

網脈絡膜血管病変の病態解明並びに
新規治療薬の探索に関する研究

増田 智美

目次

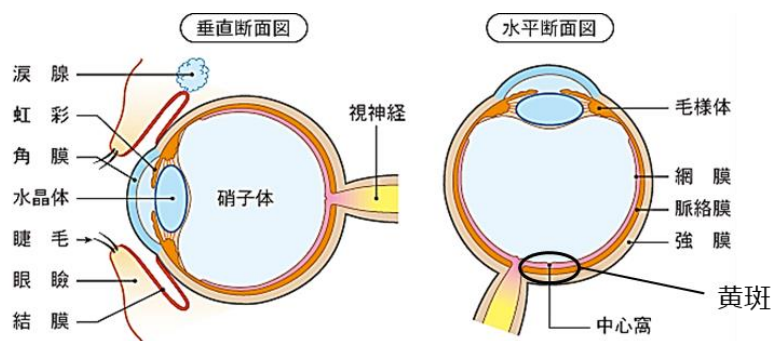
序論	1頁
第1章 コモンマーモセットを用いたレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルの確立	4頁
第1節 緒言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験結果	
第4節 考察	
第2章 脈絡膜血管新生に対するエダラボンの作用	23頁
第1節 緒言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験結果	
第4節 考察	
第3章 糖尿病網膜症におけるアポリポ蛋白質 E (ApoE) の役割	46頁
第1節 緒言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験結果	
第4節 考察	
総括及び結論	73頁
謝辞	76頁
引用文献	77頁
略語一覧表	93頁

序論

視覚は五感の1つであり、外界からの光は網膜の視細胞において電気信号に変換され、視神経を介して大脳皮質の視覚野に到達し認識される。光が網膜に到達するまでに通過する組織（角膜、前房、水晶体、硝子体）には、それを遮る血管は存在せず特異な構造を有する（Fig. 1）。また、黄斑部と呼ばれる網膜の中心部は視力に最も関係している（Fig. 1）。

Fig. 1 眼球の構造

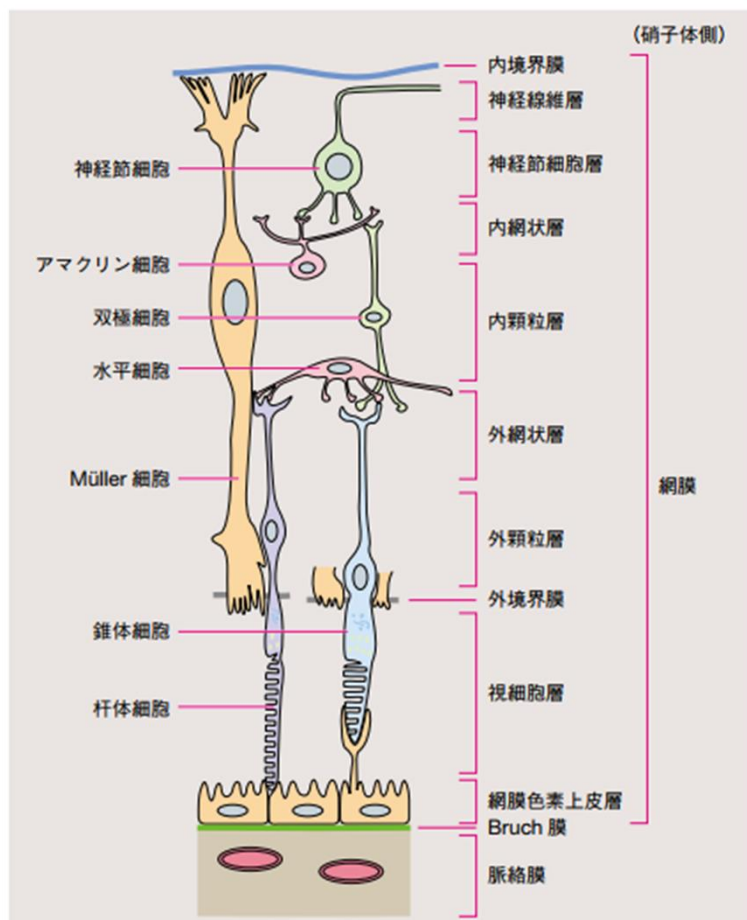
(<https://www.santen.co.jp/ja/healthcare/eye/eyecare/structure/改变>)



網膜は、内境界膜、神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、外境界膜、視細胞層の9層から成る感覚網膜と、1層の網膜色素上皮層で構成され、複雑な構造を持っている（Fig. 2）。さ

Fig. 2 網膜の構造

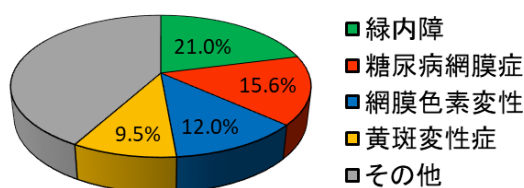
(眼科診療クオリファイ 18 眼底 OCT のすべて 2013 年 中山書店)



らに網膜の外側には、ブルッフ膜や脈絡膜、強膜が存在しており、内側となる眼内は硝子体と呼ばれる透明なゼリー状の組織で満たされている (Fig. 2)。

滲出型加齢黄斑変性症は、脈絡膜血管新生を生じ物理的な傷害及び血管外漏出物による浮腫の形成により、網膜色素上皮及び網膜が障害される。また糖尿病合併症の1つである糖尿病網膜症は、網膜内に異常血管新生や浮腫を生じ網膜が障害される疾患である。とくに黄斑部に変性が起こると、視機能が著しく低下し最悪の場合失明に至る。実際、2013年に

おける日本の中途失明原因は、第2位が糖尿病網膜症、第4位が黄斑変性症



(米国では1位) である (Fig. 3)。

眼内の血管新生や浮腫を含む病態には、血管内皮増殖因子

Fig. 3 日本の中途失明原因疾患 (2013年)

(厚生労働科学研究費補助金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調査研究 平成24年度報告書」を基に作成)

(vascular endothelial growth factor: VEGF) の関与が大きいことが明らかになり、治療方法の1つとして抗VEGF抗体の眼内への直接投与 (硝子体内投与) が確立され、視力改善に大きく貢献している (1-6)。しかしながら、患者の身体的・経済的負担が大きいこと、感染症リスクがあること、一部の患者は抗VEGF抗体に感受性がない (ノンレスポンドー) ことが問題視されている (7-14)。また、世界的な高齢化や糖尿病人口の増加により、加齢黄斑変性症もしくは糖尿病網膜症を発症し、視機能に問題を抱える患者は今後も増加することが予想されている。そのため、VEGFとは異なる治療標的の探索及び抗VEGF抗体と併用可能な治療薬の開発が望まれている。

本研究は、眼内血管新生疾患である滲出型加齢黄斑変性症及び糖尿病網膜症に焦点を当て、その病態解明並びに新規治療薬の探索を目的として行った。

第1章では、ヒトに近い霊長類コモンマーモセットを用いて、滲出型加齢黄斑

変性症病態モデルであるレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを確立した。第2章では、マウス及びコモンマーモセットの滲出型加齢黄斑変性症モデルを用いて、ラジカルスカベンジャーであるエダラボンの効果を検証した。最後に第3章では、糖尿病網膜症患者の硝子体サンプルと各種血管新生モデルを用いて、網膜血管新生に対するアポリポ蛋白質Eの作用を検討し、病態への関与を明らかにした。

1章 コモンマーモセットを用いたレーザー誘発脈絡膜血管新生

モデルの確立

第1節 緒言

加齢黄斑変性症は、視機能障害により患者の生活の質 (quality of life: QOL) を著しく低下させる疾患である。加齢黄斑変性症は、日本においては失明原因第4位 (Fig. 3)、欧米・米国においては失明原因第1位であり (15, 16)、超高齢化社会に伴い年々その患者数は増加している。加齢黄斑変性症はその病状に応じて、萎縮型と滲出型の2つのタイプに分類される。萎縮型は、網膜色素上皮が徐々に萎縮していき (地図状萎縮)、徐々に視力が低下していく。一方、滲出型はVEGFの関与が強く、網膜の外側に位置する脈絡膜に新生血管を生じさせる (choroidal neovascularization: CNV) (Fig. 4)。この新生血管は本来存在しない異常血管であり、その脆弱性のために血漿成分の漏出や出血が起こる (17)。滲出型加齢黄斑変性症の病態進行は早く、視機能を司る黄斑に漏出や出血が起こると、急激な視力低下や最悪の場合失明に至る。そのため、脈絡膜血管新生の予防もしくはその抑制は滲出型加齢黄斑変性症の治療戦略になり得る。現在滲出型加齢黄斑変性症の治療には、抗VEGF抗体が第一選

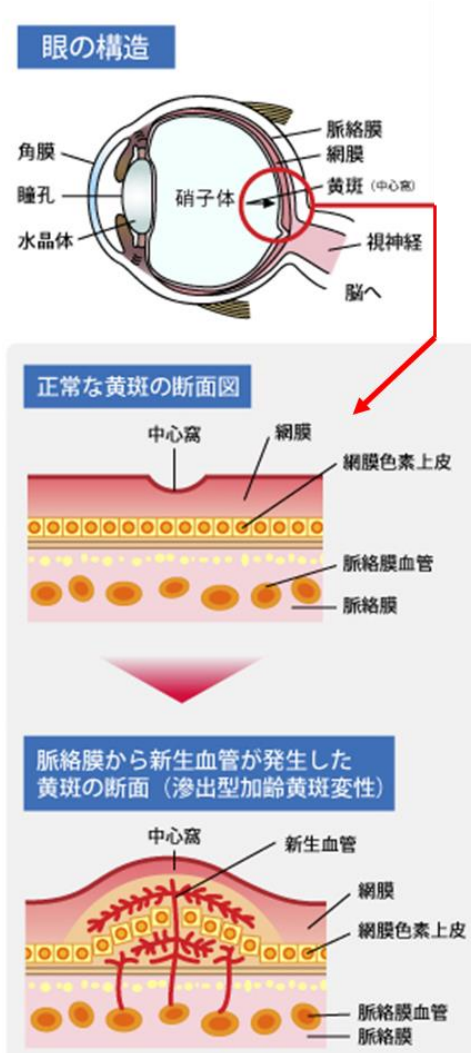


Fig. 4 滲出型加齢黄斑変性症
(http://jsantho.com/eye_disease/加齢黄斑変性症.html より改変掲載)

択であるが、侵襲性が高く感染症のリスクを伴う (0.02 ~ 1.6%) (7-11)。加えて、抗VEGF抗体は高価であり、患者の経済的負担が大きい。さらに、一部の患者は抗VEGF抗体に感受性を示さないノンレスポonderであり、治療の恩恵を受けることができない。以上の理由より、滲出型加齢黄斑変性症に対する新規治療法の開発が切望されている。

レーザー誘発脈絡膜血管新生モデルは、網膜色素上皮及びブルッフ膜へのレーザー照射後、主に炎症細胞の放出する血管新生促進因子により、滲出型加齢黄斑変性症病態の特徴である脈絡膜血管新生を誘発するモデルである。現在、マウス、ラット、ウサギ及び非ヒト霊長類を用いたレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルが汎用されている (18)。げっ歯類を用いる利点は、低コスト、短期間の評価及び容易な遺伝子改変が挙げられる。しかしながら、げっ歯類の動物には黄斑が存在せず、临床上黄斑に脈絡膜新生血管が出現する滲出型加齢黄斑変性症を完全に模倣することはできない。一方、非ヒト霊長類は、高コストや遺伝子改変の難しさなどの欠点があるものの、黄斑を含む身体的構造や遺伝的背景がヒトに近く臨床に近い病態を呈する。

そこで、本研究において、小型霊長類であるコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) (Fig. 5) に着目した。コモンマーモセットは、体長50 cm前後、体重200~500 gの小型サルである。利点としては、コモンマーモセットを用いて疾患モデルを作製した場合、アカゲザル、カニクイザル、及びアフリカミドリザルなどの従来の大型サル (体重>2 kg) を用いる場合に必要な飼育コスト及び評価薬物量を抑えることが可能である。そのため、コモンマーモ



Fig. 5 コモンマーモセット
(https://www.ciea.or.jp/service/laboratory_animal/marmoset.php)

セットは、脳卒中モデル、パーキンソン病モデル、脊髄損傷モデル、アルツハイマー病モデルなどの神経科学の分野で様々な実験に用いられている (19-24)。コモンマーモセット脈絡膜血管新生モデルの作製は、病態解明並びに新規治療標的の探索において、げっ歯類モデルに比べ、より信頼性のある前臨床データの創出に寄与できる。したがって、本研究はコモンマーモセットを用いたレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルの確立を目的とした。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

ケタミン (ketamine) はDaiichi Sankyo Propharma (Tokyo, Japan)、キシラジン (xylazine) はBayer Healthcare (Tokyo, Japan)、メデトミジンをKyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan)、10% fluoresceinをAlcon Japan (Tokyo, Japan)、フルオロマウントはDiagnostic BioSystems (CA, USA)、生理食塩水はOtsuka Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokushima, Japan)、オイキット (EUKITT) はO. Kindler (Freiburg, Germany)、fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) はMerck KGaA (Darmstadt, Germany)、ミドリン[®]P点眼液、ヒアレイ[®]点眼液0.1%はSanten Pharmaceutical Co., Ltd. (Osaka, Japan)、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA)、メタノール (methanol)、polyacrylamide gel (SuperSepTM) はWako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、ペントバルビタール (sodium pentobarbital) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、optimum cutting temperature (O.C.T.) compoundをSakura Finetechnical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)、マスコート付き

スライドガラスは松波硝子工業 (Osaka, Japan)、DAB Substrate KitはVector Laboratories (Burlingame, CA) から購入した。

0.01Mリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) は、0.137 M NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₃ · 12H₂O、1.8 mM KH₂PO₄で調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 動物

体重240～360 g、2～3年齢の雌性コモンマーモセット14頭 [うち4頭は京都大学霊長類研究所繁殖、残りの10頭はCLEA Japan, inc. (Tokyo, Japan) から購入] は、京都大学霊長類研究所及び岐阜大学生命科学総合研究支援センター動物飼育エリアで24～27°C、湿度40～70%の環境で飼育した。実験動物の取り扱いは、Association for Research in Vision and Ophthalmologyで決められたガイドラインを遵守して行った。また、実験内容については、京都大学霊長類研究所の2010 Guide for Care and Use of Laboratory Primatesに従って、京都大学、岐阜薬科大学及び岐阜大学動物実験委員会に申請承認された上で実施した。

2-2-2 レーザー誘発脈絡膜血管新生 (choroidal neovascularization: CNV) モデル

コモンマーモセットは、ケタミン (40 mg/kg, i.m.)、メedetミジン (0.2 mg/kg, i.m.)、ペントバルビタール (5 mg/kg, i.p.) により麻酔をかけた。瞳孔は、トロピカミド及びフェニレフリン塩酸塩から成るミドリン[®]P点眼液を用いて散瞳させた。散瞳後、黄斑周囲8か所にレーザー照射を行った (532 nm, 100 ms, 50 μm, 650~2,000 mW; MERILAS 532a; MERIDIAN AG, Thun, Switzerland)。

また、滲出型加齢黄斑変性症の治療薬である抗VEGF抗体ranibizumab (Lucentis[®]) の脈絡膜血管新生に対する作用を検討した。Ranibizumabは、出力

1,500 mWのレーザー照射を行った直後、0.1 mg (10 μ L) 硝子体内投与した。

2-2-3 蛍光眼底造影 (fluorescein fundus angiography: FFA)

血管外漏出を検出するために脈絡膜血管新生モデルにおいてFFA解析を行った。コモンマーモセットは、レーザー照射14日後上述と同様の方法で麻酔をかけた。瞳孔は、トロピカミド及びフェニレフリン塩酸塩から成るミドリン[®]P点眼液を用いて散瞳させ、乾燥防止のためヒアレイン[®]点眼液0.1%を点眼した。その後、10% fluoresceinを0.5 mL静脈内投与し、Micron III Retinal Imaging Microscope (Phoenix Research Laboratories, Pleasanton, CA, USA) を用いて3分後の眼底を撮影した。

血管外漏出は下記に基づいてグレード評価した。レーザー照射時に出血したサンプルや脈絡膜新生血管が連結したサンプルは、データから除外した。

Grade 1 = 過蛍光が認められない

Grade 2 = 漏出は伴わないが過蛍光を認める

Grade 3 = 明るい過蛍光と過度の漏出を認める

2-2-4 組織学的検討

レーザー照射21日後、麻酔下のコモンマーモセットを開胸し、10 U/mLヘパリン含有生理食塩水を0.5 L、続いて4% PFAを0.5 L心臓から両側総頸動脈へ灌流し、眼球を摘出した。摘出した眼球は、4% PFAで24時間以上固定し、12.5~25% スクロース溶液で置換し、前眼部を切除した。その後、眼球をO.C.T-compoundに包埋し凍結ブロックを作製した。解析のため、クライオスタット (Leica, Tokyo, Japan) を用いて網膜の連続横断切片 (厚さ10 μ m) を作製し、マスコート付きスライドガラスの上ののせて-80°Cで保存した。

形態学的解析のため、各眼3切片を用いてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。凍結切片はPBSに浸しO.C.T-compoundを洗浄後、段階的にエタノール濃度を下げて蒸留水に浸透したのち、ヘマトキシリン液に2分間、エオジン液に5分間浸した。その後、段階的にエタノール濃度を上げて脱水し、キシレンで透徹したのちオイキットで封入した。染色後の網膜凍結切片は、レーザー照射部位を明視野顕微鏡で撮影した。

2-2-5 免疫組織化学

レーザー照射21日後、麻酔下のコモンマーモセットの眼を摘出し、4% PFAを用いて4°Cで12時間固定した。その後、O.C.T. compoundを用いて凍結ブロックを作製し-80°Cで保存した。解析のため、クライオスタット (Leica, Tokyo, Japan) を用いて網膜の連続横断切片 (厚さ10 μm) を作製し、マスコート付きスライドガラスの上に乗せて-80°Cで保存した。

切片はDAB Substrate Kitを用いてDAB染色を行った。始めに切片を0.01 M PBSで10分ずつ2回洗浄し、0.3%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。その後、ヤギ血清で30分ブロッキングし、マウス抗CD31抗体 (1:100 dilution; Abcam, Cambridge, UK)、抗血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 抗体 (Abcam) もしくは抗胎盤増殖因子 (placental growth factor: PlGF) 抗体 (Abcam) と4°Cで一晩反応させた。その後、二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウス抗体 (1:2,000; Thermo Fisher Scientific) を1時間、続いてアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体を30分室温で反応させた。最後にジアミノベンジジンで反応させ染色を行った。染色後の網膜凍結切片は、レーザー照射部位及び未照射部位を明視野顕微鏡で撮影した。

2-2-6 光干渉断層像 (optical coherence tomography: OCT)

レーザー照射21日後 (Day 22)、OCT画像を取得した。先に記載した通り麻酔と散瞳を行い、乾燥防止のためコンタクトレンズ (度数なし; Unicon, Tokyo, Japan) を装着した。15Dレンズを付属したOCT装置 (RS-3000 Advance, NIDEK) を用いて、脈絡膜新生血管の2次元及び3次元画像を取得した。網膜の下かつ網膜色素上皮細胞層上の領域の高反射物を脈絡膜新生血管とみなした。

2-2-7 脈絡膜新生血管面積解析

脈絡膜新生血管面積の測定は、レーザー照射3週間後 (Day 22) に麻酔下のコモンマーモセットに20 mg/mL FITC-dextran (MW 2,000 kDa) 含有PBS溶液を3 mL 大腿静脈内投与し、眼球を摘出した。摘出した眼球は、4% PFAに浸し12時間固定した。固定後、前眼部とレンズを取り除き、フルオロマウントを用いて強膜/脈絡膜/網膜色素上皮複合体の伸展標本を作製した。レーザー照射により誘発された脈絡膜新生血管は、共焦点顕微鏡 (FV10i, Olympus Tokyo, Japan) を用いて撮影した。盲検後、FLUOVIEW-ASW version 02.01 imaging software (Olympus) を用いて脈絡膜新生血管周囲を縁取りして面積を測定した。レーザー照射により眼底出血したサンプルや連結した脈絡膜新生血管サンプルは、データから除外した。

2-3 統計処理

実験結果はすべて平均 \pm 標準誤差で表し、危険率5%未満を統計学的有意とみなした。統計学的比較は、SPSSソフト (version 16.0J; IBM SPSS Statistics, IBM Corporation, Chicago, IL, USA) を用いてStudent's *t*-testを行った。

第3節 実験結果

3-1 レーザー照射部位における蛍光漏出

黄斑周囲8か所にレーザー照射（レーザー出力: 650, 1,000, 1,500, 2,000 mW）を処置し、14日後に蛍光眼底造影を行った。照射直後に取得した明視野画像では、照射出力に依存して網膜色素上皮/脈絡膜領域に障害が認められた (Fig. 6左列)。また、レーザー照射14日後は、障害部位や障害部位を含む領域で照射出力に依存した後期の過蛍光が認められた (Fig. 6右列)。

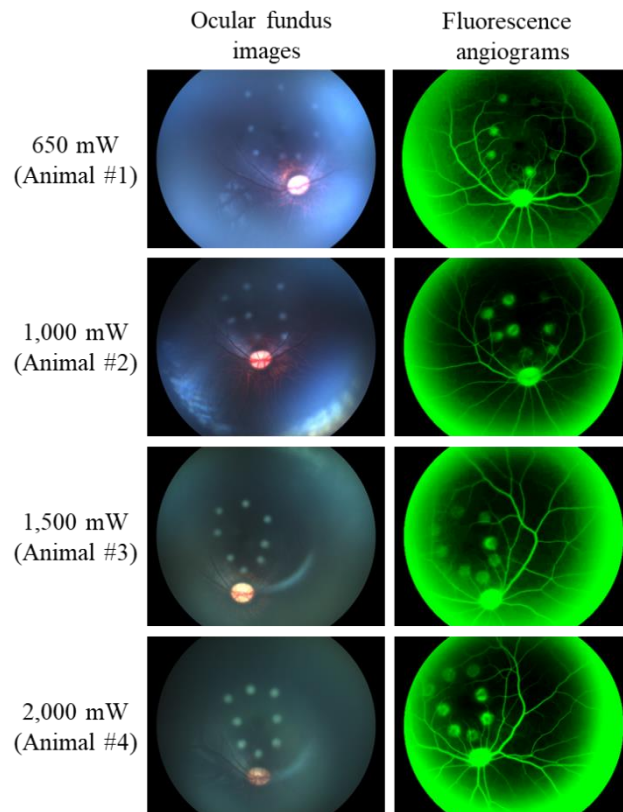


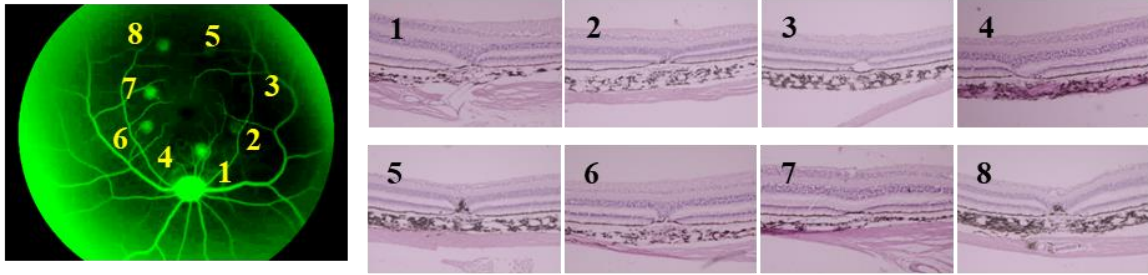
Fig. 6 Ocular fundus and angiographic images of marmosets immediately after laser irradiation.

Eight laser spots were applied around the macular hole on the left eye of each animal using the image-guided laser system (532 nm) attached with Micron III at 650, 1,000, 1,500 and 2,000 mW power (duration: 100 ms, spot size: 50 μ m). Fluorescein angiograms were taken at 14 days after laser irradiation of each laser-treated eye of each marmoset, and late hyperfluorescence and leakage within or beyond the lesion borders were observed in a laser power-dependent manner (right images).

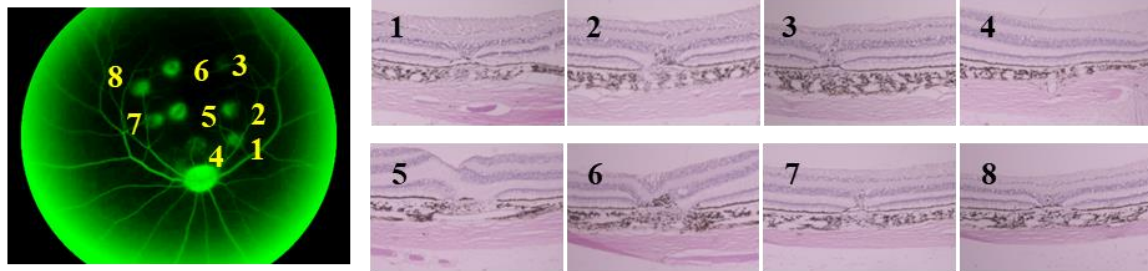
3-2 レーザー照射部位の組織学的評価

組織学的評価では、レーザー照射21日後のレーザー照射部位に出力依存的な脈絡膜血管新生が認められた (Fig. 7)。出力650 mW及び1,000 mWの条件では、毛細血管、マクロファージ、網膜色素細胞の増殖はほとんど観察されなかった。出力1,500 mW及び2,000 mWの条件では、毛細血管、マクロファージ、網膜色素細胞の増殖が網膜下及び網膜外層に認められた。以上、出力1,500 mWのレーザー照射条件がコモンマーモセット脈絡膜血管新生誘発に最適であった。したがって、以降の実験を出力1,500 mWのレーザー照射条件で行うこととした。

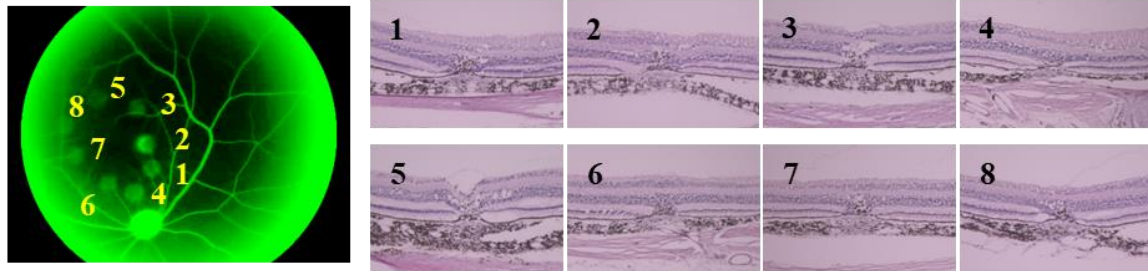
650 mW (Animal #1)



1,000 mW (Animal #2)



1,500 mW (Animal #3)



2,000 mW (Animal #4)

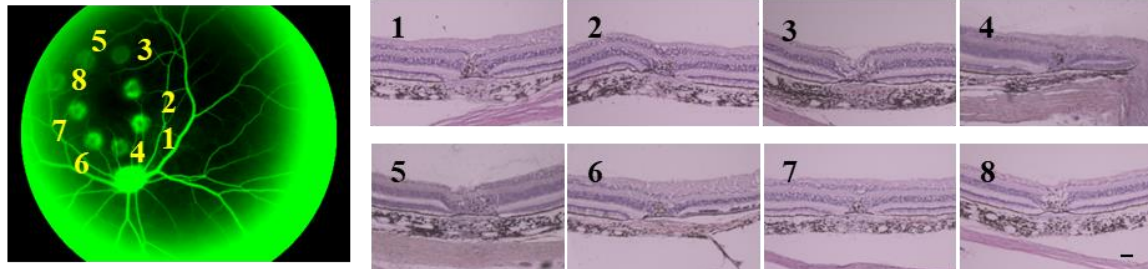


Fig. 7 Histological retinal-cross sections of marmosets at 21 days after laser irradiation.

Fluorescein angiograms were taken at 14 days after laser irradiation of each laser-treated eye of four marmosets. At 21 days after laser irradiation, transverse retinal sections were prepared and stained with hematoxylin and eosin. Each number from 1 to 8 in the fluorescein angiograms corresponds to a number in the retinal crosssections of the same eyes. CNV was observed in each laser-irradiated lesion at 21 days after laser irradiation, and the lesion areas were large depending on laser power. Scale bar indicates 100 μm .

3-3 レーザー照射部位における血管内皮細胞マーカー及び増殖因子の発現

レーザー照射部位における内皮細胞の局在性と各種増殖因子を調べるために、CD31、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 及び胎盤増殖因子 (placental growth factor: PlGF) の発現をレーザー照射21日後に検討した。

レーザー照射によって破壊したブルッフ膜の網膜側では、CD31陽性内皮細胞 (Fig. 8A, 矢印) とマクロファージ (Fig. 8A, 矢じり) がわずかに認められた。VEGFは、レーザー照射網膜全域に発現していたが、レーザー非照射網膜には認められなかった (Fig. 8B)。一方、PlGFは、レーザー照射部位以外の網膜及びレーザー未照射の網膜に偏在的に発現しており、レーザー照射部位における発現変化は認められなかった (Fig. 8C)。

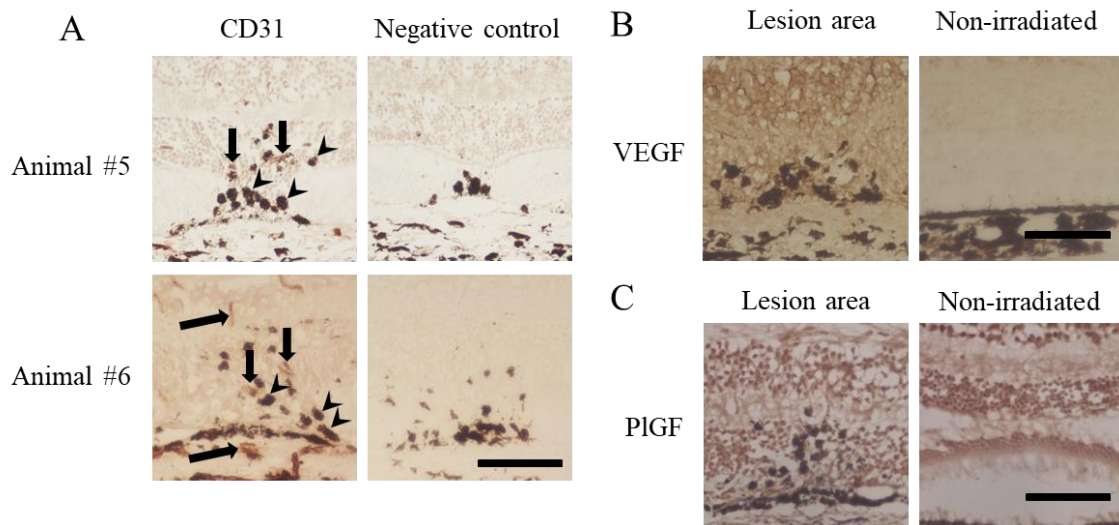


Fig. 8 Expression of CD31, vascular endothelial growth factor (VEGF), and placental growth factor (PlGF) in the retina at 21 days after laser irradiation.

(A) Representative images of neovascularization with CD31-positive endothelial cells (left images) and the negative control without primary antibody (right images) in the laser-irradiated lesion of the eye. Capillaries (arrow) and macrophages (arrowhead) were observed at the level of the Bruch's membrane. Few capillaries with CD31-positive endothelial cells and macrophages at the inner level of the disrupted Bruch's membrane were observed. (B) Representative images of VEGF-like immunoreactivity in the laser-irradiated lesion and non-irradiated retina of the eye. VEGF-like immunoreactivity was increased not only around the capillaries and macrophages but also across all retinal regions in the laser-irradiated lesion compared with the non-irradiated retina. (C) Representative images of PlGF-like immunoreactivity in the laser-irradiated lesion and non-irradiated retina of the eye. PlGF-like immunoreactivity was ubiquitously expressed in the non-lesion area and non-irradiated retina but did not show any changes in the lesion area. Each scale bar indicates 100 μ m.

3-4 レーザー照射誘発脈絡膜新生血管の面積

網膜色素上皮/脈絡膜複合体の伸展標本を用いて、FITC-dextranで標識した脈絡膜新生血管を撮影し面積を定量した (Figs. 9A, B)。本検討は、コモンマーモセット4頭に片眼8か所レーザー照射を行い、照射を失敗した3スポットを除く29レーザースポットで評価した。平均脈絡膜新生血管面積は $1.34 \pm 0.49 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ (平均 \pm S.D., $n = 29$)、各脈絡膜新生血管面積の変動係数は36.5% ($n = 29$) (Fig. 9B) であった。

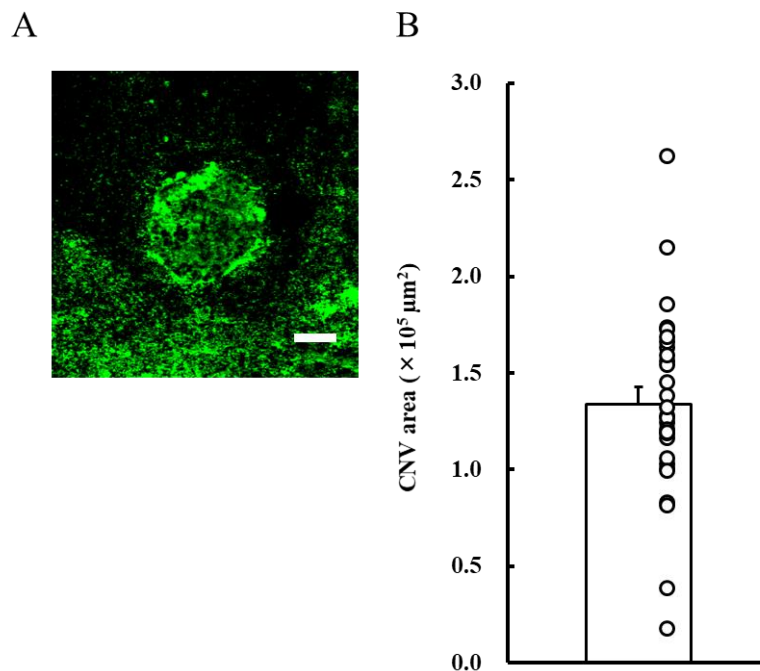


Fig. 9 Quantification of the CNV area measured on the RPE-choroidal flatmounts at 21 days after laser irradiation.

(A) A representative fluorescein image of CNV on the RPE-choroidal flatmounts. (B) Quantification of the CNV area measured on the RPE-choroidal flatmounts of four laser-treated eyes. Data are represented as mean \pm SEM (29 laser spots). Scale bar indicates 100 μm .

3-5 レーザー照射誘発脈絡膜新生血管の光干渉断層像

レーザー誘発脈絡膜新生血管の光干渉断層像 (OCT) 画像をレーザー照射21日後の蛍光眼底造影後に撮影した。OCT画像 (Fig. 10A) は、眼底画像 (Fig. 10B) の赤矢印部分に位置する網膜の断層像である。眼底画像の赤矢印下に位置する3つの照射部位 (Fig. 19B黄色矢印) において、脈絡膜新生血管 (Fig. 10A青矢印) が形成されていることを明らかにした。さらに、レーザー照射部位を立体的に表示し観察することに成功した (Fig. 10C)。

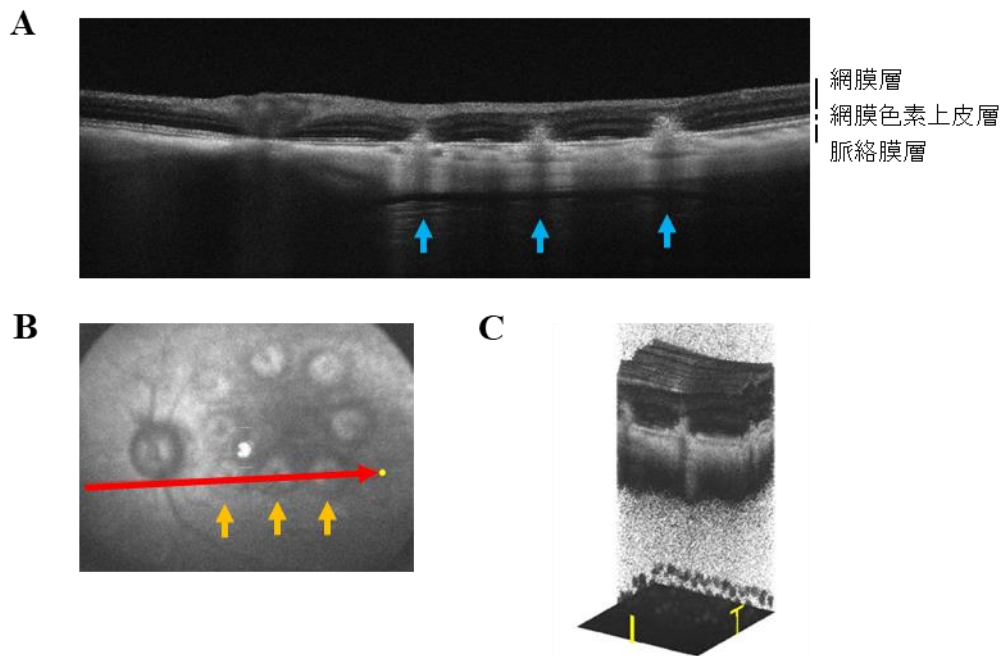


Fig. 10 Representative images in laser-induced neovascularization using SD-OCT.

At 21 days after laser irradiation at 1,500 mW, OCT images were obtained by using SD-OCT under deep anesthesia. (A) 2D retinal transverse image, (B) Scanning laser ophthalmoscopy, (C) 3D reconstruction image was obtained from sequential retinal transverse images. The 2D retinal transverse image in A was obtained from the red line in B, and this image showed a disruption of the highly reflective layer that corresponded to the RPE and a sub-retinal hyperreflective material regarded as CNV above the RPE layer. Blue and yellow arrows (in A and B) indicate laser irradiation site, and red arrow (in B) indicates location of OCT image (A).

3-6 コモンマーモセット脈絡膜血管新生に対する抗VEGF抗体への作用

確立したコモンマーモセットレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを用いて、滲出型加齢黄斑変性症の治療薬である抗VEGF抗体ranibizumabの脈絡膜血管新生に対する作用を検討した。レーザー照射直後のranibizumab 0.1 mgの硝子体内投与は、血管外漏出を有意に抑制し (Figs. 11A, B)、脈絡膜新生血管を有意に抑制した (Figs. 11C, D)。

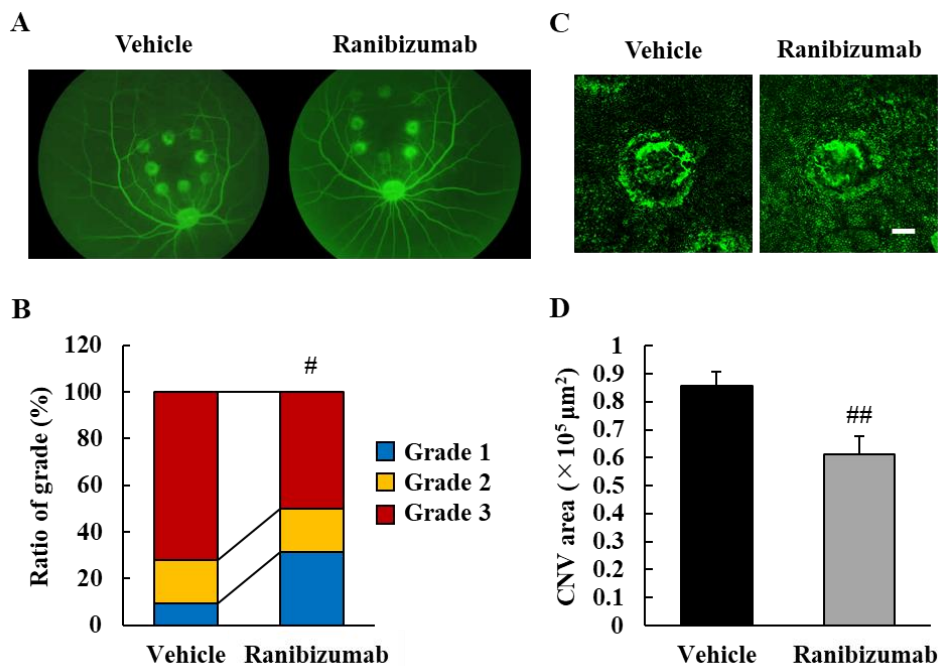


Fig. 11 Intravitreal administration of ranibizumab reduced CNV size in common marmosets

(A) Fluorescein angiogram of eye fundus were obtained at Day 21, respectively. (B) The graph represents the ratio of FFA grade (%). Data are presented as means \pm SEM (n = 32 laser spots). $^{\#}P < 0.05$ vs. vehicle-treated group (Mann–Whitney *U* test). (C) Representative confocal microscopy images of CNV. Scale bar represents 100 μ m. (D) Quantification of CNV area. Data are presented as means \pm SEM (vehicle, n = 4 eyes, 31 laser spots; ranibizumab, n = 4 eyes, 28 laser spots). $^{\#\#}P < 0.05$ vs. vehicle-treated group (Student's *t*-test).

第4節 考察

滲出型加齢黄斑変性症の病態解明や新規薬物候補の薬効評価には、マウスやラットなどのげっ歯類の脈絡膜血管新生モデルが汎用されてきた (18)。滲出型加齢黄斑変性症の治療には、抗VEGF抗体 (ranibizumab及びbevacizumab)、抗VEGFアプタマー (pegaptanib)、VEGF-A、VEGF-B及びPIGFを阻害する融合タンパク質 (aflibercept) を用いた抗VEGF治療が、多くの臨床研究で良い成果 (血管外漏出の抑制) を収めており (1-6)、実際に医療現場でも使用されている。しかしながら、これらの薬物のいくつかは構造的特異性を有するために、げっ歯類由来VEGFなどヒト以外の生物種由来のVEGFには結合することができず、げっ歯類脈絡膜血管新生モデルで評価することは困難である (25, 26)。すなわち、霊長類以外の脈絡膜血管新生モデルを用いて新薬候補化合物の薬効評価をする際には、陽性対照薬としてこれら薬物を比較検討することができない。そのため、カニクイザル、アカゲザル、アフリカミドリザルのような非ヒト霊長類が前臨床における薬効評価に用いられてきた (27-29)。しかしながら、これら霊長類はげっ歯類 (ラット< 400 g、マウス< 40 g) より体が大きく (> 2 kg)、薬効評価するためには高額な医薬品が大量に必要となる。一方、コモンマーモセットは、体重200~500 gの小型の新世界ザルであり (30)、カニクイザル、アカゲザル及びアフリカミドリザルといった従来の大型旧世界ザルよりも扱いやすく薬効評価の費用が抑えられるという利点がある。そのため、コモンマーモセット脈絡膜血管新生モデルの確立は、滲出型加齢黄斑変性症の病態解明並びに新規治療標的の探索において、げっ歯類モデルより信頼性のある前臨床データの創出及び霊長類モデルにおける費用対効果の改善に寄与できると考え、本章で検討した。

本研究では、出力650~2,000 mWの緑色レーザー (532 nm) の照射により、コモンマーモセットの網膜下に位置する網膜色素上皮/脈絡膜領域を出力依存的に障

害した。レーザー照射14日後には、従来の旧世界ザル脈絡膜新生血管と同様、レーザー照射部位において血管外漏出を示す過蛍光が認められた (Fig. 6)。また、網膜色素上皮細胞層/脈絡膜層領域へのレーザー照射によって生じた14日後の蛍光漏出の程度は、21日後のOCT断層画像で観察された脈絡膜新生血管の大きさ及び組織標本で観察された網膜色素上皮層/脈絡膜層の組織学的障害の大きさに比例していた (Figs. 6, 7, and 10)。なかでも出力1,500及び2,000 mWの照射条件では、網膜下や網膜外層に毛細血管やマクロファージ、増殖網膜色素上皮細胞が安定的に誘導された (Fig. 8)。そのため、脈絡膜血管新生誘発には出力1,500 mWの照射条件を最適と判断し、その後の検討を行った。

本研究では、レーザー照射したブルッフ膜の網膜内層にCD31陽性内皮細胞やマクロファージの浸潤を確認し、VEGFは毛細血管やマクロファージの周囲だけではなくレーザー照射部位の網膜全層にも観察された (Fig. 8)。過去の報告では、滲出型加齢黄斑変性症患者脈絡膜新生血管の網膜色素上皮細胞やマクロファージにおいてVEGFが増加し (31)、マウス脈絡膜血管新生モデルのレーザー照射3日後に網膜/脈絡膜/強膜においてVEGFとPIGFタンパク質が増加していることが示されている (32)。これらの知見は、VEGF及びPIGFが網膜色素上皮層/脈絡膜層障害後の脈絡膜血管新生の過程に重要な役割を担っていることを示唆している。しかしながら本研究では、レーザー照射21日後におけるPIGFの発現は、照射網膜と非照射網膜で明らかな差異が認められなかった (Fig. 8C)。過去の報告では、PIGF欠損やPIGF受容体中和抗体による脈絡膜血管新生抑制作用が示され、PIGFの脈絡膜血管新生への関与が実証されている (33)。本研究で検討したレーザー照射21日後において、照射網膜及び非照射網膜のPIGF発現量は同等であったことから、脈絡膜血管新生後期におけるPIGF関与は少ないことが考えられる。一方、VEGF発現量は、非照射網膜に比べて照射網膜において明らかに増加して

おり、脈絡膜血管新生後期へのVEGFの関与が示唆された。

げっ歯類脈絡膜血管新生モデルの評価の場合、蛍光色素標識dextranまたは蛍光色素標識isolectin B4の静脈内投与により脈絡膜新生血管を可視化したのち、面積を定量するという客観的手法が用いられる (34,35)。一方、霊長類脈絡膜血管新生モデルの評価の場合、マウスと同じ方法を実施するためには、大量の蛍光色素標識dextranまたは蛍光色素標識isolectin B4を必要とするため、代わりに血管外漏出のスコア化が用いられてきた。しかしながら、血管外漏出のスコア化は統計学的検出力に限界があり、また主観的評価である点が問題であった。本研究で用いたコモンマーモセットは、霊長類であるもののラットのように比較的小さい動物である。ゆえに、げっ歯類脈絡膜血管新生モデルと同様の評価方法が可能であると考え、実証した (Fig. 9)。ヒトに近い身体構造や遺伝的背景を有することから、コモンマーモセット脈絡膜血管新生モデルはげっ歯類に比べて臨床に近い滲出型加齢黄斑変性症病態を呈することが予測されることに加え、従来の大型霊長類脈絡膜血管新生モデルより薬物評価コストが抑えられ、またげっ歯類脈絡膜血管新生モデルと同様の客観的薬物評価を行うことが可能である。これは、本モデルが霊長類モデルの欠点を補い、かつげっ歯類モデルの利点を持ち併せていることから、従来の霊長類モデルやげっ歯類モデルよりも優位性があると考えられる。

臨床において滲出型加齢黄斑変性症治療薬として用いられている抗VEGF抗体ranibizumab (Lucentis®) は、0.5 mg (50 μ L) 硝子体内投与されており、脈絡膜血管新生を有意に抑制している。臨床において、ヒト硝子体液量約4 mLに対しLucentis®は約1/25に相当する50 μ L (0.5 mg) 投与されている。本検討においても、コモンマーモセット硝子体液量約250 μ Lに対し約1/25に相当する10 μ L (0.1 mg) を投与したところ、脈絡膜血管新生は有意に抑制された。以上の結果より、本研

究で確立したコモンマーモセットレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルにおいて、抗VEGF治療の評価が可能であることが示唆された。

本研究では、世界で初めてコモンマーモセットを用いた滲出型加齢黄斑変性症モデルの確立に成功した。本モデルは、滲出型加齢黄斑変性症の病態解析や治療薬候補のスクリーニングに十分に有用と考えられる。

第2章 脈絡膜血管新生に対するエダラボンの作用

第1節 緒言

第1章緒言で述べたように、加齢黄斑変性症の特徴である脈絡膜の新生血管は、その脆弱性のために漏出や出血を生じやすい。中心視野を司る黄斑で漏出や出血が生じると、急激な視力低下や最悪の場合失明を引き起こす。現在行われている抗VEGF療法は、感染症のリスクや身体的・経済的負担があることに加え、定期的な硝子体への投与が必要である。そのため、抗VEGF抗体の治療間隔を延長するような新規治療薬の開発が求められている。

加齢黄斑変性症発症には様々な因子が複雑に関与しており、加齢による恒常性変化もその一因である。視細胞や隣接する網膜色素上皮 (RPE) は、生体内で最も酸素消費が多い組織であり (36-39)、網膜は常に高エネルギー光にさらされることから活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が産生されやすい環境である (40, 41)。そこで加齢により抗酸化能が減少するとROSが増加し、酸化ストレスが生じる。実際に、加齢により抗酸化能を有するカロテノイド (42) やグルタチオンSトランスフェラーゼ (43)、ビタミンE (44) が減少していること、リポフスチン (網膜色素上皮が視細胞外節を定常的に貪食処理する過程で生じる加齢性の副産物) の沈着 (45, 46)、ミトコンドリアDNAダメージ (47, 48) や過剰な脂質酸化 (46, 49) が促進していることが報告されている。さらに、疫学的調査や基礎研究から、強力なROS産生因子であるタバコの煙が加齢黄斑変性症発症の環境的因子であることが明らかとなっている (50-52)。ROSは、内皮細胞や網膜色素上皮細胞においてVEGFの発現を増加させ (53, 54)、そのVEGFは内皮細胞の遊走や増殖すなわち血管新生を刺激するだけでなく、NADPHオキシダーゼを活性化し細胞内ROSを一層増加させる悪循環をもたらす (55, 56)。さらにROSはタンパク質や脂質の過酸化を引き起こし、生成された脂質酸化産物の1

つである4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) もVEGF分泌を増加させる (57)。加齢黄斑変性症の進行予防という観点から、サプリメントの効果を検討したAge-Related Eye Disease Study (AREDS) により、βカロテン、ビタミンC、ビタミンE、亜鉛などを含む抗酸化微量栄養素により疾患の進行が抑制されることが明らかになったことから (58)、加齢によって増加する酸化ストレスが加齢黄斑変性症病態に関与していることが示唆される。そこで、酸化ストレスを誘導する過剰なROSに対し消去能を有する薬剤が滲出型加齢黄斑変性症の治療薬になると期待される。そこで本章では、本邦で急性脳卒中の治療薬として承認されている唯一のラジカル捕捉剤エダラボン (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, Radicut, Fig. 12) に着目した。

エダラボンは脳血管障害や局所脳虚血誘発神経障害に対して神経保護作用を有し (59, 60)、ラクナ梗

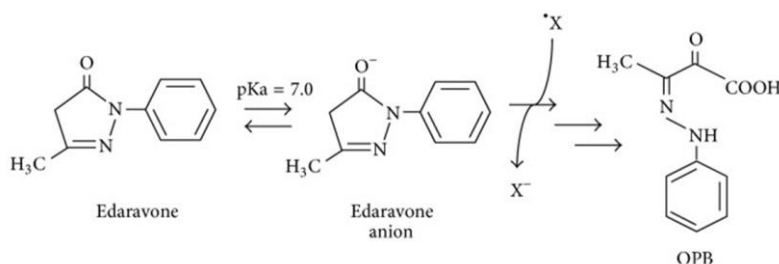


Fig. 12 エダラボンの構造及び簡略した反応図
(Masuda et al., Oxid Med Cell Longev, 2017)

塞サイズを減少させ (61)、エンドトキシン誘発肝障害を抑制することが報告されている (62)。眼科領域の研究では、エダラボンは網膜虚血再灌流障害を減弱させ (63)、分枝網膜静脈閉塞症の血管外膜切開術後の視機能を改善し (64)、網膜剥離後の視細胞死を改善し (65)、ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの網膜障害 (66) や緑内障モデルの網膜神経節細胞死に対して保護作用を示すことが明らかとなっている (67)。また、*in vitro* 低酸素低グルコース誘発網膜神経節細胞死や、*in vivo* *N*-methyl-D-aspartate 網膜障害 (68) 及び光による視細胞変性 (69) に対するエダラボンの保護作用も報告されている。

強力な抗酸化剤*N*-acetylcysteineが滲出型加齢黄斑変性症モデルであるレーザ

一誘発脈絡膜血管新生に対して保護作用を示したことから (70)、血管新生に抗酸化剤が有効であることが示唆された。それゆえ、ラジカル捕捉剤エダラボンも滲出型加齢黄斑変性症に対して有効ではないかと仮説を立て、*in vivo*及び*in vitro*の実験系を用いて検討を行った。なお、*in vivo*レーザー脈絡膜血管新生モデルの薬効評価として、マウスに加えマーモセットについても検討を行うこととした。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

第1章の第2節2-1実験材料に加えて、ペニシリン (penicillin) 及びストレプトマイシン (streptomycin) はMeiji Seika (Tokyo, Japan)、polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Immobilon)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II、phosphatase inhibitor cocktail III、Igepal CA-630、trypsin、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's F-12はMerck KGaA (Darmstadt, Germany)、polyacrylamide gel (SuperSepTM)、サンプルバッファー [sample buffer solution (2ME+)(x4)]、ImmunoStar[®]LD、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、塩化カリウム (potassium chloride: KCl)、エダラボン (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazoline-5-one) をはWako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)、BCA protein assay kit、Hoechst 33342、propidium iodide (PI)、CMH₂DCFDA はThermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、Tris-HCl (pH 8.0)、Blocking One-P は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、human recombinant VEGFをR&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)、Cell Counting Kit-8をDojindo laboratories (Kumamoto, Japan)、ヒト網膜上皮細胞 (ARPE-19) を American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入した。RIPA buffer

は、50 mM Tris -HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、1% SDS、1% Igepal CA-630で調整した。

2-2 実験方法

2-2-1 動物

8週齢の体重20~30g雄性C57BL/6Jマウス (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) 及び1~2歳齢の体重270~450g雄性コモンマーモセット (CLEA Japan, Tokyo, Japan) (Fig. 5) を用いた。動物は12時間/12時間の明暗サイクルのもと、自由給水下に固形飼料 (CE-2またはCMS-1M: CLEA Japan, Tokyo, Japan) を与えた。

コモンマーモセットは、岐阜大学生命科学総合研究支援センターの中動物飼育エリアで24~27°C、湿度40~70%の環境で飼育した。実験動物の取り扱いは、Association for Research in Vision and Ophthalmologyで決められたガイドラインを遵守して行った。また実験内容については、京都大学霊長類研究所の2010 Guide for Care and Use of Laboratory Primatesに従って、岐阜薬科大学及び岐阜大学動物実験委員会に申請承認された上で実施した。

2-2-2 レーザー誘発脈絡膜血管新生 (choroidal neovascularization: CNV) モデル

ケタミン (43.8 mg/kg) とキシラジン (2.5 mg/kg) 混合溶液を10倍希釈したものを筋肉内投与し、マウスに麻酔をかけた。瞳孔は、トロピカミド及びフェニレフリン塩酸塩から成るミドリン®P点眼液を用いて散瞳させ、乾燥防止のためヒアレイン®点眼液0.1%を点眼した。カバーガラスをあてがいながら眼底を覗き、血管を避けて視神経周囲6か所にレーザー照射を行った (647 nm, 120 mW, 100 ms, 50 µm; MC500, NIDEC, Aichi, Japan)。その後、Micron III Retinal Imaging Microscope (Phoenix Research Laboratories, Pleasanton, CA, USA) を用いて、眼底の

気泡観察によりレーザー照射を確認した。

コモンマーモセットレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルは、第1章、第2節2-2と同様に作製した。麻酔下のコモンマーモセットの瞳孔を散瞳させ、黄斑周囲8か所にレーザー照射を行った (532 nm, 1500 mW, 100 ms, 50 μ m; MERILAS 532a; MERIDIAN AG, Thun, Switzerland)。

2-2-3 薬物の調整及び処置

エダラボン (5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3-H-pyrazol-3-one) は、*in vivo*の検討では生理食塩水 (Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) に溶解し (68, 69)、静脈内投与の際は、既報に従い塩酸及び水酸化ナトリウムを用いてpH7.0に調整した (71)。

マウス脈絡膜血管新生モデルを用いたエダラボンの作用検討では、レーザー照射後から1日2回2週間の腹腔内投与 (0.3~3 mg/kg) もしくはレーザー照射直後に単回尾静脈内投与 (3, 10 mg/kg) を行った。またエダラボンの治療可能時間域を検討するため、レーザー照射直後、24、48、72時間後に単回尾静脈内投与 (3 mg/kg) を行った。コモンマーモセット脈絡膜血管新生モデルを用いたエダラボンの作用検討では、レーザー照射直後にエダラボンを単回大腿静脈内投与 (3 mg/kg) した。

細胞を用いた*in vitro*の検討では、エダラボンはDMSOに溶解後、終濃度10~100 μ M (DMSO終濃度は0.1%未満) となるように培地で希釈し添加した。

2-2-4 蛍光眼底造影 (fluorescein fundus angiography: FFA)

血管外漏出を比較するために脈絡膜血管新生モデルにおいてFFA解析を行った。マウスは、レーザー照射2週間後 (Day 15) に上述と同様の方法で麻酔をか

けた。瞳孔は、トロピカミド及びフェニレフリン塩酸塩から成るミドリン®P点眼液を用いて散瞳させ、乾燥防止のためヒアレイン®点眼液0.1%を点眼した。その後、fluorescein 10%を生理食塩水で10倍に希釈したものを0.1 mL尾静脈内投与し、Micron III Retinal Imaging Microscopeを用いて1分後の眼底を撮影した。

コモンマーモセットの場合は、第1章、第2節2-3と同様に行った。レーザー照射20日後 (Day 21)、麻酔下のコモンマーモセットの瞳孔を散瞳させ、fluorescein 10%を0.5 mL静脈内投与し、マウスと同様に撮影した。

血管外漏出は下記に基づいてグレード評価した。なお、コモンマーモセットの場合は漏出程度の判別が困難なため、3段階で評価した。また、レーザー照射時に出血したサンプルや脈絡膜新生血管が連結したサンプルはデータから除外した。

【マウスの場合】

- Grade 1 = 過蛍光が認められない
- Grade 2 = 漏出は伴わないが過蛍光を認める
- Grade 3 = 中程度の漏出と過蛍光を認める
- Grade 4 = 明るい過蛍光と過度の漏出を認める

【コモンマーモセットの場合】

- Grade 1 = 過蛍光が認められない
- Grade 2 = 漏出は伴わないが過蛍光を認める
- Grade 3 = 明るい過蛍光と過度の漏出を認める

2-2-5 光干渉断層像 (optical coherence tomography: OCT)

コモンマーモセット脈絡膜血管新生モデルについては、レーザー照射3週間後

(Day 22)、OCT画像を取得した。第1章、第2節2-2に記載した通り麻酔と散瞳を行った後、乾燥防止のためコンタクトレンズ (度なし; Unicon, Tokyo, Japan) を装着した。15Dレンズを付属した装置 (RS-3000, NIDEK) を用いて、生きたまま脈絡膜新生血管の2次元及び3次元画像を取得した。

2-2-6 脈絡膜新生血管面積解析

脈絡膜新生血管面積の測定は、マウスの場合、レーザー照射2週間後 (Day 15) に麻酔下で20 mg/mL fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (MW 2,000 kDa) 含有PBS溶液を0.5 mL尾静脈内投与し、眼球を摘出した。コモンマーモセットの場合、レーザー照射3週間後 (Day 22) に麻酔下で20 mg/mL FITCを含む生理食塩水を3 mL大腿静脈内投与し、眼球を摘出した。摘出した眼球は、4% PFAに浸け12時間固定した。固定後、前眼部とレンズを取り除き、フルオロマウントを用いて強膜/脈絡膜/網膜色素上皮複合体の伸展標本を作製した。レーザー照射によりできた脈絡膜新生血管は、共焦点顕微鏡 (FV10i, Olympus Tokyo, Japan) を用いて撮影した。盲検後、FLUOVIEW-ASW version 02.01 imaging software (Olympus) を用いて脈絡膜新生血管周囲を縁取りして面積を測定した。レーザー照射により眼底出血したサンプルや連結した脈絡膜新生血管サンプルはデータから除外した。

2-2-7 ウェスタンブロット解析

エダラボンが酸化ストレスを抑制したか検討するために、ウェスタンブロットにより4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) 修飾タンパク質の発現を評価した。レーザー照射後のマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、眼球を摘出した。速やかに前眼部、レンズ、網膜を慎重に分離し、強膜/脈絡膜/網膜色素上皮複合体を液体窒素

で凍らせた。網膜はRIPA buffer (1% protease inhibitor cocktail、1% phosphate inhibitor cocktail II、1% phosphate inhibitor cocktail III含有) 内でホモジナイズし、12,000 × gで20分遠心後の上清をタンパク質抽出液とした。レーザー照射により眼底出血したサンプルは除外した。

各タンパク質濃度は、BSAとBCA protein assay kitを用いて測定した。等量のタンパク質を含むサンプル液を用いて5~20% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動後のタンパク質はPVDF膜に転写し、Blocking One-Pを用いて30分室温でブロッキングした。一次抗体として、マウス抗4-HNEモノクローナル抗体 (1:500 dilution; JaICA, Shizuoka, Japan) 及びマウス抗β-actin抗体 (1:10,000 dilution; Merck KGaA) とともに4°Cで一晩反応させた。本研究で用いたマウス抗4-HNEモノクローナル抗体は、4-HNEヒスチジン、4-HNEリジン、4-HNEシステイン付加体に反応するが、なかでも4-HNEヒスチジンに対して最も高い親和性を有する。二次抗体として、HRP標識ヤギ抗マウス抗体 (1:2,000; Thermo Fisher Scientific) と1時間反応させた。タンパク質バンドはImmunoStar[®]LDで可視化し、LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) で撮影し、付属のLumino Imaging Analyzerで定量した。

2-2-8 細胞培養

初代ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMECs) はDS Pharma Biomedical (Osaka, Japan) から購入し、10% FBSを含むがホルモンや抗生物質、フェノールレッドを含まないCell Systems Corporation (CSC) complete recombinant mediumに、成長因子 culture boost growth factor (DS Pharma Biomedical)、100 U/mL ペニシリン (Meiji Seika, Tokyo, Japan)、100 µg/mL ストレプトマイシン (Meiji Seika)を添加して培養した。培養器材は、表面を細胞接着因子 (Attachment factor, DS Pharma

Biomedical) を良く馴染ませてから使用した。細胞は37°C、5% CO₂環境で培養し、3~4日ごとtrypsin処置により継代を行った。継代数3~8のHRMECsを実験に用いた。

ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) は、10% FBS、100 U/mLペニシリン、100 µg/mLストレプトマイシンを含むDMEM/Ham's F-12培地を用いて、37°C、5.0% CO₂環境下で培養した。3~4日ごとにtrypsin処置により継代を行った。ARPE-19細胞は継代数20~30のものを実験に使用した。

2-2-9 細胞内ROS測定

酸化ストレスに対するエダラボンの作用を評価するため、ARPE-19細胞を用いてH₂O₂誘発細胞内ROS及びHRMECsを用いてVEGF誘発細胞内ROSを測定した。

10% FBS含有培地を用いて、ARPE-19細胞もしくはHRMECsを 2.0×10^3 細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種し培養した。その後、1% FBS含有培地に交換しさらに24時間培養した。エダラボンは終濃度10~100 µMとなるように添加し、エダラボン添加1時間後にH₂O₂ (終濃度1.5 mM) もしくはVEGF (終濃度10 ng/mL) を添加した。H₂O₂もしくはVEGF添加4時間後、10 µLの5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CMH₂DCFDA) を添加し、37°Cで1時間培養後、マイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて波長485 nm及び535 nmを測定した。この試薬は過酸化水素、ヒドロキシラジカル、ペルオキシ亜硝酸といったROSを検出することが可能である。蛍光強度を細胞数で補正するため、全細胞数をHoechst33342、死細胞をpropidium iodide (PI) によって検出し計測した。

2-2-10 細胞増殖試験

HRMECsを96ウェルプレートに 2.0×10^3 細胞/ウェルの密度で播種し、37°C、5% CO₂環境で24時間培養した。その後、成長因子を除いた10% FBS含有CSC mediumに培地交換し、さらに24時間培養した。その後、エダラボンを終濃度1~100 μMとなるように添加した。エダラボン添加1時間後にVEGFを終濃度10 ng/mLとなるように添加した。VEGFとの共培養24時間後、新しい10% FBS含有CSC mediumに培地交換し、エダラボン及びVEGFを除去した。

生細胞数はWST-8アッセイ (Cell Counting Kit-8) により決定した。WST-8は細胞外に留まり、生細胞が有する乳酸脱水素酵素の補酵素であるNADHから電子伝達物質 (1-methoxy PMS) を介して電子を受け取ることで還元され、水溶性のWST-8ホルマザン (極大吸収波長450 nm) を生成し橙色を呈する。細胞増殖前後3時間の450及び650 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定し、この変化量を生細胞数とみなした。

2-3 統計解析

データは平均 ± 標準誤差で表した。統計学的解析はthe Statistical Package for the Social Sciences 15.0J for Windows software (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて、Student's *t*-test、Dunnett's testまたはMann-Whitney *U*-test with Bonferroni correctionを行った。P値が0.05未満のとき、統計学的有意とみなした。

3-2 マウスレーザー誘発脈絡膜血管新生に対する静脈内投与エダラボンの作用

レーザー照射直後にエダラボン単回静脈内投与を行ったところ、腹腔内投与と同様、エダラボン処置群において平均FFAグレード (Figs. 14A, B) と平均脈絡膜新生血管面積 (Figs. 14C, D) は有意に減少した。

また、エダラボン単回静脈内投与の脈絡膜血管新生抑制作用は、レーザー照射直後、3時間後、24時間後のいずれにおいても認められたが (Fig. 14E)、レーザー照射48時間後や72時間後の単回静脈内投与においてはエダラボンの脈絡膜血管新生抑制作用は認められなかった (Fig. 14F)。

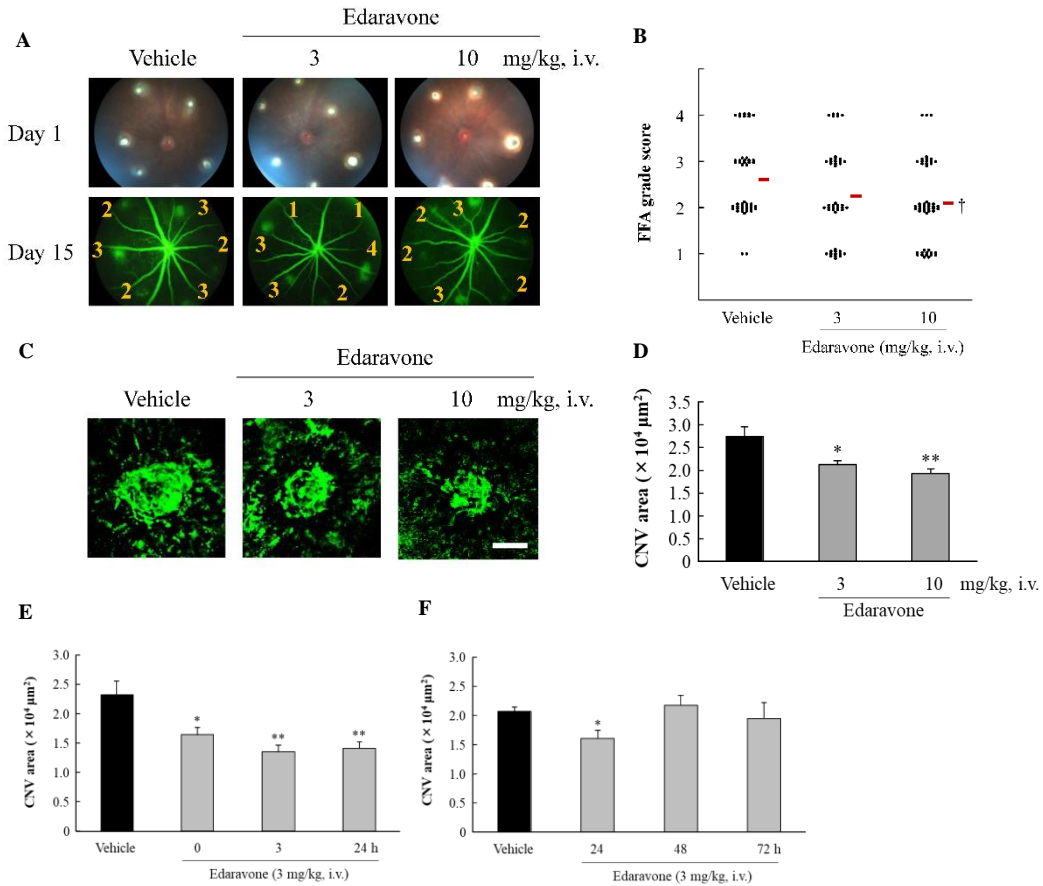


Fig. 14 Intravenously administration of edaravone reduced CNV size in mice

(A) Bright-field photograph and fluorescein angiogram of eye fundus were obtained at Day 1 and Day 15, respectively. Numbers in fundus fluorescein angiogram are the grade of vascular leakage. (B) The graph represents FFA grade scores of each laser spot (black dots) and average FFA grade score (red line) (vehicle, $n = 9$, 46 laser spots; 3.0 mg/kg, $n = 9$, 48 laser spots; 10 mg/kg, $n = 10$, 52 laser spots). $^\dagger P < 0.05$ vs. vehicle-treated group (Mann–Whitney U test). (C) Representative confocal microscopy images of CNV. Scale bar represents 100 μm . (D) Quantification of CNV area. Data are presented as means \pm SEM (vehicle, $n = 9$, 54 laser spots; 3.0 mg/kg, $n = 7$, 42 laser spots; 10 mg/kg, $n = 9$, 54 laser spots). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs. vehicle-treated group (Dunnett’s test). Quantification of CNV area in mice receiving edaravone (E) 0–24 h after laser photocoagulation and (F) 24–72 h after laser photocoagulation. Experiments shown in (E) and (F) were performed separately. (E) Data are presented as means \pm SEM (vehicle, $n = 9$ eyes, 50 laser spots; 0 h, $n = 9$ eyes, 49 laser spots; 3 h, $n = 9$ eyes, 51 laser spots; 24 h, $n = 9$ eyes, 52 laser spots). (F) Data are presented as means \pm SEM (Vehicle, $n = 9$ eyes, 53 laser spots; 24 h, $n = 10$ eyes, 59 laser spots; 48 h, $n = 10$ eyes, 56 laser spots; 72 h, $n = 8$ eyes, 43 laser spots). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs. vehicle-treated group (Dunnett’s test).

3-3 マウス脈絡膜の4-HNE修飾タンパク質発現に対するエダラボンの作用

酸化ストレスマーカーである4-HNE修飾タンパク質バンドは25 kDa及び50 kDaに観察され、過去の報告と同様脈絡膜での発現レベルは、レーザー照射3時間後にピークに達した (Figs. 15A, B)。過剰なROS産生は脂質過酸化物質4-HNEの産生より前に起こると予測されるため、レーザー照射直後に3.0 mg/kgエダラボン単回静脈内投与を行ったところ、25 kDaの4-HNE修飾タンパク質発現は有意に減少した (Figs. 15C, D)。

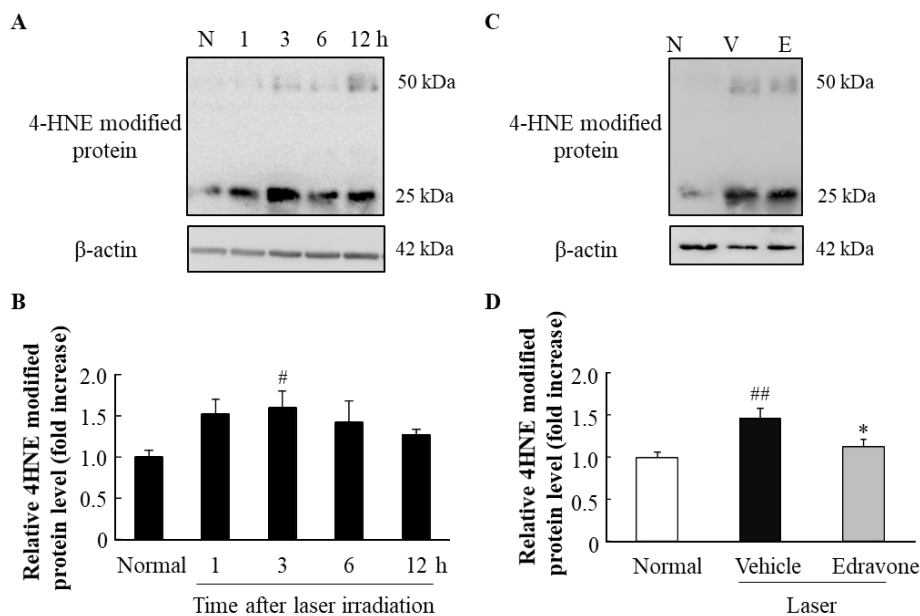


Fig. 15 Edaravone reduced laser-induced oxidative stress in the mouse choroid

(A) Western blot images of 4-HNE modified protein expression in the mouse choroid 1, 3, 6 and 12 h after laser photocoagulation. N, normal (without laser photocoagulation). (B) Quantitative analysis of western blot bands. Data are presented as means \pm SEM ($n = 9-10$ at each time point). [#] $P < 0.05$ vs. normal group (Student's t -test). (C) Western blot images of 4-HNE modified protein expression in the mouse choroid 3 h after laser photocoagulation. N, normal (without laser photocoagulation), V, vehicle, E, edaravone. (D) Quantitative analysis of western blot bands. Data are presented as means \pm SEM ($n = 5$ or 8). ^{##} $P < 0.01$ vs. normal group, ^{*} $P < 0.05$ vs. vehicle-treated group (Student's t -test).

3-4 細胞内ROS産生に対するエダラボンの作用

*In vivo*において観察されたエダラボンの脈絡膜血管新生に対する抑制作用の分子メカニズムを理解するため、ヒト網膜色素上皮細胞株であるARPE-19細胞を用いてH₂O₂誘発細胞内ROS産生を測定し、エダラボンのラジカル捕捉能を検討した。Control群と比較してvehicle処置群で2.25倍の細胞内ROSが検出され、その増加は10 μM及び100 μMのエダラボン処置により有意に抑制された (Fig. 16A)。また、100 μMエダラボン単独処置群はcontrol群よりも細胞内ROS量が減少した (Fig. 16A)。

さらに、ヒト網膜毛細血管内皮細胞であるHRMECsを用いてVEGF誘発細胞内ROS産生についても同様に検討したところ、control群と比較してvehicle処置群で1.86倍の細胞内ROSが検出され、その増加は10 μMのエダラボン処置により有意に抑制された (Fig. 16B)。

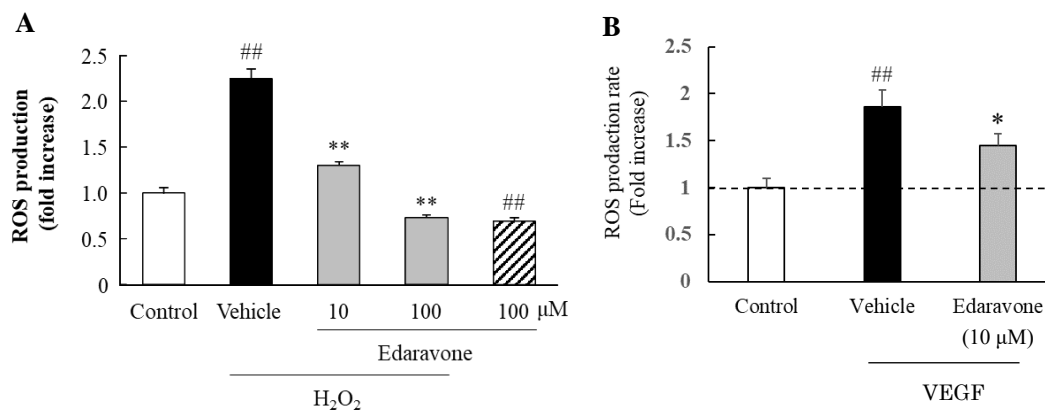


Fig. 16 Edaravone inhibited H₂O₂-induced and VEGF-induced ROS production

(A) The graph shows intracellular ROS in ARPE-19 cells. Data are presented as means ± SEM (n = 6) and each value was corrected by viable cell number. ##*P* < 0.01 vs. control group (Student's *t*-test). ***P* < 0.01 vs. vehicle-treated group (Dunnett's test). (B) The graph shows intracellular ROS in HRMECs. Data are presented as means ± SEM (n = 5, 6). ##*P* < 0.01 vs. control group, **P* < 0.05 vs. vehicle-treated group (Student's *t*-test).

3-5 VEGF誘発ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMECs) 増殖に対するエダラボンの作用

つぎにVEGF誘発HRMECs増殖に対するエダラボンの作用を検討した。Vehicle処置群では、control群に比べて細胞増殖が1.45倍増加した (Fig. 17)。この細胞増殖促進作用はエダラボン10 μ M処置により有意に抑制され、エダラボン100 μ M処置ではvehicle群と比べて27%抑制した。一方、control群と比較して100 μ Mエダラボン単独処置に有意な変化はなく (Fig. 17)、また細胞の形態異常も認められなかった (data not shown)。

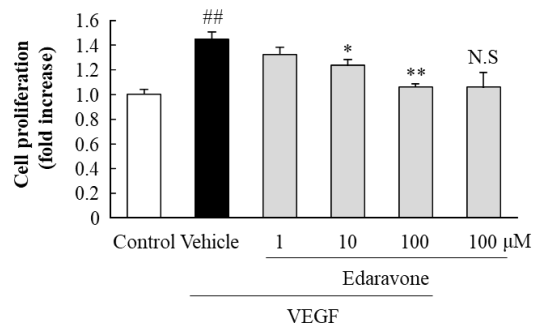
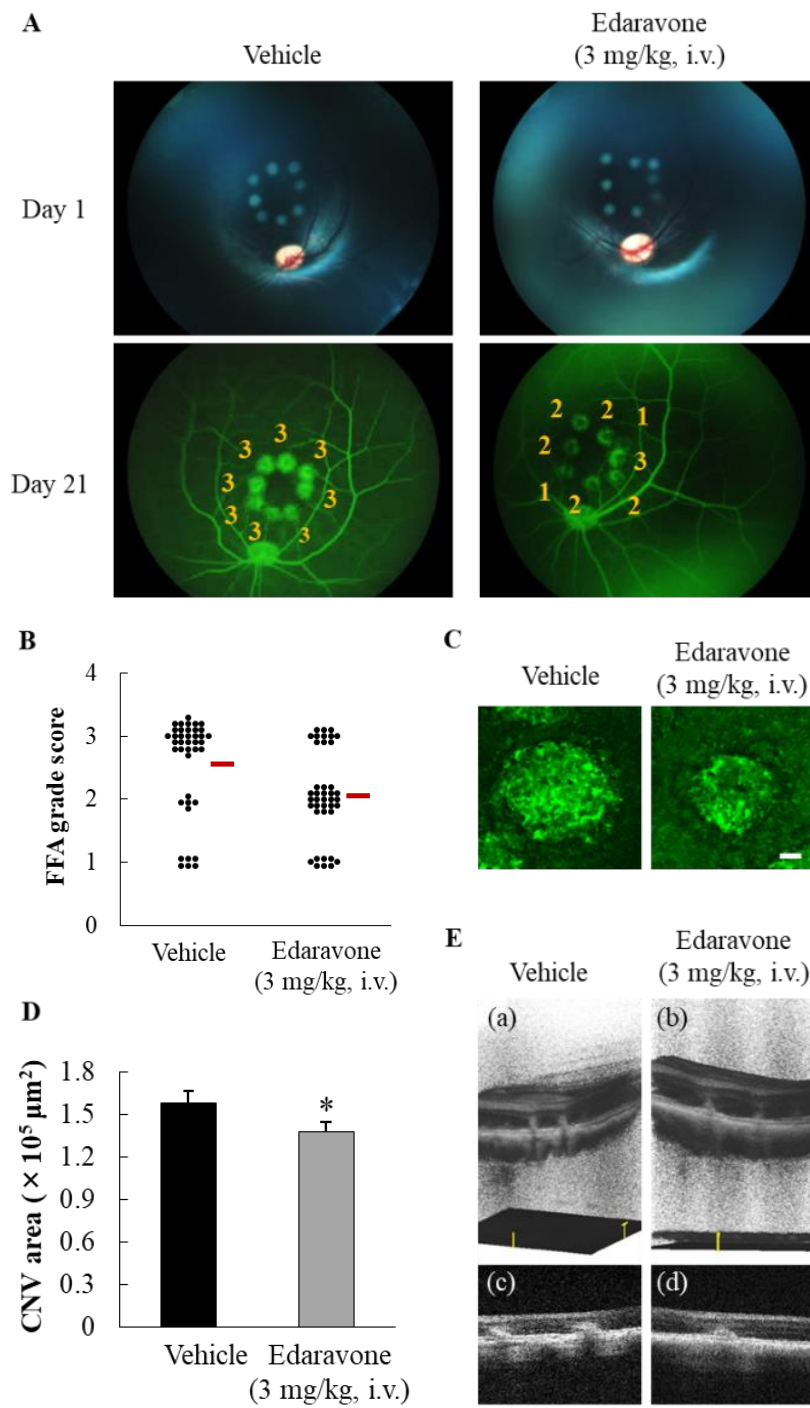


Fig. 17 Edaravone inhibited VEGF-induced cell proliferation

The graph shows cell proliferation in HRMECs. Data are presented as means \pm SEM (n = 6). ## P < 0.01, N.S. vs. control group (Student's t -test). * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. vehicle-treated group (Dunnett's test).

3-6 コモンマーモセット脈絡膜血管新生に対するエダラボン静脈内投与の作用

エダラボンの単回静脈内投与は、マウス脈絡膜血管新生に対して抑制作用を示した。この抑制作用がげっ歯類だけではなく、ヒトに近い動物の脈絡膜血管新生にも作用することを確認するため、コモンマーモセットレーザー照射直後にエダラボン3.0 mg/kg単回静脈内投与を行った。マウスと同様、vehicle群及びエダラボン処置群のレーザー照射部位に蛍光漏出が認められた (Fig. 18A)。Vehicle群と比較してエダラボン処置群において、有意な平均FFAグレードの低下及び平均脈絡膜血管新生の抑制が認められた (Figs. 18B-D)。また、コモンマーモセット脈絡膜新生血管の光干渉断層像 (OCT) 画像において、レーザー照射部位の網膜と脈絡膜の間に脈絡膜血管新生様の組織形態変化が検出された (Fig. 18E)。



Continued on the next page

Fig. 18 Intravenous administration of edaravone reduced CNV size in common marmosets.

(A) Bright-field photograph and fluorescein angiogram of eye fundus were obtained at Day 1 and Day 21, respectively. Numbers in fundus fluorescein angiogram are the grade of vascular leakage. (B) The graph represents FFA grade scores of each laser spot (black dots) and average FFA grade score (red line) (vehicle, $n = 5$ eyes, 40 laser spots; 3.0 mg/kg, $n = 5$ eyes, 40 laser spots). $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ vs. vehicle-treated group (Mann–Whitney U test). (C) Representative confocal microscopy images of CNV. Scale bar represents 100 μm . (D) Quantification of CNV area. Data are presented as means \pm SEM (vehicle, $n = 5$ eyes, 40 laser spots; 3.0 mg/kg, $n = 5$ eyes, 38 laser spots). $^*P < 0.05$ vs. vehicle-treated group (Student's t -test). (E) (a, b) 3D and (c, d) 2D optical coherence tomography images at laser spots were obtained at Day 22.

第4節 考察

酸化ストレスは加齢黄斑変性症の主要リスクファクターであり (36-39)、抗酸化剤治療によりマウス脈絡膜血管新生が改善することが報告されている (70, 72)。本研究で用いたエダラボンは、脳保護剤として既に承認されており、その有効性と忍容性は良好である。新規医薬品の開発は承認まで長期間を要することから、脈絡膜血管新生過程におけるROSの関与、並びにエダラボンの加齢黄斑変性症への適応外使用もしくは適応拡大の可能性を明らかにすることを目的に本研究を行った。

エダラボンは、生理条件下において半分がアニオン体として存在し、主に酸化力の高いヒドロキシラジカルや脂質過酸化ラジカルなどを捕捉する (73, 74)。本研究では、レーザー照射後2週間1日2回のエダラボン1 mg/kg腹腔内投与 (Fig. 13) もしくはレーザー照射24時間後までのエダラボン3 mg/kg単回静脈内投与 (Fig. 14) は、マウス脈絡膜新生血管のサイズを減少させ血管外漏出を抑制した。以上の結果から、脈絡膜血管新生過程にROSが重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、エダラボンの半減期は0.15~0.17 h (α 期) と短い (73, 74)、2週間1日2回のエダラボン1 mg/kg腹腔内投与及びエダラボン3 mg/kg単回静脈内投与では、レーザー照射後に網膜や脈絡膜において発生した種々のラジカルを捕捉し脈絡膜血管新生を抑制するために十分量が眼内に送達されていることが示唆された。

網膜色素上皮細胞は網膜の視細胞層と脈絡膜の間に存在する。不飽和脂肪酸を豊富に含む視細胞外節は、光受容時に脂質過酸化が起こりやすい。そこで、隣接する網膜色素上皮細胞が視細胞外節を貪食し、代わりに視細胞外節の構成成分を再生して視機能を維持している。そのため、網膜色素上皮細胞において酸化ストレス障害を抑制することは加齢黄斑変性症の発症及び進行を抑制するうえ

で重要だと考えられる。本研究では、過去の報告と同様に、エダラボンがヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) における H_2O_2 誘発細胞内ROS産生を抑制した (Fig. 16A)。エダラボン単独処置群の細胞内ROS量はcontrol群 (H_2O_2 無し) よりも下回ったが、細胞死による細胞数減少は起きておらず、ストレスを与えていない通常培養環境で生じるROSを捕捉しているものと考えられる。

脂質過酸化において、4-HNEはタンパク質のリジン及びシステイン残基とミカエル付加反応しタンパク質を修飾する (75-78)。レーザー照射によってNADPH酸化酵素を活性化させ過剰に産生されたROSは (79)、脂質過酸化物である4-HNE修飾タンパク質の発現を増加させ、レーザー照射3時間後にピークに達した (70) (Fig. 15)。また、エダラボンは、レーザー照射24時間後まで早期の単回静脈内投与において脈絡膜血管新生抑制作用が認められた (Fig. 14)。レーザー照射24時間後は既に脂質過酸化が収束していることが予想され (Fig. 15)、エダラボンは脂質過酸化とは別の経路へ作用している可能性が考えられる。

脈絡膜血管新生モデルにおいて、レーザー照射はROSの増加や脂質過酸化の促進だけではなく、NF- κ B活性化を介した炎症を引き起こす。実際に、レーザー照射1日後 (24時間後) には、マクロファージの浸潤、白血球の浸潤、及びVEGFの発現増加が認められる (80-83)。エダラボンの白血球ローリング抑制作用 (84)、アストロサイトにおけるVEGF発現抑制作用 (85)、並びに血管内皮細胞におけるVEGF誘発の二次的なROS産生 (Fig. 16B) を考慮すると、レーザー照射24時間後のエダラボン単回静脈内投与の脈絡膜血管新生抑制作用には、レーザー照射誘発ROSの捕捉に加えて、VEGFの発現抑制、VEGF誘発の二次的なROS産生抑制、白血球浸潤及び炎症の抑制も関与している可能性が考えられる。レーザー照射24時間以降は、連続腹腔内投与のみが脈絡膜血管新生を有意に抑制することが可能であった (Figs. 14E, F)。この結果は、レーザー照射24時間以降は、連続投与

によって血中のエダラボンを維持し、持続的に産生されているROSを捕捉し続けなければならないことを示唆している。

内皮細胞の増殖は脈絡膜血管新生を含む血管新生において重要な過程であり、VEGF/ERK経路やROSが関与することが報告されている (86-88)。臨床試験結果から、エダラボン0.5、1及び1.5 mg/kg単回静脈内投与時の最大薬物血中濃度Cmaxは、それぞれ3.78、9.91及び17.6 μM であることから (74)、*in vitro*実験系のエダラボン濃度を10 μM 前後に設定し評価した。本研究において、エダラボン10 μM はVEGF誘発内皮細胞増殖を有意に抑制し (Fig. 17)、エダラボンの脈絡膜血管新生抑制作用に内皮細胞の増殖抑制作用が含まれることが示唆された。

これまで、エダラボンがマウスレーザー誘発脈絡膜血管新生に対して有効であることを明らかにした。しかしながら、多くの事例にあるように、マウスを用いた薬効評価結果が臨床試験では再現されないことが頻繁にある。そこで、第1章で確立したコモンマーモセットを用いたレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを作製し、霊長類脈絡膜血管新生に対するエダラボンの作用を評価したところ、レーザー照射直後のエダラボン3 mg/kg単回静脈内投与はコモンマーモセット脈絡膜血管新生を抑制した (Figs. 18A-D)。マウスとコモンマーモセットで比較すると、エダラボン3 mg/kg単回静脈内投与は、マウスモデルの場合 $0.62 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (vehicleの27%)、コモンマーモセットモデルの場合 $2.1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (vehicleの13.1%)脈絡膜血管新生を抑制している。この差は、マウスモデル (120 mW) とコモンマーモセット脈絡膜血管新生 (1,500 mW) のレーザー出力の差とそれに付随する脈絡膜血管新生重症度の違いのためと考えられる。また、アフリカミドリザル脈絡膜血管新生に対する抗VEGF抗体bevacizumabの成績 (27%脈絡膜新生血管抑制) や第1章で検討したコモンマーモセット脈絡膜血管新生に対する抗VEGF抗体ranibizumab (Lucentis®) の成績 (29%脈絡膜新生血管抑制) と比較すると

(29)、エダラボン単回静脈内投与のコモンマーモセット脈絡膜血管新生抑制作用は弱かった (13%脈絡膜新生血管抑制)。これは、エダラボンが単回投与のためにROS捕捉効果が持続しなかったためと考えられる。しかしながら、エダラボンはVEGFに依存しないROS捕捉作用を有することから、抗VEGF抗体との併用や抗VEGF抗体に対するノンレスポonderへの適用に期待できる。

以上本研究において、ラジカルスカベンジャーエダラボンは、酸化ストレスとその下流の脂質過酸化及び血管内皮細胞増殖を抑え、レーザー誘発脈絡膜血管新生を抑制させたことから、脈絡膜血管新生を特徴とする滲出型加齢黄斑変性症の治療に対する有用性が示唆された。

第1章及び第2章において、小型サルであるコモンマーモセットを用いた脈絡膜血管新生モデルを確立し、酸化ストレスの眼内血管新生への関与及び滲出型加齢黄斑変性症治療に対するラジカルスカベンジャーの有用性を明らかにした。第3章では、滲出型加齢黄斑変性症と同様、眼内血管新生を特徴とする糖尿病網膜症に焦点を当て、新規治療標的の探索に関する研究を行った。

第3章 糖尿病網膜症におけるアポリポ蛋白質E (ApoE) の役割

第1節 緒言

世界の糖尿病人口は爆発的に増え続けており、2015年に4億1,500万人とされた糖尿病有病者数は、2040年までに6億4,200万人に増加すると予測されている (89, 90)。また1型糖尿病患者の50%、2型糖尿病患者の30%に視力を脅かす網膜障害が認められ (91)、労働年齢人口の主要失明原因疾患の1つである糖尿病網膜症の有病者数も今後増加することが予想されている。

糖尿病網膜症は、網膜の微小血管障害によって引き起こされ、進行の程度により3つのステージ(単純糖尿病網膜症、前増殖糖尿病網膜症、増殖糖尿病網膜症)に分類され


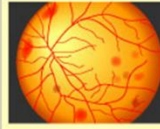
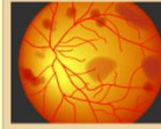

正常な網膜	糖尿病性網膜症		
	単純網膜症	前増殖網膜症	増殖網膜症
			
自覚症状の有無	なし	ほとんどなし	あり (視野に黒い影や視力低下など)
治療方法		網膜光凝固術	網膜光凝固術や硝子体手術 ※視力の回復は難しい

Fig. 19 糖尿病網膜症の進行段階

(https://dm.medimag.jp/column/172_2.html)

る (Fig. 19)。単純糖尿病網膜症は、眼底に毛細血管瘤や点状出血、血管から漏出したタンパク質や脂肪から成る硬性白斑が認められるが、自覚症状はほとんど無い (92)。高血糖状態が続き毛細血管が障害されると、血管壁の肥厚や血管閉塞により網膜に十分な栄養や酸素が行き渡らない虚血状態が生じる (前増殖糖尿病網膜症)。この時期においても、視機能障害は重症ではないため多くの患者は自覚がない (92)。ところがこのような網膜の虚血状態が続くと、血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) が増加し網膜血管新生が起こる (93, 94)。その新生血管が硝子体で出血すると、飛蚊症や著しい視力低下を引き起こす。また、線維性の増殖膜により硝子体と網膜が癒着すると、増殖膜が収縮した際に網膜

を牽引し剥離を生じ視力が著しく低下する (95)。このように、末期である増殖糖尿病網膜症まで進行すると、重度の視力低下や失明をきたす。

糖尿病は網膜毛細血管を傷害し、透過性亢進により血漿成分が網膜内に貯留する黄斑浮腫を伴う場合がある。近年、この糖尿病性黄斑浮腫を伴う糖尿病網膜症に対する抗VEGF治療が確立され (96)、重度の視力障害及び失明を回避することが可能になってきた。しかしながら、日常生活に不便が無いレベルの視力を維持するためには、糖尿病網膜症の早期発見を可能にするバイオマーカーや新規治療標的の探索が求められている。

血中において、脂質は、親水性のリン脂質、遊離コレステロール及びアポリポ蛋白質、並びに疎水性のコレステロールエステル及びトリグリセリドと結合し運搬される (リポ蛋白質)。人口調査において血漿脂質と糖尿病網膜症に統計学的に有意な関連性があるものの、リスクや予後診断を決定づけるほどの関連性の強さはないと主張されてきた (97)。しかしながら、特定のリポ蛋白質種は増殖糖尿病網膜症重症度に強く関与することが示唆されている (98, 99)。Lyonsらが実施したThe Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications cohort研究では、主なりポ蛋白質クラス (高密度リポタンパク質HDL、低密度リポタンパク質LDL、超低密度リポ蛋白質VLDL) において、1型糖尿病網膜症は直径が小さい粒子のサブクラス分布に移行し、LDL粒子濃度の増加することが示された (100)。また彼らは、酸化LDLを含む循環免疫複合体が重症糖尿病網膜症の予測因子となることを発見した (101)。さらに、LDLやVLDLの主要構成タンパク質であるアポリポ蛋白質B-100、酸化LDL、酸化LDL免疫複合体は、健常眼では全く存在しないが、網膜症発症前の糖尿病患者網膜に認められる (102, 103)。さらに、酸化脂質は酸化ストレス、小胞体ストレス及び炎症を引き起こし、毛細血管内皮細胞、周皮細胞、網膜色素上皮細胞及びミ

ユラー細胞などの培養ヒト網膜細胞死を引き起こす (103-110)。近年Yuらが実施した研究において、酸化LDLのマウス眼内投与により糖尿病網膜障害が悪化することが明らかになった (99)。これらの知見は、糖尿病によって網膜透過性が亢進し眼内に滲出した血漿リポ蛋白質が糖尿病網膜症の進行に関与していることを示唆している。

アポリポ蛋白質E (ApoE, Fig. 20) は主に肝臓から生成される34kDaの糖タンパク質であり、VLDLや中間密度リポタンパク質IDL及びHDLなどのリポ蛋白質を構成しているアポリポ蛋白質の1つであり、脂質代謝に関与する (111, 112)。ApoEは、LDL受容体、LDL受容体関連タンパク

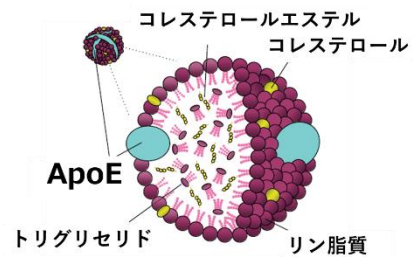


Fig. 20 脂質運搬体における ApoE の局在

(Valérie Leduc et al., *Int J Alzheimers Dis*, 2011 改変)

質1 (LRP1)、VLDL受容体及びApoE受容体2 (ApoER2/LRP8) を含むLDL受容体ファミリーメンバーに結合することが知られている (Fig. 21) (113)。ヒトApoEはε2、ε3、ε4対立遺伝子にコードされており、3つのアイソフォーム ApoE2 (ε2/ε2)、ApoE3 (ε3/ε3) 及びApoE4 (ε4/ε4) が見出されている (114)。これらのアイソフォームは異なるアミノ酸配列を有し、受容体結合ドメイン112/158位が、ApoE2はCys/Cys、ApoE3はCys/Arg、ApoE4はArg/Argで構成さ

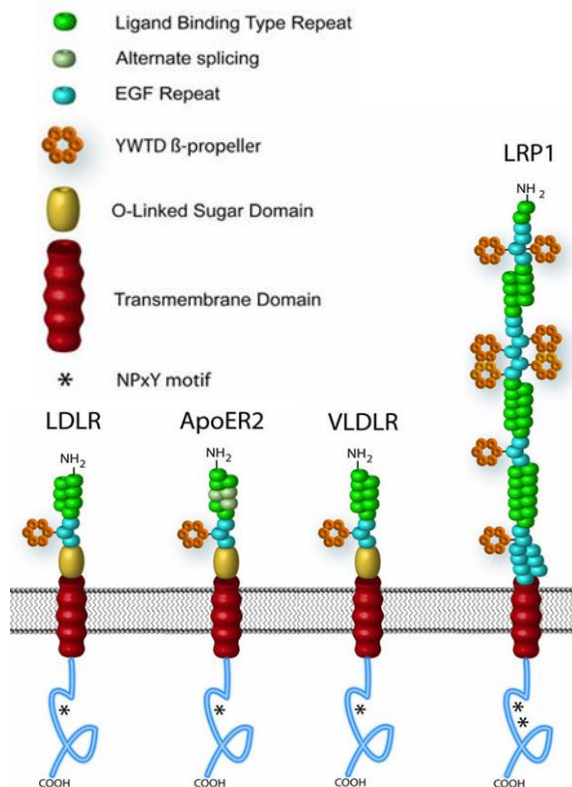


Fig. 21 中枢神経における主な ApoE 受容体 (Rebeck GW et al., *Mol Neurodegener.*, 2006)

れ、それぞれの人口に占める割合は、8.4、77.9、13.7%である (Fig. 22)。一方、マウスApoEに多型は存在せず、受容体結合ドメイン112/158位がヒトApoE4と同様

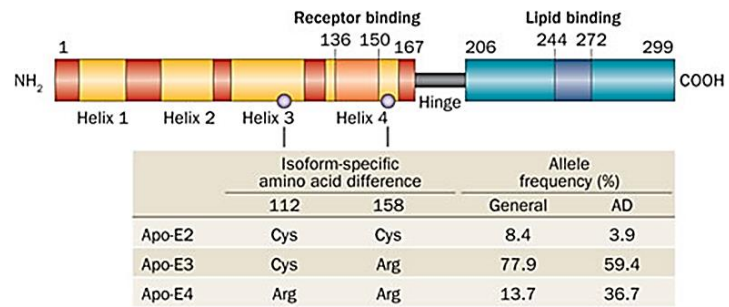


Fig. 22 ApoE の構造及びアイソフォームの特徴
(Liu CC et al., Nat Rev Neurol., 2013)

Arg/Argで構成されている。これら3つの多型は受容体や脂質結合親和性を制御しており、異なる反応を示す (115, 116)。例えば、アミロイドβ (Aβ) 前駆蛋白質の転写とAβの分泌能力はアイソフォーム間で異なっており (117)、アルツハイマー病においてはApoE4が危険因子と同定されている (Fig. 22)。

ApoEの発現は、網膜の視細胞外節、網膜神経節細胞層及びブルッフ膜に確認されている (114, 118-121)。またApoEは、網膜色素上皮細胞から分泌されることや、網膜に特異的なミュラーグリア細胞で合成され硝子体液中に分泌されることから (122)、ApoEが網膜に対して何らかの影響を及ぼしていると推測される。またヒト脳やマウス網膜において、ApoEはVEGF発現量と正の相関を示すことから (123-125)、網膜血管新生に関与していることが示唆される。しかしながら、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。

そこで本研究では、増殖糖尿病網膜症の特徴である網膜血管新生におけるApoEの関与について検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

第1章及び第2章の第2節2-1実験材料に加えて、Human Apolipoprotein E/ApoE

Quantikine ELISA Kit (DAPE00)、Human VEGF Quantikine ELISA Kit (DVE00) を R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)、ヒト組換えタンパクアポリポ蛋白質 E (ApoE) 2、ApoE3、ApoE4をPerotech, Inc. (Rocky Hill, NJ, USA)、eNOS阻害薬N^G-nitro-L-arginine methyl ester, hydrochloride (L-NAME) を Dojindo laboratories (Kumamoto, Japan) から購入した。

2-2 方法

2-2-1 動物

8週齢の体重20～30g雌雄C57BL/6Jマウス (Japan SLC、Hamamatsu、Shizuoka, Japan) を用いた。マウスは12時間/12時間の明暗サイクルのもと、自由給水下に固形飼料 (CE-2: CLEA Japan, Tokyo, Japan) を与えた。実験動物の取り扱いは、Association for Research in Vision and Ophthalmologyで決められたガイドラインを遵守して行った。また、実験内容については、岐阜薬科大学動物実験委員会に申請承認された上で実施した。

2-2-2 硝子体液サンプルの準備

本実験はヘルシンキ宣言を遵守し、岐阜薬科大学及び岐阜大学医学部の倫理審査委員会に承認された上で実施した (申請番号24-84)。対象患者に本研究の目的と手法を説明し、全被験者から同意を取得した。被験者 [黄斑円孔 (macular hole: MH) 40名、糖尿病黄斑浮腫 (diabetic macular edema: DME) 8名、増殖糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy: PDR) 39名] から、硝子体手術時に硝子体液を採取した。本研究では、倫理的に硝子体液を採取でき、かつ血管新生を伴わない疾患であるMHを対照群とした。また、硝子体切除術を繰り返し行っている患者サンプル及び明らかな出血が認められるサンプルは、評価から除外した。本

研究では、PDR患者39名を抗VEGF治療 (bevacizumab硝子体内投与) あり群 (15名) と治療なし群 (24名) に分けて評価した。採取した硝子体サンプルは、15,000×g、4°Cで10分間遠心後、上清のみを-80°Cで保存した。詳細な患者情報 (年齢、性別、LDLレベル、HDLレベル) はTable 1に示した。

Table 1. Demographics of patients.

	MH	DME	PDR (IVB-)	PDR (IVB+)	<i>p</i> -value*	Post-hoc <i>p</i> -value**
Eye sample, number	40	8	24	15		
Mean age, yrs (SD)	66.5 (10.2)	63.8 (5.8)	64.4 (10.1)	50.8 (11.9)	< 0.01	< 0.05 [#]
Male/Female (Male, %)	16/24 (40.0)	5/3 (62.5)	12/12 (50.0)	9/6 (60.0)	0.469	
Blood LDL (SD, number)	124.3 (31.3, 3)	112.1 (27.5, 8)	86.7 (42.0, 20)	116.1 (22.1, 12)	0.062	
Blood HDL (SD, number)	57.3 (17.2, 3)	51.4 (11.0, 8)	29.7 (19.2, 20)	42.1 (14.1, 12)	< 0.01	< 0.05 [§]

*Comparison of three or four groups. ANOVA was performed, and ** for post-hoc comparisons, Tukey tests were performed. [#]There is a significant difference between PDR (IVB+) group and other groups. [§]There is a significant difference between DME group and PDR (IVB-) groups. SD: standard deviation

2-2-3 酵素結合免疫吸着アッセイ (enzyme-linked immuno sorbent assay: ELISA)

本アッセイは、10、50、100倍に希釈した硝子体液サンプルを用いて実施した。ApoE濃度はHuman Apolipoprotein E/ApoE Quantikine ELISA Kit (DAPE00; R&D Systems, Inc., Boston, MA, USA)、VEGFはHuman VEGF Quantikine ELISA Kit (DVE00; R&D Systems, Inc.)を用いて、説明書に従って測定した。はじめに、底に抗ApoEポリクローナル抗体が予め付着しているプレートの各ウェルに、付属の希釈液、標準液、コントロール液、サンプルを加え、室温で3時間振とうさせた。

その後、各ウェルを4回洗浄し、西洋わさびペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase: HRP) 標識モノクローナル抗ApoE抗体液を加え、室温で1時間振とうさせた。再び洗浄し、基質液を加え室温で30分反応させた。最後に反応停止液を添加し、30分以内にマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で450及び540 nmの吸光度を測定した。各サンプル原液のApoE及びVEGF濃度は、標準液の結果から検量線を作成し算出した。

2-2-4 細胞培養

初代ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMECs) は第2章、第2節2-4と同様に培養維持し、継代数3～8のHRMECsを実験に用いた。

2-2-5 細胞増殖試験

細胞増殖は過去に報告されている方法を改変して行った。HRMECsを96ウェルプレートに 2.0×10^3 細胞/ウェルの密度で播種し、37°C、5% CO₂環境で24時間培養した。その後、成長因子を除いた10% FBS含有CSC medium (DS Pharma Biomedical) に培地交換し、さらに24時間培養した。アポリポ蛋白質E (ApoE) 2、ApoE3、ApoE4ヒト組換えタンパク質 (Perotech, Inc., Rocky Hill, NJ, USA) を用いて、それぞれ終濃度0.03～3 μMとなるように添加した。一酸化窒素合成酵素eNOS阻害薬L-NAME (終濃度2 mM) を用いる際は、ApoE添加1時間前に添加した。ApoE添加1時間後に終濃度10 ng/mLとなるようにVEGFを添加した。VEGFとの共培養24時間後、新しい10% FBS含有CSC mediumに培地交換し、ApoE及びVEGFを除去した。

生細胞数はWST-8アッセイ (Cell Counting Kit-8) により評価した。WST-8は細

胞外に留まり、生細胞が有する乳酸脱水素酵素の補酵素であるNADHから電子伝達物質 (1-methoxy PMS) を介して電子を受け取ることで還元され、水溶性のWST-8ホルマザン (極大吸収波長450 nm) を生成し橙色を呈する。細胞増殖前後3時間の450及び650 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定し、この変化量を生細胞数とみなした。

2-2-6 細胞遊走試験

0.03% コラーゲンコート処理した12ウェルプレートにHRMECsを 4.0×10^4 細胞/ウェルの密度で播種し、37°C、5% CO₂環境で24時間培養した。1% FBS含有CSC mediumに培地交換し6時間培養したのち、 1.0×10^3 μ L用チップを用いてウェルの中央線上のHRMECs単層を剥離した (細胞スクラッチ)。その後、浮遊細胞を取り除くために再度1% FBS含有CSC mediumで培地交換した。ApoE2、ApoE3、ApoE4は終濃度0.03~3 μ Mになるよう添加し、1時間後にVEGFを終濃度10 ng/mLとなるように添加した。これらの試薬を添加して37°C、5% CO₂環境で24時間培養した。

遊走前後のスクラッチエリアにおいて、各ウェル4か所3.6 mm²ずつCCDカメラ (DP30bW, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。細胞遊走は、24時間でスクラッチエリアに遊走した細胞数を計測し、各ウェル4か所の平均値を算出し評価した。

2-2-7 高酸素誘発網膜症 (oxygen-induced retinopathy: OIR) モデル

購入したマウスを交配させ、生まれた生後7日の新生仔マウスと母親マウスを75% O₂環境下で5日間飼育した。酸素濃度はコントローラー (PRO-OX 110;

Rerning Bioinstruments Co., Redfield, SD, USA) によって常時モニタリングした。生後12日の新生仔マウスを通常酸素下に戻した2日後 (生後14日後)、15 μ MのApoE2もしくはApoE3を1 μ L硝子体内投与した。

2-2-8 網膜伸展標本の作製及び網膜血管の撮影

生後17日のマウスに10 mg/kgペントバルビタールナトリウム腹腔内投与による麻酔後、20.0 mg/mL fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (MW 2,000 kD) 含有PBS溶液を左心室から1 mL投与し灌流した。灌流後、眼を摘出し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で8時間固定した。その後、角膜やレンズを取り除き網膜を単離した。単離した網膜はフルオロマウント (Diagnostic Bio Systems, Pleasanton, CA, USA) を用いて伸展標本を作製した。

網膜伸展標本の全体像は、蛍光顕微鏡 (BX-50: OLYMPUS) とMetaMorph Microscopy Automation and Image Analysis Systems (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA, USA) を用いて撮影した。取得した画像とMetaMorph 内のAngiogenesis Tube Formation moduleを用いて、網膜の異常血管数 (nodes) と異常血管面積 (nodes area) を測定し、病的血管新生を定量した。なお、連結塊を含む領域の血管の最大幅と厚さによってnodeを決定した。

2-2-9 免疫組織化学

生後17日の正常及び高酸素負荷網膜症マウスの眼を摘出し、4% PFAで4°C、24時間固定した。その後、O.C.T. compoundと液体窒素を用いて凍結ブロックを作製し-80°Cで保存した。解析のため、クライオスタットでマスコート付きスライドガラス上に10 μ mずつ連続横断切片を作製した。

切片はPBSで10分ずつ2回洗浄し、M.O.M. IgG blocking reagentで1時間ブロッキ

ングし、マウス抗CD31抗体 (1:500 dilution; AnaSpec, Inc., San Jose, CA, USA) は4°Cで一晩反応させた。その後再びブロッキングを行い、ラビット抗ApoE抗体 (1:100 dilution; Bioworld Technology, St. Louis Park, MN, USA) を4°Cで一晩反応させた。二次抗体としてAlexa Fluor[®] 546標識ヤギ抗マウス抗体 (1:2,000; Thermo Fisher Scientific) 及びAlexa Fluor[®] 488標識ヤギ抗ラビット抗体 (1:2,000; Thermo Fisher Scientific) を室温で1時間ずつ反応させた。最後にHoechst 33342 (1:2,000) を30分間反応させ核染色を行った。

各波長の蛍光画像は蛍光顕微鏡 (BX-50: OLYMPUS) とMetamorphを用いて撮影し、各タンパク質の発現局在を評価した。一次抗体を使わずに二次抗体だけ反応させた切片をネガティブコントロールとした。

2-2-10 ウェスタンブロット解析

マウス網膜におけるApoEの発現量を検討するため、各評価時期 (生後12日、14日、17日) における正常及び高酸素負荷網膜症マウスの眼を摘出し、単離した網膜を液体窒素で速やかに冷凍した。網膜はRIPA buffer (1% protease inhibitor cocktail、1% phosphate inhibitor cocktail II、1% phosphate inhibitor cocktail III含有) 内でホモジナイズし、12,000 × gで20分間遠心後の上清をタンパク抽出液とした。HRMECsにおけるApoE受容体ApoER2の発現を検討するため、HRMECsを12ウェルプレートに4 × 10⁴ 細胞/ウェルの密度で播種し、24時間培養後に1% FBS含有CSC mediumに培地交換し、さらに6時間培養した細胞をRIPA buffer (1% protease inhibitor cocktail、1% phosphate inhibitor cocktail II、1% phosphate inhibitor cocktail III含有) で溶解した。上述同様、12,000 × gで20分間遠心後の上清をタンパク抽出液とした。各タンパク質濃度は、BSAとBCA protein assay kitを用いて測定した。マウス網膜サンプルの10 µgを20% 2-メルカプトエタノールに希釈し調整した。

第2章、第2節2-10と同様の方法でタンパク定量、サンプル調整、電気泳動を行い、Block One-Pを用いて30分室温でブロッキングした。その後、ラビット抗ApoEポリクローナル抗体 (1:1,000 dilution)、ラビット抗ApoER2抗体 (1: 1,000, Abcam, Cambridge, UK)、マウス抗 β -actin抗体 (1:10,000 dilution; Merck KGaA) に浸し、4°Cで一晩反応させた。二次抗体として、HRP標識ヤギ抗ラビット抗体もしくはマウス抗体 (1:2,000; Thermo Fisher Scientific) を用いた。タンパク質バンドはImmunoStar[®]LDで可視化し、LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) で撮影し、付属のLumino Imaging Analyzerで定量した。

2-2-11 免疫細胞化学

ApoE受容体の1つであるApoE receptor 2 (ApoER2) の細胞局在を免疫細胞化学的手法によって検討した。すなわち、ガラスチャンバースライド (Laboratory-Tek; Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) にHRMECsを 1.0×10^4 cells/wellの密度で播種し、37°C、5% CO₂環境で24時間培養した。その後、10% FBS含有CSC medium (DS Pharma Biomedical) に培地交換し、24時間培養した。つぎにPBSで2回洗浄後、4% PFAに15分浸け固定した。3%ヤギ血清を用いて30分ブロッキング後、一次抗体のラビット抗ApoER2抗体 (ab108208, 1: 250, Abcam) とともに4°Cで一晩反応させた。洗浄後、二次抗体であるAlexa Fluor[®] 488標識ヤギ抗ラビット IgG (Thermo Fisher Scientific) を1時間室温で反応させた後、Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) と30分間反応させた。最後にフルオロマウントで封入し、共焦点顕微鏡 (Olympus) を用いて蛍光画像を取得した。

2-3 統計処理

実験結果はすべて平均 \pm 標準誤差で表し、危険率5%未満を統計学的有意とみ

なした。統計学的比較は、SPSSソフト (version 16.0J; IBM SPSS Statistics, IBM Corporation, Chicago, IL, USA) を用いてStudent's *t*-test、Dunnett's testまたはMann-Whitney *U*-test with Bonferroni correctionを行った。

第3節 実験結果

3-1 患者硝子体液中のApoE濃度及び血管内皮増殖因子 (VEGF) 濃度

糖尿病黄斑浮腫、増殖糖尿病網膜症及び黄斑円孔患者の硝子体液中のApoE及びVEGF濃度は、ELISAキットを用いて測定した。黄斑円孔患者と比べ、糖尿病黄斑浮腫患者及び増殖糖尿病網膜症患者硝子体液中のApoEとVEGFは有意に高い濃度であった (Figs. 23A, B)。Bevacizumab硝子体内投与患者の硝子体液中では、VEGF濃度が有意に低下していたが、ApoE濃度は明らかな変化が認められなかった (Fig. 23A, B)。全患者間の相関性を評価すると、ApoE及びVEGF濃度に有意な正の相関が認められ (Fig. 23C, $\rho = 0.530$, $P < 0.001$; Spearman's rank correlation coefficient)、y軸をApoE濃度 (ng/mL) の対数、x軸をVEGF濃度 (pg/mL) の対数とすると、相関関係式は $y = 0.3052x + 2.7132$ となった。

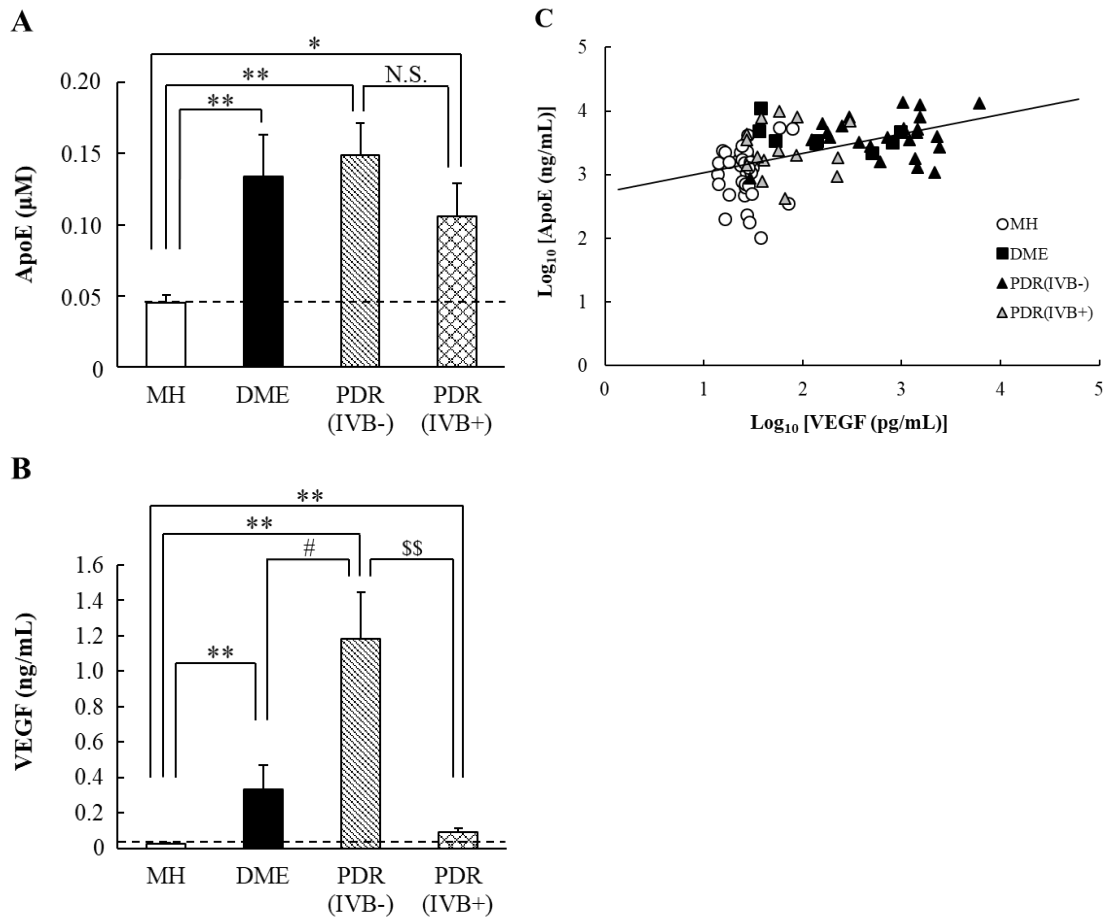


Fig. 23 Concentrations of ApoE and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the vitreous humor of patients with a macular hole (MH), diabetic macular edema (DME), and proliferative diabetic retinopathy (PDR).

(A and B) Concentrations of ApoE and VEGF in vitreous humor of patients with MH, DME, and PDR. The PDR samples for eyes that were treated with or without intravitreal injection of bevacizumab were analyzed separately. (C) Relationship between VEGF to ApoE in eyes of all patients. The relationship between ApoE and VEGF can be described by the equation, $y = 0.3052x + 2.7132$ in which y is the logarithms level of ApoE in ng/mL and x is the logarithms level of VEGF in pg/mL. Data are shown as the means \pm standard error of the means (SEMs) [MH, $n = 40$; DME, $n = 8$; PDR (IVB-), $n = 24$; PDR (IVB+), $n = 15$]. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. MH, # $P < 0.05$ vs. DME, \$\$ $P < 0.01$, N.S. vs. PDR (IVB-) (Mann-Whitney U -test with Bonferroni correction). MH, macular hole; DME, diabetic macular edema; PDR (IVB-), proliferative diabetic retinopathy without intravitreal injection of bevacizumab (IVB); PDR (IVB+), proliferative diabetic retinopathy with IVB.

3-2 VEGF誘発細胞増殖に対するApoEの作用

ApoE2及びApoE3は、VEGF存在下及び非存在下においてヒト網膜血管内皮細胞 (HRMECs) の増殖を有意に促進した (Figs. 24A, B)。一方、ApoE4は、単独でHRMECs増殖を有意に抑制し、VEGFに対して明らかな作用を示さなかった (Fig. 24C)。ApoE2及びApoE3で認められた内皮細胞増殖促進作用は、一酸化窒素合成素endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 阻害薬L-NAMEによって部分的に抑制された (Fig. 24D, E)。

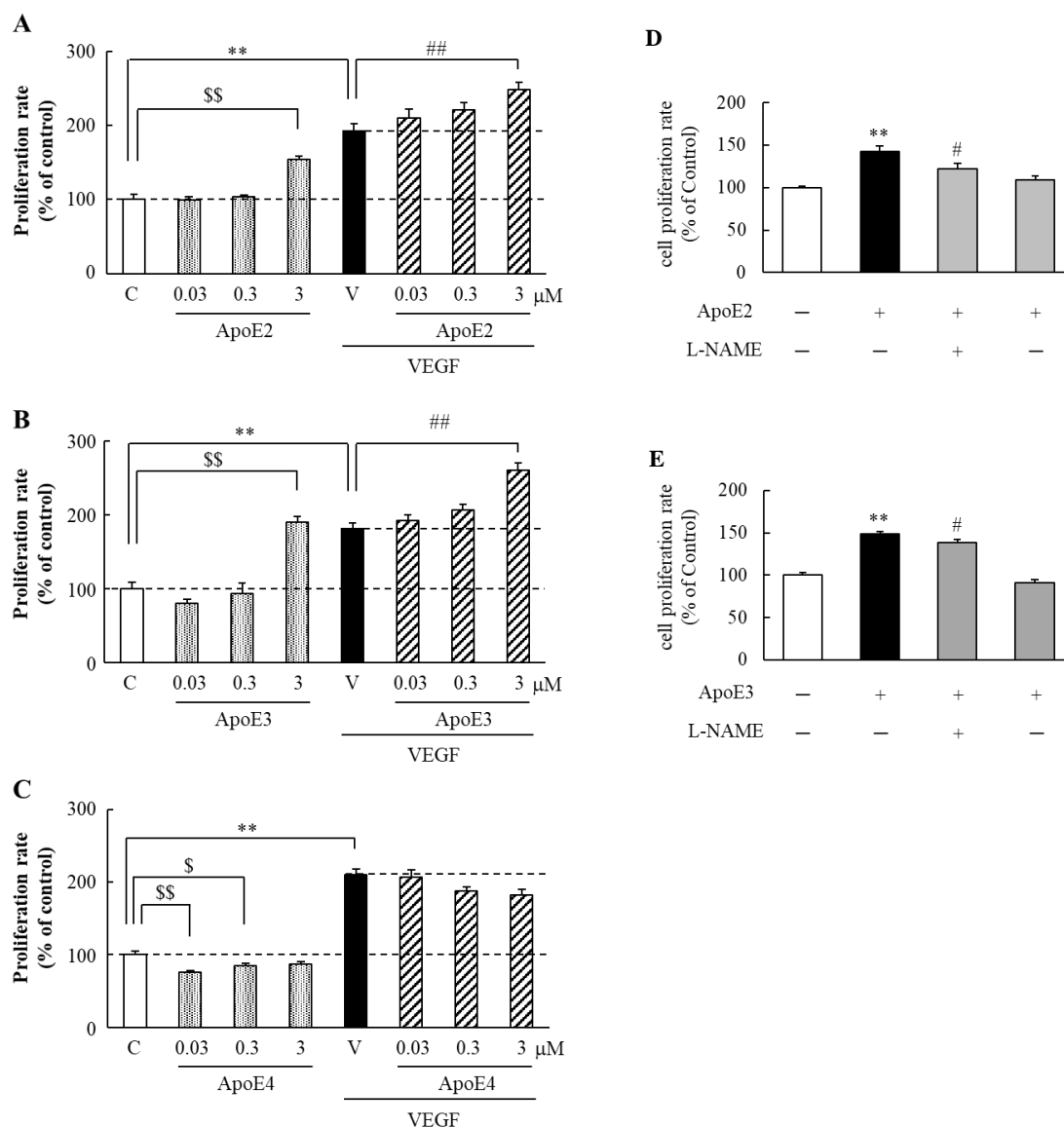


Fig. 24 Effects of ApoE on VEGF-induced cell proliferation.

The effects of ApoE2 (A), ApoE3 (B), and ApoE4 (C) on VEGF-induced proliferation of human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs) are shown. Data are the means \pm SEM (n = 6). $**P < 0.01$ vs. control (Student's *t*-test); $**P < 0.01$ vs. control group (Student's *t*-test); $##P < 0.01$ vs. vehicle-treated group (Dunnett's test); $\$P < 0.05$, $\$\$P < 0.01$ vs. control group (Dunnett's test). The effects of eNOS inhibitor L-NAME on (D) ApoE2- and (E) ApoE3-induced proliferation of HRMECs are shown. Data are the means \pm SEM (n = 6). $**P < 0.01$ vs. control (ApoE-/L-NAME-, Student's *t*-test); $\#P < 0.05$ vs. vehicle-treated group (ApoE+/L-NAME-, Student's *t*-test).

3-3 VEGF誘発細胞遊走に対するApoEの作用

増殖に対する作用と同様、ApoE2及びApoE3は、VEGF存在下及び非存在下においてHRMECsの遊走を有意に促進した (Figs. 25A, B)。一方、ApoE4は、VEGF存在下及び非存在下においてHRMECs遊走に対して作用を示さなかった (Fig. 25C)。

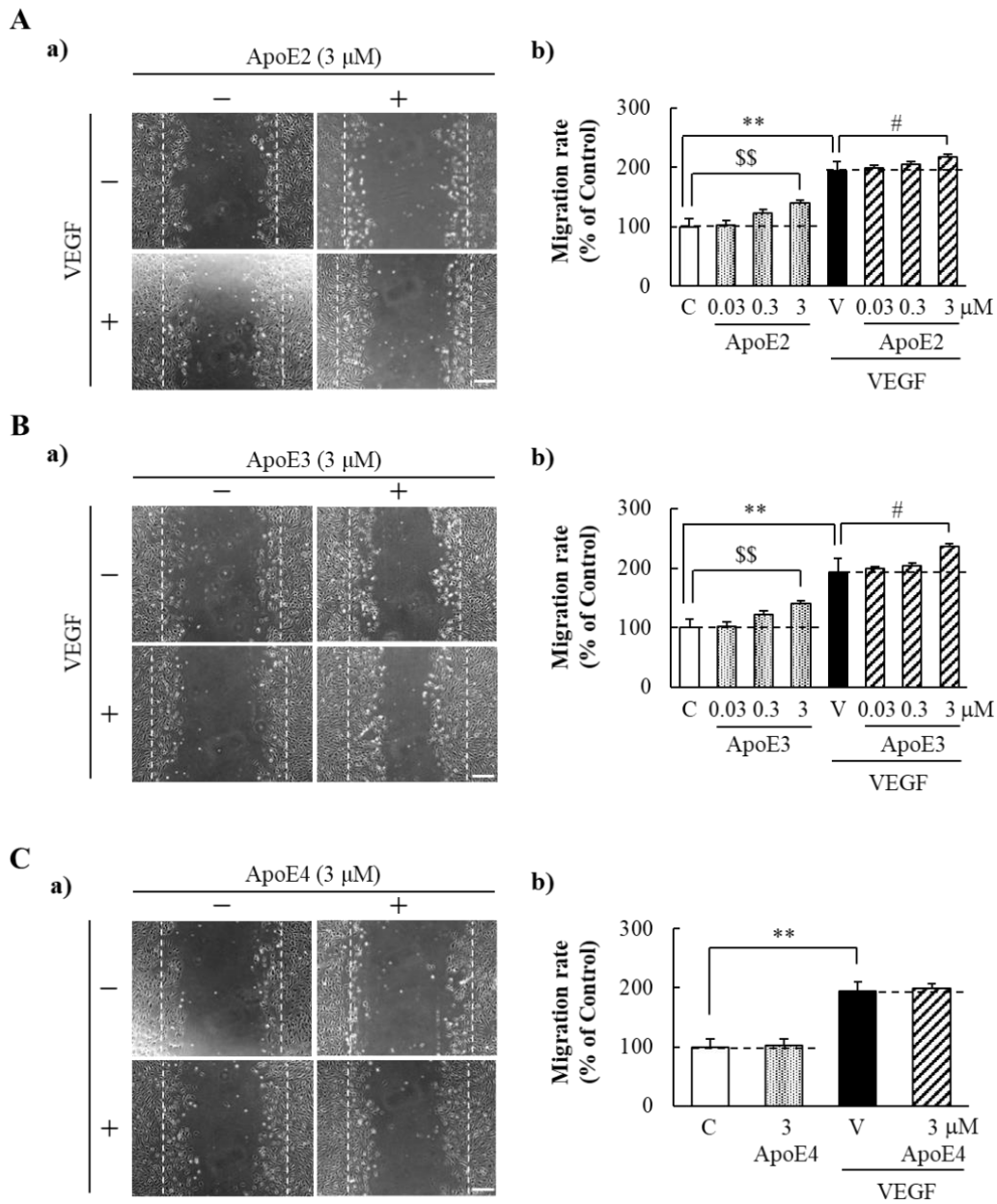


Fig. 25 Effects of ApoE on VEGF-induced cell migration

The effects of ApoE2 (A), ApoE3 (B), and ApoE4 (C) on the VEGF-induced migration of HRMECs. Representative images are shown in A (a), B (a), C (a). Scale bar represents 100 μ m. The values are the means \pm SEM (n = 6). ***P* < 0.01 vs. control (Student's *t*-test); ***P* < 0.01 vs. control group (Student's *t*-tests); #*P* < 0.05 vs. vehicle-treated group (Dunnett's test); \$\$*P* < 0.01 vs. control group (Dunnett's test).

3-4 高酸素負荷網膜症 (OIR) マウス網膜におけるApoEの発現局在及び発現量変化

生後17日目における正常マウス網膜において、ApoEは網膜層全体に発現しており、その一部は内皮細胞マーカーCD31と共局在していた (Fig. 26A)。また、OIRマウスにおいては、網膜層全体の発現量が減少するが、CD31との共局在に変化は認められなかった (Fig. 26A)。さらに、ウェスタンブロット法によりマウス網膜におけるApoE発現量の経時的な変化について解析した。ApoEの発現量は、生後12日後の網膜ではOIRマウスの方が有意に増加しており、生後17日後の網膜ではOIRマウスの方が有意に減少していた (Fig. 26B)。

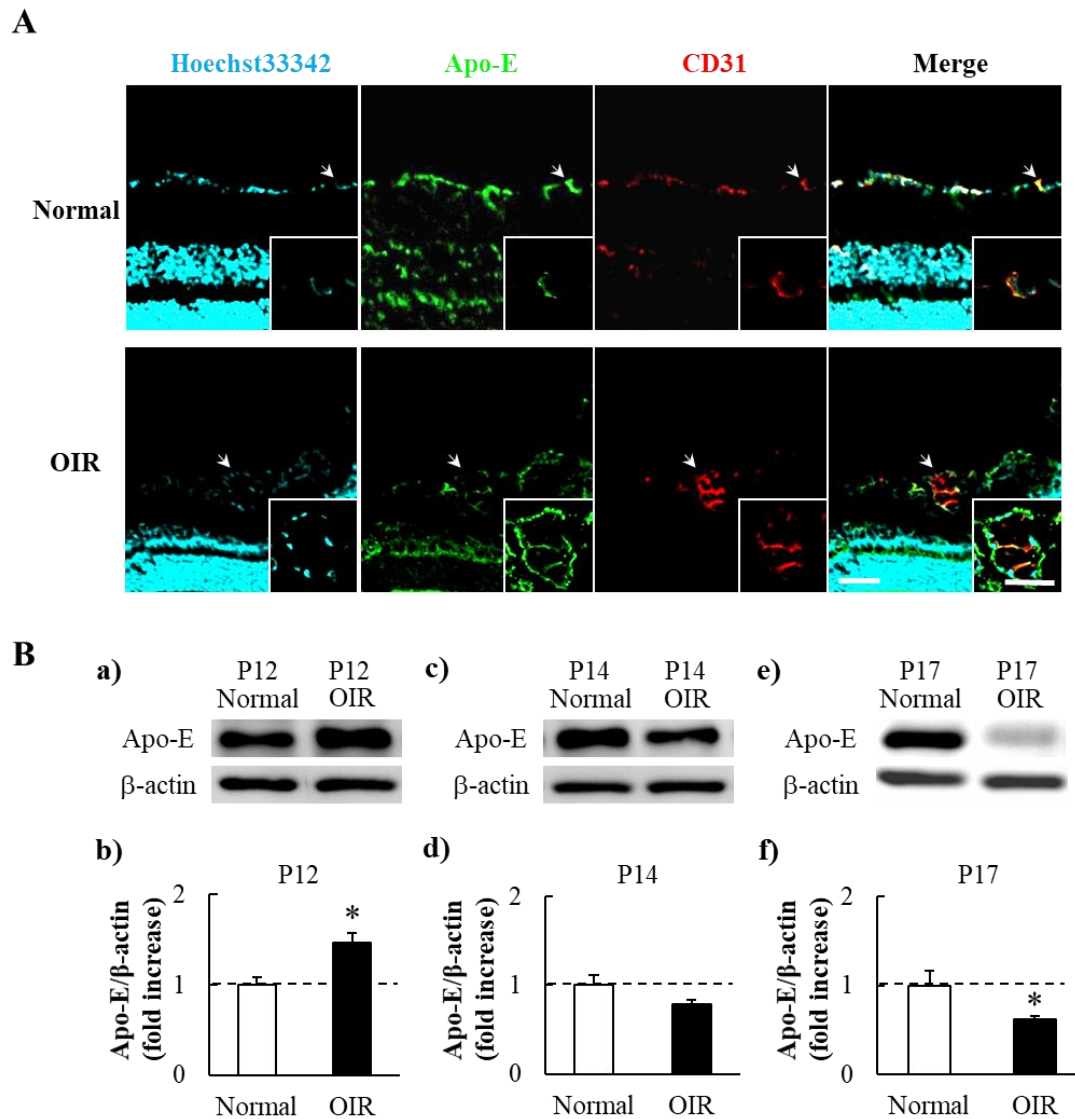


Fig. 26 Expression and localization of ApoE in retinas of normal and OIR mice.

(A) Photomicrographs of immunostained retinas of normal and OIR mice groups are shown. Areas indicated by white arrows are magnified at the bottom right. Hoechst33342, cyan; ApoE, green; CD31, red. (B) Western blots of retina of ApoE on normal and OIR retinas. Western bands images and the quantified results are shown; a), b), at P12; c), d), at P14; e), f), at P17. Data are the means \pm SEM (P12, n = 6; P14, n = 6; P17, Normal, n = 8; OIR, n = 9). * P < 0.05 vs. normal group (Student's t -tests). Scale bar represents 50 μ m.

3-5 高酸素負荷網膜症 (OIR) マウスの網膜血管新生に対するApoEの作用

内皮細胞増殖及び遊走に対して促進作用が認められた濃度が終濃度となるように、ApoE2もしくはApoE3を高酸素負荷網膜症 (OIR) マウスの生後14日目に硝子体内投与した。ApoE2及びApoE3投与群は共に異常血管数及び異常血管面積を有意に増加した (Fig. 27)。

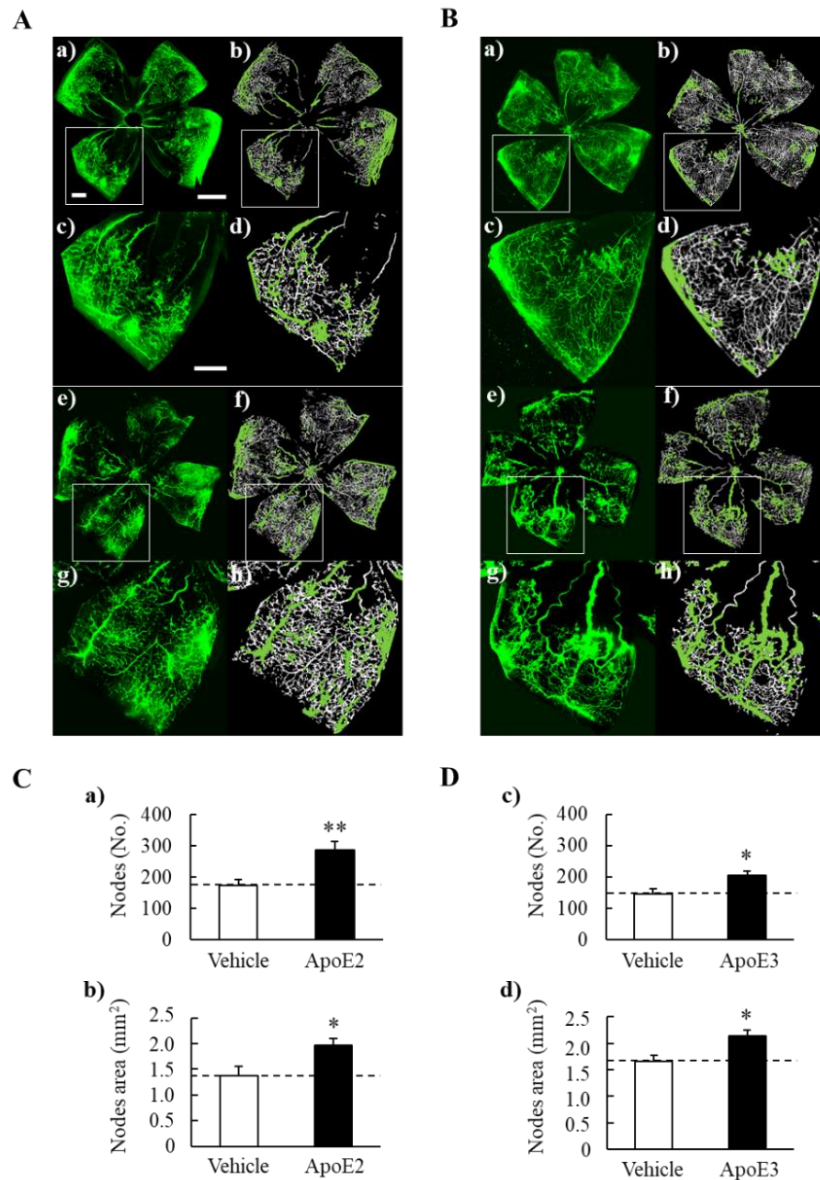


Fig. 27 Effects of ApoE on retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy (OIR) mice. Photomicrographs of flat-mounted retinas obtained on P17 from vehicle- and ApoE2-treated groups are shown in A(a) and A(e), respectively. Magnified images are shown in A(c) and A(g) and the analyzed images are shown in A(b), A(d), A(f) and A(h). The flat-mounted retinas obtained on P17 in vehicle- and ApoE3-treated groups are shown in B(a) and B(e), respectively. The magnified images are shown in B(c) and B(g) and the analyzed images are shown in B(b), B(d), B(f) and B(h). Greenish areas in the analyzed images represent the node regions which are indices of pathological neovascularization. The quantified results of the number and size of the area of the nodes are shown in C and D. Data are the means \pm SEM (C, n = 5; D, n = 8). * P < 0.05 vs. vehicle-treated group (Student's t -tests). Scale bar = 250 and 500 μ m.

3-6 ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMECs) におけるApoE受容体ApoER2の 発現

HRMECsにおいて、ApoER2のタンパク質バンドが100 kDaに検出され (Fig. 28A)、ApoER2のタンパク質は細胞全体に発現していた (Fig. 28B)

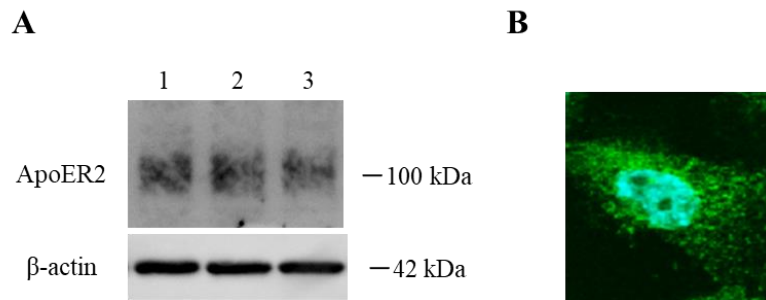


Fig. 28 The expression and localization of ApoER2 in HRMECs

(A) The expression and localization of ApoER2 in HRMECs in the culture are shown. Three western bands of ApoER2 and β -actin in HRMECs were detected at about 100 kDa and 42 kDa, respectively. (B) The expression of ApoER2 was detected widely in HRMECs. Scale bar = 10 μ m, Hoechst33342 (cyan), nucleus; Alexa 488 (green), ApoER2.

第4節 考察

糖尿病網膜症は、網膜微小血管を構成する内皮細胞が増殖・遊走することにより異常血管を新生することを特徴とする疾患である。本研究では、対照群である黄斑円孔患者と比較して、糖尿病黄斑浮腫及び増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液において、ApoE及びVEGFが有意に増加していることを明らかにした。また、全患者間においてApoEとVEGFに有意な正の相関が認められた。以上の結果から、網膜血管新生を伴う糖尿病網膜症の病態にApoEが関与していることが示唆された。

つぎに、糖尿病網膜症患者硝子体液で増加していたApoEの病的血管新生へ及ぼす影響を検討するために、血管新生において重要な過程である内皮細胞の増殖及び遊走に対する組換えヒトApoE蛋白質の作用を検討した。興味深いことに、ApoE2とApoE3はVEGF存在下/非存在下に関わらず内皮細胞増殖及び遊走に対して促進作用を示す一方、ApoE4単独では増殖に対して抑制作用を示し、遊走に対しては明らかな変化が認められなかった。ApoE4は、アミロイド β (A β) 前駆蛋白質の転写とA β の分泌に対し促進作用を示すことから、アルツハイマー病における危険因子として同定されている (117)。しかしながら、糖尿病網膜症と同様に眼内血管新生 (脈絡膜血管新生) を特徴とする滲出型加齢黄斑変性症では、ApoE ϵ 4対立遺伝子を有する患者はApoE ϵ 2対立遺伝子を有する患者より抗VEGF治療の予後が良いとされている (126)。また、ApoE3のeNOS活性化や内皮細胞の遊走促進作用に対するApoE4の抑制作用を考慮すると (127)、ApoE2及びApoE3は、網膜血管新生に対して促進的に作用し糖尿病網膜症の病態形成に関与している一方、ApoE4は、網膜血管新生に対して抑制的に作用している可能性が示唆される。

ApoE蛋白質は、マウス生後3日目から網膜に発現し、それは生後7日目から経

時的に増加し、発達期の正常網膜血管新生に関与している (121)。糖尿病網膜症の特徴である病的網膜血管新生を呈する高酸素負荷網膜症モデルマウスにおけるApoE発現量は、正常マウスと比較して、生後12日目 (高酸素下飼育5日間目) に有意に増加し、生後17日目 (高酸素下飼育5日間+通常酸素下飼育5日間目) に有意に減少した。高酸素負荷網膜症マウスの生後12日目は、5日間の高酸素暴露によりVEGF発現が抑制され中心網膜の毛細血管が退縮する (無血管領域の形成)。その後生後12日目から通常酸素下で飼育すると、網膜は著しい低酸素状態に陥るためにVEGF発現は数時間で著しく増加し、生後15日目にその発現量はピークに達する。その代償として異常網膜血管新生が起こり、高酸素負荷網膜症マウス生後17日目は無血管領域や低酸素領域が縮小した状態である (128, 129)。すなわち、高酸素負荷網膜症モデルの網膜において、マウスApoE発現量の減少と網膜異常血管新生がほぼ同じ時期に起きている。ApoE欠損マウスは、血管新生及び動脈硬化症病態を呈することから (130, 131)、内因性のマウスApoEは血管新生に対して抑制的な作用を有する可能性が示唆される。マウスApoEの112位及び158位のアミノ酸はヒトApoE4と同じであるが、マウス及びヒト間でApoEのアミノ酸レベルは70%しか相同性が無いため、それぞれ血管新生に対して機能的な差異が考えられる。

高酸素負荷網膜症マウスの生後14日目、すなわち高酸素下から通常酸素下の飼育に戻し血管新生が起きる時期であり、ApoEの網膜発現量が正常マウスと同等になる時期に、ApoE2もしくはApoE3を硝子体内に投与し、異常網膜血管新生へ及ぼす影響を検討した。ApoE2及びApoE3は共に高酸素負荷網膜症モデルの異常網膜血管新生を増加させ、*in vitro*試験系で明らかにしたApoE2及びApoE3のヒト網膜毛細血管内皮細胞に対する増殖及び遊走促進作用は、*in vivo*試験系の異常網膜血管新生に対する促進作用に関与していることが示唆された。

近年、ApoE2は受容体ApoER2に結合し、PI3キナーゼ/Aktを介して内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) を活性化し、ウシ大動脈内皮細胞の遊走を刺激すること、eNOS阻害薬N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) がApoE3誘発細胞遊走を抑制すること、ApoE4はApoE3によるeNOS活性化や内皮細胞の遊走促進を阻害することが示された (127)。また、ApoE2及びApoE3によるNO産生増加は、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVECsやEA.hy926) においても認められている (132, 133)。NOはMAPKカスケードなどを刺激し、内皮細胞の増殖及び遊走、すなわち血管新生を促進するため (134-137)、本研究で明らかになったApoE2やApoE3の網膜血管新生促進作用はApoER2とeNOS活性化を介している可能性が考えられる。実際に、本研究においても、培養ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMECs) にApoER2が発現していること、NOS阻害薬L-NAMEがApoE2及びApoE3のHRMECs増殖促進作用を抑制することを確認し、ApoEの細胞増殖及び遊走促進作用にeNOSの活性化が一部関与していることを明らかにした。

ヒトApoE2トランスジェニックマウスの網膜色素上皮細胞において、脂質の集積とVEGF及び塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) の発現が亢進していることが報告されている (118)。また、培養網膜色素上皮細胞に対するApoE3の添加はVEGFの発現を上昇させることや (138)、ヒトApoE4トランスジェニックマウスではVEGFレベルが低いこと (123, 139)、ApoE4はApoE3によるeNOS活性化や内皮細胞の遊走促進を阻害することが示されており (127)、ApoE2及びApoE3は眼内VEGF発現を増加させ血管新生に対して促進的に作用を示す一方、ApoE4は抑制作用を示す可能性が考えられる。臨床においても、糖尿病網膜症と同様の眼内血管新生 (脈絡膜血管新生) を特徴とする滲出型加齢黄斑変性症において、ApoEε4対立遺伝子を有する患者がApoEε2対立遺伝子を

有する患者より抗VEGF治療の予後が良いとされている (126)。すなわち、ApoE2 ($\epsilon 2/\epsilon 2$) アイソフォームを発現する患者の眼内ではVEGFの発現上昇を介して脈絡膜血管新生に関与し、抗VEGF治療の効果を減弱している可能性が考えられる。

ApoEは脂質と複合体を形成し、細胞外の脂質を細胞内へ運び込む際のリガンドとして機能する。ApoE2及びApoE3に特異的に結合親和性が高いリポ蛋白質にHDLが挙げられる (140, 141)。HDLは、スカベンジャー受容体SR-B1に結合し、PI3K経路を介して低酸素誘導因子HIF-1 α やVEGFの発現を上昇させ、下肢虚血モデルに血管新生を引き起こす (142-144)。また、HDLはPI3K/Akt/NO経路の活性化を介して末梢血中単球を内皮前駆細胞に分化させ (145)、それら内皮前駆細胞は成熟血管内皮細胞へと分化し血管新生に関与すると考えられる。そのため、本研究で明らかにしたApoEの眼内血管新生促進作用において、SR-B1とその下流シグナルの関与も考えられる。

本研究では、増殖糖尿病網膜症患者硝子体液におけるApoEの増加、並びにアイソフォームApoE2及びApoE3の網膜異常血管新生促進作用を明らかにした。以上の結果から、ApoE2及びApoE3は、VEGFとは非依存的に網膜血管新生を促進させ、増殖糖尿病網膜症病態の悪化の一端を担っている可能性を見出した。また、患者の有するApoE多型が糖尿病網膜症の進行程度及び抗VEGF治療の予後に影響する可能性並びにApoEが糖尿病網膜症の新規治療標的となる可能性を明らかにした。

総括及び結論

病的な眼内血管新生や黄斑浮腫を伴う眼疾患は、視力低下や失明を引き起こし、患者の生活の質を著しく損なう。これら病態に関わる重要な因子として、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が同定され、抗体治療法の確立によって、失明リスクは劇的に減少した。しかしながら、高額な抗VEGF抗体は患者の経済的負担となり、また定期的な硝子体内投与は感染症のリスクを伴うだけでなく身体的負担にもなる。さらに、抗VEGF治療の恩恵を受けられないノンレスポonderが存在するなど様々な課題が残されている。そのため、糖尿病網膜症や滲出型加齢黄斑変性症において、VEGFとは異なる治療標的の発見及び抗VEGF抗体と併用可能な治療薬の探索が望まれる。そこで、本研究では、糖尿病網膜症や滲出型加齢黄斑変性症に焦点を当て、病態の解明及び新規治療標的の探索を行った。

第1章では、脈絡膜血管新生を特徴とする滲出型加齢黄斑変性症に焦点を当て、臨床応用を想定した研究を実現するために、非ヒト霊長類コモンマーモセットを用いてレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルを作製した。始めに安定的に脈絡膜血管新生と血管外漏出を誘発するレーザー出力を検討し、その後組織学的変化を検討した。また、光干渉断層像 (OCT) による脈絡膜新生血管の撮像を検討した。さらに、本モデルを用いて、滲出型加齢黄斑変性症治療薬である抗VEGF抗体の作用を検討した。

- 1) レーザー出力に依存して照射部位に障害が起こり、出力1,500 mWのレーザー照射部位において、血管外漏出及びCD31陽性細胞の局在を確認した。
- 2) レーザー照射21日後の照射網膜及び非照射網膜において、VEGFは照射網膜特異的に高発現しており、照射21日後の脈絡膜血管新生病態にVEGFが関与していることが示唆された。一方、PIGFの発現は照射網膜及び非照射網膜におい

て明らかな差が無く、照射21日後の脈絡膜血管新生病態へのPIGFの関与は少ないことが示唆された。

- 3) 光干渉断層像 (OCT) を用いて、コモンマーモセットモデルの脈絡膜新生血管の撮像に成功した。
- 4) コモンマーモセット脈絡膜血管新生モデルに対し、滲出型加齢黄斑変性症治療薬である抗VEGF抗体は抑制作用を示した。

第2章では、脈絡膜血管新生に対する酸化ストレスの関与を明らかにするため、マウス及びコモンマーモセットを用いて疾患モデルを作製し、ラジカル消去能を有し脳保護薬として既に承認されているエダラボンの作用を検討した。エダラボンの保護作用の分子メカニズムを検討するため、酸化ストレスマーカーである4-HNE修飾タンパク質の発現量、活性酸素種 (ROS) の捕捉作用、及びヒト網膜血管内皮細胞 (HRMECs) 増殖に対する作用を検討した。

- 1) エダラボン連続腹腔内投与または単回静脈内投与は、マウス脈絡膜血管新生及び血管外漏出を抑制した。
- 2) エダラボンは脈絡膜の4-HNE修飾タンパクの発現量を低下させ、培養HRMECsの増殖を抑制した。
- 3) コモンマーモセットを用いたモデルに対しても同様に、エダラボン単回静脈内投与は脈絡膜血管新生及び血管外漏出を抑制した。

近年、糖尿病網膜症の進行にリポ蛋白質の関与が示唆されることから、第3章ではリポ蛋白質の構成因子アポリポ蛋白質E (ApoE) の網膜血管新生に対する作用を検討した。始めに糖尿病網膜症患者の硝子体液サンプル中のApoEとVEGFの濃度を測定し、HRMECsを用いた*in vitro*実験系において、各ApoEアイソフォームの血

管新生に対する作用を検討した。つぎに、マウスを用いた*in vivo*実験系では、ApoE2及びApoE3を眼内に直接投与し(硝子体内投与)、病的網膜血管新生に対するApoEの作用を検討した。

- 1) 糖尿病網膜症患者の硝子体液において、ApoE及びVEGFが増加し、正の相関が認められた。
- 2) ヒト組換えApoE2及びApoE3は、VEGF非依存的にHRMECsの増殖及び遊走を促進し、その作用は一酸化窒素合成酵素 (eNOS) を部分的に介していた。
- 3) マウス網膜におけるApoE発現は、血管内皮細胞を含む様々な細胞に認められ、その発現量は高酸素負荷網膜症モデルの生後12日目は有意に増加し、血管新生が認められる生後17日目で減少した。
- 4) ヒト組換えApoE2及びApoE3の硝子体内投与は、マウス高酸素負荷網膜症マウスの病的網膜血管新生を促進した。

以上、ラジカルスカベンジャーであるエダラボンは、脂質過酸化抑制及び内皮細胞増殖抑制を介してマウス及びコモンマーモセット脈絡膜血管新生を抑制すること、糖尿病網膜症患者硝子体内で増加していたApoEが、eNOS活性化を介して病的網膜血管新生を促進することを示した。これらの結果から、脈絡膜血管新生過程における酸化ストレスの関与及び病的網膜血管新生におけるApoEの関与を明らかにした。また本研究において、脈絡膜血管新生に対して有効性が示されたエダラボンは、医薬品としてその有用性や忍容性が既に認められているため、滲出型加齢黄斑変性症の有益な新規治療薬候補の1つとなる可能性が十分にあり、また網膜血管新生を特徴とする糖尿病網膜症病態においてApoEが新規治療標的となる可能性を見出した。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を賜り、また御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原 英彰博士に深甚なる感謝の意を表します。

本稿にて示した研究活動に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤 雅光博士、同助教 中村 信介博士並びに前講師 鶴間 一寛博士に心から感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なる御助言を賜りました岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室教授 稲垣 直樹先生、医療薬剤学大講座薬物治療学研究室教授 保住 功先生並びに医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室准教授 原 宏和先生に深謝致します。

本研究に際し、御協力と御助言を頂きました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室諸氏に感謝致します。とくに共同研究者として御協力頂いた高田 信介氏、橋本 悠平氏、古島 淳史氏に厚く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、御助言並びに御協力を賜りました岐阜大学医学部眼科学分野准教授 望月 清文先生並びに准教授 川瀬 和秀先生、岐阜市民病院眼科部長 川上 秀昭先生、松波総合病院眼科第二部長 末森 晋典先生、京都大学霊長類研究所高次脳機能分野教授 中村 克樹先生並びに特定研究員 三輪 美樹氏に深謝致します。

本研究の一部はJSPS科研費 16J11563 の助成によって行われた。

引用文献

1. Rosenfeld, P. J., Brown, D. M., Heier, J. S., Boyer, D. S., Kaiser, P. K., Chung, C. Y., and Kim, R. Y. (2006) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **355**, 1419-1431
2. Bashshur, Z. F., Haddad, Z. A., Schakal, A. R., Jaafar, R. F., Saad, A., and Nouredin, B. N. (2009) Intravitreal bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: the second year of a prospective study. *American journal of ophthalmology* **148**, 59-65.e51
3. Gragoudas, E. S., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Jr., Feinsod, M., and Guyer, D. R. (2004) Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **351**, 2805-2816
4. Heier, J. S., Brown, D. M., Chong, V., Korobelnik, J. F., Kaiser, P. K., Nguyen, Q. D., Kirchhof, B., Ho, A., Ogura, Y., Yancopoulos, G. D., Stahl, N., Vitti, R., Berliner, A. J., Soo, Y., Anderesi, M., Groetzbach, G., Sommerauer, B., Sandbrink, R., Simader, C., and Schmidt-Erfurth, U. (2012) Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **119**, 2537-2548
5. Solomon, S. D., Lindsley, K., Vedula, S. S., Krzystolik, M. G., and Hawkins, B. S. (2014) Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration. *The Cochrane database of systematic reviews*, Cd005139
6. Yuzawa, M., Fujita, K., Wittrup-Jensen, K. U., Norenberg, C., Zeitz, O., Adachi, K., Wang, E. C., Heier, J., Kaiser, P., Chong, V., and Korobelnik, J. F. (2015) Improvement in vision-related function with intravitreal aflibercept: data from phase 3 studies in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **122**, 571-578
7. Fintak, D. R., Shah, G. K., Blinder, K. J., Regillo, C. D., Pollack, J., Heier, J. S., Hollands, H., and Sharma, S. (2008) Incidence of endophthalmitis related to intravitreal injection of bevacizumab and ranibizumab. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **28**, 1395-1399
8. Mason, J. O., 3rd, White, M. F., Feist, R. M., Thomley, M. L., Albert, M. A., Persaud, T. O., Yunker, J. J., and Vail, R. S. (2008) Incidence of acute onset endophthalmitis following intravitreal bevacizumab (Avastin) injection. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **28**, 564-567

9. Pilli, S., Kotsolis, A., Spaide, R. F., Slakter, J., Freund, K. B., Sorenson, J., Klancnik, J., and Cooney, M. (2008) Endophthalmitis associated with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy injections in an office setting. *American journal of ophthalmology* **145**, 879-882
10. Scott, I. U., and Flynn, H. W., Jr. (2007) Reducing the risk of endophthalmitis following intravitreal injections. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **27**, 10-12
11. Meyer, C. H., Mennel, S., and Eter, N. (2007) [Incidence of endophthalmitis after intravitreal Avastin injection with and without postoperative topical antibiotic application]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* **104**, 952-957
12. Ehlken, C., Jungmann, S., Böhringer, D., Agostini, H. T., Junker, B., and Pielen, A. (2014) Switch of anti-VEGF agents is an option for nonresponders in the treatment of AMD. *Eye* **28**, 538-545
13. Zhang, M. (2014) [Attention to the non-responders to anti-VEGF treatment of wet age-related macular disease]. [*Zhonghua yan ke za zhi*] *Chinese journal of ophthalmology* **50**, 406-410
14. Prenner, J. L., Halperin, L. S., Rycroft, C., Hogue, S., Williams Liu, Z., and Seibert, R. (2015) Disease Burden in the Treatment of Age-Related Macular Degeneration: Findings From a Time-and-Motion Study. *American journal of ophthalmology* **160**, 725-731.e721
15. Arden, G. B. (2006) Age-related macular degeneration. *The journal of the British Menopause Society* **12**, 64-70
16. Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G., and Wong, T. Y. (2012) Age-related macular degeneration. *Lancet* **379**, 1728-1738
17. Bates, D. O., Hillman, N. J., Williams, B., Neal, C. R., and Pocock, T. M. (2002) Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Journal of Anatomy* **200**, 581-597
18. Pennesi, M. E., Neuringer, M., and Courtney, R. J. (2012) Animal models of age related macular degeneration. *Molecular aspects of medicine* **33**, 487-509
19. Puentes, S., Kaido, T., Hanakawa, T., Ichinohe, N., Otsuki, T., and Seki, K. (2015) Internal capsule stroke in the common marmoset. *Neuroscience* **284**, 400-411
20. Jenner, P., Rupniak, N. M., Rose, S., Kelly, E., Kilpatrick, G., Lees, A., and Marsden, C. D. (1984) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

- tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neuroscience letters* **50**, 85-90
21. Ando, K., Maeda, J., Inaji, M., Okauchi, T., Obayashi, S., Higuchi, M., Sahara, T., and Tanioka, Y. (2008) Neurobehavioral protection by single dose l-deprenyl against MPTP-induced parkinsonism in common marmosets. *Psychopharmacology* **195**, 509-516
 22. Iwanami, A., Kaneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Nomura, T., Toyama, Y., and Okano, H. (2005) Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *Journal of neuroscience research* **80**, 182-190
 23. Kobayashi, Y., Okada, Y., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Yasuda, A., Nori, S., Hikishima, K., Konomi, T., Fujiyoshi, K., Tsuji, O., Toyama, Y., Yamanaka, S., Nakamura, M., and Okano, H. (2012) Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PloS one* **7**, e52787
 24. Sasaki, E., Suemizu, H., Shimada, A., Hanazawa, K., Oiwa, R., Kamioka, M., Tomioka, I., Sotomaru, Y., Hirakawa, R., Eto, T., Shiozawa, S., Maeda, T., Ito, M., Ito, R., Kito, C., Yagihashi, C., Kawai, K., Miyoshi, H., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Habu, S., Okano, H., and Nomura, T. (2009) Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* **459**, 523-527
 25. Yu, L., Wu, X., Cheng, Z., Lee, C. V., LeCouter, J., Campa, C., Fuh, G., Lowman, H., and Ferrara, N. (2008) Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Investigative ophthalmology & visual science* **49**, 522-527
 26. Lu, F., and Adelman, R. A. (2009) Are intravitreal bevacizumab and ranibizumab effective in a rat model of choroidal neovascularization? *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **247**, 171-177
 27. Zhang, M., Zhang, J., Yan, M., Li, H., Yang, C., and Yu, D. (2008) Recombinant anti-vascular endothelial growth factor fusion protein efficiently suppresses choroidal neovascularization in monkeys. *Molecular vision* **14**, 37-49

28. Nork, T. M., Dubielzig, R. R., Christian, B. J., Miller, P. E., Miller, J. M., Cao, J., Zimmer, E. P., and Wiegand, S. J. (2011) Prevention of experimental choroidal neovascularization and resolution of active lesions by VEGF trap in nonhuman primates. *Archives of ophthalmology* **129**, 1042-1052
29. Goody, R. J., Hu, W., Shafiee, A., Struharik, M., Bartels, S., Lopez, F. J., and Lawrence, M. S. (2011) Optimization of laser-induced choroidal neovascularization in African green monkeys. *Experimental eye research* **92**, 464-472
30. Zuhlke, U., and Weinbauer, G. (2003) The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model in toxicology. *Toxicologic pathology* **31 Suppl**, 123-127
31. Grossniklaus, H. E., Ling, J. X., Wallace, T. M., Dithmar, S., Lawson, D. H., Cohen, C., Elner, V. M., Elner, S. G., and Sternberg, P., Jr. (2002) Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Molecular vision* **8**, 119-126
32. Hollanders, K., Van Bergen, T., Kindt, N., Castermans, K., Leysen, D., Vandewalle, E., Moons, L., and Stalmans, I. (2015) The effect of AMA0428, a novel and potent ROCK inhibitor, in a model of neovascular age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **56**, 1335-1348
33. Rakic, J.-M., Lambert, V., Devy, L., Lutun, A., Carmeliet, P., Claes, C., Nguyen, L., Foidart, J.-M., Noël, A. s., and Munaut, C. (2003) Placental Growth Factor, a Member of the VEGF Family, Contributes to the Development of Choroidal Neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* **44**, 3186-3193
34. Sakurai, E., Anand, A., Ambati, B. K., van Rooijen, N., and Ambati, J. (2003) Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* **44**, 3578-3585
35. Su, D., Li, X., and Gao, D. (2013) Inhibition of choroidal neovascularization by anti-EphB4 monoclonal antibody. *Experimental and therapeutic medicine* **5**, 1226-1230
36. Cano, M., Thimmalappula, R., Fujihara, M., Nagai, N., Sporn, M., Wang, A. L., Neufeld, A. H., Biswal, S., and Handa, J. T. (2010) Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2

- signaling, and Age-related Macular Degeneration. *Vision research* **50**, 652-664
37. Jarrett, S. G., and Boulton, M. E. (2012) Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Molecular aspects of medicine* **33**, 399-417
 38. Li, X., Cai, Y., Wang, Y. S., Shi, Y. Y., Hou, W., Xu, C. S., Wang, H. Y., Ye, Z., Yao, L. B., and Zhang, J. (2012) Hyperglycaemia exacerbates choroidal neovascularisation in mice via the oxidative stress-induced activation of STAT3 signalling in RPE cells. *PloS one* **7**, e47600
 39. Tokarz, P., Kaarniranta, K., and Blasiak, J. (2013) Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Biogerontology* **14**, 461-482
 40. Youssef, P. N., Sheibani, N., and Albert, D. M. (2011) Retinal light toxicity. *Eye (London, England)* **25**, 1-14
 41. Yu, D. Y., and Cringle, S. J. (2001) Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Progress in retinal and eye research* **20**, 175-208
 42. Beatty, S., Murray, I. J., Henson, D. B., Carden, D., Koh, H., and Boulton, M. E. (2001) Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. *Investigative ophthalmology & visual science* **42**, 439-446
 43. Maeda, A., Crabb, J. W., and Palczewski, K. (2005) Microsomal glutathione S-transferase 1 in the retinal pigment epithelium: protection against oxidative stress and a potential role in aging. *Biochemistry* **44**, 480-489
 44. Friedrichson, T., Kalbach, H. L., Buck, P., and van Kuijk, F. J. (1995) Vitamin E in macular and peripheral tissues of the human eye. *Current eye research* **14**, 693-701
 45. Boulton, M., Rozanowska, M., and Rozanowski, B. (2001) Retinal photodamage. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **64**, 144-161
 46. Reeg, S., and Grune, T. (2015) Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? *Antioxidants & redox signaling* **23**, 239-255
 47. Wang, A. L., Lukas, T. J., Yuan, M., and Neufeld, A. H. (2008) Increased mitochondrial DNA damage and down-regulation of DNA repair enzymes

- in aged rodent retinal pigment epithelium and choroid. *Molecular vision* **14**, 644-651
48. Jarrett, S. G., Lewin, A. S., and Boulton, M. E. (2010) The importance of mitochondria in age-related and inherited eye disorders. *Ophthalmic research* **44**, 179-190
49. Castorina, C., Campisi, A., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Russo, A., and Vanella, A. (1992) Lipid peroxidation and antioxidant enzymatic systems in rat retina as a function of age. *Neurochemical research* **17**, 599-604
50. Sigler, E. J., Randolph, J. C., Calzada, J. I., and Charles, S. (2014) Smoking and choroidal thickness in patients over 65 with early-atrophic age-related macular degeneration and normals. *Eye (London, England)* **28**, 838-846
51. Wang, A. L., Lukas, T. J., Yuan, M., Du, N., Handa, J. T., and Neufeld, A. H. (2009) Changes in retinal pigment epithelium related to cigarette smoke: possible relevance to smoking as a risk factor for age-related macular degeneration. *PloS one* **4**, e5304
52. Woodell, A., and Rohrer, B. (2014) A mechanistic review of cigarette smoke and age-related macular degeneration. *Advances in experimental medicine and biology* **801**, 301-307
53. Chua, C. C., Hamdy, R. C., and Chua, B. H. (1998) Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free radical biology & medicine* **25**, 891-897
54. Kuroki, M., Voest, E. E., Amano, S., Beerepoot, L. V., Takashima, S., Tolentino, M., Kim, R. Y., Rohan, R. M., Colby, K. A., Yeo, K. T., and Adamis, A. P. (1996) Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *The Journal of clinical investigation* **98**, 1667-1675
55. Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S. I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M. T., Pagano, P. J., Johnson, C., and Alexander, R. W. (2002) Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circulation research* **91**, 1160-1167
56. Wang, Y., Zang, Q. S., Liu, Z., Wu, Q., Maass, D., Dulan, G., Shaul, P. W., Melito, L., Frantz, D. E., Kilgore, J. A., Williams, N. S., Terada, L. S., and Nwariaku, F. E. (2011) Regulation of VEGF-induced endothelial cell

- migration by mitochondrial reactive oxygen species. *American journal of physiology. Cell physiology* **301**, C695-704
57. Ruef, J., Hu, Z. Y., Yin, L. Y., Wu, Y., Hanson, S. R., Kelly, A. B., Harker, L. A., Rao, G. N., Runge, M. S., and Patterson, C. (1997) Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. *Circulation research* **81**, 24-33
 58. (2001) A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Archives of ophthalmology* **119**, 1417-1436
 59. Kikuchi, K., Tancharoen, S., Takeshige, N., Yoshitomi, M., Morioka, M., Murai, Y., and Tanaka, E. (2013) The efficacy of edaravone (radicut), a free radical scavenger, for cardiovascular disease. *International journal of molecular sciences* **14**, 13909-13930
 60. Nonaka, Y., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Iwama, T., and Hara, H. (2008) Combination effects of normobaric hyperoxia and edaravone on focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in mice. *Neuroscience letters* **441**, 224-228
 61. Nakase, T., Yoshioka, S., and Suzuki, A. (2011) Free radical scavenger, edaravone, reduces the lesion size of lacunar infarction in human brain ischemic stroke. *BMC neurology* **11**, 39
 62. Zong, L., Yu, Q. H., Du, Y. X., and Deng, X. M. (2014) Edaravone protects endotoxin-induced liver injury by inhibiting apoptosis and reducing proinflammatory cytokines. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* **47**, 231-236
 63. Song, Y., Gong, Y. Y., Xie, Z. G., Li, C. H., Gu, Q., and Wu, X. W. (2008) Edaravone (MCI-186), a free radical scavenger, attenuates retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Acta pharmacologica Sinica* **29**, 823-828
 64. Maeno, T., Tano, R., Takenaka, H., and Mano, T. (2009) Edaravone (MCI-186) is effective as a free radical scavenger following arteriovenous sheathotomy for treatment of macular oedema associated with branch retinal vein occlusion. *The British journal of ophthalmology* **93**, 1479-1482

65. Roh, M. I., Murakami, Y., Thanos, A., Vavvas, D. G., and Miller, J. W. (2011) Edaravone, an ROS scavenger, ameliorates photoreceptor cell death after experimental retinal detachment. *Investigative ophthalmology & visual science* **52**, 3825-3831
66. Yuan, D., Xu, Y., Hang, H., Liu, X., Chen, X., Xie, P., Yuan, S., Zhang, W., Lin, X., and Liu, Q. (2014) Edaravone Protect against Retinal Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *PloS one* **9**, e99219
67. Aksar, A. T., Yuksel, N., Gok, M., Cekmen, M., and Caglar, Y. (2015) Neuroprotective effect of edaravone in experimental glaucoma model in rats: a immunofluorescence and biochemical analysis. *International journal of ophthalmology* **8**, 239-244
68. Inokuchi, Y., Imai, S., Nakajima, Y., Shimazawa, M., Aihara, M., Araie, M., and Hara, H. (2009) Edaravone, a free radical scavenger, protects against retinal damage in vitro and in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **329**, 687-698
69. Imai, S., Inokuchi, Y., Nakamura, S., Tsuruma, K., Shimazawa, M., and Hara, H. (2010) Systemic administration of a free radical scavenger, edaravone, protects against light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *European journal of pharmacology* **642**, 77-85
70. Hara, R., Inomata, Y., Kawaji, T., Sagara, N., Inatani, M., Fukushima, M., and Tanihara, H. (2010) Suppression of choroidal neovascularization by N-acetyl-cysteine in mice. *Current eye research* **35**, 1012-1020
71. Kawai, S., Matsumoto, K., and Utsumi, H. (2010) An EPR method for estimating activity of antioxidants in mouse skin using an anthralin-derived radical model. *Free radical research* **44**, 267-274
72. Xie, P., Zhang, W., Yuan, S., Chen, Z., Yang, Q., Yuan, D., Wang, F., and Liu, Q. (2012) Suppression of experimental choroidal neovascularization by curcumin in mice. *PloS one* **7**, e53329
73. Watanabe, T., Tanaka, M., Watanabe, K., Takamatsu, Y., and Tobe, A. (2004) [Research and development of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotectant]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **124**, 99-111
74. Shibata, H., Arai, S., Izawa, M., Murasaki, M., Takamatsu, Y., Izawa, O., Takahashi, C., and Tanaka, M. (1998) Phase I Clinical Study of MCI-186 (Edaravone, 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) in Healthy Volunteers

- Safety and Pharmacokinetics of Single and Multiple Administrations. *Rinsho yakuri/Japanese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **29**, 863-876
75. Szweda, L. I., Uchida, K., Tsai, L., and Stadtman, E. R. (1993) Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine. *The Journal of biological chemistry* **268**, 3342-3347
76. Uchida, K., Szweda, L. I., Chae, H. Z., and Stadtman, E. R. (1993) Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8742-8746
77. Uchida, K., and Stadtman, E. R. (1993) Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *The Journal of biological chemistry* **268**, 6388-6393
78. Uchida, K., and Stadtman, E. R. (1992) Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4544-4548
79. Monaghan-Benson, E., Hartmann, J., Vendrov, A. E., Budd, S., Byfield, G., Parker, A., Ahmad, F., Huang, W., Runge, M., BurrIDGE, K., Madamanchi, N., and Hartnett, M. E. (2010) The role of vascular endothelial growth factor-induced activation of NADPH oxidase in choroidal endothelial cells and choroidal neovascularization. *The American journal of pathology* **177**, 2091-2102
80. Rohrer, B., Long, Q., Coughlin, B., Wilson, R. B., Huang, Y., Qiao, F., Tang, P. H., Kunchithapautham, K., Gilkeson, G. S., and Tomlinson, S. (2009) A targeted inhibitor of the alternative complement pathway reduces angiogenesis in a mouse model of age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* **50**, 3056-3064
81. Cui, W., Zhang, H., and Liu, Z. L. (2014) Interleukin-6 receptor blockade suppresses subretinal fibrosis in a mouse model. *International journal of ophthalmology* **7**, 194-197
82. Hasegawa, E., Sonoda, K. H., Shichita, T., Morita, R., Sekiya, T., Kimura, A., Oshima, Y., Takeda, A., Yoshimura, T., Yoshida, S., Ishibashi, T., and

- Yoshimura, A. (2013) IL-23-independent induction of IL-17 from gammadeltaT cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **190**, 1778-1787
83. Itaya, M., Sakurai, E., Nozaki, M., Yamada, K., Yamasaki, S., Asai, K., and Ogura, Y. (2007) Upregulation of VEGF in murine retina via monocyte recruitment after retinal scatter laser photocoagulation. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**, 5677-5683
84. Sakamoto, K., Yamashita, T., Yamanishi, H., and Yamamoto, J. (2013) The effect of edaravone to leukocyte rolling and adhesion molecule expression in microvessels. *Health* **05**, 402-408
85. Ishikawa, A., Yoshida, H., Metoki, N., Toki, T., Imaizumi, T., Matsumiya, T., Yamashita, K., Taima, K., and Satoh, K. (2007) Edaravone inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in human astrocytes exposed to hypoxia. *Neuroscience research* **59**, 406-412
86. Yang, X. M., Wang, Y. S., Zhang, J., Li, Y., Xu, J. F., Zhu, J., Zhao, W., Chu, D. K., and Wiedemann, P. (2009) Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1alpha and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* **50**, 1873-1879
87. Lim, Y. C., Bhatt, M. P., Kwon, M. H., Park, D., Lee, S., Choe, J., Hwang, J., Kim, Y. M., and Ha, K. S. (2014) Prevention of VEGF-mediated microvascular permeability by C-peptide in diabetic mice. *Cardiovascular research* **101**, 155-164
88. Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., and Heldin, C. H. (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* **269**, 26988-26995
89. International Diabetes Federation, (2017) IDF Diabetes Atlas 8th Edition.
90. World Health Organization, (2016) Global report on diabetes.
91. Stefansson, E., Bek, T., Porta, M., Larsen, N., Kristinsson, J. K., and Agardh, E. (2000) Screening and prevention of diabetic blindness. *Acta ophthalmologica Scandinavica* **78**, 374-385

92. Kollias, A. N., and Ulbig, M. W. (2010) Diabetic Retinopathy: Early Diagnosis and Effective Treatment. *Deutsches Arzteblatt International* **107**, 75-84
93. Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E., and et al. (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *The New England journal of medicine* **331**, 1480-1487
94. Simo, R., and Hernandez, C. (2008) Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia* **51**, 1574-1580
95. Gupta, V., and Arevalo, J. F. (2013) Surgical Management of Diabetic Retinopathy. *Middle East African Journal of Ophthalmology* **20**, 283-292
96. Blinder, K. J., Dugel, P. U., Chen, S., Jumper, J. M., Walt, J. G., Hollander, D. A., and Scott, L. C. (2017) Anti-VEGF treatment of diabetic macular edema in clinical practice: effectiveness and patterns of use (ECHO Study Report 1). *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)* **11**, 393-401
97. Klein, B. E. K., Myers, C. E., Howard, K. P., and Klein, R. (2015) Serum Lipids and Proliferative Diabetic Retinopathy and Macular Edema in Persons with Long Term Type 1 Diabetes: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *JAMA ophthalmology* **133**, 503-510
98. Modjtahedi, B. S., Bose, N., Papakostas, T. D., Morse, L., Vavvas, D. G., and Kishan, A. U. (2016) Lipids and Diabetic Retinopathy. *Seminars in Ophthalmology* **31**, 10-18
99. Yu, J. Y., Du, M., Elliott, M. H., Wu, M., Fu, D., Yang, S., Basu, A., Gu, X., Ma, J. X., Aston, C. E., and Lyons, T. J. (2016) Extravascular modified lipoproteins: a role in the propagation of diabetic retinopathy in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* **59**, 2026-2035
100. Lyons, T. J., Jenkins, A. J., Zheng, D., Lackland, D. T., McGee, D., Garvey, W. T., and Klein, R. L. (2004) Diabetic retinopathy and serum lipoprotein subclasses in the DCCT/EDIC cohort. *Investigative ophthalmology & visual science* **45**, 910-918
101. Lopes-Virella, M. F., Baker, N. L., Hunt, K. J., Lyons, T. J., Jenkins, A. J., and Virella, G. (2012) High concentrations of AGE-LDL and oxidized

- LDL in circulating immune complexes are associated with progression of retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes care* **35**, 1333-1340
102. Wu, M., Chen, Y., Wilson, K., Chirindel, A., Ihnat, M. A., Yu, Y., Boulton, M. E., Szweda, L. I., Ma, J. X., and Lyons, T. J. (2008) Intraretinal leakage and oxidation of LDL in diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* **49**, 2679-2685
103. Fu, D., Yu, J. Y., Wu, M., Du, M., Chen, Y., Abdelsamie, S. A., Li, Y., Chen, J., Boulton, M. E., Ma, J. X., Lopes-Virella, M. F., Virella, G., and Lyons, T. J. (2014) Immune complex formation in human diabetic retina enhances toxicity of oxidized LDL towards retinal capillary pericytes. *J Lipid Res* **55**, 860-869
104. Lyons, T. J., Li, W., Wells-Knecht, M. C., and Jokl, R. (1994) Toxicity of mildly modified low-density lipoproteins to cultured retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Diabetes* **43**, 1090-1095
105. Song, W., Barth, J. L., Yu, Y., Lu, K., Dashti, A., Huang, Y., Gittinger, C. K., Argraves, W. S., and Lyons, T. J. (2005) Effects of oxidized and glycated LDL on gene expression in human retinal capillary pericytes. *Investigative ophthalmology & visual science* **46**, 2974-2982
106. Zhang, S. X., Wang, J. J., Dashti, A., Wilson, K., Zou, M. H., Szweda, L., Ma, J. X., and Lyons, T. J. (2008) Pigment epithelium-derived factor mitigates inflammation and oxidative stress in retinal pericytes exposed to oxidized low-density lipoprotein. *Journal of molecular endocrinology* **41**, 135-143
107. Diffley, J. M., Wu, M., Sohn, M., Song, W., Hammad, S. M., and Lyons, T. J. (2009) Apoptosis induction by oxidized glycated LDL in human retinal capillary pericytes is independent of activation of MAPK signaling pathways. *Molecular vision* **15**, 135-145
108. Wu, M., Yang, S., Elliott, M. H., Fu, D., Wilson, K., Zhang, J., Du, M., Chen, J., and Lyons, T. (2012) Oxidative and endoplasmic reticulum stresses mediate apoptosis induced by modified LDL in human retinal Muller cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **53**, 4595-4604
109. Fu, D., Wu, M., Zhang, J., Du, M., Yang, S., Hammad, S. M., Wilson, K., Chen, J., and Lyons, T. J. (2012) Mechanisms of modified LDL-induced pericyte loss and retinal injury in diabetic retinopathy. *Diabetologia* **55**, 3128-3140

110. Du, M., Wu, M., Fu, D., Yang, S., Chen, J., Wilson, K., and Lyons, T. J. (2013) Effects of modified LDL and HDL on retinal pigment epithelial cells: a role in diabetic retinopathy? *Diabetologia* **56**, 2318-2328
111. Hui, D. Y., Brecht, W. J., Hall, E. A., Friedman, G., Innerarity, T. L., and Mahley, R. W. (1986) Isolation and characterization of the apolipoprotein E receptor from canine and human liver. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 4256-4267
112. Getz, G. S., and Reardon, C. A. (2009) Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *Journal of Lipid Research* **50**, S156-S161
113. Holtzman, D. M., Herz, J., and Bu, G. (2012) Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a006312
114. Antes, R., Ezra-Elia, R., Weinberger, D., Solomon, A., Ofri, R., and Michaelson, D. M. (2013) ApoE4 induces synaptic and ERG impairments in the retina of young targeted replacement apoE4 mice. *PloS one* **8**, e64949
115. Zhang, H., Wu, L. M., and Wu, J. (2011) Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators of inflammation* **2011**, 949072
116. Phillips, M. C. (2014) Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB life* **66**, 616-623
117. Huang, Y. A., Zhou, B., Wernig, M., and Sudhof, T. C. (2017) ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and Abeta Secretion. *Cell* **168**, 427-441.e421
118. Lee, S. J., Kim, J. H., Kim, J. H., Chung, M. J., Wen, Q., Chung, H., Kim, K. W., and Yu, Y. S. (2007) Human apolipoprotein E2 transgenic mice show lipid accumulation in retinal pigment epithelium and altered expression of VEGF and bFGF in the eyes. *Journal of microbiology and biotechnology* **17**, 1024-1030
119. Ishida, B. Y., Bailey, K. R., Duncan, K. G., Chalkley, R. J., Burlingame, A. L., Kane, J. P., and Schwartz, D. M. (2004) Regulated expression of apolipoprotein E by human retinal pigment epithelial cells. *J Lipid Res* **45**, 263-271
120. Anderson, D. H., Ozaki, S., Nealon, M., Neitz, J., Mullins, R. F., Hageman, G. S., and Johnson, L. V. (2001) Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: implications

- for the process of drusen formation. *American journal of ophthalmology* **131**, 767-781
121. Kurumada, S., Onishi, A., Imai, H., Ishii, K., Kobayashi, T., and Sato, S. B. (2007) Stage-specific association of apolipoprotein A-I and E in developing mouse retina. *Investigative ophthalmology & visual science* **48**, 1815-1823
122. Amaratunga, A., Abraham, C. R., Edwards, R. B., Sandell, J. H., Schreiber, B. M., and Fine, R. E. (1996) Apolipoprotein E is synthesized in the retina by Muller glial cells, secreted into the vitreous, and rapidly transported into the optic nerve by retinal ganglion cells. *The Journal of biological chemistry* **271**, 5628-5632
123. Antes, R., Salomon-Zimri, S., Beck, S. C., Garcia Garrido, M., Livnat, T., Maharshak, I., Kadar, T., Seeliger, M., Weinberger, D., and Michaelson, D. M. (2015) VEGF Mediates ApoE4-Induced Neovascularization and Synaptic Pathology in the Choroid and Retina. *Current Alzheimer research* **12**, 323-334
124. Chiappelli, M., Borroni, B., Archetti, S., Calabrese, E., Corsi, M. M., Franceschi, M., Padovani, A., and Licastro, F. (2006) VEGF gene and phenotype relation with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Rejuvenation research* **9**, 485-493
125. Provias, J., and Jeynes, B. (2011) Correlation analysis of capillary APOE, VEGF and eNOS expression in Alzheimer brains. *Current Alzheimer research* **8**, 197-202
126. Wickremasinghe, S. S., Xie, J., Lim, J., Chauhan, D. S., Robman, L., Richardson, A. J., Hageman, G., Baird, P. N., and Guymer, R. (2011) Variants in the APOE gene are associated with improved outcome after anti-VEGF treatment for neovascular AMD. *Investigative ophthalmology & visual science* **52**, 4072-4079
127. Ulrich, V., Konaniah, E. S., Herz, J., Gerard, R. D., Jung, E., Yuhanna, I. S., Ahmed, M., Hui, D. Y., Mineo, C., and Shaul, P. W. (2014) Genetic variants of ApoE and ApoER2 differentially modulate endothelial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 13493-13498
128. Smith, L. E., Wesolowski, E., McLellan, A., Kostyk, S. K., D'Amato, R., Sullivan, R., and D'Amore, P. A. (1994) Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* **35**, 101-111

129. Lange, C., Ehlken, C., Stahl, A., Martin, G., Hansen, L., and Agostini, H. T. (2009) Kinetics of retinal vaso-obliteration and neovascularisation in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* **247**, 1205-1211
130. Moulton, K. S., Heller, E., Konerding, M. A., Flynn, E., Palinski, W., and Folkman, J. (1999) Angiogenesis Inhibitors Endostatin or TNP-470 Reduce Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation* **99**, 1726
131. Moulton, K. S., Vakili, K., Zurakowski, D., Soliman, M., Butterfield, C., Sylvin, E., Lo, K.-M., Gillies, S., Javaherian, K., and Folkman, J. (2003) Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4736-4741
132. Stannard, A. K., Riddell, D. R., Sacre, S. M., Tagalakis, A. D., Langer, C., von Eckardstein, A., Cullen, P., Athanasopoulos, T., Dickson, G., and Owen, J. S. (2001) Cell-derived apolipoprotein E (ApoE) particles inhibit vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 46011-46016
133. Sacre, S. M., Stannard, A. K., and Owen, J. S. (2003) Apolipoprotein E (apoE) isoforms differentially induce nitric oxide production in endothelial cells. *FEBS letters* **540**, 181-187
134. Bir, S. C., Xiong, Y., Kevil, C. G., and Luo, J. (2012) Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. *Cardiovascular research* **95**, 7-18
135. Huang, J.-J., Shi, Y.-Q., Li, R.-L., Hu, A., Lu, Z.-Y., Weng, L., Wang, S.-Q., Han, Y.-P., Zhang, L., Li, B., Hao, C.-N., and Duan, J.-L. (2015) Angiogenesis effect of therapeutic ultrasound on HUVECs through activation of the PI3K-Akt-eNOS signal pathway. *American Journal of Translational Research* **7**, 1106-1115
136. Duda, D. G., Fukumura, D., and Jain, R. K. (2004) Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends in molecular medicine* **10**, 143-145
137. Ma, F. X., and Han, Z. C. (2005) Statins, nitric oxide and neovascularization. *Cardiovascular drug reviews* **23**, 281-292

138. Bojanowski, C. M., Shen, D., Chew, E. Y., Ning, B., Csaky, K. G., Green, W. R., Chan, C. C., and Tuo, J. (2006) An apolipoprotein E variant may protect against age-related macular degeneration through cytokine regulation. *Environmental and molecular mutagenesis* **47**, 594-602
139. Maharshak, I., Salomon-Zimri, S., Antes, R., Liraz, O., Nisgav, Y., Livnat, T., Weinberger, D., Colton, C. A., Solomon, A. S., and Michaelson, D. M. (2015) The effects of the apoE4 genotype on the developing mouse retina. *Experimental eye research* **145**, 17-25
140. Steinmetz, A., Jakobs, C., Motzny, S., and Kaffarnik, H. (1989) Differential distribution of apolipoprotein E isoforms in human plasma lipoproteins. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* **9**, 405-411
141. Weisgraber, K. H. (1990) Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J Lipid Res* **31**, 1503-1511
142. Prosser, H. C., Tan, J. T., Dunn, L. L., Patel, S., Vanags, L. Z., Bao, S., Ng, M. K., and Bursill, C. A. (2014) Multifunctional regulation of angiogenesis by high-density lipoproteins. *Cardiovascular research* **101**, 145-154
143. Tran-Dinh, A., Diallo, D., Delbosc, S., Varela-Perez, L. M., Dang, Q. B., Lapergue, B., Burillo, E., Michel, J. B., Levoye, A., Martin-Ventura, J. L., and Meilhac, O. (2013) HDL and endothelial protection. *British Journal of Pharmacology* **169**, 493-511
144. Miura, S., Fujino, M., Matsuo, Y., Kawamura, A., Tanigawa, H., Nishikawa, H., and Saku, K. (2003) High density lipoprotein-induced angiogenesis requires the activation of Ras/MAP kinase in human coronary artery endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**, 802-808
145. Sumi, M., Sata, M., Miura, S., Rye, K. A., Toya, N., Kanaoka, Y., Yanaga, K., Ohki, T., Saku, K., and Nagai, R. (2007) Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 813-818

略語一覽表

AMD	age-related macular degeneration
ApoE	apolipoprotein E
BRB	blood-retinal barrier
CNV	choroidal neovascularization
CSC	cell systems corporation
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
FFA	fluorescein fundus angiography
FITC	fluorescein isothiocyanate
HRMEC	human microvascular endothelial cell
HDL	high-density lipoprotein
HIF	hypoxia inducible factor
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
LDL	low-density lipoprotein
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginine methyl ester, hydrochloride
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NO	nitric oxide
OCT	optical coherence tomography
OIR	oxygen-induced retinopathy
QOL	quality of life
ROS	reactive oxygen species
RPE	retinal pigment epithelium

SRB1	scavenger receptor class B type 1
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
VEGF	vascular endothelial growth factor
4HNE	4-hydroxy-2-nonenal