

総括研究報告書

糖尿病網膜症の重症化の原因の究明とその対策

主任研究者 堀 貞夫 東京女子医科大学眼科

研究要旨 糖尿病網膜症（網膜症）の重症化の原因の究明のために、網膜症の重症度と眼局所および全身因子との関連性について検討した。網膜症の進展には糖尿病罹病期間、HbA1c 値、vWF が関連しており、これらの因子からみた網膜症進展の予測モデルを作成した。また、網膜症の病態の検討では、網膜症の重症度と前房水および硝子体液中の VEGF、IL-6、PlGF、TNF- α 、Endostatin 濃度が関連しており、血管新生促進因子と抑制因子が相互に影響しあいながら進展していくことが明らかになった。また、内科再診患者を対象としたアンケート調査を行ったところ、糖尿病教室受講者に網膜症理解度が高く、自覚症状や眼科通院の必要性を理解している患者に眼科通院状況が良好なことが明らかになった。軽症網膜症の病期判定基準の試案を作成し、発表した。

分担研究者 船津英陽
山下英俊

A.研究目的

糖尿病網膜症（網膜症）は後天性視覚障害の主要原因であり、視力障害の主因は増殖網膜症である。単純網膜症や増殖前網膜症から増殖網膜症への進展機構をコホート研究の形で、臨床的および基礎的に眼局所因子、全身因子を検討して、網膜症進展の病態を解明するとともに、進展予測法を検討して、今までの治療法をより有効に施行するための治療指針（ガイドライン）の作成を目指す。

B.研究方法

①網膜症の進展機構の臨床的解明、②網膜症管理のためのガイドライン作成、③網膜症の進展機構の基礎的解明、④糖尿病患者の意識調査、⑤網膜症病期判定基準の草案の 5 項目について検討した。

1. 網膜症の進展機構の臨床的解明

対象として重症単純網膜症、増殖前網膜症を有する糖尿病患者 159 例を登録して、1 年間の経過観察（コホート研究）を行なった。

登録時に全例 10 方向のカラー眼底撮影および蛍光眼底撮影 (FAG) を行ない、撮影結果を画像解析装置によって解析し、網膜症病期、眼底所見の重症度、黄斑浮腫の程度を Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)分類、福田分類を用いて詳細に判定、記録した。網膜症病期は ETDRS 分類では Level 35 (以下同様) : 48 例、43 : 50 例、47 : 29 例、53 : 23 例であった。また、黄斑浮腫の程度は、黄斑浮腫なし : 36 眼、局所性浮腫 : 11 眼、びまん性浮腫 : 23 眼であった。

2. 網膜症の進展機構の基礎的解明

「1. 網膜症の進展機構の臨床的解明」で登録した症例を対象に、登録時に全身および眼局所因子として年齢、性別、糖尿病罹病期間、内科的治療法、HbA_{1c} 値、喫煙歴、アルコール消費、高血圧、収縮期血圧、拡張期血圧、body mass index (BMI)、眼圧、緑内障、腎症を調査して、血液中の vascular endothelial growth factor (VEGF)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6)、transforming growth factor β ₁ (TGF β ₁)、advanced glycation endproducts (AGE)、thrombomodulin (TM)、von Willebrand factor (vWF)、lipoprotein(a) (Lp(a))の濃度を測定した。

また、硝子体手術および白内障手術を行った糖尿病患者を対象に、硝子体液および前房水を採取して、眼内液中の VEGF、TNF- α 、IL-6、TGF β ₁、AGE、Endostatin、Platelet factor-4(PF-4)、Placenta growth factor (PlGF)の濃度と血液中の VEGF、TNF- α 、IL-6、TGF β ₁、AGE、Endostatin、PF-4、TM、vWF、Lp(a)の濃度を測定した。

3. 糖尿病患者の意識調査

内科再来の糖尿病患者対象に無作為にアンケート調査の協力を依頼して、3613 例の再来患者から回答を得られた。網膜症の理解度や眼科通院状況に関するアンケート調査を行った。

4. 網膜症病期判定基準の草案

軽症網膜症における網膜症病期判定基準を作成するため、網膜出血、硬性白斑、軟性白斑、静脈異常などの眼底所見ごとに、重症度の基準となる眼底写真 (画角 50 度、4 方向) を選択した。これらの眼底所見の組み合わせにより、網膜症病期を判定する基準を草案した。

5. 統計学的解析法

統計学的解析法には Statistical Analysis System (SAS)を用い、単変量および多変量解析を行った。

C. 研究結果

1. 網膜症進展機構の臨床的解明

網膜症の病期ごとの進展頻度としては、ETDRS 分類でレベル 35 は進展 : 51 眼、不変・改善 : 78 眼、レベル 43 は進展 : 18 眼、不変・改善 : 33 眼、レベル 47 は進展 : 11 眼、不変・改善 : 21 眼、レベル 53 は進展 : 0 眼、不変・改善 : 21 眼であった。

2. 網膜症進展機構の基礎的解明

1) 網膜症の重症度と全身因子

網膜症の重症度と関連する全身因子としては、多変量解析の結果、糖尿病罹病期間、HbA_{1c} 値、vWF 濃度が相関していた。この

結果を用いて網膜症進展の予測モデルを作成し、予測罹病確率を求めた。

2) 黄斑浮腫の程度と全身および眼局所因子多変量解析の結果、黄斑浮腫の程度と後部硝子体剥離の状態、血液中の IL-6 濃度が有意な相関がみられた。眼内液中のサイトカインの濃度と黄斑浮腫の程度との間には相関がみられなかった。

3) 網膜症の重症度と眼局所因子

網膜症の重症度と解析したサイトカインの中で、前房水および硝子体液中の VEGF と IL-6 濃度が関連性が高く、両者は相互に網膜症の進展に関与していることが示唆された。同一眼の硝子体液中の VEGF、PIGF、IL-6、TNF- α の濃度間に相関がみられ、ネットワークを形成して網膜症の病態に関与している可能性がある。また、網膜症の重症度と血管新生因子との相関では、血管新生促進因子である VEGF と抑制因子である endostatin の前房水および硝子体液中の濃度が網膜症の重症度と相関していた。

4) 糖尿病患者の意識調査

内科外来再診の糖尿病患者 3613 例を対象に、網膜症の理解度や眼科外来通院状況に関するアンケート調査を行った。網膜症の理解度に関しては、糖尿病教室を受講した患者でもっとも高く、次いで眼科からの説明を受けた患者に理解度が高かった。眼科受診状況については、内科からの説明のみではなく、眼科的自覚症状を有する例や眼科通院の必要性を理解している症例で眼科通院状況が良好なことが明らかになった。

5) 網膜症病期判定基準の草案

各眼底所見ごとの重症度の基準となる眼底写真を選定し、眼底所見を 3-5 段階に分類した。この基準写真をもとに、網膜症病期を決めた。

D. 考察

網膜症重症化の原因究明とその対策をたてるために、①網膜症の進展機構の臨床的解明、②網膜症管理のためのガイドライン作成、③網膜症の進展機構の基礎的解明、④糖尿病患者の意識調査、⑤網膜症病期の判定基準の草案の 5 項目について検討した。重症単純網膜症および増殖前網膜症を有する糖尿病患者を対象に、網膜症の重症度と眼局所および全身因子との関連性について検討した。

眼局所因子としては、これまでの報告と同様に網膜虚血に伴い産生、分泌が亢進する VEGF 濃度が眼内液において高値を示していた。VEGF の産生亢進には網膜虚血ばかりでなく、他のサイトカインとの相互作用（サイトカインネットワーク）の関与が指摘されている。今回の検討では、VEGF とともに眼内液中の IL-6 濃度が網膜症の重症度、VEGF 濃度、前房蛋白濃度と相関しており、VEGF と IL-6 は眼内において相互にネットワークを形成しながら網膜症の進展に関与している可能性が示唆された。また、血管新生促進因子と抑制因子の検討では抑制因子である endostatin の前房水および硝子体液中の濃度が網膜症重症度、VEGF 濃度、眼底所見の重症度と相関しており、網膜症の進展には血管新生促進と抑制のバランスが重要であることが示唆された。

全身因子としては、これまでと同様に強力な網膜症の危険因子である罹病期間および HbA1c 値に加えて、血管内皮障害の指標であ

る vWF の血液中の濃度が網膜症重症度と相関していた。これらの結果をもとに網膜症進展の予測モデルを作成し、予後予測をたてた。

糖尿病患者の意識調査においては、多くの患者が網膜症が原因で視力障害をきたすことを理解していたが、中でも糖尿病教室を受講している患者では理解度が高く、眼科管理の上でも重要であることが認識された。また、眼科通院状況については、内科医の眼科受診の必要性の説明や受診の勧めのみでは不十分で、患者自身が眼科的自覚症状を有していたり、実際に眼科受診の必要性を理解している場合に受診状況が良好であった。これらのことは、適切な眼科管理を行うためには単に一方的に説明するのみでは不十分であり、患者の理解を得るための対策を講じることが重要であると考えられた。

これまで、軽症網膜症に対する薬物治療などの効果を判定するための良い指標となる網膜症病期分類が本邦にはなかった。そこで、我々は、内科と眼科で共通に利用でき、客観的評価の基準となる病期分類を目指して、分類を草案した。今後この分類をもとにさらに発展させ、日本国内で広く利用できる網膜症病期分類の確立を目指していくつもりである。

今回、重症単純網膜症（軟性白斑が1個以上）と増殖前網膜症を対象に、1年間の経過観察を行い、網膜症病期および眼底所見変化と全身因子との関連性について検討した。さらに、FAG を施行する最適な時期を検討し、厚生省の糖尿病調査研究事業の一環として報告された「網膜症の光凝固基準」にのっとり適宜光凝固を行ない、光凝固の実施基準を再判定する予定である。これらの結果をもとに、血糖コントロール状態、罹病期間、血液中の

測定因子の濃度を予測因子として用いて、網膜症の診断および治療の指針（ガイドライン）の作成する予定である。

E. 結論

網膜症重症化の病態には罹病期間、血糖コントロール以外に血液中の von Willbrand factor が関与しており、これらの危険因子により網膜症の予後予測が可能である。また、眼内液中の血管新生促進因子（VEGF、IL-6 など）と並び抑制因子（endostatin）も眼局所においてネットワークを形成して網膜症の病態に関与していると考えられた。さらに、内科通院中の糖尿病患者に対するアンケート調査結果より、網膜症の理解度を向上させるための患者教育の方法や通院中断を防止するための対策の重要性が再認識された。網膜症病期判定基準を草案した。

F. 研究発表

論文発表

1. 堀貞夫. 内科医による網膜症管理. 日本医師会雑誌 123 : 365-369, 2000
2. Funatsu H and Hori S. Present status of ophthalmological care for diabetic patients in Japan. Jpn J Ophthalmol 44 : 75-81, 2000

学会発表

1. Simizu E, Funatsu H, Hori S, Yamashita H, Sekimoto K, Ohara K. Contributing factors to the pathogenesis of diabetic macular edema. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 1999

2. Sekimoto K, Funatsu H, Hori S, Yamashita H, Shimizu E, Kojima R. Risk factors relevant to severity of diabetic retinopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 1999

3. Ohara K, Funatsu H, Hori S, Yamashita H, Shimizu E, Kitano S. Role of cytokines in pathogenesis of diabetic retinopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 1999

4. 福嶋はるみ、船津英陽、関本香織、大原こずえ、北野滋彦、堀 貞夫、山下英俊、山下哲次。糖尿病網膜症の成因に影響する因子。第 103 回日本眼科学会総会、1999

5. 清水えりか、船津英陽、平岡美依奈、児嶋理恵、北野滋彦、堀 貞夫、山下英俊、山下哲次。糖尿病黄斑浮腫の成因に影響する因子。第 103 回日本眼科学会総会、1999

6. 大原こずえ、船津英陽、清水えりか、北野滋彦、堀貞夫、山下英俊、宮田敏男、山下哲次。糖尿病網膜症の病因におけるサイトカインの役割。第 53 回日本臨床眼科学会、1999

7. 野間英孝、船津英陽、中村新子、春山賢介、蒔田浩司、大原こずえ、清水えりか、北野滋彦、堀貞夫、山下哲次、山下英俊。糖尿病網膜症における血管新生の病態。血管新生促進及び抑制因子について。第 53 回日本臨床眼科学会、1999

8. 船津英陽、清水えりか、堀貞夫、山下英俊。糖尿病網膜症重症化の原因の究明と対策。第 14 回日本糖尿病合併症学会、1999

9. 清水えりか、船津英陽、堀貞夫、山下英俊。糖尿病黄斑浮腫の成因に影響する因子。第 14 回日本糖尿病合併症学会、1999

10. 中村新子、船津英陽、清水えりか、野間英孝、北野滋彦、岩本安彦、堀貞夫。糖尿病網

膜症の成因に影響する因子。第 14 回日本糖尿病合併症学会、1999

11. Funatsu H, Shimizu E, Yamashita H, Noma H, Yamashita T, Hori S. Roles of cytokines in pathogenesis of diabetic retinopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2000

12. Noma H, Funatsu H, Hori S, Yamashita H, Shimizu E, Yamashita T. The regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy. Possibility of balance between stimulator and inhibitor. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2000

13. 野間英孝、船津英陽、中村新子、春山賢介、蒔田浩司、大原こずえ、清水えりか、北野滋彦、堀貞夫、山下哲次、山下英俊。第 21 回日本眼科手術学会、2000

14. 中村新子、船津英陽、清水えりか、野間英孝、北野滋彦、岩本安彦、堀貞夫。内科外来通院の糖尿病患者における意識調査。第 6 回日本糖尿病眼科学会総会、2000

15. 児嶋理恵、清水えりか、船津英陽、野間英孝、関本香織、三村達哉、北野滋彦、山下哲次、山下英俊、堀貞夫。第 104 回日本眼科学会総会、2000

16. Hori S. A guide line to manage diabetic retinopathy in Japan. The 6th General Assembly of International Agency for the Prevention of Blindness. 1999

総括研究報告書

糖尿病網膜症の重症化の原因の究明とその対策

分担研究者 船津英陽 東京女子医科大学糖尿病センター眼科

研究要旨 糖尿病網膜症（網膜症）の進展機構の解明のために、網膜症の重症度と眼局所および全身因子との関連性について検討した。網膜症の進展には罹病期間、HbA1c、von Willebrand factor (vWF)が相関しており、これらの因子からみた網膜症進展の予測モデルを作成した。また、網膜症の病態の検討では、網膜症の重症度と前房水および硝子体液中の VEGF、IL-6、Endostatin 濃度が相関しており、血管新生促進因子と抑制因子が相互に影響しあいながら進展していくことが明らかになった。また、内科再診患者を対象としたアンケート調査を行ったところ、糖尿病教室受講者に網膜症理解度が高く、自覚症状や眼科通院の必要性を理解している患者に眼科通院状況が良好なことが明らかになった。

A.研究目的

糖尿病網膜症（網膜症）は後天性視覚障害の主要原因であり、視力障害の主因は増殖網膜症である。単純網膜症や増殖前網膜症から増殖網膜症への進展機構をコホート研究の形で、臨床的および基礎的に眼局所因子、全身因子を検討して、網膜症進展の病態を解明するとともに、進展予測法を検討して、今までの治療法をより有効に施行するための治療指針（ガイドライン）の作成を目指す。

B.研究方法

①網膜症の進展機構の臨床的解明、②網膜症管理のためのガイドライン作成、③網膜症の進展機構の基礎的解明、④糖尿病患者の意識調査の4項目について検討した。

1. 網膜症の進展機構の臨床的解明

対象として重症単純網膜症、増殖前網膜症を有する糖尿病患者 159 例を登録して、1 年間の経過観察（コホート研究）を行なった。登録時に全例 10 方向のカラー眼底撮影および蛍光眼底撮影（FAG）を行ない、撮影結果を画像解析装置によって解析し、網膜症病期、眼底所見の重症度、黄斑浮腫の程度を Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)分類、福田分類を用いて詳細に判定、記録した。網膜症病期は ETDRS 分類では Level 35（以下同様）：48 例、43：50 例、47：29 例、53：23 例であった。また、黄斑浮腫の程度は、黄斑浮腫なし：36 眼、局所性浮腫：11 眼、びまん性浮腫：23 眼であった。

2. 網膜症の進展機構の基礎的解明

「1. 網膜症の進展機構の臨床的解明」で登録した症例を対象に、登録時に全身および眼局所因子として年齢、性別、糖尿病罹病期間、内科的治療法、HbA1c、喫煙歴、アルコール消費、高血圧、収縮期血圧、拡張期血圧、body mass index (BMI)、眼圧、緑内障、腎症を調査して、血液中の vascular endothelial growth factor (VEGF)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6)、transforming growth factor β 1 (TGF β 1)、advanced glycation endproducts (AGE)、thrombomodulin (TM)、von Willebrand factor (vWF)、lipoprotein(a) (Lp(a))の濃度を測定した。

また、硝子体手術および白内障手術を行った糖尿病患者を対象に、硝子体液および前房水を採取して、眼内液中の VEGF、TNF- α 、IL-6、TGF β 1、AGE、Endostatin、Platelet factor-4(PF-4)の濃度と血液中の VEGF、TNF- α 、IL-6、TGF β 1、AGE、Endostatin、PF-4、TM、vWF、Lp(a)の濃度を測定した。

3. 糖尿病患者の意識調査

内科再来の糖尿病患者対象に無作為にアンケート調査の協力を依頼して、3613例の再来患者から回答を得られた。網膜症の理解度や眼科通院状況に関するアンケート調査を行った。

4. 統計学的解析法

統計学的解析法には Statistical Analysis System (SAS)を用い、単変量および多変量解析を行った。

C.研究結果

1. 網膜症進展機構の臨床的解明

網膜症の病期ごとの進展頻度としては、ETDRS 分類でレベル 35 は進展：51 眼、不変・改善：78 眼、レベル 43 は進展：18 眼、不変・改善：33 眼、レベル 47 は進展：11 眼、不変・改善：21 眼、レベル 53 は進展：0 眼、不変・改善：21 眼であった。

2. 網膜症進展機構の基礎的解明

1) 網膜症の重症度と全身因子

網膜症の重症度と関連する全身因子としては、多変量解析の結果、糖尿病罹病期間、HbA1c、vWF 濃度が相関していた。この結果を用いて網膜症進展の予測モデルを作成し、予測罹病確率を求めた。

2) 黄斑浮腫の程度と全身および眼局所因子

多変量解析の結果、黄斑浮腫の程度と後部硝子体剥離の状態、血液中の IL-6 濃度が有意な相関がみられた。眼内液中のサイトカインの濃度と黄斑浮腫の程度との間には相関がみられなかった。

3) 網膜症の重症度と眼局所因子

164 例、188 眼の前房水および硝子体液を採取した。

網膜症の重症度と解析したサイトカインの中で、前房水および硝子体液中の VEGF と IL-6 濃度が関連性が高く、両者は相互に網膜症の進展に関与していることが示唆された。また、網膜症の重症度と血管新生因子との相関では、血管新生促進因子である VEGF と抑制因子である endostatin の前房水および硝子体液中の濃度が網膜症の重症度と相関していた。他のサイトカインや増殖因子と網膜症の

重症度とは相関はみられなかった。

4) 糖尿病患者の意識調査

内科外来再診の糖尿病患者 3613 例を対象に、網膜症の理解度や眼科外来通院状況に関するアンケート調査を行った。網膜症の理解度に関しては、糖尿病教室を受講した患者でもっとも高く、次いで眼科からの説明を受けた患者に理解度が高かった。眼科受診状況については、内科からの説明のみではなく、眼科的自覚症状を有する例や眼科通院の必要性を理解している症例で眼科通院状況が良好なことが明らかになった。

D. 考察

網膜症重症化の原因究明とその対策をたてるために、①網膜症の進展機構の臨床的解明、②網膜症管理のためのガイドライン作成、③網膜症の進展機構の基礎的解明、④糖尿病患者の意識調査の 4 項目について検討した。重症単純網膜症および増殖前網膜症を有する糖尿病患者を対象に、網膜症の重症度と眼局所および全身因子との関連性について検討した。

眼局所因子としては、これまでの報告と同様に網膜虚血に伴い産生、分泌が亢進する VEGF 濃度が眼内液において高値を示していた。VEGF の産生亢進には網膜虚血ばかりでなく、他のサイトカインとの相互作用（サイトカインネットワーク）の関与が指摘されている。今回の検討では、VEGF とともに眼内液中の IL-6 濃度が網膜症の重症度、VEGF 濃度、前房蛋白濃度と相関しており、VEGF と IL-6 は眼内において相互にネットワークを形成しながら網膜症の進展に関与している可能性が示唆された。また、血管新生促進因子と抑制因子の検討では抑制因子である

endostatin の前房水および硝子体液中の濃度が網膜症重症度、VEGF 濃度、眼底所見の重症度と相関しており、網膜症の進展には血管新生促進と抑制のバランスが重要であることが示唆された。

全身因子としては、これまでと同様に強力な網膜症の危険因子である罹病期間および HbA1c に加えて、血管内皮障害の指標である vWF の血液中の濃度が網膜症重症度と相関していた。これらの結果をもとに網膜症進展の予測モデルを作成し、予後予測をたてた。

糖尿病患者の意識調査においては、多くの患者が網膜症が原因で視力障害をきたすことを理解していたが、中でも糖尿病教室を受講している患者では理解度が高く、眼科管理の上でも重要であることが認識された。また、眼科通院状況については、内科医の眼科受診の必要性の説明や受診の勧めのみでは不十分で、患者自身が眼科的自覚症状を有していたり、実際に眼科受診の必要性を理解している場合に受診状況が良好であった。これらのことは、適切な眼科管理を行うためには単に一方的に説明するのみでは不十分であり、患者の理解を得るための対策を講じることが重要であると考えられた。

今回、重症単純網膜症（軟性白斑が 1 個以上）と増殖前網膜症を対象に、1 年間の経過観察を行い、網膜症病期および眼底所見変化と全身因子との関連性について検討した。さらに、FAG を施行する最適な時期を検討し、厚生省の糖尿病調査研究事業の一環として報告された「網膜症の光凝固基準」にのっとり適宜光凝固を行ない、光凝固の実施基準を再判定する予定である。これらの結果をもとに、血糖コントロール状態、罹病期間、血液中の測定因子の濃度を予測因子として用いて、網

膜症の診断および治療の指針(ガイドライン)の作成する予定である。

E.結論

網膜症重症化の病態には罹病期間、血糖コントロール以外に血液中の von Willbrand factor が関与しており、これらの危険因子により網膜症の予後予測が可能である。また、眼内液中の血管新生促進因子(VEGF、IL-6など)と並び抑制因子(endostatin)も眼局所においてネットワークを形成して網膜症の病態に関与していると考えられた。さらに、内科通院中の糖尿病患者に対するアンケート調査結果より、網膜症の理解度を向上させるための患者教育の方法や通院中断を防止するための対策の重要性が再認識された。

F.研究発表

論文発表

1. Funatsu H and Hori S. Present status of ophthalmological care for diabetic patients in Japan. *Jpn J Ophthalmol* 44 : 75-81, 2000
2. 船津英陽. 患者教育と網膜症のコンプライアンス. *Diabetes Frontier* 10(2) : 243-247, 1999

学会発表

1. Simizu E, Funatsu H, Hori S, Yamashita H, Sekimoto K, Ohara K. Contributing factors to the pathogenesis of diabetic macular edema. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 1999

2. Sekimoto K, Funatsu H, Hori S, Yamashita H, Shimizu E, Kojima R. Risk factors relevant to severity of diabetic retinopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 1999

3. Ohara K, Funatsu H, Hori S, Yamashita H, Shimizu E, Kitano S. Role of cytokines in pathogenesis of diabetic retinopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 1999

4. 福嶋はるみ、船津英陽、関本香織、大原こずえ、北野滋彦、堀 貞夫、山下英俊、山下哲次. 糖尿病網膜症の成因に影響する因子. 第103回日本眼科学会総会、1999

5. 清水えりか、船津英陽、平岡美依奈、児嶋理恵、北野滋彦、堀 貞夫、山下英俊、山下哲次. 糖尿病黄斑浮腫の成因に影響する因子. 第103回日本眼科学会総会、1999

6. 大原こずえ、船津英陽、清水えりか、北野滋彦、堀貞夫、山下英俊、宮田敏男、山下哲次. 糖尿病網膜症の病因におけるサイトカインの役割. 第53回日本臨床眼科学会、1999

7. 野間英孝、船津英陽、中村新子、春山賢介、蒔田浩司、大原こずえ、清水えりか、北野滋彦、堀貞夫、山下哲次、山下英俊. 糖尿病網膜症における血管新生の病態、血管新生促進及び抑制因子について. 第53回日本臨床眼科学会、1999

8. 船津英陽、清水えりか、糖尿病網膜症重症化の原因の究明と対策. 第14回日本糖尿病合併症学会、1999

9. 清水えりか、船津英陽、糖尿病黄斑浮腫の成因に影響する因子. 第14回日本糖尿病合併症学会、1999

10. 中村新子、船津英陽、清水えりか、野間英孝、北野滋彦、岩本安彦、堀貞夫. 糖尿病網

膜症の成因に影響する因子. 第 14 回日本糖尿病合併症学会、1999

11. Funatsu H, Shimizu E, Yamashita H, Noma H, Yamashita T, Hori S. Roles of cytokines in pathogenesis of diabetic retinopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2000

12. Noma H, Funatsu H, Hori S, Yamashita H, Shimizu E, Yamashita T. The regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy. Possibility of balance between stimulator and inhibitor. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2000

13. 野間英孝、船津英陽、中村新子、春山賢介、蒔田浩司、大原こずえ、清水えりか、北野滋彦、堀貞夫、山下哲次、山下英俊。第 21 回日本眼科手術学会、2000

14. 中村新子、船津英陽、清水えりか、野間英孝、北野滋彦、岩本安彦、堀貞夫。内科外来通院の糖尿病患者における意識調査。第 6 回日本糖尿病眼学会総会、2000

15. 児嶋理恵、清水えりか、船津英陽、野間英孝、関本香織、三村達哉、北野滋彦、山下哲次、山下英俊、堀貞夫。第 104 回日本眼科学会総会、2000

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

分担研究報告書

分担研究者 山下英俊 山形大学医学部眼科学教授

研究要旨

本研究では糖尿病網膜症の眼内新生血管の発生を制御する因子を臨床的な検討により検出し、VEGFとそれ以外の因子の関連を同一サンプルで測定し因子間のネットワークを研究した。さらに、血管新生を制御する因子としての細胞外基質ヒアルロン酸の作用を培養血管内皮細胞を用いて検討した。

患者における病態の把握とサイトカイン、増殖因子の関わりは臨床例から得た硝子体液中濃度と網膜症病態との関連を検討した。VEGF, PIGF, IL-6、TNF- α の硝子体液中の濃度を同一サンプルを用いてELISA法で測定した。in vitro実験での血管内皮細胞でのヒアルロナン（ヒアルロン酸）合成酵素(hyaluronan synthase=HAS)の発現をRT-PCR、ノーザンブロット法で検討した。TGF- β による発現制御を検討した。

VEGF硝子体濃度は糖尿病網膜症など網膜虚血ではPIGF硝子体濃度と同一サンプルで強い相関がみられた。PIGF濃度は糖尿病網膜症など網膜虚血ではIL-6とも相関がみられた。IL-6とTNF- α も有意の相関が見られた。因子間には相互関係がみられネットワークを形成していることが示唆された。培養血管内皮細胞におけるHASの発現をmRNAレベル検討したところHAS1, HAS2, HAS3の3分子が発現されていた。HAS2の発現はTGF- β 、PDGF-BBにより上昇し、この2者の併用により相乗効果がみられた。

A. 研究目的

本研究では糖尿病網膜症の眼内新生血管の発生を制御する因子を臨床的な検討により検出すること、そしてVEGFとそれ以外の因子がどのように関連して病態を形成するかを研究した。そのためには複数の因子の作用を同時にモニターしつつ、その相互のクロストークを明かにしていく必要がある。さらに、血管新生を制御する因子を培養血管内皮細胞を用いて検討するための基礎的実験をおこなった。

B. 方法

I) 患者における病態の把握とサイトカイン、増殖因子の関わり

臨床例から得た眼内液中濃度と網膜症病態との関連を検討した。VEGF, PIGF, IL-6, TNF- α の硝子体液中の濃度を同一サンプルを用いてELISA法で測定した。硝子体液中は網膜虚血（糖尿病網膜症、網膜静脈閉塞症）患者（12例）及び非糖尿病患者（32例）の硝子体手術時に採取した。眼内液中濃度と網膜症病態との関連を検討した。

II) in vitro実験での血管内皮細胞でのヒアルロナン（ヒアルロン酸）合成酵素 (hyaluronan synthase=HAS)

血管新生の過程では血管内皮細胞機能が細胞外基質により制御される。その因子

の一つとしてヒアルロン酸をとりあげて、ヒアルロン酸合成酵素(HAS)による産生制御を検討した。培養細胞としてはヒト皮膚由来毛細血管内皮細胞を用いた。

HASには3つのアイソフォームが存在している。HAS1, HAS2, HAS3である。これらの発現をRT-PCR、ノーザンブロット法で検討した。TGF- β 1による発現制御を検討するためにTGF- β 受容体 (I型受容体、II型受容体)、細胞内シグナル伝達因子 (Smads)のcDNAを遺伝子導入してHASの発現の変化をRT-PCR法で観察した。

C. 研究結果

I) 患者における病態の把握とサイトカイン、増殖因子の関わり

VEGF硝子体濃度は糖尿病網膜症など網膜虚血ではPIGF硝子体濃度と同一サンプルで強い相関がみられた(偏相関係数=0.88, $P=0.0001$)。PIGF濃度は糖尿病網膜症など網膜虚血ではIL-6とも相関がみられた(偏相関係数=0.69)。IL-6とTNF- α も有意の相関が見られた($R=0.73$, $P=0.003$)。

II) in vitro実験での血管内皮細胞でのヒアルロナン（ヒアルロン酸）合成酵素 (hyaluronan synthase=HAS)

血管内皮細胞におけるHASの発現をmRNAレベル検討したところHAS1,

HAS2, HAS3の3分子が発現されていた。mRNAレベルでの発現レベルについて検討したところ、HAS2, HAS3の発現がHAS1より著しく高かった。HAS2の発現はTGF- β 、PDGF-BBにより上昇し、この2者の併用により相乗効果がみられた。

D. 考察

今回の研究で得られた結果より糖尿病網膜症など網膜虚血にみられる血管新生の病態でVEGFは中心的な作用を示しているが、そのほかにもPIGF、IL-6、TNF- α が関与していることが示された。これらの因子間での相互関係を検討したところPIGFとVEGFは関連していることが考えられた。この2つの因子はVEGFファミリーに属して低酸素により誘導されるが、PIGFがIL-6と関連する一方、VEGFは関連が見られなかった。このことよりPIGF, VEGFの発現誘導のメカニズムは異なっていることが考えられる。またIL-6, TNF- α は相互に関連しておりその意義は今後の問題である。

ヒアルロン酸は低分子量では血管新生促進、高分子量では血管新生抑制作用があると考えられている。培養血管内皮細胞は3つのアイソフォームのうちHAS2の発現が高く、TGF- β 、PDGFにより誘導された。内皮細胞の遊走における作用

について検討し、臨床的検討で検出された因子の病態上の意義を今後検討したいと考えている。

E. 結論

VEGF, PIGF, IL-6、TGF- β 2の前房水、硝子体液中の濃度をELISA法で測定し、眼内液中濃度と網膜症病態との関連を検討した。VEGF, PIGFは眼内虚血により誘導されると考えられ、この2つのサイトカインには相関が見られた。IL-6は血糖コントロールと、TGF- β 2は硝子体出血と相関がみられ、これら種々の因子が糖尿病網膜症の多様な病態形成に関与していると考えられた。

血管新生因子の血管新生における作用機序を調べるため培養血管内皮細胞でのプロテアーゼ産生、増殖、遊走、管腔形成に対する作用を検討するシステムを確立し、そのシステムが動いていることを血管新生因子として確認されているVEGFを用いて確認した。血管新生は細胞外基質により制御される。その因子の一つとしてヒアルロン酸をとりあげ、ヒアルロン酸合成酵素(HAS)による産生制御を検討した。ウシ大動脈内皮細胞にはHASのアイソフォーム (HAS1, 2, 3)のうちHAS2が発現しており、細胞機能、血管新生機能への関与が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Usui T, Suzuki K, Amano S, Miyata K, Heldin P, Yamashita H: Hyaluronan synthase (HAS) expression in bovine eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 563-567, 1999.
- 2) Mita T, Yamashita H, Kaji Y, Obata H, Hanyu A, Suzuki M, Tobar I: Functional difference of TGF- β isoforms regulating corneal wound healing after excimer laser keratectomy. *Exp Eye Res* 68:513-519, 1999
- 3) Ideta R, Yamashita H, Tanaka Y, Kato S, Kitano S, Hori S: Roles of cytokines in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 117: 700-701, 1999.
- 4) Yamada H, Obata H, Kaji Y, Yamashita H: Expression of transforming growth factor β superfamily receptors in developing rat eyes. *Jpn J Ophthalmol* 43: 290-294, 1999.
- 5) Yamashita H, Eguchi S, Watanabe K, Takeuchi S, Yamashita T, Miura M: Expression of placenta growth factor (PlGF) in ischemic retinal diseases. *Eye* 13(3A): 372-374, 1999.
- 6) Kaji Y, Amano S, Oshika T, Obata H, Ohashi T, Sakai H, Shirasawa E, Tsuru T, Yamashita H: Effects of anti-inflammatory agents on corneal wound-healing process after surface excimer laser

keratectomy. *J Cat Ref Surg* in press

7) Yamamoto T, Takeuchi S, Suzuki K, Yamashita H: Expression and possible roles of activin A in proliferative vitreoretinal diseases. *Jpn J Ophthalmol* in press 2000

8) 山下英俊、川崎良：糖尿病網膜症の分子病態。医学のあゆみ 191: 539-545, 1999.

9) 山下英俊、宮園浩平、臼井智彦：結合組織のシグナル伝達：TGF- β 。『平滑筋細胞学』（森崎信尋編）メジカルセンス、東京 pp101-108, 1999

10) 山下英俊：糖尿病網膜症の分子メカニズム。医学のあゆみ 192:615-620, 2000.

2. 学会発表

- 1) 山下英俊：糖尿病網膜症とサイトカイン。第36回臨床分子医学会シンポジウム。福岡 1999年4月。
- 2) Mita T, Suzuki M, Tobar I, Kaji Y, Yamashita H: Apoptosis related signal transducers in retina of RCS rats. *IOVS* 40 (suppl): S475, 1999. 71st ARVO 1999.5. (アメリカ-フォートローダーデール)
- 3) Usui T, Suzuki K, Kaji Y, Amano S, Miyata K, Yamashita H: Regulation of hyaluronan synthase (HAS) expression in corneal endothelial cells. *IOVS* 40 (suppl): S630, 1999. 71st ARVO 1999.5. (アメリカ-フォートローダーデール)
- 4) Yamamoto T, Takeuchi S, Yamashita H: Pathophysiology of intraocular proliferative membrane formation-From aspects of

comparison among anterior, epiretinal and subretinal membranes. 12th Congress of European Society of Ophthalmology 1999. 6 (Stockholm, Sweden)

5) Kato S, Takemori M, Kitano S, Hori S, Yamashita H: Relation between retinopathy progression and age in type II diabetes mellitus. 12th Congress of European Society of Ophthalmology 1999. 6 (Stockholm, Sweden)

6) 山下英俊：シンポジウム「糖尿病網膜症」。オーガナイザー兼発表者。病態からみた眼科治療戦略の立て方：光凝固の奏功機序からみた適応と効果。第19回日本眼薬理学会。広島1999年9月。

7) 山下英俊：糖尿病網膜症の黄斑病変へのアプローチ（シンポジウム）”サイトカイン・増殖因子の作用の面より”第53回日本臨床眼科学会。東京1999年10月。

8) 山本禎子、赤羽直子、鈴木清香、竹内忍、山下英俊：黄斑上膜を伴う糖尿病黄斑浮腫例の検討。第53回日本臨床眼科学会。1999.10.東京

9) 山下英俊：糖尿病網膜症の病態と治療—最近の話題—。第58回広島地方眼科学会、第108回広島県眼科医会総会特別講演。広島市。1999年11月

10) 山下英俊：『内科治療への期待—全身因子からみた網膜症—』シンポジウム「糖尿病網膜症の内科治療—有用性と限界—」第6回糖尿病眼学会。2000年3月

11) ガリナ デイミトロバ、加藤聡、永原幸、櫻井真彦、富田剛司、山下英俊：糖尿病における眼循環の変化に対する高血圧症の影響。第6回日本糖尿病眼学会。2000.3. (札幌)

12) 河崎さつき、佐藤忍、斎藤達也、山川正、向笠浩司、伊藤聡、青木一孝、斎藤淑子、伊藤譲、関原久彦、小関義之、加藤聡、山下英俊：血糖コントロール不良例に対する加療後の網膜症の発症と進展。第6回日本糖尿病眼学会。2000.3. (札幌)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得なし
2. 実用新案登録なし
3. その他なし