

筑 波 大 学

博 士（医学）学 位 論 文

論文題目

エンドセリン A 受容体拮抗薬は、ストレプトゾトシン糖尿病ラットの網膜で上昇した VEGF および ICAM-1 の発現を抑制する

2 0 0 5

筑波大学大学院人間総合科学研究科

増 澤 浩 一

目次

第一章 糖尿病網膜症とエンドセリン

1 糖尿病網膜症とは	2
2 エンドセリンとは	4
3 糖尿病網膜症とエンドセリンの関係	5

第二章 糖尿病網膜症の実験的研究

1 糖尿病網膜症の動物モデル	7
2 streptozotocin-induced diabetic rat modelについて	10
3 実験的糖尿病網膜症の悪化と改善の指標	11

第三章 エンドセリン遮断薬による糖尿病網膜症の治療

1 エンドセリン遮断薬について	14
2 エンドセリン受容体拮抗薬の選択	15

第四章 本研究に関する実験

1 目的	16
2 方法	16
3 結果	40
4 考察	43
5 結論	49

第五章 総合考察（臨床応用への可能性）

引用文献	53
------	----

図・表	62
-----	----

第一章 糖尿病網膜症とエンドセリン

1 糖尿病網膜症とは

糖尿病網膜症は糖尿病の三大合併症の一つである。また現在、日本人の失明原因の第一位がこの糖尿病網膜症であり[1]、糖尿病患者が年々増加していることや、この失明の多くが中高年齢層になって生じるいわゆる中途失明であることから社会的問題としても注目されている[2]。糖尿病に罹患後、網膜症が発症するまでには一定の期間を要する。つまり、糖尿病がありながらも網膜症が発症していない期間が何年か存在する。一般的にはこれらの期間は 5～10 年程度と考えられている[3]。この無網膜症の期間を経て、網膜に点状出血や微小血管瘤を生じると初めて検査上で確認できる。これらの微小出血に加えて斑状出血や硬性白斑が生じるまでの時期を単純網膜症 simple diabetic retinopathy (SDR)と称する。この時期は例えば糖尿病の内科的コントロールが奏功するなどの要因によって器質的な変化を残さずに改善することができるいわゆる「可逆的な網膜症」の段階である。この可逆的な網膜症の時期に十分な治療が施されなかった網膜では、血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF)や intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 などの関与により次第に毛細血管レベルの血管に閉塞が生じるようになる[4-8]。この時期に蛍光眼底造影検査 fluorescein angiography (FAG)を行うと、網膜の各所に血流の見られない無灌流野 non perfusion area (NPA)が確認できる。軟性白斑や網膜内細小血管異常 intraretinal microvascular abnormality (IRMA)を特徴とするこの時期は増殖前網膜症 preproliferative diabetic retinopathy (PPDR)とよばれ、この

段階から網膜症は「不可逆的な網膜症」へと大きく変化する。NPA では VEGF をはじめとした増殖因子の発現が亢進しており、同部への網膜光凝固術 photocoagulation (PC) など適切な治療が施されないとながて網膜には線維血管性の増殖性変化が生じる。これが網膜症の最終段階で、増殖糖尿病網膜症 proliferative diabetic retinopathy (PDR) とよばれ、網膜剥離や血管新生緑内障を生じ、多くの症例で手術治療が行われる。しかし、この段階に至ると硝子体手術 vitrectomy を行っても一部の症例は十分な改善は得られず失明に至る。

糖尿病を治療せず放置した場合、基本的には上記のような自然経過をたどるが、糖尿病患者個々の例をみると、すべての症例でこのような教科書的な経過をたどるわけではない。糖尿病罹患後に網膜症を発症するまでの期間を例にとると、一般的には前述のごとく罹患後 5～10 年程度と考えられているが、少数ながら、これらの期間以前の早期から網膜症を発症する例もあり、厚生労働省の統計では、Ⅰ型糖尿病の 17%、Ⅱ型糖尿病の 14% の患者で罹病期間が 5 年未満においてもすでに網膜症を認めたと報告されている[9]。

臨床においては、糖尿病自体のコントロールは同程度であっても、網膜症の進行具合が明らかに異なる症例をしばしば経験する。この差は何によって生じているのであろうか。現在、糖尿病が metabolic syndrome という新しい疾患概念の一つの病型としてもとらえられるようになってきており、網膜症においても、例えば血糖コントロール以外の網膜症進行の主要な risk factor として高血圧が指摘されている[10, 11]。ゆえに、網膜症の進行度合いの違いの要因として、これらの危険因子を含む全身的な要因の有無などを考慮する必要があると考えられる。しかしながら、網膜症の進行に本質的に何が関与しているかは未だ不明のままである。したがって、これら網膜症の進行の違いに寄与するような要因が何であることを追及し、網膜症の進行のメカニズムがある程度明確になれば、

それに対する治療をできるだけ早期に、例えば網膜症が非可逆的な状態になる前に開始することにより、少なくとも視機能の点からは Quality of life を侵すことなく経過することが可能になるかもしれない。

本研究では、後述の理由からこの網膜症の進行の要因として、血管収縮性のペプチドであるエンドセリン endothelin (ET)の関与が大きいのではないかと推察し、検討を行った。

2 エンドセリンとは

ETは1988年にYanagisawa[12]らによりブタ血管内皮細胞の培養上清から単離された21個のアミノ酸よりなるペプチドである。既知の内因性血管収縮物質と比較してその血管収縮作用は極めて強力で、またその収縮作用が極めて持続性であるため、発見当初より脳血管攣縮[13]、高血圧[14]、冠血管攣縮[15]などに関与する可能性が推測され、各分野で様々な検討が行われてきた。

このETにはET-1、ET-2、ET-3という3種類のアイソペプチドが存在する[16]が、血管内皮細胞ではもっぱらET-1が産生されている[17]。また、これらに対する受容体として、それぞれに対する親和性の強さが $ET-1 \geq ET-2 \gg ET-3$ である ET_A receptorと $ET-1=ET-2=ET-3$ である ET_B receptorが存在し[16]、 ET_A receptorは主に血管平滑筋（網膜の毛細血管では周皮細胞）に分布し、 ET_B receptorは主に血管内皮に分布している[18]。

眼科領域でも、ETの受容体が虹彩、毛様体の平滑筋[19, 20]や網膜血管[21]などに存在することから、眼圧調節、網膜および視神経乳頭の血液循環に関与していることが推測され、研究が進んだ。これらのうち、最も多く行われてきた研究は、ET-1の硝子体内注射を用いて網膜血管への影響を検討したものである[22-27]。様々な濃度のET-1が硝子体内に投与され、網膜血管径や網膜組織血

流量のような網膜循環に関連した因子[22, 24, 27]や網膜電図 electroretinogram (ERG)のような視機能に関連した因子[26]が検討された。これらの検討の結果、網膜血管への直接的な神経支配を欠く網膜循環[28]においては、局所因子としてのET-1が一酸化窒素 nitric oxide (NO)とともにその循環調節に最も重要な役割を果たしていることが示唆されるようになった[29]。また、ET receptor agonistやET receptor antagonistを用いた解析からETによる網膜血管の収縮作用は、主にET_A receptorが関与する反応であることが示唆された[23]。

3 糖尿病網膜症とエンドセリンの関係

糖尿病網膜症において、網膜での循環動態がどのように変化するかに関して、以前より検討が行われてきた。しかし、測定法の違いなどから様々な報告がなされ、一定の見解が得られていなかった。近年、糖尿病網膜症と網膜循環について最近の趨勢をまとめた報告が日本眼科学会総会においてなされ、そこではClermontらによる、「糖尿病初期ではET-1の増加により網膜血流が低下し、その結果虚血によってVEGFが出現し、網膜症が進行するとそれが増加し、網膜血流を増加させる」との報告[30]に基づき、網膜血流量は、網膜症のない時期や初期では減少し、網膜症が進行すると増加するとの見解が示されている。さらに、動物モデルにおいても糖尿病では網膜循環は低下するとする報告が多いこともあわせて示された[31]。このことから、糖尿病網膜症の初期で生じる網膜血流の減少に関与する因子の検討が行われ、強力で持続的な血管収縮を引き起こすET-1に注目が集まり、様々な検討が行われた。実験的な検討においては、約150匹の多数のラットを用いたTakagiらの研究[32]が代表的なものであり、ストレプトゾトシン streptozotocin (STZ)により誘発された糖尿病ラットの網膜ではコ

ントロールと比較して 33%の血流減少が認められ、この減少はET antagonist の硝子体注射で改善したこと、また、非糖尿病ラットに 1×10^{-8} MのET-1 を硝子体内注射すると糖尿病ラットと同程度の血流減少を生じたことなどを報告し[32]、糖尿病網膜症においてET-1 がその網膜血流の減少に強く関与していることを示唆した。これ以外にも糖尿病網膜における網膜血流の減少がET antagonistによって改善したという報告が複数あり[33, 34]、糖尿病網膜症の進行にET-1 が関与する可能性を示唆している。また、臨床においても Letiziaらは単純網膜症、増殖前網膜症、増殖網膜症を有する患者の血中ET-1 濃度を測定し、それぞれの病期ごとに比較したところ、増殖前網膜症で最も上昇していたと報告した[35]。増殖前網膜症の特徴は毛細血管レベルの血管閉塞が多発することであり、網膜症が増殖化に向かう最初の変換点である。この増殖前網膜症を生じている患者血中のET-1 が他の病期よりも上昇していたという事実は大変興味深い。推測の域をでないが、血中で増加したET-1 は網膜循環中でも同様に流れているため、この慢性に上昇したET-1 がtriggerとなって毛細血管レベルの血管収縮が引き起こされ、無灌流野を生じる原因となっていると考えられることもできないだろうか。これより進行した網膜症である増殖糖尿病網膜症（PDR）においては、その手術時に得られた硝子体液中のET-1 濃度が非糖尿病のコントロール患者に比較して著明に増加していたことが報告されている[36]。我々はその前段階である増殖前網膜症でも既に硝子体液中のET-1 濃度は増加しているのではないかと推測しているが、現時点ではこれに関するデータはない。

以上より、糖尿病網膜症の進行に ET-1 が何らかの関与をしているという可能性が推測されたため、実際に糖尿病の動物モデルを用いて、糖尿病網膜症と ET-1 の関連について実験を進めることとした。

第二章 糖尿病網膜症の実験的研究

1 糖尿病網膜症の動物モデル

現時点で様々なモデルが確立され、実用的であるという観点から、本研究では糖尿病動物としてラットを使用することとした。この糖尿病ラットには大きく分類して2種類ある。自然発症糖尿病ラットと、薬剤導入性の糖尿病ラットである。しかし、両者に共通の最大の欠点がある。それは、現在のところヒトでみられるものと同じ増殖網膜症を明確に生じるモデルが存在していないということである。つまり、ある薬剤の効果を増殖網膜症の発症の有無で比較するといった検討を行うことができない。それゆえ、ある因子についての評価を行う場合は、増殖網膜症と関連する何らかの基準を設定し、検討を行うこととなる。これとは逆の発想で、何らかの因子（例えば ET-1）によって増殖網膜症を生じさせることができれば、その因子が網膜症の増殖化に関与する可能性を考えることができるかもしれないと考え、その方法も試みたが、技術的にも難しく不可能であった。

上記を考慮した上で、糖尿病ラットとして、自然発症糖尿病ラットと薬剤導入性の糖尿病ラットどちらのモデルを使用するのが適切であるかを検討した。実際の临床上では 1 型糖尿病患者が圧倒的多数を占める。これに対応するモデルということになると自然発症糖尿病ラットが採用されるべきであると思われる。この種類のラットでは Goto-Kakizaki (GK) rat、Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat をはじめとして、系統が確立され国内でも市販されているラットが数種類存在する。これらを使用した網膜の研究も行われてはいるが、これらのラ

ットの網膜に増殖網膜症を生じたという報告は未だない。これらの市販ラットのうち、WBN/Kob rat[37]に関しては、長期飼育（約 2 年）により、血管の異常（拡張、蛇行）や毛細血管の脱落が認められたという報告がある[38]。また、最近市販されるようになった Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rat は 55 週齢以降、網膜毛細血管の狭小化、周皮細胞の脱落、高度の蛍光漏出、毛細血管基底膜の肥厚、増殖膜の形成および牽引性網膜剥離といったヒト増殖網膜症類似の所見を呈するとされ、さらに、網膜症の進行に伴い虹彩周囲に血管増殖膜を形成し、時に前房出血も認められ出血性緑内障に類似した所見を呈すると報告されている[39]。現在、これ以外に既存の糖尿病モデルに増殖網膜症まで進行する系統はなく、SDT rat はヒト糖尿病網膜症の成因解明および治療薬の開発に有用な合併症モデルになると期待されている。しかしながら、これらのモデルでは網膜にそれぞれの特徴的变化を生じるまでに 1 年以上の期間を要し、例えば治療効果を検討するなどの実験においては実用性に問題が生じると考えられた。また、SDT rat にみられた増殖網膜症類似の所見はその成因がヒトのそれとは異なり、無血管野の出現を起点とするものではない別の機転が関与しているものであることが最近報告された[40]。また、市販はされていないが実験に供され網膜に関する報告があるものとして Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat[41]なども考慮されたが、他の自然発症糖尿病ラットと同様に糖尿病が確立するまでに長期間を要し（type 2 の糖尿病状態になるまでに約 30 週、type 1 の糖尿病になるまでに約 40 週）、さらに、45 週の時点で確認したトリプシン消化標本で、糖尿病網膜症の初期の変化に特徴的な acellular capillaries や pericyte ghosts がみられなかったことから、このラットは血管障害性の糖尿病網膜症の研究には適さないとした論文もあり[42]、積極的な使用には適さないと考えられた。

以上より、Ⅱ型糖尿病による網膜症を念頭において実験を行う場合は、動物モデルでも同様に自然発症の糖尿病ラットを使用するのが望ましいと思われたが、

- (1) 糖尿病自体を発症するのに長期間を要する。また、個々のラットで糖尿病の発症時期が不均一であるため、治療薬の検討に際し、治療開始の週齢をそろえることができない。
- (2) ヒト類似の明確な増殖網膜症を生じるモデルがない
- (3) 自然発症糖尿病ラットモデルを使用した網膜での報告が少ないため、目的とする因子の過去のデータとの比較が難しい

という方法論的な難しさが考えられた。

また、GK rat や OLETF rat を例にとると、この両者のラットでは糖尿病発症の原因遺伝子座がそれぞれ 3～7 ヶ所推定されており[43-47]、このうち共通している遺伝子座が両系統間で今のところ見当たらないことや、WBN/Kob rat、SDT rat や OLETF rat では糖尿病の発症に明確な性差が存在する[37, 39, 48]（糖尿病の発症に性ホルモンが関与）ことなどから、同じⅡ型とされる糖尿病であっても、その病因がそれぞれ根本的に異なるのではないかと考えられる。

以上を考慮すると、単純に血糖の上昇に伴う生体の反応をみていくためには、このような異なる原因で糖尿病を発症している可能性がある自然発症の糖尿病モデルより、むしろ薬剤にて膵臓のβ細胞を破壊して糖尿病を導入した方がよいのではないかと考えるようになった。

2 streptozotocin-induced diabetic rat model について

2-1 ストレプトゾトシン糖尿病ラットを使用する利点

前途の理由から多くの糖尿病網膜症の実験は、薬剤導入による糖尿病モデルで行われている。現在はストレプトゾトシン streptozotocin (STZ)による糖尿病導入が一般的である。このモデルで実験を行うことにより、薬剤投与後約1日で糖尿病が導入されるという時間的な利点、モデル作製の経費が安価であるという経済的な利点、また、このモデルが様々な形で一般的に広く使用されているということから、今までに報告された多大な文献があるというデータの利点が得られる。

自然発症糖尿病ラットと同様にこのモデルでも増殖網膜症を生じたという報告は今のところない。しかし、網膜症の増殖化に関与すると考えられる VEGF を始めとした数多くの分子生物学的因子がこのモデルにより研究されてきた。したがって、実際に増殖網膜症をこのモデルでも作製することはできなくとも、増殖網膜症に関連する因子に関して過去に得られた数多くのデータを利用すれば、それらを増殖網膜症の指標とすることができるのではないかと考えた。また、ET-1 に関しても、第一章の3で述べた Takagi らの研究はこの STZ を使用したモデルであることをはじめ、ET-1 に関する実験を行った多数のデータも存在する[32, 33, 49-51]。これらから、糖尿病の動物モデルとしては STZ 誘発性の糖尿病モデルを使用することとした。

2-2 糖尿病導入の期間と程度

STZ による糖尿病の導入は STZ の用量により糖尿病の重症度を比較的自由にコントロールできるとされており、例えば STZ の導入量が 65 ~ 90mg/kg では

重症の 1 型モデルから 2 型モデルが作製されるが、45mg/kg 程度に投与量を少なくすると軽症の 2 型モデルとなり、重症度の異なる糖尿病動物の作製が可能である[52]。今回、糖尿病動物を作製するにあたり、どの程度の糖尿病状態を作製するかを検討した。

まず、今後予定されている治療期間との関係からこれを考えることにした。STZ 誘発性の糖尿病モデルで行われた網膜の研究では、早いものでは導入後 1 週間程度で検討を行った報告もあるが[53-55]、2 週間から 1 ヶ月程度で検討した報告が多く、長いものでは半年～9 ヶ月といった期間で検討を行っていた[33, 56-58]。しかし、長期間で検討を行ったものではラットの生存のためにインスリンの併用を行っている実験もみられた[33]。そのため、評価を目的とする治療薬（例えば ET antagonist）以外の関与する要因を必要とせずに、糖尿病のみによる影響と、さらにはその治療薬との関連を明確にしたいとの考え方から、治療期間を 1 ヶ月程度として、インスリンなど結果に影響する可能性のある薬剤を使用しないで行える実験系を考えることとした。

また、血糖に関してはほとんどの文献で 250mg/dl 以上を糖尿病として扱っているが、比較的短期間での検討であるため、血糖による網膜への影響がより大きくなることを意図して、血糖 500mg/dl 程度を目標として STZ の用量を決めていくことにした。

3 実験的糖尿病網膜症の悪化と改善の指標

前述のように、現在のところ明確な増殖網膜症を生じる糖尿病モデルは存在しない。このため今回の検討では増殖網膜症の発症の有無による直接的な治療効果の比較はできない。しかし、上記で示した STZ 誘発性のラットモデルでは従来より網膜症の増殖に関与すると考えられている数々の因子について検討さ

れている。このため、今回の研究では、網膜症の悪化（増殖化）に関与すると考えられる代表的な因子の網膜での発現を測定し、この因子の増悪と改善を指標として、ET antagonist による網膜症の治療の可能性を論じたいと考えた。今回は、網膜症の悪化の指標としてすでに広く認識されている以下の 3 要因について検討することにした。

3-1 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF は現在、網膜症の悪化に最も影響が大きいと考えられている分子生物学的因子であり[59]、現在までに糖尿病ラットにおける発現上昇の報告[54, 56, 57, 60-63]や増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中における発現上昇の報告[64-66]などを始めとして多数の報告がなされている。VEGF は糖尿病のかなり初期から網膜での発現が上昇しているとされており、この要因としては、高血糖により形成された advanced glycation end product (AGE)の蓄積によるもの[67]、高濃度のグルコース負荷による protein kinase C (PKC)の活性化を介するもの[68]などが考えられている。この VEGF は、毛細血管の閉塞、透過性亢進、血管増殖といった網膜症の自然経過に認められる各病態をこれ一つの因子だけでも再現できるとされている[4, 5]。そのため、網膜症の悪化防止を目指すための最も有効なターゲットとされており、抗 VEGF 薬をはじめとして、VEGF を抑制するための様々な手法が提案されている。

3-2 Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 および Retinal leukostasis

最近、白血球の網膜血管内への接着（retinal leukostasis）が網膜症の悪化に関与しているとする報告が多数みられるようになってきた[6, 55, 69-71]。毛細血管レベルでは、もともと白血球は血管径よりも大きいため、正常でも常に血

管内皮との interaction が生じている。糖尿病になると、血管内皮と白血球間に発現する様々な因子の変化によって、白血球の血管内皮への接着の状態も変化する。Retinal leukostasis は、網膜症の初期のうちでは可逆的に改善するが、進行するとそれが不可逆的なものとなり、結果的に血管閉塞をきたすとされる[72]。つまり、これが増殖前網膜症の時期に相当し、網膜に無灌流野が生じる原因となると考えられている。この leukostasis に最も影響が大きいとされている分子生物学的因子が ICAM-1 であり[7, 70]、糖尿病ラットの網膜で発現が上昇していたという報告がすでになされている[7]。Leukostasis を改善することは網膜の微小循環の改善につながり、結果的に網膜症の改善につながると考えられ、そのための治療のターゲットとしてこの leukostasis や ICAM-1 が注目を集めるようになった。

以上より、今回の研究では、現在のところ網膜症悪化の代表的な要因とされる VEGF、ICAM-1 および retinal leukostasis を網膜症悪化の指標とし、この発現変化などをもとに網膜症の治療におけるエンドセリン拮抗薬の効果を検討することとした。

第三章 エンドセリン遮断薬による糖尿病網膜症の治療

1 エンドセリン遮断薬について

現在までに様々なタイプのエンドセリン遮断薬が開発されてきた。このうち実際に開発に進展がみられたのはエンドセリン受容体拮抗薬である。主に血管平滑筋(網膜では周皮細胞)に分布して血管の収縮をつかさどるET_A receptor、および主に血管内皮に存在して血管の拡張に関与するET_B receptorの2種類の受容体に対し、様々な拮抗作用を持つ薬剤が開発された。当初はBQ-123 (ET_A receptor選択的)やBQ-788 (ET_B receptor選択的)などのペプチド性の拮抗薬が用いられ、静脈投与などの方法で様々な検討が行われた。例えば、肺高血圧症のモデルラットにET_A receptor選択的拮抗薬であるBQ-123を持続投与したところ、右室圧(肺動脈圧)の上昇と右室肥大が著明に抑制されたことなどが報告され[73]、内因性のエンドセリンが実際に疾患に関与し、それがエンドセリン受容体拮抗薬で改善することなどが確認された。このペプチド性の拮抗薬は*in vitro*の実験に用いるにはさほど支障はなかったが、ペプチド性の物質であるため経口投与が不可能で、血中の半減期が極めて短いという欠点があり、これらを解消するため、非ペプチド性の拮抗薬が開発された。この中から、後に市販薬となったbosentan[74]をはじめとして様々な薬剤が開発され、現在経口投与も含めた様々な投与方法で使用されている。今回の実験では、上記の特性などからエンドセリン受容体拮抗薬のうち、将来の臨床応用も念頭におき、経口投与も可能な非ペプチド性の薬剤を使用することとした。

2 エンドセリン受容体拮抗薬の選択

エンドセリン受容体拮抗薬を糖尿病ラットに投与して網膜への効果を観察した研究は、先に紹介したTakagiらの報告を始めとしていくつか報告されている[32-34]。これらの多くはET_A receptorに選択的なペプチド性の拮抗薬を投与して、網膜の血流動態の変化を観察したものである。非ペプチド性のエンドセリン拮抗薬もET_A receptorに選択的性を有する薬剤以外に、ET_B receptor選択的、ET_A/ET_B receptor非選択的薬剤が存在し、また、ET_A/ET_B receptor非選択的薬剤ではそれぞれの受容体に対する抑制効果の割合も薬剤により様々である。過去の報告からET-1による網膜血管の収縮作用は、主にET_A receptorが関与する反応であることが示唆されているため[23]、これに対する拮抗薬を使用することは血流の改善につながるのではないかと考えられた。しかし、現在までに報告されたET_A receptor選択的拮抗薬による網膜血流の改善効果はほとんどがBQ-123などのペプチド性の薬剤によるもので、しかも短時間投与における血流に対する効果を検討したものである。現在のところ、例えば1ヶ月などある程度の長期間投与した際の効果を報告したものはない。実臨床における糖尿病網膜症の病態を考えた場合、問題となるのは慢性的に生じている病態である。つまり、慢性の網膜血流の減少によって生じる問題を改善できるかを考える場合、一時的な血流の改善を確認するということよりも、慢性の血流減少によって二次的に生じる変化が改善できるかをみることも大切ではないかと考えられた。

以上より、今回の研究では、初期糖尿病網膜症での網膜血流の減少に影響を及ぼしていると考えられているET-1に対し、網膜血管の収縮に係るET_A receptorの選択的拮抗薬を1ヶ月間という期間持続的に投与し、この薬剤が糖尿病の悪化に係るVEGF、ICAM-1、leukostasisといった因子の発現に効果を示すかということを検討した。

第四章 本研究に関する実験

1 目的

ストレプトゾトシン streptozotocin (STZ)により導入された実験的糖尿病ラットの網膜では、糖尿病網膜症の悪化に関連した因子 (VEGF、ICAM-1、Retinal leukostasis)の発現が上昇しているとすでに報告されている[6, 7, 53-57, 60, 69, 71]。まず、今回の我々の実験系でも同様な結果が得られるかを調べる。本実験では、網膜血管の収縮に関与するエンドセリン-1 の作用を抑制することにより、糖尿病で発現上昇した上記因子が改善するのではないかという仮説に基づき、糖尿病ラットにエンドセリン A 受容体拮抗薬を投与し、網膜での効果を確認する。その結果、この薬剤が初期糖尿病網膜症の進行防止のための新しい治療薬の選択肢となり得るかを検討する。

2 方法

本実験の計画書は、「筑波大学動物実験取扱規程」に基づき、動物実験委員会の承認を受けたものである。

また、「視覚および眼科研究における動物の使用についての ARVO 宣言(The Association for Research in Vision & Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)」に準じて実験動物を扱った。

実験の概略

STZ により糖尿病ラットを作製した。基剤であるクエン酸バッファー (citrate buffer)のみを投与したラットをコントロール(non-DM control 群)とした。

糖尿病導入 1 週間後、糖尿病ラットを 2 群にわけ、一方の群にはエンドセリン A 受容体拮抗薬 (TA-0201) を浸透圧ポンプを用いて持続的に 4 週間投与 (DM+TA-0201 群) し、もう一方の群には生理食塩水を同様に投与 (DM+vehicle 群) した。

4 週間の治療後、すべてのラットを sacrifice し、網膜における以下の因子について () に記述した方法で測定を行い、non-DM control 群、DM+vehicle 群、DM+TA-0201 群の 3 群で比較を行った。

VEGF mRNA (Real-time PCR)

VEGF & ICAM-1 protein (ELISA)

VEGF & ET-1 protein (Immunohistochemistry)

Retinal leukostasis (concanavalin A による造影および Retinal flatmount)

Histopathological analysis (HE 染色)

また、上記の 2 倍の期間 (10 週間) 糖尿病状態としたラットを別に用意して蛍光眼底造影 fluorescein angiography (FAG) を行い、網膜に造影検査上の変化が認められるかを確認した。

以下に実験の詳細について順に解説する (実験手順の詳細については 内に示した)

2-1 糖尿病ラットの作製

糖尿病モデル動物の作製には、10 週齢の雄成熟白色ラット(Sprague-Dawley rat) (日本チャールスリバー、横浜) を使用した。今回の実験に際しては、糖尿病ラットを作製するための STZ の用量、適切な網膜の眼底造影方法、浸透圧ポンプの効果的な皮下埋め込み手技、使用するエンドセリン遮断薬の型などを決定するための多数の予備実験を必要とした。それらを合わせ、合計 115 匹のラットを使用した。

2-1-1 STZ の基剤について

今回の実験では、血糖値が 500mg/dl 程度以上のとなるラットを作製することを目標とした。まず、STZ (和光純薬、大阪) を溶解する基剤を作製した。他の文献で基剤としてクエン酸バッファーが用いられていたが、その溶液として pH は 4.0 ~ 6.5、濃度 0.01M ~ 0.1M まで若干の違いがあった。そのため、これらの中で多く用いられていた pH および濃度を採用し、以下の方法で作製し、基剤とした。

0.1M クエン酸バッファー (pH=4.5) ~ 200ml の作製

(使用試薬)

クエン酸三ナトリウム二水和物 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ MW=294.1

クエン酸 $\text{HOOCCH}_2\text{C}(\text{OH})(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$ MW=192.1

(準備)

0.1M クエン酸三ナトリウム 500ml

(14.7g の試薬を 500ml の水に溶解し、オートクレーブする)

0.1M クエン酸 100ml

(1.92g の試薬を 100ml の水に溶解し、密栓オートクレーブする)

(調整)

クエン酸ナトリウム溶液に、pH を測定しながらクエン酸を加える

オートクレーブする

2-1-2 STZ のラットへの導入方法と STZ の投与量の決定

まず、予めラットの体重と血糖を測定し、各ラットに対する STZ の必要量 (45mg/kg ~ 70mg/kg) を 1.5ml のエッペンチューブに正確に秤とり、氷冷した。STZ は溶液中では不安定なため、投与直前に上記で作製したクエン酸バッファーに溶解し、5 分以内に腹腔内に投与した。非糖尿病のコントロールラットにはクエン酸バッファーのみを同様に投与した。

血糖の測定には頻回の測定が可能で血流動態に影響を及ぼす可能性が少ないため、簡易血糖測定器 (Ascensia BREEZE®) (バイエルメディカル、東京) を用いて尾部より行った。測定時間は毎回同時間帯になるようにした。

STZ 投与量の決定のための予備的な実験では、血糖の測定を 48 時間後 (2 日後)、120 時間後 (5 日後)、168 時間後 (1 週間後)、336 時間後 (2 週間後) に行った。45 ~ 55mg/kg 程度の STZ 投与では、中には 600mg/dl を超えるような血糖が得られるラットも存在したが、多くは 200 ~ 400mg/dl 程度の血糖にとどまり、200mg/dl 台程度のラットの中には 2 週間後に血糖が正常化するラットも存在した。一方、65mg/kg の STZ 投与では 500mg/dl 以上の血糖が得られるものが多かったが、ややばらつきが認められた。投与を 70mg/dl としたラットでは比較的安定して 500mg/dl 程度の血糖が得られた。このため、今回の実験系では 70mg/kg の STZ 投与で糖尿病ラットを作製することとした。

2-1-3 グループ分け

以上の結果を踏まえ、今回の実験では 70mg/kg の STZ 投与にて糖尿病ラットを作製することとし、以下の 3 グループで検討を行うこととした。

- (1) non-DM control 群 (クエン酸バッファーのみの投与群)
- (2) DM+vehicle 投与群 (STZ 70mg/kg 投与 + 生食治療群) (後述)
- (3) DM+TA-0201 投与群 (STZ 70mg/kg 投与 + エンドセリン受容体拮抗薬治療群) (後述)

2-2 エンドセリン受容体拮抗薬による治療

2-2-1 エンドセリン受容体拮抗薬の選択

エンドセリン受容体拮抗薬としては、非ペプチド性で、選択的エンドセリン A 受容体拮抗薬である TA-0201 (田辺製薬、埼玉) を使用することとした。これは、当研究室ですでにラットやハムスターに対して投与し、その効果を確認した実績があること[75-79]などから採用した。使用量に関してはラットでは 0.3 ~ 0.5mg/kg/day で十分な効果が報告されているが[76-78, 80, 81]、ハムスターに 1.3mg/kg/day で使用した報告もある[75, 82]。今回の実験ではこれらを考慮し、1mg/kg/day で投与することとした。

2-2-2 浸透圧ポンプについて

非ペプチド性で経口投与可能なTA-0201であるが、より確実な治療効果の有無を確認するため、浸透圧ポンプによる持続的皮下投与を行うこととした。浸透圧ポンプはDurect社 (Cupertino, CA) のALZET[®] osmotic mini pump (model

2004)を用いた。この浸透圧ポンプはポンプの表面を形成する半透膜を通してポンプ内への水の流入が生じることなどを利用し、ポンプが埋め込まれた組織環境の浸透圧の差によって動作する。これをラットなどの目的とする動物の皮下に埋め込み、一定の流量で薬剤を体内に連続注入することが可能である。投与期間や動物の大きさに対応していくつかのモデルがある。それぞれのモデルの流量は予め固定されているため、投与量はポンプに充填する溶液の濃度を変えることで調整することができる。今回は1ヶ月(28日間)の治療を行うため、上記のうちmodel 2004を選択した。

2-2-3 TA-0201 の調整

上記の浸透圧ポンプを使用して持続的に TA-0201 の投与を行うために、TA-0201 の濃度を調整した。TA-0201 は生理食塩水に溶解した。Model 2004 は容量が 200 μ l で流量は 0.25 μ l/hr に調整されている。よって、例えばこのポンプを用いて 1mg/day で薬剤の投与を計画する場合、1 日分の総流量が 6 μ l (/24hr)であるため、1mg/ 6 μ l の濃度で TA-0201 を溶解することになる。このようにして、各ポンプに TA-0201 を充填した。また、TA-0201 を溶解せず、生理食塩水のためのポンプを埋め込むラットを DM+vehicle 治療群とした。

2-2-4 糖尿病ラットのグループ分け

STZ を投与して糖尿病状態としたラットでは、糖尿病導入 1 週間後に全ラットの血糖を測定した。このラットを無作為に 2 群に分け、片方の群には TA-0201 を含むポンプを割り当て (DM+TA-0201 投与群)、もう一群には生食のみを含むポンプを割り当て (DM+vehicle 投与群)で、次項の方法に従ってポンプの埋め込みを行った。

2-2-5 浸透圧ポンプの埋め込み術

ペントバルビタール（ネンブタール®）（大日本製薬、大阪）による全身麻酔の後、ラットの背部を剃毛し、10%ポピドンヨード（イソジン®）（明治製菓、東京）にて消毒した。剪刀にて剃毛部の中央の皮膚を1～1.5cm程度切開した。ペアンにてその両側に皮下の切開を鈍的に広げた。同部よりポンプを挿入し、良好な位置であることを確認した後、針つき2-0 silk糸で切開部を3糸縫合した。予備実験では、ラットが覚醒直後より縫合を自己で抜去する行動が度々見られ、縫合がしばしば離開した。いくつかの方法を試みた結果、強い結紮を3回行う方法でほぼ離開がなくなったため、この方法ですべての縫合を行った。埋め込み翌日に縫合が離開していないラットではその後に離開することはなかったため、埋め込み翌日の創部の観察を厳重に行った。

2-3 血糖および体重の経過

上記の方法によりポンプが埋め込まれたラット（DM+vehicle 投与群およびDM+TA-0201 投与群）および非糖尿病コントロールラットの3群に対し、1週間毎に血糖と体重の測定を行い、非糖尿病および糖尿病状態の確認を行った。

2-4 網膜の摘出および保存

浸透圧ポンプの埋め込みから4週間後、ジエチルエーテル（和光純薬、大阪）による全身麻酔下に他臓器や血液とともに眼球を摘出し、網膜を分離した。分離した網膜は2mlのエッペンドルフチューブにいれ、液体窒素で急速冷凍した後、各種測定を行うまで-80℃のフリーザーに保存した。

各因子の発現の分析

2-5 VEGF 遺伝子の発現

2-5-1 網膜からの RNA の抽出

網膜からの RNA 抽出方法

(RNA 用の) クロロホルム、イソプロパノール、100%エタノール、diethylpyrocarbonate (DEPC)処理水を準備する

手袋、マスクを着用、机にアルミホイルを敷く

試料が入った 2ml エッペンドルフチューブを-80 のフリーザーから出し、各 400 μ l の ISOGEN を加える。

ポリトロンでホモジナイズする

室温で 5 分間反応させる

(30 秒 vortex した後) 各チューブに 80 μ l ずつクロロホルムをいれる

Max で 15 秒間 Vortex する(または激しく 15 秒間手で shake)

室温で数分間 (3 分程度) 反応させる

12,000x g(12,000 回転で可)で 15 分間遠心する (4)

水層 (上層) を新しい RNA 用 1.5ml チューブに移す
(165 μ l 位のチップ etc を利用)

移したこの水層の各チューブに 200 μ l ずつ氷冷したイソプロパノールを加えて Vortex

これを氷上で (5 ~) 10 分反応させる

12,000x g で 10 分間遠心する (4)

RNA のペレットができる

上清をピペットで捨てる

残った各チューブのペレットに 70%エタノールを 400 μ l ずつ加える

12,000x g で 10 分間遠心する (4)

RNA のペレットができる

上清をピペットで捨てる

各チューブのペレットに 100%エタノールを 400 μ l ずつ加える

12,000x g で 10 分間遠心する (4)

RNA のペレットができる

上清をピペットで捨てる

短時間風乾する

ペレットを予め DEPC 処理された滅菌蒸留水 (または TE (pH8.0) または 0.5%SDS) に溶解して total RNA 溶液とする (通常 DEPC 処理した超純水 (Milli-Q 水) 100 μ l を加え、vortex で溶解している)

2-5-2 網膜から得られた RNA の DNase 処理

以下の方法で DNase 処理を行った

QIAGEN RN easy mini column kit & RNase Free DNase set による DNase 処理

(準備)

Total RNA (DEPC 水で total volume を 100 μ l とする)

100% EtOH

RNase free tube & tip

2-メルカプトエタノール

QIAGEN RN easy mini column kit & RNase Free DNase set

(RLT buffer, RNase free water, RW1 buffer, RPE buffer)

DNase 前処理 (DNase-Free DNase set) (Cat.No 79254, -4 store)

粉末状の DNase に 550 μ l の RNase free water (kit 内にある) を加えてゆっくり tapping
後 1.5ml のチューブに移す

-20 で 9 ヶ月保存可

RDD buffer は用時調整

(手順)

まず遠心器が 22 になっていることを確認

試料

+ RLT 溶液(RLT buffer に 2-メルカプトエタノールを 100: 1 の割合で混合したもの)

350 μ l を加える

Vortex

+100% EtOH 250 μ l

Vortex

1.5ml チューブの全量 (700 μ l) を mini column にいれる

10,000 回転、15 秒、22 遠心

外側の廃液用チューブを捨て、新しい廃液用チューブ (kit 内にある) を装着する

+RW1 buffer 350 μ l

10,000 回転、15 秒、22 遠心

廃液を捨てる

Mini column に DNase 溶液 (DNase に RDD buffer を 1: 8 の割合で混合したもの) を 80 μ l 加える

室温、15 分 incubation

+RW1 buffer 350 μ l

10,000 回転、15 秒、22 遠心

廃液を捨てる

+RPE 溶液 (RPE buffer に 100% EtOH を 1: 4 の割合で混合したもの) 500 μ l を加える

10,000 回転、15 秒、22 遠心

廃液を捨てる

+RPE 溶液 (RPE buffer に 100% EtOH を 1: 4 の割合で混合したもの) 500 μ l を加える
10,000 回転、2 分、22 遠心

廃液を捨てる

チューブは空のまま、10,000 回転、15 秒、22 遠心

新しい 1.5ml チューブに mini column をはめる

kit 内の RNase free water 50 μ l を mini column にいれる

室温、10 分 incubation

10,000 回転、1 分、22 遠心

OD 値測定、回収率は 60~70%程度

2-5-3 RNA の Reverse Transcription

前項までの方法で得られた RNA を用いて、以下の方法に従って逆転写し、cDNA を作製した

Omni script による網膜抽出 RNA の Reverse Transcription

(操作は氷上にて施行)

total RNA を吸光度から $4\mu\text{g}$ 分とり (残りはエタ沈してとっておく) 水との合計で $27.6\mu\text{l}$ とする

これに下記の master mixture を各 $12.4\mu\text{l}$ ずつ加える

軽く vortex と遠心

37 、2 時間

終了したら、 $40\mu\text{l}$ のうち、 $20\mu\text{l}$ に $980\mu\text{l}$ の滅菌水を加えて vortex (これで $2\text{ng}/\mu\text{l}$ の DNA ができる)

残りの $20\mu\text{l}$ には各 $180\mu\text{l}$ の滅菌水を加えて、各 sample のものを合計し (例えば 5 検体 あったら、 1ml となる) それを $10\text{ng}/\mu\text{l}$ の標準曲線用 (standard 用) とする

-20 で保存

(**Omni script kit+RN ase inh.の調整**)(1 検体分)

(master mixture はこれに 1 から 2 検体分割り増しした合計をかけて計算する)

10 × Buffer	$4\mu\text{l}$	(kit)
dNTP	$4\mu\text{l}$	(kit)
Oligo dT primer	$0.4\mu\text{l}$	Life science のキットから流用
RNase inh.	$2\mu\text{l}$	(kit)
RT	$2\mu\text{l}$	(kit)
合計	$12.4\mu\text{l}$	

2-5-4 Real-time PCR 法による VEGF mRNA の発現分析

得られた cDNA を template として、VEGF mRNA の発現の分析を行った。mRNA の発現量は Applied Biosystems (ABI) (Foster City, CA,USA) の prism 7700 Sequence Detector を用いて、定量 PCR (real-time PCR) を行うこととした。

この real-time PCR は、96 ウェルのプレートに試料および各測定項目のプライマーと反応基剤である master mixture を加え、コンピューターに接続された 7700 Sequence Detector で反応を行い、その吸光度を real time に測定し分析を行うものである。非特異的な反応を検出しないためには TaqMan Probe を用いた検出系で測定を行うのがより望ましいとされているため、今回はその方法を採用した。プライマーおよびプローブはあらかじめ ABI で作製および検証がなされており、これを利用した。また、house keeping gene としては β -actin を使用することとした。これらのプライマーとプローブの塩基配列および反応液の調整方法は以下のごとくである

Primer & Probe

For VEGF

Sense: 5'-tgagaccctggtggacatctt-3'

Antisense: 5'-cacacaggacggcttgaaga-3'

Probe: 5'-ccccgatgagatagagtat-3'

For β -actin

Sense 5'-ggccgggacctgaca-3'

Antisense 5'-gctgtggtggtgaagctgtag-3'

Probe 5'-actacctcatgaagatcc-3'

反応液の調整

各ウェルに対して total 25 μ l の反応液になるように調整する。1 well 中の各反応液の割合

は以下の通りである（すべて ABI の純正品を使用した）。

PCR Master Mixture	12.5 μ l
TaqMan primer & pbobe (FAM label)	1.25 μ l
DDW	6.25 μ l
試料	5.0 μ l
total	25.0 μ l

また、標準曲線用（standard 用）の試料は前項で作製した 10ng/ μ l のものを順次 2 倍希釈して、これに 4 段階の数値（5 2.5 1.25 0.625）を割り振った。

上記のように調整された各反応液を専用の 96 ウェルプレートに注入し、上部を綿密にカバーした後、プレートごとごく軽く遠心（1000rpm に一度なったら終了する程度）した。また、プレートに気泡が混入していないことを確認した。以上を確認後、下記の手順に従って、コンピューター上の操作を行い、PCR 反応およびその後の分析を行った。

ABI prism 7700 Sequence Detector の操作

本体を制御するコンピューターの電源を入れ、SDS software を開き、測定のための各種の設定を行う

PCR 反応は以下のコンディションで行った

Thermal Cycler Conditions

- | | | |
|---|----|-------------|
| 1 | 50 | 2 分 |
| 2 | 95 | 10 分 |
| 3 | 95 | 15 秒、60 1 分 |
- 3 = repeat 40cycles

PCR 反応の終了後、SDS software 上で VEGF および β -actin mRNA の発現解析を行い、Experimental Report を印刷する

7700 本体から 96 well プレートを取り出し終了する

上記で得られた Experimental Report に、各試料の VEGF および β -actin mRNA の発現量が示されているので、 β -actin を用いて VEGF の値を補正し、最終的な各試料の発現量を決定した。

2-6 VEGF および ICAM-1 protein の発現

2-6-1 網膜からの蛋白の抽出および濃度測定

まず、下記の方法で網膜から蛋白を抽出し、蛋白濃度を測定した

ELISA 用蛋白抽出

クーラーボックスを用意

サンプルを-80 度のフリーザーからだしてきて、すぐに各チューブに PBS を 500 μ l ずつ入れる（片眼の時は 300 μ l ずつ）

ポリトロンでホモジナイズする。可能ならチューブを若干上下させながら回転させるようにする。終了したら 1 回ごと 1 のビーカーにためた RO 水（2 段階に）でも機械をまわし、その後短時間空まわしして水分を飛ばし、キムタオルで拭くということを繰り返す。温度が上がると蛋白は変性するのでそれを防止する意味もある。

遠心（15000rpm、15 分、4 度）

上清を新しい 1.5ml チューブに移す

（蛋白の定量）

各試料 3 本の 1.5ml チューブを用意。これに加えて検量線用のチューブを 3 本、blank 用のチューブを 2 本用意する

最初のチューブに各 200 μ l の dH₂O を入れる（検量線用も同様）。blank 用には各 100 μ l の dH₂O を入れる

このチューブに各試料を 10 μ l いれ、検量線用には標準 BSA (20mg/ml)を同じく 10 μ l いれる。すべていれたら vortex。

できたこのチューブの内容を他の 2 本の同じ試料用のチューブに 100 μ l ずつ分注する
(これですべてのチューブに内容物が 100 μ l ずつはいつていることになる)

着色用の A 液と B 液を用意し、50:1 の割合で混合する

A 液と B 液を混ぜたらできるかぎり速やかにこれを各チューブに 1ml ずついれ、そのいれたチューブも同様に速やかに Vortex する。すべていれたら 37 度のインキュベーターに 30 分程度いれる。

その後に、ELISA 用プレートに各チューブを triplicate (結局各試料 6 ウェルになる) になるように各 200 μ l ずついれていく

Biolumin の 550nm で吸光度を測定する

2-6-2 ELISA による VEGF および ICAM-1 の測定

上記で抽出した蛋白を試料として、ELISA により網膜の VEGF および ICAM-1 の測定を下記の方法にて行った。

ELISA の基本手技 (VEGF および ICAM-1 共通)

まず、Standard 希釈用の 1.5ml チューブを 5 本 (残りのウェルに応じて変更可) 用意する。すべてのチューブに各 200 μ l ずつ Calibration dilutent をいれる。

次に Standard と試料をフリーザーからだして解凍する。

続いて、Standard 希釈用の 1 番のチューブに Standard 液を 200 μ l いれる、その中の 200 μ l を次の 2 番のチューブにいれる。このようにして最後のチューブまで倍々希釈したチューブをつくる (5 段階)。

VEGF または ICAM-1 測定用プレートの各ウェルに上記でつくった Standard 液と網膜蛋白試料を各 50 μ l ずつ duplicate でいれていく。泡をいれないよう注意。終わったら目視して、泡があるウェルにはチップの先を泡の先につけてつぶす。ただし、決して壁をさわらないこと。

透明フィルムでふたをして 2 時間、震盪させながら反応させる。

2 時間たったら、まず VEGF または ICAM-1 の Conjugate を Calibration diluent で 15ml の Falcon tube に希釈する。まず、各ウェル 100 μ l 必要なので、これをもとにして合計量を計算する。Calibration diluent と Conjugate の割合は 11(ml): 0.5(ml)として計算する。

合計 5 回洗浄する。

Conjugate 液を 100 μ l ずつ各ウェルにいれていく。

透明フィルムを貼り、2 時間震盪させる。

同様にプレートを 5 回洗浄する。

Color reagent A と B を 1:1 の割合で混ぜ、各ウェルに 100 μ l ずつ入れる。

フィルムを貼って震盪しながら色の変化を観察する。30 分から 1 時間程度反応させる。その後 stop solution により反応を停止する。

Biolumin の 450nm で吸光度を測定する。

測定値から blank の値を引いた吸光度をもとにして VEGF または ICAM-1 の吸光度と濃度に関する標準直線を描き、そこから各検体の VEGF または ICAM-1 の濃度を計算する。さらにその値を 2-6-1 で求めた各 sample の蛋白濃度で割り、組織 1mg あたりの VEGF または ICAM-1 の濃度(pg/mg)を計算した。

2-7 VEGF および ET-1 の免疫染色

2-7-1 網膜の切片の作製

各群から無作為にラットを選び、免疫染色用に眼球を摘出した。眼球を 10%緩衝ホルマリン液で固定後、脱水、パラフィン包埋し 5 μ m の切片を作製した。

2-7-2 免疫染色

上記の切片を脱パラフィン後、microwave oven (750W)にてクエン酸緩衝液中で 15 分間処理し、以下の方法に従って免疫染色を行った。

(染色方法)

湿潤箱を用意し、底にキムワイプを 4 枚ほど敷く。その上に蒸留水などをかけて湿らせる。

スライドガラスを金属ラックからだして並べ、緩衝ホルマリンをトランスファーピペットで組織の上にかける。5 分固定 (室温)

緩衝ホルマリンを除き、ドーゼに PBS を満たした後金属ラックをいれ、そのなかにスライドガラスを 1 枚ずついれていく。室温で 5 分放置後に洗浄する (1 回。PBS も交換)

5 分後にスライドガラスを渡し棒の上に置き、トランスファーピペットで各スライドガラスに 3%過酸化水素水をかけ、室温で 7 分おき、脱ペルオキシダーゼ処置を行う

7 分後に渡し棒を利用して 3%過酸化水素水を除き、PBS を満たしたドーゼにいれ、室温で 5 分間洗浄する (1 回。PBS も交換)

その後スライドガラスを渡し棒の上に置き、10%FBS/PBS-T をスライドガラス上で室温にて 30 分反応させ、ブロッキング処置を行う

30 分の反応後に渡し棒を利用して 10%FBS /PBS-T を除くが、このまま PBS の洗浄はせず、抗体の反応にうつる

1 次抗体 (抗体の希釈は 1% FBS /PBS-T にて行う) を反応させる (37 度のインキュベーターで 1 時間または 4 度で over night)

規定の時間後、湿潤箱をもってきて、まず抗体をできる限り回収する

続いて、ドーズに PBS を満たしてスライドガラスを金属ラックにいれ室温で 5 分おき、洗浄する (3 回)(PBS はその都度交換)

DAKO EnVision を 2 ~ 3 滴滴下し、室温で 30 分反応させる

ドーズに PBS を満たしてスライドガラスを金属ラックにいれ室温で 5 分おき、3 回洗浄

湿潤箱の蓋を裏返して中にケイドライを敷く。その上にスライドガラスを 1 枚ずつ並べていく。

キットの DAB solution を滴下し発色させる

マウントする

negative control として 1 次抗体を反応させないスライドガラスもつくる

(必要な試薬類)

(1)PBS 2L

(2)上記でできた PBS のうちの 50ml を使用して PBS-T をつくる

PBS 50ml+Tween20 25 μ l (=PBS-T 0.05%)

(3) 上記でできた 50ml の PBS-T のうち、22.5ml を用いて、25ml の 10%FBS/PBS-T をつくる

PBS-T 22.5ml+ FBS 溶液 2.5ml

(4) 上記でできた 25ml の 10%FBS/PBS-T 溶液のうち、2.5ml を(2)でつくった PBS-T の残りのうちの 22.5ml とあわせて 1%FBS/PBS-T 溶液をつくる

(5)deperoxdase 用試薬

市販の 30%H₂O₂ 溶液を 100%メタノールで 10 倍に希釈する

H₂O₂ 2.5ml+100%メタノール 22.5ml

(1 次抗体および detection 用キット)

VEGF (rabbit antihuman VEGF polyclonal antibody, Immunological Laboratories, Fujioka, Japan)

ET-1 (guinea pig anti-ET-1, Peninsula Laboratories, San Carlos, CA)

DAKO EnVision, Peroxidase, Rabbit (DAKO, Carpinteria, CA)

(抗体の希釈)

説明書に従って希釈する

使用した抗体は4℃で保存

2-8 Retinal leukostasis の解析

網膜の血管内に接着した白血球数を調べるため、以下の方法に従って造影を行い、摘出した網膜のフラットマウントを作製し、蛍光顕微鏡で確認した。

Concanavalin A による接着白血球の染色

準備

Fluorescein concanavalin A (FL-1001) (Vector)(Con A) (25mg 1本で14~15匹位できる)
(40 µg/ml で使用)

1x PBS (in vivo 用の tablet で作製した(1匹で200ml 使用))

10% buffer formalin (6Fの20%のものをミリQで希釈して使用)

50ml Falcon tube 5本、15ml Falcon tube 2本

50ml シリンジ 3本

100mm tissue culture 用 dish

アトム静脈カテーテル 3Fr (節付)

2-0 シルク糸

Micro slide glass (PLL コート付) (Matsunami)

24x24 Micro cover glass (Matsunami)

Perma Fluor Aquaeous Mounting Medium (Thermo)

直鑷子 1本、曲鑷子 2本、直剪刀 1本、曲剪刀 1本

ジュエラー 1本、小曲鑷子 1本、小剪刀 1本、メス刀

手技

ラットに pentobarbital にて麻酔をかける

50ml Falcon tube 5 本（前 2 本、Con A 1 本、後 2 本）に PBS を 40ml ずつ入れる。そのうちの Con A 用に Con A を 320 μ l 入れて Vortex する

15ml Falcon tube 2 本に 10% buffer formalin を 5ml ずつと 100mm dish に 15ml 入れる

50ml シリンジ 3 本（PBS 用 2 本、Con A 用 1 本）にそれぞれの液を吸引する（Con A 用にはカバーする）

ラットの皮膚を臍上部から腋下付近まで直線的に切開する

腹腔を開く。臍上部から横隔膜下付近まで広げる

腸管などの内臓をキムワイプでよけ、下大静脈を露出する

曲鑷子を使って 2-0 シルク糸を下大静脈の後ろに通し、結紮の用意をしておく

肝臓上部の横隔膜付近から横隔膜を切開し、胸腔をあける

横隔膜をはずした後、心臓が露出するまで胸郭を切り開く

心臓をつかみ、心尖を確認し、カテーテルを注入する

下大静脈を縛り、その遠位端（腎静脈付近）を切開する

心臓に PBS を圧をかけながら注入する（体重 g 当り 0.1ml）。2 本目と交換するときに空気が入らないよう注意する。交換直後に肝静脈を切開する

続いて Con A を注入する

残りの PBS を上記同様の量で注入

心臓からカテーテルをぬき、位置を確認

眼球を摘出し、10% buffer formalin に入れる

25 分後に網膜のフラットマウント開始

網膜を視神経も残るように注意してはずしてから、網膜の 2 箇所にて切開をいれて、徐々に水分をキムワイプで吸収しながら広げていく

封入。余分な空気をカバーガラスの間からぬく

網膜を蛍光顕微鏡（PROVIS AX70; Olympus, Tokyo）で観察する

2-9 組織病理学的検討

2-7-1 と同様の方法で網膜の切片を作製し、脱パラフィンを行った後、Hematoxylin および Eosin 染色を以下の方法で行った。

Hematoxylin-Eosin 染色

スライドグラスをホルダーにいれ、緩衝ホルマリンを満たした器に 5 分入れる

5 分程度たった後水を満たした器の中で数回出し入れして洗浄し、Hematoxylin の中に 3 分程度つける。時々出し入れし、染まっているか確認する

次に同様に水洗する。水をきって 5 分程度 Eosin の中につける

Eosin の中からホルダーを出し、再度水洗の後にアルコール脱水する

そのままキシレンに移り、脱アルコールを行う

封入する

2-10 網膜の蛍光眼底造影

10 週間糖尿病状態にしたラットを別に用意し、以下の方法に従って FITC-dextran (シグマアルドリッチジャパン、東京) による造影を行い、網膜に造影検査上の変化がみられるか蛍光顕微鏡で確認した。

FITC-dextran angiography

準備

Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (50mg/ml で使用)

1x PBS

10% buffer formalin

15ml Falcon tube 3 本

100mm tissue culture 用 dish

Micro slide glass (PLL コート付) (Matsunami)

24x24 Micro cover glass (Matsunami)

Perma Fluor Aquasous Mounting Medium (Thermo)

直鑷子 1 本、直剪刀 1 本、曲剪刀 1 本

ジュエラー 1 本、小剪刀 1 本、メス刃

手技

ラットに pentobarbital にて麻酔をかける

15ml の Falcon チューブ 2 本に 10% buffer formalin を 5ml ずつと 100mm dish に 15ml いれる

ラットの皮膚を臍上部から腋下付近まで直線的に切開する

上部腹腔を開く

肝臓上部の横隔膜付近から横隔膜を切開し、胸腔をあける

横隔膜をはずした後、心臓が露出するまで胸郭を切り開く

心臓をつかみ、心尖を確認し、そこから翼状針を刺入する

心臓に FITC-dextran を約 2.5ml 注入する

心臓から針をぬき、位置を確認

眼球を摘出し、10% buffer formalin に入れる

25 分後に網膜のフラットマウント開始

網膜を視神経も残るように注意してはずしてから、網膜の 2 箇所に切開をいれて、徐々に広げていく

封入

網膜を蛍光顕微鏡 (PROVIS AX70; Olympus, Tokyo) で観察する

2-11 統計処理

得られたデータの分析はStat View version 5.0のソフトウェアを用いて行い、すべての結果は、mean \pm SDで示した。また、グループ間の比較はMann-Whitney-*U* 検定で行い、多重比較検定にはScheffé法を用いた。*P*値が0.05未満であるものを「有意差あり」とした。

3 結果

3-1 各群の体重および血糖値

表1に各群の体重および血糖値を示す。糖尿病群(DM+vehicle、DM+TA-0201)では、週齢を合わせた非糖尿病群 (non-DM control) のラットと比較して著明な血糖値の上昇が認められた。血糖値はDM+vehicle 群とDM+TA-0201群で差はなく、4週間のTA-0201の治療は、血糖値には影響しないと考えられた。

3-2 組織学的な変化について

各群から得られたラットの網膜の切片の結果を図1に示す。HE染色による光学顕微鏡上では各群に明らかな違いは認められなかった。

3-3 網膜におけるET-1の発現について

ET-1に関しては、STZ誘発性の糖尿病ラットにおける網膜での発現上昇を確認した報告がすでにあるため[32, 33, 49, 51]、これらの確認の意味合いも兼ね、今回は免疫染色でその発現量の評価を行った。定量的な評価ではないが、今回の結果でも過去の報告と同様に糖尿病の網膜ではET-1の発現が上昇していることが確認できた(図2A)。TA-0201による治療は、このET-1の上昇を抑制する可能性が示された。

3-4 網膜におけるVEGFの発現について

Real-time PCRで得られた、網膜におけるVEGF mRNAの発現を図3Aに示す。非糖尿病コントロールラット (non-DM control) に比して、vehicle治療糖尿病ラット (DM+vehicle) では、VEGF mRNAの有意な上昇が認められたが($p < 0.05$)、TA-0201の治療により、この上昇は有意に抑制された($p < 0.05$)。

一方、ELISA法により得られたVEGF proteinの発現もこの結果と一致していた (図3B)。Vehicle治療糖尿病ラット (DM+vehicle) では、非糖尿病コントロールラット (non-DM control) より30%のVEGFの上昇が認められたが($p < 0.05$)、TA-0201治療はその上昇を有意に抑制した。

VEGF proteinについては、さらに免疫染色においても同様の傾向が確認できた (図2B)。Vehicle治療糖尿病ラットでは非糖尿病コントロールラットに比較し、網膜各層においてVEGFに対する染色性が上昇していた。染色は網膜全体にびまん性に認められたが、図2Bの挿入図にみられるようにvehicle治療糖尿病ラットでは他群と比較し、細胞質の染色性が上昇している所見が確認できた。

3-5 網膜におけるICAM-1 の発現と Retinal leukostasis について

網膜におけるICAM-1 proteinの発現を図3Cに示す。VEGFと同様にICAM-1 proteinもvehicle治療糖尿病ラット (DM+vehicle) で非糖尿病ラット (non-DM control) に比して約30%の発現上昇が認められた。この上昇はTA-0201による治療で著しく改善された($p < 0.05$)。

このICAM-1 proteinの発現に対応する結果が、leukostasisの結果でも得られた。図4に3群の代表的な写真を示す。concanavalin Aにて染色され、血管内に接着した白血球が白矢印にて示されているが、vehicle治療糖尿病群

(DM+vehicle)では、弱拡大の1視野中に複数の接着白血球が確認できるラットが多数見られた(図4B)。これに対しコントロール群(non-DM control)(図4A)とTA-0201治療糖尿病群(DM+TA-0201)(図4C)ではその割合は少数であった。これらの結果をより定量的に確認するため、各網膜全体の細動脈血管内に生じた白血球の接着をカウントした結果が図5である。ただし、毛細血管内に接着した白血球のカウントはアーチファクトとの区別が比較的難しく、正確な比較が難しいと考えられた。そのため、今回はほぼ確実にその数をカウントできるという観点から、細動脈系に吸着された白血球をカウントし、比較した。その結果、vehicle治療糖尿病ラット(DM+vehicle)では、非糖尿病コントロールラット(non-DM control)と比較して3.3倍もの接着した白血球が認められた。TA-0201による治療はこの糖尿病による増加分を75.6%改善した。

3-6 網膜における造影検査上の変化について

今回の検討に使用した糖尿病ラットの罹病期間は5週間であるが、これより倍の期間(10週間)糖尿病状態としたラットを用意し、fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextranによる造影検査上で変化が認められるかを確認した。その結果、毛細血管の細部までFITC-dextranの造影が確認された。つまり、今回検討を行った5週間の糖尿病ラットの倍の期間糖尿病状態としたラットでも、造影剤の漏出もしくは無灌流野といった、糖尿病網膜症の進行によって臨床でみられる造影検査上の所見はまだ認められないことが確認された(図6)。

4 考察

今回、STZにより導入された糖尿病ラットの網膜において、網膜症の悪化に關与する分子生物学的因子とされるVEGFおよびICAM-1の発現上昇、および網膜におけるleukostasisの増大が認められた。これら因子の上昇は選択的ET_A受容体拮抗薬の一つであるTA-0201によって改善し、これが初期糖尿病網膜症の治療薬のオプションになりうる可能性が示された。

4-1 VEGFと網膜血流

糖尿病網膜症の悪化要因となる分子生物学的因子として、現在までに様々な因子の關与が推測されているが、この中でVEGFは現在最も注目されている因子である。実験的糖尿病動物の網膜における発現上昇の報告[54, 56, 57, 60-63]に加え、臨床においても増殖糖尿病網膜症（PDR）患者の硝子体液中での上昇が報告[64-66]され、網膜症の最終段階であるPDRへの進行の際の中心的な因子と考えられている[59]。そのため、この因子を抑制することが網膜症の増殖化を含む進行に最も効果的であると予想され、このVEGFの抑制を目的とした様々な方法が試みられている。今回の我々の糖尿病モデルにおいても、mRNA(real-time PCR) レベル、蛋白レベル (ELISA、免疫染色) で網膜でのVEGFの発現上昇が認められ、過去の報告の結果と一致する所見が得られた。

このVEGFの発現上昇を促す大きな要因の一つに組織の低酸素がある[83]。網膜組織は豊富な血流量によってその機能を維持しており、網膜血流の減少は、網膜組織の低酸素の原因となり得ることは十分に考えられる。ところで実際に、

実験的および臨床的にも網膜症初期には網膜血流が減少することが確認されている[31]。すると網膜血流は網膜の毛細血管レベルでも減少するため、結果的に網膜組織の低酸素を生じるのではないかと考えられる。一方、逆に、網膜血流の改善は網膜に生じている組織の低酸素を改善しうるのではないかと考えられる。今回は以上の考えに基づいて、網膜の血流に関与するとされているET関連の薬剤を用いて、そのVEGF発現に対する有効性を検討することにした。

今回、エンドセリンA受容体拮抗薬の投与群ではVEGFの発現がvehicle投与群と比較して抑制された。ET_A receptorは毛細血管レベルでは周皮細胞（pericyte）に存在してその血管収縮に関与する。そのため、今回、VEGFが改善したことの理由の一つに、この抑制が毛細血管系の収縮およびそれに引き続く血流の低下を抑制し、結果的に網膜組織の低酸素が改善された可能性があることが考えられた。ただし、毛細血管レベルの網膜の血流と酸素飽和度を局所的かつ正確に測定することは技術的に困難であることもあり、本研究では血流そのものの評価や酸素飽和度の測定等は行っていない。将来何らかの方法で毛細血管レベルの血流や酸素飽和度等の変化を評価する方法を考える必要があると思われる。

4-2 VEGFとET-1

VEGFの発現上昇を促す要因として、血流の減少等を介する間接的なET-1の関与とは別に、腫瘍に関する研究においては、ET-1自体がVEGFの発現促進要因となっているとする報告がみられる[84, 85]。これに関連するものとして、ETを抑制することがVEGFの抑制を介することによって腫瘍の治療の選択肢となりうるという報告がある[86, 87]。これらの報告の中に、卵巣癌においては、ET-1

が直接的にVEGFの強力な促進因子となっており、それはET_A 受容体を介して行われるとするものがある[86]。今までに、いくつかの論文で初期糖尿病の網膜では、ET-1の発現が上昇していたとする報告がみられる[32, 51]。この事実から考えると、糖尿病ラットにおけるVEGFの発現上昇はET-1の発現上昇による直接的な関与も加わっているかもしれない。

卵巣癌のVEGFがエンドセリンA受容体拮抗薬により改善されたことは大変興味深い。なぜなら、今回我々も同様にエンドセリンA受容体拮抗薬を使用し、網膜でのVEGFの改善を得たからである。今回の我々の実験では、ET-1の発現を免疫染色によって評価したが、その結果、vehicle治療糖尿病ラットでは非糖尿病ラットと比較してET-1の発現上昇を認め、これはエンドセリンA受容体拮抗薬により改善された。したがって、今回得られたVEGFの改善は、4-1で述べた血流の改善に加えて、ET-1の発現そのものの改善による効果が加わっている可能性も否定できないと思われる。

上記論文では、VEGFの発現上昇は低酸素応答性の転写因子であるHIF-1 によって誘導されたと報告している[86]。これもまた興味深い結果である。なぜなら、VEGFもET-1もそのプロモーター領域に共通してHIF-1 の認識配列を持つからである[88-90]。つまり、HIF-1 の発現が上昇するような、例えば組織の低酸素などの環境の変化が生じたとき、VEGFとET-1はその両者とも発現の上昇が促される状態となる可能性が生じるからである。この際、これらの両者に何らかの正の相互作用があると、相乗的にお互いの発現が上昇し、最終的には著明なVEGFの発現上昇をきたすとも考えられる。今回、網膜組織の量的な問題などからgel shift assay 等を行えず、HIF-1 に関しては検討を行っていないが、HIF-1 という共通の促進因子を持つET-1とVEGFは糖尿病の網膜においても密接な相互作用を担っている可能性が示唆され、ETの抑制作用をもつ薬剤

はVEGFの抑制を期待できる点で有効な薬剤となる可能性が考えられた。

4-3 Retinal leukostasis と ICAM-1

現在、網膜の微小血管の閉塞（例えば増殖前網膜症における無灌流野の発生）の成因に、VEGFの発現上昇とともに網膜のleukostasisの関与が推測されており、leukostasisに関連した分子生物学的因子であるICAM-1とともに最近多数の報告がみられるようになった[6, 7, 55, 69-71]。今回の実験では、vehicle治療糖尿病群では、非糖尿病群と比較して網膜血管内に3.3倍の白血球の接着を認め、エンドセリンA受容体拮抗薬の治療によってこれらは75.6%の改善をみた。また、ICAM-1はvehicle治療糖尿病群で、非糖尿病群と比較して約30%の発現上昇が認められ、それはエンドセリンA受容体拮抗薬の治療によって著明に改善された。

我々が調べた範囲では、現在までに網膜においてICAM-1に対するET拮抗薬の効果を検討した報告はない。他の分野ではET-1により促進された心筋細胞のICAM-1の発現がエンドセリンA受容体拮抗薬であるS-0139によって抑制された（しかし、エンドセリンB受容体拮抗薬であるBQ788では抑制されなかった）という報告[91]や、aldosteroneの投与によって生じた血管壁のICAM-1の増加が同じくエンドセリンA受容体拮抗薬であるBMS 182874で抑制された報告[92]などがある。薬剤そのものの違いを考慮する必要があるが、今回我々が用いた薬剤も同様にエンドセリンA受容体拮抗薬であり、網膜においても他の臓器と同様にエンドセリンA受容体拮抗薬の投与がICAM-1の抑制に働く可能性示された。これに関連して、別の実験として、今回用いた選択的ET_A受容体拮抗薬であるTA-0201ではなく、非選択的ET_A/ET_B受容体拮抗薬であるSB209670 (SmithKline

Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, Pa)を用いて今回と同様の検討を行ったところ、ICAM-1の改善は認められなかった(参考図1)。この理由として確実なものは得られていないが、上記心筋細胞で検討した論文のICAM-1の発現がエンドセリンB受容体拮抗薬であるBQ788では抑制されなかったことなどから、少なくともICAM-1の発現においてはET_B 受容体を抑制することは望ましいことではない可能性があると考えられた。

一方、網膜において、VEGFの発現上昇がICAM-1の発現上昇を促したとする報告[70, 93]がみられる。今回、VEGFはvehicle治療糖尿病ラットで発現上昇し、エンドセリンA受容体拮抗薬の投与で改善しており、この傾向はICAM-1の結果においても同様に認められた。この結果のみから考察すると、今回のICAM-1のエンドセリンA受容体拮抗薬による改善は、VEGFの改善にも影響されている可能性が考えられる。しかしながら、参考図1で使用した(非選択的ET_A/ET_B 受容体拮抗薬であるSB209670を投与された)ラットのVEGF発現量の結果は参考図2のごとくであった。エンドセリンA受容体拮抗薬を使用したモデルと比較してVEGFの改善率は低下しているが、有意な改善が認められている。この結果から、VEGFは改善してもそれがそのままICAM-1の改善にはつながらないという事実もあることが確認された。この解離のメカニズムの説明は現段階では困難である。しかし、この事実は「糖尿病網膜症の悪化を防止するためにVEGFのみを抑制しても、網膜症の進行を完全に抑制することはできない」という事実を説明する一つの根拠になるかもしれない。また逆に、エンドセリンA受容体拮抗薬のように、VEGFを含む複数の網膜症の悪化要因を同時に改善する可能性のある薬剤はこの点においても有用であると思われる。

Leukostasisの結果については、上記ICAM-1の結果に矛盾しない結果が得られたが、エンドセリンA受容体拮抗薬によるleukostasisの改善はICAM-1の改善

のためなのか、または、エンドセリンA受容体拮抗薬による毛細血管系の収縮の改善がこのleukostasisの結果に影響しているのか現時点では判断が難しい。

本研究の結果により、エンドセリンA受容体拮抗薬の投与は、VEGFとともに毛細血管系の閉塞に大きく関与するとされるleukostasisおよびICAM-1の改善をもたらす可能性が考えられた。毛細血管系の閉塞は、臨床上の病期では網膜の各所に無灌流野non perfusion area (NPA)が多発する増殖前網膜症期に相当する時期と考えられ、いわば網膜の増殖化への最初の変化である。つまり、この時点までに何らかの治療を行い、網膜症をこれ以降の段階に進行させないことは網膜症を増殖網膜症にしないための最後の砦である。よって、エンドセリンA受容体拮抗薬によって、VEGF、ICAM-1、leukostasisといったこの病期に問題となる因子を改善できる可能性が確認されたことは臨床との関連でも大変重要であると考えられた。

4-4 糖尿病網膜症の初期の治療について

本研究の網膜切片のHE染色では、今回用いた5週間糖尿病状態としたラットには明らかな組織学的な変化は認められなかった。また、10週間糖尿病状態としたラットでも無灌流野、蛍光漏出に代表される造影検査上で認められるような変化は確認できなかった。第二章の1で述べたように、他の検討でもラットは半年～1年といった長期間糖尿病状態となっても、いわゆる臨床上でみられるような進行した網膜症は生じないと報告されている。さらに増殖網膜症となると、ヒトでみられるものと同様の網膜症は現時点でもまだ確実なものはないとされている。これらの事実を考慮すると、本研究のモデルにおいても組織学的、造影検査上で網膜の変化がみられないのは当然とも考えられる。しかし、

今回注目したのはそのような時期であっても網膜では分子生物学的な変化はすでに生じており、特定の治療を施せばそれらが改善するという事実である。つまり、網膜に組織学的な変化が生じる前に治療を施すことができれば、網膜に器質的な変化をきたさずに治療ができる可能性が生じる。臨床においては、いかに増殖網膜症を生じさせないよう網膜症を管理するかということが論議されるテーマでもあり、この、初期の段階で行う糖尿病網膜症の治療法が今後も追及されると考えられる。その意味から、エンドセリンA受容体拮抗薬による治療はそのひとつの選択肢となりえると考えられた。

5 結論

STZにより導入された糖尿病ラットの網膜では、組織学的、造影検査上の変化が認められる以前からVEGF、ICAM-1といった分子生物学的因子やleukostasisなど糖尿病網膜症の悪化に関与する因子の発現の上昇が認められ、これらの上昇はエンドセリンA受容体拮抗薬であるTA-0201の投与により改善された。したがって、初期糖尿病網膜症の増殖化への進行防止のために、エンドセリンA受容体拮抗薬の投与は将来有効な網膜症治療の選択肢となり得る可能性が示された。

第五章 総合考察（臨床応用への可能性）

今回、VEGF、ICAM-1やleukostasisといった糖尿病網膜症の悪化に関与すると考えられている因子がエンドセリンA受容体拮抗薬の投与で改善することを確認した。糖尿病網膜症の治療に際しては、侵襲的な治療が必要となる増殖前網膜症より前の段階にとどめておくことが必須である。その点から、今後も糖尿病網膜症に対する薬物治療の模索は続くと考えられる。

現在、VEGFに関しては、VEGF受容体阻害剤（SU5416）VEGFアプタマー（pegaptanib (Macugen®)）抗VEGF抗体（ranibizumab (Lucentis®)）といった様々な抗VEGF薬が開発され、脈絡膜新生血管を伴う黄斑変性症をはじめとした血管新生性の眼疾患への有効性が報告されている[94-98]。抗VEGF薬は、糖尿病網膜症に対しては黄斑浮腫に有効とする報告がある[99, 100]。ただ、これまでの報告では、これらの薬剤は基本的に硝子体注射などの侵襲を伴う方法で投与されており、さらに安全で簡便な治療法の開発が望まれる。例えば単純網膜症の後期～増殖前網膜症の前期といった、何らかの治療は必要であるが、まだ眼局所の侵襲的な治療を行うには早いと考えられる、我々が臨床医として最も苦慮する病期の患者への治療を考えてみる。これらの患者に対しては、局所への侵襲を伴う治療は行い難いので基本的には内服治療になると考えられる。この際、網膜に対しては上記のようにVEGFの抑制を行うことが最も効果的であると考えられるが、これをこのようなQOLに影響のない初期段階の患者に全身投与で適用することには後述の理由で問題がある。すなわち糖尿病患者においては、網膜では悪役としてふるまうVEGFも、他の臓器ではむしろ必要であることが多いとされている。例えば糖尿病の患者では、心筋におけるVEGFの減少が冠血管の側副路の形成を阻害し[101]、陰茎におけるVEGFの減少は勃起不全を生

じると報告[102]されている。糖尿病の患者は虚血性心疾患や勃起不全を合併していることも多く、この場合には、網膜症のためとはいえ抗VEGF薬の投与には慎重な検討を要すると思われる。一方、糖尿病におけるETの阻害は、網膜における改善のみならず、これら循環器系、泌尿器系の両者においても改善するとの報告がある[103, 104]。VEGFのように、その発現を上昇させたいのか、抑制したいのかが臓器によって異なる因子と比較して、ETはその阻害が各臓器にとって有用であり、例えば内服のように全身的な投与が必要となる際にも使用が容易である可能性が高い。

さらにまたこのことに関連して、ヨーロッパの多施設で行われた前向きの大規模な臨床試験であるEUCLID studyにおいて、高血圧のない 1 型糖尿病患者に対し、2年に及ぶangiotensin converting enzyme (ACE)阻害薬である lisinoprilの投与によりplacebo投与群と比較して網膜症の進行が50%抑制され、増殖網膜症の進行は82%抑制されることが報告され[105]、さらにこのACE阻害薬の効果はETの抑制の効果が根底にあるとする意見[106]もあることは非常に興味深く、今後、ET阻害薬の臨床応用を考える上で有用な結果と思われる。

ET阻害薬の糖尿病網膜症への臨床応用を行うには様々な検証が必要である。しかし、ET阻害薬の現状として、非選択的ET_A/ET_B受容体拮抗薬であるボセンタンbosentan (Tracleerトラクリア®) が2005年6月から日本でも肺高血圧症に対して使用可能になり、今後、本邦でもET阻害薬の臨床での使用経験のデータが蓄積されていくと思われる。また、海外では今回用いた薬剤と同じエンドセリンA受容体拮抗薬の sitaxsentan (Thelin®) が第3相試験にてボセンタンと同等の良好な結果が得られた[107, 108]ことが15th annual meeting of European Respiratory Societyで報告され[109]、今後の市販化に伴い、選択肢の広がりが期待される。

今回の検討では、選択的ET_A受容体拮抗薬が糖尿病網膜症の増殖化の抑制にも有効である可能性が示された。今後この薬剤が、実際の糖尿病網膜症の患者においても有効となり得るのか、さらなる検討を重ねていきたいと考えている。

引用文献

1. 中江公裕, 小暮文雄, and 長屋幸郎, わが国における視覚障害の現況, in 厚生省指
標(0452-6104). 1991. p. 13-22.
2. 堀貞夫, 【糖尿病に起因する合併症】 糖尿病網膜症-概念、分類、診断、治療-, in 日
本臨床増刊 10. 2002. p. 147-154.
3. 船津英陽, 眼科診療プラクティス. 20: p. 134 ~ 139.
4. Tolentino, M.J., et al., *Intravitreal injections of vascular endothelial growth
factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate.*
Ophthalmology, 1996. 103(11): p. 1820-8.
5. Schlingemann, R.O. and V.W. van Hinsbergh, *Role of vascular permeability
factor/vascular endothelial growth factor in eye disease.* Br J Ophthalmol, 1997.
81(6): p. 501-12.
6. Miyamoto, K., et al., *In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in
retinal microcirculation of diabetic rats.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. 39(11):
p. 2190-4.
7. Miyamoto, K., et al., *Prevention of leukostasis and vascular leakage in
streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion
molecule-1 inhibition.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(19): p. 10836-41.
8. Aiello, L.P., *Clinical implications of vascular growth factors in proliferative
retinopathies.* Curr Opin Ophthalmol, 1997. 8(3): p. 19-31.
9. 厚生省 糖尿病調査研究報告書 (平成 3 年度) . p. 33-38.
10. Klein, R., et al., *Is blood pressure a predictor of the incidence or progression of
diabetic retinopathy?* Arch Intern Med, 1989. 149(11): p. 2427-32.
11. Klein, R., et al., *The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy:
XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and
associated risk factors in type 1 diabetes.* Ophthalmology, 1998. 105(10): p.
1801-15.
12. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by
vascular endothelial cells.* Nature, 1988. 332(6163): p. 411-5.
13. Asano, T., et al., *Endothelin and the production of cerebral vasospasm in dogs.*
Biochem Biophys Res Commun, 1989. 159(3): p. 1345-51.
14. Tomobe, Y., et al., *Mechanisms of altered sensitivity to endothelin-1 between
aortic smooth muscles of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats.* J

- Pharmacol Exp Ther, 1991. 257(2): p. 555-61.
15. Kurihara, H., et al., *The possible role of endothelin-1 in the pathogenesis of coronary vasospasm*. J Cardiovasc Pharmacol, 1989. 13 Suppl 5: p. S132-7; discussion S142.
 16. Miyauchi, T. and T. Masaki, *Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system*. Annu Rev Physiol, 1999. 61: p. 391-415.
 17. Vane, J., *Endothelins come home to roost*. Nature, 1990. 348(6303): p. 673.
 18. 後藤勝年, 【*Vascular biology 分子生物学と病態・治療*】 血管と生理活性物質のトピックス 血管リモデリングとエンドセリン, in *医学のあゆみ*(0039-2359). 1999. p. 384-388.
 19. Erickson-Lamy, K., et al., *Effect of endothelin on outflow facility and accommodation in the monkey eye in vivo*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. 32(3): p. 492-5.
 20. MacCumber, M.W., H.D. Jampel, and S.H. Snyder, *Ocular effects of the endothelins. Abundant peptides in the eye*. Arch Ophthalmol, 1991. 109(5): p. 705-9.
 21. Takahashi, K., et al., *Production of endothelin 1 by cultured bovine retinal endothelial cells and presence of endothelin receptors on associated pericytes*. Diabetes, 1989. 38(9): p. 1200-2.
 22. Sakaue, H., et al., [*Effects of endothelin on retinal blood vessels*]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1992. 96(4): p. 469-72.
 23. Takei, K., et al., *Analysis of vasocontractile responses to endothelin-1 in rabbit retinal vessels using an ETA receptor antagonist and an ETB receptor agonist*. Life Sci, 1993. 53(6): p. PL111-5.
 24. Sato, T., et al., [*Endothelin-1-induced vasoconstriction in retinal blood vessels in the rabbit*]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1993. 97(6): p. 683-9.
 25. Takei, K., et al., *A new model of transient complete obstruction of retinal vessels induced by endothelin-1 injection into the posterior vitreous body in rabbits*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1993. 231(8): p. 476-81.
 26. Oku, H., et al., [*Effects of intravitreal injection of endothelin on the visual system*]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1993. 97(4): p. 467-73.
 27. 杉山哲也, 奥英弘, and 守屋伸一, *エンドセリン-1 の眼循環に及ぼす影響*, in *日本眼科学会雑誌*(0029-0203). 1993. p. 678-682.
 28. Ye, X.D., A.M. Laties, and R.A. Stone, *Peptidergic innervation of the retinal vasculature and optic nerve head*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990. 31(9): p. 1731-7.

29. 吉富健志, 神経眼科入門シリーズ 眼薬理学入門 眼薬理学総論 一酸化窒素とエンドセリン, in 神経眼科(0289-7024). 1997. p. 9-15.
30. Clermont, A.C., et al., *Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for vascular endothelial growth factor in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy*. Am J Ophthalmol, 1997. 124(4): p. 433-46.
31. [The 106th annual meeting of the Japanese Ophthalmological Society. Sendai, Japan. May 23-26, 2002. Abstracts]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2002. 106 Suppl: p. 1-264.
32. Takagi, C., et al., *Regulation of retinal hemodynamics in diabetic rats by increased expression and action of endothelin-1*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. 37(12): p. 2504-18.
33. Deng, D., et al., *Diabetes-induced vascular dysfunction in the retina: role of endothelins*. Diabetologia, 1999. 42(10): p. 1228-34.
34. Evans, T., et al., *Endothelins, their receptors, and retinal vascular dysfunction in galactose-fed rats*. Diabetes Res Clin Pract, 2000. 48(2): p. 75-85.
35. Letizia, C., et al., *Circulating endothelin-1 in non-insulin-dependent diabetic patients with retinopathy*. Horm Metab Res, 1997. 29(5): p. 247-51.
36. Oku, H., et al., *Possible involvement of endothelin-1 and nitric oxide in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy*. Retina, 2001. 21(6): p. 647-51.
37. Tsuchitani, M., et al., *A new diabetic strain of rat (WBN/Kob)*. Lab Anim, 1985. 19(3): p. 200-7.
38. Matsuura, T., et al., *Proliferative retinal changes in diabetic rats (WBN/Kob)*. Lab Anim Sci, 1999. 49(5): p. 565-9.
39. Shinohara, M., et al., *A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications*. Int J Exp Diabetes Res, 2000. 1(2): p. 89-100.
40. Yamada, H., et al., *Retinal neovascularisation without ischaemia in the spontaneously diabetic Torii rat*. Diabetologia, 2005. 48(8): p. 1663-8.
41. Kawano, K., et al., *Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain*. Diabetes, 1992. 41(11): p. 1422-8.
42. Matsuura, T., et al., *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rat is not a suitable animal model for the study of angiopathic diabetic retinopathy*. Int J Tissue React, 2005. 27(2): p. 59-62.
43. Wallace, K.J., et al., *Quantitative trait locus dissection in congenic strains of the Goto-Kakizaki rat identifies a region conserved with diabetes loci in human*

- chromosome 1q*. Physiol Genomics, 2004. 19(1): p. 1-10.
44. Wallis, R.H., et al., *Enhanced insulin secretion and cholesterol metabolism in congenic strains of the spontaneously diabetic (Type 2) Goto Kakizaki rat are controlled by independent genetic loci in rat chromosome 8*. Diabetologia, 2004. 47(6): p. 1096-106.
 45. Hirashima, T., et al., *A diabetogenic gene (ODB-1) assigned to the X-chromosome in OLETF rats*. Diabetes Res Clin Pract, 1995. 27(2): p. 91-6.
 46. Hirashima, T., et al., *A diabetogenic gene, ODB2, identified on chromosome 14 of the OLETF rat and its synergistic action with ODB1*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 224(2): p. 420-5.
 47. Akhi, M., H. Kose, and K. Matsumoto, *Fine mapping of the hyperglycemic and obesity QTL by congenic strains suggests multiple loci on rat chromosome 14*. J Med Invest, 2005. 52(1-2): p. 109-13.
 48. Kawano, K., et al., *OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain*. Diabetes Res Clin Pract, 1994. 24 Suppl: p. S317-20.
 49. Chakravarthy, U., et al., *Endothelin expression in ocular tissues of diabetic and insulin-treated rats*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. 38(10): p. 2144-51.
 50. De Juan, J.A., et al., *Changes in the density and localisation of endothelin receptors in the early stages of rat diabetic retinopathy and the effect of insulin treatment*. Diabetologia, 2000. 43(6): p. 773-85.
 51. Yokota, T., et al., *Role of protein kinase C on the expression of platelet-derived growth factor and endothelin-1 in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary pericytes*. Diabetes, 2003. 52(3): p. 838-45.
 52. Iwashima, Y., *[Drug-induced animal models of diabetes]*. Nippon Rinsho, 2002. 60 Suppl 8: p. 47-51.
 53. Poulaki, V., et al., *Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF*. J Clin Invest, 2002. 109(6): p. 805-15.
 54. Qaum, T., et al., *VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. 42(10): p. 2408-13.
 55. Joussen, A.M., et al., *Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina*. Am J Pathol, 2001. 158(1): p. 147-52.
 56. Gilbert, R.E., et al., *Vascular endothelial growth factor and its receptors in control and diabetic rat eyes*. Lab Invest, 1998. 78(8): p. 1017-27.
 57. Hammes, H.P., et al., *Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental*

- background diabetic retinopathy of the rat.* Diabetes, 1998. 47(3): p. 401-6.
58. Moravski, C.J., et al., *The renin-angiotensin system influences ocular endothelial cell proliferation in diabetes: transgenic and interventional studies.* Am J Pathol, 2003. 162(1): p. 151-60.
 59. Aiello, L.P., et al., *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders.* N Engl J Med, 1994. 331(22): p. 1480-7.
 60. Murata, T., et al., *The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas.* Lab Invest, 1996. 74(4): p. 819-25.
 61. Sone, H., et al., *Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes.* Diabetologia, 1997. 40(6): p. 726-30.
 62. Segawa, Y., et al., *Upregulation of retinal vascular endothelial growth factor mRNAs in spontaneously diabetic rats without ophthalmoscopic retinopathy. A possible participation of advanced glycation end products in the development of the early phase of diabetic retinopathy.* Ophthalmic Res, 1998. 30(6): p. 333-9.
 63. Ellis, E.A., et al., *Increased H₂O₂, vascular endothelial growth factor and receptors in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat.* Free Radic Biol Med, 2000. 28(1): p. 91-101.
 64. Burgos, R., et al., *Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are not influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy.* Diabetologia, 1997. 40(9): p. 1107-9.
 65. Funatsu, H., et al., *Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy.* Br J Ophthalmol, 2002. 86(3): p. 311-5.
 66. Malecaze, F., et al., *Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy.* Arch Ophthalmol, 1994. 112(11): p. 1476-82.
 67. Stitt, A.W., *The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy.* Exp Mol Pathol, 2003. 75(1): p. 95-108.
 68. Williams, B., et al., *Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro.* Diabetes, 1997. 46(9): p. 1497-503.
 69. Kinukawa, Y., M. Shimura, and M. Tamai, *Quantifying leukocyte dynamics and plugging in retinal microcirculation of streptozotocin-induced diabetic rats.* Curr

- Eye Res, 1999. 18(1): p. 49-55.
70. Miyamoto, K., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*. Am J Pathol, 2000. 156(5): p. 1733-9.
 71. Ishida, S., et al., *VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. 44(5): p. 2155-62.
 72. Hofman, P., et al., *Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina: new insights into the pathogenesis of capillary nonperfusion*. Arch Ophthalmol, 2001. 119(6): p. 861-6.
 73. Miyauchi, T., et al., *Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. Circ Res, 1993. 73(5): p. 887-97.
 74. Clozel, M., et al., *Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. 270(1): p. 228-35.
 75. Yamauchi-Kohno, R., et al., *Role of endothelin in deterioration of heart failure due to cardiomyopathy in hamsters: increase in endothelin-1 production in the heart and beneficial effect of endothelin-A receptor antagonist on survival and cardiac function*. Circulation, 1999. 99(16): p. 2171-6.
 76. Ueno, M., et al., *Endothelin-A-receptor antagonist and oral prostacyclin analog are comparably effective in ameliorating pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy in rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. 36(5 Suppl 1): p. S305-10.
 77. Ueno, M., et al., *A combination of oral endothelin-A receptor antagonist and oral prostacyclin analogue is superior to each drug alone in ameliorating pulmonary hypertension in rats*. J Am Coll Cardiol, 2002. 40(1): p. 175-81.
 78. Murakoshi, N., et al., *Vascular endothelin-B receptor system in vivo plays a favorable inhibitory role in vascular remodeling after injury revealed by endothelin-B receptor-knockout mice*. Circulation, 2002. 106(15): p. 1991-8.
 79. Maeda, S., et al., *Involvement of endogenous endothelin-1 in exercise-induced redistribution of tissue blood flow: an endothelin receptor antagonist reduces the redistribution*. Circulation, 2002. 106(17): p. 2188-93.
 80. Ohnishi, M., et al., *Endothelin stimulates an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine, in experimental heart failure*. Clin Sci (Lond), 2002. 103 Suppl 48: p. 241S-244S.
 81. Yamamoto, K., et al., *Roles of renin-angiotensin and endothelin systems in*

- development of diastolic heart failure in hypertensive hearts.* Cardiovasc Res, 2000. 47(2): p. 274-83.
82. Matsumoto, Y., et al., *Long-term endothelin a receptor blockade inhibits electrical remodeling in cardiomyopathic hamsters.* Circulation, 2002. 106(5): p. 613-9.
 83. Cai, J. and M. Boulton, *The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions.* Eye, 2002. 16(3): p. 242-60.
 84. Salani, D., et al., *Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma.* Am J Pathol, 2000. 157(5): p. 1537-47.
 85. Wulfig, P., et al., *Endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer.* Clin Cancer Res, 2004. 10(7): p. 2393-400.
 86. Spinella, F., et al., *Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells.* J Biol Chem, 2002. 277(31): p. 27850-5.
 87. Rosano, L., et al., *Therapeutic targeting of the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma.* Cancer Res, 2003. 63(10): p. 2447-53.
 88. Braun, L., et al., *The regulation of the induction of vascular endothelial growth factor at the onset of diabetes in spontaneously diabetic rats.* Life Sci, 2001. 69(21): p. 2533-42.
 89. Kakinuma, Y., et al., *Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1alpha induced for impaired myocardial energy metabolism.* Circulation, 2001. 103(19): p. 2387-94.
 90. 峯岸直子, 【血管の発生・再生と造血】 低酸素反応性血液・血管共通分子の発現制御, in 血管医学(1345-9031). 2001. p. 451-459.
 91. Hayasaki, Y., et al., *ICAM-1 expression on cardiac myocytes and aortic endothelial cells via their specific endothelin receptor subtype.* Biochem Biophys Res Commun, 1996. 229(3): p. 817-24.
 92. Pu, Q., et al., *Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling.* Hypertension, 2003. 42(1): p. 49-55.
 93. Lu, M., et al., *VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. 40(8): p. 1808-12.
 94. Gragoudas, E.S., et al., *Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration.* N Engl J Med, 2004. 351(27): p. 2805-16.
 95. Moshfeghi, A.A. and C.A. Puliafito, *Pegaptanib sodium for the treatment of*

- neovascular age-related macular degeneration*. Expert Opin Investig Drugs, 2005. 14(5): p. 671-82.
96. Ng, E.W. and A.P. Adamis, *Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneratio*. Can J Ophthalmol, 2005. 40(3): p. 352-68.
 97. *ENHANCED EFFICACY ASSOCIATED WITH EARLY TREATMENT OF NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION WITH PEGAPTANIB SODIUM: An Exploratory Analysis*. Retina, 2005. 25(7): p. 815-827.
 98. Michels, S. and P.J. Rosenfeld, *[Treatment of neovascular age-related macular degeneration with Ranibizumab/Lucentis]*. Klin Monatsbl Augenheilkd, 2005. 222(6): p. 480-4.
 99. Cunningham, E.T., Jr., et al., *A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2005. 112(10): p. 1747-57.
 100. Kitano, S., *[Medications for diabetic macular edema]*. Nippon Rinsho, 2005. 63 Suppl 6: p. 275-9.
 101. Chou, E., et al., *Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue*. Circulation, 2002. 105(3): p. 373-9.
 102. Jesmin, S., et al., *Diminished penile expression of vascular endothelial growth factor and its receptors at the insulin-resistant stage of a type II diabetic rat model: a possible cause for erectile dysfunction in diabetes*. J Mol Endocrinol, 2003. 31(3): p. 401-18.
 103. Zaedi, S., et al, *Changes of NO and ET-1 in plasma and cardiac tissues in streptozotocin-induced early diabetic rat: effects of selective and dual ET receptor antagonists*. in *9th International Conference on Endothelin*. 2005.
 104. Jesmin, S., et al, *Clinical implication of endothelin antagonism in diabetic erectile dysfunction: Changes in VEGF and NO in type II diabetic penis and beneficial or detrimental effects of endothelin antagonism*. in *9th International Conference on Endothelin*. 2005.
 105. Chaturvedi, N., et al., *Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*. Lancet, 1998. 351(9095): p. 28-31.

106. Lam, H.C., et al., *Role of endothelin in diabetic retinopathy*. Curr Vasc Pharmacol, 2003. 1(3): p. 243-50.
107. Langleben, D., et al., *STRIDE 1: Effects of the Selective ETA Receptor Antagonist, Sitaxsentan Sodium, in a Patient Population with Pulmonary Arterial Hypertension that meets Traditional Inclusion Criteria of Previous Pulmonary Arterial Hypertension Trials*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. 44: p. S80-S84.
108. *STRIDE-2 Trial: A placebo-controlled study for sitaxsentan in pulmonary arterial hypertension*. in *9th International Conference on Endothelin*. 2005.
109. in *15th annual meeting of the European Respiratory Society: Abstract 3131*. 2005.

表 1. 各群の体重および血糖値

	non-DM control	DM+vehicle	DM+TA-0201
Body weight (g)	496.4 ± 51.2	345.1 ± 35.1*	352.9 ± 36.3*
Blood glucose (mg/dl)	117.3 ± 10.7	539.2 ± 31.9†	528.7 ± 39.0†

値は平均値 ± 標準偏差で示した。

* : $P < 0.01$ でnon-DM controlに対する有意差を示す。† : $P < 0.01$ でnon-DM controlに対する有意差を示す。

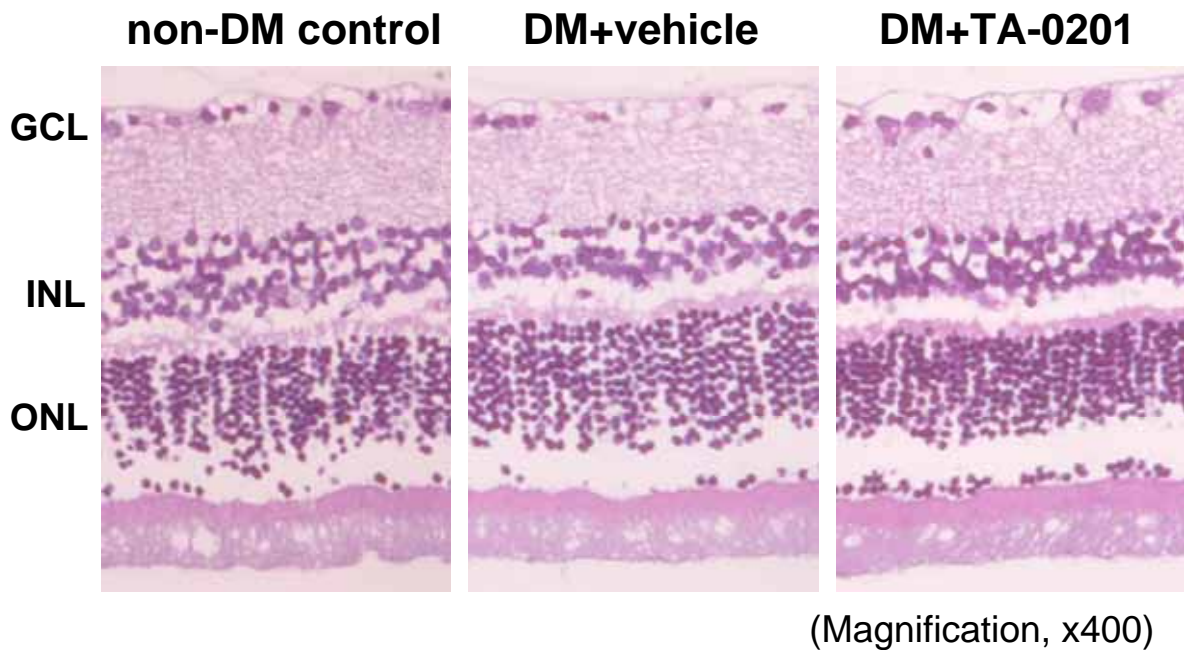


図1 網膜のヘマトキシリン・エオジン染色像

non-DM control: 非糖尿病コントロールラット、DM+vehicle: vehicle 治療糖尿病ラット、DM+TA-0201: ET_A antagonist 治療糖尿病ラット
各群間に明らかな違いは認められない。

GCL; ganglion cell layer, IPL; inner nuclear layer, ONL; outer nuclear layer (Magnification x400)

A

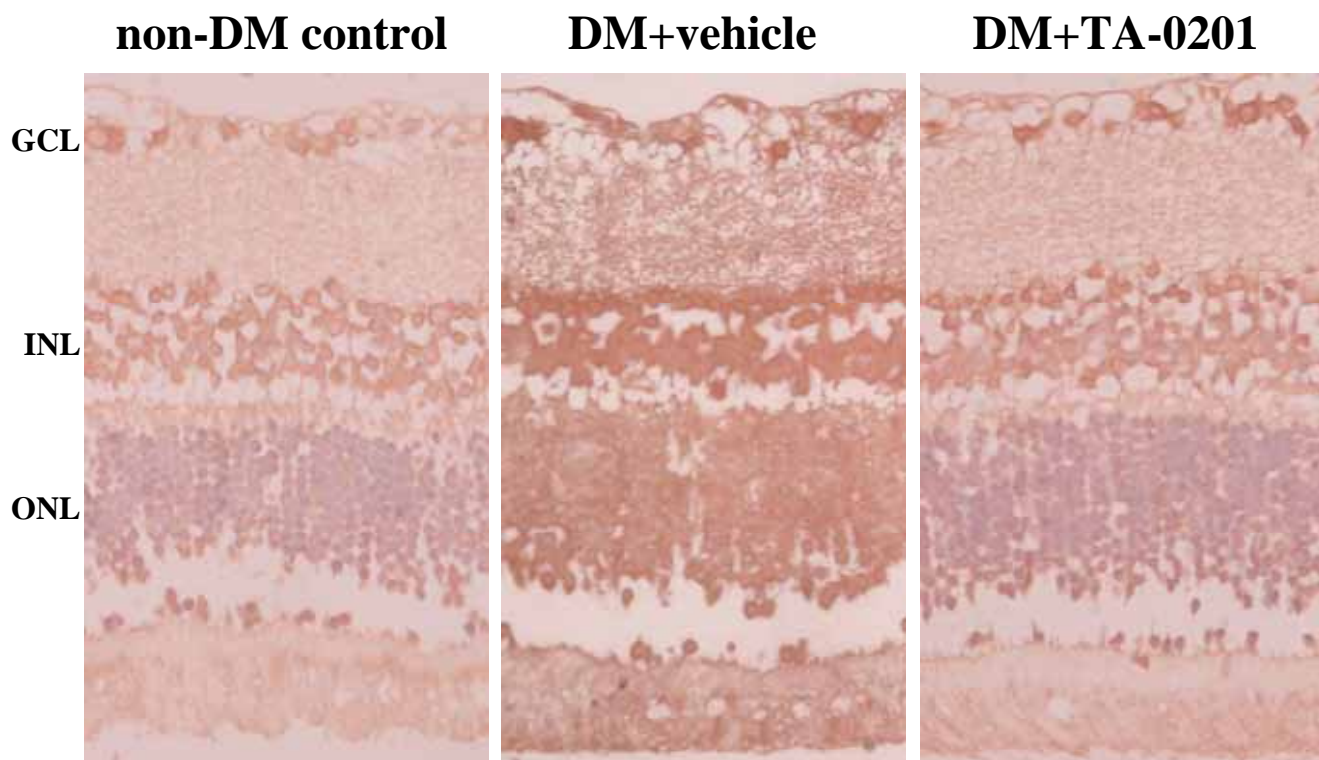


図2A 網膜におけるET-1の免疫組織染色像

non-DM control: 非糖尿病コントロールラット、DM+vehicle: vehicle 治療糖尿病ラット、DM+TA-0201: ET_A antagonist 治療糖尿病ラット

GCL; ganglion cell layer, INL; inner nuclear layer, ONL; outer nuclear layer (Magnification x400)

B

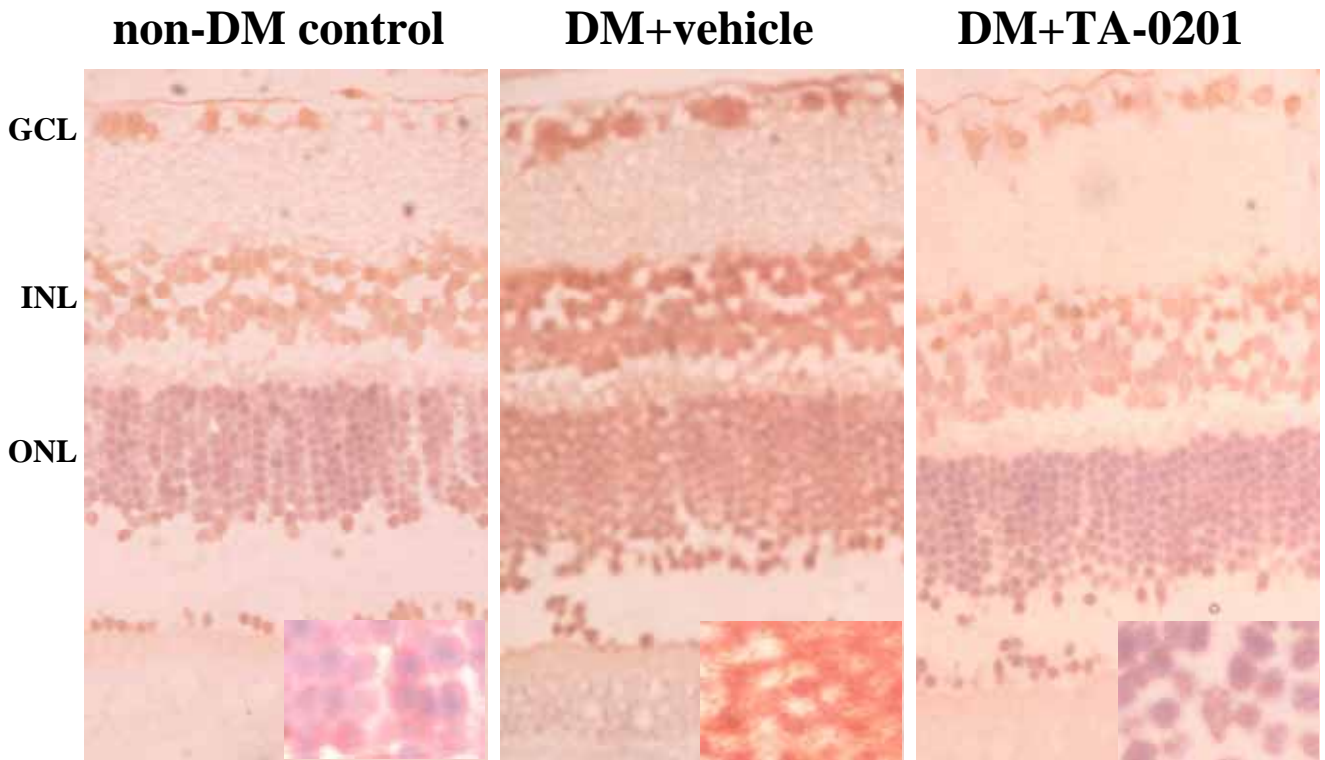


図2B 網膜におけるVEGFの免疫組織染色像

non-DM control: 非糖尿病コントロールラット、DM+vehicle: vehicle 治療糖尿病ラット、DM+TA-0201: ET_A antagonist 治療糖尿病ラット

vehicle 治療糖尿病ラットでは他群と比較し、顆粒層細胞質の染色性が上昇している (挿入図)

GCL; ganglion cell layer, IPL; inner nuclear layer, ONL; outer nuclear layer (Magnification x400)

A

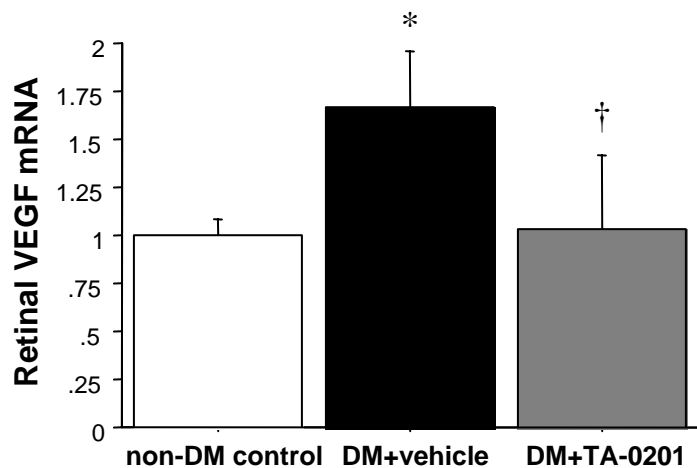


図3A 網膜におけるVEGF mRNAの発現レベル

non-DM control:非糖尿病コントロールラット(n=5)、DM+vehicle:vehicle治療糖尿病ラット(n=5)、DM+TA-0201:ET_A antagonist治療糖尿病ラット(n=5)

データはnon-DM controlの平均値に対する割合で示した(平均値 ± 標準偏差)。

*: $P < 0.05$ でnon-DM controlに対する有意差を示す。†: $P < 0.05$ でDM+vehicleに対する有意差を示す。

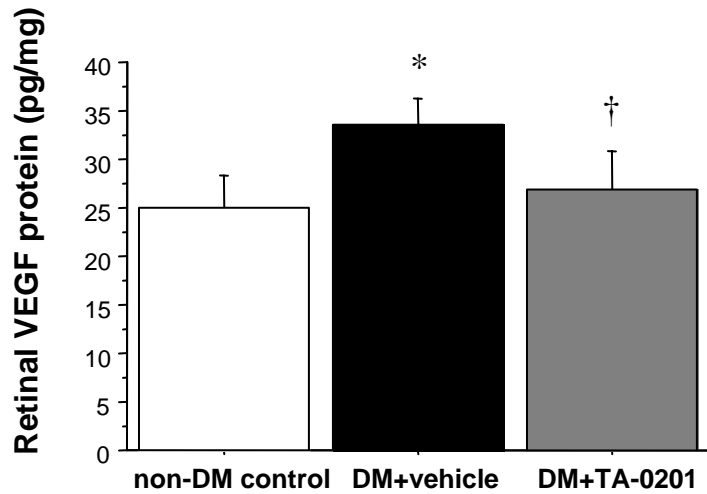
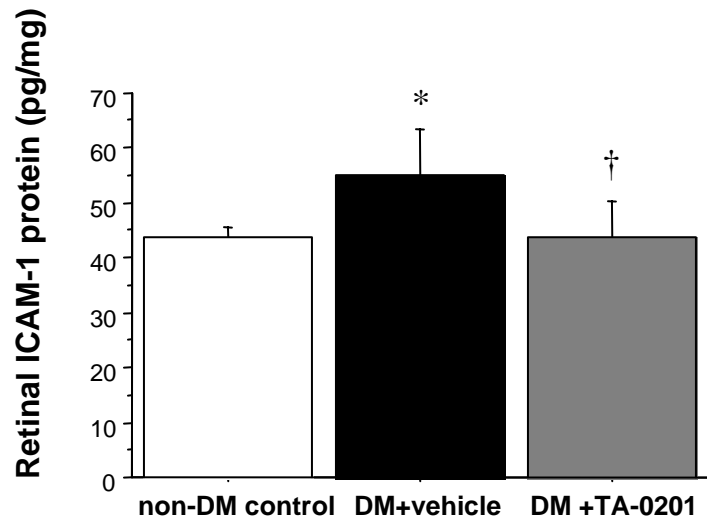
B**C**

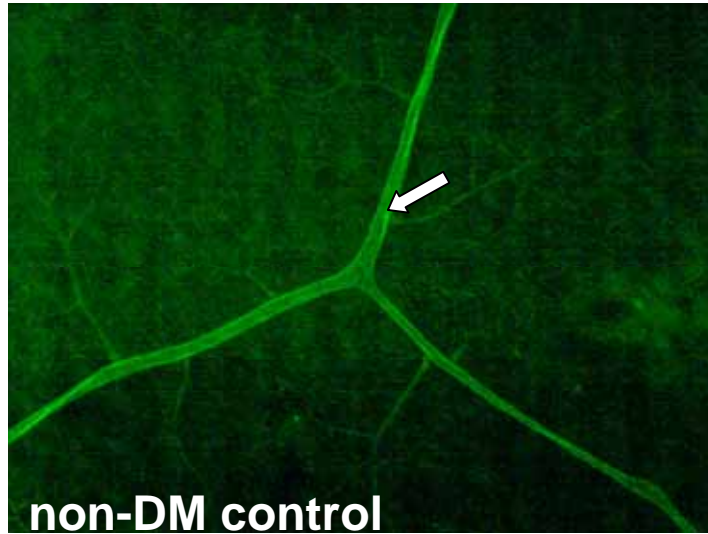
図3 B,C 網膜におけるVEGF およびICAM-1 蛋白の発現レベル

non-DM control: 非糖尿病コントロールラット (n=6)、DM+vehicle: vehicle治療糖尿病ラット (n=6)、DM+TA-0201: ET_A antagonist治療糖尿病ラット (n=6)

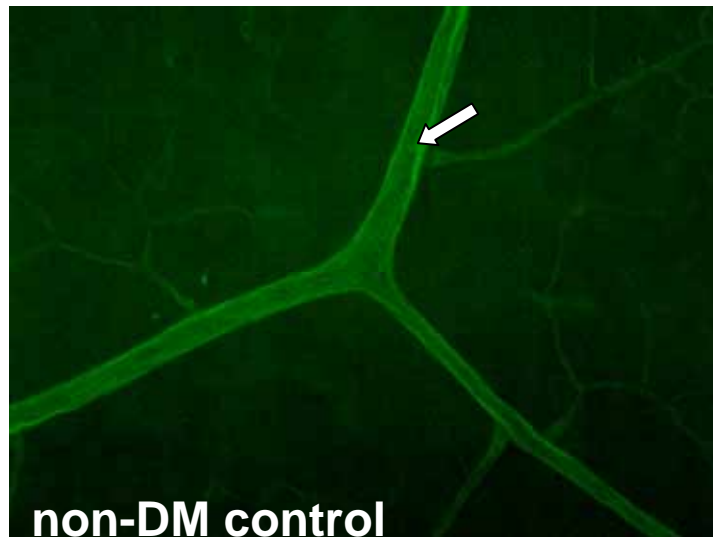
ELISAにより得られたデータを示す (平均値 ± 標準偏差)。

*: $P < 0.05$ でnon-DM controlに対する有意差を示す。†: $P < 0.05$ でDM+vehicleに対する有意差を示す。

A



(Magnification, x100)



(Magnification, x200)

図4A 非糖尿病コントロールラットに認められた網膜血管内の白血球接着の典型例

Concanavalin Aにて白血球を染色し、網膜をフラットマウントした。網膜血管内に少数の接着した白血球を認める(白矢印)。

B

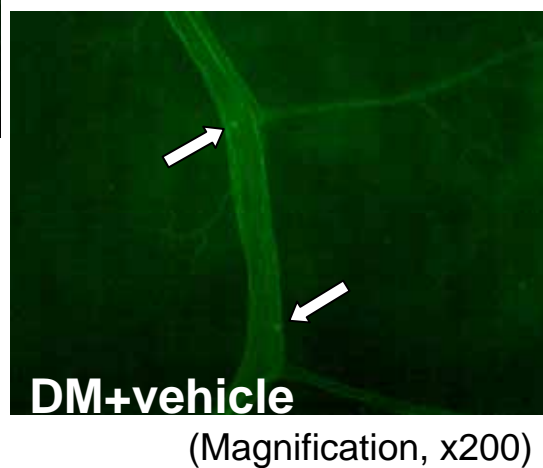
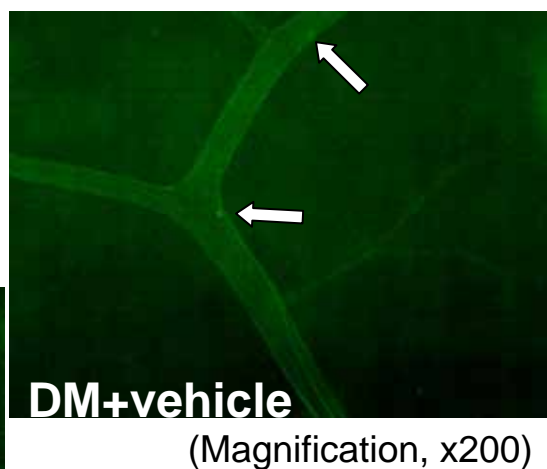
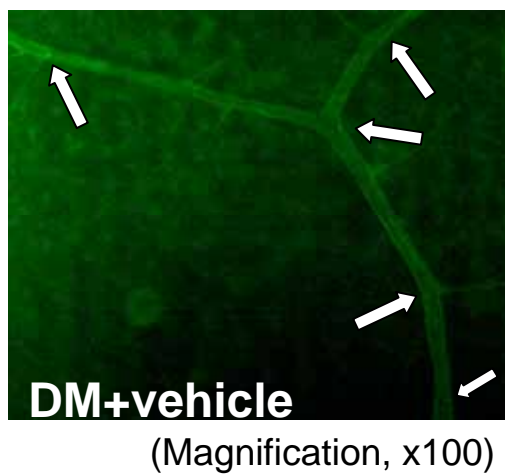
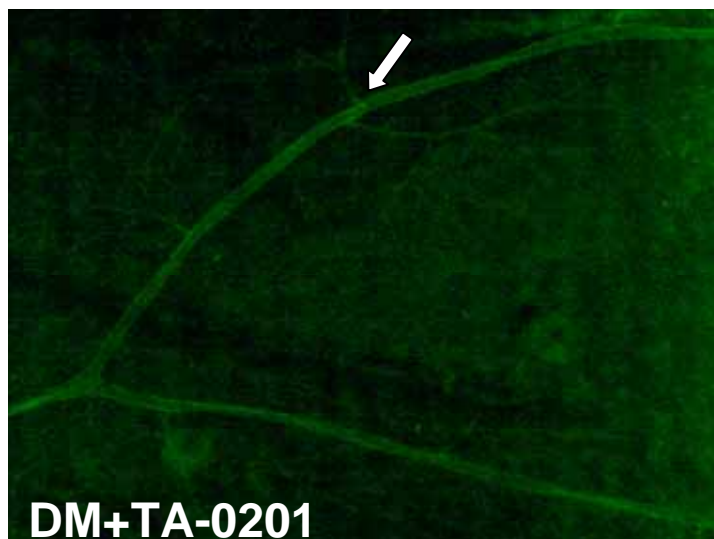


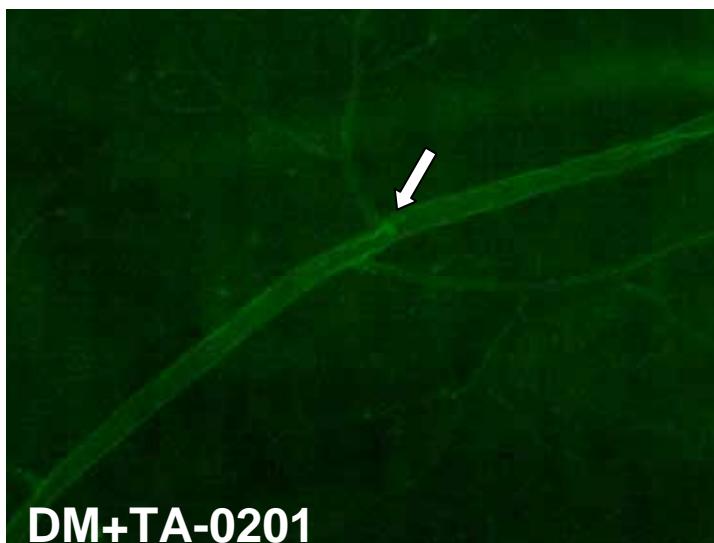
図4B vehicle治療糖尿病ラットに認められた網膜血管内の白血球接着の典型例

1視野中にも多数の接着した白血球を認めた(白矢印)。

C



(Magnification, x100)



(Magnification, x200)

図4C ET_A antagonist治療糖尿病ラットに認められた網膜血管内の白血球接着の典型例

網膜血管内に接着した白血球は、非糖尿病コントロールラットと同程度に少数となった(白矢印)。

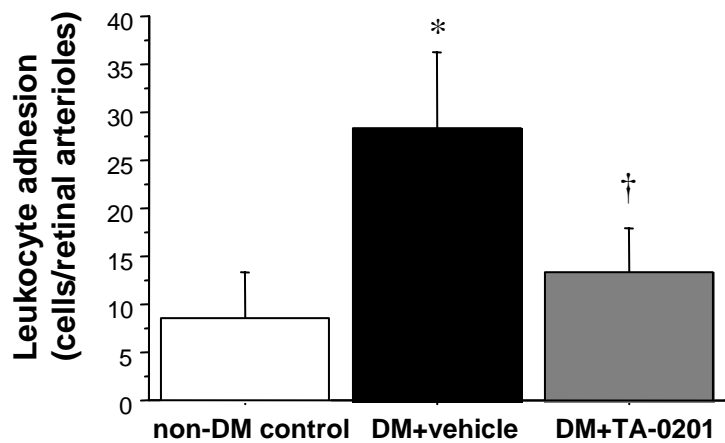
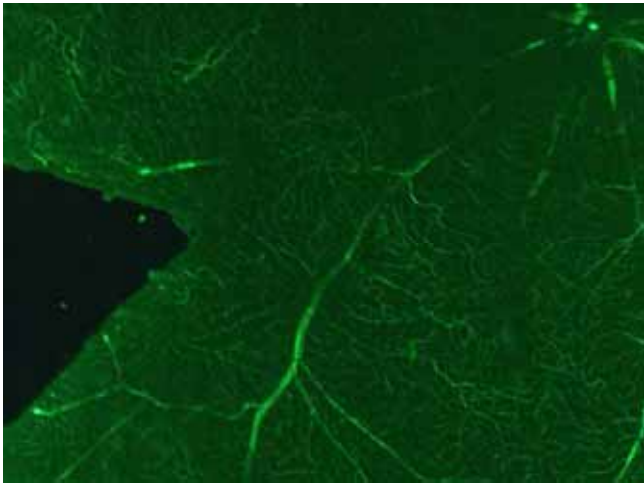


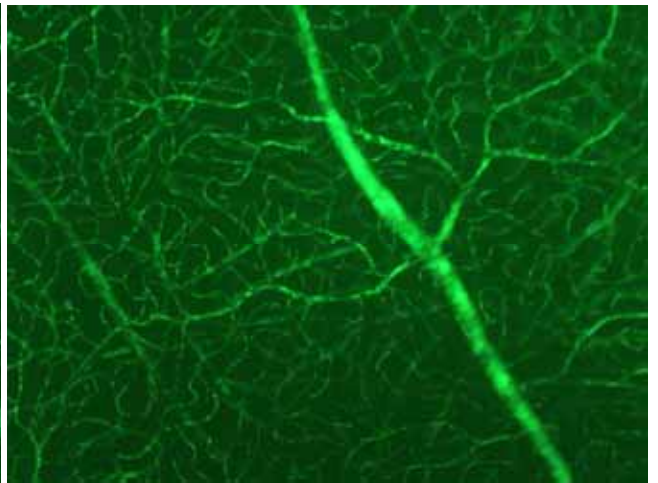
図5 網膜血管内に接着された白血球数

non-DM control:非糖尿病コントロールラット(n=10)、DM+vehicle:vehicle 治療糖尿病ラット(n=10)、DM+TA-0201:ET_A antagonist 治療糖尿病ラット(n=10)

データは平均値 ± 標準偏差で示した。
*: $P < 0.05$ でnon-DM controlに対する有意差を示す。†: $P < 0.05$ でDM+vehicleに対する有意差を示す。



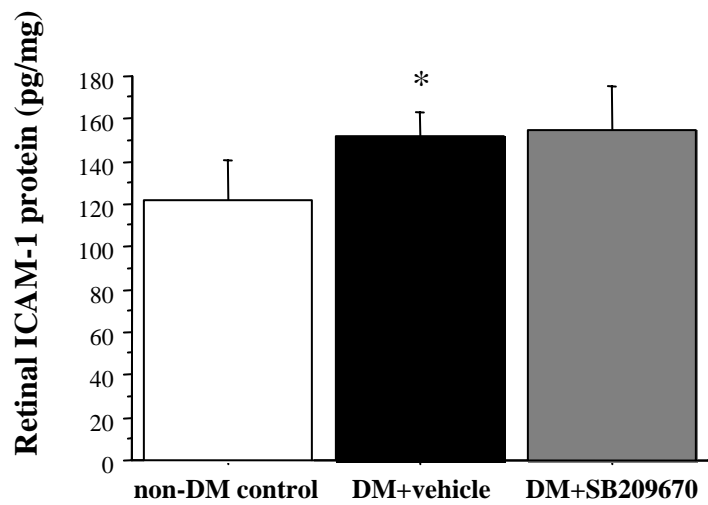
(Magnification, x40)



(Magnification, x100)

図6 網膜のFITC-dextranによる造影検査(糖尿病期間10週のラット)

毛細血管レベル(右図)も含め、蛍光漏出や無灌流野等の明らかな異常は認められない。

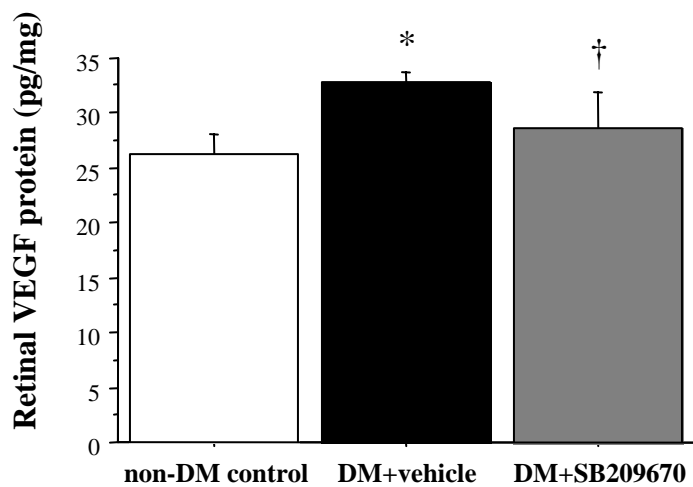


参考図1 網膜におけるICAM-1 蛋白の発現レベル

non-DM control: 非糖尿病コントロールラット (n=5)、DM+vehicle: vehicle 治療糖尿病ラット (n=5)、DM+SB209670: ET_A/ET_B dual antagonist 治療糖尿病ラット (n=5)

ELISAにより得られたデータを示す (平均値 ± 標準偏差)。

*: $P < 0.05$ でnon-DM controlに対する有意差を示す。



参考図2 網膜におけるVEGF 蛋白の発現レベル

non-DM control: 非糖尿病コントロールラット (n=5)、DM+vehicle: vehicle 治療糖尿病ラット (n=5)、DM+SB209670: ET_A/ET_B dual antagonist 治療糖尿病ラット (n=5)

ELISAにより得られたデータを示す (平均値 ± 標準偏差)。

*: $P < 0.05$ でnon-DM control に対する有意差を示す。†: $P < 0.05$ でDM+vehicle に対する有意差を示す。