

角膜創傷治癒に及ぼす SPARC 由来ペプチドの影響

森下 亮子

近畿大学医学部眼科学教室

抄 録

SPARC (Secreted protein which is acidic and rich in cysteine) は角膜実質創傷部に出現し、実質細胞の活性化に関与していると考えられている。培養家兎角膜実質細胞に対する SPARC の作用機序の詳細を知る目的で、SPARC のドメインII領域のペプチド KGHK, III領域のペプチド3.2, IV領域のペプチド4.2a, 4.2a', 4.2b を作成した。それぞれのペプチドが角膜実質細胞のコラーゲングル収縮に及ぼす影響を検討した。ドメインIV領域由来のペプチド4.2a, 4.2a' のみがコラーゲングル収縮抑制作用を示し、他のペプチド KGHK, 3.2, 4.2b はコラーゲングル収縮に影響を与えなかった。角膜実質細胞とI型コラーゲンとの接着に対するペプチド4.2aの影響を検討した。細胞培養用プラスチック製カバースリップをI型コラーゲンでコーティングした後、角膜実質細胞を播種した。ペプチド4.2aを添加し、経時的に蛍光画像解析装置を用いて細胞面積を計測し、走査型電子顕微鏡で細胞の形態を観察した。ペプチド4.2a添加は角膜実質細胞のコラーゲンへの接着・伸展を阻害し、反接着作用を示した。これらのことから、SPARC のドメインIV領域に実質細胞とコラーゲンとの接着・伸展を阻害する機能があることが明らかになった。

Key words: 角膜実質, 角膜上皮, 角膜創傷治癒, SPARC ペプチド, I型コラーゲン, 細胞接着

緒 言

角膜は厚さ0.52~1.0 mmで、上皮層, Bowman膜, 角膜実質層, Descemet膜および内皮細胞の5層からなる規則正しい微細な構造をなしている。角膜実質は角膜の厚みの90%以上を占めており、主として角膜実質細胞(角膜線維芽細胞)と細胞外マトリックスであるコラーゲンおよびプロテオグリカンから構成されている¹。角膜実質の大部分はI型コラーゲンで、角膜実質細胞が産生している。角膜実質細胞はきわめて扁平な細胞で、コラーゲンの層間に存在している²。角膜実質に損傷が加わると、創傷部周辺の角膜実質細胞は活性化されて線維芽細胞様細胞に変化し、活発な分裂、増殖を開始する。活性化した角膜実質による角膜実質の癒痕形成と癒痕収縮が、角膜損傷における角膜の混濁と形状(屈折)の変化を生じると考えられる³。角膜損傷後の不正乱視の出現や、実質の切除による屈折矯正手術後の形状の変化や上皮下混濁^{4,5}などは実質の創傷治癒による癒痕形成と収縮が大きく関与している⁶。

日比野らは、角膜実質創傷治癒のin vitroモデル

として、角膜実質細胞をコラーゲングル内で培養し、角膜上皮細胞培養上清が培養角膜実質細胞によるコラーゲングル収縮を促進することを報告した⁷。さらに、角膜上皮細胞培養上清中から精製したコラーゲングル収縮促進因子が、SPARCであることを報告した⁸。SPARCはオステオネクチン, BM-40とも呼ばれる分子量43 kDaのカルシウム糖蛋白質である⁹。

SPARCは多彩な生理機能を示し、骨組織の維持、細胞外基質構造の維持、抗細胞接着作用、サイトカインの機能調整、抗細胞増殖作用、細胞外基質産生の抑制、抗血管新生作用を有している¹⁰⁻¹⁷。このような多彩な機能を介して、SPARCは創傷の治癒、組織の再構築、細胞外基質の産生と代謝、および細胞増殖の調整にかかわっていると考えられている¹⁸。角膜におけるSPARCの生物学的作用はまだ明らかではないが、SPARCは実質創傷部に出現することから、角膜実質の癒痕収縮に関与することが考えられる。また、SPARCは4つの機能的ドメインから構成されており、各ドメインはSPARCの諸機能とそれぞれ密接に関与している¹⁸。ドメインIは、

SPARCの酸性部位であり、細胞の接着・伸展を抑制する¹⁹との報告もある。ドメインIIは、システイン残基に富み、種々のサイトカインと結合する部位である。そのC末端側には2カ所のCuイオン結合領域がある。II領域のペプチドLys-Gly-His-Lys (KGHK)に脈管形成を刺激するとの報告もある²⁰。ドメインIIIは、 α ヘリカル構造からなり、IV型コラーゲンへの結合とプロテアーゼ分泌の亢進作用に関連する部位である。III領域のペプチド3.2がMMP産生を上昇させるとの報告もある²¹。また、ドメインIVは、Ca結合作用、コラーゲンとの結合、サイトカインとの結合、血管内皮細胞との結合などの機能を有しており、細胞の接着・伸展を抑制するとの報告もある^{11,19,22}。

そこで本研究では、角膜実質に対するSPARCの角膜創傷治癒に対する作用機序の詳細を知る目的で、種々のSPARC由来のペプチドを作成し、それらの角膜実質細胞とコラーゲンとの関係に及ぼす影響について検討した。

方 法

材料および試薬

白色家兎(日本在来種、雄、体重2-3kg)は北摂産業より購入した。リン酸緩衝生理食塩水(pH 7.2; 以下PBSと略す)は日水製薬、trypsin-EDTA溶液(0.25%trypsin, 1mM EDTA-4Na), medium199培養液はGIBCO BRL社、イーグル minimum essential medium (MEM)培地「ダイゴ」は日本製薬、細菌性コラゲナーゼはSIGMA社、ディスパーゼは合同酒清株式会社、ウシ胎児血清(FCS)はJRH biosciences社、ウシ血清アルブミンはWako社、プラスチック培養皿(24ウェル培養皿)はCorning社、ブタ腱由来酸可溶性Type I collagen (cell matrix Type I-A)は新田ゼラチン株式会社、セルデスク[®](細胞培養用プラスチック製カバースリップ)は住友ベークライト株式会社、SPARCペプチドは宝酒造

株式会社及び本学共同研究所にて作成、4%四酸化オスミウム液はTAAB社、Millipore filter[®](type HA)はMillipore社のものを用いた。

実験方法

初代家兎角膜上皮細胞の培養

家兎をペントバルビタール(5ml)静脈注射にて麻酔死させ速やかに眼球を脱臼した後、角膜片を摘出した。角膜内皮をデスメ膜とともにピンセットで機械的に除去し、2mg/mlのディスパーゼを含むmedium199培養溶液で4°Cにて一晚反応させた。スパーテルで角膜上皮を実質より剥離し、trypsin-EDTA溶液で15分間37°Cで反応させ、ピペッティングを充分に行い単細胞化させた。15%FCSを含むmedium199培養液を加えて洗浄、遠心(800g, 7分)し実験に用いた。

角膜実質細胞の培養

家兎の角膜上皮剥離後の角膜実質を細菌性コラゲナーゼ(1mg/ml)を含むMEM培養液で反応させ、溶解し遊離した角膜実質細胞を遠心(180g, 10分)にて回収した。得られた角膜実質細胞は10%FCSを含むMEM培養液で培養し、1週間毎に1:2の割合で継代培養を行い、今回の実験では培養4代目の角膜実質細胞を使用した。

ペプチドの合成

SPARCの構造(図1)は、N末端側からCa²⁺結合領域のドメインI、システインの豊富なドメインII、EFハンド構造をとり α ヘリカル構造をしているドメインIII・IVの4個のドメインに分けることができる。SPARCのペプチドに関するSageらの研究^{19-21,23}を参考にし、ドメインII領域に属するペプチド2.3、ドメインIII領域に属するペプチド3.2、ドメインIV領域に属するペプチド4.2a, 4.2a', 4.2bを作成した。ペプチド4.2aと4.2bはアミノ酸シーケンス256から270までをはさんでそのN末端側とC末端側に一致し、ペプチド4.2a'はペプチド4.2a

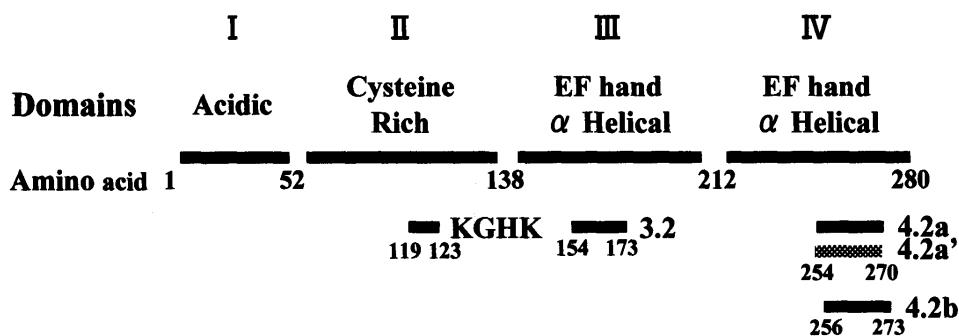


図1 SPARCの構造と今回作成したSPARC由来ペプチドの位置

Peptide	Sequences	Location
KGHK	KGHK	(119-123)
3.2	KNVLVTLYERDEGNNLLTEK	(154-173)
4.2a	TC:DLNDNKYIALEEWAG:	(254-270)
4.2a'	TC:DLNDNKYIAL <u>DE</u> EWAG:	(254-270)
4.2b	:DLNDNKYIALEEWAG:CFG	(256-273)
	256 266 270	

図2 今回作成したペプチドとそのシーケンス
ペプチド4.2aと4.2bはアミノ酸シーケンス256から270までをはさんでそのN末端側とC末端側に一致し、ペプチド4.2a'はペプチド4.2aのGluをAspに置換して設計した。

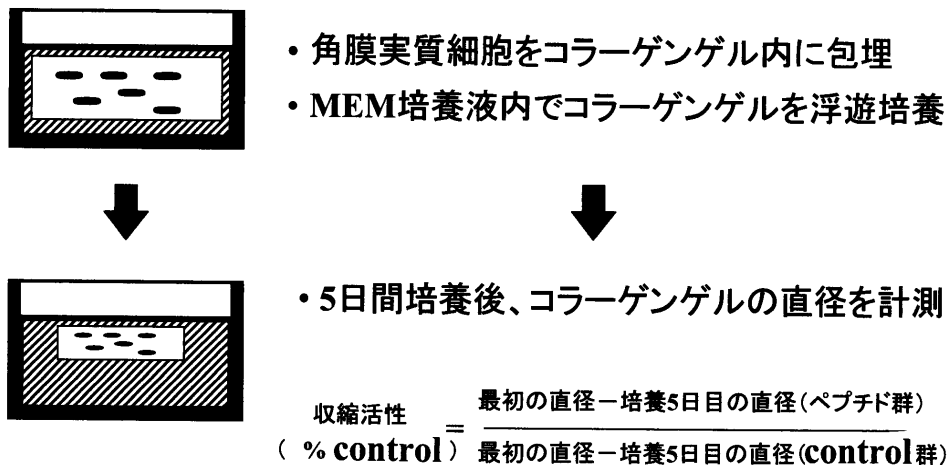


図3 角膜実質細胞のコラーゲンゲル収縮モデルの作製法と収縮活性の算出法

のグルタミン酸 (Glu) をアスパラギン酸 (Asp) に置換して設計した (図2)。

角膜実質細胞のコラーゲンゲル収縮モデルの作製

角膜実質細胞のコラーゲンゲル内培養は Nishida らの方法に準じて行った²⁴ (図3)。低温に保ったコラーゲン塩酸溶液 (3 mg/ml), 中和用緩衝液 (0.0875 N NaOH, 0.455 M NaHCO₃, 350 mM HEPES), 8.75倍濃度の MEM 培養液, FCS を 14 : 1 : 2 : 2 の割合で混合し, 速やかに中性化させた。その後コラーゲン溶液と 7.3×10^5 個/ml に調整した角膜実質細胞浮遊液を 19 : 3 の比率で混和し, あらかじめウシ血清アルブミン (10 mg/ml) でコートした24穴培養皿上に 300 μ l 注入し, 37°Cで30分間静置しゲル化させた。その後, 種々の SPARC ペプチドを含む血清無添加 MEM 培養液を重層し, 5日間コラーゲンゲルを浮遊培養後, ゲルの直径を計測し

た。培養5日間でのペプチド添加群でのゲル直径の変化量と control 群の変化量との割合を算出し、以下の如くゲル収縮活性 (% control) を算出した。

収縮活性 (% control) = (最初のゲルの直径 - 培養5日目のペプチド添加群のゲルの直径) / (最初のゲルの直径 - 培養5日目の対照群のゲルの直径) × 100
コラーゲンゲル中の角膜実質細胞の観察

角膜実質細胞のコラーゲンゲル収縮モデルの作製と同様に, 実質細胞を包埋したゲルを作製した。培養5日目に10%ホルマリンにて, 室温で1時間固定した。その後0.05%クリスタルバイオレットを添加して一晩染色し, PBSで脱色した。スライドガラス上にゲルを置き, カバーガラスを上からのせ軽く圧迫し光学顕微鏡 (ZEISS社製) で観察, 写真撮影を行った。

セルデスク® 上へのI型コラーゲンコーティング

10 µg/ml に調整した I 型コラーゲン (150 µl) をセルデスク® 上に注入し、1 時間室温にてコーティングした。その後 PBS で 2 回洗浄し、さらに 1% BSA-PBS で同様にコーティングした後、PBS で 3 回洗浄し乾燥させ実験に用いた。

角膜実質細胞の I 型コラーゲンマトリックスへの接着・伸展

I 型コラーゲンでコーティングしたセルデスク® 上にペプチド 4.2a (0.3 mM) を含む血清無添加 MEM 培養液を添加し 2 時間インキュベートした後、培養液を吸引した。その後、細胞浮遊液を播種した(前処理群)。一方、セルデスク® 上にペプチド 4.2a (0.3 mM) と細胞浮遊液を同時に播種した(添加群)。また、ペプチド非添加で細胞のみを播種した(control 群)。それぞれの群で細胞 (3000 個/セルデスク®) を播種後 10, 30, 60 分間 37°C でインキュベートした後、4% パラホルムアルデヒドで 4°C 1 時間固定した。1% エオジン液で 20 分間染色した後 100% エタノールで脱水し、スライドガラスに封入した。高感度デジタル冷却 CCD カメラ (浜松ホトックス ORCA III m)、デジタル蛍光画像解析装置 (Nikon E800) を用いて写真撮影を行い、画像解析システム (マッキントッシュ G4、ピクトログラフィー 3000) を用い細胞面積をピクセルを用いて解析した。

走査型電子顕微鏡による観察

I 型コラーゲンをコーティングしたセルデスク® 上に、角膜実質細胞浮遊液とペプチド 4.2a (0.3 mM) を同時添加し、細胞播種後 10, 30, 60 分間 37°C でインキュベートした。その後 4% パラホルムアルデヒドに 4°C で 1 時間浸漬し、PBS にて 10 分毎に 6 回洗浄し前固定とした。後固定は 1% 四酸化オスミウム (PBS で希釈) で 2 時間行い、PBS で 10 分毎に 6 回洗浄した。アルコール脱水の後ブタノールに置換し凍結乾燥し、導電処理を行い走査型電子顕微鏡 (SEM) にて細胞の形態を観察し撮影を行った。別の実験では、あらかじめコラーゲンコートしたセルデスク® 上に実質細胞を播種し、2 時間反応させた後に、ペプチド 4.2a を添加し、添加 1, 2, 3 時間後に固定し、SEM による観察を行った。

角膜上皮創傷治癒モデルの作製

角膜創傷治癒モデルは Jumblatt らの方法に準じて作製した²⁵。初代家兎角膜上皮細胞を 24 ウェルプラスチックプレートに 2×10^5 個/ウェルずつ播種し、15% FCS を含む medium 199 培養液中でコンフルエントの状態になるまで、37°C で 4 日間培養を行った。その後ウェル内の培養液を吸引除去し、直径 5 mm の HA filter を培養角膜上皮細胞の中央に置き、ウェルの裏面より液体窒素で冷却したプローブ

を約 5 秒間押し当てた。medium 199 培養液を加えた後、filter を取り除いて円形の角膜上皮欠損を作製した。培養液中に種々の濃度のペプチド 4.2a を添加し、37°C で 24 時間培養した後 10% ホルマリン液で固定し、1% クリスタルバイオレットで染色した。残存した角膜上皮欠損部の面積をコンピューター画像上で測定した。

統 計

すべての実験は各群 3 個以上の検体で行い、平均および標準誤差を算定した。また、各群間の統計的検定は student T 検定を用いた。

成 績

コラーゲングル収縮モデルを用いて、種々の SPARC 由来のペプチドが角膜実質細胞に及ぼす影響を検討した (図 4)。ペプチド KGHK、ペプチド 3.2 はコラーゲングル収縮作用に影響を与えなかったが、ペプチド 4.2a は角膜実質のコラーゲングル収縮作用を有意に抑制することが認められた。ペプチド 4.2a の Glu²⁶⁶ を Asp に置換したペプチド 4.2a' でも角膜実質細胞のコラーゲングル収縮抑制作用が認められた。一方、ペプチド 4.2a より 2 残基 C 末端側のペプチド 4.2b は、コラーゲングル収縮作用に影響を与えなかった。

次に角膜実質細胞のコラーゲングル収縮抑制作用を示したペプチド 4.2a と SPARC との関係を検討した (図 5)。SPARC 単独添加群ではコラーゲングル収縮は control 群と比較して促進が認められた。ペプチド 4.2a 単独の添加では、control 群に比べてコラーゲングル収縮は抑制された。また、SPARC と

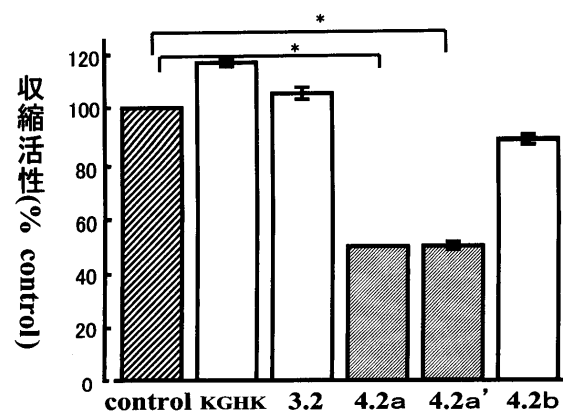


図 4 角膜実質のコラーゲングル収縮に対する SPARC ペプチドの影響 (mean ± S.E.M., n=3, *: p < 0.01) ペプチド KGHK, 3.2, 4.2a, 4.2a', 4.2b はいずれも 0.3 mM の濃度で添加した。

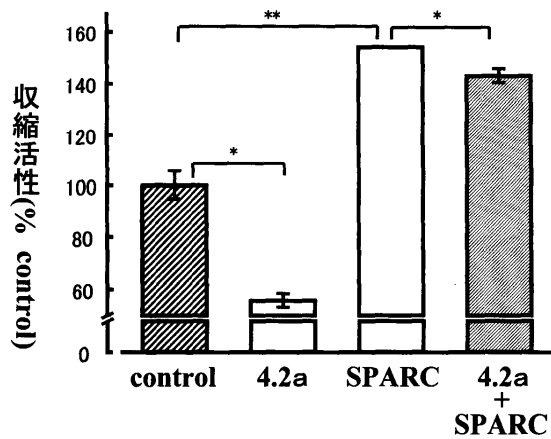


図5 角膜実質細胞のコラーゲンゲル収縮に対するペプチド4.2aとSPARCの影響 (mean±S.E.M., n=3, *: p<0.05, **: p<0.01) ペプチド4.2aは0.3 mM, SPARCは10 µg/mlの濃度で添加した。

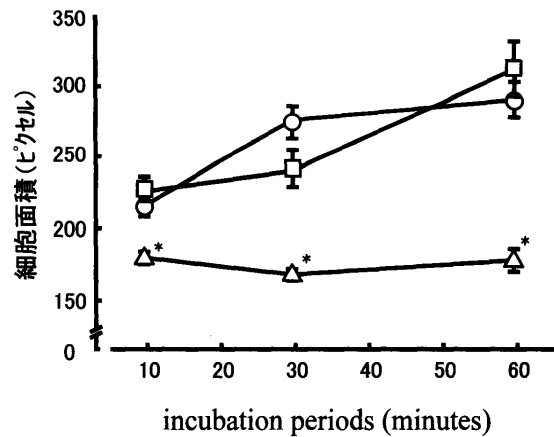


図7 I型コラーゲン上への角膜実質細胞の伸長におけるSPARCペプチド4.2aの影響 コラーゲン上で実質細胞を播種し、経時的に細胞面積を計測した。(mean±S.E.M., n>50, *: p<0.01) —□—control群, —○—ペプチド4.2a前処理群(0.3 mM), —△—ペプチド4.2a添加群(0.3 mM)

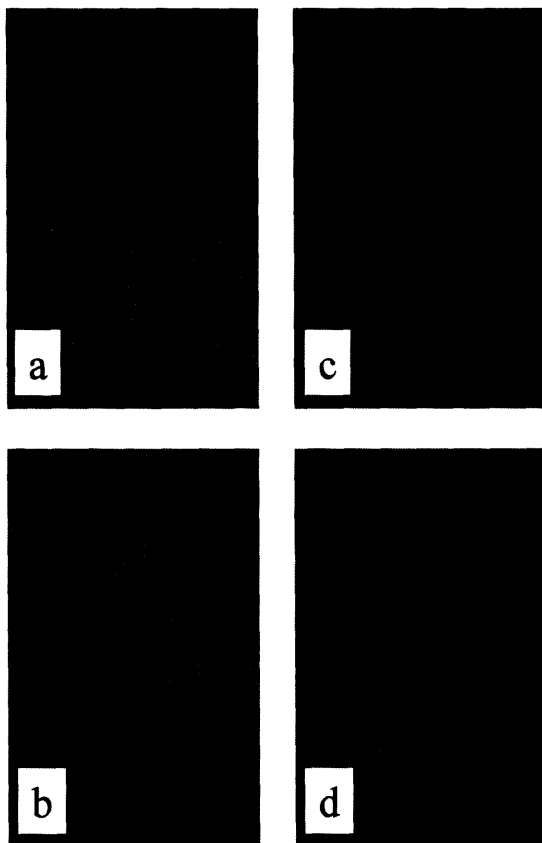


図6 培養5日目のコラーゲンゲル中の角膜実質細胞像 角膜実質細胞をコラーゲンゲル内で5日間培養後、固定、染色した。control群(a), SPARC (10 µg/ml) 添加群(b), ペプチド4.2a (0.3 mM) 添加群(c), ペプチド4.2a' (0.3 mM) 添加群(d) 倍率 (×100)

ペプチド4.2aを同時添加した群ではSPARC単独添加群に対し有意にコラーゲンゲル収縮の抑制が認められた。

培養5日目のコラーゲンゲル中の角膜実質細胞を光学顕微鏡下で観察した(図6)。対照群では角膜実質細胞はコラーゲンゲル内で突起を伸ばして紡錘状の形状を示しており、SPARC添加群ではさらに角膜実質細胞の突起が多く認められた。それに比べ、ペプチド4.2a添加群では細胞の突起は認められず球形を呈し、ペプチド4.2a'添加群も同様に突起は認められなかった。

次に、I型コラーゲンマトリックス上での角膜実質細胞の伸展の程度を検討した(図7)。Control群(—□—)では反応時間経過に伴い細胞面積が増加しているが、ペプチド添加群(—△—)では時間が経過しても細胞面積に変化は認められず、いずれの培養時間でもControl群との間に有意な差を認めた。一方、コラーゲンマトリックスをあらかじめペプチド4.2aで処理した前処理群(—○—)では、control群と同様に反応時間に伴う細胞面積の増加が認められ、control群との間に差は認められなかった。

さらに、角膜実質細胞のI型コラーゲン上での伸展に与える影響をSEMで観察した(図8)。control群では、時間と共に細胞が突起を伸ばしコラーゲン上に伸展していく様子が観察された(図8 a, b, c, d)。ペプチド4.2a添加群では、時間経過による細胞の変化があまり認められず細胞は球形を呈し、突起もほとんど認められなかった(図8 e, f, g,

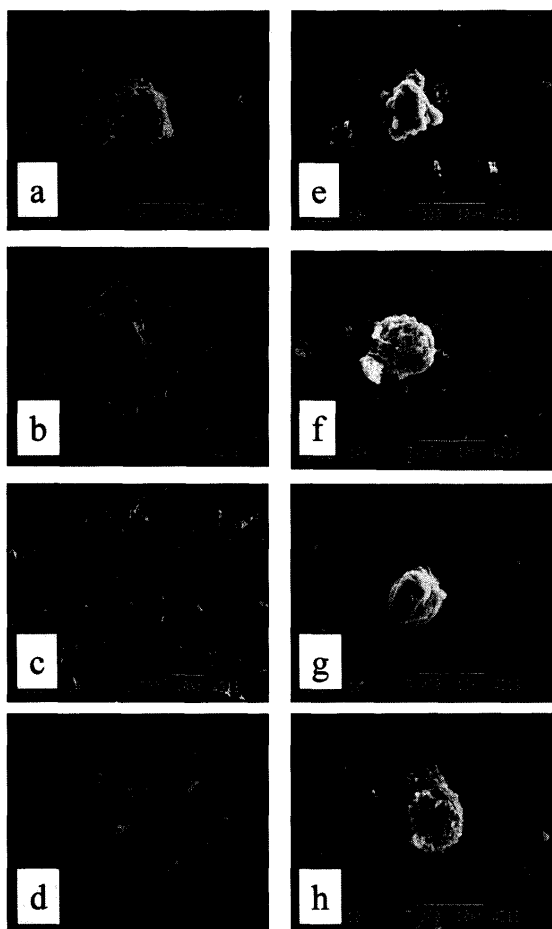


図8 I型コラーゲン上への角膜実質細胞の伸展におけるペプチド4.2aの影響
実質細胞をコラーゲン上に播種し、経時的に細胞の形態をSEMで観察した。
control群(a, b, c, d), ペプチド4.2a (0.3 mM) 添加群(e, f, g, h), ペプチド添加10分後(a, e), ペプチド添加30分後(b, f), ペプチド添加60分後(c, g), ペプチド添加90分後(d, h)
倍率(a, e, f-h×3000, b-d×1500)

h).次に細胞をあらかじめコラーゲン上で十分に伸展させてからペプチドを添加して細胞の形態の変化を観察した(図9)。細胞播種後2時間目には細胞が十分にコラーゲン上に伸展している様子が観察され(図9 a), control群ではその後1時間, 2時間, 3時間経過しても, 細胞には大きな変化は認められずコラーゲン上に伸展している様子が観察された(図9 b, c, d)。ペプチド4.2a 添加群では, ペプチド添加後, 細胞の突起が収縮し, 細胞の形態も時間経過に伴い丸くなっていく様子が認められ(図9 e, f, g), 実質細胞とコラーゲン間の接着を抑制している可能性が示唆された。

上皮創傷治癒モデルを用いて, ペプチド4.2aの角

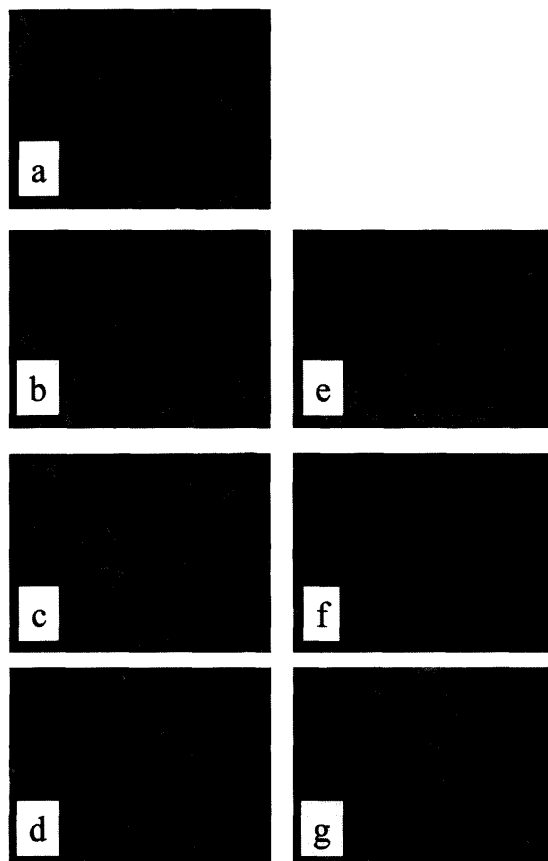


図9 I型コラーゲン上への角膜実質細胞の伸展におけるペプチド4.2aの影響
実質細胞をコラーゲン上で2時間培養後ペプチドを添加し、経時的に細胞の形態をSEMで観察した。
control群(a, b, c, d), ペプチド4.2a (0.3 mM) 添加群(e, f, g), ペプチド添加前(細胞播種2時間後)(a), ペプチド添加1時間後(b, e), 2時間後(c, f), 3時間後(d, g)
倍率(a-f×1000, g×2000)

膜上皮細胞への影響を検討した(図10)。培養24時間後の上皮欠損面積はcontrol群(0 mM)では6.57 mm²であり, ペプチド4.2a (0.3 mM) 添加群では6.66 mm², ペプチド4.2a (0.1 mM) 添加群では5.77 mm², ペプチド4.2a (0.03 mM) 添加群では6.20 mm²であり, いずれの濃度のペプチドを添加した場合でも control群に比べ有意な差は認められなかった。このことより, ペプチド4.2aは角膜上皮細胞の接着・移動には影響しないことが考えられた。

考 按

今回の研究の結果, 種々の SPARC ペプチドを作成したが, SPARC のドメインIV領域由来のペプチド4.2a, 4.2a'のみがコラーゲングル収縮に対して

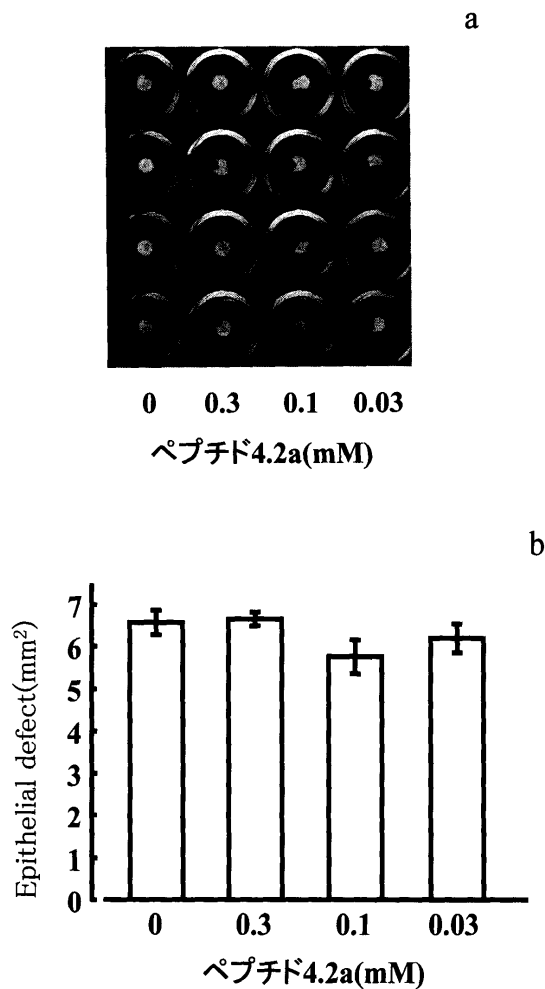


図10 上皮創傷治癒モデルにおけるペプチド4.2aの影響
角膜上皮創傷治癒モデル写真(a), 上皮欠損面積(b)
実験的上皮欠損を作成し, ペプチド4.2aを種々の濃度で添加し, 24時間培養した(a), 染色後残存する上皮欠損部の面積を計測した(b).
(mean±S.E.M., n=4)

抑制作用を示し, 他のドメイン由来のペプチドは角膜実質細胞のコラーゲンゲル収縮に影響を与えなかった(図4)。またペプチド4.2aよりもC末端側のペプチド4.2bは実質細胞のコラーゲンゲル収縮に対して影響を与えず, さらにペプチド4.2aと4.2a'との間にコラーゲンゲル収縮抑制作用の差が認められなかった(図4)。このことより実質細胞のコラーゲンゲル収縮抑制作用が, SPARCのアミノ酸シーケンス254~265の間に存在していることが示唆された。SPARCのドメインIV領域のペプチドには血管内皮細胞の増殖抑制や, 中胚葉細胞の移動を抑制することが報告されている^{26,27}。さらに血管内皮増殖

因子(VEGF)のreceptorに対して競合することが報告されており²⁸, 結果からもドメインIVには強い生理活性があることが示唆される。

SPARCが角膜実質細胞によるコラーゲンゲル収縮を促進し, 角膜実質の創傷治癒に重要な役割を演じていることが報告されている⁸。実験では, SPARCは角膜実質細胞のコラーゲンゲル収縮を促進しているが, SPARCのドメインIV領域由来のペプチド4.2aは逆に角膜実質細胞のコラーゲンゲル収縮を抑制し(図5), 一見相反する結果のように見受けられる。SPARCの促進作用には, α -SMAの発現促進, LAPとの結合などTGF β との相互作用が考えられている²⁹。また, SPARCはEGF, 血小板由来増殖因子(PDGF), VEGFなどの種々のサイトカインとの相互作用が報告されており^{28,30}, 多彩な生理作用はこれらに参与しているためと考えられる。一方, ペプチド4.2aと同じドメインIV領域のペプチドにはVEGF受容体への競合作用が報告されており²⁸, SPARCとペプチド4.2の作用の相違は, サイトカインとの相互作用の相違によることが考えられる。

I型コラーゲンコーティングしたセルデスク[®]上に, 角膜実質細胞を播種する前にペプチド4.2aを先に添加しても角膜実質細胞のコラーゲン上への伸展には変化が認められなかったが, ペプチド4.2aと角膜実質細胞を同時に添加すると細胞のコラーゲン上への伸展は阻害された(図7)。このことはペプチド4.2aがコラーゲンに結合して細胞がコラーゲン上に伸展するのを阻害するのではなく, ペプチド4.2aが直接細胞に作用し, 細胞がコラーゲン上に伸展するのを阻害していると示唆される。SPARCに対する受容体は報告されていないが, SPARCはPDGFのレセプターへの結合を阻害する¹⁵との報告がある。血管内皮細胞のVEGF receptorにSPARCのドメインIV領域が接着することも報告されている²⁸。角膜実質細胞にVEGFの受容体が発現しているかは現在まで不明であったが, 結果からペプチド4.2aの作用にVEGFレセプターが関与していることが考えられる。

角膜実質細胞をコラーゲン上に播種すると, 対照群では時間経過と共に細胞が突起をコラーゲン上に伸ばしていつているのに対し, ペプチド4.2aの添加で実質細胞の伸展が阻害されることが観察された(図8)。さらにあらかじめコラーゲン上で伸展した細胞もペプチド4.2aの添加によって突起を縮小させて, 球形を呈することが認められた(図9)。このことから, ペプチド4.2aは角膜実質細胞に作用してコラーゲン上への細胞の伸展を阻害することが示唆された。このことはペプチド4.2aがanti-adhesion

factor 作用²⁷を有していると推察される。一方、コラーゲンコートしたプラスチック上で SPARC を添加することにより、血管内皮細胞が接着するが広がらないという報告など¹⁰、SPARC の anti-adhesive factor としての機能も報告されている¹³。これらのことから SPARC の anti-adhesive factor は、ドメイン IV 領域に由来することが考えられる。

また、実験では角膜上皮創傷治癒モデルではペプチド 4.2a は、実験的角膜上皮の創傷治癒には影響を与えなかった(図10)。発生学的には角膜上皮細胞は表皮外胚葉由来であり、角膜実質細胞は神経堤細胞由来で異なっている。それゆえに細胞表面の各々の受容体に差があり上皮細胞と実質細胞では、ペプチドに対する反応に相違が生じていることが考えられる。また角膜上皮が作成する基底膜は、IV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの種々の細胞外マトリックス (ECM) から構成される³¹。上皮創傷治癒モデルにもプラスチック皿上に ECM による基底膜が形成されていると考えられる。このことから、上皮の創傷治癒には実質細胞と I 型コラーゲンとの間の作用とは異なる作用機序が存在することが考えられ、ペプチドの上皮細胞と実質細胞への作用の相違に関係しているかもしれない。

In vitro で実質細胞のコラーゲンゲル収縮を抑制することは、in vivo では実質の癒痕収縮など創傷治癒を抑制する可能性が考えられる。一方、上皮の創傷治癒には SPARC ペプチドは作用しないことが示唆された。これらのことから臨床的には、ペプチド 4.2a が実質の創傷治癒を選択的に抑制することが考えられ、創傷部の癒痕形成の抑制や屈折矯正手術の効果持続などに有効である可能性を持つものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました恩師下村嘉一教授に深甚なる謝意を表します。また終始御助言、御指導を賜りました三島 弘助教授に感謝の意を表します。本論文の一部は第 8 回眼創傷治癒研究会(金沢, 2001年 9 月), Association for Research in Vision and Ophthalmology 年次総会 (Fort Lauderdale, Florida, 2000年 5 月), 第104回日本眼科学会総会 (京都, 2000年 4 月), 第24回角膜カンファレンス (2000年 2 月) において発表した。

文 献

- Gipson IK (1994) Anatomy of the conjunctiva, cornea, and limbus, In: Smolin G, Thoft RA (eds): The cornea, Boston, Little, Brown and Company, pp 3-24
- Nishida T (1997) Cornea, In: Krachmer JH, Mannis MJ (eds): CORNEA, St. Louis, Mo, Mosby-Year Book, Inc, pp 3-27
- Jester JV, Barry PA, Lind GJ, Petroll WM, Garana R, Cavanagh HD (1994) Corneal keratocytes: In situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 730-743
- Lipshitz I, Loewenstein A, Varssano D, Lazar M (1997) Late onset corneal haze after photorefractive keratectomy for moderate and high myopia. Ophthalmology 104: 369-374
- 中安清夫, 金井 淳 (1997) PTK・PRK 手術の問題点. 眼科39: 835-844
- 加藤卓次 (2001) LASIK 術後の角膜創傷治癒. あたらしい眼科18: 737-738
- 日比野剛, 和田幸久, 三島 弘, 大鳥利文, 西田輝夫 (1995) 角膜実質のコラーゲンゲル収縮作用に対する上皮細胞の影響. 日眼会誌99: 989-994
- Hibino T (1995) Biochemical studies on the corneal epithelial cell-derived stimulator of collagen gel contraction by keratocytes. Acta Med Kinki Univ 20: 247-254
- Engel J, Taylor W, Paulsson M, Sage H, Hogan B (1987) Calcium binding domains and calcium-induced conformational transition of SPARC/BM-40/osteonectin, an extracellular glycoprotein expressed in mineralized and nonmineralized tissues. Biochemistry 26: 6958-6965
- Sage H, Vernon RB, Funk SE, Everitt EA, Angello J (1989) SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix. J Cell Biol 109: 341-356
- Maurer P, Hohenadl C, Hohenester E, Gohring W, Timpl R, Engel J (1995) The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domain that binds calcium and collagen IV. J Mol Biol 253: 347-356
- Gilles C, Bassuk JA, Pulyaeva H, Sage EH, Foidart JM, Thompson EW (1998) SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. Cancer Res 58: 5529-5536
- Goldblum SE, Ding X, Funk SE, Sage EH (1994) SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) regulates endothelial cell shape and barrier function. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 3448-3452
- Funk SE, Sage EH (1991) The Ca²⁺-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 2648-2652
- Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, Ross R, Sage EH (1992) The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 1281-1285
- Iruela-Arispe ML, Vernon RB, Wu H, Jaenisch R, Sage EH (1996) Type I collagen-deficient Mov-13 mice do not retain SPARC in the extracellular matrix: impli-

- cations for fibroblast function. *Dev Dyn* 207: 171-183
17. Strandjord TP, Madtes DK, Weiss DJ, Sage EH (1999) Collagen accumulation is decreased in SPARC-null mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 277: 628-635
 18. 金内雅夫 (1998) SPARC. *日臨56 (増刊: 糖尿病 3)*: 258-261
 19. Lane TF, Sage EH (1990) Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca²⁺-binding sites modulate cell shape. *J Cell Biol* 111: 3065-3076
 20. Lane TF, Iruela-Arispe ML, Johnson RS, Sage EH (1994) SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J Cell Biol* 125: 929-943
 21. Shankavaram UT, DeWitt DL, Funk SE, Sage EH, Wahl LM (1997) Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol* 173: 327-334
 22. Lane TF, Sage EH (1994) The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 8: 163-173
 23. Mason IJ, Taylor A, Williams JG, Sage H, Hogan BL (1986) Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000. *EMBO J* 5: 1465-1472
 24. Nishida T, Ueda A, Fukuda M, Mishima H, Yasumoto K, Otori T (1988) 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
 25. Jumblatt MM, Neufeld AH (1986) A tissue culture assay of corneal epithelial wound closure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 8-13
 26. Sage EH, Bassuk JA, Yost JC, Folkman MJ, Lane TF (1995) Inhibition of endothelial cell proliferation by SPARC is mediated through a Ca²⁺-binding EF-hand sequence. *J Cell Biochem* 57: 127-140
 27. Huynh MH, Sage EH, Ringuette M (1999) A calcium-binding motif in SPARC/osteonectin inhibits chondrosarcoma cell migration during *Xenopus laevis* gastrulation: Evidence of counter-adhesive activity in vivo. *Dev Growth Differ* 41: 407-418
 28. Kupprion C, Motamed K, Sage EH (1998) SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 29635-29640
 29. 原 英徳 (1999) 角膜創傷治療における SPARC の役割について. *近畿大医誌* 24: 103-114
 30. Kim WJ, Mohan RR, Wilson SE (1999) Effect of PDGF, IL-1 α , and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1367-1372
 31. Trokel SL, Srinivasan R, Braren B (1983) Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmol* 96: 710-715