

|           |   |
|-----------|---|
|           | みやお ますみち  |
| 氏 名       | 宮尾 益道   |
| 学 位       | 博 士 (医学)  |
| 学 位 記 番 号 | 新大博(医)第1727号  |
| 学位授与の日付   | 平成20年1月25日  |
| 学位授与の要件   | 学位規則第4条第2項該当  |
| 博 士 論 文 名 | Caspase-3, Caspase-8, and Nuclear Factor- $\kappa$ B Expression in Human Cholesteatoma<br>(真珠腫性中耳炎における、カスパーゼ3, カスパーゼ8及びNF kappa Bの発現) |
| 論文審査委員    | 主査 教授 内 藤 眞<br>副査 教授 高 橋 姿<br>副査 教授 味 岡 洋 一   |

#### 博士論文の要旨

真珠腫性中耳炎は病理組織学的に角化重層扁平上皮とその落屑上皮よりなり、成因としては、内陥した鼓膜に剥奪上皮が過剰堆積し増大するものと推察されている。真珠腫上皮の分化・増殖に深く関わっているサイトカインとして以前より腫瘍壊死因子 TNF- $\alpha$ や IL-1 が知られている。これらの細胞外からの刺激に対する細胞内のシグナル伝達機構には、アポトーシスの促進に関わる caspase、抑制に関わる nuclear factor (NF)- $\kappa$ B を中心とした経路がある。

caspase は、アポトーシスシグナル伝達系路で中心的な役割を果たしているアポトーシス実行因子の一つである。caspase はファミリーを形成しており、initiator caspase である caspase-8 は、細胞外からのアポトーシス誘導刺激 (TNF- $\alpha$ ) から伝達を受け活性化される。活性化された caspase-8 は effector caspase である caspase-3 を活性化し、細胞をアポトーシスに導く。

一方、TNF- $\alpha$ や IL-1 により誘導されるアポトーシスを抑制する転写因子として NF- $\kappa$ B が知られている。NF- $\kappa$ B は通常抑制因子 I- $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B)により細胞質

に保持され不活化されているが、TNF- $\alpha$ やIL-1に代表される種々の刺激によりI- $\kappa$ Bの分解が誘導されNF- $\kappa$ Bは、細胞質から核へ移行し標的遺伝子の発現誘導を行い、アポトーシスを抑制する。

今回、caspase-3,caspase-8, NF- $\kappa$ Bの真珠腫上皮における発現部位を免疫組織化学的手法にて観察し、臨床所見との関連も検討した。また、活性型caspase-3の生化学的検討も行った。

#### [ 対象と方法 ]

検体には同一術者によって術中に採取された真珠腫41例と、対照として正常耳後部皮膚13例を使用し、免疫組織化学的手法(ABC法)にてcaspase-3、caspase-8、NF- $\kappa$ Bの上皮各層(基底層、有棘層、顆粒層)における局在を観察し、臨床所見との関連について検討した。caspase-3、caspase-8、NF- $\kappa$ Bとアポトーシス細胞の発現との関連をみるためにTUNEL法もあわせて行った。また、11例の真珠腫および6例の正常皮膚の組織溶解液を用いて比色法によるcaspase-3活性の定量を行った。

#### [ 結果 ]

免疫組織化学的手法にてcaspase-3は真珠腫上皮の有棘層から顆粒層にかけて、caspase-8は顆粒層に発現を認めた。NF- $\kappa$ Bは真珠腫上皮全層の細胞質に発現を認めたが核は染色されなかった。正常皮膚では、基底層の一部にわずかに発現を認めた。陽性コントロールとして使用した炎症性皮膚では、核にNF- $\kappa$ Bの発現がみられた。

臨床所見との関連では、術前に耳漏を認めた感染例全例で3つの蛋白の発現を認めた。また、遺残型真珠腫においてはcaspase-8の発現がほとんど認められなかった。遺残型は全て二期的手術にて摘出しており、感染性のものではないことより、感染がこれらの蛋白と密接に関連している可能性が推察された。

TUNEL法では真珠腫上皮基底層よりも上層でアポトーシス細胞が観察され、特に顆粒層において顕著にみられた。これは、caspaseの発現パターンと一致していた。

比色法による活性型 caspase-3 の定量では、真珠腫と正常皮膚の吸光度に統計学的有為差を認めた。(Mann-Whitney's U test:  $P < 0.05$ ) 真珠腫において、caspase-3 の活性が亢進していることが確認された。

[ 考察 ]

caspase-3 と caspase-8 が共に真珠腫上皮顆粒層に認められ、活性型 caspase-3 が正常皮膚に比べ多く存在している事より、過去の報告と同様に真珠腫性中耳炎においてアポトーシスが亢進していることが示唆され、ケラチンの過剰堆積に深く関わっている可能性が推察された。また、NF- $\kappa$ B は真珠腫上皮に存在しているものの核が染色されなかった事より、その作用は抑制されている可能性が推察された。正常皮膚では基底層にわずかに発現をみた事より、NF- $\kappa$ B は真珠腫と正常皮膚で異なった作用を持っている可能性が考えられた。臨床所見との関連では、感染の存在が真珠腫上皮剥脱の過剰堆積に影響している可能性が考えられた。

(論文審査の要旨)

真珠腫性中耳炎は鼓膜の重層扁平上皮およびその剥離角化上皮の過剰堆積によって発症する。申請者は真珠腫 41 例の上皮組織を正常皮膚と比較してアポトーシスの促進にかかわる caspase やアポトーシスの抑制にかかわる NF- $\kappa$ B の発現について検討し、真珠腫性中耳炎におけるアポトーシスの関与を研究した。免疫組織学的検討の結果、正常皮膚ではほとんど見られない caspase-3 と caspase-8 の発現が真珠腫上皮の顆粒層に認められ、活性型 caspase-3 の定量でも真珠腫上皮におけるアポトーシスの亢進が示唆された。アポトーシス細胞を染め出す TUNEL 染色でも真珠腫上皮の顆粒層に陽性像が認められた。一方、NF- $\kappa$ B の発現は真珠腫上皮全層で細胞質内に認められ、不活性化していることが推測された。

本研究は真珠腫性中耳炎においては上皮のアポトーシス亢進がケラチンの過剰堆積に深く関与する可能性を強く示唆する結果を得た。この点に学位論文としての価値を認める。