

## Arg-Gly-Asp-Ser による線維芽細胞接着抑制効果

川村 俊彦<sup>1)</sup>, 中村 孝夫<sup>2)</sup>, 切通 彰<sup>2)</sup>, 山本 良<sup>3)</sup>笹部 哲生<sup>1)</sup>, 岸田 健一<sup>4)</sup>, 湯浅武之助<sup>5)</sup><sup>1)</sup>大阪府立羽曳野病院眼科, <sup>2)</sup>大阪大学医学部眼科学教室, <sup>3)</sup>社会保険紀南総合病院眼科<sup>4)</sup>大阪府立看護大学生化学教室, <sup>5)</sup>国立大阪病院眼科

## 要 約

線維柱帯切除術では, 術後線維芽細胞の増殖により濾過胞が癒痕化するため, 眼圧を良好に維持するためには濾過胞の長期保持が重要となる. Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) の細胞接着抑制効果を培養した結膜線維芽細胞を用いて検討するとともに, 家兎に線維柱帯切除術を施行した後, RGDS 結膜下注射による眼圧の降下度および濾過胞の生存期間の変化について検討を行った. RGDS の培養細胞に対する作用は, 2 mg/ml, 5 mg/ml の投与で有意な効果がみられた. 線維柱帯切除術後の眼圧は, 術後 10 日, 14 日後で対照群と比較して 5 mg/ml 投与群で

有意に低下していた. 各濃度とも術後 3 週間では有意差はみられなかった. 濾過胞の生存期間は, 対照群で  $4.8 \pm 0.5$  日 (平均値  $\pm$  標準偏差), 5 mg/ml 投与群で  $13.4 \pm 1.1$  日と有意差 ( $p < 0.01$ ) があつた. RGDS 投与群において, 充血, 角膜上皮障害などの副作用は全くみられなかった. (日眼会誌 101: 288-292, 1997)

キーワード: Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), 線維芽細胞, 眼圧, 濾過胞, 細胞接着

## The Inhibitory Effects of Arg-Gly-Asp-Ser on Attachment of Fibroblasts

Toshihiko Kawamura<sup>1)</sup>, Takao Nakamura<sup>2)</sup>, Akira Kiritooshi<sup>2)</sup>,  
Ryo Yamamoto<sup>3)</sup>, Tetuo Sasabe<sup>1)</sup>, Kennichi Kishida<sup>4)</sup>  
and Takenosuke Yuasa<sup>5)</sup><sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Osaka Prefectural Habikino Hospital<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Osaka University of Medicine<sup>3)</sup>Department of Ophthalmology, Kinan Sougou Hospital<sup>4)</sup>Laboratory for Biochemistry, Osaka Prefectural College of Nursing<sup>5)</sup>Department of Ophthalmology, Osaka National Hospital

## Abstract

Trabeculectomy often fails because of scarring of the filtering bleb, which is caused by the proliferation of fibroblasts. In this study, we investigated the inhibitory effect of Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) oligopeptide, a cell binding domain of fibronectin molecules, on the attachment of fibroblasts *in vitro* and on scarring of filtering bleb after trabeculectomy on rabbits' eyes. The following results were obtained. ① RGDS inhibited the attachment of rabbit conjunctival fibroblasts significantly ( $p < 0.01$ ) when it was added to the culture medium at final concentrations of 2 and 5 mg/ml. ② The administration of 0.2 ml of RGDS solution (5 mg/ml) into the filtering

bleb 3 days after surgery caused significant reductions of intra ocular pressure compared with the control maintained the bleb more than 13 days whereas the blebs of the control eyes disappeared within 6 days ( $p < 0.01$ ). ③ No complications were caused on the eyeballs of the rabbits by the administration of RGDS. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 288-292, 1997)

Key words: Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), Fibroblast, Intra ocular pressure, Bleb, Cell attachment

## I 緒 言

緑内障濾過手術の効果の持続は術後の癒痕形成に大き

く左右される. 現在では, 濾過胞を長期間維持させるために術中に濾過胞作成部にマイトマイシン C (以下, MMC) を添布する<sup>1)</sup>か, あるいは術後に 5-フルオロウラ

別刷請求先: 662 兵庫県西宮市上ヶ原十番町 2-30-511 川村 俊彦

(平成 8 年 7 月 15 日受付, 平成 8 年 11 月 6 日改訂受理)

Reprint requests to: Toshihiko Kawamura, M.D. 2-30-511 Uegaharajyuban-chou, Nishinomiya-shi, Hyougo-ken 662, Japan

(Received July 15, 1996 and accepted in revised form November 6, 1996)

シル(以下,5-FU)を局所投与する<sup>2)3)</sup>ことで術後の瘢痕形成に最も重要な役割を演じる結膜線維芽細胞の増殖を抑制し,手術成績の向上を計っている.実際,これらの抗腫瘍薬が併用されるようになってから,再手術例を含めた難治例でも濾過手術の長期成績は向上しつつある<sup>4)5)</sup>.しかし,これらの薬剤はともに細胞増殖を非選択的に抑制するため,5-FUでは角膜上皮障害が高率に生じ<sup>6)~8)</sup>,MMCでは角膜上皮障害の発生は少ないとされるものの,強膜壊死,感染症などの晩期合併症が懸念され,結膜縫合部の融解などの危険性もある<sup>9)</sup>.

線維芽細胞の増殖は,まず同細胞が局所に遊走し,接着した後に増殖するという過程を経るので,細胞分裂を完全に抑制しなくとも接着を阻害できれば,結果的には増殖抑制効果が期待できるものと思われる.この観点から,我々は細胞接着に関係する因子のうち,フィブロネクチンの細胞接着領域に存在するアミノ酸配列である Arg-Gly-Asp-Ser (以下,RGDS)<sup>10)</sup>に着目した.細胞のRGDS認識部位がフィブロネクチンなどの接着分子のRGDS配列を認識するので,オリゴペプチドのRGDSを投与すると,これが競合的に細胞のRGDS認識部位と結合し,結果的に細胞がフィブロネクチンなどの接着分子と結合できなくなる.RGDSは癌細胞の血管内皮への接着を阻止することで間接的に局所での細胞増殖を抑制し,癌転移を予防することで知られている<sup>11)12)</sup>.また,眼科領域ではテノン嚢由来の線維芽細胞の接着を抑制することが報告<sup>13)</sup>されている.本来,生体内に存在している構造であるため,細胞毒性がないと考えられ,したがって,角膜上皮障害や強膜壊死を来す危険性もないと予測される.著者らは今回,このペプチドが線維芽細胞の接着を抑制し,延いては線維柱帯切除術後の瘢痕形成抑制に応用できる可能性があるかどうかを,家兎を用いて *in vitro* および *in vivo* の両方の系で検討した.

## II 方法

### 1. 培養細胞を用いた実験

培養家兎結膜線維芽細胞を Dalbecco-minimal-essential medium (以下,DMEM) 100  $\mu$ l 当たり  $10^3$ 個になるように懸濁させ,これを96穴培養皿にまいた.RGDS(ペプチド研究所製)を1,2,5 mg/mlの濃度でDMEMに溶解し,それぞれ100  $\mu$ lを96穴培養皿の細胞培養液に加えた.24時間後,phosphate buffer salineで2回洗浄し,4%ホルマリンで24時間固定した.クリスタル・バイオレット染色後,顕微鏡下で接着細胞数の計測を行った.対照として,RGDS非添加DMEMを用いた.

### 2. 線維柱帯切除術の実験

有色家兎両眼に線維柱帯切除術を同一術者が施行した.術式としては,フェノバルビタール静脈注射で麻酔後,11時から2時までの結膜を切開し,強膜を露出させた.3 mm  $\times$  3 mmの強膜弁を作成し,1 mm  $\times$  3 mmの線

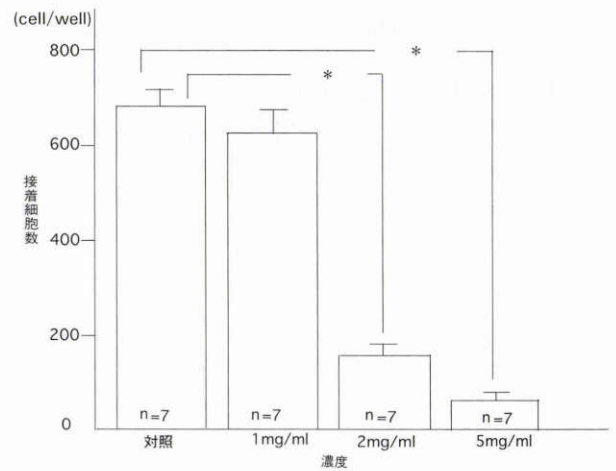


図1 Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)濃度と接着細胞数. 対照群とRGDS 2 mg/mlおよび対照群とRGDS 5 mg/ml間で有意差がみられた( $p < 0.01$ ). \*:  $p < 0.01$

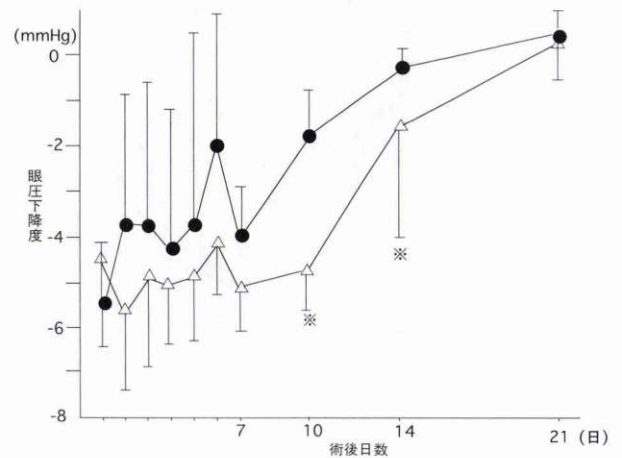


図2 術後日数と眼圧下降度.

術後10日と14日で対照群とRGDS 5 mg/ml間の眼圧下降度に有意差がみられた( $p < 0.01$ ). ●: 対照( $n=6$ ), △: RGDS 5 mg/ml( $n=6$ ), ※:  $p < 0.01$

維柱帯を短冊状に切除した.虹彩切除を施行した後,10-0 ナイロンで強膜弁を2糸縫合した.最後に10-0 ナイロンで結膜を連続縫合し手術を終了した.術翌日から3日間および1週間後に各濃度(1,2,5 mg/ml)のRGDSを生理食塩水で溶解し,30ゲージ針を用いて0.2 mlを濾過細胞の1 mm後極側の結膜下に注射を行った.RGDSは片眼のみに投与し,他眼を対照として生理食塩水を同量結膜下注射した.各濃度5匹を手術した.

眼圧をAlcon Applanation Pneumatograph<sup>®</sup>で術後3週間(術後1週間,10日目,2週間目,3週間目)測定し,濾過胞の状態を手術顕微鏡下で観察した.眼圧測定に当たっては0.4%塩酸オキシプロカイン(ペノキシノール<sup>®</sup>)点眼麻酔下に,開眼器を使用せずに行った.

### III 結 果

#### 1. RGDS 濃度と接着細胞数

1 mg/ml 投与群では有意な細胞接着抑制効果はみられなかったが, 2 mg/ml, 5 mg/ml 投与群では有意な差がみられた(図1, 3, 4).

#### 2. 眼 圧 降 下

術前眼圧を基準値とし, 術後眼圧との差を眼圧降下度とした. 眼圧降下度は, 術後 10, 14 日後で対照群と比較して 5 mg/ml 投与群で低下がみられたが, 1 mg/ml, 2 mg/ml 投与群では差はなかった(図2). 各濃度とも術後3週間では眼圧降下度に有意差はみられなかった.

#### 3. 濾過胞の生存期間

濾過胞の生存期間は, 対照群で  $4.8 \pm 0.5$  日(平均値  $\pm$  標準偏差), 1 mg/ml 投与群で  $5.2 \pm 0.6$  日, 2 mg/ml 投与群で  $6.3 \pm 0.7$  日と 1 週間以内に濾過胞は消失した. 5 mg/ml 投与群では  $13.4 \pm 1.1$  日間保持した(表1, 図5, 6).

今回, RGDS 投与群において, 充血, 角膜上皮障害, 結合縫合部の融解などの副作用は全くみられなかった.

### IV 考 按

RGDS はマウス癌細胞と血管内皮細胞との接着を *in vitro* および *in vivo* で阻害することから, 間接的に癌細

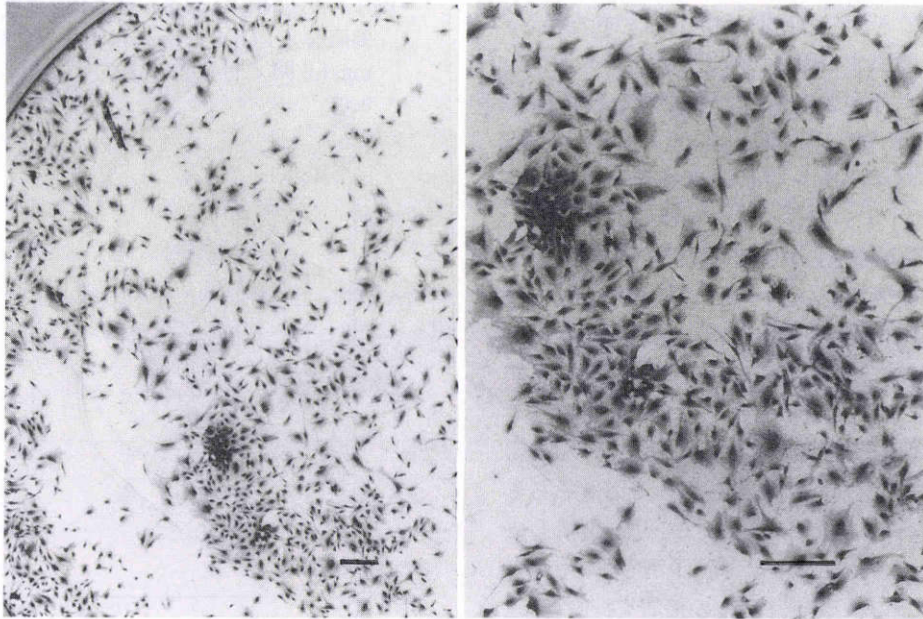


図3 培養皿中の線維芽細胞, バーは 250  $\mu$ m(対照).

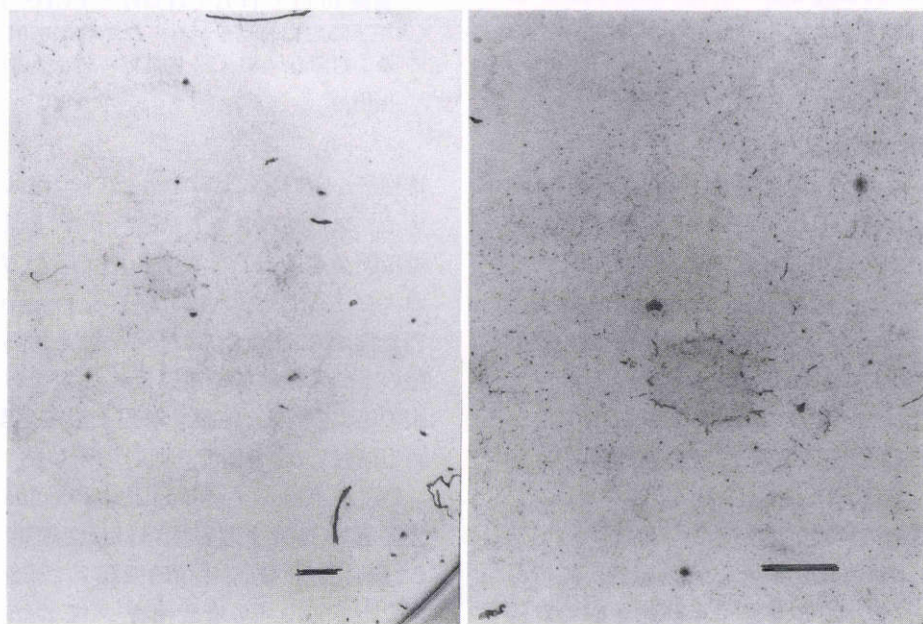


図4 培養皿中の線維芽細胞, バーは 250  $\mu$ m(RGDS 5 mg/ml).  
線維芽細胞はほとんどみられない.

表1 濾過胞消失までの日数

対 照	RGDS 濃度 (mg/ml)			
	1	2	5	
日 数	4.8±0.5	5.2±0.6	6.3±0.7	13.4±1.1*

(n=6) 平均値±標準偏差 \* : p<0.01

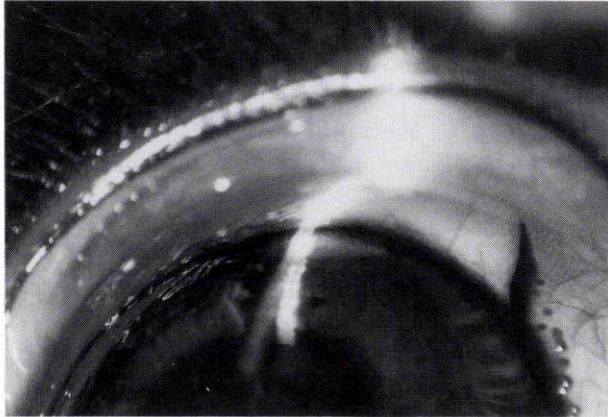


図5 濾過胞の状態(対照眼,術後1週間目).  
濾過胞は消失している。



図6 濾過胞の状態(RGDS 5 mg/ml眼,術後1週間目).  
濾過胞は保持されている。

胞の増殖を阻害し、癌転移を抑制できる可能性が示唆されている<sup>11)12)</sup>。眼科領域ではRGDSが水晶体上皮細胞の接着を阻害することが*in vitro*で確認されており、後発白内障の防止に臨床応用するための研究がなされている<sup>14)15)</sup>。最近、RGDSが*in vitro*でヒトテノン嚢由来の線維芽細胞に対しても接着を阻害することがHershkovitzら<sup>13)</sup>によって示されたが、RGDSが線維芽細胞の接着を*in vivo*でも阻害できるならば、手術後の結膜下癒痕形成を抑制できる可能性があり、特に緑内障濾過手術後に有用であると考えられる。

RGDSの眼疾患への応用については、増殖性硝子体網膜症の治療に応用可能であるかを*in vitro*で検討したRobertら<sup>16)</sup>の報告がある。それによると、RGDS 1 mg/mlにより網膜色素上皮細胞のフィブロネクチンへの接着が70%阻害され、RGDS 3 mg/mlでは網膜色素上皮

細胞の水晶体上皮基底膜への接着が有意に阻害された。しかし、RGDSによる網膜色素上皮細胞の内境界膜自身への接着は明らかではなく、有効性は疑問とされている。著者らが家兎眼の緑内障濾過手術に使用した限りではRGDSは*in vivo*で有効であり、濾過胞消失までの期間がRGDS 5 mg/mlで平均13日で対照よりも有意に延長された。これはRGDSの細胞接着阻害作用により術後の線維芽細胞の増殖が抑制されたため、濾過胞の癒痕化が起こりにくくなった結果であると考えられた。また、術後眼圧も10, 14日で有意に下降がみられた。したがって、緑内障濾過手術にRGDSを併用することで、手術成績を向上できる可能性があると考えられる。

RGDSの細胞接着阻害作用は構造によって差があり、*in vitro*ではすでに重合体の方がモノマーよりも強力であることが明らかにされている<sup>11)17)</sup>。さらに、環状構造のRGDSも重合体と同等の効果があることが知られている<sup>18)19)</sup>。今回は入手が簡単であり、比較的安価であることからモノマーで検討したが、今後は重合体や環状RGDSについても同様に検討する必要がある。RGDSの効果は純粋に細胞接着阻害のみによるものであるのか、RGDSそのものに細胞増殖抑制作用があるのかも今後の検討課題である。

RGDSがもともと生体内に存在している構造であることは、種々の薬剤と比較して副作用の面で極めて有利であるといえる。実際に、著者らも家兎眼では濾過胞の縫合部分の接着不良や漏洩などの重篤な副作用を何ら認めなかった。したがって、ヒト眼でも病態によっては臨床応用の可能性は十分に考えられる。今回のように緑内障単独手術のみならず、白内障と緑内障の同時手術の際にRGDSを前房内と濾過胞内に投与することで、後発白内障の発生を防止しつつ濾過手術の効果も延長できることが期待されるので、ヒト眼の結膜線維芽細胞に対する接着抑制効果を含め、角膜内皮細胞や線維柱帯組織に対する細胞毒性の有無も今後検討していく必要がある。

本研究は文部省科学研究費補助金# 03454414 を受けた。

#### 文 献

- 1) Chen CW, Huang HT: Trabeculectomy with simultaneous topical application of mitomycin-C in refractory glaucoma. J Ocul Pharmacol 6: 175-182, 1990.
- 2) Heuer DK, Parrish RK, Gressel MG, Hodapp E, Palmberg PF, Anderson DR: 5-Fluorouracil and glaucoma filtering surgery. II. A pilot study. Ophthalmology 91: 384-394, 1984.
- 3) Heuer DK, Parrish RK, Gressel MG, Hodapp E, Desjardins DC, Skuta GL, et al: 5-Fluorouracil and glaucoma filtering surgery. Intermediate follow-up of a pilot study. Ophthalmology 93: 1537-1546, 1986.
- 4) Kitazawa Y, Kawase K, Matushita H: Trabeculectomy with mitomycin. Arch Ophthal-

- mol 109: 1693—1698, 1991.
- 5) **Palmer SS**: Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy. *Ophthalmology* 98: 317—321, 1991.
  - 6) **Shapiro MSRA, Friend J, Parrish RK, Gressel MG**: 5-FU toxicity to the ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2585—2591, 1994.
  - 7) **Knapp A, Heuer DK, Stern GA, Driebe WT Jr**: Serious corneal complications of glaucoma filtering surgery with post operative 5-fluorouracil. *Am J Ophthalmol* 103:183—187, 1987.
  - 8) **Lee DA, Herch P, Kersten D, Melamed S, Epstein DL**: Complication of subconjunctival 5-fluorouracil following glaucoma filtration surgery. *Ophthalmic Surg* 18: 187—190, 1987.
  - 9) 山之内卯一, 高久 功, 津田尚幸: マイトマイシンC によると思われる強膜軟化について. *臨眼* 33: 112—113, 1984.
  - 10) **Pierschbacher DM, Ruosalahti E**: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309: 30—33, 1984.
  - 11) 濱木邦夫, 東 市郎: 合成 RGD ペプチドと癌転移阻止. *細胞培養* 15: 30—33, 1989.
  - 12) **Humphries MJ, Yamada MK, Olden K**: Investigation of the biological effects of anti-cell adhesive synthetic peptides that inhibit experimental metastasis of B16-F10 murine melanoma cells. *Jpn J Ophthalmol* 30: 367—375, 1986.
  - 13) **Hershkoviz R, Melamed S, Greenspoon N, Ofer L**: Nonpeptidic analogues of the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence specifically inhibit the adhesion of human tenon's capsule fibroblasts to fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2585—2591, 1994.
  - 14) 土井正光, 笹部哲生, 切通 彰, 岸田健一, 湯浅武之助: Arg-Gly-Asp-Ser オリゴマーの合成と接着阻止作用. *あたらしい眼科* 10: 1235—1238, 1993.
  - 15) **Sasabe T, Suwa Y, Kiritoshi A, Doi M, Yuasa T, Kishida K**: Differential effects of fibronectin-derived oligopeptides on the attachment of rabbit lens epithelial cells *in vitro*. *Ophthalmic Res* 28: 201—208, 1996.
  - 16) **Robert L, Avery RL, Glaser BM**: Inhibition of retinal pigment epithelial cell attachment by a synthetic peptide derived from the cell binding domain of fibronectin. *Arch Ophthalmol* 104: 1220—1222, 1986.
  - 17) **Saiki I, Iida J, Murata J, Ogawa R, Nishi N, Sugimura K, et al**: Inhibition of the metastasis of murine malignant melanoma by synthetic polymeric peptide containing core sequences of cell-adhesive molecules. *Cancer Res* 49: 3815—3822, 1989.
  - 18) **Isoai A, Ueno Y, Gigahama Y, Goto H, Kumagai H**: A novel Arg-Gly-Asp containing peptide specific for platelet aggregation and its effect on tumor metastasis: A possible mechanism of RGD peptide-mediated inhibition of tumor metastasis. *Cancer Letters* 65: 259—264, 1992.
  - 19) **Kumagai H, Tajima M, Ueno Y, Gigahama Y, Ohba M**: Effect of cyclic RGD peptide on cell adhesion and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commu* 177: 74—82, 1991.