

サブスタンス P とインスリン様成長因子-1 の相互作用による 家兎角膜上皮細胞増殖能に及ぼす影響

原 ルミ子¹⁾, 片上千加子²⁾, 山本 節²⁾

¹⁾新日鐵広畑病院眼科, ²⁾神戸大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：神経麻痺性角膜症の発症に関与するとされるサブスタンス P (SP) の角膜上皮細胞に対する作用を解明するために, insulin like growth factor-1 (IGF-1) との相互作用による角膜上皮細胞増殖能に及ぼす影響を *in vivo*, *in vitro* 実験系で検討した。

方 法：*In vivo* 実験では, 家兎角膜に上皮欠損を作製し, SP, IGF-1 をそれぞれ単独あるいは併用して点眼し, その創傷治癒経過を比較検討した。また, 48 時間後に強角膜片を摘出し, ³H-チミジンで標識後オートラジオグラフィに供した。*In vitro* 実験では, 家兎角膜上皮細胞を SP を含む培養液で IGF-1 添加, 非添加のもと培養し, ³H-チミジンオートラジオグラフィに供した。

結 果：*In vivo* 実験では, SP と IGF-1 の両者を点

眼した群では, 角膜上皮欠損の治癒が促進された。³H-チミジンオートラジオグラフィにおいては, いずれの実験においても, SP 単独あるいは IGF-1 単独では対照群と比較して角膜上皮細胞増殖能促進作用はなかったが, 両者の併用により有意に角膜上皮細胞増殖能が促進された。

結 論：SP と IGF-1 の併用は角膜上皮細胞の増殖能を促進し, 創傷治癒を促進することが明らかとなった。
(日眼会誌 103 : 641—646, 1999)

キーワード：サブスタンス P, IGF-1, 角膜上皮細胞増殖能, 神経麻痺性角膜症, 角膜上皮創傷治癒

The Effect of Substance P with Insulin-like Growth Factor-1 on Corneal Epithelial Cell Proliferation

Rumiko Hara¹⁾, Chikako Katakami²⁾ and Misao Yamamoto²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Sinnittetsu Hirohata Works Hospital

²⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University

Abstract

Purpose : To elucidate the pathogenesis of neuroparalytic keratopathy, we examined the effect of substance P (SP) on corneal epithelial cell proliferation in comparison with that of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) *in vivo* and *in vitro*.

Methods : In the *in vivo* study, the epithelium of rabbit cornea was removed mechanically and treated with eye drops containing SP, IGF-1, SP+IGF-1, or physiological saline as a control. Corneas were excised 48 hours after the removal of the epithelium, labeled with ³H-thymidine, and subjected to autoradiography. An *in vitro* study was also performed by culturing rabbit corneal epithelial cells in culture medium containing SP with or without IGF-1 and labeling cells with ³H-thymidine for a subsequent autoradiographic study.

Findings : In the *in vivo* study, SP in combination with IGF-1 enhanced the healing of rabbit corneal epithelial defect. ³H-thymidine autoradiography revealed that in both *in vivo* and *in vitro* studies, SP+IGF-1 stimulated corneal epithelial cell proliferation, but SP or IGF-1 alone did not.

Conclusion : These results indicate that SP enhances the stimulatory effect of IGF-1 on corneal epithelial cell proliferation and accelerates corneal epithelial healing. (J Jpn Ophthalmol Soc 103 : 641—646, 1999)

Key words : SP, IGF-1, Corneal epithelial cell proliferation, Neuroparalytic keratopathy, Corneal epithelial wound healing

別刷請求先：650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-2 神戸大学医学部眼科学教室 片上千加子

(平成 10 年 12 月 7 日受付, 平成 11 年 5 月 10 日改訂受理)

Reprint requests to: Chikako Katakami, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University, 7-5-2 Kusunoki-cho, chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan

(Received December 7, 1998 and accepted in revised form May 10, 1999)

I 緒 言

角膜は眼球の最外層に位置し、外界からの様々な刺激に常にさらされているが、角膜上皮障害が生じても周囲の角膜上皮細胞の伸展・増殖・分化によって通常は速やかに修復される^{1)~3)}。しかし、時に正常な創傷治癒機構が働かず、上皮欠損が遷延化し重篤な病態を来することがある。その一つとして、腫瘍、手術などにより三叉神経が障害されることによって起こる神経麻痺性角膜症が知られているが、その発症に神経伝達物質の一つであるサブスタンス P(SP)の関与が推測されている。

SPは11個のアミノ酸から成るペプチドであり⁴⁾⁵⁾、平滑筋細胞、線維芽細胞、内皮細胞の増殖を促進することが報告⁶⁾⁷⁾されている。しかし、角膜上皮細胞に対する作用については明らかにされていない。近年、SPが細胞増殖促進因子の一つである insulin like growth factor-1 (IGF-1)との併用により角膜上皮の伸展を促進することが報告⁸⁾され、その作用が解明されつつあるが、角膜上皮細胞増殖能に及ぼす作用については未だ不明な点が多い。今回、我々はSPとIGF-1との併用により、SPの角膜上皮細胞増殖能に及ぼす作用を *in vivo*, *in vitro* 両実験系において検討したので報告する。

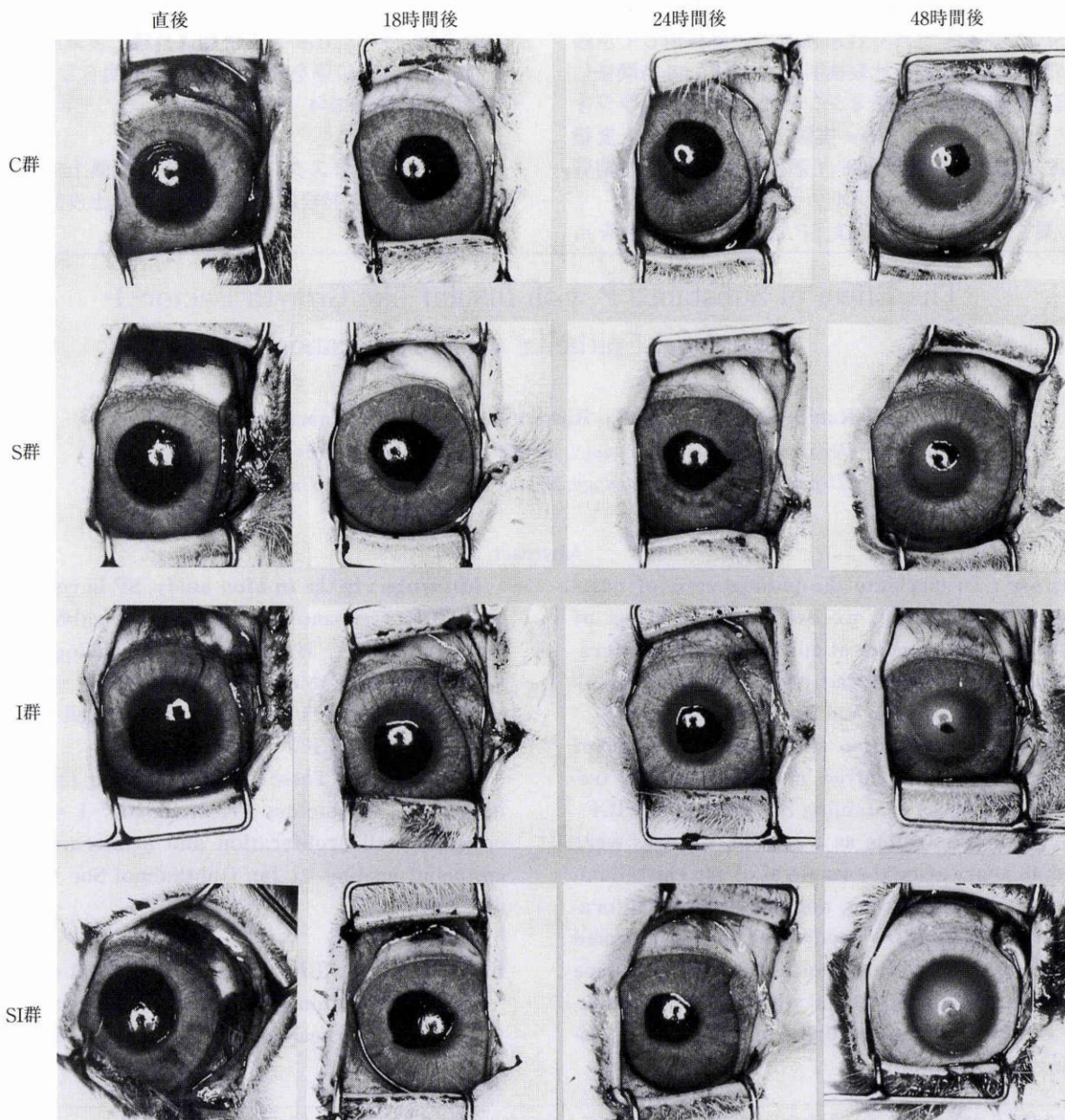


図1 家兎角膜上皮欠損治癒経過の前眼部写真。

家兎角膜上皮欠損を円鋸刀で作製し、生理食塩水(C群)、サブスタンス P(SP) (S群)、インスリン様成長因子 (IGF-1) (I群)、SP+IGF-1 (SI群)を各々1日6回点眼した。各群における角膜上皮欠損治癒経過を示す。24時間後以降 SI群において治癒が促進していた。

II 実験方法

1. *In vivo* 実験

実験には、成熟白色家兎 (Japanese White, 体重 2~3 kg) 8 匹 16 眼を用いた。実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」に従い行った。家兎は塩酸ケタミン (ケタラール®) の筋肉内注射による全身麻酔と 0.4% 塩酸オキシプロカイン (ペノキシール®, 参天製薬) による点眼麻酔を施した後、両眼角膜中央部に直径 6 mm の上皮欠損を円鋸刀 (フェザー替え刃メス No. 15) で機械的に作製した。家兎を 4 群に分け、角膜上皮欠損作製直後から 3 時間間隔で 1 日 6 回以下の点眼を行った。

S 群: SP (BACHEM 社) を 1mg/ml に生理食塩水で溶解したもの。

I 群: IGF-1 (BACHEM 社) を 10 µg/ml に生理食塩水で溶解したもの。

SI 群: SP および IGF-1 の両者。

C 群: 生理食塩水 (対照群)。

角膜上皮欠損作製直後、6, 18, 24, 30, 42, 48 時間後に上皮欠損部をメチレンブルーで染色し、前眼部写真撮影を行い、欠損面積を NIH-image で測定した。また、角膜上皮欠損作製 48 時間後に家兎をペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) の静脈内注射で致死させた後、眼球を摘出し、強角膜片を 10 µCi/ml の ³H-チミジン (Amersham, 100~130 Ci/mmol) を含む Dulbecco's minimum essential medium (DME, GIBCO) 中で、37℃ で 4 時間標識した。その後、10% ホルマリンで固定し、型のごとくパラフィン包埋後、強角膜切片を作製し、オートラジオグラフィに供した。すなわち、既報⁹⁾の方法に準じて暗室内で乳剤 (50% konica NR-M 2, コニカ) に浸した後に乾燥させ、シリカゲル入りの暗箱の中で 4℃ で 3 週間露出させた。露出後フジレンドール (富士フィルム) で 5 分間現像し、フジレンフィックス (富士フィルム) で 5 分間定着させ、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。光学顕微鏡下において角膜上皮細胞による ³H-チミジンの取り込みを観察した。一切片のすべての ³H-チミジン取り込み角膜上皮細胞数を計測し、上皮基底細胞数で補正した。

2. *In vitro* 実験

2 代目培養家兎角膜上皮細胞 (Corne Pack, クラボウ社製) を 16 穴チェンバースライド (Nalge Nunc International, Naperville, 米国) に 5.0×10^4 細胞/穴播種し、増殖用無血清液体培地 (RCGM) で 5 日間培養し、sub-confluent の状態となったところで培養液を増殖剤を含まない基礎培地 (RCBM) と交換し、24 時間さらに培養した。その後、SP を 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M 含んだ RCBM と変換し、IGF-1 (10 ng/ml) 添加、非添加のもと 24 時間培養し、³H-チミジン (10 µCi/ml) で 4 時間標識した後、カルノア固定液で 15 分間固定後、上述の方法に準じてオートラジオグ

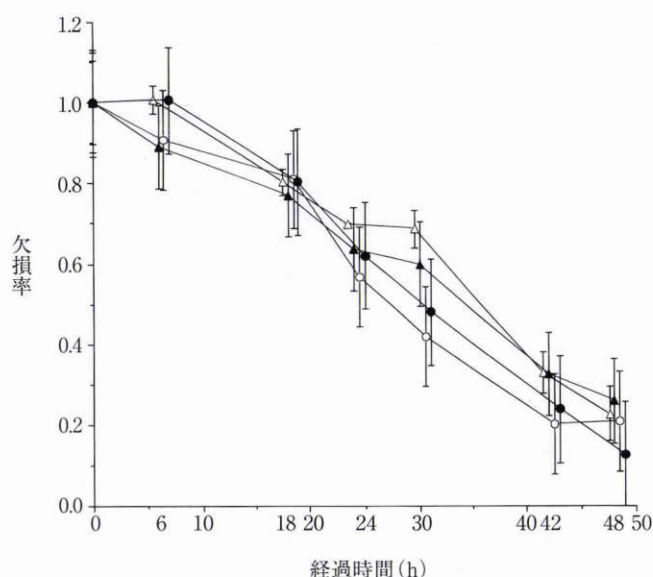


図 2 角膜上皮欠損治癒経過。

図 1 の写真を基に NIH-image を用いて上皮欠損面積を測定し、横軸には時間を、縦軸には角膜上皮欠損作製直後の面積を基準に各撮影時間における角膜上皮欠損面積をその比率で表した。平均値 ± 標準誤差 △: 生理食塩水 (C 群), ▲: SP (S 群), ○: IGF-1 (I 群), ●: SP+IGF-1 (SI 群) 点眼による経過を各々示す。

ラフィに供した。対照には、SP も IGF-1 も含まない RCBM のみで培養したものを用いた。HE 染色後、光学顕微鏡下で ³H-チミジンの取り込みを観察した。

なお、得られた結果は Fisher の説明 (PLSD) の多重比較検討を用いて、各群間あるいは対照群との間の有意性を検定した。

III 結果

1. *In vivo* 実験

1) 角膜上皮欠損治癒経過

上記 4 群の角膜上皮欠損治癒経過を図 1 に示す。角膜上皮欠損作製直後の欠損面積を基準に、その欠損率の経時的な変化を表したのが図 2 である。各群とも直線的に欠損面積が減少しており、角膜上皮欠損作製 18 時間後までは各群においてその創傷治癒にほとんど差がなかったが、24 時間以降 C, S 群に比し、I, SI 群において創傷治癒が促進され、48 時間後では SI 群は特に他群に比し創傷治癒が促進されていた。今回の実験では、個体数が少なかったため (n=4) 統計学的に検討は行わなかったが、いずれの実験においても特に SI 群の創傷が促進されている傾向にあった。

2) ³H-チミジンオートラジオグラフィ

³H-チミジンオートラジオグラフィの結果を図 3 に示す。これを各群 10 切片において 1 切片当たりのすべての ³H-チミジン取り込み角膜上皮細胞数および上皮基底細胞数を計測し、C 群の上皮基底細胞数を基準に各切片の ³H-チ

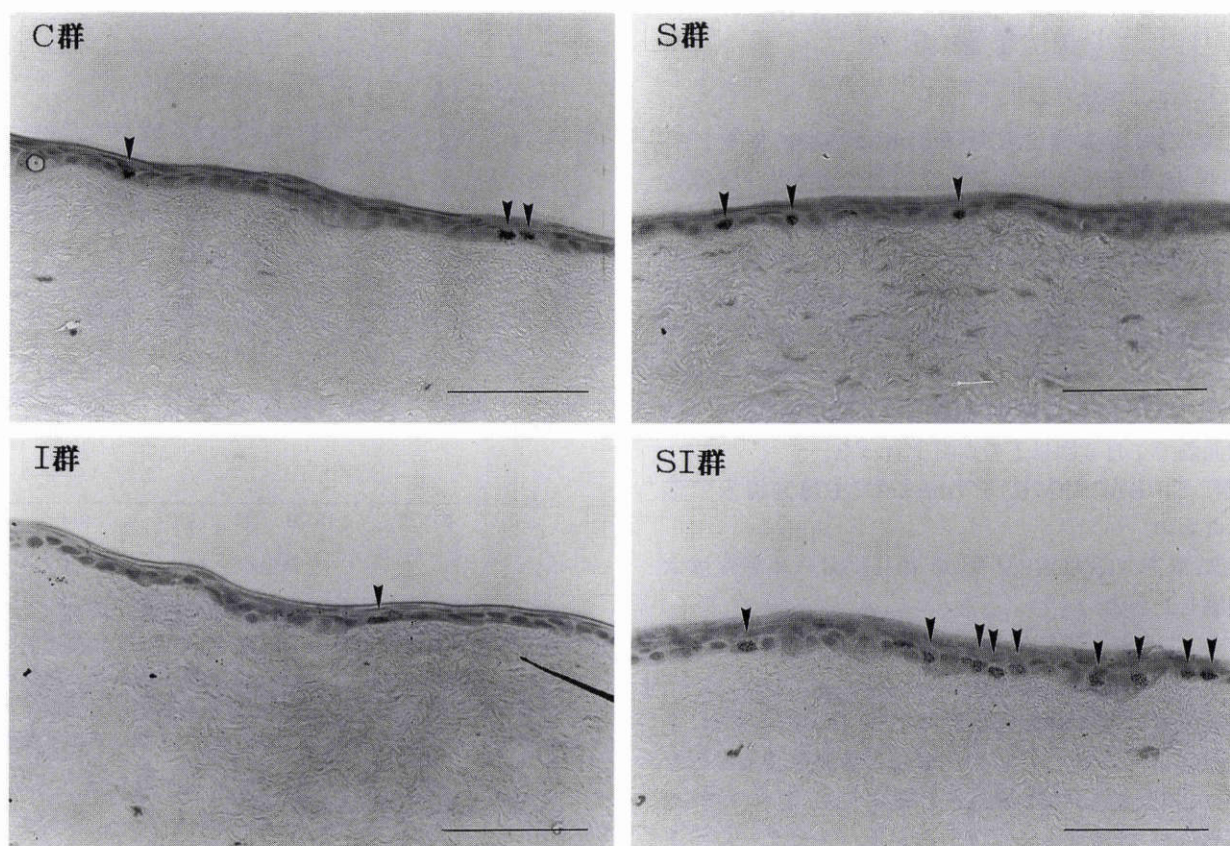


図3 ^3H -チミジンオートラジオグラフィ.

家兎角膜上皮欠損を円鋸刀で作製し,生理食塩水(C群),SP(S群),IGF-1(I群)またはSP+IGF-1(SI群)を1日6回点眼した.48時間後に摘出した強角膜片を ^3H -チミジンで標識し,オートラジオグラフィに供した.SI群において他群に比較して多数の ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞がみられる.▼は ^3H -チミジン取り込みを示す.バーは200 μm

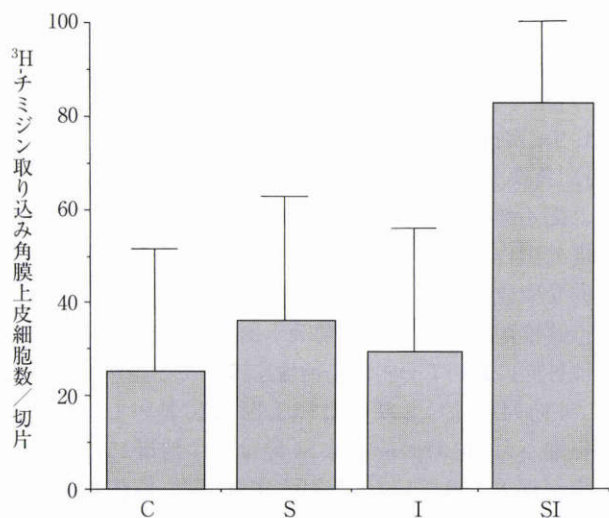


図4 ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数(*in vivo*実験).

各群各々10枚の ^3H -チミジンオートラジオグラフィの切片において ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数および上皮基底細胞数を計測し,C群の上皮基底細胞数を基準に各切片の ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数を補正し,平均値 $\pm$ 標準偏差を示した.SI群において他群に比し ^3H -チミジン取り込み上皮細胞数が有意に増加していた($p < 0.001$).

ミジン取り込み細胞数を補正後,その平均値を図4に表した.なお,各切片は角膜上皮欠損を含む部位で作製した. ^3H -チミジン取り込み細胞数はS群,I群ではC群と有意差はなかったが,SI群においては有意に増加していた($p < 0.001$).また, ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数は角膜上皮欠損周辺で多くみられる傾向にあった.

2. *In vitro* 実験

計10回の培養を行い,各培養実験において各群それぞれ無作為に選んだ4個の顕微鏡視野中の全細胞数に対する ^3H -チミジン取り込み細胞数の割合を計測し,対照群のそれを1とした比率を平均化したものを表1に示す.SP単独添加群においては,対照群と比較していずれの濃度においても有意な増加はなかった.IGF-1単独添加群においても対照と比較して有意な増加はなかった.SPとIGF-1との併用添加群では対照群と比較し,有意に取り込み細胞数が増加していた($p < 0.01$)が,SPの濃度による依存性はなかった.

IV 考 按

三叉神経障害に伴って角膜上皮障害を生じる神経麻痺性角膜炎の発症に,神経伝達物質の一つであるSPの関

表 1 ^3H -チミジン取り込み培養角膜上皮細胞数の比率 (*in vitro* 実験)

SP 濃度	0	10^{-7}M	10^{-6}M	10^{-5}M
IGF-1 非添加群	1	0.98 ± 0.37	1.20 ± 0.76	1.44 ± 0.57
IGF-1 添加群 (10 ng/ml)	1.11 ± 0.35	$2.33 \pm 0.68^*$	$2.25 \pm 0.45^*$	$2.71 \pm 0.17^*$

家兎角膜上皮細胞をチェンバースライド上で SP を含んだ培養液中で IGF-1 添加あるいは非添加のもと 24 時間培養し、 ^3H -チミジンで標識後、オートラジオグラフィに供した。各群の無作為に選んだ 4 個の顕微鏡視野中の全細胞数に対する ^3H -チミジン取り込み角膜上皮細胞数の割合を、対照群のそれを 1 とした比率を示す。

*：対照群に対し有意であった (Fischer の検定 $p < 0.01$)。

平均値 $\pm$ 標準偏差 SP：サブスタンス P, IGF-1：insulin like growth factor-1

与が推測されている。SP は tachykinin family の一つであり、11 個のアミノ酸から成るペプチドで⁴⁾⁵⁾、その作用については、平滑筋収縮作用、血管拡張作用、肥満細胞からのヒスタミン遊離作用などが報告^{10)~12)}されている。また、平滑筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞に対し増殖促進作用を有するとの報告⁶⁾⁷⁾もある。角膜においては、知覚神経である三叉神経が分布しており、角膜および虹彩には多くの SP 陽性線維が免疫染色により証明¹³⁾されていることから、神経麻痺性角膜症の発症に SP の関与が推測される。今回神経麻痺性角膜症の発症機序解明の一助とするため、SP の角膜上皮細胞増殖能に対する作用を *in vivo*, *in vitro* 両実験系で検討した。

まず、白色家兎を用いた *in vivo* 実験において、角膜上皮欠損の治癒は SP と IGF-1 の両者を点眼した群 (SI 群)において、他の群に比し有意に促進されていた。また、各群の治癒経過は、18 時間後までは各群に大差はなく、24 時間後からその創傷治癒速度に差がみられた。角膜上皮の創傷治癒は、細胞の伸展 (移動)・分裂 (増殖)、そして分化の 3 段階で行われており^{1)~3)}、分裂 (増殖)が活発になるのは 12~24 時間後とされている²⁾¹⁴⁾。今回の実験においてみられるように、上皮欠損作製後一定時間においてその群間の創傷治癒速度に差が生じ始めていることから、SI 群での治癒促進は増殖段階で起こっていることが推察される。そこで、各群における角膜上皮細胞増殖能を ^3H -チミジンオートラジオグラフィにより検討した。その結果、上皮欠損作製 48 時間後の角膜上皮細胞増殖能は、SP と IGF-1 を併用した SI 群において他の C 群、S 群、I 群に比較し有意に亢進していた。以上の結果から、SP は IGF-1 との相互作用により角膜上皮細胞増殖能を亢進させ、角膜上皮欠損の修復を促進することが明らかとなった。

次に、培養家兎角膜上皮細胞を用いた *in vitro* の系で、SP の角膜上皮細胞増殖能に対する作用を検討した結果、対照群や SP あるいは IGF-1 の単独添加群に比し、SP と IGF-1 の両者を添加した群において ^3H -チミジン取り込み細胞数の比率が増加していた。この結果から、*in vitro* の系でも SP は IGF-1 との相互作用により角膜上皮細胞の増殖を促進することが明らかとなった。

先に述べたように、SP そして他の神経伝達物質であるサブスタンス K は直接平滑筋細胞やヒトの皮膚線維芽細胞に作用し、その増殖を促進したり⁷⁾、あるいは SP が血中の T-リンパ球の増殖を促進するとの報告¹⁵⁾がある。SP の角膜上皮細胞増殖能に及ぼす作用については、教室の川上ら¹⁶⁾は神経麻痺性角膜症モデルであるカブサイシン投与ラットにおいて、角膜における SP の発現の減弱と角膜上皮細胞増殖能の低下をみたことから、SP の角膜上皮細胞増殖能への関与を推測した。Nakamura ら⁸⁾、Nishida ら¹⁷⁾は SP と IGF-1 との相互作用により角膜上皮の伸長を促進すると報告しているが、増殖能に対する作用については、器官培養において ^3H -チミジンの取り込みに影響を与えなかった¹⁷⁾としている。しかし、他の細胞に対して増殖能促進作用を有する SP が、角膜上皮細胞に対しては増殖能に影響を与えず、伸長のみを促進することには疑問が残る。今回の *in vivo*, *in vitro* 実験で明らかのように、SP は単独では角膜上皮細胞増殖促進作用を持たないが、細胞増殖因子の一つである IGF-1 との併用により、角膜上皮細胞増殖能を促進することが明らかとなった。その効果は、細胞に対する直接作用をみる *in vitro* 実験よりも種々の因子の関与も推察される *in vivo* 実験においてより顕著であったことから、SP と IGF-1 の角膜上皮細胞増殖能に対する促進作用は、角膜上皮細胞に対する直接的な作用ではなく、他の因子を介した間接的な作用であることが推測される。そのため、西田らの結果からもわかるように *in vitro* の実験系では SP と IGF-1 による角膜上皮細胞増殖促進作用は検出し難いのであろうと考えられる。西田らは SP と IGF-1 との相互作用により、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンを介して上皮の伸長を促進することを明らかにしている。同様に増殖に関しても何らかの他の因子を介した作用である可能性が推測されるが、その実態についてはさらなる研究が必要である。

今回の実験結果から、SP と IGF-1 との併用が角膜上皮創傷治癒を促進し、それは角膜上皮細胞の伸展のみならず増殖の促進によるものであることが明らかとなった。今後、この相乗効果の機序についてさらなる研究が必要であると考えられる。

文 献

- 1) **Nishida T, Nakamura M, Murakami J, Mishima H, Otori T** : Epidermal growth factor stimulates corneal epithelial cell attachment to fibronectin through a fibronectin receptor system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 : 2464—2469, 1992.
- 2) **Dua HS, Gomes JAP, Singh A** : Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 78 : 401—408, 1994.
- 3) **Ilene KG, Guy V** : Corneal epithelial wound healing. In : Nishida T (Ed) : Corneal Healing Responses to Injuries and Refractive Surgeries. Kugler, Hague, Netherlands, 1—9, 1998.
- 4) **von Euker US, Gaddum JH** : An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 72 : 74—87, 1931.
- 5) **Pernow B** : Substance P. *Pharmacol Rev* 35 : 85—141, 1983.
- 6) **Nilsson J, von Euler A, Dalsgaard CJ** : Stimulation of connective tissue growth by substance P and substance K. *Nature* 315 : 61—63, 1985.
- 7) **Tanaka T, Danno K, Ikai K, Imamura S** : Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 90 : 399—401, 1988.
- 8) **Nakamura M, Ofuji K, Chikama T, Nishida T** : The NK 1 receptor and its participation in the synergistic enhancement of corneal epithelial migration by substance P and insulin-like growth factor -1. *Br J Ophthalmol* 120 : 547—552, 1997.
- 9) **Katakami C, Sahori A, Kazusa R, Yamamoto M** : Keratocyte activity in wound healing after epikeratophakia in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : 1837—1845, 1991.
- 10) **Donald G, Payan MD** : Neuropeptide and inflammation. The role of substance P. *Annu Rev Med* 40 : 341—352, 1989.
- 11) **Burnstock G** : Autonomic neuroeffector junctions. Reflex vasodilatation of the skin. *J Invest Dermatol* 69 : 47—57, 1977.
- 12) **Hagermark O, Hokfelt T, Pernow B** : Flare and itch induced by substance P in human skin. *J Invest Dermatol* 71 : 233—235, 1978.
- 13) **Miller A, Costa M, Furness JB, Chubb IW** : Substance P immunoreactive sensory nerves supply the rat iris and cornea. *Neurosci Lett* 23 : 243—249, 1981.
- 14) **Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG** : Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. *Invest Ophthalmol* 15 : 4—14, 1976.
- 15) **Payan D, Brewster D, Goetzel E** : Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol* 131 : 1613—1615, 1983.
- 16) **川上淳子, 片上千加子, 山本 節** : カプサイシン投与ラットにおける角膜上皮の変化. *日眼会誌* 100 : 653—659, 1996.
- 17) **Nishida T, Nakamura M, Ofuji K, Ted WR, Mark JM, Christopher JM** : Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor -1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol* 169 : 159—166, 1996.