

研究成果報告書

糖尿病動物を用いた網膜の機能変化と 網膜症発症のメカニズムの解明

(課題番号 18591904)

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金(基盤研究(C))研究成果報告書

平成20年5月

研究代表者 吉田 晃 敏

旭川医科大学 学長

1. はじめに

糖尿病網膜症は我が国における成人失明原因の主因であり、その予防法の確立が待たれる。糖尿病網膜症は網膜出血や網膜虚血などの網膜循環障害により引き起こされており、欧米の研究から網膜症発症初期の段階から網膜血流の低下が示唆されている。これまでの報告は若年発症の1型糖尿病患者を対象とした報告がほとんどであり、我が国の糖尿病患者の大部分を占める2型糖尿病患者を対象とした検討はほとんどなされていない。2型糖尿病は成人期に生活習慣病を背景として発症するとされ、近年メタボリックシンドロームとして注目されている。このような患者では高血圧・高脂血症・動脈硬化など全身疾患を有している症例が多く、多面的に病態をとらえる必要がある。本研究では、我が国における2型糖尿病患者の網膜循環動態を評価し、それに影響を与える全身因子の検討を試みた。

これまで我々はレーザードップラ眼底血流計を用いて網膜血管径と血流速度の絶対値を測定し、循環評価の上でもっとも重要なパラメータである網膜血流量の絶対値を測定することにより、様々な疾患での網膜循環を評価してきた。特に最近では、この方法を用いることにより血管内皮機能を評価する上で重要な指標であるシェアストレスを測定することが可能であることを示した。我々はこの装置を用いることによって、網膜細動脈レベルでの動脈硬化の定量的評価法を確立したいと考えている。これが可能であれば、レーザードップラ眼底血流計を用いた網膜循環評価が全身の細動脈硬化の指標として眼科領域のみならず医学全般に広く受け入れられる新しい評価法となりうると考えている。このような研究はこれまでなされておらず、極めて独創性に富んだ研究になると考えられる。さらに我々はネコを用いた網膜循環の基礎的研究も平行して行っており、血圧や血糖などの全身因子の変動あるいは薬物治療の網膜循環への影響とそのメカニズムについても検証した。

我々の施設ではレーザードップラ眼底血流計をいち早く導入したが、現時点でこの装置を使用できる施設は国内外で数カ所しかない。また、2型糖尿病患者を対象としてこの装置を用いて網膜循環を評価している臨床研究はこれまでに報告がない。このような臨床および基礎研究にまたがる網膜循環実験系を確立しているのは世界でも我々の施設しかなく、本研究から得られた知見は国内のみならず世界的にも価値の高い研究になると考えている。

2. 研究組織

主任研究者 吉田晃敏 (旭川医科大学眼科学講座 教授 (現 学長))
分担研究者 長岡泰司 (旭川医科大学眼科学講座 講師)
佐藤栄一 (旭川医科大学眼科学講座 助教)
高橋淳士 (旭川医科大学眼科学講座 助教)
泉直宏 (旭川医科大学医学部医学研究科 大学院生)
十川健司 (旭川医科大学医学部医学研究科 大学院生)

海外研究協力者 Lih Kuo 教授 (テキサス A&M 大学 Scott & White 眼研究所)
Travis W Hein (テキサス A&M 大学 Scott & White 眼研究所)

3. 交付決定額 (配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	2,200 千円		2,200 千円
平成 19 年度	1,300 千円	390 千円	1,690 千円

4. 研究成果

1) 人を対象とした臨床研究 (吉田、長岡、佐藤、高橋)

十分な説明を行い、同意の得られた2型糖尿病患者を対象にして、レーザードップラ眼底血流計を用いて網膜血管径、血流速度、血流量を測定した。2001年より開始したこの長期経過観察研究は継続して行われ、これまでに400人を超える糖尿病患者の眼循環動態を評価しており、現在も継続中である。この研究から、以下の成果が得られた。

- ・ 前増殖および増殖糖尿病網膜症患者で汎網膜光凝固の適応と診断された糖尿病患者を対象に、中心窩脈絡膜血流量を測定したところ、術後に血流量が増加することを初めて明らかにした。これは光凝固の重篤な合併症である黄斑浮腫の病態解明につながる知見であると考えられる。現在British Journal of Ophthalmology誌に投稿中である (in revision)。また、脈絡膜全体の血流量も測定したところ、中心窩とは逆に血流量は低下しており、部位により光凝固に対する反応が異なることが示された。この成果は2008年度の国際学会で発表し、現在投稿準備中である。
- ・ 2型糖尿病患者と罹病期間の関係を検討したところ、糖尿病発症5年未満では網膜血流は減少しているが、5年から15年までは増加に転じ、その後再び減少することを見いだした。この成果は2008年度の国際学会で発表し、現在投稿準備中である。
- ・ 糖尿病網膜症のない2型糖尿病患者の長期経過観察 (平均4年) を行い、エントリー時に網膜血流量が高値であった群で有意にその後の網膜症の発症率が高いことを見いだした。この成果は2008年秋に開催される米国眼科学会で発表予定である。
- ・ 2型糖尿病患者では、血管調節や酸化ストレスなどに深く関わっている一酸化窒素 (NO) の指標であるNOxの血中濃度が有意に増加していることを明らかにした。(Japanese Journal of Ophthalmology 2006)
- ・ 高血圧も糖尿病網膜症の病態に深く関わっており、糖尿病患者の眼循環動態を考える上で、高血圧治療薬の影響も考慮しなければならない。我々は最近網膜症進展抑制効果が報告されているアンギオテンシンII受容体拮抗薬を正常人に投与し、網膜循環に与える効果について検討を行い、正常人では網膜循環には変化が認められないことを報告した。現在Eye誌に投稿中である。
- ・ 糖尿病網膜症とよく似た病態として、インターフェロン網膜症があげられる。その臨床像としては網膜出血や軟性白斑など網膜循環障害を示すことが多いが、この疾患における網膜循環動態については詳しい検討がなされていなかった。本研究ではインターフェロン療法の適応とされた慢性C型肝炎患者を対象として投与前後での網膜循環動態を評価し、網膜症の発症に網膜血管内皮機能の異常が関与している可能性が示

唆された。(Invest Ophthalmol & Vis Sci 2007)。

2) ネコを用いた基礎実験系 (長岡、泉、十川)

糖尿病における血管障害に血管内皮機能の異常が深く関与していることが示されているが、網膜循環においては詳しい検討がなされていない。そこで、糖尿病患者における網膜血管内皮機能の評価法の開発と、内皮機能に影響を与える因子の検討を、自家繁殖させたネコを用いた基礎実験系で行った。

- ・ 高濃度酸素投与によって網膜血流量が低下することは知られていたが、この反応の網膜血管内皮から放出される一酸化窒素(NO)およびエンドセリン(ET)がどのように関与しているかは明らかではなかった。我々は、ネコに高濃度酸素を負荷した際に血流が一過性に低下し、負荷終了後に血流が回復する際に血管内皮から放出されるNOが重要な働きをしていることを見いだした。これを利用して、人眼でも血管内皮機能の評価できる可能性が示唆された。この論文は、Invest Ophthalmol & Vis Sci誌に現在投稿中である (in revision)。
- ・ 高血糖そのものが網膜血管内皮機能にどのように影響を与えるかを、ネコを用いた実験系で調べた。すると、血管内皮依存性の網膜血管拡張性物質であるブラジキニン(BK)による網膜血流量増加反応が、高血糖負荷により減弱することを見いだした。血管内皮非依存性拡張因子であるSNPの増加反応は維持されたことから、高血糖負荷により網膜血管内皮機能の指標とされるNO産生が障害されたと推測された。この成果は2008年度の国際学会で発表し、現在投稿準備中である。

3) 摘出血管を用いたin vitro実験系 (長岡)

これまでの本研究から得られた知見より、糖尿病網膜症発症早期からすでに網膜循環が障害されることが明らかとなった。そこで我々は、この循環障害を早期に介入して改善することで、網膜症の発症進展を予防できるのではないかと考えている。網膜循環調節の詳細なメカニズムを検討するため、in vitroでの摘出血管を用いた実験系を導入することを試みた。分担研究者の長岡が、この分野の世界の第一人者である米国テキサスA&M大学Lih Kuo教授との共同研究を行い、以下の知見を得た。

- ・ 高脂血症治療薬スタチンは、その優れた血管保護作用が注目されている。我々も以前人眼でスタチンによる網膜血流増加を報告していたが、その詳しいメカニズムは明らかではなかった。摘出血管を用いた実験により、スタチンは容量依存性、血管内皮依存性、NO依存性に網膜細動脈を拡張させることを見いだした。(Invest Ophthalmol & Vis Sci 2007)。
- ・ 赤ワインの心血管保護作用が注目されているが、我々は赤ワインに含まれるポリフ

ェノールの一種であるレスベラトロールに着目し、網膜血管への作用を評価した。そして、レスベラトロールは血管内皮と平滑筋の両者に作用して、容量依存性、NOおよびカリウムチャンネル依存性に網膜細動脈を拡張させることを見いだした (Invest Ophthalmol & Vis Sci 2007)。

- 糖尿病網膜症の病態に慢性の炎症が深く関与している可能性が示唆されている。我々は炎症マーカーとして知られるC反応性蛋白(CRP)の網膜血管への直接作用について検討し、CRPが血管内皮機能を障害すること、スタチンや抗酸化剤の全投与により拡張反応が改善することなどを報告した。(Invest Ophthalmol & Vis Sci 2008)

5. 研究発表

(1) 雑誌論文

1. Izumi N, Nagaoka T, Sato E, Mori F, Takahashi A, Sogawa K, Yoshida A. Short-term effects of topical tafluprost on retinal blood flow in cats. *Journal of Ocular Pharmacology & Therapeutics*. (in press)
2. Nagaoka T, Kuo L, Yoshida A, Hein T. C-Reactive Protein Inhibits Endothelium-Dependent Nitric Oxide-Mediated Dilation of Retinal Arterioles via Enhanced Superoxide Production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008 ;49:2053-60.
3. Nagaoka T, Hein T, Yoshida A, Kuo L. Resveratrol, a constituent of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;2007 48(9): 4232-4239.
4. Yokota H, Nagaoka T, Mori F, Hikichi T, Hosokawa H, Tanaka H, Ishida Y, Suzuki F, Yoshida A. Prorenin levels in retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 2007; 143:531-533.
5. Nagaoka T, Hein T, Yoshida A, Kuo L. Simvastatin elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and mevalonate-rho kinase pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:825-832.
6. Nagaoka T, Sato E, Takahashi A, Yokohama S, Yoshida A. Retinal circulatory changes and interferon therapy in patients with hepatitis C: role of retinal circulation in interferon-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:368-375.
7. Sugawara R, Nagaoka T, Kitaya N, Fujio N, Takahashi J, Takahashi A, Yokota H, Yoshida A. Choroidal blood flow in the foveal region in eyes with rhegmatogenous retinal detachment and scleral buckling procedures. *Br J Ophthalmol* 2006;90:1363-5.
8. Izumi N, Nagaoka T, Mori F, Sato E, Takahashi A, Yoshida A. Relation between plasma nitric oxide levels and diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 2006;50:465-8.
9. Nagaoka T, Yoshida A. Noninvasive evaluation of wall shear stress on retinal microcirculation in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1113-1119.
10. Nagaoka T, Takahashi A, Sato E, Izumi N, Hein T, Kuo L, Yoshida A. Effect of systemic administration of statin on retinal circulation. *Arch Ophthalmol* 2006;124:665-670.

(2) 学会発表

1. A. Takahashi, T. Nagaoka, E. Sato, A. Yoshida. Effect of Panretinal Photocoagulation on Pulsatile Ocular Blood Flow in Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; E-Abstract 2740.
2. H. Yokota, T. Nagaoka, A. Takahashi, E. Sato, A. Yoshida. Reduced Compliance of the Retinal Arteriolar Circulation With Increased Serum Prorenin in Patients With Type 2 Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; E-Abstract 2741.
3. T. Nagaoka, A. Takahashi, H. Yokota, E. Sato, K. Sogawa, A. Yoshida. Change in Retinal Blood Flow Associated With Duration of Type 2 Diabetes Mellitus *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; E-Abstract 3509.
4. K. Sogawa, T. Nagaoka, E. Sato, A. Takahashi, N. Izumi, A. Yoshida. Acute Hyperglycemia Induces the Endothelial Dysfunction of Retinal Arteries *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; E-Abstract 5364.
5. N. Izumi, T. Nagaoka, E. Sato, K. Sogawa, H. Kagokawa, A. Takahashi, A. Kawahara, A. Yoshida. Role of Nitric Oxide in Regulation of Retinal Blood Flow in Response to Hyperoxia in Cats N. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; E-Abstract 871.
6. H. Yokota, T. Nagaoka, A. Takahashi, E. Sato, A. Yoshida. Relation Between Serum Levels of Prorenin and Retinal Circulation in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Without Retinopathy *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; E-Abstract 3765.
7. A. Takahashi, E. Sato, T. Nagaoka, A. Yoshida. Effect of Topical Tafluprost on Retinal and Ocular Nerve Head Circulation in Normal Human Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; E-Abstract 2280.
8. T. Nagaoka, L. Kuo, A. Yoshida, T. W. Hein. C-reactive Protein Inhibits Endothelium-Dependent Nitric Oxide-Mediated Dilatation of Isolated Porcine Retinal Arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; E-Abstract 2271.
9. E. Sato, A. Takahashi, M. Kawai, T. Nagaoka, A. Yoshida. Retinal Hemodynamics in Patients With Normal Tension Glaucoma *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; E-Abstract 4396
10. Nagaoka T, Hein TW, Yoshida A, Kuo L. Simvastatin elicits vasodilation of retinal arterioles through nitric oxide synthase activation and cyclic GMP signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; E-Abstract 3765.
11. Takahashi A, Nagaoka T, Sato E, Yoshida A. Effect of argon laser panretinal

photocoagulation on choroidal circulation in the foveal region and worsening of macular edema in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; E-Abstract 1019.

(3) 図書

眼底疾患アトラス 吉田晃敏、高橋淳士、福井勝彦著 金原出版、2007年

CHANGE IN RETINAL BLOOD FLOW ASSOCIATED WITH DURATION OF

TYPE 2 DIABETES MELLITUS ((T. Nagaoka, A. Takahashi A, H. Yokota, K. Sogawa, E. Sato, A. Yoshida)) Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan

Purpose: To investigate the relationship between retinal circulation and duration of type 2 diabetes mellitus.

Methods. Using a laser Doppler velocimetry system (CLBF Model 100; Canon, Tokyo, Japan), we measured retinal vessel diameter and blood velocity and calculated retinal blood flow (RBF), pulsatility ratio, and resistive index in the retinal arterioles in 194 eyes of 194 patients (102 men, 92 women; mean age \pm SD, 59.8 \pm 10.3 years). Patients with type 2 diabetes had no diabetic retinopathy (n=143) or background diabetic retinopathy (n=51). To examine whether diabetes-related changes in RBF is associated with the duration of diabetes, we divided patients into the four groups based on the disease duration (group A, <5 years, n=62; group B, 5-9 years, n=46; group C, 10-14 years, n=41; group D, >15 years, n=45).

Results. There were no differences in retinal arteriolar vessel diameter among the four groups. However, there were significant differences in blood velocity, RBF, pulsatility ratio, and resistive index. The average blood velocity in group A was significantly lower than in group C. RBF significantly increased in groups B and C compared with group A, whereas there was no difference in RBF between groups A and D. The pulsatility ratio and resistive index significantly increased in group D compared with group A.

Conclusions. RBF may decrease in early-phase diabetes and may tend to increase with the increased duration of type 2 diabetes. However, the RBF decreased but the pulsatility ratio and resistive index increased in patients who have the disease longer than 15 years, suggesting that increased vascular rigidity may be involved with decreased RBF in long-duration type 2 diabetes.

Effect of Panretinal Photocoagulation on Pulsatile Ocular Blood Flow in patients with proliferative diabetic retinopathy

((A. Takahashi, T. Nagaoka, E. Sato, A. Yoshida)) Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan.

PURPOSE: To determine the effect of panretinal photocoagulation (PRP) on the pulsatile ocular blood flow (POBF) and the pulse amplitude (PA) in patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR).

METHODS: Twelve eyes of 12 patients with PDR who had undergone PRP were included. The POBF and the PA were measured with Langham OBF computerized tonometry system before, 1 month and 6 month after the last photocoagulation.

RESULTS: The mean POBF and PA significantly ($p < 0.05$) decreased 1 month ($589.8 \pm 74.1 \mu\text{l}/\text{min}$ and $1.26 \pm 0.23 \text{ mmHg}$) and 6 months ($563.39 \pm 51.7 \mu\text{l}/\text{min}$ and $1.08 \pm 0.10 \text{ mmHg}$) after PRP compared with those ($770.2 \pm 90.2 \mu\text{l}/\text{min}$ and $1.61 \pm 0.24 \text{ mmHg}$) before PRP.

CONCLUSIONS: This is the first study to examine the effect of PRP on pulsatile ocular blood flow using the Langham tonometer in patients with PDR. The present results that the mean PA and POBF decrease after PRP indicate that total choroidal blood flow may decrease in response to PRP.

Retinal blood flow may predict development of retinopathy in patients with type 2 diabetic patients without retinopathy

Taiji Nagaoka, Atsushi Takahashi, Eiichi Sato, Harumasa Yokota, Kenji Sogawa, Yuji Kato, Hiroyuki Kagokawa, Katsuhiko Fukui, Akitoshi Yoshida.

Department of Ophthalmology, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan

In this prospective follow-up study, we studied the development of retinopathy in relation to baseline retinal blood flow (RBF) in patients with type 2 diabetes. We used laser Doppler velocimetry to measure RBF in 66 patients with diabetes and no retinopathy at baseline. Patients were divided into three groups according to the RBF value (high, middle, low) and followed for 4.0 ± 1.2 years. Retinopathy developed in six (27%) in the low group, one (5%) in the middle group, and seven (32%) in the high group. Patients with high RBF were more likely to develop retinopathy. Our findings suggest that increased RBF may predict development of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes.