

Title	Hyaluronan Oligosaccharides Induce CD44 Cleavage and Promote Cell Migration in CD44-expressing Tumor Cells
Author(s)	菅原, 一樹
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45404">https://hdl.handle.net/11094/45404</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	菅 原 一 樹
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19346 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Hyaluronan Oligosaccharides Induce CD44 Cleavage and Promote Cell Migration in CD44-expressing Tumor Cells (ヒアルロン酸オリゴ糖は CD44 発現腫瘍細胞において CD44 切断を誘導し、細胞遊走能を亢進させる)
論文審査委員	(主査) 教授 宮坂 昌之 (副査) 教授 谷口 直之 教授 高井 義美

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

CD44 は種々の細胞に発現する接着分子で、ヒアルロン酸 (HA) などをリガンドに持つ。これまでに、フォルボールエステル (PMA) や抗 CD44 抗体 IM7 などにより CD44 細胞外ドメインの切断が誘導され、さらに腫瘍細胞の遊走能亢進が誘導されることが報告されてきたが、CD44 切断の生理的誘導物質は同定されていない。CD44 リガンドの一つである HA は通常は高分子多糖として存在するが、一部の担癌患者の生体内には血管新生などの活性を持つ低分子量 HA が出現する。この点に注目し、低分子量 HA の腫瘍細胞における CD44 切断誘導能の有無を検討することで、生体内に存在する CD44 切断の誘導物質の同定を行った。

#### 【方法】

##### 低分子量 HA の作成

200-kDa HA を酵素消化し、ゲル濾過により低分子量 HA を分離することで 6-14 糖までの HA を含む溶液 (fr-HA) を調製した。HA の分子量の同定は HPLC を用いて行った。低分子量 HA を 2 糖まで完全消化する際も同様に行った。

##### CD44 切断誘導実験

腫瘍細胞を 24-well plate に培養し、低分子量 HA、高分子量 HA、PMA で刺激し、SDS-PAGE、western blotting を行った。Western blotting では CD44 切断にて生じた細胞膜側に残された CD44 断片を抗体にて検出することで CD44 切断の検討を行った。

##### 免疫細胞染色

高分子量 HA を固相化したカバーガラスに腫瘍細胞を加え、一晚培養した後に低分子量 HA、高分子量 HA、PMA によって刺激し、固定後に CD44、アクチン線維を染色した。

##### Migration assay

Transwell chamber の上下を隔てる膜に高分子量 HA を固相化し、上室に腫瘍細胞を加えた。細胞が膜に接着したのを確認後、低分子量 HA、高分子量 HA を添加し、膜の下面に移動した細胞数を数えた。

## 【結果】

ヒト膀胱癌細胞株 MIA PaCa-2 やヒト膠芽腫細胞株 U251MG を frHA で刺激すると、HA 濃度に依存して CD44 切断の増強が誘導されたのに対して、未消化の 200-kDa HA では明らかな CD44 切断の誘導は認められなかった。frHA に含まれる低分子量 HA を 2 糖まで完全消化したところ、CD44 切断誘導能が消失したことから、CD44 切断の増強が溶液中の HA によって誘導されたことが確認された。HA はその分子量に応じて異なった作用を示すことから、一定サイズの HA 精製オリゴ糖を用いて検討したところ、6~36 糖までの HA は強い CD44 切断誘導能を有し、一方 36、200、1000-kDa HA では明らかな誘導能は持たないことがわかった。また、低分子量 HA により誘導された CD44 切断は、抗 CD44 中和抗体によって完全に抑制されたことから、HA と CD44 の相互作用によることが確認された。これまでに CD44 切断を誘導する刺激により、腫瘍細胞の運動能の亢進が誘導されることが報告されていることから、CD44 切断を最も強く誘導した 6.9-kDa HA (36 糖) を用いて細胞運動能亢進につき検討したところ、6.9-kDa HA により MIA PaCa-2 において細胞表面に多数の filopodia が形成され、さらに CD44 依存性に細胞運動能が亢進することがわかった。一方、CD44 切断を誘導しなかった 1000-kDa HA ではこれらの変化は誘導されなかった。

## 【総括】

ヒト膀胱癌細胞株などにおいて 6~36 糖の低分子量 HA が CD44 切断を誘導し、200-kDa 以上の HA は誘導しないことがわかった。CD44 切断を誘導する低分子量 HA は、さらに腫瘍細胞の形態変化、細胞遊走能の亢進をも誘導することが明らかとなった。CD44 切断誘導活性を持つ低分子量 HA と同様の大きさの HA が担癌患者の生体内に出現することが報告されていることから、生体内においても低分子量 HA が腫瘍の進展に関わっている可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

CD44 は膜貫通型の接着分子で、細胞外基質の構成成分であるヒアルロン酸 (HA) などをリガンドに持つ。これまでに、種々の刺激により CD44 細胞外ドメインの切断が誘導され、それが腫瘍細胞の遊走能亢進に重要であることが報告されてきたが、その生理的誘導物質は同定されていなかった。そこで申請者は生体内に存在する誘導物質の同定を目的に研究を行った。通常 HA は高分子多糖として存在するが、一部の担癌患者では血管新生などの活性を持つ低分子量 HA が出現する。これらの点に注目して解析を行った結果、ヒト膀胱癌細胞株などにおいて 6~36 糖の低分子量 HA のみが、癌細胞表面の CD44 を介して作用することにより、CD44 切断を誘導することがわかった。CD44 切断を強く誘導した 36 糖の HA は CD44 依存性の細胞遊走能も亢進させた。以上のことから、低分子量 HA は生体内において CD44 切断や癌細胞遊走能の亢進を誘導することにより癌の進展に関わっている可能性が考えられた。本研究は癌進展のメカニズムを理解する上で重要であり、学位授与に値する研究であると考えられる。