

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20204

研究課題名(和文) 角化重層扁平上皮-線維芽細胞クロストークを介した真珠腫骨破壊メカニズムの解明

研究課題名(英文) Crosstalk between keratinocytes and fibroblasts : a mechanism underlying cholesteatoma induced bone destruction.

研究代表者

岩本 依子 (IWAMOTO, YORIKO)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：70636480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：真珠腫構成細胞であるケラチノサイトと線維芽細胞をマウスから単離し、生体内外で真珠腫組織を再現し、ケラチノサイトから分泌される液性因子が線維芽細胞に作用し、RANKL発現を上昇させ、破骨細胞分化を誘導することを見出した。液性因子の候補としてはプロスタグランジンE2が考えられた。ヒト真珠腫組織においても、真珠腫と接する骨上に破骨細胞が存在することを証明した。また、線維芽細胞がRANKLを高発現していることを確認した。更にperimatrix層を単離し、RNAシーケンス解析を行い、正常皮膚と比較し、破骨細胞分化に関与する遺伝子群の有意な発現上昇を認めることが判明した。

研究成果の概要(英文)：I succeeded in generating in vivo and in vitro models for cholesteatoma tissue using keratinocytes and fibroblasts derived from mouse ear pinnae. With these models, I demonstrated that keratinocytes stimulate osteoclast differentiation through the induction of RANKL in fibroblasts. PGE2 significantly upregulated RANKL expression in fibroblasts, suggesting PGE2 is a candidate for a RANKL inducer. Also in human cholesteatoma tissue, osteoclasts accumulated on the bone surface, and fibroblasts highly expressed RANKL. RNA sequence analysis of fibroblasts in perimatrix layer revealed highly expression of genes which involve in differentiation of osteoclasts.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞間クロストーク 角化扁平上皮細胞 線維芽細胞 プロスタグランジンE2

1. 研究開始当初の背景

1) 真珠腫性中耳炎の臨床的背景

真珠腫は、骨を破壊する性質を持ち、側頭骨を溶解して進展するため、顔面神経麻痺・髄膜炎などの合併症を引き起こし、時には生命を脅かす疾患である。抗菌薬の発達や早期発見による中耳炎の軽症化が唱えられる近年でも頭蓋内合併症は毎年報告されており、見過ごすことの出来ない病態である。現在骨破壊を抑制する唯一の治療法は外科的摘出だが、申請者を含む国内外の耳鼻科医の知見として、重篤な合併症が手術負担の大きい高齢者に多く見られることが知られており、真珠腫治療の選択肢の一つとしての保存的治療法開発が危急の課題であると考えられている。

2) 真珠腫性中耳炎による骨破壊

真珠腫の骨破壊機序は未解明であるが、真珠腫と接する骨破壊面に破骨細胞が多数見られるという報告が古くよりなされている。炎症性骨破壊疾患である関節リウマチや歯周病でも、骨吸収活性を担う破骨細胞が骨破壊に関与している事が知られており、真珠腫においても同様に破骨細胞が骨破壊を担っていると考えられる。骨破壊の薬剤による治療の第一候補として、破骨細胞の機能を抑える骨吸収抑制剤が挙げられる。これまで、破骨細胞に作用する骨吸収抑制剤の開発は、骨粗鬆症や関節リウマチに伴う運動器障害の治療を目的として、ビスホスホネート系製剤など多くの薬剤の開発が行われている。申請者らも、近年、人工多能性幹細胞からの破骨細胞の分化誘導系を開発し、新たな薬物探索系を創出した(JBMM 32,331-6,2014)。一方、当該実験系を活用することで、新たな創薬標的の同定、並びに新規骨吸収抑制剤の探索にも成功している。しかしながら、これらの骨吸収抑制剤を用いた治療は、全身の骨代謝への影響が不可避であり、真珠腫による骨破壊に特異的に作用する、新しい創薬アプローチが求められる。

3) 真珠腫モデルマウスの構築

真珠腫の骨破壊機序の解明が遅れる要因の一つとして、真珠腫による骨破壊を再現した適切な動物モデルが存在しないことが挙げられる。既報の動物モデルとしては、真珠腫を自然発症する唯一の動物であるモンゴルスナネズミの他にラットやモルモットによるものがあるが、分子レベルでの骨破壊機序の解明には、遺伝子操作が容易に行えるマウスモデルが望まれる。申請者は、真珠腫組織構成細胞である線維芽細胞および角化扁平上皮細胞(以下ケラチノサイト)をマウス耳介より単離し、この二者の細胞を混合したものをマウス頭頂部骨膜下に移植することで、真珠腫様組織を持つ腫瘍を形成することに成功した(図1)。更には、組織切片の解析にて、この腫瘍の直下の頭頂骨上に破骨細胞が誘導されていることを確認した。

4) 培養系での真珠腫組織再現

申請者は、ケラチノサイト、線維芽細胞、更に破骨細胞間のクロストークを細胞培養でも再現した。すなわち、マウス耳介より単離し三次元培養を行ったケラチノサイトを線維芽細胞と共存培養すると、破骨細胞の分化誘導因子である receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) mRNA 発現が劇的に上昇する事を明らかにした。この効果はケラチノサイト培養上清を線維芽細胞培地に加えることでも確認できており、ケラチノサイトより分泌される何らかの液性因子が、線維芽細胞におけるRANKL発現増強に作用していると考えられる。更には、ケラチノサイトの培養上清にて培養した線維芽細胞とマウス骨髄細胞を共存培養したところ、破骨細胞分化が誘導されることを確認した。

2. 研究の目的

これまでに構築したマウスを用いた生体内外での真珠腫モデル系による解析を通じ、ケラチノサイトと線維芽細胞のクロストークを介した骨破壊のメカニズムを解明することを目的とした。更には、マウスで立てた仮説の臨床検体での検証を行うことで、真珠腫の骨破壊抑制をターゲットとした保存的治療法の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 真珠腫骨破壊モデルマウスにおける破骨細胞誘導を組織学的に定量評価する。また、培養系による真珠腫モデルによる破骨細胞誘導についても定量評価を行う。

2) ケラチノサイト培養上清に含まれる、線維芽細胞に対するRANKL発現促進因子を、分子生物学的手法および生化学的手法の双方から同定する。

3) 1) 2) で得られたマウスモデルにおける真珠腫における破骨細胞誘導メカニズムの仮説が、ヒト真珠腫において成立するかを臨床検体を用い、免疫組織学的及び分子生物学的手法を用いて検証を行う。

4. 研究成果

1) マウスを用いた真珠腫モデル系により、真珠腫様腫瘍が接する骨表面上へ破骨細胞誘導を確認し、定量化を行った。ケラチノサイトと線維芽細胞を混合注射して得られた腫瘍では、ケラチノサイト単独腫瘍に比べ、有意に多くの破骨細胞が誘導されることが分かった(図1)。

また、腫瘍内の線維芽細胞がRANKLを高発現していることを免疫染色にて確認した。また、培養系モデルにおいて、ケラチノサイトと共存培養した線維芽細胞が、実際に単球より破骨細胞への分化誘導能を持つ事を、ファイブプラスチックと骨髄由来単球の共存培養系を用いて定量的に評価した(図2)。この破骨細胞分化誘導はRANKLノックアウトマウス由来の線

維芽細胞では生じないことから、線維芽細胞由来のRANKLにより破骨細胞分化が誘導されていることが証明された(図2)。

2) 次いで、ケラチノサイトから分泌される液性因子が線維芽細胞のRANKL発現を上昇させる機序について検証を行った。当初、液体クロマトグラフィーにて解析予定であったが、培養上清が不足していたため、サイトカインアレイにより上清に含まれるサイトカインを検証した。18種のサイトカインの上昇が検出され、これらのうちレセプター分子を除いた9種のサイトカインのmRNA発現を確認した。この中で、ケラチノサイトにおける発現が線維芽細胞に比して高い傾向にある4種のサイトカインを選び、リコンビナントタンパクによるRANKL発現への影響を検証したが、直接的なRANKL発現への影響は認めなかった。そこで、骨芽細胞でRANKLの発現を上昇させるとの報告があり、ケラチノサイトで合成されることが知られるプロスタグランジンE2 (PGE2)の効果を検証した。PGE2を加えた培地で培養した線維芽細胞では、有意にRANKL発現の上昇が見られた(図3)。

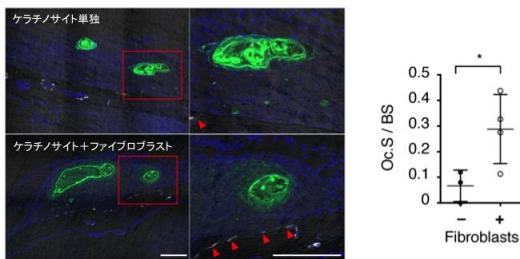


図1 ケラチノサイトと線維芽細胞を混合して得られた真珠腫瘍腫瘍では、ケラチノサイト単独で得られた腫瘍に比し、有意に多くの破骨細胞が誘導される。

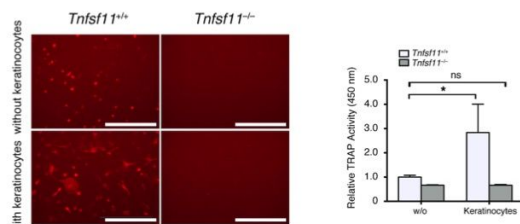


図2 ケラチノサイトと共培養した線維芽細胞は単球から破骨細胞への分化誘導能を持つ。この分化誘導はRANKLノックアウトマウスから単離した線維芽細胞では見られない。

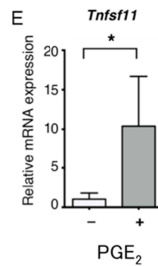


図3 プロスタグランジンE2を加えた培地で培養された線維芽細胞は有意にRANKL発現上昇を認める。

3) マウスモデルを用いて立てた、角化扁平上皮細胞および線維芽細胞間のクロストークを介し線維芽細胞のRANKL発現を増強し、破骨細胞を誘導するという仮説が、実際ヒト真珠腫において骨破壊要因になりうるかを、臨床検体を用いて検証した。まず、ヒト真珠腫臨床検体において、破骨細胞の存在の確認をTRAP染色を用いた。真珠が接する骨上で、破骨細胞が高率に存在することを確認できたことから(データ未発表)、ヒト真珠腫においても破骨細胞が骨破壊に関与している可能性を示した。

更に、ヒト真珠腫におけるRANKLの供給源の検証を行った。マウスでの真珠腫モデルと同様に、perimatrix層の線維芽細胞がマRANKLを高発現していることを免疫染色にて確認した(データ未発表)。そこで、ヒト真珠腫のperimatrix層におけるプロスタグランジン受容体(EP4)発現を免疫染色にて確認したところ、コントロールであるヒト皮膚の真皮層と比較し、発現が増強していることが確認された。

次いで、ヒト真珠腫組織のperimatrix層をLaser micro dissectionにて単離し、RNAシーケンス解析を行った。そこで、真珠腫組織では、コントロールの正常皮膚と比較し、破骨細胞分化に関与する遺伝子群の有意な発現上昇を認めることが判明した。上流解析では、IL1等の炎症性サイトカインの関与が示唆された。

現在、線維芽細胞のRANKL発現上昇に直接関わる因子については更なる解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Iwamoto Y, Nishikawa K, Imai R, Furuya M, Uenaka M, Ohta Y, Morihana T, Itoi-Ochi S, Penninger JM, Katayama I, Inohara H, Ishii M., Intercellular Communication between Keratinocytes and Fibroblasts Induces Local Osteoclast Differentiation: a Mechanism Underlying Cholesteatoma-Induced Bone Destruction. ,Molecular and Cellular Biology. 2016 May 16;36(11):1610-20. doi: 10.1128/MCB.01028-15.

〔学会発表〕(計 2件)

演者：Yoriko Iwamoto, Keizo Nishikawa, Tetsuo Morihana, Takao Imai, Yumi Ohta, Ryusuke Imai, Masaru Ishii, Hidenori Inohara

演題名：A novel experimental model for cholesteatoma-induced bone destruction.

学会名：Politzer Society Meeting 発表年：2015年 発表場所：新潟

演者：Yoriko Iwamoto, Ryusuke Imai, Yumi Ohta, Tetsuo Morihana, Hidenori Inohara

演題名：Interaction between keratinocytes and fibroblasts induces osteoclastogenesis: a mechanism underlying cholesteatoma induced bone destruction.

学会名：CHOLE 2016 発表年：2016年

発表場所：Edinburgh UK

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩本依子 (IWAMOTO, Yoriko)

大阪大学大学院医学系研究科

特任研究員

研究者番号：70636480