

—総説—

## 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中 細胞外スーパーオキシドジスムターゼ (EC-SOD) の役割

力石裕一<sup>a), b)</sup>, 伊豆田洋志<sup>a)</sup>, 足立哲夫<sup>c)</sup>, 原 英彰<sup>a), \*</sup>

**要約:** 血管新生 (既存の血管から新しい血管ネットワークが形成される現象) は通常、厳密に制御されているが、一旦この制御機構が崩壊すると、調節不能な血管新生 (病的血管新生) が発生する。糖尿病網膜症における不可逆的な視野欠損や失明の原因は網膜に生じた病的血管新生である。そこで、糖尿病網膜症の病態・機序を解明するための一環として、増殖糖尿病網膜症 (PDR) における硝子体中細胞外スーパーオキシドジスムターゼ (EC-SOD) の役割について検討した。硝子体中 EC-SOD および血管新生の主要因子である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 濃度は、黄斑円孔患者に比べ PDR 患者で高値を示し、全患者において両者間に強い正の相関関係が認められた。そこで、EC-SOD の役割を探索するため、*in vitro* 血管新生モデルを用いて EC-SOD の抗血管新生作用を検討した。EC-SOD は VEGF 誘発ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) およびヒト網膜毛細血管内皮細胞増殖、および HUVEC 管腔形成を抑制した。以上より、EC-SOD は PDR 患者の硝子体内で上昇し、*in vitro* において抗血管新生作用を有したことから、血管新生の病態において中心的な役割を担う可能性が示唆された。

**索引用語:** 血管新生、血管内皮細胞増殖因子、細胞外スーパーオキシドジスムターゼ、糖尿病網膜症

## A Role of Extracellular Superoxide Dismutase (EC-SOD) in Vitreous Bodies from Proliferative Diabetic Retinopathy Patients

Yuichi CHIKARAISHI<sup>a), b)</sup>, Hiroshi IZUTA<sup>a)</sup>, Tetsuo ADACHI<sup>c)</sup>, Hideaki HARA<sup>a), \*</sup>

**Abstract:** Angiogenesis, in which new vessels are formed from existing vessels, is usually regulated strictly. However, once the regulated mechanism is ruptured, dysregulated angiogenesis (pathological neovascularization) is generated. In diabetic retinopathy (DR), retinal pathological neovascularization is leading causes of irreversible failing vision and blindness. Therefore, as part to clarify the mechanism of pathogenesis in DR, we investigated the role of intravitreal EC-SOD in proliferative diabetic retinopathy (PDR). The intravitreal concentrations of EC-SOD and vascular endothelial growth factor (VEGF), which is a major factor in angiogenesis, were significantly higher in PDR patients than in macular hole patients, and showed a positive correlation with each other (in the whole patients). Furthermore, to investigate possible roles of EC-SOD, we evaluated the angiostatic effect of EC-SOD using an *in vitro* angiogenesis model. EC-SOD significantly suppressed VEGF-induced cell proliferation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human retinal microvascular endothelial cells, and *in vitro* tube formation in HUVECs. In conclusion, EC-SOD was increased in the vitreous body from PDR patients and had the angiostatic effects *in vitro*. Therefore, these results suggest that EC-SOD may play a pivotal role in the pathogenesis of angiogenesis.

<sup>a)</sup> 岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西1丁目25-4)

Department of Biofunctional Evaluation, Molecular Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University  
(1-25-4, Daigaku-nishi, Gifu 501-1196, JAPAN)

<sup>b)</sup> わかもと製薬株式会社 相模研究所 薬理研究室 (〒258-0018 神奈川県足柄上郡大井町金手378)

Pharmacological Research, Sagami Research Laboratories, Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd.  
(378, Kanate, Ohi-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa 258-0018, JAPAN)

<sup>c)</sup> 岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 臨床薬剤学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西1丁目25-4)

Department of Biomedical Pharmaceutics, Laboratory of Clinical Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical University  
(1-25-4, Daigaku-nishi, Gifu 501-1196, JAPAN)

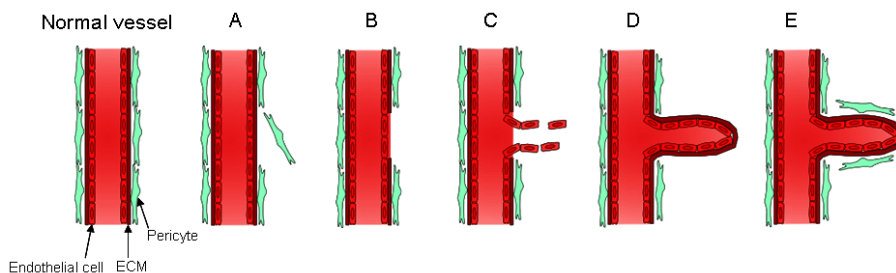
**Key phrases:** angiogenesis, vascular endothelial growth factor, extracellular superoxide dismutase, diabetic retinopathy

**1. 緒言**

血管新生は既存の血管から新しい血管ネットワークが形成される現象であり、その過程は (1) 血管不安定性による周皮細胞 (pericyte) の脱落、(2) コラゲナーゼやプラスミノゲンアクチベーター等のタンパク質分解酵素の活性化による細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の分解、(3) 血管内皮細胞の増殖および遊走、(4) 血管内皮細胞による管腔形成、基底膜の再生、周皮細胞の被覆といった多彩なステップが関与している (Fig. 1)<sup>1)-3)</sup>。胎生期および成体における子宮内膜や卵胞、そして創傷治癒など限られた組織において生じる生理的な血管新生では、上記プロセスは厳密に制御されている。しかし、一旦このプロセスが崩壊すると、無秩序な形態を呈する調節不能な血管新生 (病的な血管新生) が発生し、癌、関節リウマチおよびアテローム性動脈硬化症など多くの主要な疾患の悪性化の過程において中心的な役割を担っている。眼科領域においても、病的な血管新生は様々な疾患に関与し

ている。眼内血管新生疾患の中でも、糖尿病網膜症や未熟児網膜症などの網膜血管新生疾患では、網膜から硝子体内に発生・進展した病的な血管新生が原因で、不可逆的な視野欠損や失明を引き起こされる。

糖尿病網膜症は糖尿病合併症の一つであり、長期間累積した高血糖状態に伴う糖代謝異常により、網膜血管を構成する細胞 (血管内皮細胞、周皮細胞) の障害や血液レオロジーの異常をきたし、網膜や硝子体に多彩な病変を呈する網膜細小血管疾患である。平成 17 年度に報告された「網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究」によると、日本における後天性視力障害の原因として、糖尿病網膜症は緑内障に次いで第 2 位であり、視力障害の原因として約 5 人に 1 人の割合を占めている<sup>4)</sup>。また、近年、糖尿病発症年齢の若年化がみられ、若年発症者は高齢者での発症に比べ重症化しやすいことが報告されている<sup>5),6)</sup>。そのため、失明を防ぐだけでなく、生涯にわたる良好な視力を保持するには、糖尿病網膜症の早期発見、早期治療はわが国における医療経済の上で重要課題の一つである。



**Fig. 1** The process of angiogenesis.

Angiogenesis, in which new vessels are formed from existing vessels, includes multiple steps: (A) detachment of pre-existing pericytes for vascular destabilization, (B) degradation of the extracellular matrix (ECM), (C) migration and proliferation of endothelial cells, (D) formation of capillary-like networks by endothelial cells, and (E) reattachment of pericytes for vascular stabilization.

Stages	Simple diabetic retinopathy	Pre-proliferative diabetic retinopathy	Proliferative diabetic retinopathy	
Fundus images				
Clinical conditions	Vascular permeability	• Vascular occlusion • Retinal ischemia	Neovascularization	• Neovascularization • Vitreous traction
Fundus findings	• Microaneurysm • Retinal hemorrhage • Hard exudate • Retinal edema	• Soft exudate • IRMA • Venous abnormality	• Neovascularization on the optic disc • Retinal neovascularization	• Vitreous hemorrhage • Preretinal hemorrhage • Proliferative membrane • Tractional RD

**Fig. 2** Clinical conditions and fundus findings in the stages of diabetic retinopathy.

IRMA: intraretinal microvascular abnormalities, RD: retinal detachment. These figures were modified from Handbook of Prevention and Therapy for Diabetic Retinopathy (Nankodo Co., Ltd., 2007).

糖尿病網膜症の主要病態は網膜の血管透過性亢進、血管閉塞、血管新生である。糖尿病網膜症の病期はこれら病態の進行状態に相応して大別すると、単純糖尿病網膜症 (simple diabetic retinopathy)、増殖前糖尿病網膜症 (pre-proliferative diabetic retinopathy) および増殖糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy) に分類される (Davis 分類) (Fig. 2)。単純糖尿病網膜症は、網膜血管障害による血液網膜関門の破綻 (網膜血管透過性亢進) により、血液成分が網膜組織内へ漏出した状態で、毛細血管瘤の形成、点状・斑状の網膜出血、網膜浮腫 (漏出した血漿成分の内顆粒層や外網状層への貯留)、硬性白斑 (網膜浮腫が持続し吸収される過程で生じる白色から黄白色の沈着物) が見られる。増殖前糖尿病網膜症では、単純網膜症に比べ網膜血管障害が亢進し、網膜血管閉塞がより進行した状態となり、軟性白斑 (網膜表層に現れる白斑)、網膜内細小血管異常 (網膜血管閉塞領域に隣接して生じる不規則に拡張・蛇行した細小血管)、高度な静脈変化 (ビーズ様変化、ループ形成、重複化など) が見られる。増殖糖尿病網膜症になると、重篤な網膜虚血により網膜や乳頭上から新生血管の発生・進展が認められる。硝子体中に発育した新生血管に硝子体牽引が加わると、新生血管が破綻して硝子体出血や網膜前出血を生じる。また、新生血管周囲に線維血管性増殖膜が形成され、硝子体牽引に伴い牽引性網膜剥離が引き起こされる。網膜における病的な血管新生の発生自体、視力低下に繋がることは少ないが、その血管新生に伴って生じた牽引性網膜剥離や硝子体出血は視力低下に重大な

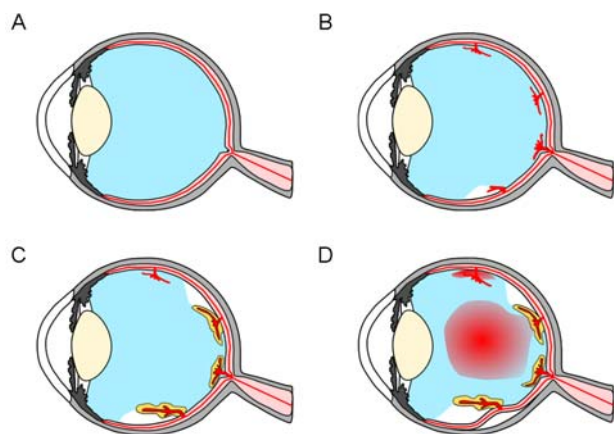
影響を及ぼす (Fig. 3)。したがって、如何に病的な血管新生を予防し、また生じてしまった異常な血管を如何に消退させるかが、患者の QOL を改善するために非常に重要な課題である。

糖尿病網膜症の病態進展過程には多くのサイトカインや増殖因子が関与しており、それらの中でも特に血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) は重要な役割を担っている。VEGF は強力な血管新生促進因子であり、側副血管形成の促進や微小血管の透過性を亢進する作用を有している<sup>7, 8)</sup>。VEGF は高血糖や虚血によって誘導され、生理的な血管新生および病的な血管新生の両者において重要な役割を担っている<sup>9, 10)</sup>。増殖糖尿病網膜症患者から採取した房水および硝子体内では VEGF 量の著明な増加が認められており<sup>11, 12)</sup>、VEGF をはじめとする血管新生促進因子は、血管内皮細胞を刺激し、硝子体内への病的な血管新生の発生・進展に大きく関与するとされている<sup>13, 14)</sup>。

酸化ストレスは酸化物質の生成亢進と抗酸化防御システムの破綻により、生体が酸化に傾いた状態と定義されている<sup>15)</sup>。糖尿病眼疾患では、酸化ストレスと高血糖間に強い相関関係が存在することから、高血糖に伴う代謝異常で誘導される酸化ストレスは、病態初期に重要な役割を担っていると考えられている<sup>16)</sup>。また、酸化ストレスは *in vitro* において VEGF 産生亢進能を有することから、糖尿病罹患中に生じる VEGF 発現に関与していると考えられている<sup>17, 18)</sup>。さらに、酸化ストレスは血管内皮細胞において血管新生応答に関連する VEGF シグナル伝達の重要な下流メディエーターであることも報告されている<sup>19, 20)</sup>。

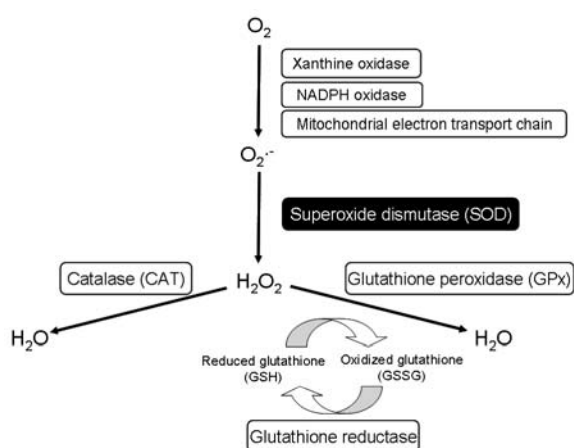
活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS はスーパーオキシド (superoxide:  $O_2^{\cdot-}$ )、過酸化水素 (hydrogen peroxide:  $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル (hydroxyl radical:  $\cdot OH$ ) など、酸素がより反応性の高い分子種に変化したもので、ミトコンドリアの電子伝達系、好中球やマクロファージなどの食細胞で発現している NADPH オキシダーゼによって発生する。定常状態において、ROS は様々なシグナル伝達経路を仲介し細胞機能に不可欠だが、過剰な ROS は細胞障害を引き起こす。そのため、生体内では抗酸化酵素や酸化物質によって ROS を消去し、一定のレベルに保つ抗酸化防御システムが備わっている。抗酸化酵素による反応の中心となっているのがスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase: SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase: GPx)、カタラーゼ (catalase: CAT) であり、SOD が  $O_2^{\cdot-}$  を  $H_2O_2$  に変換し、GPx や CAT が  $H_2O_2$  を消去している (Fig. 4)。

SOD は、哺乳類では copper- and zinc-containing SOD (CuZn-SOD)、manganese SOD (Mn-SOD) および extracellular SOD (EC-SOD の3つのアイソザイムが存在



**Fig. 3** The process of vision loss caused by retinal neovascularization.

(A) Normal eye. (B) New abnormal vessels (neovascularization), which are growing from the retina or optic disc and extending along the inner surface of the retina or into the vitreous cavity. (C) Proliferation of fibrous tissue (yellow) accompanying neovascularization. (D) Preretinal hemorrhage, vitreous hemorrhage, and retinal detachment that are caused by contraction of the posterior vitreous surface.



**Fig. 4** Major pathways of reactive oxygen species (ROS) generation and metabolism.

Superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) can be generated by a variety of endogenous enzymes, such as the xanthine oxidase and NADPH oxidase, or from the mitochondrial electron transport chain. Superoxide dismutase (SOD) then converts the superoxide to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). This is catalyzed to innocuous  $H_2O$  by glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT).

する。CuZn-SODは細胞質、Mn-SODはミトコンドリアおよび細胞内に局在するのに対し、EC-SODは大部分がヘパリン硫酸プロテオグリカンを介して血管内皮細胞表面や血管のECMと結合し、細胞外に位置する。そのため、EC-SODは他のSODに比べ特徴的な局在を示している。最近、糖尿病患者の前・後脛骨動脈においてEC-SOD活性の低下が報告された<sup>21)</sup>。しかし、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内におけるEC-SODの濃度とその機能については明らかにされていない。

そこで本総説では、増殖糖尿病網膜症患者から採取した硝子体および血清中EC-SOD濃度の変化を、対照として設定した黄斑円孔患者と比較した。また、糖尿病網膜症の病態進展に関与しているVEGF濃度についても併せて検討した。さらに、硝子体中EC-SODの作用機序を解明する一環として、血管内皮細胞の管腔形成能・増殖能・遊走能を指標とした*in vitro*血管新生モデルを用いて、EC-SODの抗血管新生作用を検討した。

## 2. EC-SOD濃度およびVEGF濃度の定量とその相関性

### 2. 1. 患者背景

患者背景をTable 1に示す。被験者は増殖糖尿病網膜症患者12名(男性5名、女性7名)および黄斑円孔患者14名(男性1名、女性13名)。黄斑円孔(加齢性変化に伴う後部硝子体皮質の牽引により、突然の視力低下や変視症をきたす疾患)は非炎症性・非増殖性疾患である。黄斑円孔患者から採取される硝子体は、倫理的に得ることができる正常眼の硝子体の構成に最も類似していることから、対照

として設定した。増殖糖尿病網膜症患者および黄斑円孔患者の年齢はそれぞれ $52.9 \pm 10.6$ 歳および $63.5 \pm 10.6$ 歳であった。増殖糖尿病網膜症患者の所見は、黄斑浮腫4例、硝子体出血7例、増殖膜形成9例、牽引膜7例、牽引性網膜剥離5例であり、黄斑円孔患者の所見は、黄斑円孔第2期(外層円孔[網膜表層(前壁)と網膜色素上皮間が空洞となった状態]の前壁が裂隙により弁状となり、そこに硝子体皮質が付着している状態)6例、黄斑円孔第3期(円孔が拡大し、外層円孔の前壁からできた弁が遊離して蓋状となり、そこに硝子体皮質が付着している状態)8例であった。また、増殖糖尿病網膜症患者のうち硝子体手術前の処方歴は、インスリン投与6例、血糖降下剤投与6例であった。

### 2. 2. 硝子体および血清サンプリング

増殖糖尿病網膜症患者および黄斑円孔患者の硝子体および血清サンプリングは、ヘルシンキ宣言を遵守し、大阪医科大学の治験審査委員会から認可を受けた。患者に本試験の目的を説明し、同意(インフォームドコンセント)を得た。大阪医科大学病院で増殖糖尿病網膜症および黄斑円孔の治療のため、26名28眼(増殖糖尿病網膜症患者14眼、黄斑円孔患者14眼)に硝子体切除術を施行し、Balanced Salt Solutionによる眼内灌流前に硝子体カッターで硝子体を切除した。採取した硝子体サンプルは遠心後、上清を $-80^\circ\text{C}$ で保存した。また、硝子体切除術時に18名(増殖糖尿病網膜症患者9名、黄斑円孔患者9名)から血清サンプルを採取し、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

**Table 1** Data for patients with macular hole or proliferative diabetic retinopathy.

Characteristics	Macular hole (14 patients)	Proliferative diabetic retinopathy (12 patients)
Age (Years)	$63.5 \pm 10.6$	$52.9 \pm 10.6$
No. of women	13	7
Duration (Years)	-	$7.7 \pm 1.6$
<b>Clinical findings</b>		
Macular edema	-	4
+Proliferative membrane	-	1
+Traction membrane	-	1
Alone	-	2
Vitreous hemorrhage	-	7
+Traction membrane	-	6
Proliferative membrane	-	8
+Traction retinal detachment	-	5
Alone	-	3
<b>Pretreatments</b>		
Insulin	-	6
Hypoglycemic drug	-	6
Macular hole Stage 2	6	-
Macular hole Stage 3	8	-

Complications of each patient are shown in "Clinical findings", and "Pretreatments" indicates therapies until vitreous surgeries. "Age" and "Duration" data are mean  $\pm$  SD. The result was cited from ref 22.

### 2. 3. 硝子体および血清中 EC-SOD 濃度と VEGF 濃度の比較

増殖糖尿病網膜症患者および黄斑円孔患者の硝子体および血清中 EC-SOD 濃度の測定は、Adachi らの手法に準じて ELISA 法で測定した<sup>23)</sup>。ヒト EC-SOD モノクローナル抗体 (終濃度 50 mg/L) を 96 穴プレートの各穴に固定後、標準品、硝子体サンプルまたは血清サンプルを添加して静置した。その後、アルカリフォスファターゼ標識ヒト EC-SOD モノクローナル抗体を各穴に添加し、基質溶液 [終濃度 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% sodium azide および 2.7 mM p-nitrophenyl phosphate 含有塩酸ジエタノールアミン溶液 (0.1 M, pH 9.8) で発色させた。発色強度は測定波長 415 nm の吸光度を測定し、EC-SOD 濃度を算出した。硝子体中 EC-SOD 濃度は、黄斑円孔患者 (mean ± SD, 29.3 ± 6.6 ng/ml) に比べ増殖糖尿病網膜症患者 (58.0 ± 23.8 ng/ml) で有意 ( $P < 0.01$ ) な高値を示した (Fig. 5)。一方、血清中 EC-SOD 濃度は、増殖糖尿病網膜症患者と黄斑円孔患者間に違いは認められなかった (増殖糖尿病網膜症患者: 85.3 ± 18.4 ng/mL, 黄斑円孔患者: 85.0 ± 12.3 ng/mL) ( $P = 0.96$ )。

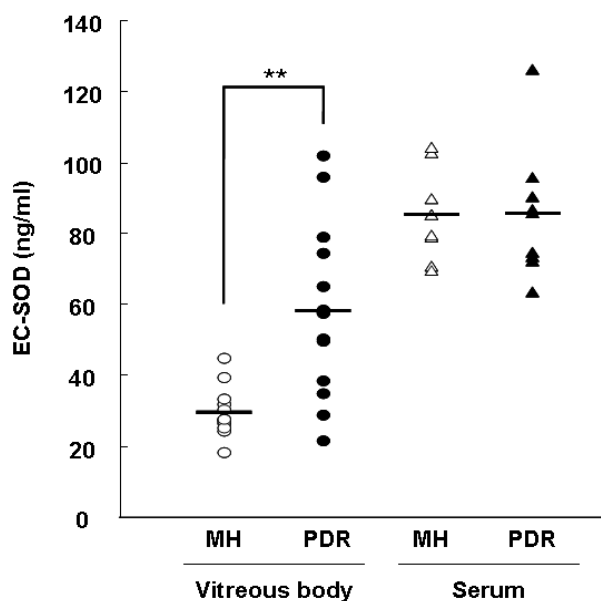


Fig. 5 EC-SOD levels in vitreous body and serum samples from macular hole (MH) and proliferative diabetic retinopathy (PDR) patients.

\*\* $P < 0.01$  (Kruskal-Wallis test). The result was cited from ref 22.

増殖糖尿病網膜症患者および黄斑円孔患者の硝子体および血清中 VEGF 濃度は Endogen<sup>®</sup> Human VEGF ELISA Kit (Pierce Biotechnology) を用いて測定した。硝子体または血清サンプルを ELISA プレートの各穴に添加して静置後、ビオチン化標識抗ヒト VEGF 抗体を添加した。その後、ストレプトアビジン-horseradish peroxidase (HRP) 溶

液を添加し、3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine 基質溶液で発色させた。発色強度は測定波長 450 nm 参照波長 550 nm) の吸光度を測定し、VEGF 濃度を算出した。硝子体中 VEGF 濃度は、黄斑円孔患者 (mean ± SD, 17.7 ± 15.5 pg/mL) に比べ増殖糖尿病網膜症患者 (798.2 ± 882.7 pg/ml) で有意 ( $P < 0.01$ ) な高値を示した (Fig. 6)。一方、血清中 VEGF 濃度は、増殖糖尿病網膜症患者と黄斑円孔患者間に違いは認められなかった (増殖糖尿病網膜症患者: 177.9 ± 155.5 pg/mL, 黄斑円孔患者: 151.3 ± 96.8 pg/mL) ( $P = 0.83$ )。

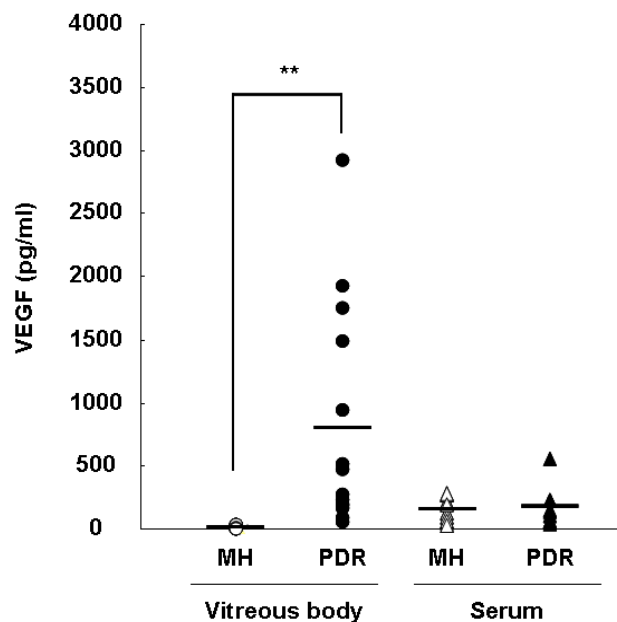


Fig. 6 VEGF levels in vitreous body and serum samples from macular hole (MH) and proliferative diabetic retinopathy (PDR) patients.

\*\* $P < 0.01$  (Kruskal-Wallis test). The result was cited from ref 22.

### 2. 4. 硝子体および血清中 EC-SOD 濃度と VEGF 濃度の相関

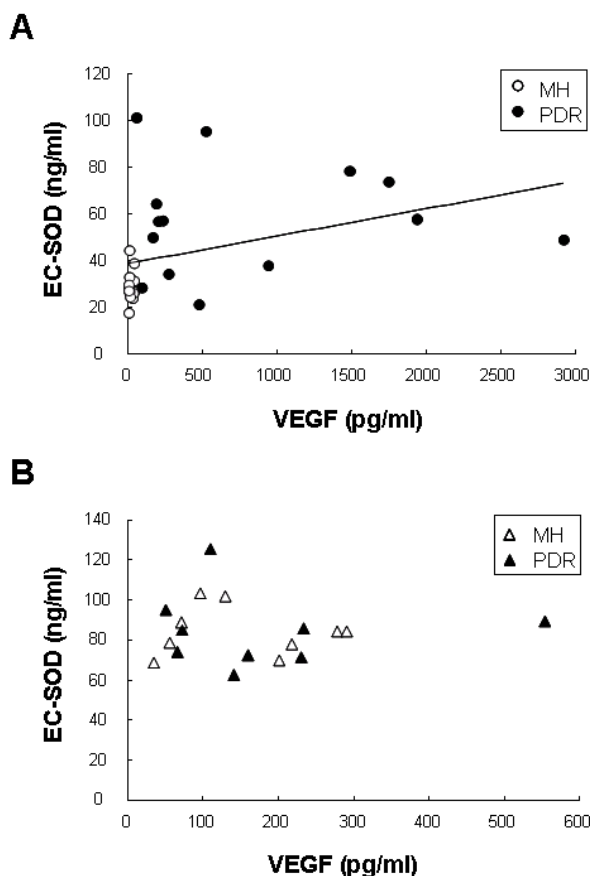
増殖糖尿病網膜症患者および黄斑円孔患者の硝子体および血清中 EC-SOD 濃度と VEGF 濃度の相関関係について検討した (Spearman rank-correlation test)。全患者において、硝子体中 EC-SOD 濃度は VEGF 濃度と強い正の相関性 ( $r_s$  [Spearman's rho correlation coefficient] = 0.61,  $P < 0.001$ ) が認められた (Fig. 7A)。一方、血清中 EC-SOD 濃度および VEGF 濃度間に明らかな相関性は認められなかった ( $r_s = -0.03$ ,  $P = 0.46$ ) (Fig. 7B)。

### 3. in vitro 血管新生モデルを用いた検討

#### 3. 1. VEGF 誘発 HUVEC 管腔形成に対する EC-SOD の作用

増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内で EC-SOD 濃度が上昇したことに起因する EC-SOD の役割を検討する一環と





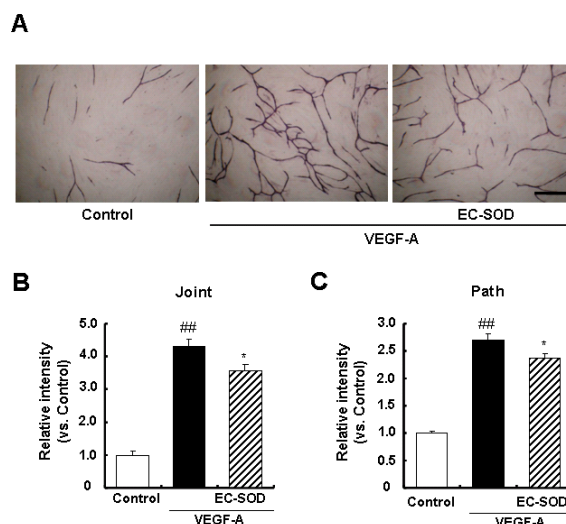
**Fig. 7** Correlations between EC-SOD and VEGF levels (for vitreous body and serum).

(A) Intravitreal EC-SOD showed a significant correlation with intravitreal VEGF. The correlation coefficient was 0.61, and the  $P$  value was  $P < 0.001$ . (B) In the serum, there was no significant correlation between EC-SOD and VEGF.

MH: Macular hole, PDR: Proliferative diabetic retinopathy  
The results were cited from ref 22.

して、EC-SODの抗血管新生作用を血管新生キット(倉敷紡績株式会社)を用いて評価した。本キットは、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(human umbilical vein endothelial cell: HUVEC)と正常ヒト皮膚線維芽細胞が生理的環境下で共培養されており、HUVECによって形成される微小血管様管腔構造は不均一な管腔形態を示すため、生体内で認められる毛細血管床と類似している<sup>24)–26)</sup>。さらに、本血管新生評価系は、HUVECによる微小血管様管腔構造の形成促進のため、血管新生において最も重要な因子の一つであるVEGFが用いられている(*in vitro*血管新生モデルでは、VEGFファミリーの内、血管新生において中心的役割を担うVEGF-Aを使用)。したがって、諸種化合物の抗血管新生作用を探索する上で適したモデルである。EC-SOD(終濃度100 ng/ml)はVEGF-A(終濃度10 ng/ml)含有培地に添加した。培養1、4、7および9日目に培地交換を行い、培養11日目に細胞を固定した。HUVECはマウス抗ヒト

CD31抗体を添加後、5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT)を基質にアルカリホスファターゼ反応で染色した。染色後、各穴あたり無作為に選んだ5カ所をデジタルカメラ(COOLPIX 4500)で撮影した。HUVECによって形成された微小血管様管腔構造の形態は、血管新生定量ソフトウェア ver. 2 (Kurabo)で解析し、本ソフトウェアで算出される joint (管腔ネットワークを形成する分岐点数)および path (管腔ネットワークを形成する枝数)について定量的に評価した。VEGF-A添加により、コントロール(VEGF-A非添加)に比べ、HUVECによって形成される微小血管様管腔構造の増加が認められ、この作用はEC-SOD添加により明らかに減少した(Fig. 8A)。微小血管様管腔構造の形態を血管新生定量ソフトウェアで定量的に評価したところ、VEGF-A添加により、両評価指標(joint および path)はコントロールに比べ、2倍以上の有意( $P < 0.01$ )な増加が認められた。EC-SODはVEGF-Aによる両評価指標の増加を有意( $P < 0.05$ )に抑制した(Fig. 8B, 8C)。



**Fig. 8** Effects of EC-SOD on *in vitro* tube formation in HUVECs.

(A) *In vitro* tube formation was achieved using an *in vitro* angiogenesis kit. HUVECs were stained with anti-CD31 antibody, an endothelial-cell marker. Scale bar represents 0.5 mm. Tube formation was evaluated by measurements of (B) joint and (C) path. Data represent means  $\pm$  SEM;  $n = 8$  per group. ##:  $P < 0.01$  vs. Control (Tukey test). \*:  $P < 0.05$  vs. VEGF-A alone (Tukey test). The results were cited from ref 22.

### 3. 2. HUVEC および HRMEC の VEGF 誘発細胞増殖および細胞遊走に対する EC-SOD の作用

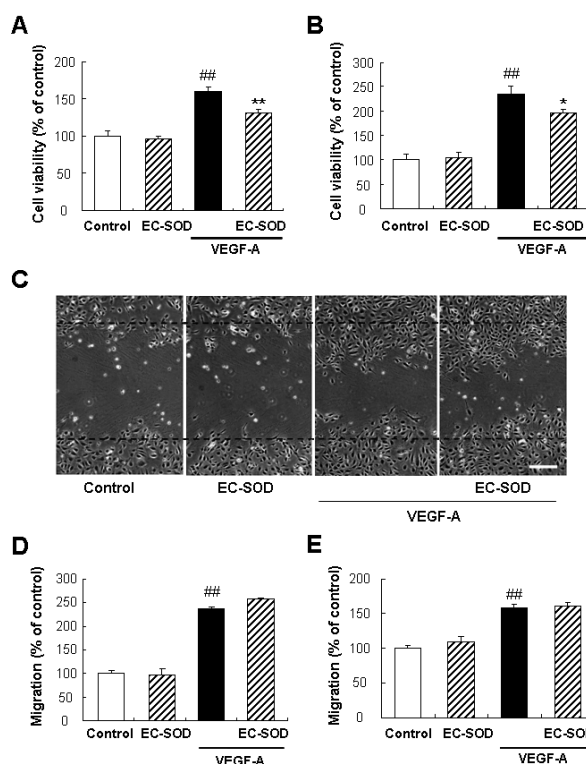
VEGF 誘発 HUVEC 管腔形成に対する EC-SOD の抗血管新生作用をより詳細に検討するため、HUVEC およびヒト網膜毛細血管内皮細胞(human retinal microvascular endothelial cell: HRMEC)の細胞増殖能および細胞遊走能に対する EC-SOD の作用を評価した。

細胞増殖能に対する評価では、HUVEC または HRMEC を 96 穴プレートに播種 ( $2 \times 10^3$  cells/well) し、24 時間培養した。その後、2% FBS 含有培地を用いて 6 時間、血清除去 (serum starvation) を行った。EC-SOD (終濃度 100 ng/mL) は VEGF-A (終濃度 10 ng/mL 有無の培地に添加し、72 時間培養した。生細胞数の測定は、テトラゾリウム塩 WST-8 を発色基質とする Cell counting kit-8 (CCK-8; 株式会社同仁化学研究所) を用いて行った。CCK-8 を添加して 3 時間インキュベート後、測定波長 450 nm (参照波長 660 nm) の吸光度を測定した。VEGF-A 添加により、HUVEC および HRMEC はコントロールに比べ、それぞれ 1.6 倍および 2.4 倍の有意 ( $P < 0.01$ ) な細胞増殖促進が認められた (Fig. 9A, 9B)。VEGF-A と共に EC-SOD を添加することにより、HUVEC および HRMEC の VEGF 誘発細胞増殖を有意 (それぞれ  $P < 0.01$  および  $P < 0.05$ ) に抑制した (Fig. 9A, 9B)。EC-SOD の単独添加はコントロールと比べ明らかな変化は認められなかった。

細胞遊走能に対する評価では、HUVEC または HRMEC を 12 穴プレートに播種 ( $4 \times 10^4$  cells/well) し、48 時間培養した。その後、1% FBS 含有培地を用いて 24 時間、血清除去を行った。EC-SOD (終濃度 100 ng/mL) は VEGF-A (終濃度 10 ng/ml) 有無の培地に添加し、24 時間培養した。細胞遊走能は、10~200  $\mu$ l 用チップを用いて約 1 mm の幅に HUVEC および HRMEC を剥離し、その領域内に進展した細胞数を評価した (高感度冷却 CCD [charge coupled device] カメラ [DP30BW, OLYMPUS] を用いて各穴あたり 4ヶ所について同位置を撮影)。VEGF-A 添加により、HUVEC および HRMEC はコントロールに比べ、それぞれ 2.4 倍および 1.6 倍の有意 ( $P < 0.01$ ) な細胞遊走促進が認められたが、EC-SOD 添加による細胞遊走抑制作用は認められなかった (Fig. 9C-E)。

#### 4. 考察

増殖糖尿病網膜症患者および黄斑円孔患者から採取した硝子体および血清中 EC-SOD および VEGF 濃度を測定した。増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中 EC-SOD および VEGF 濃度は、黄斑円孔患者に比べ高値を示し、全患者において両者間に強い正の相関関係が認められた。一方、血清中 EC-SOD および VEGF 濃度は、増殖糖尿病網膜症患者および黄斑円孔患者間で違いは認められなかった。増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内で増加した EC-SOD の役割を明らかにする一環として、血管新生に着目し、血管内皮細胞の管腔形成能・増殖能・遊走能を指標とした *in vitro* 血管新生モデルを用いて EC-SOD の作用を評価した。EC-SOD は VEGF 誘発 HUVEC 管腔形成、HUVEC および HRMEC の VEGF 誘発細胞増殖に対して抑制作用を示した。



**Fig. 9** Effects of EC-SOD on VEGF-induced cell proliferation and migration in HUVECs and HRMECs. In the proliferation assay, (A) HUVECs and (B) HRMECs were incubated with VEGF-A with or without EC-SOD. Data represent means  $\pm$  SEM. The numbers of each group were Control (n = 12), EC-SOD alone (n = 12), VEGF-A alone (n = 18), and VEGF-A plus EC-SOD (n = 18). ###:  $P < 0.01$  vs. Control (Tukey test). \*, \*\*:  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  vs. VEGF-A alone (Tukey test). (C, D) HUVECs and (E) HRMECs migration were assessed using a wound-healing assay. Scale bar represents 250  $\mu$ m. Horizontal lines indicate wound-edges. Data represent means  $\pm$  SEM (n = 4). ###:  $P < 0.01$  vs. Control (Tukey test). The results were cited from ref 22.

本検討において、硝子体中 EC-SOD および VEGF 濃度は、黄斑円孔患者に比べ増殖糖尿病網膜症患者で高値を示し (Figs. 5, 6)、全患者において、両因子間に強い正の相関性が認められた (Fig. 7)。しかし、増殖糖尿病網膜症患者内では、これら両因子間に相関性は認められなかった。これらの結果は、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内で増加した EC-SOD および VEGF がそれぞれ独立して制御されていることを示唆している。それでは何故 EC-SOD は増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内で増加したのだろうか？ EC-SOD の発現は特異的な細胞および組織に局限されており、とくに肺、心臓、腎臓および血管において高発現が認められている<sup>27)</sup>。増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内には病的な新生血管が形成されており、黄斑円孔患者に比べ EC-SOD がより隣接する環境にあることが予想される。また、メチオニン代謝物の一つであるホモシステインは、血管内皮細胞に結合した EC-SOD のヘパリン結合能を抑制

する働きがあり<sup>28)</sup>、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内で増加している<sup>29)</sup>。さらに、糖尿病患者では、高血糖に起因する非酵素的糖化が亢進しており、糖化 CuZn-SOD は酵素活性を阻害されるが<sup>30)</sup>、糖化 EC-SOD は酵素活性を維持したままである<sup>31)</sup>。EC-SOD への糖化はヘパリン結合ドメインであるリジン残基に生じるため、糖化 EC-SOD はヘパリン親和性が低下しており<sup>31)</sup>、糖尿病患者では本来、血管内皮細胞周囲の ECM に分布している EC-SOD の局在が変化している可能性がある。以上のことから、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内では高血糖による VEGF の増加が認められ、そのホメオスタシスとしての抑制効果のため、EC-SOD が増加した可能性が考えられる。

網膜における病的な血管新生は増殖糖尿病網膜症の特徴的所見であり、その病態形成において、血清中 VEGF 濃度の増減は認められないが、硝子体中 VEGF 濃度とは強い正の相関性を示すことが報告されている<sup>11), 12)</sup>。本検討においても、既知の報告と同様に、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中 VEGF 濃度は、対照として設定した黄斑円孔患者に比べ高値を示した。非糖尿病患者に比べ増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中 VEGF 濃度が約 100 倍上昇していることに起因するメカニズムの詳細は不明だが、硝子体中 VEGF 濃度の上昇は増殖糖尿病網膜症患者の病態進展における危険因子の一つであると思われる。

糖尿病網膜症の病態進展に関わる主要因子の一つである VEGF の発現には酸化ストレスの関与が報告されている<sup>32)</sup>。また、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内では、脂質過酸化の指標であるマロンジアルデヒド様代謝物および 4-ヒドロキシノネナル量の増加が報告されており<sup>33)</sup>、増殖糖尿病網膜症において眼組織と酸化ストレスの間には密接な関連性が示唆されている。酸化ストレスは様々なレッドックス酵素（例えば SOD、CAT、グルタチオン S-トランスフェラーゼ）および抗酸化物質（例えばビタミン E、コエンザイム Q<sub>10</sub>）によって制御されていることが知られている。本検討において、レッドックス酵素の一つである EC-SOD は、黄斑円孔患者に比べ増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内で約 2 倍の増加が認められた。この結果から、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内で増加した EC-SOD が担う役割として、(1) EC-SOD は酸化ストレスと抗酸化活性間のバランス維持に寄与している可能性がある、また、(2) EC-SOD は血管新生抑制物質として作用している可能性がある。Wheeler らは EC-SOD を過剰発現させたマウスに B16-F1 腫瘍細胞を移植した際、B16-F1 腫瘍細胞の増殖および腫瘍血管新生が抑制されたことを報告している<sup>34)</sup>。そこで、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体内で増加した EC-SOD の抗血管新生作用について、*in vitro* 血管新生モデルを用いて評価した。EC-SOD は VEGF 誘発 HUVEC 管腔形成および VEGF 誘発 HUVEC および HRMEC 増殖に対して抑制作用を示した (Figs. 8, 9)。

EC-SOD の血管内皮細胞増殖抑制作用は、HUVEC だけでなくヒト網膜毛細血管内皮細胞である HRMEC においても認められた (Fig. 9)。VEGF 誘発血管新生には ROS が関与しており、様々な抗酸化剤による抗血管新生作用が報告されている<sup>19)</sup>。以上より、EC-SOD は血管新生のシグナル伝達経路に関与している ROS の産生を抑制することにより、その作用を発揮している可能性があるが、詳細なメカニズムは不明である。しかし、*in vitro* における検討において、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中 EC-SOD 濃度 (約 20~100 ng/mL) とほぼ同程度である 100 ng/ml EC-SOD に抗血管新生作用が認められたことから (Figs. 8, 9)、実際の病態においても EC-SOD は抗血管新生作用を示す可能性が示唆された。

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) は血管内皮細胞の細胞遊走を促進することが知られている。NO は O<sub>2</sub><sup>-</sup> とほぼ拡散律速で反応し、その生理作用を損失するため<sup>35)</sup>、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 消去活性作用を有する EC-SOD は NO の生理活性保護に重要である。EC-SOD は VEGF 誘発 HUVEC 管腔形成および VEGF 誘発 HUVEC および HRMEC 増殖に対して抑制作用を示したが、VEGF 誘発 HUVEC および HRMEC 遊走に違いは認められなかった (Figs. 7, 8)。現時点において EC-SOD が HUVEC および HRMEC の細胞遊走に影響を及ぼさなかった理由は不明だが、その作用の一部に NO の生理活性保護の関与が考えられる。

酸化性物質が VEGF 過剰発現と糖尿病網膜症間の仲介役として担う役割は十分に確立されており、ROS レベルを低下させる薬剤が糖尿病網膜症の治療に有用である可能性がある。例えば、低分子量 SOD やカタラーゼ様物質は O<sub>2</sub><sup>-</sup> や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の還元を触媒するのに非常に効果的であること<sup>36)</sup>、SOD 様物質であるテンポール (tempol) は糖尿病ラットで生じる血管内皮細胞の機能不全を改善すること<sup>37)</sup>、そして亜硝酸過酸化分解促進薬である FP15 は糖尿病マウスの網膜血管への白血球接着および血管機能不全の両者に対して保護効果を有することが報告されている<sup>38)</sup>。眼組織は直接紫外線が照射されるため、他の組織に比べ多量の ROS に曝されており、強い抗酸化活性を有する薬物は糖尿病網膜症の治療に有効であるかもしれない。

本検討において、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中 EC-SOD および VEGF 濃度を測定したが、増殖糖尿病網膜症患者の中には硝子体出血を伴う患者も含まれていた。そこで、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体出血の有無による両因子の影響を検討した。しかし、硝子体中 EC-SOD および VEGF 濃度共に、硝子体出血の有無による違いは認められず (データ未提示)、両因子共に硝子体出血による影響は認められなかった。



## 5. 結論

増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中 EC-SOD 濃度および VEGF 濃度は、対照として用いた黄斑円孔患者に比べ高値を示し、両因子は全患者間において強い正の相関関係が認められた。また、*in vitro* 血管新生モデルを用いた検討において、EC-SOD は VEGF 誘発 HUVEC 管腔形成および VEGF 誘発 HUVEC および HRMEC 増殖を抑制し、抗血管新生作用を示した。以上より、抗酸化防御システム的一端を担う抗酸化酵素 EC-SOD は、網膜における病的な血管新生を主病態とする増殖糖尿病網膜症において中心的な役割を担う可能性が示唆され、糖尿病網膜症の病態・機序を解明するために有用な知見を得ることができた。

## 6. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に際し、終始御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤 雅光先生並びに同助教 鶴間 一寛先生に深謝致します。また、本研究の遂行にあたり、実験材料の御提供と御助言を賜りました大阪医科大学眼科学教室教授 池田 恒彦先生並びに同講師 杉山 哲也先生に深謝致します。

## 7. 引用文献

- Bussolino F., Mantovani A., Persico G., *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 251-256 (1997).
- Hanahan D., *Science*, **277**, 48-50 (1997).
- Carmeliet P., Jain R.K., *Nature*, **407**, 249-257 (2000).
- 中江公裕, 増田寛治郎, 妹尾正, 小暮文雄, 澤充, 金井淳, 石橋達郎, “厚生労働科学研究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,” 2006, pp. 263-267.
- Kato S., Takemori M., Kitano S., Hori S., Fukushima H., Numaga J., Yamashita H., *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **58**, 187-192 (2002).
- Alberti G., Zimmet P., Shaw J., Bloomgarden Z., Kaufman F., Silink M., Consensus Workshop Group, *Diabetes Care*, **27**, 1798-1811 (2004).
- Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F., *Science*, **219**, 983-985 (1983).
- Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly D.T., *Science*, **246**, 1309-1312 (1989).
- Millauer B., Shawver L.K., Plate K.H., Risau W., Ullrich A., *Nature*, **367**, 576-579 (1994).
- Sone H., Kawakami Y., Okuda Y., Kondo S., Hanatani M., Suzuki H., Yamashita K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 193-198 (1996).
- Aiello L.P., *Curr. Opin. Ophthalmol.*, **8**, 19-31 (1997).
- Funatsu H., Yamashita H., Mimura T., Noma H., Nakamura S., Hori S., *Eye*, **21**, 377-382 (2007).
- Aiello L.P., Northrup J.M., Keyt B.A., Takagi H., Iwamoto M.A., *Arch. Ophthalmol.*, **113**, 1538-1544 (1995).
- Aiello L.P., Gardner T.W., King G.L., Blankenship G., Cavallerano J.D., Ferris F.L. 3rd, Klein R., *Diabetes Care*, **21**, 143-156 (1998).
- Sies H., *Exp. Physiol.*, **82**, 291-295 (1997).
- Brownlee M., *Nature*, **414**, 813-820 (2001).
- Ellis E.A., Grant M.B., Murray F.T., Wachowski M.B., Guberski D.L., Kubilis P.S., Luty G.A., *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 111-120 (1998).
- Obrosova I.G., Minchenko A.G., Marinescu V., Fathallah L., Kennedy A., Stockert C.M., Frank R.N., Stevens M.J., *Diabetologia*, **44**, 1102-1110 (2001).
- Colavitti R., Pani G., Bedogni B., Anzevino R., Borrello S., Waltenberger J., Galeotti T., *J. Biol. Chem.*, **277**, 3101-3108 (2002).
- Ushio-Fukai M., Tang Y., Fukai T., Dikalov S.I., Ma Y., Fujimoto M., Quinn M.T., Pagano P.J., Johnson C., Alexander R.W., *Circ. Res.*, **91**, 1160-1167 (2002).
- Fattman C.L., Schaefer L.M., Oury T.D., *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 236-256 (2003).
- Izuta H., Chikaraishi Y., Adachi T., Shimazawa M., Sugiyama T., Ikeda T., Hara H., *Mol. Vis.*, **15**, 2663-2672 (2009).
- Adachi T., Nakamura M., Yamada H., Futenma A., Kato K., Hirano K., *Clin. Chim. Acta.*, **229**, 123-131 (1994).
- Bishop E.T., Bell G.T., Bloor S., Broom I.J., Hendry N.F., Wheatley D.N., *Angiogenesis*, **3**, 335-344 (1999).
- Donovan D., Brown N.J., Bishop E.T., Lewis C.E., *Angiogenesis*, **4**, 113-121 (2001).
- Friis T., Kjaer Sørensen B., Engel A.M., Rygaard J., Houen G., *APMIS*, **111**, 658-668 (2003).
- Zelko I.N., Mueller M.R., Folz R.J., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **39**, 243-251 (2008).
- Yamamoto M., Hara H., Adachi T., *FEBS Lett.*, **486**, 159-162 (2000).
- Coral K., Angayarkanni N., Gomathy N., Bharathselvi M., Pukhraj R., Rupak R., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 3607-3612 (2009).
- Kawamura N., Ookawara T., Suzuki K., Konishi K., Mino M., Taniguchi N., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **74**, 1352-1354 (1992).
- Adachi T., Ohta H., Hayashi K., Hirano K., Marklund S.L., *Free Radic. Biol. Med.*, **13**, 205-210 (1992).
- Caldwell R.B., Bartoli M., Behzadian M.A., El-Remessy A.E., Al-Shabrawey M., Platt D.H., Liou G.I., Caldwell R.W., *Curr. Drug Targets*, **6**, 511-524 (2005).
- Verdejo C., Marco P., Renau-Piqueras J., Pinazo-Duran

- M.D., *Eye*, **13**, 183-188 (1999).
- 34) Wheeler M.D., Smutney O.M., Samulski R.J., *Mol. Cancer Res.*, **1**, 871-881 (2003).
- 35) Thomson L., Trujillo M., Telleri R., Radi R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **319**, 491-497 (1995).
- 36) Hoogwerf B.J., Young J.B., *Cleve. Clin. J. Med.*, **67**, 287-293 (2000).
- 37) Nassar T., Kadery B., Lotan C., Da'as N., Kleinman Y., Haj-Yehia A., *Eur. J. Pharmacol.*, **436**, 111-118 (2002).
- 38) Sugawara R., Hikichi T., Kitaya N., Mori F., Nagaoka T., Yoshida A., Szabo C., *Curr. Eye Res.*, **29**, 11-16 (2004).

## 8. 特記事項

本総説は岐阜薬科大学博士論文（乙第 334 号）の内容を中心にまとめたものである。