

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592617

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症病態における炎症機転惹起の分子機構と治療戦略の確立

研究課題名(英文) Molecular pathogenesis and strategic approach of treatment for diabetic retinopathy

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症に合併する硝子体網膜疾患における炎症の分子メカニズムを明らかにするためにサイトカインネットワークと樹状細胞など炎症担当細胞の網膜病変形成の分子細胞生物学的に検討した。その結果、糖尿病網膜症を含め網膜硝子体疾患眼の硝子体内には炎症性の細胞、とくにマクロファージ、樹状細胞がみられ、病態に炎症メカニズムが関与することを示した。その結果、糖尿病網膜症の治療に抗炎症薬としてのステロイドの効果を示した。

研究成果の概要(英文)：The molecular pathogenesis of diabetic retinopathy was investigated based on the inflammatory processes. The inflammatory processes included the interaction among dendritic cells, vitreo-retinal cells and vascular cells, and the inflammatory processes were regulated by inflammatory cytokines including VEGF, TNF- and others. According to the results of this research, the effects of an anti-inflammatory agent, steroid, on diabetic retinopathy were investigated, and topical steroid treatment was shown to be effective to treat diabetic retinopathy clinically.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 炎症機転 樹状細胞 サイトカイン 共培養 硝子体由来細胞 ステロイド薬 臨床研究

## 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。しかし、T. Y. Wongらによるメタアナリシス (META=EYEStudy) によると、現在、世界中で糖尿病網膜症患者は約 1 億人、増殖糖尿病網膜症患者約 2000 万人、糖尿病黄斑浮腫約 2000 万人、視力障害をきたす網膜症 (Vision Threatening Retinopathy) は約 3000 万人に達するとかんがえられ、まさに文明病となりつつある。これからは視力をより高く保つ Quality of vision (QOV) 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。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。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。しかし、抗 VEGF 薬の効果は決定的ではない。これはほかに多くの種類のサイトカインが糖尿病網膜症とはじ

めとする増殖性硝子体網膜疾患に関与することが示されている研究によっても予想されることである。VEGF 以外では IL-8, IL-1、IL-1、TNF、MCP-1 など多くの炎症性サイトカインが関与することが明らかにされている。これらおおくの炎症性サイトカインが糖尿病網膜症、ぶどう膜炎、感染を始めとする多くの原因によって増殖性硝子体網膜疾患を引き起こし、病態を極めて複雑にしている。これら多くの炎症メカニズムを引き起こす一連の炎症のカスケードの起点を明らかにし、新しい発想での治療薬の開発が望まれている。炎症反応の起点としての樹状細胞の関与が角膜疾患などの疾患では多くの研究が先行している。我々のパイロット研究で、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っていること、マクロファージや樹状細胞様の抗原提示細胞の発現が確認された。本研究では、増殖性硝子体網膜疾患の分子メカニズムの解明のため、マクロファージや樹状細胞など抗原提示細胞の眼内組織における炎症反応への関与を分子細胞生物学的に検討する。

## 2. 研究の目的

糖尿病網膜症、感染、ぶどう膜炎に合併する増殖性硝子体網膜疾患における炎症性サイトカイン発現と網膜病変の分子細胞生物学的に明らかにし、治療薬開発の分子ターゲットとして多様な病態に共通する因子を発見するシステムを構築し、新しい発想で多くの疾患に共通して効果が期待できる治療薬開発を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では糖尿病網膜症、特に糖尿病黄斑浮腫 (DME) を中心に研究を進めた。糖尿病網膜症は、これまでの臨床的、分子細胞生物学的研究により、高血糖負荷 (in vitro 実験系

では高濃度グルコース負荷)によって眼内細胞が機能異常をおこして引き起こされる病態が解明されてきた。この情報をもとに、本研究では、多くの細胞のネットワークに対する炎症メカニズムの影響と治療ターゲットとしての炎症メカニズム制御について検討した。

#### (1) 細胞生物学的研究

研究システムの構築：ヒトの疾患治療への研究を行うための分子細胞生物学的研究を行うためにヒト硝子体由来の細胞培養系を確立する。

ヒト硝子体由来細胞の細胞生物学的検討：糖尿病網膜症の病態に関与しうる硝子体由来細胞の起源について細胞化学的手法を用いて硝子体内に存在する細胞ポピュレーションについて検討した。(ヒトサンプルの研究使用については山形大学医学部倫理委員会の承認を受けている。)

共培養系の確立：ブタ、ヒト由来の炎症機転制御樹状細胞(DC)、網膜血管内皮細胞、硝子体細胞、網膜神経膠細胞、角膜上皮細胞に培養系を上記と同様に確立する。眼内環境を *in vitro* で再現することを目指し、共培養系のシステムが構築した。

*in vitro* で再現した眼内環境モデル(共培養系)における炎症の細胞反応のカスケードと樹状細胞と硝子体内細胞制御の分析：*in vitro* の実験系で樹状細胞と他の眼細胞の細胞機能制御を高濃度糖負荷下で検討した。細胞機能としては遊走能、ヒアルロン産生能を検討した。

(2) 炎症性サイトカインと糖尿病網膜症病態制御系の検討：機能制御分子を用いて糖尿病網膜症病態への治療効果を検討した。

#### 4. 研究成果

糖尿病網膜症および糖尿病黄斑浮腫(DME)を中心に網膜硝子体疾患における炎症メカ

ニズムの関与とそれに対するステロイド点眼薬(ジフルプレドナート点眼薬)の治療効果を検討し、網膜硝子体疾患における炎症メカニズムについて検討した。

#### (1) 細胞生物学的な検討

##### 眼内細胞ポピュレーションの検討

26例 26眼の網膜硝子体疾患の硝子体手術時に採取した試料における炎症担当細胞を免疫組織化学的に観察した。細胞化学的にCD68 (macrophage marker)、DEC205 (汎樹状細胞マーカー)、RPE65 (retinal pigment cell marker)の発現を観察した。硝子体内細胞数は疾患活性度が低い症例群(Quiet group)より活性度が高い症例群(Active group)では細胞数が有意に多かった(10.9vs118.1)。26眼中8眼で硝子体に出現している細胞について細胞化学的に検討した。その結果 CD68 陽性 macrophage : Quiet group、Active group 両群でみられた。DEC205 (pan DC marker) 陽性細胞 : Active group でみられ、出血と関連がみられた。RPE65 陽性細胞 : 主に網膜剥離の合併症例でみられた。8眼のうち1眼が糖尿病網膜症症例であり、CD68 陽性 macrophage、DEC205 (pan DC marker) 陽性細胞がともに見られた。

炎症メカニズム制御細胞の眼内へのリクルートメカニズムの検討

樹状細胞(DCs)の機能を検討するために、ヒト角膜における樹状細胞(DCs)遊走モデル作成をおこなった。角膜内血管新生、リンパ管新生がDCsの遊走を促進する可能性を報告した。活性化したDCsの角膜組織へのリクルートにおいてリンパ系の関与が考えられた。さらに高血糖状態でのDCsの細胞生物学的な機能の変化についてヒトDCsについて検討した。ヒト角膜上皮細胞を高血糖状態で培養した。さらにヒト角膜上皮細胞をDCsと共培養をおこなって培養上清中の炎症性サイトカインの濃度を測定した。その結果、ヒ

ト角膜上皮細胞を DCs と共培養すると TNF の産生が亢進していた。

#### 高血糖の影響の検討

高濃度糖負荷下における炎症機転を制御する単球由来樹状細胞(DC)の制御機構について検討した。ブタ硝子体由来細胞を培養しヒアルロナン(ヒアルロン酸)産生能を検討した。糖濃度 100 mg/dL (対照)、450 mg/dL (糖負荷群)の培地で培養し細胞上清を回収した。DCのみの培養で3日間の糖負荷ではヒアルロナン濃度に有意差を認めず、7日以降では有意に低下した。次に、ブタ単球由来の DC とブタ硝子体由来細胞を共培養 (DC 群)し、培養上清中のヒアルロナン濃度を ELISA で検討した。DC と硝子体細胞の共培養を行った場合、共培養前と比較して有意にヒアルロナン濃度が低下した。長期間糖負荷や DC との共培養に伴う細胞へのストレスが硝子体由来細胞のヒアルロナン産生を抑制する可能性が示された。炎症機転を制御する DC が糖尿病網膜症病態に關与するメカニズムの一つと考えられる。

#### (2) 治療研究

ステロイド点眼薬(ジフルプレドナート点眼薬)の治療効果対象は山形大学医学部附属病院眼科で2008年12月から2010年10月までDMEに対してジフルプレドナート点眼薬投与を行い、初回点眼終了後12か月以上経過観察可能であった29例42眼である。点眼治療のみで経過した症例は17例22眼で、点眼治療を1クール施行が12例15眼、2クール施行が4例5眼、3クール施行が2例2眼だった。ステロイド点眼のみで約半数の症例で効果を1年継続できた。また、1クールの治療後、効果が減弱した場合、繰り返し治療は有効であった。

結論：これらの結果から、糖尿病網膜症を含め網膜硝子体疾患眼の硝子体内には炎症性の細胞、とくにマクロファージ、樹状細胞がみられ、病態に炎症メカニズムが關与するこ

とを示している。

#### 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 1 件)

1) Mari Narumi, Koichi Nishitsuka, Mitsunori Yamakawa, Hidetoshi Yamashita: A survey of vitreous cell components performed using liquid-based cytology. Acta Ophthalmologica 査読有 doi: 10.1111/aos.12623, 2015

[学会発表](計 3 件)

成味 真梨、西塚 弘一、山下 英俊：糖負荷下における樹状細胞によるブタ硝子体由来細胞のヒアルロナン産生制御について。第119回日本眼科学会総会、さっぽろ芸文館(札幌市)(学会長：吉田晃敏旭川医科大学長)、4月16 - 19、2015

Mari Narumi; Hiroyuki Namba; Yoshiko Kashiwagi; Hidetoshi Yamashita; Mitsunori Yamakawa: High glucose suppresses TNF- induced by interaction between corneal epithelial cells and dendritic cells. 87th The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Orlando, USA; May3-8, 2014. Sachi Abe, Teiko Yamamoto, Katsuhiro Nishi, Eriko Kirii, Sakiko Goto, Hidetoshi Yamashita: Long-term follow-up outcomes of treatment with steroid eye drop (diflupredonate ophthalmic emulsion) for diabetic macular edema. 34<sup>th</sup> World Congress of Ophthalmology 2014 Tokyo 東京国際フォーラム 東京(学会長：大鹿哲郎筑波

大学教授), April 2-6, 2014.

## 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) 連携研究者

後藤 早紀子 (GOTO SAKIKO)  
山形大学・医学部眼科学・医員  
研究者番号: 40444038

阿部 さち (ABE SACHI)  
山形大学・医学部眼科学・助教  
研究者番号: 90550658

成味 真梨 (NARUMI MARI)  
山形大学・医学部眼科学・医員  
研究者番号: 00613069