

令和元年5月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20221

研究課題名(和文) ゲノム、プロテオーム解析による後天性真珠腫シグナル伝達ネットワークの解明

研究課題名(英文) elucidation of acquired cholesteatoma signaling network using genomic and proteomic analysis

研究代表者

福田 篤 (Fukuda, Atsushi)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：70609742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リアルタイムPCRを用いて後天性中耳真珠腫におけるNotchシグナル関連遺伝子の発現解析を行った結果、中耳真珠腫上皮は正常外耳道皮膚に比べて、有意にNOTCH1の発現低下を認め、その標的遺伝子であるHES1の発現低下傾向も認めた。Hes1ノックアウトマウスを用いた研究では、NotchシグナルがHES1を介して顆粒層への分化を抑制することにより、有棘層の数を維持することで適切に表皮細胞の分化を制御していることが報告されている。後天性中耳真珠腫における角化扁平上皮の異常増殖性に関して、Notchシグナルを介したHES1の発現変化が病態生理に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後天性中耳真珠腫における角化扁平上皮の異常増殖性に関して、Notchシグナルを介したHES1の発現変化が病態生理に関与している可能性が本研究にて明らかになった。このことから、Notchシグナル関連分子の中から後天性中耳真珠腫に対する新たな治療標的因子が見つかる可能性がある。後天性真珠腫の発症原因は未だ明確にされておらず、依然として根本的治療は外科的治療のみであるが、新たな標的分子、シグナル伝達機構を解明することができれば、今後の後天性真珠腫治療におけるbreak throughとなり、真珠腫の非外科的治療法開発へ大きな一歩となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed gene expression related to Notch signaling of acquired middle ear cholesteatoma using PCR array kit. As a result, the expression of NOTCH1 in middle ear cholesteatoma epithelium significantly decreased than that in normal external ear canal epithelium, and the expression of HES1, which is a target gene of NOTCH1, tended to decrease. The study using Hes1 KO mice have revealed that notch signaling promoted spinous cell fate specification from basal layer cells and further induced granular differentiation, but simultaneously prevented further differentiation to maintain an immature spinous fate in a Hes1-dependent manner. The expression change of HES1 through notch signaling may play an important role in the pathophysiology of middle ear cholesteatoma.

研究分野：耳科学

キーワード：後天性中耳真珠腫 Notchシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

後天性真珠腫は、角化扁平上皮 Keratinocyte の異常増殖により側頭骨に生じる境界明瞭な非腫瘍性病変である。後天性真珠腫は局所浸潤性で中耳破壊の原因となり、頭蓋内合併症により死亡する可能性がある。これまで多数の研究が行われてきたにもかかわらず、後天性真珠腫の発症原因は未だ明確にされておらず、依然として根本的治療は外科的治療のみである。

真珠腫は腫瘍ではないが新生物に類似した臨床的特徴を示す。これまでの報告から、真珠腫は細胞過剰増殖へとバランスが変化し、浸潤・骨溶解作用が増強された、制御不能な細胞増殖の一例であると考えられている。細胞増殖の調整不全には、細胞内部のゲノム異常やエピジェネティックな変化や外部刺激が関与していると考えられ、この反応には細胞内外の様々なシグナル伝達カスケードが関与すると考えられる。

近年、発癌や癌の増殖・生存を制御する driver oncogene が次々に報告され、それぞれに対する分子標的薬の開発や臨床応用がすでに行われている。例えば、上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor; EGFR)は正常細胞の増殖と分化に関連があることが明らかになっており、EGFR の発現増加と活性化は、一部の腫瘍において発生と進行の両方に重要な役割を果たしている。EGFR 遺伝子変異を有した肺癌に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害薬は、極めて高い著効性を示すことが報告されている。また、EGFR を過剰発現している頭頸部癌や一部の大腸癌に対して抗 EGFR 抗体がすでに臨床応用されている。

マイクロアレイ分析技術を用いた最近の研究では、真珠腫組織は多くの腫瘍関連遺伝子を発現していること、そしてこれらが発症に何らかの役割を果たす可能性があることが実証された(Klenke C. PLoS One 2012)。真珠腫でも EGFR の過剰発現が同定されていることから、EGFR 遺伝子調節の変化が真珠腫の増殖に関係していることが示唆される(Jin BJ. Clin Exp Otorhinolaryngol 2011, Liu W. Eur Arch Otorhinolaryngol 2014)。最近では、in vitro ではあるが、EGFR を標的とした光線力学的治療によって、真珠腫由来のケラチノサイトを選択的に死滅させることができたとの報告がある(Gluth MB. Otol Neurotol 2015)。

2. 研究の目的

EGFR シグナル伝達経路に代表されるシグナル伝達の異常は、真珠腫の発症・増殖メカニズムの核となっていると考えられる。本研究により真珠腫発症・増殖メカニズムを分子生物学的側面から解明し、これに関わる新たな標的分子、シグナル伝達機構を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

手術治療を行なった後天性真珠腫症例を対象とした。手術検体として摘出した中耳真珠腫と正常外耳道皮膚組織からサンプルを採取した。PAXgene Tissue System (PAX)を用いて組織サンプルを固定し、固定した組織をパラフィン包埋後、薄切した切片から Hematoxylin Eosin(HE) 染色標本作製して、光学顕微鏡を用い、組織の保存状態を確認した。

(1) quantitative realtime-PCR array® :

保存状態の良い組織サンプル 12 例(真珠腫組織 6 例、正常外耳道皮膚組織 6 例)の PAX 固定パラフィン包埋ブロックに対して、10 μ m に薄切し切片を作製した。そして、microdissection 法にて上皮組織を回収した。まず、PAXgene Tissue RNA Kit を用いてトータル RNA 精製を行った。RT² SYBR® Green ROX qPCR MasterMix を用いて cDNA を合成した。次に、RT² Profiler™ PCR Array Human Notch Signaling Pathway キットを用いて quantitative-realtime-PCR を施行、インターカレーション法 (SYBR green) にて検出を行った。cDNA 逆転写反応、および PCR 生成物検出、解析に関して StepOnePlus™ realtime PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用した。各遺伝子転写レベルに関して GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) と RPLP0 (Ribosomal protein, large, P0) で標準化を行い、相対的 mRNA 発現量に関して $\Delta\Delta$ Ct 法に基づき計算を行った。

(2) 免疫組織染色 :

PAXgene Tissue System (PAX)を用いて組織サンプルを固定し、固定した組織をパラフィン包埋後、薄切した切片から Notch1 (CST #3608 Notch (D1E11) XP® Rabbit mAb)、EGFR (CST #4267S EGF Receptor (D38B1) XP® Rabbit mAb) の免疫組織染色を行い、タンパク発現の評価を行った。

4. 研究成果

リアルタイム PCR を用いて中耳真珠腫における Notch シグナル関連遺伝子の発現解析を行った結果、中耳真珠腫上皮は正常外耳道皮膚に比べて、有意に *NOTCH1* の発現低下を認め、その標的遺伝子である *HES1* の発現低下傾向も認めた。しかしながら、中耳真珠腫上皮、および正常外耳道皮膚において、免疫染色にて Notch1 の発現を確認したところ、いずれの上皮においても強い発現が認められた。ただし、1 検体あたりから採取できるサンプルが非常に小さいため、免疫組織染色を行うための十分な検体数を確保することができず、タンパク発現量に関する十分な比較検討は困難であった。Notch シグナル関連分子のタンパク発現については、今後の検討課題としたい。*Hes1* ノックアウトマウスを用いた研究では、Notch シグナルが *HES1* を介して顆粒層への分化を抑制することにより、有棘層の数を維持することで適切に表皮細胞の分化を制御していることが報告されている。中耳真珠腫における角化扁平上皮の異常増殖性に関して、Notch シグナルを介した *HES1* の発現変化が病態生理に関与している可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Fukuda A, Morita S, Nakamaru Y, Hoshino K, Fujiwara K. Short-Term Hearing Prognosis of Ossiculoplasty in Pars Flaccida Cholesteatoma Using the EAONO / JOS Staging System. *J Int Adv Otol*. 2019;15(June 2018):2-7. doi:10.5152/iao.2019.5983 査読有

Morita S, Nakamaru Y, Fukuda A, Fujiwara K, Hoshino K, Homma A. Clinical Characteristics and Treatment Outcomes for Patients With External Auditory Canal Cholesteatoma. *Otol Neurotol*. 2018;39(2):189-195. doi:10.1097/MAO.0000000000001659 査読有

Fukuda A, Morita S, Nakamaru Y, et al. Anti-mumps IgM antibody positive rate with sudden sensorineural hearing loss using second-generation enzyme immunoassay: A retrospective, multi-institutional investigation in Hokkaido, Japan. *Auris Nasus Larynx*. 2018;45(5):911-915. doi:10.1016/j.anl.2017.11.016 査読有

Morita S, Fujiwara K, Fukuda A, et al. The clinical features and prognosis of mumps-associated hearing loss: a retrospective, multi-institutional investigation in Japan. *Acta Otolaryngol*. 2017;137(sup565):S44-S47. doi:10.1080/00016489.2017.1290826 査読有

Fujiwara K, Morita S, Hoshino K, Fukuda A, Nakamaru Y, Homma A. Evaluation of Vestibular Functions in Patients with Vogt-Koyanagi-Harada Disease. *Audiol Neurootol*. 2017;22(3):190-195. doi:10.1159/000481426 査読有

Morita S, Nakamaru Y, Homma A, Yasukawa S, Hatakeyama H, Sakashita T, Kano S, Fukuda A, Fukuda S. Expression of p53, p16, cyclin D1, epidermal growth factor receptor and Notch1 in patients with temporal bone squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2017;22(1):181-189. doi:10.1007/s10147-016-1026-5 査読有

Fukuda A, Morita S, Harada T, et al. Value of T1-weighted Magnetic Resonance Imaging in Cholesteatoma Detection. *Otol Neurotol*. 2017;38(10):1440-1444. doi:10.1097/MAO.0000000000001558 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

A Fukuda, S Morita, K Hoshino, K Fujiwara, Y Nakamaru, A Homma. Hearing Prognosis for Ossiculoplasty in Cholesteatoma Using the EAONO/JOS Staging System. 9th EAONO instructional workshop 6.20-23(Copenhagen,Denmark), 2018

福田 篤, 森田 真也, 干野 季美子, 藤原 圭志, 中丸 裕爾, 本間 明宏. EAONO/JOS 中耳真珠腫進展度分類を用いた術後聴力予後因子の検討. 第 28 回日本耳科学会総会・学術講演会, 2018

A Fukuda, S Morita, K Hoshino, K Fujiwara, A Homma, Y Nakamaru. Hearing Prognostic Factors of Tympanoplasty Type III for Primary Acquired Pars Flaccida Cholesteatoma. 4th Congress of European ORL-HNS Barcelona, Spain 2017.10.7-11, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6．研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。