

糖尿病網膜症と糖尿病血管新生緑内障における前房水と血中の 血管内皮増殖因子/血管透過性因子濃度

小沢 忠彦¹⁾, 曾根 博仁²⁾, 奥田 諭吉²⁾, 川上 康²⁾, 関根 康夫³⁾
今井 正之¹⁾, 本村 幸子³⁾, 稲富 誠⁴⁾, 谷口 重雄⁵⁾, 松尾 克彦⁶⁾
瀬川 俊章⁶⁾, 鈴木日出夫⁶⁾, 山下亀次郎²⁾

¹⁾小沢眼科内科病院, ²⁾筑波大学臨床医学系代謝内分泌内科, ³⁾筑波大学臨床医学系眼科
⁴⁾昭和大学医学部眼科学教室, ⁵⁾昭和大学医学部附属藤が丘病院眼科, ⁶⁾東亜合成つくば研究所

要 約

インスリン非依存型糖尿病患者の前房水・血清中血管内皮増殖因子/血管透過性因子(vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, VEGF/VPF)濃度を検討した。増殖網膜症患者群(n=12), 血管新生緑内障患者群(n=11)の前房水 VEGF/VPF 濃度は, 網膜症非合併患者群(n=10)に対して有意に高値を示した。血管新生緑内障患者群では著しい高値を示し, VEGF/VPF が網膜症のみならず同血管新生緑内障の発症, 進展にも重要な役割を演じている可能性が強く推定された。

血清 VEGF/VPF 濃度は網膜症の進行度とは相関がなかった。健常人のデータとも有意差はなかった。本研究の結果は血管新生緑内障に対する抗 VEGF/VPF 療法の可能性を示唆する。(日眼会誌 102: 731—738, 1998)

キーワード: 血管内皮増殖因子, VEGF, 血管透過性因子, VPF, 糖尿病網膜症, 血管新生緑内障, 血管新生, サイトカイン

Vascular Endothelial Growth Factor Levels in the Aqueous and Serum in Diabetic Retinopathy with or without Neovascular Glaucoma

Tadahiko Kozawa¹⁾, Hirohito Sone²⁾, Yukichi Okuda²⁾, Yasushi Kawakami²⁾, Yasuo Sekine³⁾
Masayuki Imai¹⁾, Sachiko Hommura³⁾, Makoto Inatomi⁴⁾, Shigeo Yaguchi⁵⁾, Katsuhiko Matsuo⁶⁾
Toshiaki Segawa⁶⁾, Hideo Suzuki⁶⁾ and Kamejiro Yamashita²⁾

¹⁾Kozawa Hospital, ²⁾Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, ³⁾Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, ⁴⁾Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine, ⁵⁾Department of Ophthalmology, Showa University Fujioka Hospital
⁶⁾Tsukuba Research Laboratory, Toagosei Co. Ltd.

Abstract

We determined the levels of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in the aqueous and serum in non-insulin dependent diabetic patients with proliferative retinopathy (n=12) and neovascular glaucoma (n=11). The aqueous levels of VEGF/VPF were significantly higher in both groups than in 10 diabetics without such complications. The levels were very high in patients with neovascular glaucoma, suggesting that VEGF/VPF is involved in the pathogenesis and progression of diabetic neovascular glaucoma. The se-

rum levels were not significantly related to the presence or the stage of retinopathy. The findings suggest the possibility of treatment of neovascular glaucoma using anti-VEGF/VPF preparations. (Jpn Ophthalmol Soc 102: 731—738, 1998)

Key words: Vascular endothelial growth factor, VEGF, Vascular permeability factor, VPF, Diabetic retinopathy, Neovascular (rubeotic) glaucoma, Angiogenesis, Cytokine

別刷請求先: 305-0006 茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大学臨床医学系代謝内分泌内科 奥田 諭吉
(平成9年9月25日受付, 平成10年6月10日改訂受理)

Reprint requests to: Yukichi Okuda, M.D., P.D. Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305, Japan
(Received September 25, 1997 and accepted in revised form June 10, 1998)

I 緒 言

血管新生は、既存の血管から新たな血管が枝分れして形成される過程で、①タンパク分解酵素による血管基底膜融解、②血管内皮細胞の血管外遊走、③血管内皮細胞の分裂・増殖、④管腔形成 (tube formation) の4段階から成り、生理的には発生・胎盤形成や創傷治癒などで観察される¹⁾。血管内皮増殖因子/血管透過性因子 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, VEGF/VPF) は、1989年に同定されたペプチドで、血管内皮細胞にはほぼ特異的に作用し、上記の血管新生の4段階すべてを促進する極めて強力な血管新生刺激作用²⁾とヒスタミンの5,000倍にも及ぶ血管透過性亢進作用とを併せ持つペプチドである³⁾。

VEGF/VPFはplatelet derived growth factor (PDGF)ファミリーに属し、シグナルペプチドを有する分泌型のサイトカインで⁴⁾、種差に乏しい³⁾。単一遺伝子からのalternative splicingにより4種のアイソフォームが生成され⁵⁾、ヒトではそれぞれ121, 165, 189, 206アミノ酸 (VEGF/VPF₁₂₁, VEGF/VPF₁₆₅, VEGF/VPF₁₈₉, VEGF/VPF₂₀₆と表記される)から成る⁶⁾。このうち、前二者が主に産生細胞から遊離して作用するのに対し、後二者は強いヘパリン親和性を有するため、分泌後ほとんど細胞膜上や細胞外マトリックスのヘパラン硫酸に結合する⁷⁾。

VEGF/VPFは、生理的には胎生期における組織形成⁸⁾・胎盤形成・女性の性周期に伴う黄体や子宮内膜の変化・創傷治癒などの血管新生を伴う生理的現象に密接に関与する一方⁹⁾、固形腫瘍増大・慢性関節リウマチ⁹⁾・甲状腺機能亢進症¹⁰⁾・卵巣過剰刺激症候群¹¹⁾などの病態において重要な役割を果たすことが判明しつつある。

VEGF/VPFは、このように各種病態との関連が疑われていたが、高感度の測定系がなかったため臨床検体を用いた検討は限られており、VEGF/VPFを極めて大量に産生する腫瘍を対象にした検討¹²⁾以外はあまりみられなかった。近年、Hanataniら¹³⁾により作製された高感度enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)系により、健常人血清を始めとする各種検体中のVEGF/VPFタンパク濃度を直接測定することが可能になった。増殖糖尿病網膜症の房水中VEGF/VPFが高値を示すことはすでに報告されているが、これらの検討で用いられた測定系は感度が不十分な上、増殖糖尿病網膜症にしばしば合併し、その視力予後をさらに悪くすることで、実地臨床問題となっている糖尿病血管新生緑内障では、その名が示すように血管新生が病態の中心的役割を演じているにも拘わらず、VEGF/VPFの関与については明らかでない。そこで、糖尿病網膜症患者の前房水中および血清中のVEGF/VPF濃度をこの高感度ELISA系を用いて測定し、その網膜症の進行度・血管新生緑内障合併の有無により分類して比較検討した。

一方、増殖糖尿病網膜症患者の血清insulin like growth factor-1 (IGF-I)レベルが、網膜症非合併または非増殖糖尿病網膜症患者の約2倍に上昇していたことが報告¹⁴⁾されている。同様の現象がVEGF/VPFにおいても認められ、さらに、血清VEGF/VPF濃度と糖尿病網膜症の活動性が相関すれば、網膜症の発症・増悪の簡便なスクリーニング法またはマーカーになり得るのではないかと考え、糖尿病患者および健常者群における血清中VEGF/VPF濃度を測定し、網膜症の有無やその程度との相関を検討した。

II 対象および方法

1. インスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) 患者と糖尿病非合併眼科手術患者の前房水中 VEGF/VPF 濃度

小沢眼科内科病院で眼科手術を行った、白内障または網膜症を合併したNIDDM患者49名(男性32名,女性17名,平均値±標準偏差:53.6±12.7歳),および白内障または網膜剥離の患者で、糖尿病その他の全身疾患を有さない眼科手術患者10名(①糖尿病非合併群,男性5名,女性5名,48.0±12.1歳)の計59名を対象とした。このうち、NIDDM患者については予め眼科的診察により、②網膜症非合併NIDDM群、③単純網膜症群、④前増殖網膜症群、⑤増殖網膜症群、⑥血管新生緑内障群に分類した。これらの患者の眼科手術時に採取した前房水中のVEGF/VPF濃度を後述のELISAにより測定し、非糖尿病患者群を含む各群間の差異を検討した。検体は測定まで-20℃で保存した。

2. 各種進行度の網膜症を合併した NIDDM 患者における血清 VEGF/VPF 濃度

筑波大学附属病院および小沢眼科内科病院で経過観察中のNIDDM患者計103人(男性59人,女性44人,59.5±13.6歳)を対象とした。血清クレアチニン値が正常上限を超えている腎症合併患者および自覚症状を有する神経障害合併患者は予め対象から除外したが、インスリンを含む外来処方薬は変更なく継続された。対象患者は、予め眼科的診察により、①網膜症非合併群、②単純網膜症群、③前増殖網膜症群、④増殖網膜症群、⑤非活動(沈静化)網膜症群(福田分類AIII, AIV, AV)の5群に分類した。これらの患者の外来受診時に採血を行い、血清を分離し測定まで-20℃で保存した。これらの血清中のVEGF/VPF濃度を後述の高感度ELISAにより測定した。また、これらのNIDDM患者と年齢・性別をマッチさせた健常者群50人(男性29人,女性21人,56.1±11.3歳)の血清VEGF/VPF濃度についても同様に検討した。

3. 検体中の VEGF/VPF 濃度の決定

検体中のVEGF/VPF蛋白濃度の測定は、抗ヒトVEGF/VPF₁₂₁ウサギポリクローナル抗体¹⁵⁾を用いた高感度化学発光サンドウィッチELISAにより行った¹³⁾。すなわち、イースト (*Saccharomyces cerevisiae*) にヒト

表 1 前房水中 VEGF/VPF 濃度を測定した対象患者各群の臨床的背景

	人数 (男/女)	年齢 (歳)	罹病期間 (年)	HbA _{1c} (%)
①糖尿病非合併群	10 (5/5)	52.1±17.7	N.A.	N.A.
②網膜症非合併 NIDDM 群	10 (4/6)	46.5±15.5	7.5±2.8	7.2±0.9
③単純網膜症群	9 (5/4)	52.4±13.2	8.9±2.2	7.9±1.5
④前増殖網膜症群	7 (4/3)	62.3±14.0	10.7±2.9	8.1±1.1
⑤増殖網膜症群	12 (8/4)	58.1±10.2	12.9±3.8*	9.2±1.7*
⑥血管新生緑内障群	11 (7/4)	51.7±14.5	10.7±3.2	8.4±2.0
合計	59 (33/26)	53.3±13.6	10.1±2.9	8.2±1.6

VEGF/VPF: 血管内皮増殖因子/血管透過性因子, NIDDM: インスリン非依存型糖尿病, 平均値±標準偏差, *: ⑤は②に対して $p < 0.05$

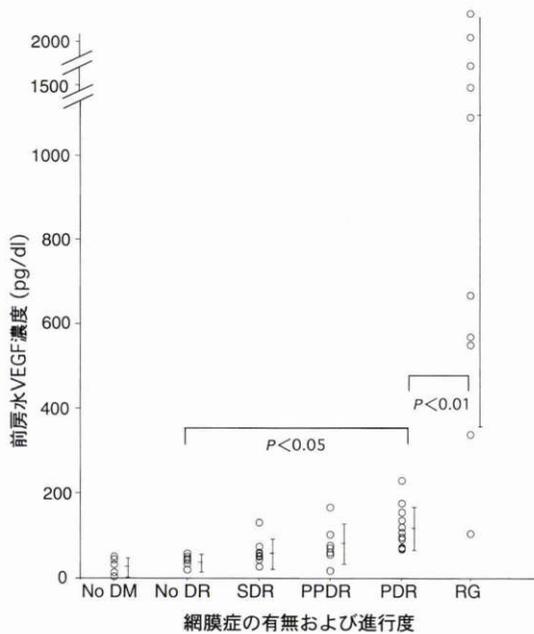


図 1 網膜症の有無および進行度別のインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)患者および健常者の前房水中血管内皮増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)濃度の分布。

n=59, 平均値±標準偏差, No DM: 糖尿病非合併群, No DR: 網膜症非合併 NIDDM 群, SDR: 単純網膜症群, PPDR: 前増殖網膜症群, PDR: 増殖網膜症群, RG: 血管新生緑内障群

VEGF/VPF₁₂₁ 遺伝子を導入し, その培養液を精製することにより得られたリコンビナントヒト VEGF/VPF₁₂₁ と, グルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合蛋白でウサギを免疫して, その血清中 IgG 画分を精製することにより, 抗ヒト VEGF/VPF₁₂₁ ウサギポリクローナル抗体を得た¹²⁾¹⁵⁾. このポリクローナル抗体を 0.1 M 塩化ナトリウム・0.025 M 炭酸緩衝液(pH=9.0)に 10 μg/ml になるように溶解し, 96 穴マイクロタイタープレートの

各ウェルに 100 μl ずつを固相化し, 0.1% ウシ血清アルブミン・0.2 M 炭酸緩衝液(pH=9.5)・0.1 M 塩化ナトリウム液・0.1% アジ化ナトリウム液によりブロックし測定に供した。

1% ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水により 3~10 倍に希釈したサンプル 100 μl を各ウェルに加え, 22°C で 1 時間インキュベートした. その後, 洗浄して第 2 抗体として, ペルオキシダーゼでラベルした上記と同じ抗 VEGF/VPF ポリクローナルウサギ抗体 Fab' を加えて, さらに 22°C で 1 時間インキュベートした. さらに洗浄後, 発色基剤として o-フェニレンジアミン過酸化水素溶液(和光純薬)を加え, 22°C で 30 分間インキュベートした. 2 N 硫酸 100 μl を添加して反応を停止させ, マイクロプレートリーダー(M-Vmax, Molecular Devices, 米国)で波長 490 nm(対照波長 650 nm)で吸光度を測定した. ヒト VEGF/VPF₁₂₁(R&D Inc. 米国)により標準曲線を作成し, 検体中の VEGF/VPF 濃度を決定した. 各測定値は 3 回の測定値の平均により求めた. このようにして求めた VEGF/VPF の測定感度は 3 pg/ml であった. この ELISA は最小のアイソザイムである VEGF/VPF₁₂₁ に対する抗体を用いており, 4 種すべてのアイソフォームを検出することを事前に確認した. Intraassay, interassay CV 値は, それぞれ 6.1%, 9.5% であった。

4. 統計処理

測定結果は平均値±標準偏差で表示し, 統計学的検討には Kruskal-Wallis の検定および Mann-Whitney の U 検定を用い, $p < 0.05$ を有意差ありとした. なお, 本研究で用いられた臨床検体は小沢眼科内科病院倫理委員会の承認に基づき, 事前に各患者のインフォームド・コンセントを得た上で採取された。

III 結 果

1. 糖尿病網膜症患者の前房水中 VEGF/VPF 濃度の成績

①～⑥の各群の年齢,性別に有意差はなかった.罹病期間・hemoglobin A (HbA)_{1c}はいずれも,⑤増殖網膜症群では,②網膜症非合併 NIDDM 群より有意に高値を示した(表1).前房水 VEGF/VPF 濃度は,①糖尿病非合併眼科手術患者群 24.9±21.8(平均値±標準偏差)pg/ml,②網膜症非合併 NIDDM 患者群 34.9±20.9 pg/ml,③単純網膜症合併群 56.0±35.5 pg/ml,④前増殖網膜症合併群 79.4±46.6 pg/ml,⑤増殖網膜症合併群 116.4±50.8 pg/ml,⑥血管新生緑内障合併群 1,093.7±736.7 pg/mlであった.⑤増殖網膜症群では,②網膜症非合併群と比較して有意に高値を示した.さらに,⑥血管新生緑内障合併群の房水中の VEGF/VPF 値は著高値を示し,他群すべてと比較して有意に高値であった.なお,これら以外の群間に有意差はなかった(図1).

2. 糖尿病網膜症患者の血清 VEGF/VPF 濃度の成績

①～⑤の各群間で,性別,年齢,HbA_{1c}に関しては,有意差がなかった.しかし,糖尿病罹病期間は,②単純網膜症群と比較して,④増殖網膜症群において有意に高値を示した(表2).各群の血清 VEGF/VPF 濃度は,①網膜症非合併群が 93.8±55.7 pg/ml,②単純網膜症群が 97.3±49.4 pg/ml,③前増殖網膜症群が 105.9±77.7 pg/ml,⑤増殖網膜症群が 123.5±73.0 pg/ml,④非活動(沈静化)網膜症群が 88.0±67.2 pg/mlで,各群間に有意差はなかった.さらに,これらの測定値を健常者群の値 109.4±63.8 pg/mlと比較しても,有意な変化はなかった.なお,④増殖網膜症群のうち,血管新生緑内障合併例と非合併例の間でも有意差はなかった(図2).

IV 考 按

現在までに,糖尿病網膜症患者の房水または硝子体中濃度が高値を示すことが指摘されている増殖因子として

は,IGF-I¹⁶⁾¹⁷⁾,interleukin-6(IL-6)¹⁸⁾,basic fibroblast growth factor(bFGF)¹⁹⁾²⁰⁾などが挙げられる.VEGF/VPFが網膜に存在し,血管内皮細胞に特異的に作用することは,Chenら²¹⁾により明らかにされた.VEGF/VPFは血管新生作用も growth hormone(GH)/IGF-IやbFGFよりはるかに強力で,さらには著明な血管透過性亢進作用も有し浸出性病変との関連が想起される上,毛細血管閉塞による組織虚血により網膜局所で産生され得るというGH/IGF-IやbFGFにはみられない特徴を有する³⁾.実際に低酸素に曝された各種網膜細胞^{22)~25)}を含む各種細胞において,速やかな VEGF/VPF の産生上昇が報告^{23)26)~29)}されており,これは虚血組織への側副血行路の発達を促し,その低酸素状態を代償しようとする合目的な生体反応であると考えられる.しかし一方,このことが糖尿病状態の網膜においては,脆弱で破綻しやすい新生血管を増生させ,増殖網膜症を増悪させると考えられている.その他にも持続的高グルコース環境やグルコース濃度の急激な低下³⁰⁾,さらに,妊娠時血中濃度相当の高プロゲステロン環境³¹⁾など糖尿病網膜症の臨床的増悪因子として知られる各種因子により VEGF/VPF 産生が誘導されることも明らかになっている.

Adamisら³²⁾は増殖網膜症患者(n=8)の硝子体中 VEGF/VPF 濃度を time-resolved immunofluorometric assay で測定した際の中央値 29.1 pM が,非糖尿病患者(n=12)の硝子体での値(8.1 pM)と比較して高値であることを示した.また,Plouetら³³⁾は増殖網膜症患者(n=14)の硝子体中の VEGF/VPF 濃度は平均 28.5±8.1(平均値±標準偏差)ng/mlで,非糖尿病患者(n=13)の平均 2.1±1.0 ng/ml より有意に高いことを報告した.さらに,Malecazeら³⁴⁾は増殖糖尿病網膜症由来の硝子体手術検体(n=14)について,今まで糖尿病網膜症との関連が示唆された各種成長因子の発現を radiotherapy-polymerase chain reaction(RT-PCR)で検討した結果,bFGF および IGF-I の発現はそれぞれ 2 例および 3 例のみに認められたのに対し,VEGF/VPF は 14 例全例に発現が

表2 血清中 VEGF/VPF 濃度を測定した対象患者各群の臨床的背景

	人数 (男/女)	年齢 (歳)	罹病期間 (年)	HbA _{1c} (%)
①網膜症 NIDDM 群	44 (26/5)	56.4±13.6	8.1±3.4	7.6±1.3
②単純網膜症群	19 (10/9)	60.1±12.8	8.2±2.1	8.3±0.9
③前増殖網膜症群	13 (8/5)	58.4±12.1	9.7±2.8	8.2±0.9
④増殖網膜症群	18 (12/6)	62.3±14.0	11.3±2.5*	8.4±1.0
⑤非活動性(沈静化)網膜症群	9 (3/6)	62.1±10.2	11.9±2.6	7.9±1.3
合計	103 (59/44)	57.2±13.0	8.9±2.6	7.7±1.2

*:④は②に対して p<0.05

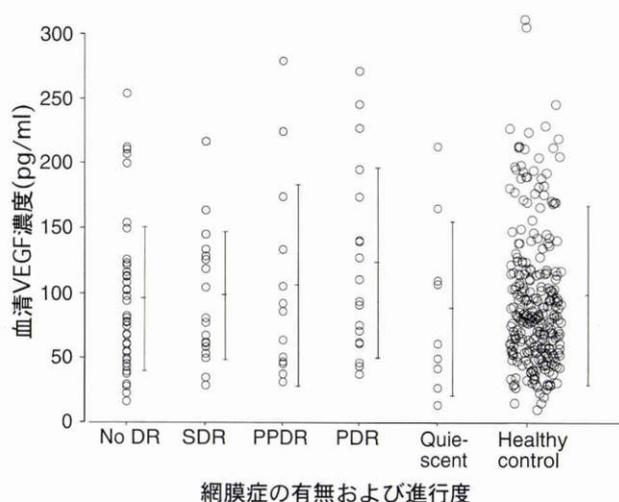


図2 網膜症の有無および進行度別のインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)患者および健常者の血清中血管内皮増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)濃度の分布。

n=106, 平均値±標準偏差, No DR: 網膜症非合併 NIDDM 群, SDR: 単純網膜症群, PPDR: 前増殖網膜症群, PDR: 増殖網膜症群, Quiescent: 治療後の沈静化した網膜症群, Healthy control: 健常者群

認められ, GH/IGF-IやbFGFよりもむしろ VEGF/VPF が糖尿病網膜症の発症・進展に中心的な役割を果たしている可能性を推定した。

Aiello ら³⁵⁾は 164 人分 210 房水検体中の VEGF/VPF 濃度を radioimmunoassay (RIA) および radioreceptor assay で測定したところ, 非糖尿病患者検体では 31 検体中 2 検体のみに VEGF/VPF が検知されたのに対し, 糖尿病網膜症患者由来の検体では 136 検体中 69 検体(新生血管を伴う検体では 38 検体中 29 検体)に VEGF/VPF が検知されたことを報告した。実際に測定可能であった房水検体中の VEGF/VPF 濃度は, 非増殖網膜症では 0.1 ± 0.1 ng/ml であったのに対し, 活動性増殖網膜症患者検体では 3.6 ± 6.3 ng/ml, 沈静化した増殖網膜症では 0.2 ± 0.6 ng/ml であった。さらに, 光凝固療法施行後に房水 VEGF/VPF 濃度が低下した症例もあった。しかし, 彼らの用いた VEGF/VPF の測定系の感度は 50 pg/ml とそれほど高くはなく, 増殖網膜症以外の網膜症群, または網膜症非合併群においてはほとんどの例で測定感度以下であった。今回の検討で用いた ELISA は高感度で, 増殖網膜症以外の群においても十分測定が可能であった。本研究の結果でも Aiello ら³⁵⁾の報告どおり, 増殖網膜症合併 NIDDM 患者の前房水 VEGF/VPF 濃度は, 網膜症非合併 NIDDM 患者と比較して有意に高値を示した。

Aiello ら³⁵⁾の報告も含め, その名のとおりに血管新生が病態の中心的な役割を演じていると考えられる糖尿病血管新生緑内障に VEGF/VPF が関与しているかどうかは, これまで検討されてこなかった。血管新生緑内障は, 線維柱帯網(trabecular meshwork)を覆うように線維血

管膜が増生し, 前房隅角が非可逆性に閉塞し, 眼圧上昇を来す病態である。さらに, 新生血管の透過性亢進も関与するともいわれる。網膜循環障害によく合併することが知られているが, この線維血管膜増殖と透過性亢進の直接的な原因は不明であった³⁶⁾。

VEGF/VPF は, この線維血管膜増殖と透過性亢進, さらに循環障害に基づく低酸素状態との関係を一元的に説明し得る因子であると考えられたため, 今回の検討では「血管新生緑内障合併増殖網膜症群」と「血管新生緑内障非合併増殖網膜症群」とに分けて検討した。その結果, 血管新生緑内障患者の房水 VEGF/VPF 濃度は, 増殖網膜症群と比較しても約 10 倍の著しい高値を示すことが明らかになり, VEGF/VPF が本疾患の病態において中心的な役割を演じている可能性が高いことが示された。この増殖網膜症群との著しい差に関しては, ①血管新生緑内障を来すような症例は増殖網膜症の中でも活動性が高い例が多いこと, ②血管新生緑内障では血管新生の部位が網膜のみならず前房付近にも及んでいることから, 前房水の採取部位と VEGF/VPF の産生源との距離が近いこと, などの影響も考えられた。Aiello らの結果では, 活動性増殖網膜症の房水 VEGF/VPF 濃度平均 5.5 ng/ml, 虹彩ルベオース合併例では 7.3 ng/ml と両者に著明差はない。この理由として, Aiello らの検討では増殖網膜症以外の網膜症群や網膜症非合併群のほとんどの例で前房水中 VEGF/VPF 濃度が測定感度以下であり, 血管新生緑内障非合併例についてもその多くで測定値が得られていない。これに対し, 本検討ではより高感度の測定系を用いたため, 網膜症非合併例を含む測定したすべての検体で測定値が得られた。したがって, Aiello らの結果では血管新生緑内障患者の検体とそれ以外検体との差が, むしろ実際より過小評価されている可能性があると考えられる。また Aiello らの検討では, 虹彩ルベオースを有する症例を分けて検討してはいるものの, これらの症例が緑内障を呈していたかどうかについては明らかでないのに対し, 本検討中の「血管新生緑内障群」は, 実際に緑内障を呈していた症例のみから成っている。これが本検討中の「血管新生緑内障群」の測定値が, Aiello らの虹彩ルベオース症例の測定値より大幅に上昇していたもう一つの理由と考えられる。このことは, 同時に房水中 VEGF/VPF が虹彩ルベオースから血管新生緑内障への病態進展と関与していることを示しており興味深い。

血管新生緑内障の治療としては, 種々の手術が行われているものの, まだ満足すべき成績が得られていない。我々は現在, 抗 VEGF/VPF 抗体の局所投与により増殖網膜症のモデルとして用いられる高酸素網膜症マウスの網膜血管新生病変の阻止を試みているが, 血管新生緑内障において VEGF/VPF が主要な因子であることが明らかになれば, 将来的には抗 VEGF/VPF 抗体の局所, 例えば前房内投与により血管新生を抑制する治療法につながる

る可能性がある。最近, Tolentino ら³⁷⁾は逆にサル眼内にヒト VEGF/VPF を注入して, 虹彩ルベオーシスと血管新生緑内障を誘発し得たことを報告した。血管新生緑内障と VEGF/VPF との関連についての本研究の仮説を裏付ける研究結果として注目される。

各種疾患における血清 VEGF/VPF の検討としては, 一部の癌患者や polyneuropathy, organomegaly, endocrine disorders, M-protein and skin changes (POEMS) 症候群患者の血清 VEGF/VPF 値が高値を示すことが報告¹²⁾³⁸⁾されている。しかし糖尿病網膜症患者では, 健常者群と比較して有意な血清 VEGF/VPF レベルの上昇はなかった。Burgos ら³⁹⁾も最近, 増殖網膜症を有するインスリン依存型および非依存型両方の糖尿病患者において, 硝子体中 VEGF/VPF 濃度と血清中 VEGF/VPF 濃度との間に有意な相関がなかったことを報告している。また, 糖尿病患者の血中 endothelial growth factor (EGF) および PDGF 濃度は, 非糖尿病群と比較して有意に高値であることが報告されているが, いずれも網膜症を始めとする合併症との相関は認められていない⁴⁰⁾。血中 IGF-I 濃度に関しても, 急速に進行した増殖糖尿病網膜症患者血清において高値を示したという報告¹⁴⁾がある一方, 網膜症有無や病勢との相関について否定的な結果¹¹⁾⁴²⁾もみられ, 未だに結論が得られていない。

IGF-I が体内の網膜以外の部位で主に産生され, 血流により網膜に運ばれて網膜症増悪に関与すると推察されるのに対して, VEGF/VPF は主に網膜組織で産生され, 眼内局所において作用するものと思われる。量的にも微量である上, 血液網膜関門 (blood-retinal barrier) の存在も手伝って, 循環血中に流出して血清 VEGF/VPF 濃度を上昇させるには至らないものと考えられた。

文 献

- 1) Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931—10934, 1992.
- 2) Neufeld G, Tessler S, Gitay GH, Cohen T, Levi BZ: Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res* 5: 89—97, 1994.
- 3) Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13: 18—32, 1992.
- 4) Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, Freter L, Yeo KT: Glycosylation is essential for efficient secretion but not for permeability-enhancing activity of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor). *Biochem Biophys Res Commun* 179: 1568—1575, 1991.
- 5) Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, et al: Vascular endothelial growth factor: A new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 1198—1206, 1989.
- 6) Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806—1814, 1991.
- 7) Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267: 26031—26037, 1992.
- 8) Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS, Ferrara N: Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 133: 848—859, 1993.
- 9) Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, et al: Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 152: 4149—4156, 1994.
- 10) Sato K, Yamazaki K, Shizume K, Kanaji Y, Obara T, Ohsumi K, et al: Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Graves' immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles *in vitro* and *flt* mRNA expression in the rat thyroid *in vivo*. *J Clin Invest* 96: 1295—1302, 1995.
- 11) McClure N, Healy DL, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning RJ, et al: Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet* 344: 235—236, 1994.
- 12) Kondo S, Asano M, Matsuo K, Ohmori I, Suzuki H: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1221: 211—214, 1994.
- 13) Hanatani M, Tanaka Y, Kondo S, Omori I, Suzuki H: Sensitive chemiluminescence enzyme immunoassay for vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human serum. *Biosci Biotech Biochem* 59: 1958—1959, 1995.
- 14) Merimee TJ, Zapf J, Froesch ER: Insulin-like growth factors. Studies in diabetics with and without retinopathy. *N Engl J Med* 309: 527—530, 1983.
- 15) Kondo S, Asano M, Suzuki H: Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 1234—1241, 1993.
- 16) Grant M, Russell B, Fitzgerald C, Merimee TJ: Insulin-like growth factors in vitreous. Studies in control and diabetic subjects with neovascularization. *Diabetes* 35: 416—420, 1986.

- 17) Meyer SR, Pfeiffer A, Blum WF, Freyberger H, Klein M, Losche C, et al: Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. Studies in non-diabetic and diabetic subjects. *J Clin Invest* 92: 2620—2625, 1993.
- 18) Kauffmann DJH, van Meurs JC, Mertens DAE, Peperkamp E, Master C, Gerritsen ME: Cytokines in vitreous humor: Interleukin-6 is elevated in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 900—906, 1994.
- 19) Baird A, Culler F, Jones KL, Guillemin R: Angiogenic factor in human ocular fluid. *Lancet* 2 (8454): 563, 1985.
- 20) 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.
- 21) Chen CH, Chen SC: Evidence of the presence of a specific vascular endothelial growth factor in fetal bovine retina. *Exp Cell Res* 169: 287—295, 1987.
- 22) Pe'er J, Shweiki D, Itin A, Hemo I, Gnessin H, Keshet E: Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab Invest* 72: 638—645, 1995.
- 23) Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, et al: Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: Identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med* 1: 182—193, 1995.
- 24) Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA: Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 113: 1538—1544, 1995.
- 25) Hata Y, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H, Ueno H, Sueishi K: Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal glial cells promotes *in vitro* angiogenesis. *Virchows Arch* 426: 479—486, 1995.
- 26) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843—845, 1992.
- 27) Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM: Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 90: 649—652, 1994.
- 28) Minchenko A, Salceda S, Bauer T, Caro J: Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell Mol Biol Res* 40: 35—39, 1994.
- 29) Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. *Lab Invest* 71: 374—379, 1994.
- 30) Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Kondo S, Hanatani M, Suzuki H, et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF) is induced by chronic high glucose concentration and upregulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 193—198, 1996.
- 31) Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Kondo S, Hanatani M, Matsuo K, et al: Induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) production by progesterone on cultured retinal pigment epithelial cells. *Life Sci* 59: 21—25, 1996.
- 32) 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.
- 33) Plouet J, Chollet P, Moro F, Malecaze F: Secretion of VAS/VEGF by retinal pericytes: A paracrine stimulation of endothelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 900 (ARVO Abstracts), 1993.
- 34) Malecaze F, Clamens S, Simorre PV, Mathis A, Chollet P, Favard C, et al: Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 112: 1476—1482, 1994.
- 35) 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.
- 36) Rehak J: Neovascular glaucoma and intraocular pressure. I. Pathogenesis of increased intraocular pressure and therapy (a review of historical and current therapeutic modalities). *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* 133: 71—73, 1992.
- 37) Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP: Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 114: 964—970, 1996.
- 38) Watanabe O, Arimura K, Kitajima I, Osame M, Maruyama I: Greatly raised vascular endothelial growth factor (VEGF) in POEMS syndrome. *Lancet* 347: 702, 1996.
- 39) Burgos R, Simo R, Audi L, Mateo C, Mesa J, Garcia-Ramirez M, et al: Vitreous levels of vas-

cular endothelial growth factor are not influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 40: 1107—1109, 1997.

- 40) **Lev RA, Hwang DL**: Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor in blood in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh)* 123: 326—330, 1990.
- 41) **Hyer SL, Sharp PS, Brooks RA, Burrin JM, Kohner EM**: Serum IGF-1 concentration in diabetic retinopathy. *Diabet Med* 5: 356—360, 1988.
- 42) **Hyer SL, Sharp PS, Brooks RA, Burrin JM, Kohner EM**: A two-year follow-up study of serum insulin-like growth factor-I in diabetics with retinopathy. *Metabolism* 38: 586—589, 1989.
-