

第 107 回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

硝子体の病態生理

網膜硝子体疾患の分子レベルにおける病態解明

池田 恒彦

大阪医科大学眼科学教室

共同研究者

奥 英弘, 杉山 哲也, 今村 裕, 勝村 浩三, 勝村ちひろ, 丸一みどり

石田 理, 小林 正人, 小山 玲子, 辻本 真実, 佐藤 文平, 植木 麻理

南 政宏(大阪医科大学眼科学教室), 中村 公俊(松本市中村眼科)

高井 真司, 宮崎 瑞夫(大阪医科大学薬理学教室)

中西 豊文, 清水 章(大阪医科大学病態検査学教室)

佐野 浩一(大阪医科大学微生物学教室)

尾林 博, 中村 直登, 長谷川 剛(京都府立医科大学第一内科学教室)

西村 真人(京都府立医科大学臨床検査医学教室)

渡辺 彰英, 外園 千恵, 西田 幸二, 木下 茂(京都府立医科大学眼科学教室)

足立 哲夫(岐阜薬科大学臨床薬剤学教室), 川越 清隆(日立化成工業)

松野 聖, 姚 玉林, 大坪 祥人, 桑野 光明(参天製薬奈良研究所)

Donald G. Puro(W. K. Kellogg Eye Center, University of Michigan)

要 約

網膜硝子体疾患の治療成績を向上させるためには、疾患の分子レベルでの成因をより詳細に解明し、有効な薬物療法を開発する必要がある。今回、特発性黄斑円孔、加齢黄斑変性、糖尿病網膜症の3疾患の病態を分子生物学的手法を用いて研究した。

特発性黄斑円孔の硝子体中にはセリンプロテアーゼであるキマーゼおよびトリプターゼの活性が他の網膜硝子体疾患と比較して有意に亢進していた。また、サル眼を用いた免疫染色の結果、中心窩ミュラ細胞が幹細胞様の未分化な性格を有している可能性が推定された。キマーゼの硝子体中投与により中心窩の網膜細胞にアポトーシスが誘導され、また黄斑上の硝子体に線維化が生じた。培養ミュラ細胞を用いた実験では、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)により未分化な状態にすると、キマーゼによって増殖の抑制およびアポトーシスの誘導が生じ

た。以上の結果から、肥満細胞の機能異常によるキマーゼおよびトリプターゼの産生亢進が、中心窩ミュラ細胞のアポトーシスおよび黄斑上の硝子体の線維化を促進し、特発性黄斑円孔が発症する可能性が推定された。

加齢黄斑変性は、種々の酸化ストレスや動脈硬化が発症に関与していることが指摘されている。今回、加齢黄斑変性患者で低比重リポ蛋白(LDL)の代謝に関与する paraoxonase (PON) 遺伝子を解析し、2か所の遺伝子多型があることを発見した。また、同患者の血清では酸化 LDL、PON 活性および細胞外 superoxide dismutase (EC-SOD) の血中濃度が、有意に上昇していることを見出した。さらに、加齢黄斑変性患者では血清中の肺炎クラミジア抗体価が IgA、IgG とともに高値であった。加齢黄斑変性では、PON 遺伝子多型による遺伝的素因、酸化 LDL の増加および EC-SOD の機能不全に

別刷請求先：569-8686 高槻市大学町 2-7 大阪医科大学眼科学教室 池田 恒彦
(平成 15 年 9 月 2 日受付, 平成 15 年 10 月 8 日改訂受理)

Reprint requests to: Tsunehiko Ikeda, M. D. Department of Ophthalmology, Osaka Medical College, 2-7 Daigakucho Takatsuki 569-8686, Japan

(Received September 2, 2003 and accepted in revised form October 8, 2003)

よる血管障害、肺炎クラミジアによる慢性炎症などが病態に関与している可能性が推定された。

糖尿病性合併症の発症には後期糖化最終産物(advanced glycation end products, AGEs)が関与することが知られている。今回、増殖糖尿病網膜症の硝子体中で3種類のAGEs(pentosidine, carboxymethyllysine, crossline)および2種類のサイトカイン [vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukine-6 (IL-6)] を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で定量したが、いずれも他疾患と比較して有意に高値を呈し、VEGF, IL-6 と AGEs の間には正の相関があった。培養ミューラ細胞は IL-6 および VEGF の mRNA を発現しており、AGEs の作用によりその発現が増強した。また、*in vitro* の実験で AGEs の光増感作用によ

りヒアルロン酸の脱重合が促進された。AGEs はミューラ細胞によるサイトカインの産生を介して眼内増殖および血管新生を惹起するとともに、光増感作用により硝子体液化を促進し、糖尿病網膜症の進展に関与している可能性が推定された。(日眼会誌 107: 785-812, 2003)

キーワード：特発性黄斑円孔，加齢黄斑変性，糖尿病網膜症，キマーゼ，トリプターゼ，アポトーシス，網膜幹細胞，酸化ストレス，動脈硬化，酸化低比重リポ蛋白，Paraoxonase 遺伝子，細胞外 SOD，肺炎クラミジア，後期糖化最終産物，血管内皮増殖因子，インターロイキン 6，光増感作用，硝子体液化

A Review

The Pathogenesis of Vitreoretinal Diseases from the Standpoint of Molecular Biology

Tsunehiko Ikeda

Department of Ophthalmology, Osaka Medical College

Abstract

It is important to study the pathogenesis in vitreoretinal diseases to develop new medical therapy. We investigated the molecular mechanisms underlying the genesis of idiopathic macular hole, exudative age-related macular degeneration (AMD), and diabetic retinopathy.

We observed high levels of chymase and tryptase activity in the vitreous humor of patients with idiopathic macular hole. This activity was significantly higher than in other vitreoretinal diseases. Immunohistochemical study using monkey eyes showed the possibility that Müller cells in foveal lesions have properties similar to retinal stem cells. Intravitreal injection of chymase induced apoptosis of foveal retinal cells and fibrous change of vitreoretinal interface in the macular area. Biochemical study using cultured human Müller cells revealed that chymase caused the inhibition of growth and the induction of apoptosis in dedifferentiated Müller cells treated with basic fibroblast growth factor (bFGF). These findings show that increased production of chymase and tryptase in mast cells could be related to the pathogenesis of idiopathic macular hole.

Oxidative stress and arterosclerosis may be the major causes of exudative AMD. Paraoxonase (PON) is a polymorphic protein known to prevent oxidation of low-density lipoprotein (LDL). We

analyzed PON genotypes and found that two types of polymorphism were significantly different between patients with AMD and control subjects. We also investigated serum oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) levels, PON activity, and extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) levels. All these factors were significantly higher in patients with AMD than in controls. Titers of IgA and IgG antibodies against chlamydia pneumoniae in the serum of AMD patients were also significantly higher than in controls. These results indicate that genetic factors related to PON polymorphisms, vascular damage caused by increment of serum oxLDL and malfunction of EC-SOD, and chronic inflammation provoked by chlamydia pneumoniae infection may be involved in the pathogenesis of AMD.

Excess accumulation of advanced glycation end products (AGEs) has a causative role in the development of diabetic complications. We determined the concentrations of three AGEs (pentosidine, carboxymethyllysine, and crossline) and two cytokines (VEGF, IL-6) using ELISA. The levels of the three AGEs and two cytokines in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) were significantly higher than in controls. The concentrations of VEGF and IL-6 were strongly correlated with the level of these AGEs. Cultured human

Müller cells expressed both VEGF and IL-6 mRNA and these expressions were augmented after the treatment of AGEs, while also acting as photosensitizers and accelerating the degradation of hyaluronic acid *in vitro*. AGEs may consequently play an important role in the pathogenesis of diabetic retinopathy by inducing the production of VEGF and IL-6 in retinal Müller cells and the acceleration of vitreous liquefaction.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi(J Jpn Ophthalmol Soc 107 : 785–812, 2003)

Key words : Idiopathic macular hole, Age-related macular degeneration, Diabetic retinopathy, Chymase, Tryptase, Müller cells, Apoptosis, Retinal stem cell, Oxidative stress, Arteriosclerosis, Oxidized low-density lipoprotein, Paraoxonase gene, Extracellular superoxide dismutase, Clamydia pneumoniae, Advanced glycation end products, Vascular endothelial growth factor, Interleukin-6, Photosensitizer, Vitreous liquefaction

I 緒 言

網膜硝子体手術の普及と分子生物学の臨床応用により、種々の網膜硝子体疾患の病態が詳細に解明されてきている¹⁾。しかし、現時点でもこれらの疾患の病態に関しては依然として不明な点が数多く残されている。本宿題報告では、特発性黄斑円孔、加齢黄斑変性、糖尿病網膜症の3疾患を取り上げた。そして、各疾患の分子レベルでの病態を解明することにより、将来的に新たな薬物治療開発の手掛かりを得ることを目的とした。

特発性黄斑円孔は、後部硝子体皮質前ポケット後壁の硝子体ゲルの中心窩に対する牽引により生じるとされている²⁾が、後部硝子体皮質前ポケットは一つに加齢変化であるにもかかわらず何故この疾患に限って黄斑円孔が形成されるのか、また硝子体牽引という機械的な機序のみでこのような綺麗な円形の裂孔が何故形成されるのか、また何故黄斑円孔は同心円状に拡大していくのかなど疑問な点も多い。特発性黄斑円孔の病態を解明するためには、硝子体の関与だけでなく、網膜の細胞レベルでの原因を検討する必要がある。

加齢黄斑変性に対しては、光凝固³⁾、光線力学療法⁴⁾、経瞳孔的温熱療法⁵⁾、放射線療法⁶⁾、硝子体手術⁷⁾⁸⁾など種々の治療法が考案されているが、このどれもが脈絡膜新生血管を破壊するという対症療法であり、原因治療ではない。しかも、そのいずれの治療成績も現時点では決して満足できるものではない。加齢黄斑変性の治療には、その予防法も視野に入れた根治的な薬物治療の確立が急務である。

糖尿病網膜症に関しては、光凝固と硝子体手術の普及により治療成績が確実に向上しているが、なお十分な視力保持ができない症例も多いのが実状である。糖尿病性合併症の発症機序としては、グリケーション説⁹⁾、PKC β 説¹⁰⁾、ポリオール説¹¹⁾などが提唱されている。糖と蛋白の非酵素的付加反応(メイラード反応)によって形成される後期糖化最終産物(advanced glycation end products, AGEs)は、種々のサイトカイン産生やフリーラジカル発生を亢進させ、糖尿病網膜症の発症に深く関与す

ることが近年解明されてきている¹²⁾¹³⁾。今回、著者らはAGEsと種々のサイトカイン、およびAGEsと硝子体液化の関連について研究した。

II 特発性黄斑円孔の病態

1. 特発性黄斑円孔と硝子体

1) 特発性黄斑円孔における硝子体異常

特発性黄斑円孔の成因としては、Kishiら²⁾の提唱した後部硝子体皮質前ポケットの後壁を形成する硝子体ゲルによって惹起される網膜硝子体牽引が主因と考えられている。また、臨床的に特発性黄斑円孔症例では、年齢に比して後部硝子体未剝離例が多いこと、高頻度に網膜格子状変性巣がみられること¹⁴⁾、眼底周辺部に異常な網膜硝子体癒着が存在し、人工的後部硝子体剝離作製時に医原性裂孔を生じやすいこと¹⁵⁾¹⁶⁾などから、何らかの硝子体異常がその病態に関与している可能性が考えられる。

2) 網膜硝子体疾患とレニン-アンギオテンシン系生理活性物質

アンギオテンシンII(angiotensin II, Ang II)はレニン-アンギオテンシン系の最終の生理活性物質であるが、全身および局所の血流制御以外にも、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)を介した血管新生作用や、心血管組織においてはコラーゲンを含む細胞外マトリックスの代謝に関与することが報告¹⁷⁾¹⁸⁾されている。Ang IIの合成系には、アンギオテンシン変換酵素(angiotensin converting enzyme, ACE)以外に、肥満細胞由来のセリンプロテアーゼであるキマーゼによる合成系の存在が明らかにされている¹⁹⁾。著者らは以前に増殖糖尿病網膜症の硝子体中にAng II濃度とACE活性が他疾患に比較して有意に高値を呈することを報告²⁰⁾したが、今回ACEと同様にキマーゼも増殖糖尿病網膜症で高値を呈するのではないかという予測のもとに、種々の網膜硝子体疾患の硝子体中のキマーゼ活性を測定した。その結果、予想に反して特発性黄斑円孔でキマーゼ活性が他疾患と比較して有意に高いという興味ある結果を得た。この結果が、特発性黄斑円孔の病態を

生化学的に解明する研究の発端となった²¹⁾。

3) 網膜硝子体疾患と硝子体中キマーゼ活性

今回、キマーゼ活性を測定したのは硝子体手術時に硝子体液を採取した 54 例 54 眼である。疾患の内訳は特発性黄斑円孔 14 例 14 眼(男性 6 例, 女性 8 例, 平均年齢 66.1 ± 5.3 歳), 増殖糖尿病網膜症 14 例 14 眼(男性 9 例, 女性 5 例, 平均年齢 59.0 ± 13.7 歳), 特発性黄斑上膜 13 例 13 眼(男性 4 例, 女性 9 例, 平均年齢 63.8 ± 8.9 歳), 裂孔原性網膜剝離 13 例 13 眼(男性 10 例, 女性 3 例, 平均年齢 53.8 ± 7.5 歳)であった(年齢は平均±標準偏差で表示)。

方法は、患者に十分なインフォームド・コンセントを得た上で、通常の 3 ポートシステムの硝子体手術時、灌流を開始する前に硝子体カッターで希釈しない硝子体液を 0.5~1.0 ml 採取し直ちに凍結保存した。キマーゼ活性の測定法は、既報のごとく行った²²⁾。原理としては、キマーゼが Ang I を Ang II に変換する際、Ang I から切断された His-Leu をフタルアルデヒドと反応させ、蛍光分光光度計(340 nm excitation, 455 nm emission, F-2000, 日立)で測定し、既知量の His-Leu を用いて作製した検量線により定量した。ACE 活性測定も既報に準じ、基質として Hippuril-His-Leu を用い、ACE により切断された馬尿酸(hippuric acid)を高速液体クロマトグラフィで分離し 228 nm の紫外線波長で検出して既知量の hippuric acid を用いて定量した²³⁾。

その結果、特発性黄斑円孔、増殖糖尿病網膜症、特発性黄斑上膜、裂孔原性網膜剝離における硝子体中のキマーゼ活性はそれぞれ、 1.87 ± 0.53 , 0.06 ± 0.04 , 0.40 ± 0.12 , 0.08 ± 0.03 (平均±標準偏差)mU/mg protein で、特発性黄斑円孔は他疾患に比べて有意に高値を呈した($p < 0.05$, Turkey 検定)(図 1)。一方、特発性黄斑円孔、増殖糖尿病網膜症、特発性黄斑上膜、裂孔原性網膜剝離における硝子体中の ACE 活性は、それぞれ 0.18 ± 0.09 , 0.30 ± 0.07 , 0.01 ± 0.01 , 0.03 ± 0.02 mU/mg protein で、増殖糖尿病網膜症は特発性黄斑上膜、裂孔原性網膜剝離に比較して有意に高値であった($p < 0.05$, Scheffe 検定)。

4) 特発性黄斑円孔とキマーゼ

今回の結果から、レニン-アンギオテンシン系の生理活性物質のうち、キマーゼの活性が特発性黄斑円孔の硝子体中で有意に上昇しているのがわかった。ヒト硝子体中のキマーゼ活性の正常値は不明であるが、イヌやサル硝子体中のキマーゼ活性が検出限度以下であることを考えると²⁴⁾、黄斑円孔でみられたキマーゼ活性の上昇は何らかの病的意義をもつものと推測される。

特発性黄斑円孔でみられる後部硝子体剝離の遅延²⁾、網膜面に残存する硝子体皮質の接線方向あるいは前後方向への収縮²⁵⁾²⁶⁾などは、硝子体のコラーゲン異常に起因する可能性が推定される。実際に特発性黄斑円孔の硝子

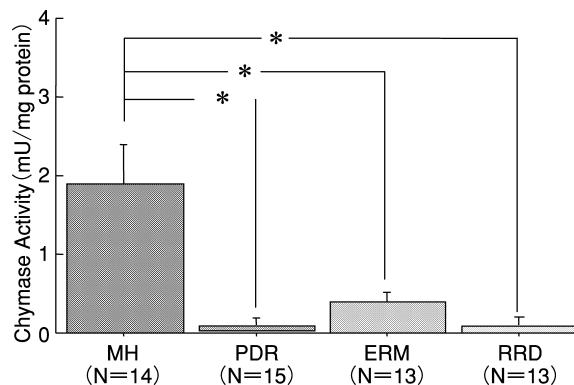


図 1 硝子体中のキマーゼ活性。

特発性黄斑円孔のキマーゼ活性は、増殖糖尿病網膜症、特発性黄斑上膜、裂孔原性網膜剝離に比較して有意に高値であった(*: $p < 0.05$, Turkey 検定)。

MH: 黄斑円孔, PDR: 増殖糖尿病網膜症, ERM: 黄斑上膜, RRD: 裂孔原性網膜剝離

体中には VI 型コラーゲンなどの異常な集合体の存在が報告²⁷⁾されている。

キマーゼは Ang I を Ang II に変換する作用以外にも、結合型 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) を遊離型 TGF- β 1 に変換して、プロコラーゲンを切断してコラーゲンを産生する作用や、細胞外マトリックスの分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP) の活性化およびそのインヒビターである tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) の不活性化を介して、コラーゲン分解を促進する作用を有することも報告^{28)~30)}されている。また、キマーゼは VI 型コラーゲンの分解にも関与している³¹⁾。このようにキマーゼは、コラーゲンの産生・分解の 2 つの作用を併せ持つことで、特発性黄斑円孔の病態に関与している可能性が推定される。

5) 肥満細胞とキマーゼ

キマーゼは肥満細胞から産生される²⁰⁾が、近年、肥満細胞が組織の線維化や血管新生に関与することが注目されている³²⁾³³⁾。肥満細胞は眼球では脈絡膜、毛様体、結膜、強膜などに存在することが報告³⁴⁾されている。硝子体中のキマーゼが眼内のどの組織から産生されるのか現時点では不明であるが、脈絡膜や毛様体などのぶどう膜組織がその候補として考えられる。

6) 特発性黄斑円孔とトリプターゼ

肥満細胞にはトリプターゼ陽性と、トリプターゼ・キマーゼ陽性の 2 種類の細胞が存在する³⁵⁾。脈絡膜における肥満細胞の局在としては、眼底後極部にトリプターゼ・キマーゼ陽性の肥満細胞が多いことが知られている³⁴⁾。トリプターゼもキマーゼ同様にセリンプロテアーゼの一つで、組織の線維化に関与することが知られている³⁶⁾。著者らはキマーゼと同様に、特発性黄斑円孔、増殖糖尿病網膜症、特発性黄斑上膜、裂孔原性網膜剝離の硝子体中のトリプターゼ活性を測定した。その結果、そ

れぞれ 0.0146 ± 0.0053 , 0.0018 ± 0.0018 , 0.0166 ± 0.0046 , 0.0117 ± 0.0029 mU/mg protein (平均±標準偏差)で、特発性黄斑円孔と特発性黄斑上膜が有意に高値を呈した ($p < 0.05$, Fisher PSLD 検定) (図 2)。特発性黄斑円孔と特発性黄斑上膜はいずれも後部硝子体皮質ポケットの後壁の硝子体ゲルが発症に関与するとされている³⁷⁾。また、特発性黄斑円孔の中には黄斑上膜を合併している症例もあり、両者は同じ硝子体黄斑界面症候群として共通した発症機序を有する可能性が考えられる。

7) セリンプロテアーゼ・インヒビターの関与

今後の課題として、キマーゼやトリプターゼの蛋白量と活性の関係を検討する必要がある。キマーゼやトリプターゼなどのセリンプロテアーゼのインヒビターとしては、 $\alpha 1$ アンチトリプシン、 $\alpha 1$ アンチキモトリプシ

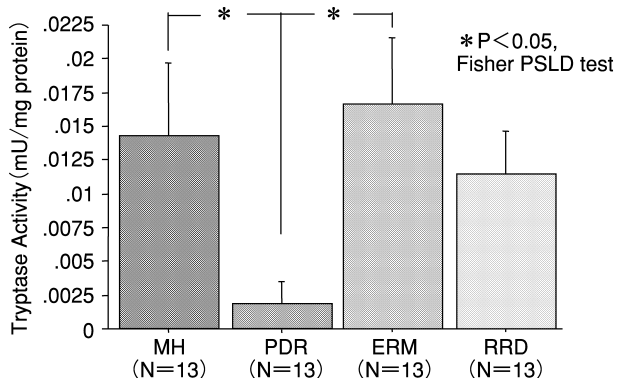


図 2 硝子体中のトリプターゼ活性。

特発性黄斑円孔、特発性黄斑上膜では増殖糖尿病網膜症に比較して有意に高値であった。
($p < 0.05$, Fisher PSLD 検定)

ン、 $\alpha 2$ マクログロブリンなどが知られており³⁸⁾³⁹⁾、これらの生理活性物質の低下により特発性黄斑円孔ではキマーゼ活性が相対的に上昇している可能性が考えられる。逆に糖尿病網膜症では血液眼関門が破綻しているために、血中のこれらの物質が硝子体中に拡散してきたため、キマーゼ活性が相対的に低下しているのかもしれない。日常臨床では糖尿病患者に黄斑円孔症例が少ないような印象がある。

著者らはプロテオミクスを用いて、特発性黄斑円孔と増殖糖尿病網膜症の硝子体の蛋白分析を行っている⁴⁰⁾⁴¹⁾。現時点では明確なことは言いえないが、幾つかのスポットが特発性黄斑円孔にはなく増殖糖尿病網膜症にみられた。その中の一つが $\alpha 1$ アンチキモトリプシンであった。また、 $\alpha 1$ アンチトリプシンは黄斑円孔に比較して糖尿病網膜症において大きなスポットがみられた (図 3 A, B)。このことは、セリンプロテアーゼインヒビターの有無がキマーゼおよびトリプターゼ活性に影響している可能性を推定している。この点については、今後さらに検討する予定である。

2. 特発性黄斑円孔と中心窩ミュラ細胞

1) 中心窩ミュラ細胞の特殊性

特発性黄斑円孔の成因には中心窩における硝子体牽引が関与している可能性は高いが、緒言でも述べたように、硝子体牽引という機械的な作用だけで、このような綺麗な円形の裂孔が形成されるとは考えにくい。特発性黄斑円孔の成因には網膜の細胞レベルでの検討が必要と考えられる。

Gass は中心窩のミュラ細胞を形態的な特徴から Müller cell cone と命名し、この部位のミュラ細胞が特異な

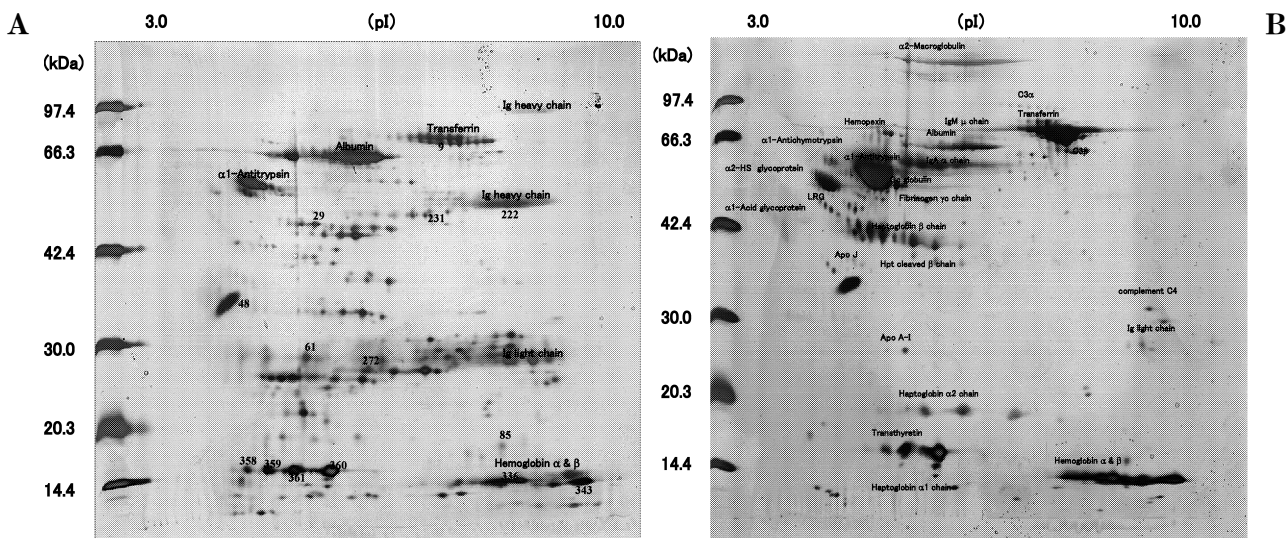


図 3 硝子体のプロテオーム解析。

A: 特発性黄斑円孔, B: 増殖糖尿病網膜症

セリンプロテアーゼインヒビターである $\alpha 1$ アンチキモトリプシンのスポットは黄斑円孔ではみられなかったが、増殖糖尿病網膜症では確認された。また、 $\alpha 1$ アンチトリプシンは黄斑円孔に比較して増殖糖尿病網膜症において大きなスポットがみられた。

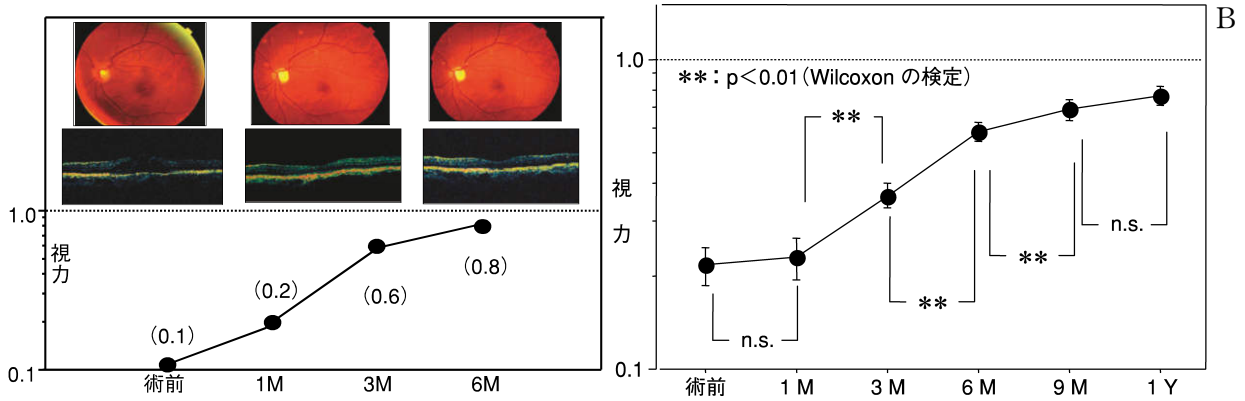


図 4 特発性黄斑円孔の硝子体手術後の経過。

A：特発性黄斑円孔に対する硝子体手術後の眼底所見と視力の推移

検眼鏡的および光干渉断層計(OCT)所見で早期に中心窩の形態が改善しているにもかかわらず、視力が遅れて改善してくることが多い。

B：硝子体手術後の視力の長期経過

黄斑部の形状が修復された後も、視力の緩徐な改善が続く。これは中心窩の網膜幹細胞が時間をかけて感覚網膜を構成する各種細胞に分化して後に視機能を獲得しているような印象を受ける。

機能を有していると予測するとともに、特発性黄斑円孔の発症機序に関係しているのではないかと考察している⁴²⁾。

2) 網膜幹細胞と中心窩ミュラ細胞

近年、中枢神経系にも幹細胞が存在することが報告^{43)~46)}され再生医療の面からも注目されている。網膜と毛様体の境界部、いわゆる ciliary marginal zone には神経細胞、グリア細胞、視細胞への分化能を有する網膜幹細胞が存在することが報告⁴⁷⁾⁴⁸⁾されている。幹細胞はこのような組織の境界部以外に、小腸の陰窩(crypt)などの陥凹した部位にも存在し⁴⁹⁾⁵⁰⁾、また角膜上皮の幹細胞が存在する輪部へは血管の侵入がみられない⁵¹⁾ことから、著者らは中心窩にも網膜幹細胞が存在するのではないかとこの仮説を立てた⁵²⁾。

中心窩に幹細胞が存在することを推測させる臨床的事象として、特発性黄斑上膜の硝子体手術時にトリムシノロンを使用して完全に黄斑上膜を剝離除去したにもかかわらず、術後に黄斑上膜の再発した症例を経験しており、これは中心窩の未分化な細胞がグリア系の細胞に分化増殖した可能性が考えられる。

また、特発性黄斑円孔に対する硝子体手術後の経過として、検眼鏡的および光干渉断層計(OCT)所見で早期に中心窩の形態が改善しているにもかかわらず、視力が遅れて改善してくることをしばしば経験する(図 4 A, B)。これは、まるで中心窩の未分化な網膜幹細胞が時間をかけて感覚網膜を構成する各種細胞に分化した後に視機能を獲得しているような印象を受ける。

3) キマーゼのアポトーシス作用

キマーゼは線維芽細胞の増殖を促進する一方、血管平滑筋細胞、気管支平滑筋細胞、心筋細胞などの他の細胞に脱分化(dedifferentiation)する能力を有する比較的

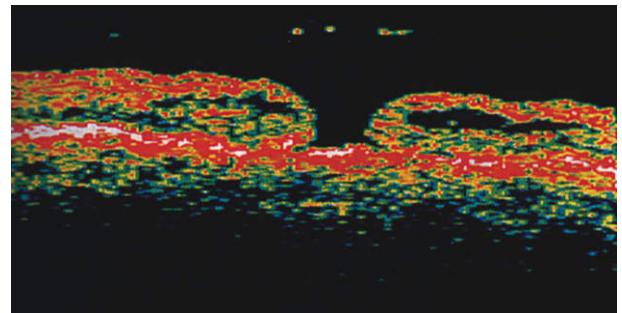


図 5 特発性黄斑円孔の OCT 所見。

断面には空虚な部位が存在し、アポトーシスによって細胞が死滅する際にみられる細胞容積の減少(apoptotic volume decrease)を思わせる像を呈している。感覚網膜の支持細胞であるミュラ細胞に何らかの機能異常が生じている可能性も考えられる(写真は群馬大学眼科岸章治教授のご好意による)。

化度の低い細胞にアポトーシスを誘導することが報告^{53)~57)}されている。また、一過性全脳虚血における遅発性細胞死やアルツハイマー病における神経細胞のアポトーシスは、神経幹細胞の存在する海馬に起きやすいとされており^{58)~60)}、小腸の陰窩におけるアポトーシスも幹細胞領域に起こることが報告⁴⁷⁾されている。

特発性黄斑円孔の OCT 所見では、中心窩の網膜は層状構造が消失しており、感覚網膜の支持細胞であるミュラ細胞に何らかの機能異常が生じている印象がある。OCT の断面には空虚な部位が存在し、アポトーシスによって細胞が死滅する際にみられる細胞容積の減少、すなわち apoptotic volume decrease を思わせる像を呈している(図 5)。

これらのことから、我々は中心窩ミュラ細胞が幹細胞様の性質を有し、キマーゼが分化度の低い中心窩ミュラ

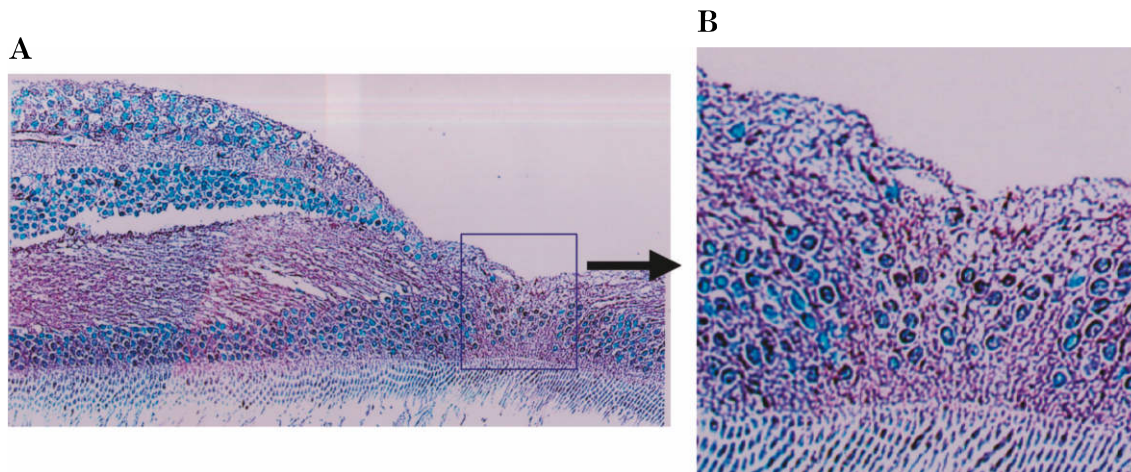


図 6 サル眼黄斑部におけるネスチン陽性細胞。

正常眼に対して行ったネスチンによる免疫染色の結果，中心窩周囲にネスチン陽性細胞が散見された(A：黄斑部，B：その強拡大)。

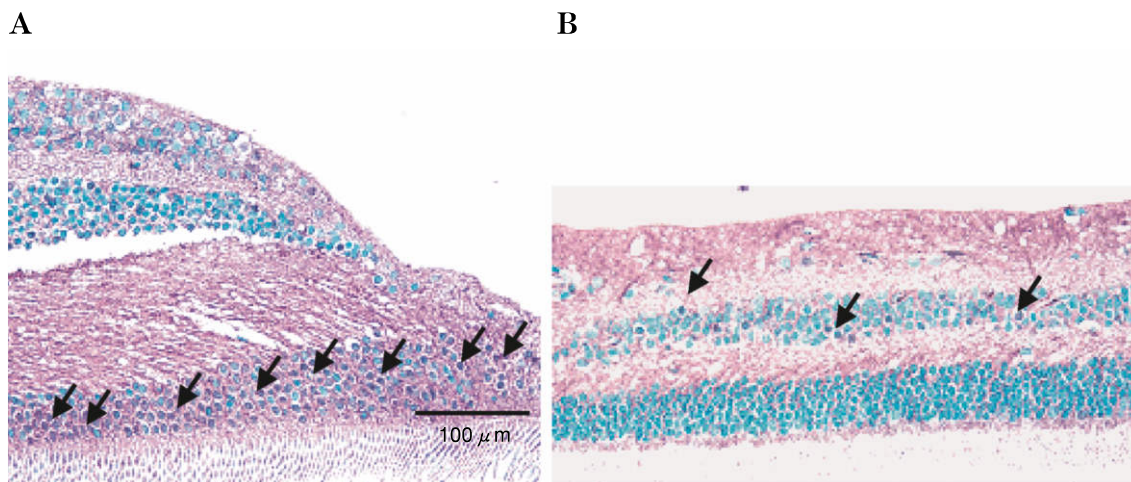


図 7 黄斑部と中間部のネスチン陽性細胞の比較。

黄斑部と比較して中間部にはネスチン陽性細胞が少なかった。

細胞のアポトーシスを惹起させることで，中心窩の支持構造が消失し，特発性黄斑円孔が生じるのではないかという仮説を立て以下の実験を行った。

4) サル眼における硝子体中キマーゼ注入の影響

a) 実験方法

正常ニホンザル 2 匹(A, B, 雄, 体重 11~14 kg)を用いた。サル A の 1 眼は対照として何も投与せず，他眼の硝子体腔内にキマーゼ(4 U/mg protein)を各 10 μ l, 2 週間ごとに 4 回投与した。サル B は両眼にキマーゼ(4 U/mg protein)を硝子体内に各 30 μ l を 1 回投与した。各処置はペントバルビタール 20 mg/kg 静脈内投与による全身麻酔下で行った。今回投与したキマーゼの濃度は前述した特発性黄斑円孔患者における硝子体内キマーゼ活性(平均値：1.87 mU/mg protein)に基づいて算出した。すなわち，10 μ l の溶液をサル硝子体(容量：

約 3.5 ml)に注入し，それが均一に拡散すると仮定すれば約 350 倍希釈される。30 μ l では同様に約 120 倍希釈される。そのため，サル A では 4 U/mg protein の約 350 分の 1，すなわち約 11 mU/mg protein となり，サル B では約 33 mU/mg protein となる。したがって，黄斑円孔患者の硝子体内キマーゼ活性に比べ，前者は約 6 倍，後者は約 18 倍の濃度に相当する。キマーゼは Takai らの方法⁶¹⁾により精製されたサルキマーゼ⁶²⁾を用いた。

サル A は最終処置の 2 週間後に，サル B は 1 週間後にペントバルビタールの過量投与により安楽死させ眼球を摘出した。摘出した眼球は 4% パラホルムアルデヒドで約 24 時間固定した後，脱水しパラフィン包埋した。その後，マイクロームによって厚さ 5 μ m の連続切片を作製した。

サル A の正常対照眼から得られた黄斑部近傍, 黄斑と赤道部の中間部, 赤道部, 周辺部の切片に神経幹細胞のマーカーであるネスチンによる免疫染色を施行した⁶³⁾. 方法は脱パラフィン後, 3% 過酸化水素水で 5 分処理, 20 倍希釈した一次抗体(抗ヒトネスチン・ウサギ IgG, ペプチド抗体, IBL)で 60 分間処理, ビオチン化二次抗体で 30 分処理を行い, さらに ABC 試薬(VECTASTIN Elite ABC kit)と DAB 反応により染色した後, 3% メチルグリーンで核染色した.

サル A(正常対照眼, 低用量キマーゼ投与眼), サル B(高用量キマーゼ投与眼)から得られた黄斑部近傍の切片に対してヘマトキシリン・エオジン(HE)染色と TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL)染

色を施した. TUNEL 染色には Takara *in situ* apoptosis detection kit を用い, そのプロトコールに従い, TdT Enzyme を 10 倍希釈して使用した. DAB 反応により染色した後, 3% メチルグリーンで核染色した.

b) 実験結果

正常対照眼に対して行ったネスチンによる免疫染色の結果, 中心窩周囲にネスチン陽性細胞が散見された(図 6 A, B). 黄斑部と比較して中間部にはネスチン陽性細胞が少なかった(図 7 A, B). ネスチン陽性細胞の密度を各部位ごとに比較すると, 黄斑部で明らかに高く, その他の部位の間には有意差はなかった(図 8).

HE 染色の結果, 正常対照眼および低用量キマーゼ投与眼では黄斑部に明らかな変化をみなかったのに対して, 高用量キマーゼ投与眼では黄斑上に後部硝子体膜の肥厚を疑わせる所見がみられた(図 9 A, B).

TUNEL 染色の結果, 正常対照眼では陽性細胞がみられなかったのに対して, 高用量キマーゼ投与眼では中心窩周囲に TUNEL 陽性細胞が散見された(図 10 A, B).

c) 結果の解釈

今回の実験結果から, 黄斑部網膜は他の部位に比較して多くのネスチン陽性細胞がみられた. ネスチンは神経幹細胞および網膜幹細胞のマーカーとして知られており, 今回の結果から黄斑部近傍に幹細胞様の性質を有する未分化な細胞が存在していることが推定された. また, これは特発性黄斑円孔の OCT 所見で網膜分離を生じている部位に一致していた. HE 染色によりキマーゼ投与眼では黄斑上の後部硝子体膜肥厚を疑わせる所見がみられたが, これがキマーゼによる線維化作用の結果かどうかは追試して検討する必要がある.

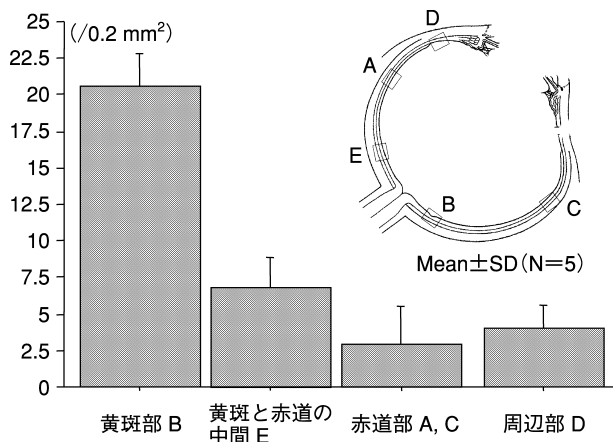


図 8 ネスチン陽性細胞の分布.

ネスチン陽性細胞の密度を各部位ごとに比較すると, 黄斑部で明らかに高く, その他の部位の間には有意差はみなかった.

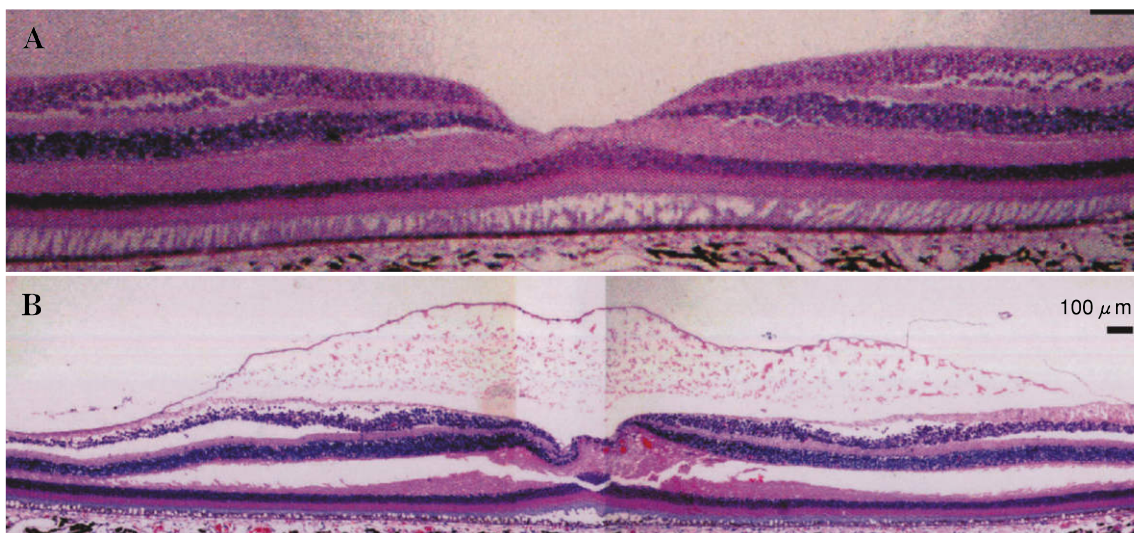


図 9 キマーゼ硝子体中注入による黄斑部の組織学的変化.

A: 対照眼, B: キマーゼ投与眼

ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色の結果, 正常対照眼では黄斑部に明らかな変化をみなかったのに対して, 高用量キマーゼ投与眼では黄斑上に後部硝子体膜の肥厚を疑わせる所見がみられた.

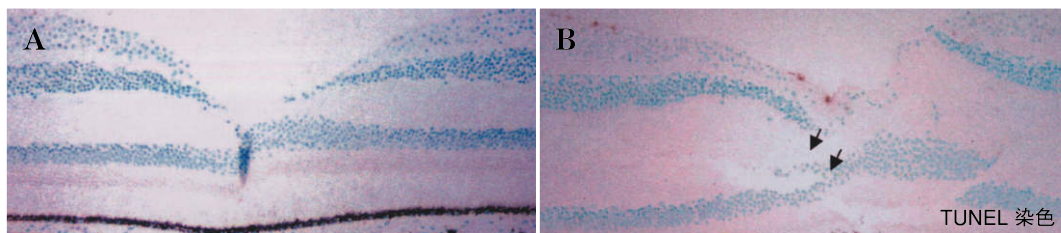


図 10 キマーゼ硝子体中注入によるアポトーシスの誘導.

A：対照眼，B：キマーゼ投与眼

TUNEL 染色の結果，正常対照眼では陽性細胞をみなかったのに対して，高用量キマーゼ投与眼では中心窩周囲に TUNEL 陽性細胞が散見された。

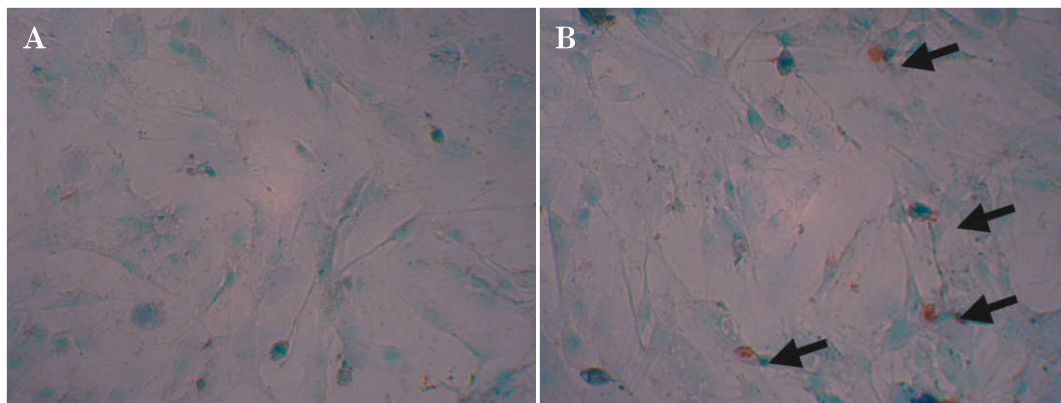


図 11 培養ミュラ細胞における幹細胞因子受容体(c-kit)の発現.

A：塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)非添加，B：bFGF 添加

培養ミュラ細胞は無処置の状態では c-kit を発現していなかったが，細胞を脱分化させる働きのある bFGF を 24 時間培養液中に添加した場合には，細胞質に c-kit の発現がみられた。bFGF の作用により培養ミュラ細胞は未分化な状態に変化したと考えられる。

TUNEL 染色の結果，キマーゼ投与眼で中心窩周囲に陽性細胞が多くみられたこと，キマーゼは血管平滑筋細胞などの比較的分化度の低い細胞に対してアポトーシス惹起作用を有すること^{53)~57)}，さらに上記のネスチン免疫染色の結果，黄斑部近傍に幹細胞様の性質を有する未分化な細胞が多くみられることから，キマーゼが分化度の低い中心窩ミュラ細胞のアポトーシスおよび黄斑上の後部硝子体膜の線維化を促進し，このことが特異性黄斑円孔発症の一因となっている可能性が推定された。

5) 培養ミュラ細胞に対するキマーゼの作用

次にミュラ細胞に対するキマーゼの作用を検討する目的で，培養ミュラ細胞を用いた以下の *in vitro* の実験を行った。

a) プタミュラ細胞の培養

ミュラ細胞の培養は Puro ら⁶⁴⁾の報告した方法に準じて行った。豚眼を赤道部で半切した後，網膜を摘出して 0.1% トリプシン 1 ml で 40 分間酵素処理した後，ウシ胎児血清 20% を含む培養液 4 ml を加えホモジネートした。その後，培養皿底面に単離した細胞を付着させ継代培養を行った。培地は D-MEM/F-12(GIBCO)を用いた。培養細胞は継代 5~6 代のものを使用した。

b) 培養ミュラ細胞における抗幹細胞受容体抗体(c-kit)の発現

培養ミュラ細胞を用いて，まず幹細胞因子(stem cell factor)の受容体である c-kit の発現をみた。細胞をチャンパー付きのスライドグラス上で 1 週間静置培養した後，c-kit の発現を免疫染色で確認した^{65)~67)}。具体的には細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で溶解した 4% パラホルムアルデヒドで室温で 18 時間固定し，0.3% 過酸化水素を 30 分室温で反応させ，内因性ペルオキシダーゼのプロッキングを行った後，抗 c-kit 抗体(SIGMA 社)を一次抗体として反応させた。その後，ABC kit(VECTOR 社)を用い DAB 反応により染色した後，3% メチルグリーンで核染色し判定した。対照としては一次抗体を用いないものと比較した。その結果，培養ミュラ細胞は通常 c-kit を発現していなかったが，細胞を脱分化させる働きのある塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF，大日本製薬社)10 ng/ml を 24 時間培養液中に添加した場合には，細胞質に c-kit の発現がみられた(図 11 A, B)。このことから，bFGF の作用により培養ミュラ細胞は未分化な状態に変化したと考えられた^{68)~70)}。

c) 培養ミュラ細胞におけるキマーゼのアポトーシス作用

次に、培養ミュラ細胞に対するキマーゼの影響を検討した。方法は96穴マイクロプレート上に 5×10^3 ずつ播かれた培養ミュラ細胞に対し、10 ng/mlのbFGF添加および非添加培養液で24時間静置培養した後、キマーゼを各濃度(0, 10, 50 ng/ml)添加し6日間培養した。その後、WST-8 kit(同仁化学研究所⁷¹⁾)を用いて細胞数を測定した。その結果、培養ミュラ細胞にbFGFを加えない状態ではキマーゼを作用させても細胞数に変化はみられなかったが、bFGFの添加により脱分化させた培養ミュラ細胞はキマーゼの添加により細胞数が有意に減

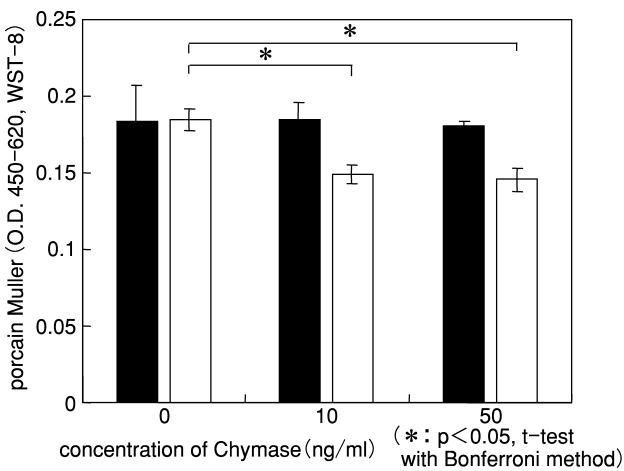


図12 キマーゼによる培養ミュラ細胞の増殖抑制作用。培養ミュラ細胞にbFGFを加えない状態ではキマーゼを作用させても細胞数に変化はみなかったが、bFGFの添加により未分化な状態になった培養ミュラ細胞はキマーゼの添加により細胞数が有意に減少した。

■ : bFGF(-), □ : bFGF(+)

少しした(図12)。これは、キマーゼが未分化な培養ミュラ細胞に対して増殖抑制作用を有しているためと考えられた。また、同条件下でチャンバー付きスライドグラス上で培養したミュラ細胞に対して *in situ* apoptosis detection kit(タカラ社)を用いて行ったTUNEL染色の結果でも、bFGFを作用させた培養ミュラ細胞のみに、キマーゼ添加によりTUNEL陽性細胞が出現した(図13A, B)。

d) 結果の解釈

以上の結果⁷²⁾から、キマーゼは未分化な培養ミュラ細胞に対して細胞増殖抑制作用およびアポトーシス誘導作用を有している可能性が推定された。このことは、中心窩に存在する幹細胞様の性質を有する未分化なミュラ細胞がキマーゼの影響によりアポトーシスを来し、その結果として特発性黄斑円孔が発症するという仮説の一つの裏付けになり得るものと考えられる。

6) 性ホルモンとの関連

特発性黄斑円孔症例ではなぜ硝子体中のキマーゼ活性が上昇するのかに関しては今後検討する必要がある。特発性黄斑円孔は更年期の女性に多いとされており、以前からエストロゲンなどの性ホルモンとの関連が指摘されている⁷³⁾。キマーゼ産生細胞である肥満細胞はエストロゲンによって増殖することが知られており⁷⁴⁾⁷⁵⁾、著者らも外挿値であるが、特発性黄斑円孔の硝子体中のエストラジオール(E2)値(RIA法)が対照と比較し高値であることを見出している。逆に特発性黄斑円孔症例の血清エストロゲン濃度は、エストロン(E1)、エストラジオール(E2)とも対照に比較して低値であった。更年期の性ホルモンの産生低下に引き続き、アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であるアロマトラーゼの活性が末梢組織において亢進することが知られている⁷⁶⁾。また、網

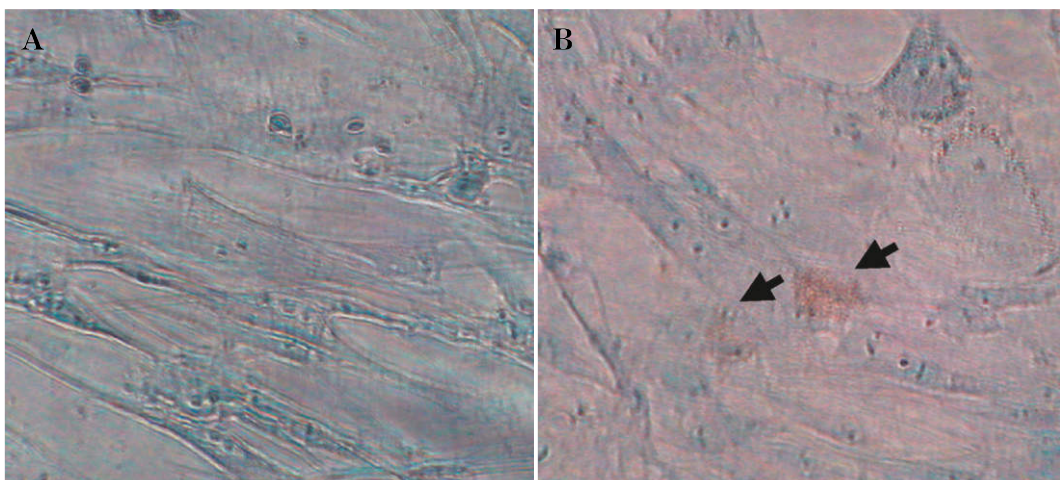


図13 培養ミュラ細胞におけるキマーゼのアポトーシス誘導作用。

A : bFGF非添加, B : bFGF添加

bFGFを作用させた培養ミュラ細胞のみに、キマーゼ添加によりTdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL)陽性細胞が出現した。

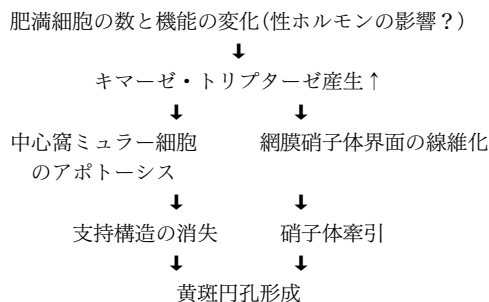


図 14 特発性黄斑円孔の病態.

膜などの眼組織においてもアロマトラーゼが発現することが報告⁷⁷⁾⁷⁸⁾されている。現時点の推論としては、活性が上昇したアロマトラーゼによって眼局所のエストロゲン濃度が上昇し、その結果、肥満細胞の増殖が促進されキマーゼ産生が増加する機序が考えられる。

3. 小 括

以上の結果から、特発性黄斑円孔の成因を図 14 のように推論した。まず、更年期における性ホルモンの影響により肥満細胞の細胞数や機能異常が生じて、その結果キマーゼやトリプターゼといったセリンプロテアーゼの硝子体中の活性が上昇する。キマーゼは幹細胞様の性格を持つ中心窩ミューラー細胞にアポトーシスを惹起し、その結果、中心窩の感覚網膜の支持構造が消失あるいは組織の再生能力が低下する。一方、キマーゼやトリプターゼは硝子体変性および網膜硝子体界面の線維化を促進し、中心窩の網膜硝子体牽引が増強する。これらの結果として、特発性黄斑円孔が発症する可能性が推定された。

もし、上記の仮説が正しいとしたら、現時点でいくつか開発されているキマーゼ阻害剤やトリプターゼ阻害剤、あるいはアロマトラーゼ阻害剤といったものが、将来的に特発性黄斑円孔の治療薬になり得る可能性があると思われる。

III 加齢黄斑変性の病態

1. 加齢黄斑変性の危険因子

加齢黄斑変性は、欧米では糖尿病網膜症を抜いて失明原因の第一となり、本邦でも近年患者数が急増している⁷⁹⁾。本疾患の病因については不明な点が多いのが実状であるが、危険因子には以前から種々のものが考えられている。すなわち、全身因子としては高血圧、動脈硬化、高脂血症、環境因子としては光や喫煙、また血縁者には約 4 倍の頻度で本疾患が発症するといった遺伝性や白人に多いといった人種差があることも知られている^{80)~83)}。しかし、実際にこれらの危険因子がどのような機序で加齢黄斑変性の病態に関与するのであろうか。以前から高脂血症や高コレステロール血症が加齢黄斑変性の危険因子といわれてはいるが、著者らの生化学的検査結果では、総コレステロールや中性脂肪は対照に比較

表 1 加齢黄斑変性患者の血清による生化学的検査結果。加齢黄斑変性患者の血清総コレステロール値や中性脂肪値は対照に比較してやや高い傾向はあったが有意差はみられなかった。

	AMD	対照
年齢(歳)	71.1±8.1	70.6±8.3
性別(男/女)	47/25	90/50
総コレステロール (mg/dl)	204.5±30.6	201.3±31.9
中性脂肪 (mg/dl)	117.8±60.0	113.2±52.1
HDL (mg/dl)	49.3±15.2	50.0±16.0
アポリポ蛋白 A 1 (mg/dl)	143.0±21.1	144.6±22.0
アポリポ蛋白 B (mg/dl)	100.4±24.9	99.8±20.5

AMD：加齢黄斑変性，平均値±標準偏差

してやや高い傾向はあったが、有意差はみられなかった(表 1)。

近年、加齢黄斑変性患者では抗酸化作用のあるカロチノイドやビタミンの摂取が進行を抑制するという報告⁸⁴⁾や、血清中のグルタチオン・リダクターゼやグルタチオン・ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素が加齢黄斑変性患者では低値であるといったような報告⁸⁵⁾がなされ、加齢黄斑変性と酸化ストレスの関連が注目されている。

2. 加齢黄斑変性と酸化ストレス

近年、動脈硬化の主因として、酸化ストレスを受けて変性した低比重リポ蛋白、すなわち酸化低比重リポ蛋白(LDL)が注目されている⁸⁶⁾。喫煙も酸化 LDL を増加させることが知られている。酸化 LDL はマクロファージによって貪食されるが、通常の LDL と違い、酸化 LDL を貪食したマクロファージは泡沫細胞に変化し、これが血小板由来増殖因子(PDGF)などのサイトカインを放出し、血管平滑筋細胞を増殖させ動脈硬化が進行することが知られている。また、酸化 LDL の産生には paraoxonase(PON) 遺伝子多型が関与していることが指摘されている⁸⁷⁾⁸⁸⁾。そこで著者らは、まず加齢黄斑変性と脂質代謝に関与する PON 遺伝子および酸化 LDL との関連について検討した。

1) PON 遺伝子多型と加齢黄斑変性

PON 遺伝子は酸化リン脂質を分解する酵素で、高比重リポ蛋白(HDL)と結合して存在し、LDL の酸化を抑制することが報告⁸⁹⁾⁹⁰⁾されている。本酵素は蛋白内に 2 か所の多型があり、その LL(L ホモ型)と BB(B ホモ型)では酵素活性が低く、LDL の酸化抑制作用が弱い⁹¹⁾。本酵素の遺伝子多型は糖尿病網膜症において報告⁹²⁾⁹³⁾されているが、加齢黄斑変性で検討した報告はない。加齢黄斑変性と遺伝子多型に関しては、過去にアポリポ蛋白 E 遺伝子での報告⁹⁴⁾⁹⁵⁾があるのみである。著者らは本酵素と加齢黄斑変性の関連を調べる目的で、加齢黄斑変性患者の PON 遺伝子多型の解析、血清中 PON 活性の測定、血清中酸化 LDL 濃度の測定を行った。

表 2 加齢黄斑変性患者における paraoxonase (PON) 遺伝子多型の解析結果。
加齢黄斑変性患者と対照で PON 内の 2 か所の遺伝子多型 (BB および LL) の分布に統計学的に有意差がみられた ($p=0.0127$, $p=0.009$).

	対照	AMD		対照	AMD
Genotype			Genotypes		
AA	17 (12.1)	6 (8.3)	LL	108 (77.1) **	66 (91.7) **
AB	74 (52.9)	28 (38.9)	LM	28 (20.0)	5 (6.9)
BB	49 (35.0) *	38 (52.8) *	MM	4 (2.9)	1 (1.4)
Alleles			Alleles		
A	108 (38.6)	40 (27.8)	L	244 (87.1)	137 (95.1)
B	172 (61.4)	104 (72.2)	M	36 (12.9)	7 (4.9)

(* : $p=0.0445$, ** : $p=0.0323$)

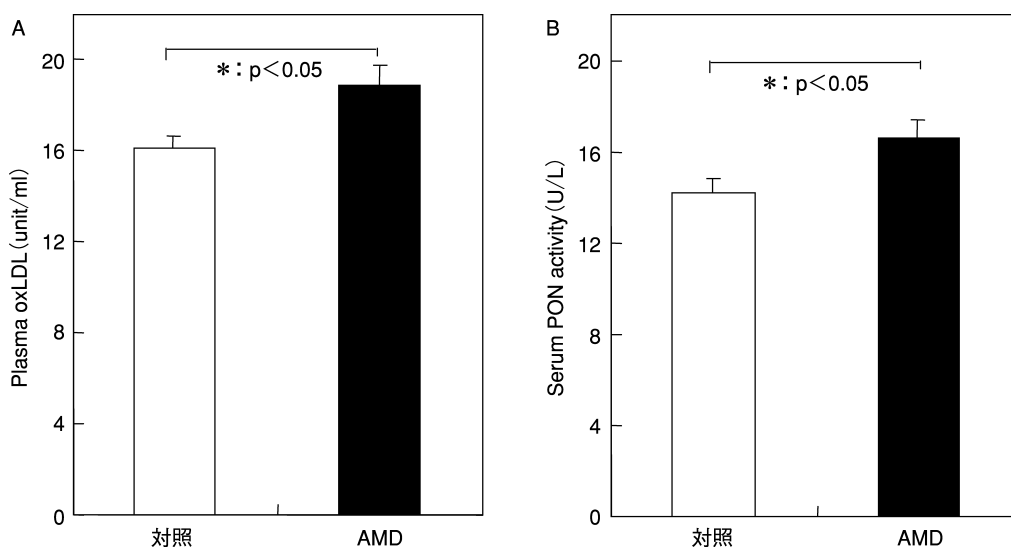


図 15 加齢黄斑変性患者の血清中酸化低比重リポ蛋白 (LDL) 濃度および paraoxonase (PON) 活性。酸化 LDL 濃度および PON 活性とも対照と比較して加齢黄斑変性患者では有意に高値であった (* : $p<0.05$, $p<0.01$).

方法は WB kit (Wako Pure Chem) を用いて、加齢黄斑変性患者の末梢血から DNA を抽出し、PON 遺伝子多型 (A/B, Gln-Arg 192 および L/M, Leu-Met 54) を Humbert ら⁹⁶⁾の報告に従い polymerase chain reaction (PCR) 法で解析した。

解析結果を表 2 に示す。AA, AB, BB および LL, LM, MM はそれぞれ PON 内の 2 か所の遺伝子多型、A, B, L, M はそれぞれ対応するアミノ酸を示し、A, B は 192 番目のグルタミンとアルギニン、L, M は 54 番目のロイシンとメチオニンを示す。加齢黄斑変性患者と対照で PON 内の 2 か所の多型、BB と LL の分布に統計学的に有意差があった ($p=0.0127$, $p=0.009$)。加齢黄斑変性患者では、酵素活性の低い L ホモ型と B ホモ型の頻度が高く、この結果は加齢黄斑変性の病因に PON 遺伝子多型が関与していることを示しており、本疾患の発症に遺伝的素因が関与していることを推定しているものと考えられる。

2) 酸化 LDL および PON 活性と加齢黄斑変性
次に加齢黄斑変性患者 72 例と、性別、年齢を一致さ

せた 140 例の健常者で血清中の酸化 LDL 濃度および PON 活性を ELISA 法で測定した。酸化 LDL 濃度の測定は抗酸化 LDL monoclonal 抗体⁹⁷⁾および抗 apo B 抗体を用いて ELISA 法により定量した。PON 活性は paraoxon を基質として用いる Eckerson ら⁹⁸⁾の方法に従い施行した。

その結果、血清中酸化 LDL 濃度および PON 活性とも対照と比較して加齢黄斑変性患者では有意に高値であった ($p<0.05$, $p<0.01$) (図 15 A, B)。しかも、酸化 LDL 濃度および PON 活性の間には正の相関がみられた ($r=0.710$, $p<0.011$) (図 16)。これは酸化ストレスの増加によって代償的に PON 活性が亢進している可能性が考えられる。以上の結果から、PON 遺伝子多型および血清中酸化 LDL は加齢黄斑変性の病因に関与している可能性がある⁹⁹⁾。

3) EC-SOD と加齢黄斑変性

a) EC-SOD とは

Superoxide dismutase (SOD) は活性酸素の一種であるスーパーオキシドを消去する酵素であるが、ヒト組織

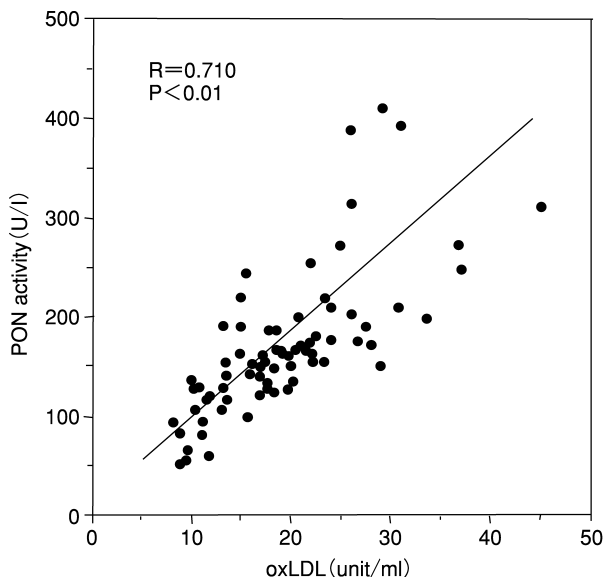


図 16 酸化 LDL と PON 活性の相関。

酸化 LDL 濃度および PON 活性の間には正の相関がみられた ($r=0.710$, $p<0.011$)。

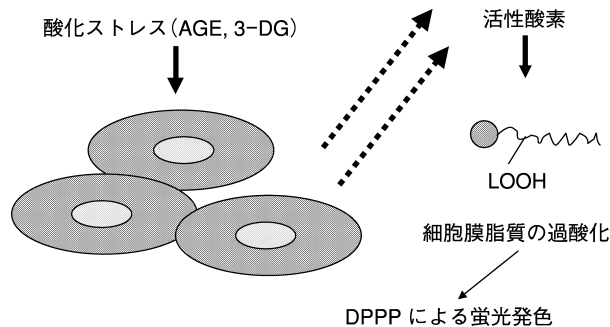


図 17 血管内皮細胞における酸化ストレスの影響。
ヒト皮膚血管内皮細胞を培養し、加齢に伴い体内に蓄積される後期糖化最終産物 (AGEs) や 3-deoxyglucose (3-DG) によって酸化ストレスを作用させ、活性酸素を発生させた。その結果生じた過酸化脂質を DPPH 試薬を用いて蛍光発色させ定量した。

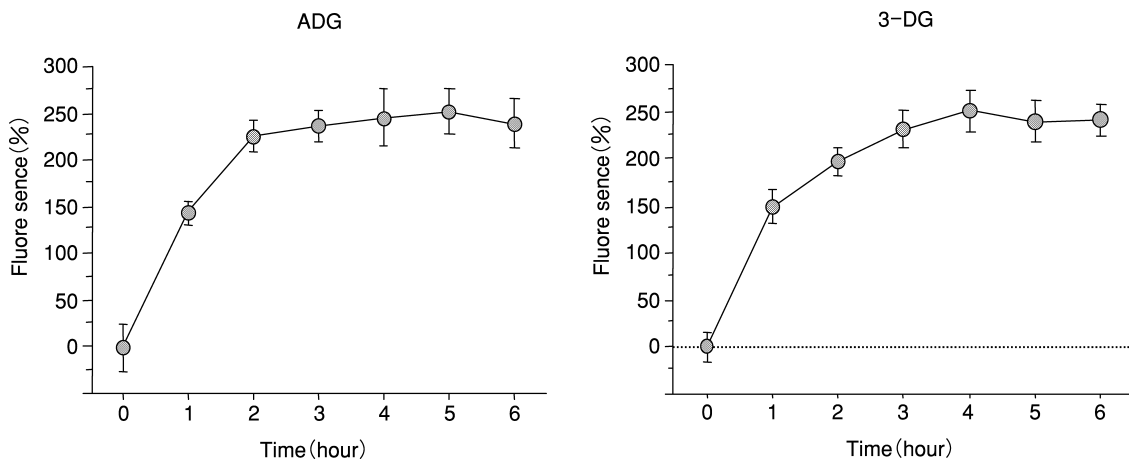


図 18 酸化ストレスによる細胞膜過酸化変性度。

AGE および 3-DG による酸化ストレスにより、時間依存性に培養液中の過酸化脂質量が増加した。

では細胞質内に存在する copper/zinc (Cu, Zn)-SOD, ミトコンドリアに存在する manganese (Mn)-SOD, それに細胞外に存在する extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) の 3 種類のアイソザイムがあることが知られている¹⁰⁰⁾。

EC-SOD はヘパリン親和性を持つ唯一の SOD アイソザイムであり、C 末端近傍の陽性荷電を有するリジン, アルギニン残基により血管内皮細胞のヘパラン硫酸と可逆的に結合している。生体内では分子量 135 kD で 4 量体を形成して血管壁に広く分布し、細胞外 (内皮細胞-好中球間微小環境) で発生する活性酸素を効率良く消去し、内皮細胞を酸化ストレスから防御している。通常は細胞膜と結合しており、血液中の活性酸素による細胞傷害を防御しているが、酸化ストレス状態では細胞膜結合親和性が低下し、EC-SOD の血中濃度が上昇することが知

られている¹⁰¹⁾。

b) 酸化ストレスと EC-SOD

まず、予備実験として、酸化ストレスがヒト血管内皮細胞に与える影響を検討した。ヒト皮膚血管内皮細胞を培養し、加齢に伴い体内に蓄積される後期糖化最終産物 (AGE) や 3-deoxyglucose (3-DG) によって酸化ストレスを作用させ、活性酸素を発生させた。その結果細胞膜脂質の過酸化が生じるが、それを DPPH 試薬を用いて蛍光発色させ、過酸化脂質の量を測定した。また、細胞膜脂質の酸化により低下した膜結合 EC-SOD 量を ELISA 法で測定した (図 17)。

AGEs, および 3-DG 添加によって生じた酸化ストレスにより惹起された細胞膜過酸化変性度の経時変化を図 18 に示す。時間依存性に過酸化脂質量が増加していることがわかる。

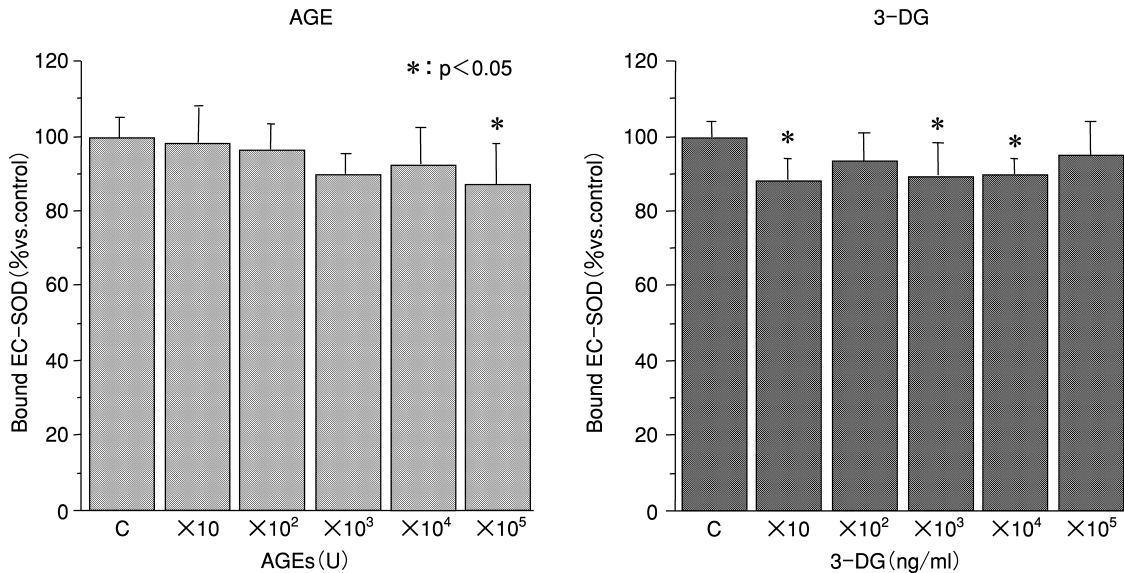


図 19 酸化ストレス負荷による細胞膜結合 extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) 濃度。AGEs および 3-DG 添加による酸化ストレス負荷によって、細胞膜結合性 EC-SOD 濃度が有意に低下した。つまり細胞膜非結合の遊離 EC-SOD 濃度が増加したことになる。

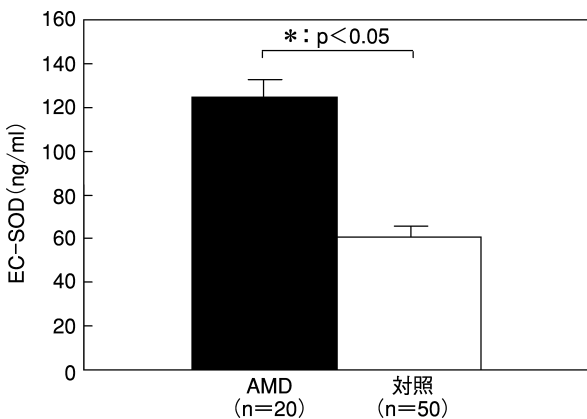


図 20 加齢黄斑変性患者の血清 EC-SOD 濃度。加齢黄斑変性群では対照群に比較して血清 EC-SOD 濃度が高値を呈した。

次に AGEs, 3-DG による酸化ストレスを負荷した後の、細胞膜結合 EC-SOD 濃度を測定した(図 19)。AGEs は 105 ng/ml で、また 3-DG では多少のばらつきはあるが、101, 103, 104 ng/ml で、対照と比較して細胞膜結合性 EC-SOD 濃度が有意に低下した。つまり、細胞膜非結合の遊離 EC-SOD 濃度が増加したことになる¹⁰²⁾。

c) 加齢黄斑変性と EC-SOD

以上の予備実験の結果を踏まえて、実際に加齢黄斑変性患者の血清中 EC-SOD 濃度を ELISA 法により測定した。対象は年齢を相関させた加齢黄斑変性患者 26 例 (70.8±7.4 歳) および対照 20 例 (68.1±5.8 歳) である。測定は EC-SOD 特異抗体を用いた ELISA 法で行った。また、両群で高血圧, 糖尿病, 高脂血症, 喫煙歴, body mass index (BMI) の間に有意差はなかったが、加齢黄斑変性群の男性の比率 (19 例 73%) は、対照群比率

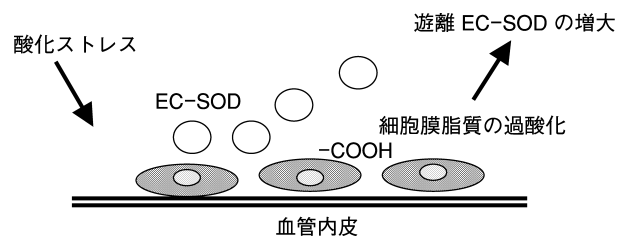


図 21 加齢黄斑変性患者で血清 EC-SOD 濃度が上昇する機序。

加齢, 喫煙などの種々の酸化ストレスによって血管内皮細胞の細胞膜脂質の過酸化が生じて、その結果として、細胞膜に結合していた EC-SOD が遊離し、血清 EC-SOD 濃度が上昇する。

(10 例 50%) と比較して有意に高値であった¹⁰³⁾。

結果は、加齢黄斑変性群では 124.8 ng/ml, 健常者では 60.8 ng/ml で、有意に加齢黄斑変性群で血清 EC-SOD 濃度が高値を呈した(図 20)。

4) 結果の解釈

加齢黄斑変性患者の血清中で EC-SOD 濃度が上昇する機序を図 21 のように推測してみた。加齢, 喫煙などの種々の酸化ストレスによって血管内皮細胞の細胞膜脂質の過酸化が生じて、その結果として細胞膜に結合していた EC-SOD が遊離し、血清 EC-SOD 濃度が上昇する。その結果、血管内皮細胞表面の酸化ストレスに対する抵抗性が低下し、血管内皮細胞障害が促進され、脈絡膜新生血管が誘発されるのではないかと推測した。

3. 肺炎クラミジアと加齢黄斑変性

次に、我々は動脈硬化の危険因子として、近年注目されている肺炎クラミジア (chlamydia pneumoniae) と加齢黄斑変性の関連に着目した。

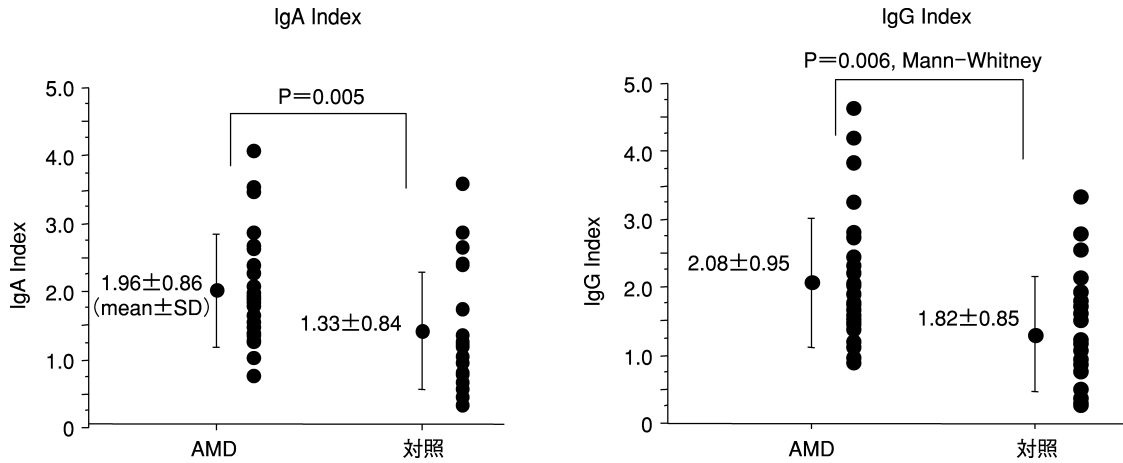


図 22 加齢黄斑変性患者血清中の肺炎クラミジア抗体値。
IgG index, IgA index とも加齢黄斑変性群が対照群よりも有意に高値であった。

1) 肺炎クラミジアと動脈硬化

近年、動脈硬化の発症に慢性的炎症性機序¹⁰⁴⁾、特に肺炎クラミジア感染の関与が注目されている。両者の関連については、Saikku ら¹⁰⁵⁾が虚血性心疾患の男性症例で、血清中肺炎クラミジア IgG, IgA 抗体価が上昇していることを報告して以来、動脈硬化性疾患と肺炎クラミジア感染の関連性につき臨床的、基礎的な研究が行われてきた。肺炎クラミジア感染と動脈硬化の関連性を強く推定する所見として、動脈硬化病巣から肺炎クラミジアが検出され¹⁰⁶⁾¹⁰⁷⁾、さらに実験的に肺炎クラミジア感染に引き続き、動脈硬化病変が生じることが確認されている¹⁰⁸⁾。

2) 加齢黄斑変性患者の肺炎クラミジア抗体価

そこで、動脈硬化との関連性が指摘されている加齢黄斑変性について、その発症に肺炎クラミジア感染が関与している可能性を検討するため、滲出型加齢黄斑変性患者 27 例(平均 71.1±6.4 歳, 男性 19 例, 女性 8 例), および年齢を一致させた対照群 22 例(平均 69.5±6.5 歳, 男性 12 例, 女性 10 例)の血清中肺炎クラミジア IgG および IgA 抗体価を ELISA 法を用いて測定し比較した。測定方法は Kishimoto らの方法¹⁰⁹⁾に準じて、血清を肺炎クラミジア YK 41 株から精製した肺炎クラミジアの外膜抗原と反応させた後、p-nitrophenyl phosphate を加え 405 nm の吸光度を測定した。日本人の成人 592 例の正常値は IgG index が 1.27±0.87, IgA index が 1.20±0.78 とされている。

その結果、IgA index は加齢黄斑変性群が 1.96±0.80, 対照群が 1.39±0.84 (p=0.005, Mann-Whitney U 検定), IgG index は、加齢黄斑変性群が 2.08±0.95, 対照群が 1.32±0.85 (p=0.006, Mann-Whitney U 検定) で、両抗体価とも加齢黄斑変性群で有意に高値であった(図 21)¹¹⁰⁾。

3) 結果の解釈

加齢黄斑変性でみられた肺炎クラミジア抗体価の上昇

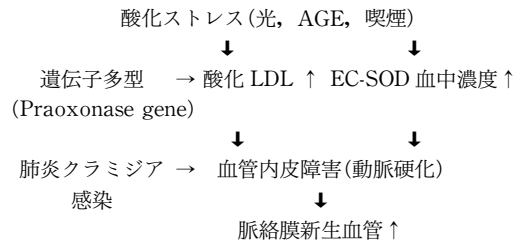


図 23 加齢黄斑変性の病態。

は、本疾患発症に肺炎クラミジア感染が関与している可能性を推定していると考えられる。この病原体は本来気管支炎、肺炎などの呼吸器疾患の原因菌であるが¹¹¹⁾、マクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞など様々な細胞の中で増殖することが知られている¹¹²⁾。また、感染した細胞内で増殖し、隣接する細胞に感染することによって慢性的な炎症を惹起することが知られている。肺炎クラミジアはマクロファージによって全身に移行し、種々の組織に感染を起こすが、肺炎クラミジアに感染した血管内皮細胞は intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) などの接着因子を発現し¹¹³⁾、さらに多くのマクロファージを捕捉して感染を助長させることが報告されている。後極部の脈絡膜は、その豊富な血流量から転移性腫瘍、トキソプラズマ症、ヒストプラズマ症などの病巣の好発部位となる。肺炎クラミジアがマクロファージによって血行性に伝播されることを考えると、後極部に同感染が生じる可能性も十分考えられる。後極部に生じた感染は脂質代謝や免疫機序を介して動脈硬化を促進させる一方、tumor necrosis factor- α (TNF- α) や IL-6 などの炎症性サイトカインや MMP を分泌し¹¹⁴⁾、血管構築を破壊してさらに脈絡膜出血を惹起する可能性も考えられる。今回の結果は、肺炎クラミジア感染が加齢黄斑変性の直接的な原因であることを意味するものではないが、加齢黄斑変性の前駆病変とされる drusen に

様々な炎症性蛋白の発現がみられる¹¹⁵⁾点からも、同感染が慢性的な炎症機序を介して加齢黄斑変性の発症に何らかの影響を及ぼすものと推測される。今後、加齢黄斑変性の硝子体手術で摘出した脈絡膜新生血管組織で肺炎クラミジアの直接的な検出を試みる予定である。

4. 小 括

今回得られた結果から加齢黄斑変性の病態を図 23 のようにまとめてみた。喫煙や AGEs, 3-DG といった酸化ストレスにより血中の酸化 LDL 濃度が上昇し、これに LDL の酸化を抑制する PON 遺伝子多型が関与している可能性がある。また、酸化 LDL によって惹起される脈絡膜血管の動脈硬化に肺炎クラミジア感染が増悪因子として加わり、血管内皮障害が進行する。一方で酸化ストレスによって血管内皮の細胞膜に結合した EC-SOD が減少し、抗酸化作用が低下して血管内皮細胞の傷害が進行する機序も考えられる。これらの一連の変化が脈絡膜新生血管を惹起し加齢黄斑変性が発症するのではないかと考えられる。

以上の結果から、加齢黄斑変性に対して、抗酸化薬、AGEs 阻害剤、肺炎クラミジア感染に対するマクロライド系やニューキノロン系の抗生物質などの薬物療法が有効である可能性が考えられる。

IV 糖尿病網膜症の病態

1. 糖尿病網膜症とサイトカイン

1) 増殖糖尿病網膜症の病態に関与するサイトカイン
糖尿病網膜症が進行すると毛細血管床閉塞による網膜虚血が生じ、新生血管の発育およびそれを基盤とする増殖膜が生じ、牽引性網膜剝離が進行して失明に至る。増殖糖尿病網膜症の硝子体中には網膜虚血によって産生が亢進する VEGF が増加し血管新生を誘発することが知られている¹¹⁶⁾¹¹⁷⁾。著者らも過去に TGF- β 2, hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), アンジオテンシン II などが増殖糖尿病網膜症の硝子体中に高濃度存在すること、またその産生源としてミュラ細胞の可能性があることを報告^{118)~126)}してきた。

2) 眼内増殖におけるミュラ細胞の関与

以前は神経系の単なる支持組織として認識されていたに過ぎなかったグリア細胞が、多彩な機能を有し、種々の疾患の病態に深く関与することが次々と解明されている。グリア細胞は種々の細胞増殖因子やサイトカインの産生源になっているだけでなく、種々の因子の受容体をも有し、神経系における独自のサイトカインネットワークを形成している。脳神経系においては、アストロサイトやミクログリアがサイトカイン分泌の中心的役割を担っていることが知られているが、感覚網膜における主要なグリア細胞であるミュラ細胞も同様の機能を有することが明らかとなってきた¹²⁷⁾。

2. 糖尿病網膜症と後期糖化最終産物(AGEs)

1) AGEs とサイトカイン

AGEs とは糖と蛋白の非酵素的付加反応によって生じる後期生成物のことで、pentosidine, carboxymethyllysine (CML), crossline など種々のものが報告¹²⁸⁾されている。一般に AGEs は代謝回転の遅い組織に蓄積し、種々のサイトカインを誘導することで糖尿病網膜症の病態に深く関与することが指摘されている。今回、著者らは血管新生作用を有する VEGF と AGEs, および炎症性サイトカインの一つである IL-6 と AGEs の関連について検討した。

2) VEGF と AGEs

a) 増殖糖尿病網膜症の硝子体中の VEGF と crossline 濃度

増殖糖尿病網膜症の硝子体中における AGEs の一つである crossline および VEGF の濃度を定量した。硝子体サンプルは前述の方法で増殖糖尿病網膜症 14 例 14 眼から採取した。性別は男性 7 例、女性 7 例、平均年齢 56.1 ± 10.2 歳、推定糖尿病罹病期間は 20.8 ± 14.3 年、平均 HbA1c 値は $8.4 \pm 1.6\%$ であった。対照には非糖尿病症例 14 例 14 眼の硝子体を使用した。性別は男性 8 例、女性 6 例、平均年齢 65.2 ± 9.5 歳、疾患の内訳は裂孔原性網膜剝離が 7 眼、特発性黄斑上膜が 7 眼であった。

Crossline 濃度は既報のごとく抗 crossline polyclonal 抗体を用いて competitive ELISA 法で定量した。VEGF 濃度は competitive ELISA 用キット (American research products, Behnont, MA, 米国) を用いて定量した¹²⁹⁾¹³⁰⁾。

その結果、硝子体中 crossline 濃度は増殖糖尿病網膜症群は 221.9 ± 149.2 pmol/ml, 対照群では 118.2 ± 58.3 pmol/ml で前者が有意に高値を呈した ($p < 0.05$)。また、硝子体中 VEGF 濃度も増殖糖尿病網膜症群で 5.5 ± 4.1 ng/ml, 対照群で 0.5 ± 0.4 ng/ml と同様に前者で有意に高値を呈した ($p < 0.01$) (図 24 A, B)。また、crossline と VEGF の間には正の相関がみられた (図 25)¹²²⁾。

b) 培養ミュラ細胞における VEGF 産生と AGEs の影響

次に培養ヒトミュラ細胞を用いて、同細胞における VEGF の産生および AGE の及ぼす影響を検討した。培養ヒトミュラ細胞は共同研究者であるミシガン大学 Donald G. Puro 教授の供与を受けた。

AGE の生成は、bovine serum albumin (BSA) を 10 mM の PBS (pH 7.4) と 0.5 M のグルコースを 37°C で 6 週間インキュベートして作製した。また、同様の条件下でグルコースなしでインキュベートしたものを対照とした。BSA 非結合のグルコースを除去した後、heparin-sepharose CL-4 B column chromatography で精製し、

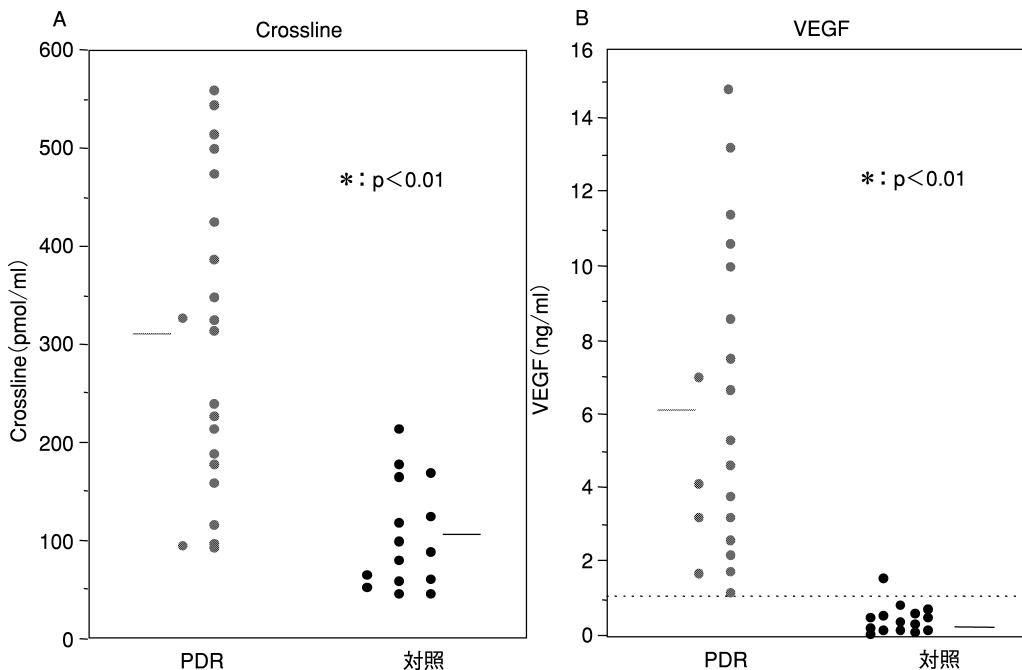


図 24 増殖糖尿病網膜(PDR)症患者の硝子体中における crossline, 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)濃度。硝子体中 crossline 濃度, VEGF 濃度とも対照群に比較して PDR 群では有意に高値を呈した。

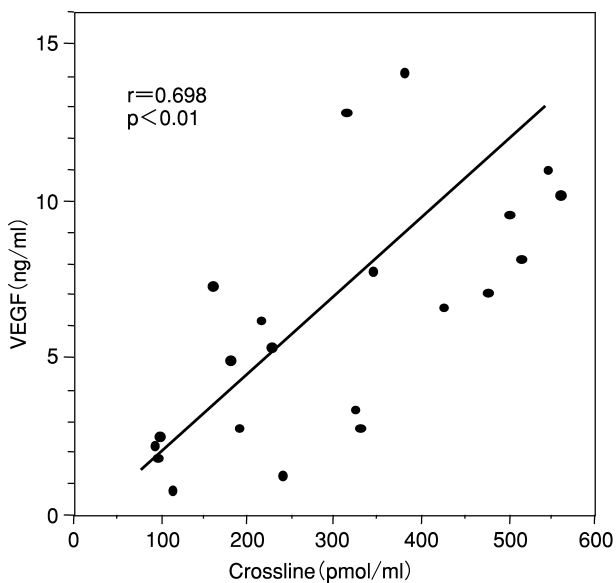


図 25 Crossline, VEGF の硝子体中濃度の相関。crossline と VEGF の間には正の相関がみられた($r=0.698$, $p < 0.01$)。

toxicolor system kit を用いて endotoxin を除去した。精製された AGEs-BSA 中のクロスリンは 620 pmol/mg protein であった。

ヒトミュラ細胞の培養液中に 2 種類の濃度の AGEs-BSA (1, 5 $\mu\text{g/ml}$) を添加したものと, AGEs-BSA 無添加のものを用いて 12 時間培養した。その後, quantitative RT-PCR で VEGF の発現をみた。また, 培養上清中の VEGF 濃度を ELISA 法で測定した。

その結果, 培養液中に AGEs-BSA を添加することで, ミュラ細胞における VEGF mRNA の発現が亢進した。培養上清中の VEGF 濃度は AGEs 濃度依存性に増加した(図 26 A, B)。

c) 結果の解釈

糖尿病網膜症が進行すると毛細血管領域の血管閉塞により網膜無灌流域が生じ, その結果虚血網膜から VEGF が放出され血管新生が誘発されるが¹¹⁶⁾¹¹⁷⁾, VEGF の産生源として以前からミュラ細胞が候補とされている¹³¹⁾。今回の培養ヒトミュラ細胞を用いた実験でもそのことが証明された。また, 糖尿病罹病期間が長期化すると体内に AGE が蓄積されるが, 増殖糖尿病網膜症では硝子体中の crossline 濃度が対照と比較して有意に高く, しかもその値は VEGF と相関していた。培養ミュラ細胞を用いた実験でも AGEs がミュラ細胞の VEGF 産生を亢進することが証明され, 糖尿病網膜症では硝子体中に蓄積された AGEs がミュラ細胞に作用して VEGF をより多量に産生させることで, 悪循環を形成している可能性が考えられる。硝子体手術により網膜症が鎮静化する一つの機序として, AGEs を含む硝子体を除去することが血管新生抑制に働いている可能性がある。

3) IL-6 と AGEs

a) 増殖糖尿病網膜症の硝子体中の IL-6, pentosidine, CML 濃度

次に代表的な炎症性サイトカインである IL-6 と AGE の関連について検討した。

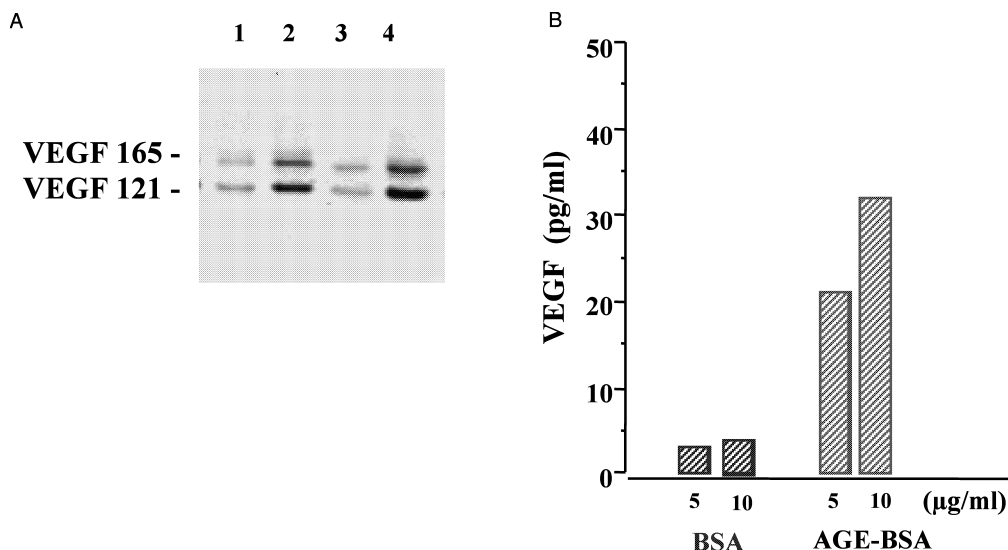


図 26 培養ミューラ細胞における AGEs による VEGF 産生亢進作用。

A：RT-PCR， B：培養液中 VEGF 濃度

培養液中に AGEs-BSA を添加することで， RT-PCR ではミューラ細胞における VEGF mRNA の発現が亢進した。培養上清中の VEGF 濃度は AGEs-BSA の濃度依存性に増加した。

AGE-BSA：5 µg/ml (lean 2)， 10 µg/ml (lean 4)， BSA：5 µg/ml (lean 1)， 10 µg/ml (lean 3)

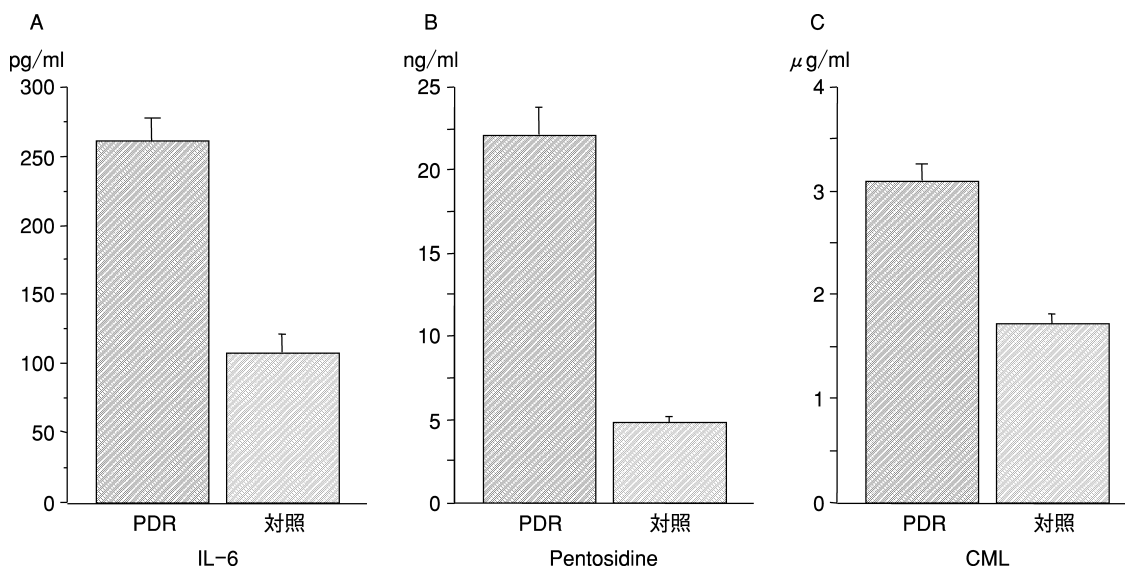


図 27 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中における IL-6, pentosidine, CML 濃度。

A：IL-6， B：pentosidine， C：CML

いずれも PDR 群で有意に高値であった (p<0.001)。

まず，増殖糖尿病網膜症の硝子体手術中に採取した硝子体中の IL-6, pentosidine, CML の濃度を ELISA で定量した。増殖糖尿病網膜症例 46 例 50 眼の硝子体手術時に希釈しない硝子体を前述の方法で採取した。性別は男性 19 例 21 眼，女性 27 例 29 眼，平均年齢 59.3±11.8 歳であった。推定糖尿病罹病期間は 14.1±10.3 年，平均 HbA1c 値は 7.7±1.6% であった。対照には年齢を相関させた非糖尿病症例 48 例 48 眼の硝子体を使用した。性別は男性 26 例 26 眼，女性 22 例 22 眼，平均年齢 60.2±12.6 歳，疾患の内訳は，特発性黄斑円孔 19

眼，特発性黄斑上膜 7 眼，裂孔原性網膜剥離 13 眼，黄斑円孔網膜剥離 2 眼，網膜静脈分枝閉塞症 3 眼，加齢黄斑変性 2 眼，ポリープ状脈絡膜血管症 1 眼であった。

硝子体中の IL-6 濃度の測定には chemiluminescent enzyme immunoassay using a Lumipuls 1200 system (富士レビオ)を用いた。Pentosidine および CML 濃度は特異抗体(伏見製作所)を用いた高感度 competitive ELISA 法で定量した。

その結果，硝子体中 IL-6 濃度は，増殖糖尿病網膜症群で 261.3±15.0 pg/ml，対照群では 108.8±11.3 pg/

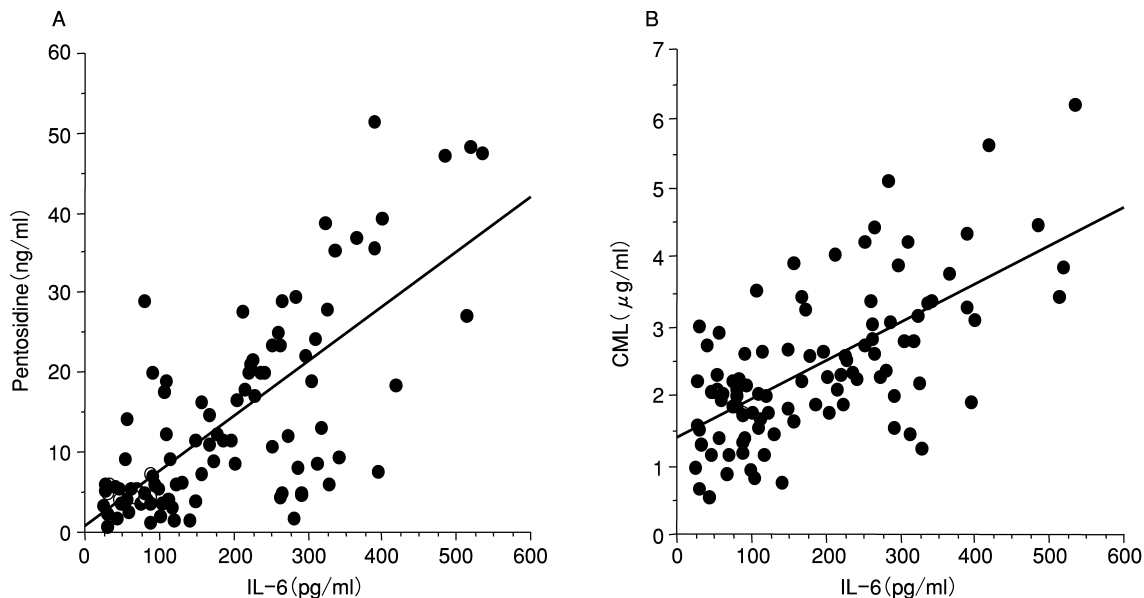


図 28 IL-6 と pentosidine, carboxymethyllysine (CML) の硝子体中濃度の相関。
IL-6 濃度と pentosidine 濃度および CML 濃度は、いずれも正の相関がみられた ($r=0.729$, $r=0.649$)。

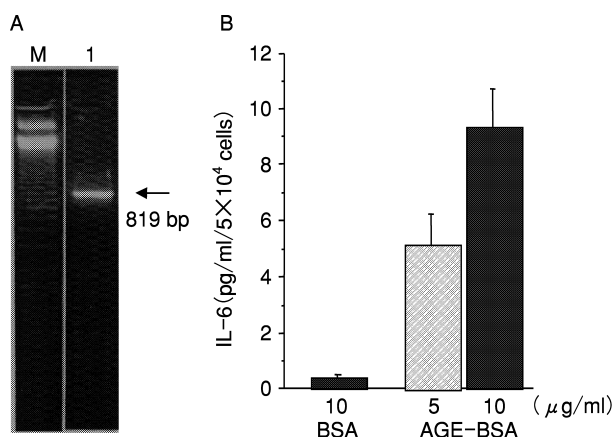


図 29 培養ミューラ細胞における advanced glycation end products (AGEs) による IL-6 産生亢進作用。

A : reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), B : 培養液中濃度
培養液中に AGEs-BSA を添加することで、RT-PCR ではミューラ細胞における IL-6 mRNA の発現が亢進した。培養上清中の IL-6 濃度は AGEs-BSA の濃度依存性に増加した。

ml, Pentosidine 濃度は、増殖糖尿病網膜症群で 22.2 ± 1.6 ng/ml, 対照群では 5.0 ± 0.3 ng/ml, CML 濃度は増殖糖尿病網膜症群で 3.10 ± 0.15 μ g/ml, 対照群では 1.75 ± 0.10 μ g/ml であり、いずれも統計学的に増殖糖尿病網膜症群で有意に高値であった ($p < 0.001$) (図 27 A~C)。また、IL-6 濃度と pentosidine 濃度および CML 濃度は、いずれも正の相関がみられた ($r=0.729$, $r=0.649$) (図 28 A, B)¹³²。

b) 培養ミューラ細胞における IL-6 産生と AGEs の影響

次に VEGF と同様に培養ヒトミューラ細胞を用いて、同細胞における IL-6 の産生および AGEs の及ぼす影響を検討した。AGEs の生成は、前述の方法で行った。

ヒトミューラ細胞の培養液中に 2 種類の濃度の AGEs-BSA (5, 10 μ g/ml) を添加したものと、AGE-BSA 無添加のものを用いて 24 時間培養した。その後、quantitative RT-PCR で IL-6 の発現をみた。また、培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法で測定した。

その結果、培養液中に AGEs-BSA を添加することで、ミューラ細胞における IL-6 mRNA の発現が亢進した。また、培養上清中の IL-6 濃度は AGE-BSA 5 μ g/ml 添加で 5.15 ± 1.09 pg/ml, 10 μ g/ml 添加で 9.43 ± 1.40 pg/ml, 対照で 3.90 ± 0.13 pg/ml となり、濃度依存性に培養液中の IL-6 濃度が増加した (図 29 A, B)。

c) 結果の解釈

IL-6 は多機能を有する炎症性サイトカインの一つ¹³³) で、眼球では網膜色素上皮細胞、ミューラ細胞、角膜上皮細胞、虹彩色素上皮、毛様体上皮などに発現がみられることが報告^{134)~137)}されている。IL-6 は VEGF の産生を誘導することで血管新生や黄斑浮腫を促進させたり、他のサイトカインとネットワークを形成して眼内増殖に深く関与することが報告¹³⁸⁾されている。過去にも増殖糖尿病網膜症の前房水中に IL-6 濃度が増加しているとする報告¹³⁹⁾がある。増殖糖尿病網膜症では硝子体中の pentosidine, CML といった AGEs が硝子体中に増加しており、それがミューラ細胞からの IL-6 の産生を促進して、眼内増殖機転や炎症機転を進行させている可能性が推定された¹⁴⁰⁾¹⁴¹⁾。

3. 硝子体液化と AGEs

1) AGEs と光増感作用

加齢により生じる硝子体変化には、光化学反応によるコラーゲンの架橋形成とヒアルロン酸の脱重合が関与しており、その反応にはさまざまな光感受性物質の関与が指摘されている^{142)~146)}。一方、糖尿病患者の硝子体中に蓄積される AGEs¹²²⁾¹⁴⁷⁾には光増感作用があること¹⁴⁸⁾や AGEs 存在下の試験管内でヒアルロン酸の脱重合が促進することも報告¹⁴⁸⁾¹⁴⁹⁾されている。日常臨床において、糖尿病網膜症患者では正常人と比べ、後部硝子体皮質前ポケット¹⁵⁰⁾が比較的低年齢で形成されることを経験することから、著者らは AGEs が硝子体液化に促進する可能性を考えた。今回、我々は AGE が糖尿病網膜症患者の硝子体液化に及ぼす影響をみる目的で、照射によるヒアルロン酸の分子量変化に及ぼす AGE の影響につ

いて、high performance liquid chromatography (HPLC) を用いた *in vitro* の実験を行った。

2) AGEs によるヒアルロン酸の液化作用

被験試料として分子量 1×10^6 のヒアルロン酸ナトリウム (参天製薬株式会社 Lot No. KK 1074) を、光増感物質としては前述の AGEs (含有蛋白濃度: 86.987 mg/ml) を用いた。また、分子量マーカーとして pullulan standard (昭和電工 Lot No. 20201) を使用した。照射には分光光度計 (SHIMADZ UV-2200 A : E/RD/0129)、照射装置 (JASCO M-M 3 型 Xe ランプ 浜松ホトニクス 300 W) を用いた。分子量測定には、HPLC システムを使用した。

予備実験として、HPLC によりの pullulan standard 5 種類の retention time (RT) を測定し検量線を作製した。

本実験は、0.02% ヒアルロン酸溶液を作製し、AGEs を添加した群 (AGEs 添加群)、添加しない群 (AGEs 非添加群) を設定した。ヒアルロン酸溶液の溶媒には PBS を用いた。各サンプル量は 2 ml とし、AGEs 添加群には溶液全体量の 1% 相当に当たる $20 \mu\text{l}$ の AGE 溶液を添加した。AGEs 溶液の添加量は、人の硝子体中の含有蛋白量 (0.4~1.1 mg/ml) とほぼ同じになるように設定した。各群において照射 4 時間を施行した群と同条件で暗所に 4 時間置いた群を設定し、処置後 HPLC で RT を測定して 4 群の分子量の変化を推定した。

予備実験の結果、RT と分子量の対数は負の相関関係にあることがわかった (回帰式: $Y = aX + b$ $a = -0.341$, $b = 11.142$, $r = -0.995$) (図 30)。すなわち、ヒアルロン酸の RT が長いほど、ヒアルロン酸の脱重合、つまり硝子体の液化が進行していることになる。

本実験の結果、照射 4 時間で AGE 添加群の RT は非添加群と比較して有意に延長した ($p = 0.02$ Mann-Whitney U 検定)。また、暗所では AGE 添加群と非添加群の RT には有意差をみなかった ($p = 0.56$ Mann-Whitney U 検定) (図 31 A, B)¹⁵⁰⁾。

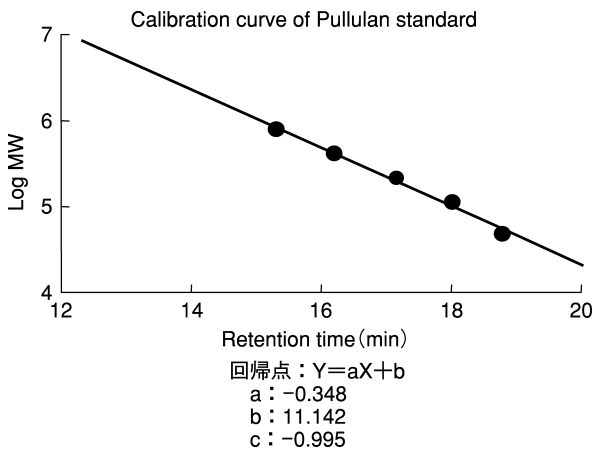


図 30 High-performance liquid chromatography (HPLC) によるヒアルロン酸の retention time (RT) と分子量の関係。

予備実験の結果、RT と分子量の対数は負の相関関係にあることがわかった (回帰式: $Y = aX + b$ $a = -0.341$, $b = 11.142$, $r = -0.995$)。すなわち、ヒアルロン酸の RT が長いほど、ヒアルロン酸の脱重合、つまり硝子体の液化が進行していることになる。

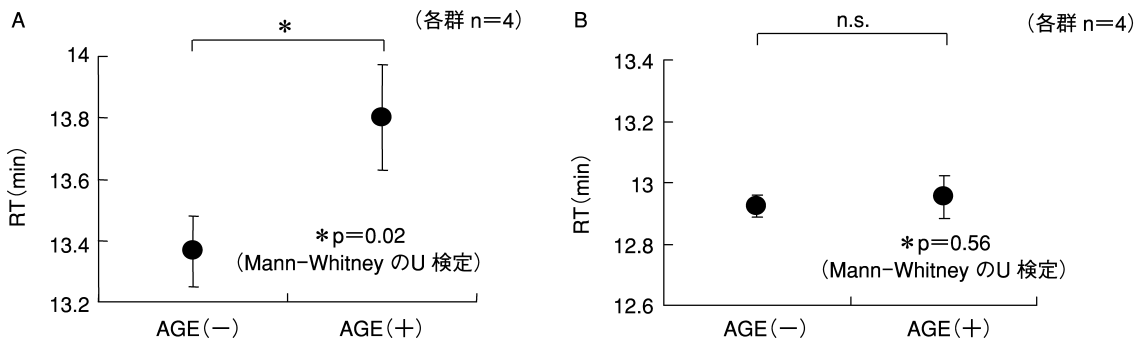


図 31 AGEs の光増感作用によるヒアルロン酸の脱重合。

A: 照射 4 時間, B: 暗所 4 時間

照射 4 時間で AGEs 添加群の RT は非添加群と比較して有意な延長がみられた ($p = 0.02$)。暗所では AGEs 添加群と非添加群の RT には有意差をみなかった ($p = 0.56$)。

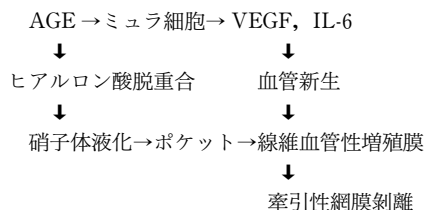


図 32 糖尿病網膜症の病態。

3) 結果の解釈

以上の結果は、AGEs 存在下では光照射によるヒアルロン酸の脱重合が促進されることを示しているものと考えられる。すなわち、糖尿病患者では硝子体中に存在する AGEs の作用で、光照射によるヒアルロン酸の脱重合が促進され、より早期に顕著な硝子体皮質前ポケットが形成される可能性が考えられる。増殖糖尿病網膜症では後部硝子体皮質前ポケットに沿って線維血管性増殖膜が形成され、その後に生じる後部硝子体剥離によって牽引性網膜剥離を来し視力低下の原因となる。

4. 小 括

糖尿病網膜症と AGEs に関する研究の結果を図 32 のようにまとめた。Crossline, pentosidine, CML などの AGEs はミューラ細胞を介して、VEGF や IL-6 といったサイトカインの産生を促進し血管新生や眼内増殖などの病態に深く関与している可能性が考えられる。また、一方で AGEs は光によるヒアルロン酸の脱重合を進行させ、硝子体液化による後部硝子体皮質前ポケットを形成し、増殖糖尿病網膜症の増殖膜形成や後部硝子体剥離進行による牽引性網膜剥離の発症に関与している可能性がある。

糖尿病網膜症の薬物には ACEs 阻害薬、PKC β 阻害剤、血管新生抑制剤などが有望視されている^{152)~154)}が、今回の結果から AGEs 阻害剤は VEGF や IL-6 などのサイトカインの産生を抑制することで、糖尿病網膜症の治療薬剤の一つになり得る可能性が考えられる。

V おわりに

以上、特発性黄斑円孔、加齢黄斑変性、糖尿病網膜症の 3 疾患の病態についての著者らの研究成果を報告した。硝子体手術は術中所見だけでなく、手術時に得られる硝子体サンプルや増殖膜の解析により病態を解明する糸口を提供してきた。特に、これらの検体を使用した分子生物学的研究の最近の進歩には目ざましいものがある。しかし、現時点における本邦の状況としては、奏効機序が十分に解明されないまま、多くの硝子体手術が施行されているのもまた事実である。

特発性黄斑円孔では、硝子体牽引だけでなく網膜の細胞レベルでの何らかの変化が生じているものと考えられる。今回の研究結果では中心窩ミューラ細胞が幹細胞様の性質を有しており、そのアポトーシスによって黄斑円孔

が発症する仮説を述べた。今回のデータのみで結論づけるのは不十分と思われるが、黄斑部網膜には他の部位にはない細胞の分化段階での特殊性が存在するのではないかと思われる。もしこれが事実なら、種々の黄斑疾患の病態を解明するきっかけになり得る可能性があり、今後も引き続き研究を続けていきたい。

加齢黄斑変性の病因として種々の酸化ストレスが関与していることは確実と思われる。今回、遺伝子多型が関与していることがわかったが、今後は個人の遺伝子多型に対応するオーダーメイド治療も視野に入れた何らかの薬物治療を考案する必要がある。そのためには眼局所の所見だけでなく、加齢黄斑変性を全身疾患と位置づけ、種々のデータを蓄積する必要がある。また、種々の疫学的なデータも重要で、これによって新たな治療のヒントが得られる可能性もある。

糖尿病網膜症は依然として本邦の失明原因の第 1 位である。光凝固や硝子体手術の普及によって治療成績は確実に向上しているが、社会生活を維持できる有用な視力を保持することは依然として困難な場合が多い。光凝固一つをとっても完全に奏効機序が解明されているとはいいがたく、硝子体手術にも限界がある。また、近年増加している糖尿病黄斑浮腫に関しても、硝子体手術が何故奏効するのか不明な点が多く、手術が奏効する症例としない症例があるのを見極める必要がある。また、同じ糖尿病網膜症でも黄斑浮腫を来しやすい症例もあれば、著明な血管新生が生じているにもかかわらず黄斑浮腫が全く生じない症例もある。この辺りの病態を解明していくことで、より質の高い医療が行える可能性がある。

今回の宿題報告では、これら網膜硝子体疾患の病態を解明する一つの手掛かりを提供できたのではないかと考えている。今後も臨床で得られる素朴な疑問点を大切にしながら、これらの疾患の病態をより深く解明する努力を続けていきたい。

稿を終えるに当たり、今回の宿題報告の機会を与えて下さいました日本眼科学会評議員各位、本研究を支援して頂きました大阪医科大学眼科学教室ならびに同窓会各位、ならびに第 107 回日本眼科学会総会長の 大島健司教授(福岡大学)、座長の労をお取り下さいました 田野保雄教授(大阪大学)に心より深謝申し上げます。

また、本研究は、文部科学省研究費補助金、大阪アイバンク助成金、網膜剥離友の会支援金などにより行われたことを付記して謝意を表します。

文 献

- 1) Wiedemann P : Growth factors in retinal disease : Proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. *Surv Ophthalmol* 36 : 373-384, 1992.
- 2) Kishi S, Hagimura N, Shimizu K : The role of

- the premacular liquefied pocket and premacular vitreous cortex in idiopathic macular hole development. *Am J Ophthalmol* 122 : 622—628, 1996.
- 3) **Macular Photocoagulation Study Group** : Visual outcome after laser photocoagulation for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. The influence of initial lesion size and initial visual acuity. *Arch Ophthalmol* 112 : 462—464, 1994.
 - 4) **Bressler NM** : Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin : Two-year results of 2 randomized clinical trial-stap report 2. *Arch Ophthalmol* 119 : 198—207, 2001.
 - 5) **Reichel E, Berrocal AM, Ip M, Kroll AJ, Desai V, Duker JS, Puliafito CA** : Transpupillary thermotherapy of occult subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 106 : 1908—1914, 1999.
 - 6) **Mandai M, Takahashi M, Miyamoto H, Hiroshiba N, Kimura H, Ogura Y, et al** : Long-term outcome after radiation therapy for subfoveal choroidal neovascularization associated with age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol* 44 : 530—537, 2000.
 - 7) **Merrill PT, LoRusso FJ, Lomeo MD, Saxe SJ, Khan MM, Lambert HM** : Surgical removal of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 106 : 782—789, 1999.
 - 8) **Ohji M, Fujikado T, Saito Y, Hosohata J, Hayashi A, Tano Y** : Foveal translocation : A comparison of two techniques. *Semin Ophthalmol* 13 : 52—62, 1998.
 - 9) **Vlassara H, Bucala R, Striker L** : Pathogenic effects of advanced glycosylation : Biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 70 : 138—151, 1994.
 - 10) **Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL** : Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration : Proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci* 86 : 5141—5145, 1989.
 - 11) **Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, et al** : Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42 : 801—813, 1993.
 - 12) **Sebag J, Buckingham B, Charles MA, Reiser K** : Biochemical abnormalities in vitreous of humans with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 110 : 1472—1476, 1992.
 - 13) **Stitt AW, Moore JE, Sharkey JA, Murphy G, Simpson DA, 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.
 - 14) **上水流広史, 小椋祐一郎** : 特発性黄斑円孔における網膜周辺部変性の頻度. *臨眼* 49 : 1095—1097, 1995.
 - 15) **Kapetanios AD, Donati G, Pournaras CJ** : Results and complications of surgery for idiopathic macular holes. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 214 : 282—284, 1999.
 - 16) **吉澤豊久, 斎藤暢子, 村上健治, 市辺幹雄, 安藤秀夫, 安藤伸朗, 他** : 特発性黄斑円孔硝子体手術の合併症. *眼科手術* 10 : 248—250, 1997.
 - 17) **Otani A, Takagi H, Suzuma K, Honda Y** : Angiotensin II potentials vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res* 82 : 619—628, 1998.
 - 18) **Weber KT, Brilla CG** : Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83 : 1849—1865, 1991.
 - 19) **Takai S, Miyazaki M** : The role of chymase in vascular proliferation. *Drug News Perspect* 15 : 278—282, 2002.
 - 20) **Kida T, Ikeda T, Nshimura M, Sugiyama T, Imamura Y, Sotozono C, et al** : Renin-Angiotensin system in proliferative diabetic retinopathy and its gene expression in cultured human Müller cells. *Jpn J Ophthalmol* 47 : 36—41, 2003.
 - 21) 未発表データ
 - 22) **Nishimoto M, Takai S, Kim S, Jin D, Yuda A, Sakaguchi M, et al** : Significance of chymase-dependent angiotensin II-forming pathway in the development of vascular proliferation. *Circulation* 104 : 1274—1279, 2001.
 - 23) **Takai S, Kim S, Sakonjo H, Miyazaki M** : Mechanisms of angiotensin II type 1 receptor blocker for anti-atherosclerotic effect in monkeys fed a high-cholesterol diet. *J Hypertens* 21 : 361—369, 2003.
 - 24) **Shiota N, Saegusa Y, Nishimura K, Miyazaki M** : Angiotensin II-generating system in dog and monkey ocular tissues. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24 : 243—248, 1997.
 - 25) **Johnson RN, Gass JD** : Idiopathic macular holes. Observations, stages of formation, and implications for surgical intervention. *Ophthalmology* 95 : 917—924, 1988.
 - 26) **Johnson MW, Van Newkirk MR, Meyer KA** : Perifoveal vitreous detachment is the primary pathogenic event in idiopathic macular hole formation. *Arch Ophthalmol* 119 : 215—220, 2001.
 - 27) **Knupp C, Munro PMG, Luther PK, Ezra E, Squire JM** : Structure of abnormal molecular assemblies(collagen 6) associated with human full thickness macular holes. *J Struct Biol* 129 : 38—47, 2000.

- 28) **Kofford MW, Schwartz LB, Schechter NM, Yager DR, Diegelmann RF, Graham MF** : Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. *J Biol Chem* 272 : 7127—7131, 1997.
- 29) **Lees M, Taylar DJ, Woolley DE** : Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinase A and B. *Eur J Biochem* 223 : 171—177, 1994.
- 30) **Frank BT, Rossall JC, Caughey GH, Frang KC** : Mast cell tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is cleaved and inactivated extracellularly by α -Chymase. *J Immunol* 166 : 2783—2792, 2001.
- 31) **Kielty CM, Lees M, Shuttleworth CA, Woolley D** : Catabolism of intact type VI collagen microfibrils : Susceptibility to degradation by serine proteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 191 : 1230—1206, 1993.
- 32) **Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, George SJ** : Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 : 1707—1715, 1998.
- 33) **Boesiger J, Tsai M, Maurer M, Yamaguchi M, Brown LF, Vlahffey KP, et al** : Mast cell can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J Exp Med* 188 : 1135—1145, 1998.
- 34) **May CA** : Mast cell heterogeneity in the human uvea. *Histochem Cell Biol* 112 : 381—386, 1999.
- 35) **海老原伸行** : 眼科領域における肥満細胞学 (Mast Cytology) の展開. *あたらしい眼科* 19 : 1049—1051, 2002.
- 36) **Ruoss SJ, Hartmann T, Caughey GH** : Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 88 : 493—499, 1991.
- 37) **Kishi S, Shimizu K** : Oval defect in detached posterior hyaloid membrane in idiopathic pre-retinal macular fibrosis. *Am J Ophthalmol* 118 : 451—456, 1994.
- 38) **Walter M, Sutton RM, Schechter NM** : Highly efficient inhibition of human chymase by alpha (2)-macroglobulin. *Arch Biochem Biophys* 368 : 276—284, 1999.
- 39) **Harvima IT, Haapanen L, Ackermann L, Naukkarinen A, Harvima RJ, Horsmanheimo M** : Decreased chymase activity is associated with increased levels of protease inhibitors in mast cells of psoriatic lesions. *Acta Derm Venereol* 79 : 98—104, 1999.
- 40) **Nakanishi T, Koyama R, Ikeda T, Shimizu A** : Catalogue of soluble proteins in the human vitreous humor : Comparison between diabetic retinopathy and macular hole. *Journal of Chromatography B* 776 : 89—100, 2002.
- 41) **Koyama R, Nakanishi T, Ikeda T, Shimizu A** : Catalogue of soluble proteins in human vitreous humor by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry including seven angiogenesis-regulating factors. *J Chromatography B* 792 : 5—21, 2003.
- 42) **Gass JD** : Müller cell cone, an overlooked part of the anatomy of the fovea centralis : Hypotheses concerning its role in the pathogenesis of macular hole and foveomacular retinoschisis. *Arch Ophthalmol* 117 : 821—823, 1999.
- 43) **van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH** : Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415 : 1030—1034, 2002.
- 44) **Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage FH** : Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci* 12 : 340—348, 1998.
- 45) **Perron M, Harris WA** : Retinal stem cells in vertebrates. *Bioessays* 22 : 685—688, 2000.
- 46) **Reh TA, Fischer AJ** : Stem cells in the vertebrate retina. *Brain. Behav. Evol.* 58 : 296—305, 2001.
- 47) **Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al** : Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287 : 2032—2036, 2000.
- 48) **Kubota R, Hokoc JN, Moshiri A, McGuire C, Reh TA** : A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res Dev Brain Res* 134 : 31—41, 2002.
- 49) **Potten CS, et al** : The significance of spontaneous apoptosis and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer. Metastasis Rev* 11 : 179—195, 1992.
- 50) **Ijiri K** : Apoptosis (cell death) induced in mouse bowel by 1, 2-dimethylhydrazine, methylazoxymethanol acetate, and gamma-rays. *Cancer Res* 49 : 6342—6346, 1989.
- 51) **Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM** : Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57 : 201—209, 1989.
- 52) **Fischer AJ, Reh TA** : Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat. Neurosci.* 4 : 247—252, 2001.
- 53) **Leskinen MJ, Lindstedt KA, Wang Y, Kovanen PT** : Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by a mechanism involving fibro-

- nectin degradation and disruption of focal adhesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 : 238—243, 2003.
- 54) **Wang Y, Shiota N, Leskinen MJ, Lindstedt KA, Kovanen PT** : Mast cell chymase inhibits smooth muscle cell growth and collagen expression *in vitro* : Transforming factor-beta 1-dependent and-independent effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 : 1928—1933, 2001.
- 55) **Leskinen M, Wang Y, Leszczynski D, Lindstedt KA, Kovanen PT** : Mast cell chymase induces apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 : 516—522, 2001.
- 56) **Lazaar AL, Plotnick MI, Kucich U, Crichton I, Lotfi S, Das SK, et al** : Mast cell chymase modifies cell-matrix interactions and inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Immunol* 169 : 1014—1020, 2002.
- 57) **Hara M, Matsumori A, Ono K, Kido H, Hwang MW, Miyamoto T, et al** : Mast cells cause apoptosis of cardiomyocytes and proliferation of other intramyocardial cells *in vitro*. *Circulation* 100 : 1443—1449, 1999.
- 58) **Nitatori T, Sato, N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibana K, et al** : Delayed neuronal death in the CA 1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 15 : 1001—1011, 1995.
- 59) **Shigeno T, Yamasaki Y, Kato G, Kusaka K, Mima T, Takakura K, et al** : Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. *Neurosci Lett* 120 : 117—119, 1990.
- 60) **Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ** : Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA 1 : Transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J Neurosci Res* 70 : 462—473, 2002.
- 61) **Takai S, Shiota N, Kobayashi S, Matsumura E, Miyazaki M** : Induction of chymase that forms angiotensin II in the monkey atherosclerotic aorta. *FEBS Letters* 412 : 86—90, 1997.
- 62) **Oleksyszyn J, Powers JC** : Amino acid and peptide phosphate derivatives as specific inhibitors of serine peptidases. *Methods Enzymol* 244 : 423—441, 1994.
- 63) **Ahmad I, Tang L, Pham H** : Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 270 : 517—521, 2000.
- 64) **Puro DG** : Calcium channels of human retinal glial cells. (T. Narahashi (Ed) :), *Methods of Neuroscience*, Vol. 19, Academic Press, Orlando, FL, pp. 68—81, 1994
- 65) **Zhang SC, Fedoroff S** : Cellular localization of stem cell factor and c-kit receptor in the mouse nervous system. *J Neurosci Res* 45 : 1—15, 1997.
- 66) **Morii E, Kosaka J, Nomura S, Fukuda Y, Kitamura Y** : Demonstration of retinal cells expressing messenger RNAs of the c-kit receptor and its ligand. *Neurosci Lett* 166 : 168—170, 1994.
- 67) **He J, deCastro CM, Vandembark GR, Busciglio J, Gabuzda D** : Astrocyte apoptosis induced by HIV-1 transactivation of the c-kit protooncogene. *Proc Natl Acad Sci* 94 : 3954—3959, 1997.
- 68) **Grinspan JB, Stern JL, Franceschini B, Pleasure D** : Trophic effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on differentiated oligodendroglia : A mechanism for regeneration of the oligodendroglial lineage. *J Neurosci Res* 36 : 672—680, 1993.
- 69) **Grinspan JB, Reeves MF, Coulaloglou MJ, Nathanson D, Pleasure D** : Re-entry into the cell cycle is required for bFGF-induced oligodendroglial dedifferentiation and survival. *J Neurosci Res* 46 : 456—464, 1996.
- 70) **Longley BJ, Tyrrell L, Ma Y, Williams DA, Halaban R, Langley K, et al** : Chymase cleavage of stem cell factor yields a bioactive, soluble product. *Proc Natl Acad Sci* 94 : 9017—9021, 1997.
- 71) **Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Islam O, Kodama E, Yamamoto A, et al** : Evaluation of *in vitro* proliferative activity of human fetal neural stem/progenitor cells using indirect measurements of viable cells based on cellular metabolic activity. *J Neurosci Res* 69 : 869—879, 2002.
- 72) 未発表データ
- 73) **James M, Feman SS** : Macular holes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 215 : 59—63, 1980.
- 74) **Parshad RK, Batth BK** : Cystogenesis of antral follicles induced by dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates mast cell proliferation and maturation in the house rat (*Rattus rattus*) ovary. *Indian J Exp Biol* 37 : 933—935, 1999.
- 75) **Zhao XJ, McKerr G, Dong Z, Higgins CA, Carson J, Yang ZQ, et al** : Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. *Thorax* 56 : 205—211, 2001.
- 76) **Pasmanik M, Schlinger BA, Callard GV** : *In vivo* steroid regulation of aromatase and 5 alpha-reductase in goldfish brain and pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 71 : 175—182, 1988.
- 77) **Gelinas D, Callard GV** : Immunocytochemical and biochemical evidence for aromatase in neurons of the retina, optic tectum and retinotectal pathways in goldfish. *J Neuroendocrinol* 5 : 635—641, 1993.

- 78) **Callard GV, Drygas M, Gelinas D** : Molecular and cellular physiology of aromatase in the brain and retina. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44 : 541—547, 1993.
- 79) **Klein R** : Epidemiology. In : Berger JW, et al, (Eds) : Age-related macular degeneration, St Louis : Mosby, 1999 : 31—55.
- 80) **The Eye Disease Case-Control Study Group** : Risk factors for neovascular age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 110 : 1701—1708, 1992.
- 81) **Vingerling JR, Dielemans I, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE, de-Jong PT** : Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam study. *Am J Epidemiol* 142 : 404—409, 1995.
- 82) **Vingerling JR, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT** : Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol* 114 : 1193—1196, 1996.
- 83) **Klaver CC, Wolfs RC, Assink JJ, van-Duijn CM, Hofman A, de-Jong PT** : Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol* 116 : 1646—1651, 1998.
- 84) **Age-Related Eye Disease Study Research Group** : A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and visual loss. *Arch Ophthalmol* 119 : 1417—1436, 2001.
- 85) **Cohen SM, Olin KL, Feuer WJ, Hjelmeland L, Keen CL, Morse LS** : Low glutathione reductase and peroxidase activity in age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 78 : 791—794, 1994.
- 86) **Witztum JL, Steinberg D** : Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88 : 1785—1792, 1991.
- 87) **Garin MCB, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, et al** : Paraoxonase polymorphism met-leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme : A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 99 : 62—66, 1997.
- 88) **Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M, Arie K, Itoh H, Hamashige N, et al** : Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol* 57 : 69—73, 1996.
- 89) **Mackness MI, Arrol S, Durrington PN** : Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 286 : 152—154, 1991.
- 90) **Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN** : Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*. 104 : 129—135, 1993.
- 91) **Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, et al** : Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 346 : 869—872, 1995.
- 92) **Odawara M, Tachi Y, Yamashita K** : Paraoxonase polymorphism Gln 192-Arg is associated with coronary heart disease in Japanese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocr Metab* 82 : 2257—2260, 1997.
- 93) **Ikeda Y, Suehiro, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arie K, et al** : Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 47 : 598—602, 1998.
- 94) **Souied EH, Benlian P, Amouyel P, Feingold J, Lagarde JP, Munnich A, et al** : The epsilon 4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 125 : 353—359, 1998.
- 95) **Klaver CC, Kliffen M, van-Duijn CM, Hofman A, Cruts M, Grobbee DE, van-Broeckhoven C, de-Jong PT** : Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 63 : 200—206, 1998.
- 96) **Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE** : The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 3 : 73—76, 1993.
- 97) **Itabe H, Takeshima E, Iwasaki H, Kimura J, Yoshida Y, Imanaka T, et al** : A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation of oxidized phosphatidylcholines and polypeptides. *J Biol Chem* 269 : 15274—15279, 1994.
- 98) **Eckerson HW, Romson J, Wytte C, La-Du BN** : The human serum paraoxonase polymorphism : Identification of phenotypes by their response to salts. *Am-J-Hum-Genet.* 35 : 214—227, 1983.
- 99) **Ikeda T, Obayashi H, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Imamura Y, et al** : Paraoxonase gene polymorphisms and plasma oxidized low-density lipoprotein level as possible risk factors for exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 132 : 191—195, 2001.
- 100) **Hjalmarsson K, Marklund SL, Engstrom A, Edlund T** : Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987 ; 84 : 6340—6344.
- 101) **Yamamoto M, Hara H, Adachi T** : Effects of homocystein on the binding of extracellular-

- superoxide dismutase to the endothelial cell surface. FEBS Lett. 486 : 159—162, 2000.
- 102) **Adachi T, Ohta H, Yamada H, Futenma A, Kato K, Hirano K** : Quantitative analysis of extracellular superoxide dismutase in serum and urine by ELISA with monoclonal antibody. Clin Chim Acta 212 : 89—102, 1992.
 - 103) **Imamura Y, Adachi T, Obayashi H, Satofuka S, Ikeda T** : Serum and vitreous levels of extracellular superoxide dismutase in patients with age-related macular degeneration. Ophthalmology, in press.
 - 104) **Mehta JL, Saldeen TG, Rand K** : Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 31 : 1217—1225, 1998.
 - 105) **Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, et al** : Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet 2 : 983—998, 1988.
 - 106) **Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT, et al** : Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries. J Infect Dis 167 : 841—849, 1993.
 - 107) **Campbell LA, O'Brien ER, Cappuccio AL, Kuo CC, Wang SP, Stewart D, Patton DL, et al** : Detection of Chlamydia pneumoniae (TWAR) in human coronary atherectomy tissues. J Infect Dis 172 : 585—588, 1995.
 - 108) **Fong IW, Chiu B, Viira E, Fong MW, Jang D, Mahony J** : Rabbit model for Chlamydia pneumoniae infection. J Clin Microbiol 35 : 48—52, 1997.
 - 109) **Kishimoto T, Matsushima T, Morikawa T, Kawagoe K** : Assay of specific anti-chlamydia pneumoniae antibodies by ELISA method. 3. Setting of serological criteria. J Jpn Assc Infect Dis 73 : 457—466, 1999.
 - 110) **Ishida O, Oku H, Ikeda T, Nishida M, Kawagoe K, Nakamura K** : Is Chlamydia pneumoniae infection a risk factor for age related macular degeneration? British J Ophthalmology 87 : 523—524, 2003.
 - 111) **Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J** : A new Chlamydia psittaci strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. N Engl J Med 315 : 161—168, 1986.
 - 112) **Gaydos CA, Summersgill JT, Sahney NN, Ramirez JA, Quinn TC** : Replication of Chlamydia pneumoniae *in vitro* in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. Infect Immun 64 : 1614—1620, 1996.
 - 113) **Kalayoglu MV, Perkins BN, Byrne GI** : Chlamydia pneumoniae-infected monocytes exhibit increased adherence to human aortic endothelial cells. Microbes Infect 3 : 963—969, 2001.
 - 114) **Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P** : Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. Circulation 98 : 300—307, 1998.
 - 115) **Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV** : A role for local inflammation in the formation of drusen in aging eye. Am J Ophthalmol 134 : 411—431, 2002.
 - 116) **Aiello LP, Avery RL, Arrig 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 Eng J Med 331 : 1480—1487, 1994.
 - 117) **Adamis AP, Miller JW, Bemal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo T, et al** : Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. Am J Ophthalmol 118 : 445—450, 1994.
 - 118) **Ikeda T, Puro DG** : Nerve growth factor : A mitogenic signal for retinal Müller glial cells. Brain Res 649 : 260—264, 1994.
 - 119) **Ikeda T, Puro DG** : Regulation of retinal glial cell proliferation by antiproliferative molecules. Exp Eye Res 60 : 435—444, 1995.
 - 120) **Ikeda T, Waldbilling RJ, Puro DG** : Truncated of IGF-I yields two mitogens for retinal Müller glial cells. Brain Res 686 : 87—92, 1995.
 - 121) **Ikeda T, Honma Y, Nishida K, Hirase K, Sotozono C, Kinoshita S, et al** : Expression of transforming growth factor- β s and their receptors by human retinal glial cells. Curr. Eye Res. 17 : 546—550, 1998.
 - 122) **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.
 - 123) **Hirase K, Ikeda T, Sotozono C, Nishida K, Sawa H, Kinoshita S** : TGF- β 2 in the vitreous in proliferative diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 116 : 738—744, 1998.
 - 124) **Nishimura M, Ikeda T, Ushiyama M, Ohtsuka K, Yoshimura M, Kinoshita S** : Vitreous levels of human hepatocyte growth factor increase in proliferative diabetic retinopathy with rubeosis. J Clin Endocrinol Metab 84 : 659—662, 1999.
 - 125) **Inokuchi N, Ikeda T, Imamura Y, Sotozono C, Kinoshita S, Uchihori Y, et al** : Vitreous levels of Insulin-like growth factor-1 in patients with proliferative diabetic retinopathy. Curr Eye Res

- 23 : 368—371, 2001.
- 126) **Oku H, Ikeda T, Honma Y, Sotozono C, Nishida K, Nakamura Y, et al** : Gene expression of neurotrophins and their high-affinity trk receptors in cultured human Müller cells. *Ophthalmic Res* 34 : 38—42, 2002.
- 127) **池田恒彦** : ミュラー細胞とサイトカイン. *臨眼*, 54 : 1025—1031, 2000.
- 128) **繁田幸男, 谷口直之, 編** : 蛋白の糖化-AGE の基礎と臨床. 27—29, 医学書院, 東京, 1997.
- 129) **Nakamura K, Hasegawa T, Fukunaga Y, Ienaga K** : Crossline A and B as candidates for the fluorophores in age-and-diabetes-related cross-linked protein, and their diacetates produced by Maillard reaction of a N-acetyl-L-tyrosine with d-glucose. *J Chem Soc Chem Commun* 14, 992—994, 1992.
- 130) **Obayashi H, Nakano K, Shigeta H, Yamaguchi M, Yoshimori K, Fukui M, et al** : Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 226 : 37—41, 1996.
- 131) **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, 1993.
- 132) **Nakamura N, Hasegawa G, Obayashi O, Yamazaki M, Ogata M, Nakano K, et al** : Increased concentration of pentosidine, an advanced glycation end product, and interleukin-6 in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* in press.
- 133) **Lotz M** : Interleukin-6 : a comprehensive review. *Cancer Treat Res* 80 : 209—233, 1995.
- 134) **Elnor VM, Scales W, Elnor SG, Danforth J, Kunkel SL, Strieter RM** : Interleukin-6 (IL-6) gene expression and secretion by cytokine-stimulated human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 54 : 361—368, 1992.
- 135) **Yoshida S, Sotozono C, Ikeda T, Kinoshita S** : Interleukin-6 (IL-6) production by cytokine-stimulated human Müller cells. *Curr Eye Res* 22 : 341—347, 2001.
- 136) **Cubitt CL, Lausch RN, Oakes JE** : Differences in interleukin-6 gene expression between cultured human corneal epithelial cells and keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 330—336, 1995.
- 137) **Knisely TL, Grabbe S, Nazareno R, Granstein RD** : Production of interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by murine iris and ciliary body explants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 4015—4022, 1994.
- 138) **Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ** : Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271 : 736—741, 1996.
- 139) **Funatsu H, Yamashita H, Shimizu E, Kojima R, Hori S** : Relationship between vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in diabetic retinopathy. *Retina* 21 : 469—477, 2001.
- 140) **Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F** : The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann N Y Acad Sci* 748 : 562—570, 1995.
- 141) **Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T, Motomura T, Hashimoto K, Yamamoto H, et al** : Advanced glycation end products stimulate interleukin-6 production by human bone-derived cells. *J Bone Miner Res* 12 : 439—446, 1997.
- 142) **McCord JM** : Free radicals and inflammation. Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185 : 529—531, 1974.
- 143) **Andley UP, Chakrabarti B** : Role of singlet oxygen in the degradation of hyaluronic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 115 : 894—901, 1983.
- 144) **Armand G, Chakrabarti B** : Informational differences between hyaluronates of gel and liquid human vitreous. Fractionation and circular dichroism studies. *Curr Eye Res* 6 : 445—450, 1987.
- 145) **Ueno N, Sebag J, Hirokawa H, Chakrabarti B** : Effects of visible light irradiation on vitreous structure in the presence of a photosensitizer. *Exp Eye Res* 44 : 863—870, 1987.
- 146) **Akiba J, Ueno N and Chakrabarti B** : Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. *Curr Eye Res* 13 : 505—512, 1994.
- 147) **Stitt AW, Moore JE, Sbarkey JA, Murphy G, Simpson DAC, Bucala R, et al** : Advanced glycation end products in vitreous : Structural and functional implications for diabetic vitreous retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 2517—2523, 1998.
- 148) **Orthwerth BJ, Prabhakaram M, Nagaraj RH and Linetsky M** : The relative UV sensitizer activity of purified advanced glycation end products. *Photochem Photobiol* 65 : 666—672, 1997.
- 149) **Deguine V, Menasche M, Ferrari P, Fraisse L, Pouliquen Y, et al** : Free radical depolymerization of hyaluronan by maillard reaction products Role in liquefaction of aging vitreous. *Int J Biol Macromol* 22 : 17—22, 1998.
- 150) **Kishi S, Shimizu K** : Posterior precortical vitreous pocket. *Arch Ophthalmol* 108 : 979—982, 1990.
- 151) 未発表データ
- 152) **Pradhan R, Fong D, March C, Jack R, Rezapour G, Norris K, et al** : Angiotensin-converting enzyme inhibition for the treatment of moderate to severe diabetic retinopathy in normotensive type 2 diabetic patients. A pilot

- study. *J Diabetes Complications* 16 : 377—381, 2002.
- 153) **Frank RN** : Potential new medical therapies for diabetic retinopathy : Protein kinase C inhibitors. *Am J Ophthalmol* 133 : 693—698, 2002.
- 154) **Pradhan R, Fong D, March C, Jack R, Rezapour G, Norris K, et al** : Angiotensin-converting enzyme inhibition for the treatment of moderate to severe diabetic retinopathy in normotensive type 2 diabetic patients. A pilot study. *J Diabetes Complications* 16 : 377—381, 2002.

Comment : 箕田 健生

本報告は特発性黄斑円孔，加齢黄斑変性，糖尿病網膜症の3疾患の病態を分子生物学的手法によって研究したものであり，その主な成果は以下の3点に要約される。

1. 生理活性物質アンギオテンシンIIの合成系の一つであるキマーゼ活性を硝子体液で測定したところ，特発性黄斑円孔は他の2疾患に比べ有意に高値を示した。次に著者らは中心窩ミュラ細胞が網膜幹細胞様の機能を有し，キマーゼが中心窩ミュラ細胞のアポトーシスを惹起させることで，中心窩の支持構造が消失し，黄斑円孔が生じるのではないかという作業仮説を立て，以下の実験結果を得た。1) サルの網膜に神経幹細胞のマーカーであるネスチン免疫染色を行ったところ，黄斑部にネスチン陽性細胞が高頻度に認められた，2) 硝子体中に高濃度のキマーゼを投与すると，中心窩周囲にアポトーシスを示すTUNEL陽性細胞が散見された，3) bFGFを加えて脱分化させた培養ミュラ細胞にキマーゼを添加するとTUNEL陽性細胞が出現した。以上のことから，中心窩に存在する幹細胞様の性質を有するミュラ細胞がキマーゼによってアポトーシスをきたし，その結果として特発性黄斑円孔が発症するという仮説が裏付けられた。

2. 加齢黄斑変性の危険因子の一つ，酸化LDLの産生に関与しているとされているparaoxonase(PON)遺伝子多型を本症患者で検討した結果，対照との間にPON多型の分布に有意差を認め，本症の病因にPON遺伝子多型が関与している可能性が示された。また近年，動脈硬化の危険因子として注目されている肺炎クラミジアのIgGおよびIgA抗体価を本症患者で測定したところ，両抗体価とも対照に比べ有意に高値であり，肺炎クラミジア感染が慢性的炎症を介して加齢黄斑変性の発症に関与している可能性が示唆された。

3. 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体では，後期糖化最終産物(AGEs)の一つであるcrossline濃度が有意に高値を示した。また，培養ミュラ細胞の培養液中にAGEsを添加するとミュラ細胞でのVEGFmRNAの発現が亢進した。このことから本症では硝子体に蓄積されたAGEsがミュラ細胞に作用してVEGFを多量に産生させて，網膜症の悪循環を形成している可能性が示された。

以上のべたように，本研究では幾つかの斬新な作業仮説の下に，3疾患の病態を様々な分子生物学的手法によって検討し，各々の仮説の信頼性を支持するエビデンスが豊富に示され，まさに日眼総会の宿題報告にふさわしい内容であると思われる。特に黄斑円孔の成因に関しては近年，後部硝子体皮質前ポケット後壁を形成する硝子体ゲルによる網膜硝子体牽引が主因とされているが(Kishi et al, 1996)，硝子体ゲルと接する中心窩ミュラ細胞の異常も本症の発症に関与している可能性がある(Gass, 1999)。したがって，著者らの中心窩ミュラ細胞が網膜幹細胞様の機能を有し，キマーゼ等の作用でアポトーシスを生じ，硝子体牽引とあいまって黄斑円孔が形成されるという仮説は独創的であり，黄斑円孔ばかりでなく，他の黄斑疾患の病態を考えるうえでも興味深い。網膜幹細胞がciliary marginal zoneのみでなく中心窩にも存在するか，かつそのことが黄斑円孔その他の疾患の病態にどのように関与しているか，またなぜ黄斑円孔の患者で硝子体中のキマーゼ活性が上昇するか，これらの諸問題が著者らの今後の研究によって更に解明されることが期待される。