

総 説

CD44 高発現腫瘍と炎症メディエーター

笠 井 慎, 古 市 嘉 行, 杉 田 完 爾

山梨大学医学部小児科

要 旨：炎症性細胞や癌細胞は CD44 を高発現していることが知られている。一方細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) や間葉系細胞は CD44 の主要なリガンドである hyaluronan (hyaluronic acid, HA) を多量に有しているため、CD44-HA 相互作用の場として、炎症や癌細胞の生存・増殖に重要な役割を果たしている。最近の研究により HA の機能はポリマー鎖の長さ (molecular size) により異なることが明らかとなってきたが、我々は CD44 を高発現している *B-precursor acute lymphoblastic leukemia* (ALL) 細胞株を炎症メディエーターである超低分子量 HA (ultra-low-molecular-weight HA, ULMW-HA) を用いて刺激すると細胞死が誘導されることを見出した。この細胞死は ROS の細胞内蓄積と HMGB1 の細胞外放出を伴うネクローシスが主体であった。炎症時における CD44-HA 相互作用の詳細な機能や、CD44 高発現腫瘍細胞の生物学的特性についての理解が深まることにより、CD44 を標的とした悪性腫瘍の新たな治療が可能になるかもしれない。

キーワード CD44, 炎症メディエーター (inflammatory mediator), hyaluronan (HA), 細胞外マトリックス (ECM), reactive oxygen species (ROS)

I. はじめに

炎症とは、感染、腫瘍、物理的・化学的刺激などに対する生体の防御機構である。炎症部位においては、CD44 を高発現した炎症性細胞と、hyaluronan (hyaluronic acid, HA) を多量に含有している細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) が、CD44-HA 相互作用を介して、細胞の遊走、血管新生、組織修復など様々な段階の制御機構に関与している¹⁾。

一方、腫瘍性疾患においても、CD44-HA 相互作用の生物学的特性が注目され、癌 (幹) 細胞での CD44 発現量や CD44 variant isoforms 発現、機能などが解明されるに従い、癌細胞の生存・増殖や転移に ECM が重要な役割を果た

していることが明らかとなってきた。

本総説では、炎症時における CD44-HA 相互作用の役割と、CD44 高発現腫瘍細胞の生物学的特性について、これまでに明らかにされた知見をまとめるとともに、我々の研究室で新たに得られた CD44 高発現 *B-precursor acute lymphoblastic leukemia* (ALL) 細胞に関する研究結果を報告する。

II. CD44 と Hyaluronan

1. CD44

CD44 は細胞内ドメインを持つ 1 回膜貫通型糖蛋白質で HA の主要な受容体である。HA 以外にも fibronectin, collagens, osteopontin, matrix metalloproteinases (MMPs) がリガンドとして存在する。受容体構造としては細胞外ドメイン遠位側が HA の結合に関与し、近位側は

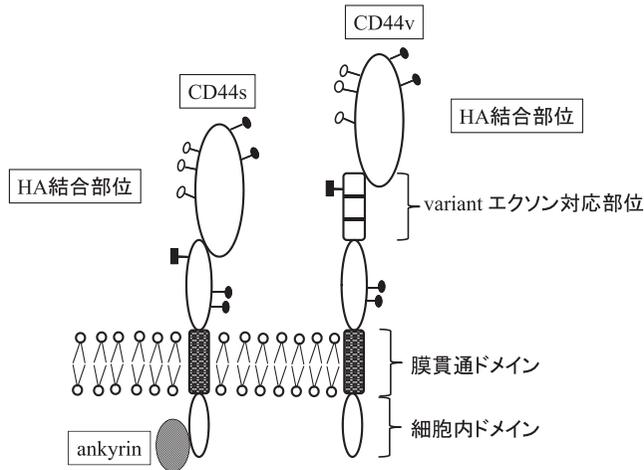


図1. CD44 の構造

CD44 は1回膜貫通型糖蛋白質で Hyaluronan (HA) の主要な受容体である。CD44s; 標準型 CD44 (CD44 standard), CD44v; CD44 variant isoforms, ankyrin; 細胞膜裏打ち蛋白質。

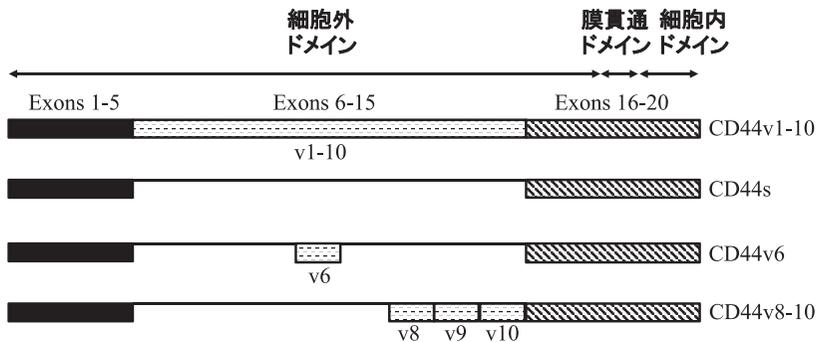


図2. CD44 遺伝子

選択的スプライシングにより、いくつものアイソフォームが存在する。CD44s はエクソン 1-5, 16-20 によってコードされる蛋白質からなる。CD44v6 は CD44s にエクソン 11 を CD44v8-10 はエクソン 13-15 をそれぞれ含んだスプライシングバリエーション。

CD44mRNA が選択的スプライシングを受ける部位である。細胞内ドメインは細胞骨格及びシグナリング蛋白質と相互作用する部位である(図1)。

CD44 はヒト細胞のほぼ全ての細胞膜に発現しており、発現量は組織により異なる²⁾。CD44 の遺伝子はヒト第11染色体短腕上に存在し20のエクソンのうち10のエクソンに対

する選択的スプライシングにより複数種類の成熟 mRNA が形成される。このため、CD44 にはいくつもの isoform が存在し、エクソン 6-15 (variant exons 1-10, v1-10) の選択的スプライシングにより合成される³⁾(図2)。主要な isoform である標準型 CD44 (CD44s) はエクソン 1-5, 16-20 によってコードされる蛋白質からなる。多様な細胞に発現し、主に造血

系細胞において高発現している。一方、CD44 variant isoforms (CD44v) は、正常細胞では発現していないがある種の癌細胞では高発現しており、CD44v6⁴⁾ や CD44v8-10⁵⁾ は悪性度や転移能が高い腫瘍に発現があると報告されている。胃癌、乳癌などの様々な固形癌においては、膜貫通ドメインと細胞内ドメインを欠いた可溶性 CD44 が存在し、その血中濃度と病期との間に相関を認めるため、癌幹細胞マーカーとして用いられている⁶⁾。

CD44 は、リンパ球のホーミング、細胞の凝集、細胞-細胞間接着、細胞-ECM 間のシグナリング、ECM の保持力の形成及び HA の細胞内への取り込みと分解、血管形成、癌細胞の増殖・転移など種々の機能に関与している。

2. Hyaluronan (HA)

HA は N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とグルクロン酸 (GlcA) の二糖の単純な繰り返しユニットからなり、分子量は最大で 2.0×10^7 Da に及ぶ高分子グリコサミノグリカン (GAGs) 鎖である⁷⁾。ECM において多数のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンと非共有結合で会合し、複合体を形成する。正常組織において HA は平均分子量 1.0×10^7 Da 程度の high molecular weight HA (HMW-HA) として存在している。

HA の合成過程では、これまで3つの HA 合成酵素 (hyaluronan synthase, HAS) が確認されており、HAS1 と HAS2 は分子量の大きい 2.0×10^6 Da 以上の HMW-HA を合成し⁸⁾、HAS3 は 2.0×10^5 Da 以下の low molecular weight HA (LMW-HA), ultra low molecular weight HA (ULMW-HA) を合成する⁹⁾。まず細胞膜内側表面で HAS により HA は合成され、細胞間隙に移動し、そこでポリマー鎖が延長されていく。種々の癌組織では HAS 遺伝子の発現が亢進し HA の産生量が正常細胞に比べて高くなり、癌細胞の浸潤と関連することが示唆されている^{10,11)}。

HA のターンオーバーは非常に速く、血管内での半減期はおよそ 2-5 分である¹²⁾。HA の分

解は hyaluronidase (Hyal) によって調整されており、これまでに7つの hyaluronidase-like enzymes が確認されている。まず細胞膜に存在する hyaluronidase-2 (Hyal-2) が 2.0×10^4 Da 程度のフラグメントまで HA を分解する。その後 HA フラグメントはエンドサイトーシスによりライソゾームに運ばれ hyaluronidase-1 (Hyal-1) によってさらに消化される¹³⁾ (図3)。

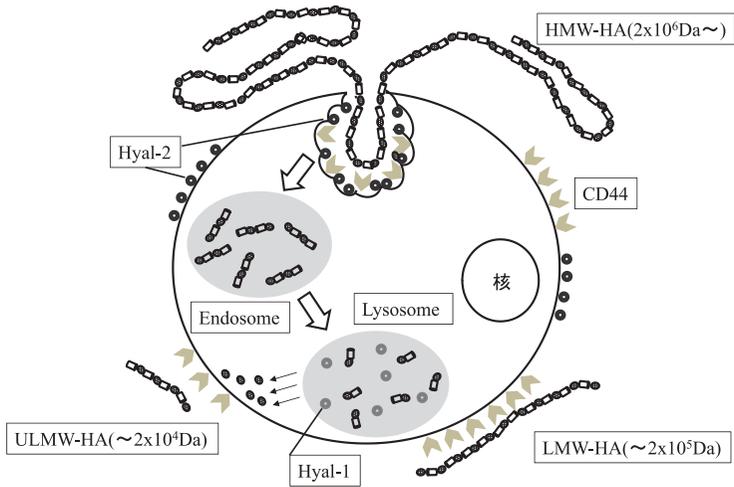
HA は非常に多量の水分子と結合する能力を持ち、皮膚や関節内に多量に存在し粘弾性の保持に重要な役割を果たしている。またリガンドの機能としては CD44-HA 相互作用によりマトリックスの形成や細胞の増殖及び遊走など様々な機能を有している¹⁴⁾。

Ⅲ. CD44 と炎症

組織損傷からの治癒過程においては、炎症、細胞の遊走と凝集、血管新生、リモデリング、組織形成が主要な段階となる。ECM はこの組織修復段階において重要な役割を果たしている。通常は ECM 中の HA 量によって fibroblast growth factor receptor (FGFR) が活性化され HAS 合成が促進されることで HA 量は調節されている。一方、組織損傷や炎症性疾患、悪性腫瘍における炎症の部位では ECM 中の HA 量が増加することが報告されている^{15,16)}。

CD44 は好中球、リンパ球、macrophage などの炎症性細胞に高発現している。組織損傷により炎症が起きると、その炎症部位において HA の合成が促進されると同時に炎症性メディエーターが放出され CD44 と HA の結合活性が高まる。

炎症によりこれらの炎症性細胞は血管内皮細胞のセレクチンに弱く結合し、内皮細胞の表面をローリングし始める。次に炎症性細胞に発現しているインテグリンリガンドである ICAM-1, VCAM-1 に血管内皮壁由来のインテグリンが結合することで強固な接着を形成し、炎症部位へ移動する。IL-1, TNF- α などの炎症性サイトカインが血管内皮上の HA の保持力を高



Update on the Mammalian Hyaluronidases. May. 18, 2004より引用、一部改変

図3. 細胞内への Hyaluronan (HA) の取り込み及び分解

Hyal; hyaluronidase, HMW-HA; high molecular weight HA, LMW-HA; low molecular weight HA, ULMW-HA; ultra low molecular weight HA

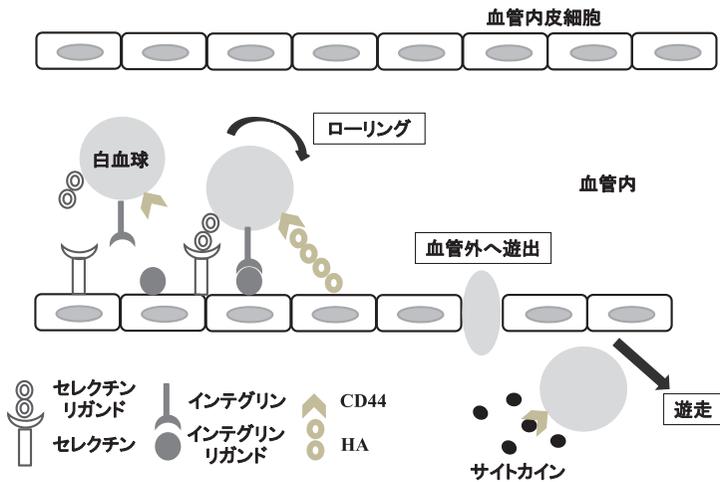


図4. 炎症性細胞のローリング, 接着, 血管外への遊走

め, 血流の剪断応力に抵抗した HA を増やすことで, CD44-HA 相互作用によりリンパ球のローリングはさらに促進される^{17,18)}。CD44 は HA との結合以外にもサイトカインや成長因子, ECM 構成物である fibronectin などの細胞接着因子に結合する領域を有している (図4)。

CD44-HA 相互作用により周囲の組織から損傷環境にローリングしてきた好中球やリンパ球などの炎症性細胞は, 細胞接着因子により細胞-ECM 間接着を形成し, 細胞の凝集を引き起こす。その結果, 組織修復を促進させる¹⁹⁾。

損傷組織において産生されたフリーラジカ

ルや reactive oxygen species (ROS) によって HMW-HA は 5.0×10^4 Da 程度にまでフラグメント化され LMW-HA となる²⁰⁾。ROS は p38MAPK を介して Hyal-2 遺伝子の発現を刺激し、HA を分解すると考えられている²¹⁾。細胞表面に発現している CD44 はフラグメント化された LMW-HA を細胞内に取り込むことで、ストレス下にあることを細胞に伝える²²⁾と同時に、細胞 - ECM 間のシグナリングを細胞内へ伝達する。LMW-HA により刺激を受けたマクロファージは、MMP-12, plasminogen activator inhibitor-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β , IL-8, IL-12 などのサイトカインやケモカインの発現を促進する²³⁾。以上より LMW-HA は炎症前駆作用に関与していると考えられている²⁴⁾。炎症性肺疾患においてマクロファージの表面に発現する CD44 をブロックすることで細胞 - ECM 間のシグナリングが活性化せずに修復過程が遅れたとする報告がある²⁵⁾。

組織損傷から治癒への次の段階では、血管新生が炎症性メディエーターにより促進される。新生血管は炎症組織へ酸素と栄養を供給することで炎症を慢性化させ、新たな炎症細胞を送り込む。HA は血管内皮細胞との相互作用により血管新生を調節する役割を担っている。炎症の初期においてはフラグメント化された LMW-HA が蓄積して炎症を惹起し、血管新生を促進する方向へ作用するが、LMW-HA が細胞内で排除されるとその後はマクロファージによって好中球やリンパ球などの炎症性細胞の貪食や apoptosis が促進され、ECM 中の HA は HMW-HA に回復する。HMW-HA は内皮細胞の増加や炎症性細胞の遊走を減弱させることで血管新生を阻害する方向へ作用する。また、抗酸化作用として白血球の DNA ダメージを減弱させることに寄与している。CD44 に HMW-HA が結合することで細胞膜をコーティングし、cell death receptor がマスクされ、その結果 apoptosis が回避できることが確認されている²⁶⁾。

このように HA の機能はポリマー鎖の長さ (molecular size) により異なり、LMW-HA は炎症前駆作用として働き、HMW-HA は pro-survival シグナルを介して抗炎症作用及び抗酸化作用に働くものと考えられている²⁷⁾。

CD44 と炎症性疾患の関わりについてはこれまで広範な研究が行われ、例えば慢性炎症における癌への進展や、2 型糖尿病での脂肪細胞の炎症と高血糖、慢性関節リウマチなど、様々な分野で CD44 の発現量や variant、機能調節が研究対象となってきている²⁸⁻³¹⁾。

IV. CD44 と造血器腫瘍

造血幹細胞 (hematopoietic stem cells, HSC) とは自己複製能と多分化能を保持している細胞であり、骨髄内のニッチ (niche) と呼ばれる微小環境に存在している。ニッチは造血細胞の増殖、分化、生存を維持する ECM ネットワークを形成する。HSC はニッチにおいて主に細胞周期の静止期 (G0 期) の状態に在るが、ひとたび血球産生の需要が高まるとニッチから動員されて細胞周期に入り各種の血球細胞産生を行う。ニッチとの接着因子として β 1-インテグリンやホーミングのためのケモカインとして CXCL12 とその受容体 CXCR-4, CXCR-12 などがある。炎症や造血器腫瘍によりニッチの機能が障害されると、正常な造血機能の恒常性は失われ、例えば感染症により骨髄の CXCR-12 が減少するとの報告もある³²⁾。

白血病幹細胞もまた、ニッチに接着し増殖していくが、白血病幹細胞の主要な接着因子の 1 つが CD44 であり^{33,34)} 白血病幹細胞はニッチにおける主要なグリコサミノグリカンである HA と CD44 を介して接着することで生存及び増殖すると考えられている³⁵⁾。

一般に、癌幹細胞は細胞死を回避するために細胞内の ROS を低く保つことが重要である。ROS は酸化ストレスの主な原因物質の 1 つであり、細胞内 ROS の蓄積は酸化ストレスシグナルである p38MAPK や p21 の活性化を

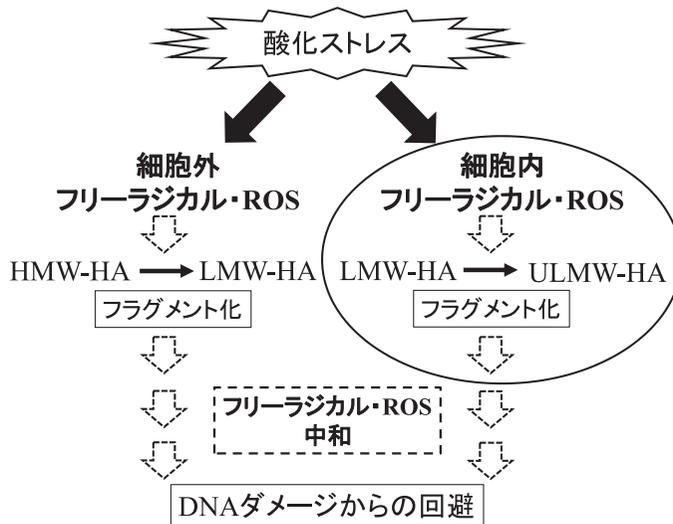


図5. HAのフラグメント化に伴うフリーラジカル及びROSの中和
 HMW-HA; high molecular weight HA, LMW-HA; low molecular weight HA, ULMW-HA; ultra low molecular weight HA, ROS; reactive oxygen species

誘導し、癌の増殖を抑制する。消化器系癌細胞株を用いた研究において、CD44v 高発現細胞株は CD44v 低発現細胞株と比較し、細胞内 ROS が蓄積しにくいとの報告がある³⁶⁾。これは CD44v 高発現細胞株ではシスチントランスポーターが細胞膜に安定化されることでグルタチオンの生成を亢進し、細胞内酸化ストレスを回避していると考えられている。他にも、細胞内に取り込まれた ULMW-HA (6×10^4 Da) がさらに分解される過程で細胞内の ROS やフリーラジカルを中和することで DNA ダメージを減弱させるとする報告がある^{37,38)}。一方で、同様の機序により ECM に放出された ROS は、高分子の HA が分解される過程で中和し周囲の細胞をダメージから回避していると考えられている (図5)³⁹⁾。

即ち定常的な状態においては、白血病幹細胞および白血病細胞は CD44-HA 相互作用を介して酸化ストレスを回避していると考えられている。

V. 当教室での研究結果

この節では CD44 高発現白血病細胞株を用いた CD44-HA 相互作用に関する当教室での研究結果を報告する。

1. CD44-HA 相互作用

小児急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) は近年、多剤併用化学療法や分子標的療法剤、造血幹細胞移植療法の進歩により治療成績が飛躍的に向上し⁴⁰⁾、当院においても生存率は 80% を超えている⁴¹⁾。しかし、Philadelphia 染色体陽性 (Ph^+) ALL や *mix-lineage leukemia* (*MLL*) 遺伝子再構成陽性 ALL (*MLL+ALL*) は化学療法に抵抗性を示し、依然として予後不良である。

MLL 遺伝子は染色体 11q23 に座位し、50 以上の遺伝子と再構成を起こし融合遺伝子を形成することで白血病発症を誘導すると考えられている。転座形式は $t(4;11)$, $t(9;11)$, $t(11;19)$ が高頻度に認められる。*MLL+ALL* は特異的な遺伝子発現を示し、高発現遺伝子として CD44

や *Fms-like tyrosine kinase 3* (FLT3) が知られている⁴²⁾。我々は以前、FLT3 ligand (FL) を発現・分泌している骨髓ストローマ細胞に接着した *MLL+ALL* 細胞は FLT3/FL-interaction を介して休眠状態となることで抗白血病剤に対し apoptosis 抵抗性となる可能性があることを報告した⁴³⁾。今回我々は同じく *MLL+ALL* 細胞に高発現している CD44 を HA で刺激したときの生物学的特性について検討した。

我々はまず分子量 1.0×10^4 Da 以下の ULMW-HA を用いて CD44 が高発現している *MLL+ALL* 細胞株 KOPB26 を刺激すると thymidine uptake が強く抑制されることを見出した。一方、 $5.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$ Da の LMW-HA 及び $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ Da の HMW-HA では thymidine uptake は抑制されなかった。さらに CRISPR/Cas9 system を用いたゲノム編集により CD44 を knock down した *MLL+ALL* 細胞株では ULMW-HA 刺激による thymidine uptake の抑制は認められなかった。以上の結果より CD44 と ULMW-HA の相互作用が細胞の thymidine uptake の抑制に重要であることが判明し、また CD44-HA 相互作用により生じる白血病細胞の生物学的特性は HA の molecular size に依存していることが示唆された。

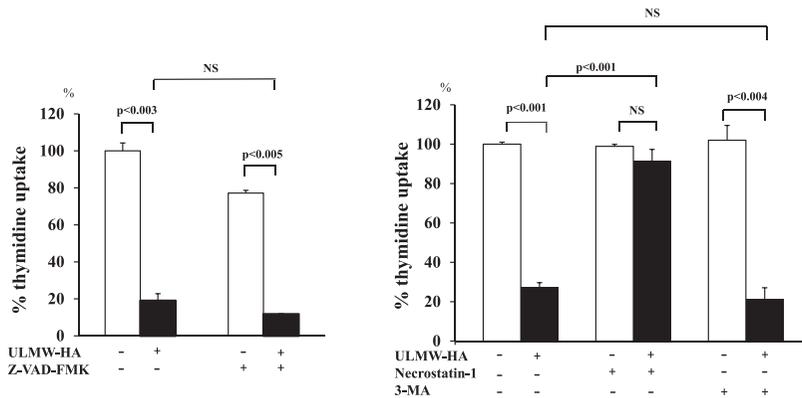
さらに当教室で確立したリンパ球性白血病細胞 15 株 (*B-precursor ALL* 細胞 10 株、T-細胞性 ALL 細胞 5 株) を ULMW-HA で刺激したところ、thymidine uptake 抑制は *MLL+ALL* だけでなく CD44 高発現 *B-precursor ALL* 細胞株でも認められた。しかし、T-細胞性 ALL 細胞株では CD44 の発現量と thymidine uptake 抑制に相関を認めなかった。次に ULMW-HA による thymidine uptake 抑制と CD44 の variant の関連を検討するために *B-precursor ALL* 細胞株と T-細胞性 ALL 細胞株を用いて reverse transcription-PCR 法 (RT-PCR 法) で CD44 splice variant RNAs を調べたところ、全ての細胞株が CD44s を発現していた。一方、*B-precursor ALL* 細胞株の 13 細胞株中 2 株 (CD44 高発現細胞株 KOPB26, CD44 低発現

細胞株 KOCL69) と T-細胞性 ALL 細胞株の 3 細胞株中 1 株 (CD44 低発現細胞株 JURKAT) は CD44s に加え CD44 variant を発現していた。この結果から CD44 variant の発現と ULMW-HA 刺激による thymidine uptake の抑制には関連を認めないことが判明した。

2. CD44 と細胞死

我々はさらに、thymidine uptake の抑制機序を解明するために cell cycle を解析した。CD44 高発現 *MLL+ALL* 細胞株 KOPB26 を ULMW-HA で刺激したところ G0/G1 及び G2 期の細胞数は増えておらず、subdiploid 分画も変化を認めなかった。この結果より thymidine uptake の抑制は cell cycle arrest によるものではないことが確認された。さらに、ULMW-HA 添加後の細胞死を Annexin-V/PI 染色で検討したところ経時的に細胞死が誘導されていることが示された。

我々は細胞死の機序を確認するため、細胞株 KOPB26 に ULMW-HA の刺激下で pancaspase inhibitor Z-VAD-FMK を添加したが細胞死に変化は認められなかった。autophagy inhibitor 3-MA を添加すると有意差は認められなかったが細胞死はむしろ増強された。しかし necrosis inhibitor necrostatin-1 を添加したところ細胞死はほぼ完全に抑制されることが判明した (図 6)。また、ROS detector CM-H2DCFDA を用い flow cytometry で解析したところ ULMW-HA 刺激後 4 日目に約 5 倍の細胞内 ROS の蓄積を認めた。さらに ULMW-HA 刺激後の炎症関連蛋白質 high-mobility protein group box 1 (HMGB1) の動態について解析したところ、HMGB1 は KOPB26 の核内から細胞質内に刺激後早期に蓄積され、その後細胞死とともに細胞外に多量に放出されることを見出した。HMGB1 は通常核内に存在している DNA 結合非ヒストン蛋白であり、apoptosis では細胞外に放出されないが、炎症応答や感染に関連する necrosis や necroptosis に伴って細胞外に放出され、TNF- α などの炎症性サイトカ



Kasai S, et.al.; Cell Death Dis, 8: e2857, 2017.より引用

図6. CD44高発現細胞株 KOPB26の ULMW-HA 刺激による thymidine uptake 抑制への pan-caspase inhibitor, autophagy inhibitor, necrosis inhibitor の影響 (day4)
 $\% \text{ thymidine uptake} = \{1 - [(\text{cpm of treated cells}) / (\text{cpm of untreated cells})]\} \times 100$, Unpaired *t* test, $p < 0.05$; 有意差あり, NS; no significant, Z-VAD-FMK; pan-caspase inhibitor, 3-MA; autophagy inhibitor, necrostatin-1; necrosis inhibitor

インを誘導し炎症を促進することが知られている。また, HMGB1は autophagy を誘導する機能を持ち, 細胞を endotoxemia や細菌感染によるダメージから回避させている可能性が報告されている⁴⁴⁾。

最後に我々は ULMW-HA で刺激後3日目の CD44 高発現 MLL+ALL 細胞株 KOPB26 を, 電子顕微鏡下で観察した (図7)。全細胞の約30%では, 細胞膜の欠損や, 核膜が欠損し濃縮した核, 空胞状のクリステを持つ膨張したミトコンドリアなど, necrosis に特徴的な細胞死を認めた。生細胞の約30%は, 小胞体ストレス (endoplasmic reticulum stress, ER stress) を示唆する形態変化を, 約10%は autophagy を示唆する autophagosome と lysosome が融合した autolysosome を認めた。

発熱を伴う感染症や炎症を機に白血病を含む悪性腫瘍が一時的に自然退縮する症例が多数報告されている^{45,46)}。ULMW-HA は感染症や炎症により間葉系細胞から多量に放出されることが報告されているが⁴⁷⁾, 我々の研究結

果より CD44 高発現 *B-precursor* ALL 細胞はこの ULMW-HA 刺激により, ROS を細胞内に蓄積し necrosis が誘導されることが判明した。また HMGB1 は, ULMW-HA 刺激後, 核内から細胞内に移行し, necrosis に伴う細胞膜の崩壊により細胞外へ放出されることを見出した。放出された HMGB1 は, 炎症性サイトカインとして機能するとともに, 樹状細胞や単球の Toll 様受容体 (TLR; Toll-like receptor) に作用し TNF- α (Tumor necrosis factor α) などの炎症性サイトカインを誘導する。サイトカインにより間葉系細胞は ULMW-HA を大量に放出し, CD44-HA 相互作用はより増強される。このように ULMW-HA 刺激に始まる positive feedback loop が形成されることで (図8), 局所の炎症を機に白血病細胞が necrosis へと誘導されると考えられる⁴⁸⁾。

VI. まとめ

炎症と, 悪性腫瘍の生存・増殖及び転移の機

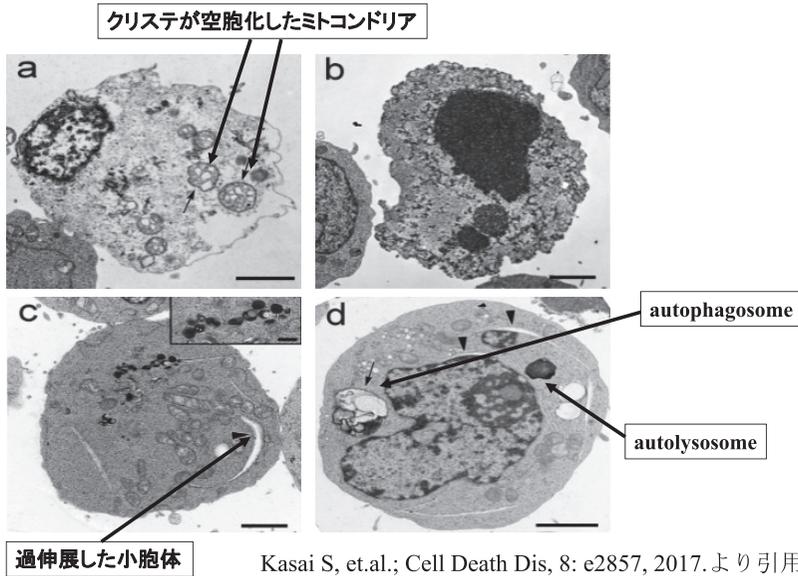


図7. CD44 高発現細胞株 KOPB26 の ULMW-HA 刺激による透過電顕像 (day3)

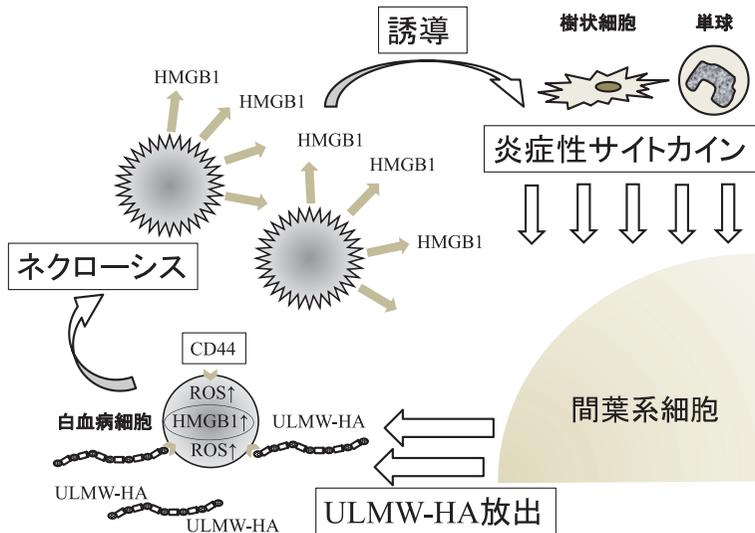


図8. 炎症時に起こると予想される positive feedback loop と CD44 高発現 B-precursor ALL の necrosis 誘導のシエマ

序においては、ともに CD44-HA 相互作用が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。以前より、発熱を伴う急性感染症に罹患すると悪性腫瘍が一時的に退縮したとの臨床報

告が多数認められるが、ULMW-HA と CD44 の相互作用による細胞死誘導はこの退縮現象の理解の一助となるものと考えられた。HA は炎症においても、癌細胞の生物学的特性におい

でも molecular size によりその機能が異なるが ULMW-HA の機能を模した化合物や抗 CD44 抗体の開発により, CD44 を標的とした CD44 高発現癌細胞への治療も可能となるかもしれない。

VII. 引用文献

- 1) Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T: Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds*, 28(3): 78–88, 2016.
- 2) Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B: CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, 61(7): 1303–1313, 1990.
- 3) Clare MI, Helen Y: The hyaluronan receptor, CD44. *The Int J Biochem Cell Biol*, 34(7): 718–721, 1999.
- 4) Wang JL, Su WY, Lin YW, Xiong H, Chen YX, *et al.*: CD44v6 overexpression related to metastasis and poor prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(8): 12866–12876, 2017.
- 5) Lau WM, Teng E, Chong HS, Lopez KA, Tay AY, *et al.*: CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells. *Cancer Res*, 74(9): 2630–2641, 2014.
- 6) Yu Q, Toole BP: A new alternatively spliced exon between v9 and v10 provides a molecular basis for synthesis of soluble CD44. *J Biol Chem*, 271(34): 20603–20607, 1996.
- 7) Weigel PH, Hascall VC, Tammi M: Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*, 272(22): 13997–14000, 1997.
- 8) Itano N, Kimata K: Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*, 54(4): 195–199, 2002.
- 9) Aya KL, Stern R: Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. *Wound Repair Regen*, 22(5): 579–593, 2014.
- 10) Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, Tammi M, Agren U, *et al.*: Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am J Pathol*, 156(2): 529–536, 2000.
- 11) Itano N, Sawai T, Miyaishi O, Kimata K: Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res*, 59(10): 2499–2504, 1999.
- 12) Reed RK, Laurent UB, Fraser JR, Laurent TC: Removal rate of [3H] hyaluronan injected subcutaneously in rabbits. *Am J Physiol*, 259(2 Pt 2): H532–H535, 1990.
- 13) Stern R, Jedrzejak MJ: Hyaluronidase: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev*, 106(3): 818–839, 2006.
- 14) Petrey AC, de la Motte CA: Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol*, 5: 101, 2014.
- 15) Lipponen P, Aaltomaa S, Tammi R, Tammi M, Agren U, *et al.*: High stromal hyaluronan level is associated with poor differentiation and metastasis in prostate cancer. *Eur J Cancer*, 37(7): 849–856, 2001.
- 16) Kosaki R, Watanabe K, Yamaguchi Y: Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res*, 59(5): 1141–1145, 1999.
- 17) Nandi A, Estess P, Siegelman MH: Hyaluronan anchoring and regulation on the functionally active form of CD44. *J Biol Chem*, 275(20): 14939–14948, 2000.
- 18) Clark RA, Alon R, Springer TA: CD44 and hyaluronan-dependent rolling interactions of lymphocytes on tonsillar stroma. *J Cell Biol*, 134(4): 1075–1087, 1996.
- 19) Svec K, White J, Vaillant P, Jessurun J, Roongta U, *et al.*: Acute lung injury fibroblast migration and invasion of a fibrin matrix is mediated by CD44. *J Clin Invest*, 98(8): 1713–1727, 1996.
- 20) Longaker MT, Chiu ES, Adzick NS, Stern M, Harrison MR, *et al.*: Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Ann Surg*, 213(4): 292–296, 1991.
- 21) Nikitovic D, Tzardi M, Berdiaki A, Tsatsakis A, Tzanakakis GN: Cancer microenvironment and inflammation: role of hyaluronan. *Front Immunol*, 6: 169, 2015.
- 22) Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY: Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem*, 277(7): 4589–4592, 2002.
- 23) McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, *et al.*: Hyaluronan(HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. *J Clin Invest*, 98(10): 2403–2413, 1996.
- 24) Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T: Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds*, 28(3): 78–88, 2016.
- 25) Liang J, Jiang D, Griffith J, Yu S, Fan J, *et al.*: CD44 is a negative regulator of acute pulmonary inflammation and lipopolysaccharide-TLR signaling in mouse macrophages. *J Immunol*, 178(4): 2469–2475, 2007.
- 26) Bourguignon LY, Zhu H, Chu A, Iida N, Zhang L, *et al.*: Interaction between the adhesion receptor,

- CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. *J Biol Chem*, 272(44): 27913–27918, 1997.
- 27) Cyphert JM, Trempus CS, Garantzios S: Size matters: molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology. *Int J Cell Biol*, 2015: 563818, 2015.
 - 28) Grisar J, Munk M, Steiner CW, Amoyo-Minar L, Tohidast-Akrad M, *et al.*: Expression patterns of CD44 and CD44 splice variants in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 30(1): 64–72, 2012.
 - 29) Garay J, Piazuolo MB, Majumdar S, Li L, Trillo-Tinoco J, *et al.*: The homing receptor CD44 is involved in the progression of precancerous gastric lesions in patients infected with *Helicobacter pylori* and in development of mucous metaplasia in mice. *Cancer Lett*, 371(1): 90–98, 2016.
 - 30) Witting BM, Stallmach A, Zeitz M, Günthert U: Functional involvement of CD44 variant 7 in gut immune response. *Pathology*, 70(3): 18492002–1892002, 2003.
 - 31) Liu LF, Kodama K, Wei K, Tolentino LL, Choi O, *et al.*: The receptor CD44 is associated with systemic insulin resistance and proinflammatory macrophages in human adipose tissue. *Diabetologia*, 58(7): 1579–1586, 2015.
 - 32) Burberry A, Zeng MY, Ding L, Wicks I, Inohara N, *et al.*: Infection mobilizes hematopoietic stem cells through cooperative NOD-like receptor and Toll-like receptor signaling. *Cell Host Microbe*, 15(6): 779–791, 2014.
 - 33) Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE: Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*, 12(10): 1167–1174, 2006.
 - 34) Williams DA, Cancelas JA: Niche retreats for stem cells. *Nature*, 444(7121): 827–828, 2006.
 - 35) Hahn BK, Piktel D, Gibson LF, Landreth KS: Hematopoiesis: the role of stromal integrin interactions in pro-B cell proliferation. *Hematology*, 5(2): 153–160, 2000.
 - 36) Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, *et al.*: CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*, 19(3): 387–400, 2011.
 - 37) Zhao H, Tanaka T, Mitlitski V, Heeter J, Balazs EA, *et al.*: Protective effect of hyaluronate on oxidative DNA damage in WI-38 and A549 cells. *Int J Oncol*, 32: 1159–1169, 2008.
 - 38) Greenwald RA, Moy WW: Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum*, 23(4): 455–463, 1980.
 - 39) Halicka HD, Mitlitski V, Heeter J, Balazs EA, Darzynkiewicz Z: Attenuation of the oxidative burst-induced DNA damage in human leukocytes by hyaluronan. *Int J Mol Med*, 23(5): 695–699, 2009.
 - 40) 杉田完爾：小児難治性白血病の克服を目指して。山梨医科学雑誌, 22(4): 59–69, 2007.
 - 41) 犬飼岳史：小児急性リンパ性白血病の完治を目指して—山梨大学小児科の治療成績から振り返る進歩と今後の課題—。山梨医科学雑誌, 27(1): 1–11, 2013.
 - 42) Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, *et al.*: MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*, 30(1): 41–47, 2002.
 - 43) Furuichi Y, Goi K, Inukai T, Sato H, Nemoto A, *et al.*: Fms-like tyrosine kinase 3 ligand stimulation induces MLL-rearranged leukemia cells into quiescence resistant to antileukemic agents. *Cancer Res*, 67(20): 9852–9861, 2007.
 - 44) Yanai H, Matsuda A, An J, Koshiba R, Nishio J, *et al.*: Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(51): 20699–20704, 2013.
 - 45) Hobohm U: Fever and cancer in perspective. *Cancer Immunol Immunother*, 50: 391–396, 2001.
 - 46) Challis GB, Stam HJ: The spontaneous regression of cancer. A review of cases from 1900 to 1987. *Acta Oncol*, 29: 545–550, 1990.
 - 47) Nikitovic D, Tzardi M, Berdiaki A, Tsatsakis A, Tzanakakis GN: Cancer microenvironment and inflammation: role of hyaluronan. *Front Immunol*, 6: 169, 2015.
 - 48) Kasai S, Furuichi Y, Ando N, Kagami K, Abe M, *et al.*: Inflammatory mediator ultra-low-molecular-weight hyaluronan triggers necrosis of B-precursor leukemia cells with high surface CD44 expression. *Cell Death Dis*, 8: e2857, 2017.
 - 49) <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronan.E.h.tml>. Update on the Mammalian Hyaluronidases. *May*. 18, 2004.