

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10832

研究課題名(和文) 樹状細胞を中心とした硝子体内炎症惹起制御機能と糖尿病網膜症進展の分子病態

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of progression of diabetic retinopathy focusing inflammatory mechanisms by dendritic cells in vitreous

研究代表者

山下 英俊 (YAMASHITA, Hidetoshi)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90158163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症および黄斑浮腫では、炎症反応の起点として樹状細胞の関与が多くの疾患で先行しており、糖尿病網膜症の分子病態の一つとして、樹状細胞など抗原提示細胞の硝子体内へのリクルート、リクルート後の硝子体内及び網膜の細胞(神経膠細胞)のとの相互制御作用の解明により炎症メカニズムが関与する糖尿病網膜症の分子細胞生物学的病態明らかにした。この病態解明により炎症をターゲットとする治療薬として、ステロイド点眼による新たな治療法の開発をおこなった。ステロイド点眼は外来でも適応可能な新規治療薬である。

研究成果の概要(英文)：The systemic conditions of diabetic patients such as hyperglycemia and hypertension cause vascular endothelial cell dysfunction of the retina, particularly of blood capillaries, and retinal circulatory dysfunction and ischemia that subsequently damage retinal tissues. These pathological conditions are considered to be the same as the molecular mechanism of inflammation, which includes inflammatory cells (dendritic cells and macrophages) and many inflammatory cytokines including VEGF. According to these molecular mechanisms, anti-inflammatory corticosteroids have been proved to be effective and safe treatment modalities. Our present research clarified that the ocular topical administration of anti-inflammatory corticosteroid (difluprednate) is useful to treat diabetic retinopathy and diabetic macular edema.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病黄斑浮腫 血管内皮増殖因子(VEGF) 炎症 眼局所薬物治療 ステロイド薬 抗VEGF薬 長期治療成績 包括的治療プロトコール

1. 研究開始当初の背景

世界における糖尿病患者数は、International Diabetes Federation (IDF) の Diabetes Atlas 2011 年第 5 版によると約 3 億 7 千万人、2030 年には約 5 億 5 千万人に及ぶと推計されており、今後急速に増加すると考えられる。日本では、糖尿病が強く疑われる患者数が 1997 年 690 万人、2002 年 740 万人、2007 年 890 万人、2012 年 950 万人と急激に増加している。糖尿病網膜症を合併している糖尿病患者数も増加していると考えられ、2010 年におけるメタアナリシスによると全世界における糖尿病網膜症患者数は 9300 万人という膨大な数にのぼる。糖尿病患者数の増加に伴い糖尿病網膜症を有する患者数も増加していると考えられ、糖尿病網膜症は日本人の後天性視覚障害 (身体障害者手帳発給をデータベースとして) 常に第 1 位または第 2 位を占め、視力障害者の約 2 割を占めている。近年の傾向として以前より若年者での糖尿病発症が増加していると考えられ、糖尿病網膜症の発症及び重症化のリスクが大きくなっている。日本眼科医会研究班により、日本における視覚障害の社会的コストの研究によると、糖尿病網膜症を含むすべての視力障害により、2007 年の経済コストは 2 兆 9 千億円余、視覚障害をかかえることによる個人の健康年数喪失から計算した疾病負担コストは 5 兆 8 千億円余 / 年、合わせると年間約 8 兆 8 千億円に及ぶ社会的コストがかかっていることになる。医療経済としても大きな社会問題になっている。健康日本 21 の目標として健康寿命を長くするためにも、糖尿病網膜症の治療のエンドポイントは失明予防ではなく、生涯にわたり生活の質を高く保つための視力を保持とすることが社会的な要請である。このような社会的要請に対応するためには、糖尿病網膜症治療薬として、眼局所の治療として硝子体注入ではなく、発症、進展を抑制する二次予防的アプローチを可能とする治療薬開発により、軽症から開始し失明を予防することが重要である。これまで糖尿病網膜症の分子病態研究により糖代謝異常、それに起因する血管構成細胞 (内皮細胞、周細胞) の機能及び構造の傷害、血球細胞と血管内皮細胞の相互作用の観点から血管障害と血管閉塞、網膜虚血に起因する血管内皮増殖因子 (VEGF) の誘導と血管病態などが明らかにされてきた。網膜血管が障害されたのちの病態に対する網膜光凝固術、硝子体手術などの開発、発展により失明がかなりの程度抑制されている。また、薬物治療として抗 VEGF 薬が有効であることが臨床研究からも明らかになってきたが、抗 VEGF 薬のみによる治療効果は必ずしも十分ではない。これは多様な炎症性サイト

カインが関与することによるものと考えられる。多様な病態が糖尿病網膜症を引き起こし、血管病を極めて複雑にしている。多くの炎症性サイトカインにより炎症のカスケードの起点としてマクロファージ、樹状細胞など抗原提示細胞の分子機能と炎症病態への関与を明らかにし、治療の新しい分子標的を解明し、新規治療薬の開発を目指すのが本研究の目的である。炎症反応の起点として樹状細胞の関与が多くの疾患で先行しており、我々の研究グループのこれまでのパイロット研究で、糖尿病網膜症を含む増殖性硝子体網膜疾患の硝子体内で硝子体細胞はマクロファージ様の機能を持つこと、マクロファージ系細胞には樹状細胞等の抗原提示細胞が存在することはこれまで明らかにしてきた。

2. 研究の目的

社会要請にこたえる治療薬の開発を目指す。そのターゲットとしての炎症機転は糖尿病網膜症病態に大きく関与することはステロイド薬の眼局所注射が網膜病変の治療に有効であることから明らかになっている。本研究では炎症機転のステップとして早期の病態解明をおこない、炎症をターゲットとする治療薬の開発をめざす。

炎症反応の起点として樹状細胞の関与が多くの疾患で先行しており、本研究では、糖尿病網膜症の分子病態の一つとして、樹状細胞など抗原提示細胞の糖尿病網膜症をはじめ網膜硝子体疾患における分子細胞生物学的病態を検討する。

外来でも適応可能な新規治療薬開発 (たとえば点眼などによる治療) を目指す。

3. 研究の方法

以下の、本研究は山形大学医学部倫理委員会の承認のもと行われた。

炎症反応の起点として樹状細胞の役割について

1) in vitro 研究

ヒト樹状細胞 (DC)、ブタ硝子体由来細胞およびヒト培養星状神経膠細胞を用いた。

I. ブタ硝子体由来細胞サンプリング: 糖濃度 100 mg/dL (Control 群)、高濃度グルコース濃度群 (Glu 群) の培地で培養し、細胞上清を回収した。未熟 DC (imDC) と共培養して得られた細胞上清 (imDC 群) を回収した。得られた細胞上清中のヒアルロナン (HA) 濃度を ELISA を用いて測定した。

II. ヒト培養星状神経膠細胞サンプリング: 糖濃度 100 mg/dL (Control 群)、高濃度グルコース群 (Glu 群) の DC (imDC)、成熟 DC (mDC) と共培養して得られた細胞上清を回収した。得られた細胞上清中のヒアルロナン濃度、VEGF 濃度を ELISA を用いて測定した。

2) 臨床的研究

液状化検体細胞診 (liquid based

cytology;LBC法)により灌流下硝子体生検における樹状細胞の分布について検討した。25ゲージ硝子体手術を施行した45例48眼(黄斑ポケット、黄斑円孔、網膜症脈閉塞症、眼内炎、増殖糖尿病網膜症、網膜剥離、ぶどう膜炎、悪性リンパ腫が対象疾患)。検体は灌流下でカットレート5000回転/分で採取し、LBC標本(BDシユアパス™法)を作成した。細胞学的な観察に加えて、バイオマーカーとしては、CD68(マクロファージ)、RPE65(網膜色素上皮細胞)、DEC-205(CD205)(Bリンパ球、樹状細胞)について検討した。

新規治療薬開発

ジフルプレドナート点眼で治療した糖尿病黄斑浮腫の症例の長期予後を明らかにすることを目的として臨床研究をおこなった。診療録を用いた後ろ向き観察研究。ジフルプレドナート点眼で薬物治療を行った。ジフルプレドナート点眼薬の使用法は、最初の4週間は1日4回点眼、続く8週間は1日2回点眼、計12週間を1クールとして使用した。(米国食品医薬局認可使用法に準拠)視力、網膜厚推移と転機について検討した。対象は点眼で治療を開始し12ヶ月以上経過を追えた症例は66例98眼。治療前平均logMAR視力は0.379、平均中心窩網膜厚は458.9μmであった。

4. 研究成果

炎症反応の起点として樹状細胞の役割について

1) in vitro 研究

硝子体細胞、神経膠細胞とも糖負荷では上清中のHA濃度に有意な差を認めなかったがDCとの共培養系で有意にHA濃度の低下を認めた。ヒト星状神経膠細胞の実験では、imDCとの共培養系でHA低下、mDCでHA増加を認め、VEGF濃度がmDCで有意に高い結果であった。この結果からDCの成熟度がヒト星状神経膠細胞との細胞間相互作用に影響する可能性が示され、その作用によってHA産生が制御、あるいはHA分解酵素がなり、結果VEGF濃度上昇を引き起こした可能性がある。この結果は急激な血糖下産生されたと考えられた。異なる条件の糖負荷実験では培地の糖濃度を大きく変化させた場合、その濃度差が細胞ストレスと降により糖尿病網膜症が悪化するメカニズムに関連する可能性もあり長期的な培養や細胞レベルでの詳細な検討を含めて更なる検討が必要である。

まとめると、ブタ硝子体由来細胞やヒト星状神経膠細胞の細胞上清に含まれるヒアルロン酸およびVEGFは細胞培地の糖濃度の大きな変動やDCとの共培養の影響を受ける。

炎症反応の起点として樹状細胞の役割について

2) 臨床的研究

1. 細胞学的な観察により異型リンパ球を認めることができた。また、硝子体内の細胞数は炎症性疾患の方が有意に多かった。

11. 免疫細胞化学的な検討によりバイオマーカーを観察した症例では、CD68+細胞が10症例で観察された。DEC-205+細胞は感染性眼内炎でみられた。網膜剥離の症例で網膜色素上皮細胞のマーカーRPE65+がみられた。硝子体内には白血球、リンパ球がみられた。増殖糖尿病網膜症を含めた網膜硝子体疾患においては、マクロファージ、白血球、リンパ球、樹状細胞など炎症に関わる細胞が多く出現していることが明らかになった。新規治療薬開発

12ヶ月以上点眼治療のみで経過した糖尿病黄斑浮腫症例は49眼(50%)あった。他の49眼にはステロイド局所投与、抗血管内皮増殖因子治療、硝子体手術等が追加治療として施行された。糖尿病黄斑浮腫に対してジフルプレドナート点眼薬治療を開始して点眼のみで12ヶ月以上治療できたのものが約半数あり、視力、網膜厚の改善を得た。

ジフルプレドナート点眼で眼圧上昇などにより使用できなかった場合に抗VEGF薬にコンバートしても効果が確保できた。本研究で、ジフルプレドナート点眼を糖尿病黄斑浮腫の治療戦略のなかでどのように位置づけるかについて、これまでの臨床研究から得た知見をもとにして包括的治療プロトコルを作成することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 件)

[学会発表](計11件)

1. 阿部さち、山下英俊:ステロイド点眼法を利用した糖尿病黄斑浮腫の包括的治療プロトコルの展望。(シンポジウム)第71回日本臨床眼科学会。2017年10月12-15日。東京国際フォーラム、JPタワーホール&カンファレンス
2. 金子 優、村上敬憲、西塚弘一、鈴木俊紀、大江倫太郎、山川光徳、山下英俊:硝子体生検における液状化検体細胞診(LBC法)の有用性。第71回日本臨床眼科学会。2017年10月12-15日。東京国際フォーラム、JPタワーホール&カンファレンス
3. 阿部さち、後藤早紀子、西勝弘、松下高幸、西塚弘一、山本禎子、山下英俊:糖尿病黄斑浮腫に対するジフルプレドナート点眼治療の長期結果。第121回日本眼科学会総会2017年4月6-9日。

- 東京国際フォーラム
4. 西塚弘一、西勝弘、武田祐介、阿部さち、難波広幸、桐井枝里子、村上敬憲、松下高幸、金子優、山下英俊：術中 OCT による周辺部網膜硝子体の局所解剖と網膜剥離の病態。第 121 回日本眼科学会総会 2017 年 4 月 6-9 日。東京国際フォーラム
 5. 西塚弘一、西勝弘、武田祐介、阿部さち、難波広幸、桐井枝里子、村上敬憲、松下高幸、金子優、山下英俊：増殖糖尿病網膜症手術加療時の増殖膜処理における術中 OCT の有用性の検討。第 70 回日本臨床眼科学会。2016 年 11 月 3 - 11 月 6 日。京都国際会議場
 6. Abe S, Goto S, Nishi K, Yamamoto T, Yamashita H: Effects of second-line intravitreal anti-VEGF therapy for refractory diabetic macular edema. 89th The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Seattle, USA; May 1-5, 2016.
 7. 669. Nishituka K, Nishi K, Kaneko Y, Namba H, Yamashita H: Quantification of residual vitreous after vitreous shaving during vitrectomy using intraoperative optical coherence tomography. 89th The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Seattle, USA; May 1-5, 2016.
 8. 阿部さち、後藤早紀子、松下高幸、西勝弘、山下英俊：糖尿病黄斑浮腫に対するステロイドレスポンダーテストを基準とした薬物治療選択。第 120 回日本眼科学会総会 2016 年 4 月 7-10 日。仙台市仙台国際センター、東北大学百周年記念会館
 9. 西塚弘一、西勝弘、武田祐介、阿部さち、桐井枝里子、難波広幸、菅野彰、赤羽梢、村上敬憲、松下高幸、金子優、山下英俊：周辺部硝子体処理適正化のための術中 OCT による周辺部硝子体の定量の試み。第 54 回日本網膜硝子体学会総会（東範行・国立成育医療研究センター眼科）第 32 回日本眼循環学会（大路正人滋賀医大眼科教授）合同学会。2015 年 12 月 4 - 12 月 6 日。（東京国際フォーラム）
 10. 西塚弘一、成味真梨、菅野彰、金子優、鈴木俊紀、山川光徳、山下英俊：硝子体細胞新の臨床的意義。第 69 回日本臨床眼科学会。2015 年 10 月 22 - 10 月 25 日。名古屋国際会議場・ANA クラウンプラザホテルグランコート名古屋

11. 成味真梨、難波広幸、山下英俊：糖負荷下、DC 共培養系におけるブタ硝子体由来細胞のヒアルロンタン産生制御。第 119 回日本眼科学会総会 2015 年 4 月 16-19 日。札幌市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 英俊 (YAMASHITA, Hidetoshi)
 山形大学・医学部・教授
 研究者番号：90158163

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

阿部 さち (ABE, Sachi)
 山形大学・医学部・助教
 研究者番号：90550658

(4) 研究協力者

後藤 早紀子 (GOTO, Sakiko)

成味 真梨 (NARUMI, Mari)