The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Expression and Localization of Tenomodulin, a Transmembrane Type Chondromodulin-I related Angiogenic Inhibitor, in Mouse Eyes
Author(s)	大島, 佑介
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43901
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

【111】

氏　　名	大島佑介（おおしま ゆうすけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　17681　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Expression and Localization of Tenomodulin, a Transmembrane Type Chondromodulin-I related Angiogenic Inhibitor, in Mouse Eyes （Chondromodulin-I 関連・膜貫通型血管新生抑制因子 Tenomodulin のマウス眼球における遺伝子発現および蛋白局在の解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　田野　保雄 （副査） 教　授　不二門　尚　　教　授　宮崎　純一

論文内容の要旨

【目的】我々は軟骨由来の血管新生抑制因子 Chondromodulin-I（ChM-I）に高い相同性を有する新規の膜貫通型糖蛋白 Tenomodulin（TeM）のクローニング（GenBank Accession Nos. AF219993, AF234259）に成功し、ChM-I が眼球や軟骨において血管侵入のバリア的な役割を担っていることに相似して、TeM は腱や靭帯等の血管に乏しい強靭結合組織に特異的に発現することを明らかにした。本研究において、我々は眼球組織での TeM の遺伝子発現ならびに蛋白局在を解析し、さらに TeM の ChM-I に共通する C 末端 cysteine-rich ドメインの *in vitro* における血管新生抑制活性について検討した。

【方法】マウス眼球における TeM の遺伝子発現ならび蛋白局在を northern blot、RT-PCR、in situ bybridization、western blot、immunohistochemistry 等の手法にて解析した。なお、Northern blot では、マウス TeM cDNA より ^{32}P-cDNA probe を、in situ hybridization では DIG-RNA probe を作成し、また、western blot と immunohistochemistry では、ヒト TeM ならびにマウス TeM のアミノ酸共通配列より作成されたポリクローナル抗ペプチド抗体を用いて実験を行った。さらに、*in vitro* における血管新生抑制活性の検討には、ヒト TeM とヒト ChM-I に共通する C 末端 cysteine-rich ドメインを含む分泌蛋白（TeM : Phe^{225}-Val^{317}、ChM-I : Pbe^{272}-Val^{334}）を発現するアデノウイルスベクターを作成し、ヒト網膜血管内皮細胞に遺伝子導入することにより、血管内皮成長因子（VEGF）刺激下での細胞の DNA 合成能（BrdU up-take）と管腔形成能を定量的に測定した。

【成績】マウスでは、胎生期 12.5 日より TeM 遺伝子の発現が認められ、生後 4 週齢マウスの各臓器別による northern blot の結果から、TeM 遺伝子が眼球にも特異的に発現することが明らかになった。さらに、RT-PCR 及び in situ hybridization の解析から、眼球組織において、TeM は胎生期では眼筋接合部（腱）、強角膜、水晶体線推細胞層、網膜内層および網膜色素上皮細胞層に発現し、生後 4 週齢の時点では、水晶体での遺伝子発現は消失し、角膜実質層、強膜、神経線維細胞層や網膜色素上皮細胞層に遺伝子発現が限局した。一方、TeM 蛋白は糖鎖修飾の違いにより分子量が 40 kD および 45 kD で検出され、眼球組織での局在はその遺伝子発現パターンにほぼ一致していた。また、アデノウイルスによる遺伝子導入により、TeM もしくは ChM-I の C 末端ドメインを含む組み換え蛋白を autocrine に分泌する血管内皮細胞群は、コントロール群（非導入群ならびに mock 群）に比較して、DNA 合成能が 60%に低下

し、管腔形成能が有意に阻害された。

【総括】TeM は胎生期より眼球の強膜、角膜等の無血管組織や網膜に発現することが明らかになった。TeM と ChM-I に共通する C 末端機能ドメインが血管内皮細胞の活性化に抑制的に作用することから、TeM は同じく眼球に発現する分泌型糖蛋白である ChM-I と相補的に、眼球での血管形成や血管侵入のバリアとして関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

眼球は角膜、水晶体や硝子体などの血管に乏しい透明な組織と、秩序立てた血流循環によって栄養される網膜や脈絡膜などの血管に富む組織によって緻密に構築されている。眼球における血管形成とその消退のバランス、すなわち、分子レベルでの血管成長促進因子と抑制因子のバランスは、眼球の発達や視機能の維持に重要な役割を果たしているのみならず、糖尿病網膜症をはじめとする種々の重篤な網膜疾患でみられる病的な血管新生の発生機序に深く関与している。

本論文は、軟骨および眼球に特異的に発現する血管新生抑制因子 Chondromodulin-I（ChM-I）に高い相同性を有する膜貫通型糖蛋白 Tenomodulin（TeM）のマウス眼組織における遺伝子発現パターンならびに蛋白局在、さらに、ヒト TeM とヒト ChM-I に共通する C 末端機能ドメインによる血管新生抑制作用について、*in vitro* で検討したものである。

TeM は胎生後期より遺伝子発現が認められ、眼組織では外眼筋接合部（腱）、強・角膜などの強靭結合組織、水晶体線維細胞層、網膜神経線維細胞層や網膜色素上皮細胞層に特異的に発現していた。また、TeM 蛋白は糖鎖修飾の違いにより 40 kD と 45 kD の異なる分子量で検出され、膜型糖蛋白として遺伝子発現とほぼ一致した局在を示した。さらに、TeM と ChM-I に共通する C 末端 cysteine-rich ドメインを含む分泌蛋白を発現するアデノウイルスベクターを作成して、ヒト網膜血管内皮細胞に遺伝子導入したところ、これら組み換え蛋白を autocrine に分泌する遺伝子導入細胞群は、コントロール群（非導入群ならびに mock 群）に比較して、血管内皮成長因子（VEGF）刺激下での DNA 合成能が有意に低下し、管腔形成能が著しく阻害される結果が得られた。

これまで、VEGF などに代表される多くの血管新生促進因子が眼に発現することが知られているが、眼組織に特異的に発現する血管新生抑制因子に関する報告は少ない。分泌型血管新生抑制因子である ChM-I が眼に発現することに加え、共通した機能ドメインを有する膜貫通型蛋白 TeM が眼組織に発現している今回の研究結果から、両分子が相補的に眼球での血管侵入のバリア的な役割を担っている可能性が示唆された。また、本研究で得られた成果は、眼科領域のみならず、広く血管新生疾患に対する治療の一助として、両分子の血管新生抑制機能ドメインを用いた遺伝子治療や新たな薬物療法の開発に貢献するものと思われ、本論文は学位の授与に値すると考えられる。