

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2008～2009
 課題番号：20791200
 研究課題名(和文) 細胞骨格における圧受容制御機構の解明：PPAR を介した真珠腫の新しい治療戦略
 研究課題名(英文) Cytoskeletal analysis in control of pressure :its relationship to PPAR expression
 研究代表者 白土 秀樹 (SHIRATSUCHI HIDEKI)
 九州大学・大学病院・助教
 研究者番号：30398060

研究成果の概要(和文)：中耳真珠腫は発生の過程で中耳圧変化、特に中耳陰圧の影響を強く受けていることが知られている。中耳真珠腫における細胞形態変化に関する研究の次なるターゲットとして integrin に注目、以下のことを検討し明らかにした。

- 1) 真珠腫に発現する integrin 及びシグナル関連蛋白発現の差異(先天性真珠腫、後天性真珠腫) integrin 関連蛋白で両者に発現量、発現形式に有意差を認めた。
- 2) 中耳粘膜培養で陰圧環境で見られる integrin シグナル発現の変化
培養上皮細胞で圧変化によるシグナル変化を認めた。
- 3) 真珠腫における PPAR から integrin へのシグナル伝達の解明(inside-out シグナル、outside-in シグナル)
圧関与の有無で(先天性 vs 後天性) 両シグナル系の関与形式が異なっていた。

研究成果の概要(英文)：

The following major progresses were submitted for publication.

1. The expression of integrin-related protein was different between congenital and acquired middle ear cholesteatoma.
2. The integrin-related signaling was changed by pressure overload.
3. PPAR was closely linked to integrin signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2400000	720000	3120000
2009年度	800000	240000	1040000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳科学

キーワード：PPAR ,cytoskelton, integrin

1. 研究開始当初の背景

真核細胞が様々な形態を変化させ、統一のとれた方向性のある運動をするのは、細胞全体に張り巡らせた細胞骨格によるものである。近年細胞骨格は細胞外基質（マトリックス）、細胞膜さらに核との情報シグナルを伝達し、逆に種々のシグナルを発信することで個体発生や癌の浸潤・転移において非常に重要な役割を果たすことが次第に明かなりつつある。しかしながら癌遺伝子を中心とした核内蛋白や膜蛋白の解析に比べ、非腫瘍細胞の細胞骨格研究は非常に遅れている。中耳真珠腫は発生の過程で中耳圧変化、特に中耳陰圧の影響を強く受けていることが知られている。真珠腫には先天性と後天性のものがあるが、先天性のものは比較的中耳陰圧の影響を受けていないと考えられており、もし integrin が外圧の影響を受けているなら、両者に発現する integrin 関連分子に差がでることが予想される。integrin が重力の変化、刺激を感知しそれらを細胞内へ outside-in シグナルを利用して情報伝達することを分子生物学的に報告した。

(Hirodome, 2002, Hirakawa 2004) 即ち、RhoA, FAK, paxillin などの細胞内 integrin 裏打ち蛋白が重力変化により活性化するとしている。また、近年、Masuda らは PPAR が integrin 裏打ち蛋白である FAK をリン酸化することで integrin の発現を抑制することを報告している。(Masuda 2005) 近年様々な癌腫や上皮細胞で PPAR 発現とその機能についての解析が進み、レチノイン酸のシグナルを修飾し、細胞骨格の破壊、細胞間接着性の低下に重要な役割をはたしていることが明らかになった。我々はかつて PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor が細胞膜に存在するカテニンを抑制することを報告した。また、近年、PPAR から integrin へのシグナルが報告され、上皮細胞では PPAR は integrin を抑制すると報告されている



以上をふまえて、中耳真珠腫における細胞形態変化に関する研究の次なるターゲットとして integrin に注目するに至ったのは、真珠腫で retinoic acid の作用点としての PPAR が高率に発現し、さらに核内レセプターである PPAR と生物学的に外界環境との接点である catenin, integrin との“クロストーク”を明らかにすることで、これまでの細胞骨格研究によって得られた知見を治療に応用できるのではないかと考えたからである。我々の研究の end point は真珠腫における retinoic acid 治療の可能性を探ることであるが、真珠腫は癌細胞と異なり p53 などの細胞増殖機構にはほとんど異常を認めず、細胞骨格への影響の検討が治療の鍵となる。そこで今回、我々は integrin の inside-out シグナルに注目し、真珠腫の inside-out シグナルに PPAR が関与しているかを検討した。また、先天性真珠腫と後天性真珠腫における両者の違いについて検討した。

2. 研究の目的

こうした研究背景を受け、今回以下のことを検討し明らかにした。

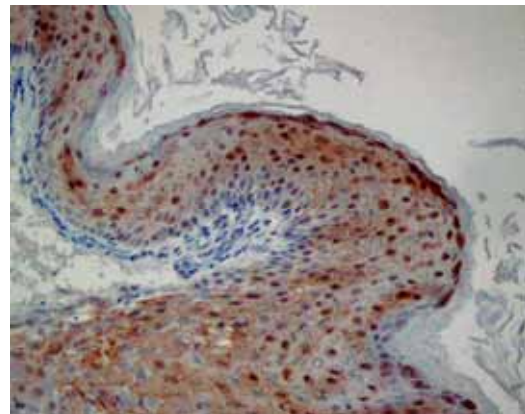
1) 真珠腫に発現する integrin 及びシグナル関連蛋白発現の差異（先天性真珠腫、後天性真珠腫）

2) 中耳粘膜培養で陰圧環境で見られる integrin シグナル発現の変化

3) 真珠腫における PPAR から integrin へのシグナル伝達の解明 (inside-out シグナル、outside-in シグナル)

3. 研究の方法

1. 今後の研究遂行に不可欠な中耳真珠腫細胞は手術標本から cell line を確立し、air-liquid-interface 法により形質解析を行う。当教室は通常の細胞培養は可能であるが上記法の確立に必要な半透過性膜が不可欠である。さらに、retinoic acid 処理を行い細胞形態の変化を見るとともに、in situ hybridization により integrin の発現を明らかにした。
2. 培養細胞から抽出した DNA を遺伝子プライマーを用いて direct sequence し、サイトケラチンドメインの以上部位を同定した。また、retinoic acid 処理による integrin mRNA の発現量変化を測定する。PPAR γ mRNA の発現変化を検討した。
3. 細胞周期関連蛋白、特に cyclinD1 や膜蛋白 catenin の発現量変化を retinoic acid 処理前後で比較する。これにより他の増殖 signal の関与を検討した。



PPAR γ 発現

4. 研究成果

1) 真珠腫に発現する integrin 及びシグナル関連蛋白発現の差異 (先天性真珠腫、後天性真珠腫)

integrin 関連蛋白で両者に発現量、発現形式に有意差を認めた。

当科で診断治療を行った、中耳発生真珠腫の内、中耳粘膜のコントロールを有する先天性真珠腫 10 例と後天性真珠腫瘍 20 例を免疫組織化学的に検討した。年齢は 15 歳から 73 歳、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を SAB 法を用いて免疫組織化学染色した。用いた抗体は PPAR、integrin 5 1, integrin 4 7、炎症反応蛋白である NF

B である。先天性真珠腫: 組織学的に周囲組織に明らかな炎症を認めないもの、かつ臨床的に鼓膜陥凹などの所見を認めない症例、後天性真珠腫: 組織学的に周囲組織に中等度以上の炎症を認め、かつ臨床的に鼓膜陥凹などの所見を認める症例、と定義した。

PPAR γ 発現とintegrin発現減弱との相関

integrin	PPAR γ 発現 (+)		計
	先天性	後天性	
正常発現	0(0%)	3(18%)	3
発現低下	3(100%)	14(82%)	17
Total	3	17	20

・ PPAR γ 陽性例はintegrin発現が抑制されている
 ・ 先天性真珠腫ではPPAR γ 発現が低い

Department of Otorhinolaryngology, Kyoto University

両者の相関をまとめると、先天性真珠腫は30%と後天性真珠腫と比べて integrin 発現が低い傾向があった。また、両者とも PPAR 陽性例は integrin 発現が抑制されていた。

PPAR γ 発現とNF κ Bとの相関(炎症signalの関与)

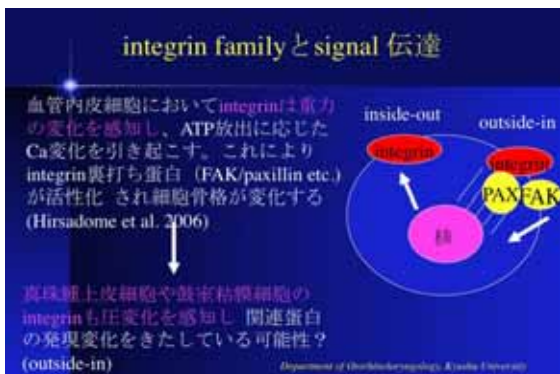
NF κ B	n	PPAR γ 発現		計	P
		陽性	陰性		
正常発現	n=20	12(40%)	8(27%)	20(67%)	有意差なし
発現低下	n=10	8(27%)	2(6%)	10(33%)	
Total		20(67%)	10(33%)	30(100%)	

1 test
 PPAR γ 発現例はNF κ Bが低下する傾向がある

Department of Otorhinolaryngology, Kyoto University

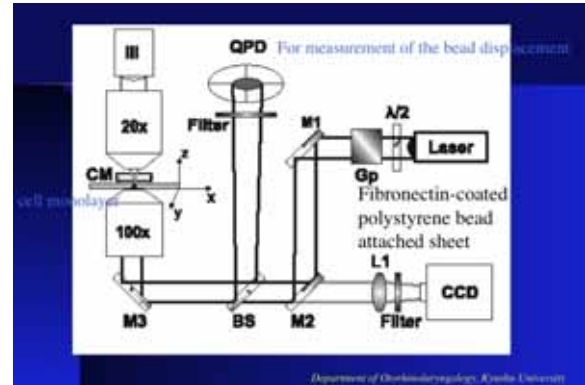
2) 中耳粘膜培養で陰圧環境で見られる integrin シグナル発現の変化

培養上皮細胞で圧変化によるシグナル変化を認めた。



培養細胞内では圧縮刺激や牽引刺激を用いて、発現蛋白や遺伝子変化の比較を行った。その結果、陰圧環境下では integrin シグナル下流の PAX, FAK 遺伝子などの発現が亢進し integrin signal の活性化が示唆された。これは integrin の out-side-in signal 経路の活性化を示唆し、真珠腫

培養細胞における圧受容システムの関与が推測された。



レーザー照射による変圧発生下、観察システムによる解析

3) 真珠腫における PPAR から integrin へのシグナル伝達の解明(inside-out シグナル、outside-in シグナル)

圧関与の有無で(先天性 vs 後天性)両シグナル系の関与形式が異なっていた。

さきにも、述べたように、PPAR 陽性例は integrin 発現が抑制されていた。両者の integrin 発現には有意差が存在している点を考慮すると、中耳真珠腫における圧調節機構は

- 1) 真珠腫上皮に発現する膜蛋白である integrin の発現様式に依存し、
- 2) そのシグナル伝達にも密接に関与しながら
- 3) PPAR を介して制御されている可能性がある。

今後の展開

側頭骨外科手術において中耳真珠腫の重要度は近年益々高まっているが、錐体尖や頭蓋底など危険部位に進展した場合、熟練した術者でも完全摘出は難しい場合がある。同時に術後合併症の危険性は高く、真珠腫上皮細胞の分子生物学的特性に注目した、全く新しい分子標的治療が切望されている。申請者は従来から中耳真珠腫を分

子生物学的に解析するために、新たな視点から主として“細胞骨格”に注目して研究を進めており、数々の研究成果を報告してきたが、近年心不全における心筋細胞の圧受容機構でも同様の視点から integrin 関連分子に注目が集まっている (nature 2008)。今後我々は再生医療領域で解析が進んでいる細胞骨格の細胞内シグナル伝達機構を応用することで、圧受容機構の個別差異をヒト個体が本来有する多様性 (SNP: single nucleotide polymorphisms) に求め、細胞骨格解析を応用した中耳真珠腫の安全かつ確実なテーラーメイド医療の確立を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

腫瘍細胞でのシグナル伝達研究などを含む
(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. Shiratsuchi H, Nakashima T, Komune N., Komune S. PPAR expression in middle ear cholesteatoma; Its roles in integrin expression and matrix invasion. Laryngoscope. In press.

2. Segawa Y, Oda Y, Yamamoto H, Shiratsuchi H, Hirakawa N, Komune S, Tsuneyoshi M. Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and their prognostic implications in nasopharyngeal carcinoma. Oncol Rep. 2009;21(5):1197-202

3. Segawa Y, Oda Y, Yamamoto H, Uryu H, Shiratsuchi H, Hirakawa N, Tomita K, Yamamoto T, Oda S, Yamada T, Komune S, Tsuneyoshi M. Overexpression of inducible nitric oxide synthase and accumulation of 8-OHdG in nasopharyngeal carcinoma. Histopathology. 2008;52(2):213-23.

4 賀数康弘、松本希、白土秀樹、中島寅彦、君付隆、小宗静男：真珠腫性中耳炎に対する乳突腔充填術後に生じた真珠腫再発について。頭

頸部外科 17(3) : 279-285, 2008 . (原著)

[学会発表](計 3 件)

1. 第 19 回日本耳科学会総会・学術講演会
(2009 年 10 月 8 日 ~ 10 日, 東京)

白土 秀樹、村上大輔、君付 隆、小宗静男 耳管開放症症例における耳管機能検査の検討

2. 第 19 回日本頭頸部外科学会総会・学術講演会(2009 年 1 月 29 日, 30 日, 名古屋)

白土秀樹、中島寅彦、安松隆治、門田英輝、古後龍之介、橋本和樹、小宗静男 当科における唾液腺癌の臨床病理学的検討

3. 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会(2008 年 5 月 15 日 ~ 17 日, 大阪)

白土秀樹、中島寅彦、橋本和樹、安松隆治、平川直也、小宗静男 上咽頭癌に対する TS-1, Vitamin A 併用放射線化学療法(TAR 療法)の治療成績

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白土 秀樹 (SHIRATSUCHI HIDEKI)

研究者番号 : 30398060

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :