

細胞外マトリックス遺伝子発現調節におけるサイトカインの役割

簀 持 淳

近年、サイトカインの細胞外マトリックス成分の遺伝子発現調節にはたす役割が注目されるようになってきた。本稿ではサイトカインの細胞外マトリックス成分、特に皮膚や骨の主構成蛋白である I 型コラーゲンの遺伝子発現に対する影響について述べた。TNF- α は α_1 (I) コラーゲンを転写レベルで抑制し、 α_1 (I) コラーゲンプロモーター遺伝子の -107 までの部分を介することが明らかにされた。

(平成 6 年 5 月 2 日採用)

Role of Cytokines in Controlling Extracellular Matrix Gene Expression

Atsushi Hatamochi

Recently, the role of cytokines in controlling gene expression of extracellular matrix components has been increasingly emphasized. In this article, the effects of cytokines on regulation of gene expression of extracellular matrix components, especially of type I collagen were described. It was found that TNF- α reduced α_1 (I) collagen transcription through at least up to -107 bp upstream of the human α_1 (I) collagen promoter gene in fibroblasts. (Accepted on May 2, 1994) *Kawasaki Igakkaishi* 20 Suppl: 31-40, 1994

Key Words ① Cytokines ② Fibroblasts ③ Extracellular matrix
④ Collagen ⑤ Gene expression
⑥ Tumor necrosis factor- α

はじめに

サイトカインとは免疫応答、炎症反応、さらには造血反応などの生体機能の発現を制御している蛋白分子群の総称である¹⁾。サイトカインにはリンフォカイン、モノカイン、インターロイキン、インターフェロンなどと呼ばれるものが含まれるのであるがこれらは単球-マクロファージ、リンパ球のみならず血小板、線維芽細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞など生体内のあらゆ

る細胞より産生されることが知られている。種々のサイトカインが同定されその性状が明らかになるにつれてサイトカインと疾患との関係も明らかになりつつある。サイトカインの欠乏、過剰産生、拮抗物質の存在などが多くの疾患の病因あるいは病態に関与している。またサイトカインが遺伝子工学的手法により大量に産生されることが可能となった現在、サイトカインを治療に用いる試みも始まっている。

サイトカインは特異的な細胞表面レセプターに結合する。それぞれのサイトカインは重複す

る多数の細胞調節能を有する。またそれぞれのサイトカインが多種類の標的細胞を有し、それぞれが異なった効果を標的細胞に及ぼす。すなわち単一のサイトカインでも多種類の標的細胞に作用し、異なった影響を及ぼす(pleiotropy: 多様性)。しかも、異なったサイトカインが同じ機能も有している(redundancy: 重複性)²⁾ (Fig. 1)。そしてサイトカインの細胞表面での結合が最終的には細胞のRNAや蛋白合成のパターンに影響を及ぼし、細胞の動態を変化させるのである。

細胞外マトリックスはコラーゲンに代表される細胞外に沈着した種々の化学物質の複合会合体であり、生体のいたるところに存在する。細胞外マトリックスは大きく分けてコラーゲン性蛋白、非コラーゲン性蛋白、プロテオグリカンの3構成成分より成り立っている³⁾。最近、多くのサイトカインが、細胞外マトリックス構成成分の遺伝子発現に特異的に影響を及ぼすことが知られている (Table 1)。また近年、特に細胞外マトリックス代謝が強く関与する現象である創傷治癒過程及び線維化における、これらサイトカインの細胞外マトリックス発現調節にはたす役割が注目されつつある。本稿ではサイトカインの細胞外マトリックス、特に皮膚などの主成分であるI型コラーゲンの遺伝子発現に及ぼす影響について述べたい。

創傷治癒過程における細胞外マトリックス発現にはたすサイトカインの役割

創傷治癒は連続しておこる各相の炎症反応、

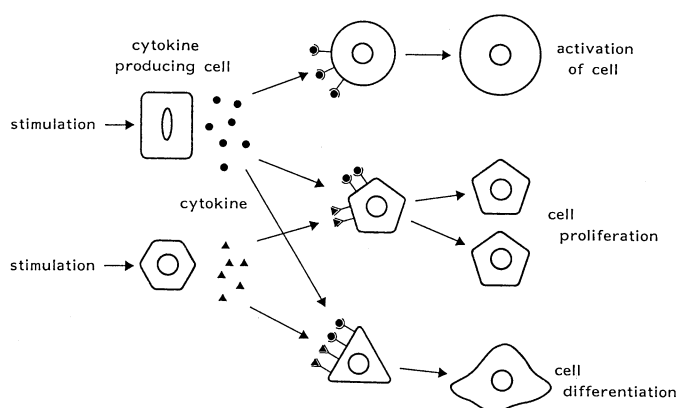


Fig. 1. Pleiotropy and redundancy of cytokines

Table 1. Effects of cytokines on fibroblast growth and connective tissue production

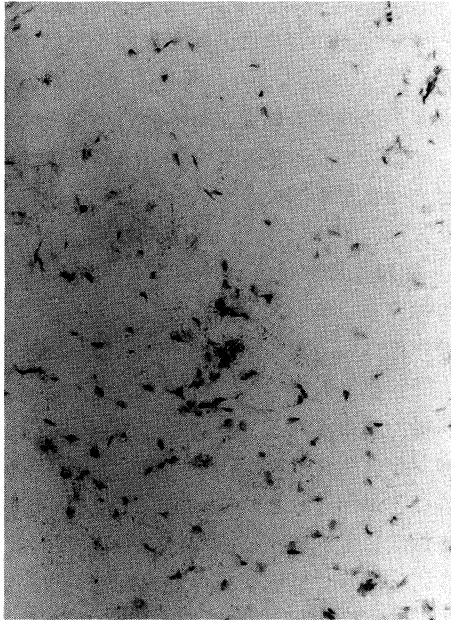
Cytokine	Fibroblast proliferation	Connective tissue production
EGF	↑	↓
IL-1	↑	↑ ↓
IL-6	—	↑
TNF- α	↑ ↓	↓
TNF- β (LT)	↑	—
TGF- β	↑ ↓	↑
PDGF	↑	—
FGF	↑	—
IFN- α	↓	↓
IFN- β	↓	—
IFN- γ	↓	↓

↑: increased ↓: decreased —: not detected

種々の細胞の遊走及び増殖、細胞外マトリックス合成、血管新生、そして再構築によって特徴づけられる相互的な一連の修復過程であり、非常に複雑な機構によって制御されていると考えられる⁴⁾。これらの多くの反応の生物学的な意味はなお不明な点も多いが、少なくとも真皮の主構成成分であるI型コラーゲンの生合成は皮膚組織欠損の再構築に重要な中心的役割をはたしている^{5),6)}。合成されるコラーゲンはこれまで放射性ラベルされたプロリンを動物に注射し、新たに合成される蛋白へ取り込まれ、水酸化されるものによって測定されてきた。コラーゲンの創傷への沈着は約3週間続き、やがて沈着は終了するとされているが⁷⁾、その間コラーゲン合成

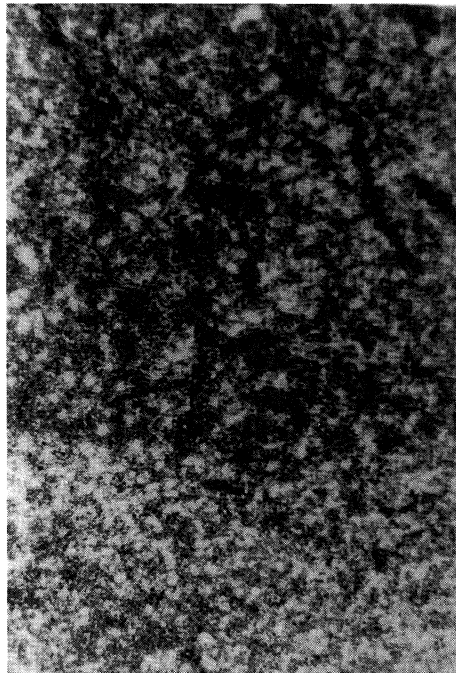
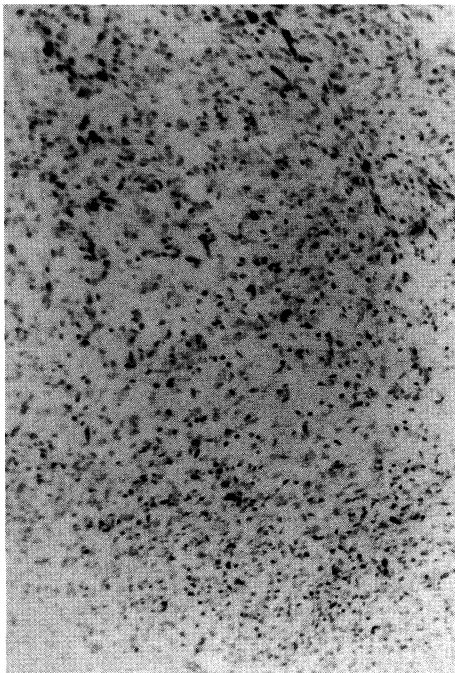
の上昇は持続し⁷⁾, すなわち, 合成と分解の平衡が保たれていることが示唆される. 一方, ラットの肉芽組織より抽出した RNA より I 型コラーゲンの mRNA レベルをドットプロット, あるいはノーザン・プロットを用いて定量すると肉芽

組織形成の初期にはコラーゲン遺伝子発現は有意に増加を示すが, その末期になるとそれは減少する⁸⁾. しかし, これらの測定は創傷全体を摘出したものを用いてなされたものであり個々の細胞や創傷における局在についての情報は得られていない. In situ hybridization 法によるコラーゲン特異的 mRNA レベルの測定は創傷治癒の過程での経過並びに細胞における局在を研究するのに有用な手法である. 我々は in situ hybridization 法によりラットの創傷治癒過程における I 型コラーゲンの細胞レベルでの局在を



2-A

Fig. 2. Localization of collagen $\alpha_1(I)$ chain mRNA synthesizing cells during the phases of wound healing. A: Activation of deep dermal fibroblastic cells 16 h after initial wounding. B: 6-day-old wound: intense labeling of fibroblastic cells within newly formed granulation tissue in the deep and upper layers of the granulation tissue in light (left) and dark field microscopy (right). C: At day 8 after initial wounding most of the highly labeled cells are found to be localized directly beneath the epidermis, and only weak labeling was observed in deeper layers of the restoration tissue in light (left) and dark field (right) microscopy.



2-B

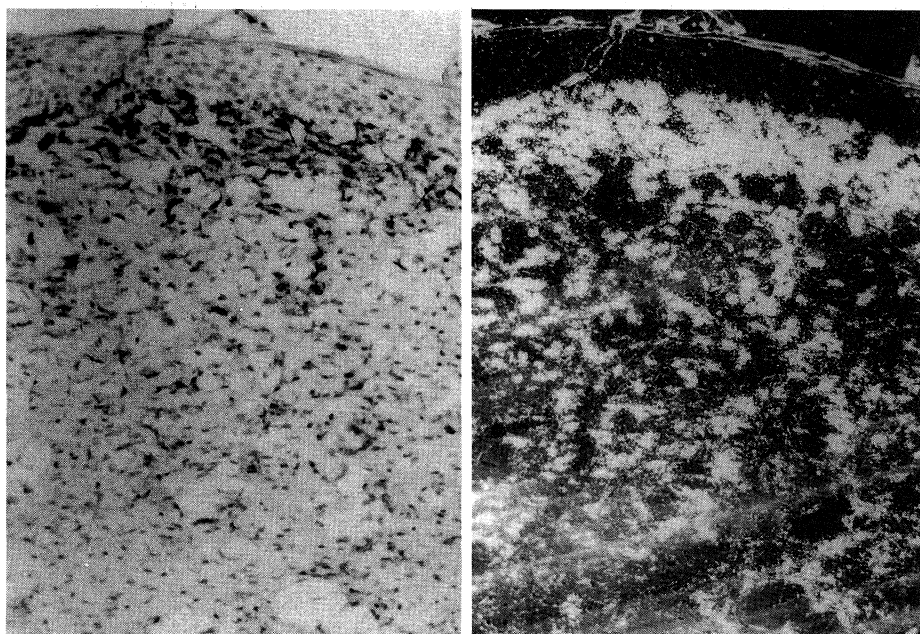
検討した⁹⁾。創傷を起こしてから16時間後には肉芽組織の深層付近にある線維芽細胞様細胞にコラーゲン遺伝子の活性化が認められた (Fig. 2A)。創傷の16日目には強い $\alpha_1(I)$ コラーゲン mRNA の発現が肉芽組織中の多くの細胞に認められ (Fig. 2B)，8日目には強い活性が表皮直下に局在して認められた (Fig. 2C)。26日目には $\alpha_1(I)$ コラーゲン遺伝子発現の増加はもはや認められなかった。

種々のサイトカイン，特に血小板由来成長因子 (PDGF)，トランスフォーミング成長因子 (TGF)- β ，線維芽細胞成長因子 (FGF) などの成長因子が創傷治癒を促進させることが知られている¹⁰⁾。PDGF 及び TGF- β_1 は動物実験において軟部組織の修復を刺激する強力な成長因子として知られている^{11)~13)}。また，線維芽細胞の培養系において PDGF は選択的にフィブロネクチン，グリコサミノグリカン，ヒアルロン酸合成を増加させる^{14),15)}。また，TGF- β はグリコサミノグリカン，フィブロネクチン，I型コラーゲン合成の増加を引き起こす^{16),17)}。PDGF 及び TGF- β_1 は異なったメカニズムで in vivo で

の修復を促進させるが，最終的にはこれらの成長因子はともに，通常治癒過程に必須である，コラーゲン合成の促進に関与するのである^{4),18)}。修復の初期には PDGF は急性炎症反応を増加させ，特にマクロファージを遊走，活性化させるように働くが，TGF- β はむしろ線維芽細胞のコラーゲン合成の促進に直接に影響を及ぼすように働く¹⁹⁾。しかしながら，成長因子による創傷の治癒促進過程での促進させる度合いや，時間経過，沈着してくる細胞外マトリックスのタイプなどまだまだ不明な点も多い。

線維化におけるサイトカインの役割

線維化はいくつかの疾患の経過中にたとえば肺，肝，血管壁(動脈硬化症)，皮膚などにおける疾患で認められる。皮膚における疾患としては強皮症，ケロイド，肥厚性瘢痕，Shulman 症候群などが知られている。それらの反応はきわめて類似しており，その主な特徴はおかされた臓器におけるコラーゲンを主成分とする細胞外マトリックスの過剰な沈着である²⁰⁾。線維化の形



2-C

成される各段階について、病因論的に最も研究がなされているのは恐らく強皮症であり、それは線維化の過程を研究するためにきわめて適したモデルと考えられる^{21),22)}。

線維化ではまず最初の反応として血管壁がおかされることが考えられ、引き続いて、血小板や炎症性細胞により産生された活動性のメディエーターが周辺組織へ浸透する状態が起こる^{23),24)}。その因子としては、PDGF、表皮成長因子 (EGF) やトランスフォーミング成長因子 (TGF)- β などの成長因子などで、これらは線維芽細胞の活性化因子としても知られており^{24),25)}、線維芽細胞を損傷のある部へ遊走したり、その増殖を亢進させたり、コラーゲンやその他の細胞外マトリックス成分の生合成を活性化させたりする¹⁰⁾。強皮症の初期における炎症性細胞と活性化された線維芽細胞の解剖学的な colocalization は、これらの炎症性細胞から放出されるサイトカインがその活性化に重要な影響を及ぼしているものと示唆されている。この概念はさらに活性化されたリンパ球、単球の培養上清が培養線維芽細胞のコラーゲン合成を刺激するとする実験結果によって支持されるようになった^{26),27)}。そしてその後さらに recombinant に得られたサイトカインを用いることが可能となり、これらの培養上清中の単一の成分の生物学的活性の特徴づけがなされるようになった。TGF- β_1 及び TGF- β_2 が細胞外マトリックス合成の誘導にきわめて重要であることが明らかになりつつある²⁸⁾。新生児マウスの皮内に TGF- β を局所注射することにより急速に肉芽組織が形成され、マトリックス蛋白の沈着を増加させるという成績がある²⁹⁾。これは線維芽細胞の遊走と増殖の亢進にもよるのであるが、マトリックス蛋白の合成の増加によってなされている。TGF- β によるコラーゲン及びフィ

ブロネクチン遺伝子発現の誘導についてはその後、分子レベルでの詳細な研究がなされている^{30),31)}。マウス α_2 (I) コラーゲン・プロモーター遺伝子を用いた解析では TGF- β は NIH-3T3 細胞におけるコラーゲン遺伝子発現を10倍増加させ、それは Nuclear Factor-1(NF-1)の結合部位を介してなされることが明らかにされた。

いくつかの *in vitro* での研究で、線維化の特に炎症反応を伴った活動期の部分より得た線維芽細胞の I 型コラーゲン mRNA レベルが増加している^{32)~34)} ことより、多くの線維化の過程でのコラーゲン合成の活性化は転写のレベルでなされていると考えられている。また、直接に nuclear run-off 法により転写の比を測定することによってもそれが確認されている³⁵⁾。最近, *in situ* hybridization 法を用いて過剰な α_1 (I) コラーゲン mRNA が血管周囲性の浸潤細胞と co-localization する線維芽細胞様細胞に認められることが示されている^{36),37)}。またさらに強皮症患者の真皮における増強された TGF- β mRNA と α_1 (I) コラーゲンの mRNA の co-localization についても報告がなされている^{38),39)}。

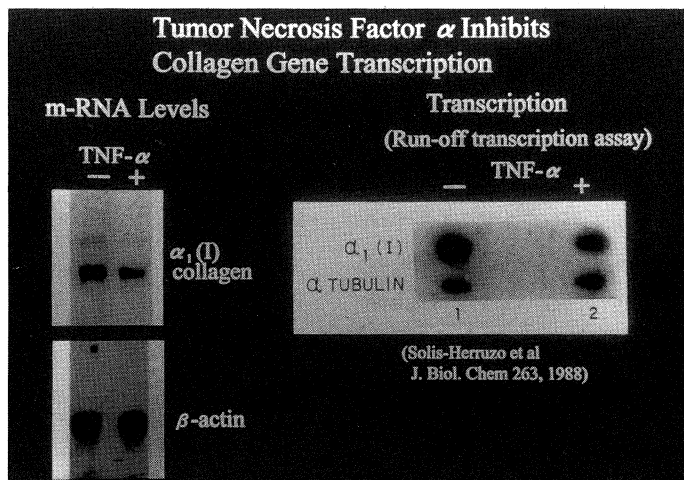


Fig. 3. Effects of TNF- α and α_1 (I) collagen gene expression by human dermal fibroblasts.

腫瘍壊死因子- α (TNF- α) のヒト真皮線維芽細胞における α_1 (I) コラーゲン・プロモーター遺伝子調節機構

サイトカインの細胞外マトリックス成分の遺伝子発現調節に対する役割は近年、創傷治癒や線維化、さらには癌の転移など種々の方面から注目されるようになってきている。細胞外マトリックス産生に強い影響を及ぼすサイトカインに TNF- α がある。TNF- α は真皮線維芽細胞のコラーゲン遺伝子を転写レベルで抑制する^{40)~42)} (Fig. 3)。我々はこの TNF- α が細胞表面のレセプターに結合した後の I 型コラーゲン遺伝子の転写を調節する細胞内の経路を理解するために α_1 (I) コラーゲン・プロモーター遺伝子を線維芽細胞に一過性に移入する方法で解析を試みた⁴³⁾。すなわち多くの他の遺伝子においてなされている方法と同じであるが、我々は I 型コラーゲン遺伝子の調節領域 (プロモーター) の研究をより簡便にするために大部分の構造遺伝子部分をより小さなマーカー遺伝子に接続 (fuse) した。これらの研究において一般によく用いられるマーカー遺伝子に細菌由来のクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子⁴⁴⁾ がある。これは真核細胞には内因性に存在しない。Figure 4 は本研究に用いたキメラ遺伝子の原型で、ヒト α_1 (I) コラーゲン上流 2.3 Kbp を CAT 遺伝子に接続したものである (P 2.3 K α_1 (I) CAT)。調節領域の機能を調べる目的でキ

メラ遺伝子を DNA transfection 法により培養線維芽細胞に移入する。そしていわゆる一過性発現実験 (transient expression experiments) を施行する。すなわち transfection 48 時間後に細胞を回収し、溶解し extract とした後、CAT 酵素の活性を測定する (CAT アッセイ)。CAT 酵素の活性は基質として 14 C-クロラムフェニコールを用い extract と反応させ、薄層クロマトグラフによってアセチル化した 14 C-クロラムフェニコール量を測定する。この活性は CAT 遺伝子に

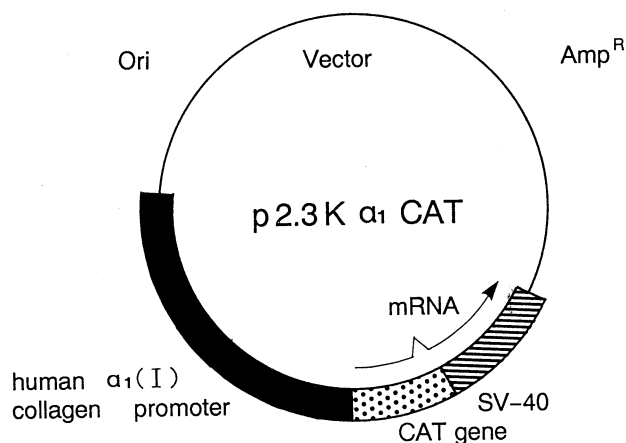


Fig. 4. Prototype recombinant plasmid used for various constructions.

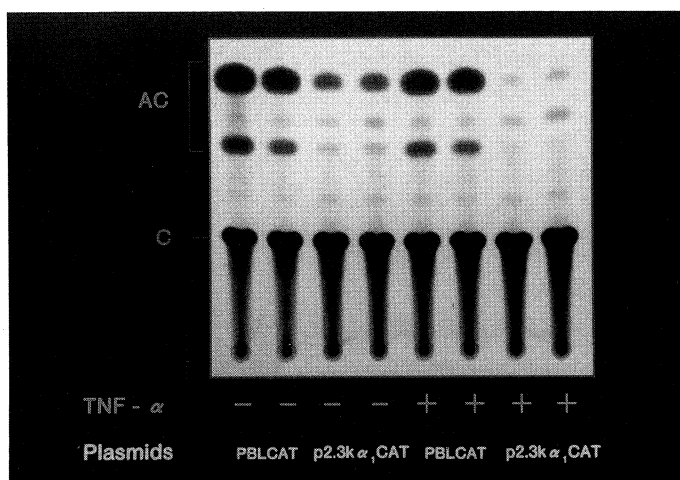


Fig. 5. Effects of TNF- α on the activity of the transcriptional regulatory elements of α_1 (I) collagen gene in transfected cultured fibroblasts.

接続された遺伝子の調節領域の転写の活性に比例している。従ってここで示す実験の結果は培養線維芽細胞における I 型コラーゲンの調節領域の活性についての情報を示している。さらにキメラ遺伝子中に存在する調節配列についての研究は欠失変異キメラ遺伝子さらには点変異 (mutagenesis) キメラ遺伝子作成により解析が可能である。

Figure 5 に培養線維芽細胞に transfection された $\alpha_1(I)$ コラーゲン遺伝子転写調節に対する $\text{TNF-}\alpha$ の影響を示す。 $\text{TNF-}\alpha$ は $\text{P2.3 K}\alpha_1(I)$ CAT の transfection された線維芽細胞の CAT 活性を抑制するが、対照の単純ヘルペス・thymidine kinase 遺伝子⁴⁵⁾ に対しては影響が認められない。またいくつかの $\alpha_1(I)$ コラーゲン欠失変異キメラ遺伝子を用いてのいわゆる deletion analysis では $\text{TNF-}\alpha$ は上流より -332 まで欠失しても (**Fig. 6A**)、またさらに -107

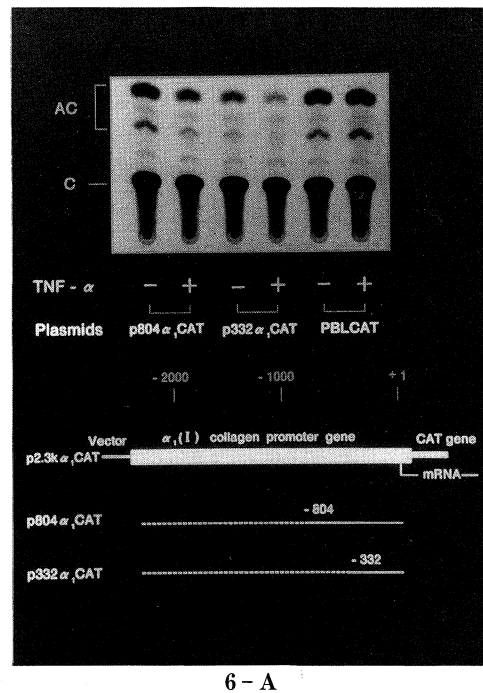


Fig. 6. Effects of $\text{TNF-}\alpha$ on the CAT activity of fibroblasts transfected with various deleted $\alpha_1(I)$ collagen promoter gene.

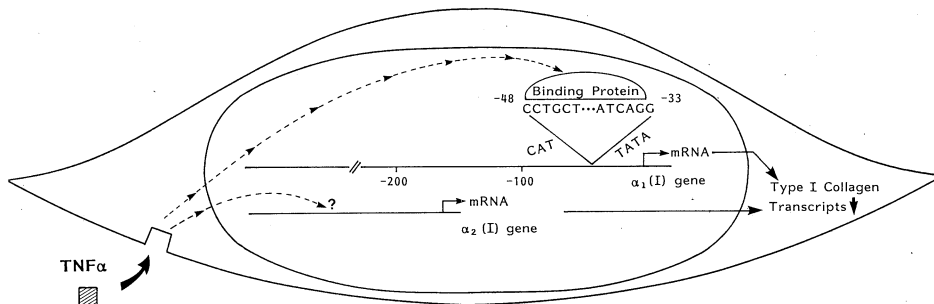
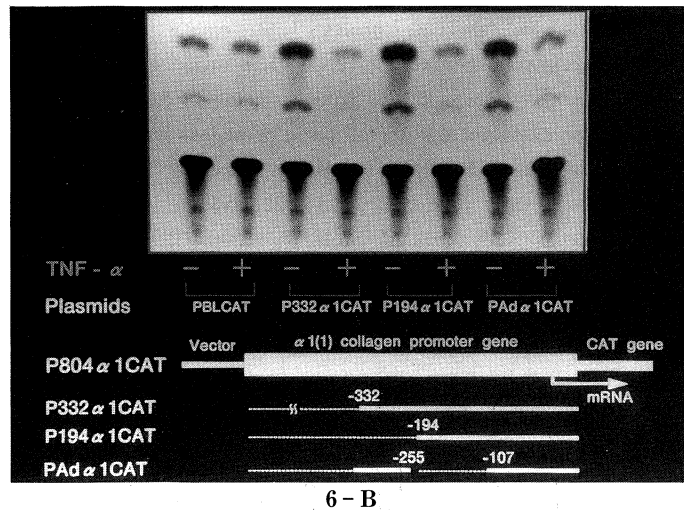


Fig. 7. Schematic representation of the regulatory mechanism of $\text{TNF-}\alpha$ on collagen biosynthesis in human dermal fibroblasts.

まで欠失させても (Fig. 6B) なお $\alpha_1(I)$ コラーゲンの転写活性を抑制する. $\alpha_1(I)$ コラーゲンの-107より下流には CCAAT box, TATA box が存在するが-48~-33の部分に興味ある回転対称シーケンス-48 CCTGCTCT/CCATCAGG-33が存在している. その部分を点変異させて CAT アッセイを施行したところ TNF- α の抑制の度合は明らかに減少し (data は示さず), また, バンドシフトアッセイ等により

その部分に結合する蛋白の存在することも明らかにした (data は示さず). 現在その蛋白の特徴づけ, 精製を行っている. このように TNF- α は少なくともこの-48~-33の部分を通して $\alpha_1(I)$ コラーゲン遺伝子の転写を抑制すると考えられる (Fig. 7).

本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No5-601) の援助によって行われたものである.

文 献

- 1) Balkwill FR, Burke F : The cytokine network. *Immunology Today* 10 : 299-304, 1989
- 2) Paul WE : Pleiotropy and redundancy : T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell* 57 : 521-524, 1989
- 3) Krieg TH, Hein R, Hatamochi A, Aumailley M : Molecular and clinical aspects of connective tissue. *Eur J Clin Invest* 18 : 105-123, 1988
- 4) Peacock EE, Jr. : Wound Repair, 2nd edition, Philadelphia, WB Saunders Co. 1984
- 5) Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF : Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med* 161 : 337-340, 1979
- 6) Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, Stenman S : Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* 48 : 47-51, 1980
- 7) Madden JW, Peacock EE : Studies on the biology of collagen during wound healing : I. Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat. *Surgery* 64 : 288-294, 1968
- 8) Makela, Vuorio E : Type I collagen messenger RNA levels in experimental granulation tissue and silicosis in rats. *Med Biol* 64 : 15-22, 1986
- 9) Scharfetter K, Kulozik M, Stolz W, Lankat-Buttgereit B, Hatamochi A, Söhnchen R, Krieg T : Localization of collagen $\alpha_1(I)$ gene expression during wound healing by in situ hybridization. *J Invest Dermatol* 93 : 405-412, 1989
- 10) Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A : Platelet derived growth factor (BBhomodimer), transforming growth factor- β_1 , and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. *Am J Pathol* 140 : 1375-1388, 1992
- 11) Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN : Role of platelet-derived growth factor in wound healing : synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 7696-7700, 1987
- 12) Ksander GA, Ogawa Y, Chu GH, McMullin H, Rosenblatt JS, McPherson JM : Exogenous transforming growth factor-beta 2 enhances connective tissue formation and wound strength in guinea pig derma wounds healing by secondary intent. *Ann Surg* 211 : 288-294, 1989
- 13) Lynch SE, Colvin RB, Antoniades NH : Growth factors in wound healing. *J Clin Invest* 84 : 640-646, 1989
- 14) Blatti SP, Foster DN, Ranganathan G, Moses HL, Getz MJ : Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 1119-1123, 1988
- 15) Allan-Hoffman BL, Schlosser SJ, Brondyk WH, Fahl WE : Fibronectin levels are enhanced in human

- fibroblasts overexpressing the c-sis protooncogene. *J Biol Chem* 265 : 5219—5225, 1990
- 16) Ignatz RA, Massague J : Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261 : 4337—4345, 1986
- 17) Bassols A, Massague J : Transforming growth factor β regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 263 : 3039—3045, 1988
- 18) Ross R : The fibroblast and wound repair. *Biol Rev (Camb)* 43 : 51—96, 1968
- 19) Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin G, Senior RM, Deuel TF : Platelet-derived growth factor and transforming growth factor β induce in vivo and in vitro tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 109 : 429—440, 1989
- 20) Mauch C, Krieg T : Pathogenesis of fibrosis-introduction and general aspects. *Rheumatology* 10 : 372—384, 1986
- 21) Fleischmajer R : The pathophysiology of scleroderma. *Int J Dermatol* 16 : 310—318, 1977
- 22) Le Roy EC : Scleroderma (systemic sclerosis). Kelly WB, Ruffy S, Sledge LB, eds. *Textbook of Rheumatology*, W. B. Saunders, 1981
- 23) Gauss-Müller V, Kleinman HK, Martin GR, Schiffmann E : Role of attachment factors and attractants in fibroblast chemotaxis. *J Lab Clin Med* 96 : 1071—1080, 1980
- 24) Grotendorst G, Martin GR : Cell movement in wound-healing and fibrosis. *Rheumatology* 10 : 385—403, 1986
- 25) Kang AH : Fibroblast activation. *J Lab Clin Med* 92 : 1—4, 1978
- 26) Johnson RL, Ziff M : Lymphokine stimulation of collagen accumulation. *J Clin Invest* 58 : 240—252, 1976
- 27) Wahl SM, Wahl LM, McCarthy JB : Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. *J Immunol* 121 : 942—946, 1978
- 28) Le Roy EC, Smith EA, Kahaleh MB : A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Rheumat* 32 : 817—825, 1989
- 29) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fanci AS : Transforming growth factor type beta : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 4167—4171, 1986
- 30) Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH : Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNA's posttranslationally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 79 : 1285—1288, 1987
- 31) Rossi P, Karsenty G, Roberts AB, Roche NS, Sporn MB, de Crombrughe B : A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor β . *Cell* 52 : 405—414, 1988
- 32) Kähari V, Vuorio T, Nanto-Salonen K, Vuorio E : Increased type I collagen mRNA levels in cultured scleroderma fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 181 : 183—186, 1984
- 33) Jimenez S, Feldmann G, Bashey R, Bienkowski R, Rosenbloom J : Coordinate increase in the expression of type I and type III collagen genes in progressive systemic sclerosis fibroblasts. *Biochem J* 237 : 837—843, 1986
- 34) Hatamochi A, Ono M, Arakawa M, Takeda K, Ueki H : Analysis of collagen gene expression by cultured fibroblasts in morphoea. *Br J Dermatol* 126 : 216—221, 1992
- 35) Kähari VM, Multimaki P, Vuorio E : Elevated pro- α_2 (I) collagen messenger RNA levels in cultured scleroderma fibroblasts result from an increased transcription rate of the corresponding gene. *FEBS*

- Lett 215 : 331—334, 1987
- 36) Kähari VM, Sandberg M, Kalimo H, Vuorio T, Vuorio E : Identification of fibroblasts responsible for increased collagen production in localized scleroderma by in situ hybridization. *J Invest Dermatol* 90 : 664—670, 1988
 - 37) Scharffetter K, Lankat-Buttgereit B, Krieg T : Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in situ hybridization. *Eur J Clin Invest* 19 : 9—17, 1988
 - 38) Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, Krieg T : Co-localization of transforming growth factor beta₂ with alpha₁ (I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic scleroderma. *J Clin Invest* 186 : 917—922, 1990
 - 39) Peltonen J, Kähari L, Jaakkola S, Kähari VM, Varga J, Uitto J, Jimenez SA : Evaluation of transforming growth factor beta and type I procollagen gene expression in fibrotic skin diseases by in situ hybridization. *J Invest Dermatol* 94 : 365—371, 1990
 - 40) Scharffetter K, Heckmann M, Hatamochi A, Mauch C, Stein B, Riethmüller G, Ziegler-Heitbrock J, Krieg T : Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on collagen synthesis of human skin fibroblasts in vitro. *Exp Cell Res* 181 : 409—419, 1989
 - 41) Solis-Herruzo JA, Brenner DA, Chojkier M : Tumor necrosis factor α inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 263 : 5841—5845, 1988
 - 42) Takeda K, Hatamochi A, Arakawa M, Ueki H : Effects of tumor necrosis factor- α on connective tissue metabolism in normal and scleroderma fibroblast cultures. *Arch Dermatol Res* 284 : 440—444, 1993
 - 43) Mori K, Hatamochi A, Ueki H, Jimenez S, Olsen A : Regulation of α_1 (I) collagen promoter by TNF- α in human dermal fibroblasts. in preparation.
 - 44) Gorman CM, Moffat LF, Howard B : Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2 : 1044—1051, 1982
 - 45) Jones KA, Yamamoto KR, Tjian R : Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter in vitro. *Cell* 42 : 559—572, 1985