

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462656

研究課題名(和文) 真珠腫上皮のバリア機能からみた中耳真珠腫の骨吸収機序

研究課題名(英文) Mechanism of bone resorption in middle ear cholesteatoma in the light of epithelial barrier function

研究代表者

鈴木 秀明 (SUZUKI, Hideaki)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：20187751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：真珠腫上皮は組織学的に表皮が反転した形の嚢胞であり、内部に蓄積したケラチン落屑物は酸性のpHを示す。正常な表皮においてもその表面は弱酸性に保たれているが、角質層と顆粒層によるバリア機能により、表皮下に影響が及ぶことはない。これに対し真珠腫上皮ではバリア機能が破綻し透過性が亢進していた。その原因として、角質層におけるフィラグリンとコルネオデスモシンの発現低下、および顆粒層におけるクローディン1、クローディン3、トリセルリンの発現低下が関与していると考えられた。以上の結果は、真珠腫内部の酸性pHが上皮を透過して隣接する骨組織に達し骨吸収が起こるといった化学的骨吸収説を支持するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Middle ear cholesteatoma is an epidermal cyst with keratin debris accumulating inside that has acidic pH. Generally speaking, the surface of normal epidermis is maintained acidic, however, barrier function of the horny and granular layers protects subepidermal tissues from the acidic environment. On the other hand, barrier function of the cholesteatoma epithelium is impaired, resulting in an increased permeability. Impaired barrier function is explained by a decrease in the expressions of filaggrin and corneodesmosin in the horny layer and claudin-1, claudin-3 and tricellulin in the granular layer. These lines of evidence supports the acid lysis theory that the cholesteatoma epithelium has impaired barrier function and leaks the acidity of its contents, leading to the resorption of the underlying bone.

研究分野：炎症性上気道疾患の病態

キーワード：中耳真珠腫 骨吸収 pH 上皮バリア 透過性 破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1)中耳真珠腫の大きな特徴の1つは、真珠腫を伴わない慢性中耳炎と比べて著明な骨破壊が見られる点である。このためこの疾患を放置すると、耳漏、伝音難聴に加えて、しばしば迷路瘻孔によるめまいや高度感音難聴、さらには顔面神経麻痺や頭蓋内合併症を併発することも稀ではない。きわめて初期の真珠腫では耳処置による経過観察が可能ながあるものの、進行した場合、有効な保存的治療法がなく手術の絶対的適応となることがほとんどである。

(2)真珠腫の骨吸収機序については従来よりさまざまな観点から研究がなされてきた。骨吸収促進や破骨細胞活性化の因子として、真珠腫上皮で発現・産生・分泌される prostaglandin E, interleukin-1, interleukin-6, parathyroid hormone, tumor necrosis factor- $\alpha$ , collagenase, platelet-derived growth factor, cathepsin, nitric oxide synthase, hexosaminidase, matrix metalloproteinase, receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK)など、種々の物質が報告されてきた。しかしその機序はいまだ十分に解明されておらず、治療法に関しても手術による真珠腫の摘出以外に有効な手段がないのが現状である。

(3)真珠腫塊は種々の有機酸を含み、酸性の pH を示すことが報告されている<sup>1)</sup>。一般に正常な表皮の表層も同様に酸性の環境となっているが、通常は表皮の強固なバリア機能のため皮下へ浸透することはない。しかしこれまでのわれわれの研究では、超微形態的に真珠腫上皮のバリア機能は障害されており、上皮下に透過した酸性 pH が骨組織を化学的に脱灰・浸食する可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。無機成分が骨と同様の組成(ハイドロキシアパタイト)である歯牙では、酸による浸食により齲蝕歯が生じることがよく知られており、この観点から齲蝕歯予防に関するさまざまな方法が提唱され試みられている。

(4)一般に表皮のバリア機能は、角質層に存在する filaggrin および顆粒層に存在する claudin などのタイト結合蛋白によって維持されている。特に filaggrin は、アトピー性皮膚炎、魚鱗癬、接触性皮膚炎など表皮バリア機能が障害される皮膚疾

患において発現異常もしくは発現低下が認められることが報告されている。またタイト結合も表皮バリア機能に関与することが報告されている。最も基本的なタイト結合蛋白である claudin family のうち皮膚では主に claudin-1 と claudin-3 が発現していることが知られている。Tricellulin は上皮細胞の三点結合部に発現するタイト結合蛋白で、2005年に発見された新しい分子である<sup>3)</sup>。いずれも filaggrin とならんで、表皮バリア機能に大きな役割を果たしている可能性がある。本研究では実際に生体内においてバリア機能が障害されているかどうかを検証し、さらに真珠腫上皮における表皮バリア蛋白の発現とこれを制御する因子を探索する。

## 2. 研究の目的

本研究は中耳真珠腫表皮におけるバリア機能の障害を明らかにし、真珠腫では酸による化学的骨吸収機序が主であり、破骨細胞の関与は少ないことを立証することを目的とする。研究は次の4つの段階から成る。

(1)真珠腫上皮の透過性の変化を実際の生体内で確認するため、中耳手術中に電氣的インピーダンスを測定する。対照として耳後部および外耳道におけるインピーダンス測定を併せて行う。

(2)手術時に採取した真珠腫組織における filaggrin, claudin-1, claudin-3, tricellulin, corneodesmosin などのバリア蛋白の発現を、免疫組織化学およびリアルタイム RT-PCR により検証する。さらに角質層のバリア機能に関与するイソペプチド結合の発現について免疫組織化学的に検索する。対照試料として頸部または耳後部の正常皮膚を用いる。この実験によりこれらのバリア機能に関与する蛋白に発現異常・発現低下が認められるかどうかを検索する。

(3)採取した真珠腫組織を培養液中で組織培養し、種々のサイトカインや薬剤を負荷し、filaggrin, claudin-1, claudin-3, tricellulin などのバリア蛋白の発現増強/抑制を、蛋白レベルと mRNA レベルで検索する。さらに、上記薬物刺激を加えた組織にランタントレーサーを負荷し、透過型電子顕微鏡下に侵入したランタンを観察する。これに

より組織の透過性の変化を超微形態レベルで明らかにする。

(4) 真珠腫に隣接する骨組織中に存在する破骨細胞バイオマーカーと制御因子の mRNA を検索する。さらに骨組織から非脱灰切片を作成して組織学的に破骨細胞を検索する。

### 3. 研究の方法

(1) 真珠腫上皮の *in vivo* 電気的インピーダンス測定

中耳真珠腫患者の手術時に、真珠腫上皮の電気的インピーダンスを測定した。インピーダンス測定器は ASAHI BIOMED 社製 Tissue Conductance Meter AS-TC100 を用いた。12.5 mV 定電圧下に 320 Hz および 30.7 kHz の交流電流を印荷した棒状電極を、真珠腫上皮の腔側面に数秒間軽く押し当てて測定した。基準電極は両側前腕屈側に設置した。対照として耳後部皮膚、外耳道皮膚、非真珠腫性慢性中耳炎の乳突洞粘膜の電気的インピーダンスを測定した。

(2) 真珠腫上皮におけるバリア蛋白の発現

手術中に採取した真珠腫組織を 4% paraformaldehyde で固定し、OCT compound に凍結包埋し、7  $\mu$ m 厚の切片を作成した。Filaggrin, claudin-1, claudin-3, tricellulin, corneodesmosin, イソペプチド結合に対する特異抗体を反応させ、次に Alexa Fluor 488 で標識した 2 次抗体を反応させた後、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss Axioskop 2 plus fluorescence microscope) で観察・撮影した。対照として耳後部皮膚を同様に処理した。

さらに採取した真珠腫組織から acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform 法により RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法により filaggrin, claudin-1, claudin-3, tricellulin, corneodesmosin の mRNA を検索した。対照として耳後部皮膚を同様に処理した。

(3) サイトカイン刺激によるバリア蛋白発現の変化

採取した真珠腫組織を TNF- $\alpha$ 、IL-1, IL-17, IL-22, IL-25, IL-31 を加えた培養液中で 24 時間インキュベートし、上記と同様のリアル

タイム RT-PCR 法によりバリア蛋白の mRNA の発現の変化を調べた。

(4) 真珠腫病巣における破骨細胞の存在

真珠腫に隣接する組織を手術ドリルで削開するときに生じる骨パテを回収し、acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform 法により RNA を抽出した。そして破骨細胞バイオマーカー (RANK, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), cathepsinK, osteoclast-associated receptor (OSCAR), calcitonin receptor, matrix metalloproteinase 9 (MMP9)) と制御因子 (RANK ligand (RANKL), osteoprotegerin) の mRNA をリアルタイム RT-PCR 法により検索した。対照として、真珠腫の浸食を受けていない部分の側頭骨皮質骨、および非真珠腫性中耳炎の骨組織を用いた。

次に、真珠腫に隣接する骨組織を骨片として採取し、エタノール固定、Villanueva bone染色の後、methylmethacrylate包埋を行った。包埋した試料から 5  $\mu$ m 厚の非脱灰切片を切り出し、偏光顕微鏡で観察して破骨細胞の有無を調べた。対照として非真珠腫性中耳疾患の骨組織を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 真珠腫上皮の *in vivo* 電気的インピーダンス

耳後部皮膚、外耳道皮膚、真珠腫上皮、乳突洞粘膜の電気的インピーダンスはそれぞれ、320 Hz において  $1440.7 \pm 311.3$  k、 $123.2 \pm 31.6$  k、 $40.0 \pm 12.6$  k、 $65.1 \pm 27.4$  k、30.7 kHz において  $733.2 \pm 138.5$  k、 $241.9 \pm 26.9$  k、 $18.4 \pm 3.5$  k、 $218.4 \pm 98.2$  k、であった。真珠腫上皮の電気的インピーダンスを測定は他の組織に比べて有意に低かった。

(2) 真珠腫上皮におけるバリア蛋白の発現

免疫組織染色の結果、真珠腫上皮、耳後部皮膚ともに、filaggrin, corneodesmosin, イソペプチド結合は角質層を中心に、claudin-1, claudin-3, tricellulin は顆粒層と有棘層を中心に発現していた。イソペプチド結合の発現は真珠腫上皮と耳後部皮膚とで差がなかった。リアルタイム PCR の結果では、filaggrin, corneodesmosin, claudin-1, claudin-3, tricellulin の発現が真珠腫において

低下していた。

### (3) サイトカイン刺激によるバリア蛋白発現の変化

6 種類のサイトカイン刺激後、filaggrin, claudin-1, claudin-3, tricellulin, corneodesmosin の mRNA の発現には有意な変化は認められなかった。

### (4) 真珠腫病巣における破骨細胞の存在

破骨細胞のバイオマーカーの一つであるRANKと活性化因子のRANKLのmRNAの発現は、非真珠腫に比べて真珠腫において有意に低かった。他の5つのバイオマーカー (TRAP, cathepsin K, OSCAR, calcitonin receptor, MMP9) と抑制因子であるosteoprotegerinのmRNAの発現については、真珠腫と非真珠腫との間で差がなかった。

非脱灰骨切片を組織学的に検索した結果、真珠腫、非真珠腫ともに破骨細胞は認められず、正常なヒト腸骨に存在する破骨細胞密度と比べて有意に低値であった。

### (5) 結論

真珠腫上皮の透過性は亢進しており、バリア機能を担っている filaggrin, claudin-1, claudin-3, tricellulin, corneodesmosin の発現低下がその原因と考えられた。真珠腫病巣における破骨細胞については、組織学的にも mRNA レベルでも上昇しておらず、その関与については否定的であった。以上の結果は、真珠腫における骨吸収には破骨細胞は関与していないことを示唆し、酸による化学的骨吸収機序を支持するものと考えられた。

#### <引用文献>

- 1) Iino Y, et al.: Organic acids and anaerobic microorganisms in the contents of the cholesteatoma sac. Ann Otol Rhinol Laryngol 92: 91-96, 1983.
- 2) Nguyen KH, et al.: Possible participation of acidic pH in bone resorption in middle ear cholesteatoma. Laryngoscope 124: 245-250, 2014.
- 3) Ikenouchi J, et al.: Tricellulin constitute a novel barrier at tricellular

contacts of epithelial cells. J Cell Biol 171: 939-945, 2005.

### 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 4件)

Koizumi H, Suzuki H, Ikezaki S, Ohbuchi T, Hashida K, Sakai A: Osteoclasts are not activated in middle ear cholesteatoma. J Bone Miner Metab 34: 193-200, 2016.

(\*equal contributors)査読有

DOI: 10.1007/s00774-015-0655-5

Koizumi H, Suzuki H, Ohbuchi T, Kitamura T, Hashida K, Nakamura M: Increase permeability of the epithelium of middle ear cholesteatoma. Clin Otolaryngol 40: 106-114, 2015. (\*equal contributors)査読有

DOI: 10.1111/coa.12332

Suzuki H, Koizumi H, Ikezaki S, Tabata T, Ohkubo J-I, Kitamura T, Hohchi N: Electrical impedance and expression of tight junction components of nasa turbinate and polyp. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 78: 16-25, 2015. (\*equal contributors)査読有

DOI: 10.1159/000442024

Nguyen KH, Suzuki H, Ohbuchi T, Wakasugi T, Koizumi H, Hashida K, Baba R, Morimoto H, Doi Y: Possible participation of acidic pH in bone resorption in middle ear cholesteatoma. Laryngoscope 124: 245-250, 2014. (\*equal contributors)査読有

DOI: 10.1002/lary.23883

#### [学会発表](計 4件)

小泉弘樹、池寄祥司、橋田光一、竇地信介、鈴木秀明: 中耳真珠腫における骨吸収機序に破骨細胞は関与しない。第25回日本耳科学会、長崎ブリックホール(長崎県長崎市) 2015年10月8~10日。

小泉弘樹、橋田光一、池寄祥司、鈴木秀明: 真珠腫上皮における透過性の検討。第116回

日本耳鼻咽喉科学会、東京国際フォーラム(東京都千代田区)、2015年5月21~23日。

小泉弘樹、橋田光一、竹内頌子、田畑貴久、池寄祥司、鈴木秀明：Increase permeability of the epithelium of middle ear cholesteatoma. 第24回日本耳科学会、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)、2014年10月16~18日。

鈴木秀明、Nguyen Khac-Hung、若杉哲郎、大淵豊明、小泉弘樹、橋田光一：中耳真珠腫のpHと骨吸収機序。第114回日本耳鼻咽喉科学会、ロイトン札幌(北海道札幌市)、2013年5月16~18日。

なし

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 秀明(SUZUKI, Hideaki)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20187751

### (2)研究分担者

橋田 光一(HASHIDA, Koichi)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90389461

若杉 哲郎(WAKASUGI, Tetsuro)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20461569

大淵 豊明(OHBUCHI, Toyoaki)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00412651

小泉 弘樹(KOIZUMI, Hiroki)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70461572

### (3)連携研究者