

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21592268
研究課題名（和文）	糖尿病網膜症の硝子体中コラーゲンに対する自己免疫反応と病態との関連
研究課題名（英文）	Autoimmune reaction for vitreous collagen in the pathogenesis of diabetic retinopathy
研究代表者	
	池田 恒彦 (Ikeda Tsunehiko)
	大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：	70222891

研究成果の概要（和文）：

硝子体の主要成分であるⅡ型コラーゲンに対する抗原抗体反応が糖尿病網膜症の病態に関係しているかを検討した。硝子体手術を施行した糖尿病網膜症 17 例と年齢・性別を一致させた非糖尿病患者 15 例及の血清および硝子体中の抗Ⅱ型コラーゲン IgG 抗体価を ELISA にて測定した。その結果、糖尿病網膜症患者の血清中抗Ⅱ型コラーゲン IgG 抗体価はコントロール群と比較して有意に高値を示した。抗Ⅱ型コラーゲン IgG 抗体価の測定が網膜症の病態把握に有用となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We investigated autoimmune reaction for vitreous type II collagen in the pathogenesis of diabetic retinopathy. We compared the levels of anti-type II collagen(II-C) IgG antibody in vitreous fluid and serum in 17 patients with diabetic retinopathy (DR) and 15 patients with non-inflammatory eye diseases, using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In patients with diabetic retinopathy, serum levels of anti-II-C IgG antibody were significantly higher than those of control subjects ($p < 0.05$). We conclude that serum levels of anti-II-C antibody might reflect the progression of DR. and measuring anti-II-C antibody levels is a useful means to assess prognosis of diabetic microangiopathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：眼免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症は糖尿病腎症、糖尿病神経障害と並ぶ糖尿病三大合併症の一つであり、日本の成人の失明原因の第一位となっている。網膜血管の基底膜、腎臓の糸球体基底膜およびメザンギウム基質の主要構成蛋白質はいずれもIV型コラーゲンであり、糖尿病網膜症や糖尿病腎症の進行により血中のIV型コラーゲンおよびIV型コラーゲンに対するIgG抗体が増加する事が報告されている。

(2) 硝子体の主要構成蛋白質はII型コラーゲンであるが、健常者では blood-retinal barrier によりII型コラーゲンが血液中に暴露される事はない。これと同様に、関節軟骨は関節内に存在する無血管組織で、主な構成蛋白質はII型コラーゲンである。関節リウマチ (rheumatoid arthritis ; 以下 RA) は原因不明の慢性炎症性疾患であるが、その発症と進展には関節構成体に過剰産生される組織傷害性因子が関与していると考えられている。RA患者の血清中ではIgGクラスの抗II型コラーゲン抗体価は健常者と比較し有意に高値を示し、RAの初期では関節軟骨で産生されるII型コラーゲンに対する抗原抗体反応が起こり関節軟骨の破壊が起こると考えられている。

(3) Balashobaらは糖尿病網膜症患者では全ての病期において血清及び涙液中の抗II型及びIV型コラーゲン抗体が陽性である事を示した (Vestn Oftalmol 2000)。これらの事実より、我々は糖尿病網膜症において、blood-retinal barrier が破綻すると硝子体中のII型コラーゲンが血液に暴露され隔絶抗原として働き抗原抗体反応が惹起されそこで生じる炎症反応が網膜症の進行に関与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 上記の観点から、糖尿病網膜症患者の血液中及び硝子体中に含まれる抗II型コラーゲン抗体価と網膜症の病状に相関がみられる可能性があると考えた。そこで、今回我々は糖尿病網膜症患者群と非糖尿病群の血清中抗II型コラーゲン IgG 抗体価を比較し相関が認められるかを検討した。

(2) また、網膜局所の抗II型コラーゲン IgG 抗体価を測定する目的でストレプトゾシン (以下 STZ) 投与ラットと citratre buffer を投与したラットをコントロール群としての網膜中の抗II型コラーゲン IgG 抗体価を薬剤投与後8週と16週で比較検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト血清中および硝子体中抗II型コラーゲン IgG 抗体価の検出

本学倫理委員会の承諾を得たうえで、平成17年8月から平成20年8月の期間中に当科外来を受診した患者で本研究についての説明を行い同意を得られた症例のうち、手術に至った糖尿病網膜症17例(増殖糖尿病網膜症12例、糖尿病黄斑浮腫5例)および、年齢・性別を一致させた非糖尿病患者15例(網膜剥離症例9例及び白内障症例7例)をコントロールとした。各群の年齢と男女比は男性11例、女性6例で平均55.8歳±9.1歳、コントロール群は男性11例、女性5例で平均59.4歳±21.0歳であった。前述のとおりRAの罹患により抗II型コラーゲン抗体価の上昇が認められる事から、事前に問診を行い関節リウマチの罹患のある患者と血液検査にてリウマトイド因子陽性となった患者は対象から除外した。また、糖尿病網膜症群17例のうち15例15眼、コントロール群の網膜剥離群5例5眼は硝子体手術施行時に硝子体を採取した。採取された血液は遠心分離の後血清

のみを採取し 20 倍希釈し、硝子体試料はコ
ラゲナーゼ溶液及びヒアルロニダーゼ溶液
を用いて処理した後 20 倍希釈した後 -80°C
で保存した。

(2) 糖尿病ラットにおける網膜内抗 II 型コ
ラーゲン IgG 抗体価の測定

1) 実験動物

9 週齢のロングエバンスラットを 6 匹ずつ 4
群に分類し、グループ 1 : citrate buffer 投与
後 8 週で屠殺、グループ 2 : STZ 投与後 8 週
で屠殺、グループ 3 : citrate buffer 投与後
16 週で屠殺、グループ 4 : STZ 投与後 16 週
で屠殺とした。

2) 薬剤投与

実験開始 24 時間前から絶食とし水分摂取
のみとした。グループ 2, 4 には体重 1kg
あたり 50mg のストレプトゾシンを 腹腔内
注射し、グループ 1, 3 には同量の citrate
buffer を同様の方法で投与した。注射後 24
時間は糖尿病化を促すため固形の餌は与え
ず 20%TZ のみを与えた。

3) 薬剤 24 時間後全ラットで血糖値測定

STZ 投与群においては BS が 300mg/dl
を超えないものは糖尿病化が不十分と判断
し再度同量の STZ を腹腔内注射した。血糖値
が 300mg/dl を超えるまでこの処置を繰り返
し施行した。

4) 血液及び網膜の採取

薬剤投与後 8 週または 16 週で血圧および
体重測定後、エーテル麻酔下で心房採血を施
行し脱血の後屠殺、両眼の網膜を採取した。
血液は血糖値及び電解質量を測定し、遠心分
離にて血清のみを採取し、網膜は生理食塩水
で洗浄後 -80°C で凍結保存とした。

(3) 血清・硝子体抗体価の測定

血清抗体価の測定は Chondrex 社のヒト抗 II
型コラーゲン抗体 IgG 測定キットを用いて
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

(ELISA) 法により行った。96 ウェルの
ELISA プレートを購入し、プレート洗浄し、非特異反
応を抑制するためブロッキング液を 100mL
ずつ全てのウェルに加え、室温で 1 時間イン
キュベートした。プレートを洗浄後、血清試
料およびスタンダード抗体を各ウェルに加
え室温で一晩インキュベートした。プレートを
洗浄後、その希釈 2 次抗体液 100mL を全
てのウェルに加え、室温で 2 時間インキュベ
ートした。洗浄後、ストレプトアビジン-ペ
ルオキシダーゼをストレプトアビジン-ペ
ルオキシダーゼ希釈液で溶解し、その 100mL
を全てのウェルに添加し、室温で 1 時間イン
キュベートした。プレートを洗浄後、
O-phenylenediamine dihydrochloride
(OPD) 溶液を各ウェルに加え 30 分間イン
キュベートした。50 μl の 2N 硫酸 (反応停
止液) を全ての well に加え 490nm の吸光度
を測定した。

(4) 網膜中抗体価の測定

1) プロテアーゼインヒビターを含む C L B
buffer 500 μl に対し網膜 1 個を漬けてグラ
スホモジナイザーを用いて氷上で 10 分間ホ
モジナイズし 40000 回転 30 分 (4°C) の遠心
分離後上澄みのみを採取した。上澄み液を
Chondrex 社のラット抗 II 型コラーゲン抗体
IgG 測定キットを使用して血清・硝子体中抗
体価測定と同様の方法で測定した。

(5) 網膜試料に含まれる蛋白質量の測定
各サンプルに含まれる網膜の量には差があ
り、サンプル間で抗体価の誤差が生じるため
其々のサンプルに含まれる蛋白量を測定し、
蛋白濃度により抗体価を補正した。
方法としては、全てのホモジナイズ後の網膜
上澄み液を其々 5 倍、10 倍に希釈し、
1ml エッペンドルフチューブに各希釈後のサ
ンプル及びスタンダードをそれぞれ 15 μl と
Working Reagent 300 μl 入れ 37°C で 30 分間

反応させる。PIERCE 社 BCA Protein Assay Reagent Kit の各ウェルに反応させた溶液をそれぞれ 100 μ l ずつ入れ 562nm の吸光度を測定し蛋白量を定量する。

4. 研究成果

(1) 血清中の抗 II 型コラーゲン IgG 抗体価
糖尿病網膜症群で 56.772 \pm 33.79units/ml、
コントロール群では 30.528 \pm 3.422units/ml
と糖尿病網膜症群で有意に高値を示した (p
=0.0129;Mann-Whitney U 検定)。(図 1)

(2) 硝子体中抗 II 型コラーゲン IgG 抗体価
硝子体中の抗 II 型コラーゲン IgG 抗体価は
増殖糖尿病網膜症の 1 例を除く全例で測定感
度以下であった。測定可能であった症例の抗
体価は 1.17~6.17 (units/ml) であった。ま
た、この症例の術前眼底検査では後部硝子体
は未剥離で硝子体出血と周辺部まで広範囲
に牽引性増殖膜が認められたが、他の症例で
も同様の所見を認めるものもありこの症例
のみに特徴的な所見は特に認められなかつ
た。

(3) ラットの身体的変化

各グループの屠殺時の血圧・脈拍数に有意差
は認められなかった。また、血液中電解質の
値にも各グループで有意差は認められなかつ
た。屠殺時の血糖値の平均はグループ 1 で
174+27.2mg/dl, グループ 2 が
419+83.7mg/dl, グループ 3 で
177+43.6mg/dl, グループ 4 で
507+15.8mg/dl と STZ を投与したグループ
で有意に高値を示した。(p < 0.001) (図 2)
薬剤投与時から屠殺時までの体重変化を比
較すると、薬剤投与後 8 週で屠殺したグルー
プ 1 と 2 ではグループ 1 が 164.5 \pm 16.8 g の
増加を示したの対しグループ 2 では 44.3 \pm
24.6 g の増加にとどまり有意に低い値を示し
た。

また、薬剤投与後 16 週で屠殺したグループ

3 と 4 ではグループ 3 が 235.4 \pm 167 g の増
加を認めていたのに対し、グループ 4 では
-8.2 \pm 43.9 g と体重の減少がみられ有意に低
値であった。(p < 0.001) (図 3)

(4) ラット網膜中の抗 II 型コラーゲン IgG
抗体価

グループ 1 で 47units/g, グループ 2 で
49.6units/g, グループ 3 で 46.3units/g, グル
ープ 4 で 47.3units/g と各グループで有意差
は認められなかった。

(5) 考按

今回の研究では糖尿病網膜症患者の血清
中抗 II 型コラーゲン IgG 抗体価はコントロ
ール群と比較して有意に高値を示した。この
事から糖尿病網膜症患者の体内では RA 患者
と同様に何らかの自己免疫反応が生じてい
る可能性が示唆された。

但し、眼内局所での抗原抗体反応を検出す
る目的で行った硝子体中の抗 II 型コラーゲ
ン IgG 抗体測定は糖尿病網膜症群の 1 例を除
き両群共に測定感度以下であった。硝子体中
の抗体価がほとんどの症例で陰性であった
理由として、ELISA 測定の際にサンプルの粘
性を解除する為にコラゲナーゼおよびヒア
ルロニダーゼ処理し 20 倍希釈する必要があ
ったため感度が低下した可能性がある。

また、糖尿病網膜症ではしばしば硝子体出
血が認められるため、抗体価が測定可能であ
ったとしてもその抗体が硝子体内で局所的
に産生されたものであるのか、血液由来の抗
体が硝子体出血に伴って硝子対中に流入し
てきたものであるのかは今後検討が必要で
あると考えられた。

STZ ラットの網膜では、STZ 投与後 1 週間
後から糖尿病網膜症の悪化に関与するとさ
れる Vascular endothelial growth factor
(VEGF) および Intercellular adhesion
molecule-1 (ICAM-1) などの分子生物学的

因子の発現の上昇や網膜血管内への白血球の吸着 (Retinal leukostasis) が亢進することが知られている。さらに、これらのメディエーターが網膜血管内皮細胞を障害することで blood- retinal barrier が破綻する。

今回の実験では、ラット屠殺時に血糖値を測定しており STZ 投与群の全例糖尿病の導入を確認している。STZ ラットの網膜において、糖尿病性変化は糖尿病導入早期から生じていたと考えられる。しかしながら、糖尿病導入後 8 週および 16 週でも抗 II 型コラーゲン IgG 抗体価に有意差を認めなかった。

また、虚血状態においてラットの脳の星状膠細胞では matrix metalloproteinase (MMP)-13 の産生が高まるとされており、糖尿病網膜症患者や STZ ラットの眼内も虚血状態が持続していたと考えられるため、今回の実験で糖尿病網膜症および STZ ラットの網膜内で MMP-13 が産生され MMP-13 の主な作用である II 型コラーゲンの変性が生じた可能性があると考えられた。

今回の研究では、糖尿病網膜症患者はすべて手術に至った糖尿病の比較的進行している症例を対象としたが、今後は病期と抗 II 型コラーゲン抗体価にどのような相関が見られるかを検討し糖尿病網膜症進行のパラメータとして用いることが出来るかさらなる研究が必要だと考えられる。また、眼内局所の抗 II 型コラーゲン抗体産生を証明するためにさらなる検討が必要であると考えられる。

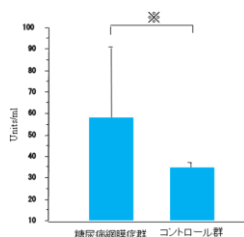


図 1

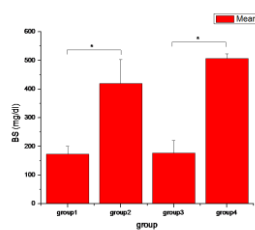


図 2

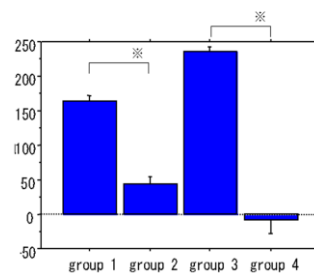


図 3

図 1 血清中の抗 II 型コラーゲン IgG 抗体価
糖尿病網膜症群で 56.772 ± 33.79 units/ml、
コントロール群では 30.528 ± 3.422 units/ml
と糖尿病網膜症群で有意に高値を示した。

(※ $p = 0.0129$: Mann-Whitney U 検定)

図 2 実験ラット屠殺時の血糖値の平均は
グループ 1 で 174 ± 27.2 mg/dl, グループ 2 が
 419 ± 83.7 mg/dl, グループ 3 で
 177 ± 43.6 mg/dl, グループ 4 で
 507 ± 15.8 mg/dl と STZ を投与したグループ
で有意に高値を示した。(t 検定 $p < 0.001$)

図 3 ラットの体重変化

グループ 1 : 164.5 ± 16.8 g、グループ 2 :
 44.3 ± 24.6 g、グループ 3 : 235.4 ± 167 g、
グループ 4 : -8.2 ± 43.9 g (t 検定 ※ $p < 0.001$)

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)

[学会発表] (計 1 件)

Atsuko Nakaizumi, Measurement of serum and vitreous concentrations of anti-type II collagen antibody in diabetic retinopathy, World Ophthalmology Congress 2012 (2012.2.19 Abu Dhabi, United Arab Emirates)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 恒彦 (Ikeda Tsunehiko)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：70222891

(2) 研究分担者

奥 英弘 (Oku Hidehiro)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90177163

杉山 哲也 (Sugiyama Tetsuya)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：20298764

石崎 英介 (Ishizaki Eisuke)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：70530434

(3) 連携研究者

高井 真司 (Takai Shinji)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80288703

林 哲也 (Hayashi Tetsuya)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30257852

(4) 研究協力者

中泉 敦子 (Nakaizumi Atsuko)
大阪医科大学・医学部・大学院生