

# ケロイド由来線維芽細胞に対する $\text{TNF-}\alpha$ , $\text{TGF-}\beta$ の影響について

山本 雅之

創傷治癒過程において、様々な要因により、線維芽細胞などを抑制する条件に異常が生じ、肥厚性瘢痕や、ケロイドが形成されると考えられているが、これらの発生原因や治療法に関しては、今だ不明な点も多い。

ヒト皮膚線維芽細胞に対する細胞増殖因子や、サイトカインなどの影響について現在まで、様々な報告がなされ、ケロイド形成においても細胞増殖因子や、サイトカインなどの関与が報告されてきた。

本研究で著者は、手術時に得られたケロイドおよび周辺正常組織から線維芽細胞を遊出し、Transforming Growth Factor (TGF)  $-\beta$  と Tumor Necrosis Factor (TNF)  $-\alpha$  との相互作用について、コラゲナーゼの酵素活性とそのメッセンジャー RNA (mRNA) について検討を行った。その結果、ケロイド由来の線維芽細胞において  $\text{TNF-}\alpha$  単独刺激ではコラゲナーゼの酵素活性が促進されたのに対し、 $\text{TNF-}\alpha$  および  $\text{TGF-}\beta$  の併用によるコラゲナーゼの酵素活性抑制がみられた。また mRNA レベルでは  $\text{TNF-}\alpha$  単独刺激と、 $\text{TNF-}\alpha$  および  $\text{TGF-}\beta$  の併用には有意な差が見られなかった。これらの結果は、酵素活性レベルでの  $\text{TGF-}\beta$  の  $\text{TNF-}\alpha$  に対する抑制作用と考えられる。細胞増殖因子によるケロイドに対する治療の可能性が示唆された。

(平成12年10月25日受理)

## Effect of Growth Factors on Cultured Human Keloid Fibroblasts

Masayuki YAMAMOTO

Regarding wound repair, there are important but as yet unknown factors involved in the regulation of fibroblast function in the formation of hypertrophic scars and keloids. If these factors could be clarified, new therapies for keloids could be developed.

Recently, some researchers have reported that growth factors and cytokines possess some abilities to control hypertrophic scar and keloid formation.

The purpose of this study was to investigate whether the collagenase activity in human keloid fibroblasts is stimulated by two kinds of growth factors,  $\text{TNF-}\alpha$  and  $\text{TGF-}\beta$ . Increased levels of collagenase activity and collagenase mRNA were found in human keloid fibroblasts following exposure to  $\text{TNF-}\alpha$ . A decreased level of collagenase activity was found in human keloid fibroblasts following exposure to both  $\text{TNF-}\alpha$  and  $\text{TGF-}\beta$ . These results indicate that  $\text{TGF-}\beta$  can inhibit collagenase activity in human keloid fibroblasts stimulated by  $\text{TNF-}\alpha$ , suggesting that

growth factors and cytokines may play a therapeutic role in keloid formation. (Accepted on October 25, 2000) *Kawasaki Igakkaishi* 27(1): 41-47, 2001

**Key Words** ① **Keloid** ② **Collagenase**  
③ **Tumor Necrosis Factor (TNF) - $\alpha$**   
④ **Transforming Growth Factor (TGF) - $\beta$**

## はじめに

創傷治癒過程において、様々な要因により、線維芽細胞などを抑制する条件に異常が生じ、肥厚性瘢痕や、ケロイドが形成されと考えられ、細胞増殖因子や、サイトカインなどの関与が報告されてきた<sup>1), 2)</sup>。

以前著者は、正常線維芽細胞では、Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ , Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ それぞれ単独刺激で細胞増殖を促進し、TNF- $\alpha$ およびTGF- $\beta$ の併用による細胞増殖抑制がみられること、またケロイド由来の線維芽細胞では、TNF- $\alpha$ およびTGF- $\beta$ 単独刺激では、細胞増殖にほとんど影響が見られずTNF- $\alpha$ およびTGF- $\beta$ の併用による細胞増殖抑制がみられたと報告した<sup>3)</sup>。

TGF- $\beta$ は、最初、肉腫細胞より産生され、腫瘍の増殖に関する物質、形質転換因子として発見され、その後の研究により、様々な組織に線維化をもたらす因子の一つとして注目を集めている<sup>4)~9)</sup>。

またTNF- $\alpha$ は、様々な組織や細胞において多彩な作用を示し、感染症や炎症性疾患などの反応を引き起こす細胞傷害活性原因物質として注目されている。現在では各々に、線維芽細胞や他の様々な細胞に対して多様な生物活性を示すことが報告されている<sup>10)~15)</sup>。

本研究で著者は、手術時に得られたケロイドおよび周辺正常組織から線維芽細胞を遊出し、TGF- $\beta$ とTNF- $\alpha$ との相互作用についてコラゲナーゼの酵素活性とそのメッセンジャーRNA(mRNA)について検討を行った。

## 方法と材料

### 1) 材料

手術時に得られたケロイドおよび周辺正常組織を使用した。

Sigma Chemical Company製のTNF- $\alpha$ とTGF- $\beta$ を使用した。

### 2) 線維芽細胞培養法

Outgrowth法により20% fetal bovine serum (FBS, FlowLaboratories, USA), glutamine (0.6 mg/ml), penicillin (100 U/ml), streptomycin (50  $\mu$ g)を加えたDullbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 日水製薬)を使用し、初代培養を行った。

組織片からのoutgrowthを確認した後、初代培養をtrypsinization (0.2% trypsin, 0.7 M Methylenediamine tetraacetic acid)し、25 cm<sup>2</sup> プラスティックフラスコ内で継代培養した。培養液は10% FBS加DMEMを使用し、3日毎に交換した。また、継代は、分割比1:3で行った。実験には、継代数3~5の細胞を用いた。

### 3) コラゲナーゼ活性の測定

コラゲナーゼ活性の測定は、solution法<sup>16)~19)</sup>を用い、コラゲノキットCLN-100(コラーゲン技術研究会, 東京)を使用した。線維芽細胞を35 $\times$ 10 mm ディッシュにて前記条件で培養し、confluentに達したものをを用いた。培養液中に、各濃度(1 ng/ml, 10 ng/ml)の試薬(TNF- $\alpha$ のみ, TGF- $\beta$ のみ, TNF- $\alpha$ とTGF- $\beta$ )を加え、48時間後に上清を回収した。

キットのプロトコールに従い、培養上清中に含まれるコラゲナーゼをトリプシン処理し、FITC (fluorescein isothiocyanate)で標識された水溶性コラーゲン基質と反応後、分解産物を抽

出し、蛍光光度を、蛍光分光光度計で測定した。1 分間に 1 ディッシュあたり、 $1 \mu\text{g}$  のコラーゲンを分解するコラーゲナーゼ活性を、1 単位 (U) とした。

#### 4) mRNA の測定

RNA の抽出は、線維芽細胞を  $150 \times 10 \text{ mm}$  ディッシュにて前記条件で培養し、confluent に達したものに、ULTRASPEC-II RNA isolation system (BIOTECX, USA) を使用し、single-step 法<sup>20)</sup>で行った。培養液中に、各濃度 ( $1 \text{ ng/m}$ ,  $10 \text{ ng/m}$ ) の試薬 (TNF- $\alpha$  のみ, TGF- $\beta$ 1 のみ, TNF- $\alpha$  と TGF- $\beta$ ) を加え、48 時間培養後培地を除去し、Phosphate Buffered Saline (PBS) にて洗浄後、1 ディッシュあたり  $500 \mu\text{l}$  の denaturing solution を加え rubber policeman を使用して細胞を採取した。この採取した細胞を Eppendorf tube 内で攪拌し、BIOTECX 社プロトコルに従い total RNA を抽出した。RNA を Dot blot 法<sup>16), 17)</sup>によってニトロセルロースフィルター上に移し、bake した後、prehybridization、さらに<sup>32</sup>P でラベルした cDNA probe と hybridization を行った。

Probe の<sup>32</sup>P 標識には、Primer DNA labeling Kit (Takara, Kyoto, Japan) を使用する random prime 法で行った。cDNA probe に Klenow enzyme を用いて、<sup>32</sup>P で DNA をラベルした。cDNA probe として  $\alpha_1(\text{I})$  collagen は plasmids Hf 677<sup>21)</sup> の  $1.5 \text{ kb}$  insert を、 $\alpha_1(\text{III})$  collagen は plasmids p III-33<sup>22)</sup> の  $0.9 \text{ kb}$  insert を、collagenase は plasmids K4<sup>23)</sup> の  $0.7 \text{ kb}$  insert を、 $\beta$ -actin は plasmids pHFA-1<sup>24)</sup> の  $0.5 \text{ kb}$  insert を用いた。各 mRNA 定量は Bioimaging analyzer Fuji  $\times$  BAS 2000 (Fuji, Japan) で解析した。mRNA 発現量は internal control として用いた  $\beta$ -actin を基準 (1) として補正した。

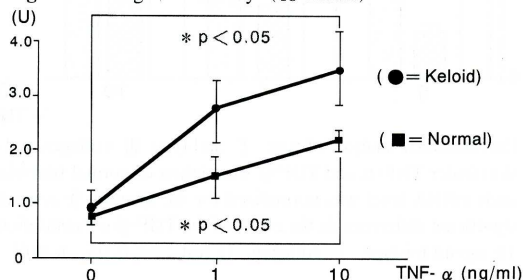
## 結 果

### 1) コラーゲナーゼ活性

測定した蛍光吸収度よりコラーゲナーゼ活性を算出し、1 分間に 1 ディッシュあたり、 $1 \mu\text{g}$

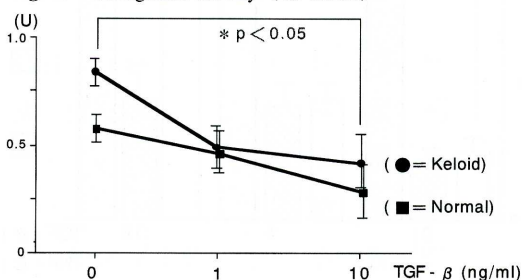
の基質を分解するコラーゲナーゼ活性を、1 単位 (U) としてグラフに示した。正常線維芽細胞およびケロイド由来の線維芽細胞において、TNF- $\alpha$  単独刺激によって濃度依存性にコラーゲナーゼの酵素活性が促進された (Fig. 1)。それに

Fig. 1. Collagenase activity (48 Hours)



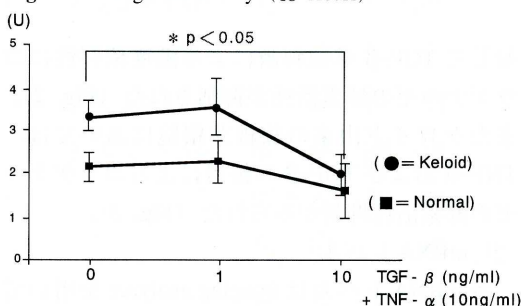
Effect of TNF  $\alpha$  on collagenase activity (U) of normal and keloid fibroblasts. There were significant differences in the effects of the TNF- $\alpha$  concentrations of 0 ng/ml and 10 ng/ml. (t-test:  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ )

Fig. 2. Collagenase activity (48 Hours)



Effect of TGF- $\beta$  on collagenase activity (U) of keloid fibroblasts. There was a significant difference in the effect in the TGF- $\beta$  concentrations of 0 ng/ml and 10 ng/ml. (t-test:  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ )

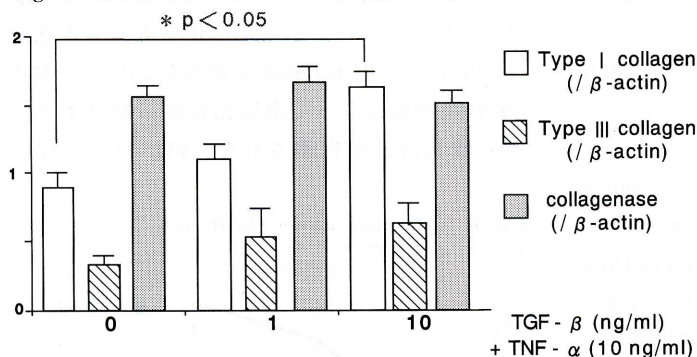
Fig. 3. Collagenase activity (48 Hours)



Effect of TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  on collagenase activity (U) of keloid fibroblasts. There was a significant difference in the effect in the TGF- $\beta$  concentrations of 0 ng/ml and 10 ng/ml. (t-test:  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ )

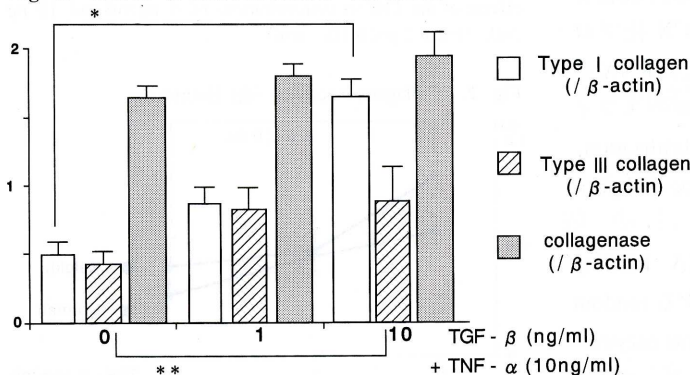


Fig. 4. mRNA (Normal Fibroblasts) (48 Hours)



Densitometric analysis of type I and type III collagen and collagenase expression under TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  stimulation of normal fibroblasts. The quantity of each mRNA level was normalized for the quantity  $\beta$ -actin mRNA. There was a significant difference in the effect of the TGF- $\beta$  concentrations of 0 ng/ml and 10 ng/ml for type I collagen. (t-test:  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ )

Fig. 5. mRNA (Keloid Fibroblasts) (48 Hours)



Densitometric analysis of type I and type III collagen and collagenase expression under TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  stimulation of keloid fibroblasts. The quantity of each mRNA level was normalized for the quantity  $\beta$ -actin mRNA. There were significant differences in the effects of TGF- $\beta$  concentrations of 0 ng/ml and 10 ng/ml for type I and type III collagen. (t-test:  $*p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ ,  $n = 6$ )

対して TGF- $\beta$  単独刺激による濃度依存性にコラゲナーゼの酵素活性が抑制された (Fig. 2). またケロイド由来の線維芽細胞においては, TNF- $\alpha$  および TGF- $\beta$  の併用によるコラゲナーゼの酵素活性抑制がみられた (Fig. 3).

## 2) mRNA レベル

各 mRNA レベルは imaging analyzer を用いて定量的に解析した. 各 mRNA の発現量は internal control である  $\beta$ -actin の発現量を基準 (1) として補正し, グラフに示している (Fig. 4, 5).

mRNA レベルでは TNF- $\alpha$  単独刺激と, TNF- $\alpha$  および TGF- $\beta$  の併用には有意な差がみられなかった.

## 考 察

創傷治癒過程においては, 細胞が傷害されると, マトリックス蛋白質分解酵素が産生され, 壊死組織が排除されていく. また増殖期には, 周辺組織より遊走してきた線維芽細胞が増殖し, コラーゲン, フィブロネクチン, エラスチンなどの細胞外マトリックスを産生し, さらにコラゲナーゼ, エラスターゼなどマトリックス蛋白質分解酵素も産生することにより, 再構築を促進させ創傷治癒を進めていく主役となっている<sup>25)</sup>.

ケロイドとは, 炎症後, 外傷後, あるいは特別な誘因なく発生する線維芽細胞由来の良性腫瘍であるとされている. しかし周囲に拡大, 浸潤, 増殖し, 临床上はとすると治療に抵抗し非常に難渋する. この原因や治療法の研究は, 過去100年以上にわたり生化学的, 病理組織学的, 免疫学的になされてきたが, 未だ明確な知見が得られず, 治療法の確立はなされていない<sup>26)</sup>. 近年, ケロイドの形成に,

細胞増殖因子や, サイトカインなどの関与が報告されてきた<sup>1), 2)</sup>. その中でも, TNF- $\alpha$  は, 様々な組織や細胞において多彩な作用を示し, 感染症や炎症性疾患などの反応を引き起こす細胞傷害活性原因物質として注目されている. 線維芽細胞に対しては, 細胞増殖促進, コラゲナーゼ産生亢進が報告されている<sup>10)</sup>.

また肉腫細胞より産生され, 腫瘍の増殖に関する物質, 形質転換因子として発見された TGF- $\beta$  は, その後の研究により, 様々な組織

に線維化をもたらす因子の一つとして注目を集めている。線維芽細胞に対しては、I, III, IV 型コラーゲン, フィブロネクチン, エラスチンなどの細胞外マトリックスの産生を促進し, コラゲナーゼ, エラスターゼなどマトリックス蛋白質分解酵素阻害因子の産生亢進により, 創傷治癒に有利に働くと考えられている<sup>4), 9), 27)</sup>。

現在までに, TNF- $\alpha$  と TGF- $\beta$  との相互作用の報告は, 両者の発見された経緯から, 腫瘍や血液細胞の分野でなされている<sup>28)~31)</sup>。しかし形成外科領域では詳細に検討した報告はなく, 著者は<sup>3)</sup>, ケロイド由来の線維芽細胞に対し, TNF- $\alpha$  および TGF- $\beta$  単独刺激では, 細胞増殖にほとんど影響が見られず, TNF- $\alpha$  および TGF- $\beta$  の併用により細胞増殖抑制がみられたことから, 細胞外マトリックス代謝, 特にコラゲナーゼ活性に関しても何らかの影響をもたらすと考え, 本研究でケロイド由来線維芽細胞における TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  とのコラゲナーゼ活性に対する相互作用について検討を行った。

今回の結果より, ケロイド由来の線維芽細胞において TNF- $\alpha$  単独刺激ではコラゲナーゼの酵素活性が促進されたのに対し, TGF- $\beta$  単独刺激で, コラゲナーゼの酵素活性の抑制がみられた。これらは, Chua ら<sup>12)</sup>により, ヒト皮膚線維芽細胞に対して TNF- $\alpha$  の単独刺激によりコラゲナーゼの酵素活性が2.8倍に上昇し, またコラゲナーゼの mRNA レベルでは10倍の上昇が報告されていること, また Gronowicz ら<sup>13)</sup>により, ヒト皮膚線維芽細胞に対して TNF- $\alpha$  の単独刺激によりコラゲナーゼの酵素活性が8倍に上昇し, またコラゲナーゼの mRNA レベルでは4倍の上昇が報告されていることと一致するものである。

Overall ら<sup>4)</sup>によると, ヒト皮膚線維芽細胞に対して TGF- $\beta$  の単独刺激によりコラゲナーゼ阻害因子の産生が1.7倍に促進され, またコラゲナーゼ阻害因子の mRNA レベルでは2.9倍の上昇が報告されている。また Alvares ら<sup>7)</sup>は, TGF- $\beta$  の単独刺激によりコラゲナーゼの mRNA レベルが25~50%抑制されたと報告し

ている。したがって TGF- $\beta$  の単独刺激によりコラゲナーゼ阻害因子が上昇しコラゲナーゼの酵素活性の抑制がもたらされたのである。

またコラゲナーゼの酵素活性は, TNF- $\alpha$  単独刺激で促進されたが, TGF- $\beta$  を併用することにより抑制がみられた。Chang ら<sup>8)</sup>によると, TNF- $\alpha$  に感受性の有る L929系細胞において, TGF- $\beta$  を投与するとチロシンリン酸化経路が活性化され, 腫瘍壊死因子抵抗性蛋白質 TRT protein を産生し, セリン・スレオニンキナーゼ活性を上昇させることにより TNF- $\alpha$  の細胞傷害性を中和するとしている。すなわち TGF- $\beta$  を併用することにより, TNF- $\alpha$  の作用がブロックされ, TNF- $\alpha$  によってもたらされたコラゲナーゼの酵素活性の上昇を抑制することが, ケロイド由来線維芽細胞においても確かめられたものと考えられる。

また mRNA レベルでは TNF- $\alpha$  単独刺激と, TNF- $\alpha$  および TGF- $\beta$  の併用には有意な差がみられなかった。これらの結果より, ケロイド由来線維芽細胞において, コラゲナーゼの mRNA レベルが TNF- $\alpha$  により促進されているにもかかわらず, コラゲナーゼの酵素活性が抑制されることは, コラゲナーゼ蛋白質レベルでの TGF- $\beta$  の TNF- $\alpha$  に対する抑制作用と考えられる。現在まで, ステロイドの局注や, トラニラストの内服など, 様々な治療法が開発されてきた<sup>32)</sup>。ケロイド由来の線維芽細胞における細胞増殖因子を組み合わせた相互作用に対する研究は, ケロイド形成における細胞増殖因子の関与や, その調節作用を解明し, ケロイドに対する治療の可能性や創傷治癒に関する研究の基礎の一つになると考えられる。

## おわりに

細胞増殖因子の組み合わせや, その抑制因子の使用によってケロイドに対する治療の可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり, ご指導とご校閲を賜りました

川崎医科大学形成外科学教室 森口隆彦教授に深甚なる謝意を捧げます。そして本研究にご協力いただきました川崎医科大学形成外科学教室、皮膚科学教室、組織培養センター、RI センター各位に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第8回日本形成外科学会基礎学術集会(1999年10月、於東京)および第6回ケロ

イド肥厚性癬痕研究会(2000年3月、於東京)にて発表した。

本研究の一部は、川崎医科大学プロジェクト研究費(No. 11-801)および平成11年度文部省科学研究費(課題番号11671792)の援助によって行われたことを付記し、感謝に意を表します。

## 文 献

- 1) McCoy BJ, Cohen IK : Collagenase in keloid biopsies and fibroblasts. *Connect Tissue Res* 9 : 181-185, 1982
- 2) McCauley RL, Chopra V, Li YY, Herndon DN, Robson MC : Altered cytokine production in black patients with keloids. *J Clin Immunol* 12 : 300-308, 1992
- 3) 山本雅之, 森口隆彦 : ヒト癬痕由来線維芽細胞に対する細胞増殖因子の影響について。ケロイド・肥厚性癬痕研究会記録集。東京, 日本アクセル・シュプリング出版株式会社。1998, pp 15-19
- 4) Overall CM, Wrana JL, Sodek J : Transforming growth factor-beta regulation of collagenase, 72 kDa-progelatinase, TIMP and PAI-1 expression in rat bone cell populations and human fibroblasts. *Connect Tissue Res* 20 : 289-294, 1989
- 5) Chua CC, Chua BH, Zhao ZY, Krebs C, Diglio C, Perrin E : Effect of growth factors on collagen metabolism in cultured human heart fibroblasts. *Connect Tissue Res* 26 : 271-281, 1991
- 6) Agarwal C, Hembree JR, Rorke EA, Eckert RL : Transforming growth factor-beta 1 regulation of metalloproteinase production in cultured human cervical epithelial cells *Cancer Res* 54 : 943-949, 1994
- 7) Alvares O, Klebe R, Grant G, Cochran DL : Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. *J Periodontol* 66 : 552-558, 1995
- 8) Chang NS : Transforming growth factor-beta 1 induction of novel extracellular matrix proteins that trigger resistance to tumor necrosis factor cytotoxicity in murine L 929 fibroblasts. *J Biol Chem* 270 : 7765-7772, 1995
- 9) Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau RA : Collagen synthesis by human liver (myo) fibroblasts in culture : evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. *J Hepatol* 23 : 307-317, 1995
- 10) Dayer JM, Beutler B, Cerami A : Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 162 : 2163-2168, 1985
- 11) Solis JA, Brenner DA, Chojkier M : Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 263 : 5841-5845, 1988
- 12) Chua CC, Chua BH : Tumor necrosis factor-alpha induces mRNA for collagenase and TIMP in human skin fibroblasts. *Connect Tissue Res* 25 : 161-170, 1990
- 13) Gronowicz G, Hadjimichael J, Richards D, Cerami A, Rossomando EF : Correlation between tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) -induced cytoskeletal changes and human collagenase gene induction : *J Periodontal Res* 27 : 562-568, 1992
- 14) Westermarck J, Hakkinen L, Fiers W, Kahari VM : TNF-R 55-specific form of human tumor necrosis factor-alpha induced collagenase gene expression by human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 105 : 197-202, 1995
- 15) Rekdal O, Osterud B, Svendsen JS, Winberg JO : Evidence for exclusive role of the p 55 tumor necrosis factor (TNF) receptor in mediating the TNF-induced collagenase expression by human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 107 : 565-568, 1996
- 16) Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y : Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 103 : 359-363, 1994



- 17) Hatamochi A, Wada T, Takeda K, Ueki H, Kawano S, Terada K, Morita T : Collagen metabolism in cutis laxa fibroblasts : increased collagenase gene expression associated with unaltered expression of type I and type III collagenase. *J Invest Dermatol* 97 : 483 - 487, 1991
- 18) Terato K, Nagai Y, Kawanishi K, Yamamoto S : A rapid assay method of collagenase activity using 14 C-labeled soluble collagen as substrate. *Biochim Biophys Acta* 445 : 753 - 762, 1976
- 19) Ohsawa S, Hori H, Hata R, Nagai Y : Stimulation of the collagen metabolism articular chondrocytes in culture by a factor derived from polymorphonuclear leukocytes. *Biomed Res* 5 : 177 - 186, 1984
- 20) Chomczynski P, Sacchi N : Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 : 156 - 159, 1987
- 21) Chu ML, Myers JC, Bernard MP, Ding JF, Ramirez F : Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro $\alpha$ 1 (I) collagen chain. *Nucleic Acid Res* 10 : 5925 - 5934, 1982
- 22) Miskulin M, Dalgleish R, Kluge-Beckerman B, Rennard SI, Tolstoshev P, Brantly M, Crystal RG : Human type III collagen gene expression is coordinately modulated with the type I collagen genes during fibroblast growth. *Biochemistry* 25 : 1408 - 1413, 1986
- 23) Angel P, Poting A, Mallick U, Rahmsdorf HJ, Schorpp M, Herrlich P : Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol Cell Biol* 6 : 1760 - 1766, 1986
- 24) Gunning P, Ponte P, Okayama H, Angel J, Blau H, Kedes L : Isolation and characterization of full-length cDNA clones for human  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -actin mRNAs : Skeletal but not cytoplasmic actins have an amino terminal cysteine that is subsequently removed. *Mol Cell Biol* 3 : 787 - 795, 1983
- 25) 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー 藤本大三郎編. 東京, アイピーシー社. 1991, pp204 - 219
- 26) 形成外科手術手技シリーズ「ケロイドと肥厚性瘢痕の治療」大浦武彦編. 東京, 克誠堂出版株式会社. 1994, pp 40 - 74
- 27) Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK : The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg* 98 : 827 - 833, 1996
- 28) 上条竜太郎, 武田 健, 南雲正男, 紺野邦夫 : TGF- $\beta$  による TNF- $\alpha$  の線維芽細胞に対する作用の抑制. *炎症* 10 : 369 - 373, 1990
- 29) 陣内逸朗, 別所正美, 斉藤昌信, 平嶋邦猛 : 白血病幹細胞の増殖に対する TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  の作用についての検討. *臨床血液* 33 : 1600 - 1601, 1992
- 30) Ladany A, Nagy JO, Jeney A, Timar J : Cytokine sensitivity of metastatic human melanoma cell lines-simultaneous inhibition of proliferation and enhancement of gelatinase activity. *Pathol Oncol Res* 4 : 108 - 114, 1998
- 31) Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G : Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver : regulation by TNF-alpha and TGF-beta 1 *J Hepatol* 30 : 48 - 60, 1999
- 32) 形成外科手術手技シリーズ「ケロイドと肥厚性瘢痕の治療」大浦武彦編. 東京, 克誠堂出版株式会社. 1994, pp 86 - 117