

## 網膜浮腫・虚血・血管新生を制御する白血球の重要性について

石田 晋<sup>1)</sup>, 山城 健児<sup>2)</sup>, 白井 智彦<sup>3)</sup>, 天野 史郎<sup>3)</sup>  
小椋祐一郎<sup>4)</sup>, 樋田 哲夫<sup>5)</sup>, 小口 芳久<sup>1)</sup><sup>1)</sup>慶應義塾大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>京都大学大学院医学研究科視覚病態学, <sup>3)</sup>東京大学大学院医学系研究科眼科<sup>4)</sup>名古屋市立大学医学部眼科学教室, <sup>5)</sup>杏林大学医学部眼科学教室

## 要 約

**背景**：網膜疾患の基本的な 3 病態、浮腫・虚血・血管新生に対する白血球の関与について最近、飛躍的に研究が進んでいる。これに伴い、新たな薬物療法の臨床応用を視野に入れながら、白血球と網膜病態の関係を体系的に理解する必要がある。

**方法**：過去の関連文献の知見を統合しながら、白血球の網膜血管病態における役割について考察した。

**結果**：Vascular endothelial growth factor (VEGF) によって誘導される白血球の網膜血管内皮細胞への接着は網膜血管の透過性を亢進することがわかり、この白血球を介する病態は糖尿病網膜症モデルでもみられた。網膜血管新生が虚血網膜を代償せず硝子体増殖を来

すのは、硝子体に浸潤した単球・マクロファージが VEGF を分泌しながら網膜血管内皮細胞を硝子体へ遊走させるためと考えられた。反対に、細胞傷害性 T リンパ球は血管内皮細胞にアポトーシスを誘導し、このメカニズムによって、病理的血管新生が抑制されたり、網膜血管の退縮から無血管野が形成されると考えられた。

**結論**：網膜浮腫・虚血・血管新生は白血球による制御を受けていると考えられる。(日眼会誌 108 : 193-201, 2004)

**キーワード**：網膜浮腫、網膜虚血、網膜血管新生、炎症、白血球

## A Review

## Significance of Leukocytes in the Regulation of Retinal Edema, Ischemia, and Angiogenesis

Susumu Ishida<sup>1)</sup>, Kenji Yamashiro<sup>2)</sup>, Tomohiko Usui<sup>3)</sup>, Shiro Amano<sup>3)</sup>, Yuichiro Ogura<sup>4)</sup>  
Tetsuo Hida<sup>5)</sup> and Yoshihisa Oguchi<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine<sup>3)</sup>Department of Ophthalmology, The University of Tokyo, Graduate School of Medicine<sup>4)</sup>Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School<sup>5)</sup>Department of Ophthalmology, Kyorin University School of Medicine

## Abstract

**Background** : Involvement of leukocytes in three major pathologic conditions in the retina, i. e., edema, ischemia, and angiogenesis, has recently been thoroughly investigated. The accumulated evidence will lead to an integrated understanding of the relationship between leukocytes and retinal disorders, which is required for clinical applications of new medical treatment.

**Method** : Leukocyte roles in the retinal vascular pathology were assessed by reviewing the related literature.

**Results** : Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced leukocyte adhesion to the retinal vessels was shown to result in blood-retinal barrier breakdown, and the leukocyte-mediated pathogenesis was also seen in a model of diabetic retinopathy. A possible mechanism by which retinal angiogenesis

develops intravitreal proliferation instead of compensating the avascular retina is that VEGF-producing monocytes/macrophages infiltrate the vitreous with subsequent migration of retinal vascular endothelial cells. On the other hand, cytotoxic T lymphocyte-mediated apoptosis of endothelial cells appears to cause the suppression of pathological retinal angiogenesis and the formation of ischemic retina secondary to vascular regression.

**Conclusion** : Leukocytes are considered to regulate retinal edema, ischemia, and angiogenesis. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 108 : 193-201, 2004)

**Key words** : Retinal edema, Retinal ischemia, Retinal angiogenesis, Inflammation, Leukocytes

別冊請求先：160-8582 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 石田 晋  
(平成 15 年 7 月 7 日受付, 平成 15 年 10 月 8 日改訂受理)

Reprint requests to : Susumu Ishida, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

(Received July 7, 2003 and accepted in revised form October 8, 2003)

## I はじめに

網膜における浮腫・虚血・血管新生という3つの代表的な病態は、臨床の現場においてしばしば内科的治療でコントロールできず、現在それぞれ外科的治療の対象となっている。糖尿病網膜症の増悪・進行に伴い出現するこれらの病態は、患者の視力予後を大きく左右するため、各病期での適切な対処が要求される。近年の網膜硝子体外科手技の飛躍的な進歩は、視力予後の改善に多大な貢献をもたらしてきた。しかし、これらの病態のメカニズムには未だ不明な点が多く、ゆえに外科的治療のみでは、これらの病態を制御するには限界があることも確かである。

一方、外科手技の進歩に時をほぼ同じくして、網膜研究の分野では疾患・病態に対する分子・細胞レベルの解析が着実に進められ、膨大なデータが蓄積されてきた。中でも血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)は、糖尿病網膜症の単純期から増殖期まで病態に関与していることが明らかにされ、最も注目を集めている分子である。現在、これらの研究データの臨床応用に向けて、新たな内科的治療が診療に導入される準備段階にあるといえる<sup>1)2)</sup>。

このような流れの中で、我々は網膜血管障害における白血球の関与に焦点を当て研究を展開してきた。本稿では、網膜浮腫・虚血・血管新生それぞれの病態において、血管内皮細胞に対する白血球接着が重要な役割を担っていることを、既報の知見も交えて概説する。

## II 網膜浮腫と白血球

網膜浮腫は、血液網膜関門(blood-retinal barrier, BRB)が破綻し網膜血管の透過性が亢進することにより惹き起こされる病態である。VEGFはそもそも血管透過性因子(vascular permeability factor, VPF)として報告<sup>3)</sup>されたように、血管内皮細胞の分裂を促進する<sup>4)5)</sup>だけでなく、血管透過性を亢進させる分子である。糖尿病患者の眼内 VEGF 濃度は、増殖期<sup>6)7)</sup>はもとより、単純期から上昇しており<sup>8)</sup>、糖尿病黄斑浮腫に VEGF が関与していることが推定された<sup>9)</sup>。糖尿病ラットでは、早期から網膜における VEGF の発現と血管透過性が亢進しており<sup>10)</sup>、糖尿病による BRB の破綻は VEGF を介することが確認された<sup>11)</sup>。

一方以前から、糖尿病患者の剖検眼において、網膜血管における接着分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)の発現が上昇し、網膜への白血球浸潤が増加することが指摘されていた<sup>12)</sup>。糖尿病ラットにおいても同様に、早期から網膜における ICAM-1 上昇と白血球接着がみられ(図 1)、興味深いことに、糖尿病による BRB の破綻は ICAM-1 を介することが確認された<sup>13)</sup>。このことは、VEGF が血管内皮細胞における ICAM-1

発現を誘導すること<sup>14)15)</sup>、そして白血球の血管内皮細胞への接着がタイトジャンクション構成蛋白の消失など引き続く複数の経路を介して血管透過性を亢進すること<sup>16)~18)</sup>からも妥当と考えられる。さらに、包括的かつきわめて重要な知見として、VEGF による BRB の破綻は、白血球の ICAM-1 を介する網膜血管への接着に依存することが明らかにされた<sup>19)</sup>。このように、VEGF の網膜に対する VPF としての作用は、少なくとも一部は白血球を伴う炎症性サイトカインとして機能した結果であると考えられることができる。

VEGF には単一の遺伝子から選択的スプライシングにより、5種類のアイソフォームができ、VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189, VEGF 206 のようにアミノ酸の数により呼称される。網膜で構造的に発現する主要なアイソフォームは VEGF 121 と VEGF 165 (齧歯類ではアミノ酸が1つ少なく、VEGF 120 と VEGF 164)である<sup>20)</sup>。VEGF 受容体としては、VEGFR-1<sup>21)</sup>、VEGFR-2<sup>22)</sup>、neuropilin-1<sup>23)</sup>が血管内皮細胞に発現する。血管内皮細胞分裂<sup>24)25)</sup>、ICAM-1 の発現<sup>26)</sup>、血管透過性<sup>27)</sup>を担うシグナルは VEGFR-1 ではなく、VEGFR-2 を介する。Neuropilin-1 は、VEGF 165 の特異的受容体であり、VEGF 165 の VEGFR-2 を介した生物活性を増強するとされている<sup>23)</sup>。これらのことから、VEGF の血管内皮細胞の分裂能は、VEGF 165 の方が VEGF 121 より強力であるとされている<sup>28)</sup>。では、VEGF による BRB 破綻に関しても、アイソフォーム間でこのような差があるのだろうか？

我々はリコンビナント VEGF 120 と VEGF 164 をラット硝子体に注入し、その炎症惹起能を比較した。すると、網膜における ICAM-1 上昇、血管内皮への白血球接着、BRB 破綻のどれをも、VEGF 164 の方が VEGF 120 より強力に誘導した<sup>29)</sup>。また、糖尿病ラット網膜で誘導される VEGF アイソフォームは主に VEGF 164 であり<sup>11)</sup>、このアイソフォームは質・量ともに糖尿病網膜の病態に強く関与していると考えられた。そこで実際、VEGF 165(164)を選択的に阻害する抗 VEGF 165(164) アプタマー<sup>30)</sup>を糖尿病ラット硝子体に投与し、その抗炎症効果を検討した。VEGF 164 を単独に阻害した場合、白血球接着、BRB 破綻とも有意に抑制されたが<sup>29)</sup>、VEGFR-1/Fc キメラ蛋白を用いて全アイソフォームを阻害した場合<sup>11)31)</sup>と比べて抑制効果に何ら遜色はなかった。これらのことから、VEGF 165 アイソフォームは糖尿病網膜症の単純期における炎症の惹起に中心的な役割を担う分子であることが推定された。

## III 網膜虚血と白血球

網膜血管が退縮する機序は、よくわかっていない。虚血網膜症モデルでは、ラットやマウスの新生仔を高濃度酸素に暴露させると、既存の網膜血管がひとまず退縮

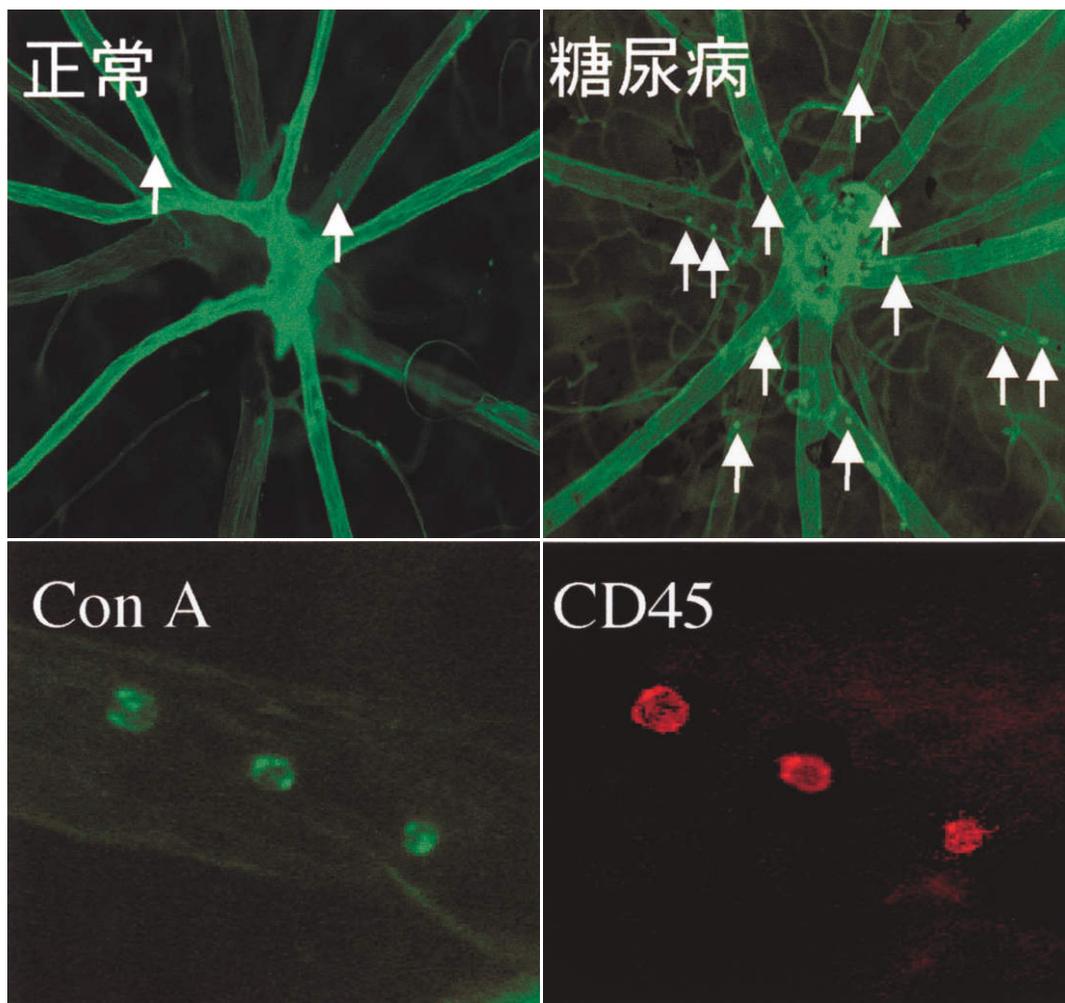


図 1

Concanavalin A lectin (Con A) を用いると網膜血管系と白血球が同時に描出される。糖尿病ラット (右上, ストレプトゾトシン誘導後 3 か月) では網膜血管への白血球接着 (矢印) が正常ラット (左上) に比べて明らかに亢進した。Con A で染色される細胞 (左下) は CD45 陽性 (右下) であり、白血球であることが確認された (文献 29 より改変, 引用)。

し、広大な無血管野を形成する。ここで新生仔を再び空気下に戻すと高度な虚血誘導による血管新生が生じる (図 2)。このモデルは未熟児網膜症モデルとも呼ばれているが、実際の治療で未熟児に使用するよりも過剰に高濃度の酸素を齧歯類新生仔に投与することにより、臨床ではみられないような広大な無血管野を短時間で簡便に作製できる利点がある。このモデルを用いて、網膜血管新生のメカニズムを調べた報告<sup>32)~36)</sup>は多いが、その前駆病態である網膜虚血のメカニズムの解明にはさほどスポットライトが当たっていない。既報では、虚血網膜症モデルにおける無血管野形成は、網膜血管内皮細胞のアポトーシスによる血管退縮であることが示されている<sup>37)</sup>。そして内皮細胞アポトーシスには、抗アポトーシス因子<sup>38)</sup>でもある VEGF の発現が減少すること<sup>37)</sup>、血管が周皮細胞に被覆されていないこと<sup>39)</sup>が必要な条件とされている。

我々は網膜虚血をもたらす血管内皮細胞アポトーシス

に白血球が関与するのではないかと考えた。まず、虚血網膜症モデルにみられる血管退縮の過程で、経時的に ICAM-1 発現が上昇し、白血球接着が無血管野形成に先行することを見出した<sup>40)</sup> (図 3)。そこで白血球の役割を調べるために、内皮細胞 ICAM-1 と結合する白血球側の接着分子 CD 18 を中和抗体で阻害した。すると驚くべきことに、白血球の接着とともに、無血管野の形成が抑制されたのである<sup>40)</sup>。同様に、CD 18 欠損マウスでは野生型マウスと比べ、無血管野の形成は軽度であった<sup>40)</sup>。さらに、血管内皮細胞アポトーシスの誘導機構を調べるために、アポトーシスのシグナルを活性化する白血球側の因子 FasL を中和抗体で阻害すると、無血管野の形成が抑制された<sup>40)</sup>。In vitro では、無血管野形成期にある虚血網膜症ラットから採取した T リンパ球と高酸素刺激を与えた血管内皮細胞を混合培養すると、血管内皮細胞に FasL を介するアポトーシスが誘導された<sup>40)</sup>。これらのことから、細胞傷害性 T リンパ球—血

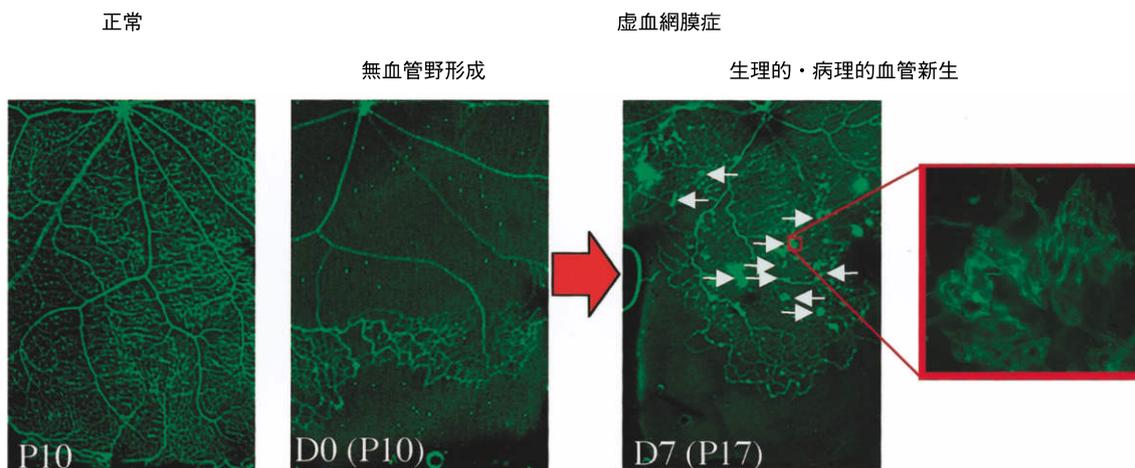


図 2

ラット新生仔を高濃度(80%)酸素に暴露させると、生後同日齢(P10)の正常ラット新生仔と比較して、広大な無血管野が形成された[D0(P10)]。ここで、空気下に戻すと高度の網膜虚血によって誘導される血管新生が開始され、無血管野は生理的血管新生により補填されるが、硝子体方向へ発芽する病的血管新生[D7(P17)、矢印]も著明に観察された(文献46より改変、引用)。Pは生後日数、Dは空気下に戻した血管新生誘導後の日数を表す。

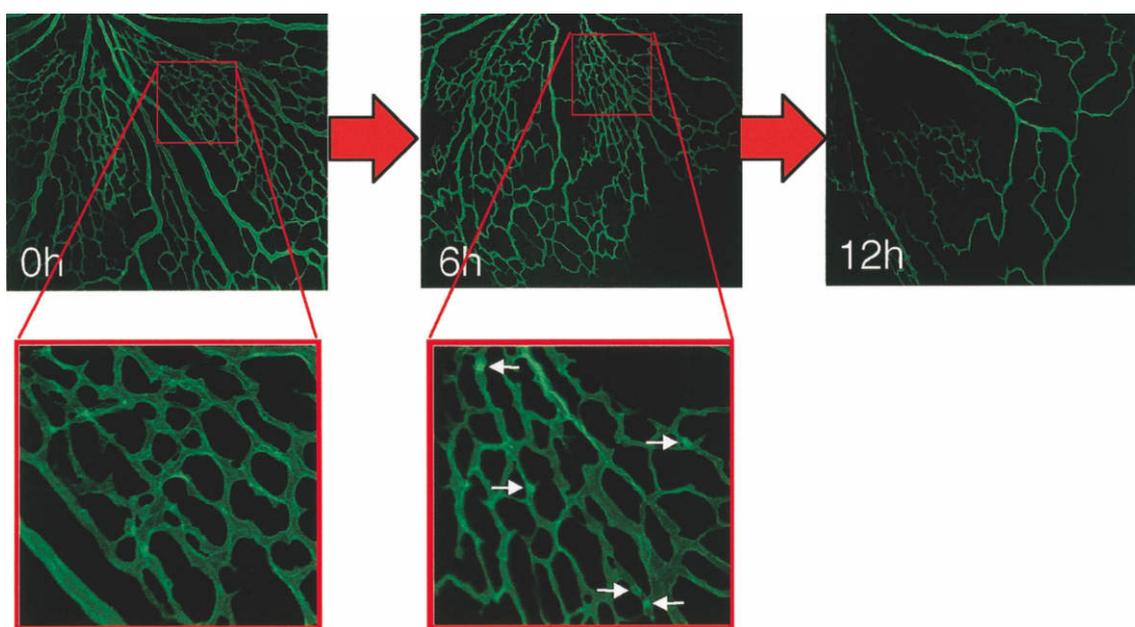


図 3

高酸素負荷により、ラット新生仔(P2, 0h)の網膜血管は急速に退縮し(6h)、無血管野が形成される(12h)が、この現象に白血球接着(矢印)が先行することを見出した(文献40より改変、引用)。

管内皮細胞間のCD18-ICAM-1を介する細胞接着と引き続くFasL-Fasを介するアポトーシスが網膜血管を退縮させる主要なメカニズムである可能性が示された。

糖尿病モデルでは、網膜血管に接着した白血球がFasLを介して血管内皮細胞にアポトーシスを誘導し、これがBRB破綻の原因の一つであると最近報告<sup>41)</sup>された。さらに、CD18欠損マウスおよびICAM-1欠損マウスを用いて長期経過を観察した糖尿病モデルでは、糖尿病野生型マウスと比較して網膜毛細血管の内皮細胞消

失が著明に抑制された<sup>42)</sup>。これらのことから、我々が示した白血球を介する網膜虚血のメカニズムは、糖尿病網膜症が単純期から前増殖期へと増悪する過程においても使用されていると考えられる。

#### IV 網膜血管新生と白血球

網膜血管新生は基本的には網膜虚血により誘導される。すなわち、正常網膜発生における生理的血管新生も<sup>43)</sup>、虚血網膜症モデルでみられる病的血管新生

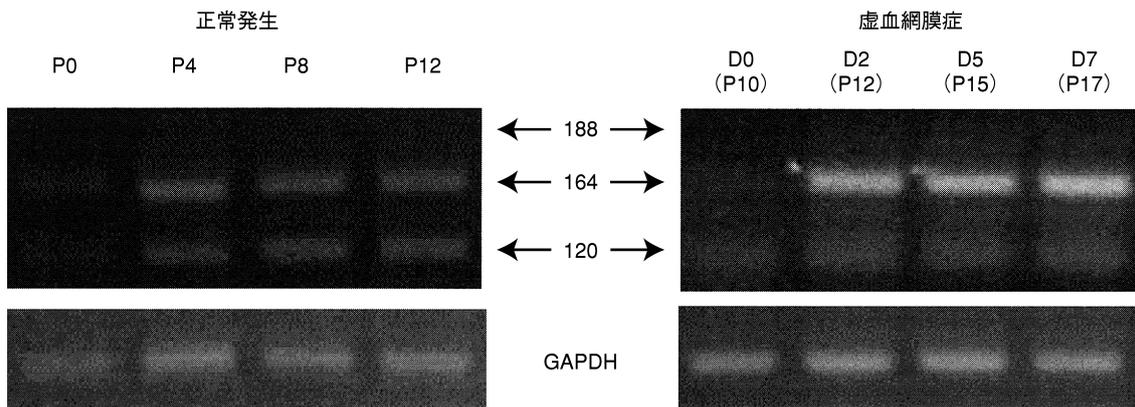


図 4

病的・生理的血管新生が進行中の虚血網膜症(右)では、生理的血管新生が進行中の正常発生(左)と比べると、網膜における VEGF 164 の発現が著明に亢進していた(文献 46 より改変, 引用)。

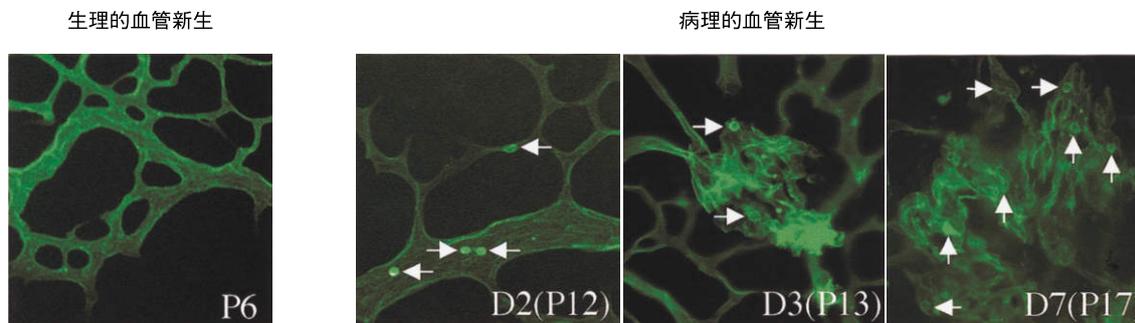


図 5

生理的血管新生が進行する先端部には、白血球接着はみられない(P 6)が、病的血管新生では、白血球接着が血管新生に先行し[D 2(P 12)], その後も随伴する[D 3(P 13), D 7(P 17)]ことを見出した(文献 46 より改変, 引用)。

も<sup>33)</sup>, 虚血網膜細胞から低酸素誘導<sup>44)45)</sup>される VEGF により規定される。このように生理的・病的網膜血管新生は両者とも網膜虚血により開始されるにもかかわらず、根本的な相違点がある。前者では、新生血管は網膜内を無血管野(正しい方向)へ秩序正しく進展する。これに対し、後者では、新生血管は網膜虚血を代償せずに網膜から硝子体(誤った方向)へ侵入してしまう。虚血網膜症モデルでは虚血網膜を代償する生理的血管新生と硝子体へ発芽する病的血管新生の両者が同時に観察できる。一体、網膜血管新生にこのような方向の差が生じるメカニズムは何なのであろうか？

我々はまず、正常発生と虚血網膜症モデルそれぞれにおける網膜の VEGF アイソフォーム発現パターンを比較した。すると興味深いことに、正常発生では VEGF 120 と VEGF 164 はほぼ等しく発現するのに対し、虚血網膜症モデルでは VEGF 164 が著明に誘導されていた<sup>46)</sup>(図 4)。VEGF 164 は VEGF 120 に比べて強力な炎症性サイトカインであるため<sup>29)47)</sup>, 血管新生部位に白血球が動員されるかを検討した。病的血管新生では、多

くの白血球接着を伴うのに対し、生理的血管新生の先端部位ではほとんど観察されなかった<sup>46)</sup>(図 5)。この白血球接着が VEGF 164 発現の亢進に依存するかを調べるために、抗 VEGF 165(164)アプタマーを虚血網膜症モデルに投与した。白血球接着が著しく抑制されるとともに、病的血管新生も抑制されたが、興味深いことに、生理的血管新生は抑制されず温存された<sup>46)</sup>。抗 VEGF 165(164)アプタマーの投与は、網膜発生における生理的血管新生にも影響を与えなかった<sup>46)</sup>。VEGF 164 欠損マウスでも、網膜発生における生理的血管新生は野生型マウスと同等であった<sup>46)</sup>。ところが、VEGFR-1/Fc キメラ蛋白を用いて正常網膜発生および虚血網膜症モデルにおけるすべての VEGF アイソフォームを阻害すると、生理的・病的ともに血管新生は抑制された<sup>46)</sup>。これらの結果から、病的血管新生とそれに付随する白血球接着は VEGF 164 に依存し、生理的血管新生は VEGF 164 を必要としないことが明らかとなった。

では、病的網膜血管新生における白血球の役割は何なのであろうか？ 増殖糖尿病網膜症患者から摘出した

線維血管膜にマクロファージの浸潤がみられることは以前から指摘されていた<sup>48)</sup>。虚血網膜症モデルでは、単球の網膜血管への接着が病理的血管新生に先行し、その成長に伴う<sup>46)</sup>。虚血網膜症モデルにおける単球・マクロファージの走化性因子(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)を阻害すると、病理的血管新生が軽度に抑制されること<sup>49)</sup>が最近報告された。我々はクロドネート含有リポゾーム<sup>50)</sup>を虚血網膜症モデルに使用し、単球・マクロファージ系細胞を選択的にアポトーシスにより消去した。すると、VEGF 164 を阻害した結果と同様、病理的血管新生は高度に抑制されたが、生理的血管新生には影響しなかった<sup>46)</sup>。これらの結果から、病理的網膜血管新生は単球・マクロファージに依存していることが明らかとなり、虚血性・炎症性の両者の性質を併せ持つ血管新生であると考えられる。

では、どのようなメカニズムで単球・マクロファージは病理的血管新生を促進するのだろうか？ この答えの一つとして、病理的血管新生部位近傍の硝子体にマクロファージが VEGF を産生しながら遊走していること<sup>51)</sup>が示されている。我々は虚血網膜症ラットから採取した単球を低酸素で刺激すると、VEGF 120 よりも VEGF 164 が著明に誘導されること<sup>46)</sup>を示した。また、単球は VEGFR-1 を有しており、VEGF は単球の走化性因子としても知られる<sup>47)52)53)</sup>。VEGFR-1 に対する親和性は VEGF 165 の方が VEGF 121 よりもきわめて高い<sup>54)</sup>ことから説明されるように、単球の動員を担う主要なアイソフォームは VEGF 165(164)である<sup>47)</sup>。これらのことから、病理的血管新生とは、VEGF 164 によって動員された単球が、VEGF 164 を産生しながら硝子体に遊走することにより、網膜血管新生の方向を網膜ではなく硝子体へ攪乱した結果であるともいえる。この VEGF 164 と単球の正のフィードバック系をどこかで断ち切ることが、生理的血管新生を温存しながら病理的血管新生を抑制する理想的な治療につながると考えられる。実際、VEGF の全アイソフォームを阻害すると、生理的血管新生まで抑制してしまい<sup>46)55)</sup>、網膜虚血を治療できないことになる。また、糖尿病網膜症患者の増殖膜検体を用いた研究から、線維血管増殖の活動性は VEGF 165-VEGFR-2/neuropilin-1 というリガンド-受容体システムに依存することが示された<sup>56)</sup>。これらのことから、VEGF 165 を選択的に阻害するという治療戦略は、BRB 破綻のみならず線維血管増殖に対しても適切であると考えられる。

次に、我々は病理的血管新生におけるリンパ球の役割を調べた。増殖糖尿病網膜症患者から摘出した線維血管膜には、活性化した細胞傷害性 T リンパ球の浸潤がみられることは以前から指摘されていた<sup>57)</sup>。虚血網膜症モデルの病理的血管新生への接着白血球の中にも、活性化した細胞傷害性 T リンパ球が多くみられる<sup>46)</sup>。T リン

パ球の免疫応答を阻害するために、T リンパ球特異的な接着分子 CD2 を中和抗体で阻害した。すると驚くべきことに、病理的血管新生は増悪した<sup>46)</sup>。同様に、FasL 欠損マウスでは野生型マウスに比べ、病理的血管新生が高度であることが最近<sup>58)59)</sup>報告された。これらのことから、病理的網膜血管新生は、単球・細胞傷害性 T リンパ球といった白血球成分により正・負の調節を受けており、炎症・免疫が関与する病態と考えることができる。

病理的網膜血管新生を推進させる VEGF 産生細胞としては、上述した単球・マクロファージ系の白血球成分以外にも、線維血管膜内の遊走グリア細胞<sup>56)</sup>や周皮細胞<sup>60)</sup>などが指摘されている。本稿では白血球の役割に焦点を絞っているため詳述を避けるが、どの細胞成分がどの段階で病態へ関与するかなど総合的に理解されるには、今後の研究を待たねばならない。

## V おわりに

網膜血管の病理に白血球がきわめて密接に関与することを、網膜の基本的な 3 病態を軸に概説した。VEGF 165(164)は、白血球を介して生物活性を発揮する炎症性サイトカインとして考える必要があり、炎症と血管新生は切っても切れない関係にある。生理的血管新生では均衡を保っていた VEGF アイソフォームの発現バランスが VEGF 165(164)亢進へと傾いた時、網膜虚血を代償するはずの血管新生の方向が炎症細胞により攪乱され、硝子体増殖という病理的な特徴を帯びることになる。これらの新知見は、我々の研究で用いられた抗 VEGF 165 アプタマー(現在 Macugen™として臨床試験中)が網膜疾患に適用される生物学的根拠を与えている。また、網膜血管に接着する白血球成分によっては、血管内皮細胞の増殖あるいは逆にアポトーシスを促進し、正・負いずれの制御もあることが明らかとなった。網膜虚血は、白血球による負の制御の結果ととらえられる。これら一連の発見は、網膜における血管細胞生物学に新たな概念を与え、網膜血管新生の免疫療法など今後この研究分野のさらなる展開を促すものと期待される。

## 文 献

- 1) **Eyeteck Study Group** : Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE 001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* 22 : 143-152, 2002.
- 2) **Eyeteck Study Group** : Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration : Phase II study results. *Ophthalmology* 110 : 979-986, 2003.
- 3) **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.
- 4) **Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N** : Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246 : 1306—1309, 1989.
- 5) **Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al** : Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246 : 1309—1312, 1989.
- 6) **Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, et al** : Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118 : 445—450, 1994.
- 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. *N Engl J Med* 331 : 1480—1487, 1994.
- 8) **Tanaka Y, Katoh S, Hori S, Miura M, Yamashita H** : Vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Lancet* 349 : 1520, 1997.
- 9) **Takagi H, Otani A, Kiryu J, Ogura Y** : New surgical approach for removing massive foveal hard exudates in diabetic macular edema. *Ophthalmology* 106 : 249—256, 1999.
- 10) **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.
- 11) **Qaum T, Xu Q, Jousen AM, Clemens MW, Qin W, Miyamoto K, et al** : VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 2408—2413, 2001.
- 12) **McLeod DS, Lefer DJ, Merges C, Litty 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.
- 13) **Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, Murata T, Clermont AC, et al** : Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 10836—10841, 1999.
- 14) **Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK** : During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med* 2 : 992—997, 1996.
- 15) **Lu M, Perez VL, Ma N, Miyamoto K, Peng HB, Liao JK, et al** : VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1808—1812, 1999.
- 16) **Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, et al** : Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 74 : 336—343, 1994.
- 17) **Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, et al** : Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 135 : 497—510, 1996.
- 18) **Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH** : Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown *in vivo*. *Neuroscience* 86 : 1245—1257, 1998.
- 19) **Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Moromizato Y, Aiello LP, Ogura Y, et al** : Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol* 156 : 1733—1739, 2000.
- 20) **Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amano S, Aguilar S, Miller JW, et al** : Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2115—2121, 1999.
- 21) **Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, et al** : Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5 : 519—524, 1990.
- 22) **Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB** : Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6 : 1677—1683, 1991.
- 23) **Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M** : Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92 : 735—745, 1998.
- 24) **Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH** : Different signal transduction properties of KDR and Flt 1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269 : 26988—26995, 1994.
- 25) **Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, et al** : Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 271 : 5638—5646, 1996.
- 26) **Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY** : Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1),

- and E-selection through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 276 : 7614—7620, 2001.
- 27) **Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF**, et al : Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 276 : 3222—3230, 2001.
  - 28) **Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler H, Charnahelli H, Klagsbrun M** : Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF 165. *J Biol Chem* 272 : 31582—31588, 1997.
  - 29) **Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Ahmed E, Carrasquillo KG**, et al : VEGF 164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2155—2162, 2003.
  - 30) **Ruckman J, Green LS, Beeson J, Waugh S, Gillette WL, Henninger DD**, et al : 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF 165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 273 : 20556—20567, 1998.
  - 31) **Joussen AM, Poulaki V, Qin W, Kirchhof B, Mitsiades N, Wiegand SJ**, et al : Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion *in vivo*. *Am J Pathol* 160 : 501—509, 2002.
  - 32) **Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L**, et al : Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 10457—10461, 1995.
  - 33) **Stone J, Chan-Ling T, Pe'er J, Itin A, Gnessin H, Keshet E** : Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 290—299, 1996.
  - 34) **Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Frutiger M, Thomas MA, Chang S**, et al : Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 9764—9769, 1996.
  - 35) **Das A, McLamore A, Song W, McGuire PG** : Retinal neovascularization is suppressed with a matrix metalloproteinase inhibitor. *Arch Ophthalmol* 117 : 498—503, 1999.
  - 36) **Yoshida A, Yoshida S, Ishibashi T, Kuwano M, Inomata H** : Suppression of retinal neovascularization by the NF-kappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1624—1629, 1999.
  - 37) **Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E** : Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1 : 1024—1028, 1995.
  - 38) **Gerber HP, Dixit V, Ferrara N** : Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273 : 13313—13316, 1998.
  - 39) **Benjamin LE, Hemo I, Keshet E** : A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125 : 1591—1598, 1998.
  - 40) **Ishida S, Yamashiro K, Usui T, Kaji Y, Ogura Y, Hida T**, et al : Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vasoobliteration in disease. *Nat Med* 9 : 781—788, 2003.
  - 41) **Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Cai WY, Suzuma I, Pak J**, et al : Suppression of Fas-FasL-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes. *FASEB J* 17 : 76—78, 2003.
  - 42) **Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H**, et al : Long-term leukocyte-mediated vascular pathology in the diabetic retina. *ARVO Annual Meeting*, 2003.
  - 43) **Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T**, et al : Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 15 : 4738—4747, 1995.
  - 44) **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.
  - 45) **Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W** : Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 270 : 19761—19766, 1995.
  - 46) **Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano S, Ogura Y**, et al : VEGF 164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med* 198 : 483—489, 2003.
  - 47) **Usui T, Ishida S, Yamashiro K, Kaji Y, Poulaki V, Moore JE**, et al : VEGF 164 (165) as the pathological isoform : Differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR 1 and VEGFR 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 368—374, 2004.

- 48) **Esser P, Heimann K, Wiedemann P** : Macrophages in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy : Differentiation of subpopulations. *Br J Ophthalmol* 77 : 731—733, 1993.
- 49) **Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T, Elnor SG, Elnor VM** : Role of MCP-1 and MIP-1 alpha in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *J Leukoc Biol* 73 : 137—144, 2003.
- 50) **Schmidt-Weber CB, Rittig M, Buchner E, Hauser I, Schmidt I, Palombo-Kinne E**, et al : Apoptotic cell death in activated monocytes following incorporation of clodronate-liposomes. *J Leukoc Biol* 60 : 230—244, 1996.
- 51) **Naug HL, Browning J, Gole GA, Gobe G** : Vitreal macrophages express vascular endothelial growth factor in oxygen-induced retinopathy. *Clin Experiment Ophthalmol* 28 : 48—52, 2000.
- 52) **Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J**, et al : The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 271 : 17629—17634, 1996.
- 53) **Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D** : Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1. *Blood* 87 : 3336—3343, 1996.
- 54) **Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R**, et al : The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271 : 7788—7795, 1996.
- 55) **Ozaki H, Seo MS, Ozaki K, Yamada H, Yamada E, Okamoto N**, et al : Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol* 156 : 697—707, 2000.
- 56) **Ishida S, Shinoda K, Kawashima S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E** : Coexpression of VEGF receptors VEGF-R 2 and neuropilin-1 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1649—1656, 2000.
- 57) **Tang S, Le-Ruppert KC** : Activated T lymphocytes in epiretinal membranes from eyes of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233 : 21—25, 1995.
- 58) **Barreiro R, Schadlu R, Herndon J, Kaplan HJ, Ferguson TA** : The role of Fas-FasL in the development and treatment of ischemic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 1282—1286, 2003.
- 59) **Davies MH, Eubanks JP, Powers MR** : Increased retinal neovascularization in Fas ligand-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3202—3210, 2003.
- 60) **Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashita T, Yamashita J**, et al : Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 270 : 28316—28324, 1995.
-