

令和元年6月6日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16962

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症の発症と進行において酸化ストレスと最終糖化産物が及ぼす病態の解析

研究課題名(英文) Oxidative Stress and Advanced Glycation End Products in the Diabetic Retinopathy

研究代表者

鳥山 佑一 (Toriyama, Yuichi)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：90757759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：水晶体自発蛍光値(以下Lens-FR)と前房水酸化還元電位(以下ORP)は、いずれも糖尿病群が対照群に比べ有意に高値であり、網膜症の重症度においても統計学的に有意な相関を認めた。Lens-FRと前房水ORPの間には有意な相関は認めなかった。前房水VEGF濃度は糖尿病網膜症の重症度と強い相関を認め、前房水ORPとVEGF濃度との間にも強い相関関係を認めたが、Lens-FRとVEGF濃度との間には有意な相関は認めなかった。眼内酸化ストレスを反映する前房水ORPおよび終末糖化産物の蓄積を反映する水晶体自発蛍光値は、それぞれ独立した糖尿病罹病期間と網膜症の活動性を評価する指標となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症の発症に終末糖化産物の蓄積と酸化ストレスは重要な要因となる。本研究は終末糖化産物蓄積を反映する水晶体自発蛍光値を非侵襲的な方法で測定し、眼内の酸化ストレス状況を反映する前房水酸化還元電位を低侵襲かつ短時間で測定した。いずれも糖尿病網膜症の発症と進行に従って上昇し、水晶体自発蛍光値は糖尿病の罹病期間の推測に、酸化還元電位は糖尿病網膜症の活動性にそれぞれ有用な指標となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Both the Lens-FR and aqueous ORP showed significantly higher in the diabetic group than in the non diabetic group. Both the lens-FR and aqueous ORP were significantly correlated with the severity of diabetic retinopathy. There was no significant correlation between the lens FR and the aqueous ORP. There was a strong correlation between the concentration of aqueous VEGF and the severity of diabetic retinopathy. Although the strong correlation was found between the aqueous ORP and the concentration of VEGF, there was no significant correlation between the Lens-FR and aqueous VEGF. In conclusion, we could evaluate in vivo accumulation of AGE and intraocular oxidative stress with minimally invasion. Lens FR and aqueous ORP may serve as new independent indicators for the evaluation of diabetes duration and the severity of diabetic retinopathy.

研究分野：糖尿病網膜症

キーワード：糖尿病網膜症 酸化ストレス 終末糖化産物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は、持続する高血糖により細小血管の閉塞と血液網膜柵の破綻による漏出を病態とする進行性の糖尿病合併症である。高血糖の是正により改善が得られるのは単純網膜症までであり、進行により黄斑浮腫や網膜剥離、血管新生緑内障を引き起こし、不可逆的な視機能障害をきたす。主たる治療は抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 薬や網膜光凝固術、硝子体手術など網膜症の病態変化に対する対症的な治療であり、その治療法の確立のためには、糖尿病網膜症の発症と進行の病態解明が必須となる。高血糖による細小血管合併症の発生機序には未だ不明な部分が多く、この機序解明は新たな合併症治療の開発につながる事が期待される。網膜症の進行には、終末糖化産物 (AGEs) の蓄積や、細胞内の酸化還元状態の変化と酸化ストレス亢進、ポリオール代謝経路の亢進、プロテインキナーゼ C の活性化などが相互に絡み合い発症、進展すると考えられている。我々はこれまで AGEs の蓄積を反映する皮膚自発蛍光値および水晶体自発蛍光値を測定し、それぞれ糖尿病網膜症の進行との関連性を明らかにしてきた。また糖尿病の分子機構において、酸化ストレスは代謝異常のさらに上流に位置しているとの報告もされており、酸化ストレスとその他の代謝異常との関連解明は、糖尿病網膜症の発症と進行の解明において重要な意味をもつ。生体において酸化ストレスが亢進すると組織の酸化還元電位が高値となることを利用し、我々は、高血糖を呈する糖尿病モデルマウスである Aki ta マウスと網膜において VEGF を過剰産生し糖尿病網膜症に類似した網膜血管障害を呈する Kimba マウスの眼組織および前房水を用いて、眼内の酸化還元電位を測定したところ、野生型マウスに比べ両マウスとも有意に酸化還元電位が高値を示し、酸化ストレスが亢進していることを発見した。

### 2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、本研究では糖尿病症例における眼内の AGEs の蓄積と酸化還元状態を測定、さらに眼内の炎症性サイトカインや VEGF を網羅的に定量し、網膜症の病態の進行と各々の関連や相互関係を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 内眼手術症例における糖尿病群と非糖尿病群間の水晶体自発蛍光値と酸化還元電位および抗酸化力の測定

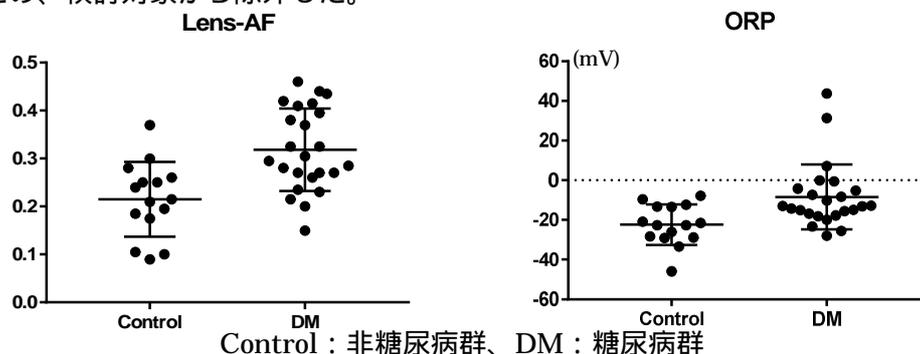
本学倫理委員会の承認を得たうえで、事前に本研究について十分な説明を行い、インフォームドコンセントが得られた内眼手術予定患者 39 例 39 眼を対象とした。眼内酸化ストレスや AGEs 蓄積に影響があると考えられる、ぶどう膜炎の既往や内眼手術歴がある症例、化学療法の治療歴がある症例、血液透析中の症例などは対象から除外した。非糖尿病症例 15 例は男性 6 例女性 9 例で平均年齢は  $74.1 \pm 6.6$  歳、糖尿病症例 24 例は男性 17 例女性 7 例で平均年齢は  $64.3 \pm 12.8$  歳であった。対象は全て有水晶体眼であり、術前に水晶体自発蛍光値を測定した。非糖尿病群の術式は白内障手術が 14 例、白内障手術と硝子体手術の併施が 10 例、糖尿病群は白内障手術が 12 例、白内障および硝子体手術併施が 3 例、いずれも手術開始時に前房水を採取し、採取後速やかに酸化還元電位と抗酸化力を測定した。残存の前房水は速やかに -80 で保存した。

(2) 前房水 VEGF 濃度およびサイトカイン濃度の測定

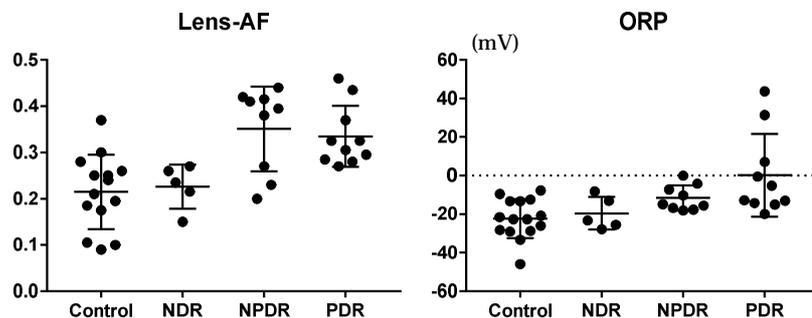
残存前房水を用いてマルチプレックスアッセイを行い、前房水 VEGF 濃度と炎症性サイトカイン濃度を測定した。それぞれ水晶体自発蛍光値、酸化還元電位およびこれらのサイトカイン濃度との相関、糖尿病群と非糖尿病群の群間差、糖尿病網膜症の重症度との関連について解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 水晶体自発蛍光値 (以下 Lens-AF) と前房水酸化還元電位 (以下 ORP) は、いずれも糖尿病群が対照群に比べ有意に高値を示した。なお前房水には血清などに比べ抗酸化物質が非常に豊富に存在しており、本研究で測定した前房水抗酸化力の測定値は、糖尿病群・非糖尿病群いずれにおいてもほぼ全例で測定可能域の最大値を振り切る結果となったため、検討対象から除外した。

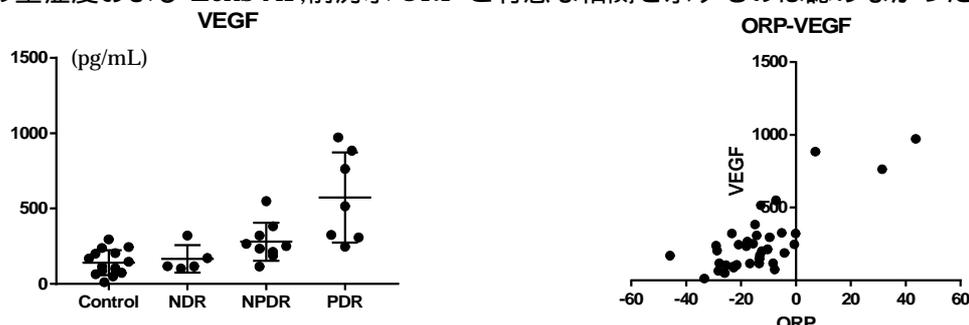


(2) Lens-AF, 前房水 ORP はいずれも糖尿病網膜症の病期が重症になるにつれ高値を示し、統計学的に有意な相関を示した。Lens-AF と前房水 ORP との間には有意な相関は認めなかった。



R=0.62, P<0.001                      R=0.57, P<0.001 (Spearman の順位相関係数)  
NDR：網膜症なし、NPDR：非増殖糖尿病網膜症、PDR：増殖糖尿病網膜症

(3) 前房水 VEGF 濃度は糖尿病網膜症の重症度と強い相関を認め、前房水 ORP と VEGF 濃度との間にも強い相関関係を認めたが、Lens-AF と VEGF 濃度との間には有意な相関は認めなかった。本研究で測定した VEGF 以外のサイトカインにおいては、糖尿病網膜症の重症度および Lens-AF, 前房水 ORP と有意な相関を示すものは認めなかった。



R=0.72, P<0.001 (Spearman の順位相関係数)      R=0.78, P<0.001 (Pearson の相関係数)

眼内酸化ストレスを反映する前房水 ORP および終末糖化産物の蓄積を反映する水晶体自発蛍光値は、いずれも糖尿病群で高値を示し、糖尿病網膜症が重症になるにつれて高値となったが、それぞれの値に相関は認めなかった。VEGF は糖尿病網膜症の発症と進行に関わる最も代表的な成長因子であり、本研究でも網膜症の重症度と前房水 VEGF 濃度には強い相関を認めた。VEGF 濃度と ORP の間にも強い相関を認めたことから、眼内の酸化ストレス状態は VEGF と同様に測定時点での糖尿病網膜症の活動性により強く影響を受けていると考えられた。一方で、AGEs の蓄積を反映した Lens-AF は網膜症の重症度とは相関を示したが、VEGF 濃度とも ORP と相関を示さなかった。AGEs の蓄積は不可逆的な変化であり、それを反映した Lens-AF も測定時の網膜症の活動性ではなく高血糖に暴露された期間の長さによって上昇していくものと考えられる。

これらの研究結果から、前房水の酸化還元電位は VEGF 濃度の測定よりも簡便かつ短時間で評価可能な糖尿病網膜症の活動性の指標としての有用性が示唆され、水晶体自発蛍光値は、病歴聴取や随時血糖、HbA1c などからは推定が難しい、より正確な糖尿病罹病期間の評価が非侵襲的に行える可能性が示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Hirano T, Kitahara J, Toriyama Y, Kasamatsu H, Murata T, Sadda S. Quantifying vascular density and morphology using different swept-source optical coherence tomography angiographic scan patterns in diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol. 2019 Feb;103(2):216-221. 査読有
2. Hirano T, Toriyama Y, Iesato Y, Ishibazawa A, Sugimoto M, Takamura Y, Nagaoka T, Murata T. Effect of Leaking Foveal Microaneurysms on the Treatment of Center-Involving Diabetic Macular Edema: A Pilot Study. Ophthalmic Res. 2019;61(1):10-18. 査読有

3. Hirano T, Kakihara S, Toriyama Y, Nittala MG, Murata T, Sadda S: Wide-field en face swept-source optical coherence tomography angiography using extended field imaging in diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol. 102(9):1199-1203. 2018 査読有
4. Hirano T, Toriyama Y, Iesato Y, Imai A, Murata T.  
CHANGES IN PLASMA VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR  
LEVEL AFTER INTRAVITREAL INJECTION OF BEVACIZUMAB,  
AFLIBERCEPT, OR RANIBIZUMAB FOR DIABETIC MACULAR EDEMA.  
Retina. 38 ( 9 ) :1801-1808. 2018 査読有
5. Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Hirabayashi K, Sakurai T, Kamiyoshi A,  
Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Liu T, Xian X, Zhai L, Dai K, Tanimura  
K, Liu T, Cui N, Yamauchi A, Murata T, Shindo T: Adrenomedullin Suppresses  
Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Vascular Hyperpermeability and  
Inflammation in Retinopathy. Am J Pathol. 187(5):999-1015. 2017 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. Yuichi Toriyama, Takao Hirano, Yorishige Matsuda, Masumi Wakabayashi, Akira Imai, Toshinori Murata. Intraocular Oxidative Stress and Accumulation of Advanced Glycation End Products in Diabetic Eyes. The 34th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology. Bangkok. 2019/3/6-9
2. 鳥山佑一. 抗 VEGF 治療との併用療法が有効な糖尿病黄斑浮腫症例 シンポジウム 1 抗 VEGF と併用療法. 第 35 回日本眼循環学会 2018 年 7 月 松本. 2018/7/20-21
3. 鳥山佑一、平野隆雄、松田順繁、若林真澄、時光元温、村田敏規. 糖尿病黄斑浮腫における前房水サイトカイン濃度と抗 VEGF 注射回数との関連の検討. 第 122 回日本眼科学会総会. 大阪. 2018/4/19-22
4. 鳥山佑一、平野隆雄、松田順繁、若林真澄、時光元温、村田敏規. 糖尿病黄斑浮腫における抗 VEGF 注射前後の網膜形態と治療回数との関連の検討. 第 23 回日本糖尿病眼学会総会. 東京. 2017/10/27-29
5. 鳥山佑一、平野隆雄、若林真澄、松田順繁、時光元温、村田敏規. 当院における糖尿病網膜症に対する汎網膜光凝固術後の中心窩網膜厚変化の検討. 第 71 回日本臨床眼科学会. 東京. 2017/10/12-15
6. 鳥山佑一、平野隆雄、若林真澄、村田敏規. 糖尿病網膜症における網膜感度と網膜厚および網膜循環との関連. 第 34 回日本眼循環学会. 大阪. 2017/7/22-23

〔図書〕(計2件)

1. 鳥山佑一. マルチモーダルイメージング 糖尿病網膜症. RETINA Medicine. 先端医学社. 8(31-36), 2019
2. 鳥山佑一. 進化する OCT 活用術 糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症、網膜動脈閉塞症. OCULISTA. 全日本病院出版会. 60(34-43), 2018

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。