

## 増殖性糖尿病網膜症眼の硝子体内における 血管内皮増殖因子の検出

尾崎 弘明<sup>1)</sup>, 林 英之<sup>1)</sup>, 大島 健司<sup>1)</sup>, 今永 至親<sup>2)</sup>  
黒木 政秀<sup>3)</sup>, 荒川 文子<sup>3)</sup>, 桑原 元尚<sup>3)</sup>, 松岡 雄治<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>福岡大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>村上華林堂病院眼科, <sup>3)</sup>福岡大学医学部第一生化学教室

### 要 約

血管内皮細胞に特異的に作用し, 低酸素刺激で誘発される血管新生促進因子である血管内皮細胞増殖因子の増殖性糖尿病網膜症の硝子体内における存在を免疫学的に検索した。硝子体手術が施行された増殖性糖尿病網膜症10例10眼を対象とし, 対照群として特発性黄斑部網膜上膜形成症, 切迫黄斑円孔, 増殖性硝子体網膜症, 穿孔性眼外傷の計10例10眼を用いた。硝子体手術時に希釈せず硝子体を採取し, 脱塩, 凍結乾燥で濃縮し, SDS-ポリアクリラミド電気泳動後, western blotting, 免疫染色を行った。免疫染色の一次抗体にはヤギ抗ヒト血管内皮細胞増殖因子ポリクローナル抗体, 二次抗体にはビオチ

ン標識ウサギ抗ヤギ IgG を用いた。その結果, 増殖性糖尿病網膜症の10例中7例に免疫反応陽性のバンドが認められ, 非増殖性糖尿病網膜症群においては全例目的とするバンドは認められなかった。このことから, 増殖性糖尿病網膜症の眼内には血管内皮細胞増殖因子が存在し, 眼内血管新生の発生, 進行に関与する可能性が示唆された。(日眼会誌 100: 208-212, 1996)

キーワード: 血管内皮増殖因子(VEGF), 増殖性糖尿病網膜症, 眼内血管新生, Western blotting

## Immunodetection of Vascular Endothelial Growth Factor in the Vitreous of Eyes with Proliferative Diabetic Retinopathy

Hiroaki Ozaki<sup>1)</sup>, Hideyuki Hayashi<sup>1)</sup>, Kenji Oshima<sup>1)</sup>,  
Yoshichika Imanaga<sup>2)</sup>, Masahide Kuroki<sup>3)</sup>, Fumiko Arakawa<sup>3)</sup>,  
Motohisa Kuwahara<sup>3)</sup> and Yuji Matsuoka<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka University

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Murakamikirindou Hospital

<sup>3)</sup>Department of First Biochemistry, School of Medicine, Fukuoka University

### Abstract

To determine the association of a hypoxia-induced, vascular endothelial cell selective growth factor: vascular endothelial growth factor (VEGF) on proliferative diabetic retinopathy (PDR), undiluted vitreous fluids were collected from 10 eyes with PDR at the time of vitrectomy. Vitreous fluids from 10 eyes without PDR were used as control. All samples were electrophoresed with a 14% sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel, and electrically transferred to a Durapore membrane. Immunoblot detection of VEGF was done by standard western blotting using rabbit polyclonal anti-human VEGF antibody. Positive immunoreaction bands were ob-

served on lanes of 7 samples from PDR, and they were comigrated with recombinant human VEGF. No reactions were observed on lanes of all samples without PDR. The presence of VEGF within the vitreous fluids of eyes with PDR was determined, and suggesting the association of VEGF with PDR. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 208-212, 1996)

Key words: Vascular endothelial growth factor (VEGF), Proliferative diabetic retinopathy (PDR), Ocular neovascularization, Western blotting

別刷請求先: 814-80 福岡県福岡市城南区七隈7-45-1 福岡大学医学部眼科学教室 尾崎 弘明  
(平成7年6月1日受付, 平成7年10月19日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroaki Ozaki, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Fukuoka University,  
7-45-1 Nanakuma Jyounan-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka-ken 814-80, Japan

(Received June 6, 1995 and accepted in revised form October 19, 1995)

## I 緒 言

網膜血管新生は、網膜毛細血管床の閉塞と、その結果生じる網膜虚血により誘発されることが臨床的に認められている。したがって、網膜血管新生を誘発する血管新生促進因子は、網膜の低酸素状態において活性が増大し、血管内皮細胞の活性化、増殖を引き起こすと考えられている<sup>1)</sup>。生体に投与すると、血管新生を引き起こす因子としては塩基性線維芽細胞成長因子(basic-fibroblast growth factor, basic-FGF)などの様々な増殖因子が知られているが<sup>2)</sup>、それらの多くは網膜の実験的虚血や低酸素による影響を受けることはなく、また血管内皮細胞以外の線維芽細胞などに対しても増殖促進作用をもつことから、補助的な因子であると考えられている。

最近になって、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)が低酸素刺激による産生、分泌の増加がみられる唯一の血管新生促進因子として知られるようになり、また、血管内皮細胞の増殖を選択的に刺激することから、現在のところ眼内血管新生において最も主要な役割を果たしていると考えられつつある<sup>3)~8)</sup>。

Millerら<sup>9)</sup>は血管新生を作製した動物モデル(サル)で眼内のVEGFの濃度が血管新生の程度、タイミングと相関すること、VEGFが網膜の内顆粒層で産生され、眼内に分泌されると報告している。また、Adamisら<sup>10)</sup>は増殖性糖尿病網膜症(PDR)の硝子体内におけるVEGFの濃度を sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で測定し、非増殖性糖尿病網膜症群よりも高値

であることを報告した。今回我々も同様に、VEGFのPDRの硝子体内におけるVEGFの存在について免疫学的に検索を行ったのでここに報告する。

## II 対象と方法

### 1. 対 象

1994年4月から1995年1月までの10か月の間に福岡大学病院眼科および村上華林堂病院眼科で施行された増殖性糖尿病網膜症の硝子体手術初回例10例10眼(男性3名、女性7名、平均年齢±標準偏差55.4±5.8歳)を対象とした。対照群として特発性黄斑部網膜上膜形成症3例3眼、切迫黄斑円孔2例2眼、増殖性硝子体網膜症3例3眼、穿孔性眼外傷2例2眼の計10例10眼(男性5名、女性5名、平均年齢±標準偏差50.8±23.1歳)を対象とした。各症例の病態を表1に示す。

### 2. 方 法

#### 1) 硝子体の採取、濃縮

硝子体手術時に3ポート作製後、1mlのディスプレイの注射器をつけた25ゲージ針をポートから眼内に挿入し、希釈せずに0.5~1.0mlの硝子体を採取した。採取した硝子体は速やかに-20°Cで保存した。次に、各検体を濃縮する目的で、100μlずつを8/32透析チューブ(三光純薬)で一晩透析し脱塩処理後、Freeze Dryer DC 41 A(Yamato社製)で凍結乾燥を行った。

#### 2) Western blotting

各試料を10μlの蒸留純水に溶解し、Laemmli<sup>10)</sup>の方法に従ってSDS-PAGE(14%ゲル、サイズ80×80×1mm)を行った。また、対照としてのヒトリコンピナント

表1 対象と結果

症例	性	年齢	病 名	術前光凝固	硝子体出血	網膜剝離	VEGF
1	男	63	増殖性糖尿病網膜症	汎網膜光凝固	全周	なし	陽性
2	女	59	増殖性糖尿病網膜症	汎網膜光凝固	全周	なし	陽性
3	女	56	増殖性糖尿病網膜症	汎網膜光凝固	全周	なし	陰性
4	女	47	増殖性糖尿病網膜症	汎網膜光凝固	全周	なし	陰性
5	女	55	増殖性糖尿病網膜症	汎網膜光凝固	1/2象限	なし	陽性
6	女	51	増殖性糖尿病網膜症	汎網膜光凝固	1/2象限	なし	陽性
7	男	53	増殖性糖尿病網膜症	汎網膜光凝固	1/2象限	なし	陽性
8	女	64	増殖性糖尿病網膜症	汎網膜光凝固	なし	あり	陰性
9	女	48	増殖性糖尿病網膜症	汎網膜光凝固	なし	あり	陽性
10	女	58	増殖性糖尿病網膜症	汎網膜光凝固	全周	なし	陽性
11	男	71	特発性黄斑部網膜上膜形成症	なし	なし	なし	陰性
12	女	67	特発性黄斑部網膜上膜形成症	なし	なし	なし	陰性
13	女	57	特発性黄斑部網膜上膜形成症	なし	なし	なし	陰性
14	女	73	切迫黄斑円孔	なし	なし	なし	陰性
15	男	61	切迫黄斑円孔	なし	なし	なし	陰性
16	男	45	増殖性硝子体網膜症	なし	なし	あり	陰性
17	女	74	増殖性硝子体網膜症	なし	なし	あり	陰性
18	男	26	増殖性硝子体網膜症	なし	なし	あり	陰性
19	男	14	穿孔性眼外傷	なし	なし	あり	陰性
20	女	20	穿孔性眼外傷	なし	なし	あり	陰性

VEGF：血管内皮増殖因子

VEGF 165(Pepro Tech)も同時に泳動した。泳動後、Trans-blot SD Transfer Cell(Bio-Rad 社製)でデュラポアメンブレン(Millipore)へのトランスブロットを行った後、免疫染色を以下の手順で行った。一次抗体、二次抗体の濃度および反応時間、洗浄の回数などは予備実験により決定した。①転写メンブレンをブロックエース®(大日本製薬)で一晩ブロッキング、② washing buffer (0.01 M BBS: borate buffered saline, 0.05% NP-40, pH 8.0) で5分間ずつ3回洗浄、③一次抗体のヤギ抗ヒト VEGF ポリクロナール抗体(Pepro Tech)溶液で2時間振盪、④ washing buffer で10分間ずつ3回洗浄、⑤二次抗体のビオチン標識ウサギ抗ヤギ IgG(Vector)溶液で1時間振盪、⑥ washing buffer で10分間ずつ3回洗浄、⑦酵素反応としてアビジン標識 Horse-Raddish-Peroxydase(Vector)溶液で30分間振盪、⑧ washing buffer で10分間ずつ3回洗浄、⑨発色剤として3,3'-Diaminobenzidin, tetrahydrochloride(DAB), 基質として30% 過酸化水素水を加えて20分間反応、⑩停止液(イオン交換蒸留純水)を加え発色停止。

### III 結 果

ヤギ抗ヒト VEGF 抗体を用いた免疫染色の結果、PDR の症例 10 例中 7 例に 50 kDa, 45 kDa, 30 kDa に 3 本のバンドが認められた。また、残りの 3 例は 50 kDa, 30 kDa の 2 本のバンドのみが認められた。図 1 に代表例の結果を提示する。これらのバンドが VEGF か非特異的反応かを検討するため、非免疫ヤギ IgG を用いて同様の条件での対照反応を行った。その結果、50 kDa, 30 kDa の 2 本のバンドのみが認められ、45 kDa のバンドは認められなかった(図 2)。よって、図 1 に矢印で示した 45 kDa のバンドは VEGF であり、他の 2 本は非特異的反応であると考えられた。

一方、非増殖性糖尿病網膜症群の各疾患では、全例 VEGF に相当するバンドは認められなかった(図 3)。全症例の結果を表 1 に示す。

さらに、今回の条件下でのヒトリコンビナント VEGF の検出限界を同様の方法で求めたところ、1 レーン当たりの VEGF が 1.25 ng まで検出された(図 4)。

### IV 考 按

糖尿病網膜症の血管新生を惹起する因子としては、これまでに塩基性線維芽細胞成長因子(basic-FGF)、インスリン様増殖因子-1(insulin like growth factor-1)などの増殖因子が知られており、それらの濃度が硝子体中で上昇していることが明らかにされている<sup>12)13)</sup>。

一方、VEGF は低酸素刺激で産生、分泌が増加すること、さらに、血管内皮細胞のみに特異的に作用する 2 つの性質をもつ唯一の血管新生促進因子であり、網膜血管新生において主要な役割を果たす増殖因子として最近特に

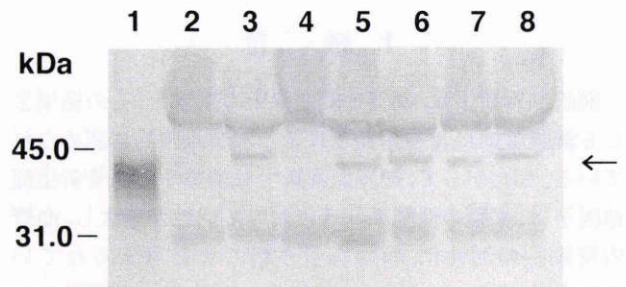


図 1 増殖性糖尿病網膜症(PDR)の硝子体の western blotting 所見(ヤギ抗ヒト血管内皮細胞増殖因子(VEGF)抗体)。

Lane 1: ヒト VEGF (20 ng), Lane 2: 症例 3, Lane 3: 症例 5, Lane 4: 症例 4, Lane 5: 症例 6, Lane 6: 症例 7, Lane 7: 症例 9, Lane 8: 症例 10, Lane 3, 5, 6, 7, 8 に VEGF に相当する 45 kDa のバンドが認められる(矢印)。

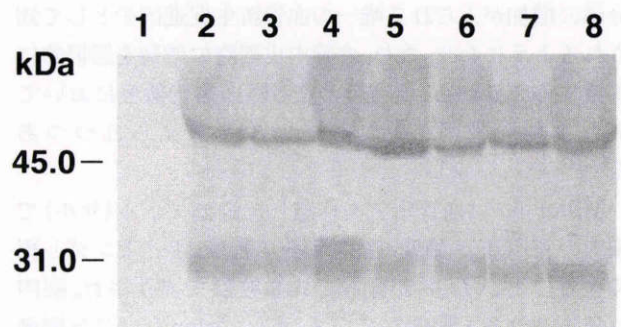


図 2 PDR の硝子体の western blotting 所見(非免疫ヤギ IgG)。

Lane 1: ヒト VEGF (20 ng), Lane 2: 症例 3, Lane 3: 症例 5, Lane 4: 症例 4, Lane 5: 症例 6, Lane 6: 症例 7, Lane 7: 症例 9, Lane 8: 症例 10, 図 1 の Lane 3, 5, 6, 7, 8 に認められた 45 kDa のバンドは認められない。

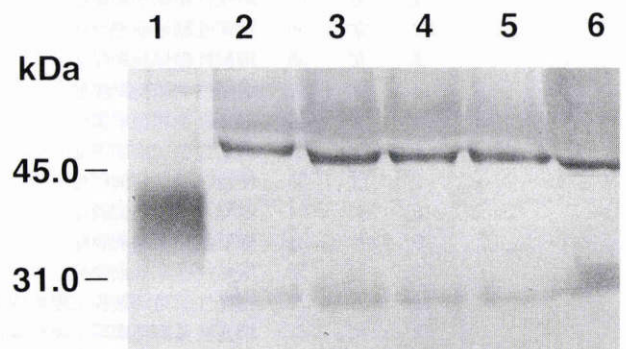


図 3 非増殖性糖尿病網膜症群の硝子体の western blotting 所見。

Lane 1: ヒト VEGF (20 ng), Lane 2: 症例 11(特発性黄斑部網膜上膜形成症), Lane 3: 症例 12(特発性黄斑部網膜上膜形成症), Lane 4: 症例 14(切迫黄斑円孔), Lane 5: 症例 17(増殖性硝子体網膜症), Lane 6: 症例 19(穿孔性眼外傷), 全例 VEGF に相当するバンドは認められない。

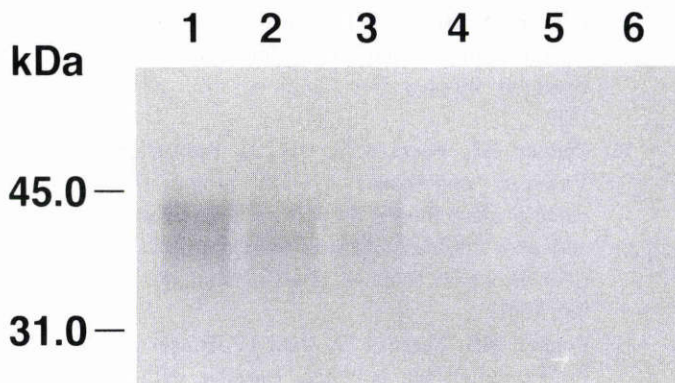


図4 ヒトリコンビナント VEGF の western blotting 所見(ナギ抗ヒト VEGF 抗体).

Lane 1: ヒト VEGF(10 ng), Lane 2: ヒト VEGF(5 ng), Lane 3: ヒト VEGF(2.5 ng), Lane 4: ヒト VEGF(1.25 ng), Lane 5: ヒト VEGF(0.68 ng), Lane 6: ヒト VEGF(0.34 ng), Lane 1, 2, 3, 4 に VEGF のバンドが認められる.

注目され解析が進められている<sup>3)~8)</sup>.

VEGF の研究は Senger ら<sup>14)</sup>が血管透過性を亢進させる蛋白性因子 VPF(vascular permeability factor)を腹水型腫瘍細胞から単離したのにはじまり、その後、Ferrara ら<sup>15)</sup>はヒト下垂体の folliculo-stellate 細胞の培養液中から分子量 43 kDa のポリペプチドを単離し、VEGF(vascular endothelial growth factor)と名付けたが、両者は同一の遺伝子に由来することが明らかとなった。

VEGF は *in vitro* において血管内皮細胞の増殖を促進するとともに、蛋白分解酵素である組織型プラスミノゲンアクチベーターやウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターの産生を促進する<sup>16)</sup>。さらに、培養血管内皮細胞のコラーゲンゲル内への侵入と管腔形成を惹起し、その作用は単独では弱く、basic-FGF の共存で相乗的に促進される<sup>17)</sup>。また、VEGF は basic-FGF などとは異なり、シグナルペプチドをもつ分泌蛋白であり、マクロファージや神経系細胞から産生分泌されることが知られている<sup>18)</sup>。

今回の我々の western blotting の結果、3本のバンドが認められたが、非免疫ヤギ IgG を用いた対照実験では、2本の非特異的なバンドのみが検出された。したがって、分子量約 45 kDa のバンドが VEGF であると証明された。また、検出された VEGF のバンドが各症例間でわずかな差が生じたが、これは検体を濃縮して電気泳動したことによる影響が考えられる。

Adamis ら<sup>10)</sup>は PDR の硝子体内における VEGF の濃度は PDR の患者 8 例で平均 29.1 pM と報告している。我々の検索の場合、VEGF の検出限界は 1 レーンにつき 1.25 ng であることから、硝子体内における濃度が約 31.2 pM 以上の場合に検出可能となる。したがって、彼らの結果とほぼ一致すると考えられる。今回の報告では

PDR 10 例中 7 例に VEGF が検出され、残る 3 例では検出されなかった。その理由としては、硝子体内の VEGF が我々の方法の検出感度以下であったこと以外に、検体の処理過程における蛋白の変性の可能性も考えられる。また、Adamis らは硝子体内の VEGF の濃度が硝子体出血の程度と相関すると説明しているが、今回の検出例と非検出例における硝子体出血の程度には明らかな差は認められず、さらに、網膜剥離の有無の点からも、PDR の病態の違いによる VEGF の検出、非検出の差は認められなかった。

また、硝子体中に検出された VEGF の由来に関しては、虚血網膜を伴う増殖性糖尿病網膜症にのみ VEGF が検出されたこと、VEGF はシグナル配列をもつ分泌蛋白であること、さらに、血中では極めて低濃度であることなどから<sup>19)</sup>、網膜由来の可能性が最も考えられる。

今回の報告では、PDR の硝子体内には VEGF が非増殖性糖尿病網膜症群に比べ高濃度に存在することが追認され、VEGF が眼内血管新生の発生、進行に関与している可能性が示唆された。今後、PDR の重症度と眼内の VEGF や basic-FGF との関係についてもさらに検討していきたい。

本論文の要旨は、第 99 回日本眼科学会総会(1995 年、名古屋)において発表した。

#### 文 献

- 1) Ashton N: Retinal neovascularization in health and disease. *Am J Ophthalmol* 44: 7-17, 1957.
- 2) Schweigerer L: Fibroblast growth factors and angiogenesis. *Z Kardiol* 78: 12-15, 1989.
- 3) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306, 1989.
- 4) Sheweki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845, 1992.
- 5) Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* 47: 211-218, 1991.
- 6) Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13: 18-32, 1992.
- 7) Senger DR, Water L, Brown L, Nagy A, Yeo K, Yeo Y, et al: Vascular permeability growth factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer and Metastasis Rev* 12: 303, 1993.
- 8) 林 英之: 血管新生促進因子・抑制因子, 眼科 New Insight 3. 眼内血管新生性疾患. メディカルビュー社, 21-29, 1994.
- 9) Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, et al: Vascular endothelial growth factor/Vascular permeability

- growth factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 145: 574—584, 1994.
- 10) **Adamis AP, Miller JW, Bernal M, D'Amico D, Folkman J, Yeo K, et al:** Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445—450, 1994.
  - 11) **Laemli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680—685, 1970.
  - 12) **Sivalingam A, Kenney J, Brown GC, Benson WE, Donoso L:** Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 108: 869—872, 1990.
  - 13) **Grant M, Russell B, Fitzgerald C, Merimee T:** Insulin-like growth factors in vitreous, studies in control and diabetic subjects with neovascularization. *Diabetes* 35: 410—420, 1986.
  - 14) **Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF:** Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983—985, 1983.
  - 15) **Ferrara N, Henzel WJ:** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851—858, 1989.
  - 16) **Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 902—906, 1991.
  - 17) **Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R:** Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 824—831, 1992.
  - 18) **Berse B, Brown L, Water L, Dvorak H, Senger DR:** Vascular permeability growth factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophage, and tumors. *Mol Biol Cell* 3: 211—220, 1992.
  - 19) **Yeo K, Wang H, Nagy J, Sioussat T, Ledbetter S, Hoogwerf AJ, et al:** Vascular permeability growth factor (Vascular Endothelial Growth Factor) in guinea pig and human tumor and inflammatory effusion. *Cancer Res* 53: 2912—2918, 1993.