

ラミニン, フィブロネクチンおよび IV 型コラーゲンに対する ヒト角膜上皮細胞パキシリンリン酸化の差異

大藤 圭子

山口大学医学部眼科学教室

要 約

目 的: パキシリンは細胞骨格蛋白質(68 kD)で, 細胞基質間接着に伴うチロシンリン酸化は, 細胞内シグナル伝達における重要性が推定されている. 角膜上皮細胞において, 細胞外マトリックスの違いにより生じるパキシリンのチロシンリン酸化の変化を検討した.

方 法: ヒト角膜上皮細胞をラミニン, フィブロネクチン, IV 型コラーゲン上にそれぞれ播種, 培養した. 接着細胞を剥離, 溶解したサンプルを抗パキシリン抗体で免疫沈降し, western blotting 法でリン酸化されたパキシリンを検出した.

結 果: ラミニン上では培養時間に依存してパキシリンのリン酸化が亢進し, 培養後 24 時間で最大値を示し

た. フィブロネクチン上では培養後 6 時間を最大とする一過性の亢進がみられ, フィブロネクチン濃度に依存してリン酸化の亢進があった. IV 型コラーゲン上では, 培養時間および IV 型コラーゲン濃度に反応するパキシリンのリン酸化は緩徐であった.

結 論: 細胞外マトリックスがパキシリンのリン酸化を通して, 角膜上皮細胞に何らかのシグナルを与えている可能性が考えられた. (日眼会誌 103:722-728, 1999)

キーワード: 細胞外マトリックス, 角膜上皮細胞, パキシリン, チロシンリン酸化

Differential Tyrosine Phosphorylation of Paxillin in Human Corneal Epithelial Cells on Extracellular Matrix Proteins

Keiko Ofuji

Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine

Abstract

Purpose: To understand the interaction of corneal epithelial cells with laminin, fibronectin, and collagen type IV, major components of basement membrane, we investigated whether tyrosine phosphorylation of paxillin was increased during attachment of these cells to matrix proteins. Paxillin is one of the focal adhesion proteins and it is tyrosine phosphorylated during cell adhesion.

Methods: SV 40-transformed human corneal epithelial (HCE) cells were plated on these extracellular matrix proteins and incubated. The cellular lysates were submitted to immunoprecipitation and western blotting to determine tyrosine phosphorylation of paxillin.

Results: When the cells were plated on laminin matrix, the stained band indicating tyrosine phosphorylated paxillin increased in proportion to cultivation periods. The increase was significant at 6 to 24 hours of cultivation. When HCE cells were cul-

tured on various concentrations of laminin, paxillin was up-regulated in phosphorylation in a dose-dependent fashion. On a fibronectin matrix, tyrosine phosphorylation of paxillin increased in a time-dependent fashion and peak time point was 6 hours of cultivation. Paxillin was up-regulated in tyrosine phosphorylation in direct relation with the fibronectin concentration. On a type IV collagen matrix, tyrosine phosphorylation of paxillin increased in relation to time, but not so rapidly as cultures on a laminin or fibronectin matrix.

Conclusion: Differential tyrosine phosphorylation of paxillin may have been caused by different extracellular matrix proteins. (J Jpn Ophthalmol Soc 103:722-728, 1999)

Key words: Extracellular matrix, Corneal epithelial cells, Paxillin, Tyrosine phosphorylation

別刷請求先: 755-8505 宇部市小串 1144 山口大学医学部眼科学教室 大藤 圭子
(平成 11 年 2 月 3 日受付, 平成 11 年 5 月 24 日改訂受理)

Reprint requests to: Keiko Ofuji, M.D. Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine,
1144 Kogushi, Ube 755-8505, Japan

(Received February 3, 1999 and accepted in revised form May 24, 1999)

I 緒 言

角膜上皮細胞は、基底膜を構築する細胞外マトリックスを基質として接着することにより、その細胞の形態や機能が維持されている。細胞外マトリックスは細胞を物理的に支持し、組織や器官の形成に役立つだけでなく、細胞表面のインテグリンと呼ばれる受容体を介して細胞外マトリックス独自の情報を細胞内に送ることによって分化、増殖などの基本的な細胞機能を制御していることが明らかになってきた¹⁾²⁾。

角膜上皮細胞には、細胞外マトリックスに対する受容体、すなわち、インテグリンが存在し、細胞外マトリックスからのシグナルはインテグリンを介して伝えられる³⁾⁴⁾。インテグリンと細胞外マトリックスの結合が、角膜上皮細胞の接着、伸展、移動の作動系として重要である⁵⁾。パキシリンは細胞と基質との接着部に存在する分子量68 kDの細胞骨格系の蛋白質で⁶⁾、細胞基質間接着に伴ってチロシンリン酸化される⁷⁾⁸⁾ことから、インテグリンを介する細胞内シグナル伝達における重要性が推定されている^{9)~11)}。

一方、細胞機能は種々の細胞内情報伝達物質により制御されており、細胞内情報伝達において蛋白リン酸化酵素群であるチロシンリン酸化酵素が重要である¹²⁾。本研究では細胞外マトリックスが持続的に角膜上皮細胞に与える影響を比較するために、パキシリンの細胞内チロシンリン酸化状態の変化を指標に検討した。

II 実験方法

1. 細胞外マトリックスのコートと細胞培養

ラミニン (EHS sarcoma 由来, Collaborative Biomedical Products, Bedford), フィブロネクチン (human plasma, Boehringer Mannheim), IV型コラーゲン (新田ゼラチン) をそれぞれリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) で希釈した。これらを細胞培養プレート (100 mm 径, Collaborative Biomedical Products, Bedford) の底面が完全に覆われるように加えた。37°C で1時間インキュベーションした後、細胞の非特異的な接着を防ぐため、0.1% ウシ胎仔血清 (FCS) アルブミンでさらに37°C で1時間インキュベーションした。PBS で洗浄して各実験に用いた。

SV-40 アデノウイルス recombinant ベクターにより不死化させたヒト角膜上皮細胞 (SV-40 transformed human corneal epithelial cell, HCE 細胞) は、正常角膜上皮細胞の性質を保持した細胞で¹³⁾、supplemented hormone epithelial medium (SHEM 培地, 15% FCS, 5 µg/ml insulin, 0.1 µg/ml cholera toxin, 10 ng/ml human epidermal growth factor (EGF), 0.5% dimethyl sulfoxide, 40 µg/ml gentamicin-DMEM/F12) で培養¹³⁾して本研究に用いた。それぞれの細胞外マトリックスを予めコートした培

養プレートに継代培養した HCE 細胞を播種し、無血清培養液 (Dulbecco-modified Eagles' medium, DMEM, GIBCO) で種々の期間培養した。

2. 間接蛍光抗体法によるパキシリンの局在

HCE 細胞におけるパキシリンの局在を間接蛍光抗体法を用いて確認した。スライドガラス上に HCE 細胞を播種し、24 時間培養後アセトン固定した。一次抗体に抗パキシリンモノクローナル抗体 (Transduction Laboratories, 250 倍希釈)、二次抗体に fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Cappel, West Chester, 500 倍希釈) を用いた。抗体の希釈には 1% FCS アルブミンを添加した PBS を用いた。

3. パキシリンのチロシンリン酸化の検討

培養終了後、それぞれの培養プレートを氷冷した PBS で2回洗浄し、1 ml の細胞溶解液 (1% Triton X, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 50 mM NaF, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Na₃VO₄, pH 7.5) を加え、接着した細胞を剥離、溶解した。溶解液を回収し 15,000 回転、4°C 3 分間で遠心後、上清をサンプルとした。各サンプル中の蛋白量は蛋白アッセイキット (BIO-RAD, Bradford 法による) を用いて測定し、等量になるよう補正した。

これらのサンプルに抗パキシリンモノクローナル抗体 (Transduction Laboratories) 5 µg を添加し、4°C で一晩免疫沈降した。Protein G sepharose (Pharmacia) を加え、さらに1時間4°Cで反応させた。遠心後、ゲルを細胞溶解液 1 ml で3回洗浄した。Sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel (SDS/PAGE) sample buffer (第一化学) 20 µl を添加し5分間煮沸後、SDS/PAGE (4~20% acrylamide gel) で展開し、PVDF 膜 (Millipore, Marboro) に転写した。転写後ブロッキングバッファー (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で一晩4°Cでブロッキングした後、抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体 (RC 20, Transduction Laboratories, 2,500 倍希釈) を用いて、イムノプロテイングを行った。バンドの検出には ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham) を用いた。検出後に、これらの PVDF 膜を rehybridization buffer (0.2 M Tris HCl, pH 7.4, 0.1% Tween 20) で一晩4°Cで洗浄処理し、再度、抗パキシリン抗体 (10⁴ 倍希釈) でイムノプロットを行った。バンドの検出には同様に ECL を用いた。デンストメータ値によりそれぞれの蛋白量が等量であることを確認した。

4. 統計学的方法

いずれの実験も4回繰り返し、値は平均値±標準誤差で表し、多重比較 (Dunnett 法) で検討した。

III 結 果

培養した HCE 細胞の形状は位相差顕微鏡で確認した

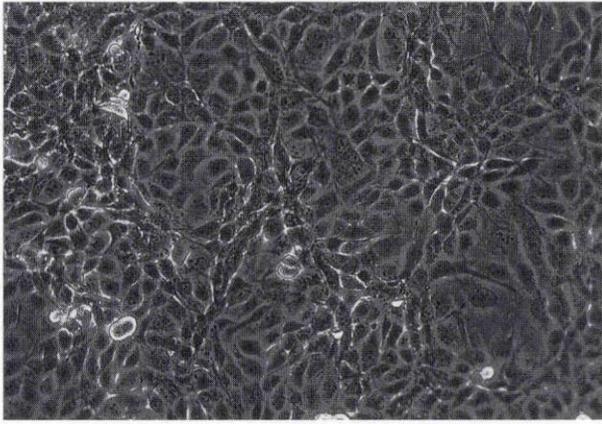


図1A ヒト角膜上皮細胞(HCE細胞)の形態。
培養したHCE細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した
(200倍)。

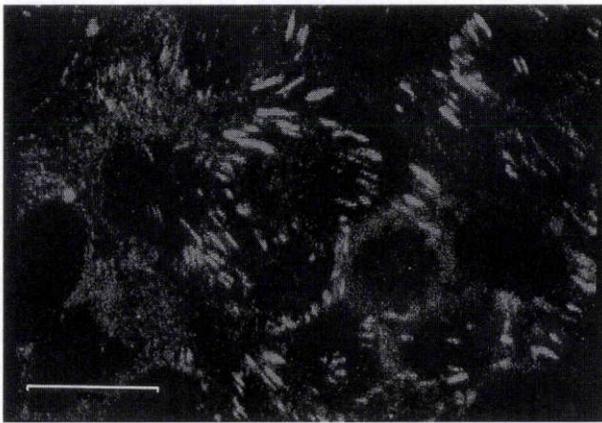


図1B HCE細胞におけるパキシリンの局在。
パキシリンは角膜上皮細胞の先端部に存在し、線状に染
色された。バーは40 μm

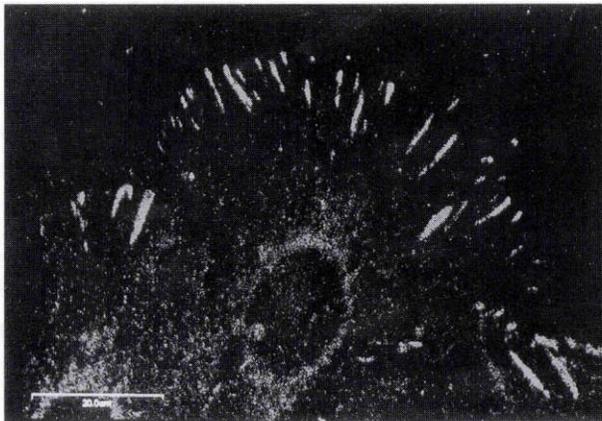


図1C HCE細胞におけるパキシリンの局在。
パキシリンは角膜上皮細胞の先端部に存在し、線状に染
色された。バーは20 μm

(図1A). パキシリンは細胞膜と細胞骨格の間に存在し、裏打ち構造を取るため伸展していく細胞の先端に線状に集積する。HCE細胞においてパキシリンは細胞の先端部に存在し、線状の染色が確認できた(図1B,C)。

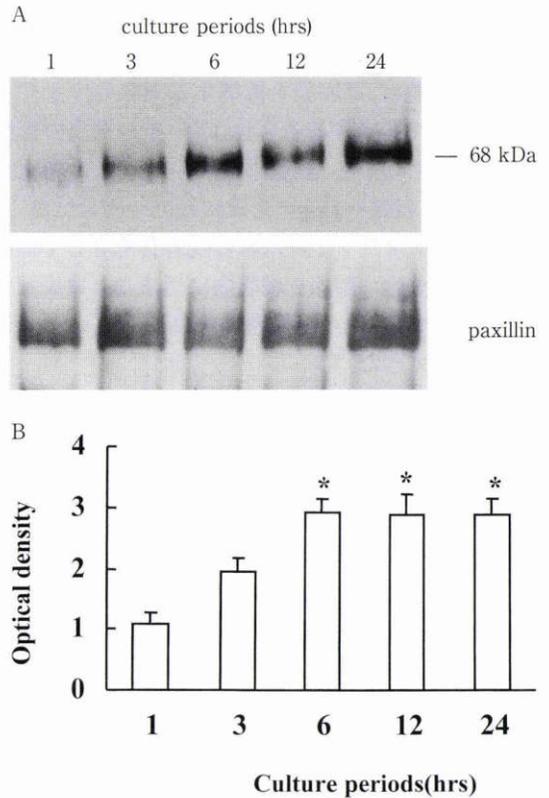


図2 ラミニン上でのパキシリンのチロシンリン酸化強度の経時変化。

A: ラミニンコート上でHCE細胞を1~24時間培養した。細胞溶解液を抗パキシリン抗体で免疫沈降し、sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel (SDS/PAGE)で展開後、チロシンリン酸化された蛋白質を検出した(上段)。再度、抗パキシリン抗体でイムノプロットを行い、パキシリンの蛋白量を確認した(下段)。

B: デンシトメータで解析した実測値の平均を示す。培養後1時間でのリン酸化レベルと比較した。N=4, 平均値±標準誤差, * : $p < 0.01$

1. ラミニンマトリックスに対するパキシリンのチロシンリン酸化

ラミニンへの接着に伴ってパキシリンのチロシンリン酸化が亢進するかを検討した。10 μg/mlの濃度でラミニンをコートした培養皿にHCE細胞を播種し、種々の時間(1, 3, 6, 12, 24時間)培養した。培養時間に依存してパキシリンのリン酸化は亢進し6時間後プラトーに達し、検討した24時間まで高い値を示した。再度抗パキシリン抗体でイムノプロットを行い、各サンプルの蛋白量を確認したが各群間で差はなかった(図2A)。各培養時間でのパキシリンリン酸化強度の平均値をグラフに表し、培養1時間後のリン酸化レベルと比較すると、6時間後に有意にリン酸化の亢進がみられ、24時間で最大値を示した(図2B)。

次に、ラミニンの濃度変化がパキシリンのリン酸化に与える影響を検討するため、種々の濃度(1, 5, 10, 25, 50 μg/ml)のラミニン上で、HCE細胞を24時間培養した。

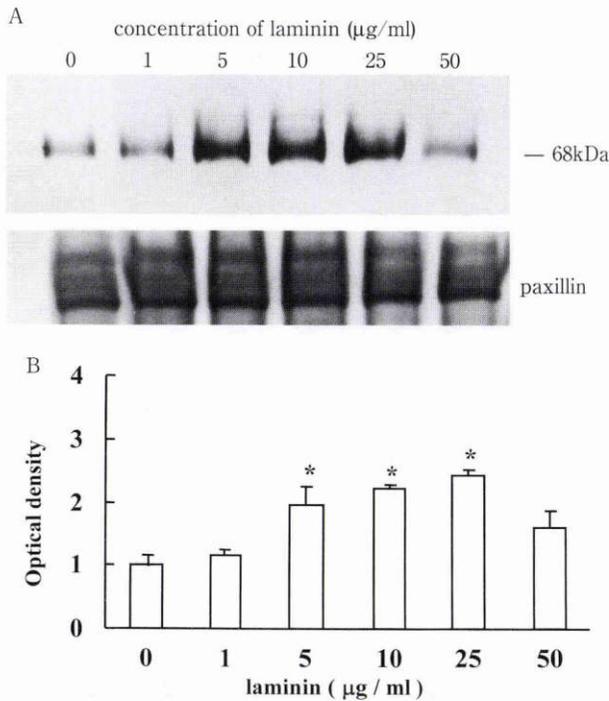


図3 ラミニン濃度に対するパキシリンのチロシンリン酸化。

A: HCE 細胞を種々の濃度(0, 1, 5, 10, 25, 50 µg/ml)のラミニン上で24時間培養した。細胞溶解液を抗パキシリン抗体で免疫沈降し, SDS/PAGEで展開後, チロシンリン酸化された蛋白質を検出した(上段)。再度, 抗パキシリン抗体でイムノプロットを行い, パキシリンの蛋白量を確認した(下段)。

B: デンシトメータで解析した実測値の平均を示す。0 µg/ml(対照)でのリン酸化レベルと比較した。N=4, 平均値±標準誤差, *: $p < 0.01$

濃度に依存してリン酸化レベルの上昇がみられた(図3 A)。対照(0 µg/ml)でのリン酸化レベルと比較すると, 5~25 µg/mlの濃度範囲で有意なリン酸化の亢進が起こり, 50 µg/mlの高濃度ではリン酸化の減少がみられた。各群での平均値をグラフに表した(図3 B)。

2. フィブロネクチンマトリックスに対するパキシリンのチロシンリン酸化

10 µg/mlの濃度でコートしたフィブロネクチン上で, HCE 細胞を種々の時間(1, 3, 6, 12, 24時間)培養した。経時的にパキシリンのリン酸化が亢進し, 6時間で最大値を示し, 12, 24時間では逆に低下する傾向がみられた(図4 A)。4回の実験の平均値を, 培養後1時間でのリン酸化レベルと比較した(図4 B)。

コートしたフィブロネクチンの濃度とパキシリンリン酸化の影響を知るため, 種々の濃度(1, 5, 10, 25, 50 µg/ml)のフィブロネクチン上で HCE 細胞を12時間培養した。濃度依存性にリン酸化レベルの上昇がみられ, 25~50 µg/mlで最大値を示した(図5 A)。対照(0 µg/ml)でのリン酸化レベルと比較すると, 今回検討した濃度範囲ではフィブロネクチンが高濃度であるほどパキシリンのリン

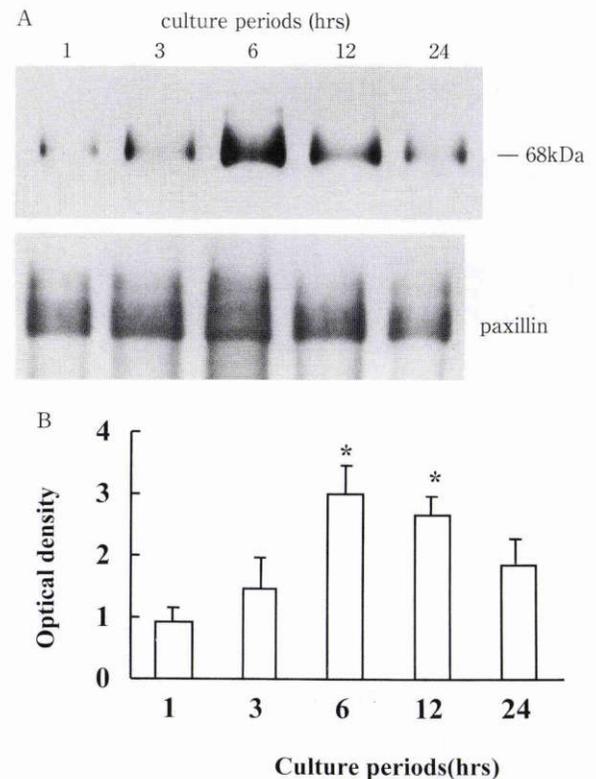


図4 フィブロネクチン上でのパキシリンのチロシンリン酸化強度の経時変化。

A: フィブロネクチンコート上で HCE 細胞を1~24時間培養した。細胞溶解液を抗パキシリン抗体で免疫沈降し, SDS/PAGEで展開後, チロシンリン酸化された蛋白質を検出した(上段)。再度抗パキシリン抗体でイムノプロットを行い, パキシリンの蛋白量を確認した(下段)。

B: デンシトメータでの解析値を示す。各時間での実測値の平均を, 培養後1時間でのリン酸化レベルと比較した。N=4, 平均値±標準誤差, *: $p < 0.01$

酸化は促進されていた(図5 B)。

3. IV型コラーゲンに対するパキシリンのチロシンリン酸化

同様に10 µg/mlにコートしたコラーゲン上で, HCE 細胞を1~24時間それぞれ培養した。時間経過に反応するパキシリンのリン酸化変化は緩徐で(図6 A)培養6時間後に有意に亢進し, その後, 徐々に亢進して24時間で最大値を示した(図6 B)。しかしながら, ラミニン上やフィブロネクチン上でのような程度のパキシリンのリン酸化はなかった。次に, IV型コラーゲンの濃度と, パキシリンリン酸化の影響を検討した。IV型コラーゲン上(1, 5, 10, 25, 50 µg/ml)で, HCE 細胞を24時間培養した(図7 A)。対照(0 µg/ml)と比較すると, 10 µg/mlで有意にパキシリンのリン酸化亢進がみられたが, これよりIV型コラーゲンが高濃度であっても, 著明な亢進はなく, 変化は緩徐であった(図7 B)。なお, 細胞外マトリックスをコートしない培養プレート上ではパキシリンのチロシンリン酸化レベルに経時的な変化はなく, 影響を与えな

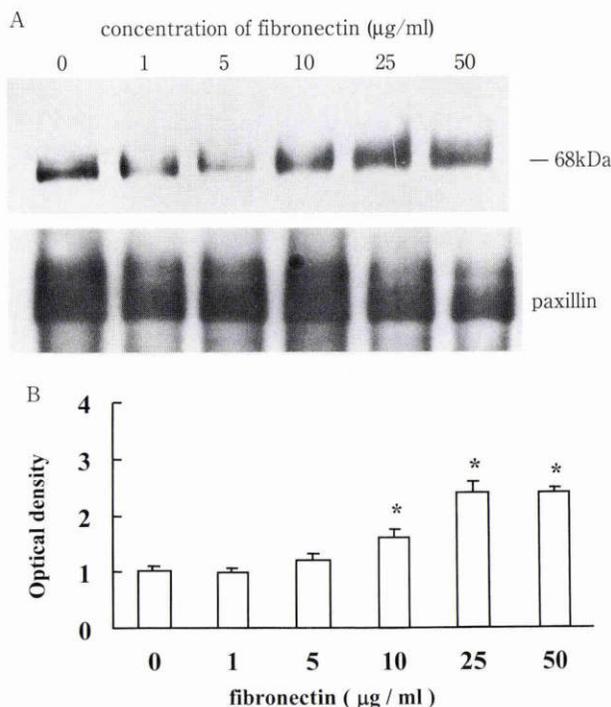


図5 フィブロネクチン濃度に対するパキシリンのチロシンリン酸化。

A: HCE 細胞を種々の濃度 (0, 1, 5, 10, 25, 50 μg/ml) のフィブロネクチン上で 12 時間培養した. 細胞溶解液を抗パキシリン抗体で免疫沈降し, SDS/PAGE で展開後, チロシンリン酸化された蛋白質を検出した (上段). 再度抗パキシリン抗体でイムノプロットを行い, パキシリンの蛋白量を確認した (下段).

B: デンシトメータでの解析値を示す. 実測値の平均を 0 μg/ml (対照) でのリン酸化レベルと比較した. N = 4, 平均値 ± 標準誤差, * : p < 0.01

かったため, 今回の反応は HCE 細胞が各細胞外マトリックスに反応して惹き起こされたリン酸化変化と考えた.

IV 考 按

今回の研究で, 角膜上皮細胞は基底膜を構成するラミニン, フィブロネクチン, IV 型コラーゲンに反応し, 基底膜成分の違いによって, 分子量 68 kD 付近のパキシリンのリン酸化に変化がみられた. チロシンリン酸化を受けたパキシリンは mobility change を来すため, 幅の広いバンドになると報告¹⁴⁾されている. 今回の研究でもパキシリンは幅の広いバンドとして検出され, その強度はフィブロネクチン, ラミニン, IV 型コラーゲンの順であった. ラミニン上では, 時間経過とともにパキシリンリン酸化が著明に亢進した. フィブロネクチン上では, 時間経過に対するパキシリンリン酸化の亢進は速やかで, 6 時間を最大とする一過性の亢進がみられた. また, フィブロネクチンが高濃度であるほどリン酸化は亢進していた. IV 型コラーゲン上では, 時間経過および濃度変化に対するパキシリンのリン酸化反応は緩徐であった.

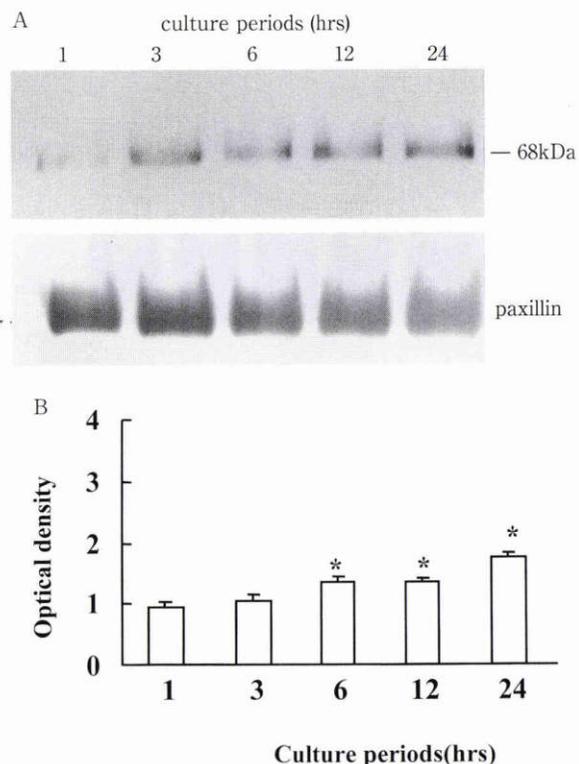


図6 IV型コラーゲン上でのパキシリンのチロシンリン酸化強度の経時変化。

A: IV 型コラーゲンコート上で HCE 細胞を 1~24 時間培養した. 細胞溶解液を抗パキシリン抗体で免疫沈降し SDS/PAGE で展開後, チロシンリン酸化された蛋白質を検出した (上段). 再度抗パキシリン抗体でイムノプロットを行い, パキシリンの蛋白量を確認した (下段).

B: デンシトメータでの解析値を示す. 各時間での実測値の平均を, 培養後 1 時間でのリン酸化レベルと比較した. N = 4, 平均値 ± 標準誤差, * : p < 0.01

ラミニン, IV 型コラーゲンは, 基底膜の主要な構成成分で, 正常角膜上皮に存在する¹⁵⁾¹⁶⁾. フィブロネクチンは角膜上皮剥離や実質切開の際, 直ちに創部表面に出現し, 周辺の上皮細胞の一時的な基質として伸展移動を促進させる. その後, 創部を上皮細胞が被覆すると速やかに消失する^{17)~19)}. 今回の結果, フィブロネクチンが最も早い時期から反応しており, フィブロネクチンが細胞の接着に最も重要であることを推定するものと考えられる.

今回の研究では, ラミニン, フィブロネクチン, IV 型コラーゲンへの反応時間と濃度をそれぞれ変えて, パキシリンのリン酸化状態の差異を検討したが, これらは微小環境の変化, すなわち細胞外マトリックスの量的異常, 質的異常に対する反応を反映していると考えられる.

細胞の接着には, インテグリンを介した裏打ち蛋白質のリン酸化が重要である¹²⁾²⁰⁾. インテグリンを介したパキシリンのリン酸化は細胞内シグナル伝達における重要性が推定されている^{6)~8)}. チロシンリン酸化されたパキシリンは, 細胞の形態変化や移動に関与していると考え

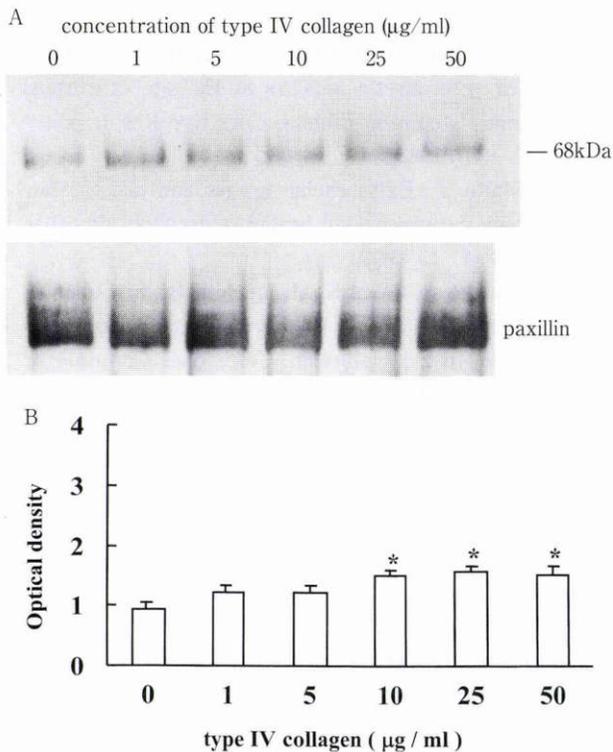


図7 IV型コラーゲン濃度に対するパキシリンのチロシンリン酸化。

A: HCE細胞を種々の濃度(0, 1, 5, 10, 25, 50 µg/ml)のIV型コラーゲン上で24時間培養した。細胞溶解液を抗パキシリン抗体で免疫沈降し、SDS/PAGEで展開後、チロシンリン酸化された蛋白質を検出した(上段)。再度抗パキシリン抗体でイムノブロットを行い、パキシリンの蛋白質量を確認した(下段)。

B: デンシトメータでの解析値を示す。実測値の平均を0 µg/ml(対照)でのリン酸化レベルと比較した。N=4, 平均値±標準誤差, *: p<0.01

られており⁹⁾、胎児発生においてリン酸化される蛋白質の主要なものであることから器官形成に関与しているという報告⁷⁾²¹⁾もある。

インテグリンは細胞外マトリックスのリガンド分子と結合する³⁾一方で、細胞内ではパキシリンなどの蛋白質を介して細胞の接着、移動に関与している⁹⁾¹¹⁾²²⁾。実際、インテグリンβ1も、創傷治癒に反応して発現が増強され¹⁵⁾、インテグリンα5β1の発現を促進するinterleukin-6、サブスタンスPとinsulin like growth factor-1(IGF-1)などは、創傷治癒を促進する²³⁾²⁴⁾。細胞接着制御機構において、細胞—細胞外マトリックスとの反応が細胞の機械的な接着のみに関わるのではなく、シグナル伝達分子としても機能することが考えられる。

今回、パキシリンのリン酸化を指標に各細胞外マトリックスの影響を検討したが、このリン酸化レベルの変動が実際の病態とどのような関係があるのかは不明である。また、今回の研究では各細胞外マトリックスに細胞を24時間の長時間にわたって作用させ、細胞外マトリックスが角膜上皮細胞に対して持続的に反応の場を提供して

いる間でのリン酸化を検討したが、一般に細胞内蛋白質のチロシンリン酸化反応は、細胞の形態学的変化に先行して誘導されるため、新しく合成された蛋白質が関与している可能性も考えられる。早期でのリン酸化反応についても検討する必要があると思われた。接着機構の解析には、インテグリンを介した細胞機能のみならず、細胞外マトリックスとの反応性についても考慮する必要がある。

角膜上皮細胞は基底膜を構成するマトリックス成分の違いに反応し、パキシリンリン酸化のピークの時間、およびマトリックスの濃度が異なっている点は興味深く、少なくとも細胞外マトリックスがパキシリンのリン酸化を通して、角膜上皮細胞に何らかのシグナルを与えている可能性が考えられ、その差異について報告した。

稿を終えるに当たり、本研究に際しご指導とご校閲を賜りました山口大学医学部眼科学教室の西田輝夫教授に深謝いたします。ヒト角膜上皮細胞の提供をいただいた市立豊中病院眼科の佐々木かおる先生に感謝いたします。研究全般にわたり、ご指導いただいた教室の中村雅胤博士に心から謝意を表します。

文 献

- 1) Jain S, Azar DT: Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 5: 3—12, 1994.
- 2) Ben-Zvi A, Rodrigues MM, Krachmer JH, Fujikawa LS: Immunohistochemical characterization of extracellular matrix in the developing human cornea. *Curr Eye Res* 5: 105—117, 1986.
- 3) Hynes RO: Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549—554, 1987.
- 4) Parsons JT: Integrin-mediated signaling regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 8: 146—152, 1996.
- 5) Hannigan GE, Lenung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radera G, Filmus J, et al: Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379: 91—96, 1996.
- 6) Turner CE, Kramarcy N, Sealock R, Burrige K: Localization of paxillin, a focal adhesion protein, to smooth muscle dense plaques, and the myotendinous and neuromuscular junctions of skeletal muscle. *Exp Cell Res* 192: 651—655, 1991.
- 7) Turner CE: Paxillin is a major phosphotyrosine-containing protein during embryonic development. *J Cell Biol* 115: 201—207, 1991.
- 8) Turner CE, Romer LH: Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp 125 FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: A role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* 119: 893—903, 1992.
- 9) Leventhal PS, Feldman EL: Tyrosine phosphorylation and enhanced expression of paxillin dur-

- ing neuronal differentiation *in vitro*. J Biol Chem 271 : 5957—5960, 1996.
- 10) **Shikano T, Haneda M, Togawa M, Kikkawa R** : Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p 125 FAK) and paxillin in glomeruli from diabetic rats. Jpn J Nephrol 38 : 57—64, 1996.
 - 11) **Tanaka T, Yamaguchi R, Sabe H, Sekiguchi K, Healy JM** : Paxillin association *in vitro* with integrin cytoplasmic domain peptides. FEBS Lett 399 : 53—58, 1996.
 - 12) **Schaller MD, Parsons JT** : Focal adhesion kinase and associated proteins. Curr Opin Cell Biol 6 : 705—710, 1994.
 - 13) **Araki K, Ohashi Y, Sasabe T, Kinoshita S, Hayashi K, Yang XZ, et al** : immortalization of rabbit corneal epithelial cells by a recombinant SV 40 adenovirus vector. Invest Ophthalmol Vis Sci 34 : 2665—2671, 1993.
 - 14) **Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P** : Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB 2 binding to focal adhesion kinase. Nature 372 : 786—791, 1994.
 - 15) **Murakami J, Nishida T, Otori T** : Coordinated appearance of β 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. J Lab Clin Med 120 : 86—93, 1992.
 - 16) **Martin GR, Timpl R** : Laminin and other basement membrane components. Ann Rev Cell Biol 3 : 57—85, 1987.
 - 17) **Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, Lanign JM, Colvin RB** : Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. Lab Invest 45 : 120—129, 1981.
 - 18) **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, 1981/1982.
 - 19) **Nishida T** : Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. Curr Opin Ophthalmol 4 : 4—13, 1993.
 - 20) **Cattelino A, Cairo S, Malanchini B, de Curtis I** : Preferential localization of tyrosine-phosphorylated paxillin in focal adhesion. Cell Adhes Commun 4 : 457—467, 1997.
 - 21) **de Curtis I, Malanchini B** : Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and redistribution of paxillin during neuronal adhesion. Exp Cell Res 230 : 233—43, 1997.
 - 22) **Yamada KM, Geiger B** : Molecular interactions in cell adhesion complexes. Curr Opin Cell Biol 9 : 76—85, 1997.
 - 23) **Ohashi H, Maeda T, Mishima H, Otori T, Nishida T, Sekiguchi K** : Up-regulation of integrin α 5 β 1 expression by interleukin-6 in rabbit corneal epithelial cells. Exp Eye Res 218 : 418—423, 1995.
 - 24) **Nakamura M, Chikama T, Nishida T** : Up-regulation of integrin α 5 expression by combination of substance P and insulin-like growth factor-1 in rabbit corneal epithelial cells. Biochem Biophys Res Comm 246 : 777—782, 1998.