

# ヒト皮膚における血管新生刺激サイトカインの発現とその作用機序に関する包括的研究

聖マリアンナ医科大学 皮膚科

相馬 良直

Background: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces proliferation of endothelial cells and in vivo angiogenesis. The regulation of the secretion of VEGF from human skin fibroblasts has not been well investigated, although paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells have been suggested to play a key role in granulation tissue formation. Objective: To explore the significance of human skin fibroblasts as a source of VEGF in granulation tissue formation. Methods: VEGF secreted from cultured human skin fibroblasts was measured by ELISA. VEGF mRNA expression was examined by real-time polymerase chain reaction analysis. Results: Transforming growth factor- $\beta$ 1, platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1 $\alpha$  strongly up-regulated VEGF secretion from human skin fibroblasts. Epidermal growth factor, transforming growth factor- $\alpha$ , basic fibroblast growth factor, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  had no significant effects on VEGF secretion. Transforming growth factor- $\beta$ 1, platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1 $\alpha$  acted synergistically each other. The levels of secreted VEGF after the stimulation of these cytokines were high enough to exert its biological activities. Interferon- $\gamma$  enhanced interleukin-1 $\alpha$ -induced VEGF production but diminished the effect of transforming growth factor- $\beta$ 1. The results of ELISA were confirmed at the mRNA level by real-time polymerase chain reaction analysis, except for the synergistic effect of interferon- $\gamma$  with interleukin-1 $\alpha$ . Conclusions: Fibroblasts could be an important source of VEGF during wound healing. Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells via VEGF may play a key role in the formation of granulation tissue.

## 1 緒言

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管内皮細胞に特異的に働き、その増殖を刺激する細胞増殖因子である。ホモダイマー構造を持つ分子量 40-45kDa の糖蛋白で、内皮細胞の表面にある 2 種類の特異受容体に結合して活性を発揮する。mRNA の alternative splicing による 5 種のアイソフォームが知られ、大きい方の 2 つ、すなわち VEGF189 と VEGF206 は細胞表面に結合した状態で、小さい方の 3 つである VEGF121、VEGF145、VEGF165 は分泌型で存在する。この 3 種の分泌型アイソフォームは内皮細胞の増殖を刺激し、*in vivo* において血管新生を刺激する<sup>1) 2)</sup>。

ヒト皮膚においてはケラチノサイトが VEGF を産生、分泌することが知られている<sup>3)</sup>。血管新生が行われている創傷治癒の場において、創傷辺縁のケラチノサイトは VEGF を発現し、後期においては創を被覆すべく遊走してきたケラチノサイトにも VEGF の発現が見られる<sup>4)</sup>。また VEGF 受容体は創傷の血管の内皮細胞に強く発現している<sup>5)</sup>。正常のマウスでは創傷部に VEGF 発現が認められるのに対し、創傷治癒が遅延したマウスでは VEGF 発現は低下している<sup>6)</sup>。これらの結果から VEGF が創傷治癒に重要な役割を果たし

ていると考えられている。このような背景のもと、培養ケラチノサイトによる VEGF 発現は非常に詳しく調べられており、epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 4 (IL-4), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 短波長紫外線、過酸化水素などの酸化剤、低酸素状態などが VEGF 発現を誘導することが知られている<sup>6) - 10)</sup>。このように、皮膚の創傷治癒においてはケラチノサイトが VEGF の主要な供給源と考えられてきた。

創傷治癒の場においては、良好な肉芽組織の形成が重要であり、肉芽組織は炎症性細胞、新生血管、線維芽細胞から成っている。この血管新生に VEGF が主要な役割を果たしていると考えられている。皮膚潰瘍の治癒には活発な血管新生を伴う肉芽組織の形成が必須であるが、潰瘍底にはケラチノサイトは存在せず、この肉芽形成にケラチノサイト由来の VEGF が作用していないことは明らかである。一方、肉芽組織における血管新生には、線維芽細胞と血管内皮細胞の paracrine interaction が大きな役割を果たしていることが、種々の共培養系を用いた実験で示唆されているが<sup>11) - 13)</sup>、その paracrine がどのような分子を介しているのかは分かっていない。

無刺激状態でのヒト皮膚線維芽細胞における VEGF 産生量は、ケラチノサイトのそれと比べて非常に低い<sup>14)</sup>。しかし線維芽細胞は肉芽組織中に最も多数存在する細胞であり、個々の細胞から分泌される VEGF は微量であっても、全体としては無視できない量に達する可能性もある。我々は線維芽細胞から分泌される VEGF が、線維芽細胞と血管内皮細胞の paracrine interaction における最重要分子であるとの仮



Comprehensive studies on the expression and working mechanisms of angiogenic cytokines in human skin

Yoshinao Soma

Department of Dermatology, St. Marianna University School of Medicine

説を掲げ、その可能性を検証しようと考えた。ヒト皮膚線維芽細胞からの VEGF 分泌はこれまでにほとんど調べられていない。我々は種々の growth factor やサイトカインを、単独あるいは組み合わせて線維芽細胞に作用させ、その VEGF 産生を調べた。その結果、潰瘍底の肉芽形成においては、線維芽細胞から産生分泌される VEGF が重要であると考えられたので、以下に報告する。

## 2 実験

### 2.1 細胞培養とサイトカイン

手術時に採取した皮膚片より定法通りにヒト皮膚線維芽細胞を培養し、継代数 4 から 6 の細胞を実験に供した。培養液には 10% のウシ胎児血清を加えた Eagle minimum essential medium (MEM) を使用した。遺伝子組換えヒト TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$  は R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN) より購入した。遺伝子組換えヒト platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), EGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), TGF- $\alpha$  は Pepro Tech EC Ltd. (London, UK) から、遺伝子組換えヒト TNF- $\alpha$  は Genzyme/Techne (Boston, MA) より購入した。

### 2.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

24 穴プレートでコンフルエントになるまで培養したヒト皮膚線維芽細胞を無血清 MEM 培地で 48 時間培養し、飢餓状態としたのち、培地を吸引し、種々のサイトカインを加えた無血清 MEM 培地 0.5 ml を加えた。37°C で 48 時間培養後、培養上清を回収し、凍結保存した。細胞数は Coulter Counter (Beckman Coulter, Japan) で計測した。培養上清中の VEGF 濃度は IBL 社 (Gunma, Japan) より購入した ELISA キット (感度 7.8 pg/ml) を用いて行った。

### 2.3 RNA 抽出と real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

T-25 培養フラスコでコンフルエントになるまで培養したヒト皮膚線維芽細胞を無血清 MEM 培地で 48 時間培養し、飢餓状態としたのち、培地を吸引し、種々のサイトカインを加えた無血清 MEM 培地を加えた。37°C で 8 時間培養後、細胞を回収し、SV Total RNA Isolation System (Promega Co., Madison, WI) を用いて、全 RNA を抽出した。1st Strand cDNA Synthesis KIT for RT-PCR (Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN) を用いて逆転反応を行い、1 mg の全 RNA より cDNA を合成した。増幅反応は LightCycler-Primer Set Human VEGF と LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) を用いて行った。LightCycler Software Ver. 3.5 にてデータを抽出し、Excel (Microsoft, Redmond, WA) を用いて解析した。

### 2.4 統計解析

Student's t-test を用いて統計解析を行った。

## 3 結果

### 3.1 個々のサイトカインのヒト皮膚線維芽細胞の VEGF 分泌に及ぼす影響

ヒト皮膚線維芽細胞からの VEGF 分泌に及ぼす種々のサイトカインの影響を Fig. 1 に示す。TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB と IL-1 $\alpha$  は強力に VEGF 分泌を増加させたが、EGF, TGF- $\alpha$ , bFGF, TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  は有意な効果を示さなかった。TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB, IL-1 $\alpha$  の VEGF 分泌増加作用はそれぞれ 15 倍、5 倍、10 倍であった。

### 3.2 サイトカインの組み合わせによる VEGF 分泌の変化

予備実験において、EGF, TGF- $\alpha$ , bFGF, TNF- $\alpha$  は単独でも他のサイトカインと組み合わせても、線維芽細胞からの VEGF 分泌を変化させなかったが、IFN- $\gamma$  は他のサイトカインと組み合わせるとある作用を示すという結果が得られた。そこで、IFN- $\gamma$  を PDGF-BB, IL-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 と組み合わせた場合の効果について検討した。Fig. 2 に示すように、IFN- $\gamma$  は単独では効果を示さないが、IL-1 $\alpha$  の VEGF 分泌刺激作用を増強させ、TGF- $\beta$ 1 の作用を減弱させた。PDGF-BB の作用には影響しなかった。また、

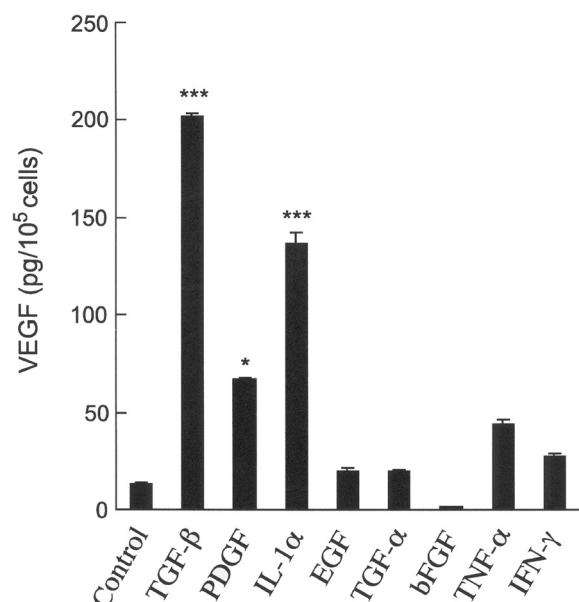


Fig. 1 Effects of individual cytokines on the secretion of VEGF from human skin fibroblasts. Confluent cultures of human skin fibroblasts were serum-starved for 48 hours. Then cells were treated with 10 ng/ml of TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB, IL-1 $\alpha$ , EGF, TGF- $\alpha$ , bFGF, TNF- $\alpha$ , or 500 U/ml of IFN- $\gamma$  for 48 hours. VEGF concentrations in the conditioned media were determined by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate determinations. \*P<0.05; \*\*\*P<0.001

PDGF-BB, IL-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 の組み合わせの効果を調べたところ、この3つのサイトカインはそれぞれ相乗的に作用することが示された (Fig. 2)。3種すべてを加えた場合にもっとも強い VEGF 分泌刺激作用がえられ、TGF- $\beta$ 1 と PDGF-BB の組み合わせがそれに次いだ。これらのサイトカインによる刺激作用の強力は驚くべきもので、無刺激の細胞から分泌される VEGF は  $5.4 \pm 1.0$  pg/ $10^5$  cells に過ぎないが、3種すべてを加えた場合の VEGF 分泌は  $551.0 \pm 38.3$  pg/ $10^5$  cells に及び (Fig. 2)、約 100 倍の刺激効が示された。3種すべてを加えた場合の培養上清中の VEGF 濃度は 1.6 ng/ml であり、VEGF の生物学的活性を發揮するのに十分な濃度であった。

### 3.3 PDGF-BB と TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$ の相乗作用

種々の濃度の PDGF-BB と TGF- $\beta$ 1 または IL-1 $\alpha$  を一緒に加えた場合の VEGF 分泌を調べたのが Fig. 3 である。TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$ , PDGF-BB は単独でそれぞれ 28 倍、12 倍、10 倍の刺激効果を示したが、PDGF-BB を TGF- $\beta$ 1 または IL-1 $\alpha$  と組み合わせると、PDGF の濃度に依存して VEGF 分泌は増加した。TGF- $\beta$ 1 と PDGF-BB の組み合わせ、IL-1 $\alpha$  と PDGF-BB の組み合わせでの最大効果は、それぞれ 69 倍と 44 倍であった。

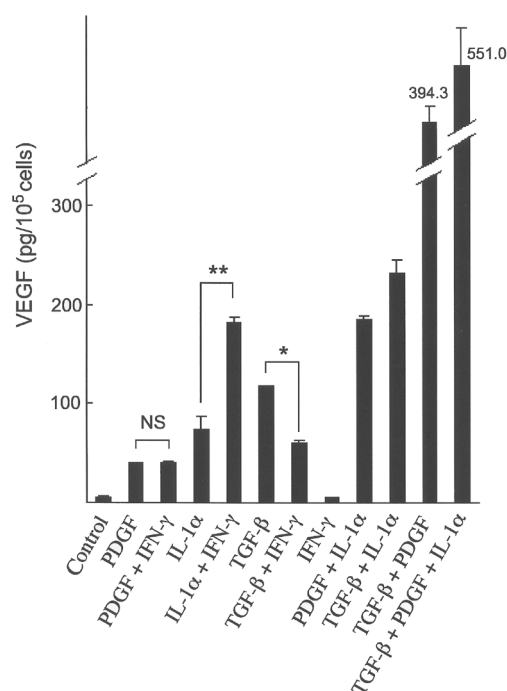


Fig. 2 Effects of the combinations of cytokines on VEGF secretion. Confluent cultures of human skin fibroblasts were serum-starved for 48 hours. Then cells were treated with 10 ng/ml of TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB, IL-1 $\alpha$ , and/or 500 U/ml of IFN- $\gamma$  for 48 hours. VEGF concentrations in the conditioned media were determined by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate determinations. NS: not significant; \*P<0.05; \*\*P<0.01

### 3.4 IFN- $\gamma$ が IL-1 $\alpha$ と TGF- $\beta$ 1 の作用に及ぼす影響

IFN- $\gamma$  が IL-1 $\alpha$  と TGF- $\beta$ 1 の作用に及ぼす影響をさらに検証するため、種々の濃度の IFN- $\gamma$  を IL-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 と共に加え、VEGF 分泌を調べた (Fig. 4)。100, 300, 500 U/ml の IFN- $\gamma$  は IL-1 $\alpha$  による VEGF 産生刺激作用を増強したのに対し、同じ濃度の IFN- $\gamma$  は TGF- $\beta$ 1 の VEGF 産生刺激作用を減弱させた。すなわち IFN- $\gamma$  は線維芽細胞からの VEGF 分泌に関して、bifunctional に作用することが示された。

### 3.5 サイトカインで刺激された細胞の VEGF 発現の real-time PCR による検討

Real-time PCR の結果を Fig. 5 に示す。TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB, IL-1 $\alpha$  は VEGF mRNA 発現を有意に増加させ、これは ELISA の結果とよく一致していた。PDGF が IL-1 $\alpha$  や TGF- $\beta$ 1 と相乗的に作用することも ELISA と同様であった。IFN- $\gamma$  は TGF- $\beta$ 1 の VEGF 発現増強作用を有意に減弱させ、これも Fig. 4 に示す ELISA の結果とよく一致していた。しかし IFN- $\gamma$  は IL-1 $\alpha$  による VEGF mRNA 発現増加作用に対し有意の影響を与えず、これは ELISA の結果と一致しなかった。

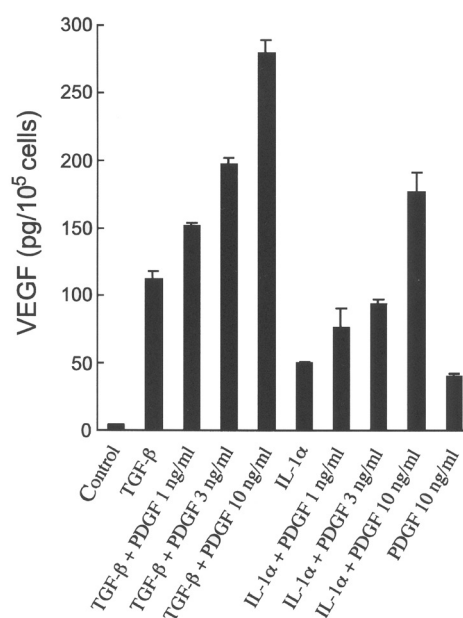


Fig. 3 Synergistic effects of PDGF-BB with TGF- $\beta$ 1 or IL-1 $\alpha$ . Confluent cultures of human skin fibroblasts were serum-starved for 48 hours. Then cells were treated with 10 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 or IL-1 $\alpha$  with or without the indicated concentrations of PDGF-BB for 48 hours. VEGF concentrations in the conditioned media were determined by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate determinations.

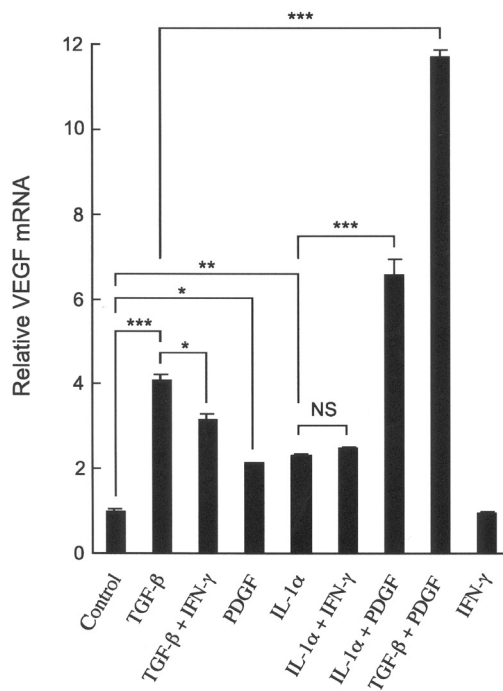


Fig. 5 Real-time PCR analysis of VEGF expression in cells treated with cytokines. Confluent cultures of human skin fibroblasts were serum-starved for 48 hours. Then cells were treated with 10 ng/ml of TGF-β1, PDGF-BB, IL-1α and/or 500 U/ml of IFN-γ for 48 hours. Total RNA was extracted from the cells, reverse transcribed into cDNA, which was then subjected to the real-time PCR analysis as described in Materials and Methods. Expression levels for VEGF were normalized to the amount of GAPDH mRNA and indicated relative to its expression level in untreated cells. As a reference, cells treated with TGF-β1 and PDGF-BB were taken. Data are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. NS: not significant; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001

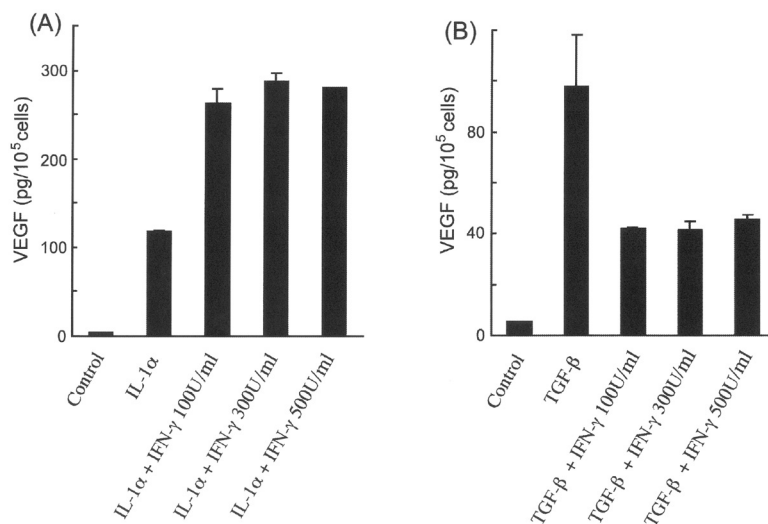


Fig. 4 Effects of IFN-γ on VEGF secretion induced by IL-1α and TGF-β1. Confluent cultures of human skin fibroblasts were serum-starved for 48 hours. Then cells were treated with 10 ng/ml of IL-1α (A) or TGF-β1 (B) with or without the indicated concentrations of IFN-γ for 48 hours. VEGF concentrations in the conditioned media were determined by ELISA. Data are expressed as mean ± SD of duplicate determinations.

#### 4 考察

肉芽組織の形成には、マクロファージの集積、線維芽細胞の遊走と増殖、細胞外基質の蓄積、血管新生などのステップが必要である。これらの現象は様々な細胞増殖刺激因子や走化性因子、すなわち PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, bFGF, VEGF, IL-1, TNF- $\alpha$ , insulin-like growth factor, connective tissue growth factor, IFN- $\gamma$  などにより制御されている<sup>15) - 17)</sup>。本研究では、皮膚線維芽細胞が創傷治癒における VEGF の主要な産生源となりうる可能性を検討するため、種々の細胞増殖因子やサイトカインが、線維芽細胞の VEGF 産生に及ぼす影響について調べた。

線維芽細胞における VEGF の誘導は、ケラチノサイトのそれと比べ、十分に検討されていない。マウスの線維芽細胞株である NIH/3T3 や AKR-2B において PDGF と TGF- $\beta$  が VEGF を誘導すること<sup>18) 19)</sup>、低酸素状態がヒト皮膚線維芽細胞の VEGF 発現を増強させること<sup>10) 20)</sup>、低酸素状態、TGF- $\beta$ , PDGF, IL-1 がヒト滑膜線維芽細胞の VEGF 発現を誘導すること<sup>21)</sup>などが断片的に報告されているに過ぎない。最近 Trompezinski らは一連の報告で、ヒト皮膚線維芽細胞からの VEGF 分泌は TGF- $\beta$ 、紫外線照射、prostaglandin E<sub>2</sub>, IL-4 により増強されることを示す一方、常状態における線維芽細胞からの VEGF 分泌はケラチノサイトからのそれに比べてきわめて少量であり、しばしば検出限界以下であると述べている<sup>8) 14) 22)</sup>。本研究で我々は、TGF- $\beta$ 1 だけでなく PDGF-BB と IL-1 $\alpha$  もヒト皮膚線維芽細胞からの VEGF 分泌を強力に刺激することを初めて示した。TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB, IL-1 $\alpha$  による分泌増加は、それぞれ 15 から 28 倍、5 から 10 倍、10 から 12 倍という目覚ましいものであった (Fig. 1, 3)。さらにこれらのサイトカインによる増強作用は相乗的であり (Fig. 2)、この 3 種すべてを作用させた場合には、培養上清中 VEGF 濃度は 1.6ng/ml に達した。これは VEGF の血管内皮細胞増殖作用を発揮するのに十分な濃度である。これらの組み合わせによる相乗的な VEGF 分泌刺激作用は、real-time PCR による分析で、mRNA レベルでも証明された (Fig. 5)。

IFN-g 自体は VEGF 分泌に何の作用を持たないが、IL-1 $\alpha$  と一緒に加えた場合には、IL-1 $\alpha$  の VEGF 分泌刺激作用を増強させた。IFN- $\gamma$  と IL-1 はいずれも重要な炎症性サイトカインであり、両者の相乗効果はケラチノサイトにおける inducible nitric oxide synthase (iNOS) 誘導<sup>23)</sup>、同じくケラチノサイトにおける RANTES 誘導<sup>24)</sup>、内皮細胞における bFGF 誘導<sup>25)</sup> など、いくつかの現象において報告されている。本研究により、線維芽細胞からの VEGF 分泌刺激も、これらの炎症性サイトカインの重要な作用の一つである可能性が初めて示唆された。この点については

ELISA の結果と real-time PCR の結果に乖離が認められたため、我々は同じ実験を 2 回繰り返したが結果は同じで、IL-1 $\alpha$  単独の場合と IL-1 $\alpha$  と IFN-g の両方を加えた場合とで、VEGF mRNA 発現量に差はなかった。このことから、おそらくは IFN- $\gamma$  と IL-1 $\alpha$  の相乗作用は post-transcriptional なレベルで働いているものと思われた。また我々は、IFN- $\gamma$  が TGF- $\beta$ 1 による VEGF 産生刺激作用を抑制する効果があることを、ELISA および real-time PCR で示した。同様の現象は Trompezinski らによって蛋白レベルでのみ示されている<sup>8)</sup>。このことから、IFN- $\gamma$  は線維芽細胞からの VEGF 分泌の制御において bifunctional な作用をもつサイトカインであると思われた。

PDGF と TGF- $\beta$ 1 は創傷治癒の早期の段階で血小板から放出される。IL-1 と IFN- $\gamma$  は単球やマクロファージなどの種々の炎症細胞から放出される。すなわち、これらのサイトカインは創傷治癒の場に確実に存在し、重要な役割を担っていると考えられている<sup>15) 16)</sup>。本研究において、PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$  は強力な VEGF 誘導作用を有することが明らかとなり、さらに IFN- $\gamma$  はこれらの VEGF 誘導に対し bifunctional に作用することが明らかとなった。そしてこれらの刺激により線維芽細胞から放出された VEGF は、生物学的活性を十分に発揮できる濃度であった。以上より我々は、線維芽細胞がヒト創傷治癒における VEGF の重要なソースであり、VEGF を介する線維芽細胞と血管内皮細胞の相互作用が、肉芽形成において中心的な役割を果たしているのではないかと結論した。

#### (文 献)

- 1) Ferrara N, Houck K, Jakeman L et al: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*, 13: 18-32, 1992.
- 2) Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S et al: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13: 9-22, 1999.
- 3) Ballaun C, Weninger W, Uthman A et al: Human keratinocytes express the three major splice forms of vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol*, 104: 7-10, 1995.
- 4) Brown LF, Yeo K-T, Berse B et al: Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med*, 176: 1375-1379, 1992.
- 5) Peters KG, de Vries C, Williams LT: Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 8915-8919, 1993.

- 6) Frank S, Hubner G, Breier G et al: Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem*, 270: 12607-12613, 1995.
- 7) Detmar M, Yeo K-T, Nagy JA et al: Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*, 105: 44-50, 1995.
- 8) Trompezinski S, Denis A, Vinche A et al: IL-4 and interferon  $\gamma$  differentially modulate vascular endothelial growth factor release from normal human keratinocytes and fibroblasts. *Exp Dermatol*, 11: 224-231, 2002.
- 9) Brauchle M, Funk JO, Kind P et al: Ultraviolet B and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem*, 271: 21793-21797, 1996.
- 10) Detmar M, Brown LF, Berse B et al: Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol*, 108: 263-268, 1997.
- 11) Villaschi S, Nicosia RF: Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model. *Lab Invest*, 71: 291-299, 1994.
- 12) Tille J-C, Pepper MS: Mesenchymal cells potentiate vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res*, 280: 179-191, 2002.
- 13) Velazquez OC, Snyder R, Liu Z-J et al: Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *FASEB J*, 16: 1316-1318, 2002.
- 14) Trompezinski S, Schmitt PD, Viac J: UV radiation and prostaglandin E<sub>2</sub> up-regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) in cultured human fibroblasts. *Inflamm Res*, 50: 422-427, 2001.
- 15) Singer AJ, Clark RAF: Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341: 738-746, 1999.
- 16) Falanga V, Shen J: Growth factors, signal transduction and cellular responses. In: Falanga V (eds): *Cutaneous wound healing*. Martin Dunitz Ltd, London, 2001, 81-108.
- 17) Nickoloff BJ, Naidu Y: Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J Am Acad Dermatol*, 30: 535-546, 1994.
- 18) Finkenzeller G, Marme D, Weich HA et al: Platelet-derived growth factor -induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. *Cancer Res*, 52: 4821-4823, 1992.
- 19) Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T et al: Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- $\beta$  in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*, 269: 6271-6274, 1994.
- 20) Minchenko A, Bauer T, Salceda S et al: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest*, 71: 374-379, 1994.
- 21) Berse B, Hunt JA, Diegel RJ et al: Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 115: 176-182, 1999.
- 22) Trompezinski S, Pernet I, Mayoux C et al: Transforming growth factor- $\beta$ 1 and ultraviolet A1 radiation increase production of vascular endothelial growth factor but not endothelin-1 in human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol*, 143: 539-545, 2000.
- 23) Frank S, Kolb N, Werner ER et al: Coordinated induction of inducible nitric oxide synthase and GTP-cyclohydrolase I is dependent on inflammatory cytokines and interferon- $\gamma$  in HaCaT keratinocytes: implications for the model of cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol*, 111: 1065-1071, 1998.
- 24) Wakugawa M, Nakamura K, Akatsuka M et al: Interferon-gamma-induced RANTES production by human keratinocytes is enhanced by IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-13 and is inhibited by dexamethasone and tacrolimus. *Dermatology*, 202: 239-245, 2001.
- 25) Samaniego F, Markham PD, Gendelman R et al: Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice. *J Immunol*, 158: 1887-1894, 1997.