

学位申請論文

8-methoxypsoralen 存在下 UVA 照射の正常および強皮症線維芽細胞の I 型, III 型コラーゲン合成能に対する効果

獨協医科大学 皮膚科学

北村 洋平

要 旨 近年強皮症の皮膚硬化に対する PUVA 療法 (8-methoxypsoralen (8-MOP) 投与後, 長波長紫外線 (UVA) を照射する方法) の有効性が数多く報告されているが, この治療による皮膚硬化改善のメカニズムは不明である. 我々は正常および強皮症患者真皮由来培養線維芽細胞の I 型, III 型コラーゲン合成能とコラゲナーゼ遺伝子発現に対する 8-methoxypsoralen (8-MOP) 存在下 UVA 照射の効果を検討した. 8-MOP 存在下 UVA 照射は正常人および強皮症患者線維芽細胞ともに I 型, III 型コラーゲン合成とこれらの mRNA レベルを UVA 照射量依存性に減少させ, 一方でコラゲナーゼ遺伝子発現は不変のままであった. コラーゲン合成の抑制が皮膚硬化に対する PUVA 療法の有効性のメカニズムの 1 つであることが示唆された.

Key Words : UVA 照射, 8-methoxypsoralen, コラーゲン合成, 強皮症, 線維芽細胞

緒 言

強皮症は皮膚および内臓に過剰にコラーゲンが蓄積することを特徴とする線維性の結合組織病である. 近年, 限局性, 全身性強皮症ともにその皮膚硬化に PUVA 療法 (8-methoxypsoralen (8-MOP) 投与後, 長波長紫外線 (UVA) を照射する方法) が有効であったとする多数の報告^{1~5)} がみられるが, この治療による皮膚硬化改善のメカニズムは現在なお不明である. UVA の単独照射は培養ヒト真皮線維芽細胞に対し, コラーゲンの分解を開始させる特異なメタロプロテアーゼである, コラゲナーゼ (MMP-1) の発現を誘導するが^{6,7)}, I 型コラーゲン mRNA 発現には効果を示さないことが知られている⁶⁾. これまでに培養ヒト真皮線維芽細胞への 8-methoxypsoralen (8-MOP) 存在下 UVA 照射のコラゲナーゼ発現への影響は報告されているが⁷⁾, I 型コラーゲン発現に対する 8-methoxypsoralen (8-MOP) 存在下 UVA 照射の効果はまだ調べられていない. それゆえに, 我々は正常および強皮症真皮由来培養線維芽細胞の I 型, III 型コラーゲン合成能とコラゲナーゼ遺伝子発現に対する 8-MOP 存在下 UVA 照射の効果を検討した.

方 法

1. 線維芽細胞の培養

線維芽細胞株をアメリカリウマチ協会の診断基準⁸⁾ を満たしている 4 人の強皮症患者 (42 歳女性, 45 歳女性, 47 歳女性, 61 歳女性) の皮膚から強皮症診断時に使用する皮膚生検組織より得て培養し確立した. また, 3 人の健常人 (25 歳女性, 48 歳女性, 49 歳女性) 皮膚由来線維芽細胞は, 形成外科的手術の際に得た皮膚組織より培養した. なお, これらの強皮症および健常人由来の線維芽細胞はインフォームドコンセントを得たうえで培養, 使用している. 初代培養を既報⁹⁾ に従い outgrowth method にて行った. 得られた細胞株を S-42F, S-45F, S-47F, S-61F, N-25F, N-48F, N-49F とそれぞれ名付けた. 細胞は 10% FBS 含有の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) にて培養し維持した. なお今回用いた強皮症皮膚由来線維芽細胞のコラーゲン産生活性はすでに報告されており¹⁰⁾, mRNA レベルで正常細胞のそれに対して数値化されており (%), 以下の通りである. S42F : 189%, S45F : 95%, S47F : 239%, S61F : 352%. 各実験には 2 ないし 10 の population doubling level のものを用いた.

平成 20 年 11 月 1 日受付, 平成 20 年 11 月 29 日受理
別刷請求先 : 北村洋平

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880
獨協医科大学 皮膚科学

2. 細胞増殖能 (DNA 合成量) 測定

線維芽細胞の増殖能は既報¹¹⁾に従って行った。線維芽細胞を6穴組織培養用プレートにコンフルエントに培養。様々な濃度の8-MOP含有のDMEMにて24時間培養。[6-³H] thymidine (spec. act. 15.0 Ci/mmol, NEN Chemicals, USA) 1 μ Ci/mlを添加しさらに3時間培養した。トリクロール酢酸にて処理後、沈殿を1M水酸化ナトリウムにて溶解、一部の放射活性をliquid scintillation counterで測定した。

3. 8-methoxypsoralen (8-MOP) 添加培養と

UVA 照射

コンフルエントに達した状態で、 10^{-5} Mの8-MOPが添加された10%FBS含有DMEMで24時間培養し、その後UVA照射(0.3~2.4 J/cm²)を行い、さらに24時間培養した。

4. コラーゲン生合成能の測定

UVA照射後培地を5 μ Ci/ml [2, 3-³H] proline (Amersham, England), および50 μ g/mlのL-ascorbic acid 2-phosphate含有したDMEMと交換し、24時間培養した。この培養上清を回収し、carrier proteinとして最終濃度100 μ g/mlのウサギI型コラーゲン (SIGMA, USA)を加え、最終濃度10%のトリクロール酢酸による沈殿にてコラーゲンを回収した。沈殿を0.05M酢酸に溶解し、最終濃度0.03%ペプシンで4℃、3時間反応させた後、エタノール沈殿にて回収した。回収したコラーゲンサンプルの一部は2-メルカプトエタノールにより還元し、SDS-5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離、ゲルを乾燥後、X線フィルムに露光し、デンシトメーターを用いて解析し、値を細胞数で補正した。

5. RNAの抽出とノーザンブロット

全RNAをphenol/guaidium isothiocyanate (TRIzol® Reagent, インビトロジェン, Japan)により培養線維芽細胞より抽出。各RNA (8 μ g per lane)を1%アガロースゲルにて電気泳動後、ナイロン・フィルターに移し、ethidium bromide染色により泳動量を確認、UV cross linkingで固定prehybridizationし、定法により各DNA probeとhybridizationした。DNA probeとして α 1(I) collagen¹²⁾, α 2(I) collagen¹³⁾, α 1(III) collagen¹⁴⁾, α 1(VI) collagen¹⁵⁾, collagenase (MMP-1)¹⁶⁾およびglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)¹⁷⁾を用いた。それぞれのcDNA probeはnick translation法を[α -³²P] dCTP (Amersham, England)を用いて行った。Filterは洗浄後、放射線フィルムに感

表1 正常および強皮症線維芽細胞のDNA合成活性に対する8-methoxypsoralenの影響

8-methoxypsoralen の濃度	放射性thymidine 線維芽細胞DNA合成への取り込み [10 ³ dpm/dish]	
	正常線維芽細胞	強皮症線維芽細胞
0	22.86 \pm 5.28	17.46 \pm 2.48
4 \times 10 ⁻⁷	21.72 \pm 2.02	15.33 \pm 2.19
4 \times 10 ⁻⁶	23.12 \pm 3.45	15.40 \pm 1.17
4 \times 10 ⁻⁵	16.28 \pm 1.17	13.91 \pm 1.52
4 \times 10 ⁻⁴	1.07 \pm 0.19*	3.92 \pm 0.24*

正常線維芽細胞としてN-25F, N-48Fを、強皮症線維芽細胞としてS-42F, S-45F, S-47Fを用いた。結果はmean \pm S.E.Mで表した。*対照に対するP < 0.01

光、現像しデンシトメーターで放射能活性を数値化した。

6. 使用したDNAとその構造

プラスミッドp2.3KCOL1A1Lucはヒト α 1(I)コラーゲン遺伝子(COL1A1)プロモーター部分-2.3キロ塩基対(kbp)から+42base pair(bp)がルシフェラーゼ遺伝子に融合したものである。すでに報告されているp2.3K α 1(I)CAT¹⁸⁾のSacI-KpnI断片(-2.3kb~+42bp)をpGEM7(+)(Promega, USA)のmulticloning siteのSacI-KpnI部に挿入しサブクローニングし、そのSacI-XhoI断片を切り出しpGL2-Basic(Promega, USA)のSacI-XhoI部にその断片を挿入し作成した。ルシフェラーゼアッセイの内在性対照としてCMV immediate earlyエンハンサープロモーターとウミシイタケルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を持つphRL-CMV Vector (Promega, USA)を用いた。

7. 一過性遺伝子導入およびルシフェラーゼアッセイ

細胞の一過性のtransfectionはFuGene 6 kit (Roche Applied Science, Switzerland)を用いて既報¹⁹⁾に従って行った。5 \times 10⁵個の線維芽細胞を6-well組織培養プレートに撒き培養。2日後に培養液を10⁻⁵Mの8-MOPを含む10%FBS加DMEMに換え、引き続き0.3 J/cm²のUVAを照射し、そのまま24時間培養、そしてp2.3KCOL1A1 Luc 1.0 μ gと20 ngのphRL-CMV Vector (Promega, USA)をco-transfectionさせた。48時間後、細胞を回収しpassive lysis buffer (Promega, USA)で溶解しlysateを準備、Luciferase活性をDual Luciferase Reporter Assay System (Promega, USA)を用いてルミノメーターで測定した。

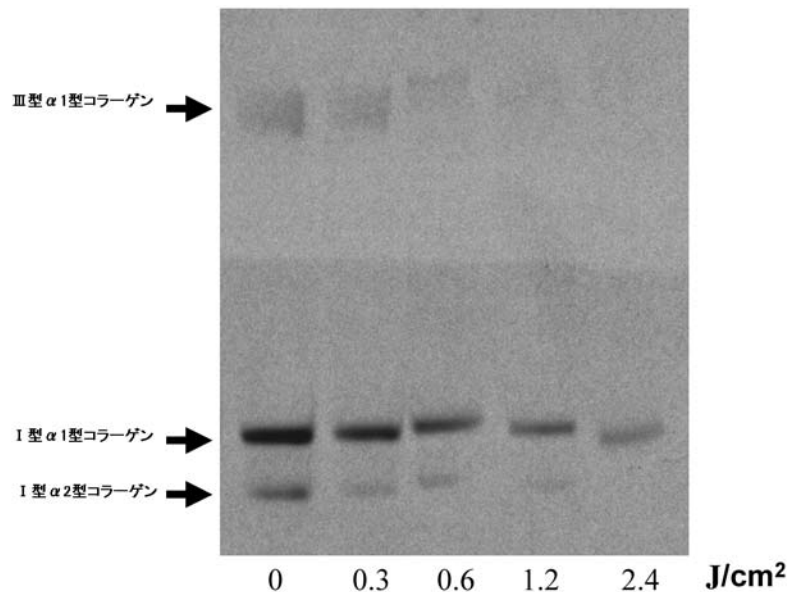


図1 正常線維芽細胞のI型およびIII型コラーゲン合成能に対する8-methoxypsoralen (8-MOP) 存在下UVA照射の影響 (N-48Fを用いた)

線維芽細胞を10%FBS含有のDMEMで、37℃、5%CO₂の条件下コンフルエントに達した状態で、10⁻⁵Mの8-MOPが添加された10%FBS含有DMEMで24時間培養し、その後UVA照射 (0.3~2.4J/cm²) を行い、培地を50μCi/ml [2, 3-³H] proline, 50μg/mlのL-ascorbic acid 2-phosphateを含有したDMEMと交換し、24時間培養した。この培養上清からコラーゲンをトリクロール酢酸、エタノールによる沈殿を行い回収した。回収したコラーゲンサンプルは2-メルカプトエタノールにより還元し、SDS-5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離、ゲルを乾燥後、X線フィルムに露光し、デンストメータを用いて解析した。

8. 統計処理

結果をcontrolに対するpercentage (平均値±Standard error of mean, 以下SEM) で表し、統計的有意差はStudent's t testで測定した。P値が0.05以下で有意差とした。

結 果

1. 正常および強皮症線維芽細胞の細胞増殖活性に対する8-methoxypsoralen (8-MOP) の影響

正常、強皮症線維芽細胞ともにDNA合成活性は10⁻⁷~10⁻⁵Mの8-MOPとの培養では特に変化は認められなかった。一方、10⁻⁴M濃度の8-MOPとの培養後は両細胞とも、浮遊し、死滅する細胞が観察されるとともに、正常細胞で対照細胞の約5%に、強皮症細胞で対照細胞の約20%にまで減少し、この濃度は細胞に対しtoxic doseであった(表1)。

2. 正常および強皮症線維芽細胞のI型およびIII型コラーゲン合成能に対する8-methoxypsoralen (8-MOP) 存在下UVA照射の影響

正常線維芽細胞に対する8-MOP存在下での0.3~2.4J/cm²のUVA照射でI型およびIII型コラーゲン合成がUVA照射量依存性に減少がみられた(図1)。その値は2.4J/cm²のUVA照射でα1(I) およびα2(I) およびα1(III) コラーゲンでそれぞれ対照の63.3%, 68.4%, 62.2%と有意に減少が認められた(表2)。強皮症線維芽細胞においても同様にコラーゲン合成はUVA照射量依存性に減少がみられた。2.4J/cm²のUVA照射でα1(I) およびα2(I) およびα1(III) コラーゲンでそれぞれ対照の65.3%, 66.9%, 64.8%と有意に減少が認められた(表3)。

3. 8-methoxypsoralen (8-MOP) 存在下でのUVA照射は正常および強皮症線維芽細胞のI型およびIII型コラーゲンmRNAレベルを低下させる

ノーザンブロットの結果では8-methoxypsoralen (8-MOP) 存在下での0.3~2.4J/cm²のUVA照射は正常線

表2 正常線維芽細胞のI, III型コラーゲン合成に対する8-methoxypsoralen存在下でのUVA照射の影響

UVA照射量 (J/cm ²)	I型 α_1 鎖コラーゲン	I型 α_2 鎖コラーゲン	III型 α_1 鎖コラーゲン
0	100 ± 3.03	100 ± 4.04	100 ± 3.27
0.3	91.1 ± 2.71	96.8 ± 0.99	98.3 ± 0.54
0.6	77.3 ± 2.44*	83.8 ± 2.41*	87.7 ± 3.09
1.2	71.5 ± 1.29**	81.9 ± 2.41**	74.6 ± 3.07**
2.4	63.3 ± 2.44**	68.4 ± 3.45**	62.2 ± 3.33**

正常線維芽細胞としてN-49F, N-48Fを用いた. 結果はmean ± S.E.Mで表した. *対照に対するP<0.05 **対照に対するP<0.01

表3 強皮症線維芽細胞のI, III型コラーゲン合成に対する8-methoxypsoralen存在下でのUVA照射の影響

UVA照射量 (J/cm ²)	I型 α_1 鎖コラーゲン	I型 α_2 鎖コラーゲン	III型 α_1 鎖コラーゲン
0	100 ± 5.31	100 ± 7.99	100 ± 4.89
0.3	93.2 ± 2.71	95.6 ± 3.85	97.3 ± 4.66
0.6	78.2 ± 4.39*	83.8 ± 2.41*	84.7 ± 3.11*
1.2	72.3 ± 3.25**	76.4 ± 3.48**	71.6 ± 3.07**
2.4	65.3 ± 7.34**	66.9 ± 4.61**	64.8 ± 6.51**

強皮症線維芽細胞としてS-42F,S-45F,S-47Fを用いた. 結果はmean ± S.E.Mで表した. *対照に対するP<0.05 **対照に対するP<0.01

線維芽細胞の α_1 (I), α_2 (I) および α_1 (III) コラーゲンmRNAレベルをUVA照射量依存性に著しく減少させたが, 一方で α_1 (VI) コラーゲンmRNAレベルはわずかに減少がみられるのみで, コラゲナーゼmRNAレベルは不変であった(図2a). 発現レベルを数値化すると2.4J/cm²のUVA照射での α_1 (I), α_2 (I), α_1 (III) および α_1 (VI) コラーゲンとコラゲナーゼmRNAレベルはGAPDHによる補正值でそれぞれ対照の48%, 42%, 43%, 83%, 97%であった(図2b). 強皮症線維芽細胞において α_1 (I), α_2 (I) および α_1 (III) コラーゲンmRNAレベルは8-MOP存在下での0.3~2.4J/cm²のUVA照射で著しく減少がみられたが, コラゲナーゼmRNAレベルは不変が保たれた(図2c). 発現レベルを数値化すると2.4J/cm²のUVA照射でそれぞれ43%, 43%, 41%で, 一方コラゲナーゼmRNAレベルの値は102%であった(図2d). 培養線維芽細胞への8-MOP存在下でのUVA照射は α_1 (I) コラーゲン遺伝子(COL1A1)プロモーター活性を減少させる

上流2.3kbの α_1 (I) コラーゲン・プロモーター遺伝子とレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を融合されたDNAを用いたルシフェラーゼアッセイの結果では8-MOP存在下での0.3J/cm²のUVA照射は培養正常

線維芽細胞の α_1 (I) コラーゲンの転写活性を60.2%までに減少させた(図3). 8-MOP存在下での0.6J/cm²以上の照射量は一過性の遺伝子導入に障害を与えたので0.6J/cm²以上の照射による実験は施行しなかった.

考 察

全身性強皮症は皮膚および種々の臓器にコラーゲンの過剰な沈着による線維化を特徴とする全身性結合組織病である. 推定されている抗線維化因子(薬剤)たとえばインターフェロン α ²⁰⁾, D-ペニシラミン²¹⁾, リコンビナント・ヒト・インターフェロン γ ²²⁾, リコンビナント・ヒト・リラキシン²³⁾などはすでに全身性強皮症の線維化に対して治験的に試みられたがよい結果は得られていない²⁴⁾. 限局性^{1,3~5)} および全身性強皮症^{2,4)}の皮膚硬化病変に対するPUVA療法の有効性がいくつかの論文として報告されている. 近年, 我々もPUVA療法による全身性強皮症の皮膚硬化に対する有効性を経験し報告した²⁵⁾. しかしながら強皮症の皮膚硬化に対するPUVA療法の有効性のメカニズムは不明のままである.

培養線維芽細胞に長波長紫外線(UVA)照射を単独で行うとコラゲナーゼ発現が誘導されるが^{6,7)}, 一方ではI型コラーゲンの発現に影響はみられない⁶⁾. 我々の実験

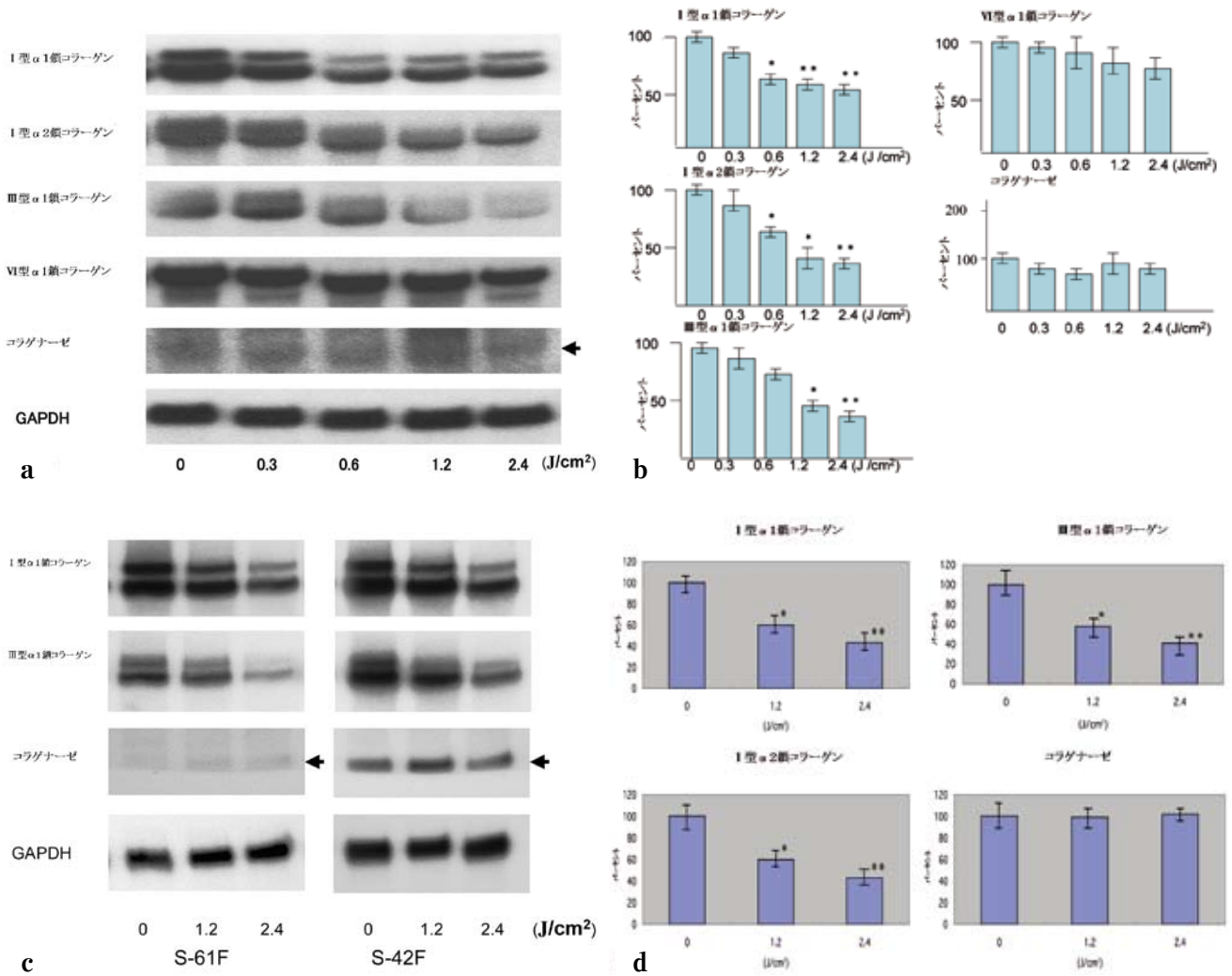


図 2 正常および強皮症線維芽細胞のI型, III型, VI型コラーゲンおよびコラーゲナーゼ mRNA レベルに対する 8-methoxypsoralen (8-MOP) 存在下でのUVA照射の影響
a : 正常線維芽細胞 (N-49F) でI型α1鎖, I型α2鎖, III型α1鎖, VI型α1鎖コラーゲン, コラーゲナーゼ およびGAPDHのcDNAプローブを用いてノーザンブロットを施行した。
b : 正常線維芽細胞 (N-25F, N-48F, N-49F) を用いたノーザンブロットをデンストメーターで定量化し, GAPDH値で補正した。結果はmean ± SEMで示した。
 * : p < 0.05 vs 対照 ** : p < 0.01 vs 対照
c : 強皮症線維芽細胞 (S-42F, S-61F) を用いてノーザンブロットを施行した。
d : 強皮症線維芽細胞 (S-42F, S-45F, S-447F, S-61F) を用いて施行したノーザンブロットを定量化し, GAPDH値で補正した。結果はmean ± SEMで示した。
 * : p < 0.05 vs 対照 ** : p < 0.01 vs 対照

結果は正常および強皮症線維芽細胞に対して8-MOP存在下でUVA照射を行うと線維芽細胞のI型, III型コラーゲン合成を減少させることを示し, またコラーゲナーゼ遺伝子発現にはわずかな影響がみられるのみであった。Herrmannら⁷⁾は8-MOP存在下でのUVA照射が6倍もの線維芽細胞のコラーゲナーゼ発現がみられたと報告した。コラーゲナーゼ発現の彼らの結果と我々の結果との矛盾点はそれぞれの研究で用いられたUVA照射量の違い

によって説明される。我々は0.3~2.4J/cm²のUVA照射量で実験を行ったが, 彼らはその実験の中で9あるいは18J/cm²のUVA照射量を用いている。さらにScharffetterら⁶⁾は6から60J/cm²のUVA照射単独でコラーゲナーゼ発現が誘導されたと報告している。これらの結果は培養線維芽細胞のコラーゲナーゼ発現の誘導には高照射量のUVA照射が必要であることが示唆された。

我々の研究では8-MOP存在下でのUVA照射が線維

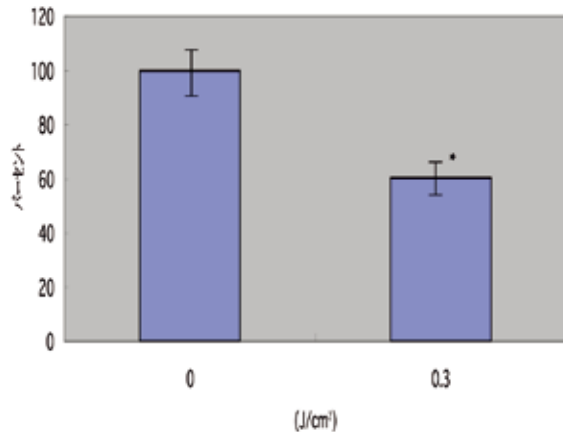


図3 培養正常線維芽細胞の $\alpha 1$ (I) コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーター活性に対する8-MOP存在下でのUVA照射の影響

正常線維芽細胞 (N25-F, N-48F) を10⁻⁵Mの8-methoxypsoralen加DMEMで24時間培養後0.3 J/cm²のUVAを照射した後, p2.3KCOL1A1Luc 1.0 μ gと20 ngのphRL-CMV Vector (Promega, USA) をco-transfectionさせた. 結果はmean \pm SEMで示した.

* : p < 0.01 vs 対照

芽細胞のコラーゲン合成を抑制することが明らかにされたが, その抑制の調節のされ方がI型とIII型コラーゲンで平行して, あたかも同調するかのごとくなされていた. I型とIII型コラーゲンの発現レベルの調節は多くの現象, 疾患, 薬剤などによって同調してなされる. たとえば線維芽細胞の増殖に伴ってヒトI型およびIII型コラーゲン遺伝子発現は同調してなされることが知られ¹⁴⁾, トランスフォームしたマウス細胞の多くの株でやはりI型およびIII型コラーゲンmRNA発現は同調してなされることが報告されている^{26,27)}. 真皮のマイクロフィラメントを形成しているとされ, ヒトの皮膚線維芽細胞で多量に発現されていることが明らかにされている^{15,28)} VI型コラーゲンは3本の異なったポリペプチド鎖 [$\alpha 1$ (VI), $\alpha 2$ (VI), $\alpha 3$ (VI)] から成るヘテロトリマーである^{29,30)}. 今回の研究でも8-MOP存在下でのUVA照射による線維芽細胞のVI型コラーゲンmRNAレベルへの影響を調べた. その結果, I型とIII型コラーゲンmRNAレベルは顕著に低下するのに対し, VI型コラーゲンmRNAレベルはわずかに低下を示すのみであった. このことは8-MOP存在下でのUVA照射により, 同調して調節を受けるI型とIII型コラーゲン発現に対して, VI型コラーゲンは独立して調節を受けることが示唆される. この現象はこれまでに報告されている現象^{31,32)}と矛盾しない.

今回の我々の研究で, 我々は8-MOP存在下でのUVA照射が正常線維芽細胞のI型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の

転写を抑制することを明らかにした. 我々の研究は8-MOP存在下でのUVA照射が培養正常線維芽細胞のコラーゲン合成能を転写レベルで抑制することを示している. 強皮症線維芽細胞のI型コラーゲン産生が転写レベルで増強されていることが明らかにされており, これは強皮症における真皮の線維化の形成に対する1つの重要な病態生理学的なメカニズムである^{33,34)}. それゆえに, I型コラーゲンの産生を転写レベルで抑制する方法を行うことが, この疾患の皮膚硬化の治療への可能で重要なアプローチであるといえる. 我々は, 正常細胞のみであるが8-MOP存在下でのUVA照射による線維芽細胞の遺伝子発現レベルでのコラーゲン合成の抑制が強皮症の皮膚硬化に対してPUVA療法が有効性に働く主要なメカニズムであることを示唆させる. それに加えて8-MOP存在下で線維芽細胞に高照射量のUVA照射を行った時には, コラーゲナーゼ発現が増加されることがもう一つの有効なメカニズムとして働くであろう.

結 論

強皮症の皮膚硬化に対するPUVA療法 (8-methoxypsoralen (8-MOP) 投与後, 長波長紫外線 (UVA) を照射する方法) の有効性のメカニズムは現在なお不明である. 今回の我々の結果では8-MOP存在下でのUVA照射により正常および強皮症由来の培養線維芽細胞の遺伝子発現レベルでのコラーゲン合成の抑制がみられ, これがその主要なメカニズムであることが示唆された.

謝 辞 稿を終えるにあたり, 御指導, 御高閲を賜りました本学皮膚科学教室の山崎雙次教授に深謝いたします. また, 研究を直接御指導いただきました同教室の簗持 淳教授に感謝の意を表します.

文 献

- 1) Kersch M, Volkandt M, Meurer M, et al : Treatment of localized scleroderma with PUVA bath photochemotherapy. *Lancet* **343** : 1233, 1994.
- 2) Morita A, Sakakibara S, Skakibara N, et al : Successful treatment of systemic sclerosis with topical PUVA. *J Rheumatol* **22** : 2361-2365, 1995.
- 3) Kersch M, Dirschka T, Volkandt M : Treatment of localized scleroderma by PUVA phototherapy. *Lancet* **346** : 1166, 1995.
- 4) Kanekura T, Fukumaru S, Matsushita S, et al : Successful treatment of scleroderma with PUVA therapy. *J Dermatol* **23** : 455-459, 1996.
- 5) Scharffetter-Kochanek K, Goldermann R, Lehmann P,

- et al : PUVA therapy in disabling pansclerotic morphea of children. *Br J Dermatol.* **132** : 830-831, 1995.
- 6) Scharffetter K, Wlaschek M, Hoog A, et al : UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res* **283** : 506-511, 1991.
- 7) Herrmann G, Brenneisen P, Wlaschek M, et al : Psoralen photoactivation promotes morphological and functional changes in fibroblasts in vitro reminiscent of cellular senescence. *Journal of Cell Science* **111** : 759-767, 1998.
- 8) Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee : Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* **23** : 581-590, 1980.
- 9) Fleischmajer R, Perlish JS, Krieg T, et al : Variability in collagen and fibronectin synthesis by scleroderma fibroblasts in primary culture. *J Invest Dermatol* **76** : 400-403, 1981.
- 10) Ikeda H, Sunazuka T, Suzuki H, et al : EM703, the new derivative of erythromycin, inhibits transcription of type I collagen in normal and scleroderma fibroblasts. *J Dermatol Sci* **49** : 195-205, 2008.
- 11) Hatamochi A, Arakawa M, Takeda K, et al : Activation of fibroblast proliferation by Werner's syndrome fibroblast-conditioned medium. *J Dermatol Sci* **7** : 210-216, 1994.
- 12) Chu ML, Myers JC, Bernard MP, et al : Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro alpha 1 (I) collagen chain. *Nucleic Acids Res* **10** : 5925-34, 1982.
- 13) de Wet W, Bernard M, Benson-Chanda V, et al : Organization of the human pro- α 2 (I) collagen gene. *J Biol Chem* **262** : 16032-16036, 1982.
- 14) Miskulin M, Dalglish R, Kluge-Beckerman B, et al : Human type III collagen gene expression is coordinately modulated with the type I collagen genes during fibroblast growth. *Biochemistry* **25** : 1408-1413, 1986.
- 15) Chu M-L, Mann K, Deutzmann R, Pribula-Conway D, et al : Characterization of three constituent chains of collagen type VI by peptide sequences and cDNA clones. *Eur J Biochem* **168** : 309-317, 1986.
- 16) Angel P, Pötting A, Mallick U, et al : Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol Cell Biol* **6** : 1760-1766, 1986.
- 17) Arcari P, Martinelli R, Salvatore F : The complete sequence of a full length cDNA for human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : evidence for multiple mRNA species. *Nucleic Acids Res* **12** : 9179-9189, 1984.
- 18) Mori K., Hatamochi A., Ueki H, et al : The transcription of human α 1(I) procollagen gene (COL 1 A 1) is suppressed by tumor necrosis factor- α through proximal short promoter elements-evidence for suppression mechanisms mediated by two nuclear factor binding sites. *Biochem J* **319** : 811-816, 1996.
- 19) Sato M, Shegogue D, Hatamochi A, et al : Lysophosphatidic acid inhibits TGF- β -mediated stimulation of type I collagen mRNA stability via an ERK-dependent pathway in dermal fibroblasts. *Matrix Biol* **23** : 353-361, 2004.
- 20) Black CM, Silman AJ, Herrick AI, et al : Interferon- α does not improve outcome at One year in patients with diffuse cutaneous scleroderma : results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* : **42** : 299-305, 1999.
- 21) Clements PJ, Furst DE, Wong WK, et al : High-dose versus low-dose D-penicillamine in early diffuse systemic sclerosis : analysis of a two-year, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* : **42** : 1194-203, 1999.
- 22) Polisson RP, Gilkeson GS, Pyun EH, et al : A multicenter trial of recombinant human interferon γ in patients with systemic sclerosis : effects on cutaneous fibrosis and interleukin 2 receptor levels. *J Rheumatol* : **23** : 654-658, 1996.
- 23) Seibold JR, Korn JH, Simms R, et al : Recombinant human relaxin in the treatment of scleroderma : a randomized, double, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* : **132** : 871-879, 2000.
- 24) Denton CP, Merkel A, Furst DE, Khanna D, Emery P, Hsu VM, Silliman N, Streisand J, Powell J, et al : CAT-192 Study Group ; Scleroderma Clinical Trials Consortium : Recombinant human anti-transforming growth factor beta 1 antibody therapy in systemic sclerosis : a multicenter, randomized, placebocontrolled phase I/II trial of CAT-192. *Arthritis Rheum* : **56** : 323-333, 2007.
- 25) Hashikabe M, Ohtsuka T, Yamazaki S : Quantitative

- echographic analysis of photochemotherapy on systemic sclerosis skin. *Arch Dermatol Res* **296** : 522-527, 2005.
- 26) Liao G, Yamada Y, de Crombrughe B : Coordinate regulation of the levels of type III and type I collagen mRNA in most but not all mouse fibroblasts. *J Biol Chem* **260** : 531-536, 1985.
- 27) Parker ML, Judge K, Gevers W : Loss of type I procollagen gene expression in SV40-transformed human fibroblasts is accompanied by hypermethylation of these genes. *Nucleic Acids Res* **10** : 5879-5891, 1982.
- 28) Olsen D, Peltonen J, Jaakkola S, et al : Collagen gene expression by human skin fibroblasts : abundant steady-state levels of type VI procollagen mRNAs. *J Clin Invest* **183** : 791-795, 1989.
- 29) Jander R, Rauterberg J, Glanville RW : Further characterization of the three polypeptide chains of bovine and human short-chain collagen (intima collagen). *Eur J Biochem* **133** : 39-46, 1983.
- 30) Trueb B, Winterhalter K : Type IV collagen is composed of a 200 kd subunit and two 140 kd subunit. *EMBO J* **5** : 2815-2819, 1986.
- 31) Hatamochi A, Aumailley M, Mauch C, et al : Regulation of collagen VI expression in fibroblasts. Effects of cell density, cell-matrix interactions, and chemical transformation. *J Biol Chem* **264** : 3494-3499, 1989.
- 32) Heckmann M, Aumailley M, Hatamochi A, et al : Down-regulation of alpha 3(VI) chain expression by gamma-interferon decreases synthesis and deposition of collagen type VI. *Eur J Biochem* **182** : 719-726, 1989.
- 33) Jimenez SA, Hitraya E, Varga J : Pathogenesis of scleroderma. *Collagen. Rheum Dis Clin North Am* **22** : 647-674, 1996.
- 34) Saitta B, Gaidarova S, Cicchillitti L, et al : CCAAT binding transcription factor binds and regulates human COL1A1 promoter activity in human dermal fibroblasts : demonstration of increased binding in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum* **43** : 2219-2229, 2000