

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：84408
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K16952
研究課題名(和文) 真珠腫性中耳炎に対するDNAメチル基転移酵素を標的としたエピゲノム創薬の有効性

研究課題名(英文) Efficacy of epigenomic drug discovery, targeting DNA methyltransferase for cholesteatoma.

研究代表者

岩本 依子 (Iwamoto, Yoriko)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・その他部局等・耳鼻咽喉科・診療主任

研究者番号：70636480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者の所属機関において、2018年度から2019年度にかけて真珠腫性中耳炎に対する鼓室形成術は合計32例が施行された。そのうち後天性真珠腫に対する手術が15例、先天性真珠腫に対する手術が12例、二次性真珠腫に対する手術が5例であった。当初、年間20例程度の検体採取を見込んでいたが、再発を認めなかった例や微小検体例、検体が角化層のみのものであり、検証対象となる顆粒層以下の非角化層の上皮を含む検体が12例と大幅に少なく、予定していた研究方法にて有意な結果を得るには不十分と判断し、研究を中断するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初、ヒト真珠腫におけるDNAメチル基転移酵素(DNMT)の角化重層扁平上皮細胞増殖への影響を検証するため、申請者の所属機関において真珠腫性中耳炎に対して施行された鼓室形成術にてヒト真珠腫検体を採取し、ヒト検体におけるDNAメチル基転移酵素の発現と臨床的重症度の相関の確認を行うことを予定していたが、検体量の不足のため予定を中断するに至った。今後、詳細な検証を行うためには、検体採取方法の改善により非角化層を多く含む検体の採取が望まれるとともに、多施設で検体採取を行うなど、より多くのヒト真珠腫検体を採取することが必要となると考える。

研究成果の概要(英文)：In my institution, 32 ears with middle ear cholesteatoma were operated for two years between fiscal 2018 and fiscal 2019. Fifteen cases had surgery for acquired cholesteatoma, 12 cases had surgery for congenital cholesteatoma, and 5 cases had surgery for secondary cholesteatoma. Initially, about 20 samples were expected to be collected annually, but there were cases in which recurrence was not observed, small sample cases, and samples of only keratinized layer. The number of samples containing nonkeratinized epithelium layer was extremely small (12 cases), and it was judged that samples were not sufficient to obtain significant results, and the study was discontinued.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：角化重層扁平上皮細胞 DNAメチル基転移酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 真珠腫は、骨を破壊する性質を持ち、側頭骨を溶解して進展するため、顔面神経麻痺・髄膜炎などの合併症を引き起こし、時には生命を脅かす疾患である。抗菌薬の発達や早期発見による中耳炎の軽症化が唱えられる近年でも頭蓋内合併症は毎年報告されており、見過ごすことの出来ない病態である。現在唯一の治療法は外科的摘出だが、真珠腫治療の選択肢の一つとしての保存的治療法開発が望まれている。真珠腫の骨破壊機序は未解明であるが、真珠腫と接する骨破壊面に破骨細胞が多数見られるという報告が古くよりなされている (Laryngoscope 94,76-95,1984)。

(2) 申請者らは、近年、マウス角化扁平上皮細胞および線維芽細胞を用い、真珠腫様の腫瘍をマウス生体内で作出する事に成功し、更にはその真珠腫瘍腫瘍が接する骨上に破骨細胞を誘導することを見出した。また、マウス角化扁平上皮細胞および線維芽細胞を用いた *in vitro* の共培養系にて、角化扁平上皮細胞から分泌される液性因子が線維芽細胞における破骨細胞分化誘導因子である receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の発現を上昇させ、破骨細胞分化を誘導することを確認した (Mol Cell Biol. 36,1610-20, 2016)。真珠腫性中耳炎では、角化重層扁平上皮細胞の異常増殖が主な病態と考えられているが、この結果から、角化重層扁平上皮の増殖が、破骨細胞誘導ひいては骨破壊に寄与している事が示唆され、角化扁平上皮の増殖抑制は、真珠腫の進展抑制に加えて骨破壊の予防に寄与することが期待される。

(3) 角化重層扁平上皮の異常増殖については、これまでに様々なサイトカインの関与が報告されている。一方で、真珠腫は後天的な非遺伝性疾患であり、外部環境からの刺激がその発生および進展に重要な役割を担っていると考えられるが、そのエピゲネティックな制御機構については未解明な点が多い。近年、ヒト上皮細胞について、DNA メチル基転移酵素 DNA methyltransferase (Dnmt) 3a および Dnmt3b によるエピゲノム調節が、幹細胞性の維持や増殖の調節に重要な役割を果たしていることが報告された (Cell Stem Cell. 6;19(4), 491-501, 2016)。これまでに、申請者らは、Dnmt3a が破骨細胞の分化の制御にも寄与しており、その酵素活性阻害剤である 3,3'-二没食子酸テアフラビンが破骨細胞の分化を抑制することを報告している (Nature Med 21(3):281-7; 2015)。つまり、DNA メチル基転移酵素活性阻害剤が、真珠腫上皮の増殖抑制および破骨細胞分化抑制による骨破壊抑制という二重の治療標的となりうる事を示唆している。そこで、申請者は 3,3'-二没食子酸テアフラビンの真珠腫における効果を確認するため、申請者が創出したマウスモデルを用い、線維芽細胞および角化扁平上皮にテアフラビンを混合し、真珠腫様腫瘍の作製を行った。テアフラビンを混合した群では腫瘍経が非混合群に比べ有意に小さく、更には誘導される破骨細胞数も少ないことが分かった (未発表)。この腫瘍形成能の抑制メカニズムを *in vitro* の培養系にて検証したところ、テアフラビンは角化扁平上皮の生存には影響しないが、細胞増殖を抑える効果をもつことが明らかになった。一方で、線維芽細胞の生存・増殖には影響を与えなかった。これらから、DNA メチル基転移酵素の阻害は、真珠腫の増殖抑制および骨破壊の抑制の双方を標的とした新たな保存的治療のエピゲノム創薬候補として期待される。

2. 研究の目的

これまでのマウスを用いた実験により得られた知見を元に、DNA メチル基転移酵素のヒト真珠腫における角化重層扁平上皮細胞増殖への影響を確認することで、DNA メチル基転移酵素阻害剤のヒト真珠腫への応用性を検証し、真珠腫上皮増殖の抑制、真珠腫による骨破壊抑制の双方を標的とした創薬開発につながる成果を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 申請者の所属機関において真珠腫性中耳炎に対して施行された鼓室形成術にてヒト真珠腫検体を採取する。

(2) ヒト検体における DNA メチル基転移酵素の発現・局在の確認を定量的 PCR や免疫組織染色を用い、mRNA レベルおよびタンパクレベルで確認し、臨床的重症度 (進展範囲・骨破壊の程度) との相関評価を行う。

4. 研究成果

(1) 申請者の所属機関において、2018 年度から 2019 年度にかけて真珠腫性中耳炎に対する鼓室形成術 (外耳道真珠腫・鼓室形成術後の医原性真珠腫を除く) は合計 32 例が施行された。そのうち後天性真珠腫に対する一期的手術および段階的手術の第 1 次手術が 7 例、第 2 次以降の手術が 8 例、先天性真珠腫に対する一期的および第 1 次手術が 5 例、第 2 次以降の手術が 7 例、二次性真珠腫に対する一期的および第 1 次手術が 4 例、第 2 次手術が 1 例であった。これらのうち 2 次手術以降の 6 例で再発を認めなかった。

DNA メチル基転移酵素については、上皮細胞幹細胞で高発現し、特に DNMT3b については分化早期に発現の減少が見られることが知られており (Cell Stem Cell. 6;19(4), 491-501, 2016)。発現の検証には基底層近くの細胞を含む検体が必要となるが、手術検体の中には、微小検体であるものや、角化層のみのものもあり、顆粒層以下の非角化層を含む検体は 12 例のみであった。当初年間 20 例程度の検体採取を見込んでいたが、実際得られる検体数が予定より大幅に少なくなる見込みとなり、今回予定していた研究方法にて有意な結果を得るには不十分と判断し研究

を中断するに至った。

(2) 基底層周囲を含む検体の採取のためには、perimatrix 層を含む検体採取が望ましく、検体採取法の検討が必要と思われる。また、これまでの報告で成人例では小児例に比べて線維層が厚いこと示唆されており (Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 82:73-7,2016) 成人例ではより perimatrix 層を含む検体が採取しやすい可能性もあり、幅広い年齢で検体採取を行い、比較することが望まれる。幅広い年齢での検体採取や検体量を増やす意味で、多施設での共同研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----