

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09855

研究課題名（和文）難聴・平衡障害における破骨細胞の関与に関する検討

研究課題名（英文）analysis of osteoclasts involved in hearing loss and balance disorder

研究代表者

神崎 晶（KANZAKI, SHO）

独立行政法人国立病院機構（東京医療センター臨床研究センター）・聴覚・平衡覚研究部・室長

研究者番号：50286556

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：中耳炎によって耳小骨が溶解し難聴になってしまうことが臨床問題であるが、詳細な機序についてはわかっていない。Lipopolysaccharide(LPS)を中耳内に単回投与した中耳炎モデルを用いて、マウス中耳洗浄液中IL-6の上昇がみられた。さらに、破骨細胞の血管周囲誘導像が3次的に観察し、LPS投与群と生食投与群を比較した。ヒト耳小骨と同じく、表面の一定部位に複数の孔が存在することを確認した。中耳炎により難聴となる機序の1つとして、LPSにより炎症細胞が惹起され、誘導された破骨細胞が耳小骨内血管に作用し、血流を増やすことにより、サイトカインネットワークが増幅される、という仮説が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義）骨は通常運動器のために存在しているが、中耳耳小骨のみ、感覚器としては唯一の骨である。骨破壊によって難聴になるが、まずはその機序が不明である。今回用いた透明化と血流解析によって解剖上複雑な臓器の3次元解析と血流の解析結果を示すことができたので、より複雑な解剖を呈する内耳にも応用可能である。  
社会的意義）中耳炎は世界の至る箇所で小児を中心に広く認められる疾患である。特に抗生剤が不足している国々においては、中耳炎による鼓膜穿孔や中耳炎による耳小骨連鎖が溶解し難聴になってしまう。手術が必要であるが、そのような国々では手術も行われていないため文盲、さらに貧困の原因になる。

研究成果の概要（英文）：In an otitis media model mice with a single dose of lipopolysaccharide (LPS), an increase in IL-6 in the middle ear lavage fluid of mice was observed. In addition, perivascular induced osteoclasts were observed in three dimensions and compared between the LPS-treated and normal saline groups. As in the human ear ossicles, multiple pores were observed at certain sites on the surface. One of the hypothesized mechanisms of otitis media and hearing loss is that LPS induces inflammatory cells, and then induce osteoclasts that act on blood vessels in the ossicles and increase blood flow, thereby amplifying the cytokine network.

研究分野：耳科学

キーワード：耳小骨 破骨細胞 骨溶解 血流 透明化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

耳小骨は音を伝えるうえで大切な臓器であり、感覚器では唯一の骨である。とはいえ耳小骨は運動器の骨と同様な特徴を有している一方で、骨のターンオーバーが極端に長いこともわかっている。

一方、急性中耳炎は、小児疾患においては最多の罹患数を示す疾患である。中耳炎を反復することによる慢性中耳炎では難聴になり、小児期になることが多いことから、文盲や経済的貧困になりうるということが報告されている。その難聴の一因としては、細菌感染による耳小骨の溶解が考えられる。その機序には耳小骨代謝を担う破骨細胞と骨芽細胞とのバランスの崩れによる過剰な骨吸収が考えられるが、詳細は不明のままである。また、耳小骨が溶解すると手術治療が必要になってしまうことから、機序を解明し予防することで手術を回避できるというメリットがある。

### 2. 研究の目的

われわれは、Lipopolysaccharide (LPS) 単回投与によって耳小骨内で破骨細胞が血管周囲に誘導される可能性を示唆した。本研究では、LPS 単回投与により得られた中耳洗浄液中のサイトカインと耳小骨破骨細胞との関連を解析するとともに、鼓膜穿孔の影響を受けにくい難聴中耳炎モデルを作製することを目的とした。

### 3. 研究の方法

破骨細胞の局在を 3 次元的に解析するために、破骨細胞を赤色蛍光タンパク質で可視化できる TRAP-tdTomato マウスを用いて、中耳炎モデルを作製した。マウス鼓室内に緑膿菌由来 LPS を 27G 針で投与し、急性中耳炎モデルとした。別個体に生理食塩水 (生食) を鼓室内投与し、対照群とした。投与 3 日後にマウスを犠牲死させ、生食を用いて中耳を洗浄し、洗浄液中のサイトカインを測定した。また、単離したツチ骨を透明化処理し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてツチ骨における破骨細胞の局在を観察した。

さらに、TRAP-tdTomato マウスの右耳に LPS を含んだハイドロゲル、左耳に生理食塩水ゲルを、33G 針を用いて鼓室内投与し、新たな難聴中耳炎モデルの作製を試みた。投与 1 日後、3 日後、7 日後の耳骨胞中ゲルの残存と鼓膜穿孔の閉鎖を観察した。

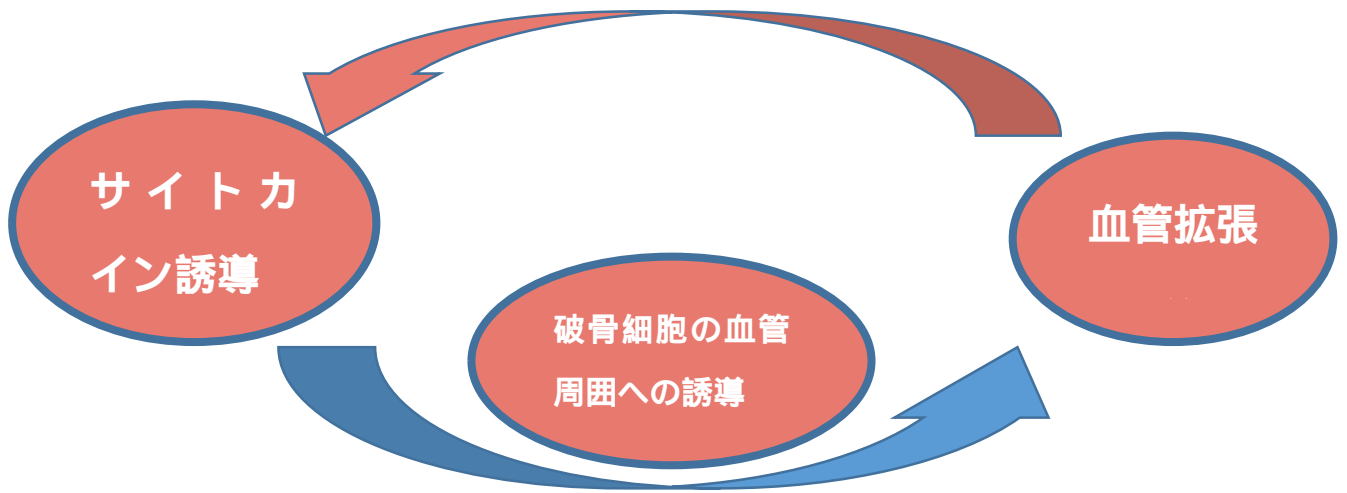
### 4. 研究成果

中耳炎モデルマウスの中耳洗浄液をサイトカインアレイにより解析した結果、LPS 投与で特異的に上昇しているサイトカインがある一方で、炎症性サイトカインの一部は生食投与によっても誘導されていた。生食投与群と比較して有意に洗浄液中の IL-6 が上昇していた耳のツチ骨を透明化し観察したところ、骨表面及び骨内部の血管周囲に TRAP-tdTomato 陽性の破骨細胞が出現していた。

LPS 単回投与により発現が上昇するサイトカインが複数あり、それらのサイトカインが耳小骨での破骨細胞誘導に寄与していることが示唆された。中耳炎においては、LPS により炎症反応が惹起され、破骨細胞が誘導されることで骨溶解を起し、難聴になると推測される (図 1)。

今後の展望としては、本疾患モデルの結果から骨破壊の機序を解明し、臨床応用に向けた治療の開発を検討したいと考えている。

図1 サイトカイン誘導、血管拡張、破骨細胞との関係



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Li Yang, Kanzaki Sho, Shibata Shinsuke, Nakamura Masaya, Ozaki Masahiro, Okano Hideyuki, Ogawa Kaoru	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparison of Drug Availability in the Inner Ear After Oral, Transtympanic, and Combined Administration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2021.641593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishiyama Yuri, Nishiyama Takanori, Kanzaki Sho, Oishi Naoki, Fujioka Masato, Yamada Hiroyuki, Ebisuno Chihiro, Kaiho Mayumi, Uwamino Yoshifumi, Fukano Hanako, Hoshino Yoshihiko, Hasegawa Naoki, Ogawa Kaoru	4. 巻 27
2. 論文標題 Three cases of otitis media caused by Mycobacterium abscessus subsp. abscessus: Importance of medical treatment and efficacy of surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1251-1257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2021.04.012	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kanzaki Sho, Takahashi Satoshi, Toda Masahiro, Yoshida Kazanari, Ogawa Kaoru	4. 巻 28
2. 論文標題 Pros and Cons of the Exoscope for Otologic Surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgical Innovation	6. 最初と最後の頁 360-365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1553350620964151	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kanzaki S, Kanzaki J, Ogawa K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Surgical Treatment of Otosclerosis Using a Unique Stapes Prosthesis Without Hook.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Otolaryngologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kanzaki S, Toyoda M, Umezawa A, Ogawa K.	4. 巻 21(16)
2. 論文標題 Application of Mesenchymal Stem Cell Therapy and Inner Ear Regeneration for Hearing Loss:	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤山 拓海, 黒田 有希子, 松尾 光一, 神崎晶.
2. 発表標題 マウス急性中耳炎モデルにおける中耳洗浄液の解析と難聴中耳炎モデルの作製.
3. 学会等名 第32回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 19.野田 渉, 黒田 有希子, 神崎晶, 松尾 光一.
2. 発表標題 キヌタ骨における血管の走行と骨貫通部位の種間保存性に関する解析.
3. 学会等名 第32回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木開, 黒田有希子, 松尾光一, 神崎晶
2. 発表標題 中耳炎でなぜ難聴になるのか? 耳小骨溶解の機序の解明
3. 学会等名 第31回日本耳科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神崎晶
2. 発表標題 ヒスタミンと鼻アレルギーと中耳の破骨細胞
3. 学会等名 第31回日本耳科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神崎晶、小川郁
2. 発表標題 なぜ中耳炎で難聴になるのか
3. 学会等名 日本耳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高芝愛美香、神崎晶、小川郁
2. 発表標題 リボポリサッカライドを加えた鼓室内投与による内耳薬物動態の経時的変化に関する検討
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木開、小川郁
2. 発表標題 TRAP 染色を用いた中耳炎マウスにおける耳小骨の破骨細胞の観察
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Kanzaki et al
2. 発表標題 In vivo imaging analysis of an inner ear drug delivery :Combined injections
3. 学会等名 AAOHNS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kanzaki S, Shibata S, Nakamura M, Ozaki M, Okano H.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 nature springer	5. 総ページ数 4
3. 書名 Methods Molecular Biology, Bioluminescence,	

〔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
研究協力者	松尾 光一 (Matsuo Koichi) (40229422)	慶應義塾大学・細胞組織学研究室・教授 (32612)	

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