

総 説
-----

## VEGF からみた糖尿病網膜症の病態と抗 VEGF 療法 The role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy and anti VEGF therapy

若 林 美 宏  
Yoshihiro WAKABAYASHI

東京医科大学病院眼科  
Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University Hospital

### 1. 糖尿病網膜症と VEGF

糖尿病網膜症は糖尿病の三大合併症の一つであり、本邦における成人の失明原因の第2位である。本症により毎年約3,000人が社会的失明に至っていると考えられている。糖尿病網膜症の原因は慢性の高血糖に伴う代謝異常が引き起こす網膜毛細血管の障害（細小血管障害）であり、その発症と進行の鍵となる因子は血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor; VEGF）<sup>1)</sup>である。VEGFは二量体からなる糖蛋白質で、血管内皮細胞の分裂、遊走、分化を刺激することで血管形成や血管新生を誘導する増殖因子であり、さらに強力な血管透過性亢進作用を持つ。また、炎症性サイトカインとして炎症細胞の遊走や、神経保護に関与していると考えられている。元来VEGFは血管の恒常性維持に不可欠な増殖因子であるが、高血糖や虚血などの刺激により過剰に発現し、眼内に異常を引き起こす。

糖尿病網膜症の基本病態は網膜毛細血管の消失と透過性亢進である。その本態は血管壁を構成する血管内皮細胞、周皮細胞、基底膜の変性であり、慢性の高血糖に起因する代謝障害が原因である。進行すると血管透過性亢進による網膜出血と浮腫が増強

し、毛細血管の消失範囲に相応した網膜虚血が生じる。この血管透過性亢進にはVEGFが深く関与しており、これが黄斑部の毛細血管に生じると糖尿病黄斑浮腫が生じ視力低下の原因となる。糖尿病黄斑浮腫は網膜症のどの時期にも生じうる。さらに網膜症が進行し毛細血管の消失範囲が拡大すると虚血が進行し、VEGF発現に拍車がかかる。その結果、網膜に脆弱な新生血管が発生し、さらに進行すると新生血管は線維血管性の増殖膜に進展する。この線維血管性増殖膜は硝子体と病的に癒着し始め、硝子体による牽引が発生すると新生血管が破綻し、硝子体出血が生じる。さらに進行し増殖膜が拡大すると病的牽引が増強し、牽引性網膜剥離が生じる。また、虚血網膜に発現したVEGFは硝子体にも拡散し、さらに虚血の程度が高度であると硝子体から前房にも拡散する。前房水中の過剰なVEGFは虹彩や隅角の新生血管を発症させ、血管新生緑内障が生じる<sup>2)</sup>。

現在まで糖尿病黄斑浮腫に対し、分子標的治療薬として数種類のVEGF阻害薬が保険適応となっている。また本邦では保険適応外使用であるが、抗癌剤であるベバシズマブ（アバスタチン<sup>®</sup>）が血管新生緑内障と増殖糖尿病網膜症に対する外科手術のア

平成27年3月31日受付、平成27年4月22日受理

キーワード：糖尿病網膜症、糖尿病黄斑浮腫、血管内皮増殖因子、VEGF、抗VEGF療法  
(別冊請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1 東京医科大学病院眼科)

TEL : 03-5339-3759 FAX : 03-5339-3759

ジュバントとして使用され、失明患者は減少傾向にあると考えられている<sup>3)4)</sup>。以上より、VEGFが糖尿病網膜症の発症と進行に深く関わり、VEGF阻害薬が臨床応用されている昨今の状況を踏まえ、VEGFの作用機序と役割を充分理解することが本疾患の病態の理解と治療方針の決定に重要であると言える。

## 2. VEGFの種類と作用機序

VEGFにはVEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-DとPIGF(placenta growth factor)の5つのファミリーがあり、受容体にはチロシンキナーゼ型のVEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(Flt-1/KDR)、VEGFR-3(Flt-4)、さらに分泌型のVEGFR-1(sFlt-1)とニューロピリン(neuropilin-1, NP-1)がある。各VEGFファミリーは結合する受容体が重複しながら決まっており、それぞれ異なる作用を有している<sup>5)6)</sup>。血管内皮に対する作用が最も強いのはVEGF-Aで虚血により誘導される性質をもつ。一般にVEGFと表記されている場合はVEGF-Aを表している。ヒトVEGF-Aの中には構成アミノ酸の数の違いにより、VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>145</sub>、VEGF<sub>165</sub>、VEGF<sub>189</sub>、VEGF<sub>206</sub>の5つのアイソフォームが知られている。これらのうち、眼内で産生されているアイソフォームはVEGF<sub>121</sub>とVEGF<sub>165</sub>であり、特にVEGF<sub>165</sub>は最も多く存在し、病的な血管新生に重要な役割を果たしている<sup>7)8)</sup>。

VEGFファミリーの各受容体とリガンドとの関係を図1に示す<sup>5)</sup>。VEGF-AはVEGFR-1とVEGFR-2に結合するが、血管新生作用や血管透過性作用を担うのは主にVEGFR-2で、多くの血管内皮細胞に発現している。VEGFR-1は正常網膜の毛細血管に多

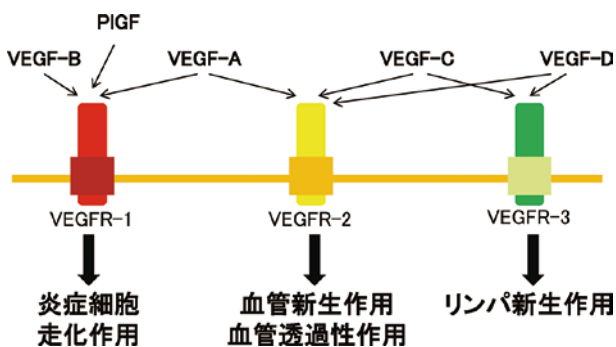


図1 VEGFファミリーの各受容体とリガンドとの関係を示す。  
文献5を一部改変。

く分布し、主に胎生期の血管形成に関与しているため病的な血管新生への直接的な関与は少ないとされている。一方、糖尿病網膜症の眼内ではVEGFR-2の発現が増していることが知られている<sup>9)</sup>。VEGF-BはVEGFR-1と結合し、細胞接着や炎症細胞遊走、走化に関与している。PIGFによるVEGFR-1の活性化はVEGFR-2のチロシン残基のリン酸化とこれによるVEGFR-2のリン酸基転移反応(キナーゼの活性化)を促し、VEGFR-2による血管新生を増幅させる作用があると考えられている<sup>10)</sup>。また、NP-1はVEGF<sub>165</sub>と特異的に結合し、VEGFR-2のシグナル伝達を増強する補助受容体としての役割を担っている<sup>11)</sup>。一方、VEGFR-1と分泌型のVEGFR-1(sFlt-1)はVEGFを捕捉することでVEGFR-2の作用を抑えている(おとり作用)と考えられている<sup>5)</sup>。なお、VEGF-CとVEGF-DはVEGFR-3とVEGF-4と結合し、主にリンパ管新生に関与していると考えられている<sup>6)</sup>。

## 3. 糖尿病網膜症におけるVEGF発現

### a) 高血糖による代謝異常とVEGF

慢性の高血糖は4つの生化学的経路、すなわちポリオール代謝経路の活性亢進、非酵素的糖化後期反応産物の産生(advanced glycation end products: AGEs産生)、プロテインキナーゼC経路の活性化(PKC活性化)、ヘキソースアミン代謝経路の活性亢進を介して細小血管障害を引き起こす<sup>2)</sup>。さらに糖尿病の眼内では酸化ストレスが亢進しており<sup>12)13)</sup>、活性酸素はこれら4つの生化学的経路を賦活化させる<sup>2)</sup>。これらのうち、AGEs産生とPKC活性化はVEGF産生を直接的に制御することが分かっている。網膜を構成する細胞のうち、網膜色素上皮細胞、周皮細胞、血管内皮細胞、グリア細胞、ミュラー細胞、神経節細胞がVEGFを産生しており<sup>14)</sup>、培養網膜色素上皮細胞において、長期の高血糖負荷はVEGFの発現を亢進させる<sup>15)</sup>。さらに、ラットと家兔硝子体中へのAGEsの投与は網膜の神経節細胞層、内顆粒層、網膜色素上皮細胞層でのVEGF mRNAを増加させ<sup>16)</sup>、PKCは周皮細胞と内皮細胞の供培養モデルにおいてVEGF mRNAの発現を増加させることが分かっている<sup>17)</sup>。

### b) 虚血とVEGF

1995年にPierce EAらは低酸素に暴露されたマウスの眼内でミュラー細胞にVEGFが強く発現し

ていることを初めて報告した<sup>18)</sup>。その後、虚血によるVEGFの発現には転写因子としてhypoxia-inducible factors (HIF)が関与していることが分かった<sup>19)</sup>。蛍光眼底造影で観察される無灌流領域の範囲が広いほど、新生血管の活動性も強いことから、虚血の程度とVEGFの発現程度との間に強い関連性がある。近年、その無灌流領域の面積と前房水中のVEGF濃度との間に正の相関関係があることが示されている<sup>20)</sup>。

### c) VEGF発現に関するその他の因子

高血圧の合併は糖尿病網膜症の発症と進行に関わる重要なリスクファクターであり、高血圧ラットの網膜においてVEGFとVEGF受容体の発現が増加していることが報告されている<sup>21)</sup>。インスリンは網膜色素上皮細胞のVEGF mRNAの発現を増加させる<sup>22)</sup>。さらにインスリン療法は網膜のVEGF発現と関連して血管透過性を亢進させ、黄斑浮腫を悪化させることが報告されている<sup>23)</sup>。我々の施設において、

増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術で得た硝子体を試料として、白血球の遊走に関わる複数のケモカインとVEGF濃度を同時に測定し、互いの相関関係を調べた結果、増殖糖尿病網膜症の眼内にはIL-8、MCP-1、IP-10、Migが高濃度に存在しており、これらのケモカインはVEGF濃度と正の相関関係があった(図2)。すなわち増殖糖尿病網膜症において、ケモカインとVEGFは互いにネットワークを形成しながら増殖糖尿病網膜症の病態に深く関わっていることが分かり、その病態に炎症も関与していることが示唆された<sup>24)25)</sup>。さらに、炎症に関わる補体と糖尿病網膜症との関係を調べたところ、糖尿病網膜症の眼内で活性型補体フラグメントであるC5aが高濃度に存在し、補体が活性化していることが分かった。同時に測定したVEGF濃度とC5a濃度との間には正の相関関係があり、両者は互いに何らかの関連性があることが示めされた<sup>26)</sup>。さらに、糖尿病網膜症の眼内で単球とマクロファージの活性

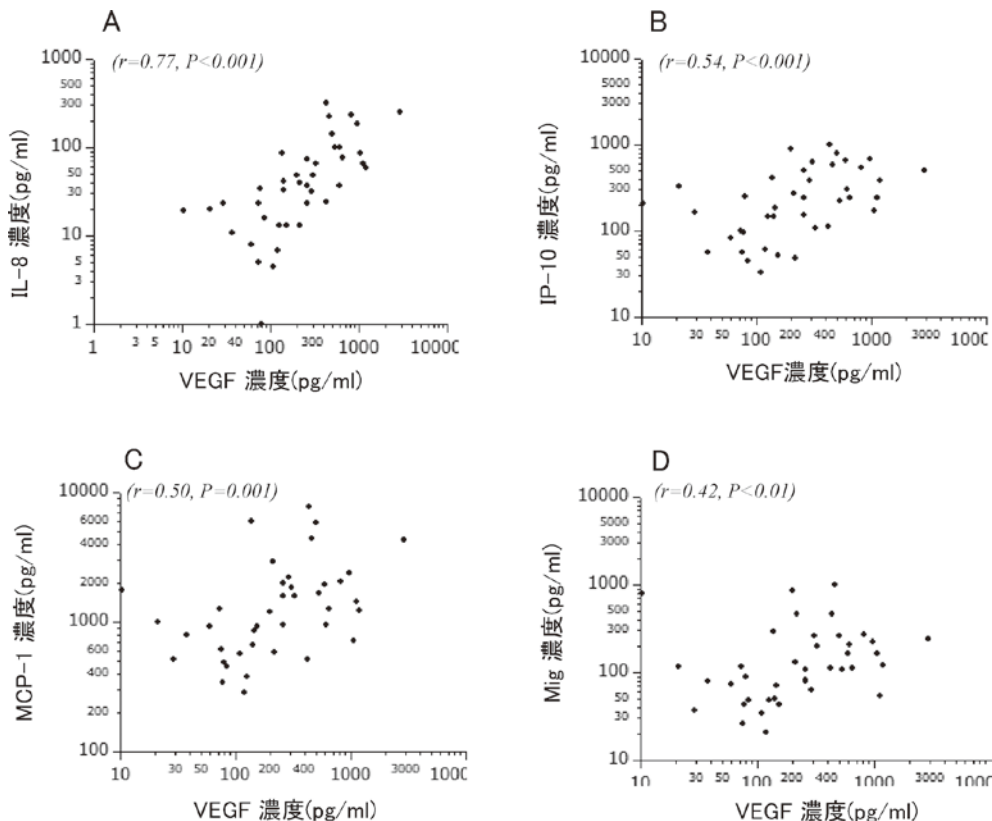


図2 増殖糖尿病網膜症の硝子体中VEGF濃度とケモカイン濃度との相関<sup>24)</sup>

- A VEGF濃度とIL-8濃度との間に有意な正の相関関係がある
- B VEGF濃度とIP-10濃度との間に有意な正の相関関係がある
- C VEGF濃度とMCP-1濃度との間に有意な正の相関関係がある
- D VEGF濃度とMig濃度との間に有意な正の相関関係がある

VEGF: vascular endothelial growth factor, IL-8: interleukin-8, MCP-1; monocyte chemotactic protein-1, Mig; monokine induced by interferon- $\gamma$

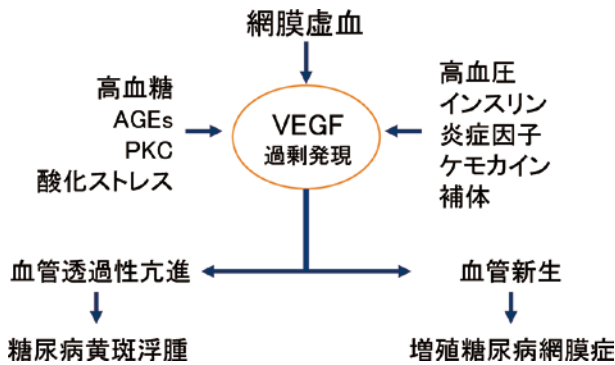


図3 VEGF 発現に関する因子と VEGF の作用<sup>6)</sup>  
 AGEs; advanced glycation endproducts, PKC; protein kinase C

を示す CD14 の濃度は VEGF 濃度と相関性を示した<sup>27)</sup>。

以上の結果から、糖尿病の眼内では高血糖、高血圧、酸化ストレス、AGEs、PKC、炎症性サイトカイン、ケモカイン、補体などの刺激により VEGF の過剰発現が生じ、血管透過性亢進による網膜出血、網膜浮腫が発生する<sup>6)</sup>。また毛細血管消失の進行とともに虚血が進行し、その結果で増加した VEGF が新生血管を発生させ、増殖糖尿病網膜症に至ると考えられている (図3)。

4. VEGF による血管透過性亢進

糖尿病で生じる血管透過性亢進は血液網膜柵の破壊が原因である。網膜には2種類の血液網膜柵があり、細胞間のタイトジャンクションが重要な役割を果たしている。その一つである内血液網膜柵は毛細血管の内皮細胞間にあるタイトジャンクションで、もう一方である外血液網膜柵は網膜色素上皮細胞間

のタイトジャンクションである。血管内皮のタイトジャンクションの一部は occludin という蛋白質で構成されており、これは内皮の細胞間を繋ぐように存在し、柵機能に重要な役割を担っている。VEGF が促進する血管透過性亢進はタイトジャンクションに局在している occludin がリン酸化されることにより生ずると考えられており、その機序には PKC が関与している<sup>28)</sup>。

5. VEGF による血管新生

1994 年 Aiello らは世界で初めて網膜疾患の硝子体中の VEGF 濃度を測定した。その結果、増殖糖尿病網膜症の VEGF は他の網膜疾患に比較して有意に高濃度であったことから、眼内血管新生に VEGF が関与していると結論した<sup>29)</sup>。我々の施設で測定した増殖糖尿病網膜症群の硝子体 VEGF 濃度の中央値は 239 pg/ml (10.4-2,877.0 pg/ml) で、対象である非増殖性の黄斑疾患群の 21.0 pg/ml (6.1-70.7 pg/ml) と比較して有意に高濃度であった (図4)。また、両群の血清 VEGF 濃度は硝子体 VEGF 濃度と比較して低く、かつ両群間に有意差がなかったことから、VEGF は糖尿病の眼局所で過剰発現していることが分かった。さらに、活動性の高い増殖糖尿病網膜症の VEGF 濃度は活動性の低い症例と比較して有意に高濃度であった<sup>24)</sup>。以上より、増殖糖尿病網膜症の眼内における VEGF の発現量は新生血管の活動性をよく反映していると考えられる。VEGF が血管新生を引き起こす過程には PKC<sup>30)</sup> など多数の因子が関与している。特に、VEGF はセリンプロテアーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA)、マ

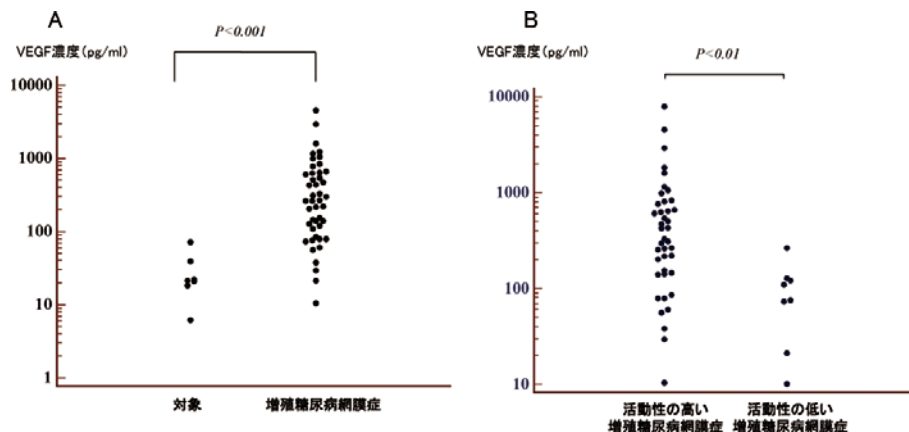


図4 増殖糖尿病網膜症の硝子体中の VEGF 濃度<sup>24)</sup>  
 A 増殖糖尿病網膜症の硝子体中 VEGF 濃度は対象と比較して有意に高かった。  
 B 活動性の高い増殖糖尿病網膜症の硝子体中 VEGF 濃度は活動性の低い症例と比較して有意に高かった。

トリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などの蛋白分解酵素を活性化させ、血管新生の最初の段階である毛細血管基底膜の蛋白分解を促進している<sup>31)32)</sup>。

## 6. VEGF と糖尿病網膜症の術後予後

近年、硝子体手術システムは飛躍的に進歩し、硝子体カッターの直径は20ゲージの0.92 mmから最近では27ゲージの0.42 mmに小型化し、硝子体カッターのカットレートは毎分7,500回転まで高速回転化している。また、硝子体手術の観察系の進歩も目覚ましいものがあり、増殖膜などの病変を詳細に観察しながら手術が可能となっている。したがって以前に比較し、より低侵襲で安全な膜処理が可能であり、増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術の予後も著しく改善している。増殖糖尿病網膜症に対して硝子体手術を行うと、術後の硝子体 VEGF 濃度が減少し、術後の病状が安定化すると推察されている<sup>33)</sup>。しかし、硝子体手術前の眼内 VEGF 濃度が高値であった糖尿病網膜症は手術後も網膜症が進行する危険性が高いことも分かっている<sup>34)</sup>。我々の施設で手術を要した増殖糖尿病網膜症 52 症例について、術前の硝子体 VEGF 濃度と手術合併症との関連を調べたところ、VEGF 濃度が高い症例は有意に術後の硝子体出血や血管新生緑内障が生じやすいことが分かった。また、網膜症の活動性を示す新生血管の程度、高血圧と高脂血症の有無、年齢、HbA<sub>1c</sub>、抗凝固剤内服の有無など 15 個の項目を説明変数、術後合併症の発生を目的変数として多変量解析をしたところ、眼内 VEGF 濃度は独立した危険因子であり、VEGF 濃度が高い症例は術後合併症が生じやすいことが分かった<sup>35)</sup>。すなわち、VEGF は術後予後を左右する重要な因子であり、術前の VEGF 濃度を測定する事は予後を予測するうえで有意義であることが示された。

## 7. 糖尿病網膜症と抗 VEGF 療法

### a) 抗 VEGF 薬

糖尿病網膜症に対する最近の治療として、VEGF をターゲットにした分子標的治療が行われている。現在、本邦で糖尿病網膜症に使用されている抗 VEGF 薬は 3 種類あり、投与方法は硝子体注射である。ラニズマブ (ルセンチス<sup>®</sup>) とアフリベリセプト (アイリーア<sup>®</sup>) は黄斑浮腫に対し保険適応であり、ベバシズマブ (アバスタチン<sup>®</sup>) は保険適応

外使用である。ベバシズマブはヒト化マウスモノクローナル抗体であり、転移性直腸癌の治療薬として開発された世界発の抗 VEGF 薬である。ラニズマブは VEGF に対するマウスモノクローナル抗体を遺伝子組み換えによりヒト化した薬剤で、Fab 断片である。ラニズマブはすべての VEGF アイソフォームを阻害する。アフリベリセプトは VEGFR-1 と VEGF-2 の細胞外ドメインを抗体の Fab フラグメントと入れ替えた融合蛋白である。アフリベリセプトは VEGFR-1 の細胞外ドメインを有するため VEGF との親和性は高く、VEGF すべてのアイソフォームと結合し、さらに PlGF や VEGF-B にも結合する性質をもつ。

### b) 糖尿病黄斑浮腫に対する抗 VEGF 療法

自然経過をみた糖尿病黄斑浮腫の 24% が 3 年間で視力が半減すると報告されている<sup>36)</sup>。糖尿病黄斑浮腫の自然経過での視力予後は不良であるが、糖尿病黄斑浮腫に対し抗 VEGF 薬を投与すると、黄斑浮腫は徐々に減少し、視力が改善することが分かっている。ただし、単回投与での効果には限界があり、再発傾向が強いため、多くの症例で長期の反復投与が必要となる (図 5)。糖尿病黄斑浮腫に対する抗 VEGF 療法の有効性については複数の大規模臨床試

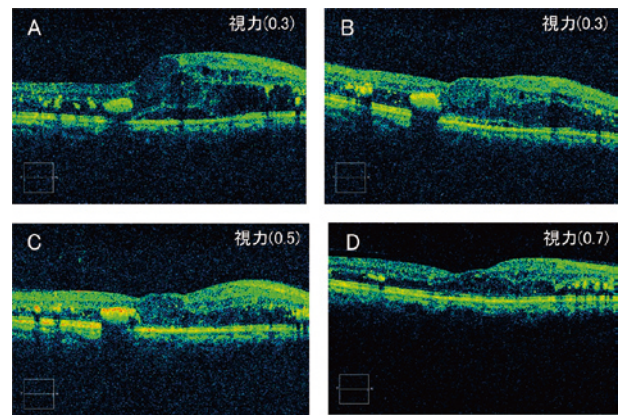


図 5 糖尿病黄斑浮腫に対してラニズマブ硝子体注射を行った症例の OCT の経過

A ラニズマブ硝子体注射前の OCT 所見。黄斑浮腫が観察される。

B ラニズマブ硝子体注射後 1 か月目の OCT 所見。黄斑浮腫は減少しているが、まだ残存している。

C その後 2 回ラニズマブ硝子体注射を追加した。黄斑浮腫はさらに減少し、視力は 0.5 まで回復している。

D 合計 4 回ラニズマブ硝子体注射を施行した後の OCT 所見。黄斑浮腫はほぼ消失し、視力は 0.7 に改善している。

OCT; optical coherence tomography

験により実証されている。そのうちの一つである RISE 試験<sup>37)38)</sup>によれば、糖尿病黄斑浮腫 377 例に対しラニズマブを毎月投与する群とシヤム投与群の 2 群に分けて 2 年間経過観察した結果、最終的に視力の値が 2 倍に改善する割合はシヤム投与群が 18% に対し、ラニズマブ投与群が 39% と有意に高く、小数視力が 0.5 以上と良好な症例の割合はシヤム群 38% に対し、ラニズマブ投与群が 63% と有意に高かった。また、治療前視力が良い症例ほど治療後視力も良好であったことから、早期治療の重要性が示されている。アフリベルセプト、ベバシズマブ、ラニズマブの 3 種の効果を比較した報告では、3 群間で局所および全身合併症の頻度に差はなく、治療前視力が不良である症例に対してはアフリベルセプトの効果がより優位であった<sup>39)</sup>。近年では糖尿病黄斑浮腫の治療として抗 VEGF 療法が中心であるが、硝子体手術の有効性と安全性を証明した報告も多数ある<sup>40)</sup>。硝子体手術の奏功機序は未だ不明であるが、硝子体切除により虚血網膜への酸素拡散が増加し、網膜内層の酸素分圧が上昇し、VEGF の発現が減少する事で血管透過性が減少し黄斑浮腫が減少すると推察されている<sup>2)</sup>。

### c) 増殖糖尿病網膜症と血管新生緑内障に対する抗 VEGF 薬

増殖糖尿病網膜症および血管新生緑内障に対し抗 VEGF 薬の硝子体注射を行うと、眼底や虹彩の新生血管は速やかに減少する (図 6)。増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術または血管新生緑内障に対す

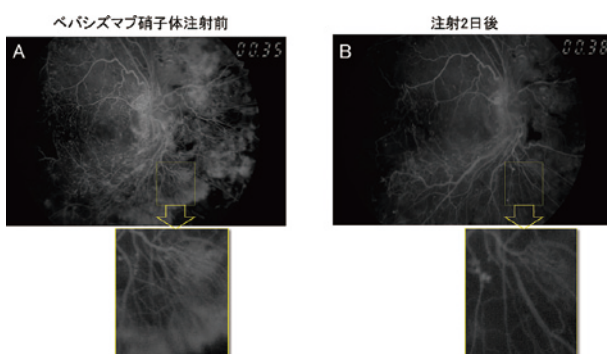


図 6 増殖糖尿病網膜症に対するベバシズマブ硝子体注射前後の蛍光眼底造影所見  
A ベバシズマブ硝子体注射前の蛍光眼底造影所見 (造影開始 35 秒)  
新生血管からの蛍光漏出が観察される。  
B ベバシズマブ硝子体注射 2 日後の蛍光眼底造影所見 (造影開始 38 秒)  
新生血管からの蛍光漏出が著明に減少している。

る濾過手術の数日前にベバシズマブ投与を行うと、術中術後の新生血管からの出血を最小限に抑えられるため、合併症の頻度を減らすことができる。硝子体手術の前にベバシズマブを投与しておく、早期の再出血 (術後一か月以内に生じた再出血) の頻度が有意に少ないこと、また術中の出血が少ないため止血処置の回数が減り、結果的に平均 27 分の手術短縮が可能であることが報告されている<sup>3)</sup>。また、血管新生緑内障の手術前にベバシズマブ投与を施行しておく、前房出血の頻度が少なくなり、眼圧下降の持続期間もより長くなる<sup>4)</sup>。糖尿病網膜症に対する外科手術に際し、抗 VEGF 薬は周術期のアジュバントとしても有用である。

## 8. おわりに

糖尿病網膜症の病態と治療予後に VEGF が深く関わっており、VEGF をターゲットにした抗 VEGF 療法の有効性が数多く示されている。しかしながら、VEGF は血管の恒常性維持に不可欠の因子であり、ベバシズマブなどの抗 VEGF 薬を抗癌剤として全身投与した際には高血圧、タンパク尿、虚血性心疾患、脳梗塞、脳出血創傷治癒遅延など生命に関わる重篤な合併症が発生するリスクがある<sup>41)</sup>。現在のところ、抗 VEGF 薬の硝子体注射が全身合併症を引き起こすとの調査報告はない。しかし薬剤間を比較した場合、糖尿病の存在下ではベバシズマブ投与はラニズマブ投与に比較すると心筋梗塞のリスクが高い危険性が指摘されている<sup>42)</sup>。また軽度および中等度の非増殖糖尿病網膜症があると、冠動脈疾患 (ハザード比 1.69) と脳卒中 (ハザード比 2.69) の発症リスクが高いことが分かっている<sup>43)</sup>。よって糖尿病黄斑浮腫に対する抗 VEGF 療法は長期に渡り繰り返し施行する必要があることを考慮すると、今後も長期の安全性について充分検証する必要がある。

## 文 献

- 1) Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161**: 851-858, 1989
- 2) David JB: *Diabetic retinopathy: evidence-based management*. Springer, New York, 2010
- 3) Zhang ZH, Liu HY, Hernandez-Da Mota SE, Falavarjani KG, Ahmadieh H, Xu X, Liu K: Vitrectomy with or without preoperative intravitreal bevacizumab for PDR: A meta-analysis of randomized

- controlled trials. *Am J Ophthalmol* **156** : 106-115, 2013
- 4) Saito Y, Higashide T, Takeda H, Ohkubo S, Sugiyama K : Beneficial effect of preoperative intravitreal bevacizumab on trabeculectomy outcomes in neovascular glaucoma. *Acta Ophthalmol* **88** : 96-102, 2010
  - 5) Ferrara N : Vascular endothelial growth factor : basic science and clinical progress. *Endocr Rev* **25** : 581-611, 2004
  - 6) Simo R, Sundstrom JM, Antonetti DA : Ocular anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy : The role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes care* **37** : 893-899, 2014
  - 7) Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano S, Ogura Y, Hida T, Oguchi Y, Ambati J, Miller JW, Gragoudas ES, Ng YS, D'Amore PA, Shima DT, Adamis AP : VEGF<sub>164</sub>-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med* **198** : 483-489, 2003
  - 8) Usui T, Ishida S, Yamashiro K, Kaji Y, Poulaski V, Moore J, Amano S, Horikawa Y, Dartt D, Golding M, Shima DT, Adamis AP : VEGF<sub>164(165)</sub> as the pathological isoform : differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45** : 368-374, 2004
  - 9) Witmer AN, Vrensen GFJM, Van Noorden CJ, Schlingemann RO : Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* **22** : 1-29, 2003
  - 10) Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrecht D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerschin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P : Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptor Flt1 and Flk1. *Nat Med* **9** : 936-943, 2003
  - 11) Ishida S, Shinoda K, Kawashima S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda Y : Coexpression of VEGF receptors VEGF-R2 and neuropilin-1 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41** : 1649-1656, 2000
  - 12) Kowluru RA : Oxidative stress and diabetic retinopathy : pathophysiological mechanisms and treatment and perspectives. *Rev Endocr Metab Disord* **9** : 315-327, 2008
  - 13) Wakabayashi Y, Usui Y, Shibauchi Y, Uchino H, Goto H : Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in the vitreous of patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Prac* **89** : 59-61, 2010
  - 14) Simo R, Carrasco E, Garcia-Ramirez M, Hernandez C, Memoadez C : Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* **2** : 71-98, 2006
  - 15) Sone H, Kawasaki Y, Okuda Y : Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **221** : 193-198, 1996
  - 16) Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R, Adamis AP : Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* **101** : 1219-1224, 1998
  - 17) Amadio M, Osera C, Lupo G, Motta C, Drago F, Govoni S, Pascale A : Protein kinase C activation affects, via the mRNA-binding Huantigen R/ELAV protein, vascular endothelial growth factor expression in a pericytic/endothelial coculture model. *Mol Vis* **18** : 2153-2164, 2012
  - 18) Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE : Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci* **92** : 905-909, 1995
  - 19) Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, Hackett SF, Okamoto N, Zack DJ, Semenza GL, Campochiaro PA : Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is increased in ischemic retina : temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40** : 182-189, 1999
  - 20) Kwon SH, Shin JP, Kim IT, Park DH : Aqueous Levels of angiopoietin-like 4 and semaphorin 3E correlate with nonperfusion area and macular volume in diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, 2015 in press
  - 21) Suzuma I, Hata Y, Clermont A, Pokras F, Rook SL, Suzuma K, Feener EP, Aiello LP : Cyclic stretch and hypertension induced retinal expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2. Potential mechanisms for exacerbation of diabetic retinopathy by hypertension. *Diabetes* **50** : 444-454, 2001
  - 22) Lu M, Amano S, Miyamoto K, Garland R, Keough K, Qin W, Adamis AP : Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40** : 3281-3286, 1999
  - 23) Poulaski V, Qin W, Jousen AM, Hurlbut P, Wiegand SJ, Rudge J, Yancopoulos GD, Adamis AP : Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  and VEGF. *J Clin Invest* **109** : 805-815, 2002
  - 24) Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y, Kezuka T, Takeuchi M, Goto H, Iwasaki T : Correlation of

- vascular endothelial growth factor with chemokine in the vitreous in diabetic retinopathy. *Retina* **30** : 339-344, 2010
- 25) Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y, Takeuchi M, Kezuka T, Iwasaki T, Goto H : Increased levels of monokine induced by interferon- $\gamma$  (Mig) in the vitreous of patients with diabetic retinopathy. *Diabetic Med* **25** : 875-877, 2008
- 26) Muramatsu D, Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y, Kezuka T, Goto H : Correlation of complement fragment C5a with inflammatory cytokines in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology* **251** : 15-17, 2013
- 27) Umazume K, Usui Y, Wakabayashi Y, Okunuki Y, Kezuka T, Goto H : Effects of soluble CD14 and cytokine levels on diabetic macular edema and visual acuity. *RETINA* **33** : 1020-1025, 2013
- 28) Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, Duh E, Ishii H, Takagi C, Mori F, Ciulla TA, Wasy K, Jirousek M, Smith LE, King GL : Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* **46** : 1473-1480, 1997
- 29) Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE : Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* **331** : 1480-1487, 1994
- 30) Suzuma K, Takahara N, Suzuma I, Isshiki K, Ueki K, Leitges M, Aiello LP, King GL : Characterization of protein kinase C beta isoforms activation on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 721-726, 2002
- 31) Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R : Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activator inhibitor 1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **181** : 902-906, 1991
- 32) Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST : Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res* **55** : 29-42, 1998
- 33) Yoshida S, Nakama T, Ishikawa K, Arima M, Tachibana T, Nakao S, Sassa Y, Yasuda M, Enaida H, Oshima Y, Kono T, Ishibashi T : Antiangiogenic shift in vitreous after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology and visual science* **53** : 6997-7003, 2012
- 34) Funats H, Ymashita H, Mimura T, Noma H, Nakamura S, Hori S : Risk evaluation of outcome of vitreous surgery based on vitreous levels of cytokines. *Eye* **21** : 377-382, 2007
- 35) Wakabayashi Y, Usui Y, Okunuki Y, Ueda S, Kimura K, Muramatsu D, Kezuka T, Goto H : Intraocular VEGF levels as a risk factor for postoperative complications after vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology and visual science* **53** : 6403-6410, 2012
- 36) Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group : Photocoagulation for diabetic macular edema. *Arch Ophthalmology* **103** : 1796-1806, 1985
- 37) Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, Boyer DS, Patel S, Feiner L, Gibson A, Sy J, Rundle AC, Hopkins JJ, Rubio RG, Ehrlich JS : RISE and RIDE Research Group : Ranibizumab for Diabetic Macular Edema Results from 2 Phase III Randomized Trials : RISE and RIDE. *Ophthalmology* **119** : 789-801, 2012
- 38) Brown DM, Nguyen QD, Marcus DM, Boyer DS, Patel S, Feiner L, Schlottmann PG, Rundle AC, Zhang J, Rubio RG, Adamis AP, Ehrlich JS, Hopkins JJ : RIDE and RISE Research Group : Long-term outcomes of ranibizumab therapy for diabetic macular edema : The 36-month results from two phase III trials RISE and RIDE. *Ophthalmology* **120** : 2013-2022, 2013
- 39) The Diabetic Retinopathy Clinical Research Network : Aflibercept, bevacizumab, or Ranibizumab for diabetic macular edema. *N Engl J Med*, 2015 in press
- 40) Wakabayashi Y, Kimura K, Muramatsu D, Usui Y, Umazume K, Suzuki J, Goto H : Axial length as a factor associated with visual outcome after vitrectomy for diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology and visual science* **53** : 5395-5402, 2013
- 41) Kamba T, McDonald DM : Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *British Journal of Cancer* **96** : 1788-1795, 2007
- 42) Campbel RJ, Gill SS, Bronskill SE, Paterson JM, Whitehead M, Bell CM : Adverse events with intravitreal injection of vascular endothelial growth factor inhibitors : nested case-control study. *BMJ* **345** : e4203, 2012
- 43) Kawasaki R, Tanaka S, Tanaka S, Abe S, Sone H, Yokote K, Ishibashi S, Katayama S, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N, Yamashita H : Japan Diabetes Complications Study Group : Risk of cardiovascular diseases is increased even with mild diabetic retinopathy : the Japan Diabetes Complications Study. *Ophthalmology* **120** : 574-582, 2013