

# 皮膚マトリクスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase:MMP)-9 遺伝子過剰発現マウスの作成とその解析

帝京大学医学部ちば総合医療センター皮膚科

小林 孝志

The skin surrounding the whole body maintains the homeostasis by the tissue metabolism both in the normal status and in the inflammatory conditions. Among many species of matrix metalloproteinase (MMP), two kinds of gelatinase, MMP-2 and MMP-9 are known to cleave not only denatured collagen, named as gelatin, but also other not a few matrix components such as fibronectin, elastin, and type IV and VII collagens and pro-form of cytokines including tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and transforming growth factor (TGF)- $\beta$  to be activated. In comparison with MMP-2, MMP-9 is known to be induced in the case of inflammatory stimuli and plays important roles for such tissue metabolism including tumor invasion, blister formation, dermatitis, apoptosis by ultraviolet irradiation, and keratinization. For example, MMP-9 null mice reportedly show no blister formation on the experimental model of bullous pemphigoid and they also manifest very low level of keratinization on the squamous cell carcinoma. This study was aimed to determine the effects of overexpression of MMP-9 in the skin.

## 1. 緒言

生体で働く組織代謝酵素には様々なものがあり、細胞外マトリクス (extracellular matrix: ECM) 代謝に関するものも多く存在する。これらには、架橋を司る lysyl oxidase など ECM 成分を合成しいわゆる同化作用を有する酵素群、一方、ECM 成分を専ら分解することに働き異化作用を有する酵素群、に大別される<sup>1-3)</sup>。後者の代表的なものが、matrix metalloproteinase (MMP) 群の酵素である<sup>1-3)</sup>。

MMP 群の酵素は、脊椎動物では、1960年代、おたまじやくしが尻尾を自己消化して蛙になる際の尻尾から発見された酵素、collagenase に端を発し<sup>1-4)</sup>、現在まで20種類以上の酵素が報告されている<sup>1-3)</sup>。これらはすべて別々の遺伝子によりコードされたアミノ酸による蛋白質であるが、相同性を持っている<sup>2)</sup>。なかでも MMP-2 と MMP-9 は gelatinase として知られ、元々は変性コラーゲンである gelatin を分解する酵素として発見、命名された<sup>1-3)</sup>。

しかし1980年代後半に、基底膜に特異的に存在するIV型コラーゲンやVII型コラーゲンを含め、ファイブロネクチンやエラスチンなど他の複数のECM蛋白を分解すること<sup>5, 6)</sup>、また最近では、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ などのサイトカインの前駆体分子を分解して活性化するなど

様々な基質が報告されており<sup>7)</sup>、MMP-2とMMP-9は組織代謝で重要な役割りを果たすことが示唆されるに至っている<sup>1-3)</sup>。

皮膚では、真皮の線維芽細胞は専らMMP-2を、表皮角化細胞はMMP-2とMMP-9を分泌することが解明されているが<sup>1-3, 8)</sup>、これら両酵素により、前駆体が分解されたあと、TNF- $\alpha$ などのサイトカインの刺激でさらに特にMMP-9発現が亢進することが知られている<sup>9, 10)</sup>。実際、皮膚の炎症疾患の代表的な湿疹・皮膚炎皮膚でのMMP-9の発現亢進を確認している<sup>11)</sup>。このようにMMP-9は発現誘導されやすい酵素であり、これはMMP-9遺伝子プロモーターにMMP-2にはないTATA boxが存在するなど、様々な発現調節領域が存在することによって裏付けられている<sup>1, 12, 13)</sup>。

これまで、遺伝子改変によるMMP-9発現制御についての動物モデルを用いた検討では、MMP-9欠失マウスを用い、骨髓細胞由来MMP-9が水疱の形成に関わる炎症に関与するという報告<sup>14, 15)</sup>などがある。しかし、表皮角化細胞由来MMP-9を過剰発現させた報告はなく、本研究は、その検討を行うために企画された。

## 2. 実験

### 2.1 遺伝子改変マウスMMP-9発現ベクターの取得

米国Genecopoeia社のEX-Mm03900-M02を使用し、また以下の8種のPCR primer、

ATG-F : ATGAGTCCCTGGCAGCCCCTGC  
cdna-R1 : TGTTCGAATGGCCTTTAGTG  
cdna-F1 : GCTGGCAGAGGCATACTTGT  
cdna-F2 : CGTCGTGATCCCCACTTACTA  
cdna-F3 : GTCTTCCTGGGCAAGCAGTA  
cdna-F4 : CTATACCTCCCACGGCCTAT



Generation and analyses of transgenic mice for the overexpressed matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the skin

Takashi Kobayashi

Department of Dermatology, Teikyo University Chiba Medical Center

cdna-F5 : TGTGGGTGTACACAGGCAAG

mu-PF : GGCCAGACGTGGGTCGATT

を用いて、polymerase chain reaction (PCR) 法や制限酵素切断、ライゲーションなどの一般的な遺伝子操作法により、*Kpn* Iと*Not* IでマウスMMP-9 cDNAを挿入したベクターに、さらに開始コドンから305番目の塩基をTからGに置換することから、102番目のアミノ酸をバリンからグリシンに置換する遺伝子改変MMP-9発現ベクター (pCMV-cDNA (V102G)) を得て、その塩基配列を確認した。

次に、遺伝子改変マウスMMP-9について、蛋白発現とgelatinase活性を検討するために、培養293T細胞にRoche社のFugene 6 試薬を用いて遺伝子導入を行い、培養上清を回収、gelatin-zymograph法を用いて<sup>16)</sup> gelatinase活性を持つ遺伝子改変MMP-9発現を確認した。

## 2.2 K14 プロモーターを用いた遺伝子改変 MMP-9 発現ベクターの取得

米国ATCC株より分譲して得た、pG3-K14 cassette (pG3Z-K14) を用い、上述と同様にPCR法や制限酵素切断、ライゲーションなどの一般的な遺伝子操作法により、ウサギβ-globin second intron を挿入、さらに*Bgl* IIで、上述の遺伝子改変MMP-9 cDNA (V102G) を挿入、ヒトK14 プロモーター、ウサギβ-globin second intron、Kozak 配列、遺伝子改変MMP-9 cDNA (V102G)、及びヒトK14 polyadenylation signalを直列に連結したものを含む皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウス作成用ベクター (phK14-cDNA (V102G)) を得た。

## 2.3 皮膚 MMP-9 過剰発現トランスジェニックマウスの作製と表現型の観察

皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウスの作製採卵用のC57BL/6系統雌マウスに卵巣刺激ホルモン(妊馬血清性腺刺激ホルモン; PMSG) 及び黄体形成ホルモン(ヒト絨毛性腺刺激ホルモン; hCG) をそれぞれ個体あたり約5単位、48時間間隔で腹腔内投与して過剰排卵させ、C57BL/6系統雄マウスと交配させた。膣栓確認後、交配後1日目の卵管からマウス受精卵(初期胚)を採取し、上記で得られたphK14-cDNA (V102G) のDNA溶液を、該受精卵の雄性前核に2plずつマイクロインジェクション

した。これを2細胞期までWhitten'sの培地中にて37℃で培養し、偽妊娠の雌ICR系マウスの輸卵管に戻して個体を発生させ、帝王切開により仔マウスを取り出した。得られた仔マウスは、すぐに仮親につけて離乳期まで育てた。

上記で作製したトランスジェニックマウスについて、PCR法を用いてスクリーニングを行った。作製されたトランスジェニックマウスは、出生後3週経過したところで、9個体の尾の先を切り取って、高分子DNA抽出法によりゲノムDNAを抽出し、各DNA60ngを鋳型として、プライマーは、GT-hk14pro-F3:CAGGTAAGTGGTTAAGGTGCAG、AGT-hk14pA-R1:TTATGCAACTCAGATAATGAAGCTG、35サイクルの条件で3353bpの増幅を行った。その後、アガロースゲル電気泳動法を用いて解析、陽性の3個体のすべて雄ファウンダーマウス(F0-005, F0-006, F0-007)を得た。

次に、サザンブロット法を用いて陽性ファウンダーマウスのトランスジェニック遺伝子を定量した。分析用プローブを調製するために、PCR法を用いて、プライマーは、GT-hk14pro-F1:GATATACACACCTCCAAAGCAGGAC、AGT-hk14pA-R3:TCTGCACCTTAACCTAGTTACCTGにより938bpを増幅し、得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により分離した。泳動後のゲルから目的のバンドを切り出し、Sephaglas Band Prep Kit (Pharmacia社製)を用いて精製して、これをランダムプライマー法(Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2; 宝酒造社製)により<sup>32</sup>P-標識して分析用プローブとした。調製した分析用プローブを用いて挿入DNAの内側で一ヶ所のみ切断する制限酵素(BspHI)によりサザンブロットを行った。

得られた皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウスを同週齢の雄マウスと比較した。

## 3. 結果

### 3.1 遺伝子改変マウス MMP-9 発現ベクターの取得

開始コドンから305番目の塩基をTからGに置換することから、102番目のアミノ酸をバリンからグリシンに置換する遺伝子改変MMP-9発現ベクター (pCMV-cDNA (V102G)) を得て、その塩基配列を確認した(図1)。

またこの遺伝子改変マウスMMP-9について、gelatin-

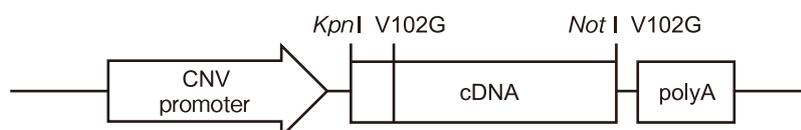


図1 遺伝子改変MMP-9発現ベクター(pCMV-cDNA (V102G))の構築を表す。矢印はサイトメガロウイルスプロモーター配列、cDNAは制限酵素*Kpn*Iと*Not*I切断部に挿入されたマウスMMP-9の、102番目のアミノ酸をバリンからグリシンに置換する遺伝子改変のcDNA配列、polyAは、polyA tail配列を示す。

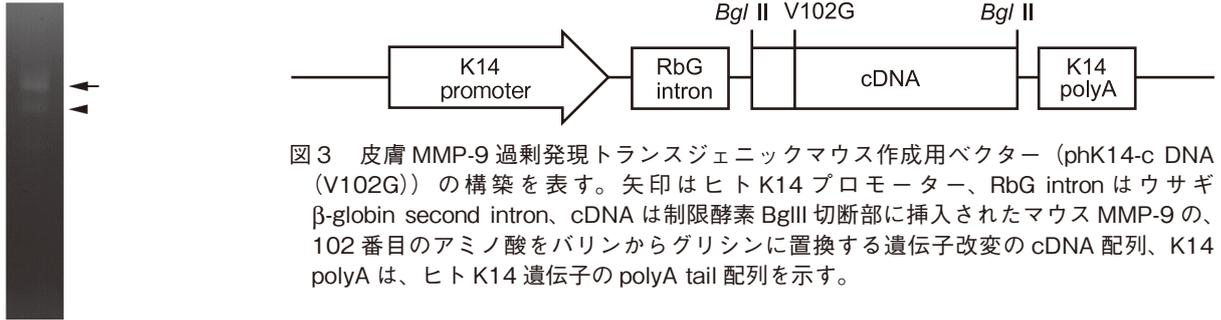


図3 皮膚 MMP-9 過剰発現トランスジェニックマウス作成用ベクター (phK14-c DNA (V102G)) の構築を表す。矢印はヒト K14 プロモーター、RbG intron はウサギ  $\beta$ -globin second intron、cDNA は制限酵素 BglIII 切断部に挿入されたマウス MMP-9 の、102 番目のアミノ酸をバリンからグリシンに置換する遺伝子改変の cDNA 配列、K14 polyA は、ヒト K14 遺伝子の polyA tail 配列を示す。

図2 遺伝子改変 MMP-9 発現ベクター (pCMV-cDNA (V102G)) を用いて培養細胞に遺伝子導入した培養液の gelatin-zymograph 法の結果を示す。gelatinase 活性を持つ MMP-9 のバンドについて、潜在型 (矢印)、活性型 (矢尻) として発現を確認した。

zymograph法を用いて gelatinase 活性を持つ遺伝子改変 MMP-9 発現について、非活性型と、活性型のバンドを確認した (図2)。

### 3.2 K14 プロモーターを用いた遺伝子改変 MMP-9 発現ベクターの取得

ヒト K14 プロモーター、ウサギ  $\beta$ -globin second intron、Kozak 配列、遺伝子改変 MMP-9 cDNA (V102G)、及びヒト K14 polyadenylation signal を直列に連結したものを含む皮膚 MMP-9 過剰発現トランスジェニックマウス作成用ベクター (phK14-cDNA (V102G)) を得た (図3)。

### 3.3 皮膚 MMP-9 過剰発現トランスジェニックマウスの作製と表現型の観察

マウス受精卵 (初期胚) 297 個に、上記で得られた phK14-cDNA (V102G) の DNA 溶液を、該受精卵の雄性前核に 2pl ずつマイクロインジェクションした。うち生存 246 個について 9 体のレシピエントを使用し、7 体に妊娠あり、帝王切開により仔マウスを取り出した。産仔の出生数は 15 体であったが、その後の生存数の関係で 9 個体の尻尾を PCR 法を用いて解析、陽性の 3 個体のすべてファウンダーマウス (F0-005, F0-006, F0-007) を得た (図4A)。またサザンブロット法を行った結果、F0-005、F0-006、F0-007 で band を確認し、特に F0-006 で強いトランスジェニック遺伝子の発現を認めた (図4B)。

得られた皮膚 MMP-9 過剰発現トランスジェニックマウスを同週齢の雄マウスと比較した結果、高発現のトランスジェニック遺伝子を確認した F0-006 マウスで、生後 3 週間より、炎症時一般に伴う異常角化を尻尾や耳に、脱毛を背部に認めた (図5)。

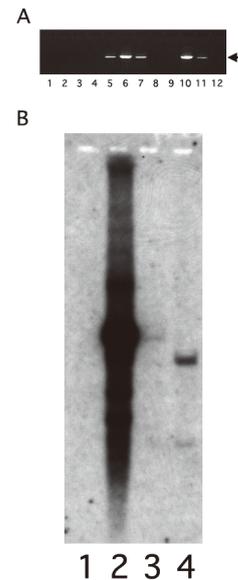


図4 受精卵にマイクロインジェクションを行った後、生まれたマウスについてのトランスジェニック遺伝子発現を解析した (A) PCR 法、(B) サザンブロット法の結果を示す。(A) Lane 1 から 9 は各々、順に F0-001 から F0-009 までのマウス由来 genome DNA を表し、lane 10、11、12 は各々、野生型 genome 1  $\mu$ g に加えてトランスジェニック遺伝子を 100pg、100fg、0g を加えたコントロールを表す。矢印に増幅された陽性バンドを示す。F0-005、006、007 の 3 種のファウンダーマウスを得た。(B) Lane 1 は、野生型 genome、lane 2 は、F0-006、lane 3 は F0-005、lane 4 は F0-007 を示す。3 種類のファウンダーマウスのうち、F0-006 に強い遺伝子導入を認めた。

## 4. 考察

最近の遺伝子改変動物を用いた研究から、様々な蛋白質について各々の生体内での実際の機能が解明されてきた。皮膚科領域で MMP-9 に関するものでは、欠失マウスの解析から、特に多型核白血球由来の MMP-9 が、水疱症の水疱形成<sup>14, 15)</sup>、炎症を伴った癌の浸潤と転移<sup>17, 18)</sup>に関わることが解析されている。

しかしながら MMP-9 は、皮膚の表皮角化細胞が分泌することが示されている<sup>1-3, 6, 8-10, 12, 13, 16)</sup>。今回の研究は表皮角化細胞由来 MMP-9 過剰発現動物モデルを作成することでその働きを解明することを主たる目的に企画された。

マウス MMP-9 は、ヒト MMP-9 と同様に N-末端側のア

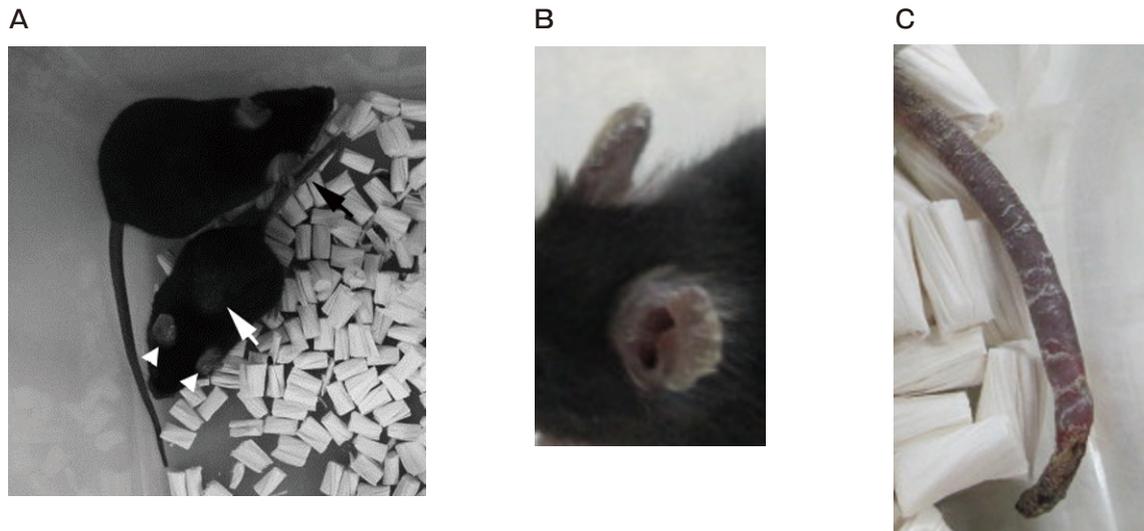


図5 野生型とF0-006の皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウス(MMP-9TG)との表現型の比較を表す。(A)生後10週間で、野生型(上)と比較してF0-006(下)では炎症一般に伴う異常角化を尻尾や耳(白矢尻)に、脱毛を背部(白矢印)に認めた。(B)F0-006の耳の拡大、(C)F0-006の尻尾の拡大をそれぞれ示す。

ミノ酸が分解されることにより活性化を受けて生体内で働くことが知られている<sup>19, 20)</sup>。他のMMPについてもこの活性化を受けるアミノ酸配列は相同性が高く保持されており、活性化を受けるアミノ酸の置換が別のMMPに関する同様の研究でも行われていることから<sup>19, 20)</sup>、今回の研究でも、この活性化が起りやすいように活性化に関わるアミノ酸に変異を加え、その変化を発現ベクターの細胞へのトランスフェクションによる培養上清の分子量で確認した。

ヒトK14のプロモーターは表皮基底層の角化細胞に特異的に蛋白を発現させるための遺伝子領域として知られており<sup>19, 21, 22)</sup>、今回もこれを用いた。他に同様の局在発現させるK5のプロモーターを用いる方法が報告されており<sup>20)</sup>、また分化した角化細胞のみに発現するK1やK10などを使用することも今後試みられる余地がある。

今回、特にMMP-9過剰発現が認められたマウスで、野生型と比較して脱毛、耳や尻尾の過角化を認めた。これらは、MMP-9発現亢進を確認した皮膚の代表的な炎症疾患である湿疹・皮膚炎で認められる所見であるが<sup>11)</sup>、別に、本研究者のこれまでの検討結果により、MMP-9はヒトの皮膚組織で、悪性や良性の異常角化組織、過角化組織での発現を認めている<sup>23-25)</sup>。また培養表皮角化細胞では、高カルシウムの濃度やtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ を添加した分化刺激、ultraviolet (UV) B照射やTNF- $\alpha$ およびinterleukin (IL)-1 $\alpha$ 添加による炎症惹起刺激で、MMP-2と比較してMMP-9が選択的に発現亢進することを解明している<sup>1, 8-10, 26)</sup>。さらに最近、本研究により、この際に起こるMMP-9発現亢進を司るMMP-9プロモーターと分化のマーカースとして知られるインボルクリンのプロモーターとに共通に結合して発現量を抑制する蛋

白がpoly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)であり、このPARP-1が、炎症やアポトーシスに関わるカスパースの働きで分解されることで両者の発現が亢進することを検証した<sup>27)</sup>。もともと分化刺激は炎症時の過角化を含めた角化、表皮角化細胞に運命づけられたプログラムされた細胞死の刺激であり、一種のアポトーシスと考えられる<sup>1)</sup>。また炎症惹起もアポトーシスを起こす刺激として捉えることができる<sup>1)</sup>。今後、交配をしながらさらに表現型を検討する必要があるが、今回の皮膚の変化はこれらアポトーシスに関わるMMP-9の役割を裏付けるものと考えられる。加えてMMPは老化において過剰発現することも示唆されており<sup>1)</sup>、今回の結果は、皮膚の老化とMMP-9との関わりも想定され興味深い。

別に、本マウスを用いることで、皮膚、特に表皮でのMMP-9過剰発現モデルとして、新たな、あるいは既存の抗炎症薬や保湿薬の効果を検証するのに有用であると思われる。

また、毒ガスとして知られるサルファマスタードやナイトロジェンマスタードへの暴露により、MMP-9発現が亢進することが知られており<sup>28)</sup>、これらの化学兵器への暴露動物モデルとしての利用も期待される。

さらに、K14プロモーターに成長ホルモンを発現する過剰発現マウスではマウスの成長そのものに影響を与えることも判明しており<sup>22)</sup>、今後、ホモマウス作成などの際にMMP-9過剰による全身他臓器の表現型検討も必要と考えられる。

なお本研究は、上述したような観点から前職で防衛省の職務発明として認定され、特許出願することとなった(特願：2013-041950)。

## (参考文献)

- 1) Kobayashi T: Gelatinases in the skin. In: Oshiro N, Miyagi E eds: Matrix Metalloproteinases: Biology, Functions and Clinical Implications. Nova Science Publishers, 2012, 99-125.
- 2) 小林孝志：真皮結合組織代謝異常 線維成分異常：玉置邦彦編：最新皮膚科学大系 第10巻「内分泌・代謝異常症 脂肪組織疾患 形成異常症 異物沈着症」、中山書店、2003、2-13.
- 3) 小林孝志：天然分解酵素：田畑泰彦編：遺伝子医学MOOK1 再生医療へのブレイクスルー その技術革新と今後の方向性、メディカル ドゥ、2004、82-87
- 4) Gross J, Nagai Y: Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 1197-1204, 1965.
- 5) Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He C, Bauer EA, Goldberg GI: H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen, J. Biol. Chem., 263, 6579-6587, 1988.
- 6) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI: SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages, J. Biol. Chem., 264, 17213-17221, 1989.
- 7) McCawley LJ, Matrisian LM.: Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! Curr. Opin. Cell Biol., 13, 534-540, 2001.
- 8) Kobayashi T, Hattori S, Shinkai H: Matrix metalloproteinases-2 and -9 are secreted from human fibroblasts, Acta Derm. Venereol., 83, 105-107, 2003.
- 9) 小林孝志：皮膚の炎症性疾患におけるmatrix metalloproteinase-9の役割—Leptomycin B投与による治療の可能性について、炎症・再生, 24, 578-583, 2004.
- 10) Kobayashi T, Shinkai H: Leptomycin B reduces matrix metalloproteinase 9 expression and suppresses cutaneous inflammation, J. Invest. Dermatol., 124, 331-337, 2005.
- 11) Kobayashi T: Is matrix metalloproteinase (MMP)-9 a culprit involved in dermatitis? Increased expression of gelatinolytic activity in allergic contact dermatitis, Contact Dermatitis, 64, 171-172, 2011.
- 12) Kobayashi T, Kishimoto J, Ge Y, Jin W, Hudson DL, Ouahes N, Ehama R, Shinkai H, Burgeson RE: A novel mechanism of matrix metalloproteinase-9 gene expression implies a role for keratinization, EMBO Rep, 2, 604-608, 2001.
- 13) Kobayashi T, Kishimoto J, Hattori S, Wachi H, Shinkai H, Burgeson RE. Matrix metalloproteinase 9 expression is coordinately modulated by the KRE-M9 and 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate responsive elements, J. Invest. Dermatol., 122, 278-285, 2004.
- 14) Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, Senior RM, Werb Z: The serpin  $\alpha$  1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo, Cell, 102, 647-655, 2000.
- 15) 小林孝志：水ぶくれをつくる酵素は？—好中球由来酵素の水疱形成に果たす役割、蛋白質・核酸・酵素, 46, 263-264, 2001.
- 16) Kobayashi T: MMP-9 and TIMP-1 assays in keratinocyte cultures. In: Turksen K ed. Epidermal Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology vol 289, Humana Press, 2005, 201-208.
- 17) Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z: MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis, Cell, 103, 481-490, 2000.
- 18) 小林孝志：癌の発生を促す酵素はどこからくるのか？ 蛋白質・核酸・酵素, 46, 757-758, 2001.
- 19) Krampert M, Bloch W, Sasaki T, Bugnon P, Rülcke T, Wolf E, Aumailley M, Parks WC, Werner S: Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin, Mol. Biol. Cell, 15, 5252-5254, 2004.
- 20) McCawley LJ, Wright J, LaFleur BJ, Crawford HC, Matrisian LM: Keratinocyte expression of MMP3 enhances differentiation and prevents tumor establishment, Am. J. Pathol., 173, 1528-1539, 2008.
- 21) Vassar R, Rosenberg M, Ross S, Tyner A, Fuchs E: Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1563-1567, 1989.
- 22) Wang X, Zinkel S, Polonsky K, Fuchs E: Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 219-226, 1997.
- 23) Kobayashi T, Onoda N, Takagi T, Hori H, Hattori S, Nagai Y, Tajima S, Nishikawa T: Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in normal epidermis and some epidermal tumors, Arch. Dermatol. Res., 288, 239-244, 1996.

- 24) Kobayashi T, Sakuraoka K, Takagi T, Hori H, Hattori S, Nagai Y, Tajima S, Nishikawa T: Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in Hailey-Hailey and Darier's diseases, *Dermatology*, 193, 110-114, 1996.
- 25) Kobayashi T, Sakuraoka K: A case of angiokeratoma circumscriptum: Immunolocalization of matrix metalloproteinase (MMP)-9, *J. Dermatol.*, 25, 391- 394, 1998.
- 26) Onoue S, Kobayashi T, Takemoto Y, Sasaki I, Shinkai H: Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation, *J. Dermatol. Sci.*, 33, 105-111, 2003.
- 27) Kobayashi T: Suppression of matrix metalloproteinase-9 expression in undifferentiated, non-apoptotic keratinocytes is abrogated by the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase-1, *Apoptosis*, 16, 1205-1216, 2011.
- 28) Wormser U, Brodsky B, Reich R: Topical treatment with povidone iodine reduces nitrogen mustard-induced skin collagenolytic activity, *Arch. Toxicol.*, 76, 119-121, 2002.