

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592065

研究課題名（和文） 糖尿病網膜症の発症、進展における全身因子、眼局所因子の関連機序の解明

研究課題名（英文） General and Focal Factors Associated on Progression of Diabetic Retinopathy

研究代表者

緒方 奈保子 (OGATA NAHOKO)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60204062

研究成果の概要（和文）：

糖尿病網膜症の進行と腎機能、血中 PEDF との関係を検討した。その結果、腎機能の悪化とともに網膜症が進行していた。BUN、クレアチニンと血中 PEDF には有為な相関があり、PEDF は糖尿病患者の血管障害に拮抗して上昇していた。糖尿病網膜症の治療に抗 VEGF 抗体を硝子体内投与後、血中 VEGF が有為に低下しており全身に移行していることがわかった。さらに培養ヒト網膜色素上皮細胞に小胞体ストレスを惹起したところ、tight junction の変化がみられた。

研究成果の概要（英文）：

We determined the relationship between plasma PEDF levels and renal function in patients with diabetic retinopathy. The levels of plasma PEDF increased with advances in both conditions of diabetic retinopathy and nephropathy. Thus, increased levels of PEDF in the blood may indicate microvascular damages in diabetic patients and may predict the progression of retinopathy and nephropathy. We determine the level of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the plasma of patients with proliferative diabetic retinopathy before and after an intravitreal injection of bevacizumab. The decreased levels of blood VEGF after an intravitreal injection of bevacizumab indicate that bevacizumab enters the general circulation and may also affect the PEDF levels. We investigate the effects of endoplasmic reticulum (ER) stress on the tight junctions of the retinal pigment epithelial (RPE) cells *in vitro*. After the induction of ER, increased expressions of tight junction mole were detected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医学、眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：糖尿病網膜症、PEDF、VEGF、抗 VEGF 抗、小胞体ストレス、tight junction

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は成人失明の主要疾患であり、

患者数は増大している。糖尿病網膜症の発症、進展に関与する全身および眼局所要因およ

び因子をあきらかにし、網膜血管の障害、閉塞の機序を解明、さらに糖尿病網膜症の治療を検討することは多くの患者を失明から救うことになる。

2. 研究の目的

(1) 糖尿病網膜症進行因子を明らかにする。

①Pigment epithelium-derived factor (PEDF)は、強力な血管新生阻害因子である。また、soluble VEGF receptor-1 (sVEGF-R1)も VEGF の作用を抑制し、血管新生を抑制する。そこで糖尿病網膜症患者の硝子体内 PEDF 濃度および VEGF、sVEGF-R1 濃度を測定し、血管新生の要因を知る。

②糖尿病網膜症の進行と腎機能、血中 PEDF との関係を検討する。

(2) 糖尿病網膜症の治療に用いられる抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 抗体の全身への影響

①増殖糖尿病網膜症に対し抗 VEGF 抗体を眼内投与する前後の血中 VEGF 濃度を測定し、全身への影響を明らかにする。

②抗 VEGF 抗体を眼内投与後の偏眼（非投与眼）の眼内 VEGF 濃度を測定し、偏眼に及ぼす影響を明らかにする。

(3) 糖尿病は小胞体ストレスが原因といわれる。しかしながら、糖尿病網膜症においては小胞体ストレスの関与が明らかになっていない。小胞体ストレスが網膜の細胞にどのような影響をもたらすかを検討する。

3. 研究の方法

(1) ①治療的硝子体手術時に硝子体液を採取し、PEDF、VEGF、sVEGF-R1 濃度を ELISA 法で測定し、網膜症進行の要因、機序を知る。

②糖尿病患者の血中 BUN、クレアチニン、PEDF を測定し、網膜症の有無、程度との関係を検討する。

(2) ①対象は増殖糖尿病網膜症患者。抗 VEGF 抗体を眼内投与する直前、翌日、1 週後、1 か月後に採血を施行、血中の VEGF 及び PEDF を ELISA 法で測定する。

②対象は両眼同程度の増殖糖尿病網膜症患者で、片眼に抗 VEGF 抗体を眼内投与し翌日に硝子体手術予定者。投与直前、投与後 1 日の硝子体手術前に前房水を採取し、VEGF 濃度を測定する。投与後 7 日投与しなかった偏眼の抗 VEGF 抗体を投与直前に前房水を採取し、VEGF 濃度を測定する。

(3) ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE19) に ER stress 惹起物質である Tunicamycin (TM) また Thapsigargin (TG) を添加し、VEGF、zo-1、occludin、claudin-1 の発現を real time RT-PCR および免疫染色で検討する。また、ER stress 負荷時の細胞の透過性を TER (経上皮電気抵抗測定) で測定する。

4. 研究成果

(1) ① 増殖糖尿病網膜症の硝子体内では sVEGFR-1 と VEGF が上昇しており、PEDF が低下していた。硝子体内 VEGF、sVEGFR-1、PEDF の相関を検討すると増殖糖尿病網膜症では硝子体内 VEGF と sVEGFR-1 が相関していたが、硝子体内 VEGF と PEDF の相関はなかった。硝子体内 VEGF の上昇に伴い sVEGFR-1 が VEGF の作用を抑制するため増加していると考えられた。

②糖尿病網膜症の進行とともに腎機能が悪化しており、網膜症の進行と腎機能が相関することがわかった。また、PEDF と血中 BUN、クレアチニンが相関しており、PEDF が糖尿病の血管障害、腎障害に拮抗するため増加していると考えられた。

(2) ①眼内に抗 VEGF 抗体を投与後したのち、血中 VEGF、PEDF を測定すると血中 PEDF に有意な変化はないが、血中 VEGF は投与後 1 ヶ月まで有意に低下しており、眼内に投与した抗 VEGF 抗体は全身に移行しており、全身への影響の可能性があることがわかった。

②抗 VEGF 抗体を硝子体内投与した偏眼の前房水中 VEGF 濃度は著明に低下しており硝子体内投与した抗 VEGF 抗体が全身を通じて偏眼にも移行していることがわかった。

(3) 培養ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE19) に小胞体ストレスを惹起後、tight junction の ZO-1、occludin と claudin-1 の mRNA 及びタンパクレベルで有意な上昇を認めた。さらに TER が増加しており、ER ストレスで透過性が低下していることがわかった。

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 12 件)

1) Tadanobu Yoshikawa, Nahoko Ogata, et al、Increased Expression of Tight Junctions in ARPE19 Cells under Endoplasmic Reticulum Stress. Current Eye Research、査読有、2011、in press

2) Kayako Matsuyama, Nahoko Ogata, et al、Effects of Intravitreally Injected Bevacizumab on Vascular Endothelial Growth Factor in Fellow Eyes. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics、査読有、2011、in press

3) Tadanobu Yoshikawa, Nahoko Ogata, et al、Characteristics of Age-Related Macular Degeneration in Patients with Diabetic Retinopathy. Japanese Journal of Ophthalmology、査読有、54、2011、in

press

- 4) 緒方奈保子、PEDF、臨床眼科、査読無、65、2011、194-196
- 5) Kayako Matsuyama, Nahoko Ogata, et al、Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium derived factor before and after intravitreal injection of beva- cizumab. British Journal of Ophthalmology、査読有、94、2010、1215-1218
- 6) Kayako Matsuyama, Nahoko Ogata, et al、Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Pigment Epithelium Derived Factor in Eyes Before and After Intravitreal Injection of Bevacizumab. Japanese Journal of Ophthalmology、査読有、53、2009、243-248
- 7) Asako Goto, Naoko Ogata, et al、Genetic analysis of typical wet-type age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese population. Journal of Ocular Biology, Disease, and Informatics、査読有、2、2009、165-175
- 8) 嶋 千絵子、緒方奈保子、松山加耶子、他、糖尿病網膜症に高度な黄斑部漿液性網膜剥離を認めた症例、あたらしい眼科、査読有、26、2008、235-238
- 9) Matsuyama K, Ogata N, et al、Case of retinochoroiditis associated with porcine ascarids diagnosed by antibodies in subretinal fluid. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol、査読有、246、2008、1065-1067
- 10) Matsuyama K, Ogata N, et al、Relationship between pigment epithelium-derived factor (PEDF) and renal function in patients with diabetic retinopathy. Molecular Vision. 査読有、14、2008、992-996
- 11) Matsunaga N, Chikaraishi Y, Izuta H, Ogata N, et al、Role of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in the vitreous in proliferative diabetic retinopathy. Ophthalmology、査読有、115、2008、1916-1922
- 12) Shima C, Ogata N, et al、Posterior sub-Tenon injection of triamcinolone acetate as pretreatment for focal laser photocoagulation in diabetic macular edema patients. Japanese Journal of Ophthalmology、査読有、52、2008、265-268
- 1) 松岡雅人、南野桂三、和田光正、松山加耶子、緒方奈保子、他、左右差のある糖尿病網膜症の軽症眼に眼虚血症候群を合併した一例、第16回日本糖尿病眼学会、2010. 11. 27、大阪、大阪国際会議場
- 2) 松山加耶子、南野桂三、和田光正、正健一郎、木本高志、緒方奈保子、他、黄斑外に生じた出血性網膜色素上皮剥離を伴うポリープ状脈絡膜血管症の一例、第49回網膜硝子体学会、2010. 11. 27、大阪、大阪国際会議場
- 3) 松岡雅人、緒方奈保子、他、硝子体細胞診で腺癌細胞を検出した仮面症候群の一例、第64回日本臨床眼科学会、2010. 11. 13、神戸、神戸国際会議場
- 4) Nahoko Ogata, et al、Two cases of ocular sarcoidosis in which vitreous cytology was useful for supporting diagnosis、European Association for Vision and Eye Research、2010. 10. 9、Crete, Greece
- 5) Nahoko Ogata, et al、Age-Related Macular Degeneration in Patients with Diabetic Retinopathy、World Ophthalmology Congress、2010. 6. 5、Berlin, Germany
- 6) Tadanobu Yoshikawa, Nahoko Ogata, et al. Altered expression of tight junctions in APRE19 cells under endoplasmic reticulum stress、The Association for Research in Vision and Ophthalmology、2010. 5. 2、Florida, USA
- 7) 藤田識人、岡田由香、上出利光、松岡雅人、緒方奈保子、他、脈絡膜血管新生におけるオステオポンチンの作用の検討、第114回日本眼科学会、2010. 4. 16、名古屋、名古屋国際会議場
- 8) 吉川匡宣、緒方奈保子、他、小胞体ストレス負荷時の網膜色素上皮細胞におけるtight junctionの変化、第114回日本眼科学会、2010. 4. 16、名古屋、名古屋国際会議場
- 9) 緒方奈保子、教育セミナー「網膜光凝固術の適応と限界」 糖尿病網膜症に対する光凝固、第33回日本眼科手術学会、2010. 1. 23、東京、東京国際フォーラム
- 10) 松岡雅人、緒方奈保子、他、糖尿病患者の眼圧、第15回日本糖尿病眼学会、2009. 12. 4、名古屋、名古屋国際会議場
- 11) 松山加耶子、緒方奈保子、他、糖尿病網膜症患者におけるbevacizumab投与前後の血中VEGFと血中サイトカインの経過、第48回網膜硝子体学会、2009. 12. 4、名古屋、名古屋国際会議場
- 12) 松山加耶子、緒方奈保子、他、Bevacizumab投与眼及びその僚眼の前房水中血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、第63回日本臨床眼科学会、2009. 10. 9、福岡、福岡国

[学会発表] (計 30 件)

際会議場

- 13) 藤田識人, 緒方奈保子, 雑賀司珠也, 他、眼組織の血管新生におけるオステオポンチンの役割、第14回眼創傷治癒研究会、2009. 8. 8、仙台、仙台江陽グランドホテル
- 14) 吉川 匡宣, 緒方奈保子、他、糖尿病網膜症に合併した滲出型加齢黄斑変性、第47回網膜硝子体学会、第25回眼循環学会 合同学会、2008. 11. 28、京都、国立京都国際会館
- 15) 松山加耶子, 緒方奈保子、他、Bevacizumab 投与前後の血中VEGF濃度、第47回網膜硝子体学会、第25回眼循環学会 合同学会、2008. 11. 28、京都、国立京都国際会館
- 16) 岩田 岳, 赤堀正和, 関 麻子, 岡本はる、皆見正好, 尾羽澤実, 木村至, 寺内直樹, 野田徹, 溝田淳, 本田美樹, 田中稔, 林孝彰, 緒方奈保子、他、感覚器障害の克服を目指して 眼疾患バイオマーカーの探索とモデル動物を用いた予防・治療薬の開発、第 62 回国立病院総合医学会、2008. 11. 21、東京、東京国際フォーラム
- 17) 緒方奈保子、糖尿病網膜症と PEDF、第 1 回 RRM(Retina Research Meeting) 、2008. 11. 8、東京、順天堂大学
- 18) 木村元喜, 緒方奈保子、他、強膜外浸潤をきたした脈絡膜悪性黒色腫の一例、第 6 2 回日本臨床眼科学会、眼病理研究会、2008. 10. 23、東京、東京国際フォーラム
- 19) 松山加耶子、和田光正、安藤 彰、緒方奈保子、他、抗がん剤投与中に見られた虚血性網膜症の一例、第62回日本臨床眼科学会、2008. 10. 23、東京、東京国際フォーラム
- 20) Matsuyama K, Ogata, N, et al、Case of ischemic retinopathy induced by chemotherapy with Paclitaxel and Carboplatin. European Association for Vision and Eye Research、2008.10.1、Slovenia
- 21) Kimura M, Ogata N, et al、Case of Choroidal Melanoma with Massive Extraocular Extension through Sclera. European Association for Vision and Eye Research、2008.10.1、Slovenia
- 22) Ogata N, et al、Posterior Sub-Tenon Injection of Triamcinolone Acetonide as a Pretreatment of Focal Laser Photocoagulation for Diabetic Macular Edema. European Association for Vision and Eye Research、2008.10.1、Slovenia
- 23) 松永 望、力石 裕一、伊豆田 洋志、緒方 奈保子、他、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内における sVEGFR-1 の役割、第 28 回日本眼薬理学会、2008. 9. 20、岡山、ホテルグランヴィア岡山
- 24) 緒方奈保子、糖尿病網膜症の病態と治療、第 139 回和歌山眼科集談会、2008. 7. 31、和歌山、グランヴィア和歌山
- 25) Matsuyama K, Ogata N, et al、Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Pigment Epithelium-Derived Factor in Human Eyes Before and After Intravitreal Injection of Bevacizumab. World Ophthalmology Congress、2008. 6. 28、Hong Kong
- 26) Ogata N, et al、Plasma Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Levels and Diabetic Status in Patients with Diabetic Retinopathy. World Ophthalmology Congress、2008. 6. 28、Hong Kong
- 27) Matsuyama K, Ogata N, et al、Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Pigment Epithelium-Derived Factor in Human Eyes Before and After Intravitreal Injection of Bevacizumab. Annual Meeting of Association for the vision and Ophthalmology、2008. 4. 27、Florida、USA
- 28) Ogata N, et al、Plasma Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Levels and Diabetic Status in Patients with Diabetic Retinopathy. Annual Meeting of Association for the vision and Ophthalmology、2008. 4. 27、Florida、USA
- 29) 松山加耶子、緒方奈保子、他、糖尿病網膜症患者の血清 PEDF 濃度と前房水 PEDF 濃度、第 112 回日本眼科学会総会、2008. 4. 17、横浜、パシフィコ横浜
- 30) 緒方奈保子、全身因子と糖尿病網膜症、第 112 回日本眼科学会総会、2008. 4. 17、横浜、パシフィコ横浜

〔図書〕(計 4 件)

- 1) Nahoko Ogata, et al、KARGER Switzerland、Experimental Approaches to Diabetic Retinopathy、2010、124-141
- 2) 緒方奈保子、眼科診療学 ABC、全身疾患と眼障害、2009、318-329
- 3) 緒方奈保子、中山書店、眼科診療のコツと落とし穴 4 巻 眼科薬物療法のコツと落とし穴
糖尿病黄斑浮腫にたいする治療-トリアムシノロンとレーザー治療、2008、104 - 105
- 4) 緒方奈保子、中山書店、眼科診療のコツと落とし穴 3 巻 眼科検査・診断のコツと落とし穴
糖尿病黄斑浮腫の治療法選択、2008、8 5

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 奈保子 (OGATA NAHOKO)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60204062

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者 (H20年度のみ)

和田 光正 (WADA MITSUMASA)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：40333215

城 信雄 (JYO NOBUO)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：50411533