

平成 14 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管の分子機構
—特に色素上皮由来因子の役割について—

大野 京子

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科視覚応答調節学

要 約

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)は先進諸国における 50 代以上の失明原因の常に上位を占める重要な疾患であり, 人口の高齢化に伴い益々その頻度は増加しつつある。しかしながら, AMD における脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)の分子機構は未だ完全には解明されていない。従来から網膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)が産生する血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)の発現上昇が CNV 発生に重要であるとされてきたが, トランスジェニックマウスの結果などから VEGF 単独では CNV 発生には不十分であると考えられる。CNV は無血管である網膜外層に新生血管が侵入していく現象であり, この場合には正常状態で血管侵入を抑制している抑制因子の発現低下の方が重要なのではないかと我々は考えた。そして, 近年明らかになった最強の血管新生抑制因子, 色素上皮

由来因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)に注目し, 加齢や酸化ストレスによって生じる RPE の分化状態の崩れが PEDF の発現低下を惹起し, その結果生じる VEGF と PEDF のバランスの崩れが CNV 発生の引き金を引くのではないかというメカニズムを明らかにした。さらに本稿では, CNV 発生において PEDF 以外にも重要な役割を有すると考えられる炎症細胞の集積機序や加齢による Bruch 膜の変化についても言及し, 最後に AMD の CNV を反映する動物モデルの可能性について述べ, これまでの CNV 研究の中で, 何がどこまで解明され何が残された課題であるのかを明らかにした。(日眼会誌 107: 657–673, 2003)

キーワード: 網膜色素上皮細胞, 加齢黄斑変性, 脈絡膜新生血管, VEGF, PEDF

A Review

Molecular Mechanism for Choroidal Neovascularization
in Age-related Macular Degeneration

Kyoko Ohno-Matsui

Department of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

Abstracts

Choroidal neovascularization (CNV) in age-related macular degeneration (AMD) is the most common cause of severe visual loss in patients over age 60 years in developed countries. While much is unknown about the underlying pathogenesis of CNV, the increased production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by retinal pigment epithelium (RPE) is thought to play a central role in the development of this condition. However, recent studies using gene-manipulated mice question the importance of VEGF alone in promoting CNV. Angiogenesis is thought to result from the balance between angiogenesis stimulation and inhibition. A potent antiangiogenic factor recently has been

um (RPE) is thought to play a central role in the development of this condition. However, recent studies using gene-manipulated mice question the importance of VEGF alone in promoting CNV. Angiogenesis is thought to result from the balance between angiogenesis stimulation and inhibition. A potent antiangiogenic factor recently has been

別刷請求先: 113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科視覚応答調節学 大野 京子 (平成 15 年 4 月 1 日受付, 平成 15 年 7 月 28 日改訂受理)

Reprint requests to: Kyoko Ohno-Matsui, M.D. Department of Ophthalmology and Visual Science, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

(Received April 1, 2003 and accepted in revised form July 28, 2003)

identified in the retina and shown to be secreted by RPE cells. The inhibitor, pigment epithelium-derived factor (PEDF) is considered the key factor associated with avascularity of the cornea, vitreous, and outer retinal layer of the eye. We recently demonstrated that an imbalance between PEDF and VEGF in RPE cells caused by aging and oxidative stress may contribute to the dysregulation of endothelial cell proliferation in CNV. In this review, we also discuss the angiogenic role of inflammatory cells in CNV, age-related changes in Bruch's mem-

brane, and the possibility of the development of animal models reflecting CNV in AMD.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 107 : 657-673, 2003)

Key words : Retinal pigment epithelium, Age-related macular degeneration, Choroidal neovascularization, Vascular endothelial growth factor, Pigment epithelium-derived factor

I はじめに

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration, AMD) は高齢者の黄斑部に生じる疾患であり、人口の高齢化に伴い先進諸国で増加の一途をたどっている¹⁾。AMD は萎縮型と滲出型とに分類されているが、臨床では、より著しい視機能障害を惹き起こす滲出型 AMD が重要である。滲出型 AMD は、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 細胞, Bruch 膜, 脈絡膜毛細血管の加齢変化を基盤として発症し、その主要な病態は黄斑部に生じる脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) である²⁾。AMD による CNV に対しては、現在種々の内科的、外科的治療法が試みられているが、視機能上重要な黄斑部に生じることから、しばしば難治性である。病態に即した新しい治療方法を確立するためにも、AMD における CNV 発生の分子メカニズムを解明することは重要である。

しかしながら、CNV 発生の分子機構は未だ完全には解明されていない。CNV は複雑な病態であり、その分子機構も複雑であることが予想される。疾患の特異性はその始まり方にあると考えられるが、それでは何が AMD の CNV 発生の最初の引き金なのか？ 虚血を引き金として誘発されることが多い網膜血管新生とは異なり、脈絡膜毛細血管には明らかな血管閉塞が生じにくい。また、虚血が CNV 発生の引き金になるとは考えにくい。また、CNV 発生の前駆病変としてはドルーゼンが有名ではあるものの、臨床で明らかなドルーゼンがない眼にも CNV は発生する。つまり、今なお AMD で CNV を惹き起こす決定的な引き金があるか、という点が明らかになっていないのである。AMD の CNV 発生の分子機構を解くための共通のキーワード、それは現在のところ、加齢と黄斑部だけなのである。したがって、我々はこの2つのキーワードを元にその分子機構を紐解いて行かなくてはならない。

本稿では、この2つのキーワードを中心に、複雑な病態が絡み合った AMD における CNV 発生の分子機構について、これまでの研究の流れを様々な側面から整理し、次に我々が精力的に研究を行っている新しい血管新

生抑制因子である色素上皮由来因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) の CNV 発生における役割について重点的に解説する。そして、最後にこれまでの研究成果から明らかになってきた CNV 発生の分子機構の概念図と残された課題について説明し、私見を交えて総説したい。

II RPE と血管内皮増殖因子

従来、手術的に摘出したヒト CNV 膜やラットやサルの眼底にレーザー強凝固を施行して作製した動物の実験的 CNV モデルにおいて、増殖した脈絡膜血管内皮細胞に随伴するように、RPE の増殖がみられること⁴⁾⁻⁷⁾、さらに RPE は種々の成長因子やサイトカインを分泌し眼内の種々の病態において主役であること⁸⁾などから、おそらく RPE が何らかの血管新生を制御する因子を発現し、脈絡膜血管内皮細胞の増殖を促進することが CNV 発生の原因ではないかと推察されてきた。その因子が何であるかは長い間不明であったが、その最有力候補となったのが血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) である。VEGF は、当初腫瘍に関連した血管における蛋白の透過性を亢進する因子、vascular permeability factor として同定された因子であるが⁹⁾、後に血管新生を促す増殖因子として、1989 年に Ferrara ら¹⁰⁾によって下垂体濾胞星状細胞の培養上清から見出された VEGF と同一の因子であることが明らかになった。VEGF は塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) などと異なり、血管内皮細胞を特異的に増殖させる因子であり¹⁰⁾、*in vitro* で血管内皮細胞の増殖を惹き起こし¹¹⁾、個体レベルでも血管新生、血管透過性亢進を誘導する。VEGF は世紀の大発見であり、以後、悪性腫瘍をはじめ人体の種々の組織における血管新生の大半がこの VEGF によって惹き起こされると考えられるようになった。そしてその流れを受けて、CNV の分子機構の解明においてもこの VEGF が精力的に研究されてきた。つまり、RPE からの VEGF 発現上昇が CNV の原因ではないかと考えられるようになったのである。その根拠として、手術的に摘出したヒト CNV 膜もしくは実験的に作製した CNV 膜の病

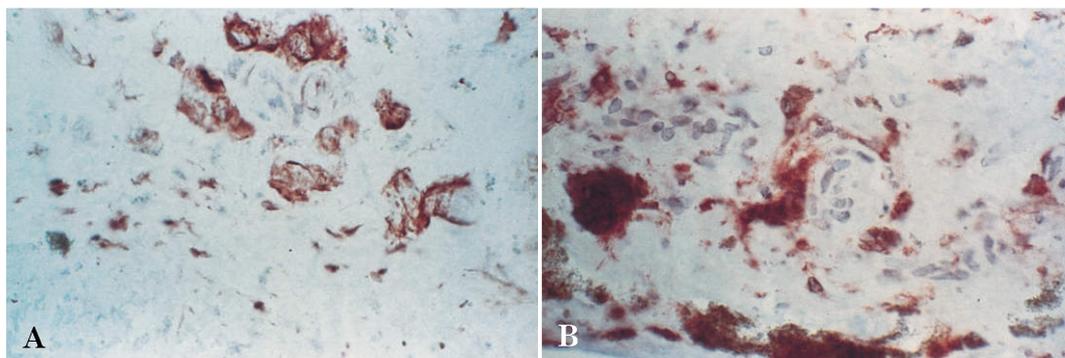


図 1 脈絡膜新生血管の手術摘出標本。

A：サイトケラチンの免疫染色。新生血管膜中に多数の網膜色素上皮(RPE)細胞がみられる。
B：血管内皮増殖因子(VEGF)の免疫染色。新生血管膜中の RPE が VEGF を発現している。

理組織学的所見において、増殖した RPE やマクロファージが VEGF を発現していること^{4)~6)12)}(図 1)、AMD 患者の硝子体液中の VEGF 濃度が上昇していること¹³⁾などが報告された。さらに *in vitro* でも、培養 RPE は脈絡膜に面した基底部の方向に極性をもって VEGF を分泌しており、低酸素刺激によりこの基底方向への VEGF 発現が有意に上昇することがわかった¹⁴⁾。

以上の結果は、何らかの病的刺激によって RPE から VEGF 発現が上昇し、その VEGF が脈絡膜毛細血管に働いて脈絡膜血管内皮細胞の増殖を惹き起こす結果 CNV が生じるという可能性を推察する。そこで次に、CNV 発生における VEGF の重要性を確かめるために行われた実験が、VEGF を RPE もしくは網膜下に過剰発現することにより CNV を再現できるのか？ という研究である。Spilsbury ら¹⁵⁾はラットの VEGF₁₆₄ cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターを網膜下に注入し、RPE に VEGF を過剰発現させたところ、10 日後に CNV が発生した。同様に、Wang ら¹⁶⁾はヒト VEGF₁₆₅ cDNA を組み込んだアデノ関連ウイルスベクターをラットの網膜下に注入したところ、やはり CNV が発生した。以上から、彼らはいずれも VEGF 単独の過剰発現が CNV 発生に十分であると推察している。しかし、これらのウイルスベクターによる発現方法には若干の問題点が残る。それは、ベクターを網膜下に注入する際にどうしても穿孔による機械的ダメージを生じ Bruch 膜の integrity が損傷されること、さらに穿孔により炎症が二次的に惹起され、過剰発現させたい因子以外の要因が混在してしまう危険性があることである。したがって本当に、RPE における VEGF 発現上昇が CNV 発生の主役であることを証明するのであれば、やはり内因性に VEGF を過剰発現させた場合に CNV が生じるかどうかを証明することが必要となる。

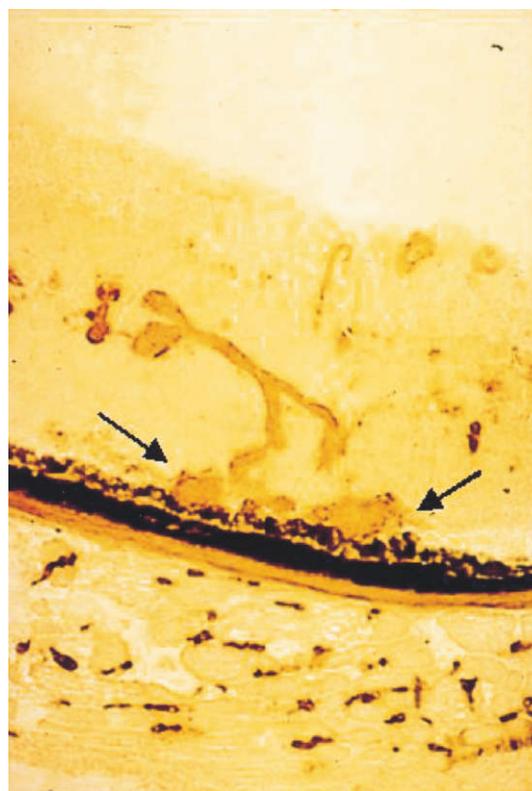


図 2 Tet system を用いて大人のマウスの網膜視細胞に VEGF を過剰発現させた VEGF トランスジェニックマウスの網膜組織所見。

血管内皮細胞を特異的に染色するレクチン染色により、VEGF 過剰発現 2 週間後に、網膜血管に端を発する網膜下新生血管が形成された(矢印)。

II VEGF トランスジェニックマウスの実験結果から推察されたこと

それでは VEGF の内因性の過剰発現だけで CNV は生じるのか？ この命題に対する最初のキーとなる研究が Okamoto ら¹⁷⁾によってなされた。彼らはロドプシン・プロモーターに full length のヒト VEGF を結合した融合遺伝子を作製し、視細胞に VEGF を過剰発現す

るトランスジェニックマウスを作製し、はじめて網膜局所に VEGF を過剰発現させることに成功した。その結果、このマウスでは生後3か月でヒトの AMD に極めて類似した網膜下の新生血管網が形成されたのである。しかし組織学的検討では、この新生血管は網膜深層血管に由来しており、脈絡膜側からの血管侵入がなかったという点で CNV とは明らかに異なっていた。通常のトランスジェニックマウスでは、用いるプロモーターによる生後の発達早期に遺伝子発現のスイッチが入ってしまうことが多い。このマウスにおいても VEGF 過剰発現が生じた時期はちょうど網膜深層毛細血管が形成される生後間もない時期であり、そのため幼弱な網膜血管内皮細胞だけが VEGF に反応し、すでに成熟していた脈絡膜血管は VEGF に反応しなかったのではないかと考えられた。そこで、我々は遺伝子発現時期を自由に制御できる Tet system を用いて大人のマウスの視細胞に任意の時期に VEGF 遺伝子発現をスイッチオンできるトランスジェニックマウスを作製した¹⁸⁾。その結果、大人のマウスでも VEGF 発現上昇の2週間後にやはり同様の網膜下新生血管が形成されたのである(図2)。しかし、この網膜下新生血管もやはり網膜深層血管に由来しており、脈絡膜からの血管侵入はみられなかった。以上の結果は、いったん成熟分化した網膜血管内皮細胞であっても VEGF の過剰発現に反応して脱分化し増殖することを示している。しかし、RPE が何らかのバリアとして脈絡膜血管の侵入を防ぐのか、VEGF の分泌される方向性が異なるのか、いずれにしても視細胞における VEGF 過剰発現では脈絡膜血管は反応しなかったのである。

RPE 特異的に VEGF を発現するトランスジェニックマウス、これは長い間作製できなかったが、ついに Schwesinger ら¹⁹⁾は RPE 65 をプロモーターとし、マウスの VEGF₁₆₄ cDNA を結合させた融合遺伝子を用いて RPE 特異的に VEGF を発現するトランスジェニックマウスの作製に成功した。その結果、このマウスでは生後4か月をピークに RPE につよい VEGF mRNA の発現がみられ、組織学的検討により、脈絡膜毛細血管の血管密度が増加し、脈絡膜内血管新生ともいべき病態がみられた。しかし、このトランスジェニックマウスにおいても、やはり Bruch 膜を突き破ったいわゆる CNV は生じなかったのである。

以上の3つの VEGF トランスジェニックマウスの実験結果は重要なことを推察している。つまり、RPE や視細胞からの VEGF 発現上昇は、脈絡膜や網膜の血管内皮細胞を活性化して刺激するものの、脈絡膜の血管内皮細胞は Bruch 膜を貫いて網膜下に入ることはできなかったのである。それはなぜか？ ウイルスベクターを用いて VEGF を過剰発現させた実験では CNV が生じたことを考え合わせると、一つの可能性としては、

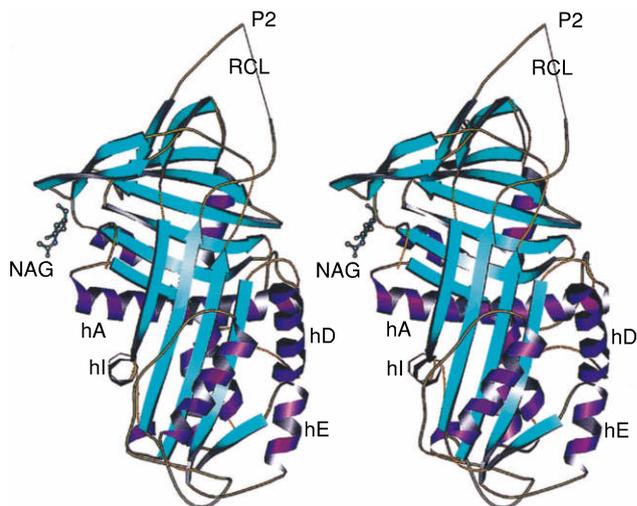


図3 色素上皮由来因子(PEDF)構造解析(文献24から許可を得て転載)。

PEDF はセリンプロテアーゼインヒビターの1種であり、特徴的なセリン反応性ループを有するがプロテアーゼ阻害活性はない。

VEGF の過剰発現だけではなく、Bruch 膜の integrity の破綻というステップが CNV 発生には同時に必要なのではないかと。という可能性がある。そして、もう一つの可能性は、CNV 発生には RPE における VEGF の発現上昇単独では不十分であり、VEGF 以外にもっと重要な因子が CNV には必要なのではないかと。というものである。そこで、我々は次のステップへと進んだ。

III 眼の血管新生を制御するキーファクター； PEDF の発見

VEGF 以外に重要な因子があるとすれば何か？ 血管新生は血管新生促進因子と血管新生抑制因子のバランスの結果生じると考えられている²⁰⁾。眼球には、本来ものをみるという光学的特性のために血管を排除した無血管部位が多数存在することから、以前から何らかの強力な血管新生抑制因子の存在が推察されていた。その因子は長く不明であったが、ついに近年、RPE 培養上清中から強力な血管新生抑制因子が同定されたのである。その因子は PEDF であり、元々は1989年、Y 79 網膜芽細胞腫細胞という幼弱な神経細胞に神経分化を誘導する因子として、ヒト胎児 RPE の培養上清から単離された分泌性の蛋白²¹⁾で、他の神経系細胞に対しても神経保護作用を有することが報告²²⁾されている。構造上はセリンプロテアーゼインヒビター(Serpin)ファミリーと相同性を有するが、セリンプロテアーゼ活性は持たないという特徴がある²³⁾。PEDF の構造解析も最近報告²⁴⁾されている(図3)。従来 PEDF については、その神経栄養因子としての作用ばかりが注目されていたが、最初の発見からちょうど10年後の1999年、Dawson ら²⁵⁾はウシ毛細血管内皮細胞の遊走アッセイにおいて、PEDF が内因性

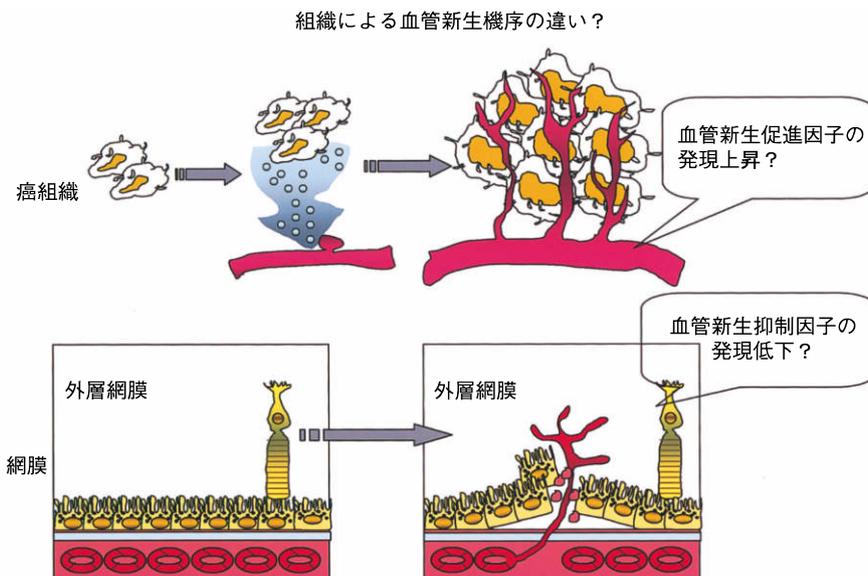


図 4 組織による血管新生機序の違いの概念図。

癌組織では、悪性腫瘍という新しい組織の増殖に付随する血管新生であり、この場合にはおそらく増殖する癌細胞が分泌する血管新生促進因子の発現上昇が血管新生の主役であろうと推察される。一方、脈絡膜血管新生が生じる網膜外層は元々無血管であり、かつ組織増殖を伴わずに血管だけがあとから侵入してくる。この場合にはおそらく、正常状態において血管の侵入を抑制している血管新生抑制因子の発現低下の方が重要なのではないかと推察される。

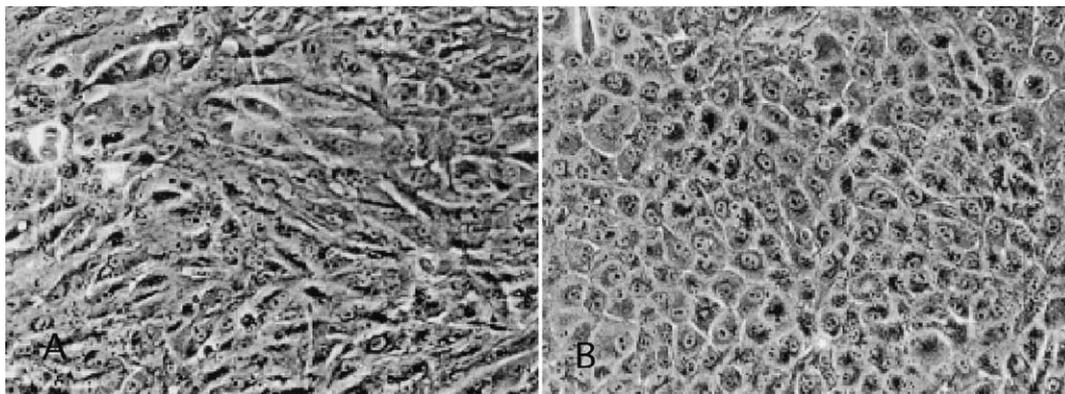


図 5 培養ヒト RPE の位走査顕微鏡写真(文献 33 から改変)。

A：通常のプラスチック上に培養した脱分化(RPE)。線維芽細胞様の概観を呈する。B：ラミニンコートしたフラスコ上に 10 ng/ml の塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)添加培地で培養した分化 RPE。細胞間が明瞭になり、敷石状の概観を呈する。

の血管新生抑制因子としては最も強力な血管新生抑制作用を有することを明らかにし、PEDF の強力な血管新生抑制作用が一躍注目されることとなった。彼らは角膜や硝子体のホモジネートをラットの角膜に埋植しても周囲からの血管新生は生じないが、これらのホモジネートから PEDF のみを除去すると何ら血管新生促進因子を加えなくてもそれだけで血管新生が生じることを角膜アッセイ法で示し、眼が生理的に無血管であるのはこの PEDF が積極的に血管の侵入を抑制しているからであると述べた。

血管新生の分子機構は、各組織により異なると考えられる(図 4)。例えば癌組織などのように、癌細胞の組織

増殖に伴って新生血管が入ってくる場合には、おそらく癌細胞が分泌する血管新生促進因子の発現上昇が主役であろう。しかし、CNV は本来無血管であるべき網膜外層に二次的に血管だけが侵入していく現象であり、そのような場合には、おそらく血管新生促進因子の増加よりも、生理的状态で血管侵入を阻止していた抑制因子の減少の方が重要ではないか、そしてそれが PEDF なのではないか、と我々は考えた。つまり AMD においては、加齢に伴い RPE が何らかの病的状態になり、この PEDF の発現が低下することが CNV 発生の最初の引き金を引くのではないかと考えたのである。

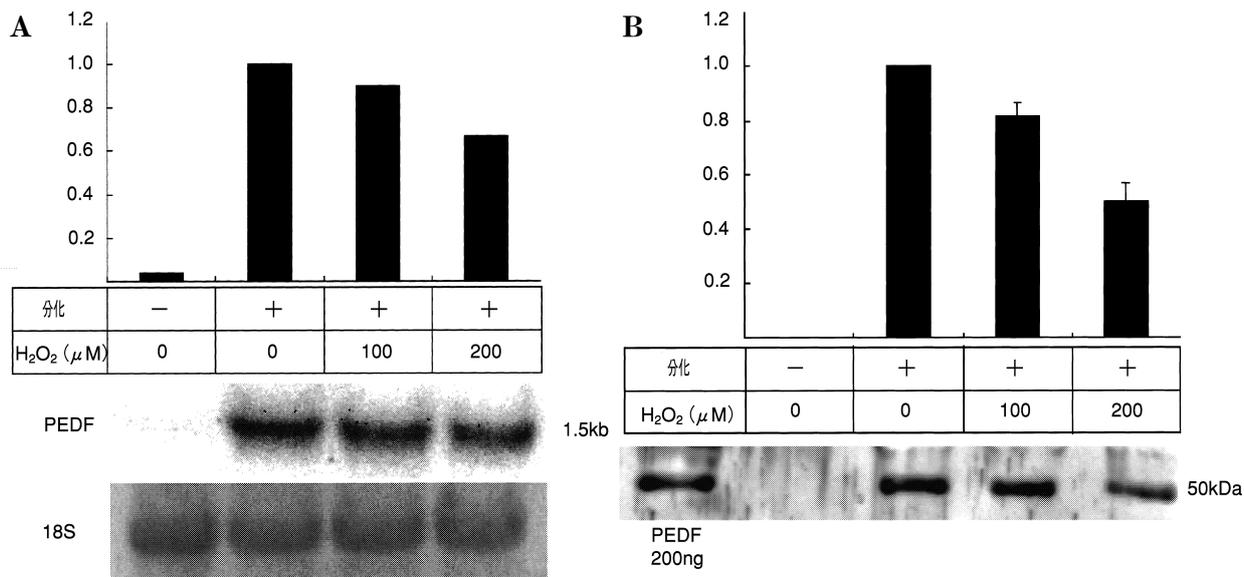


図 6

A: ノーザン・プロット法による RPE における PEDF メッセージ RNA (mRNA) の発現 (文献 33 から改変)。脱分化 RPE ではほとんど発現はみられないが、分化 RPE では 1.5 kb 付近に明瞭な PEDF mRNA の発現がみられる。さらに過酸化水素 (H₂O₂) 処理により、量依存性に分化 RPE における PEDF-mRNA の発現低下がみられた。B: ウェスタン・プロット法で測定した RPE 培養上清中の PEDF 蛋白量 (文献 33 から改変)。脱分化 RPE の培養上清中には PEDF 蛋白の発現はみられないが、分化 RPE の培養上清中には約 50 kDa 付近に PEDF 蛋白の明瞭な発現がみられる。さらに H₂O₂ 処理後の分化 RPE 培養上清では、量依存性に PEDF 蛋白の発現低下がみられた。

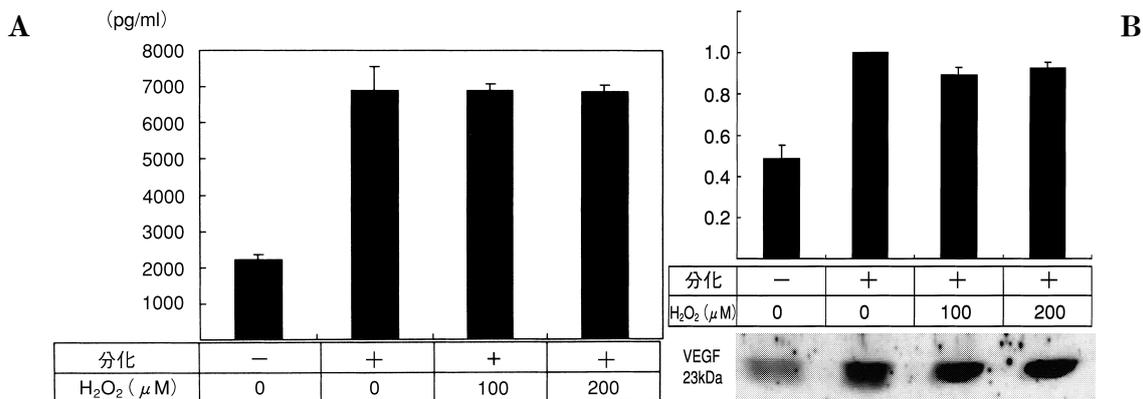


図 7

A: 酵素結合免疫吸着 (ELISA) 法で測定した RPE 培養上清中の VEGF 蛋白濃度 (文献 33 から改変)。分化 RPE では脱分化 RPE に比べ約 3 倍以上の VEGF 蛋白産生の上昇がみられる。分化 RPE に H₂O₂ を添加しても、VEGF 分泌量は高いまま変化しない。B: ウェスタン・プロット法で測定した RPE 培養上清中の VEGF 蛋白量 (文献 33 から改変)。分化 RPE では脱分化 RPE に比べ VEGF 蛋白産生の上昇がみられるが、分化 RPE に H₂O₂ を添加しても、VEGF 分泌量はほとんど変化しない。

IV 酸化ストレス負荷時の PEDF 発現変化

それでは加齢に伴い RPE に病的変化を惹き起こす刺激とは何か? 我々は RPE に病的状態を惹き起こす刺激として、酸化ストレスに注目した。従来から AMD 発生と日光曝露や喫煙との関連が推察されている^{26)~28)}。黄斑部の RPE は脈絡膜毛細血管からの過剰な酸素供給や黄斑部にピンポイントに生じる光曝露、さらには視細胞外節の貪食による不飽和脂肪酸の蓄積などによ

り、強い酸化ストレスに曝露されている。これらの酸化ストレスに抗するために、RPE はカタラーゼを始めとした高い抗酸化酵素活性を有している²⁹⁾³⁰⁾が、抗酸化酵素活性は加齢とともに減少することが知られている³¹⁾。そこで、我々は加齢に伴う抗酸化酵素活性の低下から余剰となった酸化ストレスが RPE に病的刺激として作用し、RPE に病的状態を惹き起こす結果 PEDF の発現が変化し、CNV 発生への引き金となるのではないかと仮説を立て研究を行った。

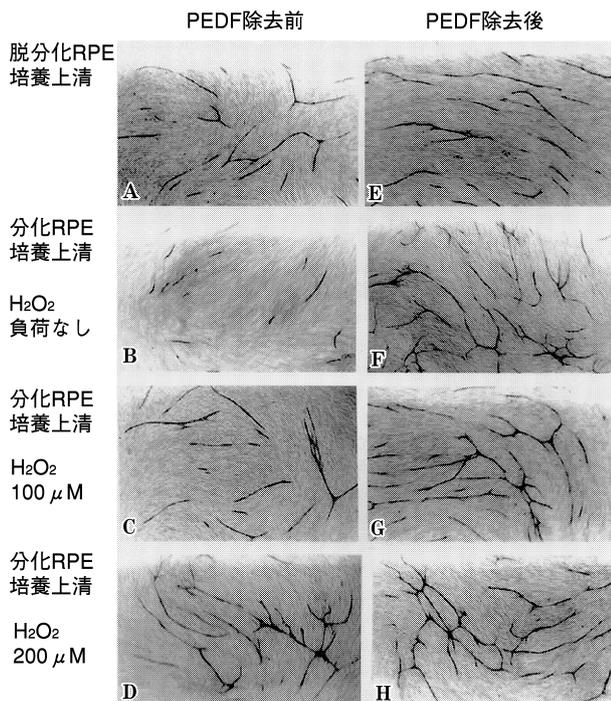


図 8 酸化ストレス負荷時の分化 RPE 培養上清の、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の血管腔形成に対する効果 (文献 33 から改変)。

HUVEC に脱分化 RPE の培養上清を添加して培養すると、血管腔形成の増加がみられる (A) が、分化 RPE 培養上清添加では血管腔形成は抑制される (B)。しかし H₂O₂ 処理後の分化 RPE 培養上清を添加すると、H₂O₂ の量依存性に血管腔形成の増加がみられた (C, D)。免疫沈降法により分化 RPE 培養上清から PEDF を除去すると、分化 RPE の血管新生抑制効果は完全に消失し、H₂O₂ 処理の有無に関係なく、血管腔形成の促進がみられた (F~H)。

RPE は細胞培養すると分化形質を逸脱し線維芽細胞様に形質変換してしまうことがよく知られている。そこでまず、我々は *in vitro* で生理的状态を反映するために Campochiaro らの報告³²⁾に従って、RPE に分化形質を誘導した。具体的にはラミニンコートしたフラスコ上に RPE を播種し bFGF 添加培地で培養するものである (図 5)。この方法で分化した RPE は、単層の敷石状となる形態的特徴に加え、生化学的にも RPE 特異的遺伝子である cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) や RPE₆₅ の発現、メラニン色素の生成などがみられ、生化学的にも分化した状態と考えられている³²⁾。こうして作製した分化 RPE と通常の脱分化 RPE とを用いて PEDF の発現を調べてみると、mRNA レベルにおいても蛋白レベルにおいても、脱分化 RPE では PEDF は全く発現していないが、分化状態になると PEDF 発現が著明に上昇してくることがわかった³³⁾ (図 6)。このような細胞分化に伴う PEDF の発現メカニズムはこれまで全く報告されておらず、現在我々は分化誘導による PEDF の発現制御機構を分子レベルで研究しているところである。一方、抑制因子である PEDF に対し、血管新生促進因子である VEGF は脱分化 RPE では培養上清中に約 2 ng/ml の VEGF 産生がみられるが、分化 RPE では 3~4 倍の発現上昇がみられた (図 7)。つまり、脱分化状態では RPE は中等量の VEGF を産生し、PEDF は全く産生していない。しかし、細胞が分化すると血管新生促進因子である VEGF と血管新生抑制因子である PEDF の両者の発現はともに著明に上昇してくるということがわかった。

そこで次に、この分化状態の RPE に酸化ストレスと

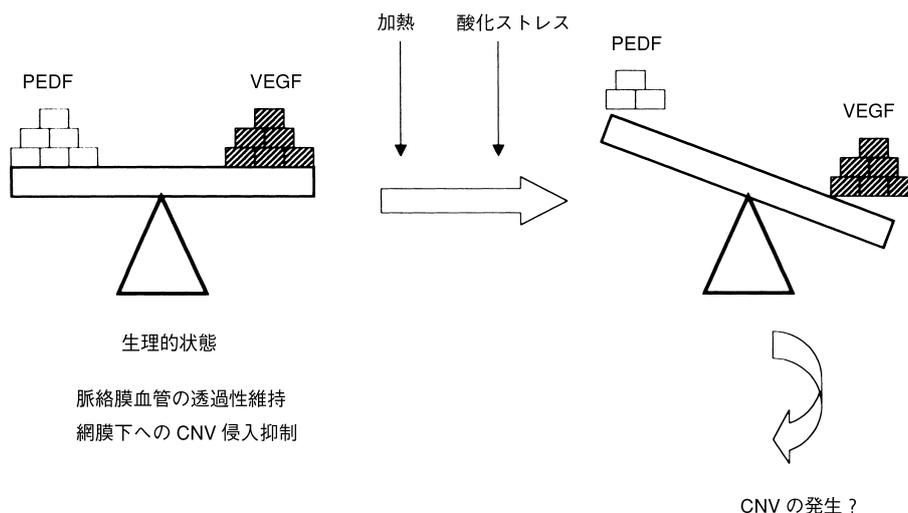


図 9 PEDF 発現変化から考えられる加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管発生機序のシエマ (文献 33 から改変)。

生理的状态の分化した RPE では高濃度の VEGF と高濃度の PEDF を発現し、両者のバランスが保たれているために血管新生は生じない。しかし加齢や酸化ストレスにより PEDF のみが低下することによって VEGF と PEDF の発現バランスが崩れ、脈絡膜血管新生への引き金を引くのではないかと考えられる。

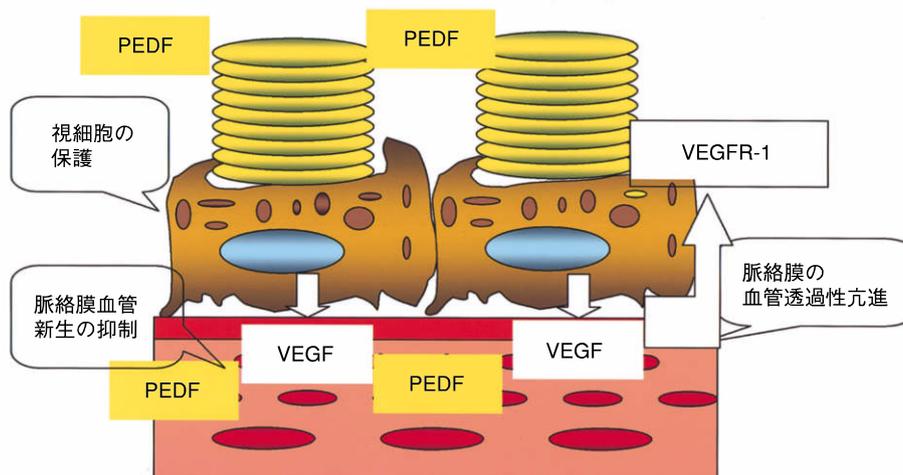


図 13 RPE における VEGF と PEDF の相互作用の模式図。

RPE は分化状態において、隣接する脈絡膜毛細血管の高い透過性を維持するために、survival factor として VEGF を分泌する。しかし、同時に VEGF による血管内皮増殖作用を抑制するために RPE 上の VEGFR-1 受容体を介して VEGF によるオートクライン作用により高濃度の PEDF を発現し、脈絡膜血管新生の発生を抑制しているのではないかと推察される。また、PEDF は神経栄養因子としての作用から視細胞の保護にも働く。この RPE における VEGF と PEDF の相互作用は、外側にある脈絡膜血管の高い透過性を維持しながら視細胞を無血管に保つという矛盾した作用を同時に行いながら両者のホメオスタシスを維持している RPE に特有の機構ではないかと推察される。

RPE における VEGF と PEDF の相互作用について実験を進めた³⁷⁾。RPE 上には VEGF receptor-1 (VEGFR-1)、VEGFR-2 の VEGFR が発現している (図 10)。そこで次に、分化 RPE の培地中に VEGF 中和抗体を投与して RPE 自身が分泌した VEGF の作用を阻害すると PEDF の産生は有意に抑制された (図 11)。受容体レベルでは VEGFR-1 中和抗体の添加により、同様に RPE からの PEDF 発現は有意に抑制されたが、VEGFR-2 中和抗体の添加では PEDF 発現は抑制されなかった。さらに、VEGF 阻害後に VEGFR-1 の特異的リガンドである placenta growth factor (PlGF) を投与すると RPE からの PEDF 発現低下はみられなくなった (図 12)。以上から、分化した RPE では RPE 自身が分泌する VEGF が RPE 上の VEGFR-1 を介してオートクラインに PEDF 発現を上昇させているということがわかった。一方、脱分化状態の RPE では VEGFR-1、VEGFR-2 の発現は分化 RPE と同程度にみられたが、培地中に VEGF や PlGF を添加しても PEDF は全く発現せず、両者のフィードバックシステムは存在していなかった。では、なぜ RPE は生理的状态でこのような複雑な血管新生促進因子と抑制因子とのフィードバックをしているのであろうか？ また、このフィードバックシステムの存在が CNV 発生に何か関係があるのか？

まず、生理的状态においてなぜ RPE は高濃度の VEGF を産生する必要があるのだろうか？ 以前から RPE は正常状態でも恒常的に VEGF を発現していることが報告されており、VEGF の生理的役割が推察されていた⁵⁾³⁸⁾³⁹⁾。VEGF は血管内皮細胞増殖作用の他に、

ヒスタミンの数万倍もの強力な血管透過性亢進作用を有することが知られている⁹⁾。事実、VEGF を皮下に投与すると筋肉や皮膚の連続性血管内皮に fenestration が誘導される⁴⁰⁾。RPE に接する脈絡膜毛細血管は、無血管の視細胞を栄養するために有窓性で高い透過性を有する血管であり、何らかの原因により RPE が萎縮した場合には、隣接した脈絡膜毛細血管の fenestration が続発性に消失することが報告⁴¹⁾されている。以上から、おそらく RPE から分泌される VEGF は、高い透過性を有する脈絡膜毛細血管に対する一種の栄養因子として機能しているのではないかと推察される。

しかし、脈絡膜血管の維持に必要ではあっても、高濃度の VEGF 産生は同時に血管内皮増殖作用により CNV を惹起する危険性がある。そこで、RPE 上の VEGFR-1 受容体を介してオートクラインで同時に PEDF の発現を上昇させ、CNV を抑制していると考えられる (図 13)。つまり、この機能は網膜と脈絡膜の両者のホメオスタシスを維持している RPE に特有の機能であり、外層にある脈絡膜の高い透過性を維持しながら内層にある網膜視細胞の無血管を維持するという矛盾した機能を同時に行うためには、VEGF と PEDF の両方を高濃度に発現するこのようなフィードバック機構が必要なのではないかと考えられる。一方で、脱分化状態の RPE ではこのフィードバック機構が完全に失われていた。そのために VEGF が高濃度に産生されても血管内皮増殖作用を打ち消す PEDF が産生されず、VEGF のみが優位に立ち血管新生に促進的に働くと考えられる。

実験モデルを用いた組織学的検討でも、CNV の発

生, 進行過程において, 最初に血管内皮細胞が増殖し CNV が形成されるときには RPE は脱分化し, 血管内皮細胞とともに増殖して CNV の進展を助長するが, その後 RPE が一層の細胞として CNV を完全に囲い込み再びバリアを形成すると, 逆に CNV の退縮を誘導することが報告⁴²⁾されている. 今回の結果と照らし合わせると, RPE はもともと血管新生に対し促進と抑制の両方に働く可能性をもち, それは RPE の分化状態に左右されることを意味する. そして, その理由は今回示したような RPE の分化状態の違いによる VEGF と PEDF のフィードバックシステムの存在の有無によるのかも知れない.

IV PEDF ノックアウトマウスの結果と CNV 発生における炎症細胞の役割

これまでの流れで加齢や酸化ストレスによる RPE 細胞の分化, 脱分化による PEDF の発現変化が CNV 発生に重要であることが明らかになってきた. 新しい血管新生抑制因子である PEDF は近年注目されており, 動物の実験モデルにおいて CNV における PEDF 遺伝子治療の有効性が報告⁴³⁾され, この報告を受けて現在米国でヒト AMD 患者に対する PEDF 遺伝子治療の臨床試験が行われており, その成果が期待されている⁴⁴⁾.

このように, PEDF は強力な血管新生抑制作用を有すること, 同時に神経栄養因子として視細胞保護にも働くこと, さらに元々内因性の因子であるため副作用を生じにくいなどといった種々の利点から, CNV に対する臨床応用が今最も期待されている因子である. しかし, また最初の疑問に戻るが, それでは PEDF が本当に CNV 発生を左右する究極の答えなのだろうか? これまで PEDF ノックアウトマウス作製の試みはなされていたが, いずれも胎生期に lethal であり, その表現型は明らかではなかった (Tombran-Tink, personal communication). しかしごく最近になり, PEDF ノックアウトマウスの表現型がはじめて報告⁴⁵⁾された. それによると, 生後3か月の PEDF ノックアウトマウスでは網膜の血管密度が約5倍以上に増加していたと記載されている. しかし, 詳しい組織所見などは記載されておらず, 論文の主題はより著明な変化がみられた膵臓と前立腺の方に移ってしまっている. 論文中には CNV に関する記載は全くない. CNV については言及されていないが, おそらく網膜内の血管密度増加のみで, いわゆる Bruch 膜を貫くような CNV は生じなかったのではないかと推察される. さらに, 今年の ARVO においても Regeneron 社が PEDF ノックアウトマウスを作製し, CNV 発生はなかったと報告⁴⁶⁾している. これらの PEDF ノックアウトマウスの結果は, PEDF は CNV 発生において非常に重要な因子ではあるが, それ単独ではやはり CNV の最初の引き金を引くには不十分であるこ

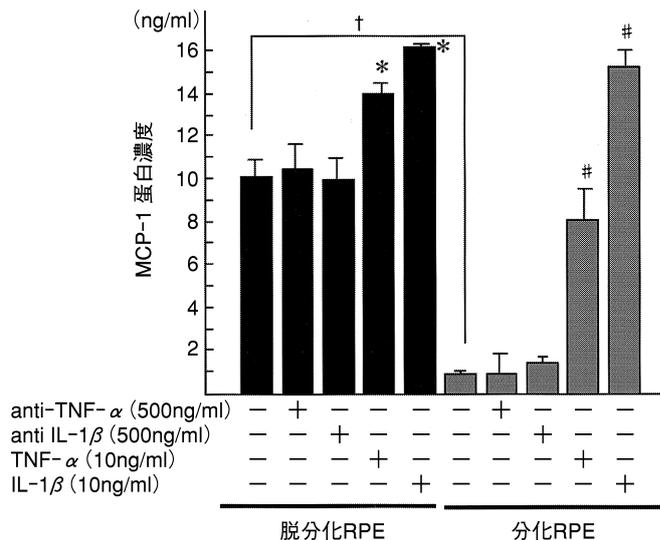


図 14 ELISA 法で測定した RPE 培養上清中の monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 蛋白濃度 (文献 49 から改変).

脱分化 RPE では炎症性サイトカインで刺激しない状態ですでに分化 RPE に比べ, 著明な MCP-1 発現上昇がみられる. $p < 0.05$, Mann-Whitney U test. (文献 49 から改変).

とを意味している可能性がある. さらに, PEDF ノックアウトマウスの表現型はある意味で RPE における VEGF トランスジェニックマウスの結果¹⁹⁾と類似している. つまり, 血管新生関連因子の発現変化のみでは網膜内もしくは脈絡膜内に限局した血管新生(血管密度の増加)を起こすことはできても, Bruch 膜というバリアを超える新生血管を作製することはできない可能性が推察されたのである.

それでは Bruch 膜を超える CNV が生じるためには何が足りないのか? 以前から, ヒト剖検眼や手術的に摘出した CNV 膜の病理組織学的検討から, CNV における炎症細胞の集積が報告³⁾¹²⁾⁴⁷⁾されている. また CNV を有する眼では, CNV から離れた部位でも Bruch 膜は菲薄化し, その直下にマクロファージを主体とした炎症細胞の集積がみられる⁴⁸⁾. これらの活性化マクロファージはコラゲナーゼやエラスターゼといったマトリックス分解酵素を分泌し Bruch 膜を浸食することにより, CNV 発生を助長すると考えられる. つまり, 血管新生関連因子の発現変化に加え, 炎症細胞の関与や加齢自体による Bruch 膜の脆弱化, 菲薄化といったバリアの破綻という要因が新たに加わらなければ, Bruch 膜というバリアを超えた真の CNV は生じないのではないかと推察される. さらに, マクロファージは $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ といった炎症性サイトカインを分泌し, これらが RPE に作用して RPE からの VEGF 発現上昇を促すことにより間接的に CNV を助長させることも報告⁴⁷⁾されている. また, 活性化マクロファージは自身も VE-

GF を産生することが知られている¹²⁾。

それでは、なぜ CNV の部位に炎症細胞が集積してくるのか？ AMD 眼の *in situ* hybridization において CNV 中の RPE は高濃度の monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) を発現していることが報告¹²⁾されている。MCP-1 は CC ケモカインファミリーの一つで、強力なマクロファージ走化因子である。我々は培養ヒト RPE を用い、RPE が正常の状態から脱分化状態に至ると転写因子 nuclear factor (NF)- κ B の内因性活性化を介して MCP-1 の発現が著明に上昇することを見出し報告⁴⁹⁾した (図 14)。つまり、加齢や酸化ストレスに伴う RPE の分化状態の崩れは、VEGF や PEDF といった血管新生関連因子の変化を惹き起こすだけでなく、同時に MCP-1 の発現を上昇させることによりマクロファージを集積し、その結果、二次的な炎症反応と Bruch 膜の integrity の破綻を起こすのではないかと考えられる。つまり、これらの様々な過程が同時に働くことによって初めて、正常から RPE の分化状態の崩れ、血管新生関連因子の発現変化と炎症細胞の惹起、そして Bruch 膜を超える CNV 発生へと進んでいく可能性が考えられる。

V マトリックスの変化

Bruch 膜は炎症細胞などによる浸食の他、それ自体も加齢に伴い様々な変化を受ける。これは RPE の脱分化に伴い生じる場合もあれば、Bruch 膜に生じる変化が逆に RPE など周囲細胞に影響を及ぼす場合もある。Bruch 膜の加齢に伴う重要な変化の一つが、後期グリケーション代謝産物 (advanced glycation end products, AGEs) の沈着である。AGEs は加齢や高血糖により生体蛋白が非酵素的糖負荷反応を受けて産生される糖化蛋白の最終産物で、CNV の前駆病変であるドルーゼン、basal deposits などに沈着がみられる⁵⁰⁾⁵¹⁾。こうして Bruch 膜に蓄積した AGEs は脈絡膜血管内皮細胞の細胞増殖、VEGF の発現上昇を惹き起こし⁵²⁾、間接的に CNV の発生、進展に関与していると推察される。さらに、AGE は RPE にも働いてその分化を抑制したりアポトーシスを促進する遺伝子発現を上昇させることにより、RPE に対し脱分化や萎縮の方向に作用することが報告⁵³⁾されている。

検眼鏡的にもみられるマトリックスの変化としてはドルーゼンが有名である。ドルーゼンは AMD における CNV の前駆病変として重要であり、このドルーゼンに対し光凝固を施行することによって後の CNV 発生が予防できるかという臨床試験が現在行われている。Crabb ら⁵⁴⁾はドルーゼンの成分を解析したところ、ドルーゼン中に tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-3, vitronectin をはじめとする種々の蛋白を同定した。さらに、AMD を発症した donor では発症していない

donor に比較し、以上の蛋白の酸化修飾された形が多く見受けられたことから、蛋白の酸化修飾がドルーゼン形成に重要な役割をしているのではないかとした⁵⁴⁾。さらに、Bruch 膜内に存在するマトリックス分解酵素やその inhibitor の、加齢に伴う変化も報告されている。TIMP-3 は AMD と同様に CNV を生じる疾患である Sorsby's fundus dystrophy において変異がみられることで話題になった因子であるが、ヒト Bruch 膜にこの TIMP-3 が存在し特に高齢者の Bruch 膜やドルーゼンでつよく染色される⁵⁵⁾⁵⁶⁾ことから、Bruch 膜内におけるマトリックス分解制御の乱れが Bruch 膜の integrity の破綻を招き CNV 発生に関与している可能性も推察されている。

Matrix metalloproteinase (MMPs) は細胞外マトリックスの構成蛋白質を分解する酵素で、現在までに 20 種類以上が同定されている。その中でも特に基底膜の主な成分である collagen type IV を分解するという点で MMP-2 と MMP-9 が重要である。事実動物モデルでは MMP-2 ノックアウトマウスや MMP-9 ノックアウトマウスではレーザー照射により誘発された CNV が抑制された⁵⁷⁾⁵⁸⁾。しかしながら、実験結果に基づいて開始された経口の MMP-2, -9, -13 の複合阻害剤である Agouron 社の prinomastat (AG 3340) のヒト AMD に対する臨床試験は、有効性が証明されずに中止された⁵⁹⁾。AG 3340 は経口投与であり、脈絡膜における薬剤の有効濃度や、複合製剤であることに起因する副作用の問題、また実験モデルと異なりヒト AMD ではすでに完成した CNV に投与されるといった投与時期の違いなどが、有効性が証明されなかった理由としてあげられる。今後は CNV 発生の各段階における特異的な MMP isoform を同定し、特異的阻害剤をより有効な delivery route で投与する必要がある。さらに、同じ細胞外マトリックス分解酵素である、セリンプロテアーゼ系のプラスミノゲン活性化因子 (plasminogen activator, PA) と CNV 発生との関連なども報告されている。

VII わかっていない謎；なぜ CNV は黄斑部に生じるのか？

これまで述べてきたように、AMD の分子機構には未だ解明されていない謎が多く存在する。その中の一つがなぜ CNV は黄斑部に極めて集中して生じるのかという疑問である。これについては今まで多数の説明がなされている。例えば、黄斑部の RPE はすでに述べたような理由から、周辺部の RPE に比べて多大な酸化ストレスに常に曝されている。また、加齢に伴い RPE 内には消化しきれなくなった視細胞外節に由来する老化色素リポフスチンが蓄積してくるが、黄斑部の RPE は周辺部の RPE に比べより多くのリポフスチンを含有している⁶⁰⁾。さらに、加齢に伴う RPE の減少が報告されているが、

RPE のアポトーシスは黄斑部にほぼ限局して生じる⁶¹⁾。こういった RPE の変化を反映してか、Bruch 膜の加齢変化も黄斑部に著明である⁶²⁾。一方、RPE や Bruch 膜以外の説明もある。例えば、インドシアニグリーン赤外蛍光眼底造影を用いた検討で、AMD の患者では黄斑部の脈絡膜血流の減少が著明であることや⁶³⁾⁶⁴⁾、黄斑部に watershed zone がみられ、その部位に CNV が発生してくること⁶⁵⁾などから、黄斑部には虚血が生じやすいと述べている。しかし、以上の説明はあくまでも黄斑部に起きやすいという違いを量の違いで説明しているのみである。したがって、黄斑部に圧倒的に選択的に生じる CNV のほとんど all or none に近い特性の理由はまだ説明できていない。

VIII 将来の一つの課題；AMD モデル動物

AMD の CNV は上述の理由から黄斑部に極めて選択的に生じる病態である。したがって、元々黄斑部のない動物にそのモデルを作ろうとするのには若干の無理がある。しかし、今後 AMD における CNV の分子機構解明や治療法の開発を進めていく上では、やはり病態を反映した AMD の CNV モデルの確立が急務である。

これまで多用されてきたモデル、それは Ryan ら⁶⁶⁾によって開発されたサルやラットの眼底にレーザー強凝固を行って Bruch 膜を破壊し、その後に CNV 発生をみるというモデルである。最近では、このモデルをマウスに応用することにより、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなどの遺伝子操作マウスに CNV を作製し、CNV 発生における単一因子の影響を調べることが可能となった⁶⁷⁾。しかしながら、このレーザーモデルの問題点は非常に強いエネルギーで Bruch 膜を破壊してしまうため、外傷性脈絡膜破裂や網膜色素線条の CNV には近いかも知れないが、著しい Bruch 膜の断裂が先行しない AMD の CNV とは病態がかなり異なる。そのため、AG 3340 の臨床試験結果にみられるように、この動物モデルを用いた実験結果と実際のヒトに対する治療効果が異なってしまう危険性もある。さらに重要なことは、脈絡膜血管内皮細胞が Bruch 膜を貫いて網膜下に入っていき最初の重要なプロセスの解明が、このモデルでは不可能であることである。

レーザー照射を行わずに CNV を誘導するモデルとしては、ウサギやサルの網膜下に bFGF や VEGF を含有するマイクロスフィアを移植して CNV を誘導するモデルが報告⁶⁸⁾⁶⁹⁾されている。また、Spilsbury ら¹⁵⁾はラット VEGF₁₆₄ cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターをラットの網膜下に注入し、注入 10 日後から AMD 類似の CNV 形成を確認している。しかし、これらの網膜下注入という操作を伴うモデルでは、やはり医原的な Bruch 膜の integrity の破壊が CNV 発生に関与している可能性を否定できない。Spilsbury らは最初の穿刺部

位から離れた部位にも CNV が生じたとし、このモデルにおける CNV 発生には必ずしも Bruch 膜の integrity の破壊が必須ではないとしている。しかし、穿孔に伴う影響を完全に否定するためには、やはり外科的侵襲を伴わない CNV モデルの開発が必須である。

外科的侵襲を加えずに CNV が発生するモデル。それは現在のところ、実験的ぶどう膜炎モデルと網膜変性モデルにみられる CNV だけではないだろうか。Sakamoto ら⁷⁰⁾は interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) により誘導された実験的ぶどう膜炎モデルを用い、誘導 45 日後に 40% 近くのラットで CNV の形成を確認した。また、Nishikawa ら⁷¹⁾は網膜変性モデルマウスにおいて、視細胞消失後の CNV 発生の詳細な経過を報告している。AMD とは異なる病態ではあるものの、これらのモデルにおける CNV の自然発症機序の解明は AMD の CNV 発生のメカニズムを考える上で何らかのヒントを与えてくれるかも知れない。

さらに、モデル動物としてのもう一つの可能性は、老化モデルであると考えている。Majji ら⁷²⁾は老化促進マウスの眼を組織学的に調べたところ、老化促進マウスの P8 という種で生後 10 か月以上で RPE や Bruch 膜に著明な加齢変化がみられ、その一部に Bruch 膜内に限局した CNV がみられたとしている。しかし、Bruch 膜を貫く CNV はやはり発生していない。その他、貪食した視細胞外節の RPE 内での消化に関与する酵素 cathepsin D の変異型トランスジェニックマウスにおいて、電子顕微鏡で Bruch 膜に basal laminar and linear deposits がみられたとの報告⁷³⁾がある。また、脂質代謝に重要な役割をする apolipoprotein E 欠損マウスで Bruch 膜への debris の蓄積が多くみられたことや⁷⁴⁾、変異型 TIMP-3 のノックインマウスで Bruch 膜の内面に異常がみられたこと⁷⁵⁾、などが報告されている。しかしながら、これらのマウスでは主として電子顕微鏡レベルでヒトの AMD に類似した Bruch 膜の異常がある程度再現されるものの、やはりそれだけでは CNV は生じないのである。

つまり以上の流れを考えると、AMD の CNV を再現するにはいくつもの変化が同時期に併わせて再現される必要があるのではないかと考えられる。生体内ではこれらの種々の変化が自然に coordinate されて次々に生じるために、結果として Bruch 膜を貫く CNV が形成されるのであろう。おそらく、動物モデルで真に AMD の CNV を再現するには、①加齢による Bruch 膜の変化や脆弱性、② Bruch 膜周囲への炎症細胞集積、③そして最終的には RPE からの血管新生関連因子の発現変化、の 3 つが少なくとも絶対必要条件であり、これらが決め手となって CNV が発生するのではないかと考えられる。もちろん、他にも CNV 発生を修飾する因子はあるのかも知れないが、これらの 3 要因は必須であり、いずれが欠けて

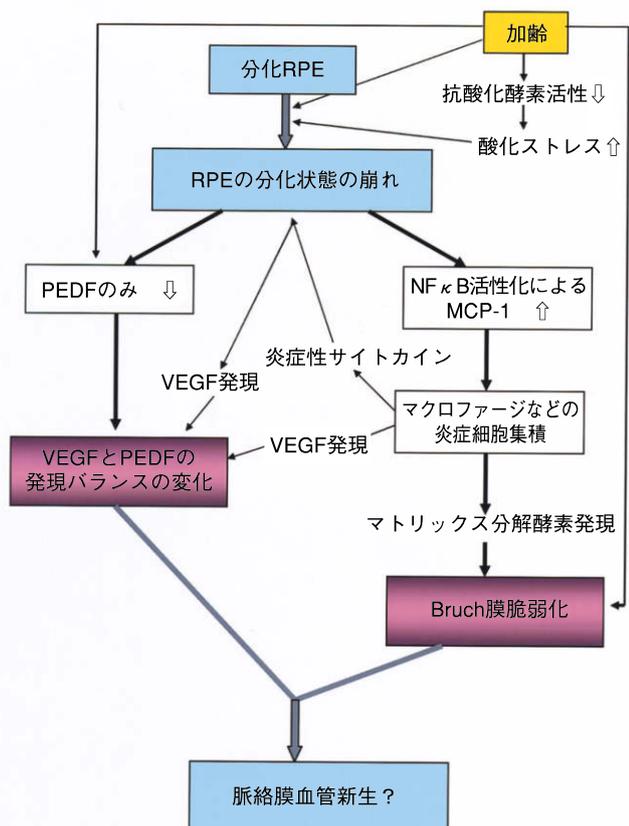


図 15 以上の流れから考えられる加齢黄斑変性における脈絡膜血管新生のメカニズム。

主軸を成すのは加齢や酸化ストレスなどにより引き起こされる RPE 細胞の分化の崩れであり、これを引き金に種々のカスケードが始まると推察している。RPE の脱分化は PEDF の発現低下による VEGF と PEDF のバランスの崩れを生じる。また、同時に MCP-1 の発現を上昇させることによって炎症細胞を惹起する。炎症細胞自体も VEGF を発現し、さらに VEGF と PEDF のバランスの崩れを助長する。さらに、加齢自体による PEDF の発現低下や Bruch 膜の変化もこれらに加わる。以上により、① VEGF と PEDF の発現バランスの崩れ、② 炎症細胞の集積、そして③ Bruch 膜の integrity の破綻、がそろった場合に脈絡膜血管新生が発生する可能性があるのではないかと推察している。

も生体内での CNV 自然発生を再現することはできないのではないだろうか。これらすべてを再現する CNV モデルができたとき、そのときこそ AMD の CNV 発生の分子メカニズムの解明はさらに飛躍的に進むと期待される。

IX おわりに

以上述べてきたように、AMD における CNV 発生の分子機構は未だ不明な点も多いものの、新しい血管新生抑制因子 PEDF の発見を軸としてかなりの新しい事実が判明してきた。しかし実際の CNV 発生においては、おそらく PEDF のみならず種々の変化が coordinated に同時に変化することによって CNV が発生するのであ

ろう。図 15 に現在我々が考えた AMD における CNV 発生の概念図を示す。まず、加齢自体と加齢に伴う抗酸化酵素活性の低下に基づく酸化ストレスの増大により、正常の分化状態にある RPE の細胞分化が崩れる。この分化状態の崩れがカスケードの発端であると考えている。RPE の脱分化に伴い今回示したような血管新生抑制因子 PEDF の発現低下が生じ、血管新生促進因子と抑制因子のバランスの崩れが生じる。また、加齢そのものによる PEDF の低下も相まって PEDF のさらなる低下を招く。同時に RPE の脱分化により内因性 NF(B 活性化を介した MCP-1 の発現上昇が生じ、マクロファージが集積する。集積したマクロファージは MMP などのマトリックス分解酵素を発現して Bruch 膜を浸食する。さらに、マクロファージ自身も VEGF を分泌し、またマクロファージが分泌する炎症性サイトカインが二次的に RPE に働き VEGF 発現を上昇させ、血管新生促進因子と抑制因子のさらなるバランスの変化を招く。同時に加齢に伴う Bruch 膜の脆弱性もこれに加わり、図に記載したような様々なカスケードが加齢による RPE の脱分化という形質転換を引き金に始まると考えられる。

現在、基礎研究の成果に基づいた様々な臨床試験がヒト AMD 患者に対しても行われている。この中には PEDF に対する遺伝子治療⁴⁴⁾、VEGF アプタマーを用いた VEGF 阻害⁷⁶⁾、抗炎症薬としてのステロイド製剤などが含まれている。これらの臨床試験の成果はときに、動物実験の結果と臨床試験の成果の違いを浮き彫りにし、ヒトではどの因子が本当に重要であるのかを逆説的に教えてくれる場合もあるし、さらにもし基礎研究に基づいた臨床試験で有効性が証明されれば、現在確実な治療手段がない AMD における CNV の多数の患者さんが新しい治療の恩恵に授かれる日も近いと期待される。

AMD の CNV の分子機構の解明はもう本当にあと一歩まできている。それが現在の印象である。そして、分子機構に基づいた分子治療の開発と普及を目指して、今後のさらなる研究の発展が期待される。

稿を終えるに当たり、ご指導、ご助言を賜りました東京医科歯科大学大学院分子細胞機能学森田育男教授ならびに視覚応答調節学望月 學教授に深謝を申し上げます。またヒト RPE 細胞を譲渡していただき、細胞の分化方法をご教示いただいた Wilmer 眼研究所 Peter A Campochiaro 教授、Sean F Hackett 博士に深謝いたします。

文 献

1) Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, et al : The Framingham Eye Study monograph : An ophthalmological and epidemiological study of cataract,

- glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973—1975. *Surv Ophthalmol* 24 : 335—610, 1980.
- 2) **Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt JC**, et al : Racial differences in the cause-specific blindness in east Baltimore. *N Engl J Med* 325 : 1412—1417, 1991.
 - 3) **Green WR, Harlan JB** : Histopathologic features. In : Berger JW, et al(Eds) : Age-related macular degeneration. CV Mosby, St Louis, 81—154, 1999.
 - 4) **Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, Thach AB, Hinton DR** : Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 855—868, 1996.
 - 5) **Yi X, Mai LC, Uyama M, Yew DT** : Time-course expression of vascular endothelial growth factor as related to the development of the retinochoroidal vasculature in rats. *Exp Brain Res* 118 : 155—160, 1998.
 - 6) **Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H, Nakagawa K, Sueishi K, Inomata H** : Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 159—167, 1997.
 - 7) **Miller H, Miller B, Ryan SJ** : The role of retinal pigment epithelium in the involution of subretinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 : 1644—1652, 1986.
 - 8) **Campochiaro PA** : Growth factors in the retinal pigment epithelium and retina. In : Marmor MF, et al(Eds) : The retinal pigment epithelium. Oxford Press, New York, 459—477, 1999.
 - 9) **Senger DR, van der Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK** : Vascular permeability factor(VPF, VEGF)in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12 : 303—324, 1993.
 - 10) **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.
 - 11) **Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N** : Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246 : 1306—1309, 1989.
 - 12) **Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, Cohen C**, et al : Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol Vis* 21 : 119—126, 2002.
 - 13) **Wellis JA, Murthy R, Chibber R, Nunn A, Molinatti PA, Kohner EM**, et al : Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularization. *Br J Ophthalmol* 80 : 363—366, 1996.
 - 14) **Blaawgeers HGT, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA**, et al : Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. *Am J Pathol* 155 : 421—428, 1999.
 - 15) **Spilbury K, Garrett KL, Shen WY, Constable IJ, Rakoczy PE** : Overexpression of vascular endothelial growth factor(VEGF)in retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 157 : 135—144, 2000.
 - 16) **Wang F, Rendahl KG, Manning WC, Quiroz D, Coyne M, Miller SS** : AAV-mediated expression of vascular endothelial growth factor induces choroidal neovascularization in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 781—790, 2003.
 - 17) **Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, Ozaki H, Vinos MA, LaRochelle W**, et al : Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina : A new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol* 151 : 281—291, 1997.
 - 18) **Ohno-Matsui K, Hirose A, Yamamoto S, Saikia J, Okamoto N, Gehlbach P**, et al : Indicible expression of vascular endothelial growth factor in adult mice causes severe proliferative retinopathy and retinal detachment. *Am J Pathol* 160 : 711—719, 2002.
 - 19) **Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, Jousen AM, Fernandez A, Meyer TN**, et al : Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 158 : 1161—1172, 2001.
 - 20) **Folkman J** : Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1 : 27—31, 1995.
 - 21) **Tombran-Tink J, Johnson LV** : Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 1700—1707, 1989.
 - 22) **Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrazek D, Elias R, McGinnis JF** : Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res* 57 : 789—800, 1999.
 - 23) **Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J** : Pigment epithelium-derived factor (PEDF) : Neurotrophic activity and identification as a unique member of the serine protease inhibitor(SERPIN) gene family. *Proc Natl Acad Sci* 90 : 1526—1530, 1993.
 - 24) **Simonovic M, Gettins PG, Volz K** : Crystal struc-

- ture of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc Natl Acad Sci* 98 : 1131—1135, 2001.
- 25) **Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu HJ, Benedict W, et al** : Pigment epithelium-derived factor : A potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285 : 245—248, 1999.
- 26) **Taylor HR, West S, Munoz B, Rosenthal FS, Bressler FS, Bressler SB, et al** : The long-term effects of visible light on the eye. *Arch Ophthalmol* 110 : 99—104, 1992.
- 27) **Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BEK** : Sunlight and age-related macular degeneration : The Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 111 : 514—518, 1993.
- 28) **Snodderly DM** : Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr* 62 : 1448 S—1461 S, 1995.
- 29) **Tate DJ, Miceli MV, Newsome DA** : Phagocytosis and hydrogen peroxide induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 1271—1279, 1995.
- 30) **Liles MR, Newsome DA, Oliver PD** : Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium. *Arch Ophthalmol* 109 : 1285—1288, 1991.
- 31) **Tate DJ, Newsome DA, Oliver PD** : Metallothionein shows an age-related decrease in human macular retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 2348—2351, 1993.
- 32) **Campochiaro PA, Hackett SF** : Corneal endothelial cell matrix promotes expression of differentiated features of retinal pigmented epithelial cells : Implication of laminin and basic fibroblast growth factor as active components. *Exp Eye Res* 57 : 539—547, 1993.
- 33) **Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Uetama T, et al** : Novel mechanism for age-related macular degeneration : An equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 189 : 323—333, 2001.
- 34) **Tombran-Tink J, Schivaram SM, Chader GJ, Johnosn LV, Bok D** : Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neuroscience* 15 : 4992—5003, 1995.
- 35) **Palmieri D, Watson JM, Rinehart CA** : Age-related expression of PEDF/EPC-1 in human endometrial stromal fibroblasts : Implications for interactive senescence. *Exp Cell Res* 247 : 142—147, 1999.
- 36) **Pignolo RJ, Cristofalo VJ, Rotenberg MO** : Senescent WI-38 cells fail to express EPC-1, a gene induced in young cells upon entry into G 0 state. *J Biol Chem* 268 : 8949—8957, 1993.
- 37) **Ohno-Matsui K, Yoshida T, Uetama T, Mochizuki M, Morita I** : Vascular endothelial growth factor upregulates pigment epithelium-derived factor via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303 : 962—967, 2003.
- 38) **Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Besce B, et al** : Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193 : 631—638, 1993.
- 39) **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.
- 40) **Roberts WG, Palade GE** : Increased microvascular permeability and endothelial fenestrations induced by vascular endothelial growth factor *in vivo*. *J Cell Sci* 108 : 2369—2379, 1995.
- 41) **Korte GE, Gerszberg T, Pua F, Henkind P** : Choriocapillaris atrophy after experimental destruction of the retinal pigment epithelium in the rat. A study in thin sections and vascular casts. *Acta Anat* 127 : 171—175, 1986.
- 42) **Miller H, Miller B, Ryan SJ** : The role of retinal pigment epithelium in the involution of subretinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 : 1644—1652, 1986.
- 43) **Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, Duh E, Zack DJ, Li Q, et al** : AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 1994—2000, 2002.
- 44) **Rasmussen H, Chu KW, Campochiaro PA, Gehlbach PL, Haller JA, Handa JT, et al** : Clinical protocol. An open-label, phase 1, single administration, dose-escalation study of ADVDPEDF.11 D(ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Hum Gene Ther* 12 : 2029—2032, 2001.
- 45) **Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP, et al** : Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 9 : 774—780, 2003.
- 46) **Renard RA, Cao J, Yancopoulos GD, Wiegand SJ** : Eye phenotype of pigment epithelium-derived factor knockout mice. *ARVO abstract* (B 727).
- 47) **Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, et al** : The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1891—1898, 1999.
- 48) **Van der Shaft TL, Mooy CM, Bruijn WC, de**

- Jong PT** : Early stages of age-related macular degeneration : An immunofluorescence and electron microscopy study. *Br J Ophthalmol* 77 : 657—661, 1993.
- 49) **Uetama T, Ohno-Matsui K, Morita I, Mochizuki M** : Phenotypic changes regulates monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *J Cell Physiol* (in press).
- 50) **Ishibashi T, Murata T, Hangai M, Nagai R, Horiuchi S, Lopez PF, et al** : Advanced glycation end products in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 116 : 1629—1632, 1998.
- 51) **Handa JT, Verzijl N, Matsunaga H, Aotaki-Keen A, Luttj G, Koppele JM, et al** : Increase in the advanced glycation end product pentosidine in Bruch's membrane with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 775—779, 1999.
- 52) **Hoffmann S, Friedrichs U, Eichler W, Rosenthal A, Wiedemann P** : Advanced glycation end products induce choroidal endothelial cell proliferation, matrix metalloproteinase-2 and VEGF upregulation *in vitro*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240 : 996—1002, 2002.
- 53) **Honda S, Farboud B, Hjelmeland LM, Handa JT** : Induction of an aging mRNA retinal pigment epithelial cell phenotype by matrix-containing advanced glycation end products *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 2419—2425, 2001.
- 54) **Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Dhadrach K, West KA, Sakaguchi H, et al** : Drusen proteome analysis : An approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci* 99 : 14682—14687, 2002.
- 55) **Fariss RN, Apte SS, Olsen BR, Iwata K, Milam AH** : Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is a component of Bruch's membrane of the eye. *Am J Pathol* 150 : 323—328, 1997.
- 56) **Kamei M, Hollyfield JG** : TIMP-3 in Bruch's membrane : Changes during aging and in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2367—2375, 1999.
- 57) **Lambert V, Munaut C, Jost M, Noel A, Werb Z, Foidart JM, et al** : Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 161 : 1247—1253, 2002.
- 58) **Berglin L, Sarman S, van der Ploeg I, Steen B, Ming Y, Itohara S, et al** : Reduced choroidal neovascular formation in matrix metalloproteinase-2-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 403—408, 2003.
- 59) **Blodi BA, AG 3340 Study Group** : Effects of prinomastat(AG 3340), an angiogenesis inhibitor, in patients with subfoveal choroidal neovascularization associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : S 311, 2001.
- 60) **Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S** : Aging human RPE : Morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 195—200, 1984.
- 61) **Del Priore LV, Kuo YH, Tezel TH** : Age-related changes in human RPE cell density and apoptosis proportion *in situ*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 3312—3318, 2002.
- 62) **Newsome DA, Huh W, Green WR** : Bruch's membrane age-related changes vary by region. *Curr Eye Res* 6 : 1211—1221, 1987.
- 63) **Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J** : Effect of aging on foveolar choroidal circulation. *Arch Ophthalmol* 116 : 150—154, 1998.
- 64) **Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J, Maguire MG, Fine SL, Brucker AJ, et al** : Foveolar choroidal blood flow in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 385—390, 1998.
- 65) **Ross RD, Barofsky JM, Cohen G, Baber WB, Palao SW, Gitter KA** : Presumed macular choroidal watershed vascular filling, choroidal neovascularization, and systemic vascular disease in patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 125 : 71—80, 1998.
- 66) **Ryan SJ** : Subretinal neovascularization. Natural history of an experimental model. *Arch Ophthalmol* 100 : 1804—1809, 1982.
- 67) **Tobe T, Oltega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevanik NL, et al** : Targeted disruption of the FGF 2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol* 153 : 1641—1646, 1998.
- 68) **Cui JZ, Kimura H, Spee C, Thumann G, Hinton DR, Ryan SJ** : Natural history of choroidal neovascularization induced by vascular endothelial growth factor in the primate. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238 : 326—333, 2000.
- 69) **Kimura H, Spee C, Sakamoto T, Hinton DR, Ogura Y, Tabata Y, et al** : Cellular response in subretinal neovascularization induced by bFGF-impregnated microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 524—528, 1999.
- 70) **Sakamoto T, Sanui H, Ishibashi T, Kohno T, Takahara K, Inomata H, et al** : Subretinal neovascularization in the rat induced by IRBP synthetic peptide. *Exp Eye Res* 58 : 155—160, 1994.
- 71) **Nishikawa S, LaVail MM** : Neovascularization of the RPE : Temporal differences in mice with rod photoreceptor gene defects. *Exp Eye Res* 67 : 509—515, 1998.
- 72) **Majji AB, Cao J, Chang KY, Hayashi A, Aggarwal S, Grebe RR, et al** : Age-related retinal pigment epithelium and Bruch's membrane degeneration in senescence-accelerated mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3936—3942, 2000.
- 73) **Rakoczy PE, Zhang D, Robertson T, Barnett**

- NL, Papadimitrou J, Constable IJ, et al** : Progressive age-related changes similar to age-related macular degeneration in a transgenic mouse model. *Am J Pathol* 161 : 1515—1524, 2002.
- 74) **Dithmar S, Curcio CA, Le NA, Brown S, Grossniklaus HE** : Ultrastructural changes in Bruch's membrane of apolipoprotein E-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2035—2042, 2000.
- 75) **Weber BHF, Lin B, White K, Kohler K, Soboleva G, Herterich S, et al** : A mouse model for Sorsby fundus dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2732—2740, 2002.
- 76) **Guyon DR. The Eyetech Study Group** : Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. Phase 2 study results. *Ophthalmology* 110 : 979—986, 2003.
-