

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月19日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791906

研究課題名(和文) 真珠腫性中耳炎に対する免疫療法の開発：新モデル開発

研究課題名(英文) Effect of in vivo over-expression of KGF by electroporatively transfected KGF cDNA on the histology of middle ear cholesteatoma.

研究代表者

福田 智美 (YAMAMOTO-FUKUDA TOMOMI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：40372776

研究成果の概要(和文)：KGFは本来角化上皮の増殖を促し創傷治癒を促進する因子である。ヒト中耳真珠腫組織ではKGFが常に強発現しており、異常増殖能を持つ真珠腫上皮への変化を引き起こす重要なトリガーの一つと考えられる。今回エレクトロポレーション法を用いた新奇動物モデルで中耳真珠腫形成へのKGF作用の重要性が示された。そこで、本新奇動物モデルを用いKGF受容体阻害剤による阻害実験を行った。結果、真珠腫形成が100%阻害され、保存療法への応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we have indicated that keratinocyte growth factor (KGF) plays an important role in middle ear cholesteatoma formation. KGF is a mesenchymal-cell-derived paracrine growth factor that specifically stimulates epithelial cell growth. In this study, we investigated the effects of over-expressed KGF in vivo. As results, a single injection of KGF expression vector coupled with electroporation induced inflammatory reaction and increased proliferative activity of epithelial cells in external auditory canal, and consequently KGF may possibly induce a cholesteatoma formation. Treatment of rats of the long-term model with SU5402, a KGF receptor inhibitor, prevented cholesteatoma formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉学

キーワード：真珠腫性中耳炎、KGF、KGFR

1. 研究開始当初の背景

真珠腫性中耳炎は慢性中耳炎の一つであるが、他の中耳炎とは異なり隣接する骨組織を破壊し、時に中耳腔内から頭蓋底へと進展して、脳膿瘍などの致命的合併症をも引き起こす、腫瘍にも似た難治性中耳炎である。その組織は、増殖能、新陳代謝が異常に亢進し

た皮膚組織と炎症細胞が多数浸潤している皮下肉芽組織から構成される。

中耳組織は単層粘膜上皮で構成されており、重層扁平上皮は存在しない。故に、外耳道や鼓膜由来の重層扁平上皮細胞の異常増殖、中耳腔への進展が主な病因と考えられている。^{1,2} 上皮異常増殖には様々なサイトカ

インが関与しているという報告がある。³⁻⁹

我々はヒト真珠腫組織で、角化細胞増殖因子 (KGF) /受容体 (KGFR) の発現が真珠腫再発率に有意に関係しているデータを示し (Yamamoto-Fukuda T et al: Lab Invest. 2003)、KGF/KGFRのパラクライン機構が真珠腫形成に強く関与しているとした。¹⁰ KGFは通常皮膚損傷時の治癒期に発現し、上皮が正常化すると発現が抑制される。すなわちKGFは本来角化上皮の増殖を促し創傷治癒を促進する因子である。ヒト真珠腫組織では繰り返す炎症と共に肉芽が大量に発現し、様々なサイトカインと共にKGFが常に強発現している。KGF/KGFRのパラクライン機構が鼓膜陥凹から増殖する真珠腫への進展やひいては骨破壊を引き起こす重要なトリガーの一つとなっているのではないかと、更にはこのKGF/KGFRのパラクライン機構を抑制できれば真珠腫性中耳炎の増殖を抑制できるであろうと考えた。

1. Sculerati N et al: Otolaryngol Clin North Am 1989; 22:859-68.
2. Tos M: Laryngoscope 2000; 110(11):1890-7.
3. Kojima et al: Acta Otolaryngol 1994; 114:423-429.
4. Fujioka et al: Eur Arch Otorhinolaryngol 1994; 251:199-204.
5. Schulz et al: 1993 Am J Otolaryngol 14:82-87.
6. Lang et al: Ann Otol Rhinol Laryngol 1997; 106:669-673.
7. Schilling et al: Am J Otolaryngol 1992; 12:249-253.
8. Bujia et al: Eur Arch Otorhinolaryngol 1996; 253:152-157.
9. Yan et al: Ann Otol Rhinol Laryngol 1991; 100:157-161.
10. Yamamoto-Fukuda T et al: Lab Invest. 2003 ; 83, 123-36.

2. 研究の目的

本研究課題は、これまで過去10年間継続して行ってきた真珠腫性中耳炎の増殖機構の解明という課題を踏まえて、角化細胞増殖因子 (KGF) /受容体 (KGFR) のパラクライン機構の中耳真珠腫上皮細胞増殖機構における重要性を示すことを目的とした。

そのために新奇動物モデルの作成を行うことを目的とし、安全性の極めて高いエレクトロポレーション法を用いて、hKGFmRNAをラット鼓膜もしくは外耳道皮膚に遺伝子導入し、強制発現させ、実験的真珠腫を作成した。更に、KGF/KGFRのパラクライン機構を制御する免疫学的手法を確立し、かつ動物モデルを用いて真珠腫性中耳炎に対するKGFR阻害剤の治療効果を検証し、臨床応用の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物にSDラット、pEYFP-Mitoベクターを使用し、エレクトロポレーション法による遺伝子導入の至適条件を決定する。

(2) 至適条件下でSDラットの外耳道細胞内にhKGF発現ベクター、KGFのプロモーター領域に結合しKGF発現を惹起するhIL-1 α 発現ベクターもしくは空ベクターを導入し、各々の蛋白を強制発現させた後、DAY1, DAY4, DAY7で鼓膜観察、組織採取し実験的真珠腫形成の有無、上皮細胞増殖活性 (Ki-67) を比較検討する。(短期モデル)

(3) KGF発現ベクターの間欠的投与によるKGF蛋白長期発現モデルを作成。4日毎に5回各々の発現ベクターを導入し、最後のベクター導入から7日目に鼓膜を観察し、組織を採取する。(長期モデル)

(4) KGFR阻害薬 (SU5402) を用い阻害実験を行う。実験的真珠腫の形成抑制もしくは消失効果を検証する。

4. 研究成果

結果、発現ベクターを導入すると、挿入後4日目まで蛋白発現が見られた。

短期モデルではhKGF発現ベクター導入群でのみケラチンの蓄積が認められた。hIL-1 α 発現ベクター導入群では炎症所見は認めるのみで、空ベクター群の外耳道所見は正常所見であった。DAY4でhKGF発現ベクター導入群では他群と比較しKi-67LIが有意に上昇していた。KGFの一過性強発現で導入後4日目をピークに上皮細胞の増殖能が上昇し、ケラチンの蓄積が誘発された。しかし、KGF蛋白の発現量の減少する7日目にはケラチン貯留率は低下していた。

長期モデルでは、hKGF発現ベクター導入群でのみ3/4と高率に真珠腫組織の形成を認め、KGF蛋白の長期発現により真珠腫形成が誘発される可能性が示唆された。

阻害実験の結果は、KGFR阻害薬投与例全例で真珠腫形成が抑制された。

今回の実験結果はKGFのパラクライン作用の中耳真珠腫形成への重要性を示した。また、KGFR阻害剤を用いた保存療法の開発の可能性を示唆する結果が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- (1) 福田智美、小路武彦、高橋晴雄、【耳科基礎研究のトピックス】中耳真珠腫発症における角化細胞増殖因子(KGF)および受容体(KGFR)の関与 エレクトロポレーターでのベクター導入による新動物モデルを用いて、Otology Japan、査読有、22巻5号、2012、pp.891-896

- (2) 福田智美、小路武彦、高橋晴雄、【慢性炎症の病態を理解する】慢性炎症の制御と最新治療 角化表皮細胞の増殖分化の制御、JOHNS、査読無、27巻、2011、pp.1797-1802

- (3) YAMAMOTO-FUKUDA T, KOJI T, SHIBATA Y, IKEDA T, HISHIKAWA Y, TAKAHASHI H, Effect of in vivo over-expression of KGF by electroporatively transfected KGF cDNA on the histology of middle ear cholesteatoma. Proceedings of the 10th International Symposium on the Recent Advances of Otitis Media, held in New Orleans, USA, on June 5-9, 2011. TALLEY MANAGEMENT GROUP, NJ, USA, 2012, in press

[学会発表] (計5件)

- ① 福田智美 高橋晴雄、公募パネルディスカッション3:耳科学基礎研究の新展開. 角化細胞増殖因子受容体(KGFR)阻害薬による実験的眞珠腫性中耳炎治療の可能性の検定:新動物モデルを用いて(シンポジスト)、第22回日本耳科学会総会、2012、10月4日、名古屋
- ② 福田智美 高橋晴雄、耳科基礎研究のトピックス;SDラット外耳における角化細胞増殖因子(KGF)プラスミド導入による中耳眞珠腫形成 新動物モデルを用いて(シンポジスト)、第21回日本耳科学会総会、2011、11月25日、沖縄
- ③ YAMAMOTO-FUKUDA T, KOJI T, TAKAHASHI H, Effect of in vivo over-expression of KGF on the histology of middle ear Cholesteatoma, 14th International

Congress of Histochemistry and
Cytochemistry, 2012, Aug. 28,京都

④ YAMAMOTO-FUKUDA T, KOJI T,
TAKAHASHI H, Symposium 2: Cell
biological event in cholesteatoma I - active
proliferation: Effect of in vivo
over-expression of KGF by electroporatively
transfected KGF cDNA on the histology of
Middle Ear Cholesteatoma. symposium, (シ
ンポジスト) 9th International Conference
on Cholesteatoma and Ear Surgery、2012,
June, Nagasaki

⑤ YAMAMOTO-FUKUDA T, KOJI T,
SHIBATA Y, IKEDA T, HISHIKAWA Y,
TAKAHASHI H, Effect of in vivo
over-expression of KGF by electroporatively
transfected KGF cDNA on the histology of
Middle Ear Cholesteatoma. the 10th
International Symposium on the Recent
Advances of Otitis Media, 2011, June 5-9,
New Orleans, USA,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 智美 (YAMAMOTO-FUKUDA TOMOMI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
講師
研究者番号：40372776

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし