

第 111 回 日本眼科学会総会 特別講演 I

角膜：その静と動

西田 輝夫

山口大学大学院医学系研究科眼科学教室

要 約

角膜の生理的機能は、外界の光を眼内に導入し水晶体とともに網膜に焦点を結ぶことと眼球の強度を維持することである。良好な視機能には、角膜の透明性と適切な屈折力を有する形状を常に保持することが不可欠である。角膜は、見かけ上静的な状態の組織であるが、角膜および角膜を取り巻く組織との間で、組織のレベル、細胞のレベルや分子のレベルで動的なプロセスが作動している。本稿では、角膜の恒常性(ホメオスターシス)を維持する機序と種々の角膜疾患に対する新しい治療法の開発について概説する。

1. 静的な角膜：角膜の生理的機能と構造

角膜は外胚葉由来であり、いわば透明な皮膚であるが、血管は存在せず、生体内で最も知覚の敏感な組織である。角膜表面は涙液により覆われ保湿され、また涙液、輪部係蹄血管や前房水から酸素の供給や生体活性物質による機能調節を受けている。角膜とその周辺組織との直接的あるいは間接的な相互作用により、角膜の機能と構造が調整され維持されている。角膜を構成する細胞(上皮細胞、線維芽細胞、内皮細胞)は、角膜を取り巻く環境(眼瞼結膜、球結膜、輪部係蹄血管、角膜輪部幹細胞、涙液、血管および前房水、三叉神経)や浸潤してきた種々の細胞(多核白血球、樹状細胞、好酸球など)とさまざまなレベルのネットワークを通じて相互に作動しており、活発な動的平衡の上に静的な角膜が維持されている。

2. 動的角膜：構造と機能を維持するネットワーク

近年のレーザー工学やコンピュータ科学の進歩により、角膜を構成する細胞やコラーゲン線維の状態を詳細に細胞のレベルで観察することが可能となってきた。さらに、細胞生物学や分子生物学の進歩により、細胞—細胞間あるいは細胞—細胞外マトリックス間の制御機構、さらにサイトカインなどの液性因子や神経由来の因子の役割が徐々に明らかにされてきた。透明性と形状保持という角膜の基本的な生理機能を維持するために、①細胞性ネットワーク、②細胞—細胞外マトリックス相関、③液性因子によるサイトカインネットワーク、④神経系因子による調節機構などのネットワークシステムが作

動している。

3. 角膜を巡るネットワークの破綻：遷延性角膜上皮欠損と角膜潰瘍

角膜に病変を認め視機能が低下しているとき、その所見が上皮、実質あるいは内皮にあるのかの判定は適切な診断と治療法を選択するためにきわめて重要である。しかし、角膜そのものに原因を求めても解決しない例をしばしば経験する。角膜疾患の原因や治療の標的を、角膜のみならず、角膜を取り巻く環境やネットワークに求めることも大切である。

上皮細胞間の接着機構の形成不全、基底膜の異常、涙液中サイトカインの偏倚、角膜知覚低下あるいは眼瞼結膜でのアレルギー反応などさまざまなネットワークの破綻により上皮の創傷治癒は遅延し遷延性角膜上皮欠損となる。一方、角膜上皮欠損や透過性亢進と角膜潰瘍は互いに悪循環の関係にあり、上皮という外界に対するバリアが破壊されると涙液や浸潤細胞からの炎症性サイトカインにより角膜線維芽細胞が活性化され、過剰なコラーゲンの分解により角膜潰瘍が生じる。

4. 角膜疾患治療薬の開発と臨床応用

基礎科学的な研究成果をもとに、現在治療に苦慮する角膜疾患の治療薬の開発と臨床応用を行ってきた。厚生労働省から承認を得るまでの過程は 20~30 年の単位であり、研究室から実際の臨床の場に至る製剤化の道はきわめて遠い。

1) 遷延性角膜上皮欠損治療薬の開発

角膜における遷延化した上皮欠損に対する自己血由来フィブロネクチン点眼療法の有用性を報告した。しかし、血液由来薬剤の内包する問題により製剤化はきわめて困難であり、近年、自己血由来フィブロネクチン点眼液自動作製装置を開発した。さらに将来の血液由来フィブロネクチンに変わる治療法の可能性を求めて、フィブロネクチン第二結合部位のペプチドである PHSRN の角膜上皮に対する作用を研究している。欠損部には urokinase-type plasminogen activator (u-PA) が発現し上皮細胞の移動を促進する。上皮細胞の u-PA 分泌を促進するアネクシン V による点眼療法の臨床試験が行われ

別刷請求先：755-8505 宇部市南小串 1-1-1 山口大学大学院医学系研究科眼科学教室 西田 輝夫
(平成 19 年 10 月 31 日受付, 平成 19 年 12 月 17 日改訂受理)

Reprint requests to: Teruo Nishida, M. D., D.Sc. Department of Ophthalmology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube-City, Yamaguchi 755-8505, Japan

(Received October 31, 2007 and accepted in revised form December 17, 2007)

ている。

2) 神経麻痺性角膜症治療薬の開発

知覚神経伝達物質であるサブスタンス P は、インスリン様成長因子 (IGF)-1 と共同して相乗的に角膜上皮の伸展移動を促進する。角膜知覚が低下している糖尿病角膜症や神経麻痺性角膜症での遷延性角膜上皮欠損に対する FGLM-アミド (サブスタンス P の C 末端の 4 個のアミノ酸配列) + SSSR (IGF-1 の C ドメインの 4 個のアミノ酸配列) 点眼療法の臨床研究と製剤開発を行っている。

3) 角膜潰瘍治療薬の開発

感染が抗微生物薬の投与で沈静化した後にも、角膜実質の融解である角膜潰瘍が進行し同時に角膜上皮欠損が遷延化する。角膜上皮欠損の修復のみならず角膜潰瘍を抑制する薬物を探索する目的で、コラーゲングル内で線維芽細胞を培養する実験系を開発し、トリプトライドが

副腎皮質ステロイド薬と同様にこれらのコラーゲン分解作用を抑制することを明らかにした。今後コラーゲン分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP) 阻害剤ではなく線維芽細胞に作動する潰瘍治療薬としての有用性が期待される。(日眼会誌 112: 179—213, 2008)

キーワード：角膜，角膜上皮細胞，角膜線維芽細胞，細胞間接着機構，tight junction，gap junction，サイトカイン，ケモカイン，成長因子，細胞外マトリックス，フィブロネクチン，インテグリン，創傷治癒，神経，角膜知覚，サブスタンス P，インスリン様成長因子-1，遷延性角膜上皮欠損，神経麻痺性角膜症，角膜潰瘍，緑膿菌，matrix metalloproteinase，トリプトライド

A Review

The Cornea : Stasis and Dynamics

Teruo Nishida

Department of Ophthalmology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

Abstract

The physiological roles of the cornea are to conduct external light into the eye, focus it, together with the lens, onto the retina, and to provide rigidity to the entire eyeball. Good vision thus requires maintenance of the transparency and proper refractive shape of the cornea. Although the cornea appears to be a relatively static structure, dynamic processes operate within and around the cornea at the tissue, cell, and molecular level. In this article, I review the mechanisms responsible for maintenance of corneal homeostasis as well as the development of new modes of treatment for various corneal diseases.

I. The static cornea : structure and physiological functions

The cornea is derived from ectoderm, so that it can be considered as transparent skin. It is devoid of blood vessels and manifests the highest sensitivity in the entire body. The surface of the cornea is covered by tear fluid, which serves both as a lubricant and as a conduit for regulatory molecules. The cornea is also supplied with oxygen and various nutrients by the aqueous humor and a loop vascular system in addition to tear fluid. The cornea interacts with its surrounding tissues directly as well as indirectly through tear fluid or aqueous humor, with such interactions playing an important role in the regulation of corneal structure and functions. The resident cells of the cornea—epithelial cells, fibroblasts (kera-

cytes), and endothelial cells—also engage in mutual interactions through network systems. These interactions as well as those with infiltrated cells and regulation by nerves contribute to the maintenance of the normal structure and functions of the cornea as well as to the repair of corneal injuries.

II. The dynamic cornea : maintenance of structure and functions by network systems

Developments in laser and computer technology have allowed observation of the cells and collagen fibers within the cornea. Furthermore, progress in cell and molecular biology has allowed characterization of dynamic network systems—including cell-cell and cell—extracellular matrix interactions as well as cytokines and neural factors—that contribute to the maintenance of corneal transparency and shape.

III. Disruption of network systems : persistent corneal epithelial defects and corneal ulcer

Selection of the appropriate treatment for pathologic lesions of the cornea and the accompanying decrease in visual acuity requires localization of the lesion with regard to the epithelium, stroma, or endothelium of the cornea. In certain instances, however, it is not possible to determine the cause of the problem within the cornea. In such cases, the cause of the pathologic lesion and the target for treatment may lie in the surrounding tissues or environment. For example, corneal epithelial wound

healing may be delayed, leading to the development of persistent epithelial defects, as a result of disruption of intercellular junctions between epithelial cells, an abnormality of the corneal basement membrane, altered concentrations of various cytokines in tear fluid, a lowered corneal sensation, or allergic reactions in the lid conjunctiva. Loss of corneal epithelial barrier function can further allow inflammatory cytokines present in tear fluid, together with infiltrated cells, to activate keratocytes and elicit excessive degradation of collagen in the stroma, thereby giving rise to corneal ulcer.

IV. Development of new drugs for corneal diseases

We have attempted to apply the results of basic scientific research to the development of new drugs for corneal diseases that remain difficult to treat. The process of authorization for new drugs from the Ministry of Health, Labor, and Welfare takes more than two decades, however. The path from the bench to clinical practice is thus a long one.

1. Development of eyedrops for treatment of persistent corneal epithelial defects

We demonstrated the clinical efficacy of fibronectin eyedrops for the treatment of persistent epithelial defects of the cornea. However, the possibility of blood-borne infections has interfered with the development of serum-derived fibronectin as a drug. An automated machine for the preparation of autologous fibronectin eyedrops has therefore recently been developed. Furthermore, in seeking an alternative to fibronectin eyedrops, we are investigating the effects of a peptide corresponding to the second cell-binding domain of fibronectin on corneal epithelial wound healing. Considering that urokinase-type plasminogen activator may be expressed at the site of corneal epithelial defects and facilitates epithelial migration, the potential clinical application of annexin V, which stimulates the secretion of urokinase-type plasminogen activator for the treatment of persistent corneal epithelial defects is also now under investigation in Japan.

2. Development of eyedrops for treatment of neurotrophic keratopathy

Substance P, a neurotransmitter, stimulates cor-

neal epithelial migration in a synergistic manner with insulin-like growth factor (IGF)—1. We have shown that eyedrops containing both the substance P—derived peptide FGLM-amide and the IGF-1—derived peptide SSSR are effective for the treatment of persistent corneal epithelial defects in individuals with diabetic keratopathy or neurotrophic keratopathy, both of which are associated with a reduction in corneal sensation.

3. Development of drugs for corneal ulcer

Treatment of corneal infection with antibiotics does not necessarily halt the process of corneal ulceration, which is characterized by excessive degradation of stromal collagen, or resolve persistent corneal epithelial defects. In addition to eyedrops for the treatment of persistent corneal epithelial defects, we have therefore also been working on the development of new drugs for the treatment of corneal ulcer. To this end, we have established an experimental system in which corneal fibroblasts are cultured in a three-dimensional collagen gel. With this system, we have shown that triptolide and steroids inhibit collagen degradation by corneal fibroblasts. Triptolide or its derivatives are thus potential drugs for the treatment of corneal ulcer and would work by acting directly on corneal fibroblasts rather than by inhibiting the secreted enzymes (matrix metalloproteinases) responsible for collagen degradation.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 179—213, 2008)

Key words : Cornea, Corneal epithelial cells, Corneal fibroblasts, Junctional apparatus, Tight junction, Gap junction, Cytokines, Chemokines, Growth factors, Extracellular matrix, Fibronectin, Integrins, Wound healing, Nerve, Corneal sensation, Substance P, Insulin-like growth factor-1, Persistent corneal epithelial defects, Neurotrophic keratopathy, Corneal ulcer, *Pseudomonas aeruginosa*, Matrix metalloproteinases, Triptolide

I 緒 言

夜行性動物であるラットを恒常的な暗所や明所で飼育すると、小腸でみられる消化酵素の概日リズムが消失するという報告が私の学位論文である¹⁾。生物のさまざまな生理機能の引き金として如何に光が大切かを学んだ。

外界の変化を感知し生体の機能を対応させていくことは、地球上の生物にとって生存のために必須の生体反応である。多くの生物種の中でもヒトは光感知器を脳と結びつけ、生体の恒常性の維持に対する基本的な信号とし、その後の高度な精神機能の発達へとつなげてきた。同時に、より精緻な像の焦点を光感知器である網膜に結

ぶための器官を必要とした。皮膚に由来する水晶体と角膜がこの役割を演じるようになった。

適切に外界の変化を認識し、光感知器である網膜を通じて脳内に的確な情報を送るためにも、角膜はその形状が大きく変化しないきわめて静的な状態を要求される組織である。角膜の生理的な機能は、①外界の光を眼内に導入すること、②網膜に焦点を結ぶこと、および③眼球全体の形態と強度を維持し外界からのさまざまな侵襲から守るためのバリアーであることなどである²⁾。したがって、角膜に要求されるのは、光を眼内に十分取り込むための透明性であり、同時に安定した適切な屈折力を有することである。これらの条件を満たすために、角膜は生体内の他の器官や組織と比してきわめてユニークな特徴を有している。角膜の構造は比較的単純であり、主たる構成細胞は上皮細胞、線維芽細胞および内皮細胞と神経細胞であり、実質はコラーゲン I 型やプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスから構成されている。正常な状態では角膜そのものには血管が存在しないが、角膜を取り巻く輪部には係蹄血管がきわめて豊富に存在している。角膜実質を構成するコラーゲン線維の直径とその配置は均一で、皮膚などで観察されるコラーゲン線維と異なり整然と配列されており、透明性の維持に大きく貢献している。また角膜は、生体内で最も知覚の敏感な組織であり、角膜には知覚神経の神経終末がきわめて密に分布している。また角膜は無血管組織であるが、その前面は涙液で後面は前房水で覆われており、これらの組織液から酸素、栄養素のみならず細胞の機能を調節するサイトカインなどの信号を受け取っている。

安定した視機能を維持するために、角膜は透明性や形状が激しく変動してはならない組織であるが、組織のレベル、細胞のレベルあるいは分子のレベルでさまざまなネットワークによる調節や制御を受け、きわめて活発な動的平衡の上に、この静的な角膜の形態と機能が維持されている。

本稿では、今まで我々が明らかにしてきた角膜の恒常性維持機構を概説し、遷延性角膜上皮欠損と角膜潰瘍に関して動的な平衡の破綻という観点から病態の考察を行い、さらにこれらの理解をもとに開発してきた新しい治療法について概説する。

II 静的な角膜：角膜の生理的機能と構造

角膜は眼球全体の屈折力の約 2/3 を担当し、屈折系として十分な外界の光を水晶体や網膜に導き、網膜面上に焦点を合わせることで重要な生理的機能を果たしている。屈折系としての角膜を考えると、その透明性とともに角膜の形状が大切である。角膜は、水平方向 11.7 mm、垂直方向 10.6 mm で、厚さは中心で 0.52 mm、周辺に向かってやや厚くなる。前面の曲率半径は 7.8 mm で 43 D の屈折力を有する。生体の他の指標に比較

して、角膜の形状の個人間のばらつきはきわめて少ないと考えられる。Gordon と Donzis によると、角膜曲率 (D) は生後徐々に変化し、10 歳頃に成人とほぼ同じ曲率となる³⁾。したがって、10 歳から 15 歳以降角膜の形状は大きく変化することはなく、きわめて安定した形状を示している。ヒトにとって環境の変化を認識するために最も大切な感覚である視覚情報を、どのような状況下でも安定して入手するためにも、このように角膜の形状が安定していることは合目的である。

一方、角膜の透明性は、端的には角膜実質のコラーゲン線維の配列に依存しているといえる⁴⁾。さらに後述のように角膜実質のコラーゲン配列は、コラーゲン線維間を充填するきわめて吸水性に富むプロテオグリカンの含水量に依存しており、この含水量を一定に保つためには、角膜上皮と角膜内皮でのバリアー機能と内皮細胞のポンプ機能が重要な役割を演じている⁵⁾。したがって、臨床的にも角膜上皮層が無傷で連続していることが必須であり、内皮細胞が十分な数と活性を有していることが基本である⁶⁾。

我々眼科医は、古くから主として細隙灯顕微鏡を用いて、角膜の状態を光学的切片として観察してきた⁷⁾(図 1A)。さらに鏡面反射を利用したスペキュラーマイクロスコープによる角膜内皮の観察⁸⁾⁹⁾、プラチドリリングの反射を利用することによって解析し角膜の表面形状を観察する videokeratography などが臨床の場で用いることができるようになり、角膜の形状を種々の係数で表現することにより、角膜疾患の理解に大きく貢献してきた。角膜の厚みも内皮細胞の機能を知る重要な指標であり、光学的に角膜の厚みを測定する機器が開発され¹⁰⁾¹¹⁾、その後超音波を用いての pachymetry へと発展した。

近年では、共焦点光学系を応用した共焦点生体顕微鏡が、臨床の現場で角膜の観察に用いられている^{12)~17)}。さらに光源にレーザー光を用いたレーザー共焦点生体顕微鏡が開発され、角膜各層で構成する細胞の状態をきわめて高解像度の画像として観察することが可能となってきた^{18)~20)}。

細隙灯顕微鏡は、幅の狭い光を角膜に投射することにより、角膜の断面を観察することができる。倍率の限界から細胞レベルでの観察は困難であるが、日常の臨床で観察する細隙灯顕微鏡の所見は、ちょうど組織切片で観察されるものと同じであり、組織切片像をイメージして細隙灯顕微鏡で観察することが、病態の理解にきわめて有用であると考えられる(図 1B)。一方、レーザー光を用いた共焦点生体顕微鏡は、角膜表面に対して平行な面で光学的切片を作製し観察できる(図 2)。角膜上皮では、最表層の細胞、翼細胞そして基底細胞が、それぞれ大きさの異なる細胞として区別して観察される。上皮下には無細胞層の基底膜あるいは Bowman 層が観察され、きわめて多数の細い神経線維叢の存在が観察される。このよ

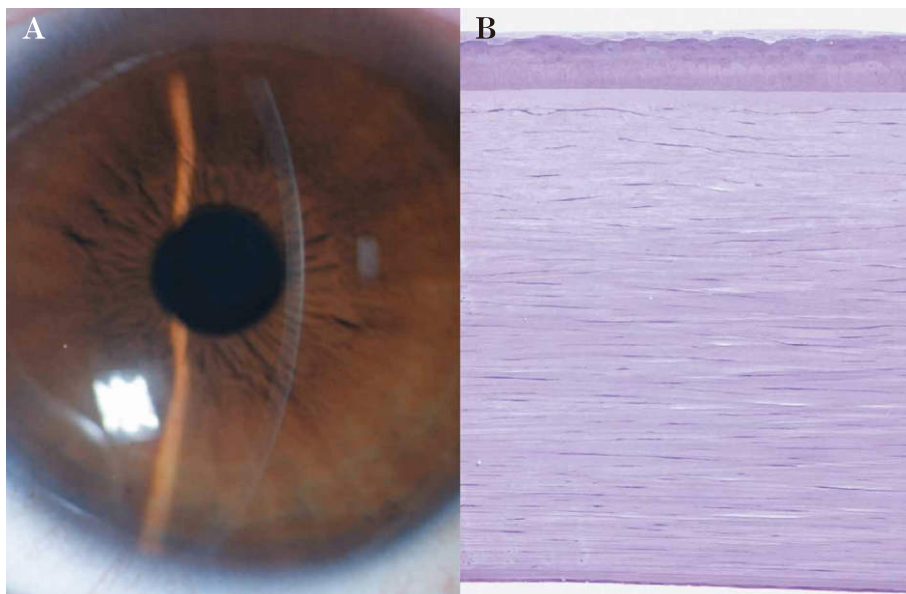


図 1 角膜。
A：細隙灯顕微鏡所見，
B：ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色。

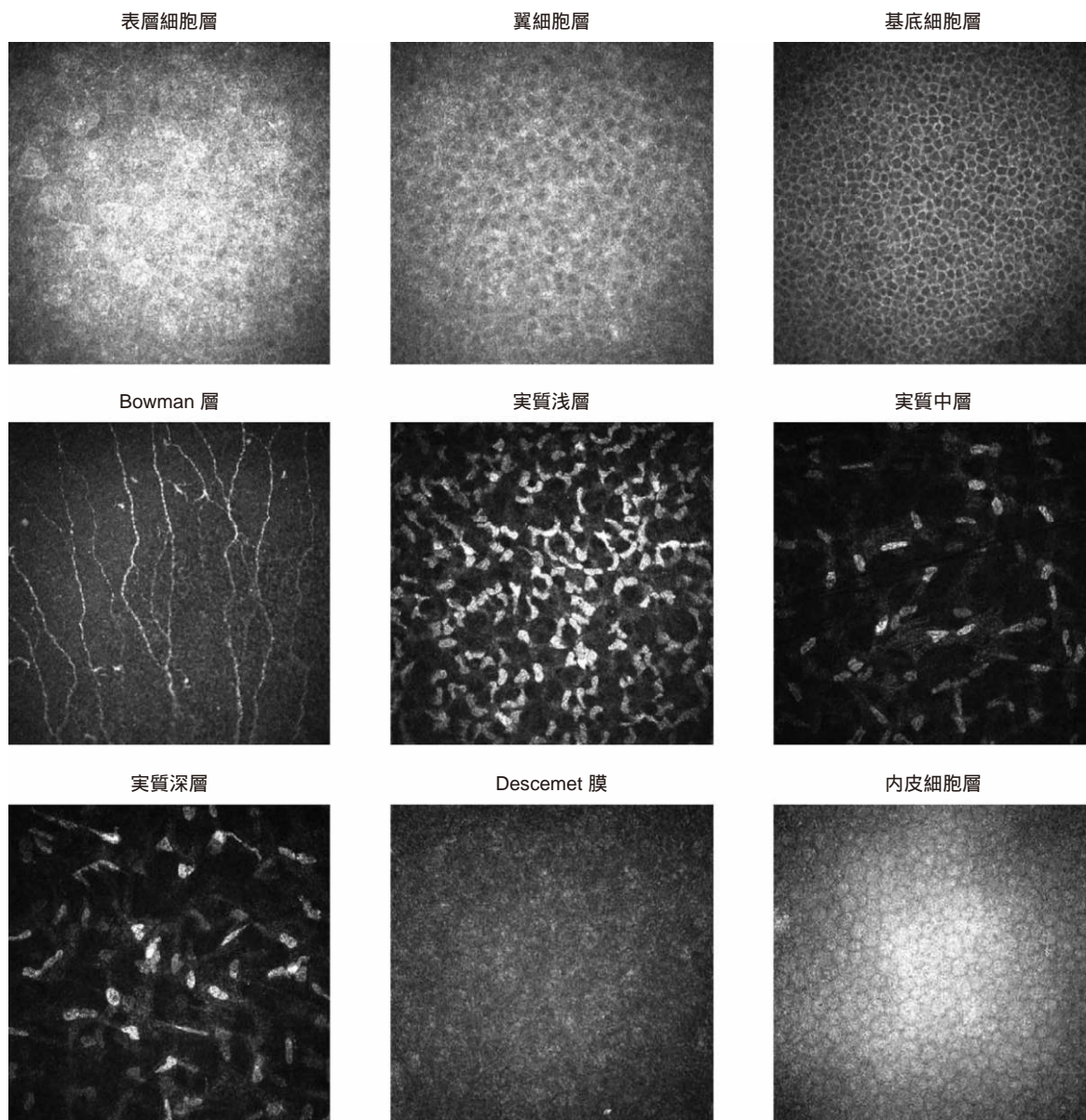


図 2 レーザー共焦点生体顕微鏡による角膜の観察像。

表 1 静的角膜(透明性と形状)を維持するネットワーク

組織レベルでの相互作用	細胞レベルでの相互作用	分子レベルでの相互作用
オキュラーサーフェス(結膜-涙液-角膜)ネットワーク	細胞間相互作用(上皮細胞, 線維芽細胞, 内皮細胞)	神経因子ネットワーク 成長因子ネットワーク
輪部幹細胞-角膜上皮	細胞外マトリックスとの相互作用(基底膜, 間質コラーゲン)	サイトカインネットワーク
知覚神経-角膜	浸潤細胞-固有(居住)細胞間相互作用	ケモカインネットワーク
係蹄血管-角膜		

うな神経線維叢は、断面として見る細隙灯顕微鏡では直接観察することはできなかった。さらに焦点を奥に合わせると角膜実質が観察される。角膜実質には、多くの線維芽細胞が多角形で互いに連結している。線維芽細胞の密度は、実質の浅層、中層および深層で異なっており、最も多くの細胞成分は浅層に観察される。実質の奥に、無細胞域の Descemet 膜があり、続いてスペキュラーマイクロスコピーでよく観察してきた六角形の均一な大きさの内皮細胞が観察される。

レーザー共焦点生体顕微鏡を用いることにより、組織切片を作製せずに *in vivo* の状態で角膜の各層での細胞の状態を直接観察することが可能となる (*in vivo histology*)²⁰。現在さまざまな臨床所見とレーザー共焦点生体顕微鏡での所見との相同性が報告されており、将来、我々が組織の変化のみならず、細胞の変化を考えて、角膜疾患の診断や治療法の選択を行う時代が近づいているのではと考える。今後の眼科臨床において、レーザー共焦点生体顕微鏡は、細隙灯顕微鏡とともにきわめて有用な角膜の所見や病態の情報を提示することが期待される。角膜は、biopsy を行うことが比較的困難な組織であり、従来から行われてきた組織を切除して固定後に観察するいわゆる病理学の所見が乏しい分野である。生体角膜での細胞レベルでの変化が観察でき従来の病理所見との相同性が確立されれば、レーザー共焦点生体顕微鏡での臨床観察は “*in vivo pathology*” といえる²¹。

III 動的角膜：構造と機能を維持するネットワーク

角膜の基本的な機能である透明性と形状を維持するために、角膜では組織、細胞あるいは分子のレベルでさまざまなネットワークが存在し機能している(表1)。角膜を中心としたオキュラーサーフェスの恒常性には、涙液を介して結膜からの信号が大切であり、アレルギー性結膜疾患では、細胞障害性のサイトカインや炎症性ケモカインが結膜を構成する細胞から産生されることにより、種々の角膜障害が生じる。輪部幹細胞 (limbal stem cells) は角膜上皮細胞の恒常性を維持するためには必須であり、その傷害や欠損は上皮障害の重大な原因となる。さらに組織レベルでは、知覚神経や血管と角膜との相互作用が大切である。一方、細胞レベルでは、角膜上

皮細胞同士の結合様式や線維芽細胞同士が形づくる網目状構造、また、細胞と基底膜あるいは間質コラーゲンなどの細胞外マトリックスとの相互作用に加え、病的な状態では、好酸球や好中球などの浸潤してきた細胞と角膜上皮細胞あるいは角膜実質固有の線維芽細胞との相互作用が病態の形成に動的に作動している。さらに、角膜ならびに角膜を取り巻く環境から分泌される神経由来の因子や、成長因子、サイトカインなどを介するネットワークが、分子のレベルで、角膜を構成する細胞の形態と機能を維持するために動的に作動している。

1. 上皮細胞間のネットワーク

角膜上皮は、角膜内では外界に直接接している唯一の細胞層である。5ないし6層の上皮細胞からなり、角膜全体の約10%の厚みを占めている。基底膜に接している基底細胞のみが増殖能を有するとされており、約1週間で翼細胞から最表層細胞へと分化しアポトーシスにより脱落していく(図3)。このように上皮細胞は基本的にきわめて早い細胞回転 (cell turnover) を繰り返している。上皮細胞は、いわば積極的な細胞死によって外界からの侵襲から角膜実質などを守っているといえる。角膜上皮層の生理的な機能は、角膜表面を平滑にし、微生物や化学的、機械的な侵襲から角膜全体を守ることであり、外界とのバリアーとしてきわめて重要な生理的機能を果たしている²²。したがって、角膜上皮の障害は、バリアーの破綻により外界からの侵襲が直接線維芽細胞に及び、細胞に大きな影響を与え細胞機能の偏倚が生じる。

角膜上皮の生理機能を考えるとき、上皮細胞間の接着機構が重要である(図4)。一般に細胞間の接着機構として、① adherens junctions, ② desmosome, ③ tight junctions, ④ gap junctions などが知られている。角膜上皮のバリアー機能にとって tight junctions が、また細胞間の情報交換を通じて機能を同期するために gap junctions が重要な役割を演じている。tight junctions の構成蛋白質である zonula occludens (ZO)-1 は、角膜上皮の最表層の細胞間に存在し、再構築した像でも上皮の表面の層に観察される。一方、細胞内の信号を伝達し、隣接する細胞の機能を同期させる結合様式である gap junctions を構成する connexin 43 の局在は、ZO-1 とは異なり、上皮基底細胞間に発現している。adherens jun-

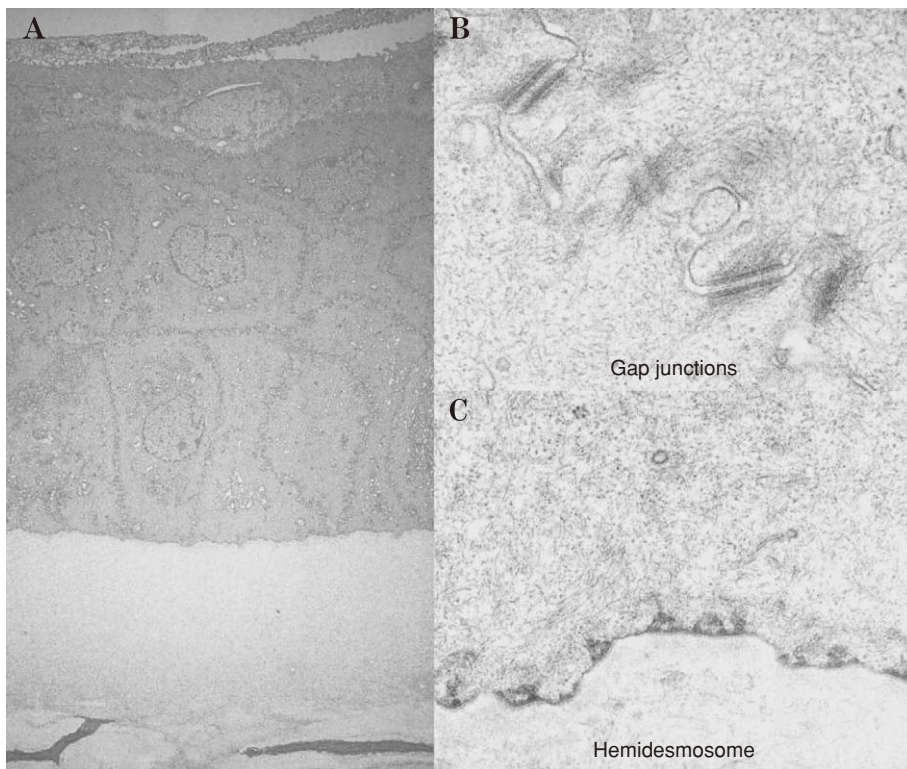


図 3 透過型電子顕微鏡による角膜の観察(ヒト).

A : 角膜上皮層,
B : Gap junctions の存在,
C : Hemidesmosomes の存在.

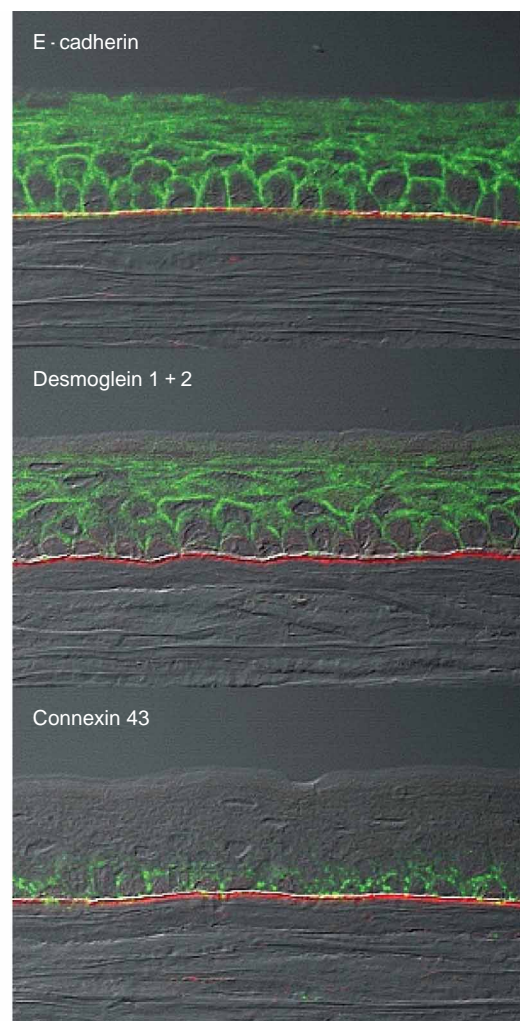
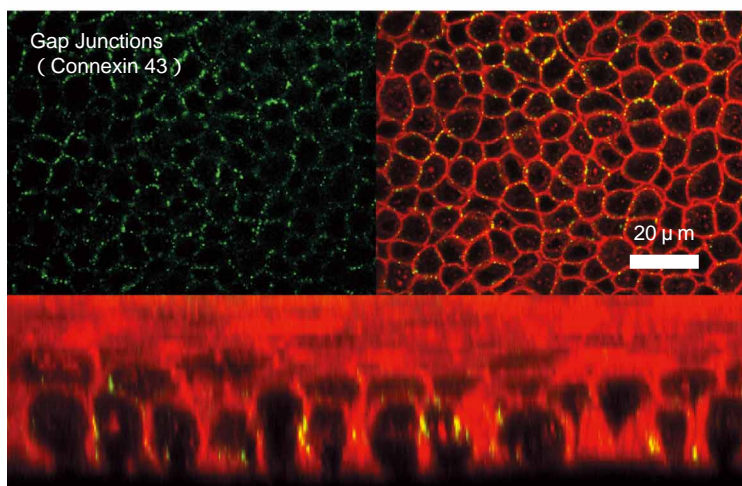
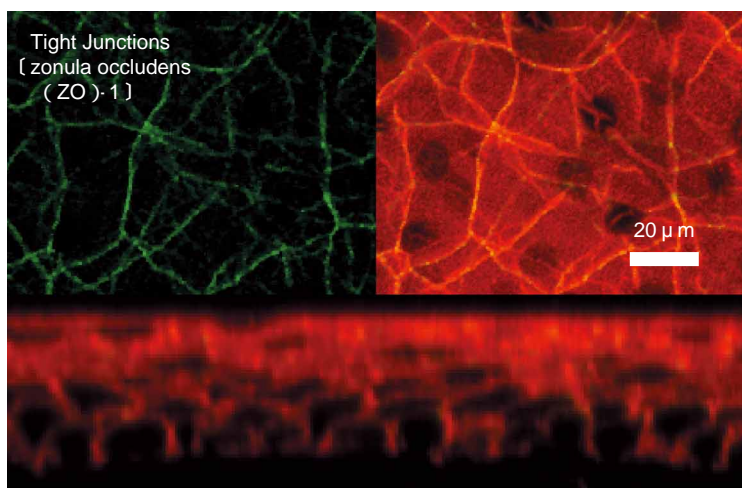


図 4 角膜上皮における細胞間接着機構の局在.

ctions である E-cadherin や desmosome の構成蛋白質である desmoglein 1+2 は、それぞれ角膜上皮全層に存在する。厚さ約 50 μm の角膜上皮であるが、このように表層細胞と基底細胞では異なる細胞間結合様式をとっており、基底細胞から分化するにつれ、角膜上皮はバリアーをより強固にしていくが、一方で、活発に増殖する基底細胞は、機能を同期するためにも、互いに連絡を取り合う gap junctions で結合している。ここに角膜上皮細胞間での一つの細胞性ネットワークをみることができる。

2. 角膜実質細胞間のネットワーク

角膜の透明性は角膜実質のコラーゲンの配列によって規定されていると言っても過言ではない。角膜実質は、角膜全体の厚みの 90% を占め、組織切片や透過型電子顕微鏡で観察すると、角膜線維芽細胞はきわめて密に充填したコラーゲン線維の中に散在している(図 5)。Otori は、角膜実質中の電解質を測定し、実質内での細胞成分はその容積の 2 ないし 3% であることを 1967 年に明らかにした²³⁾。したがって、角膜実質のほとんどは細胞外マトリックスが占めていると言っても過言ではない。

散在している線維芽細胞の長い突起の先端を注意深く観察すると、隣接する細胞突起と gap junction で結ばれている(図 5A)。実際 freeze fracture 法でも gap junction の存在が確認でき²⁴⁾(図 5B)、また gap junctions の構成蛋白質である connexin 43 を蛍光抗体法で染色すると、角膜線維芽細胞に点状に陽性所見が観察された(図 5C)。そこで、熱と塩酸で角膜実質のコラーゲンを溶解し、残った線維芽細胞を走査型電子顕微鏡で観察すると、角膜線維芽細胞は互いに突起を伸ばし、三次元の網目状構造を形成していることが明らかとなった²⁵⁾(図 5D)。正常角膜実質内に存在する角膜線維芽細胞の細胞分裂能やコラーゲン合成能はきわめて低く、ゆっくりした代謝回転で角膜実質の恒常性維持に関与している(resting corneal fibroblasts)。培養した角膜線維芽細胞は、gap junctions で結合しており、実際に dye coupling 法で一つの細胞に蛍光色素を注入すると、色素は周辺の細胞内に拡散する。炎症性サイトカインである tumor necrosis factor α (TNF- α) で刺激すると、gap junction を構成する connexin 43 の脱リン酸と分解の亢進により、dye coupling も低下する。このことは、角膜実質が何らかの傷害を受け炎症が生じると炎症性サイトカインにより、角膜線維芽細胞は活性化され、三次元の細胞性ネットワークから遊離して、突起の少ない球状の活性型角膜線維芽細胞(activated corneal fibroblasts)となることを示唆している²⁶⁾²⁷⁾(図 6)。細胞間の信号伝達に関与するサイトカインが、角膜線維芽細胞のコラーゲン代謝に対してどのような効果を示すかを培養した角膜線維芽細胞のコラーゲン合成および分解能を測定して検討した²⁸⁾。

角膜線維芽細胞によるコラーゲン合成は transforming growth factor β (TGF- β) とインスリン様成長因子(IGF)-1 が促進し、炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL)-1 や TNF- α はコラーゲン合成を阻害した。一方、コラーゲン分解は、IL-1 や TNF- α により促進する(表 2)。したがって、炎症性サイトカイン(IL-1 や TNF- α) は細胞外マトリックス破壊を促進させて細胞を活性化する方向に働き、TGF- β や IGF-1 などが細胞を沈静化する方向に働いていると考えられる。このように、角膜実質線維芽細胞は、細胞間結合で互いに細胞内の信号を同期させ、細胞を取り囲んでいるコラーゲンと相互に作用し合い、さらにサイトカインにより機能の制御を受け、コラーゲンの合成と分解に関して動的な平衡関係を維持して透明性を維持している。ここに角膜実質における細胞間、細胞—細胞外マトリックスおよびサイトカインのネットワークをみることができる。

3. 角膜と神経線維

角膜は生体内で最も知覚の敏感な組織である²⁹⁾。臨床的にも角膜上皮のわずかな傷害はきわめて強い疼痛を与える。角膜内に網目状に多くの神経線維が存在していることは、以前より報告がなされてきた^{30)~33)}。Neurofilaments に対する抗体を用いて神経線維を染色し、レーザー共焦点顕微鏡で観察し三次元で再構築すると(図 7A)、太い neurofilaments が角膜実質の中を横切り、角膜上皮に向かって徐々に細い線維を出し、上皮下や上皮内にきわめて細い神経線維を分布している。

角膜内の知覚神経は三叉神経に由来しており、また臨床的にも研究的にも、角膜への神経支配の傷害により、角膜の恒常性が破壊されることが古くから知られている^{34)~38)}。角膜内には知覚神経伝達物質であるサブスタンス P を含む神経線維が多数存在することが、1980 年代初頭に多くの施設から報告された^{39)~43)}。我が国でも、Shimizu らは、サブスタンス P の角膜や前眼部での局在について報告を行ってきた^{44)~46)}。一方、サブスタンス P の受容体である neurokinin (NK)-1 の角膜内での局在をサブスタンス P とともに観察すると、サブスタンス P 陽性神経線維が実質から角膜上皮に向けて存在しており、さらに角膜上皮基底細胞にもサブスタンス P 特異蛍光が観察された(図 7B)。NK-1 は線維芽細胞にも存在するが、角膜上皮細胞にきわめて豊富に存在していることが明らかとなり(図 7C)、知覚神経伝達物質であるサブスタンス P が、角膜上皮細胞や線維芽細胞の機能に大きな役割を果たしていることが予測される。ここに神経系による角膜を構成する細胞の機能を調節するネットワークがある。

4. 角膜と細胞外マトリックス

前述のように角膜には間質としてのコラーゲン以外にも基底膜を構成するさまざまな細胞外マトリックス蛋白質が存在している。角膜上皮細胞に特異的なマーカーで

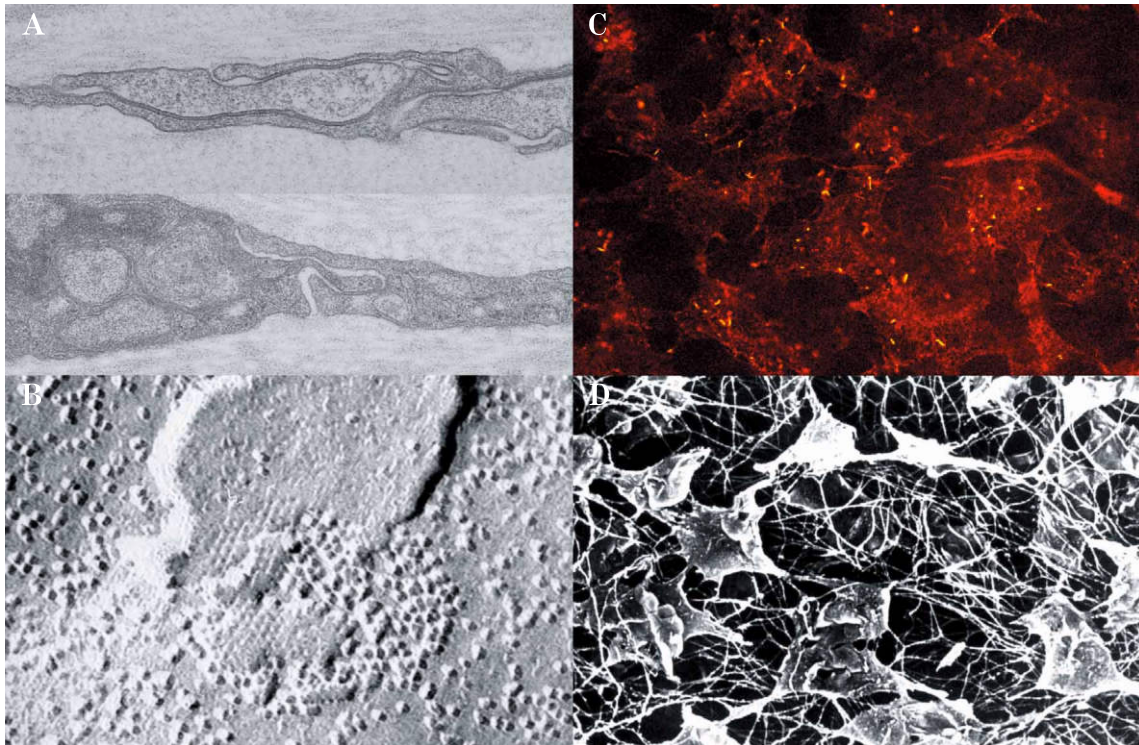


図 5 角膜実質内での線維芽細胞の結合様式と網目状構造.

A：透過型電子顕微鏡，B：Freeze fracture 法，C：蛍光抗体法(緑：connexin 43，赤：ファロイジン，マージ像)，D：走査型電子顕微鏡

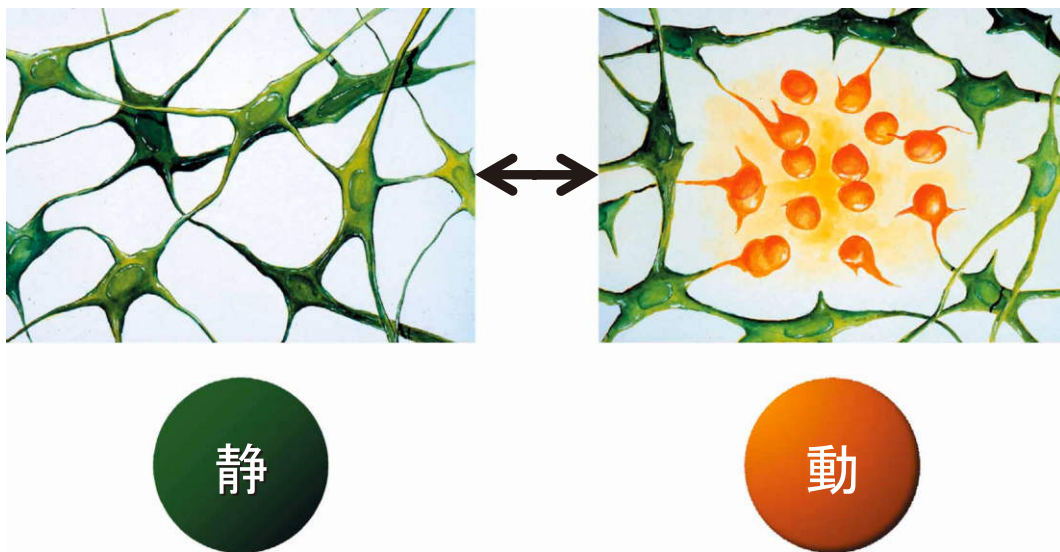


図 6 角膜実質線維芽細胞の遷移(文献 27 から転載).

あるケラチン 12 と，線維芽細胞のマーカーであるビメンチンで細胞成分を染色し，細胞外マトリックスの存在を蛍光抗体法で観察した．基底膜にはラミニニンやIV型コラーゲンが発現しており，角膜実質にはIV型コラーゲンに加え，I型コラーゲンやフィブロネクチンが発現している．角膜の透明性を維持するうえで，これらの細胞外マトリックスが角膜を構成する細胞の機能に積極的に作動していることが考えられる．

角膜上皮層の恒常性の維持には，基底膜が大きく貢献しているが，この点については後述する．一方，角膜実質に存在する実質細胞(線維芽細胞)の形態や機能も，細胞を取り囲む細胞外マトリックスであるコラーゲンの存在により制御されている．培養した角膜線維芽細胞を用いてコラーゲンの三次元ゲルの中で培養し，通常行われているプラスチック上での培養と，どのように形態が変化するかを検討した⁴⁷⁾．プラスチック上で培養すると

典型的な線維芽細胞の形態を示すが、コラーゲンゲル内で三次元的に培養すると、一つ一つの細胞が紡錘形になり長い突起を出す(図8)。このコラーゲンゲルによる実質線維芽細胞の形態への効果は可逆的で、ゲル内の細胞がプラスチック上に移動すると、rufflingを伴って扇状

に広がった先端をもつ細胞の形態に変化する。逆に大きく広がった細胞がコラーゲンゲル内に移動すると、細長い紡錘状の細胞へと形態を変化することが観察された。さらに角膜線維芽細胞をコラーゲンゲル内で培養すると、gap junctionsが発現することを透過型電子顕微鏡で観察できた。

角膜線維芽細胞をさまざまなコラーゲン濃度で培養すると、コラーゲン濃度が高くなるにつれ、線維芽細胞の増殖能は低下する(図9)。このことは角膜実質を構成するコラーゲンの状態により、角膜潰瘍などで細胞に対して相対的にコラーゲン濃度が低下すると線維芽細胞の増殖が活性化する我々の臨床的な経験とよく一致している。

角膜線維芽細胞の生理的機能は、コラーゲンやプロテオグリカンを合成するとともに、それらを分解したり実質内の異物を排除することである。角膜線維芽細胞は、生体内で貪食活性をもっている。従来、角膜実質内の異

表 2 角膜線維芽細胞のコラーゲン代謝に対するサイトカインの作用

サイトカイン	コラーゲン合成	コラーゲン分解
IL-1	阻害	亢進
IL-6	影響なし	影響なし
IL-8	影響なし	影響なし
TNF- α	阻害	亢進
TGF- β	亢進	影響なし
IGF-1	亢進	影響なし

IL: インターロイキン, TNF: tumor necrosis factor, TGF: transforming growth factor, IGF: インスリン様成長因子。
(文献 28 から転載, 改変)

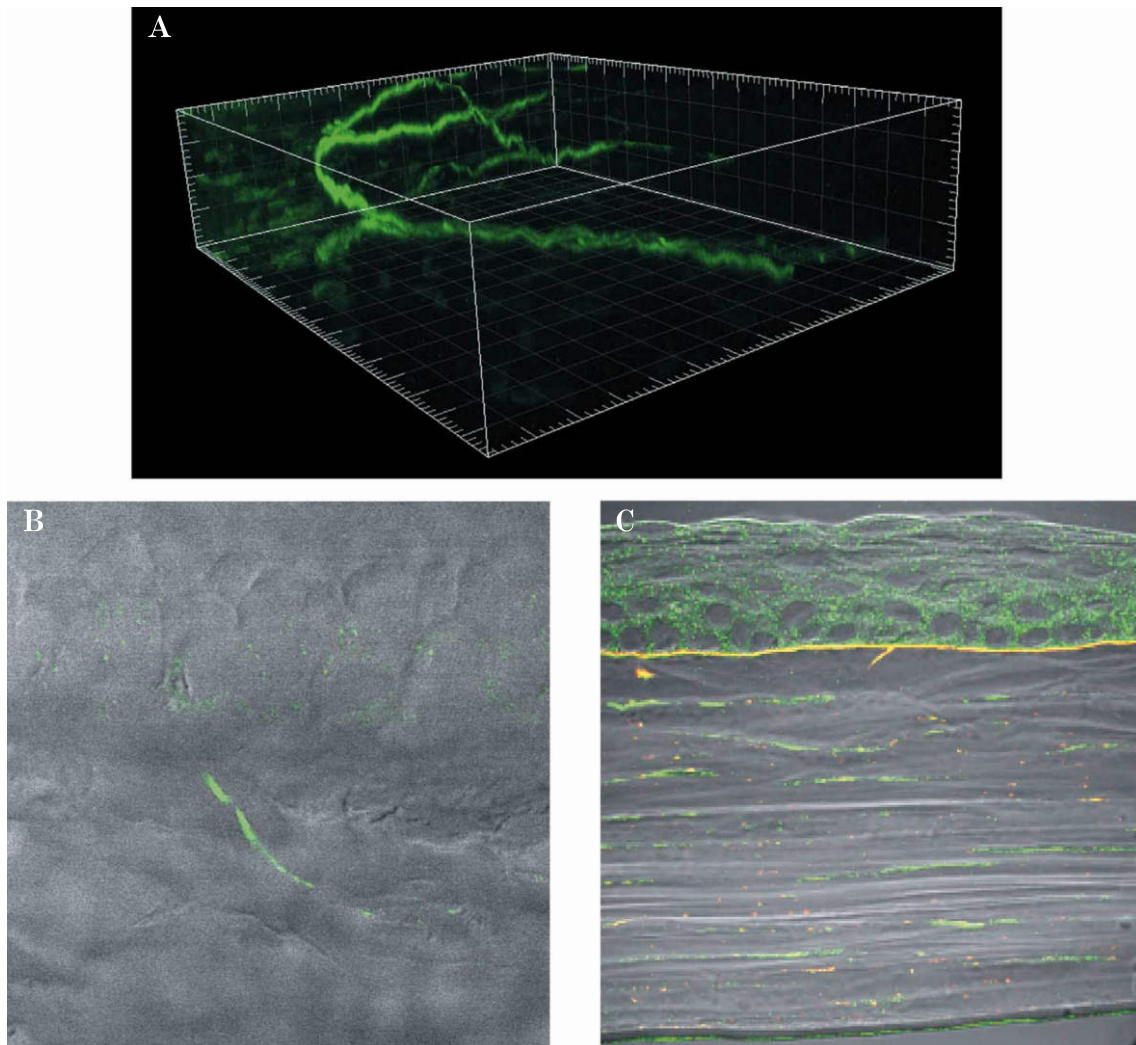


図 7 角膜での神経。

A: レーザー共焦点顕微鏡による神経線維の局在の観察(緑: 神経線維), 三次元再構築像, B: サブスタンス P 陽性神経線維, C: サブスタンス P 受容体(neurokinin 1; NK-1), (緑: NK-1, 赤: ラミニン, マージ像)。

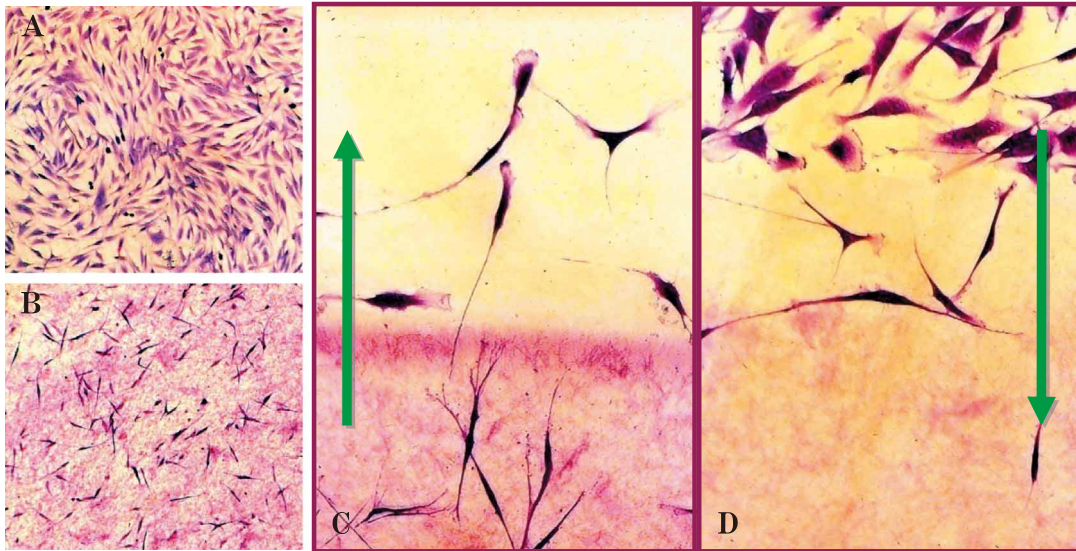


図 8 コラーゲンゲル内での角膜線維芽細胞の形態変化.

A：プラスチック培養皿上，B：コラーゲンゲル内，C：コラーゲンゲル内からプラスチック上に移動した細胞，D：プラスチック上からコラーゲンゲル内へ移動した細胞.

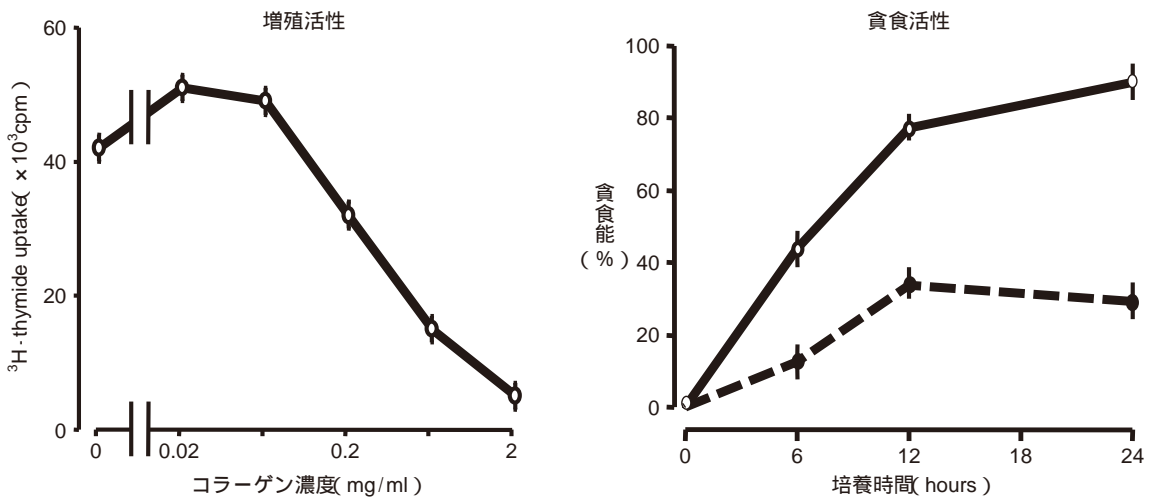


図 9 コラーゲンゲル内での角膜線維芽細胞の増殖能と貪食能.

左：増殖活性. 右：貪食活性, —○—：コラーゲン(-), ---●---：コラーゲン(+).

物は浸潤してきたマクロファージなどの細胞により貪食されると考えられてきた. 我々は, マクロファージに加えて角膜線維芽細胞が実質中に注入された異物(墨汁やラテックスビーズ)を貪食し, きわめて長期間にわたって細胞内に保有していることを報告した⁴⁸⁾⁴⁹⁾. コラーゲンのゲル内で培養すると, 角膜線維芽細胞の貪食活性は低く抑えられ, 逆にコラーゲンの存在しない条件であるプラスチック上ではきわめて高い貪食能を示した(図9). 培養した角膜線維芽細胞の貪食能は, フィブロネクチンの存在で亢進⁵⁰⁾, 副腎皮質ステロイド薬により抑制される⁵¹⁾. 角膜線維芽細胞が貪食すると, 異物を分解するために, 細胞内のリソソーム酵素の活性が亢進する⁵²⁾.

角膜線維芽細胞はコラーゲンマトリックスの中で三次元の網目状構造を取り, 互いに gap junctions を通して機能が同期し, あたかも一つの細胞系として存在している. 細胞の周囲にコラーゲンが存在すれば, 角膜線維芽細胞は増殖能も低く貪食活性も低い, 比較的静かな細胞として存在するが, 逆に細胞外のコラーゲン濃度が相対的に下がってくると, ネットワークから外れ活発に増殖し, 貪食する動的な細胞に変化する. 細胞外マトリックスであるコラーゲンが, 線維芽細胞の形態と機能を制御している一例であると考えられる.

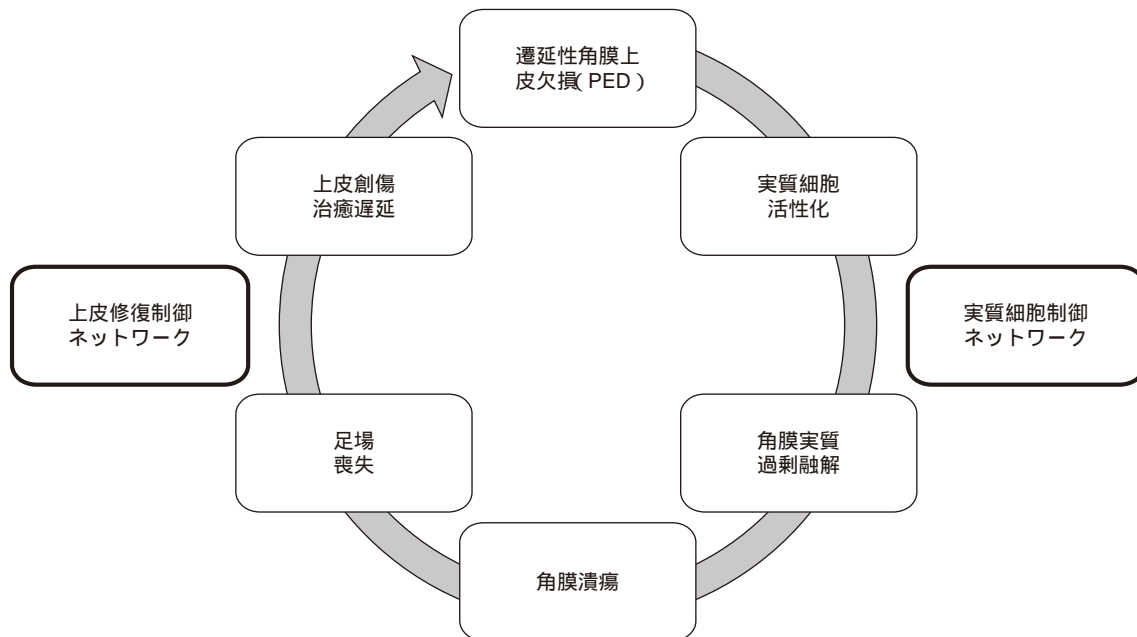


図 10 遷延性角膜上皮欠損と角膜潰瘍を巡る悪循環。

IV 角膜を巡るネットワークの破綻： 遷延性角膜上皮欠損と角膜潰瘍

日常の診療の中で、我々が現在でも治療に苦慮するさまざまな角膜疾患がある。角膜知覚の低下あるいは三叉神経障害に起因する神経麻痺性角膜症は、それらの一つである。また、抗生物質や抗菌薬の開発で感染症そのものの治療は可能になったが、角膜実質の融解、すなわち感染性角膜潰瘍を治癒せしめうる事が困難な症例も経験する。これらの疾患に共通した所見は遷延化した角膜上皮欠損と角膜実質融解、すなわち角膜潰瘍である。

一般に角膜上皮の欠損はきわめて速やかに修復され再被覆される。しかしながら、時に、上皮欠損が長期にわたり遷延化し再被覆されない症例を経験する。また遷延化した角膜上皮欠損は、線維芽細胞を活性化し実質の融解を引き起こす。角膜実質が融解すると足場を失い、角膜上皮の修復機序に障害が生じる。ここに遷延性角膜上皮欠損と角膜潰瘍を巡る一つの悪循環が存在する(図 10)。

遷延性角膜上皮欠損や角膜潰瘍の病態を理解し、新しい治療の方策を模索するためには、角膜上皮の創傷治癒過程を制御するネットワークや、角膜線維芽細胞の機能を制御調節するネットワークに関して研究を行い、どのような異常が生じているのか、あるいはどのようにして修復できるのかを考えることが大切である。

1. 遷延性角膜上皮欠損(角膜上皮創傷治癒調節機序の異常)

角膜上皮が傷害され欠損すると、残存した周辺の上皮細胞がまず一層の細胞として欠損部に伸展し移動を開始する。一層の上皮細胞層で欠損部が被覆され、一時的な

バリアーが形成されると上皮細胞の増殖が生じ細胞数が増加し多層の上皮細胞層となる。その後、上皮細胞は分化し正常角膜上皮で観察されるような整然とした層構造に復元し上皮創傷治癒が完成する。このように、角膜上皮の創傷治癒過程においては、上皮細胞が伸展・移動する欠損部の基質の状態、ならびにサイトカインや成長因子など種々の液性因子による上皮細胞の活性化が重要な役割を演じている。したがって、遷延性角膜上皮欠損は、これらの因子の異常により上皮修復が行われない状態であると考えられる⁵³⁾⁵⁴⁾(図 11)。

1) 一時的基質としてのフィブロネクチン

角膜上皮(ラット)を搔爬して、上皮欠損部を被覆していく過程を 16 mm 映画で撮影した time-lapse cinematography で観察すると、上皮欠損部に向かって遊離した角膜上皮細胞が単独で伸展し激しく ruffling を行いながら移動し、しばらくしてから角膜上皮全層が雪崩のように全体として移動するのが観察された⁵⁵⁾。フィブロネクチンを培養液に添加すると、最初の段階の上皮細胞の移動が充進した。角膜上皮での創傷治癒を考えると、第一相である上皮細胞の欠損部への移動が重要で、そのためには欠損部の足場としての基質が大きな役割を演じている。

1970 年代の後半から 80 年代にかけ、癌細胞が何故原発巣から離れやすいのかという研究などから、細胞の接着にフィブロネクチンという糖蛋白質が関与していることが明らかになってきた。フィブロネクチンは癌細胞のみならず、一般に線維芽細胞の接着に関与すると考えられていた。そこで、角膜創傷治癒の過程にフィブロネクチンが関与しているかを検討するために、種々の角膜傷害を加えてフィブロネクチンの局在の変化を蛍光抗体法

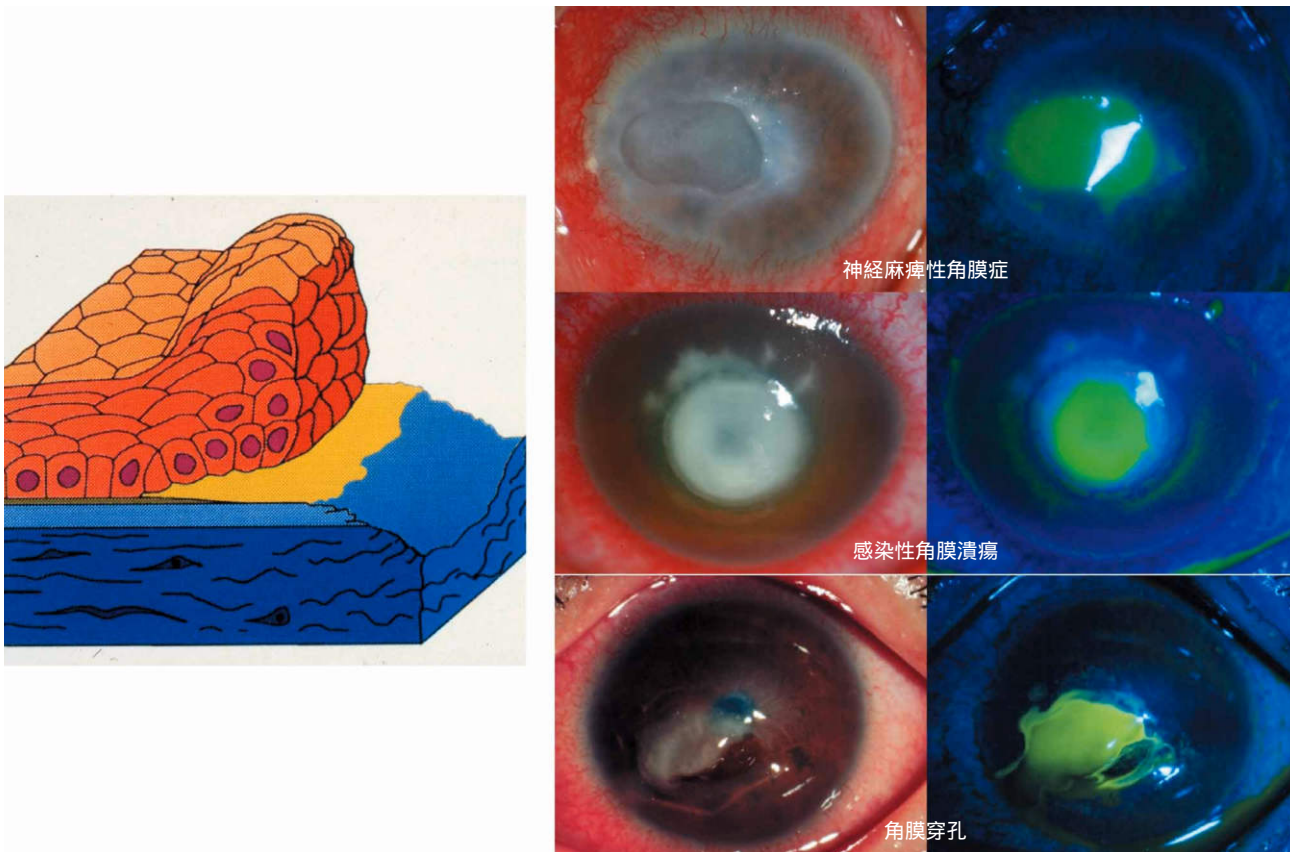


図 11 遷延性角膜上皮欠損。
病態の模式図と症例。

で観察した。

無傷の正常角膜では、フィブロネクチンは実質に淡く染色されるが、角膜に切開を加えると傷害部の実質に強いフィブロネクチン特異蛍光が観察され、出現したフィブロネクチンの上を上皮細胞が伸展していた⁵⁶⁾。同年に Harvard 大学の Fujikawa らも同様の結果を報告し、フィブロネクチン・マトリックスが角膜上皮の創傷治癒過程において一時的な基質となることを示した⁵⁷⁾。内皮傷害による水疱性角膜症や熱傷あるいはエキシマレーザー照射などの角膜に対する種々の傷害に対しても、フィブロネクチンが発現されていた^{58)~62)}。これらの形態学的な研究から、角膜上皮の創傷治癒においてフィブロネクチンが重要な役割を演じることが明らかとなった。

フィブロネクチンが実際に角膜上皮細胞の接着に作用するのかどうかを検討した。SV40 で transform したヒト角膜上皮細胞 (HCE 細胞)⁶³⁾⁶⁴⁾ をフィブロネクチンでコートした培養皿に播種し、time-lapse videography で細胞の形態の変化を観察した。フィブロネクチン・マトリックスの上では、対照としたウシ血清アルブミン上での挙動に比較して、より多くの角膜上皮細胞が接着し大きく拡がりながら伸展し活発に移動していた。このようにフィブロネクチンが基質として角膜上皮細胞の接着や

伸展あるいは運動性を促進することが明らかとなり⁶⁵⁾、また Ohji らによっても同様の結果が報告された⁶⁶⁾。さらにフィブロネクチンの分子構造の中で細胞のフィブロネクチン受容体との結合に関与するアミノ酸配列である RGD を含むペプチドを添加すると、角膜上皮細胞のフィブロネクチンへの接着が阻害されることから、角膜上皮細胞表面のフィブロネクチン受容体(後にインテグリン)との結合が重要であることを示した⁶⁵⁾。さらにフィブロネクチンは、角膜上皮細胞に対して chemotaxis や haptotaxis を促進することを明らかにした⁶⁷⁾。

2) フィブロネクチン受容体(インテグリン)と上皮創傷治癒

一方、フィブロネクチン受容体であるインテグリンの動向を観察すると、無傷の角膜では、インテグリンは角膜上皮のうち、主として基底細胞に局在している。切開を加えて1日後には、傷害された角膜実質に強いフィブロネクチン特異蛍光が観察され、同時に切開部に伸長移動している上皮細胞すべてにインテグリンが発現した。傷害後2週間経ち、傷が修復してくると、実質のフィブロネクチンは減少し、上皮では正常で観察されたのと同じように実質に接している基底細胞のみにインテグリンが局在していた⁶⁸⁾(図 12)。また角膜上皮を搔爬し経時的に上皮細胞を回収してフィブロネクチンとの接着性を

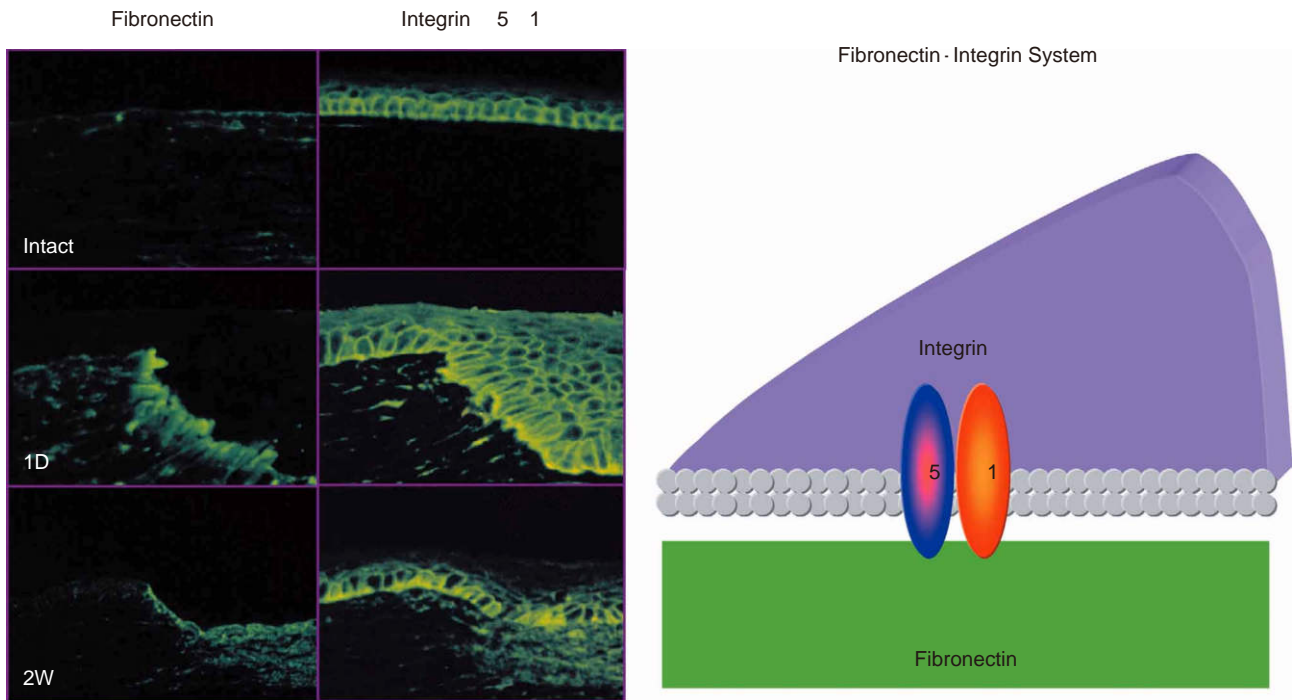


図 12 フィブロネクチンとフィブロネクチン受容体(インテグリン).
 角膜切開後のフィブロネクチン(fibronectin)とインテグリン(integrin)の局在の変化.
 Intact: 無傷の角膜, 1D: 傷害後1日, 2W: 傷害後2週間.

指標にインテグリン活性を測定すると、活発に上皮が移動している時期の細胞が最も強い活性を示し、創傷治癒の過程の上皮細胞でインテグリンが発現していることが推測された⁶⁹⁾。これらの研究により、フィブロネクチンとその受容体であるインテグリンの発現、消失は連動しており、角膜上皮の創傷治癒にフィブロネクチン—インテグリン系が重要な役割を演じていることが明らかとなった⁷⁰⁾。

生体内での定期的な生じる上皮・表皮細胞の修復の一つの例として発情周期(estrous cycle)に応じて生じる子宮内膜の上皮細胞の脱落があげられる。角膜上皮の創傷治癒過程で観察されたフィブロネクチン—インテグリン系の変動が子宮内膜上皮細胞でも観察できるかをラットで検討した。発情周期に応じて、上皮細胞が消失する時期に上皮細胞でのインテグリンの発現が消失し、脱落しやすくなっており、逆に上皮が再生する時期にはインテグリンの発現が亢進していた⁷¹⁾。このようにフィブロネクチン—インテグリン系は、角膜のみならず皮膚表皮の創傷治癒や子宮内膜の上皮の生理的な修復などにおいても生体内で広く重要な役割を演じている^{72)~78)}。

3) 角膜上皮の伸長に対するフィブロネクチンの作用

角膜上皮が損傷した場合、個々の上皮細胞の接着性や移動性のみならず、角膜上皮が一つのシートとして伸長することが生体内では重要である。そこで、フィブロネクチンが、シートとしての角膜上皮の移動や伸長にどのような効果をもっているのかを検討するために、我々は

家兎の角膜を器官培養し、一定時間後に固定し、通常の組織切片を作製して、切断した角膜実質の断面を伸びた角膜上皮の長さを測定する実験系を開発した⁷⁹⁾(図13)。フィブロネクチンを培養液に添加すると濃度に応じて角膜上皮の伸長が促進した^{79)~81)}。このようにフィブロネクチンが角膜上皮細胞の接着や伸展および角膜上皮層の移動を促進することが明らかとなった。当時、フィブロネクチンの作用は、線維芽細胞に対してのみ報告されていたので、我々のこの報告は、フィブロネクチンが上皮あるいは表皮細胞に対しても接着因子として作用するという、世界で最初の報告であった。

4) インテグリンの発現を促進する薬物の探索

我々はフィブロネクチンに関する研究と並行して、角膜上皮細胞の移動を促進する物質を器官培養法を用いて探索してきた(表3)。フィブロネクチン以外に、ヒアルロン酸^{82)~85)}、表皮成長因子(EGF)⁸⁰⁾⁸¹⁾、インターロイキン6(IL-6)⁸⁶⁾⁸⁷⁾、サブスタンス P+IGF-1(後述)、アネキシン V⁸⁸⁾などが角膜上皮の伸長を促進することを明らかにしてきた。また近年では、フィブロネクチンの第2結合部位由来のペプチドである PHSRN が上皮の伸長と *in vivo* での創傷治癒を促進することを明らかにした⁸⁹⁾。きわめて興味深いことに、これらの物質のうち、ヒアルロン酸はフィブロネクチンと結合することにより上皮の創傷治癒を促進していると考えられ⁹⁰⁾、また EGF⁹¹⁾、IL-6⁹²⁾、サブスタンス P+IGF-1 およびそれらに由来するペプチドの組み合わせ(FGLM-アミド+SSSR)は、角

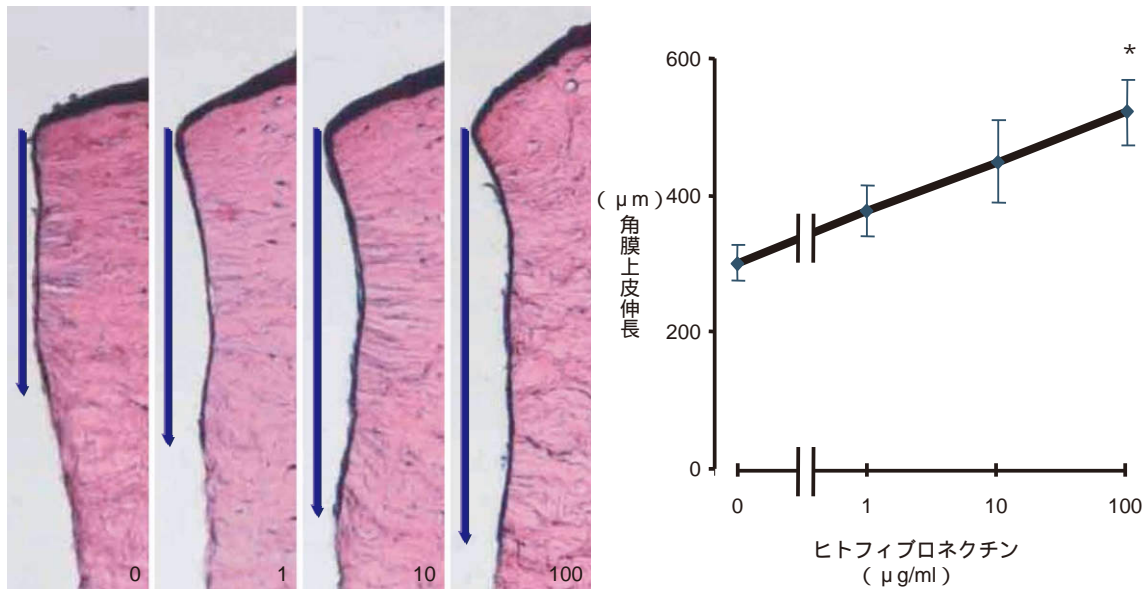


図 13 フィブロネクチンの角膜上皮伸長への効果(器官培養法)
左写真右下の数字はフィブロネクチンの濃度(µg/ml)を示す。* : p<0.005.

膜上皮細胞でのインテグリンの発現を亢進し、上皮細胞のフィブロネクチンへの接着を高めることが明らかとなった⁹³⁾。これらの研究成績から、フィブロネクチン—インテグリン系が如何に重要な生理的役割を演じているかが明らかである。

5) *In vivo*でのフィブロネクチン点眼の効果

フィブロネクチンが角膜上皮欠損の再被覆を亢進するかどうかを *in vivo* で検討した。角膜上皮をヨードで剝離した家兎にフィブロネクチン点眼を行うと上皮欠損の再被覆が促進した⁹⁴⁾。糖尿病ラットでの上皮創傷治癒にもフィブロネクチン点眼は有効であった⁹⁵⁾。またヒアルロン酸の点眼と相乗的に上皮修復を促進した⁸³⁾。Phanらも同様に *in vivo* でフィブロネクチン点眼が種々の角膜傷害の上皮修復に有効であることを報告した^{96)~98)}。

2. 神経麻痺性角膜症

角膜への三叉神経からの神経支配が障害され角膜知覚が低下している症例で、しばしば角膜上皮の創傷治癒が遅延し遷延性角膜上皮欠損となることを臨床的に経験する。三叉神経から角膜への神経栄養因子すなわち trophic factor の枯渇が原因で、角膜上皮の恒常性を維持する機構が破綻し、角膜上皮障害が生じている状態であると考えられる^{99)~102)}(図 14)。Yamada らは、涙液中にサブスタンス P とその代謝物が存在することを高速液体クロマトグラフィーで明らかにし、さらに角膜知覚が低下している症例では涙液中のサブスタンス P 量が低下していることを報告した^{103)~105)}。また非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)であるジクロフェナックにより涙液中のサブスタンス P 量が低下することを示した¹⁰⁶⁾。前述のように角膜内の神経線維にはサブスタンス P 陽性の線維が存在することなどと考え合わせ³⁹⁾⁴⁰⁾⁴⁴⁾、知覚神経

表 3 我々が研究してきた角膜上皮の創傷治癒を促進する物質

物質名	文献
フィブロネクチン	79, 94, 95
PHSRN(フィブロネクチン第2結合部位由来ペプチド)	89
ヒアルロン酸	82~85
表皮成長因子(EGF)	80, 81
インターロイキン(IL)-6	86, 87, 92
サブスタンス P+インスリン様成長因子(IGF)-1	93, 107, 108, 115
FGLM-アミド+SSSR(サブスタンス P および IGF-1 由来ペプチド)	113, 116, 146~149
アネキシン V	88

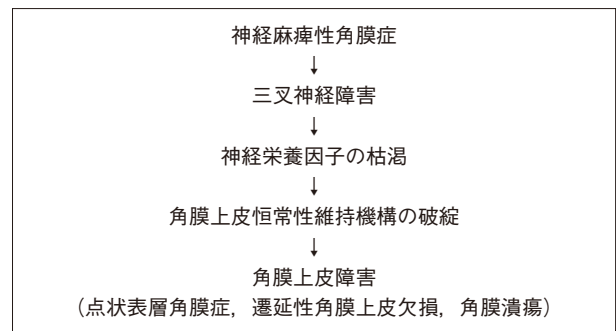


図 14 神経麻痺性角膜症.

伝達物質であるサブスタンス P の角膜上皮創傷治癒に対する作用について研究を始めた¹⁰²⁾。

1) サブスタンス P と角膜上皮創傷治癒

我々の開発した角膜器官培養法を用いて、サブスタンス P が角膜上皮の伸長に作用するかどうかを検討したが、用いたどの濃度でも何ら影響を与えなかった。一

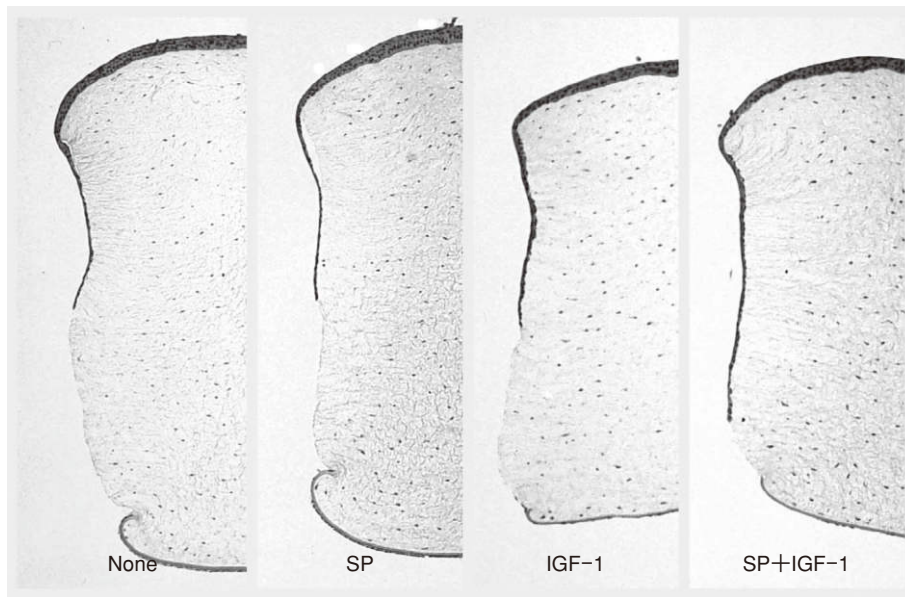


図 15 サブスタンス P(SP)とインスリン様成長因子(IGF)-1の角膜上皮伸長への効果(器官培養法)

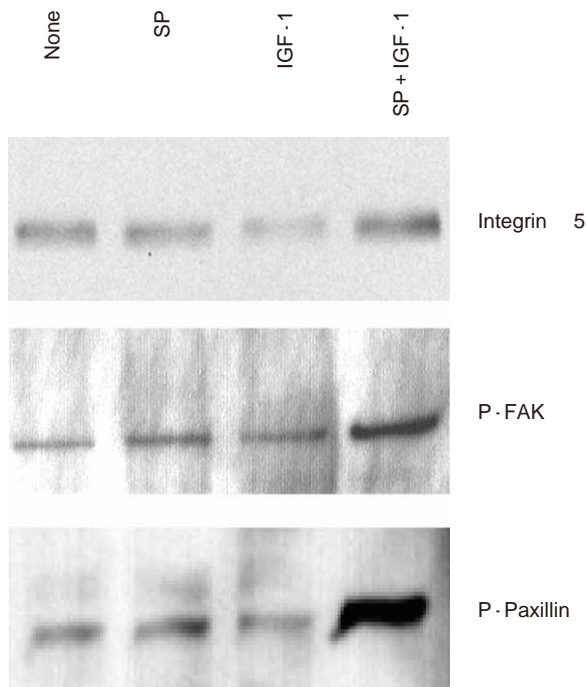


図 16 サブスタンス P と IGF-1 によるインテグリン $\alpha 5$ 発現, focal adhesion kinase (FAK) リン酸化, paxillin リン酸化の亢進.
P-FAK: リン酸化 FAK, P-Paxillin: リン酸化 paxillin.

方, 成長因子の一つである IGF-1 を添加しても, 何の作用も見出すことができなかった. しかしながら, サブスタンス P と IGF-1 を同時に添加すると, 角膜上皮の伸長は有意に促進された¹⁰⁷⁾(図 15). このサブスタンス P と IGF-1 による相乗作用は, お互いの濃度に依存していた. 角膜の神経線維にはサブスタンス P 以外にも calcitonin gene-related peptide (CGRP) などが含まれている

が⁴³⁾⁴⁶⁾, IGF-1 との角膜上皮伸長への相乗作用はサブスタンス P に特異的で, 他の神経伝達物質である vasoactive intestinal peptide (VIP), CGRP, アセチルコリン, ノルエピネフリン, セロトニンや他のタキキニンである neurokinin A, neurokinin B, kassinin, eledoisin あるいは physalaemin では観察されなかった. また IGF-1 と IGF-2 あるいは EGF にはサブスタンス P との相乗作用が見出されたが, 構造が類似しているインスリンには作用が認められなかった¹⁰⁸⁾.

2) サブスタンス P と IGF-1 の相乗作用の機序

サブスタンス P と IGF-1 による角膜上皮創傷治癒の促進が, どのようなメカニズムで作用するのかについて, 培養した角膜上皮細胞を用いて検討した. 角膜上皮に対するサブスタンス P と IGF-1 との相乗作用には, 角膜上皮細胞に発現しているサブスタンス P 受容体である NK-1 が関与している¹⁰⁹⁾. NK-1 を通じての細胞内信号伝達は, チロシンキナーゼ (TK) 経路, protein kinase C (PKC) 経路および p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) を経て伝達され¹¹⁰⁾¹¹¹⁾, カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM-PK II) の活性化を引き起こす¹¹²⁾.

またサブスタンス P と IGF-1 は, 角膜上皮細胞でのインテグリンの発現を促進し⁹³⁾¹¹³⁾, インテグリンの裏打ち蛋白質であり細胞の運動性に関与する focal adhesion kinase (FAK) や paxillin のリン酸化を促進した¹¹⁴⁾(図 16). しかしながら, サブスタンス P あるいは IGF-1 単独ではそのような効果は認められなかった. このようにサブスタンス P と IGF-1 は相乗的に角膜上皮細胞を活性化し, 上皮の創傷治癒を促進することが明らかになった.

3) *In vivo*でのサブスタンス P+IGF-1の角膜上皮創傷治癒に対する作用

サブスタンス P+IGF-1 点眼が、正常な知覚を有する角膜での上皮創傷治癒を促進するかどうかを *in vivo* で検討した。サブスタンス P+IGF-1 点眼により、家兎での上皮欠損の再被覆は有意に促進した¹¹⁵⁾。さらに角膜知覚が減弱している角膜知覚麻痺眼での上皮創傷治癒への効果をみるために、ラットを用いて、三叉神経節を熱凝固した神経麻痺性角膜症の動物モデルを作製した¹¹⁶⁾。この動物モデルでは、処置をしていない正常ラットでの創傷治癒パターンに比較して角膜上皮欠損の再被覆が遅延しており、角膜上皮でのフルオレセイン透過性が亢進しており、神経麻痺性角膜症の一つの臨床所見として観察される角膜上皮バリアーの破綻が観察された。サブスタンス P と IGF-1 の点眼を行うと、上皮欠損の修復が促進し、無処置の正常ラットでの創傷治癒と同じパターンを示した。また角膜上皮のバリアー機能も回復した¹¹⁶⁾。これらの *in vivo*での研究成績は、サブスタンス P と IGF-1 の点眼が神経麻痺性角膜症の治療に有効であることを示唆している。

3. 角膜潰瘍

遷延性角膜上皮欠損の反対の局面である角膜実質の融解、すなわち角膜潰瘍ではどのようにネットワークが破綻しているのかについて、我々の考え方を述べる。

角膜潰瘍は、角膜実質を構成するコラーゲンの過剰分解であると単純に定義することができる。角膜潰瘍は、主として微生物による感染性のものと、自己免疫疾患やアレルギーなどによる免疫原性(非感染性)のものがあるが、角膜上皮のバリアーの破壊に引き続いて角膜実質のコラーゲンが融解するという共通の病態を有する。角膜潰瘍部には、活性化した角膜線維芽細胞に、炎症細胞(好中球、好酸球など)の浸潤などが病理学的に認められる。そこで好中球などの浸潤してきた細胞と角膜実質固有の細胞である角膜線維芽細胞との相互作用が生じる。同時に線維芽細胞も浸潤細胞とともに種々のサイトカインを分泌し、互いにサイトカインネットワークで連動しているが、このネットワークも破綻を来す。実質の融解に伴い角膜上皮細胞はその足場を失い、上皮細胞と細胞外マトリックスとの相互作用にも破綻が生じる。このように、角膜潰瘍では、線維芽細胞によるコラーゲン代謝の動的平衡が破綻している。

1) 感染性角膜潰瘍

角膜は直接外界に接しており、比較的感染症を起こしやすい部位である。感染性角膜潰瘍の四大起炎菌は、緑膿菌、肺炎連鎖球菌、ブドウ球菌およびモラクセラ菌である¹¹⁷⁾。角膜外傷、異物、既存の角膜疾患などが誘因となるが、近年ソフトコンタクトレンズの連続装用に関連した角膜潰瘍が増加してきている。

角膜潰瘍の病態として、角膜実質の主たる構成成分で

あるコラーゲンを分解する酵素(コラーゲナーゼ、今日の matrix metalloproteinases, MMPs)の活性化が古くから明らかにされている。角膜あるいは角膜由来の細胞からコラーゲン分解酵素が抽出、精製され、酵素の活性維持のための分子構造などの生化学的研究が行われた。コラーゲン分解酵素は重金属イオンを必要とする酵素であることなどが明らかにされた。角膜潰瘍を治療するために、組織破壊に関与するコラーゲナーゼ阻害作用を有する薬物の探索が積極的に行われてきた。アセチルシステイン、 $\alpha 2$ マクログロブリン、あるいは近年でもガラジンなどの合成特異的 MMP 阻害剤など数多くのコラーゲナーゼ阻害剤の開発が試みられた。細菌を角膜に接種する *in vivo* 感染性角膜潰瘍モデルあるいは化学熱傷を用いた非感染性角膜潰瘍モデルでの評価が行われたが、残念なことにどれ一つとして、実際の臨床試験で有効性を明らかにすることができず、未だに我々眼科医が臨床効果を信頼できる抗角膜潰瘍剤は開発されていない。*In vitro*では有効でありながら、なぜ臨床的に効果が認められないのかは角膜潰瘍の病態を理解するうえできわめて興味ある重要な点である。一つの問題点は、抽出したコラーゲン分解酵素の活性を試験管内で阻害する薬剤の探索という観点から研究が行われ、生体内の角膜の中でさまざまなネットワークによる調節と細胞成分が存在する中で生じている角膜潰瘍の病態の理解という観点が欠けていたためではないかと考える。

2) コラーゲンゲル内三次元培養法によるコラーゲン分解測定法の確立

角膜実質の線維芽細胞に関する研究は、ほとんどが培養用のプラスチック皿の上で培養して形態や機能の変化を観察したものである。線維芽細胞の生体内での形態や機能を知り、角膜潰瘍治療薬を探索するためには、少なくとも実質の大半を占めるコラーゲンマトリックスの存在下での研究が必要であると考えた。

そこで培養した角膜実質の線維芽細胞によるコラーゲン分解能をより生体内に近い状態で観察する実験系を開発した¹¹⁸⁾。角膜実質線維芽細胞をコラーゲンゲル内で三次元的に培養し、一定時間後に培養液を回収した。培養液から分子量 10 万以上の高分子をミリポアフィルターで除去し、10 万未満の低分子量の物質を回収した。この操作により、分解されていないコラーゲン分子と分解断片とを分離することができた。低分子の断片を含む培養液をその後塩酸の存在下で加熱し加水分解を行い、コラーゲンに比較的多く含まれているアミノ酸であるプロリン量を測定し、細胞によるコラーゲン分解能とした。

3) 緑膿菌によるコラーゲン分解の機序(図 17)

感染性角膜潰瘍の一つの例として、緑膿菌がどのように線維芽細胞に作動し、コラーゲンを分解するかについて検討した¹¹⁸⁾。前述の実験系を用いて、角膜線維芽細

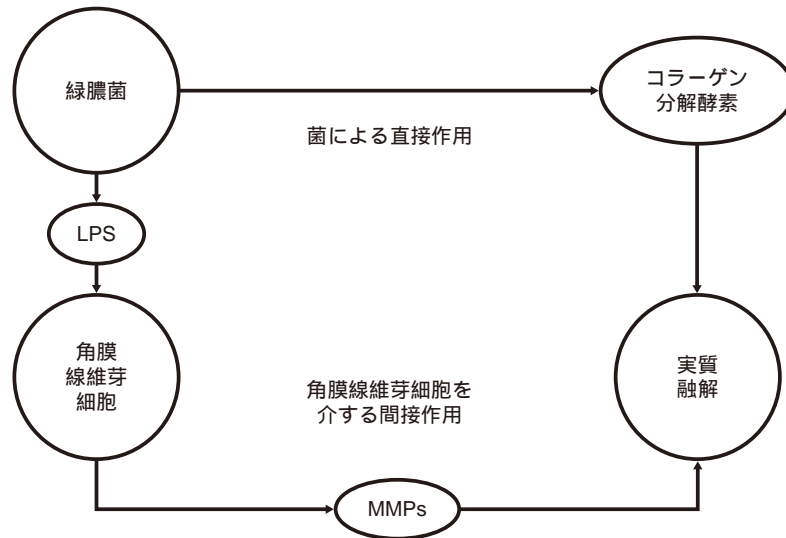


図 17 緑膿菌によるコラーゲン分解.

菌コラーゲナーゼによる直接分解経路と線維芽細胞を介した間接経路.
LPS : lipopolysaccharide, MMPs : matrix metalloproteinases.

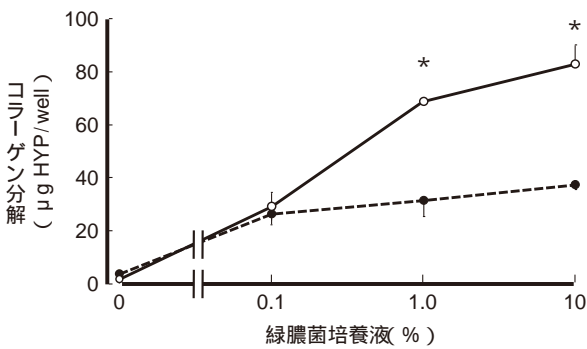


図 18 緑膿菌培養液と角膜線維芽細胞によるコラーゲン分解の促進.

—○— : 緑膿菌培養液 + 角膜線維芽細胞, —●— : 緑膿菌培養液のみ, * : $p < 0.01$.

胞がない状態で緑膿菌の培養液のみを添加すると、ある程度のコラーゲン分解が観察された。これは緑膿菌が分泌する細菌由来のコラーゲン分解酵素の作用である。そこで、角膜線維芽細胞が存在する条件で同じように緑膿菌の培養液を添加すると、添加した培養液の量に応じて、コラーゲン分解が著明に増加した(図 18)。緑膿菌は、エラスターゼ、lipopolysaccharide(LPS)あるいは exotoxin A などの因子を分泌する。そこで、これらの因子のうちどれが角膜線維芽細胞によるコラーゲン分解に作用しているのかを検討した。緑膿菌から精製したエラスターゼを用いた場合には、コラーゲングル内の細胞の有無にかかわらず添加した濃度に依存してコラーゲンの分解を促進したが、角膜線維芽細胞が存在すると、コラーゲン分解はさらに充進した。さらに、LasR(elastase regulation gene)と LasB(elastase structural gene)をノックアウトしたエラスターゼ活性のない変異種の緑

膿菌培養液を用いて同様の実験を行うと、角膜線維芽細胞の有無にかかわらずコラーゲンの分解量には全く影響を及ぼさなかった。また角膜線維芽細胞は proMMP-1, proMMP-3, proMMP-2 および proMMP-9 を分泌している。緑膿菌エラスターゼは、角膜線維芽細胞の培養液中のこれらの proMMPs を活性化する。このことは、エラスターゼは、直接コラーゲンを分解する経路と、角膜線維芽細胞に作用してコラーゲン分解を刺激する経路のどちらをも促進し、緑膿菌による角膜潰瘍の病態にエラスターゼが重要な役割を果たしていることが示唆された。

細菌のエンドトキシンである LPS はグラム陰性菌の細胞外膜を構成する糖脂質で、さまざまな病原体成分の中でも最も強く宿主の自然免疫機構を活性化し、炎症細胞からの種々のサイトカインの産生を促す¹¹⁹⁾。しかしながら LPS を正常角膜に点眼しても炎症反応は生じないが、上皮に傷をつけて LPS を点眼するか角膜実質に LPS を注入すると、好中球の浸潤を伴う角膜炎および潰瘍を生じる¹²⁰⁾。我々の開発したコラーゲン分解測定モデルで検討すると、LPS および exotoxin A はコラーゲン分解には影響を与えない。しかし、LPS は、角膜線維芽細胞によるケモカイン〔IL-8 や monocyte chemoattractant protein (MCP)-1〕や intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 の合成や分泌を促進した¹²¹⁾¹²²⁾。このように、緑膿菌が分泌する LPS が角膜線維芽細胞を刺激し活性化する。その結果、細胞性由来のコラーゲン分解酵素である MMPs が分泌および活性化され、コラーゲンの分解が進行すると考えられる。

4) 好中球と角膜線維芽細胞の相互作用

角膜潰瘍では浸潤してきた好中球がコラーゲンを分解

すると考えられてきた。しかしながら我々の実験系を用いて検討すると、好中球のみではわずかにコラーゲンが分解されるだけであるが、コラーゲングル内に角膜線維芽細胞と好中球を一緒に培養すると、加えた好中球の量に応じてコラーゲン分解が著明に亢進した(図 19)。好中球の培養上清や炎症性サイトカインである IL-1 を添加しても同様に線維芽細胞によるコラーゲン分解が促進され、IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1 RA) の添加で抑制することができた。この研究結果は、好中球ではなく角膜線維芽細胞がコラーゲン分解の主役、すなわち effector であり、好中球はその作用を制御する modulator であり、この過程に IL-1 が大きな役割を演じていることを示している¹²³⁾。

以上の研究成績とその他の我々の研究成績を総合して、角膜潰瘍の病態として図 20 に示すようなネットワークが考えられる。細菌由来の LPS などの刺激を受け、角膜線維芽細胞は IL-8 などのサイトカインを分泌する。IL-8 は好中球に対してケモカインとして作用し局所への好中球の浸潤を促進する。同時に、好中球と線維芽細胞の接着を促す ICAM-1 も細胞表面に発現する。刺激を受けた好中球は、炎症性サイトカインである IL-1 を分泌し、線維芽細胞を刺激し、細胞性的コラーゲン分解酵素である MMP の合成、分泌および活性化を促進する。その結果として実質コラーゲンの分解が亢進する。ここにも、線維芽細胞と浸潤した好中球の間での細胞性的ネットワークが存在し、また細胞同士の間で多彩

なサイトカインあるいはケモカインのネットワークが認められる。このように、感染性角膜潰瘍での実質コラーゲン融解には、細菌による直接的な分解経路に加え、角膜線維芽細胞が関与する経路、さらに好中球により増強される三つの経路の存在が考えられる。感染性角膜潰瘍の治療の実際と併せて考えてみると、感染症の治療の原則は抗菌薬で細菌を殺すことであり、このことにより、細菌由来のコラーゲン分解酵素はそれ以上分泌されなくなり、ある程度角膜実質の融解を抑制することができる。したがって感染症の初期であれば、抗菌薬のみで潰瘍に至らずに治癒することができる。しかしながら、もし細菌由来の LPS からの信号が既に角膜線維芽細胞に送られ、細胞が刺激されていたとすると、細菌が死滅し

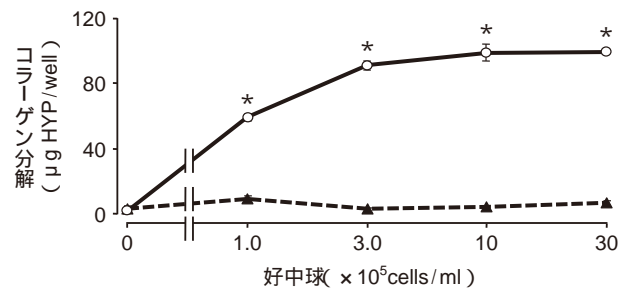


図 19 好中球と角膜線維芽細胞によるコラーゲン分解の促進。
 —○—：好中球 + 角膜線維芽細胞 (10⁵ cells/ml),
 —▲—：好中球のみ,
 * : p < 0.001 (好中球なしを対照とした比較)

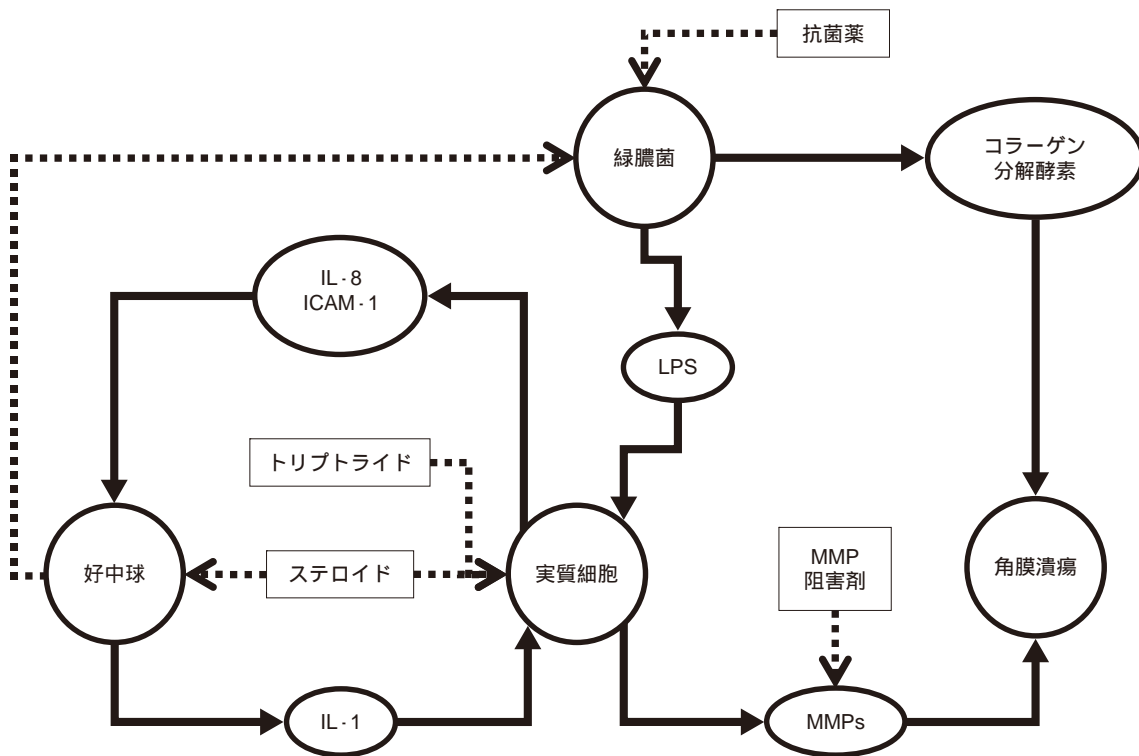


図 20 感染性角膜潰瘍の病態。
 IL : インターロイキン, ICAM : intercellular adhesion molecule

て細菌による直接的なコラーゲン分解が抑制されても、角膜線維芽細胞を介する経路や好中球を介する経路は活性化されたままである。この段階では、抗菌薬のみでコラーゲン分解を抑制することはもはやできない。角膜潰瘍では、角膜に浸潤してきた好中球が実質融解の主役であると従来考えられてきたが、我々の研究から、実質コラーゲンを分解している作動細胞は角膜線維芽細胞それ自身であり、その機能を好中球が制御しているという新しい考え方を提示できた。

V 角膜疾患治療薬の開発と臨床応用

フィブロネクチンに始まり、サブスタンス P と IGF-1 など、角膜上皮の創傷治癒を促進する調節因子の研究を行ってきた。これらの因子以外にも、EGF や IL-6 などの成長因子やサイトカイン、細胞外マトリックスとしてのヒアルロン酸などの効果についても報告してきた。さらに近年では、フィブロネクチンの第 2 結合部位である PHSRN というアミノ酸配列をもつペプチドが、角膜上皮の移動や創傷治癒を促進することを明らかにした⁸⁹⁾。また細胞の移動には、細胞外マトリックスとの接着と urokinase 型 plasminogen activator すなわち uPA による脱着とのサイクルが必要であるが¹²⁴⁾、アネキシン V が角膜上皮細胞での uPA 分泌を促進することにより、上皮の創傷治癒を促進することを報告した⁸⁸⁾。角膜創傷治癒の分野で長年研究を続けてきたが、未だに次から次へと関与する因子が明らかとなり、全体像を見わたせることは本当に困難であるということをかえって実感している。

遷延性角膜上皮欠損は、角膜上皮を巡る調節・制御のネットワークの異常であると考えられる。欠損後、残存する上皮細胞が基質に接着し伸展し、その後細胞増殖により細胞の数を増やし、さらに分化が生じ、表面が平滑な角膜上皮へと修復する過程には、さまざまな因子が関与している。我々は、フィブロネクチンが良好な基質を提供することにより細胞と細胞外マトリックスとの相互作用の破綻を修復することを示し、また IGF-1 とそれに由来する SSSR というペプチドが角膜上皮細胞を活性化し、サイトカインネットワークの破綻を修復し、さらに知覚神経伝達因子であるサブスタンス P とそれに由来する FGLM-アミドが角膜上皮細胞の感受性を高め、神経系ネットワークの破綻を修復することを明らかにしてきた。

次に、これらの研究室での研究成果を臨床応用した過程について述べる。

1. 遷延性角膜上皮欠損治療薬の開発(フィブロネクチン点眼療法)

1) フィブロネクチン点眼剤の調製

角膜上皮創傷治癒をフィブロネクチンが促進するという研究成績を実際の臨床に応用するに当たり、いかにし

てフィブロネクチン点眼剤を調製するかが最大の問題であった。1980 年代初頭には、生物活性を有するヒト血漿由来フィブロネクチンは研究用としても市販されていなかった。幸いフィブロネクチンは血漿中に比較的高濃度で存在すること、フィブロネクチンはゼラチンと高い親和性もち affinity chromatography により簡便に精製することができることなどの特性により、患者自身の血液の提供を受け 1 時間以内に高純度の点眼剤を調製するシステムを確立した¹²⁵⁾。この方法で調製したフィブロネクチンの回収率は約 50% と低いものの、純度は高く、また室温で約 1 週間は生物活性が安定している。しかしながら、フィブロネクチン蛋白質の分解が進行するために長期の保存を行うことができず、我々は現在でも基本的に毎週調製している。また、フィブロネクチンの生物活性を標準的に測定し提示するための基準を設定した¹²⁶⁾。

以来四半世紀にわたり、フィブロネクチン点眼剤の臨床的有用性を示してきた。実際に多くの臨床の現場で処方していただくためには、製剤化が必要である。しかしながら、血液製剤という性質およびフィブロネクチンが蛋白質であるという性質上、血液を介する感染(C 型肝炎、AIDS、梅毒など)を完全に克服することはできず、今日に至るまで製剤化が行われていない。そこで、考え方を変え、患者からの血漿を用いて、安全に効率よくフィブロネクチン点眼剤を自動作製する装置を日本点眼薬研究所と共同で開発した(図 21)。すべてのカラムと溶液は disposable のキットに組み込まれており、血漿を注入した後、これらのパックを器械にセットしスイッチを入れると、約 1 時間後に滅菌された精製フィブロネクチン点眼剤を自動で作製することができるようになった。現在、医療用機器としての申請を行うための準備を進めている。もし医療用機器として承認されれば、患者自身の血液から患者自身の点眼薬を作製して治療に用いることが簡便にできるようになり、血液製剤の問題点を克服できるものと期待している。これはいわばテーラーメイド医療の一つの実践例であり、また将来ともさまざまな医療現場で必要とされる血液製剤に対する一つの解決策を提示できるのではないかと考える。

2) 自己血由来フィブロネクチン点眼療法の実際

角膜ヘルペス後および糖尿病での遷延性角膜上皮欠損の症例(2例 3眼)に対して、前述のように自己血から調製したフィブロネクチン点眼剤を用いて治療を行い、1983 年に世界で初めて報告した¹²⁷⁾。その後、角膜ヘルペス後の上皮障害 20 眼に対して、上皮欠損が平均 61.5 日持続していた症例で、自己血由来フィブロネクチン点眼により平均 15.6 日で上皮欠損が再被覆されたことを報告し、フィブロネクチン点眼療法の有効性を示した¹²⁸⁾。さらに外傷性再発性角膜びらんや、当時に水晶体嚢外摘出による白内障術後に時に生じる上皮欠損の治



図 21 自己血由来フィブロネクチン点眼剤自動作製装置の開発。

療に対しても有効であることを報告した¹²⁹⁾¹³⁰⁾。世界中でも、フィブロネクチン点眼療法が有効である症例報告がなされ、我々の提示した治療法の有用性が示された^{131)~137)}。しかしながら現在に至るまで、患者本人から血液を採取したうえで二重盲験法で、臨床的有効性を示す試験を行うことができないために、いわゆる evidence-based medicine (EBM) に基づく治療法としては確立されていない。New York Blood Center あるいは当時の Chiron Ophthalmics 社が中心となって、プールした血液から調製したヒトフィブロネクチン点眼剤の臨床試験がアメリカで行われたが、フィブロネクチン製剤の有効性を示すことはできなかった¹³⁸⁾¹³⁹⁾。原因としては、製剤化するために凍結乾燥を行い、種々の賦型剤を添加したことにより、フィブロネクチンの生物活性が弱められたのではないかと考える。我々の調製法の最大の利点は、毎回新鮮血から調製していることである。我が国でも、日本ケミカルリサーチ社と参天製薬が共同で New York Blood Center から入手したフィブロネクチン製剤で容量依存性の臨床試験を行った。この試験の成績では、フィブロネクチン点眼が臨床的に遷延性角膜上皮欠損の治療にきわめて有用であり、容量依存性があることが示された。しかしながら、前述のように製剤が血液由来のウイルスに完全に汚染されていないことを示すことは現実に困難であり、製剤化が断念された。山口大学で 2000 年 4 月から 2005 年 3 月までの 5 年間に、自己血から調製したフィブロネクチン点眼治療を行った 151 眼についてその有効性を検討したが、角膜びらんや上皮幹細胞が傷害されていない遷延性角膜上皮欠損に対して有効であるが(図 22)、点状表層角膜症の治療には効果がないことが明らかとなった。今後前述の自動作製装置を用いることで、可能な限り同質の自己血由来フィブロネクチン点眼を調製できれば、多施設での臨床的有用性の検証を行うことができるものと考ええる。

3) フィブロネクチン点眼療法の開発で学んだこと

フィブロネクチンと角膜創傷治癒の研究を通じて、薬剤の開発について多くのことを学ぶことができた。フィブロネクチンの研究を始めたのが 1980 年で、最初の症例報告をしてから既に四半世紀が経過している。しかしながら製品化して多くの施設で多くの患者のために処方する薬剤としては未だ承認されていない。血液由来のウイルスなどの感染症の発生を考えた場合、血液製剤の開発はほとんど不可能であるといえる。血液は輸血をはじめ今日でも実際の医療現場ではきわめて重要なものである。将来には遺伝子工学などの技術により、合成できる時代がくるかもしれないが、しかしながら、それまでの間は、我々が提示したように、患者自身の血液から患者本人の薬剤を精製・調整し、その患者の治療に役立つという考え方が一つの方策ではないかと考える。また、遷延化した角膜上皮欠損の症例の数はそれほど多くはない。しかし、たとえ症例数が少なくとも患者にとっては大切な眼である。我々臨床医にとって、症例数が多いかどうかということとは別に、目の前のただ一人の患者をいかに治癒せしめるかということもきわめて大切な使命である。薬剤としては、たとえ経済性はなくとも、オーファンドラッグとして臨床医に提供される必要がある点が、ここにあると考える。

2. 神経麻痺性角膜症治療薬の開発(FGLM-アミド + SSSR 点眼療法)

大阪大学、近畿大学そして山口大学で、数多くの症例にフィブロネクチン点眼を用いてきたが、フィブロネクチン点眼療法を必要とする多くの症例で角膜知覚が低下しており、いわゆる神経麻痺性角膜症であることに気づいた。神経麻痺性角膜症は、糖尿病、ヘルペス感染、脳外科での手術後などの三叉神経障害を原因として生じ、点状表層角膜症、角膜びらん、あるいは遷延性角膜上皮欠損など多彩な角膜所見を呈する^{99)~101)}(図 23)。今日、

(PED, 66 歳 男性)

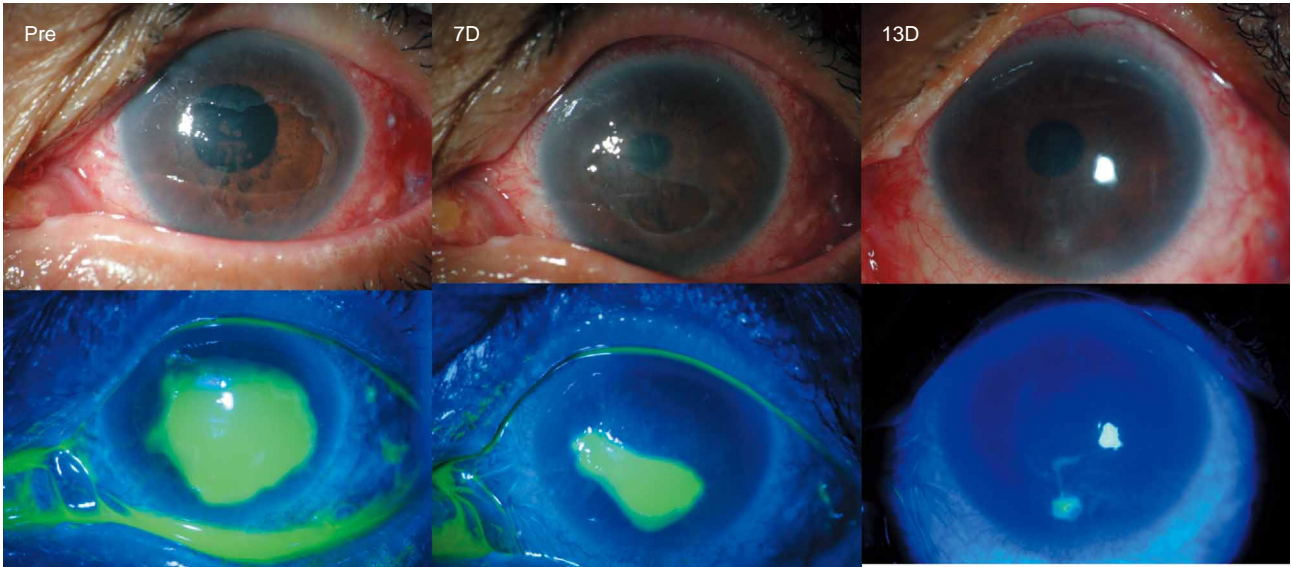


図 22 フィブロネクチン点眼剤による遷延性角膜上皮欠損(PED)の治療(糖尿病網膜症に対する硝子体手術後, 66 歳, 男性).

pre : 点眼前, 7D : 点眼 7 日後, 13D : 点眼 13 日後

症例が飛躍的に増加している糖尿病にみられる糖尿病角膜症も, 知覚低下がその一因であると考えられ, 神経麻痺性角膜症の一つであると考えられる¹⁴⁰⁾. またエキシマレーザーを用いた角膜屈折矯正手術後(角膜表層切除術, laser *in situ* keratomileusis)には角膜知覚が低下する^{141)~144)}. 研究室での細胞や培養組織を用いた研究と *in vivo* での研究成績に基づき, 神経麻痺性角膜症に対する点眼療法への臨床応用(translational research)に向けての研究を行った¹⁴⁵⁾.

1) 全分子から最小必須アミノ酸配列へ

サブスタンス P も IGF-1 もともに角膜上皮細胞に対してのみならず, さまざまな組織や細胞に対して, 機能を調節する多彩な生理活性を有している. 実際にサブスタンス P は縮瞳作用を示し, IGF-1 は角膜での血管新生を誘導する. サブスタンス P と IGF-1 を用いて治療することを考えるとき, それらの副反応をできるだけ除く目的で, サブスタンス P と IGF-1 の構造のうち, 角膜上皮細胞への作用を示す最小必須アミノ酸配列を求めようとした.

サブスタンス P は, 11 個のアミノ酸からなるペプチドである. そのアミノ酸配列のうち, N 末端の 7 個のアミノ酸配列をもつペプチド, SP(1-7)には IGF-1 との相乗作用を認めなかった. 逆に C 末端の 7 個のアミノ酸配列をもつペプチド, SP(5-11)には IGF-1 との相乗作用が認められた. そこで少しずつ短いペプチドにして作用を検討すると, C 末端から 4 個のアミノ酸からなるペプチドでも IGF-1 との相乗作用が観察されたが, しかし 3 個のペプチド, SP(9-11)にはそのような作用は認められなかった(図 24). これらの結果から, サブスタ

ンス P の C 末端の FGLM-アミドという配列が IGF-1 とともに, 角膜上皮創傷治癒を促進する最小アミノ酸配列であることが明らかとなった¹¹³⁾¹⁴⁶⁾¹⁴⁷⁾.

そこで, 次に 70 個のアミノ酸からなる分子量 7,649 という大きな蛋白質である IGF-1 の構造の中から, 同様の考え方で, 最小必須配列を求める研究を, 山口大学医学部薬理学教室の乾教授との共同研究で行った. IGF-1 は, IGF-2 やプロインスリンと分子構造がきわめて類似し, A, B, C および D の 4 個のドメインからなる. インスリンは, A および B のドメインが残り C および D ドメインが酵素的に切断されている. サブスタンス P あるいはそれに由来する FGLM-アミドとの相乗作用が IGF-1 と IGF-2 には認められたが, インスリンには認められないことに注目し, IGF-1 の 4 個のドメインをそれぞれもつペプチドを合成し, 角膜上皮の伸長に対する作用を器官培養法で検討した. 予想どおり, 相乗作用は A, B および D ドメインには認められなかったが, IGF-1 の C ドメインとの間でサブスタンス P との相乗作用が認められた¹⁴⁸⁾. そこで glutathione s-transferase (GST) に結合した C ドメインのアミノ酸配列の各アミノ酸を一つずつアラニンに変換してどのアミノ酸配列が必須であるかを検討したところ, SSSR というこれも 4 つのアミノ酸からなる配列が, サブスタンス P や FGLM-アミドとの相乗作用に必須であることを明らかにした¹⁴⁹⁾(図 25). 実際に動物を用いた *in vivo* の研究でも, FGLM-アミド+SSSR 点眼が角膜上皮の創傷治癒を促進することを確認した^{146)~150)}.

2) サブスタンス P+IGF-1 点眼療法の臨床応用

サブスタンス P+IGF-1 点眼療法の第一例は, 共同研

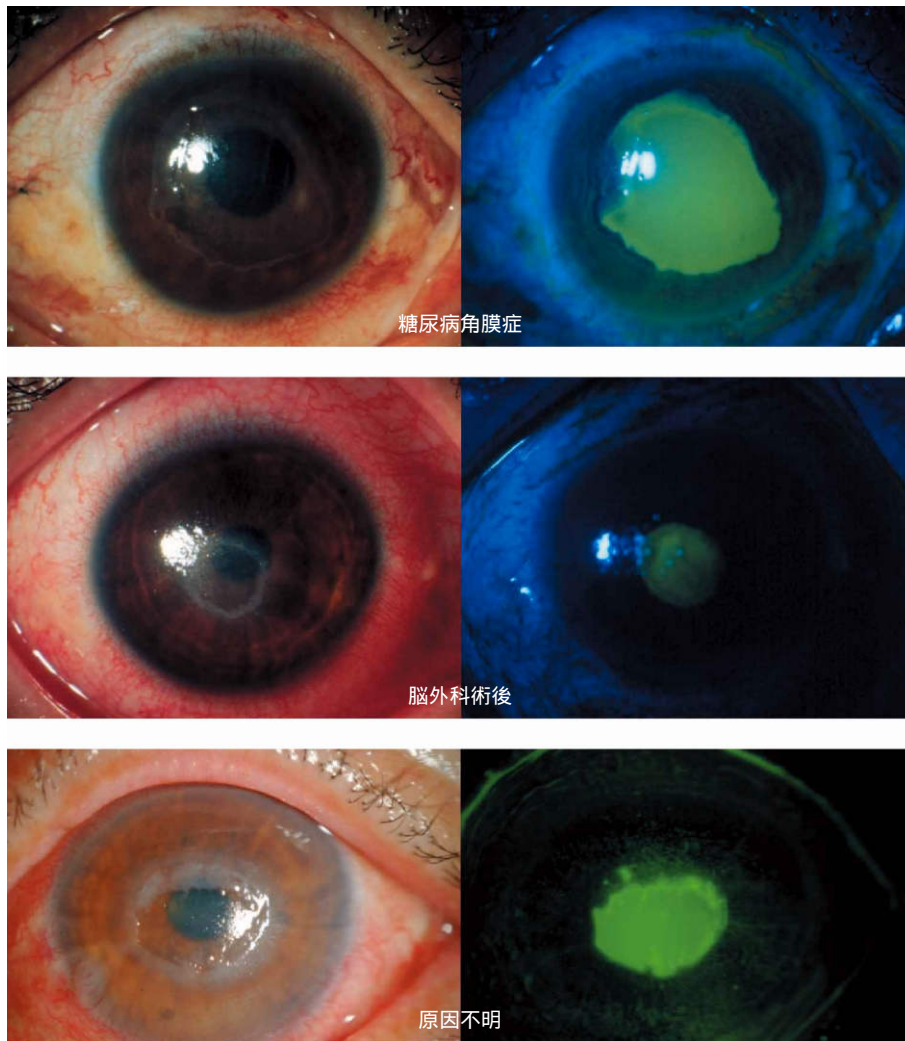


図 23 神経麻痺性角膜症.

	IGF-1との相乗作用
サブスタンスP (R P K P Q Q F F G L M) -NH ₂	+
SP (5 - 11) (Q Q F F G L M) -NH ₂	+
SP (6 - 11) (Q F F G L M) -NH ₂	+
SP (7 - 11) (F F G L M) -NH ₂	+
SP (8 - 11) (F G L M) -NH ₂	+
SP (9 - 11) (G L M) -NH ₂	-
SP (1 - 7) (R P K P Q Q F)	-

図 24 角膜上皮伸長に対する IGF-1 との相乗作用を示すサブスタンス P 最小必須アミノ酸配列の探索.

究者である Brown らによって Texas Tech University, Health Science Center (Lubbock, Texas)において、家族性自律神経失調症 (Riley-Day 症候群)に伴う遷延性角膜上皮欠損に対して行われた¹⁵¹⁾。興味あることに、サブ

スタンス P のみの点眼やサブスタンス P+インスリンの点眼では効果が認められず、サブスタンス P と IGF-1 の点眼で初めて上皮欠損の再被覆が生じた。このことは、角膜上皮の移動や創傷治癒にはサブスタンス P と

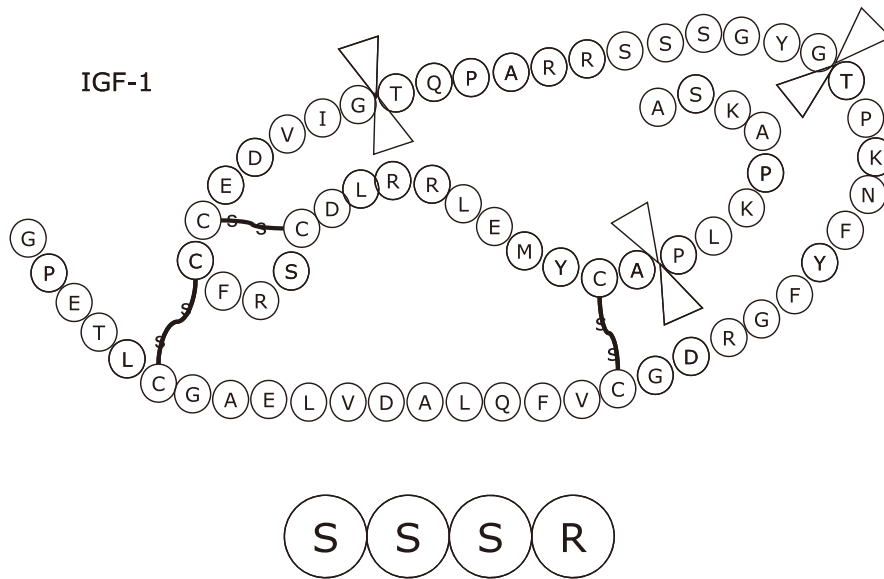


図 25 角膜上皮伸長に対するサブスタンス P との相乗作用を示す IGF-1 最小必須アミノ酸配列の探索.

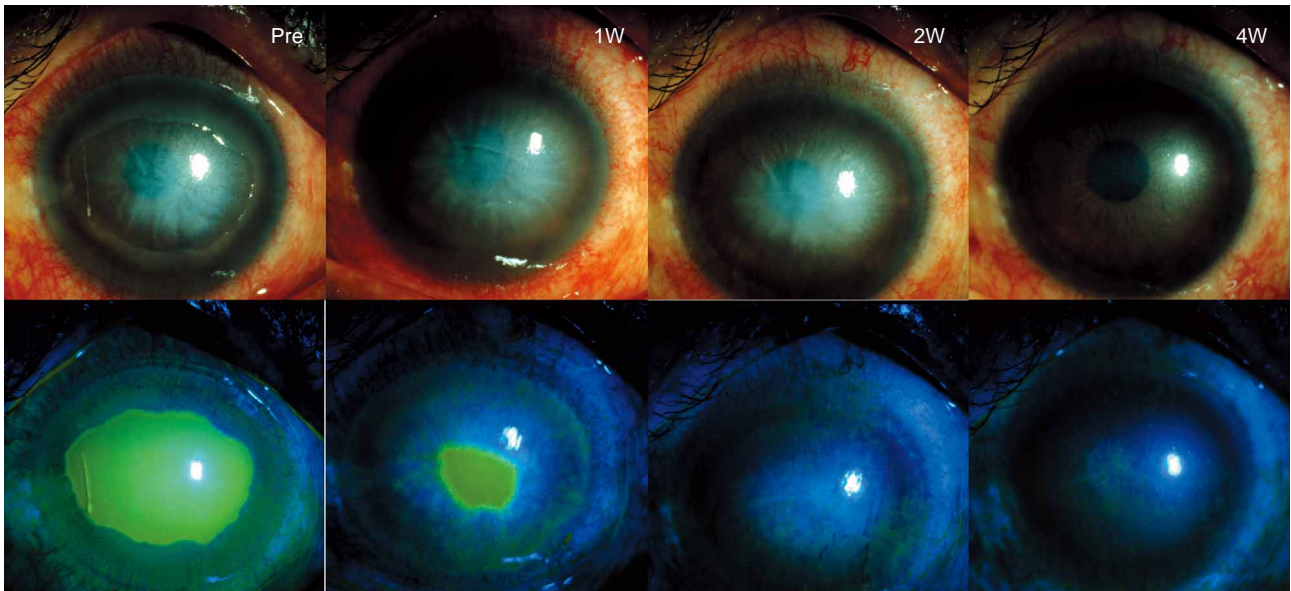


図 26 FGLM-アミド+IGF-1 点眼剤による神経麻痺性角膜症での遷延性角膜上皮欠損の治療(原因不明, 55 歳, 女性).

Pre : 点眼前, 1W : 点眼後 1 週, 2W : 点眼後 2 週, 4W : 点眼後 4 週.

IGF-1 が相乗的に作用しているという我々の研究成績と
きわめてよく一致している.

その後, 山口大学において, サブスタンス P 由来の
ペプチドである FGLM-アミドと IGF-1 による点眼治療
を行った(図 26). 最初の症例(55 歳の女性)は, 原因は
不明であるが大きな角膜上皮欠損が 10 か月以上にわた
り持続していた. いくつかの眼科医で加療を受けていた
が, どうしても上皮欠損が治癒しないため当科を紹介さ
れ受診した. 初診時に, 角膜知覚はなく, 神経麻痺性角
膜症による遷延性角膜上皮欠損と診断し, FGLM-アミ
ド+IGF-1 点眼を開始した. 点眼開始 1 週間には, 10 か

月以上にわたり反応しなかった上皮欠損が縮小し始め,
2 週間には完全に上皮欠損が消失した. 上皮欠損による
実質浮腫は残存していたが, 4 週間には実質浮腫も消失
した. 初診時 0.01 だった視力も最終的に 1.0 にまで回
復し, その後再発もなく経過している¹⁵²⁾(図 26).
FGLM-アミド+IGF-1 点眼で加療し上皮欠損が再被覆
した神経麻痺性角膜症の別の 1 例では, 4 か月後に角膜
知覚が回復し, 共焦点生体顕微鏡(confoscan)で神経線
維の存在が観察できた(図 27). このように FGLM-アミ
ド+IGF-1 点眼治療は, 上皮の再生のみならず神経線維
の再生を促す可能性があることが示唆された¹⁵³⁾.

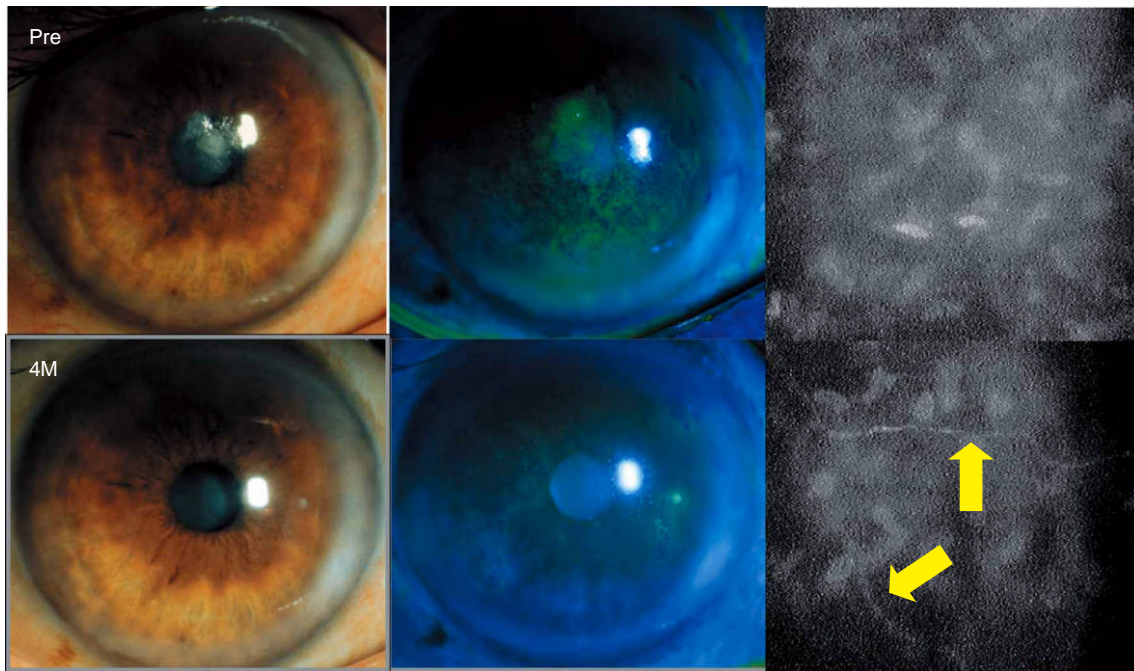


図 27 FGLM-アミド+ IGF-1 点眼剤による遷延性角膜上皮欠損の治療(63 歳, 男性).
共焦点生体顕微鏡で神経の再生が観察できた(矢印).
Pre: 点眼前, 4M: 点眼後 4 か月.

その後, 1997 年 10 月から 2002 年 9 月まで, 神経麻痺性角膜症に伴う遷延性角膜上皮欠損(11 例)に FGLM-アミド+IGF-1 点眼治療を行った. これらの症例は平均 20.2 週にわたり上皮欠損が遷延化していたものである. 11 例中 2 例は治療開始後 1 週以内に完全に上皮欠損が修復し, 7 例でも 2 週以内に修復した. しかし 2 例では上皮の再被覆が認められなかった. すべての症例で点眼による副反応は観察されず, FGLM-アミド+IGF-1 点眼治療が, 神経麻痺性角膜症に伴う遷延性角膜上皮欠損の治療に有効であると考えられた¹⁵⁴⁾.

前述のように, 研究室で IGF-1 の分子構造中, サブスタンス P あるいは FGLM-アミドとの相乗作用に有効なアミノ酸配列が SSSR であるということが見出されたため, 次に FGLM-アミド+SSSR 点眼治療を試みた(図 28). 症例は 59 歳の男性で, 副咽頭間隙腫瘍に対して切除術が行われ, その後約 1 か月して角膜に上皮欠損が生じた典型的な神経麻痺性角膜症の症例である. 比較的周辺がなめらかな曲線を描く大きな上皮欠損で, 欠損部周辺に上皮混濁と盛り上がり認められた. FGLM-アミド+SSSR 点眼を開始して 1 週後には上皮欠損が半分以下に縮小し, 6 週後には完全に消失し, 上皮の状態はきわめてよく保たれていた(図 28). 26 眼での FGLM-アミド+SSSR 点眼治療の治療成績では, 19 眼(73%)で完全な上皮の再被覆が治療開始後 4 週以内に認められた(Yamada ら, 投稿中). ただ, 上皮幹細胞が疲弊している症例では有効ではなく, 角膜上皮欠損の再生には幹細胞が必要であることを示唆している.

このように, サブスタンス P と IGF-1 という組み合わせから始まった研究から, FGLM-アミドと SSSR という小さなペプチドの組み合わせによる点眼が, 神経麻痺性角膜症での遷延性角膜上皮欠損の治療に有効であることが明らかとなり, 現在, 山口大学眼科では, FGLM-アミド+SSSR 点眼を用いて治療を行い, 症例を積み重ねている. Brown らは, サブスタンス P+IGF-1 での治療の経過で, 副反応として小水疱性の発疹が生じたことを報告している¹⁵⁵⁾. 我々の開発してきたペプチドを用いた治療では未だ経験しておらず, 全分子中の作用に有効な部位のアミノ酸配列に基づくペプチド治療が副反応の惹起を軽減あるいは消失していると考えられる. この点については, 今後の多施設での多数例による臨床試験で注意深く検証していかねばならない.

一方, 三叉神経の障害で生じる神経麻痺性角膜症では, 遷延性角膜上皮欠損のみならず治療に抵抗する点状表層角膜症(SPK)も経験する. 前述のように, 熱凝固により三叉神経節を傷害したラットの動物モデルの角膜を観察すると, フルオレセインで点状に染色される SPK が観察され, 角膜上皮の透過性が有意に充進する. 最近の研究でも, サブスタンス P と IGF-1 により, 培養した角膜上皮細胞で, 上皮バリアーとなる tight junctions を構成する蛋白質である ZO-1 の発現が充進していることが示されている. このことは, サブスタンス P と IGF-1 により角膜上皮細胞の分化が促進され, バリアー機能が充進する可能性を示している. そこで FGLM-アミド+SSSR 点眼が, 糖尿病症例の白内障手術後に経験

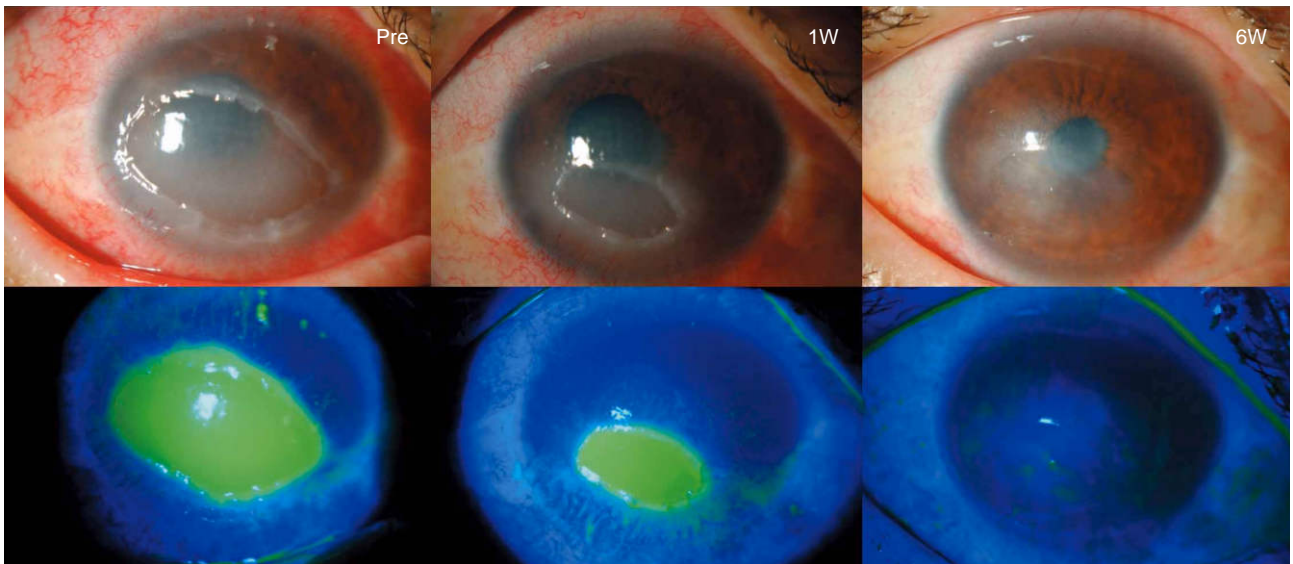


図 28 FGLM-アミド+SSSR 点眼剤による神経麻痺性角膜症での遷延性角膜上皮欠損の治療(副咽頭間隙腫瘍切除術後, 59 歳, 男性)

Pre : 点眼前, 1W : 点眼後 1 週, 6W : 点眼後 6 週.

する SPK の治療や予防に効果があるのかを二重盲検で検討した. SPK の程度を数量化するために, 以前 Miyata らが報告した Area-Density 分類を用いてスコア化し, 両群の SPK の術後の変化を統計学的に検討した¹⁵⁶⁾. プラセボを投与した群では, 白内障手術後 1 日目に SPK スコアが増加し, その後 2 週間にわたり徐々に低下した. 一方, FGLM-アミド+SSSR 点眼を行った群では, 術後 1 日目もほとんどスコアは増加せず, SPK の発生は最小で, 術後 3 日目に, 両群間で統計学的な有意差が認められた. この臨床研究から, FGLM-アミド+SSSR 点眼は, 糖尿病症例での白内障術後の SPK 発生の予防に有効であることが明らかとなった (Chikamoto ら, 未発表).

角膜知覚の低下に伴う神経麻痺性角膜症で, 遷延性角膜上皮欠損のみならず, 点状表層角膜症の予防や治療に FGLM-アミド+SSSR 点眼が有効であることが, 現在までの少数例での臨床研究から示唆されており, 今後多施設での二重盲検による有用性の検証を行う必要がある.

3. 角膜潰瘍治療薬の開発

過去永年にわたりさまざまなコラーゲン分解酵素の阻害剤に関する臨床試験が行われてきたが, どれも明確な臨床的有効性を示すことができなかった. コラーゲン分解酵素である MMP を阻害するために, MMP 阻害剤を治療に用いることが試みられてきた. 血清の点眼, 血液中に含まれる $\alpha 2$ マクログロブリン, EDTA, アセチルシステインやゲルマニウムシステインの点眼, さらに近年では MMP に特異的な合成された酵素阻害剤などが角膜潰瘍の治療薬として試みられた. しかしながら, これらの薬剤は試験管内では間違いなくコラーゲン分解

を阻害するが¹⁵⁷⁾¹¹⁸⁾, 生体内や臨床の間ではその有効性が確認できなかった. 一つの説明として, MMP を阻害しても線維芽細胞や浸潤してきた好中球の活性は抑えきれず, 次から次へと生体内では MMP 蛋白質が合成および分泌され活性化されているのではと考えられる.

臨床的な経験として, 感染がある程度抗菌薬などで抑制された段階で, 副腎皮質ステロイド薬が角膜実質の融解を抑制する. そこで, 副腎皮質ステロイド薬の作用を検討した¹⁵⁸⁾. 角膜線維芽細胞をコラーゲンゲル内で培養し, IL-1 を添加すると線維芽細胞によるコラーゲン分解が著明に促進される. 種々の濃度のデキサメサゾンを追加すると, ステロイドの濃度に応じて, コラーゲンの分解が抑制される (図 29). このとき, 線維芽細胞からの MMP 分泌の阻害や活性化の阻害が観察される. これらの結果から, 副腎皮質ステロイド薬により細菌の LPS や IL-1 により刺激された角膜線維芽細胞や好中球の活性化が抑制され, 線維芽細胞や好中球を介するコラーゲン分解の経路が抑制されることを示している. ただここで臨床的に最も問題となるのは, 副腎皮質ステロイド薬により好中球の活性が抑制されることにより, 逆に残存する細菌が再び活性化してくること, つまり生体の自然免疫を副腎皮質ステロイド薬が抑制することである. 実際の臨床の間では, 抗菌薬により完全に細菌が死滅されているかが大切な判断基準で, 感染性角膜潰瘍の治療の局面で, いつ副腎皮質ステロイド薬を追加するかが大きな問題となる.

我々は角膜潰瘍の治療薬を開発する標的として, 線維芽細胞の機能抑制を考え, 副腎皮質ステロイド薬に変わる薬剤をスクリーニングしてきた. その過程で, 中国の伝統医療で用いられている雷公籐の成分であるトリプト

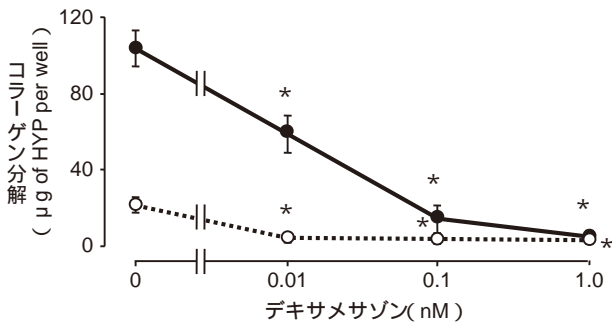


図 29 IL-1 により亢進した角膜線維芽細胞によるコラーゲン分解に対する副腎皮質ステロイド薬の効果。
 ●：IL-1(+), ○：IL-1(-).

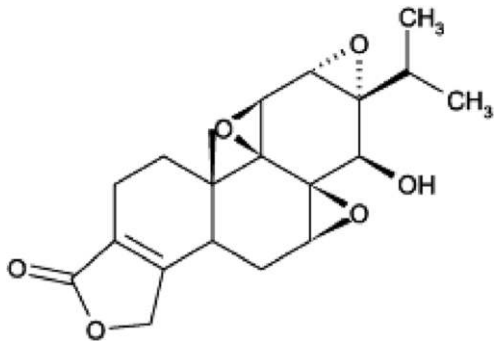


図 30 トリプトライドの分子構造.

ライドが、線維芽細胞によるコラーゲン分解を抑制することを見出した。トリプトライドは、化学構造が決定され現在合成されており、副腎皮質ステロイド薬に類似した構造を有している(図 30)。

コラーゲングル内で培養した角膜線維芽細胞に好中球の培養上清を添加すると前述のようにコラーゲン分解が著明に亢進する。トリプトライドの濃度に依存して、好中球により亢進した角膜線維芽細胞によるコラーゲン分解を抑制した¹⁵⁹⁾(図 31)。トリプトライドは、角膜線維芽細胞による好中球や単球に対するケモカインである IL-8 あるいは MCP-1 および細胞表面の接着分子である ICAM-1 などの合成を抑制した¹⁶⁰⁾。

まだまだ研究は始まったばかりで、すぐに臨床の場で試みるところまでは進んでいないが、トリプトライドが角膜線維芽細胞に作用し細胞を介したコラーゲン分解を抑制する。免疫系の抑制が少ない構造類似物質を見出すことができれば、抗菌薬とともに用いることにより、安心して角膜潰瘍を治療できる薬剤が開発できるのではないかと考えている。

VI おわりに

過去四半世紀にわたり我々が行ってきた角膜上皮細胞と線維芽細胞の細胞生物学的研究と、それらの成果に基づく臨床応用の実際を概説した。

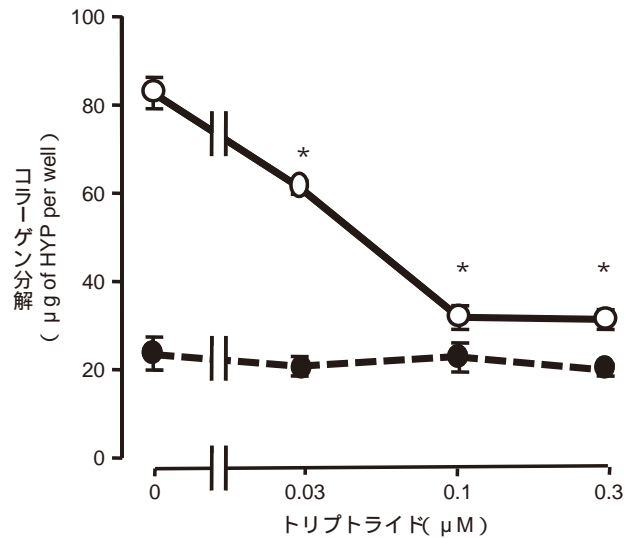


図 31 好中球培養上清により亢進した角膜線維芽細胞によるコラーゲン分解に対するトリプトライドの効果。
 ○：角膜線維芽細胞 + 好中球培養上清,
 ●：角膜線維芽細胞,
 * : p<0.001 vs 0.

角膜はさまざまなレベルでの動的なネットワークにより、その形態や機能が制御されている。角膜上皮の創傷治癒を制御するネットワークの研究から、自己血由来フィブロネクチン点眼療法やサブスタンス P+IGF-1(および部分ペプチド)点眼療法などの遷延性角膜上皮欠損に対するあたらしい治療法の開発につながった。また、角膜線維芽細胞の機能制御を行うネットワークの研究から、新たに角膜潰瘍治療薬の開発への糸口が得られたのではないかと考える。

現在我々が臨床の場で用いることのできる薬剤は、20年あるいは30年前に研究室で試験管内での反応として見出されたものである。たとえ薬剤として有効である可能性が明らかにされたとしても、実際確立した治療法として承認されるまでには、とてつもなく長い時間が必要であるということに改めて実感している。

生涯を通じてほとんど変化しない静かな組織である角膜に、細胞や分子の秘められたダイナミックな動きがある。きわめて静的な角膜の構造と機能は、きわめて活発な動的平衡により支えられている。この動きの中で、一見何も変化しないように見える角膜が維持されている。そして多くの角膜疾患は、この動的平衡の破綻に原因があるとと言っても過言ではない。

追記

本論文では、角膜実質の居住細胞(角膜実質細胞)をすべて角膜線維芽細胞と表現した。本論文で述べた自己血由来フィブロネクチン点眼療法あるいはサブスタンス P+IGF-1(あるいはそれらに由来するペプチド)点眼療法は、山口大学医学部倫理委員会で臨床研究として承認を受け、書面によるイン

フォームドコンセントを得た後に行った。

謝辞

日本眼科学会総会において特別講演の機会を賜り、日本眼科学会の田野保雄理事長(講演時)、第 111 回日本眼科学会総会の下村嘉一総会長、理事、監事、評議員の諸先生方および日本眼科学会会員の先生方に、心より厚く御礼申し上げる。また木下 茂先生(京都府立医科大学教授)には、当日座長の労をお取りいただき深く感謝申し上げます。

大阪大学、近畿大学、山口大学そして Boston 時代を通じて、いろいろな局面で、多くの先生方のご支援やご指導を賜った。特にこのすばらしく楽しい角膜の研究にお導き下さった眞鍋禮三先生(大阪大学名誉教授)、ならびに厳しいながらも慈愛のあふれるご指導をいただいた大鳥利文先生(近畿大学名誉教授)に心よりの感謝を申し上げたい。1977 年から 1980 年の 3 年間は、Boston の Eye Research Institute of Retina Foundation において、故 Charles Schepens 先生と故向井紀次先生に、研究者のあり方や研究室と臨床の橋渡しについてご指導を受けることができ、一つの時代を築き上げられた巨人に接することができたことは本当に幸運であった。Philadelphia の Wills Eye Hospital の Peter Laibson 先生と、東京大学の故三島濟一先生には、一度も直接師事する機会は無かったが、いつも励まして下さり、目の前にある研究成果のその先に何かあるのかを示して下さり、貴重なご指導をいただくことができた。お二人は何よりも私自身の憧れでもあり、改めて、衷心から感謝の思いを捧げたい。

振り返ってみると、大学人としての私自身の研究生活を支えてきたのは、眼科医として、今、治すことができないことへの悔しさであり、何とか解決策を求めようとする探求心と執着心であった¹⁶¹⁾。研究では、常に予測した結果が生まれただけではなく、逆に失望したことが多かったかもしれない。しかし、何か成績が出たとき、新しい発見があったときに、素直に感動する心を持てたことが、持続へのエネルギーになった。ただ、それも自分一人では決して成し得なかったことであり、一緒に研究や診療を行ってくれた教室員や良き仲間存在に負うことが多く、心より感謝している。

文 献

- 1) Nishida T, Saito M, Suda M : Parallel between circadian rhythms of intestinal disaccharidases and food intake of rats under constant lighting conditions. *Gastroenterology* 74 : 224—227, 1978.
- 2) Nishida T : Cornea. In : Krachmer JH, et al (Eds) : *Cornea : Fundamentals of cornea and external disease*, 2nd ed. Mosby, New York, v. 1, 2005.
- 3) Gordon RA, Donzis PB : Refractive development of the human eye. *Arch Ophthalmol* 103 : 785—789, 1985.
- 4) Maurice DM : The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 136 : 263—286, 1957.
- 5) Mishima S : Corneal thickness. *Surv Ophthalmol* 13 : 57—96, 1968.
- 6) Mishima S : Clinical investigations on the corneal endothelium-XXXVIII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 93 : 1—29, 1982.
- 7) Vogt A : Textbook and atlas of slit lamp microscopy of the living eye. Godesberg, Germany, Wayenborgh, 1981.
- 8) Bourne WM, Enoch JM : Some optical principles of the clinical specular microscope. *Invest Ophthalmol* 15 : 29—32, 1976.
- 9) Bourne WM, McCarey BE, Kaufman HE : Clinical specular microscopy. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 81 : 743—753, 1976.
- 10) Maurice DM, Giardini AA : A simple optical apparatus for measuring the corneal thickness, and the average thickness of the human cornea. *Br J Ophthalmol* 35 : 169—177, 1951.
- 11) Mishima S, Hedbys BO : Measurement of corneal thickness with the Haag-Streit pachometer. *Arch Ophthalmol* 80 : 710—713, 1968.
- 12) Jester JV, Andrews PM, Petroll WM, Lemp MA, Cavanagh HD : *In vivo*, real-time confocal imaging. *J Electron Microscop Tech* 18 : 50—60, 1991.
- 13) Jester JV, Petroll WM, Garana RM, Lemp MA, Cavanagh HD : Comparison of *in vivo* and *ex vivo* cellular structure in rabbit eyes detected by tandem scanning microscopy. *J Microsc* 165 : 169—181, 1992.
- 14) Mastropasqua L, Nubile M : Confocal microscopy of the cornea. Slack Inc., Thorofare, 2002.
- 15) Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, He YG, McCulley JP, Jester JV : Clinical and diagnostic use of *in vivo* confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology* 100 : 1444—1454, 1993.
- 16) Lemp MA, Dilly PN, Boyde A : Tandem-scanning (confocal) microscopy of the full-thickness cornea. *Cornea* 4 : 205—209, 1985.
- 17) Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV : Three-dimensional imaging of corneal cells using *in vivo* confocal microscopy. *J Microsc* 170 : 213—219, 1993.
- 18) Stave J, Zinser G, Grummer G, Guthoff R : Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of *in vivo* presentation of corneal structures. *Ophthalmologie* 99 : 276—280, 2002.
- 19) Zhivov A, Stachs O, Kraak R, Stave J, Guthoff RF : *In vivo* confocal microscopy of the ocular surface. *Ocul Surf* 4 : 81—93, 2006.
- 20) Guthoff R, Baudouin C, Stave J : Atlas of confocal laser scanning *in-vivo* microscopy in ophthalmology. Springer-Verlag, Berlin, 2006.
- 21) Wakuta M, Chikama T, Takahashi N, Nishida T : A case of bilateral corneal epithelial dysplasia

- characterized by laser confocal biomicroscopy and cytokeratin immunofluorescence. *Cornea* 27 : 107—110, 2008.
- 22) **Mishima S, Hedbys BO** : The permeability of the corneal epithelium and endothelium to water. *Exp Eye Res* 6 : 10—32, 1967.
- 23) **Otori T** : Electrolyte content of the rabbit corneal stroma. *Exp Eye Res* 6 : 356—367, 1967.
- 24) **Ueda A, Nishida T, Otori T, Fujita H** : Electron-microscopic studies on the presence of gap junctions between corneal fibroblasts in rabbits. *Cell Tissue Res* 249 : 473—475, 1987.
- 25) **Nishida T, Yasumoto K, Otori T, Desaki J** : The network structure of corneal fibroblasts in the rat as revealed by scanning electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 : 1887—1890, 1988.
- 26) **Hao JL, Suzuki K, Lu Y, Hirano S, Fukuda K, Kumagai N**, et al : Inhibition of gap junction-mediated intercellular communication by TNF- α in cultured human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1195—2000, 2005.
- 27) **西田輝夫** : 組織培養を用いた角膜創傷治療の研究. 塚原 勇 (編) : 眼科領域における最新の進歩. 医学教育出版社, 東京, 1985.
- 28) **Nishida T** : Biology of corneal stromal keratocytes. In : Kinoshita S, et al (Eds) : Current opinions in the Kyoto Cornea Club. Kugler, Amsterdam, 1997.
- 29) **Belmonte C, Aracil A, Acosta MC, Luna C, Gallar J** : Nerves and sensations from the eye surface. *Ocul Surf* 2 : 248—254, 2004.
- 30) **Abd-El-Malek S** : On the presence of sensory fibres in the ocular nerves. *J Anat* 72 : 524—530, 1938.
- 31) **Muller LJ, Vrensen GF, Pels L, Cardozo BN, Willekens B** : Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 985—994, 1997.
- 32) **Marfurt CF, Murphy CJ, Florczak JL** : Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 2242—2251, 2001.
- 33) **Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM** : Corneal nerves : structure, contents and function. *Exp Eye Res* 76 : 521—542, 2003.
- 34) **Magendie PA** : De l'influence de la cinquieme paire de nerfs sur la nutrition et les fonctions de l'oeil. *J Physiol (Paris)* 4 : 176—177, 1824.
- 35) **Rose W** : Surgical treatment of trigeminal neuralgia. *The Lancet* 1 : 295—302, 1892.
- 36) **Paton L** : The trigeminal nerve and its ocular lesions. *Br J Ophthalmol* 10 : 305—342, 1926.
- 37) **Jaffe M** : Neuroparalytic keratitis. *Arch Ophthalmol* 20 : 688—689, 1938.
- 38) **Mishima S** : The effects of the denervation and the stimulation of the sympathetic and the trigeminal nerve on the mitotic rate of the corneal epithelium in the rabbit. *Jpn J Ophthalmol* 1 : 65—73, 1957.
- 39) **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.
- 40) **Tervo K, Tervo T, Eranko L, Eranko O** : Substance P immunoreactive nerves in the rodent cornea. *Neurosci Lett* 25 : 95—97, 1981.
- 41) **Tervo K, Tervo T, Eranko L, Vannas A, Cuello AC, Eranko O** : Substance P-immunoreactive nerves in the human cornea and iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23 : 671—674, 1982.
- 42) **Ehinger B, Sundler F, Tervo K, Tervo T, Tornqvist K** : Substance P fibres in the anterior segment of the rabbit eye. *Acta Physiol Scand* 118 : 215—218, 1983.
- 43) **Jones MA, Marfurt CF** : Peptidergic innervation of the rat cornea. *Exp Eye Res* 66 : 421—435, 1998.
- 44) **Shimizu Y, Kuwayama Y, Fukuda M, Ishimoto I, Shiosaka S, Inagaki S**, et al : Localization of substance P-like immunoreactivity in the anterior eye segment of squirrels : an immunohistochemical analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22 : 259—263, 1982.
- 45) **Sasaoka A, Ishimoto I, Kuwayama Y, Sakiyama T, Manabe R, Shiosaka S**, et al : Overall distribution of substance P nerves in the rat cornea and their three-dimensional profiles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 351—356, 1984.
- 46) **Kuwayama Y, Stone RA** : Distinct substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in the guinea pig eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 1947—1954, 1987.
- 47) **Nishida T, Ueda A, Fukuda M, Mishima H, Yasumoto K, Otori T** : Interactions of extracellular collagen and corneal fibroblasts : morphologic and biochemical changes of rabbit corneal cells cultured in a collagen matrix. *In Vitro Cell Dev Biol* 24 : 1009—1014, 1988.
- 48) **Fujita H, Ueda A, Nishida T, Otori T** : Uptake of india ink particles and latex beads by corneal fibroblasts. *Cell Tissue Res* 250 : 251—255, 1987.
- 49) **Nishida T, Ueda A, Otori T, Fujita H** : Long-term storage of endocytosed latex beads in keratocytes *in vivo*. *Cornea* 10 : 532—535, 1991.
- 50) **Mishima H, Yasumoto K, Nishida T, Otori T** : Fibronectin enhances the phagocytic activity of cultured rabbit keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 1521—1526, 1987.
- 51) **Mishima H, Nishida T, Otori T** : Dexamethasone inhibition of phagocytosis by corneal keratocytes in culture. *Arch Ophthalmol* 106 : 978—980, 1988.
- 52) **Mishima H, Ueda A, Nishida T, Otori T** : Increased lysosomal enzyme activity of keratocytes after endocytosis of foreign particles. *Jpn J Ophthalmol* 36 : 84—90, 1992.
- 53) **Nishida T** : Extracellular matrix and growth

- factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 4 : 4—13, 1993.
- 54) **Nishida T, Tanaka T** : Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 7 : 2—11, 1996.
 - 55) **Murakami J, Morimoto K, Nishida T, Otori T** : Movement of corneal epithelium of rats *in situ* observed by time-lapse cinematography. In : Shimizu K (Ed) : *Current Aspects in Ophthalmology*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, v. 1., 1992.
 - 56) **Suda T, Nishida T, Ohashi Y, Nakagawa S, Manabe R** : Fibronectin appears at the site of corneal stromal wound in rabbits. *Curr Eye Res* 1 : 553—556, 1981.
 - 57) **Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, Lanigan JM, Colvin RB** : Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest* 45 : 120—129, 1981.
 - 58) **Nishida T, Ohashi Y, Inoue Y, Nakagawa S, Awata T, Suda T, et al** : Dynamics of fibronectin in corneal wound healing : Immunohistochemical study of experimental bullous keratopathy in rabbits. *Cornea* 1 : 311—317, 1982.
 - 59) **Ohashi Y, Nakagawa S, Nishida T, Suda T, Watanabe K, Manabe R** : Appearance of fibronectin in rabbit cornea after thermal burn. *Jpn J Ophthalmol* 27 : 547—555, 1983.
 - 60) **van Setten GB, Koch JW, Tervo K, Lang GK, Tervo T, Naumann GO, et al** : Expression of tenascin and fibronectin in the rabbit cornea after excimer laser surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 230 : 178—183, 1992.
 - 61) **Tanaka T, Furutani S, Nakamura M, Nishida T** : Changes in extracellular matrix components after excimer laser photoablation in rat cornea. *Jpn J Ophthalmol* 43 : 348—354, 1999.
 - 62) **Tanaka T, Furutani-Miura S, Nakamura M, Nishida T** : Immunohistochemical study of localization of extracellular matrix after holmium YAG laser irradiation in rat cornea. *Jpn J Ophthalmol* 44 : 482—488, 2000.
 - 63) **Araki K, Ohashi Y, Sasabe T, Kinoshita S, Hayashi K, Yang XZ, et al** : Immortalization of rabbit corneal epithelial cells by a recombinant SV40-adenovirus vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 2665—2671, 1993.
 - 64) **Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, et al** : An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 614—621, 1995.
 - 65) **Nishida T, Nakagawa S, Watanabe K, Yamada KM, Otori T, Berman MB** : A peptide from fibronectin cell-binding domain inhibits attachment of epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 : 1820—1825, 1988.
 - 66) **Ohji M, Mandarino L, SundarRaj N, Thoft RA** : Corneal epithelial cell attachment with endogenous laminin and fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 2487—2492, 1993.
 - 67) **Watanabe K, Nakagawa S, Nishida T** : Chemotactic and haptotactic activities of fibronectin for cultured rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 : 572—577, 1988.
 - 68) **Murakami J, Nishida T, Otori T** : Coordinated appearance of beta 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. *J Lab Clin Med* 120 : 86—93, 1992.
 - 69) **Nishida T, Nakagawa S** : Expression of fibronectin receptors in corneal epithelial cells. In : Beuerman R, et al (Eds) : *Healing processes in the cornea*. The Portfolio Publishing Co., The Woodlands, Texas, v. 1, 1989.
 - 70) **Stepp MA, Spurr-Michaud S, Gipson IK** : Integrins in the wounded and unwounded stratified squamous epithelium of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 1829—1844, 1993.
 - 71) **Nishida T, Murakami J, Otori T** : Expression of fibronectin receptor (integrin) in the uterus of rats in relation to the estrous cycle. *Histochemistry* 96 : 279—283, 1991.
 - 72) **Grinnell F, Billingham RE, Burgess L** : Distribution of fibronectin during wound healing *in vivo*. *J Invest Dermatol* 76 : 181—189, 1981.
 - 73) **Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB** : Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 79 : 264—269, 1982.
 - 74) **Clark RA** : Fibronectin in the skin. *J Invest Dermatol* 81 : 475—479, 1983.
 - 75) **Grinnell F** : Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem* 26 : 107—116, 1984.
 - 76) **Takashima A, Grinnell F** : Human keratinocyte adhesion and phagocytosis promoted by fibronectin. *J Invest Dermatol* 83 : 352—358, 1984.
 - 77) **Takashima A, Grinnell F** : Fibronectin-mediated keratinocyte migration and initiation of fibronectin receptor function *in vitro*. *J Invest Dermatol* 85 : 304—308, 1985.
 - 78) **Igisu K** : The role of fibronectin in the process of wound healing. *Thromb Res* 44 : 455—465, 1986.
 - 79) **Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R** : Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea *in situ*. *J Cell Biol* 97 : 1653—1657, 1983.
 - 80) **Watanabe K, Nakagawa S, Nishida T** : Stimulatory effects of fibronectin and EGF on migration of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 205—211, 1987.
 - 81) **Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T** : Differential modes of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration. *J Cell Physiol* 145 : 549—554, 1990.

- 82) **Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T** : Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. *Exp Eye Res* 53 : 753—758, 1991.
- 83) **Nakamura M, Nishida T, Hikida M, Otori T** : Combined effects of hyaluronan and fibronectin on corneal epithelial wound closure of rabbit *in vivo*. *Curr Eye Res* 13 : 385—388, 1994.
- 84) **Nakamura M, Nishida T** : Recent developments in the use of hyaluronan in wound healing. *Expert Opin Investig Drugs* 4 : 175—188, 1995.
- 85) **Nakamura M, Sato N, Chikama TI, Hasegawa Y, Nishida T** : Hyaluronan facilitates corneal epithelial wound healing in diabetic rats. *Exp Eye Res* 64 : 1043—50, 1997.
- 86) **Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T** : Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 153 : 1—5, 1992.
- 87) **Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T, Hikida M** : Interleukin 6 facilitates corneal epithelial wound closure *in vivo*. *Arch Ophthalmol* 110 : 1292—1294, 1992.
- 88) **Watanabe M, Kondo S, Mizuno K, Yano W, Nakao H, Hattori Y**, et al : Promotion of corneal epithelial wound healing *in vitro* and *in vivo* by annexin A5. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 1862—1868, 2006.
- 89) **Kimura K, Hattori A, Usui Y, Kitazawa K, Naganuma M, Kawamoto K**, et al : Stimulation of corneal epithelial migration by a synthetic peptide (PHSRN) corresponding to the second cell-binding site of fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1110—1118, 2007.
- 90) **Nakamura M, Mishima H, Nishida T, Otori T** : Binding of hyaluronan to plasma fibronectin increases the attachment of corneal epithelial cells to a fibronectin matrix. *J Cell Physiol* 159 : 415—422, 1994.
- 91) **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.
- 92) **Ohashi H, Maeda T, Mishima H, Otori T, Nishida T, Sekiguchi K** : Up-regulation of integrin alpha 5 beta 1 expression by interleukin-6 in rabbit corneal epithelial cells. *Exp Cell Res* 218 : 418—423, 1995.
- 93) **Nakamura M, Chikama T, Nishida T** : Up-regulation of integrin alpha 5 expression by combination of substance P and insulin-like growth factor-1 in rabbit corneal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246 : 777—82, 1998.
- 94) **Nishida T, Nakagawa S, Nishibayashi C, Tanaka H, Manabe R** : Fibronectin enhancement of corneal epithelial wound healing of rabbits *in vivo*. *Arch Ophthalmol* 102 : 455—456, 1984.
- 95) **Nakamura M, Sato N, Chikama T, Hasegawa Y, Nishida T** : Fibronectin facilitates corneal epithelial wound healing in diabetic rats. *Exp Eye Res* 64 : 355—359, 1997.
- 96) **Phan TM, Foster CS, Wasson PJ, Fujikawa LS, Zagachin LM, Colvin RB** : Role of fibronectin and fibrinogen in healing of corneal epithelial scrape wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 377—385, 1989.
- 97) **Phan TM, Foster CS, Zagachin LM, Colvin RB** : Role of fibronectin in the healing of superficial keratectomies *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 386—391, 1989.
- 98) **Phan TM, Foster CS, Shaw CD, Zagachin LM, Colvin RB** : Topical fibronectin in an alkali burn model of corneal ulceration in rabbits. *Arch Ophthalmol* 109 : 414—419, 1991.
- 99) **Cavanagh HD, Colley AM** : The molecular basis of neurotrophic keratitis. *Acta Ophthalmol Suppl* 192 : 115—134, 1989.
- 100) **Davis EA, Dohlman CH** : Neurotrophic keratitis. *Int Ophthalmol Clin* 41 : 1—11, 2001.
- 101) **Goins KM** : New insights into the diagnosis and treatment of neurotrophic keratopathy. *Ocul Surf* 3 : 96—111, 2005.
- 102) **Nishida T** : Neurotrophic mediators and corneal wound healing. *Ocul Surf* 3 : 194—202, 2005.
- 103) **Yamada M, Ogata M, Kawai M, Mashima Y** : Decreased substance P concentrations in tears from patients with corneal hypesthesia. *Am J Ophthalmol* 129 : 671—672, 2000.
- 104) **Yamada M, Ogata M, Kawai M, Mashima Y, Nishida T** : Substance P and its metabolites in normal human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2622—2625, 2002.
- 105) **Yamada M, Ogata M, Kawai M, Mashima Y, Nishida T** : Substance P in human tears. *Cornea* 22 : S48—54, 2003.
- 106) **Yamada M, Ogata M, Kawai M, Mochizuki H, Mashima Y** : Topical diclofenac sodium decreases the substance P content of tears. *Arch Ophthalmol* 120 : 51—54, 2002.
- 107) **Nishida T, Nakamura M, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ** : Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol* 169 : 159—166, 1996.
- 108) **Nakamura M, Nishida T, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ** : Synergistic effect of substance P with epidermal growth factor on epithelial migration in rabbit cornea. *Exp Eye Res* 65 : 321—329, 1997.
- 109) **Nakamura M, Ofuji K, Chikama T, Nishida T** : The NK1 receptor and its participation in the synergistic enhancement of corneal epithelial migration by substance P and insulin-like growth factor-1. *Br J Pharmacol* 120 : 547—552, 1997.

- 110) **Ofuji K, Nakamura M, Nishida T** : Signaling regulation for synergistic effects of substance P and insulin-like growth factor-1 or epidermal growth factor on corneal epithelial migration. *Jpn J Ophthalmol* 44 : 1—8, 2000.
- 111) **Nakamura M, Chikama T, Nishida T** : Participation of p38 MAP kinase, but Not p44/42 MAP kinase, in stimulation of corneal epithelial migration by substance P and IGF-1. *Curr Eye Res* 30 : 825—834, 2005.
- 112) **Yamada N, Yanai R, Inui M, Nishida T** : Sensitizing effect of substance P on corneal epithelial migration induced by IGF-1, fibronectin, or interleukin-6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 833—839, 2005.
- 113) **Chikama T, Nakamura M, Nishida T** : Up-regulation of integrin alpha5 by a C-terminus four-amino-acid sequence of substance P (phenylalanine-glycine-leucine-methionine-amide) synergistically with insulin-like growth factor-1 in SV-40 transformed human corneal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 255 : 692—697, 1999.
- 114) **Nakamura M, Nagano T, Chikama T, Nishida T** : Up-regulation of phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin by combination of substance P and IGF-1 in SV-40 transformed human corneal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 242 : 16—20, 1998.
- 115) **Nakamura M, Ofuji K, Chikama T, Nishida T** : Combined effects of substance P and insulin-like growth factor-1 on corneal epithelial wound closure of rabbit *in vivo*. *Curr Eye Res* 16 : 275—278, 1997.
- 116) **Nagano T, Nakamura M, Nakata K, Yamaguchi T, Takase K, Okahara A, et al** : Effects of substance P and IGF-1 in corneal epithelial barrier function and wound healing in a rat model of neurotrophic keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 3810—3815, 2003.
- 117) **Hyndiuk RA, Cokington CD** : Bacterial keratitis. In : Tabbara KF, et al (Eds) : *Infection of the eye*, 2nd ed. Little Brown, Boston, 1996.
- 118) **Hao JL, Nagano T, Nakamura M, Kumagai N, Mishima H, Nishida T** : Effect of galardin on collagen degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp Eye Res* 69 : 595—601, 1999.
- 119) **Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N** : Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 4 : 915—926, 2002.
- 120) **Schultz CL, Morck DW, McKay SG, Olson ME, Buret A** : Lipopolysaccharide induced acute red eye and corneal ulcers. *Exp Eye Res* 64 : 3—9, 1997.
- 121) **Kumagai N, Fukuda K, Fujitsu Y, Lu Y, Chikamoto N, Nishida T** : Lipopolysaccharide-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and chemokines in cultured human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 114—120, 2005.
- 122) **Fukuda K, Kumagai N, Yamamoto K, Fujitsu Y, Chikamoto N, Nishida T** : Potentiation of lipopolysaccharide-induced chemokine and adhesion molecule expression in corneal fibroblasts by soluble CD14 or LPS-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3095—3101, 2005.
- 123) **Li Q, Fukuda K, Lu Y, Nakamura Y, Chikama T, Kumagai N, et al** : Enhancement by neutrophils of collagen degradation by corneal fibroblasts. *J Leukoc Biol* 74 : 412—419, 2003.
- 124) **Morimoto K, Mishima H, Nishida T, Otori T** : Role of urokinase type plasminogen activator (u-PA) in corneal epithelial migration. *Thromb Haemost* 69 : 387—391, 1993.
- 125) **Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Nishibayashi C, Manabe R** : Rapid preparation of purified autologous fibronectin eyedrops from patient's plasma. *Jpn J Ophthalmol* 26 : 416—424, 1982.
- 126) **Shimizu M, Moon M, Shirono C, Minakuchi K, Nishimura T, Koga J, et al** : Establishment of a standardized assay system of fibronectin activity using fibronectin-mediated cell adhesion. *Biol Pharm Bull* 20 : 1219—1223, 1997.
- 127) **Nishida T, Ohashi Y, Awata T, Manabe R** : Fibronectin. A new therapy for corneal trophic ulcer. *Arch Ophthalmol* 101 : 1046—1048, 1983.
- 128) **Nishida T, Nakagawa S, Manabe R** : Clinical evaluation of fibronectin eyedrops on epithelial disorders after herpetic keratitis. *Ophthalmology* 92 : 213—216, 1985.
- 129) **Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Tani Y, Manabe R** : Fibronectin eyedrops for traumatic recurrent corneal lesion. *Lancet* 2 : 521—522, 1983.
- 130) **Nishida T, Yagi J, Fukuda M, Kusube T, Otori T** : Spontaneous persistent epithelial defects after cataract surgery. *Cornea* 6 : 32—37, 1987.
- 131) **Harnisch JP, Sinha PK** : Fibronectins : a possible treatment of therapy-resistant corneal ulcers. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 187 : 53—56, 1985.
- 132) **McCluskey P, Wakefield D, York L** : Topical fibronectin therapy in persistent corneal ulceration. *Aust N Z J Ophthalmol* 15 : 257—262, 1987.
- 133) **Phan TM, Foster CS, Boruchoff SA, Zagachin LM, Colvin RB** : Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers. *Am J Ophthalmol* 104 : 494—501, 1987.
- 134) **Spigelman AV, Deutsch TA, Sugar J** : Application of homologous fibronectin to persistent human corneal epithelial defects. *Cornea* 6 : 128—130, 1987.
- 135) **Kim KS, Oh JS, Kim IS, Jo JS** : Topical fibronectin treatment in persistent corneal epithelial defects and corneal ulcers. *Korean J Ophthalmol* 4 : 5—11, 1990.

- 136) **Qu XA** : Treatment of persistent corneal epithelial disorders with human plasma fibronectin eyedrops. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 26 : 21—23, 1990.
- 137) **Kim KS, Oh JS, Kim IS, Jo JS** : Clinical efficacy of topical homologous fibronectin in persistent corneal epithelial disorders. *Korean J Ophthalmol* 6 : 12—18, 1992.
- 138) **McCulley JP, Horowitz B, Husseini ZM, Horowitz M** : Topical fibronectin therapy of persistent corneal epithelial defects. Fibronectin Study Group. *Trans Am Ophthalmol Soc* 91 : 367—86 ; discussion 86—90, 1993.
- 139) **Gordon JF, Johnson P, Musch DC** : Topical fibronectin ophthalmic solution in the treatment of persistent defects of the corneal epithelium. Chiron Vision Fibronectin Study Group. *Am J Ophthalmol* 119 : 281—287, 1995.
- 140) **Saito J, Enoki M, Hara M, Morishige N, Chikama T, Nishida T** : Correlation of corneal sensation, but not of basal or reflex tear secretion, with the stage of diabetic retinopathy. *Cornea* 22 : 15—18, 2003.
- 141) **Matsui H, Kumano Y, Zushi I, Yamada T, Matsui T, Nishida T** : Corneal sensation after correction of myopia by photorefractive keratectomy and laser *in situ* keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 27 : 370—373, 2001.
- 142) **Kumano Y, Matsui H, Zushi I, Mawatari A, Matsui T, Nishida T, et al** : Recovery of corneal sensation after myopic correction by laser *in situ* keratomileusis with a nasal or superior hinge. *J Cataract Refract Surg* 29 : 757—761, 2003.
- 143) **Wilson SE** : Laser *in situ* keratomileusis-induced (presumed) neurotrophic epitheliopathy. *Ophthalmology* 108 : 1082—1087, 2001.
- 144) **Wilson SE, Ambrosio R** : Laser *in situ* keratomileusis-induced neurotrophic epitheliopathy. *Am J Ophthalmol* 132 : 405—406, 2001.
- 145) **西田輝夫** : 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.
- 146) **Nakamura M, Chikama T, Nishida T** : Synergistic effect with Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ of the C-terminal of substance P and insulin-like growth factor-1 on epithelial wound healing of rabbit cornea. *Br J Pharmacol* 127 : 489—497, 1999.
- 147) **Nakamura M, Kawahara M, Morishige N, Chikama T, Nakata K, Nishida T** : Promotion of corneal epithelial wound healing in diabetic rats by the combination of a substance P-derived peptide (FGLM-NH₂) and insulin-like growth factor-1. *Diabetologia* 46 : 839—842, 2003.
- 148) **Yamada N, Yanai R, Nakamura M, Inui M, Nishida T** : Role of the C domain of IGFs in synergistic promotion, with a substance P-derived peptide, of rabbit corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1125—1131, 2004.
- 149) **Yamada N, Yanai R, Kawamoto K, Nagano T, Nakamura M, Inui M, et al** : Promotion of corneal epithelial wound healing by a tetrapeptide (SSSR) derived from IGF-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 3286—3292, 2006.
- 150) **Nakamura M, Kawahara M, Nakata K, Nishida T** : Restoration of corneal epithelial barrier function and wound healing by substance P and IGF-1 in rats with capsaicin-induced neurotrophic keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 2937—2940, 2003.
- 151) **Brown SM, Lamberts DW, Reid TW, Nishida T, Murphy CJ** : Neurotrophic and anhidrotic keratopathy treated with substance P and insulinlike growth factor 1. *Arch Ophthalmol* 115 : 926—927, 1997.
- 152) **Chikama T, Fukuda K, Morishige N, Nishida T** : Treatment of neurotrophic keratopathy with substance-P-derived peptide (FGLM) and insulinlike growth factor I. *Lancet* 351 : 1783—1784, 1998.
- 153) **Morishige N, Komatsubara T, Chikama T, Nishida T** : Direct observation of corneal nerve fibres in neurotrophic keratopathy by confocal biomicroscopy. *Lancet* 354 : 1613—1614, 1999.
- 154) **Nishida T, Chikama T, Morishige N, Yanai R, Yamada N, Saito J** : Persistent epithelial defects due to neurotrophic keratopathy treated with a substance P—derived peptide and insulin-like growth factor—1. *Jpn J Ophthalmol* 51 : 442—447, 2007.
- 155) **Brown SM, Khanani AM, Stetson CL, Reid TW** : Vesicular eruption in a child with trigeminal nerve palsy during topical therapy with substance p and insulinlike growth factor I for neurotrophic keratitis. *Arch Ophthalmol* 122 : 1722—1723, 2004.
- 156) **Miyata K, Amano S, Sawa M, Nishida T** : A novel grading method for superficial punctate keratopathy magnitude and its correlation with corneal epithelial permeability. *Arch Ophthalmol* 121 : 1537—1539, 2003.
- 157) **Hao JL, Nagano T, Nakamura M, Kumagai N, Mishima H, Nishida T** : Galardin inhibits collagen degradation by rabbit keratocytes by inhibiting the activation of pro-matrix metalloproteinases. *Exp Eye Res* 68 : 565—572, 1999.
- 158) **Lu Y, Fukuda K, Liu Y, Kumagai N, Nishida T** : Dexamethasone inhibition of IL-1-induced collagen degradation by corneal fibroblasts in three-dimensional culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2998—3004, 2004.
- 159) **Lu Y, Fukuda K, Seki K, Nakamura Y, Kumagai N, Nishida T** : Inhibition by triptolide of IL-1-induced collagen degradation by corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 5082—5088, 2003.
- 160) **Lu Y, Fukuda K, Nakamura Y, Kimura K,**

Kumagai N, Nishida T : Inhibitory effect of triptolide on chemokine expression induced by proinflammatory cytokines in human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 2346—

2352, 2005.

161) **Nishida T** : The path from the laboratory to the clinic in corneal research. *Asia-Pacific J Ophthalmol* 10 : 2—8, 1998.

Comment : 眞鍋 禮三

西田輝夫教授は過去 30 年以上にわたり、一貫して角膜の基礎ならびに臨床研究に従事して来られた日本を代表する研究者である。西田教授の研究活動の基礎は 1971 年に大阪大学医学部を卒業後、直ちに大阪大学蛋白質研究所に入所して須田正巳教授から基礎医学の研究法を学び、須田教授とともに愛媛大学医学部第 1 生化学教室に移った後は生化学の研究法を習得したうえで、1977 年には、Eye Research Institute of Retina Foundation(ボストン)に留学して、向井紀次教授の下で病理学ならびに細胞生物学的な研究方法などを学んで蓄積したものである。卒後 10 年目(1980 年)に、臨床医学系の大阪大学眼科学教室に入局したのも、それまでに蓄えてきた基礎医学での研究成果を臨床医学に応用するという彼の夢を実現させるためだったのではなかったかと思っている。すなわち、西田教授は大阪大学眼科学教室に入局 2 年後には、遷延性角膜上皮欠損症に対するフィブロネクチンの効果を世界で初めて発見し、その後、ライフワークとなったフィブロネクチンなどの細胞外マトリックス、成長因子やサイトカインによる角膜創傷治癒の分子細胞生物学的機序の解明を 1984 年に近畿大学講師(医学部眼科学)に就任した後も、1993 年に山口大学教授(医学部眼科学)に就任した後も多くの優秀な教室員らとともに続け、その成果を集大成したものが本論文である。

本論文ではまず、角膜の生理的機能と構造について解説し、次いで構造と機能を維持するネットワークとしての細胞性ネットワーク、細胞と細胞外マトリックスとの相関、液性因子によるサイトカインネットワーク、神経系因子による調節機構などのネットワークのシステムについて述べた後、これらのネットワークが破綻して生じる遷延性角膜上皮欠損と角膜潰瘍の発症メカニズムとその治療薬の開発について述べている。特に、発端となった遷延性角膜上皮欠損症の治療薬として自己血由来のフィブロネクチン点眼液自動作製装置を開発したり、フィブロネクチン第 2 結合部位のペプチド(PHSRN)の角膜上皮に対する作用を検討したうえで治療を試みたり、神経麻痺性角膜症の治療薬として FGLM(サブスタンス P の C 末端の 4 個のアミノ酸配列)+SSSR(インスリン成長因子の C ドメインの 4 個のアミノ酸配列)の製剤開発を行ったり、その他の角膜潰瘍治療薬の開発にも精力を注いでいる。今後益々の発展を期待するものである。