

Connective Tissue Growth Factor (結合組織細胞成長因子)

遺伝子の構造と TGF- β による発現調節について

大河内 仁志

Connective Tissue Growth Factor (結合組織細胞成長因子)
遺伝子の構造とTGF- β による発現調節について

大河内仁志

研究の目的・背景

Connective Tissue Growth Factor (結合組織細胞成長因子、CTGF)は1991年Bradhamらによりヒト臍帯静脈内皮細胞の培養上清から発見された細胞成長因子で(1)、線維芽細胞や平滑筋細胞に対してmitogenic activityとchemotactic activityがありPDGF(血小板由来細胞成長因子)様の生物活性をもっている。CTGFは349個のアミノ酸からなるモノマーで、39個のCysteineを含み現在までにこのCysteine残基の保存性によりCTGFファミリーとしてマウスで2個(FISP-12、CYR61)とニワトリで2個(NOV、CEF-10)の遺伝子が見つかった。fisp-12(2)、cyr61(3)、cef-10(4)はもともと線維芽細胞において血清により誘導されるimmediate early geneとして発見され、fisp-12とcyr61はその後3T3細胞においてTransforming Growth Factor- β (TGF- β)によって誘導される遺伝子として別に報告された β IGM2と β IGM1(5)とそれぞれ同じものであることが判明した。特にFISP-12はCTGFと90%のアミノ酸配列が相同であり、マウスのCTGF homologと考えられている。Nov geneはニワトリのウイルス誘発性の腎腫瘍であるnephroblastomaにおいて発現が亢進しており(6)oncogeneである可能性も示唆されている。CTGFが同定される以前に相馬らはTGF- β により刺激されたヒト線維芽細胞の培養上清中にPDGF関連ペプチドが検出されることを報告していた(7)。PDGFやEGF(表皮細胞成長因子)、FGF(線維芽細胞成長因子)などの他の細胞成長因子による刺激ではこのPDGF関連ペプチドは検出されなかった。我々はこのPDGF関連ペプチドがCTGFと同一であることを証明し、TGF- β により選択的にCTGF mRNAが増加することを示した(8)。またラットに埋め込んだwound chamber内の組織においてTGF- β とCTGFのmRNAの発現を経時的に調べたところ、初期にTGF- β の発現のピークがみられ、9日後の組織でCTGF mRNAの発現のピークがみられた。以上の結果よりin vitro およびin vivoでTGF- β とCTGFは密接な関係があることが示唆されたので、TGF- β によるCTGF遺伝子の発現調節機構の解明が重要であると考え、CTGFのgenomic DNAを分離して遺伝子構造を明らかにし、プロモーター領域にTGF- β response elementが存在するかを検討した。

材料と方法

細胞の培養：ヒト皮膚線維芽細胞は皮膚生検標本より得、実験には継代6代以下のものを用いた。NIH/3T3細胞はS. Aaronsonより贈与された。これらの細胞は10% fetal calf serum(FCS)含有Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)の中で37°C 10%二酸化炭素90%空気の条件下で培養した。

細胞成長因子：TGF- β 1はG. Straussmanより贈与され、組み替え体 PDGF BBはChiron社から、EGFはBiomedical Technologies社から、basic FGFはSigma社から購入した。

RNAの抽出とノーザンブロットハイブリダイゼーション：培養細胞から酸-チオシアン酸グアニジン-フェノール法(9)を用いてRNAを分離した。10 μ g~15 μ gのRNAを1.5%アガロース/ホルムアルデヒドゲル上で電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。CTGFのプロンプとして1.1Kbのopen reading frameを含む断片を用いた。この断片はCTGFに特異的なプライマーであるHO1 (5'-cggaattgcagtgccaacctgacc-3')とHO2 (5'-ccgaattcttaagtctctcactctc-3')を用いて2.1kbのCTGFcDNAを鋳型にしてPCR(Polymerase chain reaction)によって得た。PCRは94°C30秒、55°C30秒、72°C1分を1サイクルとしてTaq polymerase (Promega社)を用いて計30サイクル行った。プロンプはRandom Primer DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim社)を用い、「 α -³²P]dCTPで標識したものをquick spin columnで精製後、1x10⁶cpm/mlとなるように加えた。ハイブリダイズに用いた溶液の組成はNaCl 0.9M、NaH₂PO₄ 0.05M、EDTA 0.005M、2x Denhardt's、0.1% SDS、tRNA 100 μ g/ml、salmon sperm DNA 100 μ g/ml、PolyA 5 μ g/mlである。2時間プレハイブリダイズした後、42-44°Cで16時間ハイブリダイズした。1x SSC/0.1%SDSと0.1x SSC/0.1%SDSでそれぞれ2回ずつ洗った後、増感紙とX線フィルムを用いてオートラジオグラフィーを-70°Cで6-72時間行った。

創傷治癒過程の組織とRNAの分離：Fisher 344メスのラットの腹部にステンレスのスクリーンでできたメッシュチェンバーをベントバルビタール麻酔下に埋め込んだ。1匹あたり6個のチェンバーを埋め込み、3日ごとに30日後まで経時的にチェンバーを取り出し、チェンバー内の組織を集めてRNAの抽出を行った。チオシアン酸グアニジンと塩化セシウムを用いて超遠心を行った。TGF- β 1とCTGFのcDNAをプロンプとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

Nuclear run on assay：直径150mmのプレートにConfluentになったヒト皮膚線維芽細胞

の核を分離し、Greenberg and Ziffの方法(10)を少し変えて Nuclear run on assay を行った。Trichloroacetic acid を使う代わりにpH5.2の酢酸ナトリウムを最終濃度が0.3Mとなるように、エタノールが70%になるように加えてRNAを沈殿させた。[³²P]UTPで標識されたRNAを8x10⁶ cpm/mlに調製し、CTGF cDNAをはじめとする各種cDNAを5 μgずつ固定したニトロセルロース上でハイブリダイゼーションを行った。

Genomic clonesの分離と塩基配列の決定：まずヒトゲノムDNAを培養ヒト皮膚線維芽細胞から分離した(11)。このゲノムDNAの4 μgをPCR反応の鋳型として用い、CTGF cDNAの内部プライマーであるHO2と HO3(5'-cggaattcctggaagacacgtttggc-3')を用いた。HO2と HO3はEcoR I siteをもつためPCR産物をEcoR Iで切断し、M13ファージベクターにサブクローニングした。得られたクローンをSequenase kit (United States Biochemical社)を用いて6%ないし8%尿素-アクリルアミドゲル上で電気泳動し塩基配列を決めた所、900bpのインサートを持ち中央に387bpのイントロンを含んでいた。そこでStratagene社の Lambda FIX 2ベクターに組み込まれた Human Genomic Libraryを購入し、900bpの DNA 断片を[³²P] dCTPで標識したものをプローブとしておよそ1x10⁶個のファージをスクリーニングした。直径150mmの寒天培地のプラークを2枚のニトロセルロース膜に移し取り、プローブとサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。2枚とも陽性のファージを5個ピッキングし、直径100mmの寒天培地で2次スクリーニングをして10個のファージをピッキングし、さらに3次スクリーニングをして最終的に4個のクローンを分離した。ファージDNAを抽出して、制限酵素Xba Iを用いて切断パターンを比較しながら900bpの DNA 断片をプローブにしてサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。陽性となった4.3kbのインサートをXba I部位でM13ファージベクターにサブクローニングした。M13ファージベクターはM13mp18とM13mp19の2種類を用い、M13ファージのUniversalプライマーとCTGF cDNAの内部プライマーとを使用して両方向から塩基配列を決定した。

Luciferase reporter gene assay : CTGFのプロモーター領域-823から+74までを制限酵素のXba Iと Bgl IIにより切断し、まずpBluescript KS plasmid (Stratagene社)にクローニングし、次に制限酵素Sac Iと Xho Iで切断してpGL2-Basicベクター (Promega社)にクローニングした。これを(P0)と名付け、鋳型とし、以下のプライマーを用いてPCRを行った。P1はHOP1(5'-cggagctcttggcttc-3')と HOS1(5'-ctcgaggtcgacggta-3')とを用いて-638から+74までを含み、P2はHOP2(5'-cggagctcagttggacaga-3')と HOS1とを用いて-363から+74までを、P3はHOP3(5'-cggagctcgaagagatag-3')と HOS1とを用いて-276から+74までを、P4はHOP4(5'-cggagctcagtgattgatgagc-3')と HOS1とを用いて-128から+74までを含んだものである。

NIH/3T3細胞を6穴プレートにまき、40-50% confluentになった段階でLIPOFECTIN(GIBCO BRL)を用いて、2 μ gのリポータープラスミッドと0.5 μ gのpSV- β -Galactosidaseベクター (Promega社)を6時間トランスフェクトした。その後インスリン、トランスフェリン、セレン酸を加えた無血清のDMEM中で16時間培養し、種々の細胞成長因子を加えてさらに24時間培養した。Luciferase Assay system (Promega社)を用いてcell lysateを得、luciferaseの基質であるluciferinを加えて発光させ、single photon monitorをもつシンチレーションカウンター(Beckman LS6000SC)で1分間測定してLuciferase活性を調べた。トランスフェクションの効率の違いは β -Galactosidase活性を測定して補正した。

結果

1) 創傷治癒過程におけるTGF- β とCTGF mRNAの発現

すでにin vitroのヒト皮膚線維芽細胞培養系においてTGF- β によりCTGF mRNAの発現が長時間にわたり選択的に誘導されることは報告されている(8)。そこでin vivoの創傷治癒過程でTGF- β とCTGF mRNAの発現をみるために、ラットの皮下にステンレススチールでできたメッシュチューブを埋め込み、3日ごとに経時的に取りだし、その組織からRNAを抽出してTGF- β 1とCTGFをプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。図1に示す如く、TGF- β は初期の炎症細胞浸潤期に強い発現がみられ徐々に漸減していくのに対し、CTGFは6日後に出現し9日後にピークをむかえ以後徐々に漸減した。この時期は肉芽形成期に一致している。

2) 短時間TGF- β 刺激によるCTGF mRNAの発現

前述の如くTGF- β 刺激によりCTGF mRNAの発現が長時間誘導されるが、その誘導の持続にTGF- β の存在が必要かどうかを調べる実験を行った。すなわちconfluentのヒト皮膚線維芽細胞を24時間無血清のDMEMで培養したのちTGF- β を10ng/mlとなるように加え、1時間後にPBSで洗ってTGF- β を除去し、再び無血清のDMEMを加え、経時的にRNAを抽出してノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。図2に示す如くTGF- β 除去後4-30時間においてもCTGF mRNAの発現が強く認められた。TGF- β を30分後、4時間後に除去した場合もほぼ同様の実験結果が得られたことより、一旦線維芽細胞がTGF- β に刺激されてCTGF mRNAの発現が誘導されると、その後はTGF- β の有無にかかわらず長時間誘導されることが示された。



図1 創傷治癒過程におけるTGF- β 1とCTGFmRNAの発現

ラットの腹部に埋め込んだスチールメッシュチューブを3日ごとに取り出し、中の組織からRNAを抽出してTGF- β 1とCTGFをプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。各レーンとも15 μ gの総RNAを電気泳動した。

MAC:ラットの腹膜のマクロファージ由来RNA

SKIN:ラットの正常皮膚由来のRNA

FIB:TGF- β 刺激をうけたヒト線維芽細胞由来のRNA

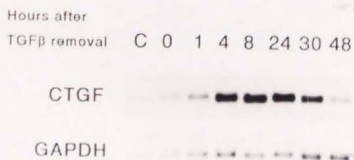


図2 培養ヒト線維芽細胞におけるTGF- β 短時間刺激後のCTGFmRNAの発現

Confluentのヒト線維芽細胞を無血清のDMEMで24時間培養したのちTGF- β を10ng/mlとなるように加え、1時間後にPBSで洗ってTGF- β を除去し(0時間)再び無血清のDMEMとし表示の時間培養してRNAを抽出した。CTGFをプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。各レーンとも10 μ gの総RNAを電気泳動した。

C:無刺激コントロール

3) 蛋白合成阻害剤によるCTGF mRNAの発現

次にTGF- β によるCTGF mRNAの発現に新たな蛋白合成が必要か否かを検討するために蛋白合成阻害剤を用いた実験を行った。すなわちconfluentのヒト皮膚線維芽細胞を24時間無血清のDMEMで培養したのち蛋白合成阻害剤であるcycloheximideあるいはpuromycinを10 μ g/mlとなるように加え、4時間後にRNAを抽出してCTGF mRNAの発現がみられるかどうかを調べた。驚いたことにcycloheximide単独でCTGF mRNAの発現がみられたがpuromycin単独では見られなかった。無添加のコントロールではCTGF mRNAの発現がみられなかった。そこでpuromycinの濃度を10倍(100 μ g/ml)としたが、図3に示す如くCTGF mRNAの発現は認められなかった。またpuromycinあるいはcycloheximideを加えて1時間後にさらにTGF- β (10ng/ml)を加えて3時間37°Cにおいた後にRNAを抽出してCTGF mRNAの発現を調べた所、両者共に発現がみられた(図3)。cycloheximideとpuromycinの結果が一致しなかったことは、作用機序に何らかの違いのあることを示唆しているが、少なくともTGF- β によるCTGF mRNAの発現には新たな蛋白合成を必要としないことが示された。

4) TGF- β によるCTGF mRNAの増加は転写活性の上昇による

TGF- β によるCTGF mRNAの増加は転写活性の上昇によるものかmRNAの分解が抑制されて蓄積するのかを検討するためにNuclear run on assayを行った。Nuclear run on assayは細胞から核だけを分離して一旦mRNAの転写を止めたのち、転写継続に必要な成分を加えると新たな転写は開始されないが転写途中にあったものはmRNA鎖が延長することを利用したものである。延長した部分は放射性同位元素で標識されるので、検出したいmRNAのcDNAをニトロセルロース膜上にドットプロットしておき、合成されたRNAとハイブリダイズさせて、核を分離した時点での転写途中にある特定のmRNAの量すなわち転写活性を知ることができる。CTGF mRNAについて無刺激、TGF- β 刺激4時間後と24時間後のヒト皮膚線維芽細胞の核を分離し、転写活性を調べたものが図4である。TGF- β 4時間後では明らかではないが、24時間後の転写活性は著明に亢進していることが示された。他のimmediate early geneのmRNAの量を調べたところ、c-fosはほとんど検出されず、c-mycは無刺激でも多量に存在しTGF- β 4時間後にやや減少し、24時間後には元のレベルに戻っていた。JEやGROはPDGFにより誘導されるimmediate early geneであり分泌されてサイトカイン様の作用を示す(12)が、両者共にTGF- β 24時間後に転写活性の上昇を示した。

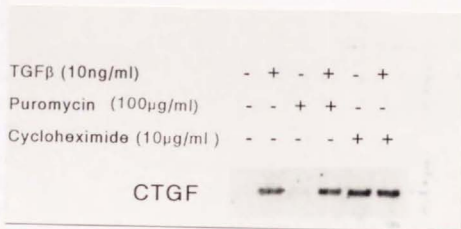


図3 培養ヒト線維芽細胞におけるTGF- β と蛋白合成阻害剤によるCTGF mRNAの発現
 Confluentのヒト線維芽細胞を無血清のDMEMで24時間培養したのちTGF- β 単独の場合はを添加3時間後、蛋白合成阻害剤単独の場合は表示の濃度で4時間培養後、両者の場合は蛋白合成阻害剤添加1時間後にTGF- β を加え3時間培養後にRNAを抽出した。CTGFをプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。
 各レーンとも10 μ gの総RNAを電気泳動した。
 +: 添加、 -: 無添加

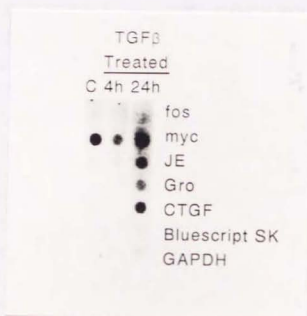


図4 培養ヒト線維芽細胞を用いたNuclear run on assay
 Confluentのヒト線維芽細胞を無血清のDMEMで24時間培養したのち無刺激のもの(C)、TGF- β 添加4時間後と24時間後に核を分離し、 32 P UTPを用いて転写中のmRNAを標識した。標識されたRNAを抽出して8x10⁶cpm/mlに調整し、ニトロセルロース上にドット状にプロットした各5 μ gのcDNAとハイブリダイズした。
 fos: v-fosのcDNAをPst Iで切断した1.3kbの断片、myc: v-mycのcDNAをEcoR Iで切断した5.5kbの断片、JE: JEのcDNAをPst Iで切断した0.8kbの断片、Gro: GroのcDNAをPst Iで切断した0.9 kbの断片、CTGF: 2.1kbのCTGF cDNA、Bluescript SK: 陰性コントロールとしてのプラスミッド、GAPDH: ヒトGAPDHのcDNAをHind IIIとXba Iで切断した0.5kbの断片

5) CTGF genomic clonesの分離と塩基配列

TGF- β によるCTGF mRNAの増加は転写活性の亢進によることが示されたので、CTGFのプロモーター機能を研究するためにCTGF genomic DNAの分離と解析を行なった。まずCTGF cDNAをPst Iで切断してopen reading frameの5' 端部に相当する600bpの断片を得て、これをプローブとしてヒトgenomic libraryをスクリーニングしたが成功しなかった。そこで培養ヒト線維芽細胞からDNAを抽出し、その4 μ gを鋳型としてCTGFに特異的なプライマーであるHO2とHO3を用いてPCRを行った。CTGF cDNAでは理論上500bpのバンドが期待されたが、PCRの産物として約400bp大きい900bpのバンドが得られたのでこれをHO900と名付け、M13ファージベクターにサブクローニングした。HO900の塩基配列を決定したところ中間に387bpのイントロンを含んでいたのでCTGF genomic DNAの断片が得られたと考え、このHO900をプローブとして再びヒトgenomic libraryをスクリーニングした。約 1×10^6 個のファージをスクリーニングして4個のクローンを分離し、制限酵素による切断パターンとサザンブロットハイブリダイゼーションによる解析の結果、そのうちの1つのクローンにおいてXba Iで切断した4.3kbの断片の中にすべてのCTGF cDNAが含まれていることがわかった。そこでこの4.3kbのDNAをM13ファージにサブクローニングして全塩基配列を決定した(図5)。mRNAの転写開始部位はオリゴヌクレオチドを用いたプライマー延長法により決定した。CTGF遺伝子は5個のエクソンと4個のイントロンから構成され、マウスのFISP-12遺伝子と比較しても第一エクソンのアミノ酸の数が1個違うだけで同じ構造を示した(図6)。また上流には823bpのプロモーター領域が含まれていた。この中にTATAbox、CATbox、Sp1、AP-1などのコンセンサスシーケンスが認められ、serum response elementの中心であるCArG boxはCC(A/T)₆GGとされている(13)が、CTGFプロモーターにおいても-380から-390の間に存在している。またTGGN₆GCCAAで示されるNuclear Factor-1 (NF-1)のコンセンサスシーケンスも間にはいる塩基数Nは5ないし7でよい(14)ことから、CTGFに見られるTGGagtgtGCCAG(-194~-182)にNF-1が結合する可能性があるためNF-1 likeとし、1塩基違いでGNNTTGGtGaで示されるTGF- β inhibitory element (TIE) (15)と考えられる部位TIE like(-128~-119)も存在している。マウスのFISP-12とプロモーター領域を比較してみると近位の-300までは80%の相同性があり、よく保存されているがそれより以遠は40%と相同性が低い(図7)。CTGFもFISP-12もTGF- β により誘導されるのでTGF- β response elementが存在するとすれば-300 bpまでに存在する可能性が高いと思われた。

図5 CTGF遺伝子の全塩基配列 (-823から3390まで)

-823 TCTAGAGCTCGCGGAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGCGTGCAGCTCGATCCCTTTTT
-763 CTGGAACACTTGATGGCCACTCGTCCCTTGTCTTGCCTATATAAACTCCTACATATAT
-703 TAAGAGAAAATAAGCAAGAGTTTGGAAATCGCCCCAGGAGACTGCATCCTGAGTCAC
AP-1
-643 ACGAGTCTTTGTTCTCTTTCTGTGCCAAAACCGTTACCTCAAGTGACAAATGATCAAAAT
-583 CTCAAATATAGAAATTCAGGGTTTTACAGGTAGGCATCTTGAGGATTTCAAATGGTTAAAA
-523 GCAACTCACTCCTTTTCTACTCTTTGGAGAGTTTCAAGAGCCTATAGCCTCTAAAAACGCA
-463 AATCATTGCTAAGGGTTGGGGGGGAAACCTTTTCGAATTTTTTAGGAATTCCTGCTGT
-403 TTGCCTCTTCAGCTACCTACTTCTCTAAAAAGGATGTATGTCAAGTGCAGAGACAGGGCCAA
CAG box
-343 ACTTATTCGAAAAAGAAATAAGAAATAATTCGCCAGTGTGTTTATAAATGATATGAATCAG
AP-1
-283 GAGTGGTGGCAAGAGGATAGGAAAAAAAATCTATTTGGTGTGGAAATCTCGCTTT
-223 TTTTTTCTTTTTTTTTTTTTCTGTGAGCTGGAGTGTGCCAGCTTTTTTCAGACGGAGGAA
NF-1 like
-163 TGCTGAGTGTCAAGGGGTGAGGATCAATCCGGTGTGACTTGGATGGAGGCAGGAAGGTGGGG
TID-like
-103 AGGAATCGAGGAATGTCCCTGTTTGTGTAGGACTCCATTCAGCTCAATGGCGAGCCCGG
CATbox
-43 GCGCCCGGAGCGTATAAAAACCTCGGGCCGCGCCCAACTCAACAACAACCTCTTC
SP-1 TATbox SP-1 +1
17 CCGCGTGAAGAGACAGCCAGTGGACTCCACCTCCAGCTCGACGGCAGCCGCCCCGG
77 CCGACAGCCCCGAGACGACAGCCCGCGGTCCCGTCCCACTCCGACCACCGCCAGC
137 GCTCCAGGCCCGCGTCCCGCTCGCGGCAACCGGCCCTCCGCTCCGCGCGAGTGCC
197 AACCATGACCGCCCGCAGTATGGGCCCGTCCGGTTCGCTTCGTGGTCTCTCGCCCT
M T A A S M G P V R V A F V V L L A
257 CTGCAGCCGGTAAAGCGCGGAGCCCCGTCGGCGCGGCTGCCAGGGAGGACTC
L C S R
317 GGGCGCGCGGGGAGGGCGTGCAGCGCCGACCGAGCGCGCTGACCGCCTGTCTCCCT
377 GCAGCGCGCGTGCAGCAAACTGCAGCGGGCGTCCCGTGCAGCGAGAGCCGCGCC
P A V G Q N C S G P C R C P D E P A
437 CGCTGCCCGCGGGCGTGAAGCTCGTCTGGACGGTGCAGCGCTGCTCCGCGCTCGCG
P R C P A G V S L V L D G C G C C R V C
497 CAAGCAGCTGGCGAGCTGTGCACCGAGCGGACCCCTGCGACCCGCAAGGGCCTTT
A K Q L G E L C T E R D P C D P H K G L
557 CTGTGACTTCGGTCCCGGCCAACCGAAGATCGCGCTGTGCACCGGTAAGACCCGAG
F C D F G S P A N R K I G V C T
617 CCCCCACCGTAGGTGTCCGCGCGCTCCTCCCTACGCCACCCGCGCTGGAAAAAG
677 AACCGCTCGGACTGAGTTTCTTCTCCAGCTGCTGCCAGCCGCGCCCTGCGAGCCAGA
737 TCCCACTCGCATCCCTGACGCTCGGATGTGAGAGTGCCCAATGCCTGACCTGTGCAT
797 CCCCCACCTCTCTCCCTTCTCTCCAGCCAAAGATGGTGTCCCTGATCTCTG
A K D G A P C I F
857 GTGTAACGGTGTACCGCAGCGGAGTCTCTCCAGAGCAGCTGCAAGTACCAGTGCAGCT
G G T V Y R S G E S F Q S S C K Y Q C T
917 GCCTGGACGGGGCGGTGGGCTGCATGCCCTGTGCAGCATGGAGCTTGTCTGCCACGCC
C L D G A V G C M P L C S M D V R L P S
977 CTGACTGCCCTTCCGAGGAGGGTCAAGCTGCCCGGAAATGCTGCGAGGATGGGTGT
P D C P F P R R V K L P G K C C E E W F
1037 GTGACGAGCCAAAGGACAAACCGTGGTGGGCTGCCCTCGCGGGTGAATGACTCTTC
C D E P K D Q T V V G P A L A
1097 CTCTAAGTCAGGGTCGTATCTCTCCAGGGAGGAGTCTAATGTGCCGACCGAAGC

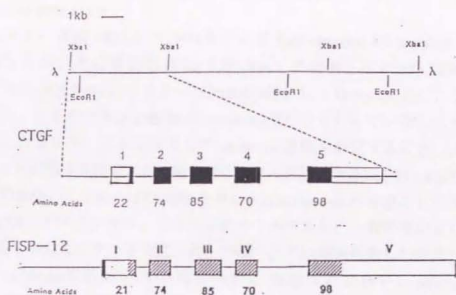


図6 CTGFとFISP-12のgenomic DNAの比較

CTGFに関してはλ phageに組み込まれた1kbのgenomic insertのrestriction mapと5つのエクソンを図示し、対応するアミノ酸の数を表示した。5'端と3'端の翻訳されない部分を口で示した。FISP-12は第一エクソンのアミノ酸の数が1違うだけでCTGFと同じ構造を示した(文献2を改変)。

```

-823 TCTAGAGCTCCCCGAGCTCTAATAGACTCTA---TAGGGCTGGATCGATCCCTTT
      * * * * *
-822 TCT---TCTCTCTCCACTATATCCCTGACAC---TAGGCTCTGAGATAGCCATT
      * * * * *
-765 T---ITGGAAACAT---TGATGGCCACTGCTCCCTCTCTCTGCTATATAMAAC--T
      * * * * *
      TGGTCTGAACTATAAAGTATTTTCTGAAACCACTCCGCGATATACCCCTTGCCG
-714 CTTACATATATFAGAGAAACTAA---GCAAGACTTTGGAAATTTGCCCGGAGACTG
      * * * * *
      CCTGGAGCTCAAGAGCAGTTCTTACATAAAGAGTCTGTAATAATCTT--CCTGGAACTA
      * * * * *
-656 CATCTGAGTGCACAGAGTCTTTGTTCT---TCTT--TCTGTC--CCAAAGCTGTACTC
      * * * * *
      CATCTT-TGGCTTTCATCTTTCAGCCATCAAAATGGCCATCTCCAGTACCAAAAGATC
-602 AAGTCAAAATGATCAATCTCAATATAGATTCAGGCTTTTCAGTAGGCATCTTGA
      * * * * *
      AA-TGGCTTATTCAGAT-ACAAGAATGCA--CATAGAATTCGGGAGGAGGAGG-
-542 GQATTCAAATGCTTAAAGCCACTACTCTCTTTTACTCTCT--ITGGAGAGTTCAGAG
      * * * * *
      GQATTCAAATGGCTATAG---CAC-CTCTCTCTCTGCTGAGTAGAGAGACCAAGAG
-483 CTTATGCTCTCT---AAAGAGCAATATCTTCTGAGGCTGGGGGGAAGACTTTT
      * * * * *
      ACTAGGCCCGGTAAAGAAATAAATAATCTCAAAACAGAGAAAGAGATATTTT
-428 CCAATTTTGGAAATCTGCTCTTGGCTTTGCTGCTGACTGACTGACTGACTGACTG
      * * * * *
      TTTAATTTCTAGGCCCGGCTGATTTGCTCTGAGCTATTGATCTGAGAGCTTT
-368 TAGTCTGCTGACGAGACAGG---GCAACTATTGCAAAAGAGATCTGAGATAATATGCC
      * * * * *
      TAGTCTGAGCCGAGACTGGCAAGAGATTTTAGAGAGAAAGATCAGGAAATATC
-310 AGCTTTTATAATCATAT---ATAGAGAGTGGCGAGGAGGATA--GGAATAAATAAT
      * * * * *
      GTTAATCTTAGCTATATATCTTCTGGAGGCTGAGAGAGATATGGGAAGTTTATA
-251 CTATTGGC---TCTGGAAATACTGGGCTTTTITTTTCTTTTCTTTTCTTTCTGGA
      * * * * *
      CTCTCTGCTTTTCTGGCAACAGAGGCTCTTTTITTTTCTT---GGGA
      * * * * *
-196 CTGGAGCTCTGAGGCTTTTTCAGAGCGAGGATCTGAGCTCTCAGGGGCTCAGGATCAA
      * * * * *
      CTAAGCTCTGGAGCTTTTTCAGAGCGAGGATCTGAGCTCTCAGGGGCTCAGGATCAA
      * * * * *
-136 TCCGCTGTGCTT---GGCCGAGAGGCTGGGAGGATGGGAGGATCTCCCTTTTCTT
      * * * * *
      TCCGCTGTGCTT---GGCCGAGAGGCTGGGAGGATGGGAGGATCTCCCTTTTCTT
-76 GTAGGACTCCACTGACTTTTTCAGCCCGGCTGATTTGGAGGCTTTTATAGGCTTCC
      * * * * *
      GTAGGACTCAITGACTTTTTCAGCCCGGCTGATTTGGAGGCTTTTATAGGCTTCC
      * * * * *
-17 GGGCTTTGGCCCAACTCACAGAGACTCTG
      * * * * *
      ---CCGCGCCT-AGTCTCACAGAGCTTCT
  
```

図7 CTGFとFISP-12のプロモーター領域の塩基配列の比較

上段: CTGF、下段: FISP-12 (文献2より引用) 相同部を*で示した。
-300bpまでは80%の相同性を認め、-300~-823bpでは40%の相同性を認めた。

6) Luciferase reporter gene assay

CTGFのプロモーター領域 -823から +74までをまずpBluescript KS plasmid (Stratagene社) に組み込み、次に制限酵素Sac I と Xho I で切断してfirefly 由来のLuciferase cDNAを含んだ pGL2-Basicベクター (Promega社) にクローニングし、これを(P0)と名付けた。ヒトやマウスの細胞はLuciferase遺伝子を持っていないので、それらの細胞に作製したプラスミッドを導入してLuciferase活性を測定することによりCTGFのプロモーターの働きを検討した。特にTGF- β の添加によるLuciferase活性の変化に注目した。培養細胞としてNIH/3T3細胞を用い、transfectionの方法としてはリン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、リポフェクチンの中から、一番効率がよく安定した結果の得られるリポフェクチンを使用した。TGF- β で24時間刺激した群はしなかった群に比べてLuciferase活性が約20倍高かった。実験は対で行い、pSV- β -Galactosidaseベクターを同時に加えてGalactosidase活性を測定し、Luciferase活性との比をとってtransfectionの効率を補正したが、TGF- β 刺激でGalactosidase活性も2倍に増加したためみかけ上10.7倍となった。他の細胞成長因子であるPDGF、bFGF、EGFなどの刺激では3倍以下の違いであった(図8)。CTGFのプロモーター領域を逆向きに挿入したものはほとんどLuciferase活性がなかった。またNIH/3T3細胞の代わりにヒト線維芽細胞を用いても同様の成績が得られた。

P0をtransfectしたNIH/3T3細胞をTGF- β で1時間刺激しPBSで洗ったのち23時間無血清の培養液中で培養したものは、刺激しなかったものより5.5倍のLuciferase活性を示した。

-823bpまでのCTGFプロモーター領域を含むP0がTGF- β に反応したので、次にどの部分が重要であるかを検討した。すなわち図9に示す如く、既存の転写因子の結合部位を1個ずつ除去するようにプライマーをそれぞれつくり、P0を鋳型としてPCR反応を行い、プロモーター領域を短くしたP1からP4までの変異体を作製し、NIH/3T3細胞にこれらをtransfectさせた。TGF- β に対する反応をみたところP1からP3までは無刺激のものに比べて5~10倍のLuciferase活性が認められたが、P4は0.2倍であった(図9)。P4のLuciferase活性自体はTGF- β 刺激と無刺激のものとほとんど変わらなかったが、Galactosidase活性がTGF- β 刺激により5倍に増加したため、見かけ上0.2倍となった。以上のことからTGF- β に反応するプロモーター領域は-276から-128の間に存在していることが示唆された。

	control	TGF- β	PDGF	FGF	EGF
Luciferase	10.1	272.4	44.8	43.8	10.2
(x10000)	11.8	203.4	45.7	35.5	12.1
mean	10.95	237.85	45.25	39.65	11.15
Galactosidase	67.3	161.2	126.9	94.9	93.5
(x10000)	74.7	126.6	127.7	94.5	93.2
mean	71	143.9	127.3	94.7	93.35
Luc/Gal	0.154	1.653	0.355	0.419	0.119
Fold induction		10.7	2.3	2.7	0.8

図8 Luciferase assay

CTGFのプロモーターを組み込んだpGL2-basic vectorを40~50%confluentの3T3細胞にリポフェクチンを用いて6時間transfectし、無血清のDMEM (インスリン、トランスフェリン、セレン酸を含む) に換え16時間後各細胞成長因子を10ng/mlとなるように加え、さらに24時間培養した。Cell lysateに試薬を加え、Luciferase活性と β -galactosidase活性をsingle photon monitorを用いて1分間測定した。Luciferase活性と β -galactosidase活性の比をとることによってtransfectionの効率を補正し、無刺激のものとの刺激したものと比較した。

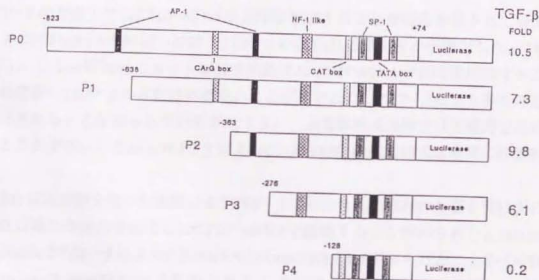


図9 CTGFのプロモーターの変異体におけるTGF- β に対する反応性の検討
Consensus sequenceを1つずつ除くように CTGFのプロモーターを短くした変異体P1~P4を合成し、TGF- β を10ng/mlとなるように加えてLuciferase活性を測定した。

考察

TGF- β をマウスの皮膚に注射するとその部位にコラーゲンの沈着と線維化がおこることが報告され(16)、ラットにおいてはTGF- β が創傷治癒を促進することが知られている(17、18)。Igarashiらにより *in vitro* の系においてヒト線維芽細胞はTGF- β によりCTGFを産生することが報告されている(8)ので *in vivo* においてもTGF- β とCTGFは密接な関係があるのではないかと考え、本研究ではまず創傷治癒過程における両者の発現を調べるためにラットでwound chamberを用いたモデルを設定した。図1の如くTGF- β の発現は初期段階に高く徐々に漸減していったが、これはTGF- β は血小板や単球に多く含まれており、初期の炎症細胞浸潤期に血小板や単球から放出されることで説明される。一方CTGF mRNAの発現は6日頃よりみられ9日目まで漸減していく。チェンバー内でTGF- β により活性化された線維芽細胞がCTGFを産生していると推測されるが、この時期は肉芽形成期にあたり、コラーゲン産生が盛んであると同時に血管新生の盛んな時でもあり、内皮細胞もCTGFを産生するので内皮細胞の関与も否定できない。今後 *in situ hybridization* を用いて個々の細胞における発現様式をみる必要があると思われる。創傷の修復過程において初期にはTGF- β やPDGFがinitiatorとして重要なことは既知の事実であるが肉芽形成期における細胞成長因子の役割については未だ不明な点が多い。CTGFがconnective tissue cellに対してmitogenic activityをもつことを考慮すれば、CTGFが線維芽細胞に対しオートクリンないしパラクリン的に作用していることが予想され、この時期にCTGFが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

既にTGF- β の存在下ではCTGF mRNAが長時間増加することが明らかにされているので次にこのCTGF mRNAの発現の持続にTGF- β の存在が必要か否かを検討した。TGF- β の30分ないし1時間刺激でもヒト線維芽細胞ではCTGF mRNAが長時間増加することより発現の持続にTGF- β の存在は必要ないことが示された。TGF- β により多くの遺伝子が活性化されることが知られているが(19)、通常細胞成長因子は短時間で発現が抑制されることが多いことからTGF- β によるCTGF mRNAの発現様式は非常に特徴的である。

また蛋白合成阻害剤を用いた実験によりTGF- β は蛋白合成阻害剤の影響を受けずに、言い換えれば新たな蛋白合成なしにCTGF mRNAを誘導することが示された。IgarashiはcycloheximideとTGF- β によりCTGF mRNAのsuperinductionがみられたことからCTGFはimmediate early geneの1つであると報告している(8)。しかし今回の実験でcycloheximide単独投与によりCTGF mRNAが増加したことから以下のことが考えられた。1) CTGF mRNAは常に転写されているが通常はRNaseによってすぐに分解されるために検出されないと仮定すると、cycloheximideによりRNaseが合成されず従ってCTGF

mRNAが蓄積した。2) CTGF mRNAの転写を抑制する不安定なrepressorが通常は合成されていると仮定すると、cycloheximideによりそれが合成されず、抑制が解除されて転写が亢進した。3) cycloheximide自身がCTGF mRNAの発現を誘導した。別の蛋白合成阻害剤である puromycin単独ではCTGF mRNAは増加しなかったことから1)と2)の可能性は否定的である。最近Edwardsらは cycloheximide単独でc-fosや c-junの発現を誘導することを報告している(20)。そのメカニズムとしてcycloheximideには核蛋白をリン酸化する能力がありc-fosや c-junのプロモーターに作用してそれらの発現を直接誘導すると説明されている。他の蛋白合成阻害剤であるanisomycinにも同じ作用があるが、puromycinにはないとされ、実際にanisomycin単独ではCTGF mRNAは増加したがpuromycinでは増加しなかった。従ってCTGFにも同様なメカニズムが働いていることが予想され、3)の可能性が示唆された。一方今回の実験で蛋白合成阻害剤とTGF- β の併用によりCTGF mRNAの発現はみられたが、superinductionといえるほどではなく、その理由として筆者は成人皮膚由来の線維芽細胞を用い、Igarashiは新生児包皮由来の線維芽細胞を用いたので、細胞の反応性の違いに起因するものかもしれない。

通常のノーザンブロットハイブリダイゼーションは細胞質のRNAを含んだ全RNAを抽出して行っているので特定のmRNAの増加がみられた場合、転写活性の亢進による合成増加の場合と細胞質内での分解が抑制されてmRNAの安定性が増して蓄積する場合とが考えられる。Nuclear run on assayは核を単離した時点で転写中のmRNAの量を調べるものであるから間接的に転写活性を検討していることになる。ヒト皮膚線維芽細胞を用いて無刺激、TGF- β 4時間、TGF- β 24時間後の核内でのCTGF mRNAの量を比較したところ明らかに24時間後ではCTGF mRNAの量が増加しており、転写活性が亢進していることが示された。無刺激のものではCTGF mRNAはほとんど認められなかったことより前述のcycloheximideを用いた実験で仮定したCTGF mRNAが常に転写されている可能性はこの結果からも否定される。ノーザンブロットの結果ではTGF- β 刺激後4時間でCTGF mRNAの量が増加しており、Nuclear run on assayでもTGF- β 刺激後4時間で転写活性の亢進がみられることが予想されたが、24時間後ほどははっきりした結果は得られなかった。他のimmediate early geneのmRNAの量を調べたところ、c-fosはほとんど検出されず、c-mycは無刺激でも多量に存在しTGF- β 4時間後にやや減少し、24時間後には元に戻っていた。c-fosはTGF- β により活性化されることが報告されている(21)が、短時間のことで4時間後には反応が終了していると考えられた。c-mycは常に転写されているが、同時に分解も速いため通常のノーザンブロットでは無刺激では検出されない。今回c-mycはTGF- β により転写が軽度抑制されたが、AKR-2B線維芽細胞ではc-mycはTGF- β により転写が亢進するといわれており(21)、同じ線維芽細胞でもcell lineによる違いがあることが示唆された。JEやGROはPDGFにより誘導されるimmediate early geneで分泌されてサイトカイン様の働きをもつ糖蛋白であり

(12)、CTGFも分泌されるimmediate early geneと考えられるので比較検討した。JEはAKR-2B線維芽細胞でTGF- β により活性化されることが知られており(21)、GROは内皮細胞や角化細胞ではTGF- β により抑制される(22, 23)が、線維芽細胞での報告はない。今回の実験ではJEもGROもTGF- β により24時間後に活性化されたが、1つの解釈としてTGF- β はCTGFを誘導するのでCTGFのPDGF様の作用によって2次的に両者が誘導された可能性もある。

CTGFのgenomic DNAの解析を行い、4.3kbの塩基配列を決定したところ、遺伝子構造は5個のエクソンと4個のイントロンからなっていた。Fisp-12はCTGFとアミノ酸の相同性が90%であり、39個のシステイン残基の保存性からマウスのCTGF homologと考えられるが、genomic DNAの比較においてもイントロンの長さは異なるものの同じ構造をもっていた。両者のプロモーター領域を比較してみると-300bpまでは80%保存されているが、それより離れると相同性は低くなる。Fisp-12もTGF- β で誘導されることからTGF- β に反応する部位は-300bpまでに存在する可能性が高いことが予想された。実際Luciferase assayにおいて823bpのCTGFのプロモーターがTGF- β により活性化されたことからこの領域内にTGF- β に反応する部位が存在することが示唆された。Transfectionの実験は主にNIH/3T3細胞を用いたが、ヒト線維芽細胞でも同様な結果が得られたのでマウスとヒトで共通のメカニズムが働いていると考えられた。NIH/3T3細胞も線維芽細胞由来であるから他の上皮系あるいは内皮系の細胞でTGF- β に反応するかどうか興味のもたれるところであり、今後さらに検討したい。次に823bpのCTGFプロモーターにAP-1などの転写因子が結合可能な部位が存在することが塩基配列から推測されたので、それらを1個ずつ除いた変異体を作製した。TGF- β に対する反応性を検討したところ図9の如くP3とP4で明らかに差が出たため、TGF- β に反応する部位は-276から-128の間にあることが示唆された。特にP4ではLuciferase活性自体はTGF- β の有無でほとんど変わらなかったのに対してGalactosidase活性はTGF- β により5倍に増加したためみかけ上0.2倍を示した。Transfectionの効率を補正する目的でpSV- β -galactosidaseベクターを同時に用いLuciferase活性とGalactosidase活性の比をとって補正したが、このプラスミッドに含まれるSV40 early promoterがTGF- β に反応したため、厳密な意味では適正な補正になりえなかった。従ってLuciferase活性をTGF- β の有無で比較した場合、結果的に実際の相違よりみかけ上減少したと考えられるが、TGF- β に反応する部位に関してはP3とP4で明らかに差が出ていることからこの間に存在すると推論してよいと思われた。この-276から-128の領域にはNuclear Factor-1(NF-1)の結合可能部位が1カ所ある。Plasminogen Activator Inhibitor type-1の遺伝子はNF-1とUSFのコンビネーションでTGF- β により活性化されると報告されている(24)。またコラーゲン $\alpha 2(I)$ の遺伝子はNF-1結合部位を通してTGF- β により活性化され(25)長時間発現が持続するので、この

TGF- β に対する反応性という点でCTGFと似ており、CTGFに関してもNF- κ B結合部位が重要な役割を果たしているかもしれない。

TGF- β で1時間刺激してその後TGF- β を除いても2-3時間後のLuciferase活性が5倍以上に上昇したことは、前述のTGF- β で1時間刺激後のノーザンブロットの結果と合致するものである。TGF- β により誘導されたCTGFの遺伝子発現の持続にはTGF- β の存在は必要ないといえるが、転写を中止させるメカニズムは全く不明である。CTGFファミリーの一員であるNOVはニワトリのnephroblastomaにおいて過剰発現しており、CTGFが異常発現した場合は癌化と関連する可能性もあり今後検討してみたいと考えている。

まとめ

ヒト線維芽細胞においてTGF- β によりCTGF mRNAの発現が蛋白合成阻害剤の影響を受けずに誘導され、一旦発現するとTGF- β の存在は必要とせず長時間転写活性が亢進することを示した。in vitroのみならずin vivoでも創傷治癒過程においてTGF- β に遅れてCTGF mRNAの発現のピークがみられ、両者の間には密接な関係があることが示唆された。CTGFのgenomic DNAを分離し、4.3kbの塩基配列を決定して5個のエクソンと4個のイントロンからなる構造を明らかにした。TGF- β により823bpのCTGFのプロモーターが活性化され、TGF- β response elementは-276~-128の領域にあることが示唆された。今後TGF- β の関与が示唆されているケロイドや全身性強皮症についてCTGFの発現を検討することが病態解明に役立つと思われる。

文献

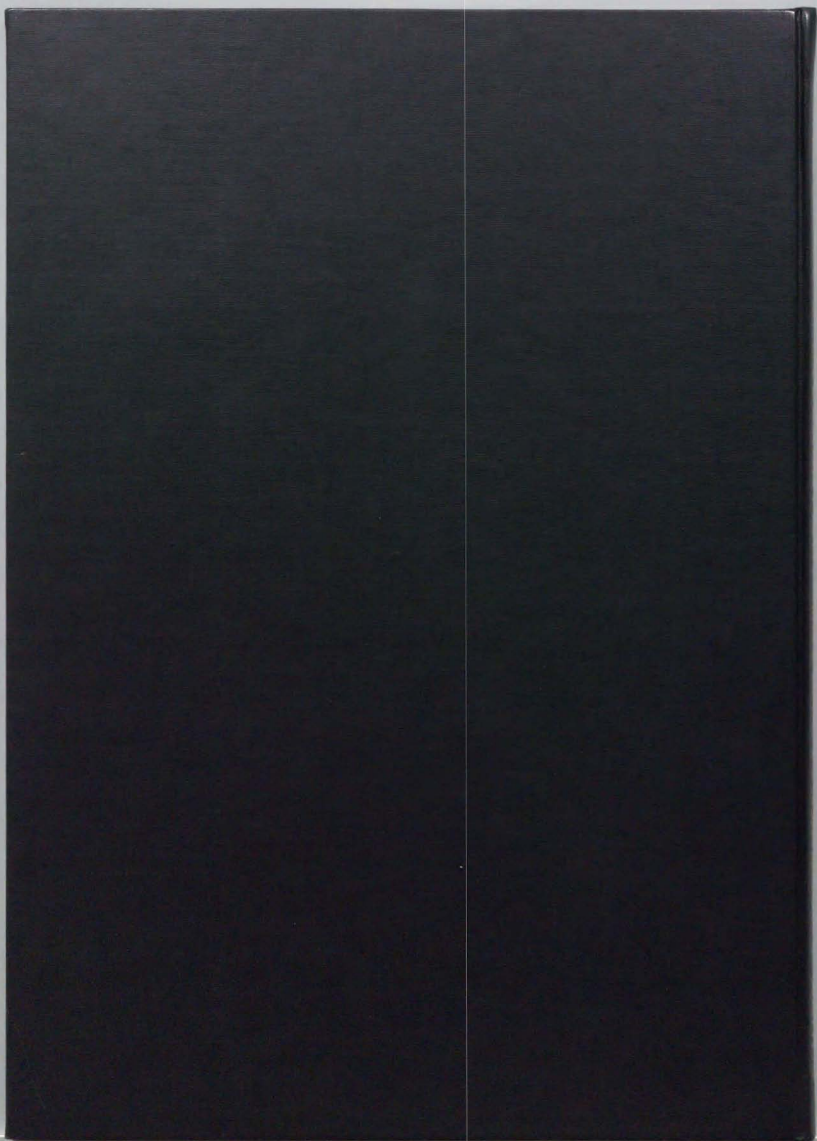
1. Bradham, D. M. , Igarashi, A. , Potter, R. L. , and Grotendorst, G. R. (1991) Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC induced immediate-early gene product CEF-10. *J. Cell. Biol.* 114:1285-1294.
2. Rysek, R. P. , Macdonald-Bravo, H. , Mattel, M. G. , and Bravo, R. (1990) Structure, mapping and expression of fisp-12, a growth factor-inducible gene encoding a secreted cysteine rich protein. *Cell Growth & Differentiation* 2:225-233.
3. O'Brien, T. P. , Yang, G. P. , Sanders, L. , and Lau, L. F. (1990) Expression of *cyrG1*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol. Cell. Biol.* 10:3569-3577.
4. 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.
5. Brunner, A. , Chinn, J. , Neubauer, M. , and Purchio, A. F. (1991) Identification of a gene family regulated by transforming growth factor- β . *DNA and Cell Biology* 10:293-300.
6. Joliet, V. , Martinerie, C. , Dambrine, G. , Plassiart, G. , Brisac, M. , Crochet, J. , and Perbal, B. (1992) Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (*nov*) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol. Cell. Biol.* 12:10-21.
7. 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. Cell. Physiol.* 140:246-253.
8. Igarashi, A. , Okochi, H. , Bradham, D. M. , and Grotendorst, G. R. (1993) Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol. Biol. Cell* 4:637-645.
9. Chomczynski, P. , and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
10. 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.
11. Sambrook, J. , Fritsch, E. F. , and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 9:14-19.
12. 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.
13. Treisman, R. (1987) Identification and purification of a polypeptide that binds to the *c-fos* serum response element. *EMBO J* 6:2711-2717.

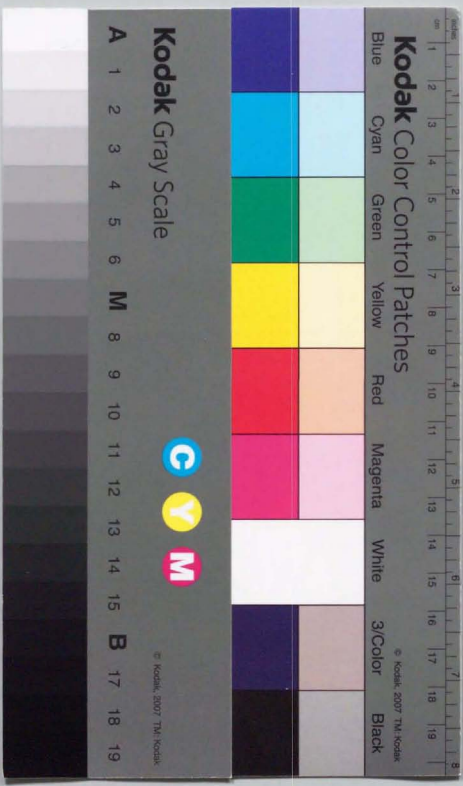
14. La Thangue, N. B. and Rigby, P. W. J. (1988) in: *Transcription and Splicing* (Hames, B. D. and Glover, D. M., eds.), p1-42.
15. Kerr, L. D., Miller, D. B., and Matrisian, L. M. (1990) TGF- β 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* 61:267-278.
16. Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, P. 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.
17. 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- β . *Science* 237:1333-1336.
18. Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Lingelbach, J., Masakowski, V. R., Griffin, G. L., Senior, R. M. and Deuel, T. F. (1989) Platelet-derived growth factor and Transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J. Cell Biol.* 109:429-440.
19. Edwards, D. R. and Heath, J. K. (1991) Regulation of transcription by Transforming growth factor- β . The hormonal control regulation of gene transcription (Cohen, P. and Foulkes, J. G. editors) Elsevier Science Publishers B. V. chapter 16 333-347.
20. Edwards, D. R. and Mahadevan, L. C. (1992) Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *EMBO J.* 11:2415-2424.
21. Leof, E. B., Proper, J. A., Gouston, A. S., Shipley, G. D., GiCorleto, P. E., and Moses, H. L. (1986) Introduction of c-mis 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.
22. 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.
23. 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 murin keratinocytes by transforming growth factor β . *Mol. Cell. Biol.* 8:3088-3093.
24. Riccio, A., Pedone, P. V., Lund, L. R., Olesen, T., Olesen, H. S., and Andreasen, P. A. (1992) Transforming growth factor β 1-responsive element: closely associated binding sites for USF and CCAAT-binding transcription factor-nuclear factor 1 in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene. *Mol. Cell. Biol.* 12:1846-1855.

25. Oikarinen, J., Hatamochi, A., and de Crombrughe, B. (1987) Separate binding sites for nuclear factor 1 and a CCAAT DNA binding factor in the mouse $\alpha 2(1)$ collagen promoter. *J. Biol. Chem.* 262:11064-11070.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY

5





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

C Y M

© Kodak, 2007 TM Kodak