

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591991

研究課題名（和文）弛緩部型中耳真珠腫の発症・進展機序の解明と予防・治療に関する研究

研究課題名（英文）Pathogenesis and developing mechanism of pars flaccida cholesteatoma, and its prevention and surgical treatment

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）：

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。真珠腫の形成や上皮の進展は、表皮と線維芽細胞を主体とする表皮下組織のオートクラインやパラクラインによる表皮の増殖・分化の亢進、上皮の migration 障害による debris 形成と炎症の持続など、悪循環により拡大進展すると考えられた。

中耳粘膜の再生に関しては、培養中耳粘膜組織の作成と移植実験に成功。すなわち家兔の中耳粘膜から三次元的な中耳粘膜を作成し、それを他の家兔に移植し、形態的にも生理学的にも正常に近似する粘膜が形成された。

研究成果の概要（英文）：

The selection of the proper operation (tympanoplasty) according to the condition of cholesteatoma is important to prevent recurrent cholesteatomas and it contribute to the hearing improvement. The formation of cholesteatoma and extention of the epithelium are considered to be extended by vicious circle, such as the hyperprpliferation and differentiation of epithelium by autocrine or paracrine system between keratinocytes and fibroblasts, the disturbance of epithelial migration, and continuing of inflammation.

Concerning the regeneration of the middle ear mucosal epithelium, we succeeded in preparing the cultured middle ear mucosal tissue and transplantation this tissue to the middle ear cavity in animal study. In other words, we transplanted the rabbit's three-dimensional cultured middle ear mucosa to the opposite side of the middle ear cavity. The regenerated mucosa was similar to the normal middle ear mucosa morphologically and physically animal study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	70,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：弛緩部型真珠腫、中耳粘膜再生、遺伝子解析、中耳粘膜ガス換気能、上皮増殖、上皮分化、線維芽細胞、手術術式

1. 研究開始当初の背景

弛緩部型真珠腫の発症は再形成性真珠腫に見られるような単純な上皮の内陥によるものではなく、さらに多くの因子が関与していると推測している。病理学的検討や臨床的所見からも真珠腫進展には炎症の関与が重要であることが確認されている。Retraction pocket から真珠腫の陥凹部に至る過程で、炎症はどのような経路で由来するのか、炎症により上皮組織はどのように反応するのか、また炎症の程度は関係するか、滲出性中耳炎との関係は？など、まだ未解決の部分も多い。

私共は長年にわたり、その病因に関して基礎的、動物実験的あるいは臨床的研究を行ってきた。このように表皮の増殖や最終分化に影響を及ぼす因子、表皮細胞のアポトーシス、サイトカインネットワークの関与を含め、慢性炎症の関与や上皮と上皮組織（線維芽細胞）の相互作用など基礎的な研究に加え、再発予防としての粘膜再生から上皮化促進因子の解明を検討して、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や、真珠腫の術前・後、手術所見から臨床病態など総合的に解明してきた。

なぜ弛緩部と後上部のみに発症するのか？稀に表皮のみが侵入する二次性真珠腫の存在するのはなぜか？陥凹部が長期間静止しているタイプとdebrisを蓄積しながら真珠腫に移行する例の差は何か？上皮のmigration(陥凹部の

自浄作用)を障害する因子は？乳突洞の気胞化抑制はどのように関係するのか？耳管機能の影響はあるのか？重要な因子とされている慢性炎症の違いは何か？など未解決の問題は多い。

2. 研究の目的

私共は長年にわたり、その病因に関して基礎的、動物実験的あるいは臨床的研究を行い、いくつかの点について解明してきた。とくに①表皮細胞の増殖・分化・細胞死(アポトーシス)、②線維芽細胞など表皮組織の関与(表皮細胞への影響)については、表皮増殖におけるサイトカインネットワークの関与、表皮の分化と細胞死との関連や、表皮下に存在する線維芽細胞の特性について研究してきた。その結果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。また病理学的検討や手術所見などの臨床的所見からも真珠腫進展には炎症の関与が重要であることが確認されている。

とくに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。真珠腫形成に関与する炎症の質や程度についても未だ結論はでていない。Gene chipを用いた真珠腫(表皮細胞)の遺伝子解析などについて検討してきた。今後、表皮のみでなく表皮下の線維芽細胞の特徴、性質やその関与の検討も行う。また中耳粘膜の再生は真珠腫発症や術後の再発の予防

に重要であり、効率のよい粘膜再生法の研究や、遺残性真珠腫予防の対策や治療として、表皮細胞のアポトーシス誘導を目的とした真珠腫上皮に対する遺伝子導入の研究を行う。またバーチャルリアリティを用いた手技の開発を行い、安全な手術手法の確立を目指す。

以下のように研究を継続し、弛緩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、適切で成功率の高い手術的治療手技の開発を目的とする。

3. 研究の方法

弛緩部型真珠腫の病態、耳管機能、術後成績などの臨床的検討、組織学的・免疫組織学的検討、手術例からの臨床病態の解析と術式の工夫・開発、ならびに真珠腫表皮細胞の増殖・分化に関わる因子(促進・制御)についての分子生物学的な解析。とくに制御因子の検討を molecular pathology と biology の手法を用いて行うと同時に、粘膜再生の基礎的研究を進展させ動物実験モデルによる中耳腔粘膜再生について継続的に実験を重ねた(人工中耳粘膜)。また滲出性中耳炎の中耳圧と中耳腔ガス換気能について観察し、中耳粘膜の生理的な機能の研究実績をもとに、術後中耳腔粘膜の組織学的所見と中耳粘膜ガス換気能との関連性について検討した。さらに gene chip を用いた細胞とくに上皮下の線維芽細胞の遺伝子解析の研究などを行った。

具体的には以下のごとくである。

・臨床病態の解析と術式の工夫・開発

術式別の再発率、再発例の病態と術式、成功ならびに非成功例の病態と術式、術後 CT などより術後の上鼓室の含気化程度など、術式ごとの手術成績を分析し、適切な術式の選択基準の明確化を目指した。

・滲出性中耳炎の疫学的検討

滲出性中耳炎患児の長期間の follow up と弛緩部の陥凹の進展状況の経時的な変化についての検討。

・真珠腫上皮の病理組織学的な解析

病理組織学的、分子生物学的手法による真珠腫上皮、上皮下組織、粘膜上皮の検討(表

皮の増殖・最終分化やアポトーシス機構、上皮バリアー機構や基底膜変化)の検討。

・上皮下線維芽細胞の役割

真珠腫進展に於いて上皮下の線維芽細胞が真珠腫上皮の活性にどのように関与しているかを解明する。真珠腫進展において線維芽細胞の果す役割について検討。真珠腫に特徴的な遺伝子の有無を検討するためにDNAマイクロアレイを用いて真珠腫上皮ならびに線維芽細胞の網羅的な遺伝子発現を解析。

・中耳粘膜の再生に関する検討

再形成真珠腫の防止に重要な鍵となる早期の粘膜再生検討を継続した。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、作成した薄い人工中耳粘膜シートの動物実験より経粘膜的なガス交換能など生理学的な検討を行い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臨床応用へのステップを試みた。

・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を目指す):表皮細胞への遺伝子(標的)治療の開発。

・将来的治療戦略

安全なアプローチ(高次元医用画像の応用):バーチャルリアリティを用いた手技の開発。

4. 研究成果

臨床病態の解析を継続的に行った。手術所見などの臨床所見からも、従来から指摘している我々の真珠腫の成因(炎症による表皮細胞の増殖・分化、ならびに表皮下組織の障害など)を肯定する所見が得られた。手術の工夫にしても、遺残性再発に対しては、内視鏡を術中に使用することにより効果があがり、再形成性再発に対しては、薄い軟骨片による鼓膜形成や鼓室形成術も有る程度の効果のあることが理解できた。また術式別の再発率、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、術後聴力成績にも影響を与えることが理解された。

今回行った聴力改善成績の検討では、一期的手術において病型別に比較すると緊張部型が 32.4%と最も成功率が悪く、弛緩部型のうち鼓膜緊張部癒着症例も 45.8%と不良な結果であった。一方で、弛緩部型鼓膜緊張部非癒着症例では 73.1%と比較的良好な成績が得られた。弛緩部型は鼓膜緊張部に病変がない場合、真珠腫の進展度の割に耳小骨病変が軽度なことが多く、逆に緊張部型では真珠腫が限局する割に耳小骨病変が高度な例が多い。しかし、弛緩部型でも鼓膜緊張部癒着症例ではその殆どが後上部に癒着を認め、病態的には緊張部型と類似しており、facial recess や tympanic sinus への上皮の癒着や肉芽増殖が認められていた。そのため、弛緩部型鼓膜緊張部癒着症例の聴力改善成績は緊張部型と同様に不良であったものと推測された。段階手術を行った場合でも緊張部型の成功率は 15.4%であったことを考えると、鼓膜緊張部に癒着が存在する症例では、術後早期の聴力改善は得られたとしても同部の再癒着を来すことが考えられる。そのため安定した聴力を維持することが困難なことが多く、長期的な聴力改善が不良である一因と考えられた。

一方、術式別にみた術後聴力成績は統計学的には有意差を認めなかったものの、CWU に関しては非充填例に比べ、充填例での成績がやや不良であった。CWU 非充填例では乳突洞粘膜の上皮化や再含気化が期待できるため、術後鼓室内に良好な含気を維持できる可能性が高く、術後の聴力改善が良好であったと考える。しかし、一期的な後壁保存手術で非充填とする場合は真珠腫の病態に合わせて適応を判断しないと再形成性再発の可能性もあるため、術式の選択には十分に注意する必要があると考えられた。

今回の分析から理解されるように真珠腫の病態に合わせた適切な術式を選択することは再発を防止する上で重要であることは

言うまでもないが、術後聴力成績にも影響を与えるものと考えられ、真珠腫における術式の選択にはその適応を慎重に検討することが大切と考えられる。これら手術成績などを学術誌、学会報告をした。

真珠腫上皮のモデルとして培養表皮細胞を用いて細胞周期関連物質である cdk2(cyclin dependent kinase2)、cdk4 の発現を調べると、IL-1 α と KGF の刺激によりその発現が亢進することがわかった。これまでの研究結果と併せて考えると、真珠腫では上皮下の炎症により IL-1 α や KGF をはじめとする各種の炎症性サイトカインの発現が亢進し、その影響を受け表皮細胞における cdk2、cdk4 が up-regulate され表皮細胞の増殖を来すと考えられた。

これまで表皮の増殖・分化におけるサイトカインや細胞周期関連物質の関与、表皮の分化と細胞死などについて検討してきた。その結果、真珠腫の進展は炎症の悪循環であり、多くのサイトカインネットワークが関与することが推測された。また表皮の最終分化に深く関与する involucrin、各種の PKC と阻害因子について検討では、真珠腫上皮の増殖においては各種の炎症性サイトカインの発現が亢進するものの、分化と細胞死に関しては正常上皮と同様に行われること、また上皮と上皮下組織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。

すなわち表皮と線維芽細胞を主体とする表皮下組織のオートクラインやパラクラインによる表皮の増殖・分化の亢進、上皮の migration 障害による debris 形成と炎症の持続など、悪循環により拡大進展すると考えられ、この背景には、炎症の反復による乳突蜂巣の発育障害や fold 形成など軟性形態の構造変化があり、幼小児期における滲出性中耳炎など中耳炎症病変の control が予防の中心となると推測された。

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検討した結果、中耳真珠腫においても線維芽細胞が病態を決定するような表現型を持つことによって局所免疫を制御し、また paracrine loop

によるケラチノサイトの増殖も制御している可能性が考えられた。IL-1 α で刺激した線維芽細胞において包括的に遺伝子発現解析をおこなった結果、GM-CSF、TGF- α 、Epregrulin、ICAM-1などは中耳真珠腫由来の線維芽細胞において有意に mRNA 発現が増強していた。とくに Epidermal growth factor(EGF) family に属する増殖因子である Epregrulin が正常皮膚由来と比較して中耳真珠腫由来の細胞において優位に mRNA が増強していた。また免疫組織学的検討では、Epregrulin は中耳真珠腫のケラチノサイトと線維芽細胞に強発現しており、病態との関連が強く示唆された。

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、形態的にも生理学的にも正常に近似する粘膜が形成されたすなわち白色家兎の中耳粘膜および鼻粘膜から温度応答性感受性細胞を用いた粘膜細胞シートを作成し、組織学的検討を行った結果では、中耳粘膜細胞シートおよび鼻粘膜細胞シートは正常中耳粘膜とほぼ同等の構造を呈した。すなわちH-E染色では単層の粘膜上皮と線維芽細胞を含む上皮下の構造が認められ、上皮のマーカーであるサイトケラチンおよび上皮下組織のマーカーであるVimentinで免疫染色を行ったところ、各々適正な部位に発現を認めた。電子顕微鏡所見でも微絨毛が観察され、正常粘膜組織に近似した構造を呈した。また中耳粘膜細胞および鼻粘膜細胞シートを白色家兎の中耳にそれぞれ移植したところ、移植した粘膜細胞シートは生着し、含気ある中耳腔が作成され良好な成績をおさめた。さらに動物の頭部CTを撮影し、生きたまま(側頭骨切片を作成することなく)、中耳骨包の含気化の状態を確認することができ、CTによる評価の有用性が示された(図6)。その後の側頭骨切片でも粘膜シート移植群では肉芽増生・骨増生の抑制およびそれに伴う良好な中耳骨包の含気化が確認された。

遺残真珠腫上皮の自然消滅の試みとして、表皮細胞のアポトーシス誘導がある。

caspase-14 はアポトーシス関連遺伝子である caspase family の一員で、上皮細胞の分化に関係しており、皮膚の上皮細胞に特異的に発現することが報告されている。そこで我々は caspase-14 に注目し、keratinocyte に特異的に作用するプロモーターを検索した。caspase-14 の上流領域を Promoter Scan にかけて検索したところ、700bp あるいは 1000bp 辺りにプロモーターが存在していると推測された。そこで予測されたプロモーター領域を EGFP とともにアデノウィルスシャトルベクターに導入する事で caspase-14 のプロモーターと EGFP を有するアデノウィルスを作製した。これを keratinocyte と fibroblast に感染させ EGFP を観察したところ、keratinocyte で特異的に発現を認めた。これらの結果より caspase-14 プロモーターは真珠腫上皮細胞に対する遺伝子治療などに応用できると考えられた。

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 4 件)

①田中康広、小島博己、山本和央、森山 寛
鼓膜緊張部癒着に対する cartilage tympanoplasty の有用性. 耳展(査読有) 52(1): 16-22, 2009.

②Kojima H: Middle ear regeneration using transplantation of tissue-engineered cell sheet. Mediterranean Journal of Otology (査読有) 4; 2008: 27.

③田中康広、小島博己、山本和央、森山 寛:
当科における鼓室形成術 IV 型の術後聴力成績. Otology Japan (査読有); 18(5): 648-653, 2008.

④Uchimizu H. Effects of inflammatory changes in the middle ear mucosa on middle.

Acta Oto-Laryngologica (査読有), 2007; 127:1031-1037.

[学会発表] (計 9 件)

①内水浩貴、森山 寛:中耳腔全圧測定法を用いた鼓室換気チューブ抜去時期の検討 第 19 回日本耳科学会 2009 年 10 月 10 日 大阪

②吉川 衛、小島博己、山本和央、田中康広、森山 寛:培養中耳粘膜組織作成における線維芽細胞が及ぼす上皮細胞への作用についての基礎的検討 第19回日本耳科学会 2009年10月9日 大阪

③山本和央、内水浩貴、谷口雄一郎、田中康広、小島博己、森山 寛:鼻粘膜上皮細胞シート移植による中耳粘膜再生—家兎を用いた移植実験— 第19回日本耳科学会 2009年10月9日 大阪

④小島博己:中耳粘膜再生に向けて—培養中耳粘膜組織移植による検討— 第110回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2009年5月14日 東京

⑤宮崎日出海、力武正浩 小島博己 森山 寛:側頭骨領域ナビゲーション手術のための低侵襲リファレンスフレーム(特許出願中)—錐体尖部真珠腫手術での使用経験—、第10回耳鼻咽喉科ナビゲーション研究会 2008年11月8日 東京

⑥宮崎日出海、小島博己、力武正浩、山本和央、森山 寛:側頭骨手術用三次元リアルタイムナビゲーションシステム、第18回日本耳科学会 2008年10月17日 大阪

⑦Suzuki R, Manome ,Koijima H, Moriyama H: Utilization of caspase-14 promoter for selective transgene expression in squamous layers of cholesteatoma in the middle ear. The 14th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. 2008.6. 12 (Sapporo)

⑧森山 寛鼓室形成術の経験から(特別講演). 福島地方部会. 2008年4月13日

⑨吉川 衛、小島博己、田中康広、森山 寛 : 中耳真珠腫病態におけるEpiregulinの役割についての検討 第17回日本耳科学会 2007年10月18日 福岡

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

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

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

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

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

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