

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月 2日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ~2011

課題番号：21592215

研究課題名 (和文) 硝子体細胞—血管細胞連関による網膜血管環境安定化機構と糖尿病網膜症
治療法開発研究課題名 (英文) New strategy to treat diabetic retinopathy using stabilization of
hyalocyte-vascular endothelial cell correlation

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

研究成果の概要(和文): 網膜血管の状態を保護、安定化、または病態の悪循環による悪化を促進しうるシステムとして、網膜血管内皮—硝子体細胞連関について分子レベルで明らかにし、その破綻した病的状態としての糖尿病網膜症の病態を分子レベルで検討し治療薬開発の新しい分子ターゲットを明らかにする。また、薬物治療開発推進ため治療薬開発段階で薬物の有効性、安全性を検討するスクリーニングシステムの開発を目指す。網膜血管内皮細胞と硝子体由来細胞の共培養系を樹立した。この共培養系にIL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VEGFを作用させ、さらに抗VEGF抗体、ステロイド薬を作用させた。各サイトカインのうちTNF α を除くサイトカインで血管内皮細胞は増殖が促進され、VEGFの効果のみが抗VEGF抗体で抑制された。ステロイド薬は上記のサイトカインのうち、TNF α を除くサイトカインの作用を抑制した。これらの血管内皮細胞への直接作用は硝子体由来細胞の共培養により減弱され、生体内での薬物動態は生体内での検討が重要とかがえられた。

抗炎症作用が糖尿病黄斑浮腫(DME)治療薬として有効か調べた。以上の所見をもとに糖尿病全身コントロールに抵触しない新しいステロイド点眼薬の difluprednate ophthalmic emulsion 0.05%をDMEに対する治療として検討した。本剤は emulsion であるため、後眼部へ移行しやすい特徴をもつ。点眼薬という投与法のメリットとして、非観血的治療であり安全である。軽症のDMEや汎網膜光凝固中にDMEが発症した症例も適応となり、網膜厚の有意な減少が認められた。また、硝子体手術後に残存する重症のDMEに対して硝子体内注射は薬物クリアランスの点から有効性が低いと考えられるが、点眼治療は網膜厚が有意に減少した。

研究成果の概要(英文):

Ocular angiogenesis is regulated by polypeptides including cytokines, which are known to affect vascular endothelial cells. We have investigated that hyalocytes interact with vascular endothelial cells, and some cytokines affect these interactions. To determine the effect of various chemically active agents on the viability of endothelial cells alone and cocultured with hyalocytes. The viability of human retinal endothelial cells (HRECs) was determined after exposure to IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α and VEGF using the MTT assay. These results were compared to the viability when the HRECs were cocultured

with porcine hyalocytes that had been exposed to different types of cytokines. The effects of bevacizumab, fenofibrate and dexamethasone on the viability of HRECs in coculture with hyalocytes were also assessed. Ten micrograms / millilitre of bevacizumab decreased the percentage of living HRECs stimulated by VEGF without hyalocytes, but with the hyalocytes, 100 μ g / ml of bevacizumab was required to decrease the percentage of viable HRECs stimulated by VEGF. Dexamethasone at 50 μ g / ml, decreased the viability of HRECs stimulated by IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and VEGF without hyalocytes but could not decrease the viability of HRECs cocultured. Coculturing HRECs with vitreous-derived hyalocytes depressed the effects of cytokines, bevacizumab, fenofibrate and dexamethasone. This suggests that the vitreal hyalocytes may play a role in pathogenic endothelial cell proliferation in vivo. In addition, inflammatory processes play important roles in diabetic retinopathy and maculopathy involving hyalocytes and endothelial cells.

Upon the above results, we examined the effects of steroid eye drops to treat diabetic maculopathy. We evaluated the efficacy of treatment refractory diabetic macular edema (DME) after vitrectomy with difluprednate ophthalmic emulsion 0.05% (Durezol®). This study enrolled patients with refractory diabetic macular edema in our clinic. In all subjects, more than 3 months had passed since any prior treatments. The subject eyes were treated with Durezol® 4 times daily for the first month, and then twice daily for 2 months (eye drop group). The mean retinal thickness was improved significantly. Instillation of difluprednate ophthalmic emulsion 0.05% is a safe and effective treatment modality that does not require surgical intervention and does not produce severe side effects.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・眼科学

キーワード:(1)糖尿病黄斑浮腫 (2)網膜内境界膜 (3)硝子体細胞
 (4)グリア細胞 (5)網膜-硝子体界面 (6)血管内皮細胞
 (7)ステロイド (8)点眼薬治療

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は平成19年度の厚生労働省の調査によると日本に約890万人の患者がいると推定され

ており、前回の平成14年度の740万人から急速に増加しつつある。さらに毎年約3000名の患者が視力障害者に認定されると推定されており、

これは後天失明の原因の第二位で約 5 分の 1 をしめる。これまでの病態研究および治療法の進歩により、血糖、血圧など全身因子のコントロール、網膜光凝固、硝子体手術を行うことが適切にできれば糖尿病の血管病変をかなりコントロールして失明は数%に抑えることができるようになってきている。これからは視力をより高く保つ Quality of vision (QOL)向上をめざし、さらに進んだ治療戦略、即ち、失明防止でなく、より高い生涯視力を保証するシステムがつよく求められている。40才台で糖尿病に罹患する人が増加しつつある現在、糖尿病網膜症による視力低下を防ぐことは生涯の視力を保存するためだけでなく、仕事を続けて生き甲斐のある豊かな生活ができることにつながる。この目的のためには糖尿病網膜症の早期発見、早期治療について眼科独自の治療法を確立する必要がある。これまでに糖尿病網膜症の病態研究は、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、血管閉塞にともなう網膜虚血と細胞反応、血管内皮増殖因子(VEGF)の誘導と血管病態などが明らかになってきた。これに対する網膜光凝固、硝子体手術などの発達は失明を防ぐ治療として定着している。しかし、今後、高い視力予後を得るための新しい発想での薬物治療、新技術に基づく硝子体手術の成績向上の開発が望まれている。糖尿病網膜症の初期段階から後期にもいたる病態の中で中心的な役割を果たしているVEGF、炎症性サイトカインを中心とした種々のサイトカインの作用を制御する治療法が考案され、臨床応用に向けた試みが始まっている。しかし、抗VEGF薬、ステロイド薬を外科的に眼局所に注入する治療法以外は現時点では実用化されておらず、糖尿病網膜症の病態にもとづく薬物治療開発は *in vitro* の実験結果と *in vivo* での効果、さらには臨床的な効果におおきなギャップがある。我々はこれまで網膜血管内皮細胞—硝子体細胞

共培養系を用いた研究によると、それぞれの細胞の単培養系よりサイトカインの作用が共培養系では強くなる半面、単培養系では治療薬のステロイド、抗VEGF薬などの病態抑制効果がみられたが、共培養系ではその効果が減弱する現象を発見した。いわば硝子体および硝子体細胞は網膜硝子体疾患の悪化を促進する場合と、眼内環境の変化を阻止して網膜、網膜血管を保護、安定化するバッファーとしての機能があることを示唆する。正常状態では網膜血管の保護的にはたらくこの現象が、疾病をもつ状態では病態を変化させて治療へと向かわせる治療薬の効果を生体内では減弱させて予期した効果が得られていない可能性も示唆された。

2. 研究の目的

網膜血管の状態を保護、安定化、または病態の悪循環による悪化を促進しうるシステムとして、網膜血管内皮—硝子体細胞連関について分子レベルで明らかにし、その破綻した病的状態としての糖尿病網膜症の病態を分子レベルで検討し治療薬開発の新しい分子ターゲットを明らかにする。また、薬物治療開発推進ため治療薬開発段階で薬物の有効性、安全性を検討するスクリーニングシステムの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞生物学的研究

ブタ由来硝子体細胞と血管内皮細胞とを共培養した系と血管内皮細胞のみの系に分け、サイトカイン(増殖因子)、薬剤を投与し72時間後に網膜血管内皮細胞の増殖変化を比較した。

サイトカイン(増殖因子)としてはIL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF α 、VEGFを用いた。濃度は10 μ g/mlとした。

(2) 糖尿病黄斑浮腫(DME)の臨床病態生理の検討

糖尿病黄斑浮腫の治療法としてステロイド治療薬の効果を検討するために、その病態を検討した。病態を明らかにする目的で網膜—硝子体

界面を3次元的に観察した。山形大学医学部附属病院眼科で治療をおこなったDME16例18眼。3次元観察は術前後にFD-OCTを用いて黄斑部断層像とセグメンテーション解析による観察を行った。硝子体手術では内境界膜(ILM)、黄斑上膜(ERM)を除去し、一部を病理組織学的に観察した。

(3) 糖尿病黄斑浮腫(DME)に対するステロイドによる治療効果検討

あらたに開発されたステロイド点眼治療の効果について検討した。対象は3か月間治療歴がなく点眼治療を行った25例36眼(男性11例19眼、女性14例17眼)で、1か月間は1日4回、以後2か月間は1日2回点眼し、3か月間で終了とした。長期経過をlogMAR視力、光干渉断層計による中心窩網膜厚について検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞生物学的研究

IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF α , VEGFの刺激により特にIL-1 β 、IL-6、VEGFの時に血管内皮細胞の増殖を強く認めました。共培養することにより更に増殖が亢進される結果となりました(Tojo N, Kashiwagi Y, Yamamoto S, Yamamoto T, Yamashita H: The in vitro response of human retinal endothelial cells to cytokines and other chemically-active agents is altered by co-culture with vitreous-derived hyalocytes. *Acta Ophthalmologica* 88(3): e66-72. Epub 2010 Mar 23 doi: 10.1111/j.1755-3768.2010.01879.x の Figure 1)。

以上の結果より、硝子体細胞—血管内皮細胞の共培養の系においては相互作用が示された。次にこの共培養系においてステロイドの効果について検討した。血管内皮細胞のみの場合は50 μ g/mlのデキサメタゾンにはIL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、VEGFにおける細胞増殖亢進作用を抑制

した。共培養の系ではステロイドの細胞増殖抑制作用が減少した。即ち、抑制には200 μ g/mlのデキサメタゾンを要した。(Tojo N, Kashiwagi Y, Yamamoto S, Yamamoto T, Yamashita H: The in vitro response of human retinal endothelial cells to cytokines and other chemically-active agents is altered by co-culture with vitreous-derived hyalocytes. *Acta Ophthalmologica* 88(3): e66-72. Epub 2010 Mar 23 doi: 10.1111/j.1755-3768.2010.01879.x の Figure 4 A)

(2) 糖尿病黄斑浮腫(DME)の臨床病態生理の検討

術前の網膜表面のOCT所見は3群に分類できた。I群:断層像では平滑で3次元観察で微細な趨壁(fine fold)を認めるもの8眼(44%)。II群:断層像で明らかに凹凸、ERMが検出されるもの7眼(39%)。III群:断層像、3次元観察で平滑なもの3眼(17%)。術後3か月で平均網膜厚減少率は1群35%、2群53%、3群50%だった。I群では術後fine foldが消失し組織学的にILM上に細胞附着像がみられた。II群ではERM、fine fold消失を認めILM剥離非施行例でfine foldは残存した。ILMへの細胞附着と硝子体皮質様組織がみられた。ILM上の細胞の起源に関しては、硝子体細胞、網膜グリアなどの可能性があり、その作用を細胞生物学的に検討する実験系をセットアップしつつある。III群の所見は変化しなかった。網膜表面の微細な趨壁をセグメンテーション解析による3次元観察で捉えられた。この結果から、DMEの病態として、細胞生物学的な検討から予測された炎症機転のみでなく、物理的な牽引という因子もDMEの病態として関連があることが示された。事項に示すステロイド薬の検討においてその効果の解釈に注意を要すると考えられた。

(3) 糖尿病黄斑浮腫(DME)に対するステロイドによる治療効果検討

平均 logMAR 視力は点眼開始時 0.55→終了時 0.53 (p=0.75)、平均中心窩網膜厚は点眼開始時 515.5 μ m、点眼→終了時 322.1 (p<0.01)であった。点眼終了時に有効であった眼の後 9眼が再発した。生命表法を用いた検討では 10か月後まで 40%で有効性が維持された。生体眼内での治療効果はステロイドが有効であることを明らかにした。

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 4件)

- ① 山下英俊、山本禎子、川崎良、佐藤浩章、佐藤さくら、斉藤公子、後藤早紀子、望月典子、田邊祐資、桐井枝里子、阿部さち、本間慶、嘉山孝正:糖尿病網膜症の治療戦略。臨床眼科 65:1027-10412011. 査読なし
- ② Tojo N, Kashiwagi Y, Yamamoto S, Yamamoto T, Yamashita H: The in vitro response of human retinal endothelial cells to cytokines and other chemically-active agents is altered by co-culture with vitreous-derived hyalocytes. Acta Ophthalmologica 査読有、88(3) : e66-72. Epub 2010 Mar 23 doi: 10.1111/j.1755-3768.2010.01879.x
- ③ Nakano S, Yamamoto T, Kirii E, Abe S, Yamashita H: Steroid eye drop treatment (difluprednate ophthalmic emulsion) is effective in reducing refractory diabetic macular edema. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 査読有、248(6): 805-10, 2010.
- ④ 阿部さち、山下英俊: 後天性網膜・硝子体疾患。あたらしい眼科 27:176-184、2010. 査読なし

[学会発表](計 4件)

- ① 柏木佳子、西塚弘一、山下英俊: ブタ硝子体細胞におけるIL-1刺激によるヒアルロン酸産生制御の検討。第116回日本眼科学会総会。2012年4月5日。東京 東京国際フォーラム。
- ② 後藤早紀子: シンポジウム「糖尿病黄斑浮腫の薬物治療-新たな可能性と問題点」ステロイド眼局所治療の展望。第65回日本臨床眼科学会総会(シンポジスト)。2011年10月8日。東京 東京国際フォーラム。
- ③ 後藤早紀子、山本禎子、桐井枝里子、阿部さち、山下英俊: 糖尿病黄斑浮腫に対するステロイド点眼治療の長期経過。第49回日本網膜硝子体学会。2010年11月26日~28日。大阪、大阪国際会議場。
- ④ 阿部さち、山本禎子、中野早紀子、桐井枝里子、柏木佳子、山下英俊: 糖尿病黄斑浮腫における網膜一硝子体界面病態の3次元画像観察。第113回日本眼科学会総会。2009年4月17日。東京 東京国際フォーラム。

[図書](計 1件)

- ① 阿部さち、山下英俊: 糖尿病最新の治療2010-2012。pp181-183、2009(南江堂)

[産業財産権]

○出願状況(計 1件)

名称: 黄斑浮腫治療用点眼剤

発明者: 山下英俊、中野早紀子、山本禎子他

権利者: 山形大学

種類: 特許

番号: 国内特許2009-165-924

出願年月日: 2010年7月14日

国内外の別: 国内

○取得状況(計◇件): なし

[その他]:なし

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

山本 禎子(YAMAMOTO TEIKO)

山形大学・医学部・准教授(現在:要町やまもと眼科医院長)

研究者番号:00297706

後藤 早紀子(旧姓中野)(GOTO SAKIKO)

山形大学・医学部眼科学・助教

研究者番号:40444038

柏木 佳子(KASHIWAGI YOSHIKO)

山形大学・医学部・客員助教(現在:山形県立米沢女子短期大学助手)

研究者番号:90375345

阿部 さち(ABE SCHI)

山形大学・医学部・医員

研究者番号:90550658