

学位申請論文

ヒト $\alpha 1$ 鎖 I 型コラーゲン遺伝子の転写調節

—プロモーター領域の欠失解析と転写増強領域の DNA 結合因子の解析—

獨協医科大学 皮膚科学

吉田 隆洋

要 旨 我々はヒト $\alpha 1$ 鎖 I 型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーター領域の欠失解析を施行し、転写増強領域に対して DNA 結合因子の解析を行った。ルシフェラーゼアッセイをヒト真皮由来線維芽細胞とヒト COL1A1 プロモーターの -2.3 キロ塩基対 (bp) から +42 bp をルシフェラーゼ遺伝子に融合した DNA を基本とし、COL1A1 プロモーターを上流側より徐々に欠失させた変異体を用いて行った。その結果、-402 bp までの欠失ではほぼ同レベルであった活性が -332 bp までの欠失で著しく低下し、この間に転写増強領域があると考えられた。-402 bp から -332 bp までの DNA 断片を放射性ラベルし、線維芽細胞の核抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ蛋白の結合を示唆するバンドが認められた。置換変異を加えた DNA 断片による競合アッセイにより蛋白は -386 bp ~ -371 bp の領域に結合することが判明。ルシフェラーゼアッセイで、その部に置換変異を加えたコンストラクトでは活性の減少がみられ、同領域が転写増強に関与している可能性が示唆された。

Key Words : I 型コラーゲン, 遺伝子プロモーター, 転写, 欠失解析, DNA 結合因子

緒 言

I 型コラーゲンは真皮の膠原線維の主要成分であり、線維芽細胞により産生される。I 型コラーゲン生合成の調節は種々の生理的、病理的な現象に置いて重要な役割を果たしており、その多くは転写レベルで調節されていることが知られている¹⁾。また I 型コラーゲン発現の調節を研究することは、真皮膠原線維の増加する皮膚線維症と、逆に減少する皮膚萎縮症および皺のメカニズムや治療を考える上で重要である。皮膚線維症の 1 つである強皮症においても線維芽細胞の I 型コラーゲン産生が転写レベルで増加している^{2,3)}。従って I 型コラーゲンの転写調節機構を解析することは本症をはじめとする線維化の治療を考える上でも重要である。一般にコラーゲンは 3 本の α 鎖というポリペプチドからなる 3 重らせん (3 本鎖ヘリックス) 構造をつくり、異なった型のコラーゲンの α 鎖をコードする遺伝子は少なくとも 20 種あり、これらはコ

ラーゲンファミリーと呼ばれている。I 型コラーゲンは 2 本の $\alpha 1$ (I) 鎖及び 1 本の $\alpha 2$ (I) 鎖より成り、これらはそれぞれの遺伝子によりコードされている⁴⁾。I 型コラーゲン遺伝子プロモーター領域の欠失解析による転写調節の解析はこれまでにいくつかの検討がなされてきている^{5~8)}。ヒト $\alpha 1$ 鎖 I 型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) では Jimenez SA らのグループによる解析がなされているのみである^{7,8)}。今回我々はヒト COL1A1 プロモーター領域の機能的欠失解析を施行し、転写増強領域に対して DNA 結合因子の解析を行った。

方 法

1. 線維芽細胞の培養

線維芽細胞は 18 歳男性、25 歳女性の良性腫瘍摘除術の際に得た腫瘍辺縁の健常皮膚より樹立した。既報⁹⁾ に従い初代培養し 2 株 (N18M, N25F) を得た。細胞は 10 % fetal bovine serum (FBS) (SIGMA, 東京) 含有の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (SIGMA, 東京) にて培養し維持した。各実験に 2 ないし 5 の population doubling level (PDL) のものを用いた。

平成 20 年 11 月 1 日受付, 平成 20 年 12 月 8 日受理
別刷請求先: 吉田隆洋

〒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

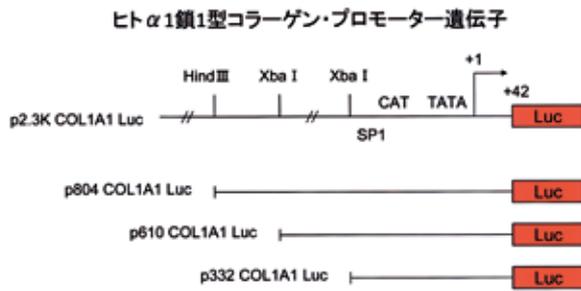


図1 ヒト $\alpha 1$ 鎖 I 型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーターの機能的欠失解析に用いたDNA.

2. 使用したDNAとその構造

p2.3K COL1A1 Luc, p804 COL1A1 Luc, p610 COL1A1 Luc, p332 COL1A1 Luc (図1) は, すでに報告されている p2.3K $\alpha 1$ (I) CAT 10) の Sac I-Kpn I 断片 (-2.3kbp ~ +42bp), HindIII-KpnI 断片 (-804bp ~ +42bp), XbaI-KpnI 断片 (-610bp ~ +42bp), XbaI-KpnI 断片 (-332bp ~ +42bp) をそれぞれ pGEM7 (+) (Promega, 東京) のマルチクローニングサイトに挿入してサブクローニングし, その SacI-XhoI 断片を切り出し pGL2-Basic (Promega) の SacI-XhoI 部にその断片を挿入し作成した. p529 COL1A1 Luc, p481 COL1A1 Luc, p402 COL1A1 Luc は p610 COL1A1 Luc をその -610 bp にある XbaI 部よりエクソヌクレアーゼ III を用いた Henikoff の方法¹¹⁾ で転写開始点方向への欠失を行い, 正確な欠失の端の位置をシーケンスにより確認することにより作成した. YT-1 ~ YT-6 の DNA 断片はそれぞれ pYT-1 ~ pYT-6 より制限酵素 BamHI, XbaI で切断し, アクリルアミドゲルより切り出し作成した. これらのプラスミドは以下のごとく作成した. まず図2に示す各配列の両端に BamHI, XbaI サイトと外側に任意の3塩基を加える形にそれぞれ2本鎖となるようにDNAを合成し, ハイブリダイズ後上記の制限酵素で処理し, それぞれを pGEM7 (+) (Promega) のマルチクローニングサイトに挿入して作成した. p610 YT4mCOL1A1 Luc は p610 COL1A1 Luc の XbaI-XbaI 断片 (-610bp ~ -332bp) を以下に述べる断片と置き換えて作成した. 置き換えた断片は -376bp ~ -371bp に図2の YT-4 に示す置換変異をもつ合成DNAを2本鎖にハイブリダイズさせた後両端を XbaI で消化し, 準備したものをを用いた.

3. 一過性遺伝子導入およびルシフェラーゼアッセイ

細胞への一過性のトランスフェクションは FuGene 6 kit (Roche Applied Science, Indianapolis, USA) を用い既報¹²⁾ に従って行った. 5×10^5 個の線維芽細胞 (N18M) を6穴組織培養プレートに撒き培養. 2日後に COL1A1-



図2 gel mobility shift assay の競合物として用いたDNA. 置換変異を加えた部分を赤で示す.

luciferase プラスミド $1.0 \mu\text{g}$ と, 20 ng の phRL-SV40 ベクター (Promega) を共導入させた. 48時間後, 細胞を回収し passive lysis buffer (Promega) で溶解し, 溶解液を準備, ルシフェラーゼ活性を Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いルミノメーターで測定した. ルシフェラーゼアッセイには内在性対照として SV40 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-SV40 ベクター (Promega) を用いた. すべての実験は各群3プレートで行い少なくとも3回繰り返した.

4. 核蛋白の抽出および Gel mobility shift assay

$150 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$ dish にコンフルエントに線維芽細胞 (N25F) を培養し, PBS で洗浄後ラバーポリスマンを用いて細胞を得た. 核は Groudine の方法¹³⁾ にて単離した. 核は4倍量の以下の組織を含むバッファー A すなわち 20 mM Hepes (pH 7.9), 1 mM EGTA, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 400 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 0.01% Nonidet P-40, 0.5 mM PMSF, $10 \mu\text{g/ml}$ leupeptin, $10 \mu\text{g/ml}$ pepstatin A に懸濁, それを30分間 4°C でスターラーで混和して抽出し, 15000 回転/分で Eppendorf チューブで5分間 4°C で遠心, 上清を4時間, 以下のバッファー B すなわち 20 mM Hepes (pH 7.9), 50 mM NaCl, 0.1 mM Na_2EDTA , 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 20% (v/v) glycerol で透析した. それを 15000 回転/分で Eppendorf チューブで5分間 4°C で遠心し, 上清を核蛋白として用いた. 蛋白濃度は protein assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.) にて測定した. 線維芽細胞から抽出された蛋白濃度は約 2 mg/ml でそれを 1 mg/ml にバッファー B で調製して実験に用いた.

Gel mobility shift assay は既報¹⁴⁾ に従って行った. $1-4 \mu\text{g}$ の核蛋白抽出物を $10 \mu\text{l}$ の以下の溶液で20分 26°C でインキュベーションした. 溶液は 20 mM Hepes (pH

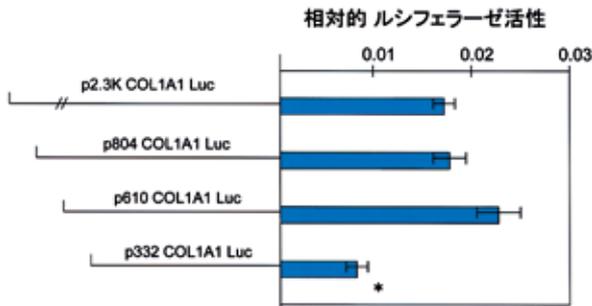


図3 ヒト $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーターの機能的欠失解析の結果。
* ; $p < 0.01$ (vs p2.3K COL1A1 Luc)

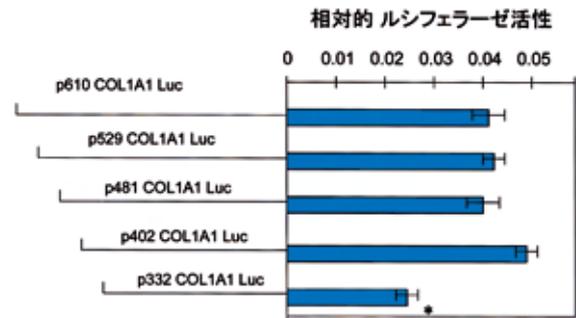


図5 詳細なヒト $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーターの機能的欠失解析の結果。
* ; $p < 0.01$ (vs p610 COL1A1 Luc)

ヒト $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン・プロモーター遺伝子

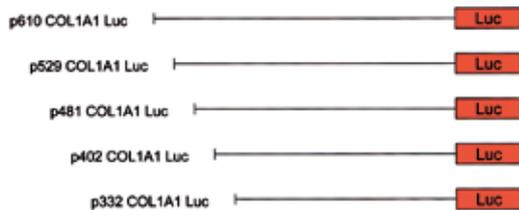


図4 詳細なヒト $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーターの機能的欠失解析に用いたDNA。

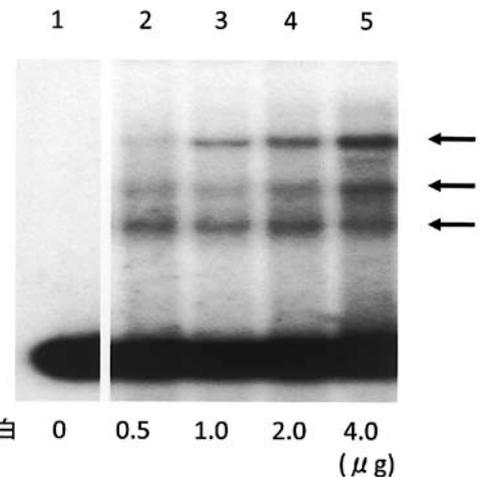


図6 gel mobility shift assayの結果 (1) 図2のYT-1 (Wild type) のDNAに ^{32}P をエンドラベルして反応に用いた。検出された3本のバンドを矢印で示した。

7.5), 0.5 mg/ml BSA, 150 mM NaCl, 1 mM Na_2 EDTA, 0.5 mM DTT, 2.5 μ g の poly-dI-dC, T4 polynucleotide kinase で ^{32}P をエンドラベルした 10^4 c.p.m. (approx. 0.2 ng) の二重鎖DNAを含む。反応後, 2 μ l の sample buffer [30% (v/v) glycerol, 0.2% (w/v) Bromophenol Blue 0.2% (w/v) Xylene Cyanol] を加え, 6%ポリアクリルアミドゲルでTBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid 8 mM Na_2 EDTA) にて電気泳動した。ゲルをX線フィルムにてX線蛍光撮影を行いデンストメーターにて解析した。

5. 統計処理

結果を平均値 \pm 標準誤差で表し, 検定はANOVAのTukeyで行い, ソフトはSPSS15を使用した。P値が0.05以下で有意と判定した。

結 果

1. ヒト $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーター領域の機能的欠失解析

p2.3K COL1A1 Luc, p804 COL1A1 Luc, p610 COL1A1 Luc, p332 COL1A1 Luc (図1) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。相対的ルシフェラーゼ活性はプロモーター部分が-2300 bpのp2.3K COL1A1 Luc

に対して-610bpのp610 COL1A1 Lucでやや上昇する傾向がみられたが, -332bpへ欠失させたp332 COL1A1 Lucではp2.3K COL1A1 Lucに対し約47%までの有意な低下が認められた (図3)。このことは-610bpから-332bpの間にCOL1A1の転写を上昇させるDNA領域が存在することを示唆している。そこでさらに詳細なCOL1A1の欠失構造をもつコンストラクトを作成し (図4), さらなる欠失解析を施行した。その結果, -610bp~-402bpでやや上昇する傾向がみられたが, -332bpへの変異体で-610bpのものに対し約63%の有意な低下が認められた (図5)。

2. ヒト $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーター領域-402bp~-332bpに結合するDNA結合因子の解析

上記の結果よりそのエレメントに結合し, COL1A1転写を上昇させるDNA結合因子の存在を調べる目的でgel

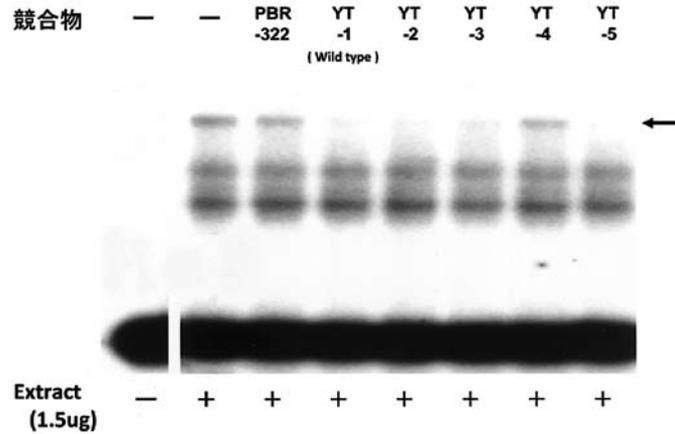


図7 gel mobility shift assayの結果 (2)

図2のDNA断片 (YT1~5) を用いて競合アッセイを行った。対照としてpBR322から切り出したDNA断片を用いた。競合反応がみられるバンドを矢印で示した。

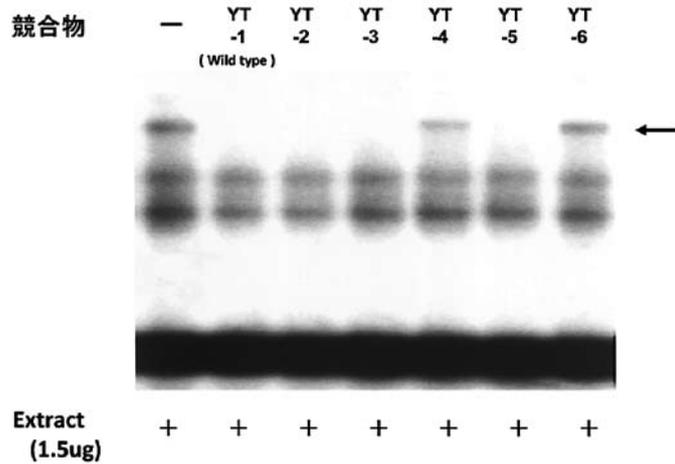


図8 gel mobility shift assayの結果 (3)

図2のDNA断片 (YT1~6) を用いて競合アッセイを行った。競合反応がみられるバンドを矢印で示した。

mobility shift assayを施行しその結果を図6に示した。-402bp~-332bp DNA断片を32Pで標識して各量の核蛋白抽出物と反応させた。核蛋白なし (レーン1) に対しレーン2~5で濃度依存性に2本 (ゲルの上方から2本)、また濃度非依存性に1本 (ゲルの上方から3本目) のバンドが認められた (図6)。

3. DNA結合因子の結合するDNA領域の検索

先のgel mobility shift assayを種々の競合物DNAを加えて施行し、その蛋白の結合部位を検索した。-402bp~-332bp DNA断片を32P標識して図2に示す各所に変異を加えたDNA断片をそれぞれ競合物として200倍量加えるgel mobility shift assayを施行した。その結果、最も上方にみられるバンドが野生型の断片 (YT-1) をは

じめYT-2, YT-3, YT-5では競合されるが、対照のPBR-322の断片 (BamHI×SphI, 191bp) とともにYT-4では競合されなかった。なお他の2本のバンドはYT-1, YT-2, YT-3, YT-4, YT-5で競合されなかった (図7)。

YT-4の変異を加えた部分は-386bp~-371bpのCTTCCACCTTTGGAAGの回轉対称形を示す興味深いシーケンス部位である。YT-4の変異はその下流に相当する部分に施行されている。それゆえに上流に変異を加えたDNA断片 (YT-6) を競合物に用いて第3番目のgel mobility shift assayを施行した。その結果、最も上方にみられるバンドは前の実験同様YT-1, YT-2, YT-3, YT-5では競合されたがYT-4のみならずYT-6でも競合反応は認められなかった (図8)。

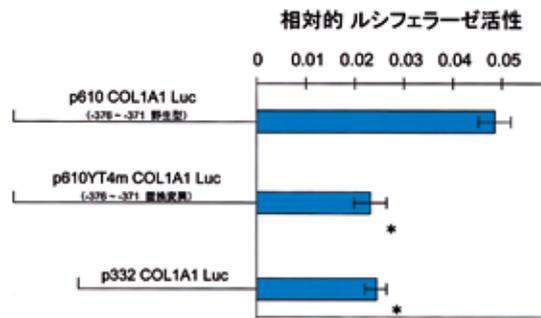


図9 ヒト $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーターの欠失および置換変異によるCOL1A1転写活性への影響

p610 Y4mCOL1A1 Lucはp610 COL1A1 Lucの-376bp~-371bpに図2, Y4の置換変異を加えて作成した。p610 COL1A1 Lucおよび-332bpへのdeletionすなわちp332 COL1A1 Lucとともにルシフェラーゼアッセイを行った。

* ; $p < 0.01$ (vs p610 COL1A1 Luc)

4. ヒト $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーター領域の欠失および置換変異によるCOL1A1転写活性への影響

p610 COL1A1 Lucの-376bp~-371bpに置換変異を加えて作成したp610 Y4mCOL1A1 Lucのルシフェラーゼ活性はもとのp610 COL1A1 Lucの活性に対し約48%と有意に低下が見られた。一方同時に施行した-332bpの欠失体すなわちp332 COL1A1 Lucはp610 COL1A1 Lucの活性に対し約51%と有意に低下が見られた(図9)。

考 察

ヒト $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーター領域の欠失解析による転写調節の解析はこれまでにJimenez SAらのグループにより解析がなされている^{7,8)}。彼らはchloramphenicol acetyltransferase (CAT)をレポーター遺伝子として種々の長さのヒトCOL1A1プロモーター領域を融合したコンストラクトを使用して、CATアッセイによって行っている。彼らはプロモーターの中核側 (proximal region) の部分 (-174bp~-84bp) に調節領域を見出している。今回、我々はルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として、彼らのものとは異なった長さのCOL1A1プロモーター領域の断片をそれに融合させて作成したコンストラクトを用いて、ルシフェラーゼアッセイにより、ヒトCOL1A1プロモーターの機能的欠失解析を施行した。

今回の我々の結果はbasal levelでの解析であるが、-402bp~-332bpが転写増強領域であることが明らか

にされた。そしてさらなる検索からそのDNA領域は-386bp~-371bpでそこに特異的に結合するDNA結合因子の存在が示唆された。Jimenez SAら⁷⁾の実験で、同部を含むコンストラクト (最終点-463bp) と同部を含まないコンストラクト (最終点-369bp) のアッセイの結果では我々のように有意差をもって後者で低下が認められず、我々の結果と矛盾している。その理由としては遺伝子導入する細胞が我々はヒト皮膚由来線維芽細胞株を用いているのに対し彼らはマウスNIH3T3細胞を用いている点が考えられる。本遺伝子で転写調節に関与するDNA領域は、転写開始点より約30塩基対上流にあるいわゆるTATA boxといわれるもの、約100塩基対上流に存在するいわゆるCAT boxといわれるCCAAT配列が知られている¹⁵⁾。我々の実験では最終点-332bpまでのプロモーターの欠失でのアッセイを試みたが、Jimenez SAら⁷⁾はさらに最終点-174bp, -84bpまで欠失させたコンストラクトを用いNIH3T3細胞で検討しており、-84bpまでの欠失で著しく活性の低下することを報告している。さらにヒトCOL1A1の転写レベルでの調節機構の検討は、basal levelのみならず増殖因子やサイトカインなどによる刺激後の遺伝子プロモーター領域の欠失解析によって検討がなされている。TGF- β の線維芽細胞のI型コラーゲン遺伝子発現活性化作用やTNF- α のI型コラーゲン遺伝子発現抑制作用に対する発現調節機構の解析によりなされており、TGF- β では $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン上流遺伝子-174bp~-84bpをTGF- β responsive sequencesとし、-164bp~-142bpに局在するSp1類似DNA結合部位でのDNA-蛋白質結合活性の増加を伴って、COL1A1転写が活性化されるとしている⁷⁾。またHitrayaら⁸⁾の論文では発症初期の全身性強皮症由来線維芽細胞を用いてのヒトCOL1A1プロモーター領域欠失解析を行い、TGF- β responsive sequences内の、Sp1およびnuclear factor1 (NF-1)に認識される-129bp~-107bpと-104bp~-78bpに局在する結合部位でのDNA-蛋白質結合活性の増加を伴って、ヒトCOL1A1の転写が活性化されるとしている。TNF- α に関しては同遺伝子の-101bp~-97bpと-46bp~-38bpの2箇所を介してなされていることが明らかにされている¹⁰⁾。

gel mobility shift assay (図8)で-386bp~-371bpのCTTCCACCTTTGGAAGの回転対称形を示す部位に、-402bp~-332bpの転写増強に関与していることが示唆される蛋白が、結合していることが明らかとなった。gel mobility shift assayの結果からは最も上方のバンドがこの配列に特異的に結合するものと考えられ、また他の2本のバンドはDNAに非特異的に結合する核内に存在する蛋白である可能性が考えられた。特に最下層のバ

ンドはアッセイの際、加える核蛋白量とは関係なく結合しているのをそのように考えられ、中間に位置するバンドも多量の非放射性DNAを加えても競合を受けないことからそのように考えられる。

gel mobility shift assayで明らかにし得た、ヒトCOL1A1の転写増強に関わるDNA領域に対してそこに結合する転写因子結合配列の予想をGenomatix Matinspector¹⁶⁾で検索した。-386bp~-371bpの16塩基に前後2塩基ずつ加えて20塩基で検索したところ、きれいにmatchしたものは検索されず少しmatchしたものが以下の2項目検索されたのみである。(1) Barbiturate-inducible element box from pro + eukaryotic genes (30.2%) (2) Gut-enriched Krueppel like binding factor (51.9%)。

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を特徴とする線維性の全身性結合組織病である。抗線維化因子(薬剤)と言われているもの、たとえばインターフェロン α ¹⁷⁾、D-ペニシラミン¹⁸⁾、リコンビナント・ヒト・インターフェロン γ ¹⁹⁾、リコンビナント・ヒト・リラキシン²⁰⁾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出ていない²¹⁾。近年皮膚疾患にも遺伝子(核酸)治療がなされるようになってきた^{22~24)}。限局性および全身性強皮症の皮膚硬化病変に対して今回我々が明らかにしたヒトCOL1A1の転写増強に関わるDNA領域を治療に応用する可能性について考察した。先にも述べたがHitrayaら⁸⁾は全身性強皮症由来線維芽細胞を用いてのプロモーター領域欠失解析で-129bp~-107bpと-104bp~-78bpがヒトCOL1A1転写の活性化に重要としている。これらのDNA領域や、今回の我々の明らかにしたCOL1A1の-386bp~-371bpの合成DNAを含む外用剤を塗布し皮膚に吸収させ、線維芽細胞内に取り込ませてその結合蛋白を取り除くことが出来れば、線維芽細胞のI型コラーゲンの転写が増加している強皮症の病態の改善につながる可能性が考えられる。

結 論

今回我々はヒト $\alpha 1$ 鎖I型コラーゲン遺伝子(COL1A1)プロモーター領域の欠失解析およびgel mobility shift assayを施行し、転写調節の解析を行った。その結果、-402bpから-332bpに転写増強領域の存在することを明らかにし、さらに-386bp~-371bpに結合し、その転写増強に関与していることが示唆されるDNA結合因子の存在することを明らかにした。

謝 辞 稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜

りました本学皮膚科学教室の山崎雙次教授に深謝致します。また、研究を直接御指導頂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) Ramirez F, Di Liberto M : Complex and diversified regulatory programs control the expression of vertebrate collagen genes. *FASEB J* **4** : 1616-1623, 1990
- 2) Jimenez SA, Hitraya E, Varga J : Pathogenesis of scleroderma. *Collagen Rheum Dis Clin North Am* **22** : 647-674, 1996.
- 3) 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.
- 4) Kivirikko KI : Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann Med* **25** : 113-126, 1933.
- 5) Schmidt A, Rossi P, de Crombrugge B : Transcriptional control of the mouse $\alpha 2(I)$ collagen gene : functional deletion analysis of the promoter and evidence for cell-specific expression. *Mol Cell Biol* **6** : 347-354, 1986.
- 6) Ravazzolo R, Karsenty G, de Crombrugge B : fibroblast-specific factor binds to an upstream negative control element in the promoter of the mouse alpha 1 (I) collagen gene. *J Biol Chem* **266** : 7382-7387, 1991.
- 7) Jimenez SA, Varga J, Olsen A, et al : Functional analysis of human $\alpha 1(I)$ procollagen gene promoter-differential activity in collagen-producing and-nonproducing cells and response to transforming growth factor $\beta 1$. *J Boil Chem* **269** : 12684-12691, 1994.
- 8) Hitraya EG, Varga J, Carol M, et al : Identification of elements in the promoter region of the $\alpha 1(I)$ procollagen gene involved in its up-regulated expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **41** : 2048-2058, 1998.
- 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) Mori K, Hatamochi A, Ueki H, et al : The transcription of human 1(I) procollagen gene (COL1 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.
- 11) Henikoff S : Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28** : 351-359, 1984.
 - 12) Sato M, Shegogue D, Hatamochi A, et al : Lysophosphatidic acid inhibits TGF-beta-mediated stimulation of type I collagen mRNA atability via an ERK-dependent pathway in dermal fibroblasts. *Matrix Biol* **23** : 353-361, 2004.
 - 13) Groudine M, Peretz M, Weintraub H : Transcriptional regulation of hemoglobin switching in chicken embryos. *Mol Cell Biol* **1** : 281-288, 1981.
 - 14) Hatamochi A, Mori K, Arakawa M, et al : Collagenase gene expression in cutis laxa fibroblasts is upregulated by transcriptional activation of the promoter gene through a 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-responsive element. *J Invest Dermatol* **106** : 631-636, 1996.
 - 15) Hatamochi A, Golumbek PT, Van Schaftingen E, et al : A CCAAT DNA binding factor consisting of two different components that are both required for DNA binding. *J Biol Chem* **263** : 5940-5947, 1988.
 - 16) Cartharius K, Frech K, Grote K, et al : MatInspector and beyond : promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21** : 2933-2942, 2005.
 - 17) Black CM, Silman AJ, Herrick AI, Denton CP, et al : Interferon- α does not improve outcome at One year in patients with diffuse cutaneous scleroderma : results of arandomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **42** : 299-305, 1999.
 - 18) Clements PJ, Furst DE, Wong WK, et al : High-dose versus low-dose D-penicillamine in early diffuse systemic sclerosis : anaiysis of a two-year, double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* **42** : 1194-1203, 1999.
 - 19) Polisson RP, Gilkeson GS, Pyun EH, et al : A multi-center trial of recombinant human interferon γ in patients with systemi sclerosis : effects on cutaneous fibrosis and interleukin 2 receptor levels. *J Rheumatol* **23** : 654-658, 1996.
 - 20) 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.
 - 21) Denton CP, Merkel A, Furst DE, et al : Cat-192 Study Group ; Scleroderma Clinical Trials Consortium : Recombinant human anti-transforming growth factor beta 1 antibody therapy in systemic scierosis : a multicenter, randomized, placebocontrolled phase I/II trial of CAT-192. *Arthritis Rheum* **56** : 323-333, 2007.
 - 22) Nakagami H, Tomita N, Kaneda Y, et al : Anti-oxidant gene therapy by NF kappa B decoy oligodeoxynucleotide. *Curr Pharm Biotechnol* **7** : 95-100, 2006.
 - 23) 玉井克人, 金田安史, 中邨弘重, 他 : NF κ B デコイ DNA によるアトピー性皮膚炎治療. *日本臨床63増刊* **12** : 659-663, 2005.
 - 24) Ritprajak P, Hashiguchi M, Azuma M : Topical application of cream-emulsified CD86 siRNA ameliorates allergic skin disease by targeting cutaneous dendritic cells. *Mol Ther* **16** : 1323-1330, 2008.