



Title	Novel Pharmacological Target for the Treatment of Ocular Neovascular Diseases
Author(s)	木下, 哲志
Description	配架番号 : 2145
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11663号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11663
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59075
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Kinoshita.pdf



学 位 論 文

Novel Pharmacological Target for the Treatment of Ocular Neovascular Diseases

(眼内血管新生性疾患に対する新規治療の探索)

2015 年 3 月

北海道大学

木下 哲志

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	9 頁
考察	16 頁
総括および結論	18 頁
謝辞	19 頁
引用文献	20 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kinoshita S, Noda K, Tagawa Y, Inafuku S, Dong Y, Fukuhara J, Dong Z, Ando R, Kanda A, Ishida S. Genistein Attenuates Choroidal Neovascularization. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 1177-1182 (2014).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Kinoshita S, Noda K, Takashina S, Dong Y, Fukuhara J, Dong Z, Ando R, Kanda A, Noda K, Ishida S. Genistein Suppresses Laser-Induced Choroidal Neovascularization in Mice. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2013 年 5 月 Seattle, WA, USA
2. 木下哲志、野田航介、高階沙織、董 陽子、福原淳一、董 震宇、安藤 亮、神田敦宏、石田 晋. マウス脈絡膜新生血管モデルにおけるゲニステインの抑制効果. 第 117 回日本眼科学会総会, 2013 年 4 月 東京

緒言

黄斑は網膜の中心部にあたり、良好な中心視野を得て視力を保つために重要な部位である。この黄斑が障害される加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration, AMD) は、50 歳以上の人々において重篤な視力低下をきたす主な疾患の一つである¹⁻⁴。また、現在我が国は超高齢社会を迎え、高齢者の罹患する AMD は日本における中途失明原因の一つとして重要視されている⁵⁻⁹。AMD は萎縮型と滲出型の 2 つに分類される。萎縮型 AMD は黄斑部の網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE)、Bruch 膜、脈絡膜に重度の萎縮変化がみられる。一方で、滲出型 AMD は黄斑部の網膜下あるいは RPE 下に脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) が発生する。CNV のその未成熟な血管構造は出血や血漿漏出の原因となるため (図 1)、網膜機能の低下および重篤な視力低下につながる。

CNV の発生機序については未だ十分に解明はされていないものの、ドルーゼンと呼ばれる様々なタンパク質を含む細胞外物質が RPE に沈着することが一つの原因とされる¹⁰。ドルーゼンには免疫反応や炎症反応に関与する物質が含まれており、これらが慢性炎症を引き起こすことが CNV の発生原因の一つとされている¹¹。滲出型 AMD は萎縮型に比べて比較的急激に進行し予後も不良な病型であるために臨床的

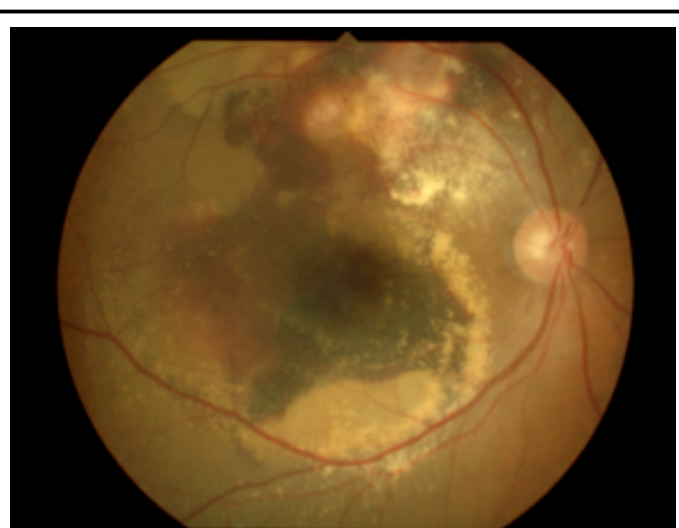


図 1 滲出型加齢黄斑変性
網膜の黄斑部を中心に、広い範囲に出血と滲出斑を認める。

にも重要視され、その病態解明と治療において様々な研究が進められてきた。従来おこなわれていた CNV への直接レーザー凝固は網膜への侵襲が強く、それを軽減する為に光線力学的療法 (photodynamic therapy, PDT) が考案され実施されてきたが、近年は CNV を抑制する治療として血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) を阻害する手法が注目を集めている¹²⁻¹⁴。VEGF は血管におけるタンパクの透過性を亢進させる因子であり、血管新生を促

進させる生理機能を有する^{12,13}。ラニビズマブ(ranibizumab)をはじめとした抗 VEGF 製剤を眼内投与する抗 VEGF 療法は、従来の PDT と比較して良好な成績を収めており現在の主流となっている¹⁵⁻¹⁷ (図 2)。しかし、抗 VEGF 療法は単回の治療で終了するものではなく、病勢を持続して抑制するためには長期にわたり複数回の硝子体注射が必要である場合が多い。現在、この反復投与によって引き起こされる感染や網膜組織の萎縮など眼局所の副作用^{18,19}、あるいは脳梗塞をはじめとした血管イベントなどの全身的な副作用²⁰⁻²²が問題となっており、安全性の面から抗 VEGF 療法の代替あるいは補助的な治療法が模索されている。

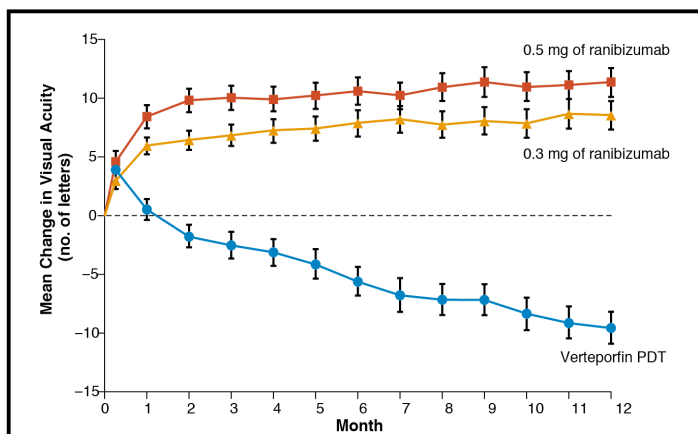


図 2 抗 VEGF 療法と PDT の治療効果比較

従来の PDT 療法と比較すると、ラニビズマブの硝子体内投与による抗 VEGF 療法は良好な治療成績が得られている。(Brown DM, et al. N Engl J Med. 2006 より改変)

近年、滲出型 AMD の予防や進展抑制について大規模な臨床試験がおこなわれ、有効性が示された一部のサプリメントが既に応用され市販化されている^{23,24}。イソフラボンは大豆などマメ科植物に由来するフラボノイドの一つである。ゲニステイン (図 3) はその代表的な物質であり、生理活性として抗炎症作用^{25,26}、抗酸化作用^{27,28}、チロシンキナーゼ阻害作用²⁹を持つ。また、膀胱癌³⁰や肝臓癌³¹の動物モデルにおける血管新生抑制作用が報告されており、眼科領域においてはゲニステイン

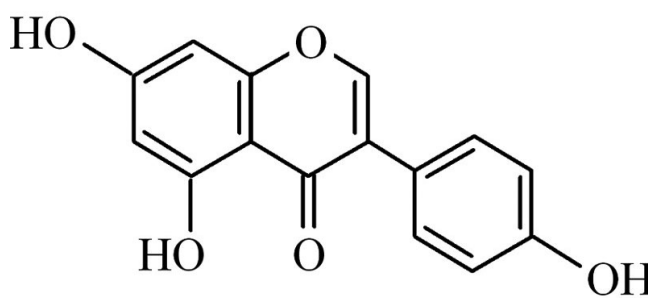


図 3 ゲニステインの分子構造式

が動物モデルにおける CNV 形成の抑制³²や、脈絡膜毛細血管における血管新生を抑制³³したとの報告がある。しかしながら、そのメカニズムについては検討されておらず未だに解明されていない。

今回の研究の目的は、ゲニステインが CNV 形成をどのように抑制するのか、そのメカニズムについて検討することである。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AMD, age-related macular degeneration

CNV, choroidal neovascularization

Δ CT, delta threshold cycle

$\Delta \Delta$ CT, delta delta threshold cycle

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

ETS-1, v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1

ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1

MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1

MMP, matrix metalloproteinase

PBS, phosphate buffered saline

PCR, polymerase chain reaction

PDT, photodynamic therapy

RPE, retinal pigment epithelium

VEGF, vascular endothelial growth factor

実験方法

1. レーザー誘導脈絡膜新生血管モデルの作製

本実験におけるマウスの扱いは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に即しておこなった。また Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で定められたガイドラインに基づいて実施した。

生後 8 週齢、雄の C57BL/6J マウス(日本クレア, 東京)を用いた。0.5%ペントバルビタール (0.2ml/匹) を腹腔内注射して麻酔し、0.5%フェニレフリン塩酸塩と 0.5%トロピカミドが混合された市販点眼液(ミドリ P; 参天, 大阪)を両眼に点眼し散瞳させた上で角膜にカバーガラスを置き、細隙灯顕微鏡を用いて照射部位を確認しながらレーザー光凝固装置 (Novus Spectra; Lumenis, 東京) を用いてレーザーを眼底 4 カ所に各 1 発照射した。照射条件は、レーザー出力 200mW、波長 532nm、凝固時間 100ms、スポットサイズ 75 μm とした。照射の際には網膜下エアールブサインで Bruch 膜が破れたことを確認し、エアールブサインを認めなかった眼球や、網膜出血や脈絡膜出血を生じた眼球は実験から除外した。

2. 薬剤の投与

薬剤の投与は経口自由摂取で行い、コントロール群およびゲニステイン投与群の 2 群のマウスを作成して比較した。ゲニステイン投与群には、ゲニステイン (LC laboratories, Woburn, MA, USA) を基餌 (AIN-76; 日本クレア) に添加した 0.5%ゲニステイン混合餌を摂取させた。餌はレーザー照射の 7 日前からレーザー照射後の組織採取時まで連日摂取させた。

3. CNV の面積測定

レーザーを照射した 7 日後に、0.5%ペントバルビタール (0.2ml/匹) を腹腔内注射することで麻酔した上で開腹し、左心室に挿入した 20G カニューレから PBS を 5mL 灌流することで脱血したのち、1%ゼラチンに溶解した 0.5%フルオレセイン標識デキストラン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 2mL 灌流した。その後直ちに眼球を摘出し、2%パラホルムアルデヒドで 30 分固定した後に、角膜・水晶体・網膜・眼球周囲の結合組織を取り除いた。残った RPE・脈絡膜・強膜の複合組織を、スライドガラスの上で視神経乳頭を中心に放射状に 4~8 箇所切開して展開し (フラットマウント法)、Fluorescent Mounting Medium (Dako,

Carpinteria, CA)を滴下してカバーガラスを置いた。作製したフラットマウントを蛍光顕微鏡 (BIOREVO; Keyence, 大阪) で観察し、蛍光標識された CNV の面積を測定した。面積の測定には顕微鏡装置のコンピューター解析ソフト (BZ-II analyzer; Keyence) を用いた。観察時に網膜下出血あるいは脈絡膜出血の有無を再度確認し、これらを認めた眼球は検討から除外した。

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法

レーザー照射による CNV 誘導から 3 日後に RPE-脈絡膜複合体を眼球から採取し、プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) を加えた RIPA buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 内で超音波破碎した。溶解後に 4°C、13,500 rpm、15 分間の条件で遠沈し、上清中の単球走化因子 [monocyte chemoattractant protein (MCP)-1]、白血球接着分子 [intercellular adhesion molecule (ICAM)-1]、マトリックスメタロプロテアーゼ [Matrix metalloproteinase (MMP)]-9 を ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。各分子の濃度は、BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) で得られた総蛋白濃度をもとに補正した。

5. RNA 抽出および real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

レーザー照射 1 日あるいは 3 日後に摘出した眼球から RPE-脈絡膜複合体を採取し、TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて RNA を回収し、GoScrip Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) と oligo dT(20) primers (Promega) を用いて 800ng の RNA の逆転写をおこなった。*Ets-1* TaqMan probe と *F4/80* TaqMan probe は Life Technologies 社から購入し、内因性コントロールは *Actb* (forward 5' -CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3' , reverse 5' -ATG GAG CCA CCG ATC CAC A-3') を用いた。GoTaq qPCR Master Mix (Promega)、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO, 東京) を使用し、StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて real-time PCR を施行した。反応条件は 95°C 2 分、続いて 95°C 15 秒、60°C 60 秒が 40 サイクルとした。Threshold cycle (C_T) 値は StepOnePlus Real-Time PCR System のプログラムにより自動的に測定された。既報³⁴にもとづいて、内因性コントロール *Actb* を用いて各サンプル中の遺伝子の相対的発現量を ΔCT 法で算出し、コントロー

ル群とゲニステイン投与群の間における遺伝子の発現量は $\Delta \Delta CT$ 法を用いて比較した。

6. 免疫組織学的検討による浸潤マクロファージの解析

レーザー照射3日後に眼球を摘出し、角膜と水晶体を除去した。残った網膜、脈絡膜および強膜を1%牛血清アルブミンで30分間ブロックし、ウサギポリクローナル抗CD31抗体(100倍希釈; Abcam, 東京)およびラットポリクローナル抗F4/80抗体(100倍希釈; Serotec, Oxford, UK)を用いて4℃で一晩反応させた。その後PBSで5回洗浄し、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit secondary antibody(200倍希釈; Life Technologies)およびAlexa Fluor 546 goat anti-rat secondary antibody(200倍希釈; Life Technologies)を用いて、それぞれ室温で30分間反応させ蛍光二重染色をおこなった。スライドガラスの上で視神経乳頭を中心に放射状に分割し、網膜を取り除いたうえでFluorescent Mounting Medium(Dako)で固定し、蛍光顕微鏡(BIOREVO; Keyence)を用いてCNVとマクロファージを観察してCNV面積1000mm²あたりのマクロファージの数を算出した。

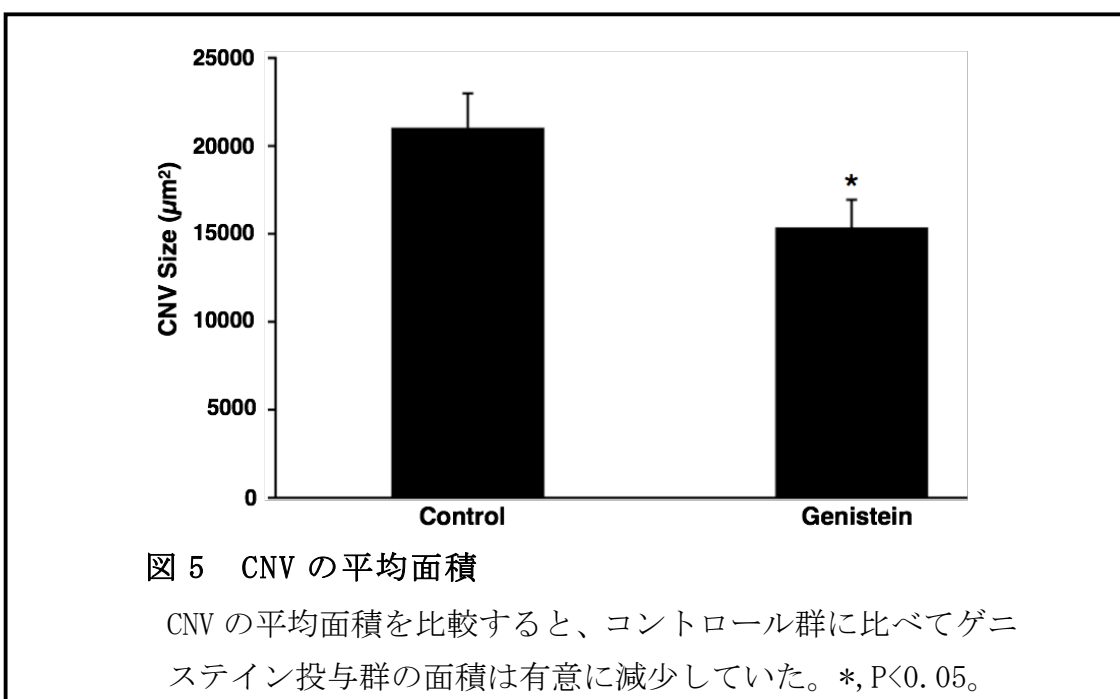
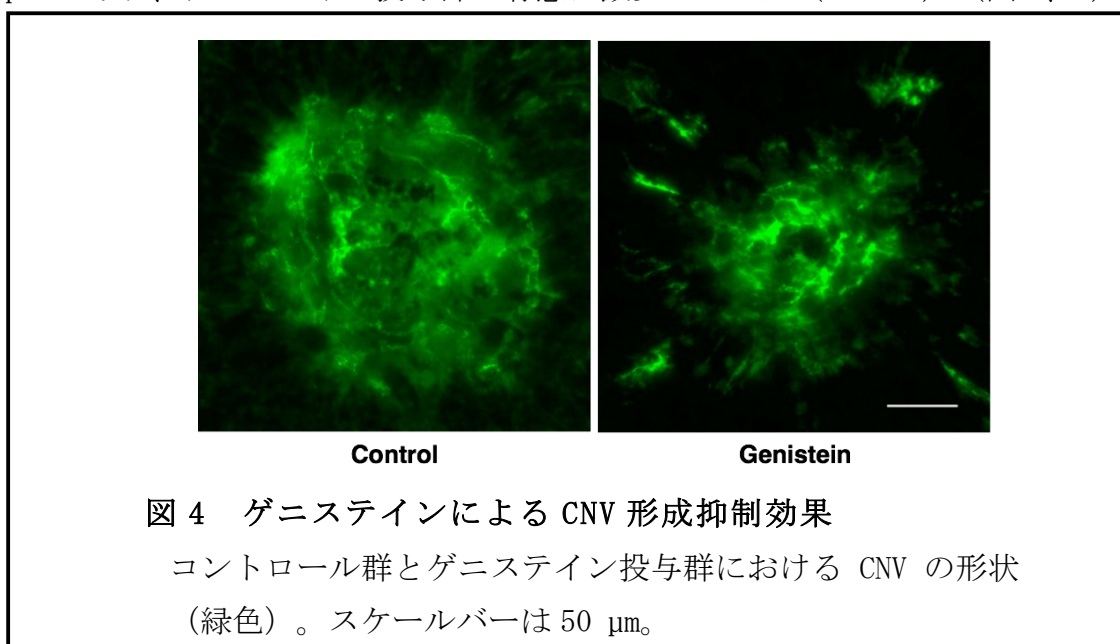
7. 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。また各群間の比較検討はStudent's *t*-testを用いて解析し、P値が0.05を下回った場合に統計学的に有意差ありとした。

実験結果

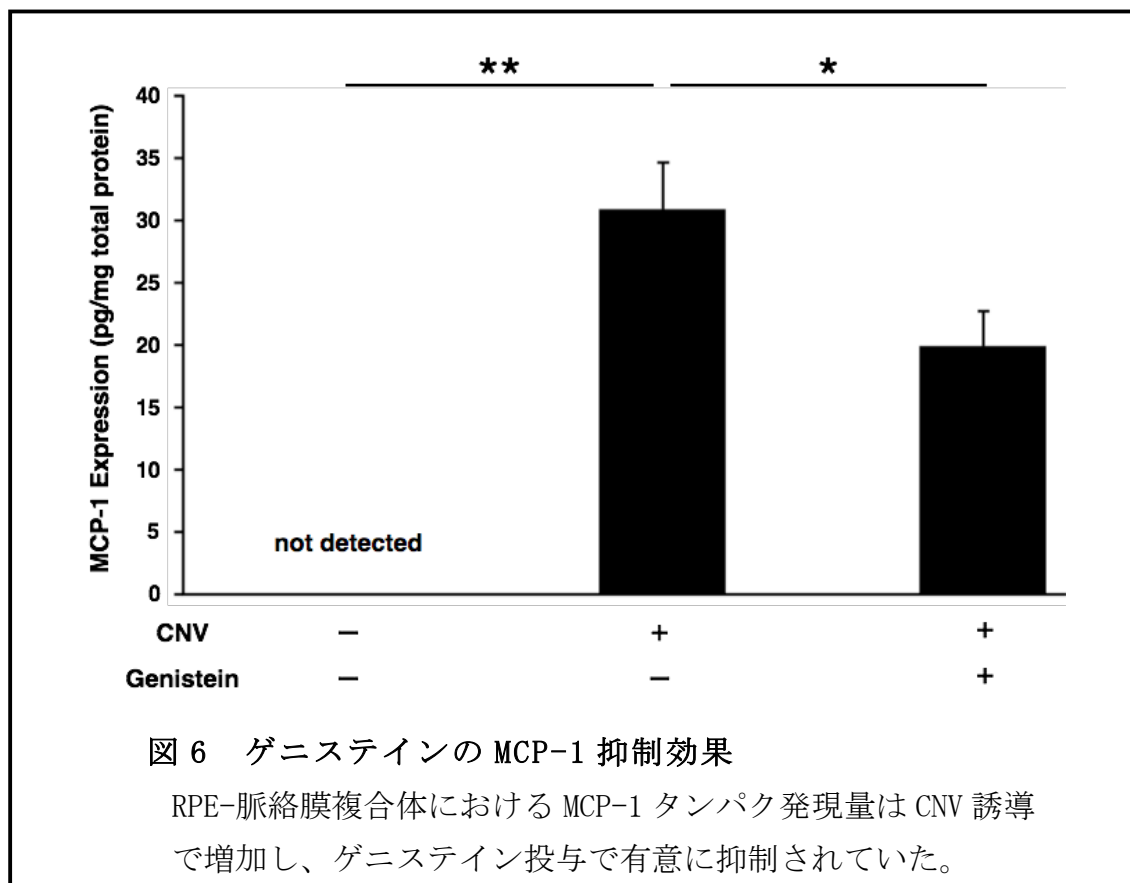
1. ゲニステイン投与による CNV 形成抑制効果

ゲニステインの CNV 形成抑制効果を検討するために、レーザー照射 7 日後の眼球を摘出して作成したフラットマウントにおける CNV 面積を測定し、コントロール群とゲニステイン投与群で比較した。CNV の平均面積はコントロール群 (n=36) で $21074.0 \pm 1940.7 \mu\text{m}^2$ 、ゲニステイン投与群 (n=30) で $15441.9 \pm 1511.8 \mu\text{m}^2$ であり、ゲニステイン投与群で有意に減少していた ($P < 0.05$) (図 4、5)。



2. ゲニステインによる炎症関連分子の抑制効果とマクロファージ浸潤の抑制効果

ゲニステインによる CNV 形成の抑制機序を検討するために、レーザー照射 3 日後の RPE-脈絡膜複合体における MCP-1 と ICAM-1 のタンパク発現量を ELISA 法で検討した。MCP-1 は CNV 非誘導コントロール群 (n=7) では検出できず、CNV 誘導コントロール群 (n=9) では 30.9 ± 3.5 pg/mg に増加していたが ($P < 0.01$)、CNV 誘導ゲニステイン投与群 (n=8) では 20.0 ± 2.7 pg/mg と減少していた ($P < 0.05$)。また ICAM-1 は CNV 非誘導コントロール群 (n=13) では 124.1 ± 3.2 ng/mg で、CNV 誘導コントロール群 (n=9) では 138.2 ± 4.0 ng/mg と増加していたが ($P < 0.05$)、CNV 誘導ゲニステイン投与群 (n=14) では 124.2 ± 2.7 ng/mg と減少していた。以上の結果から、ゲニステインが CNV 誘導で増加する MCP-1 と ICAM-1 のタンパク発現を抑制することが明らかとなった (図 6、7)。



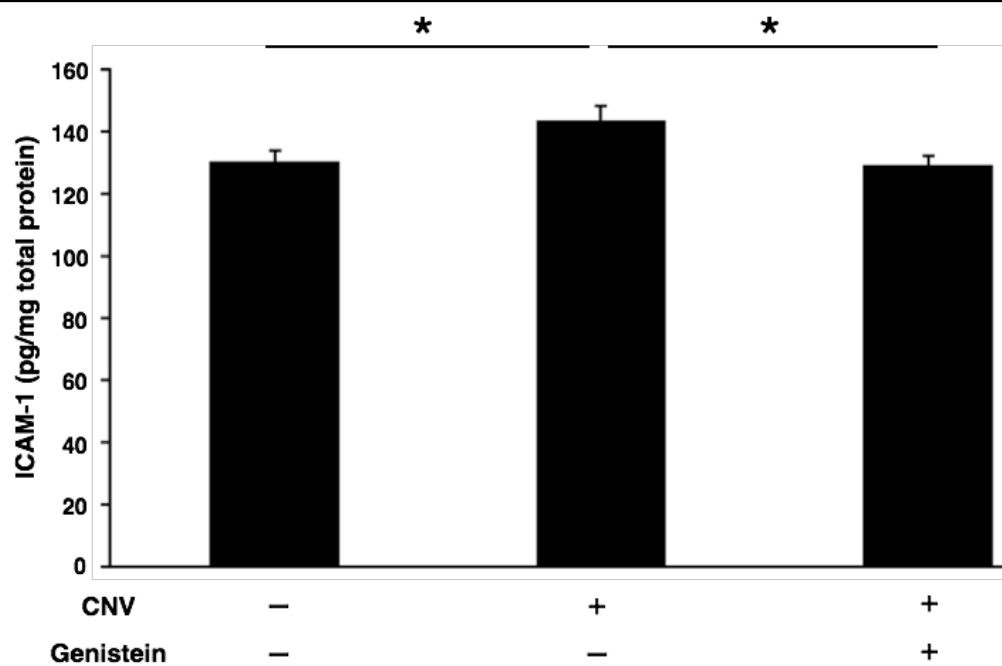
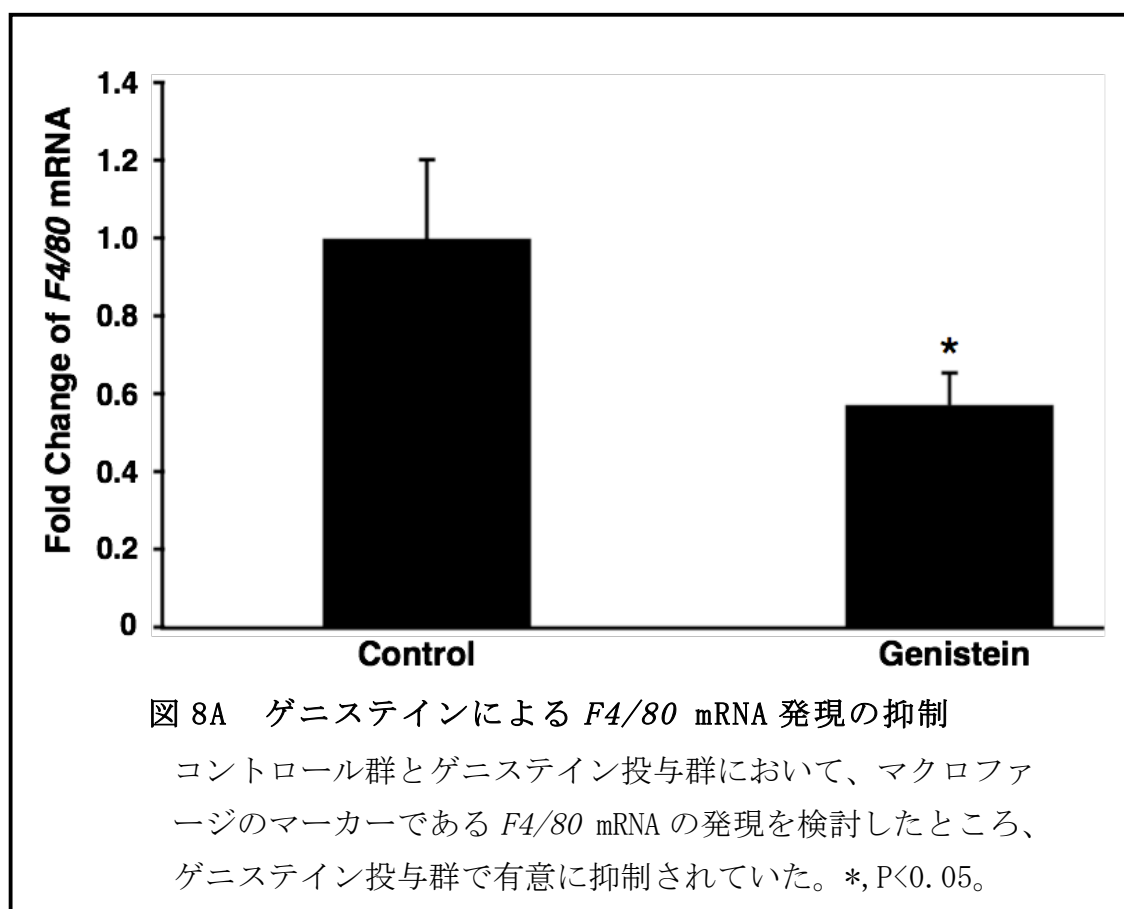


図 7 ゲニステインの ICAM-1 抑制効果

RPE-脈絡膜複合体における ICAM-1 タンパク発現量は CNV 誘導で増加し、ゲニステイン投与で有意に抑制されていた。

また、ヒト CNV の病態形成における関与が知られているマクロファージについて検討をおこなった。まず、マウスにおけるマクロファージの特異的マーカーである *F4/80* の発現について real-time PCR 法を用いて検討したところ、コントロール群と比較するとゲニステイン投与群では *F4/80* mRNA の発現は 56% に抑制されており、CNV におけるマクロファージ浸潤の抑制を示唆する結果であった (n=6、 $P<0.05$) (図 8A)。



さらに、抗 *F4/80* 抗体を用いて免疫組織学検討をおこなったところ、CNV 面積 $1000\mu\text{m}^2$ あたりのマクロファージ数はコントロール群では 24.4 ± 2.7 個であるのに対してゲニステイン投与群では 8.8 ± 0.8 個と有意に減少しており (n=4、 $P<0.01$)、real-time PCR 法の検討結果を支持するものであった (図 8B、C)。

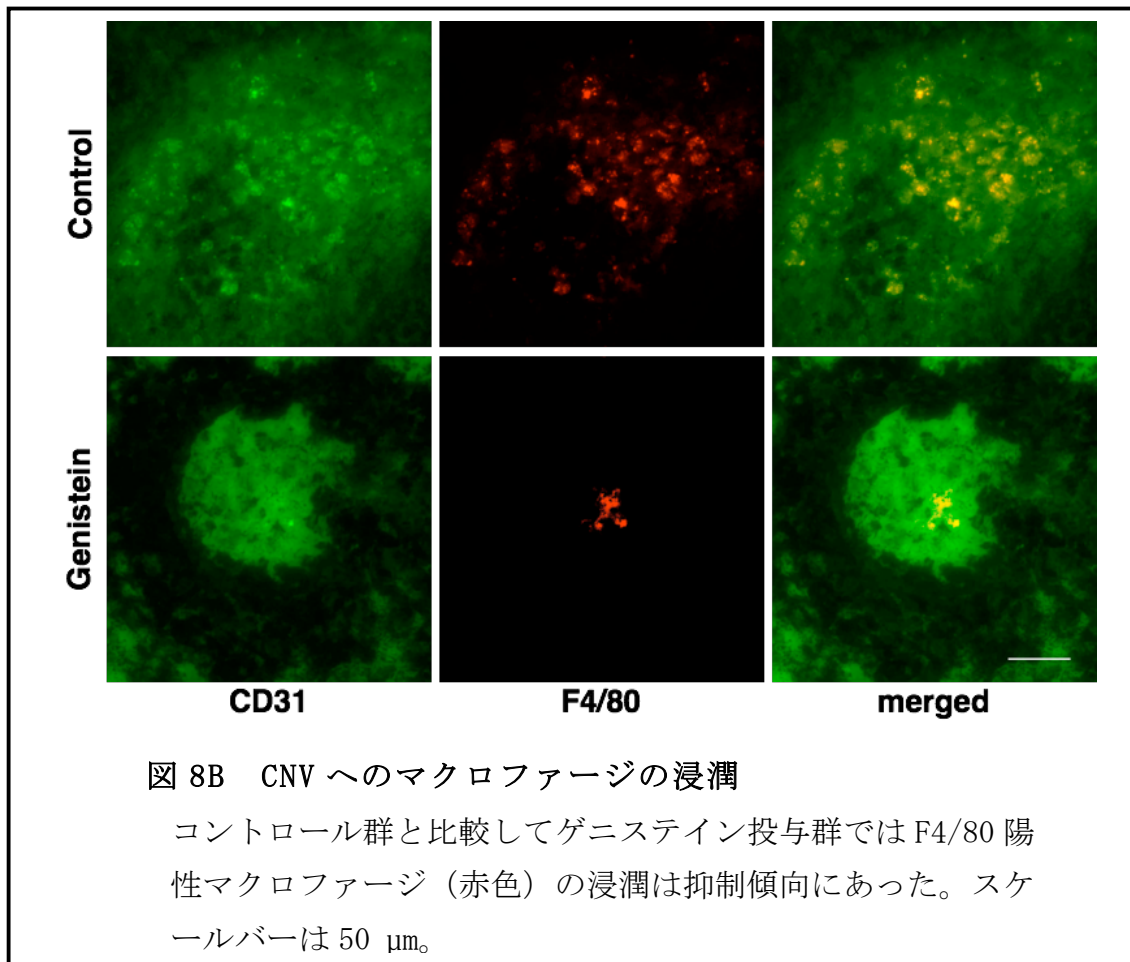


図 8B CNV へのマクロファージの浸潤

コントロール群と比較してゲニステイン投与群では F4/80 陽性マクロファージ（赤色）の浸潤は抑制傾向にあった。スケールバーは 50 μm 。

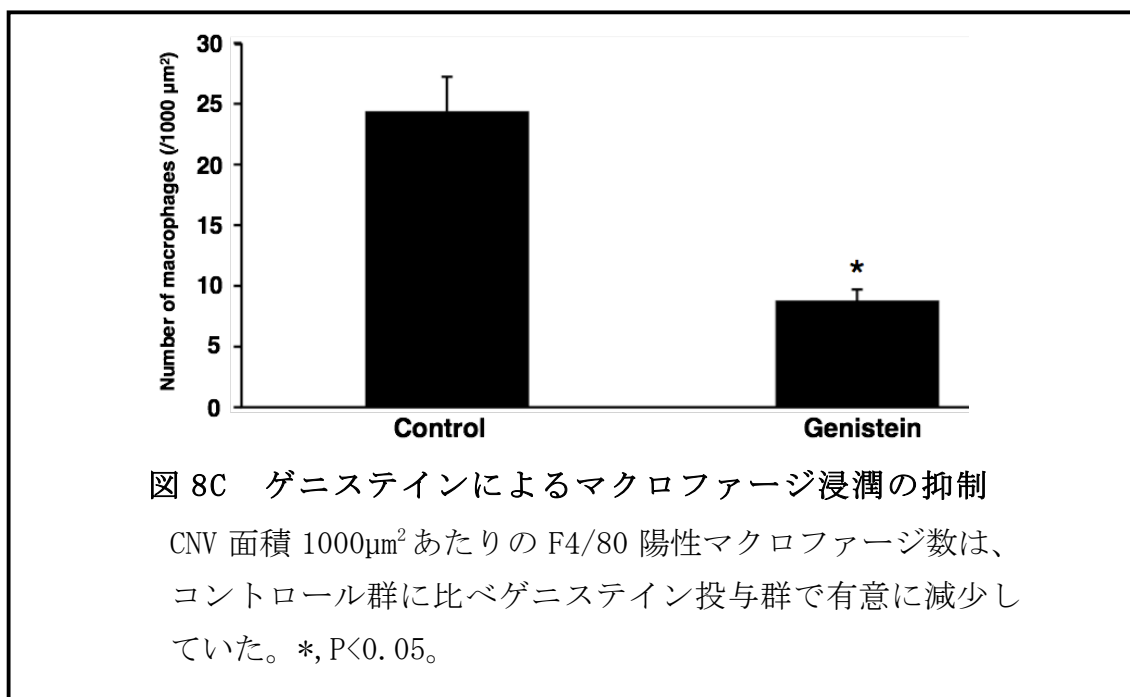
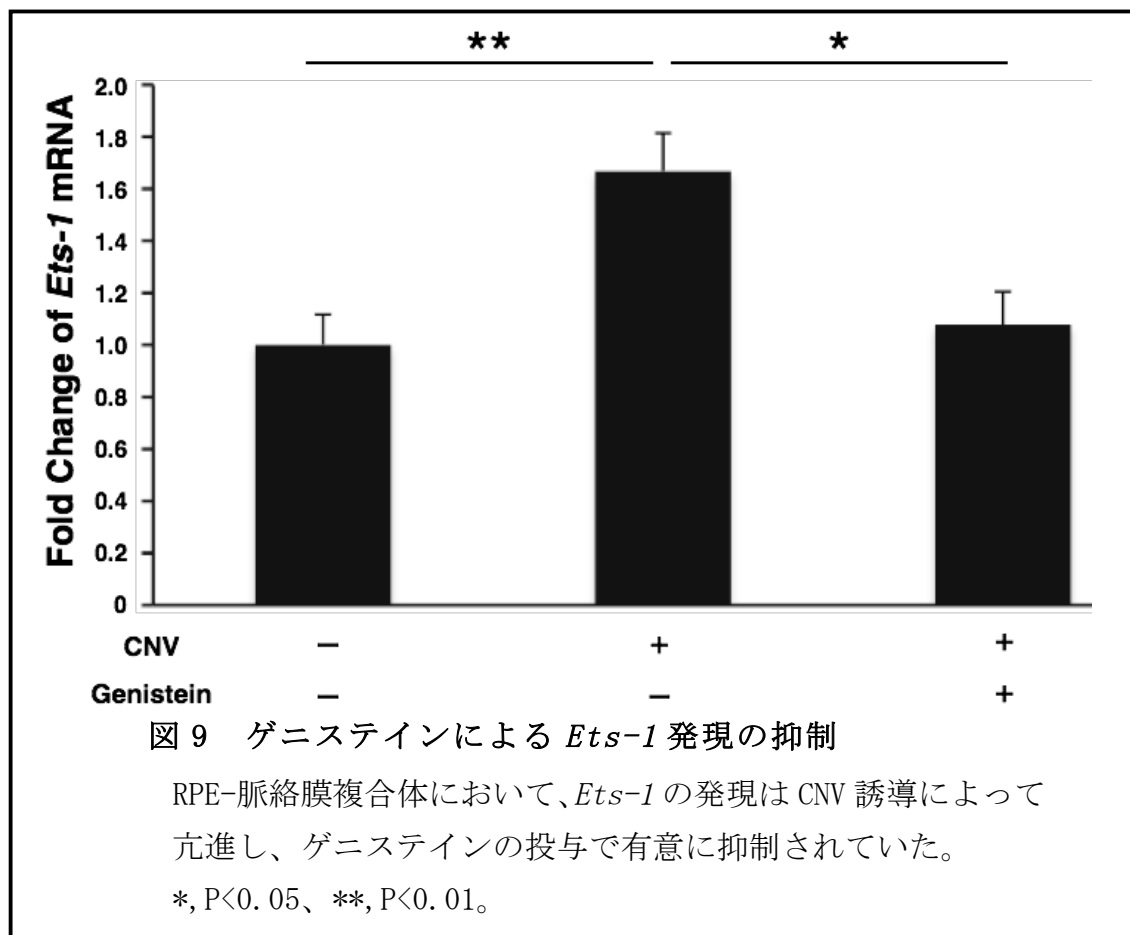


図 8C ゲニステインによるマクロファージ浸潤の抑制

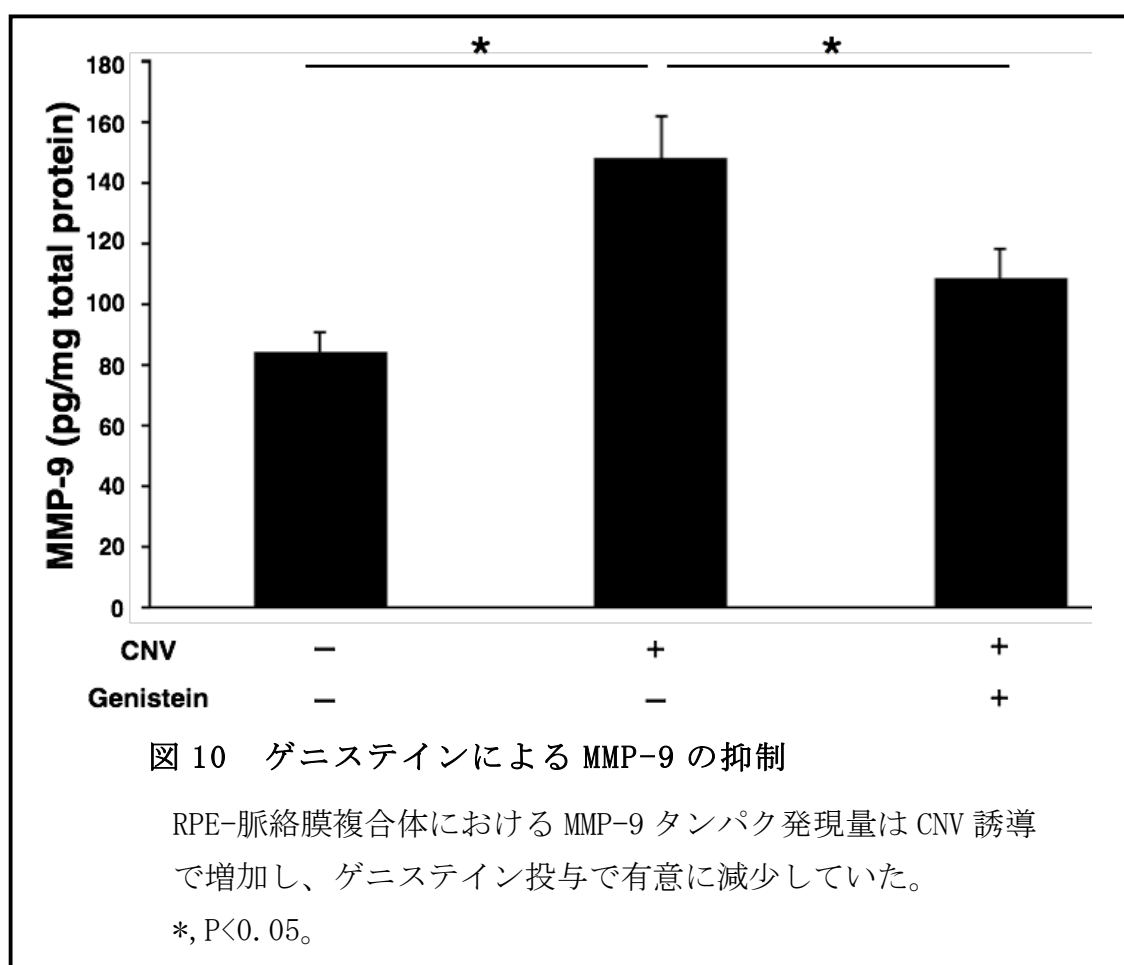
CNV 面積 $1000\mu\text{m}^2$ あたりの F4/80 陽性マクロファージ数は、コントロール群に比べゲニステイン投与群で有意に減少していた。*, $P < 0.05$ 。

3. ゲニステインによる転写因子 *Ets-1* の抑制

血管新生を促進することが知られる転写因子 *Ets-1* (*v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*) に対するゲニステインの関与を検討するために、レーザー照射 1 日後の RPE-脈絡膜複合体から回収した total RNA を用いて、real-time PCR 法で *Ets-1* mRNA の発現について検討した。その結果、CNV 誘導コントロール群 (n=7) の *Ets-1* mRNA の発現は、CNV 非誘導コントロール群 (n=9) に対して 66%増加 ($P<0.01$) しており、CNV 誘導ゲニステイン投与群 (n=5) の *Ets-1* mRNA の発現は CNV 誘導コントロール群に対して 35%減少 ($P<0.05$) していた。これらの結果から、*Ets-1* はレーザー照射で誘導される CNV 形成過程で発現が亢進し、ゲニステインがそれを抑制することが示された (図 9)。



また、血管新生のプロセスに関わるタンパク分解酵素 MMP-9 に対するゲニステインの関与について検討するために、レーザー照射 3 日後の RPE-脈絡膜複合体における MMP-9 のタンパク発現量を ELISA 法で検討した。MMP-9 は CNV 非誘導コントロール群 (n=8) では 84.4 ± 6.1 pg/mg、CNV 誘導コントロール群 (n=8) では 148.3 ± 13.6 pg/mg に増加していたが ($P < 0.05$)、CNV 誘導ゲニステイン投与群 (n=7) では 109.0 ± 9.0 pg/mg であり有意に減少していた ($P < 0.05$) (図 10)。



考察

本研究により、ゲニステインが動物モデルにおける CNV 形成を抑制することが示された。また、ゲニステインの全身投与は CNV 誘導にともなって増加する RPE-脈絡膜複合体の炎症関連分子やマクロファージの浸潤を抑制することが示された。さらに、ゲニステインが転写因子 *Ets-1* の発現を抑制することで MCP-1、ICAM-1、MMP-9 の産生が抑制されることが示された。これらの結果は、ゲニステインが CNV に対する治療効果を持つことを示唆している。

これまでの報告によると、レーザー誘導 CNV モデルにおいて MCP-1 や ICAM-1 を遺伝子的にノックアウトさせるとマクロファージの浸潤が減少するとされており^{35,36}、MCP-1 と ICAM-1 はこの動物実験モデルにおいて重要な役割を担っていると考えられる。今回の実験では、ゲニステインの全身投与によって局所の MCP-1 と ICAM-1 のタンパク濃度が減少することが示された。また、MCP-1 と ICAM-1 はマクロファージの遊走と白血球接着において重要な分子である^{35,37}。我々の検討においても、RPE-脈絡膜複合体に浸潤するマクロファージの数とマクロファージの特異的マーカーである *F4/80* の遺伝子発現が抑制されていることが明らかとなり、既報に矛盾しない結果であった。過去の報告では、ゲニステインは *in vivo* および *in vitro* において MCP-1 と ICAM-1 を抑制することが示されている³⁸⁻⁴⁰。以上より、ゲニステインによる CNV 形成の抑制機序には、MCP-1 と ICAM-1 に対する抑制が含まれると考えられる。

また、ゲニステイン投与群では RPE-脈絡膜複合体に含まれる MMP-9 のタンパク濃度が減少していた。一般的な血管新生のプロセスにおいては、血管内皮細胞が血管新生を促すサイトカインによって刺激されると、基底膜が分解され、内皮細胞の遊走と増殖に引き続いて、新たな管腔が形成される⁴¹。基底膜の分解過程においては MMPs などのタンパク分解酵素やプラスミノゲンアクチベーターなどのセリンプロテアーゼが関与しており⁴²、これらの IV 型コラゲナーゼ、MMP-2、MMP-9 が基底膜の構造を加水分解する上で重要な役割を持つ⁴³⁻⁴⁵。既報では、ヒトの培養 RPE 細胞を TNF- α などの炎症関連分子で刺激したところ MMP-9 の産生が増加したとの報告があり⁴⁶、さらに動物実験モデルにおいてレーザーで CNV を誘導すると MMP-9 の発現が亢進し、MMP-9 をノックアウトすると CNV 形成が抑制されたとの報告^{47,48}がある。以上より、本検討でゲニステインが CNV を抑制したメカニズムとして、先述した MCP-1 と ICAM-1 の抑制のみならず、MMP-9 を抑制したことがもう一つの理由として考えられる。

さらに、ゲニステインの CNV 抑制メカニズムに MCP-1 および ICAM-1 などの炎症関連分子や MMP-9 など血管新生に関連する分子の発現を制御する転写因子の関与を考え検討したところ、Ets ファミリー転写因子のひとつである *Ets-1* の遺伝子発現がゲニステインによって抑制されていることが明らかになった。*Ets-1* は炎症や血管新生における様々な生理学的プロセスに関与する転写因子であり⁴⁹、血管内皮細胞において MMP-1、MMP-3、MMP-9 の発現を亢進させるという報告⁵⁰や、MCP-1^{51, 52}や ICAM-1^{53, 54}の発現を亢進させるという報告がある。一方で、ゲニステインは *in vivo* および *in vitro* で *Ets-1* の発現を抑制するという報告^{55, 56}がある。このことから、ゲニステインの CNV 形成抑制メカニズムには 2 つの経路があると考えられる。1 つはゲニステインが *Ets-1* の発現を抑制し、血管内皮細胞における MCP-1 と ICAM-1 の産生が抑制され、その下流のマクロファージの浸潤が抑制され CNV 形成が抑制された経路、もう 1 つはゲニステインが *Ets-1* の発現を抑制し、血管内皮細胞における MMP-9 の産生が抑制され、CNV 形成が抑制された経路である。ゲニステインはこの 2 つの経路を同時に抑制することで CNV 形成を抑制したと考えられる。過去の報告によると、ゲニステインは転写因子である NF- κ B を抑制⁵⁷し、また一方で MCP-1⁵⁸、ICAM-1⁵⁸、MMP-9⁵⁹の発現には NF- κ B が関与しているとされる。今回は検討していないが、ゲニステインは *Ets-1* のみならず NF- κ B の発現も同時に抑制し、CNV の形成を抑えた可能性も考えられる。

以上の検討から、ゲニステインは CNV 形成抑制作用を持ち、滲出型 AMD に対する補助的治療の一つとして有用である可能性が示された。

総括および結論

1. ゲニステインは CNV 形成を抑制する。
2. ゲニステインは CNV 形成に関与する MCP-1 と ICAM-1 を抑制する。
3. ゲニステインは CNV 形成過程におけるマクロファージの浸潤を抑制する。
4. ゲニステインは血管新生や炎症に関与する転写因子 *Ets-1* の発現を抑制する。
5. ゲニステインは血管新生のプロセスに関わる MMP-9 を抑制する。
6. 本研究の結果から、ゲニステインの摂取によって滲出型 AMD における CNV 形成を抑制できる可能性が示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、御指導と御校閲を賜りました北海道大学大学院医学研究科眼科学分野、石田晋教授に深甚なる謝意を表します。また本研究全般にわたって直接御指導を頂きました北海道大学大学院医学研究科眼科学分野、野田航介准教授に深く感謝の意を表します。さらに研究にあたって多くの御助言を頂きました北海道大学大学院医学研究科眼科学分野、神田敦宏特任講師、加瀬諭先生、村田美幸先生に厚く御礼を申し上げます。さらに研究室のサポートをして頂いた、廣瀬育代技術補助員、吉田志帆研究補助員、石塚タンエルダル研究補助員に心より感謝の意を表します。

引用文献

- 1 Sommer, A. *et al.* Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in east Baltimore. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1412-1417, (1991).
- 2 Mitchell, P., Smith, W., Attebo, K. & Wang, J. J. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* **102**, 1450-1460, (1995).
- 3 VanNewkirk, M. R. *et al.* The prevalence of age-related maculopathy: the visual impairment project. *Ophthalmology* **107**, 1593-1600, (2000).
- 4 Hong, T. *et al.* Long-term changes in visual acuity in an older population over a 15-year period: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* **120**, 2091-2099, (2013).
- 5 Oshima, Y. *et al.* Prevalence of age related maculopathy in a representative Japanese population: the Hisayama study. *Br. J. Ophthalmol.* **85**, 1153-1157, (2001).
- 6 Miyazaki, M. *et al.* Risk factors for age related maculopathy in a Japanese population: the Hisayama study. *Br. J. Ophthalmol.* **87**, 469-472, (2003).
- 7 Miyazaki, M. *et al.* The 5-year incidence and risk factors for age-related maculopathy in a general Japanese population: the Hisayama study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 1907-1910, (2005).
- 8 Kawasaki, R. *et al.* Prevalence and risk factors for age-related macular degeneration in an adult Japanese population: the Funagata study. *Ophthalmology* **115**, 1376-1381, 1381 e1371-1372, (2008).
- 9 Yasuda, M. *et al.* Nine-year incidence and risk factors for age-related macular degeneration in a defined Japanese population the Hisayama study. *Ophthalmology* **116**, 2135-2140, (2009).
- 10 Smiddy, W. E. & Fine, S. L. Prognosis of patients with bilateral macular drusen. *Ophthalmology* **91**, 271-277, (1984).
- 11 Ishibashi, T. *et al.* Advanced glycation end products in age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* **116**, 1629-1632, (1998).

- 12 Senger, D. R. *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-985, (1983).
- 13 Ferrara, N. & Henzel, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 851-858, (1989).
- 14 Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309, (1989).
- 15 Brown, D. M. *et al.* Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1432-1444, (2006).
- 16 Rosenfeld, P. J. *et al.* Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1419-1431, (2006).
- 17 Heier, J. S. *et al.* Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **119**, 2537-2548, (2012).
- 18 Lois, N., McBain, V., Abdelkader, E., Scott, N. W. & Kumari, R. Retinal pigment epithelial atrophy in patients with exudative age-related macular degeneration undergoing anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Retina* **33**, 13-22, (2013).
- 19 Rofagha, S. *et al.* Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* **120**, 2292-2299, (2013).
- 20 Moorthy, S. & Cheung, N. Cerebrovascular accidents and ranibizumab. *Ophthalmology* **116**, 1834-1835, (2009).
- 21 van der Reis, M. I. *et al.* A systematic review of the adverse events of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor injections. *Retina* **31**, 1449-1469, (2011).
- 22 Bressler, N. M. *et al.* Cerebrovascular accidents in patients treated for choroidal neovascularization with ranibizumab in randomized controlled trials. *Retina* **32**, 1821-1828, (2012).

- 23 Age-Related Eye Disease Study Research, G. 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. *Arch. Ophthalmol.* **119**, 1417-1436, (2001).
- 24 Age-Related Eye Disease Study 2 Research, G. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA* **309**, 2005-2015, (2013).
- 25 Verdrengh, M., Jonsson, I. M., Holmdahl, R. & Tarkowski, A. Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm. Res.* **52**, 341-346, (2003).
- 26 Zhang, Y. *et al.* Genistein inhibit cytokines or growth factor-induced proliferation and transformation phenotype in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Inflammation* **35**, 377-387, (2012).
- 27 Wiseman, H. *et al.* Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 395-400, (2000).
- 28 Djuric, Z., Chen, G., Doerge, D. R., Heilbrun, L. K. & Kucuk, O. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Lett.* **172**, 1-6, (2001).
- 29 Akiyama, T. *et al.* Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**, 5592-5595, (1987).
- 30 Singh, A. V., Franke, A. A., Blackburn, G. L. & Zhou, J. R. Soy phytochemicals prevent orthotopic growth and metastasis of bladder cancer in mice by alterations of cancer cell proliferation and apoptosis and tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **66**, 1851-1858, (2006).
- 31 Gu, Y., Zhu, C. F., Iwamoto, H. & Chen, J. S. Genistein inhibits invasive potential of human hepatocellular carcinoma by altering cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* **11**,

- 6512-6517, (2005).
- 32 Kwak, N., Okamoto, N., Wood, J. M. & Campochiaro, P. A. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 3158-3164, (2000).
 - 33 Majji, A. B., Hayashi, A., Kim, H. C., Grebe, R. R. & de Juan, E., Jr. Inhibition of choriocapillaris regeneration with genistein. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1477-1486, (1999).
 - 34 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408, (2001).
 - 35 Sakurai, E. *et al.* Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 2743-2749, (2003).
 - 36 Schmack, I. *et al.* Modulation of choroidal neovascularization by subretinal injection of retinal pigment epithelium and polystyrene microbeads. *Mol. Vis.* **15**, 146-161, (2009).
 - 37 Tsutsumi, C. *et al.* The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 25-32, (2003).
 - 38 Cho, H. Y. *et al.* Comparative effect of genistein and daidzein on the expression of MCP-1, eNOS, and cell adhesion molecules in TNF-alpha-stimulated HUVECs. *Nutr Res Pract* **5**, 381-388, (2011).
 - 39 Babu, P. V., Si, H., Fu, Z., Zhen, W. & Liu, D. Genistein prevents hyperglycemia-induced monocyte adhesion to human aortic endothelial cells through preservation of the cAMP signaling pathway and ameliorates vascular inflammation in obese diabetic mice. *J. Nutr.* **142**, 724-730, (2012).
 - 40 Zhang, H. P., Zheng, F. L., Zhao, J. H., Guo, D. X. & Chen, X. L. Genistein inhibits ox-LDL-induced VCAM-1, ICAM-1 and MCP-1 expression of HUVECs through heme oxygenase-1. *Arch. Med. Res.* **44**, 13-20, (2013).
 - 41 Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the

- angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364, (1996).
- 42 Vu, T. H. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of
development and normal physiology. *Genes Dev.* **14**, 2123-2133, (2000).
- 43 Hiraoka, N., Allen, E., Apel, I. J., Gyetko, M. R. & Weiss, S. J.
Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as
pericellular fibrinolysins. *Cell* **95**, 365-377, (1998).
- 44 Pepper, M. S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen
activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb.
Vasc. Biol.* **21**, 1104-1117, (2001).
- 45 Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell.
Mol. Med.* **9**, 267-285, (2005).
- 46 Hoffmann, S. *et al.* MMP-2 and MMP-9 secretion by rpe is stimulated
by angiogenic molecules found in choroidal neovascular membranes.
Retina **26**, 454-461, (2006).
- 47 Lambert, V. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 contributes to
choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* **161**, 1247-1253,
(2002).
- 48 Lambert, V. *et al.* MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal
neovascularization. *FASEB J.* **17**, 2290-2292, (2003).
- 49 Oettgen, P. Regulation of vascular inflammation and remodeling by
ETS factors. *Circ. Res.* **99**, 1159-1166, (2006).
- 50 Oda, N., Abe, M. & Sato, Y. ETS-1 converts endothelial cells to the
angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix
metalloproteinases and integrin beta3. *J. Cell. Physiol.* **178**,
121-132, (1999).
- 51 Zhan, Y. *et al.* Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated
vascular inflammation and remodeling. *J. Clin. Invest.* **115**,
2508-2516, (2005).
- 52 Aoki, T. *et al.* Ets-1 promotes the progression of cerebral aneurysm
by inducing the expression of MCP-1 in vascular smooth muscle cells.
Gene Ther. **17**, 1117-1123, (2010).
- 53 de Launoit, Y., Audette, M., Pelczar, H., Plaza, S. & Baert, J. L.

- The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors. *Oncogene* **16**, 2065-2073, (1998).
- 54 Yockell-Lelievre, J. *et al.* Functional cooperation between Stat-1 and ets-1 to optimize icam-1 gene transcription. *Biochem. Cell Biol.* **87**, 905-918, (2009).
- 55 Watanabe, D. *et al.* Transcription factor Ets-1 mediates ischemia- and vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization. *Am. J. Pathol.* **164**, 1827-1835, (2004).
- 56 Kiriakidis, S. *et al.* Novel tempeh (fermented soyabean) isoflavones inhibit in vivo angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane assay. *Br. J. Nutr.* **93**, 317, (2007).
- 57 Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z. & Sarkar, F. H. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett.* **269**, 226-242, (2008).
- 58 Gawaz, M. *et al.* Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* **98**, 1164-1171, (1998).
- 59 Ko, H. M. *et al.* Platelet-activating factor induces matrix metalloproteinase-9 expression through Ca(2+)- or PI3K-dependent signaling pathway in a human vascular endothelial cell line. *FEBS Lett.* **579**, 6451-6458, (2005).