

6) TGF-beta/Smad signaling pathwayにおける PKC-deltaの関与

強皮症皮膚線維芽細胞における PKCの responsive element に関しては、PKC-deltaのみCAT法にて検討した。正常細胞と同様、-353から-186base pairの領域に作用していると思われた(図6a)。

しかし、強皮症の細胞では Smad binding siteの substitution mutationでも有意に反応性が低下した(図6b)。PKC-deltaは Spl や Ets family に作用するのに加え、強皮症の細胞では TGF-beta/Smad signalingにも関与していると思われた。実際、強皮症では Rottlerin 添加にて PKC-delta を阻害すると Smad3 の蛋白量は減少した(図6b)。PKC-delta を阻害することで TGF-beta/Smad signaling も抑制することが出来ると考えられた。

## D. 考案

今回の検討により、PKCによるコラーゲン転写メカニズムについて図8のようなモデルが考えられた。正常皮膚線維芽細胞に置いて collagenの転写はPKC-alpha, -deltaという二つのシグナルによって制御されており、それぞれをブロックすることでコラーゲンの転写は抑制される(図7a)。しかし、強皮症では TGF-beta/Smad signalingの作用により、PKC-deltaが優位に働くためにPKC-alphaの作用がマスクされる。PKC-deltaを阻害すると TGF-beta/Smad signalingも抑制されてコラーゲン転写は大きく抑制される(図7b)。

## E. 結論

PKC-delta は本症の病因に関与している可能性がある。また、PKC-delta を阻害することでは TGF-beta/Smad signaling pathway も阻害することができ、効率的にコラーゲンを抑制できる可能性がある。今後、さらなる検討が必要と考えられる。

## F. 文献

1. Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K: Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 474-480
2. Jimenez SA, Gaidarova S, Saitta B, Sandorfi N, Herrich DJ, Rosenbloom JC, Kucich U, Abrams WR, Rosenbloom J. Role of protein kinase C-delta in the regulation of collagen gene expression in scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 2001, 108: 1395-1403

## G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 H16 年度強皮症研究会議

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

図1a

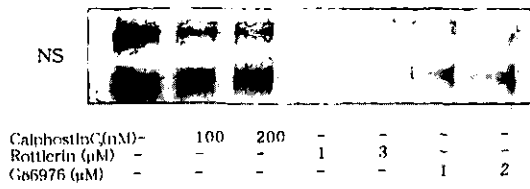


図1b

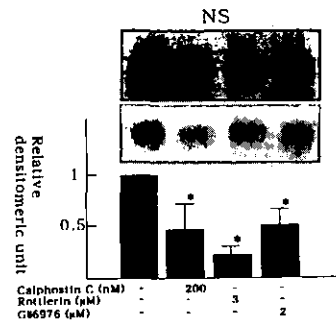


図1c

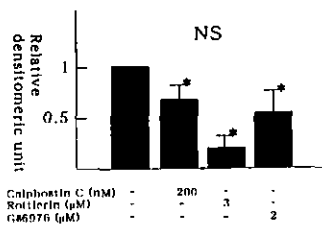


図1：正常皮膚線維芽細胞における PKC inhibitor の alpha2(I) コラーゲン発現に及ぼす影響

a:免疫プロット法による type I コラーゲン蛋白の検出。

b:ノーザン・プロット法による alpha2(I) コラーゲン mRNA の検出。

c:CAT 法による alpha2(I) コラーゲン遺伝子転写活性の測定。

図2a

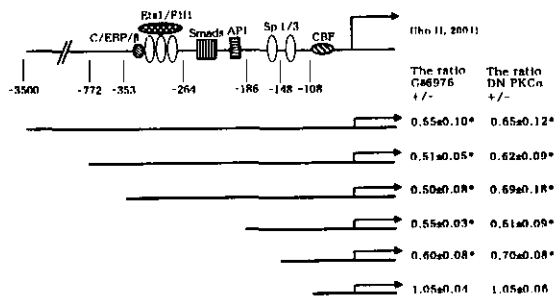


図2b

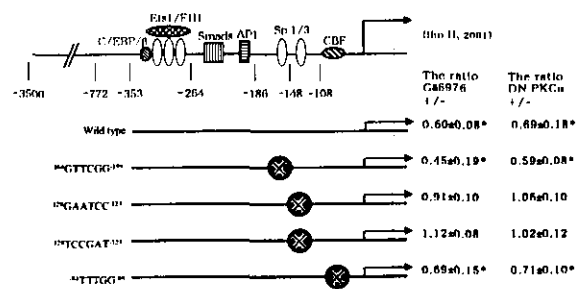


図2c

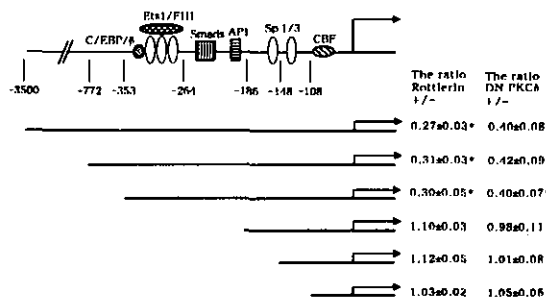


図2d

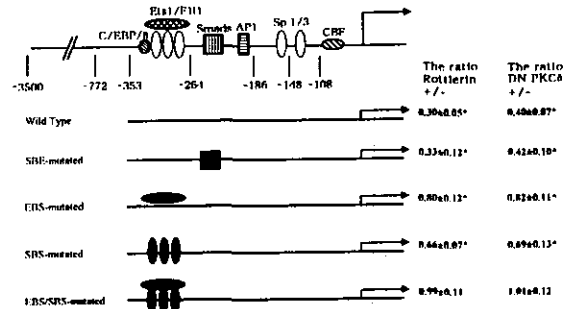


図2：

a:alpha2(I) コラーゲン遺伝子プロモーター領域における Gö6976 および DN PKC-alpha の responsive element の検討。

b:Sp1/3 binding site の substitution mutation の効果。

c:alpha2(I) コラーゲン遺伝子プロモーター領域における Rottlerin および DN PKC-delta の responsive element の検討。

d:Sp1/3 binding site, Ets binding site, Smad binding site の substitution mutation の効果。

図3a

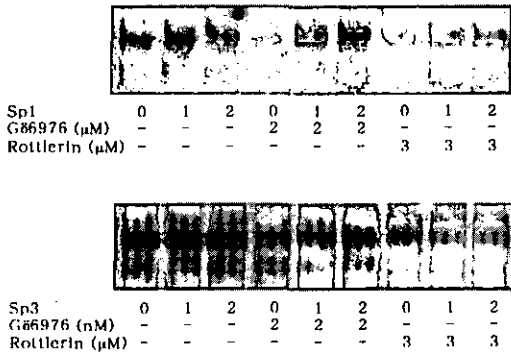


図3b

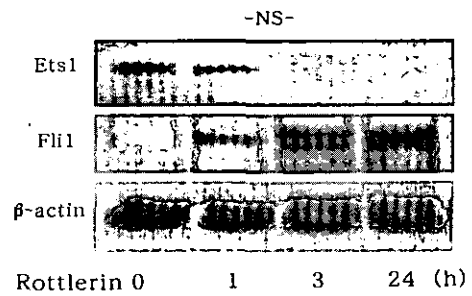


図3 : PKC の inhibitor の作用に関与する転写因子の検討  
 a:免疫プロット法による type I コラーゲン蛋白の検出。  
 b:免疫プロット法による Ets1 及び Fli1 蛋白の検出。

図4a

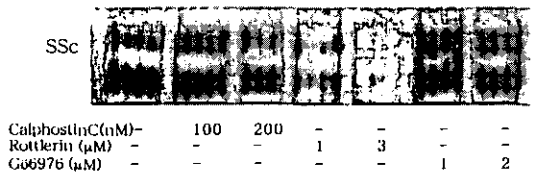


図4b

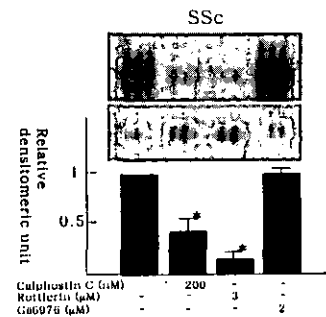


図4c

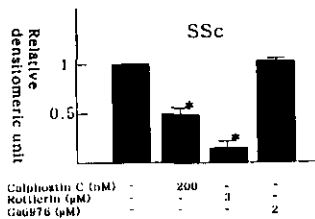


図4 : 強皮症皮膚線維芽細胞における PKC inhibitor の alpha2(I)コラーゲン発現に及ぼす影響  
 a:免疫プロット法による type I コラーゲン蛋白の検出。  
 b:ノーザン・ブロット法による alpha2(I)コラーゲン mRNA の検出。  
 c:CAT 法による alpha2(I)コラーゲン遺伝子転写活性の測定。

図5a

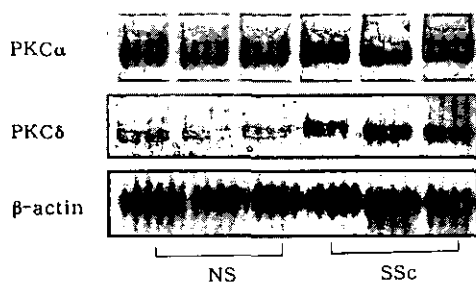


図5b

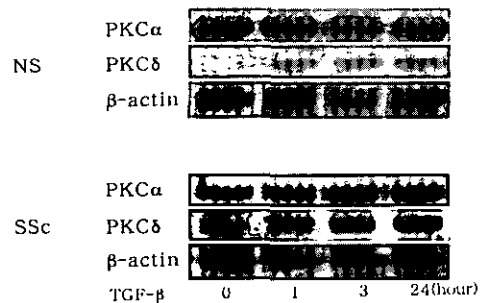


図5 : 正常及び強皮症皮膚線維芽細胞における PKC 発現量の比較  
 a:免疫プロット法による PKC-alpha および-delta 蛋白の検出。  
 b:PKC-delta に対する TGF-beta の効果。

図6a

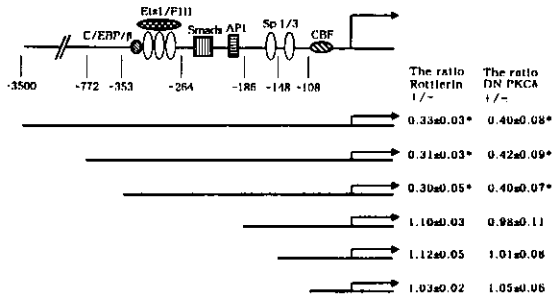


図6b

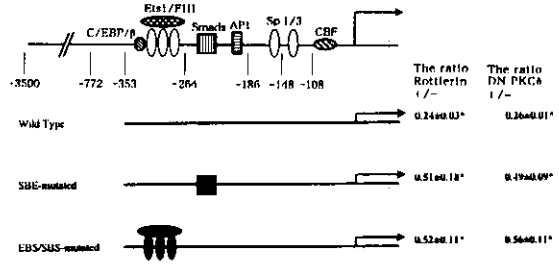


図6c

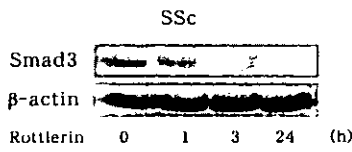


図6：強皮症皮膚線維芽細胞における PKC-delta の TGF-beta/Smad signaling に対する作用  
 a: alpha2(I) コラーゲン遺伝子プロモーター領域における Rottlerin および DN PKC-delta の responsive element の検討。  
 b: Spl/3 binding site, Ets binding site, Smad binding site の substitution mutation の効果  
 c: 免疫ブロット法による Smad3 蛋白の検出。

図7a

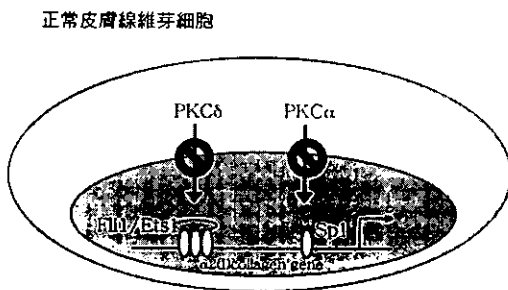


図7b

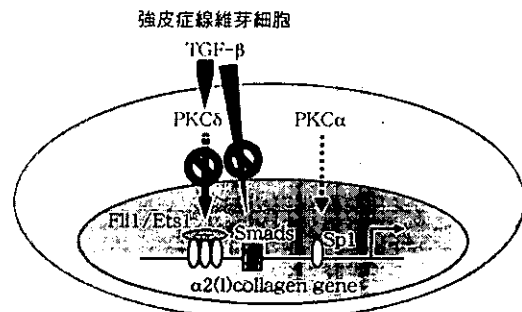


図7：PKC による type I コラーゲン発現制御モデル  
 a: 正常皮膚線維芽細胞  
 b: 強皮症線維芽細胞

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

核内 ErbB3 binding protein 1 (EBP1)の強皮症線維化におよぼす  
影響

分担研究者 川口鎮司 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター講師  
協力者 原まさ子 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター教授

### 研究要旨

強皮症に特徴的な臓器の線維化は、病変局所の線維芽細胞の細胞外マトリックス産生異常に起因している。我々は、強皮症線維芽細胞の一つの機能異常として、細胞内 IL-1 $\alpha$ の構成的な発現をみつけた。さらに、IL-1 $\alpha$ の過剰な産生がコラーゲン産生亢進に関与していることを報告してきたが、その過剰産生の機序は明かとなっていない。そこで、IL1A 遺伝子の転写調節部位の遺伝子配列をプローブとして、DNA 結合因子を同定し、その機能を解析した。その結果、EBP1 が強皮症線維芽細胞の IL-1 $\alpha$ の発現に重要な働きをしていることがわかった。さらに、EBP1 の発現制御により線維芽細胞の発現するコラーゲン量を低下させることが可能であった。

### A. 研究目的

強皮症の病態が、線維芽細胞の異常により形成されていることは多くの研究者によって認められている<sup>1,5</sup>。一方、線維芽細胞の異常が、線維芽細胞自身の異常なのか、組織に浸潤してくる単核球により引き起こされるのか、あるいは、なんらかの自己抗体により惹起されるのかは未だに不明である。我々のグループでの研究により、線維芽細胞のコラーゲン産生に、内因性の IL-1 $\alpha$ 過剰産生が重要な働きを呈していることがわかってきている<sup>6,7</sup>。しかし、IL-1 $\alpha$ の産生・発現を誘導している機序は不明である。IL-1 $\alpha$ の転写調節部位は以前に我々が同定しており<sup>8</sup>、今回の研究では、その転写調節部位に、結合する転写調節

因子の同定とその因子の機能解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1) yeast-One hybrid 法

IL1A の転写調節領域の配列を3回繰り返した2本鎖 DNA を作成し、その DNA 配列に結合する蛋白質を、線維芽細胞の cDNA library から、yeast-One Hybrid 法(Clontech 社)にてスクリーニングした。

2) ヒト EBP1 に対する抗体を作成するため、EBP1 のアミノ酸配列より抗原性の高いと判定された c 末から 150 から 163 のアミノ酸を有するペプチドを作成した（キアゲン）。NewZealand White のウサギに3回、抗原を注

射し、血清を採取した。Affinity column を用いて精製をした。

### 3) ゲルシフトアッセイ

IL1A 遺伝子の転写調節領域 DNA と線維芽細胞から抽出した核蛋白質の結合を確認し、抗 EBPI 抗体を用いてスーパーシフトアッセイを行った。ゲルシフトアッセイには、Chemiluminescent EMSA kit (Pierce 社)を用いた。

### 4) siRNA を用いた EBPI の抑制

EBPI 遺伝子の翻訳開始部位からの 19 塩基を作成し、pSilencer neo vector (Ambion 社)に組み込む。Lipofection 法にて線維芽細胞に遺伝子導入し、G418 を用いて stable transfectant を作成した。

### 5) IL-1 $\alpha$ mRNA の解析

線維芽細胞の発現する IL-1 $\alpha$  mRNA 量を、real-time PCR 法にて解析した。

### 6) コラーゲン産生量

線維芽細胞の発現するコラーゲン産生量を procollagen type I c-peptide EIA kit (Takara)を用いて検討した。

## C. 研究結果

### 1) Yeast One-hybrid 法によるスクリーニング

EBPI が IL1A の転写調節領域に結合する蛋白質として同定された。

### 2) IL1A 遺伝子転写調節領域への EBPI の結合能

強皮症線維芽細胞の核抽出液と IL1A 遺伝子の転写調節部位の結合能を検討した。正常線維芽細胞の核抽出液では結合蛋白質は認められないが、強皮症線維芽細胞では特異バンドがみられた (図 1)。さらに、抗 EBPI 抗体を用いることにより、スーパーシフトを起こすことがわかり、IL1A の転写調節領域には、EBPI が結合していることがわかった。

### 3) EBPI の線維芽細胞内局在

線維芽細胞を 4-chamber slide にて培養し、48 時間後に 2% paraformaldehyde/0.1% Triton X100 にて固定した。抗 EBPI 抗体を用いて、EBPI の細胞内発現を検討した。正常線維芽細胞では、細胞内のみ弱い染色が認められたが、強皮症線維芽細胞では、核内に強い発現が認められた (図 2)。

### 4) EBPI の IL-1 $\alpha$ mRNA 発現への作用

EBPI mRNA に特異的な配列を有する 21mer の RNA を合成する pSilencer-neo vector を強皮症の線維芽細胞に遺伝子導入し、EBPI 蛋白質の産生を抑制した。その結果、図 3 に示すように IL-1 $\alpha$  mRNA の発現が低下した。

### 5) EBPI のコラーゲン産生におよぼす作用

siRNA 法により、EBPI を抑制することにより、強皮症線維芽細胞の産生するプロコラーゲン産生量は低下した (図 4)。

## D. 考案

強皮症線維芽細胞が IL-1 $\alpha$  を過剰に産生していることには、EBP1 の転写調節因子としての作用が重要であった。EBP1 は、当初 PA2G4 family の一つとしてヒトで見つけられ<sup>9</sup>、ErbB3 の結合蛋白質であることが 2000 年に報告された<sup>10</sup>。ErbB3 のリガンドである heregulin と ErbB3 との結合により、ErbB3 の細胞内ドメインに結合している EBP1 は、解離し核内へ移行する。その後、転写調節因子として働いている可能性が示唆されていたが、詳細は不明のままであった。今回結果を示さなかったが、EBP1 が結合している ErbB3 は、正常および強皮症線維芽細胞には発現していなかった(mRNA レベルと細胞表面)。つまり、線維芽細胞においては、EBP1 は、ErbB3 の結合蛋白質として存在しているのではなく、その活性化の機序は明かではない。強皮症線維芽細胞では、核内に EBP1 が存在していたが、正常線維芽細胞では、細胞内だけに染色された。EBP1 が、核内へ移行する機序については今後の検討が必要である。

また、EBP1 の発現を抑制することにより、コラーゲンの合成が抑制された。この抑制が、蛋白レベルでの生合成の抑制なのか、遺伝子転写レベルでの抑制なのかを検討する必要がある。さらに、EBP1 は、IL-1 $\alpha$  の転写調節を介して、コラーゲン合成に関与すると我々は、考えているが、今回の結果からでは、EBP1 が、直接コラーゲン産生を亢進させる可能性も推測される。今後、EBP1 のコラーゲン合成におよぼす直接的な作用についても検討していく。

## E. 結論

強皮症線維芽細胞では、EBP1 が核内に集積し、その結果、構成的な IL-1 $\alpha$  の発現が誘導され、コラーゲン合成が亢進している可能性が示唆された。強皮症の病態に EBP1 の発現および核内への移行が重要であると考えられる。現在、核内への移行の機序を検討中である。

## F. 文献

1. LeRoy EC: Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro. A possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 1974;54:880-889.
2. Kadono T, Kikuchi K, Ihn H, Takehara K, Tamaki K: Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J Rheumatol* 1998;25:296-301.
3. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, et al: Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 1995;105:280-284.
4. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith EA, LeRoy EC: Increased expression of TGF- $\beta$  receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF- $\beta$  signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol* 1998;110:47-51.

5. Kawaguchi Y, Harigai M, Hara M, Suzuki K, Kawakami M, Ishizuka T, et al: Increased interleukin 1 receptor, type I, at messenger RNA and protein level in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:1504-1510.
6. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM: Endogenous IL-1alpha from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J Clin Invest* 1999;103:1253-1260.
7. Kawaguchi, Y: 1994. IL-1 $\alpha$  gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 97:445-450.
8. Kawaguchi Y, Hara M, Kamatani N, Wright TM: Identification of an IL1A gene segment that determines aberrant constitutive expression of interleukin-1  $\alpha$  in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:193-202.
9. Lamartine J, Seri M, Cinti R, Heitzmann F, Creaven M, Radomski N, Jost E, Lenoir GM, Romeo G, Sylla BS: Molecular cloning and mapping of a human cDNA (PA2G4) that encodes a protein highly homologous to the mouse cell cycle protein p38-2G4. *Cytogenet Cell Genet* 1997;78:31-35.
10. Yoo JY, Wang XW, Rishi AK, Lessor T, Xia XM, Gustafson TA, Hamburger AW: Interaction of the PA2G4 (EBP1) protein with ErbB3 and regulation of this binding by heregulin. *Br J Cancer* 2000;82:683-690.



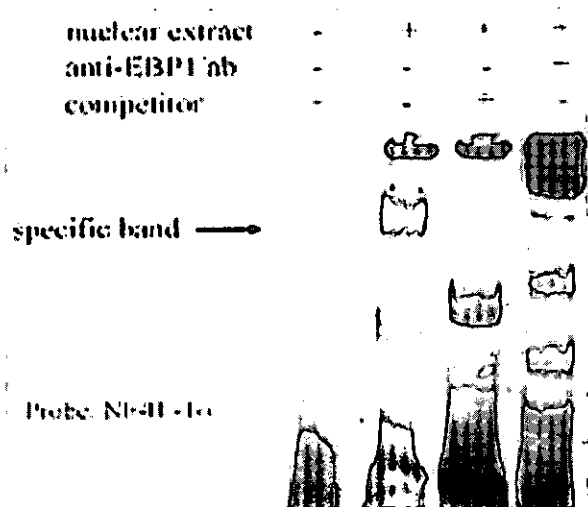


図1 ゲルシフトアッセイ  
 lane 2 に認められた特異バンドが、抗 EBPI 抗体を添加することにより、上方へ移動した (lane 4)。

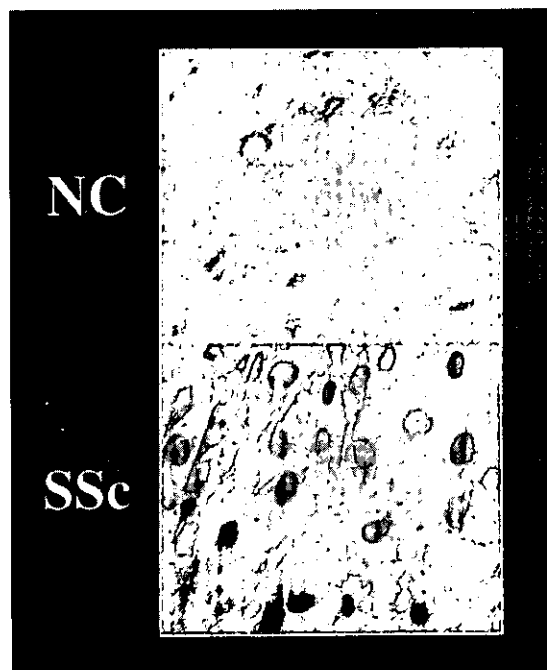


図2 EBPI の細胞内局在  
 強皮症 (SSc) と正常 (NC) 線維芽細胞を chamber slide 上に固定し、抗 EBPI 抗体にて反応させ、ABC kit を用いて DAB 染色をおこなった。強皮症線維芽細胞では核内が染まったのに対し、正常線維芽細胞では細胞質内の染色のみであった。

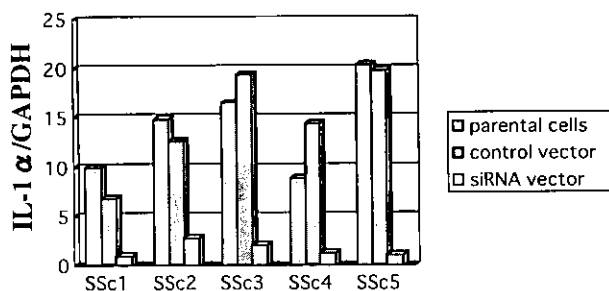


図3 IL-1 $\alpha$  mRNA の発現におよぼす EBPI の影響  
 5種類の強皮症線維芽細胞 (SSc1 から SSc5) に pSilencer-neo (EBPI) を遺伝子導入し、EBPI の発現を抑制した。その結果、5例とも線維芽細胞の発現する IL-1 $\alpha$  の mRNA 発現が減少した。

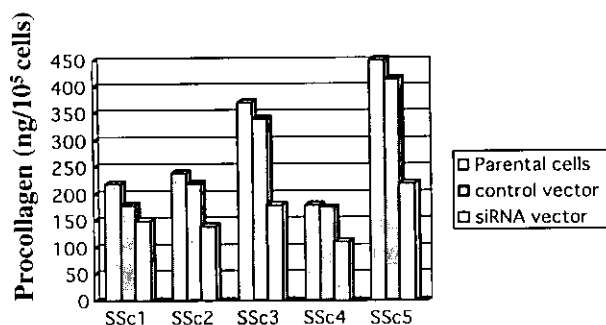


図4 コラーゲン産生におよぼす EBPI の影響  
 5種類の強皮症線維芽細胞 (SSc1 から SSc5) に pSilencer-neo (EBPI) を遺伝子導入し、procollagen type I c-peptide の産生量を検討した。EBPI の抑制により、コラーゲン産生は減少した。

## 強皮症の線維化におよぼす核内 pro-IL-1 $\alpha$ 結合因子の解析

分担研究者 川口鎮司 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター講師  
協力者 深澤千賀子 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター助手  
協力者 原まさ子 東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター教授

### 研究要旨

強皮症に特徴的な臓器の線維化は、病変局所の線維芽細胞の細胞外マトリックス産生異常に起因している。我々は、強皮症線維芽細胞の異常の一つのとして、細胞内、特に核内 pro-IL-1 $\alpha$  の構成的な発現をみつけた。さらに、核内 pro-IL-1 $\alpha$  の抑制により、IL-6, PDGF およびコラーゲンの産生抑制が誘導されることがわかってきた。一方、IL-1 $\alpha$  は、細胞外に分泌され、標的細胞上の受容体に結合することによりその作用を示すとされてきた。そこで、核内 pro-IL-1 $\alpha$  の機能を解析する目的で pro-IL-1 $\alpha$  結合蛋白質の同定とその機能を検討した。Nuclear localization sequence (NLS) を有する pro-IL-1 $\alpha$  であっても、単独では、細胞内から核内への移動はおこらず、結合蛋白質としての HAX-1 の存在が重要であった。また、コラーゲン合成に関与するためには、さらに、IL-1 受容体 type II との結合も重要であることが示された。これらの pro-IL-1 $\alpha$  複合体が、強皮症の線維芽細胞異常に関与していることが推定された。

### A. 研究目的

強皮症の病態が、線維芽細胞の異常により形成されていることは多くの研究者によって認められている<sup>1-5</sup>。我々のグループの研究により、線維芽細胞のコラーゲン産生に、内因性の IL-1 $\alpha$  過剰産生が重要な働きを呈していることがわかってきている<sup>6,7</sup>。IL-1 $\alpha$  は、mRNA から premature form の pro-IL-1 $\alpha$  (31 kDa) が合成され、protease により、17 kDa の mature IL-1 $\alpha$  へ変換される。この protease は、細胞内にも組織、血液中にも存在する。pro-IL-1 $\alpha$ 、mature IL-1 $\alpha$  ともに細胞外へ分泌されるが、細胞によっては、分泌が制限されて

いることもわかっている。皮膚上皮細胞、線維芽細胞および血管内皮細胞では、主に細胞内に蓄積されている。血管内皮細胞では、細胞内 IL-1 $\alpha$  を抑制することにより、血管内皮細胞の増殖能が増加したとする報告がある<sup>8</sup>。血管内皮細胞は、IL-1 $\alpha$  を分泌しないため、細胞内にて直接的に増殖抑制に働いていることが示唆された。しかし、IL-1 $\alpha$  が、細胞内で炎症性サイトカインとしての作用を誘導できるとする報告はない。今までの報告では、細胞外に分泌された IL-1 $\alpha$  が、細胞表面上の IL-1 受容体に結合することにより、多量の作用を惹起するとされている<sup>9</sup>。そこで、細胞

質内にて合成された pro-IL-1 $\alpha$ が、核へ移動し核内で作用を惹起するためには、pro-IL-1 $\alpha$ 単独ではなく、複合体の形成が重要であると仮定した。本研究では、pro-IL-1 $\alpha$ の結合蛋白質を同定し、その機能を解析することを試みた。

## B. 研究方法

### 1) 免疫沈降法

強皮症線維芽細胞を 10% FBS 添加の DMEM で培養し、70%コンフルエントとなったところで、methionine 無添加の培地に、<sup>35</sup>S-methionine を添加し、16時間培養して、細胞を <sup>35</sup>S にて標識した。標識した細胞の細胞質および核内の蛋白質を抽出した。モノクローナル抗ヒト IL-1 $\alpha$ 抗体を R & D 社より購入し、protein G-agarose と 4℃にて反応させ、複合体を作成した。この IL-1 $\alpha$ 抗体複合体を線維芽細胞の細胞内抽出液と混合し 4℃で反応させ、遠心と洗浄を5回、繰り返し免疫沈降を行った。Pellet を 10% SDS-PAGE にて展開し、autoradiography にて撮影した。

### 2) アミノ酸配列の決定

強皮症線維芽細胞を <sup>35</sup>S にて標識せずに細胞内抽出液と抗 IL-1 $\alpha$ 抗体を用い免疫沈降をおこない、SDS-PAGE にて展開後、PVDF 膜に転写した。PVDF 膜をクマシーブルーにて染色後、Procise 494 protein sequencing を用いて N 末から 10 残基の配列を決定した。

### 3) siRNA を用いた蛋白質合成の抑制

pSilencer neo vector (Ambion 社)に蛋白質に特

異的な RNA 配列を組み込み、lipofection 法 (TransFast, Promega)にて線維芽細胞に遺伝子導入し、G418 を用いて stable transfectant を作成した。

### 4) 免疫染色法

線維芽細胞を chamber slide にて培養し、80%コンフルエントとなったところで、固定して、抗ヒト IL-1 $\alpha$ 抗体(R&D社)を用いて、免疫染色を行った。

### 5) コラーゲン産生量

線維芽細胞の発現するコラーゲン産生量を procollagen type I c-peptide EIA kit (Takara)を用いて検討した。

## C. 研究結果

### 1) 免疫沈降法による結合蛋白質の同定

強皮症線維芽細胞の細胞内抽出液内に、pro-IL-1 $\alpha$ (31 kDa)と結合している蛋白質が、66, 45 および 35 kDa に認められた(図1)。1番強いシグナルとして認められた 66 kDa の蛋白質に関して、アミノ酸シーケンスを行ったところ、N 末からの配列が、F-T-L-Q-P-A-A-H-T-G であり、ホモロジー検索の結果、ヒト IL-1 受容体 type II と 100%一致した。

### 2) pro-IL-1 $\alpha$ 結合蛋白質

近年、細胞内 IL-1 $\alpha$ の結合蛋白質が IL-1 $\alpha$ の機能に重要であると考えられ、すでに、2つの研究室から2種類の結合蛋白質が報告されている。図2に示したように、HAX-1<sup>10</sup> と Necdin<sup>11</sup> が結合蛋白質である。それぞれ、35 お

よび 46 kDa と報告されており、今回の我々の結果で得られた結合蛋白の分子量と一致した。

3) HAX-1, Necdin, IL-1 受容体 type II(IL-1RII) の抑制による pro-IL-1 $\alpha$  の細胞内局在  
siRNA 法を用いて、HAX-1, Necdin, IL-1RII を選択的に抑制した。Pro-IL-1 $\alpha$  の細胞内局在を検討する目的で、抗 IL-1 $\alpha$  抗体を用いた免疫染色法を行った。図 3 に示すように、HAX-1 を抑制した細胞では、pro-IL-1 $\alpha$  は、核内への移行が妨げられていた。HAX-1 は、pro-IL-1 $\alpha$  の核内移行に重要な役割を果たしていることが推測された。

4) HAX-1, Necdin, IL-1RII のコラーゲン産生におよぼす影響  
siRNA 法にてそれぞれの pro-IL-1 $\alpha$  結合蛋白を選択的に抑制し、強皮症線維芽細胞の産生するプロコラーゲン量を定量した。HAX-1 および IL-1RII を抑制することにより、コラーゲンの産生は抑制された(図 4)。これらの検討は、正常線維芽細胞でも行ったが、HAX-1, Necdin および IL-1RII の抑制は、コラーゲン産生量には影響を与えなかった。

#### D. 考案

強皮症線維芽細胞にみられる pro-IL-1 $\alpha$  の核内への集積は、少なくとも 3 種類の結合蛋白との複合体により、生じていることが明らかとなった。特に、核内への移動は、HAX-1 の役割が重要であった。HAX-1 は、当初、リンパ球に特異的に発現する HS-1 蛋白に結

合する因子として発見され<sup>12</sup>、その後、2001年に、pro-IL-1 $\alpha$  の N 末近傍から、3ヶ所に結合することが報告された<sup>10</sup>。特に、pro-IL-1 $\alpha$  の nuclear localization sequence (NLS) の部位への結合が知られており、今回の我々の結果からも核移行に重要な蛋白質であることが示唆される。一方、IL-1RII 発現を抑制された線維芽細胞は、pro-IL-1 $\alpha$  の核内への移行には影響を与えられなかった。しかし、コラーゲン産生量は低下した。この結果は、核内で、pro-IL-1 $\alpha$  と IL-1RII との複合体がコラーゲン産生に重要であるか、または、IL-1RII の核内移行がコラーゲン産生に重要である可能性が生じてきた。pro-IL-1 $\alpha$  の単独での核内移行では、コラーゲンの産生に影響をあたえないと考えられる。我々の検討では、正常線維芽細胞は、IL-1RII の mRNA レベルでの発現が RT-PCR 法にて構成的に認められ、また、免疫染色法にて、細胞内での弱い染色が確認されている。強皮症線維芽細胞では、核内に IL-1RII の染色がみられた。つまり、IL-1RII が、pro-IL-1 $\alpha$  と結合することにより、核内に移動し、コラーゲンの合成に関与しているという可能性も考慮する必要がある。pro-IL-1 $\alpha$  の産生過剰が強皮症の線維芽細胞の phenotype を決定していることを考えてきたが、IL-1 $\alpha$  複合体、特に、HAX-1 と IL-1RII の重要性が明かとなった。

#### E. 結論

細胞内 pro-IL-1 $\alpha$  は、細胞表面の受容体を介した時のシグナル伝達とは異なり、複雑な IL-1 $\alpha$  複合体を形成し、細胞質から核に移動

し、何らかの作用を惹起していることが示唆された。今後、さらに、この複合体がコラーゲン遺伝子への転写調節因子として機能できないかを検討していく。

## F. 文献

1. LeRoy EC: Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro. A possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblasts. *J Clin Invest* 1974;54:880-889.
2. Kadono T, Kikuchi K, Ihn H, Takehara K, Tamaki K: Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J Rheumatol* 1998;25:296-301.
3. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, et al: Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 1995;105:280-284.
4. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith EA, LeRoy EC: Increased expression of TGF- $\beta$  receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF- $\beta$  signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol* 1998;110:47-51.
5. Kawaguchi Y, Harigai M, Hara M, Suzuki K, Kawakami M, Ishizuka T, et al: Increased interleukin 1 receptor, type I, at messenger RNA and protein level in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:1504-1510.
6. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM: Endogenous IL-1 $\alpha$  from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. *J Clin Invest* 1999;103:1253-1260.
7. Kawaguchi, Y: 1994. IL-1 $\alpha$  gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 97:445-450.
8. Maier JA, Voulalas P, Roeder D, Maciag T: Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 alpha antisense oligomer. *Science* 1990;249:1570-1574.
9. Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-2147
10. Yin H, Morioka H, Towle CA, Vidal M, Watanabe T, Weissbach L: Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 alpha N-terminal binding protein. *Cytokine* 2001;15:122-137.
11. Hu B, Wang S, Zhang Y, Feghali CA, Dingman JR, Wright TM: A nuclear target for interleukin-1 $\alpha$ : interaction with the growth suppressor necdin modulates proliferation and collagen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10008-10013.
12. Suzuki Y, Demoliere C, Kitamura D, Takeshita H, Deuschle U, Watanabe T: HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HSP, a substrate of Src family tyrosine kinases. *J Immunol* 1997;158:2736-2744.

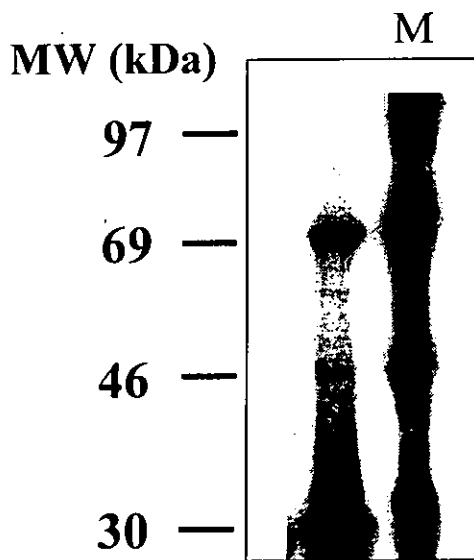


図1. pro-IL-1 $\alpha$  結合蛋白質の検出  
 $^{35}\text{S}$ にてラベルした強皮症線維芽細胞の細胞内蛋白を、抗 IL-1 $\alpha$  抗体を用いて免疫沈降を行った。SDS-PAGEにて展開し、オートラジオグラフィーにてバンドを検出した。  
 M: molecular marker

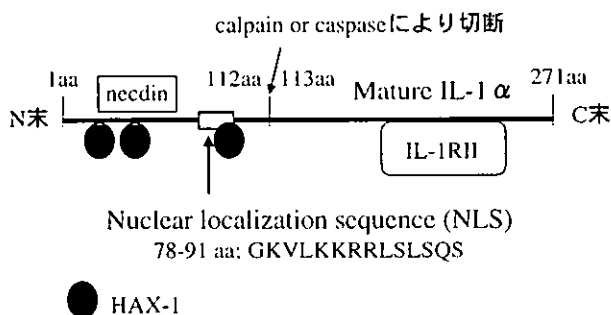


図2. 線維芽細胞内の pro-IL-1 $\alpha$  複合体の構造  
 271 アミノ酸からなる pro-IL-1 $\alpha$  は、112 番目と 113 番目にて切断され、113-271 aa の mature IL-1 $\alpha$  と N 末部分となる。78-91 aa には、nuclear localization sequence (NLS) と考えられているモチーフがある。

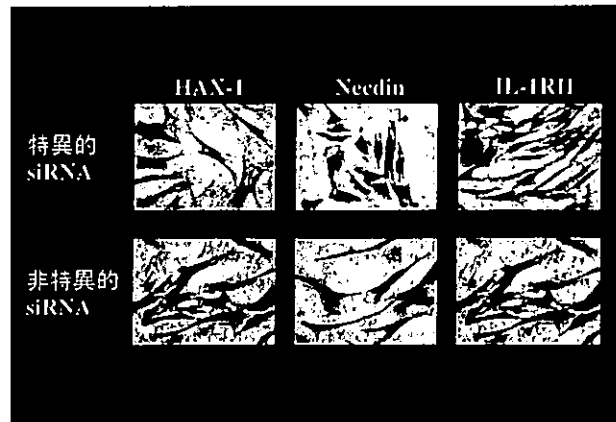


図3. 結合蛋白質を抑制したときの pro-IL-1 $\alpha$  の細胞内局在  
 強皮症線維芽細胞にそれぞれの遺伝子の配列を組み込んだ pSilencer-neo を stable transfection し、抗 IL-1 $\alpha$  抗体にて免疫染色した。HAX-1 を抑制した線維芽細胞でのみ、核内への pro-IL-1 $\alpha$  の移動が抑制された。下段は、vector に組み込んだ特異的遺伝子配列をスクランブルし相同性をなくし、それを組み込んだ pSilencer-neo を導入した線維芽細胞の結果をコントロールとして示した。

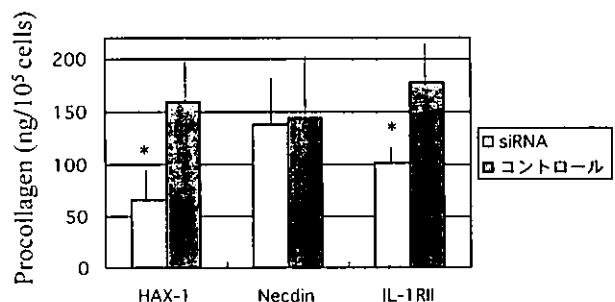


図4. pro-IL-1 $\alpha$  結合蛋白質を抑制した線維芽細胞のコラーゲン産生能の検討  
 HAX-1, Necdin, IL-1RII を siRNA 法を用いて抑制した培養強皮症線維芽細胞のコラーゲン産生量を、procollagen type I EIA kit にて測定した。HAX-1 および IL-1RII を抑制した細胞にて有意なコラーゲンの産生低下が認められた(\*,  $P < 0.01$ )。

厚生労働科学研究補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

Sphingosine kinase は TGF- $\beta$ により誘導され、TIMP-1 遺伝子の発現を制御している

分担研究者 石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学教授  
協力者 山中正義 群馬大学医学部附属病院皮膚科助手

研究要旨

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) はコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの合成を促進し、強皮症の病態形成にも深く関与していると考えられている。本研究では sphingosine kinase (SphK) の TGF- $\beta$  シグナル伝達機構に対する役割について、特に tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) 遺伝子の発現に対する影響について検討した。ヒト皮膚由来線維芽細胞では、SphK は TGF- $\beta$  により誘導されることが明らかになり、アデノウイルスベクターを用いた SphK1 強発現線維芽細胞においては TIMP-1 の発現は増強し、さらに TGF- $\beta$  と SphK-1 との相乗効果による著明な TIMP-1 の発現の増強が見られた。RNA interference を用いた SphK1 遺伝子ノックダウン系では TGF- $\beta$  により誘導される TIMP-1 の発現が抑制された。さらに TIMP-1 プロモーターアッセイにて SphK-1 はプロモーターレベルで TIMP-1 遺伝子の発現を調整し、この制御は AP1 領域を介することが明らかになった。

A. 研究目的

TGF- $\beta$  は線維芽細胞において細胞外マトリックスの分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) を抑制し、更に TIMPs をはじめとする MMPs の抑制因子を活性化することにより細胞外マトリックスの沈着に関与していると考えられている<sup>1)</sup>。また、全身性強皮症由来線維芽細胞では MMP-1 の活性が低下していること<sup>2)</sup> や TIMPs の発現が亢進していること<sup>3)</sup> が過去に報告されており、TGF- $\beta$  の細胞外マトリックス分解

系の制御に関するメカニズムの検討を進めることは、全身性強皮症の病態解明あるいは治療への応用において重要である。

Sphingosine-1-phosphate (S1P) は、以前は sphingosine 代謝における一つの間代謝産物という位置付けであったが、近年になりシグナル伝達物質として重要かつ多彩な作用を有することが明らかとなってきている<sup>4)</sup>。S1P は細胞増殖、アポトーシス、細胞分化、細胞骨格・細胞運動調節などにおいて多彩な活性を示し、腫瘍、血管新

生、炎症などの病態への関与も報告されている<sup>5)</sup>。

SphK は sphingosine をリン酸化して SIP を生成する酵素であるが、これまでに platelet-derived growth factor (PDGF), tumor necrosis- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),

nerve growth factor (NGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) などの成長因子により誘導されることが知られているが<sup>5)</sup>、TGF- $\beta$ に関する報告はない。そこで、TGF- $\beta$ の SphK 発現に対する影響を検討し、SphK が TGF- $\beta$ により誘導されることを確認した。そこで、TGF- $\beta$ により誘導された SphK がいかなる作用を細胞外マトリックス代謝に及ぼすのかを知るために、SphK と同じく TGF- $\beta$ により誘導される遺伝子の一つである TIMP-1 遺伝子に焦点を当て、SphK の TIMP-1 遺伝子発現に対する影響を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 細胞培養

今回の培養細胞実験はすべてヒト新生児包皮由来線維芽細胞を用いた。TGF- $\beta$ を添加する実験では、TGF- $\beta$ を添加する24~48時間前より、serum starvation (0.1%FCS) を行った。TGF- $\beta$ の濃度は 2.5 ng / mL とした。

### 2) sphingosine kinase activity assay

Olivera and Spiegel<sup>6)</sup>の方法に準じた。細胞を洗浄後、assay buffer で抽出。抽出したサンプルに sphingosine (50  $\mu$ M)と $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (10  $\mu$ Ci, 1 mM) を加えて 37°C で 30 分間反応させた。標識 SIP を薄層型クロマトグラフィーで分離し、X 線フィルムに露光した。バンドの定量化は PhosphorImager (Molecular Dynamics, Inc.; Sunnyvale, CA) を用いるか、プレートのバンドに一致する部位を scrape してシンチレーションカウンターにて測定した。

### 3) RT-PCR, Northern blot

RNA の抽出は AGPC 法 (Acid guanidinium-Phenol-Chloroform 法) にて行った。

RT reaction には random hexamer primer を用いた。SphK-1 の primer は forward : 5'-CGC CGC AGG GAA TGA CAC C-3', reverse : 5'-GCC TGT CCC CCC AAA GCA TAA C-3'を用いた。PCR 産物のサイズは 1492 bp である。コントロール (18S rRNA) は、QuantumRNA Classic 18S Standards (Ambion, Austin, TX) を用い、PCR 産物のサイズは 488 bp である。

Northern blot においても同様の方法で RNA を抽出し、各レーン 3.5 $\mu$ g の RNA をゲルに泳動し、ナイロンメンブランに転写した。 [<sup>32</sup>P]標識 cDNA TIMP-1 プローブ<sup>7)</sup> をハイブリダイズした。コントロールは 18S rRNA 5'-ACG GTA TCT GAT CGT CGA ACC-3'<sup>8)</sup>を用いた。バンドの定量化は PhosphorImager にて行った。

### 4) Western blot

サンプルは whole cell lysate を用いた。バッファー (Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), NaCl (150 mM), 1 % Nonidet P-40, 15 mM NaF, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g / mL aprotinin, 10  $\mu$ g / mL leupeptin) にて抽出し、SDS-PAGE で分離。ニトロセルロース膜に転写し、一次抗体、二次抗体反応させた後、バンドは enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) キットを用いて検出した。抗体は rabbit polyclonal human SphK-1<sup>9)</sup>, rabbit polyclonal c-Jun, phosphor-c-Jun (Cell Signaling Technology Beverly, MA) を用いた。TIMP-1 蛋白の検出には、サンプルとして培養液を用い、抗体には mouse monoclonal TIMP-1 (Ab4, Oncogene, San Diego, CA) を用いた。



## 5) Adenoviral Constructs

He Ⅰ<sup>10)</sup> の方法を用いて human SphK-1 遺伝子を発現する adenovirus を作成した。full-length human SphK1<sup>9)</sup> を shuttle vector (pAdTRACK-CMV) に組み込み、AdEasy-1 adenoviral backbone plasmid と共に *Escherichia coli* BJ5183 cell にエレクトロポレーション法で co-transfection した。human SphK-1 遺伝子を含むアデノウイルスを切り出し、293 cell に FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) を用いて transfection した。293 cell への感染、増殖を繰り返し、高力価のウイルスを得た。

## 6) Small Interfering RNA (siRNA)

siRNA を用いた hSPHK-1 遺伝子のノックダウンは、the siRNA user guide (<http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/sirna.html>) に準じた。スタートコドンから 70 塩基下流の 5'-GG CAA GGC CTT GCA GCT C-3'<sup>11)</sup> を作製 (Ambion, Austin, TX) し、OligofectAMINE (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて細胞に transfection した。

## 7) CAT assay

TIMP1-CAT plasmid は Dr.D.A.Mann より供与されたものを使用した<sup>12)</sup>。リン酸カルシウム法により transient-transfection し、CAT assay を行った<sup>12)</sup>。

## C. 研究結果

### 1) ヒト線維芽細胞において TGF-β は SphK 遺伝子発現を誘導する

はじめに、TGF-β の SphK activity に対する影響について検討した。その結果、TGF-β 添加3時間後より活性の増強が見られ、その増強は 24 時間後においても持続していた (Fig.1.A,B)。次に、この activity の増強が SphK 蛋白の増加に基づく

ものか、別の機序により activity を増強しているものなのかを知るために、SphK-1 の mRNA および蛋白レベルでの TGF-β の影響について、RT-PCR 法、ウエスタンブロット法にて検討した。その結果、TGF-β は mRNA レベルで SphK-1 遺伝子の発現を増強していることが明らかになった (Fig.1.C,D)。蛋白レベルでも mRNA と同様に発現の増強が見られた (Fig.1.E)。これらの結果は、線維芽細胞において TGF-β が SphK 遺伝子発現を誘導することを示している。

### 2) SphK-1 は TIMP-1 遺伝子の発現を誘導し、TGF-β の作用を増強する

TGF-β は多くの遺伝子の発現を誘導するが、その作用機序は様々である<sup>13,14)</sup>。すなわち、TGF-β によって直接誘導される遺伝子もあれば、TGF-β によって誘導された他の遺伝子により誘導されるといった二次的な作用によるものもある<sup>15)</sup>。SphK 遺伝子発現は TGF-β 添加 1 時間後には著明に増強されており (今回示していないが、TGF-β 添加 20 分後にも mRNA 発現の増強がみられた)、SphK は TGF-β の二次的な作用により誘導される遺伝子の発現に関与しているのではないかと考えた。TIMP-1 は TGF-β により誘導される遺伝子の一つであるが、その作用は TGF-β による直接的なものではなく、TGF-β を添加したことによって産生される他の蛋白の存在が必要であることが既に蛋白合成阻害剤を用いた実験結果により示されている<sup>16)</sup>。Fig.2A に蛋白合成阻害剤であるシクロヘキサマイド (CHX) を用いた実験の結果を示す。過去の報告と同様、CHX を添加した系では TGF-β による TIMP-1 遺伝子の発現増強は見られない。この結果から、TGF-β による TIMP-1 遺伝子の発現増強には新たな蛋白の合成が必要であることがわかる。次に、SphK-1 が TIMP-1 遺伝子の発現を誘導するか否かを検討するため

に、SphK-1 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを作製した。ウイルスを感染させたヒト線維芽細胞においてウイルス量依存的に SphK-1 遺伝子の発現は増強している(Fig. 2 B)。SphK-1 は TIMP-1 蛋白の発現を増強し、更に TGF- $\beta$ による作用も増強していた(Fig.2C)。mRNA レベルにおいても同様の結果が見られた (Fig.2D,E)。これらの結果は、SphK-1 の発現が TIMP-1 遺伝子の発現および TGF- $\beta$ による TIMP-1 遺伝子の発現増強に関与している可能性を示すものと考えた。

### 3) SphK-1 は TGF- $\beta$ による TIMP-1 遺伝子の発現増強に必要である

つぎに、内因性の SphK-1 が TGF- $\beta$ による TIMP-1 遺伝子の発現増強に必要であるかどうかを知るために、small interfering RNAs (siRNA)により SphK-1 をノックダウンした細胞を用いた検討を行った。siRNA の効果は sphingosine kinase activity assay にて確認した (Fig. 3A)。この結果、SphK-1 をノックダウンした細胞においては basal レベルの TIMP-1 遺伝子の発現は抑制されなかったが、TGF- $\beta$ による TIMP-1 遺伝子の発現増強は抑制されていた(Fig. 3B,C)。これらの結果から、SphK-1 は TGF- $\beta$ による TIMP-1 遺伝子の発現増強に必要であることが示唆された。

### 4) SphK-1 は AP-1 領域を介して TIMP-1 プロモーター活性を増強している

最近、TGF- $\beta$ は AP-1 領域を介して TIMP-1 プロモーター活性を増強していると報告された<sup>17)</sup>。そこで、SphK-1 が TIMP-1 プロモーター活性を増強しているか否か。しているとすれば AP-1 領域を介しているのか、を検討した (Fig.4A)。big (-736 ~ +95) TIMP-1 プロモーターでは、TGF- $\beta$ と SphK-1 とともにプロモーターを活性化し、さらに SphK-1 と TGF- $\beta$ の相乗効果によるプロモーターの活性化がみられた。これは、SphK-1 アデノウ

イルスを用いた SphK-1 強制発現系における実験結果と一致するものであった。minimal (-102 ~ +95) TIMP1 プロモーターでは、TGF- $\beta$ による活性化はみられたが、SphK-1 による活性化はみられなかった。しかしながら、SphK-1 と TGF- $\beta$ の相乗効果によるプロモーターの活性化はみられた。これらの結果からは、SphK-1 単独によるプロモーターの活性化の機序と SphK-1 と TGF- $\beta$ の相乗効果によるプロモーターの活性化の機序は異なるものであることが示唆され、SphK-1 単独によるプロモーター活性化の責任領域は-736 ~ -102 の間にあるものと考えられた。次に、AP-1, Pea3, Sp1 領域を変異させた minimal プロモーターを用いて同様の検討を行った (Fig.4B)。その結果、SphK-1 と TGF- $\beta$ の相乗効果によるプロモーターの活性化は、AP-1 領域を変異させたプロモーターにおいては見られなかった。この結果より、SphK-1 と TGF- $\beta$ の相乗効果によるプロモーターの活性化は、AP-1 領域を介していることが明らかになった。更に AP-1 因子のうち TGF- $\beta$ による TIMP-1 プロモーター活性の増強に関与しているとされている c-Jun について検討した (Fig.5)。TGF- $\beta$ は c-Jun のリン酸化に影響を与えなかったが、SphK-1 は c-Jun のリン酸化を著明に増強した。これらの結果より、SphK-1 と TGF- $\beta$ の相乗効果によるプロモーターの活性化には、c-Jun のリン酸化と AP-1 領域の活性化が関与していることが示唆された。

## D. 考案

TGF- $\beta$ は多彩な作用をもち、線維芽細胞における細胞外基質のリモデリングや細胞接着、遊走においては重要な働きを担っていると考えられている。今回我々は、TGF- $\beta$ が SphK 活性を増強すること、そしてその活性の増強は mRNA および蛋

白レベルの増強に基づくものであることを明らかにした。更に、TGF- $\beta$ により誘導され強皮症の病態にも関与していると考えられている TIMP-1 に対する影響について検討し、SphK が TIMP-1 遺伝子の発現、特に TGF- $\beta$ を介した TIMP-1 遺伝子の発現に関与している可能性を示した。

今回の結果を強皮症の病態で考えてみると、SphK は TIMP-1 遺伝子の発現を増強の方向に向かわせる因子、すなわち、線維化を促進する方向へ向かわせる因子であると捉えることができる。しかし、SphK のコラーゲンプロモーター活性に対する影響の検討では、SphK はコラーゲンプロモーター活性を抑制することが既に明らかになっている<sup>18)</sup>。今回我々は、SphK が c-Jun のリン酸化を促進することを明らかにしたが、最近 c-Jun のリン酸化が TGF- $\beta$ によるコラーゲン遺伝子の発現に対して拮抗的に作用するという報告があり、SphK によるコラーゲンプロモーター活性の抑制には c-Jun のリン酸化が関与しているのかもしれない。また、SphK は TNF- $\alpha$ によっても誘導されることが知られている<sup>19)</sup>が、TNF- $\alpha$ による MMP-1,-3 遺伝子発現の増強には c-Jun が関与しているとする報告もあり、SphK の線維化に与える影響については他の成長因子、細胞外基質遺伝子の発現に関する更なる検討が必要であると考えられる。

## E. 結論

SphK の TGF- $\beta$ を介した TIMP 遺伝子発現に与える影響について報告した。Sphingolipid の細胞外基質代謝における役割はまだほとんど明らかになっていない。今後もさまざまな視点からの研究の積み重ねが必要である。

## F. 文献

1. Massague J.: The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990, 6:597-641
2. Takeda K., Hatamochi A., Ueki H., Nakata M., Oishi Y.: Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994, 103:359-363
3. Kikuchi K, Kadono T, Furue M, Tamaki K.: Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1997, 108:281-4.
4. Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S.: Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1585:193-201.
5. Spiegel S, Milstien S.: Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003,4:397-407.
6. Olivera A, Barlow KD, Spiegel S.: Assaying sphingosine kinase activity. *Methods Enzymol.* 2000, 311:215-23.
7. Levy MT, Trojanowska M, Reuben A.: Oncostatin M: a cytokine upregulated in human cirrhosis, increases collagen production by human hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2000 ,32:218-26.
8. O'Neill L, Holbrook NJ, Fargnoli J, Lakatta EG.: Progressive changes from young adult age

- to senescence in mRNA for rat cardiac myosin heavy chain genes. *Cardioscience*. 1991, 2:1-5.
9. Johnson KR, Becker KP, Facchinetti MM, Hannun YA, Obeid LM.: PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate *J Biol Chem*. 2002, 277:35257-62.
  10. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B.: A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95:2509-14.
  11. Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chae SS, Stefansson S, Liao G, Hla T. Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation.: *J Biol Chem*. 2002, 277:6667-75.
  12. Sohara N, Trojanowska M, Reuben A.: Oncostatin M stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 via a MEK-sensitive mechanism in human myofibroblasts.: *J Hepatol*. 2002, 36:191-9.
  13. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A.: Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem*. 2001, 276:17058-62.
  14. Yang YC, Piek E, Zavadil J, Liang D, Xie D, Heyer J, Pavlidis P, Kucherlapati R, Roberts AB, Bottinger EP.: Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100:10269-74.
  15. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR.: Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J*. 1999, 13:1774-86.
  16. Overall CM, Wrana JL, Sodek J.: Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem*. 1991, 266:14064-71.
  17. Hall MC, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR, Clark IM.: The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem*. 2003, 278:10304-13.
  18. Sato M, Markiewicz M, Yamanaka M, Bielawska A, Mao C, Obeid LM, Hannun YA, Trojanowska M.: Modulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by endogenous sphingolipid mediators. *J Biol Chem*. 2003, 278:9276-82.