

新しい真菌由来物質による角膜新生血管の抑制

仁井 誠治¹⁾, 出井 健之¹⁾, 寺野 紘²⁾, 真島 行彦¹⁾¹⁾慶應義塾大学医学部眼科学教室, ²⁾藤沢薬品工業株式会社

要 約

土壤糸状菌 *Scolecobasidium arenarium* 産生物質誘導体 FR 118487 による角膜新生血管抑制効果を日本白色ウサギを用い実験的に観察した。角膜ポケット法を用い, CuCl_2 含有ペレット埋込みで誘発した角膜新生血管モデルおよび Wister rat 角膜片を挿入した角膜移植モデルで, 誘発物の輪部寄りに FR 118487 含有ペレットを埋込み, 局所投与での角膜新生血管抑制効果を検討した。 CuCl_2 誘発モデルでは 1 週後の最大血管長が対照群 2.84 ± 0.13 (平均値 \pm 標準偏差) mm に対して, FR

118487 (500 μg) 群は 0.08 ± 0.10 mm ($p < 0.01$), 角膜移植モデルでは 2 週後の最大血管長が対照群 3.33 ± 0.18 mm に対して, FR 118487 (500 μg) 群は 0.05 ± 0.05 mm ($p < 0.01$) と, いずれも有意に角膜新生血管を抑制していた。(日眼会誌 101: 465—469, 1997)

キーワード: FR 118487 局所投与, *Scolecobasidium arenarium* 産生物質, 角膜新生血管抑制, CuCl_2 , 角膜移植

Inhibition of Corneal Neovascularization by a New Analog of Fungal Product

Seiji Nii¹⁾, Takeshi Idei¹⁾, Hiroshi Terano²⁾
and Yukihiro Mashima¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University²⁾Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

Abstract

The anti-angiogenic activity of FR 118487, a new synthetic analogue of *Scolecobasidium arenarium* products, was examined in corneas of Japanese white rabbits. We studied locally administered FR 118487 with hydron pellets in two models; corneal neovascularization after implantation of a CuCl_2 pellet (CuCl_2 -induced model) and a Wister rat's cornea (keratoplasty model) into a rabbit cornea. In the CuCl_2 -induced model, maximum length of neovascularization was 0.08 ± 0.10 (mean \pm standard deviation) mm with FR 118487 (control 2.84 ± 0.13 mm) at 1 week after the implantation. In the ker-

atoplasty model, maximum length of neovascularization was 0.05 ± 0.05 mm with FR 118487 (control 3.33 ± 0.18 mm) at 2 weeks after the implantation. In both models, FR 118487 had a significant ($p < 0.01$) effect on inhibition of corneal neovascularization. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 465—469, 1997)

Key words: Locally administered FR 118487, *Scolecobasidium arenarium* products, Inhibition of corneal neovascularization, CuCl_2 , Keratoplasty

I 緒 言

角膜新生血管は種々の角膜疾患に続発し, これに伴う混濁により視力障害の原因となることが知られている。また, 角膜移植に際しては, 術前からの角膜新生血管や, 術後に縫合糸などの刺激によって生じる角膜新生血管は, 拒絶反応に対する重大なリスクファクターとなっている。これまで, 新生血管抑制物質としては, 軟骨抽出物

質¹⁾, プロタミン²⁾, ステロイド³⁾⁴⁾, トロンボスポンジン⁵⁾⁶⁾, 金属⁷⁾, 抗生剤⁸⁾, 硝子体^{9)~11)}や水晶体¹²⁾の抽出物質, フマジリン¹³⁾¹⁴⁾など多くの物質が知られているが, 未だ眼科の分野においては臨床応用に至っていない。今回我々は, 血管新生因子として活性や半減期などに関して安定性の高い CuCl_2 を用いた CuCl_2 誘発ウサギ角膜新生血管モデル¹⁵⁾および角膜移植モデルにおいて, 土壤糸状菌 *Scolecobasidium arenarium* の 1 系列である F-2015

別刷請求先: 〒160 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 仁井 誠治
(平成 8 年 9 月 2 日受付, 平成 9 年 2 月 26 日改訂受理)

Reprint requests to: Seiji Nii, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University,
35 shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

(Received September 2, 1996 and accepted in revised form February 26, 1997)

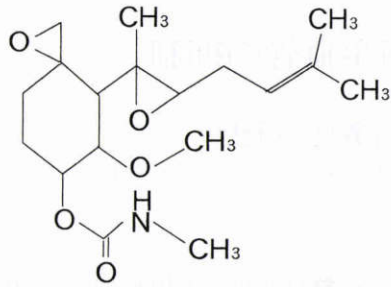


図1 FR 118487の構造式.

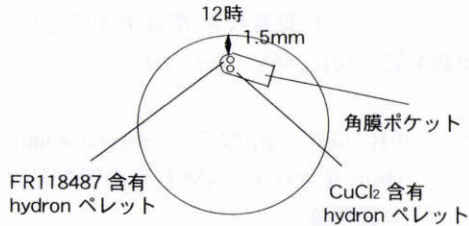


図2 CuCl_2 誘発角膜新生血管モデル.

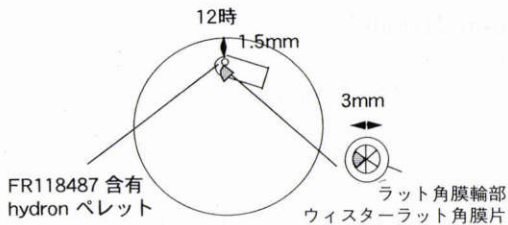


図3 角膜移植モデル.

が産生するFR 111142の誘導體FR 118487(図1)の角膜新生血管抑制効果につき検討した.

II 対象と方法

対象として,体重2 kg前後の雌の日本白色ウサギを各群4匹ずつ用いた.

1. CuCl_2 誘発角膜新生血管モデル

まず,ウサギ角膜にクレセントナイフで図2に示すようにポケットを作製した.その後,12時の輪部から1.5 mmの位置に角膜中央に向かってFR 118487(20 μg , 100 μg または 500 μg)を含むhydronペレットおよび CuCl_2 (20 μg)を含むhydronペレットの順に縦に並ぶように図2のごとく,このポケット内に挿入し,Gimbroneら¹⁶⁾の方法に準じてモデルを作製した.これをFR 118487群とした.同様に,薬剤を含まないhydronペレットおよび CuCl_2 (20 μg)を含むhydronペレットを挿入したものを対照群とした.その後,2週間角膜新生血管の形成を観察し,その時点で輪部から最も伸びていた新生血管の長さを最大血管長とし,これを各群で比較した.有意差検定にはStudent's t-testを用いた.

2. 角膜移植モデル

1と同様にポケットを作製し,12時の輪部から1.5 mmの位置に角膜中央に向かってFR 118487(500 μg)を

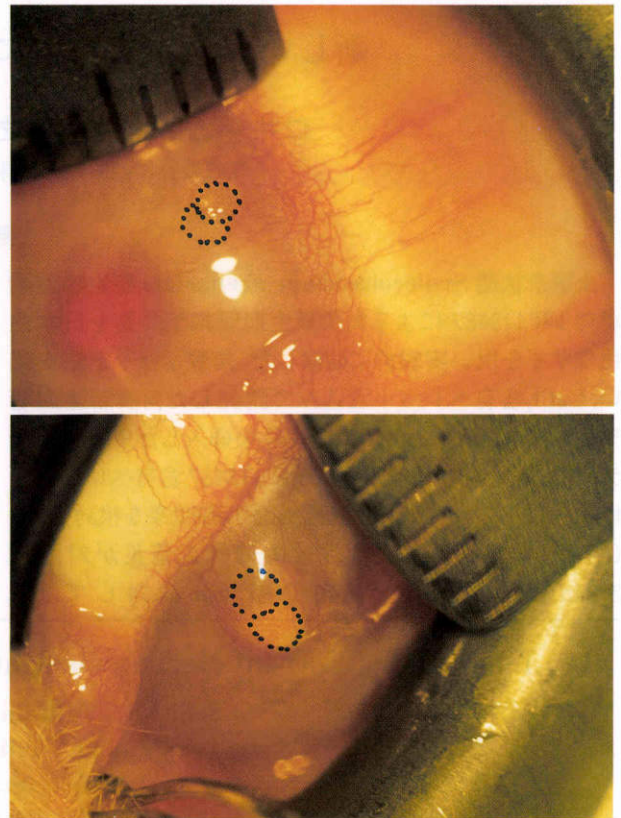


図4 CuCl_2 誘発角膜新生血管モデルの前眼部(14日目).

点線で囲まれた部分は輪部よりFR 118487(500 μg)を含むhydronペレットおよび CuCl_2 (20 μg)を含むhydronペレットを示す.

上:FR 118487(500 μg)群,下:対照群

含むhydronペレットおよびWistar rat角膜片の順に縦に並ぶように図3のごとく,このポケット内に挿入した.これをFR 118487群とした.Wistar rat角膜片は, rat角膜中央を3 mmのトレパンで打ち抜いたものを6分割した1片を用いた.同様に,薬剤を含まないhydronペレットおよびWistar rat角膜片を挿入したものを対照群とした.その後,2週間角膜新生血管の形成を観察し,その時点で輪部から最も伸びていた新生血管の長さを最大血管長とし,これを各群で比較した.有意差検定にはStudent's t-testを用いた.

III 結果

1. CuCl_2 誘発角膜新生血管モデル

2週後のFR 118487群(500 μg)と対照群の前眼部写真を図4に示す.FR 118487群(500 μg)は,対照群に比べ有意に角膜新生血管の形成を抑制している.FR 118487群(500 μg)の角膜新生血管は,FR 118487を含むペレットにさざぎられるように,ペレットから等距離の所で留まっている形になっている.1週後輪部から最も伸びていた新生血管の長さを測定し,グラフにしたものが図5である.1週後の最大血管長は,対照 2.84 ± 0.13 (平均

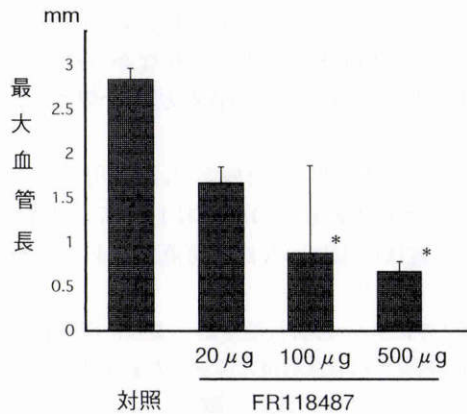


図5 CuCl₂ 誘発角膜新生血管に対する FR 118487 の抑制効果(7日目).

n=4, * : p<0.01

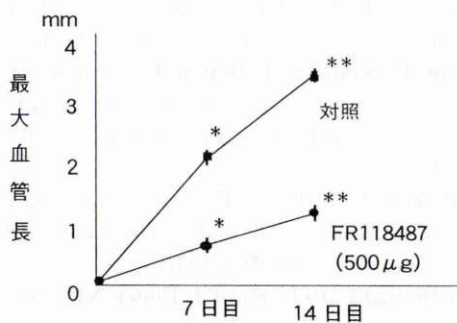


図6 CuCl₂ 誘発角膜新生血管に対する FR 118487 の抑制効果(経時変化).

n=4, * : p<0.01, ** : p<0.01

値±標準偏差)mm に対して, FR 118487 群(20 μg) 1.68±0.17 mm, FR 118487 群(100 μg)0.88±0.99 mm, FR 118487 群(500 μg) 0.68±0.10 mm であり, FR 118487 群(100 μg と 500 μg)では, 対照に比べ p<0.01 で有意に角膜新生血管を抑制している。

CuCl₂ 誘発角膜新生血管に対する FR 118487 の抑制効果を経時的にみたものを図6に示す。縦軸にはその時点で輪部から最も伸びていた新生血管の長さをとった。1週目, 2週目のいずれの時点でも, FR 118487 群は対照群に比べ p<0.01 で有意に角膜新生血管の形成を抑制していた。

2. 角膜移植モデル

2週後の FR 118487 群と対照群の前眼部写真を図7に示す。FR 118487 群は対照群に比べ有意に角膜新生血管の形成を抑制している。FR 118487 群ではラット角膜片は白濁しているものの, 角膜新生血管をほとんど認めないのに対して, 対照群では白濁したラット角膜片・ペレットを取り囲むように角膜新生血管が生じている。

角膜移植モデル角膜新生血管に対する FR 118487 の抑制効果を縦軸に, その時点で輪部から最も伸びていた新生血管の長さをもってグラフにしたものが図8である。2週目の時点で, 最大血管長は対照 3.33±0.18 mm

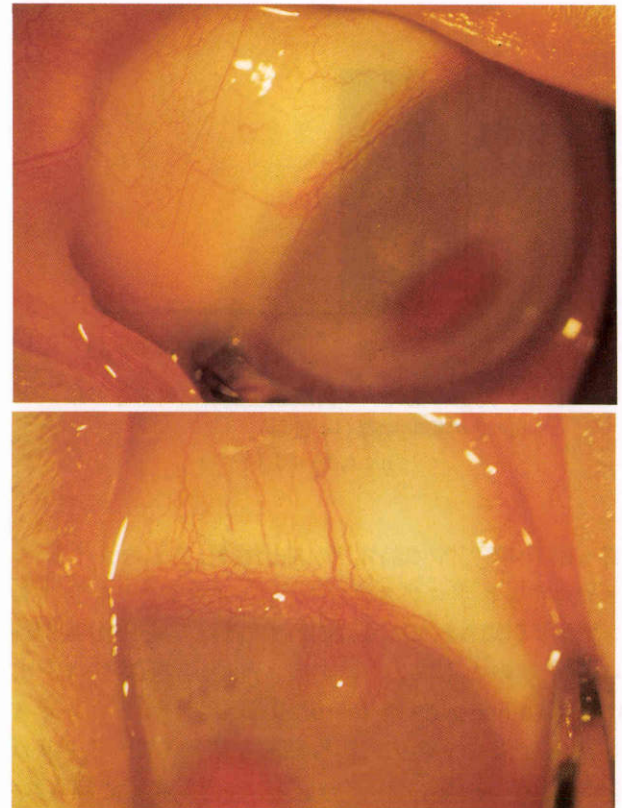


図7 角膜移植モデルの前眼部(14日目).

上: FR 118487(500 μg)群, 下: 対照群

に対して, FR 118487 群 0.05±0.05 mm であり, FR 118487 群は対照群に比べ p<0.01 で有意に角膜新生血管の形成を抑制していた。

なお, 移植したラット角膜片は2週目の時点では軽度白濁しているが, その後, 角膜新生血管の増加に伴い強く白濁した。強く白濁する時期は FR 118487 群では対照群に比べ遅い傾向にあり, その時期でも角膜新生血管は FR 118487 群ペレットを避ける形で増加していた。

いずれのモデルにおいても, この間に FR 118487 投与による体重の減少は認めなかった。

IV 考 按

血管新生は, 血管新生刺激が血管に及ぶと発現する。主な血管新生刺激として, 腫瘍細胞, 炎症細胞, 虚血網膜などがあり, そこから線維芽細胞成長因子¹⁷⁾, アンジオジェニン¹⁸⁾, 血管内皮細胞成長因子¹⁹⁾, 腫瘍壊死因子²⁰⁾, プロスタグランジン¹⁷⁾, 血小板由来血管内皮細胞成長因子²¹⁾などの血管新生因子が放出され, 直接または間接的に血管に作用すると考えられている。その後, 血管基底膜・周囲の細胞外基質が蛋白分解酵素によって融解され, その欠損部から血管内皮細胞が血管外に遊走・分裂していく。最後に管腔形成, 基底膜形成, ペリサイトの進出が起こり新生血管が完成する²²⁾²³⁾。

新生血管抑制物質は, この過程を抑制するものであるが, 基底膜融解の障害に働くものとして, 軟骨抽出物

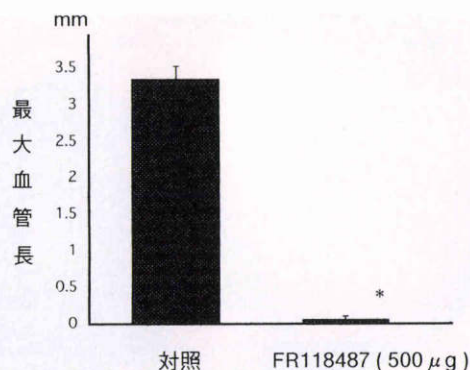


図8 角膜移植モデル角膜新生血管に対するFR 118487の抑制効果(14日目).
n=4, *p<0.01

質¹⁾,硝子体^{9)~11)}や水晶体¹²⁾の抽出物質,アミロライド²⁴⁾,メドロキシプロゲステロン²⁵⁾,ミノサイクリン⁸⁾,キチン²⁶⁾などが知られている.血管内皮細胞の遊走・分裂抑制に働くものとして,プロタミン²⁾,血小板因子-4²⁷⁾²⁸⁾, transforming growth factor (TGF- β)²⁹⁾³⁰⁾, トロンボスポンジン⁵⁾⁶⁾, フマジリン¹³⁾¹⁴⁾, 硫酸多糖—ペプチドグリカン複合体³¹⁾, 金属⁷⁾, インターフェロン³²⁾³³⁾などが知られ,基底膜形成阻害に働くものとして,プロリン³⁴⁾,血管静止性ステロイド³⁴⁾などが知られている.

今回検討したFR 118487は,土壤糸状菌 *Scolecobasidium arenarium* の1系列であるF-2015が産生するFR 111142の誘導体であり³⁵⁾,類似したものとしては *Aspergillus fumigatus* から抽出されたフマジリンやその誘導体AGM-1470 (angiostatin)がある¹³⁾¹⁴⁾.FR 118487は血管内皮細胞増殖抑制能をもち,その抑制能は原抽出物であるFR 111142よりも合成誘導体であるFR 118487の方がはるかに高く,またフマジリンと比べると, *in vitro* のヒト血管内皮細胞培養系ではフマジリンの約5倍, *in vivo* の鶏胚尿漿膜法(CAM法)ではフマジリンの4倍以上である³⁵⁾³⁶⁾.

角膜新生血管は臨床的にさまざまな問題を起す,角膜移植に際しては拒絶反応に対するリスクファクターとなっている.今回, CuCl_2 で誘発した角膜新生血管モデルおよびWistar rat角膜片を挿入した角膜移植モデルにおいて,FR 118487含有ペレット埋込みによる局所投与の角膜新生血管抑制効果について検討したところ,いずれのモデルにおいても,対照に比べp<0.01で有意に角膜新生血管を抑制していた.これは,物理化学的な血管新生刺激のみならず,生物学的な異種抗原としての血管新生刺激に対しても,FR 118487が角膜新生血管抑制効果を示す可能性を示唆している.

真菌由来血管新生抑制物質の問題点として組織毒性の強さがあるが¹³⁾¹⁴⁾,FR 118487はフマジリンに比べ毒性の点では優れているものの,全身投与においてはフマジリンの1/4程度の僅かの体重減少が認められている³⁵⁾.

この点から,今回はペレット埋込みによる局所投与で検討したところ,体重減少が認められなかった.しかし,実際の臨床においては別の局所投与方法が予想され,今後検討を要する.

以上,投与方法,投与期間,対象疾患,副作用など今後引き続き検討の余地はあるものの,FR 118487は血管新生抑制薬として臨床応用につながる可能性があると考えられた.

稿を終えるに当たり,御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部眼科学教室小口芳久教授に深謝いたします.

文 献

- 1) Langer R, Brem H, Falterman K, Klein M, Folkman J: Isolation of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization. *Science* 193: 70-72, 1976.
- 2) Taylor S, Folkman J: Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 297: 307-312, 1982.
- 3) Crum R, Szabo S, Folkman J: A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 230: 1375-1378, 1985.
- 4) Folkman J, Ingber DE: Angiostatic steroids. Methods of discovery and mechanism of action. *Ann Surg* 206: 374-383, 1987.
- 5) Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP: Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 56: 345-455, 1989.
- 6) Tarabozetti G, Robert D, Liotta LA, Giavazzi R: Plectin thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: A potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 111: 765-772, 1990.
- 7) Matsubata T, Ziff M: Inhibition of human endothelial cell proliferation by gold compounds. *J Clin Invest* 79: 1440-1446, 1987.
- 8) Tamargo RJ, Bok RA, Brem H: Angiogenesis inhibition by minocyclin. *Cancer Res* 51: 672-675, 1991.
- 9) Felton SM, Brown GC, Felberg NT, Federman JL: Vitreous inhibition of tumor neovascularization. *Arch Ophthalmol* 97: 1710-1713, 1979.
- 10) Luty GA, Thompson DC, Gallup JY, Mello RJ, Patz A, Fenselau A: Vitreous: An inhibitor of retinal extract-induced neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 52-56, 1983.
- 11) Jacobson B, Basu PK, Hasany SM: Vascular endothelial cell growth inhibitor of normal and pathologic human vitreous. *Arch Ophthalmol* 102: 1543-1545, 1984.
- 12) Williams GA, Eisenstein R, Schumacher B, Hsiao KC, Grant D: Inhibitor of vascular endothelial cell growth in the lens. *Am J Ophthalmol* 97: 366-371, 1984.
- 13) Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, et al: Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis

- and suppress tumor growth. *Nature* 348 : 555—557, 1990.
- 14) **Kusaka M, Sudo K, Fujita T, Maruis S, Itoh F, Ingber D, et al** : Potent antiangiogenic action of AGM-1470 ; comparison to the fumagillin parent. *Biochem Biophys Res* 174 : 1070—1076, 1991.
 - 15) **Parke A, Bhattacharjee P, Palmer RM, Lazarus NR** : Characterization and quantification of copper sulfate-induced vascularization of the rabbit cornea. *Am J Pathol* 130 : 173—178, 1988.
 - 16) **Gimbrone MA, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J** : Tumor growth and neovascularization : An experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 52 : 413—427, 1974.
 - 17) **Folkman J, Klagsbrun M** : Angiogenic factors. *Science* 235 : 422—447, 1987.
 - 18) **Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, et al** : Isolation and characterization of Angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24 : 5480—5486, 1985.
 - 19) **Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N** : Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246 : 1306, 1989.
 - 20) **Frater-Schroder M, Risau W, Hallman R, Gautschi P, Bohlen P** : Tumor necrosis factor, a potent inhibitor of endothelial growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci* 84 : 5277—5281, 1987.
 - 21) **Ishikawa F, Miyazono K, Hallman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, et al** : Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338 : 557, 1989.
 - 22) **Folkman J** : Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43 : 175—203, 1985.
 - 23) **Folkman J** : Important Advances in Oncology 1985. In : De Vita VT Jr, et al (Eds) : JB Lippincott Company, Philadelphia, 42, 1985.
 - 24) **Schweigerer L** : Fibroblast growth factors and angiogenesis. *Z Kardiol* 78(Suppl 6) : 12—15, 1989.
 - 25) **Ashino-Fuse H, Takano Y, Ogikawa T, Shimamura M, Iwaguchi T** : Medroxyprogesterone acetate, an anti-cancer and anti-angiogenic steroid, inhibits the plasminogen activator in bovine endothelial cells. *Int J Cancer* 44 : 859—864, 1989.
 - 26) **Saiki I, Murata J, Nakajima M, Tokura S, Azuma I** : Inhibition by sulfated chitin derivatives of invasion through extracellular matrix and enzymatic degradation of metastatic melanoma cells. *Cancer Res* 50 : 3631—3637, 1990.
 - 27) **Maione TE, Gray GS, Petro J, Hunt AJ, Donner AL, Bauer SI, et al** : Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 247 : 77—79, 1990.
 - 28) **Maione TE, Gray GS, Hunt AJ, Sharpe RJ** : Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor-4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity. *Cancer Res* 51 : 2077—2083, 1991.
 - 29) **Roberts AB, Spon MB** : Transforming growth factors. *Cancer Surv* 4 : 683—705, 1985.
 - 30) **Frater-Schroeder M, Myllar G, Birchmeier W** : Transforming growth factor beta inhibits endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 137 : 295—302, 1986.
 - 31) **Tanaka NG, Sakamoto N, Inoue K, Korenaga H, Kadaya S, Ogawa H, et al** : Antitumor effects of an antiangiogenic polysaccharide from an *Arthrobacter* species with or without a steroid. *Cancer Res* 49 : 6727, 1989.
 - 32) **Sidky Y, Borden E** : Inhibition of angiogenesis by interferons ; effect on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res* 47 : 5155—5161, 1987.
 - 33) **Miller JW, Stinson WG, Forkman J** : Regression of experimental iris neovascularization with systemic alpha-interferon. *Ophthalmol* 100 : 9—14, 1993.
 - 34) **Ingber DE, Forkman J** : Inhibition of angiogenesis through modulation of collagen metabolism. *Lab Invest* 59 : 453—459, 1988.
 - 35) **Otsuka T, Shibata T, Tsurumi Y, Takase S, Okuhara M, Terano H, et al** : A new potent angiogenesis inhibitor, FR 118487. *J Antibiotics* 45 : 348—354, 1992.
 - 36) **Otsuka T, Okawa T, Shibata T, Oku T, Okuhara M, Terano H, et al** : New potent angiogenesis inhibitor, FR 118487. *J Microbio Biotechnol* 1 : 163—168, 1991.