胞質の小胞やカベオラ、さらには窓構造を介する経路(細胞内輸送 intracellular or transcellular transport)の2つがみられた。VEGFを硝子体内注入すると、この2つの経路が亢進した。本来、VEGFは低酸素によって発現が亢進することで知られるが、ヒト網膜症眼においては明らかな血管閉塞もなく、透過性が亢進する以前から既に網膜血管周囲でVEGFの発現が亢進していた。その発現誘導因子として、高血糖によってもたらされる後期グリケーション終末産物(advanced glycation end products, AGEs)が関与していた。

網膜血管の内腔閉塞の病理組織学的所見はフィブリン、血小板、白血球などから成る血栓形成で、後期にはグリア細胞やマクロファージも関与していた。VEGFは自らの発現を誘導する血栓形成による組織虚血をも惹起し、そのメカニズムとして、外因系凝固の initiator として機能する組織因子の発現促進が一因であった。加えて、AGEsも組織因子の発現亢進、および抗血小板凝集作用

別刷請求先：〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学大学院医学系研究科眼科学教室 石橋 達朗

(平成 11 年 9 月 8 日受付, 平成 11 年 9 月 13 日改訂受理)

Reprint requests to: Tatsuro Ishibashi, M.D. Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received September 8, 1999 and accepted in revised form September 13, 1999)

を有するプロスタサイクリンの産生促進因子(prostacyclin-stimulating factor, PSF)の発現を阻害することによって血栓形成に関わっていた。これらの組織因子と VEGF の発現は互いにフィードバックを掛け合うことによって、さらに循環障害を助長する。

網膜症の血管新生は、網膜血管内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成という一連のステップにより起こる。網膜血管周皮細胞は新生血管の成熟に関与し、内皮細胞に随伴するように遊走、増殖していた。VEGF の硝子体内単独投与は網膜血管新生を起こした。また、VEGF の細胞増殖シグナルを司る受容体は kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase-1 (KDR/Flk-1, KDR)で、その遺伝子発現には転写因子 Sp 1 が関与し、KDR の発現は塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)や AGEs によって促進された。糖尿病網膜において KDR の発現は単純網膜症の段階でも既に亢進していたので、網膜症は発症早期から増殖性変化への準備状態にあるといえる。

以上のように、VEGF とその受容体システムが網膜症の病態形成に、その初期の段階から幅広く関与している。

これらの病態解明に基づき、治療への応用についても検討を加えた。VEGF とその受容体システムを阻害することによって網膜症の治療への道が拓けると考える。そこで、VEGF とその受容体システムの阻害により、新生血管の発生を阻止する 2 つの方法について検討した。①血糖降下薬でインスリン抵抗性改善作用をもつトログリタゾンが、VEGF によって惹起される内皮細胞のシグナル伝達の誘導を、 Ca^{2+} の流入や mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの活性化を阻害することによって、内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成および高圧酸素負荷網膜症における血管新生を有意に抑制した。これらのことから、

トログリタゾンが単なる血糖コントロール効果以上に網膜症の発症・進展を抑制し得る可能性がある。② VEGF 受容体 KDR の発現には転写因子 Sp 1 が重要なので、Sp 1 認識配列の合成オリゴヌクレオチド Sp 1 デコイを内皮細胞に導入することによって、KDR の発現を抑制し、VEGF とその受容体システムをより有効的に阻害できる可能性がある。

既に発生してしまった新生血管を退縮させる方法についても検討した。新生血管の退縮過程の病理組織学的検討から、VEGF とその受容体システムを阻害するとともに、新たな血管調節因子である angiopoietin-2 (Ang-2) を過剰発現させれば、新生血管の早期退縮誘導も可能である。そこで、遺伝子治療的手法を用いて、新生血管の退縮誘導をするために目的遺伝子を過剰発現させる方法を検討した。まず、網膜症の治療に現在広く行われている網膜光凝固術の凝固斑に限局性に遺伝子を導入する方法を確立した。また、硝子体手術後に硝子体内に遺伝子を注入し、主にミュラー細胞に高い効率で目的遺伝子の導入が可能であった。すなわち、現在広く行われている治療法と併用して、Ang-2 の遺伝子導入を行うことによって、新生血管を早期に退縮させる可能性がある。

本研究では細胞生物学的立場から網膜症の病態を解明し、明らかになったメカニズムに基づき、新たな治療法の可能性を示した。(日眼会誌 103: 923-947, 1999)

キーワード: 血管細胞生物学, 循環障害, 糖尿病網膜症, 代謝異常, サイトカイン, 血管内皮増殖因子, 血管透過性亢進, 血管閉塞, 血管新生, 後期グリケーション終末産物, 組織因子, トログリタゾン, Angiopoietin, 遺伝子治療

Cell Biology of Intraocular Vascular Diseases

Tatsuro Ishibashi

Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Abstract

Diabetic retinopathy (DR) still remains the leading cause of blindness in the working population of Japan and western world, though therapies such as retinal photocoagulation and vitrectomy can be remarkably effective when administered at an appropriate stage in the disease process. Consequently, there is a need for further investigation of the pathogenesis of DR to develop better therapy. DR is characterized by gradually progressive alterations in the retinal microvasculature, leading to three fundamental morbidities: ① vascular hyperpermeability, ② vascular occlusion, and ③ neovascularization. Recent studies have revealed that hyperglycemia causes several metabolic disorders which cause DR directly or indirectly through the abnormal expres-

sion of cytokines including vascular endothelial growth factor (VEGF). In this study, we performed precise tests of the correlation between intraocular VEGF and the three fundamental changes in the diabetic retina mentioned above.

Ultrastructural study of the human retina revealed that two major pathways are responsible for hyperpermeability of diabetic retinal vessels, i.e., intercellular or paracellular transport (opening of the tight junctions) and intracellular or transcellular transport (caveolae, intracytoplasmic vesicles, and fenestration). All these pathways were induced by intravitreal injection of VEGF. The major trigger of VEGF overexpression is tissue ischemia caused by vascular occlusion. However, the retinas from the

eyes with background DR revealed increased expression of VEGF without apparent incidence of vascular occlusion. We have identified accumulation of advanced glycation end products (AGEs) in these retinas, and found that AGEs are a major stimulus for VEGF overexpression in background DR.

Retinal vascular occlusion was caused by thrombus formation primarily in the capillary vessels. Thrombi mainly consisted of fibrin, platelets, and leucocytes in the early stage of their formation, and glial cells and macrophages were also involved in the later stage. The blood coagulation process plays an important role in fibrin formation in thrombi. The expression of tissue factor (TF), an initiator of extrinsic blood coagulation, was upregulated by VEGF in retinal vascular endothelial cells (REC). In addition, AGEs were also thrombogenic through the induction of TF expression and suppression of the expression of prostacyclin stimulating factor (PSF), which stimulate prostacyclin synthesis in vascular endothelial cells. These findings suggest that AGEs, VEGF, and TF could interact in a vicious circle because AGEs and VEGF could induce retinal vascular occlusion which results in further increase in VEGF expression.

Intravitreal injection of VEGF could induce retinal neovascularization. VEGF stimulates vascular endothelial cell proliferation by binding to a specific receptor named kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase (KDR/Flk-1, KDR). AGEs and basic fibroblast growth factor (bFGF) induced expression of KDR in REC, and a transcription factor Sp 1 was involved in this process. Since the expression of KDR as well as VEGF was already upregulated in the retinas with background DR, VEGF appeared to start to induce the proliferative changes long before the actual onset of proliferative DR. These findings indicated that VEGF and its receptor system plays a pivotal role all through the disease process of DR.

We considered that amelioration of the activated VEGF and its receptor system could lead to the de-

velopment of new therapy for DR. We have developed two novel methods to prevent retinal neovascularization by inhibiting VEGF and its receptor system. ① An insulin sensitizing agent (troglitazone) inhibited proliferation, migration, and *in vitro* tube formation by REC as well as oxygen-induced retinal neovascularization in a mouse model. Thus, glycemic control by troglitazone could reduce the incidence of neovascularization in diabetic eyes. ② Transfection of Sp 1 decoy into REC could inhibit the expression of KDR, which might lead to the suppression of VEGF and its receptor system in eyes with DR.

In addition to inhibiting the incidence of retinal neovascularization, we are also developing a method to promote early regression of newly formed vessels. It has been hypothesized that the vasculature destabilized by angiopoietin-2 (Ang-2), a recently identified vasomodulating factor, regresses if there is not simultaneous angiogenic stimulus by VEGF. To induce Ang-2 expression in the retina, we have developed two targeted gene transfer methods: ① retrovirus mediated gene transfer to photocoagulation sites, and ② adenovirus mediated gene transfer to Müller cells after vitrectomy. A combination of Ang-2 gene transfer and inhibition of VEGF and its receptor system by the methods mentioned above, together with photocoagulation or vitrectomy, could promote early regression of retinal neovascularization.

In this study, we investigated the cellular biological mechanisms of DR. Then based on our new findings, we proposed new therapy methods for DR.

(J Jpn Ophthalmol Soc 103: 923-947, 1999)

Key words: Vascular cell biology, Circulatory disturbance, Diabetic retinopathy, Metabolic disorder, Cytokine, Vascular endothelial growth factor, Vascular hyperpermeability, Vascular occlusion, Neovascularization, Advanced glycation end products, Tissue factor, Troglitazone, Angiopoietin, Gene therapy

I 緒 言

眼内循環は臓器微小循環の一つである。微小循環とは小さな血管という意味ではあるが、実際には全血管床面積の 90% を占める広大な機能単位である。各臓器は細動脈から毛細血管を経て細静脈に至る微小循環の整然とした機能単位により、その代謝機能の恒常性が維持されて

いる。これらすべての血管の内腔を覆っているのが血管内皮細胞である。従来、内皮細胞は血管の内腔を被覆し、血液成分と生体組織を隔絶する物理的なバリアーを形成することが主な働きと考えられていたが、最近では多彩な機能を持った細胞群であることが判明してきた。内皮細胞を中心とした血管壁細胞を扱う研究は血管生物学 (vascular biology) あるいは血管細胞生物学 (vascular

表1 網膜循環障害を来す主な疾患

- ・糖尿病網膜症
- ・網膜動脈閉塞症
- ・網膜静脈閉塞症
- ・網膜細動脈瘤
- ・未熟児網膜症
- ・イールズ病

cell biology)として、一つの研究領域を形成しつつある¹⁾。

眼内循環は網脈絡膜循環とほぼ同義語で使われ、その障害が種々の眼内血管病変を惹き起こす。眼内循環障害の中でも臨床的に重要な位置を占めるのが網膜循環障害である。網膜循環障害を来す主な疾患を表1に挙げているが、この中で最も患者数が多く、また失明率が高い疾患が糖尿病網膜症(以下、網膜症)である。網膜症においては表1に示す疾患が呈する多彩な病変がみられる。我々は現在の社会的課題であり、さらなる病態の解明と、より有効な治療法の開発が望まれる網膜症に的を絞って、今回の研究を行った。

糖尿病患者総数は、1998年に発表された厚生省糖尿病実態調査では690万人と推定され、2010年には1,000～1,400万人に達すると予想されている。その合併症である網膜症の有病者も増加し、200～300万人と推定される。網膜症の治療法として、光凝固療法および硝子体手術が確立されてはいるが、未だに網膜症が中途失明原因の上位を占め、年間3,000～4,000人の患者が新たに失明に陥っている。

網膜症の本態は、糖尿病による高血糖状態が網膜血管、特に毛細血管およびそれを取り巻く網膜組織に機能的・器質的変化をもたらした結果生じる血管原性病変である。網膜症は多彩な眼底所見を呈するが、病変の主座は毛細血管の血管壁細胞、すなわち内皮細胞と周皮細胞である。血管細胞生物学的立場からみると、その病態は網膜血管の透過性亢進、網膜血管の内腔閉塞、血管新生の3つに分けることができる。

糖尿病のコントロール状態と合併症の進展についてのprospectiveな研究成績は、慢性的な高血糖自体が網膜症の発症、進展に関与していることを証明した²⁾³⁾。高血糖の持続によりもたらされる代謝異常はきわめて多様であり、蛋白の非酵素的糖化による後期グリケーション終末産物(advanced glycation end products, AGEs)の形成、ジアシルグリセロール(diacylglycerol, DAG)ープロテインキナーゼC(protein kinase C, PKC)経路の活性化、ポリオール代謝経路の活性亢進、酸化ストレス、脂質代謝異常、細胞内レドックス状態の変化、アラキドン酸カスケードの活性化などがある(図1)⁴⁾。これらの代謝異常は互いにネットワークを形成し、血管壁細胞に対して、直接、あ

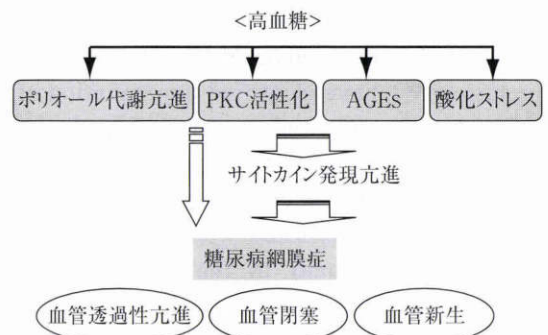


図1 糖尿病による代謝異常と網膜症。

糖尿病による高血糖状態では過剰のグルコースが細胞内に流入し、ポリオール代謝経路が活性化される。この経路で産生されるフルクトースは蛋白の糖化、すなわち後期グリケーション終末産物(AGEs)の産生を促進し、その過程で副産物として活性酸素が産生される。また、ポリオール代謝経路の活性化によるNADH/NAD⁺比の上昇は*de novo* ジアシルグリセロール(DAG)合成、プロテインキナーゼC(PKC)の活性化を促進する。これらの代謝異常は直接あるいは血管内皮増殖因子(VEGF)をはじめとしたサイトカインの産生を介して網膜症の病態形成に関与する。

表2 網膜症の臨床像と基本病態

臨床病期	基本病態	眼底所見
単純	血管透過性亢進	網膜浮腫 硬性白斑 網膜出血
増殖前	血管閉塞	軟性白斑 網膜内細小血管異常
増殖	血管新生	新生血管 増殖組織 硝子体出血 網膜剥離

るいは種々のサイトカインの発現を介して作用し、網膜症の病変を形成する。

サイトカインとは、極微量で細胞表面の特異的レセプターを介して生理活性を示す蛋白因子の総称で、細胞増殖因子もこれに含まれる。現在、網膜症の発症、進展に最も関与しているサイトカインは血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)であると考えられている。VEGFは多機能サイトカインで、血管透過性因子(vascular permeability factor, VPF)とも呼ばれ、血管新生を促進するばかりでなく血管透過性も亢進させる。また分泌型蛋白で、虚血で発現が促進されることなどにより、網膜症との密接な関連が指摘されている^{5)～10)}。

そこで、本論文では血管細胞生物学的見地から網膜症の病態とVEGFとの関わりについて記し、さらに網膜症に対する新しい治療法の可能性について記す。なお、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

い、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。

II 網膜症の臨床像と基本病態

網膜症の眼底所見は多彩で、毛細血管瘤、網膜浮腫、網膜および硝子体出血、硬性および軟性白斑、網膜内細小血管異常、新生血管、増殖組織、網膜剥離などが出現し、病期の進行とともに、単純、増殖前、増殖網膜症に分けられる。それぞれの病期の基本病態は、単純網膜症では網膜血管の透過性亢進、増殖前網膜症では網膜血管の内腔閉塞、増殖網膜症では血管新生である(表2)。

III 網膜症の病態

1. 網膜血管の透過性亢進

正常網膜血管の内皮細胞間には連続性の密着結合(tight junction, TJ), 別名 zonula occludens(ZO)が存在する。TJは数種類の蛋白によって構成され、膜貫通型蛋白である occludin, TJ 膜裏打ち蛋白である ZO-1 などが一つの複合体を成している¹¹⁾¹²⁾。また、網膜血管内皮細胞の細胞質には小胞(vesicle)やカベオラ(caveolae)が少なく、窓構造(fenestration)もみられず、いわゆる無窓型毛細血管を示す。そのため血管外への物質の透過が厳しく制限され、血液網膜関門(blood-retinal barrier, BRB)を形成する¹³⁾¹⁴⁾。

糖尿病は BRB の破綻を来す代表的な疾患の一つである。検眼鏡的に網膜症がみられない糖尿病患者に蛍光眼底造影を行うと、網膜血管から蛍光色素の漏出が高頻度にかかる¹⁵⁾。また、フルオロフォトメトリーを使った検討でも、糖尿病患者では網膜症のない時期であっても健常人に比べて硝子体中の蛍光色素の濃度が高い¹⁶⁾¹⁷⁾。したがって、検眼鏡的な網膜症の出現以前に、網膜血管の透過性亢進が既に起こっている。以前、我々は摘出ヒト眼球および実験的糖尿病ラットを用いて病理組織学的に網膜血管の透過性亢進について検討した¹⁸⁾¹⁹⁾。その結果、網膜血管では TJ の離解や小胞の増加により透過性が亢進し、免疫組織化学的には血漿蛋白であるアルブミンやフィブリノーゲン(フィブリン)の血管外漏出がみられた。

1) ヒト網膜症眼における血管透過性亢進の病理

我々は過去に、ヒト網膜症眼における網膜血管の透過性機序について病理組織学的に検討し、毛細血管および細静脈内皮細胞の細胞間 TJ の離解、細胞質小胞の増加、窓構造の形成を報告²⁰⁾した。今回、さらに症例を追加して病理組織学的に検討した。材料としては、眼窩内悪性腫瘍や血管新生緑内障などにより摘出した網膜症を有するヒト眼球(4眼)を用いた。摘出眼球はグルタルアルデヒドで固定し、エポンに包埋して超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。前回の所見に加えて、内皮細胞の細胞質にカベオラの増加もみられた(図2A, B)。カベオラは血管内腔側の細胞膜から出芽して細胞内小胞となり、次い

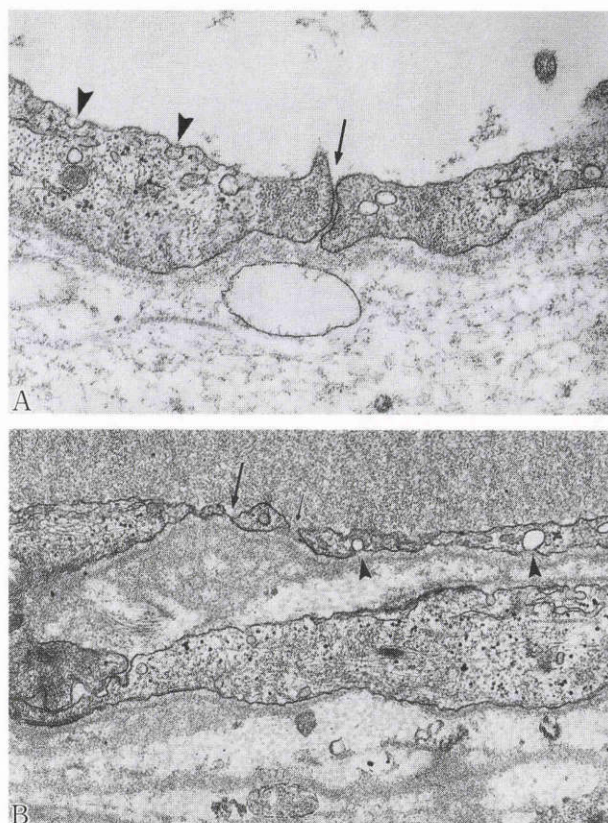


図2 ヒト網膜症眼における血管透過性の電子顕微鏡写真。

A: 網膜血管内皮細胞間の細胞間接合部が離解している(矢印)。また、内皮細胞の細胞質にはカベオラが多数みられる(矢じり)(32,600倍)。

B: 内皮細胞の細胞質には窓構造がみられ、隔膜を持つもの(長い矢印)と持たないもの(短い矢印)がある。また、カベオラも存在する(矢じり)(19,700倍)。

で基底膜側の細胞膜に融合することによって細胞を横断する物質輸送(transcytosis)を行うと考えられている²¹⁾。今回観察されたヒト網膜症眼でのカベオラの増加は、細胞内輸送が血管内皮細胞で盛んに行われていることを示すものであり、透過性亢進の一因となり得る。また、窓構造には隔膜がみられるものと、みられないものがあった(図2B)。一般に窓構造を持つ毛細血管は脈絡膜毛細血管のように隔膜を有するが、腎糸球体の有窓毛細血管は隔膜を持たない²²⁾。隔膜の有無により透過性に差があり、隔膜を持たない有窓毛細血管の方が物質を通しやすい²³⁾。今回のヒト網膜症眼の検討で、網膜毛細血管の内皮細胞に隔膜を持たない窓構造がみられたことは、その部では著しい透過性亢進を生じているものと推測された。

また、剖検時に摘出した網膜症眼(1眼)のアセトン固定凍結切片を作製して、免疫組織学的に光学顕微鏡を用いて観察した。血漿蛋白の一つであるアルブミンに対する抗体(Dako社、デンマーク)を用いて免疫染色を行うと、陽性反応が網膜血管壁および血管周囲にみられ、実際に血管透過性が亢進していることが証明された(図3)。さらに、血管透過性亢進の結果生じる硬性白斑にはフィ

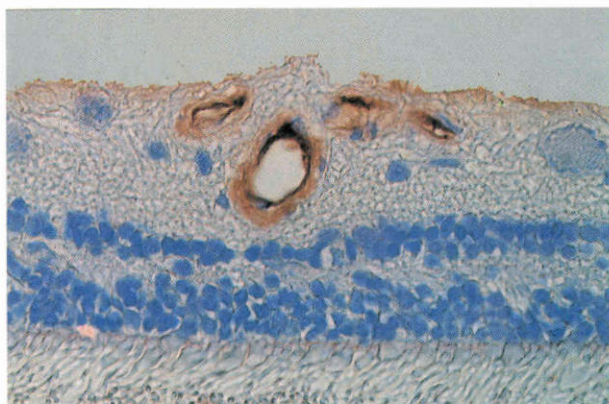


図3 ヒト網膜症眼におけるアルブミンの免疫組織化学光学顕微鏡写真。
陽性反応が網膜血管壁および血管周囲にみられる(360倍)。

ブリノーゲン(フィブリン)が含まれていた²⁴⁾。

以上から、網膜血管における透過性亢進の病理組織学的所見として、内皮細胞間を介する経路(細胞間輸送 intercellular or paracellular transport)と、細胞質の小胞やカベオラ、さらには窓構造を介する経路(細胞内輸送 intracellular or transcellular transport)の2つが考えられた。この透過性亢進の結果、血漿成分が網膜に貯留し、網膜浮腫や硬性白斑を生じる。

2) VEGF と血管透過性亢進(硝子体内注入)

VEGF は VPF とも呼ばれるように、血管透過性亢進作用を有し、ヒスタミンの約5万倍の強い透過性亢進作用を持つ⁵⁾。糖尿病ラット網膜では血管透過性亢進を示すアルブミンの血管外漏出がみられるとともに、VEGF 蛋白の発現が著明に亢進している²⁵⁾。透過性亢進を示す血管は VEGF 陽性の血管に多くみられ、罹病期間とともに数が増加する。また、VEGF mRNA の発現は血管周囲のグリア細胞、神経節細胞などにみられる²⁶⁾。したがって、VEGF が糖尿病眼の網膜血管透過性亢進に関与してい

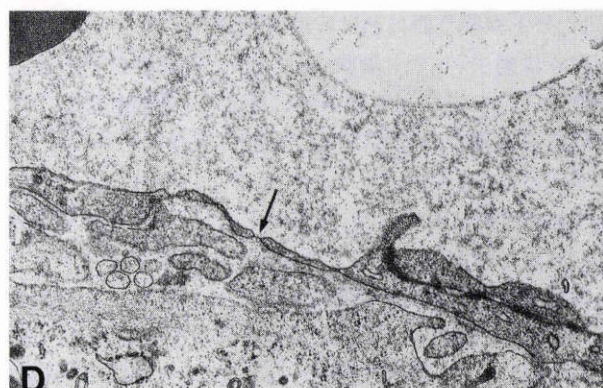
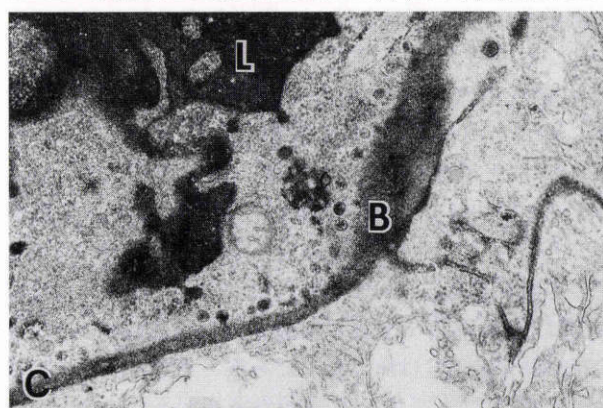
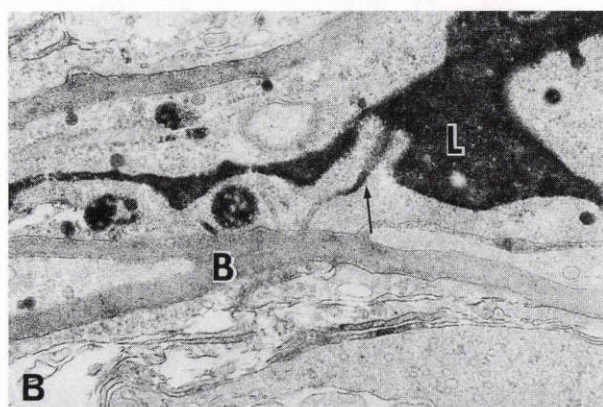
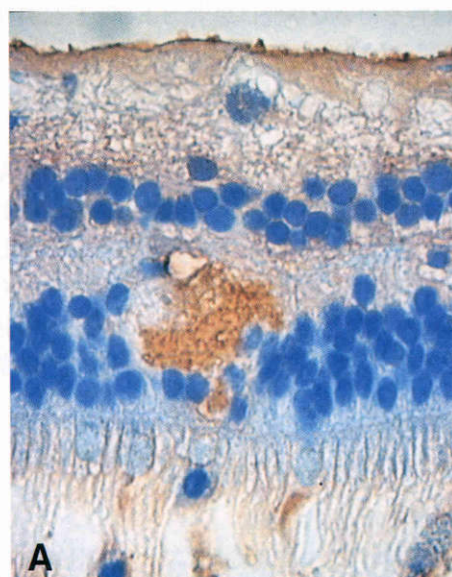


図4 VEGF 硝子体内注入による血管透過性亢進。

A: サル眼におけるフィブリノーゲンの免疫組織化学光学顕微鏡写真。サルの硝子体に VEGF 2 μ g/100 μ l を3日おきに4回投与した。外網状層に陽性反応がみられる(540倍)。

B, C: Horseradish peroxidase (HRP) を静注したラット眼の電子顕微鏡写真。ラットの硝子体に VEGF 500 ng/10 μ l を隔日、2回投与した後、HRP を静注し、ベンチジン反応を行った。

B: HRP の反応物が密着結合(TJ)を越えて(矢印)、内腔(L)から基底膜(B)に透過している(28,300倍)。

C: 反応物が内皮細胞の小胞や、内腔(L)側および基底膜(B)側のカベオラに多数みられる(28,900倍)。

D: サル眼の電子顕微鏡写真。サルの硝子体に VEGF 20 μ g/100 μ l を3日おきに4回投与した。内皮細胞に窓形成がみられる(矢印)(15,300倍)。

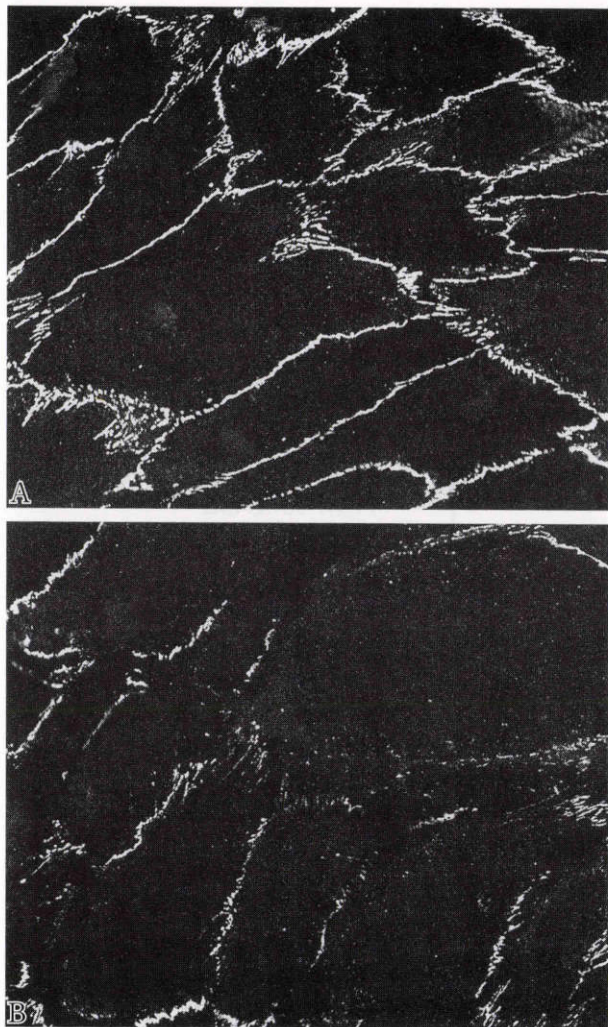


図 5 培養ウシ網膜血管内皮細胞における zonula occludens-1 (ZO-1) の免疫組織化学光学顕微鏡写真。

A: VEGF による刺激前では, ZO-1 は内皮細胞間に均一に染色される (430 倍)。

B: VEGF 刺激を行うと, ZO-1 の内皮細胞間での染色が減少する (430 倍)。

ることが推定される。

VEGF による血管透過性亢進の機序として, TJ 構成蛋白である occludin の発現低下²⁷⁾, vesiculovacuolar organelles (VVOs) の形成²⁸⁾, カベオラの増加²⁹⁾, 窓構造の形成^{30) 31)} などが報告されているが, 網膜血管に関してはまだ不明な点が多い。

今回, 我々はヒト VEGF₁₆₅ (Peprotec 社, 米国) をラット眼 (20 眼) およびサル眼 (5 眼) の片眼の硝子体に投与し, 網膜血管に与える影響を臨床的および病理組織学的に検討した。ラットでは 125~500 ng/10 μ l を隔日, 2~7 回, サルでは 2~20 μ g/100 μ l を 3 日おきに 4 回投与し, 眼球を摘出した。網膜血管の透過性を検討するために, ラットに 2% フルオレセインナトリウム (フルオレサイト®) 0.25 ml を静注し, 走査型レーザー検眼鏡 (scanning laser ophthalmoscope, SLO) で観察した (20 眼)。サル眼

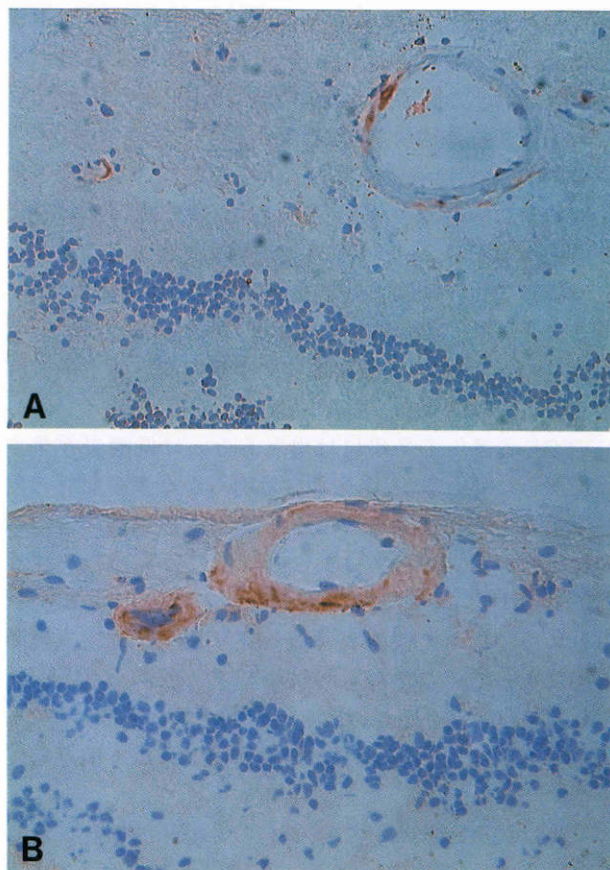


図 6 網膜症のないヒト糖尿病眼における AGEs と VEGF の免疫組織化学光学顕微鏡写真。

A: 網膜血管壁に AGEs (ピラリン) の沈着がみられる (180 倍)。

B: 網膜血管壁細胞に VEGF の発現がみられる (220 倍)。

(1 眼) では抗フィブリノーゲン抗体 (Dako 社, デンマーク) で免疫染色を行い, さらにラットの眼球摘出時 (3 眼) にはトレーサーの horseradish peroxidase (HRP) type II (Sigma 社, 米国) を体重 100 g 当たり 10 mg 静注し, ベンチジン反応を行い, 電子顕微鏡で観察した。ラット眼 (14 眼) およびサル眼 (4 眼) は通常の電子顕微鏡による観察のため, 眼球摘出後グルタルアルデヒドで固定し, エポンに包埋して超薄切片を作製した。ラット眼およびサル眼とも VEGF 投与で網膜血管の透過性亢進を生じ, 臨床的には網膜浮腫や網膜出血がみられた。また, SLO では蛍光色素の網膜血管外への漏出が局所的にみられた。病理組織学的にはフィブリノーゲンの血管外漏出 (図 4 A), TJ の離開 (図 4 B), 小胞やカベオラの増加 (図 4 C), 窓構造の出現 (図 4 D) などヒト網膜症眼と類似した所見が得られた。この結果は VEGF が網膜症の初期病変の形成, すなわち網膜血管の透過性亢進の病態形成に関与していることを示す。また, 我々は *in vitro* の系を用いて, 透過性亢進のメカニズムについて検討を加えた。コンフルエントになったウシ網膜血管内皮細胞を VEGF₁₆₅ (20

ng/ml)で刺激し、網膜血管内皮細胞の TJ に与える影響を免疫細胞学的に検討した。数種類の TJ 構成蛋白から ZO-1 に着目し、抗 ZO-1 抗体 (Zymed 社, カナダ) を用いて間接蛍光抗体法で細胞における局在を調べた。ZO-1 の局在は、未刺激状態では血管内皮細胞間の境界に一致して均一にみられたが、VEGF 刺激 60 分後には細胞間の染色性は低下した (図 5A, B)。VEGF による ZO-1 蛋白の局在変化は網膜血管内皮細胞間の TJ の機能変化、つまりバリアー機能の破綻を意味する。

3) ヒト単純網膜症眼および網膜症のないヒト糖尿病眼での AGEs 沈着と VEGF 発現

VEGF の遺伝子発現には虚血あるいは低酸素が重要な働きをしているが、臨床的には明らかな網膜血管の内腔閉塞が生じる前から VEGF の発現と透過性の亢進は起こっている。したがって、この時期には高血糖に伴う PKC の活性化、ポリオール代謝経路の活性亢進、酸化ストレスなど種々の代謝異常が VEGF 遺伝子発現亢進の要因になっていると考えられる^{32)~34)}。前述したように、これらの代謝異常は互いにネットワークを形成することによって増強し合い、網膜症の血管障害に広く関与している。

我々は代謝異常の中でも、蛋白の非酵素的糖化に注目して検討した。糖尿病では高血糖の持続に伴い、多くの生体蛋白が非酵素的糖化反応 (グリケーション) を受ける。血管壁細胞である内皮細胞や周皮細胞の細胞内および膜蛋白、基底膜などの細胞外マトリックス蛋白であるコラーゲンなども例外ではない。この反応はメイラード反応とも呼ばれ、前期反応と後期反応とに分けられる。AGEs とは糖の還元末端と蛋白のアミノ基とが非酵素的に反応し、前期反応に続く後期反応で形成される不可逆性の糖化蛋白である^{35)~37)}。AGEs は褐色化、蛍光性、分子架橋形成を特徴とし、AGE 構造としてカルボキシメチルリジン (carboxymethyllysine, CML)、ピラリン、ペントシジン、クロスリンなどが同定されている。また、AGEs 形成の中間産物である 3-デオキシグルコソニルやメチルグリオキサールなども糖尿病合併症の成因に関与している可能性がある。

我々は抗 CML 抗体を用いて、免疫組織化学的にヒト網膜症眼での局在について検討した³⁸⁾。CML は増殖網膜症眼ばかりでなく単純網膜症眼の網膜、特に血管壁および血管周囲のグリア細胞に沈着がみられた。そして、CML の沈着と VEGF の発現には相関がみられ、VEGF 発現に AGEs の関与が推定された。また、抗ピラリンモノクローナル抗体および抗 VEGF ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社, 米国) を用いて、剖検時に摘出した網膜症のないヒト糖尿病眼 (2 眼) を検討すると、網膜血管壁にピラリンの沈着および血管壁細胞に VEGF の発現がみられた (図 6A, B)。培養ウシ網膜血管内皮細胞を用いて *in vitro* で検討すると、AGEs が網膜

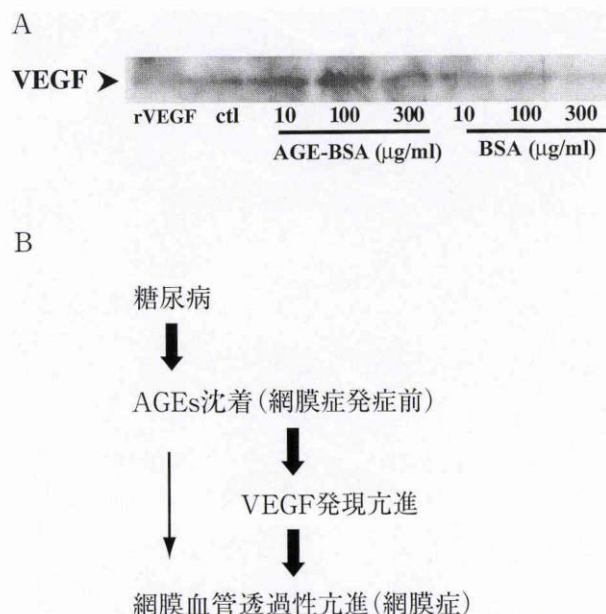


図7 AGEs の網膜症への関わり。

A: 培養ウシ網膜血管内皮細胞において、AGE 化ウシ血清アルブミン (AGE-BSA) は VEGF の産生を亢進させる。rVEGF: リコンビナントヒト VEGF

B: AGEs は網膜症の発症前より血管壁に沈着し、直接あるいは VEGF の作用を介して早期病変形成の段階から網膜症に関与する。

血管内皮細胞の VEGF 産生促進の一因になっていることが確認された (図 7A)。また、AGEs を硝子体に注入すると、グリア細胞をはじめとした網膜細胞に VEGF の発現亢進を来すことも報告³⁹⁾されている。以上から、糖尿病網膜では網膜症の発症前から AGEs を介した VEGF の発現亢進がみられ、網膜血管の透過性亢進に関与すると考えられる (図 7B)。また、AGEs が直接血管透過性を亢進させるという報告^{40)~42)}もある。

細胞外で形成された AGEs は内皮細胞や周皮細胞が発現する受容体と結合することによって、種々の細胞反応を惹起する。これまでに分子クローニングされている AGE 受容体として、receptor for AGE (RAGE), macrophage scavenger receptor type-A (MSR-A), galectin-3 などがある^{43)~45)}。今回、RAGE に対する抗血清を用いて、剖検で得られた網膜症眼 (1 眼) の網膜を免疫組織化学的に検討すると、確かに網膜血管壁細胞に発現していることが確認された。

一方、細胞内で形成される AGEs は RAGE などの受容体を介さずに直接、その細胞機能に影響を与える。さらに、細胞内外での AGEs 産生過程や AGEs の受容体への結合後に活性酸素が産生される。活性酸素は細胞内でセカンドメッセンジャーとして機能し、転写因子 AP-1 や NF-κBなどを活性化し、種々の細胞接着因子や VEGFをはじめとしたサイトカインの発現を誘導することによって、さらなる病態形成に関与する^{39) 46)~48)}。

表 3 血管内皮細胞と血栓

血管内皮細胞は、凝固、線溶、血小板機能に関わる種々の因子を産生し、そのバランスで血栓形成が制御されている。

	抗血栓性因子	向血栓性因子
凝固系	ヘパラン硫酸プロテオグリカン	組織因子(TF)
	組織因子経路インヒビター(TFPI)	
	トロンボモジュリン(TM)	
線溶系	組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)	プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1(PAI-1)
	プロスタサイクリン(PGI ₂)	フォンウィルブラント因子(vWF)
血小板系	一酸化窒素(NO)	血小板活性化因子(PAF)

4) 網膜血管の透過性亢進が網膜症の病態に与える影響

ヒト糖尿病眼に生じる網膜血管の病理組織学的所見の中で、基底膜の肥厚や周皮細胞の変性が初期変化として知られているが、透過性亢進はこれらの変化が生じる以前に出現する¹⁸⁾。したがって、基底膜の肥厚や周皮細胞の変性は、主に透過性亢進の結果生じた二次的な病変と考えられる。いったん、AGEs や VEGF によって内皮細胞の透過性が亢進すると、基底膜にはアルブミンやフィブリノーゲンなどの血漿蛋白が蓄積し、肥厚の一因となる。加えて、これまで直接血液成分に触れることがなかった基底膜成分である IV 型コラーゲンやラミニンなども直接高血糖に曝されることによって AGE 化される。AGE 化された基底膜成分は代謝回転が遅くなり、基底膜肥厚が助長される。また、AGEs は周皮細胞の増殖に抑制的に作用し、さらに急性毒性を示すことから、周皮細胞変性の一因と考えられている⁴⁹⁾。

網膜血管の透過性亢進によって生じた網膜の浮腫液や硬性白斑にはフィブリノーゲンをはじめとした血漿蛋白が含まれる。フィブリノーゲンあるいはフィブリンは血管新生に促進的に働く⁵⁰⁾⁵¹⁾。また、硬性白斑には VEGF の発現がみられ⁵²⁾、硬性白斑の存在自体がさらなる透過性亢進や血管新生にも関与していることが推定される。

以上のように、AGEs や VEGF などによって生じた網膜血管の透過性亢進は、さらなる AGEs の産生亢進や VEGF の発現を促進し、網膜症の悪化を招く。

2. 網膜血管の内腔閉塞

一般的に血管の閉塞には血栓形成が重要な役割を果たす。血管内皮細胞は抗血栓作用と向血栓作用の相反する機能を有し、抗血栓作用には抗凝固作用、線溶系促進作用、抗血小板作用がある(表 3)⁵³⁾⁵⁴⁾。

凝固系はその開始機序の違いにより外因系凝固と内因系凝固の 2 つに分けられる。これらの凝固反応においては、複数の凝固因子によるカスケード反応を経て最終的にはフィブリンが形成される。外因系凝固の引き金となるのは内皮細胞が産生する組織因子(tissue factor, TF)である。その一方で内皮細胞は抗凝固作用を持つ組織因

子経路インヒビター(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)、トロンボモジュリン(thrombomodulin, TM)、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなども産生する。

線溶系とは血栓の主成分であるフィブリンを分解する系で、内皮細胞から線溶促進作用を持つ組織プラスミノゲンアクチベーター(tissue plasminogen activator, t-PA)と抗線溶作用を持つプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)が分泌され、両者のバランスにより線溶動態が決定される。

血小板は活性化されると、凝集と呼ばれる過程を経て血栓を形成する。内皮細胞からは血小板活性化作用を有するフォンウィルブラント因子(von Willebrand Factor, vWF)や血小板活性化因子(platelet-activating factor, PAF)が産生され、また一方で、血小板凝集を抑制するプロスタサイクリン(prostacyclin, PGI₂)や一酸化窒素(nitric oxide, NO)も産生される。

生理的には抗血栓作用が優勢で血液の流動性を保ち、円滑な循環に働いているが、糖尿病では種々の凝固因子の活性化^{55)~57)}、線溶活性の低下⁵⁸⁾⁵⁹⁾あるいは血小板凝集能の亢進⁶⁰⁾⁶¹⁾がみられ、血栓が形成されやすくなる。網膜血管の閉塞は臨床的に蛍光眼底造影上、蛍光色素の充盈欠損域としてみられる。まず、毛細血管領域の小範囲の欠損域が生じ、その後、閉塞が細静脈や細動脈にも及び、不可逆性の血管閉塞によって遂には広範囲の充盈欠損域が形成される。しかし、可逆性を有する段階では閉塞部の再疎通像もみられる⁶²⁾。

実験的糖尿病ラットの網膜血管では、内腔閉塞の早期の病理組織学的所見として、フィブリン、血小板を主体とした微小血栓が形成される⁶³⁾。また、活性化された白血球による閉塞も報告⁶⁴⁾⁶⁵⁾されている。

1) ヒト網膜症眼における血管閉塞の病理

ヒト網膜症眼における網膜血管閉塞の病理組織像として、血管壁細胞が消失し、基底膜のみが残存し、内腔はグリア細胞の細胞質により占められている所見が 30 年以上前に電子顕微鏡を用いて報告されているが、これらの所見は血管閉塞の終末像である⁶⁶⁾⁶⁷⁾。最近、血管閉塞に白

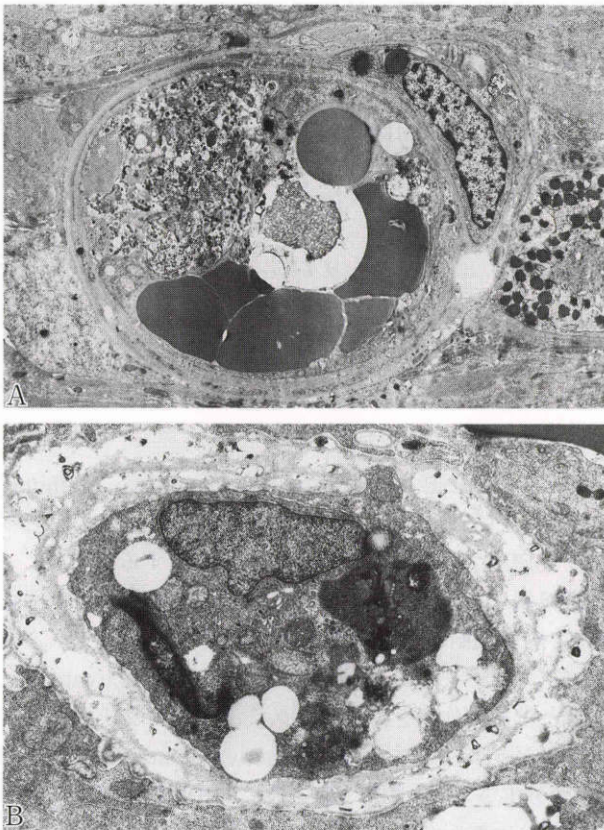


図8 ヒト網膜症眼における血管閉塞の電子顕微鏡写真.

A: 網膜血管の内腔は血栓により閉塞している(2,900倍).

B: 血管壁細胞は消失し, 内腔にはマクロファージがみられる(7,300倍).

血球の重要性が指摘されているが, 光学顕微鏡による観察であり, 電子顕微鏡による詳細な観察はなされていない⁽⁶⁸⁾.

今回, III. 1. 1)の項で使用したヒト眼球を用いて, 網膜血管の内腔の状態を電子顕微鏡で観察した. 多くの網膜血管の内腔は開存していたが, 細静脈や毛細血管の一部に血栓形成がみられた. 血栓はフィブリン, 血小板, 白血球, 赤血球, 細胞残渣物などから形成されていた(図8A). また, 血管壁細胞は消失して基底膜のみが残り, 内腔はグリア細胞の細胞質やマクロファージ, あるいは無定型物質で占められている閉塞像もみられた(図8B). したがって, 血管閉塞の早期像は網膜血管における血栓形成であり, 後期の閉塞にはグリア細胞だけではなく, マクロファージの関与もあり得る.

2) VEGF による血管閉塞(硝子体内注入)

Tolentino ら⁽⁶⁹⁾は VEGF をサルの硝子体に注入すると, 蛍光眼底造影で充盈欠損域が出現することを報告したが, その病理組織学的所見は明らかにしていない. 我々は III. 1. 2)の項で用いた VEGF 硝子体注入ラット眼およびサル眼における網膜血管の閉塞の機序を検討した. ラット網膜では血管閉塞の一つの指標である軟性白斑が

みられ(図9A), 蛍光眼底造影では無灌流領域の形成がみられた. 電子顕微鏡による観察では, ラット眼およびサル眼の網膜血管の内腔に血栓がみられ, 血栓はフィブリン, 血小板, 白血球などから形成されていた(図9B).

以上から VEGF の硝子体注入を行うと, 網膜症に類似した網膜血管の内腔閉塞が出現し, その病理組織像は血栓の形成であった.

3) VEGF および AGEs による血栓形成の機序

VEGF は組織因子の発現を誘導したり, vWF の分泌を促進することから血栓形成に関与していると考えられている⁽⁷⁰⁾⁽⁷¹⁾. また, AGEs は血栓形成を抑えるトロンボモジュリンやプロスタサイクリンの産生を抑制し⁽⁵⁰⁾⁽⁷²⁾, 抗線溶作用を持つ PAI-1 の産生を促進する⁽⁷³⁾. しかし, 網膜症の網膜局所における血栓形成の機序は不明である. そこで, 我々は血液凝固の観点から組織因子を, 血小板機能の観点から最近分離, 精製された prostacyclin-stimulating factor (PSF) に注目して検討した.

a) 組織因子

組織因子は血液凝固第 III 因子で, 外因系凝固の initiator として機能する. 正常では主に血管壁の外層に存在して, 血管壁が破綻した際の止血に重要な役割を演じているが, 病的状態では血管内皮細胞表面にも発現して凝固亢進の原因となる. 血管内皮細胞の組織因子は, さらに AGEs によって発現が誘導される⁽⁷⁴⁾. しかし, これまで網膜症への関与については明らかにされていない. そこで, 我々は手術時に得られた前房水中の組織因子濃度と網膜症の重症度の関係を調べた. 対象は糖尿病患者 44 例と, 年齢, 性別を合わせたコントロール群 35 例で, 26 例が単純網膜症, 9 例が活動性のない増殖網膜症, 9 例が活動性増殖網膜症であった. 白内障手術時に前房水約 100 μ l を採取し, one-step sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて組織因子濃度を測定した. 得られた組織因子濃度と網膜症の重症度, 性別, 年齢, 糖尿病罹病期間(10 年以上, 10 年未満), 腎機能, 血糖コントロール(HbA1c), 前房水中蛋白濃度, 血清中組織因子濃度について相関関係を調べた. その結果, 前房水の組織因子濃度と網膜症の重症度, 前房水中蛋白濃度は有意に相関していた. つまり, 活動性網膜症患者の前房水中組織因子濃度[244.5(SD 112.4)pg/mL]は単純網膜症患者[132.4(SD 50.1)pg/mL, $p < 0.05$]およびコントロール群[114.9(SD 95.1)pg/mL, $P < 0.01$]に比べ有意に上昇していた. また, 長期に糖尿病に罹患している患者群[249.5(SD 105.6)pg/mL]の方が, 短期間の罹患者群[129.3(SD 95.3)pg/mL]より前房水中組織因子濃度は高かった($p < 0.05$) (Kruskal-Wallis analysis). しかし, 前房水中組織因子濃度と血清中組織因子濃度の間に有意な相関はみられず, 糖尿病状態では眼局所において組織因子の産生が亢進していることが推定された.

そこで, 剖検で得られた摘出眼球(網膜症眼 2 眼, 非糖

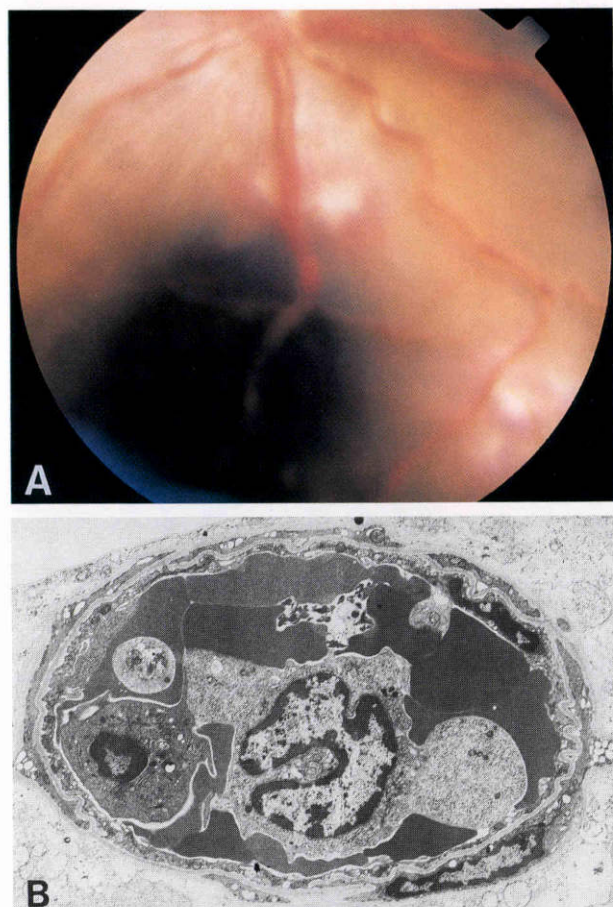


図9 VEGF 硝子体注入による血管閉塞.

A: ラット眼の眼底写真. ラットの硝子体に VEGF 500 ng/10 μ l を隔日, 3 回投与した. 数個の軟性白斑がみられる.

B: ラット眼の電子顕微鏡写真. ラットの硝子体に VEGF 500 ng/10 μ l を隔日, 4 回投与した. 網膜血管の内腔に血栓がみられる (3,000 倍).

糖尿病眼 2 眼) について, 網膜における組織因子の発現と局在を免疫組織学的に検討した. 網膜のアセトン固定凍結切片を作製し, 抗組織因子モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行うと, 確かにヒト網膜症眼の網膜血管壁には非糖尿病眼に比べて強い組織因子の発現がみられた (図 10A). よって, 組織因子は糖尿病網膜局所において発現が亢進しており, 特に血管内皮細胞に強く局在していたことから, 前房水中の組織因子濃度の起源の一つとしては網膜血管内皮細胞が考えられた. さらに, 網膜症において血管内皮細胞の組織因子発現を亢進させている因子について培養網膜血管内皮細胞を用いて検討すると, VEGF および AGEs が血管内皮細胞の組織因子産生を亢進させることが確認された (図 10B).

b) Prostacyclin-stimulating factor (PSF)

PSF はヒト線維芽細胞培養上清から分離精製された分子量 31 kDa の分泌型蛋白で, 大動脈血管内皮細胞に作用してプロスタサイクリンの産生を促進することから

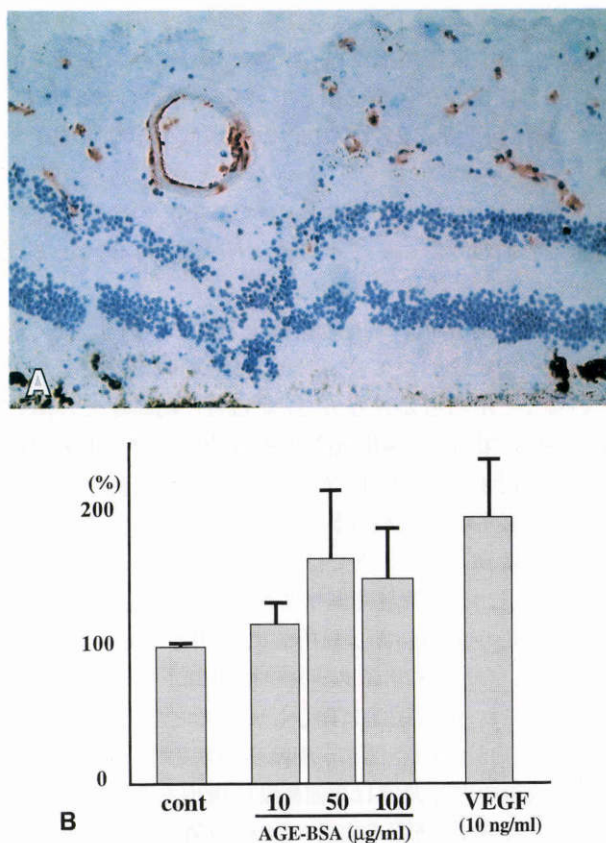


図10 組織因子の眼組織における発現.

A: ヒト網膜症眼における組織因子の免疫組織化学光学顕微鏡写真. 網膜血管壁細胞に陽性所見がみられる (120倍).
B: AGE-BSA および VEGF によって培養ウシ網膜血管内皮細胞の組織因子活性は促進される.

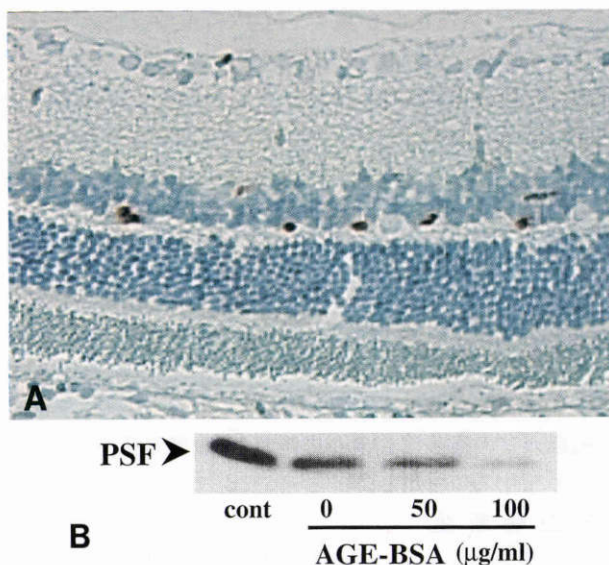


図11 Prostacyclin-stimulating factor (PSF)の眼組織における発現.

A: 正常ラット網膜における PSF の免疫組織化学光学顕微鏡写真. 網膜血管壁細胞に陽性所見がみられる (180倍).
B: 培養ウシ網膜血管内皮細胞の PSF 蛋白の発現は AGE-BSA によって抑制される.

PSF と呼ばれる⁷⁵⁾. PSF はプロスタサイクリンの作用を介して抗血小板凝集能や血管拡張作用によって血管の恒常性維持に重要な役割を演じていると考えられている. また, 糖尿病患者における PSF の発現低下が動脈硬化などの大血管障害に関与していることが推定されている⁷⁶⁾. しかし, これまで網膜における PSF の発現, 局在, 病態との関わりについては全く不明であり, 今回我々はこれらについて検討を行った.

抗 PSF 抗体を用いて免疫組織化学的に検討すると, 正常ラット網膜において, PSF は血管壁細胞で強く発現していることが明らかになった(図 11A). 網膜症との関わりについて培養ウシ網膜血管内皮細胞および周皮細胞を用いて検討すると, AGEs が血管内皮細胞における PSF 発現を阻害することがわかった(図 11B). 一方, 周皮細胞に対しては *in vitro* の系では阻害作用は軽度しかみられなかった. しかし, 糖尿病網膜において周皮細胞が変性・脱落するような部位では局所的に著明な PSF の低下が推測され, プロスタサイクリンの産生低下による易血栓性が惹起され, 血管閉塞に関与していると考えられた.

4) 網膜血管の内腔閉塞が網膜症の病態に与える影響

網膜血管の内腔閉塞は周囲網膜に虚血あるいは低酸素状態をもたらす. 網膜虚血は VEGF の遺伝子発現に重要な働きをしている. その機序として, 転写因子(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)を主要な因子とした転写レベルの亢進⁷⁷⁾⁷⁸⁾, さらに低酸素状態で蓄積するアデノシンを介する mRNA の安定性亢進が報告されている⁷⁹⁾.

今回の検討ではヒト網膜血管の閉塞に血栓形成が関与していたが, 血栓には活性化された血小板が含まれていた. 血栓中の活性化血小板も VEGF の重要な供給源であることが腫瘍血管新生の場において示されている^{80)~82)}. また, 血栓中の白血球も種々のサイトカインや接着因子を放出することによって, さらなる循環障害および進展病変形成に関与していると考えられる⁶⁴⁾⁶⁹⁾. 加えて, 組織因子の発現と VEGF の発現は互いにフィードバックを掛け合うことによって悪循環を繰り返す^{83)~86)}. 血管閉塞の後期に内腔にみられるグリア細胞やマクロファージも VEGF などのサイトカインを産生する^{87)~90)}. したがって, 網膜血管閉塞による周囲網膜の虚血や血栓形成などによる血管閉塞自体が VEGF の産生を亢進させ, さらなる網膜血管の透過性亢進や内腔閉塞, 血管新生を来し, 網膜症の悪化につながる.

3. 血管新生

血管新生(angiogenesis)とは, 既存の血管から内皮細胞が遊走, 増殖し, 新しい血管網を形成する現象である. 一般的に血管新生は5つのステップ, すなわち

- (1) 内皮細胞の活性化,
- (2) 基底膜やその周囲の細胞外マトリックスの融解,
- (3) 内皮細胞の出芽と遊走,
- (4) 内皮細胞の増殖,

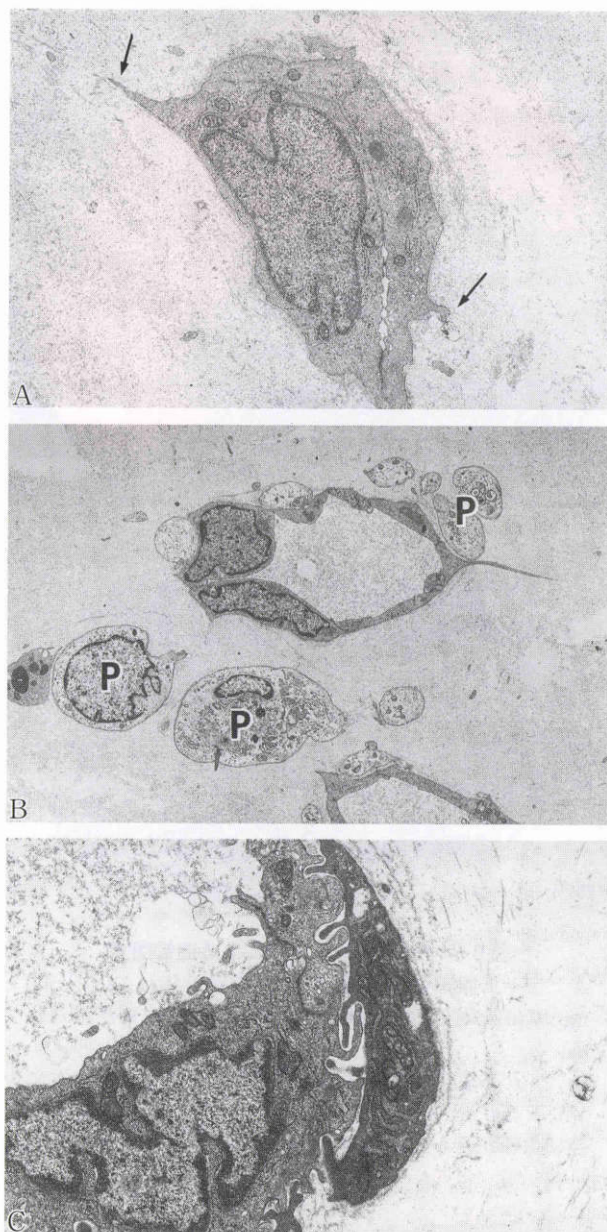


図12 ヒト網膜症眼における血管新生の電子顕微鏡写真.

A: 未熟な新生血管は活動性の高い内皮細胞のみから成り, 内腔は狭い. 内皮細胞には細胞突起がみられる(矢印)(6,200倍).

B: 未熟な新生血管の内皮細胞周囲に周皮細胞(P)が遊走してくる(2,200倍).

C: 内皮細胞と周皮細胞の細胞膜に interdigitation がみられる(9,200倍).

(5) 内皮細胞の分化による管腔形成,

により行われ, すべてのステップに VEGF を中心としたサイトカインが関与する⁹¹⁾.

増殖網膜症では血管新生, すなわち新生血管の発生が基本病態である. 新生血管は臨床的に網膜血管, 主に細静脈から発生する. 網膜症における血管新生も一般的な血管新生と同じ機序で起こると思われるが, 詳細は不明である.

1) ヒト網膜症眼における血管新生の病理

硝子体内増殖組織に含まれる新生血管の微細構造については今までもいくつかの報告^{92)~94)}があるが、成熟過程を詳細に検討した報告はない。最近の *in vitro* および *in vivo* の実験モデルを用いた検討では、新生血管の成熟に周皮細胞の役割が重要視されている⁹⁵⁾⁹⁶⁾。

そこで今回、血管新生緑内障のため摘出したヒト網膜症眼(2眼)の硝子体内増殖組織および硝子体手術の際に採取した活動性の高い硝子体内増殖組織(8症例)を病理組織学的に検討した。増殖組織はグルタルアルデヒドで固定し、エポンに包埋して超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。増殖組織には多数の新生血管が含まれ、新生血管には種々の成熟過程を示す像がみられた。活動性の高い未熟な新生血管は内皮細胞のみから成り、狭い内腔を有していた(図 12A)。内皮細胞の細胞質は厚く、リボゾームや粗面小胞体などの細胞内小器官が豊富で、細胞突起もみられた。新生血管の内皮細胞間には TJ はみられず、しばしば未熟な細胞間接合部がみられた。また、基底膜は薄く部分的に存在した。やがて、周皮細胞が内皮細胞の周りに遊走してくる(図 12B)。周皮細胞は内皮細胞を取り囲むような形態をとり、内皮細胞の細胞突起を覆うような像もみられた。また、内皮細胞と周皮細胞の細胞膜の接触や interdigitation もみられた(図 12C)。成熟した新生血管は内皮細胞と周皮細胞から成り、お互いは基底膜を有し、内皮細胞の細胞質の菲薄化および窓形成もみられた。このように、網膜症の新生血管の成熟過程には周皮細胞が重要な役割を果たしている。

過去の報告では、網膜症眼の網膜血管において周皮細胞が特異的に変性、消失するといわれている⁶⁶⁾⁹⁷⁾。新生血管を構成する周皮細胞の起源として、網膜血管の周皮細胞の遊走、増殖が考えられるが、もし、すべての網膜血管の周皮細胞が変性するのであれば、その可能性は低い。そこで、新生血管の観察に用いた網膜症眼(2眼)の網膜を電子顕微鏡的に検討した。増殖網膜症を呈する網膜血管の周皮細胞には今までの報告のように変性したものが多数みられたが、中には変性像がみられないものも存在した(図 13A)。次に剖検で得られた網膜症眼(1眼)のホルマリン固定パラフィン包埋切片を抗増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)モノクローナル抗体(Dako 社, デンマーク)を用いて免疫染色を行った。網膜毛細血管および細静脈壁の外層の細胞核に陽性所見がみられ、活動性の高い周皮細胞の存在が確認された(図 13B)。

以上から、血管新生初期の未熟な新生血管は内皮細胞のみから構成されているが、次第に周皮細胞が遊走し、新生血管は成熟する。また、網膜ではすべての周皮細胞が変性するわけではなく、活動性の高い周皮細胞も存在する。おそらく、これら活動性の高い周皮細胞が新生血管の内皮細胞周囲に増殖、遊走してくるものと推測する。

2) VEGF と血管新生(硝子体内注入)

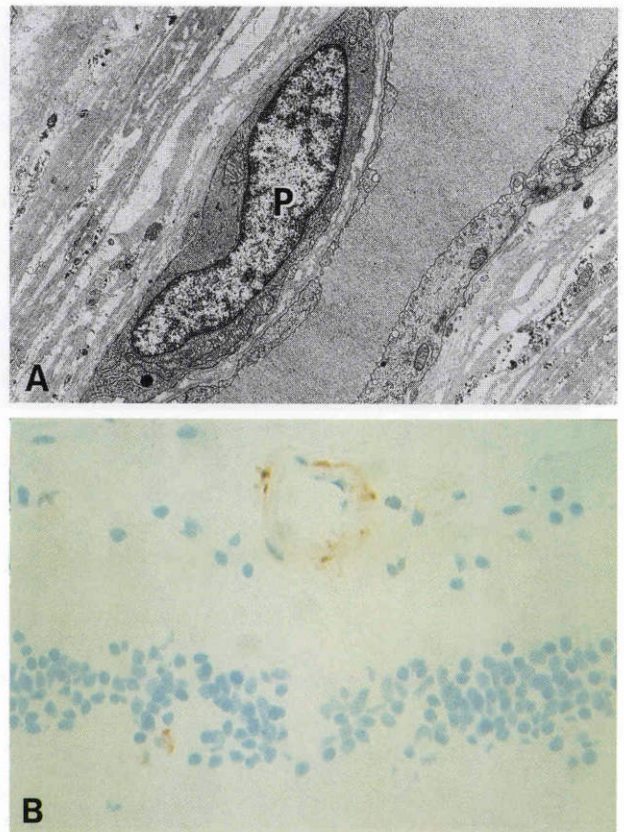


図 13 ヒト網膜症眼における周皮細胞の動態。

A: ヒト増殖網膜症眼の網膜血管の電子顕微鏡写真。周皮細胞(P)には変性所見はみられない(4,800倍)。

B: ヒト網膜症眼における増殖細胞核抗原(PCNA)の免疫組織化学光学顕微鏡写真。網膜血管の周皮細胞に陽性像がみられる(220倍)。

VEGF を硝子体に投与すると、家兎眼では網膜血管から新生血管を発生させることができるが、サル眼では新生血管の報告⁹⁸⁾はなされていない。今回、ラット眼およびサル眼において VEGF が実際に新生血管を起こし得るかどうかについて、III. 1. 2)の項で用いた VEGF 硝子体注入ラット眼およびサル眼を用いて病理組織学的に検討した。Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled アルブミン(Sigma 社, 米国)3 mg/ml を静注したラット網膜の伸展標本では新生血管の発生がみられた(図 14A)。ラット眼およびサル眼の網膜浅層の網膜血管内皮細胞は活動性が高くなり、増殖の指標である核分裂像も確認された(図 14B)。また、既存の網膜血管の内皮細胞は多数の細胞突起を出し、遊走像もみられた(図 14C)。未熟な新生血管はヒト網膜症眼で示したように、内皮細胞のみから構成され、狭い内腔が形成されていた(図 14D)。以上の結果から、VEGF の硝子体内単独注入により、ラット眼およびサル眼において網膜血管から新生血管が生じ得ることが確認された。

3) VEGF とその受容体システム

VEGF のシグナル伝達は内皮細胞が発現する受容体

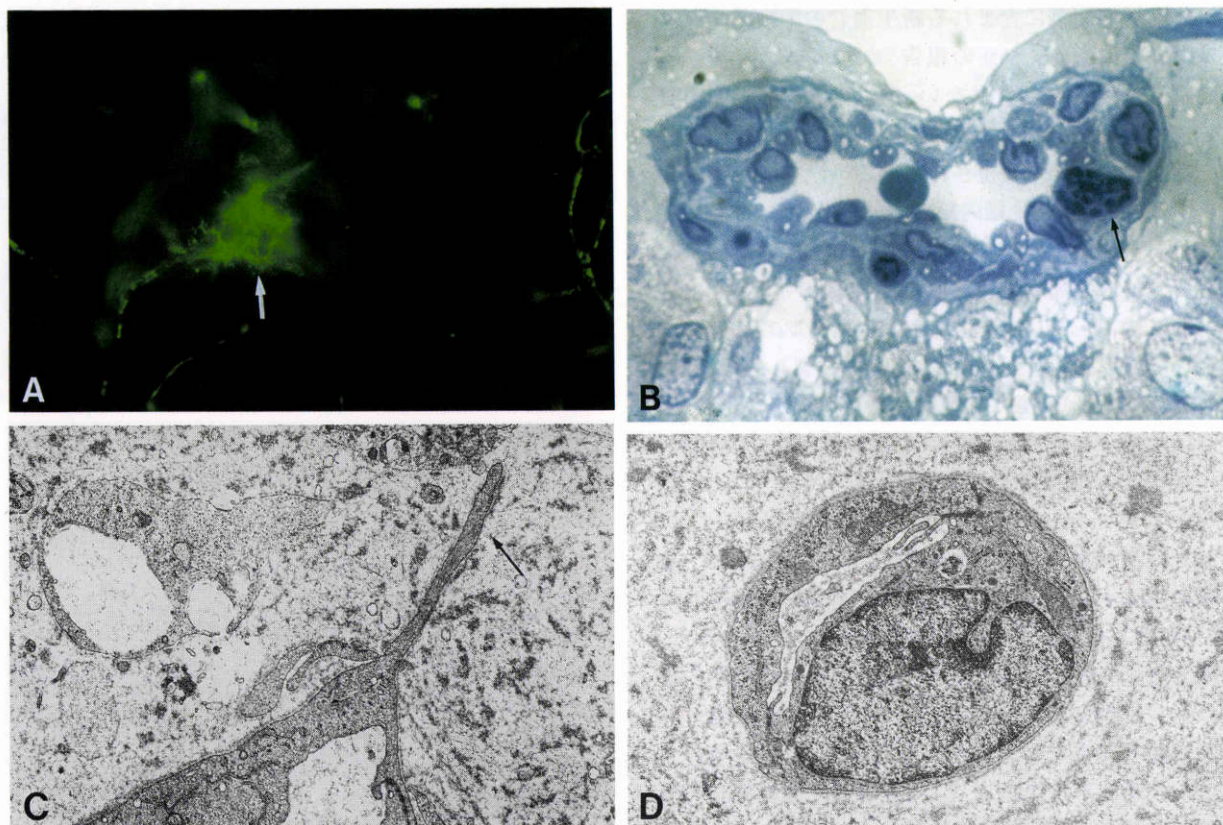


図 14 VEGF 硝子体注入による血管新生.

A : Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled アルブミンを静注したラット網膜の伸展標本. ラットの硝子体に VEGF 500 ng/10 μ l を隔日, 7 回投与した. 新生血管がみられる (矢印).
 B : ラット眼の電子顕微鏡写真. ラットの硝子体に VEGF 500 ng/10 μ l を隔日, 7 回投与した. 網膜表層の血管内皮細胞に核分裂像がみられる (矢印) (800 倍).
 C : サル眼の電子顕微鏡写真. サルの硝子体に VEGF 20 μ g/100 μ l を 3 日おきに 4 回投与した. 内皮細胞には長い細胞突起がみられる (矢印) (9,300 倍).
 D : サル眼の電子顕微鏡写真. サルの硝子体に VEGF 20 μ g/100 μ l を 3 日おきに 4 回投与した. 未熟な新生血管で内皮細胞のみから成り, 狭い内腔を形成する (9,700 倍).

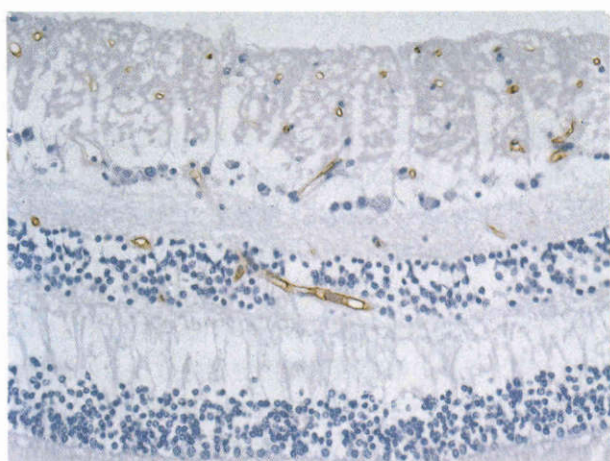


図 15 ヒト網膜症眼における VEGF 受容体 kinase insert domain-containing receptor (KDR) の免疫組織化学光学顕微鏡写真.

単純網膜症の時期であるにも関わらず, KDR の発現亢進が網膜血管内皮細胞においてみられる (120 倍).

を介して行われるが, 高親和性 VEGF 受容体 (VEGF receptor, VEGFR) としては, fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) と kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase-1 (KDR/Flk-1, KDR) が知られており⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾, Flt-1 を VEGFR-1, KDR を VEGFR-2 とも呼ぶ. いずれも典型的なチロシンキナーゼ型受容体であり構造的に類似しているが, VEGF による内皮細胞の増殖シグナルを誘導するのは KDR である¹⁰¹⁾¹⁰²⁾.

これまで, VEGF の発現制御については詳細に検討されている一方で, 受容体に関してはまだ不明の点が多い. VEGF によるシグナルが受容体を介するものである以上, 受容体の発現量あるいはその発現を制御している因子を明確にすることは治療への応用を考えるうえでも重要である. そこで, 我々は増殖シグナルを司る KDR の発現制御機構に重点を置き検討を行った.

まず, 剖検で得られた摘出眼球 (網膜症眼 2 眼, 非糖尿病眼 2 眼) を用いて, ヒト網膜における KDR の発現について特異抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社, 米国) を用

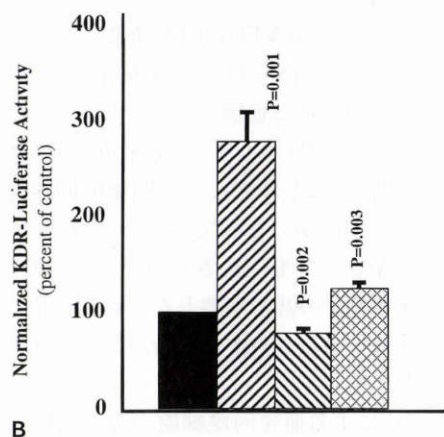
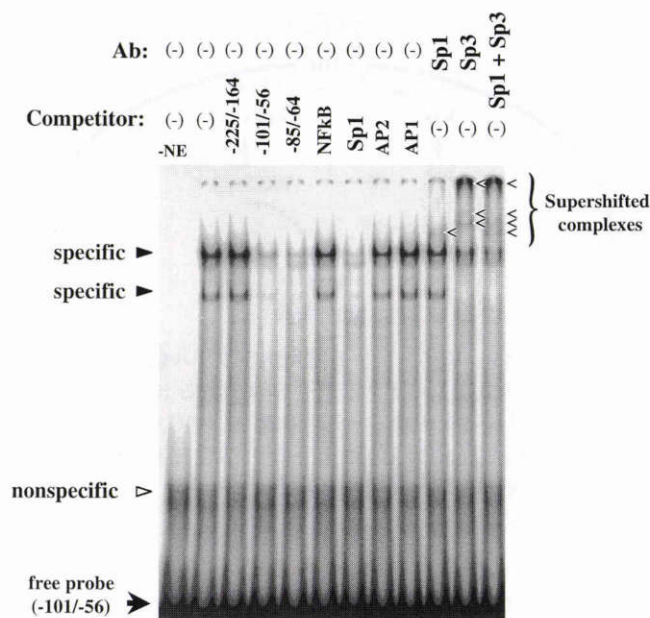


図 16 KDR プロモーター活性を制御する転写因子.

A: ゲルシフトアッセイによる KDR プロモーター解析。
培養ウシ網膜血管内皮細胞から核蛋白を抽出し、KDR プロモーター活性部位 (-101~-56) をプローブとしてゲルシフトアッセイ及びスーパーシフトアッセイを行うと、その部位には転写因子 Sp1, Sp3 が結合することがわかる。

B: Sp1/Sp3転写因子の発現ベクター導入によるKDRプロモーター活性. 培養ウシ網膜血管内皮細胞にSp1/Sp3転写因子の発現ベクターを導入すると, KDRプロモーター活性はSp1によって促進され, Sp3が拮抗的阻害作用を有していることがわかる(文献104から引用).

 : Control vector

 : Sp1 pCMV4

 : Sp3 pCMV4

$$: \text{Sp}1 + \text{Sp}3$$

+

KDR-promoter+Luciferase construct

いて免疫染色で検討した。その結果、糖尿病のない網膜では KDR の発現が非常に弱いのにに対し、糖尿病網膜では単純網膜症の時期であるにも関わらず KDR の発現が亢進していることが明らかになった(図 15)。

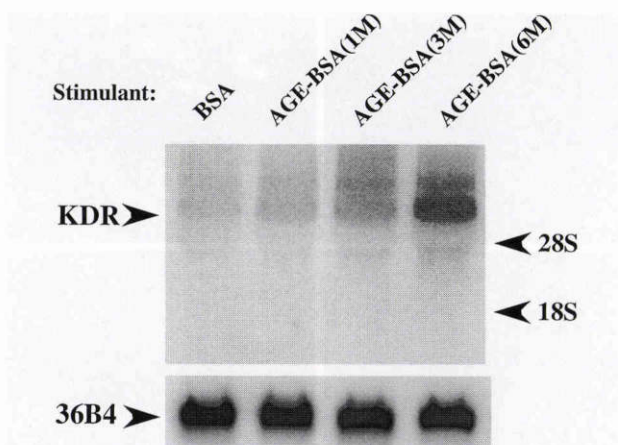


図 17 AGE による KDR 遺伝子発現促進.

In vitro で作成した AGE-BSA によって培養ウシ網膜血管内皮細胞を刺激すると、反応期間の長い AGE-BSA によって KDR 遺伝子の発現が促進される。M: month, 刺激時間はすべて 24 時間。

次に、培養ウシ網膜血管内皮細胞を用いて、種々の培養条件における KDR の発現量と、それぞれの条件における VEGF の内皮細胞増殖促進作用の相関をみてみると、VEGF による増殖促進作用は、内皮細胞における KDR の発現量に依存することが確認された¹⁰³⁾。このことは、KDR の発現を人為的に制御することができさえすれば、たとえ VEGF が多量に存在したとしても、その作用を阻害し得ることを意味する。

そこで、将来的に KDR 遺伝子の発現を制御し得るものか、その発現制御に関わる転写因子について検討した。培養網膜血管内皮細胞を用いて、ゲルシフトアッセイによる KDR プロモーター解析を行うとともに、転写因子の発現ベクター導入により KDR プロモーター活性に与える影響を検討した。その結果、転写因子 Sp 1 が KDR プロモーター活性促進因子として機能しており、同じファミリーである Sp 3 が拮抗的阻害作用を有していることが明らかになった¹⁰⁴⁾(図 16)。これら転写因子の発現あるいは作用を阻害することも治療応用への糸口の一つになり得る。

さらに、糖尿病網膜で KDR の発現が亢進している原因物質として、AGEs の可能性について検討すると、AGEs は転写因子 Sp 1 を活性化し、KDRmRNA の発現亢進の一因になっていることが確認された(図 17)。さらに、VEGF との相乗作用があるといわれているが、そのメカニズムが十分には解明されていなかった塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)¹⁰⁵⁾についても検討した。その結果、bFGF は血管内皮細胞において VEGF の発現促進ばかりでなく、同時に受容体である KDR の発現も亢進させ得ることが明らかになった。これらの結果は、bFGF と VEGF が内皮細胞に与える相乗作用のメカニズムを意味しているものと考える¹⁰³⁾。

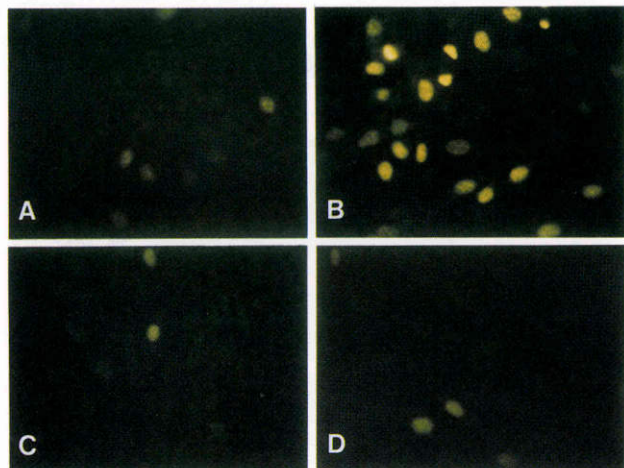


図18 トログリタゾンによる VEGF 依存性血管内皮細胞の細胞周期進行の阻止。

培養ウシ網膜血管内皮細胞(A)を VEGF (13 nM)で24時間刺激すると、細胞周期の進行を示す細胞が増加する(B)。しかし、トログリタゾン(10 μM)を前投与すると、細胞の染色性が低下し細胞周期の進行は抑制されている(C)。トログリタゾン単独投与でも、Aに比べて細胞周期進行が抑制される(D) (320倍)。

以上のことから、AGE や bFGF などの因子が KDR の発現を促進することによって、VEGF とその受容体システムを増強することがわかる。また、増殖シグナルを司る KDR の発現が、単純網膜症の時期でも亢進していることから、網膜症の比較的早期であっても既に増殖性変化への準備状態は確実に進んでいる。

IV 網膜症の治療

網膜症の3つの基本病変である網膜血管の透過性亢進、内腔閉塞および血管新生のいずれにも、VEGF とその受容体システムが深く関与していることが明らかとなった。したがって、網膜における VEGF の働きを阻害することができれば、網膜症の発症・進展の阻止、すなわち、網膜症の治療法の開発につながる可能性がある。今回は網膜症の治療について、ターゲットを血管新生に絞って検討した。血管新生の治療法として、大きく分けて2つのアプローチがあると考えられ、一つは新生血管の発生阻止であり、現在行われている網膜症に対する治療の多くがこの概念に基づくものである。そして我々の考えているもう一つのアプローチは、いったん発生した新生血管に対しては、その退縮を誘導して早期に沈静化させようという方法である。

1. 新生血管の発生阻止

新生血管の発生阻止の観点から VEGF とその受容体システムを阻害する部位として考えられるのは、VEGF の発現そのものの抑制、いったん発現された VEGF の受容体への結合の阻止、受容体結合後のシグナル伝達の阻止の3つで、いずれかを阻害することができれば有効な

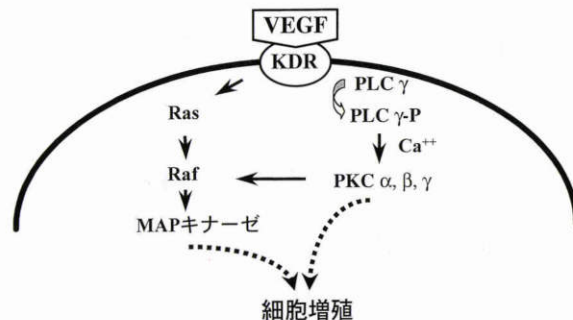


図19 VEGF による細胞内シグナル伝達。

VEGF はチロシンキナーゼ型受容体である KDR に結合後、細胞内へのカルシウムの流入、PKC や mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの活性化を誘導して血管内皮細胞を増殖周期へと導く。

治療法となり得る。

1) インスリン抵抗性改善薬トログリタゾンによる網膜血管新生抑制

a) トログリタゾンの VEGF 阻害効果

トログリタゾン ($C_{24}H_{27}NO_5S$, 分子量 441) は、インスリン抵抗性改善作用を持つ血糖降下薬であり¹⁰⁶⁾、現在アメリカでは約 70 万人が服用している。最近、トログリタゾンは、血糖降下作用ばかりでなく細胞増殖抑制作用を有することなども明らかになってきており、糖尿病性血管合併症の治療薬としても注目される¹⁰⁷⁾。我々はトログリタゾンが増殖網膜症の基本病態となる血管新生に対する抑制効果が期待できるものか、*in vitro*, *in vivo* の系を用いて検討した。

まず、VEGF による血管内皮細胞の細胞周期に与える影響と、トログリタゾンによる阻害効果について、特異的核抗原に対する蛍光標識抗体(抗 PCNA と抗 Ki-67)の二重染色法¹⁰⁸⁾によって検討した。VEGF は培養ウシ網膜血管内皮細胞の細胞周期を著明に進行させたが、トログリタゾンで前処理することによって VEGF 依存性の細胞周期進行は有意に抑制された(図18)。また、VEGF によって誘導された内皮細胞の遊走、増殖、*in vitro* 管腔構造形成を阻害するものか検討すると、いずれもトログリタゾンによって濃度依存性に抑制された。これらの結果から、トログリタゾンには *in vitro* 血管新生抑制作用があることが明らかになった。

さらに、新生児マウスに高濃度酸素を負荷して網膜血管新生を誘導するモデルにおいて、トログリタゾンを硝子体内投与することによって網膜血管新生を抑制することも確認された。血糖をコントロールする薬剤が同時に血管新生抑制作用をあわせ持つことは、これまでの治療法と併用することでより有効に網膜症の進行を阻止できる可能性を示唆する。

b) トログリタゾンが VEGF の作用を抑制するメカニズム

これまでに、トログリタゾンは血管平滑筋細胞の増殖

を抑制することが報告され、そのメカニズムとして細胞内シグナル伝達で重要な蛋白質リン酸化酵素である PKC や mitogen-activated protein (MAP) キナーゼなどの機能を阻害することが報告^{109)~111)}されている。

VEGF は血管内皮細胞の発現する受容体である KDR への結合後、細胞内情報伝達を構成する重要な因子の一つである細胞質カルシウム濃度を増加させ、PKC や MAP キナーゼなどを活性化することによって内皮細胞の増殖を誘導する(図 19)¹¹²⁾。これらのことから、PKC や MAP キナーゼなどが、前述したトログリタゾンによる VEGF 依存性シグナル阻害の標的になる可能性が推定された。そこでまず、VEGF による細胞質カルシウム濃度の増加に対するトログリタゾンの効果を、カルシウム蛍光指示薬である Fura-2 を用いて観察した。VEGF の投与によって培養ウシ網膜血管内皮細胞における持続性の細胞質カルシウム濃度増加をみるのに対し、10 μ M のトログリタゾンを前投与すると、VEGF 依存性の細胞質内カルシウム濃度の上昇は著明に抑制された。PKC は細胞内カルシウム濃度上昇に依存して活性化されるため¹¹³⁾、トログリタゾンは PKC 活性の阻害作用を持つ可能性が推定された。そこで、トログリタゾンが PKC の下流に位置する MAP キナーゼの活性化に与える影響を検討すると、確かにトログリタゾンは VEGF 依存性の MAP キナーゼ活性化も有意に抑制することが確認された。

以上の *in vitro* の研究結果、トログリタゾンは VEGF が KDR 受容体に結合後の細胞内情報伝達を抑制することにより、VEGF の作用を阻害することが明らかになった。つまり、VEGF が多量に存在しても、その受容体結合後の細胞内シグナル伝達を阻害するトログリタゾンによって、網膜症における網膜血管新生を阻止できる可能性が推定された。さらに前述のように、VEGF は網膜症の発症から増殖期まですべてのステージの進行に関与しているという事実から、トログリタゾンの血糖降下作用と併せ持つ VEGF 阻害作用は、増殖期のみならず、網膜症の発症段階からの治療効果が期待できる。

2. 新生血管の退縮誘導

網膜新生血管の発生阻止と併せて、既に発生してしまった新生血管を早期退縮させることができれば、網膜症による失明を大幅に減少させることも可能である。増殖網膜症でも末期になると新生血管が自然に退縮するが、このような症例では通常、網膜の荒廃が進み、視力予後は不良である。しかし、このメカニズムを解明し、網膜の荒廃が起こる前に新生血管を退縮させることができれば、良好な視力が保てる可能性がある。

1) ヒト網膜症眼での新生血管の退縮

胎生期にみられる瞳孔膜や硝子体動脈は生後に退縮する。その退縮過程では、まずマクロファージが血管内腔を閉塞し、その後、内皮細胞が変性し、血管が退縮するとい

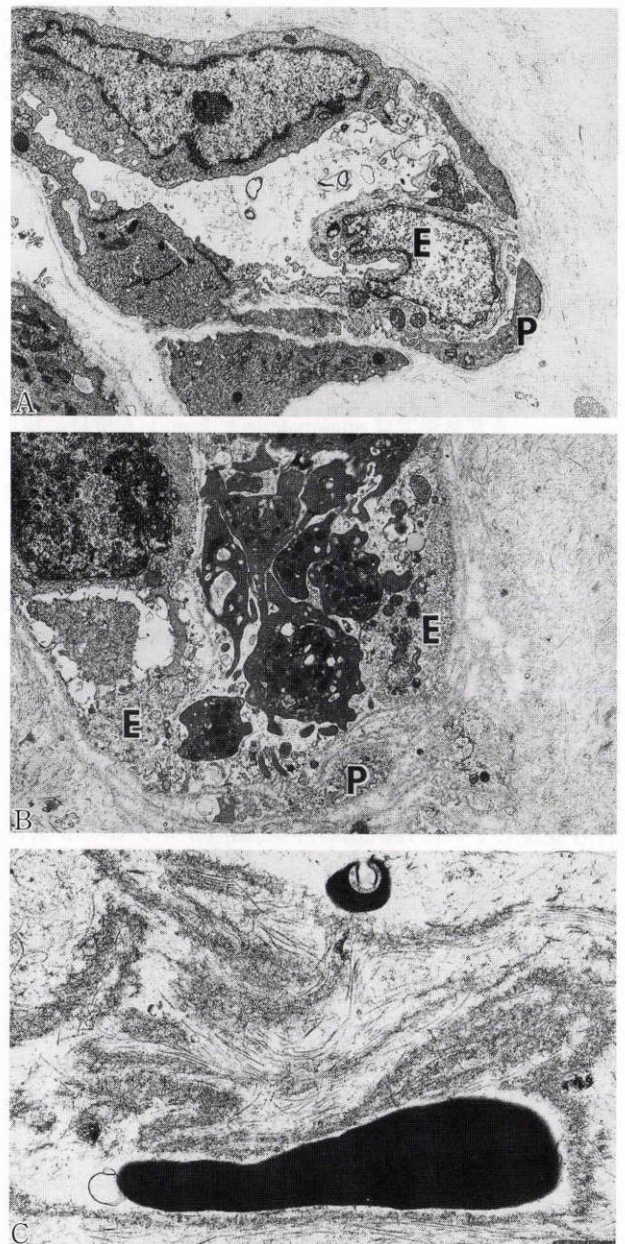


図 20 ヒト網膜症眼における新生血管退縮の電子顕微鏡写真。

A: 一部の内皮細胞(E)は細胞膜が破れ、ネクロシスを起こしている。また、周皮細胞(P)と内皮細胞間の接触が離れている(5,200倍)。

B: 内皮細胞(E)がネクロシスを示す部位には血小板血栓がみられる。周皮細胞(P)もネクロシスに陥っている(5,200倍)。

C: 内皮細胞は消失し、基底膜のみが残存している。内腔には赤血球がみられる(9,200倍)。

われている¹¹⁴⁾¹¹⁵⁾。また、実験的角膜新生血管の退縮過程は、内皮細胞障害後に起こる血小板の粘着および凝集、血流のうっ滞、内皮細胞の変性などが報告¹¹⁶⁾されている。しかし、網膜症眼の新生血管の退縮過程についての報告はない。

そこで今回、硝子体手術の際に採取した活動性の低い

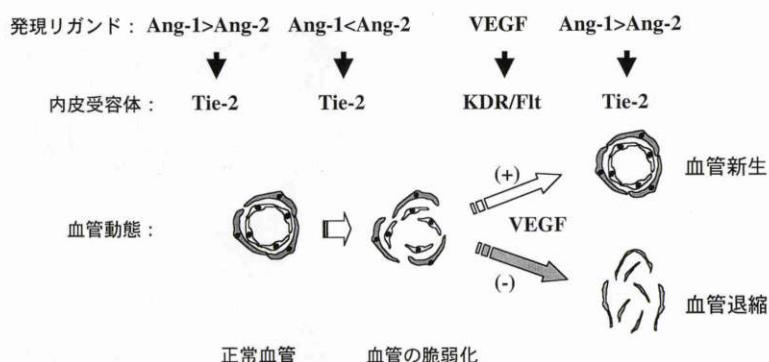


図 21 血管退縮と angiopoietin/Tie-2 システム.

正常血管では angiopoietin-1 (Ang-1) が優位に作用しているが, 虚血などによって拮抗的阻害作用を有する angiopoietin-2 (Ang-2) の発現が亢進すると, 周皮細胞の脱落により血管は脆弱化する. このとき VEGF が十分に存在しないか, あるいはその作用が阻害されれば, その血管は退縮する.

硝子体内増殖組織 (5 症例) を病理組織学的に検討した. 増殖組織はグルタルアルデヒドで固定し, エポンに包埋して超薄切片を作製し, 電子顕微鏡で観察した. 増殖組織には少数の新生血管が存在し, 種々の退縮過程を示していた. 初期の退縮期血管にみられる変化として, 内皮細胞と周皮細胞間の接触が離れ, その部位の内皮細胞がネクローシスに陥る. 内皮細胞は細胞膜が破れ, 細胞内小器官も変性していた (図 20A). 内皮細胞がネクローシスに陥った部位にはしばしば血小板やフィブリンによる血栓の形成がみられた (図 20B). さらに, 血管壁細胞の障害が進むと, 最終的には血管壁細胞は消失し, 細胞外マトリックスに置き換わり新生血管は退縮する. また, 一部の退縮期血管の血管壁には基底膜のみが残存し, 内腔に赤血球や細胞外マトリックスが充満していた (図 20C). 内皮細胞死は主にネクローシス像であり, アポトーシスと思われる電子顕微鏡像は僅かであった.

以上から, ヒト網膜症の新生血管の退縮初期には内皮細胞の変性, 消失が関与し, 内皮細胞が障害されると内腔には血栓が起り, さらに血管壁細胞の消失という一連の変化を生じ, 新生血管が退縮すると考えられた.

2) ヒト網膜症眼での増殖組織における angiopoietin/Tie 2 システム

血管退縮のメカニズムはまだ十分には明らかにされていない. 現在, そのメカニズムに関して最も注目されているのが最近新たに分子クローニングされた血管調節因子である angiopoietin とその受容体 Tie-2 を介する働きである. Tie-2 受容体は VEGF 受容体と同様に受容体型チロシンキナーゼであり, その発現は血管内皮細胞に特異的である. リガンドである angiopoietin には 50% の相同性を有する angiopoietin-1 (Ang-1) と angiopoietin-2 (Ang-2) が報告されている. 詳細なメカニズムについて不明な点も多いが, Ang-1 は内皮細胞の発現する Tie-2 受容体を介して基底膜の形成を促進したり, 内皮細胞の周囲に周皮細胞を呼び寄せることによって血管構築を安定化させる. 一方, シグナル伝達能を有しない Ang-2 は

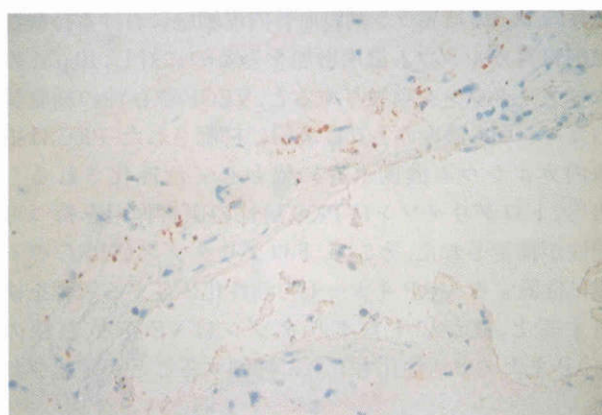


図 22 ヒト網膜症眼における Ang-2 の免疫組織化学光学顕微鏡写真.

新生血管の退縮期にある増殖組織で, 新生血管およびその周囲に陽性所見をみる (180 倍).

Ang-1 の受容体への結合を拮抗的に阻害することによって, 周皮細胞を内皮細胞から遊離させ, 既存の血管構築を脆弱化させる. いったん脆弱化した血管に対し, VEGF が十分量存在し作用すれば血管新生が誘導されるが, VEGF の作用が不十分であればその血管は退縮すると考えられている (図 21)^{117)~121)}.

我々は網膜症の硝子体手術時に得られた増殖組織 (6 症例) を用いて, Ang-2, Tie-2, VEGF の発現を免疫組織化学的に検討した. 増殖組織は 4% パラホルムアルデヒドで固定後, パラフィン包埋, 薄切した後, Ang-2, Tie-2, VEGF に対するポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社, 米国) を用いて免疫染色を行った. 新生血管の退縮期にある増殖組織では, Ang-2, Tie-2 の発現はみられたが, VEGF の発現がほとんどみられなかった (図 22). これらの結果は, 網膜症眼における新生血管の退縮過程にも VEGF とその受容体システムおよび Ang/Tie-2 システムが関与していると考えられる.

3) 遺伝子治療による新生血管の退縮誘導の可能性

新生血管を退縮させるには, VEGF とその受容体シス

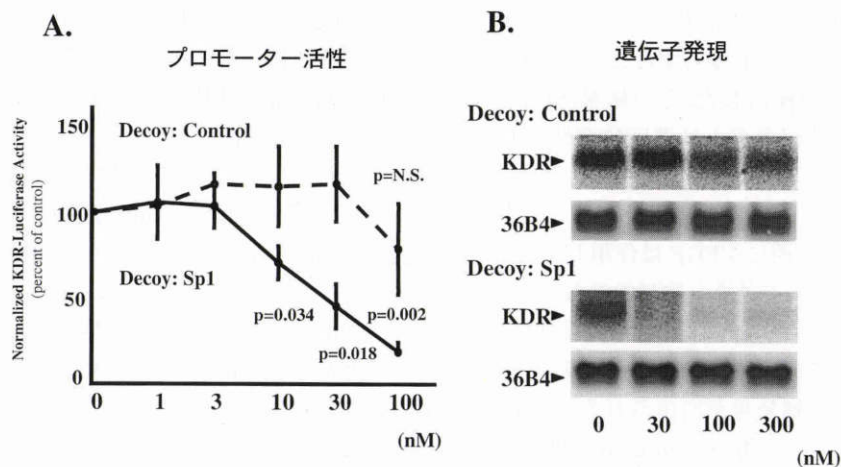


図 23 Sp1 デコイ導入による KDR プロモーター活性および遺伝子発現阻害。

培養ウシ網膜血管内皮細胞に Sp1 デコイを導入することによって KDR プロモーター活性(A)および遺伝子発現(B)は濃度依存性に抑制される(文献 104 から引用)。

テムを阻害するだけでもある程度の効果が期待される。しかし、同時に angiopoietin/Tie-2 システムを活性化させることによって、より有効的に短期間で血管の退縮を誘導できるであろう。我々はこれを遺伝子治療的手法で行うことを検討した。

a) VEGF とその受容体システムの阻害

前述のトログリタゾンの内服も VEGF とその受容体システムを阻害する方法の一つではある。しかし、眼局所において VEGF とその受容体システムをコントロールすることも必要である。

今回、遺伝子治療的手法を用いて、培養ウシ網膜血管内皮細胞において VEGF 受容体である KDR 遺伝子の発現阻害を試みた。我々は前述したように KDR プロモーター領域の解析によって、そのプロモーター活性には転写因子 Sp1 が重要であることを明らかにした。そこで、

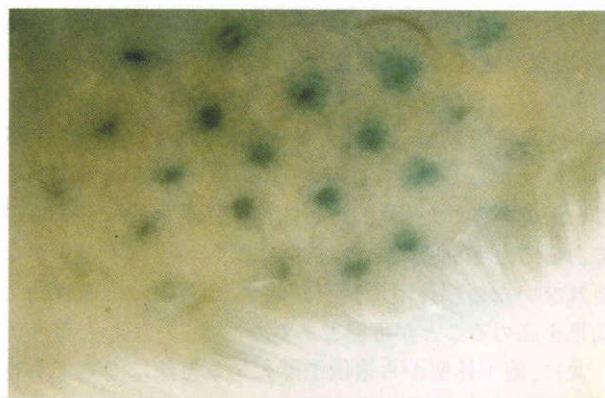


図 24 光凝固斑への遺伝子導入。

ラット網膜において、光凝固斑に一致して β -galactosidase の発現を示す青色の発色がみられる。

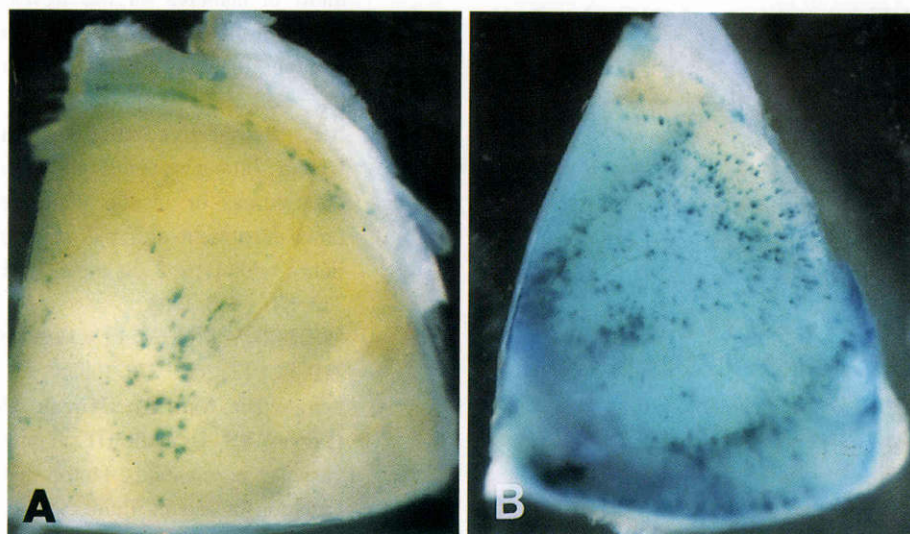


図 25 硝子体注入による網膜組織への遺伝子導入。

硝子体手術をしない場合(A)に比べて硝子体手術を併用することによって(B), 目的遺伝子の導入効率が格段に向上する(文献 123 から引用)。

転写因子 Sp 1 の認識配列である合成オリゴヌクレオチド、つまり Sp 1 デコイを遺伝子導入することで KDR 発現の抑制が可能であるか検討した。その結果、Sp 1 デコイの血管内皮細胞への遺伝子導入は濃度依存性に KDR プロモーター活性および KDR 遺伝子発現を抑制することが確認された(図 23)¹⁰⁴⁾。KDR の発現そのものを抑制することができれば、必然的に VEGF は作用しにくくなるわけであり、*in vivo* での有効性を検討中である。

b) Angiopoietin/Tie-2 システムの過剰発現誘導。

VEGF 抑制下で退縮をより有効的に誘導するには、さらに angiopoietin-2 の過剰発現が期待される。今回はまず、コントロールベクターを用いて *in vivo* で眼組織に目的遺伝子を効率よく導入し、過剰発現させる方法を確立した。

まず、網膜症の治療に現在広く行われている網膜光凝固の凝固斑に限局性に遺伝子を導入する方法について検討した¹²²⁾。光凝固斑では細胞の増生が起こることに着目し、増殖細胞にのみ選択性をもって導入可能なレトロウイルスベクターの導入を試みた。その結果、レトロウイルスベクターを網膜下に注入後に光凝固を行うことで、凝固斑に一致して限局性に目的遺伝子の発現が可能であることが確認された(図 24)。目的部位に選択的に導入可能であることが利点であり、神経網膜への遺伝子導入がなされないため副作用の発現が低く、光凝固の抗血管新生効果を高めることが可能である。

次に、硝子体側から遺伝子導入する方法についても検討した。この方法には増殖停止中の細胞にも導入可能なアデノウイルスベクターを用いた。その結果、高い効率ではなかったが、単に硝子体腔に注入するだけでも主に網膜ミュラー細胞に遺伝子が導入された。さらに、増殖網膜症に対して行われている硝子体手術を行ったうえで遺伝子導入を試みると、著明に高い効率で目的遺伝子の導入が可能であることが明らかになった(図 25)¹²³⁾。ミュラー細胞は網膜に豊富に存在するため、この細胞に遺伝子導入することで眼内環境を大きく変化させることも可能であると考えられる。

今回はコントロール遺伝子を用いた結果を報告したが、現在、Ang-2 の遺伝子導入と早期新生血管退縮誘導の有効性を検討中である。今回の遺伝子導入法の確立は、目的に応じて導入遺伝子を変えることで、その適応が大きく広がる可能性を秘めている点でも意義深いものと考えられる。遺伝子導入による治療への応用は、眼科領域でも机上の空論ではなく、確実に現実的なものとなってきており、今後の発展性が期待される。

V おわりに

網膜症を主題にして、まず、ヒト網膜症眼の病理学を基礎に、細胞および分子生物学的手法を用いて病態の解明を行った。また治療法の開発では、病態に基づき、一つは

現在既に臨床で使われているインスリン抵抗性改善薬による網膜血管新生抑制の可能性について記し、さらに今後の発展性が期待される治療法として、遺伝子治療の可能性について記した。

これから 21 世紀に向けて、我々に課せられているテーマは、さらに high quality な治療の追究である。分子生物学的手法を用いた病態の解明と最先端の治療技術との連携が今こそ求められている。病態の解明により、治療応用への的が絞られ、実際に臨床応用への現実性も高まりつつある。現在行われている治療法をさらに発展させ、より副作用が少なく、かつ有効な治療法の開発を目指して失明防止に寄与することが著者らの職務であり、さらに研究を続けていきたい。

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会を与えて下さいました日本眼科学会評議員各位、日本眼科学会会員、第 103 回日本眼科学会総会長の安達恵美子教授ならびに座長の労をお取り頂いた宇山昌延教授に心より感謝申し上げます。本研究にご協力頂きました玉井 信教授(東北大学)、田野保雄教授(大阪大学)に厚く御礼申し上げます。ご指導を頂きました猪俣 孟教授をはじめ共同研究者の教室員、多大な協力を頂きました研究協力者の諸先生方、実験を手伝って頂いた原たつえ、今村万里、久力由美、高原三千代の各氏に深謝いたします。

本研究は、文部省科学研究費補助金(基盤研究 A2 #09307040、基盤研究 B2 #09470382)、厚生省特定疾患調査研究費補助金、厚生省科学研究費補助金の研究助成を受けたことを付記して謝意を表します。

文 献

- 1) 児玉龍彦, 高橋 潔, 渋谷正史: 血管生物学. 講談社, 東京, 1—2, 1997.
- 2) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 329: 977—986, 1993.
- 3) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 352: 837—853, 1998.
- 4) 羽田勝計, 吉川隆一: 糖尿病血管合併症の成因. 実験医学 13: 266—270, 1995.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) **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 Engl J Med* 331: 1480—1487, 1994.
 - 8) **Adamis AP, Miller JW, Bernal M-T, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo T-K, et al:** Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445—450, 1994.
 - 9) 畑 快右, 石橋達朗: VEGF. *Practical Ophthalmology* 37, 1: 120—127, 1998.
 - 10) **Aiello LP, Hata Y:** Molecular mechanisms of growth factor action in diabetic retinopathy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 6: 146—156, 1999.
 - 11) **Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al:** Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777—1788, 1993.
 - 12) **Yap AS, Mullin JM, Stevenson BR:** Molecular analyses of tight junction physiology: Insights and paradoxes. *J Membrane Biol* 163: 159—167, 1998.
 - 13) **Cunha-Vaz JG, Shakib M, Ashton N:** Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *Br J Ophthalmol* 50: 441—453, 1966.
 - 14) **Shiose Y:** Electron microscopic studies on blood-retinal and blood-aqueous barriers. *Jpn J Ophthalmol* 14: 73—87, 1970.
 - 15) 山名泰生: 糖尿病性網膜症の初期病変について. 蛍光眼底造影法による研究. *臨眼* 37: 185—193, 1983.
 - 16) **Cunha-Vaz J, De Abreu JRF, Campos AJ, Figo GM:** Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol* 59: 649—656, 1975.
 - 17) **Waltman SR, Oestrich C, Krupin T, Hanish S, Ratzan S, Santiago J, et al:** Quantitative vitreous fluorophotometry. A sensitive technique for measuring early breakdown of the blood-retinal barrier in young diabetic patients. *Diabetes* 27: 85—87, 1978.
 - 18) **Ishibashi T, Tanaka K, Taniguchi Y:** Disruption of blood-retinal barrier in experimental diabetic rats: An electron microscopic study. *Exp Eye Res* 30: 401—410, 1980.
 - 19) **Murata T, Ishibashi T, Inomata H:** Immunohistochemical detection of blood-retinal barrier breakdown in streptozotocin-diabetic rats. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 231: 175—177, 1993.
 - 20) **Ishibashi T, Inomata H:** Ultrastructure of retinal vessels in diabetic patients. *Br J Ophthalmol* 77: 574—578, 1993.
 - 21) **Simionescu N:** Cellular aspects of transcapillary exchange. *Physiol Rev* 63: 1536—1579, 1983.
 - 22) **Bearer EL, Orci L:** Endothelial fenestral diaphragms: A quick-freeze, deep-etch study. *J Cell Biol* 100: 418—428, 1985.
 - 23) **Levick JR, Smaje LH:** An analysis of the permeability of a fenestra. *Microvasc Res* 33: 233—256, 1987.
 - 24) **Murata T, Ishibashi T, Inomata H:** Immunohistochemical detection of extravasated fibrinogen (fibrin) in human diabetic retina. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 230: 428—431, 1992.
 - 25) **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.
 - 26) **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 retinas. *Lab Invest* 74: 819—825, 1996.
 - 27) **Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, Lieth E, Tarbell JM, Gardner TW, et al:** Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content. Vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. *Diabetes* 47: 1953—1959, 1998.
 - 28) **Qu-Hong, Nagy JA, Senger DR, Dvorak HF, Dvorak AM:** Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium. *J Histochem Cytochem* 43: 381—389, 1995.
 - 29) **Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Bebzadian MA, Caldwell RB:** VEGF-induced permeability increase is mediated by caveolae. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 157—167, 1999.
 - 30) **Roberts WG, Palade GE:** Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 108: 2369—2379, 1995.
 - 31) **Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W:** Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 140: 947—959, 1998.
 - 32) **Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C:** Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular

- smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* 46: 1497—1503, 1997.
- 33) **Frank RN, Amin R, Kennedy A, Hohman TC**: An aldose reductase inhibitor and aminoguanidine prevent vascular endothelial growth factor expression in rats with long-term galactosemia. *Arch Ophthalmol* 115: 1036—1047, 1997.
 - 34) **Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, et al**: Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 98: 1667—1675, 1996.
 - 35) **Brownlee M**: Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46: 223—234, 1995.
 - 36) **荒木令江, 堀内正公**: 糖尿病合併症と AGE. AGE の生化学. *Diabetes Frontier* 4: 403—408, 1993.
 - 37) **永井竜児, 堀内正公**: AGE の化学構造, 定量法および AGE レセプター. 繁田幸男, 谷口直之(編): 蛋白の糖化. AGE の基礎と臨床. 医学書院, 東京, 27—33, 1997.
 - 38) **Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomata H, Ikeda K, Horiuchi S**: The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* 40: 764—769, 1997.
 - 39) **Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, et al**: Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 101: 1219—1224, 1998.
 - 40) **Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H**: Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 170: 1387—1407, 1989.
 - 41) **Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R**: Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: A model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12043—12047, 1992.
 - 42) **Wautier J-L, Zoukourian C, Chappey O, Wautier M-P, Guillausseau P-J, Cao R, et al**: Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 97: 238—243, 1996.
 - 43) **Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan Y-CE, et al**: Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267: 14998—15004, 1992.
 - 44) **Emi M, Asaoka H, Matsumoto A, Itakura H, Kurihara Y, Wada Y, et al**: Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene. *J Biol Chem* 268: 2120—2125, 1993.
 - 45) **Cherayil BJ, Chaitovitz S, Wong C, Pillai S**: Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7324—7328, 1990.
 - 46) **Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, et al**: Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8807—8811, 1994.
 - 47) **Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, et al**: Advanced glycation end-products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 96: 1395—1403, 1995.
 - 48) **Neumann A, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Münch G**: High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF- κ B activation and cytokine expression. *FEBS Letters* 453: 283—287, 1999.
 - 49) **Yamagishi S, Hsu C-C, Taniguchi M, Harada S, Yamamoto Y, Ohsawa K, et al**: Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products: A possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 681—687, 1995.
 - 50) **Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM**: Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 57: 673—686, 1987.
 - 51) **Takei A, Tashiro Y, Nakashima Y, Sueishi K**: Effects of fibrin on the angiogenesis in vitro of bovine endothelial cells in collagen gel. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* 31: 467—472, 1995.
 - 52) **Takagi H, Otani A, Kiryu J, Ogura Y**: New surgical approach for removing massive foveal hard exudates in diabetic macular edema. *Ophthalmology* 106: 249—257, 1999.
 - 53) **Bombeli T, Mueller M, Haerberli A**: Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost* 77: 408—423, 1997.
 - 54) **Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al**: Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527—3561, 1998.
 - 55) **Ganda OP, Arkin CF**: Hyperfibrinogenemia. An

- important risk factor for vascular complications in diabetes. *Diabetes Care* 15: 1245—1250, 1992.
- 56) **Mansfield MW, Heywood DM, Grant PJ**: Circulating levels of factor VII, fibrinogen, and von Willebrand factor and features of insulin resistance in first-degree relatives of patients with NIDDM. *Circulation* 94: 2171—2176, 1996.
 - 57) **Jörneskog G, Egberg N, Fagrell B, Fatah K, Hessel B, Johnsson H, et al**: Altered properties of the fibrin gel structure in patients with IDDM. *Diabetologia* 39: 1519—1523, 1996.
 - 58) **Ishibashi T, Inoue S, Tanaka K**: Fibrinolytic activity of the retinae in streptozotocin-diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 125—127, 1985.
 - 59) **Takahashi H, Tsuda A, Tatewaki W, Wada K, Niwano H, Shibata A**: Activation of blood coagulation and fibrinolysis in diabetes mellitus: Evaluation by plasma levels of thrombin-antithrombin III complex and plasma- α 2-plasmin inhibitor complex. *Thromb Res* 55: 727—735, 1989.
 - 60) **Watała C, Gwoździński K, Pluskota E, Pietrucha T, Walkowiak B, Trojanowski Z, et al**: Diabetes mellitus alters the effect of peptide and protein ligands on membrane fluidity of blood platelets. *Thromb Haemost* 75: 147—153, 1996.
 - 61) **Glassman AB**: Platelet pathophysiology in diabetes mellitus. *Eur J Lab Med* 4: 117—120, 1996.
 - 62) **Yamana Y, Oka Y, Ohnishi Y, Ishibashi T, Inoguchi T**: Reflow of obstructed capillaries in the maculae of humans with diabetic retinopathy, observed by fluorescein angiography. *Br J Ophthalmol* 72: 660—665, 1988.
 - 63) **Ishibashi T, Tanaka K, Taniguchi Y**: Platelet aggregation and coagulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy in rats. *Diabetes* 30: 601—606, 1981.
 - 64) **Schröder S, Palinski W, Schmid-Schönbein GW**: Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 139: 81—100, 1991.
 - 65) **Miyamoto K, Hiroshiba N, Tsujikawa A, Ogura Y**: In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2190—2194, 1998.
 - 66) **Bloodworth JMB, Molitor DL**: Ultrastructural aspects of human and canine diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol* 4: 1037—1048, 1965.
 - 67) **Kuwabara T, Cogan DG**: Retinal vascular patterns. VII. Acellular change. *Invest Ophthalmol* 4: 1049—1058, 1965.
 - 68) **McLeod DS, Lefer DJ, Merges C, Luttig GA**: Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *Am J Pathol* 147: 642—653, 1995.
 - 69) **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.
 - 70) **Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, et al**: Vascular permeability factor: A tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172: 1535—1545, 1990.
 - 71) **Brock TA, Dvorak HF, Senger DR**: Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca^{2+} and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* 138: 213—221, 1991.
 - 72) **Yamagishi S, Yamamoto Y, Harada S, Hsu C-C, Yamamoto H**: Advanced glycosylation end products stimulate the growth but inhibit the prostacyclin-producing ability of endothelial cells through interactions with their receptors. *FEBS Letters* 384: 103—106, 1996.
 - 73) **Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H**: Advanced glycation end products inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 41: 1435—1441, 1998.
 - 74) **Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, et al**: Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96: 2262—2271, 1997.
 - 75) **Yamauchi T, Umeda F, Masakado M, Isaji M, Mizushima S, Nawata H**: Purification and molecular cloning of prostacyclin-stimulating factor from serum-free conditioned medium of human diploid fibroblast cells. *Biochem J* 303: 591—598, 1994.
 - 76) **Sekiguchi N, Umeda F, Masakado M, Ono Y, Hashimoto T, Nawata H**: Immunohistochemical study of prostacyclin-stimulating factor (PSF) in the diabetic and atherosclerotic human coronary artery. *Diabetes* 46: 1627—1632, 1997.
 - 77) **Forsythe JA, Jiang B-H, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al**: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16: 4604—4613, 1996.
 - 78) **Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, et al**: Hypoxia inducible factor-1 α is increased in ischemic retina: Temporal and spa-

- tial correlation with VEGF expression. Invest Ophthalmol Vis Sci 40: 182—189, 1999.
- 79) **Fischer S, Knoll R, Renz D, Karliczek GF, Schaper W**: Role of adenosine in the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in porcine brain derived microvascular endothelial cells. Endothelium 5: 155—165, 1997
 - 80) **Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, et al**: Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: Significance for VEGF measurements and cancer biology. Br J Cancer 77: 956—964, 1998.
 - 81) **Pinedo HM, Verheul HMW, D'Amato RJ, Folkman J**: Involvement of platelets in tumor angiogenesis? Lancet 352: 1775—1777, 1998.
 - 82) **O'Byrne KJ, Dobbs N, Propper D, Smith K, Harris AL**: Vascular endothelial growth factor platelet counts, and prognosis in renal cancer. Lancet 353: 1494—1495, 1999.
 - 83) **Zhang Y, Deng Y, Luther T, Müller M, Ziegler R, Waldherr R, et al**: Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. J Clin Invest 94: 1320—1327, 1994.
 - 84) **Folkman J**: Tumor angiogenesis and tissue factor. Nature Med 2: 167—168, 1996.
 - 85) **Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR**: In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: Correlation with the malignant phenotype of human breast disease. Nature Med 2: 209—215, 1996.
 - 86) **Shoji M, Hancock WW, Abe K, Micko C, Casper KA, Baine RM, et al**: Activation of coagulation and angiogenesis in cancer. Immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. Am J Pathol 152: 399—411, 1998.
 - 87) **Iijima K, Yoshikawa N, Connolly DT, Nakamura H**: Human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells produce vascular permeability factor. Kidney Int 44: 959—966, 1993.
 - 88) **Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C**: Macrophages and angiogenesis. J Leukoc Biol 55: 410—422, 1994.
 - 89) **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. Virchow Arch 426: 479—486, 1995.
 - 90) **Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA**: Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. Am J Pathol 152: 1445—1452, 1998.
 - 91) **Folkman J, Shing Y**: Angiogenesis. J Biol Chem 267: 10931—10934, 1992.
 - 92) **Taniguchi Y**: Ultrastructure of newly formed blood vessels in diabetic retinopathy. Jpn J Ophthalmol 20: 19—31, 1976.
 - 93) **Hamilton CW, Chandler D, Klintworth GK, Machemer R**: A transmission and scanning electron microscopic study of surgically excised preretinal membrane proliferations in diabetes mellitus. Am J Ophthalmol 94: 473—488, 1982.
 - 94) **Williams JM, de Juan E, Machemer R**: Ultrastructural characteristics of new vessels in proliferative diabetic retinopathy. Am J Ophthalmol 105: 491—499, 1988.
 - 95) **Sato Y, Rifkin DB**: Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transforming growth factor- β 1-like molecule by plasmin during co-culture. J Cell Biol 109: 309—315, 1989.
 - 96) **Ishibashi T, Inomata H, Sakamoto T, Ryan SJ**: Pericytes of newly formed vessels in experimental subretinal neovascularization. Arch Ophthalmol 113: 227—231, 1995.
 - 97) **Kuwabara T, Cogan DG**: Retinal Vascular Patterns. VI. Mural cells of the retinal capillaries. Arch Ophthalmol 69: 114—124, 1963.
 - 98) **Ozaki H, Hayashi H, Viores SA, Moromizato Y, Campochiaro PA, Oshima K**: Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates. Exp Eye Res 64: 505—517, 1997.
 - 99) **De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT**: The *fms*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. Science 255: 989—991, 1992.
 - 100) **Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT**: Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. Proc Natl Acad Sci USA 90: 7533—7537, 1993.
 - 101) **Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C-H**: Different signal transduction properties of KDR and Flt 1, two receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 269: 26988—26995, 1994.
 - 102) **Takahashi T, Shibuya M**: The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC- γ pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. Oncogene 14: 2079—2089, 1997.
 - 103) **Hata Y, Rook SL, Aiello LP**: Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p 44/p 42 mitogen-activated protein kinase-dependent

- pathway. *Diabetes* 48: 1145—1155, 1999.
- 104) **Hata Y, Duh E, Zhang K, Robinson GS, Aiello LP**: Transcription factors Sp 1 and Sp 3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. *J Biol Chem* 273: 19294—19303, 1998.
- 105) **Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J**: Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 69: 508—517, 1993.
- 106) **Kellerer M, Kroder G, Tippmer S, Berti L, Kiehn R, Mosthaf L, et al**: Troglitazone prevents glucose-induced insulin resistance of insulin receptor in rat-1 fibroblasts. *Diabetes* 43: 447—453, 1994.
- 107) **Law RE, Meehan WP, Xi X-P, Graf K, Wuthrich DA, Coats W, et al**: Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 98: 1897—1905, 1996.
- 108) **Kobayashi S, Nishimura J, Kanaide H**: Cytosolic Ca^{2+} transients are not required for platelet-derived growth factor to induce cell cycle progression of vascular smooth muscle cells in primary culture. *Actions of tyrosine kinase. J Biol Chem* 269: 9011—9018, 1994.
- 109) **Yasunari K, Kohno M, Kano H, Yokokawa K, Minami M, Yoshikawa J**: Mechanisms of action of troglitazone in the prevention of high glucose-induced migration and proliferation of cultured coronary smooth muscle cells. *Circ Res* 81: 953—962, 1997.
- 110) **Kihara S, Ouchi N, Funahashi T, Shinohara E, Tamura R, Yamashita S, et al**: Troglitazone enhances glucose uptake and inhibits mitogen-activated protein kinase in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 136: 163—168, 1998.
- 111) **Goetze S, Xi X-P, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, Law RE**: Troglitazone inhibits angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 nuclear translocation and activation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 452: 277—282, 1999.
- 112) **Takahashi T, Ueno H, Shibuya M**: VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf · MEK · MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 18: 2221—2230, 1999.
- 113) **Wellner M, Maasch C, Kupprion C, Lindschau C, Luft FC, Haller H**: The proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein kinase C- α and protein kinase C- ζ . *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 19: 178—185, 1999.
- 114) **Matsuo N, Smelser GK**: Electron microscopic studies on the pupillary membrane: The fine structure of the white strands of the disappearing stage of this membrane. *Invest Ophthalmol* 10: 108—119, 1971.
- 115) **Jack RL**: Regression of the hyaloid vascular system. An ultrastructural analysis. *Am J Ophthalmol* 74: 261—272, 1972.
- 116) **Ausprunk DH, Falterman K, Folkman J**: The sequence of events in the regression of corneal capillaries. *Lab Invest* 38: 284—294, 1978.
- 117) **Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al**: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE 2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161—1169, 1996.
- 118) **Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al**: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87: 1171—1180, 1996.
- 119) **Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al**: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie 2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55—60, 1997.
- 120) **Risau W**: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671—674, 1997.
- 121) **Hanahan D**: Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277: 48—50, 1997.
- 122) **Murata T, Hoffmann S, Ishibashi T, Spee C, Gordon EM, Anderson WF, et al**: Retrovirus-mediated gene transfer targeted to retinal photo-coagulation sites. *Diabetologia* 41: 500—506, 1998.
- 123) **Sakamoto T, Ueno H, Goto Y, Oshima Y, Ishibashi T, Inomata H**: A vitrectomy improves the transfection efficiency of adenoviral vector-mediated gene transfer to Müller cells. *Gene Ther* 5: 1088—1097, 1998.