

表皮細胞の最終分化産物の加齢による変化について

中野 敦

近畿大学医学部皮膚科学教室

抄 録

高齢者の皮膚は若年者の皮膚に比して皮膚表面は夏においても乾燥状態となりやすく、特にその傾向は下腿において著明である。そこで我々は50歳以上の高齢者群及び20歳以下の若年者群の各々の下腿と顔面の正常皮膚を材料とし、表皮細胞の5種類の最終分化産物(蛋白)に対する抗体-抗 filaggrin 抗体, 抗 prosaposin 抗体, 抗 sphingomyelinase 抗体(抗 SMase 抗体), 抗 involucrin 抗体, 抗 loricrin 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い比較検討した。その結果、顔面部皮膚においては、prosaposin と sphingomyelinase (SMase) の発現量が若年者群に比して高齢者群では有意に低下していた。一方、下腿部皮膚においては、この2つの蛋白に加えて、顔面皮膚で両群間に有意差の無かった filaggrin の発現量が若年者群に比して高齢者群では有意に低下していた。Involucrin と loricrin の発現量は顔面部皮膚、下腿部皮膚共に両群間の発現量に有意差は認めなかった。これらの結果より高齢者皮膚の易乾燥性には表皮内細胞間脂質の合成能の低下が大きく関与しており、さらに下腿では filaggrin の発現量低下による保水因子の量の低下も加わって顔面皮膚などに比し容易に乾燥しやすくなることが示された。

Key words: 最終分化産物, filaggrin, prosaposin, sphingomyelinase, involucrin, loricrin, 加齢

緒 言

高齢者の皮膚は若年者の皮膚と比べていつも乾燥し、落屑を伴いやすく、冬期の湿度が低く空気の乾燥した季節には下腿において乾燥傾向は一層顕著である。これは加齢により汗腺や皮脂腺などの付属器の機能が低下すること¹に加えて、保湿因子の前駆体である filaggrin の形成の低下²⁻⁴や角層細胞間脂質の主成分であるセラミドの形成低下などが関係していると考えられる⁵⁻⁷。セラミドは β -グルコセラプロシダーゼによりグルコシルセラミドより形成されると考えられている^{8,9}が、しかし、sphingomyelinase (SMase, 以下 SMase) の働きによってスフィンゴ脂質より生産される可能性も残っている^{10,11}。我々はすでに SMase を活性化する saposin D^{12,13}とその前駆体である prosaposin がアトピー性皮膚炎患者のドライスキンにおいて低下していることを報告している¹⁴。

Loricrin は cornified envelope (以下 CE) の主要成分と考えられている蛋白¹⁵で、顆粒層内ケラトヒアリン顆粒の一成分として発現し、表皮トランスグルタミナーゼ-1によって involucrin より遅れて

CEに組み込まれる。Involucrin の発現にはトランスグルタミナーゼと同様にプロテインキナーゼCの活性化が関与しているとされるが¹⁶、この2種類の蛋白も共に表皮細胞の分化のマーカーである重要な蛋白なので今回の検討に加えた。

そこで本研究では、保湿因子、角層細胞間脂質の形成に関与すると考えられる蛋白の加齢による変化を調べるために、50歳以上の高齢者群及び20歳以下の若年者群の正常皮膚を材料とし、表皮細胞の分化のマーカーである filaggrin^{17,18}、prosaposin¹³、SMase^{11,19}、involucrin²⁰、loricrin^{15,21}の量の変化をそれぞれに対する抗体を用いて免疫組織化学的に検討し、併せてそれらの量を定量化することにより、各々の合成能を比較検討した。

材料と方法

使用した抗体

抗 filaggrin 抗体: Biomedical Technologies Inc.社 (U.S.A.) の anti-human filaggrin monoclonal antibody.

抗 involucrin 抗体: Biomedical Technologies Inc.社の involucrin immuno-kit の anti-involucrin

表1 症例構成

若年者群							
症例	年齢 (歳)	性別	部位	症例	年齢 (歳)	性別	部位
1	18	女	前額部	1	1	男	下腿
2	7	女	前額部	2	10	女	下腿
3	20	女	頬部	3	13	女	下腿
4	6	男	前額部	4	12	女	下腿
5	20	女	頬部	5	20	男	下腿
6	16	女	頬部	6	8	女	下腿
				7	1	男	下腿
平均	14.5			平均	9.3		
高齢者群							
症例	年齢 (歳)	性別	部位	症例	年齢 (歳)	性別	部位
1	59	女	前額部	1	55	女	下腿
2	83	女	頬部	2	77	女	下腿
3	72	男	前額部	3	75	女	下腿
4	89	女	前額部	4	72	女	下腿
5	70	男	前額部	5	73	女	下腿
6	82	女	前額部	6	64	女	下腿
				7	67	男	下腿
				8	57	女	下腿
平均	75.8			平均	67.5		

polyclonal antibody.

抗 prosaposin 抗体：崔ら¹⁴の抗体を用いた。

抗 loricrin 抗体と抗 SMase 抗体：抗 prosaposin 抗体と同様に合成ペプチドを作成し担体蛋白 Key-hole Limpet Hemocyanin (KLH) (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, U.S.A.) と結合後、ウサギを免疫し抗血清を得た。

被検材料

被検材料として手術（良性腫瘍，主として色素性母斑や脂漏性角化症）の際に得られた正常皮膚を用いた。それらを20歳以下の若年者群の顔面皮膚6例（6～20歳，平均14.5歳）と下腿部皮膚7例（1～20歳，平均9.3歳），50歳以上の高齢者群の顔面皮膚6例（59～89歳，平均75.8歳）と下腿部皮膚8例（55～77歳，平均67.5歳）の4群に分類した（詳細は表1に示す）。

なお高齢者から得られた皮膚については，臨床的に老人性乾皮症と診断された症例の皮膚は含まれていない。

免疫組織化学染色

材料皮膚を OCT Compound (Miles Ink. 社 U.S.A.) で包埋凍結し，クリオスタットで4 μ mの厚さに切り，98%冷エタノール（-20 $^{\circ}$ C）で10分固定後，抗 filaggrin 抗体（1：200倍希釈），抗 prosaposin 抗

体（1：500倍希釈），抗 SMase 抗体（1：1000倍希釈），抗 loricrin 抗体（1：500倍希釈），抗 involucrin 抗体（involucrin immuno-kit の anti-involucrin polyclonal antibody，原液）をそれぞれ一次抗体とし labelled streptavidin biotin (LSAB) 法で行った。一次抗体は37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させ，その後二次抗体にはビオチン化抗ウサギあるいはマウス IgG (DAKO 社，U.S.A.) を用い室温で10分間反応させた。さらに horse radish peroxidase (HRP) 標識ストレプトアビジン (DAKO 社) を37 $^{\circ}$ Cで20分間反応させ，3-amino-9-ethylcarbazole (DAKO 社) にて室温で3分発色させ，直ちに静かな流水で1～2分洗浄した。尚，抗 filaggrin 抗体はあらかじめグリコーゲンで吸着させてから免疫染色に用いた²²。

抗体反応量の測定と定量化

瀬口らの方法²³を用いて免疫組織化学染色した標本をネオパンFフィルム (FUJI 写真フィルム K.K., 東京) を用い同一の条件下に緑色フィルター下で白黒写真撮影し，無作為に選んだ3カ所の表皮染色部位を Chromato-Scanning meter (CS-900) (島津製作所，京都) を用いて発色量を測定した。その後，角層および顆粒層の染色部位に一致して得られたメインピークの吸光度を，表皮有棘層の吸光度に対する相対的吸光度として記録計算し，3カ所の平均値を得られたデータとし比較検討した。

成 績

抗 filaggrin 抗体による検討

LSAB 法を用いた免疫組織化学染色では抗 filaggrin 抗体は顆粒層から角層の最下部にかけての表皮に陽性所見を示した。顔面皮膚においては、若年者群 (図 1-A) と高齢者群 (図 1-B) では反応の強さに差は認められなかったが、下腿部皮膚では若年者群 (図 1-C) に比し高齢者群 (図 1-D) では反応性は弱く、濃淡のムラが有り不均一であった。Chromato-Scanning meter を用いた発色量の比較では、filaggrin は顔面皮膚若年者群で 5.79 ± 1.04 (n=6)、顔面皮膚高齢者群で 5.75 ± 0.61 (n=6) で、統計学的な有意差は認められなかったが、下腿部皮膚においては若年者群で 5.82 ± 2.07 (n=7)、高齢者群で 2.41 ± 0.76 (n=8) となり、両者間に統計学的に有意差 ($p < 0.01$) を認めた (表 2)。

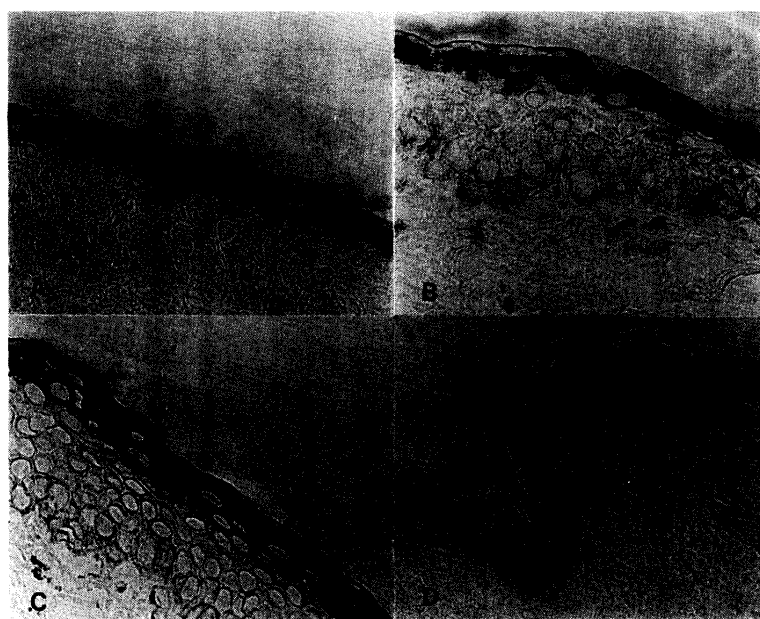
抗 prosaposin 抗体による検討

filaggrin と同様に免疫組織化学染色所見を比較

した。抗 prosaposin 抗体は角層下層から顆粒層上層の表皮細胞に陽性所見を示したが、顔面部皮膚では若年者群 (図 2-A) に比して、高齢者群 (図 2-B) では染色性は弱く、同様に下腿部皮膚においても顔面部皮膚と同様若年者群 (図 2-C) に比して高齢者群 (図 2-D) では染色性は弱く、染色性に濃淡のムラが認められた。Chromato-Scanning meter を用いた発色量の比較では、顔面皮膚若年者群で 4.88 ± 1.00 (n=6)、顔面皮膚高齢者群で 3.65 ± 0.48 (n=6) となり、両者間に統計学的な有意差 ($p < 0.05$) を認めた。また、下腿部皮膚においても若年者群で 5.22 ± 1.33 (n=7)、高齢者群で 2.27 ± 0.74 (n=8) と、両者間に統計学的に有意差 ($p < 0.01$) を認めた (表 3)。

抗 SMase 抗体による検討

抗 SMase 抗体は顆粒層から角層中層にかけての表皮細胞に陽性所見を示したが、顔面部皮膚においては若年者群 (図 3-A) に比し高齢者群 (図 3-B) で染色性は低下した。また下腿部皮膚でも若年者群

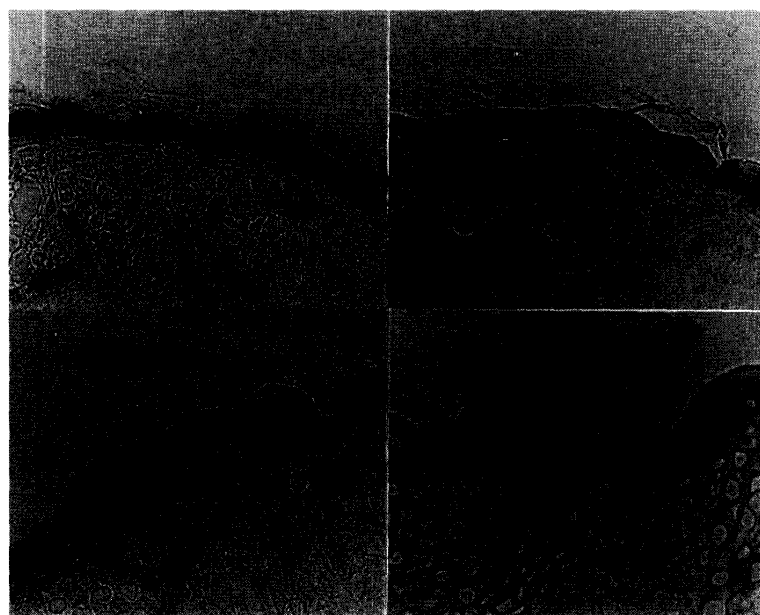


Filaggrin

図 1 抗 filaggrin 抗体を用いた免疫組織化学染色所見 (×500)
 A: 顔面部皮膚若年者群
 B: 顔面部皮膚高齢者群
 C: 下腿部皮膚若年者群
 D: 下腿部皮膚高齢者群

表 2 Chromato-Scanning meter を用いた若年者皮膚及び高齢者皮膚における filaggrin の発現量の比較

	filaggrin の発現量		
	若年者群	高齢者群	
顔面部皮膚	5.79 ± 1.04 (n=6)	5.75 ± 0.61 (n=6)	有意差なし
下腿部皮膚	5.82 ± 2.07 (n=7)	2.41 ± 0.76 (n=8)	$p < 0.01$
	有意差なし	$p < 0.01$	



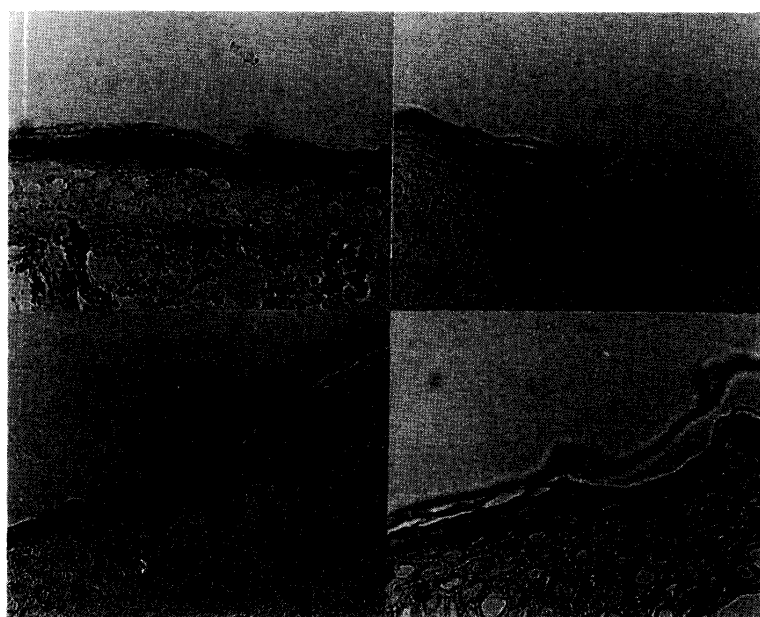
prosaposin

図2 抗 prosaposin 抗体を用いた免疫組織化学染色所見 (×500)

- A: 顔面部皮膚若年者群
 B: 顔面部皮膚高齢者群
 C: 下腿部皮膚若年者群
 D: 下腿部皮膚高齢者群

表3 Chromato-Scanning meter を用いた若年者皮膚及び高齢者皮膚における prosaposin の発現量の比較

	prosaposin の発現量		
	若年者群	高齢者群	
顔面部皮膚	4.88±1.00 (n=6)	3.65±0.48 (n=6)	p<0.05
下腿部皮膚	5.22±1.33 (n=7)	2.27±0.74 (n=8)	p<0.01
	有意差なし	p<0.05	



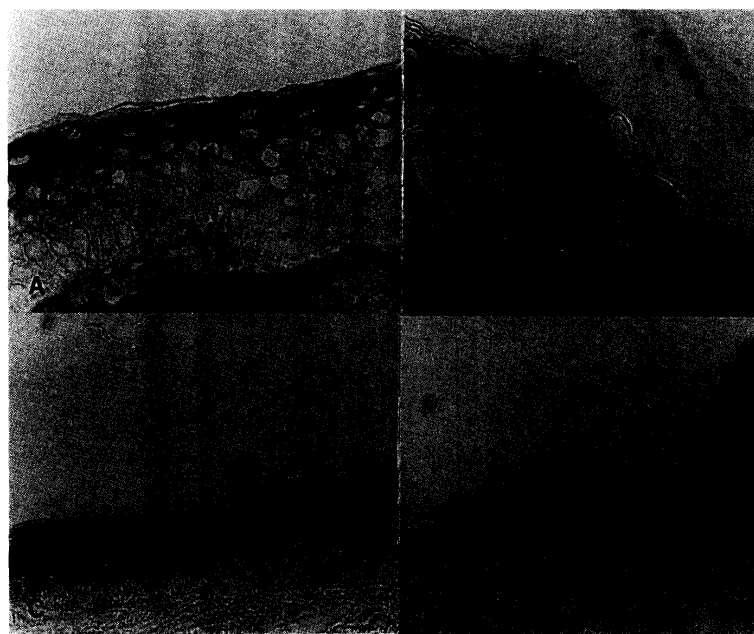
Sphingomyelinase (SMase)

図3 抗 sphingomyelinase 抗体 (抗 SMase 抗体) を用いた免疫組織化学染色所見 (×500)

- A: 顔面部皮膚若年者群
 B: 顔面部皮膚高齢者群
 C: 下腿部皮膚若年者群
 D: 下腿部皮膚高齢者群

表4 Chromato-Scanning meter を用いた若年者皮膚と高齢者皮膚における SMase の発現量の比較

	SMase の発現量		
	若年者群	高齢者群	
顔面部皮膚	5.74±0.98 (n=6)	4.97±0.69 (n=6)	p<0.05
下腿部皮膚	6.39±2.54 (n=7)	4.43±1.05 (n=8)	p<0.05
	有意差なし	有意差なし	



Involucrin

図4 抗 involucrin 抗体を用いた免疫組織化学染色所見 (×500)

- A: 顔面部皮膚若年者群
 B: 顔面部皮膚高齢者群
 C: 下腿部皮膚若年者群
 D: 下腿部皮膚高齢者群

表5 Chromato-Scanning meter を用いた若年者皮膚と高齢者皮膚における involucrin の発現量の比較

	involucrin の発現量		
	若年者群	高齢者群	
顔面部皮膚	6.01±0.65 (n=6)	6.29±0.98 (n=6)	有意差なし
下腿部皮膚	6.28±1.58 (n=7)	6.43±0.83 (n=8)	有意差なし
	有意差なし	有意差なし	

(図3-C)に比し高齢者群(図3-D)で染色性は弱く不均一であった。発色量の比較では顔面部皮膚は若年者群で 5.74 ± 0.98 (n=6), 高齢者群で 4.97 ± 0.69 (n=6), となり, 両者間に有意差 (p<0.05) が認められた(表4)。さらに下腿部皮膚でも若年者群で 6.39 ± 2.54 (n=7), 高齢者群で 4.43 ± 1.05 (n=8)と, 若年者群に比し高齢者群で低下しており, 両者間に有意差 (p<0.05) が認められた(表4)。

抗 involucrin 抗体による検討

抗 involucrin 抗体は, 顔面部皮膚の若年者群(図4-A), 高齢者群(図4-B)において顆粒層細胞に

ほぼ均一に反応し, 一部有棘層上層細胞とも反応した。下腿部皮膚でも若年者群(図4-C), 高齢者群(図4-D)で顔面部皮膚と同様の反応性を示した。発色量の比較では顔面部皮膚が若年者群で 6.01 ± 0.65 (n=6), 高齢者群で 6.29 ± 0.98 (n=6), 下腿部皮膚が若年者群で 6.28 ± 1.58 (n=7), 高齢者群で 6.43 ± 0.83 (n=8)となり, 年齢別, 部位別に見てその発色量に有意な差は認めなかった(表5)。

抗 loricrin 抗体による検討

抗 loricrin 抗体は顔面部皮膚においては, 若年者群(図5-A), 高齢者群(図5-B)ともに顆粒層細胞

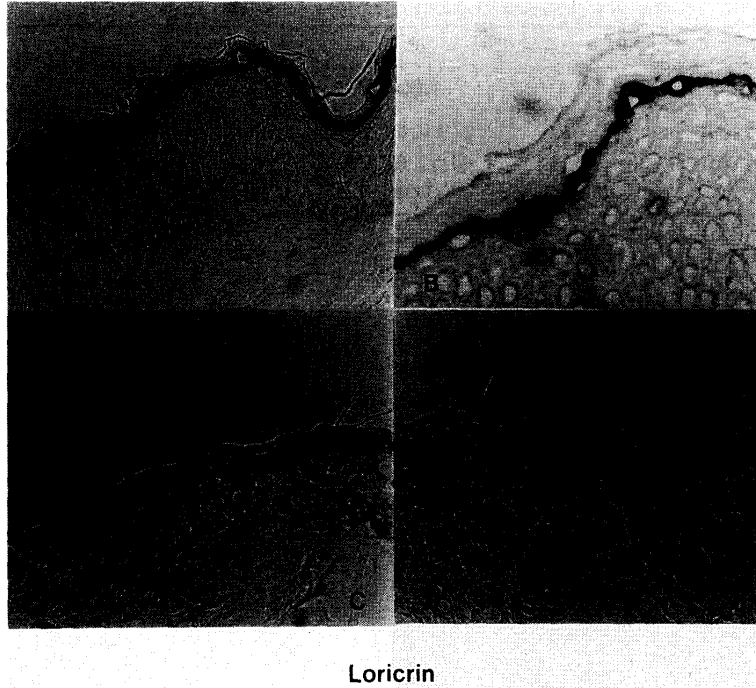


図5 抗loricrin抗体を用いた免疫組織化学染色所見(×500)

- A: 顔面部皮膚若年者群
 B: 顔面部皮膚高齢者群
 C: 下腿部皮膚若年者群
 D: 下腿部皮膚高齢者群

表6 Chromato-Scanning meterを用いた若年者皮膚と高齢者皮膚におけるloricrinの発現量の比較

	loricrinの発現量		
	若年者群	高齢者群	
顔面部皮膚	4.37±0.94 (n=6)	4.92±1.31 (n=6)	有意差なし
下腿部皮膚	4.43±1.20 (n=7)	4.08±0.45 (n=8)	有意差なし
	有意差なし	p<0.05	

胞の上層に限局して染色陽性部分が認められた。一方、下腿部皮膚においても若年者群(図5-C)、高齢者群(図5-D)で、顔面部皮膚とほぼ同等の染色性を示した。発色量の比較では顔面部皮膚が若年者群で 4.37 ± 0.94 (n=6)、高齢者群で 4.92 ± 1.31 (n=6)、下腿部皮膚が若年者群で 4.43 ± 1.20 (n=7)、高齢者群で 4.08 ± 0.45 (n=8)となり、年齢別、部位別に見てその発色量に統計学的な有意差は認めなかった(表6)。

考 察

Filaggrinは表皮細胞の分化産物の1つで、角質細胞内でケラチン線維を埋めケラチンパターンを形成している²⁴。そして角層上層に移行するにつれて分解され、アミノ酸やウロカニン酸、ピロリドンカルボン酸になり、角層の保水機能に関与するとされている²⁵。一方、角層細胞間を埋める角層間脂質はセラミドが約50%を占め、その他、コレステロール、遊離脂肪酸、コレステロール硫酸などから成る²⁶。こ

のセラミドは有棘層上層でスフィンゴ脂質より合成されるが、この合成には2つの系が考えられている。1つは有棘細胞層上層と顆粒細胞層内の層板顆粒内にアシルグリコシルセラミドとして蓄積され β -グルコセレブロシダーゼの作用によって、角層間に分泌される時に脱グリコシル化されてセラミドになる系^{8,9}と、スフィンゴミエリンがSMaseによって加水分解される系である^{10,11}。そしてこのSMaseを活性化する働きをもつのがsaposin Dであり、その前駆体のprosaposinは両者を活性化する^{12-14,27}。よってSMaseとprosaposinは皮膚のセラミド量と関連があり、角層の水分蒸散に対するバリアー機能の点から見た重要なマーカーである。

次にinvolucrinとloricrinは共にCEを形成する蛋白である。CEは表皮角層細胞の細胞膜の構造で、昔は酸・アルカリ抵抗性の膜とされたものであるが、近年構成成分が次第にはっきりとしてきた。図6にその模式図を引用する²⁸。それによると細胞膜の脂質二重層の細胞内側面にinvolucrin, cystatin A(ラ

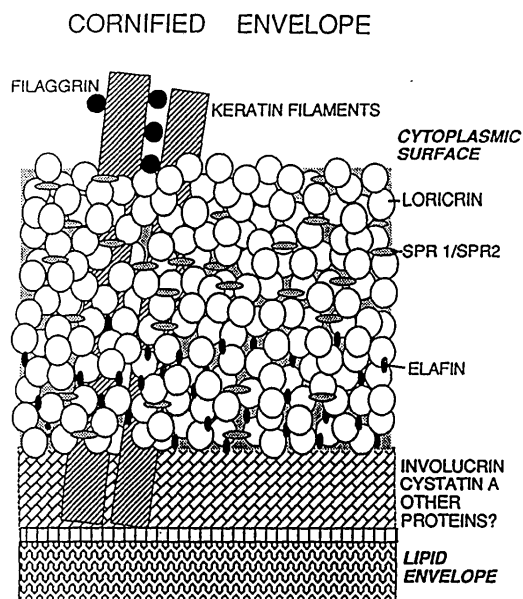


図6 ヒト cornified envelope (CE) の構造モデル (文献28より引用)

ットでは α)²⁹⁻³¹ と他の蛋白が沈着 (裏打ち) し, 更にその内側に elafin³², small proline rich protein (SPR 蛋白)³³ と loricrin が重合している. これらの蛋白はトランスグルタミナーゼ-1³⁴ により ϵ -(γ -glutamyl) lysine 結合で強固に結合している^{35,36}. Loricrin は人表皮の CE の蛋白量の約75%を占める³⁷ 塩基性の蛋白で, involucrin より遅れて顆粒層内で発現し, ケラトヒアリン顆粒内に局在した後, 表皮トランスグルタミナーゼ-1によって CE に組み込まれ細胞膜の内側面を裏打ちするタンパクの一種となる (図6). ただ loricrin は他の CE の構成蛋白である SPR 蛋白や involucrin, cystatin A, cysteine-rich protein³⁸, elafin などより遅れて出現するので, involucrin や cystatin A により形成された CE の枠組みの内側に最後に架橋される蛋白ではないかと考えられている³⁹. Involucrin は有棘層上層細胞と顆粒細胞の細胞膜で発現し膜に分布する蛋白で, loricrin と同様に細胞膜の物理的強化にはたらく角層細胞の一つのマーカーとなる.

本実験の結果より, 顔面部皮膚における filaggrin の発現量は高齢者で特に低下することはなく, 下腿部皮膚においてのみ低下しており, すでに報告されている結果と一致した^{3,4}. 下腿においては filaggrin などの角層成分の形成低下ばかりでなく, 皮脂, 発汗量なども他部位と比較して低値であることが認められている^{1,40}. これらの性質が附加的に作用して高齢者では冬期に角層が乾燥し易くなり乾皮症状が顕著となる.

次に, 角層細胞間脂質についてであるが, 表皮におけるセラミド量は, 若年者においては季節によらず一定のレベルに保たれており, 水分蒸発に対するバリアー機能を保持していると考えられている⁴¹. 今回の実験では, prosaposin と SMase の発現量は顔面部皮膚, 下腿部皮膚とも高齢者で有意な低下を示したが, これはアトピー性皮膚炎患者の無疹部表皮においては SMase の発現量は減少せず, prosaposin の発現量のみが低下していたという崔らの報告¹⁴ と少し異なっている. 高齢者では顔面や下腿といった部位の違いと無関係に, SMase の発現量と, SMase や β -グルコセレブロシダーゼの activator である prosaposin の発現量が低下しているという特徴が得られた. 高齢者皮膚では SMase の量とその activator 蛋白も減少しているので, その結果として, 表皮でのセラミド量が著しく低下している可能性が考えられる. 又, この SMase の量が減少しているという結果は, 加齢により SMase 活性が低下するという山村らの報告¹⁰ と一致している.

一方 involucrin と loricrin については, 免疫組織化学染色所見上, involucrin は有棘層上層の細胞から顆粒細胞まで, また loricrin は顆粒層細胞と, 各々の発現される部位に一致して若年者群, 高齢者群と大差なく比較的均一に染まった. Chromato-Scanning meter による発現量の比較でも顔面部皮膚, 下腿部皮膚とも年齢による発現量に統計上の有意差は認めなかった. loricrin は CE の約75%を占める構成成分であることを考えると, CE の形成は加齢による影響は少ないものと考えられる.

以上のことより, 表皮細胞の最終分化産物に対する抗体を用いて若年者皮膚と高齢者皮膚での合成能を比較検討したところ, 顔面部皮膚において, 加齢により prosaposin, SMase の発現量の減少を認め, さらに下腿部皮膚では filaggrin の発現量も低下していた. filaggrin は角層の保水機能に関係しており, prosaposin と SMase はセラミドの合成能に関与する蛋白であり, これらの低下が高齢者表皮内での変化の一つであり, このことが老人皮膚での易乾燥性に大きく関係していることが考えられる. そして臨床的には, 特に下腿部皮膚においては, 水分保持機能を持つ filaggrin の低下にバリアー機能としてのセラミドなどの角層間脂質の合成の低下も加わり, 顔面部皮膚などに比し一層乾燥しやすく, 落屑状となりやすいことが考えられた.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導ならびに御校閲を賜りまし

た恩師手塚 正教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究を遂行するにあたり、終始懇切なる御指導、御助言を賜ったライフサイエンス研究所高橋昌江助手、元皮膚科学教室崔昌益先生に心から感謝致します。さらに本研究に御協力いただきました愛須きぬ代研究助手をはじめ皮膚科学教室各位に感謝致します。

文 献

- Inomata N (1973) The aging and sebaceous activity. *Jpn J Dermatol* 83: 517-519
- 手塚 正 (1989) フィラグリンと線維間基質, 今村貞夫, 小川秀興編集, 皮膚科 MOOK, 角化異常症 15, 金原出版, 東京: 49-55
- Fang KT (1989) Comparison of changes of terminal differentiation in the facial skin between the young and the aged. *Acta Med Kinki Univ* 14: 161-169
- Tezuka T, Qing J, Saheki M, Kusuda S, Takahashi M (1994) Terminal differentiation of facial epidermis of the aged: immunohistochemical studies. *Dermatology* 188: 21-24
- Kawashima M, Morita K, Higaki Y, Hidano A, Abe A, Imokawa G (1990) Quantitative analysis of ceramides in the stratum corneum of aged skin and atopic dermatitis. (abstr) *J Invest Dermatol* 94: 541
- Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A (1991) Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: aetiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 96: 523-526
- Leger DS, Francois AM, Leveque JL, Stoudemayer TJ, Grove GL, Kligman AM (1988) Age-associated changes in stratum corneum lipids and their relation to dryness. *Dermatologica* 177: 159-164
- Holleran WM, Takagi Y, Imokawa G, Jackson S, Lee JM, Elias PM (1992) β -glucocerebrosidase activity in murine epidermis: characterization and localization in relation to differentiation. *J Lipid Res* 33: 1201-1209
- Holleran WM, Takagi Y, Menon GK, Legler G, Feingold KR, Elias PM (1993) Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. *J Clin Invest* 91: 1656-1664
- Yamamura T, Tezuka T (1990) Change in sphingomyelinase activity in human epidermis during aging. *J Dermatol Sci* 1: 79-84
- Menon GK, Grayson S, Elias PM (1986) Cytochemical and biochemical localization of lipase and sphingomyelinase activity in mammalian epidermis. *J Invest Dermatol* 86: 591-597
- Morimoto S, Martin BM, Kishimoto Y, O' Brien JS (1988) Saposin D: a sphingomyelinase activator. *Biochem Biophys Res Commun* 156: 403-410
- Hiraiwa M, O' Brien JS, Kishimoto Y, Galdzicka M, Fluharty AL, Ginns EI, Martin BM (1993) Isolation, characterization, and proteolysis of human prosaposin, the precursor of saposins (sphingolipid activator proteins). *Arch Biochem Biophys* 304: 110-116
- Cui CY, Kusuda S, Seguchi T, Takahashi M, Aisu K, Tezuka T (1997) Decreased level of prosaposin in atopic skin. *J Invest Dermatol* 109: 319-323
- Yoneda K, Horhl D, McBride OW, Wang M, Cehrs KU, Idler WW, Steinert PM (1992) The human loricrin gene. *J Biol Chem* 267: 18060-18066
- Takahashi H, Iizuka H (1993) Analysis of the 5-upstream promoter region of human involucrin gene: activation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Invest Dermatol* 100: 10-15
- Dale BA (1985) Filaggrin, A keratin-filaggrin associated protein. *Ann Acad Sci* 455: 330-342
- Horii I, Kawasaki K, Nakajima Y, Okasaki K (1982) Histidinerich protein as a possible origin of free amino acids of stratum corneum, In: Seiji M, Bernstein IA, eds. Normal and abnormal epidermal differentiation, University of Tokyo Press: 301-316
- Bowser PA, Gray GM (1978) Sphingomyelinase in pig and human epidermis. *J Invest Dermatol* 70: 331-335
- Watt FM (1983) Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 81: 100-103
- Hohl D, Mehrel T, Lichti U, Turner ML, Roop DR, Steinert PM (1991) Characterization of human loricrin. *J Biol Chem* 266: 6626-6636
- Vigneswaran N, Haneke E, Peters KP (1987) Cross-reaction of a monoclonal anti-filaggrin antibody with glycogen. *Histochemistry* 87: 597-600
- Seguchi T, Cui CY, Kusuda S, Takahashi M, Aisu K, Tezuka T (1996) Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch Dermatol Res* 288: 442-446
- Dale BA, Holbrook KA, Kimball JR, Hoff M, Sun TT (1985) Expression of epidermal keratins and filaggrin during human fetal skin development. *J Cell Biol* 101: 1257-1269
- Scott IR, Harding CR, Barrett JG (1982) Histidine-rich protein of the keratohyalin granules: Source of the free amino acids, and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* 719: 110-117
- Swartzendruber D, Wertz PW, Madison KC, Downing DT (1987) Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J Invest Dermatol* 88: 709-713
- Tayama M, Soeda S, Kishimoto Y, Martin BM (1993) Effect of saposins on acid sphingomyelinase. *Biochem J* 290: 401-404
- Steinert PM, Marekov LN (1995) The Proteins Elafin, Filaggrin, Keratin Intermediate Filaments, Loricrin, and Small Proline-rich Proteins 1 and 2 Are Isodi-peptide Cross-linked Components of the Human Epidermal Cornified Cell Envelope. *J Biol Chem* 270: 17702-17711
- Takahashi M, Tezuka T, Towatari T, Katunuma N (1990) Properties and nature of a cysteine proteinase inhibitor located in keratohyalin granules of rat epidermis. *FEBS Lett* 267: 261-264
- Takahashi M, Tezuka T, Katunuma N (1992) Phos-

- phorylated cystatin alpha is a natural substrate of epidermal transglutaminase for formation of skin cornified envelope. *FEBS Lett* 308: 79-82
31. Koront B, Towatari T, Kelley M, Brzin J, Lenarcic B, Turk (1988) Interactions between a viral protease and cystatins. *Biol Chem* 369: 281-286
 32. Schalkwijk J, van Vlijmen IMJJ, Alkemade JAC, de Jongh GJ (1993) Immunohistochemical localization of SKALP/elafin in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 100: 390-393
 33. Backendorf C, Hohl D (1992) A common origin for cornified envelope proteins? *Nature genetics* 2: 91
 34. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH (1991) Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* 5: 3071-3077
 35. Green H (1977) Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* 11: 405-416
 36. Simon M, Green H (1984) Participation of membrane-associated proteins in the formation of the crosslinked envelope of the keratinocyte. *Cell* 36: 827-834
 37. Steinert PM (1995) A model for the hierarchical structure of the human epidermal cornified cell envelope. *Cell Death and Differentiation* 2: 23-40
 38. Tezuka T, Takahashi M (1987) The cystine-rich envelope protein from human epidermal stratum corneum cells. *J Invest Dermatol* 88: 47-51
 39. Yoneda K, Steinert PM (1993) Overexpression of human loricrin in transgenic mice produces a normal phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10754-10758
 40. 手塚 正 (1982) 老化に伴った表皮の変化。老人性乾皮症にみとめられた変化は冬期のみ認められる変化か。 *皮膚* 24: 460
 41. Yoneda K, Steinert PM (1993) Overexpression of human loricrin in transgenic mice produces a normal phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10754-10758