

---

 総 説
 

---

## 加齢黄斑変性の新しい治療法

加地 秀, 石川 浩平, 寺崎 浩子

名古屋大学医学部眼科学教室

## 要 約

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration : AMD) は高齢者の社会的失明の原因として重要である。AMD は萎縮型と滲出型に分類されるが、そのうちの滲出型 AMD に近年新しい治療法が導入され、効果を上げている。これらは大きく二つに分けることができる。一つは血管新生のプロセスにかかわる分子を標的とすることによって新生血管の発生を抑えるものであり、これには抗血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) 療法が含まれる。もう一つはそれ以外の方法により脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization : CNV) を直接的に除去あるいは傷害するもので

あり、これには光線力学的療法が含まれる。なかでも ranibizumab の登場により治療による視力の改善が可能となったが、反復投与が必要であるという点が問題であり、持続的な因子の発現を目的とした遺伝子治療もアメリカでは治験が開始されている。本稿ではこれらの治療法を取り上げ、また CNV 発症のメカニズムについて論ずるとともに将来的に有望たりうる治療法についても述べる。(日眼会誌 113 : 479—491, 2009)

キーワード : 加齢黄斑変性, 光線力学療法, 抗 VEGF 療法, 遺伝子治療, 血管新生

---

 A Review
 

---

## New Therapies for Age-related Macular Degeneration

Shu Kachi, Kohei Ishikawa and Hiroko Terasaki

Department of Ophthalmology, Nagoya University School of Medicine

## Abstract

Age-related macular degeneration (AMD) is a major cause of blindness in the elderly in developed countries. New treatments have been developed, and they can be grouped into those that selectively disrupt new vessels, e. g., photodynamic therapy ; and those that target molecules that play an important role in angiogenesis, e. g., anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs. Ranibizumab, the anti-VEGF-drug, was the first drug that led to an improvement of visual acuity. However, a disadvantage of this drug is the need of repeated injection, and to overcome this

disadvantage, gene therapy and some other methods are being studied. A clinical trial of gene therapy is being performed in the USA. In this review, we describe the new therapies for AMD.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113 : 479—491, 2009)

Key words : Age-related macular degeneration, Photodynamic therapy, Anti-VEGF therapy, Gene therapy, Angiogenesis

## I はじめに

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration : AMD) は高齢者の社会的失明の原因として重要である。欧米では以前より社会的失明の原因の第一位であり、日

本においてもライフスタイルの欧米化に伴ってその順位を上げている。これは萎縮型と滲出型に分類されるが、滲出型 AMD (以下では特別に記載がない限り AMD は滲出型 AMD を意味する) に対してはこれまでに放射線、レーザー、そして新生血管の抜去や黄斑移動術など

---

 別刷請求先 : 466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65 番地 名古屋大学医学部眼科学教室 加地 秀

(平成 20 年 7 月 5 日受付, 平成 20 年 10 月 21 日改訂受理) E-mail : kachishu-ngy@umin.ac.jp

Reprint requests to : Shu Kachi, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya University School of Medicine. 65 Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

(Received July 5, 2008 and accepted in revised form October 21, 2008)

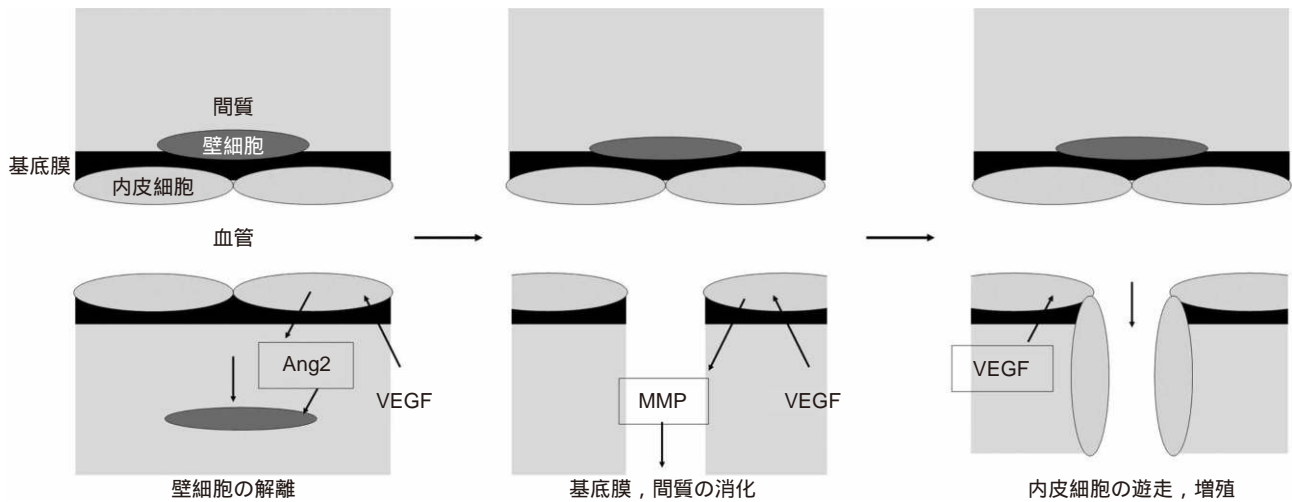


図 1 血管新生(angiogenesis).

血管新生とは①血管からの壁細胞の解離, ②細胞外マトリックスの消化, そして③内皮細胞の遊走, 増殖により, 既存の血管から新生血管が生じるプロセスであり, ①には angiopoietin 2(Ang 2)が, ②には matrix metalloproteinase(MMP)が, ③には vascular endothelial growth factor(VEGF)が主に参与している。Ang 2, MMP の発現にも VEGF が参与している。

の手術療法など, さまざまな治療法が試みられてきた。その AMD に近年新しい治療法が導入され, 効果を上げている。そのキーワードは外科的治療から内科的治療へ, そして標的療法である。

AMD の本態は脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization: CNV)であり, 血管新生により発症するが, AMD の治療の方法は血管新生のプロセスを研究し, その行程にかかわる分子を標的とすることによって新生血管の発生を抑える抗血管新生療法と, それ以外の方法に大別できる。前者には bevacizumab, ranibizumab, pegaptanib による抗血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)療法が含まれ, 後者にはレーザーや手術など従来行われてきた治療法や光線力学療法(photodynamic therapy: PDT), あるいは vascular disrupting agent による薬物治療が含まれる。

本稿では現在行われている治療法として新生血管に対する選択的レーザー治療である PDT, 薬物の局所投与による治療法として副腎皮質ステロイド薬局所投与と抗 VEGF 療法とを取り上げ, また CNV 発症のメカニズムについて論ずるとともに将来的に有望たりうる治療法についても述べる。

## II 血管新生と治療の標的

血管新生(angiogenesis)とは, 血管からの壁細胞の解離, 細胞外マトリックスの消化, そして内皮細胞の遊走, 増殖により, 既存の血管から新生血管が生じるプロセスである(図 1)。これらのプロセスには多くの因子が参与しているが, 壁細胞の解離という部分には angiopoietin という蛋白質が主に参与している<sup>1)~4)</sup>。通常の状態では壁細胞から分泌される angiopoietin 1 が内皮細胞

にあるレセプター型のチロシンキナーゼである Tie 2 レセプターと結合し, この Tie 2 レセプターを活性化させている。これは内皮細胞の細胞死を抑制するとともに, 細胞間接着を維持するように働き, そのため内皮細胞と壁細胞が接着した状態が維持される。しかしながら, 低酸素状態, あるいは VEGF による刺激が加わった状態では, 内皮細胞から angiopoietin 2 が分泌され, angiopoietin 2 は angiopoietin 1 と競合して Tie 2 レセプターに結合し, その活性を抑制する。そのため壁細胞が解離し, 血管は不安定化する。続いて VEGF の刺激により内皮細胞から分泌されたマトリックス分解酵素(matrix metalloproteinase: MMP)による細胞外マトリックスの消化が行われる。これ自体血管新生には必要であるが, それと同時に細胞外器質に補足されていた血管新生促進因子の放出<sup>5)</sup>, 血管新生促進因子の活性化も血管新生に関与していると考えられている<sup>6)</sup>。ただし, MMP によるコラーゲンなどの限定分解によって endostatin など, 血管新生を抑制する物質も産生される<sup>7)~9)</sup>。それに続いて VEGF による内皮細胞の遊走, 増殖, 管腔形成というプロセスが起こり, 最後に angiopoietin 1 が Tie 2 レセプターと結合し, 血管の成熟が起こると考えられている。これらのプロセスにかかわる分子はすべて抗血管新生療法の標的となりうるが, 実際, 動物実験レベルではこれらさまざまな蛋白質の阻害によって CNV の発生が抑制されることが報告されている<sup>10)~13)</sup>。

### 1. 抗 VEGF 療法

血管新生のプロセスにかかわる蛋白質の中でも最も重要な働きをしているのが VEGF である。VEGF は 1989 年に血管内皮細胞を分裂させる因子として発見された<sup>14)</sup>が, これは 1983 年に血管透過性を亢進させる因子とし

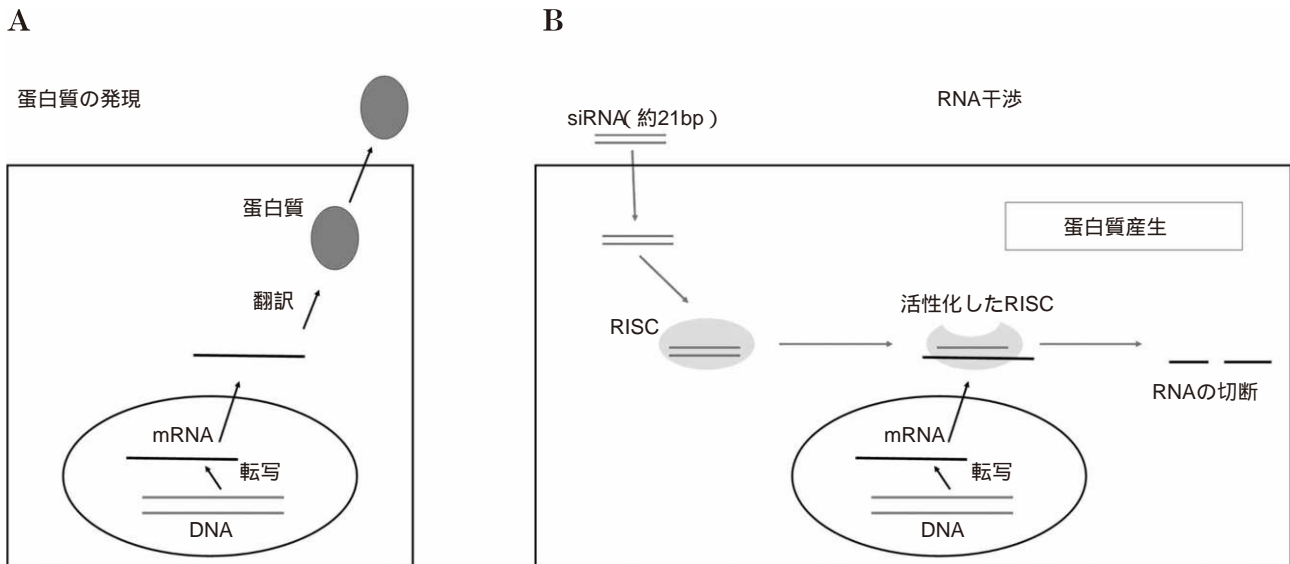


図 2 Small interfering RNA (siRNA) と RNA 干渉 (RNAi).

- A : 蛋白質が産生されるには、ある遺伝子から転写によりメッセンジャー RNA (mRNA) がつくられ、核外にでた mRNA をもとに翻訳により小胞体で蛋白質が産生されるというプロセスが必要である。
- B : siRNA は対象となる mRNA と相補的な配列をもった約 21 塩基対の二本鎖 RNA であり、これを細胞内に導入することにより、siRNA は RNA-induced silencing complex (RISC) を構成している蛋白質とともに、RISC に取り込まれ、取り込まれた二本鎖 siRNA はほどけて一本鎖になる。一本鎖となった siRNA は対象となる mRNA と結合し、活性化した RISC が mRNA を切断し、その結果 mRNA は分解され、蛋白質の発現は抑制される。この現象を RNA 干渉という。

て発見されていた vascular permeability factor (VPF)<sup>15)</sup> と同じ蛋白質であることが後の研究で見出された。VEGF ファミリーには VEGF-A から E, placenta growth factor (PlGF) が含まれ、レセプター型チロシンキナーゼである VEGF レセプター (VEGFR) 1 から 3 といったレセプターと結合する<sup>16)</sup>。内皮細胞には VEGFR-1 と 2 がともに発現しているが、VEGF は VEGF レセプター 2 と結合することによって、血管内皮細胞の遊走、増殖、血管透過性の亢進を起し<sup>17)</sup>、また、マクロファージに対しては VEGFR-1 を介してその遊走を促す<sup>18)</sup>。このように VEGF は血管内皮細胞を遊走、増殖させる他に、血管透過性を亢進させる働きがあり、また炎症への関与も報告されている。このことから近年、この VEGF を標的とする抗 VEGF 治療薬がまず癌に対する治療薬として開発された<sup>16)</sup>。眼科領域においても AMD 患者の CNV を免疫組織化学的に検討した結果、VEGFR-2 が血管内皮細胞に、そして、VEGF は周囲の網膜色素上皮 (RPE)、血管内皮細胞、マクロファージに発現していることが示され<sup>19)</sup>、抗 VEGF 治療薬は AMD に対しても臨床的に使用され始めている。

抗 VEGF 療法とは、VEGF の働きを抑えることにより新生血管を抑え、浮腫を消退させる治療法であるが、そのアプローチは大きく 3 つに分けられる。

その一つは VEGF、あるいは VEGFR の発現を抑制するというもので、siRNA (small interfering RNA) を用いた治療法が研究されている。蛋白質が産生されるに

は、ある遺伝子から転写によりメッセンジャー RNA (mRNA) がつくられ、核外にでた mRNA をもとに翻訳により小胞体で蛋白質が産生されるというプロセスが必要であるが、細胞に二本鎖 RNA が取り込まれることにより相補的な mRNA が分解される現象 (RNA 干渉: RNAi)<sup>20)</sup> を利用して標的とする蛋白質の産生を抑制することが可能である。siRNA は対象となる mRNA と相補的な配列をもった約 21 塩基対の二本鎖 RNA であり、これを細胞内に導入することにより、siRNA は RNA-induced silencing complex (RISC) を構成している蛋白質とともに、RISC に取り込まれ、取り込まれた二本鎖 siRNA はほどけて一本鎖になる。一本鎖となった siRNA は対象となる mRNA と結合し、活性化した RISC が mRNA を切断し、その結果 mRNA は分解され、蛋白質の発現は抑制される (図 2)。現在、VEGF<sup>21)</sup> や VEGFR<sup>22)</sup> に対する siRNA が開発されてきており、siRNA による臨床試験がアメリカにおいては既に開始されている<sup>23)</sup>。

二つ目は VEGF が VEGFR と結合した後のシグナル伝達を阻害するという方法で、この方法としては VEGF レセプターチロシンキナーゼ阻害薬<sup>24)</sup>、C キナーゼ阻害薬<sup>25)</sup> といった薬品の AMD 治療への応用が研究されている (図 3)。

三つ目は VEGF と結合する抗体などを投与することによって VEGF と VEGFR の結合を妨げるもので、これが現在の抗 VEGF 療法の主流となっている (図 4 A)。

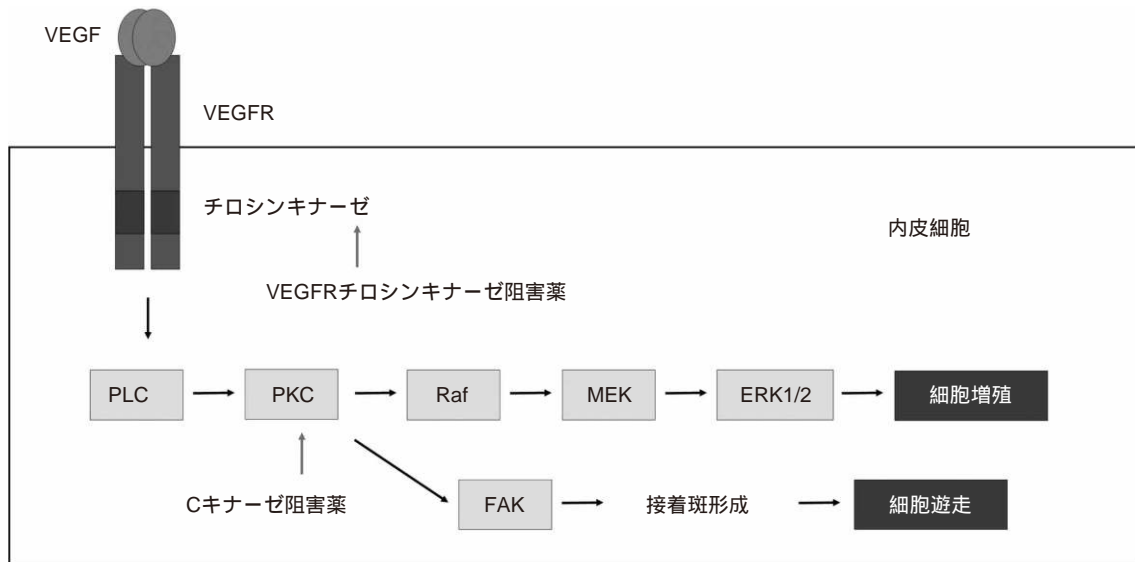


図 3 シグナル伝達の阻害による抗血管新生療法.

血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)がレセプター(VEGF receptor : VEGFR)と結合した後のシグナル伝達を阻害することにより血管新生を抑制することが可能である. VEGF レセプターチロシンキナーゼ阻害薬<sup>24)</sup>, Cキナーゼ阻害薬<sup>25)</sup>などが研究されている. ERK 1/2 : extracellular signal-regulated kinase 1 and 2, FAK : focal adhesion kinase, MEK : mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK kinase, PKC : pohosphokinase C, PLC $\gamma$  : phospholipase C $\gamma$ , Raf : v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog.

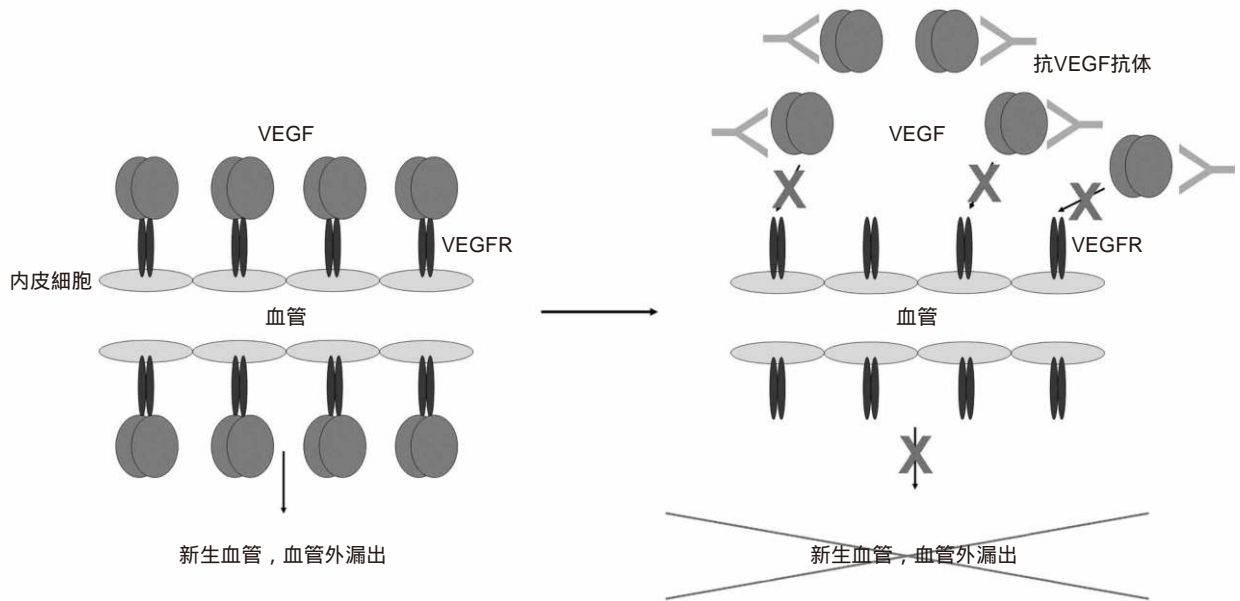
この治療法に用いられる物質には抗体, レセプター, そしてアプタマーといったものがあるが, 最初に AMD の治療薬としてアメリカで認可されたものが VEGF に結合するアプタマーとして開発された pegaptanib である<sup>26)</sup>. ランダムに配列した RNA の中には特定の蛋白質に結合するものがあることが 1990 年に発見されたが, このような RNA がアプタマーである. Pegaptanib が後述する他の抗 VEGF 治療薬と異なるのは, 蛋白質ではない核酸, 27 塩基の RNA アプタマーにポリエチレングリコールを付けた構造であるという点と, アイソフォームの 1 つである VEGF 165 のみと特異的に結合するという点である. 生体内には長さの異なるいくつかの種類の VEGF が存在するが, これは単一の VEGF 遺伝子から選択的スプライシングという方法でつくられる<sup>27)</sup>. VEGF 121, 165 が液性の因子であるのに対し, VEGF 189, 206 などは細胞外マトリックスと結合した形で存在する. 眼内で主に産生される VEGF は 121 と 165 であり, 血管新生には特にこれらが関与している<sup>28)</sup>. マウスにおける VEGF 164(ヒトにおける VEGF 165)のノックアウトマウスや虚血網膜症モデルを用いた研究により, 病的血管新生には VEGF 164 が必須であるが, 生理的血管新生には VEGF 164 の抑制は影響を与えないという報告がなされた<sup>29)</sup>ことから, pegaptanib は VEGF 165 以上の長さの VEGF には結合するが, VEGF 121 には結合しないように設計されている. pegaptanib の臨床試験は 2001 年 11 月よりすべてのタイプの AMD に対して, 6 週間に一度の硝子体注射を行う

というかたちで行われている(VISION トライアル)<sup>26)</sup>. その結果, 視力の改善は認められなかったものの, 対照に比べて, pegaptanib 投与群においては視力低下が少ないという結果が得られた. この薬剤は本邦においても臨床試験が行われ<sup>30)</sup>, 2008 年に発売が開始された.

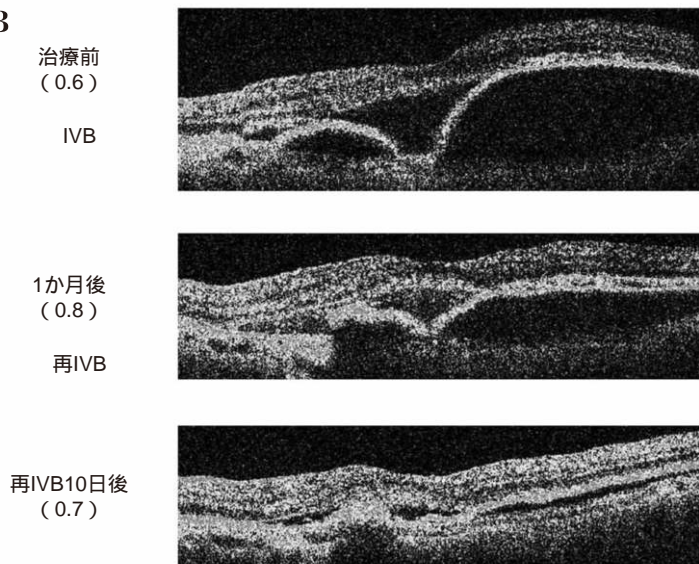
一方でこれまで開発されたあらゆる治療法の中で初めて視力の改善効果を示した薬剤が ranibizumab である<sup>31)32)</sup>. ただし, 本邦においてはポリープ状脈絡膜血管症に対する光線力学療法も少なくとも短期的には視力の改善が報告されている<sup>33)</sup>. モノクローナル抗体を人間の治療に用いるために humanized, ヒト化したものが抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体である. これが癌の治療のために開発された bevacizumab であり, 97% がヒト由来の構造になっている. 当初, サル眼に硝子体注入を行った研究から, 硝子体注射した抗体の一部, 約 1/3 の大きさである Fab は網膜全層に浸透するものの抗体全体では網膜を透過しないと考えられていた<sup>34)</sup>. そのため, AMD に対する局所投与用に抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体の Fab である ranibizumab が開発された. 先ほどの pegaptanib とは異なり, これら bevacizumab と ranibizumab は VEGF のレセプターとの結合部位に結合する. そのため VEGF 165 ばかりでなく, VEGF 121 とも結合する. またプラスミンによる VEGF 165 の分解産物である VEGF 110 も活性を有すると考えられているが, その VEGF 110 にも bevacizumab, ranibizumab は結合し, すべてのアイソフォームの VEGF を抑えることになる<sup>35)</sup>.



A



B



C

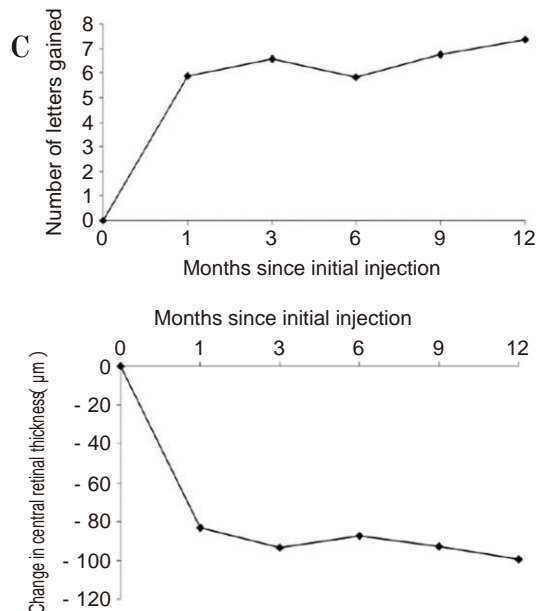


図 4 Bevacizumab による抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 療法.

- A : VEGF と結合する抗体などを投与することによって VEGF と VEGF レセプター (VEGFR) の結合を妨げ、血管新生、血管からの漏出を抑制する。
- B : Bevacizumab 1.25 mg/0.05 ml の硝子体投与 (IVB) により、網膜厚の減少と視力の改善が得られる。
- C : Bashshur らは、まず導入期として IVB (2.5 mg/0.1 ml) を行い、光干渉断層計 (OCT) 上黄斑部がドライでなければ 1 か月に 1 回の IVB を 2 回繰り返す、その後は黄斑部への新しい網膜下液の発生、黄斑部網膜厚の 100 µm 以上の増加、5 文字以上の視力の低下、新しい classic type CNV の発生、あるいは新しい黄斑部の出血があった場合のみ IVB の追加を行った。これにより平均視力の改善 (上段) と平均網膜厚の減少 (下段) が得られたと報告している。

(文献 39 より転載のうえ改変)

Ranibizumab を用いた臨床治験としては 2003 年に Predominantly classic に対しては ANCHOR トライアル<sup>31)</sup>が、そして Minimally classic と Occult with no classic に対しては MARINA トライアル<sup>32)</sup>が行われている。前者は 1 か月に一度の、後者は 4 週間に一度の硝子体

注射を行っているが、いずれのトライアルにおいても対照群 (前者は PDT 施行群、後者はプラセボ投与群) の視力が低下したのに対して、ranibizumab 群は視力の改善を示していた。

これらの薬剤が本邦では使用できなかったことから、

施設内の倫理委員会での承認などを経て、多くの施設で使用され始めているのが bevacizumab である。抗癌剤である本薬剤は当初、硝子体注射によっては網膜を透過しないと考えられていたため、AMD に対する全身投与がまず行われた (SANA スタディー)<sup>36)</sup>。全身の副作用は軽度の血圧上昇のみであり、また平均視力の改善も得られたものの、やはり全身投与における潜在的な危険性を考えると局所投与が望まれること、そして bevacizumab が網膜を透過するという報告があった<sup>37)</sup> こともあり、AMD に対する bevacizumab 1.25 mg/0.05 ml の硝子体注射がさまざまな施設で試みられるようになり、良好な成績が報告されている<sup>38)39)</sup> (図 4 B)。

VEGF に結合するものとしてはもう一つ VEGF レセプターがある。生体内にはもともと可溶性の VEGF レセプター、soluble Flt-1 があり、これは VEGF の機能を調節しているといわれている。薬剤として開発されたものとして VEGF-TRAP があるが、これは VEGFR-1 と 2 の VEGF 結合部と IgG の Fc 部を併せもつ人工的な蛋白質である<sup>40)</sup>。VEGF-TRAP も臨床試験がアメリカで行われ、対照に比して有意な網膜厚の減少を認めている<sup>41)</sup>。

このように抗 VEGF 療法は AMD に対する非常に有効な治療法であり、今後ますます使用されていくと考えられるが、それにはまだ検討の必要な課題がある。一つは局所投与で治療する場合、どの程度の反復投与が必要なのかということである。VISION スタディーにおいて、1 回の注射あたりの眼内炎のリスクは 0.16% であったが、1 年間注射を続けると 1.3% に眼内炎が発生すると報告されている<sup>26)</sup>。さらに、反復投与が必要であればこの確率はさらに上昇すると考えられる。また、VEGF には神経保護作用があるともいわれており、ラットの虚血再灌流モデルを用いた研究で VEGF は神経細胞のアポトーシスを抑制する<sup>42)</sup>ことが報告されている。2008 年になって、ラットにおいて抗 VEGF 抗体単回投与では神経節細胞は傷害されなかったという報告<sup>43)</sup>、可溶性 VEGF 受容体を発現するトランスジェニックマウスにおいて長期間 VEGF をブロックし続けても網膜の神経細胞、血管に悪影響はなかったという報告<sup>44)</sup>もなされているが、臨床的に VEGF を長期間ブロックすることが神経網膜や正常血管に影響を与えないのかさらなる検討が必要であるかもしれない。

### Ⅲ 光線力学的療法と vascular disrupting agent

#### 1. 光線力学的療法

一般のレーザーが CNV と周囲の組織に同等の障害を与えるのに対し、光線力学的療法 (photodynamic therapy: PDT) は CNV に集積する光感受性物質を全身投与し、その活性を励起する波長 (689 nm) のレーザーを照

射することによって周囲の組織への障害を最小限にしながら選択的に CNV を閉塞させる。この方法の開発により、中心窩下の病変に対しても治療を行い、視力の維持を図ることが可能となった。

AMD に対するバルテポルフィン (ビスグイン<sup>®</sup>) を用いた PDT が我が国で開始されて約 4 年が経過した。本邦より先に臨床導入されていた欧州では occult type の CNV に対してはプラセボと比較して視力低下抑制効果に有意差がないとのことで適応から除外された。そのため、あらゆるタイプの CNV に有効であり、PDT と比較しても治療効果が高いとされる抗 VEGF 療法<sup>31)32)</sup> の登場に伴い、欧米では PDT の行われる機会が減少している。一方、本邦での PDT は最近公表されたガイドラインによると、どの造影タイプに対しても有効性があり、病変がアジアで多いとされるポリープ状脈絡膜血管症 (PCV) である場合はその有効性がさらに高いとされており<sup>45)</sup>、現在でも重要な位置を占めている。

前述したように PDT は欧米に比し本邦では治療成績は良好であるものの、視力改善が得られる症例は多くない。これは 1 回の PDT で病変の閉塞が得られないことや、再発によって病変が徐々に拡大し、数回の PDT 後に病変が閉塞しても不可逆的な視力低下がもたらされていることが原因であろう。PDT 後にレーザー照射範囲に一致した脈絡膜循環障害がみられることは周知のことである<sup>46)47)</sup>。また、PDT の際に生じる炎症が脈絡膜や網膜色素上皮 (RPE) に対する障害にも関与しているばかりでなく、PDT による炎症に伴って VEGF が産生され<sup>48)49)</sup>、それが PDT 後の再発にも関与するという説がある。このように PDT には本来の目的である CNV を閉塞するという作用がある反面、治療に伴い、組織の虚血や炎症を引き起こし、これが CNV の拡大や再発を促進するように働く場合があると考えられる。また、我々の施設で、PDT 前後に黄斑部局所網膜電図による黄斑部網膜機能の評価を行ったが、PDT 直後には著しい振幅の低下を示し、レーザー照射部位の脈絡膜循環障害が強いほど、黄斑部局所網膜電図で評価した黄斑部網膜機能障害も強いことが分かっている<sup>50)</sup> (図 5)。

以上に述べたように PDT は必ずしも万能の治療法とはいえないが、その弱点を補う方法として近年、薬剤を併用した PDT が行われる機会が増加してきている。その一つが、副腎皮質ステロイド薬であるトリアムシノロンアセトニド (TA) のテノン嚢内あるいは硝子体内への投与を PDT に併用するというものである。これは、AMD の新生血管の発症に炎症が関与していると考えられ、消炎を図ること自体がその治療となりうること、そして PDT に伴って起こる炎症を抑えることによってその副作用を抑え、再発のリスクを軽減する可能性があることによるものである。実際、Spaide らのパイロットスタディでは PDT に TA の硝子体内投与を併用するこ

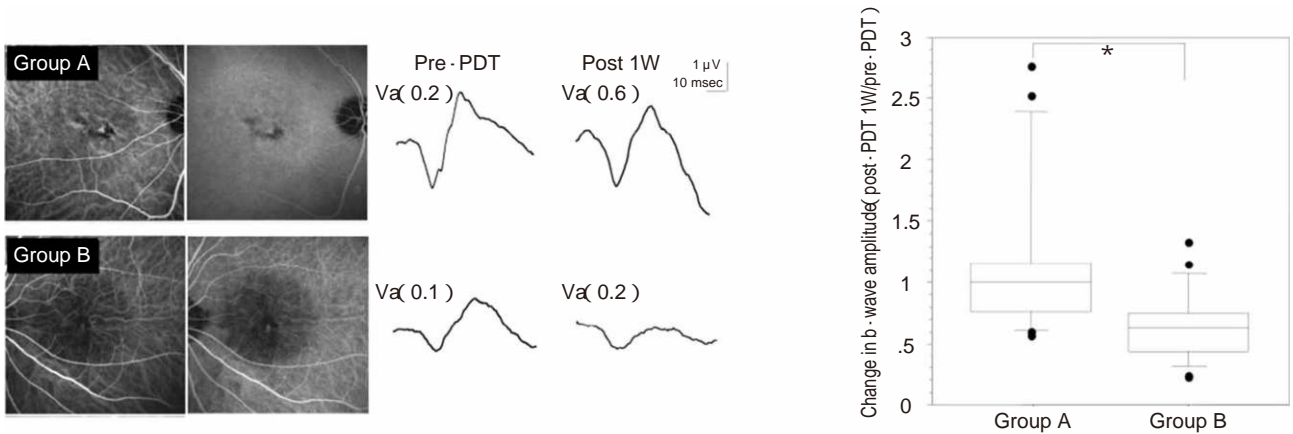


図 5 光線力学的療法(PDT)に伴う黄斑機能の変化。

PDTにより治療直後の黄斑部局所網膜電図の振幅は低下するが、レーザー照射部位の脈絡膜循環障害が強い群(Group B)は弱い群(Group A)に比較して、その機能障害も強い。左：代表症例。右：PDT 前の b 波の振幅に対する PDT 1 週後の振幅の割合。\* :  $p < 0.05$

(文献 50 より転載のうえ改変)

とにより視力の改善，再治療回数の減少がみられており<sup>51)</sup>，我々の行った黄斑部機能の研究においても，PDT を単独で行った場合と異なり，TA 併用 PDT では治療直後の黄斑部網膜機能が保たれていた。

この TA の作用機序は PDT 直後の炎症に伴う網膜厚の増加<sup>46)52)53)</sup>を TA が抑制することによっても考えられるが，興味深いことに PDT 直後の網膜厚と網膜機能の変化に強い関連はなく，網膜厚の変化以外の要因も関与しているものと考えられる。また，TA の脈絡膜循環障害に対する影響という点では，TA を併用した症例においても，PDT を単独で行ったものと同様に，レーザー照射部位に一致する脈絡膜循環障害が強い症例がみられた。このように TA は PDT そのものによる脈絡膜循環障害を緩和することはなかったが，脈絡膜循環障害に伴うなんらかの因子の発現を抑制することによって網膜機能障害を緩和するのかもしれない。

その強い抗新生血管作用から，最近では抗 VEGF 薬の PDT との併用が盛んに行われるようになってきており，TA を上回る併用効果が期待される<sup>54)</sup>。前述したような TA の効果は VEGF の抑制効果だけではないと考えられ，そうであれば副腎皮質ステロイド薬，抗 VEGF 薬，PDT のトリプルセラピーが有効である可能性があり，そのような試みもなされている<sup>55)</sup>。また，併用薬剤によって最適な投与時期が異なると考えられ，この点についても今後のさらなる研究が必要である。

## 2. Vascular disrupting agent による薬物療法

薬物により直接的に CNV を傷害するためには選択的に CNV に対して薬物を作用させる工夫が必要である。このような治療法ははまだ臨床応用はされていないが，レーザーを用いた CNV 動物モデルの治療実験はいくつか報告がある。そのような薬剤の一つが VEGF 121 と gelonin のキメラ蛋白質である。Gelonin は植物由来の

ribosome inactivating protein である。この毒素は RNA N-グリコシダーゼ活性をもち，リボソーム RNA の特定のアデニンの N-グリコシド結合を切断する。これによりリボソームは不活化し，蛋白質合成は阻害され，細胞死が起こる<sup>56)57)</sup>。CNV には VEGF レセプターが他の血管内皮細胞に比べて著しく多く発現している<sup>58)59)</sup>ことから VEGF レセプターに結合する VEGF 121 とのキメラ蛋白質を作製し，これを全身投与することによって gelonin を CNV 周囲のみに集積させることが可能である。これによって CNV を選択的に傷害することが可能であったと報告されている<sup>59)</sup>(図 6)。

## IV AMD 治療の新しいベクター

Ranibizumab などの AMD に対する薬物療法の有用性が示されてきている。これら薬物の局所投与による治療の欠点は効果が長期間持続せず，反復投与が必要なことである。ここではその欠点を解消すべく開発，研究されている薬剤のベクター，デリバリーシステムについて述べる。

### 1. 徐放剤とその他のデバイス

副腎皮質ステロイド薬は炎症を抑えることにより，AMD や黄斑浮腫の治療に用いられる。しかしながら，その他の薬剤と同様に効果が持続せず，反復投与が必要となる。この問題点を解決するためにデキサメサゾンを含む生体内で分解されるインプラントの硝子体内投与の臨床試験が開始されている<sup>60)</sup>。ウサギを用いた実験では少なくとも 8 週間にわたって治療レベルの薬剤濃度が維持されていた。このようなインプラントは副腎皮質ステロイド薬だけではなく，他の薬剤の投与にも応用できる可能性がある。それ以外にも結膜下などのスペースにデバイスを設置，あるいは徐放剤の投与を行い，持続的に薬剤を眼内，あるいはテノン嚢内に投与する試みが



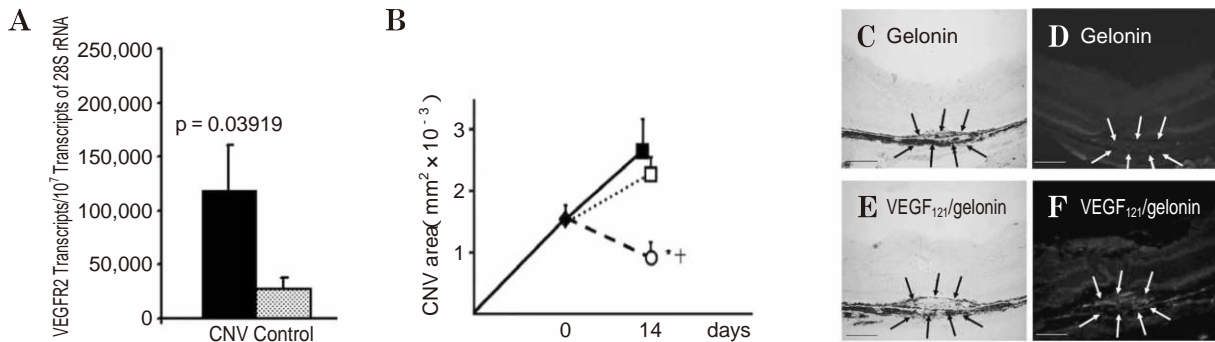


図 6 VEGF 121-toxin キメラ蛋白質によるマウス CNV モデルの治療。

脈絡膜新生血管(CNV)には VEGF レセプターが著しく多く発現している(A)。そのため VEGF 121/gelonin キメラ蛋白質を全身投与することによって毒素である gelonin を CNV 周囲のみに集積し、CNV を縮小させることが可能であった(B: ■=PBS, □=gelonin, ○=VEGF 121/gelonin)。Gelonin 単独投与では CNV に集積しないが(C, D), VEGF 121/gelonin キメラ蛋白質は CNV に集積している(E, F)。(矢印=CNV)。(文献 59 より転載のうえ改変)

なされている。

## 2. 遺伝子治療

AMD(萎縮型, 滲出型ともに)に対しては, 異常遺伝子を正常遺伝子に置換するような狭義の遺伝子治療ではなく, 治療蛋白質を反復投与する代わりに, 遺伝子を眼内の細胞に導入し, 持続的に蛋白質を発現させるというドラッグデリバリーシステムとしての遺伝子治療が行われる。眼組織への遺伝子導入のためのベクターとしてはウイルスを使わない non-viral なものも研究はされている<sup>61)</sup>が, 現在中心となっているのはウイルス由来のベクターである。動物モデルを用いてさまざまな研究が行われているが, ヒトの AMD に対する遺伝子治療としては神経保護作用と血管新生抑制作用を併せもつ色素上皮由来因子 (pigment epithelium derived factor: PEDF)<sup>62)~64)</sup>を発現するアデノウイルスを用いた臨床試験がアメリカで行われた。この Phase 1 の臨床試験の結果, その局所, 全身に対する安全性が確認されたと報告されている<sup>65)</sup>。

ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合の遺伝子発現は非常に早く高いピークを示す一方, 急激な減衰が短所の一つである。しかしながらこれまでの実験では多くの場合, CMV などウイルス由来のプロモーターが用いられていた。哺乳類の組織特異的なプロモーターとウイルス由来のプロモーターの遺伝子発現を比較した研究により, 後者が高いピークとその後の急激な減衰を示す一方で前者は一定の発現を保つことが報告された<sup>66)</sup>。組織特異的なプロモーターの使用はアデノウイルスベクターによる恒常的な遺伝子発現に役立つ可能性がある。またウイルス由来のすべての遺伝子を除去した gutless adeno-vector と呼ばれるリコンビナントのアデノウイルスベクターも開発されており, このベクターの使用は免疫反応を減少させ, 遺伝子発現の長期化に有用であることが報告されている<sup>67)</sup>。

近年, 動物モデルを用いての CNV に対する治療実験では, 長期的な遺伝子発現を得る目的で, アデノウイルスに代わってレンチウイルス<sup>68)</sup>やアデノ随伴ウイルス (adeno-associated vector: AAV)<sup>12)69)~71)</sup>などが用いられるようになってきている。前者の導入遺伝子がホストの染色体に取り込まれて遺伝子発現するのに対し, 後者は染色体に取り込まれない状態で長期間遺伝子の発現が持続するという特徴がある。この性質は腫瘍原性, 癌奇形性など潜在的な遺伝子治療の危険性の低下につながることから注目されており, イギリス, アメリカのグループが Leber 先天盲に対する AAV を用いた遺伝子治療を開始している<sup>72)73)</sup>。AAV を AMD の遺伝子治療に用いる場合の短所はピークに達するまでに約 6 週間と遺伝子発現が遅いことと, ベクターが小さいことから大きな遺伝子をパッケージできないことが挙げられる。遺伝子発現の遅さは AAV が一本鎖の DNA ウイルスであり, 遺伝子発現のために DNA を合成し, 二本鎖になる必要があるためである<sup>74)</sup>。Selfcomplementary AAV は, 一本鎖の中に相補的な配列をもっており, みずから二本鎖を形成することによって通常の AAV と比べてはるかに早く, また強い遺伝子発現が可能であり<sup>75)</sup>, AMD に対する遺伝子治療に有用である可能性がある<sup>76)</sup>。一方, 大きな遺伝子がパッケージできないことに対する回答の一つとしては zinc finger protein transcription factor (ZFP-TF) キメラ蛋白質がある<sup>77)</sup>。これはある特定の遺伝子配列と結合する ZFP と転写因子 TF が結合した人工的な蛋白質であり, この遺伝子を導入することによって, 生理的な血管新生抑制物質を過剰発現させることが可能であり, これをもって CNV を治療するというものである。この手法を用いる利点は, 一つの小さな遺伝子により大きな遺伝子の発現が可能であること, 複数の遺伝子に共通のプロモーター領域と結合するように ZFP をデザインすることによって 1 つの遺伝子で複数の蛋白質を



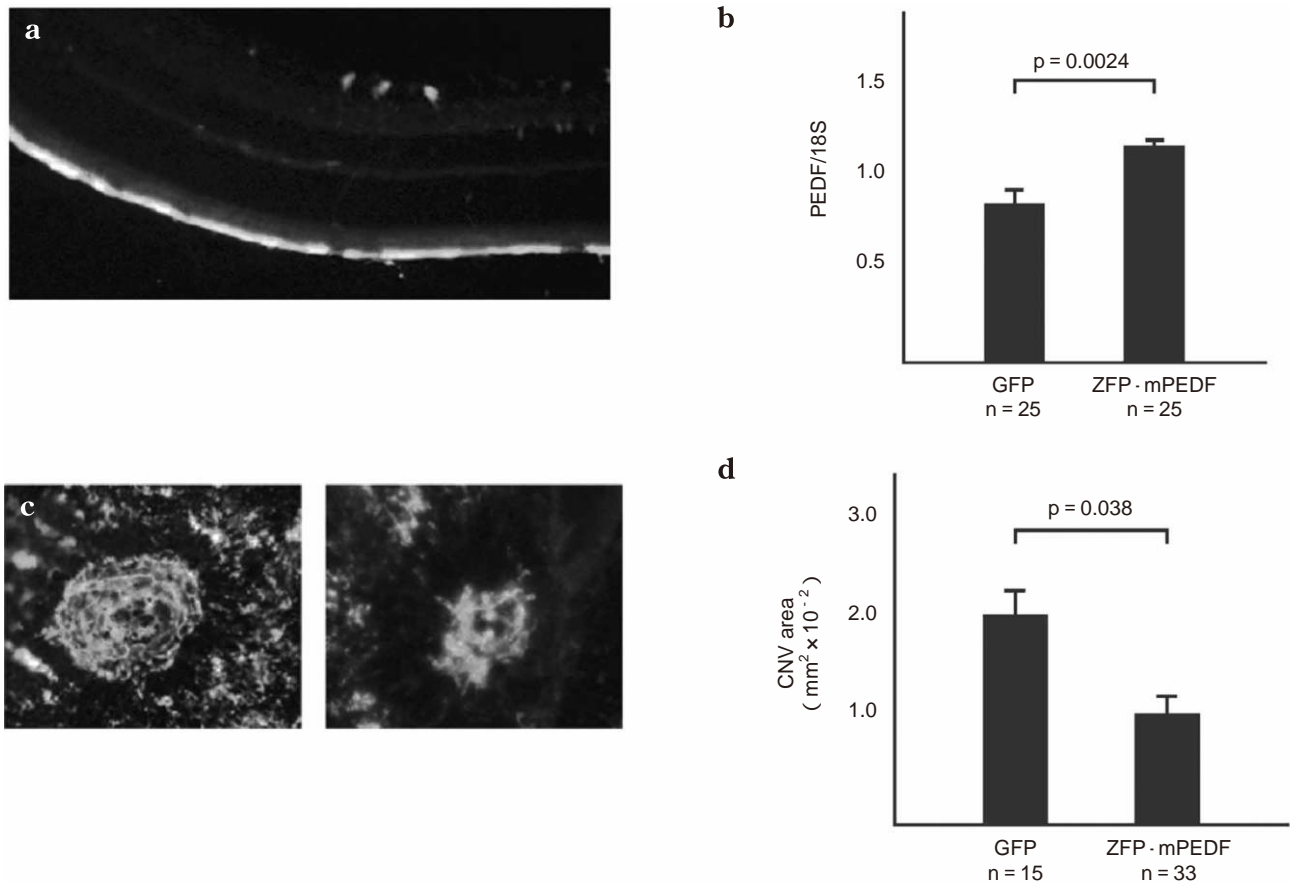


図 7 Zinc finger protein-PEDF activator を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) によるマウス CNV モデルの遺伝子治療.

AAV の網膜下投与により主に網膜色素上皮 (RPE) に遺伝子の発現がみられる (a). AAV の網膜下注射により zinc finger protein-PEDF activator (ZFP-mPEDF) を発現させることによって色素上皮由来因子 (PEDF) の発現は増強した (b). これにより対照と比較して (c 左), CNV を 50% 抑制することが可能であった (c 右, d).

発現させることが可能であること, 特定の遺伝子の発現を抑制することも可能であること, などが挙げられる. 実際に動物モデルにおいては PEDF の発現を増強する ZFP-TF の遺伝子をもった AAV の注入により CNV を 50% 抑制することが可能であった<sup>71)</sup> (図 7).

### 3. 骨髄由来の細胞を用いた治療

脈絡膜新生血管は脈絡膜血管からの血管新生 (angiogenesis) により生じると考えるのが一般的であるが, 近年 VEGF などのサイトカインによって骨髄から動員された血管内皮前駆細胞 (endothelial precursor cell: EPC)<sup>78)</sup> が局所に遊走し, 取り込み, 分化, 増殖というプロセスを経て新生血管を生じるという血管発生 (vasculogenesis) も腫瘍などにおける新生血管の発生に関与しているという報告がなされた<sup>79)</sup>. その後, 骨髄移植マウスの CNV モデルを用いた実験によって, これが CNV の発生にも関与していることが報告され, 注目されている<sup>80)</sup>. しかしながら, 異なる性別のドナーから骨髄移植を受けた患者が後に癌を発症した際の腫瘍血管におけるドナー由来の内皮細胞の割合を調べた研究から, EPC

の直接的な関与, すなわち骨髄由来の細胞から生じた内皮細胞の割合は実際の人間の腫瘍においては意外と大きくないことが報告された<sup>81)</sup>. CNV においても EPC の新生血管への直接的な関与は小さい可能性があり, 血管発生を抑えるという観点からの治療法は難しいかもしれない. しかしながら, 最近では局所に遊走した骨髄由来の細胞はアストロサイトなどさまざまな細胞に分化し, CNV 領域における組織の修復に関与する可能性が報告され<sup>82)</sup>, またこれら細胞が CNV を抑制する可能性が報告された<sup>83)</sup>. このような骨髄由来の細胞の性質を利用して血管新生を抑制する, あるいは遺伝子導入を併用してこれらの細胞をドラッグデリバリーのツールとして用いた治療などは有用かもしれない.

## V 結 語

抗 VEGF 療法の開発により, AMD の治療は外科的治療から内科的治療へという転換点を迎えた感がある. 反復投与の必要性の解決と, 潜在的副作用の可能性など乗り越えるべき課題もあるが, これらの治療法は患者に

対するメリットも大きく、今後さらなる発展が期待される。また、AMD に関しては抗 VEGF 療法にとって代わられた感のある PDT であるが、日本人において高い比率を占めるにもかかわらず、抗 VEGF 療法が比較的効果が低いポリープ状脈絡膜血管症に対して高い有効率を示しており、他の治療薬剤との併用も含めて今後も使用されていくものと考えられる。

本論文は黄斑研究会からの総説である。

## 文 献

- 1) Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al : Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE 2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87 : 1161—1169, 1996.
- 2) Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al : Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE 2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87 : 1171—1180, 1996.
- 3) 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.
- 4) Morisada T, Kubota Y, Urano T, Suda T, Oike Y : Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis. *Endothelium* 13 : 71—79, 2006.
- 5) Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML : Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* 169 : 681—691, 2005.
- 6) Rundhaug JE : Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9 : 267—285, 2005.
- 7) O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al : Endostatin : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88 : 277—285, 1997.
- 8) Nyberg P, Xie L, Kalluri R : Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 65 : 3967—3979, 2005.
- 9) Kalluri R : Basement membranes : structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3 : 422—433, 2003.
- 10) Nambu H, Nambu R, Oshima Y, Hackett SF, Okoye G, Wiegand S, et al : Angiopoietin 1 inhibits ocular neovascularization and breakdown of the blood-retinal barrier. *Gene Ther* 11 : 865—873, 2004.
- 11) Hangai M, Moon YS, Kitaya N, Chan CK, Wu DY, Peters KG, et al : Systemically expressed soluble Tie 2 inhibits intraocular neovascularization. *Hum Gene Ther* 12 : 1311—1321, 2001.
- 12) Lai CM, Shen WY, Brankov M, Lai YK, Barnett NL, Lee SY, et al : Long-term evaluation of AAV-mediated sFlt-1 gene therapy for ocular neovascularization in mice and monkeys. *Mol Ther* 12 : 659—668, 2005.
- 13) Takahashi T, Nakamura T, Hayashi A, Kamei M, Nakabayashi M, Okada AA, et al : Inhibition of experimental choroidal neovascularization by over-expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in retinal pigment epithelium cells. *Am J Ophthalmol* 130 : 774—781, 2000.
- 14) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N : Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1306—1309, 1989.
- 15) 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.
- 16) Intravitreal bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration : a one-year prospective study. *Am J Ophthalmol* 145 : 249—256, 2008.
- 17) Shibuya M : Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 67 : 281—316, 1995.
- 18) 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.
- 19) Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Ogura Y, Matumura M, et al : Vascular endothelial growth factor family and receptor expression in human choroidal neovascular membranes. *Microvasc Res* 64 : 162—169, 2002.
- 20) Hannon GJ : RNA interference. *Nature* 418 : 244—251, 2002.
- 21) Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, Tang W, Yang X, Maguire AM, et al : Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis* 9 : 210—216, 2003.
- 22) Shen J, Samul R, Silva RL, Akiyama H, Liu H, Saishin Y, et al : Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 13 : 225—234, 2006.
- 23) Campochiaro PA : Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. *Gene Ther* 13 : 559—562, 2006.
- 24) Takeda A, Hata Y, Shiose S, Sassa Y, Honda M, Fujisawa K, et al : Suppression of experimental choroidal neovascularization utilizing KDR selective receptor tyrosine kinase inhibitor. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241 : 765—772, 2003.
- 25) Saishin Y, Silva RL, Saishin Y, Callahan K, Schoch C, Ahlheim M, et al : Periocular injection of microspheres containing PKC412 inhibits choroidal

- neovascularization in a porcine model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4989—4993, 2003.
- 26) **Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR** : Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 351 : 2805—2816, 2004.
  - 27) **Ferrara N** : VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2 : 795—803, 2002.
  - 28) **Shima DT, Gougos A, Miller JW, Tolentino M, Robinson G, Adamis AP, et al** : Cloning and mRNA expression of vascular endothelial growth factor in ischemic retinas of *Macaca fascicularis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1334—1340, 1996.
  - 29) **Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano S, Ogura Y, et al** : VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med* 198 : 483—489, 2003.
  - 30) **ベガプタニブナトリウム共同試験グループ** : 脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性を対象としたベガプタニブナトリウム 1 年間投与試験. *日眼会誌* 112 : 590—600, 2008.
  - 31) **Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, et al** : Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355 : 1432—1444, 2006.
  - 32) **Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, et al** : Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355 : 1419—1431, 2006.
  - 33) **Kurashige Y, Otani A, Sasahara M, Yodoi Y, Tamura H, Tsujikawa A, et al** : Two-year results of photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol* 146 : 513—519, 2008.
  - 34) **Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N, Thomson K, Berleau L, Licko V, et al** : Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125 I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol* 27 : 536—544, 1999.
  - 35) **Lowe J, Araujo J, Yang J, Reich M, Oldendorf A, Shiu V, et al** : Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor *in vitro* and *in vivo*. *Exp Eye Res* 85 : 425—430, 2007.
  - 36) **Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS** : Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 112 : 1035—1047, 2005.
  - 37) **Heiduschka P, Fietz H, Hofmeister S, Schultheiss S, Mack AF, Peters S, et al** : Penetration of bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 2814—2823, 2007.
  - 38) **Avery RL, Pieramici DJ, Rabena MD, Castellarin AA, Nasir MA, Giust MJ** : Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 113 : 363—372. e 5, 2006.
  - 39) **Bashshur ZF, Haddad ZA, Schakal A, Jaafar RF, Saab M, Nouredin BN** : Intravitreal bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration : a one-year prospective study. *Am J Ophthalmol* 145 : 249—256, 2008.
  - 40) **Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, et al** : VEGF-Trap : a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 11393—11398, 2002.
  - 41) **Nguyen QD, Shah SM, Hafiz G, Quinlan E, Sung J, Chu K, et al** : A phase I trial of an IV-administered vascular endothelial growth factor trap for treatment in patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 113 : 1522. e 1—1522. e 14, 2006.
  - 42) **Nishijima K, Ng YS, Zhong L, Bradley J, Schubert W, Jo N, et al** : Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol* 171 : 53—67, 2007.
  - 43) **Iriyama A, Chen YN, Tamaki Y, Yanagi Y** : Effect of anti-VEGF antibody on retinal ganglion cells in rats. *Br J Ophthalmol* 91 : 1230—1233, 2007.
  - 44) **Ueno S, Pease ME, Wersinger DM, Masuda T, Vinore SA, Licht T, et al** : Prolonged blockade of VEGF family members does not cause identifiable damage to retinal neurons or vessels. *J Cell Physiol* 217 : 13—22, 2008.
  - 45) **Tano Y** : Guidelines for PDT in Japan. *Ophthalmology* 115 : 585—585. e 6, 2008.
  - 46) **Michels S, Schmidt-Erfurth U** : Sequence of early vascular events after photodynamic therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2147—2154, 2003.
  - 47) **Schmidt-Erfurth U, Laqua H, Schlotzer-Schrehard U, Viestenz A, Naumann GO** : Histopathological changes following photodynamic therapy in human eyes. *Arch Ophthalmol* 120 : 835—844, 2002.
  - 48) **Schmidt-Erfurth U, Schlotzer-Schrehard U, Curstiefen C, Michels S, Beckendorf A, Naumann GO** : Influence of photodynamic therapy on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor 3, and pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4473—4480, 2003.
  - 49) **Tatar O, Adam A, Shinoda K, Stalmans P, Eckardt C, Luke M, et al** : Expression of VEGF and PEDF in choroidal neovascular membranes following verteporfin photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol* 142 : 95—104, 2006.
  - 50) **Ishikawa K, Kondo M, Ito Y, Kikuchi M,**



- Nishihara H, Piao CH, et al : Correlation between focal macular electroretinograms and angiographic findings after photodynamic therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 2254—2259, 2007.
- 51) Spaide RF, Sorenson J, Maranan L : Photodynamic therapy with verteporfin combined with intravitreal injection of triamcinolone acetonide for choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 112 : 301—304, 2005.
  - 52) Costa RA, Farah ME, Cardillo JA, Calucci D, Williams GA : Immediate indocyanine green angiography and optical coherence tomography evaluation after photodynamic therapy for subfoveal choroidal neovascularization. *Retina* 23 : 159—165, 2003.
  - 53) Rogers AH, Martidis A, Greenberg PB, Puliafito CA : Optical coherence tomography findings following photodynamic therapy of choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 134 : 566—576, 2002.
  - 54) Dhalla MS, Shah GK, Blinder KJ, Ryan EH Jr, Mitra RA, Tewari A : Combined photodynamic therapy with verteporfin and intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Retina* 26 : 988—993, 2006.
  - 55) Augustin AJ, Puls S, Offermann I : Triple therapy for choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration : verteporfin PDT, bevacizumab, and dexamethasone. *Retina* 27 : 133—140, 2007.
  - 56) Stirpe F, Olsnes S, Pihl A : Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *J Biol Chem* 255 : 6947—6953, 1980.
  - 57) Girbes T, Ferreras JM, Arias FJ, Stirpe F : Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini Rev Med Chem* 4 : 461—476, 2004.
  - 58) Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Ogura Y, Matumura M, et al : Vascular endothelial growth factor family and receptor expression in human choroidal neovascular membranes. *Microvasc Res* 64 : 162—169, 2002.
  - 59) Akiyama H, Mohamedali KA, E Silva RL, Kachi S, Shen J, Hatara C, et al : Vascular targeting of ocular neovascularization with a vascular endothelial growth factor 121/gelonin chimeric protein. *Mol Pharmacol* 68 : 1543—1550, 2005.
  - 60) Fialho SL, Rego MB, Siqueira RC, Jorge R, Haddad A, Rodrigues AL, et al : Safety and pharmacokinetics of an intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes. *Curr Eye Res* 31 : 525—534, 2006.
  - 61) Kachi S, Oshima Y, Esumi N, Kachi M, Rogers B, Zack DJ, et al : Nonviral ocular gene transfer. *Gene Ther* 12 : 843—851, 2005.
  - 62) Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV : PEDF : a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* 53 : 411—414, 1991.
  - 63) Araki T, Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP : Pigment epithelium-derived factor (PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death. *J Neurosci Res* 53 : 7—15, 1998.
  - 64) Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, et al : Pigment epithelium-derived factor : a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285 : 245—248, 1999.
  - 65) Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM, Klein ML, Holz E, Frank RN, et al : Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration : results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 17 : 167—176, 2006.
  - 66) Kachi S, Esumi N, Zack DJ, Campochiaro PA : Sustained expression after nonviral ocular gene transfer using mammalian promoters. *Gene Ther* 13 : 798—804, 2006.
  - 67) Hardy S, Kitamura M, Harris-Stansil T, Dai Y, Phipps ML : Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* 71 : 1842—1849, 1997.
  - 68) Kachi S, Binley K, Umeda N, Akiyama H, Yokoi K, Kachi M, et al : Delivery of angioinhibitory genes using the VMD2 promoter in lentiviral vectors results in selective expression in RPE and inhibition of choroidal neovascularization. *Human Gene Ther* 2008(in press).
  - 69) Lai YK, Shen WY, Brankov M, Lai CM, Constable IJ, Rakoczy PE : Potential long-term inhibition of ocular neovascularisation by recombinant adeno-associated virus-mediated secretion gene therapy. *Gene Ther* 9 : 804—813, 2002.
  - 70) 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.
  - 71) Yokoi K, Zhang HS, Kachi S, Balaggan KS, Yu Q, Guschin D, et al : Gene transfer of an engineered zinc finger protein enhances the anti-angiogenic defense system. *Mol Ther* 15 : 1917—1923, 2007.
  - 72) Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, et al : Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358 : 2240—2248, 2008.
  - 73) Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al : Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358 : 2231—2239, 2008.
  - 74) Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ : Second-strand synthesis is a rate-limiting step for

- efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70 : 3227—3234, 1996.
- 75) **McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ** : Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8 : 1248—1254, 2001.
- 76) **Yokoi K, Kachi S, Zhang HS, Gregory PD, Spratt SK, Samulski RJ**, et al : Ocular Gene Transfer with Self-Complementary AAV Vectors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 3324—3328, 2007.
- 77) **Moore M, Ullman C** : Recent developments in the engineering of zinc finger proteins. *Brief Funct Genomic Proteomic* 1 : 342—355, 2003.
- 78) **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T**, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964—967, 1997.
- 79) **Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L**, et al : Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7 : 1194—1201, 2001.
- 80) **Takahashi H, Yanagi Y, Tamaki Y, Muranaka K, Usui T, Sata M** : Contribution of bone-marrow-derived cells to choroidal neovascularization. *Biochem Biophys Res Commun* 320 : 372—375, 2004.
- 81) **Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC**, et al : Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 11 : 261—262, 2005.
- 82) **Chan-Ling T, Baxter L, Afzal A, Sengupta N, Caballero S, Rosinova E**, et al : Hematopoietic stem cells provide repair functions after laser-induced Bruch's membrane rupture model of choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 168 : 1031—1044, 2006.
- 83) **Yodoi Y, Sasahara M, Kameda T, Yoshimura N, Otani A** : Circulating hematopoietic stem cells in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 5464—5472, 2007.
-