

平成 21 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

眼内増殖性疾患における増殖膜収縮のメカニズム解明および
ROCK 阻害薬による病態制御の可能性

喜多 岳志

九州大学大学院医学研究院眼科学分野

要 約

増殖糖尿病網膜症 (PDR) や増殖硝子体網膜症 (PVR) といった眼内増殖性疾患において、網膜面上に形成される線維性増殖膜の癒痕収縮は、重篤な視力障害の直接的原因となる。本検討にて、手術の際に採取した硝子体液中で直接コラーゲンゲルに包埋した硝子体細胞 (ヒアロサイト) を刺激した結果、硝子体中の transforming growth factor- β (TGF- β) が増殖膜の癒痕収縮に中心的な役割を果たすことを示し、さらにその分子メカニズムの一端として Rho-kinase (ROCK) の重要性を明らかにした。また、選択的 ROCK 阻害薬である fasudil は硝子体液中

によるコラーゲンゲル収縮をほぼ完全に抑制し、ウサギ PVR モデルの進行を効果的に抑制した。Rho/ROCK 経路は TGF- β のみならず収縮にかかわる他のサイトカインにも共通した収縮を直接司る経路であると考えられ、ROCK 阻害薬は眼内増殖性疾患の新規治療薬になりうると考えられた。(日眼会誌 114 : 927—934, 2010)

キーワード : 増殖糖尿病網膜症, 増殖硝子体網膜症, 形質転換増殖因子- β , Rho-kinase 阻害薬

A Review

Molecular Mechanisms of Preretinal Membrane Contraction in Proliferative Vitreoretinal Diseases and ROCK as a Therapeutic Target

Takeshi Kita

Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Abstract

Cicatricial contraction of preretinal fibrous membrane is a cause of severe vision loss in proliferative vitreoretinal diseases such as proliferative diabetic retinopathy (PDR) and proliferative vitreoretinopathy (PVR). In this study, vitreous samples from PDR or PVR patients caused significantly stronger contraction of hyalocyte-containing collagen gels, an *in vitro* model of cicatricial contraction, compared with those from nonproliferative controls. We elucidated the critical role of transforming growth factor- β (TGF- β) in the contractile effect and its underlying mechanisms mediating cicatricial contraction in proliferative vitreoretinal diseases at least in part. Fasudil, a potent and selective Rho-kinase (ROCK) inhibitor, almost completely blocked collagen gel

contraction induced by vitreous samples. In addition, fasudil significantly inhibited the progression of experimental PVR in rabbit eyes *in vivo*. Rho/ROCK pathway, considered to be a key downstream mediator of TGF- β and other contractile-inducing factors, might become a unique therapeutic target for the treatment of proliferative vitreoretinal diseases.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 114 : 927—934, 2010)

Key words : Proliferative diabetic retinopathy, Proliferative vitreoretinopathy, Transforming growth factor- β , Rho-kinase inhibitor

別刷請求先 : 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学大学院医学研究院眼科学分野 喜多 岳志

(平成 22 年 4 月 13 日受付, 平成 22 年 6 月 15 日改訂受理) E-mail : kita@eye.med.kyushu-u.ac.jp

Reprint requests to : Takeshi Kita, M. D. Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received April 13, 2010 and accepted in revised form June 15, 2010)

I 眼内増殖性疾患の病態

近年の網膜硝子体手術の飛躍的な進歩により、増殖糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy : PDR) によって光覚まで失う完全失明者は減少傾向にあるが、未だに社会的失明者の増加に歯止めをかけられていないのが実情である¹⁾。また、増殖硝子体網膜症 (proliferative vitreoretinopathy : PVR) の発症は片眼性の場合が多く、また続発性病態であるなどの理由から社会的失明の原因疾患名としては表面化しないが、いったん発症するとその視力予後はきわめて不良である²⁾。これら眼内増殖性疾患の治療として硝子体手術の寄与するところは非常に大きいですが、視力予後という観点からすると手術だけでは限界があるのも事実である。

眼内増殖性疾患の進行において、過剰な創傷治癒反応の結果、眼内で産生が亢進するさまざまな生理活性物質の働きにより線維性の増殖膜が網膜硝子体界面に形成される。その増殖膜は進行に伴い瘢痕・収縮し、牽引性網膜剥離を引き起こし、重篤な視機能障害の直接的原因と

なる。牽引性網膜剥離であっても、硝子体手術によって網膜の復位という解剖学的治癒は高率に得られるようになったが、その視力予後は依然として不良である。さらに、増殖膜の再増殖・牽引による網膜再剥離の危険性もあり、繰り返しの手術を要するほど、患者・術者双方にとって満足度が低下する厄介な病態である。したがって、外科的治療を要するにまで至らないより早期段階での、あるいは外科的治療を要するに至った場合でも再手術のリスクを軽減し、加えて術後により良好な視機能を維持するための薬物療法の確立が急務である。

II 増殖膜収縮における TGF- β の重要性

牽引性網膜剥離を引き起こす原因となる増殖膜の収縮機構には、形質転換増殖因子- β (transforming growth factor- β : TGF- β)³⁾、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor : PDGF)³⁾⁴⁾、インスリン様増殖因子 (insulin-like growth factor-1 : IGF-1)⁴⁾、エンドセリン⁵⁾ などさまざまな生理活性物質が関与することが報告されている。その一つとして、TGF- β は、分化、アポトー

シス、遊走、免疫抑制、細胞外マトリックスの産生、収縮などの非常に多彩な作用を有するサイトカインであり⁶⁾、TGF- β 1、 β 2、 β 3 の 3 つのアイソフォームが存在する。TGF- β はすべて活性を有さない latent form として産生され、さまざまな化学的、酵素的な要素によって活性化されることが知られている^{7)~9)}。

本検討において、硝子体中の全(活性型+非活性型) TGF- β 1、全 TGF- β 2、活性型 TGF- β 2 のそれぞれの濃度を測定したところ、いずれも PDR、PVR の硝子体において、非増殖性疾患である黄斑円孔(macular hole : MH)や裂孔原性網膜剝離(rhegmatogenous retinal detachment : RRD)の硝子体と比較して有意に高い濃度を示した。また、全 TGF- β 1 濃度は全 TGF- β 2 濃度と比較すると十分の一以下と非常に低い濃度であり、活性型 TGF- β 1 濃度は全例で測定感度以下であった(図 1 A~C)。さらに、活性型 TGF- β 2 濃度は全 TGF- β 2 濃度のおよそ 4.5% を占め、活性型 TGF- β 2 濃度と全 TGF- β 2 濃度は有意な相関を示した¹⁰⁾(図 1 D)。

次に、コラーゲンをういた *in vitro* の癬痕収縮モデルを用いて¹¹⁾、増殖膜を構成する細胞の一つと考えられている硝子体細胞(ヒアロサイト)を包埋したコラーゲンを、硝子体手術の際に採取した硝子体液で刺激す

ると、PDR や PVR 硝子体液は MH や RRD の硝子体液と比較して有意に強いゲルの収縮を誘導し、その収縮は TGF- β の 3 つのアイソフォームすべてに対して効果のある TGF- β の中和抗体で不完全ながらも非常に強く抑制された(図 2 A, B)。さらに、その収縮の程度は硝子体中の全 TGF- β 2 濃度とは有意な相関を示さないものの、活性型 TGF- β 2 濃度と非常に強い相関を示した($r=0.82$, $p<0.0001$) (図 2 C, D)。これらのことから、増殖膜の収縮には硝子体中の TGF- β 、その中でも眼内に多く存在している TGF- β 2 が非常に重要な役割を担っていると考えられた。しかしながら、TGF- β 中和抗体の効果は不十分なことから、前述した収縮に関与すると考えられている TGF- β 以外の因子の関与も示唆された。つまり、TGF- β だけを分子標的としても治療効果は不十分と考えられた。そのうえ、TGF- β は生理的な状態でも眼内に存在しており、細胞のアポトーシスや過剰な免疫の抑制などの多彩な機能を有し、眼内の恒常性維持に非常に重要な役割を果たしている¹²⁾。そのため、TGF- β そのものを分子標的とすることは、これらの重要な機能をも阻害してしまうことによる細胞の癌化や自己免疫疾患の誘発など、重篤な副作用を引き起こす可能性が危惧され、治療標的とすることは困難とも考えられた¹³⁾。

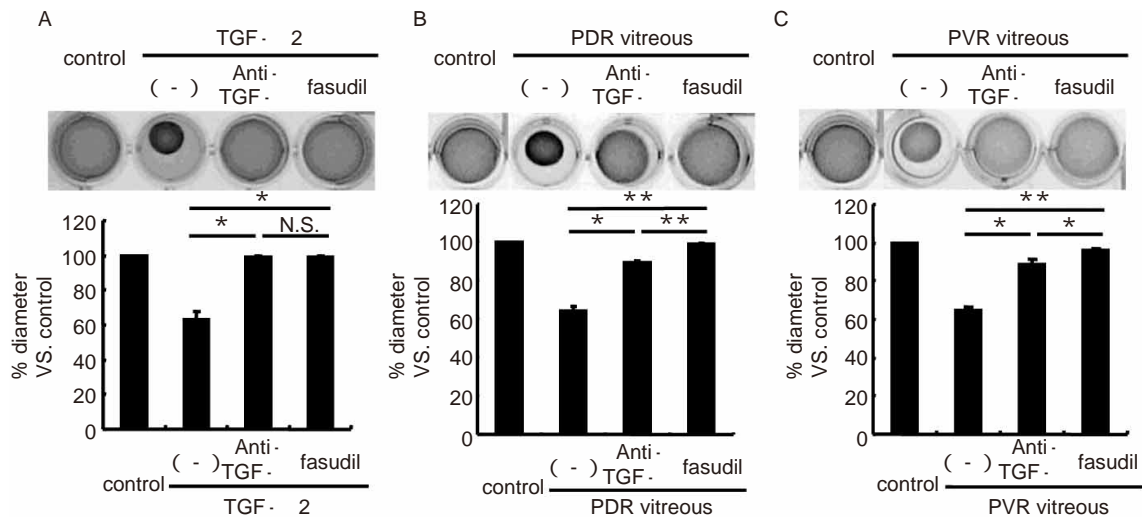


図 3 リコンビナント TGF-β2 (A), PDR 硝子体液 (B), PVR 硝子体液 (C) によって誘導されるヒアロサイトを包埋したコラーゲルゲルの収縮に対する TGF-β 中和抗体と fasudil による阻害作用。TGF-β に対する中和抗体はリコンビナント TGF-β2 による収縮を完全に抑制したが、PDR 硝子体液および PVR 硝子体液による収縮に対しては著明に抑制するもののその効果は不十分であった。一方で fasudil はいずれによる収縮もほぼ完全に抑制した。*: p<0.05, **: p<0.01, N.S.: not significant (有意差なし)。(文献 10, 図 3 より転載)

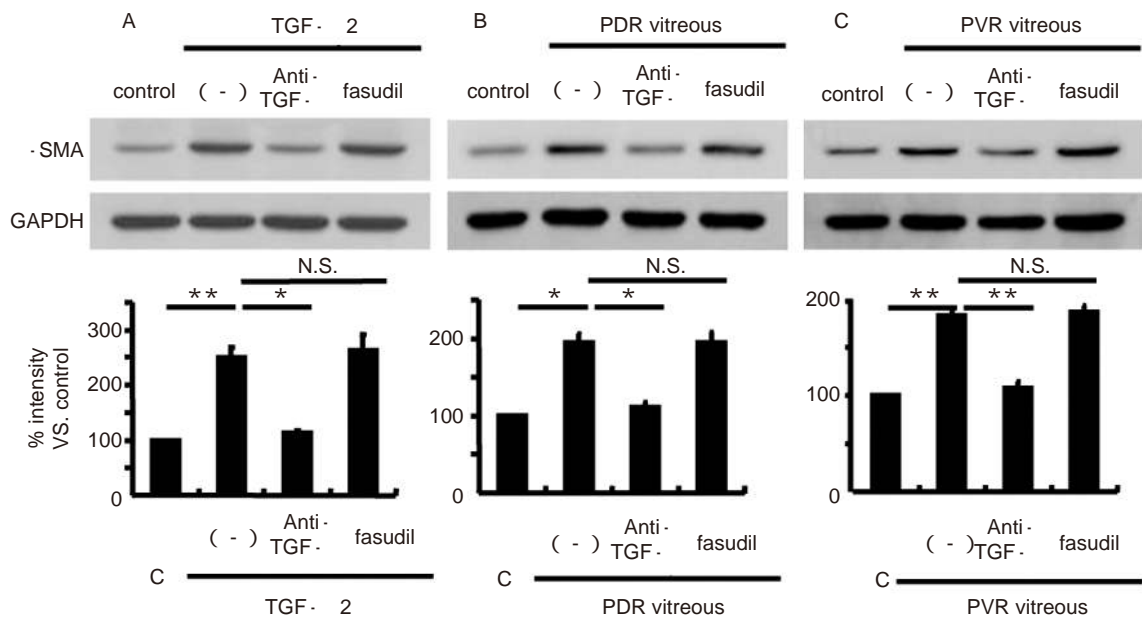


図 4 α-SMA の発現における TGF-β 中和抗体および fasudil の効果。リコンビナント TGF-β2 (A), PDR 硝子体液 (B), PVR 硝子体液 (C) はいずれも α-SMA (α-smooth muscle actin) の発現を有意に亢進させ、TGF-β に対する中和抗体はそれらによって亢進した発現を著明に抑制した。このことから硝子体液による α-SMA の発現亢進は主に硝子体中の TGF-β によるものであることが分かる。一方で fasudil は α-SMA の発現には影響を与えなかった。*: p<0.05, **: p<0.01, N.S.: not significant (有意差なし)。(文献 10, 図 4 より転載)

III ROCK 阻害薬の効果と増殖膜の収縮機序

そこで、より収縮シグナルの末端に作用する薬剤として、我々は Rho-kinase (ROCK) 阻害薬に着目した。選択的 ROCK 阻害薬である fasudil は、細胞収縮を阻害する作用を有し、脳血管や冠動脈の攣縮、狭心症など幅広い

心・血管疾患に対する治療目的で既に注射薬として臨床応用されている薬剤で¹⁴⁾、内服薬での臨床治験も進行中である。リコンビナント TGF-β2, PDR を有する硝子体液, PVR を有する硝子体液によって誘導されるコラーゲンゲル収縮のいずれに対しても、fasudil は TGF-β 中和抗体では抑制できなかった部分も含めてほぼ完全に抑

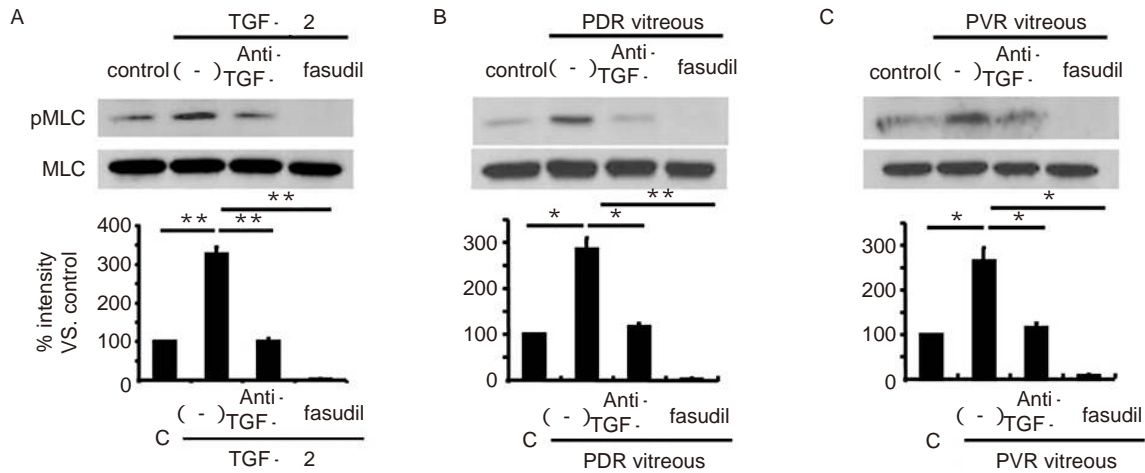


図 5 Fasudil がミオシン軽鎖(MLC)リン酸化に与える影響.

リコンビナント TGF- β 2(A), PDR 硝子体液(B), PVR 硝子体液(C)はいずれも MLC のリン酸化を有意に亢進させ, TGF- β に対する中和抗体はそれらによって亢進したリン酸化を著明に抑制した. このことから硝子体液による MLC のリン酸化亢進は α -SMA の発現と同様に, 主に硝子体中の TGF- β によるものであると考えられる. 一方で fasudil は MLC のリン酸化をほぼ完全に抑制した. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

(文献 10, 図 5 より転載)

制した(図 3).

この眼内増殖性疾患を有する硝子体液による収縮メカニズムおよび fasudil の作用メカニズムを検討したところ, 眼内増殖性疾患を有する硝子体液による刺激によって, より強い収縮力をもつ筋線維芽細胞への形質転換を示す分子である α -smooth muscle actin(α -SMA)の発現は亢進し(図 4), さらに収縮シグナルであるミオシン軽鎖(myosin light chain: MLC)のリン酸化の亢進も認められた(図 5). そして, 双方とも TGF- β に対する中和抗体で著明に抑制されたことから, これらが主に TGF- β によって誘導されると考えられた.

Fasudil は硝子体液刺激による α -SMA の発現亢進は阻害しないものの(図 4), コラーゲンゲルに包埋したヒアロサイトの免疫細胞学的な検討から, fasudil は α -SMA の規則的な分布を阻害することが明らかとなった(図 6). さらに, fasudil は硝子体液による MLC のリン酸化亢進をほぼ完全に抑制した(図 5). すなわち, fasudil は細胞が α -SMA を発現するようになる筋線維芽細胞への形質転換そのものは阻害しないものの, ROCK を阻害することで収縮に直接作用するシグナルである MLC のリン酸化およびそれに引き続き強い収縮力に重要な役割を果たす α -SMA の規則的な分布¹⁵⁾を阻害することによって, 硝子体液が有する収縮作用をほぼ完全に抑制したと考えられた. 収縮シグナルである MLC のリン酸化は, TGF- β のみならず, 前述した TGF- β 以外の収縮促進因子にも共通したシグナルであるため^{3)16)~18)}, ROCK を標的とすることは TGF- β そのものを分子標的とするよりも現実的かつ効率的であると考えられる.

また, *in vivo* において家兎を用いた増殖硝子体網膜症モデル¹⁹⁾の進行に対する fasudil の効果を検討したと

ころ, fasudil は, 低濃度(10 μ M)では病態初期において抑制効果があるのみであったが, 30 μ M の濃度では病態の進行を著明に抑制した. また, 増殖膜が形成された段階(stage 2)から fasudil を投与してもその後の PVR の進行を有意に抑制した(図 7 A). さらに, 増殖膜中の α -SMA を免疫組織学的に検討すると, コラーゲンゲルに包埋したヒアロサイトの場合と同様に自然経過で進行した PVR(stage 5)で見られる増殖膜では α -SMA が強く発現しており, その分布も規則的であり, 増殖膜が網膜を牽引している像が観察された. 一方で fasudil を作用させた増殖膜では, α -SMA の発現は保たれているものの, その規則的な分布が阻害されており, 増殖膜自体も収縮力を失い, 増殖膜による網膜の牽引は観察されなかった(図 7 B~G).

最後に, fasudil の網膜毒性について電気生理学的, 光学顕微鏡的, 電子顕微鏡的な検討に加え, アポトーシスを TUNEL 染色で評価したところ, 有効濃度(30 μ M)においていずれの検討においても明らかな網膜毒性は示さなかった(図 8).

IV おわりに

眼内増殖性疾患における増殖膜の癒着収縮機構にはさまざまな生理活性物質が関与することが過去に報告されている. その中で TGF- β は PDR や PVR の硝子体中に高い濃度で存在しており²⁰⁾²¹⁾, また増殖膜中にもその発現が確認されている²²⁾. さらに, TGF- β は *in vitro* にて強い収縮作用を示すこと³⁾から, この病態において TGF- β が重要な役割を有するのではないかということはこれまででも推測されていた. 本検討は, この推測に直接的なエビデンスを与えるという意味で大変意義深いもので

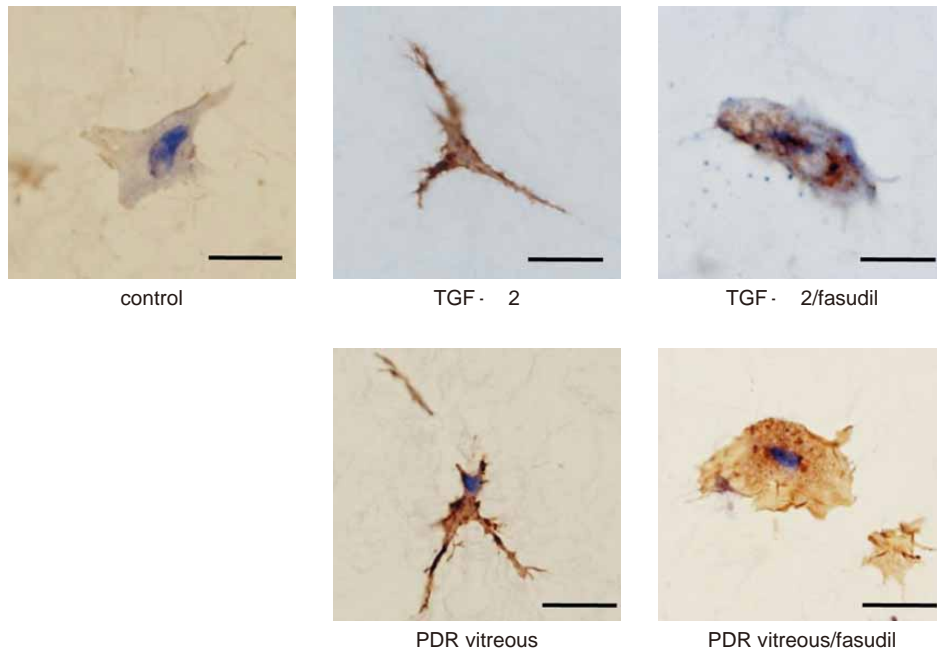


図 6 コラーゲンゲルに包埋したヒアロサイトにおける α -SMA の免疫細胞学的検討。リコンビナント TGF- β 2 および PDR の硝子体液で刺激したヒアロサイトは細胞突起を伸ばし、それに沿って α -SMA (茶色) の規則的な発現を認めた。一方でそれぞれに fasudil (20 μ M) を作用させた細胞では、 α -SMA の発現自体は保たれているものの、その組織的な分布が阻害され、細胞の形態は楕円状となり、細胞突起を伸ばしている像は観察されない。スケールバーは 10 μ m。

(文献 10, 図 S2 より転載)

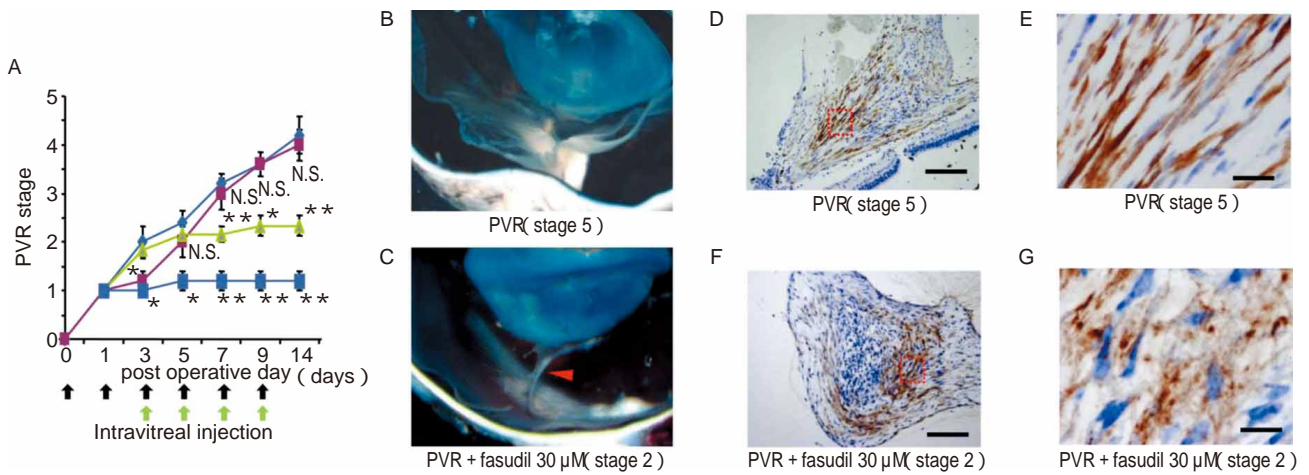


図 7 Fasudil の家兎 PVR モデルの進行に対する抑制効果。

A : Fasudil は、低濃度 (10 μ M) では病態初期において抑制効果があるのみであったが、30 μ M の濃度では病態の進行を著明に抑制した。また、増殖膜が形成された段階 (stage 2) から fasudil を投与してもその後の PVR の進行を有意に抑制した。◆ : control, ◆ : fasudil 10 μ M, ▲ : fasudil 30 μ M (from stage 2), ◆ : fasudil 30 μ M. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, N.S. : not significant vs. vehicle.
 B, C : 自然経過で進行した stage 5 の PVR 眼を立体顕微鏡で観察すると、網膜面上に形成された増殖膜の癒痕・収縮によって網膜全剥離の状態となっているが、fasudil (30 μ M) を投与した stage 2 の眼内では、網膜に付着した増殖膜 (矢頭) を認めるが、それによる牽引性網膜剥離は認めなかった。さらに、これらの増殖膜中の α -SMA の発現および分布 (茶色) を免疫組織学的に検討すると、stage 5 の増殖膜では発現が充進した α -SMA は増殖膜の牽引方向に規則的に配列していた (D)。一方で fasudil を作用させた stage 2 の増殖膜では、図 6 と同様、 α -SMA の発現は保たれているものの、その規則的な分布が阻害され、増殖膜自体も収縮力を失っている像が観察された (F)。スケールバーは 200 μ m。(E, G はそれぞれ D, F の拡大像。スケールバーは 10 μ m。)

(文献 10, 図 6 より転載)

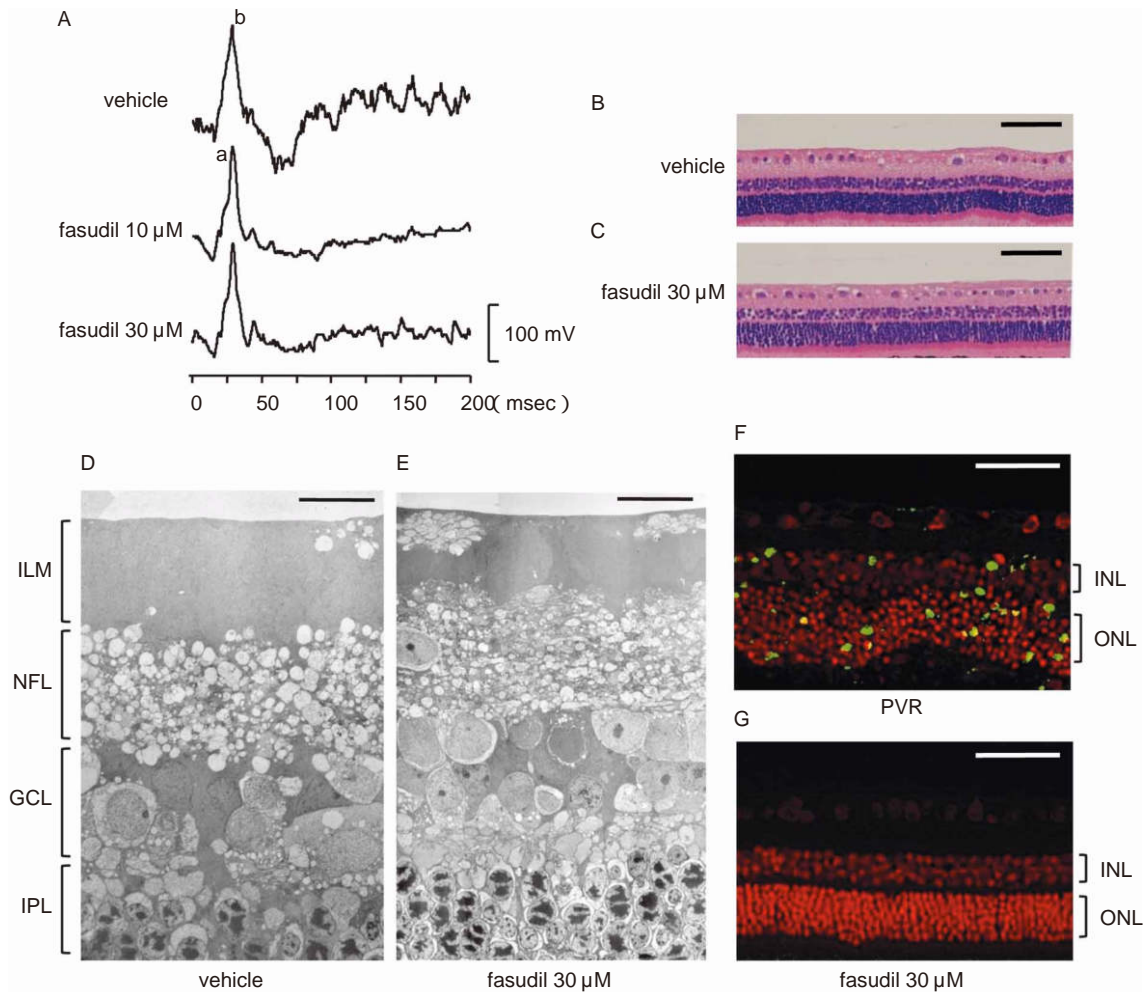


図 8 Fasudil 硝子体腔内投与の安全性評価.

家兎硝子体腔内に $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ の fasudil を 0, 1, 3, 5, 7 日目に投与し, 28 日目に網膜電図を測定した (A). さらに光学顕微鏡 (B, C: スケールバーは $100 \mu\text{m}$), 電子顕微鏡 (D, E: スケールバーは $10 \mu\text{m}$) にて組織学的な評価を行った結果, いずれも fasudil による明らかな網膜毒性を認めなかった. 加えて, アポトーシスを TUNEL 染色にて評価したところ, 陽性対照として用いた PVR 眼では TUNEL 陽性細胞 (緑) が観察されたが (F: スケールバーは $50 \mu\text{m}$), fasudil 投与眼では TUNEL 陽性細胞は観察されなかった (G: スケールバーは $50 \mu\text{m}$). ILM: internal limiting membrane (内境界膜), NFL: nerve fiber layer (神経線維層), GCL: ganglion cell layer (神経節細胞層), IPL: inner plexiform layer (内網状層), INL: inner nuclear layer (内顆粒層), ONL: outer nuclear layer (外顆粒層).

(文献 10, 図 S4 より転載)

あると考えられる. しかしながら, TGF- β のように恒常性の維持にも重要な役割を果たしているような単一のサイトカインを治療標的とすることは思わぬ副作用を引き起こす危険性を孕んでいる. TGF- β 以外の分子についても, 例えば近年では網膜色素上皮細胞由来の血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が脈絡毛細血管板の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが示され, 慢性的に抗 VEGF 療法を行う問題点も指摘され始めている²³⁾. Rho/ROCK 経路は TGF- β のみならず収縮にかかわるあらゆるサイトカインに共通した, シグナルの末端で収縮を直接司る経路であり, さらに今回用いた ROCK 阻害薬である fasudil は, 既に他分野にて臨床応用され, 安全性が確認されている薬剤

であるため, 安全かつ効果的に眼内増殖性疾患の病態を制御できる可能性がある. さらに, fasudil には今回検討した増殖膜の癒着収縮阻害作用に加えて血流改善作用があり²⁴⁾, 神経保護作用を有することも明らかにされている²⁵⁾. 治療 (手術) の成功とは手術の終了時点で評価されるものではなく, その後の視力予後をもって評価されるべきものである. 術後に血流がさらに悪化したり, 網膜が萎縮して徐々に視力が悪化する例も決して少なくないが, 現時点ではほぼ何も手を施すことはできていない. 今回検討した ROCK 阻害薬は, 手術療法だけでは限界がある眼内増殖性疾患の新規治療薬として臨床応用されることが大いに期待される. 今後, 人眼への応用に向けて安全性や投与法のさらなる検討が必要である.

文 献

- 1) **Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, et al : American Diabetes Association :** Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 26 : S 99—102, 2003.
- 2) **Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F :** Proliferative vitreoretinopathy : risk factors and pathology. *Prog Retin Eye Res* 21 : 127—144, 2002.
- 3) **Hirayama K, Hata Y, Noda Y, Miura M, Yamanaka I, Shimokawa H, et al :** The involvement of the Rho-kinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 3896—3903, 2004.
- 4) **Hardwick C, Feist R, Morris R, White M, Wither- spoon D, Angus R, et al :** Tractional force generation by porcine Müller cells stimulation by growth factors in human vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 2053—2063, 1997.
- 5) **Guidry C, Hook M :** Endothelins produced by endothelial cells promote collagen gel contraction by fibroblasts. *J Cell Biol* 115 : 873—880, 1991.
- 6) **Massague J :** TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67 : 753—791, 1998.
- 7) **Brown PD, Wakefield LM, Levinson AD, Sporn MB :** Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor- β 's 1, 2 and 3. *Growth Factors* 3 : 35—43, 1990.
- 8) **Lypns RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL :** Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor- β 1 by plasmin. *J Cell Biol* 110 : 1361—1367, 1990.
- 9) **Miyazono K, Heldin CH :** Role for carbohydrate structures in TGF- β 1 latency. *Nature* 338 : 158—160, 1989.
- 10) **Kita T, Hata Y, Arita R, Kawahara S, Miura M, Nakao S, et al :** Role of TGF- β in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 : 17504—17509, 2008.
- 11) **Kita T, Hata Y, Miura M, Kawahara S, Nakao S, Ishibashi T :** Functional characteristics of connective tissue growth factor on vitreoretinal cells. *Diabetes* 56 : 1421—1428, 2007.
- 12) **Streilein JW, Wilbanks GA, Cousins SW :** Immunoregulatory mechanisms of the eye. *J Neuroimmunol* 39 : 185—200, 1992.
- 13) **Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF :** Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 342 : 1350—1358, 2000.
- 14) **Shimokawa H, Rashid M :** Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci* 28 : 296—302, 2007.
- 15) **Bogatkevich GS, Tourkina E, Abrams CS, Harley RA, Silver RM, Ludwicka-Bradley A :** Contractile activity and smooth muscle α -actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. *Am J Physiol Lung Mol Physiol* 285 : L 334—343, 2003.
- 16) **Zhang X, Lin M, van Golen KL, Yoshioka K, Itoh K, Yee D :** Multiple signaling pathways are activated during insulin-like growth factor- I (IGF-I) stimulated breast cancer cell migration. *Breast Cancer Res Treat* 93 : 159—168, 2005.
- 17) **Miao L, Dai Y, Zhang J :** Mechanism of RhoA/Rho kinase activation in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 : H 983—989, 2002.
- 18) **Kernochan LE, Tran BN, Tangkijvanich P, Melton AC, Tam SP, Yee HF Jr :** Endothelin-1 stimulates human colonic myofibroblast contraction and migration. *Gut* 50 : 65—70, 2002.
- 19) **Fastenberg DM, Diddie KR, Dorey K, Ryan SJ :** The role of cellular proliferation in an experimental model of massive periretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 93 : 565—572, 1982.
- 20) **Connor TB Jr, Roberts AB, Sporn MB, Daniel- pour D, Dart LL, Michels RG, et al :** Correlation of fibrosis and transforming growth factor- β type 2 levels in the eye. *J Clin Invest* 83 : 1661—1666, 1989.
- 21) **Kita T, Hata Y, Kano K, Miura M, Nakao S, Noda Y, et al :** Transforming growth factor- β 2 and connective tissue growth factor in proliferative vitreoretinal diseases : possible involvement of hyalocytes and therapeutic potential of Rho kinase inhibitor. *Diabetes* 56 : 231—238, 2007.
- 22) **Bochaton-Piallat ML, Kapetanios AD, Donati G, Redard M, Gabbiani G, Pournaras CJ :** TGF- β 1, TGF- β receptor II and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2336—2342, 2000.
- 23) **Saint-Geniez M, Kurihara T, Sekiyama E, Malsonado AE, D'Amore PA :** An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 : 18751—18756, 2009.
- 24) **Rikitake Y, Kim H, Huang Z, Seto M, Yano K, Asano T, et al :** Inhibition of rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke* 36 : 2251—2257, 2005.
- 25) **Kitaoka Y, Kitaoka Y, Kumai T, Lam TT, Kuribayashi K, Isenoumi K, et al :** Involvement of RhoA and possible neuroprotective effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Res* 1018 : 111—118, 2004.