

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10763

研究課題名(和文) 外耳・中耳に発現するABC輸送体と組織環境に伴う中耳真珠腫の発症・進行リスク

研究課題名(英文) ABC transporter of outer and middle ear related to a risk factor of middle cholesteatoma

研究代表者

楠 威志 (Kusunoki, Takeshi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：30248025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子解析の結果、538AA(乾性)が53.8%(14/26例)、538GA(湿性)が46.2%(12/26例)であった。また、湿性耳垢群で両側真珠腫症例の発生率は58.3%(12例中7例)に対して、乾性耳垢群で両側真珠腫症例は、21.4%(14例中3例)と、湿性耳垢群の方が、乾性耳垢群より両側真珠腫症例の発生率が高かった。視診のみで耳垢型を判別した14症例を含めると、乾性耳垢の割合は62.5%(25/40例)、湿性耳垢の割合は37.5%(15/40例)であった。また、両側真珠腫症発生率に関しては、乾性耳垢群24.0%(6/25例)が、湿性耳垢群66.7%(10/15例)と有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：On 26 patients performed ABCC11 genotyping ,dry earwax with 538A/A and wet earwax with 538G/A were 53.8%(14/26) and 46.2%(12/26). Wet earwax with538G/G was none. Concerning the incidence of cases with bilateral middle ear cholesteatoma (including past history of surgery of middle ear cholesteatoma), a group of wet earwax 58.8%(7/12) showed higher than dry earwax 21.6(3/14), but not significance due to small number (26 patients performed ABCC11 genotyping). 40 patients (26 patients with ABCC11 genotyping and 14 patients with middle ear cholesteatoma were decided earwax in healthy side by only inspection ) were analyzed as follows(Table 2). The frequencies of dry earwax and wet earwax were 62.5%(25/40) and 32.4%(15/40). Wet earwax with538G/G was none. The incidence of cases with bilateral middle ear cholesteatoma (including past history of surgery of middle ear cholesteatoma), a group of wet earwax 66.7%(7/15 ) showed significantly higher than dry earwax 24.0(6/25) (P<0.05) .

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：中耳真珠腫 耳垢 ABCC 遺伝子 トランスポーター 外耳環境

## 1. 研究開始当初の背景

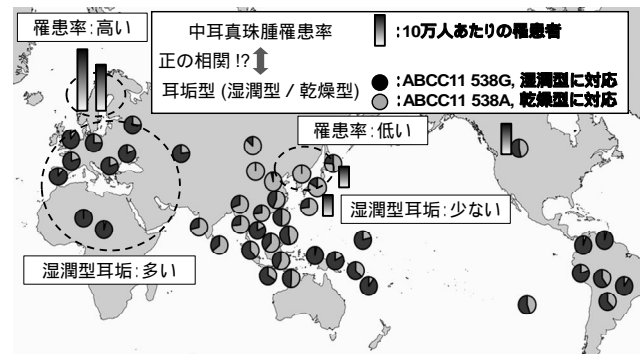
聴覚は人類の重要なコミュニケーションツールの一つであるので、聴力の低下や欠損は生活の質を著しく低下させる。難聴をもたらす疾患の一つである「中耳真珠腫」は、耳小骨の破壊を起点に耳鳴りやめまい、顔面神経麻痺、さらには脳髄膜炎といった症状を伴う「罹患者の生命まで脅かす疾患」である。その治療法は手術が第一選択であり、手術に伴う身体的および精神的負担に加え、再発率は30%と難治性である。さらに、未だ詳細な発症機序が不明であるため、中耳真珠腫の発症を予防する方法はない。そこで、本疾患の発症および進行を分子レベルで理解し、その予防・治療法を確立させることは、耳鼻咽喉科領域における重要な課題の一つである。

以前、申請者は、中耳真珠腫に伴う骨の溶解を行う破骨細胞の発生に必須のサイトカインRANKLと破骨細胞によって産生されるカテプシンLが中耳真珠腫組織周辺において高発現していることを見出してきた(研究課題番号: 21592168, (1)Kusunoki et al., *J Otolaryngol.*, 30, 157-161, 2001.)。また、中耳真珠腫組織周辺では持続的な炎症性変化に加え、破骨細胞の前駆細胞およびマクロファージ、リンパ球の浸潤が認められることや(Hamzei et al., *Laryngoscope*, 113, 436-442, 2003.; Fukuda et al., *JOHNS*, 27, 1797-1802, 2011.)。外耳道上皮細胞にたいする角化細胞増殖因子の局所発現によって中耳真珠腫の発症を誘導できること(Fukuda et al., *Otol. Jpn.*, 22, 891-896, 2012.)が報告されている。

最近では、*ABCC11* 遺伝子多型(538G>A)が耳垢の性状(湿性もしくは乾性)を決定することがYoshiuraら((2)*Nature Genetics* 38: 324 - 330, 2006)によって報告され、湿潤型の耳垢を与えるABC輸送体*ABCC11* 遺伝子上の一塩基多型(c.538G>A)を有するの方が中耳真珠腫に罹りやすいということ((3)Takagi et al., *Otol. Jpn.*, 21, 791-794, 2011.)

が報告されている。さらに申請者は、湿潤耳垢 および中耳真珠腫の罹患率 (Takagi et al., *Otol. Jpn.*, 21, 791-794, 2011.)の世界分布を照らし合わせ(図1)、両者が正に相関することを見出し、中耳真珠腫の発症と進行に関する作業仮説を提唱した。

図1: *ABCC11* 遺伝子多型と中耳真珠腫罹患率の世界分布



## 「ABC輸送体 *ABCC11* は、中耳真珠腫が発症・進行しやすい環境を外耳・中耳に提供する」

つまり、「*ABCC11* 遺伝子(遺伝子型538GG/GA)によって産生される湿潤型の耳垢が軟部外耳道に蓄積すると、外耳・中耳環境が生物学的に変化し、この後に外耳道上皮細胞における新陳代謝・遺伝子発現のバランスが破綻すると、中耳真珠腫が発生する」と申請者は考えた。

## 2. 研究の目的

我々は「*ABCC11* 遺伝子上の一塩基多型に起因する湿潤型耳垢の蓄積が原因で軟部外耳道環境の変化と外耳道上皮細胞の新陳代謝異常が起こり、中耳真珠腫の発症リスクが顕著に増加する」と考えている。そして、「*ABCC11* 以外のABC輸送体には、中耳真珠腫の発症・進行リスクを規定する第二・第三の因子としての可能性がある」と申請者は考えている。本研究の意義は以下のごとくである。

[学術面での重要性1: 中耳真珠腫の発生・進行を制御する分子機構は十分に解明されていない]

本申請課題は、中耳真珠腫の発症・進行機

構の解明に直結する点において重要な研究である。中耳真珠腫の発症・進行を規定する因子の候補に関する知見が近年蓄積されつつあるが、その検証やこれらの相互連関解析は十分に行われていない。本申請課題は、「ABCC11 が中耳真珠腫を発症・進行させる分子基盤の解明」という成果を見込める研究である。

[学術面での重要性 2 : ABC 輸送体の生理機能の大部分が未知の状態である]

本申請課題は、ABC 輸送体の生理機能の解明に直結する点においても重要な研究である。48 種のヒト ABC 輸送体の存在が明らかにされたが、その生理機能および生命現象との連関は、その大部分が未知の状態である。ABC 輸送体は、乾・湿の状態の違いに加えて成分の違いを耳垢に与えることができるので、「ABC 輸送体と中耳真珠腫の発症・進行との連関の解明」および「中耳真珠腫の発症・進行を規定する新たな因子の同定」という成果を本研究に見込むことができる。

[社会・経済面での重要性 : 生活の質の維持と国際社会への貢献に繋がる]

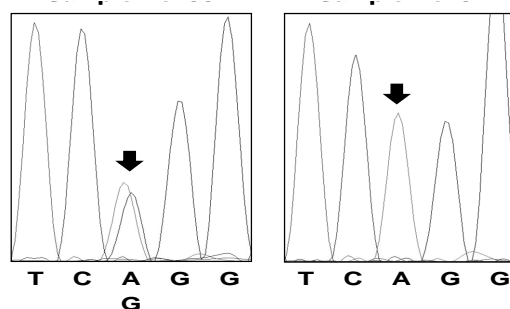
本申請課題は、罹患者が十分に満足できる予防・治療が確立されていない疾患の一つ「中耳真珠腫」の予防・治療に成果を還元することができる。我が国における中耳真珠腫罹患者率は 4 人/10 万人であるが、この 3 倍以上の罹患者率が欧州諸国において認められる(図 1)。また、中耳真珠腫は、難聴や耳鳴り、目眩を伴い、再発率が 20-30%/5-10 年の難治性疾患であるため、人々の生活の質を著しく低下させる。本申請課題は、中耳真珠腫の発症・進行を規定する新たな因子を同定できるので、当該因子を標的にした診断や創薬を実現して、健やかな国際社会の実現に貢献できる。

### 3 . 研究の方法

口頭および書面同意を得た中耳真珠腫患者から、手術時に摘出される中耳真珠腫と術後

血液を得た。血液から抽出したゲノム DNA を鋳型として、ABCC11 538G>A を含む領域を PCR で増幅し、当該一塩基多型のシーケンス解析を行った(図 2)。視診においては、健側および患側の病変部から離れている耳垢に着目して、その乾湿を判別した。尚、本研究は、順天堂大学医学部倫理委員会の承認をはじめ、各分担施設の倫理委員会の承認を受けて実施された。

図 2 : 中耳真珠腫患者の ABCC 遺伝子多型



### 4 . 研究成果

遺伝子解析をし得た中耳真珠腫 26 症例全てにおいて、視診による耳垢判別結果と遺伝子解析による結果が一致することが確認された。遺伝子解析の結果、538AA(乾性)が 53.8% (14/26 例)、538GA(湿性)が 46.2% (12/26 例)であった。また、湿性耳垢群で両側真珠腫症例の発生率は 58.3%(12 例中 7 例)に対して、乾性耳垢群で両側真珠腫症例は、21.4%(14 例中 3 例)と、湿性耳垢群の方が、乾性耳垢群より両側真珠腫症例の発生率が高かった。視診のみで耳垢型を判別した 14 症例を含めると、全ての中耳真珠腫患者における乾性耳垢の割合は 62.5% (25/40 例)、湿性耳垢の割合は 37.5% (15/40 例)であった。また両側真珠腫症発生率に関しては、乾性耳垢群 24.0% (6/25 例)、湿性耳垢群 66.7% (10/15 例)と、湿性耳垢群の方が、乾性耳垢群に比べ両側真珠腫症発生率が有意に多いことが判明した(  $^2 P < 0.05$  )。尚、乾性耳垢群と湿性耳垢群との間で中耳真珠腫の進展度に関する差は認められなかった。

考察: Ishikawa R((4)Frontiers in Genetics

3:306, 2013) は、*ABCC11* 遺伝子の一塩基多型解析によって、湿性耳垢がアフリカ人、ヨーロッパ人に多く、日本人に少ないことを示している。高橋ら(平成6年度厚生省心身障害研究 414 - 420) は、ヨーロッパ人では日本人と比較して中耳真珠腫の発生頻度が高いことを報告している。日本国内に限った場合であるが、高木は(Oto Jpn 21:791-794, 2011) *ABCC11* 遺伝子検査を施行し、健常人では、372人中湿性耳垢 59人(15.9%)、中耳真珠腫症例では、156人中40人(25.6%)と、中耳真珠腫症例では健常人に比べて湿性耳垢の頻度が有意( $P < 0.01$ )に高いと報告し、湿性耳垢の原因遺伝子が真珠腫発症にも関与すると結論付けている。

本研究で扱った中耳真珠腫手術症例では、全体の67.6%が乾性耳垢群であり、32.4%が湿性耳垢群であった。本研究ではコントロール群として、健常人として耳垢チェックはおこなっていない。高木の報告した健常人のデータと比較すれば、本研究も同様に、中耳真珠腫症例では健常人に比べて湿性耳垢の頻度が有意( $P < 0.01$ )に高くなる。

両側中耳真珠腫については、乾性耳垢 24.0%、湿性耳垢 66.7%と有意に湿性耳垢が高頻度に発生していた。

上記の結果から、我々は、湿性耳垢が真珠腫発生を助長させるメカニズムとして

以下の3つの仮説をたててさらなる研究をすすめている。

- 1) 湿性耳垢の移動速度低下の伴う「自浄作用の障害」による炎症の遷延化、デブリ貯留に伴う鼓膜陥凹に繋がり中耳真珠腫への移行。
- 2) 湿性耳垢の代謝産物の増加にて、耳内環境が、弱酸性になり脱灰、蛋白分解酵素の活性化により骨破壊の促進することが、真珠腫が発生しやすく、また、進行しやすい環境なる？

- 3) 本研究では両側中耳真珠腫については乾性耳垢 24.0%、湿性耳垢 66.7%と有意に湿性耳垢が高頻度に発生していた。湿性耳垢の移動速度低下の伴う耳閉感、掻痒感に対する両側の頻回耳かきから炎症の遷延化、デブリ貯留をきたし、両側真珠腫に至ることなどを考え生活習慣を加え検討中である。

#### 引用文献

(1) Kusunoki T, Nishida S, Murata K, Kobashi K, Hiwasa T, Tomura T: Cathepsin L activity and its inhibitor in human otitis media. The Journal of Otolaryngology 2001;30 :157-161.

(2) Yoshiura K, Kinoshita A, Ninokata A, Ishikawa T, Kaname T, Bannai M, et al. A SNP in the *ABCC11* gene is the determinant of human earwax type. Nature genetics 2006;38:324-330.

(3) Takagi T, Hato N, Gyo K Earwax genotype as a factor of middle ear cholesteatoma. Otol Jpn 2011;21:791-794.

(4) Ishikawa T, Toyoda Y, Niikawa N Pharmacogenetics of human ABC transporter *ABCC11*: New insights into apocrine gland growth and metabolite secretion. Frontiers in Genetics 2012; 3:1-17.

#### 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2件)

- 1) Kusunoki T, Nakagawa H, Tsukamoto M, Toyoda Y, Kamiya K, Okada H, Hara S, Hatakeyama H, Furukawa M, Ikeda K. Earwax phenotype related to risk factor of middle ear cholesteatoma. M J Otol. 2017;1-2: 003. 査読あり
- 2) Nakagawa H, Toyoda Y, Albrecht T, Tsukamoto M, Praetorius M, Ishikawa T, Kamiya K, Kusunoki T, Ikeda K, Serkan Sertel. Are ATP-binding cassette transporter and earwax

associated with the incidence of cholesteatoma?

Medical Hypotheses. 2018;114:19-22.査読あり

3) 楠 威志、岡田弘子、神谷和作、古川正幸、  
池田勝久 耳垢の決定遺伝子 ABCC11 と耳内  
環境に伴う中耳真珠腫の発症リスク Otol  
Jpn 2017;592:27.査読なし

〔学会発表〕(計 1 件)

楠 威志、岡田弘子、神谷和作、古川正幸、  
池田勝久 耳垢の決定遺伝子 ABCC11 と耳内  
環境に伴う中耳真珠腫の発症リスク 第 27  
回日本耳科学会総会 平成 29 年 11 月 23 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

楠 威志 (KUSUNOKI Takeshi)  
順天堂大学・医学研究科・教授  
研究者番号：30248025

### (2) 研究分担者

中川 大 (NAKAGAWA Hiroshima)  
中部大学応用生物学部・講師  
研究者番号 40397039

豊田 優 (TOYOTA Yu)  
東京大学医学部附属病院薬剤部・特任助教  
研究者番号：80650340