

2. 学会発表 (予定)

山下 敏史 他：超音波血栓融解療法の眼科応用の検討. 第 112 回日本眼科学会総会、横浜、2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Tachibana S et al: Ultrasonic vibration for boosting fibrinolytic effect of urokinase. *Blood and Vessel* 12:450-453, 1981
2. Kudo S et al: Thrombolysis with ultrasound effect. *Tokyo Jikeikai Med J* 104:1005-1012, 1989
3. Francis CW et al: Enhancement of fibrinolysis in vitro by ultrasound. *J Clin Invest* 90(5):2063-2068, 1992
4. Tachibana K: Enhancement of fibrinolysis with ultrasound energy. *J Vasc Interv Radiol* 3(2):299-303, 1992
5. Francis CW et al: Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. *Ultrasound Med Biol* 21(3):419-424, 1995
6. Tachibana K et al: Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound

accelerated thrombolysis. *Circulation* 92(5):1148-1150, 1995

7. Alexandrov AV et al: Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 351(21):2170-2178, 2004
8. Motarjeme A: Ultrasound-enhanced Thrombolysis. *J Endovasc Ther* 14(2):251-256, 2007

49. 眼虚血状態での硝子体手術による網膜障害に対する D-アロースの保護効果

溝手雅宣、廣岡一行、福田恒輝、白神史雄
(香川大)

研究要旨 希少糖の一つである D-アロースは虚血再灌流時に放出されるグルタミン酸を抑制することが報告されている。虚血状態での硝子体手術時の灌流液中に、D-アロースを混ぜることにより、その網膜障害に対する保護効果を検討した。灌流液中に D-アロースを混ぜたものでは、何も混ぜないものに比べて術後 7 日目の網膜電図の b 波の振幅の減弱が抑制された。また組織学的検討においても、神経節細胞数、内顆粒層の厚みにおいて、有意に障害が抑制された。高灌流圧によって網膜虚血を起こしうる硝子体手術では、灌流液中に追加した D-アロースが網膜機能、組織の障害に対して保護的に作用する可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々はラットを用いた網膜虚血再灌流モデルを用いて、希少糖の一つである D-アロースの神経保護効果を報告した。¹⁾ 今回、眼虚血状態での硝子体手術を施行し、術中に D-アロースや MK-801 を含む灌流液を使用することによる網膜機能、組織に対する効果について検討した。

B. 研究方法

白色家兎を実験動物として使用し、灌流圧 30 mmHg で片眼のみ硝子体切除を行った。その後灌流圧を 140 mmHg まで上昇させることにより網膜虚血を行い、45 分間虚血を行った。灌流液中に何も混ぜない群 (C 群)、0.02% MK-801 を混ぜた群 (M 群)、2% D-アロースを混ぜた群 (D 群) に分け、それぞれ術前、術後 1、7 日目に網膜電図を施行した。また術後 7 日目に眼球を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで固定した後、厚さ

5 μ m の網膜切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い網膜組織障害を検討した。

(倫理面への配慮)

「動物の愛護および管理に関する法律」(動物愛護管理法) に沿って実験を施行した。

C. 研究結果

網膜電図の a 波の振幅はいずれの群においても違いは認められなかったが (図 1a)、術後 7 日目の網膜電図の b 波の振幅は、術前を 100% とすると C 群では 64% であったのに対して M 群では 82%、D 群では 94% となり、C 群に比べ D 群においてのみ有意に減弱が抑制された (対応のない t 検定、 $P < 0.05$)。 (図 1b) また組織学的検討 (図 2) では神経節細胞数と内顆粒層の厚みは、傍眼を 100% とした場合 C 群では各々 41%、61% であったのに対して M 群では各々 81%、100%、D 群では各々 66%、94% で M 群、D 群

ともに障害の抑制が認められた（対応のない t 検定、 $P < 0.05$ ）。（図 3）

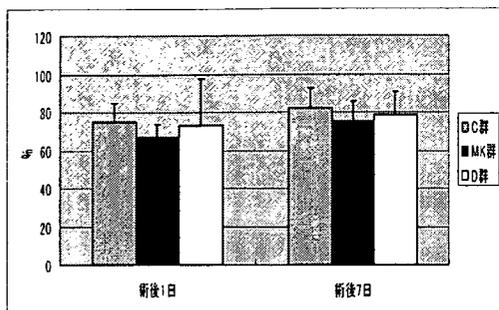


図 1 a 網膜電図 a波の変化

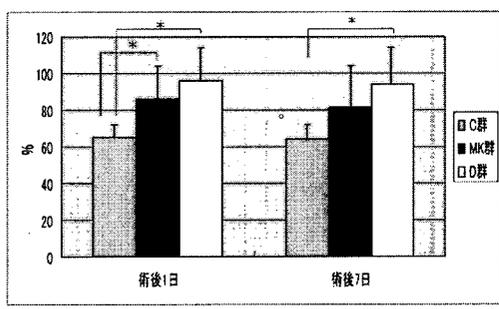


図 1 b 網膜電図 b波の変化



図 2 網膜 光学的顕微鏡所見

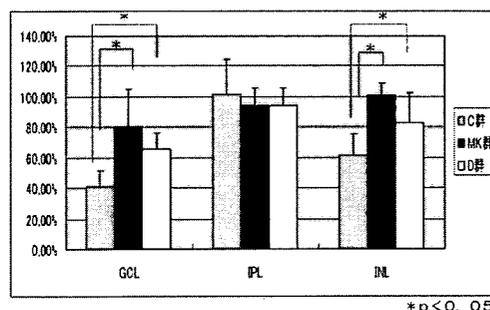


図 3 組織学的検討

D. 考察

硝子体手術時の高眼圧による虚血状態により、網膜は機能的、組織学的にも障害を受けるが、灌流液中に MK801、D-アロースを追加することにより障害の抑制がみられた。MK801 では構造的な保護効果のみであったが、D-アロースでは機能的な保護効果もみられた。これはD-アロースのグルタミン酸の放出の抑制作用によるものと思われる。

1)

E. 結論

眼虚血状態で行う硝子体手術では、灌流液中に追加したD-アロースが網膜機能、組織の障害に対して神経保護的に作用する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2003年5月22日に希少糖の生理活性作用の利用方法および希少糖を配合した組成物（生理番号：PCT-03-RS01）の名称で特許の出願を行った。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Hirooka K et al: Neuroprotective effects of D-allose against retinal ischemia-reperfusion injury. Invest Ophthalmol & Vis Sci 41:1653-1657, 2006

50. 眼内炎における High-Mobility Group Box 1 Protein の発現

有村 昇¹⁾、喜井裕哉¹⁾、園田恭志¹⁾、山切啓太¹⁾
橋口照人²⁾、丸山征郎²⁾、坂本泰二¹⁾
(¹⁾鹿児島大、²⁾鹿児島大血管代謝病態解析学)

研究要旨 非ヒストン DNA 結合核タンパク質である High-Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) は敗血症などの様々な疾患において致死的炎症性メディエーターとして注目されているが、眼科領域での検討は少ない。敗血症類似の眼疾患として、眼内炎患者の眼内における HMGB1 の発現について検討した。眼内炎患者 10 例 10 眼、特発性黄斑円孔 (MH) 患者 12 例 12 眼を対象に硝子体中 HMGB1 濃度を ELISA 法にて測定した。さらに、眼内炎により眼球摘出に至った 1 例と結膜悪性黒色腫の眼球摘出標本について、抗 HMGB1 抗体を用いた免疫組織学的検討を行った。硝子体中 HMGB1 濃度は、眼内炎患者と MH 患者 (13.96 vs 0.236 ng/mL) で有意差 ($P = .0006$, Mann Whitney-U 検定) を認め、眼内炎患者では敗血症患者血中 HMGB1 濃度と同等であった。眼内炎患者において HMGB1 濃度は罹病期間 ($P = .0097$, $R = 0.862$)、術前視力 ($P = .0177$, $R = 0.790$)、術後視力 ($P = .0086$, $R = 0.876$) と有意な相関を示した (Spearman 順位相関係数)。眼内炎患者の眼組織では炎症細胞浸潤を伴った、特に核外における強い HMGB1 の発現を認めた。敗血症と同様に、眼内炎においても HMGB1 の病態への関与が示唆された。

A. 研究目的

High-Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) は体細胞の核にユビキタスに存在する蛋白質であり、主に転写調節に関わる因子として知られていた。敗血症患者血清中において、特に予後不良例で高値を示すこと、細胞外において炎症性メディエーターとして機能することなどが注目され、脳虚血や関節リウマチなど様々な病態への関与が報告されている。しかしながら眼科領域における検討は限られており、その関与には不明な点が多い。敗血症類似の眼疾患として、眼内炎患者の眼内における HMGB1 の発現について検討した。

B. 研究方法

眼内炎患者 10 例 10 眼、特発性黄斑円孔 (MH) 患者 12 例 12 眼を対象に、硝子体手術時に硝子体を採取、HMGB1 濃度を ELISA 法にて測定した。2 群間の有意差の有無について Mann Whitney-U 検定を行い、眼内炎患者 HMGB1 濃度と罹病期間、術前・術後視力 (logMAR) との相関について Spearman 順位相関係数を用いて検討した。さらに、眼内炎により眼球摘出に至った 1 例と結膜悪性黒色腫の眼球摘出標本について、抗 HMGB1 抗体を用いた免疫組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

患者硝子体、摘出眼球の使用に際しては鹿

1. 参考文献

1. Lotze MT and Tracey KJ: Nat Rev Immunol 5:331-342, 2005
2. Wang H et al: Science 285:248-251, 1999
3. Yang H et al: Proc Natl Acad Sci USA 101:296-301, 2004

51. 高血圧ラットの臓器障害に及ぼす Fluvastatin の影響と網膜血管の白血球接着との関連性

高橋秀徳¹⁾、Wu Yaqiong²⁾、入山 彩¹⁾、小畑 亮¹⁾、井上裕治¹⁾、
柳 靖雄¹⁾、玉置泰裕¹⁾、沼部敦司³⁾、上原譽志夫²⁾、新家 眞¹⁾
(¹⁾ 東京大、²⁾ 東京大保健センター、³⁾ 獨協医科大臨床検査部)

研究要旨 目的：Dahl 食塩感受性高血圧ラット(DS)の高血圧臓器障害における HMG-CoA 還元酵素阻害薬 Fluvastatin と白血球接着因子の関連を検討し、網膜血管の白血球接着数測定の意味を検討した。

方法：DS♂4 週齢 30 匹を用いて、(1)0.3%低食塩食群(0.3%DS)及び 8%高食塩食群に分け、さらに 8%高食塩食群は、(2)非治療群(8%DS-control)、(3)前半 10 日 Fluvastatin(2.5mg/kgBW/day)治療群(8%DS-early)、(4)後半 10 日 Fluvastatin 治療群(8%DS-late)及び(5)全期間 Fluvastatin 治療群(8%DS-whole)に分け、全群を 3 週間飼育した。体重と血圧(tail-cuff 法)を毎週測定し、最終日に acridine orange を静注し、網膜血管壁に接着した白血球数(RA-WBC)を Scanning Laser Ophthalmoscope で計測した。採血・採尿・腎摘出し、血清から単球遊走因子(MCP-1)と血中可溶性細胞内接着分子(sICAM-1)と腫瘍壊死因子(TNF- α)を ELISA で測定した。

結果：8%DS-control は高血圧化し、著明な蛋白尿、腎硬化を呈した。Fluvastatin 治療により尿蛋白排泄量及び MCP-1 はいずれの群でも同様に低下した。ステップワイズ法による多変量解析にて、RA-WBC は MCP-1 と有意な正の関係にあった($p < 0.05$)。

結論：高血圧臓器障害後半における白血球接着因子発現が Fluvastatin により抑制され、網膜血管の白血球接着が白血球接着因子発現と関連したことから、Fluvastatin による臓器保護には白血球接着因子抑制が関与すると考えられ、全身の白血球接着因子の評価に網膜血管の白血球接着数測定が有効であると考えられた。

A. 研究目的

高血圧は脳心血管イベントの重要なリスクファクターであるが、高血圧臓器障害機序の詳細はまだ明らかになっていない。臓器障害には血管内皮への白血球接着が重要と言われており¹⁾、今回我々は Dahl 食塩感受性高血圧ラット(DS)の高血圧臓器障害における HMG-CoA 還元酵素阻害薬 Fluvastatin と白血球接着因子の関連を検討し、網膜血

管の白血球接着数測定の意味を検討した。

B. 研究方法

DS♂4 週齢 30 匹を用いて、(1)0.3%低食塩食群(0.3%DS)及び 8%高食塩食群に分け、さらに 8%高食塩食群は、(2)非治療群(8%DS-control)、(3)前半 10 日 Fluvastatin(2.5mg/kgBW/day)治療群(8%DS-early)、(4)後半 10 日 Fluvastatin

治療群 (8%DS-late) 及び (5) 全期間 Fluvastatin 治療群 (8%DS-whole) に分け、全群を 3 週間飼育した。体重と血圧 (tail-cuff 法) を毎週測定し、最終日に 24 時間尿を採取した。acridine orange を静注し、網膜血管壁に接着した白血球数 (RA-WBC) を Scanning Laser Ophthalmoscope で計測した²⁾。採血し、血清から単球遊走因子 (MCP-1) と血中可溶細胞内接着分子 (sICAM-1) と腫瘍壊死因子 (TNF- α) を ELISA で測定した。腎臓を摘出し、腎硬化度を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は ARVO statement に基づき行い、東京大学動物実験実施マニュアルに従いラットの苦痛軽減に努めた。

C. 研究結果

8%DS-control は高血圧化し(図1)、著明な蛋白尿、腎硬化を呈した。Fluvastatin 治療により尿蛋白排泄量(図2)、腎硬化度(図3)及びMCP-1(図4)はいずれの群でも同様に低下した。ステップワイズ法による多変量解析にて、RA-WBC は MCP-1 と有意な正の関係にあった ($p < 0.05$)。

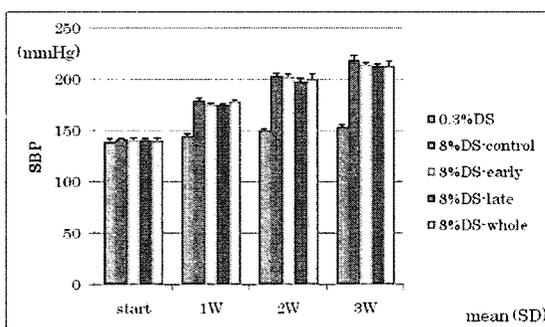


図1 8%DSの高血圧化

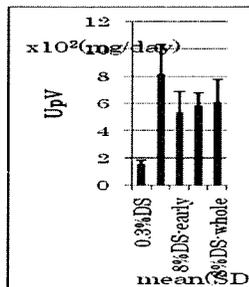


図2 尿蛋白

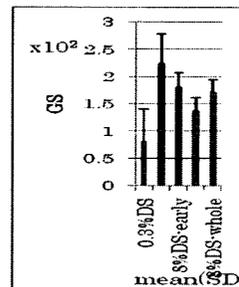


図3 腎硬化度

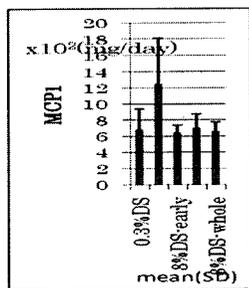


図4 MCP1

D. 考察

高血圧臓器障害後半における白血球接着因子発現が Fluvastatin により抑制され、網膜血管の白血球接着が白血球接着因子発現と関連したことから、Fluvastatin による臓器保護には白血球接着因子抑制が関与すると考えられ、全身の白血球接着因子の評価に網膜血管の白血球接着数測定が有効であると考えられた。

E. 結論

Fluvastatin による臓器保護には白血球接着因子抑制が関連する。全身の白血球接着因子の評価に網膜血管の白血球接着数測定が有効である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Takahashi H, Yaqiong W, Yanagi Y, Kawabata Y, Negoro H, Araie M, Uehara Y: Blood pressure rising determines adhesion of white blood cells to retinal artery in young spontaneously hypertensive rats. The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Fukuoka, Japan 2006
2. 高橋秀徳, Wu Yaqiong, 柳靖雄, 玉置泰裕, 沼部敦司, 新家眞, 上原譽志夫: Dahl 食塩感受性ラット腎障害に及ぼすアンギオテンシン受容体拮抗薬の影響と血管白血球接着との関連性。第30回日本高血圧学会総会。宜野湾市、沖縄県 2007
3. Wu Yaqiong, 高橋秀徳, 柳靖雄, 玉置泰裕, 沼部敦司, 新家眞, 上原譽志夫: Dahl 食塩感受性ラットの易腎障害性の機序と血圧上昇の役割。第30回日本高血圧学会総会。宜野湾市、沖縄県 2007
4. Takahashi H, Qyaning W, Numabe A, Yanagi Y, Tamaki Y, Araie M, Uehara Y: White blood cell adhesion and angiotensin ii mechanism in kidney damage in dahl salt-sensitive rats. ISN NEXUS SYMPOSIUM Hypertension and the Kidney. Vienna, Austria 2007
5. Qyaning W, Takahashi H, Numabe A, Yanagi Y, Tamaki Y, Araie M, Uehara

Y: The mechanisms of susceptibility of dahl strain to hypertensive kidney damage. ISN NEXUS SYMPOSIUM Hypertension and the Kidney. Vienna, Austria 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Arndt H, Smith CW, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Hypertension. May 21(5):667-673, 1993
2. Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, et al. Visualization and Quantitative Analysis of Leukocyte Dynamics in Retinal Microcirculation of Rats: Invest Ophthalmol Vis Sci 37:1341-1347, 1996

52. 糖尿病ラットの網膜における病態プロテオミクス解析

羽二生久、佐野令奈、小山省三、村田敏規
(信州大)

研究要旨 ストレプトゾトシンを投与した糖尿病ラット網膜の 2, 12 週における蛋白変化を二次元電気泳動と質量分析装置を用いたプロテオミクスの手法で網羅的に検討した。二次元電気泳動ゲル上のスポットのうち、量的に有為に変化し、同定できたスポットは 11 個で、6-phosphofructokinase、creatinkinase (mitochondrial) や glial fibrillary acidic protein 等であった。これらは糖代謝やリン酸化、神経膠の関連蛋白であり、糖尿病網膜症の発症機序を考える上で有用と思われる結果が得られた。

A. 研究目的

糖尿病ラット網膜を二次元電気泳動と質量分析を用いたプロテオミクスの手法で解析し、糖尿病による網膜蛋白発現変化を網羅的に検討した。

B. 研究方法

SD ラット (7 週齢, ♂) に streptozotocin (in 10mM citrate buffer (pH 4.5), 60mg/kg body weight) を尾静脈より投与し、糖尿病発症ラットを作製した (STZ 群)。糖尿病発症は血糖値が 300mg/dl を超えた事により確認した。対照群には同齢ラットに 10mM citrate buffer を投与した。糖尿病発症から 2, 12 週目にラットを深麻酔し、心臓から生理食塩水を還流後、眼球を摘出、網膜を採取した。網膜を lysis solution (7M urea, 2M thiourea, 5% β -mercaptoethanol, 4% CHAPS, 0.5% IPG buffer pH 3-10) でホモジネートし、二次元電気泳動 (一次元目: Immobiline drystrip pH 3-10NL 13cm, 二次元目: 12%

SDS-PAGE) を行い、各群 6 回繰り返した。一回の泳動に網膜 2 枚を使った。得られた二次元泳動ゲルを画像解析ソフト (PDquest Ver. 8.0) で解析・統計処理した。対照群と比較して 2 倍以上の発現量変化を認め、かつ有意差 ($p < 0.05$) のあった二次元泳動スポットを切り出し、トリプシン処理後、ペプチド断片を質量分析装置 (MALDI-TOF-MS; Voyager Elite-Pro) で測定した。

その測定値から peptide mass fingerprint 検索のために MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) を用いて個々の蛋白を同定した。

(倫理面への配慮)

実験は当大学の動物実験委員会の承認を得た後に ARVO の statement に従って行った。

C. 研究結果

STZ 群は全例が高血糖になり、網膜採取時まで持続した。

各二次元電気泳動ゲル上では、600 個以上のスポットが検出できた。各群の時系列毎

に解析を行った結果、二次元電気泳動ゲル上のスポットで 2 週では 7 個、12 週では 6 個が対象群に比べて STZ 群で有為に 2 倍以上の量的変化を示した (図 1)。

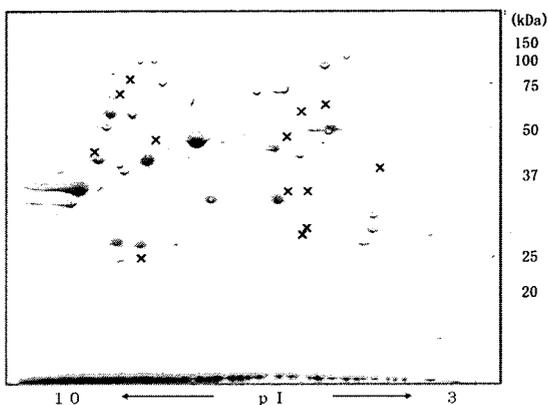


図 1 代表的な糖尿病ラット網膜の二次元電気泳動ゲル像
×は有意差のあったスポット位置

2 週で変化したスポットのうち、増加したスポットは 2 個で、蛋白を同定したところ、1 個は糖代謝関連蛋白である protein phosphatase 2A (PP2A) であった。残りの 5 個は減少しており、同定できた蛋白のうち 1 個はリン酸化蛋白である mitochondrial creatin kinase (MtCK) であった。

12 週では 1 個のスポットを除いて、すべて増加していた。そのうちの 1 個は神経関連蛋白の glial fibrillary acidic protein (GFAP) であった (図 2)。減少していたスポットは糖代謝関連蛋白である 6-phosphofructokinase (PFK1) であった。2 週と 12 週で共通するスポットはなかったが、PFK1 は 2 週でも STZ 群で低下する傾向が見られた (図 3)。

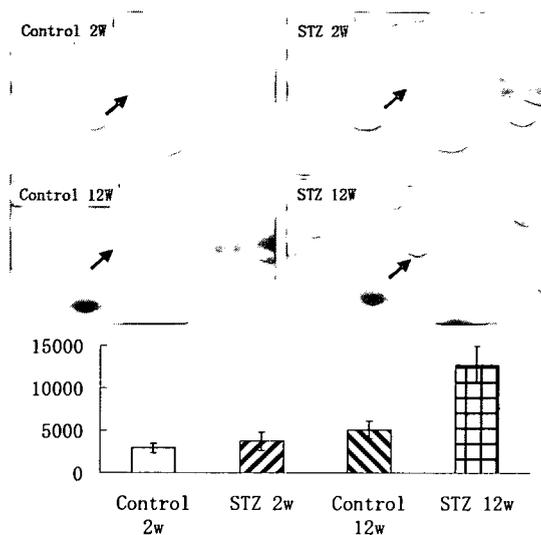


図 2 GFAP の発現パターン像と発現量変化
矢印が GFAP のスポット

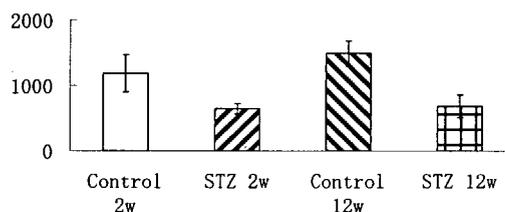


図 3. PFK1 の発現量変化

D. 考察

今回、同定された蛋白に GFAP が含まれている。この蛋白はラットやマウスの糖尿病網膜症モデルでの糖尿病発症初期で増加することが、ウエスタンブロット等の方法ですでに報告されている。我々の結果と同様、4 週では変化は見られず、その後、増加している。これまでに報告されているプロテオミクスデータでは GFAP のこのような変化は報告されていない。今回の二次元電気泳動ではこの変化を捉えることに成功するとともに、さらに、統計的に有意差をもち、かつ 2 倍以上の変化という高いクライテリアを設定することによって、信憑性の高い

結果を得ることができたと考えている。PFK1 はグルコースの解糖系酵素の一つである。肝臓など一部の組織を除いて、インスリンは解糖系を促進するといわれており、さらに、インスリンによって PFK 活性が上昇することが報告されている。我々の結果はインスリン分泌がほとんど無い状態を反映しているのかもしれない。同様に、インスリンシグナルカスケードに関連する酵素の脱リン酸化に関与していると考えられている PP2A についても、インスリンの分泌が PP2A の発現を抑制し、かつ、糖尿病患者の骨格筋において、発現の増加が報告されている。

また、エネルギー代謝に関与しているリン酸化蛋白である MtCK も減少しており、これも他の組織の結果と一致している。

同定した蛋白の網膜における機能や網膜症の発症に関連する報告は必ずしも多くないが、他の組織において糖尿病関連が報告されている蛋白が含まれており、今後、詳細を検討するに値するといえる。

E. 結論

プロテオミクス的手法により糖尿病ラット網膜において 11 個の蛋白の発現量変化を検出した。これらの蛋白の網膜における機能を明らかにすることは、糖尿病網膜症の機序を考える上で有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Lieth E et al: Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group. Diabetes. 47:815-820, 1998
2. Feit-Leichman RA et al: Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 46:4281-4287, 2005
3. Quin GG et al: Proteome map of normal rat retina and comparison with the proteome of diabetic rat retina: new insight in the pathogenesis of diabetic retinopathy. Proteomics. 7:2636-2650, 2007
4. Silva AP et al: Effects of insulin and actin on phosphofructokinase activity and cellular distribution in skeletal muscle. An Acad Bras Cienc. 76:541-548, 2004
5. Højlund K et al. Effect of insulin on protein phosphatase 2A expression in

muscle in type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest.* 32:918-923, 2002

6. Turko IV, Murad F. Quantitative protein profiling in heart mitochondria from diabetic rats. *J Biol Chem.* 278:35844-35849, 2003

53. 硝子体内液性因子の包括的解析：各種網膜硝子体疾患の比較

菅原美香、園田康平、吉村 武、肱岡邦明、望月泰敬、
江内田寛、大島裕司、上野暁史、畑 快右、石橋達朗
(九州大)

研究要旨 近年、網膜硝子体疾患、特に糖尿病網膜症患者の硝子体液中の液性因子についての報告が散見され^{(1)~(3)}、網膜硝子体疾患に炎症の要素があると考えられる。そのため、種々の網膜硝子体疾患において、硝子体中の液性因子の濃度についての知識を得ることは重要である。昨年、我々は糖尿病網膜症症例 139 例の硝子体内液性因子の包括的解析を行い、糖尿病網膜症患者で IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF が上昇しており、IL-6, IL-8, MCP-1 に相関関係がみられることなどの知見を得た。今回我々は、糖尿病網膜症の症例数を増して解析を行うとともに、手術を要したその他の網膜硝子体疾患についても硝子体液を採取し、液性因子の濃度を包括的に測定、解析を行った。対象は糖尿病黄斑浮腫 (DME) 群 92 例、増殖糖尿病網膜症 (PDR) 群 132 例、網膜静脈分枝閉塞症 (BRVO) 群 30 例、網膜中心静脈閉塞症 (CRVO) 群 13 例、裂孔原性網膜剥離 (RRD) 群 57 例、control 群 (黄斑円孔・黄斑上膜) 81 例である。採取した硝子体液は蛍光マイクロビーズアレイシステム (Luminex[®]) を用いて種々の液性因子濃度の同時測定を行った。control 群と比較して全ての疾患で 21 種の測定項目のうち IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF が検出感度以上で上昇を認めた。その 4 因子は DME 群より PDR 群、また BRVO 群より CRVO 群において有意に上昇していた。VEGF は、上昇している疾患 (PDR 群、CRVO 群) と上昇していない疾患 (DME 群、BRVO 群、RD 群) に分かれた。個々の症例レベルで 4 因子の相関を検討した結果、IL-6, IL-8, MCP-1 の 3 因子は、いずれの疾患でも相互に相関しながら上昇している傾向があった。VEGF が上昇していた PDR 群、CRVO 群に関して、VEGF とその他の 3 因子を比較したところ、PDR 群では VEGF といずれも相関していたが、CRVO 群では相関がみられず、VEGF が独立して著明に上昇している結果となった。Luminex[®] を用いた包括的解析により、各網膜硝子体疾患における硝子体内液性因子の差異を明らかにすることができた。

A. 研究目的

近年、網膜硝子体疾患、特に糖尿病網膜症患者の硝子体液中の液性因子についての報告が散見される。増殖糖尿病網膜症 (PDR) 8 例で IL-6 の上昇がみられたという報告⁽¹⁾ や、糖尿病黄斑浮腫 (DME) 26 例で IL-6 と

VEGF が上昇かつ高い相関を示していたという報告⁽²⁾、また増殖硝子体網膜症 20 例と網膜剥離 (RD) 9 例で MCP-1 の上昇がみられたという報告⁽³⁾ がある。このことから、網膜硝子体疾患は炎症の要素が関与していると考えられる。

また 1994 年に糖尿病網膜症など網膜虚血性疾患患者の硝子体中において VEGF の濃度が有意に高いという報告⁽⁴⁾ののち、現在では Bevacizumab (Avastin[®]) や Ranibizumab (Lucentis[®])により VEGF をターゲットとした分子標的療法が糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症等の網膜硝子体疾患で奏功することが広く知られるようになってきた⁽⁵⁾。

以上のような背景から網膜硝子体疾患の硝子体液中の液性因子の濃度について知識を得ることは重要と考えられる。

今回我々は、手術を要した各種網膜硝子体疾患患者の硝子体液について Luminex 100[®] (Luminex 社)を用いた蛍光マイクロビーズアレイシステムにより、各疾患に関わる液性因子の濃度につき包括的に解析した。

B. 研究方法

対象は、2005 年 9 月から 2007 年 2 月の期間に九州大学で硝子体手術を施行された 405 例 (男性 217 例、女性 188 例) で、手術開始時(灌流前)に採取した硝子体サンプルを用いた。内訳は、対照群 81 例、糖尿病黄斑浮腫(DME)群 92 例、増殖糖尿病網膜症(PDR)群 132 例、網膜中心静脈閉塞症(CRVO)群 13 例、網膜静脈分枝閉塞症(BRVO)群 30 例、裂孔原性網膜剥離(RRD)群 57 例であった。年齢の平均は control 群 47~83 歳・平均 65.9 歳、DME 群 33~86 歳・平均 62.9 歳、PDR 群 24~81 歳・平均 55.3 歳、CRVO 群 52~88 歳・平均 71.6 歳、BRVO 群 52~86 歳・平均 69.8 歳であった。採取した硝子体は -80℃にて保存、解析時に PBS にて 10 倍希釈し、Biosource 社の Antibody beads kit

と Luminex 社の Luminex 100[®]を使用して 21 種類の液性因子を包括的に測定した。測定項目は IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-17, IFN-g, TNF-a, IL-8, eotaxin, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, RANTES, EGF, basic FGF, G-CSF, GM-CSF である。

(倫理面への配慮)

硝子体サンプルの採取については、九州大学倫理委員会の承認を得た上、患者にはインフォームドコンセントを行った。

C. 研究結果

測定結果を図 1-4 に示す (* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$; Mann-Whitney U -test)。測定した 21 因子のうち、上昇していたのは IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF であった。IL-6, IL-8, MCP-1 は全ての疾患で上昇していた。IL-2, IFN-g, TNF-a など一般に T 細胞系に關与するサイトカインは上昇していなかった。VEGF は、上昇している疾患(PDR 群、CRVO 群)と上昇していない疾患(DME 群、BRVO 群、RD 群)に分かれた。上昇した 4 因子とも、DME 群より PDR 群、また BRVO 群より CRVO 群において有意に上昇がみられた。さらに上昇した 4 因子の各々個々の症例レベルでの相関関係を調べた (Spearman's 相関解析 (図 5))。その結果、IL-6, IL-8, MCP-1 の 3 因子は、いずれの疾患でも相互に相関しながら上昇している傾向があった。VEGF が上昇していた PDR 群、CRVO 群に関して、VEGF とその他の 3 因子を比較したところ、PDR では VEGF といずれも相関していたが、CRVO 群では相関がみられず、VEGF が独立して著明に上昇している結果となった。

図1

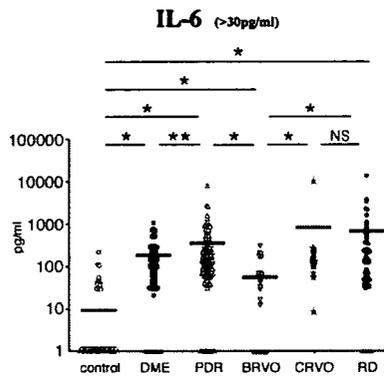


図2

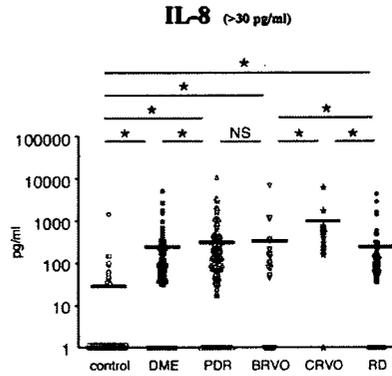


図3

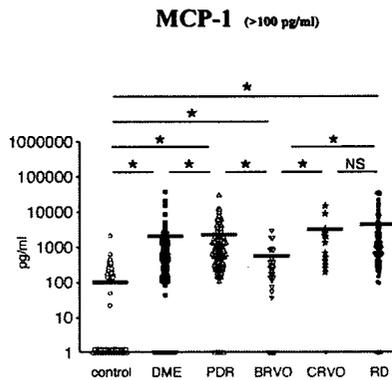


図4

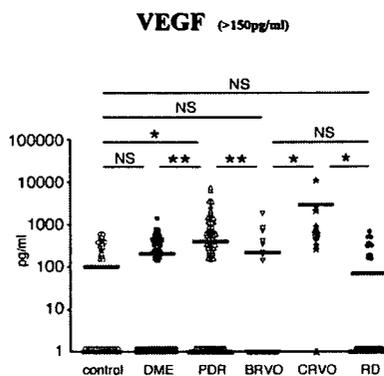


図5. 相関解析 (Spearman's correlation)

	DME (n=92)	PDR (n=132)	BRVO (n=30)	CRVO (n=13)	RRD (n=57)
IL-6 / IL-8	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.01
IL-6 / MCP-1	P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.05	P<0.01
IL-8 / MCP-1	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P=0.09	P<0.01
IL-6 / VEGF		P<0.01		P=0.61	
IL-8 / VEGF		P<0.01		P=0.58	
MCP-1 / VEGF		P<0.05		P=0.63	

D. 考察

1. いずれの網膜硝子体疾患においても、IL-6, IL-8, MCP-1 を介した炎症による組織破壊・単球細胞浸潤は主な病態を形成することが考えられた。

2. PDR 群ではそれら 3 因子を基盤とした VEGF の産生が起こっているのに対し、CRVO 群ではそれら 3 因子と無関係に虚血から VEGF が独立して産生されているのではないかと考えた。

3. 加えて網膜虚血性疾患においては、VEGF による血管透過性の亢進・血管新生促進作用が更に難治化する原因になるという意見を支持する結果となった。

E. 結論

蛍光マイクロビーズアレイシステム (Luminex®) を用いた包括的解析によって、各網膜硝子体疾患における硝子体内液性因子の差異を明らかにすることができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

in the treatment of neovascular age-related macular degeneration: applying clinical trial results to the treatment of everyday patients. *Am J Ophthalmol.* 144(4): 627-637, 2007.
review

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

1. Mocan MC et al.: Elevated intravitreal interleukin-6 levels in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Can J Ophthalmol.* 41: 747-752, 2006.
2. Funatsu H et al.: Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 110:1690-1696, 2003.
3. Capeans C et al.: C-C chemokines in the vitreous of patients with proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy. *Retina.* 18: 546-550, 1998.
4. Aiello LP et al.: Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 331(22): 1480-1487, 1994
5. Brown DM et al.: Anti-VEGF agents

54. 糖尿病網膜症に伴う線維血管増殖組織中の新生血管における tumor endothelial marker 7 の発現

吉田茂生¹⁾²⁾、山地陽子¹⁾、佐藤孝太¹⁾、仙石昭仁¹⁾、大内田研宙¹⁾、吉田綾子¹⁾
江内田寛¹⁾、石川桂二郎¹⁾、藤澤公彦³⁾、向野利寛²⁾、石橋達朗¹⁾
(¹⁾九州大、²⁾福岡大筑紫、³⁾九州厚生年金病院)

研究要旨 我々は以前、増殖糖尿病網膜症に伴う線維血管増殖組織(以下増殖組織)の包括的遺伝子発現解析を行い、腫瘍新生血管で特異的に発現が上昇していると考えられている tumor endothelial marker 7 (TEM7)が増殖組織でも発現していることを発見した。今回複数の増殖組織を用いて TEM7 の発現レベルおよび局在を検討したので報告する。対象は 1996～2007 年に福大筑紫病院、九州大学および九州厚生年金病院において硝子体手術の際に採取した増殖組織 15 検体。対照コントロールとして特発性網膜上膜(iERM)5 検体を用いた。TEM7mRNA の発現は iERM ではほとんど認められなかったのに対し、増殖組織 10 検体全てで有意に発現レベルが上昇していた。TEM7PCR 産物のダイレクトシーケンスでは、増殖組織中に膜型、分泌型、細胞内停留型のアイソフォームが存在していた。蛍光免疫二重染色では、増殖組織中で TEM7 と血管内皮細胞のマーカーである CD34 が共染色された。免疫電子顕微鏡法では、TEM7 は管腔側の新生血管内皮細胞膜に局在していた。TEM7 は増殖組織において新生血管の機能維持に関与していることが示唆され、新しい診断や治療の分子マーカーになる可能性があると考えた。

A. 研究目的

糖尿病網膜症は先進国において主要な失明原因疾患のうちの 1 つである。増殖糖尿病網膜症(proliferative diabetic retinopathy;PDR)の病態増悪因子として網膜血管新生がある。網膜新生血管が線維性の増殖を伴い線維血管増殖組織(fibrovascular membranes ;FVMs、以下増殖組織と記述)を形成すると、牽引性網膜剥離を生じ、失明へ至る。

我々は以前、PDRにともなう増殖組織から cDNAライブラリを作成し、7000クローンの EST解析を行い、腫瘍新生血管で特異的に発現が上昇している TEM7 が増殖組織でも発現

していることを発見した。そこで、増殖組織形成における TEM7 の特徴的な役割を明らかにすることで、網膜血管新生の形成機序の理解を深め、新しい診断や治療につながる可能性がある。

本研究では、PDR患者からの摘出増殖組織中の新生血管において、TEM7 mRNA および蛋白が発現しているか否かについて検討し、TEM7 の網膜血管新生における役割について論じた。

B. 研究方法

1996～2007 年に福大筑紫病院、九州大学および九州厚生年金病院において PDR を有す

る II 型糖尿病患者から経毛様体扁平部硝子体手術の際に 15 検体の増殖組織を摘出した。対照コントロールとして特発性網膜上膜 (ERM) 5 検体も採取した。

PDR患者10名(平均年齢62.5±14.6歳、罹病期間 15.2±8.6 年)からえられた増殖組織サンプル と対照のERM患者5 名(平均年齢72.7±14.8 歳)は

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析に用いた。残りの増殖組織 5 サンプル(平均年齢57.2±18.9 歳、罹病期間18.1±12.5 年)は免疫染色と *in situ* hybridizationに用いた。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に基づいて行った。九州大学病院倫理委員会の承認に基づき、患者から術前にインフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究結果

TEM7mRNA の発現は iERM ではほとんど認められなかったのに対し、増殖組織 10 検体全てで有意に発現レベルが上昇していた

(図 1)。TEM7PCR 産物のダイレクトシーケンスでは、増殖組織中に膜型、分泌型、細胞内停留型のアイソフォームが存在していた。蛍光免疫二重染色では、増殖組織中で TEM7 と血管内皮細胞のマーカーである CD34 が共染色された。免疫電子顕微鏡法では、TEM7 は管腔側の新生血管内皮細胞膜に局在していた。

D. 考察

TEM7mRNA は PDR 患者増殖組織に発現していることが明らかとなった。 *in situ*

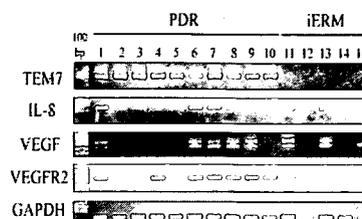


図 1 増殖糖尿病網膜症患者 (PDR; 1-10) からの線維血管増殖組織および特発性網膜前膜患者からの網膜前膜 (iERM; 11-15)における TEM7、インターロイキン 8 (IL-8)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、VEGFR2 の半定量 RT-PCR 解析

hybridization および免疫染色で、TEM7 は増殖組織の血管内皮細胞に局在することが示された。VEGF やその受容体といった血管新生因子が新生血管を含まない ERM のいくつかにも発現していたのに対し、TEM7 の発現は PDR 患者増殖組織中の血管内皮細胞に特異的に発現上昇していた(図 1)。これらの結果は、TEM7 は増殖組織中の新生血管の機能維持に重要な役割を演じている可能性を示唆している。

TEM7の増殖組織中の血管内皮細胞での発現レベル増加は、TEM7が創傷治癒や胎盤形成などを含めた血管新生のマーカーであることを支持している。我々の結果は、胎生期の生理的血管新生や腫瘍血管新生などにおいておこる遺伝子発現プロファイルを、ヒト網膜血管新生が少なくとも部分的に共有していることを示唆している。

TEM7の機能は完全には明らかでない。増殖組織cDNAを鋳型としたTEM7の塩基配列解析では、TEM7は長い細胞外領域、疎水性の膜貫通領域、細胞質尾部からなる一型膜貫通型蛋白であると想定される。これを支持