

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2022
課題番号：19K18790
研究課題名(和文) バイオインフォマティクスアプローチによる後天性中耳真珠腫シグナル伝達機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of Signaling Mechanisms in Acquired Middle Ear Cholesteatoma via a Bioinformatics Approach

研究代表者
福田 篤 (Fukuda, Atsushi)
北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：70609742
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)：真珠腫組織を用いてPCR法によるNotchシグナル関連遺伝子の発現分析と免疫組織化学染色によるNotchシグナル関連タンパクの発現分析を施行したところ、正常外耳道皮膚に比べて真珠腫組織におけるNotch1遺伝子の発現は有意に低下し、HES1遺伝子の発現の低下もみられた。さらに、Notch1とHES1タンパクの発現は、正常外耳道皮膚に比べて有意に低下していた。Notchシグナルはケラチノサイトの増殖停止と分化を導くことが報告されているが、真珠腫におけるNotch1とHES1の発現低下は、ケラチノサイトが分化から増殖へとバランスを変化させ、病的状態の原因を引き起こしている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後天性中耳真珠腫における角化扁平上皮の異常増殖性に関して、Notch1とHES1の発現低下が病態生理に関与している可能性が本研究にて明らかになった。このことから、Notchシグナル関連分子に着目することで、後天性中耳真珠腫に対する新たな治療戦略が見つかる可能性がある。後天性中耳真珠腫の発症原因は未だ明らかではなく、依然として根本的治療は外科的治療のみであるが、新たな標的分子、シグナル伝達機構を解明することができれば、今後の後天性中耳真珠腫治療におけるbreak throughとなり、真珠腫に対する非外科的治療法開発へ大きな一歩となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed polymerase chain reaction in the cholesteatoma and external auditory canal (EAC) skin samples. This was followed by immunohistochemical staining of Notch1, enhancer of split-1 (HES1) cholesteatoma and EAC skin samples, respectively. The fold change of Notch1 gene expression was lowest in cholesteatoma, with a statistically significant difference. Moreover, the fold change of HES1 expression decreased. The positive rates of Notch1 and HES1 protein expressions in the cholesteatoma were significantly lower than in the EAC skin. The decreases in Notch1 and HES1 protein expression might play an important role in the hyperproliferative character of the keratinizing squamous epithelium in cholesteatoma.

研究分野：耳科学

キーワード：後天性中耳真珠腫 Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

後天性中耳真珠腫は、角化扁平上皮 Keratinocyte の異常増殖により側頭骨中耳に生じる境界明瞭な非腫瘍性病変である。後天性中耳真珠腫は局所浸潤性で中耳および内耳破壊の原因となり、難聴、めまい、顔面神経麻痺をもたらす。頭蓋内に進展した場合は合併症により死亡する可能性がある。これまで多数の研究が行われてきたにもかかわらず、後天性中耳真珠腫の発症原因は未だ明確にされておらず、依然として根本的治療は外科的治療のみである。

真珠腫は腫瘍ではないが新生物に類似した臨床的特徴を示す。これまでの報告から、真珠腫は細胞過剰増殖へとバランスが変化し、浸潤・骨溶解作用が増強された、制御不能な細胞増殖の一例であると考えられている。細胞増殖の調整不全には、細胞内部のゲノム異常やエピジェネティックな変化や外部刺激が関与していると考えられ、この反応には細胞内外の様々なシグナル伝達カスケードが関与すると考えられている。

上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor; EGFR)は正常細胞の増殖と分化に関連があることが明らかにされているが、真珠腫でも EGFR の過剰発現が同定されており、EGFR 遺伝子調節の変化が真珠腫の増殖に関係していることが示唆される。しかし、EGFR 遺伝子調節の変化による真珠腫上皮の過剰増殖と、真珠腫による周囲組織への浸潤・骨溶解作用の程度に必ずしも相関は認められておらず、なぜ真珠腫が周囲の骨を溶解させるのかについての明確なメカニズムやその分子機構についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

EGFR シグナル伝達経路に代表されるシグナル伝達の異常は、真珠腫の発症・増殖メカニズムの核となっていると考えられる。本研究により真珠腫発症・増殖メカニズムを分子生物学的側面から解明し、これに関わる新たな標的分子、シグナル伝達機構を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

真珠腫組織を用いて PCR 法による Notch シグナル関連遺伝子の発現分析を行った。PAXgene® Tissue System (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland) で固定しパラフィン包埋 (PFPE) した組織から厚さ 10 μ m の切片を作成した。マイクロダイセクション法にて真珠腫および正常外耳道皮膚組織から上皮層を回収し、mRNA を抽出し、84 の Notch シグナル関連遺伝子のプライマーで構成される RT² mRNA PCR Array (RT² Profiler™ PCR Array Human Notch Signaling Pathway, Qiagen) にて quantitative-realtime-PCR を施行し遺伝子発現解析を行なった。各遺伝子の転写レベルに関しては GAPDH 遺伝子 (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) と RPLP0 遺伝子 (Ribosomal protein lateral stalk subunit P0) の 2 つのハウスキーピング遺伝子を用いて標準化を行い、それぞれの Δ Ct 値を算出し、相対的 mRNA 発現比 (Fold change) に関しては $\Delta\Delta$ Ct 法に基づき計算を行った。すなわち、真珠腫サンプル中の標準化した遺伝子発現量 ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) を同一患者のコントロールサンプル中の標準化した遺伝子発現量 ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) で除した値を Fold change として算出した。

また、手術時に採取した真珠腫組織を用いて免疫組織化学染色を施行した。10%ホルマリンで固定後にパラフィン包埋 (FFPE) した組織を 4 μ m の厚さで薄切片を作成し、抗 Notch1、抗 HES1、抗 p53 モノクローナル抗体を用いて免疫化学染色を施行した。いずれの実験も正常外耳道皮膚を対照とした。Notch1 発現については細胞膜が明瞭に染色されているものを陽性細胞と判定した。HES1 と p53 については核が明瞭に染色されているものを陽性細胞と判定した。光学顕微鏡の 400 倍の視野において任意の 3 箇所ケラチノサイト層全体の陽性細胞数の割合を計測し、3 箇所の割合の平均値を算出した。正常な皮膚と同様に計測するために、上皮層を含む真珠腫全体ではなく上皮層のみを解析した。染色強度は考慮しなかった。以上の判定については、臨床情報を盲検化した 2 人の医師によって行い、2 人の値の平均値をサンプルの抗原陽性率とした。

Welch の t 検定を用いて、それぞれの遺伝子の Ct 値と抗原陽性率を真珠腫群と対照群の間で比較した。統計学的解析には JMP pro 14 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を使用し、p 値が 0.05 未満である場合を統計学的に有意であると判断した。

4. 研究成果

真珠腫 PFPE 標本は男性 5 耳，女性 1 耳から組織を採取し作製した．対照群として，同患者からそれぞれの正常外耳道皮膚を採取し PFPE 標本を作製した．HE 染色により標本が適切に採取されていることを確認した後，これらの標本から mRNA を抽出し，PCR アレイにて遺伝子発現解析を行った．84 遺伝子のうち 48 の遺伝子発現を解析できたが，残りの 36 遺伝子については半数以上の Ct 値が欠損していたため解析ができなかった．真珠腫における *Notch1* 遺伝子の相対的発現比は最も低く，統計的に有意な差が認められた ($p = 0.042$)．Notch シグナルの主要な標的の一つである *HES1* 遺伝子の相対的発現比も減少していた ($p = 0.272$)．*Notch3* 遺伝子の相対的発現比は増加していた ($p = 0.680$)．

真珠腫 FFPE 標本は男性 28 名，女性 13 から組織を採取し作製した．対照群として，手術を受けた他の男性 4 名，女性 4 名の 8 名の患者から正常外耳道皮膚を採取し FFPE 標本を採取した．*Notch1* の発現陽性率は，真珠腫では $48.5 \pm 32.4\%$ ，外耳道皮膚では $83.4 \pm 17.5\%$ であり，*Notch1* の発現に統計的に有意な差が認められた ($p < 0.001$)．*HES1* の発現陽性率は，真珠腫で $44.9 \pm 17.8\%$ ，外耳道皮膚で $55.7 \pm 7.1\%$ であり，統計的に有意な差が認められた ($p < 0.01$)．*p53* の発現陽性率は，真珠腫では $8.5 \pm 11.4\%$ ，外耳道皮膚では $0.5 \pm 0.7\%$ であり，統計的に有意な差が認められた ($p < 0.001$)．真珠腫組織における *Notch1* 遺伝子の発現，*Notch1* と *HES1* の発現は，正常外耳道皮膚に比べて有意に低下していた．

本研究は，後天性中耳真珠腫の病態生理に *Notch1* が関与している可能性を明らかにした初めての研究である．真珠腫組織における *Notch1* mRNA の発現は，正常外耳道皮膚組織に比べて有意に低下していた．免疫組織化学的検討の結果，真珠腫上皮における *Notch1* と *HES1* の主な発現部位は，正常外耳道皮膚上皮と類似していたが，真珠腫上皮での *Notch1* と *HES1* の発現は，正常外耳道皮膚上皮に比べて有意に低かった．*Notch1* 受容体の発現低下は，核に移行する NICD を減少させ，転写因子 CSL と相互作用して形成される転写因子複合体を減少させて，標的転写産物である *HES1* mRNA を減少させたと考えられる．さらに，*Notch1* の Dll および Jag リガンドや， γ -セクレターゼ複合体の構成因子である NCSTN の mRNA レベルも低下していることが確認された．一方，*Notch3* の mRNA レベルは上昇していた．*Notch3* の細胞内ドメイン(IC)は，*Notch1* の IC に比べて不十分な活性化因子であり，*HES1* プロモーターの転写活性を競争的に阻害することで，*Notch1* の抑制因子として作用する．つまり，*Notch3* が増加すると，*HES1* の発現に抑制的な影響を及ぼす．以上のように，真珠腫では *Notch1*-*HES1* シグナル経路の発現が低下する傾向が認められた．Notch シグナルは，ケラチノサイトの増殖停止と分化を導くことが報告されている．さらに，基底細胞から有棘細胞の運命を決定するのにも重要な役割を果たしている．ケラチノサイトで *HES1* を発現させると，その下流で，分化特異的なタンパク質をコードする有棘細胞層の遺伝子が誘導される．マウスの皮膚で *Notch1* 遺伝子を欠損させると，表皮と角膜が過形成になり，その後，皮膚腫瘍が発生したり，化学物質による皮膚の発癌も促進したことから，*Notch1* が腫瘍抑制遺伝子として機能していることが示されている．真珠腫における *Notch1* と *HES1* の発現低下は，ケラチノサイトが分化から増殖へとバランスを変化させ，病的状態の原因となっている可能性がある．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Fukuda Atsushi, Kano Satoshi, Nakamaru Yuji, Morita Shinya, Hoshino Kimiko, Fujiwara Keishi, Homma Akihiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Notch Signaling in Acquired Middle Ear Cholesteatoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otology & neurotology	6. 最初と最後の頁 e1389 ~ e1395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MAO.0000000000003245	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Atsushi Fukuda
2. 発表標題 Notch Signaling in Acquired Middle Ear Cholesteatoma
3. 学会等名 15th ASIA OCEANIA ORL-HNS CONGRESS（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田 篤, 森田 真也, 藤原 圭志, 干野 季美子, 中丸 裕爾, 本間 明宏
2. 発表標題 後天性中耳真珠腫における Notchシグナル関連分子発現についての検討
3. 学会等名 第31回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田 篤, 森田真也, 藤原圭志, 干野季美子, 中丸裕爾, 本間明宏
2. 発表標題 好酸球性中耳炎EOMと中耳炎を合併した好酸球性多発血管炎性肉芽腫症EGPAの比較
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 Fukuda Atsushi, Morita Shinya, Fujiwara Keishi, Hoshino Kimiko, Nakamaru Yuji, Homma Akihiro
2. 発表標題 Comparison of eosinophilic otitis media (EOM) and eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA) with otitis media
3. 学会等名 5th Congress of European ORL-HNS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukuda Atsushi, Morita Shinya, Fujiwara Keishi, Hoshino Kimiko, Nakamaru Yuji, Homma Akihiro
2. 発表標題 Comparison of eosinophilic otitis media (EOM) and eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA) with otitis media
3. 学会等名 18th ASEAN ORL-HNS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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