

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2000～2012

課題番号：22591891

研究課題名（和文） 緊張部型中耳真珠腫の成因・進展機序の解明、予防と手術的治療に関する研究

研究課題名（英文） The research of pathogenesis, development's mechanism and treatment of Pars Tensa Cholesteatoma.

研究代表者 森山 寛 (MORIYAMA HIROSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：60125036

研究成果の概要（和文）：

緊張部型真珠腫に対する cartilage tympanoplasty は長期的にも鼓膜の再陥凹を防止し、聴力改善も良いこと、そして滲出性中耳炎の罹患と緊張部型真珠腫との関係のあることが理解された。真珠腫進展や真珠腫上皮の活性に上皮下の線維芽細胞が関与することが考えられ、上皮と上皮下組織の相互作用による影響の大なることが理解された。動物実験にて温度応答性培養皿で家兎鼻粘膜上皮細胞シートを作製し、中耳へ移植し良好な粘膜再生が確認され、組織学的にも機能的評価（中耳腔の圧測定）にも良い結果を得られた。上皮細胞の分化に 1.170 関係する Caspase-14 が真珠腫上皮細胞に特異的に発現していることを確認。Caspase-14 プロモーターが中耳真珠腫の治療（遺残真珠腫上皮の消失）に役立つ事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Cartilage tympanoplasty for Pars tensa(PT) cholesteatoma prevent postoperative retraction of tympanic membrane in the long term, and it was found that the hearing improvement was good. There are some relations between Otitis media with effusion and PT-cholesteatoma. It was thought that fibroblasts in subepithelial layer were involved in activity of cholesteatoma epithelium and cholesteatoma extension. The interaction of epithelium and the subepithelial tissue play key role for development of cholesteatoma. We cultured a rabbit nasal mucosa epithelial cells sheet in temperature-responsive culture plate by animal experiment, and we transplanted it to the middle ear, and good mucosa regeneration was confirmed. Regenerated mucosa shows almost normal conditions with a histologically and functionally (pressure measurement of the middle ear cavity). We confirm that Caspase-14 where 1.170 is associated with for the differentiation of epithelial cells specifically develops in cholesteatoma epithelial cells. It is suggested that Caspase-14 promoter helped treatment (disappearance of the persistent cholesteatoma epithelium) of the middle ear cholesteatoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
24年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：耳鼻咽喉科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：緊張部型真珠腫、中耳粘膜再生、遺伝子解析、中耳腔ガス換気能、術後成績表皮増殖機序、線維芽細胞、カスパーズ 14

1. 研究開始当初の背景

緊張部型真珠腫の多くの症例は幼小児期の滲出性中耳炎の反復や耳管機能の不全が背景にある。私共は弛緩部型真珠腫の病因に関して継続的に基礎的、動物実験的あるいは臨床的研究を行った結果、真珠腫の形成や上皮の進展は、鼓膜上皮の陥凹だけでは起こらず、炎症の持続などの別の要因が加わることが不可欠な条件と考えられた。真珠腫上皮の増殖は各種の炎症性サイトカインの発現が亢進し、上皮と上皮は密接に関連しながら病態を形成するなどが理解された。しかしながら、炎症に関連する因子は多種多様であり、また炎症の内容も多岐にわたる。真珠腫の初期の形成に関与すると考えられる炎症の質や程度についても未だ結論はでておらず、更なる研究は不可欠と考えられる。

一方、術後の再癒着の予防や聴力改善の維持には、術後の中耳腔粘膜の再生、正常化と経粘膜的なガス換気能の回復が重要となる。従ってガス交換機能を有する正常な生理的機能を備えた中耳粘膜の再生実験を継続してきた。その結果、中耳粘膜細胞などを特殊培養することにより人工中耳粘膜の作成に成功し、さらに現在は培養環境の工夫によりきわめて薄い中耳粘膜シートの作成も可能となった。さらに人工中耳粘膜ならびに粘膜シートの臨床応用に向けての研究を進めたい。

また鼓室後上部はアブミ骨や tympanic sinus など複雑な構造物の存在もあり、直視できない部位も多く、緊張部型真珠腫では容易に進展しえる部位でもある。内視鏡などの使用により以前から比較して表皮の遺残は少なくなっているものの、依然として遺残性真珠腫の可能性も否定できない。そこで遺残となった表皮細胞(扁平上皮)のアポトーシスを亢進させることにより、扁平上皮細胞の自然消失をめざす研究にも取り組む。

以上のような継続的な研究のゴールとして、未解決の問題が多く残されている緊張部型真珠腫の発症機序や進展機序の解明とその予防

法や、術後の再発予防について研究し、新たな治療法の開発が必要であった。

2. 研究の目的

鼓膜緊張部の癒着例では、陥凹が長期間乾燥しているタイプと炎症を繰り返しながら真珠腫に移行する例がある。その違いは十分に解明されてはいない。とくに後者の鼓膜緊張部の癒着から陥凹部の炎症、debris 蓄積を繰り返しながら、tympanic sinus や上鼓室へ上皮が進展し形成される緊張部型真珠腫は、早期からアブミ骨や顔面神経管の破壊やときに感音難聴を来し、さらに通常の鼓室形成術を施行しても再陥凹や癒着を来し、聴力改善が困難な症例も少なくない。これらの多くの症例は幼小児期の滲出性中耳炎の反復や耳管機能の不全が背景にあることが多い。従って病態の検討と真珠腫への進展機序の解明は、予防ならびに生理的治癒に導ける適切な手術的治療法の開発に役立つ。

3. 研究の方法

鼓膜癒着や緊張部型真珠腫の手術症例の病体分析や、滲出性中耳炎の長期観察などの検討などの臨床的なアプローチと、細胞培養、分子生物学的手法、遺伝子解析や遺伝子導入によるアポトーシス誘導などの基礎的なアプローチ、さらに中耳粘膜再生に関しては、*in vitro* のみならず家兎を用いての動物実験からの検討により、人への応用を実現するためのステップとするため、3年間にわたり順序立てながら、また継続しながら以下の計画を実施した。

(1) 臨床病態の解析

緊張部型真珠腫の臨床所見、耳管機能、画像や手術所見などより、その病態を検討する。さらに過去に手術を施行した緊張部型真珠腫例の長期の術後成績(鼓膜形態、再発の有無、聴力改善など)について検討し、病態別に術式の評価を行うと同時に、成功・不成功に関わる因子を解明したと考える。

(2) 術式の工夫・開発

術式別の再発率、再発例の病態と術式などを検討する。とくに軟骨薄片による鼓室形成術の手術成績を分析した。

(3) 滲出性中耳炎の長期経過観察からの検討

滲出性中耳炎患児の長期間の follow up と鼓膜所見とくに緊張部陥凹、癒着変化などの検討を行った。

(4) 上皮下線維芽細胞の役割

真珠腫上皮の活性に深く関与するものとして上皮下の線維芽細胞の存在がある。真珠腫進展においてこの線維芽細胞の果す役割について解析。とくに非炎症病変と炎症病変における線維芽細胞の役割の相違について分析する。手法としては培養系による分子生物学的な手法や Gene chip を用いて遺伝子解析を行った。

(5) 中耳粘膜の再生ならびガス換気能に関する検討

再癒着や真珠腫再発の防止や術後の聴力を改善するために最も重要である中耳腔の形成のための中耳粘膜の再生を促す因子ならびに阻害因子について検討し、さらに早期の粘膜再生の試みを *in vitro* ならびに *in vivo study* で行った。その中心となるものは、これまでの研究により作成に成功した人工中耳粘膜ならびに薄い中耳粘膜シートである。様々な培養環境において再生の促進因子を解析。また人工中耳粘膜シートの動物実験より形態学的な検討のみでなく、経粘膜的なガス交換能などの生理学的な検討を行い、臨床応用へのステップとした。

(6) 遺残真珠腫上皮の生理的消滅をめざした遺伝子治療の検討

扁平上皮(真珠腫表皮細胞)に特異的なマーカーを使い意図的にアポトーシスを惹起させることにより、術後の遺残上皮の自然消失の可能性について検討した。すなわち表皮細胞への遺伝子(標的)治療の開発のキッカケとなる研究内容であった。

4. 研究成果

(1) 緊張部型真珠腫の発症・進展機序をまとめると、まず陥凹が起こり、気胞化抑制による狭小化した鼓室後上部の形態(骨性、軟性)異常により、多くの孤立腔が形成され、炎症の遷延化を助長するとともに粘膜の間質が肥厚し、また腺管形成を伴いながら陥凹部の裏面に複雑な狭小腔(粘膜腔)を形成する。そして炎症の増悪により上皮の増殖や肉芽の形成が起る。また急性増悪により陥凹上皮が部分崩壊(断裂)し、複雑な粘膜腔が上皮側へ開放される。炎症により活性化された重層扁平上皮は *immigration* により粘膜上皮を置換しながら複雑な粘膜腔や腺管内へ進展する。この重層扁平上皮の *immigration* や表皮の増殖性変化により、陥凹上皮は複雑な波状・皺状の形態を示す。しかしながら肉眼的には連続した上皮と見受けられる。

すなわち陥凹部上皮の自浄作用も障害され *debris* が蓄積する。その後は更なる炎症の継続による各種のサイトカインの産生と、上皮自身の *autocrine* や、上皮と上皮下の *paracrine* を介する増殖機転などの *cross-talk* により、表皮の増殖が亢進するという炎症の悪循環のため、真珠腫が増大することになる。すなわちマクロ的(肉眼的)には *debris* を溜めながら連続した上皮が陥凹進展するように観察されるが、顕微鏡的には陥凹上皮の粘膜腔内への *immigration* という現象が部分的には起きており、全体としては *retract cholesteatoma* (陥凹型真珠腫)の振る舞いをするようになる。

(2) 術式別の再発率、再発例の病態の分析、成功ならびに非成功例の病態と術式、CTによる術後の含気化程度など、術式ごとの手術成績を分析した結果、真珠腫の病態に合わせた適切な術式選択は再発を防止する上で重要であり、また術後聴力成績にも影響を与えることが理解された。とくに薄片軟骨による鼓室形成術 *cartilage tympanoplasty* は長期的にも鼓膜の再陥凹を認めず、聴力改善も悪くないことが明らかになった。

(3) 滲出性中耳炎患児の長期間の follow up

を行い、緊張部陥凹、癒着など鼓膜所見の検討を行い、滲出性中耳炎の罹患と緊張部型真珠腫との関係のあることが理解された。

(4) 中耳真珠腫由来の線維芽細胞において過剰発現している遺伝子群の中から中耳真珠腫の病態を考える上で特に重要と思われた増殖因子の **Epiregulin** について検討を行った。線維芽細胞は、手術時に患者から摘出した中耳真珠腫組織および耳後部の皮膚組織より培養した。後述の実験には、すべて 4 回継代した線維芽細胞を使用した。中耳真珠腫および皮膚由来の線維芽細胞をそれぞれ recombinant human IL-1 α および IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 10ng/ml で 4 時間刺激し、**Epiregulin** の mRNA 発現を定量した。また中耳真珠腫組織および耳後部の皮膚組織において、**Epiregulin** とその受容体である **EGF receptor** および **ErbB4** の発現について免疫組織学的に検討を行った。さらに、中耳真珠腫由来の線維芽細胞が過剰発現する **Epiregulin** がケラチノサイトの過増殖に関与していることを確認するため、線維芽細胞とケラチノサイトの共培養環境下での **Colony formation** について検討を行った。

線維芽細胞を IL-1 α および IL-1 β で刺激すると、**Epiregulin** は皮膚組織由来のものと比較して、中耳真珠腫由来の細胞で有意に mRNA 発現が増強していた。また免疫組織学的検討において、**Epiregulin** はケラチノサイトとその上皮下の線維芽細胞で発現が認められ、皮膚組織よりも中耳真珠腫組織において発現が増強していた。さらに、中耳真珠腫由来の線維芽細胞とケラチノサイトの共培養を行うと、皮膚由来の線維芽細胞の場合と比較して、有意に **Colony formation** が増強し、かつ **Epiregulin** の中和抗体や siRNA による処理で有意に抑制された。

これらの結果から、感染などによって活性化されたケラチノサイトが IL-1 を産生すると、中耳真珠腫においては線維芽細胞

からの **Epiregulin** の産生を惹起させ、再びケラチノサイトの増殖や分化に関与するという **paracrine loop** が存在し、かつ中耳真珠腫組織に存在する線維芽細胞においては有意にその傾向が強いため、この過剰に産生された **Epiregulin** が中耳真珠腫の病態に関与している可能性が示唆された。

(5) 中耳粘膜の再生に関する検討においては、培養中耳粘膜組織の作成と移植実験に成功した。すなわち家兎の中耳粘膜から三次元的な中耳粘膜を作成し、それを他の家兎に移植し、形態的にも機能的にも正常に近似する粘膜が形成された。しかし、実際の臨床応用を考えた場合、中耳では十分な量の組織の採取が困難なこと、外来での採取が困難なため 2 期的手術が必要となることなどの問題点が挙げられる。そこで我々は中耳への他の移植材料として鼻粘膜を考えた。鼻粘膜は容易に安全に採取でき、患者さんへの負担も少ないという利点がある為、鼻粘膜の上皮細胞を用いて細胞シートを作製し、中耳粘膜欠損部に移植して、粘膜の再生を促す研究に着手し、中耳粘膜を用いたものと同様の成果が得られつつある。

先行実験においてウサギを用いた動物実験を数匹行い、温度応答性培養皿でウサギ鼻粘膜上皮細胞シートを作製し (図 7)、中耳への移植により非常に良好な粘膜再生がおり、骨や肉芽の増生は抑制されることを検証した。また、機能的評価においても中耳腔の圧を測定し比較検討を行い、良好な結果を得られている。

また東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得てヒト鼻粘膜上皮細胞シートの作製にも成功し、組織学的にヒトの中耳粘膜上皮とほぼかわらないことを確認している。

このような理由から、鼓室形成術において病的粘膜を除去したあとの骨面に鼻粘膜上皮細胞シートを移植することで、正常な粘膜を再生させ中耳腔とそれに連続する乳突腔が正常に機能することにより、創傷治癒の促進および中耳真珠腫の再発や鼓膜再癒着の防止を期待できると考えられる。

(6) 中耳真珠腫は分化の進んだ上皮細胞ケラチノサイトとその落屑物で構成されている。つまり病理学的には悪性ではない。しかし、炎症を契機に急速に増大し、側頭骨を含めた周囲の組織を破壊するという特徴がある。治療の基本は手術である。しかし、錐体尖部に進展している症例や顔面神経、大静脈、硬膜に癒着している症例では完全に真珠腫上皮を除去するのが困難である。そのため新たな治療法の開発が望まれている。

近年、Caspase-14 が上皮細胞の分化に関係しているという報告がなされた。そこで、我々はこの Caspase-14 に注目し、これが上皮細胞に特異的に発現していることを確認し中耳真珠腫の治療に利用できるかどうかを検討した。

まずは中耳真珠腫の免疫染色で Caspase-14 が中耳真珠腫の上皮に発現していることを確認、次に培養細胞ケラチノサイト、線維芽細胞、扁平上皮癌細胞 SCC9 を使用し Western blot で上皮細胞ケラチノサイトと SCC9 細胞に Caspase-14 が特異的に発現している事を確認した。この実験では、扱いの難しいケラチノサイトの代わりにヒトの舌癌より確立した扁平上皮癌細胞である SCC9 細胞を用いた。

次に Caspase-14 の上流領域を Promoter Scan にかけて、700bp あるいは 1000bp 辺りにプロモーターが存在している可能性が大きい事を確認した。そこで、ルシフェラーゼベクターを使用し、これに Caspase-14 のプロモーターを組み込んだベクターを作製し SCC9 細胞、線維芽細胞に遺伝子導入してルミノメーターで計測したところ 1000bp よりも 700bp のプロモーターの活性が強いと思われた。この結果より 700bp のプロモーターを使用し、EGFP とともにアデノウイルスシヤトルベクターに導入する事で Caspase-14 のプロモーターと EGFP を有するアデノウイルスを作製した。これをケラチノサイト、線維芽細胞、SCC9 細胞に感染させ EGFP を観察したところ、やはり上皮細胞ケラチノサイト、SCC9 細胞で強く発現を認めた。これ

らの結果より Caspase-14 プロモーターが中耳真珠腫の治療に役立つ事が示唆された。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ①Rie Suzuki, Hiroimi Kojima, Hiroshi Moriyama, Yoshinobu Manome. Utilization of caspase-14 promoter for selective transgene expression in squamous layers of cholesteatoma in the middle ear. *Int. Adv. Oto.* 8:(1) ; 2012 . 21-29 査読有
- ②小島博己, 吉田隆一, 志和成紀, 田中康広, 森山寛 弛緩部型真珠腫の手術成績からみた「真珠腫進展度分類案 2008 年」の検討 *Otology Japan* 20 ; 2010. 677-683 査読有
- ③内水浩貴, 山本耕司, 森山 寛 : 成人発症の滲出性中耳炎と乳突蜂巣発育度との関係. *耳鼻咽喉科展望* 53(5) ; 2010.280-286 査読有
- ④Mamoru Yoshikawa, Hiroimi Kojima, Naoko Okada, Hirohisa Saito, Hiroshi Moriyama. Cholesteatoma Fibroblasts Promote Epithelial Cell Proliferation Through Overexpression of Epiregulin. *PLoS One*, in press.

〔学会発表〕(計 11 件)

- ①吉川 衛. 中耳真珠腫の上皮間葉相互作用における Epiregulin の役割についての検討. 第 22 回日本耳科学会・学術講演会, 10 月 6 日, 名古屋.
- ②山本和央. 中耳手術における移植用細胞シートの臨床応用化にむけて. 第22回日本耳科学会総会. 2012年10月5日 名古屋
- ③Mamoru Yoshikawa. Identification of Specific Gene Expression Profiles in Middle Ear Cholesteatoma. Symposium-5 Genetic Aspect of Pathogenesis and Pathophysiology of Cholesteatoma, The 9th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery, June 5, Nagasaki.
- ④山本和央. 家兎を用いた鼻粘膜上皮細胞

シート移植による中耳粘膜再生—小動物CT
による中耳含気腔の検討— 第20回日本耳科
学会 2010年10月9日 愛媛
⑤田中康広, 癒着性病変に対する cartilage
tympanoplasty の術後成績 第 20 回日本耳科
学会 2010年10月7日 愛媛

[図書] (計 0 件)

2 2

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他] 無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 寛 (MORIYAMA HIROSHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：60125036

(2) 研究分担者

内水浩貴 (UCHIMIZU HIROTAKA)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：00307414

志和成紀 (SHIWA MASANORI)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20235766

吉川 衛 (YOSHIKAWA MAMORU)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：50277092

山本和央 (YAMAMOTO KAZUHISA)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50408449

田中康広 (TANAKA YASUHIRO)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：40266648

小島博己 (KOJIMA HIROMI)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60234762

(3) 連携研究者