神経伝達物質の家兎角膜に及ぼす影響

渡部 通史[1)], 中安 清夫[2)], 金井 淳[2)]
[1)]佐久市立浅間総合病院眼科, [2)]順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：家兎角膜上皮と実質細胞の培養液に神経伝達物質を添加し，その影響を検索する．

方 法：角膜上皮と実質細胞の培養には，RCGM 培地を用いた．添加する神経伝達物質として，substance P，アセチルコリン，vasoactive-intestinal peptide（VIP）を用いた．

結 果：神経伝達物質添加 24 時間後の培養角膜上皮細胞の増殖能は，substance P 添加群で対照群よりも有意に亢進し（$p<0.05$），アセチルコリンと VIP 添加では変化がなかった．角膜上皮細胞の伸展能は，神経伝達物質添加により変化しなかった．角膜実質細胞では，神経伝達物質添加による増殖能と伸展能の変化はなかった．

結 論：培養液に添加した substance P は角膜上皮細胞の増殖能を促進する．（日眼会誌 103:356—362, 1999）

キーワード：神経伝達物質，角膜上皮細胞，角膜実質細胞，Substance P，増殖能

The Effect of Neurotransmitters on Rabbit Cornea

Michifumi Watanabe[1)], Kiyoo Nakayasu[2)] and Atsushi Kanai[2)]
[1)]*Eye Department of Asama Municipal Hospital*
[2)]*Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine*

Abstract

Purpose : To ascertain the effect of neurotransmitters added to the culture medium of rabbit corneal epithelium and stromal cells.

Method : The corneal epithelium and stromal cells were cultured in RCGM medium. Three neurotransmitters were added to the medium : substance P, acetylcholine, and vasoactive-intestinal peptide (VIP).

Results : Proliferation of epithelial cells significantly increased after incubation for 24 hours with substance P ($p<0.05$). There was no change in proliferation after addition of acetylcholine or VIP. The extension of epithelial cell layer increased after addition of substance P but not after addition of acetylcholine or VIP. No change was induced in proliferation of stromal cells or extension of the stromal cell layer after addition of any one of the three substances.

Conclusion : Substance P stimulates the proliferation of corneal epithelial cells when added to the culture medium. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 356—362, 1999)

Key words : Neurotransmitter, Corneal epithelial cells, Corneal stromal cells, Substance P and proliferation

I 緒 言

三叉神経は，眼球およびその周囲組織に分布し，その終末から種々の神経伝達物質を分泌している[1)]．神経麻痺性角膜炎の原因として，substance P をはじめとする神経伝達物質の影響が指摘されており[1)~3)]，substance P は角膜上皮の創傷治癒に深く関わっているとの報告[2)~4)]もある．今回，我々は神経伝達物質の角膜への影響を調べる目的で，培養家兎角膜上皮細胞，実質細胞に 3 種類の神経伝達物質を添加し，その増殖能，伸展能について検索したので報告する．

II 方 法

1. 実験 1

白色家兎角膜から，角膜中央を頂点とし，輪部を底辺とした三角形の 8 つの角膜小片を作製した．それぞれの角膜小片を 35 mm シャーレに置き，10% ウシ胎児血清（FCS）加 DMEM 培地で，37℃ で培養することにより，角

別刷請求先：113-0033 東京都文京区本郷 3—1—3 順天堂大学医学部眼科学教室 渡部 通史
（平成 10 年 4 月 24 日受付，平成 10 年 12 月 2 日改訂受理）
Reprint requests to: Michifumi Watanabe, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine. 3-1-3 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan
(Received April 24, 1998 and accepted in revised form December 2, 1998)

膜上皮をoutgrowthさせ，初代培養角膜上皮細胞を得た．

第2代の継代培養角膜上皮細胞を8 wellのチャンバースライドに2×10^4/well撒き，RCGM培地（クラボウ®）を用いて37℃で培養した．培養5日後，家兎角膜上皮がコンフルエンスに達する以前に，substance P（SP），アセチルコリン（Ach），vasoactive-intestinal peptide（VIP）の3種類の神経伝達物質をそれぞれの培地に添加し，24時間培養した．また，SPとその拮抗剤のspantideを同時またはそれぞれ単独に添加し，同様に24時間培養した．SP, Ach, VIP, spantideはSigma社製を使用した．

各神経伝達物質添加24時間後，分裂期にある細胞に5-bromo-2'-deoxyuridine（BrdU）を取り込ませた後，BrdUに対するモノクローナル抗体（Amersham®）を反応させ，さらにエオジン染色をした後，分裂期の細胞を同定した．光学顕微鏡を用いて，任意の視野で細胞を200個数え，そのうちの分裂期にある細胞数を各神経伝達物質添加群毎に比較した．3種類の神経伝達物質の濃度は，いずれも10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8} Mの3段階で，各々n=4として検索した．

また，SP, spantide単独添加群とSP, spantide同時添加群では添加濃度をSPで10^{-4} M, spantide 10^{-5} Mとし，各々の群ともn=4とした．得られた結果を有意水準5%，t検定でそれぞれ検索した．

2. 実験2

白色家兎角膜を実験1と同様の方法で角膜小片にした後，35 mmシャーレでDMEM+10% FCSで培養した．角膜上皮細胞が角膜小片周囲にoutgrowthし，シートを形成したところで，任意の位置で角膜上皮細胞のシートの一部をカミソリで除去した．その後，SP, Ach, VIPをそれぞれ添加したRCGM培地に交換し，24時間培養した後，無水エタノールで固定し，シートの除去部を越えて伸展してきた角膜上皮を写真撮影し各々の伸展距離を印画紙上で計測し，各神経伝達物質添加群と対照群を比較した．神経伝達物質の濃度はSP, Ach, VIPとも10^{-4}Mとし，いずれの群もn=13とし，有意水準5%，t検定で検索した．

3. 実験3

白色家兎から，角膜実質細胞を分離，培養し，第4～5代の培養家兎角膜実質細胞（RK）を8 wellのチャンバースライドに1×10^4/well撒き，37℃で培養した．培地は実験1で角膜上皮細胞の培養に用いたRCGM培地を使用した．培養2日後，家兎角膜実質細胞がコンフルエンスに達する以前に，SP, Ach, VIPの3種類の神経伝達物質をそれぞれ培地に添加し，24時間培養した．24時間後，実験1と同様の方法でBrdUを取り込んだ細胞を数え，細胞数を各神経伝達物質添加群毎に比較した．神経伝達物質の濃度は，実験1と同様で，各々n=4とし，有意水準5%，t検定で検索した．

4. 実験4

実験3と同様の方法で得た角膜実質細胞を35 mmシャーレに1×10^5/well撒き，37℃で4日間RCGM培地を用いて培養した．4日後，コンフルエンスに達した角膜実質細胞のシートの一部を実験2と同様にカミソリで除去した．その後，SP, Ach, VIPをそれぞれ添加したRCGM培地に交換し，48時間培養した後，無水エタノールで固定し，シートの除去部を越えて伸展してきた角膜実質細胞を写真撮影し，実験2と同様に各々の伸展距離を印画紙上で計測し，各神経伝達物質添加群と対照群を比較した．神経伝達物質の濃度はSP, Ach, VIPとも10^{-4}Mとし，いずれの群もn=4とし，有意水準5%，t検定で検索した．

III 結　果

1. 実験1

培養24時間後の角膜上皮細胞は，各群とも著明な形態学的変化はみられず，また，BrdUを取り込んだ細胞がモノクローナル抗体により染色され，標識された（図1）．

SP添加群では10^{-4} Mの濃度で対照群に比べ，染色された細胞数が統計学的に有意に多く，細胞増殖能の増加を示した（$p<0.05$）．また，染色された細胞数はSP濃度の減少とともに少なくなり，10^{-6} M以降の濃度では，染色された細胞数は対照群と比べ，有意な差はなかった（図2A）．10^{-4} M SP単独添加群とSP添加およびその拮抗剤であるspantideを10^{-5} Mの濃度で同時に添加した群との比較では，SP単独添加群での有意な染色細胞数増加が，SP, spantide同時添加群ではみられず，その細胞数は無添加の対照群と比べ，有意差がなかった（図2B）．Spantide単独添加では対照群に比べ，染色された細胞数

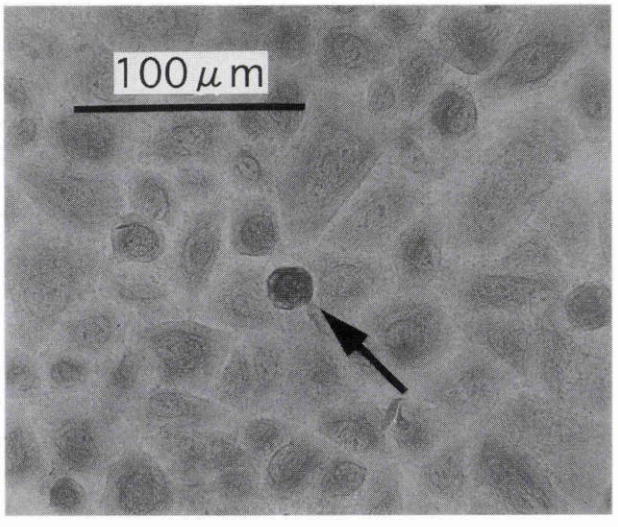

図1　Substance P（SP）添加24時間後の培養家兎角膜上皮細胞．
矢印は抗5-bromo-2'-deoxyuridine（BrdU）抗体で標識された細胞（エオジン染色，強拡大）．

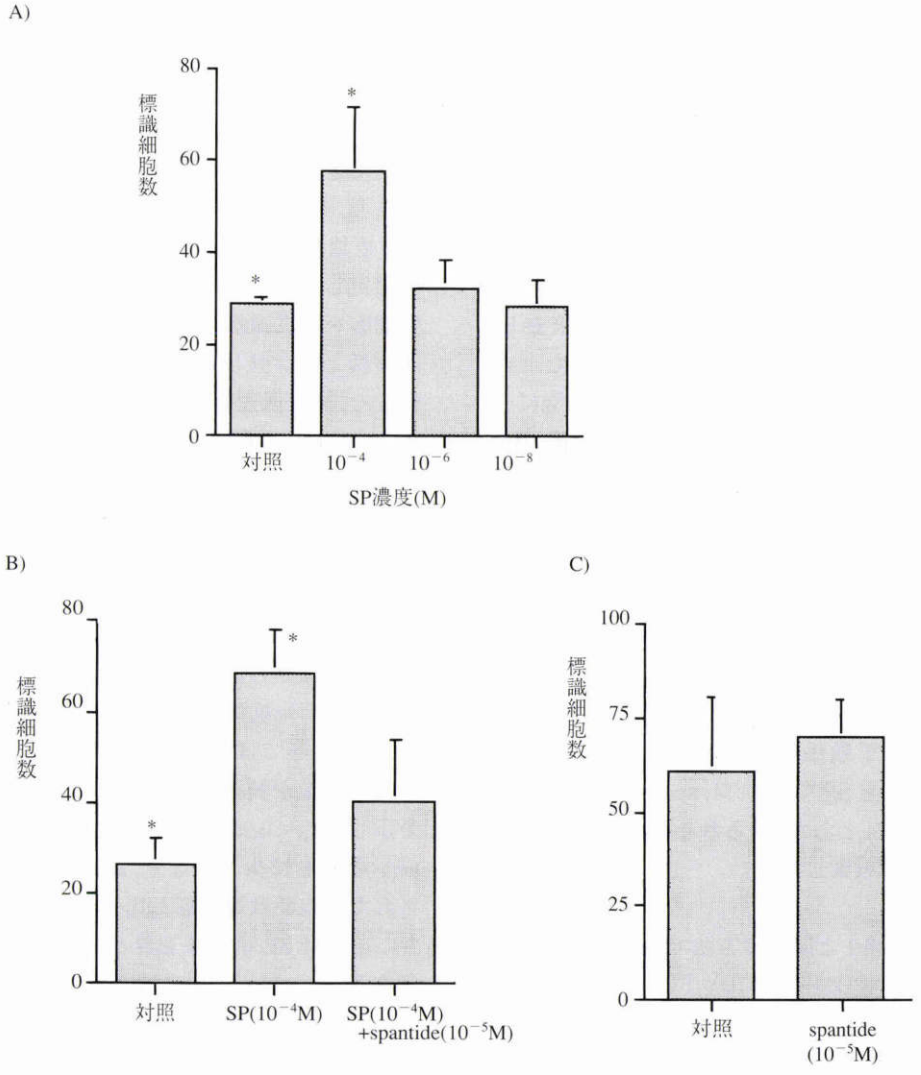

図2 SP添加およびspantide添加24時間後の抗BrdU抗体で標識された培養家兎角膜上皮細胞数の比較.
細胞数は各wellで任意に細胞を200個計測したうちのものをさす. n=4, A)：SP添加群, B)：10^{-4} M SP添加および10^{-4} M SP, 10^{-5} M spantide同時添加群, C)：10^{-5} M spantide添加群, ＊：<0.05

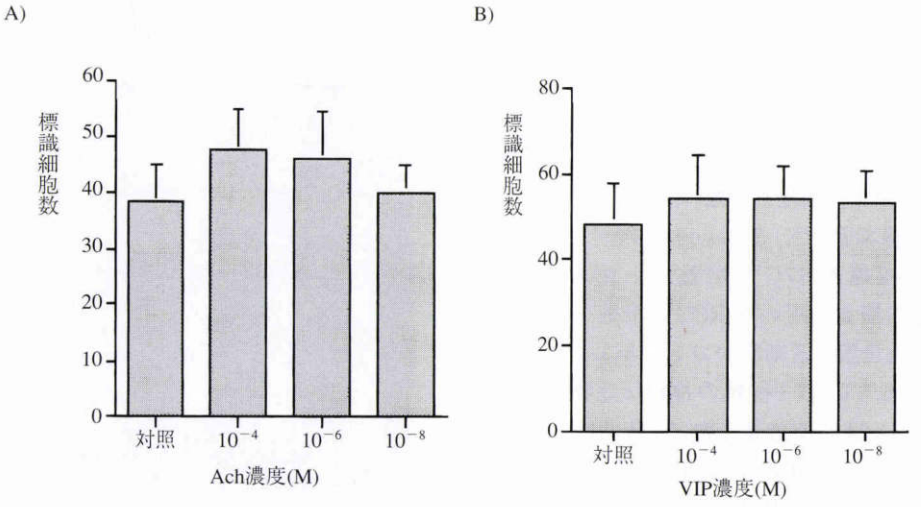

図3 アセチルコリン(Ach)およびvasoactive-intestinal peptide(VIP)添加24時間後, 抗BrdU抗体で標識された培養家兎角膜上皮細胞数の比較.
細胞数は各wellで任意に細胞を200個計測したうちのものをさす. n=4, A)：Ach添加群, B)：VIP添加群

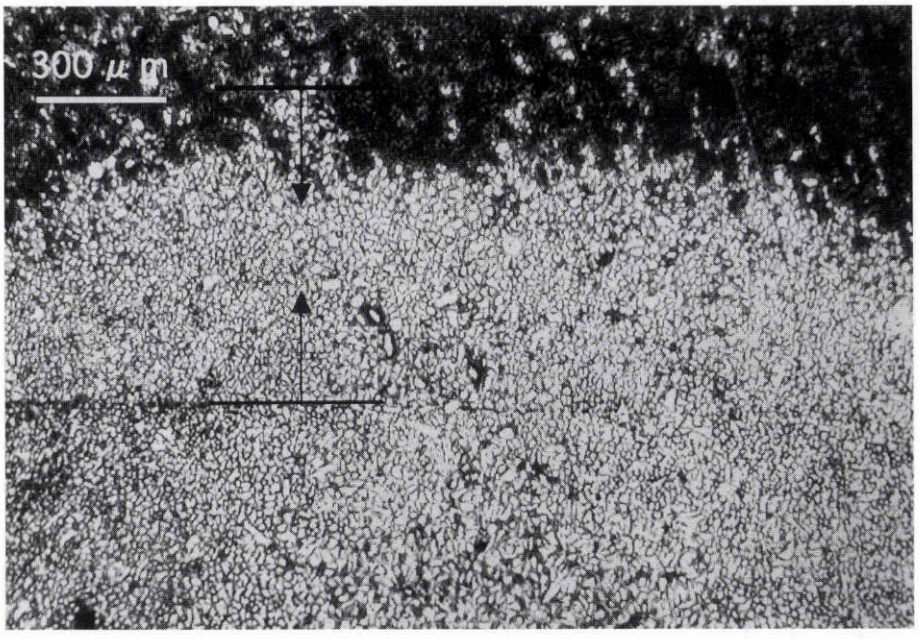

図4　SP添加24時間後，家兎角膜上皮細胞が除去部位から伸展した状態.
中央の黒線：シート状家兎角膜上皮細胞の除去部位，矢印：計測部位，弱拡大

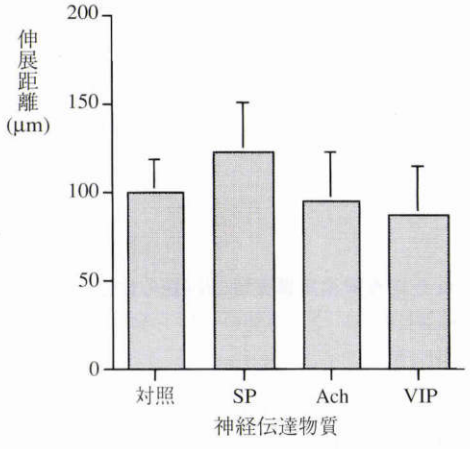

図5　除去部位から伸展した家兎角膜上皮細胞伸展距離の比較.
n＝4

において統計学的有意差はなかった(図2C).

Ach添加群では，10^{-4}および10^{-6} Mの濃度で対照群に比べ，染色された細胞数が多くみられ，細胞増殖能が増加する傾向がみられたものの統計学的有意差はなかった(図3A).

VIP添加群では，どの濃度においても染色された細胞数において統計学的有意差はなかった(図3B).

2. 実験2

24時間後の角膜上皮細胞は，すべての群で細胞群が除去部位を越えて伸展し，細胞の伸展能がみられた(図4).また，伸展してきた細胞は，互いに密に接着しており，非除去部でのコンフルエンスの状態を保っていた.印画紙上で計測された細胞の伸展距離は対照群と比べ，SP添加群で細胞の伸展距離が長かったが，統計学的有意差はなかった(図4,5).

Ach, VIP添加群においても対照群に比べ，伸展距離に明らかな変化はなく，統計学的有意差もなかった(図5).

3. 実験3

RCGM培地で24時間培養後の角膜実質細胞は，形態学的に著明な変化はなかった.また，各群ともBrdUを取り込んだ細胞がモノクローナル抗体により染色された.しかしながら，染色された細胞数は各神経伝達物質添加群と対照群の間で，統計学的有意差はなかった(図6A～C).

4. 実験4

48時間後の角膜実質細胞は，すべての群で除去部位を越えて伸展し，細胞の伸展能がみられた(図7).また，角膜上皮細胞と異なり，伸展した細胞は，互いに接着するというよりも，孤立している傾向がみられた(図7).印画紙上で計測された細胞の伸展距離は，各群とも対照群と比べ，統計学的有意差はなかった(図8).

IV　考　　按

三叉神経終末には，SP, calcitonin gene-related peptide(CGRP), VIP, Achなどの神経伝達物質が存在している[1].そのうちSPについては，角膜上皮の創傷治癒および角膜上皮伸展能に深く関与しているとの報告[2)～4)]が既にある.Reidら[2)]はSPが培養家兎角膜上皮細胞の増殖能をより増加させ，さらにインスリンやCGRPの存在下でそれが助長されると報告している.また，中村ら[5)]はepidermal growth factor(EGF)の存在下でSPによる角膜上皮の伸展能促進効果につき報告している.

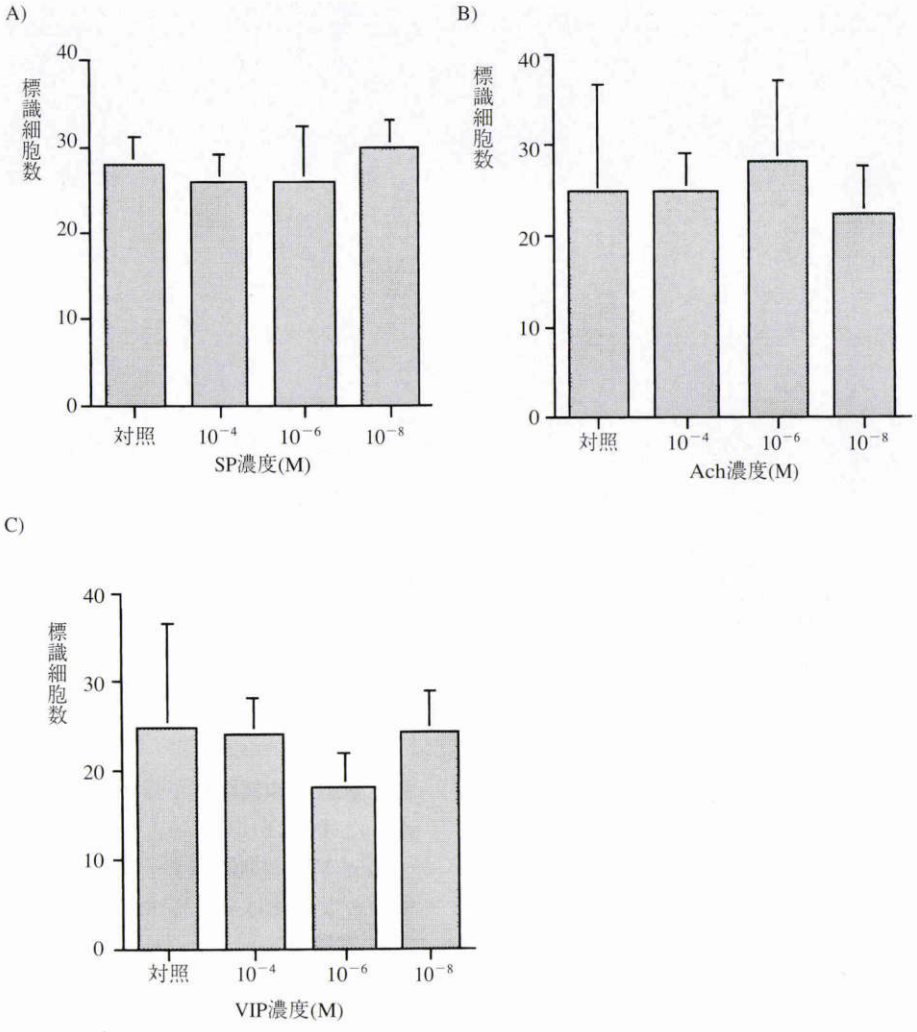

図6 SP, Ach, VIP 添加24時間後の抗 BrdU 抗体で標識された培養家兎角膜実質細胞数の比較.
細胞数は各 well で任意に細胞を 200 個計測したうちのものをさす. n=4, A)：SP 添加群, B)：Ach 添加群, C)：VIP 添加群

今回, 我々の実験系においても, SP の添加により, 培養家兎角膜上皮細胞の BrdU の取り込みが有意に増し, 増殖能亢進がみられた. SP の拮抗剤である spantide の同時添加では, SP の単独添加でみられた有意な BrdU の取り込みはみられず, すなわち, SP の作用は spantide により抑制された. これらのことから, SP は角膜上皮細胞増殖能を促進する可能性が高いことが考えられ, また, Reid ら[2], 中村ら[5]の報告を十分支持し得るものと思われた.

今回の実験で計測された細胞伸展距離については, SP の添加により, その距離が増加したものの, 統計学的な有意差はなかった. 我々の検索した細胞伸展能は, 細胞移動能と細胞増殖能の双方を反映したものと考えられ, 細胞移動能に関する要因が結果に影響した可能性も考えられた.

Reid ら[2]および中村ら[5]はインスリン, CGRP, EGF などのホルモンおよび細胞外基質が, 角膜上皮細胞の増殖能や伸展能の増加に関して SP と深く関わり, また, その作用を助長するものと報告している. また, 西田ら[6]は SP の作用を助長するのは上記以外のインスリン様成長因子であると述べている. これらのホルモンおよび細胞外基質における SP への相乗効果については十分な解明はまだなされていない. 西田ら[6]は SP のアミノ酸配列上にインスリン様成長因子Ⅰの受容体を確認しており, その受容体を介してインスリン様成長因子ⅠがSP の作用を助長すると報告している. 今回, 我々が実験に用いた RCGM 培地には, インスリン, EGF の両者が含まれているため, インスリン, EGF 個々の SP への作用については検索し得なかった.

Cavanagh ら[7]は Ach を添加した培養家兎角膜上皮細胞で, [H^3]thymidine 取り込み, cyclic guanosine monophosphate(cGMP)が増加したと報告している. 家兎角膜上皮では Ach の受容体が確認されており[8][9], Cavanagh ら[7]のモデルでは, 受容体を介して Ach が家兎角膜上皮細胞に作用し, cGMP の増加および分裂能増加を促すものとしている. しかしながら, 今回の Ach 添加では, 10^{-4}, 10^{-6} M の濃度で, 培養家兎角膜上皮細胞の BrdU 陽性細

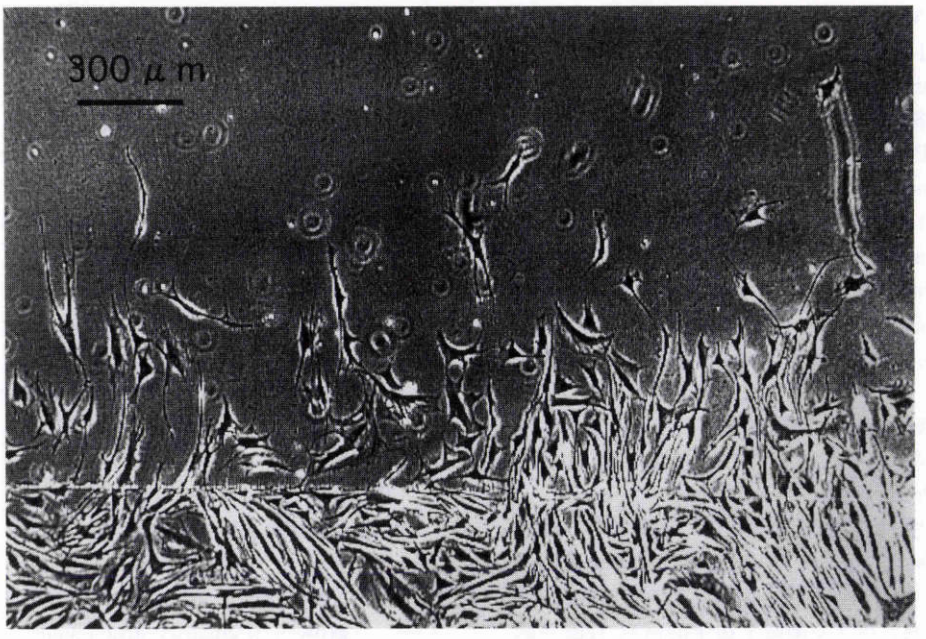

図7　SP添加2日後，家兎角膜実質細胞が除去部位から伸展した状態.
中央下部分の直線：カミソリによる除去部位，弱拡大

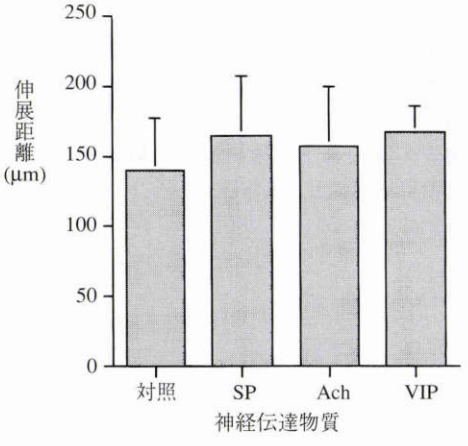

図8　除去部位から伸展した家兎角膜実質細胞伸展距離の比較.
n＝4

胞が増加していたものの，統計学的に有意な差はなく，Cavanagh ら[7]の結果と一致しなかった.

今回，VIP については，我々の知る限り，角膜への直接的な影響は報告されておらず，VIP を含む神経線維なども角膜では確認されていない[10]. 今回の結果でも VIP を添加した培養角膜上皮細胞，実質細胞で明らかな増殖能の変化はみられず，角膜への影響はないように思われた. しかし，近年 VIP は，SP とともに免疫能への関与が指摘されている[11]. さらに，VIP は前房中で，T リンパ球の反応を抑制するという報告[12]もある. 角膜の炎症性変化および潰瘍においても，VIP は SP とともに何らかの影響を及ぼしていることが考えられ，今後検索すべきものと思われる.

角膜実質細胞では，杉本ら[13]が培養ヒト角膜実質細胞に及ぼす影響について報告しており，明らかな SP の及ぼす影響は見出していない. また，現在のところ，SP，Ach および VIP に対する角膜実質細胞の受容体についても，その存在は確認されていない. *In vitro* における細胞休止期のヒト皮膚の線維芽細胞では，SP で増殖が刺激されることが報告[14]されている. また，ヒト皮膚の創傷治癒において，強い瘢痕組織では SP を始めとする種々の神経伝達物質がみられ，それらは線維性増殖および刺激症状の一因であるとする報告[15]もなされている. 角膜創傷治癒過程において，角膜実質細胞は線維芽細胞様となり，コラーゲン蛋白を始めとする細胞外基質を産生し，欠損部を修復していく[16][17]. その際，線維芽細胞様となった角膜実質細胞が皮膚線維芽細胞と類似した性質を持ち，SP の影響を受ける可能性を全く否定することはできない. よって，我々は敢えて角膜実質細胞についても検索を行った. しかしながら，今回の結果からは，SP，Ach および VIP による角膜実質細胞の細胞増殖能，伸展能への影響は確認できなかった. 我々は神経伝達物質とヒト角膜実質細胞のⅠ型コラーゲン産生能についても検索したが，現在のところ，両者の間で明らかな関連性は見出しておらず，神経伝達物質と線維性増殖との関連性についても確認していない.

文　献

1) **木下　茂**：神経麻痺性角膜炎. 佐々木かおる(編)：眼科 new insight 5. 角膜疾患の細胞生物学. メジカルビュー，東京，54—64，1995.

2) **Reid TW, Murphy CJ, Iwahashi CK, Foster BA, Mannis MJ**: Stimulation of epithelial cell growth by the neuropeptide substance P. J Cell Biochem 52：476—485, 1993.
3) **Gallar J, Pozo MA, Rebollo I, Belmonte C**: Effects of capsaicin on corneal wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1968—1974, 1990.
4) **Denis P, Fardin V, Norman JP, Elena PP, Laroche L, Saraux H,** et al: Localization and characterization of substance P binding sites in rat and rabbit eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 1894—1902, 1991.
5) **中村雅胤, 西田輝夫, 大鳥利文**：上皮創傷治癒における神経伝達物質(サブスタンスP)の役割. Prog Med 13: 2626—2627, 1993.
6) **西田輝夫, 中村雅胤, 近間泰一郎, 大藤圭子, 長野敬, 田中俊朗, 他**：第101回日本眼科学会総会宿題報告II. 眼の細胞生物学. 神経麻痺性角膜症. 角膜知覚の臨床的意義に関する細胞生物学的研究. 日眼会誌 101: 948—974, 1997.
7) **Cavanagh HD, Colley AM**: The molecular basis of neurotrophic keratitis. Acta Ophthalmol 67 (Suppl 92): 115—134, 1989.
8) **Lind GJ, Cavanagh HD**: Nuclear muscarinic acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 2943—2953, 1993.
9) **Lind GJ, Cavanagh HD**: Identification and subcellular distribution of muscarinic acetylcholine receptor-related proteins in rabbit corneal and Chinese hamster ovary cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 1492—1507, 1995.
10) **Uddman R, Alumets J, Ehinger B, Hakanson R, Loren I, Sundler F**: Vasoactive intestinal peptide nerves in ocular and orbital structures of the cat. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 878—885, 1980.
11) **Fergason TA, Frecher S, Herndon J, Griffith TS**: Neuropeptides modulate immune deviation induced via the anterior chamber of the eye. J Immunol 154: 1746—1756, 1995.
12) **Taylor AW, Streilein JW, Cousins SW**: Immunoreactive vasoactive intestinal peptide contributes to the immunosuppressive activity of normal aqueous humor. J Immunol 153: 1080—1086, 1994.
13) **杉本 学, 松尾俊彦, 松尾信彦**：培養ヒト角膜実質細胞に対するsubstance Pの影響. 眼紀 43:843—846, 1992.
14) **Kähler CM, Herold M, Wiedermann CJ**: Substance P: A competence factor for human fibroblast proliferation that induces the release of growth-regulatory arachidonic acid metabolites. J Cell Physiol 156: 579—587, 1993.
15) **Crowe R, Parkhouse N, McGrouther D, Burnstock G**: Neuropeptide-containing nerves in painful hypertrophic human scar tissue. Br J Dermatol 130: 444—452, 1994.
16) **木下 茂**：創傷治癒における細胞増殖と分化. 片上千加子(編)：眼科new insight 5. 角膜疾患の細胞生物学. メジカルビュー, 東京, 86—97, 1995.
17) **藤沢久美子, 片上千加子, 山本 節**：角膜アルカリ外傷治癒過程におけるkeratocyteの動態について. 日眼会誌 95: 59—66, 1991.