

論文要旨

HAS3-related hyaluronan enhances biological activities necessary for metastasis of osteosarcoma cells

〔 骨肉腫細胞において HAS3 が関与するヒアルロン酸は転移に必要な
である生物学的活性を促進する 〕

東福 勝宏

【序論および目的】

種々の悪性腫瘍においてヒアルロン酸 (HA) の産生増加は転移に必要な生物学的活性を促進するといった報告が散見される。また、HA レセプターである CD44 の過剰発現も種々の悪性腫瘍では、予後不良と相関するといわれる。このことより、HA と CD44 の相互作用が骨肉腫の浸潤・転移に重要な役割を果たすことが示唆される。HA は hyaluronan synthase (HAS) により合成され、哺乳類では 3 種類の HAS (HAS1, HAS2, HAS3) が存在し、これらの HAS アイソフォームにより産生される HA 分子量は異なる。HA による種々の生物学的活性の幾らかは分子量依存性であるため、HAS アイソフォームの発現や活性をコントロールすることで転移に必要な生物学的活性を制御していることが示唆される。今回我々は、高率に肺転移を来すマウス骨肉腫細胞株 LM8 において、浸潤・転移に必要な生物学的活性に関与する HA 分子量および HAS アイソフォームを検討した。

【材料および方法】

異なる分子量 (270、800、2300 kDa) の外因性 HA にて骨肉腫細胞株 LM8 を刺激し、増殖能は MMT assay、浸潤能は Matrigel assay、細胞外器質分解能は zymography による MMP assay、接着能は Adhesion assay を用いて調べた。また、異なる分子量の HA で LM8 を刺激し、HA 誘導による protooncogene (c-fos, c-jun, c-myc) mRNA の発現を RT-PCR にて確認した。HA 依存性 MAP kinase のリン酸化は Western Blotting を用いて、また、移動能や細胞生存に関与する Focal Adhesion Kinase (FAK) のチロシンリン酸化は、anti-FAK antibody で免疫沈降した後、anti-phosphotyrosin antibody で immunoblotting を行い、HA 分子量間の違いを調べた。LM8 細胞と骨肉腫サンプル 14 例において、CD44、HAS1、HAS2、HAS3 の mRNA 発現を RT-PCR にて確認した。Hyaluronan synthase suppressor である 4-methylumbelliferone (MU) にて前処理し、LM8 の増殖能および浸潤能を上記の手法を用いて確認した。

【結果】

LM8において、CD44とHAS3のmRNA発現を認めるも、HAS1とHAS2の発現はみられなかった。骨肉腫サンプル14例では、HAS2とHAS3は、HAS1よりもmRNAの発現率が高かった。270、800 kDaのHA刺激により、LM8の細胞増殖能と浸潤能は濃度依存的に促進した。特に270 kDaのHAでは最も強い効果を示した。一方、2300 kDaのHA刺激では増殖能、浸潤能に効果を及ぼさなかった。100~1000 kDaの分子量を産生すると考えられているHAS3の活性をMUにて抑制すると、増殖能、浸潤能ともに抑制された。細胞外器質分解能は、270 kDaのHA刺激により濃度依存的にMMP2の産生能は促進した。また270、800 kDaのHA刺激の方が、2300 kDaのHA刺激より多くMMP2産生を示した。Adhesion assayでは2300 kDaでコーティングしたプレートにおいて、LM8は最も高い接着能を示した。CD44の特異的抗体であるKM81で前処理すると接着能は低下し、この接着能はCD44依存性であることがわかった。LM8のprotooncogeneに及ぼすHAの効果については、c-fosにおいて270 kDaのHA刺激の方が、2300 kDaのHA刺激よりmRNAの発現が強かった。一方、c-myc、c-junのmRNAの発現において、分子量間の違いは認めなかった。MAP kinaseのリン酸化は、いずれの分子量のHAで刺激しても、刺激後5分後にErkの著しいリン酸化がみられた。分子量間で比較すると270 kDaのHA刺激が最も強い効果を及ぼした。同様に、FAKのリン酸化も270 kDaのHA刺激により最も強く効果を及ぼした。

【結論及び考察】

HAS3が産生する分子量(100~1000 kDa)のHAは、細胞増殖能、浸潤能、細胞外器質分解能といった転移に必要な生物学的活性を促進することがわかった。また、LM8に発現しているHAS3をMUにて抑制すると、細胞増殖能と浸潤能は抑制された。このことより、転移に必要な細胞増殖能、浸潤能といった主要な生物学的活性は、HAS3の活性により促進していることがわかった。また、LM8細胞はHAS2が産生する分子量(平均分子量2000 kDa以上)のHAと強い接着能を示した。HAS2は、産生するHAとLM8細胞が接着、HA-rich pericellular coatやHA-rich細胞外器質を形成することで、細胞分裂や細胞移動、細胞溶解性リンパ球による攻撃からの防御などの面より、腫瘍細胞に好適な環境を提供することが示唆された。実際の骨肉腫患者の検体でも、HAS2とHAS3は高率にmRNAの発現を認め、HAS2、HAS3は、それぞれの分子量のHAを合成することで骨肉腫の浸潤・転移に関与することが示唆された。

(International Journal of Oncology Vol.29, No.1 2006年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1436 号	氏名	東福 勝宏
審査委員	主査	秋山 伸一	
	副査	松山 隆美	小賤 健一郎

HAS3-related hyaluronan enhances biological activities necessary for metastasis of osteosarcoma cells

(骨肉腫細胞において HAS3 が関与するヒアルロン酸は転移に必要である生物学的活性を促進する)

公表 International Journal of Oncology, Vol.29, No.1, 175-183, 2006 年 7 月

【目的】悪性腫瘍の転移性亢進において、ヒアルロン酸(HA)の関与が知られている。哺乳類では3種類の hyaluronan synthase (HAS)の存在が知られ、それぞれの HAS アイソフォームにより合成される HA の分子量は異なるとされる。本研究の目的は、骨肉腫細胞株 LM8 において、浸潤・転移に必要な生物学的活性に関する HA 分子量および HAS アイソフォームを明らかにすることである。

【材料および方法】LM8 細胞と骨肉腫サンプルにおいて、CD44、HAS アイソフォームの mRNA 発現を RT-PCR にて確認した。LM8 細胞を異なる分子量(270、800、2300 kDa)の HA にて刺激し、増殖能、浸潤能、細胞外基質分解能 (MMP 産生)、接着能を調べた。HA 刺激による protooncogene (c-fos、c-jun、c-myc) mRNA の発現を RT-PCR、MAP kinase および Focal Adhesion Kinase (FAK) のリン酸化を Western Blotting にて調べた。HAS の suppressor である 4-methylumbelliferone (MU) で LM8 細胞を前処理し、増殖能および浸潤能を確認した。

【結果】LM8 細胞において、CD44 と HAS3 の mRNA 発現を認めるも、HAS1 と HAS2 の発現はみられなかった。骨肉腫サンプルでは、HAS2 と HAS3 は、HAS1 よりも mRNA の発現率が高かった。HAS3 が合成する分子量の HA で、増殖能、浸潤能および細胞外基質分解能 (MMP2 産生) は濃度依存的に促進した。また HAS3 活性を MU にて抑制すると、増殖能と浸潤能はともに抑制された。c-fos の mRNA 発現、MAP kinase および FAK のリン酸化においても、HAS3 が合成する分子量の HA で亢進を認めた。LM8 細胞に発現する CD44 は HAS2 が合成する分子量の HA と高い接着性を示した。

【考察】転移に必要な増殖能、浸潤能といった主要な生物学的活性は、HAS3 の活性により促進していることが明らかとなった。また、主に HAS2 が合成する HA と骨肉腫細胞上の CD44 が接着し、HA-rich pericellular coat や HA 豊富な細胞外環境を形成することで、リンパ球などによる攻撃からの防御、細胞の分裂や浸潤など、骨肉腫細胞に好適な環境を築くことが示唆された。実際の骨肉腫患者の検体においても、HAS2 と HAS3 は高率に mRNA の発現を認め、HAS2 と HAS3 は、それぞれの分子量の HA を合成することで骨肉腫の浸潤・転移に関与することが考えられた。

以上より、本論文は骨肉腫細胞の浸潤・転移に必要なとされる生物学的活性に関する HA 分子量および HAS アイソフォームを明らかにした論文であり、浸潤・転移の分子メカニズムの解明に有用である。従って、本論文は学位論文として価値のあるものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1436 号	氏名	東福 勝宏
審査委員	主査	秋山 伸一	
	副査	松山 隆美	小賊 健一郎
<p>主査および副査の3名は、平成18年9月26日、学位請求者 東福勝宏君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) この研究でマウス骨肉腫細胞株 LM8 を選んだ理由や目的は何か特別にあるのか。この細胞は HAS3 のみが発現しているが、選ぶ際にこの点を考慮していたのか。</p> <p>(回答) 骨肉腫の HA に関連した浸潤・転移の研究を行うことを考えていたため、肺転移能の極めて高い骨肉腫細胞株であるということで LM8 を選択した。この細胞を選ぶ際には、HAS3 が特異的に発現している事は認識していなかったが、結果的にこの実験を進める上で都合が良かった部分もある。</p> <p>質問2) HAS の inhibitor として MU を用いているが、HAS あるいは HAS3 に特異的なのか。</p> <p>(回答) MU は HAS には特異的ではあるが、アイソフォームである HAS3 に特異的ではない。MU が HAS を抑制する確立されたメカニズムは明らかではない。MU は HAS 遺伝子には影響を及ぼさないが、細胞膜の脂質環境を変化させるといった報告がある。</p> <p>質問3) 今回の実験では LM8 が HAS3 のみを発現していたため、HAS3 の inhibitor として用いたのか。</p> <p>(回答) そのとおりである。</p> <p>質問4) HAS3 が内因性 HA を産生するといったが、外来性 HA 刺激による変化をみるのであれば、MU で内因性 HA を抑制した後、外来性 HA で刺激をするという method を考えなかったのか。</p> <p>(回答) ご指摘のとおり、細胞を MU で処理して、外来性 HA 刺激による生物学的活性の変化をみた方が適切だったと考える。実験の途中から HAS という酵素の存在を知り、これに注目して実験を進めるようになったので、このような手法になってしまった。</p> <p>質問5) LM8 細胞は CD44 を発現しているが、可溶性の CD44 は存在しているのか。可溶性 CD44 が多く存在するのであれば、どの分子量の HA と結合性を示すのか。そのようなことは考えたのか。</p> <p>(回答) 文献にて種々の悪性腫瘍細胞における可溶性 CD44 の存在が指摘されているが、今回の実験では、LM8 細胞における可溶性 CD44 の存在は調べていない。しかしながら、可溶性 CD44 は HAS2 が産生する分子量の HA と強い結合性を示す可能性は否定できないと考える。</p> <p>質問6) HA 刺激による増殖能の結果である Figure1 において、有意差検定で分子量間の有意差はあるのか。</p> <p>(回答) この論文において有意差検定に関して全く記載されていないのは欠点だと思う。増殖能、浸潤能、接着能の結果はすべてスチューデント t 検定など統計的有意性検定を行っている。増殖能の結果である Figure1 においては、一部の HA 濃度で 270kDa と 800kDa の有意差は認めなかった。</p> <p>質問7) 低分子量 HA は増殖能や浸潤能などに、高分子量 HA は接着能に関与すると発表した。分子量間で生物学的活性が異なるメカニズムを、細胞内シグナル伝達の側面からは説明しているが、HA と細胞との結合のレベルではどのように考えるか。</p> <p>(回答) RHAMM や LYVE-1 といった CD44 以外の HA レセプターの存在が知られており、増殖能や浸潤能などの生物学的活性を促進する比較的分子量の小さい HA は、これらの HA レセプターに高い結合性を示し、活性を及ぼす可能性が十分にあることを推測する。</p> <p>質問8) HA の分解の経路はどのようになっているのか。それぞれの HAS アイソフォームにより分子量の異なる HA を合成するが、HAS アイソフォームとの関連性は考えるか。</p> <p>(回答) HA を分解する酵素としてヒアルロニダーゼが一般に広く知られている。分子量の大きな HA が CD44 などの HA レセプターに結合し細胞に取り込まれ、ヒアルロニダーゼなどの分解酵素により fragmentation</p>			

され、分子量が小さくなった HA を再び細胞外に排出するといった考えがあるが、確立された概念ではない。それぞれの HAS アイソフォームにより大小異なった分子量の HA を産生し、それぞれの分子量の HA が HA レセプターに結合、細胞膜あるいは細胞内で代謝されるのではないかと考える。

質問 9) HA は 2 つの糖の繰り返しという非常に単純な構造であるが、合成される HA の大きさはどのようにして制御されているのか。

(回答) それぞれの HAS アイソフォームにより合成される HA の分子量は異なるが、HAS アイソフォームが HA 分子量を決定づける明確なメカニズムはまだ分かっていない。しかしながら、合目的的にそれぞれの HAS アイソフォームの発現や活性を亢進あるいは抑制することで調節し、必要な HA 分子依存性生物学的活性を誘導していると考えられる。

質問 10) 実際の骨肉腫の浸潤・転移を考える際に、転移の過程にある血液やその他の体液に存在している HA が関与しているのか、あるいは腫瘍細胞自身が産生する HA が関与しているのか。

(回答) HA は全身至る所に存在するが、悪性腫瘍組織内には極めて多量の HA が存在することは既に分っている。従って、腫瘍細胞自身が HAS によって産生する HA や腫瘍細胞による宿主間質細胞において産生される HA、つまり悪性腫瘍組織内で産生される HA が、骨肉腫など悪性腫瘍の浸潤・転移に関与していると考えられる。

質問 11) CD44 が HGF や EGF など growth factor のレセプターにリンクしており、CD44 が関与した増殖系シグナル伝達が促進するとリンクした growth factor のレセプターが作用しやすくなるといった最近の知見があるが、この実験に用いた骨肉腫細胞株 LM8 ではどの growth factor のレセプターが発現していたか。また、接着能の実験では、CD44 の特異的抗体である KM81 でブロックし接着能抑制がみられたことで、この接着能は CD44 依存性であることが証明できるが、増殖能や浸潤能など他の実験では、KM81 で処理した実験は行わなかったのか。

(回答) 今回の実験では、LM8 の growth factor のレセプターの発現は調べていないが、HA 刺激により CD44 の関与した増殖能促進に関連して、いずれかの growth factor が作用しやすくなっている可能性は十分あると考える。また、接着能以外の実験では、KM81 で前処理した実験は行っていないため、接着能以外は CD44 依存性の生物学的活性であることは証明できない。HA が RHAMM や LYVE-1 といった CD44 以外の HA レセプターに結合して生物学的活性を起している可能性は否定できないと考える。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。