

## 学位論文内容の要旨

| 論文提出者氏名  | 論文審査担当者   |
|--|---|
| 川島啓誠   | 主査 教授 大 槻 勝 紀<br>副査 教授 清 金 公 裕<br>副査 教授 森 浩 志<br>副査 教授 芝 山 雄 老<br>副査 教授 阿 部 宗 昭 |
| 主論文題名<br>Evaluation of Cell Death and Proliferation in Psoriatic Epidermis<br>(尋常性乾癬における細胞死と増殖の評価)   |   |
| 学位論文内容の要旨  |   |
| <p>《研究目的》</p> <p>尋常性乾癬はケラチノサイトの増殖性疾患であるにもかかわらず、アポトーシスの検出法である terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL)法で、ほとんど全てのケラチノサイトが TUNEL 陽性であるといった報告がなされている。本研究の目的は、アポトーシスの同定法として最近注目されている formamide-induced DNA denaturation assay combined with the detection of denatured DNA with a monoclonal antibody (MAb) against single-stranded DNA (formamide- MAb)法を用いて尋常性乾癬表皮における細胞死を解明するとともに、TUNEL 法と比較して formamide-MAb 法の有用性を検討することである。</p> <p>《材料と方法》</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 試料の採取と処理: 本研究で用いた 19 例の新鮮皮膚(正常ヒト表皮 6 例、尋常性乾癬表皮 13 例)は、大阪医科大学皮膚科で十分なインフォームドコンセントの後、外科的に採取し本研究に供した。試料の一部から凍結切片を作製し、4%paraformaldehyde で 10 分間固定し、さらにメタノール:アセトン比 2:1 の溶液で -20℃で 5 分間固定した。残りの試料の一部は電顕用に 2.5%glutalaldehyde と 2%paraformaldehyde の混合液で室温で 4 時間固定した。さらに 1%osmium tetroxide で 2 時間後固定した後、型のごとく脱水し Epon 樹脂に包埋した。</li> <li>2. 細胞増殖について: 抗ヒト Ki-67 抗原モノクローナル抗体(7B11; Zymed Laboratories, CA, USA)、Horseradish peroxidase 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark)を用いて酵素抗体間接法で行った。ペルオキシダーゼ活性は 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Vector Laboratories, CA, USA)を基質として検出した。Ki-67 index は 500 個のケラチノサイトについて抗 Ki-67 抗体陽性の核の数をカウントし、百分率で算出した(Ki-67 index)。</li> <li>3. 細胞死について:<br/>           (1)formamide-MAb 法: 薄切切片を 0.1mg/ml サポニン、20 μg/ml の Proteinase K で前処理し、続いて 50%の formamide 液に 56℃で 20 分間浸漬した。抗 single strand DNA(ssDNA)モノクローナル抗体 (Chemicon International, Inc., CA, USA)と Horseradish peroxidase 標識ヒツジ抗         </li> </ol> |   |

マウス IgM 抗体を用いて免疫組織化学を行った。また positive control には薄切切片を 30 分間、37°C で DNase I で前処理し、DNA を断片化したものを用いた。negative control は抗 ssDNA 抗体の代わりに PBS を用いた。

(2)TUNEL 法:非放射性標識の ApopTag kit (Oncor,Inc.,Gaithersburg,MD,USA)を用いてアポトーシスに特有な 3'-OH DNA 断端を検出した。方法は digoxigenin で標識されたヌクレオチドを TdT の存在下で 3'-OH DNA 断端に結合させ、次いでペルオキシダーゼと結合した抗 digoxigenin 抗体を用いて免疫染色した。核染色はヘマトキシリン染色で行った。negative control として TdT enzyme 溶液の代わりに蒸留水を用いた。

(3)電顕 TUNEL 法:上記の ApopTag kit を用いて peroxidase 標識抗 digoxigenin 抗体の代わりに金コロイド標識抗 digoxigenin 抗体でニッケルグリッド上の超薄切片を染色した。超薄切片は酢酸ウランやクエン酸鉛で電子染色した後、電子顕微鏡(H-7100, Hitachi Ltd.,Tokyo,Japan)で観察した。

#### 《結果》

1. Ki-67 陽性ケラチノサイトは正常ヒト表皮基底細胞層でわずかに観察されるにすぎなかったが、尋常性乾癬表皮では Ki-67 陽性細胞は表皮全体に見られた。また尋常性乾癬表皮の Ki-67 index は 0.8%と、正常ヒト表皮の 0.15%に比較して有意に増加していた。
2. formamide-MAb 法:正常ヒト表皮では顆粒細胞層の上部でのみ formamide-MAb 陽性細胞が観察されたが、尋常性乾癬ではほとんど陽性細胞は認められなかった。
3. TUNEL 法と電顕 TUNEL 法:正常ヒト表皮では TUNEL 陽性のケラチノサイトは顆粒層上部にのみ存在し、formamide-MAb 法とよく似た分布を示した。一方、尋常性乾癬表皮では全ての細胞層でほとんど全てのケラチノサイトが TUNEL 陽性であった。電顕的には尋常性乾癬のケラチノサイトはユークロマチンに富む大きな核が特徴で、しばしば分裂像を示した。正常ヒト有棘層や顆粒層のケラチノサイトでは 3'-OH DNA 断端を示す免疫金粒子は辺縁クロマチンに認められたが、ユークロマチンには観察されなかった。一方、尋常性乾癬表皮の細胞ではユークロマチンに一致して多数の免疫金粒子が認められた。

#### 《考察》

尋常性乾癬表皮は表皮突起の規則的な伸長と不完全な角化を伴う表皮の過形成が特徴である。本研究では S,G<sub>2</sub>,M 期の細胞マーカーである Ki-67 の陽性率は尋常性乾癬表皮が正常ヒト表皮よりも有意に高かった。さらに尋常性乾癬ケラチノサイトの微細構造(著明な核小体、ユークロマチンに富んだ核や細胞分裂像)は細胞死というよりは増殖期の細胞の特徴を示していた。しかし尋常性乾癬表皮のほとんどの細胞が TUNEL 陽性であったことは、細胞増殖とは明らかに矛盾する。さらに電顕 TUNEL 法により、3'-OH DNA 断端部位は正常ヒトケラチノサイトでは転写不活性部位であるヘテロクロマチンに、尋常性乾癬では転写の盛んなユークロマチンにあることが示された。すなわち尋常性乾癬のケラチノサイト核に観察された 3'-OH DNA 断端はアポトーシスによる DNA 断片化部位ではなく、転写の際にできたニックによるものと考えられた。以上の所見はアポトーシス細胞の凝縮クロマチンにおける DNA-histone 間のダメージを特異的に同定する formamide-MAb 法で検討すると、尋常性乾癬のほとんどのケラチノサイトは formamide-MAb 法に陰性であったこととよく一致する。

#### 《結語》

尋常性乾癬のケラチノサイトにおいては、TUNEL 法で同定される 3'-OH DNA 断端部位はアポトーシスで生じた DNA の二本鎖切断ではなく、転写の際に出来たニックに由来することが明らかになった。また formamide-MAb 法は TUNEL 法よりアポトーシスの検出法としてより特異性が高いと考えられた。

## 審査結果の要旨および担当者

| 報告番号  | 乙 第 号 | 氏 名  | 川 島 啓 誠 |
|---|-------|--|---------|
| 論文審査担当者   |       | 主 査 教授 大 槻 勝 紀<br>副 査 教授 清 金 公 裕<br>副 査 教授 森 浩 志<br>副 査 教授 芝 山 雄 老<br>副 査 教授 阿 部 宗 昭 |         |
| 主論文題名<br>Evaluation of Cell Death and Proliferation in Psoriatic Epidermis<br>(尋常性乾癬における細胞死と増殖の評価)  |       |  |         |
| 論文審査結果の要旨   |       |  |         |
| <p>今回、申請者は尋常性乾癬がケラチノサイトの増殖性疾患であるにもかかわらず、アポトーシスの検出法である terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL)法で、ほとんど全てのケラチノサイトが陽性に染まるという事実に注目した。S,G<sub>2</sub>,M期の細胞マーカーである Ki-67 の陽性率について検討したところ、尋常性乾癬表皮が正常ヒト表皮よりも有意に高かった。さらに尋常性乾癬ケラチノサイトの微細構造は細胞死というよりは増殖期の細胞の特徴を示していた。さらに電顕 TUNEL 法により、3'-OH DNA 断端部位を検討すると、正常ヒトケラチノサイトでは転写不活性部位であるヘテロクロマチンに、尋常性乾癬では転写の盛んなユークロマチンにあることが示された。すなわち申請者は尋常性乾癬のケラチノサイト核に観察された 3'-OH DNA 断端はアポトーシスによる DNA 断片化部位ではなく、転写の際にできたニックによるものと考えている。そこでアポトーシス細胞の凝縮クロマチンにおける DNA-histone 間のダメージを特異的に同定する formamide-MAb 法で検討したところ、尋常性乾癬のほとんどのケラチノサイトは formamide-MAb 法に陰性であった。</p> <p>以上のことから、申請者は尋常性乾癬において TUNEL 法により同定された 3'-OH DNA 断端部位はアポトーシスで生じた DNA の二本鎖切断ではなく、転写の際に出来たニックに由来することを明らかにした。さらにアポトーシスの検出法として formamide-MAb 法は TUNEL 法より特異性が高いと結論づけている。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌)<br/>Journal of Dermatological Science 35(5): 207-214, 2004 In press</p> |       |  |         |