

令和元年6月3日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16976

研究課題名(和文) 糖尿病黄斑浮腫に対する短時間照射閾値下レーザーの奏功機序と適正サブタイプの解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of short pulse subthreshold laser on diabetic macular edema

研究代表者

長谷川 典生 (Hasegawa, Norio)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10723299

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)：短時間照射閾値下レーザーであるエンドポイントマネジメント(EPM)の奏功機序をマウスを用いて検討した。網膜色素上皮(RPE)において、EPM後にHSP70が有意に上昇していたが、従来凝固群では上昇していなかった。EPM3日目にはRPEのZO-1、RPE65が正常化していたが、従来凝固では7日目でも障害されていた。

難治びまん性糖尿病黄斑浮腫症例(n=14)に対して、EPMを行ったところ、網膜厚の有意な減少を認めた。有意な視力改善が得られたのはOCT分類で漿液性網膜剥離型2眼のみであった。EPMはRPEのHSP70発現を亢進させ浮腫を軽減させると考えられ、漿液性網膜剥離タイプに有用と示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病黄斑浮腫は失明原因の上位であり、社会的問題である。現在血管新生増殖因子(VEGF)阻害薬が主流であるものの、全身あるいは局所の副作用、医療経済、無効例の存在などから新たな治療が求められている。短時間照射閾値下レーザーは、網膜に不可逆的な障害を残さない光凝固で、浮腫に対する効果が期待されているが奏功機序は不明な点が多い。今回の結果から、網膜色素上皮のHSP70発現を亢進させ組織リモデリングをはかり浮腫を軽減させること、RPEに作用する点から、漿液性網膜剥離タイプの浮腫に有効なことが明らかとなり、今後VEGF阻害薬との併用治療によりVEGF阻害薬の回数を減らせることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Endpoint Management (EPM) software is one of the subthreshold laser. The level of HSP70 in the RPE was significantly elevated after laser treatment in EPM group, whereas there was no significant elevation in conventional setting group. On day 1 after laser, both EPM and conventional laser group showed destruction of ZO-1 and RPE65 staining, but EpM group showed normal staining of ZO-1 and RPE65 on day 3. However conventional laser group showed destruction of ZO-1 and RPE staining even on day 7 after laser. Our results showed that EpM laser induced HSP70 expression in the RPE, and early recovery of tight junction of the RPE, and the function of the RPE cells.

Clinical data showed EpM was effective in serous retinal detachment type classified by OCT in the eyes of refractory diabetic macular edema. Our findings suggest that EpM laser might be effective in the macular diseases, via induction of the RPE remodeling.

研究分野：眼科学

キーワード：閾値下凝固 糖尿病黄斑浮腫 OCT

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症と糖尿病黄斑浮腫(DME)

糖尿病網膜症は日本における中途失明原因の第2位であり、50～60歳代の約300万人が網膜症を発症している。その進行を抑え、発症を未然に防ぐことは社会的意義が大きい。また糖尿病網膜症にしばしば合併する糖尿病黄斑浮腫に対する治療は確立しておらず、糖尿病黄斑浮腫の病態解明および治療法確立は急務である。

現在加齢黄斑変性治療では抗血管内皮増殖因子(VEGF)薬が第一選択となっている。糖尿病黄斑浮腫においても、VEGF濃度の上昇が認められており、黄斑浮腫の原因の一つがVEGFによる血管透過性亢進作用によると考えられ、今後、抗VEGF薬は糖尿病黄斑浮腫に対しても臨床で使用されていくと思われる。しかし、VEGFには生理的血管形成などの生命維持に必要な生理的作用もあるため、長期のVEGF阻害治療は、眼・全身副作用の問題が危惧される。さらに、抗VEGF治療は高価なため、医療経済の圧迫にもつながる。抗VEGF治療とは別の糖尿病黄斑浮腫治療の確立は社会的にも意義がある。

糖尿病黄斑浮腫に対するレーザー光凝固は1980年代後半に米国の大規模多施設臨床試験で有効性が報告されたが、その後経年変化で光凝固瘢痕の拡大による網膜の萎縮、視力の低下、暗点の出現といった問題がみられた。一方、閾値下レーザー光凝固による糖尿病黄斑浮腫治療が、近年注目されている。閾値下光凝固とは網膜に凝固斑の出ない強度の出力で凝固する方法である。低出力の光凝固は、凝固網膜の瘢痕化を来さず、光凝固による網膜の構造変化が可逆的であるため、網膜機能を残存させることが可能とされている。しかし閾値下レーザー光凝固が、どのような機序で糖尿病黄斑浮腫に有効であるか、閾値下レーザー光凝固が糖尿病黄斑浮腫の中でも、どのようなタイプの浮腫に有効であるかは、まだ不明である。

以上の点から、失明原因である糖尿病黄斑浮腫における閾値下レーザー光凝固の奏功機序について解明し、糖尿病黄斑浮腫の中でも、どのようなタイプに特に有効かを検討し、糖尿病黄斑浮腫に対する治療方針を確立できる本研究は、社会的にも意義がある。

糖尿病網膜症や網膜静脈閉塞症といった虚血網膜に対するレーザー光凝固術は、その後の新生血管を抑制し、沈静化するために非常に重要な術式である。しかし、レーザー光凝固自体に黄斑浮腫を惹起する副作用、レーザー光凝固による痛み、レーザー凝固瘢痕の拡大による網膜の萎縮、暗点の出現といった問題が報告されてきた。2008年にわが国でも販売開始された、パターンスキャンレーザーは、従来よりも短照射時間・高出力設定であること、パターンスキャンテクノロジーにより照射パターンも色々選択できる、という特徴がある。短照射時間・高出力設定であるために、従来の凝固法に比べて、瘢痕拡大が少ない、網膜内層への障害が少ない、というメリットがあり、網膜色素上皮(RPE)のみをターゲットにした治療が可能になった。私たちは、光干渉断層計を用いて、パターンスキャンレーザーを用いた短照射時間・高出力設定は網膜内層への影響が少ないことを臨床で検証し、マウスを用いてVEGFをはじめとする炎症性サイトカインの発現も従来のレーザー光凝固と比べて有意に少ないことを見いだした。さらに、パターンスキャンレーザーであるPASCAL®に2012年に閾値下レーザーソフトウェア(エンドポイントマネージメント)(EPM)が搭載され、臨床で使われるようになった。この閾値

下レーザーは、パターンで凝固でき、従来の凝固法と比べて短照射時間という特徴がある。そこで、私たちは今までの研究成果をもとに、短照射時間の閾値下レーザー光凝固の糖尿病黄斑浮腫に対する有効性について、動物モデルで検討する。また、糖尿病黄斑浮腫は嚢胞様タイプ、漿液性網膜剥離タイプ、網膜膨化タイプに分類されるが、その中で短照射時間閾値下レーザー光凝固の良い適応となるタイプを確定し、糖尿病黄斑浮腫に対する新規治療法の確立につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

糖尿病黄斑浮腫はわが国において、働き盛り世代の失明原因の上位であり、社会的問題である。診断技術や治療の選択肢は増えてはいるが、糖尿病黄斑浮腫の発症機序と根本治療が現在も解明されていないことが、失明原因上位の大きな要因であろう。近年、閾値下レーザー光凝固が糖尿病黄斑浮腫に有効である、という報告がみられる。私たちは短照射時間・高出力レーザー光凝固が従来のレーザー光凝固に比べて炎症性サイトカインの惹起が少ないことを見いだした。本研究では、その点に着目し、短照射時間の閾値下レーザー光凝固の糖尿病黄斑浮腫に対する有効性について、動物モデルで検討し、糖尿病黄斑浮腫の中でも短照射時間閾値下レーザー光凝固の良い適応となるタイプを確定し、糖尿病黄斑浮腫に対する新規治療法確立をめざす。

3. 研究の方法

本研究では糖尿病黄斑浮腫に対する短照射時間閾値下レーザーの奏功機序および有効性について動物モデルを用いて検討し、臨床的にはどの形状の浮腫に効果が高いかを検証した。具体的には、マウスを用い、通常のレーザー、短照射時間閾値下レーザー(EPM)を行い、マイクロアレイおよび、たんぱくレベルをウェスタンブロットで検討する。有効性はアクリジンオレンジ眼底造影で検討する。短照射時間閾値下レーザーが有効な糖尿病黄斑浮腫のサブタイプについては、光干渉断層計による浮腫の形態で分類、検討し、後ろ向きにどのサブタイプに有効であるかも、検討する。

4. 研究成果

1) in vivo 実験

生後 8 週の雄 C57BL/6J マウスを用いて、波長 577nm の PASCAL(株式会社トプコン)を用いて網膜に閾値下凝固(エンドポイントマネジメントソフトウェアレーザー;EPM)あるいは従来凝固を行い、経時的に超広角走査型レーザー検眼鏡 Optos を用いて、カラー眼底写真、眼底自発蛍光写真、フルオレセインあるいはアクリジンオレンジ眼底造影写真を撮影した。また、レーザー前、1 日、3 日、7 日目に眼球を摘出し、網膜色素上皮 RPE のフラットマウントを作成、タイトジャンクションを観察するために ZO-1 と RPE65 を用いて免疫染色を行った。また経時的に RPE からたんぱくを抽出し、HSP70 の発現を ELISA で検討した。従来凝固は 80mW、15msec、スポットサイズ 200 μ m で行い、閾値下凝固は当初 EPM50%で行っていたが、フルオレセイン蛍光眼底造影検査で凝固斑が観察されたため、以後 30%に減らして思考した。30%で凝固したスポットは、フルオレセイン開講眼底造影でも観察できなかった。RPE フラットマウントでは、レー

ザー1 日目でRPE のタイトジャンクションは破壊されていたが、EPM レーザーでは3 日目には修復され正常となっていた。従来凝固は7 日目にやや修復されているのみで、依然破壊されていた。HSP70 の発現は、EPM レーザーで有意に3 日目から増加し、7 日目にも有意な増加がみられたが、従来凝固では7 日目に増加していたが有意ではなかった。

以上の結果から、EPM は早期からRPE においてHSP70 の発現を亢進させ、RPE のリモデリングを促している可能性が示唆された。

2) 臨床データ解析

14 眼の従来治療では難治のびまん性糖尿病黄斑浮腫(DME)症例に対して、閾値下凝固 (エンドポイントマネジメントソフトウェアレーザー ; EpM) を行い、その結果を解析した。

平均年齢は64 歳(40-76 歳)、6 か月以上経過を迫えている症例のみを対象とした。4 眼は、EpM レーザー前にトリアムシノロンアセトニドの後部テノン嚢下注射を施行、出力は平均 188 mW (120-250mW)、40-50%エネルギー、15msec の照射時間、スポットサイズ 200 μ m, スペーシングは0-0.25 とした。

視力は治療前、3 か月、6 か月と有意な改善はみられなかったが、網膜中心厚は3 か月、6 か月とも有意な減少を認めた。治療前のDME のOCT による分類は、スポンジ様網膜膨化型 8 眼、漿液性網膜剥離型 5 眼、嚢胞様黄斑浮腫 1 眼で、8 有意な視力改善が得られたのは漿液性網膜剥離型 2 眼のみであった。今回は従来治療に抵抗する難治性症例が対象であり、視力改善が得られにくかった可能性もあり、症例数が少ないため統計学的に有意差はみられなかったが、EpM レーザーは特に漿液性網膜剥離タイプに有用な可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：野崎 実穂

ローマ字氏名：Miho Nozaki

※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。