

## 論文の内容の要旨

論文題目： TGF- $\beta$ はPDGF様ペプチドの産生を介してヒト皮膚線維芽細胞のDNA合成を刺激する。

氏名： 相馬 良直

## 緒言

Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )はmultifunctionalなgrowth factorとして最近注目を集めている。分子量は約25kDaで、2つのポリペプチド鎖がいくつかのS-S結合で結びついたダイマー構造をとっている。ヒトでは血小板の $\alpha$ 顆粒中に大量に存在し、血小板の凝集に伴って放出されるほか、種々の正常細胞や癌細胞より分泌されることが知られている。TGF- $\beta$ は当初軟寒天培地中でNRK細胞（ラット腎由来の線維芽細胞株）のanchorage-independent growthを促進する物質として発見されたが、その後上皮系の細胞、血管内皮細胞、リンパ球などに対しては強い増殖阻止作用があることがわかった。さらにin vitroで線維芽細胞に作用し、コラーゲン、ファイブネクチンなどのマトリックス物質の合成を促進する効果も知られている。in vivoの実験では、新生児マウスの皮下に注射したTGF- $\beta$ が肉芽組織形成作用を示すことや、ラット背部の切創にTGF- $\beta$ を塗布すると治癒が促進されることが示されている。

Platelet-Derived Growth Factor(PDGF)は血小板の $\alpha$ 顆粒中に存在

する growth factor であり、線維芽細胞、平滑筋細胞、グリア細胞など間葉系の細胞に強い活性を持つことが知られている。その主な作用は増殖促進作用と走化性作用である。TGF- $\beta$ と同じく血小板の凝集とともに放出され、創傷治癒や線維化病変の形成などに重要な役割を果たしていると考えられている。構造的にはA鎖とB鎖と呼ばれる2つのポリペプチドが重合したダイマーであり、分子量は約30kDaである。

1986年、LeofらはAKR-2B細胞（マウス線維芽細胞株）において、他の growth factor（PDGFやEGFなど）は刺激後18~20時間をピークとしたDNA合成促進作用を示すが、TGF- $\beta$ は36時間後にDNA合成促進作用を示したとし、さらにTGF- $\beta$ で刺激されたAKR-2B細胞はPDGFのB鎖のmRNAを発現しており、PDGF様活性がその培養上清中に存在することを示した。この自ら産生するPDGF様物質がまた自らを刺激する、いわゆるオートクリンによってTGF- $\beta$ のdelayed mitogenic activityが発現されると考えられている。

このようなTGF- $\beta$ のdelayed mitogenic activityがヒトの線維芽細胞においても見られるか否かは明らかではなかった。そこで我々はヒト皮膚線維芽細胞に対するTGF- $\beta$ の作用を検討した。

## 結 果

### 1. TGF- $\beta$ のdelayed mitogenic activity

confluentになって増殖を停止しているヒト皮膚線維芽細胞にそれぞれ10 ng/mlのTGF- $\beta$ 、PDGF、EGF (epidermal growth factor)を加え、16、36、48時間後に<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みによってDNA合成を測定した(図1)。16時間後ではPDGFとEGFはDNA合成刺激作用を示したがTGF- $\beta$ の作用は現れなかった。一方36時間後、48時間後にはPDGFとEGFの作用は弱くなっていたのに対し、TGF- $\beta$ は強いDNA合成刺激作用を示した。

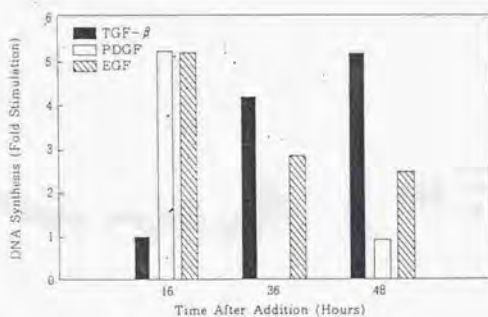


図1 種々のgrowth factorのDNA合成刺激作用

## 2. TGF- $\beta$ によるPDGF様蛋白の合成、分泌刺激

ヒト皮膚線維芽細胞に10ng/mlのTGF- $\beta$ を加え、24時間後の培養上清、細胞質蛋白を12%ポリアクリルアミドゲルに流し、ニトロセルロース膜に転写した後、抗PDGF抗体と反応させてPDGF様蛋白の検出を試みた(図2)。TGF- $\beta$ を加えない場合は何も検出できなかったが、TGF- $\beta$ を加えた場合には培養上清、細胞質蛋白の両方に39, 37, 36kDaの3種のPDGF様蛋白が検出された。EGFやFGF、PDGFではこの作用はみられず、TGF- $\beta$ に特異的な作用であった。

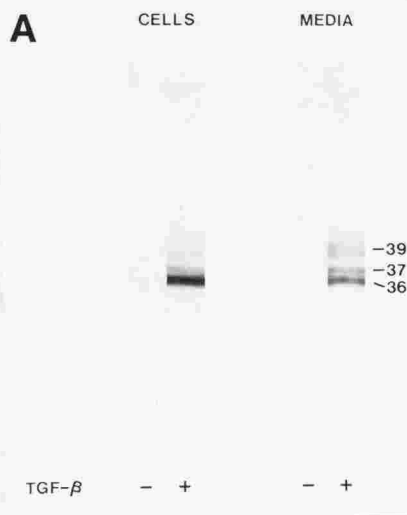


図2 TGF- $\beta$ によるPDGF様蛋白の誘導

### 3. TGF- $\beta$ のdelayed mitogenic activityと抗PDGF抗体

図1に示したTGF- $\beta$ の遅れたDNA合成刺激作用が、自ら分泌するPDGF様物質を介するものであるかどうかを見るために、抗PDGF抗体を加えて実験を行った。NIH/3T3細胞(マウス線維芽細胞株)を用いた予備実験で、我々が用いた抗PDGF抗体はPDGFの活性のみを特異的に中和し、EGF、TGF- $\beta$ 、FGFとは反応しないことが示された。ヒト線維芽細胞では、TGF- $\beta$ のmitogenic activityは約60%が中和された。PDGFの活性は100%中和されたのに対し、EGFの活性は全く変化しなかった。すなわちTGF- $\beta$ のdelayed mitogenic activityは少なくとも部分的には、PDGF様物質を介しているものと考えられた。

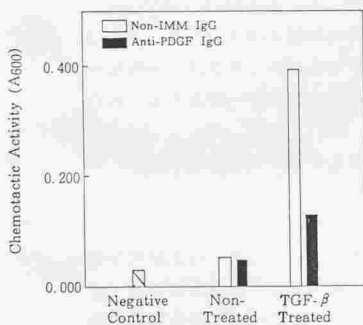


図3 培養上清のchemotactic activity

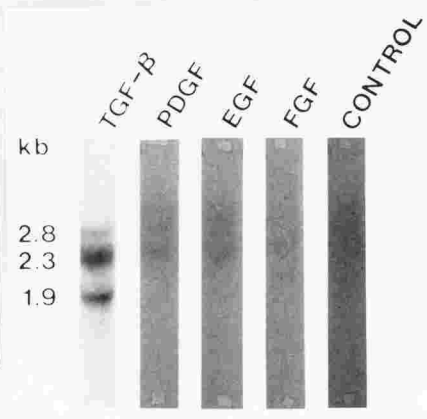


図4 ノーザンブロットによるPDGFのA鎖mRNAの検出

#### 4. 分泌されたPDGF様蛋白の生物学的活性

TGF- $\beta$ で刺激された細胞と刺激されない細胞の培養上清のchemotactic activityを測定した。chemotactic activityはPDGF以外のgrowth factorにはみられない特異的な活性である。図3に示すように、TGF- $\beta$ で刺激された細胞の培養上清のみに活性が見られ、この活性は抗PDGF抗体で大部分中和された。したがって、TGF- $\beta$ で刺激された細胞より分泌されたPDGF様物質は、PDGFとしての生物学的活性を持つものであることが示された。

#### 5. PDGFをコードするmRNAの誘導

様々なgrowth factorで刺激したヒト皮膚線維芽細胞より全RNAを抽出し、プローブとしてPDGFのA鎖、またはB鎖をコードするDNAを用いてNorthern blotを行った。図4に示すようにTGF- $\beta$ で刺激された細胞にのみ、PDGFのA鎖のmRNAが発現していた。3つのサイズのメッセージがみられるが、それらのサイズは過去の報告にあるヒトPDGFのA鎖のmRNAと同一である。B鎖のmRNAは誘導されなかった。

#### 6. in vivoでのTGF- $\beta$ の効果

このTGF- $\beta$ の作用がin vivoでもみられるかどうかを確認するために、次の実験を行った。ラットの皮内に50ngのTGF- $\beta$ あるいはEGFを注射し、指定した時間の後に局所の皮膚を採取、RNAを抽出し、PDGFのA鎖のDNAをプローブとしてドットプロットを行った。TGF- $\beta$ を注射後120分でA鎖のメッセージが最大になった。一方EGFでは、A鎖のmRNAは誘導されなかった。すなわちin vivoでもTGF- $\beta$ はPDGF様蛋白を誘導する可能性が示された。

## 考 按

線維芽細胞、軟骨細胞、内皮細胞、上皮細胞、リンパ球など、ほとんどの細胞はTGF- $\beta$ のリセプターを持つことが知られている。その作用については最近の急速な研究の進展で次々に新知見が加わっているが、標的となる細胞によって作用が異なり、また同一の細胞でも培養条件によって逆の作用を示したりと、実に多彩で不明の点も多い。in vivoでは肉芽組織形成作用や創傷治癒促進作用が知られているが、実際にいかなるメカニズムでこれらの作用が現れるのかはわかっていない。今回我々が示したTGF- $\beta$ のdelayed mitogenic activityはそれらの現象を考える上できわめて重要であろう。たとえば肉芽組織形成には線維芽細胞の遊走が不可欠であるが、TGF- $\beta$ それ自体はchemotactic activityを持っていない。TGF- $\beta$ の刺激によって線維芽細胞より分泌されたPDGF様蛋白が、線維芽細胞の遊走を刺激している可能性がある。また、オートクリンという現象は癌化ときわめて関係が深いと考えられている。TGF- $\beta$ はその名のとおり、細胞を形質転換させ自律増殖機能を失わせる作用があるが、その形質転換作用にこのPDGFを介するオートクリンが働いているかもしれない。





TGF- $\beta$ はPDGF様ペプチドの産生を  
介してヒト皮膚線維芽細胞のDNA合成を刺激する

相馬良直

②

TGF- $\beta$  は PDGF 様ペプチドの産生を介してヒト皮膚線維芽細胞の DNA 合成を刺激する

相馬良直

## 背景、目的

Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は、1978年、軟寒天培地中でNRK細胞(ラット腎由来の線維芽細胞株)のanchorage-independent growthを促進する物質として報告されたのが最初である<sup>1)</sup>。当初は線維芽細胞の増殖刺激に働く因子と考えられていたが、その後上皮細胞<sup>2)</sup>、内皮細胞<sup>3)</sup>、TおよびBリンパ球<sup>4) 5)</sup>に対しては増殖抑制に働くことがわかってきた。また線維芽細胞に作用し、コラーゲン、フィブロネクチンなどのマトリックス物質の合成を促進する効果も知られている<sup>6) 7)</sup>。

TGF- $\beta$ の生理的役割についてはわかっていないが、血小板中に存在し凝集に際して大量に放出される点や<sup>8) 9)</sup>、マクロファージ<sup>10)</sup>、好中球<sup>11)</sup>などの炎症性細胞から放出される点などから、種々の炎症機転や創傷治癒に重要な因子であろうと考えられている。

in vivoの実験では、wound chamberにTGF- $\beta$ を加えるとchamber内のコラーゲン、総蛋白及びDNA合成が増加することや<sup>12) 13)</sup>、新生児マウスの皮下に注射したTGF- $\beta$ が肉芽組織形成作用を示すこと<sup>7)</sup>、ラットの切創にTGF- $\beta$ を塗布すると治癒が促進されることが示されている<sup>14)</sup>。

このようなin vivoでの作用を説明するには、TGF- $\beta$ の線維芽細胞に対する作用を調べる必要がある。しかし、線維芽細胞に対するTGF- $\beta$ の作用の研究には、これまで主にNRKやNIH/3T3といった、マウスより樹立された線維芽細胞株が用いられてきた。これらの細胞は無限増殖可能な樹立細胞系であり、通常のdiploidの細胞とは異った増殖形態を持つものと考えらるべきである。TGF- $\beta$ の生理的役割を調べるためには当然正常組織より得られた初代培養の細胞を用いるべきであるが、これまでにそのような研究はほとんどなされていない。

そこで、筆者は、TGF- $\beta$ の正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する作用を明らかにする目的で、以下の研究を行った。

## 材料及び方法

### 1) 細胞培養

新生児包皮よりヒト皮膚線維芽細胞を得、10%ウシ胎児血清(FBS)を加えたDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)中で、90%大気、10%CO<sub>2</sub>下で

培養した。NIH/3/3 細胞は、米国National Cancer Institute のDr. S. Aaronson より分けて頂き、同じ条件で培養した。

## 2) growth factor と抗PDGF抗体

PDGF及びTGF- $\beta$ は、確立された方法を用い、ヒト血小板より分離精製した<sup>10, 11)</sup>。双方とも、SDS-PAGE、アミノ酸組成、N末端のアミノ酸配列分析により、95%以上の純度を持つことが確認されている。マウスEGFはBiomedical Technologies社(Stoughton, MA)から、acidic FGFはSigma Chemical Company (St. Louis, MO.)より購入した。精製されたヒトPDGFにて免疫したヤギの血清より、既述の方法<sup>10)</sup>によって抗PDGF IgGを得た。

## 3) ウェスタンブロット

検体を10%あるいは12%のSDS ポリアクリルアミドゲルに電気泳動したのち、ニトロセルロースフィルターに転写した。2.5mg/mlのノンファットドライミルクを溶かしたTBS (100mM NaCl, 50mM トリス-HCl, pH7.4)中で4時間、ブロッキングを行ったのち、15 $\mu$ g/mlの抗PDGF IgGと一晩反応させた。フィルターをTBS ミルクで5回洗浄し、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識アフィニティ精製ウサギ抗ヤギIgG (KPL社より購入)を1000倍に希釈し90分反応、5回TBSで洗浄したのち、NBT、BCIPを基質として発色させた。反応はすべて室温で行った。

## 4) <sup>3</sup>H-チミジンとりこみ試験

線維芽細胞を24穴プレートに培養し、confluent になってから3~4日後に実験を行った。growth factor を直接加え、指定する時間ののちに<sup>3</sup>H-チミジンを2 $\mu$ Ci/ml加え2時間ラベルした。4℃のPBSで3回、5%TCAで5回細胞を洗い、不溶物を0.1N NaOH/0.1% SDSで溶解し、シンチレーションカウンターで放射性活性を測定した。

## 5) ケモタキシスアッセイ

modified Boyden chamber を用いて以下の様に行った。検体をDMEM/0.2mg/ml BSAに溶かして下のwellに入れ、コラーゲンをコートしたポリカーボネートフィルター(径8 $\mu$ mの小孔を持つもの)でカバーした。その上のwell

に、直前に培養プラスチックからトリプシンで遊離させた線維芽細胞の浮遊液 ( $4 \times 10^6$  cells/ml) を加え、37°Cで4時間インキュベートした。フィルターをとりだしてDiff-Quick染色で染色し、フィルター上面に乗っている細胞をラバーポリスマンで取り除いた。フィルター下面に残っている細胞を直接顕微鏡で数えるか、または0.1N HClで抽出し、その吸光度(600nm)をELISAメーターで測定した。

#### 6) RNA単離とノーザンブロット

ヒト皮膚線維芽細胞から全RNAを、guanidinium thiocyanate およびCsCl<sub>2</sub>超遠心<sup>17)</sup>によって単離した。20μgの全RNAを、アガロースノホルムアルデヒドゲルに電気泳動した後、ニトロセルロースフィルターに転写した。このフィルターを、PDGFのA鎖のcDNA(ハーバード大学 Dr.T.Collinsより供与されたもの)あるいはv-sis(Oncor社)とハイブリダイズした。<sup>32</sup>Pによるラベリングは、Boehringer Mannheim Biochemicals社のRandom Primer Labelling Kitを用いて行った。オートラジオグラフィは-70°C、72時間、コダックX線フィルムと増感紙を用いて行った。

#### 7) ラット皮膚からのRNA単離とドットブロット

50ngのTGF-βあるいはEGFをラットに皮内注射し、所定の時間のうちに注射部位の皮膚を径3mmのパンチで採取した。皮膚片をホモジナイズし、全RNAをChirgwinらの方法<sup>17)</sup>により抽出した。これをニトロセルロースフィルターにドットブロットし、<sup>32</sup>PでラベルしたPDGFのA鎖のcDNAとハイブリダイズ、オートラジオグラフィを行った。

### 結 果

#### 1) TGF-βのdelayed mitogenic activity

TGF-βの線維芽細胞に対するmitogenic activityについては、AKR-2B細胞(マウス線維芽細胞)を使った実験の報告がある<sup>18)</sup>。彼らは、AKR-2B細胞において、他のgrowth factor(PDGFとEGF)は刺激後18~20時間をピークとしたDNA合成刺激作用を示すが、TGF-βは36時間後にDNA合成促進作用を示すと報告した。

そこで筆者はヒト皮膚線維芽細胞に対するTGF- $\beta$ のmitogenic activityについて検討した。confluent になって増殖を停止している初代培養のヒト包皮線維芽細胞にそれぞれ10ng/mlのTGF- $\beta$ 、PDGF、EGFを加え、16、36、48時間後に $^3\text{H}$ -チミジンで2時間ラベルし、DNA合成を測定した(Fig. 1)。16時間後ではPDGFとEGFはDNA合成刺激作用を示したが、TGF- $\beta$ の作用は現われなかった。一方36時間後、48時間にはPDGFとEGFの作用は弱くなっていたのに対し、TGF- $\beta$ は強いDNA合成刺激作用を示した。このように、TGF- $\beta$ はヒト皮膚線維芽細胞に対しmitogenic activityを持つものの、その作用はPDGFやEGFに比べ遅れて発現してくることが明らかとなった。

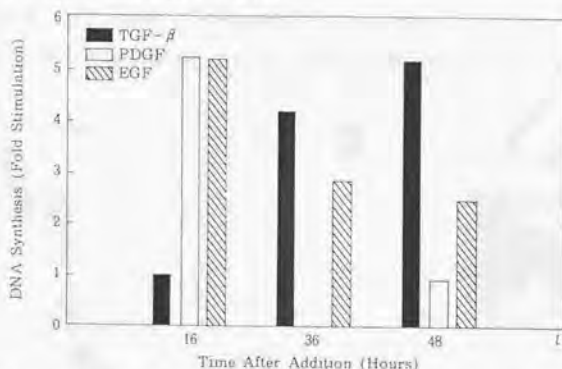


Fig. 1. Effect of TGF- $\beta$ , PDGF, and EGF on DNA synthesis in human foreskin fibroblasts. TGF- $\beta$  (2 ng/ml), PDGF (5 ng/ml), or EGF (2 ng/ml) was added to confluent cultures of foreskin fibroblasts in a 24-well plate. After the indicated times, cells were labeled with 2  $\mu\text{Ci/ml}$  of  $^3\text{H}$ -thymidine for 2 hours and incorporated radioactivity was measured as described under Materials and Methods. These results are representative of three separate experiments.

## 2) TGF- $\beta$ によるPDGF様蛋白の合成、分泌刺激

Leofら<sup>19)</sup>は、AKR-2B細胞において、TGF- $\beta$ はPDGF様物質の分泌を刺激することを示し、TGF- $\beta$ のdelayed mitogenic activityは、自ら産生するPDGF様物質を介してのautocrineメカニズムによって引き起こされるのではないかと述べた。ヒト皮膚線維芽細胞においてもTGF- $\beta$ によりPDGF様物質の産生が誘導されるか否かを調べる目的で、次の実験を行った。

confluentのヒト包皮線維芽細胞を、10ng/mlのTGF- $\beta$ を含む無血清培地あるいは含まない無血清培地中で24時間培養し、培養上清と細胞を回収した。次に

これらの中に含まれるPDGF様蛋白を、抗PDGF抗体を用いたウェスタンブロットで検出した (Fig. 2 A)。TGF- $\beta$ を加えない場合には何も検出できなかったが、TGF- $\beta$ を加えた場合には培養上清、細胞質蛋白の両方に39、37、36KDaの3種のPDGF様蛋白が検出された。

1987年、PaulssonらはPDGF及びEGFにより、ヒト線維芽細胞にPDGFのA鎖のmRNAが誘導され、PDGF様蛋白の産生が刺激されると報告した<sup>20)</sup>。そこで筆者は、PDGF、EGF、FGFの効果調べた (Fig. 2 B,C)。その結果PDGF様蛋白の合成はTGF- $\beta$ で刺激した場合のみに見られ、他のgrowth factorで刺激した場合にはcontrolと差がなかった。これはあるいは、筆者の方法の感度が足りないためかもしれないが、少なくともPDGF様蛋白の合成刺激という面において、TGF- $\beta$ の効果はPDGFやEGFの効果よりもはるかに強いと考えられた。

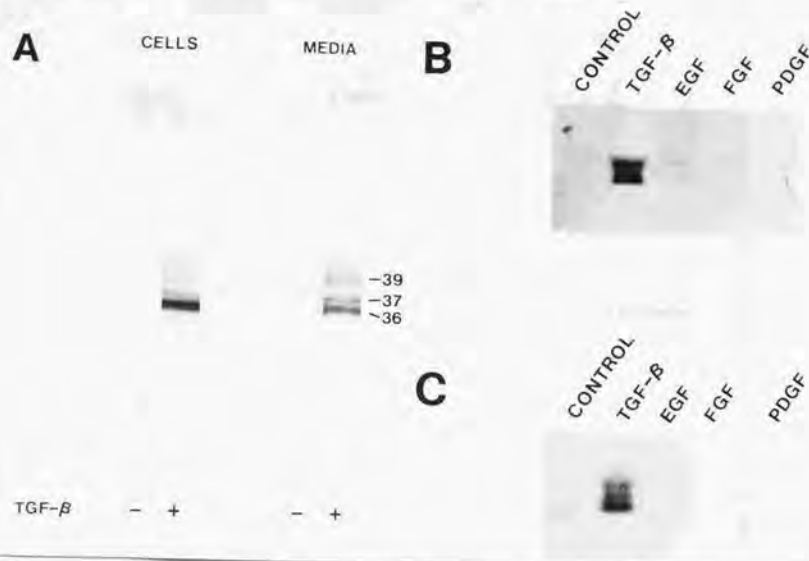


Fig. 2. Western blot analysis of PDGF-like proteins produced by human foreskin fibroblasts. A: Confluent cultures of foreskin fibroblasts were incubated with DMEM containing 0.1 mg/ml BSA with or without 10 ng/ml of TGF- $\beta$ . After 24 hours of incubation, medium and cells were harvested. Conditioned medium and cell extracts, both derived from  $2.5 \times 10^5$  cells, were applied on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and underwent western blot analysis. B, C: Conditioned media (B) and cell extracts (C) from foreskin fibroblasts treated with TGF- $\beta$ , EGF, PDGF, or FGF were prepared as described in A and western blot analysis was carried out. Concentrations of all growth factors were 10 ng/ml. These results are representative of four separate experiments.

次にTGF- $\beta$ の作用のdose-responseについて調べた (Fig. 3)。TGF- $\beta$ の濃度が0.5ng/ml以下ではPDGF様蛋白は検出できなかった。0.5ng/mlから5ng/mlでは直線的に増加し、5~10ng/mlの濃度で最大となった。

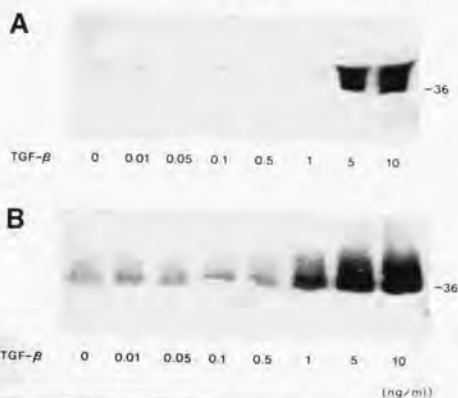


Fig. 3. Dose response of TGF- $\beta$ . Confluent foreskin fibroblasts were incubated in DMEM containing 0.1 mg/ml BSA with various concentrations of TGF- $\beta$ . After 24 hours, media (A) and cells (B) were collected and analyzed with western blot. These results are representative of two separate experiments.

### 3) TGF- $\beta$ のdelayed mitogenic activityと抗PDGF抗体

これまでの実験により、TGF- $\beta$ の刺激によってヒト皮膚線維芽細胞がPDGF様蛋白を産生、分泌することが明らかとなった。TGF- $\beta$ のmitogenic activityが、このPDGF様物質を介するautocrineによるのか、あるいは全く別の機序が存在するのかどうかを確認する目的で、抗PDGF抗体を用いた中和試験を行った。confluentのヒト皮膚線維芽細胞にTGF- $\beta$ を加え、同時に抗PDGF抗体を加えた場合と加えなかった場合においてDNA合成に差があるかどうかを検討した。前述のごとく、TGF- $\beta$ のmitogenic activityは遅れて発現するため、加えてから48時間後のDNA合成を測定した (Table 1)。その結果、TGF- $\beta$ のmitogenic activityは抗PDGF抗体によって約60%が中和された。対照としてPDGF及びEGFのmitogenic activityが抗PDGF抗体によりどのように変化するかを調べた。これらのgrowth factorは刺激後16時間で強いmitogenic activityを示すため、加えてから16時間後のDNA合成を測定した。その結果PDGFの活性は抗PDGF抗体でほぼ



100%が中和されたのに対し、EGFの活性は抗PDGF抗体で変化しなかった (Table 1)。

これらの結果を評価するためには、①用いたTGF- $\beta$ にPDGFが混入していないか、②用いた抗PDGF抗体がTGF- $\beta$ その他のgrowth factorとcross-reactしないかどうかの2点を確認しておくことが重要である。最初の疑問に答えるため、50ngのTGF- $\beta$ と0.1ngのPDGFをポリアクリルアミドゲルに流し、抗PDGF抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、0.1ngのPDGFは30kDa付近に明瞭なバンドを形成したが、50ngのTGF- $\beta$ ではバンドは見られなかった。従って用いたTGF- $\beta$ 中には、PDGFが混入していたとしても0.2%以下であることが確認された。また第2の疑問に答えるため、NIH/3T3細胞を用いた実験を行った (Table 1)。この細胞に対しては、TGF- $\beta$ は刺激後16時間でDNA合成促進作用を示したが、抗PDGF抗体によりその作用はほとんど影響を受けなかった。またこの抗体はPDGFの作用を100%中和する一方、EGFやFGFの活性には影響しなかった。この結果から、ここで用いている抗PDGF抗体の特異性が確認できた。

以上より、ヒト皮膚線維芽細胞に対するTGF- $\beta$ のmitogenic activityは、少なくとも部分的にはPDGF様活性によるものと考えた。抗体による中和効果が50%にとどまった理由については後ほど考察する。NIH/3T3細胞 (マウス線維芽細胞株)を用いた実験では、TGF- $\beta$ の作用は抗PDGF抗体の影響を受けなかったが、ここで用いた抗体はヒトPDGFに対するものであり、マウスPDGFと反応するかどうかを確認していないため、抗体がTGF- $\beta$ のmitogenic activityを中和しないからと言って、マウスにおけるPDGFのautocrineの存在を否定することはできない。

Table 1. Neutralization of TGF- $\beta$  DNA synthesis activity with anti-PDGF antibody

Cell type	Growth factor added	Stimulation period	Fold stimulation of DNA synthesis		%Inhibition by antibody
			Control	Anti-PDGF	
Human fibroblast	TGF- $\beta$ (2 ng/ml)	48h	2.36	1.64	53
	TGF- $\beta$ (5.0ng/ml)	48h	1.60	1.24	60
	PDGF (5.0ng/ml)	18h	7.66	0.78	103
	EGF (10 ng/ml)	18h	9.47	10.31	0
NIH/3T3	TGF- $\beta$ (10 ng/ml)	18h	3.43	3.17	11
	PDGF (10 ng/ml)	18h	4.13	1.22	93
	EGF (10 ng/ml)	18h	4.65	4.85	0
	FGF (10 ng/ml)	18h	2.12	2.19	0

The mitogenic activity of the indicated growth factors was determined in the presence of 60  $\mu$ g/ml of anti-PDGF IgG or non-immune IgG. All studies were performed in duplicate and the results varied by less than  $\pm 15\%$  in each condition. Data are expressed as fold stimulation above non-growth-factor-treated controls. These results are representative of three separate experiments.

#### 4) PDGF様蛋白の産生、分泌の時間動態

ヒト皮膚線維芽細胞の培養上清を10ng/mlのTGF- $\beta$ を含んだ無血清培地に交換した時点をも0時間とし、その後細胞内及び培養上清中のPDGF様蛋白の量がどのように変化するかを調べた (Fig. 4)。細胞質においては1時間後にすでにPDGF様蛋白の合成がみられ、8時間後までは急速に増加、24時間後にピークとなるが、36時間後にはやや低下している。一方培養上清では1時間後にはまだPDGF様物質は検出できず、8時間後までは急速に増加し、36時間後まで少しずつ増加するという結果であった。

このことからPDGF様蛋白は細胞内で合成されてからやや遅れて、培養上清中に分泌されることがわかった。分泌されたPDGF様蛋白がPDGFリセプターに結合して自らのDNA合成を刺激するといったautocrineが働いていると考え、TGF- $\beta$ のmitogenic activityがPDGFを直接加えた場合より遅れて現われるという観察を合理的に説明できると思われた。

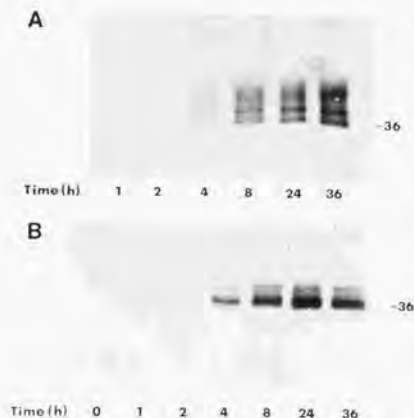


Fig. 4. Kinetics of induction of PDGF synthesis and secretion by TGF- $\beta$ . Confluent cultures of foreskin fibroblasts were cultured in DMEM containing 0.1 mg/ml BSA in the presence of 10 ng/ml TGF- $\beta$ . After indicated times media (A) and cells (B) were collected and analyzed with western blot. These results are representative of three separate experiments.

#### 5) 分泌されたPDGF様蛋白の生物学的活性

ヒト線維芽細胞により分泌されたPDGF様蛋白の分子量は36~39KDaで、血小板から精製されたPDGFの分子量(30KDa)より大きく、異なる分子構造を持つもの

と思われる。従ってこの物質がPDGFとしての生物学的活性を示すかどうか確認しておくことが重要である。

PDGFの生物学的活性の検出法としてはmitogenic assay 及びchemotaxis assay が知られている。通常前者がよく用いられているがこの場合はあまり適当でない。なぜならばこの場合、検体となる培養上清にTGF- $\beta$ が加えてあり、そのTGF- $\beta$ が持つmitogenic activityがPDGF様蛋白の活性をマスクしてしまう可能性があるからである。

そこで筆者はchemotaxis assayを選択した。アッセイにはNIH/3T3細胞を使用した。まず予備実験として、TGF- $\beta$ は1 pg/mlから10 ng/mlの濃度でchemotactic activityを持たないこと (Fig. 5)、PDGFは強い活性を示し、その活性は抗PDGF抗体で完全に中和できること、10 ng/mlのTGF- $\beta$ が混在していてもPDGFのchemotactic activityに影響を与えないことを確認した。そしてTGF- $\beta$ を加えたヒト線維芽細胞の培養上清及びTGF- $\beta$ を加えない培養上清のchemotactic activityを測定した。意外なことに両者とも強い活性を示し、その活性は抗PDGF抗体で中和されなかった。線維芽細胞に対し走化性に働く物質としてはPDGFの他にフィブロネクチンとコラーゲンが知られている。細胞より分泌されたこれらの物質、特にフィブロネクチンがPDGF様蛋白の活性をマスクしているのではないかと考え、熱及び酸処理によりフィブロネクチンを不活化した培養上清を用いて実験を行った (Fig. 6)。その結果、TGF- $\beta$ を加えた細胞の培養上清のみが強い活性を示し、その約70%が抗PDGF抗体で中和された。TGF- $\beta$ を加えない細胞の培養上清にもわずかに活性がみられたが、抗PDGF抗体により変化しなかった。これらの結果から、TGF- $\beta$ の刺激によりヒト線維芽細胞から分泌されたPDGF様物質が、PDGFとしての生物学的活性を持つことが示された。抗PDGF抗体により活性が完全に中和できなかったのはおそらく、熱、酸に抵抗性のコラーゲンが原因でないかと考えられる。TGF- $\beta$ によりコラーゲンの分泌が刺激されることが知られており、TGF- $\beta$ を加えた培養上清に、PDGF以外のchemotactic activityが対照の培養上清に比多く含まれている実験結果をよく説明できる。

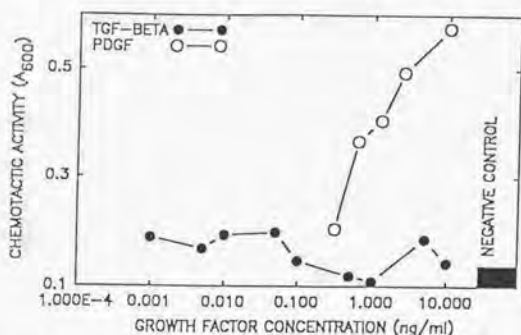


Fig. 5. Chemotactic response of NIH/3T3 to PDGF and TGF- $\beta$ . The chemotactic response of NIH/3T3 cells was determined as described under Materials and Methods. PDGF elicited a dose-dependent increase in the directed migration of the target cells whereas TGF-beta did not. These results are representative of six separate experiments.

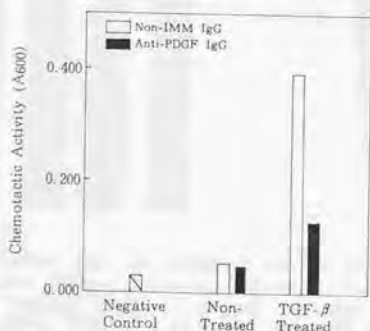


Fig. 6. Chemotactic response of NIH/3T3 cells to the conditioned media. Serum-free conditioned media from nontreated or TGF- $\beta$ -treated human fibroblasts were dialyzed against 0.5 N acetic acid, heated at 100°C for 10 minutes, and fourfold concentrated. Chemotactic response was determined in the presence of 60  $\mu$ g/ml of nonimmune goat IgG or 60  $\mu$ g/ml of anti-PDGF IgG. Similar results were obtained in two other experiments.

#### 6) TGF- $\beta$ によるPDGFのA鎖のmRNAの誘導

TGF- $\beta$ の刺激によりヒト皮膚線維芽細胞がPDGF様物質を産生することがわかったので、RNA レベルでの検討を行った。

confluent のヒト線維芽細胞を各種の growth factor を加えた無血清培地で 24 時間培養したのち、細胞より全 RNA を抽出、ノーザンブロットを行った。(Fig. 7) その結果 TGF- $\beta$  で刺激した場合のみ、1.9、2.3、2.8 kb の PDGF の A 鎖の mRNA が発現されていた。一方 PDGF の B 鎖は検出されなかった。この実験では 3 つのサイズの A 鎖の mRNA がみついているが、過去の報告<sup>21)</sup> でも常に全く同様のパターンとなっている。これが splicing によるのか、その他の理由によるものかはまだ調べられていない。

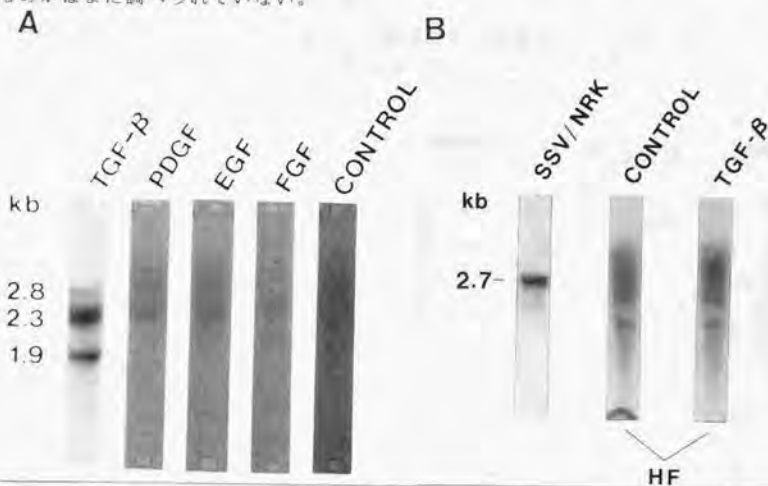


Fig. 7. A: Induction of PDGF A-chain gene expression by TGF- $\beta$ . Confluent human foreskin fibroblasts were incubated in serum-free media with 10 ng/ml of TGF- $\beta$ , PDGF, EGF, or FGF for 24 hours. Total RNA was isolated from the cells, electrophoresed in agarose gel, and transferred onto nitrocellulose filters. The filters were then hybridized with <sup>32</sup>P-labeled PDGF A-chain cDNA. B: Induction of PDGF B-chain gene. Identical samples of total RNA from the human foreskin fibroblasts used in the PDGF A-chain experiments (control and TGF- $\beta$  treated) were probed with a v-sis probe as described under Materials and Methods. No transcripts were detected after exposure of the film for 8 days at -70°C using an intensifying screen. A control lane on the same blot is shown for SSV/NRK cells (20  $\mu$ g total RNA), which was exposed for only 48 hours. Equivalent amounts of RNA were transferred and no degradations had occurred based on the staining of ribosomal RNA on the blotted filters.

次に *in vivo* でも同様のことが起こりうるか調べるため、次の実験を行った。まず  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の EGF あるいは  $\text{TGF-}\beta$  を含む生理食塩水を用意した。そして  $25 \mu\text{g}$  (growth factor  $50\text{ng}$  を含む) の  $\text{TGF-}\beta$ 、EGF、コントロールの生理食塩水をラット背部の皮内に注射し、指定する時間ののちに注射部位の皮膚を  $3\text{mm}$ パンチで採取した。この皮膚片から全 RNA を抽出、ドットプロットにて PDGF の A 鎖の mRNA を検出した (Fig. 8)  $\text{TGF-}\beta$  を注射した部位では、注射後 120 分をピークとした陽性所見が得られたが、EGF ではその作用はみられなかった。また図には示さなかったが、生理食塩水の注射では何の効果もみられなかった。以上により  $\text{TGF-}\beta$  は *in vivo* でも PDGF の A 鎖の mRNA を誘導することが示された。

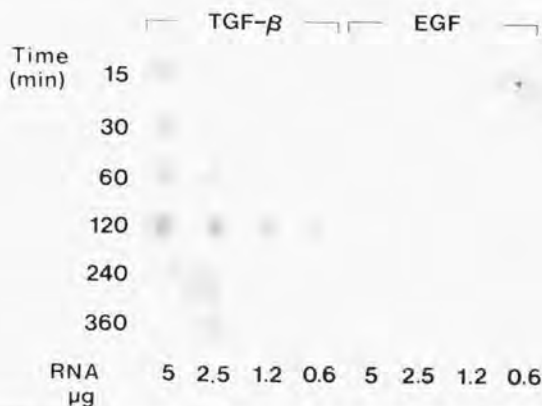


Fig. 8. Induction of PDGF A-chain gene by  $\text{TGF-}\beta$  *in vivo*;  $50 \text{ ng}$  of  $\text{TGF-}\beta$  or EGF was injected intradermally in rats and after the indicated times, skin of the injected area was harvested by using a  $3 \text{ mm}$  skin punch. Total RNA was extracted from the skin and filtered through nitrocellulose. The filters were then hybridized with  $^{32}\text{P}$ -labeled PDGF A-chain cDNA.

#### 7) $\text{TGF-}\beta$ の chemotactic activity

$\text{TGF-}\beta$  の線維芽細胞に対する chemotactic activity については Postlethwaite ら<sup>22)</sup> の報告がある。彼らは、 $\text{TGF-}\beta$  は  $5 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲で、ヒト線維芽細胞に対して chemotactic activity を持つと報告した。使用した線維芽細胞の origin は、論文中に示されていない。先に述べた予備実験の中で、筆者は  $\text{TGF-}\beta$  が

NIH/3T3 細胞に対して chemotactic でないことを確認しており、Postlethwaite らの報告に疑問を感じたため、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて TGF- $\beta$  の chemotactic activity を測定した (Fig. 9)。その結果 TGF- $\beta$  は 50pg/ml から 10ng/ml の範囲で活性を示さなかった。それに対し陽性対照として調べた PDGF は、濃度依存性に強い活性を示した。すなわち、少なくとも筆者が用いたアッセイ法では、TGF- $\beta$  の chemotactic activity は測定できなかった。

筆者は modified Boyden chamber を用いており、Postlethwaite らが記している方法とほとんど同じである。なぜこのように全く異なる結果がでたのかについては、不明であると言わざるを得ない。

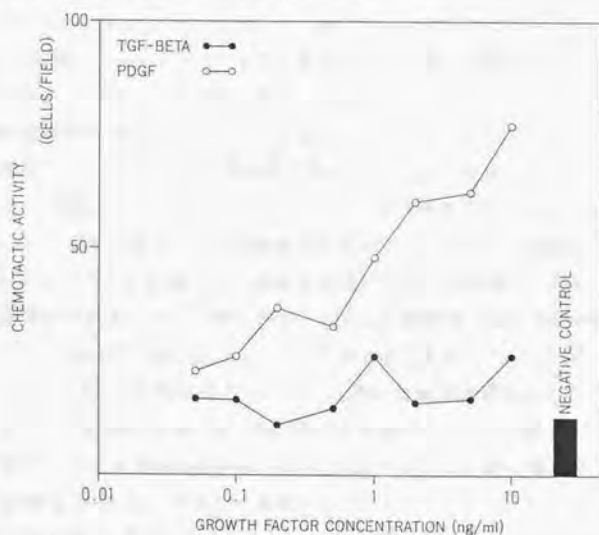


Fig. 9. Chemotactic response of human skin fibroblasts to PDGF and TGF- $\beta$  was determined as described under Materials and Methods. These results are representative of two separate experiments.

## 考 案

Platelet-derived Growth Factor (PDGF) は血小板の $\alpha$ 顆粒中に存在する growth factor であり、線維芽細胞、平滑筋細胞、グリア細胞などの間葉系の細胞に強い活性を持つことが知られている。その主な作用は mitogenic activity と chemotactic activity である<sup>23)</sup>。TGF- $\beta$  と同じく血小板の凝集とともに放出され、創傷治癒や線維化病変、動脈硬化などに重要な役割を果たしていると考えられている。構造的には A 鎖と B 鎖と呼ばれる 2 つのポリペプチド鎖が重合したダイマーであり、血小板から単離された PDGF の分子量は約 30 kDa である。A のホモダイマー、B のホモダイマー、A と B のヘテロダイマーすべてに PDGF としての活性があることがわかっているが、各々のモノマーには活性はない<sup>24)</sup>。ヒトにおける PDGF の source としては血小板以外には血管内皮細胞<sup>25)</sup>、活性化されたマクロファージ<sup>26)</sup> などが PDGF 様物質を分泌することが知られているが、それらの PDGF 様物質の構造についてよくわかっていない。

筆者は、TGF- $\beta$  がヒト皮膚線維芽細胞に対し mitogenic activity を持つものの、その発現は他の growth factor に比しやや遅れていることを示した。接触阻害により増殖を停止している細胞は大部分が G<sub>0</sub> か G<sub>1</sub> の phase にあるはずであるが、PDGF や EGF を加えると 10 数時間後には多くの細胞が S 期にはいり、DNA 合成が開始される。それに対して TGF- $\beta$  では 36 時間後に DNA 合成が開始していることから、遅れて S 期にはいっていくものと思われる。

次いで、TGF- $\beta$  を加えることにより、PDGF 様物質の産生がおこることを示した。そして、抗 PDGF 抗体により TGF- $\beta$  の mitogenic activity が約 60% 中和されたことから、TGF- $\beta$  の mitogenic activity は少なくとも部分的には PDGF 様物質を介した autocrine によるものと考えた。

PDGF の B 鎖の cDNA は、simian sarcoma virus (SSV) の持つ v-sis oncogene に対応する proto-oncogene である c-sis と同一である<sup>27)</sup>。そして SSV による癌化は PDGF の B ホモダイマー類似物質を介しておこることが明らかにされており<sup>28)</sup>、autocrine による癌化のモデルと考えられている。SSV により癌化した細胞に抗 PDGF 抗体を加えると、その増殖は 50% 程度が抑えられるものの完全には抑えられない。その理由としては、細胞内で PDGF リセプターを活性化してしまうためであるという説が有力であり<sup>29)</sup>、活性化されたりセプターが細胞表面に位置することにより初めて増殖のシグナルが伝えられるものと考えられている<sup>30)</sup>。



これらの観察から考えて、TGF- $\beta$ の刺激により線維芽細胞内で合成されたPDGF様物質は、細胞内でPDGFリセプターを活性化することができると考えられる。今回の実験でTGF- $\beta$ のmitogenic activityが抗PDGF抗体で約60%しか中和できなかったのはこのためであろうと考えた。

線維芽細胞から分泌されたPDGF様物質はPDGFとしての生物学的活性を持つことが確認され、これらの結果はTGF- $\beta$ の刺激によりヒト線維芽細胞にautocrine刺激が働くことを強く示唆している。また、PDGF様物質の産生、分泌の時間動態も、この仮説によく一致していた。

Leafらは、AKR-2B細胞にTGF- $\beta$ を加えるとPDGFのB鎖のmRNAが誘導されることを報告した<sup>19)</sup>。彼らはA鎖については調べていない(A鎖のcDNAは当時まだクローニングされていなかった)。筆者の実験ではA鎖のみが検出されB鎖は検出されなかったが、この違いはおそらくAKR-2B細胞は樹立された細胞株であるためにその増殖形態が初代培養の細胞と異なるためであろうと考えられる。筆者の結果の方がよりin vivoでの反応に近いものと思われる。事実ラットを用いたin vivoの実験でも、A鎖のmRNAが誘導されることが確認された。

Paulssonら<sup>20)</sup>は、ヒト皮膚線維芽細胞をPDGFやEGFで刺激するとPDGFのA鎖のmRNAが誘導されるがB鎖は誘導されないと報告した。彼らはTGF- $\beta$ の効果については報告していない。筆者の実験では刺激後24時間でA鎖のmRNAを誘導していたのはTGF- $\beta$ のみであった。Paulssonらは刺激後2時間や4時間といった早期にA鎖のmRNAが誘導されることを示しており、おそらく24時間後ではPDGFやEGFの効果を見るのに遅すぎたのであろう。すなわち、TGF- $\beta$ でのみ、持続的にA鎖のmRNAが検出されるものと思われる。TGF- $\beta$ で誘導されたA鎖のmRNAが果たして転写の過程での増幅によるのか、RNAの安定化によるものかどうかは不明であるが、PDGFやEGFで刺激した場合に比べ、長時間持続して検出されるということは、後者の可能性を示唆するものかもしれない。

もう一つ検討すべき問題は線維芽細胞から分泌されたPDGF様蛋白が、純粋なA鎖の産物なのか、あるいは別の遺伝子の産物なのかという点である。既に示した様にヒト線維芽細胞ではA鎖のmRNAのみが検出されるため、Aのホモダイマーが産生されていると考えるのが自然である。A鎖には糖鎖の結合する領域があり、その違いにより3つの異なる分子量のPDGF様蛋白が得られたのかもしれない。しかしこの点についてははっきりした証拠はなく、分子生物学的手法によって明らかにされていくべき問題である。

最後に筆者は、TGF- $\beta$ それ自体は線維芽細胞に対しchemotacticに働かないことを示した。in vivoでのTGF- $\beta$ の作用である肉芽組織形成、創傷治癒促進の過程には、線維芽細胞の遊走が不可欠であり、従来知られていたTGF- $\beta$ の作用のみでこの現象を説明することはできない。ここで筆者が示したPDGF様物質を介したautocrine（あるいはparacrine）が重要となるだろう。すなわちTGF- $\beta$ の刺激により線維芽細胞のautocrine増殖が刺激され、分泌されたPDGF様物質が更に近隣の線維芽細胞の遊走を刺激するというメカニズムがin vivoにおいて重要な役割を果たしているものと思われる。

TGF- $\beta$ はその名の通り線維芽細胞をtransformさせる因子であるが、どのようなメカニズムでtransformationが起こるのかは不明である。筆者が示したPDGF様物質を介したautocrineは、TGF- $\beta$ によるtransformationを考える上で極めて重要な手がかりと言えるだろう。

#### まとめ

TGF- $\beta$ はヒト皮膚線維芽細胞に対しDNA合成刺激作用を持つが、その作用は他のgrowth factorに比べ遅れて発現した。TGF- $\beta$ のDNA合成刺激作用は抗PDGF抗体で阻害されることから、線維芽細胞により合成、分泌されるPDGF様蛋白がDNA合成刺激に関与しているものと思われた。PDGFやEGF、FGFなどのgrowth factorで刺激しても、PDGF様蛋白の合成は認められなかった。TGF- $\beta$ で刺激したヒト線維芽細胞ではPDGFのA鎖の遺伝子が誘導されるが、B鎖の遺伝子は誘導されなかった。ラット皮膚にTGF- $\beta$ を皮内注射すると、注射部位にPDGFのA鎖の遺伝子が誘導された。これらの結果から、TGF- $\beta$ はPDGF様蛋白のオートクリン刺激により、線維芽細胞の増殖を刺激するものと思われた。更にTGF- $\beta$ は線維芽細胞に対し、走化性活性を持たないことを示した。

文 献

- 1) Delarco, L.E., and Todaro, G.J. (1978) Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 4001-4005.
- 2) Tucker, R.F., Shipley, G.D., Moses, H.L., and Holley, R.W. (1984) Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor. Science, 226:705-707.
- 3) Takehara, K., LeRoy, E.C., and Grotendorst, G.R. (1987) TGF- $\beta$  inhibition of endothelial cell proliferation: Alteration of EGF binding and EGF-induced growth regulatory (competence) gene expression. Cell, 49:415-422.
- 4) Kehrl, J.H., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., Jakowlew, S., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986) Transforming growth factor  $\beta$  is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. J. Immunol., 137:3855-3860.
- 5) Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986) Production of transforming growth factor  $\beta$  by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J. Exp. Med., 163:1037-1050.
- 6) Ignatz, R.A., and Massague, J. (1986) Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J. Biol. Chem., 261:4337-4345.

- 7) Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H., and Fauci, A.S. (1986) Transforming growth factor type  $\beta$ : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4167-4171.
- 8) Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., and Sporn, M.B. (1983) Transforming growth factor-  $\beta$  in human platelets: Identification of a major storage site, purification, and characterization. J. Biol. Chem., 258:7155-7160.
- 9) Childs, C.B., Proper, J.A., Tucker, R.F., and Moses, H.L. (1982) Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:5312-5316.
- 10) Assoian, R.K., Fluordelys, B.E., Stevenson, H.C., Miller, P.J., Madtes, D.K., Raines, E.W., Ross, R., and Sporn, M.D. (1987) Expression and secretion of type-  $\beta$  transforming growth factor by activated human macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:6020-6024.
- 11) Grotendorst, G.R., Smale, G. and Pancev, D. (1989) Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. J. Cell. Physiol., 140:396-402.
- 12) Sporn, M.B., Roberts, A.B., Shull, J.H., Smith, J.M., Ward, J.M., and Sodek, J. (1983) Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. Science, 219:1329-1331.

- 13) Lawrence, W.T., Gorschboth, C., Sporn, M.B., Norton, J.A., and Grotendorst, G.R. (1986) The reversal of an adriamycin induced healing impairment with chemoattractants and growth factors. *Ann. Surg.*, 203:142-146.
- 14) Mustoe, T.A., Pierce, G.F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M.B., and Deuel, T.F. (1987) Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- $\beta$ . *Science*, 237:1333-1336.
- 15) Grotendorst, G.R. (1984) Alteration of the chemotactic response of NIH/3T3 cells to PDGF by growth factors, transformation, and tumor promoters. *Cell*, 36:279-285.
- 16) Takehara, K., Grotendorst, G.R., Silver, R., and LeRoy, E.C. (1987) Dipyridamole decreases platelet-derived growth factor levels in human serum. *Arteriosclerosis*, 7:152-158.
- 17) Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Macdonald, R.J., and Rutter, W.J. (1979) Isolation of biological active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18:5294-5299.
- 18) Shipley, G.D., Tucker, R.F., and Moses, H.L. (1985) Type  $\beta$  transforming growth factor/growth inhibitor stimulates entry of monolayer cultures of AKR-2B cells into S phase after a prolonged prereplicative interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4147-4151.
- 19) Leof, E.B., Proper, J.A., Goustin, A.S., Shipley, G.D., Dicorleto, P.E., and Moses, H.L. (1986) Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor  $\beta$ : A proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:2453-2457.

- 20) Paulsson, Y., Hammacher, A., Heldin, C.H., Westermark, B. (1987) Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature*, 328:715-717.
- 21) Betsholtz, C., Johnsson, A., Heidin, C.H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M.S., Eddy, R., Shows, T.B., Philpott, K., Mellor, A.L., Knott, T.J., and Scott, J. (1986) cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. *Nature*, 320:695-699.
- 22) Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L. and Kang, A.H. (1987) Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor  $\beta$ . *J. Exp. Med.*, 165:251-256.
- 23) Ross, R., Raines, E.W. and Bowen-Pope, D.F. (1986) The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 46:155-169.
- 24) Westermark, B. (1990) The molecular and cellular biology of platelet-derived growth factor. *Acta Endocrinol.*, 123:131-142.
- 25) Dicorleto, P.E. and Bowen-Pope, D.F. (1983) Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:1919-1923.
- 26) Martinet, Y., Bitterman, P.B., Mornex, J.F., Grotendorest, G.R., Martin, G.R. and Crystal, R.G. (1986) Activated human monocytes express the c-sis proto-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity. *Nature*, 319:158-160.

- 27) Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A. and Antoniades, H.N. (1983) Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet derived growth factor. *Science*, 221:275-277.
- 28) Leal, F., Williams L.T., Robbins, K.C. and Aaronson, S.A. (1985) Evidence that the v-sis gene product transforms by interaction with the receptor for platelet-derived growth factor. *Science*, 230:327-330.
- 29) Bejcek, B.E., Li, D.Y. and Deuel, T.F. (1989) Transformation by v-sis occurs by an internal autoactivation mechanism. *Science*, 245:1496-1499.
- 30) Fleming, T.P., Matsui, T., Molloy, C.J., Robbins, K.C. and Aaronson, S.A. (1989). Autocrine mechanism for v-sis transformation requires cell surface localization of internally activated growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:8063-8067.







# Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

# Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak