

学位論文

ウサギヒアルロン酸合成酵素 (Hyaluronic acid synthase;HAS)

遺伝子のクローニングおよびその発現様式の解析

学位申請者 谷本幸太郎

広島大学歯学部口腔健康発育学講座 (歯科矯正学)

(主任：丹根一夫 教授)

2001年度

目次

序論	1
第一章 ウサギ HAS 遺伝子のクローニングおよび構造解析	
緒言	2
材料と方法	
1. ウサギ膝関節滑膜細胞の単離および培養	4
2. Reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析	5
3. ウサギ HAS2 および HAS3 cDNA のクローニング	6
結果	
1. 培養ウサギ滑膜細胞における HAS 遺伝子発現の検討	8
2. ウサギ HAS 遺伝子のクローニングおよび構造解析	9
考察	15
第二章 正常滑膜および軟骨組織における HAS 遺伝子の発現様式	
緒言	17
材料と方法	
1. RT-PCR 解析	18
2. <i>In situ</i> hybridization	18
結果	
1. 滑膜組織における HAS mRNA の発現様相	21
2. 関節軟骨組織における HAS mRNA の発現様相	23
3. 肋軟骨組織における HAS mRNA の発現様相	25
考察	29
第三章 HAS 遺伝子発現におよぼすサイトカインの影響	
緒言	31
材料と方法	
1. ウサギ膝関節滑膜細胞の培養およびサイトカイン処理	33
2. RT-PCR 解析	33

3. Real-time PCR 解析	34
結果	
1. サイトカイン影響下の培養ウサギ滑膜細胞における HAS mRNA 発現の検討	35
2. HAS mRNA 発現に対するサイトカイン単独刺激の影響	36
3. HAS mRNA 発現に対するサイトカインの複合刺激の影響	39
考察	41
総括	44
参考文献	46
謝辞	56

序論

ヒアルロン酸(HA)は、グルクロン酸(GlcA)とN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の2糖体単位が結合した分子量800~900 kDaの多糖体で、生体内の多くの組織、器官における発現が認められるが、とりわけ皮膚、臍帯、硝子体液、関節滑液、軟骨、肺、肝臓、腎臓、脳、筋肉、基底膜、血管周囲などに高濃度に存在している。また、結合組織中の主要な細胞外基質成分のひとつであり、粘弾性、保水性、膨張性などの物理化学的性質のみならず、様々な生物活性を有し、細胞の分裂、接着、増殖、分化、遊走、浸潤などに関わっている⁽¹⁻⁵⁾。さらに、HAは関節滑液中においても多量に存在し、その潤滑機能を果たすとともに、軟骨基質の主要構成要素として関節への機械的負荷を緩衝する役割も果たしている。

一方、変形性関節症(OA)や慢性関節リウマチ(RA)などの病的状態では、関節滑液中のHA濃度の低下^(6, 7)と低分子化^(7, 8)が生じ、滑液粘弾性の低下に伴う関節運動障害⁽⁹⁾や、断片化したHAによる炎症性因子の発現誘導⁽¹⁰⁾により、炎症反応を増悪させることが知られている。HAの低分子化にはサイトカインが関与していることが示唆されている⁽¹¹⁾が、その機序は明らかにされていない。

HAは細胞膜内に存在するHA合成酵素(HAS)によって合成される⁽¹²⁾。近年、ヒトとマウスのHAS遺伝子がクローニングされ、HAS1⁽¹³⁻¹⁵⁾、HAS2^(16, 17)およびHAS3⁽¹⁸⁾の存在が明らかとなった。これらのHASは、それぞれが独立したHA合成酵素として機能し、HAS1とHAS2が2000 kDa以上の高分子量HAを合成するのに対し、HAS3は200~300 kDa程度の低分子量HAを合成する⁽¹⁹⁾。しかしながら、各組織におけるHASの発現様式については不明な点が多く、各組織の発生や病態との関連についても明らかにされていない。

本研究では、ウサギHAS遺伝子のクローニングおよび構造解析を行うとともに、ウサギ滑膜および各軟骨組織におけるHAS mRNAの発現様式、および培養ウサギ滑膜細胞におけるサイトカインによるHAS mRNAの発現調節について解析した。

第一章 ウサギ HAS 遺伝子のクローニングおよび

構造解析

緒言

HA 合成に関する遺伝情報を持つ遺伝子は、*Streptococcus pyogenes* において最初に発見された (*spHas*)^(20, 21)。他の細菌では *Streptococcus equisimilis* において *seHAS*⁽²²⁾ が、*Pasteurella multocida* において *pmHAS*⁽²³⁾ が同定された。また、*Paramecium bursaria* *Chlorella virus-1* (PBCV-1) において、最初のウイルス由来の HAS (*cvHas*) が報告された⁽²⁴⁾。一方、哺乳類では、現在までにヒトおよびマウスの *HAS1*^(13, 14)、*HAS2*^(16, 17)、および *HAS3*⁽¹⁸⁾ がクローニングされ、他の脊椎動物では、ニワトリ *HAS2* および *HAS3*⁽²⁵⁾、アフリカツメガエル *HAS1(DG42)*⁽²⁶⁾、ゼブラフィッシュ *HAS2*⁽²⁷⁾ が同定された。

これらの HAS 遺伝子におけるゲノムの解析から、脊椎動物の HAS 遺伝子はすべて同一起源から *HAS1* 遺伝子系列と *HAS2* 遺伝子系列に枝別れした可能性が示唆されている⁽²⁵⁾。さらに、*HAS2* 遺伝子と *HAS3* 遺伝子ではゲノムの構造が同一であることも明らかにされた⁽²⁵⁾。

HAS 遺伝子のクローニングと構造解析により、HAS 蛋白の一次構造および HA 合成プロセスの一部が明らかとなった。HAS は複数の膜貫通ドメインと細胞内外ドメインからなる細胞膜蛋白であり⁽²⁸⁾、アミノ酸配列の高度に保存された領域を共有している^(29, 30)が、構造的には 2 つのクラスに分類できることが示唆されている⁽³⁰⁾。これまでのところ、すべての真核生物、*Streptococcus* および PBCV-1 における HAS は class I に分類され、*pmHAS* のみが class II に分類される。また、真核生物の HAS には細菌類の HAS にはない 2 つの膜

貫通ドメインを含む領域が C 末端側に存在するが、その機能については明らかにされていない。

さらに、精製した spHAS 蛋白において UDP-glucuronate (UDP-GlcA)と UDP-N-acetylglucosamine (UDP-Glc-Nac)存在下で HA 合成が認められたことから、HAS は β -1,4 および β -1,3 の 2 つの異なるグリコシド結合の触媒活性を有することが示唆された⁽³¹⁾。真核生物では、DG42⁽³²⁾およびマウス HAS1⁽³³⁾において単独で HA を合成できることが証明され、さらに β -1,4 glycosyltransferase 活性部位の 3 アミノ酸残基と、 β -1,3 glycosyltransferase 活性部位の 1 アミノ酸残基が特定された⁽³³⁾。

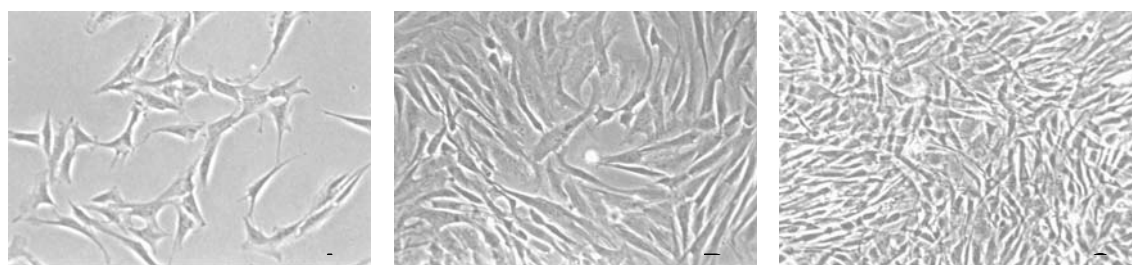
以上のように、HAS の構造や機能の一部が解明されつつあるが、生体内で異なる HAS がそれぞれどのような役割を果たしているのか、またその発現調節はいかにして行われているかなどの詳細については不明な点が多い。

本章では、ウサギ培養滑膜細胞における HAS 遺伝子発現の有無の検討とウサギ HAS 遺伝子のクローニングを行い、遺伝子配列を決定するとともに、その構造解析を行った。

材料と方法

1. ウサギ膝関節滑膜細胞の単離および培養

4週齢の雄性日本白色ウサギ(体長:約25cm、体重:約400g)の膝関節より、outgrowth法⁽³⁴⁾を用いて滑膜細胞の単離および培養を行った。すなわち、膝関節より採取した滑膜組織を細切後phosphate-buffered saline (PBS)で4~5回洗浄し、これを直径10cm培養皿(コーニングインターナショナル、東京)に接着させた。培養液には、L-グルタミン292mg/l(片山化学工業、大阪)、ペニシリンGカリウム250U/l(明治製菓、東京)、カナマイシン60mg/l(明治製菓、東京)、250µg/l amphotericin B (ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA)、および10%ウシ胎児血清(FBS; 第一化学、東京)を添加したalpha-minimum essential medium(α-MEM; 三光純薬、東京)を用い、5%CO₂/95%airの加湿気相条件で37°Cに調整したCO₂ incubator中で培養した。培地交換は2日おきに行った。培養開始4日後に滑膜細胞の増殖が認められた。7日後十分に細胞の増殖が進んだ時点で組織片を除去し、さらに2日間コンフルエントに到達するまで培養した(図1-1)。コンフルエントに達するごとに0.1%トリプシン(三光純薬、東京)/0.02%EDTA(同仁化学、熊本)溶液を用いて継代培養した。実験には5~7代継代した細胞を用いた。



(×200)

図1-1 ウサギ膝関節滑膜細胞の培養

A; 滑膜細胞の増殖開始 (培養開始 4 日後)。 B; 十分に細胞の増殖が進んだ時点で組織片を除去 (7 日後)。 C; コンフルエントに到達 (9 日後)。

2. Reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR)解析

コンフルエントに達した培養ウサギ滑膜細胞から、Quick prep™ total RNA extraction kit (Pharmacia Biotech、東京) を用いて total RNA の抽出を行った。これを 20 μ l のジエチルピロカルボン酸処理水 (DEPC-water) に溶解させ、-70°C で保存した。紫外線吸収分光光度計 Gene Spec I (日立計測器サービス、東京) で吸光度 (OD₂₆₀ および OD₂₈₀) を測定し、1 μ g の total RNA から Superscript™ preamplification system (ライフテックオリエンタル、東京) を用い、Oligo(dT)₂₀ をプライマーとして cDNA を合成した。これをテンプレートとし、Advantage cDNA Polymerase Mix (クロンテック、東京) を用いて PCR 解析を行った。PCR プライマーは表 1-1 に示した。HAS のプライマーは、GenBank より検索したヒトとマウスの HAS 遺伝子配列の中から、両種間で高度に配列が保存されるとともに HAS1、HAS2、および HAS3 の間で類似性の低い領域から設計した。PCR は表 1-2 に示す条件に従い、Gene Amp PCR System 9600 (PE Biosystems, Foster, USA) を用いて行った。PCR 産物は、1.5%アガロースゲル (ライフテックオリエンタル、東京) で電気泳動して分離し、エチジウムブロマイド染色で可視化した。

表 1-1 PCR プライマーの配列

Gene	Forward	Reverse
HAS1	(1) ATC CTG GGC CTC ATG ACC TG	TCC ACC ACC ATG AG
	(2) CTG CTC ATC CTG GGC CTC AT	CAC ATT GAA GGC TAC CCA GT
	(3) CTG CTC ATC CTG GGC CTC AT	CAG ACC TGC ACG TAG TCC AC
	(4) CTC ATG ACC TGG GCC TAC GC	AGG AGT CCA GAG GGT TAA GG
HAS2	GGC CGG TCG TCT CAA ATT CA	CCA CCC CAT TTT TGC ATG AT
HAS3	AAG TGC CTC ACA GAG ACC CC	AAG ATC ATC TCT GCA TTG CC
G3PDH	GTC TTC ACC ACC ATG GAG AA	GCT TCA CCA CCT TCT TGA TG

表 1-2 RT-PCR の条件

	熱変性	アニーリング	伸長反応	サイクル数
HAS1	94°C:30 s	60°C:30 s	72°C:30 s	35 cycles
HAS2	94°C:30 s	60°C:30 s	72°C:40 s	30 cycles
HAS3	94°C:30 s	64°C:35 s	72°C: 5 s	33 cycles
G3PDH	94°C:30 s	60°C:30 s	72°C:40 s	23 cycles

3. ウサギ *HAS2* および *HAS3* cDNA のクローニング

培養ウサギ滑膜細胞から抽出した total RNA 200 µg より Oligotex™-dT30 <Super> (宝酒造、大津) を用いて poly(A)⁺ RNA を精製した。0.5 µg の poly(A)⁺ RNA から cDNA を合成後、これをテンプレートとして目的の遺伝子断片(クローン)の PCR を行った。PCR 産物を電気泳動し、GENECLEAN[□] III kit (Baio 101, Vista, USA) を用いて精製した。P-GEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA) および大腸菌 (Competent high DH5α ; 東洋紡績、大阪) を用いてプラスミドの増幅を行った。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems, Foster, USA) を用いてクローンの塩基配列を検索した。実験は 3 回行い、それらの結果によりウサギ *HAS* の塩基配列を決定した。

HAS2 のクローニングは 2 つのクローンに分けて行った。各 PCR プライマーは、GenBank より検索したヒトとマウスの *HAS* 遺伝子の共通部分をもとに、翻訳開始部位および stop codon を含み、かつ各クローンがオーバーラップするように設計した (図 1-2)。

一方、*HAS3* のクローニングは 3 つのクローンに分けて行い、*HAS2* と同様の手法により PCR プライマーを設計した。ただし、図に示す * 印のプライマーは、expressed sequence tag (EST) データベースより検索した遺伝子配列をもとに設計した (図 1-3)。

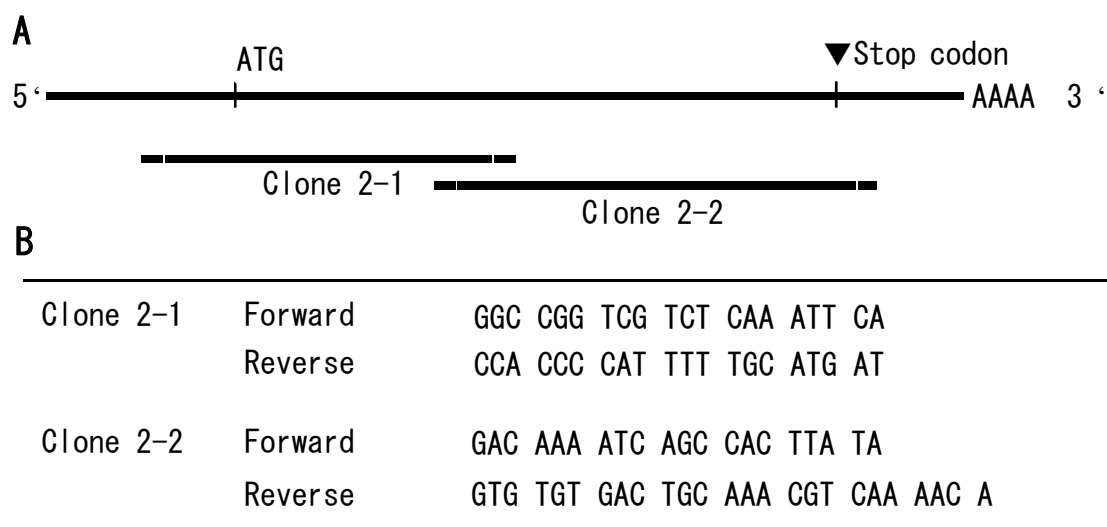


図 1-2 A; ヒトとマウスの HAS2 mRNA の共通配列から設定したウサギ HAS2 の cDNA クローンの模式図。 B; クローニングに用いた RT-PCR プライマーの設計。

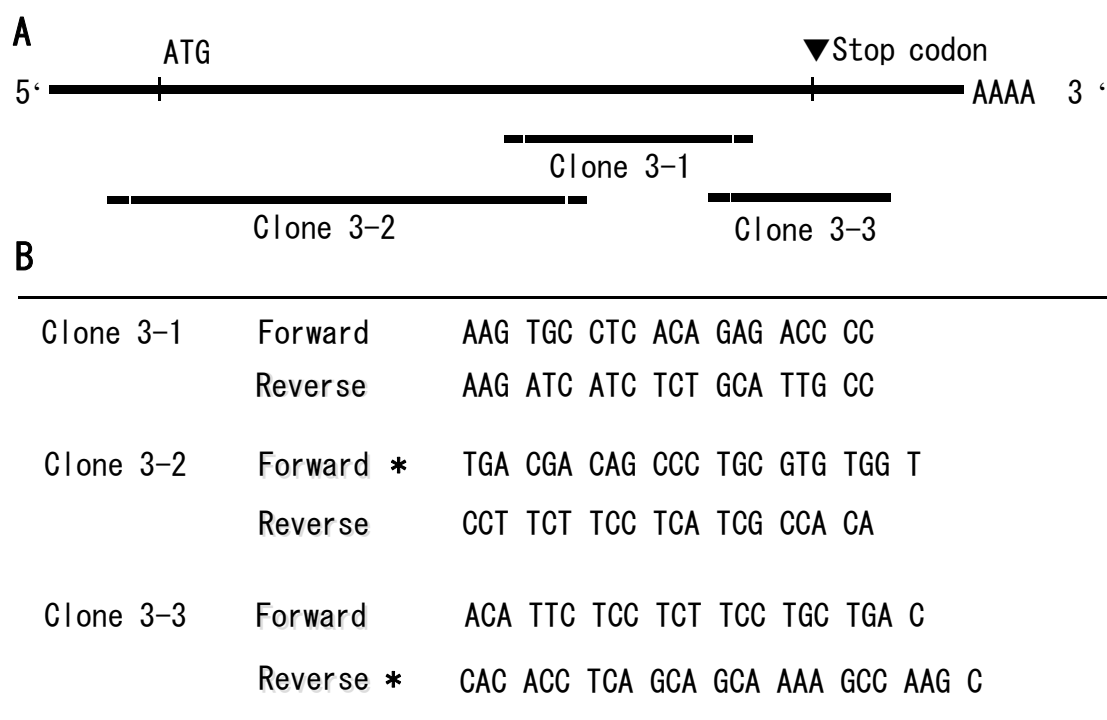


図 1-3 A; ヒトとマウスの HAS3 mRNA の共通配列から設定したウサギ HAS3 の cDNA クローンの模式図。 B; クローニングに用いた RT-PCR プライマーの設計。* 印は expressed sequence tag (EST) 検索により得られた配列を示す。

結果

1. 培養ウサギ滑膜細胞における *HAS* 遺伝子発現の検討

RT-PCR解析の結果、*HAS2*および *HAS3*ではそれぞれ687 bpおよび302 bpの位置に明瞭な増幅産物が認められた(図1-4)。一方、*HAS1*については、4種類のプライマーのあらゆる組み合わせを試みたが、*HAS1*に相当する増幅産物は認められなかった。*HAS2*および *HAS3*の増幅産物の塩基配列を決定し、ヒトおよびマウスの *HAS* 遺伝子配列に対する相同性を検索した結果、いずれも90%以上の高い相同性が得られたため増幅産物は *HAS2*および *HAS3*遺伝子であることが確認された。

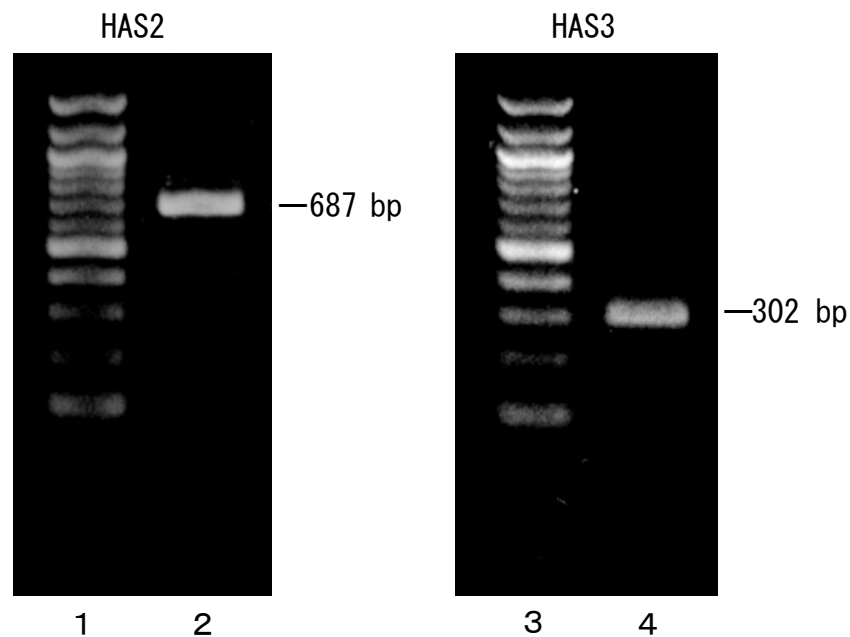


図1-4 培養ウサギ滑膜細胞における *HAS*s の発現

培養ウサギ膝関節滑膜細胞より total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。レーン 1、3 ; 分子量マーカー(100 bp DNA Ladder; 第一化学、東京)、レーン 2 ; *HAS2*、レーン 4 ; *HAS3*

2 . ウサギ *HAS* 遺伝子のクローニングおよび構造解析

ウサギ *HAS1* の増幅産物は得られなかったため、*HAS2* および *HAS3* についてクローニングを行い、塩基配列を決定した。*HAS2*、*HAS3*ともに cDNA 配列の翻訳領域は 1659 bp の長さで、推定分子量は *HAS2* が 63480、*HAS3* が 63134 であった。これらをアミノ酸配列に変換した結果、それぞれ 553 個のアミノ酸がコードされていることが明らかとなった (図 1-5, 6)。

ウサギ *HASs* のアミノ酸配列を解析したところ、HA との結合に関与するアミノ酸の共通配列である「B(X₇)B」⁽³⁵⁾は、ウサギ *HAS2* において 2 カ所、*HAS3* において 3 カ所確認された (図 1-5, 6)。

さらに、protein kinase C (PKC) によるリン酸化に関連するアミノ酸の共通配列「RHLT」「KYT」「RWLS」が、ウサギ *HAS2* および *HAS3* においてそれぞれ 2 カ所、cAMP-dependent protein kinase (PKA)によるリン酸化に関連するアミノ酸の共通配列「RWS」⁽³⁶⁾が、ウサギ *HAS2* および *HAS3* においてそれぞれ 1 カ所確認された (図 1-5, 6)。

GCCTTCTTATTCCTCC

AATTTTGGAAACTGCCTCCACCGGACCTCCGGGCCCCAGCAGGTTAAGCCCGATTTTATGCCCAAACTGGTCCAA

1 ATGCATTGTGAGAGGTTTATATGTATCCTGAGAATAATTGGAACACACTGTTTGGAGTCTCTCTCTCTGGAATCACA
M H C E R F I C I L R I I G T T L F G V S L L L G I T 27

82 GCTGCTTATATGTTGGATACAGTTTATCCAAACGGATAATTACTATTTCTCTTTGGACTGTATGGTGCCTTTTATAGCA
A A Y I V G Y Q F I Q T D N Y Y F S F G L Y G A F L A 54

163 TCACACCTCATCATCCAAAGCCTGTTTGCCTTTTTGGAGCACCGAAAAATGAAAAATCCCTAGAAACCCCATTAAGTTG
S H L I I Q S L F A F L E H R K M K K S L E T P I K L 81

244 AACAAACAGTTGCTCTTTGCATCGCTGCCTATCAAGAAGCCAGACTACTTAAGGAAATGTTTACAATCTGTGAAAAGG
N K T V A L C I A A Y Q E D P D Y L R K C L O S V R 108

325 CTGACCTCCCTGATTAAGTTGTCTGTCATGGTCAATGATGGAACTCAGAAGATGATGTTTACATGATGGACATCTTCAGT
L T Y P G I K V V M V I D G N S E D D V Y M M D I F S 35

406 GAAGTCATGGGCAGGAAACATCAGCCACTTACATCTGGAAGAACAACCTTTCATGAAAAGGGGCTGGGGAGACTGATGAG
E V M G R E T S A T Y I W K N N F H E K G P G E T D E 62

487 TCACATAAAGAAAGCTCACAACATGTAACCCAACTGGTCTTGTGCAACAAAAGTGTTCATCATGCAGAAATGGGGTGA
S H K E S S Q H V C I S G L V L E S N K S V C I M G G D W G 89

568 AAGAGAGAAGTCATGTACACAGCCTTCAGAGCACTGGGACGAAGCGTGGATTATGTACAGGTTTGTGATTAGATACCATG
K R E V M Y T A F R A L G R S V D Y V Q V C D S D T M 16

649 CTTGATCCTGCTTACATCTGTGGAGATGGTGAAGTTTGAAGAAGATCCCATGGTGGGAGGTGTGGGGGAGATGTCAG
L D Y P G S I K V V M V I D G N S E D D V Y M V G G V G 43

730 ATTTTAAACAAGTACGACTCCTGGATCTCCTTCCCTCAGCAGTGTGAGATACTGGATGGCTTTTAAATATAGAAAGGCCTGC
I L N K Y D S W I S F L S S V R Y W M A F N I E R A Q 70

811 CAGTCTTATTTGGGTGTGTCCAGTGCATTAGTGGACCTCTTGGAAATGTACAGGAACTCCTTGCTGCATGAGTTTGTGGAA
Q S Y F G S V Q C I S G P L E G M Y R N S L L H E K F V E 97

892 GACTGGTACAATCAGGAATTTATGGGCAACCAGTGTAGTTTTGGTGTATGATAGGCATCTGACAAACCGAGTGTGAGTCTG
D W Y N Q E F M G N Q C S F G D R H L T N R V L S E 24

973 GGCTACGCAACAAAATACACAGCTCGATCCAAGTGCCTTACTGAAACCCCTATAGAATATCTCCGGTGGTTAAACCAGCAG
G Y A T K Y T A R S K C L T E T P I E Y L R W L N Q Q 51

1054 ACCCGTTGGAGCAAGTCTACTTCCGAGAGTGGCTGTACAATGCAATGTGGTTTCATAAACATCACTTGTGGATGACCTAT
T R W S K S Y F R E W L Y N A M W F H K H H L W M T Y 78

1135 GAAGCGGTTATCTGGATTCTTCCCCTTCTTTCTCATTGCCACAGTAATCCAGCTCTTCTACCGGGTAAAACTGGAAC
E A F I T G F F P F F L E T V I Q L F Y R G K I V M 05

1216 ATCCCTCTCTTCTTGTAACTGTCCAGCTAGTAGGTCTCATAAAATCATCTTTTGCAGTTGCCTTAGAGGAAATATCGTC
I L L F L L T V Q L V G L I K S S F A S C L R G N I W 32

1297 ATGGTCTTTATGTCTCTACTCAGTGTGTACATGTCAAGTTTACTTCCGGCCAAGATGTTTGAATTGCAACAATAAAC
M V F M S L Y S V L Y M S S L L P A K M F A I A T I M 59

1378 AAAGCTGGGTGGGCACTTCTGGAAGGAAAACCATGTTGTTAATTTTCATAGGACTCATTCCAGTATCAGTTTGGTTTACA
K A G W G T S G R K T I V V N F I G L I P V S V W F T 86

1459 ATTCTGCTGGGTGGTGTCAATTTACCATTTATAAGGAATCTAAAAAGCCATTTTTCAGAATCCAAACAGACAGTTCTAATT
I L L G G V I F T I Y K E S K K P F S E S K Q T V L E 513

1540 GTTGAACGTTGCTCTATGCATGCTACTGGGTCATGCTTTTGCAGCTGTATGGTCTCATCAATAAGTGTGGCCGCGG
V G T L L Y A C Y W V M L L T L Y V V L I N K C G R E 40

1621 AAGAAGGACAACAGTATGACATGGTGTGATGATGA
K K G Q Q Y D M V L D V *
GAATTCGCGGCCCTGCAGGTCGACCATATGGAGAGCTCCCAACGCGAGAGGAGCCNAAAAAT

図 1-5 ウサギ HAS2 の cDNA 配列およびアミノ酸配列

四角で囲んだ部分は HA との結合に関与するアミノ酸共通配列「B(X₇)B」を示す。
下線部分は protein kinase C(PKC)によるリン酸化に関連する共通配列「RHLT」「KYT」
「RWLS」あるいは cAMP-dependent protein kinase(PKA)によるリン酸化に関連する
共通配列「RWS」を示す。

TGGGCCCCAGTCGCGCTCCCGGCCCTGGCGGCCGGGAATTCGATTTAGCCCGTTTGCAGG

```

1  ATGCCAGTGCAACTGACAACAGCCTTGCCTGTGGTGGGCACCAGCCTGTTTGCCTTGGCGGTGCTGGGTGGCATCCTGGCA
   M P V Q L T T A L R V V G T S L F A L A V L G G I L A 27
82 GCCTATGTGACAGGCTACCAGTTCATCCACACAGAGAAGCACTACCTGTCTTCGGCCTGTACGGCGCTATCCTGGGCCTG
   A Y V T G Y Q F I H T E K H Y L S F G L Y G A I L G L 54
163 CACCTGCTCATCCAGAGCCTGTTTGCCTTCCCTGGAGCACCGGCGCATGCGGCCGGCCAGGCGGCCGCTGAAGCTGCCTCA
   H L L I Q S L F A F L E H R R M R R A R R P L K L P S 81
244 CGGCGGCGCTCTGTGGCGCTCTGCATCGCCGCCTACCAGGAGACCCCGACTACTTGCGCAAGTGCCTGCGCTCAGCCAG
   R R R S V A L C I A A Y Q E D P D Y L R K C L R S A Q 108
325 CGCATCGCCTTCCCTGACCTCAAGGTGGTTATGGTGGTGCATGGCAACCGCCAGGAAGACGCCTACATGCTGGACATCTTC
   R I A F P D L K V V M V V D G N R Q E D A Y M L D I F 135
406 CATGAGGTGCTGGGTGGCACTGAGCAGGCCGGCTTCTTTGTGTGGCGCAGCAACTTCCACGAGGCAGGCGAGGGCGAGACC
   H E V L G G T E Q A G F F V W R S N F H E A G E G S D 162
487 GAGGCCAGCCTGCAGGAAGGCATGGAGCGGTGCGGGCTGTGGTGGGACCAGCACCTTCTCGTGCATCATGCAGAAGTGG
   E A S L Q E G M E R V R A V V R T S T F S C I M Q K W 189
568 GGAGCAAGCGTGAGGTACGTACACAGCCTTCAAGGCCCTCGGCGATTCAAGTGCATCCAGGTATGTGACTCGGAC
   G R K R S V M Y T A F K A L G D S V D Y I Q V C S D 216
649 ACGGTGCTGGACCCAGCCTGTACCATCGAGATGCTTCGCGCTCTGGAAGAGGATCCCCAAGTAGGGGGAGTCGGGGGAGAT
   T V L D P A C T I E M L R V L E E D P Q V G G V G G D 243
730 GTCCAAATCCTCAACAAGTATGACTCATGGATCTCGTTCTGAGCAGTGTGCGGTACTGGATGGCCTTCAACGTGGAGCGG
   V Q I L N K Y D S W I S F L S S V R Y W M A F N V E R 270
811 GCGTGCCAGTCTACTTTGGCTGTGTGCAGTGTATCAGTGGGCCCTTGGGCATGTACCGCAACAGTCTCCTCCAGCAATTC
   A C Q S Y F G C V Q C I S G P L G M Y R N S L L Q Q F 297
892 CTGGAGGACTGGTACCATCAGAAGTTCCTAGGCAGCAAGTGCAGCTTTGGGGATGACAGGCACCTCAGCAACCGAGTCTG
   L E D W Y H Q K F L G S K C S F G D D R H L T N R V L 324
973 AGTCTTGGCTACCGAACTAAGTATACAGCAGCTCCAAGTGCCTCACTGAGACCCCTACCAAGTACCTACGGTGGCTCAAC
   S L G Y R T K Y T A R S K C L T E T P T K Y L R W L N 351
1054 CAACAGACGCGCTGGAGCAAGTCTTACTTCCGGGAGTGGCTTACAACCTCTGTGGTTCATAAGCACCATCTCTGGATG
   Q Q T R W S K S Y F R E W L Y N S L W F H K H H L W M 378
1135 ACCTACGAGTTCGGTTCACAGGTTTCTTCCCTTCTTCTCATCGCCACAGTCATACAGCTTTTCTACCGTGGCCGCATC
   T Y E S V V T G F F F F L I A T V I Q L F Y R G R I 405
1216 TGGAAATCCTCTTCTCTGCTGACCGTGCAGTGGTGGGCATCATCAAAGCTACCTATGCCTGCTTCCCTTCGGGGCAAT
   W N I L L F L L T V Q L V G I I K A T Y A C F L R G N 432
1297 GCAGAGATGATCTTCATGTCCCTTACTCCCTTCTCTACATGTCTAGCCTCCTGCCCCCAAGATCTTTGCCATTGCTACC
   A E M I F M S L Y S L L Y M S S L L P A K I F A I A T 459
1378 ATCAACAAGTCTGGCTGGGCACTTCTGGCCGAAAAACAATTGGTGAACCTCATTGGCCTCATCCCTGTGCCATCTGG
   I N K S G W G T S G R K T I V V N F I G L I P V S I W 486
1459 GTGGCAGTCTTTTGGGGGTCTGGCCTACACGGCTTATGGCAGGACCTGTTCAAGTGCAGACAGAGTTAGCCTTCTTGT
   V A V L L G G L A Y T A Y C Q D L F S E T E L A F L V 513
1540 TCAGGGGCCATTCTGTATGGCTGCTACTGGGTGGCCCTCCTCATGCTGTATCTGGCCATCATAGCCCGAGATGTGGGAAG
   S G A I L Y G C Y W V A L L M L Y L A I I A R R C G K 540
1621 AAGCCAGAACAATATAGCTTGGCCTTTGCTGAGGTGTGA
      K P E Q Y S L A F A E V *
      GGGAGGGAATCGAATTCGCGGCCCGCCAGGCGGCCGGGAGCNGCGACTGGGGCCATAA

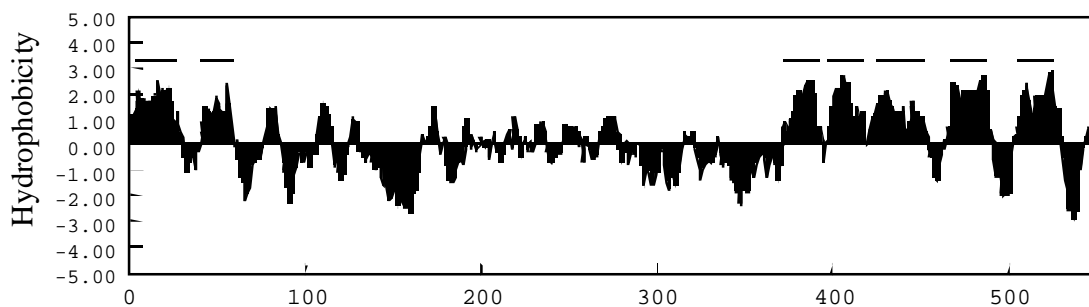
```

図1-6 ウサギHAS3のcDNA配列およびアミノ酸配列

四角で囲んだ部分はHAとの結合に関与する共通配列「B(X₇)B」を示す。下線部分はprotein kinase C(PKC)によるリン酸化に関連する共通配列「RHLT」「KYT」「RWLS」あるいはcAMP-dependent protein kinase(PKA)によるリン酸化に関連する共通配列「RWS」を示す。

Kyte&Doolittleの方法⁽³⁷⁾によるアミノ酸配列の疎水性領域の検討では、ウサギHAS2およびHAS3ともにN末端側に2カ所、C末端側に5カ所の疎水性領域が存在していた(図1-8)。

HAS2



HAS3

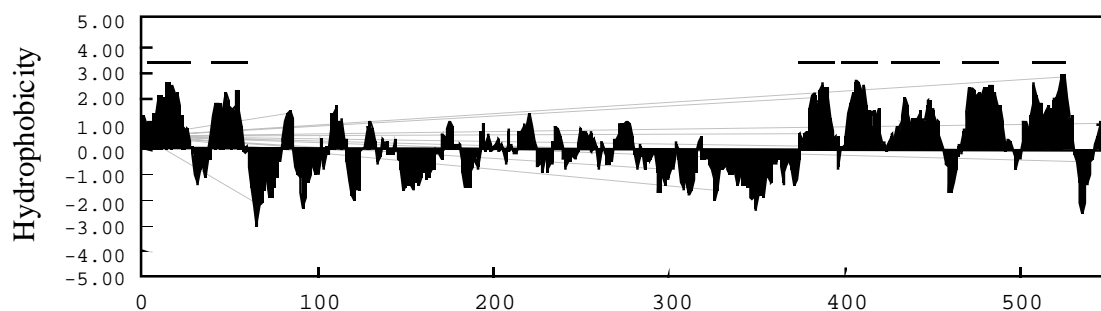


図1-8 ウサギHASsアミノ酸配列の疎水性の検討

グラフ上の線は疎水性領域を示す。

さらに、各動物種におけるアミノ酸配列の相同性の検索を行った結果、ウサギHAS2は、ヒトHAS2に対して98.7%、マウスHAS2に対して98.4%の一致率を示した。一方、ウサギHAS3は、ヒト、マウスHAS3に対してそれぞれ98.2%、97.5%の一致率を示した(図1-9)。

A		70
Rabbit	MHCERF I CILRIIGTTLFGVSLLLGITAAYIVGYQFIOTDNYYSFGLYGAF LASHLIIQSLFAFLEHRK	
Human	MHCERFLCILRIIGTTLFGVSLLLGITAAYIVGYQFIOTDNYYSFGLYGAF LASHLIIQSLFAFLEHRK	
Mouse	MHCERFL V LRIIGTTLFGVSLLLGITAAYIVGYQFIOTDNYYSFGLYGAF LASHLIIQSLFAFLEHRK	140
Rabbit	MKKSLETPIKLNKTVALCIAAYQEDPDYLRKCLQSVKRLTYPGIKVVVIDGNS V YMMDIFSEVMGR	
Human	MKKSLETPIKLNKTVALCIAAYQEDPDYLRKCLQSVKRLTYPGIKVVVIDGNS D YMMDIFSEVMGR	
Mouse	MKKSLETPIKLNKTVALCIAAYQEDPDYLRKCLQSVKRLTYPGIKVVVIDGNS D YMMDIFSEVMGR	210
Rabbit	I SATYIWKNNFHEKGPGETDESHKESQHVTLVLSNKS V CIMQKWGGKREVMYTAFRALGRSDYVQV	
Human	DKSATYIWKNNFHEKGPGETDESHKESQHVTLVLSNKS I CIMQKWGGKREVMYTAFRALGRSDYVQV	
Mouse	DKSATYIWKNNFHEKGPGET I ESHKESQHVTLVLSNKS I CIMQKWGGKREVMYTAFRALGRSDYVQV	280
Rabbit	CSDTMDPASSVEMVKVLEEDPMVGGVGGDVQILNKYDSWISFLSSVRYWMAFNIERACOSYFGCVQCI	
Human	CSDTMDPASSVEMVKVLEEDPMVGGVGGDVQILNKYDSWISFLSSVRYWMAFNIERACOSYFGCVQCI	
Mouse	CSDTMDPASSVEMVKVLEEDPMVGGVGGDVQILNKYDSWISFLSSVRYWMAFNIERACOSYFGCVQCI	350
Rabbit	SGPLGMYRNSLLHEFVEDWYNQEFMGNQCSFGDDRHLTNRVLSLGYATKYTARSKCLTETPIEYLRWLNQ	
Human	SGPLGMYRNSLLHEFVEDWYNQEFMGNQCSFGDDRHLTNRVLSLGYATKYTARSKCLTETPIEYLRWLNQ	
Mouse	SGPLGMYRNSLLHEFVEDWYNQEFMGNQCSFGDDRHLTNRVLSLGYATKYTARSKCLTETPIEYLRWLNQ	420
Rabbit	QTRWSKSYFREWLYNAMWFHKHHLWMTYEAVITGFFPFLLIATVIQLFYRGIWNILLFLLTVQLVGLIK	
Human	QTRWSKSYFREWLYNAMWFHKHHLWMTYE A ITGFFPFLLIATVIQLFYRGIWNILLFLLTVQLVGLIK	
Mouse	QTRWSKSYFREWLYNAMWFHKHHLWMTYEAVITGFFPFLLIATVIQLFYRGIWNILLFLLTVQLVGLIK	490
Rabbit	SSFASCLRGNIVMVFMSLYSVLYMSLLPAKMFATATINKAGWGTSGRKTIVVNFIFLIPVSVWFTILLG	
Human	SSFASCLRGNIVMVFMSLYSVLYMSLLPAKMFATATINKAGWGTSGRKTIVVNFIFLIPVSVWFTILLG	
Mouse	SSFASCLRGNIVMVFMSLYSVLYMSLLPAKMFATATINKAGWGTSGRKTIVVNFIFLIPVSVWFTILLG	560
Rabbit	GVIFTIYKESKPPFSESKQTVLIVGTLLYACYWVMLLTLVYVVLINKCGRRKKGOQYDMVLDV*	
Human	GVIFTIYKESKPPFSESKQTVLIVGTLLYACYWVMLLTLVYVVLINKCGRRKKGOQYDMVLDV*	
Mouse	GVIFTIYKESKPPFSESKQTVLIVGTLL I YACYWVMLLTLVYVVLINKCGRRKKGOQYDMVLDV*	
B		70
Rabbit	MPVQLTTALRVVGTSLFALAVLGGILAAYVTGYOFIHTEKHYSFGLYGAILGLHLLIQSLFAFLEHRRM	
Human	MPVQLTTALRVVGTSLFALAVLGGILAAYVTGYOFIHTEKHYSFGLYGAILGLHLLIQSLFAFLEHRRM	
Mouse	MPVQLTTALRVVGTSLFAL V LGGILAAYVTGYOFIHTEKHYSFGLYGAILGLHLLIQSLFAFLEHRRM	140
Rabbit	RRAR R RPLKLPSRRR--SVALCIAAYQEDPDYLRKCLRSAORIAFPDLKVVMMVVDGNROEDAYMLDIFHEV	
Human	RRAG A LKLPSRRR C --SVALCIAAYQEDPDYLRKCLRSAORIAFPDLKVVMMVVDGNROEDAYMLDIFHEV	
Mouse	RRAGRPLKL I CS R SR S SVALCIAAYQEDP I YLRKCLRSAORIAFP N LKVVMMVVDGNRQED I YMLDIFHEV	210
Rabbit	LGTEQAGFFVWRNSNFHEAGEGETEASLQEGMERVRAVV R IT I STFSCIMQKWGGKREVMYTAFAKALGDSVD	
Human	LGTEQAGFFVWRNSNFHEAGEGETEASLQEGM R VR D V R ASTFSCIMQKWGGKREVMYTAFAKALGDSVD	
Mouse	LGTEQAGFFVWRNSNFHEAGEGETEASLQEGMERVRAVV M ASTFSCIMQKWGGKREVMYTAFAKALG N SVD	280
Rabbit	YIQVCSDTVLDPACTIEMLRVLEEDPOVGGVGGDVQILNKYDSWISFLSSVRYWMAFNVERACOSYFGC	
Human	YIQVCSDTVLDPACTIEMLRVLEEDPOVGGVGGDVQILNKYDSWISFLSSVRYWMAFNVERACOSYFGC	
Mouse	YIQVCSDTVLDPACTIEMLRVLEEDPOVGGVGGDVQILNKYDSWISFLSSVRYWMAFNVERACOSYFGC	350
Rabbit	VOCISGPLGMYRNSLLQOFL E DWYHOKFLGSKCSFGDDRHLTNRVLSLGYRTKYTARSKCLTETPTKYLR	
Human	VOCISGPLGMYRNSLLQOFL E DWYHOKFLGSKCSFGDDRHLTNRVLSLGYRTKYTARSKCLTETPTKYLR	
Mouse	VQCISGPLGMYRNSLLQOFL E DWYH Q KFLGSKCSFGDDRHLTNRVLSLGYRTKYTARSKCLTETPT R YLR	420
Rabbit	WLNQOTRWSKSYFREWLNSLWFHKHHLWMTYESVVTGFFPFLLIATVIQLFYRGRINWILLFLLTVQLV	
Human	WLNQOTRWSKSYFREWLNSLWFHKHHLWMTYESVVTGFFPFLLIATVIQLFYRGRINWILLFLLTVQLV	
Mouse	WLNQOTRWSKSYFREWLNSLWFHKHHLWMTYESVVTGFFPFLLIATVIQLFYRGRINWILLFLLTVQLV	490
Rabbit	GIIKATYACFLRGNAEMIFMSLYSLLYMSLLPAKIFAIATINKSGWGTSGRKTIVVNFIFLIPVSIWVA	
Human	GIIKATYACFLRGNAEMIFMSLYSLLYMSLLPAKIFAIATINKSGWGTSGRKTIVVNFIFLIPVSIWVA	
Mouse	GIIKATYACFLRGNAEMIFMSLYSLLYMSLLPAKIFAIATINKSGWGTSGRKTIVVNFIFLIPVSIWVA	560
Rabbit	VLLGGLAYTAYCODL F SETELAFVSGAILYGCYVWALLMMLYLAIARRCGKKPEOYSLAFAEV*	
Human	VLL I GLAYTAYCODL F SETELAFVSGAILYGCYVWALLMMLYLAIARRCGKKPEOYSLAFAEV*	
Mouse	VLLGGLAYTAYCODL F SETELAFVSGAILYGCYVWALLMMLYLAIARRCGKKPEOYSLAFAEV*	

図 1-9 各動物種における HASs のアミノ酸レベルでの相同性

ウサギ、ヒト、マウスにおける A; HAS2 および B; HAS3 mRNA のアミノ酸配列の相同性を検索した。白黒反転させた文字は 3 者のいずれかのアミノ酸配列が異なる部分を示す。

考察

本章では、ウサギ膝関節滑膜由来培養細胞において HAS2 および HAS3 mRNA の発現が認められたが、HAS1 mRNA の発現は確認されなかった。ヒト関節軟骨細胞においても HAS1 mRNA の発現は認められなかったとの報告^(38, 39)もあり、発現が無いか低レベルである可能性や、何らかの理由で検出が困難である可能性が考えられたため、HAS2、HAS3 のみを対象とした。

ウサギHAS2は553個のアミノ酸から構成されていたが、これはヒトおよびマウスHAS2においても共通であった。一方、ウサギHAS3が553個のアミノ酸から構成されているのに対し、ヒトHAS3は554個、マウスHAS3は555個と構成アミノ酸数に違いが認められた。これはウサギHAS3においてAla⁷³~Ser⁸⁵に相当する領域のアミノ酸配列が3種間で大きく異なるためであるが、この領域がHA合成にどのように関わっているのかは不明である。しかしながら、この領域以外でのアミノ酸配列の相同性は高く、HAS2、HAS3の全アミノ酸配列は、いずれもウサギ、ヒト、およびマウスの間で約98%の相同性が認められた。このことから、哺乳類におけるHAS2およびHAS3遺伝子は異種間で高度に保存されていることが示唆された。

ウサギHAS2、HAS3は、他のHASと同様の構造⁽²⁸⁾であることが疎水性分析によって示された。すなわち、分子の中央に大きな細胞内ドメイン(large loop)を有し、N末端側に2カ所の膜貫通ドメイン、C末端側に4カ所の膜貫通ドメインと1カ所の膜接触ドメインを配した構造であると考えられた。このような構造から、HAは細胞膜の内側で合成され、細胞膜を通過して細胞外へ排出されることが示唆されている⁽²⁸⁾。

また、HASの活性に重要なアミノ酸配列は、large loop内に存在することが示唆されてきた^(21, 31)。キチン合成酵素*S. cerevisiae* chitin synthase 2 (CHS2)の β -1,4 glycosyltransferase活性に必要な「D, D, QXXRW」配列は、全てのHASのlarge loopに保存され⁽⁴⁰⁾、この中の3アミノ酸残基が β -1,4 glycosyltransferase活性部位に相当する。

一方、 β -1,3 glycosyltransferase 活性をもつ酵素には UDP-glucuronosyltransferase (UDP-GTs)が知られているが、酵素活性に関するHASとの共通配列は認められない。しかし、マウスHAS1を用いた実験により、large loop内に存在するHA合成活性部位のひとつであるLew³¹⁴を変異させるとHA合成活性は消失するが、GlcNAcのみで構成されるキトオリゴ糖の合成は可能であることが明らかにされ、同部位がHASの β -1,3glycosyltransferase活性に必須であることが証明された⁽³³⁾。また、HASの酵素活性の調節には、PKCおよびPKAによるリン酸化を介したシグナル伝達系が関与する可能性が示唆され、哺乳動物細胞においてPKCおよびPKAがHA合成を促進するという報告⁽⁴¹⁻⁴³⁾と一致した。これらのアミノ酸配列もlarge loop内に存在する。さらに、CD44とreceptor for hyaluronan mediated motility (RHAMM)の共通アミノ酸配列であり、HAとの結合に必要な部位であると推測されている「B(X₇)B」配列⁽³⁵⁾もこの中に存在する。

以上のことから、HASのlarge loopには、UDP-GlcAとUDP-Glc-Nacを交互に結合させ、これを調節する機構が存在する可能性が考えられる。今後、細胞内で合成されたHAが細胞膜を通して細胞外へ排出されるメカニズムや、HA分子量の制御方法の解明により、3種類のHASのより詳細な役割の違いが明らかにされるものと考えられる。

第二章 正常滑膜および軟骨組織における *HAS* 遺伝子の発現様式

緒言

HAS1、*HAS2*、および *HAS3* 遺伝子の発現には組織特異性が認められることから、遺伝子発現の調節領域は *HAS* 遺伝子間で異なっていることが示唆されている⁽²⁵⁾。真核生物において酵素の特性と mRNA の発現パターンが異なる 3 種の *HAS* が存在することは、HA 合成を多段階に調節する必要性からであると考えられている。ヒトの正常組織、器官のうち、*HAS1* 遺伝子は心臓、肝臓、および骨格筋において発現が認められる。*HAS2* 遺伝子は心臓および小腸での発現が認められるが、組織特異性が高い。また、*HAS3* は心臓、胎盤、肺、膵臓、前立腺、および小腸で発現が認められる⁽²⁵⁾。*HAS1* と *HAS3* 活性の欠損したマウスには生存能力があるが、*HAS2* 活性の欠損したマウスは成長遅延、および卵黄嚢の血管形成異常と心臓の形態形成異常など重大な欠陥を有し、HA をほとんど欠いているため致死的であるとされる⁽⁴⁴⁾。これに加えて、*HAS2* は高分子量 HA を合成することから、*HAS2* による HA 合成は組織の増殖と成長において重要な役割を果たすと推察されている。

滑液中の HA はその主要構成成分として関節の潤滑機能に貢献し⁽¹⁾、軟骨中の HA はプロテオグリカンを構成し、コラーゲン線維とともに軟骨負荷の分散、関節潤滑作用を発揮する。また、関節滑液および関節軟骨における多量の HA の存在が明らかであることから、滑膜および軟骨組織における *HAS* 遺伝子の発現が推察されるが、その発現様式については検討されていない。そこで、本章では滑膜および軟骨組織における *HAS* 遺伝子の発現様相を検討した。

材料と方法

1. RT-PCR 解析

4 週齢の雄性日本白色ウサギの膝関節と顎関節よりそれぞれ滑膜と軟骨を、肋軟骨より静止軟骨と成長板軟骨を採取した。各組織を細切後ホモジナイザー (POLYTRON PT1200; KINEMATICA, Luzern, Switzerland) で粉碎し、Quick prep™ total RNA extraction kitを用いて total RNAを抽出した。1 μg の total RNAから Superscript™ preamplification system を用い、Oligo(dT)₂₀をプライマーとして cDNAを合成した。これをテンプレートとし、Advantage cDNA Polymerase Mixを用いてPCR解析を行った。PCRプライマーには、表 1-1 の HAS2、HAS3 および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)のものを使用し、サーマルサイクラー Gene Amp PCR System 9600で表1-2の条件に従って増幅した。これを1.5% アガロースゲルで電気泳動した。

2. *In situ* hybridization

In situ hybridization は、T-T dimer 法⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾を用い、以下のように行った。

4 週齢の雄性日本白色ウサギの膝関節および肋軟骨よりメスを用いて軟骨層を剥離して採取した。また、顎関節については下顎頭および下顎窩を一塊として採取し、これらをただちに液体窒素を用いて凍結させた。O.C.T. compound (サクラ精機、東京) に包埋し、液体窒素中で凍結させた。肋軟骨、膝関節軟骨および膝関節滑膜の凍結ブロックより、クリオスタット (CM3500; ライカマイクロシステムズ、東京) を用い-20°Cで厚さ 7 μm の新鮮凍結切片を作製し、APS コートされたスライドガラスに添付し、ただちに乾燥させた。一方、顎関節の切片作製にはテープ法⁽⁴⁸⁾を用いた。すなわち、面出しを終えた凍結ブロックの表面に粘着剤 (ファインテック、東京) のついた polyvinylidene chloride film (旭化成工業、東京) を貼付し

た後、disposable tungsten carbide blade(ライカマイクロシステムズ、東京)を用いて切片を作製した。

固定は4%パラホルムアルデヒド(PFA;片山化学工業、大阪)/PBSにて20分間行い、PBSで5分ずつ3回洗浄した。0.2N HCl(片山化学工業、大阪)に20分間、続いて0.2% Triton X-100(片山化学工業、大阪)で10分間処理した後、1 µg/ml Proteinase K (MERCK, Darmstadt, Germany)で37°C、15分間消化し、PBSで洗浄した。4% PFA/PBSにて5分間後固定し、PBSで洗浄後2 mg/ml glycine(片山化学工業、大阪)/PBSに15分間、2回浸漬した後、DEPC waterで洗浄した。

ハイブリダイゼーションは、40% 脱イオン化ホルムアミド(片山化学工業、大阪)/4×saline-sodium citrate (SSC)に浸漬した後、25 µlのハイブリダイゼーション溶液を添加し、37°Cの moist chamber 内で一晩行った。ウサギ HAS2 および HAS3 のプローブは、それぞれのシークエンスデータをもとに選択した塩基配列の anti-sense 配列の両端にチミン二量体を付加した合成オリゴマーとした。ネガティブコントロールとして、選択部分の sense 配列の両端にチミン二量体を付加したものを用いた(表 2-1)。添加濃度は1 µg/mlとした。洗浄は、37°Cの2×SSCで1時間を5回、さらにPBSで行った。

検出は、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識マウス抗 T-T dimer 抗体(協和メディックス、東京)および3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)染色により行った。すなわち、正常マウス IgG/5% bovine serum albumin (BSA; SIGMA, St. Louis, USA)/100 µg/ml salmon sperm DNA (Quantum Biotechnologies, Montreal, Canada)/100 µg/ml 酵母 tRNA (SIGMA, St. Louis, USA)/PBS 溶液で1時間ブロッキングした後、(HRP 標識マウス抗 T-T dimer 抗体/5% BSA/100 µg/ml salmon sperm DNA/100 µg/ml 酵母 tRNA/PBS) 溶液、またネガティブコントロールとして、(正常マウス血清由来 IgG 分画(フナコシ、東京)/5% BSA/100 µg/ml salmon sperm DNA/100 µg/ml 酵母 tRNA/PBS) 溶液を35 µg 添加して一晩反応させた。0.075% Brij 35(片山化学工業、大阪)/PBSにて15分を2回、さらにPBSで洗浄した。その後DAB染色を行った。さらに、

基質部分の染色のため、アルシアンブルー染色を行った。DEPC water で 3 回洗浄後、3% 酢酸水で 5 分前処理し、pH2.5 のアルシアンブルー (SIGMA, St. Louis, USA) / 酢酸溶液を 1 分作用させ 3% 酢酸水で 5 回、流水で 5 分洗浄した。

DEPC water で洗浄後、アルコール・キシレン脱水系列を用いて脱水し、封入した。

表 2-1 *In situ* hybridization に用いたプローブの配列

HAS2	sense	<i>ATTATTATT</i>	ATGTCTCTCTACTCAGTGCTGTACATGTC
		<i>ATTATT</i>	
	anti-sense	<i>ATTATTATT</i>	GACATGTACAGCACTGAGTAGAGAGACAT
		<i>ATTATT</i>	
HAS3	sense	<i>ATTATTATT</i>	AGGCGGTGCTGGGTGGCATCCTGGCAGCC
		TATGTGACAGGCTACCAGT	<i>ATTATT</i>
	anti-sense	<i>ATTATTATT</i>	AACTGGTAGCCTGTCACATAGGCTGCCAG
		GATGCCACCCAGCACCGCC	<i>ATTATT</i>

斜体文字はチミン二量体を付加した部分を示す。

結果

1. 滑膜組織におけるHAS mRNAの発現様相

RT-PCR解析の結果、膝関節および顎関節の滑膜組織においてHAS2 mRNAの発現が認められた。膝関節、顎関節ともに28サイクルで明確なバンドの発現が検出されたことから、両関節におけるHAS2 mRNAの発現はほぼ同程度であることが明らかとなった(図2-1A)。これに対し、両組織においてHAS3 mRNAの発現は認められなかった。

また、*in situ* hybridizationの結果においても、膝関節および顎関節の滑膜表層部付近にHAS2 mRNAの発現が認められたのに対し、HAS3 mRNAの発現は表層部付近にわずかにしか認められなかった(図2-1B)。また、senseプローブを用いた結果、シグナルは検出されなかった。

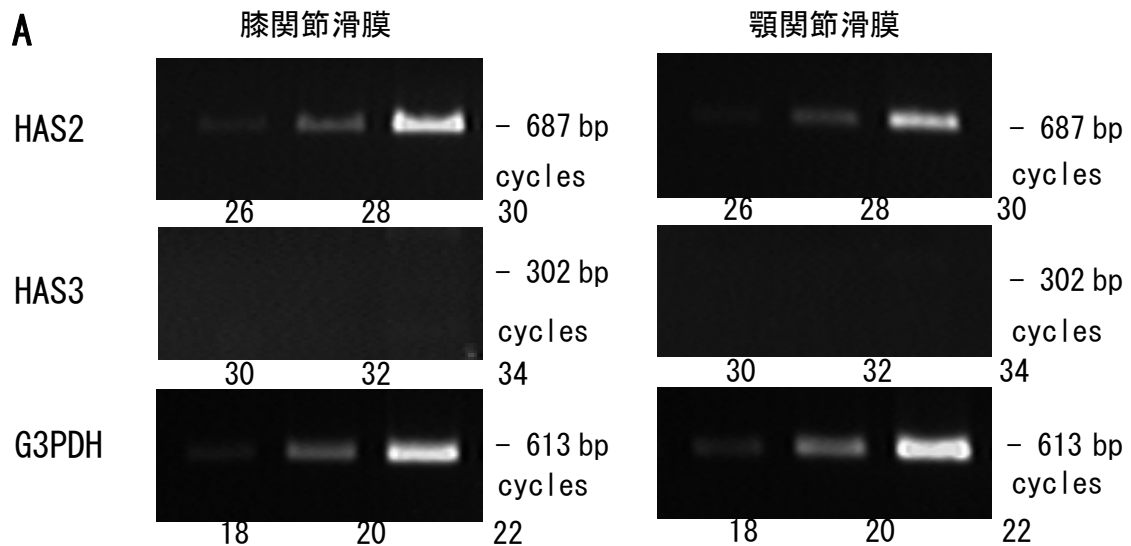


図 2-1A 膝関節および顎関節滑膜における HAS mRNA の発現-RT-PCR 解析-

ウサギ膝関節および顎関節より採取した滑膜組織の total RNA を抽出し、RT-PCR

を行った。HAS2 および HAS3 mRNA の発現を 2 サイクルおきに検討した。

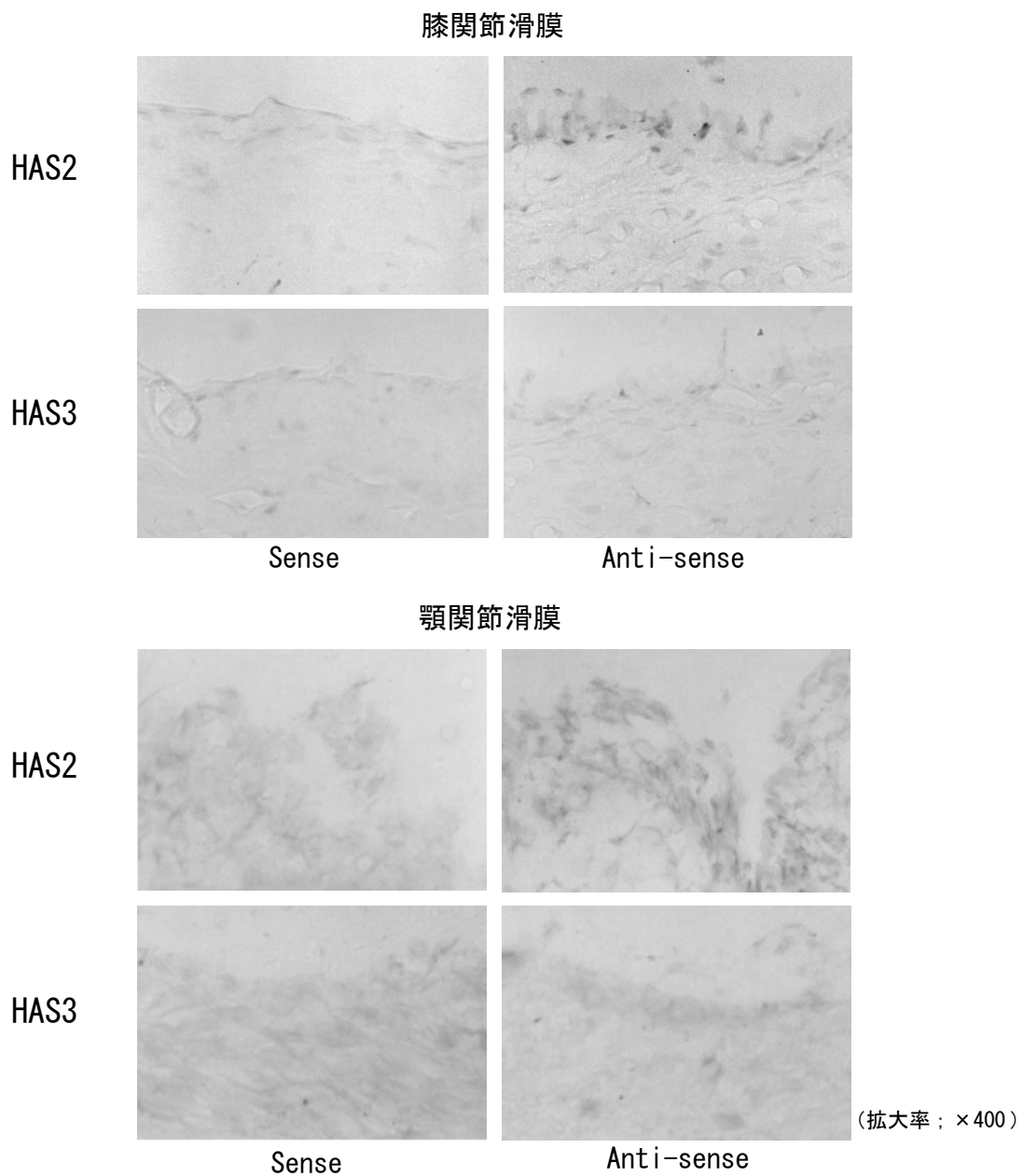


図 2-1B 膝関節および顎関節滑膜における HAS mRNA の発現 - *in situ* hybridization-
ウサギ膝関節および顎関節滑膜組織の新鮮凍結切片を作製し、HAS2 および HAS3
に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。

2 . 関節軟骨組織における HAS mRNA の発現様相

RT-PCR 解析の結果、膝関節および顎関節の軟骨組織において、HAS2 mRNA の発現が認められた。膝関節、顎関節ともに 30 サイクルでバンドの発現が明確になったことから、HAS2 mRNA の発現はほぼ同程度であることが明らかとなったが、それぞれの関節の滑膜組織における発現よりも低レベルであった。これに対し、HAS3 mRNA の発現は膝関節軟骨組織では認められず、顎関節軟骨組織ではわずかに認められた (図 2-2A)。

In situ hybridizationの結果では、HAS2 mRNA の発現は両関節軟骨において軟骨層全体にわたり認められたが、HAS3 mRNA の発現はごくわずかにしか認められなかった。また、senseプローブを用いた結果、シグナルは確認されなかった (図2-2B)。

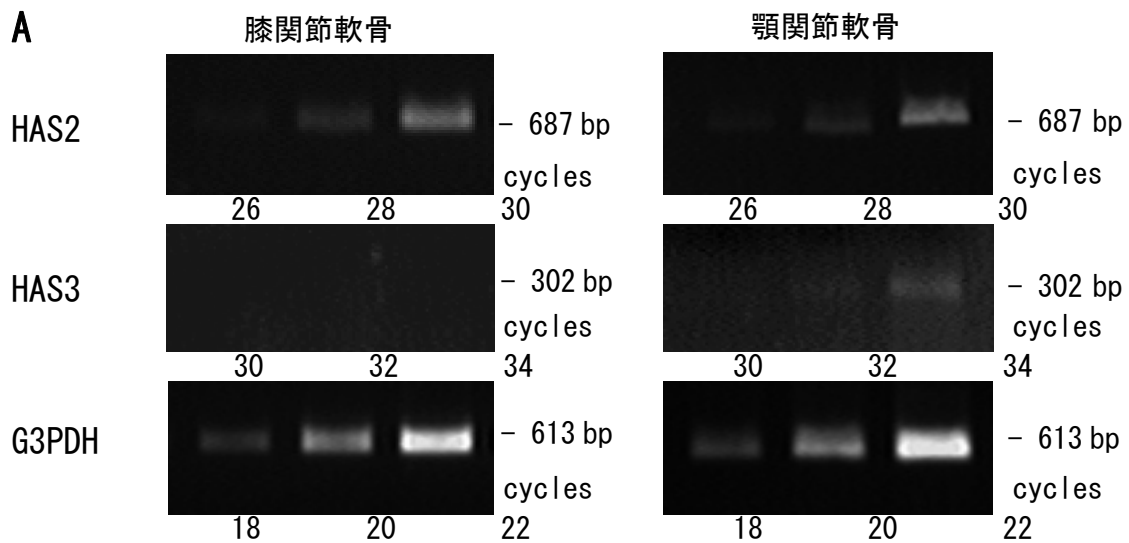


図 2-2A 膝関節および顎関節軟骨における HAS mRNA の発現-RT-PCR 解析-

ウサギ膝関節および顎関節より採取した軟骨組織の total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。HAS2 および HAS3 mRNA の発現を 2 サイクルおきに検討した。

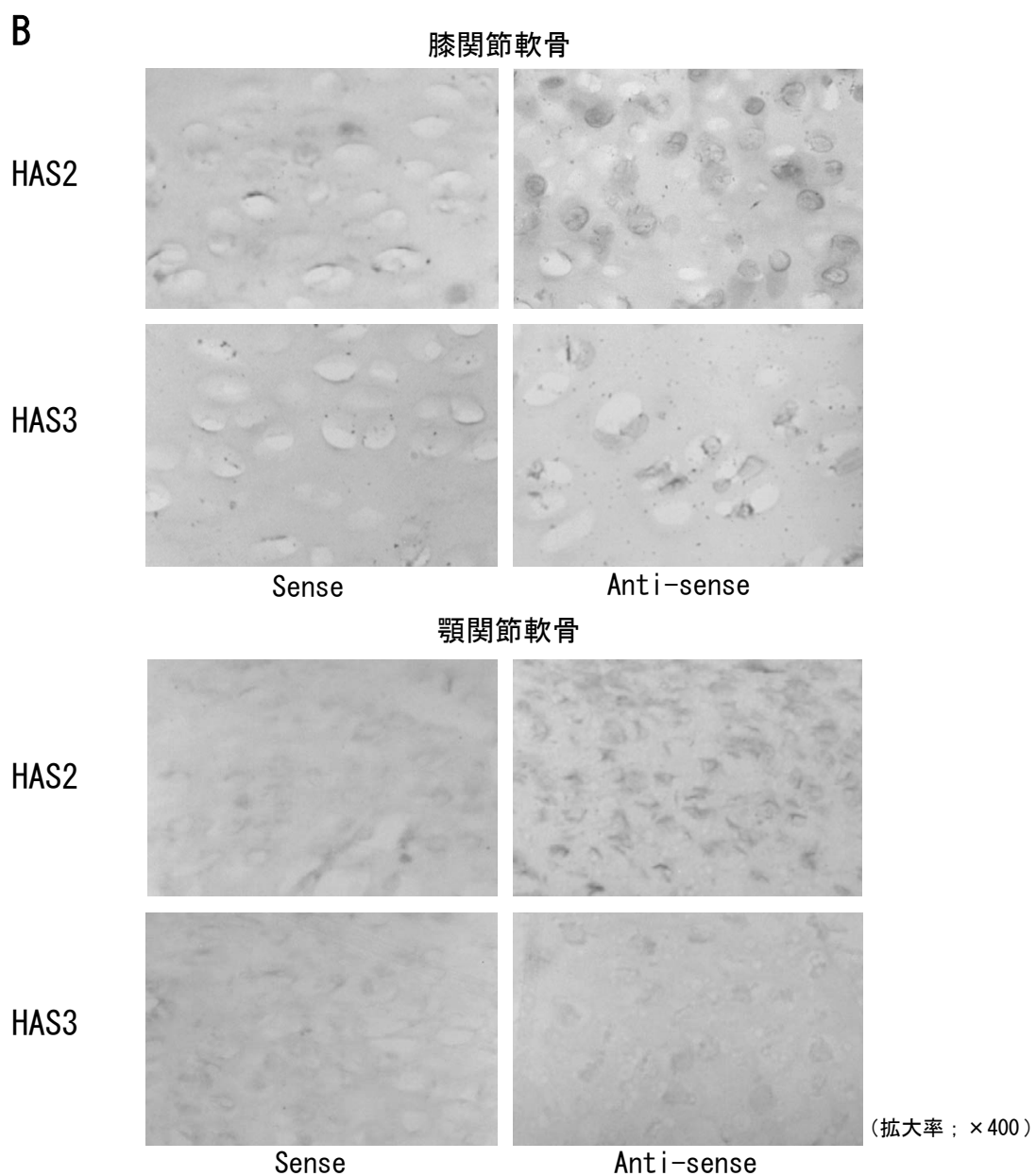


図 2-2B 膝関節および顎関節軟骨における HAS mRNA の発現 - *in situ* hybridization-
ウサギ膝関節および顎関節軟骨組織の新鮮凍結切片を作製し、HAS2 および HAS3
に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。

3 . 肋軟骨組織における HAS mRNA の発現様相

RT-PCR 解析の結果、HAS2 mRNA の発現は成長板軟骨および静止軟骨において認められた。成長板軟骨では 26 サイクルで明瞭なバンドが検出されたのに対し、静止軟骨においては同サイクルではわずかにしかバンドが検出されなかったことから、HAS2 mRNA は成長板軟骨においてより高レベルに発現していることが明らかとなった。また、成長板軟骨における HAS2 mRNA の発現は、前述の両関節の軟骨および滑膜組織における発現と比較して最も高レベルであった。一方、HAS3 mRNA の発現は成長板軟骨および静止軟骨において認められた。成長板軟骨では 34 サイクルで明確なバンドが検出されたが、静止軟骨では 32 サイクルで同程度のバンドが検出されたことから、HAS3 mRNA の発現は、逆に静止軟骨において高レベルであることが明らかとなった (図 2-3A)。

In situ hybridization の結果では、HAS2 mRNA の発現は成長板軟骨の増殖層、基質形成層、肥大層の各軟骨層において認められた。静止軟骨においても軟骨層全体にわたり HAS2 mRNA の発現が認められた。また、軟骨膜において HAS2 mRNA の高レベルの発現が認められた (図 2-3B)。一方、HAS3 mRNA の発現も成長板軟骨の基質形成層、肥大層においてはごくわずかしき認められず、増殖層においてのみ高レベルの発現が認められた。静止軟骨においては HAS3 mRNA の発現はわずかしき認められなかったが、軟骨膜において HAS3 mRNA の高レベルの発現が認められた。sense プローブを用いた結果、シグナルは確認されなかった (図 2-3C)。

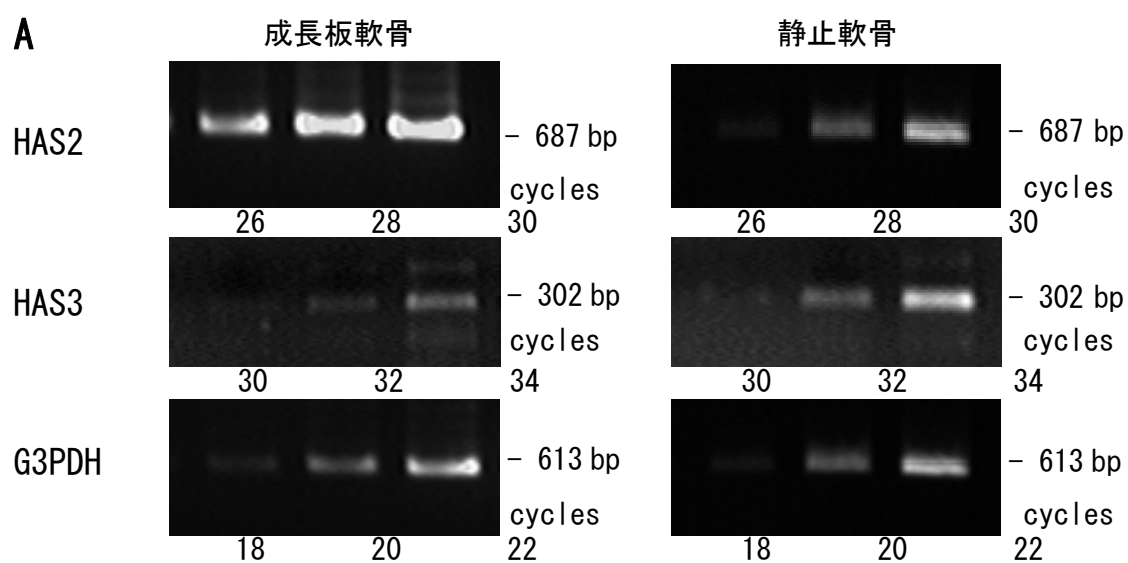


図 2-3A 成長板軟骨および静止軟骨における HAS mRNA の発現-RT-PCR 解析-

ウサギ肋骨の成長板軟骨および静止軟骨より total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。HAS2 および HAS3 mRNA の発現を 2 サイクルおきに検討した。

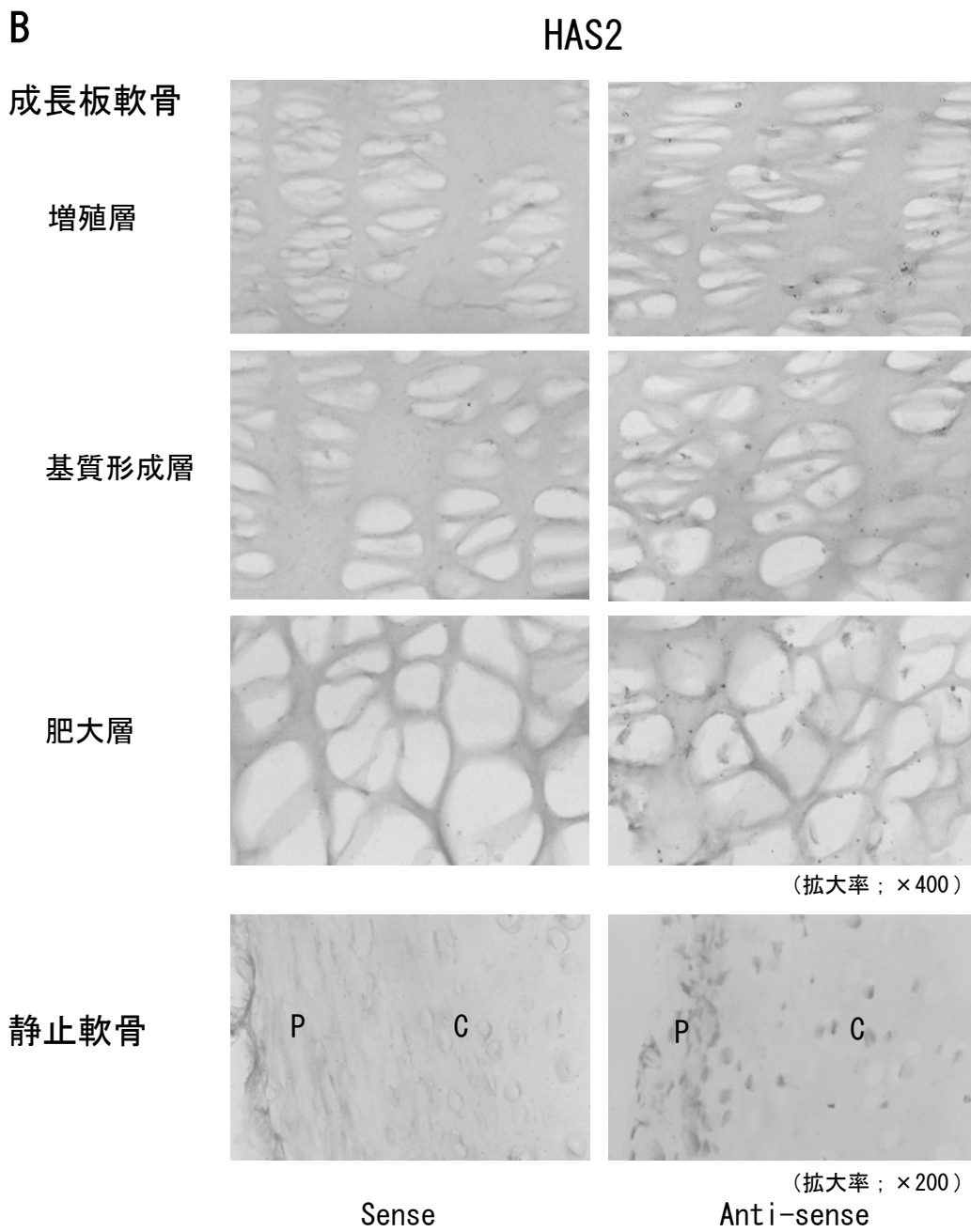


図 2-3B 成長板軟骨および静止軟骨における HAS2 mRNA の発現 *-in situ* hybridization-

ウサギ肋骨の成長板軟骨および静止軟骨組織の新鮮凍結切片を作製し、HAS2 に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。P は軟骨膜、C は静止軟骨を示す。

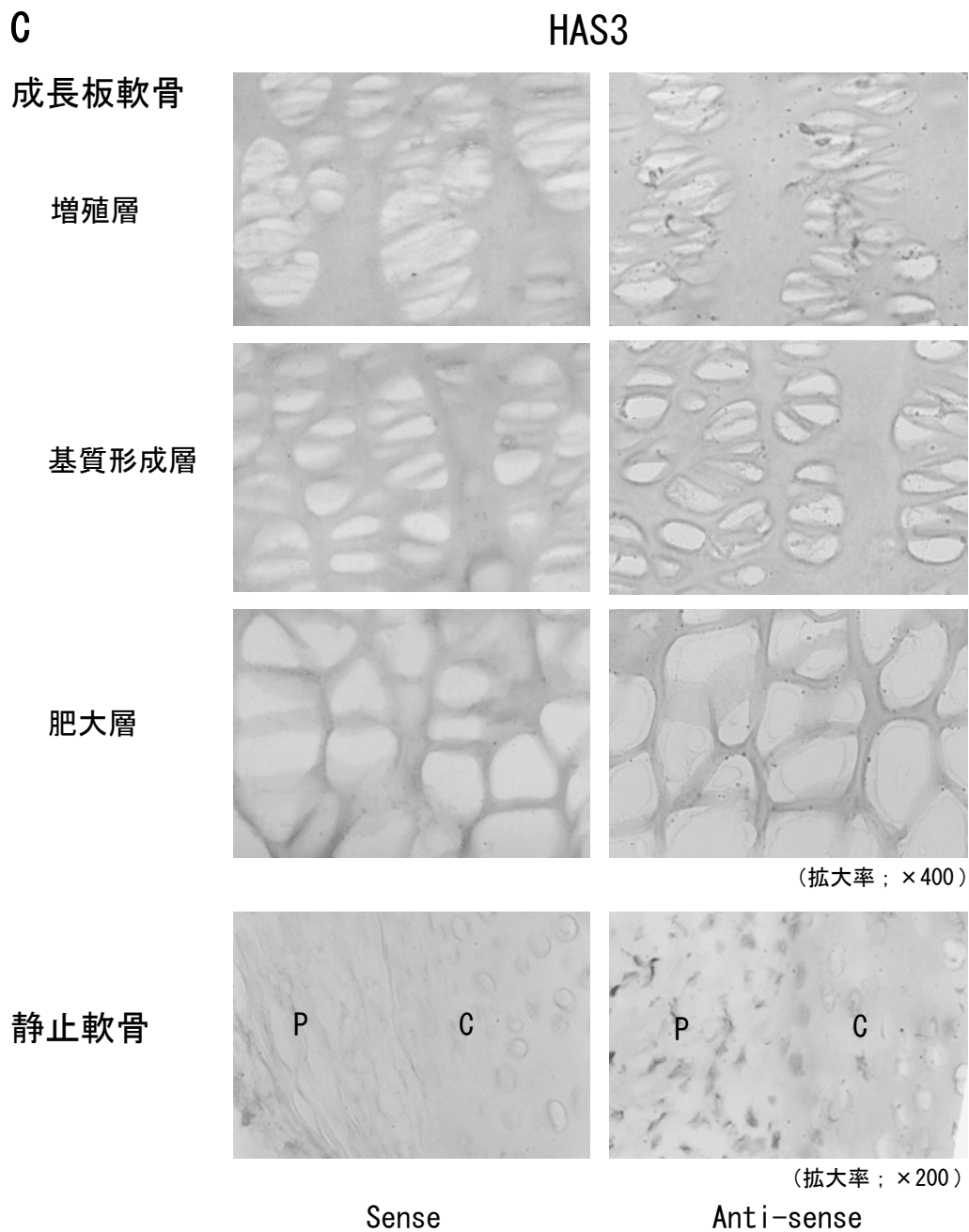


図 2-3C 成長板軟骨および静止軟骨における HAS3 mRNA の発現 - *in situ* hybridization-

ウサギ肋骨の成長板軟骨および静止軟骨組織の新鮮凍結切片を作製し、HAS3 に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。P は軟骨膜、C は静止軟骨を示す。

考察

In situ hybridization 法には、 ^3H や ^{35}S などの放射性同位元素を標識として用いる放射性 *in situ* hybridization 法⁽⁴⁹⁾と、biotin⁽⁵⁰⁾や digoxigenin (Dig)⁽⁵¹⁾、T-T dimer⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾などの抗原性物質(ハプテン)を標識する非放射性 *in situ* hybridization 法がある。本研究に用いた T-T dimer 法は、安全かつ短時間で行うことができ、解像度の高い手法である。T-T dimer をハプテンとする方法は、標識操作が簡単で、標識による分子量の増加がない、標識率のコントロールが可能で一定の標識率のプロープが得られる、標識後の精製操作が不要であるなどの特徴を有する。また、組織形態の保持ではパラフィン切片に劣るものの、プロープの浸透性が良好で感度が高いという理由から新鮮凍結切片を用いた。肋軟骨および膝関節軟骨は骨から切り離して包埋することで通法での凍結切片の作製を可能とした。一方、顎関節は小さく構造が複雑なため滑膜や軟骨を分離することが困難であり、関節ごと包埋した。骨を含む組織を切断するためには通常脱灰が必要となるが、脱灰処理中に RNA が分解される危険性があり、検出の信頼性が低下すると考えられるため、脱灰が不要な新しい技法であるテープ法⁽⁴⁸⁾を用いた。

本研究では、顎関節および膝関節の滑膜組織において HAS2 mRNA の発現が認められた。HAS2 mRNA の発現は滑膜表層部付近に集中していることが明らかとなり、滑膜表層部に存在する HAS2 により合成された HA が滑液中に分泌されることが示唆された。HAS2 は 2000 kDa 以上の高分子量 HA を合成し、中程度の活性をもつ⁽¹⁹⁾ことから、正常関節における滑液中高分子 HA の合成を行っていると考えられた。一方、200~300 kDa の低分子量 HA を合成する HAS3 は活性が高い⁽¹⁹⁾ものの、顎関節および膝関節の滑膜組織において HAS3 mRNA の発現がほとんど認められなかった。したがって、正常関節の滑膜においては HAS3 による低分子量 HA の合成がほとんど行われていないと考えられた。

成長板軟骨においては、HAS2 mRNA の発現が他の軟骨組織に比較して高レベルであった。また、全ての分化過程において発現が認められたことから、HAS2 による高分子量 HA の合成は、軟骨組織の増殖や構築の各過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。HA は軟骨細胞の肥大化に関与していることが示唆されている^(52, 53)が、それぞれの軟骨層における HAS2 の役割の違いについては不明であり、今後の検討が必要と考えられる。一方、静止軟骨や関節軟骨においても成長板軟骨よりも低レベルではあるが、HAS2 mRNA の発現が認められたことから、HAS2 は軟骨組織の成長だけでなく、構造維持にも関わっていることが示唆された。

一方、HAS3 mRNA の発現は、関節軟骨では認められず、成長板軟骨では増殖層においてのみ認められた。静止軟骨においては、RT-PCR の結果では HAS3 mRNA の発現が認められたにもかかわらず、*in situ* hybridization の結果では軟骨組織での発現が認められなかった。一方、静止軟骨周囲の軟骨膜において HAS3 mRNA の発現が高レベルに認められたことから、RT-PCR の結果は軟骨膜における HAS3 mRNA の発現を反映したものと考えられる。軟骨膜を構成する幼弱軟骨細胞(pre-chondrocyte)は増殖活性の高い細胞であり、成長板軟骨では増殖層においてのみ HAS3 mRNA が認められたことから、HAS3 は特に細胞増殖期において発現していることが示唆された。細胞増殖と HA 合成活性との間には強い相関があり、細胞密度が低い時期には HA 合成が亢進し、高い時期には HA 合成は低下することが報告されている⁽⁵⁴⁾。また、高分子量 HA は細胞増殖を抑制し、低分子量 HA は細胞増殖を亢進させるという報告^(55, 56)があり、低分子量 HA は細胞表面レセプターへの結合を介して細胞接着、増殖、あるいは分化に関わっている可能性が示唆される。本研究結果より、HAS3 により合成された低分子量 HA が軟骨細胞の増殖に関与していると考えられた。

第三章 HAS 遺伝子発現におよぼすサイトカインの 影響

緒言

OA や RA などの関節病態には、サイトカインが深く関与していることが示唆されてきた。RA では主としてマクロファージと滑膜細胞により産生された interleukin-1 beta (IL-1 β)、 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、 interleukin-6 (IL-6)、 interleukin-8 (IL-8)などのサイトカインの複合的な作用が関節組織の破壊に重要な役割を果たすとともに^(57, 58)、RA 滑膜に Th1 細胞が浸潤し、interferon-gamma (IFN- γ)が産生されることも示唆されている⁽⁵⁹⁾。一方、OA は本質的には非炎症性の退行性病変として捉えられていたが、滑膜炎の存在^(60, 61)により炎症性病変の進行形態であることが明らかとなった。また、サイトカインのなかでも、IL-1 β 、 TNF- α などの炎症性サイトカイン、および IFN- γ は OA や RA などの病的状態の関節滑液中に高い発現が認められる⁽⁶²⁻⁶⁵⁾ことから、上記の事実が実証されることとなる。

また、病的状態の関節滑液においては、低分子量 HA の分布が優勢となる^(7, 8, 66)。低分子量 HA の増加は、滑液の粘弾性を低下させ、関節の潤滑機能を低下させる⁽⁶⁷⁾とともに、低分子量 HA 自身が炎症に関連した様々な生物活性を有していることが報告されてきた。低分子量 HA は、ヒトやマウスのマクロファージにおいて炎症性サイトカインやケモカインの産生を亢進する⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾ほか、マウス尿細管皮質細胞において intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)や vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)の発現を亢進させる⁽⁷¹⁾。滑膜細胞においても、低分子量 HA により VCAM-1 の発現が誘導されることが報告された⁽¹⁰⁾。さらに、低分子量 HA はマクロファージによる一酸化窒素 (NO) の合成を亢進し、結合組織破壊に関連

する⁽⁷²⁾。これらの活性はいずれも抗 CD44 抗体により阻害されることから、HA の CD44 への結合を介した現象であると考えられている。

滑液中の低分子量 HA の増加には、既存の高分子量 HA の低分子化と、低分子量 HA の合成促進という 2 つの機序が考えられる。前者には、フリーラジカル⁽⁷³⁻⁷⁶⁾や分解酵素⁽⁷⁷⁾の関与が示唆されてきた。近年、哺乳類におけるヒアルロニダーゼ (*Hyal 1*、*Hyal2*、*Hyal3*) のクローニングが行われ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾、HA の分解系が明らかにされつつある。一方、後者には低分子量 HA を合成する HAS3 の関与が推察される。しかしながら、滑膜細胞における HAS mRNA 発現に対するサイトカインの影響については、これまで全く検討されていない。

本章では、炎症状態の関節における滑液中 HA の低分子化のメカニズムを解明することを目的として、サイトカインの単独あるいは複合刺激が培養ウサギ滑膜細胞における HAS mRNA 発現におよぼす影響を検討した。

材料と方法

1. ウサギ膝関節滑膜細胞の培養およびサイトカイン処理

4週齢の雄性日本白色ウサギの膝関節より、滑膜細胞の単離と培養を第一章の方法に準じて行った。コンフルエントに達した時点でFBS濃度を1%にした培養液に交換し、さらに12時間後にFBS濃度を0.5%にした培養液に交換後サイトカインを添加した。

サイトカインは、recombinant human IL-1 β ; 1×10^8 U/mg (Genzyme Corp., Cambridge, USA)、recombinant human TNF- α ; 1×10^7 U/mg (Genzyme Corp., Cambridge, USA)、recombinant human IFN- γ ; 1×10^7 U/mg (Genzyme Corp., Cambridge, USA)を用いた。サイトカイン単独刺激では、IL-1 β は0.1、1、10 ng/ml、TNF- α および IFN- γ は1、10、100 ng/mlの濃度で0、1、3、6、12時間処置し、total RNAを抽出した。

2種のサイトカインによる複合刺激では、低濃度サイトカイン同士の組み合わせとして、IL-1 β は0.1 ng/ml、TNF- α および IFN- γ は1 ng/mlの濃度とし、高濃度サイトカイン同士の組み合わせの際には、IL-1 β は1 ng/ml、TNF- α および IFN- γ は10 ng/mlの濃度とした。各組み合わせのサイトカインで3時間処置した後にtotal RNAを抽出した。各total RNAの抽出にはQuick prepTM total RNA extraction kitを用いた。

2. RT-PCR解析

1 μ g のtotal RNAからSuperscriptTM preamplification system を用い、Oligo(dT)₂₀をプライマーとしてcDNAを合成した。これをテンプレートとし、Advantage cDNA Polymerase Mixを用いてPCRを行った。PCRプライマーは、表1-1のHAS2、HAS3およびG3PDHのものを使用した。Gene Amp PCR System 9600を用いて表1-2の条件で増幅し、1.5% アガロースゲルで電気泳動した。

3. Real-time PCR解析

HAS2およびHAS3 mRNAの誘導については、ABI PRISM7700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Foster, USA)を用いた定量的PCR法であるreal-time PCRにて各サイトカイン添加時のmRNA量のコントロールに対する増加率を算出した。

Real-time PCRのプライマーおよびTaqManプローブは、表1-5、1-6のウサギHAS2およびHAS3遺伝子配列をもとに、Primer Expressソフトウェア (PE Biosystems, Foster, USA)を用いて設計した (表3-1)。TaqManプローブは両末端を蛍光ラベルした20~30塩基のオリゴヌクレオチドであり、ターゲット領域に特異的にハイブリダイズするように設計した。5'末端にはFluorescein系の蛍光色素 (R: リポーター) であるFAM (6-carboxyfluorescein)、3'末端にはRhodamine系の蛍光色素 (Q: クエンチャー) であるTAMRA (6-carboxytetramethyl-rhodamine)をラベルした。PCR条件は、94°C; 3分を1サイクル、94°C; 1分を5サイクル、85°C; 30秒を40サイクル、さらに64°C; 1分を1サイクルとした。標的mRNAの結果は、G3PDHの結果により補正した。解析は異なるサンプルを用いて3回行い、平均および標準偏差を求めた。

表 3-1 Real-time PCR用のプライマーおよびTaqManプローブの配列

Gene		Sequence 5'→3'
HAS2	Forward	TTT GGA GCA CCG AAA AAT GA
	Reverse	CAG CGA TGC AAA GAG CAA CT
	Probe	FAM-AAT CCC TAG AAA CCC CCA TTA AGT TGA ACA AA-TAMRA
HAS3	Forward	TCG GTG GTC ACA GGT TTC TT
	Reverse	GGC CAC GGT AGA AAA GCT G
	Probe	FAM-CCC TTC TTC CTC ATC GCC ACA GTC A-TAMRA
G3PDH	Forward	AAC TCA CTG GCA TGG CCT T
	Reverse	GCT TCA CCA CCT TCT TGA TG
	Probe	VIC-TGC CGC CTG GAG AAA GCT GCT AAG-TAMRA

結果

1. サイトカイン影響下の培養ウサギ滑膜細胞における HAS mRNA 発現の検討

培養ウサギ滑膜細胞における HAS2 および HAS3 mRNA 発現に対するサイトカインの影響を RT-PCR 解析により検討した。その結果、IL-1 β および TNF- α による刺激では、HAS2 および HAS3 mRNA の発現が濃度依存的に亢進することが明らかになった (図3-1)。一方、IFN- γ による刺激では、HAS2 mRNA の発現への影響はほとんど認められず、HAS3 mRNA の発現がわずかに亢進した。

HAS mRNA 発現に対するサイトカインの濃度依存的影響を検討した結果、IL-1 β による刺激では、HAS2 mRNA 発現の亢進は 1 ng/ml、HAS3 mRNA 発現の亢進は 10 ng/ml で最大となった。一方、TNF- α による刺激では、HAS2 mRNA および HAS3 mRNA の発現はともに 10 ng/ml で最大となった (図3-1)。

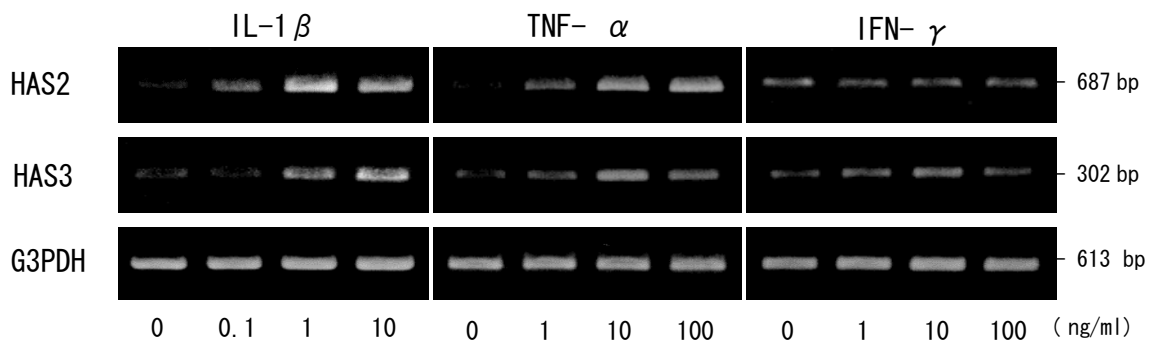


図3-1 サイトカイン影響下の培養ウサギ滑膜細胞における HAS mRNA 発現の検討

各濃度のサイトカインにより 3 時間単独刺激した培養ウサギ滑膜細胞より total RNA を抽出し、RT-PCR を行った。

2 . HAS mRNA 発現に対するサイトカイン単独刺激の影響

HAS2 mRNA の発現については、IL-1 β では 1 ng/ml 添加時に最大の 3.4 倍となり、TNF- α では 10 ng/ml 添加時に最大の 2.5 倍となった。IFN- γ (1~100 ng/ml) の刺激による HAS2 mRNA 発現の変化は認められなかった (図 3-2A)。

また、IL-1 β による HAS2 mRNA の誘導は添加後 3 時間で最大の 3.4 倍、TNF- α による誘導は添加後 1 時間で最大の 2.8 倍となり、ともにその後減少し 1 2 時間後にはコントロールレベルに戻った。IFN- γ による刺激では、1 時間後にやや発現が低下した後はコントロールレベルとほぼ同レベルの発現を示した (図 3-2B)。

一方、HAS3 mRNA の発現については、IL-1 β では 10 ng/ml 添加時に最大の 4.3 倍となり、TNF- α では 10 ng/ml 添加時に最大の 1.9 倍となった。IFN- γ については、10 ng/ml 添加時に最大の 1.5 倍の HAS3 mRNA の発現が認められた (図 3-3A)。

また、IL-1 β による HAS3 mRNA の誘導は添加後 3 時間で最大の 3.6 倍、TNF- α による誘導は添加後 1 時間で最大の 2.5 倍、IFN- γ による誘導は添加後 1 時間で最大の 2.4 倍となり、いずれも 1 2 時間後にはコントロールレベルに戻った (図 3-3B)。

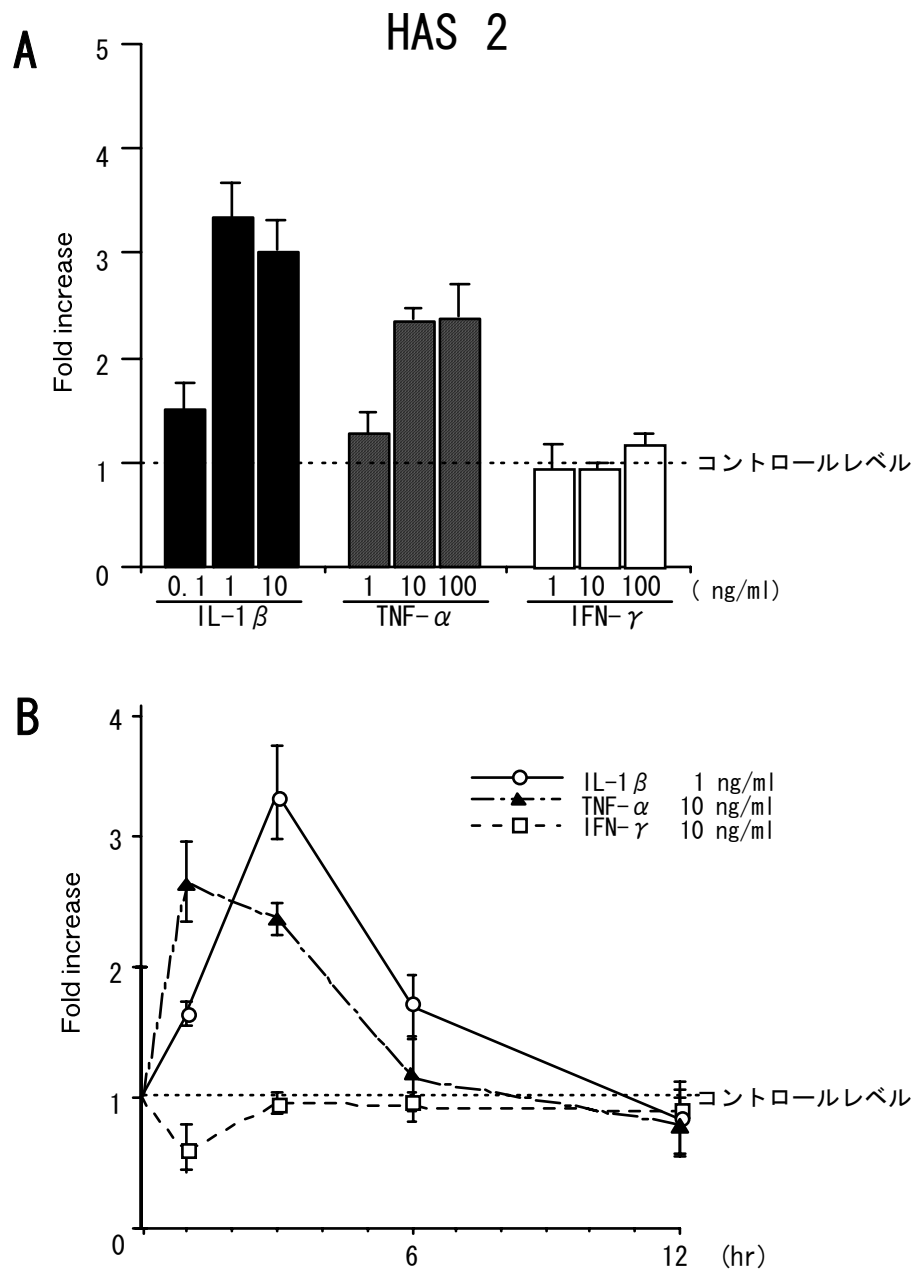


図 3-2 培養ウサギ滑膜細胞の HAS2 mRNA 発現に対するサイトカイン単独刺激の影響
 A;各濃度のサイトカインによる 3 時間単独刺激、B;至適濃度のサイトカインによる
 0~12 時間単独刺激を行った培養ウサギ滑膜細胞より total RNA を抽出し、real-time
 PCR を行った。

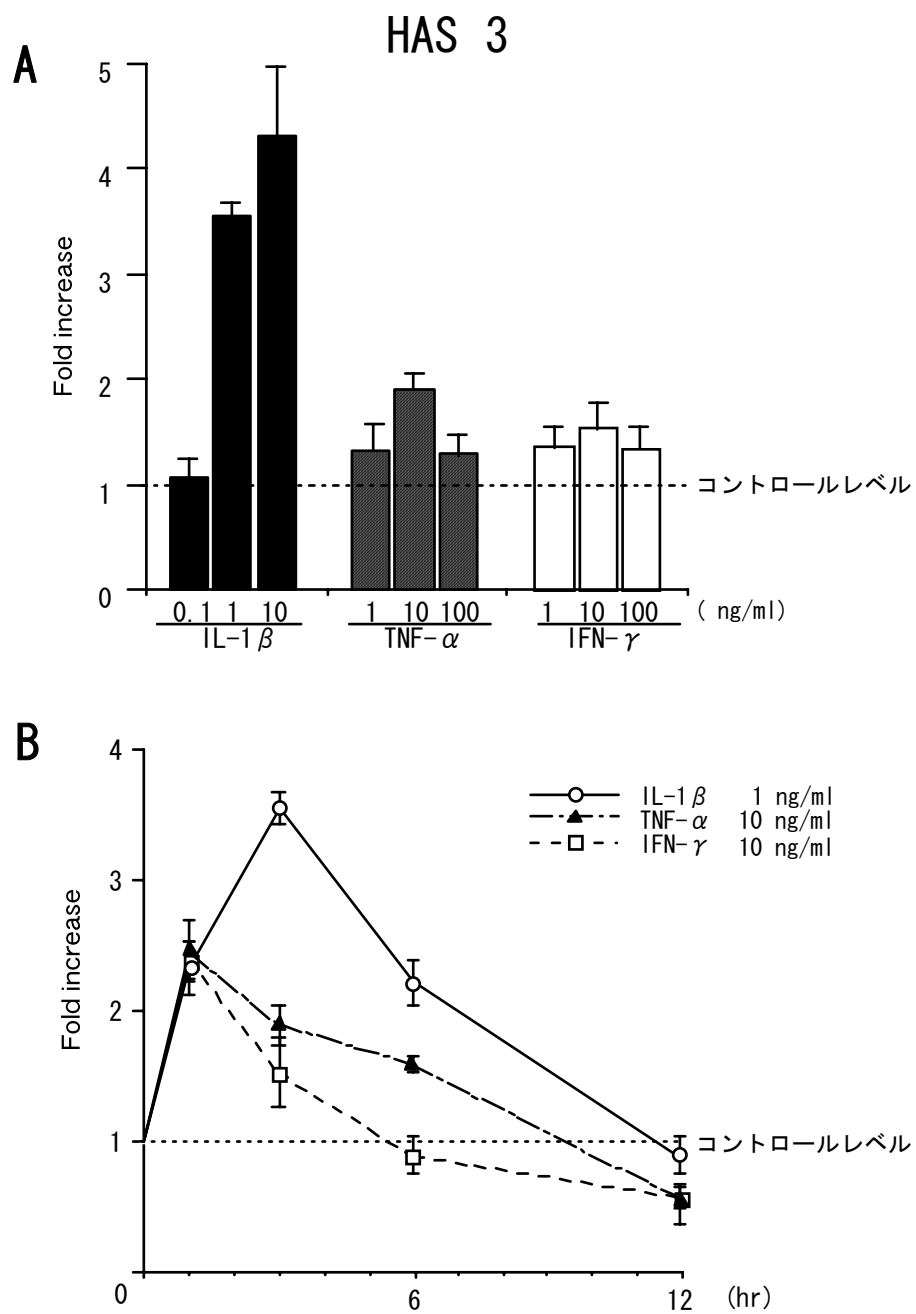


図 3-3 培養ウサギ滑膜細胞の HAS3 mRNA 発現に対するサイトカイン単独刺激の影響
 A;各濃度のサイトカインによる 3 時間単独刺激、B;至適濃度のサイトカインによる 0 ~
 12 時間単独刺激を行った培養ウサギ滑膜細胞より total RNA を抽出し、real-time
 PCR を行った。

3 . HAS mRNA発現に対するサイトカインの複合刺激の影響

HAS2 mRNA の発現については、2種のサイトカインの複合刺激ではサイトカインの単独刺激に対し、すべての組み合わせにおいて相加、あるいは相乗作用が認められた。特に、IL-1 β と IFN- γ の複合刺激では、低濃度サイトカインの組み合わせ (0.1 ng/ml IL-1 β + 1 ng/ml IFN- γ)により 5.3 倍、高濃度サイトカインの組み合わせ (1 ng/ml IL-1 β + 10 ng/ml IFN- γ)により 6.8 倍の発現亢進を示した。また、TNF- α と IFN- γ についても、低濃度サイトカインの組み合わせ (1 ng/ml TNF- α + 1 ng/ml IFN- γ)により 4.1 倍、高濃度サイトカインの組み合わせ (10 ng/ml TNF- α + 10 ng/ml IFN- γ)により 4.5 倍の増加を示した。IFN- γ による単独刺激では、HAS2 mRNA 発現の亢進は認められなかったことから、IFN- γ は IL-1 β および TNF- α による HAS2 mRNA 発現誘導に対する相乗効果を有することが明らかとなった。また、IL-1 β と TNF- α の複合刺激では、HAS2 mRNA 発現の相加的な亢進が認められた。

一方、HAS3 mRNAの発現については、低濃度サイトカインの組み合わせでは、IL-1 β と TNF- α との複合刺激で2.5倍の相加的な誘導亢進が認められたが、他の組み合わせではほとんど変化が認められなかった。また、高濃度サイトカインの組み合わせにおいても、IL-1 β と TNF- α との複合刺激で3.9倍の相加的な発現増加が認められた。一方、IFN- γ によるHAS3 mRNA発現亢進の相乗効果は認められず、逆にIL-1 β およびTNF- α の単独刺激によるHAS3 mRNA発現亢進がIFN- γ により抑制された (図3-4)。

以上の結果より、培養ウサギ滑膜細胞における HAS2 および HAS3 mRNA の発現は、IL-1 β 、 TNF- α 、 および IFN- γ の単独あるいは複合刺激により調節されることが明らかとなった。

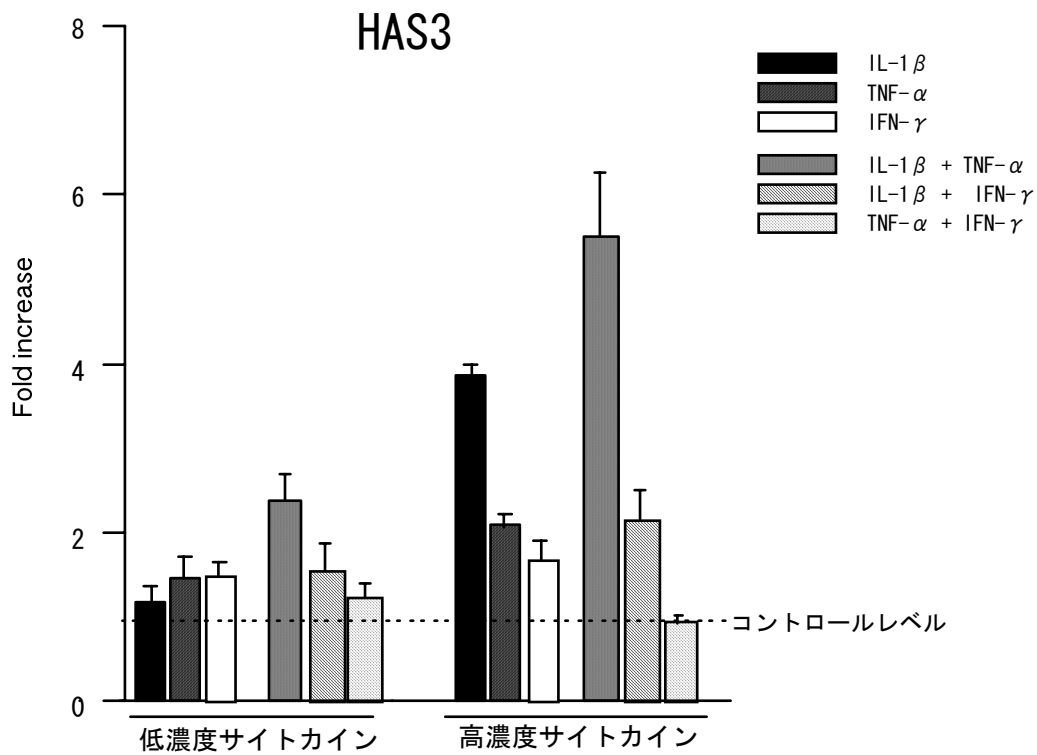
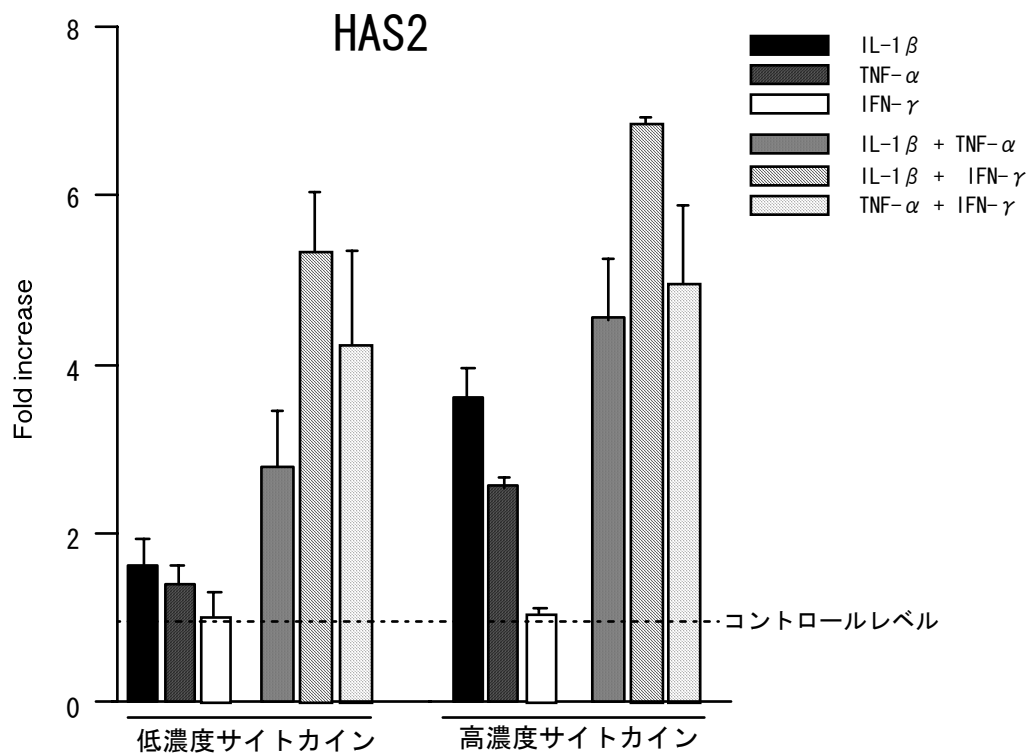


図 3-4 培養ウサギ滑膜細胞の HAS mRNA 発現に対するサイトカイン複合刺激の影響
 各濃度のサイトカインによる 3 時間の複合刺激を行った培養ウサギ滑膜細胞より
 total RNA を抽出し、real-time PCR を行った。

考察

本章では、HAS mRNA 検出のため新しい定量 PCR 法である real-time PCR 法^(81, 82)を用いた。Real-time PCR 法は、標的 mRNA 量と PCR 産物量との間に比例関係が成立する指数関数的増幅領域のシグナルをリアルタイムに検出できるため、他の PCR 法に比べ遺伝子複製の定量の正確さと再現性に優れている。これにより、さまざまな種類と濃度のサイトカインの HAS mRNA 発現への影響を正確に分析することが可能となった。

本研究結果では、培養ウサギ滑膜細胞において IL-1 β と TNF- α により HAS2 mRNA の発現が亢進したが、IFN- γ は単独では HAS2 mRNA 発現に対してほとんど影響をおよぼさなかった。一方、HAS3 mRNA の発現は IL-1 β により著明に亢進し、TNF- α 、IFN- γ によりやや増加した。培養ヒト眼線維芽細胞においても、IL-1 β により HAS2 および HAS3 mRNA の発現が誘導されることが報告されている⁽⁸³⁾。また、培養ヒト滑膜細胞では、IL-1 β と TNF- α によりグリコサミノグリカンへのグリコサミンの取り込み量が増加するが⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾、IFN- γ による取り込み量の変化はほとんど認められないことも報告されており⁽⁸⁶⁾、これらは本研究結果と一致する。

以上のことより、滑膜細胞における HA 合成は、IL-1 β および TNF- α により亢進し、これには同サイトカインによる HAS2 と HAS3 の発現誘導が関与していることが示唆される。すなわち、IL-1 β および TNF- α 刺激により、関節内では HAS2 による高分子量 HA の合成が亢進すると同時に、HAS3 による低分子量 HA の合成も亢進すると考えられる。Konttinen ら⁽⁸⁷⁾は、OA および RA 患者から採取した培養滑膜細胞において、IL-1 β により低分子量 HA の合成が亢進したことを報告した。HAS3 は酵素活性が高いため⁽¹⁹⁾、mRNA の発現レベルが同じ場合でもより多量の低分子量 HA を合成すると考えられることから、HA 低分子化機序のひとつとして、サイトカインによる HAS3 発現の亢進が示唆された。

一方、2 種類のサイトカインによる複合刺激については、IL-1 β

と IFN- γ 、および TNF- α と IFN- γ の複合刺激により、HAS2 mRNA の発現が相乗的に増加し、逆に HAS3 mRNA の発現は抑制されることが明らかとなった。したがって、IFN- γ は IL-1 β あるいは TNF- α と同時に作用することで、HAS2 による高分子量 HA の合成を促進するとともに、HAS3 による低分子量 HA の合成を抑制し、滑液中 HA の低分子化を抑制する方向に働くと考えられる。培養ヒト肺線維芽細胞においても、IFN- γ および TNF の単独刺激の場合と比較して、これらの複合刺激では高分子量 HA の合成が亢進することが示されており⁽¹¹⁾、本研究結果と一致する。サイトカインの相互作用についての詳細な機序は不明であるが、TNF- α の生物活性の多くは IL-1 β と重複し、その産生を相互に誘導することから、IL-1 β と TNF- α は HAS mRNA の誘導に関して同様の効果を有し、複合刺激で相加的な効果をもたらしたものと考えられる。また、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ などのサイトカインは、レセプターを介したシグナル伝達を行うことが知られ、IL-1 β や TNF- α が転写因子 NF- κ B の活性化を介した系であるのに対し、IFN- γ は異なるキナーゼ系である STAT 系の活性化による伝達を行っている。このような各サイトカイン固有のシグナル伝達系の違いにより、HAS mRNA 発現に対する相乗的な促進や抑制の効果が発現した可能性が考えられる。

以上のことより、培養ウサギ滑膜細胞の HAS2 および HAS3 mRNA の発現は、サイトカインの単独あるいは複合刺激により調節されることが明らかとなり、炎症状態の関節における HA の合成促進と低分子化に HAS が関連している可能性が示唆された。また、急性炎症時には滑膜組織の HA 合成が亢進する一方で、関節病態が進行した状態では滑液中 HA 濃度は逆に低下することが報告され⁽⁶⁾、HA 分解も同時に亢進していることが示唆されている。炎症反応と HA 分解系との関連では、フリーラジカルは *in vitro* で HA を低分子化し^(73, 74)、RA 滑膜組織におけるフリーラジカルの産生は炎症が高度になるに従って亢進するとされる^(76, 88)。一方、哺乳類の HA 分解酵素には、現在 Hyal1、Hyal2 および Hyal3 が同定されており、これらは異なる基質特異性を有することが示唆されているが^(89, 90)、生体組織での発現様相や発現調節についてはほとんど明らかにされ

ていない。今後、HASの発現とあわせてHA分解系を検討していくことにより、関節病態の解明が行われるものと考えられる。

総括

本研究では、ウサギ *HAS2* および *HAS3* 遺伝子のクローニングと構造解析を行った。また、ウサギ滑膜組織と各軟骨組織における *HAS2* および *HAS3* mRNA の発現様式を RT-PCR と *in situ* hybridization により検討した。さらに、サイトカインにより刺激した培養ウサギ滑膜細胞における *HAS2* および *HAS3* mRNA レベルを RT-PCR および real-time PCR により解析した。その結果、以下のことが明らかとなった。

- 1 . ウサギ *HAS2*、*HAS3* ともに cDNA 配列の翻訳領域は 1659 bp であり、それぞれ 553 個のアミノ酸がコードされていることが明らかとなった。また、これらのアミノ酸配列は、ヒトとマウスの *HAS* 遺伝子配列に対していずれも 97% 以上の相同性を示した。
- 2 . アミノ酸配列の解析により、HA 合成に必須の β -1,4 glycosyltransferase 活性部位 (*HAS2*; Asp²¹², Asp³¹⁴, Trp³⁵⁴、*HAS3*; Asp²¹⁴, Asp³¹⁶, Trp³⁵⁶) および β -1,3 glycosyltransferase 活性部位 (*HAS2*; Lew²⁸⁴、*HAS3*; Lew²⁸⁶) が保存されていることが確認された。
- 3 . *HAS2* mRNA は、正常滑膜および軟骨に広く発現することが明らかとなった。一方、*HAS3* mRNA は、正常滑膜および関節軟骨組織においてはわずかしき発現が認められなかったが、軟骨膜および成長板軟骨の増殖層において発現が認められた。
- 4 . 炎症性サイトカインである IL-1 β と TNF- α により、*HAS2* mRNA および *HAS3* mRNA の発現が誘導された。また、IFN- γ は他のサイトカインとの相互作用により、*HAS2* mRNA の誘導を促進し、また *HAS3* mRNA の誘導を抑制することが明らかとなった。

以上の結果より、正常関節組織においては主として *HAS2* が発現し、合成された高分子量 HA は軟骨組織の構築や滑液の潤滑能に寄与していると考えられた。一方、炎症状態の関節では *HAS3* が誘導され、合成された低分子量 HA は滑液粘性の低下や炎症反応の亢進に関与すると考えられた。また、*HAS3* は、軟骨組織において増殖活性

の高い軟骨層で高発現を示したことから、軟骨の分化および増殖にも関与している可能性が示唆された。

参考文献

1. Laurent, T. C. and Fraser, J. R. (1992): Hyaluronan, *Faseb J.* 6, 2397-404.
2. Toole, B. P. (1990): Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins, *Curr Opin Cell Biol.* 2, 839-44.
3. Turley, E. A. (1989): The role of a cell-associated hyaluronan-binding protein in fibroblast behaviour, *Ciba Found Symp.* 143, 121-33.
4. Toole, B. P., Munaim, S. I., Welles, S., Knudson, C. B. (1989): Hyaluronate-cell interactions and growth factor regulation of hyaluronate synthesis during limb development, *Ciba Found Symp.* 143, 138-45.
5. Knudson, W., Biswas, C., Li, X. Q., Nemecek, R. E., Toole, B. P. (1989): The role and regulation of tumour-associated hyaluronan, *Ciba Found Symp.* 143, 150-9.
6. Praest, B. M., Greiling, H., Kock, R. (1997): Assay of synovial fluid parameters: hyaluronan concentration as a potential marker for joint diseases, *Clin Chim Acta.* 266, 117-28.
7. Dahl, L. B., Dahl, I. M., Engstrom-Laurent, A., Granath, K. (1985): Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies, *Ann Rheum Dis.* 44, 817-22.
8. Bjelle, A., Andersson, T., Granath, K. (1983): Molecular weight distribution of hyaluronic acid of human synovial fluid in rheumatic diseases, *Scand J Rheumatol.* 12, 133-8.
9. Wobig, M., Bach, G., Beks, P., Dickhut, A., Runzheimer, J., Schwieger, G., Vetter, G., Balazs, E. (1999): The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of hylan G-F 20 and a lower-molecular-weight hyaluronan, *Clin Ther.* 21, 1549-62.
10. Fujii, K., Tanaka, Y., Hubscher, S., Saito, K., Ota, T., Eto, S. (1999):

Cross-linking of CD44 on rheumatoid synovial cells up-regulates VCAM-1, *J Immunol.* 162, 2391-8.

11. Sampson, P. M., Rochester, C. L., Freundlich, B., Elias, J. A. (1992): Cytokine regulation of human lung fibroblast hyaluronan (hyaluronic acid) production. Evidence for cytokine-regulated hyaluronan (hyaluronic acid) degradation and human lung fibroblast-derived hyaluronidase, *J Clin Invest.* 90, 1492-503.
12. Prehm, P. (1984): Hyaluronate is synthesized at plasma membranes, *Biochem J.* 220, 597-600.
13. Itano, N. and Kimata, K. (1996): Molecular cloning of human hyaluronan synthase, *Biochem Biophys Res Commun.* 222, 816-20.
14. Shyjan, A. M., Heldin, P., Butcher, E. C., Yoshino, T., Briskin, M. J. (1996): Functional cloning of the cDNA for a human hyaluronan synthase, *J Biol Chem.* 271, 23395-9.
15. Itano, N. and Kimata, K. (1996): Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase, *J Biol Chem.* 271, 9875-8.
16. Watanabe, K. and Yamaguchi, Y. (1996): Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase, *J Biol Chem.* 271, 22945-8.
17. Spicer, A. P., Augustine, M. L., McDonald, J. A. (1996): Molecular cloning and characterization of a putative mouse hyaluronan synthase, *J Biol Chem.* 271, 23400-6.
18. Spicer, A. P., Olson, J. S., McDonald, J. A. (1997): Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase, *J Biol Chem.* 272, 8957-61.
19. Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A. P., McDonald, J. A., Kimata, K. (1999): Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties, *J Biol Chem.* 274, 25085-92.
20. DeAngelis, P. L., Papaconstantinou, J., Weigel, P. H. (1993): Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan

- biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria, *J Biol Chem.* 268, 14568-71.
21. DeAngelis, P. L., Papaconstantinou, J., Weigel, P. H. (1993): Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*, *J Biol Chem.* 268, 19181-4.
 22. Kumari, K. and Weigel, P. H. (1997): Molecular cloning, expression, and characterization of the authentic hyaluronan synthase from group C *Streptococcus equisimilis*, *J Biol Chem.* 272, 32539-46.
 23. DeAngelis, P. L., Jing, W., Drake, R. R., Achyuthan, A. M. (1998): Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*, *J Biol Chem.* 273, 8454-8.
 24. DeAngelis, P. L., Jing, W., Graves, M. V., Burbank, D. E., Van Etten, J. L. (1997): Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1, *Science.* 278, 1800-3.
 25. Spicer, A. P. and McDonald, J. A. (1998): Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family, *J Biol Chem.* 273, 1923-32.
 26. Rosa, F., Sargent, T. D., Rebbert, M. L., Michaels, G. S., Jamrich, M., Grunz, H., Jonas, E., Winkles, J. A., Dawid, I. B. (1988): Accumulation and decay of DG42 gene products follow a gradient pattern during *Xenopus* embryogenesis, *Dev Biol.* 129, 114-23.
 27. Semino, C. E., Specht, C. A., Raimondi, A., Robbins, P. W. (1996): Homologs of the *Xenopus* developmental gene DG42 are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 4548-53.
 28. Heldermon, C., DeAngelis, P. L., Weigel, P. H. (2001): Topological organization of the hyaluronan synthase from *Streptococcus pyogenes*, *J Biol Chem.* 276, 2037-46.
 29. Weigel, P. H., Hascall, V. C., Tammi, M. (1997): Hyaluronan synthases, *J Biol Chem.* 272, 13997-4000.

30. DeAngelis, P. L. (1999): Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses, *Cell Mol Life Sci.* *56*, 670-82.
31. DeAngelis, P. L. and Weigel, P. H. (1994): Immunochemical confirmation of the primary structure of streptococcal hyaluronan synthase and synthesis of high molecular weight product by the recombinant enzyme, *Biochemistry.* *33*, 9033-9.
32. DeAngelis, P. L. and Achyuthan, A. M. (1996): Yeast-derived recombinant DG42 protein of *Xenopus* can synthesize hyaluronan in vitro, *J Biol Chem.* *271*, 23657-60.
33. Yoshida, M., Itano, N., Yamada, Y., Kimata, K. (2000): In vitro synthesis of hyaluronan by a single protein derived from mouse HAS1 gene and characterization of amino acid residues essential for the activity, *J Biol Chem.* *275*, 497-506.
34. Werb, Z. and Burleigh, M. C. (1974): A specific collagenase from rabbit fibroblasts in monolayer culture, *Biochem J.* *137*, 373-85.
35. Yang, B., Yang, B. L., Savani, R. C., Turley, E. A. (1994): Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein, *Embo J.* *13*, 286-96.
36. Pearson, R. B., Mitchelhill, K. I., Kemp, B. E. (1993) *Protein Phosphorylation: A practical Approach*, , Oxford University Press, Oxford.
37. Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J Mol Biol.* *157*, 105-32.
38. Nishida, Y., Knudson, C. B., Nietfeld, J. J., Margulis, A., Knudson, W. (1999): Antisense inhibition of hyaluronan synthase-2 in human articular chondrocytes inhibits proteoglycan retention and matrix assembly, *J Biol Chem.* *274*, 21893-9.
39. Hiscock, D. R., Caterson, B., Flannery, C. R. (2000): Expression of hyaluronan synthases in articular cartilage, *Osteoarthritis Cartilage.* *8*, 120-6.
40. Nagahashi, S., Sudoh, M., Ono, N., Sawada, R., Yamaguchi, E., Uchida, Y., Mio, T., Takagi, M., Arisawa, M., Yamada-Okabe, H. (1995):

Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites, *J Biol Chem.* 270, 13961-7.

41. Suzuki, M., Asplund, T., Yamashita, H., Heldin, C. H., Heldin, P. (1995): Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 involves activation of protein kinase C, *Biochem J.* 307, 817-21.
42. Heldin, P., Asplund, T., Ytterberg, D., Thelin, S., Laurent, T. C. (1992): Characterization of the molecular mechanism involved in the activation of hyaluronan synthetase by platelet-derived growth factor in human mesothelial cells, *Biochem J.* 283, 165-70.
43. Klewes, L. and Prehm, P. (1994): Intracellular signal transduction for serum activation of the hyaluronan synthase in eukaryotic cell lines, *J Cell Physiol.* 160, 539-44.
44. Spicer, A. P. and Nguyen, T. K. (1999): Mammalian hyaluronan synthases: investigation of functional relationships in vivo, *Biochem Soc Trans.* 27, 109-15.
45. Koji, T. and Nakane, P. K. (1990): Localization in situ of specific mRNA using thymine-thymine dimerized DNA probes. Sensitive and reliable non-radioactive in situ hybridization, *Acta Pathol Jpn.* 40, 793-807.
46. Yoshii, A., Koji, T., Ohsawa, N., Nakane, P. K. (1995): In situ localization of ribosomal RNAs is a reliable reference for hybridizable RNA in tissue sections, *J Histochem Cytochem.* 43, 321-7.
47. Koji, T. and Nakane, P. K. (1996): Recent advances in molecular histochemical techniques: in situ hybridization and southwestern histochemistry, *J Electron Microsc (Tokyo).* 45, 119-27.
48. Kawamoto, T. and Shimizu, M. (2000): A method for preparing 2- to 50-micron-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues [In Process Citation], *Histochem Cell Biol.* 113, 331-9.
49. Coghlan, J. P., Aldred, P., Haralambidis, J., Niall, H. D., Penschow, J. D., Tregear, G. W. (1985): Hybridization histochemistry, *Anal Biochem.* 149, 1-28.

50. Leary, J. J., Brigati, D. J., Ward, D. C. (1983): Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *80*, 4045-9.
51. Yamada, H., Aida, T., Taguchi, K., Asano, G. (1989): Localization of type III procollagen mRNA in areas of liver fibrosis by in situ hybridization, *Acta Pathol Jpn.* *39*, 719-24.
52. Pavasant, P., Shizari, T., Underhill, C. B. (1996): Hyaluronan contributes to the enlargement of hypertrophic lacunae in the growth plate, *J Cell Sci.* *109*, 327-34.
53. Pavasant, P., Shizari, T. M., Underhill, C. B. (1994): Distribution of hyaluronan in the epiphyseal growth plate: turnover by CD44-expressing osteoprogenitor cells, *J Cell Sci.* *107*, 2669-77.
54. Matuoka, K., Namba, M., Mitsui, Y. (1987): Hyaluronate synthetase inhibition by normal and transformed human fibroblasts during growth reduction, *J Cell Biol.* *104*, 1105-15.
55. West, D. C. and Kumar, S. (1989): Hyaluronan and angiogenesis, *Ciba Found Symp.* *143*, 187-201; discussion 201-7, 281-5.
56. Goldberg, R. L. and Toole, B. P. (1987): Hyaluronate inhibition of cell proliferation, *Arthritis Rheum.* *30*, 769-78.
57. Arend, W. P. and Dayer, J. M. (1990): Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* *33*, 305-15.
58. Feldmann, M., Brennan, F. M., Maini, R. N. (1996): Role of cytokines in rheumatoid arthritis, *Annu Rev Immunol.* *14*, 397-440.
59. Miossec, P. and van den Berg, W. (1997): Th1/Th2 cytokine balance in arthritis, *Arthritis Rheum.* *40*, 2105-15.
60. Holmlund, A. and Hellsing, G. (1988): Arthroscopy of the temporomandibular joint. A comparative study of arthroscopic and tomographic findings, *Int J Oral Maxillofac Surg.* *17*, 128-33.
61. Murakami, K., Segami, N., Fujimura, K., Iizuka, T. (1991): Correlation between pain and synovitis in patients with internal derangement of the temporomandibular joint, *J Oral Maxillofac Surg.* *49*, 1159-61; discussion

1162.

62. Horiuchi, T., Yoshida, T., Koshihara, Y., Sakamoto, H., Kanai, H., Yamamoto, S., Ito, H. (1999): The increase of parathyroid hormone-related peptide and cytokine levels in synovial fluid of elderly rheumatoid arthritis and osteoarthritis, *Endocr J.* *46*, 643-9.
63. Webb, G. R., Westacott, C. I., Elson, C. J. (1998): Osteoarthritic synovial fluid and synovium supernatants up-regulate tumor necrosis factor receptors on human articular chondrocytes, *Osteoarthritis Cartilage.* *6*, 167-76.
64. Schlaak, J. F., Pfers, I., Meyer Zum Buschenfelde, K. H., Marker-Hermann, E. (1996): Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies, *Clin Exp Rheumatol.* *14*, 155-62.
65. Takahashi, T., Kondoh, T., Fukuda, M., Yamazaki, Y., Toyosaki, T., Suzuki, R. (1998): Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* *85*, 135-41.
66. Saari, H. and Konttinen, Y. T. (1989): Determination of synovial fluid hyaluronate concentration and polymerisation by high performance liquid chromatography, *Ann Rheum Dis.* *48*, 565-70.
67. Kobayashi, Y., Okamoto, A., Nishinari, K. (1994): Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights, *Biorheology.* *31*, 235-44.
68. Noble, P. W., Lake, F. R., Henson, P. M., Riches, D. W. (1993): Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages, *J Clin Invest.* *91*, 2368-77.
69. Hodge-Dufour, J., Noble, P. W., Horton, M. R., Bao, C., Wysoka, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Trinchieri, G., Pure, E. (1997): Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages, *J Immunol.* *159*, 2492-500.
70. McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R.

- M., Bao, C., Noble, P. W. (1996): Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44, *J Clin Invest.* 98, 2403-13.
71. Oertli, B., Beck-Schimmer, B., Fan, X., Wuthrich, R. P. (1998): Mechanisms of hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular epithelial cells: hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor-kappa B and activating protein-1, *J Immunol.* 161, 3431-7.
72. McKee, C. M., Lowenstein, C. J., Horton, M. R., Wu, J., Bao, C., Chin, B. Y., Choi, A. M., Noble, P. W. (1997): Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism, *J Biol Chem.* 272, 8013-8.
73. McNeil, J. D., Wiebkin, O. W., Betts, W. H., Cleland, L. G. (1985): Depolymerisation products of hyaluronic acid after exposure to oxygen-derived free radicals, *Ann Rheum Dis.* 44, 780-9.
74. Li, M., Rosenfeld, L., Vilar, R. E., Cowman, M. K. (1997): Degradation of hyaluronan by peroxynitrite, *Arch Biochem Biophys.* 341, 245-50.
75. Greenwald, R. A. and Moy, W. W. (1980): Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid, *Arthritis Rheum.* 23, 455-63.
76. Hutadilok, N., Smith, M. M., Ghosh, P. (1991): Effects of hydrogen peroxide on the metabolism of human rheumatoid and osteoarthritic synovial fibroblasts in vitro, *Ann Rheum Dis.* 50, 219-26.
77. Orkin, R. W. and Toole, B. P. (1980): Isolation and characterization of hyaluronidase from cultures of chick embryo skin- and muscle-derived fibroblasts, *J Biol Chem.* 255, 1036-42.
78. Frost, G. I., Csoka, T. B., Wong, T., Stern, R. (1997): Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase, *Biochem Biophys Res Commun.* 236, 10-5.
79. Lepperdinger, G., Strobl, B., Kreil, G. (1998): HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity, *J Biol Chem.* 273, 22466-70.

80. Csoka, A. B., Scherer, S. W., Stern, R. (1999): Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31, *Genomics*. *60*, 356-61.
81. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR, *Genome Res*. *6*, 986-94.
82. Chiang, P. W., Wei, W. L., Gibson, K., Bodmer, R., Kurnit, D. M. (1999): A fluorescent quantitative PCR approach to map gene deletions in the *Drosophila* genome, *Genetics*. *153*, 1313-6.
83. Kaback, L. A. and Smith, T. J. (1999): Expression of hyaluronan synthase messenger ribonucleic acids and their induction by interleukin-1beta in human orbital fibroblasts: potential insight into the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy, *J Clin Endocrinol Metab*. *84*, 4079-84.
84. Hamerman, D. and Wood, D. D. (1984): Interleukin 1 enhances synovial cell hyaluronate synthesis, *Proc Soc Exp Biol Med*. *177*, 205-10.
85. Butler, D. M., Vitti, G. F., Leizer, T., Hamilton, J. A. (1988): Stimulation of the hyaluronic acid levels of human synovial fibroblasts by recombinant human tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta (lymphotoxin), interleukin-1 alpha, and interleukin-1 beta, *Arthritis Rheum*. *31*, 1281-9.
86. Meyer, F. A., Yaron, I., Yaron, M. (1990): Synergistic, additive, and antagonistic effects of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and gamma-interferon on prostaglandin E, hyaluronic acid, and collagenase production by cultured synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum*. *33*, 1518-25.
87. Konttinen, Y. T., Saari, H., Nordstrom, D. C. (1991): Effect of interleukin-1 on hyaluronate synthesis by synovial fibroblastic cells, *Clin Rheumatol*. *10*, 151-4.
88. Schenck, P., Schneider, S., Miehke, R., Prehm, P. (1995): Synthesis and degradation of hyaluronate by synovia from patients with rheumatoid arthritis, *J Rheumatol*. *22*, 400-5.
89. Kreil, G. (1995): Hyaluronidases--a group of neglected enzymes,

Protein Sci. 4, 1666-9.

90. Csoka, T. B., Frost, G. I., Stern, R. (1997): Hyaluronidases in tissue invasion, *Invasion Metastasis*. 17, 297-311.