

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18312

研究課題名（和文）中耳真珠腫のsingle cell RNA解析及び保存的治療薬の開発

研究課題名（英文）Single cell RNA-seq in cholesteatoma

研究代表者

清水 康太郎（Shimizu, Kotaro）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60846492

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々はヒト真珠腫検体の一細胞RNA解析を行い、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、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し難聴、顔面神経麻痺、外側半規管瘻孔に伴うめまい、髄膜炎を発症しう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、我々は真珠腫の病原性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-specific 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 mouse cholesteatoma 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：耳鼻咽喉科

キーワード：中耳真珠腫 一細胞RNA解析 線維芽細胞

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未だ解明されていない。我々は先行研究で、真珠腫に接する骨表面上に破骨細胞が多数存在し、真珠腫内の線維芽細胞が骨破壊誘導因子を発現していることを確認した。(Imai.R et al., *J Assoc Res Otolaryngol*, 20:449-459. 2019) 近年遺伝子解析は一細胞単位で行われており、炎症性骨破壊疾患の関節リウマチにおいても single cell RNAseq (scRNA-seq) によって線維芽細胞に subset があることが確認されている。(Croft. A. P et al., *Nature* 570:246-251. 2019) 真珠腫性中耳炎は線維芽細胞と角化扁平上皮細胞、血球系細胞で主に構成されるが、それぞれの細胞群にも subpopulation があることが予想される。

2. 研究の目的

ヒト真珠腫臨床検体に対して 1 細胞 RNAseq を行い明らかになった subset を基に、*in vivo* 系 (真珠腫モデルマウス) *in vitro* 系、臨床検体を用いて機能的評価を行い、より効率的に骨破壊の活性化・抑制経路を明らかにし真珠腫による骨破壊を予防する薬剤の開発を目的とする。

3. 研究の方法

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する。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 で処理し一細胞へと単離した。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、皮膚検体ともに角化重曹扁平上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞で主に構成されていた。真珠腫に特異的な細胞種を特定するために、それぞれのクラスターに対して疾患特異性と患者毎の検体バイアスを、カイ 2 乗値を用いて解析した。その結果、最も病原特異的で検体バイアスが小さい線維芽細胞に着目した。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。線維芽細胞に対して疑似時系列解析を行ったところ、INHBA を高発現する subset は最も分化した細胞群だった。

(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。次にヒト皮膚線維芽細胞に炎症性サイトカインと添加したところ、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

in vivo 解析に使用した真珠腫モデルマウスでは、マウス耳介から採取した角化重曹扁平上皮細胞と線維芽細胞を頭頂骨骨膜下に注入することで腫瘤を形成し、腫瘤直下に破骨細胞を誘導する。(Iwamoto. Y et al., *Mol Cell Biol* 36:1610-20. 2019) 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。成熟破骨細胞を特異的に蛍光標識した TRAP-tdTomato マウスに細胞を注入し、腫瘤直下に誘導された TRAP 陽性破骨細胞の面積を定量したところ、INHBA / activin A 欠損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。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 産生線維芽細胞は炎症性サイトカインによって誘導され、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。本研究により、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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水康太郎、菊田順一、石井優
2. 発表標題 中耳真珠腫における一細胞RNA解析
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水康太郎、菊田順一、石井優
2. 発表標題 真珠腫性中耳炎における一細胞RNA解析
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会
4. 発表年 2022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
---------	---------