

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09844

研究課題名(和文) 中耳真珠腫の破骨細胞を介した骨破壊を標的とする保存的治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of conservative therapy in osteoclast mediated cholesteatoma bone destruction.

研究代表者

大島 一男 (Oshima, Kazuo)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：80832930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト真珠腫検体の単細胞シーケンスを行い、inhibin A(INHBA)を高発現する真珠腫特異的な線維芽細胞のsubsetを同定した。次にINHBAの二量体であるactivin Aが破骨細胞分化を促進することをin vitroで確認し、真珠腫モデルマウスで線維芽細胞のINHBAの発現を欠損させることで破骨細胞分化が減少することを確認した。これらことから、ヒトの真珠腫組織に特異的なactivin A産生線維芽細胞は、局所的な破骨細胞分化を誘導することにより骨破壊を引き起こすことが示唆され、治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中耳真珠腫は近接する側頭骨やその内部構造物を溶解しながら進展する炎症性の疾患だが、骨破壊の機序は明らかになっていない。唯一の治療は外科的な切除だが、未だに有効な保存的治療手段はない。今回、我々は真珠腫線維芽細胞によって局所的な破骨細胞分化が誘導されることを明らかにし、線維芽細胞が保存的治療のターゲットになり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：We performed single cell RNA-seq in human cholesteatoma and identified a subset of cholesteatoma fibroblasts that highly expressing inhibin A (INHBA). Next, we confirmed that activin A, a dimer of INHBA, promotes osteoclast differentiation in vitro, and the deletion of INHBA in fibroblasts reduced osteoclast differentiation in cholesteatoma murine model. These findings suggest that activin A-producing fibroblasts cause bone destruction by inducing local osteoclast differentiation and may be a potential therapeutic target.

研究分野：耳科学

キーワード：中耳真珠腫 骨破壊 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真珠腫性中耳炎は骨破壊により重篤な合併症を引き起こすが、その骨破壊の機序は解明されていない。我々はこれまでに臨床検体を用い、真珠腫に接する骨表面上に破骨細胞が多数存在し、更に真珠腫内の線維芽細胞が破骨細胞誘導因子(RANKL)を発現していることを見出した。また、RANKL発現を促進するIL-1、IL-6、TNF-、PGE2等の発現が真珠腫において対照群より高いことを確認した。本研究では、真珠腫における骨破壊の機序として上記種の物質に着目し、in vivo系、in vitro系を用いてシグナル伝達経路の活性化・抑制実験を行い、真珠腫による骨破壊を予防する薬剤の開発を目指す。

2. 研究の目的

真珠腫の骨破壊誘導の機序としてIL-1、IL-6、TNF-、PGE2の4種の物質に注目し、in vitroおよびin vivoの系でこれらのシグナル経路を活性化または抑制することで、線維芽細胞からのRANKL発現が正の相関を持って増減するかを検証する。また、4種の物質の阻害剤が真珠腫モデルマウスにおける骨破壊能を抑制することを検証する。更に、これらの薬剤の内耳毒性を評価し、実臨床での応用可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

まずはヒト真珠腫検体の解析を詳細に行うため、単細胞シーケンスを実施した。手術で得られた真珠腫検体と、手術時の耳後部切開創からコントロールとして皮膚を採取した。採取した真珠腫、皮膚検体をMiltenyi Biotec社のWhole Skin Dissociation Kitを用いて酵素処理を行った後、同社のDebris Removal Solutionで処理し細胞へと単離した。単離した細胞からcalcein陽性7-AAD陰性CD45陰性細胞をセルソーティングで採取し、BD社のRhapsodyシングルセル解析システムを用いてWhole Transcriptome Analysisを行った。

4. 研究成果

(1) ヒト真珠腫検体のscRNA-seq

三人の患者から採取した真珠腫検体と皮膚検体を用いて、ヒト真珠腫検体の一細胞RNA解析を行った。真珠腫線維芽細胞はinhibin A (INHBA)をコントロールの皮膚線維芽細胞と比較して豊富に発現しており、また線維芽細胞に対してsubclustering解析を行ったところ、INHBAを特に高発現する病原性線維芽細胞のsubsetを同定した。

(2) 線維芽細胞におけるINHBA発現解析

真珠腫と健常皮膚から、線維芽細胞(CD45陰性E-cadherin陰性CD31陰性細胞)をソーティングで回収し、droplet digital PCRでINHBAの発現を定量したところ、真珠腫線維芽細胞でINHBAが有意に高発現していた。また真珠腫の蛍光免疫染色で真珠腫線維芽細胞がINHBAを発現していることを確認した。次に前述の4種の物質をヒト皮膚線維芽細胞に添加したところ、IL1-、TNF-、PGE2によってINHBAの発現が誘導された。

(3) 骨髄マクロファージを用いたin vitro機能解析

次にINHBAの二量体であるactivin Aをreceptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)存在下で骨髄マクロファージに添加し、activin AがRANKLと協調して破骨細胞分化を促進することをin vitroで確認した。

(4) 真珠腫モデルマウスを用いたin vivo機能解析

INHBA^{fl/fl}Rosa26^{CreERT2}マウス(Ryanto, G.R.T., et al. *Nat Commun* 12, 1720. 2021)の耳介から線維芽細胞を採取し4-hydroxy Tamoxifenを添加して培養することで、線維芽細胞からINHBA/activin Aの発現を欠損させたconditional knock outマウスを作成した。INHBA / activin A欠損真珠腫モデルマウスで骨表面に誘導される破骨細胞が減少することを確認した。さらに、activin Aのantagonistであるfollistatinによっても真珠腫モデルマウスで破骨細胞分化が減少することを確認した。これらのことから、ヒトの真珠

腫組織に特異的な activin A 産生線維芽細胞は IL1- 、TNF- 、PGE2 によって誘導され、局所的な破骨細胞分化を促すことにより骨破壊を引き起こすことが示唆された。当研究により、INHBA / activin A が真珠腫の治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

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
研究分担者	太田 有美 (Ohta Yumi) (00598401)	大阪大学・大学院医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	佐藤 崇 (Sato Takashi) (30756002)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	今井 貴夫 (Imai Takao) (80570663)	奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師 (24601)	

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
---------	---------