

第 112 回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

生活習慣病と眼

糖尿病硝子体網膜症の予防的治療戦略

畑 快右

九州大学大学院医学研究院眼科学分野

共同研究者

石橋 達朗

藤澤 公彦, 本多 貴一, 園田 康平, 江内田 寛, 安田 美穂

中尾新太郎, 望月 泰敬, 野田 佳宏, 向野利一郎, 狩野久美子

三浦 宗希, 喜多 岳志, 川原 周平, 有田 量一, 荒川 聡, 松原 千華

他教室員一同

(九州大学大学院医学研究院眼科学分野)

清原 裕(九州大学大学院医学研究院環境医学分野)

土井 康文(九州大学大学院医学研究院病態機能内科学)

久保 充明(理化学研究所遺伝子多型研究センター)

下川 宏明(東北大学大学院医学系研究科循環器病態学)

松井 孝明, 熊野 祐司(大島眼科病院)

山名 泰生(山名眼科医院)

篠田 久治(しのだ眼科医院)

岡田 朗(岡田内科医院)

鍵本 忠尚(Aquamen Biopharmaceuticals, K. K.)

Lloyd Paul Aiello (Department of Ophthalmology, Harvard Medical School)

Ali Hafezi-Moghadam (Department of Ophthalmology, Harvard Medical School)

要 約

糖尿病眼では網膜ばかりでなく、比較的早期から硝子体にも病的変化を生じて病態形成に関与することが示唆されており、単に糖尿病網膜症というより糖尿病硝子体網膜症(diabetic vitreoretinopathy: DVR)として病態を捉える必要がある。良好な視機能を維持していくうえでは予防的治療が重要であり、複数の段階での介入手段が考えられる。

まず、第一段階は健診などによる介入であるが、その際、適正な糖尿病の診断基準が用いられているかが問題となる。これまで我が国では海外での報告に従った基準を用いてきたが、網膜症の発症しやすさには人種間の違いもあると考えられ、我が国独自の基準が必要である。我々は、1998年より福岡県久山町における住民健診に参加し、血糖値と網膜症発症の相関について検討したところ、空腹時血糖値 116 mg/dl 以上で網膜症を発症し

やすいことが分かり、糖尿病の診断基準としてこれまでより厳しい基準が必要であると考えられた。2007年には、データの精度を上げるため久山町全住民へ眼科健診への参加を促し、70%以上の受診率を得ることができた。今後、大規模な眼科健診を長期的に行うことにより、日本で最大規模の疫学研究が可能となり、種々の眼疾患の危険因子・防御因子および疾患と生活習慣や環境要因との関係を明らかにできる可能性がある。

第二段階として、網膜症を早期の段階で治療介入し、進行させないことが重要である。早期の網膜血管病変においては白血球と血管内皮との相互作用の重要性が示唆されている。そのメカニズムの一因として我々は、糖尿病網膜の血管系において Rho/ROCK 経路の活性亢進が関与していることを初めて明らかにし、ROCK の選択的阻害剤である fasudil によって網膜血管障害を阻止で

別刷請求先：812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学大学院医学研究院眼科学分野 畑 快右

(平成 20 年 10 月 8 日受付, 平成 20 年 12 月 11 日受理) E-mail: hatachan@med.kyushu-u.ac.jp

Reprint requests to: Yasuaki Hata, M. D. Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received October 8, 2008 and accepted in revised form December 11, 2008)

きる可能性を示した。

第三段階として、期せずして増殖性病変に至った場合、網膜面上に形成される増殖膜の瘢痕収縮は牽引性網膜剝離を引き起こし、重篤な視力障害の直接的原因となる。増殖膜を構成する細胞群の一つと考えられる硝子体細胞を分離・培養し、コラーゲンゲルに包埋してヒト硝子体液で刺激すると (*in vitro* 瘢痕収縮モデル)、増殖糖尿病網膜症の硝子体液では強い収縮が誘導され、その作用は主に形質転換増殖因子 $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) に依存していることを明らかにした。さらに、未だ確立していない増殖性網膜硝子体疾患に対する予防的治療薬として、ROC-

K 阻害剤 (fasudil やスタチン系薬剤) の有効性について動物モデルを用いて明らかにした。

今後、より厳しい糖尿病の診断基準を用いることの有用性を疫学的に証明するとともに、ROCK 阻害剤がヒトに対して真に有効であることを示していく必要があるが、近い将来、より踏み込んだ糖尿病硝子体網膜症の予防的治療法が確立されることを期待する。(日眼会誌 113 : 379—402, 2009)

キーワード : 予防, ROCK, TGF- β , 硝子体細胞, スタチン

A Review

Preventive Strategy for the Treatment of Diabetic Vitreoretinopathy

Yasuaki Hata

Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Abstract

Despite considerable recent advances in vitreoretinal surgery, generally performed in more advanced stages of diabetic vitreoretinopathy (DVR), a satisfying visual acuity cannot always be achieved. Even in the early DVR stages that might be detected by routine eye exams, management of general factors, such as blood glucose concentration and blood pressure, currently constitutes the only proven preventive measures. New approaches for amelioration and treatment of DVR are needed.

The Hisayama study, an ongoing prospective cohort study of cardiovascular disease and its risk factors in a community in Hisayama Town adjoining Fukuoka City, revealed that the cut-off point for diagnostic fasting glucose level is lower (116 mg/dl) than that of the current diagnostic criteria (126 mg/dl), indicating that more rigid diagnostic criteria might reduce the incidence of DVR in the Japanese population.

In early stages of DVR, leukocyte adhesion in the retinal microvasculature substantially contributes to DVR. We investigated the involvement of the Rho/ROCK pathway in diabetic microvasculopathy and the therapeutic potential of fasudil, a selective ROCK inhibitor, and demonstrated that the Rho/ROCK pathway plays a critical role in leukocyte adhesion in diabetic retinal microvasculature and endothelial

damage. Fasudil protects the vascular endothelium at least in part by inhibiting neutrophil adhesion and reducing neutrophil-induced endothelial injury via endothelial nitric oxide.

In later stages of DVR, namely proliferative diabetic retinopathy, tractional retinal detachment associated with a cicatricial contraction of proliferative membranes can cause severe vision loss. We demonstrated the possible involvement of hyalocytes in proliferative membrane formation and its contraction mainly mediated through the function of TGF- $\beta 2$ resulting in myofibroblastic transdifferentiation and phosphorylation of the myosin light chain, a downstream mediator of ROCK. ROCK inhibition by fasudil or statins successfully inhibited cicatricial contraction of the proliferative membranes both *in vitro* and *in vivo*.

Further studies for direct evidence demonstrating whether altered diagnostic criteria of diabetes may lead to a lower incidence of DVR and determination of the therapeutic potential of ROCK inhibition in the clinic could provide new avenues of intervention for inhibiting DVR.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113 : 379—402, 2009)

Key words : Prevention, ROCK, TGF- β , Hyalocytes, Statins

I 緒 言

日本を含めた先進国において、糖尿病網膜症が後天性

失明の主因となって久しいにもかかわらずその病態解明と治療法開発は未だ十分とはいえず、その失明予防対策は社会的な重要課題の一つとなっている。各個人の遺伝子

特性や生活習慣から網膜症の発症・増悪のしやすさを予測したうえで早期から介入していく一次および二次予防医療の重要性が増しており、いったん進行した病態に対しては侵襲の強い手術を回避したり、あるいは手術を補助するような薬剤の開発や再生医療の発展によって、より良好な視機能を保持する三次医療の確立も 21 世紀の眼科医療に課せられている。

網膜症の基本病態は高血糖に伴う血管原生病変である¹⁾。それに加えて近年、検眼鏡的に硝子体の変化が認識される以前から、硝子体には病的変化が生じていることが明らかになってきている。硝子体は 98~99.7% の水分と、ヒアルロン酸や type II コラーゲンなどから構成され、laminin, fibronectin などの細胞外マトリックスを介して部分的に網膜と癒着している。この網膜硝子体界面は、糖尿病をはじめとした種々の網膜硝子体疾患における病変の主座となりうるため、網膜硝子体界面の病態を正確に捉え、制御する必要がある。近年、網膜硝子体界面における硝子体細胞(hyalocytes)の生理的・病的意義が注目されつつある²⁾。糖尿病眼の硝子体を観察すると、その硝子体は液化しにくく後部硝子体剝離が起こりにくい。また、異常なコラーゲンの架橋や非酵素的糖化などが早期から観察される。さらに、マクロファージ系細胞(硝子体細胞を含む)の増加や形態変化が起こっており^{3)~6)}、これらの変化が黄斑浮腫の病態を修飾し、さらには増殖性病変の誘因となるばかりでなく形質転換した硝子体細胞が病態を悪化させる可能性が明らかになりつつある。

このように、糖尿病眼においては網膜内ばかりでなく比較的早期から硝子体も病的変化を来しており、単に網膜症というより、糖尿病硝子体症、あるいは糖尿病硝子体網膜症として病態を捉えて治療戦略を練る必要がある。また、硝子体腔を治療の場として活用していく考え方が定着しつつある。そこで、まだ一般的ではないものの、本稿では病態を捉えた表現をする場合はできるだけ「糖尿病硝子体網膜症：diabetic vitreoretinopathy (DV-R)」という病態名を用いたい。

II 糖尿病網膜症の疫学

治療の基本は発症の予防(一次予防)である。ある程度病態が進行してからの治療法開発・発展には目覚しいものがある一方で、視力維持・改善には限界があり社会的失明に至る症例が後を絶たない^{7,8)}。健診などによる介入で、糖尿病を含めた全身状態、網膜症の有無を把握し、長期にわたり追跡していくことが重要であり、VISION 2020 に掲げる「予防可能な疾患による失明の撲滅」という観点からすると、むしろその重要性は高まっているといえる。

久山町研究は 1961 年から九州大学医学部第二内科で 40 歳以上の住民を対象に行われている前向きコーホー

表 1 糖尿病網膜症を診断する血糖値の最適値

	空腹時血糖値	2 時間血糖値	HbA1c
最適値	116 mg/dl	200 mg/dl	5.7%
敏感度(%)	86.5	86.5	86.5
特異度(%)	87.3	89.6	90.1

ト調査である。久山町は年齢構成・職業構成・栄養素摂取状況などが、全国平均とよく一致しており、日本人の標準的な集団と考えられている。1988 年から全員に糖負荷試験を実施しており、糖尿病患者の早期発見に力を注いでいる。1998 年から九州大学眼科も住民健診に参加し、糖尿病網膜症をはじめとした種々の眼疾患の実態調査を行っている。

これまでの解析で、糖尿病の厳格な診断基準を採用し早期に治療を開始することにより糖尿病網膜症の発症を抑制することができる可能性があることが明らかにされた。我々は、新規に網膜症を発症する患者がどれくらいいるか、またその危険因子は何であるかを検討した。具体的には 1998 年の受診者をベースラインのコーホート集団と設定し、2003 年、2004 年に追跡調査を行った。年齢、性別、空腹時血糖値、糖負荷後 2 時間血糖値、HbA1c、糖尿病罹病期間、高血圧、高脂血症、喫煙、飲酒、Body Mass Index、白血球数についてロジスティック回帰分析法を用いて糖尿病網膜症の発症と関連のある危険因子を探索した。その結果、糖尿病網膜症の 5 年発症率は 7.5% で過去の海外の報告と比較して低い傾向であった。また、危険因子分析ではこれまでの報告と同様に空腹時血糖値と糖尿病罹病期間が有意に関係していた。現在の糖尿病の診断基準は欧米の調査により、網膜症が出現する血糖レベルは空腹時血糖値 126 mg/dl 以上、または糖負荷後 2 時間あるいは随時血糖値 200 mg/dl 以上と推測されているが、人種が違えばこの基準が異なることが考えられる。そもそもこの基準は、網膜症を高感度で検出できる閾値という海外からの過去の報告をもとに決定された基準であるが^{9)~12)}、眼底所見の評価法に欠点があり、初期の微細な変化が見過ごされている可能性が指摘されており、126 mg/dl 以下の空腹時血糖の症例でも網膜症を認める例があることから、診断基準の見直しを要するともいわれている。

そこで久山町健診の結果から、糖尿病診断の日本基準について検討した。その結果、日本人の糖尿病の診断基準は空腹時血糖値 116 mg/dl、2 時間値 200 mg/dl、HbA1c 5.7% 以上が適当ではないかと考えられた。空腹時血糖値は現在の基準より 10 mg/dl も低い結果となった¹³⁾。言い換えれば、日本人において網膜症の発症を抑制するためには、空腹時血糖値を 116 mg/dl 前後に設定する必要があると考えられた(表 1)。この基準を用いて糖尿病の血糖コントロールをしていくことで、網膜

表 2 遺伝子多型と網膜症(臨床背景)

	DR(-)	mild-moderate NPDR	severe NPDR<
症例数(計 500)	159	128	213
性別(男性:女性)	91:68	70:58	121:92
年齢(歳)	66.2±11.8	67.5±10.7	63.4±11.3*
糖尿病罹病期間(年)	11.2±8.5	16.8±11.0*	17.3±10.6*
Body Mass Index(BMI)(kg/m ²)	24.1±3.8	23.6±3.8	23.7±3.9
HbA1c(%)	7.0±1.3	7.2±1.3	7.3±1.6
腹囲(cm)	87.0±9.7	85.9±10.0	85.2±10.4
収縮期血圧(mmHg)	129.4±15.0	129.2±17.2	135.6±19.0*
拡張期血圧(mmHg)	71.9±9.4	70.2±10.6	75.0±12.2*
トリグリセライド(mg/dl)	133.73±70.14	119.63±76.95	125.97±68.16
総コレステロール(mg/dl)	193.78±35.04	193.19±30.73	190.07±39.39
HDL コレステロール(mg/dl)	55.58±15.96	56.92±14.18	49.61±14.43*

DR: diabetic retinopathy, NPDR: non-proliferative DR

症の発症患者そのものの減少も期待できる。

2007 年度には再度大規模な住民健診を行い、3,000 人以上の母集団を設定することができた。これは 40 歳以上の対象者の 70% 以上に相当し、疫学的に評価できる母集団の設定ができたものと考えている。過去の母集団の追跡も同時に行っていくが、今後、2007 年度に設定した母集団の追跡調査を行うことで、5 年後、10 年後により意義のある疫学調査へと発展させることができると思われる。

III 糖尿病網膜症に関与する遺伝子多型

人間の外見、性格などは個人によって異なる。同じような生活習慣であっても、生活習慣病に罹患する人もいれば、罹患しない人もいる。さらには、同じ薬剤を服用しても、効果のある場合もあれば、逆に副作用のみが目立つ場合があり、個人によって反応が異なる。これらヒトの多様性は環境要因と遺伝要因が複雑に影響を及ぼし合って決定されているものと考えられている。この多様性を遺伝要因の面から規定しているのが DNA 多型であり、比較的罹患者数の多い common disease の遺伝的背景として存在していると考えられている。Single nucleotide polymorphism (SNP) はゲノム上で最も単純で数多く存在する多型であり、それらが遺伝子領域内に存在する場合、その遺伝子の機能や発現量、発現時期、発現の臓器特異性などに影響を及ぼし、疾患・病態に直接かかわっている可能性が高い。これらの遺伝子領域内 SNP を解析することにより、common disease の関連遺伝子(群)を単離することで、遺伝的側面を解明し、最終的には個々の遺伝子型に応じたオーダーメイド医療の実現へとつながる可能性がある。既に国内においても生活習慣病である心筋梗塞や糖尿病、あるいは糖尿病性腎症においても疾患感受性にかかわる因子を SNP 解析により解明しようとする試みが進められており、いくつかの候補遺伝子が同定されている。そこで今回、SNP 解析

により糖尿病網膜症の発症、重症化にかかわる因子の遺伝的側面からの解析を試みた。

方法:九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員会、および関連施設における倫理審査委員会の承認を得、文書による同意の得られた 2 型糖尿病患者 500 名の末梢血を採取し、血清、血漿および DNA を抽出した。患者を網膜症なし(n=159)、軽症および中等度網膜症あり(mild-moderate NPDR, n=128)、重症網膜症(網膜光凝固以上の治療を要する severe NPDR<, n=213)の 3 群に分類し、DNA サンプルを連結可能匿名化したうえで網膜症の発症および重症化に関与する可能性のある候補遺伝子の SNP について解析した。

臨床背景:表 2 に示すように、軽症および中等度群では糖尿病罹病期間のみが網膜症(-)群と比較して有意に長かった。重症群では網膜症(-)群と比較し、年齢が有意に低く、罹病期間は長期間であり、さらに収縮期・拡張期血圧は有意に高く、HDL コレステロールは低下していた。このことから、臨床背景として網膜症の重症化には糖尿病の若年発症、高血圧、低 HDL コレステロール血症が関与している可能性が示唆された。

高血圧に関しては、海外の研究においても糖尿病患者は高率に高血圧を合併しており¹⁴⁾、血圧コントロールは網膜症の進行を有意に抑制することが報告されている¹⁵⁾。今回の結果から、日本人においても網膜症の進行を防ぐためには血圧のコントロールも併せて行うことが重要であると考えられた。さらに、コレステロールについては、海外のコーホート研究において総コレステロール、LDL コレステロールの網膜症の重症度との相関については一定の見解を得ていないが、低 HDL コレステロールは有意に相関していることが複数の報告において示されており¹⁶⁾、今回の結果もそれを支持するものであった。低 HDL コレステロール血症が糖尿病網膜症の進行にかかわるメカニズムについては現在のところ詳細は明らかでないが、近年 HMG-CoA 変換酵素阻害薬で

表 3 網膜症発症への single nucleotide polymorphisms(SNPs)の関与

SNP	rsID	genotype, n(%)	M : m, n(%)	p 値			
					MM	Mm	mm
VEGF	T1498C	rs833061 網膜症(-)	80(50.3)	66(41.5)	13(8.2)	226(71.1) : 92(28.9)	0.4175
		網膜症(+)	164(48.2)	138(40.6)	38(11.2)	466(68.5) : 214(31.5)	
G1190A	rs13207351	網膜症(-)	13(8.2)	66(41.5)	80(50.3)	92(28.9) : 226(71.1)	0.4618
		網膜症(+)	37(10.9)	139(40.8)	165(48.4)	213(31.2) : 469(68.8)	
G1154A	rs1570360	網膜症(-)	122(76.7)	34(21.4)	3(1.9)	278(87.4) : 40(12.6)	0.4095
		網膜症(+)	253(74.2)	77(22.6)	11(3.2)	583(85.5) : 99(14.5)	
C634G	rs2010963	網膜症(-)	31(19.5)	78(49.1)	50(31.4)	140(44.0) : 178(56.0)	0.7729
		網膜症(+)	74(21.8)	158(46.5)	108(31.8)	306(45.0) : 374(55.0)	
C7T	rs25648	網膜症(-)	109(68.6)	48(30.2)	2(1.6)	266(83.6) : 52(16.4)	0.8857
		網膜症(+)	235(68.9)	98(28.7)	8(2.3)	568(83.3) : 114(16.7)	
KDR	G1192A	rs2305948 網膜症(-)	122(76.7)	36(22.6)	1(0.6)	280(88.1) : 38(11.9)	0.3579
		網膜症(+)	250(73.3)	86(25.2)	5(1.5)	586(85.9) : 96(14.1)	
A1719T	rs1870377	網膜症(-)	59(37.1)	78(49.1)	22(13.8)	196(61.6) : 122(38.4)	0.2004
		網膜症(+)	107(31.5)	176(51.8)	57(16.8)	390(57.4) : 290(42.6)	
T604C	rs2071559	網膜症(-)	92(57.9)	56(35.2)	11(6.9)	240(75.5) : 78(24.5)	0.2481
		網膜症(+)	175(51.3)	141(41.3)	25(7.3)	491(72.0) : 191(28.0)	
ROCK	C115634T	rs1515219 網膜症(-)	68(42.8)	65(40.9)	26(16.4)	201(63.2) : 117(36.8)	0.0488
		網膜症(+)	112(32.9)	161(47.4)	67(19.7)	385(56.6) : 295(43.4)	
C125592A	rs9808232	網膜症(-)	68(42.8)	65(40.9)	26(16.4)	201(63.2) : 117(36.8)	0.0488
		網膜症(+)	112(32.9)	161(47.4)	67(19.7)	385(56.6) : 295(43.4)	
C128522T	rs726843	網膜症(-)	68(42.8)	65(40.9)	26(16.4)	201(63.2) : 117(36.8)	0.0488
		網膜症(+)	112(32.9)	161(47.4)	67(19.7)	385(56.6) : 295(43.4)	
C151504G	rs2290156	網膜症(-)	33(20.8)	77(48.4)	49(30.8)	143(45.0) : 175(55.0)	0.0503
		網膜症(+)	91(26.7)	170(49.9)	80(23.5)	352(51.6) : 330(48.4)	

VEGF : vascular endothelial growth factor

あるスタチン系の薬剤は中性脂肪、総コレステロール、LDL コレステロールを低下させる一方で HDL コレステロールを上昇させることが報告されている¹⁷⁾。スタチン系の薬剤は糖尿病に伴う心血管合併症のリスクを低下させることが示唆されており¹⁸⁾、網膜症においても進行のリスクを低下させる可能性が期待されている。HDL コレステロール上昇を介した作用もスタチン系薬剤の多彩なメカニズムの一つとして含まれる可能性があると考えられ、その網膜症の進行に対する有効性についてもさらなる検討が期待される。

SNP 解析結果 : 今回は、網膜血管透過性亢進や血管新生に関与し、糖尿病網膜症の病態形成に深く関与することがよく知られているサイトカインである VEGF (vascular endothelial growth factor : 血管内皮増殖因子) 遺伝子について、これまでの報告において網膜症の発症および重症化への関与が指摘されているプロモーター領域に位置する 5 箇所の SNP^{19)~21)} について、また、VEGF のレセプターである KDR 遺伝子については、糖尿病と同様に生活習慣病である冠動脈性心疾患 (coronary heart diseases : CHD) の発症に関与することが報告されている 3 箇所の SNP²²⁾ について、さらに、今回我々が着目した Rho-kinase (ROCK) 遺伝子については、体血管抵抗および血圧上昇への関与が報告されている 4 箇所の SNP²³⁾ について解析を行った。

分類した 3 群を網膜症(-)群と(+)群(軽症, 中等度, 重症)の 2 群に再度分類, 比較し網膜症の発症について(表 3), さらに, 中等度以下(網膜症(-), 軽症, 中等度)と重症の 2 群に分け, 網膜症の重症化について(表 4)検討した。その結果, 本検討の集団においては VEGF 遺伝子プロモーター領域における SNP は網膜症発症・重症化のいずれにも有意な相関を認めなかった。日本人における過去の同様の報告では, C634G の SNP が糖尿病網膜症に関与するという結果であった。しかし, その報告においても網膜症患者全体では関与を示す一方で, 増殖糖尿病網膜症 (PDR) 群のみでは関与を示さないという結果であった²⁴⁾。その関与の有無を明らかにするには, より大きな集団における研究や, 前向きの研究が必要であると思われた。また, KDR 遺伝子における SNP も網膜症の発症, 重症化のいずれにも相関を認めなかった。一方, ROCK2 遺伝子における SNP は網膜症の重症化には関与しないと考えられたが, 検討した 4 種類の SNP のうち 3 種類において網膜症(-)群と網膜症(+群との間で有意差を認め, 網膜症発症に関与する可能性が示唆された。今後, そのメカニズムも含めて症例数を増やしてさらなる検討が必要であると考えられた。

表 4 網膜症重症化への SNPs の関与

SNP	rsID		genotype, n(%)			M : m, n(%)	p 値	
			MM	Mm	mm			
VEGF	T1498C	rs833061	<moderate NPDR	142(49.5)	118(41.1)	27(9.4)	402(70.0) : 172(30.0)	0.5789
			severe NPDR<	102(48.1)	86(40.6)	24(11.3)	290(68.4) : 134(31.6)	
G1190A	rs13207351		<moderate NPDR	27(9.4)	118(41.1)	142(49.5)	172(30.0) : 402(70.0)	0.6698
			severe NPDR<	23(9.9)	87(37.3)	103(44.2)	133(31.2) : 293(68.8)	
G1154A	rs1570360		<moderate NPDR	220(76.7)	59(20.6)	8(2.8)	499(87.0) : 75(13.0)	0.3763
			severe NPDR<	155(66.5)	52(22.3)	6(2.6)	362(85.0) : 75(15.0)	
C634G	rs2010963		<moderate NPDR	58(20.2)	132(46.0)	97(33.8)	248(43.0) : 326(57.0)	0.2726
			severe NPDR<	47(22.2)	104(49.1)	61(28.8)	198(46.7) : 226(53.3)	
C7T	rs25648		<moderate NPDR	196(68.3)	85(29.6)	6(2.1)	477(83.0) : 97(17.0)	0.768
			severe NPDR<	148(69.5)	61(28.6)	4(1.9)	357(83.8) : 69(16.2)	
KDR	G1192A	rs2305948	<moderate NPDR	214(74.6)	69(24.0)	4(1.4)	497(86.6) : 77(13.4)	0.9874
			severe NPDR<	158(74.2)	53(24.9)	2(0.9)	369(86.6) : 57(13.4)	
A1719T	rs1870377		<moderate NPDR	97(33.8)	148(51.6)	42(14.6)	342(59.6) : 232(40.4)	0.5187
			severe NPDR<	69(32.5)	106(50.0)	37(17.5)	244(57.5) : 180(42.5)	
T604C	rs2071559		<moderate NPDR	157(54.7)	111(38.7)	19(6.6)	425(74.0) : 149(26.0)	0.4356
			severe NPDR<	110(51.6)	86(40.4)	17(8.0)	306(71.8) : 120(28.2)	
ROCK	C115634T	rs1515219	<moderate NPDR	111(38.7)	128(44.6)	48(16.7)	350(61.0) : 224(39.0)	0.0918
			severe NPDR<	69(32.5)	98(46.2)	45(21.2)	236(55.7) : 188(44.3)	
C125592A	rs9808232		<moderate NPDR	111(38.7)	128(44.6)	48(16.7)	350(61.0) : 224(39.0)	0.0918
			severe NPDR<	69(32.5)	98(46.2)	45(21.2)	236(55.7) : 188(44.3)	
C128522T	rs726843		<moderate NPDR	111(38.7)	128(44.6)	48(16.7)	350(61.0) : 224(39.0)	0.0918
			severe NPDR<	69(32.5)	98(46.2)	45(21.2)	236(55.7) : 188(44.3)	
C151504G	rs2290156		<moderate NPDR	65(22.6)	142(49.5)	80(27.9)	272(47.4) : 302(52.6)	0.1208
			severe NPDR<	59(27.7)	105(49.3)	49(23.0)	223(52.3) : 203(47.7)	

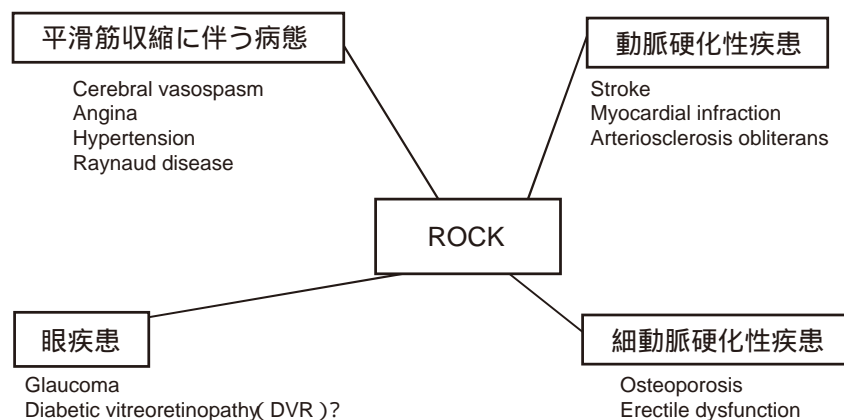


図 1 Rho-kinase (ROCK) 活性亢進と疾患・病態.

IV ROCK について

ROCK は、1990 年代半ばのほぼ同時期に、2 つの日本の研究グループと 1 つのシンガポールの研究グループから、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的蛋白質として同定された細胞内セリンスレオニンリン酸化酵素である。これまでの研究により、ROCK が平滑筋細胞の収縮のみならず、各種細胞の形態制御・遊走・遺伝子発現などの生理機能に関与していることが分かっている²⁵⁾²⁶⁾。また、ROCK は生理機能ばかりでなく、その過剰な活性化によって心血管病をはじめとした種々の病態形成に

深く関与することも明らかになってきており、ROCK 阻害薬の開発と臨床応用が期待されている²⁷⁾。眼科領域においては緑内障を標的とした治療薬の開発が進行中であるが²⁸⁾、我々は種々の網膜硝子体疾患においても ROCK 活性化の関与を推測しており、糖尿病硝子体網膜症においても同様ではないかと考え(図 1)、ROCK 阻害剤が糖尿病硝子体網膜症の予防的治療薬になりえないか、多面的に検討を進めている。

V 糖尿病による網膜血管障害と ROCK

糖尿病硝子体網膜症は血管原生病変と考えられている

表 5 糖尿病ラット網膜における Rho/ROCK 関連因子の発現変化(microarray)

遺伝子シンボル	遺伝子名	糖尿病網膜	対照	糖尿病網膜/対照比
Rhoa	Rho A	3033.447	1577.826667	1.922547682
Msn	moesin	85.24589	42.52969333	2.00438525
RGD1565043	Rho GEF10	123.4753433	93.49549333	1.320655562
Nos3	eNOS	36.60459333	69.66683667	0.525423503

eNOS：内皮型一酸化窒素合成酵素

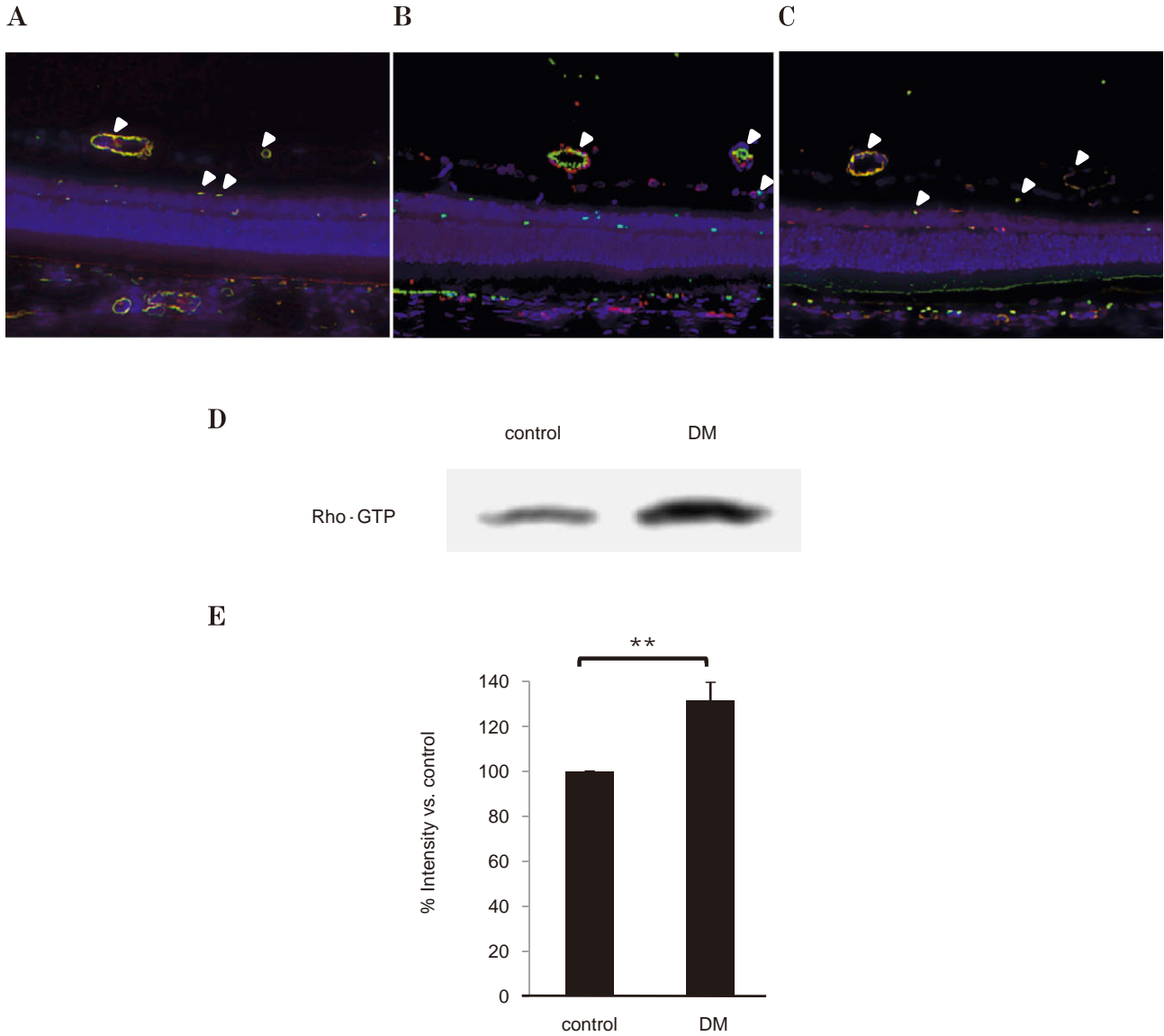


図 2 網膜血管系における Rho/ROCK の局在と活性.

パラフィン包埋した正常ラット網膜を免疫組織化学的に RhoA (A), ROCK 1 (B), ROCK 2 (C) 各抗体で検出した (original magnification : ×400). 内皮細胞は抗 CD34 (赤), RhoA, ROCK1, ROCK2 は緑で発色し, 黄色 (矢頭) が共染した血管を示す. 対照およびストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット網膜 (DM) の活性化 Rho をウエスタンブロッティングで検出し (D), 定量化した (E). ** : p < 0.01, n = 5 each.

(文献 34 より許可を得て転載)

が, これまでその発症予防としてエビデンスがあるのは血糖コントロールと血圧コントロールのみである²⁹⁾³⁰⁾. 硝子体網膜症の初期に起こる網膜血管透過性亢進や血管閉塞の少なくとも一因として白血球の血管内皮細胞への

過剰な接着による内皮傷害が示唆されている^{31)~33)}. 白血球の網膜血管への接着には内皮側の intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) と白血球側の β2 インテグリン (CD18/CD11a あるいは CD18/CD11b) の相互作用を

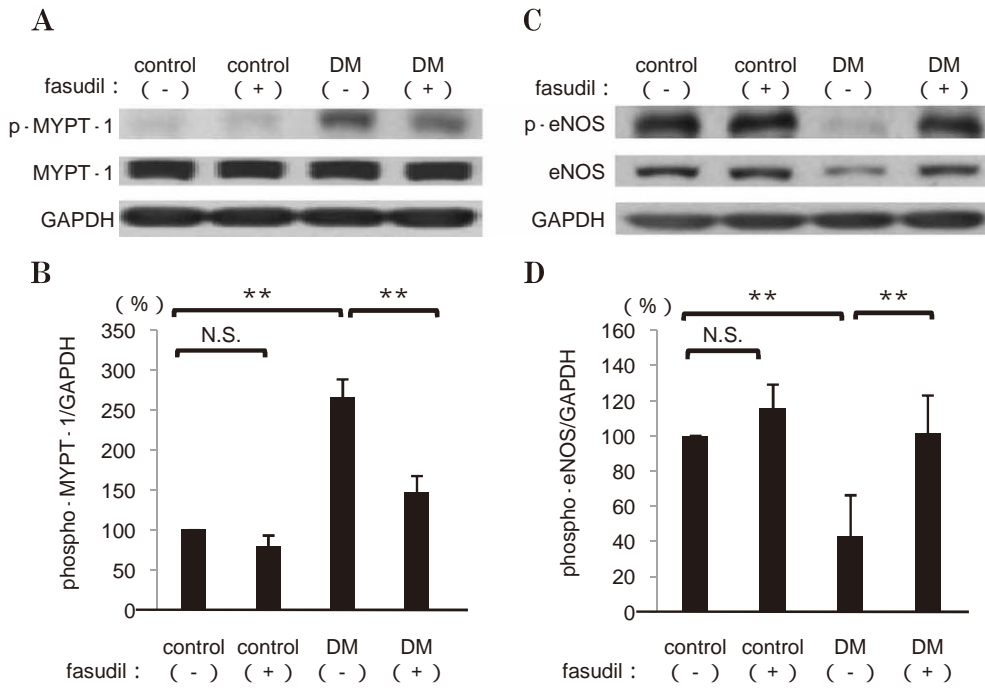


図 3 糖尿病ラット網膜における Rho/ROCK の活性化と fasudil の効果。
 ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット網膜(2週)(DM)において Rho/ROCK の下流に位置する MYPT-1 のリン酸化(p-MYPT-1)亢進(A, B)と eNOS の脱リン酸化(C, D)を認め、これらの作用は fasudil の硝子体内投与により有意に阻害された。 ** : p<0.05, N.S. : 有意差なし, n=6 each.

(文献 34 より許可を得て転載)

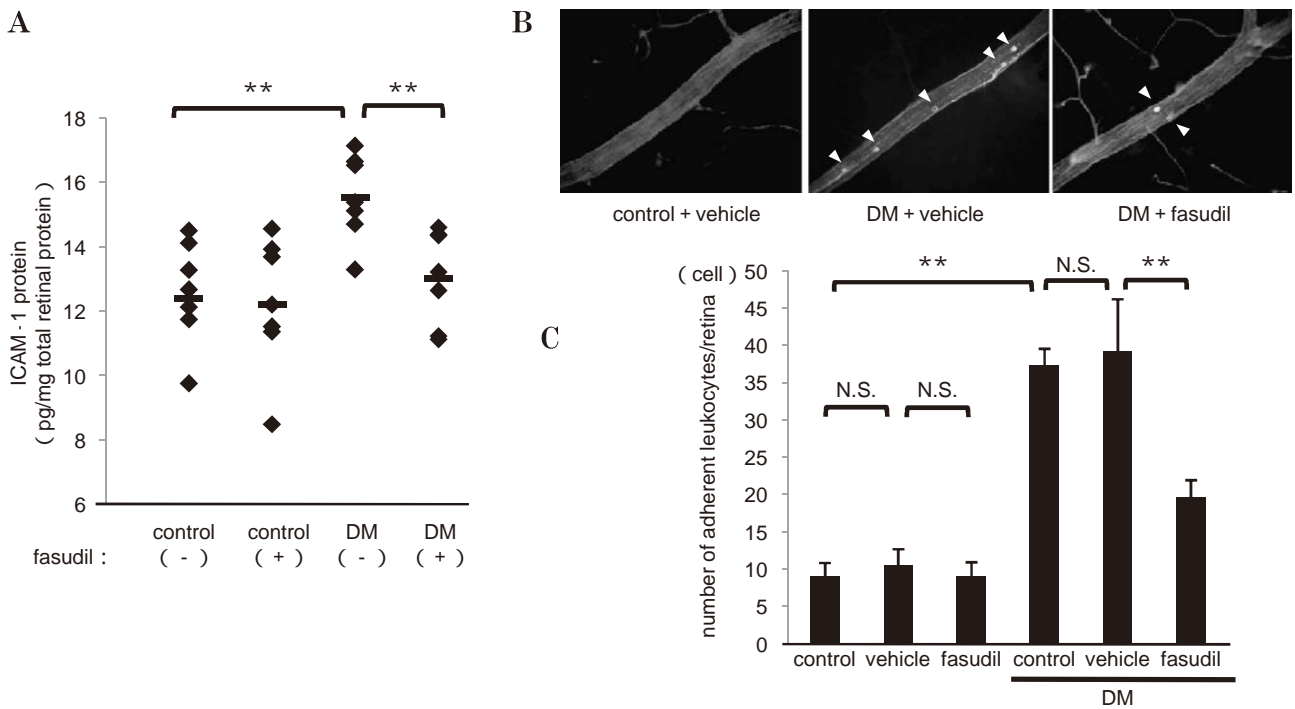


図 4 糖尿病ラット網膜における白血球接着亢進と fasudil による阻害効果。
 ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット網膜(2週)(DM)において、intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)の発現亢進(A)と網膜血管への白血球の接着亢進(B, C)を認めるが、fasudil の硝子体内投与により有意に抑制された。 ** : p<0.01, N.S. : 有意差なし, n=7 each.

(文献 34 より許可を得て転載)

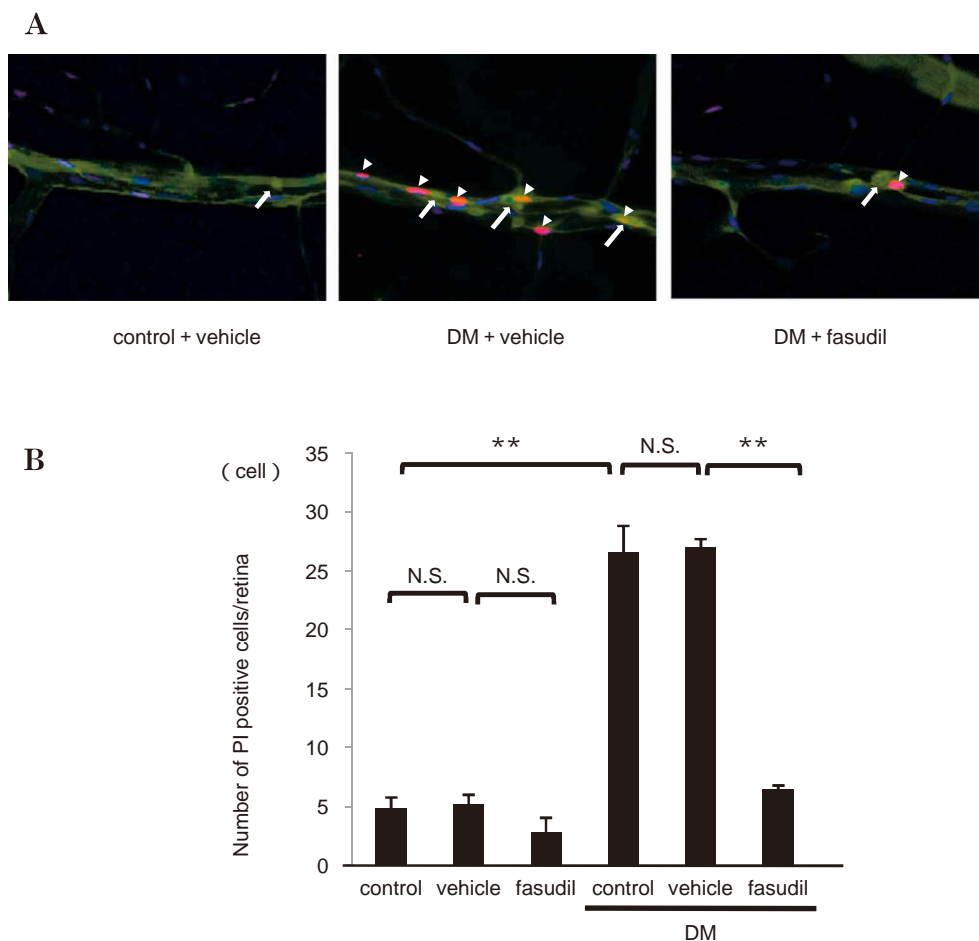


図 5 糖尿病ラット網膜における血管内皮傷害と fasudil による阻害効果。

網膜血管の内皮細胞核を青(DAPI), 傷害された内皮細胞を赤(propidium iodide: PI)で視覚化した。PI 陽性細胞(矢頭)は多くの場合, 接着した白血球(矢印)に沿って認められた。Fasudil 硝子体内投与により, PI 陽性細胞は有意に減少した。典型的な写真(A)と定量化したグラフ(B)を示す。*: $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし, $n = 5$ each.

(文献 34 より許可を得て転載)

介しており, これらの作用を抗体などによって阻害することで内皮傷害が抑制されることも実験動物レベルで明らかにされているが, 実用化には程遠く, 特にヒトでの血管障害メカニズムについては十分に解明されているとはいえない。

我々は糖尿病における接着分子の発現亢進に白血球あるいは網膜血管系における ROCK の活性亢進が関与しているのではないかと仮説のもと研究を行った。Rho/ROCK 経路は脳血管や冠動脈血管の攣縮, 高血圧, 動脈硬化などの多岐にわたる血管障害に関与することが既に報告されており, また最近では糖尿病ラットの腎障害や大動脈の障害に関与することが明らかになってきている。ROCK の選択的阻害剤である fasudil は比較的安全性が高く, 既に脳出血後の血管攣縮阻害目的に点滴薬として臨床応用されており, 肺高血圧症に対する内服薬の臨床治験も進められている。眼科領域でも ROCK 阻害剤の点眼薬が緑内障に対する眼圧降下目的に臨床応用が検討されつつある状況である。

我々はまず, ストレプトゾトシン(streptozotocin: STZ)ラット(1か月, $n = 3$)および対照ラット(同一週齢, $n = 3$)を用いて, 網膜での Rho/ROCK 関連分子の遺伝子発現が糖尿病網膜で亢進しているかを DNA-microarray を用いて検討した。その結果 RhoA, その標的蛋白である moesin, 関連蛋白である Rho GEF10 といった分子の発現亢進を認めるとともに, ROCK の活性化に伴って発現が低下することが示唆されている内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)遺伝子の発現が低下していることが確認された(表 5)。これらは遺伝子発現の結果であるが, 糖尿病網膜において Rho/ROCK 経路の活性亢進を示唆するものであった。

次に, これまで明らかにされていない網膜における Rho/ROCK 関連蛋白質の局在を免疫組織化学的に検討した。図 2 に示すように RhoA, ROCK1, ROCK2 蛋白質はいずれも網膜血管系に主に分布していた。さらに, 網膜での Rho の活性を pull down assay で評価したところ, 糖尿病ラット網膜では Rho の活性が有意に亢進し

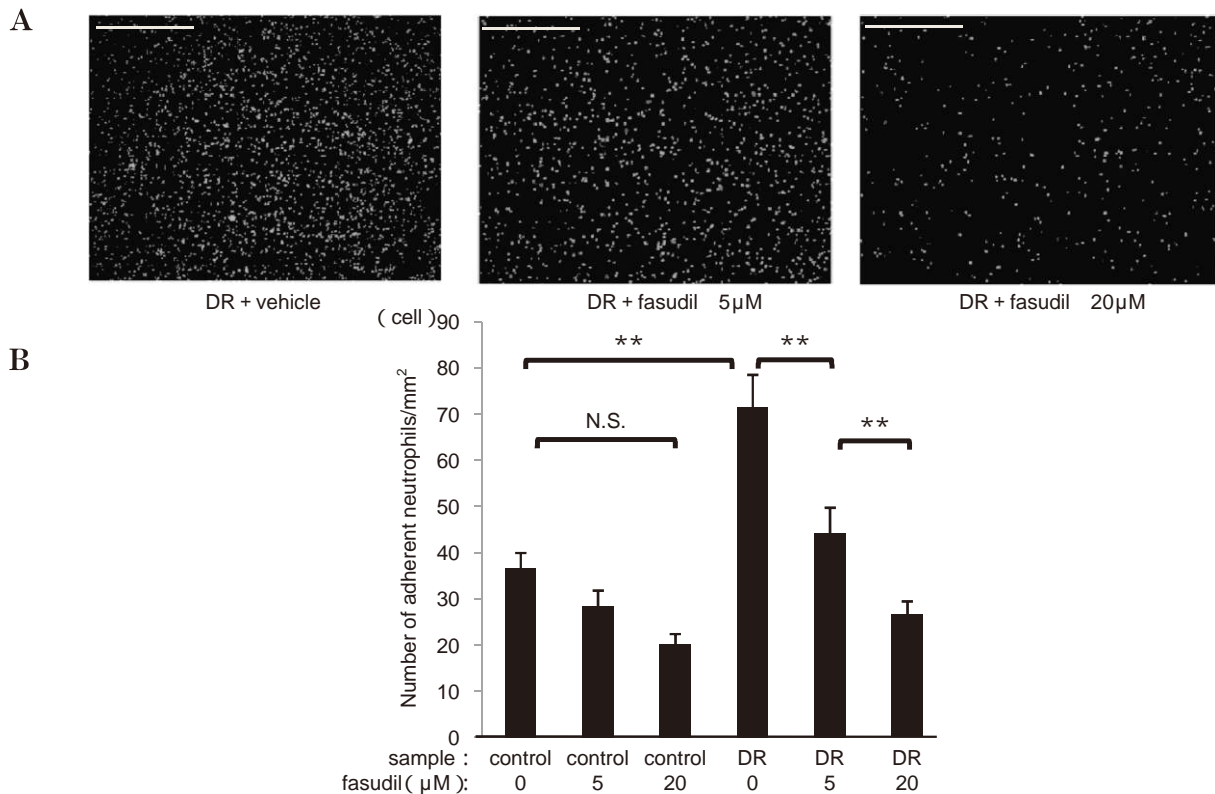


図 6 ヒト好中球の血管内皮細胞への接着と fasudil による阻害効果.

網膜症を有する患者(DR群)と健常ボランティア(対照群)から好中球を分離し Calcein-AM でラベル後, ヒト皮膚微小血管内皮細胞と共培養し, 接着好中球の数をカウントした. 典型的な写真(A)と定量化したグラフ(B)を示す. Scale bar = 100 µm. **: $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし, $n = 15$ each.

(文献 34 より許可を得て転載)

ていることが確認された. つまり, 糖尿病のラット網膜血管系において Rho/ROCK 経路の活性亢進が起きていると考えられた. また, 対照(fasudil -/+), DM(fasudil -/+)の4群(fasudil は硝子体内投与)に分け2週間後に網膜から蛋白質を抽出しウエスタンブロッティングを行うと, ROCK の標的蛋白質である MYPT-1 のリン酸化が糖尿病で亢進し fasudil 投与で有意に低下すること, eNOS の蛋白質量・リン酸化ともに糖尿病で低下するのに対し, fasudil 投与で正常化することが確認された(図3). Fasudil の硝子体内投与で流血中の白血球の接着分子に影響を与えることはなかったが, 糖尿病により亢進した ICAM-1 の発現は fasudil 投与により有意に低下し, 網膜血管にトラップされる白血球の数は有意に減少した(図4). また, 血管内皮の傷害についても評価すると fasudil 投与により著明に抑制されることが確認された(図5).

次にヒトの白血球と血管内皮細胞の共培養の系を用いて血管内皮細胞の傷害メカニズムを明らかにするとともに, ROCK 阻害剤である fasudil の効果について検討を加えた. 白血球については, 九州大学倫理審査専門委員会の承認を得, 文書による同意の得られた網膜症を有する2型糖尿病患者および健常ボランティアから末梢血を

採取し, two-step gradient technique にて好中球を抽出した. 血管内皮細胞にはヒト皮膚微小血管内皮細胞(HMVECs; Cambrex BioScience, East Rutherford, NJ)を用いた. まず好中球の接着分子についてみると, CD11a は正常群と DM 群で有意差はなく, CD11b, CD11c が DM 群で亢進していた.

血管内皮との共培養で接着能をみると, DM 群の好中球は内皮との接着能が有意に亢進しておりその接着能は fasudil を加えておくことで濃度依存性に阻害された(図6). 内皮細胞に対する傷害性も DM 群の好中球で有意に亢進しており, その傷害性は可溶性 Fas 受容体(sFasR)を添加しておくことにより濃度依存性に抑制された(図7). つまり, 好中球が接着分子を介して内皮と接着した後, 実際の内皮傷害には好中球側の FasL と内皮側の Fas の相互作用が重要であることが明らかになった. さらに, fasudil によっても好中球による内皮傷害が阻害されたが, fasudil は FasL による内皮傷害阻害作用を有しており, その作用は一酸化窒素合成酵素阻害剤である L-NAME によって消失することから(図8), fasudil は内皮細胞において一酸化窒素の産生を亢進させることによって FasL による内皮傷害経路を阻害していることが明らかになった. 最後に, 好中球の接着能・

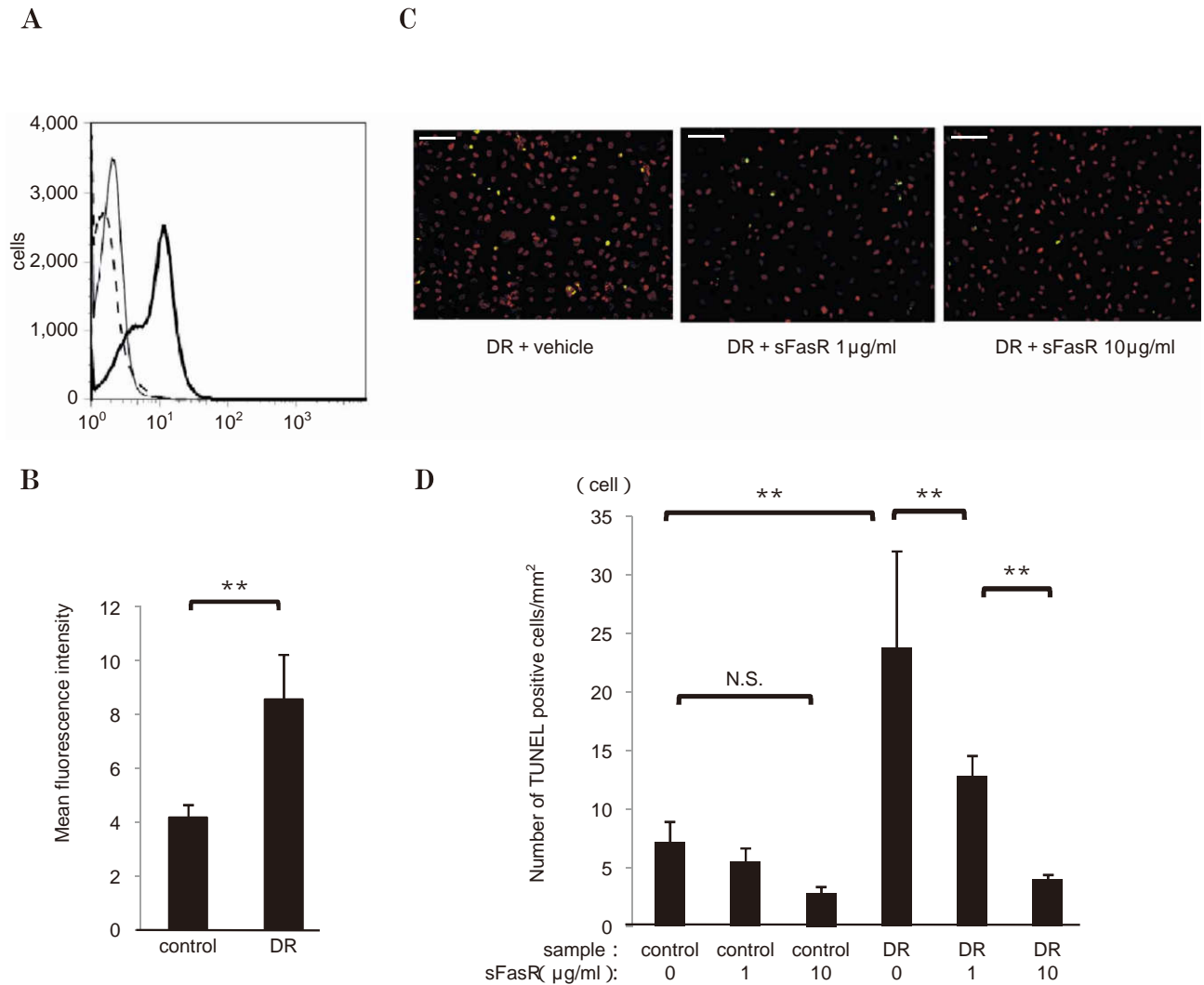


図 7 ヒト好中球による Fas/FasL 経路を介した血管内皮傷害。

A, B: 網膜症を有する患者(DR 群)では対照群と比較して好中球表面の FasL 発現が亢進していた. C, D: 内皮細胞との共培養により, DR 群の好中球は高頻度に内皮細胞の傷害を誘導し, その作用は可溶性 Fas 受容体(sFasR)により濃度依存性に阻害された. **: $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし, $n = 5$ each.

(文献 34 より許可を得て転載)

傷害能への L-NAME の影響についてみたところ, L-NAME は fasudil による接着阻害には有意な影響を示さず, fasudil による内皮傷害阻害作用を消失させることが確認された(図 9). つまり, *in vivo* において fasudil が強い内皮細胞傷害阻害作用を示したが, このことは fasudil が単に好中球の内皮細胞への接着を阻害したばかりでなく, 内皮細胞における一酸化窒素の合成を促進することによって好中球がたとえ接着したとしてもそれによる内皮傷害メカニズムを阻害する二重の効果があることを初めて明らかにしたものである³⁴⁾(図 10).

VI 増殖性病変に対する薬物による病態制御の可能性その 1

ROCK は細胞骨格であるミオシンのリン酸化に関与し α -smooth muscle actin(α -SMA)とミオシンの結合を制御する細胞内シグナル伝達分子である(図 11). 硝子

体細胞は骨髄由来のマクロファージ系細胞と考えられており³⁵⁾³⁶⁾, 本来持続的収縮能を有する細胞群ではない. しかし, 増殖性網膜硝子体疾患の硝子体中での濃度亢進が示されている形質転換増殖因子 β (transforming growth factor- β : TGF- β)³⁷⁾³⁸⁾ の存在下で培養すると持続的収縮型細胞の特徴である α -SMA を過剰発現し, いわゆる筋線維芽細胞へと形質転換する³⁹⁾. 増殖性網膜硝子体疾患の増殖膜形成に関与する細胞としてはもちろん硝子体細胞だけではなく, 網膜色素上皮細胞を用いた検討でも同様のメカニズムを確認している⁴⁰⁾.

増殖糖尿病網膜症では新生血管を含む増殖膜が網膜前・網膜硝子体界面に形成され, 新生血管そのものというより, 間質に富む増殖膜が癒痕収縮することで血管の破綻を来し一瞬にして視力低下の原因となる硝子体出血を招いたり, 牽引性網膜剝離を来すことで, 半永久的に網膜機能を障害する原因となり, さらに網膜虚血を助

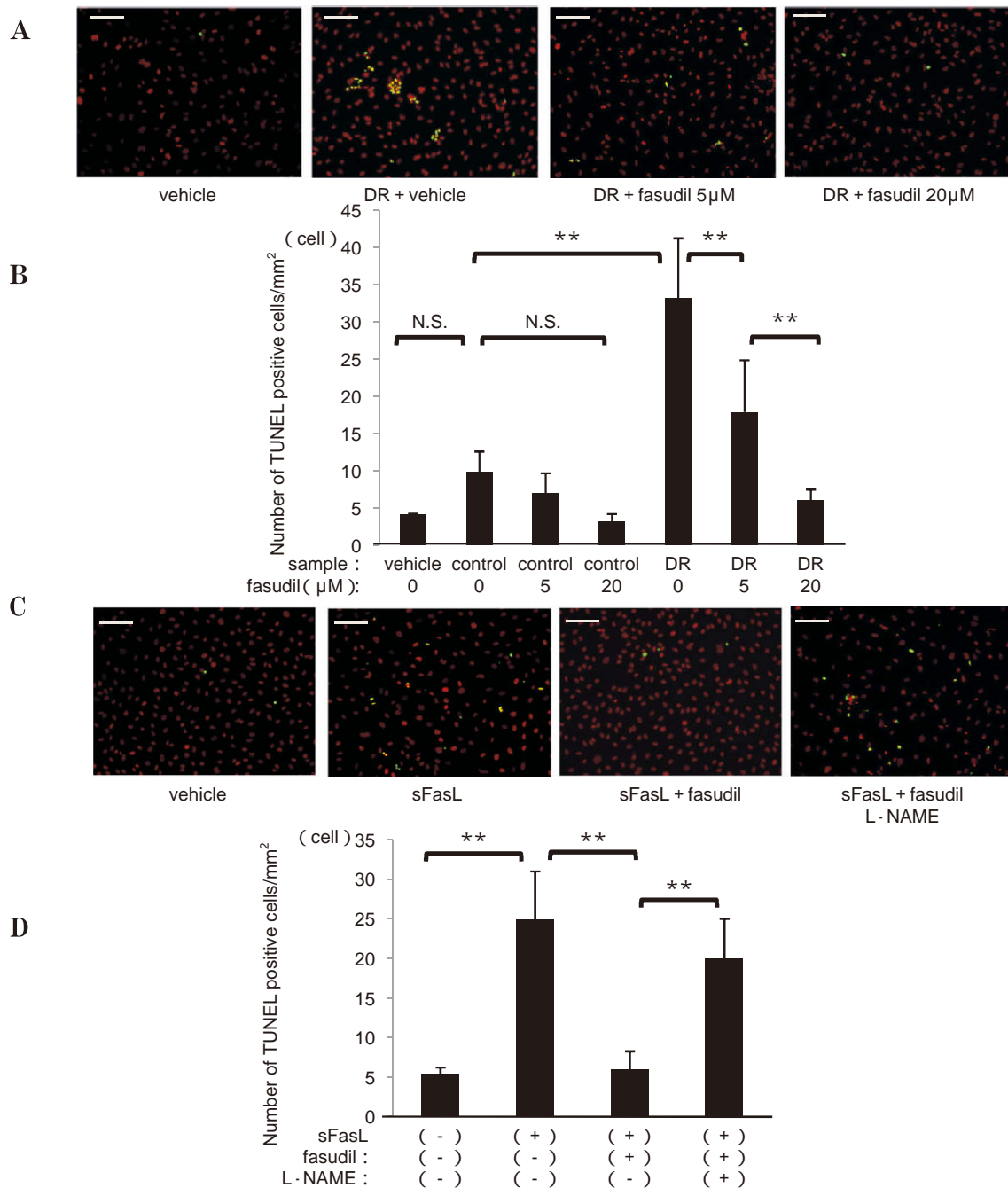


図 8 Fasudil による好中球依存性内皮傷害の抑制。

A, B: 網膜症を有する患者(DR 群)では対照群と比較して血管内皮細胞の傷害を亢進させるが, その作用は fasudil によって濃度依存性に抑制された. Scale bar = 100 µm. **: p < 0.01, N.S.: 有意差なし, n = 15 each. C, D: 可溶性 FasL (sFasL) は内皮細胞の傷害を誘導するが, その作用は fasudil によって阻害され, その阻害効果は一酸化窒素合成阻害剤である L-NAME によって有意に消失した. Scale bar = 100 µm.

** : p < 0.01, N.S.: 有意差なし, n = 4 each.

(文献 34 より許可を得て転載)

長することで血管新生緑内障が誘発されやすくなると考えられる。

現時点では外科的処置により新生血管を含む増殖膜を取り除く治療(硝子体手術)が目覚ましい進歩を遂げており, 完全失明に至る症例は着実に減少しつつある。しかし, 外科的治療には限界があるのも事実であり, 時として再増殖・再剝離などにより視機能は低下する一方で,

再手術により解剖学的な成功を取っても患者の満足には程遠く, このような症例は治療を行う医療側, 治療を受ける患者側双方にとってその精神的・肉体的苦痛は計り知れないものがある。増殖膜の瘢痕収縮メカニズムはまだ十分には解明されておらず, 我々はメカニズムを明らかにしたうえで薬物治療の可能性を検討した。

まず, 増殖性網膜硝子体疾患である増殖糖尿病網膜症

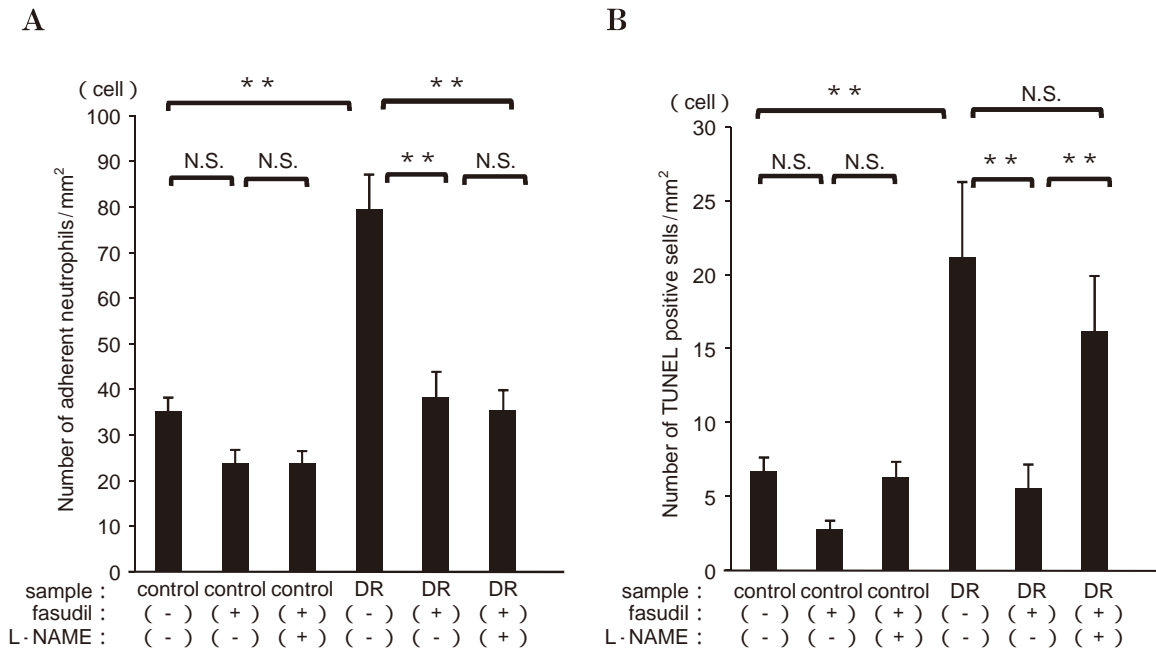


図 9 Fasudil による内皮細胞傷害の抑制効果.

A : 網膜症を有する患者(DR 群)で亢進している好中球の内皮細胞への接着能は, fasudil で阻害されるものの, L-NAME による影響を受けなかった. B : 一方, fasudil による内皮細胞傷害抑制効果は L-NAME により有意に消失した. ** : $p < 0.01$, N.S. : 有意差なし, $n = 10$ each.

(文献 34 より許可を得て転載)

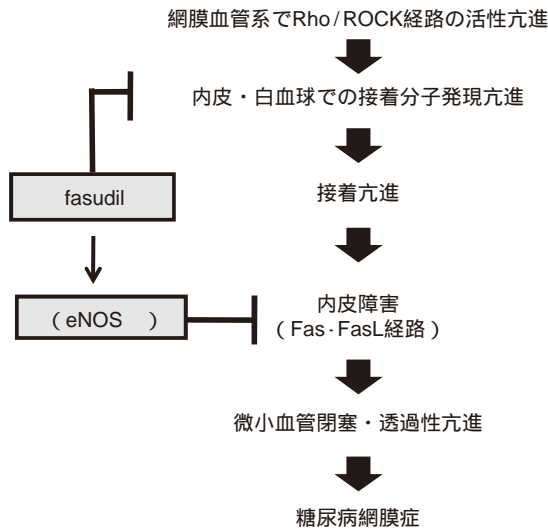


図 10 糖尿病における白血球を介した微小血管障害と fasudil による抑制メカニズム.

eNOS : 内皮型一酸化窒素合成酵素.

ならびに増殖硝子体網膜症の症例より, 文書による同意を得たうえで硝子体手術の際に硝子体液を採取し, 硝子体液中のサイトカインについて調査した. 特に細胞の持続的収縮にかかわるサイトカインの一つとして注目される TGF- β に着目し ELISA 法にて濃度測定した. その結果, 硝子体液中では TGF- β アイソフォームが主に存在しており, TGF- β の濃度が増殖糖尿病網膜症や増殖硝子体網膜症の症例で増加していた. さらに, 活性型の

TGF- β 2 濃度も測定したところ, 確かに増殖性疾患において活性型 TGF- β 2 濃度は高濃度存在していた(図 12). トータル TGF- β 2 に占める活性型 TGF- β 2 濃度の割合について検討したところ, 意外にも疾患による大きな差異はなく概ね 5% 弱という比率であった. ただし, 増殖膜局所においては不活性型 TGF- β 2 を活性型 TGF- β 2 に変換するためのプラスミン活性が高いことは容易に推測され, 実際には増殖膜局所においては活性型 TGF- β 2 が高い比率, 高濃度で存在していると考えられる.

これまで我々の報告を含めて, TGF- β 2 が細胞収縮能を有することは明らかにされているが, 実際に硝子体中の TGF- β 2 が増殖膜収縮にどれだけの関与をしているかについては不明瞭な状況にあった. そこで, ヒト硝子体液を用いて, *in vitro* の瘢痕収縮モデルである, コラーゲンゲル収縮能を評価した. コラーゲンゲル内にはウシ眼球より分離した硝子体細胞を包埋した. 図 13 に示すように過去の我々の報告同様, 硝子体細胞を包埋したコラーゲンゲルはリコンビナント TGF- β 2 の刺激により強い収縮能を示した. この収縮は対照 IgG では影響されず, TGF- β の中和抗体(1 μ g/ml)により完全に抑制された. この中和抗体を用いて硝子体の実験を行った. その結果, 黄斑円孔や裂孔原形網膜剥離症例の硝子体でもゲルの収縮はみられるものの, 増殖糖尿病網膜症や増殖硝子体網膜症の症例の硝子体によって, ゲルはより強く収縮することが確認された. 黄斑円孔や裂孔原形網膜剥離の硝子体でもゲル収縮が誘導されることは意外ではあ

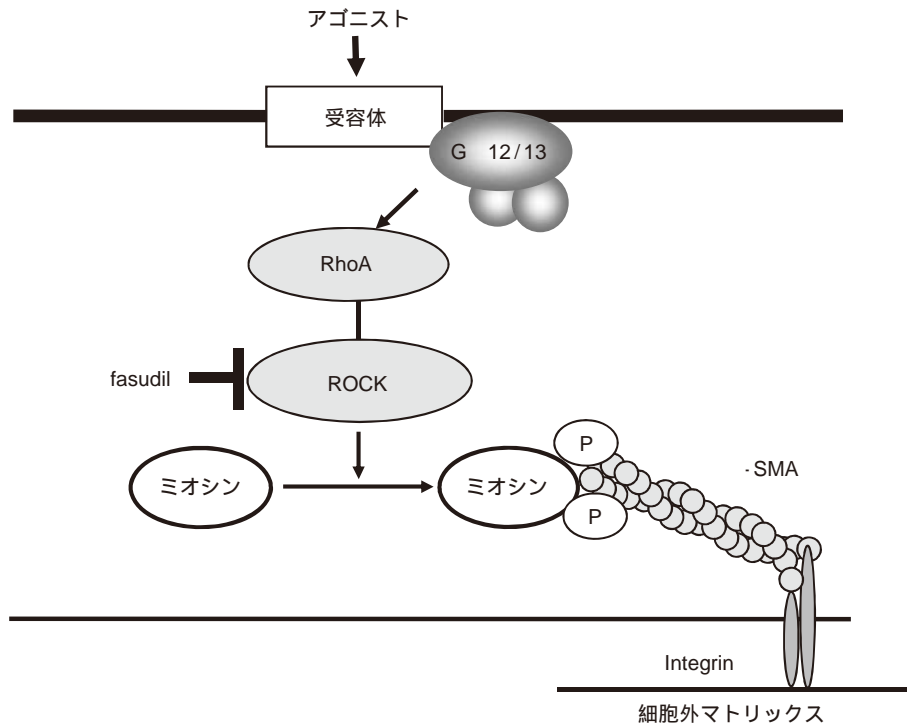


図 11 Rho/ROCK と細胞の持続的収縮.

非収縮型細胞が持続的収縮力を得るためには、 α -SMA (α -smooth muscle actin) を発現する細胞へ形質転換すること、Rho/ROCK 経路を介したミオシンのリン酸化が重要な鍵を握る。

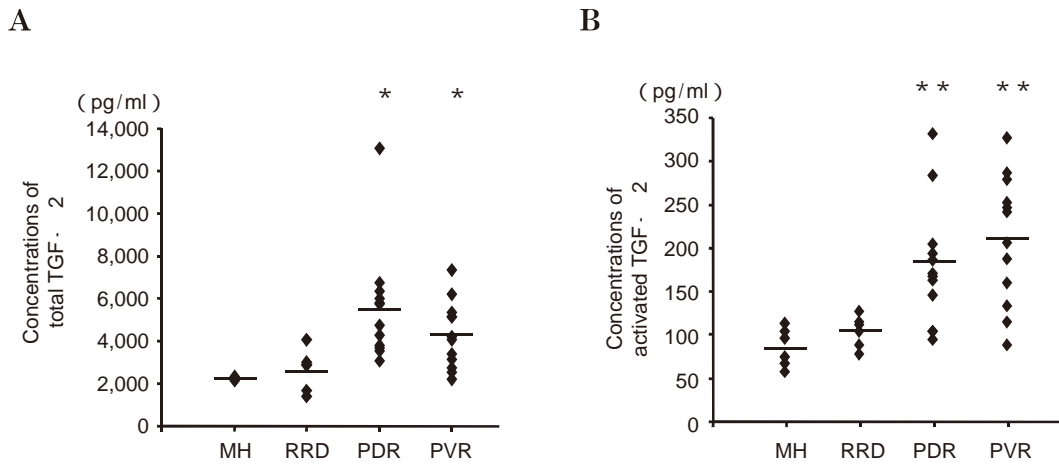


図 12 硝子体液中のトータルおよび活性型 transforming growth factor (TGF)- β 濃度.

硝子体手術の際に採取した硝子体液中のトータル TGF- β 濃度 (A) および活性型 TGF- β 濃度 (B) を ELISA 法にて測定した。

MH : macular hole (黄斑円孔) n = 6, RRD : rhegmatogenous retinal detachment (裂孔原生網膜剝離) n = 6, PDR : proliferative diabetic retinopathy (増殖糖尿病網膜症) n = 12, PVR : proliferative vitreoretinopathy (増殖硝子体網膜症) n = 12.

* : p 値 (A) ; PDR vs. MH : p = 0.0007, PDR vs. RRD : p = 0.003, PVR vs. MH : p = 0.002, PVR vs. RRD : p = 0.049. ** : p 値 (B) ; PDR vs. MH : p = 0.005, PDR vs. RRD : p = 0.015, PVR vs. MH : p = 0.002, PVR vs. RRD : p = 0.005 ; Mann-Whitney U-test.

(文献 42 より許可を得て転載)

たが、これらの症例では実際に収縮する増殖膜はほとんど存在しておらず、実験的に増殖膜を作製した状況下で検討したところ、増殖膜の収縮促進能を有する硝子体である、ということが確認されたといえる。つまり、黄斑

円孔や裂孔原生網膜剝離の硝子体中にも恒常的に TGF- β はある一定濃度存在しており、免疫抑制作用などにかかわっていることが推測される。しかし、いったん増殖膜が形成されると、図 13 で示すようにそれほど極端

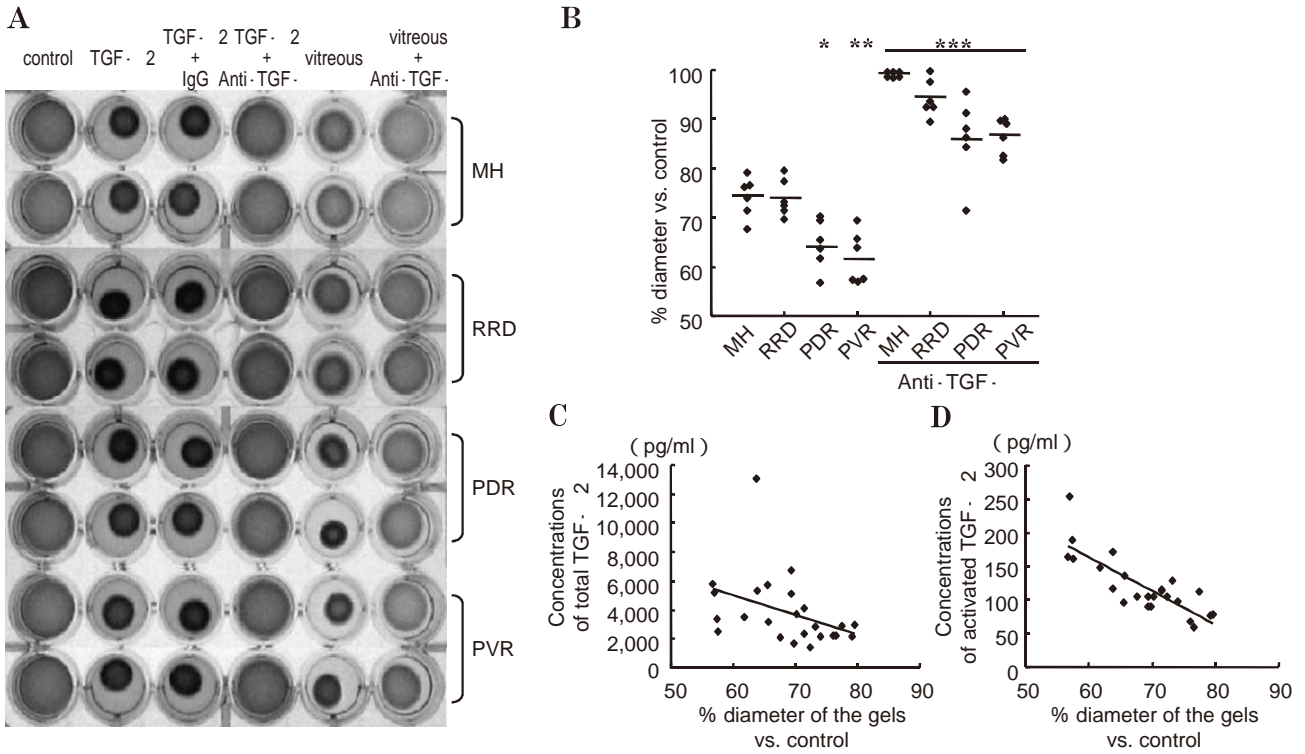


図 13 ヒト硝子体液によるコラーゲンゲル収縮における TGF- β 2 の重要性.

A : 硝子体細胞を包埋したコラーゲンゲルを対照 (DMEM), リコンビナント TGF- β 2 (0.3 nM), あるいは患者硝子体液 (vitreous) で刺激した. 抗 TGF- β モノクローナル抗体 (anti-TGF- β) (10 ng/ml) あるいは対照 IgG (10 ng/ml) を用いた (n=6 in each group). B : ゲルの直径を測定し, 対照を 100% としてグラフ化した. * : p=0.01 (vs. MH), p=0.007 (vs. RRD). ** : p=0.007 (vs. MH), p=0.004 (vs. RRD). *** : p<0.0001 (vs. each disease without anti-TGF- β mAb). C : ゲルの直径と硝子体液中トータル TGF- β 2 濃度 (n=24, r=0.39, p=0.06). D : 活性化型 TGF- β 2 濃度との相関をグラフ化した (n=24, r=0.82, p<0.0001). (文献 42 より許可を得て転載)

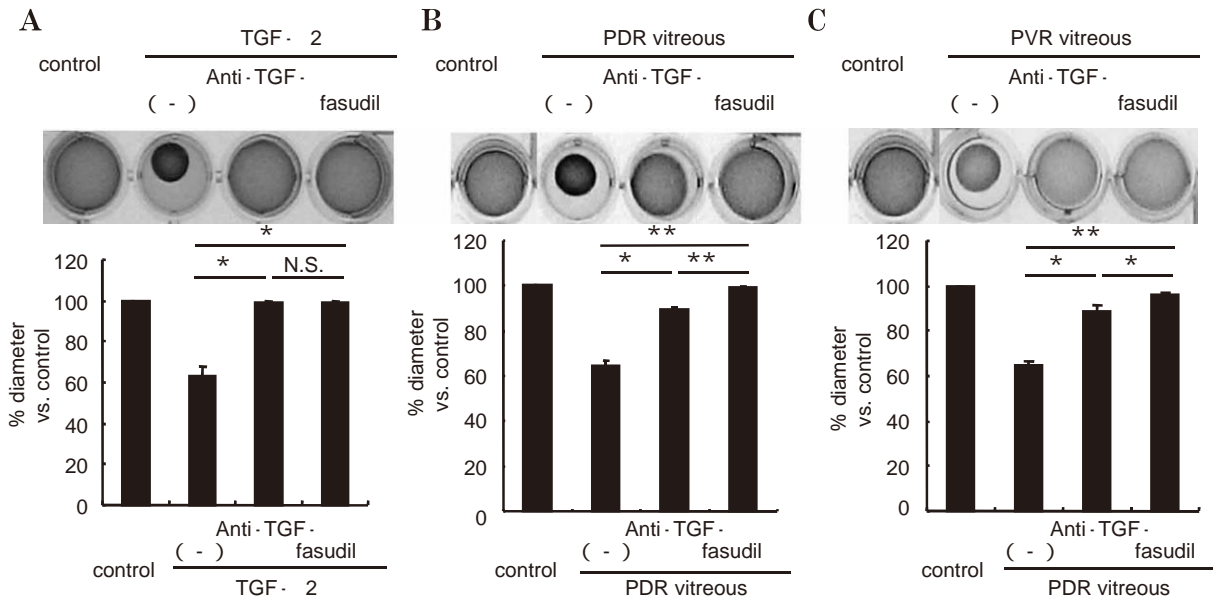


図 14 硝子体液刺激によるコラーゲンゲル収縮に対する fasudil による抑制効果.

硝子体細胞を包埋したコラーゲンゲルをリコンビナント TGF- β 2 (A), PDR 患者の硝子体 (B : PDR vitreous), あるいは PVR 患者の硝子体 (C : PVR vitreous) で刺激し (n=3, each group), 抗 TGF- β 抗体 (anti-TGF- β) あるいは fasudil (20 μ M) による阻害効果を検討した. ゲルの写真 (上段) と定量化したグラフ (下段) を示す. * : p<0.05, ** : p<0.01, N.S. : 有意差なし, paired t-test. (文献 42 より許可を得て転載)

(文献 42 より許可を得て転載)

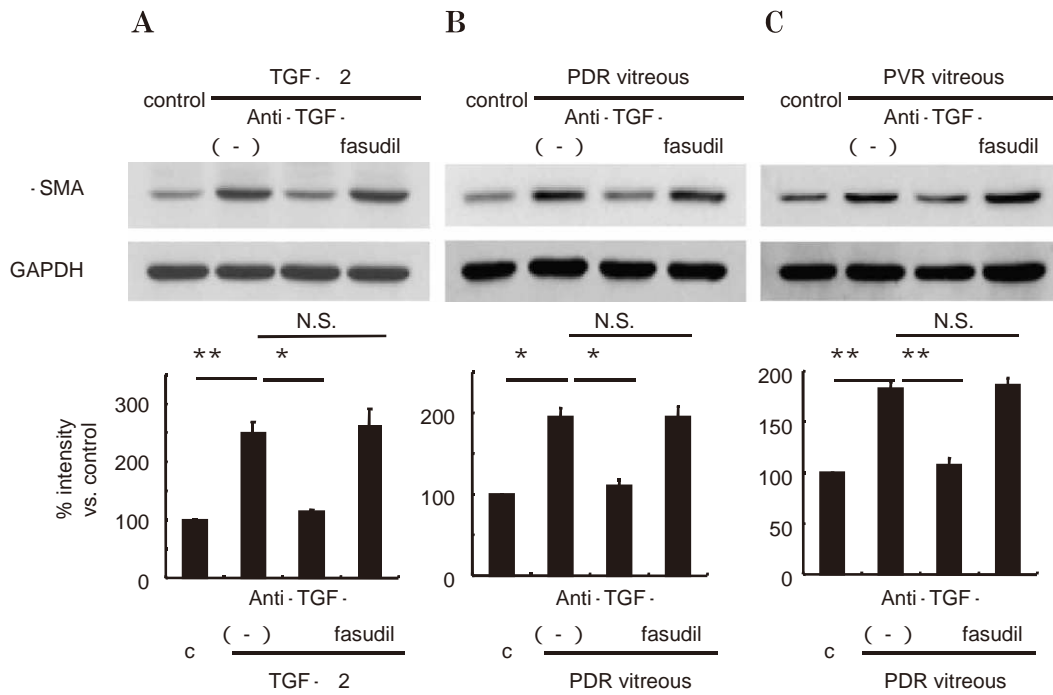


図 15 硝子体液刺激による硝子体細胞の形質転換に対する fasudil による抑制効果。
 図 14 のゲルをコラゲナーゼで処理して細胞を回収し、ウエスタンブロット解析を施行。A, B, C のサンプルは図 14 A, 14 B, 14 C からのサンプルによる。α-SMA/GAPDH 比を DMEM 処置した対照と比較しグラフ化した(下段)。* : p<0.05, ** : p<0.01, N.S. : 有意差なし, paired t-test。
 (文献 42 より許可を得て転載)

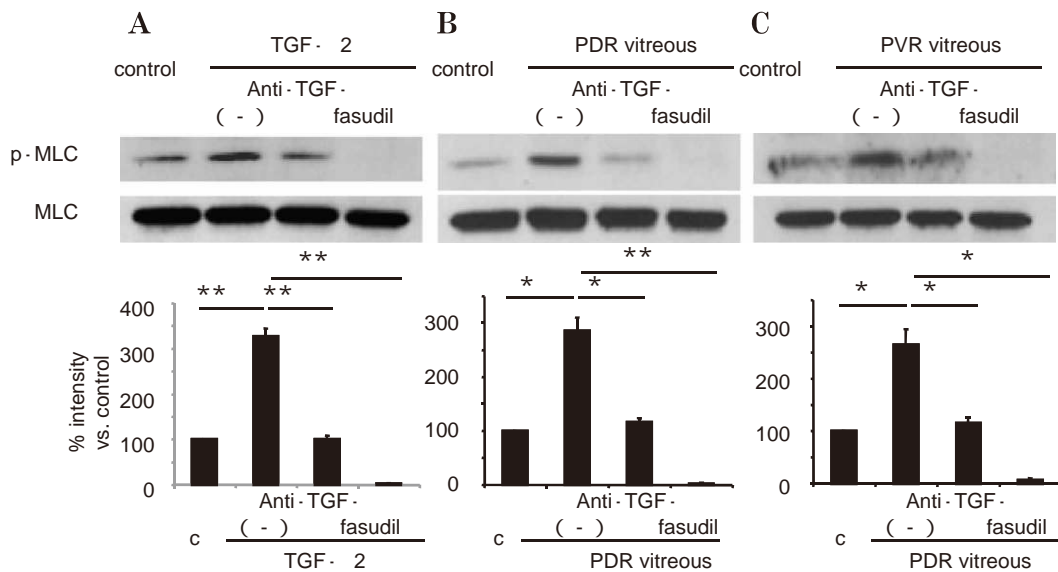


図 16 硝子体液刺激による硝子体細胞の MLC リン酸化に対する fasudil による抑制効果。
 硝子体細胞を抗 TGF-β 抗体(anti-TGF-β)あるいは fasudil で前処置し、TGF-β2(A), PDR 患者の硝子体(B)あるいは PVR 患者の硝子体で(C)刺激し、myosin light chain(MLC)のリン酸化についてウエスタンブロット解析した。リン酸化 MLC(p-MLC)/MLC 比を DMEM 処置した対照と比較しグラフ化した(下段)。
 * : p<0.05, ** : p<0.01。
 (文献 42 より許可を得て転載)

に TGF-β2 濃度が亢進するわけではないにもかかわらず、強い膜の収縮が誘導されると考えられる。また、黄斑円孔や裂孔原生網膜剝離の硝子体によるゲル収縮は TGF-β2 の中和抗体でほぼ完全に阻害されるのに対し、

増殖糖尿病網膜症や増殖硝子体網膜症の症例の硝子体によるゲル収縮に対しては有意に抑制されるものの、抑制が不十分な例もみられ、これらの疾患では TGF-β2 以外にも膜収縮を来す因子が混在していることが示唆され

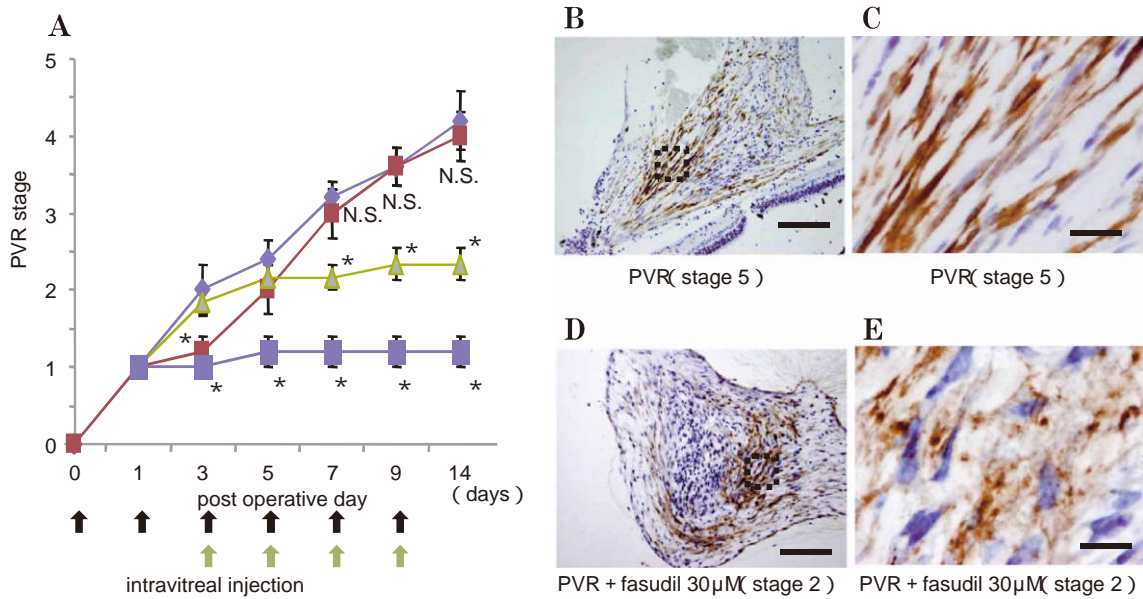


図 17 家兎眼を用いた実験的 PVR に対する fasudil の進行抑制効果。

A : 家兎眼に結膜線維芽細胞を注入する PVR モデルを作製し、14 日目までの眼底所見を評価した。薬剤濃度をある程度保つため複数回の硝子体内投与を行った。ある程度増殖膜が形成されてからの薬剤投与開始群でも進行が抑制されている。増殖膜を抗 α -SMA 抗体を用いて免疫染色を行うと (茶), stage 5 に至った眼 (B : Scale bar = 200 μ m, C : Scale bar = 10 μ m) では actin fiber が方向性をもって配列しているのに対し, fasudil 投与によって stage 2 とどまった眼における増殖膜 (D : Scale bar = 200 μ m, E : Scale bar = 10 μ m) では α -SMA の発現はみられるものの, actin fiber が明らかな方向性を示していない。

◆ : 対照 (vehicle), ■ : fasudil 10 μ M, ▲ : fasudil 30 μ M (from stage 2), ■ : fasudil 30 μ M.

* : $p < 0.05$.

(文献 42 より許可を得て転載)

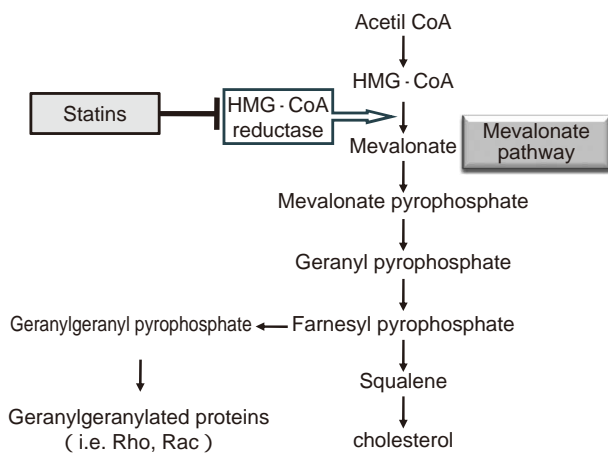


図 18 スタチン系薬剤と Rho/ROCK 経路のクロストーク。

る。それでも、ゲル収縮の程度と活性型 TGF- β 2 濃度の相関をみると非常に強い相関関係にあり、ヒト硝子体液中の増殖膜収縮因子として TGF- β 2 が中心的役割を演じていることが確認された。データは示さないが、網膜色素上皮細胞を包埋したコラーゲンゲルでも同様の実験結果であった。

TGF- β 2 が増殖膜収縮の中心的役割を担っているのであれば、TGF- β 2 を標的とした薬物治療も理論上考えられるが、TGF- β 2 は多機能サイトカインであり、免疫抑制など多岐にわたる生理的役割にも欠かせない生理活性

物質である。TGF- β 2 をブロックすることで過剰な炎症や癌化といった副作用が懸念される。また、上記したように TGF- β 2 が主要な因子とはいっても、病態が複雑になれば未知の因子を含めて他の因子の関与が絡んできている可能性があり⁴¹⁾、TGF- β 2 だけを標的としても効果としては不十分と考えられる。

そこで我々が標的として考えているのが TGF- β 2 の機能の一部であり、他のサイトカインによる細胞収縮にも共通した経路と考えられる Rho/ROCK 経路を標的とすることである。図 14 に示すように、ROCK 阻害剤の一つである fasudil (20 μ M) は TGF- β 2 (3 ng/ml) によるゲル収縮を完全に抑制し、増殖糖尿病網膜症や増殖硝子体網膜症の症例の硝子体によるゲル収縮に対してもほぼ完全に抑制作用を示すことが分かった。つまり、fasudil は TGF- β 2 以外の因子によるゲル収縮に対しても抑制作用を有し、単に TGF- β 2 を標的とするより高いポテンシャルを有することが分かる。収縮阻害のメカニズムについて検討を進めると、TGF- β 2 は硝子体細胞に対して α -SMA を発現する筋線維芽細胞への形質転換と収縮のシグナルである myosin light chain (MLC) のリン酸化を誘導するが、これに対して fasudil は形質転換そのものにはあまり影響を及ぼさないが、TGF- β 2 による MLC のリン酸化を強く阻害することが確認された。また、硝子体細胞の形質転換と収縮シグナルにはやはり硝子体液

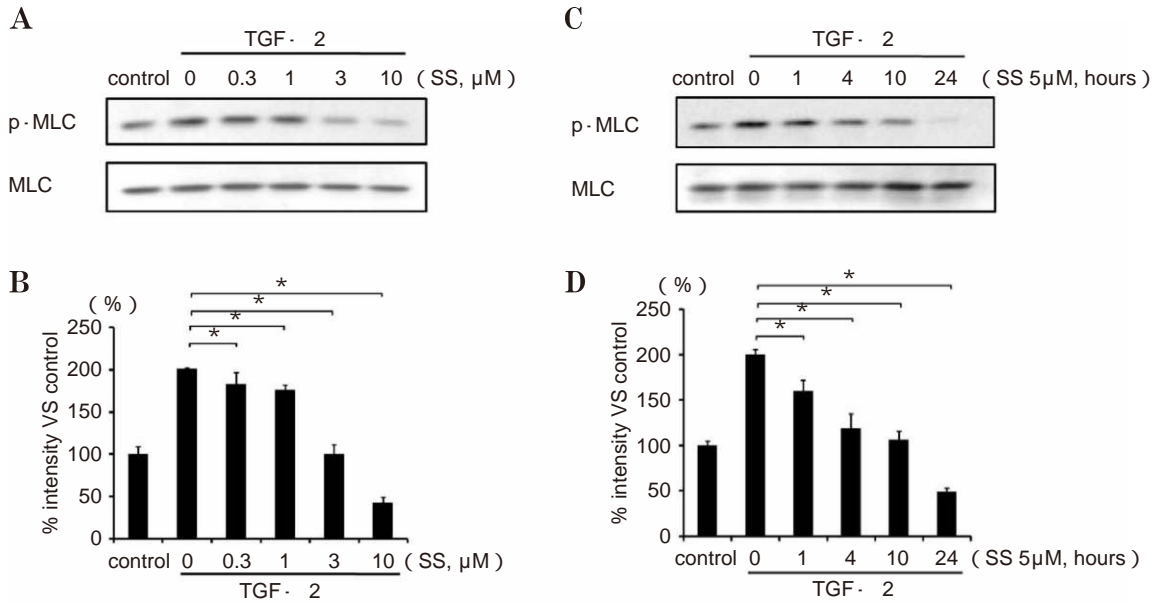


図 19 TGF-β2 依存性の MLC リン酸化に対する Simvastatin の抑制作用。
 硝子体細胞を種々の濃度の Simvastatin(SS)で前処置後、TGF-β2(3 ng/ml)で 5 日間刺激。細胞を回収後ウエスタンブロット解析した。典型的なウエスタンブロットティング結果(A, C)とリン酸化 MLC(p-MLC)/MLC 比をグラフ化した結果(B, D)を示す。* : p<0.05。

(文献 50 より許可を得て転載)

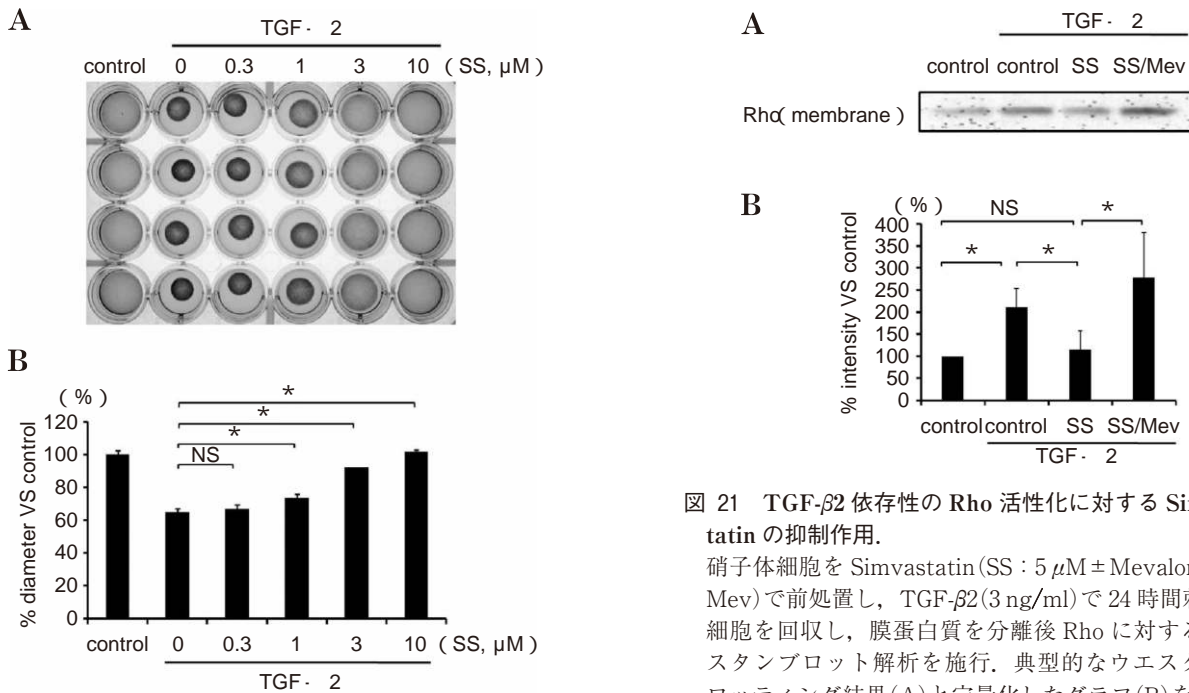


図 20 TGF-β2 依存性のコラーゲンゲル収縮に対する Simvastatin の抑制作用。

硝子体細胞を包埋したコラーゲンゲルを種々の濃度の Simvastatin(SS)で前処置後、TGF-β2(3 ng/ml)で 5 日間刺激した。ゲルの写真を撮影し(A)、ゲル直径を計測しグラフ化した(B)。* : p<0.05, NS : 有意差なし。

(文献 50 より許可を得て転載)

図 21 TGF-β2 依存性の Rho 活性化に対する Simvastatin の抑制作用。

硝子体細胞を Simvastatin(SS : 5 μM ± Mevalon 酸 : Mev)で前処置し、TGF-β2(3 ng/ml)で 24 時間刺激。細胞を回収し、膜蛋白質を分離後 Rho に対するウエスタンブロット解析を施行。典型的なウエスタンブロットティング結果(A)と定量化したグラフ(B)を示す。* : p<0.05, NS : 有意差なし。

(文献 50 より許可を得て転載)

中の TGF-β2 が主要な役割を演じていることも確認された⁴²⁾(図 15, 16)。

次に fasudil が *in vivo* で増殖膜の癒痕収縮を抑制可能かの検討を行った。残念ながら増殖糖尿病網膜症のモデル動物が存在しないため、増殖硝子体網膜症モデル家兎を用いた。家兎の硝子体から硝子体細胞を分離し増殖さ

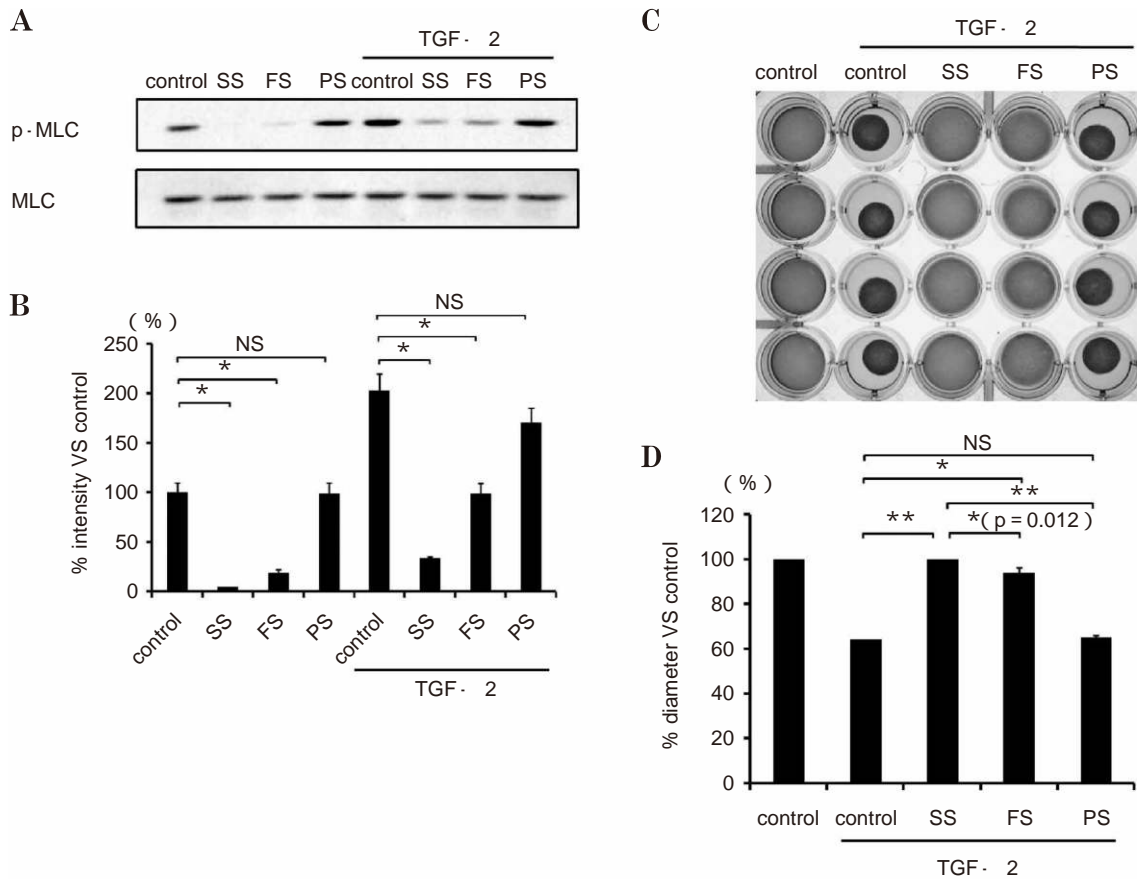


図 22 MLC リン酸化とコラーゲンゲル収縮に対する種々のスタチン系薬剤の作用比較。

A, B: 硝子体細胞を 5 μM の Simvastatin(SS), Fluvastatin(FS), Pravastatin(PS) で 30 分間前処置し, 3 ng/ml の TGF-β2 で 24 時間刺激した。細胞を回収後 MLC のリン酸化(p-MLC) についてウエスタンブロット解析した。*: p<0.05, NS: 有意差なし。C, D: 同様に硝子体細胞を包埋したコラーゲンゲルを種々のスタチン系薬剤で前処置した後, TGF-β2(3 ng/ml) で 5 日間刺激した。**: p<0.01, *: p<0.05, NS: 有意差なし。(文献 50 より許可を得て転載)

せてから硝子体中に戻すモデルの作製を試みたが家兎の硝子体細胞の培養系が十分に確立できなかったため、従来用いられている、結膜線維芽細胞を硝子体中に注入するモデルを用いた。方法としては過去の報告に従って家兎結膜から線維芽細胞を分離培養して一定量増やした段階で、同種の家兎に硝子体手術を施行しスペースを確保した後 10⁴個の線維芽細胞を注入した。薬剤の濃度をある程度維持しながら効果をみる目的で、fasudil 投与は細胞を注入した day 0 から隔日で眼内終濃度が 10 μM, 30 μM になる群、さらにはいったん膜が形成された段階から 30 μM になるよう投与した群、最初から vehicle 投与群の 4 群に分けた。Vehicle 投与(対照)群では日数の経過とともに stage の進行を認めた。10 μM 投与群では初期には有効性を認めたが徐々に効果は弱まり、7 日目以降は対照群と有意差がなかった。薬剤の濃度がもともと不十分な可能性とともに、クリアランスされて目的の濃度が維持されなかった可能性がある。一方、最初から 30 μM の濃度を投与した群では膜の形成までは進むものの、その後の膜収縮のステップへの進行をほぼ完全に抑

制することができた。さらに膜の牽引がかかり始めた段階からの薬剤投与群でもその後の病態進行をほぼ抑制することができた。ROCK 阻害剤は高濃度では細胞のアポトーシスを起こすとの報告もあるが、今回用いた濃度では増殖膜を組織学的に観察したところ、増殖膜を構成する細胞がアポトーシスを起こしたことによって病態の進行が止まったわけではなく、α-SMA の分布から、*in vitro* と同様に fasudil は α-SMA の発現、つまり形質転換そのものには影響せず、α-SMA の機能的重合を阻害して病態の進行を阻止していることがうかがえた(図 17)。このようなことから、今回は結膜の線維芽細胞を用いたものの、形質転換した細胞が収縮を起こすことによって病態の増悪を招くという意味では、実際の病態を概ね再現できていると考えられた。

また、今回用いた fasudil の濃度についてであるが、Shimokawa らの報告にあるように、10~30 μM の濃度の fasudil は ROCK にほぼ選択的に作用する濃度である⁴³⁾。つまり、ROCK を選択的に阻害することで増殖膜の瘢痕収縮に起因する病態を制御しうることを示す結果

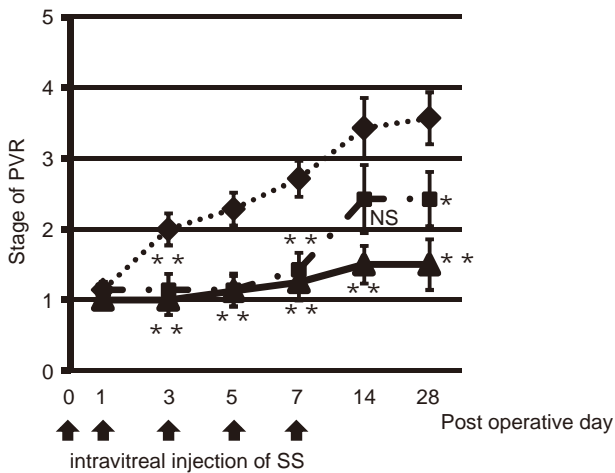


図 23 家兎眼を用いた実験的 PVR に対する Simvastatin の進行抑制効果.

家兎眼に結膜線維芽細胞を注入する PVR モデルを作製し、28 日目までの眼底所見を評価した。薬剤濃度がある程度保つため複数回の硝子体内投与を行った。 ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$, NS : vehicle と比較して有意差なし。

◆ : vehicle, ■ : $5 \mu\text{M}$ SS, ▲ : $15 \mu\text{M}$ SS
(文献 50 より許可を得て転載)

と考えられた。

VII 増殖性病変に対する薬物による病態制御の可能性その 2

さらに、ROCK を阻害しうる薬剤としてスタチン系薬剤の機能(図 18)が明らかになってきている⁴⁴⁾。スタチン系薬剤(HMG-CoA 還元酵素阻害剤)は本来肝臓に作用し HMG-CoA reductase を阻害することでコレステロールの合成を抑制する高脂血症治療薬であるが⁴⁵⁾、コレステロール合成の副経路として働く Rho の活性化をも阻害しうることなど、種々の作用が明らかになってきており pleiotropic effect として注目されている^{46)~49)}。そこでスタチン系薬剤が ROCK の上流にある Rho を阻害することでやはり増殖膜の癒着収縮を阻害しうるかについても検討を加えた⁵⁰⁾。

硝子体細胞を用いて TGF- β 依存性の MLC リン酸化に対する阻害作用をみみると、Simvastatin は濃度(0.3~10 μM)依存性、時間(1~24 時間)依存性に阻害作用を示し(図 19)、同様に硝子体細胞を包埋したコラーゲンゲルの収縮を抑制した(図 20)。上流の Rho の活性化について検討したところ Simvastatin は 5 μM の濃度で有意に阻害作用を示すことが確認された(図 21)。この作用は Mevalon 酸を加えることで消失することから、Mevalonate pathway を介したものであることも確認された。スタチン系薬剤は多種類あり、今回 Simvastatin の作用を Fluvastatin, Pravastatin などとの作用比較を行ったが、今回行った条件では Simvastatin が最も有効

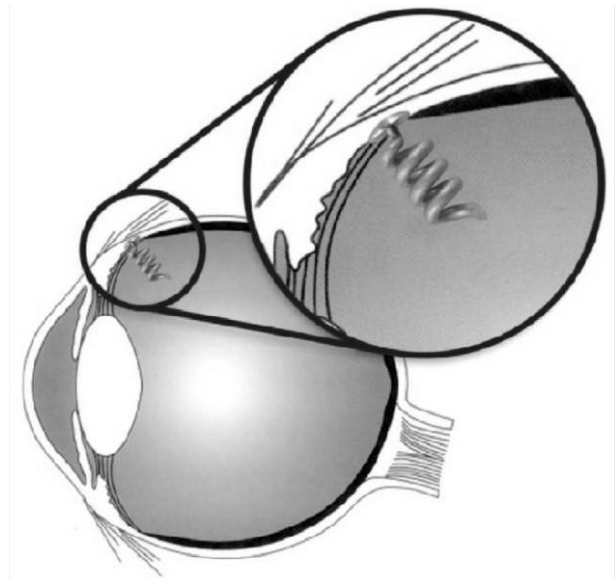


図 24 経強膜インプラントの模式図。

性を示した(図 22)。薬剤の脂溶性の違いが一因と考えられ、Simvastatin より脂溶性の強い Lovastatin(副作用が強く市場からは撤退)では細胞障害性がみられたが、今回用いた条件では Simvastatin による明らかな細胞障害性は認めなかった。ヒト硝子体液を用いた検討でも Simvastatin の有用性が確認された。In vivo においても fasudil と同様の実験を行ったところ、5~15 μM の濃度で濃度依存性に増殖硝子体網膜症の病態進行を阻害することが確認された(図 23)。同じ薬剤投与方法での家兎網膜に対する安全性試験も行ったが、網膜電図、光学顕微鏡、電子顕微鏡による観察を行ったところ明らかな薬剤毒性は認めなかった。

VIII 薬物療法の今後の展望

今回、fasudil および Simvastatin を局所投与で用いた研究を行った。その理由としては、Simvastatin の内服による血漿中濃度は例えば 20 mg 単回経口投与した際の血漿中 Cmax はせいぜい 50 nM であり⁵¹⁾、今回の結果から有効性を期待する 5~10 μM と比較して 100 分の 1 程度しか得られない。また、fasudil の場合も点滴用の薬剤を 1 shot で静脈注射した場合によく 20 μM の濃度が期待できるというレベルである。これらに加えて、網膜血液関門の存在を考えると、全身投与での硝子体中の濃度は求める濃度と程遠いことが容易に想像できる。

しかしながら、投与方法としては、実際に糖尿病硝子体網膜症という慢性疾患に対して頻回薬剤を硝子体内投与するのは合併症が懸念されるとともに非現実的である。かといって全身投与で今回得たような有効性が期待できるかということこれもまた難しい。我々は図 24 に示すような経強膜型インプラントによる徐放性製剤の作製

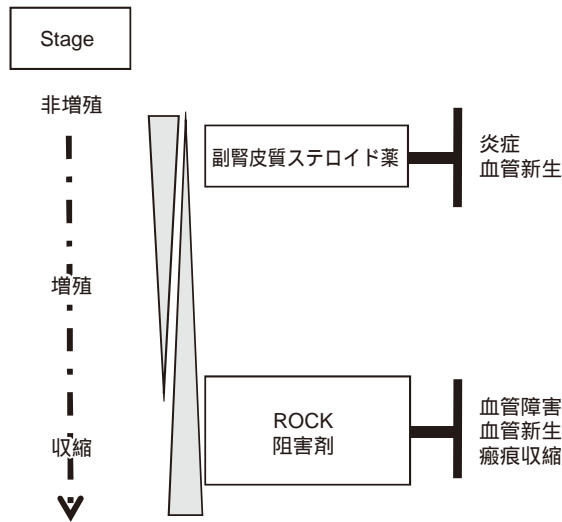


図 25 糖尿病硝子体網膜症に対する薬物治療の可能性。病態に応じた薬剤の選択，あるいは併用を検討する必要があり，今後薬剤の選択肢は増えるものと予測される。

を検討しており，眼疾患は眼局所でコントロールすることを一つの目標としている。

糖尿病硝子体網膜症は非増殖性の段階から増殖性病変に至るまで実に多彩な病態を呈する。この多彩な病態を ROCK 阻害剤だけでコントロールできるかといえばそれほど単純でもないであろう。使い古された薬剤ではあるが，副腎皮質ステロイド薬の有効性が眼科領域でも再認識されており，今後も必要とされる薬剤であろう。我々も副腎皮質ステロイド薬による内眼手術後の抗炎症効果や血管新生抑制作用などを明らかにしているが^{52)~56)}，その一方で，データは示さないものの瘢痕収縮には有効性は期待できないようである。今後，副腎皮質ステロイド薬と ROCK 阻害剤の double implant といったことも一つの戦略になりうるし(図 25)，新たな薬剤が登場する可能性もあり，今後の発展が大いに期待される分野である。

IX おわりに

糖尿病硝子体網膜症による完全失明者は着実に減少傾向にあるが，VISION 2020 で掲げる「予防・治療可能な失明者の根絶」には至っていない。最も重要な点は神経網膜がいったん障害されると現在の最善の治療を施しても視機能の回復は困難なことにある。再生医療が目ざされる今日ではあるが，実用化にはもう少し時間がかかりそうである。現時点において最善の治療は予防であり，むしろ予防医学は今後さらに重要視されるであろうし，各個人にカスタマイズされた医療がより具体的に臨床の現場に入り込んでくるものと予測される。ある程度病態が進行してから眼科医がようやく腰をあげるというこれまでのスタイルでは社会的な重要課題の克服は困難であり，もっと踏み込んだ失明予防対策が必要である。

稿を終えるにあたり，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に深謝申し上げます。本研究遂行にあたり，旭化成バイオフーマ株式会社からは fasudil の提供をいただきました，感謝申し上げます。

本研究は，文部科学省科学研究費助成金(C19592026)により行われました。また，九州大学眼科同門会の諸先生方に多大なるご援助をいただきました。この場をお借りして深謝申し上げます。

文 献

- 1) 石橋達朗：眼内血管病変の細胞生物学。日眼会誌 103：923—947, 1999.
- 2) 坂本泰二：硝子体の病態生理—硝子体の細胞反応：ヒアロサイトについて。日眼会誌 107：866—883, 2003.
- 3) Foos RY, Krieger AE, Forsythe AV：Posterior vitreous detachment in diabetic subjects. Ophthalmology 87：122—128, 1980.
- 4) Tagawa H, McMeel JW, Furukawa H, Quiroz H, Murakami K, Takahashi M, et al：Role of the vitreous in diabetic retinopathy. I. vitreous changes in diabetic retinopathy and in physiologic aging. Ophthalmology 93：596—601, 1986.
- 5) Sebag J：Abnormalities of human vitreous structure in diabetes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 231：257—260, 1993.
- 6) Faulborn J, Dunker S, Bowald S：Diabetic vitreopathy—findings using the celloidin embedding technique. Ophthalmologica 212：369—376, 1998.
- 7) 中江公裕，小暮文雄，長屋幸郎，三島清一：わが国における視覚障害の現況。厚生指標 38：13—22, 1991.
- 8) 中江公裕，増田寛次郎，妹尾 正，小暮文雄，澤充，金井 淳，他：わが国における視覚障害の現況。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究平成 17 年度総括・分担研究報告書。263—267, 2006.
- 9) The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus：Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 20：1183—1197, 1997.
- 10) World Health Organization：Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Department of Noncommunicable Disease Surveillance, WHO, Geneva, 1999.
- 11) McCance DR, Hanson RL, Charles MA, Jacobsen LT, Pettitt DJ, Bennett PH, et al：Comparison of test for glycated haemoglobin and fasting and two hour plasma glucose concentrations as diagnostic methods for diabetes. BMJ 308：1323—1328, 1994.
- 12) Engelgau MM, Thompson TJ, Herman WH, Boyle JP, Aubert RE, Kenny SJ, et al：Comparison of fasting and 2-h glucose and HbA_{1c} levels for diagnosing diabetes：diagnostic criteria and per-

- formance revisited. *Diabetes Care* 20 : 785—791, 1997.
- 13) **Miyazaki M, Kubo M, Kiyohara Y, Okubo K, Nakamura H, Fujisawa K, et al** : Comparison of diagnostic methods for diabetes mellitus based on prevalence of retinopathy in a Japanese population : the Hisayama Study. *Diabetologia* 47 : 1411—1415, 2004.
 - 14) **Hypertension in Diabetes Study (HDS) : I** . Prevalence of hypertension in newly presenting type 2 diabetic patients and the association with risk factors for cardiovascular and diabetic complications. *J Hypertens* 11 : 309—317, 1993.
 - 15) **UK Prospective Diabetes Study Group** : Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes : UKPDS 38. *BMJ* 317 : 703—713, 1998.
 - 16) **Lyons TJ, Jenkins AJ, Zheng D, Lackland DT, McGee D, Garvey WT, et al** : Diabetic retinopathy and serum lipoprotein subclasses in the DCCT/EDIC cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 910—918, 2004.
 - 17) **Diabetes Atorvastatin Lipid Intervention (DALI) Study Group** : The effect of aggressive versus standard lipid lowering by atorvastatin on diabetic dyslipidemia : the DALI study : a double-blind, randomized, placebo-controlled trial in patients with type 2 diabetes and diabetic dyslipidemia. *Diabetes Care* 24 : 1335—1341, 2001.
 - 18) **Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Kearney PM, Blackwell L, Collins R, Keech A, Simes J, et al** : Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins : a meta-analysis. *Lancet* 371 : 117—125, 2008.
 - 19) **Errera FI, Canani LH, Silva ME, Yeh E, Takahashi W, Santos KG, et al** : Functional vascular endothelial growth factor-634 G>C SNP is associated with proliferative diabetic retinopathy : a case-control study in a Brazilian population of European ancestry. *Diabetes Care* 30 : 275—279, 2007.
 - 20) **Uthra S, Raman R, Mukesh BN, Rajkumar SA, Padmaja KR, Paul PG, et al** : Association of VEGF gene polymorphisms with diabetic retinopathy in a south Indian cohort. *Ophthalmic Genet* 29 : 11—15, 2008.
 - 21) **Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, Mahalakshmi R, Karthikprakash S, Namperumalsamy P, et al** : Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis* 12 : 336—341, 2006.
 - 22) **Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y, et al** : Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 50 : 760—767, 2007.
 - 23) **Seasholtz TM, Wessel J, Rao F, Rana BK, Khandrika S, Kennedy BP, et al** : Rho kinase polymorphism influences blood pressure and systemic vascular resistance in human twins : role of heredity. *Hypertension* 47 : 937—947, 2006.
 - 24) **Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al** : A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 51 : 1635—1639, 2002.
 - 25) **Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, Brown JH** : Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res* 84 : 1186—1193, 1999.
 - 26) **Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K** : Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 22 : 32—39, 2001.
 - 27) **Shimokawa H, Rashid M** : Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci* 28 : 296—302, 2007.
 - 28) **Tanihara H, Inatani M, Honjo M, Takushige H, Azuma J, Araie M** : Intraocular pressure-lowering effects and safety of topical administration of a selective ROCK inhibitor, SNJ-1656, in healthy volunteers. *Arch Ophthalmol* 126 : 309—315, 2008.
 - 29) **UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group** : Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352 : 837—853, 1998.
 - 30) **UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group** : Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes (UKPDS 39). *BMJ* 317 : 713—720, 1998.
 - 31) **Joussen AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, Bursell SE, Adamis AP** : Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol* 158 : 147—152, 2001.
 - 32) **Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Cai WY, Suzuma I, Pak J, et al** : Suppression of Fas-FasL-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes. *FASEB J* 17 : 76—78, 2003.
 - 33) **Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, Murata T, Clermont AC, et al** : Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 10836—10841, 1999.
 - 34) **Arita R, Hata Y, Nakao S, Kita T, Miura M, Kawahara S, et al** : Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes-induced microvascular damage. *Diabetes* 58 : 215—226, 2009.
 - 35) **Noda Y, Hata Y, Hisatomi T, Nakamura Y,**

- Hirayama K, Miura M, et al : Functional properties of Hyalocytes under PDGF-rich conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2107—2114, 2004.
- 36) Qiao, H, Hisatomi T, Sonoda KH, Kura S, Sassa Y, Kinoshita S, et al : The characterization of hyalocytes : the origin, phenotype and turnover. *Br J Ophthalmol* 89 : 513—517, 2005.
- 37) Connor TB Jr, Roberts AB, Sporn MB, Danielpour D, Dart LL, Michels RG, et al : Correlation of fibrosis and Transforming growth factor- β type 2 levels in the eye. *J Clin Invest* 83 : 1661—1666, 1989.
- 38) Kita T, Hata Y, Kano K, Miura M, Nakao S, Noda Y, et al : TGF- β 2 and CTGF in proliferative vitreoretinal diseases~Possible involvement of hyalocytes and therapeutic potential of Rho kinase inhibitor~ *Diabetes* 56 : 231—238, 2007.
- 39) Hirayama K, Hata Y, Noda Y, Miura M, Yamanaka I, Shimokawa H, et al : The involvement of rho-kinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 3896—3903, 2004.
- 40) Miura M, Hata Y, Hirayama K, Kita T, Noda Y, Fujisawa K, et al : Critical role of the rho-kinase pathway in TGF- β 2-dependent collagen gel contraction by retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 82 : 849—859, 2006.
- 41) Kita T, Hata Y, Miura M, Kawahara S, Nakao S, Ishibashi T : Functional characteristics of connective tissue growth factor on vitreoretinal cells. *Diabetes* 56 : 1421—1428, 2007.
- 42) Kita T, Hata Y, Arita R, Kawahara S, Miura M, Nakao S, et al : Role of TGF- β in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 : 17504—17509, 2008.
- 43) Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, Amano M, Kozai T, Yamawaki T, et al : Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res* 43 : 1029—1039, 1999.
- 44) Van Aelst L, D'Souza-Schorey C : Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11 : 2295—2322, 1997.
- 45) Molgaard J, von Schenck H, Olsson AG : Effects of simvastatin on plasma lipid, lipoprotein and apolipoprotein concentrations in hypercholesterolemia. *Eur Heart J* 9 : 541—551, 1988.
- 46) Heart Protection Study Collaborative Group : MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals : a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 360 : 7—22, 2002.
- 47) Coons JC : Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors in osteoporosis management. *Ann Pharmacother* 36 : 326—330, 2002.
- 48) Campbell MJ, Esserman LJ, Zhou Y, Shoemaker M, Lobo M, Borman E, et al : Breast cancer growth prevention by statins. *Cancer Res* 66 : 8707—8714, 2006.
- 49) Matar P, Rozados VR, Binda MM, Roggero EA, Bonfil RD, Scharovsky OG : Inhibitory effect of Lovastatin on spontaneous metastases derived from a rat lymphoma. *Clin Exp Metastasis* 17 : 19—25, 1999.
- 50) Kawahara S, Hata Y, Kita T, Arita R, Miura M, Nakao S, et al : Potent inhibition of cicatricial contraction in proliferative vitreoretinal diseases by statins. *Diabetes* 57 : 2784—2793, 2008.
- 51) 大多和昌克, 内山尚孝, 斉藤由子, 鈴木明子, 丹野智恵子, 中谷矩章, 他 : 抗高脂血症剤 MK-733 の第 I 相臨床試験. 第 2 報 : 健常人における単回投与および連続投与時の薬物動態. *臨床医薬* 5 : 1123—1140, 1989.
- 52) Sakamoto T, Miyazaki M, Hisatomi T, Nakamura T, Ueno A, Itaya K, et al : Triamcinolone-assisted pars plana vitrectomy improves the surgical procedures and decreases the postoperative blood-ocular barrier breakdown. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240 : 423—429, 2002.
- 53) Sueishi K, Hata Y, Murata T, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H : Endothelial and glial cell interaction in diabetic retinopathy via the function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Pol J Pharmacol* 48 : 307—316, 1996.
- 54) Nakao S, Hata Y, Miura M, Noda K, Kimura YN, Kawahara S, et al : Dexamethasone inhibits IL-1 β -induced corneal neovascularization : Role of NF- κ B-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *Am J Pathol* 171 : 1058—1065, 2007.
- 55) Hata Y, Miura M, Nakao S, Kawahara S, Kita T, Ishibashi T : Antiangiogenic property of fasudil, a potent Rho-kinase inhibitor. *Jpn J Ophthalmol* 52 : 16—23, 2008.
- 56) Hata Y, Sassa Y, Kita T, Miura M, Kano K, Kawahara S, et al : Vascular endothelial growth factor expression by hyalocytes and its regulation by glucocorticoid. *Br J Ophthalmol* 92 : 1540—1544, 2008.

Comment : 大西 克尚

畑 快右准教授は糖尿病網膜症の中堅研究者の第一人者で、本症を網膜のみならず硝子体からアプローチすることの重要性を提唱し、糖尿病硝子体網膜症という新しい疾患概念を確立し、そこからその治療法の開発を進めている。

本宿題報告は糖尿病硝子体網膜症を予防する目的で、疫学、遺伝学および分子生物学などのさまざまな側面から検討を加え、治療戦略を立てている画期的な研究内容である。

その主な成果を抽出し次に記す。

1. 久山町研究では、糖尿病網膜症の5年発症率が7.5%であることと、発症には空腹時血糖と糖尿病罹病期間が有意に関係あることが示された。特筆すべきは、日本人の糖尿病診断基準として、これまでより低い、空腹時血糖値 116 mg/ml を指標とすることで網膜症の発症を予防できる可能性を示したことである。

2. 2型糖尿病患者 500 人の血液を用いた研究から、網膜症には糖尿病の若年発症、高血圧、低 HDL コレステロール血症が関与している可能性が示された。また、患者血液から DNA を抽出し、遺伝学的に網膜症との関係が予想されている因子の single nucleotide polymorphism (SNP) 解析を行っている。ここでは糖尿病網膜症に最も関係があることが知られている血管内皮増殖因子 (VEGF) およびその受容体である KDR の遺伝的多型と網膜症との間には、明らかな相関関係は認めなかったものの、Rho-kinase (ROCK) 遺伝子 family の一つである ROCK 2 遺伝子における 3 つの SNPs が糖尿病網膜症の発症に関与する可能性が示されている。

3. 糖尿病網膜症の早期に起こる白血球の血管内皮への接着および内皮細胞傷害への Rho/ROCK 経路の関与を証明し、既に臨床で脳血管障害治療に用いられている fasudil が、網膜血管への白血球の接着のみならず、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の恒常性を保つことを介して、内皮保護作用をもつことを示している。

4. 増殖網膜症での増殖膜の癒痕収縮に硝子体細胞が関与していることを示し、その過程で、形質転換増殖因子 $\beta 2$ (TGF $\beta 2$) が主な刺激因子であることを加えて証明している。また Rho/ROCK 経路の重要性を証明し、その阻害薬である fasudil を用いた増殖膜収縮に対する予防的治療の可能性について、メカニズムに基づいて理路整然と証明している。

このように本研究ではいくつかの斬新な作業仮説のもとに、網膜症の病態をさまざまな手法を用いて検討し、新たな治療への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いえる。現在、臨床応用され成果を上げている抗 VEGF 療法に加えて、新たな視点からその有用性・可能性が示された抗 Rho/ROCK 経路治療薬開発がさらに発展し、新規の予防的治療法が確立されることが期待できる。VISION 2020 に掲げられた治療可能な疾患による失明の撲滅に向けて予防的治療に力点を置いたところに本研究の意義深さがあるといえよう。