

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09388

研究課題名(和文) 骨破壊に係る遺伝子ネットワーク解析による中耳真珠腫の分子病態解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms of middle ear cholesteatoma by the analysis of gene network involving bone destruction

研究代表者

春山 琢男(haruyama, takuo)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80549270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Th17細胞の活性化を介した骨破壊は、慢性関節リウマチにみられる現象であるが、真珠腫性中耳炎においても同じTh17細胞を介した骨破壊が発生していることを発見した。この結果から「IL-17により惹起される骨破壊」という新しい機序の可能性が導き出された。そこで本研究ではその分子病態を解明するため、in-vitro解析によって真珠腫の骨破壊に関連する特異的遺伝子の発現解析に基づく遺伝子ネットワークプロファイルを決定した。具体的には、真珠腫上皮の培養系を用い、IL-17によって惹起される遺伝子の挙動をマルチプレックス解析で一挙に把握した。本プロファイル結果を基盤に、真珠腫の新規治療戦略に役立てる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中耳真珠腫の発症は全国で年間3,500-4,000症例と推察されている。現在、真珠腫性中耳炎の治療の中心は手術であるが、本研究の成果によって骨破壊を未然に防ぎ、顔面神経麻痺、めまい、難聴、髄膜炎などの重篤な合併症を回避させることは、患者救済に著しく貢献する。本課題に対して、真珠腫性中耳炎の骨破壊の免疫学的分子機構を分子レベルで解明し、治療戦略に新たな分子基盤を提供することが本研究の独創的かつ高い学術的特色である。今回の研究によって、真珠腫の骨破壊に関するターゲット遺伝子を解明することで新規の創薬の開発に繋がり、また手術を回避して保存的な治療が可能となり、臨床的に極めて意義深い研究となった。

研究成果の概要(英文)：Bone destruction mediated by activation of Th17 cells is a phenomenon seen in rheumatoid arthritis, but the applicants found that the same Th17 cell-mediated bone destruction also occurred in cholesteatoma otitis media. From this result, the possibility of a new mechanism of "bone destruction caused by IL-17" was derived. Therefore, in this study, in order to elucidate the molecular pathology, we determined a gene network profile based on the expression analysis of specific genes related to bone destruction in cholesteatoma by in-vitro analysis. Specifically, using a culture system of epithelium, the behavior of genes induced by IL-17 was grasped at once by multiplex analysis. Based on the results of this profile, it will be useful for new treatment strategies for cholesteatoma.

研究分野：鼻科学

キーワード：骨破壊 真珠腫性中耳炎 表皮細胞 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

中耳真珠腫の臨床的な重要課題は骨破壊による周囲組織の重篤な合併症を回避することである。これに対して研究代表者らは、真珠腫性中耳炎における骨破壊も Th17 細胞を介した骨代謝制御異常に起因することを初めて解明し、国際誌に発表した (Haruyama et al., *ORL* 72:325-331, 2010)。骨破壊をもたらす難治性の中耳真珠腫の病因を解明するために、ゲノムワイド関連解析(GWAS)による網羅的な解析で疾患特異的な遺伝子多型が探索され、比較的頻度の高い遺伝子多型に着目されていた。しかし、個体遺伝的バリエーションの解析は、アレル頻度の低い変異でも疾患発症に大きく寄与すると予測される遺伝子を検索することが必須とされている。デジタルオミックスアナライザーは細胞・組織・病理切片等から抽出した核酸分子を PCR 増幅なしに固定組織および低発現遺伝子も再現性高く発現、解析することができる。同時に多数の遺伝子の挙動を短時間で正確かつ再現性をもってマルチプレックス解析することができるため、多数の遺伝子が連動して複雑なネットワークを形成している遺伝子発現のプロファイルが可能となる。即ち、IL-17 によって惹起される多数の遺伝子の挙動を in-vitro 解析により、真珠腫の骨破壊に関連する特異的遺伝子の発現プロファイルが同定され、新規の治療戦略が構築可能となる。

2. 研究の目的

中耳真珠腫の発症は全国で年間 3,500-4,000 症例と推察されている。現在、真珠腫性中耳炎の治療の中心は手術であるが、本研究の成果によって新規の薬物治療を併用することによって骨破壊を未然に防ぎ、顔面神経麻痺、めまい、難聴、髄膜炎などの重篤な合併症を回避させることは、患者救済に著しく貢献する。この課題に対して、真珠腫性中耳炎の骨破壊の免疫学的分子機構を分子レベルで解明し、治療戦略に新たな分子基盤を提供できることが本研究の独創的かつ高い学術的特色である。既に、リウマチにおいては TNF- α 阻害により患者の関節炎抑制とともに骨破壊が抑制されることが報告されてきている。今回の研究によって、真珠腫の骨破壊に関するターゲット遺伝子を解明することによって新規の創薬の開発に結び付き、手術を回避して保存的な治療が可能となり、臨床的に極めて意義深い研究となる。

3. 研究の方法

本研究では真珠腫の骨破壊機序に重要なサイトカイン・キモカインの産生母地である構成細胞 (表皮細胞と線維芽細胞) を用いて、短期間で解析できる分離培養系を確立することにより、個々の患者の生体組織に近い in-vitro 評価系を確立する。既に、研究代表者らの先行研究 (Homma et al., *Acta Otolaryngol* 2014; Shiozawa et al., *Rhinology* 2015) においては、鼻ポリープ組織より簡便に上皮細胞と線維芽細胞の検体分離、培養に成功し、同細胞が凍結保存により生体機能を保存した状態で実験を行えることを確認している。この実験技術を真珠腫組織培養に応用する。摘出された真珠腫から表皮細胞と線維芽細胞を分離し、各々を純化培養する。培養された表皮細胞と線維芽細胞の真珠腫に特異的かつ生物学的な特性を確認するために、IL-17 を添加して表皮細胞から分泌されるフィラグリン量と線維芽細胞から分泌される RANKL 量を測定する。以上から、真珠腫を用いた in-vitro での培養実験系を構築する。

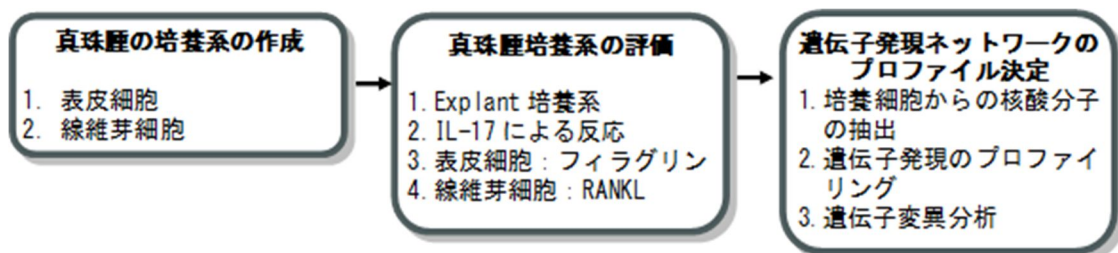
真珠腫から培養された上皮細胞と線維芽細胞の培養系を確立構成細胞系では上皮細胞と線維芽細胞に分離し、各々を純化培養する。IL-17 を培養系に非添加または添加し、細胞から核酸分子を抽出し、デジタルオミックスアナライザーによって PCR 増幅なしに、800 以上の炎症性・免疫性の関連遺伝子の挙動を短時間で正確かつ再現性をもってマルチプレックス解析して、多数の遺伝子が連動して複雑なネットワークを形成している遺伝子発現のプロファイルを作成する。IL-17 非添加群と添加群から得られた遺伝子発現のプロファイルを遺伝子発現変異分析法によって解析し、関連する特異的遺伝子の発現プロファイルを決定する。

真珠腫組織の摘出：手術時採取した上皮肉芽組織を含む真珠腫組織を細切する。摘出検体の酵素処理 Ca free MEM をバッファーとし、MEM with DNAase and protease を用いた酵素処理時間・濃度による最適条件の検討を行う。細胞の抽出：酵素処理後の検体を撈拌して遠心（1000rpm×5min）し、上清を抽出後再び遠心（1000rpm×5min）し上清を吸引し MEM を加える。表皮細胞と線維芽細胞の培養：培地として FBS/DMEM に表皮細胞と線維芽細胞を細胞特異的な成長因子を用いて純化培養を行う。培地濃度、検体濃度及び培養期間の検討を行う。

IL-17 付加の後、培養 24 および 72 時間後に培地を交換し 0-24hr,24-72hr,72-120hr の各培養上清から、表皮細胞ではフィラグリン量を、また線維芽細胞では RANKL 量濃度を測定する(ELISA 法)。

4 . 研究成果

真珠腫から培養された確立構成細胞から表皮細胞と線維芽細胞を分離し、各々を純化培養した。IL-17 を培養系に非添加または添加し、細胞から核酸分子を抽出し、デジタルオミックスアナライザーによって PCR 増幅なしに、800 以上の炎症性・免疫性の関連遺伝子の挙動を短時間で正確かつ再現性をもってマルチプレックス解析して、多数の遺伝子が連動して複雑なネットワークを形成している遺伝子発現のプロファイルを作成した。IL-17 非添加群と添加群から得られた遺伝子発現のプロファイルを遺伝子発現変異分析法によって解析し、関連する特異的遺伝子の発現プロファイルを同定した。結果を図式化して以下に提示する。



Th17 細胞の活性化を介した骨破壊は、慢性関節リウマチにみられる現象であるが、研究代表者らは、真珠腫性中耳炎においても同じ Th17 細胞を介した骨破壊が発生していることを発見した。この結果から「IL-17 により惹起される骨破壊」という新しい機序の可能性が導き出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sata Naoko, Higo Ryuzaburo, Yokoi Naoko, Haruyama Takuo, Yabe Ayumi, Kaga Akihito, Yoshikawa Hiroshi, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 111
2. 論文標題 A Case of Right-sided Pyriform Sinus Fistula	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Practica Oto-Rhino-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 51～56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5631/jibirin.111.51	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島崇史, 春山琢男, 塩沢晃人, 肥後隆三郎, 池田勝久
2. 発表標題 外科的治療が有効であった眼窩先端症候群の2例
3. 学会等名 第58回日本鼻科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 春山琢男
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎の新たな治療
3. 学会等名 第146回御茶ノ水耳鼻咽喉・頭頸科治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林優子, 肥後隆三郎, 春山琢男, 山内宏一, 塩沢晃人, 陶美梨, 大庭亜由子, 井出琢磨, 池田勝久
2. 発表標題 不明熱の原因として腎血管筋脂肪腫が疑われた1症例
3. 学会等名 第6回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島早百合, 塩沢晃人, 春山琢男, 肥後隆三郎
2. 発表標題 小児における鼻性眼窩内合併症の外科的治療の検討
3. 学会等名 第57回日本鼻科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩沢晃人, 春山琢男, 肥後隆三郎
2. 発表標題 前頭洞より波及した鼻性眼窩内合併症の1例
3. 学会等名 第80回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	古川 正幸 (Furukawa Masayuki) (20359524)	順天堂大学・医学部・先任准教授 (32620)	
研究分担者	楠 威志 (Ksunoki Takeshi) (30248025)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	池田 勝久 (Ikeda Katsuhisa) (70159614)	順天堂大学・医学部・特任教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------