

氏 名（本籍） 早 坂 恭 子

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 第 2985 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 9 年 9 月 10 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 63 年 3 月 25 日  
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 眼 房 水 の 血 管 新 生 抑 制 作 用 の 検 討 - 糖 尿 病 者 に お  
け る 作 用 低 下 と TGB2 に つ い て

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教 授 豊 田 隆 謙 教 授 玉 井 信

教 授 佐 藤 靖 史

# 論文内容要旨

## 【目 的】

糖尿病性眼合併症である網膜症，血管新生緑内障の発症，進展において血管新生は主たる役割を果たす。我々が家兎眼組織各部の検討を行ったところ，眼房水に血管新生抑制作用のあることが判明している。そこで，眼房水中の血管新生抑制因子を同定すると共に，ヒトにおける眼房水の作用，糖尿病の影響について検討した。

## 【方 法】

眼房水の血管新生抑制能は，ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の増殖と管腔形成への抑制能により判断した。眼房水は，屠殺牛眼から，および眼科手術の際に採取した。ウシ眼房水については，熱・酸処理や，抗 TGF $\beta$  抗体同時添加，ヘパリンセファロースカラム分離物の作用も検討した。また，眼房水中の TGF $\beta$ 1 および $\beta$ 2（総・活性型）濃度を ELISA 法にて測定した。

## 【結 果】

HUVEC は 10 日間で  $0.5 \times 10^4$ /well (24 well-plate) から  $15.5 \pm 1.95 \times 10^4$ /well まで増加したが，ウシ眼房水の添加により，10% (v/v) 添加群  $9.78 \pm 1.43 \times 10^4$ /well，20% 群  $4.70 \pm 0.34 \times 10^4$ /well，50% 群  $1.00 \pm 0.22 \times 10^4$ /well と，濃度依存性に有意に増殖抑制された。ウシ眼房水 40% 添加は HUVEC の管腔形成も抑制した。

HUVEC 増殖抑制能は，未処理眼房水添加（20%）群で Growth Index (% of control) 64.4  $\pm$  4.4% に対して，熱処理群で 63.7  $\pm$  9.4% と差が無かった。一方，30% 酢酸処理 (pH1.8) 眼房水添加群では Growth Index 32.6  $\pm$  7.1% と，未処理群の 57.7  $\pm$  5.3% に比べ有意に低値だった。

このことから，眼房水中に TGF $\beta$  の存在が示唆されたので，抗 TGF $\beta$  抗体の添加を試みた。眼房水非添加群では HUVEC は  $7.84 \pm 0.90 \times 10^4$ /well まで増加したが，眼房水添加（20%）群では  $3.19 \pm 0.58 \times 10^4$ /well と有意に増殖抑制され，これに抗 TGF $\beta$  抗体を 1.5, 15, 150  $\mu$ g/ml と添加することにより， $6.18 \pm 0.45 \times 10^4$ /well,  $7.19 \pm 0.66 \times 10^4$ /well,  $7.31 \pm 0.76 \times 10^4$ /well と，眼房水の作用は中和された。また，抗 TGF $\beta$  抗体 100  $\mu$ g/ml を眼房水 40% と共に添加することにより，眼房水の HUVEC 管腔形成抑制が中和された。

以上の過程と並行して，眼房水をヘパリンセファロースカラムで分離したところ，眼房水非添加群で HUVEC が  $7.55 \pm 0.34 \times 10^4$ /well まで増加するのに対し，ヘパリンセファロース結合分画添加（20%）群では  $5.06 \pm 0.50 \times 10^4$ /well と，眼房水添加群  $3.25 \pm 0.73 \times 10^4$ /well と同様に

意に増殖抑制がおきた。一方、非結合分画添加群では  $7.28 \pm 0.52 \times 10^4$  /well と眼房水非添加群と差がなかった。

そこで、ELISA 法にて TGF  $\beta$  を測定したところ、眼房水中には  $5.68 \pm 1.19$  ng/ml、ヘパリンセファロース結合分画には  $1.39 \pm 0.38$  ng/ml の TGF  $\beta 2$  を検出した。なお、TGF  $\beta 1$  はいずれの検体においても 0.1ng/ml の検出限界内では検出できなかった。以上のことから、眼房水の血管新生抑制作用の主たる因子は TGF  $\beta 2$  であると考えた。

ヒト眼房水も、非糖尿病患者由来眼房水添加（20%）群では  $6.10 \pm 0.72 \times 10^4$  /well、糖尿病患者由来群でも  $9.35 \pm 0.85 \times 10^4$  /well と、非添加群の  $14.7 \pm 0.81 \times 10^4$  /well に比べ有意に HUVEC 増殖抑制活性をもっていたが、糖尿病患者由来眼房水ではこの活性が低下していた。

非糖尿病患者眼房水中の TGF  $\beta 2$  濃度は  $7.03 \pm 0.75$  ng/ml であったのに対して、糖尿病患者房水中の濃度は  $6.40 \pm 0.72$  ng/ml であり、有意差を認めなかった。一方、眼房水中の TGF  $\beta 2$  活性化率は、非糖尿病患者眼房水では  $12.4 \pm 1.20$  % であったのに対して、糖尿病患者眼房水では  $7.70 \pm 0.72$  % と有意に低下していた。この TGF  $\beta 2$  活性化の低下が糖尿病患者由来眼房水が血管内皮細胞増殖抑制活性の低い一つの原因であると考えられた。

## 【結 論】

眼房水は主に TGF  $\beta 2$  により血管新生抑制作用をもつことが明らかとなった。糖尿病患者由来の眼房水ではこの活性が低下しているが、これは眼房水中の TGF  $\beta 2$  活性化の低下が一つの原因であると考えられた。

## 審査結果の要旨

この論文は、糖尿病性眼合併症である網膜症、血管新生緑内障の発症、進展において主たる役割を果たす血管新生について、その抑制因子側から考察したものである。ここでは、血管新生抑制作用があることが判明している眼房水を用いて、その因子の同定と、ヒトにおける作用、糖尿病の影響について検討がなされ、以下のことが明らかにされた。1) ウシ眼房水は濃度依存性に HUVEC の増殖を抑制し、管腔形成も抑制した。2) ウシ眼房水を熱処理してもその HUVEC 増殖抑制活性に変化がなく、酸処理では活性が増加した。3) 抗 TGF $\beta$  抗体の添加により、眼房水の HUVEC 増殖抑制活性、管腔形成抑制活性は完全に中和された。4) ヘパリンセファロース結合分画に HUVEC 増殖抑制活性を認めた。5) 眼房水とヘパリンセファロース結合分画には数 ng/ml の TGF $\beta$ 2 が認められた。TGF $\beta$ 2 は同非結合分画には認められず、TGF $\beta$ 1 はいずれにおいても認められなかった。6) ヒト眼房水も HUVEC 増殖抑制活性をもっていたが、糖尿病者由来眼房水ではこの活性が低下していた。7) 糖尿病および非糖尿病者眼房水中の TGF $\beta$ 2 濃度に有意差は認められず、TGF $\beta$ 2 活性化率が糖尿病者由来のものでは有意に低下していた。以上のことから、眼房水の血管新生抑制作用の主たる因子は TGF $\beta$ 2 であり、糖尿病者由来眼房水における TGF $\beta$ 2 活性化の低下が同眼房水の血管新生抑制活性の低下の一因であることが明らかにされた。以上の成績から、本研究は学位に値するものである。