

ヒト硝子体における血管内皮増殖因子とペントシジンの関係

橋本 浩隆¹⁾, 新井 清美¹⁾, 筑田 真¹⁾, 小原 喜隆²⁾¹⁾獨協医科大学越谷病院眼科, ²⁾獨協医科大学眼科学教室

要 約

糖尿病網膜症の発症が細小血管症にあることから, 血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)が発症要因の一つとして注目されている。また, 血液や網膜におけるグリケーションが糖尿病で進行することも特徴とされる。したがって, VEGFと advanced glycation end product (AGE)の変動を追求する必要がある。硝子体中の VEGF と AGE の一つであるペントシジンとの関係について, 糖尿病群(DM 群, 7 眼), 非糖尿病群(非 DM 群, 7 眼)で比較し, さらに, VEGF とペントシジンの相関係数を求め検討した。VEGF 値とペントシ

ジン値は, ともに DM 群で有意($p < 0.01$, $p < 0.05$)に高値であった。VEGF とペントシジンでは, 正の相関($r = 0.770$, $p < 0.001$)がみられた。硝子体中において, VEGF とペントシジンは関連性のある変動をとることが明らかとなったことから, AGE は糖尿病網膜症におけるサイトカインの分泌に関与し, 病態の発症・進展に影響すると推察した。(日眼会誌 102: 442—446, 1998)

キーワード: 血管内皮増殖因子(VEGF), ペントシジン, 糖尿病網膜症, グリケーション

Relationship between Vascular Endothelial Growth Factors and Advanced Glycation End Products in the Human Vitreous

Hirotaka Hashimoto¹⁾, Kiyomi Arai¹⁾, Makoto Chikuda¹⁾ and Yoshitaka Obara²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine²⁾Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine

Abstract

The relation between vascular endothelial growth factor (VEGF) and advanced glycation end product (AGE) is considered a primary factor in the development of diabetic retinopathy. Regarding the relation between VEGF in the vitreous body and pentosidine, an AGE, we compared a diabetic (DM) group (7 eyes) with a nondiabetic (nonDM) group (7 eyes), and investigated the correlation between VEGF and pentosidine by calculating the correlation coefficient. Levels of both VEGF and pentosidine were significantly higher in the DM group ($p < 0.01$, $p < 0.05$), and a positive correlation was observed between the lev-

els of VEGF and pentosidine ($r = 0.770$, $p < 0.001$). Since it is clear that there is a relation between VEGF and pentosidine in the vitreous body, we speculated that AGE is related to the secretion of cytokines in patients with diabetic retinopathy, and that it affects the development and progression of the disease. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 442—446, 1998)

Key words: Vascular endothelial growth factors (VEGF), Pentosidine, Diabetic retinopathy, Glycation

I 緒 言

血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)は糖尿病網膜症(diabetic retinopathy, DR)などの血管新生に関与するサイトカインとして知られている^{1)~4)}。非酵素的糖化反応の最終代謝生成物質(ad-

vanced glycation end product, AGE)は, マクロファージを介してサイトカインの合成・分泌を促進させると考えられている^{5)~6)}ことから, DR の発症要因として VEGF と AGE の関連が注目されている^{7)~8)}。今回我々は, 硝子体中の VEGF と AGE の一つであるペントシジンとの関係について検討した。

別刷請求先: 343-8555 埼玉県越谷市南越谷 2-1-50 獨協医科大学越谷病院眼科 橋本 浩隆
(平成 9 年 12 月 26 日受付, 平成 10 年 2 月 26 日改訂受理)

Reprint requests to: Hirotaka Hashimoto, M.D. Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine, 2-1-50 Minamikoshigaya, Koshigaya-shi, Saitama-ken 343-8555, Japan
(Received December 26, 1997 and accepted in revised form February 26, 1998)

II 実験対象ならびに方法

1. 対象

硝子体は、当院で硝子体手術の際に得られたものを材料とした。切除硝子体量を各試料で均一化するために、有水晶体眼で水晶体切除術を行わない症例を選んで採取した。切除硝子体は、手術中に水槽内に集め直ちに遠心分離(2,260×g, 4℃, 30分)を行い、血球ならびに切除した増殖組織を除去した後に試料とした。硝子体の試料は、N₂ガスを充填して-40℃で保存した。

硝子体の試料は、増殖糖尿病網膜症の手術で得た硝子体をDM群[7眼, 50.7±9.6(平均値±標準偏差)歳], 全身疾患のない眼外傷や特発性黄斑円孔の手術で得た硝子体を非DM群(7眼, 60.9±11.9歳)と分類し、腎症を併発している者は除外した。DM群の病態は、進行性の牽引性網膜剥離で手術適応となったものが2眼, 牽引性網膜剥離に硝子体出血を伴ったものが5眼であった。DM群の血糖コントロール状態はHbA_{1c}値8.64±3.11(平均値±標準偏差)%で、罹病期間は11.4±6.32(平均値±標準偏差)年であり、2群間の年齢に有意差はなかった。

すべての材料採取に際しては、本研究の主旨を説明のうえ患者の同意を得て行った。

2. 実験方法

1) VEGF 定量

VEGFの測定は、Quantikine[®] (R & D SYSTEMS社, 最小測定限界値5.0 pg/ml)を用いて固相酵素免疫測定法(ELISA法)で行った。抗ヒトVEGF murineモノクローナル抗体を固相化したマイクロプレートにprotein base緩衝液を50μlずつ注入し、さらに、試料を200μlずつ注入した。4℃で24時間静置して抗原抗体反応を行った後に、洗浄用バッファーで3度洗浄した。抗ヒトVEGFモノクローナル抗体と反応してプレートに残存した試料中のVEGFに対し、わさびペルオキシダーゼを標識した抗VEGFポリクローナル抗体200μlを注入して、4℃で12時間静置し抗原抗体反応を行った。再びプレートを洗浄用バッファーで3度洗浄し、ペルオキシダーゼ反応基質液200μlで発色させた。反応停止液である2N硫酸50μlを注入し、25分間反応させた後、波長450nmで吸光度を測定した。同時に標品の測定も行った。

2) ペントシジン定量⁹⁾

切除硝子体と同量の12N塩酸を混合し、シールドグラスチューブを用いて脱気後、N₂ガス充填による無酸素状態で110℃, 20時間の加水分解を行った。加水分解物をpore size 0.45μmの膜フィルター(DIS-MIC-25 cs, 東洋濾紙)で濾過し、濾液から200μlを取り20mlのイオン交換水で希釈して0.8×1.0cm SP-Sephadex C-25カラム(Pharmacia LKB, Uppsala, スウェーデン)に添加した。カラムを0.1N塩酸20mlで洗浄した後、1.0N塩酸

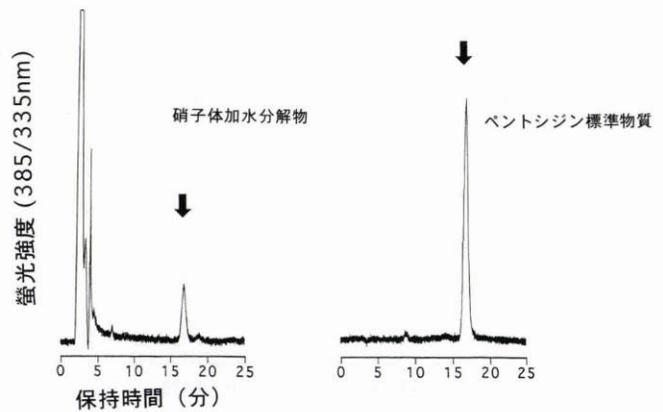


図1 硝子体加水分解物のhigh performance liquid chromatography (HPLC)によるクロマトグラム。

矢印はペントシジンのピークを示す。

5mlで溶出した。溶出液をTC-8 concentrator (タイテック社製)を用いて減圧下で蒸発させた。残留物を1.0% heptafluorobutyric acid 200μlで溶解し、その溶解液100μlを用いてhigh performance liquid chromatography (HPLC)に注入してペントシジンを測定した。

HPLCでの測定は、島津HPLCシステム(SCL-6 A system controller, LC-6 A pump, SIL-10 auto injector, RF-535 fluorescence HPLC monitor)を用いて行った。HPLCの条件は、flow rate 1 ml/min, 移動層には100%アセトニトリルと40 mM heptafluorobutyric acidの混合液(27:73 by vol)を使用し、反応温度を室温として8 mm×10 cm column prepacked with Radial-Pack C₁₈ (10 μm particle size, type 8 C 1810 μ, Waters Associates, MA, 米国)を用いて蛍光検出器(Excitation: 335 nm, Emission: 385 nm)で測定した(図1)。

3) 統計学的検討

測定したペントシジンとVEGFをそれぞれDM群と非DM群で比較し、さらに、両者の相関係数を求め、検討を行った。

統計解析は、Mann-Whitney U testを用いて行った。相関関係はPearsonの相関係数から求めた。統計処理結果の記載は平均値±標準偏差とした。

III 結果

1. 硝子体中 VEGF 値(図2)

硝子体 VEGF 値は、DM群 9.00±7.64 ng/vit, 非DM群は 1.34±0.71であり、DM群で有意(p<0.01)に高値であった。

2. 硝子体中ペントシジン値(図3)

硝子体ペントシジン値は、DM群 105.6±56.1 pmol/vit, 非DM群 40.4±23.8であり、DM群で有意(p<0.05)に高値であった。

3. 硝子体 VEGF と硝子体ペントシジンの相関(図4)

硝子体 VEGF と硝子体ペントシジンでは、正の相関(r

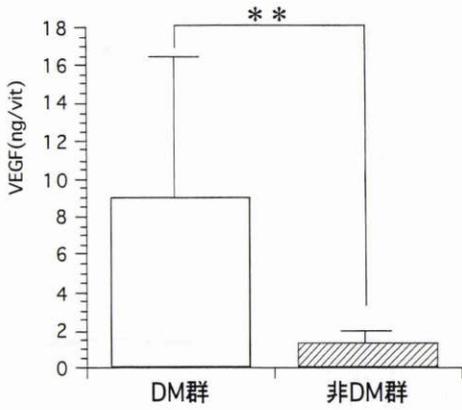


図2 硝子体におけるvascular endothelial growth factor (VEGF)の定量.

DM 群：糖尿病群, 非 DM 群：非糖尿病群

** : p<0.01, Mann-Whitney U test

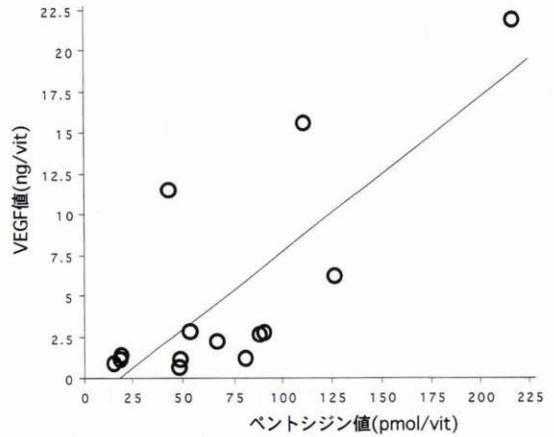


図4 硝子体における VEGF とペントシジンの相関.

$$Y = -1.714 + 0.094 X (r = 0.770, p < 0.001)$$

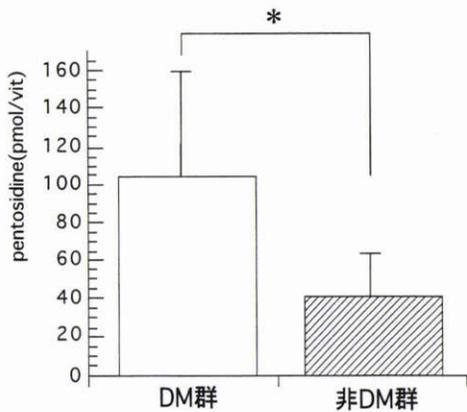


図3 硝子体におけるペントシジンの定量.

* : p<0.05, Mann-Whitney U test

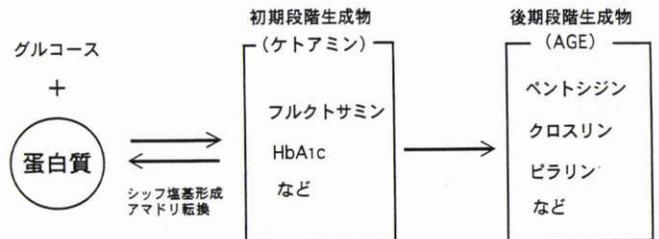


図5 グリケーションの進行経路.

AGE: advanced glycation endproducts

=0.770, p<0.001)がみられた.

IV 考 按

VEGF は 1983 年に腫瘍の分泌する血管透過性亢進因子 (vascular permeability factor, VPF) として単離された¹⁰⁾. 一方, 1989 年 Ferrara らにより下垂体濾胞細胞から血管内皮を特異的に増殖させる因子が発見され VEGF と名付けられたが, VPF と VEGF は 1989 年にそれらの complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) がクローニングされ¹¹⁾, 全く同一の遺伝子に由来する同一の蛋白質であることが明らかとなった. 分子量は約 4 万で, 分子量約 2 万のサブユニットのホモ二量体として形成される. ヒトの場合, スプライシングの差により 4 種類 (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) のサブタイプが報告¹²⁾されている. このうち, 生体内では主に VEGF₁₆₅ が生産され, 胎盤では VEGF₁₂₁ が生産される. 今回使用した, VEGF 測定キットは VEGF₁₆₅ を測定するものである. VEGF は, 血管内皮細胞増殖と血管透過性亢進に参与する多機能サイトカインの一つとされ, cyclic adenosin

3', 5'-monophosphate (cAMP), T-cell growth factor-β (TGF-β), tumor necrotizing factor-α (TNF-α), 低酸素状態や性ホルモンなどにより誘導されることが報告されており, 生理的な網膜血管新生のみならず, DR の病態に参与するものと考えられている⁵⁾. 1994 年には Aiello ら¹⁾ によって DR 患者の硝子体や房水中では VEGF 活性が増加しており, DR の臨床的悪性度と相関することが報告されている.

グリケーションは, 非酵素的に蛋白質を糖化する反応であり, 生体内で生じ得る一般的反応である. 糖尿病患者では高血糖の状態が持続することから, この反応が強く起こると考えられており, 糖尿病のさまざまな併発症を起こす発症要因の一つとされている. 図5は, グリケーションの進行経路を示したものである. グルコースなどの還元糖が蛋白質のリジン残基と反応することに始まり, その初期段階のやや安定なアマドリ化合物である中間生成物のケトアミンが生成される. さらに反応が進行すると, 後期段階には AGE が生成される. 現在, AGE として構造が同定されている主なものにペントシジン, ピラリン, クロスリンが挙げられるが, ピラリンは蛍光性を有しないとされ, また, クロスリンは強酸による加水分解には耐えられないことが知られている¹³⁾. 今回は, AGE のうち強酸に耐え蛍光を有するペントシジンの特徴を生かして, 硝子体からペントシジンを分離・定量した.

ペントシジンは、1989 年 Sell ら¹⁴⁾により脳硬膜から抽出され、リジンとアルギニン残基がペントースを介して架橋した蛍光性の架橋物質として発見され、加齢に伴い増加する老化架橋の一つとされている。ペントシジンは、高熱、強酸の状態でも 20 時間作用させても耐え得る非常に安定した物質であり、励起波長を 335 nm とし 385 nm の蛍光を発する特徴を持っている。皮膚コラーゲン中で加齢に伴い増加することや、腎症の血清で高値を示すことなどが報告⁹⁾されている。

1985 年、Vlassara ら¹⁵⁾により AGE を特異的に認識する細胞膜レセプター (AGE レセプター) がマクロファージ (Mφ) 系細胞に存在することが報告された。AGE 蛋白質は AGE レセプターを介して Mφ などに結合し細胞内に取り込まれ、リソソーム内で分解されている。この一連のプロセスの中からの刺激により、TNF, interleukin-6 (IL-6), insulin like growth factor-1 (IGF-1), gentamicin-colony stimulating factor (GM-CSF) などのサイトカインが誘導され、細胞増殖や遊走を引き起こすと考えられている¹⁶⁾。近年、このような AGE とサイトカイン分泌の機構の解明により、DR の発症原因の一つとしてこれらの関係が注目されるようになった。また、AGE が内皮細胞の遊走能を誘導し、その管腔形成能を促進させることも近年報告¹⁷⁾され、血管新生と AGE の関連性が想定されている。今回我々は、現時点において AGE と AGE レセプターとの結合に起因する VEGF 分泌の報告がないことから両者の関連に注目し、AGE の一つであるペントシジンと VEGF を DR 患者の硝子体から同時に測定し、両者の関連について検討した。

今回の測定では、硝子体 VEGF 値は DM 群で有意 ($p < 0.01$) に高値であった。硝子体ペントシジン値も DM 群で有意 ($p < 0.05$) に高値であった。DM 群の硝子体中で VEGF が高値を示したことは、これまでの報告¹¹⁾と同様の結果であり、分泌している細胞は現時点では不明であるが、DR の硝子体中に VEGF が盛んに分泌されていることが再確認された。ペントシジンも DM 群の硝子体中に有意に多く存在した。硝子体にはタイプ II, IX コラーゲンがあり、架橋を形成して硝子体のゲル構造を形成している¹⁸⁾。コラーゲンは非常にグリケーションを受けやすく、また、グリケーションの後期反応の無秩序な架橋形成物質であるペントシジンは、コラーゲンに蓄積されやすいことから高値を示したのであろう。また、DR では血液網膜関門が破綻することが知られているが、DR で手術適応となるものはほとんどが硝子体出血を生じていることから、硝子体のグリケーションには血液性状が関与すると考えられる。血液中にはグリケーションに必要な還元糖が豊富に存在するため、DM 群の硝子体でペントシジンが高値を示したことは当然の結果と思われた。また、我々は DR の血清ペントシジンが DR の悪化に伴い上昇することを示し、DR との関連性について報告¹⁹⁾

している。しかし、VEGF ではその分泌を刺激するのが産生局所で働くパラクリン系によるものと考えられており、ペントシジンのような血液による影響は考えにくい。

硝子体の VEGF とペントシジンには、正の相関 ($r = 0.770, p < 0.001$) がみられた。硝子体 VEGF と DR の悪化度¹⁾および血清ペントシジンと DR の悪化度¹⁹⁾は相関があることが知られており、今回硝子体中の VEGF とペントシジンも強い正の相関という結果を得たことから、硝子体のグリケーションも DR 悪化と関連があることが予想された。また、平田ら⁷⁾により、他の AGE であるクロスリンと VEGF の相関を糖尿病網膜症の硝子体から検討した報告もあるが、両者間に中等度の正の相関 ($r = 0.698, p < 0.01$) がみられたとされており、今回の成績を裏付ける結果である。平田らはその報告の中で、AGE により網膜のミュラー細胞から VEGF が分泌されることも証明しており、ペントシジンにおいても同様に VEGF が分泌されていることも予想される。

現時点では AGE による VEGF 分泌機序が明らかにされていないため、ペントシジンの増加に伴う VEGF の増加については推論の域を脱しないが、我々は以下の仮説を機序として考えた。① ペントシジンが Mφ と結合することにより、VEGF が Mφ から直接分泌される²⁰⁾。② ペントシジンが Mφ と結合することにより、VEGF が他のサイトカインなどを介して間接的に分泌される⁷⁾。③ glycation が活発に行われることにより、ペントシジンと同時に生成されるであろう他の AGE に Mφ が反応し、Mφ から直接・間接的に分泌される⁷⁾²⁰⁾。④ glycation が活発に行われることにより、血管基底膜にペントシジンなどの AGE が沈着し血管を狭窄させ、虚血 (低酸素) 状態を来して種々の細胞から VEGF が分泌される²¹⁾。⑤ 前記①~④に加え、VEGF の血管透過性亢進に伴う glycation の反応物質の硝子体中への濾出による positive feedback など²¹⁾である。糖尿病患者硝子体では、非糖尿病患者硝子体と比べ glycation が活発であることも報告²²⁾されている。ペントシジンは、加齢により生体内で増加することが知られているが、腎不全や糖尿病を伴った場合には加齢的变化を伴う増加量よりはるかに上昇する²³⁾²⁴⁾。そういった AGE の過剰な蓄積が DR の発症の一因となっていると思われる。

臨床面では網膜光凝固が十分に行われているにもかかわらず、増殖性変化の激しい DR に対し vitrectomy を行うことにより網膜症が鎮静化するケースや、いわゆる early vitrectomy を行うことにより良好な視機能を温存できることも経験する²⁵⁾。DR に対する治療としてある程度早期に硝子体の切除を行うことが蓄積した AGE を除去し、また、AGE が蓄積しやすいコラーゲンの除去により蓄積の場をなくすことにつながり、AGE が刺激となるサイトカイン分泌を抑制すると推察している。著者らは今回の研究の次段階として、ペントシジンの刺激による

VEGF 分泌の証明と、研究の臨床応用として early vitrectomy の有用性について検討する必要があると考えている。

稿を終えるに当たり、ペントシジン測定法の御指導ならびに標準物質の提供をしていただいた浜松医科大学整形外科教室の高橋正哲先生、星野裕信先生に感謝いたします。

本論文の要旨は第 36 回日本網膜硝子体学会総会で発表した。

文 献

- 1) Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al: Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480—1487, 1994.
- 2) Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, et al: Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445—450, 1994.
- 3) 尾崎弘明, 林 英之, 大島健司, 今永至親, 黒木政秀, 荒川文子, 他: 増殖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. *日眼会誌* 100: 208—212, 1996.
- 4) 田中義和, 加藤 聡, 船津英陽, 北野滋彦, 堀 貞夫, 三浦雅一, 他: 糖尿病網膜症における血管内皮増殖因子 (VEGF) と網膜症進行との関連. *眼紀* 48: 46—50, 1997.
- 5) 石橋達朗, 畑 快右, 村田敏規, 居石克夫: 糖尿病網膜症と血管内皮増殖因子. *細胞* 28: 569—573, 1996.
- 6) Yamamoto Y, Yamagishi S, Hsu CC, Yamamoto H: Advanced glycation end products-receptor interactions stimulate the growth of human pancreatic cancer cells through the induction of platelet-derived growth factor-B. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 700—705, 1996.
- 7) Hirata C, Nakano K, Nakamura N, Kitagawa Y, Shigeta H, Hasegawa G, et al: Advanced glycation end products induce expression of vascular endothelial growth factor by retinal müller cells. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 712—715, 1997.
- 8) 石橋達朗, 村田敏規, 畑 快右, 坂本泰二: 血管内皮増殖因子 (VEGF) と糖尿病網膜症. *眼紀* 49: 6—10, 1998.
- 9) Takahashi M, Kushida K, Kawana K, Ishihara C, Denda M, Inoue T, et al: Quantification of cross-link pentosidine in serum from normal and uremic subjects. *Clin Chem* 39: 2162—2165, 1993.
- 10) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak JF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983—985, 1983.
- 11) Leung DR, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306—1309, 1989.
- 12) 庄野禎久, 桑野信彦: VEGF と血管新生. *医学のあゆみ* 174: 135—138, 1995.
- 13) 中埜幸治: グリケーションと腎症. *腎と透析* 37: 699—703, 1994.
- 14) Sell DR, Monnier VM: Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. *J Biol Chem* 264: 21597—21602, 1989.
- 15) Vlassara H, Brownlee M, Cerami A: High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: A potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5588—5592, 1985.
- 16) 佐野裕之, 堀内正公: 蛋白のグリケーション. 最新内科学体系 第 7 巻 糖尿病, 井村裕夫, 他(編): 中山書店, 東京, 204—210, 1995.
- 17) Tezuka M, Koyama N, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S, Araki N, et al: Angiogenic effects of advanced glycation end products of the Maillard reaction on cultured human umbilical cord vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 674—680, 1993.
- 18) 上野則夫: 硝子体の構造と組成. 本田孔士(編): 眼の生化学・分子生物学. *眼科診療プラクティス*. 文光堂, 東京, 230—233, 1996.
- 19) 橋本浩隆, 新井清美, 佐藤洋子, 小原喜隆: ペントシジンと糖尿病網膜症. *眼紀* 47: 1231—1235, 1996.
- 20) 荒木令江, 篠原守継, 柴山利恵, 堀内正公: メイラード反応後期生成物 (AGE) に対する生体認識機構. *糖尿病記録号* 1992: 139—143, 1992.
- 21) 川上正舒: 糖化タンパクと糖尿病合併症. *内科* 69: 1392—1396, 1992.
- 22) 橋本浩隆: 糖尿病患者白内障と非酵素的糖化反応の関係. *日眼会誌* 102: 34—41, 1998.
- 23) Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RH, Miyata S, Grandhee S, Odetti P, et al: Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes* 41: 36—41, 1992.
- 24) Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, et al: Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 91: 2463—2469, 1993.
- 25) 筑田 真: 糖尿病網膜症に対する早期硝子体手術. *眼紀* 47: 1070—1073, 1996.