

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670743

研究課題名(和文) 遺残性真珠腫の根絶を目指して Galectin-7染色による真珠腫の術中同定

研究課題名(英文) Expression of Galectin-7 in cholesteatoma matrix and its clinical significance

研究代表者

羽藤 直人 (HATO, NAOHITO)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60284410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Galectin-7は真珠腫に特異的に発現するタンパク質である。これを利用して手術中にgalectin-7を免疫染色し手術用顕微鏡で確認すれば、真珠腫上皮の同定が容易となり、真珠腫の遺残を軽減することができる。このアイデアとシーズを臨床展開することを目的に基礎研究を行った。1) galectin-7染色に必要な試薬(保存剤としてアジ化ナトリウム含有)の内耳毒性の検証、2) アジ化ナトリウムのキレート作用の確認、3) その際の免疫染色能の変化を検討した結果、真珠腫の染色性は保たれ、明らかな内耳毒性は認めなかった。これにより臨床で真珠腫上皮を術中同定する手法が確立された。

研究成果の概要(英文)：Galectin-7, a member of lectin family, contributes to different events associated with the differentiation and development of pluristratified epithelia. By proteomic analysis of middle ear cholesteatoma obtained at operation, we found galectin-7 as a specific protein constituting cholesteatoma. As galectin 7 could be detected in cholesteatoma matrix but not in middle ear mucosa, it might be a good marker of the residue in surgery of middle ear cholesteatoma. Residue of the matrix is considered a main cause of cholesteatoma recurrence. Therefore, detection of galectin-7 by immunofluorescent staining method would be an useful procedure in detecting presence of residual cholesteatoma.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：真珠腫 Galectin-7 内耳毒性

1. 研究開始当初の背景

真珠腫の治療原則は上皮である母膜を含めた全摘手術であるが、母膜を完全に摘出することは時に困難で、わずかに残存した母膜から再発をきたすことがある。これは主に遺残の確認が術者の主観的評価に委ねられているため、真珠腫の再発を根絶するには遺残母膜の客観的で確実な同定法の開発が欠かせない。申請者らは術中に真珠腫母膜の染色ができれば、完全な真珠腫除去が可能になると考え研究を進めてきた。採取したヒト真珠腫のプロテオーム解析を行ったところ、レクチンファミリーの一つである galectin-7 が全ての真珠腫上皮から検出できること、この物質は免疫染色によって母膜で強く発現することを発見した(耳鼻臨, 2011)。そこで galectin-7 をターゲットとする免疫蛍光染色法と、脳外科で臨床使用されている手術用レーザー蛍光顕微鏡を組み合わせれば、術中に遺残母膜の同定が可能になるのではないかと着想した。検討を行ったところ、本法は真珠腫母膜の検出手段として特異性が高く感度も良好なことから、十分に実用的な検査法になりうると考えられた。一方、基礎研究に使用した市販染色試薬(Rabbit IgG Labeling Kits: Zenon 社)の使用説明書には、保存剤として内耳毒性のあるアジ化ナトリウムを添加していると記載されている。そこで臨床展開を始めるには、ヒト中耳に投与可能な新たな galectin-7 抗体試薬の作製が欠かせない。また、新規作製する染色試薬の染色性や安全性確認が不可欠であると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

Galectin-7 は真珠腫に特異的に発現するタンパク質である。これを利用して手術中に galectin-7 を免疫染色し手術用蛍光顕微鏡で確認すれば、真珠腫上皮の同定が容易となり、真珠腫の遺残を軽減することができる。この

アイデアとシーズを臨床展開することが本研究の目的である。申請者らは手術時に摘出した真珠腫上皮を用いて、蛍光免疫抗体法で galectin-7 が同定できることを既に報告している。本申請研究では、動物実験で臨床応用へ向けた課題を克服する。具体的には、1) galectin-7 染色に必要な試薬(保存剤としてアジ化ナトリウム含有)の内耳毒性の検証、2) アジ化ナトリウムのキレート作用の確認、3) その際の免疫染色能の変化を検討する。これにより臨床で真珠腫上皮を術中同定する手法と安全性の確立を目指す。

3. 研究の方法

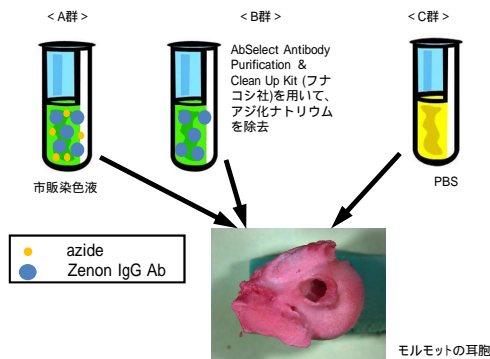
1) Galectin-7 染色性の検討

手術にて採取した標本を OCT コンパウンドで包埋し、-80 のヘキサンにて凍結後、クライオスタットにて凍結切片を作成した。Zenon Rabbit IgG Labeling Kits に Galectin-7 rabbit monoclonal antibody (epitomics 社)を加えて標識し、PBS で 500 倍に希釈したものを染色液とした。染色時間は Zenon 社が推奨する 60 分に加え、30 分、10 分についても検討した。HRP による発色を行って光学顕微鏡にて観察した。また染色・封入後、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon A1、励起光 488nm)を用いて撮影を行った。なお、コントロールには標識していない Zenon Rabbit IgG Labeling Kits を用いた。撮影に用いたレーザー強度は全ての群で同一とした。

2) Galectin-7 染色液の内耳毒性の研究

実験動物にはモルモット(体重 150 ~ 200g)を用いる。ABR を測定した後、A 群:市販染色液、B 群: AbSelect Antibody Purification & Clean Up Kit を用いて sodium azide を除去した染色液、C 群: PBS (コントロール)のいずれかを、注射器を用いて経外耳道的に鼓室内に投与する。1 週後あるいは 2 週後に再

度 ABR を測定し、ABR 閾値の変化から内耳障害の程度を評価する。なお、ABR 測定時の刺激音には 8 kHz、16 kHz、32 kHz のトーンバーストを用い、300 回の加算を行う。10dB ステップで刺激音圧を変化させ、閾値付近では 5dB ステップで変化させて聴力閾値を求め。ABR 測定後は深麻酔下に内耳を摘出して組織学的検討を行う。surface preparation 法でコルチ器を採取して、切片を作製、Rhodamine-phalloidin および Hoechst33342 による二重染色を行って、有毛細胞の骨格や核を染色する。これを蛍光顕微鏡下に観察し、基底回転、第 2 回転、頂回転における内外有毛細胞の生細胞と死細胞の数を求めて脱落率を算出する。



A 群、B 群、C 群の液を鼓室内に投与し、内耳毒性の有無を評価する

3) Sodium azide の除去効果と染色液の安全性

Sodium azide は細胞呼吸を阻害する働きがあり、1990 年代に新潟・三重・愛知・京都などで中毒事件が続いたため、日本では使用が禁止され、これを確認するための簡易検出キットが市販されている。今回の研究では市販の染色液 (Zenon Rabbit IgG Labeling Kits : Zenon 社) に AbSelect Antibody Purification & Clean Up Kit を加えて処理した後、アジ化ナトリウム簡易検出キット (関東化学製) を加えて発泡の有無を調べる。発泡があれば Sodium azide 混入の証明となる。

4) Sodium azide free 染色液の染色性

上記の方法で処理した Sodium azide free 染色液を用いて、保存していた真珠腫を染色し、blue laser beam 照射下に実態蛍光顕微鏡下に観察する。真珠腫切片ないし真珠腫そのものを検体として染色し、実用になる染色性が得られるか否かを検討する。

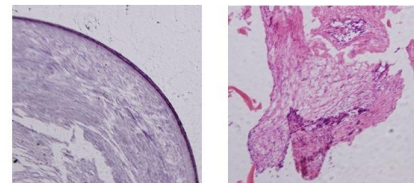
4. 研究成果

1) Galectin-7 染色性の検討

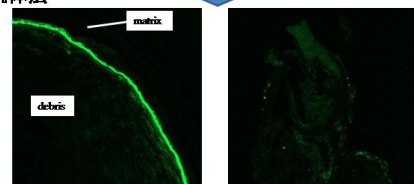
免疫染色では真珠腫母膜に galectin-7 の強い発現が認められた。しかし真珠腫内側の上皮落屑物には galectin-7 の発現は全く認められなかった。

蛍光抗体法による染色では、免疫染色の場合と同様、真珠腫母膜に galectin-7 の発現が認められた。染色時間別による比較では、60 分、30 分、10 分のいずれでも galectin-7 の発現が明瞭に確認できた。しかし同一強度で撮影した中耳粘膜では明らかな発現は確認できなかった。

HE 染色



免疫蛍光抗体法



真珠腫

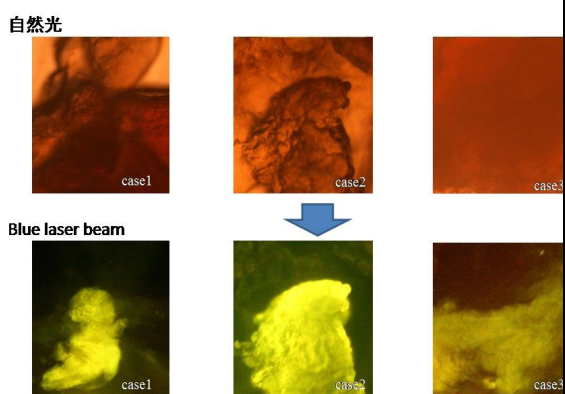
中耳粘膜

galectin-7 の真珠腫と中耳粘膜の染色性

2) Galectin-7 染色液の内耳毒性の研究

モルモットの A 群：市販染色液、B 群：AbSelect Antibody Purification & Clean Up Kit を用いて sodium azide を除去した染色液、C 群：PBS (コントロール) の全ての群で、ABR による聴覚反応に差はなく、有害事象は認め

られなかった。また、組織学的検討でも有毛細胞の脱落等、有害事象は認められなかった。なお、今回の研究では市販の染色液（Zenon Rabbit IgG Labeling Kits：Zenon 社）に AbSelect Antibody Purification & Clean Up Kit を加えて処理した後、アジ化ナトリウム簡易検出キット（関東化学製）を加えて発泡の有無を調べたが、発泡はなく Sodium azide は十分にキレートできていた。



真珠種の蛍光染色性

3) 考察

今回の実験の結果、galectin-7 は真珠腫母膜では発現しているが、中耳粘膜には発現はみられず、Zenon Rabbit IgG labeling Kits による染色法は特異性に優れていた。Zenon 社が推奨する染色時間は 60 分であるが、今回の検討では 10 分でも染色可能であり、手術時間延長による患者負担は少ないと思われる。染色された galectin-7 の観察には、すでに多くの施設で導入されている手術用蛍光顕微鏡がそのまま利用できる。この技術は真珠腫の手術に限らず、例えば癌組織でのみ強く発現する蛋白を染色し、切除マージンを可視化するなど他領域での顕微鏡下手術にも応用が期待できる。

今後の検討課題としてはやはり安全性の問題が一番に挙げられる。前述の如く、フルオレセインはすでに造影剤として様々な領域で用いられており危険性は少ないと思わ

れる。しかし今回用いた染色液には抗体の他に様々な添加物が含まれている。中でも防腐剤であるアジ化ナトリウムには悪心・嘔吐・心筋障害などの危険性があり、毒物指定を受けている。仮に今回の染色液を人体に用いた場合、液中のアジ化ナトリウム濃度は中毒量の約 50 分の 1 程度と危険性は少ないが、正円窓を介して内耳に至り内耳障害をきたす可能性があるため今回の検討を行った。安全性は動物実験では十分に実証できたが、臨床研究に移行するには更なる安全性の検証に加え、ファージディスプレイでのモノクローナル抗体生成が可能となれば、マウス由来のハイブリドーマを使用する作製方法とは異なり、臨床使用での安全性、反応性が担保される。ファージディスプレイでの抗体生成は、完全なクローンでの追加抗体作製が可能で、高額な初期投資が必要ではあるが、将来的に大量の抗体を安定供給することが可能な手法である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

高木大樹. 真珠腫の術中蛍光診断法開発に向けた基礎的研究. 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス 27 巻 2013. 44-47. 査読無

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

羽藤 直人 (Hato , Naohito)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 60284410

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

高木 大樹 (Takagi Daiki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 10448376