

平成 15 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

難治性眼表面疾患における病的角化の分子機構

中村 隆宏

京都府立医科大学大学院医学研究科視覚機能再生外科学教室

要 約

目 的：難治性眼表面疾患における病的角化の分子機構を、表皮生理的角化過程や眼表面上皮の遺伝子発現プロファイルから得られた情報を基に解析した。

対象と方法：難治性眼表面疾患患者の角膜上に被覆していた病的角化結膜を手術時に採取し、表皮生理的角化関連蛋白および遺伝子発現プロファイル上、角膜上皮に高頻度に発現している clusterin に関して、その発現を比較検討した。

結 果：半定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)、免疫染色法において、正常結膜組織と比較し、疾患群の角化結膜組織では

TGase 1, involucrin, filaggrin, keratin 1/10 の発現が有意に上昇していた。一方、clusterin の発現は有意に減少していた。また、clusterin の発現と角化の重症度との間には、負の相関が認められた。

結 論：難治性眼表面疾患における病的角化過程の分子機構に、表皮生理的角化関連蛋白の一部および角膜上皮に高頻度に発現している clusterin が関与している可能性が推定された。(日眼会誌 108：654—664, 2004)

キーワード：眼表面疾患、結膜上皮、病的角化、扁平上皮化生、Clusterin

A Review

Molecular Mechanism of Pathological Keratinization
in Severe Ocular Surface Diseases

Takahiro Nakamura

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medicine

Abstract

Purpose : To investigate the molecular mechanism of pathological keratinization in severe ocular surface diseases based on the process of epidermal physiological keratinization and the gene expression profile of ocular surface epithelium.

Materials and Methods : We examined conjunctiva covering corneas which had ocular surface diseases in which pathological keratinization was seen. We then investigated the expression of epidermal keratinization-related proteins and clusterin, which is the most abundant gene transcript in human corneal epithelium.

Results : Semiquantitative reverse transcription-

polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry showed that transglutaminase 1, involucrin, filaggrin, and cytokeratin 1/10 expression was upregulated in keratinized conjunctiva compared to normal conjunctiva. On the other hand, the level of clusterin expression in the diseased ocular surfaces was significantly lower than normal. We also concluded that clusterin expression may depend on the severity of the pathological keratinization.

Conclusion : Various keratinization-related proteins and clusterin are most likely to be involved in the pathogenesis of cicatrizing ocular surface dis-

別冊請求先：602-0841 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町 465 京都府立医科大学大学院医学研究科視覚機能再生外科学教室 中村 隆宏

(平成 16 年 4 月 19 日受付, 平成 16 年 7 月 16 日改訂受理)

Reprint requests to: Takahiro Nakamura, M.D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medicine. 465 Kajii-cho, Kawaramachi Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan

(Received April 19, 2004 and accepted in revised form July 16, 2004)

eases.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi(J Jpn Ophthalmol Soc 108 : 654—664, 2004)

Key words : Ocular surface disease, Conjunctival epithelium, Pathological keratinization, Squamous metaplasia, Clusterin

I 緒 言

Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡, 熱化学外傷などの重症の難治性眼表面疾患では, 角膜上皮の幹細胞が広範囲に消失した結果, 生体反応性に周辺の結膜組織が角膜上を被覆する。その後, 慢性瘢痕期には, 角膜表面を被覆していた結膜上皮は, 分化異常により病的角化を来す。角化が生じれば, 上皮層の物理的・生理的機能が破綻し, 難治性的上皮障害や視力障害が発生する。このような角化に関する病態を理解し, そこから得られる情報を応用することで, 将来的には有効な治療的手法を開発できると考えられる。そこで, 我々は難治性眼表面疾患における病的角化の分子機構に関する知見を集積するため, 表皮の生理的角化のメカニズムや眼表面上皮における遺伝子発現プロファイルに着目し, その病態の解明に迫った。

II Ocular surface と難治性眼表面疾患

病的角化過程における細胞動態を理解する上で鍵となるのが, 角膜上皮や結膜上皮などを含めた眼表面に対する包括的な理解である。Thoft により提唱された“ocular surface(眼表面)”という用語は, 角膜上皮と結膜上皮という眼表面を構成する外胚葉由来の非角化粘膜上皮を一体としてとらえた概念である。この概念の導入以降, 1980 年代の角膜上皮幹細胞研究の飛躍的な進歩により, 角膜上皮幹細胞の存在も明らかになりつつある。角膜上皮に特異的な細胞骨格蛋白である keratin 3/12 陰性の細胞群が角膜輪部上皮基底細胞層に存在し¹⁾, この細胞が slow-cycling cell であり²⁾, 潜在的に高い増殖能を保持し³⁾, 上皮細胞増殖因子(EGF)などの増殖因子によく反応する⁴⁾といったさまざまな状況証拠から, 角膜上皮幹細胞は角膜と結膜の境界部に位置する角膜輪部上皮の基底層に存在すると考えられている。輪部に存在する角膜上皮幹細胞は, 正常状態では非常にゆっくりとした細胞周期で角膜上皮を供給し, 創傷治癒など必要時に速やかに分化・増殖して角膜上皮基底細胞(transient amplifying cell, TA cell)を供給する。難治性眼表面疾患では, 角膜上皮幹細胞が高度に喪失した結果, 正常な角膜上皮細胞を供給することができず, 眼表面は代償性に周辺の結膜組織が炎症, 瘢痕, 血管新生などを伴って角膜表面を覆い, 著しい視力障害を来す。

III “病的角化” という病態

上述のとおり, 角膜上皮細胞と結膜上皮細胞は, それぞれの細胞群が独特の分化をとげ特異的な形質発現を行

いながら, 眼表面上皮として統一のとれた機能単位を形成している。これら角結膜上皮細胞は, 体表面に露出した粘膜上皮細胞群という点で生体内でも極めて特殊な上皮層といえ, それぞれの上皮細胞層が持つ生理的機能や細胞動態, 発生する疾患や現象には組織特異性がある。難治性眼表面疾患の慢性瘢痕期では, 角膜上を被覆した非角化粘膜上皮細胞である結膜上皮に分化異常が生じ, 多分化増生して高度に重層扁平化する^{5)~8)}。このような粘膜上皮の分化異常を病的角化(扁平上皮化生, squamous metaplasia)と呼ぶ(図 1)。組織学的には杯細胞の消失, 細胞の重層化と表層細胞の扁平化などがこれまでの研究で解明され^{9)~11)}, Stevens-Johnson 症候群などの難治性眼表面疾患のみならず, vitamin A 欠乏症, 重症ドライアイ, 上輪部角結膜炎, シェーグレン症候群などでも報告¹²⁾¹³⁾されている。しかしながらその生理的, 生化学的メカニズムについては, 全く不明のままであった。

IV 生理的角化機構

角膜や結膜などの非角化粘膜上皮とは対照的に, 角化上皮を有する皮膚は人体最大の臓器であり, 外界と生体との間に存在するバリア機能を担っている。皮膚は表皮, 真皮および皮下組織から成り, その最外層を占める表皮は厚さ 0.06~0.2 mm の細胞層が存在し, 常に外界からの物理的, 生理的バリア機能として重要な役割を担っている。生理的角化とは, 表皮の中で, 表皮角化細胞(ケラチノサイト)が基底側から基底細胞, 有棘細胞, 顆粒細胞, 角質細胞へと分化し, 最終的に角質(細胞)層を形成する形態学的, 生化学的, 分子生物学的過程すべてを示す(図 2)。生理的角化に要する時間は, 基底細胞から角質細胞に分化するのに約 14 日, 角質細胞が剥脱していくのに, さらに約 14 日かかる¹⁴⁾とされている。最表層の角質細胞は特徴的な keratin 線維パターンとそれを埋める線維間物質が存在し, 細胞膜の内層は特殊な角質被膜(コーニファイドエンベロープ)と呼ばれる厚さ約 10 nm の架橋された蛋白構造で裏打ちされ, アルカリ・トリプシンなどに対しても安定性を示し, 物理学的・化学的にも強い不溶性蛋白となっている。表皮の生理的角化過程の研究に関しては, transglutaminase 1 という細胞膜に局在する酵素が重要な働きをしていることが解明されてきた¹⁴⁾¹⁵⁾。すなわち, transglutaminase 1 は角化細胞に見られる特殊な角質被膜の形成に involucrin, loricrinなどを基質蛋白として架橋反応を触媒する¹⁶⁾¹⁷⁾。Transglutaminase 1 は常染色体劣性葉状魚鱗癬の原因遺伝子と解明されており¹⁸⁾, また我々の共同研究グルー

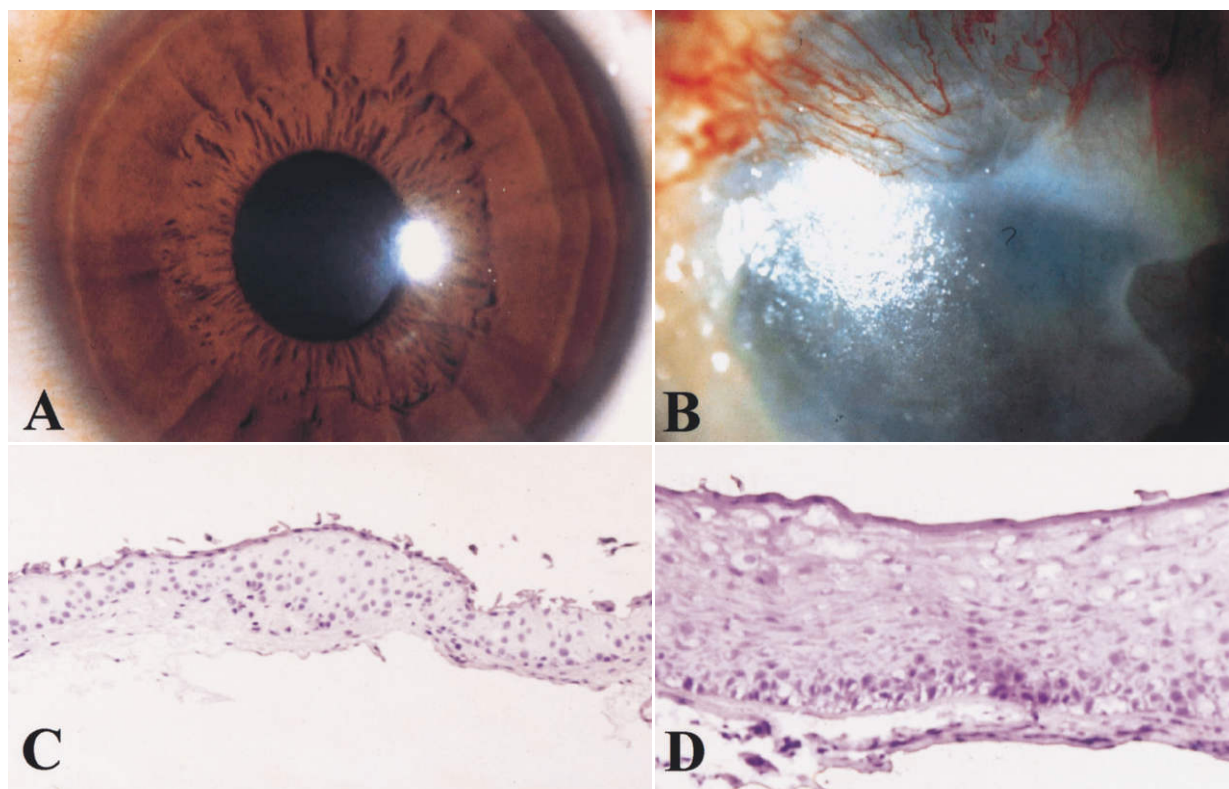


図 1 正常および難治性眼表面疾患患者の眼表面とその組織像。

A: 正常眼表面. B: 慢性癬痕期 Stevens-Johnson 症候群患者の眼表面. 角膜上に結膜が被覆し, 病的角化を起こしている. C: 正常結膜組織像 [ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色]. D: 慢性癬痕期 Stevens-Johnson 症候群患者の角化結膜組織像 (HE 染色). 結膜上皮は高度に重層化し, 病的角化 (扁平上皮化生) が認められる.

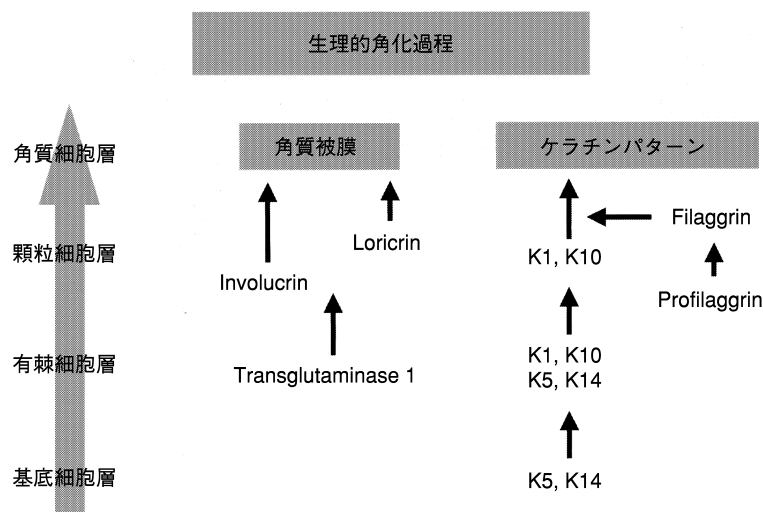


図 2 表皮生理的角化機構の模式図。

プが作製した transglutaminase 1 ノックアウトマウスでは, 角質被膜が存在しないため角質細胞間脂質の配列が正しく整列せず, 経表皮水分蒸散量の著しい亢進を示し, 新生仔期に致死性である¹⁹⁾。また, 表皮の生理的角化過程における分化マーカーとしては, 細胞内骨格蛋白である keratin 1/10 が存在し, それらは filaggrin により凝集され角質細胞を形成することがわかってい

る²⁰⁾²¹⁾。以上の観点から, これまで解明されてきた表皮の生理的角化関連物質と病的角化関連物質との相関を検討し, 病的角化のメカニズムについて遺伝子から蛋白レベルにおいて包括的に解析した。

V Transglutaminase 1 と表皮角化関連蛋白

術前の口頭および文書での同意を得た後, 京都府立医

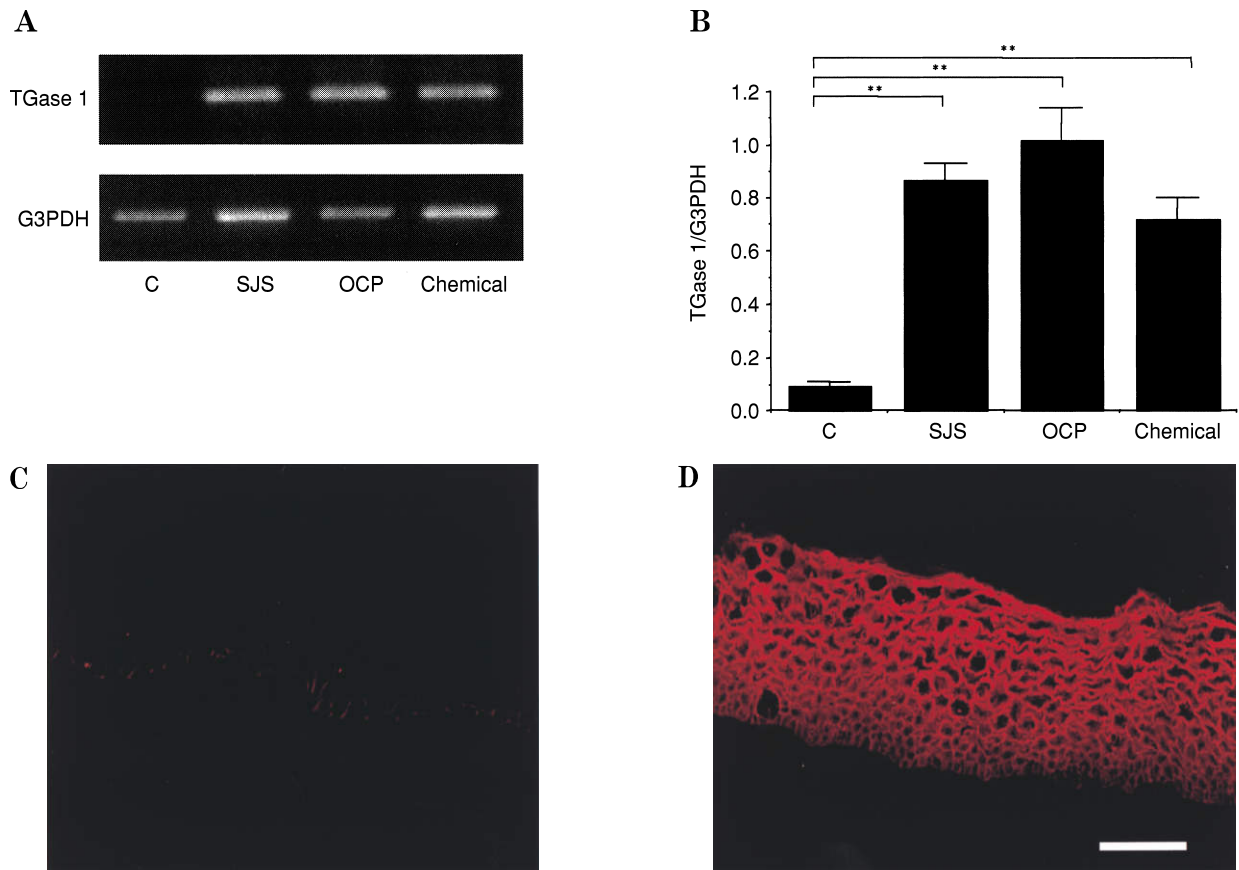


図 3 病的角化結膜における transglutaminase 1 (TGase 1) の発現。

A, B: 半定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) の解析結果。対照群 (C: 正常結膜) と比較して、難治性眼表面疾患群 (SJS: Stevens-Johnson 症候群, OCP: 眼類天疱瘡, Chemical: 熱化学外傷, N=4) では mRNA の発現が有意に上昇していた (Dunnett test, $p < 0.001$)。内部対照として G3PDH を使用した。

C, D: 免疫組織化学染色の解析結果。C (正常結膜組織) では、mRNA の発現がわずかにしか認められないが、D (SJS の病的角化結膜組織) では、細胞膜にその発現が強く認められた。バーは 100 μm (C, D)

科大学において手術時に瘢痕期の難治性眼表面疾患患者 (Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡, 熱化学外傷, 各 N=4) の角膜上に被覆している病的角化結膜組織を採取した²²⁾。採取したサンプルは、一部は TRIzol 処理により、mRNA を抽出し半定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) に使用した。また残りのサンプルは OCT compound 中に埋没し、免疫染色用に使用した。対象とした表皮角化関連蛋白は、表皮角質被膜形成に関与する transglutaminase 1, involucrin, loricrin, および角質細胞における keratin pattern に関与する filaggrin, 種々の keratin subtype [keratin 1/10 (角化型), keratin 4/13 (粘膜分化型), keratin 3/12 (角膜特異型)] に関して検討を行った。対照として同意を得た後、正常のヒト結膜上皮を用いた。検討の結果、transglutaminase 1 の発現レベルは、正常の結膜上皮と比較して mRNA, 蛋白レベルにおいて有意に病的角化結膜群 (Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡, 熱化学外傷) で上昇していた (Dunnett test $p < 0.001$) (図 3)。その発現部位は、結膜上皮層の基底細胞

を除く基底部上層から表層にかけて認められた。また、角質被膜形成蛋白の中で、loricrin に関しては免疫染色法において発現の差はなかったが、involucrin に関しては病的角化結膜群で発現強度が強かった。一方、keratin pattern に関する角化関連蛋白の中で、filaggrin, 角化型 keratin 1/10 に関しては、病的角化結膜群で有意に発現が強かった (図 4)。Filaggrin に対する検討では、基底細胞を除く基底部上層から表層にかけて顆粒状の免疫染色パターンを示していた。Keratin 1/10 に関する検討では、その発現は同様に基底部上層から表層にかけて認められた。粘膜分化型 keratin 4/13, 角膜型 keratin 3/12 に関しては、その発現に差はなかった。以上の結果をまとめると、難治性眼表面疾患における病的角化結膜において、transglutaminase 1, involucrin, filaggrin, keratin 1/10 の発現が増強しており、これらの生理的角化関連蛋白が、病的角化の病態に関与している可能性が推定された。

では、なぜ難治性眼表面疾患における病的角化結膜組織の中で、表皮の生理的角化関連蛋白が発現してくるのか

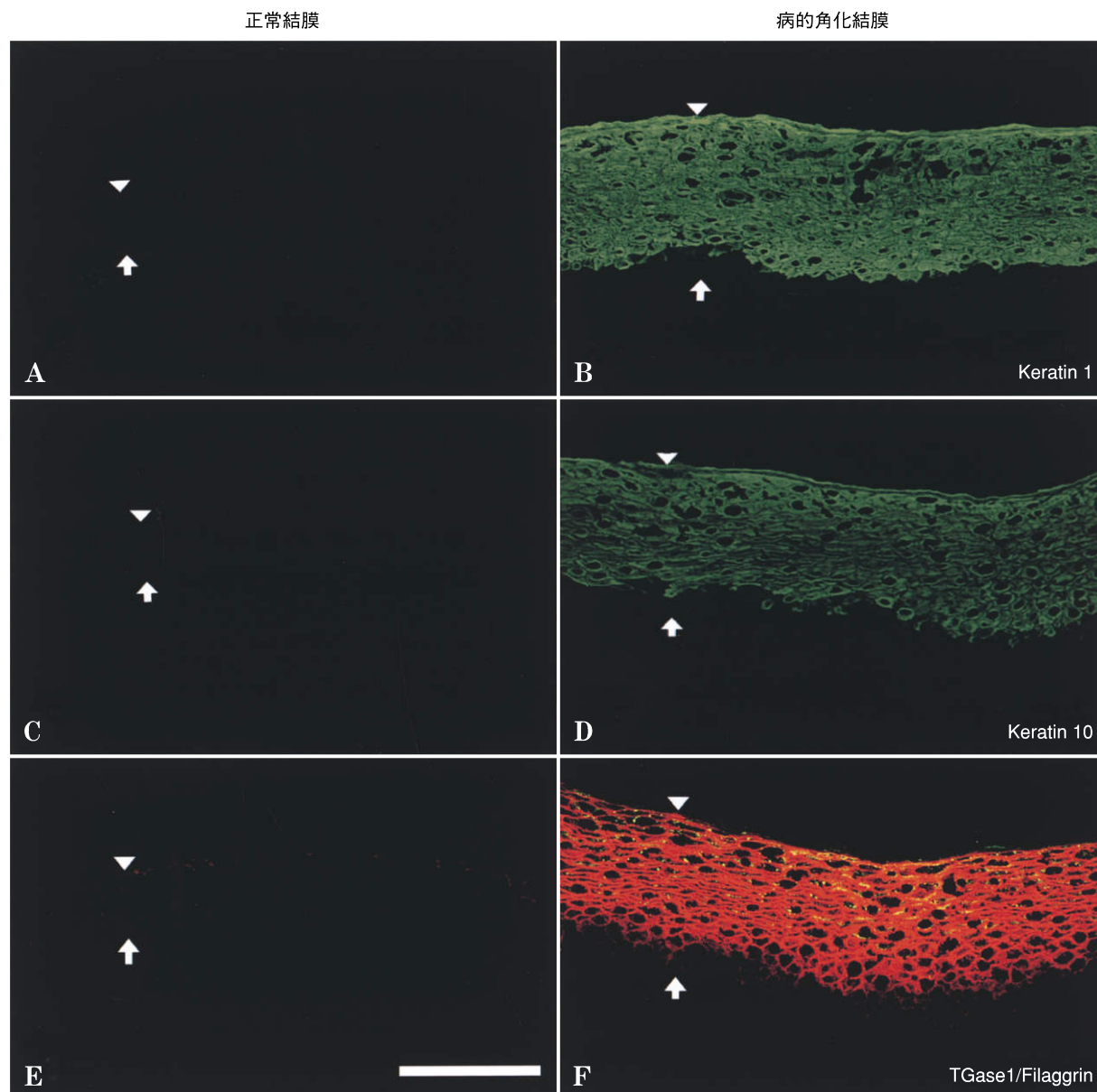


図 4 病的角化結膜における keratin 1/10, filaggrin の発現.

角化型細胞骨格蛋白の keratin 1/10 の発現は、正常結膜(A, C)では認められないのに対し、病的角化結膜(B, D)ではその発現が基底細胞を除く全層で認められた。Tase 1 と filaggrin との二重染色では、正常結膜(E)ではその発現が認められないのに対し、病的角化結膜(F)において filaggrin の発現が顆粒状に認められた。バーは 100 μm (A~F)

(文献 22 より転載、一部改変)

という疑問が浮かび上がる。まず一つの仮説として、Stevens-Johnson 症候群などの難治性眼表面疾患患者の病的角化結膜上皮は、正常結膜組織と比較して有意に Ki 67 陽性細胞の割合が上昇しており、病的角化結膜上皮細胞が過増殖状態にあることが、上皮に分化異常を起こす可能性が推定される²³⁾。次に、結膜下組織の炎症が本病態に関与している可能性がある。我々の施設では、慢性期の Stevens-Johnson 症候群患者の結膜組織を検討した結果、臨床的には炎症が消退した慢性癒痕期にもかかわらず、病的結膜上皮下の組織には、T 細胞系の炎症細胞の集積が認められた²⁴⁾。よって、上皮下の炎症細胞からの何らかの因子(炎症性サイトカインなど)が上

皮の分化異常を誘導する可能性が推定される。最後に、難治性眼表面疾患をはじめ、病的角化を起こす疾患群は高率に重症のドライアイを来す症例が多い⁷⁾⁸⁾。眼表面の非角化粘膜上皮は正常状態では涙液のサポートのもとに恒常性が維持されている。ドライアイが高度になれば、非角化上皮としての恒常性が維持できなくなり、分化異常が生じる可能性がある。いずれも推論の域を脱しないが、これらのことが複合的に関連し、このような病的角化を生じていると考えられる(図 5)。今後、病的角化の誘導因子に関するこのラインのさらなる研究の進歩が必要である。

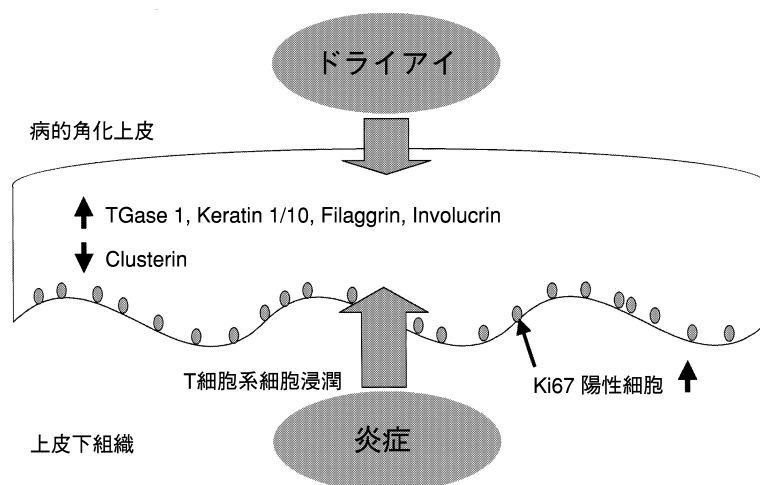


図 5 難治性眼表面疾患における病的角化の病態に関する推察される模式図。

ドライアイ、上皮の過増殖、上皮下の炎症が相互に関連して、本病態が惹き起こされていると予想される。

VI 眼表面上皮の遺伝子発現プロファイル

病的角化を含め、眼表面上皮の細胞動態・生物学的特性を理解するには、角膜上皮、結膜上皮の遺伝子発現の差異を分子レベルで解明することによってはじめて、眼表面上皮が正常に機能するための必須のファクターが理解されることが考えられる。我々の施設では、上述のコンセプトのもと、角膜上皮、結膜上皮の包括的な遺伝子発現プロファイルを作成した(表 1)²⁵⁾²⁶⁾。その中で、clusterin が *in vivo* 角膜上皮細胞で最も発現頻度の高い遺伝子産物であることがわかった。発現頻度が高ければ、その組織における機能的な重要性が高い可能性が推察される。

VII Clusterin とその機能

この clusterin は、分子量 70~80 kDa の分泌糖蛋白であり、血漿・尿・母乳・脳脊髄液などのさまざまな生理分泌液中に存在している。Apolipoprotein J, SP 40-40 などの名称もあるが、現在ではこの“clusterin”が国際的に受け入れられている。現在まで提唱されている生理的機能として、脂質の輸送・精液生成の調節・補体のカスケードの調節・アポトーシス・細胞膜の再生・細胞膜保護など多種多様な機能があげられている²⁷⁾。また、さまざまな疾患、例えば糸球体腎炎、急性腎不全、アルツハイマー病、動脈硬化、心筋梗塞などでもその発現が誘導されることがわかっている。眼組織における clusterin の役割として、主に網膜色素変性、網膜障害モデルマウスにおいて、その病態に関与していることが報告されてきた。我々の施設では、この clusterin に関する粘膜上皮における発現の解析を行った結果、角膜上皮のみならず結膜上皮を含めた粘膜上皮群(腔・食道・胃・小腸・大腸)に広く認められた²⁸⁾。興味深いことに、この発現は、皮膚などの角化上皮にはないことがわかった。以上の観点から、難治性眼表面疾患の病的角化結膜

表 1 眼表面における遺伝子発現プロファイル

角膜上皮	結膜上皮
1. Clusterin	1. Keratin 13
2. Keratin 12	2. Beta-2-microglobulin
3. Calcyclin	3. Eukaryotic initiation
4. Human adipose mRNA	4. Lipocortin
5. Alpha enolase	5. Elongation factor 1
6. Keratin 3	6. Thymosin beta-4

(Nishida et al. IOVS 1996) (Dota et al. Exp Eye Res. 2001)

組織における clusterin の発現についてその詳細を検討した。

VIII 角化と clusterin

手術時に慢性瘢痕期の難治性眼表面疾患患者(Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡, 各 N=4)の角膜上を被覆している病的角化結膜組織を採取し、既報の方法に従って半定量的 RT-PCR, 免疫染色用を使用した²⁹⁾。対象コントロールとして、同意を得た後、正常角膜、結膜および皮膚を用いた。検討の結果、clusterin の発現レベルは、正常の結膜上皮と比較して mRNA, 蛋白レベルにおいて有意に病的角化結膜群(Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡)で減少していた(図 6)。正常角膜上皮および結膜上皮における clusterin の発現は、中間層から表層にかけて認められたが、病的角化結膜群では全く発現していないか、あるいは最表層の一層に限局して発現していた。皮膚(表皮)において発現は全くなかった。

病的角化と clusterin の発現の相関をさらに検討するため、同一の病的角化結膜組織において、角化(扁平上皮化生)の程度が異なる部位を用いて検証した(図 7)。角化のマーカーとしては keratin 10 を、非角化粘膜上皮のマーカーとして keratin 13 を用いた。検討の結果、

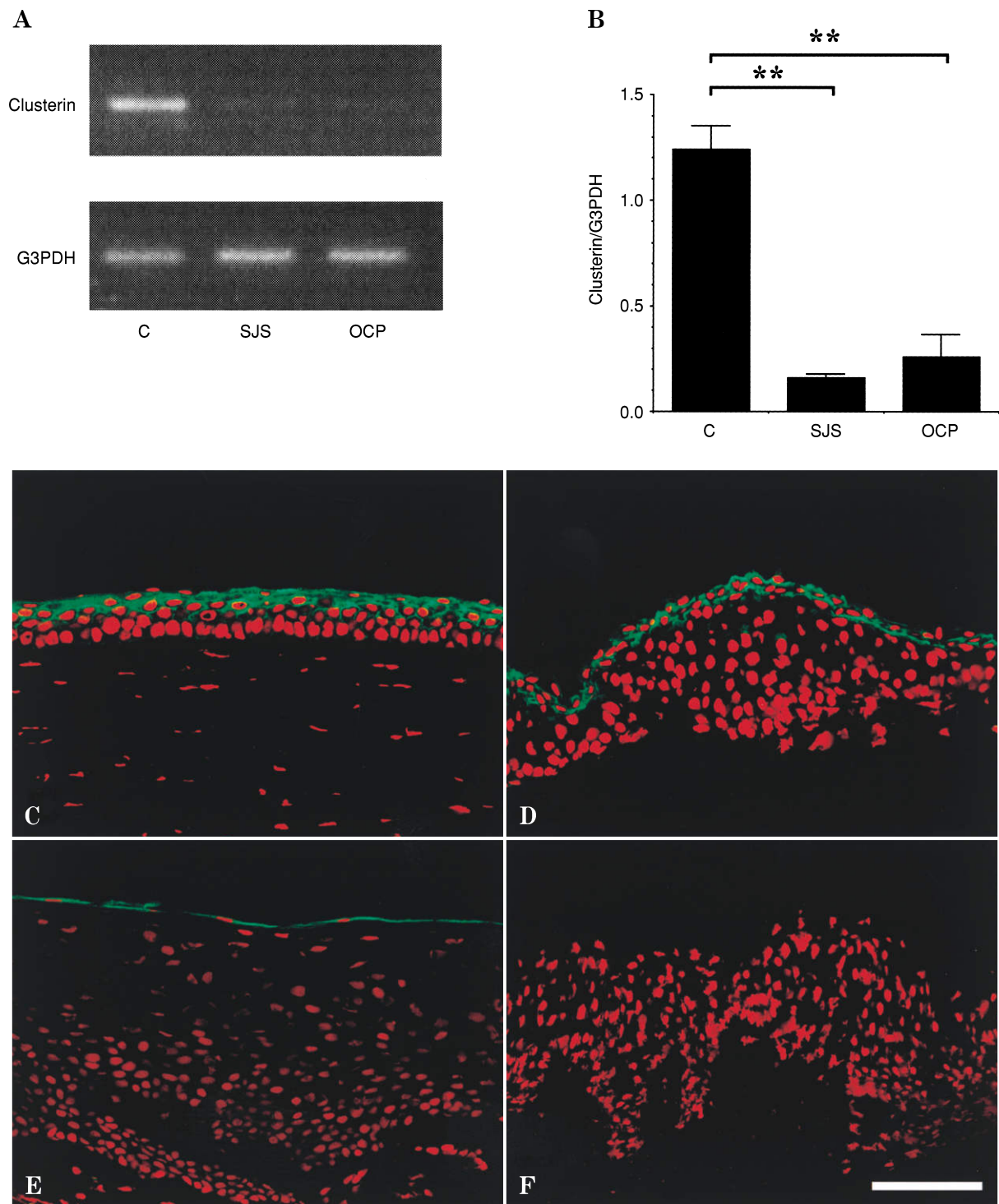


図 6 病的角化結膜における clusterin の発現.

A, B: 半定量的 RT-PCR の解析結果. 対照群 (C: 正常結膜) と比較して, 難治性眼表面疾患群 (SJS: Stevens-Johnson 症候群, OCP: 眼類天疱瘡, N=4) ではその発現が有意に減少していた (Dunnett test, $p < 0.05$). 内部対照として G3PDH を使用した. C, D, E, F: 免疫組織化学染色の解析結果. C (正常角膜組織), D (正常結膜組織) では, clusterin の発現が中間層から表層にかけて認められるが, E (SJS の病的角化結膜組織) では, その発現が認められないか, 最表層に局限して認められた. F (正常皮膚) では, 発現は認められなかった. バーは $100 \mu\text{m}$ (C~F) (文献 28 より転載, 一部改変)

角化の程度が軽度で, 多分化増生していない (高度に重層化していない) 上皮層では clusterin の発現が認められ, 同部位では角化マーカーの keratin 10 は発現して

おらず, 粘膜分化型の keratin 13 が発現していた. 角化の程度が高度で重層化している上皮層では, clusterin の発現が減弱していくと同時に, keratin 10 の発現が認

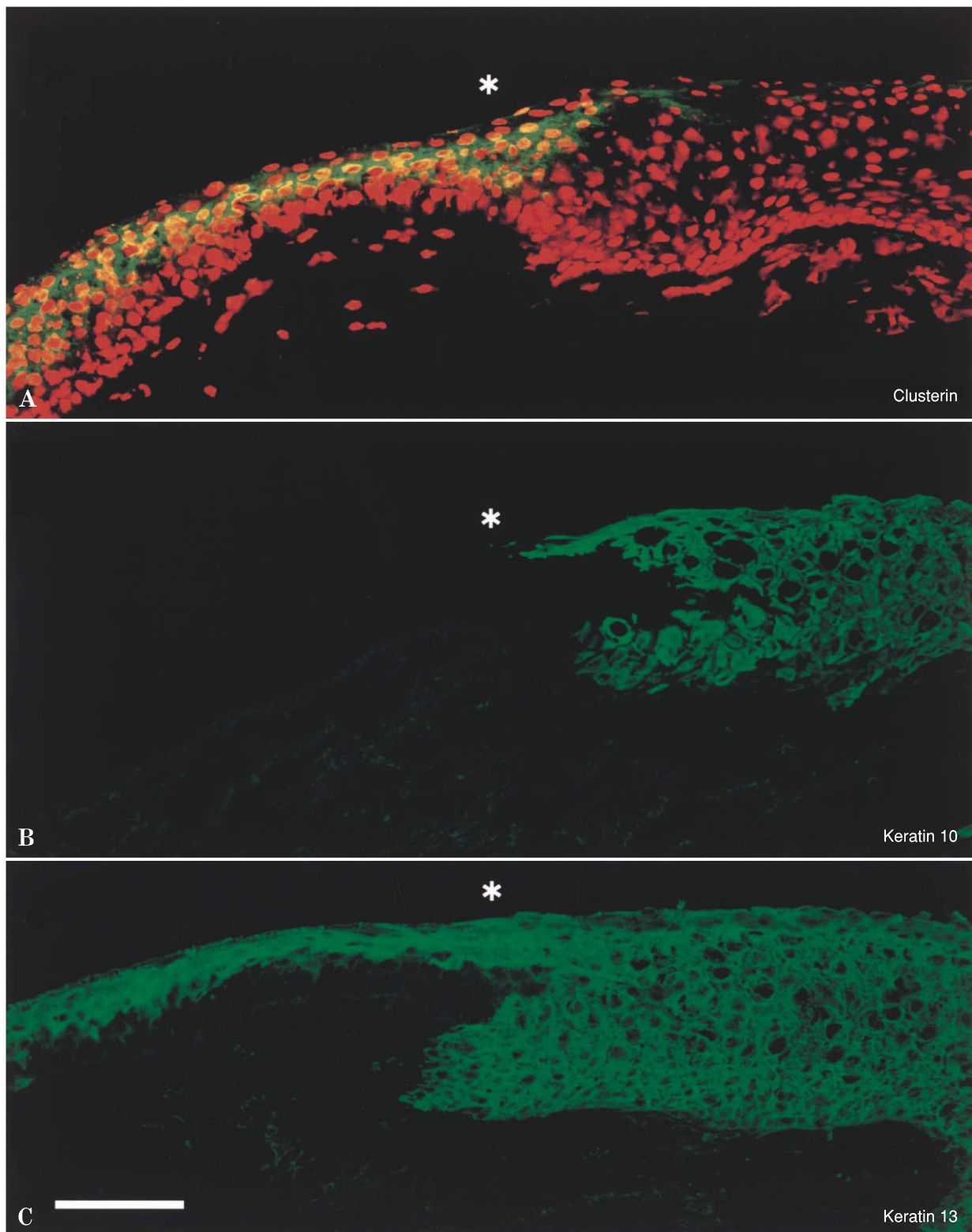


図 7 角化重症度との clusterin の発現の相関。

A, B, C: 角化の程度が異なる組織片を用いて検証した。*から左方は多分化増生していない結膜組織，右方は高度に重層化している組織を示す。角化の程度が軽度で，高度に重層化していない上皮層では clusterin の発現が認められ(A)，同部位では角化マーカーの keratin 10 の発現は認められず(B)，粘膜分化型の keratin 13 が発現していた(C)。角化の程度が高度で重層化している上皮層では，clusterin の発現が減弱してくると同時に(A)，keratin 10 の発現が認められた(B)。バーは 200 μm (A~C)

(文献 28 より転載，一部改変)

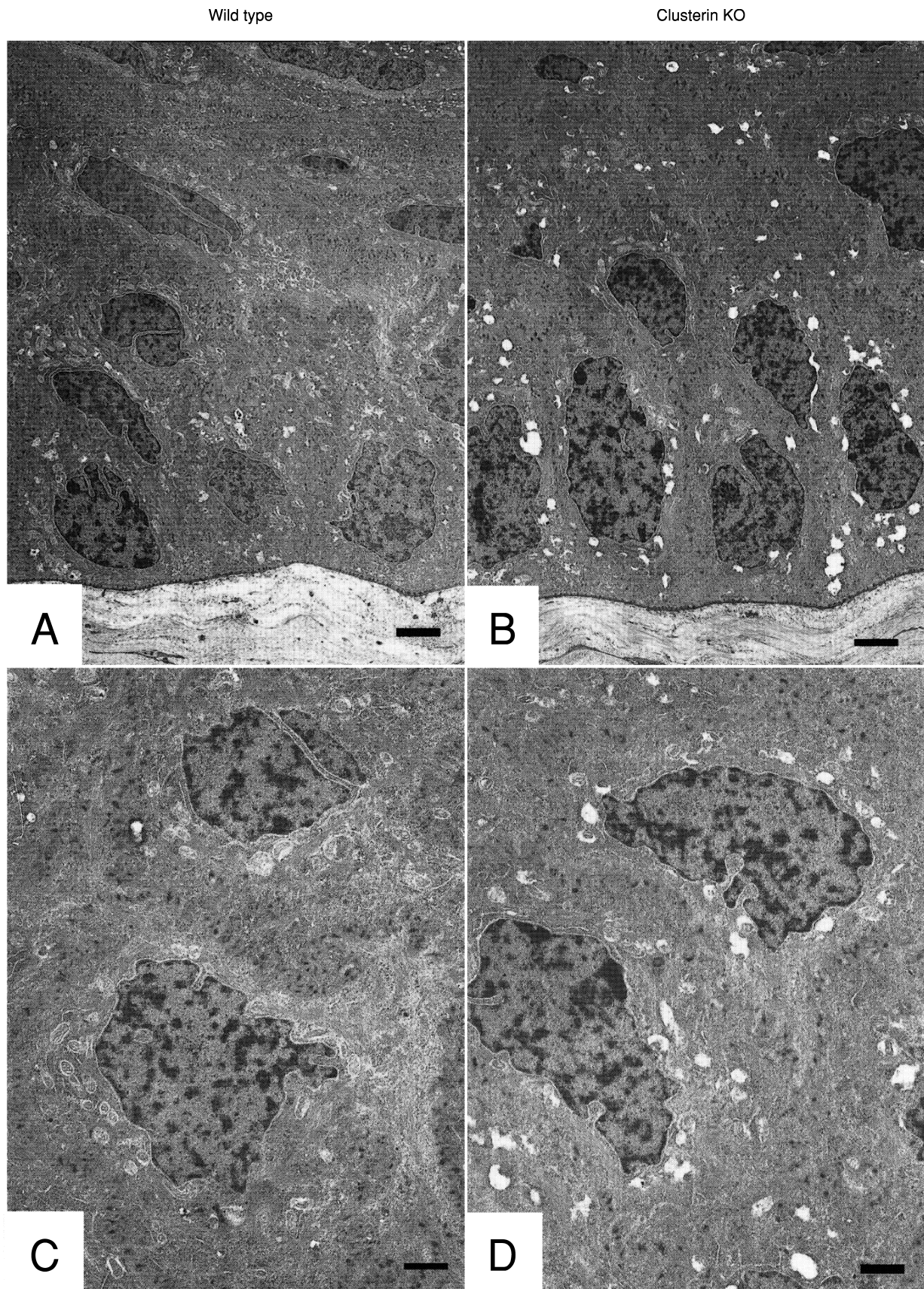


図 8 Clusterin ノックアウトマウスの角膜上皮の組織像。

透過電子顕微鏡により角膜上皮細胞内を詳細に検討した結果，clusterin ノックアウトマウス群(B, D)では対照群(A, B)と比較して，細胞内，特に核の周囲に 100～200 nm レベルの vesicle が多数確認された．バーは 2 μm(A, B)，1 μm(C, D)

められた。以上の結果から、難治性眼表面疾患において、その病的角化の程度と clusterin の発現は負の相関を示し、病的角化の重症度を示すマーカーとして有用であることが推定された。角化を示さない角膜上に被覆している翼状片組織を用いた検討では、clusterin の発現は正常結膜上皮と同等に認められることから、この結果をサポートしているものと考えられる(未公表データ)。同時に、clusterin が粘膜上皮を非角化細胞として維持するのに必須の蛋白である可能性もあり、その眼表面における遺伝子・蛋白レベルでのさらなる機能解析が必要である。

IX Clusterin ノックアウトマウス

Clusterin が広く非角化粘膜上皮に発現し、角化上皮には発現していないことから、この蛋白が上皮系細胞における非角化状態のマーカーとなる可能性がある。また眼表面上皮における発現部位が、中間層上部から表層にかけて認められることから、例えば粘膜上皮の終末分化や涙液と上皮との恒常性維持に機能している可能性が考えられる。しかし、このような発現の変化が上皮自体の固有の性質に依存するのか、二次的な結果として起こっているのかは不明である。そこで、我々は Cincinnati 大学の Kao, Aronow らの協力のもと、clusterin ノックアウトマウスの眼球における表現型を解析した³⁰⁾。その結果、スリットランプによる観察では、対照マウスと比較して、表現型に有意な差異はなかった。また、走査電子顕微鏡で角膜組織を解析した結果も有意な差異はなかった。しかしながら、透過電子顕微鏡による解析で角膜上皮細胞内を詳細に検討した結果、clusterin ノックアウトマウス群では対照群と比較して、細胞内、特に核の周囲に 100~200 nm レベルの vesicle が多数確認された(図 8)。この構造物が生理的にどのような役割を果たしているのかは不明であるが、角膜実質や角膜内皮細胞ではこのような変化は認められないことから、clusterin が角膜上皮において何らかの機能を果たしていることは間違いないようである。今後、このノックアウトマウスを用いた上皮障害モデルやドライアイモデルによる機能解析が必要である。

X おわりに

非角化上皮が角化上皮へと分化転換する“病的角化”という現象について、これまでの解明されてきたその分子機構に関しての知見をまとめてみた。依然不明な点が多いが、少なくともこの病態の中には、表皮の生理的角化機構に関連する分子や眼表面に高度に発現している分子が関与しているようである。今後の研究指針としては、今回の考察から得られた発現が増強する蛋白遺伝子のプロモータ領域の解析を行い、その発現調節機構に関する知見を集積することにより、眼表面疾患における異

常分化を制御する転写因子を同定し、角結膜上皮細胞の異常分化制御機構を解明することである。このような角結膜上皮細胞の異常分化制御機構の解明がなされれば、将来的にこれら病的角化結膜細胞を正常に分化誘導するなど、難治性眼表面疾患の治療概念に対しても画期的な転機をもたらすものと期待される。さらに、病的角化は眼科領域のみならず、皮膚科や内科疾患にも起こり得る現象であり、眼表面疾患における病的角化の病態生理に関する研究から得られる成果は、眼科疾患の病因解明のみならず、広くは角化に関連するすべての疾患の病因解明に貢献し得るものと確信する。今後のこのラインの研究の発展に期待したい。

稿を終えるに当たり、受賞講演の機会を与えて下さいました学術奨励賞選考委員各位、第 108 回日本眼科学会総会長の北原健二教授に心より感謝申し上げます。また、本研究に関し直接ご指導、ご助言を賜りました京都府立医科大学眼科木下 茂教授、大阪大学眼科西田幸二講師、兵庫医科大学皮膚科山西清文教授に深謝を申し上げます。

文 献

- 1) Schermer A, Galvin S, Sun TT : Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. J Cell Biol 103 : 49—62, 1986.
- 2) Costarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM : Existence of slow cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : Implications on epithelial stem cells. Cell 57 : 201—209, 1989.
- 3) Ebato B, Friend J, Thoft RA : Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 28 : 1450—1456, 1987.
- 4) Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, et al : The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 31 : 1773—1778, 1990.
- 5) Beitch I : The induction of keratinization in the corneal epithelium ; A comparison of the dry eye and vitamin A-deficient eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 9 : 827—843, 1970.
- 6) Collin HB, Donshik PC, Foster CS, Boruchoff SA, Cavanagh HD : Keratinization of the bulbar conjunctival epithelium in superior limbic keratoconjunctivitis in humans ; An electron microscopic study. Acta Ophthalmol 56 : 531—543, 1978.
- 7) Nelson JD, Havener VR, Cameron D : Cellulose acetate impression of the ocular surface. Arch Ophthalmol 101 : 1869—1872, 1983.
- 8) Tseng SCG : Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. Ophthalmology 92 : 728—733, 1985.

- 9) **Friend J, Kiorpes TC, Thoft RA** : Conjunctival goblet cell frequency after alkali injury is not accurately reflected by aqueous tear mucin content. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 612—618, 1983.
- 10) **Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA** : Goblet cell density in ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 102 : 1049—1051, 1984.
- 11) **Tseng SCG, Hirst LW, Maumenee AE, Kenyon KR, Sun TT, Green WR** : Possible mechanism for the loss of goblet cells in mucin-deficient disorders. *Ophthalmology* 91 : 545—552, 1984.
- 12) **Pflugfelder SC, Huang AJW, Feuer W, Chuchovski PT, Pereira IC, Tseng SC** : Conjunctival cytological features of primary Sjögren's syndrome. *Ophthalmology* 97 : 985—991, 1990.
- 13) **Tseng SCG, Hatchell D, Tierney N, Huang AJ, Sun T-T** : Expression of keratin markers by rabbit corneal, conjunctival, and esophageal epithelia during vitamin A deficiency. *J Cell Biol* 99 : 2279—2286, 1984.
- 14) **Thacher SM, Rice RH** : Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells : Relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* 40 : 685—695, 1985.
- 15) **Schroeder WT, Thacher SM, Stewart-Galetka S, Annarella M, Chema D, Siciliano MJ, et al** : Type 1 keratinocyte transglutaminase : Expression in human skin and psoriasis. *J Invest Dermatol* 99 : 27—34, 1992.
- 16) **Peter MS, Lyuben NM** : Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J Biol Chem* 272 : 2021—2030, 1997.
- 17) **Candi E, Melino G, Mei G, Tarcsa E, Chung SI, Marekov LN, et al** : Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J Biol Chem* 270 : 26382—26390, 1995.
- 18) **Huber M, Rettler I, Bernasconi K, Frenk E, Lavrijsen SP, Ponc M, et al** : Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 27 : 525—528, 1995.
- 19) **Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, Yamada K, Kinoshita C, Fushiki S, et al** : Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 1044—1049, 1998.
- 20) **Ming ME, Daryanani HA, Roberts LP, Baden HP, Kvedar JC** : Binding of keratin intermediate filaments(K10) to the cornified envelope in mouse epidermis : Implications for barrier function. *J Invest Dermatol* 103 : 780—784, 1994.
- 21) **Resing RA, Walsh KA, Dale BA** : Identification of two intermediates during processing of profilaggrin to filaggrin in neonatal mouse epidermis. *J Cell Biol* 99 : 1372—1378, 1984.
- 22) **Nakamura T, Nishida K, Dota A, Matsuki M, Yamanishi K, Kinoshita S** : Elevated expression of transglutaminase 1 and keratinization-related proteins in conjunctiva in severe ocular surface disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 549—556, 2001.
- 23) **Nishida K, Yamanishi K, Yamada K, Dota A, Kawasaki S, Quantock AJ, et al** : Epithelial hyperproliferation and transglutaminase 1 gene expression in Stevens-Johnson syndrome conjunctiva. *Am J Pathol* 154 : 331—336, 1999.
- 24) **Kawasaki S, Nishida K, Sotozono C, Quantock AJ, Kinoshita S** : Conjunctival inflammation in the chronic phase of Stevens-Johnson syndrome. *Br J Ophthalmol* 84 : 1191—1193, 2000.
- 25) **Nishida K, Adachi W, Shimizu-Matsumoto A, Kinoshita S, Mizuno K, Matsubara K, et al** : A gene expression profile of human corneal epithelium and the isolation of human keratin 12 cDNA. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1800—1809, 1996.
- 26) **Dota A, Nishida K, Adachi W, Nakamura T, Koizumi N, Okubo K, et al** : An expression profile of active genes in human conjunctival epithelium. *Exp Eye Res* 72 : 235—241, 2001.
- 27) **Aronow BJ, Lund SD, Brown TL, Harmony JA, Witte DP** : Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces : Potential role in barrier cytoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jan 15 ; 90(2) : 725—729, 1993.
- 28) **Nishida K, Kawasaki S, Adachi W, Kinoshita S** : Apolipoprotein J expression in human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 2285—2292, 1996.
- 29) **Nakamura T, Nishida K, Dota K, Kinoshita S** : Changes in conjunctival clusterin expression in severe ocular surface disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 1702—1707, 2002.
- 30) **McLaughlin L, Zhu G, Mistry M, Ley-Ebert C, Stuart WD, Florio CJ, et al** : Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *J Clin Invest* 106 : 1105—1113, 2000.