

論文の内容の要旨

論文題目 Connective Tissue Growth Factor (CTGF、結合組織増殖因子)はTGF β により選択的に誘導されるimmediate early gene産物である

氏 名 五十嵐敦之

Transforming growth factor β (TGF β)は細胞増殖に関し、多彩な生物学的作用を持つことで知られている。一般的には間葉系細胞に対し増殖促進作用を持ち、一方で上皮系や内皮系細胞、リンパ球に対しては増殖抑制作用を示す。このようにTGF β の作用は複雑であるが、TGF β の間葉系細胞に対する増殖促進作用は直接的ではなく、TGF β により誘導されるオートクリン物質による間接作用といわれている。マウスAKR-2B細胞にTGF β を作用させるとPlatelet-derived Growth Factor (PDGF) B鎖のmRNAが誘導され、ヒト平滑筋細胞においてTGF β がPDGF AA分泌を促進し、DNA合成を増加させることが報告されている。また、ヒト包皮線維芽細胞においてTGF β がPDGF様物質の自己分泌を介して細胞分裂を促進するが、この活性は抗PDGF抗体で中和されることも知られている。このようにTGF β の増殖促進作用はPDGFもしくはPDGF様物質を介するものと推察されていた。

一方、最近筆者の所属した研究グループはヒト臍帯静脈血内皮

細胞のcDNAライブラリーより抗ヒトPDGF抗体を用いてスクリーニングを行ない、PDGFとは異なる構造の蛋白質を同定し、Connective Tissue Growth Factor (CTGF, 結合組織成長因子)と命名した。この物質は38kdの分子量のモノマーで、PDGFのA鎖もしくはB鎖からなるダイマー (30~32kd) より大きく、39個のシステイン残基を持ち、間葉系細胞に対しPDGFと同様の生物活性を示す。

CTGFとヒト包皮線維芽細胞でTGF β により誘導される物質は同じ分子量を持ち同様の生物活性を有していることから、両者は同一の物質であることが強く示唆された。そこでまず始めに筆者はこの点を検討した。

ヒト包皮線維芽細胞においてTGF β 刺激で38kdのPDGF様蛋白の合成が著明に上昇するが、抗ヒトPDGF抗体をあらかじめリコンビナントCTGFとpreincubateした後ウエスタンブロット法に用いると38kdのバンドは完全に消失し、PDGF様蛋白への抗PDGF抗体の結合は阻害された。このことから、これら2つの蛋白が免疫学的交差反応性を持つことが示された。

蛋白質のレベルでこの2つの物質の異同を検討するのは回収される蛋白量の点から困難と思われた。そこで、筆者はTGF β 刺激後のヒト包皮線維芽細胞におけるCTGFのメッセージのレベルを調べることにした。CTGF cDNAをプローブとしたノーザンブロットではヒト包皮線維芽細胞においてTGF β 刺激後でメッセージの著明な上昇がみられた。このメッセージがCTGF cDNAそのものであるか否かをみるため、以下の実験を行なった。まずヒト包皮線維芽細胞をTGF β で刺激した後、全RNAを回収しこれをもとにオリゴdTをプライマーとして逆転写酵素を用いてcDNAを作成した。次にこのcDNAを鋳型として、CTGF cDNAのオープンリーディングフレームに結合するように作成したいくつかのプライマーを用い、polymerase chain reaction (PCR)を行なった。ヒト包皮線維芽細胞のcDNAの中、TGF cDNAが存在すればこのPCRによって予期される大きさの産物が得られることが期待される。果たして、PCR産物はCTGF cDNAの塩基配列から

予想された通りのサイズであり、また幾つかの制限酵素消化にて得られたフラグメントはCTGF cDNAと全く同じ消化パターンを示した。PCR産物を一本鎖ジデオキシシーケンス法にて塩基配列を解析したところ、CTGFとのホモロジーは99%でGC compression部位の2箇所の相違をみるのみであった。以上から、ヒト包皮線維芽細胞もCTGFを産生し、分泌しているものと考えた。

次に筆者は、CTGFの遺伝子レベルでの発現が、いかに調節されているかに興味を持ち、ヒト包皮線維芽細胞を用いて、TGF β 、PDGF、EGFおよびFGFのCTGF遺伝子発現に対する影響をプロトオンコジーンであるc-myc、c-fosの発現と比較してノーザンブロットにて検討した。

c-fosはPDGF、EGF、FGFの刺激では早期の一過性のc-fosのメッセージの発現がみられたが、TGF β 刺激ではc-fosのメッセージ増強はみられなかった。c-myc遺伝子に関しては、TGF β 、PDGF、EGF、FGFともにc-mycの発現の増強が観察された。これらのc-fos、c-mycの発現パターンは基本的に今までの報告例と一致するものであった。

一方、CTGF遺伝子の発現に関してはTGF β と他の増殖因子では明らかな相違が認められた。TGF β のみが選択的にCTGF遺伝子の発現を増強し、刺激後6時間から24時間にそのピークが認められた。これに対し、PDGF、EGF、FGFではごくわずかな一過性の増強がみられたのみであった。NIH/3T3細胞でも、CTGF遺伝子の発現はTGF β のみに観察された。以上からTGF β はここで用いた他の細胞増殖因子に比べ、CTGF mRNAの発現を明らかにより強く、長期間にわたって増強することが判明した。

c-fos、c-mycをはじめとする細胞増殖関連遺伝子はシクロヘキシミド存在下で発現が増強されることはよく知られており、これらの遺伝子はimmediate early geneと呼ばれている。そこで筆者はヒト包皮線維芽細胞のCTGF遺伝子発現に対するシクロヘキシミドの影響を検討したところ、CTGF mRNAのTGF β による発現の誘導はシクロヘキシミド存在下ではTGF β によるCTGF mRNAの発現が非存在下に比し、

明らかに増強していた。この実験結果は、TGF β によるCTGF mRNAの発現誘導には新たな蛋白質の合成は関与せず、TGF β が直接的にCTGF遺伝子に作用していることを意味し、CTGF遺伝子もimmediate early geneのひとつであると考えられた。Immediate early geneは血清もしくは細胞増殖因子により誘導され、細胞増殖に重要な役割を果たしており、大きく分けて2つのグループに分けられる。ひとつはc-fos、c-mycなどのプロトオンコジーンでその遺伝子産物は核内蛋白でDNAに結合し、細胞周期の制御に関与するといわれている。他方はサイトカイン様の性格を持つ蛋白をコードする遺伝子群でKCやJB遺伝子がそれにあたる。CTGF遺伝子はその産物が分泌されPDGF様の生物活性を持つことから後者のカテゴリーにはいると考えられた。一般的には細胞増殖に関与するimmediate early geneのmRNAは比較的短期間に発現のピークを迎えるが、CTGFでは発現の誘導が長時間にわたって認められた点が特徴的と思われた。

未知のimmediate early geneをsubtractive and differential screeningで同定しようとする試みがなされてきた。すなわちある細胞株を血清もしくは各種の増殖因子で刺激し、RNAを回収した後cDNAライブラリーを作成し、刺激前、刺激後のmRNAから得たcDNAをプローブとしてスクリーニングを行ない、刺激後に新たに発現した遺伝子をクローニングするという手法である。最近この方法によりマウスから β IG-M2遺伝子(fisp-12遺伝子)がクローニングされた。この遺伝子産物がいかなる活性を持っているかは不明であるが、CTGFと90%のホモロジーを持っており、これがマウスにおいてCTGFに相当する物質と思われる。これから類推するとCTGFの種特異性は低く、系統発生上よく保存された遺伝子であると考えられる。全く異なるアプローチのしかたでこのようにホモロジーの高い物質が同定されたことは興味深く、CTGFが何等かの重要な生物学的意義を持っている可能性が強い。

この他、BALB/c3T3線維芽細胞においてcyr61遺伝子が、またニワトリ胚線維芽細胞でCEF-10遺伝子が報告されている。これらの遺伝

子産物はともにCTGF同様システインに富み、CTGFより若干大きい蛋白である。CTGFとのホモロジーは45%ではあるが、システイン残基の位置が保たれている点で注目される。ともに中間部位にシステインを含まない配列を持ち、この部分がCTGFより長く、ホモロジーが著しく低い。これら蛋白の生物学的意義は明らかではないが、ヒトにおいてもCEF-10, Cys61に相当するCTGF遺伝子より若干長い遺伝子の存在が予測される。

以上述べたように本研究では、ヒト血管内皮細胞より同定されたPDGF類似蛋白質、Connective Tissue Growth Factor (CTGF) がヒト皮膚線維芽細胞においてもTGF β 刺激下で分泌されることを明らかにし、CTGF mRNAの発現は、PDGF、EGF、FGFなどの他の細胞増殖因子と異なり、TGF β で強く長時間にわたって誘導されることを示した。さらに、CTGF遺伝子の発現はシクロヘキシミド前処理で著明に増強されることを認め、CTGF遺伝子がimmediate early geneのひとつであることを示した。

CTGFはTGF β によって特異的に誘導されるimmediate early gene産物であるという点で、非常にユニークな因子であると思われる。その標的細胞はPDGFと同様、間葉系細胞であると推測されるが、内皮細胞や上皮系細胞に対するCTGFの作用を検討する必要がある。また、PDGF BBがCTGFの細胞への結合を競合的に阻害するが、CTGFがPDGFレセプターに結合するのか、PDGFレセプターと異なるCTGFレセプターが存在するのかは不明であり、今後明らかにされなければならない。さらに血管内皮細胞や線維芽細胞以外での、CTGF産生細胞の検索や、CTGFの組織内での代謝を調べることも重要である。

このように研究課題は多いが、CTGFに特異的な抗体を作成することが今後の発展に大きく貢献すると思われる。また、分子生物学的には、genomic geneレベルにおけるCTGF遺伝子の局在の検討、特にTGF β に特異的なプロモーターの検索が望まれよう。一方、最近TGF β が全身性強皮症などの結合組織増殖性疾患の誘因として注目されている。この際、CTGFが細胞増殖のメディエーターとして作用

している可能性は十分に考えられ、今後創傷治癒過程や結合組織疾患におけるCTGFの関与の研究が期待される。



Connective Tissue Growth Factor (CTGF, 結合組織成長因子)は
TGF β により選択的に誘導される immediate early gene 産物である

五十嵐 教之

Connective Tissue Growth Factor (CTGF,
結合組織成長因子)はTGF β により選択的に誘
導される immediate early gene 産物である

目的、背景

Transforming growth factor β (TGF β)は細胞増殖に関し、種々の生物学的作用を持つことで知られている。一般的には間葉系細胞に対し増殖促進作用を持ち¹⁾²⁾³⁾、一方で上皮系や内皮系細胞、リンパ球に対しては増殖抑制作用を示す³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。また、同じ細胞株に対しても、TGF β の濃度の違いにより増殖を促進したり、抑制することが報告されている⁹⁾。このようにTGF β の作用は複雑であるが、TGF β の間葉系細胞に対する増殖促進作用はPlatelet-derived Growth Factor (PDGF)、epidermal growth factor (EGF)などに比べ遅延して出現することにより、TGF β の直接作用ではなく、TGF β により誘導されるオートクリン物質による間接作用と考えられている。LeofらはマウスAKR-2B細胞にTGF β を作用させるとPDGFB鎖のmRNAが誘導されることを見出し、この内因性に作られたPDGFがPDGFレセプターに結合することによりTGF β が増殖促進作用を及ぼすと考えた¹⁰⁾。またBattegayらはヒト平滑筋細胞においてTGF β がPDGF AA分泌を促進し、遅延性のDNA合成を増加させるが、このDNA合成促進が抗PDGF抗体でブロックされることを示した⁹⁾。さらに相馬らは、ヒト包皮線維芽細胞においてTGF β がPDGF様物質の自己分泌を介して細胞分裂を促進するが、このPDGF様物質はPDGF、EGF、fibroblast growth factor (FGF)などの他の細胞増殖因子では誘導されないことを報告した¹¹⁾。このようにTGF β の増殖促進作用はPDGFもしくはPDGF様物質を介するものと推測されていた。

一方、従来よりヒト臍帯静脈血管内皮細胞はPDGF類似の生理活性物質を有する蛋白質を培養上清中に分泌し、この生理活性はヒトPDGFの抗血清によって中和されることが知られていた¹²⁾¹³⁾。また、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞はPDGF A鎖およびB鎖の遺伝子を発現していることが報告されていたが¹⁴⁾¹⁵⁾、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の培養上清中に含まれるPDGF様生理活性の主体が果たしてPDGF A鎖もしくはB鎖、あるいは他の物質から成るものか否かは不明であった。しかしながら最近筆者の所属した研究グループにより、抗ヒトPDGF抗体を用いてヒト臍帯静脈血管内皮細胞のcDNAライブラリーのスクリーニングが行なわれ、PDGFとは異なる構造の蛋白質が同定され、Connective Tissue Growth Factor (CTGF, 結合組織成長因子)と命名された¹⁶⁾。この物質は38kdの分子量のモノマーで、PDGFのA鎖もしくはB鎖からなるダイマー(30~32kd)より大きく、39個のシステイン残基を持ち、間葉系細胞に対しPDGFと同様の生物活性を示す。

CTGFとヒト包皮線維芽細胞でTGF β により誘導される物質は同じ分子量を持ち同様の生物活性を有している。このことから両者は同一の物質であることが強く示唆された。本研究における第一の目的はまずこの点を明らかにすることにあった。

次に筆者は、CTGFの遺伝子レベルでの発現が、いかに調節されているかに興味を持った。細胞の分化、増殖における成長因子の相互作用は複雑であるが、ある種の成長関連遺伝子は成長因子により誘導され、また遺伝子の発現に新たな蛋白の合成を必要としないことからimmediate early geneと呼ばれている¹⁷⁾。例えばプロトオンコジーンであるc-fos、c-mycは良く知られたimmediate early geneであり、ヒト正常皮膚線維芽細胞においてウシ胎児血清(FBS)、PDGFなどの増殖刺激でその発現が誘導される^{18) 19)}。本研究ではヒト皮膚線維芽細胞をTGF β 、PDGF、EGF、FGFで刺激し、CTGF mRNAの発現をc-fos、c-mycと比較し、またシクロヘキシミド存在下でメッセージの変化を観察し、immediate early geneであるか否かを検討した。

また、CTGF遺伝子と類似の遺伝子の存在が最近報告されているが^{20) 21) 22) 23)}、これらを比較し、CTGFの生物学的意義についても考察を加えた。

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、FBSを加えたDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中で、90%大気、10%CO₂下で培養した。NIH3T3細胞は、米国National Cancer InstituteのDr. S. Aaronsonより分与され、同条件で培養した。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞はコラゲナーゼ拡散法²⁴⁾にて新鮮臍帯より採取し、20% FBS、0.68mM Lグルタミン、20 μ g/mlゲンタマイシン、90 μ g/mlブタヘパリン、50 μ g/ml Endothelial Cell Growth Supplement (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)を加えたmedium 199にて培養した。

2) growth factorと抗PDGF抗体

リコンビナントTGF β 1は大塚製薬より、リコンビナントPDGF BBは Chiron社 (Emeryville, CA) より提供を受けた。マウスEGFはBiomedical Technologies社 (Stoughton, MA) から、acidic FGFはSigma Chemical Company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²⁵⁾によって抗PDGF抗体を得た。

3) ウェスタンブロット

検体を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Tris Buffer Saline (TBS; 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH7.4) 中で4時間ブロッキングを行なったのち、15 μ g/mlの抗PDGF抗体と一晩反応させた。フィルターを上述の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なった。

4) リコンビナントCTGFの生成

CTGFのcDNAであるDB60R32¹⁶⁾をpET5ベクターのEcoR I 部位に挿入後²⁶⁾、ベクターを大腸菌BL21DE3にトランスフォームさせ、アンピシリンを含むM9TB培養液で菌をOD₆₀₀が0.7になるまで培養し、Isopropyl β -D-thiogalactosideを加えさらに2時間培養した。この大腸菌から既述の方法で封入体を取り除きリコンビナント蛋白を回収した²⁷⁾。このリコンビナントCTGFをウェスタンブロットにおける抗PDGF抗体の中和に用いた。

5) RNA単離とノーザンブロット

培養細胞から全RNAをguanidium thiocyanateおよびphenol、chloroformによって単離した²⁸⁾。10 μ gの全RNAをアガロース/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CTGFのcDNAあるいはc-myc、c-fos (Oncor社) とハイブリダイズした。CTGFのcDNAはブルースクリプトベクターにおけるクローンDB60R32のEcoR I インサート (2.1kb) を用いた¹⁶⁾。³²PによるラベリングはBoehringer Mannheim Biochemical社のRandom Primer Labelling Kitを用いて行なった。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なった。

6) Message amplification phenotyping reactionとシーケンシング

まずTGF β で刺激したヒト包皮線維芽細胞の全RNAから、cDNAをオリゴdTをプライマーとして既述の方法で作成した²⁹⁾。このcDNAを鋳型として、CTGFのオープンリーディングフレームに一致するプライマーを用いてPCRを行なった。プライマーとしてはH01(5'-CGGAATTCGCAGTGCCAACCATGACC-3')、GG2(5'-CTGGAA GGACTCTCCGC-3')、GG1(5'-AGCTGCAAGTACCAAGTGC-3')、及びH02(5'-CCGAATTCCTTA ATGTCTCTCACTCTC-3')を使用した。PCR産物はそのまましくはPst I またはSma I で消化後、アガロースゲルに電気泳動した。GG1とH02で増幅したPCR産物はPst I、EcoR I で消化後、M13ファージベクターのPst I-EcoR I 部位に挿入され、U.S Biochemical Corp.社のSequenase kitを用いて塩基配列のシーケンスを行なった。

結 果

1) ヒト包皮線維芽細胞より分泌されるPDGF様物質とCTGFの比較

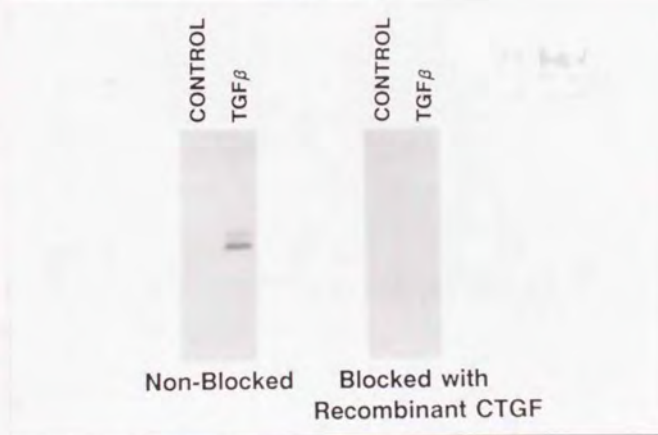
Bradhamらはヒト臍帯静脈血管内皮細胞がPDGF類似の活性を持つ蛋白質を分泌することを報告し、CTGFと命名した¹⁶⁾。一方、相馬らはTGF β がヒト包皮線維芽細胞においてPDGF類似の物質を分泌することにより間接的にその増殖を促進することを見出した¹¹⁾。この2つの蛋白質は同じ分子量を持ち、また同様の生理活性を有することから、筆者はまず、ヒト包皮線維芽細胞が産生するPDGF類似物質がCTGFと同一のものであるか否かを検討した。

定常期のヒト包皮線維芽細胞を10ng/mlのTGF β 、PDGF、EGFもしくはFGFの存在下で24時間培養、細胞を回収した後、この中に含まれるPDGF様蛋白を抗PDGF抗体を用いたウエスタンブロットで検出した(第1図)。約38kdのPDGF様蛋白の産生がコントロールに比べ、TGF β 刺激後では著明に増加していたが、PDGF、EGF、FGFではこの蛋白の産生の刺激は認められなかった。

抗ヒトPDGF抗体をpETシステムにて作成したリコンビナントCTGFとあらかじめ前処置した後ウエスタンブロット法に用いると38kdのバンドは完全に消失し、PDGF様蛋白への抗PDGF抗体の結合は阻害された(第2図)。このことから、ヒト包皮線維芽細胞が産生するPDGF様物質とCTGFには免疫交差反応性があることが明らかにされた。

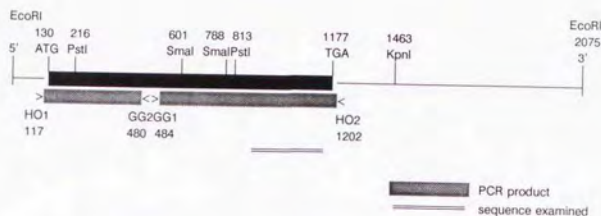


第1図 ヒト包皮線維芽細胞が分泌するPDGF様蛋白質のウエスタンブロット解析。confluentのヒト包皮線維芽細胞を10ng/mlのTGF β 、PDGF-BB、EGFもしくはFGFを含む0.1mg/ml BSA-DMEMで24時間培養後、 2.5×10^5 個の細胞を回収し、cell lysateを12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し、抗PDGF抗体をプローブとしてウエスタンブロットを行なった。

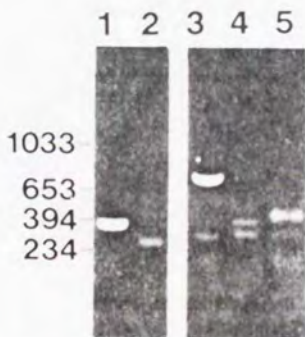


第2図 リコンビナントCTGFによるブロッキングウエスタンブロット。材料及び方法で述べたようにリコンビナントCTGFを大腸菌から回収し、抗PDGF抗体と2時間preincubateした後ウエスタンブロットのプローブとして用いた。

A



B



第3図A：CTGF cDNAの制限酵素切断部位と今回使用したPCR用プライマーの結合部位を示した地図。B：PCR産物のゲル電気泳動解析。第3図Aで示したPCR産物を未消化もしくは制限酵素消化後、0.8%のアガロースゲルに電気泳動した。使用したプライマーと制限酵素および予測されるフラグメントの塩基数は以下の通り。1:HO1-GG2 未消化 364。2:HO1-GG2 Pst I 265,99。3:GG1-HO2 未消化 719。4:GG1-HO2 Pst I 390,329。5:GG1-HO2 Sma I 415,187,117。

蛋白質のレベルでこの2つの物質の異同を検討するのは回収される蛋白量の

点から困難と思われた。そこで、次に筆者らはTGF β 刺激後のヒト包皮線維芽細胞におけるCTGFのメッセージのレベルを調べることにした。まずヒト包皮線維芽細胞を10ng/mlのTGF β で4時間刺激した後、全RNAを回収しこれをもとにオリゴdTをプライマーとして逆転写酵素を用いてcDNAを作成した。次にこのcDNAを鋳型として、CTGF cDNAのオープンリーディングフレームに結合するように作成したいくつかのプライマーを用い、PCRを行なった(第3図A)。ヒト包皮線維芽細胞のcDNAの中にCTGF cDNAが存在すればこのPCRによって予期される大きさの産物が得られることが期待される。果たして、2組のプライマーからのPCR産物はCTGF cDNAの塩基配列から予想される通りのサイズであり、また残りの制限酵素消化にて得られたフラグメントはCTGF cDNAと全く同じ消化パターンを示した(第3図B)。ここには示さないが、これらのPCR産物はCTGF cDNAプローブと強くハイブリダイズした。

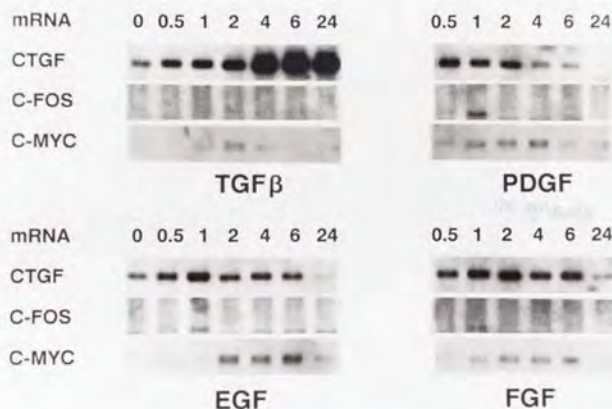
次に、オープンリーディングフレームの3'末端側(塩基484-1202、第3図A)に相当する部分のPCR産物をPst I、EcoR Iで消化後、M13ファージベクターに組み込み、一本鎖ジデオキシシークエンス法にて塩基配列を解析したところ、CTGFとのホモロジーは99%でGC compression部位の2箇所の相違をみるのみであった(第4図)。これよりヒト包皮線維芽細胞もCTGF mRNAを産生していることが示された。以上の実験結果から、ヒト包皮線維芽細胞より分泌されるPDGF様蛋白はヒト臍静脈血管内皮細胞の産生するCTGFと同一であると考えられた。

781	TCACCCGGGTATCAATGACAAAGCGCTCTGAGGCTAGAGAGCAGAGCGCTGTGTC	840	top
	P81		
		CTGTGC	bottom
841	ATGGTCAGGCTCTGGGAAGTCACTGGGAGAGAAATTAAGAGGCGAAAAAGTCATC	900	
	CTGTGC	CTGTGC	bottom
901	CTACTCTCCAAATCTCAAGGATCTCAAGTTGAGCTTTCTGGCTGCACCACTAGAG	960	top
	CTACTCTCCAAATCTCAAGGATCTCAAGTTGAGCTTTCTGGCTGCACCACTAGAG		bottom
961	CTATACGAGCTAAATCTGTGGATATATACCAAGCGGCGATCTGTCACCCCTCCACAGA	1020	top
	ACATACGAGCTAAATCTGTGGATATATACCAAGCGGCGATCTGTCACCCCTCCACAGA		bottom
1021	ACCACCACTCTCCGGTGGATCAAGTCTGCTGAGCGGCTAGAGGACATCTAAGAGAGACATG	1080	
	ACCACCACTCTCCGGTGGATCAAGTCTGCTGAGCGGCTAGAGGAGAACATCT		bottom
1081	ATGTTATCAAGACCTGTGCTGCATCAACTATCTCCCGGAGACATGACATCTTTGAA	1140	top
	ATGTTATCAAGACCTGTGCTGCATCAACTATCTCCCGGAGACATGACATCTTTGAA		bottom
1141	TCGTGTATACAGGAAGATGATAGGAGACATGCGATGAGCCAGAGATGAGAGACATT	1200	
	TC	H02	bottom
1201			top
Δ20			top

第4図 CTGF cDNAクローン(top)とPCR産物(bottom)の塩基配列比較.

2) CTGF遺伝子のTGF β による選択的誘導

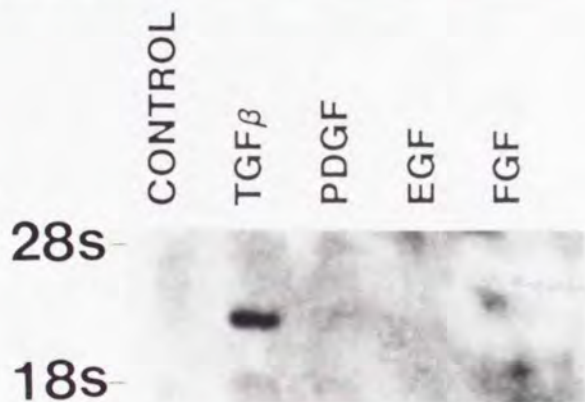
次に筆者はCTGF遺伝子発現における細胞増殖因子の影響をプロトオンコジーンであるc-fos、c-mycと比較して調べた。confluentのヒト包皮線維芽細胞を無血清の培養液で72時間培養した後、10ng/mlのTGF β 、PDGF、EGFもしくはFGFの存在下で培養、経時的に全RNAを回収しノーザンブロットを行った。第5図にその結果を示す。c-fosはコントロールではメッセージはみられず、PDGF、EGF、FGFの刺激では早期の一過性の2.2kbのc-fosメッセージの発現がみられた。細胞増殖因子添加後60分で最大の増強があり、以後急速に消失した。TGF β 刺激ではc-fosのメッセージ増強はみられなかった。c-myc遺伝子に関しては、TGF β 、PDGF、EGF、FGFともにc-mycの発現の増強が観察された。EGFで最も強い誘導がみられたが、メッセージは細胞増殖因子添加後30分で増強し始め、4ないし6時間で最高値に達し以後減少した。これらc-fos、c-mycの発現パターンは基本的に今までの報告と一致していた¹⁸⁾¹⁹⁾。



第5図 ヒト包皮線維芽細胞におけるCTGF、c-fos、c-myc遺伝子の発現の比較。confluentのヒト包皮線維芽細胞を10ng/mlのTGF β 、PDGF-BB、EGFもしくはFGFを含む無血清培養液でincubateし、経時的に全RNAを回収した。10 μ gのRNAを1.5%ホルムアミドアガロースゲルに電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、³²Pでラベルした各プローブを用いてノーザンブロットを行なった。

一方、CTGF遺伝子の発現様式はc-fos、c-mycのそれに比べ、全く異なるものであった。非刺激下でもCTGF mRNAのバンドは若干みられたが、TGF β 刺激4時間後でメッセージは著明に上昇し、24時間後まで保たれた。一方、PDGF、EGFおよびFGF刺激においては、ごくわずかなメッセージの増加が一過性に30分から6時間後にみられるのみであった。このようにTGF β はここで用いた他の細胞増殖因子に比べ、CTGF mRNAの発現を明らかにより強く、長期間にわたって増強することが示された。

このTGF β によるCTGF mRNAの発現選択性はマウスNIH/3T3細胞を用いた実験でも確認された。NIH/3T3細胞をTGF β 、PDGF、EGF、FGFで4時間培養した後全RNAを回収し、CTGF cDNAをプローブとしてノーザンブロットを行なった。第6図のようにTGF β 刺激のみでCTGF mRNAの増強が観察された。

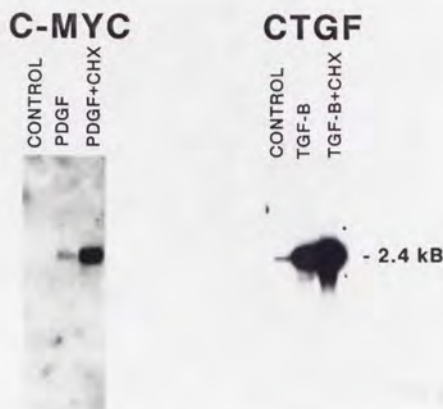


第6図 マウスNIH/3T3細胞におけるCTGF mRNAの誘導。10ng/mlの各成長因子で4時間incubateした後、第5図と同様ノーザンブロットを行なった。

3) シクロヘキシミドによるCTGF mRNAの増強

c-fos、c-mycをはじめとする細胞増殖関連遺伝子はシクロヘキシミド存在下で発現が増強されることはよく知られており、これらの遺伝子はimmediate early geneと呼ばれている^{17) 18) 30) 31) 32) 33) 34) 35) 36)}。そこで筆者はヒト包皮線維芽細胞のCTGF遺伝子発現に対するシクロヘキシミドの影響を調べるため

に以下の実験を行なった。細胞を $20\mu\text{g/ml}$ のシクロヘキシミドで2時間処理した後、 $\text{TGF}\beta$ でさらに4時間incubateし、RNAを回収、ノーザンブロットを行なった。対照実験として、シクロヘキシミド前処置後PDGF刺激によるc-mycの増強を示した。シクロヘキシミド存在下では $\text{TGF}\beta$ によるCTGF mRNAの発現が非存在下に比し、明らかに増強していた(第7図)。この実験結果は、 $\text{TGF}\beta$ によるCTGF mRNAの発現誘導には新たな蛋白質の合成は関与せず、 $\text{TGF}\beta$ が直接的にCTGF遺伝子に作用していることを意味し、CTGF遺伝子もimmediate early geneのひとつであると考えられた。



第7図 ヒト包皮線維芽細胞におけるCTGF mRNA発現に対するシクロヘキシミドの影響。ヒト包皮線維芽細胞を $20\mu\text{g/ml}$ のシクロヘキシミドで2時間前処置した後、 10ng/ml の $\text{TGF}\beta$ で4時間incubateしRNAを回収、第6図と同様ノーザンブロットを行なった。対照実験としてシクロヘキシミド処置後でのPDGF-BBによるc-myc誘導の増強を示した。

考 察

本研究ではまず、Bradhamらが報告したヒト臍帯静脈血管内皮細胞より分泌される38kdのシステインに富むPDGF様蛋白CTGF¹⁶⁾と、ヒト包皮線維芽細胞で $\text{TGF}\beta$ により誘導される、抗PDGF抗体が認識する38kdの物質が同一であるか否かを検討した。

始めに筆者はヒト包皮線維芽細胞が産生するPDGF様蛋白に対する抗PDGF抗体

の反応がリコンビナントCTGFにて完全に阻害されることを示した。この結果はこれら2つの蛋白が免疫学的交差反応性を持つことを意味する。CTGF cDNAをプローブとしたノーザンブロットではヒト包皮線維芽細胞においてTGF β 刺激後でメッセージの著明な上昇がみられ、Message amplification phenotyping reactionでヒト包皮線維芽細胞がCTGF mRNAを産生することを示した。以上の実験結果から筆者はヒト包皮線維芽細胞もCTGFを産生し、分泌しているものと考えた。

相馬らはヒト包皮線維芽細胞で、PDGFもしくはEGF添加後16時間でチミジンの取り込みが最大になるのに対し、TGF β では遅れてチミジンの取り込みが起こり、48時間後にピークを迎え、このTGF β による細胞増殖促進作用は抗PDGF抗体でブロックされることを報告した¹¹⁾。この培養上清中にはPDGF A鎖もしくはB鎖は検出されず、従って上清中のPDGF様物質、すなわちCTGFが細胞増殖促進作用を持ち、オートクリン物質として作用していると考えられる。TGF β が誘導するPDGF様物質としては、マウスAKR-2B線維芽細胞でPDGF B鎖が¹⁰⁾、ヒトおよびラット大動脈平滑筋細胞でPDGF A鎖が^{9) 41)}報告されている。従って、細胞株の違いによりTGF β により誘導されるPDGF様オートクリン物質が異なる可能性があり、この点についてはさらに検討が必要であろう。

次に本研究ではヒト包皮線維芽細胞を用いて、TGF β 、PDGF、EGFおよびFGFのCTGF遺伝子発現に対する影響をプロトオンコジーンであるc-myc、c-fosと比較して検討した。ヒト正常皮膚線維芽細胞でのプロトオンコジーン発現に関しては、PaulssonらがEGFとPDGFがc-fosとc-mycの発現を誘導することを報告し¹⁸⁾、Yaarらは血清にて誘導されるc-fosとc-mycの発現が増殖抑制因子であるインターフェロン α で抑制されないことを報告している¹⁹⁾。本研究で示したc-fosおよびc-mycの発現様式は基本的にこれらの既報告例と同じものであった。PDGF、EGF、FGFはc-fos、c-mycの両者の発現を誘導したが、TGF β はc-mycの発現を誘導したものの、c-fosの発現には影響を及ぼさなかった。一方、CTGF遺伝子の発現に関してはTGF β と他の増殖因子では明らかな相違が認められた。PDGF、EGF、FGFではごくわずかな一過性の増強がみられたのみであったのに対し、TGF β 刺激では著明なCTGF遺伝子の発現が観察され、刺激後6時間から24時間にそのピークが認められた。この持続的なメッセージの発現はヒト包皮線維芽細胞においてTGF β 刺激後24時間までCTGFが持続的に培養上清中に増加し続ける事実¹¹⁾に一致するものである。NIH/3T3細胞でも、CTGF遺伝子の発現は

TGF β のみに観察された。

LeofらはマウスAKR-2B線維芽細胞でTGF β 刺激によるc-myc、c-fosのメッセージがPDGFやEGFで刺激した場合と比べて遅れて発現することを観察し、TGF β により産生されたPDGF B鎖が二次的にc-myc、c-fosの発現を誘導するのであろうと推測した¹⁰⁾。筆者の行った実験ではTGF β 刺激でこのようなc-myc、c-fosの遅延性の発現は認められなかった。この差異の理由としては、マウスAKR-2B線維芽細胞というimmortalな樹立された細胞株と、ヒト包皮線維芽細胞という初期培養細胞による違いや、TGF β がc-myc、c-fosの発現に直接的に作用を及ぼす可能性などが考えられる。また、発現されたメッセージのレベルや時期の問題で筆者の実験系では検出されなかったのかも知れない。

CTGF mRNAのTGF β による発現の誘導はシクロヘキシミドの前処理で著明に増強された。これはCTGF遺伝子の発現に新たな蛋白質の合成を必要としないことを意味し、CTGFがimmediate early geneの一つであることの証明でもある。Immediate early geneは血清もしくは細胞増殖因子により誘導され、細胞増殖に重要な役割を果たしている。immediate early geneには大きく分けて2つのグループが存在する。ひとつはc-fos、c-mycなどのプロトオンコジーンでその遺伝子産物は核内蛋白でDNAに結合し、細胞周期の制御に関与するといわれている^{31) 32) 34) 37)}。もうひとつはサイトカイン様の性格を持つ蛋白をコードする遺伝子群でKCやJE遺伝子がそれにあたる^{38) 39)}。CTGF遺伝子はその産物が分泌されPDGF様の生物活性を持つことから後者のカテゴリーにはいると考えられた。一般的には細胞増殖に関与するimmediate early geneのmRNAは比較的短期間に発現のピークを迎えるが、CTGFでは発現の誘導が長時間にわたって認められた点特徴的と思われた。

未知のimmediate early geneをsubtractive and differential screeningで同定しようとする試みがなされてきた^{17) 30) 33) 38) 40)}。すなわちある細胞株を血清もしくは各種の増殖因子で刺激し、RNAを回収してcDNAライブラリーを作成し、刺激前、刺激後のmRNAから得たcDNAをプローブとしてスクリーニングを行ない、刺激後に新たに発現した遺伝子をクローニングするという手法である。この方法でBrunnerらやRyseckらはマウスから β IG-M2遺伝子(fisp-12遺伝子)をクローニングした^{22) 23)}。この遺伝子産物がいかなる活性を持っているかは不明であるが、CTGFと90%のホモロジーを持ち、これがマウスにおいてCTGFに相当する蛋白質と思われる(第8図)。これから類推するとCTGF遺伝子

は系統発生上よく保存された遺伝子であり、CTGFの種特異性は低いものと予想される。全く異なるアプローチのしかたでこのようにホモロジーの高い物質が同定されたことは興味深く、CTGFが何等かの重要な生物学的意義を持っている可能性が高い。

CTGF	MTAASMGPFVFAFVLLALC	SEPAVGQCSGPCPCDPAPBCPAGVSLVLDGCGCCRCVCAKQLGELCTERDPCDPHKG	79
β IG-M2	L-SVA-ISL-L	T-T-D-AQ-QAA-A-H	78
Cyr-61	-SSSTFRTLA--T-H-	T-L-L-S-T-PPA-H-L-X-AP-D-R-X-N-D-SKTQ-HT	75
CEF-10	MOSAGA-P-LAAA-L	-LA-L-L-SP-PAV-Q-A-A-Q-AP-G-P-X-N-D-SKTQ-HT	75
CTGF	LPDFGSPANKIGVCTAK	DGAPCFGGTYRSGESFQSSCKYQCTCLDGAVGCMPLCSMOVRLPSDFPFRVRLPG	158
β IG-M2		V-S	157
Cyr-61	-E-N-ASSTALK-I-R-QSE-R-EYNKI-QN	PN-H-I-PQELS-NLG-N-L-VS	155
CEF-10	-E-N-ASPAATN-I-R-QSE-R-EYNKI-QN	PN-H-I-PQELS-NLG-S-L-V	155
CTGF	KCCSEWVCDFKD	QTVGPAALAAYLEDTFGDPTMIRAN	205
β IG-M2		E-A-M	204
Cyr-61	Q	DSI KDSLDGDDLLGLDASEVELTENNELIAIKGSSSLKLPV-TE-EVLPNPLHANGQR-S	233
CEF-10	Q	S-ALKEELGNFKSFGLDASEGELTNNELIAIVKGG LKMLPV-SE-QSRAPE NFA-I-S	230
CTGF	WSACSKTCMDGISTRTVNDNASCELEKQSRILCMVRPCADLEENIKKGGKIRTPKISKPIKFELSGCTSMKTYRAKFCG		285
β IG-M2		TF-A-V	284
Cyr-61	-Q-S-T-	PE-V-ET-I-E-GQPTSSSL-SX-K-SPE-VR-TYA-S-V-K-P-Y	313
CEF-10	-Q-T-	PD-K-I-ET-I-E-GQPTASL-TA-K-SFS-VR-TYA-S-V-K-P-Y	310
CTGF	VCTDGCCTPHRTITLTPVEFKCPDGEVKKNNMFIKTCACRYNCYNDIPESLYEKMYGDM		349
β IG-M2		I	348
Cyr-61	S-V	LQ-R-VKMR-E-E-MFS-V-M-QS-K-N-HPNEASFE-SLFN-IHKFRD	373
CEF-10	S-V	QQ-R-VKIR-R-D-TFT-SV-M-QS-B-N-HA-EATP F-LVNN-IHKFRD	376

第8図 CTGFと β IG-M2、cyr61、CEF-10各遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列の比較。システインの位置を*で示す。CTGFと相同のアミノ酸配列は-で表してある。

この他、O'BrienらはBALB/c3T3線維芽細胞において血清、TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)、PDGFおよびFGFで誘導されるcyr61遺伝子を報告している²⁰⁾。また、Simmonsらはニワトリ胚線維芽細胞でv-src、血清にて誘導されるCEF-10遺伝子をクローニングした²¹⁾。これらの遺伝子産物はともにCTGF同様システインに富み、CTGFより若干大きい蛋白である。CTGFとのホモロジーは各々45%ではあるが、システイン残基の位置が保たれている点で注目される(第8図)。ともに中間部位にシステインを含まない配列を持ち、この部分がCTGFより長く、ホモロジーが著しく低い。また、両者のホモロジーは75%であった。以上よりCTGF関連遺伝子にはCTGF遺伝子、 β IG-M2(fisp-12)のグループとそれより若干長いcyr61、CEF-10のグループの二つに分けられるようである。これらの遺伝子産物の生物学的意義は明らかではないが、ヒトにおいてもcyr61、CEF-10に相当するCTGF遺伝子より長いタイプの遺伝子が存在してい

る可能性が考えられ、これが第5図でみられた、PDGF、EGFおよびFGF刺激後のCTGFメッセージのごくわずかな一過性の上昇として現れているのではないかと思われる。

TGF β のimmediate early gene発現に対する作用としてはいくつかの報告がみられる。増殖促進として働く間葉系細胞に関しては、例えばTGF β がマウスAKR-2B細胞でc-fos、c-myc、JE、c-sisを誘導する¹⁰⁾。さらに同じ細胞株でEGFによるc-fos、 β -actin、 γ -actin、fibronectin遺伝子の誘導がTGF β で増強されると報告されている³⁶⁾。

一方、増殖抑制として働く内皮細胞や表皮細胞に関してであるが、TGF β は血管内皮細胞においてEGFによるc-myc、JE、KCの発現誘導を抑制するがc-fosに対しては影響を及ぼさない⁶⁾。同様の作用はマウス表皮細胞においても認められ、またこの抑制作用には新たな蛋白合成を必要としmRNAの翻訳開始のレベルで作用するとされている⁴¹⁾⁴²⁾。KerrらはTGF β にて発現が抑制される遺伝子のプロモーター部位には共通の塩基配列があり、ここにc-fos遺伝子の産物、Fos蛋白が結合することにより抑制作用が現れると報告した⁴³⁾⁴⁴⁾。

このようにTGF β の細胞増殖関連遺伝子に対する作用は複雑であるが、CTGFはTGF β によって特異的に誘導されるimmediate early gene産物であるという点で、非常にユニークな因子であると思われる。CTGFはマウスNIH3T3細胞、ヒト皮膚線維芽細胞に対し増殖活性を持つことが確認されており、CTGFの生物活性が抗PDGF抗体で中和されることから、その標的細胞はPDGFと同様、間葉系細胞であると推測される。今後の課題としては、平滑筋細胞、軟骨細胞など他の結合組織細胞に対する作用を検討する必要があると思われる。さらに最近、毛細血管内皮細胞がPDGFレセプターを持ち、PDGFにより増殖が促進されることも見出されており⁴⁵⁾、内皮細胞や上皮系細胞に対するCTGFの作用を検討する必要がある。

CTGFのレセプターに関してであるが、CTGFはマウスNIH3T3線維芽細胞表面に結合し、PDGF BBがその結合を競合的に阻害する¹⁶⁾。CTGFがPDGFレセプターに結合するのか、それともPDGFレセプターと異なるCTGFレセプターにPDGF BBが結合性を有するのかは結論が得られていないが、CTGFと抗PDGF抗体の結合はPDGF AA、AB、BB三つのアイソフォームで阻害され、またCTGFとPDGFの抗PDGF抗体に対する反応性は還元状態では1/10以下に低下することより¹⁶⁾、CTGFとPDGFアイソフォームの間には共通する三次元構造のエピトープがあり、これがレ

セプターへの結合部位となっている可能性もある。これについては今後の研究に委ねられよう。

また血管内皮細胞や線維芽細胞以外での、CTGF産生細胞の検索や、CTGFの組織内での代謝を調べることも重要である。

以上のごとく、CTGFの生物学的性格は今後明らかにされなければならないが、そのためにはPDGFとは交叉反応性を示さない、CTGFに特異的な抗体を作成することが急務である。現在、筆者の所属した研究グループで抗CTGF抗体を作成中であるが、これによりCTGFの精製や同定が容易となり、今後の研究の発展に大きく貢献することが期待される。

さらに、分子生物学的にはgenomic geneレベルにおけるCTGF遺伝子の局在の検討、特にTGF β に特異的なプロモーターの検索が必要であろう。

TGF β は創傷治癒過程で重要な役割を果たしていると考えられている。受傷の際、TGF β は血小板から多量に放出され、好中球、単球などを創傷部位に遊走せしめるが、線維芽細胞にも作用を及ぼす。従って創傷部位におけるCTGFの発現の検討も必要であろう。一方、最近TGF β が全身性強皮症などの結合組織増殖性疾患の誘因として注目されている⁴⁶⁾。この際、CTGFが細胞増殖のメディエーターとして関与している可能性は十分に考えられる。今後創傷治癒過程や結合組織疾患におけるCTGFの役割の解明が望まれるところである。

まとめ

CTGFはヒト臍帯静脈血管内皮細胞より分泌されるPDGF類似の生理活性を有する蛋白質であるが、ヒト包皮線維芽細胞でもTGF β 刺激下で分泌されることを示した。またCTGF遺伝子の発現をヒト包皮線維芽細胞を用いて検討した結果、TGF β 刺激4時間後でメッセージは著明に上昇し、24時間後まで維持された。一方、PDGF、EGF、FGF刺激ではごくわずかな一過性のメッセージの上昇をみるのみであった。また、CTGF遺伝子のTGF β による発現誘導はシクロヘキシミド存在下で増強され、TGF β が新たな蛋白質の合成を介することなくCTGF遺伝子に直接的に作用していることが示唆され、immediate early geneのひとつと考えられた。マウスでもCTGFとホモロジーの高い物質が同定されており、CTGF遺伝子は系統発生上よく保存された遺伝子であると思われた。以上から、CTGFはTGF β に特異的に誘導されるimmediate early gene産物であり、新たな細胞増殖因子としての生物学的意義の検討が今後望まれよう。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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 β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:4167-4171.
- 3) 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.
- 4) Coffey, R. J. Jr., Bascom, C. C., Sipes, N. J., Graves-Deal, R., Weissman, B. E., and Moses, H. L. (1988) Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor β . *Mol. Cell. Biol.*, 8:3088-3093.
- 5) Heimark, R. L., Twardzik, D. R., and Schwartz, S. M. (1986) Inhibition of endothelial regeneration by type-Beta transforming growth factor from platelets. *Science*, 233:1078-1080.
- 6) Takehara, K., LeRoy, E. C., and Grotendorst, G. R. (1987) TGF- β inhibition of endothelial cell proliferation: alteration of EGF binding and EGF-induced growth-regulatory(competence) gene expression. *Cell*, 49:415-422.
- 7) 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 β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.*, 163:1037-1050.
- 8) Kehrl, J. H., Roberts, A. B., Wakefield, L. M., Jakowlew, S., Sporn, M. B., Fauci, A. S. (1986) Transforming growth factor β is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.*, 137:3855-3860.
- 9) Battegay, E. J., Raines, E. W., Seifert, R. A., Bowen-Pope, D. F., and Ross, R. (1990) TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell*, 63:515-524.
- 10) Leof, E. B., Proper, J. A., Gouston, 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 β : a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:2453-2457.
- 11) Soma, Y., and Grotendorst, G. R. (1989) TGF β stimulates primary human skin fibroblasts DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides. *J.*

- 12) 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.
- 13) DiCorleto, P. E. (1984) Cultured endothelial cells produce multiple growth factors for connective tissue cells. *Exp. Cell. Res.*, 153:167-172.
- 14) Collins, T., Ginsburg, D., Boss, J. M., Orkin, S. H. and Pober, J. S. (1985) Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature(London)*, 316:748-750.
- 15) Collins, T., Bonthron, D. T. and Orkin, S. H. (1987) Alternative splicing affects function of encoded platelet-derived growth factor A chain. *Nature(London)*, 328:621-624.
- 16) Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L., and Grotendorst, G. R. (1991) Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC induced immediate early gene product CEF-10. *J. Cell. Biol.*, 114:1285-1294.
- 17) Lau, L. F., and Nathans, D. (1987) Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:1182-1186.
- 18) Paulsson, Y., Bywater, M., Heldin, C.-H., and Westermark, B. (1987) Effects of epidermal growth factor and platelet derived growth factor on c-fos and c-myc mRNA levels in normal human fibroblasts. *Exp. Cell. Res.*, 171:186-194.
- 19) Yaar, M., Peacocke, M., Cohen, M. S., and Gilchrist, B. A. (1990) Dissociation of proto-oncogene induction from growth response in normal human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, 145:39-45.
- 20) O'Brien, T. P., Yang, G. P., Sanders, L., and Lau, L.F. (1990) Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol. Cell. Biol.*, 10:3569-3577.
- 21) Simmons, D. L., Levy, D. B., Yannoni, Y., and Erikson, R. L. (1989) Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1178-1182.
- 22) Brunner, A., Chinn, J., Neubauer, M. and Purchio, A. F. (1991) Identification of a gene family regulated by transforming growth factor β . *DNA & Cell Biol.*, 10:293-300.
- 23) Ryseck, R.-P., Macdonald-Bravo, H., Mattei, M.-G. and Bravo, R. (1991) Structure, mapping, and expression of *fisp-12*, a growth factor-inducible gene encoding a secreted cysteine-rich protein. *Cell Growth and Differentiation*, 2:225-233.

- 24) Jaffe, E. A. (1987) Cell biology of endothelial cells. *Human Pathol.*, 18:234-239.
- 25) 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.
- 26) Studier, F. W., Rosenburg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990) *Methods in enzymology*. D. V. Goeddel, Ed. Academic press, N.Y. Vol. 185, 60-89.
- 27) Hoey, T. 1990. *Current protocols in molecular biology*. F. M. Ausubel et al., Ed. John Wiley & Sons, Inc, N.Y., unit 16.5.
- 28) Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162:156-159.
- 29) Brenner, C. A., Tam, A. W., Nelson, P. A., Engleman, E. G., Suzuki, N., Fry, K. E., and Larrick, J.W. (1989) Message amplification phenotyping(MAPPING): a technique to simultaneously measure multiple mRNAs from small number of cells. *BioTechniques*, 7:1096-1103.
- 30) Almendral, J. M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J., and Bravo, R. (1988). Complexity of the early gene response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 8:2140-2148.
- 31) Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D., and Leder, P. (1983) Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, 35:603-610.
- 32) Kruijer, W., Cooper, J. A., Hunter, T., and Verma, I. M. (1984) Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature*, (London) 312:711-716.
- 33) Lau, L. F., and Nathans, D. (1985) Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J.*, 4:3145-3151.
- 34) Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., and Curran, T. (1984) Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* (London), 312:716-720.
- 35) Paulsson, Y., Hammacher, A., Heldin, C.-H., and Westermark, B. (1987) Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature* (London), 328:715-717.
- 36) Ranganathan, G., and Getz, M. J. (1990) Cooperative stimulation of specific gene transcription by epidermal growth factor and transforming growth factor type β 1. *J. Biol. Chem.*, 265:3001-3004.
- 37) Greenberg, M. E., and Ziff, E. B. (1984) Stimulation of 3T3 cells induces

transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature (London)*, 311:433-438.

- 38) Cochran, B. H., Reffel, A. C., and Stiles, C. D. (1983) Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell*, 33:939-947.
- 39) Rollins, B. J., Morrison, E. D., Stiles, C. D. (1987) A cell-cycle constraint on the regulation of gene expression by platelet-derived growth factor. *Science*, 238:1269-1271.
- 40) Linzer, D. I. H., and Nathans, D. (1983) Growth-related changes in specific mRNAs of cultivated mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4271-4275.
- 41) Majack, R. A., Majesky, M. W., and Goodman, L. V. (1990) Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by transforming growth factor- β . *J. Cell. Biol.*, 111:239-247.
- 42) Pietenpol, J. A., Holt, J. T., Stein, R. W., and Moses, H. L. (1990) Transforming growth factor β 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3758-3762.
- 43) Kerr, L. D., Holt, J. T., and Matrisian, L. M. (1988) Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science*, 242:1424-1427.
- 44) Kerr, L. D., Miller, D. B., and Matrisian, L.M. (1990) TGF β 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell*, 61:267-278.
- 45) Beitz J. G., Kim I. S., Calabresi P. and Frackelton Jr. A. R. (1991) Human microvascular endothelial cells express receptor for platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:2021-2025.
- 46) Smith, E. A., and LeRoy, E. C. (1990) A possible role for transforming growth factor β in systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.*, 95:125S-127S.



