

糖尿病網膜症におけるサイトカインの役割

大原こずえ¹⁾, 船津 英陽²⁾, 北野 滋彦²⁾, 堀 貞夫³⁾, 山下 英俊⁴⁾

¹⁾東京慈恵会医科大学眼科学教室, ²⁾東京女子医科大学糖尿病センター眼科

³⁾東京女子医科大学眼科学教室, ⁴⁾山形大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：糖尿病患者の血漿, 前房水, および硝子体液中のペントシジン(advanced glycation end products, AGE の構造の一つ), vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) の濃度を測定し, 網膜症重症度との相関について検討した。

結 果：前房水の VEGF と IL-6 濃度は網膜症重症度と有意な相関があった (VEGF, IL-6 とともに $p < 0.001$)。その他のサイトカインとペントシジンについては相関が

なかった。VEGF, IL-6 の前房水濃度は血中濃度に比べて有意に高値であった (VEGF $p = 0.02$, IL-6 $p < 0.001$)。

結 語：増殖前網膜症における血管透過性亢進に VEGF, IL-6 が眼局所で関与している可能性が推定された。また, これらは眼局所で産生されることが示された。(日眼会誌 105 : 213—217, 2001)

キーワード：糖尿病網膜症, サイトカイン, VEGF, IL-6, ペントシジン

The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy

Kozue Ohara¹⁾, Hideaki Funatsu²⁾, Shigehiko Kitano²⁾, Sadao Hori³⁾ and Hidetoshi Yamashita⁴⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Jikei University School of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, Tokyo Women's Medical University

³⁾Department of Diabetic Ophthalmology, Tokyo Women's Medical University

⁴⁾Department of Ophthalmology, Yamagata University School of Medicine

Abstract

Purpose : To investigate the role of cytokines and advanced glycation end products (AGEs) in the pathogenesis of diabetic retinopathy, we measured vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), and pentosidine (an AGE) levels in aqueous, vitreous, and paired plasma obtained from diabetic patients.

Results : The aqueous levels of VEGF and IL-6 were positively correlated with the grade of clinical severity of diabetic retinopathy (both VEGF and IL-6, $p < 0.001$). Other cytokines and pentosidine levels

were not significantly associated. The aqueous levels of VEGF and IL-6 were higher than the plasma levels (VEGF $p = 0.02$, IL-6 $p < 0.001$).

Conclusion : Within the intraocular area VEGF and IL-6 are produced and participate in the pathogenesis of hyperpermeability of retinal vessels in preproliferative diabetic retinopathy. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 213—217, 2001)

Key words : Diabetic retinopathy, Cytokine, VEGF, IL-6, Pentosidine

I 緒 言

糖尿病網膜症(以下, 網膜症)の病態解明や治療薬開発のため, 発症進展に関与する因子の研究は重要である。その病態については, 高血糖に伴う代謝異常により advanced glycation end products (AGE) が蓄積され, vas-

cular endothelial growth factor (VEGF) などのサイトカインの産生が促進され, 網膜症が進展すると考えられている^{1)~8)}。これまでの研究では, 一つもしくは少数のサイトカインと網膜症重症度との相関について検討されたものが多く, 多数のサイトカインについて検討したものは少ない。今回, 著者らは眼内液および血漿中のペ-

別刷請求先 : 105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8 東京慈恵会医科大学眼科学教室 大原こずえ
(平成 12 年 5 月 2 日受付, 平成 12 年 9 月 13 日改訂受理)

Reprint requests to : Kozue Ohara, M. D. Department of Ophthalmology, Jikei University School of Medicine. 3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

(Received May 2, 2000 and accepted in revised form September 13, 2000)

トシジン(AGEの構造の一つ)と複数のサイトカインの濃度を測定し、網膜症の病期との関連性について検討したので報告する。

II 対象と方法

対象は、1998年9月から1999年4月までに、東京女子医科大学糖尿病センター眼科で白内障手術および硝子体手術を施行した83例100眼で、内訳は男性49例、女性34例。年齢は 61.7 ± 13.1 (平均値 \pm 標準偏差)歳、糖尿病罹病期間は 16.3 ± 8.4 (平均値 \pm 標準偏差)年、糖化ヘモグロビン(HbA1c)は 7.19 ± 1.16 (平均値 \pm 標準偏差)%である。

試料は、白内障手術の際は前房水(61眼、採取量0.1~0.3 ml)を強角膜切開の後に、硝子体手術の際は硝子体液(39眼、採取量0.3~0.6 ml)をcore vitrectomyの始めに、術前に患者の同意を得て採取し、術後は速やかに -80°C で冷凍保存した。また、術後3日以内に同症例から同意を得て血液を採取し、直ちに遠心で血漿を分離後、速やかに -80°C で冷凍保存した。測定項目は、AGEの一つであるペントシジン、VEGF、interleukin-6(IL-6)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)とし、血漿においては全項目を、眼内試料においては少量のためこれらの中から数項目を選んだ。ペントシジンの濃度はIzuharaら⁹⁾の方法によって測定し、サイトカイン濃度はそれぞれQuantikine Human VEGF Immunoassay(R & D Systems, Minneapolis, 米国)、Quantikine HS Human IL-6 Immunoassay(R & D Systems, Minneapolis, 米国)、Quantikine HS Human TNF- α Immunoassay(R & D Systems, Minneapolis, 米国)、Quantikine Human TGF- β_1 Immunoassay(R & D Systems, Minneapolis, 米国)を用いてenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法で測定した。なお、予備検討として眼内液を用いて基礎的検討を行ったが、希釈試験は直線性を示し、再現性試験は日内、日間ともに変動係数は10%以内であった。また、添加回収試験は約90%であり、これらの結果から眼内液での各メディエータの測定に問題がないことが示された。

糖尿病網膜症の重症度は、Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Groupの作成した病期分類(ETDRS分類^{9)~11)}を用いて、術前および術中の眼底所見を基に病期を判定した。

検定項目は、眼内液のペントシジンとサイトカイン濃度と網膜症重症度との相関、および眼内液のペントシジンとサイトカイン濃度とそれらの血漿中濃度との相関とし、統計学的検定はSpearmanの順位相関係数を用いて、両側有意差検定における有意水準を0.05とし、判定した。

III 結果

VEGFにおいては前房水濃度と網膜症重症度との間に正の相関があった($\rho=0.66$, $p=0.0003$)。一方、硝子体濃度には相関はなかった(図1)。IL-6も同様に前房水濃度と網膜症重症度との間に正の相関があった($\rho=0.66$, $p=0.0005$)が、硝子体濃度には相関はなかった(図2)。ペントシジン、TNF- α 、TGF- β_1 においては前房水濃度、硝子体濃度のどちらにおいても網膜症重症度とは相関はなかった(図3~5)。以上を表1にまとめた。

眼内液のペントシジンとサイトカイン濃度とそれらの血漿中濃度の相関については、すべての項目において相関はなかった(表2)。

また、VEGFとIL-6について同一症例での前房水濃度と血漿中濃度を比較すると、両者とも前房水濃度が有意に高値を示した(VEGF $p=0.02$, IL-6 $p<0.001$)。その他については、ペントシジンとTGF- β_1 において前房水および硝子体各々の濃度と血漿濃度との間に統計学的有意差があった(表1※, $p<0.05$)。

なお、全症例のうち40例49眼に対し、術直前に同意を得た後、レーザーフレアセルメータを用いて前房フレア値を測定したが、前房水のVEGFとIL-6濃度は同一症例における前房フレア値と各々に有意に正の相関を示した(VEGF $p=0.022$, IL-6 $p=0.006$)。

IV 考 按

糖尿病網膜症の病態では多くのサイトカイン、増殖因子が産生され、ネットワークを形成してその病態に関与していると考えられている。高血糖によりポリオール代謝が亢進し、AGEsが産生され眼内に蓄積する⁴⁾。AGEはマクロファージに作用して、TNF- α 、IL-1、IL-6、TGF- β 、platelet-derived growth factor(PDGF)、insulin-like growth factor-I(IGF-I)などの因子を局所に放出し¹²⁾、また、網膜血管細胞や血管構成細胞に作用してVEGFの産生を促進する^{5)~8)}。これらのサイトカイン、増殖因子は網膜血管のバリア機能障害や細胞外基質の産生亢進など多様な反応を惹き起こし、糖尿病性細小血管症の病態に影響を及ぼし得ると考えられる。中でもVEGFは血管内皮細胞に特異性の高い増殖促進因子で、網膜虚血、低酸素状態で産生が亢進するだけでなく、糖代謝異常に伴って発現が上昇しており、初期網膜症および増殖前網膜症における網膜血管透過性亢進に関与していることは多くの研究により確認されつつある^{13)~17)}。今回の調査においても、前房水のVEGF濃度は網膜症重症度と相関があり、それを裏付けるものとなった。

また、前房水のIL-6濃度も網膜症重症度と有意な相関があった。IL-6は高血糖によりmonocyteからの産生が促進される¹⁸⁾が、主に増殖網膜症や増殖硝子体網膜症の病態に関わるとされている^{22)~26)}。その機序は明らか

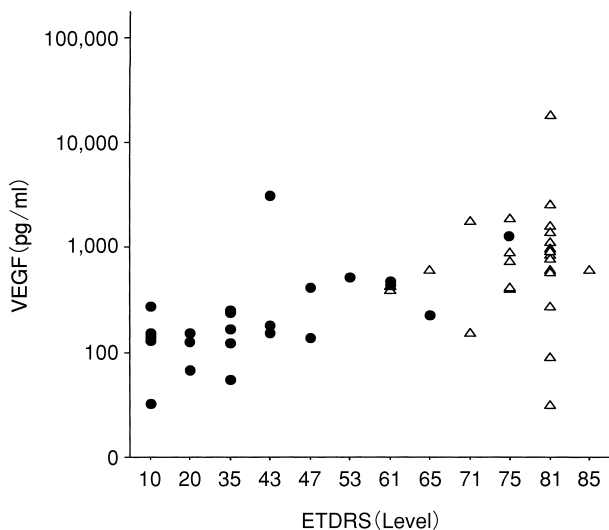


図 1 眼内 vascular endothelial growth factor (VEGF) 濃度と網膜症重症度 (ETDRS 分類) の相関。
ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group
●: 前房水, △: 硝子体液

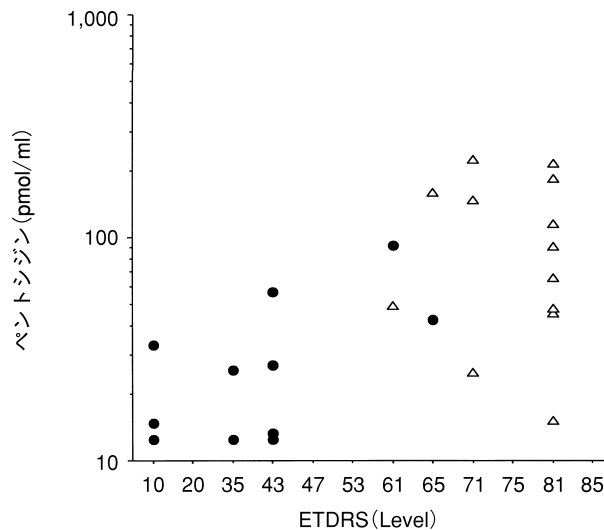


図 3 眼内ペントシジン濃度と網膜症重症度 (ETDRS 分類) の相関。

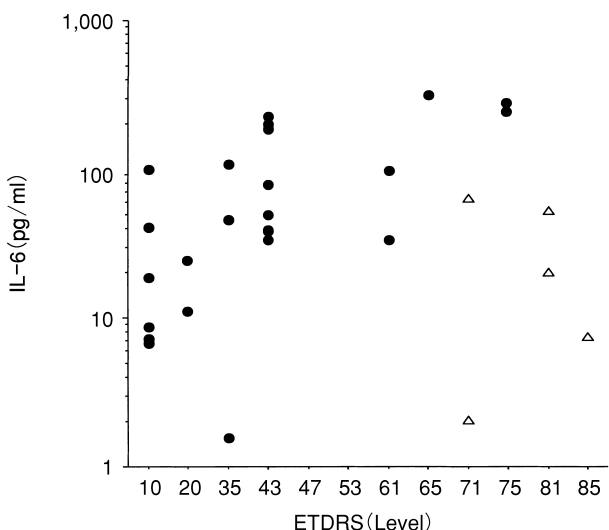


図 2 眼内 interleukin-6 (IL-6) 濃度と網膜症重症度 (ETDRS 分類) の相関。

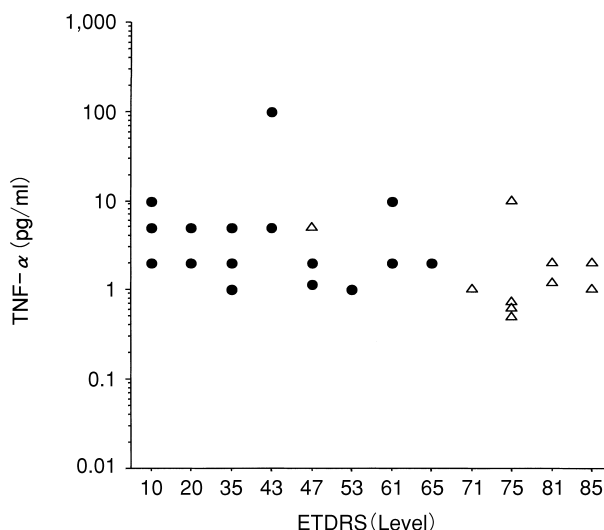


図 4 眼内 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 濃度と網膜症重症度 (ETDRS 分類) の相関。

ではないが, *in vitro* の実験において培養血管内皮細胞の透過性を亢進させること²⁷⁾や, *in vivo* の実験において前眼部血管透過性を亢進させること²⁸⁾が報告されており, 炎症に参与する chemical mediator として注目される. 今回の調査でも前房水の IL-6 濃度と前房フレア値は有意な相関を示し, さらに IL-6 濃度が単純網膜症から増殖前網膜症への進行と平行していることから, 新生血管が発生する以前の, 主に網膜血管の透過性亢進に関わる網膜症病態に IL-6 も関与していることが推定される.

一方, 硝子体液の VEGF 濃度は網膜症重症度とは相関がなかった. 今回の調査では硝子体液を採取できた症

例は ETDRS レベル 61 以上の増殖網膜症のみであり, 網膜症レベルのレンジが狭いことが要因と考えられる.

また, 眼内液のペントシジンとサイトカイン濃度とそれらの血漿中濃度の相関については, すべての項目において相関はなかった. この結果から, 網膜症の進行には眼内でのサイトカインの産生が主として関与しており, 血管のバリア破壊により眼内へ漏れてくる血液中の因子の関与は少ないことが推定される. なお, 今回の調査で網膜症重症度と有意な相関があった前房水の VEGF, IL-6 は血中濃度に比べて有意に高値であり, 新生血管が発生する以前の増殖前網膜症における血管透過性亢進の病態に VEGF, IL-6 が眼局所で関与している可能性

表 1 眼内サイトカインおよびペントシジン濃度と網膜症重症度の相関

	前房水	硝子体液
VEGF		
濃度 (pg/ml)	407.2±636.1 ※	1500.5±3426.6
相関係数 ρ	0.66	0.17
p 値	0.0003*	0.42
n	25	25
IL-6		
濃度 (pg/ml)	92.32±97.96 ※	28.66±27.04
相関係数 ρ	0.66	-0.16
p 値	0.0005*	0.8
n	24	5
ペントシジン		
濃度 (pg/ml)	27.24±23.34 ※	104.75±72.00 ※
相関係数 ρ	0.4	-0.14
p 値	0.15	0.65
n	14	13
TNF-α		
濃度 (pg/ml)	7.86±18.68	2.13±2.77
相関係数 ρ	-0.06	0.08
p 値	0.77	0.8
n	27	12
TGF-β ₁		
濃度 (pg/ml)	1.289±1.196 ※	0.755±1.008 ※
相関係数 ρ	0.01	-0.27
p 値	0.98	0.42
n	14	11

VEGF: vascular endothelial growth factor, IL-6: interleukin-6, TNF-α: tumor necrosis factor-α, TGF-β₁: transforming growth factor-β₁
 眼内液: 前房水+硝子体液 濃度: 平均値±標準偏差
 n: 眼数
 相関係数: Spearman の順位相関係数 * : 網膜症重症度と有意な相関あり
 ※: 血漿濃度と有意差あり

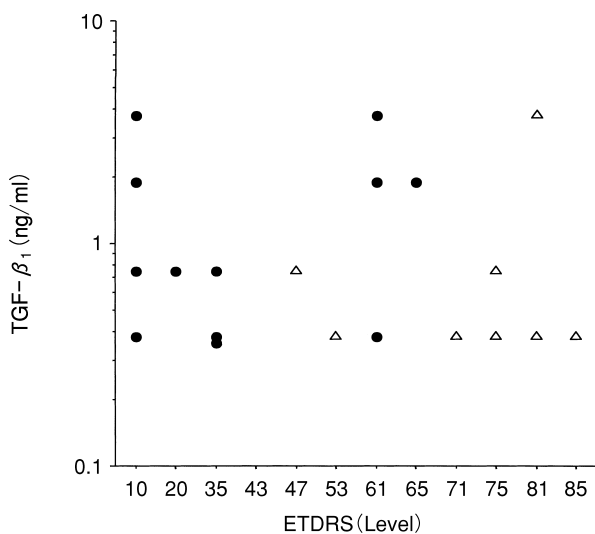


図 5 眼内 transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁) 濃度と網膜症重症度 (ETDRS 分類) の相関。

表 2 サイトカインおよびペントシジンの血漿濃度と網膜症重症度の相関

	血漿濃度	相関係数 ρ	p 値
VEGF (pg/ml)	60.7±53.8	-0.19	0.327
IL-6 (pg/ml)	2.22±2.25	-0.01	0.982
TNF-α (pg/ml)	2.66±1.73	-0.06	0.743
TGF-β ₁ (ng/ml)	6.68±4.29	0.05	0.849
pentosidine (pmol/ml)	285.6±309.7	0.22	0.46

が推定され、また、これらは眼局所で産生されることが示された。

稿を終えるに当たり、ペントシジン測定のご指導を賜りました東海大学総合医学研究所宮田敏男助教授に深謝するとともに、サイトカイン測定のご指導をいただきました三菱化学ビーシーエル山下哲次氏、および統計検討でご指導をいただきました STATZ 島田勝則氏に心から感謝いたします。

本論文は第 53 回日本臨床眼科学会で報告したものに若干数の症例を加えて再検討したものである。なお、本研究は厚生省感覚器障害研究事業(10060101)の援助を受けた。

文 献

- 1) 山下英俊: 糖尿病網膜症におけるサイトカインの役割. Diabetes Journal 23: 91-97, 1995.
- 2) 山下英俊: 糖尿病網膜症の病態と発症機序. 現代医療 30: 2697-2703, 1998.
- 3) 井藤英喜: 糖尿病の進行と血管内皮障害. 血管と内皮 5: 333-338, 1995.
- 4) Stitt AW, Moore JE, Sharkey JA, Murphy G, Simpson DAC, Bucala R, et al: Advanced glycation end products in vitreous: Structural and functional implications for diabetic vitreopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 39: 2517-2523, 1998.
- 5) Hirata C, Nakano K, Nakamura N, Kitagawa Y, Shigeta H, Hasagawa G, et al: Advanced glycation end products induce expression of vascular endothelial growth factor by retinal muller cells. Biochem Biophys Res Commun 236: 712-715, 1997.
- 6) Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomata H, Ikeda K, Horiuchi S: The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. Diabetologia 40: 764-769, 1997.
- 7) Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, et al: Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. J Clin Invest 101: 1219-1224, 1998.
- 8) 橋本浩隆, 新井清美, 筑田 真, 小原喜隆: 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. 日眼会誌 102: 442-446, 1998.
- 9) Izuhara Y, Miyata T, Ueda Y, Suzuki D, Asahi

- K, Inagi R**, et al : A sensitive and specific ELISA for plasma pentosidine. *Nephrol Dial Transplant* 14 : 576—580, 1999.
- 10) **Hyodo I, Doi T, Endo H, Hosokawa Y, Nishikawa Y, Tanimizu M**, et al : Clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer. *Eur J Cancer* 34 : 2041—2045, 1998.
- 11) **Andrew G, Mary AM, Susan S, Alice E, Caren G, Karl I** : Circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α are elevated in primary hyperparathyroidism and correlate with markers of bone resorption— A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 81 : 3450—3454, 1996.
- 12) **Gohongi T, Fukumura D, Boucher Y, Yun CO, Soff GA, Compton C**, et al : Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth : Involvement of transforming growth factor β_1 . *Nature Medicine* 5 : 1203—1208, 1999.
- 13) **Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group** : Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs—An extension of the modified airleie house classification. ETDRS Report Number 10. *Ophthalmology* 98 : 786—806, 1991.
- 14) **Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group** : Classification of diabetic retinopathy from fluorescein angiograms. ETDRS Report Number 11. *Ophthalmology* 98 : 807—822, 1991.
- 15) **Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group** : Fundus photograpic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS Report Number 12. *Ophthalmology* 98 : 823—833, 1991.
- 16) 牧田善二, 土田健一, 小池隆夫 : AGE・増殖因子. *糖尿病* 41 : 11—13, 1998.
- 17) **Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST**, et al. : Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with dibetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331 : 1480—1487, 1994.
- 18) **Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueish K** : The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest* 74 : 819—825, 1996.
- 19) **Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Elliott D, Puklin JE, Abrams GW** : Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with non-proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 36—47, 1997.
- 20) **Tanaka Y, Katoh S, Hori S, Miura M, Yamashita H** : Vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Lancet* 349 : 1520, 1997.
- 21) 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.
- 22) **Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F** : Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes *in vitro*. *Diabetes* 45 : 954—959, 1996.
- 23) **Kauffmann DJH, Meurs JC, Mertens DAE, Peperkamp Ed, Master C, Gerritsen ME** : Cytokines in vitreous humor : Interleukinn-6 is elevated in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 900—906, 1994.
- 24) 吉岡成人, 向井 朗, 竹田宗泰, 今泉寛子, 奥芝詩子, 清水紀子 : 糖尿病網膜症患者における血清, 前房水, 硝子体液中のサイトカイン-増殖糖尿病網膜症における IL-6 の増加. *眼紀* 47 : 1064—1066, 1996.
- 25) **Kon CH, Occeleston NL, Aylward GW, Khaw PT** : Expression of vitreous cytokines in proliferative vitreoretinopathy : A prospective study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 705—712, 1999.
- 26) **Ideta R, Yamashita H, Tanaka Y, Kato S, Kitano S, Hori S** : Roles of cytokines in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 177 : 700—701, 1999.
- 27) 丸尾直子, 森田育男, 室田誠逸 : インターロイキン 6(IL-6)の血管内皮細胞に及ぼす影響. *血管* 15 : 237—241, 1992.
- 28) 塚原康友 : 家兔前眼部血管透過性に対する硝子体腔内投与 サイトカインの影響. *神戸大学医学部紀要* 60 : 61—66, 1999.