

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11186

研究課題名(和文) 中耳真珠腫発症機序へのメカノトランスダクション誘導性YAP関与の解明と治療応用

研究課題名(英文) L1CAM-ILK-YAP mechanotransduction drives proliferative activity of epithelial cells in middle ear cholesteatoma.

研究代表者

福田 智美 (YAMAMOTO-FUKUDA, TOMOMI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40372776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：中耳真珠腫は、骨破壊・脳膿瘍等の合併症を起こす難治性慢性増殖性疾患で、重層扁平上皮と厚い皮下組織を特徴とする。真珠腫の発症機序として中耳調圧機構の破綻を誘因とした中耳腔陰圧による鼓膜弛緩部の陥凹、上皮増殖が報告されており、我々は以前の研究で真珠腫の基礎研究モデルとして中耳陰圧ラットモデルの作成に成功した。本研究ではこの中耳陰圧ラットモデル、中耳上皮由来初代培養細胞およびヒト真珠腫組織を用いてメカノストレス誘導性Hippo シグナルに関与する様々な蛋白解析および投与実験を行った。結果、メカノストレス下での上皮細胞増殖への上皮IL-YAP-間葉L1CAMシグナルカスケードの関与が証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞に加わる伸展圧迫などのメカニカルストレスは、胎児発生、加齢/老化、メタボリズム、循環器・運動器維持、腫瘍などで重要なパラメーターであることが明らかにされ、疾患解明の端緒となる新しい知見がもたらされてきている。

本研究は世界で初の中耳真珠腫発症に対するメカニカルストレスの関係を証明することができた。メカニカルストレスにより鼓膜上皮細胞に誘導されたYAP-ILKシグナル発現と上皮下間葉系細胞でのL1CAM発現により鼓膜上皮細胞増殖が活性化されることが証明できた。鼓膜上皮細胞単一異常での発症ではなく間葉系細胞との相互作用にて発症する可能性が示せ、新規保存治療開発するに新たな知見を示せた。

研究成果の概要(英文)：Negative pressure in the middle ear is thought to be an important factor related to the etiology of middle ear cholesteatoma.

Integrin-linked kinase (ILK) interacts with extracellular matrix and results in the upregulation of mechanotransduction effector Yes-associated protein (YAP). The L1 cell adhesion molecule (L1CAM) has recently been reported as an activator of the mechanotransduction effectors related to cell proliferation and migration.

We analyzed the expression of ILK, YAP and L1CAM in stretched-middle-ear cultured cells, negative-pressure models and human cholesteatoma tissues. According to the results, the expression of cytoplasmic ILK and nuclear YAP were shown to have increased in the thickened epithelium of the TM under a negative pressure load and the cholesteatoma. As results, we demonstrated the possibility that the stromal L1CAM and epithelial ILK-YAP signaling played an important role in epithelial growth under mechanotransduction in cholesteatoma formation.

研究分野：耳科学

キーワード：YAP ILK L1CAM middle ear cholesteatoma メカノトランスダクション

1. 研究開始当初の背景

中耳真珠腫は、骨破壊・脳膿瘍などの致命的な合併症を起こす難治性の慢性増殖性疾患で、増殖能が更新した重層扁平上皮と厚い皮下組織を特徴とする。外科的切除術が唯一の根治療法であり、患者にとって手術後の合併症・後遺症が大きな負担になるため、保存的治療法の確立が望まれる。

真珠腫の発症機序として中耳調圧機構の破綻を誘因とした中耳腔陰圧による鼓膜弛緩部の陥凹、上皮増殖が報告されており、我々は以前の研究で真珠腫の基礎研究モデルとして中耳陰圧モデルの作成に成功した。本研究ではこの中耳陰圧モデルを用いて **in vivo** でメカノストレス誘導性 **Hippo** シグナルに関与する様々な蛋白解析、ストレスファイバー阻害剤処理を行い、真珠腫性中耳炎に対するその治療効果を検証し、臨床応用の可能性を探ろうと考えていた。

2. 研究の目的

中耳真珠腫は、その病因として中耳調圧機構の破綻を誘因とした中耳腔陰圧による鼓膜弛緩部の陥凹、真珠腫形成が報告されており (**Magnuson K 他 (1995) Eur Arch Otorhinolaryngol 252**)、その組織は増殖能が亢進した上皮組織と炎症細胞が多数浸潤している厚い皮下肉芽組織から構成される。

近年、細胞への機械的刺激(メカニカルストレス)すなわち細胞に直接加わる物理的刺激や細胞外基質の硬度による細胞の形質転換、腫瘍形成の存在が明らかになってきた (**Pelissier FA 他(2014) Cell Reports 7(6)**)。このメカノトランスダクションに特異的な受容体(メカノセンサー)として **YAP/TAZ** が報告されている(**Dupont S 他 (2011) Nature 474(7350)**)。 **YAP/TAZ** は **Hippo** シグナルの下流に位置する転写コアクチベーターであり、**TEAD** ファミリーの転写因子を介して遺伝子転写を制御する。**Hippo** シグナルは、1995年から2005年にかけてショウジョウバエにおいて同定された新規シグナル経路であるが、ヒトやマウスにおいても保守されており、細胞増殖の調節のみでなく、幹細胞性の維持、細胞の分化制御に関わっていることが明らかとされている (**Zhao B (2011) Nature Cell Biology 13**)。細胞は平常状態では、**Hippo** シグナルが活性化され、**YAP** がリン酸化されて核外へ移行することで、増殖を司る転写因子である **TEAD** が活性化されず運命付けられた細胞に分化していくが、メカニカルストレスがかかるとアクチンストレスファイバーが形成され、**Hippo** シグナルが低下し、**YAP** が核内に蓄積することで **TEAD** を活性化し、分化抑制が起きる(**Wada K 他 (2011) Development 138**)。 **Hippo** シグナルの抑制により前駆細胞の過剰増殖、分化抑制が誘導されることが既に証明されている (**Wells CD, et al, (2006) Cell 125**)。事実、弛緩部型真珠腫では中耳腔陰圧による鼓膜上皮細胞の物理的刺激、上皮が接合している間質の肥厚による間質の硬度の変化がメカニカルストレスになり得ると考えられ、鼓膜上皮細胞から真珠腫幹細胞への形質転換機序の1つである可能性が考えられた。中耳真珠腫発症への鼓膜上皮へのメカノトランスダクション誘導性 **YAP-ILK** シグナルの関与を証明

することを目的とした。

3 . 研究の方法

(1) ヒト真珠腫組織でのメカノセンシング、**Hippo** シグナル **YAP/TAZ** 発現解析。手術時に採取した中耳真珠腫組織・中心穿孔性中耳炎組織・正常皮膚をもちい、解析をおこなう。メカノセンシングの関与を検討する目的で細胞間接着、基底膜との接着の変化の評価として抗 **E** カドヘリン抗体、抗 **N** カドヘリン抗体、抗オクルディン抗体、抗クラウディンを用いて免疫組織学的に評価した。**Hippo** シグナル関連蛋白の発現検定については、抗 **YAP/TAZ**、抗 **pYAP**、抗 **Wnt5a** 抗体を用いて免疫組織学的に評価した。メカノセンシングの関与を検討する目的で **Hippo** シグナル因子である **YAP** の核内移行およびその共役因子である **ILK** 発現について抗 **YAP** 抗体、抗 **ILK** 抗体、を用いて免疫組織学的に評価した。また、**ILK** 活性因子として **L1CAM** の同定を免疫組織学的に行った。

(2) 動物モデル(中耳陰圧モデル)での解析。動物モデル解析では、機械的陰圧モデル (**Akiyama N, Yamamoto-fukuda T et al. 2014 Laryngoscope**) の両者を用い、**Hippo** シグナル関連蛋白の発現検定については、抗 **YAP/TAZ**、抗 **pYAP**、抗 **Wnt5a** 抗体を用いて免疫組織学的に評価した。メカノセンシングの関与を検討する目的で **Hippo** シグナル因子である **YAP** の核内移行およびその共役因子である **ILK** 発現について抗 **YAP** 抗体、抗 **ILK** 抗体、を用いて免疫組織学的に評価した。また、**ILK** 活性因子として **L1CAM** の同定を免疫組織学的に行った。

(3) 培養細胞での解析。マウス中耳骨包上皮由来の初代培養細胞を樹立し、ストレッチチャンバーを用いストレッチアッセイを行った。各々の細胞のストレッチあり、なしの条件下での **YAP**、**ILK**、**L1CAM** の発現解析、また、**rmL1CAM** 負荷での分化、増殖能について解析をおこなった。

4 . 研究成果

(1) 細胞間接着については、ヒト弛緩部型真珠腫と正常皮膚では発現部位および量について優位な差は認めなかった。基底膜タンパクであるカドヘリンについてはヒト弛緩部型真珠腫で **E** カドヘリンから **N** カドヘリン発現へのスイッチングを起こしており、細胞増殖および遊走にかかわっていると考えられた。

(2) **Hippo** シグナル関連蛋白の発現については、ラット中耳陰圧モデルにおいて鼓膜弛緩部の肥厚を認め、同部位の上皮細胞において **Wnt5a** 陽性細胞が増加し、**YAP** の核内移行が確認された。さらに、ヒト弛緩部型真珠腫上皮においては **Wnt5a** 陽性細胞が顕著に増加し、陰圧モデルと同様に **YAP** の核内移行が確認された。また、間質の細胞についても陰圧モデルおよび弛緩部型真珠とも前述上皮と同様の傾向が認められたが、弛緩部型真珠腫では **Wnt5a** 陰性細胞においても **YAP** 核内移行が認められた。**pYAP** については **YAP** 発現が上昇すると増加する傾向が認められた。結果、**YAP** の核内移行 **pYAP** 発現上昇は、ラッ

ト中耳陰圧モデルとヒト弛緩部型真珠腫上皮両者同様の所見が得られた。

(3) 次にメカノセンシングの関与を検討する目的で **Hippo**シグナル因子である **YAP** の核内移行およびその共役因子である **ILK** 発現、また **ILK** 活性因子として **L1CAM** の同定を免疫組織学的に行った結果、陰圧をかけた鼓膜弛緩部の肥厚部位の細胞において **ILK** の発現上昇と **YAP** の核内移行が認められ、**ILK** 活性因子として中間層の間葉系細胞に **L1CAM** 発現が同定できた。同様にヒト中耳真珠腫でも有意な **ILK** の発現上昇、**YAP** の核内移行を認めた。また **ILK** 活性因子である **L1CAM** の発現率と上皮細胞増殖能の優位な相関を認めた。

(4) 培養細胞を用いた実験結果より、ストレッチ負荷のみでは **ILK** の発現上昇、**YAP** の核内移行を認めるが細胞増殖活性は誘導されなかった。しかし、ストレッチ負荷 + **rmL1CAM** 負荷では細胞増殖能が有意に亢進する結果を得られた。

(5) 今回の研究で、中耳真珠腫発症にはメカノトランスダクション誘導性 **YAP-ILK** シグナルと間葉系細胞での **L1CAM** 発現の相互シグナルが必要であることが証明できた。今後は **L1CAM** 発現を誘導する因子を同定し、保存的治療への応用を目指し新たな研究を提案していくことができると展望される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Kojima H.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 L1CAM-ILK-YAP Mechanotransduction Drives Proliferative Activity of Epithelial Cells in Middle Ear Cholesteatoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Kojima H.	4. 巻 128
2. 論文標題 Keratinocyte growth factor (KGF) induces stem/progenitor cell growth in middle ear mucosa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Pediatr Otorhinolaryngol	6. 最初と最後の頁 109699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijporl.2019.109699.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi M, Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Motegi M, Yamamoto K, Tanaka Y, Yamamoto Y, Kojima H.	4. 巻 40(8)
2. 論文標題 Partial Epithelial-Mesenchymal Transition Was Observed Under p63 Expression in Acquired Middle Ear Cholesteatoma and Congenital Cholesteatoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otol Neurotol.	6. 最初と最後の頁 e803-e811.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MAO.0000000000002328.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Takahashi M, Kojima H.	4. 巻 19(3)
2. 論文標題 Keratinocyte Growth Factor (KGF) Modulates Epidermal Progenitor Cell Kinetics through Activation of p63 in Middle Ear Cholesteatoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Assoc Res Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 223-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10162-018-0662-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama N, Yamamoto-Fukuda T, Yoshikawa M, Kojima H.	4. 巻 137(11)
2. 論文標題 Evaluation of YAP signaling in a rat tympanic membrane under a continuous negative pressure load and in human middle ear cholesteatoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 1158-1165.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2017.1351040.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 福田 智美, 穠山 直太郎, 高橋 昌寛, 小島 博己
2. 発表標題 中耳真珠腫母膜増殖機構の解析: 部分的上皮間葉移行の可能性
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 穠山 直太郎, 福田 智美, 高橋 昌寛, 吉川 衛, 小島 博己
2. 発表標題 ラット中耳陰圧モデル鼓膜上皮および中耳真珠腫上皮における ILK-YAP シグナルの解析
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 昌寛, 福田 智美, 茂木 雅臣, 穠山 直太郎, 山本 和央, 田中 康広, 山本 裕, 小島 博己
2. 発表標題 中耳真珠腫におけるタイトジャンクション関連分子発現の検討
3. 学会等名 第120回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 智美, 穠山 直太郎, 高橋 昌寛, 小島 博己
2. 発表標題 KGF過剰発現誘導性中耳真珠腫モデルにおける表皮前駆細胞増殖誘導機構の解析
3. 学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 穠山 直太郎, 福田 智美, 高橋 昌寛, 吉川 衛, 小島 博己
2. 発表標題 中耳真珠腫間質におけるYAPシグナルの解析
3. 学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto-Fukuda, Masahiro Takahashi, Mamoru Yoshikawa, Hiromi Kojima
2. 発表標題 Evaluation of YAP signaling in a Rat Tympanic Membrane Under a Continuous Negative Pressure Load and in Human Middle Ear Cholesteatoma
3. 学会等名 The Association for Research in Otolaryngology 42th Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 穠山 直太郎, 福田 智美, 吉川 衛, 小島 博己
2. 発表標題 ラット中耳陰圧モデルおよび弛緩部型真珠腫におけるYAPシグナルの解析
3. 学会等名 第27回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto-Fukuda, Mamoru Yoshikawa, Hiromi Kojima
2. 発表標題 Evaluation of Mechanotransduction in a Rat Tympanic Membrane Under a Continuous Negative Pressure Load and in Human Middle Ear Cholesteatoma.
3. 学会等名 The Association for Research in Otolaryngology 41th Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomomi Yamamoto-Fukuda, Naotaro Akiyama, Hiromi Kojima
2. 発表標題 Keratinocyte Growth Factor (KGF) Modulates Epidermal Progenitor Cell Kinetics Through activation of p63 in middle ear cholesteatoma.
3. 学会等名 The Association for Research in Otolaryngology 41th Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田智美、穉山直太郎、高橋昌寛、小島博己
2. 発表標題 中耳真珠腫発症機序の解明：中耳真珠腫形成における神経堤由来細胞の役割
3. 学会等名 第27回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto-Fukuda, Haruo Takahashi, Hiromi Kojima
2. 発表標題 Novel Experimental model for Negative Pressure in the Middle Ear and Effects of Epithelial-cell Proliferation in the Tympanic Membrane.
3. 学会等名 The Association for Research in Otolaryngology 40th Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----