Hyaluronan and Hyaladherins in Limb Development

四肢発生におけるヒアルロナンとヒアルアドヘリン

Bryan P. Toole

Department of Anatomy and Cellular Biology, Tufts University Health Science Schools,
Boston, MA 02111, USA, FAX:1-617-956-6536

Key Words: *hyaluronan, cell-matrix interactions, hyaladherin, extracellular matrix in development, limb development*

Abstract

Extracellular matrices in which cells migrate and proliferate during embryonic development are enriched in hyaluronan. Hyaluronan-binding proteins, termed hyaladherins, are a group of related proteins that serve as structural components of these extracellular matrices and as receptors at the surface of the cells therein. Recent evidence indicates that these proteins are involved in assembly of hyaluronan-rich, pericellular matrices and in aspects of cell behavior, especially cell migration and aggregation. Mesodermal cells of the early developing limb are surrounded by a hyaluronan-rich matrix, the production of which is regulated by basic fibroblast growth factor (FGF). When the cells of the chondrogenic and myogenic regions of the mesoderm condense, the cells produce less hyaluronan and become separated by a smaller volume of matrix. FGF levels diminish in the limb at this time but an FGF-like factor produced by the ectoderm maintains the high level of hyaluronan present in the periphery of the limb. Also at the condensation stage, the mesodermal cells exhibit increased levels of hyaluronan-binding sites on their surface. Endogenous cell surface hyaluronan bound to these sites can crossbridge adjacent cells, adhering them to one another, due to multivalent binding. Thus condensation can be explained, at least in part, by three facets of hyaluronan-cell interactions: 1) receptor-mediated endocytosis of pre-existing pericellular hyaluronan; 2) decreased hyaluronan production leading to cessation of coat production; 3) stabilization of the condensate by hyaluronan-receptor crossbridging. During differentiation of the condensed mesoderm to cartilage, hyaluronan-binding sites persist on the cell surface. These sites are also essential for assembly of the pericellular matrix surrounding chondrocytes.

要 旨

胚発生の過程において細胞が移動し増殖する場である細胞外マトリクス中には、ヒアルロナン(ヒアルロン酸)が多量に存在することが知られている。ヒアルアドヘリンと命名されたヒアルロナン結合蛋白質は、これら細胞外マトリクスの構成成分として機能しているものや、細胞外マトリクス中に存在する細胞表面において受容体として機能しているものからなる蛋白質のグループを構成している。最近の研究によると、これら一群の蛋白質は、ヒアルロナンを多量に含む細胞周辺マトリクスの構築に関与し、細胞の行動に関しては、特に細胞の移動と凝集に関係していることが明かにされている。発生初期の肢芽の中胚葉細胞はヒアルロナンを多量に含むマトリクスで覆われており、その合成は塩基性繊維芽細胞成長因子(FGF)によって制御されている。肢芽中胚葉の軟骨及び筋肉形成の領域で、組織分化に先立って細胞が凝集する際、細胞のヒアルロナン合成は低下し、その結果、細胞間の空間はより狭くなる。肢芽内のFGFレベルも、この時、減少するが外胚葉で生産されるFGF様の因子により、肢芽周辺部分に存在するヒアルロナン量は高濃度に維持される。また細胞凝集が起こる時期には、中胚葉細胞の表面に存在するヒアルロナン結合部位も増加する。この結合部位に結合している内在性ヒアルロナンは、その多価結合性のために、隣接する細胞どうしを架橋し、お互いを接着させることができる。このように細胞凝集は、少なくとも部分的には、ヒアルロナンと細胞間の相互作用で見られる次の三つの過程で説明することができる。第一は、細胞周辺にすでに存在しているヒアルロナンの受容体を介したエンドサイトーシス、第二は、ヒアルロナン合成の低下による細胞周辺層(マトリクス)形成の停止、第三は、ヒアルロナンと受容体の間の架橋による凝集状態の安定化である。凝集した中胚葉が軟骨へ分化する間も、ヒアルロナン結合部位は細胞表面に存在し続ける。このヒアルロナン結合部位もまた、軟骨細胞を覆う細胞周辺マトリクスの構築に必要不可欠なものである。

A. Introduction

Extracellular matrices in which cells migrate and proliferate during embryonic development are enriched in hyaluronan (reviewed in ref. 1). The physical and chemical properties of hyaluronan contribute to the structural integrity of embryonic tissues and to the morphogenetic processes that take place within them. One way in which hyaluronan participates in tissue structure is its ability to form meshworks that exert osmotic

A. はじめに

胚発生の過程において、細胞が移動し増殖する場である細胞外マトリクス中には、ヒアルロナン(ヒアルロン酸)が多量に存在することが知られている(文献1に概説)。ヒアルロナンの物理的及び化学的特性は、胚組織の構造の維持と胚組織中で進行する形態形成過程に寄与している。ヒアルロナンが組織構造において果たす一つの役割は、浸透圧を生じさせるような網目状

pressure(2, 3). The resultant swelling pressure within the tissue can lead to separation of cellular or fibrous structures or deformation of the tissue, possibly facilitating cell and tissue movements(1, 4). In addition, some embryonic cells exhibit large, hyaluronan-dependent, pericellular matrices or "coats"(5) that may influence cell-cell adhesion(6, 7), cell-substratum adhesion(8), proliferation(9), migration(10, 11) or differentiation(12).

Interaction of hyaluronan with the cell surface is mediated by membrane-bound receptors (reviewed in ref. 13). Recent work has demonstrated that the hyaluronan receptor of baby hamster kidney and transformed 3T3 cells is a glycoprotein of molecular weight, ~85 kDa(14) that is closely related to the CD44 lymphocyte homing receptor(15-18). We have prepared a monoclonal antibody, MAb IVd4, that recognizes hyaluronan-binding protein with the properties of a hyaluronan receptor in a wide variety of embryonic and transformed cell types (19). The original antigen used for production of MAb IVd4 was a mixture of hyaluronan-binding proteins prepared from chick embryo brain; three proteins in these preparations, of molecular weight 93, 91 and 69 kDa, are recognized by MAb IVd4. Similar proteins and related variants are recognized by MAb IVd4 in other tissues and cells, and these proteins are probably related to the 85 kDa hyaluronan receptor, and thus to the many variants of CD44(20, 21), since MAb IVd4 blocks binding of hyaluronan to the 85 kDa receptor on transformed 3T3 cells(19).

The hyaluronan-binding proteins discussed above, which we have termed the **hyaladherins**, are related to one another and to other hyaluronan-binding macromolecules involved in extracellular matrix structure (reviewed in ref. 13). The members of this family of proteins serve as structural components of extracellular matrices and as hyaluronan receptors on the cell surface. MAb IVd4 blocks assembly of pericellular matrices produced by a wide variety of cells, *e.g.* embryonic limb mesoderm, chondrocytes and fibrosarcoma cells(Yu, Banerjee and Toole, unpublished results). The antibody also blocks cell migration, *e.g.* of endothelial cells and neural crest cells(Banerjee and Toole, unpublished results). The effects of the antibody on pericellular matrix assembly and on cell migration are mimicked by hyaluronan hexasaccharide, a competitive inhibitor of the interaction between polymeric hyaluronan and its receptor. We are currently investigating whether the effects on matrix assembly and migration are directly related, but clearly hyaluronan and hyaladherins are important to both processes.

B. Hyaluronan-Dependent Pericellular Matrices of Limb Mesoderm

Mesodermal cells in the early chick embryo limb bud are separated by extensive hyaluronan-rich spaces(22) and these cells in culture produce large, hyaluronan-dependent, pericellular matrices or "coats"(5). When the chondrogenic and

構造を形成することである(2, 3)。その結果として組織に膨圧が生じ、細胞間や繊維性構造の分離を引き起こしたり、あるいは組織を変形させ、おそらく細胞と組織の運動性を高める(1, 4)。さらに、胚細胞のある種のものは、巨大なヒアルロン酸依存性の細胞周辺マトリクスあるいは細胞周辺"層"(5)を持っており、細胞間の接着(6, 7)や細胞と基質間の接着(8)、増殖(9)、移動(10, 11)、あるいは分化(12)に影響を与えている可能性も考えられている。

ヒアルロン酸と細胞表面の相互作用は、細胞膜に存在する受容体を介して行われる(文献13に概説)。最近の研究によると、BHK細胞や3T3細胞が発現するヒアルロン酸受容体は、リンパ球ホーミング受容体であるCD44と非常に類似した、分子量が約85 kDa(14)の糖蛋白質であることが示されている(15-18)。われわれは、胚の様々な細胞と各種の形質転換した細胞に広く分布し、ヒアルロン酸受容体として機能するヒアルロン酸結合蛋白質を認識する単クローン抗体 MAb IVd4 を作製した(19)。MAb IVd4 の作製に使用されたもとの抗原は、ニワトリ胚の脳より調製したヒアルロン酸結合蛋白質の混合物であった。すなわち、MAb IVd4はこの混合物中に存在する、分子量がそれぞれ93、91、69 kDaの三つの蛋白質を認識する。他の組織や細胞にも、MAb IVd4によって認識される同様の蛋白質や類似する多型蛋白質が存在することや、また、MAb IVd4は形質転換した3T3細胞に存在する85 kDaのヒアルロン酸受容体とヒアルロン酸との結合を阻害することから(19)、おそらく、これらの蛋白質は85 kDaのヒアルロン酸受容体と多くのCD44の多型(20, 21)に類似するものなのであろう。

以上に述べた、我々がヒアルアドヘリンと命名したヒアルロン酸結合蛋白質は、お互いに類似性があり、また細胞外マトリクス構造に関与する他のヒアルロン酸結合巨大分子とも関連性が知られている(文献13に概説)。この蛋白質ファミリーを構成する分子群は細胞外マトリクスの構造成分や、細胞表面に存在するヒアルロン酸受容体として機能している。MAb IVd4は各種の細胞、例えば、肢芽中胚葉細胞、軟骨細胞、繊維肉腫細胞によって生産される細胞周辺マトリクスの構築を阻害する(Yu, Banerjee及びToole, 未公表結果)。また、この抗体は細胞の移動、例えば、内皮細胞や神経冠細胞の移動も抑制する(Banerjee及びToole, 未公表結果)。細胞周辺マトリクスの構築や細胞の移動に対するこの抗体の阻害作用は、重合性ヒアルロン酸と受容体の拮抗阻害物質であるヒアルロン酸の六糖体によっても惹き起こすことができる。現在、我々は、マトリクスの構築と細胞の移動に対する作用が直接関係しているのか解析中であるが、明かにヒアルロン酸とヒアルアドヘリンは両過程において重要な機能を担っている。

B. ヒアルロン酸依存性の肢芽中胚葉の細胞周辺マトリクス

発生初期のニワトリ胚肢芽を構成する中胚葉細胞は、ヒアルロン酸に富む広い空間によって隔てられており(22)、培養すると巨大なヒアルロン酸依存性の細胞周辺マトリクスあるいは細胞周辺"層"を形成する(5)。したがって、生体内で肢芽の軟骨形成領域及び筋肉形成領域が凝集する時には、細胞を隔てるマ

myogenic areas of the limb bud become condensed *in vivo*, i.e. these cells are separated by a smaller volume of matrix, the isolated mesodermal cells do not exhibit visible coats in culture. This change in the ability to express coats is accompanied by a large decrease in the ratio of hyaluronan to chondroitin sulfate-proteoglycan produced by the condensation-stage mesoderm, as compared to the pre-condensation mesoderm(5).

During differentiation of chondrocytes from condensed mesoderm, the cells again become separated by extensive spaces *in vivo*; in culture, the chondrocytes re-express large pericellular coats. Chondrocyte coat structure is still dependent on hyaluronan even though proteoglycan is a quantitatively more prominent component than in early mesoderm(5, 23). In contrast to chondrogenesis, fusion of myoblasts is accompanied by loss of pericellular coats(24), apparently a necessary step towards differentiation since myoblasts cultured on a hyaluronan substratum fail to fuse(12). Thus there is a close correlation between the presence of large intercellular spaces *in vivo* and the expression of large hyaluronan-dependent coats *in vitro*.

C. Changes in Hyaluronan-Cell Interactions during Condensation of Limb Mesoderm

An important stage in differentiation of limb mesoderm is the above-mentioned condensation of cells that precedes final cytodifferentiation of muscle and cartilage. In parallel to the loss of ability to express hyaluronan-dependent coats and the changes in glycosaminoglycan synthesis that occur at this stage, an increase in membrane-associated binding sites for hyaluronan occurs(25). Hyaluronan-binding sites are known, in other systems, to be involved in endocytosis en route to degradation of hyaluronan(26-28), and so it is reasonable to suppose that the increase in hyaluronan-binding sites at the time of condensation represents the onset or increase in receptor-mediated endocytosis of hyaluronan. Decreased hyaluronan synthesis and coat production together with increased endocytosis and degradation of hyaluronan would lead to a dramatic reduction in volume of matrix between the mesodermal cells, thus allowing them to "condense".

In addition to the events leading to reduction in matrix volume, condensation may also involve direct cell interactions (e.g. see refs. 29-31). One such interaction is likely to be crossbridging of cells via multivalent binding of hyaluronan to the cell surface binding sites that are expressed at this stage(25). We have shown previously that Ca^{2+} -independent self-aggregation of transformed cell lines is due to crossbridging by hyaluronan of binding sites on adjacent cells; removal of cell surface hyaluronan or saturation of the binding sites inhibits this crossbridging(6, 32). Knudson and Maleski(7) have demonstrated that mesodermal cells from condensation stage limbs, but not cells from pre-condensation limbs, aggregate *in vitro* via such hyaluronan-mediated crossbridging.

Thus we propose that condensation may be explained in

トリクスの容積は減少し、単離された中胚葉細胞を培養した場合には顕著な細胞周辺層の形成は見られない。この細胞周辺層の形成能力の変化には、凝集前の中胚葉細胞と比較すると、凝集期段階の中胚葉細胞が合成するヒアルロナンコンドロイチン硫酸プロテオグリカンに対する比率の大幅な減少を伴っている(5)。

凝集している中胚葉細胞が軟骨細胞へ分化する間に、生体内の細胞は再び広い空間によって隔てられる。培養でも、再び軟骨細胞は巨大な細胞周辺層を形成する。軟骨細胞の周辺層の構造は、発生初期の中胚葉と比較すると、定量的にはプロテオグリカンが優勢になってくるが、依然としてヒアルロナンが主要である(5, 23)。軟骨細胞とは対照的に筋芽細胞の融合は細胞周辺層の消失を伴っており、また、この現象は筋肉分化には必須の過程である。何故ならば、筋芽細胞をヒアルロナンを基質として培養すると、細胞は融合できなくなるからである(12)。このように生体内において、広い細胞間の空間が存在することと、培養した場合、巨大なヒアルロナン依存性の細胞周辺層を形成することとの間には密接な関係が存在する。

C. 肢芽中胚葉の凝集過程におけるヒアルロナンと細胞の間の相互作用の変化

肢芽中胚葉細胞の分化における重要な過程は、すでに述べたように、筋肉と軟骨への最終的な分化に先立って起こる細胞凝集である。この段階で見られるヒアルロナン依存性の細胞周辺層の形成能の喪失とグリコサミノグリカンの合成の変化に並行して、細胞膜に存在するヒアルロナン結合部位が増加する(25)。他の系では、ヒアルロナン結合部位はヒアルロナンを分解するためのエンドサイトーシスに関与していることが知られており(26-28)、したがって細胞凝集時にヒアルロナン結合部位が増加することは、受容体を介したヒアルロナンのエンドサイトーシスの開始あるいは増加と仮定して良いと思われる。ヒアルロナン合成と細胞周辺層形成の低下は、ヒアルロナンのエンドサイトーシス及び分解の増加とあいまって、中胚葉細胞間に存在するマトリクス容積を劇的に減少させ、その結果として"細胞凝集"を可能にするのであろう。

マトリクス容積の減少に至る諸過程に加え、細胞凝集はまた直接的な細胞間相互作用を惹き起こす可能性もある(例えば文献29-31参照)。そのような相互作用のひとつは、凝集期に細胞表面に発現される結合部位とヒアルロナンとの多価結合により惹き起こされる細胞どうしの架橋であろう(25)。われわれはかつて、形質転換した細胞株の Ca^{2+} 非依存性の自己凝集は、隣接した細胞上に存在する結合部位がヒアルロナンによって架橋されることにより惹き起こされることを見いだした。すなわち、細胞表面のヒアルロナンの除去あるいは結合部位の飽和は、この細胞どうしの架橋を阻害する(6, 32)。KnudsonとMaleski(7)は凝集期の肢芽中胚葉細胞は、培養した場合、このようなヒアルロナンを介する架橋によって凝集し、凝集前の肢芽中胚葉細胞では、そうではないことを示した。

従って、我々は、細胞凝集は、以下に述べる過程によってその殆どが説明されると考える。

1) 細胞凝集の開始を可能にする、既存のヒアルロナンの受容体

DIFFERENTIATION OF CHONDROCYTES FROM LIMB MESODERM

Fig. 1. The hypothesized role of hyaluronan-cell interaction in mesodermal condensation and chondrocyte differentiation.
From ref. 51.

large part by the following events (see Fig. 1):

- 1) Receptor-mediated endocytosis of pre-existing pericellular hyaluronan, to permit condensation to begin;
- 2) Decreased hyaluronan synthesis and cessation of coat assembly, to permit condensation to continue;
- 3) Hyaluronan-mediated crossbridging of cells, to stabilize the condensate.

D. Hyaluronan-Cell Interactions in Cartilage Differentiation

Recent studies in our laboratory (Turner, Banerjee and Toole, unpublished results) have shown that interference with binding of hyaluronan, presumably at the surface of mesodermal cells, blocks chondrogenesis as assessed in the micromass culture system of Solursh and colleagues (33). In these studies, chondrogenesis was blocked by treatment of mesodermal cells either with the monoclonal antibody, MAb IVd4, to chick embryo hyaluronan-binding protein or with hyaluronan hexasaccharide which also disrupts binding of polymeric hyaluronan to binding protein. However, further experiments are necessary to distinguish whether hyaluronan and hyaluronan-binding pro-

を介したエンドサイトーシス

- 2) 細胞凝集を持続させる、ヒアルロン酸合成の低下と細胞周囲層形成の停止
- 3) 細胞凝集状態を安定化させる、ヒアルロン酸を介した細胞どうしの架橋

D. 軟骨分化におけるヒアルロン酸と細胞の間の相互作用

最近の我々の研究で (Turner, Banerjee 及び Toole、未公表結果)、Solurshら (33) によって開発された微量培養系で見られる軟骨分化は、おそらく中胚葉の細胞表面に対するヒアルロン酸の結合を阻害することによって抑制されることがわかっている。また、この研究では、中胚葉細胞をニワトリ胚のヒアルロン酸結合蛋白質に対する単クローン抗体である MAb IVd4 で処理したり、あるいは、重合性ヒアルロン酸が結合蛋白質に対して結合するのを阻害するヒアルロン酸の六糖体で処理することによっても軟骨分化が抑制された。しかしながら、ヒアルロン酸とヒアルロン酸結合蛋白質が、以下に述べるマトリクス構築に加え、細胞凝集あるいは細胞分化に直接に関与しているかどうか判断するためには更に研究が必要である。

多くの研究が、成熟した軟骨細胞によるマトリクス構築にヒア

teins are directly involved in cell aggregation or differentiation in addition to their role in matrix assembly, discussed below.

Many studies indicate that hyaluronan plays an important role in matrix assembly by mature chondrocytes; for example, the well-documented interaction of hyaluronan with link protein and proteoglycan is central to the structure of cartilage matrix(34). Recent evidence indicates that retention of hyaluronan-proteoglycan aggregates in the pericellular matrix by binding to other hyaluronan-binding proteins is also important. As mentioned above, chondrocytes in culture exhibit pericellular coats that have provided a useful *in vitro* model for studying the pericellular matrix of chondrocytes. Using this system it has been shown, first, that chondrocyte coats are destroyed by treatment with hyaluronan-specific hyaluronidase, and that this loss of coats is accompanied by release of much of the proteoglycan associated with the chondrocyte cell layer, thus indicating that it was retained in the cell layer by interaction with hyaluronan(23, 35). Second, production of these pericellular coats by chondrocytes is inhibited by hyaluronan hexasaccharide(36) or the antibody to hyaluronan-binding protein, MAb IVd4(Yu, Banerjee and Toole, unpublished results). MAb IVd4 reacts strongly with embryonic cartilage but only after treatment of the tissue with hyaluronan-specific hyaluronidase, implying that the binding protein is also occupied by hyaluronan *in vivo*. The relationship of the proteins recognized by MAb IVd4 to other hyaluronan-binding proteins in cartilage(35, 37) is not yet known. Third, pericellular coats can be rebuilt around cells that exhibit hyaluronan-binding sites, but not around cells lacking such sites, by addition of hyaluronan and cartilage proteoglycan. This process is inhibited in the presence of hyaluronan hexasaccharide(38). Since hyaluronan hexasaccharide does not inhibit hyaluronan-link protein or hyaluronan-proteoglycan binding(39) but does inhibit hyaluronan interaction with the proteins recognized by MAb IVd4(19), we conclude that hyaluronan-proteoglycan aggregates are retained in the pericellular matrix or at the chondrocyte surface by interaction with the hyaluronan-binding proteins recognized by MAb IVd4(Fig. 1).

E. Regulation of Hyaluronan Synthesis and Coat Formation

A positive relationship appears to exist between hyaluronan synthesis and cell proliferation(9), two prominent activities during the earliest stages of limb development. Basic FGF is a major growth factor in the early developing limb. The amount of this factor is highest in pre-condensation stage limb buds, when hyaluronan synthesis and cell proliferation are maximal, and decreases during subsequent condensation and differentiation of the mesoderm(40, 41). Basic FGF stimulates hyaluronan synthesis and hyaluronan-dependent coat formation in cultures of limb mesoderm(42). Thus FGF may be important in the coordinated regulation of cell proliferation, hyaluronan synthesis and pericellular matrix assembly in the pre-

ルロンが重要な役割を果たしていることを示している。例えば、十分証明されているように、ヒアルロンタンとリンク蛋白質及びプロテオグリカンとの相互作用は、軟骨マトリクス構造を形成する上で中心的な機能を果たしている(34)。近年の研究によると、細胞周辺マトリクス内でのヒアルロンタン-プロテオグリカン会合体を、他のヒアルロンタン結合蛋白質を介した結合によって保持することもまた重要であることが示されている。すでに述べたように、培養された軟骨細胞は細胞周辺層を形成するので、軟骨細胞の細胞周辺マトリクスを研究する上で有用な *in vitro* のモデルとなる。この系を用いることにより、次のことが示されてきた。第一は、ヒアルロンタン特異的なヒアルロニダーゼで処理することにより、軟骨細胞の細胞周辺層は破壊され、さらに細胞周辺層の消失には軟骨細胞層に存在するプロテオグリカンの多量の放出を伴うことが明かにされており、このことはプロテオグリカンはヒアルロンタンとの相互作用によって軟骨細胞に保持されていることを意味するものである(23, 35)。第二は、軟骨細胞によるこれら細胞周辺層の形成が、ヒアルロンタンの六糖体(36)あるいはヒアルロンタン結合蛋白質に対する単クローン抗体 MAb IVd4 で処理することにより阻害されることである(Yu, Banerjee 及び Toole, 未公表結果)。MAb IVd4 は胚の軟骨と強固に反応するが、それが見られるのは組織をヒアルロンタン特異的なヒアルロニダーゼで処理した場合のみであることから、生体内でもヒアルロンタン結合蛋白質はヒアルロンタンによって占有されていると思われる。MAb IVd4 によって認識される蛋白質と軟骨に存在する他のヒアルロンタン結合蛋白質(35, 37)との関係は今のところ不明である。第三は、破壊された細胞周辺層は、ヒアルロンタンと軟骨プロテオグリカンを添加することにより、ヒアルロンタン結合部位を有する細胞の周辺には再構築されるが、結合部位を欠いた細胞の周辺では見られないことである。この過程は、ヒアルロンタンの六糖体の存在下で阻害される(38)。ヒアルロンタンの六糖体は、ヒアルロンタンとリンク蛋白質あるいはヒアルロンタンとプロテオグリカンとの結合は阻害せず(39)、ヒアルロンタンと MAb IVd4 により認識される蛋白質との相互作用を阻害することから(19)、われわれは、ヒアルロンタン-プロテオグリカン会合体は、MAb IVd4 により認識されるヒアルロンタン結合蛋白質と相互作用することによって細胞周辺マトリクスあるいは軟骨細胞の表面に保持されていると考えている(図1)。

E. ヒアルロンタン合成及び細胞周辺層形成の制御

四肢発生の初期段階において、顕著な2つの活性であるヒアルロン酸合成と細胞増殖の間には、明かに関連性があると思われる(9)。塩基性FGFは、発生初期の肢芽において主要な細胞成長因子である。この因子の量は、ヒアルロンタン合成と細胞増殖が最も活発である凝集前の段階の肢芽で最も大となり、続いて起こる中胚葉の凝集及び分化の段階になると減少する(40, 41)。塩基性FGFは、培養された肢芽中胚葉に対してヒアルロンタンの合成とヒアルロンタン依存性の細胞周辺マトリクスの形成を促す(42)。このようにFGFは凝集前の肢芽中胚葉において細胞増殖、ヒアルロンタン合成、及び細胞周辺マトリクスの統括された制御に重要な役割を果たしていると思われる。FGFを含む拡

condensation limb bud mesoderm. Diffusible growth factors, including FGF, have been implicated in the growth regulatory effects of the apical ectodermal ridge and zone of polarizing activity of the early limb bud(43, 44). Therefore it will be of interest to determine whether these regions of the limb also influence hyaluronan-rich matrix assembly, and whether this potential effect contributes to their morphogenetic roles.

Interaction of limb mesoderm and ectoderm is important in the regulation of morphogenesis and differentiation in the limb bud. The subectodermal mesoderm remains non-condensed during premyogenic and prechondrogenic condensation, retaining mesenchymal morphology and large hyaluronan-rich spaces between cells(22). This regionalization of condensed and non-condensed mesoderm appears to be under the control of the ectoderm since factors produced by the ectoderm prevent differentiation of nearby mesoderm to cartilage and cause the retention of mesenchymal characteristics, including hyaluronan-rich intercellular spaces(45-47). We have found that ectodermal cells in culture produce a factor or combination of factors that stimulate hyaluronan synthesis and formation of hyaluronan-dependent coats in condensation-stage mesodermal cells(48). Preliminary evidence suggests that the ectodermal factor(s) includes basic FGF and TGF- β (Knudson, Munaim and Toole, unpublished results). Basic FGF and TGF- β both stimulate coat formation, but only FGF duplicates the effects of the ectodermal factor on glycosaminoglycan synthesis (42). We conclude from these studies that the ectoderm produces a factor(s) that causes subjacent mesoderm to maintain a high rate of hyaluronan synthesis relative to the central condensed mesoderm; this effect can largely be explained by ectodermal production of basic FGF but TGF- β also appears to play a role.

Thus a combination of regulatory factors, including factors related to FGF and TGF- β , may regulate regional matrix production during condensation and other morphogenetic events in the limb bud. Cooperative effects between factors related to FGF and TGF- β have been demonstrated in other morphogenetic systems (see refs. 49,50), and these agents interact with and influence the composition of extracellular matrices. It is anticipated, then, that future research will continue to focus on their important role in regulation of early morphogenetic events in the limb.

散性の細胞成長因子は、発生初期の肢芽に存在する外胚葉性頂堤、及び極性化活性帯における増殖調節作用に関与していると考えられてきた(43, 44)。それゆえに、肢芽のこれらの領域もヒアルロナンを多量に含むマトリクスの構築に影響を与えるかどうか、そしてこの潜在的な作用が、両領域の形態形成における役割に寄与しているのかどうか解析することは興味深いことであろう。

肢芽中胚葉と外胚葉は、肢芽の形態形成と細胞分化の調節に重要な役割を果たしている。外胚葉直下に位置する中胚葉は、他の中胚葉が筋肉及び軟骨分化に先行する細胞凝集を行う間に、非凝集状態に保たれ、間充織の形態とヒアルロナンに富む広い細胞間の空間を維持し続ける(22)。この凝集、非凝集状態の中胚葉の部域化は、外胚葉によって制御されていると思われる。なぜなら、外胚葉で産生される因子は、近傍に位置する中胚葉の軟骨分化を抑制し、ヒアルロナンに富んだ細胞間空間などの間充織の特徴を維持し続けるからである(45-47)。我々は、培養された外胚葉が、細胞凝集段階にある中胚葉細胞に対してヒアルロナン合成とヒアルロナン依存性の細胞周辺層の形成を促す単一あるいは複合因子を生産することを見いだした(48)。予備実験の結果から、外胚葉の因子(群)には、塩基性FGF及びTGF- β が含まれていることが示唆されている(Knudson、Munaim及びToole、未公表結果)。塩基性FGFとTGF- β は共に細胞周辺層の形成を促進するが、FGFのみが外胚葉性因子のグリコサミノグリカン合成に対する作用を再現できる(42)。我々は、これらの研究から外胚葉は、その直下に位置する中胚葉のヒアルロナン合成能を、中心部に位置する凝集状態の中胚葉に較べて高い状態に維持する因子(群)を生産している、つまり、この作用はTGF- β も役割を果たしていると思われるが、外胚葉が生産する塩基性FGFが主体になって作用していると考えている。

このように、FGF、TGF- β に類似する因子を含む調節因子の組み合わせによって、肢芽の細胞凝集及び他の形態形成過程における部域的なマトリクス合成の制御がなされているのかもしれない。FGF及びTGF- β に類似する因子間の協同的な作用は、他の形態形成系でも示されており(文献49,50参照)、さらに、これらの作用物質は、細胞外マトリクスの構成成分と相互作用し影響を与える。したがって、今後、これらの因子群が果たす四肢の初期形態形成過程の制御における重要な役割に対して、研究の焦点が当てられてゆくことが予想される。

三菱化成生命科学研究所 神経発生学
内山 孝司 訳

References

1. Toole, B.P. (1981) in Cell Biology of Extracellular Matrix (Hay, E.D., ed.) pp. 259-294, Plenum, New York
2. Comper, W.D., and Laurent, T.C. (1978) *Physiol. Rev.* **58**, 255-315
3. Meyer, F.A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **755**, 388-399
4. Morris-Wiman, J., and Brinkley, L.L. (1990) *Anat. Rec.* **226**, 383-395
5. Knudson, C.B., and Toole, B.P. (1985) *Develop. Biol.* **112**, 308-318
6. Underhill, C.B., and Toole, B.P. (1981) *Exp. Cell Res.* **131**, 419-423
7. Knudson, C.B. and Maleski, M.P. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 141a
8. Barnhart, B.J., Cox, S.H., and Kraemer, P.M. (1979) *Exp. Cell Res.* **119**, 327-332
9. Brecht, M., Mayer, U., Schlosser, E., and Prehm, P. (1986) *Biochem. J.* **239**, 445-450

10. Turley, E.A., Bowman, P., and Kytryk, M.A. (1985) *J. Cell Sci.* **78**, 133-145
11. Schor, S.L., Schor, A.M., Grey, A.M., Chen, J., Rushton, G., Grant, M.E., and Ellis, I. (1989) *In Vitro Cell Develop. Biol.* **25**, 737-746
12. Kujawa, M.J., Pechak, D.G., Fiszman, M.Y., and Caplan, A.I. (1986) *Develop. Biol.* **113**, 10-16
13. Toole, B.P. (1990) *Current Opinion Cell. Biol.* **2**, 839-844
14. Underhill, C.B., Green, S.J., Comoglio, P.M., and Tarone, G. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 13142-13146
15. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., and Seed, B. (1990) *Cell* **61**, 1303-1313
16. Culty, M., Miyake, K., Kincade, P.W., Sikorski, E., Butcher, E.C., and Underhill, C. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 2765-2774
17. Lesley, J., Schulte, R., and Hyman, R. (1990) *Exp. Cell Res.* **187**, 224-233
18. Miyake, K., Underhill, C.B., Lesley, J., and Kincade, P.W. (1990) *J. Exp. Med.* **172**, 69-75
19. Banerjee, S.D., and Toole, B.P. (1991) *Develop. Biol.* **146**, 186-197
20. Brown, T.A., Bouchard, T., St. John, T., Wayner, E., and Carter, W.G. (1991) *J. Cell Biol.* **113**, 207-221
21. Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., and Seed, B. (1991) *EMBO J.* **10**, 343-348
22. Singley, C.T., and Solursh, M. (1981) *Develop. Biol.* **84**, 102-120
23. Goldberg, R.L., and Toole, B.P. (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 2114-2122
24. Orkin, R.W., Knudson, W., and Toole, B.P. (1985) *Develop. Biol.* **107**, 527-530
25. Knudson, C.B., and Toole, B.P. (1987) *Develop. Biol.* **124**, 82-90
26. Laurent, T.C., Fraser, J.R.E., Pertoft, H., and Smedsrod, B. (1986) *Biochem. J.* **234**, 653-658
27. McGuire, P.G., Castellot, J.J., and Orkin, R.W. (1987) *J. Cell. Physiol.* **133**, 267-276
28. McGary, C.T., Raja, R.H., and Weigel, P.H. (1989) *Biochem. J.* **257**, 875-884
29. Knudsen, K.A., Myers, L., and McElwee, S.A. (1990) *Exp. Cell Res.* **188**, 175-184
30. Bee, J.A., and von der Mark, K. (1990) *J. Cell Sci.* **96**, 527-536
31. Coelho, C.N., and Kosher, R.A. (1991) *Develop. Biol.* **144**, 47-53
32. Underhill, C.B. (1982) *J. Cell Sci.* **56**, 177-189
33. Solursh, M., Ahrens, P.B., and Reiter, R.S. (1978) *In Vitro* **14**, 51-61
34. Hascall, V.C., and Hascall, G.K. (1981) in *Cell Biology of Extracellular Matrix* (Hay, E.D., ed.) pp 39-63, Plenum, New York
35. McCarthy, M.T., and Toole, B.P., (1989) *J. Cell. Physiol.* **141**, 191-202
36. Knudson, C.B., and Kuettner, K.E. (1990) *Orthop. Trans* **14**, 370
37. Crossman, M.V., and Mason, R.M. (1990) *Biochem. J.* **266**, 399-406
38. Knudson, W., and Knudson, C.B. (1991) *J. Cell Sci.* **99**, 227-235
39. Tengblad, A. (1981) *Biochem. J.* **199**, 297-305
40. Munaim, S.I., Klagsbrun, M., and Toole, B.P. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8091-8093
41. Seed, J., Olwin, B.B., and Hauschka, S.D. (1988) *Develop. Biol.* **128**, 50-57
42. Munaim, S.I., Klagsbrun, M., and Toole, B.P. (1990) *Develop. Biol.* **143**, 297-302
43. Bell, K.M., and McLachlan, J.C. (1985) *J. Embryol. Exp. Morphol.* **86**, 219-226
44. Aono, H., and Ide, H. (1988) *Develop. Biol.* **128**, 136-141
45. Solursh, M., Singley, C.T., and Reiter, R.S. (1981) *Develop. Biol.* **86**, 471-482
46. Hurle, J.M., Ganam, Y., and Macias, D. (1989) *Develop. Biol.* **132**, 368-374
47. Solursh, M. (1990) *Seminars Develop. Biol.* **1**, 45-53
48. Knudson, C.B., and Toole, B.P. (1988) *Biochem. Intl.* **17**, 735-745
49. Smith, J.C. (1989) *Development* **105**, 665-677
50. Whitman, M., and Melton, D.A. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 93-117
51. Toole, B.P., Munaim, S.I., Welles, S., and Knudson, C.B. (1989) *Ciba Found. Symp.* **143**, 138-149

Please Cite Minireviews and Other Articles of TIGG in Your Paper!

As you see in the cumulative contents of *Trends Glycosci. Glycotechnol.* Vol. 3(pp.138-141), this journal contains a lot of useful informations. Please cite *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, when you write your paper. Citation data of *Trends Glycosci. Glycotechnol.* are very important!

あなたの論文にTIGGのミニレビューやその他の論文を引用して下さい!

Trends Glycosci. Glycotechnol. Vol. 3の総目次(138-141頁)を御覧になればお分かりのように、本誌には有益な沢山の情報が載っています。皆様が論文を書かれる時には*Trends Glycosci. Glycotechnol.*を引用して下さい。*Trends Glycosci. Glycotechnol.*の引用のデータは重要です!