

中枢神経系におけるヒアルロン酸結合タンパク質
HYBID の役割に関する研究

吉野 雄太

目次

序論	1 頁
第 1 章 マウスの中樞神経系における HYBID の分布と役割	6 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
第 2 章 マウスの海馬神経における <i>Hybid</i> の役割	43 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
第 3 章 ヒト皮膚線維芽細胞の HA 脱重合における HYBID 及び TMEM2 の役割 の検討	60 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
総括及び結論	79 頁
謝辞	82 頁
引用文献	83 頁
略語一覧表	93 頁

序論

ヒアルロン酸 (Hyaluronan; Hyaluronic acid: HA) は、*N*-アセチル-D-グルコサミンと D-グルクロン酸の二糖が交互に結合した多糖であり、結合組織に分布する直鎖状グリコサミノグリカンの一つである (1) (Fig. 1)。HA の分子量は 10^4

kDa におよび、生体内に単独で存在し得る最大のアニオン性高分子ポリマーである。HA は主に皮膚、次いで硝子体、関節、脳に多く存在しており、その物理的性質により細胞外マトリックスの構成分子として細胞間の保湿作用や緩衝作用を担

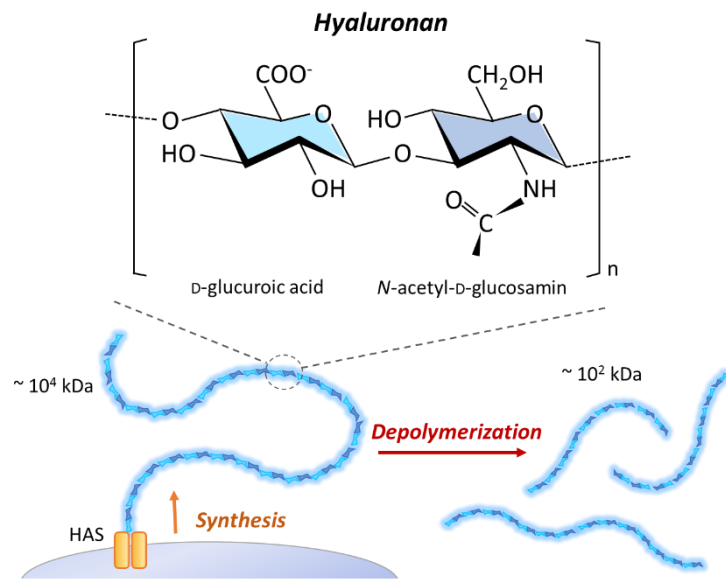


Fig. 1 The structure of HA.

う (2, 3)。また、HA はプロテオグリカンや HA 結合タンパク質との結合を介して、細胞の移動、分化、増殖など様々な生理機能を持つことは一般によく知られている (4)。興味深いことに、HA はその分子サイズによって全く異なる生理機能を担う (Fig. 2)。組織に存在する HA は基本的に高分子量 HA であり組織の恒常性を維持するが、種々の病態下においては低分子量 HA が産生され、病態の進行に寄与すると考えられている (4)。例を挙げると、高分子 HA (<1,000 kDa) は抗炎症作用 (5)、血管新生抑制作用 (6) を持つのに対して、低分子 HA (> 100 kDa) は炎症促進作用 (7)、血管新生促進作用 (8)、抗アポトーシス作用 (9) などが報告されている。

	1,000 kDa	250 kDa	10 kDa	0.01 kDa
	HMW-HA	MMW-HA	LMW-HA	Oligo-HA
Angiogenesis	Anti-angiogenesis	Pro-angiogenesis	Pro-angiogenesis	Pro-angiogenesis
Inflammatory	Anti-inflammatory	Pro-inflammatory	Pro-inflammatory	Pro-inflammatory
Cytokine release	Reduce	Increase	Increase	Increase
Cancer migration	Inhibit	Enhance	Enhance	Enhance
Other functions	Facilitates development Reduced scarring Wound contraction	Increased defense to pathogens in the gut	Enhanced skin healing	Enhanced skin healing

Green: Homeostasis
Red: Pathological condition

文献 4 (Monslow et al., Frontiers in Immunology, 2015) より改変引用

Fig. 2 Summary and pathological significance of HA size

HA molecular weight (MW) is divided into high (HMW > 1,000 kDa), medium (MMW 250-1,000 kDa), low (LMW 10-250 kDa), and oligosaccharides HA (Oligo < 10 kDa).

HA は細胞膜に存在する HA 合成酵素 (Hyaluronan synthase: HAS) により産生されるが (10)、産生される HA 分子量は環境に影響を受けず、一定のサイズであると考えられている (4)。そのため、HA 分子量はその分解過程によって極めて厳密に制御されていると考えられる。皮膚の HA の半減期は約 1-2 日と極めて短く、HA 分解と HA 合成のバランスにより高速の代謝回転を受ける (11)。HA 分解の最初の過程において、末梢の組織に存在している高分子量 HA (> 10³ kDa) は中間サイズの HA 断片 (~ 10² kDa) に脱重合を受ける。それに続き、HA 断片はリンパ管を介して体循環に取り込まれ、肝臓、脾臓、腎臓で単糖レベルまで分解を受ける (12-14)。HA 分解に関わる因子として、HA 分解酵素 (hyaluronidase: HYAL) ファミリーに属する酵素や細胞膜表面の HA 受容体 Clusters of Differentiation 44 (CD44) がこれまでに知られ、HYALs 及び CD44 は中間サイズまたは低分子量 HA の分解に関与する (15, 16)。しかしながら、劇

的な HA の生理機能変化をもたらすと考えられる HA 脱重合過程に関わる因子は長らく不明であった。

HA 脱重合に関わる因子の同定を目的として、ヒト皮膚線維芽細胞の HA 脱重合を促進する histamine によって発現誘導され、かつ、逆に HA 脱重合を抑制するトランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor: TGF) によって発現抑制される遺伝子のスクリーニングが行われた (17)。その結果、HYBID (hyaluronan-binding protein involved in HA depolymerization/KIAA1199/CEMIP) が皮膚及び関節の線維芽細胞の HA 分解初期過程を担う因子として同定された。HYBID は当初、非症候性難聴において遺伝子変異が見られる内耳タンパク質をコードする遺伝子 KIAA1199 として発見された (18)。HYBID 遺伝子は Kazusa Human cDNA Sequence Project によって HUGE タンパク質 (human undefined gene-encoded proteins > 4 kb) の一つと分類されており、150 kDa のタンパク質をコードしている (19)。また、HYBID タンパク質はいくつか特徴的な配列、即ち、細胞外リガンドとの結合が予測される 2 つの G8 ドメインと一つの GG ドメイン、そして多糖類加水分解との関与が予想される 4 つの PbH1 repeat を有する (20, 21)。HYBID タンパク質とそのドメインの模式図を Fig. 3 に示す (Fig.

3)。HYBID はその HA 脱重合活性により、生理的条件及び病態条件の両方において重要な機能を持つと考えられている。HYBID は皮膚線維芽細胞における

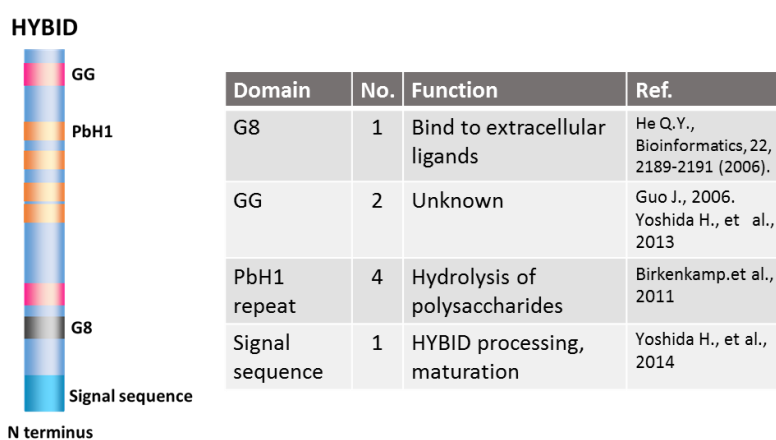


Fig. 3 The structure and domains of HYBID protein.

HA 脱重合に必須であることが証明されているが (17)、HA 分解酵素であるかどうかは定かではない。これまでに明らかになっている皮膚線維芽細胞における HYBID を介した HA 分解機構は、まず高分子量 HA が HYBID と結合したクラスリン被覆小胞を介してエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、早期エンドソーム内において HA が分解され、最後に切断された中間サイズ HA 断片が細胞外に排出される、というプロセスである (17) (Fig. 4)。また、HYBID の

HA 分解酵素活性を評価するために合成されたリコンビナント HYBID タンパク質は HA を分解しなかったことから、HYBID 自体は酵素的に HA 分解に寄与しない可能性が示さ

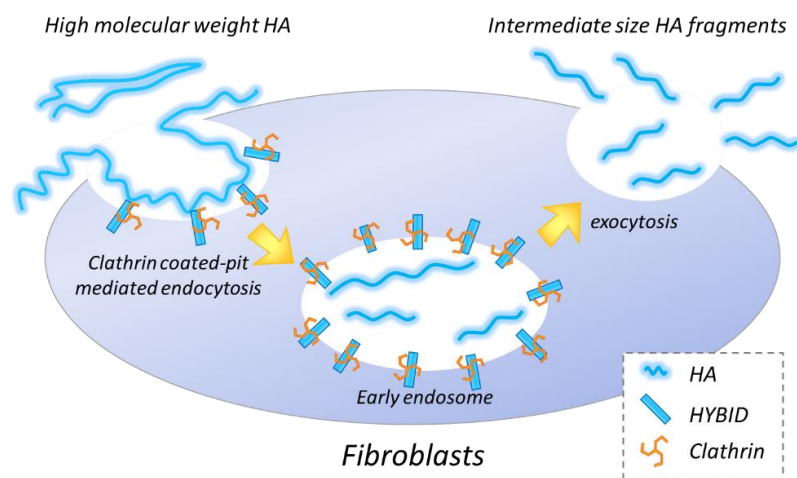


Fig. 4 The mechanism of HYBID-mediated HA depolymerization.

れている (17)。HYBID がエンドソーム内で酵素活性を持つような構造変化を起こすのか、または HYBID による HA 分解機構には未知の HA 分解酵素やパートナータンパク質が介在するのかわかりません。このように、HYBID の役割に関する知見は蓄積されつつあるが、その生理機能と分子機構については不明な点が多く、より詳細な検討が必要である。

脳は HA を多く含む臓器であるが、脳内 HA の生理機能や HA 代謝に関する理解は不十分である。脳内 HA の機能を示した報告としては、HA 合成酵素 *Has3* 欠損マウスは海馬細胞間隙の細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) 体積の減少及びてんかん症状を示すこと (22)、*CD44* 欠損マウスが認知

機能障害を示すこと (23)、老齡ラット及び脳虚血後のマウスの脳内で HA 発現量が増加すること (24, 25) などが挙げられる。上記の報告を鑑みると、HA が単なる ECM の構成因子の一つに留まらず、高次脳機能においても重要な生理機能を司ることは容易に想像できる。そして、脳内 HA の機能と代謝制御の理解によって、精神疾患や脳障害等に対する新規治療標的の発見に繋がるのが期待される。興味深いことに、主要な HA 分解酵素をコードする *HYAL1* 及び *HYAL2* は脳に殆ど発現しない (15, 26)。一方、*HYBID* は脳に多く発現するため、脳の HA 代謝において *HYBID* が主要な役割を担う可能性が考えられる。したがって、脳に存在する HA の生理機能を理解する上でも、*HYBID* の機能解明は医学的意義が大きいと考える。

本論文では、脳及び皮膚における *HYBID* の機能を明らかにすることを目的とした。第 1 章では、*Hybid* 欠損マウスを用いた検討から、マウス海馬に *Hybid* mRNA が多く存在し、実際に HA 分解に寄与することを示した。また、*Hybid* 欠損マウスの行動学的検討から、正常な認知機能には *Hybid* による HA 分解が必要であることを明らかにした。第 2 章では、*Hybid* 欠損マウス海馬の神経細胞に関して形態学的検討を行った。第 3 章では、ヒト皮膚線維芽細胞の *HYBID* を介した HA 分解機構に焦点を当て、近年新たに報告された HA 分解酵素 Transmembrane protein 2 (TMEM2) との機能を比較した。

第1章 マウスの中枢神経系における HYBID の分布と役割

第1節 緒言

HYBID は皮膚と関節軟骨の線維芽細胞の HA 脱重合における重要な因子である (17)。また、HYBID のマウスのホモログも HA 脱重合に関与する (27)。*HYBID* 遺伝子は脳、皮膚、肺、精巣、卵巣といったヒト臓器全般に広く発現するが、肝臓には発現しない (28, 29)。HYBID に関連する疾患としては、関節炎、がん、難聴、Werner syndrome (早老症の一種) などが挙げられ、これらの病態にはいずれも HA 代謝回転が関与する可能性が示唆される (17, 18, 28) (Table 1)。また、リウマチ関節炎と変形関節炎患者の関節組織と滑膜液において HYBID が発現上昇することが報告されている (17, 30)。がん細胞の増殖、遊走、浸潤は HYBID 発現量と相関する (31, 32)。これらの報告から、種々の病態条件下で HYBID 及びその HA 脱重合活性が重要な役割を担うため、その生理的役割及び病態下の役割の両方の理解が必要である。

Table. 1 HYBID との関連が報告されている疾患

疾患	報告	Ref.	
非腫瘍 家族性非症候性難聴	患者における遺伝子変異	18	
	内耳Deiter細胞における発現	97	
	Werner症候群(早老病)	患者由来皮膚線維芽細胞に高発現	28
	Crohn病	患者由来線維芽細胞に発現、炎症性サイトカイン放出に関与	98
	家族性アデノマトスポリポーシス	炎症に関与、COX-2阻害によりHYBID発現量減少	99
変形性膝関節症 関節リウマチ	患者血清、軟骨線維芽細胞における高発現、HA脱重合に関与	17	
	患者血清、軟骨線維芽細胞における高発現、HA脱重合に関与	17	
	血管新生に関与	30	
腫瘍 胃がん	胃がん細胞における発現	59	
	大腸がん	腺癌における高発現、5年生存率低下との関与	100
		大腸がん細胞における発現、Wntシグナルとの関与	21
	乳がん	乳がん細胞における発現	101
	膵臓がん	非浸潤性腺癌組織における発現	102

HA は *N*-アセチル-D-グルコサミンと D-グルクロン酸の二糖が連なる直鎖状グリコサミノグリカンであり (1)、特に皮膚、関節、硝子体、脳に多く発現する (3)。HA は HAS ファミリーによって合成され (10)、HYAL ファミリーである HYAL1 及び HYAL2 により主に分解されると考えられている (15)。近年、新たに HA 脱重合に関与する因子として HYBID が報告された (17)。興味深いことに、HYAL1 及び HYAL2 mRNA は HA を豊富に含む臓器である脳においては殆ど発現しないが (15, 26)、HYBID は他の臓器と比べて脳に多く発現する (28)。これらの報告から、HYBID は脳の HA 代謝回転において主要な役割を担うと考えられるが、脳における HYBID の機能と分布は不明である。

本章では、野生型マウスと *Hybid* 欠損マウスを比較することで、リアルタイム RT-PCR と *in situ* hybridization 法により *Hybid* mRNA の脳内分布を、各種行動試験により高次脳機能における HYBID の役割をそれぞれ検討した。また、野生型マウスと *Hybid* 欠損マウス海馬における HA 発現量及び分子量分布を比較検討した。

第 2 節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。コンピテントセル (ECOSTM Competent *E. coli* DH5 α)、agarose S、臭化エチジウム (EtBr Solution)、SacII、RNaseA は Nippon Gene (Tokyo, Japan)、アンピシリン (Ampicillin)、Lysogeny broth (LB) 培地、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、酢酸アンモニウム (ammonium acetate)、proteinase K、エタノール、ペンチレンテトラゾール、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA)、sucrose、dextran sulfate、無水酢酸 (Acetic Anhydride)、phenol、chloroform は

Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)、 ethylenediamine tetraacetate (EDTA)、 Triethanolamine-HCl は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)、 Tris-borate-EDTA (TBE)、 saline sodium citrate buffer、 T4 DNA Ligase は Takara (Shiga, Tokyo)、 pGEM T-Easy vector は Promega (Madison, WI, USA)、 O.C.T. compound は Sakura Finetechnical (Tokyo, Japan)、 Tween 20、 TritonX-100 は Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、 生理食塩水は Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)、 1 mM Tris-HCl (pH 8.0)、 ペントバルビタール (pentobarbital)、 2-プロパノールは Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、 リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO_3) リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、 リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、 塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl)、 formamide、 Tris-maleate buffer は Kishida Chemical (Osaka, Japan)、 Sephacryl S-1000 superfine は GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden) よりそれぞれ購入した。

Phosphate buffer (PB) は、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を超純水 (MilliQ) に溶解し、調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

C57BL/6J をバックグラウンドとする *Hybid* 欠損マウスは Cre-loxP 法による遺伝子組み換えにより作製された (33)。 *Hybid* の Exon1 を 2 つの loxP 配列で挟み込んだ target vector を C57BL/6J マウスの胚へ導入することで、 *Flox Hybid* アレルを持つキメラマウスを作製した。このマウスを CAG プロモーター制御下で Cre recombinase 遺伝子を発現するマウスと交配させることで全身ヘテロ *Hybid*

欠損マウスを作製し、さらに掛け合わせによりホモ *Hybid* 欠損マウスを得た。C57BL/6J マウスは日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。その後、C57BL/6J マウスと 6 世代以上のバッククロスを行い、雄性 *Hybid* 欠損マウスと同腹仔の野生型 (wild-type: WT) マウスを実験に使用した。すべてのマウスは設定温度 24°C (許容範囲: 22-26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40-70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00-午後 8:00) に維持された岐阜薬科大学の動物飼育舎で飼育した。マウスはプラスチック製のケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) を用い、自由給水下にて固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) により飼育した。行動試験はすべて午前 10:00 から午後 6:00 の間に行った。すべての実験は岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けたうえで実施した。また、遺伝子組換え動物は、岐阜薬科大学バイオセーフティー委員会に遺伝子組換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

2-2-2 マウスのジェノタイピング

生後 4-6 週齢のマウスの尻尾を先端から 2 mm 程度切り、Cell Lysis Solution (25 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0、1% SDS) 及び Proteinase K により溶解した。その後、7.5 M 酢酸アンモニウム溶液によりタンパク質を取り除き、2-プロパノール、70% エタノールによって DNA を抽出し、以下の配列のプライマーを用いて PCR を行うことでマウスの遺伝子型を同定した。

Rik-Forward: 5'-CATCTTAGCGGTCATCTCCC-3'

Rik-Reverse: 5'-ATGGAAGCGCAGCTTGTATC-3'

KO2: 5'-AAAATCTGGTGCCATTCACA-3'

増幅反応は Takara PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (Takara) を用いて 40 サイ

クル行った。1 サイクルの構成は 95°C で 30 秒間の DNA 変性、60°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 60 秒間の伸長反応にて行った。

2-2-3 リアルタイム RT-PCR

2-2-3-1 RNA 抽出

8 週齢雄性 *Hybrid* 欠損マウス及び野生型マウスの脳各部位 (嗅球、大脳皮質、線条体、海馬、小脳)、脊髄、網膜、及び肝臓を摘出し、マイクロチューブに入れ、液体窒素で急速凍結した。サンプルは RNA 抽出まで -80°C に保存した。RNA 抽出には NucleoSpin® RNA (Takara) を用いた。サンプルに 350 µL の RA1 buffer を加え、ホモジナイザー (Pycotron, Microtec Co., Chiba, Japan) を用いて氷冷下で粉碎及び均一化した後、タンパク質除去用のシリカメンブランカラムに移し、12,000 × g で 2 分間遠心した。カラムを取り除き、ろ液に 350 µL の 70% エタノールを加え、十分に混合した後、RNA 吸着用のシリカメンブランカラムに移し、12,000 × g で 1 分間遠心した。新しいチューブにカラムを移し、350 µL の脱塩用溶液 MDB buffer を加え、12,000 × g で 1 分間遠心した。その後、90 µL の Reaction buffer と 10 µL の DNase I 希釈溶液を加え、室温で 15 分間インキュベートした。200 µL の RA2 wash buffer を加え、12,000 × g で 1 分間遠心した。回収用チューブを交換し、600 µL の RA3 wash buffer を加え、12,000 × g で 1 分間遠心した。さらに、回収用チューブを交換し、250 µL の RA3 wash buffer を加え、12,000 × g で 2 分間遠心した。最後に、RNA 溶液回収用のチューブにカラムをセットし、30 µL の RNase-free H₂O を加え、12,000 × g で 1 分間遠心し、total RNA を抽出した。

2-2-3-2 RNA 逆転写

抽出した total RNA 濃度は NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) を用いて 260 nm 波長の分光測定から求め、RNase-free H₂O を加えて各サンプルの RNA 濃度が等しくなるよう調整した。RNA 逆転写には PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara) を用いた。

6.5 μ L の total RNA に 2 μ L の 5 \times PrimeScript Buffer (for Real Time)、0.5 μ L の PrimeScript RT Enzyme Mix I、0.5 μ L の Oligo dT Primer (50 μ M)、0.5 μ L の Random 6 mers (100 μ M) を加え、混合した。その後、Takara PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient を用いて、72°C で 15 分間の逆転写反応、続いて 85°C で 5 秒間の逆転写酵素失活反応を行い、cDNA を作製した。

2-2-3-3 リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR には SYBR[®] Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara) を用いた。10 μ L の SYBR[®] Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) に各プライマー (0.2 μ M)、MilliQ、cDNA 溶液をそれぞれ加え、全量を 20 μ L に調製した。その後、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara) を用いて PCR 反応を行った。Hybrid は 95°C で 5 秒間、60°C で 30 秒間、続いて 2 ステップ (95°C で 15 秒間と 95°C で 1 分間) を 60 サイクル、他の因子は 3 ステップ (94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 1 分間) を 35 サイクルの PCR 反応によりそれぞれ検出した。以下のプライマーをそれぞれ用いた。

Hybrid-forward: 5'-GGCCTACAAGAGCAGCAATC-3'

Hybrid-reverse: 5'-GTGCCTCTTGGGTAGCAGAG-3'

Hyal1-forward: 5'-TGTGGCTATAGTTTCCAGAGACC-3'

Hyal1-reverse: 5'-TGAATTCAGTGTGTGCAGTTGGGT-3'

Hyal2-forward: 5'-ACATACACCCGAGGACTCACGG-3'

Hyal2-reverse: 5'-TGAATTCCTTGCACCAGAGGCCAG-3'

Ph-20-forward: 5'-CTGATCGTACCTCTGAATACC-3'

Ph-20-reverse: 5'-CAGGTAGGAGGTAGAAGGCT-3'

Gapdh-forward: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

Gapdh-reverse: 5'-TTGCTGTGA-AGTCGCAGGAG-3'

すべての反応は *Gapdh* による内部補正を行った後、その平均値を用いた。

2-2-4 *In situ* hybridization 法による *Hybid* mRNA 分布の検討

2-2-4-1 RNA プローブの鋳型となる DNA 断片の作製

マウス *Hybid* プラスミドベクターは pcDNA3.1 ベクターにマウス *Hybid* cDNA が組み込まれており、花王株式会社より恵与されたものを使用した。マウス *Hybid* プラスミドベクターに対し、*Hybid* (*Kiaa1199*; NCBI Accession No. AB103331) の塩基配列 (1083-2020) を認識するプライマーを用いて以下の PCR 反応を行い、RNA プローブの鋳型となる DNA 断片を作製した。1 μL のマウス *Hybid* プラスミドベクター (1 ng/ μL) に 2.5 μL の 10 \times PCR Buffer for Blend Taq、0.25 μL の Blend Taq、2.5 μL の dNTPs (2 mM)、0.375 μL の各プライマー (100 μM)、MilliQ を加え、混合した。PCR 反応には Takara PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (Takara) を用い、最初に 95°C で 2 分間の初期変性、ついで増幅反応 (95°C で 30 秒間の DNA 変性、60°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 60 秒間の伸長反応) を 30 サイクル、最後に 72°C で 5 分間の反応を行った。以下のプライマーをそれぞれ用いた。

Hybid probe-forward: 5'-ACAGGCCACAACAATGGATG-3'

Hybid probe -reverse: 5'-AGAATGTGGACACGGCATTG-3'

2-2-4-2 RNA プローブの鋳型 DNA 断片の精製

1% Agarose 及び 0.005% 臭化エチジウム含有の TBE ゲルを用いて、2-2-4-1 にて作製した PCR 産物を電気泳動した。泳動後のゲルに対して UV ランプを照射し、目的とする産物の分子量 (937 bp) のバンドを確認した後、該当ゲル部分を切り出し、NucleoSpin Gel and PCL Clean-up kit (Takara) を用いて DNA の精製を行った。目的分子量付近のゲル破片 (250 mg) に対して 500 μL の NTI を加えて、55°C で 10 分間インキュベートしてゲルを溶解した後、DNA 吸着用シリカメンブレンカラムに全量を添加して 11,000 $\times g$ で 1 分間遠心した。700 μL の NT3 wash buffer を加えて 11,000 $\times g$ で 1 分間遠心を 2 回行った。つぎに、シリカメンブレンを乾燥させるために 11,000 $\times g$ で 1 分間遠心した。その後、15 μL の NE buffer をカラムに添加し、室温で 1 分間放置して DNA を溶出させた後、11,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、DNA を回収した。溶出した DNA 濃度は Nano Vue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB) を用いて 260 nm 波長の分光測定から求めた。

2-2-4-3 プラスミドベクターへの鋳型 DNA 断片の組み込み

In situ hybridization に用いるプローブ合成の際に鋳型として使用する pGEM ベクター (Promega, Madison, WI, USA) に、2-2-4-2 にて作製した DNA 断片を組み込むために、Ligation 反応を行った。1 μL の pGEM vector (50 ng/ μL)、1 μL の DNA 断片 (45 ng/ μL)、1 μL の T4 DNA Ligase、5 μL の Ligation Buffer ($\times 2$)、2 μL の MilliQ を加えた全量 10 μL をよく混合し、16°C で 30 分間の Ligation 反応を行い、4°C で一晩放置した。

2-2-4-4 Hybrid RNA プローブ合成用プラスミド DNA の増幅

2-2-4-3 で作製した RNA プローブ合成の際の鋳型となるベクターを大腸菌 DH5 α 株に形質転換し、増幅させた。ベクターの大腸菌 DH5 α 株への形質転換及び培養は岐阜薬科大学生命倫理バイオセーフティー委員会に遺伝子組み換え実験申請を行い、承認を得た上で行った。コンピテントセル (ECOSTM Competent *E. coli* DH5 α) へのプラスミド DNA の導入には、高効率迅速形質転換法を用いた。氷上でコンピテントセルを融解した後、直ちにプラスミド DNA を添加し、1 秒間ボルテックスで攪拌した。氷上で 5 分間インキュベートした後、アルミブロックバスを用いて 42°C で 45 秒間インキュベートし、直ちにボルテックスで 1 秒間攪拌した。その後、全量をアンピシリン 100 μ g/mL を含有する LB 培地 (寒天培地) に均一に塗布した。37°C で 12 時間インキュベートした後、形成されたコロニーを選んで採取し、15 mL チューブに入った 5 mL の液体 LB 培地 (アンピシリン 100 μ g/mL を含有) に入れ、37°C で一晩振盪培養し、十分に増殖させた。

2-2-4-5 *Hybrid* RNA プローブ合成用プラスミド DNA の抽出

プラスミド DNA 抽出キット Pure YieldTM Plasmid Midiprep System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて抽出を行った。2-2-4-4 の方法で作製した大腸菌の培養液を遠沈管に入れ、1,000 \times g で 3 分間遠心し、菌体を沈殿させた。上清を捨てた後、3 mL の Cell Resuspension Solution を添加し、大腸菌を再懸濁した。その後、3 mL の Cell Lysis Solution を添加し、転倒混和した後、室温で 3 分間インキュベートした。5 mL の Neutralization Solution を添加し、転倒混和した後、室温で 3 分間インキュベートした。Pure YieldTM Cleaning Column を挿入した 50 mL チューブに注ぎ、2 分間インキュベートした後、1,500 \times g で 5 分間遠心した。ろ液を Pure YieldTM Binding Column を挿入した 50 mL チューブに注

ぎ、 $1,500 \times g$ で 3 分間遠心した。2-プロパノールを加えた Endotoxin Removal Wash を 5 mL 添加し、 $1,500 \times g$ で 3 分間遠心した。さらに、エタノールを加えた Column Wash Solution を 20 mL 添加し、 $1,500 \times g$ で 5 分間遠心した。Pure Yield™ Cleaning Column を新しい 50 mL チューブに付け替え、600 μ L の Nuclease-Free Water を添加し、 $1,500 \times g$ で 5 分間遠心した。溶出したプラスミド DNA の濃度は NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB) を用いて 260 nm 波長の分光測定から求めた。

2-2-4-6 プラスミドベクターに導入された *Hybid* DNA 断片の向きの確認

PCR 法を用いて、2-2-4-3 の方法でプラスミドベクターに組み込まれた DNA 断片が順行逆行の向きを確認した。2-2-4-1 に準じた方法で、pGEM ベクター中に存在する配列を認識するプライマー (*M13 forward primer*) 及び *Hybid probe-forward* または *Hybid probe-reverse* のどちらかの 2 つの組み合わせで PCR 反応を行った。PCR 産物の増幅の有無から、そのプラスミド DNA から合成した RNA プローブが antisense プローブと sense プローブのどちらになるかを判別した。

2-2-4-7 *Hybid* RNA プローブの合成

2-2-4-6 の方法で DNA 断片の挿入方向が判別した antisense プローブ用プラスミドと sense プローブ用プラスミドをそれぞれ 1 種類用意し、制限酵素 SacII による処理の後、DIG RNA labeling Kit (SP6/T7) (Roche, Basel, Switzerland) を用いて RNA プローブを合成した。プラスミド DNA (4 μ g) に対し、10 μ L の NE Buffer 4 ($\times 10$)、2 μ L の SacII、MilliQ をそれぞれ加え、全量 100 μ L をよく混合し、37°C で一晩インキュベートした。SacII 処理後の DNA 断片は、2-2-4-2 と

同様の方法で、NucleoSpin Gel and PCL Clean-up kit (Takara) を用いて精製し、ついで NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB) を用いて濃度を定量した。精製した 1 μ g の DNA 断片に MilliQ を加え、全量 13 μ L とし、2 μ L の 10 \times NTP labeling mixture、2 μ L の 10 \times Transcription buffer、1 μ L の RNase inhibitor、2 μ L の RNA Polymerase SP6 をそれぞれ加え、よく混合した後、37°C で 2 時間インキュベートした。その後、0.8 μ L の 0.5 M EDTA (pH 8.0) を添加し、RNA 合成反応を停止させた。反応後液の 0.5 μ L を 1% Agarose 及び 0.005% 臭化エチジウム含有の TBE ゲルを用いて電気泳動し、目的分子量の RNA プローブが合成されていることを確認した。RNA プローブは -80°C に保存した。使用直前に、室温に融解し、5 μ L の RNA プローブに対し、45 μ L の Hybridization solution [7.2 % TEN solution (139 mM Tris-HCl, pH 7.5, 4.17 M NaCl, 1.39 mM EDTA), 50% formamide, 10% Dextran Sulfate, 1% RMB blocker] を加え、65°C で 15 分間インキュベートした (zic probe)。

2-2-4-8 *In situ* hybridization 用組織切片作製

マウスはペントバルビタール麻酔下 (80 mg/kg, i.p.) で開胸し、ペリスタポンプ (Atto, Tokyo, Japan) を用いて生理食塩水を左心室内に注入して灌流し、ついで 4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を 7 分間注入し固定した。その後、脳を取り出し、同固定液中に一晩放置した。固定した脳は 25% スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) に 24 時間浸漬した後、液体窒素を用いて O.C.T. compound 中に凍結包埋し、クライオスタット (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、-20°C で厚さ 12 μ m の切片を作製し、MAS コーティングされたスライドガラス (S-9441, Matsunami, Osaka, Japan) に貼付して、-80°C で保存した。

2-2-4-9 *In situ* hybridization

切片は、染色時-80°C に保存された凍結切片を取り出し、-20°C で1時間放置、4°C で1時間放置した後、室温で30分間乾燥させた。スライドを100% エタノール、95% エタノール、70% エタノール、50% エタノール、及び2× Saline Sodium Citrate (SSC; 0.03 M sodium citrate, 0.3 M NaCl) にそれぞれ1分間ずつ浸漬し、スライドを水和した。スライドを37°C の Proteinase K buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, 0.1 mg/mL Proteinase K) 中で5分間インキュベートした後、MilliQ 及び Triethanolamine HCl (TEA; pH 8.0) にそれぞれ浸漬した。その後、無水酢酸を加えた TEA 中に10分間浸漬する。2× SSC、50% エタノール、70% エタノール、95% エタノール、100% エタノール及びそれぞれ1分間ずつ浸漬し、スライドを脱水し、1時間室温で風乾した。2-2-4-7の方法で用意した zic probe 2 µL に 15 µL の MilliQ を加え、ウォーターバスを用いて10分間煮沸した後、直ちに5分間水中で冷却した。その後、予め56°C に温めた100 µL の Hybridization solution を添加し、プローブ溶液を作製した。カバーガラスを用いて、スライド上のマウス脳切片とプローブ液を密着させ、56°C で一晩インキュベートした。スライドを室温の2× SSC に浸し、30分間振盪した。スライドを65°C に温めた50% Formamide を含有する2× SSC に30分間浸した。37°C に温めた2× SSC に10分間浸した。その後、10 µL の RNase A (100 mg/mL, Machery Nagel) を加えた RNase buffer (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA) にスライドを浸し、37°C で30分間インキュベートした。65°C に温めた RNase buffer で30分間スライドを洗浄した。ついで、スライドを室温の0.05% Triton X-100 及び1% RMB blocker solution を含有する1× Maleate 中で、2時間インキュベートした。スライドを室温の1× Maleate で5分間、2回洗浄した。カバーガラスを用いて、アルカリホスファターゼ標識された抗ジゴキシゲ

ニン抗体を含有する 1 × Maleate buffer と切片を密着させ、遮光し、室温で一晩インキュベートした。スライドを 0.1% Triton X-100 を含有する 1 × Maleate で 10 分間、6 回洗浄した。スライドを 0.1% Tween 20 を含有する Genius Buffer 3 [0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 9.5)] で 5 分間、2 回洗浄した。最後に、スライドガラスを十分に乾燥させた後、2% nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate を含有する Genius Buffer 3 を 300 μL マウス脳切片上に添加し、遮光し、室温で 24 時間インキュベートした。MilliQ でスライドガラスを洗浄した後、マウントクイック試薬を用いてカバーガラスで封入した。切片は顕微鏡にて撮影した。また、ネガティブコントロールは sense プローブを用いた。

2-2-5 新奇物質探索試験 (Novel object recognition test)

試験はオープンフィールド縦 30 cm × 横 30 cm × 高さ 15 cm の試験装置を用いて行った。初回の獲得試行 (Acquisition test) では装置の中央に二つの同様の物質 (四角錐: 縦 5 cm × 横 5 cm × 高さ 3.5 cm) を壁から 5 cm 離れた位置に対称に設置し、マウスを 10 分間自由に探索行動させた。24 時間後の保持試行 (Retention test) では片方の物質を別の新奇の物質 (三角柱: 縦 5 cm × 横 5 cm × 高さ 5 cm) に交換し、同様に 10 分間マウスを自由探索行動させた。獲得試行及び保持試行におけるマウスのそれぞれの物質に対する探索時間を測定した (Fig. 5)。

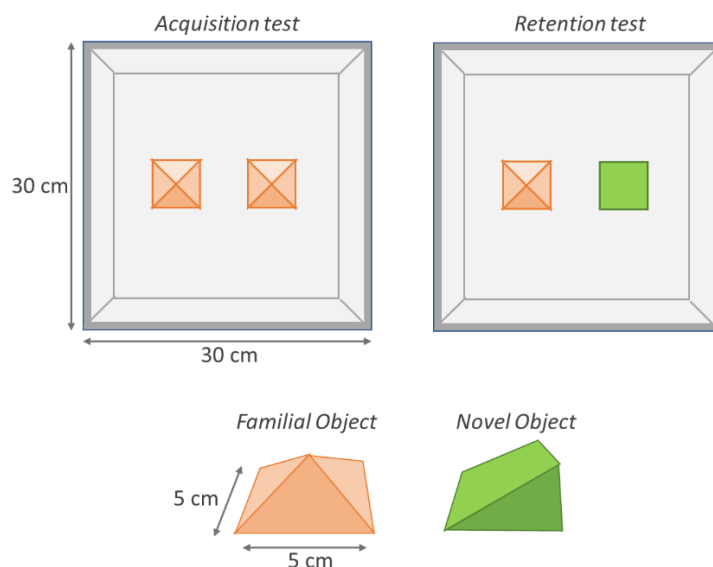


Fig. 5 An apparatus of novel object recognition test.

2-2-6 モリス水迷路試験 (Morris water maze test)

モリス水迷路試験は既報に準じて行った (34)。Fig. 6 に示す円形のプール (直径 120 × 45 cm) に水深が 30 cm となるように 20-22°C の水を入れた。試験は前訓練試行、訓練試行及びプローブ試行の 3 部に分けて行った。

前訓練試行：マウスを試験装置の中央部の水面に放ち、60 秒間泳がせた。

訓練試行：前訓練試行の翌日から 5 日間訓練試行を行った。装置を 4 つの区画 (target、left、right 及び opposite area) に分け、透明な退避用プラットフォーム (直径 10 cm) を target area の中央、水面下 1 cm の場所に設置した。装置内の任意の 4 か所を開始点とし、その内の 1 か所にマウスを放ち、プラットフォームに泳いで到達するまでを 1 回の試行とした。本試行を 30 分間隔で 1 日 4 回行った。また、各試行においてマウスはプラットフォームに到達後 15 秒間その場に滞在させた後回収し、体の水分を拭き取りヒーターを用いて十分に保温した。60 秒以内にプラットフォームに到達できなかったマウスは試験実施者によりプラットフォームに誘導され、同様に 15 秒間滞在させた後、回収した。マウスがプ

プラットフォームに到達するまでの時間を EthoVision XT (Noldus, Wageningen, Netherland) を用いて記録し、1日あたりの試行回数4回の平均値を空間学習の指標とした。5日間の訓練試行において一度もプラットフォームに到達しなかったマウスは解析から除外した。

プローブ試行：最後の訓練試行の翌日にプローブ試行を行った。装置内からプラットフォームを撤去し、opposite areaの中央にマウスを放ち、120秒間装置内を探索させた。マウスが泳いだ軌跡を Etho Vision XT (Noldus) を用いて記録し、target areaに滞在した時間の割合及びプラットフォームが存在していた領域を通過した回数を長期記憶の指標として評価した。

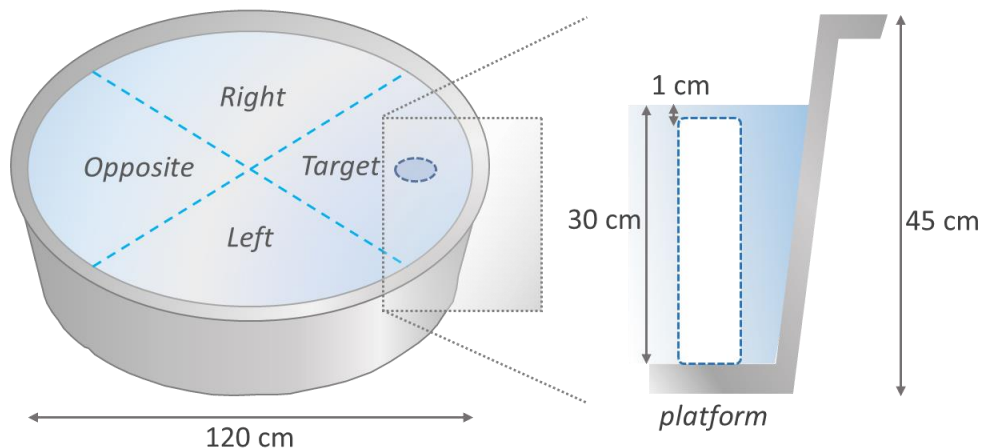


Fig. 6 An apparatus of Morris water maze test.

2-2-7 オープンフィールド試験 (Open field test)

オープンフィールド試験には、縦 30 cm × 横 30 cm × 高さ 15 cm の試験装置を用いて行った。マウスを試験装置内に移し、15分間のマウスの行動をビデオカメラにより撮影し、Etho Vision XT (Noldus) により解析を行った。マウスの自発活動量は、Fig. 7に示す縦 30 cm × 横 30 cm の範囲における移動距離を測定することで算出した。また、不安行動の指標となる中央滞在時間 (duration)、中央侵入回数 (frequency) は、Fig. 7に示す縦 15 cm × 横 15 cm から

なる中央部 (Central zone) 内での滞在時間及び侵入回数を自動的に検出することで算出した。

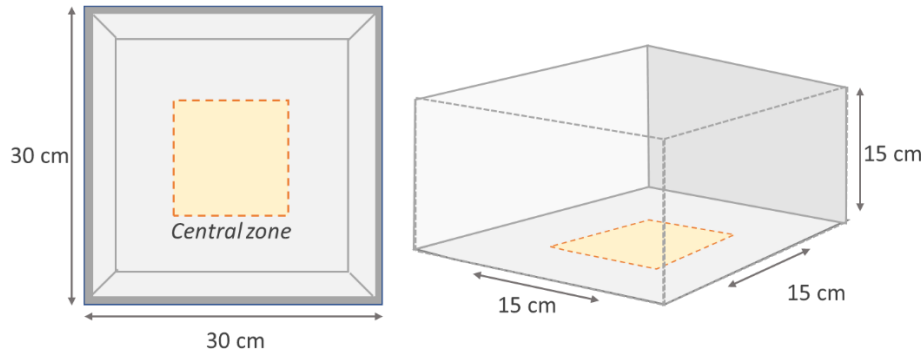


Fig. 7 An apparatus of Open field test.

2-2-8 聴性驚愕反応による聴覚機能の評価

聴性驚愕反応は小動物用驚愕反応測定装置 (SR-LAB; San Diego Instruments, San Diego, CA, USA) を用いて測定した。測定前の 5 分間、装置内にマウスを入れ、バックグラウンドとして 60 dB のノイズに暴露し、馴化を行った。測定時、8 秒ごとに合計 30 回にわたり 100 dB の驚愕音を提示し、驚愕反応としての体動を測定した。10 回ごとの反応強度の平均値を計算した。

2-2-9 ペンチレンテトラゾール誘発痙攣モデルにおける行動評価

ペンチレンテトラゾールは生理食塩水に溶解し、60 mg/kg の用量で腹腔内投与し、その直後から 15 分間の行動を観察した。マウスの行動はビデオカメラにより撮影し、以下に従いスコア化した (35)。

スコア 0 : 異常なし

スコア 1 : 探索行動、嗅ぎ行動、毛づくろい行動の後、無動

スコア 2 : 頷き行動、顔面や前肢までにとどまる短時間のミオクローヌス (四肢の収縮)

スコア 3 : 長時間のミオクローヌス (四肢の収縮)、反復性の頭部の運動あるいは身震い行動、尾部の硬直

スコア 4 : 前肢のみ、もしくは前後肢にわたる間代性痙攣、前肢を回転させるような発作、後肢の外転、持続的な立ち上がり行動、転倒、ストラウブ挙尾反応、カンガルー様姿勢

スコア 5 : 硬直痙攣

スコア 6 : 死亡

2-2-10 *Hybid* 欠損マウスの海馬 HA の評価

2-2-10-1 フェノールクロロホルムを用いた組織中 HA の抽出

8 週齢雄性 *Hybid* 欠損マウス及び野生型マウスの海馬を摘出し、海馬重量 1 mg あたり 2 μ L の Cell Lysis Solution (25 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0、1% SDS) 及び Proteinase K を添加し、55°C で一晩インキュベートし、溶解した。組織溶解液と等量のフェノールクロロホルム (水飽和フェノール及びクロロホルムを等量混合したもの) を添加し、12,000 \times g で 15 分間遠心した。新しいチューブに水層を回収し、クロロホルムを加え、30 秒間ボルテックスを用いて攪拌した後、12,000 \times g で 15 分間遠心した。水層を回収し、海馬由来 HA 抽出液として検討に用いた。

2-2-10-2 HA の定量

HA の定量にはヒアルロン酸測定キット HA-KIT (PG Research, Tokyo, Japan) を使用し、メーカーのプロトコルに従って行った。96 well plate 内の各 well に HA Coating Solution を 100 μ L ずつ添加し、プレートシールを被せ、室温で 1 時間インキュベートした。Wash Buffer を 300 μ L ずつ添加し、合計 4 回 well を洗

浄した。Blocking Buffer を 200 ずつ添加し、プレートシールを被せ、室温で 30 分間インキュベートした。Wash Buffer を 300 μ L ずつ添加し、1 回洗浄した。その後、HA 標準品を用いて作製した HA Standard 及びマウス海馬由来 HA 溶液を 50 μ L ずつ添加した。全ての well にビオチン標識された HA 結合タンパク質 (Biotin-HABP) 溶液を 50 μ L ずつ添加し、プレートシールを被せ、30 秒間十分に攪拌した後、室温で 1 時間インキュベートした。Wash Buffer を 300 μ L ずつ添加し、合計 4 回 well を洗浄した。全ての well に西欧ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase: HRP) 標識されたアビジン (HRP-Avidin) 溶液を 100 μ L ずつ添加し、プレートシールを被せ、室温で 1 時間インキュベートした。Wash Buffer を 300 μ L ずつ添加し、合計 4 回 well を洗浄した。Substrate Solution を 100 μ L ずつ添加し、遮光し、室温で 20 分間インキュベートし、発色を行った。Stop Solution を 100 μ L ずつ添加して反応を停止させ、450 nm における吸光度を測定した。HA Standard の濃度と吸光度から検量線を作製し、各サンプルの HA 濃度を算出した。

2-2-10-3 クロマトグラフィーによる HA 分子量分布の測定

HA 分子量分布の測定は、Sephacryl S-1000 superfine (GE Healthcare Bio-Sciences AB) が充填されたゲルろ過クロマトグラフィーにより行った。マウス海馬より抽出した HA 2.7 μ g をカラム (2 cm \times 95 cm) に添加し、0.5 M NaCl 溶液で溶出した。フラクションを回収後、2-2-10-2 の方法に準じて、それぞれの HA 量を定量した。カラムは PG Research 社から入手した HA 標準品 Na-HA H2 (平均分子量 1,400 kDa) 及び Na-HA L2 (平均分子量 200 kDa) HA により補正した。

2-2-11 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な解析は JSTAT (Vector) または Statistical Package for the Social Science 15.0J for Windows software (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて行った。Student's *t* 検定により統計解析を行った。危険率が 5% 未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 *Hybid* 欠損マウスの作製

3-1-1 Cre-loxP システムを用いた *Hybid* 欠損マウスの作製

Hybid 遺伝子の Exon1 配列の両端に loxP 配列を組み込んだマウスと、全身に Cre 配列を発現するマウスを掛け合わせることで、全身 *Hybid* 欠損マウスを作製し、以後の検討に用いた (Fig. 8)。マウスの外観や体重に明らかな差は認められなかった。

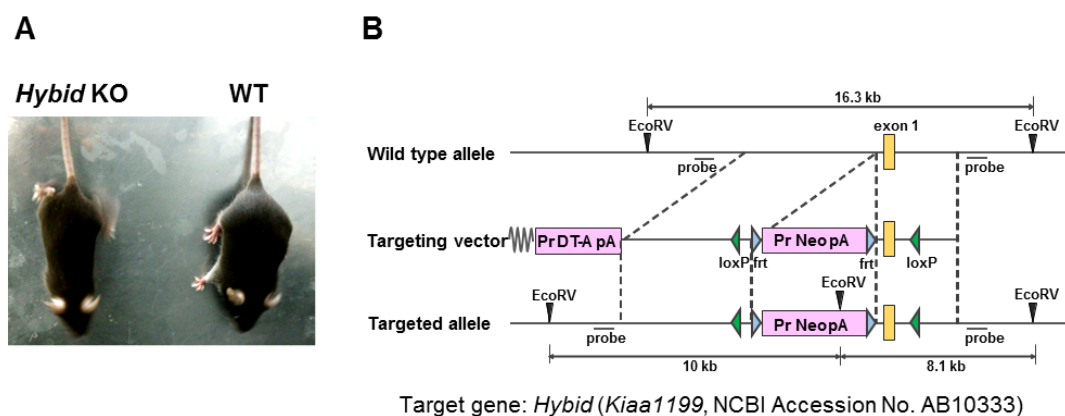


Fig. 8 *Hybid* KO mice were created using a Cre-loxP system.

(A) Appearances of WT and *Hybid* KO mice. (B) Scheme of process for targeting vector.

3-1-2 マウスジェノタイピングによる遺伝子型の同定

マウスの遺伝子型は PCR 法を用いて判別した (Fig. 9)。ヘテロ *Hybid* 欠損マウス同士を交配させ、得られた同腹のホモ *Hybid* 欠損マウス及び野生型マウスを検討に用いた。

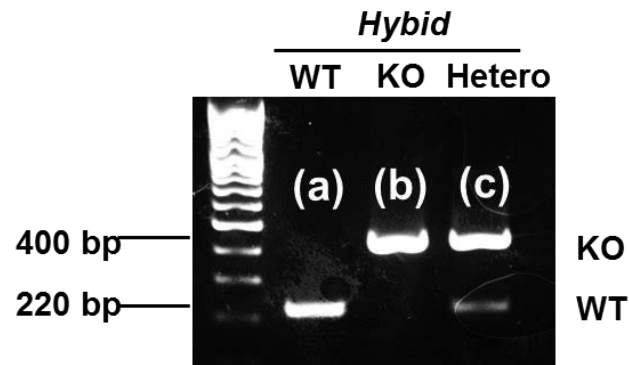


Fig. 9 Genotyping of *Hybid* KO and WT mice.

(a) WT, (b) homo *Hybid* KO, (c) hetero *Hybid* KO.

3-2 マウス脳における *Hybid* mRNA 発現量及び局在の検討

3-2-1 中枢神経組織における *Hybid* mRNA の発現量

野生型マウスの各脳部位及び中枢神経組織における *Hybid* mRNA の発現を検討した。リアルタイム RT-PCR 法を用いた検討の結果、各脳部位だけでなく、網膜や脊髄といった中枢神経組織において *Hybid* mRNA の発現が認められた (Fig. 10A)。脳部位の中でも、特に海馬及び小脳において *Hybid* mRNA の強い発現が認められた。また、既報の通り (28)、肝臓では *Hybid* mRNA が発現していないことが確認された。一方、*Hybid* 欠損マウスの各組織で *Hybid* mRNA が検出されなかったことから (Fig. 10B)、本マウスにおいて *Hybid* 遺伝子の欠損が確認された。

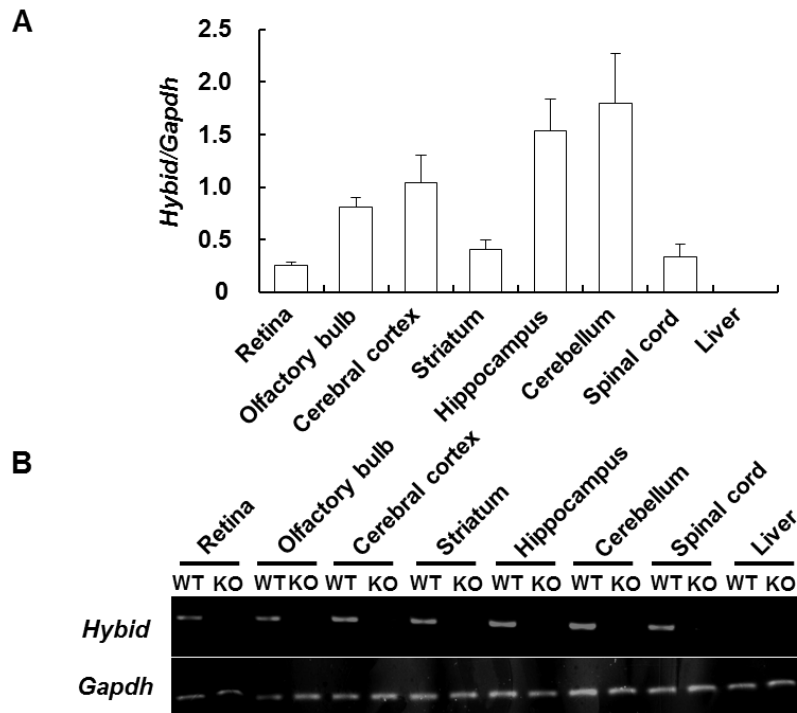


Fig. 10 Expression levels of *Hybid* mRNA in *Hybid* KO and WT mouse

(A) Expression levels of *Hybid* mRNA in WT mouse tissues, such as the brain, spinal cord, retina, and liver. (B) Images show bands of *Hybid* cDNA following gel electrophoresis after real-time PCR in *Hybid* KO mice and WT mice. Each column represents mean \pm S.E.M. n = 4.

3-2-2 マウス各脳部位における *Hyal1* 及び *Hyal2* mRNA の発現量

HYBID は HA 分解に寄与する因子であるため、*Hybid* 欠損マウスにおいて、代償機構として他の主要な HA 分解関連因子の遺伝子発現量が変化する可能性が考えられる。そこで、*Hybid* 欠損マウスと野生型マウスの脳における HA 分解酵素遺伝子の発現量を比較した。HYAL1 及び HYAL2 は既知の HA 分解酵素ファミリーであり、主に末梢において単糖レベルへの HA 分解を担う (15)。HYAL ファミリーのうち、主に HA 分解を担うのは HYAL1、HYAL2 及び PH-20 と考えられている (15)。そこで、上記 3 つの *HYALs* mRNA に関して、マウス脳組織における発現量を比較したところ、*Hyal1* 及び *Hyal2* mRNA の発現量

は両群間に明らかな差は認められなかった (Fig. 11)。また、精子 HA 分解酵素として知られている *Ph20* mRNA はマウス脳組織において検出されなかった。これらの結果より、*Hybid* 欠損による *Hyal1* 及び *Hyal2* の脳内での代償機構は生じないことが明らかとなった。

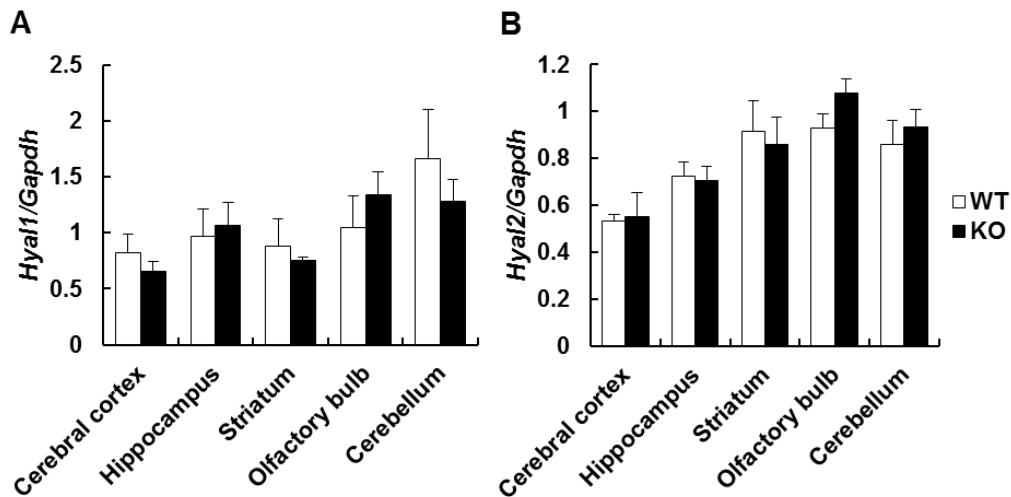


Fig. 11 Expression levels of *Hyal1* and *Hyal2* mRNA.

(A, B) Expression levels of *Hyal1* and *Hyal2* mRNA in the brain of WT and *Hybid* KO mice were measured by RT-PCR. Each column represents mean \pm S.E.M. n = 3 or 4.

3-2-3 マウス海馬及び小脳における *Hybid* 遺伝子の発現様式

つぎに、*Hybid* mRNA の高発現が示された海馬と小脳において、*Hybid* がどのような発現様式を示すかを検討した。*Hybid* 欠損マウス及び野生型マウスの脳薄切切片を用いた *In situ* hybridization の検討結果より、*Hybid* mRNA は野生型マウスの海馬歯状回及び小脳の顆粒細胞層に多く発現することが明らかとなった (Fig. 12)。また、リアルタイム RT-PCR の検討と同様に、*Hybid* 欠損マウスにおいては *Hybid* mRNA の発現は認められなかった。

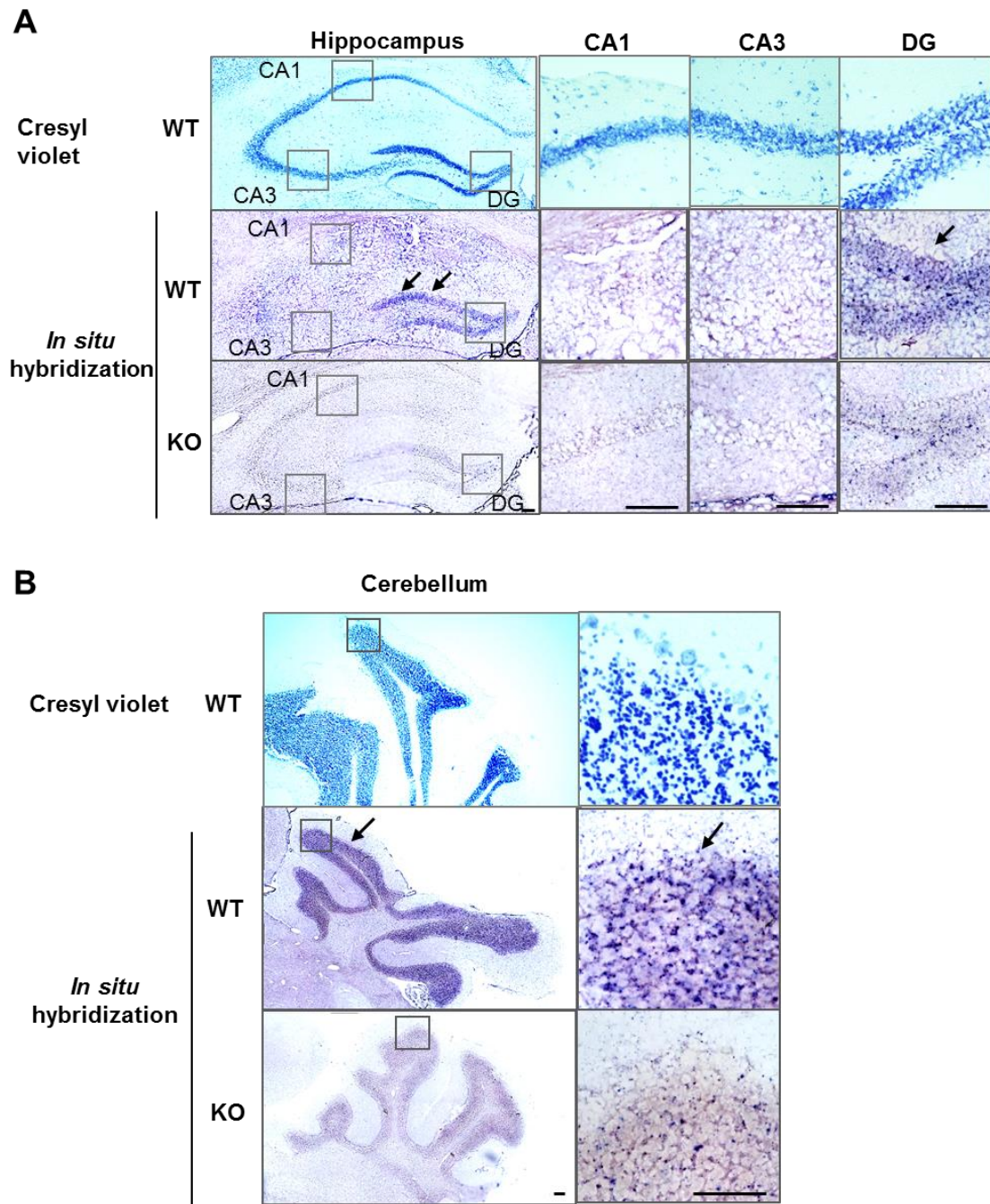


Fig. 12 *Hybid* mRNA expressed in hippocampus and cerebellum in WT mice.

(A, B) Representative images of in situ hybridization in the hippocampus (A) and cerebellum (B) in WT and *Hybid* KO mice using DIG-labeled *Hybid* RNA probe. The upper picture shows counterstaining with cresyl violet. The lower pictures show staining with the antisense RNA probes of the *Hybid* sequence in the brain of WT mice and *Hybid* KO mice. Scale bar represents 100 μ m.

3-3 *Hybid* 欠損マウスの行動評価

3-3-1 新奇物質探索試験による短期記憶の評価

Hybid はマウスの記憶学習の中枢である海馬において高発現していることより (Figs. 10 and 12)、HYBID が記憶及び学習の機能に関与する可能性が考えられる。まず、*Hybid* 欠損マウスの記憶能力を評価するために、新奇物質探索試験を行った。この試験においては、10 分間の獲得試行の 24 時間後に 10 分間の保持試行を行った (Fig. 13A)。保持試行においては、*Hybid* 欠損マウスの新奇物質に対する探索時間の割合は野生型マウスのものに比べ有意に減少していた (Fig. 13B)。この結果より、*Hybid* 欠損マウスにおいては、野生型マウスに比べ、短期記憶力の低下が示唆された。一方、いずれの試行においても総探索時間は *Hybid* 欠損マウス及び野生型マウスの両方において差が認められなかった (Fig. 13C)。このことから、被験物質に対する嗜好性には HYBID 発現が影響しないことが確認された。

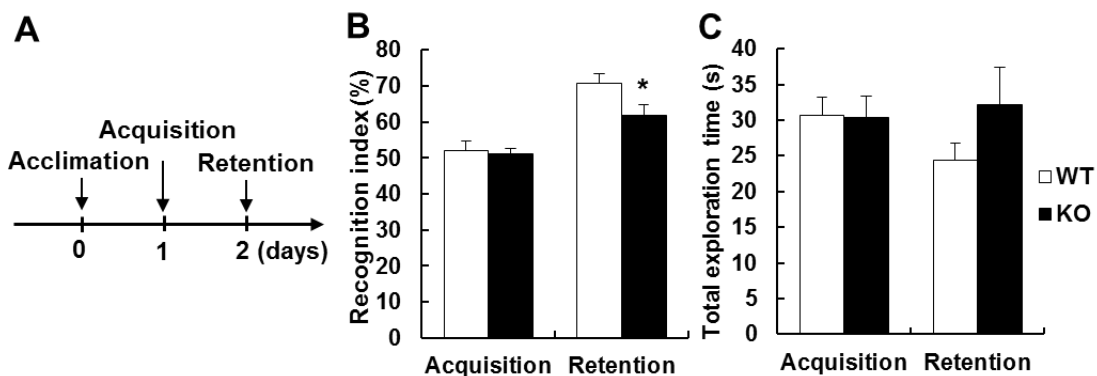


Fig. 13 *Hybid* KO mice show memory impairment in novel object recognition test.

(A) A representative protocol of the novel object recognition test. (B) The percentage of time spent exploring the left object in each session. (C) Total exploration time in the test. * $p < 0.05$ versus wild-type mice (Student's *t*-test). Each column represents mean \pm S.E.M. $n = 10$.

3-3-2 Morris 水迷路試験による空間認知記憶の評価

つづいて、海馬機能の特徴的な機能としてよく知られる空間認知記憶に及ぼす **HYBID** の関与を検討するために、**Morris** 水迷路試験を行った。本試験はマウスが浸水状態を忌避する性質を利用し、水面下の退避用プラットホームの位置を周囲の景色を手掛かりにして記憶させる試験である。この試験においては、5 日間の訓練試行の翌日にプローブ試験を行った (Fig. 14A)。2 日目の訓練試行におけるプラットホームへの到達時間は、野生型マウスと比較して *Hybid* 欠損マウスで有意な延長が認められた (Fig. 14B)。また、プローブ試験においては、**target area** に滞在した時間の割合及びプラットホームの存在していた領域を横切った回数を測定したところ、いずれも *Hybid* 欠損マウスにおいて有意に減少していた (Fig. 14C, D)。一方、水泳能力を反映する総遊泳距離は、*Hybid* 欠損マウス及び野生型マウスに差は認められなかった (Fig. 14E)。これらの結果より、*Hybid* 欠損マウスは空間位置情報の学習及び記憶能力が低下していることが明らかとなった。

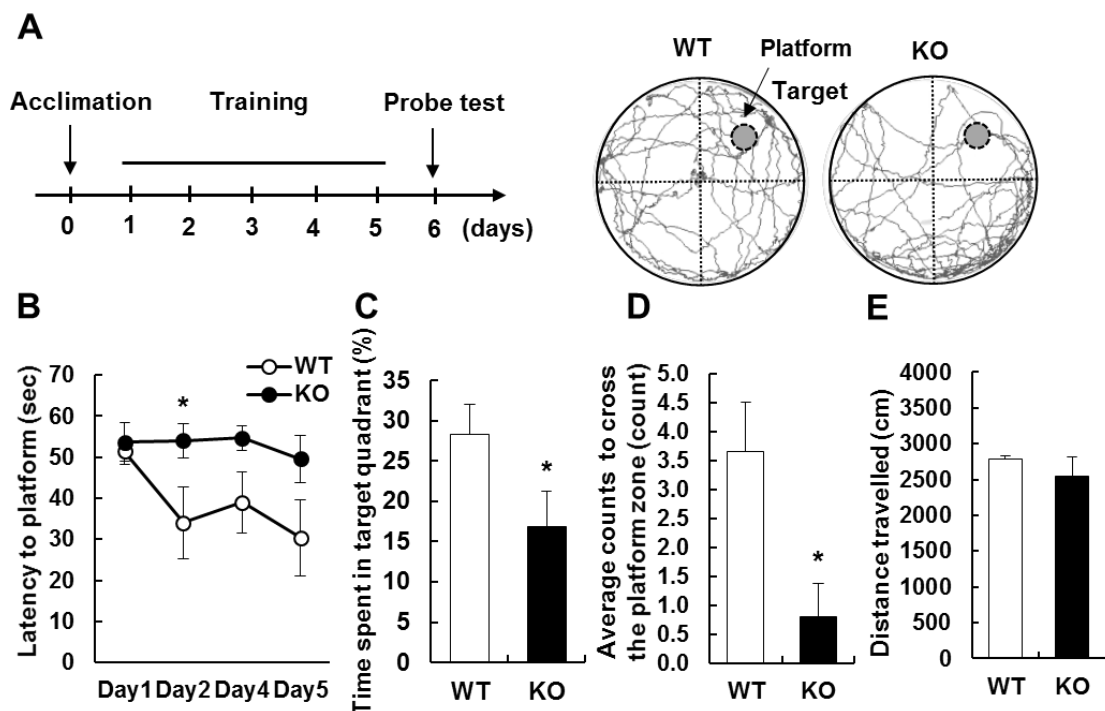


Fig. 14 *Hybrid* KO mice show memory impairment in Morris water maze test.

(A) A representative protocol of the Morris water maze test. (B) Average latency to reach the platform in the training trials. (C) Average percentage of time spent in target quadrant in the 120-s probe test. (D) Average number of crossings of the former location of the platform. (E) Distance travelled in the probe test. * $p < 0.05$ versus wild-type mice (one-tailed Student's *t*-test). Each column represents mean \pm S.E.M. $n = 6$.

3-3-3 オープンフィールド試験による自発運動量及び不安関連行動の評価

Hybrid 欠損マウスにおける自発運動量を評価するために、オープンフィールド試験を行った。この試験においては、装置内に入れられたマウスの移動距離や軌跡から自発運動量や不安関連行動を評価する。自発運動量の指標としては総移動距離を、不安関連行動の指標としては中央滞在時間及び中央への侵入回数²の2つの指標をそれぞれ用いた。*Hybrid* 欠損マウス及び野生型マウスにおいて、いずれの指標も差は認められなかった (Fig. 15)。これらの結果より、*Hybrid* は自発運動量及び不安関連行動に影響しないことが示唆された。

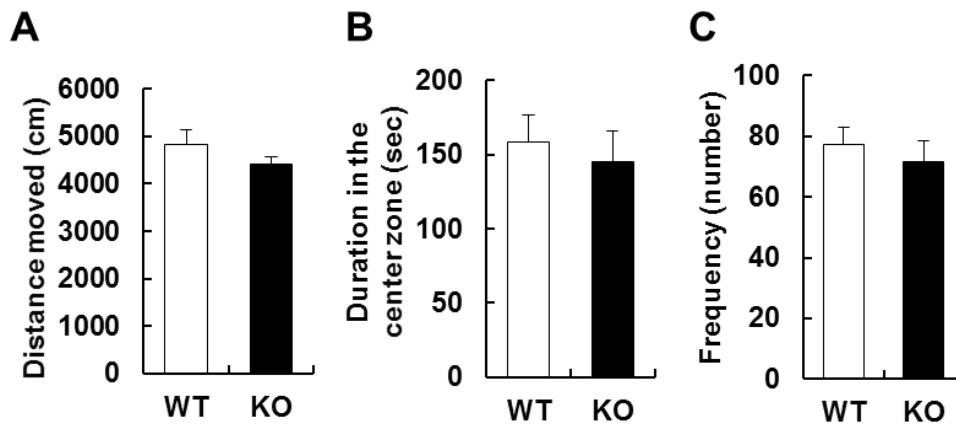


Fig. 15 *Hybrid* KO mice did not show any abnormal anxiety-like behavior.

(A–C) The results of the open field test. (A) Total distance moved for 15 min in the novel environment. (B) Duration in the center zone (15 × 15 cm). (C) Frequency of entering the center zone. Each column represents mean ± S.E.M. n = 10.

3-3-4 聴性驚愕反応の測定

HYBID 遺伝子は当初、家族性非症候性難聴の原因遺伝子として報告された (18)。家族性難聴と *Hybrid* 遺伝子欠損との関連を検討するために、聴性驚愕反応を利用して *Hybrid* 欠損マウスの聴覚機能評価を行った (Fig. 16A)。この試験においては、提示された刺激音に対するマウスの体動を驚愕反応の指標として測定した。*Hybrid* 欠損マウス及び野生型マウスにおいて、驚愕反応の平均値に明らかな差は認められなかった (Fig. 16B)。この結果より、*Hybrid* 欠損マウスの聴覚機能は正常であることが明らかとなった。

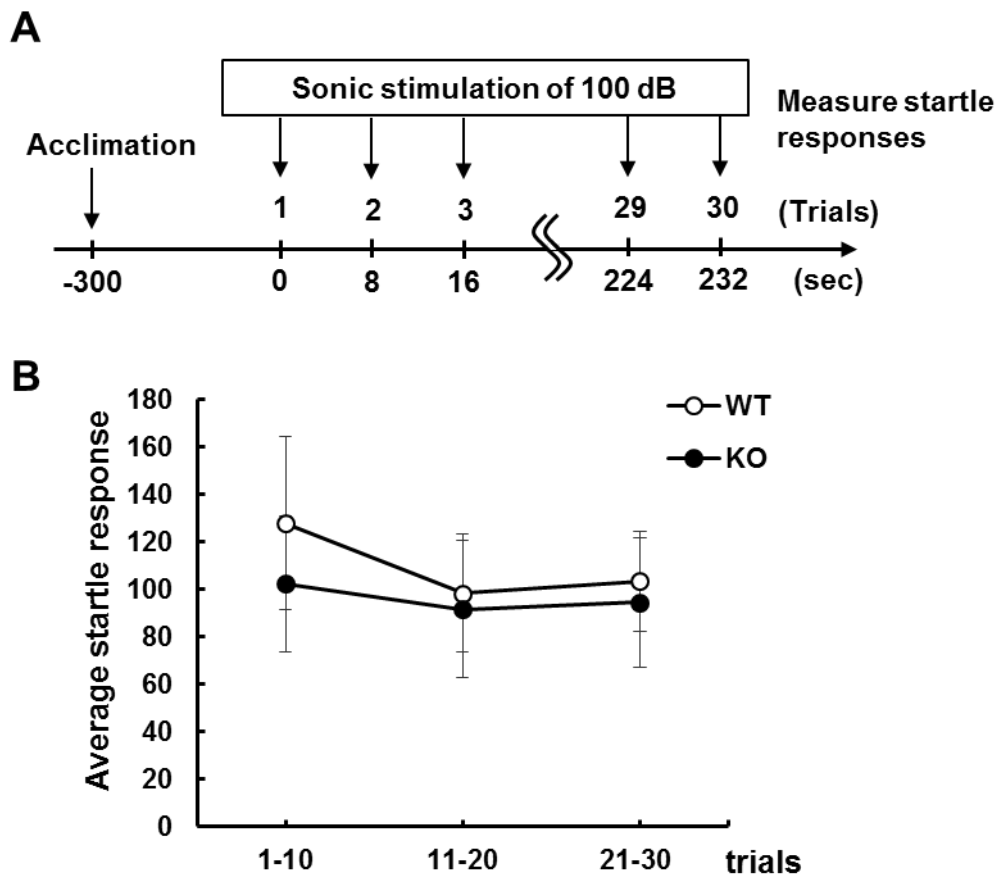


Fig. 16 *Hybrid* KO mice did not show impairment of acoustic startle responses.

(A) The protocol for the analysis of acoustic startle responses in WT and *Hybrid* KO mice. Five minutes after acclimation to the apparatus (background 60 dB), 30 sonic stimuli of 100 dB were given and startle responses were measured. (B) Average startle responses against every 10 sonic stimuli. Each column represents mean \pm S.E.M. n=6.

3-3-5 ペンチレンテトラゾール誘発痙攣の評価

つぎに、薬物誘発痙攣モデルにおいて、*Hybrid* 欠損マウスがどのような反応を示すかを検討するために、ペンチレンテトラゾールを用いて痙攣を誘発した。ペンチレンテトラゾールは神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid: GABA)_A 受容体のアンタゴニストであり、マウスにおいて強直性間代性痙攣を惹き起こす。ペンチレンテトラゾール 60 mg/kg 投与により、

全てのマウスにおいて間代性痙攣 (スコア 4) 以上の重篤な痙攣が認められた (Fig. 17)。また、痙攣のスコアにおいて、*Hybid* 欠損マウス及び野生型マウスの間に有意差は認められなかった。

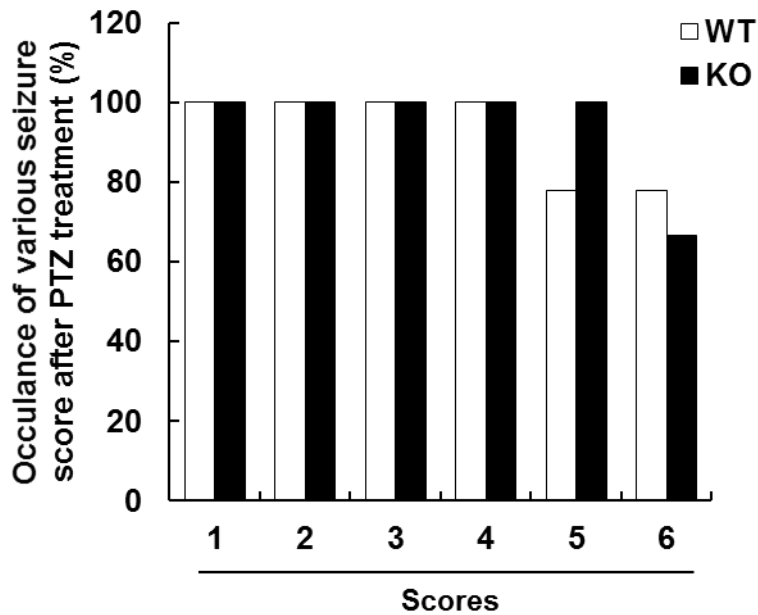


Fig. 17 *Hybid* KO mice did not show difference of sensibility against pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizure.

Occurrence of various seizure after PTZ treatment in WT and *Hybid* KO mice. Behaviors of the mice were recorded using a video camera and scored. n = 9.

3-3-6 中枢神経組織重量の評価

Hybid 欠損マウスの中中枢神経系組織の重量を検討した。*Hybid* 欠損マウス及び野生型マウスの間に、全脳及び脊髄の重量に関する有意差は認められなかった (Fig. 18)。

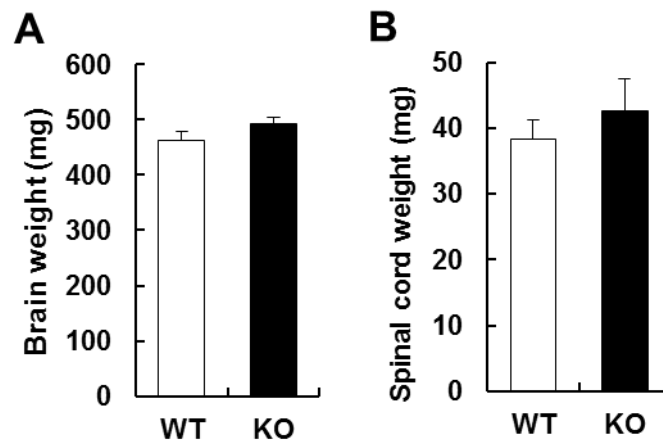


Fig. 18 Weight of the brain and spinal cord in *Hybid* KO mice.

(A, B) Weight of the brain and spinal cord of WT and *Hybid* KO mice. Each column represents mean \pm S.E.M. n = 10.

3-4 *Hybid* 欠損マウス海馬 HA の評価

3-4-1 *Hybid* 欠損マウス海馬 HA の発現量の評価

これまでの研究により、HYBID 欠損マウスの成長骨端関節組織に高分子量 HA が蓄積することが知られ (33)、脳においても同様に HA 脱重合が減弱する可能性が考えられる。そこで、HA 結合タンパク質を用いた HA 定量法により *Hybid* 欠損マウスの海馬に発現する HA の量を検討した。予想した通り、*Hybid* 欠損マウス海馬における HA 濃度は野生型マウスのものと比較して、2 倍以上に増加することが明らかとなった (WT; 23.3 ± 5.3 mg/mL, KO; 57.6 ± 4.2 mg/mL, Fig. 19)。

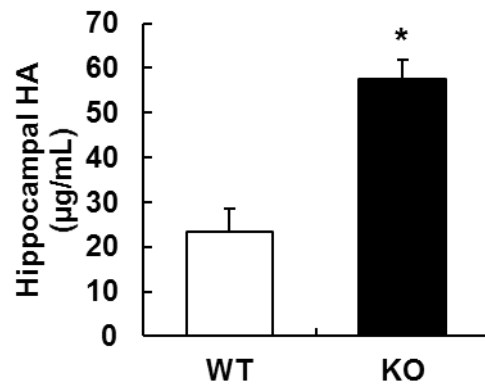


Fig. 19 Changes of the amount of HA in the hippocampus of *Hybid* KO mice.

HA concentrations in the hippocampus of WT and *Hybid* KO mice were measured by HA binding protein sandwich assay. * $p < 0.05$ versus wild-type mice (Student's *t*-test). Each column represents mean \pm S.E.M. $n = 3$

3-4-2 *Hybid* 欠損マウス海馬 HA の分子量分布の評価

つぎに、マウス海馬 HA をゲルろ過クロマトグラフィーにより分画し、HA 分子量分布を測定した。*Hybid* 欠損マウス海馬における HA 分子量のピークは Fraction 50 (約 2,000 kDa) であり、野生型マウスの Fraction 56 (約 500 kDa) と比較して、高分子量側にシフトしていることが明らかとなった (Fig. 20)。この結果より、*Hybid* 欠損マウスの海馬において、高分子量の HA が過剰に蓄積することが示唆された。

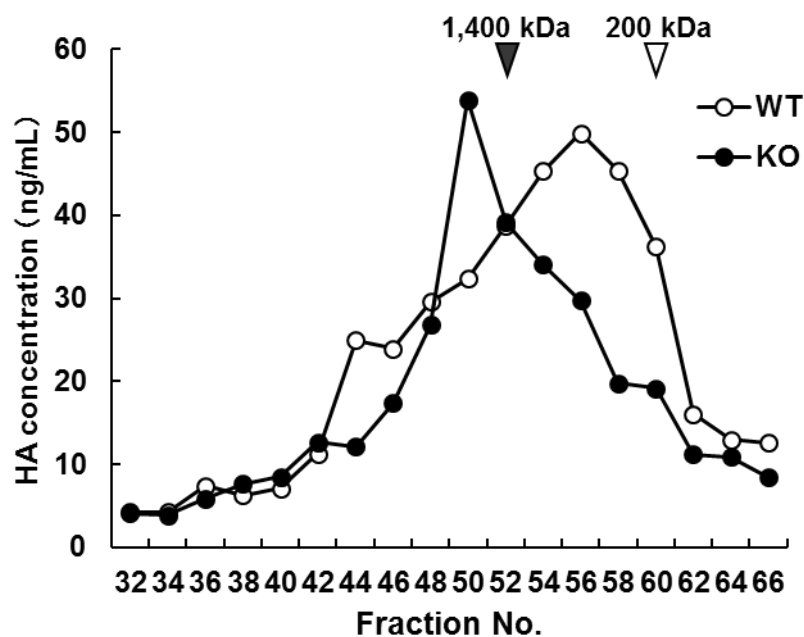


Fig. 20 Changes of the molecular mass of HA in the hippocampus of *Hybrid* KO mice.

Determination of HA size distributions in the hippocampus of WT (white circle) and *Hybrid* KO mice (black circle) by size exclusion chromatography. Total 2.7 mg HA (0.9 mg/mouse, n = 3) was applied to a Sephacryl S-1000 superfine column. A peak of HA molecular mass of the hippocampus in *Hybrid* KO mice was 2,000 kDa (Fraction 50), whereas it was 500 kDa (Fraction 56) in WT mice.

第4節 考察

本研究は、脳に多く発現するものの (28, 29)、脳における役割が一切不明であった *Hybid* 遺伝子に着目した。リアルタイム RT-PCR 解析により、*Hybid* は脳各部位及び中枢神経組織における広範な分布が認められ、その中でも特に海馬と小脳に強く発現することが明らかとなった。マウス *Hybid* 遺伝子と相補的配列を有する RNA プローブを用いた *In situ hybridization* 解析において、*Hybid* mRNA が海馬歯状回の顆粒細胞層に局在することが明らかとなった。海馬の歯状回領域は記憶能力と神経新生に関わる領域として知られている (36-39)。また、小脳は協調運動入力が集積と活動量と深い関連を持つ脳領域の一つである (40)。脳という HA が豊富な組織において、HYBID そのものが直接的に、もしくは、HYBID に代謝される HA によって間接的に高次脳機能に関与する可能性がある。また、*Hybid* mRNA の高発現部位が海馬歯状回であるため、*Hybid* の欠損が神経新生過程に影響を及ぼす可能性が考えられる。

今回の研究により、*Hybid* 欠損マウスは記憶障害を生じることが明らかとなった。また、予想通り、*Hybid* 欠損マウスの海馬 HA の平均分子量は野生型マウスと比較して増加しており、総 HA 発現量も有意に増加していた。これまでの研究で、*Hybid* 欠損マウスの成長骨端組織においても HA が高分子量化することから (33)、HA 脱重合が必要な組織において HYBID は特に多く発現する可能性がある。脳の中でも海馬が極めて HA に富む領域であることを鑑みても (22)、上記の研究結果は海馬 HYBID による HA 代謝を介した記憶機能への寄与を示唆している。*Hybid* 欠損マウスにおいて観察された記憶障害の分子機構には HA の代謝回転や脳の ECM の HA 分子量の調節が関与すると考えられる。

これまでの研究から、HA の濃度と分子量の制御は、理想的 Donnan 法則や Condensation 理論に従って水やイオン分子の移動に影響を及ぼすと考えられて

いる (41-43)。HA はアニオン性の超巨大分子であり、記憶学習機能に関わるイオン性神経伝達物質 (グルタミン酸、アセチルコリン、GABA 等) と相互作用すると予想される。それ故に、海馬における HA 分子量分布の適切な制御は記憶や学習能力に重要であることが示唆される。

HYBID は当初、非症候性家族性難聴の原因遺伝子の一つとして発見された (18)。今回の研究において、*Hybid* 欠損マウスは正常な聴性驚愕反応を示した。これまでの研究から、*HYBID* の部分変異は HA 脱重合能力を消失させることが知られている (17)。しかしながら、難聴患者で報告された *HYBID* 遺伝子の変異部位には、HA 脱重合活性と関連しないものも多かったことから、HA 脱重合活性と聴覚機能の関連は疑問視されている。*HYBID* と聴覚機能に関しては今後詳細な検討が必要である。

近年、海馬神経の周囲に存在する ECM がてんかんに関与することが報告された (22)。HA 合成酵素の一つである HAS3 の欠損マウスでは、海馬 ECM の体積減少とてんかん発作が認められる (22)。今回の研究で、*Hybid* 遺伝子の欠損が薬剤誘発痙攣への応答性に影響を及ぼすか否かについて検討した。*HYBID* は HA 脱重合関連因子であることから、*Hybid* 欠損マウスの海馬 ECM 体積が増加している可能性が考えられる。しかし、ペンチレンテトラゾール誘発痙攣モデルにおいては、*Hybid* 欠損マウスの応答性変化は認められなかった。一方、*Hybid* 欠損マウスは記憶障害を示したことから、*HYBID* は正常な記憶機能には重要な要素の一つと考えられる。本結果から、*Hybid* 欠損による高分子量 HA の蓄積は記憶障害を生じるが、海馬 ECM の体積の増加や神経細胞の応答性抑制には関与しないことが示唆された。

これまでの研究において、*HYBID* は既知の HA 分解酵素ファミリーである *HYLA1* 及び *HYAL2* とは無関係に HA 脱重合に関与することが明らかにされて

いる (17)。Hybrid 欠損マウスの脳において、Hyal1 及び Hyal2 mRNA 発現量は野生型マウスと比較して変化が認められなかった。このことから、HYBID が HYAL1 及び HYAL2 とは独立して作用することが示された。

脳は身体の中でも HA に富んだ組織の一つである。また、中枢神経系の ECM には HA、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、テネイシン、フィブロネクチンなどから構成される特徴的な複合体であるペリニューロナルネット (perineuronal nets: PNs) が存在する (44)。PNs は細胞体や軸索を取り囲む網目状の ECM 分子の集積物である (45, 46)。PNs は単なる緩衝材としてだけでなく、発生期と成体期の両方のステージにおいてシナプス機能とシナプス可塑性を調節する重要な因子として機能する (47-49)。また、PNs はアルツハイマー病態の特徴であるアミロイドプラークやタウタンパク質の過剰リン酸化に起因する神経細胞への障害に対して保護作用を持つことが知られている (50, 51)。酵素処理によって PNs を除去すると、記憶学習の分子メカニズムと考えられている長期増強 (long term potentiation: LTP) と興奮性シナプス後電流の paired-pulse 抑制が障害される (52-54)。後者は後シナプス神経における α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) 受容体の側方拡散の増加を介して生じる (53) (Fig. 21)。さら

に、統合失調症患者において PNs の形成異常が報告されている (55)。HA は PNs の主要な構成要素の一つではあるが、上述の報告より、海馬において HA が直接的にシナプス可塑性に影響を及ぼす可能性が示唆され

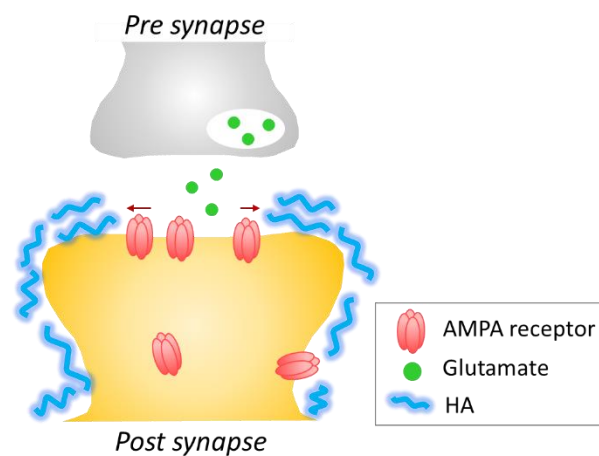


Fig. 21 HA regulates lateral distribution of AMPA receptors on postsynapses terminus.

る。海馬スライスを HA 分解酵素処理するとシナプス可塑性と LTP が障害され、外来的に HA を添加すると回復することが報告されている (54)。*Has3* 欠損マウスは海馬 ECM の体積減少、神経活動性異常、痙攣を示す (22)。興味深いことに、脱髄やアルツハイマー病などの記憶障害が見られる疾患モデル動物の脳において HA の蓄積が報告されている (56, 57)。これらの報告より、HYBID による HA 分子量制御は、PNs を含む神経細胞 ECM において、炎症誘発性低分子量 HA の産生調節など重要な生理機能を担う可能性が考えられる。

本章においては、*Hybid* 遺伝子が海馬と小脳に多く発現すること及び *Hybid* 欠損マウスは記憶障害及び海馬における高分子量 HA の蓄積を呈することを明らかにした。これらの結果は、マウス脳において HYBID は記憶機能に重要な役割を担う可能性を示唆するものである。本章の結果から、HYBID による HA 脱重合が記憶に重要な海馬神経機能への影響が考えられるため、第 2 章では *Hybid* 欠損マウスの海馬神経機能について検討を行った。

第2章 マウス海馬神経における *Hybid* の役割

第1節 緒言

HYBID は皮膚、関節軟骨及び脳において **HA** 脱重合に重要な働きを担う因子である (17, 33, 58)。 **HYBID** は非症候性家族性難聴の原因遺伝子の一つである **KIAA1199** として発見された他 (18)、がん細胞の増殖や浸潤を促進してがん病態の進行に関わる因子 **CEMIP** としても報告されている (59, 60)。病態条件下のみならず、**HYBID** はヒトの臓器としては脳、皮膚、肺、精巣、卵巣など幅広く発現しているため (28, 29)、その発現部位において様々な生理機能を担うと推測される。これまでの研究結果から、**HYBID** が **HA** 分解活性を有すること (33)、*Hybid* 欠損マウスにおける海馬に高分子量 **HA** の蓄積と空間認知記憶の障害を明らかにした。上記の研究では脳機能における **HYBID** の関与が示唆されたが、*Hybid* 欠損マウスに見られた認知機能障害のメカニズムは依然として不明である。

脳は **HA** が豊富に存在する臓器の一つである (3)。脳の神経細胞を取り囲んで存在する **HA** によって構成される **ECM** は細胞を支持する働きの他、神経機能を調節する役割も担っている。酵素処理によって **HA** を除去すると **L** 型電位依存性カルシウムチャンネルを介したカルシウム流入と長期増強が障害されることから (54)、**HA** の構成する **ECM** はシナプス可塑性に重要な役割を持つと考えられる。他にも、**HA** 合成酵素 *Has3* 欠損マウスが海馬体積の減少及びてんかん症状を示すことが知られている (22)。**HA** の受容体として知られる **CD44** は海馬の神経幹細胞の分化及び神経樹状突起形態変化を制御しており (23, 61, 62)、*CD44* 欠損マウスは空間記憶と感覚運動機能の障害を示す (63)。これらの報告から、脳機能には **HA** の正常な代謝回転が必要であると考えられる。し

かし、そういった脳機能に寄与する HA の分子量がどの程度であるかについては殆ど研究されていない。

海馬は記憶や学習といった認知機能を司る脳領域である。歯状回は海馬の一部の領域であり、類似の記憶を区別するパターン認識に重要である (64, 65)。歯状回に最も多く存在する神経細胞である顆粒細胞は、生涯に渡り産生され続け、場所細胞として空間記憶に寄与する (66, 67)。顆粒細胞は嗅内皮質からの興奮性入力を受け取り、シナプス結合を形成する役割を持つ (68)。歯状回で新しく産生された神経細胞は成熟神経細胞に分化し、既存の神経回路に組み込まれる (69)。このプロセスは神経新生として知られ、記憶及び学習に不可欠であると考えられている (70, 71)。また、正常な神経回路形成には、軸索と樹状突起の成熟及びシナプス可塑性の適切な制御が必要であり、そこではシナプス微小環境における細胞-細胞間接触、ECM、細胞接着分子などの相互作用が重要である (72)。すなわち、歯状回顆粒細胞における適切な神経新生及びシナプス形成による神経回路制御は認知機能に重要と考えられる。しかし、これらのプロセスに対する HYBID の関与を示した報告は未だない。

本研究では、HA 結合タンパク質 (Hyaluronan binding protein: HABP) の染色によって野生型マウス及び *Hybid* 欠損マウス海馬の HA 分布を比較検討した。また、野生型マウス及び *Hybid* 欠損マウスにおいて、免疫染色法により新生神経細胞のマーカである Doublecortin (DCX) の陽性細胞数を、Golgi-Cox 染色法により歯状回顆粒細胞の樹状突起スパイン密度をそれぞれ検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。エタノール、PFA、sucrose、は Wako Pure Chemical Industries、sodium citrate は Takara、O.C.T. compound、パラフィン は Sakura Finetechnical、TritonX-100 は Bio Rad Laboratories、生理食塩水は Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.、1 mM Tris-HCl (pH 8.0)、ペントバルビタール (pentobarbital) は Nacalai Tesque、FITC-conjugated Avidin D、bovine serum albumin、normal horse serum は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)、マウントクイック (Mount-Quick) は Daido Sangyo (Tokyo, Japan)、フルオロマウント (fluoromount) は Diagnostic Bio System (Pleasanton, CA, USA)、Hoechst 33342 は株式会社同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan)、Biotinylated Hyaluronan Binding Protein は Hokudo (Sapporo, Japan)、塩化カリウム (potassium chloride: KCl)、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO_3)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl)、キシレンは Kishida Chemical よりそれぞれ購入した。

Phosphate buffered saline (PBS) は、KCl、 KH_2PO_4 、NaCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を MilliQ に溶解し、調製した。Phosphate buffer (PB) は、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を超純水 (MilliQ) に溶解し、調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

Hybrid 欠損マウス及びその同腹仔である野生型マウスは、第 1 章で示した動物を使用した。動物は自由給水下にて固形飼料 (CE-2) により飼育した。すべての実験は岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けたうえで実施した。また、遺伝子組換え動物は、岐阜薬科大学バイオセーフティー委員会に遺伝子組換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

2-2-2 組織染色

2-2-2-1 凍結組織切片作製

マウスはペントバルビタール麻酔下で開胸し、ペリスタポンプ (Atto) を用いて生理食塩水を左心室内から灌流し、ついで 4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を 7 分間灌流した。その後、脳を取り出し、同固定液中に一晩放置した。固定した脳は 25% sucrose 含有 0.1 M PB (pH 7.4) に 24 時間浸漬した後、液体窒素を用いて O.C.T. compound 中に凍結包埋し、クライオスタット (Leica) を用いて、 -20°C で厚さ 10 μm の切片を作製し、MAS コーティングされたスライドグラス (S-9441, Matsunami) に貼付して、 -80°C で保存した。

2-2-2-2 HA 結合タンパク質を用いた HA 染色

切片は、染色時 -80°C に保存された凍結切片を取り出し、 -20°C で 1 時間放置、 4°C で 1 時間放置した後、室温で 30 分間乾燥させ、0.01 M PBS に浸して O.C.T. compound を洗浄した。その後、Super PAP pen (Daido sangyo) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。1% bovine serum albumin 及び 1.5% normal horse serum 含有 PBS で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、5 ng/mL のビオチン標識 HA 結合タンパク質 (biotinated-HABP; Hokudo, Japan) で

4°Cで一晩反応させた。その後、FITC-conjugated Avidin D (Vector laboratories, Tokyo, Japan) を反応させ、Hoechst 33342 (1:1,000 dilution: Invitrogen, Carlsbed, CA, USA) を用いて核染色を行った。フルオロマウント及びカバーガラスを用いて封入した後、蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence, Osaka, Japan) にて撮影を行った。切片の撮影画像から、海馬の CA1 領域放射状層下及び歯状回門における蛍光輝度を定量した。

2-2-3 組織免疫染色

2-2-3-1 パラフィン組織切片作製

マウスはペントバルビタール麻酔下 (80 mg/kg, i.p.) で開胸し、ペリスタポンプを用いて生理食塩水を左心室内に注入して灌流し、ついで 4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を 7 分間注入し固定した。その後、脳を取り出し、同固定液中に一晩放置し固定した。その後、70% エタノール 2 時間、90% エタノール 1 時間、無水エタノール 1 時間 × 5 回、キシレン 1 時間 × 3 回、融解パラフィン 4.5 時間の順に浸透させた。その後、パラフィンにて脳を包埋し、ミクロトーム (Leica) を用いて、厚さ 5 μm の切片を作製した。切片はスライドガラス (Matsunami) にのせ、37 °C にて一晩乾燥させ、室温にて保存した。

2-2-3-2 免疫染色

パラフィン切片は、キシレン 20 分間 × 3 回に浸透しパラフィンを洗浄した後、段階的にアルコール濃度を下げた溶液に浸し、蒸留水に浸透し水和させた。その後、95°C に加熱したクエン酸バッファ (pH 6.0) 中にて一時間抗原賦活化処理を行った。その後、Super PAP pen にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。1% bovine serum albumin 及び 1.5% normal horse serum 含有

PBS で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体にて一時間反応させ、Hoechst 33342 (1:1,000 dilution; Invitrogen) を用いて核染色を行った。フルオロマウント及びカバーガラスを用いて封入した後、レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡 (Fluoview; Olympus, Tokyo, Japan) にて撮影を行った。撮影画像から、海馬歯状回における DCX 陽性細胞数を算出し、成体期神経新生の程度として評価した。一次抗体には、抗 DCX 抗体 (1:50 dilution; Cell Signaling Technology) 及び抗 NeuN 抗体 (1:50 dilution; Millipore) を用いた。二次抗体には Alexa Fluor 546 F(ab')₂ fragment of anti-mouse IgG (H+L) (1:1,000 dilution; Molecular Probes, OR, USA) 及び Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of anti-donkey IgG (H+L) (1:1,000 dilution; Molecular Probes) を用いた。

2-2-4 Golgi-Cox 染色

Golgi-Cox 染色は SuperGolgi kit (Bioenno Tech., CA, USA) を用いて行った。マウスはペントバルビタール麻酔下で開胸し、ペリスタポンプ (Atto) を用いて生理食塩水を左心室内に注入して灌流した後、脳を取り出し、Impregnation solution (二クロム酸カリウム) に浸漬し、室温にて 10 日間遮光して反応させた。その後、Pre-impregnation solution に浸漬し、室温にて 2 日間遮光して反応させた。固定した脳組織は、液体窒素を用いて急速凍結し、クライオスタット (Leica) を用いて、-20°C で厚さ 150 µm の切片を作製し、Collection & Mounting buffer 中に回収した。作製した切片は MAS コーティングされたスライドガラス (S-9441, Matsunami) に押し付けて接着させ、室温にて一晩遮光し風乾した。スライドを 0.3% Triton X-100 含有 PBS (PBS-T) で 20 分間洗浄した後、Staining solution (アンモニア溶液) 中にて 20 分間遮光して反応させた。その後、Post-

staining buffer 中にて 20 分間遮光して反応させた。スライドを PBS-T で 5 分間 × 3 回洗浄した。露光を避けてスライドを風乾した後、無水エタノール 10 分間 × 4 回、キシレン 10 分間 × 3 回の順に浸透させ、マウントクイックで封入した。染色後の切片は、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence) を用いて撮影した。歯状回の神経細胞における樹状突起スパインの形態は、以下に従い分類した (73)。

(a) thin: 細長いスパイン、長い首と小さな頭部を持つ

(b) mushroom: マッシュルーム様スパイン、明瞭な首と巨大な頭部を持つ

(c) stubby: 切り株様スパイン、明瞭な首がなく非常に短い

撮影画像から、単位長さあたりの各分類のスパイン数を定量した。

2-2-5 統計学的解析

実験成績は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な解析は JSTAT (Vector) を用いて行った。Student's *t* 検定により統計解析を行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 *Hybid* 欠損マウス海馬における HA の局在の検討

第1章の研究より、*Hybid* 欠損マウスの海馬において高分子量化した HA が蓄積することを明らかにした (58)。海馬はその各領域により異なる機能を担うため、*Hybid* 欠損マウスにおいて HA が蓄積する海馬の領域を調査することは、HYBID と HA の機能を調べる上で重要である。そこで、HA 結合タンパク質を用いた HA 染色法によって、野生型マウス及び *Hybid* 欠損マウスの海馬における HA の発現様式を比較した。興味深いことに、*Hybid* 欠損マウスの海馬の中でも、CA1 領域放射状層下及び歯状回門という限られた部位において特異的に HA が蓄積していた (Fig. 22A)。また、これらの部位における染色強度を定量したところ、*Hybid* 欠損マウスで顕著な染色が認められた (Fig. 22B, C)。

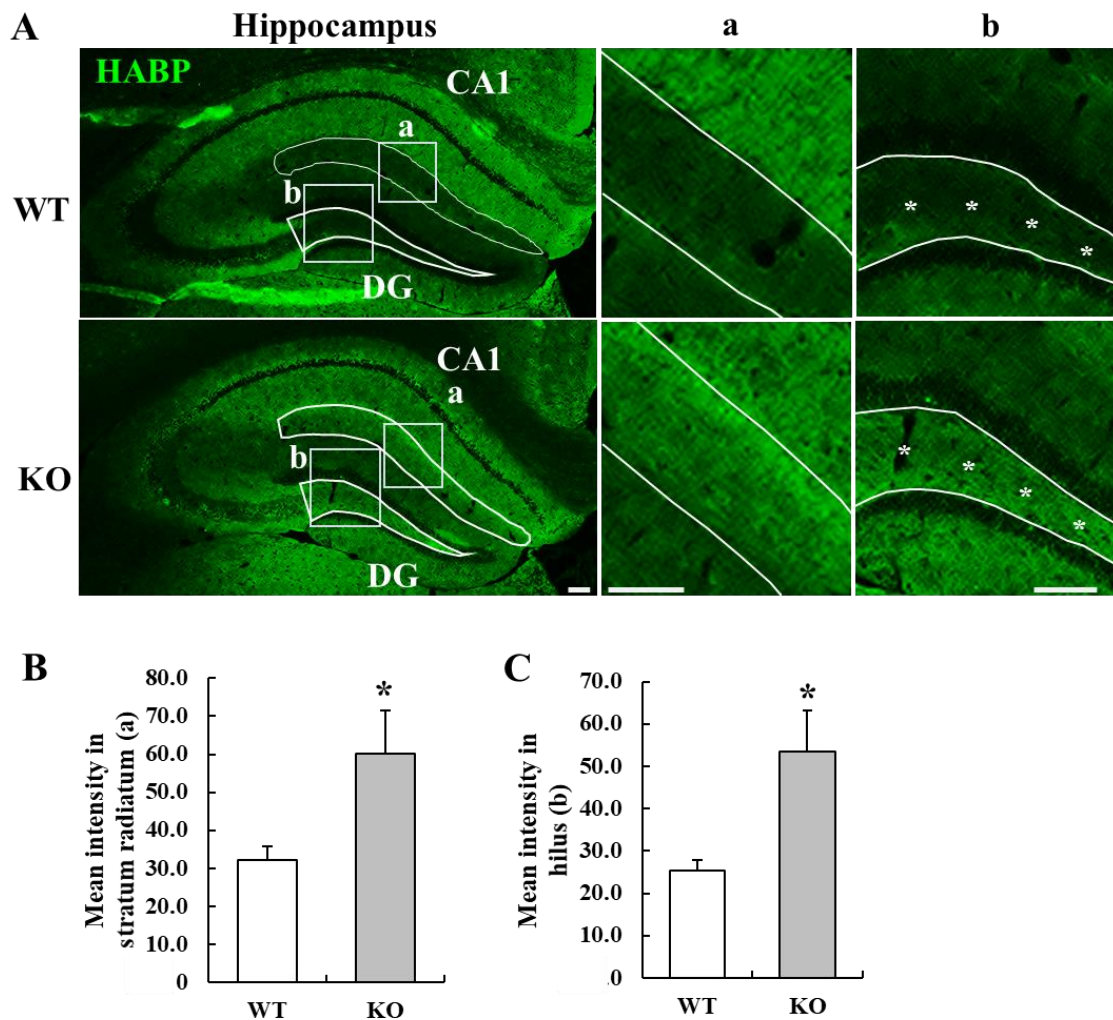


Fig. 22 HA accumulated in the hippocampus of *Hybrid* KO mice.

(A) Representative images of staining with hyaluronan binding protein (HABP) in coronal hippocampus sections of WT and *Hybrid* KO mice. Boxed areas of WT and KO mice (a and b) are magnified to the right. Scale bar represents 100 μ m. (B, C) Semi-quantification of fluorescence intensities in the aimed regions, a space under the stratum radiatum in CA1 (B) and a hilus in DG (C). * $p < 0.05$ versus wild-type mice (one-tailed Student's *t*-test). Each column represents mean \pm S.E.M. $n = 3$.

3-2 *Hybrid* 欠損マウス海馬以外の領域における HA の局在の検討

一方、海馬以外の脳領域として、大脳皮質 (Cortex)、視床後核 (Post thalamus nuclei)、嗅周皮質 (Perirhinal cortex)、扁桃体基底外側核 (Basolateral

amygdaloid nuclei) の HA 染色様式を比較したところ、*Hybid* 欠損マウスと野生型マウス間で明らかな差は認められなかった (Fig. 23)。

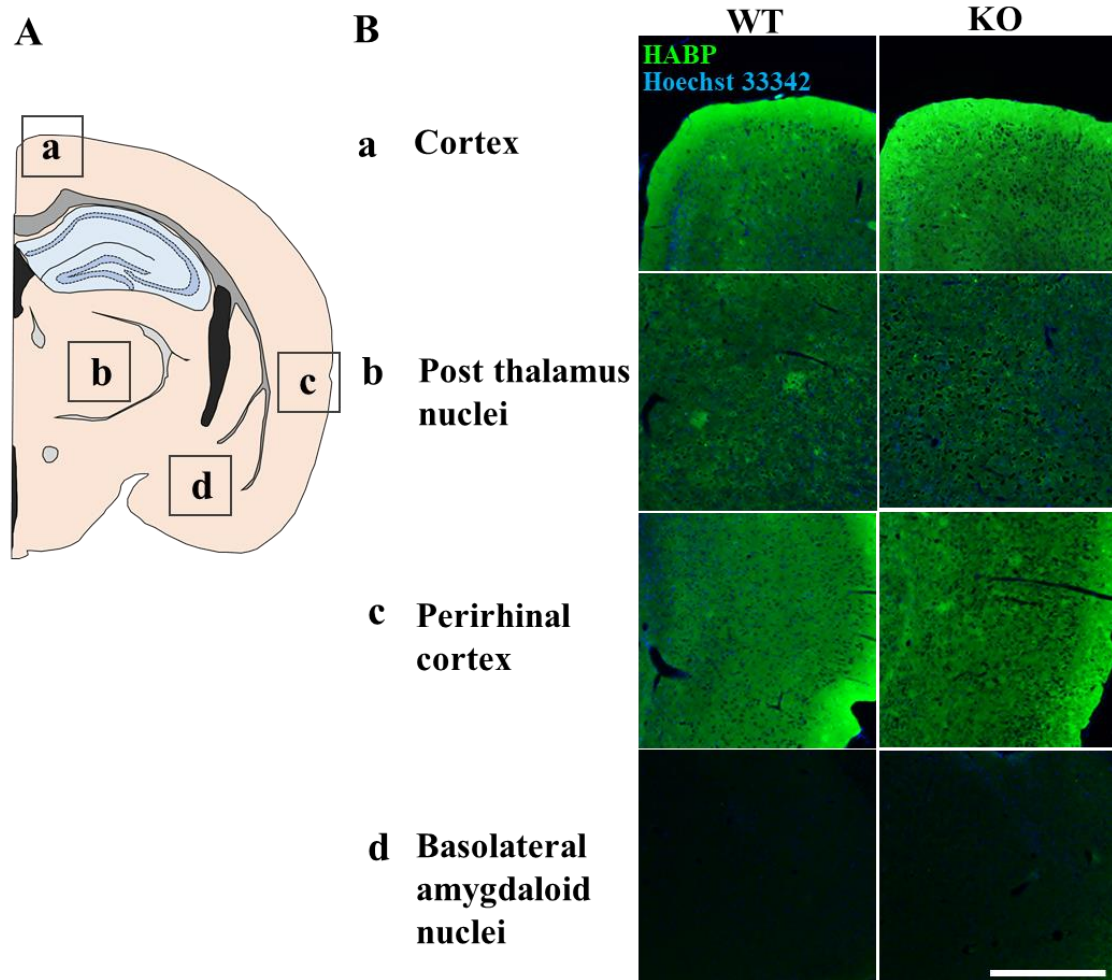


Fig. 23 Different localization of HA was not observed in other brain regions in *Hybid* KO mice.

(A) A picture of the mouse brain region at bregma -2.06 mm. Boxed areas indicated by a, b, c and d are cortex, post thalamus nuclei, perirhinal cortex and basolateral amygdaloid nuclei, respectively.

(B) Representative images of staining with HABP (Green, HA) and Hoechst 33342 (Blue, nuclei) in brain sections of WT and *Hybid* KO mice. Scale bar represents 100 μ m.

3-3 *Hybid* 欠損マウス歯状回における成体期神経新生の評価

第1章 3-4 及び本章 3-1 の結果より、*Hybid* 欠損マウスの海馬歯状回には高分子量 HA が蓄積することを明らかにした。海馬歯状回は生涯にわたり神経幹細胞が産生され続ける特殊な脳部位であるため (66)、*Hybid* 欠損マウス及び野生型マウスの海馬歯状回の神経新生の程度を比較した。抗 DCX 抗体を用いた免疫染色の結果、*Hybid* 欠損マウス海馬歯状回において、DCX 陽性の未成熟神経細胞数が有意に減少していた (Fig. 24)。一方、NeuN 陽性の成熟神経細胞数に変化は認められなかった。これらの結果から、HYBID は海馬歯状回における成体期神経新生過程に関与することが明らかとなった。

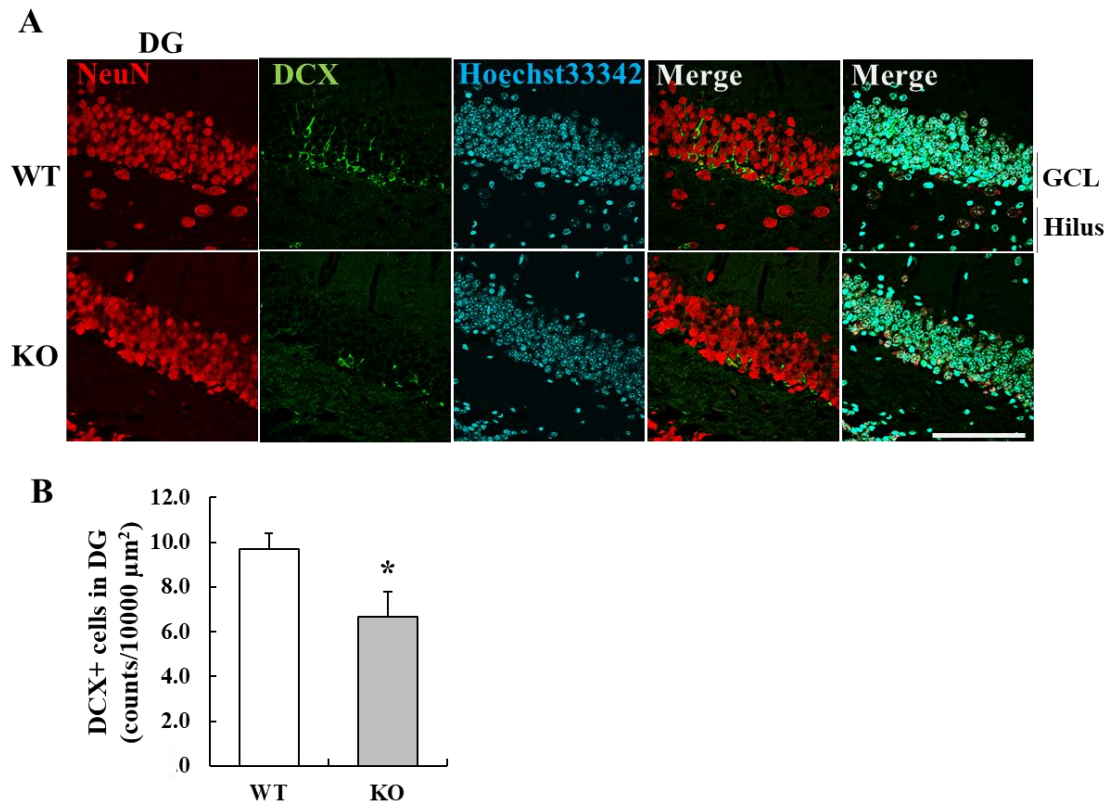


Fig. 24 Adult neurogenesis in *Hybid* KO mice.

(A) Representative images of staining with anti-DCX antibody (Green, immature neuron), anti-NeuN antibody (Red, mature neuron), and Hoechst 33342 (Blue, nuclei). GCL; granular cellular layer. Scale bar represents 100 μm . (B) Quantification of DCX-positive immature neurons in DG of WT and *Hybid* KO mice. * $p < 0.05$ versus wild-type mice (Student's *t*-test). Each column represents

mean \pm S.E.M. n = 9.

3-3 *Hybid* 欠損マウス歯状回における樹状突起スパインの評価

第1章の結果から、*Hybid* 欠損マウスが記憶障害を示すことが明らかになっており、HYBID を介した HA 代謝過程がシナプス形成過程に関与している可能性が考えられる。そこで、*Hybid* 欠損マウス及び野生型マウスの海馬歯状回の神経細胞樹状突起スパインを Golgi-Cox 染色により可視化し、比較検証した (Fig. 25A)。その結果、*Hybid* 欠損マウスにおいて総樹状突起スパイン密度が有意に減少していた (Fig. 25B)。また、樹状突起スパインをそれらの形態から、Thin、Mushroom、Stubby の3つのタイプに分類して定量したところ、*Hybid* 欠損マウスにおいて Stubby タイプの樹状突起スパイン密度が有意に減少していた (Fig. 25B)。これらの結果から、HYBID は海馬歯状回神経細胞のシナプス形成能において重要な役割を担うことが示唆された。

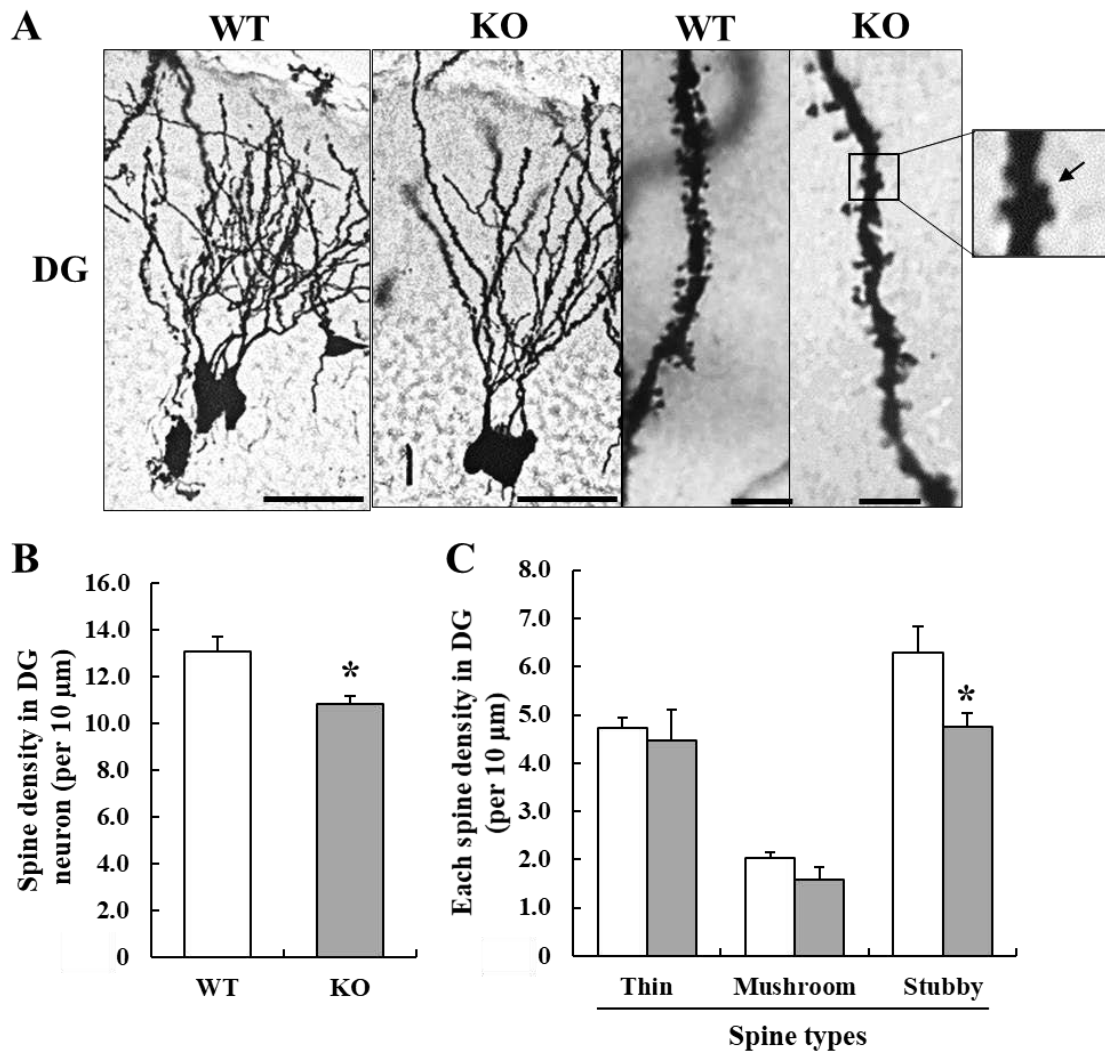


Fig. 25 Dendritic spine densities decreased in the hippocampus of *Hybrid* KO mice.

(A) Representative images of Golgi-Cox staining in DG neurons of WT and *Hybrid* KO mice. The left images show lower magnification and the right images show higher magnification of Golgi-Cox-stained neuronal dendrites. Arrow shows stubby spine. Scale bars represent 20 and 5 μm . (B, C) Quantification of dendritic spines in DG granular cells of WT and *Hybrid* KO mice. The total spine densities (B) and each type (C) were measured as the mean of ten neurons per mouse. * $p < 0.05$ versus wild-type mice (Student's *t*-test). Each column represents mean \pm S.E.M. $n = 4$.

第4節 考察

本研究において、*Hybid* 欠損マウスの海馬の中でも、CA1 領域放射状層並びに歯状回門領域に特異的に HA が蓄積することが明らかとなった。また、第1章 3-2-3 の結果から、海馬歯状回は野生型マウスの *Hybid* mRNA が多く発現する領域である。HA は加齢とともに分子量変化を伴わずに発現増加し、分解された HA は神経細胞の周囲に蓄積し、脳機能障害や神経炎症に寄与すると考えられている (24, 25)。また、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) 患者において脳脊髄液中の HA 量が増加し (74, 75)、AD モデルマウスの海馬神経軸索の HAS3 が増加する (76)。さらに、脱髄や AD など記憶障害を示す疾患モデル動物において脳に HA が蓄積する (56, 57)。これらの報告は、老化や神経変性疾患における記憶障害に HA 代謝回転の障害が関与する可能性を示している。したがって、本研究で明らかとなった *Hybid* 欠損マウス海馬の HA 蓄積はマウスの空間記憶障害と関連すると考えられる。

HA は歯状回神経の成体期神経新生の制御因子の一つと考えられている (62)。高分子量 HA は海馬歯状回神経の顆粒細胞層下において HA-CD44 シグナルを介して神経幹細胞の増殖及び分化を抑制する (62)。したがって、*Hybid* 欠損マウスの歯状回に見られた DCX 陽性未成熟神経細胞数の減少と HA 蓄積は HA-CD44 シグナルを介した神経新生の抑制で説明が可能と考える。

過去の報告から、HA の濃度と分子量分布が理想的 Donnan 法則及び Condensation 理論に従って水やイオンの移動能に影響を及ぼすことが知られている (41-43)。ECM 内に存在する高分子量 HA はアニオン性の巨大分子であり、グルタミン酸、アセチルコリン、GABA などのシナプス結合に必要なイオン性神経伝達物質の拡散を抑制する (Fig. 26)。高分子量 HA は物理的なイオン

障壁として作用し、シナプス形成過程を阻害する。それゆえに、海馬 HA の分子量制御は記憶学習において必須の機構と考えられる。HA が構成する脳の ECM は神経細胞と相互作用し、シナプス可塑性の制御において

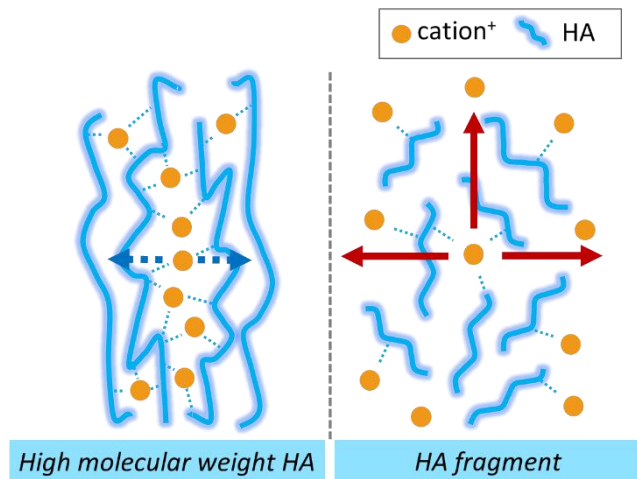


Fig. 26 HA regulates mobilities of cationic neurotransmitters.

も重要な役割を担う (77)。ECM 構成物質の変化はシナプスに存

在する受容体の発現と樹状突起スパインの構造に影響を及ぼす (53, 78)。HA 受容体である CD44 の欠損は活性依存的な樹状突起スパイン可塑性の障害を引き起こすことから、CD44 が接着分子として適切なシナプス機能の維持に寄与する可能性が示されている (23)。これらの報告より、歯状回神経細胞のシナプス形成は CD44 と高分子量 HA との相互作用によって影響を受ける可能性が高い。

興味深いことに、HYBID が直接的にシナプス形成のシグナルと相互作用する可能性も考えられる。過去の報告では、HYBID は PlexinA2 と結合することで、semaphorin (Sema) 3A-PlexinA2 シグナルによるアポトーシスを抑制する (79)。さらに、Sema5A はその受容体でありシナプス密度を調節する機能が知られる PlexinA2 と結合することで、歯状回神経細胞において過剰な興奮性シナプスの形成を抑制することが知られている (80)。上記の報告から、HYBID が PlexinA2 と結合すること、そして、Sema5A-PlexinA2 シグナルを介した歯状回神経細胞のシナプス形成を抑制し得ることが示唆される。Hybid 欠損マウスの歯状回神経細胞の樹状突起スパイン密度減少は Hybid 欠損による HA 蓄積と関

連していると仮定すると、*Hybid* 欠損マウスの示す記憶障害の機構として説明できるかもしれない。

本研究は、*Hybid* 欠損マウス脳の前頭前皮質に HA が蓄積し、未成熟神経細胞数と樹状突起スパイン密度が減少することを示した最初の報告である。本研究結果から、マウス脳において HYBID を介した HA 分解がシナプス形成に重要であり、HYBID が記憶や学習などの認知機能に寄与することが示された (Fig. 27)。第 1 章及び本章では、マウス脳における HYBID の機能を明らかにした。次章では、新規 HA 分解酵素として近年報告された膜タンパク質 2 (transmembrane protein 2: TMEM2) が HYBID を介した HA 脱重合機能にどのように関わるかを明らかにするため、HYBID の生理機能について最も研究されているヒト皮膚線維芽細胞を用いた検討を行った。

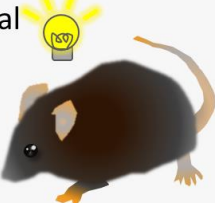


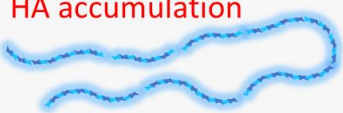
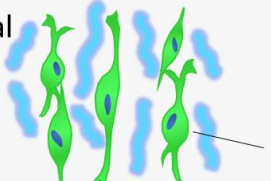
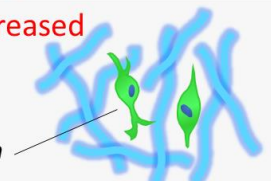
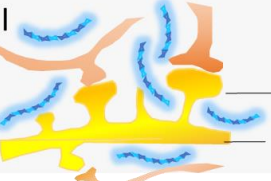
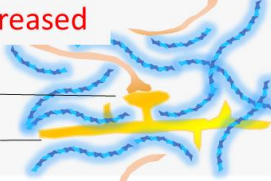
	WT	Hybrid KO
Cognitive function	Normal 	Impaired 
Hippocampal HA	Normal 	High molecular weight HA accumulation 
Hippocampal neurogenesis	Normal 	Decreased 
Dendritic spine in DG neuron	Normal 	Decreased 

Fig. 27 The phenotypes of *Hybrid KO* mice.

第3章 ヒト皮膚線維芽細胞の HA 脱重合における HYBID 及び TMEM2 の役割の検討

第1節 緒言

第1章では、マウス脳における HYBID の役割を検討し、皮膚や関節軟骨と同様に脳でも HA 脱重合に必要であることを明らかにした。しかし、序論でも述べた通り、HYBID を介した HA 脱重合の過程で HA 分解を担う因子は未だ不明であり、HYBID の分子機構の理解は不十分である。本章では、HYBID の HA 脱重合過程が最も研究されているヒト皮膚線維芽細胞を用いて、新規 HA 分解酵素である TMEM2 が HYBID システムに及ぼす影響について検討した。

身体に存在する HA の 50%以上は皮膚に存在し、そこで HA は2日以内という高速の代謝回転で合成・分解される (1, 11)。HA は ECM の主要な構成要素であり、湿潤や潤滑といった生理的機能を担う。興味深いことに、HA はその分子量に応じて様々な生理機能を持つ。高分子量 HA は抗炎症作用 (5)、血管新生抑制作用 (6) を持つのに対して、低分子 HA は炎症促進作用 (7)、血管新生促進作用 (8)、抗アポトーシス作用 (9) などが報告されている。それゆえに、HA 代謝の詳細なメカニズムを理解することは重要である。HA 分解の最初の過程において、末梢の組織に存在している高分子量 HA ($> 10^3$ kDa) は中間サイズの HA 断片 ($\sim 10^2$ kDa) に脱重合を受ける。続いて、HA 断片はリンパ管を介して体循環に取り込まれ、肝臓、脾臓、腎臓で単糖レベルまで分解を受ける (12-14)。HA 分解に関わる因子として、HA 分解酵素 HYAL ファミリーに属する酵素や細胞膜表面の HA 受容体 CD44 などが知られている (15, 16)。ところが、HA 脱重合の最初期過程において働く因子は長らく不明であった。そのような状況下において、HYBID が HA 特異的に脱重合に関わる HA 結合タンパク質であることが報告された (17)。実際に、HYBID のノックダウンは HA 分解活

性を完全に消失させたことから、HYBID がヒト皮膚及び関節軟骨の線維芽細胞の HA 脱重合に必須の因子の一つと考えられる。また、HYBID システムは Clathrin 被覆小胞を利用し、早期エンドソーム内に取り込んだ HA を分解し、中間サイズ HA 断片を細胞外の空間に排出することが明らかになっている。しかしながら、皮膚線維芽細胞の HA 脱重合には HYAL1 及び HYAL2 のどちらも関与しないこと、加えて HYBID 自体の HA 分解酵素活性が不明であることから、HYBID システム内で何が HA を分解しているかは不明である。

近年、TMEM2 が新規の細胞膜表面に存在する HA 分解酵素として報告された (81)。Yamamoto らの報告 (81)では、TMEM2 を過剰発現させた HEK293 細胞及びリコンビナント TMEM2 タンパク質を用いた *in vitro* 試験系において TMEM2 の HA 分解酵素としての機能が証明された。TMEM ファミリーは一つ以上の膜貫通ドメインを持つオープンリーディングフレームの総称である (82)。TMEM2 タンパク質は N 末端側の細胞内ドメイン、細胞膜貫通ドメイン、C 末端側の細胞外ドメインからなる (81)。TMEM2 の細胞外ドメインには、細胞外リガンドとの結合が予測される G8 ドメインと GG ドメインが一つずつ (83) (20)、多糖の加水分解に関わるとされる PbH1 repeat が 3 つ含まれる (21)。対照的に、HYBID には一つの G8 ドメイン、2 つの GG ドメイン、4 つの PbH1 repeat、N 末端側に一つのシグナル配列が含まれる (84)。また、HYBID と TMEM2 細胞外ドメインには 48% のアミノ酸配列の相同性がある (81) (Fig. 28)。ゼブラフィッシュ TMEM2 ホモログの遺伝子

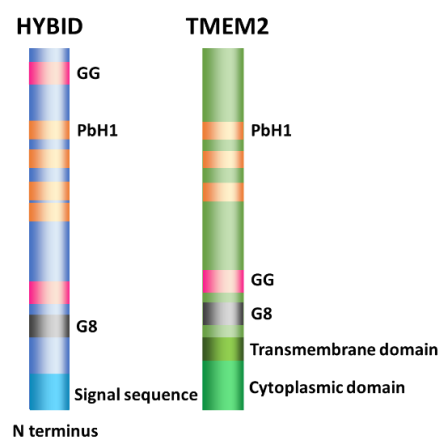


Fig. 28 The structures of HYBID and TMEM2 protein.

変異は心臓発達の障害を引き起こす (85, 86)。TMEM2 は HA 代謝回転を制御してゼブラフィッシュ発達期の血管新生を促進する (87)。これらの報告に端を発し、HYBID システムの HA 脱重合において直接 HA 分解を担う酵素が TMEM2 である可能性を検証することにした (Fig. 29)。

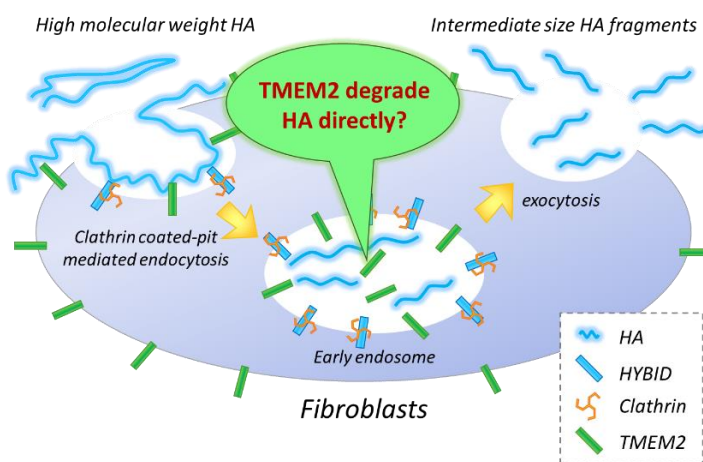


Fig. 29 A hypothesis of “hyaluronidase TMEM2 in HYBID system”

過去に TMEM2 を報告した Yamamoto らはリコンビナントタンパク質と遺伝子過剰発現した細胞を用いて HA 分解活性を評価した (81)。しかしながら、TMEM2 の機能と制御に関しては生理的に HA を分解する生体細胞を用いて検討されていない。本研究では、HYBID による HA 脱重合が確認されているヒト皮膚線維芽細胞を用いて、TMEM2 の皮膚における生理機能と制御を検討した。

第 2 節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。Eagle’s minimum essential medium (EMEM)、Sodium Pyruvate Solution、Non-essential Amino Acids Solution、Trypsin-1mmol/l EDTA・4Na Solution、Human recombinant Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1)、Human recombinant Epidermal Growth Factor (EGF)、Human recombinant basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)、Human recombinant Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) は Wako Pure Chemical Industries、protease

inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor II、phosphatase inhibitor III、Immuno Star LD、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、SDS、Igepal CA-630、6-aminohexanoic acid、histamine dihydrochloride は Sigma Aldrich、トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline: TBS) は Takara、TritonX-100 は Bio Rad Laboratories、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、Block OneP、1 mM Tris-HCl (pH 8.0) は Nacalai Tesque、Can Get Signal Solution 1、Can Get Signal Solution 2 は Toyobo (Osaka, Japan)、fluoresceinamine (FA) 標識高分子量 HA (FA-HA H2)、FA 標識低分子量 HA (FA-HA L2) は PG Research、Sephacryl CL-2B は GE Healthcare Bio-Sciences AB より、Tween 20、Triton X-100、Tris は Bio-Rad Laboratories、塩化カリウム (potassium chloride: KCl)、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate: KH_2PO_3) リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl)、は Kishida Chemical よりそれぞれ購入した。

Phosphate buffered saline (PBS) は、KCl、 KH_2PO_4 、NaCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を MilliQ に溶解し、調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

初代培養ヒト皮膚線維芽細胞 Detroit 551 細胞及びケロイド患者由来線維芽細胞 KEL FIB 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入して用いた。HT1080 ヒト線維肉腫細胞は愛媛大学プロテオサイエンスセンター 細胞増殖・腫瘍制御部門/大学院医学系研究科 生化学・分子遺伝学分野 東山繁樹先生より恵与されたものを用いた。Detroit 551 細胞は、1 mM sodium

pyruvate、nonessential amino acids、10% fetal bovine serum (FBS) を添加した EMEM (Wako, Osaka, Japan) を用いて培養した。KEL FIB 細胞及び HT1080 細胞は、10%の FBS を添加した DMEM (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて培養した。すべての細胞は 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。また、2 日おきにトリプシン処理により継代培養を行った。

2-2-2 HA 脱重合活性の評価

2-2-2-1 試料採取

Detroit 551 細胞をプレートに播種し、2 日間培養した後、1% FBS、10 µg/mL FA-HA H2 (PG Research) を含む EMEM に培地交換し、遮光条件で 37°C、5% CO₂ 条件下で 48 時間培養した。その後、培養上清を回収し、HA 脱重合活性評価の試料とした。

2-2-2-2 クロマトグラフィーによる HA 分子量分布の測定

HA 試料は Sepharose CL-2B (GE Healthcare Bio-Sciences AB) の充填されたカラム (直径 0.7 cm × 高さ 50 cm) に添加し、0.5 M NaCl により溶出した。クロマトグラフィーは 0.1 mL/min の流速で行い、フラクションコレクター (Atto) を用いて 1 フラクションあたり 0.3 mL 回収した。FA 蛍光強度は GloMax-Multi Detection System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて測定し、各フラクションにおける HA 量を算出した。また、カラムは FA-HA H2 (1,200-1,600 kDa) 及び FA-HA L2 (100-300 kDa) を用いて補正した。

2-2-3 ウェスタンブロット解析

2-2-3-1 試料採取

細胞は 24 well plate に播種し、37°C で 24 時間培養した。培地を 1% FBS 含有培地に交換した後、PBS、10 μ M histamine または 0.01-10 ng/mL TGF- β 1 を添加し、37°C で 24 時間培養した。培地を取り除き、PBS で一回洗浄した後、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor 2 及び 3 を含む RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] の混合液を各 well に 25 μ L ずつ添加し、細胞をピペットの先端でかきとって回収した。15 分間氷中に静置した後、4°C、12,000 \times g で 15 分間遠心分離し、その上清をタンパク質抽出液とした。

2-2-3-2 タンパク質定量

タンパク質定量は BCA protein assay kit を用いて行った。標準曲線の作製のため、0、25、125、250、500、750、1,000、1,500 μ g/mL の濃度に調製した bovine serum albumin を用いた。それぞれのタンパク質抽出液に Working reagent を添加した後、37°C のインキュベーター中で 30 分間反応させ、その後 532 nm の吸光度を Varioskan Flash (Thermo Scientific) を用いて測定した。タンパク質濃度に基づいて Sample buffer solution 及び RIPA buffer を用いてタンパク質濃度を均一にしたサンプルを調製し、-80°C に保存した。

2-2-3-3 電気泳動及び転写

タンパク質濃度を均一にしたサンプルを氷上で融解させた。分子量マーカー 2.5 μ L、各サンプル 4 μ g の量を 1 well あたり添加した。サンプルを添加後、ゲル一枚当たり 20 mA で 80 分間電気泳動した。電気泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-amino hexanoic acid) に 15 分間浸漬した。転写膜 Immobilon P membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) はメタノールに 30 秒間浸

漬し、15 分間 MilliQ に浸漬し、anode buffer 2 (25 mM Tris) に 15 分間浸漬した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M Tris) に浸漬したろ紙、anode buffer 2 に浸漬したろ紙、転写膜、ゲル、2 枚の cathode buffer に浸漬したろ紙の順に重ね、転写膜 1 枚当たり 100 mA で 60 分間転写した。

2-2-3-4 ウェスタンプロットティング

転写後の膜は、0.05 % Tween 20 含有 50 mM TBS (TBS-T: 10 mM Tris、40 mM Tris hydrochloride、150 mM NaCl) で洗浄し、Block One-P に浸漬し、10 分間ブロッキングした。その後、TBS-T で洗浄し、Can get signal solution 1 で希釈した一次抗体溶液に浸漬し、4°C で一晩反応させた。その後、TBS-T で洗浄し、Can get signal solution 2 で希釈した二次抗体溶液に浸漬し、室温で 3 時間反応させた。TBS-T で洗浄した後、ImmunoStar LD に 10 分間浸漬し、Luminescent image analyser LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) 及び Multi Gauge Ver. 3.0 (Fujifilm) を用いてバンドを検出した。

一次抗体には、rabbit anti-KIAA1199 (HYBID; 1:1,000 dilution; SAB2105467, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)、rabbit anti-TMEM2 (1:500 dilution; SAB2105088, Sigma Aldrich) 及び rabbit anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:2,000 dilution; Sigma Aldrich) を用いた。二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2,000 dilution; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) を用いた。

2-2-4 リアルタイム RT-PCR 解析

細胞はそれぞれ 24 well plate に播種した 24 時間後、1% FBS を含有培地に交換した。その後、PBS、10 μ M histamine、0.01-10 ng/mL TGF- β 1、1-10 ng/mL 上

皮成長因子 (EGF)、1-10 ng/mL 塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) または 1-10 ng/mL 血小板由来成長因子 (PDGF-BB) を添加し、37°C で 6 時間培養した。

RNA 抽出には NucleoSpin® RNA (Takara) を用いた。培地を取り除き、サンプル 1 well 当たり 350 μ L の RA1 buffer を加えて回収した。

以降、第 1 章 2-2-3-1、2-2-3-2、2-2-3-3 の方法に準じて行った。

以下のプライマーをそれぞれ用いた。

HYBID-forward: 5'-GGCTTCTGAGCCGGAACATC-3'

HYBID-reverse: 5'-GCTGCCTTAAATCCCAGAGCAA-3'

TMEM2-forward: 5'-TCCACAGTACCAGCCTGTCGTC-3'

TMEM2-reverse: 5'-TGATGGATAGCAAAGGCCAACTC-3'

β -*actin*-forward: 5'-TCAAGATCATTGCTCCTCCTG-3'

β -*actin*-reverse: 5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'

2-2-5 RNA 干渉

Detroit 551 細胞は抗生物質不含有培地を用いて 24 well plate 及び 96 well に播種し、37°C で 24 時間培養した。Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Thermo Scientific)、遺伝子導入用培地 Opti-MEM (Thermo Scientific) 及び Stealth RNAi™ small interfering RNA (siRNA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) の混合溶液を作製し、培地に添加して 2 nM Stealth siRNA の導入を行った。使用した Stealth siRNA は以下の通りである。

HYBID siRNA: 5'-GGACGGAGUGGUUCGAUCAUGAUAA-3' (sense 鎖)

5'-UUAUCAUGAUCGAACCACUCCGUCC-3' (antisense 鎖)

TMEM2 siRNA: 5'-CAGGAUGCUGGAAUAUGGUAUUUAU-3' (sense 鎖)

5'-AUAAAUACCAUAUUCUCGCAUCCUG-3' (antisense 鎖)

及び Negative control siRNA (Thermo Scientific)。

遺伝子導入 24 時間後に培地を交換し、HA 脱重合活性の評価及びリアルタイム RT-PCR 解析に用いた。

2-2-6 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な解析は JSTAT (Vector) を用いて行った。Student's *t* 検定または Dunnett's 検定により統計解析を行った。危険率が 5% 未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 ヒト皮膚線維芽細胞における histamine 及び TGF- β 1 による HYBID 及び TMEM2 の発現制御の検討

ヒト皮膚線維芽細胞 Detroit 551 細胞に FA 標識された高分子量 HA を添加し、培養することで HA 脱重合活性を評価した。既報 (17)と同様に、Detroit 551 細胞の HA 脱重合活性は、histamine 添加によって亢進し、TGF- β 1 添加によって抑制された (Fig. 30A)。一方、同条件下で、HYBID 及び TMEM2 のタンパク質発現量を調べたところ、TMEM2 の発現量については、histamine による変化は見られなかったが、TGF- β 1 の濃度依存的にその発現が増加した (Fig. 30B)。また、HYBID 発現量は HA 脱重合活性と密接に関連していた。対照的に、TMEM2 は HA 分解酵素として報告されたにも関わらず、HA 脱重合が完全に抑制される TGF- β 1 (10 ng/mL) 添加条件下でその発現量の増加が認められた (Fig. 30A, B, and D)。

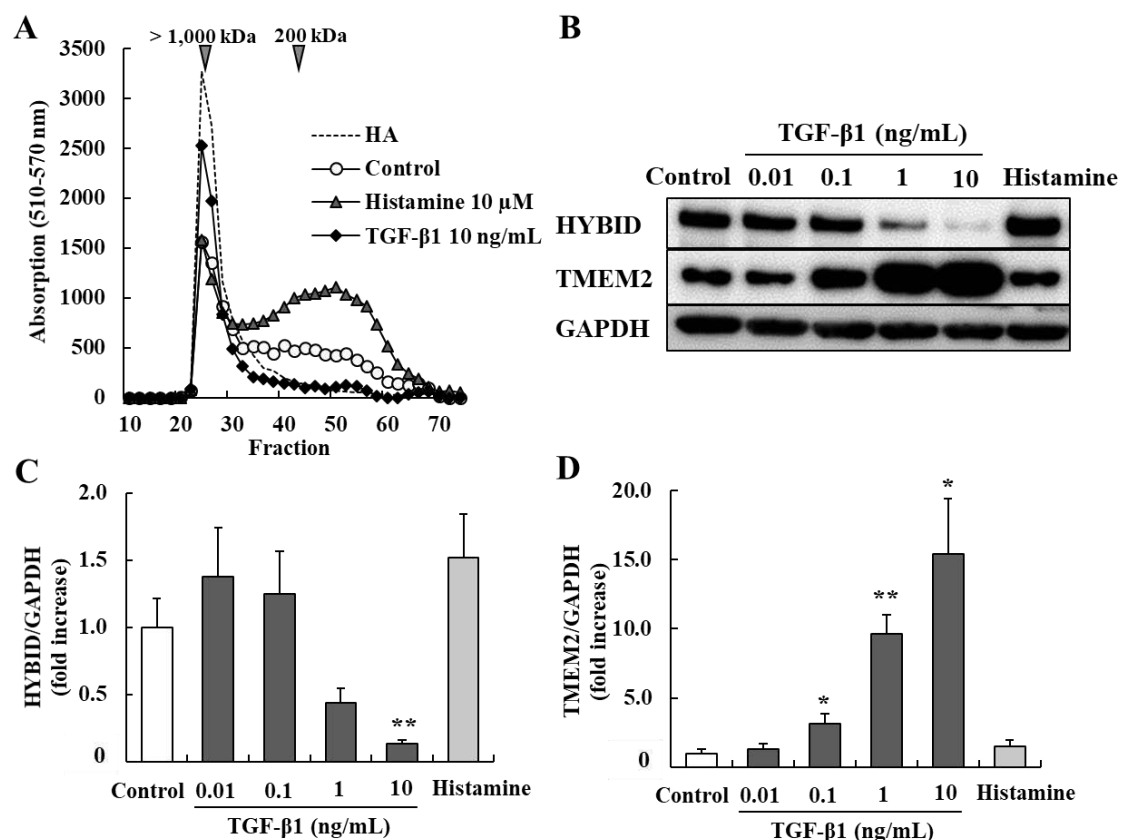


Fig. 30 Hyaluronan (HA) depolymerization and the regulation of HYBID and TMEM2 expression by histamine and TGF- β 1 in human skin fibroblasts.

(A) Effects of histamine and TGF- β 1 on HA depolymerization in Detroit 551 skin fibroblasts. The cells were cultured with fluoresceinamine-labeled HA and phosphate-buffered saline (PBS) (open circles), 10 μ M histamine (gray triangles), or 10 ng/mL TGF- β 1 (closed diamonds) for 48 h. The dotted line indicates FA-HA without incubation. (B-D) The expression levels of HYBID and TMEM2 protein in the cells treated with PBS (Control), 10 μ M histamine, or 0.01–10 ng/mL TGF- β 1 for 24 h were determined by immunoblotting. (B) Immunoblotting images. Results of quantitative analyses of HYBID (C) and TMEM2 (D). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the immunoblotting loading control. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 4). * p < 0.05, **p < 0.01 versus the Control (Dunnett's test).

3-2 ヒトケロイド患者由来線維芽細胞及びヒト線維肉腫細胞における HYBID 及び TMEM2 の発現制御

これまでに明らかになった知見が、異なる細胞種でも認められるかどうかを確認するため、ヒトケロイド患者由来線維芽細胞 KEL FIB 細胞及びヒト線維肉腫細胞 HT1080 細胞を用いて、histamine 及び TGF- β 1 添加後の HYBID 及び

TMEM2 の発現量を検討した (Fig. 31)。KEL FIB 細胞において、HYBID の mRNA 及びタンパク質発現量の両方が histamine 添加により増加し、TGF- β 1 添加により減少した (Fig. 31A, B, and D)。また、KEL FIB 細胞において、TGF- β 1 添加により TMEM2 の mRNA 及びタンパク質発現量の両方が増加した (Fig. 31A, C, and E)。HT1080 細胞において、histamine 添加により HYBID の mRNA 及びタンパク質発現量の両方が増加した (Fig. 31F, G, and I)。また、HT1080 細胞において、TGF- β 1 添加により HYBID の mRNA 発現量には変化が見られなかったが (Fig. 31I)、タンパク質発現量は減少した (Fig. 31G)。一方、HT1080 細胞において、TMEM2 の mRNA 発現量は histamine 及び TGF- β 1 のどちらの添加によって増加するが (Fig. 31J)、タンパク質発現量に変化は見られなかった (Fig. 31H)。これらの結果から、KEL FIB 細胞及び HT1080 細胞は、Detroit 551 細胞において認められた histamine 及び TGF- β 1 に対する細胞応答と類似した反応を示すことが明らかとなった。以後の検討は Detroit 551 細胞を用いて行った。

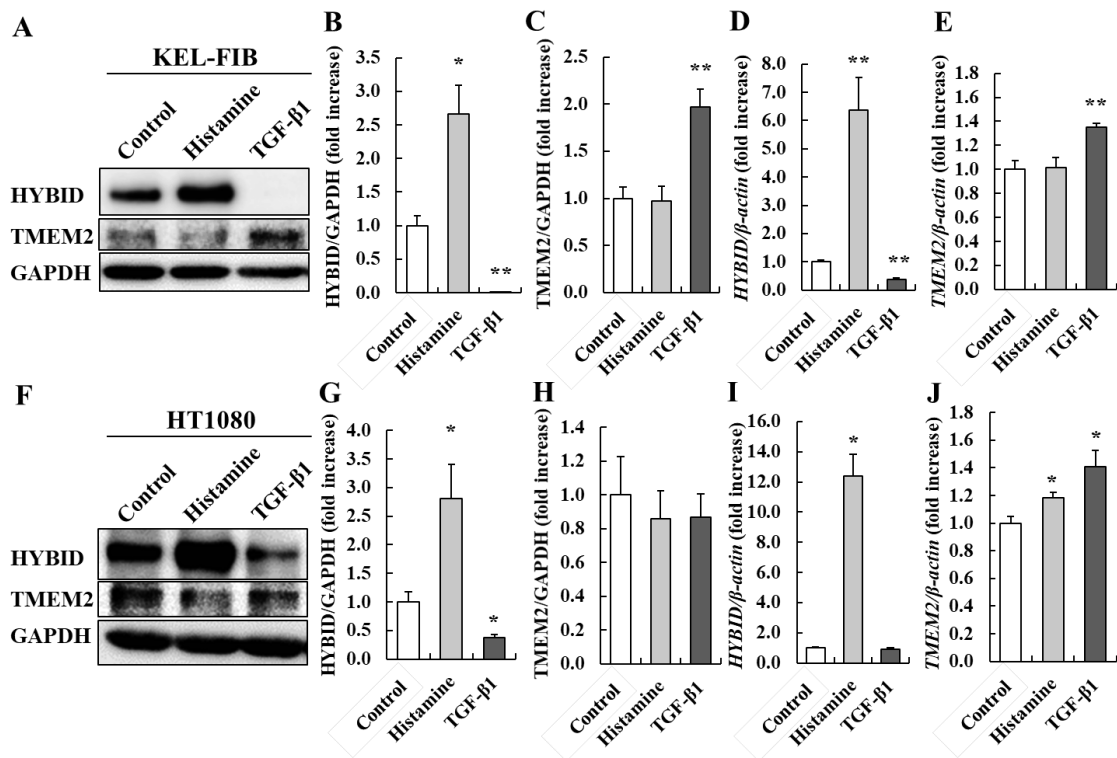


Fig. 31 Regulation of HYBID and TMEM2 by histamine and TGF-β1 in KEL FIB and HT1080 cells.

HYBID and TMEM2 protein and mRNA expression levels in response to histamine and TGF-β1 in KEL FIB (A-E) and HT1080 cells (F-J). Protein expression levels at 24 h and mRNA levels at 6 h after treatment were determined by immunoblotting and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), respectively. (A, F) Representative immunoblotting images. The expression levels of HYBID (B, G) and TMEM2 (C, H), and the expression levels of *HYBID* (D, I) and *TMEM2* (E, J) mRNA in the cells treated with 10 μM histamine, 10 ng/mL TGF-β1, or phosphate-buffered saline (PBS) (Control). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the immunoblotting loading control. *β-actin* mRNA was used as the qRT-PCR loading control. Values represent the mean ± S.E.M. (n = 4). *p < 0.05, **p < 0.01 versus the Control (two-tailed Student's *t*-test).

3-3 ヒト皮膚線維芽細胞における栄養因子による *HYBID* 及び *TMEM2* の発現制御

ヒト皮膚線維芽細胞において、HYBID を介した HA 脱重合活性は、TGF-β1、EGF、bFGF、PDGF-BB などの成長因子によって抑制されることが知られ

ている (88)。そこで、Detroit 551 細胞において、TGF- β 1、EGF、bFGF、PDGF-BB 添加の 6 及び 24 時間後の *HYBID* 及び *TMEM2* の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により調べた (Fig. 32)。既報の結果と同様に、いずれの成長因子によっても *HYBID* mRNA 発現量が減少した (Fig. 32A-D)。ただし、EGF 添加により *HYBID* 発現量は減少傾向を示したが、その差は有意ではなかった (Fig. 32B)。今回検討した成長因子のうち、TGF- β 1 のみが *TMEM2* mRNA 発現量を増加させた。これらの結果から、どちらも HA 脱重合の候補因子であるにも関わらず、*TMEM2* は *HYBID* とは異なる様式で制御されていることが明らかとなった。

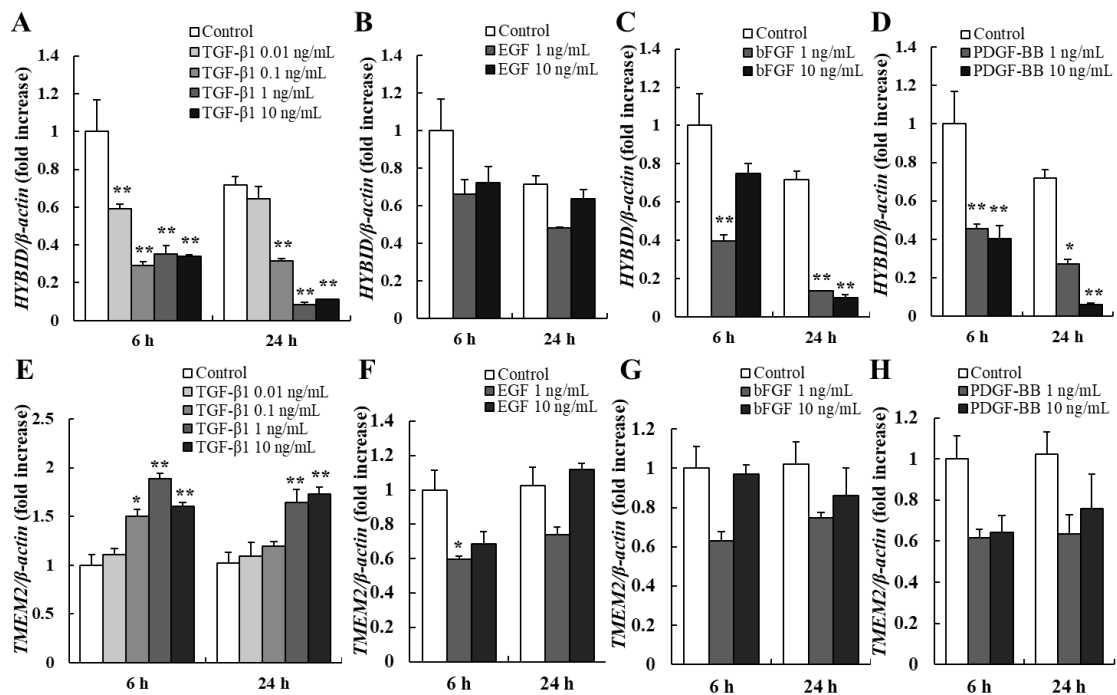


Fig. 32 Effects of TGF- β 1, epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), and platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) on the expression levels of *HYBID* and *TMEM2* mRNA in human skin fibroblasts.

The expression levels of *HYBID* (A-D) and *TMEM2* (E-H) mRNAs in the cells treated with phosphate-buffered saline (PBS) (Control), 0.01–10 ng/mL TGF- β 1 (A, E), and 1 or 10 ng/mL EGF (B, F), bFGF (C, G), or PDGF-BB (D, H) for 6 or 24 h. β -actin mRNA was used as the qRT-PCR loading control. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 4). *p < 0.05, **p < 0.01 versus the Control (Dunnett's test).

3-4 ヒト皮膚線維芽細胞における *HYBID* 及び *TMEM2* ノックダウンによる HA 脱重合への影響の検討

TGF- β 1 は HA 脱重合を抑制し、*TMEM2* 発現量を増加させるというこれまでの結果を考えると、*TMEM2* はヒト皮膚線維芽細胞においては HA 分解酵素としてではなく、むしろ抑制因子として作用する可能性がある。HA 脱重合における *TMEM2* の直接的な役割をより詳細に調べるため、Detroit 551 細胞において *HYBID* 及び *TMEM2* の発現を siRNA によりそれぞれノックダウンした。

HYBID のノックダウンにより、histamine 存在下の HA 脱重合が完全に抑制された (Fig. 33A)。興味深いことに、*TMEM2* のノックダウンにより、HA 脱重合が抑制されず、むしろ亢進した (Fig. 33A)。*HYBID* 及び *TMEM2* のノックダウン細胞において、それぞれの mRNA 発現量は顕著に減少していた (Fig. 33B, C)。興味深いことに、*TMEM2* のノックダウンにより *HYBID* mRNA 発現量が有意に増加した (Fig. 33B)。また、この結果は *TMEM2* のノックダウンによる HA 脱重合亢進の結果にも即していた。一方、*HYBID* のノックダウンによって *TMEM2* mRNA 発現量が僅かに減少した (Fig. 33C)。これらの結果から、ヒト皮膚線維芽細胞の HA 脱重合において *HYBID* は不可欠であり、その過程において *TMEM2* は HA 分解酵素としては関与しないことが示唆された。

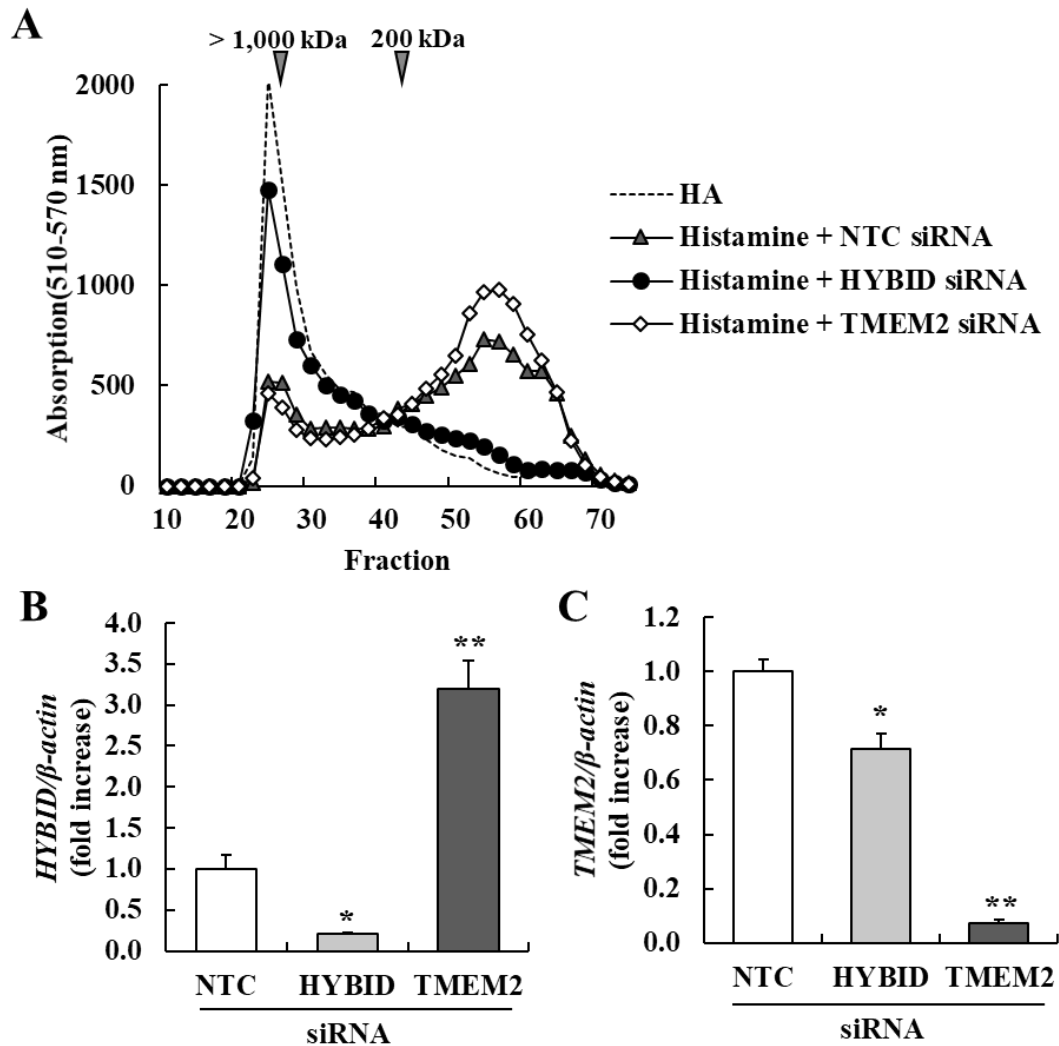


Fig. 33 Effects of *HYBID* and *TMEM2* knockdown on hyaluronan (HA) depolymerization in human skin fibroblasts.

(A) The depolymerization of HA was measured using *HYBID*-knocked-down cells (closed circles), *TMEM2*-knocked-down cells (open boxes), or a negative control (NTC; gray triangles) in the presence of histamine. Detroit 551 cells were treated with *HYBID* and *TMEM2* siRNAs for 24 h, then cultured with fluoresceinamine (FA)-labeled HA and 10 μ M histamine for 72 h. The dotted line indicates FA-HA without incubation. (B, C) The expression levels of *HYBID* and *TMEM2* mRNAs in the cells treated with the appropriate siRNAs. β -actin mRNA was used as a loading control. Values represent means \pm S.E.M. (n = 4). *p < 0.05, **p < 0.01 versus the Control (two-tailed Student's *t*-test).

第4節 考察

今回、健常者ヒト皮膚線維芽細胞の HA 脱重合において TMEM2 は HA 分解酵素として働かないことを初めて解明した。また、健常者皮膚線維芽細胞だけでなく、ケロイド患者由来線維芽細胞 KEL FIB 細胞及びヒト線維肉腫 HT1080 細胞においても、TMEM2 の発現は TGF- β 1 の刺激により誘導されることが明らかとなった。

HYBID システムにおいて、HA は HYBID と Clathrin 両方の存在下で細胞内に取り込まれ、早期エンドソーム内で分解を受け、細胞外に排出される (17)。一方、リコンビナント HYBID タンパク質は HA 分解活性を示さず、HYBID による HA 分解活性には生きた接着細胞が必要であることも報告されている。それゆえに、HYBID が酵素的に HA を分解しているかどうかは未だ不明である。また、HA 脱重合には、HYAL1 及び HYAL2 のどちらも関与しないことが知られている。今回、ヒト皮膚線維芽細胞の HA 脱重合は TMEM2 も必要としないことが明らかになった。*In vitro* 試験系で HA 分解活性を持つ TMEM2 細胞外ドメインと HYBID が特徴的な類似の構造 (GG ドメイン、G8 ドメイン、PbH1 repeats) を持つことから、Clathrin 被覆小胞システムを用いた初期エンドソーム内 HA 特異的脱重合においては、やはり HYBID が分解酵素活性を担うと考えるのが妥当であろう。しかし、HYBID を介した HA 脱重合において未知の HA 分解酵素が存在して機能している可能性は否定できない。HYBID システムの理解に向けて、より詳細な検討が必要である。

本研究において、TMEM2 はヒト皮膚線維芽細胞の HA 脱重合において HA 分解酵素として働かないことが明らかとなった。しかしながら、この知見は TMEM2 が HA 分解酵素であるという過去の知見と矛盾する (81)。この理由は今後明らかにされるべきだが、TMEM2 は発現する臓器や細胞種によって異なる

る役割を担う可能性がある。既報によると、成体期マウスの殆どの組織で *TMEM2* 転写コピー数は *HYBID* のそれと比較して多く (81)、初代培養皮膚線維芽細胞を除く殆どのヒト由来細胞種で *TMEM2* は *HYBID* よりも多く発現していた (89)。線維芽細胞において *HYBID* が *TMEM2* よりも多く発現することが、皮膚及び関節軟骨の線維芽細胞 (17)、軟骨細胞 (90) の HA 脱重合における *HYBID* の優先的機能に寄与するのかもしれない。また、*TMEM2* の寄与は比較していないものの、*HYBID* は脳の HA 脱重合にも作用することが第 1 章の研究から示されている。

予想に反して、Detroit 551 細胞において *TMEM2* をノックダウンした際に *HYBID* 発現量が増加した。*TMEM2* ノックダウンが *HYBID* mRNA 発現量を増加させたことを考えると、TGF- β 1 による *HYBID* 発現抑制を介した HA 脱重合の抑制作用は、TGF- β 1 誘発 *TMEM2* 発現誘導によるものである可能性が考えられる。しかし、その詳細は不明であり、*HYBID* と *TMEM2* の相互の発現制御の理解には更なる検討が必要である。

興味深いことに、*HYBID* 及び *TMEM2* の histamine または TGF- β 1 による発現制御様式は、ケロイド患者由来線維芽細胞 KEL-FIB 細胞及びヒト線維肉腫細胞 HT1080 細胞のどちらにおいても同様に確認された。ケロイド病は線維増殖性疾患であり、ECM の性質変化を特徴とする (91)。HA は創傷治癒過程の細胞増殖に重要な因子である。HA は癒痕の残らない幼少期の創傷治癒において高発現するが (92)、ケロイド病ではその発現量は減少する (2)。ケロイド組織において、HA、HAS、並びに HYALs の発現量は減少するといった報告もある (93)。上述のような数々の研究により、HA の代謝回転がケロイド病病態に関連することが示唆される。HT1080 線維肉腫細胞において、HA の総量は増殖能及び転移能と相関する (94, 95)。その一方、多くの報告から、種々のがん細胞に

における **HYBID** の過剰発現は腫瘍の悪性度と予後不良と関連すると考えられている (28, 31)。 **TMEM2** は **SOX4** による制御を受ける一因子として乳がん転移との関連が示唆されている (96)。 今回の研究結果及び過去の報告から、 **HYBID** 及び **TMEM2** はケロイド病や線維肉腫の病態に関与する可能性が考えられる。

本研究で得られた新しい知見は以下の2点である。(1) ヒト皮膚線維芽細胞において、 **HYBID** を発現抑制して **HA** 脱重合を抑制する **TGF- β 1** は **TMEM2** 発現を誘導した。 対照的に、 **HYBID** を発現誘導して **HA** 脱重合を促進する histamine は **TMEM2** 発現量に影響しなかった。(2) **HYBID** のノックダウンは **HA** 脱重合を完全に抑制したが、 **TMEM2** のノックダウンは **HA** 脱重合を促進した。 これらの知見から、ヒト皮膚線維芽細胞の **HA** 脱重合に **HYBID** は不可欠であるが、 **TMEM2** は **HA** 分解酵素として寄与しないことが明らかとなった。

総括及び結論

HYBID は皮膚や関節軟骨において HA 脱重合に関わる因子であり、がん病態に関与することが知られており、脳に関しては発現が確認されているのみで、その機能については不明であった。そこで本研究において、HYBID の脳における機能を明らかにすることを目的として、*Hybid* 欠損マウスを用いて記憶能力、脳内 HA の発現様式、海馬神経機能などを検討した。さらに、HYBID による HA 脱重合過程の詳細な理解を目的として、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、HYBID と新規 HA 分解酵素 TMEM2 の役割を比較検討した。

第 1 章では、*Hybid* 欠損マウスを用いて、脳における *Hybid* の発現及び機能を検討した。

- 1) 野生型マウスの海馬と小脳において、*Hybid* mRNA が多く発現していた。
- 2) *Hybid* 欠損マウスは、物体認知記憶及び空間記憶の障害を示した。
- 3) *Hybid* 欠損マウスにおいて、自発運動量、不安関連行動、聴性驚愕反応、ペンチレンテトラゾール誘発痙攣に対する感受性のいずれも野生型マウスと比べて変化は認められなかった。
- 4) *Hybid* 欠損マウスの海馬において、高分子量化した HA が蓄積していた。

第 2 章では、第 1 章で明らかとなった *Hybid* 欠損マウスの記憶障害のメカニズムとして海馬 HA 及び海馬神経機能に着目して検討を行った。

- 1) *Hybid* 欠損マウスの海馬において、CA1 領域放射状層下及び歯状回門に特異的に HA が蓄積していた。
- 2) *Hybid* 欠損マウスの歯状回において、新生神経細胞の減少が認められた。
- 3) *Hybid* 欠損マウスの歯状回神経細胞において、樹状突起スパイン密度の減少

が認められた。

第3章では、HYBIDを介したHA脱重合活性を示すヒト皮膚線維芽細胞を用いて、近年新規のHA分解酵素として報告されたTMEM2がHYBIDシステムに関与するか否か検討した。Detroit 551細胞を用いた検討結果を以下に示す。

- 1) TGF- β 1によりHYBID発現量が減少し、HA脱重合活性が完全に抑制された。
- 2) TGF- β 1によりTMEM2の発現が有意に増加した。
- 3) Detroit 551細胞だけでなく、KEL FIB細胞及びHT1080細胞においても、histamineによるHYBID発現誘導及びTGF- β 1によるTMEM2発現誘導が認められた。
- 4) HYBID mRNA発現を抑制する成長因子のうち、TMEM2発現の誘導はTGF- β 1のみに認められた。
- 5) HYBIDのノックダウンによりHA脱重合活性が完全に抑制されたが、TMEM2のノックダウンではHA脱重合活性はむしろ亢進した。
- 6) TMEM2のノックダウンによりHYBID mRNA発現量が有意に増加した。

本研究において、Hybid欠損マウスの表現型解析により、HYBIDが記憶学習といった高次脳機能に重要な役割を担うことが明らかとなった。また、Hybid欠損マウスの海馬において、高分子量化したHAが蓄積していたことから、HYBIDがマウス海馬において主要なHA分解関連因子であることが示された。また、Hybid欠損マウスの海馬歯状回において、高分子HAが蓄積し、神経新生及び樹状突起スパイン形成能が障害されることが、記憶障害の原因である可能性が考えられる。また、皮膚において、新規HA分解酵素として報告された

TMEM2 が HYBID による HA 脱重合過程の分解酵素として働かないことが示され、HYBID が酵素的 HA 分解活性を有することが強く示唆された。

以上、HYBID は海馬の HA の代謝回転において重要な役割を果たしており、HYBID による適正な HA 分子量制御が記憶や学習などの正常な脳機能に必要であることが明らかとなった。HYBID による脳内 HA の分子量制御をターゲットとした認知機能障害の病態解明または新規治療薬開発が期待される。

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御助言を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士、同助教 中村信介博士並びに前講師 鶴間一寛博士に深謝致します。

また、本研究の遂行にあたり、御指導を頂きました岐阜薬科大学化粧品健康学研究室特任教授 井上紳太郎博士に心から感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり有益なるご助言を賜りました岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室教授 五十里彰博士、医療薬剤学大講座薬物動態学研究室准教授 臼井茂之博士並びに機能分子学大講座薬理学研究室准教授 田中宏幸博士に深感致します。

本研究に際し、ご協力とご助言を頂きました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室諸氏に心から感謝の意を表します。

本研究の一部は、JSPS 科研費 JP16J11526 の助成によって行われた。

引用文献

1. Laurent, T. C., and Fraser, J. R. (1992) Hyaluronan. *FASEB J* **6**, 2397-2404
2. Meyer, L. J., Russell, S. B., Russell, J. D., Trupin, J. S., Egbert, B. M., Shuster, S., and Stern, R. (2000) Reduced hyaluronan in keloid tissue and cultured keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol* **114**, 953-959
3. Fraser, J. R., Laurent, T. C., and Laurent, U. B. (1997) Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* **242**, 27-33
4. Monslow, J., Govindaraju, P., and Pure, E. (2015) Hyaluronan - a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. *Front Immunol* **6**, 231
5. Delmage, J. M., Powars, D. R., Jaynes, P. K., and Allerton, S. E. (1986) The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. *Ann Clin Lab Sci* **16**, 303-310
6. Feinberg, R. N., and Beebe, D. C. (1983) Hyaluronate in vasculogenesis. *Science* **220**, 1177-1179
7. McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C., and 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**, 2403-2413
8. West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F., and Kumar, S. (1985) Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* **228**, 1324-1326
9. Xu, H., Ito, T., Tawada, A., Maeda, H., Yamanokuchi, H., Isahara, K., Yoshida, K., Uchiyama, Y., and Asari, A. (2002) Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J Biol Chem* **277**, 17308-17314
10. 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., and Kimata, K. (1999) Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* **274**, 25085-25092
11. Tammi, R., Saamanen, A. M., Maibach, H. I., and Tammi, M. (1991) Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture. *J Invest Dermatol* **97**, 126-130
12. Pandey, M. S., Harris, E. N., Weigel, J. A., and Weigel, P. H. (2008) The cytoplasmic domain of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) contains multiple endocytic motifs targeting coated pit-mediated internalization. *J Biol Chem* **283**, 21453-21461

13. Engstrom-Laurent, A. (1989) Changes in hyaluronan concentration in tissues and body fluids in disease states. *Ciba Found Symp* **143**, 233-240; discussion 240-237, 281-235
14. Weigel, J. A., and Weigel, P. H. (2003) Characterization of the recombinant rat 175-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). *J Biol Chem* **278**, 42802-42811
15. Csoka, A. B., Frost, G. I., and Stern, R. (2001) The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* **20**, 499-508
16. Harada, H., and Takahashi, M. (2007) CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem* **282**, 5597-5607
17. Yoshida, H., Nagaoka, A., Kusaka-Kikushima, A., Tobiishi, M., Kawabata, K., Sayo, T., Sakai, S., Sugiyama, Y., Enomoto, H., Okada, Y., and Inoue, S. (2013) KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5612-5617
18. Abe, S., Usami, S., and Nakamura, Y. (2003) Mutations in the gene encoding KIAA1199 protein, an inner-ear protein expressed in Deiters' cells and the fibrocytes, as the cause of nonsyndromic hearing loss. *J Hum Genet* **48**, 564-570
19. Suyama, M., Nagase, T., and Ohara, O. (1999) HUGE: a database for human large proteins identified by Kazusa cDNA sequencing project. *Nucleic Acids Res* **27**, 338-339
20. Guo, J., Cheng, H., Zhao, S., and Yu, L. (2006) GG: a domain involved in phage LTF apparatus and implicated in human MEB and non-syndromic hearing loss diseases. *FEBS Lett* **580**, 581-584
21. Birkenkamp-Demtroder, K., Maghnoouj, A., Mansilla, F., Thorsen, K., Andersen, C. L., Oster, B., Hahn, S., and Orntoft, T. F. (2011) Repression of KIAA1199 attenuates Wnt-signalling and decreases the proliferation of colon cancer cells. *Br J Cancer* **105**, 552-561
22. Arranz, A. M., Perkins, K. L., Irie, F., Lewis, D. P., Hrabe, J., Xiao, F., Itano, N., Kimata, K., Hrabetova, S., and Yamaguchi, Y. (2014) Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal activity and seizures via reduction in brain extracellular space. *J Neurosci* **34**, 6164-6176
23. Roszkowska, M., Skupien, A., Wojtowicz, T., Konopka, A., Gorlewicz, A., Kisiel, M., Bekisz, M., Ruszczycki, B., Dolezyczek, H., Rejmak, E., Knapska, E., Mozrzymas, J. W., Wlodarczyk, J., Wilczynski, G. M., and Dzwonek, J.

- (2016) CD44: a novel synaptic cell adhesion molecule regulating structural and functional plasticity of dendritic spines. *Mol Biol Cell* **27**, 4055-4066
24. Reed, M. J., Vernon, R. B., Damodarasamy, M., Chan, C. K., Wight, T. N., Bentov, I., and Banks, W. A. (2017) Microvasculature of the Mouse Cerebral Cortex Exhibits Increased Accumulation and Synthesis of Hyaluronan With Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **72**, 740-746
 25. Reed, M. J., Damodarasamy, M., Pathan, J. L., Erickson, M. A., Banks, W. A., and Vernon, R. B. (2018) The Effects of Normal Aging on Regional Accumulation of Hyaluronan and Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Mouse Brain. *J Histochem Cytochem*, 22155418774779
 26. Triggs-Raine, B., Salo, T. J., Zhang, H., Wicklow, B. A., and Natowicz, M. R. (1999) Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6296-6300
 27. Yoshida, H., Nagaoka, A., Nakamura, S., Sugiyama, Y., Okada, Y., and Inoue, S. (2013) Murine homologue of the human KIAA1199 is implicated in hyaluronan binding and depolymerization. *FEBS Open Bio* **3**, 352-356
 28. Michishita, E., Garces, G., Barrett, J. C., and Horikawa, I. (2006) Upregulation of the KIAA1199 gene is associated with cellular mortality. *Cancer Lett* **239**, 71-77
 29. Terashima, M., Fujita, Y., Togashi, Y., Sakai, K., De Velasco, M. A., Tomida, S., and Nishio, K. (2014) KIAA1199 interacts with glycogen phosphorylase kinase beta-subunit (PHKB) to promote glycogen breakdown and cancer cell survival. *Oncotarget* **5**, 7040-7050
 30. Yang, X., Qiu, P., Chen, B., Lin, Y., Zhou, Z., Ge, R., Zou, H., Wang, J., and Wang, J. (2015) KIAA1199 as a potential diagnostic biomarker of rheumatoid arthritis related to angiogenesis. *Arthritis Res Ther* **17**, 140
 31. Li, L., Yan, L. H., Manoj, S., Li, Y., and Lu, L. (2017) Central Role of CEMIP in Tumorigenesis and Its Potential as Therapeutic Target. *J Cancer* **8**, 2238-2246
 32. Fink, S. P., Myeroff, L. L., Kariv, R., Platzer, P., Xin, B., Mikkola, D., Lawrence, E., Morris, N., Nosrati, A., Willson, J. K., Willis, J., Veigl, M., Barnholtz-Sloan, J. S., Wang, Z., and Markowitz, S. D. (2015) Induction of KIAA1199/CEMIP is associated with colon cancer phenotype and poor patient survival. *Oncotarget* **6**, 30500-30515
 33. Shimoda, M., Yoshida, H., Mizuno, S., Hirozane, T., Horiuchi, K., Yoshino, Y.,

- Hara, H., Kanai, Y., Inoue, S., Ishijima, M., and Okada, Y. (2017) Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization Controls Endochondral Ossification through Hyaluronan Metabolism. *Am J Pathol* **187**, 1162-1176
34. Oyagi, A., Oida, Y., Kakefuda, K., Shimazawa, M., Shioda, N., Moriguchi, S., Kitaichi, K., Nanba, D., Yamaguchi, K., Furuta, Y., Fukunaga, K., Higashiyama, S., and Hara, H. (2009) Generation and characterization of conditional heparin-binding EGF-like growth factor knockout mice. *PLoS One* **4**, e7461
35. Ishisaka, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Shirai, Y., Saito, N., and Hara, H. (2013) Increased Seizure Susceptibility in a Mouse with Diacylglycerol Kinase β Deficiency. *Neuroscience & Medicine* **04**, 117-122
36. Eichenbaum, H. (1998) Using olfaction to study memory. *Ann N Y Acad Sci* **855**, 657-669
37. Milner, T. A., Lee, A., Aicher, S. A., and Rosin, D. L. (1998) Hippocampal α_2 -adrenergic receptors are located predominantly presynaptically but are also found postsynaptically and in selective astrocytes. *J Comp Neurol* **395**, 310-327
38. Becker, S. (2005) A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. *Hippocampus* **15**, 722-738
39. Wiskott, L., Rasch, M. J., and Kempermann, G. (2006) A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus* **16**, 329-343
40. Zheng, N., and Raman, I. M. (2010) Synaptic inhibition, excitation, and plasticity in neurons of the cerebellar nuclei. *Cerebellum* **9**, 56-66
41. Maroudas, A., Weinberg, P. D., Parker, K. H., and Winlove, C. P. (1988) The distributions and diffusivities of small ions in chondroitin sulphate, hyaluronate and some proteoglycan solutions. *Biophys Chem* **32**, 257-270
42. Parker, K. H., Winlove, C. P., and Maroudas, A. (1988) The theoretical distributions and diffusivities of small ions in chondroitin sulphate and hyaluronate. *Biophys Chem* **32**, 271-282
43. Peitzsch, R. M., and Reed, W. F. (1992) High osmotic stress behavior of hyaluronate and heparin. *Biopolymers* **32**, 219-238
44. Golgi, C. (1899) On the structure of the nerve cells of the spinal ganglia. 1898. *J Microsc* **155**, 9-14
45. Brauer, K., Hartig, W., Bigl, V., and Bruckner, G. (1993) Distribution of parvalbumin-containing neurons and lectin-binding perineuronal nets in the rat

- basal forebrain. *Brain Res* **631**, 167-170
46. Kwok, J. C., Dick, G., Wang, D., and Fawcett, J. W. (2011) Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol* **71**, 1073-1089
 47. Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., and Maffei, L. (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* **298**, 1248-1251
 48. Dityatev, A., Bruckner, G., Dityateva, G., Grosche, J., Kleene, R., and Schachner, M. (2007) Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol* **67**, 570-588
 49. Yamada, J., and Jinno, S. (2015) Subclass-specific formation of perineuronal nets around parvalbumin-expressing GABAergic neurons in Ammon's horn of the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* **523**, 790-804
 50. Hartig, W., Klein, C., Brauer, K., Schuppel, K. F., Arendt, T., Bigl, V., and Bruckner, G. (2001) Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. *Neurobiol Aging* **22**, 25-33
 51. Miyata, S., Nishimura, Y., and Nakashima, T. (2007) Perineuronal nets protect against amyloid beta-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res* **1150**, 200-206
 52. Bukalo, O., Schachner, M., and Dityatev, A. (2001) Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* **104**, 359-369
 53. Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., and Gundelfinger, E. D. (2009) Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* **12**, 897-904
 54. Kochlamazashvili, G., Henneberger, C., Bukalo, O., Dvoretzkova, E., Senkov, O., Lievens, P. M., Westenbroek, R., Engel, A. K., Catterall, W. A., Rusakov, D. A., Schachner, M., and Dityatev, A. (2010) The extracellular matrix molecule hyaluronic acid regulates hippocampal synaptic plasticity by modulating postsynaptic L-type Ca(2+) channels. *Neuron* **67**, 116-128
 55. Berretta, S., Heckers, S., and Benes, F. M. (2015) Searching human brain for mechanisms of psychiatric disorders. Implications for studies on schizophrenia. *Schizophr Res* **167**, 91-97
 56. Jenkins, H. G., and Bachelard, H. S. (1988) Glycosaminoglycans in cortical autopsy samples from Alzheimer brain. *J Neurochem* **51**, 1641-1645

57. Back, S. A., Tuohy, T. M., Chen, H., Wallingford, N., Craig, A., Struve, J., Luo, N. L., Banine, F., Liu, Y., Chang, A., Trapp, B. D., Bebo, B. F., Jr., Rao, M. S., and Sherman, L. S. (2005) Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med* **11**, 966-972
58. Yoshino, Y., Ishisaka, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yoshida, H., Inoue, S., Shimoda, M., Okada, Y., and Hara, H. (2017) Distribution and function of hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization (HYBID, KIAA1199) in the mouse central nervous system. *Neuroscience* **347**, 1-10
59. Matsuzaki, S., Tanaka, F., Mimori, K., Tahara, K., Inoue, H., and Mori, M. (2009) Clinicopathologic significance of KIAA1199 overexpression in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **16**, 2042-2051
60. Lindwall, C., Olsson, M., Osman, A. M., Kuhn, H. G., and Curtis, M. A. (2013) Selective expression of hyaluronan and receptor for hyaluronan mediated motility (Rhamm) in the adult mouse subventricular zone and rostral migratory stream and in ischemic cortex. *Brain Res* **1503**, 62-77
61. Skupien, A., Konopka, A., Trzaskoma, P., Labus, J., Gorlewicz, A., Swiech, L., Babraj, M., Dolezyczek, H., Figiel, I., Ponimaskin, E., Wlodarczyk, J., Jaworski, J., Wilczynski, G. M., and Dzwonek, J. (2014) CD44 regulates dendrite morphogenesis through Src tyrosine kinase-dependent positioning of the Golgi. *J Cell Sci* **127**, 5038-5051
62. Su, W., Foster, S. C., Xing, R., Feistel, K., Olsen, R. H., Acevedo, S. F., Raber, J., and Sherman, L. S. (2017) CD44 Transmembrane Receptor and Hyaluronan Regulate Adult Hippocampal Neural Stem Cell Quiescence and Differentiation. *J Biol Chem* **292**, 4434-4445
63. Raber, J., Olsen, R. H., Su, W., Foster, S., Xing, R., Acevedo, S. F., and Sherman, L. S. (2014) CD44 is required for spatial memory retention and sensorimotor functions. *Behav Brain Res* **275**, 146-149
64. Treves, A., Tashiro, A., Witter, M. P., and Moser, E. I. (2008) What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* **154**, 1155-1172
65. Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., and Moser, E. I. (2007) Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* **315**, 961-966
66. Gage, F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-1438
67. Danielson, N. B., Zaremba, J. D., Kaifosh, P., Bowler, J., Ladow, M., and Losonczy, A. (2016) Sublayer-Specific Coding Dynamics during Spatial Navigation and Learning in Hippocampal Area CA1. *Neuron* **91**, 652-665

68. Amaral, D. G., Scharfman, H. E., and Lavenex, P. (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* **163**, 3-22
69. Morris, A. M., Curtis, B. J., Churchwell, J. C., Maasberg, D. W., and Kesner, R. P. (2013) Temporal associations for spatial events: the role of the dentate gyrus. *Behav Brain Res* **256**, 250-256
70. Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., and Wojtowicz, J. M. (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* **130**, 843-852
71. Deng, W., Saxe, M. D., Gallina, I. S., and Gage, F. H. (2009) Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci* **29**, 13532-13542
72. Shen, K., and Cowan, C. W. (2010) Guidance molecules in synapse formation and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001842
73. Harris, K. M., and Stevens, J. K. (1989) Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* **9**, 2982-2997
74. Ravaglia, S., Bini, P., Sinforiani, E., Franciotta, D., Zardini, E., Tosca, P., Moglia, A., and Costa, A. (2008) Cerebrospinal fluid levels of tau phosphorylated at threonine 181 in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurol Sci* **29**, 417-423
75. Nagga, K., Hansson, O., van Westen, D., Minthon, L., and Wennstrom, M. (2014) Increased levels of hyaluronic acid in cerebrospinal fluid in patients with vascular dementia. *J Alzheimers Dis* **42**, 1435-1441
76. Li, Y., Li, Z. X., Jin, T., Wang, Z. Y., and Zhao, P. (2017) Tau Pathology Promotes the Reorganization of the Extracellular Matrix and Inhibits the Formation of Perineuronal Nets by Regulating the Expression and the Distribution of Hyaluronic Acid Synthases. *J Alzheimers Dis* **57**, 395-409
77. Dityatev, A., and Schachner, M. (2003) Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **4**, 456-468
78. Michaluk, P., Wawrzyniak, M., Alot, P., Szczot, M., Wyrembek, P., Mercik, K., Medvedev, N., Wilczek, E., De Roo, M., Zuschratter, W., Muller, D., Wilczynski, G. M., Mozrzymas, J. W., Stewart, M. G., Kaczmarek, L., and Wlodarczyk, J. (2011) Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *J Cell Sci* **124**, 3369-3380
79. Shostak, K., Zhang, X., Hubert, P., Goktuna, S. I., Jiang, Z., Klevernic, I., Hildebrand, J., Roncarati, P., Hennuy, B., Ladang, A., Somja, J., Gothot, A.,

- Close, P., Delvenne, P., and Chariot, A. (2014) NF-kappaB-induced KIAA1199 promotes survival through EGFR signalling. *Nat Commun* **5**, 5232
80. Duan, Y., Wang, S. H., Song, J., Mironova, Y., Ming, G. L., Kolodkin, A. L., and Giger, R. J. (2014) Semaphorin 5A inhibits synaptogenesis in early postnatal- and adult-born hippocampal dentate granule cells. *Elife* **3**
81. Yamamoto, H., Tobisawa, Y., Inubushi, T., Irie, F., Ohyama, C., and Yamaguchi, Y. (2017) A mammalian homolog of the zebrafish transmembrane protein 2 (TMEM2) is the long-sought-after cell-surface hyaluronidase. *J Biol Chem* **292**, 7304-7313
82. Wrzesinski, T., Szelag, M., Cieslikowski, W. A., Ida, A., Giles, R., Zodro, E., Szumska, J., Pozniak, J., Kwias, Z., Bluysen, H. A., and Wesoly, J. (2015) Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors. *BMC Cancer* **15**, 518
83. He, Q. Y., Liu, X. H., Li, Q., Studholme, D. J., Li, X. W., and Liang, S. P. (2006) G8: a novel domain associated with polycystic kidney disease and non-syndromic hearing loss. *Bioinformatics* **22**, 2189-2191
84. Yoshida, H., Nagaoka, A., Nakamura, S., Tobiishi, M., Sugiyama, Y., and Inoue, S. (2014) N-Terminal signal sequence is required for cellular trafficking and hyaluronan-depolymerization of KIAA1199. *FEBS Lett* **588**, 111-116
85. Smith, K. A., Lagendijk, A. K., Courtney, A. D., Chen, H., Paterson, S., Hogan, B. M., Wicking, C., and Bakkers, J. (2011) Transmembrane protein 2 (Tmem2) is required to regionally restrict atrioventricular canal boundary and endocardial cushion development. *Development* **138**, 4193-4198
86. Totong, R., Schell, T., Lescroart, F., Ryckebusch, L., Lin, Y. F., Zygmunt, T., Herwig, L., Krudewig, A., Gershoony, D., Belting, H. G., Affolter, M., Torres-Vazquez, J., and Yelon, D. (2011) The novel transmembrane protein Tmem2 is essential for coordination of myocardial and endocardial morphogenesis. *Development* **138**, 4199-4205
87. De Angelis, J. E., Lagendijk, A. K., Chen, H., Tromp, A., Bower, N. I., Tunny, K. A., Brooks, A. J., Bakkers, J., Francois, M., Yap, A. S., Simons, C., Wicking, C., Hogan, B. M., and Smith, K. A. (2017) Tmem2 Regulates Embryonic Vegf Signaling by Controlling Hyaluronic Acid Turnover. *Dev Cell* **40**, 123-136
88. Nagaoka, A., Yoshida, H., Nakamura, S., Morikawa, T., Kawabata, K., Kobayashi, M., Sakai, S., Takahashi, Y., Okada, Y., and Inoue, S. (2015) Regulation of Hyaluronan (HA) Metabolism Mediated by HYBID (Hyaluronan-binding Protein Involved in HA Depolymerization, KIAA1199) and HA

- Synthases in Growth Factor-stimulated Fibroblasts. *J Biol Chem* **290**, 30910-30923
89. Yamaguchi, Y., Yamamoto, H., Tobisawa, Y., and Irie, F. (2018) TMEM2: A missing link in hyaluronan catabolism identified? *Matrix Biol*
 90. Shimizu, H., Shimoda, M., Mochizuki, S., Miyamae, Y., Abe, H., Chijiwa, M., Yoshida, H., Shiozawa, J., Ishijima, M., Kaneko, K., Kanaji, A., Nakamura, M., Toyama, Y., and Okada, Y. (2018) Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization Is Up-Regulated and Involved in Hyaluronan Degradation in Human Osteoarthritic Cartilage. *Am J Pathol* **188**, 2109-2119
 91. Bayat, A., McGrouther, D. A., and Ferguson, M. W. (2003) Skin scarring. *BMJ* **326**, 88-92
 92. Evanko, S. P., Tammi, M. I., Tammi, R. H., and Wight, T. N. (2007) Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 1351-1365
 93. Sidgwick, G. P., Iqbal, S. A., and Bayat, A. (2013) Altered expression of hyaluronan synthase and hyaluronidase mRNA may affect hyaluronic acid distribution in keloid disease compared with normal skin. *Exp Dermatol* **22**, 377-379
 94. Kosaki, R., Watanabe, K., and Yamaguchi, Y. (1999) Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res* **59**, 1141-1145
 95. Saga, R., Monzen, S., Chiba, M., Yoshino, H., Nakamura, T., and Hosokawa, Y. (2017) Anti-tumor and anti-invasion effects of a combination of 4-methylumbelliferone and ionizing radiation in human fibrosarcoma cells. *Oncol Lett* **13**, 410-416
 96. Lee, H., Goodarzi, H., Tavazoie, S. F., and Alarcon, C. R. (2016) TMEM2 Is a SOX4-Regulated Gene That Mediates Metastatic Migration and Invasion in Breast Cancer. *Cancer Res* **76**, 4994-5005
 97. Usami, S., Takumi, Y., Suzuki, N., Oguchi, T., Oshima, A., Suzuki, H., Kitoh, R., Abe, S., Sasaki, A., and Matsubara, A. (2008) The localization of proteins encoded by CRYM, KIAA1199, UBA52, COL9A3, and COL9A1, genes highly expressed in the cochlea. *Neuroscience* **154**, 22-28
 98. Soroosh, A., Albeiroti, S., West, G. A., Willard, B., Fiocchi, C., and de la Motte, C. A. (2016) Crohn's Disease Fibroblasts Overproduce the Novel Protein KIAA1199 to Create Proinflammatory Hyaluronan Fragments. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2**, 358-368 e354
 99. van Heumen, B. W., Roelofs, H. M., Vink-Borger, M. E., Dekker, E., Mathus-

- Vliegen, E. M., Dees, J., Koornstra, J. J., Langers, A. M., Nagtegaal, I. D., Kampman, E., Peters, W. H., and Nagengast, F. M. (2013) Ursodeoxycholic acid counteracts celecoxib in reduction of duodenal polyps in patients with familial adenomatous polyposis: a multicentre, randomized controlled trial. *Orphanet J Rare Dis* **8**, 118
100. Sabates-Bellver, J., Van der Flier, L. G., de Palo, M., Cattaneo, E., Maake, C., Rehrauer, H., Laczko, E., Kurowski, M. A., Bujnicki, J. M., Menigatti, M., Luz, J., Ranalli, T. V., Gomes, V., Pastorelli, A., Faggiani, R., Anti, M., Jiricny, J., Clevers, H., and Marra, G. (2007) Transcriptome profile of human colorectal adenomas. *Mol Cancer Res* **5**, 1263-1275
101. Kuscu, C., Evensen, N., Kim, D., Hu, Y. J., Zucker, S., and Cao, J. (2012) Transcriptional and epigenetic regulation of KIAA1199 gene expression in human breast cancer. *PLoS One* **7**, e44661
102. Koga, A., Sato, N., Kohi, S., Yabuki, K., Cheng, X. B., Hisaoka, M., and Hirata, K. (2017) KIAA1199/CEMIP/HYBID overexpression predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology* **17**, 115-122

略語一覧表

AD	: Alzheimer's disease
AMPA	: a-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate
bFGF	: basic fibroblast growth factor
CD44	: clusters of differentiation 44
DCX	: doublecortin
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
ECM	: extracellular matrix
EDTA	: ethylenediamine tetraacetate
EGF	: epidermal growth factor
EMEM	: Eagle's minimum essential medium
FA	: fluoresceinamine
FBS	: fetal bovine serum
GABA	: γ -aminobutyric acid
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCL	: granular cellular layer
HA	: hyaluronan; hyaluronic acid
HABP	: hyaluronan binding protein
HAS	: hyaluronan synthase
HRP	: horseradish peroxidase
HYAL	: hyaluronidase
HYBID	: hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization
LB	: lysogeny broth
LTP	: long term potentiation
PB	: phosphate buffer
PBS	: phosphate buffered saline
PDGF- BB	: platelet-derived growth factor-BB
PFA	: paraformaldehyde
PNs	: perineuronal nets
PTZ	: pentylenetetrazole
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SSC	: saline sodium citrate
TBE	: tris-borate-ethylenediamine tetraacetate
TBS	: tris-buffered saline

TGF : transforming growth factor
TMEM2 : transmembrane protein 2
WT : wild-type