

糖尿病網膜症の硝子体における glycooxidation とサイトカインの関係

松本 行弘¹⁾, 高橋 正哲²⁾, 緒方 正史³⁾¹⁾獨協医科大学越谷病院眼科, ²⁾浜松医科大学整形外科学教室, ³⁾東京大学医学部衛生学教室

要 約

目的：糖尿病網膜症(DR)の発症, 進展の要因と考えられている advanced glycation end products (AGE-s) の 1 つであるペントシジン, 関連のあるサイトカインである vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF)- β_2 , monocyte chemotactic protein (MCP)-1, および活性酸素の硝子体中濃度を測定し, それぞれの関係を検討する。

方法：硝子体手術を施行した糖尿病網膜症群(DR群, 43 眼)と全身疾患がない群(対照群, 21 眼)に分け, さらに DR 群は術前の手術適応に応じて分類した。ペントシジンは酸加水分解処理後 high performance liquid chromatography (HPLC), サイトカインは enzyme-link immunosorbent assay (ELISA) 法, 過酸化水素 (H_2O_2) はチタン呈色法で測定した。

結果：DR 群の硝子体におけるペントシジン, VE-

GF, total TGF- β_2 , MCP-1 値は対照群に比べて有意 ($p < 0.01$) に高値であった。また, ペントシジンと VEGF, ペントシジンと H_2O_2 , H_2O_2 と VEGF, および total TGF- β_2 と MCP-1 の間にはそれぞれ, $r = 0.62, 0.58, 0.65, 0.59$ の正の相関 ($p < 0.01$) があつた。

結論：DR の硝子体において, glycooxidation の進行があり VEGF の分泌, 発現を促進している可能性が推定された。また, total TGF- β_2 と MCP-1 の変動は関連性がある可能性が考えられ, DR の病態の発症, 進展に影響すると推察した。(日眼会誌 105 : 435-441, 2001)

キーワード：ペントシジン, Glycooxidation, トランスフォーミング成長因子, 血管内皮増殖因子, 糖尿病網膜症

Relationship between Glycooxidation and Cytokines in the Vitreous of Eyes with Diabetic Retinopathy

Yukihiro Matsumoto¹⁾, Masaaki Takahashi²⁾ and Masafumi Ogata³⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine²⁾Department of Orthopedic Surgery, Hamamatsu University School of Medicine³⁾Department of Molecular Preventive Medicine, School of Medicine, The University of Tokyo

Abstract

Purpose : To investigate the correlations among pentosidine, an advanced glycation end product, and related cytokines [vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF)- β_2 , and monocyte chemotactic protein (MCP)-1], and active oxygen in the vitreous of patients with diabetic retinopathy (DR).

Methods : Vitreous samples from 43 eyes undergoing vitrectomy to treat DR were divided into four subgroups and analyzed. Vitreous samples from 21 eyes of patients with no systemic conditions were age- and sex-matched controls. The vitreous levels of pentosidine, cytokines, and hydrogen peroxide (H_2O_2) were determined by high performance liquid chromatography, enzyme-linked immunosorbent assay, and titanium-hydrogen peroxide colorimetric method respectively.

Results : The levels of pentosidine, VEGF, total TGF- β_2 , and MCP-1 in the vitreous samples of eyes

with DR were significantly higher than in the controls ($p < 0.01$). Significant correlation ($p < 0.01$) was found between pentosidine and VEGF, pentosidine and H_2O_2 , H_2O_2 and VEGF, and total TGF- β_2 and MCP-1 ($r = 0.62, 0.58, 0.65, \text{ and } 0.59$, respectively).

Conclusions : These results suggest that the elevated levels of the glycooxidation product pentosidine may have caused increased levels of VEGF in the vitreous of DR patients. Increased levels of total TGF- β_2 and MCP-1 together may also play an important role in the development of DR. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 435-441, 2001)

Key words : Pentosidine, Glycooxidation, Transforming growth factor- β_2 , Vascular endothelial growth factor, Diabetic retinopathy

別刷請求先：343-8555 越谷市南越谷 2-1-50 獨協医科大学越谷病院眼科 松本 行弘
(平成 12 年 7 月 12 日受付, 平成 13 年 1 月 17 日改訂受理)

Reprint requests to : Yukihiro Matsumoto, M.D. Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine. 2-1-50 Minami-Koshigaya, Koshigaya 343-8555, Japan
(Received July 12, 2000 and accepted in revised form January 17, 2001)

I 緒 言

グリケーションは蛋白質の非酵素的な糖化反応¹⁾で、glycooxidation はグリケーションの後期反応に、活性酸素が関与して後期反応生成物質 (advanced glycation end products, AGEs) が形成される反応である²⁾。AGEs にはペントシジン³⁾⁻⁶⁾、カルボキシメチルリジン (carboxymethyllysine, CML)⁷⁾⁸⁾、ピラリン⁹⁾、クロスリン¹⁰⁾などがあるが、glycooxidation はペントシジンと CML の生成過程に関与するとされている²⁾¹¹⁾¹²⁾。中でもペントシジンは、酸加水分解に対する耐性と蛍光性、架橋形成を有する非常に安定した物質で、糖尿病患者の眼組織での増加が報告¹⁾²⁾⁵⁾⁶⁾されている。

AGEs 生成過程で発生したスーパーオキシドは、不活化反応により過酸化水素 (H_2O_2) となり¹³⁾、ペントシジンの蓄積をさらに惹き起こすと考えられる。一方、AGEs は、マクロファージ (macrophage, $M\Phi$) や血管構成細胞などに発現する受容体と反応し、リガンドとして認識され細胞内に取り込まれ処理される過程で、サイトカインや増殖因子の分泌を促すことが広く指摘されている⁸⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。これらのサイトカイン、増殖因子は血管新生や眼内増殖に深く関わることが知られている。しかし、未だ糖尿病網膜症 (diabetic retinopathy, DR) の同一ヒト硝子体における AGEs と活性酸素およびこれらサイトカイン同士の関係を明らかにした報告はない。そこで、DR の同一硝子体から、ペントシジン、 H_2O_2 、単球/ $M\Phi$ 遊走作用を有する monocyte chemotactic protein (MCP)-1 および transforming growth factor (TGF)- β_2 、vascular endothelial growth factor (VEGF)¹⁶⁾¹⁷⁾ を測定し、これら各物質間同士の関係を術前の DR の病態別に分類し検討した。

II 実験対象ならびに方法

1. 対 象

硝子体の試料は、獨協医科大学越谷病院で DR の硝子体手術の際に得られた硝子体 [43 眼, 57.7 ± 11.3 (平均値 \pm 標準偏差) 歳, DR 群] を用いた。DR 群は、術前の網膜症の病態によりさらに、牽引性網膜剥離 (tractional retinal detachment, TRD) に硝子体出血 (vitreous hemorrhage, VH) を併発した群 (TRD+VH 群) 12 眼, VH がなく TRD のみで手術適応となった群 (TRD 群) 6 眼, VH のみの群 (VH 群) 18 眼, VH も TRD も存在せず糖尿病黄斑症 (diabetic macular edema, DME) で手術適応となった群 (DME 群) 7 眼の 4 群に分類した。TRD 群および DME 群は、術前 6 か月以上経過観察し、その間に VH が存在せず、かつ問診で経過観察期間以前においても VH が存在しなかったと推定された症例に限定した。対照群としては、眼疾患、全身疾患のない age-, sex-match させた特発性黄斑円孔や特発性黄斑上膜の手術

で得られた硝子体 (21 眼, 61.2 ± 11.8 歳) とした。腎不全者では生体にペントシジンが多量に蓄積されることが報告⁴⁾されているため、血清クレアチニン値が正常値以内 (1.3 mg/dl 以下) の者を対象とした。DR 群の血糖コントロール状態は HbA_{1c} 値 7.53 ± 1.79 (平均値 \pm 標準偏差) % で、推定罹病期間は 10.50 ± 7.84 (平均値 \pm 標準偏差) 年であった。

硝子体試料は、硝子体手術を行う際、毛様体扁平部に 3 ポートを作製した後、眼内灌流を行う前に硝子体カッターを眼内に挿入し、眼内灌流液の混入を避け採取した。切除硝子体は手術中に氷槽内に集め、直ちに遠心分離 ($2,260 \text{ xg}$, 4°C , 30 分) し、血球ならびに切除した増殖組織を除去した。そして、 N_2 ガスを充填して -40°C で保存した。すべての材料採取に際しては、本研究の主旨を患者に説明のうえ同意を得て行った。

2. 実験方法

1) 硝子体中ペントシジンの定量

Takahashi ら⁴⁾の方法と同様に行った。切除硝子体と同量の 12 mol/l 塩酸を混合し、シールドグラスチューブを用いて脱気後、 N_2 ガス充填による無酸素状態下で 110°C 、20 時間の加水分解を行った。加水分解物を pore size $0.45 \mu\text{m}$ のシリンジフィルター (DIS-MIC-25 cs, 東洋濾紙) で濾過し、濾過液から $200 \mu\text{l}$ を取り 20 ml のイオン交換水で希釈して $0.8 \times 10 \text{ cm}$ SP-Sephadex C-25 カラム (Pharmacia LKB 社, Uppsala, スウェーデン) に添加した。カラムを 0.1 mol/l 塩酸 20 ml で洗浄した後、 1.0 mol/l 塩酸 5 ml で溶出した。溶出液を TC-8 concentrator (Taitec 社) を用いて減圧下で蒸発・乾固させた。残留物を 1.0% n-heptafluorobutyric acid (HFBA) $200 \mu\text{l}$ で溶解し、その溶解液 $160 \mu\text{l}$ を用いて high performance liquid chromatography (HPLC) に注入し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、流速 1 ml/min 、移動層には 100% アセトニトリルと 40 mmol/l HFBA の混合液 ($27:73$ by vol) を使用し、反応温度を室温として $8 \text{ mm} \times 10 \text{ cm}$ column prepacked with Radial-Pack C 18 ($10\text{-}\mu\text{m}$ particle size, type 8 C 1810 μ : Waters 社, Milford, MA, 米国) を用いて、蛍光検出器 (励起波長 335 nm , 蛍光波長 385 nm) で測定した。試料測定前後に標準物質を注入して同様に測定し、そのピークから検量線を作成した。

2) 硝子体中 VEGF, MCP-1, TGF- β_2 の定量

VEGF はスプライジングの差による 4 種類 (121, 165, 189, 206) のアイソフォームのうち、生体内で主に産生される VEGF 165 を測定した。TGF- β は、増殖糖尿病網膜症 (PDR) の眼内液に存在するのは、TGF- β_2 が優位とされているため¹⁶⁾、総 (total) TGF- β_2 と活性型 (ma-

ture form) TGF- β_2 を測定した。

Total TGF- β_2 測定のために、試料 125 μ l に 1 mol/l 塩酸 25 μ l を加え、室温で 10 分静置し、1.2 mol/l 水酸化ナトリウムと 0.5 mol/l N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) の混合液 25 μ l と protein base 緩衝液 800 μ l で反応させ、TGF- β_2 の活性化処理を行った。活性化した試料は 2 時間以内に使用した。

各試料中の TGF- β_2 、VEGF、MCP-1 濃度の測定は、Quantikine[®] (R&D Systems 社, Minneapolis, 米国) を用いて、酵素標識免疫測定法 (enzyme-link immunosorbent assay, ELISA) で行った。それぞれ抗ヒト TGF- β_2 、VEGF、MCP-1 murine モノクローナル抗体を固相化した個々のマイクロプレートの各ウェルに、TGF- β_2 は protein base 緩衝液を 100 μ l ずつ注入し、total TGF- β_2 測定のための活性化させた試料と mature TGF- β_2 測定のための活性化処理を行っていない試料をそれぞれ 100 μ l 注入した。VEGF はそれぞれ protein base 緩衝液を 50 μ l ずつ注入し、試料を 200 μ l 注入した。MCP-1 は試料をそれぞれ 200 μ l 注入した。それぞれ TGF- β_2 、VEGF、MCP-1 の標品も注入した。攪拌後、室温で 2 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 回洗浄した。抗ヒト TGF- β_2 、VEGF、MCP-1 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 TGF- β_2 、VEGF、MCP-1 に対し、各々わさびペルオキシダーゼを標識した抗 TGF- β_2 、VEGF、MCP-1 ポリクローナル抗体 200 μ l を注入して攪拌し、室温で 2 時間静置後、4°C 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 回洗浄し、ペルオキシダーゼ反応基質液 200 μ l を注入し室温で発色させた。20 分後、反応停止液である 2 mol/l 硫酸 50 μ l を注入し、25 分反応させた後、マイクロプレートリーダー (model MPR-A 4, 東洋曹達社) を使用して、波長 450 nm で各ウェルの吸光度を測定 (いずれも二重測定) した。二重測定の平均値を算出し、同時に標品の測定値から検量線を作成し、各試料の total TGF- β_2 、mature TGF- β_2 、VEGF、MCP-1 濃度を検量した。TGF- β_2 、VEGF、MCP-1 の最小測定限界値は各々 7.0、5.0、5.0 pg/ml であった。

3) H₂O₂ の定量

チタン過酸化水素呈色法¹⁸⁾で測定した。試料 80 μ l と同量の 10 mmol/l リン酸緩衝液 (pH 7.00) を攪拌後、80 μ l のチタン呈色液を注入、攪拌し、25°C で 90 分静置し、マイクロプレートリーダーを用いて、波長 410 nm で吸光度を測定した (いずれも二重測定)。二重測定の平均値を算出し、同時に標品の測定も行い、検量線を作成し、各試料の H₂O₂ 濃度を検量した。

4) 統計学的検討

測定したペントシジン、TGF- β_2 、VEGF、MCP-1 お

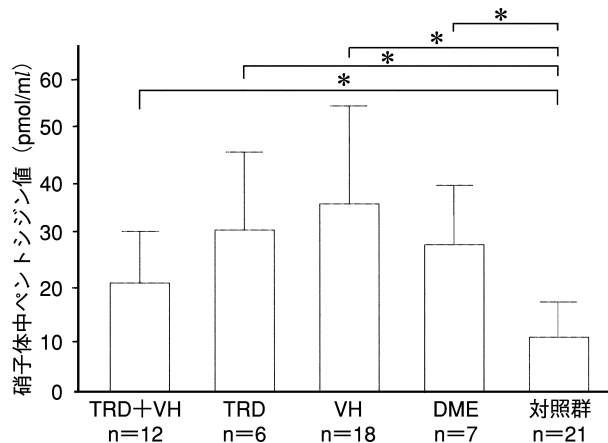


図 1 糖尿病網膜症 (DR) 群の術前病態別硝子体中ペントシジン値の比較。

牽引性網膜剝離+硝子体出血 (TRD+VH) 群、TRD 群、VH 群、糖尿病黄斑症 (DME) 群のいずれにおいても、対照群に比較して有意に高値であった。

* : $p < 0.01$

よび H₂O₂ 値を、DR 群と対照群で比較検討した。DR 群は、さらに前述の 4 群に分け検討した。統計解析は、Mann-Whitney U test を用いて行った。各々の相関係数は Pearson の相関係数から求めた。統計処理結果は、 r = 相関係数とし、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

III 結 果

1. 硝子体中ペントシジン値

1) DR 群と対照群との比較

硝子体中ペントシジン値は、DR 群 29.6 ± 18.9 (平均値 ± 標準偏差) pmol/ml が、対照群 10.2 ± 7.5 pmol/ml に比較して有意に高値を示した ($p < 0.01$)。

2) DR 群の術前状態の違いによる比較 (図 1)

TRD+VH 群は 20.5 ± 11.2 pmol/ml、TRD 群は 29.6 ± 14.5 pmol/ml、VH 群は 34.7 ± 24.6 pmol/ml、DME 群は 27.9 ± 12.9 pmol/ml であり、4 群いずれにおいても、対照群に比較して有意に高値であった ($p < 0.01$)。4 群間同士での比較では有意差はなかったが、VH 群で最も高値であり、対照群に比較して特に有意であった ($p < 0.0001$)。

3) DR 群の硝子体中ペントシジン値と血清 HbA_{1c} 値の関係

両者の間には $r = 0.01$, $p = 0.93$ で相関関係はなく、術前に VH が存在した群 (TRD+VH 群および VH 群, $n = 30$) では硝子体中ペントシジン値が 30.2 ± 20.7 pmol/ml、血清 HbA_{1c} 値が 7.77 ± 1.97% で、両者の関係は $r = -0.09$, $p = 0.66$ であった。また、VH が存在しなかった群 (TRD 群および DME 群, $n = 13$) では硝子体中ペントシジン値が 28.7 ± 13.1 pmol/ml、血清 HbA_{1c} 値が 7.17 ± 1.46% で、 $r = 0.43$, $p = 0.19$ であった。硝子体中ペントシジン値と血清 HbA_{1c} 値は VH の有無で

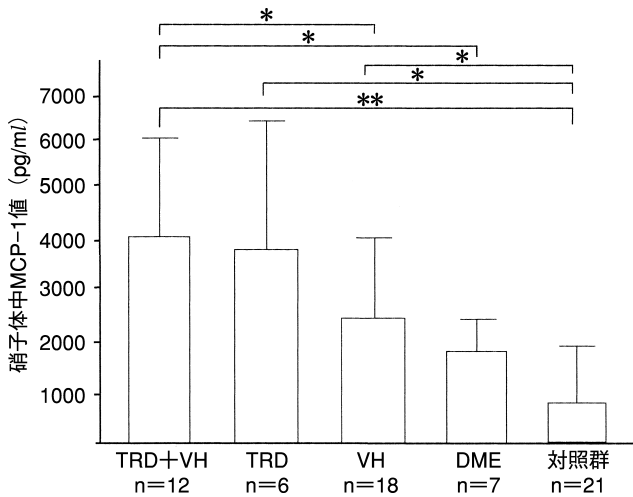


図2 DR群の術前病態別硝子体中 monocyte chemo-tactic protein (MCP-1) 値の比較。

TRD+VH群, TRD群, VH群では対照群に比較して有意に高値であった。4群間同士の比較では, TRD+VH群がVH群, DME群に比較して有意に高値であった。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

それぞれ有意差はなかった。

2. 硝子体中 TGF- β_2 , VEGF, MCP-1 値

1) DR 群と対照群との比較

硝子体中 VEGF は, DR 群の 43 眼中 42 眼, 対照群の 21 眼中 14 眼で定量された。VEGF 値は, DR 群の 836 ± 687 (平均値 \pm 標準偏差) pg/ml が対照群の 215 ± 107 pg/ml と比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。Total TGF- β_2 値は, DR 群の 3488 ± 2526 pg/ml が対照群の 1473 ± 908 pg/ml と比較して有意に高かった ($p < 0.01$)。Mature TGF- β_2 値は, DR 群の 369 ± 305 pg/ml と対照群の 340 ± 179 pg/ml で有意差はなかった。MCP-1 値は, DR 群の 2979 ± 2085 pg/ml が対照群の 1214 ± 994 pg/ml に比較して有意に高かった ($p < 0.01$)。

2) DR 群の術前状態の違いによる比較

VEGF 値は, TRD+VH 群が 924 ± 665 pg/ml, TRD 群が 771 ± 714 pg/ml, VH 群が 837 ± 765 pg/ml, DME 群が 788 ± 616 pg/ml ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$)。MCP-1 値 (図2) は, TRD+VH 群が 4093 ± 2011 pg/ml, TRD 群が 3823 ± 3054 pg/ml, VH 群が 2378 ± 1806 pg/ml で ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.05$)。total TGF- β_2 値は, TRD+VH 群が 4247 ± 2885 pg/ml, TRD 群が 3459 ± 1882 pg/ml, DME 群が 3121 ± 1245 pg/ml ($p < 0.01$, $p = 0.01$, $p = 0.01$) と, それぞれ対照群に比較して有意に高値であった。Mature TGF- β_2 値は, TRD+VH, TRD, VH, DME 群と対照群には有意差がなかった。

DR 群の 4 群間同士の比較では, MCP-1 値は, TRD+VH 群が VH, DME 群に比較して有意に高値であった ($p < 0.05$)。VEGF, total TGF- β_2 , mature TGF- β_2

は 4 群間同士に有意差はなかった。

3. 硝子体中 H₂O₂ 値

1) DR 群と対照群との比較

過酸化水素値は, DR 群の 12.8 ± 8.4 (平均値 \pm 標準偏差) nmol/ml が対照群の 8.2 ± 4.6 nmol/ml (対照群の 21 眼中 19 眼で定量された) に比較して, 高い傾向を示した。

2) DR 群の術前状態の違いによる比較

TRD+VH 群の 13.4 ± 8.0 nmol/ml, TRD 群の 11.7 ± 2.5 nmol/ml, VH 群の 15.8 ± 9.8 nmol/ml は, DME 群の 5.0 ± 2.5 nmol/ml に比較して有意に高値であった ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$) であり, VH 群は対照群に比較して有意に高値であった ($p < 0.01$)。

4. DR 群の硝子体におけるペントシジン, サイトカイン, 過酸化水素の関係 (図3~6)

硝子体中ペントシジン値と VEGF 値, ペントシジン値と過酸化水素値, VEGF 値と過酸化水素値の間には有意 ($r = 0.62, 0.58, 0.65, p < 0.01$) な相関関係があった。その関係は特に VH 群でより強い傾向があった ($r = 0.81, 0.63, 0.81, p < 0.01$)。また, total TGF- β_2 と MCP-1 の間にも有意 ($r = 0.59, p < 0.01$) な相関関係があった。両者は TRD を併発している群で強い相関関係があった (TRD 群は $r = 0.87, p < 0.05$, TRD+VH 群は $r = 0.62, p < 0.01$)。さらに, VEGF と mature TGF- β_2 では, TRD+VH 群でのみ有意な相関があった ($r = 0.68, p < 0.01$)。

なお, 対照群においては, 各物質間には有意な相関関係はなかった。

IV 考 按

DR 群の硝子体で, ペントシジンが有意に高値を示した要因としては, ①長期間の高血糖によりグルコースなどの還元糖が硝子体へ流入し, 代謝回転の遅い硝子体コラーゲンがグリケーションを受け, その後硝子体内での oxidation などを介して後期反応が進行した。②血液-網膜柵破綻による透過性亢進¹⁹⁾により, 血漿蛋白質が流入しグリケーションを受けた, あるいは血漿中 AGEs-peptide, AGEs-protein²⁰⁾, ペントシジン²¹⁾が流入し硝子体中に蓄積した。③VH による血漿蛋白質とペントシジンの物理的拡散, の可能性が考えられた。今回, VH のない DR の硝子体 (TRD 群と DME 群) のペントシジン値が, VH 群や VH+TRD 群と同様に対照群に比較して高値であったことや, 血清ペントシジンと正の相関がある血清 HbA_{1c} が²⁾, VH の有無にかかわらず硝子体中ペントシジンと相関がなかったことから, ③の血管の破綻で生じた VH による要因だけではないことが考えられた。

DR 群のペントシジンと VEGF 値が, 対照群に比較して有意に高く, 正の相関関係があったことは, ペントシジンが AGE 受容体を介して, 増殖細胞や硝子体中に

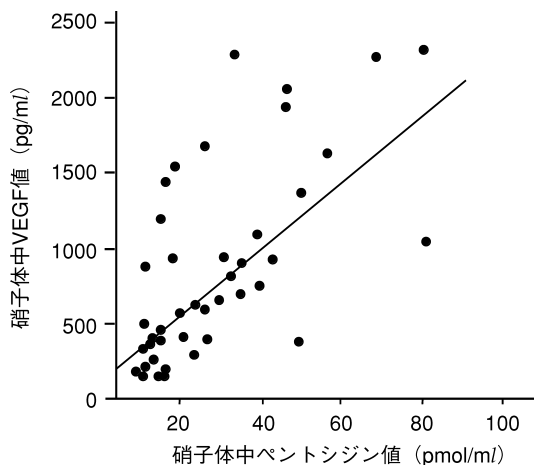


図 3 DR 群における硝子体中ペントシジンと vascular endothelial growth factor (VEGF) の相関。
 $VEGF (pg/ml) = 22.42 \times (\text{ペントシジン, pmol/ml}) + 187.1 (r=0.62, p<0.01)$

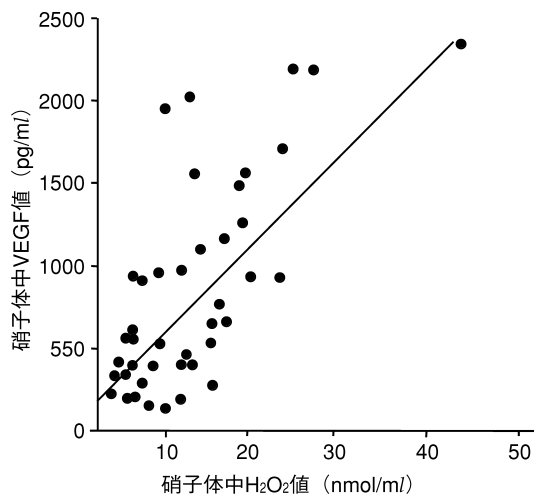


図 5 DR 群における硝子体中 H₂O₂ と VEGF の相関。
 $VEGF (pg/ml) = 52.40 \times (H_2O_2, nmol/ml) + 171.3 (r=0.65, p<0.01)$

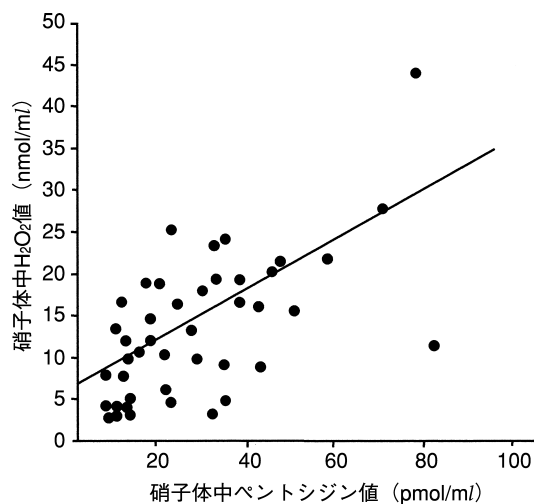


図 4 DR 群における硝子体中ペントシジンと H₂O₂ の相関。
 $H_2O_2 (nmol/ml) = 0.255 \times (\text{ペントシジン, pmol/ml}) + 5.243 (r=0.58, p<0.01)$

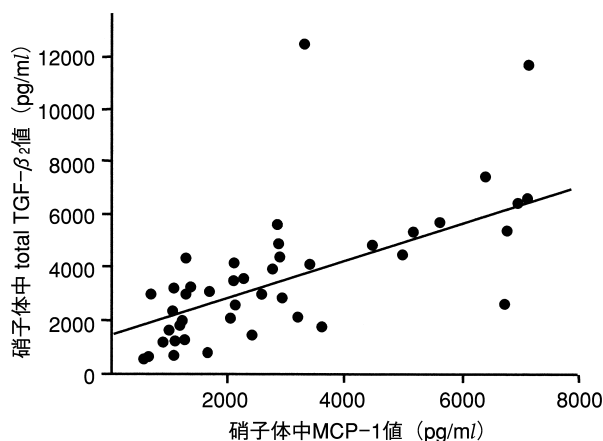


図 6 DR 群における硝子体中 total transforming growth factor-β₂ (TGF-β₂) と monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) の相関。
 $Total TGF-\beta_2 (pg/ml) = 0.705 \times (MCP-1, pg/ml) + 1386 (r=0.59, p<0.01)$

浸潤した MΦ からの VEGF 分泌促進に関与している可能性があるものと考えた。今回、DR の術前病態別の検討で、DR の進行度とペントシジン、VEGF 値の濃度勾配が一致をみなかった原因の一つに、DR が進展し TRD が生じると、AGEs を介することのない網膜の虚血による VEGF 分泌の要素が加わっている可能性が考えられる。

MCP-1 は、単球/MΦ や T リンパ球に対する遊走活性を持ち、MCP-1 により活性化された単球/MΦ からは TGF-β, tumor necrosis factor-α などが産生される。術前病態別の検討で、TRD+VH 群が VH 群、DME 群に比較して有意に高値 (p<0.05) であったことから、DR 進行度との直接的な関連が推定されたが、そのメカニズムについてはさらに研究が必要と思われる。今回、

MCP-1 とペントシジン、VEGF の間に相関関係はなかったが、ペントシジンと VEGF 値は増殖性変化の弱い DME 群でも比較的高値で、VEGF は DR 発症以前から網膜で発現が亢進している¹⁹⁾ことから、DR 初期では、MΦ 遊走活性の上昇も来す¹⁷⁾VEGF が MCP-1 のように硝子体内へ単球/MΦ を遊走させ、その MΦ から AGEs 受容体を介して種々のサイトカインが分泌されることも考えられた。

今回、mature TGF-β と VEGF の硝子体中濃度は、DR の術前状態別にみると、TRD+VH 群では VEGF と mature TGF-β₂ の間に有意 (r=0.68, p<0.01) な相関があった。TGF-β₂ と VEGF 発現の間には網膜細胞などの局所産生を介した関連¹⁶⁾があるのかも知れない。TRD+VH 群ではこのような関連が連鎖的に悪循環を繰り返したため、VEGF と mature TGF-β が有意な相

関を示したと思われる。

今回、total TGF- β_2 とMCP-1のDR術前状態別の平均値の変動が類似しており、特にTRDを併発した群で強い正の相関があった($r=0.87$, $p<0.05$: $r=0.62$, $p<0.01$)。増殖性変化の強いTRD群では、MCP-1により硝子体中に浸潤したM Φ やリンパ球系細胞、網膜構成細胞、硝子体細胞からのTGF- β_2 の分泌が増加している可能性が高いと思われる。

Luら²²⁾はAGEsを硝子体内に注入すると、ヒドロキシラジカルなど活性酸素の存在下でRPE細胞におけるVEGFの発現亢進、また、Kurokiら²³⁾は培養RPE細胞がH₂O₂やスーパーオキシドによりVEGFを産生するとし、glycooxidationとVEGFの関係を報告している。そして本研究から、DRの硝子体においてAGEsであるペントシジン、活性酸素であるH₂O₂、およびサイトカインであるVEGF、さらにTGF- β_2 とMCP-1が、それぞれ病態に応じ相互作用を持って変動していることがわかった。

稿を終えるに当たり、常にご指導をいただき、ご校閲いただきました獨協医科大学眼科学教室小原喜隆教授、獨協医科大学越谷病院眼科筑田 眞教授、つくば橋本眼科橋本浩隆先生に深謝申し上げます。ペントシジン測定についてご指導いただきました浜松医科大学整形外科教室星野裕信先生、ご協力いただきました天理よろづ相談所病院眼科(現 熊本大学眼科学教室教授)谷原秀信先生、獨協医科大学越谷病院眼科林 振民先生、新井清美研究員に深謝申し上げます。

文 献

- 1) **Brownlee M** : Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Ann Rev Med* 46 : 223—234, 1995.
- 2) **Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, Sell DR** : The mechanism of collagen cross-linking in diabetes. A puzzle nearing resolution. *Diabetes* 45 : S 67—72, 1996.
- 3) **Sell DR, Monnier VM** : Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 264 : 21597—21602, 1989.
- 4) **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.
- 5) **橋本浩隆** : 網膜症の病期別糖コントロール目標—眼科の立場より—。 *眼紀* 49 : 981—988, 1998.
- 6) **Matsumoto Y, Hashimoto H, Arai K, Chikuda M, Obara Y** : Relationship TGF- β_2 , VEGF and pentosidine in the human vitreous with proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : S 11, 1999.
- 7) **Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW** : Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 261 : 4889—4894, 1986.
- 8) **石橋達朗** : 眼内循環, 眼内血管病変の細胞生物学. *日眼会誌* 103 : 923—947, 1999.
- 9) **Hayase F, Nagaraj RH, Miyata S, Njoroge FG, Monnier VM** : Aging of proteins : Immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillard reaction *in vivo*. *J Biol Chem* 264 : 3758—3764, 1989.
- 10) **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.
- 11) **Baynes JW** : Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40 : 405—412, 1991.
- 12) **Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW** : Oxygen not required for the browning and cross linking of protein by pentose : Relevance to Maillard reactions *in vivo*. *Int J Biochem Cell Biol* 31 : 1297—1305, 1999.
- 13) **Elgawish A, Glomb M, Freidlander M, Monnier VM** : Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 271 : 12964—12971, 1996.
- 14) **佐野裕之, 堀内正公** : 蛋白質のグリケーション. 井村裕夫, 他(編) : 糖尿病, 第7巻, 中山書店, 東京, 204—210, 1995.
- 15) **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, 1999.
- 16) **山下英俊** : 眼の細胞生物学, トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF- β)スーパーファミリーの眼組織における作用. *日眼会誌* 101 : 927—947, 1997.
- 17) **Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC**, et al : Vascular permeability factor : A tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172 : 1535—1545, 1990.
- 18) **林 振民** : 糖尿病における白内障の銅イオンと過酸化反応の関係. *日眼会誌* 100 : 672—679, 1996.
- 19) **Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Elliott D, Puklin JE, Abrams GW**, et al : Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 36—47, 1997.
- 20) **Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V**, et al : Advanced glycosylation end-products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 325 : 836—842, 1991.
- 21) **Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM** : Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* 41 : 153—159, 1992.

22) **Lu M, Kuroki M, Amano S, Talentino 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.

23) **Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M**, et al : Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 98 : 1667—1675, 1996.
