

Mini Review

ヒアルロン酸ノックダウンマウスの開発および病態解析への適用

今 淳

弘前大学大学院医学研究科 附属高度先進医学研究センター・糖鎖工学講座

連絡先：今 淳，弘前大学大学院医学研究科 附属高度先進医学研究センター・糖鎖工学講座，〒036-8562 青森県弘前市在府町5，Tel: 0172-39-5015, Fax: 0172-39-5016, e-mail: yumapon@cc.hirosaki-u.ac.jp

Hyaluronan knockdown mice: application to analysis of hyaluronan-mediated pathophysiology

Hyaluronan is a ubiquitous, major component of the extracellular matrix. It is involved in cell adhesion and locomotion, and hence in tumor metastasis. We have previously reported that 4-methylumbelliferone (MU) inhibits hyaluronan synthesis and may be a useful tool for examining the functions of hyaluronan. We here demonstrate that MU-mediated inhibition of hyaluronan expression results in suppression of adhesion and locomotion of cultured melanoma cells. Furthermore, MU-treated melanoma cells showed both decreased cell surface hyaluronan formation and suppression of liver metastasis after injection into the mice. Oral administration of MU to mice also decreased tissue hyaluronan content. These hyaluronan knock-down mice displayed suppressed metastasis. Thus, both cell surface hyaluronan of melanoma cells and recipient hyaluronan can promote metastasis, indicating that MU has potential as an anti-metastatic agent.

Rec.6/25/2007, Acc.9/7/2007, pp41-46

Atsushi Kon

Department of Glycotechnology, Center for Advanced Medical Research, National University Corporation, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Aomori, Japan

Key words hyaluronan, 4-methylumbelliferone, metastasis, melanoma

はじめに

ウロン酸とN-アセチルヘキソサミンの二糖繰り返し構造を有する糖鎖をグリコサミノグリカン(glycosaminoglycan)という。ヒアルロン酸(Hyaluronan)はグリコサミノグリカンの1つであり、ウロン酸であるグルクロン酸(GlcUA)とN-アセチルヘキソサミンであるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β -1,4-GlcUA- β -1,3-GlcNAcのグリコシド結合によって繰り返し結合している(図1A)。分子量10万~100万を超える高分子多糖であり、生体内のあらゆる組織・器官の細胞外マトリックスに普遍的に存在している。

ヒアルロン酸は強い抱水性(水を巻き込む力)を有する

ために粘性が高い。したがって、ジェルのような環境を細胞に提供することで組織・器官の湿潤を保持する機能が知られている^{2,3)}。たとえば、加齢とともにヒアルロン酸含量が低下して皮膚は乾燥するが、この皮膚にヒアルロン酸を注入すると瑞々しく若々しい皮膚を取り戻すことができる。事実、ヒアルロン酸の皮内への注入は、皮膚のアンチエイジング医療として実際に行われている。さらに、最近の分子生物学および糖鎖生物学的研究の進歩によって、ヒアルロン酸は細胞の発生、分化、増殖、再生など様々な生理機能を制御することも明らかになった。また、老化、創傷治癒、炎症あるいは悪性腫瘍の転移といった様々な病態

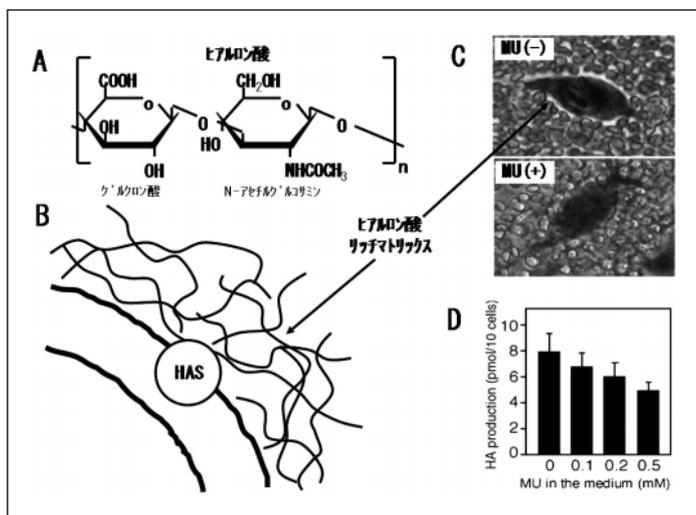


図1 ヒアルロン酸の構造およびMUによる生合成の阻害

ヒアルロン酸はグルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンの2糖の繰り返し構造を有する多糖鎖である(A)。細胞膜に存在する酵素HASによって生合成され、ついで細胞周囲に分泌してヒアルロン酸リッチマトリックスを形成する(B)。細胞を固定化赤血球と共に培養すると(固定化赤血球排除法)、ヒアルロン酸リッチマトリックスには固定化赤血球が入り込めず透明帯として観察される(C)。細胞をMUと反応させるとヒアルロン酸の生合成が阻害されるためにヒアルロン酸リッチマトリックスは消失し(C)、さらにここから培養培地中へ遊離するヒアルロン酸量も低下した(D)。

にも関わることが見出されている^{4,8)}。しかし、機能の詳細は依然として不明な部分が多く、その解明には解析を容易にする新たな系の開発が必要であるとされてきた。

筆者の研究室では、蛍光物質である4-methylumbelliferone(MU)がヒアルロン酸合成を特異的に阻害する唯一の物質であることを見出した⁹⁾。本レビューでは、MUを投与して作製したヒアルロン酸ノックダウンマウスについて紹介する。特に本マウスを活用してヒアルロン酸と悪性腫瘍の転移との関係を明らかにした研究について紹介する。また、MUによるヒアルロン酸合成阻害の分子機構など、MUノックダウンマウス作製に至るまでの基礎的研究についても言及する。

MUによるヒアルロン酸合成阻害の機構

遺伝子の機能を解析する有力な手段の一つに遺伝子ノックアウト動物の活用が知られている。しかし、ヒアルロン酸は多糖鎖であり、遺伝子の直接的な制御は受けておらず、ヒアルロン酸をノックアウトすることは不可能である。また、ヒアルロン酸の合成を行うヒアルロン酸合成酵素(Hyaluronan synthase(HAS))が最近発見された。3種の分子種HAS-1、HAS-2およびHAS-3が知られ、いずれも既にクローニングされている。したがって、HAS遺伝子ノックアウトマウスがヒアルロン酸の機能解析に有用であると予想されたが、HAS-1およびHAS-3のノックアウトマウスでは症状を何も示さず、HAS-2のマウスでは房室クッションの形成不全によって胎生致死を生じることから¹⁰⁾、HASのノックアウトマウスの活用によってもヒアルロン酸の機能を解析することは困難であることが明らかになった。そこで筆者の研究室ではヒアルロン酸合成の阻害剤の検索を行い、MUがヒアルロン酸の生合成を阻害できる唯

一の物質であることを見出した⁹⁾。

ヒアルロン酸は細胞膜貫通型酵素HASによって生合成され、細胞周囲に集積してヒアルロン酸リッチマトリックスを形成する。次いでこの部からヒアルロン酸は遊離し、さらに外側へと移動する(図1B)。MU(最終濃度0~0.5 mM)を培養ヒト皮膚線維芽細胞およびマウス由来悪性黒色腫細胞(B16F10細胞)に添加すると、ヒアルロン酸リッチマトリックスは消失し(図1C)、培地中へ遊離するヒアルロン酸量も減少した(図1D)。しかも、ヒアルロン酸以外のグリコサミノグリカンであるコンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸の生合成に対してMUは影響せず、コラーゲン、ラミニンなどの他種細胞外マトリックス成分の生合成も変動を認めなかった。すなわち、MUはヒアルロン酸特異的な唯一の阻害剤であることを見出した。

次に、MUによるヒアルロン酸合成阻害の分子機構を、ラット線維芽細胞を用いて解析した。その結果、MUはHAS遺伝子に直接的に作用してその発現を抑制するのではなく、細胞内のUDP-グルクロン酸転移酵素に作用して基質であるUDP-グルクロン酸をMUに結合させ、そのためにHASの基質でもあるUDP-グルクロン酸量が低下してヒアルロン酸合成が阻害される機構を明らかにした¹¹⁾。また、ヒアルロン酸を発現している細菌*Streptococcus equi* FM100を用いて解析したところ、ラット線維芽細胞と同じくMUはHASの遺伝子発現を抑制しなかったが、*Streptococcus equi* FM100では細胞膜に存在する脂質のカルジオリピンの分布を変動させていた。すなわち、細胞膜の脂質環境を変化させることによって細胞膜貫通型酵素HASの活性が阻害を受ける可能性を見出した¹²⁾。したがって、MUによるヒアルロン酸合成の阻害は様々な生物種に認められるものの、その分子機構の詳細は異なる可能性が見出された。

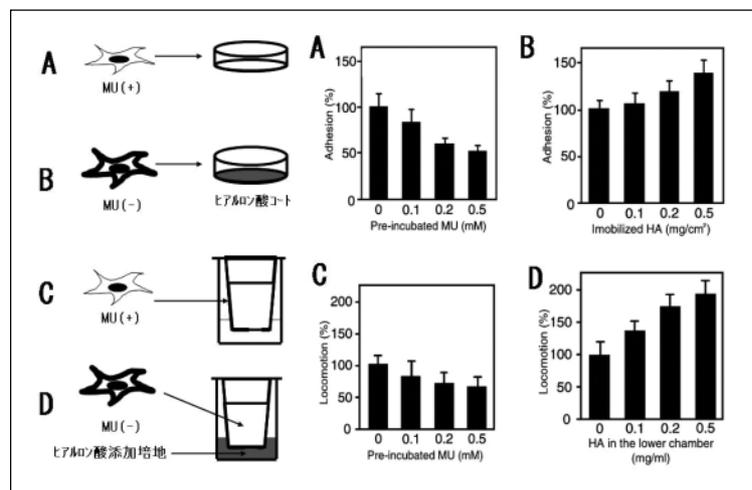


図2 細胞の接着能および遊走能に対するMUの影響

MUで処理したB16F10細胞を撒き、20分後に培養皿に付着している細胞数を計測して接着能を解析した結果、MUの濃度依存性に低下していた(A)。ヒアルロン酸でコートした培養皿に細胞を撒いた場合には、逆にヒアルロン酸の濃度依存性に増加した(B)。chamber上層にMUで処理した細胞を添加し、フィルター膜を通過してchamber下層へと移動する細胞数を計測して遊走能を解析した結果、MUの濃度依存性に低下していた(C)。MU未処理の細胞をchamber上層に添加し、chamber下層の培地中にはヒアルロン酸を添加した場合には、細胞の遊走能は逆に増強した(D)。

MUによる細胞の接着および遊走の抑制

ヒアルロン酸は悪性腫瘍の転移を促進することが最近明らかにされている^{13,14}。そこで、MUによるヒアルロン酸合成阻害によって転移が抑制されるか、転移現象を反映するとされる細胞の接着および遊走に対するMUの効果を解析した。最初にB16F10細胞とMU(最終濃度0~0.5 mM)とを反応させ、ヒアルロン酸リッチマトリックスの形成および培地中へ遊離するヒアルロン酸量の変化を解析した。その結果、両者ともMUの濃度依存性に低下していた(図1C,D)。このことを踏まえて、次にB16F10細胞をMU添加細胞培養培地に浮遊させ、次いで培養皿に撒いて20分間インキュベートした。インキュベート後に洗浄し、培養皿に付着しているB16F10細胞の数を計測した。その結果MUの濃度依存性に培養皿に付着しているB16F10細胞の数は低下していた(図2A)。一方、ヒアルロン酸でコートした培養皿に細胞を撒いた場合、コートしたヒアルロン酸の濃度依存性に付着した細胞の数は増加した(図2B)。すなわち、MUはヒアルロン酸合成を抑制することでB16F10細胞の接着能を抑制することが明らかになった¹⁵。

次にBoyden chamber法によってB16F10細胞の遊走能に対するMUの効果を解析した。Boyden chamber上層にMU(最終濃度0~0.5 mM)で処理した細胞を添加し、フィルター膜を通過してchamber下層へと移動する細胞数を計測した。その結果MUの濃度依存性に通過する細胞の数は低下していた(図2C)。また、chamber下層の培地にヒアルロン酸を添加した場合には、通過する細胞の数は逆に増強した(図2D)。以上から、MUはB16F10細胞のヒアルロン酸合成を阻害することで遊走能をも抑制することが明らかになった¹⁵。

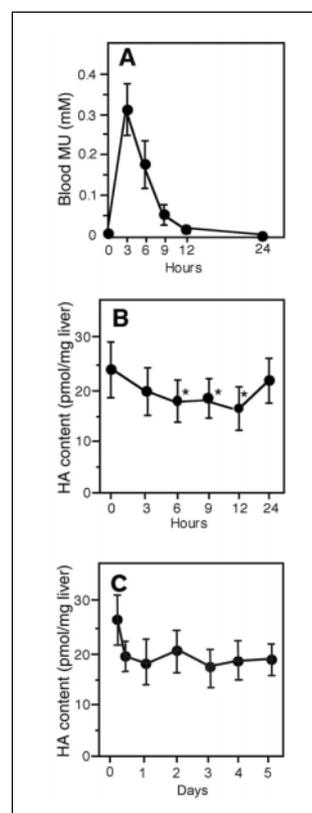


図3 マウスへのMU経口投与による血中MU濃度および組織・器官のヒアルロン酸合成の変動
MUをマウスに経口投与させると、血液中のMU濃度は投与3時間後にピークを迎えた(A)。組織・器官のヒアルロン酸合成は投与12時間後に最も抑制され24時間後には投与前の状態に戻った(B)。したがって、MUを1日に2回(12時間ごと)投与することでヒアルロン酸合成は持続的に抑制された(C)。

MU投与によるヒアルロン酸ノックダウンマウスの作製およびその解析

図2の結果から、MUによって悪性腫瘍の転移を抑制できる可能性が見出された。これら*in vitro*の結果が*in vivo*でも再現できるか否かを検討するため、C57BL/6JマウスにMUを投与してヒアルロン酸ノックダウンマウスの作成を行った。最初にC57BL/6JマウスにMU(3 mg/g体重)を

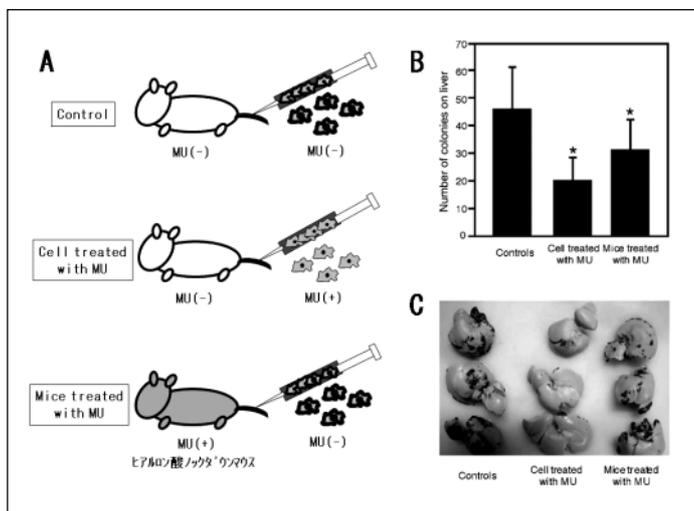


図4 MUによるB16F10細胞の転移の抑制

MUと反応させヒアルロン酸リッチマトリックスの消失したB16F10細胞をマウス尾静脈から注入すると肝臓への転移は抑制された(Cell treated with MU). また、あらかじめMUを経口投与させて作製したヒアルロン酸ノックダウンマウスにB16F10細胞を注入した場合においても転移は抑制され(Mice treated with MU), 悪性腫瘍および転移する組織・器官のヒアルロン酸が悪性腫瘍の転移を促進した。

経口摂取させ、血液中のMU濃度の変動をHPLCによって解析した。その結果、投与3時間後に血液中のMU濃度はピークを示し、その後急速に低下して24時間後には消失した(図3A)。次に各時間における組織・器官のヒアルロン酸含量を定量した。その結果、MU摂取後12時間でヒアルロン酸含量はMU投与前の66%まで減少、その後増加して24時間で投与前のレベルにまで回復した(図3B)。なお、脳組織ではヒアルロン酸の減少が認められなかった。さらなる詳細な解析が必要ではあるが、可能性の一つとして血液脳関門の存在によってMUが脳組織内に移行できない可能性が考えられた。以上の結果から、1日に2回(12時間ごと)経口摂取させることで脳組織を除く生体内すべての組織・器官のヒアルロン酸合成を持続的に抑制できることが示された(図3C)。この条件でMUを3か月間にわたって投与し続けたところ、最終的には投与前の55%までヒアルロン酸合成を低下させることが可能であった。また、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカンおよびコラーゲン、エラスチン、ラミニンの細胞外マトリックス成分含量の変動は認められず、MUによりヒアルロン酸特異的なノックダウンマウスを作製することが可能となった。

MUによる悪性腫瘍の転移の抑制

図2の*in vitro*の結果および作製したヒアルロン酸ノックダウンマウスを活用して、MUがヒアルロン酸合成を抑制することで悪性腫瘍の転移を抑制できるか否かを検討した。悪性腫瘍の転移では、悪性腫瘍自身が生合成するヒアルロン酸と悪性腫瘍の転移する組織・器官が生合成するヒアルロン酸の両者のヒアルロン酸を考慮しなければならない。そこで最初に、MUを添加した培地にB16F10細胞を

浮遊させて処理し、ヒアルロン酸リッチマトリックスを消失させたB16F10細胞をコントロールマウスの尾静脈から注入、組織・器官への転移の有無を解析した。その結果MUで処理していないB16F10細胞は肝臓および肺に高率に転移結節を形成したが、MUで処理した細胞では抑制されていた(図4A)。すなわち、B16F10細胞周囲のヒアルロン酸がMUによって消失すると転移は抑制されることが示された¹⁶⁾。

一方、ヒアルロン酸ノックダウンマウスにMU処理していないB16F10細胞を同様に投与した。その結果コントロールマウスで高率に認められたB16F10細胞の転移がヒアルロン酸ノックダウンにおいては抑制されていた(図4)。すなわち、MUの摂取によってマウスの組織・器官に存在するヒアルロン酸合成が抑制されることにより転移が抑制できることが明らかになった。以上から、MUの経口投与によって悪性腫瘍および腫瘍の転移する組織・器官両者のヒアルロン酸の合成が抑制されることで転移が抑制される可能性が示された¹⁶⁾。

終わりに

MUを投与することによってヒアルロン酸が特異的にノックダウンされるマウスを作製した。上述の如く各HASノックアウトマウスは報告されているが、無症状あるいは胎児致死となり、ヒアルロン酸研究への活用には多くの困難を伴う¹⁰⁾。本ノックダウンマウスはMUを成獣マウスに投与したものであり、その操作は非常に簡便である。したがって、このマウスの活用によりヒアルロン酸の機能の解明は今後急速に進むものと期待される。実際、本マウスを活用することでヒアルロン酸が悪性腫瘍の転移を促進することを確認することができた。しかも悪性腫瘍細

胞および転移する組織・器官の両者に存在するヒアルロン酸が転移を促進することを明らかにした¹⁶⁾。

また、本研究からMUが新規抗癌剤に成り得る可能性を見出した。筆者らはB16F10細胞のみならず、膵臓癌など種々の悪性腫瘍に対するMUの効果を解析し、いずれの悪性腫瘍に対してもMUは転移を抑制することを既に見出している¹⁷⁾。蛍光物質MUは胆汁排泄促進剤として広く臨床的に使用されている薬剤でもあり、その安全性は確立されている。したがって、MUを経口摂取することで腫瘍細胞および生体組織・器官の両者のヒアルロン酸合成を同時に抑制しながら、手術後の悪性腫瘍の再発・転移の予防、残存した腫瘍への治療などに対する効果が期待でき、MUが抗癌剤として適応拡大される可能性が大きいと考えられる。

さらに、筆者らはMUの構造を改変した様々のMU誘導体についてもヒアルロン酸合成および転移抑制効果について解析した¹⁸⁾。その結果MUよりもメチル基および水酸基を有する誘導体に強い抗転移能を有することを見出した。したがって、今後MU以上の抗転移能を有する安全な抗癌剤が開発される可能性が大いに期待された。

文 献

- Weissman B, Meyer K: The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J Am Chem Soc*, 76: 1753-1757, 1954.
- Scott JE, Cummings C, Brass A, Chen Y: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem J*, 274: 699-705, 1991.
- Mikelsaar RH, Scott JE: Molecular modeling of secondary and tertiary structures of hyaluronan, compared with electron microscopy and NMR data. Possible sheets and tubular structures in aqueous solution. *Glycoconjugate J*, 11: 65-71, 1994.
- Markwald RR, Fitzharris TP, Bank H, Bernanke DH: Structural analyses on the matrical organization of glycosaminoglycans in developing endocardial cushions. *Dev Biol*, 62: 292-316, 1987.
- Meyer LJ, Russell SB, Russell JD, Trupin JS, Egbert BM, Shuster S, Stern R: Reduced hyaluronan in keloid tissue and cultured keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 62: 292-316, 2000.
- Zhu Z, Ma B, Zheng T, Homer RJ, Lee CG, Charo IF, Noble P, Elias JA: IL-13-induced chemokine responses in the lung: role of CCR2 in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol*, 168: 2953-2962, 2002.
- Simpson MA, Reiland J, Burger SR, Furcht LT, Spicer AP, Oegema TR, McCarthy JB: Hyaluronan synthase elevation in metastatic prostate carcinoma cells correlates with hyaluronan surface retention, a prerequisite for rapid adhesion to bone marrow endothelial cells. *J Biol Chem*, 276: 17949-17957, 2001.
- Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyanishi O, Senga T, Hamaguchi M, Kimata K: Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 3609-3614, 2002.
- Nakamura T, Takagaki K, Shibata S, Tanaka K, Higuchi T, Endo M: Hyaluronic-acid-deficient extracellular matrix induced by addition of 4-methylumbelliferone to the medium of cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 208: 470-475, 1995.
- Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A Jr, Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA: Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest*, 106: 349-360, 2000.
- Kakizaki I, Kojima K, Takagaki K, Endo M, Kannagi R, Ito M, Maruo Y, Sato, Yasuda T, Mita S, Kimata K: A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem*, 279: 33281-33289, 2004.
- Kakizaki I, Takagaki K, Endo Y, Kudo D, Ikeya H, Miyoshi T, Baggenstoss BA, Tlapak-Simmons VL, Kumari K, Nakane A, Weigel PH, Endo M: Inhibition of hyaluronan synthesis in *Streptococcus equi* FM100 by 4-methylumbelliferone. *Eur J Biochem*, 269: 5066-5075, 2002.
- Kosaki R, Watanabe K, Yamaguchi Y: Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res*, 59: 1141-1145, 1999.
- Sohara Y, Ishiguro N, Machida K, Kurata H, Thant AA, Senga T, Matsuda S, Kimata K, Iwata H, Hamaguchi M: Hyaluronan activates cell motility of v-Src-transformed cells via Ras-mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase-Akt in a tumor-specific manner. *Mol Biol Cell*, 12: 1859-1868, 2001.
- Kudo D, Kon A, Yoshihara S, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki K: Effect of a hyaluronan synthase suppressor,

- 4-methylumbelliferone, on B16F-10 melanoma cell adhesion and locomotion. *Biochem Biophys Res Commun*, 321: 783-787, 2004.
- 16) Yoshihara S, Kon A, Kudo D, Nakazawa H, Kakizaki I, Sasaki M, Endo M, Takagaki T: A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. *FEBS Lett*, 579: 2722-2726, 2005.
- 17) Morohashi H, Yoshihara S, Nakai M, Yamaguchi M, Kakizaki I, Kon A, Sasaki M, Takagaki K: Inhibitory effect of 4-methyl- esculetin on hyaluronan synthesis slows the development of human pancreatic cancer in vitro and in nude mice. *Int J Cancer*, in press.
- 18) Morohashi H, Kon A, Nakai M, Yamaguchi M, Kakizaki I, Yoshihara S, Sasaki M, Takagaki K: Study of hyaluronan synthase inhibitor, 4-methylumbelliferone derivatives on human pancreatic cancer cell (KP1-NL). *Biochem Biophys Res Commun*, 345: 1454-1459, 2006.