

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 グルココルチコイドおよび増殖因子による鼓膜穿孔治癒過程
の制御についての研究

氏名 石本晋一

【緒言】鼓膜穿孔は耳鼻咽喉科の日常診療で頻りに経験する疾患である。穿孔は容易に治癒するように見えるが自然閉鎖せずに難聴や耳漏の原因となり、手術療法を行うことがしばしばある。その理由として鼓膜は非薄な組織にもかかわらず、3層（上皮層、固有層、粘膜層）から構成されていること、また下床がなく、宙に浮いた状態であることから鼓膜穿孔は皮膚が治癒するようにはいかず、閉鎖しないのではないかと推測されている。近年、皮膚等の創傷治癒に影響を及ぼすさまざまな増殖因子が鼓膜創傷治癒過程においても発現して穿孔治癒を誘導し、鼓膜穿孔縁に特定の増殖因子を添付することで穿孔の治癒を促進することが実験動物モデルを用いて報告されている。しかし、今までの研究報告の多くは単純に鼓膜穿孔を作成して、治癒過程の一時点の増殖因子の発現をみているものであった。更に増殖因子の穿孔縁への添付実験は増殖因子を単独に添付して反応をみるというものであった。われわれは鼓膜穿孔の治癒を解明するためには、治癒過程においてどのような増殖因子がどの時期に多く発現しているか経時的に観察する必要があると考えた。また各増殖因子が鼓膜各層にどのように作用するか明確に解明するためには鼓膜穿孔治癒過程で発現する増殖因子を抑制して考察する必要があると考えた。

この点に鑑み、本研究ではラットを用いて3段階にわけて実験を行い、実験的鼓膜穿孔に対する増殖因子の誘導と穿孔治癒との関係についてRT-PCR法及び免疫組織化学的手法にて検討した。すべての

増殖因子を検索することは不可能なために、特に鼓膜穿孔治癒に関与すると報告のある Keratinocyte growth factor (KGF)、basic fibroblast growth factor (basic FGF)、transforming growth factor- α (TGF- α) さらに KGF レセプターについて検討した。

【研究の第一段階】はじめに正常モデルの鼓膜穿孔治癒における増殖因子の関与を調べる目的で研究を行った。研究には成熟した 41 匹 (体重 230~300 g) のアルビノラット (以後ラット) のオスを使用して形態学的変化、経時的な増殖因子の mRNA の発現、さらに穿孔縁に増殖因子を添付した鼓膜の免疫、組織学的変化を観察した。正常鼓膜及び穿孔を作成した鼓膜において KGF、basic FGF、TGF- α および KGF レセプターの mRNA の発現を認めた。KGF、basic FGF、TGF- α の mRNA の発現は穿孔を作成した鼓膜が正常鼓膜 (穿孔なし) より mRNA の発現が増加していた。一方、KGF レセプターの mRNA の発現は正常鼓膜および穿孔作成鼓膜でも変化がなかった。経時的な増殖因子の mRNA の発現から KGF、TGF- α の mRNA の発現は鼓膜穿孔作成後から急激に上昇して 3 日目にピークを示した。一方、basic FGF の mRNA の発現は 1, 3, 7 日目と徐々に増加した。KGF が主に上皮細胞の増殖を促進して basic FGF が線維芽細胞、血管内皮細胞という、主に上皮層、固有層の細胞増殖を促進する増殖因子であることを考えると、我々の実験結果は上皮細胞が先行して鼓膜を橋渡しした後に固有層の細胞増殖がおこるという上皮層の増殖進展説を支持する結果となった。また EGF と同一のレセプターに結合する TGF- α に関しては、KGF と同一の発現形式をとることから主として上皮層の細胞増殖に関与している可能性が高いと考えられた。

実際に KGF 及び basic FGF を鼓膜穿孔縁に添付した実験 (鼓膜穿孔作成時、および 2 日目に 100 μ g/ml (0.5 μ g) 添付して 3 日目に撲殺し、標本を作成) では、コントロール群と比較して KGF 添付群では鼓膜上皮層に BrdU 陽性細胞の増加を認め、上皮層の肥厚を認めた。一方、basic FGF 添付群では固有層の肥厚及び BrdU 陽性細胞数の増加を認めた。しかしコントロール群でも鼓膜穿孔の肥厚及び BrdU 陽性細胞を多数認めることより治癒の抑制していない状態では外因性の増殖因子の他に多くの内因性の増殖因子等が治癒に作用していると考えられた。我々は外因性の増殖因子の鼓膜穿孔縁への作用を明確にするためには治癒抑制モデルを用いて検討する必要があると考えた。

【研究の第二段階】次に鼓膜穿孔において治癒抑制モデルを作成するために皮膚の創傷治癒が遅延するという報告のあるグルココルチコイドを全身投与して鼓膜においても穿孔治癒の遅延が生じるのではないかと推測して研究を進めた。研究には 52 匹 (体重 230~300 g) のラット (オス) を使用した。皮膚の創傷治癒を遅延する作用のあるグルココルチコイド (デキサメサゾン) を Phosphate buffer saline (以後 PBS) に 1mg/ml で溶解して 1mg/kg で毎朝皮下投与してグルココルチコイド投与モデルを作成した。グルココルチコイド投与モデルに鼓膜穿孔を作成して穿孔縁への影響を検討するために鼓膜穿孔縮小率、組織学的所見、BrdU 陽性細胞数、増殖因子の mRNA の発現に関してコントロール群 (PBS 皮下投与群) と比較した。鼓膜穿孔作成後 7 日目の鼓膜穿孔縮小率に関しては、コントロール群 (n=5) で 73.6 \pm 12.7% (Mean \pm SD) であるのに対してグルココルチコイド投与群 (n=5) は 19.2 \pm 9.0% (Mean \pm SD) であった。鼓膜穿孔作成後 7 日目の鼓膜 0.5mm あたりの BrdU 陽性細胞数はグルココルチコイド

投与群 (n=18, 6 耳) で 13.3 ± 7.4 、コントロール群 (n=18, 6 耳) で 30.6 ± 8.0 (Mean \pm SD) であった。ともにコントロール群と比較してグルココルチコイド投与群では低下しており統計学的に有意差を認めた。(P<0.01、Student`s t 検定)。病理、組織学的検索ではグルココルチコイド投与による治癒遅延モデルでは上皮細胞の増殖が穿孔縁から離れた所でわずかに認めるだけで、通常穿孔治癒過程で重要な作用である上皮細胞の移動作用 (migration) が穿孔縁まで進展しないで治癒が遅延しているのが観察できた。手術顕微鏡所見でも鼓膜穿孔と穿孔縁から離れて増殖した上皮細胞層とで鼓膜穿孔縁が二重輪のように観察できた。グルココルチコイド投与群でも各増殖因子 (KGF, basic FGF, TGF- α) の mRNA の発現は穿孔を作成することで増加した。KGF に関しては、グルココルチコイド投与群では鼓膜穿孔を作成していない状態でも明らかな mRNA の発現の低下を示した。グルココルチコイド投与群の basic FGF、TGF- α の mRNA の発現量は穿孔を作成していない状態ではコントロール群と同様であった。コントロール群で 3 日目まで急激に mRNA の発現量が増加傾向を示す KGF と TGF- α は、グルココルチコイド投与群においても 3 日目に最大になり、その後減少傾向を示した。しかしその発現量はコントロール群と比較して低下していた。Basic FGF に関してはコントロール群では 5 日まで徐々に mRNA の発現が増加したがグルココルチコイド群では 3 日目に最大になり、その後減少傾向を示した。またグルココルチコイド投与群の 0, 1 日目の basic FGF の発現量はコントロール群とほぼ同様であった。また、緩やかに増加する basic FGF は時間を経過するごとにグルココルチコイド投与群とコントロール群の間で mRNA の発現の隔差が増大した。以上のことよりグルココルチコイド投与ラットは増殖因子の発現を抑制して鼓膜穿孔治癒を著しく遅延していることより外因性の増殖因子の鼓膜穿孔縁への効果を検索するのに適していると考えた。

【研究の第三段階】研究 2 で作成したグルココルチコイド投与による鼓膜穿孔治癒抑制モデルの鼓膜穿孔縁に増殖因子 (KGF, basic FGF, TGF- α) を添付してそれぞれの増殖因子の効果、作用を明確にする目的で研究を行った。研究には 28 匹のラットを用いて鼓膜穿孔作成時、および 2 日目に $100 \mu\text{g/ml}$ ($0.5 \mu\text{g}$) 添付して 3 日目に撲殺し、標本を作成して観察した (研究 1 同様)。グルココルチコイド投与方法は前述同様に行った。コントロールとしてグルココルチコイドの代わりに PBS を投与して PBS を添付したコントロール 1 群とグルココルチコイド投与して鼓膜に PBS のみを添付したコントロール 2 群を作成した。上皮層の細胞増殖及び migration はグルココルチコイド投与ラットに各増殖因子を添付しても認められなかった。増殖因子を添付した各群の増殖期の各群で鼓膜 0.5mm あたりの BrdU の陽性細胞数を比較した。計測方法としては 1 耳に対して鼓膜穿孔を含んだ 5 切片をランダムに選択して KGF 添付群、basic FGF 添付群、TGF- α 添付群、コントロール群 1 (PBS 投与、PBS 添付群)、コントロール群 2 (グルココルチコイド投与、PBS 添付) とともに各 35 片 (各 7 匹, 7 耳) を用いた。各コントロール 1 群では 42.8 ± 14.0 (Mean \pm SD) であった。グルココルチコイド投与群の BrdU 陽性細胞数は KGF 添付群では 15.6 ± 2.0 、basic FGF 添付群では 15.8 ± 1.6 、そして TGF- α 添付では 18.9 ± 2.0 (Mean \pm SD) であった。コントロール 2 群では 6.7 ± 2.5 (Mean \pm SD) であった。コントロール 1 群と比較してグルココルチコイド投与群の BrdU 陽性細胞数は有意に低下していた (p<0.01、Student`s t

検定)。各群で鼓膜の長さに関しては統計的に有意差 ($p=0.109$) はなかった。グルココルチコイド投与群 (2~5 群) の中で検討するとグルココルチコイド投与下増殖因子添付群はコントロール 2 群と比較して BrdU 陽性細胞数は有意に増加していた ($p < 0.01$, Student's t 検定)。しかし各増殖因子添付群間で BrdU 陽性細胞数に有意差は認めなかった。これら 3 つの増殖因子を添付した鼓膜の組織反応としては、KGF を添付した鼓膜では穿孔縁で上皮層の細胞の過形成が basic FGF、TGF- α を添付した鼓膜より顕著であり、一部に角化している部位を観察することができた。これはグルココルチコイドによって抑制された上皮層の migration を KGF が basic FGF、TGF- α よりも促進したと思われる。また皮膚科領域で報告されているようにグルココルチコイドはケラチノサイトの増殖を抑制し、その結果として強い角化抑制作用がある。KGF はこのグルココルチコイドによる角化作用の抑制を basic FGF、TGF- α よりも回復することができた点は、注目すべき点であると思われる。

【結論】ラット鼓膜穿孔治癒過程において穿孔治癒を誘導すると思われる KGF、basic FGF および TGF- α の mRNA の発現を穿孔作成後から経時的に観察した結果、KGF および TGF- α の mRNA の発現は穿孔作成後、1 日目から 3 日目まで急激な増加を示し、その後減少した。一方、basic FGF の mRNA の発現は 1 日目から緩やかに増加し 7 日まで増加を続けた。KGF が上皮層、basic FGF が固有層の細胞増殖を強く誘導することより、我々の mRNA の発現の結果も鼓膜穿孔治癒は上皮層増殖進展説を支持する結果となった。

また皮膚において治癒治癒抑制作用のあるグルココルチコイドの投与 (1mg/kg) により鼓膜穿孔縮小率及び鼓膜 0.5mm 当りの BrdU 陽性細胞数はコントロール群と比較して有意に低下し、グルココルチコイドは鼓膜穿孔治癒を抑制した。また治癒を誘導する KGF、basic FGF、TGF- α の mRNA 発現を検索してところコントロール群と比較して顕著に mRNA の発現が抑制されていた。グルココルチコイド投与モデルは鼓膜穿孔治癒を誘導する増殖因子の発現を抑制することより、各増殖因子の鼓膜穿孔縁への働きを調べるモデルとして適していると考えた。

グルココルチコイド投与による穿孔治癒抑制モデルの鼓膜穿孔縁に KGF、basic FGF、TGF- α の添付をおこなったところ、いずれの増殖因子添付群でもコントロール (グルココルチコイド治療、増殖因子添付なし) と比較して有意に BrdU 陽性細胞が増加していた。しかし、その増加量は各群で有意差を認めず、3 種類の増殖因子間で、どの増殖因子が最も有効であるかということはいえなかった。

病理組織学的所見として KGF 添付群のみにおいて一部に抑制された migration が回復され、穿孔縁における上皮層の肥厚が認められ、また一部にグルココルチコイドによる角化抑制作用を回復する所見を認めた。しかし KGF を添付して上皮層の細胞増殖を積極的に亢進させ、migration を進行させた場合、上皮層が穿孔縁裏面へ翻転して、穿孔縁が上皮で覆われて鼓膜穿孔閉鎖が進行しないように働く可能性も考えられるため、鼓膜穿孔治癒をスムーズに進行させるためには上皮層と固有層の治癒のバランスが取れるように増殖因子を添付することが重要であると推測された。