

博士論文

ヒアルロン酸の生理機能と  
生合成に関する研究

米田雅彦

1988年

図・本館

ヒアルロン酸の生理機能と  
生合成に関する研究

米田雅彦

名古屋大学図書	
和	1030325

報告番号 甲第 2132 号

# 目次

	ページ
I 序論	3
1. はじめに	3
2. ヒアルロン酸の構造	4
3. ヒアルロン酸の性質	5
4. ヒアルロン酸の役割	6
1) ヒアルロン酸の関与する現象	
2) ヒアルロン酸結合タンパク質	
5. ヒアルロン酸の生合成	14
6. 高転移性がん細胞の作るヒアルロン酸	15
7. 本研究が扱う三つの問題点	16
II 本論 — 実験結果と考察	17
1. ヒアルロン酸と細胞増殖 (問題点1)	17
1) 線維芽細胞の増殖と細胞層ヒアルロン酸含量の変化	
2) 外来ヒアルロン酸の細胞増殖への影響	
3) ヒアルロン酸細胞増殖促進活性の特異性	
4) ヒアルロン酸合成活性促進の細胞増殖への影響	
5) マウス線維芽細胞のヒアルロン酸結合分子	
6) 外来ヒアルロン酸やヒアルロン酸合成活性促進によって 引き起こされたマトリックスの変化	
2. ヒアルロン酸生合成 (問題点2)	24
1) ヒアルロン酸合成におけるタンパク質の関与	
2) マウス真皮線維芽細胞からのヒアルロン酸結合 タンパク質の単離	
3) 牛胎児血清からの85kDaタンパク質の単離	
4) 培養液のヒアルロン酸結合タンパク質の分析	
5) 85kDaタンパク質の結合特異性	
6) 線維芽細胞での85kDaタンパク質の分布と結合様式	
7) 85kDaタンパク質はヒアルロン酸合成に必要である	

	ページ
3. 転移性がん細胞の性質からみた ヒアルロン酸の役割と生合成 (問題点3)	33
1) FM3A高転移性株はヒアルロン酸被覆の 合成活性が高い。	
2) ヒアルロン酸被覆と血管内皮細胞との関係	
3) 血清成分85kDaタンパク質は高転移能細胞株の ヒアルロン酸合成に必要である	
III 今後の展望 — 85kDaタンパク質の役割を巡って	36
IV 材料および方法	39
V 文 献	55
VI 要 旨	70
VII 図 表 表1-9、図1-38	72

## I 序論

### 1. はじめに

動物は多くの細胞によってそのかたちが作られている。人でその数を見積れば  $3 \times 10^{13}$  個にもなる。その膨大な数の細胞を獲得する作業は、一個の細胞——受精卵が細胞分裂を繰り返すことに始まり、胚が形成されてからは細胞増殖で数を揃えていく。分裂・増殖した細胞は受精卵が持っていた万能性を失い、細胞によっては多段階の分化を経て機能や形態の異なる細胞になっていく。そうした細胞が集まって、組織、器官そして一体の動物を形作っている。動物の世代交代が一個の細胞によって行なわれることで、細胞増殖は多細胞生物にとっては必ず行なわれなければならない作業である。勿論のこと単細胞生物にとっても増殖なくして個体の増加はない。また、がん細胞についても無秩序に増殖しなければ人類を脅かす病気にはなっていない。このことから細胞のもつとも基本的な能力である細胞増殖を理解することは重要である。現在までに多くの研究者によって増殖のメカニズムは顕微鏡の観察から始まり、生物学、生化学そして分子生物学の手法で、制御の細かい部分まではわかっていないにしても、骨格的な現象の流れはわかってきている。ただしこの知見は主に細胞内の現象についてである。

先に組織は細胞の集まりからなると記述したが、細胞だけで作られているのではなく細胞の間を隔なく細胞外マトリックスが満たしている。それは細胞によって細胞外に作られた構造物であり、さまざまな巨大分子の集合体である。それは組織の形を規定し、保持するだけでなく、細胞の生存環境を提供し、細胞分化や細胞増殖に影響を与えられている。また、各組織で細胞外マトリックスの量と質がことになっており、外部環境で細胞は厳重な規制を受けていると考えられる。ところがその作用が具体的にどのようなものであるかについてはほとんどわかっていない。細胞の培養では培養条件を変えることで、産生される細胞外マトリックスが変わり、細胞の形も変化がみられる。このことは、細胞が細胞外マトリックスの情報を認識し、形質を変化させることを示している。細胞外マトリックスと細胞の相互作用を細胞の動態で解釈できれば、分化や細胞の形質発現そしてがん細胞の挙動の理解を深める手助けになると思われる。個体や組織の中で細胞増殖を観察することは比較的簡単にできることである。しかし細胞増殖の機構

や制御を研究することには困難である。なぜならば細胞が増殖に連れてどんどん分化して不均一になること、組織の塊の場合には個々の細胞に与えられる外部環境を均一にすることが難しいためである。

その点で、外部環境に細工できる細胞の培養系を用いるのはよいと考えられる。それに細胞接着（正常細胞は基質に接着しないと増殖しない）、細胞増殖そして増殖停止の現象という基本的な細胞の動態が観察できる。さらに細胞は細胞外マトリックスを合成し、構成成分の変化が観察できる。その意味で細胞外マトリックスによる細胞増殖制御機構を研究するには、最適の系である。細胞増殖の実験に頻繁に用いられるのが線維芽細胞である。この細胞は増殖時に細胞外マトリックス成分であるヒアルロン酸の合成活性が上昇し、増殖停止とともに合成活性が低下することが報告されている(Morris, 1960; Daniel et al. 1961; Davidson et al. 1963; Davidson, 1963; Nameroff & Holtzer, 1967; Koyama & Ono, 1970; Bishoff, 1971; Toole et al. 1972; Moscatelli & Rubin, 1975; Lembach, 1976; Angello & Hosick, 1982; Matuoka et al. 1985)。細胞増殖とともに顕著に増減し、また数多くの報告がありながら、どうしていままでそのメカニズムが解明されなかったのか。本章では、ヒアルロン酸の構造の説明から始めて、その性質および機能についてわかってることをまとめてみた。それによっていままでよく解明できていない理由とヒアルロン酸の問題点を整理してみた。本論においては問題点を解決することでヒアルロン酸と細胞増殖の関係を機構の面で一部明らかにした。またその手段としてヒアルロン酸合成機構についても新たな知見を得たので示したい。

## 2. ヒアルロン酸の構造

1930年代のはじめ、水様のゲルを作る物質が牛のガラス体から見いだされた。ヒアルロン酸の発見である。その構造は、D-グルクロン酸とN-アセチルD-グルコサミンをそれぞれ $\beta(1\rightarrow3)$ と $\beta(1\rightarrow4)$ のグルコシド結合で交互に繰り返す多数の二糖単位からなる直鎖である。枝分かれのないことは電子顕微鏡でも確かめられている(Fessler & Fessler, 1966)。生理的なpHではカルボキシル基は完全に解離してそのためヒアルロン酸と命名されている。同様の粘質性の性質と構造を持つものが軟骨、骨、靭帯という結合組織からヒアルロン酸に前後してあいついで発

見され、その総称としてKarl Meyerにより粘質性分泌物に対する生理学的な言葉の接頭語であるムコが名に引用された。そうしてムコ多糖の歴史が始まった。後にムコ多糖がタンパク質との結合あることが分かりプロテオグリカンという名称が与えられ、糖鎖はアミノ糖を含むことから化学的にグリコサミノグリカン（以後GAGと略す）という名を与える方が妥当と思われるようになった。プロテオグリカンについては総説（木全、1988）に説明を譲るとして、現在までのデータの蓄積からもGAG含量の多い組織はガラス体や軟骨といった細胞外マトリックスに富む組織である(Cassaró & Dietrich, 1977)。表1にGAGを6グループに分類して示したが、ヒアルロン酸以外のGAGは糖残基の種類や硫酸基の数と位置によりかなりの種類がある。その中でヒアルロン酸は、唯一、硫酸化されていないため、他のGAGとは明らかに区別される。またヒアルロン酸は分子量すなわち糖鎖長が他のGAGの10倍から100倍という巨大な分子である特徴をもつ。そのために、次の項で記述するがヒアルロン酸の物性は他のGAGとはおもむきを異にする。通常、GAGはタンパク質と共有結合したプロテオグリカンの型で合成され細胞外マトリックスに分布する。ヒアルロン酸については、いまだにこの点についての決着がついていない。コアタンパク質を使わない生合成機構が提唱され、この点でも他のGAGとは明確な違いがある。生合成については別の項目で詳しく説明する。

### 3. ヒアルロン酸の性質

GAGは、その構造的な特徴から長い鎖の中に多数のカルボン酸基を持ち高負荷多重陰イオンの状態にある。その電氣的反発力のため、GAGはポリペプチド鎖のように細かく折り畳まれて密な球状構造をとることができず、延びたランダムコイル構造をとる傾向がある(Scott & Tigwell, 1978)。その構造が粘性や弾性を生じ、加えてどうしても容積が大きくなる。しかも親水性の化学構造は多量の水を吸収して水和ゲルを形成する。ヒアルロン酸のような高分子では、この性質が一層顕著になる。ヒアルロン酸の水を取り込んだ構造は研究されていて図1 BにNMRから解析された二次構造を示す。図1 B (a)には細胞膜通過時の水無しを想定してジメチルスルフォキサイド中での構造を示してある。そこに水を添加するとグルクロン酸のカルボキシル基とN-アセチルグルコサミンのアセトアミド基のNH部分の間に水分子が入る(Heatley, 1988)。条件的にはそのまま生体中で



の反応に結び付けるのは難しいが、ひとつの可能性としてあり得ると思われる。一般的に分子量が小さい他のGAGはプロテオグリカンになって飽水性をある程度持つが、高分子ヒアルロン酸の1/10から1/100ぐらいの能力にすぎない。その性質を最大限に持つヒアルロン酸の場合には、低濃度でさえ個々の鎖はからまり、溶液中で切れ目のない網目構造を形成するためさらに大容量を占め、驚くことに1gで $10^3\text{cm}^3$ の容積を占める(図1 A)(Comper & Laurent, 1978)。それでは細胞外マトリックスの中でヒアルロン酸が水を保持することが細胞増殖の現象と関わりがあるのか、また細胞にどのようにしてこの情報を送り伝えると考えるのか次の項でまとめてみた。

#### 4. ヒアルロン酸の役割

従来、ヒアルロン酸を含めた細胞外マトリックスのGAGは、その単純な構造から単なる構造物、ややすると不活性な細胞の足場と考えられがちであった。確かに、ヒアルロン酸に到っては金太郎飴のように部分的にどこを見ても同じ構造をしている。ところが、構造において単純でも前述した物性においては分子量と濃度が大きな意味を持つ。そしてヒアルロン酸は最も大きな分子量を持つため、まさしく他のGAGと比較にならないほど、分子量(糖鎖長)による物性の変化が大きいことになる。そんなヒアルロン酸に色々な機能があっても不思議でない。機能をイメージするのに生体内での分布を知ることは重要であるが、最近まで組織のヒアルロン酸量についての知見は少なかった。それは組織をアルシアンブルーで染色して調べていたためであった。この方法はヒアルロン酸に特異的でなくGAGはすべて染まるため、ヒアルロニダーゼ処理したものととの差引の比較であった。その場合、酵素が完全に働くことが必要であり問題点は多かった。最近になって、ヒアルロン酸検出に新しく、ヒアルロン酸にアフィニティーを持つタンパク質を用いた方法が報告された。感度が高く、組織や体液の小サンプルを分析できるようになった。その方法とはフルオロセインイソチオシアネート(FITC)を結合させた軟骨型プロテオグリカン(PG-H)のコアタンパク質のヒアルロン酸結合ドメインやヒアルロン酸結合タンパク質のヒアルロネクチンを用いて調べられている(Kundson & Toole, 1985; Girard et al. 1984)。それによってまだ一部ではあるが組織のヒアルロン酸量を示すことができるようになった(表2)。組織による濃度の多

様な変化はヒアルロン酸の組織特異的な機能を示唆しているのかもしれない。

また、ヒアルロン酸は数多くのタンパク質、それに細胞と親和力を持つことが知られている。機能を考えるときには、このヒアルロン酸結合性タンパク質の存在を忘れてはならないであろう。

以下では、ヒアルロン酸の関与する現象とヒアルロン酸結合性タンパク質（細胞表面も含めて）の示す活性について、とくに細胞に与える影響についてまとめ、私の研究の発端になった問題点を指摘しながらヒアルロン酸の機能を考えていきたい。

### 1) ヒアルロン酸の関与する現象

結合組織において、ヒアルロン酸は、繊維性タンパク質（コラーゲン、フィブロネクチン等）の1割に満たないにもかかわらず、細胞の外部を効果的にうめているのは前述した大容積の水和ゲルを作る性質による。そして表面への負荷すなわち外圧に耐えうる性質を組織に持たせている。関節液に多く含まれるヒアルロン酸はまさしくショックアブソーバーの働きを行なっている。また骨のつなぎ目の潤滑剤として作用している。血管壁にもヒアルロン酸は多く含まれるが、弾性の性質が血圧の上下に対して血管が耐えるように機能していると思われる。一方、多数のカルボキシル基を持つためイオン交換樹脂のように $\text{Ca}^{2+}$ のような陽イオンの保持には適している。このことは体内で生命維持にとっては重要な水と塩の平衡保持に寄与していることを示唆する。また水和ゲルは多孔性の構造を持つために、その間を水溶性分子が迅速に拡散し、細胞成分は容易に移動できる状態にある（図2）。

ところで、こういった構造体として細胞や組織の機能維持という大変重要ではあるが受容的な機能しかヒアルロン酸にはないのか。ここで水和ゲルを細胞をも包み込むほど大きなレベルで考えれば、中を細胞が移動することも可能と思われる。このことをまさしく示す現象が、生体内で見られる。例えば①ニワトリ胚発生の5.5日から8日にかけて角膜上皮の下部に未分化間充織細胞が移動して来て角膜へと分化するが、その時移動先の組織中に多量のヒアルロン酸の分泌、蓄積が観察される(Toole & Trelstad, 1971)。②皮膚の傷害の際、周囲の未分化間充織細胞が移動して組織を修復するが、この時ヒアルロン酸合成活性が上昇して細胞

移動を助ける(Bertolami & Donoff, 1978)。このように細胞移動の道筋にヒアルロン酸が分泌・蓄積され、細胞の移動を促していると考えられる。培養系においても、ヒアルロン酸は線維芽細胞の移動を助けることが分かっている(Turley et al. 1985)。ただし血管内皮細胞の移動は阻害する。白血球においては、低濃度のヒアルロン酸は細胞移動を促進するが、高濃度では阻害する(Forrester, 1981)といった逆の現象も見られる。すなわち細胞が細胞外マトリックスのヒアルロン酸濃度を読み取っていることになる。ここでもう少し細胞移動を考えてみる。

細胞は浮遊して動くような能率の悪いことはしていない。動くためには足場が必要である。また足場があつて始めて、目的先へスムーズに移動できるであろう。細胞が足場を持つことは、現象としては細胞の基質等への接着として観察できる。細胞が基質に接着している部分にはヒアルロン酸が多いという報告があり(Lark & Culp, 1982)、細胞がヒアルロン酸を認識していることを示す。細胞接着に対するヒアルロン酸の影響については多くの報告がある。ところがその効果は阻害(Underhill & Dorfman, 1978; Forrester & Lackie, 1981)であつたり、促進(Pessac & Defendi, 1972)であつたり、または効果がない(Knox & Wells, 1979)ともいわれ明確でない。また同じ濃度のヒアルロン酸でも細胞によって認識が違ふと思われるふしがある。

次に前述してきたヒアルロン酸と細胞増殖の関係はどうなっているのか。発生段階や再生の形態形成の時に見られる細胞増殖は通常ヒアルロン酸の豊富な場所で起こる。その後その部位の分化や形態形成が進むにしたがい、ヒアルロン酸合成活性の低下またはヒアルロニダーゼの活性上昇によりヒアルロン酸量が減少し、それに代わってコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸の合成活性が高くなる現象が見られる。①ニワトリ胚肢芽未分化間充織細胞の軟骨細胞への分化は、胚発生の4.5日に起こるが、その部分のヒアルロン酸量は3日から4日で最大になり4.5日では上昇してくるヒアルロニダーゼ活性により急激に減少する。そしてヒアルロン酸量の減少に代わって軟骨型のコンドロイチン硫酸とⅡ型コラーゲンの合成がおこる(Toole, 1973)。同様の現象がイモリの上肢の再生でも見られる。上肢の切断後10日目をピークとしてヒアルロン酸が蓄積し10日目から30日目にかけてヒアルロニダーゼ活性の上昇がみられ、その後コンドロイチン硫酸が増大してその間に上肢が完成する(Smith et al. 1975)。②ニワトリ胚の腎発生において13日に後

腎の小管形成が完了するが、9日から12日にかけてヒアルロン酸含量が増大し（4倍）、13日になってヒアルロニダーゼの活性上昇とともに減少する（1/10倍）。この現象は中腎の小管形成においても起こる(Belsky & Toole, 1983)。③筋原細胞の培養にヒアルロン酸を添加すると筋肉への分化を阻害する(Kujiwa et al. 1986)。これはヒアルロン酸減少後に起こる分化が添加された過剰のヒアルロン酸によって阻止されていると考えられる。以上の多くの例に共通することは、細胞分化前にヒアルロン酸合成活性の上昇が必要であり、さらにその合成活性のピークが持続するのではなくヒアルロニダーゼや合成活性の低下により減少してはじめて分化へと進行することである。すなわち分化のため細胞数が必要な間、ヒアルロン酸合成活性が高くなり、細胞増殖を助け、増殖が不用になった時点でヒアルロン酸の減少が起こることが増殖の停止そして分化へのスイッチとして必要であると考えられる。先に記述したように正常な繊維芽細胞の培養系においても同様のことが観察される。増殖期や細胞密度の低いときにヒアルロン酸合成活性が高くなり、安定期や細胞密度の高い状態になると合成活性が低下し、それに代わってコンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸の合成活性が高くなることが報告されている(Horonowski & Anastassiades, 1980; Moscatelli & Rubin, 1975)。ところが、3T3細胞、SV-3T3細胞そして滑膜細胞の場合、培養液に低濃度・低分子のヒアルロン酸を添加すると、細胞増殖の促進が見られるが、高濃度・高分子では逆に阻害されるという報告がある(Goldberg & Toole, 1987)。そのためヒアルロン酸に細胞の増殖を促す作用があるという統一ができていない。

それではどう考えればよいのか。正常細胞が増殖するためには足場が必要である。このことは前述した細胞移動と細胞接着も結局のところ細胞増殖と同一線上の問題であることを意味する。そして、細胞の足場に影響を与えるヒアルロン酸に注目しなければならない。今まで多くの研究者はヒアルロン酸と細胞増殖の関係について、ヒアルロン酸合成活性だけに注意をはらってきた。そのため彼らが見落としてきた細胞周囲に蓄積されているヒアルロン酸量を調べなければならない。また、濃度または分子量により細胞の挙動が違うことに注意しなければならない。そして細胞は何らかの機構でその違いを読み取っているのでヒアルロン酸量の増減による細胞外マトリックスの変化について調べなければならない（問題点1）。そこで私は、マウス真皮線維芽細胞を用い、細胞層に含まれるヒアルロ

ン酸含量に注意をはらい、外から分子量の明確なヒアルロン酸で細胞増殖はもちろんのこと細胞外マトリックスにどんな影響を与えるか調べた。それによって今までの壁を突破することができると思った。

## 2) ヒアルロン酸結合タンパク質

ヒアルロン酸からの情報を細胞に伝えるためにはヒアルロン酸に結合する分子を解析することが必要である。表3に示すように現在までに数多くのヒアルロン酸結合タンパク質の存在が報告されている。ヒアルロン酸以外のGAGはプロテオグリカンとしてコアタンパク質に結合して固定されている。その意味でコアタンパク質を持たないヒアルロン酸にはその役目を持つものが必要なかもしれない。または、単純な構造のヒアルロン酸にさまざまな機能を発現させるために必要なのかも知れない。ヒアルロン酸結合タンパク質は分子量も様々であるし、結合に必要なヒアルロン酸の長さもレセプターの6糖よりプロテオグリカンの10糖さらにはフィブリノーゲンの200糖までバラエティに富んでいる。ヒアルロン酸レセプターとヒアルロン酸の結合力はヒアルロン酸の高分子の方が低分子に比べ約2倍の強さがある。すなわちヒアルロン酸の長さによって結合の様子が変化しうることを示す。他の分子に関しては、高分子だけのデータであり分子量の違いによる変化は残念ながらわからない。

脳から見つかったヒアルロネクチンはストークス半径( $a = 6.3\text{nm}$ )および沈降係数( $S_{20,w} = 4.8\text{S}$ )においてヒアルロン酸レセプターと同じ値を持つ。ところがヒアルロン酸との結合はレセプターでは6糖ヒアルロン酸オリゴで有意に阻害されるが、ヒアルロネクチンは阻害されない(Underhill et al. 1987)。このことからこの2つのタンパク質はまったく別のタンパク質と考えられる。

機能についてかなりわかっている分子もある。例えば、ヒアルロン酸はフィブリノーゲンと結合して、フィブリンポリマーの形成を早めることに関与する。リンクタンパク質と軟骨型プロテオグリカン(PG-H)は相同性の高いヒアルロン酸結合ドメインを持ち、さらにリンクタンパク質はPG-Hのヒアルロン酸との結合を強固にする働きがある。形成された分子集合体は軟骨の間充織を効果的に埋めている。未分化間充織細胞型プロテオグリカン(PG-M)はヒアルロン酸以外にフィブロネクチンやI型コラーゲンに結合し、細胞接着性を制御している可能性がある

(Yamagata et al. 1987)。ニワトリ線維芽細胞のヒアルロン酸結合タンパク質 (HABP)はヒアルロン酸以外にフィブロネクチン、コラーゲン (I、III、V型)、ラミニンと結合することはわかっている (Turley & Moore, 1984)。そして機能については細胞移動と接着阻害に関わっている現象が見いだされている (Turley et al. 1985)。しかしメカニズムについてはまったくわからない。その他いくつか結合タンパク質は見つかっているが、詳しい性質はわかっていない。ニワトリ受精卵に低分子量 ( $0.5 \sim 1 \times 10^4$ ) ヒアルロン酸を投与すると血管造成が強く促進されることがわかっている (West et al. 1985)。ヒアルロン酸特有の物性は低分子の場合には見られないので、この場合むしろ上記に述べた様な結合タンパク質等とヒアルロン酸との結合に影響を与えた結果と考えられるが、今のところ、何に影響を与えたのかはわからない。

ヒアルロン酸レセプターが本当ならば、ヒアルロン酸の情報が直接細胞に伝わることになる。まさしくヒアルロン酸の機能を知るには重要な分子である。そして糖を認識するレセプターということになる。いままで見出されているものがタンパク質ドナーとタンパク質レセプターということを考えれば珍しい。このタンパク質の発見は、細胞の混濁液に少量のヒアルロン酸を加えて、細胞凝集が起こったことがきっかけである (リンパ細胞やマクロファージにもあることが示されている)。ただし、細胞凝集は低濃度ヒアルロン酸は促進するが、高濃度ヒアルロン酸は阻害する。この相反する現象は、以下の様に説明される。ヒアルロン酸レセプターが細胞膜上にあり、低濃度では1分子のヒアルロン酸が2つの細胞を集まるように橋渡しをするが高濃度になると細胞膜上のレセプターが全てヒアルロン酸で埋まってしまい細胞-細胞の結合にはヒアルロン酸は利用できないためである。最近、そのヒアルロン酸レセプターと思われるタンパク質がアクチンフィラメントと結合している可能性が示された (Tarone et al. 1984; Lacy & Underhill, 1987)。これらのことはヒアルロン酸が直接細胞、組織の形態を制御している可能性を示す。また、ヒアルロン酸があたかも細胞の一部となっているかのように細胞膜上の疎水性タンパク質と共有結合している可能性も示されている (Green & Underhill, 1988)。しかしまだ確かなものではない。

現在までに見つかっているヒアルロン酸結合タンパク質について説明してきたが、ヒアルロン酸が細胞に情報を与えるということに問題をしぼるためデータ

を整理し直した。細胞表面でのヒアルロン酸の存在の仕方ということでまとめてみた(表4)。機能としては、ヒアルロン酸がマクロファージを活性化すること、またグラニューロサイトも活性化するが、これはレセプターを介しているのか、それともエンドサイトーシスの結果引き起こされるのか結論は出ていない。また、リンパ細胞がヒアルロネクチンを介してヒアルロン酸を細胞表面に持つことに関してはまだ確かなことではない。レセプターについては、生理的な意味は別にして前述した細胞凝集反応がある。また、肝臓での血液中ヒアルロン酸の取り込みは7°Cでも起こることから、エンドサイトーシスではない(Smedsrod et al. 1984)、レセプターが機能している可能性がある。ただし実体はまだ精製されていないのでわからない。現在わかっていることでは、期待したヒアルロン酸レセプターに細胞外マトリックスの情報伝達という機能はないと思われる。

それでは培養細胞において、細胞表面に被覆として観察されるヒアルロン酸についてはどうか。被覆とは次に説明するような現象である。低密度の培養細胞にホルマリンで固定化した赤血球を添加してしばらく放置すると、細胞周辺に赤血球の近づけない部分がある。この細胞周辺の部分を被覆と呼ぶ。そしてヒアルロニダーゼ処理によりこの被覆は完全に消失することからヒアルロン酸によってその形が保たれているのに間違いはない。細胞周囲のヒアルロン酸の重要性は前述したとうりであり、合成されて細胞外に出たヒアルロン酸とは機能的に別のものと考えなければならない。

ヒアルロン酸被覆の形成に関しては次のような実験がひとつの可能性を示唆すると思われる。分化して末梢血中に出されたリンパ球に植物凝集素フィトヘマグルチン(PHA)を加えるとDNA合成を誘発することが知られている。この時、先ず5分以内に起こる現象が膜透過性上昇に伴うCa<sup>2+</sup>流入とK<sup>+</sup>溶出、膜リン脂質イノシトールリン酸の代謝回転の増大が起こる。次に15分以内にヒアルロン酸が細胞表面に出てくる現象がある(Sato et al. 1979)。PHA処理までは細胞表面にはシアル酸が多く、ヒアルロン酸は細胞膜の深層に隠れている。それがヒアルロン酸が表面に浮き上がりシアル酸を覆い隠してしまうと報告している。この浮き上がりは脂質の流動性に関係していると考えられている。さらに膜流動性とヒアルロン酸合成が関係することが次のことから考えられる。細胞をがん化させるフォルボールエステル(TPA)もヒアルロン酸合成に関与することは表5に示した。TPAはCキナ

ーゼを活性化するが、それ以外の効果として膜の流動性を上昇させることが分かっている。以上のことから、浮き上がりによりヒアルロン酸被覆が形成される可能性がある。ただ被覆中のヒアルロン酸量は測定されていなし、またムコ多糖の細胞膜における構築状態がまったくわかっていないのが現状であり、被覆が具体的にいかなる分子からできているのかわかっていない。それに被覆に含まれるヒアルロン酸がヒアルロン酸レセプターに結合しているかどうかも分かっていない。また走査型電子顕微鏡の観察では、ヒアルロニダーゼ処理により、滑らかであった細胞表面が毛羽だった状態になることが見られ、大きな変化が起こっているが(Bard et al. 1983)、分子レベルの変化についてはわからない。

それでは細胞の周囲に被覆として存在するヒアルロン酸の働きは何か。筋原細胞が融合するときヒアルロン酸被覆を失うという報告はある(Orkin et al. 1985)。しかしヒアルロン酸が未分化な状態で細胞増殖を促して細胞融合を阻止しているのか、ヒアルロン酸被覆の消失が分化へのスイッチになっているのか現象だけでありまったく機能に対する知見はない。それでは細胞増殖と関わりあるのか。基質からの細胞の分裂時の解離にヒアルロン酸被覆が関与するなら、増殖制御に関与することになる。しかし、Simian virus 40やPolyomaでトランスフォームした細胞のヒアルロン酸被覆は減少するという結果だけである(Underhill & Toole, 1982)。これだけではヒアルロン酸被覆が細胞増殖能を決定しているとは言えない。ヒアルロン酸被覆を調べるには細胞密度が低くそれぞれの細胞が分離していることが必要である。そのため安定期の被覆を調べることはできない。そのため増殖に対する作用に関しては、これ以上の詳しい知見はいまのところない。ヒアルロン酸被覆の機能を知るのにヒアルロニダーゼによる分解しかできないのが現状である。しかし組織を完全に酵素消化できないし、培養細胞を用いてもヒアルロン酸被覆は数時間で回復してくる(Goldberg & Toole, 1984)のであまり役に立ちそうにない。そのためのもっとも有効な手段はヒアルロン酸合成を止めることである。それにはヒアルロン酸合成の機構を知る必要がある。

## 5. ヒアルロン酸の生合成

現在どこまで生合成機構が明かになっているかをまとめてみた。ヒアルロン酸は、間充織組織において高濃度に存在する。ただし、培養細胞の場合ほとんど



の細胞が合成している。ヒアルロン酸はUDP-sugarから合成されることには間違いはない(Roden, 1980)。それでゴルジ体が合成場所だと思われてきたし、分子量12000のコアタンパク質らしきものも単離されている(Takagaki, 1981)。ところが、最近になって細胞膜である可能性を示す報告がでてきた(Prehm, 1984; Philipson & Schwartz, 1984)。合成酵素は細胞膜の内側にあり合成されたものが直ちに膜の穴を通して細胞外に分泌されると説明されている。さらに糖鎖の延長は還元末端への糖の付加で起こる可能性も示唆された(Prehm, 1983) (図3を参照)。ところがその制御機構についてはほとんど知られていない。ヒアルロン酸合成に影響を与える試薬が多く知られているが(表5に一覧を示す)、一般にアデニルシクラーゼ活性と相関がある。上皮細胞成長因子(EGF)もリストに載っているが、細胞増殖とヒアルロン酸合成には相関があるというぐらいしかわかっていない。

合成酵素については、Prehm & Mausolf (1986)が連鎖状球菌の細胞膜から単離した。その分子量は53000 (53kタンパク質) の一個のタンパク質である。連鎖状球菌のヒアルロン酸合成能の異なる変異株を取り、そのヒアルロン酸合成活性と53kタンパク質の量に比例関係があること、そして抗53kタンパク質抗体でヒアルロン酸合成が阻害されることを報告している。ただヒアルロン酸は二種類の糖からなり一種類のタンパク質で合成されるとは考えにくい。もっと違った機構で合成に関与しているのかもしれない。原核細胞でヒアルロン酸を合成しているのは、連鎖状球菌だけであり、真核生物のヒアルロン酸合成と同一であるかどうかは疑問のあるところである。Mian (1986)は分子量200000(200k)の一個のサブユニットと分子量121000(121k)の二個のサブユニットからなる総分子量442000の合成酵素群を培養ヒト線維芽細胞の細胞膜より単離した。121kサブユニットは分子量66000と55000のポリペプチドから、200kサブユニットの方は分子量116000(116k)と84000(84k)のポリペプチドから構成される。116kと84k成分は、チロシン残基をりん酸化されてヒアルロン酸合成活性をもつと報告されていてチロシンキナーゼの関与を示唆するが、まだ確実にはなっていない。

ここでPrehmの提唱するヒアルロン酸合成が正とするなら、生合成途中のヒアルロン酸は細胞外に向かって伸びており、Tooleらが見いだしたヒアルロン酸被覆はそれを観察していることになる(表4)。そうなれば被覆自体にはそれ程の意味

はないのか、それともレセプターを兼ねた合理的なものなのか知りたいところである。すなわちヒアルロン酸合成とヒアルロン酸被覆形成の問題は、同一線上に乗ったことになる。もしそうならばヒアルロン酸合成を知ることは、ヒアルロン酸被覆形成の過程を知ることになる。

以上のようにヒアルロン酸合成については、合成される場所もゴルジ体であるのか細胞膜であるのか、また合成酵素も何種類あるのか、さらにコアタンパク質が存在してそれをプライマーにして合成されるのか、それとも別の合成機構が報告されているようにあるのか、確実なものは何一つないのが現状である。ヒアルロン酸合成機構の解明に一番早く接近するには、ヒアルロン酸に結合しているタンパク質でヒアルロン酸合成に関与するタンパク質、すなわちコアタンパク質の存否に結論を出すことと思われ、それを捜すことから始めた（問題点2）。

## 6. 高転移性がん細胞の作るヒアルロン酸

培養系について考えてきたが、やはり心配になるのが、生体内でも同様のことを考えてよいのかということである。その疑問を解決するために、細胞の動態をすべて含んだ現象であるがん細胞の転移についてヒアルロン酸の関与を次に考えてみた。

がん細胞の多くは、原発巣で増殖するだけで納まっていない。一部の細胞が組織中を移動し血管壁を破り血液に乗って動き出す。その中の多くは生体の免疫機構によりやられてしまうが、ほんの一部は生き残り（例えば、それが一個の細胞であっても）臓器の血管壁に接着し、血管内皮細胞層および基底膜を破壊し組織中に浸潤し転移巣をつくる。というのが、現在考えられている血行性転移のプロセスであろう。それではヒアルロン酸はどのような場面に関与していると考えられるのか推測した。腫瘍細胞は原発巣から血管まで先ず動く必要があるが、腫瘍の移動にヒアルロン酸が関与するという報告がある(Toole et al. 1979)。図2に示したようにヒアルロン酸リッチなマトリックスは細胞移動には適していると思われる。ヒアルロン酸被覆が、免疫機構からがん細胞を防御するという報告がある(McBride & Bard, 1979)。それに血液中にヒアルロン酸は含まれるし、また種を越えて同じであるため免疫反応は起きない。そのため血管中を移動するとき生体防御機構をクリアーするのに役立ち、がん細胞の生存率が高くなる。転移巣

近くの血管においてヒアルロン酸は、血管内皮細胞の移動を抑制することから血管内皮細胞を収縮させたり傷の修復を阻止してその間に、血管内皮細胞の隙間から基底膜を突き抜けていく可能性がある。癌転移しやすい細胞はコラゲナーゼ活性やヘパリチナーゼ活性が高いことから、より働きやすくしていることになる。培養系の実験でヒアルロン酸の異常な合成により細胞外マトリックスの構築が破壊されるという報告がある(Stack & Brandt, 1980)。このことは転移巣に着いたがん細胞が、多量に合成したヒアルロン酸で従来の細胞外マトリックスを破壊し、再び増殖するために必要な環境を自分で作ることも考えられる。

本論では、ヒアルロン酸合成活性の高いマウス乳がん細胞で肺への高転移性を示す細胞株を用いた。そしてヒアルロン酸が実際に転移のどのステップに有用に働いているのか調べる (問題点3) とともに、ヒアルロン酸合成の阻害によって転移の防止を試みた。

## 7. 本研究が扱う三つの問題点

以上までの記述で、ヒアルロン酸の生理機能の未知の部分を確認するとともに、その不明になっている原因を明らかにしてきたつもりである。その過程でまとめた三つの問題に結論を出すことで、ヒアルロン酸の研究は壁を突き破り前進すると考えた。本論に入る前にもう一度、問題を簡単にまとめてみた。

(1) ヒアルロン酸の細胞増殖に及ぼす影響について、従来のようにヒアルロン酸合成活性ではなく、細胞周囲の蓄積量とヒアルロン酸の分子量と濃度に注意しながら調べる。また細胞の動態に影響を与えるとされている細胞外マトリックスの構造をヒアルロン酸の増減で変化させられるかかどうかが調べる。

(2) ヒアルロン酸生合成機構のメカニズムについては未知なる部分が多い。そのため生理機能の研究も道具不足で停滞気味になる。それを解決する一番早い方法は生合成プライマーとしてコアタンパク質の存否に結論を出すことであり、それを捜すことから始めた。

(3) 生体内におけるヒアルロン酸の働きを少しでも明らかにするため、高いヒアルロン酸合成活性を持つ高転移性マウス乳がん細胞の転移に注目した。転移の過程は細胞動態の全てを含んでいる。そこでヒアルロン酸の機能を類推するため、ヒアルロン酸が有用に働いている転移の段階を見つけることから始めた。

## II 本論 ——実験結果と考察

### 1. ヒアルロン酸と細胞増殖

#### 1) 線維芽細胞の増殖と細胞層ヒアルロン酸含量の変化

先ず培養細胞において細胞層ヒアルロン酸が培養期間中にどのように変化するか調べた。細胞はマウス真皮線維芽細胞を用いた。増殖期ではGAGの三分の二がヒアルロン酸でありヒアルロン酸の機能を調べるには適当なものである。図4に細胞の増殖曲線と培養皿当りの細胞層のヒアルロン酸含量を示してある。細胞増殖期に細胞層ヒアルロン酸量は増加し増殖期後期の5日目に最大になる。その後細胞が安定期に入るとヒアルロン酸量は減少する。それでは減少をなくしてやればどうなるか。最も単純に考えてヒアルロン酸を培養に加えてみることにした。ヒアルロン酸濃度については表2から高濃度を先ず用いることにした。ただし3mg/mlになるとその粘性から扱いにくく、0.6mg/mlの濃度を採用した。細胞増殖を調べる前に加えたヒアルロン酸が本当に細胞外マトリックスに取り込まれるにかどうか確かめた。そのために、FITCラベルのヒアルロン酸を用いた。培養5日目の培養細胞に添加して、時間の経過によるその変化を調べた(図5)。添加後3時間でヒアルロン酸の蛍光はいくつかの細胞表面で認められた(図5B)。蛍光は時間の経過にしたがって多くなり約48時間後に最大に達した(図5C、E)。その段階でも蛍光は疎らでいくつかの細胞表面では観察されなかった。さらにFITCラベルヒアルロン酸を添加し、蛍光の広がり期待したが、もはやそれ以上の強度は観察されなかった。観察される蛍光パターンは核の部分が排除されエンドサイトーシスの可能性を示す。そこで48時間処理の細胞について短時間の辜丸ヒアルロニダーゼ消化を行なったところ蛍光は完全に消失した(図5G)。酵素消化後も細胞は培養皿に接着したままであり、また酵素は生きている細胞には取り込まれないことから、FITCラベルヒアルロン酸は主に細胞外マトリックスに取り込まれたと結論される。そこでその時の細胞数の変化を調べた。

#### 2) 外来ヒアルロン酸の細胞増殖への影響

この培養の5日目に0.6mg/mlのヒアルロン酸を添加すると、培養7日目に安定期になっているにもかかわらず、4日後の9日目に約20%の細胞数の増加が観察され

た(図6)。同じ効果は11日目に添加した場合にも起こった。ところが一方で、ヒアルロン酸は細胞増殖の促進の効果がないとか、リンパ球(Darzynkiewicz & Balazs, 1971; Anastassiades & Robetson, 1984)や3T3、滑膜細胞(Goldberg & Toole, 1987)の細胞増殖を抑制するという報告がある。従来のヒアルロン酸添加量は100ug/mlレベルであった。そこで濃度による効果を詳しく調べてみた。この効果はヒアルロン酸濃度に依存し、約1mg/ml濃度で最大になった(図7)。図7の結果からすれば従来用いられている濃度で細胞増殖の促進が起こらないのは当然である。また2mg/mlを越えると細胞の基質からの脱離が起こる。3T3細胞においても1mg/ml濃度のヒアルロン酸が基質からの解離を促す(Abatangelo et al. 1982)。細胞分裂のためには細胞接着の解除が必要であり、ヒアルロン酸合成活性の上昇が線維芽細胞の基質からの解離を助け細胞分裂が起こるという報告もある(Brecht et al. 1986)。Goldberg & Toole (1987)もヒアルロン酸濃度によって逆の影響がでると報告している。培養初期では条件によっては抑制される(Yoneda et al. 1988a)。また増殖が観察されているのがラット線維芽細胞(Tomida et al. 1975; Hronowski & Anastassiades, 1980)、ニワトリ胚線維芽細胞(Moscatelli & Rubin, 1975)、それに人の線維芽細胞(Lembach, 1976)であり、細胞または培養条件により基質からの解離に必要なヒアルロン酸量が異なっているのかもしれない。促進と阻害は紙一重の状態にあると思われる。

ヒアルロン酸による細胞増殖の効果が確かなものかどうか、DNA合成活性と含有量を調べた。コントロールの培養から見ていくと、細胞数は7日まで増加するので、5日目でもDNA合成は盛んであった。DNAへの $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みはほぼ48時間周期で上下するが、これは培養液中に含まれる牛胎児血清による影響が現われている(図8A)。11日目の培養では細胞は安定期に達しているため、DNAへの $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みは一定に保たれている(図8B)。5日目の培養にヒアルロン酸を加えた場合 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みの低下が小さくなる。これはヒアルロン酸が細胞のDNA合成の停止に歯止めをかけているためであろう(図8A)。11日目の場合には $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みはヒアルロン酸処理24時間後に約2倍になった(図8B)。またDNA含量をBurton法(1956)で定量したところ、両培養条件においてヒアルロン酸処理によって約20%のDNA増加が測定された(データは示さない)。この効果がヒアルロン酸に特異的かどうかの問題になってくる。

### 3) ヒアルロン酸細胞増殖促進活性の特異性

ヒアルロン酸とよく似た構造を持つ他のGAGについても同様の効果があるかどうか、1mg/ml濃度で調べてみた(図9)。細胞は11日目の培養を用いた。コンドロイチン、ヘパラン硫酸は何ら影響なく、コンドロイチン硫酸、ヘパリンは細胞数の減少が見られた。これは細胞が培養皿から離れたためによる。デルマタン硫酸では効果は少ないが増殖の促進が見られた。しかしこの効果は最初の2日間だけで増加した細胞はすぐに培養皿から遊離した。はっきりした増殖促進の効果はヒアルロン酸だけであった。またこの効果は高分子ヒアルロン酸ほど大きい。ヒアルロン酸オリゴマーの添加も細胞増殖に何ら影響を与えなかった。また分子量を変えて調べたところ $5 \times 10^4$ 以下の分子量では、促進の効果が、1mg/ml濃度でも10%以下で有意なものとして判定できなかった。このことはヒアルロン酸の長さが要因になっていることを示唆する。

培養細胞への物質の添加で問題になることは、含まれる混入物が働いていないかどうかである。私は純度の高いヒアルロン酸を用いているが、さらにヒアルロン酸に混じりものがないことは次のような実験で示した。実験に用いているヒアルロン酸はニワトリとさかから精製された分子量 $9.5 \times 10^5$ の標品であるが、人のさい帯から精製された分子量 $1.0 \times 10^6$ のヒアルロン酸でも同じ結果が得られた(表6)。さらにブタの皮膚およびバクテリアより調製したヒアルロン酸でも同じ結果が得られた(データは示さない)。また低分子ヒアルロン酸に促進効果がないことを用いて、分子量 $9.5 \times 10^5$ のヒアルロン酸を辜丸ヒアルロニダーゼで消化して得られたものを添加したが、細胞促進の効果は見られなかった。もちろんその時用いた酵素を添加してもなんら影響はなかった。ヒアルロン酸標品の中にタンパク質分解酵素活性の存在しないことは、ミルクカゼイン分解(Schumacher & Schill, 1972)の有無によって調べた(データは示さない)。これらの結果はヒアルロン酸標品に含まれるタンパク質の活性によって増殖促進を示したのではなく、まさしくヒアルロン酸それ自体による活性であること示している。注目すべきことは高分子ヒアルロン酸のこの活性が10mg/mlの10糖ヒアルロン酸オリゴの添加によって50%まで阻害されたことである(表6)。すなわちヒアルロン酸の10糖が認識され、この効果が生じていると考えられる。次にこの効果をより確かなも

のにするために、細胞自体のヒアルロン酸合成活性の促進によって、同じ効果が起こることを期待した。

#### 4) ヒアルロン酸合成活性促進の細胞増殖への影響

Koyama et al.(1975)は1mM ジブチリルアデノシン3', 5'-サイクリックモノフオスフェイト (以後dbcAMPと略す) がラット線維芽細胞のヒアルロン酸合成活性を促進することを報告した。この試薬は細胞のヒアルロン酸合成活性の上昇と細胞増殖の関係を調べるには最適であった。5日目と11日目の培養に1mM dbcAMPが添加した時、両細胞層とも1日以内にヒアルロン酸含量の増加が見られた(図10A)。この時まだ培養液中のヒアルロン酸含量は増加していないが、このあと急激に上昇した(図10B)。一方細胞数は2日目には増加しはじめ、さらに2日間その現象は続いた(図10C)。この結果はdbcAMPによって引き起こされたヒアルロン酸合成活性の上昇と分泌は、外来ヒアルロン酸で観察されたように、細胞増殖を誘導した。いったん上昇して低下したヒアルロン酸合成は再度のdbcAMPの添加では、何の効果も起こらなかった。従って細胞増殖も観察されなかった(データは示さない)。この現象はdbcAMPの代わりに、ブチル基を持たない同種のアナログである8-ブromoアデノシンでも観察された。また1mM酪酸には細胞増殖の効果はなかった(データは示さない)。

以上の結果から細胞層ヒアルロン酸の増加が細胞増殖をもたらしていることは明かである。次にそのメカニズムに迫るためヒアルロン酸が結合する分子を細胞外マトリックスから捜すことにした。

#### 5) マウス線維芽細胞のヒアルロン酸結合分子

ヒアルロン酸の細胞外マトリックスへの取り込みが浸透でないことは次の実験で確かめた。FITCラベルヒアルロン酸と同時に10糖のヒアルロン酸オリゴ(3mg/ml)を添加すると蛍光の取り込みが阻害された(図11B)。ただし8糖のヒアルロン酸オリゴでは阻害効果は観察されなかった(図11C)。この結果は、ヒアルロン酸の取り込みはヒアルロン酸の少なくとも10糖を認識して行なわれていることを示している。また細胞外マトリックス中にヒアルロン酸結合活性を持つ分子が存在することを示す。前述したようにヒアルロン酸による増殖促進の効果が10糖

で阻害されたこととも一致する。その実体を明かにするために、培養7日目の細胞を2M尿素で抽出した。この時細胞死をもたらすような影響はなく、細胞内成分は抽出されていない。結合活性は $[^3\text{H}]$ ヒアルロン酸を用い、実験方法で示したようにニトロセルロース膜に残った放射活性で調べた。 $[^3\text{H}]$ ヒアルロン酸だけでは膜に結合しないが、尿素抽出物と反応させた場合には加えた $[^3\text{H}]$ ヒアルロン酸の約30%が膜に残った。この結合はコンドロイチンや8糖のヒアルロン酸オリゴによっては阻害されず、10糖のヒアルロン酸オリゴで阻害された(表7)。この特異性は外来ヒアルロン酸の細胞増殖促進とFITCラベルヒアルロン酸の細胞外マトリックスへの取り込みで得られた結果と同じものであった。すなわちこれら三つの現象には同一物質が関わっていると考えられる。またこの抽出物に、その分子が含まれていることを示している。ニワトリ胚線維芽細胞はヒアルロン酸と結合活性を持つコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(PG-M)を作っているという報告があり、その結合はコンドロイチンや8糖のヒアルロン酸オリゴではほとんど阻害されず、10糖のヒアルロン酸オリゴで阻害が起こると報告されている(Yamagata et al. 1986; Kimata et al. 1986)。そのため、ヒアルロン酸がマウス真皮線維芽細胞の細胞外マトリックスへの取り込まれるさいにも同種のプロテオグリカンが機能していることが考えられる。

このことを確かめるために、培養7日目の細胞を $[^35\text{S}]$ メチオニンで代謝ラベリングを行い、2M尿素抽出物を調べた。抽出物と放射ラベルしていない軟骨型プロテオグリカン会合体を混合し、会合条件でグリセロール濃度勾配をもちい帯領域沈降速度法を行なった。これはヒアルロン酸と結合する分子を大きな会合体として選択的に沈降させるよい方法である(Kimata et al. 1986)。用いた軟骨型プロテオグリカン会合体はまだプロテオグリカンモノマーで飽和しておらず、細胞外マトリックスに存在した遊離のPG-M様の分子が会合体に存在するヒアルロン酸糖鎖の空いた部分に結合するという原理を用いたものである。遠心管の低部に21.8%の放射活性が回収されたが、この実体を2-メルカプトエタノールで還元しSDSアクリルアミドゲル電気泳動で調べた。ゲルのフルオログラフィーで分子量600000以上のぼけたバンドが観察された(図12、lane a)。コンドロイチナーゼAC-IIで電気泳動前に処理したところ、分子量600000のバンドは消えて新たに分子量550000、500000、350000のバンドが現われた(lane b)。高分子量の2つのバ



ンドはPG-M由来のコアタンパク質と同定された。PG-Mの精製のときタンパク質分解酵素阻害剤を入れないときやPG-Mをトリプシンで限定分解したときにコンドロイチナーゼ消化後分子量350000の分解したコアタンパク質を生じることがわかっている。コントロールとしては、尿素抽出物だけを遠心した時の沈降物を用いた。この時の放射活性の回収率は11.4%であった。これを調べたのがlane Cで分子量550000、500000のコアタンパク質が少量検出された。

細胞増殖の効果は頭打ちになるのは、この分子がヒアルロン酸で飽和してしまうためだと考えた。それは前述した実験でヒアルロン酸の外からの添加やdbcAMPによるヒアルロン酸合成活性の促進の処理で、細胞外マトリックスがヒアルロン酸豊富になっているかどうかで調べた。培養5日目の細胞に1mg/mlのヒアルロン酸または1mMdbcAMPを添加し48時間培養した。そこにFITCラベルヒアルロン酸を加え24時間引き続いて培養を行なった(図1 3B、C)。コントロールには培養7日目の細胞にFITCラベルヒアルロン酸を加え24時間処理したものを用いた(図1 3A)。外来ヒアルロン酸またはdbcAMP処理されたものは、ほとんどFITCラベルヒアルロン酸を細胞外マトリックスに取り込まなかった。このことは細胞外マトリックスに存在するヒアルロン酸のレセプターが前処理によって飽和状態になっていることを示す。

しかしそれと矛盾するのが次の結果である。培養11日目から1mg/ml濃度のヒアルロン酸で4日間培養したものをヒアルロン酸を含まない新しい培養液で2日間培養する。そしてこの培養細胞を再度1mg/mlのヒアルロン酸で処理しても細胞数の増加は観察されなかった。またdbcAMPの効果もまた一度起こってしまえば、さらに添加を続けても細胞の浮き上がりだけであり、また2~3日の間dbcAMPを除去してもう一度添加しても同じことは起こらない。これは、PG-M様の分子の寿命が長いことが考えられるが、取り込まれたヒアルロン酸が細胞外マトリックスの構造に不可逆な変化を起こしているとも考えられる。それで細胞外マトリックスの変化に注目した。

#### 6) 外来ヒアルロン酸やヒアルロン酸合成活性促進によって引き起こされたマトリックスの変化

ヒアルロン酸添加やdbcAMPのヒアルロン酸合成活性促進による細胞外マトリッ

クスの変化を、その成分であるヘパラン硫酸プロテオグリカン、I型コラーゲンそしてフィブロネクチンの抗体を用いて蛍光抗体法で調べてみた。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの抗体はEngelbreth-Holm-Swarm肉腫に対するものであるが、マウス真皮線維芽細胞が作るヘパラン硫酸プロテオグリカンのヘパリチナーゼ消化で得られる分子量450000のコアタンパク質と反応することはウエスタンブロッティングで確かめてある(Kato et al. 1987; Hassell et al. 1985)。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの蛍光はヒアルロン酸添加12時間後には細胞周辺で減少しはじめている(図14C)。この時まだDNA合成は始まっていない(図8)。培養を続けるとさらに蛍光は減少した(図14D)。DNA合成はヒアルロン酸添加後18時間から24時間のうちに始まる。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの蛍光の減少はdbcAMP処理によっても見られる(図14E、F)。ただしこの場合ヒアルロン酸添加に比べると減少はゆっくりしている。ほぼ1日の遅れがある。この減少は睾丸ヒアルロニダーゼ処理やホルムアルデヒドの固定によっても変化なく観察され、ヒアルロン酸増加による抗原のマスキングではなかった。

I型コラーゲンやフィブロネクチンの蛍光は繊維状の網目になるが、ヒアルロン酸添加またはdbcAMP処理後DNA合成が始まるまでほとんど変化しない。しかし3日目にはフィブロネクチンの蛍光は繊維が細くなり、I型コラーゲンは繊維が太くなるのが観察された。フィブロネクチンやI型コラーゲンの変化は細胞増殖の間に起こるマトリックス分子の再構成の結果と考えている。ただコラーゲンとフィブロネクチンの結合はヘパリンやヘパラン硫酸がフィブロネクチンに結合することで強いものになるが、ヒアルロン酸はこの結合を阻害することが報告されている(Jilek & Hormann, 1979; Rosso et al. 1982)。しかし細胞外マトリックスの構築等にどう反映されるかはわからない。

ヘパラン硫酸プロテオグリカンの合成は安定期になるほど多い(Cohn et al. 1976)ことを考えれば、細胞外マトリックスの成分は若返りしていることになる。したがってマトリックスの構築も増殖期のものに変化していると考えられる。細胞の足場と考えられるフィブロネクチンやコラーゲンにそれほどの変化がないことから、この場合ヒアルロン酸やヘパラン硫酸プロテオグリカンが細胞に増殖期や安定期を教えているのかもしれない。

抗体による方法は添加または処理から4日間の変化をマトリックス成分の挙動で

見ているが、電子顕微鏡で形態的な変化を調べてみた。コントロールの培養では縦割像を走査型電子顕微鏡で見ると細胞皿に平たく伸びた一層または二層の細胞層が見られる。細胞層の厚みは測定の結果 $5.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$ になった(図15A)。それに対してヒアルロン酸処理した場合には細胞層は三層または四層の細胞の重なりを作りその厚みは $9.5 \pm 3.0 \mu\text{m}$ であった(図15B)。dbcAMP処理では細胞層の厚みは8から40 $\mu\text{m}$ の幅を持ったものになった。またヒアルロン酸やdbcAMP処理したものでは細胞外マトリックスに空間がよく見られた。30%増加した細胞がどこに納まっているかが疑問であったが、このことで解決した。

透過型電子顕微鏡を用いてさらに調べた。コントロールにおいては細胞が基質によく広がった形態を示し、細胞の重なりはせいぜい二層であった。また細胞外マトリックスは薄く繊維状の物質もコンパクトに集まっているのが観察された(図16A)。それに対してヒアルロン酸やdbcAMP処理したものは細胞外マトリックスの容積が増加し、細胞が何重にも重なっているのが観察された(図16B、C)。しかしコントロールに比べて容積の増加した分マトリックス成分の増加は見られず、走査型電子顕微鏡で観察された空間と思われる何も見えない部分が多くなっている。おそらくここには多量のヒアルロン酸が蓄積していると思われる。

ただし、細胞外マトリックスが増殖期のものになっているのに細胞増殖がある程度でストップしてしまうことについては今のところわからない。増殖期のマトリックス構造になりながらも、やはり偽物で不十分であったのか。その答えを明確にするには、ヒアルロン酸を抑制してみることが必要である。というのはヒアルロニダーゼ処理で細胞増殖が阻止された(Morriss et al. 1986)という報告がある。培養細胞の安定期にはヒアルロン酸合成活性の低下とともに細胞層に含まれるヒアルロン酸量も少なくなる。そのことから、ヒアルロニダーゼ活性の上昇も細胞増殖の停止に関与すると考えてもよいのかもしれない。ただし組織での活性は測定されていても酵素としては単離されておらず、その実体はまだ謎である(Orkin & Toole, 1980)。それに生体内で本当にヒアルロニダーゼによるヒアルロン酸の分解が起こっていると考えてよいのか。その疑問は解決されていない。ヒアルロン酸合成活性を低下させることができれば、増殖停止のメカニズムの答えがでてくるのかもしれない。それにはヒアルロン酸合成の機構を知ることである。

## 2. ヒアルロン酸生合成

### 1) ヒアルロン酸合成におけるタンパク質の関与

生合成機構について、いろいろな仮説が出されているがもう一步確実なものではない。マウス皮膚の線維芽細胞は増殖期に多量のヒアルロン酸を合成するが、dbcAMP添加によりさらにその合成活性が細胞当たり約4倍に促進された。ところがその増加はシクロヘキシミドの添加で完全に抑制された(図17)。この結果は、dbcAMPによって促進されたヒアルロン酸合成は新たなタンパク質合成が関与していることを示している。そこで、ヒアルロン酸合成の開始因子としてのタンパク質が存在し、このタンパク質をコアとしてヒアルロン酸は側鎖の形で伸長するという作業仮説をたてた。先ず、dbcAMPの添加で新たなタンパク質合成そして新たなヒアルロン酸合成を促し、そのヒアルロン酸にタンパク質が結合していると考えその分子の単離を試みた。

### 2) マウス真皮線維芽細胞からのヒアルロン酸結合タンパク質の単離

培養1日目の100mm培養皿10枚に1mM dbcAMPを添加し4日間培養された。 $[^{14}\text{C}]$ グルコサミンと $[^3\text{H}]$ ロイシンを含む新しい培養液に交換し24時間培養した。放射ラベルされた細胞層は集められ血清を除去するためHanks' BSSで洗浄後、グアニジン塩酸抽出液で4℃、24時間で抽出を行なった。ヒアルロン酸の回収率は95%以上であり、ヒアルロン酸として2.0mg取れた。抽出物は非共有結合のヒアルロン酸-タンパク質複合体は解離するグアニジン塩酸溶液中でセシウム密度勾配遠心(初期密度、1.40 g/ml)を行なった。 $^{14}\text{C}$ 放射活性の約68%が密度1.40 g/ml以上のヒアルロン酸画分に回収された(図18)。 $^3\text{H}$ 放射活性の0.6%がそこに含まれていた。ヒアルロン酸画分はそのまま二回目のセシウム密度勾配遠心(初期密度、1.45 g/ml)にかけられた。密度1.40 g/ml以上の $^{14}\text{C}$ 放射活性のピークを回収した(図18)。ヒアルロン酸の回収率は出発の45%であった。この画分は僅かではあるが少量のタンパク質を含んでいた。また吸光度の測定からかなりの量の核酸を含んでいることがわかった。

核酸を除去するために回収した試料をリボヌクレアーゼ A、リボヌクレアーゼ T<sub>2</sub>、デオキシリボヌクレアーゼ Iの混合液で処理した。消化物はグアニジン塩酸溶液中でセファロースCL-2Bの分子ふるいカラムクロマトグラフィーを行なった

(図19)。ゲルに排除された一番最初のピークを集めた。他のピークはほとんどが糖タンパク質であった。この試料は25ugのヒアルロン酸当り8ugのタンパク質を含んでいた。

試料はウロン酸1ug当り50dpmの<sup>3</sup>H放射活性を持っていたので、SDS電気泳動で含まれるタンパク質を調べた(図20)。試料は電気泳動前にストレプトミセスのヒアルロニダーゼで処理された。その結果、分子量85000と83000の位置にクマシーブリリアントブルーで染まる2本のバンドが現われた(総称として85kDaタンパク質と名付ける、それぞれはx, yとして区別する)(lane a)。ヒアルロン酸は高分子のためそのままではゲルの中には入れない、従ってそのヒアルロン酸に結合しているタンパク質もまたゲルには入れないことになる。ここでヒアルロニダーゼ消化しない場合にはバンドは検出されなかつた(lane b)。この結果は、SDSでは85kDaタンパク質とヒアルロン酸の結合は解離しないことを示している。またグアニジン塩酸や界面活性剤の存在下でもこの会合体は分離しないことから、両者の間の結合は共有結合と考えてもおかしくない。しかしこの推測は以後のいくつかの実験によってその可能性は否定される。

ゲルの<sup>3</sup>H-タンパク質の分布を調べたが、ヒアルロニダーゼ処理の有無に関わらず放射活性はゲルの原点近くを動かさなかつた。85kDaタンパク質のバンドには<sup>3</sup>Hの放射能は検出されなかつた。また同様の実験を[<sup>35</sup>S]メチオニン(60 uCi/ml)や[<sup>14</sup>C]アミノ酸混合液で行なつたが85kDaタンパク質はラベルされなかつた。この結果からこのクマシー染色で検出できるほど存在するタンパク質は培養に用いている牛胎児血清に由来すると推測された。ヒアルロニダーゼ消化後もゲルの原点に残っていた<sup>3</sup>Hの放射能は細胞が合成した大型プロテオグリカンであった。このことはまた後で詳しく述べる。

微量タンパク質がヒアルロン酸に結合している可能性もあり、それを確かめるために、試料のヒアルロン酸量にして50ugをクロラミンT法でヨードラベルした。ラベルした試料は(1×10<sup>7</sup> dpm)、陰イオンクロマトグラフィー(DEAE Sephacel)に通した(図21)。二つのピークが現れ、最初のピークがヒアルロン酸に相当し、二番目のピークはコンドロイチン(デルマタン)硫酸プロテオグリカンの溶出位置に当たることはスタンダードからわかつた。SDSアクリルアミドゲル電気泳動後のオートラジオグラフィーで分析した(図22)。最初のピークの放射活性はヒ

アルロニダーゼ消化前はすべて原点に有り、消化後はそのすべてが85kDaタンパク質 x, y の2本のバンドの上に載った。それに対して二番目のピークの放射活性はヒアルロニダーゼ消化の有無に関わらず原点近くに留まったままであった(データは示さない)。しかしこのピークをコンドロイチナーゼ ABCで消化すると、原点にあった放射活性は分子量500000と45000の二つのバンドに分かれた(lane d)。分子量500000が主であった。コアの大きさからみて少なくとも二つのコンドロイチン(デルマタン)硫酸プロテオグリカンであった。最初のピークはヒアルロン酸50ug当り85kDaタンパク質を2.0ug含んでいた。ヒアルロン酸の平均分子量を2000000と粘性から算出されることから、モル数で考えて85kDaタンパク質とヒアルロン酸は一対一で結合していることになる。また他のタンパク質はヒアルロン酸と結合していない。

### 3) 牛胎児血清からの85kDaタンパク質の単離

85kDaタンパク質が牛胎児血清由来であるかどうかは、細胞なしで培地にヒアルロン酸を添加し、ヒアルロン酸画分を精製することで調べた。同定するための道具として細胞層から精製した85kDaタンパク質に対する抗体をラビットで得た。調製した抗体が85kDaタンパク質を認識することはウエスタンブロッティングで調べた(図23、lane a, b)。ヒアルロン酸の精製は細胞層のヒアルロン酸の精製と同じように行なった。2回のCsCl密度勾配遠心の結果、加えたヒアルロン酸の67%が回収された、その中には約5%(w/w)のタンパク質を含んでいることがLowry et al. (1951)の方法でわかった。得られた試料はウエスタンブロッティングで調べた(図23)。電気泳動前にヒアルロニダーゼ消化したものは分子量マーカーから算定して85kと83kの位置に2本のバンドが得られた(lane d)。さらに75Kの位置に新しい薄いバンドが得られた。このバンドをzとした。これらのバンドは還元と非還元で分子量の移動はなかった。以上のことから85kDaタンパク質 x, y は血清由来であることが確かめられた。

他の動物の血清にも含まれるかどうか、動物種をかえて分布を調べてみた。方法は前述したように行なった。検出はウエスタンブロッティングで行なった(図24)。ウマ、ヤギは抗体が交差しほぼ同じ分子量のものが検出された。人にも存在するが反応は弱かった。ニワトリ、ウサギには同じ分子量の成分が存在するが

まったく反応しなかった。マウス、ラット血清中にはこの分子量に相当する成分は見いだせなかった。ところが血清とヒアルロン酸の反応温度を37℃から4℃に変更したところ、分子量85000のタンパク質が結合した（データは示さない）。抗体との反応は弱かった。これらの結果から、その免疫学的性質およびヒアルロン酸結合活性は異なっているが、調べた限りの動物の血清中には85kDaタンパク質様のものが存在した。ある限られた動物特有の反応に関与するものではないことがわかった。

ところで別の研究者の報告で血清イムノグロブリンのIgMと結合すると序論の表2で示したが、IgMのH鎖の分子量が75000から80000に相当するため同一である可能性があったが、抗牛IgM抗体と反応しないことから否定できた。

#### 4) 培養液のヒアルロン酸結合タンパク質の分析

細胞層については調べたが、マウス真皮線維芽細胞は培養液にも多量のヒアルロン酸を分泌している。このヒアルロン酸にも85kDaタンパク質が結合しているのか同様の方法で調べた。その結果、85kDaタンパク質x, yの2本バンドの他に分子量7000~75000の位置にバンドがみられた。さらに詳しく分析するために二次元の電気泳動をおこなった（図25）。細胞層の方は、x, yに分かれ、等電点はそれぞれ6.2と6.0であった。培養液の方は、x, yの他に2本のバンドが見られた。薄いバンドは前の項で血清に見られたzに相当すると思われる。さらに分子量70000の位置に濃いバンド（w）が見られた。細胞によって分解を受けた結果であるのか、それともヒアルロン酸の分泌機構と関係があるのかわからない。

#### 5) 85kDaタンパク質の結合特異性

85kDaタンパク質がヒアルロン酸とのみ結合するかどうかは、その機能を考える上で重要なことである。そこで、他のGAGが85kDaタンパク質と結合するかどうか調べた。ヒアルロン酸の精製手順は同一であるが、溶液はタンパク質変性剤のグアニジン塩酸と界面活性剤は使わず、会合条件下で行なった。これはヒアルロン酸との特異性をより強調するためである。10%(v/v)牛胎児血清に1%(w/v)のコンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デキストラン硫酸そしてDNAを加えて反応後の培養液に直接CsClを加え遠心した。いずれも結合はみられなかった。

FITCラベルヒアルロン酸（グルクロン酸の7%にカルボジアミド結合でフルオロセインを付けてある）や還元ヒアルロン酸（グルクロン酸の約60%がグルコースになっている）ではそれぞれ60%と30%まで結合活性が減少した。このことはヒアルロン酸の構造だけを認識していることを示し、さらにカルボキシル残基が最大の結合活性を示すのに必要であることを示している。またヒアルロン酸の非還元末端を $\text{NaBH}_4$ で還元した場合には結合活性は10%しか減少しなかった。（データは示さない）。すなわち末端は結合には関与していないことを示唆する。

85kDaタンパク質が何個の糖を認識して結合しているか決めるため、ヒアルロン酸を辜丸ヒアルロニダーゼで消化して作った、6糖、8糖そして10糖のヒアルロン酸オリゴで高分子ヒアルロン酸と85kDaタンパク質の結合を阻害する実験をした（図26）。実験条件は上記と同じように設定した。重量にして高分子ヒアルロン酸の10倍量の10糖ヒアルロン酸オリゴで完全に阻害した。それに対して6糖、8糖ヒアルロン酸オリゴではほとんど阻害しなかった。85kDaタンパク質はヒアルロン酸と結合するのに少なくとも10糖の認識が必要であることがわかる。ヒアルロニダーゼによるヒアルロン酸の分解が6糖または8糖であることから、このことは図20のlane bで観察されるようにヒアルロニダーゼ消化で85kDaタンパク質が検出されることの正当性を示す。

ヒアルロン酸・85kDaタンパク質複合体はタンパク質分解酵素やヒアルロニダーゼ消化しない限り互いを分けることが無理と思われるほど強い結合で結び付いている。85kDaタンパク質がヒアルロン酸と修飾を受けて共有結合しているのかどうか調べた。その方法は、ヒアルロン酸・85kDaタンパク質複合体をヒアルロニダーゼで分解して得られた85kDaタンパク質がもう一度ヒアルロン酸に結合するかどうかである。修飾を受けているなら結合はしないであろう。図27の結果はヒアルロニダーゼ消化で85kDaタンパク質が増加し、85kDaタンパク質がヒアルロン酸に再結合することを示した。すなわち結合のために修飾はされていないことを示す。pHによる解離の条件を調べるうちに、弱いアルカリ処理で解離することがわかった（図28）。0.02M水酸化ナトリウム溶液で室温、1時間処理するだけで85kDaタンパク質はヒアルロン酸から離れた。その結合認識機構については次の事象が一つの示唆を与える。ヒアルロン酸溶液を中性からpH 12.5のアルカリ性にするとう分子量に変化はないが、粘性が低下し、光散乱のデータから回転半径が減少すると



いう報告がある(Mathews & Decker, 1977)。これはコンドロイチンや他のGAGには見られない性質である。ヒアルロン酸はグルコサミンのC-4の水酸基とグルクロン酸の骨格の酸素で水素結合を造って(図1Bを参照)、ラセン構造を安定化させている。この構造がコンドロイチン等にはないことから、pHの上昇がこの結合に影響を与えラセン構造に変化を与えていると考えられる。このことから、85kDaタンパク質はヒアルロン酸のラセン構造を認識している可能性が示唆される。アルカリによる物性の変化は6M尿素の存在下でも影響を受けない。すなわちラセン構造に変化を与えない。85kDaタンパク質が尿素で解離しないのはラセン構造が保持されているためと考えられ、グアニジン塩酸や界面活性剤についてもラセン構造に変化を与えていないために解離させることができないのであろう。

#### 6) 線維芽細胞での85kDaタンパク質の分布と結合様式

85kDaタンパク質の細胞での存在様式を調べるために、培養4日目の細胞を抗85kDaタンパク質抗体で染色した(図29)。蛍光は細胞間および細胞周辺に見られた。この蛍光はヒアルロニダーゼ消化によっても消えなかった。このことは、85kDaタンパク質はヒアルロン酸に結合して細胞に存在するのではなく、細胞に結合していることを示した。すなわちヒアルロン酸は85kDaタンパク質を介して細胞表面に存在することになる。さらに培養液中のヒアルロン酸・85kDaタンパク質複合体は、85kDaタンパク質だけよりも細胞表面への結合が弱い。これは、ヨードラベルした85kDaタンパク質などを細胞と反応させた実験で示された(データは示さない)。以上のことは、85kDaタンパク質が細胞に結合してからヒアルロン酸と結合するという順番を示唆している。

85kDaタンパク質は疎水的な性質を持つため、Octyl-Sepharose 4Bに低塩濃度でよく結合する(データは示さない)。血清をOctyl-Sepharose 4Bに通した後、PBSで十分に洗浄する。この段階では85kDaタンパク質はゲルに結合している。溶出は0.5%(w/v)Nonidet P-40を含むPBSで行なった。抗体で調べた結果この溶出物に85kDaタンパク質が含まれていた。コントロールとしてはSepharose 4Bに血清を流したが、85kDaタンパク質は結合しなかった。この性質は85kDaタンパク質が細胞膜に結合するには理想的である。

ところで先に見つけ出したPG-M様のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(便

宜上PG-Mとする)との役割分担はあるのか。FITCラベルヒアルロン酸の実験では、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンラベルで調べているので、血清成分の85kDaタンパク質の存在は見逃している可能性がある。FITCラベルヒアルロン酸の取り込みで、蛍光が一部の細胞だけにみられたことから考えてみる。PG-Mまたは85kDaタンパク質が一部の細胞だけに存在するかどうかである。PG-Mが細胞表面にあるかどうかは今のところわかっていない。またPG-Mを一部の細胞だけが作っているかどうかは現在のところ証拠がなくわからない。85kDaタンパク質の分布が均一でないとする。事実、マウス真皮線維芽細胞を抗85kDaタンパク質抗体で染めた図29の結果から、細胞層は均一には染まっていない。85kDaタンパク質は血清由来であり、偶発的に細胞に取り込まれるならある程度均一に染まってもよいと思われる。おそらく細胞側に取り込む機構があり、細胞によってその違いがあるのかもしれない。念のため85kDaタンパク質とPG-Mとの異同をニワトリの系ではあるが調べた。ニワトリ線維芽細胞のPG-Mに対する抗体をニワトリ血清にある85kDaタンパク質と反応させたが交差しなかった。そのことから少なくともニワトリについては85kDaタンパク質はPG-Mとは異種である。確実な証拠はないがヒアルロン酸の細胞外マトリックスに対するレセプターはPG-Mであり、細胞への結合は85kDaタンパク質を介していると考えられる。

#### 7) 85kDaタンパク質はヒアルロン酸合成に必要である

85kDaタンパク質の結合の性質および分布を調べてきたが、85kDaタンパク質がヒアルロン酸合成に関与しているかどうかを調べた。まず培養に用いている血清から85kDaタンパク質を除去した時、すなわち85kDaタンパク質が細胞に供給されないとき、マウス真皮線維芽細胞のヒアルロン酸合成がどう変化するか調べた。血清成分から85kDaタンパク質を除去するのに、抗85kDaタンパク質抗体を結合させたアフィニティーカラムを用いた。85kDaタンパク質が血清から取れているかどうかは、アフィニティーカラムに結合したものを溶出しウエスタンブロッティングにより確かめた。確かに85kDaタンパク質がカラムに結合しており、一回のアフィニティーカラムで血清から85kDaタンパク質が完全に除去されていることは、一度カラムに通した血清をもう一度アフィニティーカラムにかけ、カラムに結合した画分に85kDaタンパク質が残らないことからわかった。コントロールとして用いた

nonimmunized IgGのアフィニティーカラムには85kDaタンパク質はまったく結合しなかった(図30)。ところが、85kDaタンパク質を除去した血清ではマウス真皮線維芽細胞は接着しなかった(図31b)。この時ビトロネクチンをコートした培養皿を用いても初期接着だけで伸展しなかった。したがってDNA合成もヒアルロン酸合成も検出できなかった。このように正常細胞ではヒアルロン酸合成に対する効果が見れなかった。ところが、接着しなくても増殖できるマウス乳がん細胞FM3Aの株でヒアルロン酸合成活性の高いP15A細胞株を用いることで問題は解決した(この株は肺への高転移性を示すが、その説明は次の項に行く)。P15Aは浮遊しても増殖できるし、浮遊しててもヒアルロン酸合成活性があまり低下しないので、この場合の実験材料としては最高であった。ただしP15Aの場合も基質への接着は紡錘形になり接着の低下が見られた(図31d)。85kDaタンパク質欠損下ではヒアルロン酸合成は約1/5にまで低下した。免疫していない抗体のアフィニティーカラムに通した血清を用いた場合には何等変化はなかった。他のグルコサミノグリカンの合成にも大きな変化は見いだせず、ヒアルロン酸合成活性の変化だけであった。またアフィニティーカラムに結合したものを溶出させ、それを85kDaタンパク質欠損の血清に添加した所、ヒアルロン酸合成が完全ではないが回復した(図32)。細胞増殖に関しては、低密度で細胞を始めた時以外では影響はなく、ただ培養皿への細胞の接着が悪く細胞が浮きやすくなった(低密度の場合、初期の接着の悪さで結果細胞増殖が抑制されたと考えられる)。このように85kDaタンパク質はGAGの中ではヒアルロン酸合成だけに影響を与え、合成を制御する重要な因子であることを示唆した。85kDaタンパク質とヒアルロン酸被覆形成の関係については、次の章で記述する。

ここで85kDaタンパク質のヒアルロン酸合成への関わりについて考えてみたい。ヒアルロン酸合成の調節については合成過程の中で、①プライマーの増減による制御、②UDP-糖プールの増減による制御、③ヒアルロン酸合成酵素の活性化による制御、④細胞表面での滞留による阻害的な制御、以上4つの時点での制御が考えられる。それでは①~④のどれに関与するのか。85kDaタンパク質がヒアルロン酸と結合することを考えれば、②の機構はないと思われる。ヒアルロン酸は細胞外に分泌される前に数時間細胞膜に滞留するという現象がある(Takagaki & Toole, 1979)。またヒアルロニダーゼ処理でヒアルロン酸合成活性が上昇するこ

とも報告されている(Philipson et al. 1985)。それで過剰のヒアルロン酸が分泌されるまで抑制する機構があると考えられた。しかし、このことは最近の報告の細胞膜でのヒアルロン酸合成を考えれば、合成速度による制御と③と同じと考えるべきであろう。③の可能性については85kDaタンパク質欠損下でもヒアルロン酸合成は零にならないことから活性促進の機能はあっても合成活性発現の能力はないと考えられる。さらに、85kDaタンパク質はヒアルロン酸の非還元末端を還元しても変わりなく結合することからプロテオグロカンのコアタンパク質のように働いていることもまた否定された。85kDaタンパク質の機能はおそらく合成途中のヒアルロン酸を安定に保持するホールディングタンパク質かアンカリングタンパク質のような役目であると推測している。

### 3. 転移性がん細胞の性質からみたヒアルロン酸の役割と生合成

#### 1) FM3A高転移性株はヒアルロン酸被覆の合成活性が高い

埼玉がんセンターの本間博士らは、マウス乳がん細胞FM3Aのほとんど転移能のない親株P-0より皮下移植から肺への転移を10回繰り返してP-10株を、さらに尾静脈注射して肺への転移を5回繰り返した後培養下で培養皿に接着する性質を持つP-15A株を選んだ(Honma et al. 1981)。尾静脈注射で各株の転移能を調べるとP-0はほとんど転移せず、P-15Aは肺への極めて高い転移能を示し、それに比べるとP-10は劣る。調べた限り、転移に相関したのはヒアルロン酸合成能であった。転移性のあるP-15AとP-10は親株P-0に比して50~60倍の上昇を示し、合成されるムコ多糖の大半(約70%)がヒアルロン酸であった(Kimata et al. 1983)。他のがん細胞についても高転移性株ほどヒアルロン酸合成活性が高いといういくつかの報告がある(Turley & Tretick, 1985; Kupchella & Hashemi, 1982)。ただし、ヒアルロン酸合成活性ではP-10, P-15A両細胞とも高く、合成活性だけではその転移能の差を説明できない。

1gのヒアルロン酸は水を含んで1000mlの容積をもつという他に見られない物理的性質を持つことは前述した。このような分子が細胞表層を作る細胞外マトリックス(ヒアルロン酸被覆)として存在するのか、または分泌して細胞外マトリックスとして合成されるかは、細胞の能力および機能に大きな差をもたらすと序論で予想した。そこでP-10, P-15Aの転移の違いもヒアルロン酸の局在が異なるので

はないかと考えて調べてみた。生化学的分析の結果から(図33)、高転移性であり培養皿に接着して増殖するP-15Aは細胞周囲にヒアルロン酸を非常に多く持っている。一方、ヒアルロン酸合成能がP-15Aと同じほど高いのに転移性がP-15Aより低く、また培養では親株P-0と同じく浮遊して増殖するP-10は、細胞周囲のヒアルロン酸は少なく、合成するヒアルロン酸のほとんどが培地中に遊離されるヒアルロン酸であった。P-10, P-15Aを移植したがん組織およびその転移巣において、アルシンプルーでの染色ではあるが、P-10は細胞間隙だけが染まるのに対して、P-15Aは細胞表層が染まり培養系での結果を裏付けるものであった(Kimata et al. 1987a)。

## 2) ヒアルロン酸被覆と血管内皮接着性との関係

ヒアルロン酸被覆をP-15Aからなくした時、P-15Aの転移能はどうか。先ず、一つの方法としてP-15Aをヒアルロニダーゼ処理することにより一時的に細胞表面からヒアルロン酸を消すことができる。そして転移のステップの一つである血管内皮細胞への接着を調べた(図34)。有意に初期接着の低下が観察された。また転移能も低下した(表8)。対照として、ヒアルロン酸合成活性の低い(特にヒアルロン酸被覆の少ない)マウスB16F10メラノーマ(肺への高転移株)を同じようにヒアルロニダーゼで処理して尾静脈注射を行なった。この細胞では、処理の有無に関わらずまったく影響がなかった。P15Aではヒアルロン酸被覆が転移に有利に働いていることがわかった。転移の他のステップでのヒアルロン酸の有用性については調べていない。

がん細胞の高転移性の獲得とヒアルロン酸合成の上昇については、B16メラノーマ(Turley & Tretiak, 1985)やヘパトーマ(Kupchella & Hashemi, 1982)でも報告されている。その一方でヒアルロン酸合成が変わらないという報告もある(Streck et al. 1987; Redini et al. 1986)。ヒアルロン酸被覆という観点で調べ直す必要があるだろう。

図34の結果からヒアルロン酸被覆が血管内皮細胞への接着に有利に働いているので、血管内皮細胞表面からヒアルロン酸と結合する分子の検索を行なった。その結果、ニワトリ胚未分化胚芽間充織細胞から見いだしていた大型のプロテオグリカン(PG-M)(Kimata et al. 1986)と類似の分子を見だし、確かにP-15Aの内

皮細胞への接着にPG-Mが関与していることも示した（木全 他、1987a；木全 他、1987b）。85kDaタンパク質の分析はまだ行なっていないが、この分子も同様に働いている可能性は残されている。

### 3) 血清成分85kDaタンパク質は高転移能細胞株ヒアルロン酸合成に必要である

ヒアルロニダーゼによる処理は他の分解酵素の混入や細胞に対するダメージが考えられ、ヒアルロン酸の合成またはヒアルロン酸被覆の形成反応を抑制してしまうような根本的な処置がぜひとも必要になる。そこで前の項で得た85kDaタンパク質欠損の血清で培養を行い、ヒアルロン酸合成を低下させ、ヒアルロン酸被覆の形成を抑制する方法を取ることにした。その前にFM3Aにおいてヒアルロン酸被覆と85kDaタンパク質の量に相関があるかどうか調べた。85kDaタンパク質は、ヒアルロン酸被覆の厚みに比例して、P-10、P-15Aとその量が多くなった。しかし合成活性の低い、そしてヒアルロン酸被覆の少ないP-0にはほとんど検出されなかった（図35）。さらに抗85kDaタンパク質抗による蛍光抗体染色で各細胞株の85kDaタンパク質の状態を調べた（図36）。85kDaタンパク質は細胞表面に局在し、ヒアルロン酸被覆の量に比例してP15Aで一番蛍光が強かった。そこでアフィニティークラムに通した血清を用いP-0、P-10、P-15A細胞を培養したところ、ヒアルロン酸合成はP-15A、P-10において約1/5にまで低下した。P-0については元来ほとんど合成していないために判定できなかったが増加はしなかった（図37）。85kDaタンパク質欠損で培養した場合には、P15Aのヒアルロン酸被覆が減少していた。このことはヒアルロン酸被覆が合成途中のヒアルロン酸で形成、維持されていることを示すのかもしれない。

次にこの85kDaタンパク質欠損の血清で培養したP-15Aについてマウス尾静脈の注射を行なった。転移しないケースこそなかったが、転移巣の数は有意に減少していた（表9）。抑制が不十分なのはヒアルロン酸合成を完全に抑制できなかったことによるのか、マウス血清中にも85kDaタンパク質が存在するためにヒアルロン酸合成が回復したことによるのか、またただ処理したマウスの数が少ないことから誤差の可能性もあり、さらに調べる必要があると思われる。

### Ⅲ 今後の展望 ——85kDaタンパク質の役割を巡って

85kDaタンパク質は2つの機能をもつことが示されたと思う。一つはヒアルロン酸を細胞表面に結合させる役目であり。もう一つは生合成への関与である。

ヒアルロン酸を細胞表面に結合させるものとしては、分子量85000をもつヒアルロン酸レセプターが、SV-3T3から見いだされている。このヒアルロン酸レセプターがヒアルロン酸に結合するのに6糖を認識しているのに対して、一方85kDaタンパク質は10糖を認識して結合している。またヒアルロン酸レセプターが一つのヒアルロン酸にいくつも結合するのに対して85kDaタンパク質は1：1で結合していると考えられる。ヒアルロン酸レセプターとヒアルロン酸の解離定数はnMオーダーであるが、85kDaタンパク質はSDS中でもヒアルロン酸から解離しないこと、さらに85kDaタンパク質は細胞から界面活性剤(TX-100)処理で抽出されるが、ヒアルロン酸レセプターはその大部分が細胞骨格に結合したままで抽出できないという違いがある。85kDaタンパク質と同一のものかどうか、断定できないが結合力を見る限り同一とは思えない。85kDaタンパク質の作用は、推測ではあるが、分泌されたヒアルロン酸を細胞表面に結合させるのではなく、次に記述するようにヒアルロン酸生合成の過程の中にあると思われる。そして細胞のヒアルロン酸被覆は生合成途中のヒアルロン酸によって作られていると考えている。

推測されるヒアルロン酸合成への関与を、図38にモデル化して示した。ヒアルロン酸合成はcAMP依存性キナーゼのカスケードにより左右され、またEGFのチロシンキナーゼにもかかわっていると本論で記述したが、そのことも考慮にいった。ただし説明の前に、このモデルは今後の実験を行うために組んだ仮説であることを知っておいてもらいたい。

まず血清に含まれる85kDaタンパク質（牛肝臓から作製したcDNAライブラリーをin vitroトランスレーションさせたところ抗85kDa抗体と反応する分子量75000のタンパク質が見いだせた。このことから肝臓で85kDaタンパク質は作られている可能性がある。他の組織・器官については調べていない。）の、レセプターとして働く膜タンパク質（R）を仮定した。このRタンパク質の存在する可能性は次のことから考えられる。定性的ではあるが、85kDaタンパク質は細胞が存在した場合、より効率的にヒアルロン酸に結合できる。またdbcAMP処理により85kDaタンパク質

のヒアルロン酸への結合量は約3倍増加している。dbcAMP処理によってヒアルロン酸糖鎖長に変化がみられないこと、それにヒアルロン酸合成に関係するタンパク質が合成されている(図17)ことから、dbcAMPで処理された細胞に、85kDaタンパク質とヒアルロン酸の両方の結合に関与し、さらにヒアルロン酸合成にかかわる第三の因子が存在するのは確かである。このRタンパク質が85kDaタンパク質の細胞への取り込みを促進し、それによって85kDaタンパク質のヒアルロン酸への結合を助け、さらにこの時85kDaタンパク質とRタンパク質はヒアルロン酸合成酵素群と会合体をつくる。そしてヒアルロン酸合成の制御に関わると考えた。しかしRタンパク質の出現については、cAMPに依存して合成されるかまたは活性化されて機能を持つ二通りのことが考えられる。cAMPはアデニルシクラーゼにより作られるが、その酵素はプロスタグランジンE<sub>1</sub>(PGE<sub>1</sub>)により活性化される。PGE<sub>1</sub>はヒアルロン酸合成を促進することが報告されている(Tomida et al. 1977a)。まだ予備的な実験で85kDaタンパク質がリン酸化されているという結果を得ている。Rタンパク質がcAMP依存性キナーゼとしてリン酸化に関与している可能性も否定できない。またEGFによりヒアルロン酸合成が促進されることは前に記述した。リン酸化反応のカスケードが核に情報を与え、いろいろな作用が考えられるが、Rタンパク質が合成されることも可能性としてある。しかし、私はもう一つの可能性を追求してみたい。EGFレセプターは細胞膜内側にチロシンキナーゼ活性部位を持ち、EGFが結合すると活性化されることはわかっている(Hunter, 1984)。ただし基質についてはいまのところわかっていない。チロシンキナーゼの部位はラウス肉腫ウイルスのsrc遺伝子産物のpp60<sup>src</sup>と類似している。このタンパク質はアミノ末端に脂肪酸が一分子結合しており、それを介して細胞膜に結合している。さらに細胞膜内側でアクチンの近傍にあり、周りのタンパク質のチロシン残基をリン酸化している(Hamaguchi & Hanafusa, 1987)。今例のように85kDaタンパク質がアクチンの近傍に存在するならば、チロシンキナーゼがアクチン結合タンパク質をリン酸化しそれによって生じたアクチンの変化がRタンパク質を活性化すると考えられる。ヒアルロン酸・85kDaタンパク質複合体の培養液への分泌の機構については、Rタンパク質の分解または不活性化によると考えている。

以上長々と推量を書いたが制御機構の全容はRタンパク質を見いだすことで、明かにできると思っている。



応用面については、ヒアルロン酸合成の制御因子が血清成分であることから、人為的に外からヒアルロン酸合成の制御が可能になり、細胞増殖の研究やがん転移（ヒアルロン酸被覆を利用している場合）を防止する処方として有効なものになると考えられる。また85kDaタンパク質のヒアルロン酸との結合のドメインを捜した結果、85kDaタンパク質のトリプシン消化断片の分子量約45,000のペプチドでもヒアルロン酸との結合能力を持ち続けることがわかった。ただしその断片にヒアルロン酸合成に関与する活性があるかどうかわからない。さらにその解析を行い、ヒアルロン酸合成に関与する活性最小ペプチドを見つけられればヒアルロン酸合成制御のより有効な方法になると思われる。

#### IV 材料および方法

##### 1. 細胞の調製

マウス真皮の線維芽細胞の調製は、Yuspa & Harris (1974)の方法を少し変えて行なった。DDYマウスの新生児(3~5日)を水道水、0.1%(v/v)塩化ベンザルコニウム(武田薬品工業株式会社)、70%(v/v)エチルアルコールの順番で洗い、最後にHanks' balanced salt solution ( $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -free)(以後Hanks' CMFと記す)で洗う。新しいHanks CMFにマウスを移し、はさみで頭、四肢、尾を切り皮膚を背の中央で切る。ピンセットで背の切込みから皮膚を剥ぐ。それを0.25%(w/v)トリプシン(Grand Island Biological Co., Gland Island, NY)を溶かしたHanks CMFに真皮を下にして浮かべる。一晩、4℃で放置した後ピンセットで真皮を上皮から引き剥す。得られた真皮をはさみで細かくし、スピナーボトルに移す。0.35%(w/v)コラゲナーゼ(Grand Island Biological Co., Grand Island, NY)を含むHanks' balanced salt solution(Hanks' BSS)(日水製薬株式会社)を加えて、37℃で45分間加温する。ぼろぼろになった細胞は遠心(300g×5min)で集められた。細胞は10%(v/v)牛胎児血清(Grand Island Biological Co., Gland Island, NY)、0.01M N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)、50ug/ml アスコルビン酸(以上はNacalai tesque, Kyoto, Japan)、ペニシリン(50ug/ml)、ストレプトマイシン(50ug/ml)(以上は、Grand Island Biological Co., Gland Island, NY)を含むダルベッコ変法イーグル培地(日水製薬株式会社)(以後DMEMと記す)で溶かされ、細胞の集合体を除くためにナイテックスフィルター(60mesh/cm)を通した後培養に用いた。

##### 2. 細胞培養

細胞は $1 \times 10^5$ 個/mlの濃度で培養は始めた。60mmの培養皿(Becton Dickinson & Co., Los Angeles, CA)の場合、培養液DMEMは3mlで培養開始の細胞数は $3 \times 10^5$ 個になる。同様に100mmの培養皿の場合には10mlの培養液に $10^6$ 個の細胞を混濁させて培養を始めた。培養液は1日目にあたらしものと交換し、以後2日毎に交換した。

### 3. 細胞培養への試薬および物質の添加条件

外来のヒアルロン酸(分子量 $9.5 \times 10^5$ ; タンパク質含量、0.04%(w/w); 生化学工業、東京)やジブチリルアデノシン環状一りん酸(以後dbcAMPと略する)(Sigma Chemical Co., St Louis, MO)の細胞に与える影響は次の二つのステージで調べた。それは増殖期後期(培養5日目、day 5)と安定期(培養11日目、day 11)である。括弧に示した日に培養液を試薬を含む新しい培養液に交換する。培養は個々の実験に示した期間だけ行なわれ、その間二日毎に試料を含んだ新しい培養液に交換した。コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン(以上は生化学工業から入手した)、ブチレート(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)そしてヒアルロニダーゼ消化物ヒアルロン酸についても同様に行なった。ヒアルロニダーゼ消化は、ヒアルロン酸(分子量 $9.5 \times 10^5$ )の20mgを辜丸ヒアルロニダーゼ(430 units/mg, type V, Sigma Chemical Co., St Louis, MO)の1mgで37°Cで20時間で行なった。反応液は0.15M塩化ナトリウムを含む0.1Mりん酸緩衝液、pH 5.3の1mlである。消化は10時間で平衡に達していることが、還元糖の測定でわかっている。

### 4. 細胞数の計測

培養皿の細胞は温めたHanks' CMFで二度洗い、次に0.12%(w/v)トリプシン(Grand Island Biological Co., Gland Island, NY)を含む同じ培養液で37°Cで30分間振とうする。培養が長期間に及んだ場合や外からヒアルロン酸を加えた時には、さらに0.1%(w/v)コラゲナーゼ(Sigma Chemical Co., St Louis, MO)を含むHanks' BSSで処理することが必要になる。またヒアルロン酸を添加する実験ではヒアルロン酸による細胞凝集の影響を排除するために、コントロールの無添加の培養にも酵素消化の際ヒアルロン酸が添加された。細胞はピッペッティングでばらばらにした後コールターカウンター(Model Zp, Coulter Electro-nics, Inc.)とヘモサイトメーターによってその数が計数された。結果は同処理された三つの平均として求めた。

### 5. ヒアルロン酸の定量

細胞層はポリスマンでかきとり、培養液はそのまま試料として用いた。測定試

料に1.3%(w/v)の酢酸カリウム(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を含む冷えたエタノールを3倍容加えて、0℃で30分間放置後遠心(10,000rpm×30min)して沈澱を得る。沈澱物に0.2M水酸化ナトリウム(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)溶液を加えて溶かし、室温で24時間放置した。その後、当量の氷酢酸(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)で中和した。これに40mg/ml濃度のプロナーゼ(科研化学)を含む1M トリス塩酸(Sigma Chemical Co., St Louis, MO)緩衝液(pH 8.0)を10分の1容量加え、50℃で一晩加温した。処理後、前述のエタノール沈澱操作を3回繰り返し、減圧にしてエタノールを除いた。これに5TRU(turbidity reducing unit)のストレプトミセスのヒアルロニダーゼ(生化学工業株式会社)を含む0.1M酢酸緩衝液(pH 5.0)を50ul加えて、よく攪拌した。50℃で5時間インキュベートした。ヒアルロニダーゼ処理後、60ulの0.04M過ヨウ素酸ナトリウム(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を含む0.04M硫酸を加えて、37℃で1時間インキュベートした。反応後120ulの3%(w/v)亜ヒ酸ナトリウム(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を含む0.5M塩酸を加えてよく攪拌し、室温で30分間放置した。そして1mlの0.3%(w/v)チオバルビチル酸(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を含む0.012M塩酸を加えてよく攪拌後、100℃で15分間煮た。反応後1mlの5%(v/v)塩酸を含む特級n-ブチルアルコール(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を加えて、よく攪拌して、色素をアルコール層に移した。遠心(10,000rpm×5min)後、上層のアルコール層を分光光度計により549nmで吸光度を測定した。

## 6. [<sup>3</sup>H]チミジンの取り込みの測定

細胞は2.5uCi/mlの[<sup>3</sup>H]チミジン(23.8Ci/mmol, Amersham Japan Co., Tokyo, Japan)を含むDMEMで6時間加温された。取り込みは最終濃度0.5mMのチミジン(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を添加することで停止させた。測定段階でのヒアルロン酸の影響を排除するために、コントロールの培養(すなわちヒアルロン酸やdbcAMPを添加していない培養)に1mg/mlのヒアルロン酸を添加し37℃で30分間加温して細胞層に結合させた。培養液は吸引で除去した。細胞層はHanks' BSSで二度洗浄する。洗浄した細胞層はポリスマンで剥して0.2%(w/v)ラウリル硫酸ナトリウム(以後SDSと略する)(Sigma Chemical Co., St Louis, MO), 2mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム(以後EDTAと略する)、20mM 塩化カリウム(以上

はNacalai tesque, Kyoto, Japanから購入) を含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH 9.0)の0.1mlに溶かした。同緩衝液に溶かした2.5mg/ml濃度のプロナーゼを十分の一容量加えて37℃で24時間反応させる。冷やした1.3%(w/v)酢酸カリウムを含む95%(v/v)エタノールを三倍容量試料に加えて、0℃で30分間放置したのち低温遠心機(10,000rpm×30min)で沈澱物を得た。沈澱物は0.5M水酸化ナトリウムで溶かしたのち液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

## 7. FITCラベルヒアルロン酸の取り込み

マウス線維芽細胞はカバーガラスを置いた60mmの培養皿に $3 \times 10^5$ の密度で蒔かれた。細胞増殖は培養皿で培養するよりも少し早くday 5に安定期に達した。

ヒアルロン酸のウロン酸残基のカルボン酸基にフルオロセインイソチオシアネート(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)(FITC)を結合させたものを用いた(Ogamo et al. 1982)。FITCラベルヒアルロン酸(分子量  $6.3 \times 10^5$ )はday 5の培養に600 ug/mlの濃度で添加され3日間培養された。FITCラベルヒアルロン酸を含む培養液はday 7に一度新しい同じ培養液と交換された。取り込まれたFITCラベルヒアルロン酸のヒアルロニダーゼ処理は次の様に行なわれた。day 6にFITCラベルヒアルロン酸を含む培養液は辜丸ヒアルロニダーゼ(1600 units/mg)の1mg/mlを含むDMEMに交換され、37℃で30分間培養された。外からのヒアルロン酸処理またはdbcAMP処理された細胞のFITCラベルヒアルロン酸の取り込みを調べる実験は、day 5の培養に1mg/mlのヒアルロン酸(分子量  $6.3 \times 10^5$ )または1mM dbcAMPを加えて2日間培養後、600 ug/mlのFITCラベルヒアルロン酸を含むDMEMで24時間培養した。そのコントロールはday 7の培養にFITCラベルヒアルロン酸処理した物を用いた。FITCラベルヒアルロン酸取り込みに対するヒアルロン酸オリゴマーの影響は、day 5の培養に600 ug/mlのFITCラベルヒアルロン酸を添加するとき3 mg/mlの8糖または10糖のヒアルロン酸を同時に添加し、24時間培養した。カバーガラス上の細胞層は洗浄なしに直接1%(w/v)サッカロース、2%(w/v)フォルムアルデヒド、0.15M塩化ナトリウムを含む0.1Mりん酸緩衝液(pH 7.2) (以後PBSと略す) で1時間処理を行い組織を固定する。カバーガラスはエタノールで洗浄と脱水を3回行なう。ヒアルロニダーゼ処理した細胞層については、1 mg/mlのヒアルロン酸(分子量  $2 \times 10^4$ )を含む1mlのPBSで5分間処理する。脱水した試料はスライドガラスにイマージョンオイル

で張り付けた。脱水はFITCラベルヒアルロン酸の蛍光が拡散するのを防止するためである。

#### 8. 細胞層からの尿素抽出物の調製

100mm培養皿で安定期に達した細胞(約 $10^7$ )を5mlのHanks' BSSで4回洗浄する。2mM phenylmethylsulfonyl-fluoride (以後PMSFと略す) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)を含む無血清のDMEMの3mlに交換し、37℃で1時間ゆっくり振とうしながら加温する。培養液を吸引した後、細胞をさらに2mlの同じ培養液で洗浄する。次に2M尿素(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)、2mM PMSFを含むDMEMの2mlと交換し、ゆっくり振とうしながら37℃で1時間処理する。抽出物の不溶物は25,000g×15 minの遠心で除去した。上清は0.15M塩化ナトリウム、1mM塩化カルシウムを含む10mMの3-シクロヘキシルアミノプロパンスルフォニック酸(CHAPS)(Wako Chemical Co., Osaka, Japan)緩衝液、pH 11.0に対して4℃で45時間透析した。

#### 9. [ $^3\text{H}$ ]ヒアルロン酸の精製

安定期まで2日の細胞を1mM dbcAMPで1日処理する。そして20 uCi/mlの[ $^3\text{H}$ ]グルコサミン (比活性、30 Ci/mmol, Amersham Japan Co., Tokyo, Japan)を含むDMEMで24時間加温する。培養液を集め1mg/mlのプロナーゼを用い50℃、24時間でタンパク質を分解する。10,000rpm×10minの遠心で上清を集める。1.3%(w/v)の酢酸カリウムを含むエタノールを3倍容用いてヒアルロン酸を含む画分を沈澱させる。沈澱物は4Mグアニジン塩酸、0.01M EDTA、0.1%(v/v)トライトンX-100 (以上はNacalai tesque, Kyoto, Japanから購入)を含む50mMトリス塩酸緩衝液、pH 8.0に溶かす。試料はセファローズCL-4B(Pharmacia Japan Co., Tokyo, Japan)カラムクロマトグラフィーにかけられ同じ緩衝液で溶出された。ゲルの排除体積画分を集めて20mMトリス塩酸緩衝液、pH 7.4に対して透析された。透析物はDEAEセファセル(Pharmacia Japan Co., Tokyo, Japan)カラムクロマトグラフィー(0.75 cm×10cm)に通した。溶出は塩化ナトリウムの同じ緩衝液の0から0.5Mの直線勾配で行なった。塩化ナトリウム濃度0.25Mで溶出された放射活性のある画分を[ $^3\text{H}$ ]ヒアルロン酸とした。[ $^3\text{H}$ ]ヒアルロン酸の比活性は1nmolウロン酸当り8000dpmであった。さらに純度はラベルの99%がストレプトミセスのヒアルロニダーゼ (生化学

工業株式会社) で低分子化した。

#### 10. 尿素抽出物を用いてのヒアルロン酸結合活性の測定

2M尿素抽出物に2mM PMSFを含んだりん酸緩衝液、pH 7.4を等容量加える。次に750dpmの $[^3\text{H}]$ ヒアルロン酸(0.094nmol)を添加して、37°Cで1時間反応させる。反応後試料はポアサイズ0.45 $\mu\text{m}$ 、半径2.5cmのニトロセルローズ膜(Millipore Type HA)を通して吸引濾過する。フィルターはすばやく室温で4mlの磷酸緩衝液で4回洗浄する。フィルターの放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定する。

#### 11. 尿素抽出物中のヒアルロン酸結合活性の実体

増殖期後期の細胞培養(100mm)を50 $\mu\text{Ci}$ の $[^{35}\text{S}]$ メチオニン(比活性、1002Ci/mol, New England Nuclear)を含むDMEMの10mlで24時間培養する。ラベルされた細胞層はHanks' BSSで3回洗い、前述したように2M尿素で抽出する。抽出物に2mM PMSFを含んだりん酸緩衝液(pH 7.4)を等容量加える。 $^{35}\text{S}$ ラベルの20000cpmと0.2 nmol(hexuronateとして)のヒアルロン酸-プロテオグリカン会合体(A1フラクション、ニワトリ胚軟骨から会合条件で密度勾配超遠心を行い低部に沈降した画分の事でヒアルロン酸と軟骨型プロテオグリカンが会合した状態で存在する)を室温で6時間反応させた。そのコントロールとして反応物からA1フラクションだけを除いた物を用意した。反応物はグリセロール(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)の帯領域沈降速度法(2mM PMSFを含んだりん酸緩衝液に溶かした5%(w/v)から30%(w/v)グリセロールと最低部のクッションとして0.15mlの同じ緩衝液に溶かした50%(w/v)グリセロールを用いた)を179000g $\times$ 5h、17°Cで行なった。遠心物は上部から15フラクションに分けて低部から3フラクションを集めた。試料に3倍容量の1.3%(w/v)酢酸カリウムを含むエタノールを加えて、遠心後沈澱物を得た。沈澱物は100 $\mu\text{l}$ の0.3M酢酸ナトリウム、0.1M EDTA、0.1M N,N'-エチルマレイミド(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)(以後NEMと略す)、0.02M PMSF、0.036M ペプスタチン(Oike et al. 1980)を含む0.5Mトリス塩酸緩衝液、pH 8.0に溶かした。0.02 unitのコンドロイチナーゼを含むものと含まないものを用意して両方を37°Cで60分間加温した。反応は2%(w/v) SDS、20%(w/v)グリセロール、5%(v/v)メルカ

プトエタノール(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)含む50mMトリス塩酸緩衝液、pH 7.4を等容量加えて100℃で5分間処理した。混合物はSDSポリアクリルアミド電気泳動(3.75%(w/v)濃縮ゲル、5-20%(w/v)分離グラジエントゲル)を行なった。ゲルの放射ラベルされたタンパク質はENLIGHTNING(New England Nuclear)でゲルが処理された後、乾燥したゲルをX線フィルム(Fuji Film Co., Tokyo, Japan)に密着させフルオログラフィで検出した。

## 1 2 . 抗体の作製および蛍光抗体法

抗体の活性と特異性はenzyme-linked immunoadsorbent assay(ELISA)とウエスタンブローディング各々によって調べた。マウスEngelbreth-Holm-Swarm肉腫(EHSS)のヘパラン硫酸プロテオグリカンはHassellによってラビットで免疫された。I型コラーゲンはラットの尾の腱から精製され、フィブロネクチンはニワトリ胚線維芽細胞の培養細胞から精製された。それぞれラビットに免疫された。抗I型コラーゲン抗体はII型コラーゲンと反応したため、ラット軟骨肉腫から精製したII型コラーゲンで作製したアフィニティカラムに通した。それによって従来少し活性のあった牛血清アルブミンやEHSSのIV型コラーゲンの活性が除去できた。ただし牛皮膚のIII型コラーゲンとの活性は少し残ったままで除去できなかった。他のマトリックス成分との反応は調べた限り見られなかった。

カバーガラス上の細胞層は室温でPBSで2回洗浄された。抗体を室温で30分間反応させた。この実験では抗体は30分の1希釈で用いた。コントロールとして免疫していない正常ラビットの血清または免疫グロブリン画分を同じ希釈で用いた。細胞層はPBSで5回洗った後、FITCを結合させた抗ラビット免疫グロブリンヤギ血清(Cappel Co., Maivern, PA)を1000分の1に希釈して室温で30分間反応させた。PBSで3回洗浄後、グリセロール：PBS=9：1の一滴を垂らしたスライドガラスに上下を逆さまにして張り付ける。それを蛍光顕微鏡で観察した。睾丸ヒアルロニダーゼ消化はPBSに1mg/mlの濃度で酵素を溶かし37℃、30分間処理した。処理後3%(w/v)パラフォルムアルデヒド、1%(w/v)サッカロースを含むPBS中で、4℃、1時間で固定した。抗体の反応は上記に従った。



### 1 3. 走査型電子顕微鏡

カバーガラス上で培養された細胞はPBSで2回洗浄され、2.5%(w/v)パラホルムアルデヒド、2%(w/v)グルタルアルデヒド(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を含む0.05Mりん酸緩衝液(pH 7.2)で0℃、1時間処理され固定された。緩衝液中で一晩放置した後、1%(w/v)オスミウムテトラキシドを含む緩衝液中に2時間置く。エタノールでの脱水の後、イソアミル酢酸で処理する。細胞皿を割って細胞の縦割像ができるようにする。試料は凍結乾燥後金を上着させ日立S-405の25kVで観察した。

### 1 4. 透過型電子顕微鏡

60mmの組織培養皿である期間培養された細胞は上記の様に固定されそして脱水された。脱水された細胞層はプロピレンオキシド(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を使って培養皿から浮きあがらず、浮き上がった細胞層を集めプロピレンオキシドで洗う。細胞層の塊は樹脂Epon 812に埋め込まれた。樹脂の切片はウラニル酢酸とクエン酸鉛で染色された。観察は日立HU-12で行なわれた。

### 1 5. 細胞からのヒアルロン酸の精製

細胞の培養は( $1 \times 10^6$ 個)、10mlのDMEMの入った100mmの組織培養皿(Becton Dickinson & Co., Los Angeles, CA)で始めた。二日目に1mM dbcAMP(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を含む新しいDMEMと交換した。二日後に1mM dbcAMPと5uCi/mlの $^{14}\text{C}$ -グルコサミン(50 Ci/mmol, Amersham Japan Co., Tokyo, Japan)と50uCi/mlの $^3\text{H}$ -ロイシン(150 Ci/mmol, Amersham Japan Co., Tokyo, Japan)を添加した新しいDMEMに換えた。24時間培養を続けた後、培養液は捨て細胞層はHanks' BSSで二回洗った。6Mグアニジン塩酸塩、10mM EDTA、10mM NEM、2mM PMSF、0.1Mアミノカプロン酸、0.2%(w/v) Nonidet P-40(以上は、Nacalai tesque, Kyoto, Japan)または8%(w/v) Zwittergent<sup>TM</sup>(3-12)(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin)を含む0.2Mトリス塩酸緩衝液(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)(pH 8.0)(以後グアニジン塩酸抽出液と記述する)中でポリスマンを使って細胞層を掻き取る。攪拌しながら4℃で24時間抽出を行なう。培養液については、1.3%(w/v)酢酸カリウムを含むエタノールを3倍容量加え、30分間放置後遠心(10000rpm×30min)して沈澱物を得た。沈澱物をグアニジン塩酸抽出液で溶

かして、4℃で24時間抽出を行なった。以後の操作は細胞層からのヒアルロン酸の精製に従った。CsCl密度勾配超遠心を二回行なった。一回目は初期密度を1.40 g/mlに合わせて日立超遠心機70P-72でRP70T(40,000rpm)を用い10℃、48時間遠心した。フラクションはファルマシアのペリスタポンプを用いてグラジエントの底から行なわれ、10本に分注した。放射活性はフラクションから10ulを採取して液体シンチレーションカウンターで測定した。底の画分について、初期密度1.45 g/mlでRP65T(40,000rpm)を用い10℃、48時間遠心した。ヒアルロン酸画分を集め10mM塩化カリウム、3mM塩化マグネシウム、2mM PMSFを含むトリス塩酸緩衝液(pH 7.2)に対して透析された。透析後、2mgのデオキシリボヌクレアーゼ I (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、0.4mgのリボヌクレアーゼ A(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、および100unitsのリボヌクレアーゼ T<sub>2</sub> (生化学工業株式会社) が加えられ、37℃で1.75時間保温された。消化後サンプルはSephacrose CL-2B(Pharmacia Japan Co., Tokyo, Japan)カラム(1.5×90 cm)に重層された。溶出液はグアニジン塩酸抽出液 (Zwittergentは4%(w/v)にした) が用いられた。フラクションから20ulを採取してカウントした。V<sub>0</sub>フラクションをPBSに対して透析して、それをヒアルロン酸画分とした。

#### 16. ヒアルロン酸結合タンパク質の検出

ヒアルロン酸画分の一部に3倍量の1.3%酢酸カリウムを含む95%エタノールが冷やした状態で加えられ、0℃で30分間放置後遠心された。この沈澱物は0.1M酢酸緩衝液(pH 5.0)に溶かされた。ヒアルロン酸量として20ugのサンプルを2つ用意して、1つは3TRUのストレプトミセス ヒアルロニダーゼ(Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan)を加え、37℃で2時間加温した。もう1つはそのまま酵素を加えず加温した。各サンプルは凍結乾燥後、サンプル緩衝液(0.15Mトリス塩酸-0.15M SDS-3mMグリセロール-0.4mMプロモフェノールブルー-10%(w/w) 2-メルカプトエタノール)に溶かし100℃で3分間煮た。各サンプルはLaemmli系のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)にかけられた。上部の濃縮ゲルは3.75%(w/v)のポリアクリルアミド濃度を用い下部の分離ゲルは11%(w/v)の濃度を用いた。ゲルはクマシーブリリアントブルーで染色した。ゲル中のラジオアクティビティを測定するために上端から1mmずつの幅で切り出して、アンモニア：過酸化水素(4:96)の入

ったバイヤル瓶にいれ、60℃で3時間加温しゲルを分解する。この溶液にアクアゾルを加え液体シンチレーションカウンターで測定した。

#### 17. ヨードラベルとヒアルロン酸の再精製

ヒアルロン酸画分の100ugをクロラミン-T法でラベルした。100 uCi(100 mCi/ml, Amersham Japan Co., Tokyo, Japan)のNa<sup>125</sup>I溶液をポリスチレン製チューブ(70mm×12mm, 4ml)に入れる。0.25M リン酸緩衝液(pH 7.2)を10ul加える。次に攪拌しながら50ulヒアルロン酸画分(ヒアルロン酸、100ug)の溶けた0.05M リン酸緩衝液(pH 7.2)の50ulに5mg/mlの濃度で溶かしたクロラミン-Tを10ul加えて5分間反応させる。反応は0.05M リン酸緩衝液(pH 7.2)に1.2mg/mlの濃度で溶かしたsodium metabisulphite(Nacalai Tesque Co., Kyoto, Japan)を100ulと1%(w/v)牛血清アルブミン(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)(以後BSAと略す)を含む0.05M リン酸緩衝液(pH 7.2)に2.0mg/mlの濃度で溶かしたヨウ化ナトリウムを800ul加えて停止する。標識物はPBSで平衡化したセファデックスG-50(Pharmacia Japan Co., Tokyo, Japan)のカラムクロマトグラフィー(10mm×120mm)でNaIを除去し精製された。カラムのゲルは予め100mg/ml BSA(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を通して標識物がゲルに吸着しないように飽和させておく。溶質物の測定はガンマーカウンターで計測した。

得られた標識物は7M尿素、10mM EDTA、2mM PMSF、10mM NEM、0.5%(w/v)Triton X-100を含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.2)に透析する。試料はDEAE Sephacelカラムクロマトグラフィー(Pharmacia Japan Co., Tokyo, Japan)に重層され塩化ナトリウムの0Mから1Mの濃度勾配で溶出された。各フラクションはガンマーカウンターで計測された。フラクションの一部について、冷えた1.3%(w/v)酢酸カリウムを含む95%(v/v)エタノールを加え、0℃で30分間放置後遠心して沈澱物を集めた。沈澱物についてそれぞれストレプトミセスのヒアルロニダーゼとコンドロイチナーゼ ABC(Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan)処理が行なわれ、処理後凍結乾燥された。乾燥物はサンプル緩衝液に溶かされSDS-PAGEに流した後、オートラジオグラフィーを行なった。

## 18. 85kDaタンパク質のヒアルロン酸への再結合

ヨードラベルした1000cpmの85kDaタンパク質-ヒアルロン酸複合体をストレプトミセスのヒアルロニダーゼ(1TRU)を含む0.1M酢酸緩衝液(pH 6.0)に溶かして37℃で1時間処理した。ヒアルロン酸から離れた85kDaタンパク質は疎水性のため、遠心(10000rpm×30min)することで沈澱として回収できる。沈澱物を7M尿素、1mM EDTA、2mM PMSFを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.2)に溶かした後、分子量170000のヒアルロン酸を20ug添加する。これを37℃で1時間加温する。1mM EDTA、2mM PMSF、10mM NENを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.2)に対して4℃で透析した後、これに2TRUのヒアルロニダーゼを加えたもの加えないものを用意した。37℃で1時間処理した。これをSDS-PAGEに流してオートラジオグラフィーで分析した。

## 19. 抗体の調製

抗原としては細胞層から抽出したヒアルロン酸タンパク質複合体をDEAE Sephacel(Pharmacia Japan Co., Tokyo, Japan)カラムクロマトグラフィーまで精製した物を用いた。ラビットにヒアルロン酸として200ugを含む500ulのPBS溶液を500ulのComplete Freund Adjuvant (Difco Laboratories Co., Detroit, Michigan)と混ぜホモゲナイズし下肢リンパ節に皮膚を切開して注入した。初期免疫後二週間おきに100ugのヒアルロン酸をIncomplete Freund Adjuvantと混ぜ下肢に皮膚外からリンパ節めがけて二回ブースターした。採血は最終ブースター後二週間目から耳より行なった。採血は一ヶ月間続けた。抗体価の検査はELISAおよびウエスタンブロッティングで確かめた。

## 20. 血清中よりの85kDaタンパク質の単離

10%(v/v)の牛胎児血清(Grand Island Biological Co., Gland Island, NY)を含むダルベッコ変法イーグル培地にヒアルロン酸(分子量  $9.5 \times 10^5$ , 生化学工業株式会社)を最終濃度200ug/mlになるように加えた。24時間37℃で加温した。グアニジン塩酸抽出液に対して透析した後、初期密度1.40g/mlでCsCl密度勾配超遠心を行なった。遠心の条件は前に述べた通りである。また二度目の超遠心についても前述のように行なった。フラクションの一部に1.3%(w/v)酢酸カリウムを含む95%(v/v)エタノールを加え、0℃で30分間放置後遠心して沈澱物を集め、0.1M酢酸緩

衝液(pH 5.0)に溶かした(この緩衝液にはタンパク質分解酵素阻害剤として、10 mM EDTA-10mM NEM-2mM PMSF-0.1M アミノカプロン酸を含む)。溶液は二等分した後、一方にはストレプトミセス ヒアルロニダーゼを1TRU加えて37°Cで2時間保温した。各サンプルは凍結乾燥後、サンプル緩衝液に溶かして3分間煮てSDS-PAGEのサンプルとした。

他の動物血清についても同様の方法で行なった。牛血清は阪大微生物研究所から、そしてウマ、ヤギ血清はGrand Island Biological Co., Gland Island, NYから購入した。人、ニワトリ、ウサギ、マウス、ラット血清は動物から採血して調製した。

## 2 1. 85kDaタンパク質のヒアルロン酸結合特異性

10%(v/v)牛胎児血清を含むDMEMに1%(w/v)のコンドロイチン(イカの皮)、コンドロイチン硫酸(ブタ皮膚)、ヘパラン硫酸(牛腎臓)、デキストラン硫酸(以上は生化学工業株式会社)またはDNA(Nacalai tesque Co., Kyoto, Japan)を加え、24時間、37°Cで加温した。ヒアルロン酸の精製手順は前項に従ったが、用いた溶液はタンパク質変性剤のグアニジン塩酸と界面活性剤を含まず会合条件下で行なった。得られたヒアルロン酸画分についてウロン酸にして40ug(DNAも40ug)をSDS-PAGEに流した。ゲルをデンスitomーターで分子量85000付近をスキャンして分子量20000のヒアルロン酸を用いた場合に対する比で求めた。また還元ヒアルロン酸とFITCラベルヒアルロン酸そして非還元末端を還元したヒアルロン酸についても同様に行なった。

ヒアルロン酸オリゴによるヒアルロン酸・85kDaタンパク質複合体形成の阻害は、会合条件下で0.2mg/ml濃度のヒアルロン酸(分子量950000)を添加する時に、2mg/ml濃度の6糖、8糖、10糖のヒアルロン酸オリゴをいっしょに添加した。精製および分析は前項に従った。

## 2 2. ウエスタンブロッティング

10ugのヒアルロン酸画分を3TRUのストレプトミセス ヒアルロニダーゼで37°C 2時間処理したのち、SDS-PAGEを行なった。電気泳動後、タンパク質をTowbin(1979)らの方法でニトロセルロース膜に電氣的に転写した。膜は1%(w/v)BSAを含

むPBS-Tween(0.05%(w/v) Tween 20 in PBS(pH 7.2))に浸して1時間37°Cで加温した後、10%(v/v)ヤギ血清を含むPBS-Tweenで1時間37°C加温する。1000倍希釈した抗体と室温で2時間放置した。次にPBS-Tweenで3回洗浄した後、PBS-Tweenで500倍に希釈したペルオキシダーゼ結合抗ラビットイムノグロブリン(Cappel Co., Maivern, PA)と1時間反応させた。再びPBS-Tweenで3回洗浄した後、膜に結合したペルオキシダーゼを0.05%(w/v) 4-クロロ-1-ナフトール、0.03%(v/v)過酸化水素(以上はNacalai Tesque Co., Kyoto, Japan)溶液で検出した。

### 23. 抗体による線維芽細胞の染色

培養皿にカバーガラスを置き、この状態でフィブロブラストを培養した。4日間の培養後、一つはストレプトミセス ヒアルロニダーゼを50TRU添加して1時間培養を続けた。その後、カバーガラスを取り出し、温めたHanks' BSSで3回洗った。3%(w/v)ホルムアルデヒド、1%(w/v)サッカロース(以上はNacalai Tesque Co., Kyoto, Japan)を含むPBSに4°Cで1時間浸し固定した。固定後、PBSで3回洗った。30倍に希釈した抗体をカバーガラスに重層し、室温で30分間放置した。次にPBSで3回洗った後、今度はFITC結合抗ウサギイムノグロブリンヤギ血清(Cappel Co., Maivern, PA)をカバーガラスに重層し、室温で30分間放置した。再びPBSで3回洗った後、グリセロール：水(9:1)でスライドガラスに張り付ける。それを蛍光顕微鏡で観察する。

### 24. マウス乳ガン細胞FM3AとマウスメラノーマB16細胞の培養

マウス乳がん細胞FM3Aから選択されたP0、P10、P15Aは埼玉がんセンターの本間、穂積両博士から頂いた。選択の仕方は結果の項で説明を行なう。FM3Aの各種細胞はEagle minimal essential medium(Eagle MEM) (日水製薬株式会社)のアミノ酸とビタミンを二倍濃度にしたものに10%(v/v)牛血清を加えた物を培養液として用いた。B16F1とB16F10はEagle MEMに10%(v/v)の牛胎児血清を加えた培養液を用いた。

### 25. FM3A各細胞株のヒアルロン酸合成活性の測定

P0、P10、P15Aを $3 \times 10^6$ 個/10ml(100mm培養皿)の密度で培養を始め、2日後に培

養液を新しいものと交換した。その時、20 uCi/mlの $^3\text{H}$ グルコサミン（比活性、32 Ci/mmol、Amersham Japan Co., Tokyo, Japan)を加え、24時間培養した。細胞をHanks' BSSで2回洗い、その洗浄液は培養液と合わせて1.3%(w/v)酢酸カリウムを含むエタノールを3倍容量加え、0℃で30分間放置後遠心(10000rpm×30min)して沈澱物を得た。細胞層はグアニジン塩酸抽出液を加え、ポリスマンでかき集め、同様にしてエタノールで沈澱物を得た。次に沈澱物にNo.5で記述したアルカリ処理とプロナーゼ消化を行なった。処理後、エタノールで沈澱させられた試料を0.1M酢酸緩衝液(pH 5.0)に溶かし、二つに分けた片方にストレプトミセスのヒアルロニダーゼを加え、50℃で16時間加温した。消化物はブタノール：酢酸：アンモニア：水=6：9：2：1の展開液でペーパークロマトグラフィーを室温で2日間行なった。原点の放射活性の差をヒアルロン酸として算出した。P15A細胞でのコンドロイチン硫酸とヘパラン硫酸の分析は同様にしてコンドロイチナーゼABCとヘパリチナーゼを用い、ペーパークロマトグラフィーにより原点での無処理との放射活性の差で測定した。

## 26. FM3A各細胞株の85kDaタンパク質の分布

前項の条件で培養を始め、3日後に細胞層を同様の操作で集めエタノールで沈澱物を得る。沈澱物をSDS-PAGEのサンプル緩衝液に溶かして100℃で5分間煮た後、十分の一容量を電気泳動に流した。抗85kDaタンパク質抗体を用いウエスタンブローディングで検出した。

## 27. 抗体の精製

50mlの血清に飽和硫酸アンモニウム(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)(pH 7.8)を25mlを徐々に加えて混ぜる。4℃で3時間攪拌したのち、室温で3000rpm×30minで沈澱物を得る。50mlの生理食塩水(0.14M塩化ナトリウム)で沈澱物を溶かし上記の同様の操作を繰り返す。2回目に得られた沈澱物は20mlのホウ酸(Nacalai tesque, Kyoto, Japan)緩衝液(0.14M塩化ナトリウムを含む)に溶かす。4℃でホウ酸緩衝液に対して透析した後、さらに4℃でPBSに対して透析する。透析中に生じた不溶物を除去するため、室温で3000rpm×15min遠心する。得られた上清は20gの陰イオン交換クロマトグラフィー(DE52, Watman Ltd., Maidstone Kent,

England)に重層して、PBSで溶出する。最初のピークの前半を採集する。

## 28. アフィニティーカラムの作製

3gのCNBr-活性化Sepharose CL-4B(Pharmacia Japan Co., Tokyo, Japan)凍結乾燥品を1mM塩酸中で30分間膨潤させる。グラスフィルター上で同じ1mM塩酸で洗浄する。乾燥ゲル1gあたり約200mlの洗浄液を数回に分けて加え、そのたびに上清を吸引して取り除く。カップリング緩衝液(0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M、pH8.3の炭酸水素ナトリウム水溶液)にカップリングするタンパク質を溶解する(5 mg/ml)。この緩衝液15mlで膨潤したゲルを洗い、直ちにタンパク質溶液に懸濁させる。4℃で一晩かき混ぜる。マグネチックスターラーは使用しないこと。反応終了後ゲルをブロッキング試薬(0.2Mグリシン、pH8.0)に移し、室温で2時間反応させる。未反応のタンパク質を洗い流すためカップリング緩衝液と0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M、pH 4.0の酢酸緩衝液で交互に洗浄を繰り返す。最後にPBSで洗浄して使用する。

## 29. 血清からの85kDaタンパク質の除去

抗85kDaタンパク質抗体のアフィニティーカラムにゲルと等容量の牛胎児血清または牛血清を4℃で一晩管流させる。PBSで溶出させゲル容量だけ回収する。これを85kDaタンパク質欠損血清として実験に用いた。コントロールとしては正常ラビットイムノグロブリンを結合させたアフィニティーカラムに同じ牛胎児血清または牛血清を流した物を用いた。カラムに結合した85kDaタンパク質は3Mチオシアン酸カリウムで溶出し、すぐにPBSに対して透析した。これを85kDaタンパク質画分として、P15Aのヒアルロン酸合成の実験に用いた。

## 30. 血管内皮細胞へのFM3A P15Aの接着実験

牛大動脈の血管内皮細胞を60mm培養皿でEagle NENを用い培養する。増殖期後期になったら、Hanks' BSSで2回洗浄する。これに培養液に混濁させたP15A細胞を入れ放置した。時間経過後培養液を取り、含まれる細胞数を計数した。ヒアルロニダーゼの処理は、 $10^7$ 個あたり25TRUを用い37℃で30分間行なった。



### 31. マウス尾静脈への注射

バクテリアル培養皿(Becton Dickinson & Co., Los Angeles, CA)でFM3A、B16細胞を培養し、細胞増殖期後期にピペッティングで細胞を集め、血清成分を除去するためPBSで2度洗う。ヒアルロニダーゼ処理についてはピペッティング前に25 TRUの酵素を加え1時間培養したものを用いた。遠心して得られた細胞塊をPBSで浮遊させて $5 \times 10^6$ 個/mlの濃度にする。これを皮下針(三龍堂商店)を用いマウス尾静脈に200ul注入する。三週間後に胸を切開して肺を取り出しがん細胞の転移巣を計数する。

### 32. その他の実験方法

DNA定量はBurton (1956)の方法にしたがい、ウロン酸定量はBitter & Muir (1962)のカルバゾール硫酸法にしたがった。また二次元電気泳動はO'Farrel (1975)の方法にしたがった。

## V 文献

- Abatangelo, G., Cortivo, R., Martelli, M., and Vecchia, P.: Cell detachment mediated by hyaluronic acid. *Exp. Cell Res.*, 137: 73-78, 1982.
- Ahlgren, T., and Jarstrand, C.: Hyaluronic acid enhances phagocytosis of human monocytes in vitro. *J. Clin. Immunol.*, 4: 246-249, 1984.
- Anastassiades, T., and Robertson, W.: Modulation of mitogen-dependent lymphocyte stimulation by hyaluronic acid. *J. Rheumatol.*, 11: 729-734, 1984.
- Angello, J.C., and Hosick, H.L.: Glycosaminoglycan synthesis by mammary tumor spheroids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107: 1130-1137, 1982.
- Balazs, E.A.: Aminosugar-containing macromolecules in the tissues of the eye and the ear, in "The amino sugars" IIA (Balazs, E.D., and Jeanloz, R.W. eds.) Academic Press, New York : pp401-460, 1965.
- Bard, J.B.L., McBride, W.H., and Ross, A.R.: Morphology of hyaluronidase-sensitive cell coats as seen in the SEM after freeze-drying. *J. Cell Sci.*, 62: 371-383, 1983.
- Belsky, E., and Toole, B.P.: Hyaluronate and hyaluronidase in the developing chick embryo kidney. *Cell Differ.*, 12: 61-66, 1983.
- Bertolami, C.N., and Donoff, R.B.: Hyaluronidase activity during open wound healing in rabbits. *J. Surg. Res.*, 25: 256-259, 1978.
- Bishoff, R.: Acid mucopolysaccharide synthesis by chick amnion cell cultures. *Exp. Cell Res.*, 66: 224-236, 1971.
- Bitter, T., and Muir, H.M.: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4: 330-334, 1962.
- Brecht, M., Mayer, U., Schlosser, E., and Prehm, P.: Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem. J.*, 239: 445-450, 1986.
- Buckingham, R.B., and Castor, C.W.: The effect of bacterial products on synovial fibroblast function: Hypermetabolic change induced by

- endotoxin. *J. Clin. Invest.*, 51: 1186-1194, 1972.
- Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62: 315-323, 1956.
- Cassaro, C.N.F., and Dietrich, C.P.: Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. *J. Biol. Chem.*, 252: 2254-2267, 1977.
- Castor, C.W.: Connective Tissue activation. IV. Regulatory effects of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum.*, 15: 504-514, 1972.
- Chevrier, A., Delpech, B., and Halavent, C.: Inhibition of the active E-Rosette forming T lymphocytes by a mesenchyme associated antigen. *Biomedicine*, 33: 21-24, 1980.
- Clarris, B.J., and Fraser, J.R.E.: On the pericellular zone of some mammalian cells in vitro. *Exp. Cell Res.*, 49: 181-193, 1968.
- Cohn, R.H., Cassiman, J-J., and Bernfield, M.R.: Relationship of transformation, cell density, and growth control to the cellular distribution of newly synthesized glycosaminoglycan. *J. Cell Biol.*, 71: 280-294, 1976.
- Comper, W.D., and Laurent, T.C.: Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 58: 255-315, 1978.
- Dahl, L., Hopwood, J.J., Laurent, U.B.G., Liljia, K., and Tengblad, A.: The concentration of hyaluronate in amniotic fluid. *Biochem. Med.*, 30: 280-283, 1983.
- Daniel, M.R., Dingle, J.T., and Lucy, J.A.: Cobalt-tolerance and mucopolysaccharide production in rat dermal fibroblast in culture. *Exp. Cell Res.*, 24: 88-105, 1961.
- Darzynkiewicz, Z., and Balazs, E.A.: Effect of connective tissue intercellular matrix on lymphocyte stimulation. I. Suppression of lymphocyte stimulation by hyaluronic acid. *Exp. Cell Res.*, 66: 113-123, 1971.
- Davidson, E.H., Allfriy, V.G., and Mirsky, A.E.: Gene expression in

- differentiated cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 49: 53-60, 1963.
- Davidson, E.H.: Heritability and control of differentiated function in cultured cells. J. Cell. Physiol., 46: 983-998, 1963.
- Delpech, B., Bertrand, P., and Maingonnat, C.: Immunoassay of the hyaluronic acid-hyaluronectin interaction: Application to the detection of hyaluronic acid in serum of normal subjects and cancer patients. Anal Biochem., 149: 555-565, 1985.
- Engstrom-Laurent, A., and Hallren, R.: Circulating hyaluronate in rheumatoid arthritis: relationship to inflammatory activity and the effect of corticosteroid therapy. Ann. Rheum. Dis., 44: 83-88, 1985a.
- Engstrom-Laurent, A., Laurent, U.B.G., Lilja, K., and Laurent, T.C.: Concentration of sodium hyaluronate in serum. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 45: 497-504, 1985b.
- Fessler, J.H., and Fessler, L.I.: Electron microscopic visualization of the polysaccharide hyaluronic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 56: 141-147, 1966.
- Forrester, J.V., and Wilkinson, P.C.: Inhibition of leucocyte locomotion by hyaluronic acid. J. Cell Sci., 48: 315-331, 1981.
- Forrester, J.V., and Lackie, J.M.: Effect of hyaluronic acid on neutrophil adhesion. J. Cell Sci., 50: 329-344, 1981.
- Fraser, J.R.E., Clarris, B.J., and Baxter, E.: Patterns of induced variation in the morphology, hyaluronic acid secretion, and lysosomal enzyme activity of cultured human synovial cells. Ann. Rheum. Dis., 38: 287-294, 1979.
- Fraser, J.R.E., Laurent, T. C., Pertoft, H., and Baxter, E.: Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. Biochem. J., 200: 415-424, 1981.
- Fraser, J.R.E., Appelgren L-E, and Laurent, T. C.: Tissue uptake of circulating hyaluronic acid. A whole body autoradiographic study. Cell Tissue Res., 233: 285-293, 1983.

- Fraser, J.R.E., Laurent, T.C., Engstrom-Laurent, A., and Laurent, U.B.G.:  
Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human.  
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 11: 17-252, 1984.
- Friedman, D.L.: Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation. Physiol. Rev., 56: 652-708, 1976.
- Girard, N., Bertrand, P., Delpech, A., and Delpech, B.: Caracterisation tissulaire de l'acide hyaluronique dans le cervelet par la hyaluronectine. C.R. Seances Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie., 298: 325-330, 1984.
- Goldberg, R.L., and Toole, B.P.: Monensin inhibition of hyaluronate synthesis in rat fibrosarcoma cells. J. Biol. Chem., 258: 7041-7046, 1983.
- Goldberg, R.L., and Toole, B.P.: Pericellular coat of chick embryo chondrocytes: Structural role of hyaluronate. J. Cell Biol., 99: 2114-2122, 1984.
- Goldberg, R.L., and Toole, B.P.: Hyaluronate inhibition of cell proliferation. Arthritis Rheum., 30: 769-778, 1987.
- Green, S.J., and Underhill, C.B.: Hyaluronate appears to be covalently linked to the cell surface. J. Cell. Physiol., 134: 376-386, 1988.
- Hakansson, L., Hallgren, R., and Venge, P.: Regulation of granulocyte function by hyaluronic acid. Invitro and in vivo effects on phagocytosis, locomotion, and metabolism. J. Clin. Invest., 66: 298-305, 1980.
- Hamaguchi, M., and Hanafusa, H.: Association of p60<sup>src</sup> with Triton X-100 resistant cellular structure correlates with morphological transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84: 2312-2316, 1987.
- Hamerman, D., and Wood, D.D.: Interleukin 1 enhances synovial cell hyaluronate synthesis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 177: 205-210, 1984.
- Hascall, V.C., and Heinegard, D.: Aggregation of cartilage proteoglycans. J. Biol. Chem., 249: 4242-4249, 1974.

- Hassell, J.R., Leyshon, W.C., Ledbetter, S.R., Tyree, B., Suzuki, S., Kato, M., Kimata, K., and Kleinman, H.K.: Isolation of two forms of basement membrane proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 260: 8098-8105, 1985.
- Heatley, F., and Scott, J.E.: A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. *Biochem. J.*, 254: 489-493, 1988.
- Honma, Y., Kasukabe, T., and Hozumi, M.: Selection and characterization of pulmonary colonizing cells from cultured mouse mammary carcinoma cells. *Gann*, 72: 898-905, 1981.
- Horonowski, L., and Anaslassiades, T.P.: The effect of cell density on net rates of glycosaminoglycan synthesis and secretion by cultured rat fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 255: 10091-10099, 1980.
- Hunter, T.: The epidermal growth factor receptor gene and its product. *Nature*, 311: 414-416, 1984.
- Jilek, F., and Hormann, H.: Fibronectin (Cold-Insoluble Globulin), VI. Influence of heparin and hyaluronic acid on the binding of native collagen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 360: 597-603, 1979.
- Kato, M., Koike, Y., Ito, Y., Suzuki, S., and Kimata, K.: Multiple forms of heparan sulfate proteoglycans in the Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor---The occurrence of high density forms bearing both heparan sulfate and chondroitin sulfate side chain. *J. Biol. Chem.*, 263: 2203-2210, 1988.
- Kimata, K., Honma, Y., Okayama, M., Oguri, K., Hozumi, M., and Suzuki, S.: Increased synthesis of hyaluronic acid by mouse mammary carcinoma cell variants with high metastatic potential. *Cancer Res.* 43: 1347-1354, 1983.
- Kimata, K., Oike, Y., Tani, K., Shinomura, T., Yamagata, M., Uritani, M., and Suzuki, S.: A large chondroitin sulfate proteoglycan (PG-M) synthesized before chondrogenesis in the limb bud of chick embryo. *J. Biol. Chem.*, 261: 13517-13525 1987.
- 木全弘治、米田雅彦、森田博之：転移における細胞外マトリックスの関与 癌と

- 化学療法、14: 2025-2032 1987a.
- 木全弘治、米田雅彦、荒井幹雄：基質接着性と癌転移 細胞、19: 511-515  
1987b.
- 木全弘治：プロテオグリカンと接着性タンパク質（器官形成、発生生物学から臓器工学まで 器官形成研究会編）、培風館、pp29-47, 1988.
- King, I.A.: Increased epidermal hyaluronic acid synthesis caused by four retinoids. *Br. J. Dermatol.*, 110: 607-608, 1984.
- Knox, P., and Wells, P.: Cell adhesion and proteoglycans. I. The effect of exogenous proteoglycans on the attachment of chick embryo fibroblasts to tissue culture plastic and collagen. *J. Cell Sci.*, 40: 77-89, 1979.
- Knudson, W., Biswas, C., and Toole, B.P.: Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 6767-6771, 1984.
- Knudson, C.B., and Toole, B.P.: Fluorescent morphological probe for hyaluronate. *J. Cell Biol.*, 100: 1753-1758, 1985.
- Koyama, H., and Ono, T.: Initiation of a differentiated function (hyaluronic acid synthesis) by hybrid formation in culture. *Biochim. Biophys. Acta*, 217: 477-487, 1970.
- Koyama, H., Tomida, M., and Ono, T.: The enhanced production of hyaluronic acid by cultured rat fibroblast cells treated with cyclic AMP and its dibutyryl derivative. *J. Cell. Physiol.*, 87: 189-198, 1975.
- Kupchella, C.E., and Hashemi, S.B.: Glycosaminoglycans in and around transplantable hepatomas of varying growth rates and metastatic characteristics in "Extracellular matrix" (eds. Hawkes, S., and Wang, J.L.) pp. 183-187 1982 (Academic Press New York)
- Kujiwa, M.J., Dechak, D.J., Fizman, M.Y., and Caplan, A.I.: Hyaluronic acid bonded to cell culture surfaces inhibits the program of myogenesis. *Dev. Biol.*, 113: 10-16, 1986.

- Lacy, B.E., and Underhill, C.B.: The hyaluronate receptor is associated with actin filaments. *J. Cell Biol.*, 105: 1395-1404, 1987.
- Lark, M.W., and Culp, L.A.: Selective solubilization of hyaluronic acid from fibroblast substratum adhesion sites. *J. Biol. Chem.*, 257: 14073-14080, 1982.
- Laurent, U.B.G., and Laurent, T.C.: On the origin of hyaluronate in blood. *Biochem. Int.*, 2: 195-199, 1981.
- Laurent, U.B.G.: Hyaluronate in human aqueous humor. *Arch Ophthalmol.*, 101: 129-130, 1983.
- Lembach, K.: Enhanced synthesis and extra-cellular accumulation of hyaluronic acid during stimulation of quiescent human fibroblasts by mouse epidermal growth factor. *J. Cell. Physiol.*, 89: 277-288, 1976.
- LoBoeuf, R.D., Raja, R.H., Fuller, G.M., and Weigel, P.H.: Human fibrinogen specifically binds hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.*, 261: 12586-12592, 1986.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- Martin, T.J., Harris, G.S., Melick, R.A., and Fraser, J.R.E.: Effect of calcitonin on glycosaminoglycan synthesis by embryo calf bone cells in vitro. *Experientia*, 25: 375-376, 1969.
- Mason, R.M., Lineham, J.D., Phillipson, M.A., and Black, C.M.: Selective inhibition of proteoglycan and hyaluronate synthesis in chondrocyte culture by cyclofenil diphenol, a non-steroidal weak oestrogen. *Biochem. J.*, 223: 401-412, 1984.
- Mathews, M.B., and Decker, L.: Conformation of hyaluronate in neutral and alkaline solutions. *Biochim. Biophys. Acta*, 498: 259-263, 1977.
- Matuoka, K., Mitsui, Y., and Murota, S.: Growth-coupled changes in glucosaminoglycans (heparan sulfate and hyaluronic acid) in normal and transformed human fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.*, 9: 577-586, 1985.



- McBride, W.H., and Bard, J.B.L.: Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. *J. Exp. Med.*, 149: 507-515, 1979.
- Meyer, K., and Palmer, J.W.: The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.*, 107: 629-634, 1934.
- Meyer, F.A., Koblentz, M., and Silberberg, A.: Structural investigation of loose connective tissue by using a series of dextran fractions as non-interating macromolecular probes. *Biochem. J.*, 161: 285-291, 1977.
- Mian, N.: Characterization of a high-Mr plasma-membrane-bound protein and assessment of its role as a constituent of hyaluronate synthase complex. *Biochem. J.*, 237: 343-357, 1986.
- Morris, C.C.: Quantitative studies on the production of acid mucopolysaccharides by replicate cell cultures of rat fibroblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 86: 878-915, 1960.
- Morriss-K, G.M., Tuckett, F., and Solursh, M.: The effects of Streptomyces hyaluronidase on tissue organization and cell cycle time in rat embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 98: 59-70, 1986.
- Moscatelli, D., and Rubin, H.: Increased hyaluronic acid production on stimulation of DNA synthesis in chick embryo fibroblasts. *Nature*, 254: 65-66, 1975.
- Moscatelli, D., and Rubin, H.: Hormonal control of hyaluronic acid production in fibroblasts and its relation to nucleic acid and protein synthesis. *J. Cell. Physiol.*, 91: 79-88, 1977.
- Nameroff, M., and Holtzer, H.: The loss of phenotypic traits by differentiated cell. IV. Change in polysaccharides produced by dividing chondrocytes. *Dev. Biol.*, 16: 250-281, 1967.
- Oegema, T.R., Brown, M., and Pziewiatkowski, D.D.: The link protein in proteoglycan aggregates from the swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.*, 252: 6470-6477, 1977.
- O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250: 4007-4021, 1975.

- Ogamo, A., Matsuzaki, K., Uchiyama, H., and Nagasawa, K.: Preparation and properties of fluorescent glycosaminoglycuronans labeled with 5-aminofluorescein. *Carbohydr. Res.*, 105: 69-85, 1982.
- Oike, Y., kimata, K., Shimomura, T., Nakazawa, K., and Suzuki, S.: Structural analysis of chick-embryo cartilage proteoglycan by selective degradation with chondroitin lyases (chondroitinases) and endo- $\beta$ -D-galactosidase (keratanase). *Biochem. J.*, 191: 193-207, 1980.
- Orkin, R.W., and Toole, B.P.: Chick embryo fibroblasts produce two forms of hyaluronidase. *J. Cell Biol.*, 85: 248-257, 1980.
- Orkin, R.W., Knudson, W., and Toole B.P.: Loss of hyaluronate-dependent coat during myoblast fusion. *Dev. Biol.*, 107: 527-530, 1985.
- Pearcer, R.H., and Grimmer, B.J.: Age and the chemical constitution of normal human dermis. *J. Invest. Dermatol.*, 58: 347-361, 1972.
- Pessac, B., and Defendi, V.: Cell aggregation: role of acid mucopolysaccharides. *Science*, 175: 898-900, 1972.
- Philipson, L.H., and Schwartz, N.B.: Subcellular localization of hyaluronate synthetase in oligodendrogloma cells. *J. Biol. Chem.*, 259: 5017-4023, 1984.
- Philipson, L.H., Westley, J., and Schwartz, N.B.: Effect of hyaluronidase treatment of intact cells on hyaluronate synthetase activity. *Biochemistry*, 24: 7899-7906, 1985.
- Prehm, P.: Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Characterization of the synthetase. Mechanism of chain growth. *Biochem. J.*, 211: 181-198, 1983.
- Prehm, P.: Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem. J.*, 220: 597-600, 1984.
- Prehm, P., and Mausolf, A.: Isolation of streptococcal hyaluronate synthase. *Biochem. J.*, 235: 887-889, 1986.
- Prehm, P.: Mechnism, localization, and inhibition of hyaluronate synthesis in "Articular cartilage bio-chemistry" (eds., Kueffner, K.E.,

- Suhleyerbach, R., Hascall, V.C.) pp.81-91 1986 (Raven Press, New York)
- Redini, F., Moczar, E., and Poupon, M.F.: Cell surface glycosaminoglycans of rat rhabdomyosarcoma lines with different metastatic potentials and of non-malignant rat myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 883: 98-105 1986.
- Roden, L.: Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans. in "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans.(Lennarz, W.J. ed.)". Plenum Publishing, New York, pp 267-371, 1980.
- Rosso, M.D., Fibbi, G., Pasquali, F., Cappelletti, R., Vannucchi, S., and Chiarugi, V.: Effects of hyaluronate and heparan sulphate on collagen-fibronectin interactions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 4: 67-72, 1982.
- Roughley, P.J., White, R.J., and Poole, A.R.: Identification of a hyaluronic acid-binding protein that interferes with the preparation of high-buoyant-density proteoglycan aggregates from adult human articular cartilage. *Biochem. J.*, 231: 129-138, 1985.
- Rozengurt, E.: Synergistic stimulation of DNA synthesis by cyclic AMP derivatives and growth-factors in mouse 3T3 cells. *J. Cell. Physiol.*, 112: 243-250, 1982.
- Sato, C., Miyazawa, T., Nishizawa, K., Kojima, K., and Okayama, M.: Changes in the organization and biosynthesis of cell surface acidic sugars during the phytohemagglutinin-induced blast formation of human T-lymphocytes. *Exp. Cell Res.*, 124: 285-292, 1979.
- Schumacher, G.F.B., and Schill, W.B.: Radical diffusion in gel for micro determination of enzymes. II. Plasminogen activator, elastase, and nonspecific proteases. *Anal. Biochem.*, 48: 9-26, 1972.
- Severson, A.R., Rothberg, P.F., Pratt, R.M., and Goggins, J.F.: Effect of parathyroid hormone on the incorporation of <sup>3</sup>H-glucosamine into hyaluronic acid in bone organ culture. *Endocrinology*, 92: 1282-1285,

1973.

- Smedsrod, B., Pertoft, H., Eriksson, S., Fraser, J.R.E., and Laurent, T.C.: Studies in vitro on the uptake and degradation of sodium hyaluronate in rat liver endothelial cells. *Biochem. J.*, 223: 617-626, 1984.
- Smith, G.N., Toole, B.P., and Gross, J.: Hyaluronidase activity and glycosaminoglycan synthesis in the amputated newt limb. Comparison of denervating, non-regenerating limbs with regenerates. *Dev. Biol.*, 42: 221-232, 1975.
- Scott, J.E., and Tigwell, M.J.: Periodate oxidation and shape of glycosaminoglycans in solution. *Biochem. J.*, 173: 103-114, 1978.
- Stack, M.T., and Brandt, K.D.: Dibutyryl cyclic AMP affects hyaluronate synthesis and macromolecular organization in normal adult articular cartilage in vitro. *Biochi. Biophys. Act.*, 631: 264-277, 1980.
- Steck, P.A., Cheong, P.H., Nakajima, M., Yung, W.K.A., Moser, R.P., and Nicolson, G.L.: Altered expression of glycosaminoglycans in metastatic 13762NF rat mammary adenocarcinoma cells. *Biochemistry*, 26: 1020-1028 1987.
- Sundblad, L.: Glycosaminoglycans and glycoproteins in synovial fluid, in "The amino sugars" IIA (Balazs, E.A., and Joanlos, R.W. eds.) Academic Press, New York: pp229-250, 1965.
- Szirmai, J.A.: Effect of steroid hormones on the glycosaminoglycans of target connective tissue, in "The amino sugars". IIB (Balazs, E.A., and Jeanolz, R. W. eds.) Academic Press, New York: 129-154, 1966.
- Takagaki, M.Y., and Toole, B.P.: Shedding of hyaluronate from the cell surface of rous sarcoma virus-transformed chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, 254: 8409-8415, 1979.
- Takagaki, M.Y., and Toole, B.P.: Hyaluronate-protein complex of rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 256: 8463-8469 1981.

- Tarone, G., Ferracini, R., Galetto, G., and Comoglio, P.: A cell surface integral membrane glycoprotein of 85000 mol wt(gp85) associated with Triton X-100-insoluble cell skeleton. *J. Cell Biol.*, 99: 512-519, 1984.
- Tengblad, A., Laurent, U.B.G., Lilja, K., Cahill, R.N.P., Engstrom-Laurent, A., Fraser, J.R.E., Hansson, H.E., and Laurent, T.C.: Concentration and relative molecular mass of hyaluronate in lymph and blood. *Biochem. J.*, 236: 521-525, 1986.
- Tomida, M., Koyama, h., and Ono, T.: Hyaluronic acid synthetase in cultured mammalian cells producing hyaluronic acid. Oscillatory change during the growth phase and suppression by 5-bromodeoxyuridine. *Biochim. Biophys. Acta*, 338, 352-363, 1974.
- Tomida, M., Koyama, H., and Ono, T.: Induction of hyaluronic acid synthetase activity in rat fibroblasts by medium change of confluent cultures. *J. Cell. Physiol.*, 86: 121-130, 1975.
- Tomida, M., Koyama, H., and Ono, T.: Effect of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and serum on synthesis of hyaluronic acid in confluent rat fibroblasts. *Biochem. J.*, 162: 539-543, 1977a.
- Tomida, M., Koyama, H., and Ono, T.: Induction of hyaluronic acid synthetase activity in rat fibroblasts by medium change of confluent cultures. *J. Cell. Physiol.*, 91: 323-328, 1977b.
- Toole, B.P., and Trelstad, R.L.: Hyaluronate production and removal during corneal development in the chick. *Dev. Biol.*, 26: 28-35, 1971.
- Toole, B.P., Jackson, G., and Gross, J.: Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69: 1384-1386, 1972.
- Toole, B.P.: Hyaluronate and hyaluronidase in morphogenesis and differentiation. *Am. Zool.*, 13: 1061-1065, 1973.
- Toole, B.P., Biswas, C., and Gross, J.: Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76: 6299-6303,

- 1979.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gorclon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gelsto nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 4350-4354, 1979.
- Tsiganos, C.P., Vynios, D.H., and Kalpaxis, D.L.: Rooster comb hyaluronate-protein, a non-covalently linked complex. Biochem. J., 235: 117-123 1986.
- Turley, E.A.: Purification of a hyaluronate-binding protein fraction that modifies cell social behavior. Biochem. Biophys. Res. Commun., 108: 1016-1024, 1982.
- Turley, E.A., and Moore, D.: Hyaluronate binding proteins also bind to fibronectin, laminin and collagen. Biochem. Biophys. Res. Commun., 121: 808-814, 1984.
- Turley, E.A., and Tretiak, M.: Glycosaminoglycan production by murine melanoma variants in vivo and in vitro. Cancer Res., 45: 5098-5105 1985.
- Turley, E.A., Bowman, P., and Kytryk, M.A.: Effects of hyaluronate and hyaluronate binding proteins on cell motile and contact behaviour. J. Cell Sci., 78: 133-145, 1985.
- Turley, E.A., Moore, D., and Hayden, L.J.: Characterization of hyaluronate binding proteins isolated from 3T3 and Murine Sarcoma virus transformed 3T3 cells. Biochemistry, 26: 2997-3005, 1987.
- Ullrich, S.J., and Hawkes, S.P.: The effect of the tumor promotor, phorbol myristate acetate (PMA), on hyaluronic acid (HA) synthrsis by chicken embryo fibroblasts. Exp. Cell Res., 148: 377-386, 1983.
- Underhill, C.B., and Dorfman, A.: The role of hyaluronic acid in inter-cellular adhesion of cultured mouse cells. Exp. Cell Res., 117: 155-164, 1978.
- Underhill, C.B.: Naturally-occurring antibodies which bind hyaluronate Biochem. Biophys. Res. Commun., 108: 1488-1494, 1982.

- Underhill, C.B., and Toole, B.P.: Transformation-dependent loss of the hyaluronate-containing coats of cultured cells. *J. Cell. Physiol.*, 110: 123-128 1982.
- Underhill, C.B., Thurn, A.L., and Lacy, B.E.: Characterization and identification of the hyaluronate binding site from membranes of SV-3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 260, 8128-8133, 1985.
- Underhill, C.B., Tarone, G., and Kausg, A.T.: The hyaluronate-binding site from the plasma membrane is distinct from the binding protein present in brain. *Connect. Tissue Res.*, 16: 225-235, 1987.
- West, D.C., Hanpson, I.N., Arnold, F., and Kumar, S.: Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid.: *Science*, 228: 1324-1326, 1985.
- Yamagata, M., Yamada, K.M., Yoneda, M., Suzuki, S., and Kimata, K.: Chondroitin sulfate proteoglycan(PG-M-like proteoglycan) is involved in the binding of hyaluronic acid to cellular fibronectin. *J. Biol. Chem.*, 261: 13526-13535, 1986.
- Yamagata, M., Suzuki, S., Akiyama, S.K., Yamada, K.M., and Kimata, K.: Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans imobilized on extracellular substrates. submitted to *J. Biol. Chem.*, 1988.
- Yaron, M., Yaron, I., Smetana, O., Eylan, E., and Herzberg, M.: Hyaluronic acid produced by human synovial fibroblasts effect of polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) and interferon. *Arthritis Rheum.*, 19: 1315-1320, 1976.
- Yoneda, M., Yamagata, M., Suzuki, S., and Kimata, K.:Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture. *J. Cell Sci.*, 90: 265-273, 1988a.
- Yoneda, M., Shimizu, S., Nishi, Y., Yamagata, M., Suzuki, S., and Kimata, K.: Hyaluronic acid-dependent change in the extracellular matrix of mouse dermal fibroblasts that is conducive to cell proliferation. *J. Cell Sci.*, 90: 275-286, 1988b.

米田雅彦、木全弘治：グリコサミノグリカン（特集—細胞外マトリックス）、*生体の科学*、医学書院、39: 306-310, 1988.

Yuspa, S., and Harris, C.C.: Altered differentiation of mouse epidermal cells treated with retinyl acetate in vitro. *Exp. Cell Res.*, 86: 95-105, 1974.



## VI 要 旨

ヒアルロン酸はD-グルクロニル- $\beta$  (1-3) -N-アセチル-D-グルコサミニル- $\beta$  (1-4) 二糖単位の繰り返しより成る多糖である。その分子量は数千から数百万に及ぶ多分散性を示す。ヒアルロン酸が発見されて50年になりながらその生合成のメカニズムは未知の点が多い。ヒアルロン酸は細胞と細胞の間を埋めている細胞外マトリックスの主成分の一つであり、多量の水と結合して多孔性の水和ゲルをつくる。この性質にもとづいてヒアルロン酸の機能は強く外圧のかかる組織の構造物成分として圧縮や張力に対する緩衝体として働くとか、電解質をはじめいろいろな栄養物との弱い結合、離脱によって細胞の生理環境を整えるものと考えられてきた。一方、細胞増殖や細胞移動といった重要な生命現象に関わっているという多くの報告があるが、その作用機構は想像の域を出ていない。

本研究は、マウス真皮線維芽細胞の培養系を用いてヒアルロン酸が細胞増殖の制御に直接かかわることを確かめるとともに、その作用機構の一部を次のように明らかにした。すなわち、培地に添加したヒアルロン酸は細胞が造る細胞外マトリックスのコンドロイチン硫酸プロテオグリカンと結合して、細胞外マトリックスに取り込まれる。これが引金となって細胞外マトリックスの構築に変化が起こる。最初に観察されるのはヘパラン硫酸プロテオグリカンの減少であり、これにつづいてDNAの合成が開始される。さらにこの後に続いて起こる様々な細胞外マトリックスの変化により、ヒアルロン酸による細胞増殖の刺激は停止する。

一方、ヒアルロン酸生合成に関しては、他のグリコサミノグリカンのようにコアタンパク質をプライマーにして合成されるのか、それとも別のメカニズムによって合成されるのか定説はない。新しいメカニズムが提唱され、合成酵素も単離したという報告があるがどちらも生合成機構の全容を明らかにするものとはなっていない。本研究は生合成プライマーとしてのコアタンパク質の有無をはっきりさせることが生合成機構解明にとって重要であるという観点から始められた。しかし、マウス真皮線維芽細胞が生産するヒアルロン酸の構造解析はプロテオグリカンのコアタンパク質のような構造は存在しないことを示した。それに代わってヒアルロン酸と非共有結合で会合し、強いタンパク質変性剤や界面活性剤でも解離しない分子量85000のタンパク質(85kDaタンパク質と名付ける)が発見される

こととなった。[<sup>3</sup>H]ロイシン、[<sup>35</sup>S]メチオニンあるいは<sup>14</sup>C-アミノ酸混合物を用いる代謝標識実験はこのタンパク質は細胞自らが合成するものではなく、培地に含まれる牛胎児血清由来であるという意外な結果を導いた。このタンパク質は調べた限りヒアルロン酸以外のポリアニオン（例えばコンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デキストラン硫酸、DNAなど）とは結合せずリガンドに対する高い構造特異性を示した。85kDaタンパク質とヒアルロン酸との結合はヒアルロン酸由来の10糖によって阻害されるが8糖以下のものでは阻害されないことから、両者の結合反応には少なくとも10糖（繰り返し単位5つ）の構造単位が必要であることが明かとなった。85kDaタンパク質はオクチルセファロースと結合し、それを遊離するには界面活性剤を必要とする点から、このような疎水性により培地中の85kDaタンパク質は細胞膜に結合するものと推定される。事実85kDaタンパク質に対する抗血清を用いた免疫組織学的観察により、培養マウス真皮線維芽細胞などの表面周辺にこのタンパク質が集中分布していることが示された。したがってヒアルロン酸の細胞表面への結合をこのタンパク質が仲介している可能性が強い。興味深いことに、85kDaタンパク質を血清から除去すると細胞によるヒアルロン酸合成速度が低下する。85kDaタンパク質がヒアルロン酸合成をどのようにして調節するのは今後の興味ある研究課題である。また以上のことは細胞のヒアルロン酸合成が体中をめぐる血液によって制御されている可能性を示唆している。85kDaタンパク質を用いヒアルロン酸合成を増減させ細胞活性の変化を調べるという新しいヒアルロン酸生理機能の研究への道が開かれるかもしれない。

表1 グリコサミノグリカンの分類

GAG	二糖繰返単位		他の糖成分*1	硫酸基の位置*2		分子量 ( $\times 10^{-4}$ )
	A	B		A	B	
ヒアルロン酸	D-グルクロン酸	D-グルコサミン	0	結合していない		5~400
コンドロイチン硫酸	D-グルクロン酸	D-ガラクトサミン	D-ガラクトース D-キシロース	4-O 6-O		0.5~5
デルマトン硫酸	L-イズロン酸	D-ガラクトサミン	D-ガラクトース D-キシロース	2-O 4-O 6-O		1.5~5
ヘパラン硫酸	D-グルクロン酸と L-イズロン酸	D-グルコサミン	D-ガラクトース D-キシロース	2-O 2-N 6-O		1.5~7
ヘパリン	L-イズロン酸	D-グルコサミン	D-ガラクトース D-キシロース	2-O 2-N 6-O		0.5~2
ケラタン硫酸	D-ガラクトース	D-グルコサミン	D-ガラクトサミン D-マンノース L-フコース シアル酸	3-O 6-O		5~10

\*1 タンパク質との架橋部分の糖も含む。

\*2 硫酸基の位置は、構成糖 A, B のそれぞれの炭素の位置で主なるものだけを示す。

表2 人体の中のヒアルロン酸濃度

組織または体液	濃度 (mg/l)	文献
へそのお	4000	Meyer et al. 1977
滑液	1400-3600	Sundblad et al. 1965
ガラス体	140-350	Balazs 1965
真皮	200	Pearcer 1972
胸リンパ液	9-18	Tengblad et al. 1986
眼房水	1	Laurent 1983
羊水 16週	20	Dahl 1983
38週	1	
尿	0.1-0.5	Laurent et al. 1981
血清	0.01-0.1	Delpech et al. 1985
		Engstrom-L et al. 1985b

表3 ヒアルロン酸結合性タンパク質

組織および細胞	分子名	分子量 ( $\times 10^{-3}$ )	ヒアルロン酸結合性		文献
			最小結合 要求性 (個)	$K_D$ (nM)	
SV-3T3	レセプター	85	6	高分子 2 低分子 5	(1)
SV-3T3 および 3T3		56-70		10	(2)
鶏、線維芽細胞	HABP	60-63			(3)
血清	フィブリ ノーゲン	47, 55, 65	200	45	(4)
血清	IgM、 IgG	900 150			(5)
人、脳	ヒアルロ ネクチン	68			(6)
鶏、とさか		15-17			(7)
軟骨	リンク タンパク質	43-50	10		(8)
軟骨		60-75			(9)
鶏、線維芽細胞	PG-M	550	10		(10)
軟骨	PG-H	400	10	100	(11)

- (1) Underhill et al. 1985. (2) Turley et al. 1987. (3) Turley 1982.  
 (4) LoBoeut et al. 1986. (5) Underhill 1982. (6) Delpech et al. 1985.  
 (7) Tsiganos et al. 1986 (8) Oegema et al. 1977. (9) Roughley et al.  
 1985. (10) Kimata et al. 1987. (11) Hascall et al. 1974.

表4 細胞とヒアルロン酸の相互作用

細胞	相互作用の相手	文献
テラトカルシノーマ	合成酵素	Prehm 1984
滑膜細胞	被覆	Clarris & Fraser 1968
軟骨細胞、筋原細胞	被覆	Goldberg & Toole 1984
マクロファージ	摂取	Ahlgren & Jarstrand 1984
顆粒球	摂取	Hakansson et al. 1980
リンパ細胞	ヒアルロネクチン?	Chevrier et al. 1980
線維芽細胞	レセプター	Underhill et al. 1985
肝臓血管内皮細胞	レセプター	Smedsrod et al. 1984

表5 ヒアルロン酸合成活性に関する因子

因子	細胞	効果	文献
cAMP	線維芽細胞	↑	Koyama et al. 1975
増殖因子(PDGF, EGF)	皮膚線維芽細胞	↑	Lembach 1983
フォルボールエステル	線維芽細胞	↑	Ullrich & Hawkes 1983
癌細胞との接触	線維芽細胞	↑	Kundson et al. 1984
インシュリン	鶏、線維芽細胞	↑	Moscatelli & Rubin 1976
パラチノイド	骨、組織培養	↑	Severson et al. 1973
コルシトニン	牛胚、骨細胞	↑	Martin et al. 1969
エストロゲン	軟骨細胞	↓	Mason et al. 1984
テストステロン	鶏、とさか	↑	Szirmai 1966
グルココルチコイド	線維芽細胞	↓	Castor 1972
インターロイキン1	滑膜細胞	↑	Hamerman & Wood 1984
インターフェロン	線維芽細胞	↑	Yaron et al. 1976
リポポリサッカライド	線維芽細胞	↑	Buckingham & Castor 1972
アデノシン	線維芽細胞	↓	Fraser et al. 1979
ビタミンA	豚、上皮	↑	King 1984
モネンシン	ラット、肉腫	↓	Goldberg & Toole 1983
血清タンパク質	線維芽細胞	↑	Tomida et al. 1977b

表6 細胞増殖に影響を与えるヒアルロン酸の特異性。

添 加 物 <sup>1</sup>	細胞数 ( $\times 10^{-5}$ 個/皿) <sup>2</sup>
無添加	14.1 $\pm$ 0.4
高分子ヒアルロン酸 (鶏とさか)	17.9 $\pm$ 1.2
高分子ヒアルロン酸 (へそのお)	16.6 $\pm$ 0.7
ヒアルロニダーゼ分解物 <sup>3</sup>	14.4 $\pm$ 0.3
10糖ヒアルロン酸オリゴ	14.4 $\pm$ 0.4
10糖ヒアルロン酸オリゴ+高分子ヒアルロン酸	15.0 $\pm$ 0.4
8糖ヒアルロン酸オリゴ	14.2 $\pm$ 0.4
8糖ヒアルロン酸オリゴ+高分子ヒアルロン酸	17.1 $\pm$ 0.9

1. ヒアルロン酸(1mg/ml)とヒアルロン酸オリゴ(10mg/ml)は11日目の培養に添加された。
2. 細胞数は各種物質添加2日後に計数した。値は3つの培養皿の平均と標準誤差である。
3. 高分子ヒアルロン酸がヒアルロニダーゼで消化された後、煮沸して反応を止めた。コントロールとして酵素を煮沸して添加したが、何の影響もなかった。またヒアルロン酸を煮沸して添加したがこの場合にも影響はなかった。



表7 2M尿素中のヒアルロン酸結合活性とその特異性

添 加 物	結合活性 (d p m)	阻害率 (%)
無添加	232 ± 15	0
コンドロイチン	219 ± 14	5
10糖ヒアルロン酸オリゴ	29 ± 6	87
8糖ヒアルロン酸オリゴ	220 ± 14	5

2M尿素抽出物と<sup>3</sup>H-ヒアルロン酸(800dpm)を37℃で1時間反応させ形成される複合体の結合特異性を各試薬の添加で調べた。

表8 FM3A高転移性細胞株P-15AおよびマウスB16メラノーマの実験肺転移のヒアルロニダーゼ前処理の効果

FM3A P-15A

	Incidence	Median	Range
Control	15/20	5.5	1~20
Hyaluronidase	3/17	0.2	1

B16 melanoma

	Incidence	Median	Range
Control	2/4	5.8	3~20
Hyaluronidase	4/4	6.3	1~20

表9 FM3A高転移性細胞株P-15Aの実験肺転移への85Kタンパク質欠損の血清条件下での培養の影響

	Incidence	Median	Range
Control	4/4	22.5	2 ~ 50
-85K protein	4/4	8.0	6 ~ 15

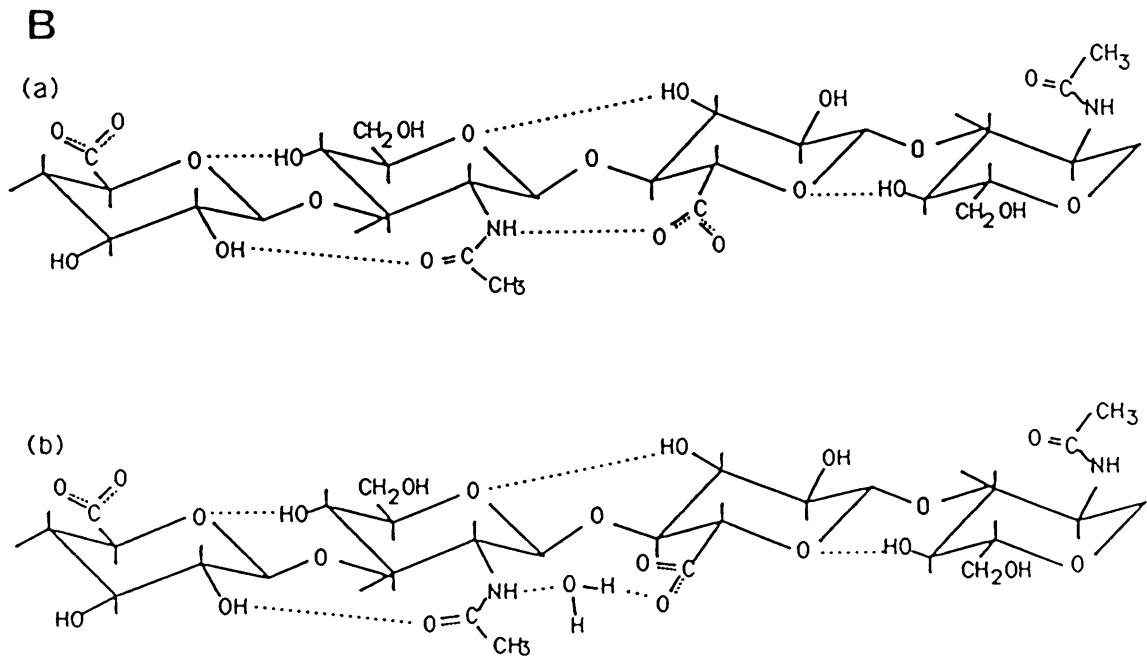
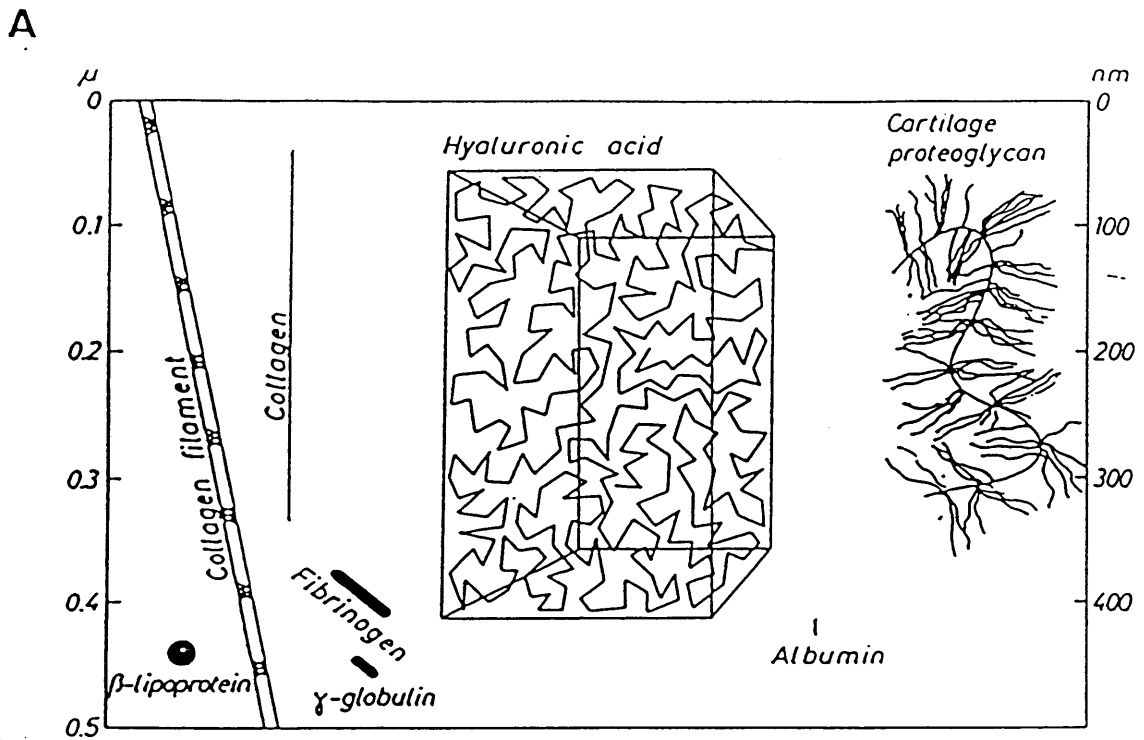


図1 ヒアルロン酸による水の保持。

A：ヒアルロン酸によって占められる容積を図式で示した。比較として他の高分子を合わせて載せた。

B：ヒアルロン酸への水の取り込み方の一つの例を示した。(a)はジメチルスルフォキサイド中でのヒアルロン酸の二次構造示した。(b)は水-ジメチルスルフォキサイド混合液中でのヒアルロン酸の二次構造を示す。

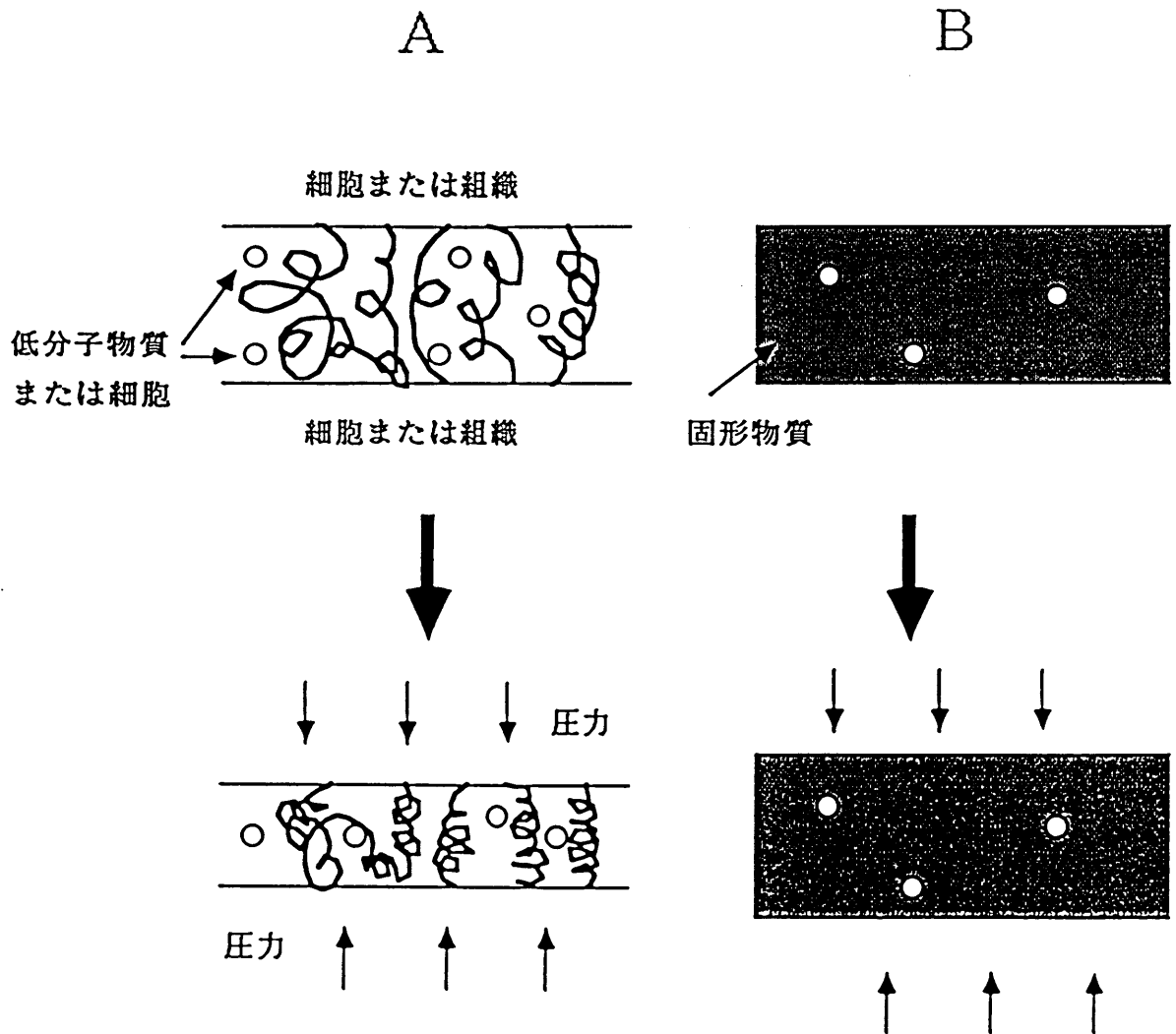


図2 ヒアルロン酸の物性に起因する機能を模式的に示した。

Aは細胞または組織の間にヒアルロン酸が含まれているとき、そしてBはタンパク質だけで満たされている時を簡略化して示した。ヒアルロン酸の場合には低分子物質や細胞が自由に動ける状況にあるが、Bではそれが無理と思われる。また、組織圧が加わってもAの場合に対応できることを示し、圧迫されても低分子物質や細胞が動ける状態にある。

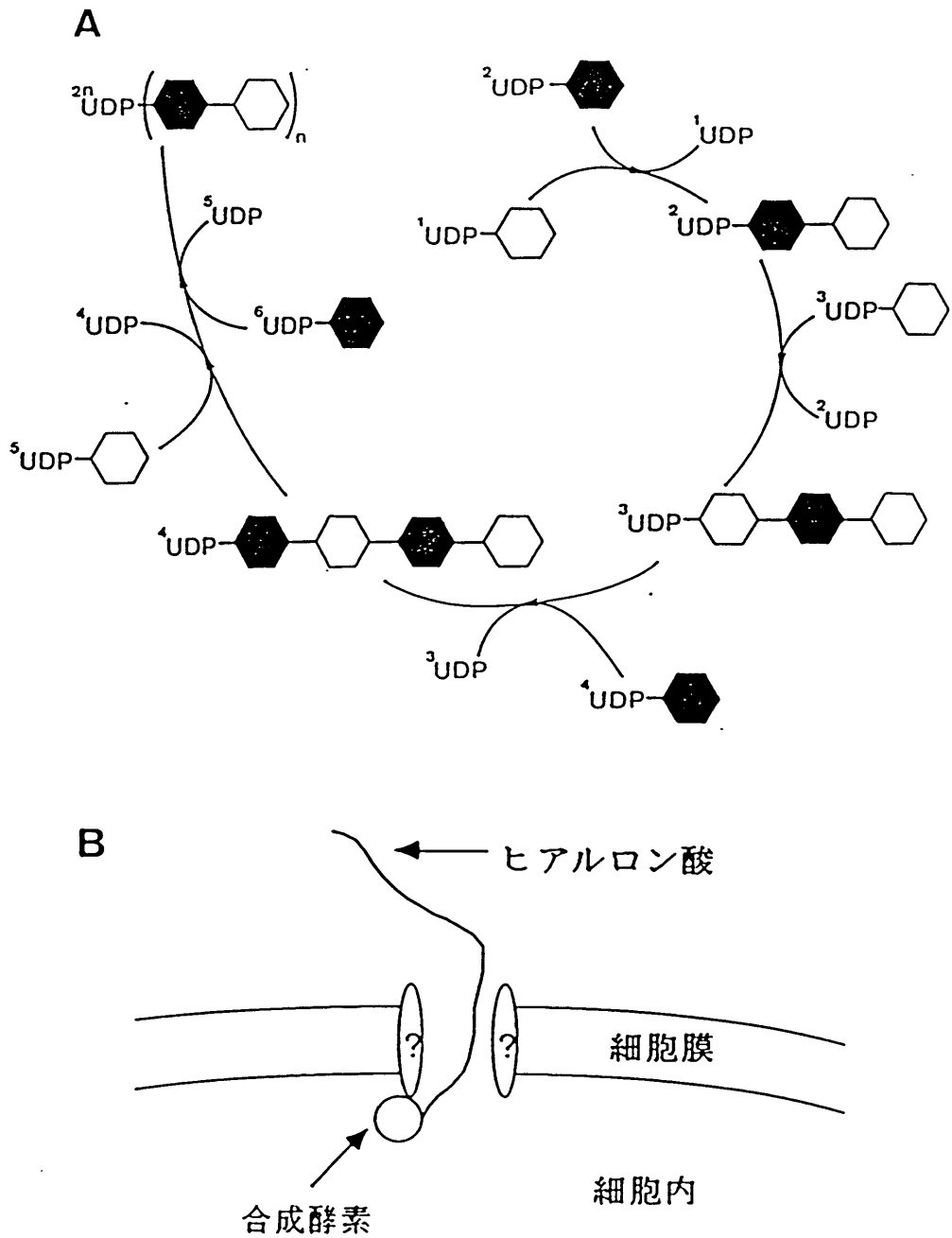


図3 Prehmによって提唱されたヒアルロン酸合成機構。

A：ヒアルロン酸鎖の合成はUDP-ヒアルロン酸にUDP-グルコサミンとUDP-グルクロン酸がUDP-ヒアルロン酸のUDPを遊離して結合して延びる。

B：ヒアルロン酸は細胞膜の内側で合成され、そのまま細胞外に穴を通して出ていく。合成酵素は分子量53000のタンパク質と報告されている。？のタンパク質が合成酵素である可能性もあるが、実体はわからない。

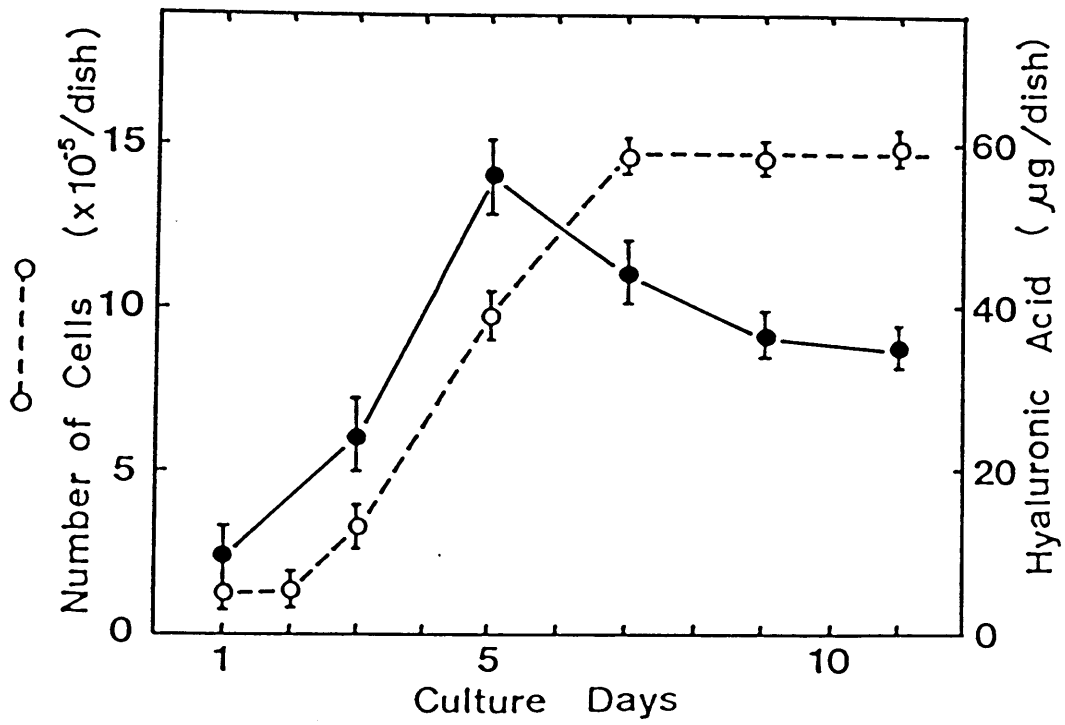


図4 マウス真皮線維芽細胞の増殖と細胞層のヒアルロン酸含量の変化。  
 ○----○は細胞数を示し、●----●は細胞層ヒアルロン酸量を示した。

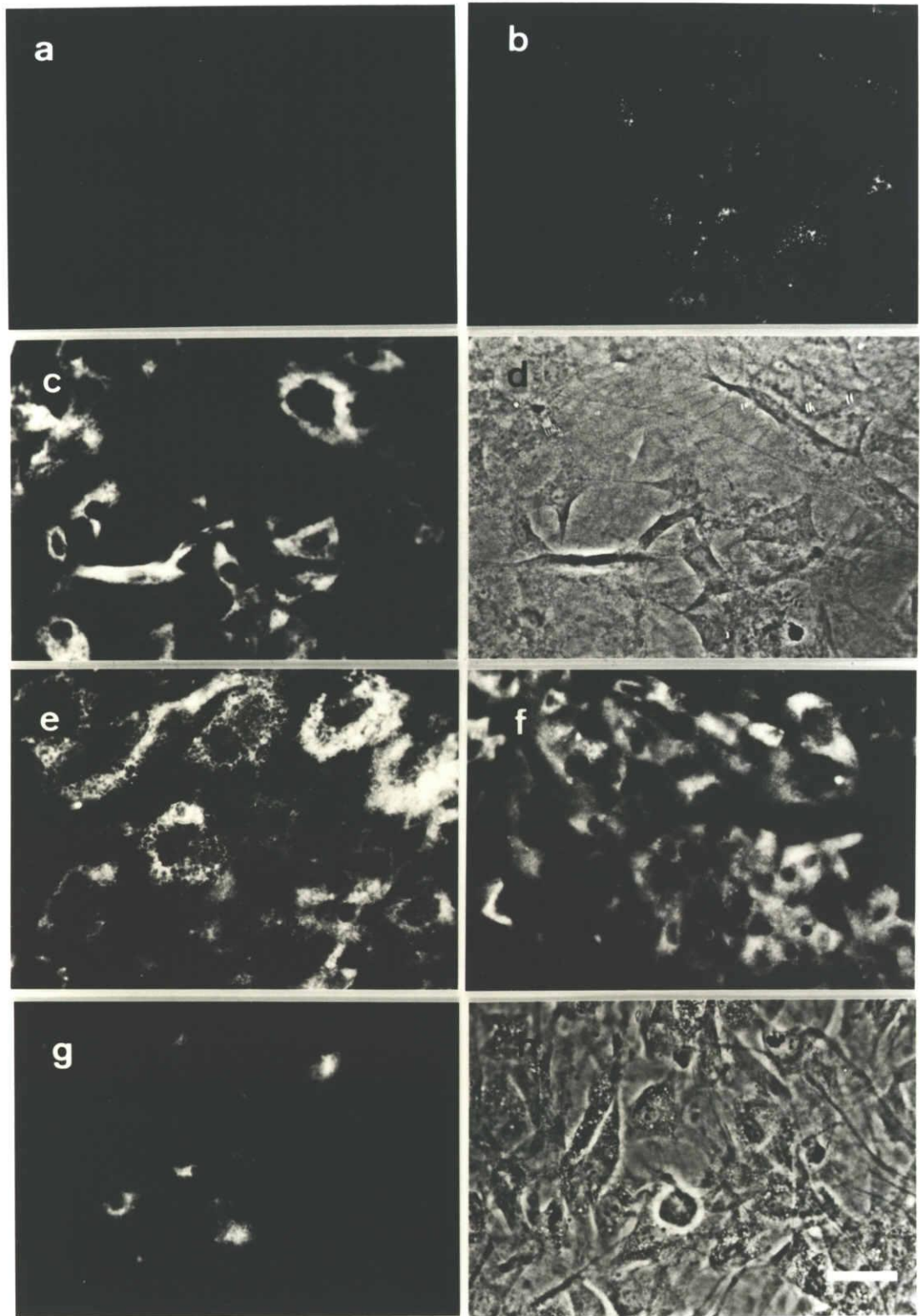


図5 培養マウス真皮線維芽細胞の細胞外マトリックスへのFITCラベルヒアルロン酸の取り込み。

5日目の培養に600ug/mlのFITCラベルヒアルロン酸を加えた。a、b、c、eそしてfは5min、3h、24h、48hそして72h経過した時の像である。gはcを1mg/mlのヒアルロニダーゼで処理したものである。d、hはc、eそれぞれの位相差像を示す。hの右下のバーは100umの長さを示す。



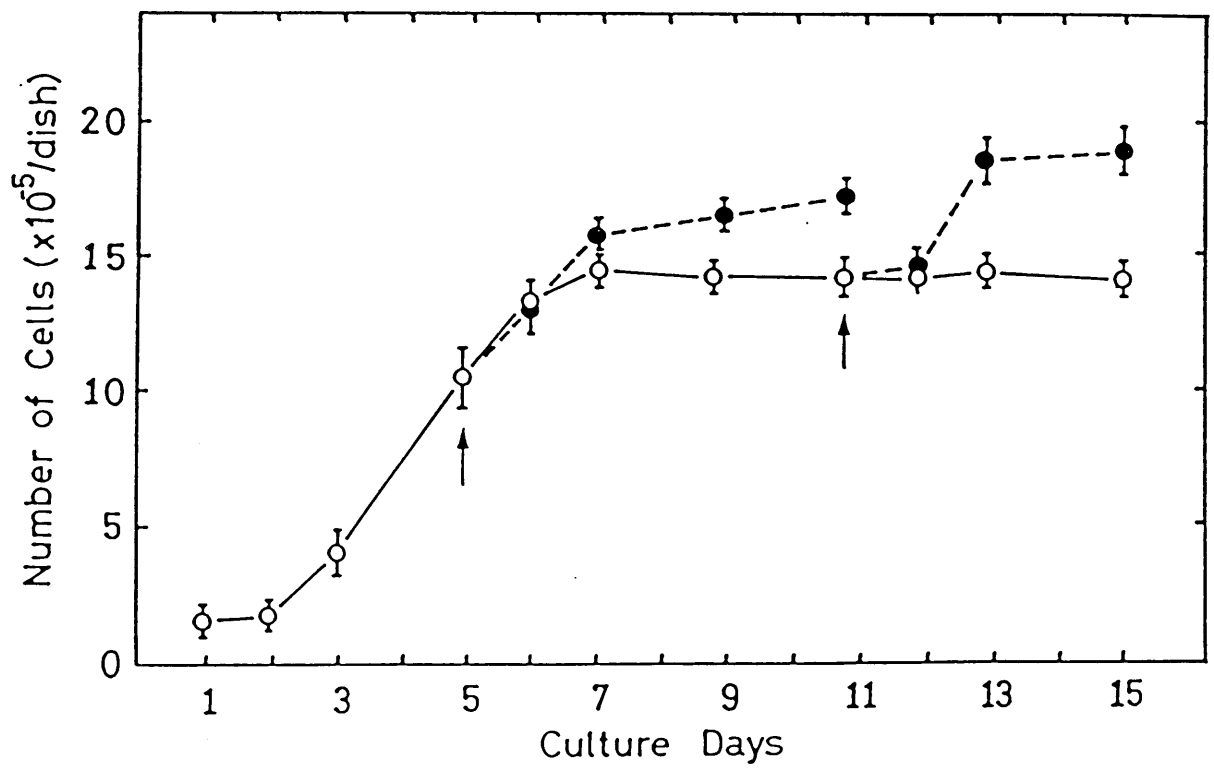


図6 培養に添加したヒアルロン酸の増殖に対する影響。

5日目または11日目に0.6mg/ml濃度のヒアルロン酸を添加した (●—●)。

○—○は無添加を示す。

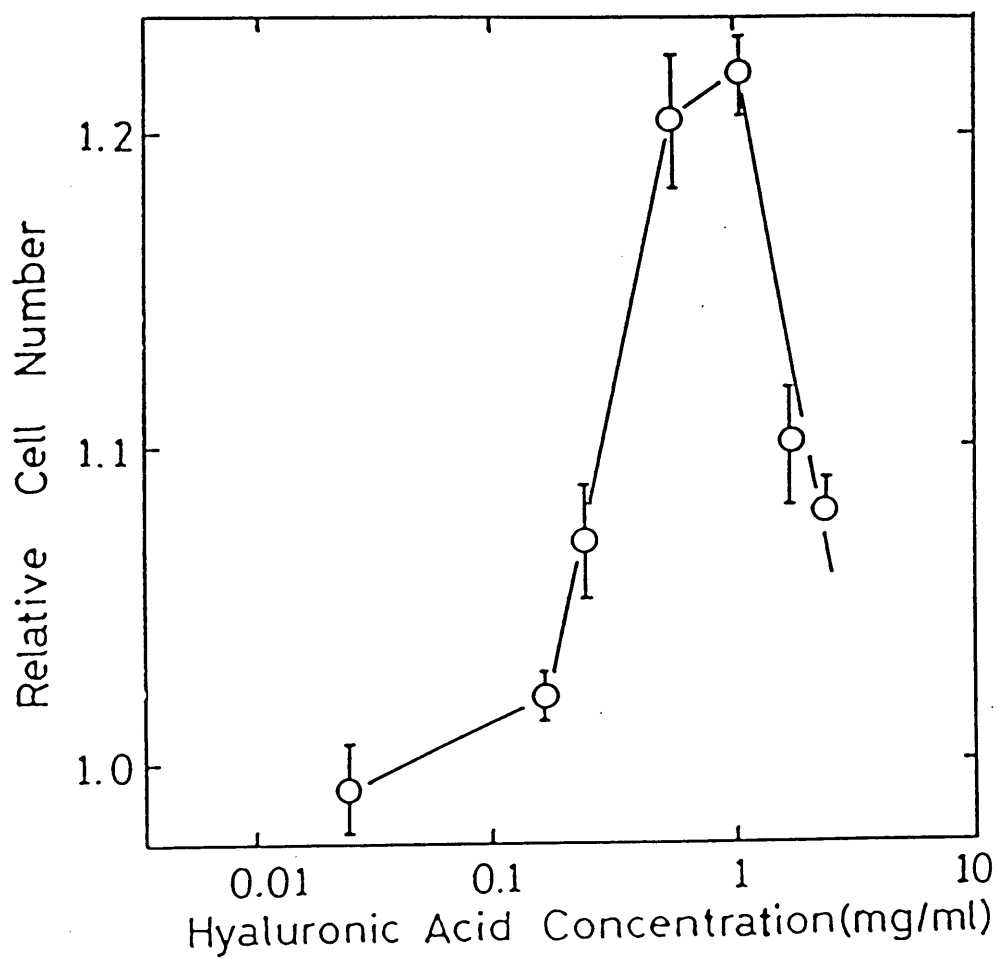


図7 安定期にある細胞に対するヒアルロン酸濃度での増殖に与える違い。  
 図5で示した11目の状態を用いた。細胞数はヒアルロン酸添加4日後の15日目に測定した。縦軸の表示は無添加に対する添加したものの割合で示した。

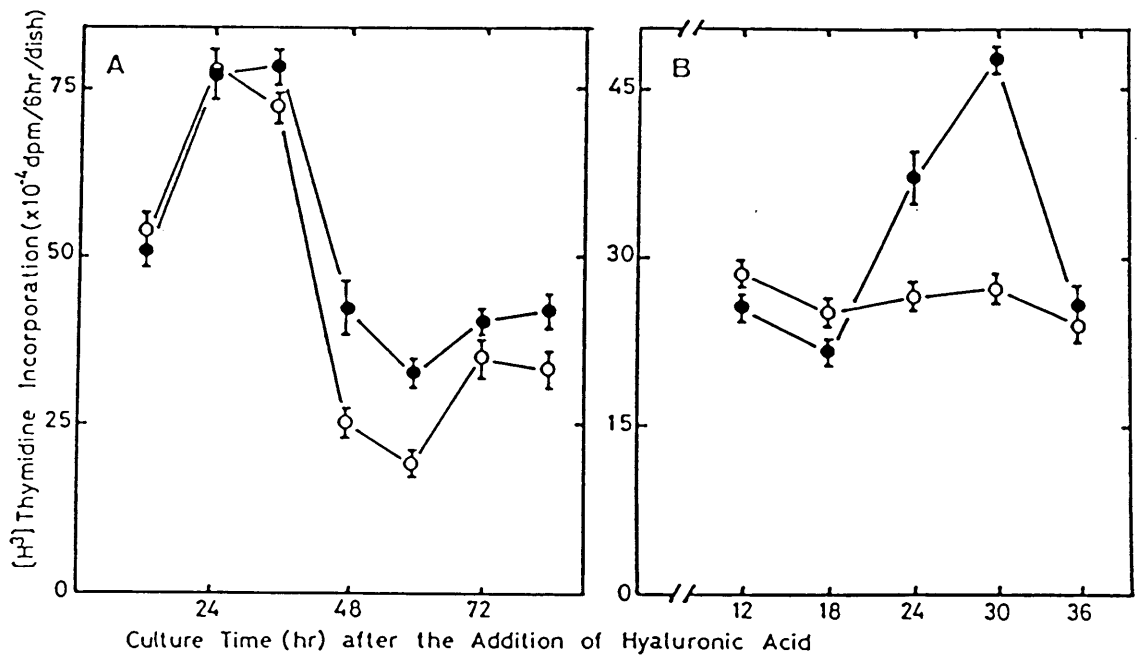


図8 ヒアルロン酸によるDNA合成活性の上昇。

DNA合成活性は $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みで調べた。Aは増殖期後期の5日目に1mg/mlのヒアルロン酸を添加した時(●—●)を示し、Bは安定期の11日目に同濃度のヒアルロン酸を添加した(●—●)場合を示す。ラベルは横軸に示したヒアルロン酸添加からの経過時間時に、6時間で行なった。縦軸は6時間で培養皿あたりに取り込まれた $^3\text{H}$ 放射活性で示してある。A、Bの○—○は無添加のコントロールを示した。

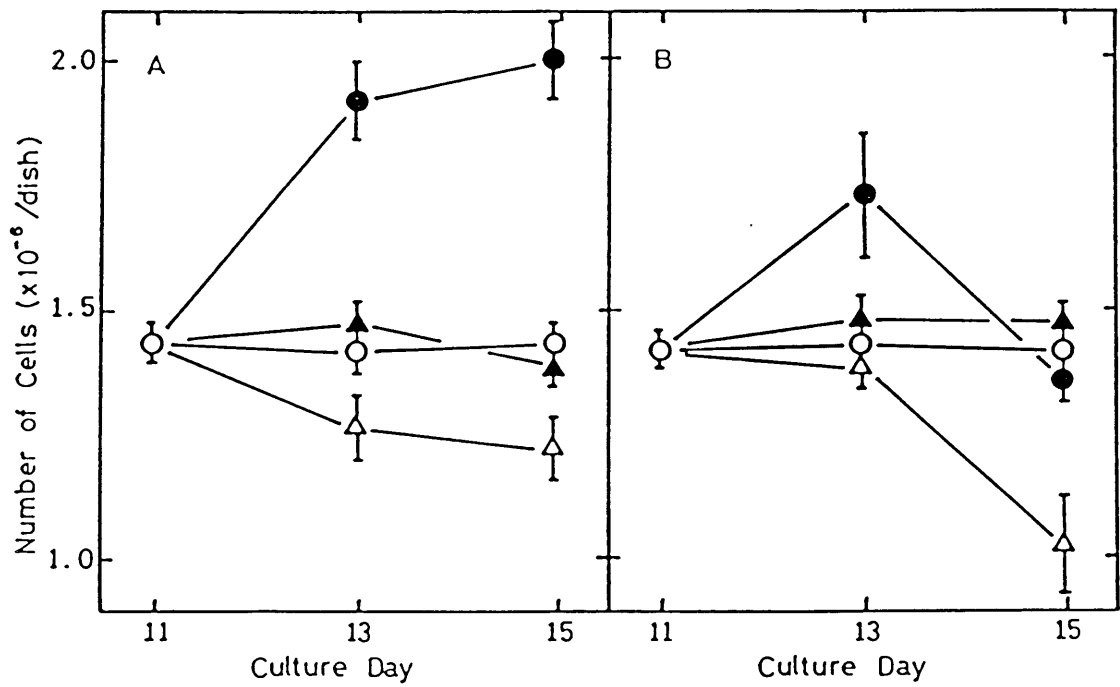


図9 各種グリコサミノグリカンの細胞増殖に与える影響。

安定期の11日目の培養に各種GAGを1mg/mlの濃度で添加して、増殖に対する影響を調べた。GAGは2日後の培地交換の時新しい培養液とともに添加された。

A：○——○無添加、●——●ヒアルロン酸、▲——▲、コンドロイチン、  
△——△、コンドロイチン硫酸。

B：○——○無添加、●——●デルマトン硫酸、▲——▲ヘパラン硫酸、  
△——△、ヘパリン。

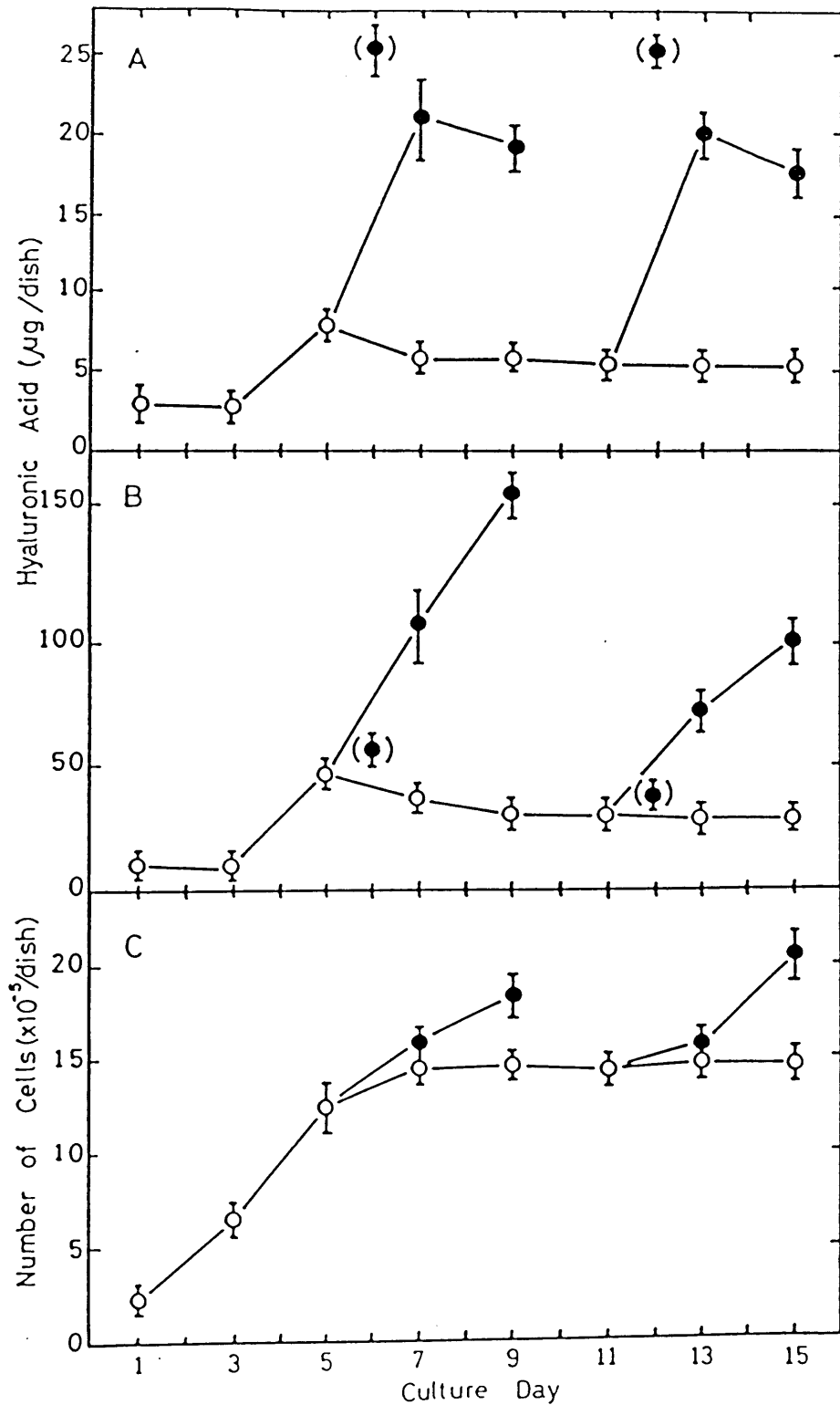


図10 増殖後期と安定期でのdbcAMPの細胞増殖およびヒアルロン酸合成に与える影響。

5日目、11日目の培養に1mM濃度のdbcAMPが添加された。dbcAMPは培地の交換毎に添加された。Aは細胞層のヒアルロン酸量を、Bは培養液中のヒアルロン酸量を示す。そしてCには細胞数を示した。●——●が処理した場合で○——○が無添加のコントロールを示す。A、Bに示した(●)は処理1日目のヒアルロン酸量をあらわしている。

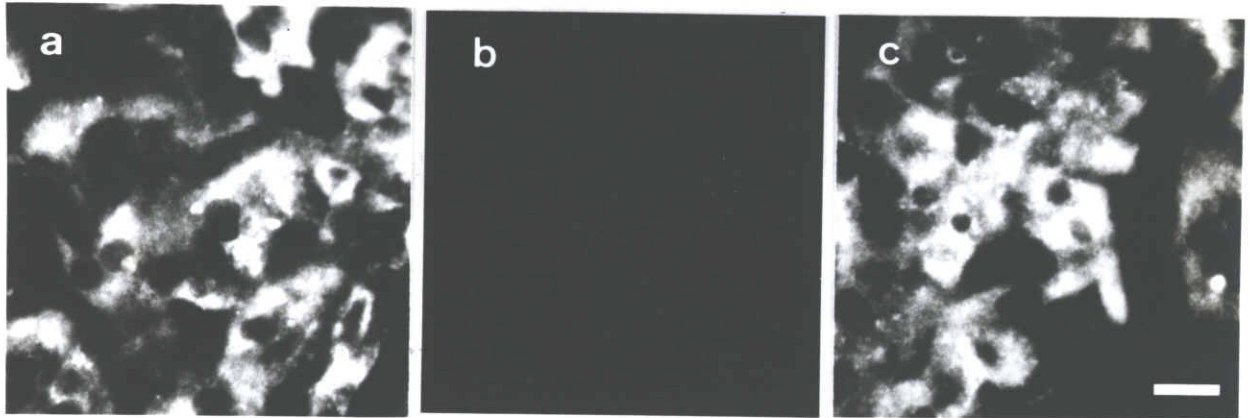


図11 細胞外マトリックスへのヒアルロン酸の取り込みに必要な糖の数。  
FITCラベルヒアルロン酸の取り込みの時にヒアルロン酸オリゴを加えて阻害するかそうかで調べた。5日目の培養を用い、aはFITCラベルヒアルロン酸を24時間加えた場合、bは10糖のヒアルロン酸オリゴを3mg/mlの濃度でFITCラベルヒアルロン酸と一緒に加えた場合、cは8糖のヒアルロン酸オリゴを10糖の代わりに加えた場合である。cの右下のバーは100umの長さをあらわす。

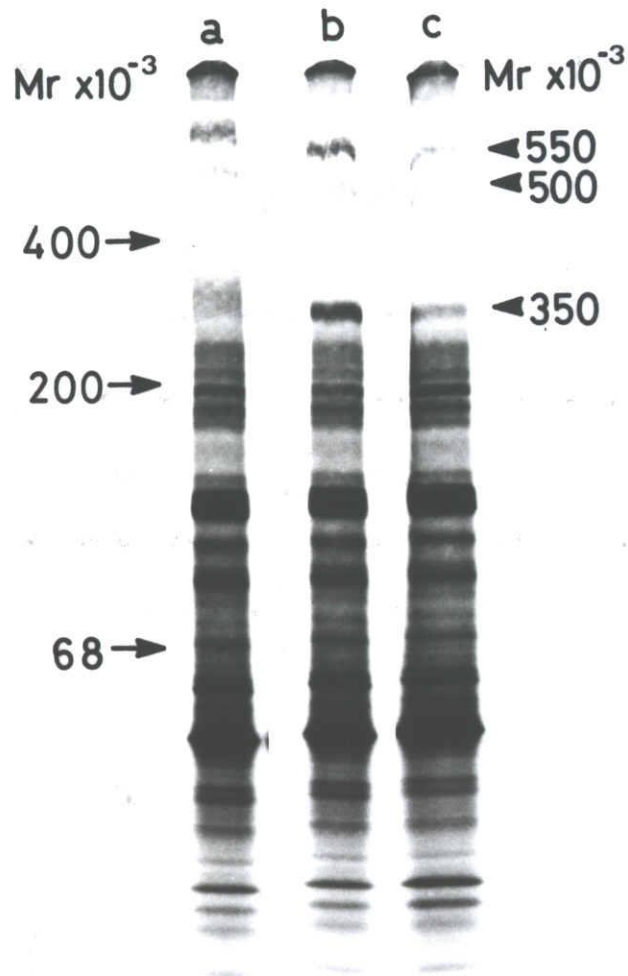


図12 細胞層のヒアルロン酸結合分子の実体。

ヒアルロン酸-プロテオグリカン複合体 (A1) と同じ画分に含まれる<sup>35</sup>Sメチオニンラベル分子のフルオログラフィーを示した。lane a: 2M尿素抽出物とA1を反応させ、遠心後低部に沈むもの、lane b: aをコンドロイチナーゼAC-IIで消化した場合、lane cは2M尿素抽出物だけを同条件で遠心してコンドロイチナーゼ処理したものである。スタンダードの分子量マーカーはラミニン(400000、200000)と牛血清アルブミン(68000)を用いた。

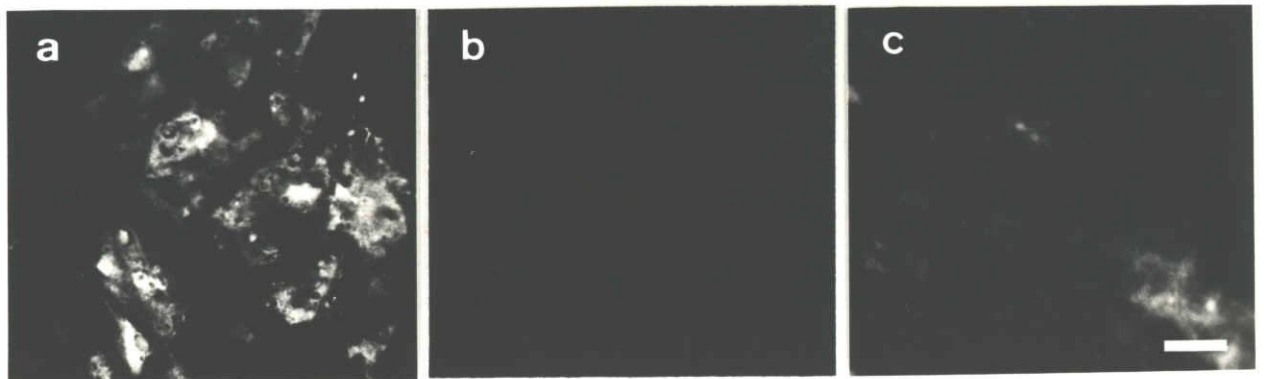


図13 ヒアルロン酸添加やdbcAMP処理した培養細胞のヒアルロン酸取り込みの能力。  
5日目の細胞にヒアルロン酸(1mg/ml)とdbcAMP(1mM)が添加され2日間培養された。そしてFITCラベルヒアルロン酸を加え、さらに2日間培養した。bはヒアルロン酸処理したもの、aはコントロールとして7日目の無添加の細胞にFITCラベルヒアルロン酸を加えたものである。cの右下に示したバーは100umの長さをあらわす。



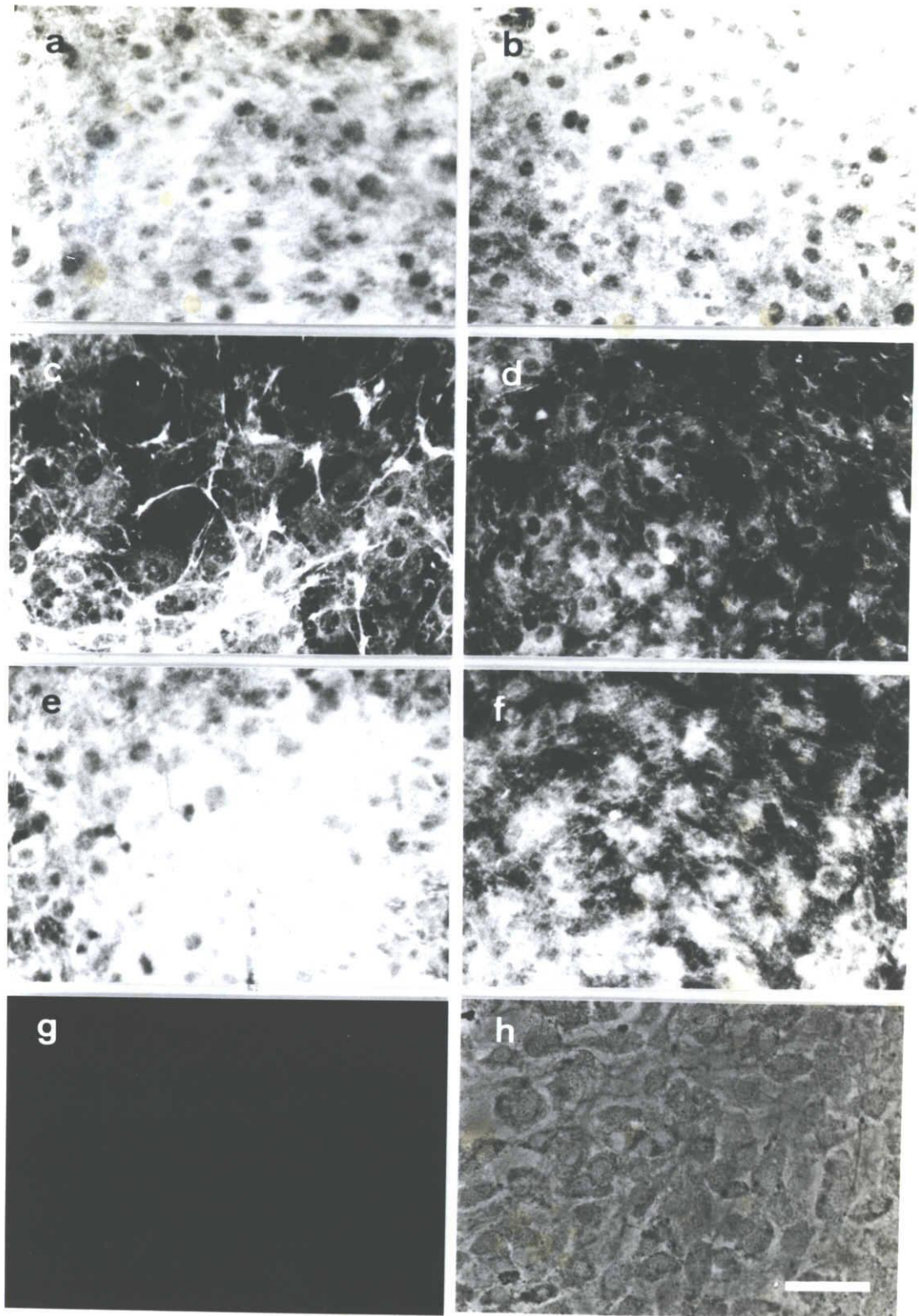


図14 ヒアルロン酸添加およびdbcAMP処理後のヘパラン硫酸プロテオグリカンの変化。

抗ヘパラン硫酸プロテオグリカン抗体を用いて調べた。5日目の細胞を用い、a、bは無添加、c、dは1mg/mlヒアルロン酸処理、e、fは1mMdbcAMP処理したものである。a、c、eは12時間後を、b、d、fは48時間後の像である。gは免疫していない血清を用いたコントロールで、hはfの位相差像である。hの右下のバーは50umの長さをあらわす。

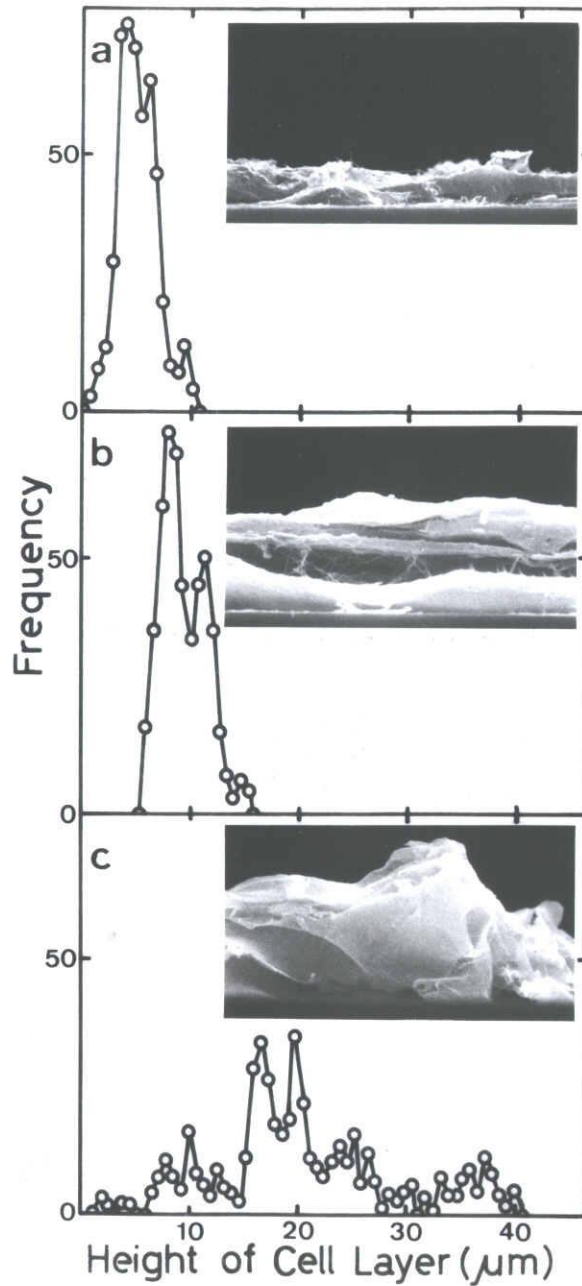


図15 ヒアルロン酸添加およびdbcAMPによる細胞層の変化。

5日目の培養に1mg/mlのヒアルロン酸を (b)、1mMdbcAMP (c) を添加し4日後の細胞層を用いた。(a)は無添加のコントロールである。挿入した写真は縦割の走査型電子顕微鏡像であり、測定に用いたものの一部である。細胞層の厚みは20枚の写真の500所で測定した結果をまとめた。cの写真に示したバーは5umの長さであらわす。

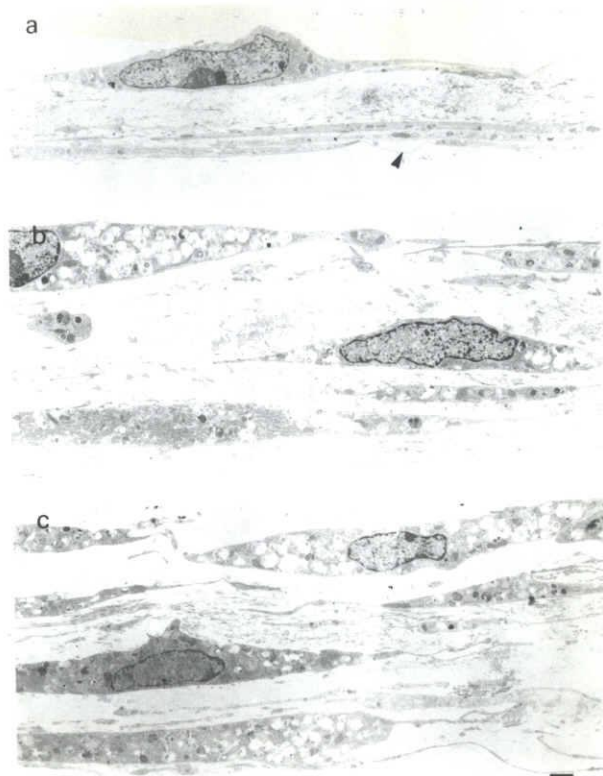


図16 細胞層の縦割の透過型電子顕微鏡像。

5日目の培養に1mg/mlのヒアルロン酸を(b)、1mMdbcAMP(c)を添加し4日後の細胞層を用いた。(a)は無添加のコントロールである。写真の下が細胞層の下になるように配列してある。cに示したバーは1 $\mu$ mの長さをあらわす。

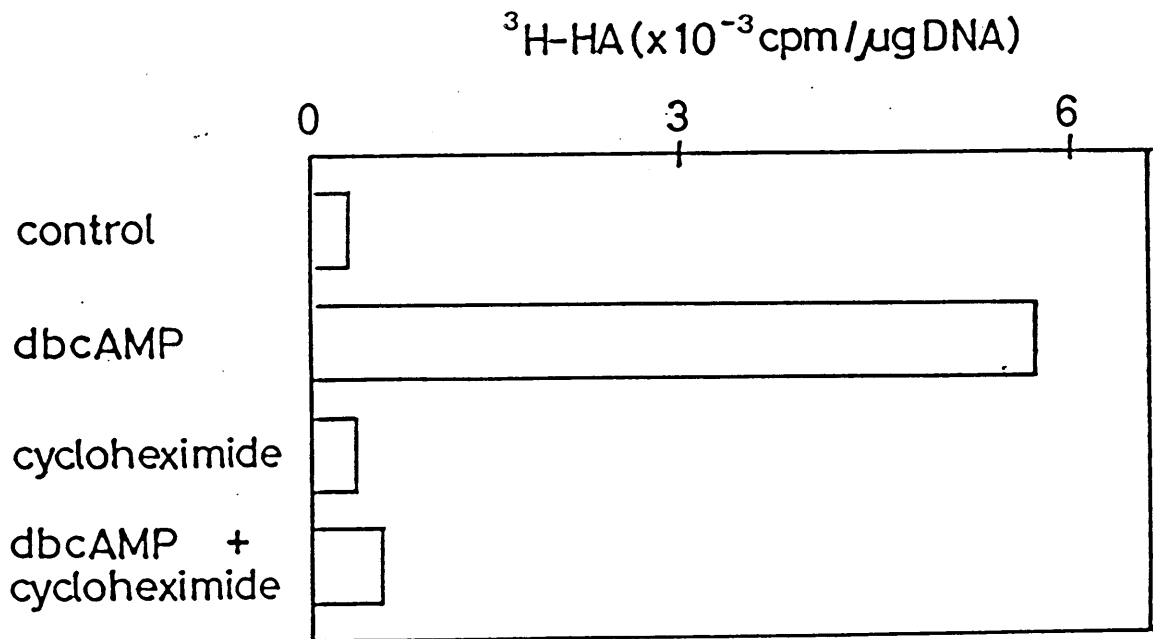


図17 ヒアルロン酸合成活性に対するdbcAMPとシクロヘキシミドの効果。  
 5日目の培養に1mMdbcAMP、0.5mMシクロヘキシミドまたは両方を添加した。それと  
 同時に $^3\text{H}$ -グルコサミンでヒアルロン酸合成活性を調べた。データは細胞層と培養  
 液を調べたがほぼ同じデータでありここでは細胞層のものを示した。

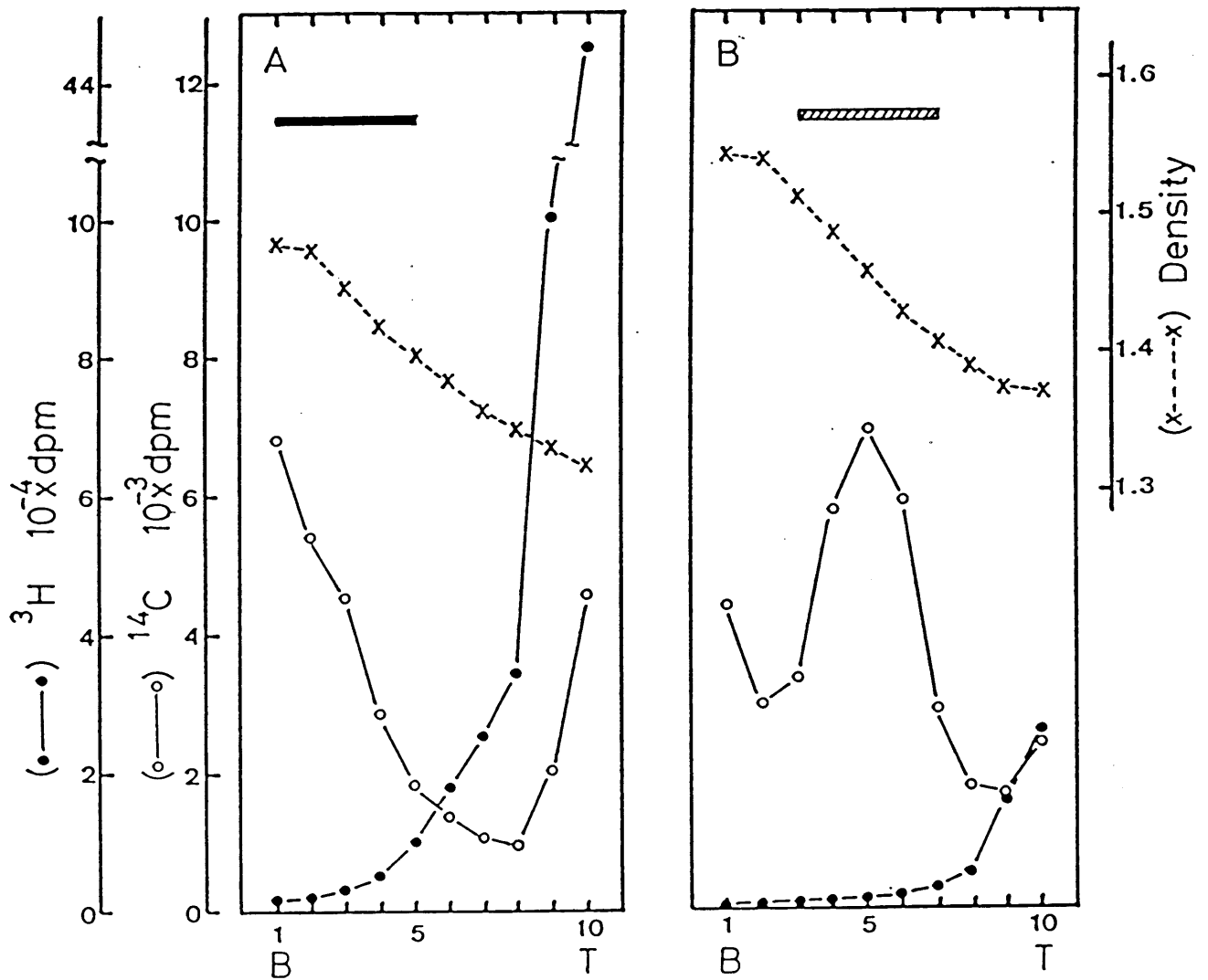


図18 マウス線維芽細胞の細胞層からの抽出物のCsCl密度勾配遠心。

(A) は1回目 ( $\rho_0 = 1.40$  g/ml)、(B) は2回目 ( $\rho_0 = 1.45$  g/ml)の結果である。○---○は $^{14}\text{C}$ -グルコサミン放射活性を、●---●は $^3\text{H}$ -ロイシンの放射活性を示す。×---×は密度をあらわす。(A) のバーの部分で2回目の遠心 (B) に用いた。(B) のバーは次の精製のためにプールした。

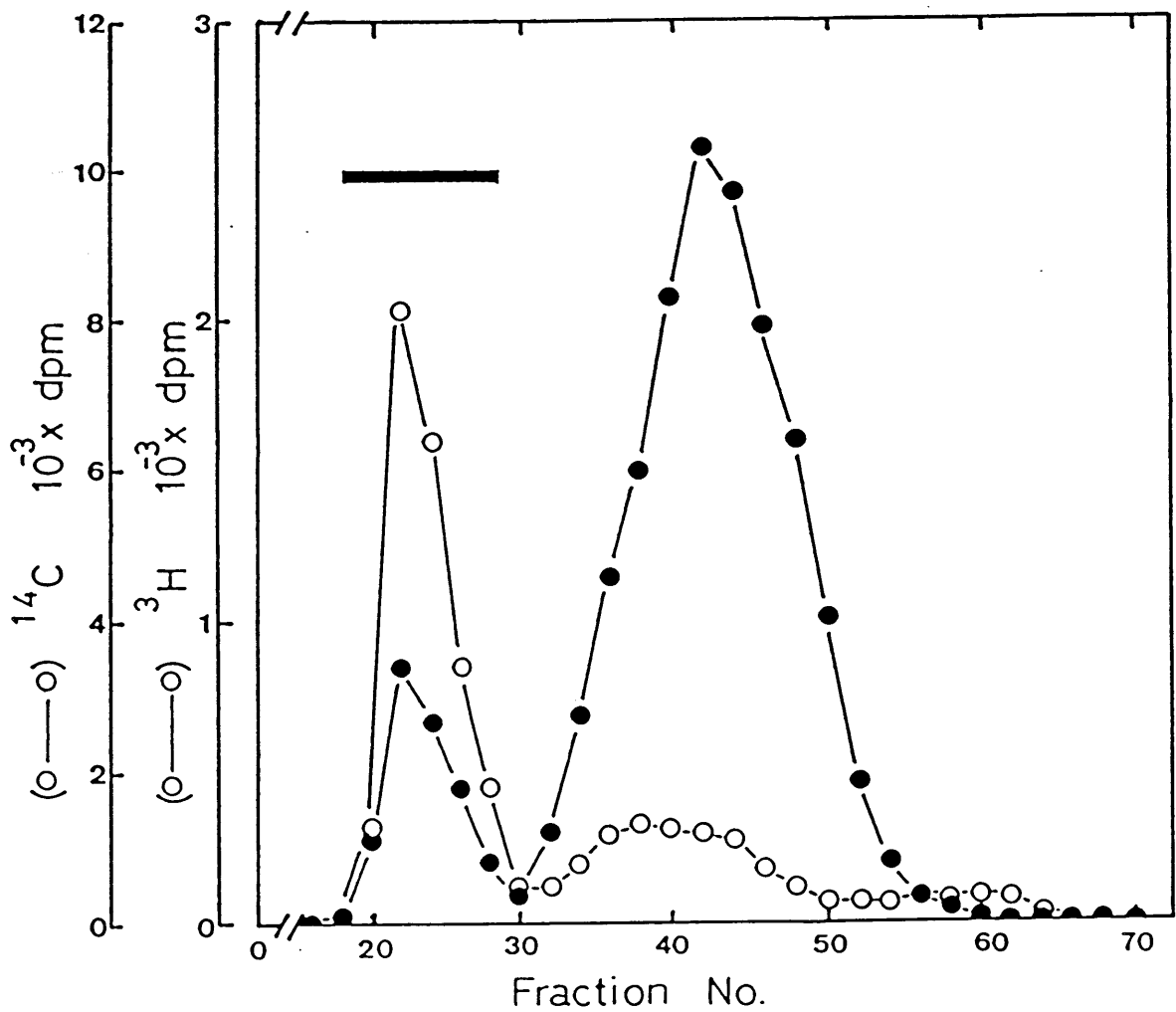


図19 CsClで集めたヒアルロン酸画分のSepharose CL-2Bカラムクロマトグラフィー。

図18 (B) の画分に含まれる核酸を分解酵素で処理し、分子ふるいクロマトグラフィーを行なった。溶出液はグアニジン塩酸抽出液を用いた。○——○は $^{14}\text{C}$ -グルコサミン放射活性を、●——●は $^3\text{H}$ -ロイシンの放射活性を示した。バーの部分でヒアルロン酸画分として回収した。

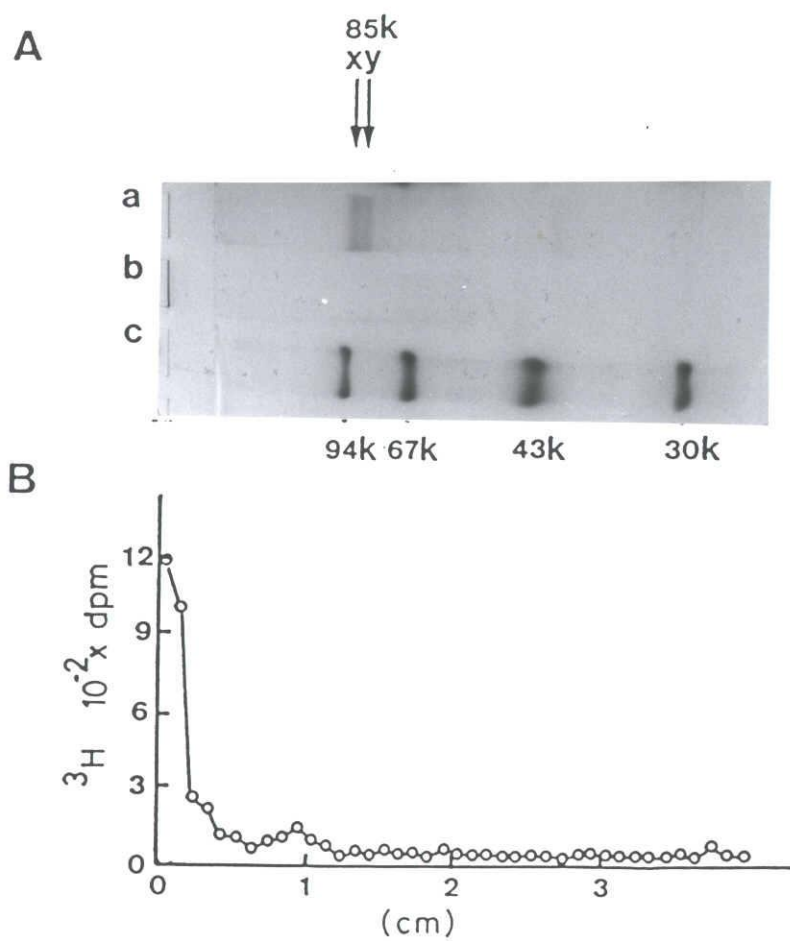


図20 マウス真皮線維芽細胞のヒアルロン酸に結合しているタンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析。

A：精製ヒアルロン酸画分をヒアルロニダーゼ消化(lane a)し、消化前(lane b)とならべて電気泳動した。クマシー染色によりタンパク質バンドを検出した。

lane cは分子量マーカーである。

B：Aのlane aの部分のスライスして $^3\text{H}$ -ロイシンの放射活性を測定した。

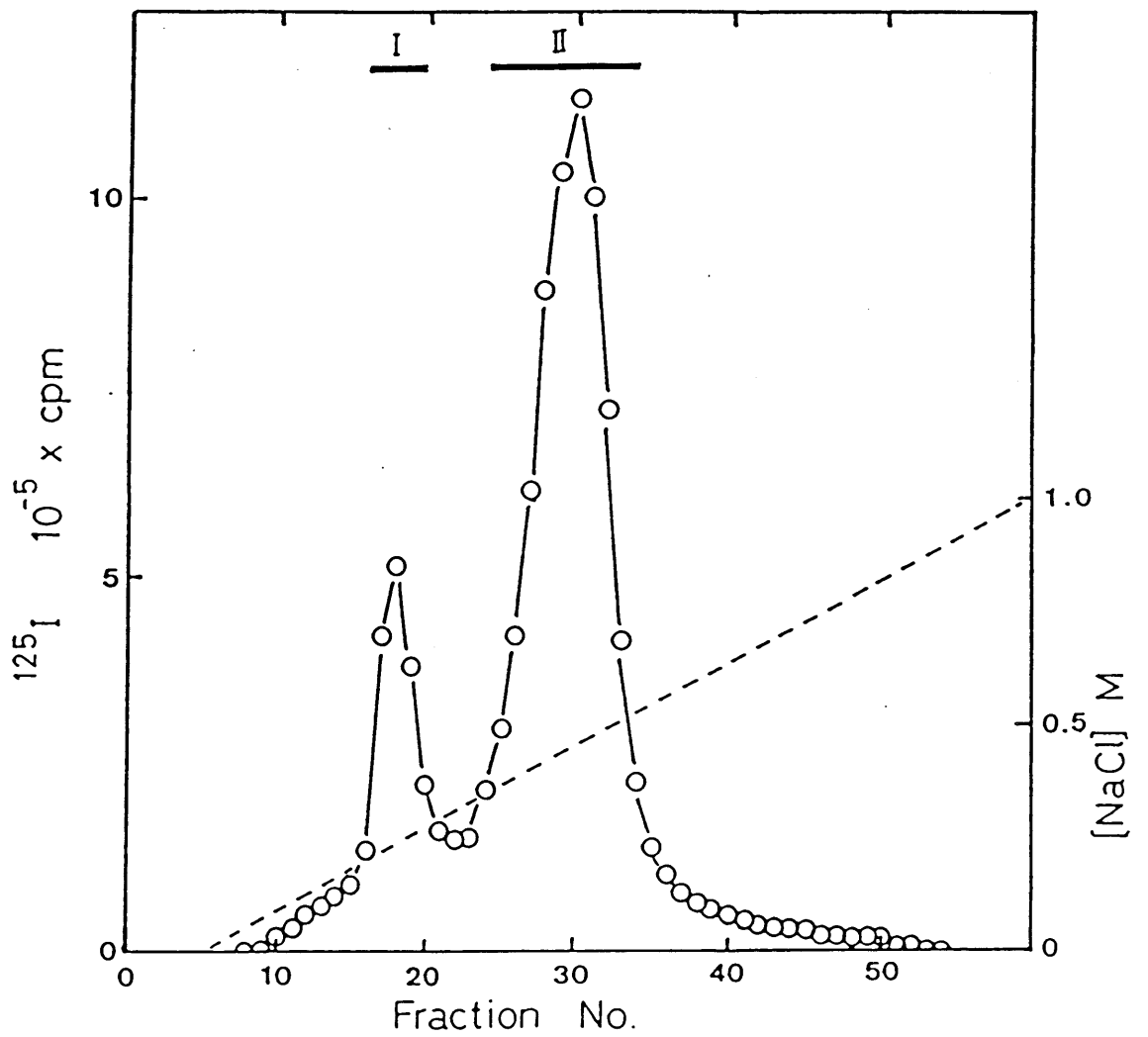


図2-1  $^{125}\text{I}$ ラベルしたヒアルロン酸画分のDEAE-Sepharoseクロマトグラフィー。  
 図19で得られたヒアルロン酸画分をクロラミンT法でヨードラベルして用いた。  
 各ピークを回収した。



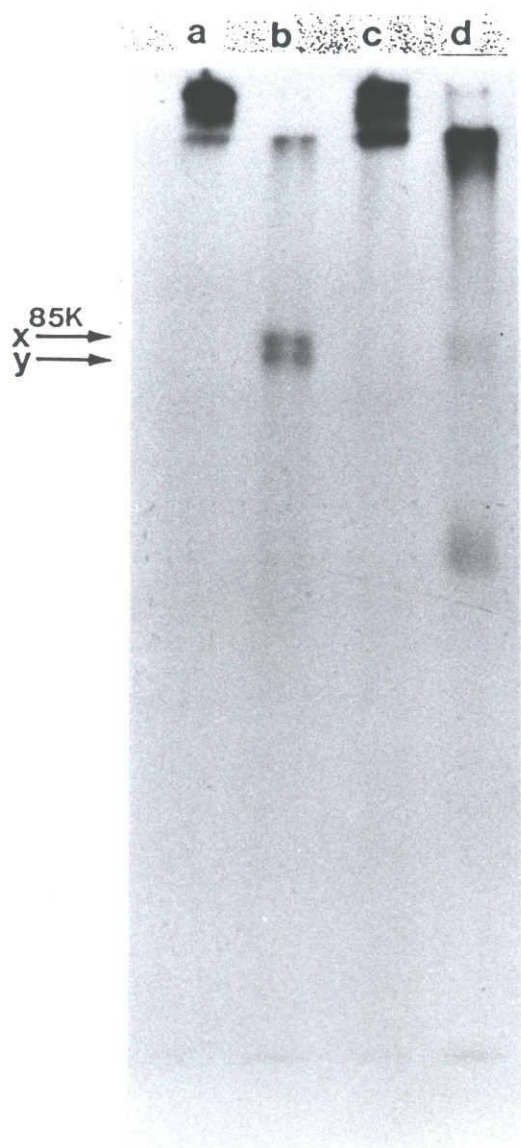


図22 陰イオン交換クロマトグラフィーの各ピークの分析。  
 図21の各ピークの一部をSDS-PAGEに流してオートラジオグラフィーにしたものである。lane a: ピーク I、lane B: ピーク I のヒアルロニダーゼ消化物、lane c : ピーク II、lane d: ピーク II のヒアルロニダーゼ消化物

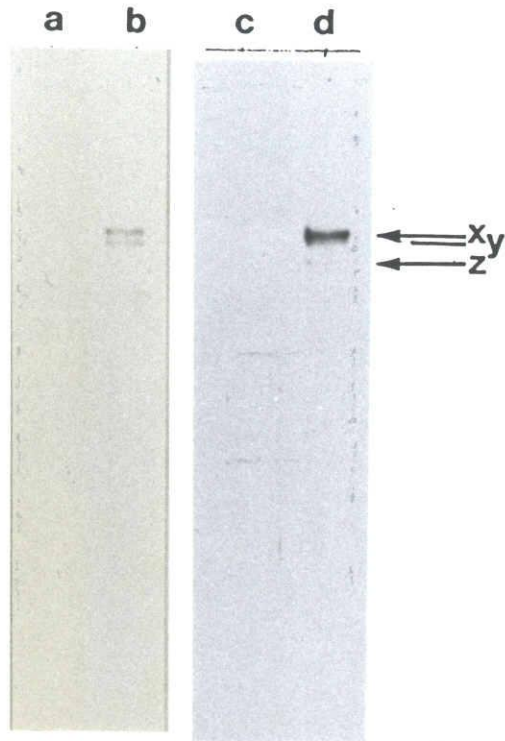


図 2 3 血清成分からの85kDaタンパク質の検出。

抗85kDaタンパク質抗体によるウエスタンブローディングで調べた。lane a: 図19で得られたヒアルロン酸画分をそのまま流した、lane b: それをヒアルロニダーゼ消化したもの。lane c: 血清から得られたヒアルロン酸画分をそのまま流した、lane d: それをヒアルロニダーゼ処理した。



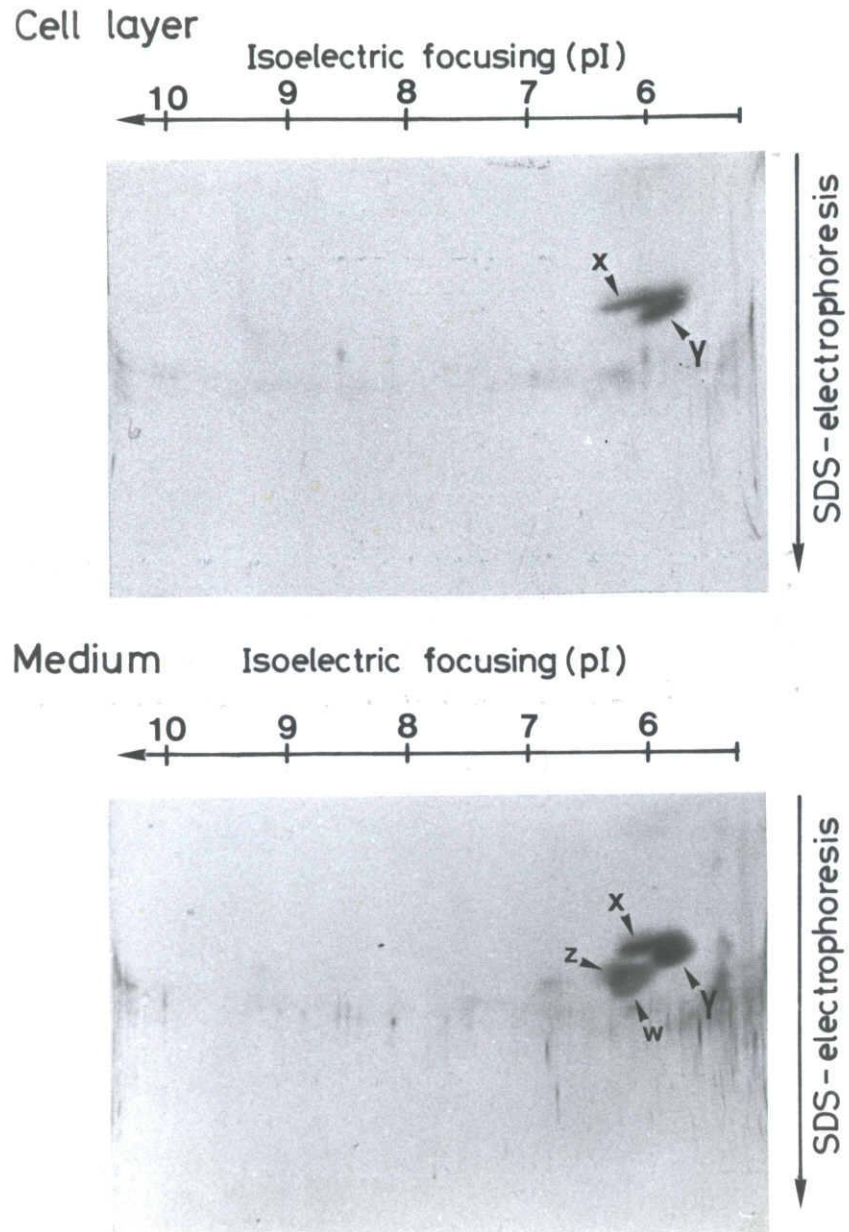


図25 細胞層および培養液から精製したヒアルロン酸に結合している85kDaタンパク質の組成の違い。

一時元目に等電点電気泳動を行い、二次元目にSDS-PAGEを行なった。試料はヒアルロン酸にして20ugを用いた。タンパク質の検出にはウエスタンブローディングを用いた。試料はヒアルロニダーゼ消化しヒアルロン酸を分解したのものを用いた。

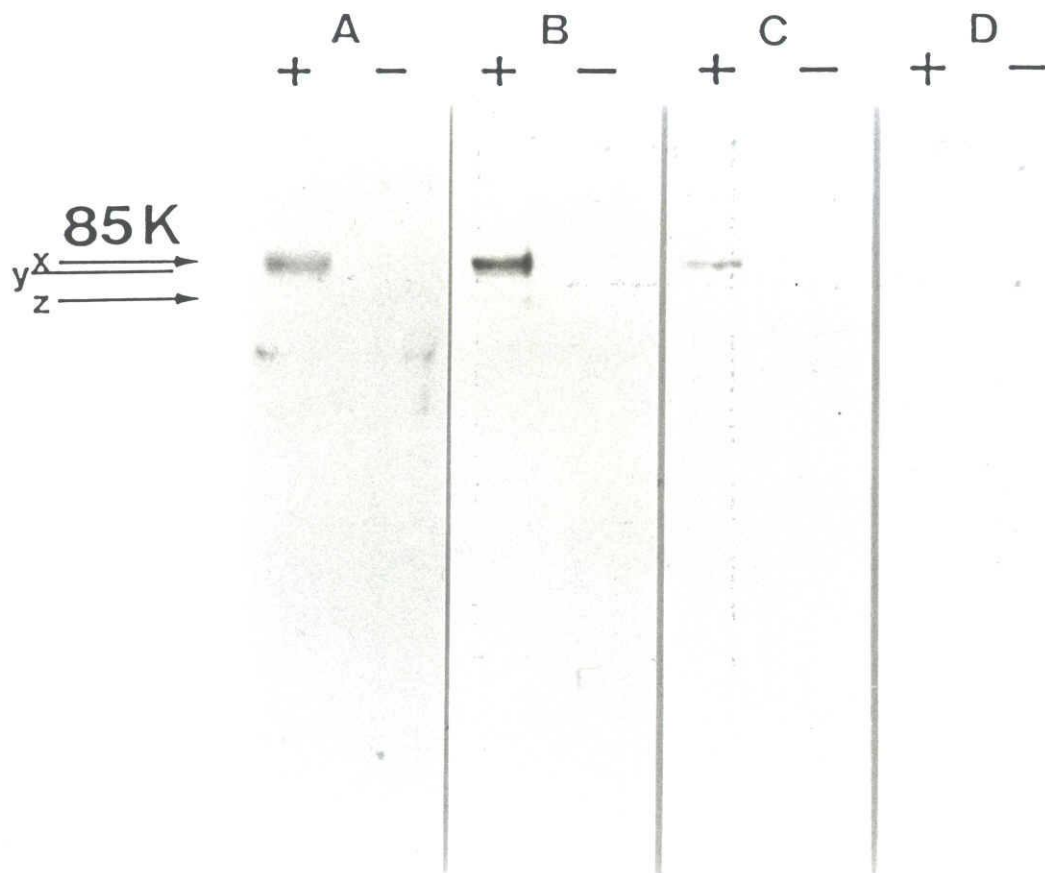


図26 85kDaタンパク質のヒアルロン酸結合におけるヒアルロン酸オリゴの阻害。  
 ヒアルロン酸（分子量950000）とPBSで希釈した血清を反応させ、CsCl密度勾配遠  
 心でヒアルロン酸として簡単に精製したものをサンプルとした。反応時に6糖  
 （B）、8糖（C）そして10糖（D）ヒアルロン酸オリゴを添加した。Aは無添加  
 のコントロールである。SDS-PAGE前にヒアルロニダーゼ処理（+）と無処理（-）  
 に分けた。タンパク質の検出にはウエスタンブローディングを用いた。

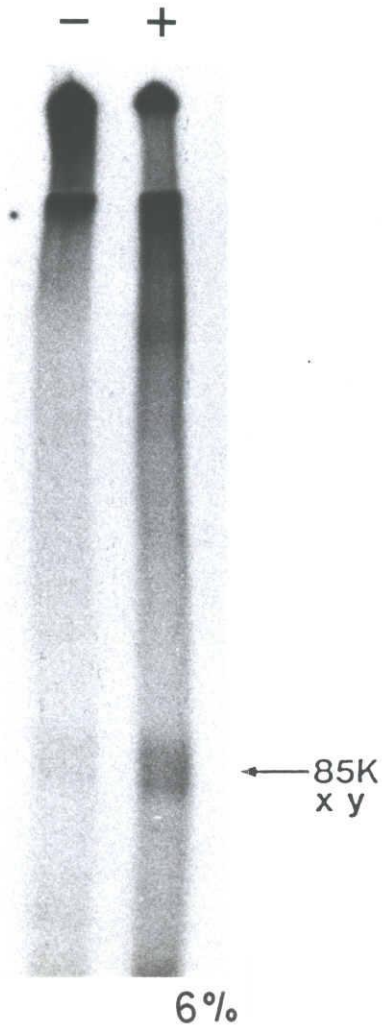


図27 ヒアルロン酸・85kDaタンパク質複合体から調製した85kDaタンパク質のヒアルロン酸への再結合。

ヒアルロン酸・85kDaタンパク質複合体をヒアルロニダーゼ処理して85kDaタンパク質を精製した。その精製物にヒアルロン酸を加えて反応後、ヒアルロニダーゼ処理した場合 (+) としない場合 (-) に分けSDS-PAGEに流した。結果はオートラジオグラフィーで示した。



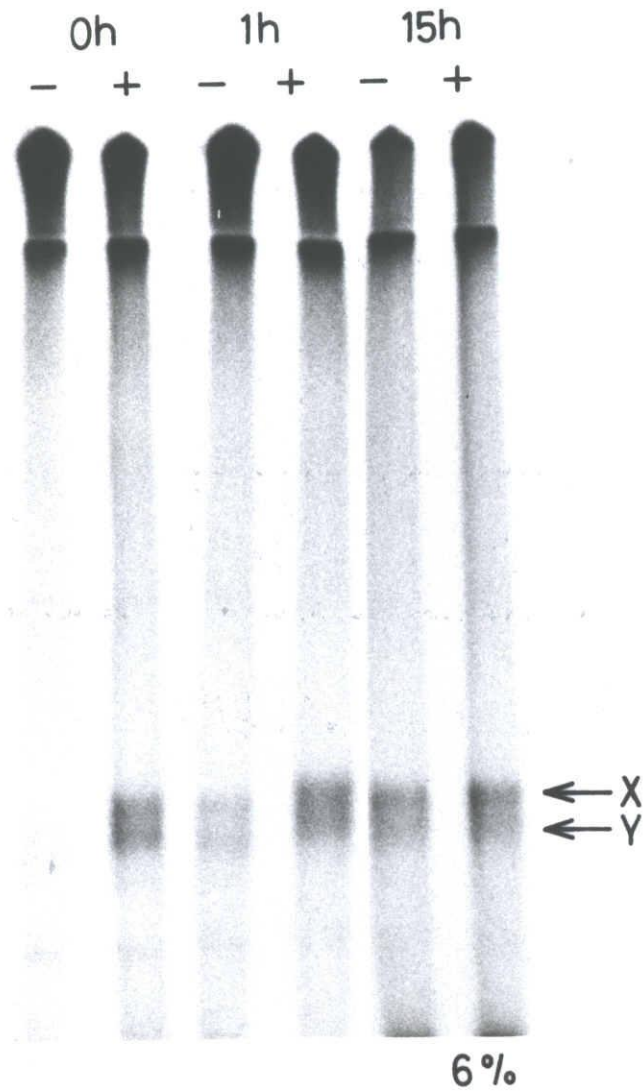


図28 アルカリ処理によるヒアルロン酸・85kDaタンパク質複合体の解離。  
 ヨードラベルされたヒアルロン酸・85kDaタンパク質複合体溶液を0.02M水酸化ナトリウムにして室温で各時間処理した。反応停止は0.5M酢酸緩衝液(pH 5.0)を10倍量加えて行なった。さらにヒアルロニダーゼを処理したもの(+)としないもの(-)に分けてSDS-PAGEに流した。結果はオートラジオグラフィーで示した。

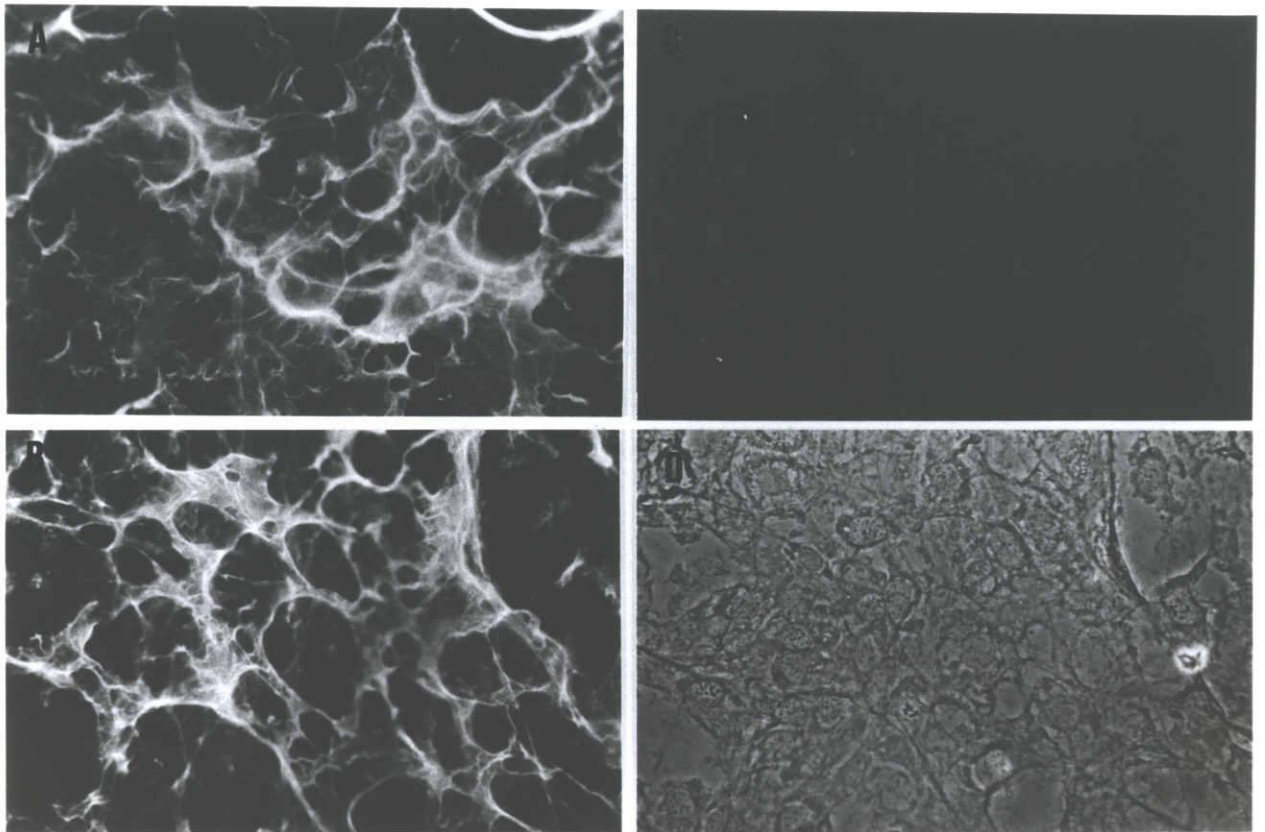


図29 マウス真皮線維芽細胞の抗85Kタンパク質抗体による間接蛍光抗体染色。

細胞層のヒアルロニダーゼ消化前(A)と消化後(B)を示した。Cは免疫していない血清で処理した場合でDはBの位相差顕微鏡像を示した。



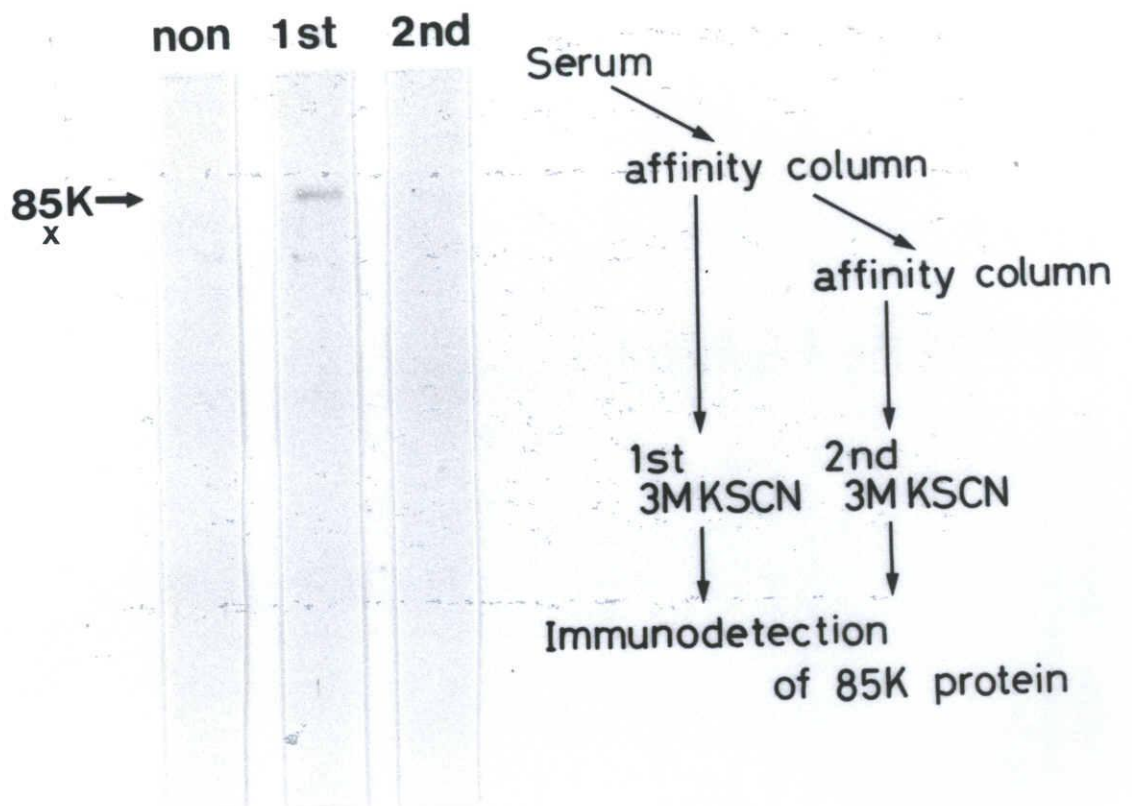


図30 血清からの85kDaタンパク質の除去。

血清を85kDaタンパク質に流して、結合したものを溶出したもの(1st)、そして一度アフィニティーカラムに通した血清をもう一度流して結合させたもの(2nd)を抗85kDaタンパク質抗体で調べた。nonは免疫していない抗体で作ったアフィニティーカラムに血清を流して、結合したものである。

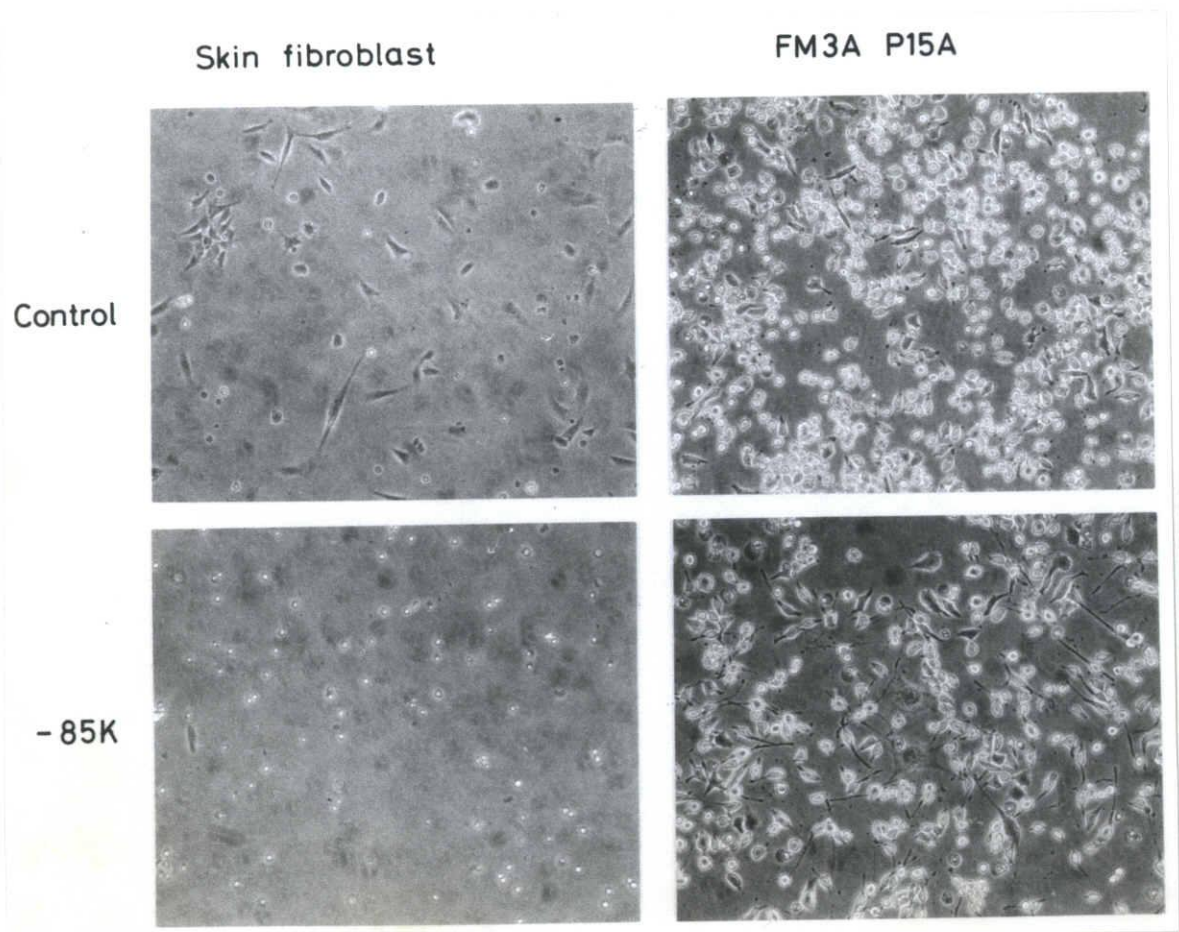


図31 85kDaタンパク質の基質接着への関与。

図34で調製した血清を用いて、マウス真皮線維芽細胞とP15A細胞の培養を行なった。培養を始めて、1日目の状態である。

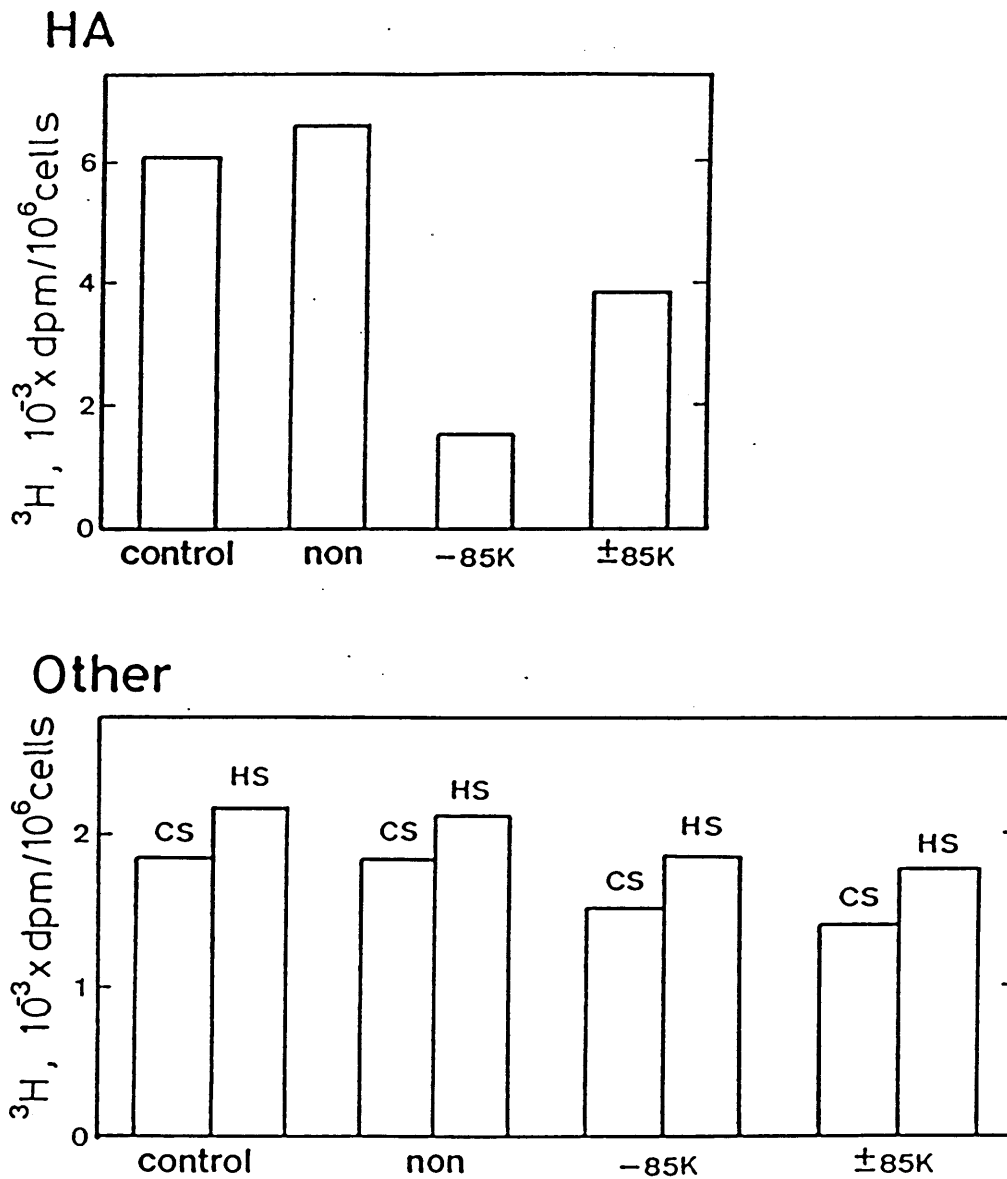


図3 2 P-15A細胞のヒアルロン酸合成に対する85Kタンパク質の関与。  
 -85K:培養に用いたウシ血清から抗85Kタンパク質抗体アフィニティーカラムにより85Kタンパク質を除去した場合、±85K:前者の条件にアフィニティーカラムに結合した画分を添加した場合、non:抗85Kタンパク質抗体の代わりに免疫していないイムノグロブリンを用いた場合を示す。  
 HAはヒアルロン酸を、CSとHSはそれぞれコンドロイチン硫酸とヘパラン硫酸をあらわす。

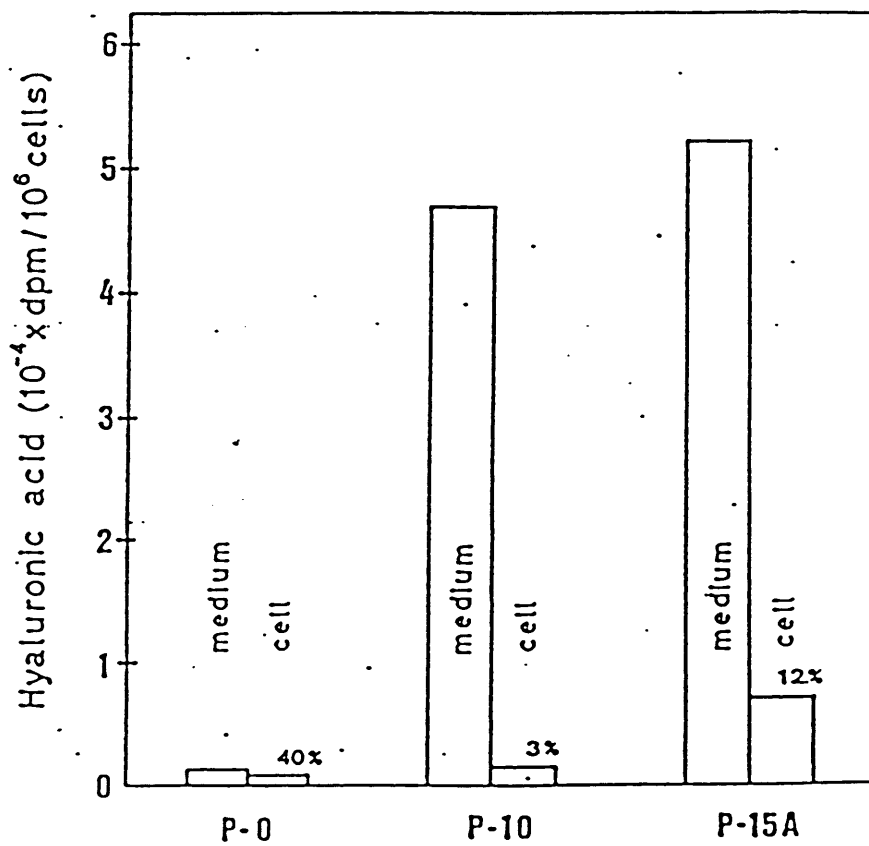


図 3 3 FM3A各細胞株のヒアルロン酸の分布。

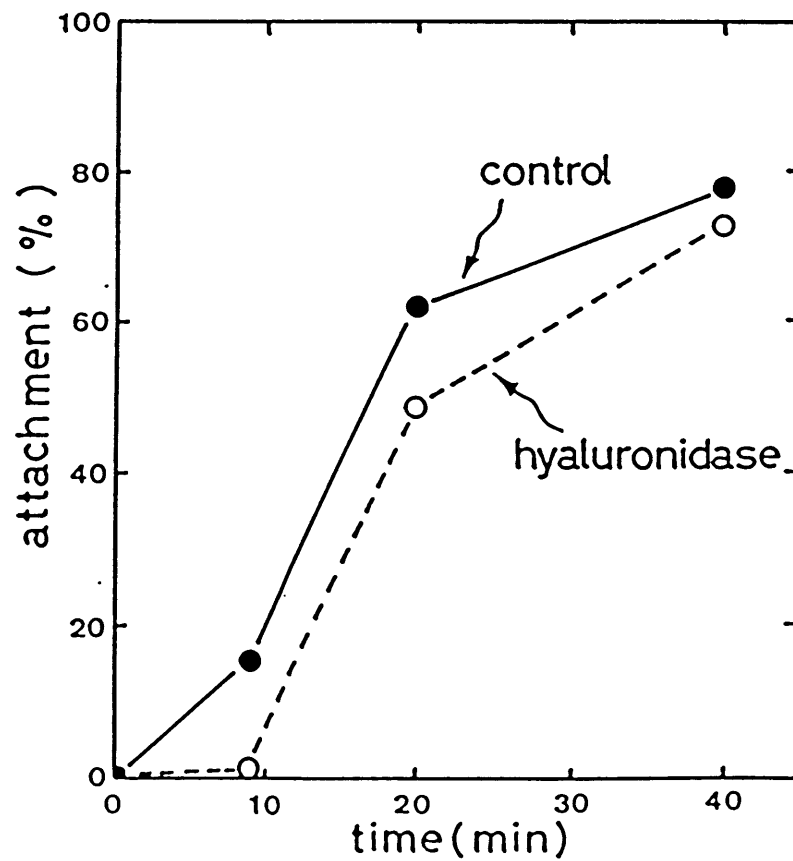


図34 血管内皮細胞への接着におけるヒアルロン酸被覆の関与。  
 FM3A P15Aをヒアルロニダーゼ処理 (○---○) し、血管内皮細胞の培養に入れて接着の時間経過を調べた。●---●、無処理のコントロール。

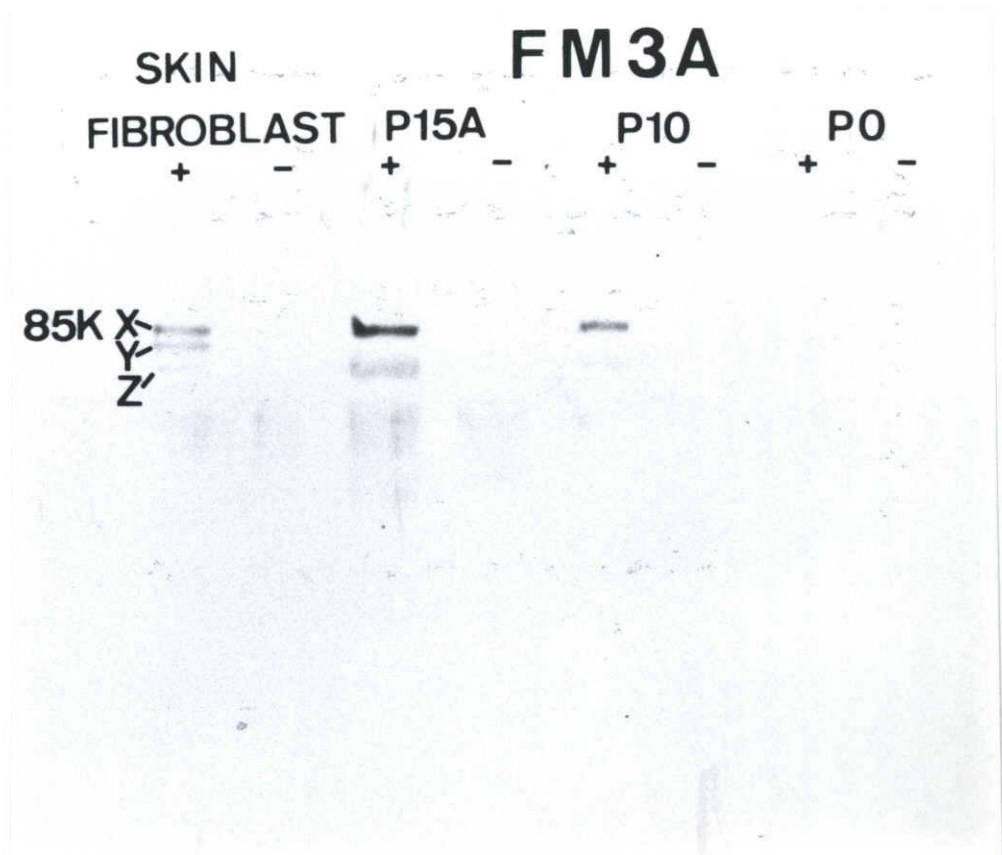


図35 ヒアルロン酸合成能の異なる細胞株における85Kタンパク質の分布。  
 正常マウス真皮繊維芽細胞の試料には培養液のヒアルロン酸・85kDaタンパク質複合体を用いた。

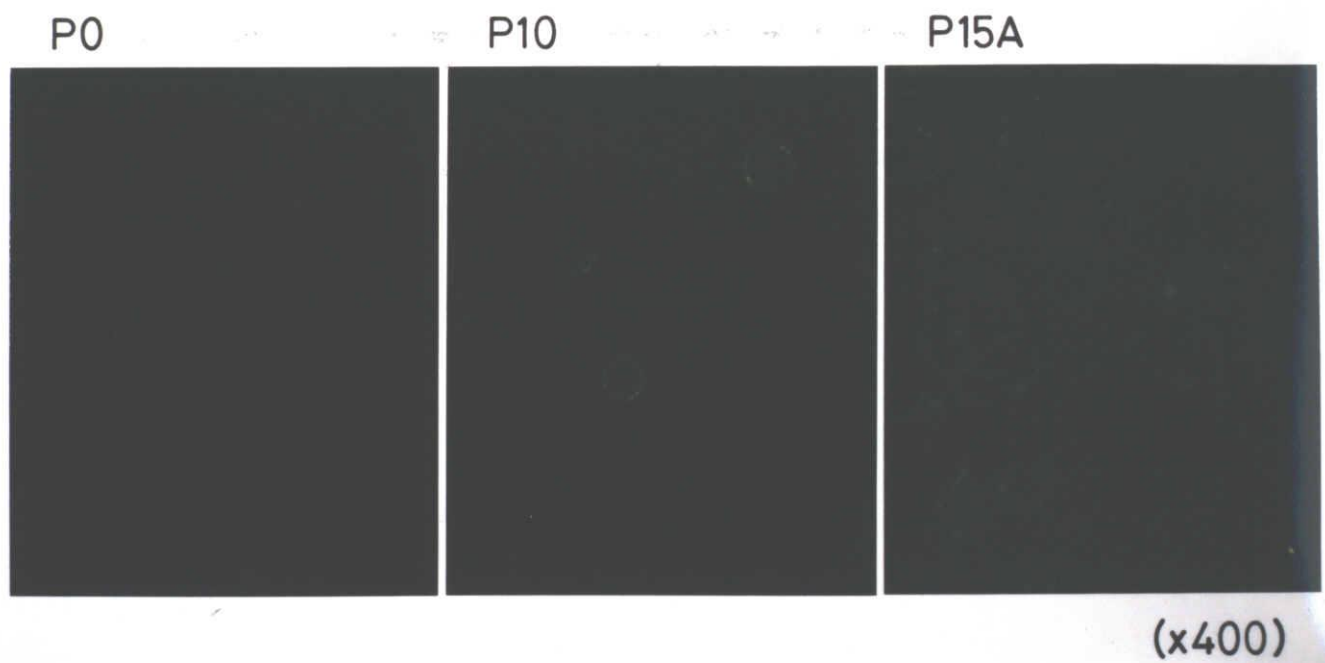


図36 マウス乳がん細胞FM3Aの抗85kDaタンパク質抗体による間接蛍光抗体染色。

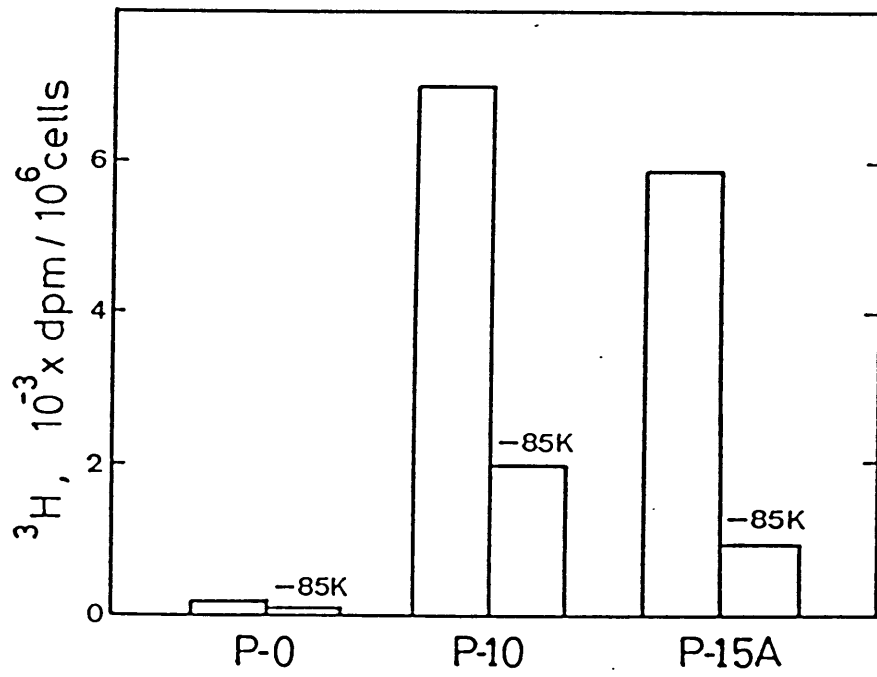


図37 85kDaタンパク質のヒアルロン酸合成に対する影響。



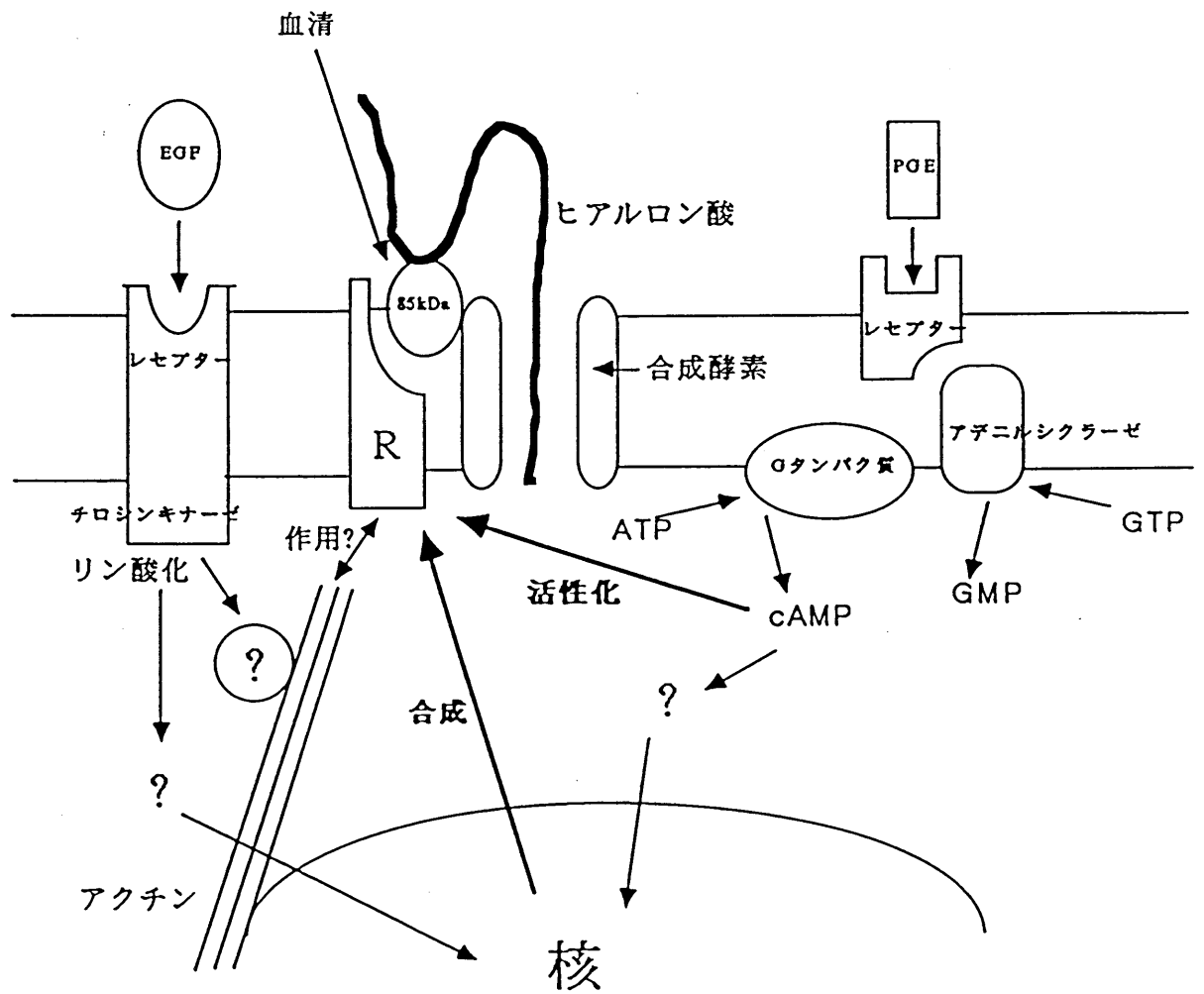


図38 ヒアルロン酸合成の制御機構と85kDaタンパク質の関与のモデル。