

第 110 回 日本眼科学会総会 宿題報告 II

眼と加齢

加齢と網膜血管障害

高木 均¹⁾²⁾¹⁾兵庫県立尼崎病院眼科, ²⁾京都大学大学院医学研究科眼科学

共同研究者

本田 孔士(大阪赤十字病院)

吉村 長久, 大谷 篤史, 鈴間 潔, 王 英泰, 鈴間 泉, 剣持 誠司, 大橋 啓一
 渡辺 大介, 尾嶋 智成, 菅波 絵里, 栗本 雅史, 木村 徹志, 喜多美穂里, 高木 史子
 (京都大学大学院医学研究科眼科学)

George L. King, Lloyd P Aiello (Joslin Diabetes Center)

西川 伸一, 植村 明嘉(理化学研究所発生・再生科学総合研究センター)

小林 利寛, 永尾 雅哉(京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻)

鈴木 茂之(京都大学大学院医学研究科社会健康学専攻薬剤疫学分野)

深水 昭吉(筑波大学応用生物化学系)

下村伊一郎, 船橋 徹(大阪大学医学部内分泌代謝内科)

佐藤 靖史(東北大学加齢医学研究所)

小川 佳宏, 菅波 孝祥(東京医科歯科大学難治疾患研究所)

小椋祐一郎(名古屋市立大学医学部)

松村 美代(関西医科大学), 桐生 純一(川崎医科大学)

小山 真治, 清家 寿之, 西村 和夫(参天製薬株式会社)

横山 富久(三共株式会社), 菅谷 健(田辺製薬株式会社)

Napoleone Ferrara (Genentech, Inc.)

Alex L Kolodkin (The Johns Hopkins University School of Medicine)

George D. Yancopoulos (Regeneron Pharmaceutical, Inc.)

Lois E Smith (Harvard Children's Hospital)

山下 哲次(株式会社三菱化学ビーシーエル)

北 徹(京都大学大学院医学研究科循環病態学)

高倉 伸幸(大阪大学微生物病研究所)

要 約

糖尿病網膜症, 静脈閉塞症, 加齢黄斑変性など加齢とともに増加する血管障害は黄斑浮腫や滲出性剝離などの滲出性病変, 血管増殖膜による牽引性剝離や新生血管緑内障などの血管新生病変により重篤な視力障害の原因となっている。これらの疾患は加齢による血管の経年変化に加えて加齢により増加する成人病, すなわち糖尿病, 高血圧, 高脂血症, 肥満といった全身疾患に起因する血管障害により惹起される。本研究では, 加齢や成人病に起因する血管障害を血管生物学的手法により分子病態を

包括的に解明し, 新規治療法を提案する。

加齢により網膜血管は酸化ストレスや血流による物理的負荷の継続的影響を受けるが, 培養網膜血管細胞では細胞内ストレスキナーゼを介するシグナル伝達が活性化されアポトーシスが惹起された。ストレスキナーゼの阻害治療が加齢による血管障害の治療法となることが示唆される。周皮細胞の増殖抑制による網膜血管変性モデルでは, 糖尿病網膜症に酷似した網膜浮腫や血管増殖の病変が形成され, 血管内皮・周皮細胞レベルでの障害のみ

別刷請求先: 660-0828 尼崎市東大物町 1-1-1 兵庫県立尼崎病院眼科 高木 均

(平成 18 年 11 月 6 日受付, 平成 18 年 12 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Hitoshi Takagi, M.D. Department of Ophthalmology, Hyogo Prefectural Amagasaki Hospital, 1-1-1 Higashi-Daimotsu-cho, Amagasaki 660-0828, Japan

(Received November 6, 2006 and accepted in revised form December 7, 2006)

で増殖網膜症病変など末期の病変形成に至ることが示唆された。周皮細胞より分泌されるアンジオポエチン1 (Ang 1) は酸化ストレスによる血管細胞のストレスキナーゼ、アポトーシスを抑制し周皮細胞変性モデルを正常化した。周皮細胞からの Ang 1 の paracrine 作用が網膜血管の恒常性に不可欠であることや Ang 1 やその下流の細胞内シグナルが糖尿病網膜症など周皮細胞変性に起因する病変への治療法となり得る可能性が示唆された。

糖尿病や網膜静脈閉塞症など毛細血管の変性が進行すると網膜虚血となり虚血性の血管新生が誘導される。虚血網膜より分泌される血管新生因子として血管内皮増殖因子 (VEGF) が重要である。糖尿病などによる血管障害が他の臓器に比較して網膜に起こりやすい原因として網膜血管には VEGF 受容体の発現特性がみられた。特に VEGF 作用を増強するニューロピリン1 (Neuropilin 1, NRP 1) は網膜血管に多く発現しており、VEGF や低酸素によりさらに発現増加して網膜血管新生を positive-

feedback 的に促進する機構があることが見出された。網膜特異的な抗血管新生療法の標的として期待される。成人病は加齢とともに増加し近年の欧米的なライフスタイルにより増加している。動脈硬化、高血圧の共通因子であるアンジオテンシン、肥満により分泌異常を来すアディポサイトカインは血管新生促進的に作用することが見出された。こうした生活習慣病因子の制御も今後の網膜血管障害の治療に重要であることが推察された。最後に網膜血管障害において VEGF に匹敵する分子として造血作用でよく知られるエリスロポエチンを見出した。増殖糖尿病網膜症患者の眼内に著しく増加し、血管新生と強い相関を示した。VEGF 阻害薬は実用化され網膜症に著効することが報告され始めている。こうした増殖因子・アディポサイトカインの制御が今後の治療法として期待される。(日眼会誌 111:207-231, 2007)

キーワード：血管内皮増殖因子, アンジオポエチン, エリスロポエチン, 血管新生, 周皮細胞変性

A Review

Aging and Retinal Vascular Diseases

Hitoshi Takagi¹⁾²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Hyogo Prefectural Amagasaki Hospital

²⁾Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Graduate school of Medicine, Kyoto University

Abstract

Ocular vascular diseases such as diabetic retinopathy, retinal vein occlusion, and age-related macular degeneration, whose population increases along with aging, have become leading causes of severe visual disturbance. Macular edema and serous retinal detachment are associated with abnormal vascular leakage and tractional retinal detachment, and neovascular glaucoma is caused by retinal neovascularization. Such ocular vascular diseases are caused by vascular cell aging and vascular damage associated with lifestyle-related diseases including diabetes mellitus, hypertension, hyperlipidemia, and obesity. In the present study, we investigated molecular mechanisms in such vascular deficiencies using vascular cell biology methodology, and we propose novel strategies for the treatment of such vascular diseases.

Along with aging, oxidative stress and physical stress, such as mechanical stretch, continuously and directly insult vascular cells. Such stress induces apoptosis by intracellular signaling through stress kinases in cultured retinal vascular cells. Inhibition of such stress kinases could be an effective treatment to protect the vascular cells against age-

related damage. In a retinal vascular developmental model, pericyte loss causes pathology mimicking macular edema and proliferative diabetic retinopathy. Angiopoietin 1 (Ang 1) secreted by pericytes suppresses oxidative stress-induced intracellular signaling through stress kinases linked to cell apoptosis and normalizes such retinal pathology. This suggests that the paracrine action of Ang 1 in the pericytes is necessary to sustain normal retinal vasculature, and that Ang 1-triggered intracellular signaling is useful for the treatment of vascular cell pathology associated with pericyte loss.

In diabetic retinopathy and retinal vein occlusion, retinal vessels regress along with retinal vascular cell apoptosis, and the retina becomes ischemic followed by pathological retinal neovascularization. VEGF has been recognized as a predominant factor to induce the ischemic retinal neovascularization. We found that retinal vascular cells have a characteristic pattern in VEGF receptor expression, which causes vascular pathology more frequently in the retina than in other organs. Neuropilin 1 (NRP 1), which enhances VEGF receptor function, is abundantly expressed in the retinal endothelial cells and

is upregulated by VEGF itself and by hypoxia to regulate a positive feedback mechanism in retinal neovascularization. This receptor could be a unique target for retina-specific therapy.

Lifestyle-related diseases increase along with aging and have further increased due to changes in Japanese lifestyle imitating that of Western countries. We found that the renin-angiotensin system which regulates hypertension and cardiovascular diseases, and adipocytokines which are abnormally secreted in obesity, act as proangiogenic factors. Regulation of such lifestyle-related disease factors is important for the treatment of retinal vascular diseases.

Finally, we found that erythropoietin is an ischemia-induced angiogenic factor that acts in-

dependently and as potently as VEGF in proliferative diabetic retinopathy (PDR). Our study utilizing human vitreous samples demonstrates that the VEGF level is particularly high and strongly associated with angiogenic activity in PDR patients. The potential of VEGF inhibitors has recently been recognized in clinical applications. The manipulation of each angiogenic factor and adipocytokine that we report here could become potential therapy in the near future.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi(J Jpn Ophthalmol Soc 111 : 207—231, 2007)

Key words : Vascular endothelial growth factor, Angiopoietin, Erythropoietin, Neovascularization, Pericyte loss

I 加齢による視力障害の原因疾患と血管障害

旧厚生省の 1991 年度¹⁾および厚生労働省の 2006 年度報告²⁾による主要な視力障害の原因疾患をみると、表 1 のように従来からの糖尿病網膜症、緑内障に加えて加齢黄斑変性の比率が増加してきており、視力障害の主要な原因疾患となっていることが分かる。糖尿病網膜症、加齢黄斑変性ばかりでなく、網膜静脈閉塞症や緑内障においても網膜循環障害が関与しており、血管障害による眼疾患が多く割合を占めている。動脈硬化など血管障害に起因する疾患は高齢化社会に移行するに従い今後一層増加するうえに、食生活などライフスタイルの欧米化に伴い糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満といった生活習慣病が増加することが予想され、密接に関連する網膜血管障害の重要性が今後眼科領域においてさらに高まることが予想される。

こうした動脈硬化や生活習慣病による網膜血管障害はどのように進展するのであろうか。網膜微小血管は一層の内皮細胞とその外側に存在する周皮細胞、および両細胞間の基底膜より構成されている³⁾(図 1)。これにより、血中蛋白質や脂質などの非選択的透過を阻害し、網膜・血液柵が形成されている。糖尿病網膜症に代表されるように初期の血管障害では、内皮細胞の変性や基底膜の肥厚、周皮細胞の変性といった変化が生ずる(図 1)。この結果、網膜・血液柵の破綻が起り、網膜浮腫や出血がみられるようになる。血管細胞の変性は ghost vessel と呼ばれる血管細胞のない血管の状態となりやがて血管が消失する。周皮細胞は内皮細胞の増殖や分化を制御しており、糖尿病網膜症では周皮細胞の変性が進むと内皮細胞の増殖が起りやすくなり、毛細血管瘤が形成される。さらに血管細胞の変性に加えて、内皮細胞や血流・血液性状の異常により血栓形成傾向となり、網膜虚血が

表 1 視覚障害者の診断申請

1996 年度(旧厚生省)		2006 年度(厚生労働省)	
1 位	糖尿病網膜症 (18.3%)	緑内障	(20.7%)
2 位	白内障 (15.6%)	糖尿病網膜症	(19.0%)
3 位	緑内障 (14.5%)	網膜色素変性	(13.7%)
4 位	網膜色素変性 (12.2%)	加齢黄斑変性	(9.1%)
5 位	高度近視 (10.7%)	高度近視	(7.8%)
6 位	視神経網脈絡膜萎縮 (9.8%)		

進行する。網膜が虚血になると虚血網膜よりさまざまな血管新生因子が誘導され網膜や隅角血管新生が惹起され血管増殖網膜症に至るようになる(図 1)。今回の宿題報告では加齢や加齢により増加する生活習慣病を起因とする網膜血管障害の分子機序について糖尿病網膜症を中心として血管細胞生物学的に考察し、新規治療法への展開を論ずる。

II 加齢による血管負荷と血管細胞内シグナル伝達

加齢による経年変化は血管細胞にどのような影響を及ぼすのであろうか。血管細胞を継代培養し続けると細胞自体の老化が起り、telomerase と呼ばれる RNA 修飾酵素の影響が示唆されている⁴⁾⁵⁾。一方、このような血管細胞自体の経年変化に加えて、加齢によりさまざまな外的負荷が血管細胞に経年的に加わる。これらには、血流による伸展刺激や shear stress などの物理的負荷や、低酸素、酸化ストレス、ホルモンの変化、免疫応答の変化、AGE(終末糖化産物)といったものが挙げられる。我々は網膜血管細胞、すなわち網膜血管内皮細胞と周皮細胞を単離培養することにより、個別の細胞への加齢負荷を行いその影響を観察した。

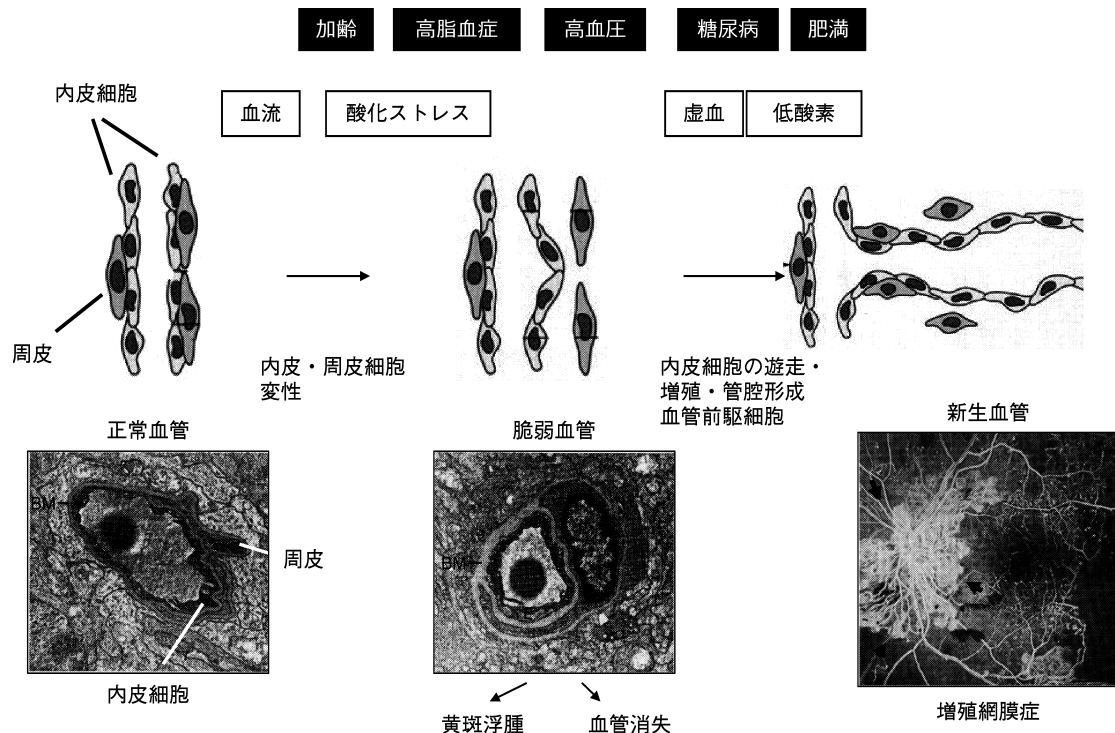


図 1 網膜細小血管の構造と血管障害の進展。

網膜細小血管は一層の内皮細胞とその外側に存在する周皮細胞、および両細胞間の基底膜より構成されている³⁾。初期の血管障害では、内皮細胞の変性や基底膜の肥厚、周皮細胞の変性といった変化が生ずる。この結果、網膜・血液層の破綻により黄斑浮腫が起こり、血管細胞の変性により血管消失が起こる。さらに血管細胞の変性に加えて、内皮細胞や血流・血液性状の異常により血栓形成傾向となり、網膜虚血が進行する。網膜が虚血になると虚血網膜よりさまざまな血管新生因子が誘導され網膜や隅角血管新生が惹起され血管増殖網膜症に至るようになる。

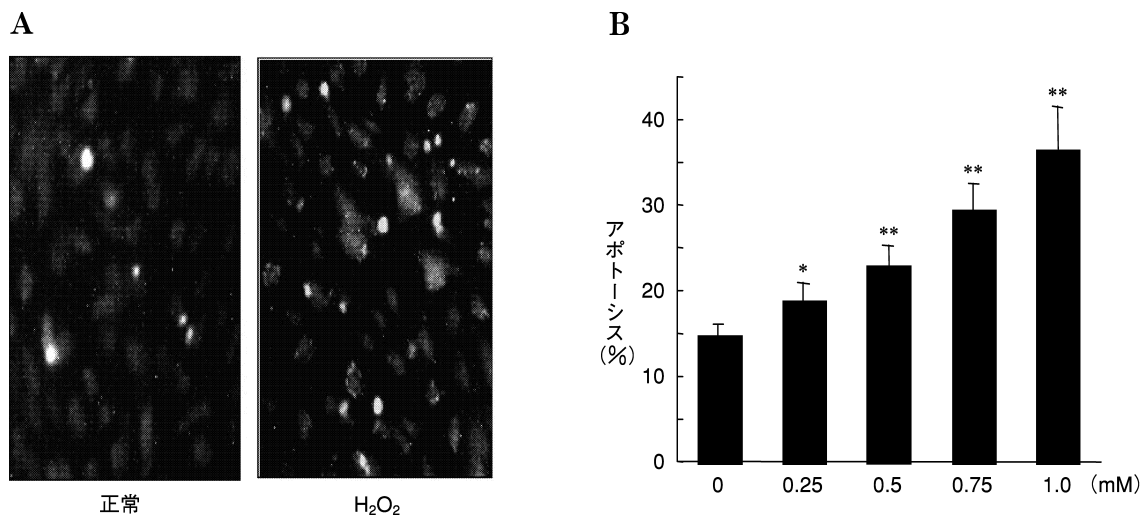


図 2 酸化ストレスは網膜血管細胞のアポトーシスを誘導する。

培養ウシ網膜血管内皮細胞に過酸化水素(H₂O₂)を付加することで酸化ストレスを負荷すると、その濃度に依って内皮細胞のアポトーシスがみられた。

A：培養網膜血管内皮細胞の TUNEL 染色。発色する細胞がアポトーシスを起こしている。

B：過酸化水素濃度依存性に網膜血管内皮細胞のアポトーシス陽性細胞比率が上昇する。

*：p=0.19, **：p<0.001

(文献 6 より許可を得て転載)

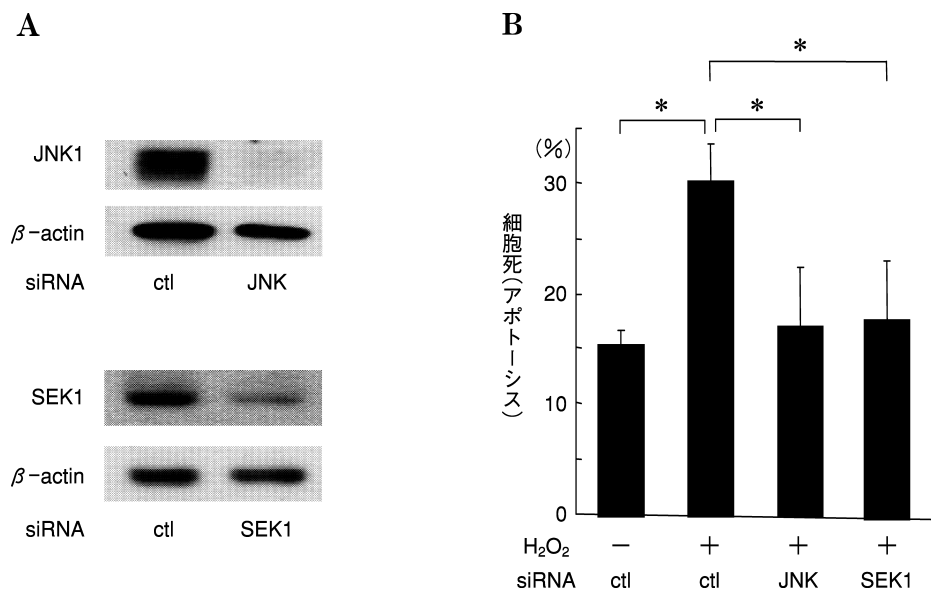


図 3 酸化ストレスによる血管障害は細胞内ストレスキナーゼを介する。

A : 培養ウシ網膜血管内皮細胞に SAPK/erk kinase(SEK 1) と Jun N-terminal kinase(JNK) の siRNA (small molecule interfering RNA) を投与し, Western blot 解析により蛋白質発現を検討した. β -actin には変化ないが, それぞれの siRNA により SEK 1 と JNK の蛋白質発現が抑制された. ctl は対照 siRNA.

B : A において細胞内ストレスキナーゼを抑制した網膜血管内皮細胞に酸化ストレス (過酸化水素, H_2O_2) を負荷し, アポトーシスになる細胞の比率を検討した. SEK 1 と JNK を抑制した状態ではアポトーシス細胞の比率は減少した. 酸化ストレスによる障害は SEK 1 と JNK を介することが示唆された.

* : $p < 0.001$

(文献 6 より許可を得て転載)

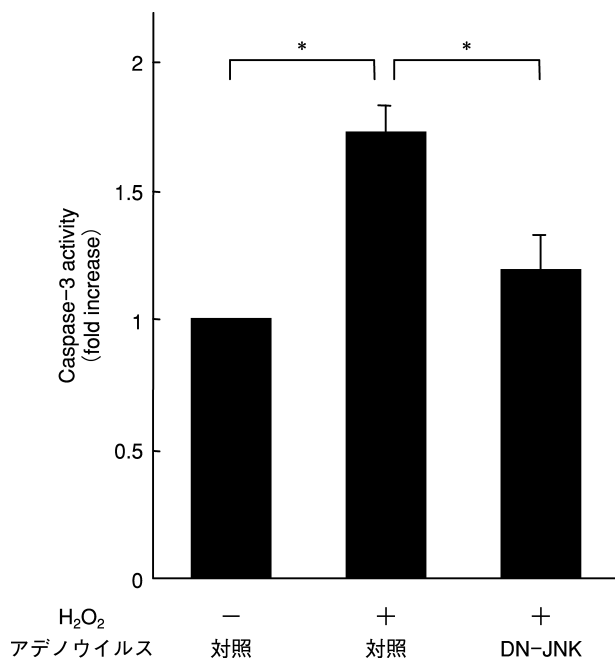


図 4 酸化ストレスにより網膜血管内皮細胞は JNK を介して caspase 3 を活性化する。

培養ウシ網膜血管内皮細胞に JNK を抑制する dominant negative JNK (DN-JNK) 遺伝子をアデノウイルスにより導入すると, 酸化ストレスにより活性化される caspase 3 の活性が抑制される。

* : $p < 0.001$

(文献 6 より許可を得て転載)

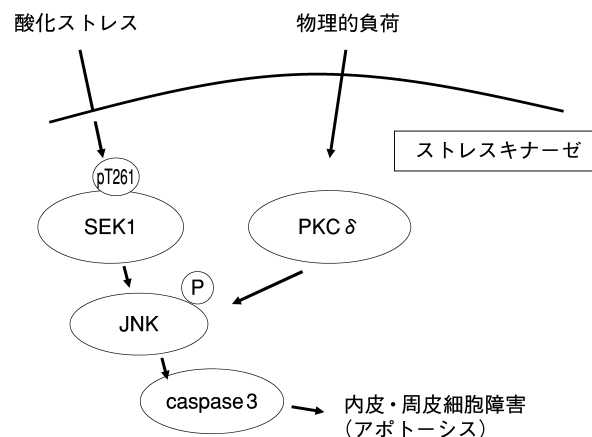


図 5 酸化ストレス, 周期的伸展負荷の細胞内シグナル伝達。

培養網膜血管内皮細胞や血管周皮細胞への過酸化水素や周期的伸展刺激は, protein kinase C δ (PKC δ), SEK 1, JNK, caspase 3 を介することがそれぞれの分子の阻害実験により示唆された. 加齢や成人病による血管障害ではストレスキナーゼを介した細胞内シグナル伝達が主要分子経路となっており, その制御が加齢による血管障害の治療となり得る可能性を示唆している。

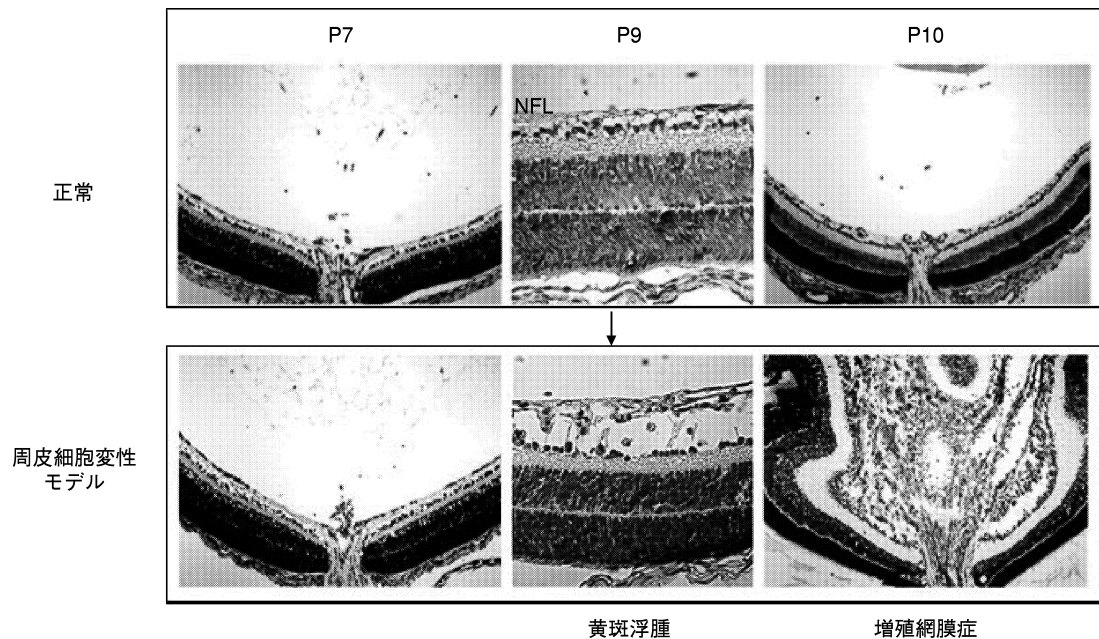


図 6 周皮細胞消失下における網膜血管発生.

抗血小板由来増殖因子受容体(PDGFR- β)阻害抗体(APB 5)投与により、マウス網膜血管発生における周皮細胞の集積を抑制した。この周皮細胞変性モデルでは、網膜血管は一樣に拡張し、急速な浮腫・出血を来した。生後9, 10日目には網膜浮腫、血管増殖膜形成がみられ、実際の糖尿病網膜症の進展に酷似した病態を示した。

NFL: Nerve Fiber Layer

(文献10より許可を得て転載)

1. 酸化ストレス

酸化ストレスは加齢により増加するばかりでなく、糖尿病、高脂血症といった生活習慣病すべての共通因子であり、血管への加齢負荷において最も影響が大きいと考えられる。我々は血管細胞への酸化ストレスの影響を検討した。培養ウシ網膜血管内皮細胞に過酸化水素を付加することで酸化ストレスを負荷すると、その濃度に依存して内皮細胞のアポトーシスがみられた⁶⁾(図2)。酸化ストレス誘導による内皮アポトーシスの細胞内シグナル伝達をさらに検討するために、siRNA (small molecule interfering RNA)を用いた gene silencing methodにより検討したところ、ストレスキナーゼとしてよく知られている、SAPK/erk kinase(SEK1), Jun N-terminal kinase(JNK), caspase 3を介してアポトーシスを惹起した⁶⁾(図3, 4, 5)。

2. 血流の物理的負荷

血管細胞には血流による shear stress や周期的伸展などの物理的負荷が持続的に加わっている。加齢により、このような負荷の影響が蓄積され血管障害の原因となる可能性が示唆される。共同研究者の鈴間らは周期的伸展により網膜血管内皮細胞において血管内皮増殖因子(VEGF)や VEGF 受容体(VEGFR 2)の発現亢進が起ることを以前報告している^{7,8)}。今回、周皮細胞への影響を検討した。高血圧患者の脈拍、血圧と同様の伸展負荷を培養ウシ網膜血管内皮細胞に付与すると周皮細胞のアポトーシスがみられるようになった。この変化には細

胞内酸化ストレス、プロテインキナーゼ C δ , JNK, caspase 3 を介していた(図5)。

上記のように加齢や成人病による血管障害の治療としては酸化ストレスや血流など加齢に伴う血管負荷自体を低減させることが重要であることが理解できる。また、加齢や成人病による血管障害では酸化ストレスや物理的負荷によるストレスキナーゼを介した細胞内シグナル伝達が主要分子経路となっており、その制御が加齢による血管障害の治療となり得る可能性を示唆している。

III 網膜血管細胞の特性とその変性による影響

糖尿病網膜症において病理組織学的に最も初期に起こる網膜毛細血管の変化は周皮細胞、内皮細胞の変性、基底膜の肥厚であることが知られている。特に周皮細胞の変化は顕著でその後の毛細血管瘤の形成や出血、血管透過性異常との関連が以前より重要視されている。網膜血管では他の組織の毛細血管に比較して、もともと周皮細胞が非常に多く存在しており、対内皮細胞比でみると、筋肉では20対1に比較して網膜では1対1の比率で存在している。このように多く存在する周皮細胞は物理的に血管壁を強固にしているばかりでなくさまざまな増殖因子を介して微小血管の恒常性に寄与している。なかでも D'Amore らにより明らかにされた transforming growth factor beta(TGF- β)を介した制御は有名で、内皮細胞と周皮細胞が接着しているときにのみ基底膜に存在する TGF- β が活性化され内皮細胞の安定化・増殖抑

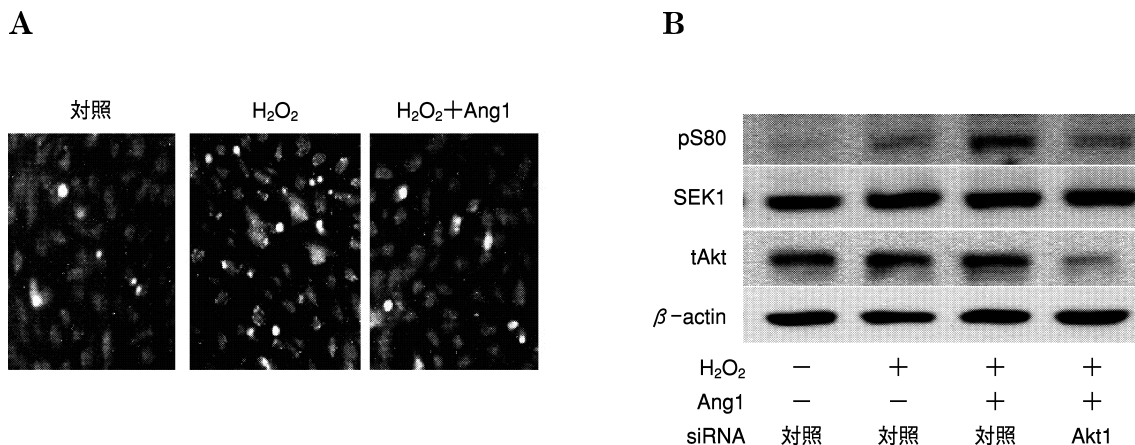


図 7 細胞内ストレスキナーゼに対するアンジオポエチン 1(Ang 1)の作用。

周皮細胞変性により血管障害が生じることより、周皮細胞より分泌され paracrine に内皮細胞を制御する Ang 1 に着目した。

A：培養網膜血管内皮細胞の TUNEL 染色像。過酸化水素(H₂O₂)により増加したアポトーシス細胞(発色細胞)は Ang 1 を負荷することにより減少した。Ang 1 が酸化ストレスによる内皮細胞死を抑制することが示唆された。

B：SEK 1 のセリン 80 のリン酸化(pS80)は SEK 1 を抑制することが報告されている。培養血管内皮細胞に酸化ストレスを与え、Ang 1 を投与したところ、SEK 1 のセリン 80 のリン酸化が起こり、Akt を抑制する siRNA によりリン酸化が阻害された。Ang 1 は Akt 経路を介して SEK 1 のセリン 80 をリン酸化し SEK 1 を抑制することによって細胞死(アポトーシス)を抑制することが示唆された。

(文献 6 より許可を得て転載)

制を行っている⁹⁾。周皮細胞が変性・消失するとこのような制御がなくなり、内皮細胞が増殖して毛細血管瘤が形成されたり、血管の脆弱性のために出血が起こるといわれている。

このように他の臓器の血管に比して特異性をもつ網膜血管において加齢による経年変化や成人病により網膜血管細胞がアポトーシスにより変性を来すとどのような病態が形成されるのであろうか。我々は周皮細胞消失の意義を検討するために内皮細胞より分泌される増殖因子の一つで周皮細胞の増殖・遊走を制御している PDGFβ(血小板由来増殖因子)の受容体(PDGFR-β)を阻害して周皮細胞変性網膜血管発生モデルを作製した。すなわち、新生仔マウスに生下時より連日、抗 PDGFR-β 阻害抗体(APB 5)を投与し、周皮細胞の網膜血管壁への集積を抑制した。その結果、周皮細胞が全く存在せず、内皮細胞のみで構成された血管網を網膜に構築することができた。電子顕微鏡レベルでは周皮細胞に加えて内皮細胞の変性、基底膜の肥厚がみられ、糖尿病網膜症初期の血管病理と酷似した病変が形成された。このような網膜血管では血管壁の拡張を主体とする構造異常を示し、さらに毛細血管瘤や著しい透過性亢進による急速な網膜出血・浮腫を来した。さらにマウスを観察すると網膜内の浮腫や硝子体内への増殖膜が形成された。これらの所見は糖尿病網膜症にみられる出血、毛細血管瘤、黄斑浮腫、血管増殖膜といった臨床病態に酷似しており、実際に糖尿病患者の網膜において周皮細胞の変性脱落が浮腫・出血・血管新生などの病態を惹起し得ることを示したモデル

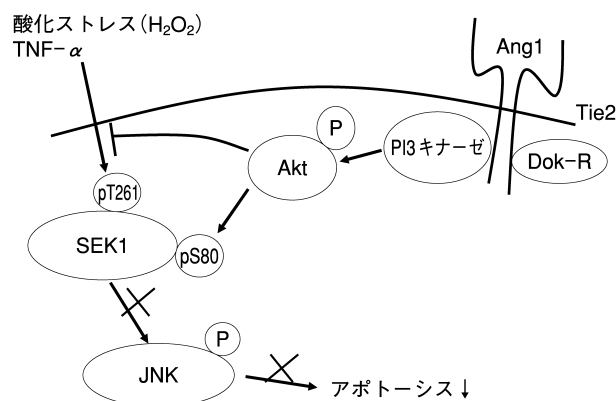


図 8 Ang 1 の血管細胞の酸化ストレスや腫瘍壊死因子(TNF-α)による細胞障害に対する抑制作用とシグナル伝達。

Ang 1 は、PI 3 キナーゼ-Akt 経路を介して酸化ストレス、TNF-α により活性化される SEK 1 のセリン 80 のリン酸化(pS80)、スレオニン 261 のリン酸化(pT261)抑制により SEK 1 を抑制する。SEK 1 下流の JNK, caspase 3 も抑制され、血管内皮細胞障害が抑制されることが示唆された⁶⁾。

ルであると考えられた¹⁰⁾(図 6)。このことより微小血管レベルでの血管細胞の変性のみで血管増殖に至る末期病変までの病態形成が起こり得ることが示唆され、初期病変の形成過程の解明やその制御が非常に重要であることが示唆される。

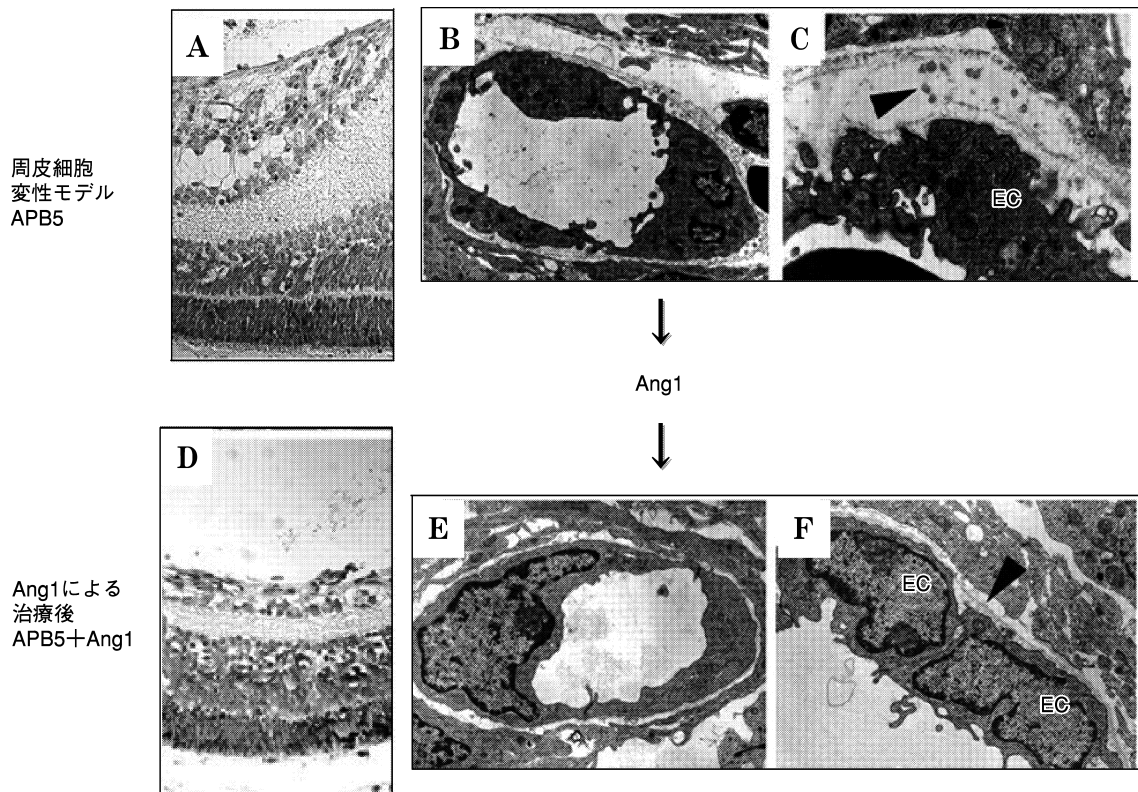


図 9 周皮細胞変性モデルへの Ang 1 の作用。

前述の PDGFR 中和抗体 (APB 5) を用いた周皮細胞変性モデルに Ang 1 を硝子体投与した。Ang 1 単独で血管構築の異常や透過性異常が改善され、網膜浮腫や血管増殖もみられず正常網膜を取り戻した (A, D)。電子顕微鏡レベルでは周皮細胞は欠落したままだが (E, F)、基底膜の肥厚や内皮細胞の変性 (B, C) が正常化しており (E, F)、内皮細胞間には tight junction も形成されていた (F, 矢頭)。周皮細胞より分泌される Ang 1 の paracrine 作用が正常網膜血管の維持に不可欠であること、糖尿病網膜症などの周皮細胞変性に起因する病変に Ang 1 やその下流の細胞内シグナルの活性化による血管治療が有効である可能性が示唆される。 (文献 10 より許可を得て転載)

EC: 血管内皮細胞

IV アンジオポエチン 1 (Ang 1) による治療の可能性

このように周皮細胞の変性・脱落が網膜症の初期から末期までの病変を惹起することより、周皮細胞の機能が網膜血管の健全性の維持に重要であることが分かり、さらにその機能を補うことにより網膜症の有効な治療が可能となることが推察される。周皮細胞の機能の中で我々は周皮細胞より分泌され paracrine に内皮細胞に影響を及ぼす Ang 1 に注目した。Ang 1 は Tie 2 受容体に結合する。遺伝子変異マウスを用いた研究結果より Ang 1/Tie 2 は血管内皮が管腔構造を形成した後に周皮細胞などの傍内皮細胞との接着により外壁形成され血管構築が完成する段階に働き、血管壁の成熟化・安定化に寄与しているといわれ、血管透過性の抑制作用や血管細胞の細胞生存効果があることが分かっている^{11)~13)}。

我々は酸化ストレスおよび糖尿病や動脈硬化などの血管障害において重要な組織障害因子となる腫瘍壊死因子 (TNF- α) による血管内皮障害への影響を検討した。前

述のように酸化ストレスにより網膜血管内皮細胞ではストレスキナーゼの活性化が起こりアポトーシスが惹起される。Ang 1 を投与すると濃度依存性にアポトーシスが抑制されることが見出された⁶⁾。Ang 1 は酸化ストレス、TNF- α により活性化される SEK 1, JNK を抑制することが見出され (図 7)、細胞内ストレスキナーゼを阻害することにより血管内皮細胞障害を抑制することが示唆された⁶⁾ (図 8)。さらに我々は周皮細胞変性により Ang 1 の paracrine 作用が欠如していると考えられる前述のモデルに Ang 1 を補填すべく投与した。驚くべきことに周皮細胞は欠如したままであるが、Ang 1 単独で血管構築の異常や透過性異常が改善され、網膜浮腫や血管増殖もみられず正常網膜を取り戻した¹⁰⁾ (図 9)。我々の結果は周皮細胞より分泌される Ang 1 の paracrine 作用が正常網膜血管の維持に不可欠であることを示しており、糖尿病網膜症にみられる周皮細胞変性に起因する病変に Ang 1 やその下流の細胞内シグナルの活性化による血管治療が有効である可能性が示唆される。

表 2 血管内皮増殖因子(VEGF)の作用と関連する血管障害

1. 低酸素・虚血による発現誘導	血管増殖型網膜症・虚血性血管新生
2. 分泌型蛋白質・液性因子(VEGF ₁₂₁ , VEGF ₁₆₅)	
3. 血管新生作用, 内皮細胞の増殖, 遊走, 管腔形成, 血管前駆細胞の導入	
4. 血管透過性作用	黄斑浮腫
5. 血栓亢進作用	無灌流領域形成
6. 細胞外基質・接着因子調節	血管内皮障害, 異常血管新生の誘導
7. 血流調節作用	
8. 白血球浸潤作用・炎症惹起作用	

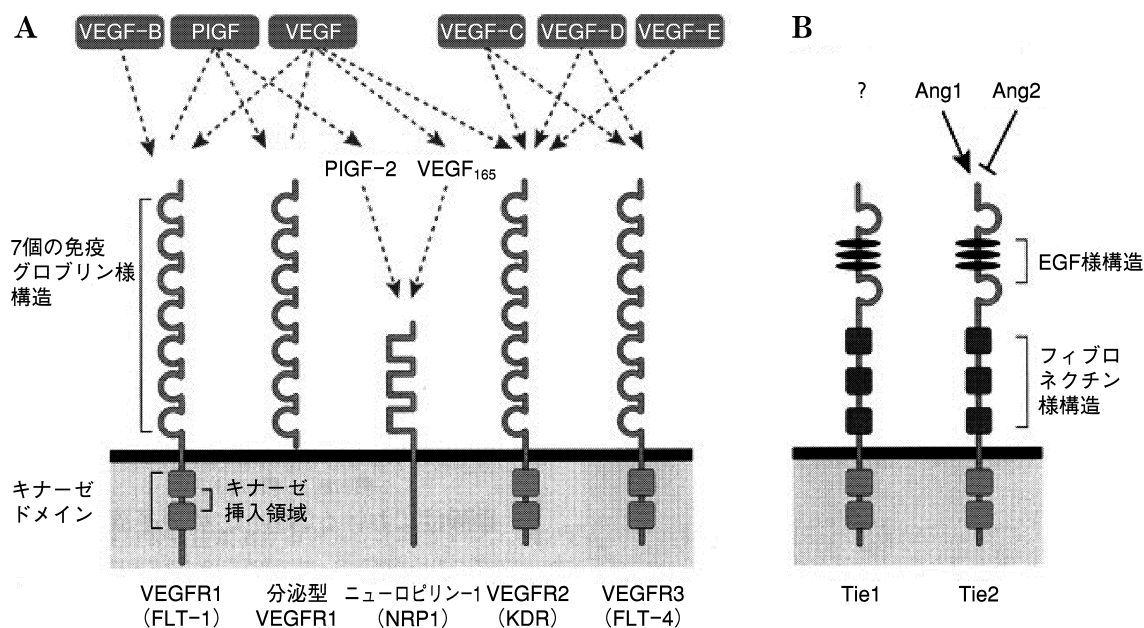


図 10 血管内皮増殖因子(VEGF)および Ang ファミリーとその受容体。

A: 矢印で示すようなリガンドと受容体の結合性が報告されている。VEGF 受容体は 3 種類とも細胞外に 7 個の免疫グロブリン様ドメインをもつチロシンキナーゼ型の受容体でキナーゼドメインに挿入配列をもつ。PlGF: placenta growth factor.

B: Tie 受容体には Tie 1 と Tie 2 があるが Tie 1 の機能はまだよく理解されていない。いずれも細胞外に 2 つの免疫グロブリン様構造とその間の 3 つの EGF(epidermal growth factor)様構造, 細胞膜近傍に 3 つの type 3 フィブネクチン様構造を有する。Ang 1, アンジオポエチン 2(Ang 2)は Tie 2 に結合するが Ang 2 は Ang 1 の内在性アンタゴニストとして働くと考えられている。

V 虚血性網膜血管新生と血管新生因子

1. VEGF(血管内皮増殖因子)

Michaelson や Ashton 以来, 虚血網膜より分泌される何らかの分子が網膜血管新生を誘導することが推測され, Factor X として提唱されてきた¹⁴⁾。この分子は網膜ばかりでなく隅角にも血管新生を惹起することから, 液性の分泌因子で低酸素により誘導される血管新生因子であると考えられていた。そのような候補分子として多様な分子が提唱される中で, 1989 年に Ferrara ら¹⁵⁾により同定された血管内皮増殖因子(VEGF)は当時 Senger ら¹⁶⁾により同定されていた血管透過性因子(VPF)と同一の分子であるが, 上記のような要件を満たす分子であった。1994 年の Miller や Adamis らの報告により, 眼内血管新生での主要因子であることが始めて報告され

た¹⁷⁾。その後, 実際の糖尿病網膜症患者において眼内の VEGF が関与していることが明らかとなり¹⁸⁾, 我々も, VEGF 阻害抗体により, マウス虚血性網膜血管新生が抑制されることを示し, VEGF の関与をより明らかにした¹⁹⁾。VEGF はその後の検討も含め, 血管障害を引き起こす多様な作用を有することが明らかになっている。血管増殖や黄斑浮腫の原因である血管新生作用, 血管透過性亢進作用だけでなく, 炎症惹起作用, 血栓亢進作用, 白血球の誘導, 網膜血栓症, 血管拡張作用など網膜血管障害においてほとんどの病態に関連することが報告されている。このように VEGF は網膜血管障害の中心的な役割を担う分子と考えられてきている(表 2)。

VEGF は VEGF 受容体に結合して作用するが, VEGF 受容体自体も虚血により発現制御され虚血性血管新生の調節機構の一つとなっている。マウスの虚血網膜

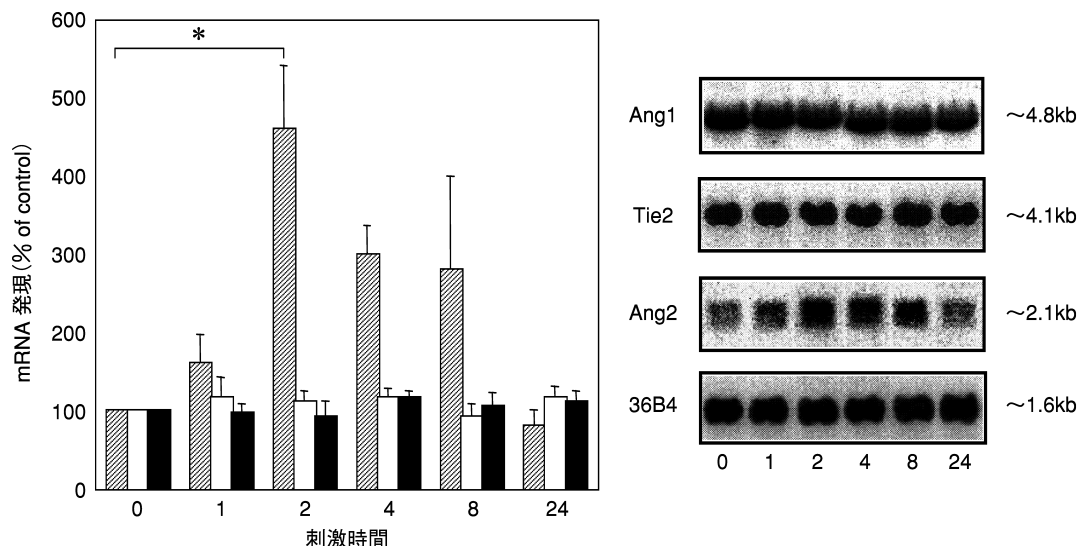


図 11 低酸素・VEGF による Ang の制御.

網膜血管内皮細胞を低酸素負荷し Ang 1, Ang 2 および受容体 Tie 2 の発現レベルを Northern blot 解析により検討した. 低酸素により Ang 2 のみが選択的に発現増加した. VEGF 刺激による反応も同様であった (データ省略). □: Ang 1, ▨: Ang 2, ■: Tie 2. *: $p < 0.03$ (文献 24 より許可を得て転載)

モデルでは, VEGFR2 は虚血網膜, 特に血管新生部位において発現増加していることが明らかとなった²⁰⁾. 培養網膜血管内皮細胞においては虚血により VEGFR2 の mRNA は減少するが, 細胞表面の VEGF 結合能は増加していた²¹⁾. 虚血による VEGFR2 の誘導機構は受容体蛋白質の recycling の低下など蛋白質レベルでの制御であると考えられた.

2. 細胞外マトリックス

活性化された VEGF/VEGFR2 による血管新生はさらに接着因子や細胞外マトリックスによる調節を受ける. VEGF はビトロネクチン結合性インテグリンの $\alpha v \beta 3$ や $\alpha v \beta 5$ とそのリガンドとなるオステオポンチン(OPN)を活性化し²²⁾, focal adhesion を形成して内皮細胞の遊走を促進するばかりでなく, metalloproteinase-2 活性の向上など細胞外マトリックス溶解, アポトーシス抑制, 管腔形成など血管新生のすべての段階を促進する. 対照的に抗血管新生作用をもつトロンスポンジンを発現誘導し negative-feedback 機構として厳密な血管新生の制御を可能にしていると考えられる²³⁾.

3. 内皮・周皮細胞連携

こうした血管内皮の制御に加えて内皮細胞・周皮細胞間の連携の制御も網膜血管新生に深くかかわっている. VEGF は血管内皮の分化, 増殖, 管腔形成にかかわり, 内皮細胞による血管形成を制御する. これに対し内皮細胞と周皮細胞間の相互連携はアンジオポエチンが制御していることが明らかにされている. アンジオポエチンは Tie 2 受容体に結合して作用する. Ang 1 は Tie 2 受容体をリン酸化し, Ang 2(アンジオポエチン 2)は前述の Ang 1 と競合的に Tie 2 に結合してその作用を阻害し,

Ang 1 の内在性アンタゴニストであると考えられている¹²⁾(図 10). 成熟血管壁では, 周皮細胞が内皮細胞の分化・増殖を制御し, 血管壁の安定化をはかると考えられているが, 周皮細胞より分泌された Ang 1 が, 内皮細胞上に発現する Tie 2 受容体にアゴニストとして作用し, 周皮細胞との接着を強化して血管壁の成熟化を促進していると考えられている. 一方で Ang 2 は Tie 2 の内因性アンタゴニストとして血管壁構造, 特に内皮・周皮細胞間接着を不安定化し, 周皮細胞を解離させて内皮細胞の VEGF に対する反応性を向上させると推測されている. 我々は Ang/Tie 2 系の網膜血管新生への関与を検討した. 低酸素により Ang 1, Tie 2 には変化がないものの Ang 2 のみが顕著に血管内皮において誘導され(図 11), マウス虚血網膜モデルや実際の増殖糖尿病網膜症患者の摘出血管増殖膜においても Ang 2 と VEGF の発現増加がみられた²⁴⁾²⁵⁾(図 12). しかも, 両因子の発現増加部位は近似しており, 培養細胞を用いた実験では両因子により相乗的に血管新生が促進された. さらに, 両因子の阻害物質を硝子体投与することにより, 網膜血管新生に及ぼす影響を検討すると, 可溶性 Tie 2 蛋白質<可溶性 VEGF 受容体蛋白質<可溶性 VEGF 受容体蛋白質+可溶性 Tie 2 蛋白質の順に網膜血管新生が抑制された. このような結果より虚血性血管新生において VEGF がより重要であるが, Ang/Tie 2 系も重要な調節因子となり, 両因子が協調的に作用していることが示唆された²⁵⁾.

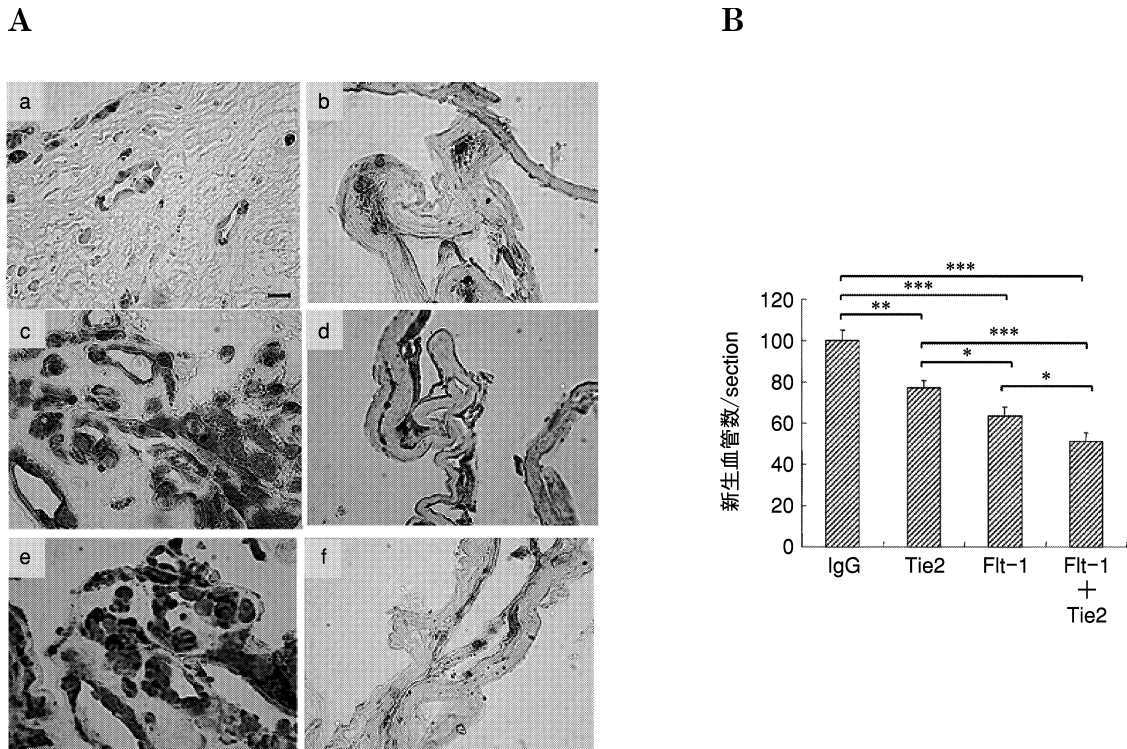


図 12 虚血性網膜血管新生における VEGF と Ang 2 の協調作用。

A：網膜増殖膜の免疫染色像。Ang 2 は低酸素、VEGF により誘導される。増殖糖尿病網膜症患者の摘出血管増殖膜に VEGF や Ang 2 の発現増加がみられ、両因子は活動性の高い増殖血管の周囲に共発現していた。Ang 1 は発現増加はみられなかった。

a, c, e：増殖糖尿病網膜症。b, d, f：特発性黄斑上膜(非血管増殖膜)。

a, b：Ang 1, c, d：Ang 2, e, f：VEGF。

B：マウス虚血性網膜血管新生モデルにおいて VEGF を阻害する可溶性 VEGF 受容体蛋白質、Ang の作用を抑制する可溶性 Tie 2 蛋白質、さらにその両方を硝子体投与することにより、網膜血管新生に及ぼす影響を検討した。可溶性 Tie 2 蛋白質<可溶性 VEGF 受容体蛋白質<可溶性 Tie 2 蛋白質+可溶性 VEGF 受容体蛋白質の順に血管新生が抑制された。VEGF と Ang 2 が虚血性網膜血管新生において協調的に作用していることが示唆される。IgG：免疫グロブリン(対照)。Tie 2：可溶性 Tie 2 蛋白質。Flt-1：可溶性 VEGF 受容体蛋白質。*： $p<0.05$ ，**： $p<0.01$ ，***： $p<0.001$ 。

(文献 25 より許可を得て転載)

VI 網膜血管障害の特異性と VEGF 受容体発現特性

高血糖による代謝異常や酸化ストレスなどは全身の血管において起こっているはずであるが、糖尿病血管合併症のなかで血管新生という病態は網膜特異的にみられる現象である。こうした網膜の特異性は網膜血管に大血管や他臓器の血管と異なる特異性があるために起こるのではないかと推測し、網膜血管障害において多用な作用を有し主要因子と考えられる VEGF 受容体について発現様式を比較検討した。VEGF には受容体として VEGFR1, VEGFR2, チロシンキナーゼ型サブタイプに加え分泌型 VEGFR1 およびニューロピリン(neuropilin-1, NRP 1)が存在することが報告されている(図 10)。VEGF 自体にも alternative splicing と呼ばれる mRNA レベルでの調節によりヒトでは 121, 165, 189, 206 アミノ酸より成る 4 種類のファミリーが存在する¹¹⁾。

大血管である大動脈内皮細胞と比較検討を行ったところ、網膜血管内皮には著しく多く VEGFR2 が発現しており、VEGF による増殖促進作用が高くなっていた²⁶⁾²⁷⁾(図 13)。大血管の内皮細胞に比較して網膜内皮では VEGF 作用が増強されることが示唆された。次に血管壁を形成する大血管の平滑筋細胞と網膜周皮細胞を比較した。周皮細胞にのみ VEGFR1 が多く発現していた²⁷⁾。この受容体は VEGF を吸着するがあまりシグナルを細胞内に伝えないことから VEGF に対して定常状態では抑制的に働くと考えられている。前述の TGF- β の活性化機構もあり、網膜血管にはこのような抑制的な受容体をもつ周皮細胞が正常状態で存在することが特性の一つとなっていると考えられる(図 14)。そしてその変性により抑制作用が減弱して内皮細胞の増殖が起こりやすくなることが推察される。

VEGF と VEGF 受容体の結合産物を観察すると網膜血管にのみ低分子量の受容体が存在しており、後に

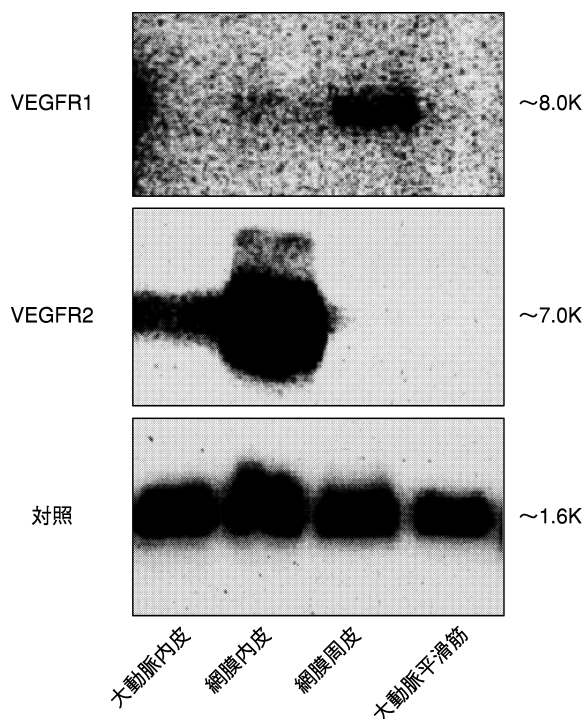


図 13 網膜微小血管細胞の VEGF 受容体(VEGFR)発現。ウシ大動脈血管内皮, ウシ網膜血管内皮, ウシ網膜周皮細胞, ウシ大動脈平滑筋細胞を定常状態で培養し Northern blot 法 (total RNA 20 μ g/lane) にて VEGF 受容体発現を解析した。網膜血管内皮には大動脈内皮よりも VEGFR2 が強く発現しており, 周皮細胞には大血管平滑筋細胞にはない VEGFR1 が発現している。(文献 27 より許可を得て転載)

NRP 1 という受容体であることが分かってきた²⁶⁾(図 15)。Soker らにより NRP 1 は VEGF₁₆₅ に特異的に結合し NRP 1 自体の細胞内へのシグナル伝達を行わないが VEGFR2 を介した VEGF 作用を増強することが報告されている²⁸⁾。VEGFR2 は VEGFR1 に比較して VEGF により強いリン酸化を受け増殖や透過性亢進作用に強くかかわっていることが示唆されており, これらの受容体の発現が多いことは VEGF による血管増殖・透過性亢進作用が他の臓器よりも増強される可能性を示唆する。さらに NRP 1 受容体はもともとニューロンの軸索進展に関与する受容体として発見されていたもので, 神経組織である網膜の血管に特異的に発現がみられたことより網膜血管増殖の特異性に関与しているのではないかと考えられ興味をもたれた。培養網膜内皮細胞を用いた我々の結果では, 虚血や VEGF 自体が NRP 1 の発現を増加させるうえに, NRP 1 阻害により VEGF 刺激による内皮細胞増殖が 80% 以上抑制された(図 16)。さらに, マウス虚血網膜モデルにおいても新生血管に NRP 1 の著しい発現増加がみられ(図 17), その抑制により血管新生が顕著に抑制された(図 18)。このような結果より, VEGF₁₆₅ の NRP 1 を介した血管新生作

用が網膜血管新生に重要であることが分かる²⁹⁾。また, VEGF₁₆₅ を選択的に阻害するアプタマーにより阻害すると, 白血球の浸潤や網膜外への異常血管新生のみが阻害され, 正常の網膜内への血管形成は阻害されないという報告もある³⁰⁾。網膜血管内皮に特異的な NRP 1 が VEGF 依存性の網膜血管新生の大部分を制御していることが示唆されるとともに NRP 1 が positive-feedback 機構として VEGF 作用を増強していることが網膜特異的に血管新生がみられる原因の一つとして推察された。

VII 生活習慣病と網膜血管障害

近年, 代償的高インスリン血症を背景に多様な成人病因子を集簇し, 冠動脈疾患ときわめて関連が強い単一病態であるメタボリックシンドロームが提唱されている。眼科領域においても糖尿病網膜症, 静脈閉塞症, 加齢黄斑変性など加齢とともに増加する網膜血管障害は, 糖尿病, 高血圧, 高脂血症, 肥満などの生活習慣病に起因しており, それぞれの疾患が網膜血管障害の risk factor として認識されている。我々はこのような生活習慣病と網膜血管病変とのかかわりについて網膜血管レベルでの分子メカニズムについて検討した。

1. 高血圧・動脈硬化と網膜血管新生

高血圧症では加齢に伴いもともと永続的に加わっている網膜血管への周期的伸展や shear stress など物理的な負荷がさらに増強される。前述のように周期的伸展により網膜血管内皮細胞において VEGF や VEGF 受容体が誘導され血管新生を促進する。さらに, 周皮細胞のアポトーシスが起こり, 内皮細胞への血管新生抑制が失われることにより, 血管新生が促進されると考えられる。このような血管細胞への血圧による直接作用に加えて動脈硬化・高血圧で重要な制御因子の一つと考えられている分子の一つのレニン・アンジオテンシン系(RAS)が重大な影響を及ぼす。RAS はアンジオテンシノーゲンがレニンによりアンジオテンシン, さらにアンジオテンシン変換酵素によりアンジオテンシン II (AII) に変換されることにより活性化される。活性化された AII は AT1 受容体と AT2 受容体という二つのタイプの受容体に作用する。RAS は血管局所あるいは血液中において活性化され主要な制御因子となっている。眼局所においても RAS が発現しており, 眼疾患, なかでも糖尿病網膜症などの虚血性網膜疾患の発症にかかわっていることが示唆されている。糖尿病網膜症患者のレニンの前駆体であるプロレニンの血漿中濃度は網膜症が悪化するほど上昇しており³¹⁾, 糖尿病黄斑浮腫や増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中 AII 濃度は非糖尿病患者に比べて上昇しており, 硝子体中 VEGF 濃度と有意な相関関係にあった^{32/33)}。The EURODIAB Controlled trial of Lisinopril in Insulin-dependent Diabetes (EUCRID) によって高血圧のない 1 型糖尿病患者において 2 年に及ぶ Angiotensin

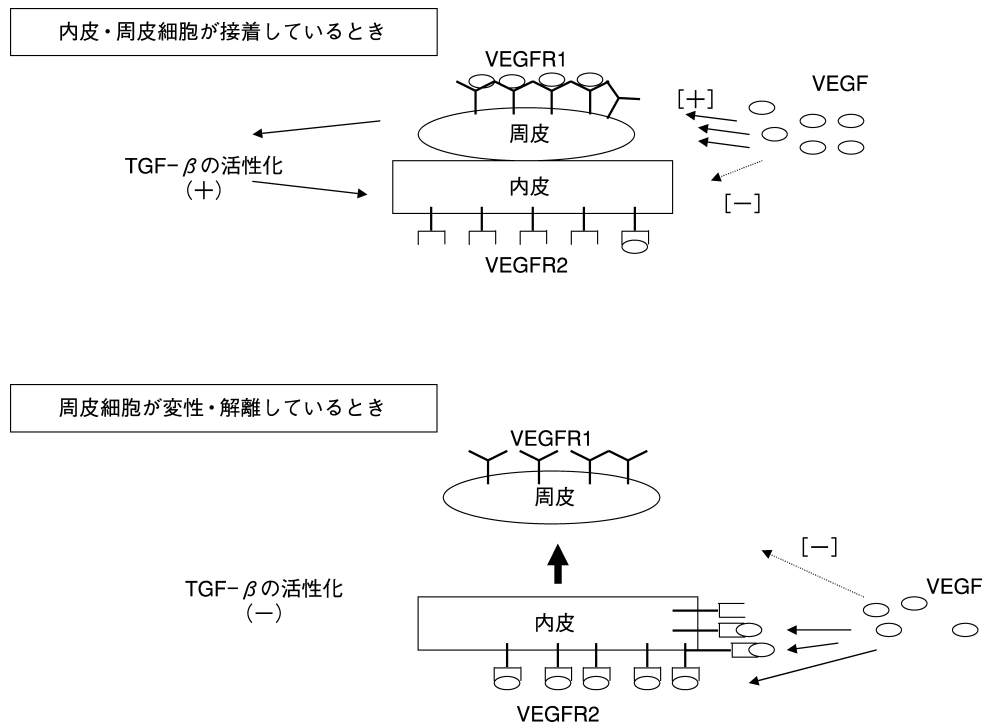


図 14 周皮細胞による網膜内皮細胞の制御機構(仮説)。

周皮細胞は内皮細胞と接触しているときには、transforming growth factor beta (TGF- β)の活性化、VEGFR 1 による過剰 VEGF の吸着により内皮細胞の増殖を抑制している。網膜症において、周皮細胞の変性・脱落が起こるとこのような制御がなくなり、血管増殖が進行することが推測される。

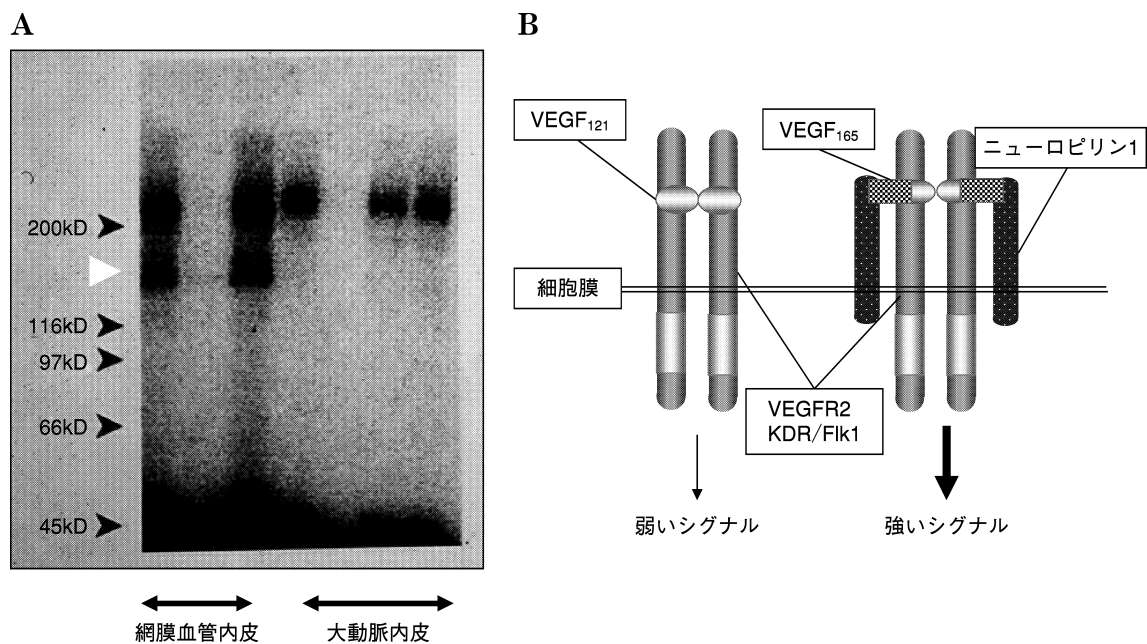


図 15 大動脈内皮と網膜血管内皮の VEGF 受容体の違い。

A : Affinity cross-linking 電気泳動により¹²⁵I 標識 VEGF と VEGF 受容体複合物を電気泳動した。網膜血管内皮にのみ小分子量の VEGF 受容体が見出された(▷)。

B : VEGF は alternative splicing と呼ばれる mRNA レベルでの調節により 121, 165, 189, 206 アミノ酸より成る 4 種類のファミリーが存在する¹¹⁾。ニューロピリン 1 (NRP 1) は VEGF₁₆₅ に特異的に結合し NRP 1 自体の細胞内へのシグナル伝達を行わないが VEGF₁₆₅ を架橋として VEGFR 2 と複合体を形成し、VEGF への結合活性を高め強いシグナル伝達により VEGF 作用を増強する²⁸⁾。VEGF₁₂₁ や他の VEGF ではこのような複合体は形成されず弱いシグナルが細胞内に伝達される。

(文献 26 より許可を得て転載)

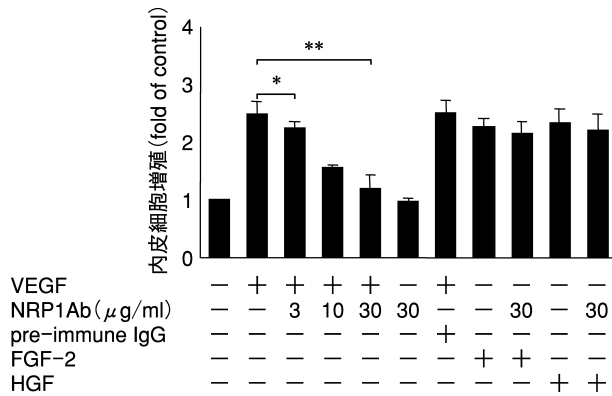


図 16 培養網膜血管内皮増殖における NRP1 の重要性.

VEGF 刺激による網膜血管内皮細胞の増殖能は NRP1 抗体(NRP1Ab)により濃度依存性に抑制された。他の増殖因子、線維芽細胞増殖因子(FGF-2)や肝細胞増殖因子(HGF)による増殖促進作用は影響を受けなかった。抗体が NRP1 に選択的に反応していることが分かる。VEGF による増殖促進活性は NRP1 中和抗体により 80%以上抑制され、網膜血管内皮における VEGF 作用のほとんどが NRP1 を介していることが示唆される。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.0001$

(文献 29 より許可を得て転載)

Converting Enzyme(ACE) inhibitor である Lisinopril の投与により網膜症の進行が placebo 投与群と比較して 50% 抑制され、増殖型網膜症の進行は 82% 抑制されることが報告された³⁴⁾。さらに UK Prospective Diabetes Study Group(UKPDS)によって β -blocker または ACE 阻害薬によって網膜症の発症および進行が抑制できることが 2 型糖尿病患者において示された³⁵⁾³⁶⁾。以上のように糖尿病網膜症患者の眼内液で RAS が発現しており、網膜症の発症・進展に関与していることが強く示唆される。しかし、AII 受容体には組織により血管新生を促進する場合と抑制する場合があることも知られている。

では、RAS は網膜血管においてはどのような影響を及ぼすのであろうか？劇症型高血圧を呈し、眼その他の組織に RAS を過剰発現させるトランスジェニック mRen-27 ラットをストレプトゾトシンにより糖尿病にすると、ヒトの糖尿病腎症でみられるような重症の腎症を発症する。このラットでは網膜と虹彩の血管内皮細胞の増殖と VEGF の発現増加が認められ、これらは RAS 阻害により抑制された³⁷⁾。また、糖尿病網膜症ではその病態に白血球と網膜血管内皮との相互作用が重要な役割を担うことが知られているが、AT1 受容体の拮抗剤により糖尿病ラット網膜血管内皮への白血球の捕捉が抑制されるという報告がある³⁸⁾。

我々は、網膜症の主要病態である VEGF 依存性血管

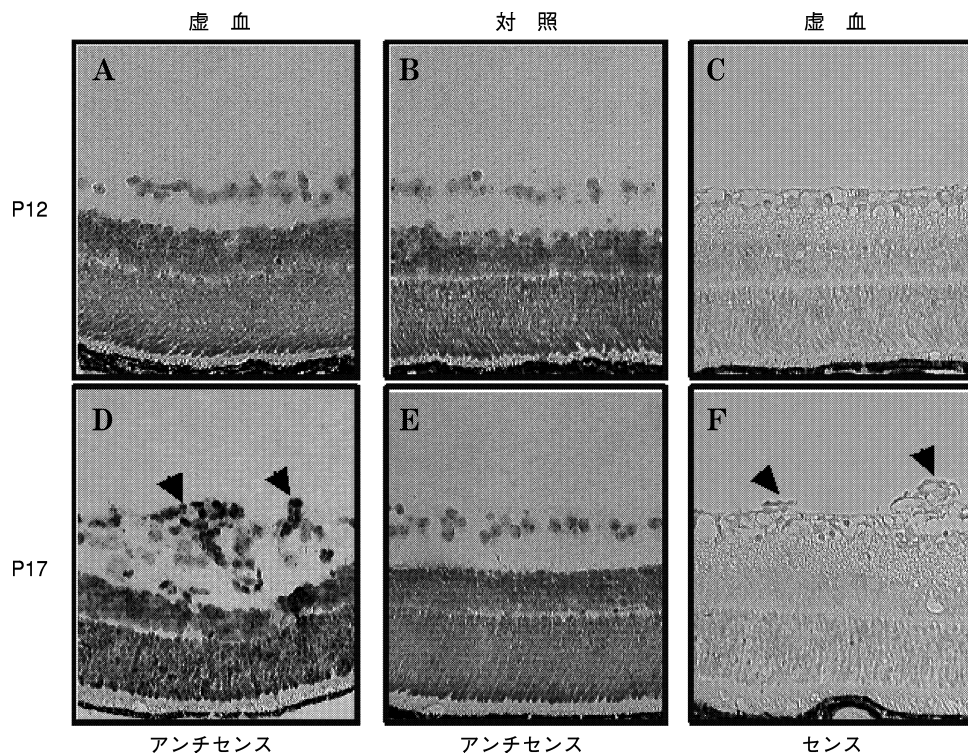


図 17 網膜血管内皮細胞における NRP1 受容体の発現制御.

NRP1 は培養網膜内皮細胞では VEGF 刺激や低酸素負荷により発現増加する。マウス虚血網膜血管新生モデルにおいて NRP1 の mRNA 発現を *in situ* hybridization 法により検討した。生後 12 日目(P12)では大きな変化はみられないが、生後 17 日目(P17)には NRP1 は neovascular tuft と呼ばれる新生血管部位の内皮細胞に著しく発現増加していた(矢頭)。(文献 29 より許可を得て転載)

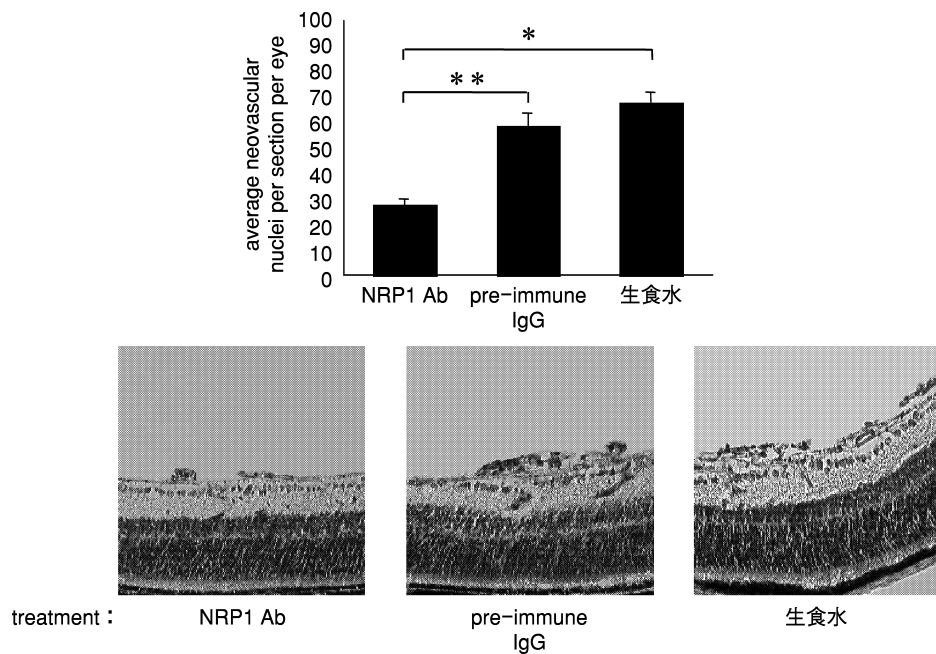


図 18 虚血網膜血管新生における NRP 1 の重要性.

マウス虚血網膜モデルにおいて NRP 1 阻害抗体を硝子体注入した。対照群 (pre-immune serum や生食水注入群) に比して硝子体中への血管新生が有意に減少していた。NRP 1 は VEGF により誘導され VEGF の作用を増強する。NRP 1 を介した VEGF 作用の positive-feedback 制御が網膜血管新生に重要な役割を果たしていることが示唆される。NRP 1 は網膜特異的な抗 VEGF 治療のよい標的となる可能性が示唆される。

* : $p < 0.001$, ** : $p = 0.0022$

(文献 29 より許可を得て転載)

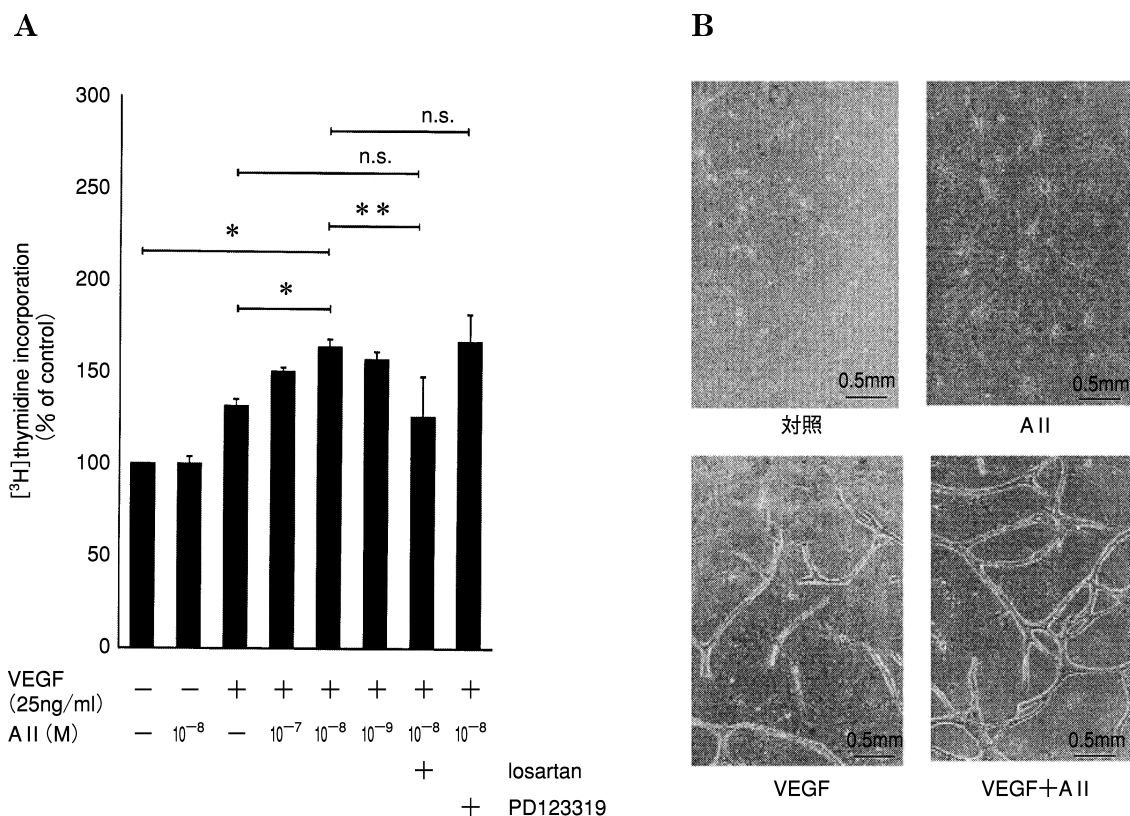


図 19 アンジオテンシン(AII)の網膜血管内皮への影響.

A : 培養ウシ網膜血管内皮細胞に VEGF を作用させると細胞増殖が促進する。その際、AII を前処置すると濃度依存性に増殖能がさらに亢進した。このような作用は AT 1 受容体阻害薬である losartan により阻害されたが、AT 2 受容体阻害薬である PD 123319 では影響を受けなかった。* : $p < 0.01$, ** : $p < 0.05$, n.s. : 有意差なし。

B : 培養ウシ網膜血管内皮細胞に VEGF を作用させると管腔形成が起こるが、AII で前処置するとさらに管腔形成が促進された。上記のように AII は AT 1 受容体依存性に VEGF 作用を増強することが見出された。

(文献 39 より許可を得て転載)

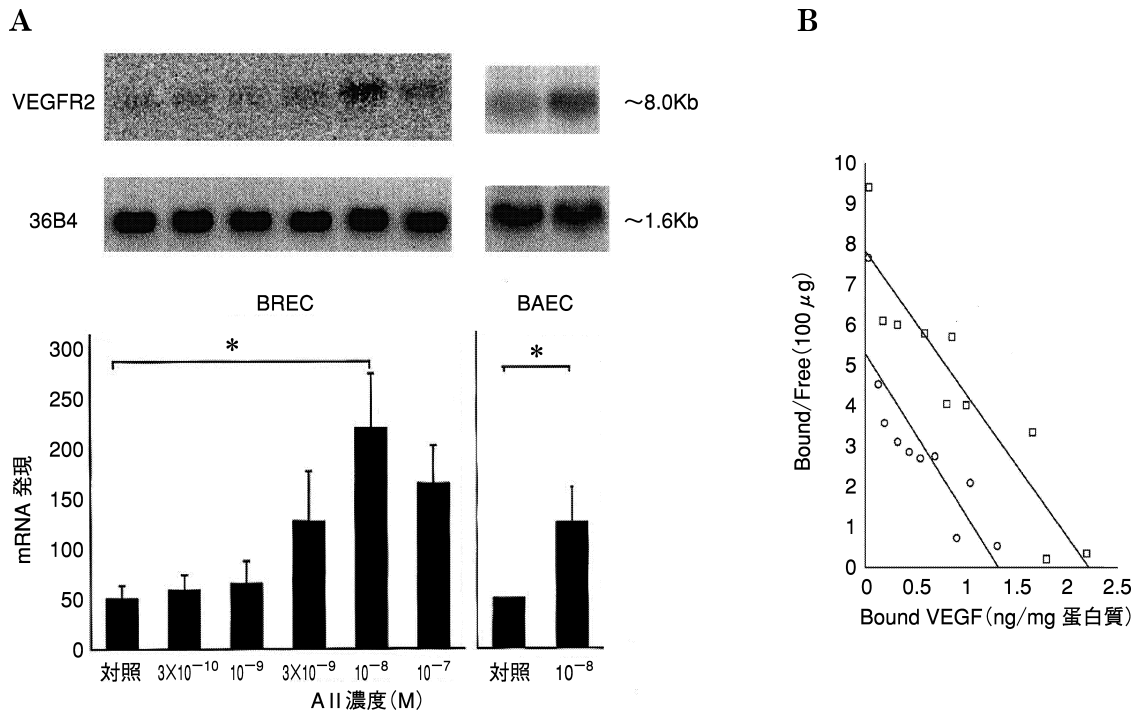


図 20 AIIの網膜血管内皮 VEGF 受容体への影響.

A: AIIが VEGF 作用を増強することより, VEGF 受容体への影響を検討した. Northern blot 解析では VEGF 受容体は AII刺激により濃度依存性に VEGFR2 の発現が増加した. 網膜内皮では最大 4 倍に増加し, 大動脈内皮よりも受容体発現がより増加していた. BREC: 網膜内皮, BAEC: 大動脈内皮.

*: $p < 0.05$.

B: Scatchard 解析により細胞膜上の VEGF 結合部位も約 80%増加することが観察された.

四角指標: AII刺激後, 円形指標: AII刺激前.

(文献 39 より許可を得て転載)

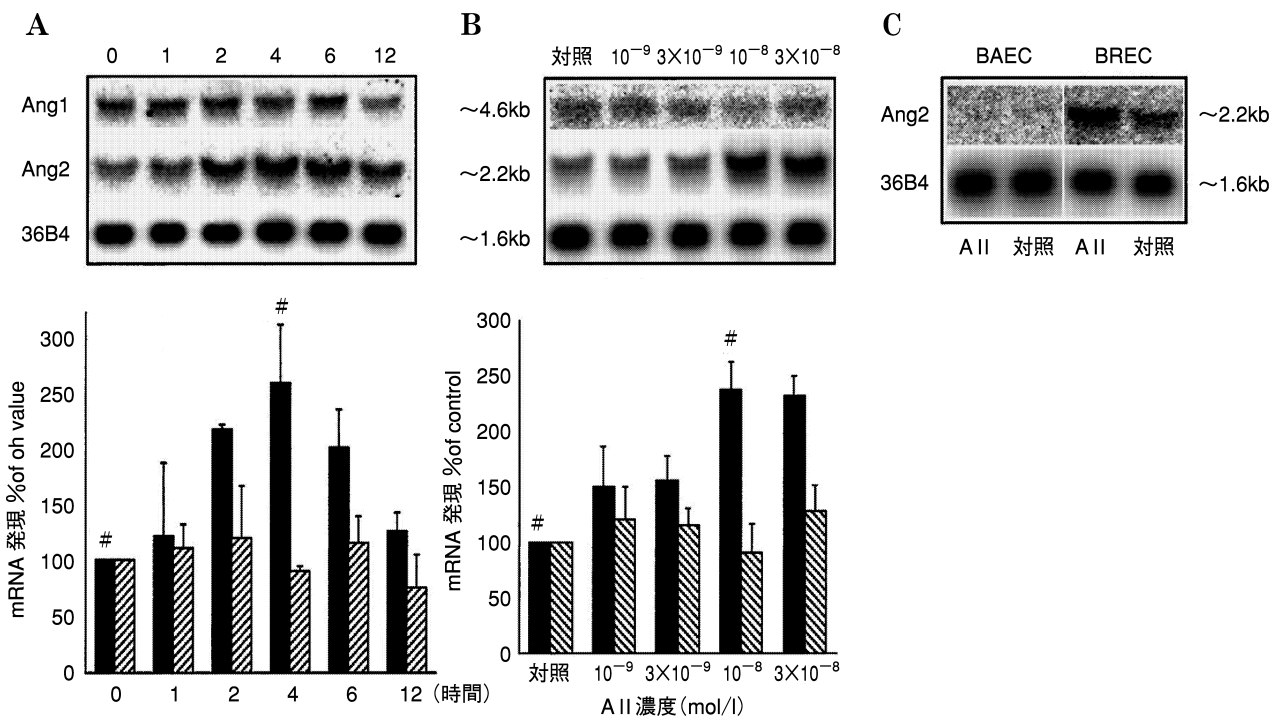


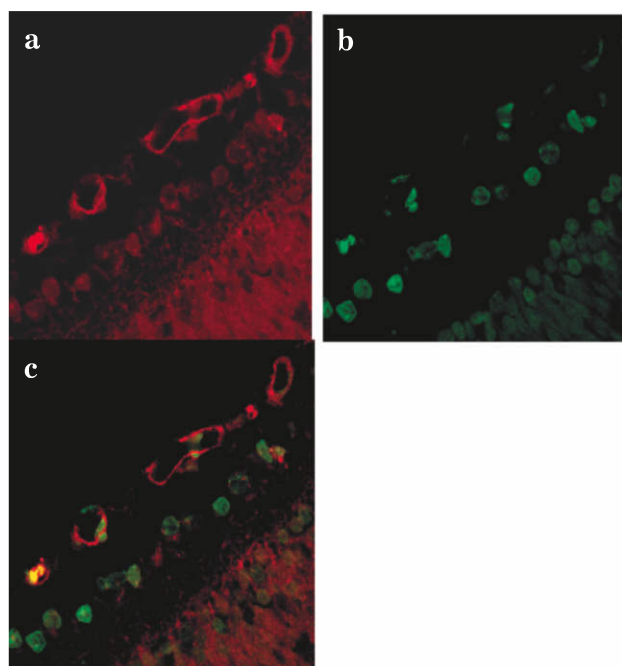
図 21 AIIの網膜血管内皮の Ang 発現への影響.

AII刺激後の網膜血管内皮細胞より mRNA を採取し Northern blot 解析にて Ang 1, Ang 2 の発現変化を検討した.

A, B: Ang 1 は発現誘導されないが, Ang 2 のみが時間依存性(A), 濃度依存性(B)に誘導された. ■: Ang 1, ■: Ang 2, #: $p < 0.01$. C: 大動脈内皮(BAEC)に比較して網膜内皮(BREC)において Ang 2 の誘導が強くみられた.

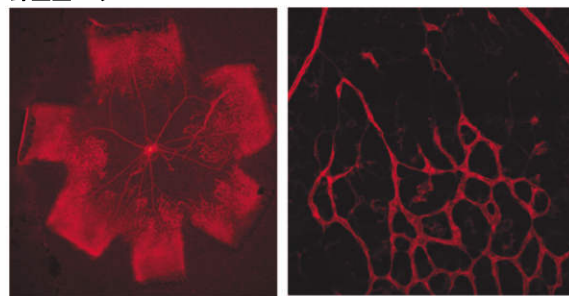
(文献 41 より許可を得て転載)

A



B

野生型マウス P12



ノックアウトマウス P12

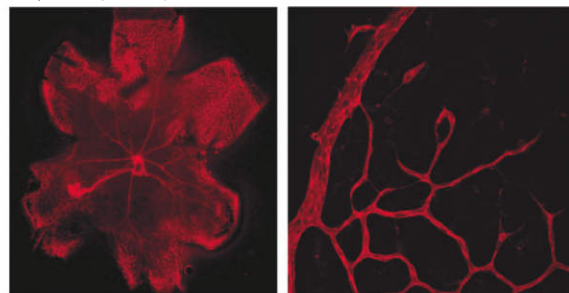


図 22 AIIの細胞生存因子としての作用.

A：マウスを生後7日目から11日目まで高酸素負荷することにより網膜血管細胞にアポトーシスが誘導され、血管脱落により無血管領域が形成される。内皮細胞 isolectin GS-B 4(a：赤)。アポトーシス細胞 *in situ* TUNEL reaction(b：緑)。アポトーシスになっている血管内皮細胞(c：黄)。

B：AT1 受容体のノックアウトマウスが野生型マウスに比較して、血管細胞の消失がより多くみられた。この結果より AT1 受容体は網膜血管内皮細胞において細胞生存因子として作用することが示唆された。(文献 42 より許可を得て転載)

新生に及ぼす AII の影響について検討した。AII を培養網膜血管細胞に付加すると濃度依存性に VEGF 依存性血管新生が促進され、AT1 受容体を介して、内皮細胞の VEGFR 2 の発現を増加させることがメカニズムとして示唆された³⁹⁾(図 19, 20)。また、網膜血管周皮細胞に AII を付加すると AT1 受容体を介して VEGF 分泌を促進した⁴⁰⁾。このように AII は網膜微小血管の VEGF paracrine 系を増強することにより、血管新生や血管透過性など VEGF による血管病変を増悪させることが見出された。また、AII は網膜内皮細胞においてアンジオポエチン系に対しても AT1 受容体を介して Ang 2 を選択的に誘導することが分かり、VEGF と協調的に作用して血管増殖や血管透過性亢進症状を増強すると考えられた⁴¹⁾(図 21)。このような作用はすべて AT1 受容体を介しており、AII の網膜症における作用に AT1 受容体の重要性が示唆される。

上記のような血管新生作用ばかりでなく、AII は網膜血管細胞の生存因子としての作用をもつことも我々の研究により見出された。マウスを高酸素負荷することにより網膜血管細胞をアポトーシスに誘導すると AT1 受容体のノックアウトマウスが野生型マウスに比較して、血管細胞の消失がより多くみられた(図 22)。さらに培養

細胞を用いた検討により AII が網膜血管内皮細胞において AT1 受容体、PI 3 キナーゼ、Akt 経路を介し、survivine という分子を活性化して細胞生存因子として働き、アポトーシスを抑制することが見出された⁴²⁾(図 23)。

上記のように AT1 受容体が網膜症の進行の鍵となる多様な作用を制御すると考えられるが、現在ヨーロッパを中心に AT1 受容体阻害剤である Candesartan の網膜症に及ぼす影響を検討する大規模臨床治験の DIRECT (The Diabetic Retinopathy Candesartan Trials) が進行中である⁴³⁾⁴⁴⁾。DIRECT では 1,700 人の網膜症のない Type 1 糖尿病患者、1,200 人の非増殖型網膜症をもつ Type 1 糖尿病患者、1,600 人の非増殖型網膜症をもつ Type 2 糖尿病患者が enroll され、3 年以上の長期にわたって Type 1 糖尿病患者における網膜症発症率と Type 1, 2 糖尿病患者における網膜症進行予防効果の判定が行われている。既に腎症には広く使用されており今後網膜症への応用が期待されることである。

2. 肥満と網膜血管新生

メタボリックシンドロームが提唱されているように、肥満を中心として、糖代謝異常、脂質代謝異常、および血圧調節異常などの危険因子が集簇することにより、冠

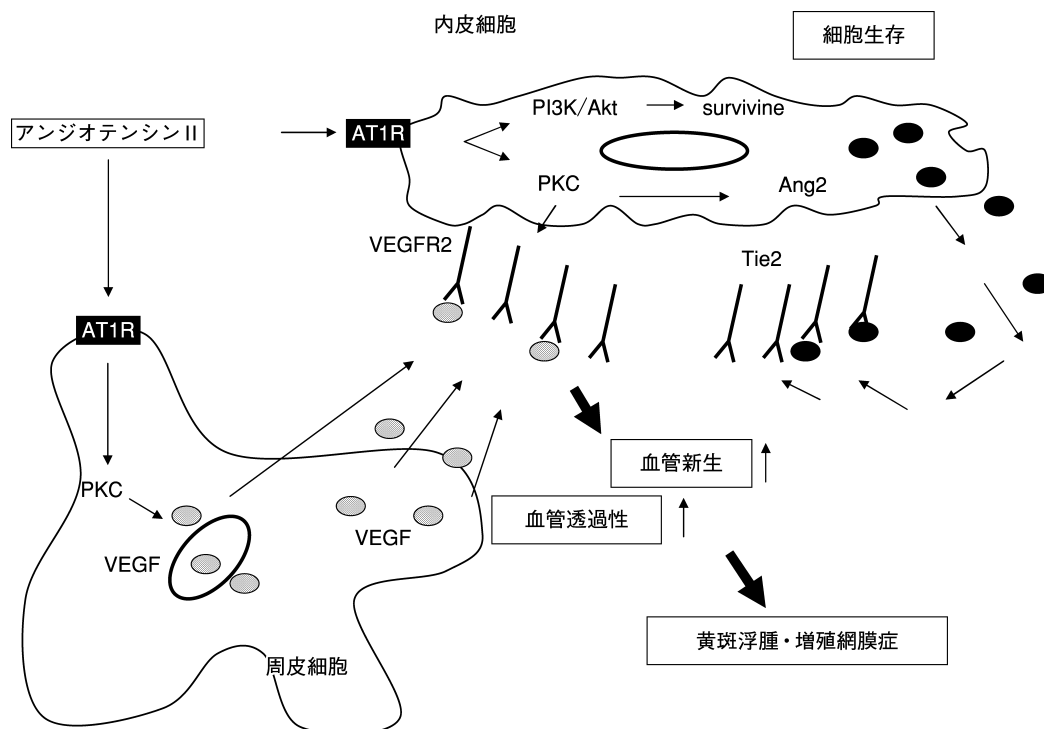


図 23 AIIの網膜血管障害への関与.

我々の研究により AII は網膜微小血管の VEGF paracrine 系および Ang 2 autocrine 系を増強することにより、血管新生や血管透過性など血管病変を増悪させることが見出された。これらの変化には AT 1 受容体 (AT1R) — PKC 経路を介していた。また、AT 1 受容体、PI 3 キナーゼ (PI3K)、Akt 経路を介し、survivine という分子を活性化して細胞生存因子としても働き、アポトーシスを抑制することが見出された^{39)~42)}。AT 1 受容体を介して血管病変を増悪させる可能性が示唆された。DIRECT (The Diabetic Retinopathy Candesartan Trials) などの大規模臨床試験の結果により今後 AT 1 受容体阻害薬の臨床応用が期待される。

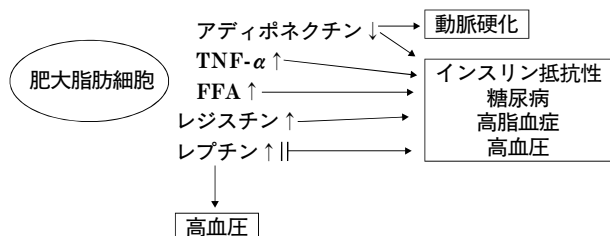


図 24 脂肪細胞と生活習慣病の分子メカニズム.

肥満では脂肪細胞より分泌されるアディポサイトカインの分泌異常を来し、インスリン抵抗性や動脈硬化病変など生活習慣病の原因となる。FFA: 遊離脂肪酸。

動脈疾患など血管障害の発症・進展が起りやすくなることが知られている。網膜血管障害との関連では、糖尿病網膜症の risk factor として高血糖以外に、高血圧、高脂血症、貧血、罹病期間、網膜症の stage などがよく知られているが、肥満とのかかわりはあまり明らかになっていない。肥満を基盤とする病態では、脂肪細胞より分泌されるアディポサイトカインと呼ばれる液性因子が主要な役割を果たしている。これらにはレプチン、アディポネクチン、TNF- α 、インターロイキン 6 (IL 6) などの因子があり、血流を介して多臓器への影響を及ぼ

している (図 24)。肥満では脂肪細胞からのレプチン分泌が下垂体のレプチン抵抗性のために上昇し、アディポネクチンは、皮下脂肪よりも内臓脂肪が増加すると分泌が低下するなどの分泌異常が惹起される。このような分泌異常はインスリン抵抗性を高め、耐糖能異常だけでなく、高血圧、高脂血症の原因ともなる。いずれの分子も網膜血管新生への影響は明らかになっていない。

レプチンは下垂体の受容体に作用して摂食促進するばかりではなく、高血圧の原因因子であり、動脈硬化症を促進することが知られている。さらに近年血管新生作用をもつことが明らかになってきた⁴⁵⁾⁴⁶⁾。肥満ではレプチン抵抗性のために血中でのレプチン濃度が上昇しているが、増殖糖尿病網膜症患者において非増殖糖尿病網膜症患者に比較して血清や硝子体レプチン濃度が上昇しているという報告や患者眼硝子体中の血管増殖膜にレプチン受容体が発現しているという報告がみられる⁴⁷⁾⁴⁸⁾。このような報告より増殖網膜症と高レプチン血症との関連が示唆されるがそのメカニズムは明らかになっていない。我々はレプチンの網膜血管新生への影響を検討した。マウス虚血網膜モデルを作製するとレプチン発現マウス > wild type > ob/ob マウス (レプチン変異マウス) の順に網膜血管新生が起り (図 25)、網膜血管細胞における

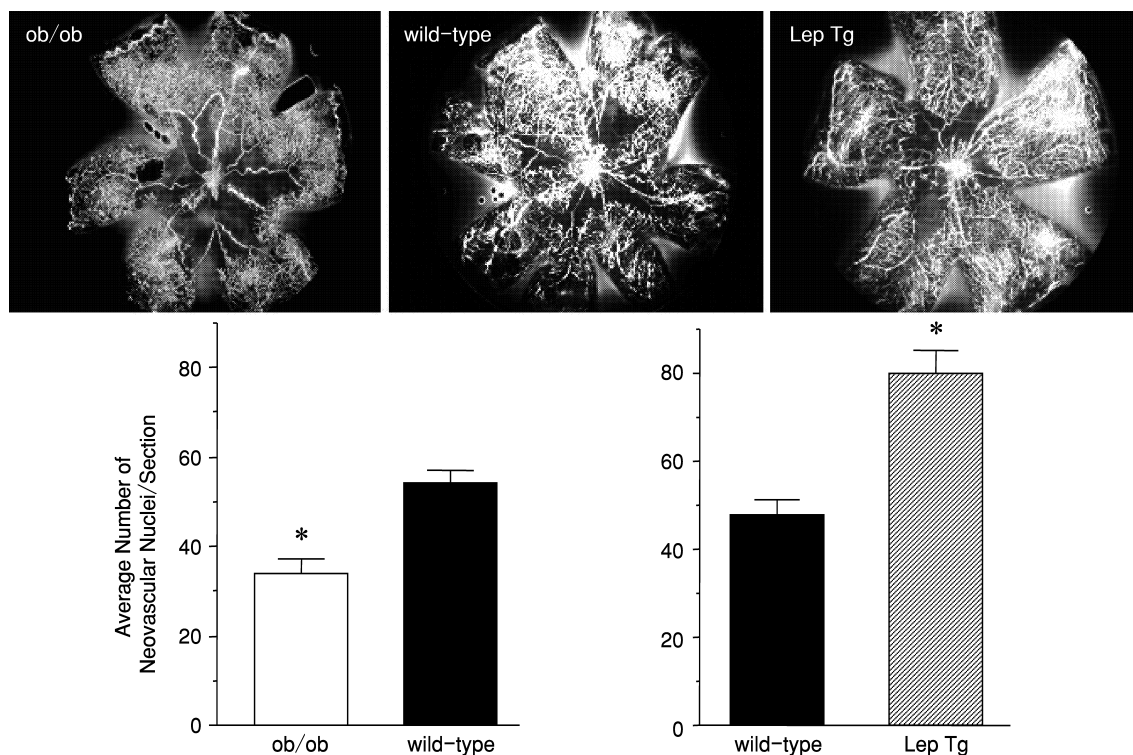


図 25 網膜血管新生へのレプチンの影響。

高酸素負荷虚血性網膜モデルを作製するとレプチン発現マウス (Lep Tg) > wild type > ob/ob マウス (レプチン変異マウス) の順に網膜血管新生が強く観察された。* : $p < 0.01$, $n = 9 \sim 10$.

(文献 49 より許可を得て転載)

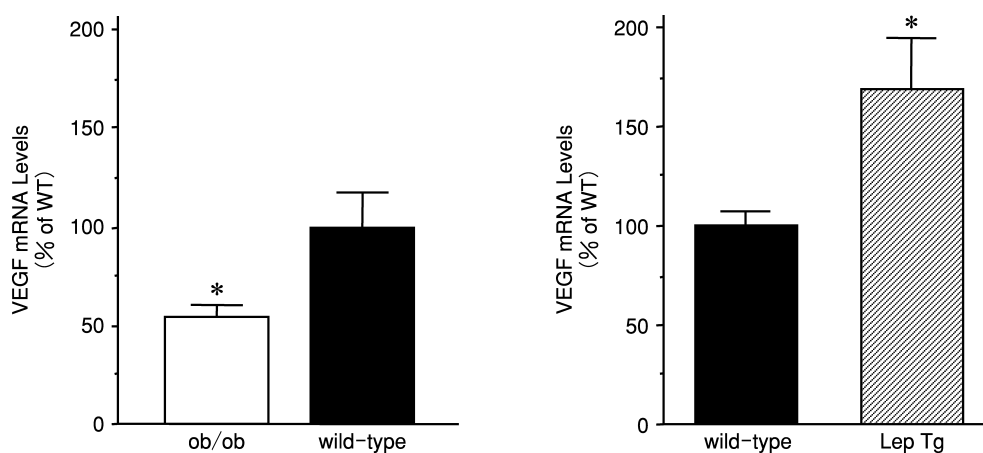


図 26 虚血網膜における VEGF 発現誘導へのレプチンの影響。

高酸素負荷虚血性網膜モデルを作製し、網膜内 VEGF mRNA 量を Real-time PCR (polymerase chain reaction) にて定量した (生後 17 日目)。レプチン発現マウス (Lep Tg) > wild type > ob/ob マウス (レプチン変異マウス) の順に網膜内 VEGF mRNA が誘導された。* : $p < 0.01$ vs. each wild-type, $n = 6$.

(文献 49 より許可を得て転載)

VEGF 発現レベルも同じ順でみられた (図 26)。レプチン刺激により培養網膜血管内皮細胞では VEGF の発現増加がみられ、細胞内の JAK-STAT 経路を介していた⁴⁹⁾ (図 27)。このような結果より高レプチン血症では VEGF の発現増加を介して網膜血管新生が促進されるメカニズムがあることが分かった。

一方、アディポネクチンは $\text{TNF-}\alpha$ や高脂血症負荷に

よる動脈硬化病変を抑制し、インスリン抵抗性を改善する作用をもつ。肥満、特に内臓肥満によりアディポネクチンは血中レベルが低下する。糖尿病網膜症患者では網膜症のない患者に比較して血中レベルが低下しているとする報告と逆に増加しているとする報告がある。血管新生への関与も、血管新生促進的に作用するとする報告とそうでないとする報告がある⁵⁰⁾⁵¹⁾。網膜血管新生への関

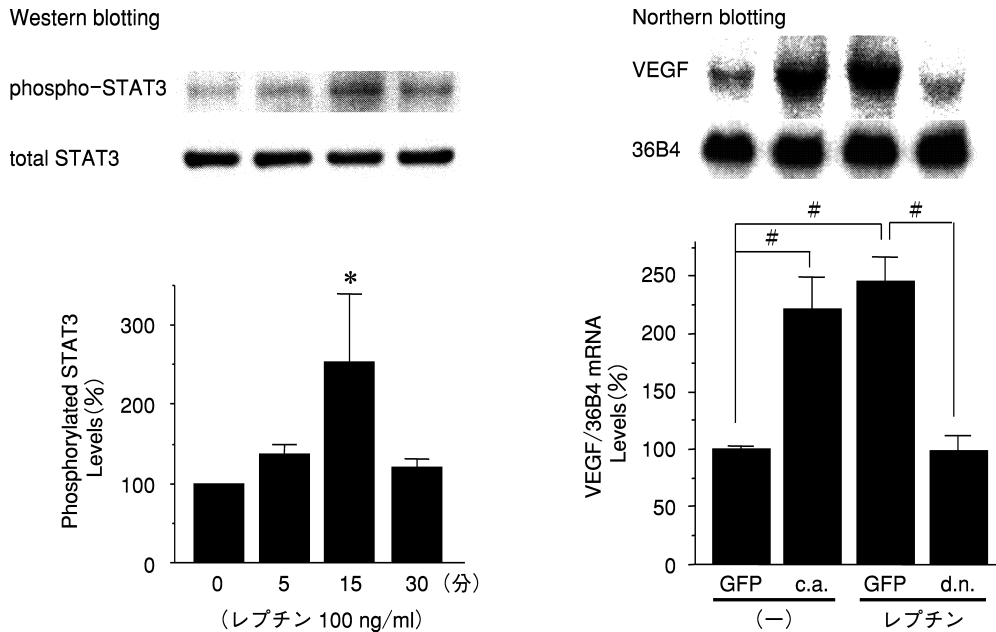


図 27 レプチンは VEGF を JAK-STAT 経路を介して誘導する。

培養網膜血管内皮をレプチンで刺激するとリン酸化 STAT3 が誘導された。また、dominant negative STAT3 遺伝子の導入により VEGF 誘導は抑制された。* : $p < 0.05$, $n = 3$, GFP : 対照, c. a. : constitutive-active STAT3, d. n. : dominant negative STAT3, # : $p < 0.01$, $n = 6$ 。

(文献 49 より許可を得て転載)

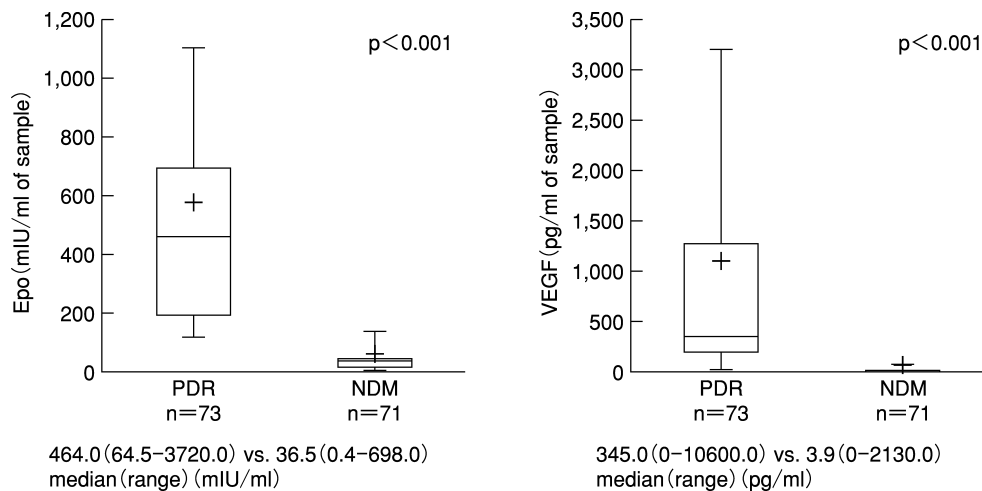


図 28 糖尿病患者硝子体液におけるエリスロポエチン (Epo) ・ VEGF 濃度。

増殖糖尿病網膜症 (PDR) 患者では VEGF と同様に Epo の濃度が非糖尿病 (NDM) 患者に比較して著しく増加している。

(文献 54 より許可を得て転載)

与は明らかになっておらず、我々はアディポネクチンノックアウトマウスを用いて検討した。ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して高酸素負荷虚血性網膜モデルにおける血管新生が抑制されていた。この結果より網膜ではアディポネクチンは血管新生を促進する作用をもつことが示唆された。

肥満を伴う糖尿病網膜症などの虚血性眼科疾患ではレプチンやアディポネクチンなどアディポサイトカインの影響が網膜血管新生に及ぶことを考慮して加療を行う必要性という新たな概念が示唆された。

VIII 増殖型糖尿病網膜症における眼内血管新生とエリスロポエチン

最後に最近我々が見出した新たな網膜血管新生を制御する分子について述べたい。我々の研究を含め多数の報告により VEGF や Ang 2 など多様な血管新生因子が網膜血管新生に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。しかし、その阻害実験を行っても網膜血管新生が完全に抑制される分子の報告はなく、従来報告されていない新規の因子の関与が示唆され、その検索を

表 3 多変量解析の結果 Epo は VEGF と独立して VEGF よりも増殖糖尿病網膜症であることへの相関が高かった

Model	OR*	95% CI †	p Value
Univariate logistic regression			
Epo	49.78	14.76-167.89	<0.001
VEGF	13.04	6.22- 27.35	<0.001
Multivariate logistic regression (4 covariates)			
Epo	27.51	5.95-127.12	<0.001
VEGF	4.51	1.88- 10.82	0.001
年齢(歳)	1.03	0.97- 1.09	0.39
性別(男性)	0.77	0.16- 3.69	0.74
Multivariate logistic regression (2 covariates)			
Epo	22.46	5.80- 87.01	<0.001
VEGF	4.24	1.84- 9.76	0.001

*OR : Odds ratio. For Epo and VEGF, OR pertains to a 1 SD increase in log-transformed scale with base 10.

†CI : Confidence interval for OR.

(文献 54 より許可を得て転載)

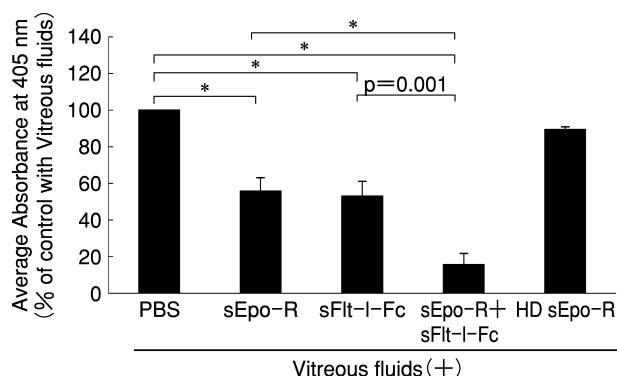


図 29 糖尿病患者硝子体液の血管内皮増殖促進活性。増殖糖尿病患者の硝子体液の添付により網膜血管内皮の増殖能が促進された。また、その促進活性は可溶性 Epo 受容体、可溶性 VEGF 受容体により同等に抑制され、両因子の阻害により相加的に抑制された。

* : $p < 0.001$.

PBS : 生理食塩水(対照), HD sEpo-R : 熱処理可溶性 Epo 受容体 (文献 54 より許可を得て転載)

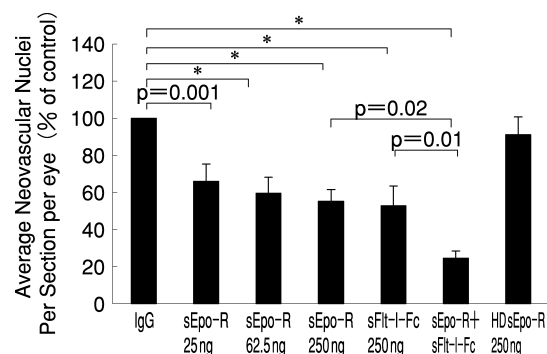


図 30 マウス虚血網膜モデルにおける血管新生における Epo の役割。

高酸素負荷マウス虚血網膜モデルを作製し、血管新生を定量的に評価した。可溶性 Epo 受容体、可溶性 VEGF 受容体により同等に抑制され、両因子の阻害により相加的に抑制された。* : $p < 0.001$.

(文献 54 より許可を得て転載)

行ってきた。我々は VEGF と同様に低酸素下で HIF-1 (hypoxia-inducible factor) による転写調節や mRNA の安定性の増強により誘導されるエリスロポエチン (Epo) に着目した。Epo は造血作用だけでなく血管新生作用を有することが近年明らかとなっており⁵²⁾⁵³⁾, 増殖糖尿病網膜症での血管新生への関与を臨床的に検討した。具体的には増殖糖尿病網膜症 (PDR) 患者の硝子体中の Epo と VEGF 濃度と、それらの生物学的活性を測定し、血管増殖因子としての重要性を比較検討した。対象は PDR 群 73 例、非糖尿病対照 (NDM) 群 71 例で、Epo (中間値) は PDR 群で 464 mIU/ml, NMD 群で 36.5 mIU/ml であり、PDR 群で著しく上昇していた (図 28)。硝子体中 Epo 濃度は血清濃度に比較して非常に高濃度であり、相関がみられないことより、眼局所で

虚血により Epo が産生されていることが示唆された。多変量解析により、Epo は VEGF とは独立した因子で、増殖 PDR との相関が VEGF よりも強いことが示唆された (表 3)。さらに PDR 患者の硝子体液に血管内皮細胞の増殖活性がみられたが、Epo 阻害は、VEGF 阻害と同等の血管細胞増殖を抑制する効果が確認された (図 29)。また、両因子を阻害すると相加的に血管細胞増殖が抑制され、同様の結果はマウス虚血網膜モデルに惹起される血管新生に対しても確認された⁵⁴⁾ (図 30)。今後さらに詳細な検討を要するが、VEGF と同等かそれ以上の重要因子である可能性が示唆され、治療や診断への新たな展開が期待されるところである。

IX 今後の展望

上記のように多様な分子病態が明らかになりつつあるが、実際の臨床に最も近いところでは、種々の VEGF

阻害剤が臨床応用されるところまできている。VEGF₁₆₅に選択的に吸着するMacugen® (EYE 001)や、ヒトリコンビナント VEGF 抗体のLucentis®などが黄斑変性や黄斑浮腫に対して臨床治験が行われている。また、抗癌治療薬として全身投与されるヒトモノクローナル抗体であるAvastin®が、当初は分子量が大きく網膜内への到達が困難と考えられていたが、硝子体投与により、網膜血管にも到達し眼内血管新生や黄斑浮腫を劇的に抑制することが最近報告され⁵⁵⁾、大きなトピックとなっている。我々も新たな VEGF 阻害治療の可能性についての検討も行ってきた。生体内の分子で VEGF を強力に抑制する可能性のある ephrin/EPH system が虚血性血管新生や VEGF による血管透過性亢進異常を改善することを見出した⁵⁶⁾。また、VEGF は神経細胞の生存因子としても重要であるため、従来型の VEGF 阻害治療では長期経過では副作用も危惧される。我々はより血管新生に特異的な治療法を行う手段として、血管新生に特異的な蛋白質の合成に関与する転写因子として Ets 1 に着目した。Ets 1 の抑制治療により効果的に Ang 2 や NRP 1 の発現が抑制され血管新生阻害治療が動物モデルにおいて可能であった⁵⁷⁾。今後、より血管新生や血管透過性など血管障害に特異的な VEGF 阻害治療が検討されるべきであろう。

もともと VEGF 阻害剤ではないが、高血糖による代謝異常として起こるプロテインキナーゼ C β (PKC β) の活性化を阻害する PKC β 阻害薬 (LY333531)⁵⁸⁾ が注目されている。我々は VEGFR2 受容体の細胞内シグナル伝達において血管増殖や血管透過性亢進作用には PKC β を介するシグナル伝達が主要経路となっていること、LY333531 により効果的に抑制できることを報告した⁵⁹⁾。高血糖による代謝障害のみでなく VEGF 作用を抑制することより非常に有効な治療法として臨床応用が期待されている。欧米で行われた大規模臨床治験ではレーザー治療を遅らせ網膜症の視力予後を改善することが示された⁶⁰⁾。本邦では網膜厚を指標とした黄斑浮腫に特化した臨床治験が進行中であり、一般臨床使用が間近であろう。また、臨床応用の可能性の高い他の薬剤として、DIRECT により正常血圧の糖尿病患者への AT 1 アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) の大規模臨床試験が行われている。有効性の有無が近く公表されるであろう。ARB は腎症において既に臨床使用されており、眼科領域においても日常的に使用される薬剤となる可能性がある。このように VEGF という単独の分子標的への治療法が臨床的に有効であることが示されつつあり、今後我々の見出したエリスロポエチンを含め、新たな分子標的への治療の可能性も期待されるところである。今後のさらなる病態解明・治療法開発により新しい治療薬の開発を期待したい。

宿題報告の機会を賜りました日本眼科学会評議員の諸先生、座長の労をおとりいただきました澤 充先生、本研究をご支援いただきました京都大学眼科同窓会、製薬会社、共同研究者の先生方に心より感謝申し上げます。また、多くの先生にご助言・励ましのお言葉を頂戴いたしました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 中江公裕, 小暮文雄, 長屋幸郎, 三島清一: 厚生省の指標 38: 13—22, 1991.
- 2) 厚生労働省難治性疾患克服研究事業「網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究」平成 17 年度報告.
- 3) Joslin EP, Kahn CR, Weir GC: Joslin's Diabetes Mellitus, 13th ed, LEA & FEBIGER, Pennsylvania, 631, 1994.
- 4) Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, et al: Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res* 99: 156—164, 2006.
- 5) Artandi SE: Telomeres, telomerase, and human disease. *N Engl J Med* 355: 1195—1197, 2006.
- 6) Murakami T, Takagi H, Suzuma K, Suzuma I, Ohashi H, Watanabe D, et al: Angiopoietin-1 attenuates H₂O₂-induced SEK1/JNK phosphorylation through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 280: 31841—31849, 2005.
- 7) Suzuma I, Suzuma K, Ueki K, Hata Y, Feener EP, King GL, et al: Stretch-induced retinal vascular endothelial growth factor expression is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C (PKC)-zeta but not by stretch-induced ERK 1/2, Akt, Ras, or classical/novel PKC pathways. *J Biol Chem* 277: 1047—1057, 2002.
- 8) Suzuma I, Hata Y, Clermont A, Pokras F, Rook SL, Suzuma K, et al: Cyclic stretch and hypertension induce retinal expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2: potential mechanisms for exacerbation of diabetic retinopathy by hypertension. *Diabetes* 50: 444—454, 2001.
- 9) Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA: An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4544—4548, 1989.
- 10) Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, Fujiwara T, Koyama S, Takagi H, et al: Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J Clin Invest* 110: 1619—1628, 2002.
- 11) Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671, 1997.
- 12) 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.
- 13) **Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, et al** : Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6 : 460—463, 2000.
 - 14) **Michelson IC** : The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders. *Trans Ophthalmol Soc UK* 68 : 137—180, 1948.
 - 15) **Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N** : Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246 : 1306—1309, 1989.
 - 16) **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.
 - 17) **Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, et al** : Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 145 : 574—584, 1994.
 - 18) **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.
 - 19) **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.
 - 20) **Suzuma K, Takagi H, Otani A, Suzuma I, Honda Y** : Increased expression of KDR/Flk-1 (VEGFR-2) in murine model of ischemia-induced retinal neovascularization. *Microvasc Res* 56 : 183—191, 1998.
 - 21) **Takagi H, King GL, Ferrara N, Aiello LP** : Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor *KDR/Flk* gene expression through adenosine A_2 receptors in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1311—1321, 1996.
 - 22) **Suzuma K, Takagi H, Otani A, Honda Y** : Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 1028—1035, 1998.
 - 23) **Suzuma K, Takagi H, Otani A, Oh H, Honda Y** : Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization. *Am J Pathol* 154 : 343—354, 1999.
 - 24) **Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y** : Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively upregulate angiopoietin 2 in bovine retinal microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 274 : 15732—15739, 1999.
 - 25) **Takagi H, Koyama S, Seike H, Oh H, Otani A, Matsumura M, et al** : Potential role of the angiopoietin/Tie2 system in ischemia-induced retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 393—402, 2003.
 - 26) **Thieme H, Aiello LP, Takagi H, Ferrara N, King GL** : Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptors on retinal and aortic vascular endothelial cells. *Diabetes* 44 : 98—103, 1995.
 - 27) **Takagi H, King GL, Aiello LP** : Identification and characterization of vascular endothelial growth factor receptor (Flt) in bovine retinal pericytes. *Diabetes* 45 : 1016—1023, 1996.
 - 28) **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.
 - 29) **Oh H, Takagi H, Otani A, Koyama S, Kenmochi S, Uemura A, et al** : Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF) : A novel mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 383—388, 2002.
 - 30) **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.
 - 31) **Franken AA, Derckx FH, Schalekamp MA, Man in t'Veld AJ, Hop WC, van Rens EH, et al** : Association of high plasma prorenin with diabetic retinopathy. *J Hypertens Suppl* 6 : S461—463, 1988.
 - 32) **Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y, Hori S** : Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 86 : 311—315, 2002.
 - 33) **Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T, Nakanishi Y, Kitano S, Hori S** : Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema and other retinal disorders. *Am J Ophthalmol* 133 : 537—543, 2002.
 - 34) **Chaturvedi N, Sjolie AK, Stephenson JM, Abrahamian H, Keipes M, Castellarin A, et al** : Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet* 351 : 23—31, 1998.
 - 35) **UK Prospective Diabetes Study Group** : Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes : UKPDS 38. *BMJ* 317 : 703—713, 1998.
 - 36) **UK Prospective Diabetes Study Group** : Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of

- macrovascular complications in type 2 diabetes : UKPDS 39. *BMJ* 317 : 713—720, 1998.
- 37) **Moravski CJ, Skinner SL, Stubbs AJ, Sarlos S, Kelly DJ, Cooper ME, et al :** The rennin-angiotensin system influences ocular endothelial cell proliferation in diabetes : transgenic and interventional studies. *Am J Pathol* 162 : 151—160, 2003.
 - 38) **Mori F, Hikichi T, Nagaoka T, Takahashi J, Kitaya N, Yoshida A :** Inhibitory effect of losartan, an AT 1 angiotensin II receptor antagonist, on microcirculation of diabetic rats. *Br J Ophthalmol* 86 : 1172—2274, 2002.
 - 39) **Otani A, Takagi H, Suzuma K, Honda Y :** Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res* 82 : 619—628, 1998.
 - 40) **Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Suzuma K, Matsumura M, et al :** Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1192—1199, 2000.
 - 41) **Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Honda Y :** Angiotensin-II induces expression of the Tie 2 receptor ligand, angiopoietin-2, in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes* 50 : 867—875, 2001.
 - 42) **Ohashi H, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Suzuma I, Miyamoto N, et al :** Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-Induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 Activity. *Circ Res* 94 : 785—793, 2004.
 - 43) **Nagisa Y, Shintani A, Nakagawa S :** The angiotensin II receptor antagonist candesartan cilexetil(TCV-116) ameliorates retinal disorders in rats. *Diabetologia* 44, 883—888, 2001.
 - 44) **Chaturvedi N, Sjoelie AK, Svensson A :** DIRECT Programme Study Group The Diabetic Retinopathy Candesartan Tials(DIRECT) Programme, rationale and study design. *J Renin Angiotensin Alsterone Syst* 3 : 255—261, 2002.
 - 45) **Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R :** Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83 : 1059—1066, 1998.
 - 46) **Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, et al :** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281 : 1683—1686, 1998.
 - 47) **Uckaya G, Ozata M, Bayraktar Z, Erten V, Bingol N, Ozdemir IC :** Is leptin associated with diabetic retinopathy? *Diabetes Care* 23 : 371—376, 2000.
 - 48) **Gariano RF, Nath AK, D'Amico DJ, Lee T, Sierra-Honigmann MR :** Elevation of vitreous leptin in diabetic retinopathy and retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3576—3581, 2000.
 - 49) **Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, et al :** Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization : possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes* 53 : 2443—2448, 2004.
 - 50) **Yilmaz MI, Sonmez A, Acikel C, Celik T, Bingol N, Pinar M, et al :** Adiponectin may play a part in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol* 151 : 135—40, 2004.
 - 51) **Hadjadj S, Aubert R, Fumeron F, Pean F, Tichet J, Roussel R, et al :** SURGENE Study Group ; DESIR Study Group. Increased plasma adiponectin concentrations are associated with microangiopathy in type 1 diabetic subjects. *Diabetologia* 48 : 1088—1092, 2005.
 - 52) **Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, et al :** Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization *in vivo*. *Blood* 93 : 2627—2636, 1999.
 - 53) **Morita M, Ohneda O, Yamashita T, Takahashi S, Suzuki N, Nakajima O, et al :** HLF/HIF-2 alpha is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J* 22 : 1134—1146, 2003.
 - 54) **Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, et al :** Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 353 : 782—792, 2005.
 - 55) **Spaide RF, Fisher YL :** Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina* 26 : 275—278, 2006.
 - 56) **Ojima T, Murakami T, Takagi H, Suzuma K, Oh H, Suzuma I, et al :** EphrinA 1 inhibits vascular endothelial growth factor-induced intracellular signaling and suppresses retinal neovascularization and blood-retinal barrier breakdown. *Am J Pathol* 168 : 331—339, 2006.
 - 57) **Watanabe D, Takagi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Ohashi H, et al :** Transcription factor Ets-1 mediates ischemia-and VEGF-dependent retinal neovascularization. *Am J Pathol* 164 : 1827—1835, 2004.
 - 58) **Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, et al :** Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272 : 728—731, 1996.
 - 59) **Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, et al :** Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms and endothelial cell growth. *J Clin Invest* 98 : 2018—2026, 1996.
 - 60) **PKC-DRS 2 Group :** Effect of ruboxistaurin on visual loss in patients with diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 113 : 2221—2230, 2006.

Comment：三宅 養三

第 110 回日本眼科学会総会の宿題報告は「眼と加齢」という主題で行われたが，その中で高木均先生は「加齢と網膜血管障害」という題で講演された．今回の報告は，加齢や糖尿病に起因する網膜血管障害を生物学的手法によりその分子病態を包括的に解明し，それを新規治療に結びつけようとするものである．

高木先生は 1993 年に京都大学眼科から糖尿病研究のメッカである Harvard 大学 Joslin Diabetes Center へ留学され，King, Aiello といったまさに糖尿病網膜症治療の革命を起こした人たちとの血管内皮増殖因子 (VEGF) に関する一連の研究が，今回の宿題報告の出発点となっている．その後の研究の積み重ねが今回の宿題報告であったが，講演を聴いて先生の学問の一貫した流れを感じた人は多かったと思う．

今回の報告では，培養網膜血管細胞を用いた酸化ストレスのアポトーシスの惹起機序の研究や，糖尿病網膜症に酷似した網膜浮腫や血管病変が周皮細胞の増殖抑制により作製される網膜血管変性動物モデルの見事な結果が示された．この動物モデルで，周皮細胞より分泌されるアンジオポエチン 1 (Ang 1) が抑制効果をもち，これが分泌されなくなった周皮細胞変性モデルに Ang 1 を補充することにより正常化するという驚くべき結果を示された．

さらに網膜血管新生，網膜血管透過性亢進に対して膜分子である ephrin/Eph の刺激，エリスロポエチンと VEGF との同時阻害，アンジオテンシン受容体阻害薬がその抑制に効果的に働くことを明らかにされた．これらの貴重な成果は，先生の一貫した研究テーマである網膜血管障害治療のチャレンジングな研究姿勢を強くその根底に感じさせ，糖尿病網膜症のみならず加齢性網膜血管障害に対する多くの薬物治療の新しい方向が示されたといえる．

今回私は，高木先生の宿題報告に対するコメントを日本眼科学会雑誌から依頼されたが，すべての宿題報告の真の評価は 10 年後になされるというのが私の考えである．10 年後に高木先生がご自分の宿題報告をもう一度振り返ってみられ，今回示された新しい研究が臨床的にどの程度の発展をとげたかを自己評価され，その成果に満足されることをお祈りするとともに，私自身も大いにそれを期待するものである．