

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19599017
 研究課題名（和文） 実験的真珠腫モデルを用いた真珠腫上皮成長因子の検討
 研究課題名（英文） Detection of epithelial growth factor for middle ear cholesteatoma using an experimental model

研究代表者

比野平 恭之 (HINOHIRA YASUYUKI)
 愛媛大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：00238320

研究成果の概要：

中耳真珠腫は強い増殖性と周囲組織の破壊をもたらす疾患であるが、これまで成因が明らかにされておらず、真珠腫に特異的な発現を示す増殖因子も確定されていなかった。本研究では再現性のある動物実験モデルを、ゲノム解析が終了した動物であるラットにおいて作成することに成功した。

この真珠腫モデルを用いて真珠腫増殖に関連する遺伝子を同定する手がかりが得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

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：耳科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 中耳真珠腫は強い増殖性を持ち、周囲の骨組織(聴器)の破壊を伴うため高度の難聴、めまい、顔面神経麻痺、頭蓋内合併症など重篤な後遺症をもたらす疾患である。近年、中耳真珠腫の増殖機序に対して、ヒト真珠腫組織における各種増殖因子やサイトカインの関与が明らかとなってきたが、中耳真珠腫に特異的な発現を示す因子は渉猟し得た限り報告されていなかった。

(2) 我々は 1991 年にモルモットを用いて、耳介皮膚の中耳骨胞へ自家移植を行うことにより再現性に優れている中耳真珠腫実験モ

デルの作製に成功した (*Experimental cholesteatomas arising from autologous free skin grafting in the middle ear cavity. Acta Otolaryngol 114:533-538, 1994.*)。このモデルは上皮の高度な角化傾向とその表皮剥屑物によって引き起こされた周囲の肉芽の慢性炎症を伴い、ヒト真珠腫の組織学的な特徴をよく表している。この中耳真珠腫実験モデルを用いて、本疾患の病態に関する研究を行ってきた結果、真珠腫は上皮下の異物肉芽腫の存在により活性化され増殖傾向を持つこと、中耳腔内を人工骨で充填することにより逆に増殖抑制傾向を持つことなどを

証明してきた (*Effects of mastoid cavity obliteration on the growth of experimentally produced residual cholesteatoma. Acta Otolaryngol 118:101-104, 1998.*)。

2. 研究の目的

(1) これまでの中耳真珠腫増殖機序の検討では、真珠腫上皮下の炎症が強い状態では上皮細胞に細胞増殖マーカーである PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) や、細胞増殖に関連するサイトカインである EGF とその receptor である EGF-R、その他 TGF- α 、 β などの発現が増加しているという報告がなされている。これらの報告は申請者らの動物実験における結果を支持するものであるが中耳真珠腫に特異的な発現を示す因子、すなわち真珠腫の薬物治療に結びつくようなデータは渉猟し得た限り報告されていない。

(2) 本研究では、1) モルモットにおいて我々の確立した中耳真珠腫実験モデルを、ゲノム解析が終了した動物であるラットにおいて作成する、2) 各種増殖因子やサイトカインの発現を検討し、真珠腫増殖、抑制のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

中耳真珠腫実験モデルを用いて、真珠腫組織における各種上皮増殖因子の発現をコントロールモデルと比較検討した。

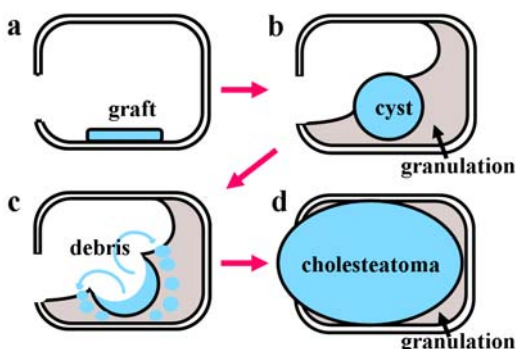
(1) モデル動物の作製

生後 6 ~ 8 週齢のウイスター系ラット 11 匹を用いた。全身麻酔後に骨胞内の粘膜をダイヤモンド・バーを用いて可及的に除去し、予め採取した耳介基部の皮膚 (2 × 2 mm) を全層で結合組織側を下に骨面へ移植した (図 1 a)。開放した骨胞を閉鎖して創面を縫合した。

皮膚移植 3 週間後、全身麻酔後に再び左側中耳骨胞を開放した。皮膚嚢胞の形成を確認 (図 1 b) した後に嚢胞壁を破り、嚢胞内の表皮剥屑物 (debris) を可及的に掻き出して上皮下の肉芽組織内に散布した (図 1 c)。これを真珠腫群とした。また嚢胞壁を破らずに骨胞を閉鎖し、創面を縫合したモデルをコントロール群とした。

真珠腫群、コントロール群とも処置後 8 週目に致死量のエーテル投与により動物を屠殺して、周囲の肉芽組織を含む真珠腫を採取した (図 1 d)。

図 1.



(2) 真珠腫増殖関連因子の検討

(真珠腫組織からの RNA の抽出)

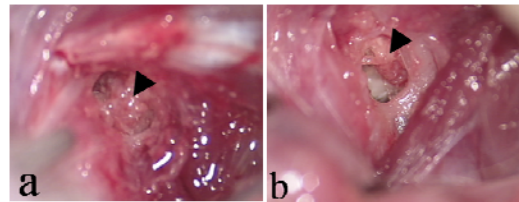
両群とも直ちに顕微鏡下に作成された真珠腫を摘出して -80°C で急速冷凍を行った。粉碎操作を行い組織より RNA を、キットを用いて抽出した (キアゲン; RNA easy kit)。両群の RNA をテンプレートとしてマイクロアレイ解析を実施し、得られたデータを gene spring software を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) モデル動物の作製

表 1 に各群における組織摘出時の真珠腫の形態 (configuration) を示す。No 7 は死亡、11 は感染のため結果から除外した。これまでモルモットを用いて作成した真珠腫モデルでは、皮膚嚢胞の形成を確認 (図 1 b) した後に嚢胞壁を破り、嚢胞内の表皮剥屑物 (debris) を可及的に掻き出して上皮下の肉芽組織内に散布した (図 1 c) モデル (真珠腫群) が、コントロール群に比べてより強い増殖能を示した。今回用いたラットにおいても同様の傾向が認められた。図 2 に摘出時の写真を示す。真珠腫群の方がより大きな嚢胞形成が見られ、強い増殖能を示唆している。

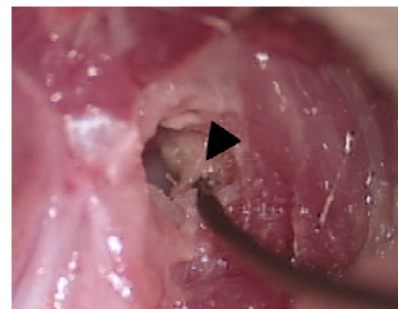
図 2.



a. 真珠腫群 b. コントロール群
矢印が形成された皮膚嚢胞 (真珠腫) を示す。

モルモットにおいてはすべての動物で嚢胞形成 (closed type) が認められたが、ラットでは表 1 に示すように真珠腫群では 7 匹中 4 匹に、コントロール群では 2 匹中 1 匹にしか嚢胞形成が認められなかった。しかし嚢胞形成が認められなかったモデルにおいても真珠腫群の上皮は強い角化傾向を示した (図 3)。

図 3.



真珠腫群 open type

矢印は形成された表皮剥屑物を示す。

表 1.

No	Configuration
Cholesteatoma	
1	open
2	closed
3	closed
4	closed
5	open
8	open
9	closed
Control	
6	open
7	/
10	closed
11	infection

(2) 真珠腫増殖関連因子の検討

(真珠腫組織からの RNA の抽出)

No 1、2、3、8、9 のモデルからは抽出組織の量的不足などにより、明瞭な RNA のバンドが検出されなかった。現在残りの動物 (No 4、5、6、10) のマイクロアレイ解析を行っている。

(3) 考察

これまで我々の行ってきたモルモットを用いた真珠腫実験モデルを、ゲノム解析が終了した動物であるラットにおいても作成できたことは今後の研究発展の見地から重要と考える。モルモットにおいて形態的および病理組織学的に強い増殖能を示した真珠腫群は、ラットにおいても同様に強い増殖能を示した。

モルモットにおいて作成された真珠腫はすべて嚢胞 (closed) 型であったが、ラットは今回の実験では真珠腫群 (増殖モデル)、コントロール群を含めて closed と open type がほぼ同じ率であった。この原因として動物種の違いによる解剖学的な差、あるいは真珠腫の成因の一因として考えられている創傷治癒機転に違いがあった可能性がある。同一の型の真珠腫モデルで増殖過程に発現する遺伝子を比較検討するため、今後はよりヒト真珠腫に近い嚢胞型モデルの作成頻度を向上させる必要がある。

今回の検討では、マイクロアレイ解析に十分な量の組織採取が困難であったため、最終的な遺伝子解析の結果をまとめることがで

きなかった。現在、2 検体の組織を合わせて解析を行っており、明瞭な RNA のバンドが見られている。今後の学会や論文発表で詳細が明らかにできると思われる。

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 3 件)

- ① Yanagihara N, Komori M, Hinohira Y. Total mastoid obliteration in staged intact canal wall tympanoplasty for cholesteatoma facilitates tympanic aeration. *Otology Neurotology*, in press. (査読あり)
- ② Hinohira Y, Yanagihara N, Gyo K. Improvements to staged canal wall up tympanoplasty for middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 137:913-917, 2007. (査読あり)
- ③ 谷口昌史, 比野平恭之. 真珠腫性中耳炎・術後再発例の手術における後壁処理. *MB ENT*, 76:55-61, 2007. (査読なし)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hinohira Y, Yanagihara N, Hato N. A new role of staged tympanoplasty for cholesteatoma. 2008 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO, Chicago, 2008.9.24. (口演発表)
- ② Hinohira Y, Yanagihara Y. Staged tympanoplasty for the treatment of cholesteatoma using intact canal wall technique: A reliable measure to prevent postoperative retraction pocket. *Instruction course. 8th international conference on cholesteatoma and ear surgery*, Antalya, Turkey, 2008.6.20. (教育講

演)

- ③ Hinohira Y. Postoperative managements of cholesteatoma and less invasive revision surgery for the recurrence. Work Shop: Tracking the residual and/or recurrent disease. 8th international conference on cholesteatoma and ear surgery, Antalya, Turkey, 2008. 6. 19. (ワーク・ショップ)
- ④ Hinohira Y. Does the use of reconstruction techniques regarding the scutum defect and the mastoid cavity influence the staging? Symposium: Staging of tympanoplasty in cholesteatoma. 8th international conference on cholesteatoma and ear surgery, Antalya, Turkey, 2008. 6. 18. (シンポジウム)
- ⑤ 比野平恭之, 柳原尚明, 谷口昌史他. 真珠腫に対する後壁保存段階的鼓室形成術から見た術後性ポケットの成因について. 第17回日本耳科学会総会, 福岡, 2007. 10. 18 (口演発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

比野平 恭之 (HINOHIRA YASUYUKI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00238320

(2) 研究分担者

竹田 将一郎 (TAKEDA SHOICHIRO)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70403821

(3) 連携研究者

なし