

令和元年6月27日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20242

研究課題名(和文) 伸展圧によって誘導される真珠腫形成と骨破壊分子制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study for osteoclastogenesis in cholesteatoma

研究代表者

今井 隆介 (Imai, Ryusuke)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00747066

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)：真珠腫性中耳炎は接する骨を溶かし重篤な合併症を引き起こしうる。しかしその発生源や骨破壊機序について分子生物学的な知見は乏しく、保存的治療の開発が進まない。本研究では真珠腫に接する骨表面において破骨細胞が増加していることを示し、真珠腫における数的検証は初の報告となった。さらにRNA-sequenceで真珠腫が破骨細胞分化を促す遺伝子発現環境であることを示した。RANKL発現の上流因子の候補検索を行い、実際に真珠腫組織中でその上流因子の濃度上昇を確かめた。真珠腫における骨破壊はこれらの上流因子によって刺激された真珠腫線維芽細胞がRANKLを発現し破骨細胞が分化・増殖するという機序が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義として本研究は中耳真珠腫における骨破壊に破骨細胞が関与しているエビデンスの一つとなる。そしてその分子生物学的メカニズムを真珠腫組織のRNA-sequenceによって仮説をあげた。我々の真珠腫モデルマウスを用いた骨破壊抑制実験の足がかりとなると考えられる。臨床的に中耳真珠腫の治療は外科的摘出が唯一の治療法であったが、本研究が示した成果は現在使われている分子学的製剤の点耳薬への応用の可能性を示し、中耳真珠腫の新しい非外科的治療法の開発の根拠となり得る。

研究成果の概要(英文)：we found that a significantly larger number of osteoclasts were observed on the eroded bone adjacent to cholesteatomas than in unaffected areas, and that fibroblasts in the cholesteatoma perimatrix expressed RANKL. We also investigated upstream transcription factors of RANKL using RNA sequencing results obtained. The concentrations of four candidate factors were increased in cholesteatomas compared with normal skin. Furthermore, one of these was expressed in infiltrating inflammatory cells in the cholesteatoma perimatrix. This is the first report demonstrating that a larger-than-normal number of osteoclasts are present in cholesteatoma, and that the disease involves upregulation of factors related to osteoclast activation. Our study elucidates the molecular basis underlying bone erosion in cholesteatoma.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：中耳真珠腫 破骨細胞 RANKL RNA sequencing

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

1. 研究開始当初の背景

真珠腫性中耳炎は、接する骨を溶かし進展する性質故に、重篤な合併症を引き起こしうる。現在、真珠腫性中耳炎の治療法は外科的切除のみであり、治療の選択肢として保存的治療法の開発が期待されている。しかし、その発生要因や骨破壊機序について、臨床面から様々な知見が蓄積される一方、分子生物学的な知見は乏しく、保存的治療の開発を遅らせる要因となっている。そこで、申請者はこれまでに、分子生物学的探索に必須である、マウスを用いた真珠腫モデルの開発に取り組んできた。申請者のグループは、真珠腫を構成する細胞に着目し、マウスモデルを作成することに成功している。具体的には、マウス耳介より単離した角化重層扁平上皮細胞(以下ケラチノサイト)と線維芽細胞(以下ファイibroプラスト)を混合し、マウス頭頂部骨膜下に移植することで真珠腫様組織構造を示す腫瘤を作成した。この腫瘤内のケラチノサイトは、重層分化し角化堆積物を産生する角化亢進状態にある。申請者は、この腫瘤が、腫瘤と接する骨表面上に破骨細胞分化を誘導する事を明らかにした。また、破骨細胞分化には、分化調節因子である Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)が必須であるが、腫瘤内のケラチノサイト周囲のファイibroプラストがRANKLを高発現していることを明らかにした。このRANKL発現のメカニズムとして、*in vitro*の共培養系を用い、ケラチノサイトから分泌される液性因子により、ファイibroプラストのRANKL発現が上昇することを見いだした。このように、真珠腫による骨破壊には、ケラチノサイトとファイibroプラスト間のクロストークが非常に重要な役割を果たしていることが判明した。

我々は研究開始当初、中耳真珠腫が中耳内の陰圧によって鼓膜が機械的に進展されて発生しているという仮説に則り、機械的進展圧の骨破壊に関わる分子生物学的影響について検証しようとした。しかし、マウスおよびヒトの皮膚線維芽細胞、ヒトの真珠腫から得られた線維芽細胞の単培養系、さらにはヒト皮膚線維芽細胞と扁平上皮細胞の共培養系を培養進展システムを用いて進展圧負荷をかけて行ったが、破骨細胞活性化に関連する遺伝子群については有意な発現変化は認められなかった。

そこで破骨機序の仮説の一つである破骨細胞起因説については真珠腫と接する骨破壊面に破骨細胞が見られるという報告がある(Laryngoscope 94, 76-95, 1984)があるが、破骨細胞は通常の骨表面でも存在しており未だ数的評価はされておらず、分子生物学的メカニズムにおいても明らかにされていなかったため、われわれはその解明に焦点を当てた。

2. 研究の目的

中耳真珠腫における骨破壊メカニズムについて破骨細胞活性化の検証を行うとともに、その分子生物学的な活性化経路とそこにかかわる細胞について真珠腫治療の手術の際に得られた臨床検体を用いて行った。

3. 研究の方法

手術中に採取された真珠腫には接していない乳突蜂巣の骨を比較対照とし、真珠腫に接する側頭骨表面の破骨細胞の数を、TRAP染色法を用いて検討した。また真珠腫のprematrixをlaser microdissection法で切り出し、遺伝子発現の網羅的解析を行い、破骨細胞活性化の分子生物学的経路について検討した。そこで得られた解析結果を実際に真珠腫で発現変化しているかをELISA法で調べ、発現局在については免疫染色および*in situ* hybridizationを用いて検討した。

4. 研究成果

真珠腫に接する骨表面において破骨細胞が増加していることを示した。これまで真珠腫と骨を接着したまま破骨細胞の存在を検証した検討はなく、真珠腫における数的検証は初の報告となった。さらに、真珠腫perimatrixの線維芽細胞にRANKLの発現し、RNA-sequenceでも真珠腫が破骨細胞分化を進める遺伝子発現環境であることを示した。RANKL発現の上流因子の候補検索を行い、そのうち実際に真珠腫組織中でTNF- α 、IL-1、IL-6、PGE2の濃度が上昇していることを確かめた。さらにIL1が真珠腫に浸潤する炎症性細胞に発現していることを検証した。真珠腫における骨破壊はこれらの炎症性サイトカインによって刺激された真珠腫線維芽細胞がRANKLを発現し、破骨細胞が分化・増殖するという機序が考えられた。さらにこの研究は骨破壊抑制を焦点にした分子標的剤、特に現在他疾患で臨床で使われている抗RANKL抗体、抗IL-1抗体、抗IL-6R抗体、抗TNF抗体の点耳薬を中耳真珠腫の骨破壊阻止に対して開発する足がかりになると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Ryusuke Imai, Takashi Sato, Yoriko Iwamoto, Yukiko Hanada, Mika Terao, Yumi Ohta, Yasuhiro Osaki, Takao Imai, Tetsuo Morihana, Suzuyo Okazaki, Kazuo Oshima, Daisuke Okuzaki, Ichiro Katayama, Hidenori Inohara

Osteoclasts modulate bone erosion in cholesteatoma via RANKL signaling
Journal of the Association for Research in Otolaryngology 査読有り in press ,2019

Yoriko Iwamoto, Keizo Nishikawa, Ryusuke Imai, Masayuki Furuya, Maki Uenaka, Yumi Ohta, Tetsuo Morihana, Saori Itoi-Ochi, Josef M Penninger, Ichiro Katayama, Hidenori Inohara, Masaru Ishii

Intercellular Communication between Keratinocytes and Fibroblasts Induces Local Osteoclast Differentiation: a Mechanism Underlying Cholesteatoma-Induced Bone Destruction

Molecular and Cellular Biology 査読有り 16;36(11):1610-20,2016

〔学会発表〕(計 3 件)

今井隆介、佐藤崇、森鼻哲生、岡崎鈴代、大崎康宏、大島一男、太田有美、今井貴夫、猪原秀典

真珠腫に接する側頭骨の破骨細胞の数的検討

日本耳鼻咽喉科学会 2019 年

Ryusuke Imai, Takashi Sato, Yasuhiro Ohski, Yumi Ohta, Takao Imai, Hidenori Inohara
Prostaglandin E2 regulates osteoclastogenesis through the induction of RANKL in middle ear cholesteatoma.

Association for Research in Otolaryngology 2018

Ryusuke Imai, Takashi Sato, Mika Terao, Hiroyuki Murota, Hidenori Inohara, Ichiro Katayama

Prostaglandin E2 regulates osteoclastogenesis through the induction of RANKL in middle ear cholesteatoma

European Society for Dermatological Research 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

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。