
ミニレビュー

神経麻痺性角膜症に対する新しい治療法

近間泰一郎

山口大学医学部眼科学講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : 神経麻痺性角膜症, 創傷治癒, サブスタンスP, インスリン様成長因子-1**はじめに**

眼の最前面に位置している角膜は、さまざまな外界からの刺激に対してその透明性と形状を維持することが良好な視機能に不可欠である。角膜は、上皮層、コラーゲンと実質細胞からなる実質層および一層の内皮細胞からなる内皮層により成り立つ非常に単純な構造をしている(図1)。また、角膜の中には、非常に多くの神経終末が分布しており、同時に涙液と前房水あるいは角膜を取り巻くように存在する輪部の係蹄血管から栄養素の供給を受けている。透明な角膜を維持するためには上皮の存在が非常に重要である。角膜上皮の恒常性は、液性因子と神経性因子が密接に関連し保たれていると考えられる。角膜上皮が障害を受け上皮欠損が生じた場合、まず欠損部周囲の上皮細胞が基質となる基底膜上に接着し、1層の上皮が欠損部を覆うように伸展する。欠損部が被覆されると増殖の過程を経て最終的に分化し整然とした上皮層を再構築する。この過程は正常な角膜では、非常に速やかに起こる(図2)。しかしながら、この創傷治癒過程が速やかに起こらない遷延性角膜上皮欠損という病態を臨床的にしばしば経験する。神経麻痺性角膜症とは、種々の原因により角膜知覚の麻痺が生じることにより角膜上皮の恒常性が破綻し角膜上皮あるいは角膜実質に傷害が生じ視力低下の原因となる疾患である。神経麻痺性角膜症は、積極的な治療法がない難治性疾患の一つで

ある。上皮欠損の修復がなかなか起こらない遷延性角膜上皮欠損に対していくつかの新しい試みを我々は報告してきた。一つの考え方として上皮細胞が接着・伸展する足場を整備する目的で細胞外マトリックスであるフィブロネクチンやヒアルロン酸の点眼を世界にさきがけておこなってきた^{1,2)}。さらに、たとえ足場が整備されても上皮細胞が十分な機能を有していない場合、上皮細胞の機能を修飾することによってより治療効果を高める目的で、サイトカイン特にEGFやインターロイキン-6が上皮の創傷治癒を促進することを示してきた^{3,4)}。実際にこのような新しい治療法を試みてきた経験から、多くの上皮欠損が修復せず遷延化する例では、角膜知覚が有意に低下していることを学び、神経麻痺性角膜症の病態として知覚神経の重要性に着目した。そこで、サブスタンスPあるいはサブスタンスP由来ペプチド(FGLM)と成長因子であるインスリン様成長因子-1(IGF-1)が角膜上皮の創傷治癒を促進することを実験的に明らかにし、神経麻痺性角膜症の治療としてサブスタンスP由来ペプチド(FGLM)とIGF-1を用いた新しい治療法を開発したので報告する。

神経麻痺性角膜症

角膜知覚は、三叉神経の第1枝により支配され生体内でもっとも鋭敏である。角膜の周辺部から神経線維が侵入し多数の分岐をしたのちに上皮層の直下に神経叢をつくり、角膜上皮間に微細な無髄神経線維による神経終末を分布する(図1)。皮膚に比し、

平成12年10月26日受理

300倍から400倍の神経終末 (1平方ミリメートルあたり約6500/mm²) が存在する。

神経麻痺性角膜症とは、何らかの原因により三叉神経に障害が生じた結果、角膜知覚が低下したときに生じ、多彩な角膜病変を呈する疾患である。病態としては、角膜知覚の麻痺による角膜障害発生の認知障害と創傷治癒促進のフィードバックが起こらないことにより生じる角膜上皮の創傷治癒の遅延と考えられ、角膜潰瘍にいたるものでは上皮の欠損のみならず実質の融解も伴う。原因としては、角膜の局所性のもので角膜移植などの角膜に切開が加わるような手術後や種々の熱傷、点眼麻酔薬の濫用による中毒性角膜症などがある。一方、神経節および中枢性のものでヘルペス性角膜炎や脳腫瘍あるいは脳腫瘍術後などがある。また、糖尿病神経症の一所見としての神経麻痺性角膜症による角膜上皮障害も臨床的に問題となっている。しかしながら角膜知覚の再生は困難であり、三叉神経障害を有する症例では神経麻痺性角膜症が発症しないように角膜を保護するという保存的な治療法しかなく、いったん発症した神経麻痺性角膜症に対する積極的な治療法は存在しなかった。

サブスタンスPの角膜上皮創傷治癒に対する影響

角膜知覚の神経伝達物質であるサブスタンスPが、角膜上皮の創傷治癒、特に最初のステップである上皮細胞の接着・移動にどのような影響を持っているかについての研究に着手した。

角膜ブロック法を用いて角膜上皮の伸展を指標に各種成長因子や神経伝達物質の作用を検討したところ、神経伝達物質であるサブスタンスP単独あるいはIGF-1単独ではコントロールに比較して角膜上皮の伸長には優位な差を認めなかったが、サブスタンスPとIGF-1が共存する条件下でのみ伸長が亢進することが明らかとなった (図3)。この結果から、サブスタンスPとIGF-1は協調して角膜上皮の創傷治癒を促進する作用を有していることが示唆された⁹⁾。この実験結果から、サブスタンスPとIGF-1の組み合わせが神経麻痺性角膜症による遷延性角膜上皮欠損の治療に対する有効性が期待された。

サブスタンスPはきわめて多彩な生理活性を有する物質であり、臨床応用を考慮する前に薬剤の安定

性とともに不要な生理活性を除く目的でIGF-1との協調作用を示す最小のアミノ酸配列を検討した。まず、サブスタンスPの11個のアミノ酸配列をN末端側の1番目から7番目までとC末端側5番目から11番目にかけて、IGF-1との協調作用を検討したところ、N末端側の7つのアミノ酸配列を有するペプチド (SP1-7) では協調作用が認められなかったが、C末端側の7つのアミノ酸配列を有するペプチド (SP5-11) ではIGF-1との協調作用を有することが明らかとなった。さらに、SP5-11のN末端のアミノ酸を1つずつ少なくして検討してみると、フェニルアラニン-グリシン-ロイシン-メチオニン (SP8-11, FGLM) の4つのアミノ酸配列まで短くしてもIGF-1との協調作用つまり角膜上皮の伸展の亢進がえられた。しかしながら、グリシン-ロイシン-メチオニン (SP9-11) の3つのアミノ酸配列になるとこの協調作用は消失した¹⁰⁾。サブスタンスPはタキキニンファミリーに属する。タキキニンファミリーの共通構造はC末端のアミノ酸配列がFXGLMである。IGF-1との協調作用がサブスタンスPに特異的であるかを知る目的で、同じタキキニンファミリーに属するNeurokinin A, B, Physalaemin, EledoisinのC末端からの4個のアミノ酸配列をもちいて検討した。結果は、C末端の4つのアミノ酸配列がFGLM以外のものでIGF-1との協調作用は認められなかった。すなわち、C末端から4番目のアミノ酸がフェニルアラニン以外のバリン、チロシンあるいはイソロイシンであれば、残りの3つのアミノ酸配列 (GLM) が共通でもIGF-1との協調作用はみられず、C末端から4番目のアミノ酸がフェニルアラニンであることが必須であると考えられた (表1)¹¹⁾。以上のことから、上皮の伸展促進においてサブスタンスPは特異的にIGF-1と協調作用を示し、なおかつサブスタンスPのC末端の4つのアミノ酸配列であるFGLMが最小必須であることが明らかとなった。さらに、白色家兎の角膜上皮剥離モデルを用いたin vivoの検討においても、サブスタンスPあるいはIGF-1単独では上皮欠損修復促進作用を認めないのに対し、サブスタンスPとIGF-1の共存下において有意に上皮欠損修復を促進することが明らかとなった。さらに、FGLMを加えて創傷治癒速度を検討すると、FGLM+IGF-1点眼群においても、サブスタンスP+IGF-1群と同様の角膜上皮欠損修復速度を示した。以上より上皮欠

		IGF-1との協調作用
Substance P(SP)	RPKPQQFFGLM-NH2	+
SP(1-7)	RPKPQQF	
SP(5-11)	QFFGLM-NH2	+
SP(6-11)	QFFGLM-NH2	+
SP(7-11)	FFGLM-NH2	+
SP(8-11),FGLM	FGLM-NH2	+
SP(9-11)	GLM-NH2	
VGLM(NeurokininA/B,8-11)	VGLM-NH2	
YGLM(Physalamin,8-11)	YGLM-NH2	
IGLM(Eledoisin,8-11)	IGLM-NH2	

表1 サブスタンスP関連ペプチドのアミノ酸配列と角膜上皮の伸長におけるIGF-1との協調促進作用

損修復促進作用において、FGLMはサブスタンスPと同等のIGF-1との協調作用を有することが明らかとなった(図4)^{8,9)}。

サブスタンスPとIGF-1の協調作用のメカニズム

サブスタンスPあるいはFGLMとIGF-1の協調作用のメカニズムを細胞レベルで検討した。角膜上皮の創傷治癒過程における最初のステップは上皮細胞の基質すなわち上皮基底膜への接着で始まることから、接着分子であるインテグリンとその裏打ち蛋白であるFAKやパキシリンの変化について検討した。培養ヒト角膜上皮細胞(HCE)を各試薬の存在下で培養し、インテグリン $\alpha 5$ の蛋白量とmRNAの変化をWestern blotting法とRT-PCR法を用いて検討した。インテグリン $\alpha 5$ は、サブスタンスPと同様にFGLM単独ではコントロールと比較して変化は認められなかった。FGLMとIGF-1の共存下では蛋白量あるいはmRNA量ともにサブスタンスPとIGF-1の共存下とほぼ同等に発現が亢進した¹⁰⁾。また、インテグリンの裏打ち蛋白であるFAKとパキシリンにおけるチロシンのリン酸化は、サブスタンスPあるいはIGF-1単独ではコントロールと比較して変化を認めないのに対してその両者が共存する条件下でのみリン酸化が亢進した(図5)¹¹⁾。これらのことより、角膜上皮細胞は、サブスタンスPあるいはFGLMとIGF-1の共存により活性化し接着能が亢進することが明らかとなった。このようにサブスタンスPおよびサブスタンスP由来ペプチド(FGLM)とIGF-1の協調作用により、角膜上皮の伸長は促進され、角膜上皮細胞のインテグリンを介した基底膜への接着能の亢進が

ひとつの作用機序であると考えられた。さらに、*in vivo*においても角膜上皮欠損の修復を促進することが明らかとなった。

臨床応用に向けて

サブスタンスPのC末端の4つのアミノ酸配列であるFGLMがIGF-1との協調作用において最小必須であることが分かり、*in vivo*でみられたサブスタンスPによる縮瞳という副反応はFGLMでは消失し、そのほか臨床的に問題となる副反応は見られないことも明らかとなった。これらの結果をもとに、大学の承認を経て、サブスタンスP由来ペプチド(FGLM)とIGF-1の合剤点眼を用いた神経麻痺性角膜症に対する臨床応用を開始した。サブスタンスP(FGLM)とIGF-1合剤点眼は、1997年1月より臨床応用を開始し、現在まで13症例に投与してきた。そのうちの遷延性角膜上皮欠損の2症例を呈示する。

症例1は、1997年より左眼の視力低下、眼痛、充血を自覚、近医にて加療されるも半年以上にわたり改善せず、当科紹介受診となった55歳の女性である。初診時視力は、左眼0.01(0.02)で、角膜知覚は右眼は正常範囲内であるのに対し、左眼では著明に低下していた。また、角膜中央部に遷延性角膜上皮欠損を認めた。この症例に対して、FGLM+IGF-1点眼を開始した。治療開始前は、角膜中央部に広範な遷延性角膜上皮欠損と、それに伴う角膜実質の浮腫を認めたが、FGLM+IGF-1点眼開始2日目より上皮欠損は修復し始め、点眼開始後2週間で上皮欠損は消失した。治療開始4週間後には、角膜実質の浮腫の消失により透明性も回復し、視力も矯正0.4にまで改善した(図6)¹²⁾。サブスタンスP由来のペプチドであるFGLMとIGF-1の点眼療法は、本症例のような角膜知覚が低下し、神経性因子の枯渇が原因と思われる神経麻痺性角膜症に有効であることが示唆された。

症例2は、右眼の増殖糖尿病網膜症に対し、硝子体手術の術後より遷延性角膜上皮欠損が生じた48歳男性である。視力は右眼手動弁、角膜知覚は右で著明に低下を認めた。治療開始前は、このように角膜中央部に広範な遷延性角膜上皮欠損を認めた。約1ヶ月にわたりこの上皮欠損が遷延化したため、FGLM+IGF-1点眼を開始した。FGLM+IGF-1点眼開

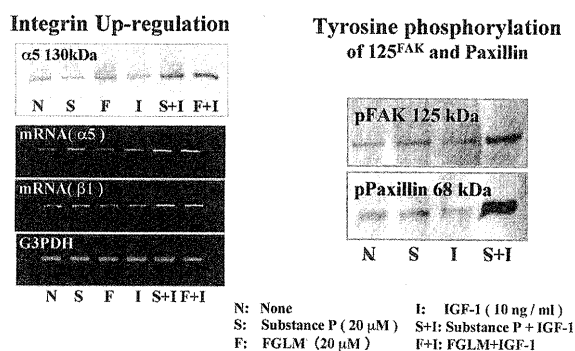


図5 角膜上皮細胞におけるサブスタンスP, FGLMとIGF-1の効果

培養ヒト角膜上皮細胞 (HCE) におけるインテグリン α 5の蛋白量の変化をWestern blotting法を用いて検討した。また、mRNA量の変化をRT-PCR法を用いて検討した。インテグリン α 5の蛋白量, mRNA量ともにサブスタンスP, FGLMあるいはIGF-1単独ではコントロールと比較して変化は認められなかったが, サブスタンスP, FGLMともにIGF-1の共存下では蛋白量, mRNA量において同等に発現が有意に亢進した。FAKとパキシリンにおけるチロシンのリン酸化は, サブスタンスPあるいはIGF-1単独ではコントロールと比較して変化を認めないが, 両者の共存下でのみリン酸化が有意に亢進した。

始翌日には明らかな角膜上皮欠損面積の減少を認め, 点眼開始後2週間で上皮欠損は完全に消失した(図7)。FGLM+IGF-1点眼療法は, 糖尿病神経症の1症状である角膜知覚低下を有する症例に出現した遷延性上皮欠損の治療にも有効であった。

おわりに

神経麻痺性角膜症の治療において, 神経性因子であるサブスタンスP由来ペプチドのFGLMとIGF-1の合剤点眼療法が有効であることが明らかとなった。このことにより, 角膜上皮細胞の伸展や移動の足場となる基質を供給する目的で投与するフィブロネクチン点眼療法やヒアルロン酸の点眼療法に加え, 神経性因子による細胞機能の活性化を利用した新しい治療法を手に入れたことになる。神経性因子の供給という観点では, 私たちが報告したSP(FGLM)+IGF-1点眼療法に加えて, イタリアのLambiaseらが神経成長因子(NGF)点眼療法を報告している¹³⁾(表2)。眼球の窓である透明で美しい角膜を維持するために, 眼瞼の状態, 涙液の状態, 結膜の状態など角膜を取り巻く環境の観察が臨床的にきわめて重要である。さらに, 細胞や分子のレベルで考えると神経性

1. 基本の整備

- ①フィブロネクチン点眼
- ②ヒアルロン酸点眼

2. 上皮細胞機能の修飾

(ア)液性因子の供給

- ①EGF (epidermal growth factor)点眼
- ②IL-6 (interleukin-6)点眼

(イ)神経性因子の供給

- ①SP(FGLM) + IGF-1点眼
- ②NGF点眼

表2 遷延性角膜上皮欠損に対する新しい治療の試み

因子やサイトカインあるいは成長因子などの微量の生体活性物質が微妙に作用しあって角膜の透明性を維持していることが明らかとなってきた。

眼科の領域においても難治性と呼ばれる疾患は数多く存在するが, その中の一つである神経麻痺性角膜症に対して神経伝達物質のひとつであるサブスタンスP (FGLM) と成長因子であるIGF-1を用いた新しい治療法を当教室から世界に先がけて報告した。今後さらに症例数を増やすと同時に, 角膜における神経性調節の関与について研究を続ける予定である。

謝 辞

本論文は山口大学医学会小西賞受賞講演(平成12年7月15日)を記録したものである。本研究に対して御指導いただいた山口大学医学部眼科学教室西田輝夫教授ならびにご協力いただいた山口大学医学部眼科学教室の諸兄に心より感謝の意を捧げる。

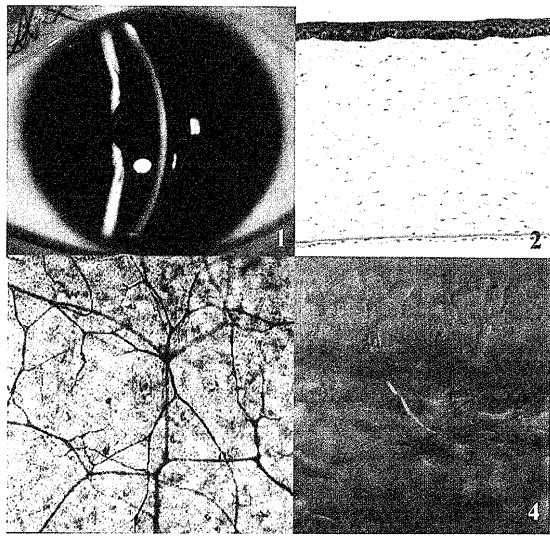


図1 角膜の細隙灯頭微鏡写真：角膜の透明性および形状が良好な視機能において重要である。2.白色家兎角膜組織 (H.E.染色):角膜上皮層, 実質層, 内皮層からなる単純な構造をしている。3.角膜実質内の神経線維ネットワーク：角膜実質内に多数の分岐をしながら広がる神経線維が認められる。4.角膜実質内神経線維のサブスタンスP：サブスタンスP陽性の神経線維が角膜実質内に観察される。

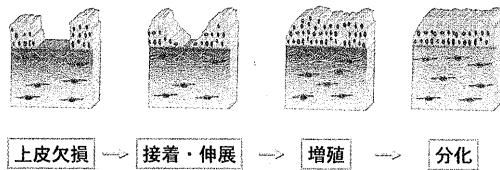


図2 角膜上皮の創傷治癒過程
外傷などにより角膜上皮に欠損が生じると、まず1層の上皮細胞が伸展し欠損部を被覆する。続いて、上皮細胞の増殖により層構造の再構築が図られ最終的に分化により整然とした角膜上皮層に回復する。

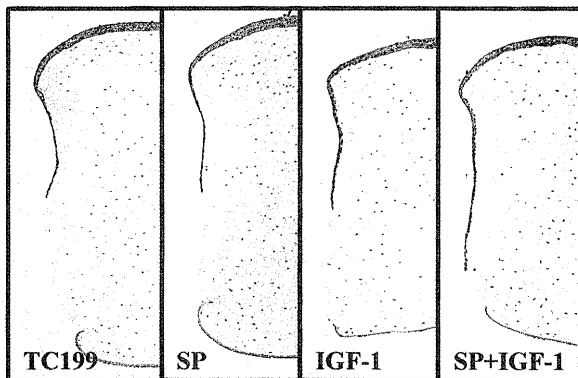


図3 角膜上皮の伸長におけるサブスタンスPとIGF-1の効果
角膜ブロック法を用いて各薬剤の角膜上皮に伸長に対する影響を検討した。サブスタンスP単独あるいはIGF-1単独では上皮の伸長になんら影響を及ぼさなかったが、サブスタンスPとIGF-1がともに存在する条件下では角膜上皮の伸長が有意に促進された。

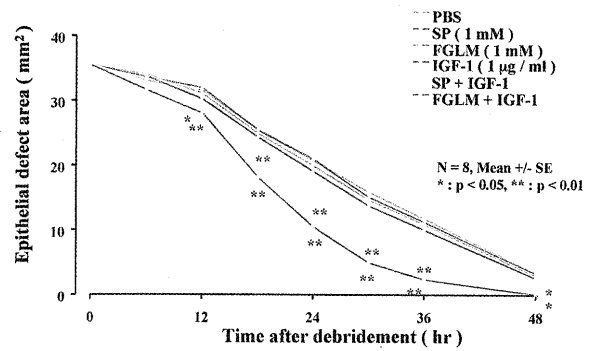


図4 角膜上皮創傷修復におけるサブスタンスP,FGLMとIGF-1の効果 (in vivo)

白色家兎角膜上皮に一定面積の欠損を作成し各種薬剤を点眼投与した際の欠損修復速度を検討した。サブスタンスP,FGLMあるいはIGF-1単独では対照と比較して欠損修復になんら影響を及ぼさなかったが、サブスタンスPとIGF-1あるいはFGLMとIGF-1を同時に投与すると欠損修復が有意に促進された。

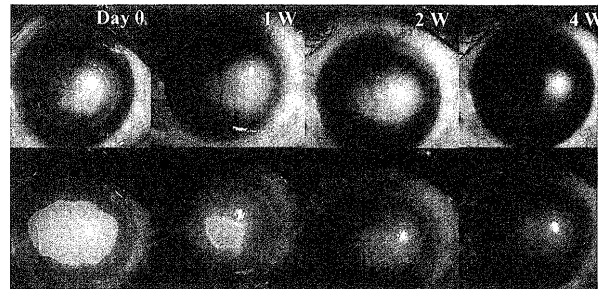


図6 神経麻痺性角膜症に対するFGLM+IGF-1点眼の効果 (症例1)

FGLM+IGF-1点眼開始1週間後には、欠損面積は約14%にまで縮小し、2週間後には消失した。また、4週間後には角膜実質浮腫も軽快し透明性の回復を認めた。

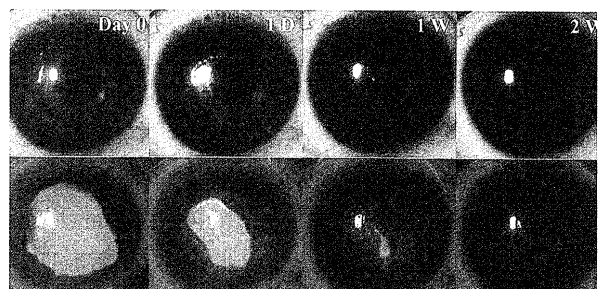


図7 糖尿病における神経麻痺性角膜症に対するFGLM+IGF-1点眼の効果 (症例2)

FGLM+IGF-1点眼開始翌日には急速に欠損面積の縮小がみられ、2週間後には上皮欠損は完全に消失した。

引用文献

- 1) Nishida T, Ohashi Y, Awata T, Manabe R. Fibronectin. A new therapy for corneal trophic ulcer. *Arch Ophthalmol* 1983; **101**: 1046-1048.
- 2) Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. *Exp Eye Res* 1991; **53**: 753-758.
- 3) 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* 1990; **145**:549-554.
- 4) Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Interleukin 6 facilitates corneal epithelial wound closure in vivo. *Arch Ophthalmol* 1992; **110**:1292-1294.
- 5) 西田輝夫. 神経麻痺性角膜症 (Neurotrophic Keratopathy) - 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 1997; **101**: 948-974.
- 6) Nishida T, Nakamura M, Ofuji K, Reid T. W., Mannis M. J., Murphy C. J. Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol* 1996; **169**: 159-166.
- 7) 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* 1999; **127**: 489-497.
- 8) 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* 1997; **16**: 275-278.
- 9) 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* 1998; **246**: 777-782.
- 10) Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Up-regulation of integrin $\alpha 5$ 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* 1999; **255**: 692-697.
- 11) 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* 1998; **242**: 16-20.
- 12) Chikama T, Fukuda K, Morishige N, Nishida T. Treatment of neurotrophic keratopathy with substance-P-derived peptide (FGLM) and insulin-like growth factor 1. *Lancet* 1998; **351**: 1783-84.
- 13) Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med* 1998; **338**:1174-1180.

A New Treatment for Neurotrophic Keratopathy

Tai-ichiro CHIKAMA

*Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

Homeostasis of the corneal epithelium is maintained by the actions of various biological mediators. We have shown that the neurotransmitter substance P [or the substance P-derived peptide phenylalanine-glycine-leucine-methionine amide (FGLM)] and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) synergistically promote corneal epithelial migration in response to epithelial injury both *in vitro* and *in vivo*. The combination of substance P (or FGLM) and IGF-1 increases the expression by corneal epithelial cells of integrin $\alpha 5$ and $\beta 1$ subunits, which together form the receptor for fibronectin and are required for the adherence of epithelial cells to the basement membrane. In clinical trials, we have also shown that the application of eye drops containing FGLM and IGF-1 is effective in the treatment of neurotrophic keratopathy, an otherwise intractable disease of the cornea. These observations suggest that neural regulation plays an important role in maintenance of corneal epithelial homeostasis.