

血清由来タンパク質 SHAP とヒアルロン酸との 共有結合複合体は、炎症におけるヒアルロン酸の機能実体か？ 複合体の発見、構造、形成機構、機能について

木 全 弘 治

SHAP-ヒアルロン酸複合体は、ヒアルロン酸に血清成分であるインター α -トリプシンインヒビターの重鎖サブユニット (HC) が他の分子には見られない特異なエステル共有結合構造を介して結ばれた複合体分子である。従来、ヒアルロン酸には共有結合するタンパク質はないと思われていたが、この分子の存在の発見以来、調べてみると炎症などの重要な生体反応に関係したヒアルロン酸の機能が実は、この複合体分子によることが分かってきた。本総説では、SHAP-HC 複合体の発見、特異な構造の解析、どのようにしてまたどのような時に複合体が生体中で形成されるかについての機構、さらに最近、科学誌を賑わしているヒアルロン酸単独では発揮できない複合体の生理機能について紹介し、さらに研究者による報告の矛盾点を議論した。

はじめに

敗血症 (sepsis) は、北米だけを例にとっても、年間 30 から 50 万人の多くの死者をもたらす疾患である。主にグラム陰性細菌の細胞壁リポ多糖 (LPS, 内毒素とも呼ばれる) が血液循環系に入り込み、肝臓類洞や肺毛細血管内において好中球 (neutrophils) を活性化し、高炎症性サイトカインにより重篤な臓器障害や臓器灌流異常をもたらす。図 1 は、大腸菌 LPS を尾静脈注射して 4 時間後の肝臓の類洞や敗血症症状を誘起したマウスの肝臓の洞様毛細血管 (sinusoids) と後洞様毛細管小静脈 (postsinusoidal venules) を spinning disk confocal microscope を用いて生きたままに観察した Kubes らの結果である¹⁾。A は蛍光ラベルしたヒアルロン酸結合タンパク質 (HABP) 投与してヒアルロン

酸 (以下 HA と略記) の量的な分布を見たもの、B は蛍光標識した血清由来タンパク質 SHAP の抗体 (黄色) と好中球表面を特異に認識する抗 Gr-1 抗体 (赤色) を投与して SHAP の分布定量し、同時に好中球の分布定量を行ったものである。HABP は LPS 投与群も非投与群においても、洞様毛細血管 (矢印) に結合が見られ、後洞様毛細管小静脈 (鏤印) には結合が見られなく、また洞様毛細血管における結合は LPS 投与群と非投与群で量的な差がなかった。つまり、HA は、LPS 投与により少なくとも 4 時間後までは、分布や量の有意な変化は無い。しかし、驚いたことに、それぞれの特異抗体でみた SHAP の分布と好中球の分布は、LPS 投与群の洞様毛細血管 (矢印) にも特異に観察された。SHAP は HA に共有結合した分子だから、この結果から LPS 投与群の洞様毛細血管にのみ SHAP-HA 複合体が形成され、それに好中球が特異に結合したと推定された。おそらくこの現象は敗血症の分子機構を説明する重要なものと思われる。

この総説では、このように劇的な差が見られた SHAP-HA 複合体とは一体どのような分子か？ その構造と複合体形成反応の機構は？ どうして好中球は SHAP-HA 複合体を好んで接着するのか、そしてどのように敗血症に関与するのか？ 複合体を含む HA マトリックスの機能は？

愛知医科大学・先端医学医療研究拠点 (〒480-1195 愛知県長久手町岩作雁又 21)

The covalent complex of hyaluronan and serum-derived protein, SHAP is a functional molecule involved in inflammation: Finding, structure, formation mechanism, and function of the complex

Koji Kimata (Research Complex for the Medicine Frontiers, Aichi Medical University, 21 Karimata, Yazako, Nagakute, Aichi 480-1195, Japan)

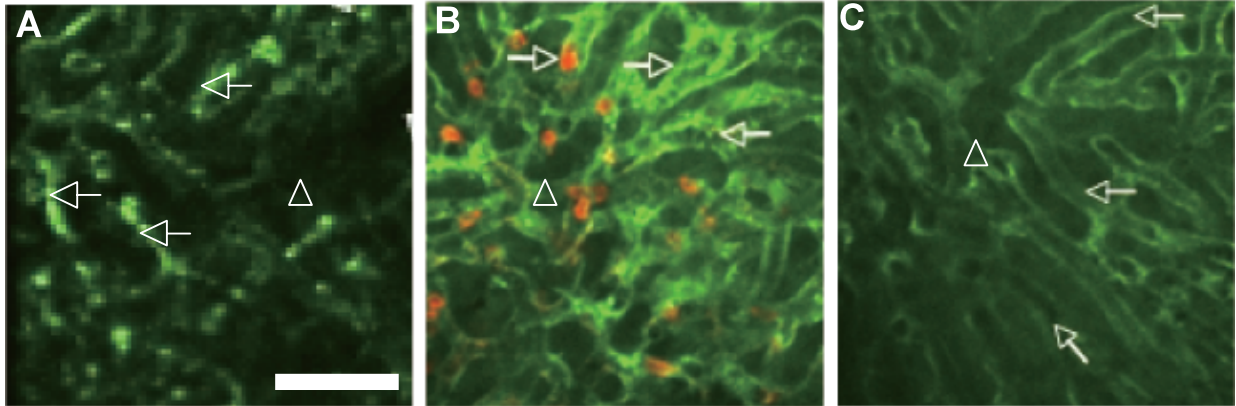


図1 大腸菌 LPS 尾静脈注射の4時間後の肝臓の類洞や敗血症症状を誘起したマウスの肝臓の洞様毛細血管 (sinusoids, 矢印) と後洞様毛細管小静脈 (postsinusoidal venules, 鏃印) の spinning disk confocal microscope を用いた観察結果。A. 蛍光ラベル HA 結合タンパク質 (HABP) 投与により HA 分布定量を行った。LPS 非投与に比べて有意な差はなかった。B. 蛍光標識抗 SHAP 抗体 (緑色) と抗 Gr-1 抗体 (赤色) の投与により各々, SHAP と好中球の分布定量を行った。C. 蛍光標識抗体非投与のコントロールで自家蛍光により組織構築の様子がわかる。LPS 非投与における SHAP と好中球の染色像は, C とほとんど同じで, 有意な分布は観察されなかった。白太線, 50 μ m 長 (文献1の引用図を改変した)

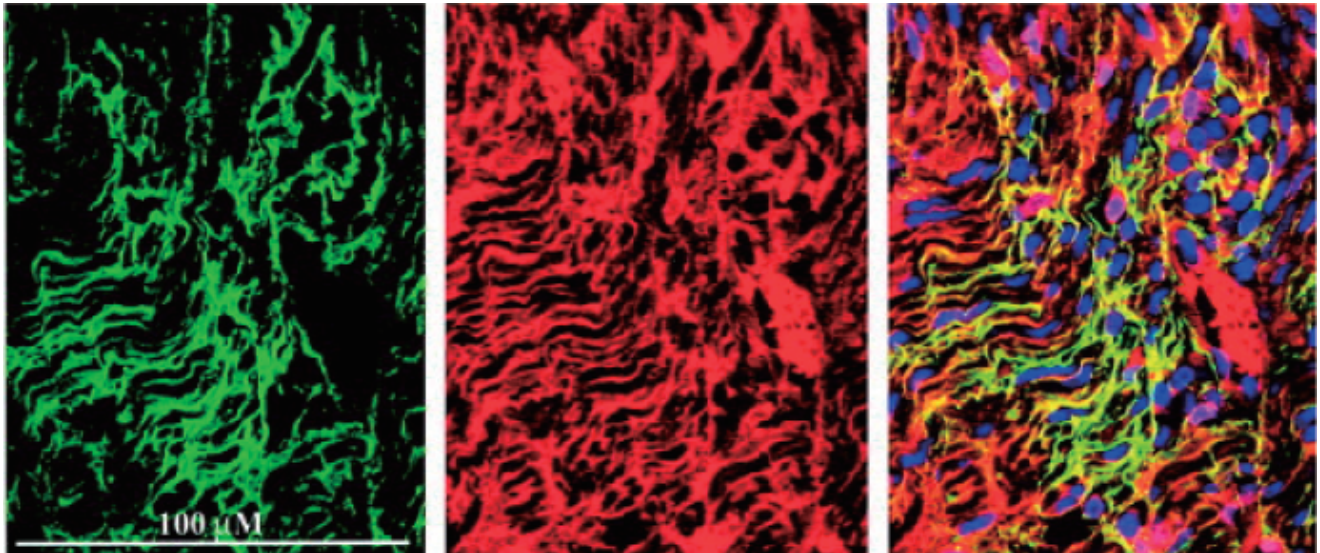


図10 免疫染色によるヒト炎症性腸疾患大腸の粘膜筋層 (平滑筋細胞よりなる) における HA (左図の緑染色像) と I α I 成分 (中央図の赤染色像) の局在

共局在 (右図の黄染色像) は SHAP-HA 複合体の存在によると思われる。共局在部分に核染色 (DAPI による青染色) で多数の炎症細胞が確認できる (文献40より引用)。

…などについて, 最近の情報を提供するものである。

1. ヒアルロン酸とは

ヒアルロン酸 (HA) はグルクロノシル-N-アセチルグルコサミンの二糖の繰り返しからなる直鎖状の構造をもつグリコサミノグリカンである (図2)。二糖の繰り返しは通常1,000個以上に達し, 他のコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンに比してとてつもなく長いのが特徴である。もう一つの特徴は, 数種類の細菌を例外として, 脊椎動物のみに普遍的に存在する成分であり, この動物界特有の機能との関連が予測されることである²⁾。事実, 多く

の研究から, HA は, 脊椎動物に特有な組織や器官の分化と形態形成における予めプログラムされた細胞増殖・細胞運動・細胞形態変化に, また一方, 例えば動脈硬化症や悪性腫瘍の転移などの疾患における異常な細胞増殖・細胞運動にも関与する重要な機能分子であることが明らかになった。

2. HA に結合する様々な分子

HA はその特徴的に長い構造上の性質により, 表1に示すような様々な分子 (タンパク質, プロテオグリカン, レセプターなど) と結合して, 多くの場合, HA リッチマト

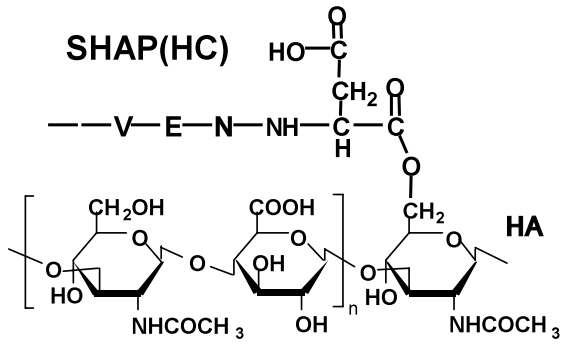


図2 ヒアルロン酸 (HA) の構造と SHAP との結合部位の構造

リックスと呼ばれる高次構造体をつくる³⁾。この時、HAは、高次構造体の各構成分子の各々がもつ機能に加えて、高次構造体に特有な機能をもつようになると思われる。これらの構成分子の中で、SHAPは、唯一、共有結合によりHAと結合していることが筆者らにより見出されたタンパク質である。

3. SHAP-HA 共有結合複合体の発見と構造

多くの細胞が培養初期にその周囲にHAリッチマトリックスを作る。特に血清添加の培地では著しい。筆者らは、このような血清添加培地で作られるマトリックス形成を解析し、高濃度のタンパク質変性剤でもHAから解離しない血清由来のタンパク質を見つけ、SHAP (serum-derived

表1 ヒアルロン酸結合分子

	分子	モジュールタイプ	MW (KD)	組織分布
細胞外	Aggrecan/PG-H	link module, type C, duplicated	400	cartilage
	Versican/PG-M	link module, type C	500	
	Brevican/BEHAB	link module, type C	39	Brain, glia
	Neurocan	link module, type C	170	
	Link protein	link module, type C	43-50	cartilage
	BRAL1	link module		Brain-type like protein
	GHAP	link module, type C	60	brain, N-terminal part of Versican ?
	Hyaluronectin		68	brain, placenta, similar to GHAP
	SPACRCAN			retina interphotoreceptor matrix
	SPACR		147-150	retina interphotoreceptor matrix
	Collagen VI	N-terminal globule		
	Gelatin binding protein		450	serum
	Fibrinogen/fibrin	N-terminal part	47, 55, 65	serum
	SHAP (ITI)	covalent; BX7B	81, 83, 85	serum, cumulus oophorus matrix, Synovial fluid
	TSG-6	link module, type A	39-48	
	PHBP		70 (50 + 17)	serum protein, homolog to HGF activator
C1q			serum	
Hemopexin			serum	
細胞表面	CD44 (hyaluronan receptor, pgp-1, HCAM, gp85, Ly-24, ECMIII)	link module, type B	50, 85-200	ubiquitous
	ICAM-1		85-110	liver endothelial cell
	RHAMM	BX7B	56-72	
	LYVE-1	link module, type B		lymph vessel endothelium
	HARE		175	liver sinusoidal endothelial cells
	CD38	link module		leukocyte
	layilin	C-type lectins	55	widely distributed
細胞内	CDC37, IVD4 antigen			vascular endothelial cell, embryonic brain
	IHABP4	BX7B		
	IHABP/RHAMM	BX7B		hepatocyte
	heptocyte receptor P32	BX7B	2X34 kD	Kidney, fibroblast
その他	HABP102		102	chondrosarcoma
	Fibroblast PG			
	Chick embryo chondrocyte HABP		60, 90, 93	
	Stabilin-1	link module, type A		
	a2-macroglobulin albumin like			
	IgM		900	
	IgG (HA Antibody)			

hyaluronan-associated protein) と名付けた^{4,5)}. その後, マスペクトロメトリーによる詳細な構造解析により, SHAPは血清中に存在するインター- α -トリプシンインヒビターの重鎖サブユニット (以降, HC と略す) であることを示した. HA と HC とは共有結合であり, 他に例をみない特異なもので, HC の C 末端アスパラギン酸の α -カルボキシル基を介して HA 鎖中の *N*-アセチルグルコサミンの 6 位水酸基にエステル結合していた (図 2).

4. SHAP が由来する血清タンパク質, インター- α -トリプシンインヒビターの構造とファミリー分子

インター- α -トリプシンインヒビター (I α I 又は ITI と略す) は尿中と血清中のトリプシン阻害活性をもつ分子として見つけられ, 80 年代から 90 年代にかけてファミリーを構成する分子群が見つかった⁶⁻⁸⁾. これらは肝臓で合成されて血流に乗り 0.15 から 0.5mg/ml にもなる濃度で全身に運ばれる. I α I は, 名前の由来である弱いトリプシンインヒビター活性をもつコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるビクニンと, タンパク質構造は互いに良く類似しているが全く異なる遺伝子の産物である 3 種類の HC の二つまたは一つがビクニンプロテオグリカンのコンドロイチン硫酸鎖部分の *N*-アセチルガラクトサミン残基に共有結合した複雑な構造をもつ (一つの HC のみが結合したものをプレ α -インヒビター, P α I と呼んで二つ結合した I α I と区別している) (図 3)^{10,11)}. 共有結合は, HC の C 末端アスパラギン酸の α -カルボキシル基とコンドロイチン硫酸鎖中の *N*-アセチルガラクトサミン残基の 6 位水酸基の間のエステル結合で, HA-SHAP 複合体間結合と同じタイプの特異なものである¹²⁾. I α I を構成する HC の組み合わせは動物種間で異なるようである. 例えば, ヒト I α I の構成 HC は HC1 と HC2 であり, P α I は HC3 が構成 HC になる (図 3) が, ウシでは前者は, HC2 と HC3 が, 後者は HC2 が構成 HC になっている¹³⁾.

後述するように, HA との複合体形成に提供される HC, SHAP はビクニンとの複合体, つまり I α I である必要がある. HC のファミリー分子として HC1, HC2, HC3 以外にさらに 5 種類の遺伝子ファミリー分子が知られているが,

ビクニンとの複合体を形成できない構造であったり, また形成している証拠がなく, SHAP の提供候補分子となる可能性は低い¹⁴⁾.

5. SHAP-HA 複合体の形成機構

SHAP-HA 複合体の化学構造と I α I の化学構造を見比べ推測できるように, SHAP-HA 複合体の形成は, I α I や P α I の HC 部分の C 末端アスパラギン酸の α -カルボキシル基の, ビクニン部分のコンドロイチン硫酸鎖中の *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基の 6 位水酸基との間のエステル結合から, HA 中の *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基の 6 位水酸基との間のエステル結合へと入れ代わって起こる (エステル結合転移反応)¹⁵⁾.

i) 血清酵素因子の関与する反応機構

筆者らは, 種々の動物の血清と HA を細胞培養培地で保温するだけで SHAP-HA 複合体が形成されることを観察し, さらに血清を煮沸すると複合体形成活性が失われること, また EDTA が反応を阻害すること, また精製 I α I や P α I と HA だけでは培養培地で保温しても形成されないことなどから, 血清には基質である I α I や P α I の他に酵素タンパク質因子が存在し, 二価金属イオンを必要とする酵素触媒作用により SHAP-HA 複合体が形成されると予測した¹⁵⁾. さらに, 筆者らは, ビクニン遺伝子をノックアウトし, SHAP-HA 複合体形成反応の基質である I α I を合成できないマウスを作ったところ, 雌が不妊症を示した (詳細は後述する). 通常, 卵巣中における卵丘複合体 (cumulus oocyte complex, COC) の HA マトリックスには SHAP が含まれており, COC は SHAP-HA 複合体により構築されていると言ってよい. このマウスの症状は, I α I 欠損による SHAP-HA 複合体形成不全により COC が巧く作られず, 正常に機能できないからと推定された. このマウスから血清を得て, 培養培地中で, 精製 I α I と HA を加えて保温するだけで SHAP-HA 複合体が形成された^{11,16)}. 筆者らは, この現象から血清中にエステル結合転移反応を触媒する未同定の酵素があると考えた. つまり, SHAP-HA 複合体形成には, 基質として I α I と HA の 2 分子が, 酵素として血清酵素タンパク質因子が必要と判断した.

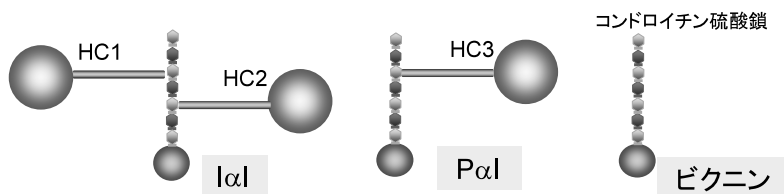


図 3 インター- α -トリプシンインヒビター (I α I) ファミリー 代表的な I α I (2 個の重鎖, HC がビクニンのコンドロイチン硫酸鎖に結合したものと) と P α I (一個の HC が結合したものと) の構造を示した. HC の構成は, 動物種により異なる. 図は, ヒトとマウスの場合を示す.

ii) TSG-6の関与する反応機構

TSG-6 (TNF-stimulated gene 6 product) は、図4に示すような構造と様々な機能をもった分子である¹⁷⁾。米国と英国の共同研究グループが、TSG-6のノックアウトマウスも上記したピクニンノックアウトマウスと同様に雌の不妊症となり、その原因がCOCにおけるSHAP-HA複合体形成の欠損によることを示し¹⁸⁾、TSG-6のSHAP-HA複合体形成における関与を推定した。デンマークのグループは、特異抗体を用いて卵胞液からTSG-6を除くと、複合体の形成活性もなくなり¹⁹⁾、その卵胞液にTSG-6を添加すると活性が回復されることを見出した。しかし、TSG-6単独では酵素活性を検出できず、酵素活性の実体はTSG-6以外の分子か、またはTSG-6を含む分子複合体であると報告した²⁰⁾。一方、Mukhopadhyayら²¹⁾は、リコンビナントTSG6が酵素活性をもつと報告したが、基質はHAと希釈した血清を用いているため、血清中の酵素因子による可能性は否定できなかった。しかし、Sanggaardら²²⁾やRuggら²³⁾は、TSG-6とIαIのHC (HC1やHC2)との共有結合複合体(TSG-6-HC1, TSG-6-HC2)が中間体として作られることを見つけ、さらにRuggらは、中間体からHCが二価金属イオン(MgイオンまたはMnイオン5mM)の存在下でHAに移り、この時、遊離したTSG-6はIαIが存在するとリサイクル利用されて、またTSG-6・HC複合体を形成し、TSG-6は触媒として作用すると報告した(図5)。つまり、TSG-6は転移活性をもつ酵素として作用していることになる。しかし、彼らは、これらの解析のいずれにおいても血清から精製されたIαIを基質としており、血清からの酵素因子の混入の可能性は完全には否定できていない。

筆者らは、ヒトTSG-6のcDNAを発現ベクターに組み込み、肝がん培養細胞株に発現させたところ、その培地中に著しいSHAP-HA複合体形成活性をもつ酵素因子が分泌されることを観察した。この活性はTSG-6自体によるものではない(特許の関係で詳細は記載できない)。図4に示すように、TSG-6はIαIやHAなどの基質以外にも様々な分子への結合活性や細胞への作用が報告されている^{17,25)}。

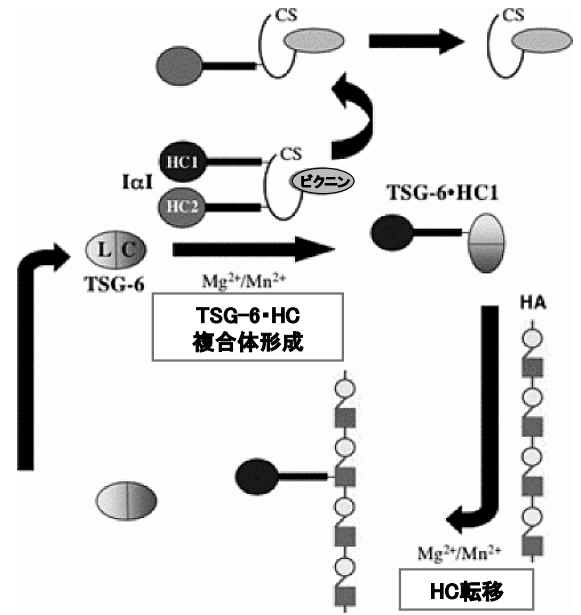


図5 TSG-6 介在によるIαIからヒアルロン酸(HA)への重鎖(HC)の転移反応
1段階、TSG-6・HC複合体の形成; 2段階、HCの複合体からHAへの転移。(文献24より引用)

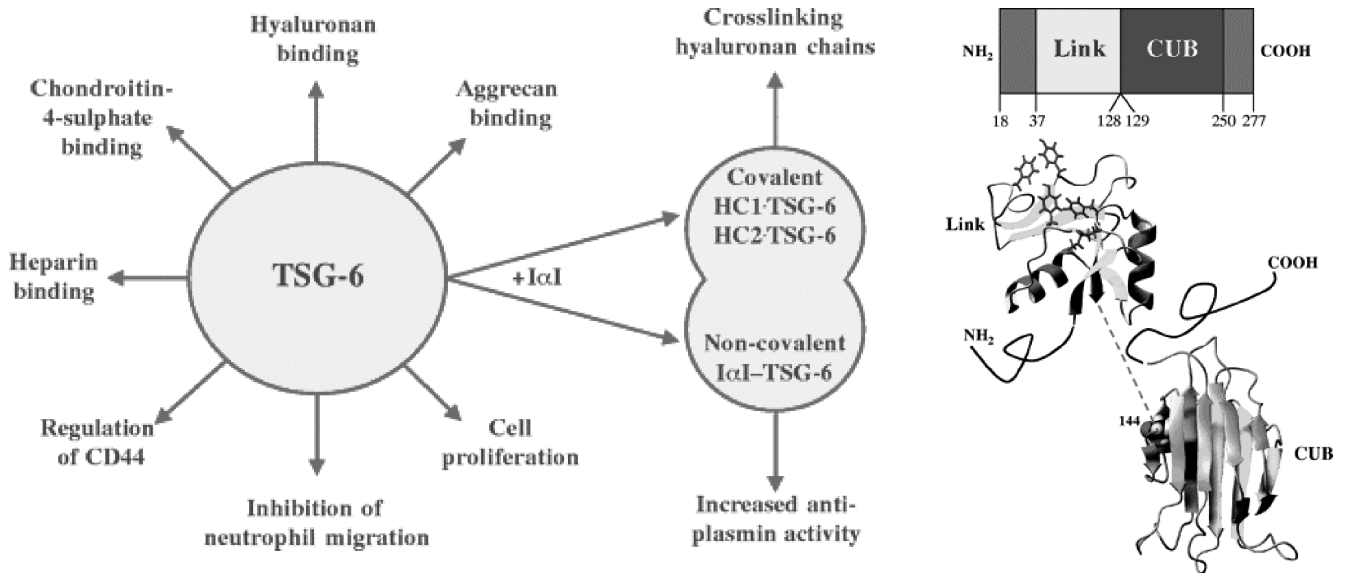


図4 ヒトTSG-6の構造(右)と、性質と予想される機能(左)(文献17より引用)
CUBドメインのCUBは、Complement protein subcomponent Clr/Cls, Urchin embryonic growth factor, Bone morphogenetic protein Aの頭文字をとって命名された。

従って、筆者らは、この結果は、TSG-6が血清中のSHAP-HA複合体形成反応を触媒する酵素因子に相互作用して活性化したからと考えている。従って未知の酵素因子の同定が待たれるが、上記したSanggaardら²²⁾やRuggら²³⁾が報告したように、リコンビナントTSG6タンパク質と精製I α Iを基質としてSHAP-HA複合体形成反応を行った場合にTSG-6とHC鎖が共有結合で結合した複合体が中間体として検出されていることから、TSG-6は中間体を形成する基質になっていることは間違いのないと思われる。この中間体と未知血清酵素因子とがどのような関係にあるのか、SHAP-HA複合体合成にRuggらやSanggaardらが主張するようにTSG-6だけが形成反応触媒因子として関与したものか、さらに未知の酵素因子が関与したものか今後の解析が待たれる(後述するようにSanggaardらは、最近、I α IのHC2が酵素活性を示すと言い出した)。

iii) TSG-6が関与するSHAP-HA複合体の形成反応機構についての諸説

最近、SHAP-HA複合体の形成反応機構を巡って、様々な可能性が示され、混沌とした感がある。以下に現状をまとめた。

TSG-6のSHAP-HA複合体形成への関与は、マウス血清(I α IとP α Iが含まれる)とHAの混合液をTSG-6の存在下で37°C、24時間保温すると、SDS電気泳動またはELISAによりHCのHAへの転移が検出されることから初めて示された²¹⁾。反応条件が検討され、Mgイオンが必要なこと、またHAオリゴ糖で必要なHAの長さを調べると八糖以上が必要と思われること、しかし反応中の血清I α IとP α Iの減少からは既に四糖レベルで反応が進行しているらしいことなどが示された。この時、I α Iの消失はP α Iより早く起こるのでI α Iの方が反応性の高い基質と思われること、また転移はコンドロイチンにも起こるが硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)には起きないことなどが示された。この報告の直ぐ後に、Sanggaardらは、血清に代わって、血清から精製されたI α Iを用いてもHAとTSG-6を加えると同じ反応が起きることを示した²²⁾。さらに彼らは、精製I α Iと精製TSG-6を1:1に混ぜてTris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl中で37°C、60分の保温後に生成されるHC1-TSG-6とHC2-TSG-6と思われる分子について、これらのサーモリシン分解物(TSG-6は抵抗性)のアミノ酸配列解析(HCの末端Aspを除いたC末端配列とTSG-6のN末端配列が検出された)から、HC1またはHC2のC末端Asp残基の α -カルボニルとTSG-6のN末端側親水性アミノ酸の水酸基がエステル結合したものであると同定した。そしてこれらはI α IのHCとピクニンのコンドロイチン硫酸鎖中のGalNAc残基C-6水酸基とのエステル結合が、TSG-6中の親水性アミノ酸水酸基とのエステル結合に置換した産物ではないかと推定した。Ruggら²³⁾は、興味

深いことに、これらのHC-TSG-6中間体からのHCのHAへの転移反応はCoイオンにより阻害されたので、中間体形成反応とは性質が異なると言っている。さらに彼らは、精製P α IはTSG-6と反応させてもHC3-TSG-6はできないが、マウス血清を使った場合には血清中のP α IはHC-HA複合体形成の基質になることから、TSG-6の存在下でのI α IとP α IからのHC-HA複合体形成は異なる機構で行われる可能性があることを報告した。このことは、P α IからのHC-HA複合体形成には血清中の他の因子の関与がありそのようなことを示す。

Milnerらは、TSG-6のLinkドメイン中のY94F変異はHAとの結合活性を低下させたがHC-HA複合体形成活性には影響しないことを見つけた。また、一方、TSG-6のC末端側のCUBドメイン(図4を参照)中にはラットの可溶性エポキシド加水分解酵素の研究から明らかにされたエステル基転移反応(transesterification)の触媒領域に相当するHis-Asp-Serの触媒3対(catalytic triad)²⁶⁾が2箇所あることを見つけて、おそらく、HC-TSG-6複合体形成にはCUBドメインが重要であり、Linkドメインは直接には関与しないと推定した²⁴⁾。最近、Sanggaardらにより、この複合体のトリプシン消化物断片のMALDI-TOF MS分析から共有結合部位の構造はTSG-6のSer²⁸の β 炭素とHCのC末端Aspの α 炭素間のエステル結合であることが明らかにされた²⁷⁾。HCのC末端AspがTSG-6のN末端ポリペプチド(22残基から33残基)のSer²⁸残基にエステル結合していることは、この残基のAla残基への変異により複合体形成ができなくなることから確認された。彼らは、この構造がセリンプロテアーゼの分解反応中に一時的に形成されるアシル化酵素中間体(キモトリプシンの例では活性部位のSer¹⁹⁵と基質タンパク質の切断部位アミノ酸のC末端炭素との間に形成される)²⁸⁾とよく似ていることから、HAとの反応では中間体にHAが求核性攻撃(nucleophilic attack)を行い、HC-HA複合体ができると推定した(図6)。

しかしながら、前述したように、TSG-6を基質I α IとHAからHC-HA複合体形成に働く酵素とすると、一方の基質との反応物が中間体として安定に単離されることは(中間体形成方向に平衡反応がずれていることを示すが、ここにHAがあると容易にHC-HA複合体形成に反応が進行するのは)奇妙である。この点について、さらにSanggaardら²⁹⁾は、以下のように、HC2-ピクニンの触媒作用で説明した。血清に代わって精製P α Iを用いた場合にはTSG-6とHAを加えてもHC3-HA複合体はできなかったとのRuggらの観察²³⁾から、血清中に複合体形成活性をもつ分子があるとの仮説のもとに、ヒト血清中を探索したところ、I α I画分に活性を見出し、さらに検討した結果、そのHC2部分が関与するとの結果を得た。さらにP α IとTSG-6からでは、I α Iを加えた時にだけHC3-TSG-6がで

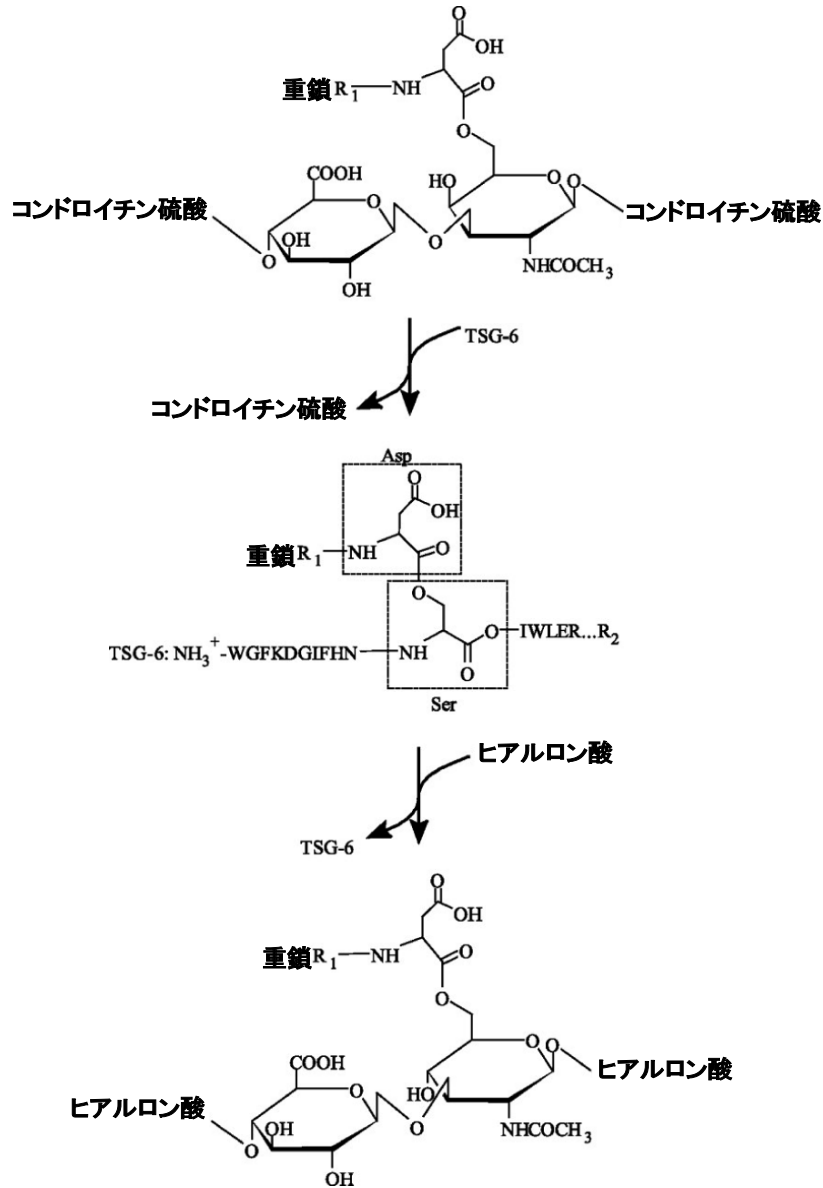


図6 TSG-6 介在による IαI からヒアルロン酸(HA)への重鎖(HC)の転移反応における共有結合部位の化学構造(文献 27 より引用)

き、この時 HA オリゴ糖を加えると HC3-HA 複合体ができた。精製した HC2-ビクニンには、これに TSG-6 と HA オリゴ糖を加えるだけで、HC2-HA 複合体が形成された。さらに HC2-ビクニンからコンドロイチナーゼ消化しほとんどのコンドロイチン硫酸鎖を消化除去して得た HC2 でも同じ活性が検出され、またこの HC2 に PαI と TSG-6 を加えると、IαI を加えた時と同様に、HC3-TSG-6 ができた。面白いことに、同様に IαI をコンドロイチナーゼ消化より得た HC1 には、このような HC3-TSG-6 複合体形成活性はなかった。セファロースに固相化した IαI に PαI と TSG-6 を加え、その後に遠心沈殿でセファロース-IαI を除いて得た HC3-TSG-6 中間体に HA オリゴ糖を加えても HC3-HA 複合体はできなかったが、HC2-ビクニンを加えたらこの複

合体ができた。従って、HC2-ビクニンは基質である IαI または PαI から TSG-6 の存在下で HC-TSG-6 中間体をつくり、さらに HA があるとこの中間体から HC を HA へ転移して HC-HA 複合体を形成する 2 段階のエステル基転移反応を触媒する活性をもつと思われた。注目すべきことは、同時にこの結果は、HC2-ビクニンが含まれない場合には、TSG-6 は中間体合成も HC-HA 複合体形成の活性も発揮できないことを意味することである。つまり、HC2-ビクニンが HC-TSG-6 中間体形成反応とその後の HC の HA への転移反応を触媒する活性をもつことを示唆している。

ところで、このような HC2-ビクニンの特異な活性については、HC2 の由来は血清であり、レコンビナント HC2 で同様な活性をもつかどうかの実験がなされていないの

で、例えば、血清中の HC2 に強い親和性をもつ他の因子が実際の活性分子である可能性は否定できない。いずれにしても、構造的に、従ってエネルギー的にも 3 種類の HC-ビクニン は極めて類似しているにも拘わらず、HC2-ビクニンのみが特異な活性をもつとの結論は、分子進化論的にも理解し難く、他の成分の関与の可能性が残る。

6. SHAP-HA 複合体の機能の解析

i) SHAP-HA 複合体ノックアウトマウス

筆者らは、I α I を構成するビクニンのコアタンパク質の遺伝子を破壊して I α I を合成不能にしたマウスの作製を試み、成功した。このマウスでは、HC の前駆体の合成はできるがビクニンがないために I α I の複合体分子が作れない、従って I α I 基質がないので、SHAP-HA 複合体はできない、つまりこのマウスは、SHAP-HA 複合体ノックアウトマウスと考えてよい¹⁶⁾ (図 7 を参照)。

ii) 卵子-卵丘複合体形成と受精における役割

ビクニンノックアウトマウスは、見かけの異常はなかったが、雌が不妊症であることが分かった。通常、卵巣中では卵子は HA マトリックスの支持により無数の丘細胞に取り囲まれて卵丘複合体 (COC) を形成しているが、排卵間際になるとこのマトリックスが急激に膨張して卵巣から押し出されるように排出される (排卵)。この膨張した複合体の状態では卵子は精子と出会い、受精が成立する。生化学的や免疫学的解析の結果からこの状態の COC の HA マトリックスは、SHAP が共有結合したものであった。ノックアウトマウスでは、一部の COC は排卵が正常に起こら

ず卵巣に残ったままであった。また排卵された COC においても卵子周囲からほとんどの丘細胞は遊離して散在していた。このビクニンノックアウトマウス実験系の利点は、I α I は血清成分であるため、精製 I α I をこのマウスの腹腔へ単に注入するだけで血流に入ることである。この注入により、速やかに SHAP-HA 複合体を含む HA マトリックスの形成が起こり、COC は無数の丘細胞が卵子を取り囲む正常な形態をもつようになり、正常に排卵された。このことは、ノックアウトマウスで観察された COC 異常は明らかに I α I の欠損による SHAP-HA 複合体形成不全によることを示唆するとともに、COC 形成とその機能発現には SHAP-HA 複合体の存在が不可欠であることを強く示唆する。つまり SHAP-HA 複合体は、卵子と丘細胞の両細胞に特異な接着足場を提供し、排卵に必要な COC 構造の保持と、さらに卵と卵丘細胞間の細胞接着シグナルによって媒介される両細胞の細胞機能にも関与すると思われる (下の追加結果を参照)。この結果は、COC では HA の機能実体は SHAP-HA 複合体であることを明確に示している。

ビクニンノックアウトマウスから得た卵子は、正常精子との混合実験 (IVF) により受精効率が約 1/3 にまで低下していた。この値は、ヒアルロニダーゼ処理で卵丘組織を外した正常卵子では受精効率が約 20% 低下したのに比べてさらに低く、従って SHAP-HA 複合体を含む HA マトリックスは、卵子と卵丘細胞間の相互作用を介して卵子細胞表面 (いわゆる透明帯に相当する) に影響し精子を受け入れ易く (結合能の促進) する作用もあると思われる³⁰⁾。

上述の TSG-6 の SHAP-HA 複合体形成への関与を示唆

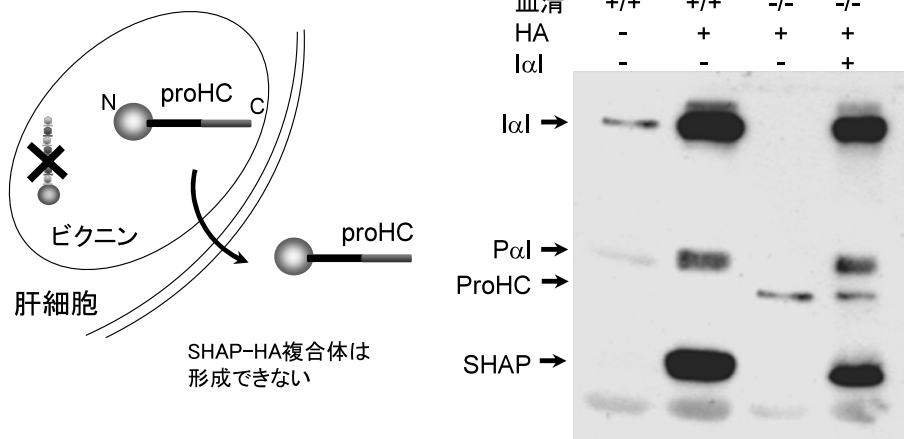


図 7 SHAP-HA 複合体ノックアウトマウスの作成とその証拠

ノックアウトマウスは、ビクニン遺伝子を不活性化して I α I 形成不能にして作成した (左)。作成の証拠 (右) は、*St. myces* ヒアルロニダーゼ処理標品の SDS 電気泳動パターンで示した。正常マウス血清を HA と保温するだけで血清中の I α I から SHAP の転移が起こっているが、ノックアウトマウス血清では I α I は検出されず、HA への HC の転移が起こらないため、SHAP も検出されない。ノックアウトマウス血清ではビクニンが合成されないため、HC はプロセッシングを受ける前の HC 前駆体 (proHC) の形のままで存在していることが確認できる。

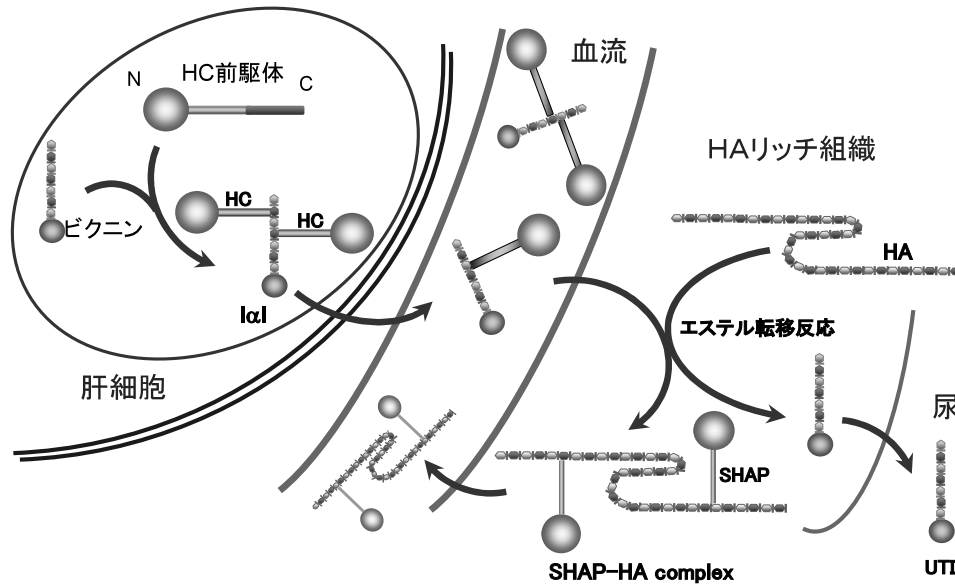


図8 血流中IαIの肝臓における合成経路と分泌IαIとHAリッチ組織におけるHAとの出会いによるSHAP-HA複合体の形成過程と血流への滲入

肝臓で合成され血液中に分泌されたIαIは炎症組織では組織に滲出し組織中のHAと出会い、血液中の酵素因子によりHCがエステル転位反応によってIαIコンドロイチン硫酸鎖からHAへ転移し、SHAP-HA複合体が形成される。複合体は逆に血流中へと流入し、血中SHAP-HA複合体濃度は上昇する。

する結果から、COC形成におけるTSG-6の関与が期待される。実際、Fulopらは¹⁸⁾、TSG-6ノックアウトマウスがピクニンノックアウトマウスと同様に雌の不妊症を示し、そのCOCマトリックスにはSHAP-HA複合体が欠損していることを示した。TSG-6は卵巣中で性腺刺激ホルモン(FSHなど)によって卵丘細胞自身により合成される³¹⁾。さらに、彼らは、ホルモン投与したマウスの卵巣を採取して*in vitro*での排卵過程を観察してTSG-6の関与を確認した。つまりTSG-6の特異抗体を用いて卵胞液からTSG-6を除くと、COCマトリックス形成がなくなり、その卵胞液にTSG-6を添加すると形成が回復することを観察した。またMukhopadhyayらは²¹⁾、ゴナドトロピンで排卵刺激したマウス卵巣から膨張(expansion)前のCOCを採取し、dbcAMPを含むマウス血清と反応させて*in vitro*で膨張を観察した。この時に八糖以上の長さのHAオリゴ糖の添加でCOCの膨張が阻害された。その理由として、COCのHAマトリックスの形成にはHC-HA複合体かHC-TSG-6のどちらかが関与したHA鎖間の架橋が必要であると考えられるが、TSG-6が結合できるHAオリゴは六糖でよいがHCが結合できるHAオリゴは八糖以上の長さをもつことが必要なので、COCのHAマトリックス形成に関与するTSG-6の役割は、HC-HA共有結合体、つまりSHAP-HA複合体の形成にあると推測している。しかし、HCまたはTSG-6がHA以外の新しいマトリックス成分にも結合してCOCのHAマトリックスを安定化している可能性もある。

事実、Salustriらは³²⁾、pentraxin-3のノックアウトマウスでは、COC形成が阻害されており、ピクニンやTSG-6ノックアウトマウスと同様に不妊症を示すことを報告し、pentraxin-3もCOCマトリックスの形成に関与しているとしている。彼らは、pentraxin-3がTSG-6と直接に結合することを明らかにして、これらの分子間相互作用が重要であるとした。しかし、最近、pentraxin-3がそのN末端側の部位を介してHCにも結合してCOCマトリックス形成に関与していることを示した³³⁾。これらの結果を考慮すると、TSG-6のCOCマトリックス形成における役割は、SHAP-HA複合体形成にありとは単純には言えない。このことは前項でまとめたIαIとHAからSHAP-HA複合体が形成される反応におけるTSG-6の関与の機構が予想以上に複雑であることを示す*in vitro*系の結果と一致した。

iii) SHAP-HA複合体の炎症における役割

IαIファミリー分子は肝臓で合成、分泌され、血流中を前記したようになかなかの濃度で循環している。一方、HAはその細胞外マトリックス成分として合成され、一部は組織で分解されるが、多くは体液中に流れだし、約90%がリンパ管(節)内側の網内系細胞によって分解され、残りのHAは血流に乗り肝臓に到達し、代謝される。血液中のHAの半減期は極めて短く、わずか2~3分で³⁴⁾、従って、通常、血液中のHAの濃度は非常に低い(10~100ng/ml)。前述したように、血清とHAが出会えばSHAP-HA複合体の形成が可能になることから、血清とHAの接触の有無と

時間、さらに両者の濃度が SHAP-HA 複合体の形成の程度を制御していることになる。組織の物理的損傷や細菌感染による組織損傷により血管網に破綻が生じ、血液成分が組織中へ流出して組織中 HA と出会うようなことが起こる時、またこの逆に組織中の大量の HA が血液中に流入するようなことが起こる時、SHAP-HA 複合体形成の機会が大幅に増えることが容易に予測される (図 8 を参照)。

7. リウマチ性関節炎症

正常の関節滑液中の HA には血液の混入はなく、従って HA は SHAP-HA 複合体としては存在する余地はないが、関節炎や関節リウマチの患者では関節腔や滑膜組織中への血液の直接の流入により、SHAP-HA 複合体の蓄積が予想される。また、この時、蓄積された複合体の血中への流入が起こり、血中 SHAP-HA 複合体の濃度が上昇することも予想される。これらの患者の関節液に多量の HA が含まれることは古くから知られているが、この HA は正常関節液には含まれない SHAP との共有結合複合体であった³⁵⁾。また、これらの患者の血中 SHAP-HA 複合体の濃度が有意に上昇していることが観察された³⁶⁾。疾患関節腔内に蓄積された SHAP-HA 複合体は、一体何をしているのであろうか。単に血液の関節内への異常流入の結果のみであろうか。

関節リウマチ患者関節液から種々の精製過程を経て SHAP-HA 複合体の単品と思われる標品を得て、細胞培養ウエルをコートした。このコート基質には、同じ量の HA 単独をコートした基質に比べて白血球細胞が数百倍も CD44 依存性に接着することを観察した³⁷⁾。この結果から、組織に蓄積された SHAP-HA 複合体には、炎症性の細胞が多数結合することが想像される。末梢血 T 細胞は結合により活性化され、IL-2 産生レベルを高め、単球細胞ではこの結合により IL-1 や TNF- α などの炎症性サイトカイン

を多量に放出する。これらの反応は炎症反応を亢進させると思われる (図 9 を参照)。この作用機作は、II 型コラーゲン誘導性によるマウスのリウマチ関節炎モデルにおいて、SHAP-HA 複合体形成不能マウスであるビクニン遺伝子ノックアウトでは野性に比べて炎症程度が有意に低下していたことから支持された³⁸⁾。

ここで、炎症細胞が HA よりも SHAP-HA 複合体に数百倍も高い細胞接着性を示す現象を考えてみる。炎症細胞の SHAP-HA 複合体基質への接着は抗 HC 抗体では影響を受けず、HA との結合を中和する活性をもつ抗 CD44 抗体により抑えられる。従って炎症細胞はその細胞表面の HA レセプターである CD44 を介して複合体の HA 部分との相互作用により接着したと思われる。つまり、SHAP-HA 複合体中の HA にはフリーな状態の HA に比べ、比較にならない程に CD44 が強く相互作用したのである。HA が SHAP と複合体を形成する時、SHAP の作用により HA が多量体 (HA 束、HA cable と呼ぶ) を形成することがあれば、HA との結合を介して CD44 も多量体化すると考えられる。この多量体化が CD44 からのシグナルを増強させ、炎症細胞の接着と活性化に作用すると推定される。事実、上記した関節リウマチ患者関節から得た SHAP-HA 複合体の電子顕微鏡写真には SHAP 同士の結合を介して HA が纏れ合っている様子が観察された³⁵⁾。

8. 大腸炎

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease) は大腸に起こる炎症性疾患の一つで、粘膜筋層の平滑筋細胞の過形成と細胞外マトリックスの顕著な蓄積により、筋層の厚さは正常時の数百倍にも達する。過形成のマトリックスには多数の単核白血球の浸潤が認められ、これらの細胞からの炎症性サイトカインは平滑筋細胞の増殖を誘導し過形成に深

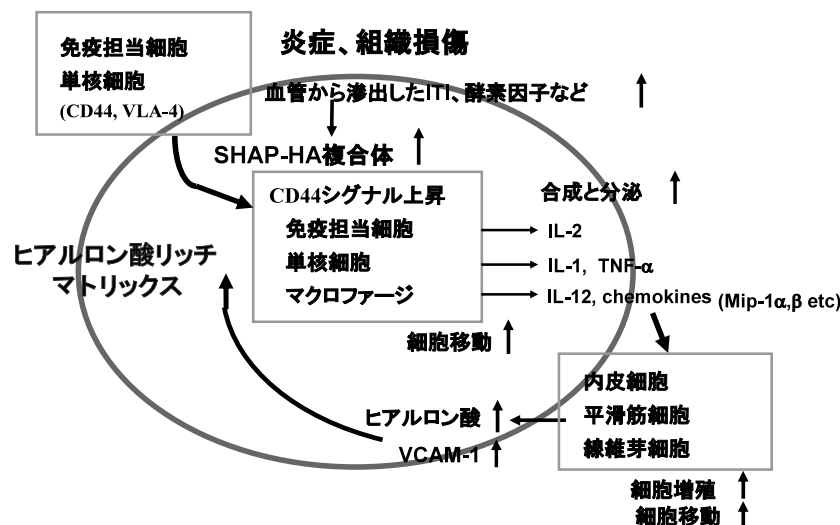


図 9 SHAP-HA 複合体の炎症反応における役割

く関わっている。特にウイルス感染（気道腫瘍ウイルスや麻疹ウイルス）が原因となる場合には、感染によって平滑筋細胞に誘導され形成されたHAを主とするマトリックスに白血球細胞がCD44を介して多数結合し、この特異結合が末梢血T細胞を活性化してIL-2レベルを高め、単球細胞を活性化してIL-1やTNF- α などの炎症性サイトカインを多量に合成・分泌させる（図9を参照）³⁹。これらの反応は炎症反応を悪化させるものと思われた。培養結腸平滑筋細胞にウイルス感染の代わりにポリI:C処理を行った疑似ウイルス感染モデル実験によりHA合成の昂進と白血球との接着反応の詳細が研究された³⁹。無処理の系で見られる単核白血球のVCAM-1発現を介した平滑筋細胞への接着とは異なり、処理系では多数の白血球が鎖状に連なった接着像が見られ、これはヒアルロニダーゼ処理により消失する。興味深いことに白血球はHAマトリックスの撚糸状の繊維（HA束）にのみ結合し、細胞表面のHAの細かい繊維には結合していなかった。この現象について、HA分子に作用して観察されたような撚糸状の繊維構造物を形成するようにする何らかの因子が関与し、これにより形成された撚糸状構造のHAが相互作用を介して白血球上のCD44の多量体化を引き起こし、活性化を招いたと想定された。de la Motteら⁴⁰は、ヒト炎症性腸疾患の大腸の免疫染色でHAと抗I α I抗体のエピトープが平滑筋細胞よりなる粘膜筋層に共局在することを示す（図10）と伴に、上記の培養結腸平滑筋細胞のポリI:C処理を行ったウイルス感染モデル実験で観察されるHA束構造にはI α Iの構成成分（SHAPと思われる）が検出されること、さらに抗I α I抗体の添加によりHA束構造物の形成が阻害されることを観察して、SHAP-HA複合体のHA束構造の形成における役割を示唆している。また最近、Selbiら⁴¹は、腎臓近位尿管上皮細胞培養系で観察されるHA束の形成についてもSHAP-HA複合体の関与を示した。

ところで、最近、気道平滑筋細胞の培養系を用いて、炎症細胞の接着基質としてのHA束にはSHAP-HC複合体の関与はないとする報告があらわれた。培養系の作るHA束に結合しているHCを定量すると、対照としたCOCからのHAマトリックスとは異なり検出限界以下であったが、白血球細胞は同じように結合したので、少なくともこれらの培養系におけるHA束の構造の特異な性質を説明するには、HC結合以外のモデル、つまりSHAP-HA複合体が関与しないモデルも必要のようだとしている⁴²。前述の結腸平滑筋細胞の培養系を用いた前者の結果との矛盾は、細胞種や動物種の違いによってHA束の白血球細胞に対する作用が異なることも考えられるが、今のところ、納得のいく説明はされていない。

9. 肝 炎

肝疾患では、肝機能の低下によりHAの代謝低下が生じ、結果として血中HA濃度が上昇する。実際、血中HA濃度は、肝機能の程度を示す診断マーカーとして利用されており、肝炎などの肝疾患では血中HA濃度の高い上昇が知られている⁴³。この時、血中でのHAの滞留は、SHAP-HA複合体の形成を招くと考えられる。実際、肝疾患の程度を示すATL濃度とSHAP-HA複合体の濃度変化との相関は、HA濃度の変化との相関よりも高い。特に興味深いのは、肝炎ウイルスによる肝炎から、肝線維症へ、さらに肝がんへの進行に伴って、HA濃度に対するSHAP-HA複合体の相対濃度がより高くなることで、優れた診断マーカーになると思われた。この結果は、前記の関節炎におけるSHAP-HA複合体形成の結果を合わせて考えると、炎症などの病態下の組織中HAはその分子実体のほとんどがSHAP-HA複合体であることを意味する。上記で明らかになったように（図8と9を参照）、SHAP-HA複合体の多量体化により形成されるHA束は、炎症細胞のCD44介在による細胞接着の最適な基質となり、接着による炎症細胞の活性化は炎症のさらなる悪化を招くと考えられる。

SHAP-HA複合体の炎症亢進の関与は、本稿の「はじめに」で紹介した細菌毒による肝炎のマウスモデル実験で強く示唆された¹。LPS（細菌細胞壁リポ多糖）エンドトキシンの静脈内投与によってマウスに誘導した肝障害モデルで、肝類洞（sinusoid）の細胞外マトリックスに多数の好中球の接着像が見られる。この接着はCD44とHA間の相互作用によることが以下のように示された。ヒアルロニダーゼ処理により半分くらいに減少することからHAが接着基質になっており、また好中球のCD44が関与することはCD44抗体の添加により接着が特異的に阻害されること、CD44ノックアウトマウスから得た好中球では接着が大きく減少したことから示された。LPS投与により類洞のHA量には大きな変化はないがTLR4依存性の経路を経たSHAPの局在が観察されるようになることが示され、従って、このLPS投与により形成されたSHAP-HA複合体への好中球のCD44依存性の接着の増加とその接着シグナルによる活性化がLPS投与による炎症現象に大きく関与していると推測された。

10. 血中SHAP-HA複合体レベルから推測される早産における子宮炎症

正常の妊娠中の子宮頸部のHA含量は分娩時における組織状態の変化に対応して増加することが報告されている⁴⁴。この過程における血液中のHAとSHAP-HA複合体のレベルを測定したところ、分娩近くでSHAP-HA複合体レベルがHAに対して上昇することを見出した。早産は頸

部や胎児膜の炎症が主な原因因子と考えられ、早産患者の血液中の SHAP-HA 複合体レベルの異常上昇があると思われるが、Kishida らは確かに、大きな上昇を観察し、SHAP-HA 複合体レベルの変化は早産の予知マーカーになると報告した⁴⁵⁾。

11. 気道の炎症, 喘息

喘息は肺の炎症性疾患で、大部分の症例で可逆性の気道閉塞を特徴とする。喘息やタバコに慢性的暴露した肺気道の気管支肺胞洗浄液には TSG-6-HC 複合体が TSG-6 とともに高い濃度で検出されるという。気道上皮細胞は、意外なことに、腎近位尿細管細胞と同様に HC3 とビクニンを常時発現しており、PαI がこの部分では合成されていると思われる⁴⁶⁾。また炎症時にはほとんどの場合に気道上皮は HA の合成上昇を示すので、SHAP-HA 複合体の形成とその濃度の上昇が考えられる。気管支喘息の主要な病態である肺気道過敏性は動物のオゾン暴露によっても実験的に誘起できる。Garantziotis らは、CD44 や IαI のノックアウトマウスではオゾンによる気道過敏性亢進が抑えられることを見つけ、さらに HAS2 トランスジェニックマウスで HA を過剰発現させたり、マウス気管内に直接に HA を注入したり、マウス皮下へ HA 結合タンパク質（市販のアグリカンコアタンパク質より調整）を投与したりして、気道過敏性への影響を調べ、以下の結論を得た。オゾンにより気道内の HA（低分子量が多い）が上昇し、そのサイズに依存して（低分子では亢進的に、高分子では逆に抑制的に作用する）、CD44 や IαI の関与下に気道過敏性に影響を及ぼす。つまり、肺上皮細胞 SHAP-HA 複合体を含む HA マトリックスが CD44 と IαI 依存性にオゾンによる気管支粘膜炎症の進展に大きく関わっていることを示した⁴⁷⁾。ブレオマシンの気管内注入による肺細胞損傷群のマウスに特異的に HA の低分子化が見られることから、低分子 HA が肺炎の進展に関わっているようであるが、CD44 の KO マウスでは野生型に比べて著しい炎症が観察されて高い死亡率を示す。これは CD44 の HA のクリアランス（分解除去）への関与の欠損によると結論している⁴⁸⁾。この例から示唆されるように、炎症における HA、SHAP-HA 複合体、それらのレセプターである CD44 などの分子群の役割は、ある時は炎症細胞の活性化に、また逆に HA や SHAP-HA 複合体のクリアランスに作用し、亢進と抑制の両面を持つと言える。最近、筆者らは、卵白アルブミンで誘導したマウス喘息モデル実験系で、IαI のノックアウトマウスは誘導後期で野生型に比べて亢進した気道過敏性を観察し、SHAP-HA 複合体の形成不全による低分子 HA がこの差をもたらしたと考えている（Zhu, L.ら, *Int. Archives Allergy Immunol.* 2010 印刷中）。さらに複雑なのは、IαI が HA と反応した時、また TSG-6 と反応した時、ビクニンが遊離

し、炎症気道におけるセリンプロテナーゼの一種である TK (tissue kallikrein) を阻害することができる（但し、IαI とビクニンとでこのセリンプロテナーゼ阻害活性に違いがあるかどうかは報告がない）ので、これらの反応は抗-炎症活性発現をもたらすとも考えられる。

12. 羊膜の抗炎症活性

羊膜は炎症や傷の癒着などを抑えて胎児を保護すると考えられている。羊膜には大量の HA が含まれているが、He ら⁴⁹⁾は、この HA には IαI の HC が結合している、つまり SHAP-HA 複合体であることを、羊膜から抽出した高分子 HA（約 300 kDa）画分をヒアルロニダーゼ消化やエステル結合を解離させるアルカリ処理の前後で遊離するタンパク質を検討して明らかにした。さらに、彼らは、羊膜抽出液が角膜線維芽細胞における TGF-β1-プロモーター活性化反応を抑え、またマクロファージのアポトーシスを誘導する活性があるとの従来の報告を確認するとともに、この活性が実は SHAP-HA 複合体によるものであると思われることを以下の実験で示した。羊膜からの精製複合体と試験管中で HA、精製 IαI と TSG-6 を混ぜて形成させた複合体の何れもが培養細胞系にこれらの活性を誘導し、ヒアルロニダーゼ消化や熱処理はこの活性を消失させたのである。その機構は示されていないが、SHAP-HA 複合体が、上述した幾つかの例で見た炎症促進作用に対して、抗炎症活性、抗癒着活性をもつとの報告は、SHAP-HA 複合体の 2 面的な機能を示唆し、その真の機能の理解にはさらに研究が必要と思われた。

13. SHAP-HA 複合体のがんにおける役割

大部分のがん腫瘍では、腫瘍細胞からの刺激を受けて血管の新生が起こる。多くのがんで HA 合成の上昇が観察されており⁵⁰⁻⁵²⁾、新生血管を介して血液への HA の流入が、また逆にがん HA への血液の流出が起こると考えられ、がん部位における SHAP-HA 複合体の形成、また血液中の SHAP-HA 複合体レベルの上昇が予想される。事実、がん患者の血中 SHAP-HA 複合体の濃度の上昇^{43,53)}とがん腫瘍組織マトリックスにおける HA と SHAP の分布^{53,54)}が検出されている。

また、腫瘍部位には慢性的な炎症が観察され、それががんの進展を高めていると考えて良い。がん細胞の転移現象と白血球の炎症部位への移動現象には、共通の細胞接着機構として、CD44 レセプターによる HA リガンドの認識反応機構があることは間違いない⁵⁵⁾。従って、SHAP による HA の修飾は、前述したように CD44-HA 相互作用を促進することからがん転移においても同様に作用すると思われる。また白血球細胞の浸潤は全てのがんに共通する基本的な特徴であり、これらの細胞からの炎症性サイトカインや

ケモカインはがん細胞の増殖や血管新生に大きく影響する。白血球細胞の活性化が内皮細胞や間質細胞 HA マトリックスの SHAP による修飾によって CD44-HA 相互作用を介して制御されているとすれば、がん細胞の増殖、転移の機構の理解に、またその制御方法の開発にも極めて重要である。

終わりに

細胞分化や器官の形態形成において、HA リッチマトリックスは細胞接着や細胞増殖を調節して重要な役割を演じる。しかし、この機能には、SHAP-HA 複合体は関与しないと思われる。細胞外マトリックスの急激な変化を必要とする形態形成などの現象に対して、SHAP-HA 複合体はむしろ細胞外マトリックスの安定化をもたらすと考えられるからである。一方、上述したように、成人組織においては、血清と HA の出会いがあれば複合体は何処でも形成されるので、これらの組織のそれぞれに特異的な HA リッチマトリックスの機能の多くには、SHAP-HA 複合体の関与があると考えられる。さらに、上述したように、組織によっては、例えば近位尿管上皮細胞は $\alpha 1$ ファミリー分子を自身で合成できる⁴¹⁾から、SHAP-HA 複合体は血清がなくても作られる可能性がある。SHAP-HA 複合体の形成は単純な二糖の繰り返しの HA 分子に新たな機能を付与したと言える。言い換えれば、今まで HA によると思われていた機能の一部は、実は SHAP-HA 複合体による可能性がある。従って、SHAP-HA 複合体形成に与る分子や酵素の合成や活性の制御の研究は、SHAP-HA 複合体形成の制御に直接に関連し、SHAP-HA 複合体の特異な機能や、炎症やがん転移などの重要な生命現象に関連する機能を理解する上で極めて重要になってきた。

謝辞

SHAP-HA 複合体の発見と構造については、現愛知県立看護大学教授の米田雅彦博士の、その後の複合体の機能と形成機構については、現愛知医科大学先端医学医療研究拠点、准教授の卓麗聖博士の多大な貢献によるところである。お二人に深く謝辞を申し上げたい。

文 献

- McDonald, B., McAvoy, E.F., Lam, F., Gill, V., dela Motte, C., Savani, R.C., & Kubes, P. (2008) *J. Exp. Med.*, 205, 915-927.
- Takeo, S., Fujise, M., Akiyama, T., Habuchi, H., Itano, N., Matsuo, T., Aigaki, T., Kimata, K., & Nakato, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 18920-18925.
- Yoneda, M., Shimizu, S., Nishi, Y., Yamagata, M., Suzuki, S., & Kimata, K. (1988) *J. Cell Sci.*, 90, 275-286.
- Yoneda, M., Suzuki, S., & Kimata, K. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 5247-5257.
- Huang, L., Yoneda, M., & Kimata, K. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 26725-26730.
- Zhao, M., Yoneda, M., Ohashi, Y., Kurono, S., Iwata, H., Ohnuki, Y., & Kimata, K. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 26657-26663.
- Rouet, P., Daveau, M., & Salier, J-P. (1992) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 373, 1019-1024.
- Salier, J-P. (1990) *Trends Biochem. Sci.*, 15, 435-439.
- Salier, J-P., Rouet, P., Raguenez, G., & Daveau, M. (1996) *Biochem. J.*, 315, 1-9.
- Enghild, J.J., Salvesen, G., Thøgersen, I.B., Valnickova, Z., Pizzo, S.V., & Hefta, S.A. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 8711-8716.
- Zhuo, L. & Kimata K. (2001) *Cell Struct. Func.*, 26, 189-196.
- Zhuo, L., Hascall, V.C., & Kimata, K. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 38079-38082.
- Castillo, G.M. & Templeton, D.M. (1993) *FEBS Lett.*, 318, 292-296.
- Zhuo, L. & Kimata, K. (2008) *Connect. Tissu. Res.*, 49, 311-320.
- Zhuo, L., Salustri, A., & Kimata, K. (2002) *Glycoconj. J.*, 19, 241-247.
- Zhuo, L., Yoneda, M., Zhao, M., Yingsung, W., Yoshida, N., Kitagawa, Y., Kawamura, K., Suzuki, T., & Kimata, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 7693-7696.
- Milner, C.M. & Day, A. (2003) *J. Cell Biol.*, 116, 1863-1873.
- Fulop, C., Szántó, S., Mukhopadhyay, D., Bárdos, T., Kamath, R.V., Rugg, M.S., Day, A.J., Salustri, A., Hascall, V.C., Glant, T.T., & Mikecz, K. (2003) *Development*, 130, 2253-2261.
- Ødum, L., Andersen, C. Y., & Jessen, T.E. (2002) *Reproduction*, 124, 249-257.
- Jessen, T.E. & Ødum, L. (2003) *Reproduction*, 125, 27-31.
- Mukhopadhyay, D., Asari, A., Rugg, M.S., Day, A.J., & Fulop, C. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 11119-11128.
- Sanggaard, K.W., Karring, H., Valnickova, Z., Thøgersen, I.B., & Enghild, J.J. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 11936-11942.
- Rugg, M.S., Willis, A.C., Mukhopadhyay, D., Hascall, V.C., Fries, E., Fülöp, C., Milner, C.M., & Day, A.J. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 25674-25686.
- Milner, C.M., Tongsoongnoen, W., Rugg, M.S., & Day, A.J. (2007) *Biochem. Soc. Transact.*, 35, 672-676.
- Wisniewski, H-G., Snitkin, E.S., Mindrescu, C., Sweet, M.H., & Vilcek, J. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 14476-14484.
- Arand, M., Wagner, H., & Oesch, F. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 4223-4229.
- Sanggaard, K.W., Sonne-Schmidt, C.S., Krogager, T.P., Kristensen, T., Winieski, H-G., Thøgersen, I.B., & Enghild, J.J. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 33912-33926.
- Katona, G., Wilmouth, R.C., Wright, P.A., Berglund, G.I., Haidu, J., Neutze, R., Schofield, C.J. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 21962-21970.
- Sanggaard, K.W., Sonne-Schmidt, C.S., Krogager, T.P., Lorentzen, K.A., Wisniewski, H-G., Thøgersen, I.B., Enghild, J.J. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 18530-18537.
- Zhuo, L., Salustri, A., Atsumi, F., Kawano, M., Wu, J., Shen, L., Ogura, A., Yasue, H., Hascall, V.C., & Kimata, K. (2005) in *Hyaluronan* (Balazs, E.A. & Hascall, V.C., eds.), Vol. 12, pp. 731-735, Matrix Biology Institute.
- Ochsner, S.A., Day, A.J., Rugg, M.S., Breyer, R.M., Gomer, R. H., & Richards, J.S. (2003) *Endocrinology*, 144, 4376-4384.
- Salustri, A., Garlanda, C., Hirsch, E., De Acetis, M., Maccagno, A., Bottazzi, B., Doni, A., Bastone, A., Mantovani, G., Beck

- Peccoz, P., Salvatori, G., Mahoney, D. J., Day, A. J., Siracusa, G., Romani, L., & Mantovani, A. (2004) *Development*, **131**, 1577–1586.
- 33) Scarchilli, L., Camaioni, A., Bottazzi, B., Negri, V., Doni, A., Deban, L., Bastone, A., Salvatori, G., Mantovani, A., Siracusa, G., & Salustri, A. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 30161–30170.
- 34) Fraser, J. R., Laurent, T.C., & Laurent, U.B. (1997) *J. Intern. Med.*, **242**, 27–33.
- 35) Yingsung, W., Zhuo, L., Morgelin, M., Yoneda, M., Kida, D., Watanabe, H., Ishiguro, N., Iwata, H., & Kimata, K. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 32710–32718.
- 36) Kida, D., Yoneda, M., Miyaura, S., Ishimaru, T., Yoshida, Y., Ito, T., Ishiguro, N., Iwata, H., & Kimata, K. (1999) *J. Rheumatol.*, **26**, 1230–1238.
- 37) Zhuo, L., Kanamori, A., Kannagi, R., Itano, N., Wu, J., Hamaguchi, M., Ishiguro, N., & Kimata, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 20303–20314.
- 38) Zhuo, L., Shen, L., Nonogaki, T., Wu, J., Itano, N., Watanabe, H., & Kimata, K. (2004) in *Chemistry and Biology of Hyaluronan* (Garg, H.G. & Hales, C.A. eds.), pp. 205–222, Elsevier Ltd. Tokyo.
- 39) de la Motte, C.A., Hascall, V.C., Calabro, A., Yen-Lieberman, B., & Strong, S.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 30747–30755.
- 40) de la Motte, C.A., Hascall, V.C., Drazba, J., Bandyopadhyay, S. K., & Strong, S.A. (2003) *Am. J. Pathol.*, **163**, 121–133.
- 41) Selbi, W., de la Motte, C.A., Hascall, V.C., Day, A.J., & Bowen, T. (2006) *Kidney Int.*, **70**, 1287–1295.
- 42) Lauer, M.E., Fulop, C., Mukhopadhyay, D., Comhair, S., Erzurum, S.C., & Hascall, V.C. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 5313–5323.
- 43) Shen, L., Zhuo, L., Okumura, A., Ishikawa, T., Miyachi, M., Owa, Y., Ishizawa, T., Sugiura, N., Nagata, Y., Nonami, T., Kakumu, S., & Kimata, K. (2006) *Hepatol. Res.*, **34**, 178–186.
- 44) Obara, M., Hirano, H., Ogawa, M., Tsubaki, H., Hosoya, N., Yoshida, Y., Miyauchi, S., & Tanaka, T. (2001) *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **80**, 492–496.
- 45) Kishida, T., Yabushita, H., Wakatsuki, A., Zhuo, L., & Kimata, K. (2008) *Connect. Tissue Res.*, **49**, 105–108.
- 46) Forteza, R., Casalino-Matsuda, S.M., Monzon, M.E., Fries, E., Rugg, M.S., & Milner, C.M. (2007) *Am. J. Res. Cell Mol. Biol.*, **36**, 20–31.
- 47) Garantziotis, S., Li, Z., Potts, E.N., Kimata, K., Zhuo, L., Morgan, D.L., Savani, R.C., Noble, P.W., Foster, W.M., Schwartz, D.A., & Hollingsworth, J.W. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 11309–11317.
- 48) Teder, P., Vandivier, R.W., Jiang, D., Liang, J., Cohn, L., Puré, E., Henson, P.M., & Noble, P.W. (2002) *Science*, **296**, 155–158.
- 49) He, H., Tseng, D.Y., Zhang, S., Chen, S.-Y., Day, A.J., & Tseng, S.C.G. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 20136–20146.
- 50) Yabushita, H., Noguchi, M., Kishida, T., Fusano, K., Noguchi, Y., Itano, N., Kimata, K., & Noguchi, M. (2004) *Oncol. Rep.*, **12**, 739–743.
- 51) Yabushita, H., Kishida, T., Fusano, K., Kanyama, K., Zhuo, L., Itano, N., Kimata, K., & Noguchi, M. (2005) *Oncol. Rep.*, **13**, 1101–1105.
- 52) Koyama, H., Hibi, T., Isogai, Z., Yoneda, M., Fujimori, M., Amano, J., Kawakubo, M., Kannagi, R., Kimata, K., Taniguchi, S., & Itano, N. (2007) *Am. J. Pathol.*, **170**, 1086–1099.
- 53) Obayashi, Y., Yabushita, H., Kanyama, K., Noguchi, M., Zhuo, L., Kimata, K., & Wakatsuki, A. (2008) *Oncol. Rep.*, **19**, 1245–1251.
- 54) Tabata, I., Nishida, Y., Sugiura, H., Zhuo, L., Yoneda, M., Kimata, K., Nakashima, H., & Ishiguro, N. (2003) *Eur. J. Surg. Oncol.*, **29**, 665–669.
- 55) Itano, N., Zhuo, L., & Kimata, K. (2008) *Cancer Sci.*, **99**, 1720–1725.
-