

インターロイキン, 成長因子および角膜実質細胞 由来因子による角膜内皮細胞の増殖促進

妹尾 正¹⁾, 高橋 和晃¹⁾, 千葉 桂三¹⁾, 長谷川 薫²⁾, 山岡 貞夫²⁾

¹⁾獨協医科大学眼科学教室, ²⁾獨協医科大学第一生理学教室

要 約

種々のインターロイキン(IL)とマイトジェンの家兎角膜内皮細胞増殖に対する効果を無血清培養下で調べた。表皮成長因子(EGF), 形質転換成長因子 α (TGF- α), 肝細胞成長因子(HGF)のようなマイトジェンは, 対照に対し濃度依存的に角膜内皮細胞の増殖を促進し, 最大効果は10 ng/ml でみられた。IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, または IL-4 は, 単独では細胞増殖促進効果はなかったが, IL-1 β と, EGF または TGF- α を組み合わせると, 対照に対し5~6倍の増殖促進効果がみられた。よって, IL-1 β はマイトジェンの増殖促進効果を増強す

ることができるコ-マイトジェン(co-mitogen)とみなすことができる。角膜内皮細胞と角膜実質細胞の共存培養や, 角膜実質細胞の培養上清(conditioned medium)の添加によっても, 2倍程度の内皮細胞数の増加が観察された。これらの結果は, 角膜内皮細胞の増殖を促進する因子が角膜実質細胞から分泌されることを示唆している。(日眼会誌 100: 845-852, 1996)

キーワード: インターロイキン, 角膜内皮細胞, EGF, TGF- α , HGF

Stimulation of Corneal Endothelial Cell Proliferation by Interleukins, Complete Mitogens and Corneal Parenchymal Cell-derived Factors

Tadashi Senoo¹⁾, Kazuaki Takahashi¹⁾, Keizou Chiba¹⁾,
Kaoru Hasegawa²⁾ and Sadao Yamaoka²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine

²⁾Department of Physiology, Dokkyo University School of Medicine

Abstract

The effects of various cytokines and mitogens on proliferation of rabbit corneal endothelial cells were examined in a serum-free culture. Complete mitogens such as epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor α (TGF- α), and hepatocyte growth factor (HGF) stimulated proliferation of corneal endothelial cells 1.5 to 2 times the control. The effect was dose-dependent up to 10 ng/ml and flattened out at higher concentrations. Interleukins (IL-x) such as IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3 or IL-4 by themselves had little or no stimulatory effect on cell proliferation. The combination of IL-1 β and EGF, or IL-1 β and TGF- α , however, showed a 5- to 6-fold stimulation over the control. IL-1 β , thus, can be regarded as a co-mitogen that can amplify the

stimulatory effect of complete mitogens (EGF and TGF- α). The number of corneal endothelial cells increased to 200% when corneal endothelial cells were co-cultured with corneal parenchymal cells. Addition of conditioned medium obtained from the culture of corneal parenchymal cells also increased the number of corneal endothelial cells more than 2-fold. These results suggest that factors which stimulate cell proliferation of corneal endothelial cells are secreted by corneal parenchymal cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 100: 845-852, 1996)

Key words: Interleukins, Corneal endothelial cells, EGF, TGF- α , HGF

別刷請求先: 321-02 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880 獨協医科大学眼科学教室 妹尾 正
(平成7年12月18日受付, 平成8年6月12日改訂受理)

Reprint requests to: Tadashi Senoo, M.D. Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi-ken 321-02, Japan
(Received December 18, 1995 and accepted in revised form June 12, 1996)

I 緒 言

临床上では、角膜内皮障害における内皮細胞数の減少は必然的である。ヒト角膜内皮細胞が *in vivo* で分裂増殖するという報告¹⁾²⁾はあるが、減少した角膜内皮細胞(以下、内皮細胞)を完全に補充するほどの増殖は未だ報告されていない。また、実験動物から得られた内皮細胞は培養下で短期間増殖するが、ヒトや実験動物を問わず、正常内皮細胞の長期継代培養(株細胞化)は非常に難しい。中でもヒト角膜内皮細胞は、ごく若年者から得られた細胞を数代継代できるのみである^{3)~5)}。故に、内皮細胞の増殖について調べることは、細胞増殖の調節機構を知るためにも、さらに临床上内皮細胞数減少による視力障害を治療する上でも有用である。

細胞増殖には、種々の細胞が産生する生理活性物質が関与していることは、多くの研究者の報告から明らかである。これまで、表皮成長因子(EGF)、形質転換成長因子 α (TGF- α)、肝細胞成長因子(HGF)などが内皮細胞の増殖を促進することが報告^{4)6)~10)}されている。さらに、EGFやHGFのレセプターの伝令リボ核酸(m-RNA)が内皮細胞において発現しているという報告¹⁰⁾¹¹⁾もある。また、角膜実質細胞、角膜上皮細胞(以下、実質細胞または上皮細胞)におけるHGFのm-RNA発現の報告¹⁰⁾や、実質細胞における組織化学的方法によるEGF検出の報告¹²⁾もある。これらの報告は、内在性成長因子が内皮細胞の増殖を調節していることを示唆している。

一方、インターロイキン(IL)は、マクロファージやリンパ球をはじめとする種々の細胞が作る生理活性物質として近年注目されている。その作用には、細胞の増殖や分化誘導といったものがあり、リンパ球だけでなく、他の細胞にも広く及んでいることがわかってきている。上皮細胞、または実質細胞において、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8の産生が報告^{13)~15)}されているものの、内皮細胞に対するこれらの因子の増殖調節作用機構についての報告は未だなされていない。そこで、培養家兎内皮細胞を用いて、内皮細胞の増殖に及ぼす種々のインターロイキンや、コンプリート・マイトジェン(complete mitogen; TGF- α 、EGF、HGFなど)の効果を比較検討した。さらに、内皮細胞と実質細胞の相互作用を調べることにより、内皮細胞の増殖に及ぼす実質細胞の効果についても検討した。

II 材料と方法

1. 試 薬

IL-1 α 、IL-1 β 、TGF- α 、HGF、EGFはベクトン・ディキンソン社、IL-2、IL-3、IL-4はゲンザイム社製を用いた。ウイリアムズE(WE)培地、ミニマム・エッセンシャル(MEM)培地、ハンクス液、ウシ胎児血清(FBS)、仔ウシ血清(CS)、トリプシン-エチレンジアミン四酢酸(EDTA)はギブコ社製を、マルチウェル・プレート(6穴-

35 mm ϕ 、または12穴-24 mm ϕ)はベクトン・ディキンソン社製を用いた。共存培養(co-culture)用のインサート・ウェルは、ミリポア社製のミリセル(24 mm ϕ)を用いた。コラゲナーゼはシグマ社製 Type Iを、フィブロネクチンはウシフィブリノーゲン(シグマ社)から抽出した。アプロチニン(トラジロール)はバイエル社製を用いた。

2. 内皮細胞および実質細胞の培養

1) 内皮細胞の初代培養

白色家兎(2 kg, 雄)をペントバルビタールナトリウム(ネンプタル®)を用いて安楽死させ眼球を摘出した。この眼球から強角膜片を作製した後、内皮細胞をデスメ膜ごと剝離した。このデスメ膜を24 mm ϕ のウェルに入れ、トリプシン-EDTAを1 ml加えて5分間室温で放置した後、トリプシン-EDTAを吸引し、37°Cで15分間インキュベートした。このウェルにWE培地を2 ml加えてよく攪拌し、内皮細胞を単離した。単離細胞の生存率は、トリパブルーによる判定で90%以上を示した。次に、単離した内皮細胞をウェル(24 mm ϕ)当たり 4×10^4 個になるように調製し、12穴のマルチ・ウェルにWE培地、各種因子、トラジロール(2 IU/ml)、フィブロネクチン(2 μ g/ml)を加えて培養し、培養後3日目に培地交換を行い、6日目に内皮細胞数を比較した。

2) 内皮細胞の2代培養

初代培養と同様の方法で単離した内皮細胞を10% FBS、10% CSを加えたWE培地で37°C、5% CO₂-95% 空気下、2日間初代培養した。この初代培養細胞をハンクス液で3回洗浄した後、トリプシン-EDTAを加えて単離した。単離した内皮細胞をウェル(24 mm ϕ)当たり 4×10^4 個になるように調製して、トラジロール(2 IU/ml)、フィブロネクチン(2 μ g/ml)を加えたWE培地で2代培養を行った。このWE培地を用いた2代培養細胞に各種因子を加え、培養後3日目に同様の条件で培地交換を行い、6日目に内皮細胞数を比較検討した。これらをまとめたものを図1に示す。

3) 実質細胞の培養

白色家兎(2 kg, 雄)より摘出した眼球から、ゴルフ刀で上皮を十分に剝離した後、強角膜片を作製した。この強角膜片から内皮をデスメ膜ごと剝離した後、強膜を切除し実質片を作製した。この実質片をハサミで十分に細切し、それを10 mlの0.05% コラゲナーゼの入ったディッシュに入れ37°C、5% CO₂-95% 空気下で24時間インキュベートした。その後、遠心分離と洗浄を繰り返し実質細胞を単離した。単離した実質細胞は、一部は初代培養の実験に用い、一部は5% FBSの入ったMEM培地で継代培養を重ねて株化し実験に用いた。

4) 内皮細胞と実質細胞の共存培養(co-culture)

まず、単離内皮細胞をWE培地にウェル(35 mm ϕ)当たり 4×10^4 個播種した。次に、その上にウェルの底がコラーゲン膜になっているミリセルを乗せ、その中に単離

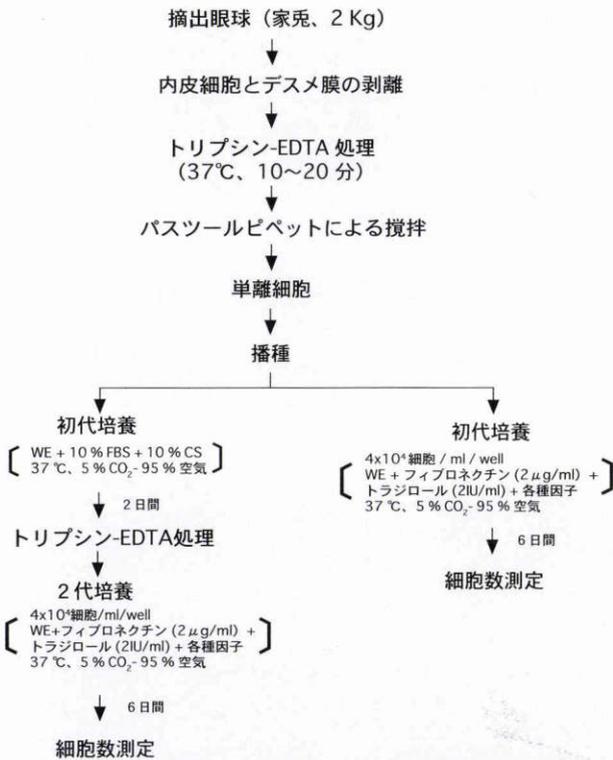


図 1 家兎内皮細胞の摘出と培養の手順。

WE: ウィリアムズ E, FBS: ウシ胎児血清, CS: 仔ウシ血清

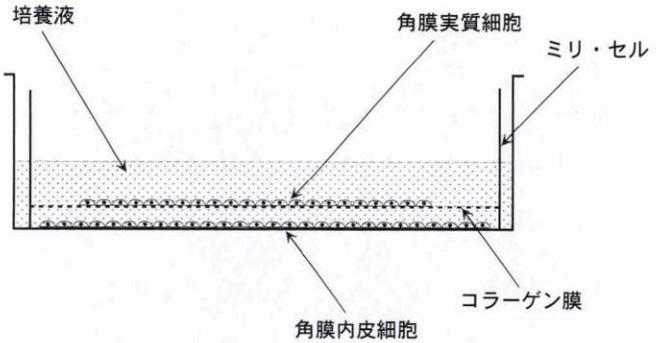


図 2 内皮細胞と実質細胞の共存培養の模式図。

内皮細胞 (4×10^4 個/2 ml) をウェルに播種し, 実質細胞 ($0 \sim 32 \times 10^4$ 個/1.5 ml) をインサート・ウェル (ミリセル) に播種した。6 日間無血清下で培養し, 細胞数を測定した。

養液を集めた。この培養液を 3,000 回転で 30 分間遠心分離し, その上清を $0.2 \mu\text{m}$ のミリポアフィルターで濾過したものを CM として実験に用いた。

4. 細胞数の測定

それぞれ同一の条件下で 3 ウェルずつ 6 日間培養した初代または 2 代培養内皮細胞をハンクス液で 3 回洗浄した後, トリプシン-EDTA をウェル当たり 1 ml 加え 5 分間室温で放置し, トリプシン-EDTA を吸引してから 37°C で 15 分間インキュベートした。この内皮細胞に 10% FBS の入った WE 培地を加えて撹拌し細胞を単離した。同一条件で 3 ウェルずつ行った細胞数を血球計算板で測定し, その平均値を用いて各実験の比較を行った。

III 結果

1. EGF, TGF- α , HGF の効果

ウェル ($24 \text{ mm}\phi$) 当たり 4×10^4 個に調製した 2 代培養内皮細胞に EGF, TGF- α , HGF を加え, 無血清下で内皮細胞の増殖に対する効果を調べた。EGF, TGF- α , HGF は濃度依存的に内皮細胞の増殖を促進し, 最大効果は 10 ng/ml でみられた (成長因子無添加と 10 ng/ml

実質細胞を種々の細胞数で播種した (図 2)。こうすることにより, 実質細胞と内皮細胞は細胞同士が接することがなく, その液性成分のみ通過することができる。この状態で 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ - 95% 空気下で培養し, 3 日目に培地交換を行い, 6 日目に内皮細胞数を比較した。

3. 実質細胞の培養上清 (conditioned medium, CM) の調製

5% FBS の入った MEM 培地で 100 代以上継代した家兎株化実質細胞をハンクス液で 3 回洗浄し, MEM 培地で 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ - 95% 空気下で 1 日間培養し, さらに MEM 培地で培地交換を行った後, 3~4 日間培養し培

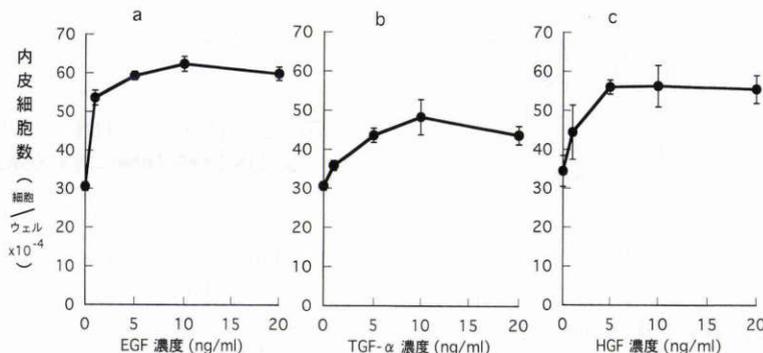


図 3 EGF, TGF- α および HGF の内皮細胞増殖に対する効果。

図 1 で示したように, 単離した内皮細胞を播種し (2 代) 培養した。図中に示された濃度の EGF (a), TGF- α (b) または HGF (c) を培養系に加え, 継代培養後 6 日目に細胞数を測定した。各点は, 平均値 \pm 標準誤差 ($n=3$) を表す。EGF: 表皮成長因子, TGF- α : 形質転換成長因子, HGF: 肝細胞成長因子

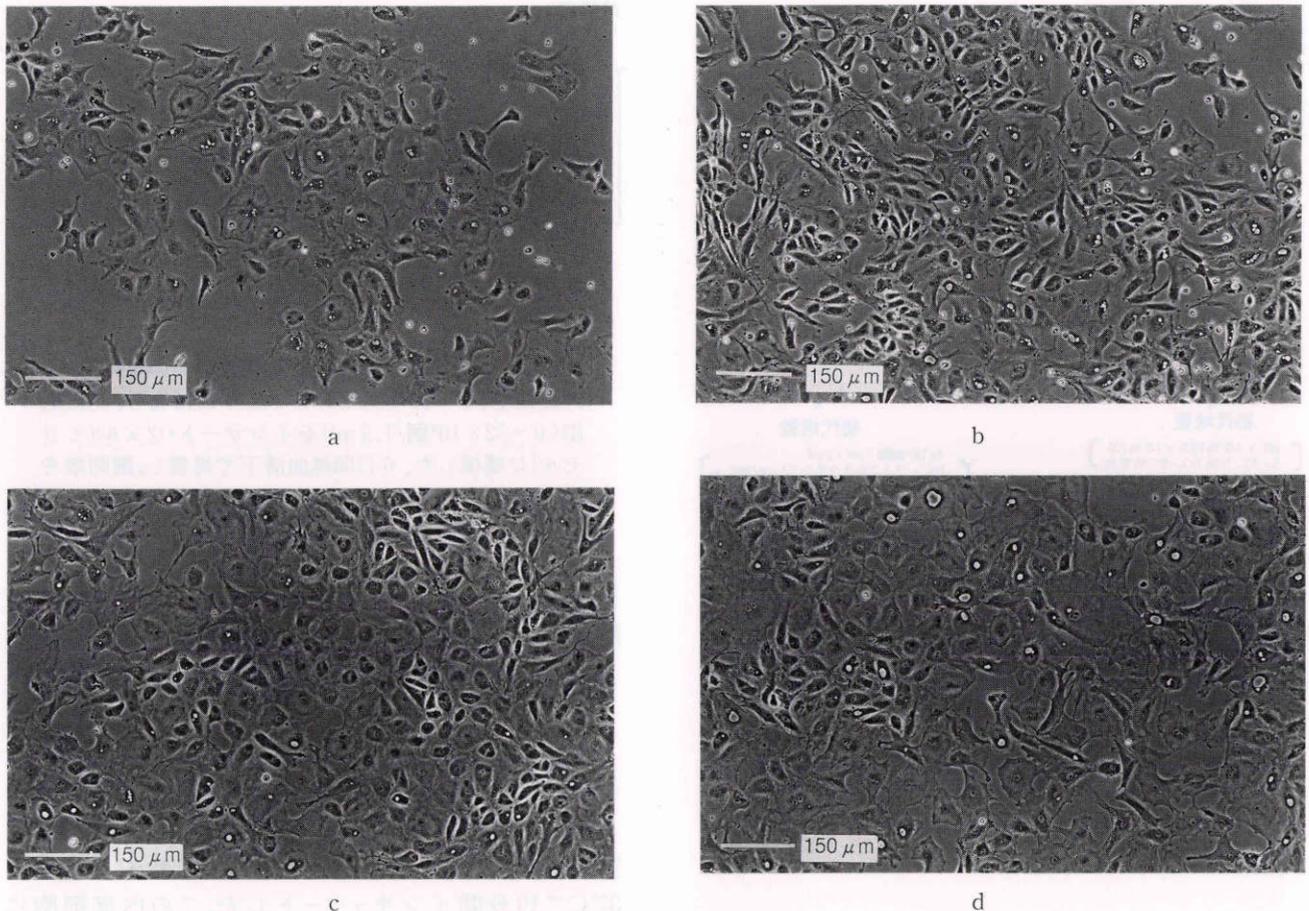


図4 内皮細胞の顕微鏡写真。

単離した内皮細胞に無添加で(a, 培地のみ), または EGF (b), TGF- α (c) あるいは HGF (d) を添加し 3 日目に撮影した。

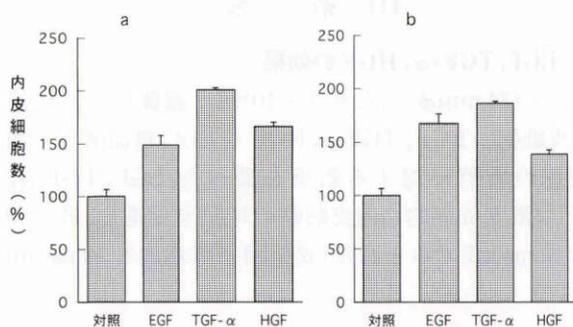


図5 初代培養と 2 代培養における内皮細胞増殖の比較。

図 1 で示したように, 単離した内皮細胞を播種し培養した. 10 ng/ml の EGF, TGF- α または HGF を加え培養した. 細胞数は初代培養後 (a), あるいは 2 代継代培養後 (b) 6 日目に測定した. 各値は平均値 \pm 標準偏差 ($n=3$) を表す.

添加したものの有意差は, それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.05$ (図 3 a~c). EGF, TGF- α , HGF により内皮細胞増殖が促進された像を図 4 a~d に示した.

2. 初代培養内皮細胞と 2 代培養内皮細胞の比較

培養細胞においては, 培養日数の違いによって成長因子に対する反応性が異なることが十分考えられる. そこ

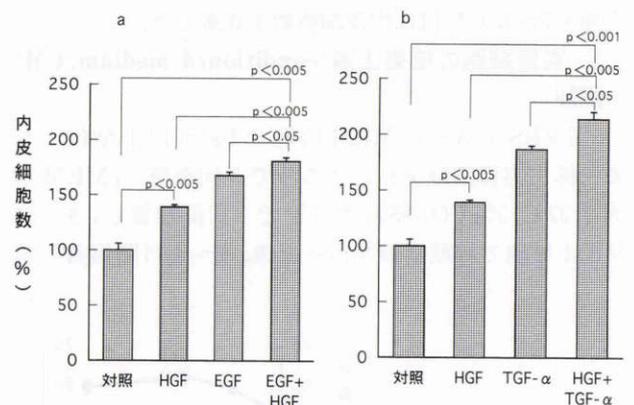


図6 EGF または TGF- α と HGF の組み合わせによる内皮細胞増殖に対する効果。

図 1 で示したように, 単離した内皮細胞を播種し (2 代) 培養した. 10 ng/ml の EGF, TGF- α または HGF を, 単独 (a, b) または組み合わせ (a では EGF+HGF, b では TGF- α +HGF) を加えた. 継代培養後 6 日目に細胞数を測定した. 各値は平均値 \pm 標準誤差 ($n=3$) を表す.

で, 初代培養内皮細胞と, 一度トリプシン処理し再度播種した 2 代培養内皮細胞で成長因子の反応性が同じか否か

について調べた。ウェル(24 mmφ)当たり 4×10^4 個に調製した初代培養、および2代培養内皮細胞に EGF, TGF- α , HGF を実験1で最も効果のあった 10 ng/ml の濃度で加えた。その結果、EGF, TGF- α , HGF は、初代培養および2代培養内皮細胞の増殖に対し、ともに促進効果があった(図5 a, b)。よって、少なくとも2代培養までは、これらの成長因子に対する反応性は変わっていないと思われる。

3. EGF, TGF- α と HGF の相互作用

ウェル(24 mmφ)当たり 4×10^4 個に調製した2代培養内皮細胞を用い、EGF, TGF- α に HGF を併用したときの効果について調べた。EGF, TGF- α , HGF は、それぞれ 10 ng/ml 加えた。HGF, TGF- α , EGF 単独添加と比較して、HGF+TGF- α , HGF+EGF は有意に、内皮細胞の増殖を促進した(図6 a, b)。

4. インターロイキンの効果

ウェル(24 mmφ)当たり 4×10^4 個に調製した2代培

養内皮細胞に種々のインターロイキンを加え、内皮細胞の増殖に対する効果を調べた。加えたインターロイキンの濃度は、IL-1 α (10 IU/ml), IL-1 β (10 IU/ml), IL-2 (10 IU/ml), IL-3 (100 IU/ml), IL-4 (100 IU/ml) とした。その結果、対照に対し上記濃度のインターロイキン単独では、内皮細胞の増殖に対する有意な促進効果はなかった(図7)。細胞増殖の促進効果はあまりなかったが、IL-1 β は内皮細胞の伸展を促進した。IL-1 β が内皮細胞の伸展を促進した像を図8 a, b に示した。

5. EGF, TGF- α と IL-1 β の相加効果

ウェル(24 mmφ)当たり 4×10^4 個に調製した2代培養内皮細胞を用い、種々のインターロイキンのうち、内皮細胞に対し細胞伸展効果の高かった IL-1 β と、EGF, TGF- α を併用したときの効果について調べた。IL-1 β は 10 IU/ml, EGF, TGF- α は 10 ng/ml の濃度で加えた。その結果、EGF, TGF- α 単独では、対照に対し 1.5 ~ 2 倍の効果が認められた。さらに、IL-1 β を加えるこ

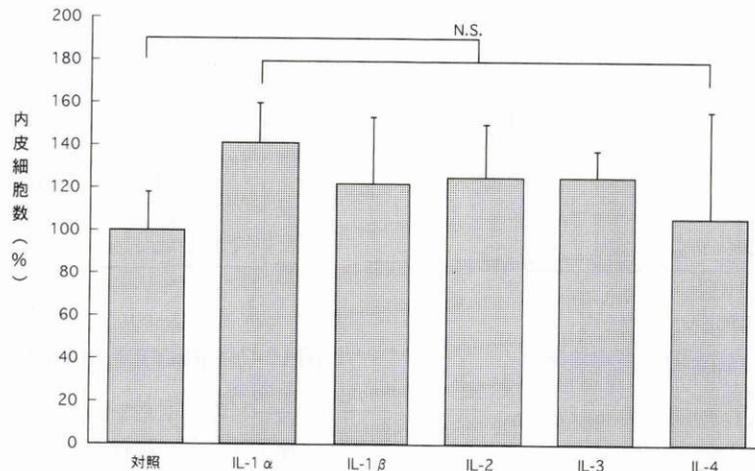
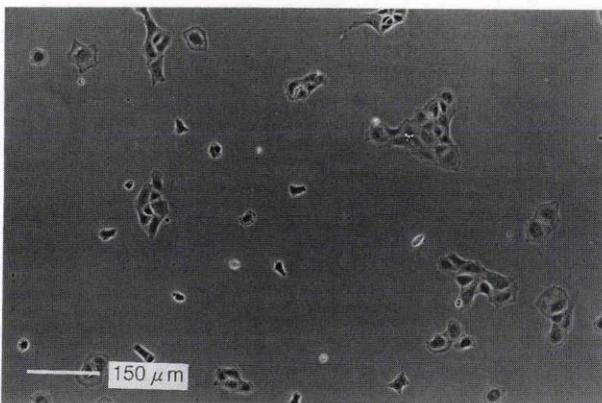
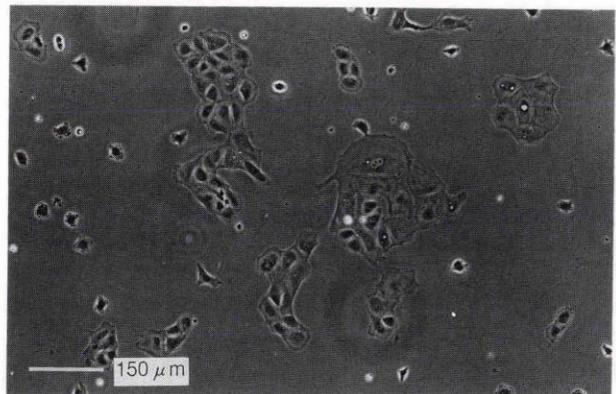


図7 インターロイキン(IL)の内皮細胞増殖に対する効果。

図1で示したように、単離した内皮細胞を播種し(2代)培養した。IL-1 α (10 IU/ml), IL-1 β (10 IU/ml), IL-2 (10 IU/ml), IL-3 (100 IU/ml), IL-4 (100 IU/ml) を添加し、継代培養後6日目に細胞数を測定した。各値は平均値±標準誤差(n=3)を表す。



(a)



(b)

図8 IL-1 β を加えた内皮細胞の顕微鏡写真。

内皮細胞(4×10^4 個/ウェル)を播種し、IL-1 β を無添加(a)または 10 IU/ml 添加(b)して初代培養した。播種後3日目の写真を示す。

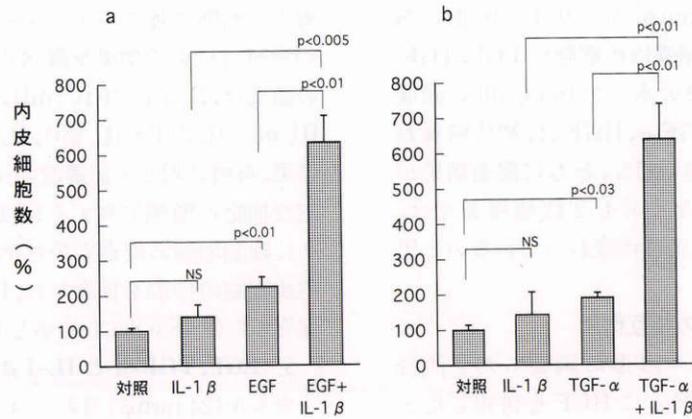


図9 EGFまたはTGF- α とIL-1 β の組み合わせの内皮細胞増殖に対する効果。

図1で示したように、単離した内皮細胞を播種し、(二次)培養した。IL-1 β (10 ng/ml), EGF (10 ng/ml)またはTGF- α (10 ng/ml)を単独、または、組み合わせて添加し、継代培養後6日目に細胞数を測定した。各値は平均値 \pm 標準誤差 (n=3)を表す。

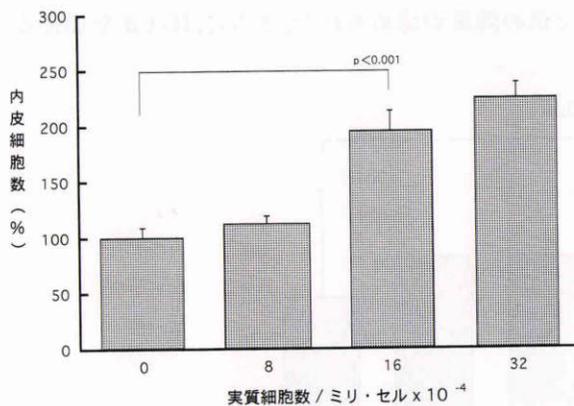


図10 実質細胞と内皮細胞の共存培養。

図2に示したように、内皮細胞と実質細胞を共存培養(初代)した。細胞数は、共存培養後6日目に測定した。各値は平均値 \pm 標準誤差 (n=3)を表す。

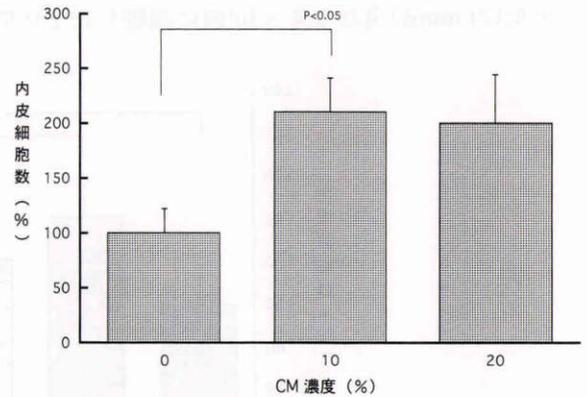


図11 実質細胞培養上清(CM)の内皮細胞増殖に対する効果。

材料と方法の中で述べた方法で実質細胞-CMを調製した。内皮細胞に実質細胞-CMを10%または20%添加して初代培養し、培養後6日目に細胞数を測定した。各値は平均値 \pm 標準誤差 (n=3)を表す。

とで、それらの効果は対照に比し5~6倍増強された(図9 a, b)。

6. 内皮細胞と実質細胞の共存培養

内皮細胞と実質細胞を共存培養し、内皮細胞に対する増殖効果を調べた。まず、内皮細胞をWE培地にウェル(35 mm ϕ)当たり 4×10^4 個播種した。そして、ミリセル(24 mm ϕ)をウェルに入れ、その中に実質細胞をミリセル当たり 8×10^4 個、 16×10^4 個、 32×10^4 個播種した。その結果、内皮細胞の増殖は実質細胞と共存培養することにより、実質細胞数に依存して促進され、 16×10^4 個以上で対照に対し有意差を認めた(p<0.001)(図10)。

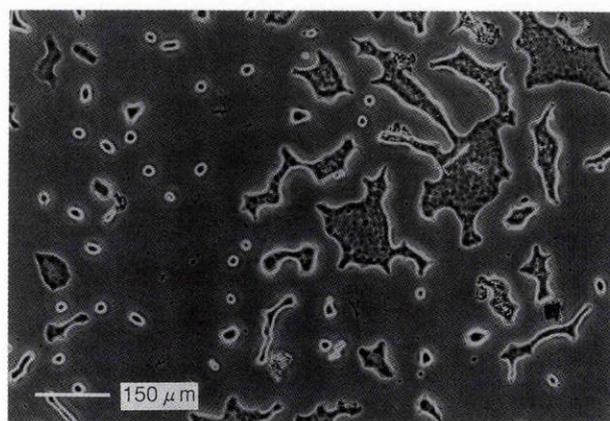
7. 実質細胞のCMによる効果

実質細胞のCMを内皮細胞を加えて効果を調べた。10%および20%のCMによって内皮細胞の増殖は、対照に対し2倍程度促進された(p<0.05)(図11)。CMによる内皮細胞の増殖像を図12 a, bに示す。

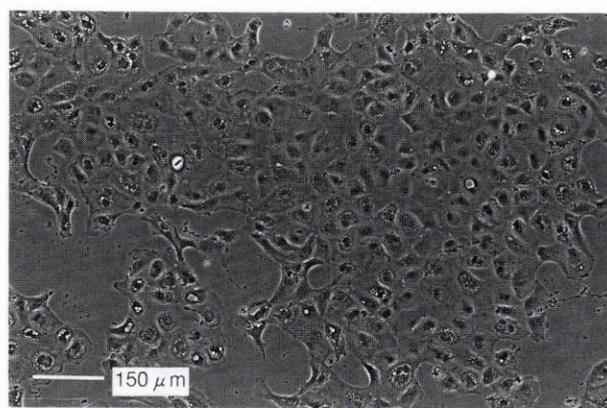
IV 考 按

既知の成長因子であるEGF, TGF- α およびHGFは内皮細胞の増殖を促進することが報告^{4)6)~10)}されている。本実験においては、これらの成長因子を含む種々の因子の存在下での内皮細胞増殖について検討した。一般に、FBSの存在下では内皮細胞は安定した増殖をするが、FBSには多くの未知・既知の成長関連因子が含まれているので、FBSを添加して培養したとき、特定の成長因子がどのように細胞増殖に影響を与えているかを判断するのは困難である。したがって、本実験では白色家兎角膜内皮細胞の無血清培養を用いて種々の因子の効果を調べた。

EGF, TGF- α , HGFは、内皮細胞に対し1.5~2倍の有意な増殖促進効果があり、最大促進効果は10 ng/mlでみられた。EGF, HGFのヒト角膜内皮細胞に対する増



(a)



(b)

図12 実質細胞-CMで増殖促進された内皮細胞の顕微鏡写真。

図11に示したように、内皮細胞に実質細胞-CMを無添加(a)または10%添加(b)して培養した。播種後3日目の写真を示す。

殖促進効果は、Wilsonら¹⁰⁾により報告されている。しかし、彼らの報告では、HGFの増殖促進効果のピークは2.5~5 ng/mlであり、本実験と異なる。これはヒトと家兎の違いによるものかも知れない。また、Wilsonらは、細胞増殖を安定化させるため、FBSまたは仔ウシ血清を培地に加えて実験しているの、無血清培養で行った本実験とは単純には比較できない。EGF、TGF- α 、HGFは、いずれも単独で細胞増殖促進効果のあるコンプリート・マイトジェン(complete mitogen)として知られている。このうち、EGFとTGF- α は、細胞表面のレセプターを共有しており、似たような効果を持つと考えられている。本実験に先立って行った予備実験では、単独で最大効果を示す10 ng/mlのEGFとTGF- α の相加効果は認められなかった。これは、内皮細胞に対するEGFとTGF- α それぞれの効果が既にプラトーに達しており、同一レセプターを介するこれらの成長因子の効果はそれ以上ないと考えるのが妥当であろう。HGFは、EGFやTGF- α とは別のレセプターを介するが、HGFにEGFまたはTGF- α をそれぞれ併用したとき、有意な相加効果を認めた。

一方、種々のインターロイキンの内皮細胞に対する増殖促進効果について調べた結果、本実験で用いた濃度のインターロイキン単独では、内皮細胞の増殖に対する促進効果はないか、あっても僅かであったが(図7)、IL-1 β では内皮細胞の伸張が促進された。さらに、IL-1 β をEGF、TGF- α とともに加えることにより、内皮細胞の増殖は著明に促進された。これまでIL-1 β の内皮細胞に対する効果については知られていないが、本実験の結果からIL-1 β は、それ自体では強い内皮細胞増殖促進効果はないが、EGFやTGF- α などのコンプリート・マイトジェンの効果を増強することのできる補助成長因子(comitogen)として働くことが示唆された。組織培養実験で、IL-1 β がEGFの上皮細胞増殖促進効果を増強した

という報告¹⁶⁾があるが、EGF、TGF- α の内皮細胞増殖促進効果のIL-1 β による増強が、どのようなメカニズムによるものなのかは現在のところ不明である。また、IL-1 α 、IL-1 β がHGFのm-RNAの発現を促進するとの報告¹⁷⁾もあり、他のインターロイキンについてもこのような相加効果があるかどうかを含め、今後検討する必要がある。

これまでに述べたことなどから、これらの内在性成長因子がパラクリン(paracrine)により内皮細胞の増殖に影響を与えている可能性は十分考えられる。そこで、内皮細胞に対し、実質細胞がパラクリンの増殖調節作用を持つかどうかを調べるため、内皮細胞と実質細胞の共存培養および、実質細胞のCMによる内皮細胞の増殖に対する効果を調べた。その結果、実質細胞との共存培養や、実質細胞のCMで内皮細胞の増殖は有意に促進された。これらの結果は、内皮細胞の増殖を促進する物質が実質細胞から分泌され、内皮細胞に対して実質細胞がパラクリンの増殖促進作用を持っていることを示唆する。また、逆の作用、すなわち内皮細胞が実質細胞にどのように影響するかということも含め、内皮細胞、実質細胞の相互作用の詳細については今後さらに検討する必要がある。臨床上で内皮障害に対し、種々の成長因子を単独投与することにより、細胞数の減少を防ぐことは非常に困難であり、加齢や角膜疾患、眼内手術操作による内皮細胞の減少は、現状では防ぐことができない。もし、加齢に伴う内皮細胞数の低下が今回検討した成長因子、インターロイキンの産生の低下や、それらのレセプターの産生低下などが主因ならば、成長因子やインターロイキンを含む生理活性物質を直接投与することや、これらの因子のレセプター遺伝子を内皮細胞に導入してレセプターを発現させることにより、ある程度はその減少が抑制できる可能性はある。

文 献

- 1) **Treffers WF**: Human corneal endothelial wound repair *in vitro* and *in vivo*. *Ophthalmology* 89: 605—613, 1982.
- 2) **Laing RA, Neubauer L, Oak SS, Kayne HL, Leibowitz HM**: Evidence for mitosis in adult corneal endothelium. *Ophthalmology* 91: 1129—1134, 1984.
- 3) **Yoe BYJT, Gilboy JE, Elvart JL**: Growth of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 248—253, 1989.
- 4) **Samples JR, Binder PS, Nayak SK**: Propagation of human corneal endothelium *in vitro* effect of growth factors. *Exp Eye Res* 52: 121—128, 1991.
- 5) **Nayak SK, Binder PS**: The growth of endothelium from human corneal rims in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1213—1216, 1984.
- 6) **Roymond GM, Jumblat MM, Bartels SP, Neufeld AH**: Rabbit corneal endothelial cells *in vitro* effects of EGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 474—479, 1986.
- 7) **Crow JM, Lima PH, Agapitos PJ, Nelson JD**: Effect of insulin and DNA synthesis in bovine endothelial cultures: Flow cytometric analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 128—133, 1994.
- 8) **Gospodarowicz, Mescher AL, Birdwell CR**: Stimulation of corneal cell proliferation *in vitro* by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp Eye Res* 25: 75—89, 1977.
- 9) **Raphael B, Kerr NC, Shimizu RW, Lass JH**: Enhanced healing of corneal endothelial wounds by epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2305—2312, 1993.
- 10) **Wilson SE, Walker JW, Chwang EL, He Yu-Guang**: Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cell of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2544—2561, 1993.
- 11) **Wilson SE, Liloyd SA**: Epidermal growth factor and its receptor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factor bae-1, and interleukin-l-alpha messenger RNA production in human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2747—2756, 1991.
- 12) **Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J**: Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res* 159: 63—72, 1994.
- 13) **坂本真栄, 稲田捷也**: 培養ヒト角膜上皮, 実質及び内皮細胞によるインターロイキン6の産生. *日眼会誌* 96: 702—709, 1992.
- 14) **坂本真栄, 清野雅子, 田澤 豊, 稲田捷也, 吉田昌男**: ヒト角膜培養上清中のIL-1活性. *眼紀* 41: 505—510, 1990.
- 15) **Cubitt CL, Tang Q, Monteiro CA, Laush RN, Oakes JE**: IL-8 gene expression in cultures of human corneal epithelial cells and keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3199—3206, 1993.
- 16) **Boisjoly HM, Laplante C, Bernatchez SF, Salesse C, Giasson M, Joly M**: Effects of EGF, IL-1 and their combination on *in vitro* epithelial wound closure and cell chemotaxis. *Exp Eye Res* 57: 293—300, 1993.
- 17) **Matumoto K, Okazaki H, Nakamura T**: Up-regulation of hepatocyte growth factor gene expression by interleukin-1 in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 235—243, 1992.