



Title	Enhanced Expression of CD34 Messenger RNA by Developing Endothelial Cells of Mice
Author(s)	伊藤, 彰彦
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38998
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	伊 藤 彰 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 7 7 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Enhanced Expression of CD34 Messenger RNA by Developing Endothelial Cells of Mice (マウス新生血管内皮細胞における CD34mRNA の発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 北村 幸彦 (副査) 教 授 米田 悦啓 教 授 青笹 克之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

CD34分子は分子量約110Kdの細胞膜貫通型蛋白で、血管内皮細胞、血管由来の腫瘍細胞、in vivoで造血を再構築しうる未熟な血液細胞において発現していることが知られている。CD34分子は血管新生過程において血管内皮細胞の接着や遊走に関与しているという可能性や、血液細胞と血管内皮細胞がこの分子をhomophilicな接着分子として利用して互いに接着するという可能性が考えられている。最近マウスCD34分子のcDNAが分離された。血管内皮細胞によるCD34mRNAの発現が血管新生に伴って誘導されるかどうかを調べるために、マウスの胎仔発生、創傷治癒、腫瘍増殖の過程においてCD34mRNAの発現をノーザン・ブロット法とin situハイブリダイゼーション (ISH) 法により解析した。又、種々の造血組織に対してISH法を行って、CD34分子が血液細胞と血管内皮細胞との間でhomophilicな接着分子として使われているかについて検討した。

【方法ならびに成績】

1) 主要な方法

CD34mRNAの発現レベルを調べるためにノーザン・ブロット法を、CD34mRNA発現細胞を同定するためにISH法を用いた。ノーザン・ブロット法ではランダム・プライミング法による³²P標識DNAプローブを、ISH法ではin vitroトランスクリプション法によるDigoxigenin標識一本鎖RNAプローブを用いた。以下の実験では採取した組織は全て二分割し、一方はRNAの抽出に、もう一方は組織学的検索に用いた。組織学的検索のための組織は4% paraformaldehyde固定の後パラフィン埋包し、連続切片を作成した。隣り合う切片をH&E染色とISH法に用い、互いの比較によりシグナルの局在を決定した。

2) マウスの発生過程におけるCD34mRNAの発現

種々の発生段階にある胎仔、胎盤、腎臓、肺臓、肝臓を摘出し、ノーザン・ブロット法によりCD34mRNAの発現レベルを調べた。胎仔全体、胎盤では胎生期を通じて(胎生10, 14, 18日) CD34mRNAの強い発現が認められた。腎臓、肺臓でも胎生18日には強い発現が認められたが、生後その発現は減弱し、生後5週では検出限界レベルとなった。一方、肝臓におけるCD34mRNAの発現は胎生期においても腎臓、肺臓よりもかなり弱く、生後2週でほとんど検出されなくなった。ISH法によると胎仔全体、胎盤、腎臓、肺臓におけるCD34mRNA発現細胞は血管内皮細胞であり、発生の進行とともにその発現の程度は低下していった。背部大動脈での発現は胎生8日から認められたが、血

管内皮細胞の前駆細胞が存在すると考えられる頭部間葉にはシグナルは検出されなかった。胎仔肝臓における CD34mRNA 発現細胞は造血細胞であり、肝細胞索の血管内皮細胞は CD34mRNA を発現していなかった。胎生期の腎臓、肺臓の血管内に存在する未分化な血液細胞では CD34mRNA 陽性シグナルは検出されなかった。

その他の造血組織における CD34mRNA の発現をISH 法により検討した。胎生 8 日の血島には CD34mRNA 陽性シグナルは検出されなかったが、胎生 9 日の卵黄嚢においては血管内皮細胞ではなく造血細胞に CD34mRNA が強く発現されていた。骨髄では胎生期（胎生18日）、出生時、成獣時のいずれにおいても CD34mRNA 陽性シグナルは検出されなかった。

3) 成獣における CD34mRNA の発現誘導

ノーザン・ブロット法によるとマウス成獣の皮膚では微量の CD34mRNA の発現が検出されたが、ISH 法では CD34mRNA 陽性シグナルは検出されなかった。そこで、成獣に血管新生を引き起こすことによって CD34mRNA の発現が誘導されるかどうかを検討した。そのために 2 種の実験を行った。まず、マウス成獣の背部皮膚全層を打抜く（径 6 mm）ことにより創傷を作成し、その後 1 日から 8 日において創傷をその周囲の皮下組織とともに採取した。次に、去勢雄マウス成獣の背部皮下にアンドロゲン依存性のシオノギ癌115（SC115）の腫瘍片を移植した。テストステロンの連日皮下注により腫瘍増殖を誘導し、移植後16日で腫瘍を周囲皮下組織とともに摘出した。ノーザン・ブロット法では創傷作成後 3 日から 6 日において CD34mRNA 発現の有意な上昇が観察され、腫瘍組織でも同様に CD34mRNA の非常に強い発現が検出された。ISH 法では肉芽組織内の小血管の内皮細胞及び腫瘍周囲に発達した腫瘍栄養血管網の内皮細胞に CD34mRNA 陽性シグナルが検出された。

【総括】

1) 血管内皮細胞によるマウス CD34mRNA の発現は血管系の発生の時期に高いレベルを示した後に、成熟とともに減弱したが、成獣においても血管新生が誘導されると再び著しい上昇を示した。このような CD34mRNA の発現様式は、CD34分子が血管新生に重要な役割を果たしているとの考えを支持するものであった。

2) 胎仔肝、卵黄嚢、骨髄における CD34mRNA の発現様式は、CD34分子が血液細胞と血管内皮細胞との間で homophilic な接着分子として使われている可能性について肯定するものではなかった。

論文審査の結果の要旨

CD34分子は免疫組織化学的な研究により血管内皮細胞及び未熟な血液細胞の細胞表面に発現されていることが知られており、血管新生過程における血管内皮細胞の接着、遊走への関与や、血液細胞と血管内皮細胞との間の homophilic な接着分子としての機能が想定されている。最近マウスCD34分子の cDNA が分離されたので、ノーザン・ブロット法により CD34mRNA の発現レベルの経時的変化を、in situ ハイブリダイゼーション法によりその発現の局在を解析し、現在想定されているCD34分子の機能について検討した。マウス胎仔発生過程においては CD34mRNA は腎臓、肺臓等種々の臓器の血管内皮細胞により強く発現されていた。その発現の程度は生後の成熟とともに減弱したが、成獣においても創傷治癒、腫瘍増殖、胎盤形成により血管新生が誘導されると再び著しい上昇を示した。一方、卵黄嚢及び胎仔肝臓における CD34mRNA 発現細胞は未熟な血液細胞であり、卵黄嚢内及び肝臓類洞の血管内皮細胞は CD34mRNA を発現していなかった。このような CD34mRNA の発現様式は、CD34分子が血管新生に重要な役割を果たしているとの考えを支持するものであったが、CD34分子が血液細胞と血管内皮細胞との間で homophilic な接着分子として使われている可能性について肯定するものではなかった。本研究によりCD34遺伝子発現様式が明らかとなり、CD34分子の生物学的意義理解の一助となったので、これは学位論文に値するものと考えられる。