

## 角膜上皮細胞, 実質細胞のサブスタンス P 産生

渡部 通史<sup>1)</sup>, 中安 清夫<sup>2)</sup>, 岩津 稔<sup>2)</sup>, 金井 淳<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>佐久市立浅間総合病院眼科, <sup>2)</sup>順天堂大学医学部眼科学教室

### 要 約

**目 的** : 培養ヒト角膜上皮細胞, 培養ヒト角膜実質細胞について, 自らサブスタンス P (SP) を産生しているか否か, また, SP の受容体である neurokinin 1 受容体 (NK1R) が発現しているか否かを検索した。

**方 法** : 培養ヒト角膜上皮細胞, 実質細胞で, SP のメッセンジャー RNA (mRNA) 発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で検索した。また, 各々の細胞が SP を産生しているか否かを酵素免疫測定法 (ELISA) を用いて蛋白レベルで定量した。さらに, NK1R の mRNA 発現を RT-PCR で検索した。

**結 果** : SP の mRNA 発現および蛋白レベルでの SP の産生が培養ヒト角膜上皮細胞, 実質細胞で確認された。また, NK1R の mRNA も培養ヒト角膜上皮細胞, 実質細胞で発現していた。

**結 論** : 培養ヒト角膜上皮細胞, 実質細胞は自ら産生した SP をオートクラインもしくはパラクラインに作用させて各々の細胞の生物学的機能を制御している可能性がある。(日眼会誌 105 : 603-607, 2001)

**キーワード** : 角膜上皮細胞, 角膜実質細胞, サブスタンス P, RT-PCR, ELISA

## Endogenous Substance P in Corneal Epithelial Cells and Keratocytes

Michifumi Watanabe<sup>1)</sup>, Kiyoo Nakayasu<sup>2)</sup>, Minoru Iwatsu<sup>2)</sup> and Atsushi Kanai<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Eye Department of Asama Municipal Hospital

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

### Abstract

**Purpose** : To detect endogenous substance P (SP) and neurokinin receptor 1 (NK1R) in cultured human epithelial cells of the cornea (HE) and human keratocytes (HK).

**Method** : Messenger RNA (mRNA) expression of SP and endogenous SP in HE and HK were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). mRNA expression of NK1R in HE and HK was detected by RT-PCR.

**Results** : The mRNA expression of SP and endogenous SP were recognized in HE and HK. The mRNA of NK1R was also expressed in HE and HK.

**Conclusion** : It appears that endogenous SP regulates the biological functions of HE and HK in an autocrine or paracrine fashion. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 603-607, 2001)

**Key words** : Epithelial cells, Keratocytes, Substance P, RT-PCR, ELISA

### I 緒 言

角膜では, サブスタンス P (SP) を分泌する三叉神経終末が角膜上皮に分布している<sup>1)</sup>. 家兎角膜では *in vitro* および *in vivo* で SP が角膜上皮細胞の増殖能を刺激することが報告<sup>2)~5)</sup>され, 神経麻痺性角膜炎の原因の一つに三叉神経麻痺に伴う SP の枯渇が挙げられる<sup>1)~4)</sup>.

SP の受容体である neurokinin 1 受容体 (NK1R) について, 西田ら<sup>2)</sup>は insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

存在下の SP による家兎角膜上皮細胞の伸長促進作用で, NK1R が関与すると報告している。また, Araki ら<sup>6)</sup>は SV 40 アデノウイルスにより, 形質転換されたヒト角膜上皮細胞で NK1R のメッセンジャー RNA (mRNA) 発現を確認している。

近年, SP は神経組織以外の細胞でも産生され, さまざまな生理作用を有することが指摘されている<sup>7)~11)</sup>. しかし, 我々の知る限り, 角膜を構成する細胞が SP を自ら産生するか否かについての報告はない。そこで今回,

別刷請求先 : 113-8431 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 12 年 11 月 21 日受付, 平成 13 年 4 月 5 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 113-8431, Japan

(Received November 21, 2000 and accepted in revised form April 5, 2001)

我々はヒト角膜における SP の作用メカニズムを調べる目的で、培養ヒト角膜上皮細胞および実質細胞の SP 産生の可能性について検討し、また、SP 受容体である NK1R の有無についても検索したので報告する。

## II 方 法

### 1. 細胞培養

70 代の女性 2 例、男性 1 例の剖検眼から、角膜を遺族の承諾を得て使用した。

眼球の病理学的検索では、いずれの症例も白内障以外、特記すべき疾患はなかった。培養ヒト角膜上皮細胞は Allman ら<sup>12)</sup>の行った方法に従って樹立した。剖検眼の角膜周辺部を切り出し、それを 8 等分の角膜小片にした後、角膜小片を 60 mm 培養シャーレまたは 24 well 培養プレートに置き、10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM+10% FCS)で培養した。3 日間の培養により、角膜小片の周囲に角膜上皮細胞を out growth させた後、角膜小片を除去し、初代の培養ヒト角膜上皮細胞を得た。初代培養ヒト角膜上皮細胞をセミコンフルエントまで培養し、実験に使用した。

培養ヒト角膜実質細胞は Nakayasu ら<sup>13)</sup>の行った方法に従い樹立した。剖検眼角膜からカミソリ刃で角膜上皮を除去した後、培養ヒト角膜上皮細胞と同様に 8 つの角膜小片にして、60 mm 培養シャーレに置いて培養し、2 週間後に角膜小片の周囲に角膜実質細胞を増殖させた。実験には第 3~5 代の培養ヒト角膜実質細胞を使用した。

培養ヒト皮膚由来線維芽細胞は、Kiss ら<sup>14)</sup>の方法に従って樹立した。10×10 mm の切除皮膚片を本人、家族の承諾を得て、35 mm 培養シャーレに置き、DMEM+10% FCS で培養し、2 週間後に皮膚片の周囲に線維芽細胞を増殖させた。実験には第 3 代の培養ヒト皮膚由来線維芽細胞を使用した<sup>15)</sup>。

### 2. 細胞からのリボ核酸(RNA)抽出、相補正デオキシリボ核酸(cDNA)合成

細胞からの RNA 抽出は Ho ら<sup>11)</sup>の方法に従い、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC)法で行った。培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞、ヒト皮膚由来線維芽細胞の各細胞を DMEM+10% FCS でセミコンフルエントまで培養し、抽出液(TRIZOL®, BRL 社)を加えることにより、RNA を抽出した。RNA 抽出後の細胞を 12,000 g/15 分遠沈し、イソプロパノールで RNA を析出させた。析出 RNA を 75% エタノールで洗浄した後、diethyl pyro carbonate(DEPC)処理水を 50  $\mu$ l 加え、RNA を溶解させた。

cDNA 合成はオリゴ dT による reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)キット(SUPER-SCRIPT Preamplification System®, BRL 社)を使用した。また、合成反応は total RNA 2  $\mu$ g 分、オリゴ

dT 1  $\mu$ l(0.5  $\mu$ g)に DEPC 処理水を加えて 12  $\mu$ l にしたサンプル/オリゴ(dT)プライマー混合液を調整し、70°C で 10 分間インキュベートした。さらに、付属の 10×PCR バッファ-2  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 22  $\mu$ l, 10 mM dNTP ミックス 1  $\mu$ l, 0.1 M DTT 2  $\mu$ l を加えて 42°C で 5 分間インキュベートした後、付属の逆転写酵素(SUPERSCRIPT II®, BRL 社)を 1  $\mu$ l(200 U)加え、42°C で 50 分間インキュベートすることにより、cDNA を合成した。

### 3. SP の mRNA 検索

RT-PCR 法のための反応液は、cDNA 5  $\mu$ l, 0.1 mM dNTPmix 5  $\mu$ l, 10×PCR バッファ-5  $\mu$ l, 10 nM プライマー各々 2.5  $\mu$ l, Taq ポリメラーゼ 0.25  $\mu$ l(1.25 U)に超純水を加え、合計 50  $\mu$ l とした。

SP のプライマーとして、Ho ら<sup>11)</sup>の報告と同様の 5'-CGACAGCGACCAGATCAAGGAGG-3' (sense), 5'-TGCATTGCACTCCTTTCAT-3' (anti sense) の塩基配列のものを使用した。RT-PCR 法の反応条件は 45 サイクル、熱変性 94°C/1 分、アニーリング 60°C/1 分、伸長反応 72°C/1 分として行った。ただし、RT-PCR は培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞の cDNA について行った。RT-PCR 後の遺伝子増幅産物は 3% のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により分析した。PCR 反応には(PTC-150, Minicycler®, MJ Reserch 社)の遺伝子増幅装置を使用した。

### 4. 酵素免疫測定法(ELISA)による SP の定量

ELISA による培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞が産生する SP の蛋白レベルでの定量は市販のキット(Substance P Enzyme Immunoassay Kit®, Cayman 社)を使用し、Ho ら<sup>11)</sup>の方法に従って行った。また、測定は n=3 として行った。培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞を 24 well 培養プレートにセミコンフルエントまで培養した後、培地を無血清の DMEM に交換し、24 時間培養した。24 時間後、培養上清液を採取し、そのうち 50  $\mu$ l をウサギ抗 SP 抗体および SP と競合してウサギ抗 SP 抗体と結合する標識抗原のアセチルコリンエステラーゼ分子(SP tracer)とともに、96 well マイクロプレートで 4°C、24 時間反応させた。24 時間後、未反応の培養上清および抗体を洗浄し、発色基質を加え、常温、遮光下で 2 時間反応させた。反応後、マイクロプレートリーダー(Model 450®, Bio-Rad 社)を使用し、420 nm で吸光度を測定し、ウサギ抗 SP 抗体と結合した SP tracer 量を測定した。一定量添加されたウサギ抗 SP 抗体および SP tracer から、SP tracer と競合してウサギ抗 SP 抗体と結合した培養上清中の SP 量を求めた。

### 5. NK1R および G3PDH の mRNA 検索

方法 3 と同様に反応液を調整後、反応条件を 50 サイクル、熱変性 94°C/1 分、アニーリング 50°C/1 分、伸長反応 72°C/1 分として RT-PCR を行った。NK1R のプ

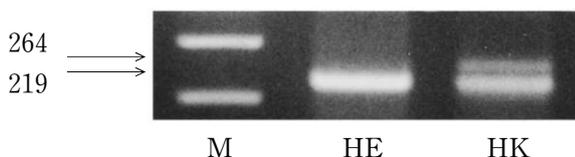


図 1 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) によるサブスタンス P (SP) のメッセージ RNA (mRNA) 検索。

SP の mRNA 発現を検索するプライマーを使用し、RT-PCR を行った結果、培養ヒト角膜上皮細胞 (HE) では 219、培養ヒト角膜実質細胞 (HK) では 219 および 264 の塩基対分子量に一致した DNA バンドが確認された。

HE: 培養ヒト角膜上皮細胞, HK: 培養ヒト角膜実質細胞, M: DNA マーカー

プライマーは、5'-GGTGATTGGCTATGCATACACC-3' (sense), 5'-TGACGGAACCTGTCATTGAGG-3' (anti sense) の塩基配列で、Hiramoto ら<sup>16)</sup>が確認したものを使用した。RT-PCR は培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞、ヒト皮膚由来線維芽細胞の cDNA について行った。

各細胞とも対照として、G3PDH についても polymerase chain reaction (PCR) を行った。使用したプライマーは 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (sense), 5'-TCCACCACCCTGTT-GCTGTA-3' (anti sense) で、反応条件は、25 サイクル、熱変性 94°C/1 分、アニーリング 60°C/1 分、伸長反応 72°C/1 分として行った。遺伝子増幅装置は方法 3 と同様のものを使用し、遺伝子増幅産物は 1% アガロースゲルで電気泳動し、方法 3 と同様に分析した。

### III 結 果

#### 1. SP の mRNA 発現

SP の mRNA 発現を検索するプライマーを使用し、RT-PCR を行った結果、SP の mRNA は目的とする 210、219、264 の 3 塩基対のうち、培養ヒト角膜上皮細胞では 219、実質細胞では 219 および 264 の塩基対分子量に一致した DNA バンドが確認された (図 1)。

#### 2. 培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞が産生した SP の定量

420 nm で吸光度測定し、SP 蛋白量を測定した結果、培養上清中の SP 量は培養ヒト角膜上皮細胞で  $9.9 \pm 0.9$  (平均値  $\pm$  標準偏差) pg/ml、実質細胞で  $6.4 \pm 2.6$  pg/ml であった (図 2)。

#### 3. NK1R および G3PDH の mRNA 発現

NK1R の mRNA を検索するプライマーを使用し、RT-PCR を行った結果、培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞とも目的とする 312 塩基対分子量に一致した DNA バンドが確認された (図 3 A)。また、ポジティブ対照として使用した培養ヒト皮膚由来線維芽細胞についても培

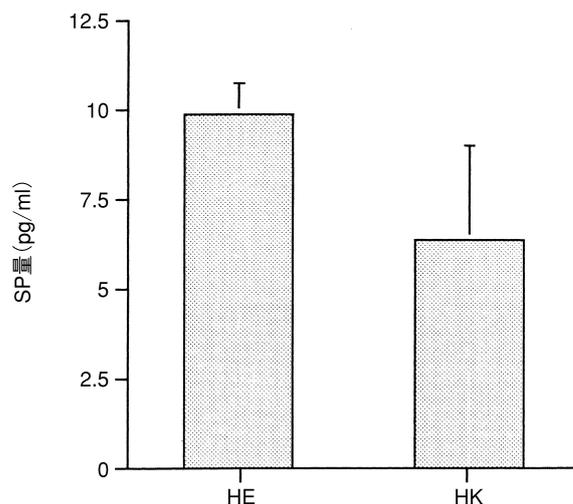


図 2 培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞が産生した SP の定量。

無血清のダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で 24 時間培養した後、培養上清を採取し、酵素免疫測定法 (ELISA) で培養上清中の SP を測定した。

HE: 培養ヒト角膜上皮細胞 (n=3), HK: 培養ヒト角膜実質細胞 (n=3)

養ヒト角膜実質細胞と同程度のバンドが確認された (図 3 A)。ただ、培養ヒト角膜上皮細胞のバンドは実質細胞に比べ、かなり弱いものであった (図 3 A)。

対照である G3PDH の mRNA は、培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞、ヒト皮膚由来線維芽細胞とも目的とする 432 塩基対の分子量に一致した DNA バンドが同程度にあり、発現を確認した (図 3 B)。

### IV 考 按

SP はニューロキニンの一つで神経ペプチドであり、知覚神経においては痛覚の神経伝達物質と考えられている<sup>1)</sup>。

また、SP は、軸索反射における末梢組織での血漿浸出、血管拡張、肥満細胞のヒスタミン遊離などを惹き起こす作用のあることも知られている<sup>17)~22)</sup>。眼科領域では角膜上皮細胞増殖刺激作用の他<sup>2)~5)</sup>、マウスでは vasoactive intestinal peptide とともに前房の免疫機能への関与が報告<sup>23)</sup>されている。

SP の前駆体遺伝子である preprotachykinin A (PPT-A) 遺伝子からは、splicing の結果、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 種類の mRNA が合成される<sup>24)25)</sup>。さらに、この 3 種類の mRNA のうち  $\beta$ 、 $\gamma$  の mRNA からは SP の他、サブスタンス K (SK) も生成されることが知られている<sup>24)25)</sup>。今回使用した SP の mRNA 検索のためのプライマー<sup>11)</sup>では、目的とする塩基対の大きさがそれぞれ  $\alpha$  が 210、 $\beta$  が 264、 $\gamma$  が 219 塩基対で、3 種類の mRNA 発現を検索できるものを使用した。その結果、培養ヒト角膜上皮細胞では  $\gamma$  mRNA、実質細胞では  $\beta$  および  $\gamma$  mRNA

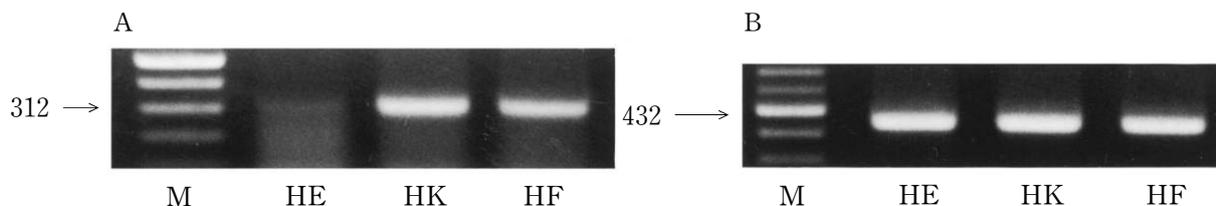


図3 RT-PCRによるNK1受容体(NK1R)およびG3PDHのmRNA発現。

A: NK1RのmRNAを検索するプライマーを使用し、RT-PCRを行った結果、HE、HKとも312塩基対分子量に一致したDNAバンドが確認された。  
 B: 対照であるG3PDHのmRNAは、培養ヒト角膜上皮細胞(HE)、実質細胞(HK)、培養ヒト皮膚由来線維芽細胞(HF)とも目的とする432塩基対の分子量に一致したDNAバンドが確認され、発現していた。  
 HE: 培養ヒト角膜上皮細胞, HK: 培養ヒト角膜実質細胞, HF: 培養ヒト皮膚由来線維芽細胞, M: DNAマーカー

Aが確認され、培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞ともSPの他SKも産生している可能性が推定された。しかし、SPのみを特異的に測定するELISAの結果から、培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞ともに少なくともSPを産生していることが確かめられた。

細胞が自ら産生したSPの特徴について、ヒト皮膚表皮細胞では、外的に添加されたSPにより、自ら産生するSP量も増えること、また、アドレナリン、アセチルコリン、calcitonin gene-related peptide(CGRP)、ヒスタミンの添加でもSPのmRNA合成が増大することが報告<sup>9)</sup>されている。さらに、ヒト皮膚表皮細胞およびリンパ球、単球、マクロファージでは、アトピー性皮膚炎および後天性免疫不全症候群(AIDS)と関連性があると推定されている<sup>9)~11)</sup>。今回の検索で、培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞がSPを産生することが確認された。しかし、この実験で用いられた材料はあくまで培養細胞であり、今後*in vivo*でも培養ヒト角膜上皮細胞、実質細胞が自らSPを産生しているのか否か、さらにはその生理的作用、角膜疾患との関わりについて検索していく必要があると思われた。

今回、SP受容体であるNK1RのmRNAが、培養ヒト角膜上皮細胞で検出され、SPの角膜上皮細胞への作用にNK1Rが介在していることが推定され、西田ら<sup>2)</sup>、Arakiら<sup>6)</sup>の結果を支持し得るものと思われた。また、培養ヒト角膜上皮細胞が自ら産生したSPもNK1Rが介在して、オートクラインまたはパラクラインに、角膜上皮の細胞機能に作用している可能性が考えられた。一方、我々の知る限りにおいて、培養ヒト角膜実質細胞がSPの影響を受けるとする報告はない。しかし、我々の実験で、NK1RのmRNA発現が培養ヒト角膜実質細胞で確認され、SPの影響を受けるものと推定された。ヒト皮膚線維芽細胞では、*in vitro*でNK1Rを介したSPによる増殖能刺激がすでに報告<sup>15)26)</sup>されており、角膜創傷治癒過程の角膜実質細胞は、線維芽細胞様にtransformするとの報告<sup>27)</sup>もされている。我々の知る限りでは、ヒト皮膚線維芽細胞がSPを産生するとの報告はな

いが、両細胞には何らかの共通性があるものと考えられる。今後、角膜創傷治癒過程でのSPの角膜実質細胞に及ぼす影響について、検索すべき余地があるものと思われた。また、培養ヒト角膜実質細胞によるSPの産生も確認されたことから、培養ヒト角膜上皮細胞同様、NK1Rを介してオートクライン、パラクラインに作用し、細胞機能を制御している可能性が推定された。

#### 文 献

- 1) 木下 茂: 神経麻痺性角膜炎. 佐々木かおり(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) 西田輝夫, 中村雅胤, 近間泰一郎, 大藤圭子, 長野 敬, 田中俊郎, 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.
- 3) 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.
- 4) 原 ルミ子, 片上千加子, 山本 節: 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. 日眼会誌 103: 641-646, 1999.
- 5) 渡部通史, 中安清夫, 金井 淳: 神経伝達物質の家兎角膜に及ぼす影響. 日眼会誌 103: 356-362, 1999.
- 6) Araki-Sasaki K, Aizawa S, Hiramoto M, Nakamura M, Iwase O, Nakata K, et al: Substance P-induced cadherin expression and its signal transduction in a cloned human corneal epithelial cell line. J Cell Physiol 182: 189-195, 2000.
- 7) Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R: Tachykinin(substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. Endocrinology 128: 2441-2448, 1991.
- 8) Linnik MD, Moskowitz MA: Identification of immunoreactive substance P in human and other

- mammalian endothelial cells. *Peptides* 10 : 957—962, 1989.
- 9) **Bae S, Matsunaga Y, Tanaka Y, Katayama I** : Autocrine induction of substance P mRNA and peptide in cultured normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 263 : 327—333, 1999.
  - 10) **Lai J-P, Douglas SD, Ho W-Z** : Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol* 86 : 80—86, 1998.
  - 11) **Ho W-Z, Lai J-P, Zhu X-H, Uvaydova M, Douglas SD** : Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* 159 : 5654—5660, 1997.
  - 12) **Allman MI, Harper RA, Yanoff M, Curfman LJ, Cameron JD, Flaxman BA** : Rabbit corneal epithelial cells grown *in vitro* without serum. *Invest Ophthalmol* 15 : 666—668, 1976.
  - 13) **Nakayasu K, Hayashi N, Okisaka S, Sato N** : Formation of capillary-like tubes by vascular endothelial cells cocultivated with keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 : 3050—3057, 1992.
  - 14) **Kiss M, Kemeny L, Gyulai R, Michel G, Husz S, Kovacs R, et al** : Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone on the IL-8/IL-8 receptor system in a cultured human keratinocyte cell line and dermal fibroblasts. *Inflammation* 23 : 557—567, 1999.
  - 15) **Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA** : NK 1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. *Br J Pharmacol* 100 : 11—14, 1990.
  - 16) **Hiramoto M, Aizawa S, Iwase O, Nakano M, Toyama K, Hoque M, et al** : Stimulatory effects of substance P on CD 34 positive cell proliferation and differentiation *in vitro* are mediated by the modulation of stromal cell function. *Int J Mol Med* 1 : 347—354, 1998.
  - 17) **Burnstock G** : Autonomic neuroeffector junctions : Reflex vasodilatation of the skin. *J Invest Dermatol* 69 : 47—57, 1977.
  - 18) **Pernow B** : Substance P. *Pharmacol Rev* 35 : 85—141, 1983.
  - 19) **Hägermark O, Hökfelt T, Pernow B** : Flare and itch induced by substance P in human skin. *J Invest Dermatol* 71 : 233—235, 1978.
  - 20) **Lembeck F, Holzer P** : Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 310 : 175—183, 1979.
  - 21) **Lembeck F, Donnerer J** : Postocclusive cutaneous vasodilatation mediated by substance P. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316 : 165—171, 1981 a.
  - 22) **Lembeck F, Donnerer J** : Time course of capsaicin-induced functional impairments in comparison with changes in neuronal substance P content. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316 : 240—243, 1981 b.
  - 23) **Ferguson TA, Fletcher S, Herndon J, Griffith TS** : Neuropeptides modulate immune deviation induced via the anterior chamber of the eye. *J Immunol* 155 : 1746—1756, 1995.
  - 24) **Nawa H, Kotani H, Nakanishi S** : Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNA from one gene by alternative RNA splicing. *Nature* 312 : 729—734, 1984.
  - 25) **Krause JE, Chirgwin JM, Carter MS, Xu ZS, Hershey AD** : Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 881—885, 1987.
  - 26) **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.
  - 27) **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.