

ポリープ状脈絡膜血管症患者における末梢血骨髓由来幹細胞

大谷 篤史, 佐々原 学, 淀井 有子, 亀田 隆範, 辻川 明孝, 吉村 長久

京都大学大学院医学研究科眼科学

要 約

目的: 滲出型加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) の一型と考えられているポリープ状脈絡膜血管症 (polypoidal choroidal vasculopathy: PCV) 症例において, 末梢血骨髓由来幹細胞の機能が病態と関連するのかが検討した。

対象と方法: PCV 31 例を対象とした。診断は日本ポリープ状脈絡膜血管症研究会の診断基準に基づき行った。末梢血を採取し, コロニー形成能を既存の方法 (Hill アッセイ) にて, 細胞遊走能は Boyden chamber 法にて測定した。病巣の大きさと疾患の両眼性発症を重症度の指標とし, 測定した細胞機能と比較検討した。

結果: コロニー形成能は両眼性症例で片眼性症例よ

り, 大きな病巣の症例で小さな病巣の症例より有意に低値であった。細胞遊走能は両眼性症例で片眼性症例より有意に低値であった。対照, AMD, PCV 群間では差がみられなかった。

結論: PCV においても AMD 同様, 末梢血骨髓由来幹細胞の機能が症例によって異なり, その違いは PCV の病態, 重症度に関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 113: 649—655, 2009)

キーワード: ポリープ状脈絡膜血管症 (PCV), 末梢血骨髓由来幹細胞, コロニー形成能, 両眼性 PCV

Circulating Bone Marrow-derived Stem Cells in Patients with Polypoidal Choroidal Vasculopathy

Atsushi Otani, Manabu Sasahara, Yuko Yodoi, Takanori Kameda
Akitaka Tsujikawa and Nagahisa Yoshimura

Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine

Abstract

Purpose: The current study was designed to investigate the role of circulating bone marrow (BM)-derived stem cells in the pathogenesis of polypoidal choroidal vasculopathy (PCV), a distinct type of neovascular age-related macular degeneration (AMD).

Methods: Thirty one clinically documented PCV patients were enrolled. Circulating BM-derived stem cells were collected from the patients' peripheral blood and cultured. Colony forming capacity (Hill assay) and migration activity (Boyden chamber system) were examined and analyzed.

Results: Colony forming units (CFU-Hill) were significantly fewer in bilateral PCV patients than in unilateral PCV patients. CFU-Hill was impaired in patients with larger (>5000 μm) PCV lesions com-

pared with patients with smaller PCV lesions. Migration activity of BM-derived stem cells was also reduced significantly in the bilateral PCV patients than in the unilateral PCV patients.

Conclusions: Similar to CNV associated with AMD, impaired functional activity of circulating BM-derived stem cells was observed in PCV patients with bilateral or larger lesions. Circulating BM-derived stem cells may have a role in the pathogenesis of PCV. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113: 649—655, 2009)

Key words: Polypoidal choroidal vasculopathy (PCV), Circulating bone marrow-derived stem cells, Colony forming unit-Hill, Bilateral PCV

別刷請求先: 606-8335 京都市左京区聖護院川原町 54 京都大学大学院医学研究科眼科学 大谷 篤史

(平成 20 年 8 月 15 日受付, 平成 20 年 12 月 22 日改訂受理) E-mail: otan@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Reprint requests to: Atsushi Otani, M.D. Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8335, Japan

(Received August 15, 2008 and accepted in revised form December 22, 2008)

I 緒 言

ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)は血管造影にて描出されるポリープ状血管と分枝状のネットワーク血管を特徴病巣とする疾患であり¹⁾, 加齢黄斑変性(AMD)の一つの特殊型と考えられているが, いわゆる狭義滲出型AMDとの本質的な異同についてはまだよく分かっていない. 欧米ではPCVの頻度はそれほど高くないとされるのとは対照的に, 日本を含めたアジアで滲出型AMDに占めるPCVの頻度は高く, また欧米人に多い乳頭型PCV(disc type)が日本では少ないといった形態的な違いもあることが知られている^{2)~4)}. また, 狭義滲出型AMDとPCVでは自然経過も異なり, PCVは比較的予後が良いとされてきた⁴⁾⁵⁾. このようにPCVの疾患病態が他の滲出型AMDと異なることは光線力学的療法の治療成績をみても理解できる^{6)~9)}. 異なる表現型を生み出す成因の検索も行われ始めており, 病理的検討の他¹⁰⁾¹¹⁾, 最近明らかにされたHTRA-1やcomplement factor H(CFH)といった遺伝子の多型¹²⁾¹³⁾が滲出型AMDの表現型に影響を及ぼしうるのかといった研究も始められている¹⁴⁾¹⁵⁾.

脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization: CNV)抜去術で得られた組織の検討や実験的CNVの病理学的研究^{16)~21)}により, CNV形成には血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)を含めた多くの増殖因子が関与していること, CNVを構成している細胞は局所にある細胞だけではなく, マクロファージを含めた骨髄由来の細胞が50%以上を占めることが示唆されている. 骨髄由来細胞の関与は想像以上に大きく, マクロファージは実験的にCNV形成への関与が示されている²²⁾²³⁾. 我々はヒト滲出型AMDにおいて末梢血中に骨髄由来幹細胞が誘導され, その数や機能が滲出型AMDの病態と相関していることを初めて見出した²⁴⁾. 今回, 日本人に多いPCV症例における末梢血骨髄由来幹細胞機能の一つであるコロニー形成能(Hillアッセイ)と細胞遊走能を測定し, 個々の病態と関連しているのか, 狭義滲出型AMD群と違いはあるのか比較検討した.

II 対象と方法

本研究は京都大学病院倫理委員会の承認を得て行った. 採血施行に関してはヘルシンキ宣言に基づき, 十分なインフォームドコンセントの後, 自由意思による書面同意が得られた患者を対象とした.

対象は京都大学医学部附属病院眼科を受診し, PCVと診断された症例31例(男20例, 女11例)と狭義AMD19例である. 採血日の6か月以内に何らかの眼科的治療を受けている症例は除外した. 各病巣タイプ(occult CNV, classic CNV, PCV)の診断は眼底所見, フ

ルオレセイン蛍光眼底造影(fluorescein angiography: FA)所見, インドシアニングリーン蛍光眼底造影(indocyaninegreen angiography: ICGA)所見, 光干渉断層計(optical coherence tomography: OCT)所見を参考に京都大学医学部附属病院眼科黄斑外来にて行った(N. Y. A. O. A. T). FA, およびICGAはSLO(Rodenstock, Germany), およびHRA2(Heidelberg Engineering, Germany)を用いて撮影を行った. OCTはOCT3000(Carl Zeiss, Germany), およびOCT ophthalmoscope(Nidek, Japan)を用いた. PCVの診断は日本ポリープ状脈絡膜血管症研究会の診断基準に基づいて行った²⁵⁾. 病巣の大きさは光線力学的療法施行時に使われる病巣最大径(greatest linear dimension: GLD)をFA所見にて計測した. Type2CNVの判定はFAでclassic所見を示すCNVでOCT所見上も網膜下への浸潤が考えられる症例とした. 本検討では滲出型加齢黄斑変性の重症度の指標として病巣の大きさと疾患の両眼性発症を採用した. これらの指標で重症度がすべて規定できるわけではないが, 定量性, 正確性には優れた指標であると考えられる.

細胞機能はコロニー形成能と細胞遊走能で推測した. コロニー形成能は既存の方法で行った²⁶⁾. 末梢血から密度勾配遠心法(Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences, Tokyo, Japan)にて単核球を分離し, 1×10^7 の細胞を60mmヒトファイブロネクチンコート培養皿(BD Biosciences, Tokyo, Japan)でまず培養した. 培養は20%ウシ胎仔血清(fetal bovine serum: FBS)含有培養液(endothelial basal medium: EBM, Endocult, StemCell Technologies, UK)で行った. 未分化細胞群をより純化するため, 48時間培養後に非接着細胞 1×10^6 を新しい24穴ファイブロネクチンコート培養皿に移し, さらに3日間培養した. 形成された細胞コロニー数をカウントし, コロニー形成能とした. データは独立した3つの培養から得られたものの平均を採用した.

細胞遊走能は上記培養5日目の細胞を用い, Boyden chamber fluorescence block systemにて測定した²⁷⁾(BD Biocoat™ Angiogenesis System: Endothelial Cell Migration, BD Biosciences). 2.5×10^4 の細胞をチャンバーに撒き, 10%FBS含有EBM(Endocult, StemCell Technologies, UK)もしくはEBMのみを入れた96穴培養プレート上に設置した. 22時間後遊走した細胞を染色し(Calcein AM, Molecular Probes, Eugene, USA)蛍光プレートリーダー(ARVO, PerkinElmer Japan, Osaka, Japan)にてカウントした. 実験は各サンプルに対しduplicateで行った. データはEBMのみの群に対する10%FBS含有EBMでの蛍光比で算出した.

統計解析はpaired or unpaired Student's t test (2-sided)(パラメトリック)とMann Whitney's U test(ノンパラメトリック)をSPSS 13.0ソフトウェアを用いて

表 1 各群の臨床データ

臨床データ	対照 (n=21)	AMD (n=19)	PCV (n=31)
性別-no.(%)			
男性	13(62)	13(68)	20(65)
年齢			
平均値±標準偏差	74.3±7.4	75.3±7.2	71.9±7.4
中央値(範囲)	76(56~86)	74(57~87)	76(56~86)
50~64歳-no.(%)	3(14)	1(5.3)	5(16)
65~74歳-no.(%)	4(19)	9(47)	15(48)
75~84歳-no.(%)	13(62)	7(37)	9(29)
≥85歳-no.(%)	1(4.8)	2(11)	2(6.5)
FAによる病変サブタイプ-no.(%)			
Predominantly classic CNV	—	11(58)	0(0)
Minimally classic CNV	—	0(0)	6(19)
Occult with no classic CNV	—	8(42)	25(81)
病変サイズ(平均値±標準誤差 μm)	—	3,360±2,495	4,366±2,679
片眼性CNV-no.(%)	—	16(84)	23(74)
矯正視力(logMAR)			
患眼			
平均値±標準偏差	0.51±0.66	0.82±0.53	0.72±0.68
中央値	0.30	0.70	0.40
範囲	-0.18~1.70	0~1.70	0~3.00
僚眼			
平均値±標準偏差	0.02±0.18	0.18±0.47	0.12±0.35
中央値	-0.08	0.00	-0.08
範囲	-0.18~0.52	-0.18~1.52	-0.18~1.16
全身疾患の既往-no.(%)			
高血圧	6(29)	10(53)	13(42)
糖尿病	7(33)	3(16)	3(9.7)
高脂血症	6(29)	3(16)	5(16)
心血管疾患	3(14)	5(26)	6(19)
脳血管疾患	0(0)	2(11)	3(9.7)
抗凝固薬内服-no.(%)	1(4.8)	4(21)	5(16)
喫煙歴-no.(%)	1(4.8)	9(47)	18(58)

AMD：滲出型加齢黄斑変性，PCV：ポリープ状脈絡膜血管症，FA：フルオレセイン蛍光眼底造影，logMAR：logarithmic Minimum Angle of Resolution.

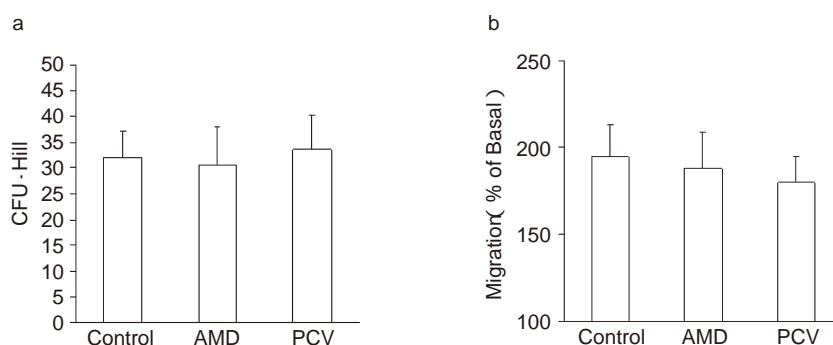


図 1 末梢骨髄由来幹細胞のコロニー形成能(a)と細胞遊走能(b).

年齢が考慮された対照患者群(control)，狭義加齢黄斑変性(AMD)患者群，ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)患者群の平均値(+標準誤差)を示す。遊走能はPCVでやや低い傾向にあったが，統計学的な有意差はなかった。

CFU：colony forming unit(コロニー形成能)，AMD：age-related macular degeneration(加齢黄斑変性)，PCV：polypoidal choroidal vasculopathy(ポリープ状脈絡膜血管症)。

行った。p<0.05のとき有意であると判定した。すべてのサンプルは臨床データをマスクした状態で行われた。

臨床データとの関連性の検討はすべての結果が出てからまとめて行った。

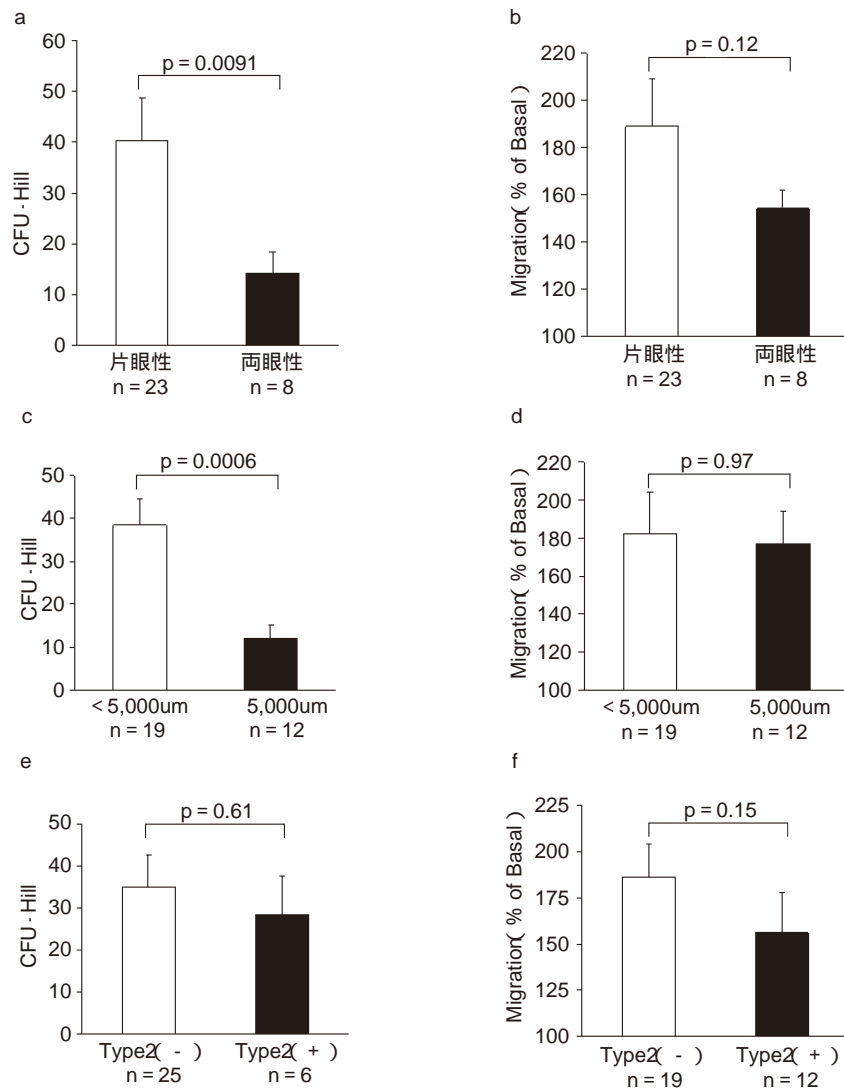


図 2 PCV 症例のコロニー形成能と細胞遊走能。

PCV 症例 (n=31) を両眼性症例と片眼性症例に分けてコロニー形成能 (a) と細胞遊走能 (b) を比較した。コロニー形成能は有意に両眼性 PCV で低かった。

PCV を病巣の大きさで 2 群に分け、コロニー形成能 (c) と細胞遊走能 (d) を比較した。大きな病巣をもつ PCV では小さい病巣の症例に比べ有意にコロニー形成能が低かった。

Type 2 CNV を合併していると考えられる症例とそうでない症例における、コロニー形成能 (e) と細胞遊走能 (f)。両機能とも Type 2 CNV を合併している群の方が低い傾向にあったが、統計学的有意差は得られなかった。

CFU: colony forming unit (コロニー形成能), AMD: age-related macular degeneration (加齢黄斑変性), PCV: polypoidal choroidal vasculopathy (ポリープ状脈絡膜血管症)。

III 結 果

今回の検討対象となった症例の臨床的基本データを表 1 に示す。PCV 群, AMD 群, 対照群に年齢と性別構成の差はなかった。併発する全身疾患では AMD 群, PCV 群で高血圧, 心血管疾患, 脳血管疾患の頻度が対照群に比べ高い傾向にあったが, 逆に糖尿病, 高脂血症は対照群が多い傾向であった。喫煙歴も AMD 群, PCV 群では高い傾向にあった。病巣サイズは PCV 群 $4,366 \pm 2,679$ (平均値 \pm 標準誤差) μm , AMD 群 $3,360 \pm 2,495 \mu\text{m}$ と PCV 群の方がやや大きく, PCV の 74%

(23 例), AMD の 84% (16 例) が片眼性症例であった。

PCV のうち FA で classic 病巣を認めたものは 6 例 (19%) であった。

末梢血骨髄由来幹細胞の Hill アッセイによるコロニー形成能 (CFU-Hill) は対照群, AMD 群, PCV 群で有意な差はみられなかった (図 1 a)。細胞遊走能は対照群, AMD 群, PCV 群の順に低くなる傾向にあったが, 有意な差はみられなかった (図 1 b)。PCV 群 31 例のうち, 両眼性症例は 8 例, 片眼性症例は 23 例であったが, 両眼性の症例は片眼性の症例に比べ CFU-Hill, 細胞遊走能ともに低値であり, CFU-Hill は統計学的に有意な

差が認められた(図 2a, 2b). 次に, PCV を合計病巣サイズにより $5,000\ \mu\text{m}$ 未満と以上の 2 群に分け, CFU-Hill, 細胞遊走能を比較した. CFU-Hill では 2 群の間に大きな差がみられたが, 遊走能には有意な差を認めなかった(図 2c, 2d). さらに, PCV に type 2 CNV を合併していると考えられる症例を抽出し, 同様に比較してみた. 統計学的な有意差は認められなかったが, type 2 CNV 合併例ではそうでないものに比べ, 平均値で約 30% の細胞遊走機能低下がみられた(図 2f). CFU-Hill も type 2 CNV 合併例で同様に低下傾向が認められた(図 2e).

IV 考 按

滲出型加齢黄斑変性でみられる CNV は, 脈絡膜血管叢からの新生血管形成がその病理的主体であると考えられている²⁸⁾. 多くの臨床的症状が, その形成された新生血管によって生じるため, 脈絡膜新生血管を抑制することが治療には重要である. 臨床的に, CNV を色素上皮下でとどまる Gass type 1 CNV とさらに網膜下まで侵入する Gass type 2 CNV に分けて考えることが多く, 最近ではこれまでの造影検査に加えて光干渉断層計(optical coherence tomography : OCT)を使ってこの分類を行うことが多くなった. この Gass が報告した分類は臨床像や臨床経過ともよく相関するため CNV を論ずるときには欠かせないものとなっている. PCV は Yannuzzi らによって報告された疾患群である¹⁾. フルオレセイン蛍光眼底造影では occult CNV として描出され, 上記の Gass type 1 CNV ではあるが, インドシアニングリーン蛍光眼底造影では特徴的なポリープ状血管病巣と分枝状血管(ネットワーク血管)が描出されることから, これらの所見がみられない AMD(いわゆる狭義滲出型 AMD)とは区別して理解すべきであると考えられている²⁹⁾. 確かに, 臨床所見や臨床経過などが PCV に特有であるものも多く, 他の AMD と区別して診断することは臨床的に重要である. しかし, PCV と狭義滲出型 AMD は同一症例で共存することもあり^{30)~32)}, 臨床経過中にもその形態が変化することがある³³⁾. また, 最近明らかになりつつある AMD の感受性遺伝子も両者の間で区別することは難しい(未発表データ). このような異なる表現型が生ずるメカニズム解明にはさらなる検討が必要である.

今回我々は, PCV 患者の末梢血中に存在する骨髄由来幹細胞のコロニー形成能(CFU)を Hill らの方法を用いて測定し, 病態との比較検討を行った. その結果, PCV 病巣が大きい症例, 両眼性の症例で CFU-Hill が有意に低いことが分かった. この結果は以前我々が同様に行った, 広義滲出型 AMD における検討と同様の傾向であり²⁴⁾, 狭義 AMD にて検討を行った結果も同じ傾向であった(データ提示なし). つまり, 末梢血骨髄由来幹

細胞は PCV についてもその病態に関与している可能性が推察された. また, 症例数の問題から統計学的な有意差は検出されなかったが, PCV に Gass type 2 CNV を合併する症例では CFU-Hill, 遊走能ともに低い傾向にあった. 病巣の大きさは二次元的に計測しているが, 三次元方向への拡大にも関与しているのかもしれない. また, この Hill アッセイのデータは末梢血中の骨髄由来幹細胞数も反映していると思われ, 末梢血骨髄由来幹細胞の疾患に対する機能を総合的に判断できていると考えている.

骨髄由来細胞が CNV 形成に関与することはこれまでの研究から強く示唆されている¹⁶⁾¹⁹⁾. 摘出 CNV の組織学的検討では CNV は血管と結合組織からなる増殖膜組織を形成しており, その構成細胞にはマクロファージ, 単球など多くの骨髄由来細胞が含まれている. 実験的 CNV モデルでの検討でも, 移植した骨髄由来細胞が CNV の血管細胞などに分化して存在することが報告されている. CNV 内のマクロファージは VEGF など増殖因子の供給源として CNV 形成にかかわるとも考えられている²²⁾. 逆にマクロファージが CNV 形成を抑制するとの研究もある³⁴⁾. 我々も, CNV の活動性に伴った末梢血骨髄由来幹細胞数の変化をヒト症例で見出し, 実験的に骨髄由来細胞を変化させるだけで CNV の大きさを強力にコントロールできることを証明している(未発表データ). PCV 病巣が重篤化した症例で骨髄由来幹細胞の CFU-Hill アッセイで測定した機能が低いという本研究の結果は, 細胞の CNV 形成への積極的関与をより強く示すと同時に, 骨髄由来幹細胞が本来の機能を発揮できた場合には CNV 形成に対し抑制的に働く可能性を示唆している. 加齢や喫煙といった, CNV 発症・進行のリスク^{35)~37)}により骨髄由来幹細胞の機能が低下することが報告されており³⁸⁾, これも今回の結果や解釈と矛盾しない. また, PCV でも骨髄由来幹細胞が関与し, その傾向が AMD と同一であることは, PCV と AMD の病理的な共通背景を示すと同時に, PCV の特徴的な表現型自体には骨髄由来幹細胞はそれほど関与していないことを示しているのかもしれない. しかし, 骨髄由来細胞の機能低下がどのように PCV や AMD での CNV 形成にかかわるのかは不明である. 今回の PCV の結果と以前に報告した AMD の結果からはその発症と骨髄由来幹細胞に関連を見出すことはできず, 発症後の病態修飾に関与するのではないかと推察できる. 我々は骨髄由来幹細胞は本来, 網膜脈絡膜疾患に反応して骨髄からの誘導数が増え, 疾患制御を行っているのではないかと考えている. AMD ではその病態によって末梢血中細胞数が増えること²⁴⁾, 網膜色素変性では変性に伴い網膜に骨髄由来細胞(多くはマイクログリア)が誘導されること³⁹⁾を報告した. また, その機能が網膜変性の進行阻止の方向であることも示した³⁹⁾⁴⁰⁾. さらに, 強度近視に併

発する CNV, 若年性 CNV の病態にも骨髄由来幹細胞機能が関与していることを見出している⁴¹⁾⁴²⁾. 特に若年性 CNV では AMD 患者とは異なり発症者で有意に骨髄由来幹細胞機能が低下しており, 状況によっては CNV 発症にも関与しているのかもしれない. また, 実験的には CNV 拡大を骨髄由来幹細胞機能を賦活することで阻止することができる(投稿準備中). これらの結果から, 現時点では骨髄由来幹細胞が疾患の安定化に働いていると考えており, その機能が障害されると疾患が重篤化するのではないかと考え, さらなる研究を行っている.

本研究で測定した骨髄由来幹細胞の機能は 2 つのみであり, すべての機能を反映できてはいない. ほんの一面を見ているだけである. 分化しうる細胞が多岐にわたる骨髄由来幹細胞の関与メカニズム解明にはまだまだ研究が必要である. しかし, これまでの検討ではその関与は予想以上に強く, 将来の新治療へ応用できると考えている. PCV に効果的とされた光線力学的療法でも, 長期的には PCV 再発などを来し, 予後がそれほど良好ではないことも分かってきた³³⁾⁴³⁾. PCV には抗 VEGF 薬の効果は他の AMD ほど強くないことも示唆され始めている⁴⁴⁾. さらなる PCV の病態理解と新たな治療法が必要であろう.

文 献

- 1) Yannuzzi LA, Sorenson J, Spaide RF, Lipson B : Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy (IPCV). *Retina* 10 : 1—8, 1990.
- 2) Maruko I, Iida T, Saito M, Nagayama D, Saito K : Clinical characteristics of exudative age-related macular degeneration in Japanese patients. *Am J Ophthalmol* 144 : 15—22, 2007.
- 3) Moorthy RS, Lyon AT, RabbMF, Spaide RF, Yannuzzi LA, Jampol LM : Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy of the macula. *Ophthalmology* 105 : 1380—1385, 1998.
- 4) Uyama M, Matsubara T, Fukushima I, Matsunaga H, Iwashita K, Nagai Y, et al : Idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese patients. *Arch Ophthalmol* 117 : 1035—1042, 1999.
- 5) Uyama M, Wada M, Nagai Y, Matsubara T, Matsunaga H, Fukushima I, et al : Polypoidal choroidal vasculopathy : natural history. *Am J Ophthalmol* 133 : 639—648, 2002.
- 6) Akaza E, Yuzawa M, Matsumoto Y, Kashiwaura S, Fujita K, Mori R : Role of photodynamic therapy in polypoidal choroidal vasculopathy. *Jpn J Ophthalmol* 51 : 270—277, 2007.
- 7) Chan WM, Lam DS, Lai TY, Liu DT, Li KK, Yao Y, et al : Photodynamic therapy with verteporfin for symptomatic polypoidal choroidal vasculopathy : one-year results of a prospective case series. *Ophthalmology* 111 : 1576—1584, 2004.
- 8) Ogino T, Takeda M, Imaizumi H, Okushiba U : Photodynamic therapy for age-related macular degeneration in Japanese patients : results after one year. *Jpn J Ophthalmol* 51 : 210—215, 2007.
- 9) Otani A, Sasahara M, Yodoi Y, Aikawa H, Tamura H, Tsujikawa A, et al : Indocyanine green angiography : guided photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Am J Ophthalmol* 144 : 7—14, 2007.
- 10) Okubo A, Sameshima M, Uemura A, Kanda S, Ohba N : Clinicopathological correlation of polypoidal choroidal vasculopathy revealed by ultrastructural study. *Br J Ophthalmol* 86 : 1093—1098, 2002.
- 11) Rosa RH, Jr., Davis JL, Eifrig CW : Clinicopathologic reports, case reports, and small case series : clinicopathologic correlation of idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy. *Arch Ophthalmol* 120 : 502—508, 2002.
- 12) Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, et al : HTRA 1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 314 : 989—992, 2006.
- 13) Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al : Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308 : 385—389, 2005.
- 14) Kondo N, Honda S, Ishibashi K, Tsukahara Y, Negi A : LOC 387715/HTRA1 variants in polypoidal choroidal vasculopathy and age-related macular degeneration in a Japanese population. *Am J Ophthalmol* 144 : 608—612, 2007.
- 15) Leveziel N, Zerbib J, Richard F, Querques G, Morineau G, Fremeaux-Bacchi V, et al : Genotype-phenotype correlations for exudative age-related macular degeneration associated with homozygous HTRA1 and CFH genotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 3090—3094, 2008.
- 16) Espinosa-Heidmann DG, Caicedo A, Hernandez EP, Csaky KG, Cousins SW : Bone marrow-derived progenitor cells contribute to experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4914—4919, 2003.
- 17) Kvanta A, Algere PV, Berglin L, Seregard S : Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1929—1934, 1996.
- 18) Nakajima M, Yuzawa M, Shimada H, Mori R : Correlation between indocyanine green angiographic findings and histopathology of polypoidal choroidal vasculopathy. *Jpn J Ophthalmol* 48 : 249—255, 2004.
- 19) Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, et al : The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1891—1898, 1999.
- 20) 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.
- 21) **Tsutsumi-Miyahara C, Sonoda KH, Egashira K, Ishibashi M, Qiao H, Oshima T**, et al : The relative contributions of each subset of ocular infiltrated cells in experimental choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 88 : 1217—1222, 2004.
- 22) **Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, Cousins SW** : Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3586—3592, 2003.
- 23) **Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J** : Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3578—3585, 2003.
- 24) **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.
- 25) 日本ポリープ状脈絡膜血管症研究会 : ポリープ状脈絡膜血管症の診断基準. *日眼会誌* 109 : 417—427, 2005.
- 26) **Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA**, et al : Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348 : 593—600, 2003.
- 27) **Maliakal JC** : Quantitative high throughput endothelial cell migration and invasion assay system. *Methods Enzymol* 352 : 175—182, 2002.
- 28) **Green WR, Enger C** : Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* 100 : 1519—1535, 1993.
- 29) **Yannuzzi LA, Ciardella A, Spaide RF, Rabb M, Freund KB, Orlock DA** : The expanding clinical spectrum of idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy. *Arch Ophthalmol* 115 : 478—485, 1997.
- 30) **Chen Y, Wen F, Sun Z, Wu D** : Polypoidal choroidal vasculopathy coexisting with exudative age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol* 28 : 119—123, 2008.
- 31) **Tamura H, Tsujikawa A, Otani A, Gotoh N, Sasahara M, Kameda T**, et al : Polypoidal choroidal vasculopathy appearing as classic choroidal neovascularisation on fluorescein angiography. *Br J Ophthalmol* 91 : 1152—1159, 2007.
- 32) 尾辻 剛, 津村晶子, 高橋寛二, 正 健一郎, 永井由巳, 福地俊雄, 他 : 自然経過観察中に classic 脈絡膜新生血管の所見を示したポリープ状脈絡膜血管症の検討. *日眼会誌* 110 : 454—461, 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) **Apte RS, Richter J, Herndon J, Ferguson TA** : Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *PLoS Med* 3 : e 310, 2006.
- 35) **Clemons TE, Milton RC, Klein R, Seddon JM, Ferris FL, 3rd** : Risk factors for the incidence of advanced age-related macular degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology* 112 : 533—539, 2005.
- 36) **Fraser-Bell S, Wu J, Klein R, Azen SP, Hooper C, Foong AW**, et al : Cardiovascular risk factors and age-related macular degeneration : the Los Angeles Latino Eye Study. *Am J Ophthalmol* 145 : 308—316, 2008.
- 37) **Hughes AE, Orr N, Patterson C, Esfandiary H, Hogg R, McConnell V**, et al : Neovascular age-related macular degeneration risk based on CFH, LOC 387715/HTRA1, and smoking. *PLoS Med* 4 : e355, 2007.
- 38) **Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A** : Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 187 : 423—432, 2006.
- 39) **Sasahara M, Otani A, Oishi A, Kojima H, Yodoi Y, Kameda T**, et al : Activation of bone marrow-derived microglia promotes photoreceptor survival in inherited retinal degeneration. *Am J Pathol* 172 : 1693—1703, 2008.
- 40) **Otani A, Dorrell MI, Kinder K, Moreno SK, Nusinowitz S, Banin E**, et al : Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 114 : 765—774, 2004.
- 41) **Sasahara M, Otani A, Yodoi Y, Gotoh N, Kameda T, Yoshimura N** : Circulating hematopoietic stem cells in patients with choroidal neovascularization secondary to pathologic myopia. *Eye* 23 : 718—726, 2009.
- 42) **Sasahara M, Otani A, Yodoi Y, Yoshimura N** : Circulating hematopoietic stem cells in patients with idiopathic choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 1575—1579, 2009.
- 43) **Akaza E, Mori R, Yuzawa M** : Long-term results of photodynamic therapy of polypoidal choroidal vasculopathy. *Retina* 28 : 717—722, 2008.
- 44) **Gomi F, Sawa M, Sakaguchi H, Tsujikawa M, Oshima Y, Kamei M**, et al : Efficacy of intravitreal bevacizumab for polypoidal choroidal vasculopathy. *Br J Ophthalmol* 92 : 70—73, 2008.