

平成 19 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

Insulin-like growth factor-1 由来テトラペプチド SSSR による
角膜上皮創傷治癒促進

山田 直之

山口大学大学院医学系研究科眼科学

要 約

我々は、神経麻痺性角膜症の治療法として Substance P + insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 点眼療法を開発し報告してきた。また、Substance P の最小必須配列は FGLM-NH₂であることを同定した。今回、IGF-1 の最小必須配列の同定を行った。ウサギ角膜片をさまざまな薬物を添加した培養液中で 24 時間培養し、実質切断面上を伸長した角膜上皮細胞層の長さを計測した。IGF-1 の C ドメインは角膜上皮伸長に対して FGLM-NH₂ と相乗作用を示した。C ドメイン中の S 33, S 34, S 35, R 36 をそれぞれアラニン置換すると相乗作用は認められ

なかった。SSSR ペプチドは相乗作用を示した。また、SSSR ペプチドは血管新生作用と細胞増殖作用を認めなかった。角膜上皮伸長に対する Substance P (FGLM-NH₂) との相乗作用に必要な IGF-1 の最小必須配列は SSSR であり、点眼薬としても安全かつ有効である。(日眼会誌 112 : 984—993, 2008)

キーワード : Substance P, IGF-1, SSSR, 神経麻痺性角膜症, 遷延性角膜上皮欠損

A Review

Promotion of Corneal Epithelial Wound Healing with a Tetrapeptide (SSSR)
Derived from Insulin-like Growth Factor-1

Naoyuki Yamada

Department of Ophthalmology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

Abstract

We have shown that the combination of insulin-like growth factor (IGF)-1 and substance P (SP) synergistically facilitates corneal wound healing. The carboxyl terminal four amino acids of SP (FGLM-amide) are sufficient for this synergism. The current study was conducted to investigate the minimal sequence of IGF-1 that is required for such synergism with SP or FGLM-amide. The effects of IGF-1—derived peptides on corneal epithelial migration were evaluated with a rabbit corneal organ-culture system. A tetrapeptide (SSSR) derived from the C domain of IGF-1 was sufficient for the synergistic promotion with FGLM-amide both of corneal epithelial migration *in vitro* and of wound closure *in vivo*. The activity of the SSSR peptide was sequence specific and its potency was similar to that of IGF-1. It was devoid, however,

of both the mitogenic action of IGF-1 and the ability of the full-length molecule to induce neovascularization. Clinical application of the SSSR peptide would be expected to be free of potentially deleterious side effects associated with treatment with full-length IGF-1. Local administration of SSSR and FGLM-amide is thus a potential new strategy for the treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 112 : 984—993, 2008)

Key words : Substance P, IGF-1, SSSR peptide, Neurotrophic keratopathy, Persistent epithelial defect

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 山田 直之

(平成 20 年 4 月 7 日受付, 平成 20 年 6 月 20 日改訂受理) E-mail : n.yamada@po.cc.yamaguchi-u.ac.jp

Reprint requests to : Naoyuki Yamada, M. D. Department of Ophthalmology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube-shi, Yamaguchi-ken 755-8505, Japan

(Received April 7, 2008 and accepted in revised form June 20, 2008)

I 緒 言

角膜は眼球の最前面に存在する無血管透明組織で、上皮、実質、内皮の3層構造をとる。角膜は知覚神経終末が豊富に分布しており体内で最も鋭敏な組織¹⁾であり神経系による調節機構が発達した組織といえる。

角膜上皮欠損は、単純な角膜びらんであれば、感染などを合併しない限り遅くとも2~3日以内に消失する。しかしながら、臨床の場合において角膜上皮欠損の治癒がなかなか得られず遷延化する症例を経験する。このような症例では角膜知覚が低下している例が多く、すなわち神経麻痺性角膜症である可能性が高い。神経麻痺性角膜症の病型にはこのような遷延性角膜上皮欠損だけに限らず、軽症のものには点状表層角膜症、重症のものには角膜潰瘍がある。神経麻痺性角膜症における遷延性角膜上皮欠損は通常の治療には抵抗性を示すことが多い。上皮欠損が長期にわたると実質融解を引き起こし角膜潰瘍となり、角膜穿孔、最悪の場合、微生物の感染を伴って眼内炎に至り失明するケースもある。また、上皮欠損は遷延化すれば周辺からの血管侵入、角膜実質混濁を伴い、たとえ上皮欠損が消失したとしても角膜実質の瘢痕のため完全な視力回復が得られない。そのため速やかな角膜上皮の再被覆化は視機能維持のためにも最重要のプロセスといえる。神経麻痺性角膜症における遷延性角膜上皮欠損に対する治療には対症療法として油性眼軟膏、治療用ソフトコンタクトレンズ装用、強制閉眼、瞼板縫合などがある。一方、原因療法にはヒアルロン酸点眼(承認薬)、フィブロネクチン点眼(研究的治療)などがあるものの、どの施設でも利用可能であり積極的に上皮再被覆を促進する点眼薬はない。

我々は1996年に、知覚神経伝達物質である Substance P と成長因子である insulin-like growth factor-1 (以下 IGF-1) が相乗的に角膜上皮伸長を促進することを家兎角膜器官培養法を用いて報告した²⁾。その後に行った動物実験³⁾、臨床応用⁴⁾の結果もこれを支持するものであり、神経麻痺性角膜症に対する新しい治療として期待し得るものである。この Substance P と IGF-1 の作用はそれぞれ単独の投与では全く効果がなく、同時に投与して初めて効果を発揮する相乗作用であった。

Substance P は 11 個のアミノ酸からなり、その生理活性は多彩であり^{5)~8)}、なかでも炎症惹起作用や縮瞳作用⁹⁾については点眼薬として開発するにあたり副作用となる可能性があった。そこで器官培養により Substance P の最小必須配列はその C 末端ペプチドであるフェニルアラニン-グリシン-ロイシン-メチオニンの 4 個すなわち FGLM-NH₂ であることを同定¹⁰⁾し、さらに動物実験¹⁰⁾や臨床応用¹¹⁾にて Substance P と同様の効果があることを報告してきた。副作用に関しても Substance P を FGLM-NH₂ に短縮することにより縮瞳作用が消失す

ることを確認した¹⁰⁾。

一方、IGF-1 はインスリンファミリーに属する 70 個のアミノ酸からなる成長因子であり、細胞増殖、抗アポトーシスなど多彩な生物活性を有している¹²⁾¹³⁾。臨床の場合で IGF-1 を使用するにあたってはその成長因子としての多彩な生理活性が副作用として生じる可能性がある。そこで IGF-1 の副作用を取り除き安全な薬を開発するために、Substance P (FGLM-NH₂) と相乗的に角膜上皮創傷治癒を促進する IGF-1 の最小必須配列の同定を目指した。

II 角膜上皮の創傷治癒を促進する IGF-1 の機能ドメインの同定

これまでの研究で IGF-1 に認められる FGLM-NH₂ との相乗作用がインスリンにはない¹⁴⁾ことが分かっていた。IGF-1 は B, C, A, D の 4 つのドメインからなる。一方、インスリンには B, A の 2 つのドメインしかない。その前駆体であるプロインスリンには C ドメインに相当する C-ペプチドがあるが、これはインスリン生成の際、プロインスリンから切り放される(図 1 A)。IGF-1 とプロインスリンを比較すると B, A ドメインは比較的相同性が高いのに対して C ドメインは相同性が低く、D ドメインはプロインスリンには認めない(図 1 B)。以上からインスリンと IGF-1 で、アミノ酸配列に差が大きいドメインは C と D ドメインであり、IGF-1 の C ドメインもしくは D ドメインのどちらかが必須ドメインであるのではないかの仮説を立てた。我々はまず IGF-1 の角膜上皮創傷治癒における Substance P (FGLM-NH₂) との相乗作用を示す必須ドメインの同定を目指した¹⁵⁾。家兎角膜器官培養法¹⁶⁾を用いて IGF-1 の C ドメインおよび D ドメインについて FGLM-NH₂ との相乗作用について検討した(図 2)。IGF-1 は単独では培養液のみの対照群と比し角膜上皮伸長作用には差を認めなかった。しかし、FGLM-NH₂ の共存下では、角膜上皮伸長を有意に促進した。同様に IGF-1 C ドメインもそれ単独では角膜上皮伸長に何の影響もないが、FGLM-NH₂ 共存下では有意に促進した。一方、IGF-1 D ドメインはそれ単独でも、FGLM-NH₂ との共存下でも角膜上皮伸長に何の影響も与えなかった。

次に IGF-1 C-ドメインが重要であることを別の方法で調べるために、IGF-1 全長において C ドメイン中にある 34 番目のセリンをアラニンに点変異させた IGF-1 S 34 A を作製した。これを家兎角膜器官培養法に用いて角膜上皮伸長に対する影響を検討した。角膜上皮伸長において IGF-1 で認められる FGLM-NH₂ との相乗作用は、IGF-1 の 34 番目のセリンをアラニンに置換することで完全に消失していた(図 3)。以上の結果から、角膜上皮創傷治癒における Substance P (FGLM-NH₂) との相乗作用を示す IGF-1 の必須ドメインは C ドメインであるこ

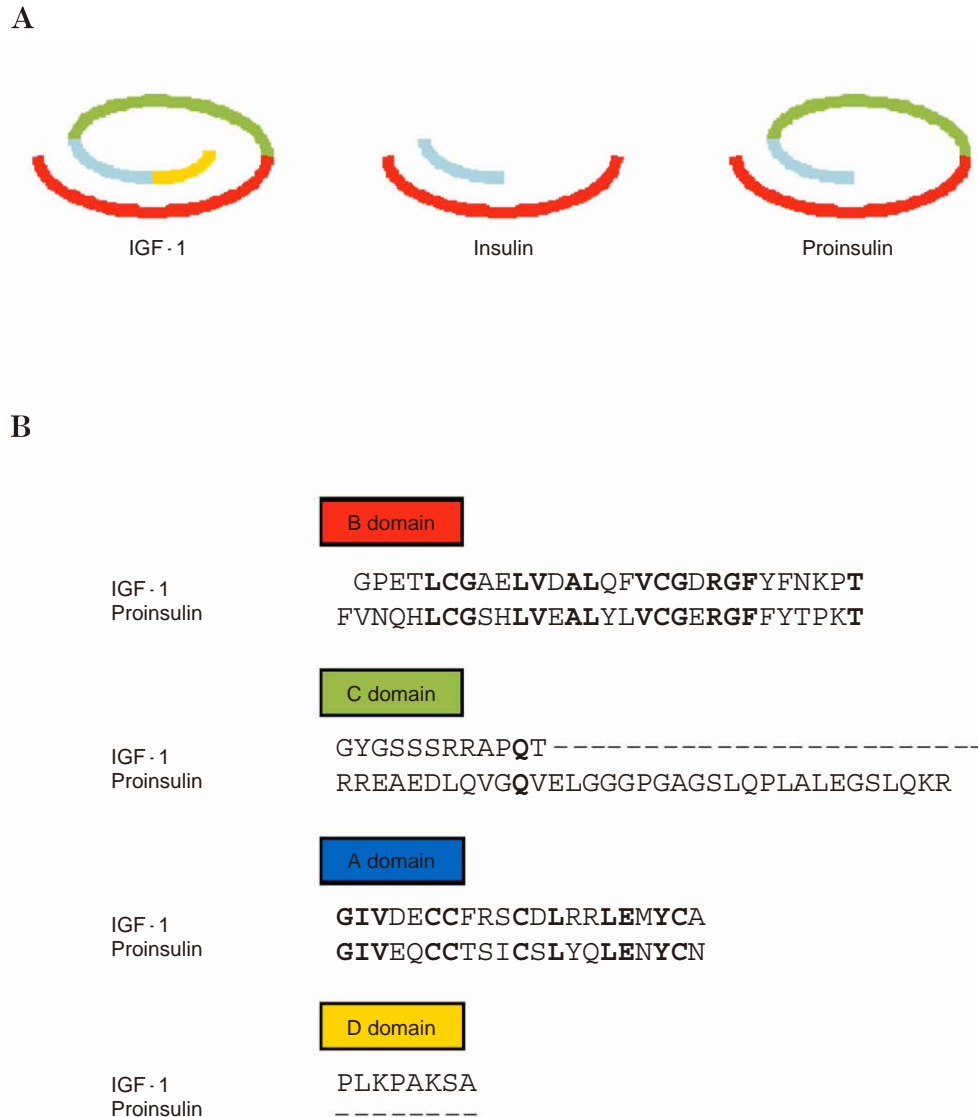


図 1 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) とインスリンの比較.

A: IGF-1 は B, C, A, D の 4 つのドメインからなる. インスリンには C, D ドメインが存在しない. インスリンの前駆体であるプロインスリンには C ペプチドが存在する. 赤: B ドメイン, 緑: C ドメインもしくは C ペプチド, 青: A ドメイン, 黄: D ドメイン.

B: IGF-1 とプロインスリンで相同性が高いのは B ドメインと A ドメインである. 太字は IGF-1 とプロインスリンで共通のアミノ酸.

(文献 15 より許可を得て転載, 一部改変)

とが明らかとなった.

従来, IGF-1 のさまざまな生理活性部位は A ドメインと B ドメインにあるとされてきた. C ドメインの役割としては A ドメインや B ドメインの IGF レセプターやインスリンレセプターへの反応の調節^{17)~19)} であると考えられていたが, C ドメイン自身の生理活性については分かっていなかった. つまり, この結果は同時に IGF-1 C ドメイン自身の生理活性について明らかにした初めての報告となった¹⁵⁾.

III FGLM-NH₂ は IGF-1 C ドメインの作用を増強する

IGF-1 や IGF-1 C ドメインは角膜器官培養法においては 1 nM の濃度で FGLM-NH₂ との相乗作用を示す²⁾¹⁵⁾. IGF-1 を IGF-1 C ドメインにまで絞り込んだため合成ペプチドを作製することができるようになり高濃度での角膜上皮伸長に対する影響が初めて検討できるようになった. IGF-1 C ドメインはそれ単独でも濃度を 100 μM まで上げると角膜上皮伸長促進作用を認めた(図 4). これは IGF-1 全長を用いていたときには予想できなかったことであり, 必須ドメインに絞り込めたがゆえに判明した

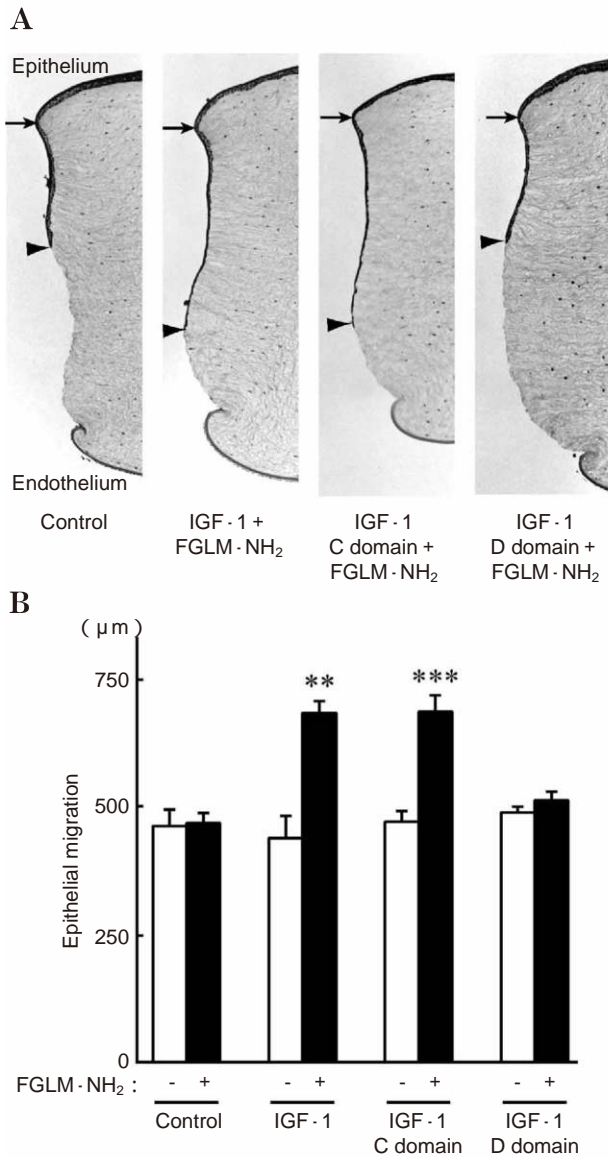


図 2 角膜器官培養法による IGF-1 C ドメイン、D ドメインの角膜上皮伸長に対する影響の検討。
 A: IGF-1 C ドメインは FGLM-NH₂ との共存下で角膜上皮伸長を有意に促進する。IGF-1 D ドメインには促進作用はない。
 B: 角膜器官培養法での結果をグラフ化したもの。n = 4~6。
 FGLM-NH₂: 20 μM. IGF-1, IGF-1 C ドメイン, IGF-1 D ドメイン: 1 nM. **: p<0.01, ***: p<0.001
 (文献 15 より許可を得て転載, 一部改変)

作用であった。このことは逆に言えば、FGLM-NH₂がある状態では IGF-1 C ドメインは 1 nM という非常に低い濃度で角膜上皮伸長促進作用を示すということになる。この結果は臨床において次のような示唆を与えてくれる。健常人では涙液中に Substance P が存在している²⁰⁾ため、低濃度の IGF-1 があれば角膜上皮創傷治癒はスムーズに行われる。一方、神経麻痺性角膜症のような角膜知覚神経が障害され、知覚神経伝達物質である Substance P が枯渇している病態²¹⁾では IGF-1 が大量に存在

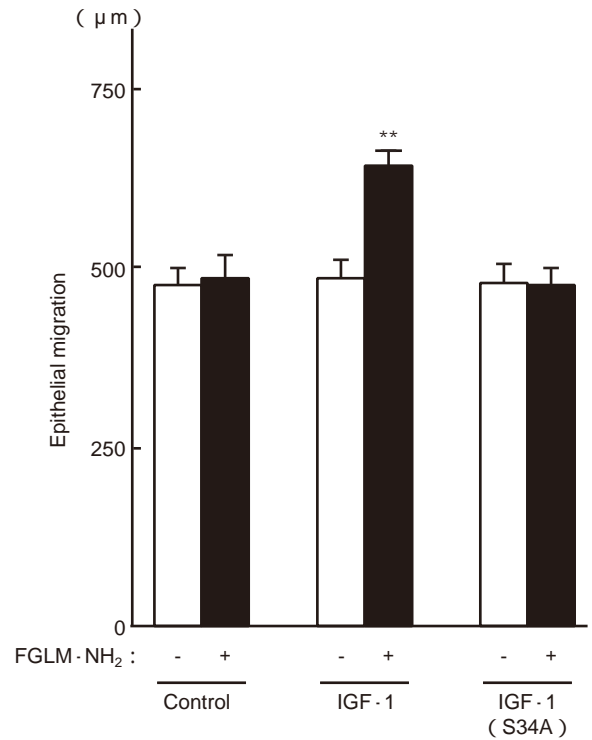


図 3 角膜器官培養法による IGF-1 S 34 A の角膜上皮伸長に対する影響の検討。
 IGF-1 の 34 番目のセリンをアラニンに点変異させた IGF-1 S 34 A では FGLM-NH₂ との角膜上皮伸長における相乗作用が消失している。n = 4~6。
 FGLM-NH₂: 20 μM. IGF-1, IGF-1 S 34 A: 1 nM.
 **: p<0.01

(文献 15 より許可を得て転載)

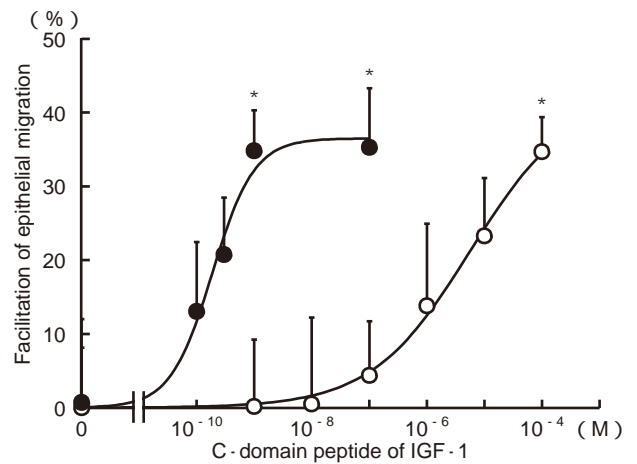


図 4 角膜器官培養法による IGF-1 C ドメインの角膜上皮伸長促進作用に対する FGLM-NH₂ の影響の検討。
 IGF-1 C ドメインは単独でも 100 μM に濃度を上げると角膜上皮伸長促進作用を認める。一方、FGLM-NH₂ の共存下では IGF-1 C ドメインの角膜上皮伸長促進作用発揮に必要な濃度はわずか 1 nM である。
 ●: FGLM-NH₂ (+), ○: FGLM-NH₂ (-), n = 6。
 FGLM-NH₂: 20 μM. *: p<0.05

(文献 22 より許可を得て転載)

しないと角膜上皮創傷治癒は得られにくいということになる。実際には IGF-1 は 100 μ M のような非生理的な高濃度では眼表面に存在しないために角膜上皮創傷治癒は遅延することとなる。この FGLM-NH₂ による IGF-1 C ドメインの角膜上皮創傷治癒に対する感度増強作用を我々は sensitizing effect と呼んだ²²⁾。具体的には、上皮伸長の最大値の 50% の値が得られる濃度 EC₅₀ は、IGF-1 C ドメイン単独では EC₅₀ = 5.60 μ M であった。一方、IGF-1 C ドメイン + FGLM-NH₂ の EC₅₀ = 0.187 nM であり、FGLM の存在下で約 3 万倍も感度を上げているこ

とが分かった。また、今まで単独で角膜上皮伸長促進作用があると報告してきたフィブロネクチン、interleukin (IL)-6 にも FGLM-NH₂ との相乗作用があることを発見した²²⁾。同様にフィブロネクチンの場合は EC₅₀ = 3.60 nM から 43.8 pM へ、IL-6 の場合には 35.8 pM から 3.7 pM へと感度を上げたが、それぞれ約 80 倍と約 10 倍に留まり、FGLM-NH₂ の sensitizing effect は IGF-1 C ドメインに強く認められることが分かった。

IV IGF-1 C ドメインの必須配列の同定

次に我々は IGF-1 C ドメインの 12 個のアミノ酸の中でさらにどのアミノ酸配列が必須であるのかをアラニン-スキャンニング法(図 5)を用いて調べた。アラニン-スキャンニング法とはどのアミノ酸残基が必須であるかを検討する蛋白質の機能解析法である。アミノ酸をそれぞれアラニンに置換することで上皮伸長促進作用が失われれば逆にそのアミノ酸は必須であるといえる。そこで種々の Glutathione S-transferase (GST) 融合蛋白質を作製し、角膜上皮伸長への影響を検討した。GST のみではそれ単独および FGLM-NH₂ との共存下においても角膜上皮の伸長には何の影響も認めなかった(図 6)。次に IGF-1 C ドメインの全長である 30~41 番目の 12 アミノ酸を GST に融合した蛋白質(GST-Gly³⁰-Thr⁴¹)では、IGF-1 C ドメインの合成ペプチドの場合と同じく FGLM-NH₂ 存在下で上皮伸長を有意に促進した。次に、C ドメインの N 末端側と C 末端側から 2 アミノ酸ずつ除いた 32~39 番目の計 8 アミノ酸を GST に融合した蛋

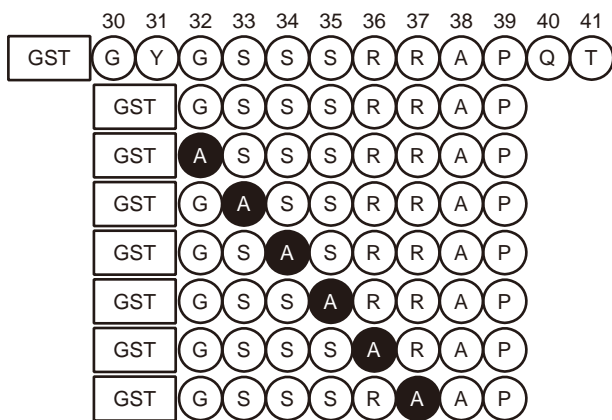


図 5 IGF-1 C ドメインのアラニン-スキャンニング。IGF-1 C ドメイン中の 32 番から 37 番までの 6 アミノ酸についてそれぞれアラニン置換した GST 融合蛋白質を作製。

(文献 23 より許可を得て転載)

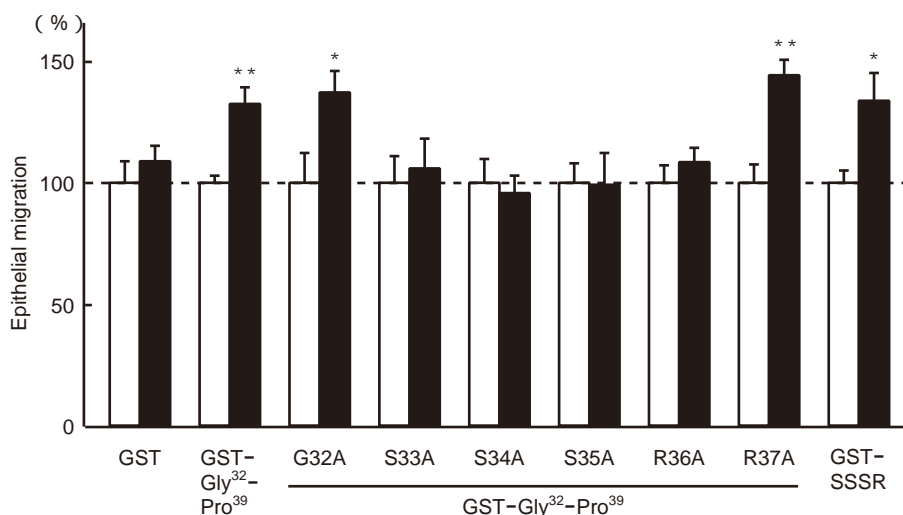


図 6 角膜器官培養法による IGF-1 C ドメイン由来の Glutathione S-transferase (GST) 融合蛋白質の角膜上皮伸長に対する影響の検討。

33 番目のセリン(S)、34 番目のセリン(S)、35 番目のセリン(S)、36 番目のアルギニン(R)をそれぞれアラニンに置換すると FGLM-NH₂ との相乗作用は消失する。この SSSR について GST 融合蛋白質である GST-SSSR として作製すると FGLM-NH₂ との相乗作用を認める。n = 6~8。

FGLM-NH₂ : 20 μ M, GST, GST 融合蛋白質 : 1 nM. * : p < 0.05, ** : p < 0.01

□ : FGLM-NH₂(-), ■ : FGLM-NH₂(+)

(文献 23 より許可を得て転載)

白質(GST-Gly³²-Pro³⁹)においても、FGLM-NH₂存在下で有意な上皮伸長促進効果を認めた(図6)。そこでCドメイン中の32~37番までの8アミノ酸のpoint mutation(それぞれをアラニン置換したGST融合蛋白質, 図5)を作製し、角膜上皮伸長に対する影響を検討した。Cドメイン中の32番目をアラニン置換しても上皮伸長促進

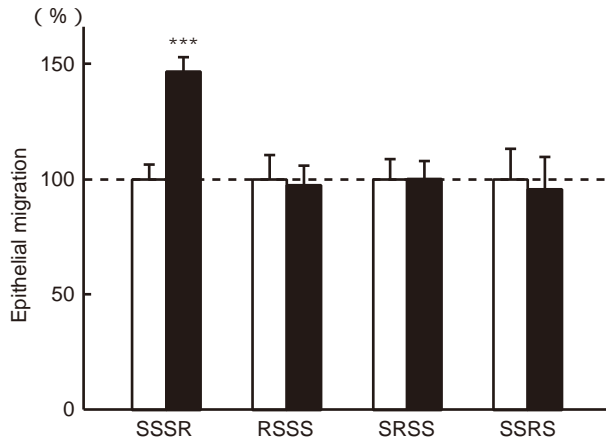


図7 角膜器官培養法によるSSSRとそのスクランブルペプチドの角膜上皮伸長に対する影響の検討。

合成ペプチドであるSSSRはFGLM-NH₂との相乗作用を認める。SSSRのスクランブルペプチドであるRSSS, SRSS, SSRSには相乗作用は認めず、SSSRの配列特異的であることが分かる。n=6。

FGLM-NH₂: 20 μM, SSSR, RSSS, SRSS, SSRS: 1 nM. ***: p<0.001

□: FGLM-NH₂(-), ■: FGLM-NH₂(+)

(文献23より許可を得て転載)

効果は認められていたが、33, 34, 35, あるいは36番目をそれぞれアラニン置換するとFGLM-NH₂存在下での上皮伸長促進効果は消失した。一方、37番目をアラニン置換しても上皮伸長促進効果は認められた(図6)。以上の結果より、この4つのアミノ酸、セリン-セリン-セリン-アルギニン(SSSR)をIGF-1の必須配列と考えた。そこで、GST-SSSRを作製し同様な実験をしたところ、FGLM-NH₂存在下で角膜上皮伸長を有意に促進した(図6)。また、合成ペプチドであるSSSRでも同様にFGLM-NH₂存在下で上皮伸長を有意に促進した(図7)。一方、スクランブルしたペプチドであるRSSS, SRSS, SSRSにはFGLM-NH₂との相乗作用はなく、SSSRという配列に特異的であることも示唆された(図7)。以上の結果から、IGF-1の最小必須配列はSSSRであることが同定された²³⁾。

V SSSRの力価の検討

IGF-1全分子と部分ペプチドであるSSSRが、角膜上皮伸長をSubstance P(FGLM-NH₂)存在下で促進することが明らかとなったが、その力価についての検討が必要であった。FGLM-NH₂存在下で種々の濃度のIGF-1もしくはSSSRについて角膜器官培養法を用いて検討した。SSSRもIGF-1も低濃度では上皮伸長促進作用を認めず用量依存的に促進作用を発揮し1 nMまで濃度を上げると両者とも有意となった(図8)。つまり、IGF-1とSSSRはFGLM-NH₂存在下における上皮伸長促進作用においてはモルベースで対等であることが分かった。

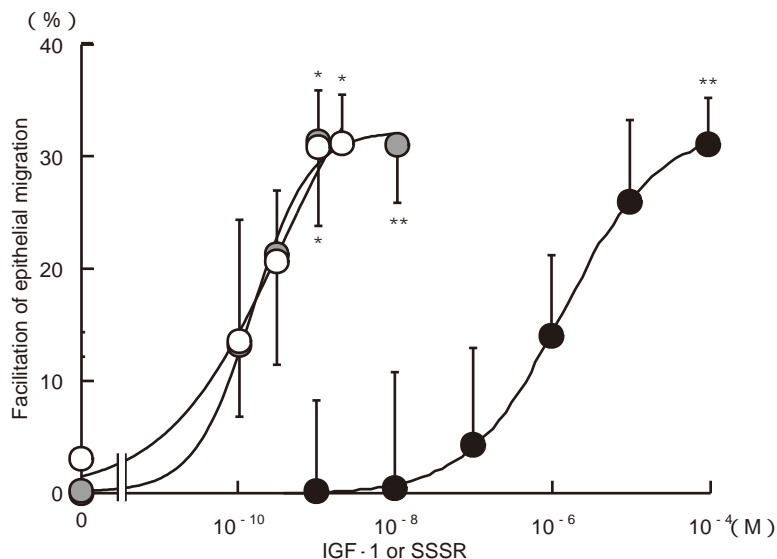


図8 角膜器官培養法によるSSSRの角膜上皮伸長促進作用に対する影響およびIGF-1との力価の比較。

FGLM-NH₂共存下においてIGF-1とSSSRは濃度を上げていくと1 nMの濃度で初めて有意に角膜上皮伸長促進作用を認める。IGF-1とSSSRは同程度の力価であると考えられる。SSSRはそれ単独でも100 μMまで濃度を上げると角膜上皮伸長促進作用を認める。n=6。

FGLM-NH₂: 20 μM. *: p<0.05, **: p<0.01

○: FGLM-NH₂+IGF-1, ●: FGLM-NH₂+SSSR, ●: SSSR

(文献23より許可を得て転載, 一部改変)

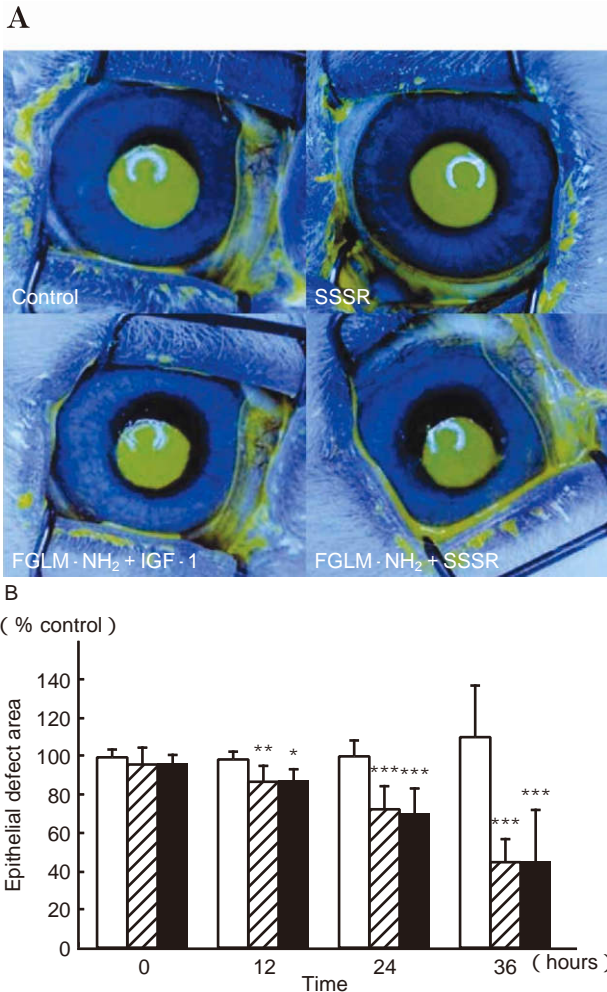


図9 *In vivo* での SSSR の角膜上皮創傷治癒への影響の検討。

A: FGLM-NH₂+IGF-1 点眼ではウサギ角膜の上皮欠損は対照に比べて縮小している。SSSR 点眼では上皮欠損は対照と同程度であるが、FGLM-NH₂+SSSR 点眼群では FGLM-NH₂+IGF-1 点眼群と同程度まで上皮欠損が縮小している。写真は上皮剝離後 24 時間。

B: 生体ウサギ角膜上皮創傷治癒モデルでの結果をグラフ化したもの。FGLM-NH₂+SSSR 点眼群では有意に角膜上皮創傷治癒が促進されている。n=8。

FGLM-NH₂: 1 mM. IGF-1, SSSR: 100 nM. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

□: SSSR, ▨: FGLM-NH₂+IGF-1
■: FGLM-NH₂+SSSR

(文献 23 より許可を得て転載、一部改変)

また IGF-1 C ドメインのときと同様に SSSR についても単独での角膜上皮伸長促進作用があるかを検討した。IGF-1 C ドメインと同様に 100 μM まで濃度を上げると SSSR もそれ単独で上皮伸長促進作用を認めた(図 8)。つまり、IGF-1 C ドメインと SSSR も同様にモルベースで対等であった。

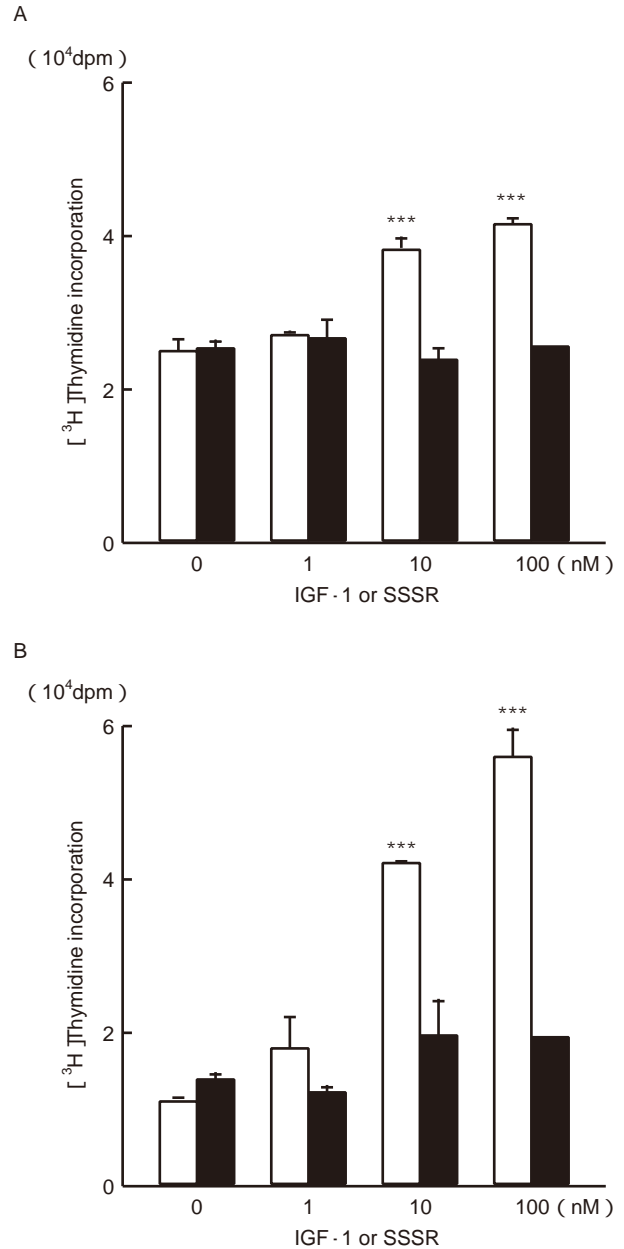


図 10 チミジン取り込みアッセイによる SSSR の細胞増殖作用に対する影響の検討。

IGF-1 には高濃度において細胞増殖作用を認めるが、SSSR には認めない。実験に用いた細胞は human corneal epithelial cells (A) と human corneal fibroblasts (B)。n=3。

***: p<0.001

□: IGF-1, ■: SSSR

(文献 23 より許可を得て転載)

VI SSSR の *in vivo* における効果

次に *in vivo* において FGLM-NH₂+SSSR 点眼が角膜上皮創傷治癒において促進効果を有するか検討を行った。白色家兎の角膜上皮を *n*-ヘプタノールで剝離し、目的の試薬を含んだ溶液を 2 時間ごとに点眼投与し、角膜上皮の創傷治癒に対する効果を比較した。上皮剝離後

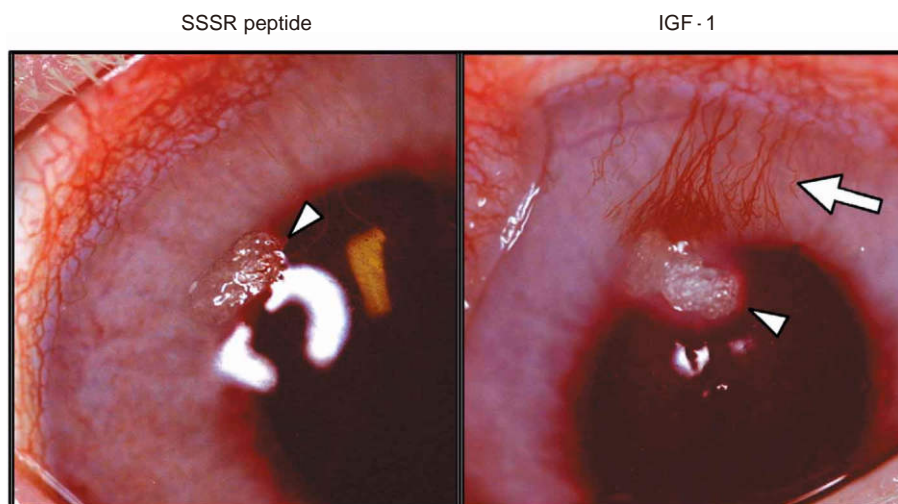


図 11 ウサギ角膜ポケット法による SSSR の血管新生作用に対する影響の検討。
IGF-1 を角膜内に留置したウサギでは血管新生を著明に認める(矢印)が、SSSR では血管新生を認めない。
IGF-1, SSSR : 10 μ g

(文献 23 より許可を得て転載)

24 時間の角膜上皮の欠損部分はフルオレセインに染色され(図 9 A), FGLM-NH₂と IGF-1 を点眼した群では、対照に比べて上皮欠損が縮小している。SSSR を単独で点眼した場合は対照とほぼ同等の大きさの上皮欠損がみられたが、FGLM-NH₂と SSSR を点眼した群では対照に比べて角膜上皮の創傷治癒を促進し、FGLM-NH₂+IGF-1 と同等の効果が得られた。FGLM-NH₂+SSSR では対照に比べて約 30% 上皮欠損面積が縮小し、*in vivo* でも有意な創傷治癒効果がみられた(図 9 B)。器官培養の系で認められた FGLM-NH₂+SSSR の角膜上皮伸長促進作用が *in vivo* においても角膜上皮創傷治癒促進作用として認められることが明らかとなった。

VII SSSR の副作用についての検討

IGF-1 には細胞増殖促進作用と血管新生促進作用がある。角膜における過剰な細胞増殖は透明性の低下を招いたり、正常なラメラ構造の維持を障害する。また、角膜における血管新生はその透明性を低下させる。これらの副作用は点眼薬として開発するにあたり取り除かなければいけないものであった。そこで SSSR が IGF-1 に認められるこれらの作用を有するのかを検討した。

細胞増殖促進作用についてチミジン取り込みアッセイを用いて検討した。Human corneal epithelial cells, human corneal fibroblasts の両者において IGF-1 で認められるチミジン取り込み能の増加が SSSR では認められなかった(図 10)。次に、血管新生促進作用についてはウサギ角膜ポケット法を用いて検討した。IGF-1 で認められる血管新生²⁴⁾は SSSR では認められなかった(図 11)。以上の結果から IGF-1 の副作用である細胞増殖促進作用や血管新生促進作用は SSSR にはないことが明らかとなり、臨床応用しても安全であると考えた。

VIII 臨床への応用

Substance P + IGF-1 関連点眼薬の最初の臨床応用は我々の共同研究者である Brown ら⁴⁾によって 1997 年に報告された。家族性自律神経失調症(Riley-Day syndrome)の症例に Substance P + IGF-1 点眼剤の組み合わせで加療を行った。この症例では角膜器官培養法の結果とまったく同様に Substance P のみでは効果がなく、Substance P + IGF-1 点眼で角膜上皮欠損が治癒した。

その後、Substance P の最小必須配列が FGLM-NH₂に絞られたことを受けて、山口大学において加療を行った FGLM-NH₂+IGF-1 点眼による最初の 1 例報告¹¹⁾を 1998 年に、11 例の症例報告²⁵⁾を 2007 年に行った。

一方、FGLM-NH₂+SSSR の臨床応用に関しては山口大学において 2004 年より始め、神経麻痺性角膜症に伴う遷延性角膜上皮欠損の症例に有効であることを報告した²⁶⁾。また、FGLM-NH₂+SSSR 点眼の適応は、幹細胞が正常に保たれている神経麻痺性角膜症の症例であることを明らかにした。

IX 角膜創傷治療薬としての製剤化

我々は IGF-1 の C ドメイン中にある SSSR(セリン-セリン-セリン-アルギニン)が Substance P 由来の FGLM-NH₂存在下で角膜上皮伸長の促進作用に関する最小必須配列であることを同定した。Substance P の部分ペプチドである FGLM-NH₂を用いることで縮腫、充血といった副作用を取り除くことができた。IGF-1 もその部分ペプチドである SSSR を用いることで本来の成長因子としての多種多様な生理活性を發揮することなく、角膜上皮創傷治癒に必要な角膜上皮伸長促進作用のみを發揮できる。Substance P + IGF-1 関連点眼薬としてはこの

FGLM-NH₂+SSSR という組み合わせが最小単位であると結論付けられる。2つのテトラペプチドの組み合わせということで角膜創傷治癒に対する特異性が増し、薬剤としての安定性も増加し、想定される副作用も最小限に止められる。さらに、製剤化するにあたり、大量合成も可能である。将来、この FGLM-NH₂+SSSR 点眼薬が神経麻痺性角膜症に苦しむ世界中の患者の治療薬としてその役割を果たすことを夢見ている。

稿を終えるにあたり、すべての研究に関しご指導、ご助言を賜りました山口大学大学院医学系研究科眼科学講座西田輝夫教授、柳井亮二先生および薬理学講座乾誠教授に深謝いたします。また、臨床面から有用な意見をいただいた山口大学医学部眼病態学講座准教授近間泰一郎先生、山口大学大学院医学系研究科眼科学講座森重直行先生、実験を一緒に行った山口大学大学院医学系研究科眼科学講座川本晃司先生、その他サポートをいただいた山口大学大学院医学系研究科眼科学の諸先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) **Rozsa AJ, Beuerman RW** : Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain* 14 : 105—120, 1982.
- 2) **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.
- 3) **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.
- 4) **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.
- 5) **Holzer P** : Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings : involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24 : 739—768, 1988.
- 6) **Pernow B** : Substance P. *Pharmacol Rev* 35 : 85—141, 1983.
- 7) **Lundberg JM, Saria A** : Bronchial smooth muscle contraction induced by stimulation of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol Scand* 116 : 473—476, 1982.
- 8) **Maggi CA** : The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regul Pept* 70 : 75—90, 1997.
- 9) **Soloway MR, Stjernschantz J, Sears M** : The miotic effect of substance P on the isolated rabbit iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20 : 47—52, 1981.
- 10) **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.
- 11) **Chikama T, Fukuda K, Morishige N, Nishida T** : Treatment of neurotrophic keratopathy with substance-P-derived peptide (FGLM) and insulin-like growth factor I. *Lancet* 351 : 1783—1784, 1998.
- 12) **Stewart CE, Rotwein P** : Growth, differentiation, and survival : multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 76 : 1005—1026, 1996.
- 13) **Jones JI, Clemmons DR** : Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions. *Endocr Rev* 16 : 3—34, 1995.
- 14) **Nakamura M, Chikama TI, Nishida T** : Characterization of insulin-like growth factor-1 receptors in rabbit corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 70 : 199—204, 2000.
- 15) **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.
- 16) **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.
- 17) **Zhang W, Gustafson TA, Rutter WJ, Johnson JD** : Positively charged side chains in the insulin-like growth factor-1 C- and D-regions determine receptor binding specificity. *J Biol Chem* 269 : 10609—10613, 1994.
- 18) **Bayne ML, Applebaum J, Underwood D, Chicchi GG, Green BG, Hayes NS, et al** : The C region of human insulin-like growth factor (IGF) I is required for high affinity binding to the type 1 IGF receptor. *J Biol Chem* 264 : 11004—11008, 1989.
- 19) **Bayne ML, Applebaum J, Chicchi GG, Miller RE, Cascieri MA** : The roles of tyrosines 24, 31, and 60 in the high affinity binding of insulin-like growth factor-I to the type 1 insulin-like growth factor receptor. *J Biol Chem* 265 : 15648—15652, 1990.
- 20) **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.
- 21) **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.
- 22) **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.
- 23) **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.
- 24) **Grant MB, Mames RN, Fitzgerald C, Ellis EA, Aboufrikha M, Guy J** : Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina : comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia* 36 : 282—291, 1993.
- 25) **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.
- 26) **Yamada N, Matsuda R, Morishige N, Yanai R, Chikama T, Nishida T**, et al : Open clinical study of eyedrops containing tetrapeptides derived from substance P and IGF-1 for treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy. *Br J Ophthalmol* 2008 (in press).
-