

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度
 課題番号：19592004
 研究課題名（和文） 治療の適正化を目指した糖尿病網膜症の網膜血管構造・機能の分子機構解析
 研究課題名（英文） Changes of retinal vascular structure in diabetic retinopathy and strategy of treatment
 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：網膜血管の傷害される疾患の病態として、血管透過性亢進、血管新生があり、その病態はサイトカインネットワークの作用により制御される。生体眼での状態に似た環境での細胞の制御メカニズムを検証するために、硝子体由来細胞の存在下で炎症性サイトカインによる刺激をした網膜血管内皮細胞の細胞生物学的な変化をヒト網膜血管内皮細胞とブタ硝子体由来細胞の共培養系を用いて検討した。その結果、ベバシズマブ、フェノフィブリン酸、デキサメタゾンによる血管内皮細胞の増殖抑制効果を減少させることが認められたことから、生体内では治療薬の効果が *in vitro* に比較して減少する可能性も示唆された。今後の治療薬開発に際して注意すべきと考える。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
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) 網膜血管内皮細胞 (2) 硝子体由来細胞 (3) 共培養
 (4) VEGF (5) 炎症性サイトカイン (6) 抗 VEGF 薬
 (7) ステロイド (8) 糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は日本に約740万人の患者がいると推定されており、急速に増加しつつある。さらに毎年約3000名の患者が失明すると推定されており、これは後天失明の原因の第二位である。これまでの病態研究および治療法の進歩により、血糖などメタボリックシンドロームのコントロール、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いる。しかし、より高い Quality of vision (QOL) 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強く求められている。糖尿病に罹患する年齢が40才台にまで広がりつつある

現在、糖尿病網膜症による視力低下を防ぐことにより生涯、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なる。このためには視力の保持をおこなうための早期発見、早期治療についての眼科独自の治療を確立する必要がある。現在までにわれわれの研究を含めて糖尿病網膜症の病態研究は糖尿病における糖代謝異常、それに起因する血管内皮細胞の機能及び構造障害、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してきた。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、高い視力予後を得るための薬物治療、硝子体手術の成績、とくに視力予後を上げるための戦略として薬物治療の活用による併用治療の開発が遅延している。より良好な視力予後を目指すためにはこれまでの疫学的な研究による早期発見、早期治療に加えて、糖尿病網膜症の初期の段階での病態の中で中心的な役割を果たしているVEGFを中心とした種々のサイトカイン、生理活性物質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。その際にこれまでおこなわれてこなかったことは、糖尿病網膜症における網膜血管の血管構成細胞の分子病態を生理的正常状態との相違点を明らかにすることにより解明するとともに、病的状態から正常な状態になるべく近づけるために重要な分子ターゲットを明らかにすること、そして正常の血管構築を維持するために必要最小限の状態についての検討とその状態を保持することである。即ち、病態に関連のある因子を必要以上に機能抑制することによる副作用を起こらないようにする必要がある。安全で有効な治療薬の開発の戦略を確立するためには必須の研究である。

2. 研究の目的

糖尿病網膜症における網膜血管の血管構成細胞の分子病態を生理的正常状態との相違点を明らかにすることにより解明するとともに、病的状態から正常な状態になるべく近づけるために重要な分子ターゲットを明らかにする。これにより、あたらしい発想での薬物治療開発を推進するとともに、治療薬開発段階から安全性を追求し重篤な副作用のリスクをヘッジすることを可能とすることを研究目的とする。

(1) 研究システムの構築：分子細胞生物学的研究と生体の眼レベルでの分子生物学的研

究を双方おこない、分子レベルでの知見を臨床へと発展させるような研究をおこなう。ヒト由来細胞培養系の確立：糖尿病網膜症の病態に關与しうる網膜・硝子体由来細胞（神経膠細胞、硝子体細胞など）の細胞株をヒト手術材料をもとにして確立し、ヒト由来細胞を用いた実験系の確立を目指す。ターゲットになることを検討する。

(2) 分子病態の検討：

糖尿病網膜症の分子病態の中心である血管内皮増殖因子（VEGF）の作用を実際の生体内の環境を模した invitro 実験系で検討する。さらに抗VEGF抗体（ベバシズマブ）により阻害した場合の副作用として細胞の正常機能への影響について検討する。血管病変に関連する病態として、炎症反応、高脂血症が報告されている。これを制御する因子として臨床的な効果が報告されているステロイド、高脂血症の治療薬の採用を共培養系において分子病態を検討する。

(3) 臨床への提言：治療戦略へむけて

以上の研究で解明されてきた因子の分子機構の解明により多くの因子により誘導されるこれらサイトカインのネットワーク化された因子間の相互作用を解明する。これらにより糖尿病網膜症の治療についての戦略的な方向を検討する。

3. 研究の方法

(1) 硝子体に存在するヒアロサイト（硝子体細胞）をブタ硝子体から分離培養した。このブタ硝子体由来細胞と血管内皮細胞の相互作用について分子生物学的に検討するために共培養系を確立した。血管内皮細胞としては網膜由来血管内皮細胞と臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を用いた。

(2) ブタの硝子体由来細胞より樹立した細胞株に炎症性サイトカイン（IL-1、IL-1、IL-6、TNF、VEGF）を作用させ、VEGF、IL-6、PEDFの遺伝子発現を観察した。

(3) 硝子体由来細胞株と血管内皮細胞の共培養系での相互作用を細胞増殖（MTTアッセイ）、血管新生（管腔形成）により検討した。

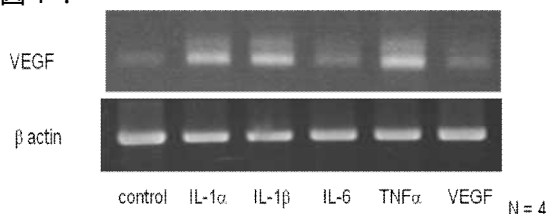
(4) 増殖性網膜硝子体疾患の硝子体中に発現しているサイトカイン（IL-1、IL-1、IL-6、TNF、VEGF）による血管内皮細胞の増殖制御、及び薬剤（ベバシズマブ（抗VEGF薬）、フェノフブリン酸、デキサメタゾン）の効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 研究1：研究システムの構築と糖尿病網膜症の分子病態の検討：

IL-1、IL-1、TNF の刺激により、硝子体細胞において、mRNA レベル (図1)、蛋白質レベルで、VEGF、IL-6 の発現増加を認めた。

図1 .



共培養系について血管内皮細胞の増殖、管腔形成は促進された。炎症性サイトカインのうち IL-1、IL-1、TNF により硝子体細胞から IL-6、VEGF 産生が亢進された。以上により、硝子体由来細胞は網膜における血管新生の形成に關与する事が示唆された。硝子体細胞は炎症性サイトカインの作用を受けて、血管内皮細胞に作用するサイトカインを産生するというメカニズムと通して病態のトランスデューサーとして作用している事が考えられた。

(2) 研究2：網膜血管 硝子体細胞連関の分子メカニズムにもとづく治療戦略の構築：増殖性網膜硝子体疾患の硝子体中に発現しているサイトカイン(IL-1、IL-1、IL-6、TNF、VEGF)による血管内皮細胞の増殖制御に対する薬剤(ベバシズマブ(抗 VEGF 薬)、フェノフィブリン酸、デキサメタゾン)の効果を検討した。細胞増殖は MTT アッセイにて観察した。硝子体由来細胞を共培養することで、網膜血管内皮細胞は IL-1、IL-1、IL-6、TNF、VEGF により増殖が促進された。ベバシズマブは硝子体細胞のない状態では VEGF による増殖作用を 10 μg/ml の濃度で抑制することが出来たが、硝子体細胞の存在下では 100 μg/ml 必要とされた。IL-1、IL-1、TNF、VEGF を投与した際ベバシズマブを 100 μg/ml 投与すると網膜血管内皮細胞の増殖抑制を認めた。フェノフィブリン酸は、硝子体細胞のない状態では IL-1 と VEGF による増殖作用を 10 μg/ml の濃度で抑制することが出来たが、硝子体細胞の存在下ではこの濃度で抑制されなかった。デキサメタゾンを 50ng/ml 加えることで、IL-1、IL-1、IL-6、VEGF による増殖作用を抑制し

たが、硝子体細胞と共培養することで、増殖抑制効果は減少した。硝子体細胞が存在することで、ベバシズマブ、フェノフィブリン酸、デキサメタゾンによる血管内皮細胞の増殖抑制効果を減少させることが認められたことから、生体内では治療薬の効果が invitro に比較して減少する可能性も示唆された。今後の治療薬開発に際して注意すべきと考える。

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 5 件)

Tojo N, Kashiwagi Y, Nishitsuka K, Yamamoto S, Asao H, Sugawara N, Yamashita T, Yamamoto T, Yamashita H: Interaction between Vitreous-derived Cells and Vascular Endothelial Cells in Vitreoretinal Diseases. Acta Ophthalmologica in press. 査読あり

中野早紀子、山本禎子、政金生人、今田恒夫、山下英俊: 糖尿病黄斑浮腫に対する硝子体手術後に直接の眼科治療によらず黄斑浮腫が変動した2例。臨床眼科62: 1159-1166, 2008. 査読あり

羽根田思音、中野早紀子、山本禎子、山下英俊: 網膜症とQOL。糖尿病診療マスター6: 611-616, 2008. 査読あり

中野早紀子、山本禎子、山下英俊: 糖尿病黄斑症に対する硝子体手術成績に影響する術前、術中因子についての検討。眼紀58: 465-470, 2007. 査読あり

中野早紀子、山本禎子、山下英俊: 増殖糖尿病網膜症手術後の良好な視力予後に關連する因子の検討。臨床眼科61: 1747-1753, 2007. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

Tojo N, Kashiwagi Y, Nishitsuka K, Yamamoto S, Asao H, Sugawara N, Yamashita T, Yamamoto T, Yamashita H: Interaction Between Vitreous-Derived Cells and Vascular Endothelial Cells in Vitreoretinal Diseases. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. April 27-May 1 2008. (アメリカ合衆国フロリダ州).

Nakano S, Yamamoto T, Kiriii E, Yamashita H: Effects of Triamcinolone and/or Bevacizumab on Refractory Diabetic

Macular Edema. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. April27-May1 2008. (アメリカ合衆国フロリダ州).

東條直貴、柏木佳子、西塚弘一、山本修一、浅尾裕信、菅原由人、山下哲次、山本禎子、山下英俊：網膜硝子体疾患における硝子体細胞と血管内皮細胞の相互作用の分子生物学。第112回日本眼科学会総会。2008年4月17-20日。(横浜市)

〔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〕

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・客員准教授

研究者番号(00297706)

柏木佳子 (KASHIWAGI YOSHIKO)

山形大学・医学部・客員助教

研究者番号(90375345)

中野早紀子 (NAKANO SAKIKO)

山形大学・医学部・医員

研究者番号(40444038)

神尾 聡美(KAMIO SATOMI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号(80375336)

(H19年～H20年12月まで)

(3)連携研究者

なし