

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09857

研究課題名(和文) 中耳真珠腫腫瘍幹細胞同定：神経堤由来細胞の可能性と腫瘍幹細胞化Key分子の同定

研究課題名(英文) To identify the key molecules of stem cell : Possible involvement of neural crest-derived cells against the pathogenesis of middle ear cholesteatoma

研究代表者

福田 智美 (Yamamoto-fukuda, Tomomi)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40372776

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)：本研究では、中耳真珠腫腫瘍幹細胞系譜、腫瘍幹細胞化Key分子の同定を目的とし、中耳発生で中耳粘膜細胞に分化する神経堤細胞に着目した。

神経堤由来細胞を可視化出来るトランスジェニックマウス(Wnt1EGFP)を用い、KGF誘導性実験的中耳真珠腫を作製し、組織学的検討を行った。結果、マウス中耳真珠腫の構成細胞として神経堤由来の細胞を同定し、中耳真珠腫を構成する神経堤由来細胞のマーカーとしてp75遺伝子を検出した。ヒト真珠腫組織でも真珠腫組織中に多数のp75陽性細胞を認めた。動物真珠腫モデルを用いた抑制では、p75陽性細胞を死滅させることで真珠腫が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中耳真珠腫構成細胞として神経堤由来細胞の存在とその細胞のマーカーが同定できた。これまで唯一であった手術療法といった真珠腫性中耳炎の治療法が根本的に変化する可能性があり、その結果、発症率および再発率の減少、手術による合併症の減少、が期待でき、

入院費・手術費・外来通院費の削減などの、医療経済効果も見込める。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on neural crest cells that differentiate into middle ear mucosa cells during middle ear development in order to identify the middle ear cholesteatoma stem cell lineage and stem cell-forming Key molecules.

Using transgenic mice (Wnt1EGFP) in which neural crest-lineage cells can be visualized, we generated KGF-inducible experimental middle ear cholesteatoma and examined them histologically. We identified neural crest-lineage cells as a component of mouse cholesteatoma and detected the p75 gene as a marker of middle ear cholesteatoma-derived neural crest-lineage cells. A large number of p75-positive cells were also found in human cholesteatoma tissues. The mouse cholesteatomas were suppressed by killing p75-positive cells in vivo.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：中耳真珠腫 シングルセル解析 腫瘍幹細胞化Key分子

1. 研究開始当初の背景

中耳真珠腫は、その病因として中耳調圧機構の破綻を誘因とした中耳腔陰圧による鼓膜の陥凹、上皮増殖、真珠腫形成が報告されており(Magnuson K et al, Eur Arch Otorhinolaryngo 1995)、その組織は増殖能が充進した上皮組織と厚い皮下肉芽組織から構成される。これまでにヒト真珠腫組織での解析(Yamamoto-Fukuda T et al, Lab Invest 2003)および間欠的角化細胞増殖因子(KGF)プラスミ導入による KGF 蛋白長期発現モデルでの解析(Yamamoto-Fukuda T et al, Acta Otolaryngol 2014, Yamamoto-Fukuda T et al, Eur Arch Otorhinolaryngol 2015)から KGF と受容体(KGFR)のパラクライン機構が中耳真珠腫増大・再形成に強く関与していること、更に KGF を介した上皮幹細胞・前駆細胞の増殖が本態であると示し(Yamamoto-Fukuda T et al, J Assoc Res Otolaryngol 2018)、その誘導因子の一つとしてエピゲノム因子が考えられた(福田智美 Bio Clinica 2016)。また、近年 Sudhoff H ら(Sci Rep 2018)がヒト中耳真珠腫由来初代培養細胞を用いて腫瘍幹細胞の存在を同定しているが、まだ細胞系譜および細胞マーカーの同定はできていない。

2. 研究の目的

これまで中耳腔粘膜はすべて第一咽頭嚢(内胚葉)由来と考えられてきたが、Thompson ら(Science 2013)によって上鼓室粘膜は神経堤細胞由来であることが示唆された。近年では神経堤由来細胞の増殖能の高さが指摘されており、神経堤由来幹細胞の報告も散見される(Morikawa et al, Biochem Biophys Res Commun 2009)。上鼓室は中耳真珠腫好発部位であり、真珠腫細胞はこれまで考えられていた皮膚などと同様の外胚葉上皮細胞由来ではなく神経堤由来の細胞である可能性も考えられた。

中耳真珠腫の増悪・進行予防では無く完全治癒を目指す場合、真珠腫腫瘍幹細胞の由来・性質の同定、及び正常細胞への分化誘導分子をとらえることが不可欠である。神経堤由来細胞が中耳真珠腫幹細胞である可能性も含め分子標的治療を目的に検討したいと考えた。

3. 研究の方法

＜トランスジェニックマウスを用いた KGF 誘導性実験的中耳真珠腫での神経堤由来細胞解析＞
計画 1. トランスジェニックマウス(Wnt1CreEGFP)での神経堤由来細胞の局在解析と神経堤由来細胞の抽出

- i) 発生期神経堤細胞に GFP 標識を付加した Wnt1CreEGFP マウスの作成および系統維持
 - ii) TG マウスでの神経堤由来細胞の局在解析を免疫組織化学法で行う
- 計画 2. トランスジェニックマウスマウスでの実験的中耳真珠腫作製
- i) 若齢マウス中耳に KGF 発現ベクターを導入し実験的中耳真珠腫作製、コントロールとして空ベクター導入群を作製する
 - ii) 内視鏡を用いた観察、組織細胞学的解析

＜真珠腫を構成する神経堤由来細胞マーカー遺伝子同定＞

計画 1. トランスジェニックマウスマウスでの検討

- i) 計画 2. で得られたサンプルを用い、qPCR 検定を行いマーカー候補遺伝子の洗い出す
- 計画 2. ヒト組織を用いた検討
- i) 手術中に採取したサンプル(後天性真珠腫(弛緩部型真珠腫、緊張部型真珠腫)、先天性真珠腫、穿孔性慢性中耳炎、鼓室硬化症、正常骨部外耳道皮膚)での免疫染色を行い、マーカー候補遺伝子の絞り込む

計画 3. 候補遺伝子導入による中耳粘膜細胞増殖能の変化の検討

- i) 野生型中耳粘膜細胞の初代培養細胞に、候補遺伝子プラスミドを導入し、細胞増殖率を検定する

＜真珠腫抑制実験＞

- i) 候補遺伝子タンパク陽性細胞の細胞死誘導し、真珠腫組織抑制率を検定する。

＜シングルセル(単一細胞)解析＞

- i) 計画 2. で得られたサンプルを用い、群間比較解析行う

4. 研究成果

本研究では、中耳真珠腫腫瘍幹細胞系譜同定、腫瘍幹細胞化 Key 分子(マーカー分子)同定、幹細胞の腫瘍化から正常分化への誘導を試み新規保存治療開発を目的とした。中耳発生で中耳粘膜細胞に分化する神経堤細胞に着目した。

神経堤由来細胞を可視化出来るトランスジェニックマウス(Wnt1EGFP)を用い、KGF 誘導性実験的中耳真珠腫を作製し、組織学的検討を行った。結果、マウス中耳真珠腫の構成細胞として神経堤由来の細胞を同定し、中耳真珠腫を構成する神経堤由来細胞のマーカーとして p75 遺伝子を検出した。ヒト真珠腫組織でも真珠腫組織中に多数の p75 陽性細胞を認めた。野生型中耳粘膜細胞に p75 遺伝子を導入することにより増殖能が上昇し、p75 遺伝子は真珠腫細胞の増殖に関与することが示された。動物真珠腫モデルを用いた抑制では、p75 陽性細胞を死滅させることで真珠

腫が抑制された。

中耳真珠腫は上皮系細胞と間葉系細胞の混合的な細胞集団から構成されており、培養系では再現できずまた動物モデルではそのサンプル量が少ないことから、同一個体での個々の細胞集団を解体し解析することが難しかった。「シングルセル（単一細胞）解析」は腫瘍に含まれる細胞を個別に解析していく研究方法であり、細胞集団を解析して平均値を捉えるこれまでの手法では見逃されてきた新しい細胞種、またこれまでになくレベルで細胞機能を解明できると考え、シングルセル解析も検討した。具体的には、WT マウス又は Wnt1EGFP マウス中耳粘膜組織を採取後一細胞に分離し、MPP-300Z マイクロピック&プレース CompassZ システム（ネッパジーン）を用い蛍光顕微鏡下に神経堤由来細胞の抽出を試みたが、GFP 発光強度が弱いため抽出できなかった。よって各々の群より 43 細胞を抽出し DNA ライブラリー作製・トランスクリプトーム解析を行ったが、クラスター解析ができなかった。原因としては、cDNA ライブラリーが得られたサンプル数が少なく目的とする神経堤由来細胞を明らかにできなかったことにある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11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 Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Hirabayashi M, Shimmura H, Kojima H	4. 巻 44(3)
2. 論文標題 Epigenetic Regulation as a New Therapeutic Target for Middle Ear Cholesteatoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Otol Neurotol.	6. 最初と最後の頁 273-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MAO.0000000000003795.	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 Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Tatsumi N, Okabe M, Kojima H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Keratinocyte Growth Factor Stimulates Growth of p75+ Neural Crest Lineage Cells During Middle Ear Cholesteatoma Formation in Mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 00241-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2022.07.010.	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 Akiyama N, Yamamoto-Fukuda T, Yoshikawa M, Kojima H.	4. 巻 7(3)
2. 論文標題 Analysis of the epidermal growth factor receptor/phosphoinositide-dependent protein kinase-1 axis in tumor of the external auditory canal in response to epidermal growth factor stimulation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investig Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 730-739.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lio2.785.	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 Akiyama N, Yamamoto-Fukuda T, Kojima H.	4. 巻 142(6)
2. 論文標題 miR-34a predicts the prognosis of advanced-stage external auditory canal squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 537-541.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00016489.2022.2086292	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 福田 智美, 穠山 直太郎, 小島 博己	4. 巻 66巻1号
2. 論文標題 中耳真珠腫の発症機序に関する考察 これまでの実験結果から(総説)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科展望	6. 最初と最後の頁 11-16
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 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 -

1. 著者名 福田 智美	4. 巻 2巻6号
2. 論文標題 真珠腫の発症機序(解説)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科	6. 最初と最後の頁 804-813
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 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 -

1. 著者名 Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Kojima H	4. 巻 22
2. 論文標題 Super-enhancer Acquisition Drives FOXC2 Expression in Middle Ear Cholesteatoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Assoc Res Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 405-424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10162-021-00801-7	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 Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Tatsumi N, Okabe M, Kojima H.	4. 巻 140
2. 論文標題 Menin-MLL inhibitor blocks progression of middle ear cholesteatoma in vivo.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Pediatr Otorhinolaryngol.	6. 最初と最後の頁 110545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijporl.2020.110545	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 Yamamoto-Fukuda Tomomi, Akiyama Naotaro, Kojima Hiromi	4. 巻
2. 論文標題 Super-enhancer Acquisition Drives FOXC2 Expression in Middle Ear Cholesteatoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Association for Research in Otolaryngology	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) 10.1007/s10162-021-00801-7	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 Yamamoto-Fukuda Tomomi, Akiyama Naotaro, Tatsumi Norifumi, Okabe Masataka, Kojima Hiromi	4. 巻 140
2. 論文標題 Menin-MLL inhibitor blocks progression of middle ear cholesteatoma in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology	6. 最初と最後の頁 110545 ~ 110545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijporl.2020.110545	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 Yamamoto-Fukuda Tomomi, Akiyama Naotaro	4. 巻 28
2. 論文標題 Keratinocyte growth factor signaling promotes stem/progenitor cell proliferation under p63 expression during middle ear cholesteatoma formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery	6. 最初と最後の頁 291 ~ 295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/M00.0000000000000655	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 Yamamoto-Fukuda Tomomi, Akiyama Naotaro, Kojima Hiromi	4. 巻 190
2. 論文標題 L1CAM-ILK-YAP Mechanotransduction Drives Proliferative Activity of Epithelial Cells in Middle Ear Cholesteatoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1667 ~ 1679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.04.007	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 Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Kojima H.	4. 巻 128
2. 論文標題 Keratinocyte growth factor (KGF) induces stem/progenitor cell growth in middle ear mucosa.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Pediatr Otorhinolaryngol.	6. 最初と最後の頁 109699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijporl.2019.109699.	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 福田 智美, 穠山 直太郎, 平林 源希, 新村 一, 小島 博己
2. 発表標題 真珠腫性中耳炎とエピジェネティクス エピジェネティクス治療薬の有用性の検討
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 穠山 直太郎, 福田 智美, 吉川 衛, 小島 博己
2. 発表標題 外耳道EGF過剰発現マウスモデルを用いたEGFR/PDPK1シグナル阻害効果の解析
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 Tomomi Yamamoto-fukuda
2. 発表標題 Special Program 3; Cholesteatoma; Epigenetic regulation as a new target for middle ear cholesteatoma therapy.
3. 学会等名 7th East Asian Symposium on Otolology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田 智美, 穠山 直太郎, 高橋 昌寛, 小島 博己
2. 発表標題 中耳真珠腫母膜増殖機構の解析: 部分的上皮間葉移行の可能性
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 穠山 直太郎, 福田 智美, 高橋 昌寛, 吉川 衛, 小島 博己
2. 発表標題 ラット中耳陰圧モデル鼓膜上皮および中耳真珠腫上皮における ILK-YAP シグナルの解析
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 昌寛, 福田 智美, 茂木 雅臣, 穠山 直太郎, 山本 和央, 田中 康広, 山本 裕, 小島 博己
2. 発表標題 中耳真珠腫におけるタイトジャンクション関連分子発現の検討
3. 学会等名 第120回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomomi Yamamoto-fukuda
2. 発表標題 New findings on the cellular origin of middle ear cholesteatoma
3. 学会等名 11th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto-fukuda
2. 発表標題 Negative pressure in the middle ear and the mechanism of induction of middle ear cholesteatoma
3. 学会等名 11th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田 智美, 穠山 直太郎, 小島 博己
2. 発表標題 真珠腫性中耳炎発症機序に基づいた抗体療法の可能性
3. 学会等名 第33回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023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	穠山 直太郎 (Akiyama Naotaro) (90554238)	東邦大学・医学部・講師 (32661)	

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