

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 2 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592168

研究課題名（和文）中耳真珠腫における骨破壊に関わる促進因子と抑制因子の研究

研究課題名（英文）Promoter and inhibitor factors of bone destruction in human middle ear cholesteatoma

研究代表者

楠 威志（KUSUNOKI TAKESHI）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30248025

研究成果の概要（和文）：

中耳真珠腫の骨破壊に関わり促進因子として、破骨細胞の産生促進因子である receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)と、この RANKL を誘導するサイトカインとして IL-17 が注目されている。また、RANKL と IL-17 を抑制因子として Cu, Zn-SOD が報告されている。真珠腫上皮より真珠腫下肉芽に分けて、免疫染色を用いて RANKL、IL-17、カテプシン L、SOD の発現を免疫染色にて観察した。骨破壊促進因子である RANKL、IL-17 は、真珠腫上皮より上皮肉芽に強く発現し、骨破壊抑制因子である Cu, Zn-SOD は、逆に、真珠腫上皮に強く発現した。今回の研究において、中耳真珠腫の骨破壊の場は中耳真珠腫上皮よりむしろ RANKL、IL-17 の発現の強い上皮肉芽であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

**Introduction:** It has been reported that cathepsin L (as one of cystein proteinases) powerfully degrade type I collagen leading to the bone destruction and receptor activator of NF-Kapper B ligand (RANKL) is an essential factor for osteoclast differentiation, furthermore, osteoclasts secrete alarge mount of cathepsin L. IL-17A can induce RANKL. Therefore, we studied cathepsin L and RANKL in human middle ear cholesteatoma. Moreover, Cu, Zn-containing superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) as inhibitors of cathepsin L, IL17A or RANKL were observed. From above data, It was discussed between epithelia and subepithelial granulations.

**Subject and Method:** The human middle ear tissues evaluated in this study were surgically obtained from patients with cholesteatoma. Expression of specimens was Cathepsin L, RANKL and Cu, Zn-SOD were examined immunohistochemically.

**Results:** The degree of bone destruction was dependent on the number of IL-17 positive cells. It was a significant correlation between IL-17 and RANKL positive cells. RANKL and IL-17 immunoreactivity was detected in subepithelial granulation tissues than in epithelia. Reversely, Cu, Zn-SOD with inhibitors of RANKL and IL-17 was more strongly positive in epithelia than in subepithelial granulation tissues.

These results suggest that a field related to the bone destruction in human cholesteatoma is subepithelial granulations rather than epithelia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：耳鼻咽喉科

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：ヒト中耳真珠腫、カテプシン、SOD、RANKL、IL-17

### 1. 研究開始当初の背景

炎症病変によって真珠腫性中耳炎が周囲骨破壊を引き起こすことは周知の事実である。真珠腫性中耳炎による骨破壊の作用機序の一つとして各種プロテアーゼが働くことがすでに報告されている。真珠腫のプロテアーゼ産生については、プロテアーゼ産生および活性を高める作用のある上皮成長因子(EGF)が真珠腫上皮に多く存在し、そのEGFが上皮肉芽内のマクロファージ、線維芽細胞に働きかけプロテアーゼ産生および活性を高める。つまり、真珠腫上皮は上皮肉芽と同様、骨破壊を促進するという報告が多いが抑制因子についての報告はほとんどなく、そこで、以前、我々は、中耳真珠腫における骨破壊促進因子のほかに、抑制因子を含め、真珠腫上皮と上皮肉芽に分け比較検討まで行い始めて報告した(Kusunoki T et al: The Journal of Otolaryngology 2001, 30:157-161.)。その内容は以下のごとくである。真珠腫上皮よりも上皮肉芽組織や非真珠腫性中耳炎肉芽にプロテアーゼの一つであるカテプシン活性が高値であることを報告した。また、カテプシンの特異的インヒビターであるシスタチンAは真珠腫上皮により多く認められた。この骨破壊を誘導するプロテアーゼはフリーラジカルにより分泌が促進される。その誘導物質の一つであるフリーラジカルを捕獲する生体内酵素である superoxide dismutase(SOD)が真珠腫上皮により多くみとめたことも報告した。このことより、SODが、中耳真珠腫に関わるプロテアーゼの抑制因子であることを考えた。

### 2. 研究の目的

破骨細胞は、カテプシンを分泌し、骨破壊に関わっていることはすでに報告されている。最近、破骨細胞の産生促進因子として receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)や IL-17A が、注目されている。そこで、前述した骨破壊抑制因子である SOD が receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)と IL-17 を抑制するか否かについて検討した。さらに IL-17、カテプシン L、SOD の発現を観察し、臨床所見とも比較検討した。

今回の研究と臨床的意義として以下のことを考えた。

臨床の場において高齢や全身状態が悪く手術不可能な患者に対してプロテアーゼおよび破骨細胞の抑制因子である SOD の局所投与により真珠腫進展を抑えることが期待できる保存的療法の手がかりになるものと考えている。さらには、これを組み合わせることにより、外来で可能な小手術範囲で安全な術式の発案など、臨床面において画期的な展開が期待できる。

### 3. 研究の方法

手術により摘出された中耳真珠腫組織と手術時に側頭筋膜と耳後部から正常皮膚を採取した。これらをパラフィン切片および凍結切片を作成し、以下の実験試料として用いた。

#### 1) Cu, Zn-SOD 免疫染色

3  $\mu$ m 薄切りパラフィン切片を用いて、Cu, Zn-SOD (Stress 社、1 : 200 希釈)を1次抗体として用い、ABC法にて発現

を観察した。

## 2) RANKL、IL-17 免疫染色

3 μm 薄切凍結切片を用いて、IL-17 抗体 (Santa Cruz 社、1 : 100 希釈)、RANKL 抗体 (Alexis 社、100 希釈) を 1 次抗体として用い、ABC 法にて発現を観察した。その際、顕微鏡下、400 倍にて最も陽性細胞の多い 3 視野の陽性細胞数の平均値で評価した。

さらに中耳真珠腫による骨破壊程度とも比較検討した。骨破壊程度は、以下の如くとした。①顔面神経の露出、②硬膜の露出、③半規管瘻孔の有無で Grade 分類した。Grade 1:3 つとも認めない、もしくは 1 つ認める。Grade 2 : 2 つ認める。Grade 3 : 全て認める。

統計学的有意差の検定には、Mann-Whitney の U 検定を用いた。また同一標本において、IL-17A 陽性細胞と RANKL 陽性細胞数に相関関係があるか否かを検討した。

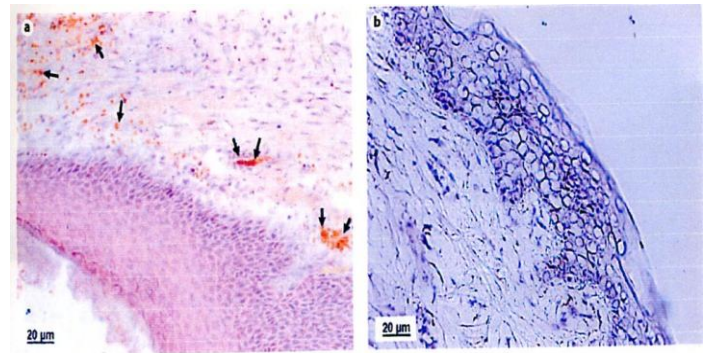
## 3) IL-17 蛋白量測定

真珠腫組織および側頭筋膜より 30 mg 組織量を採取し、ホモネート液を作成しさらに上清液を、IL-17 ELISA Kit (R&D) を使用し測定した。尚、総蛋白量は Biuret method in a Protein Assay Kit(Pierce 社)を用いて測定した。

## 4. 研究成果

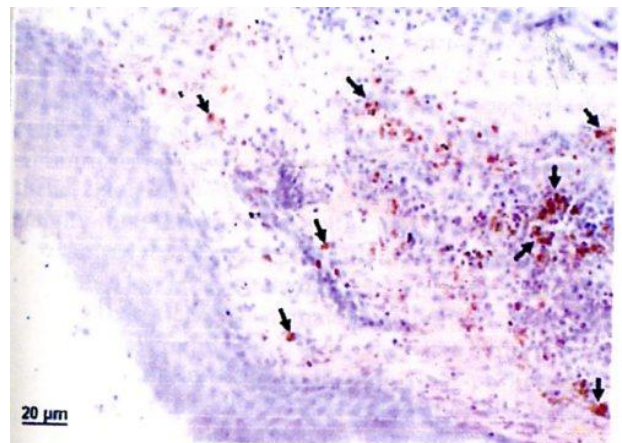
1) IL-17 蛋白/総蛋白量は、真珠腫組織群の平均値が、コントロール群とした側頭筋膜の平均値より有意に高値を示した。免疫染色による真珠腫組織中の IL-17 の発現については、真珠腫上皮には IL-17 陽性細胞像は認めず、上皮肉芽に陽性細胞を認めた。耳後部皮膚においては、ほとんどの症例で IL-17 陽性細胞を認め

なかった。



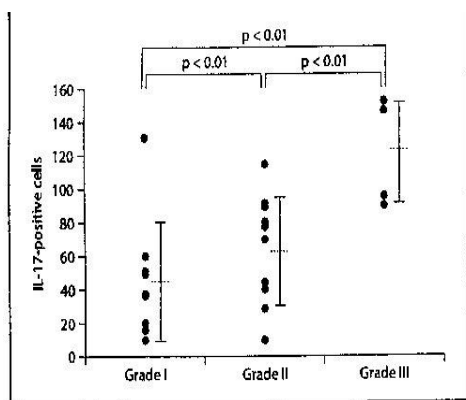
Immunohistochemical demonstration of IL-17 in a cholesteatoma (a) and the retroauricular skin (b). IL-17-positive cells are seen in the subepithelial granulation tissue, but not in the epithelium of the cholesteatoma. Note that there is no immunostaining of IL-17 in the skin.

2) RANKL については、IL-17 同様に真珠腫上皮には陽性細胞像は認めず、上皮肉芽に陽性細胞を認めた。



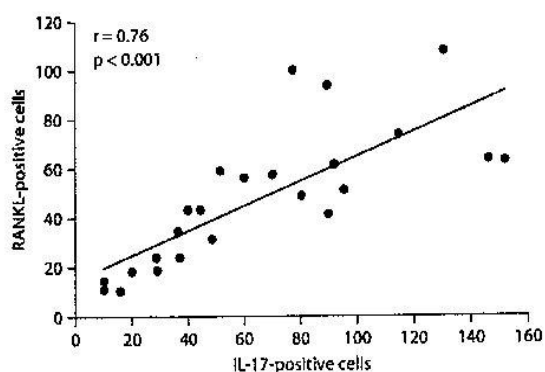
Immunohistochemical demonstration of RANKL in a cholesteatoma. RANKL-positive cells are seen in the subepithelial granulation tissue, but not in the epithelium of the cholesteatoma.

3) 骨破壊程度と IL-17、RANKL 陽性細胞数の関連については、高度な骨破壊を認める程、IL-17 陽性細胞数は多い傾向を認め統計学的にも有意に多かった。



Comparison of the number of IL-17-positive cells with the extent of bone destruction. The severity of bone destruction is dependent on the infiltration of IL-17-positive cells. The bars indicate SD.

また、同一標本における IL-17 陽性細胞と RANKL 陽性細胞数では有意な相関関係を認めた。



4) Cu, Zn-SOD は逆に、真珠腫上皮に強く発現し、上皮肉芽の発現は乏しかった。

以上のことから、中耳真珠腫の骨破壊において、IL-17 が、RANKL の過剰発現を介して、破骨細胞を誘導し骨破壊を引き起こす一因の可能性が示唆された。

この骨破壊促進因子である RANKL、IL-17 は、真珠腫上皮より上皮肉芽に強く発現した。Cu, Zn-SOD は逆に、真珠腫上皮に強く発現し、上皮肉芽の発現は乏しかったことより Cu, Zn-SOD が、骨破壊促進因子である RANKL、IL-17 の発現を抑制している可能性も示唆された。

## 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 1 件)

- ① Haruyama T, Furukawa M, Kusunoki T, Onoda J, Ikeda K : Expression of IL-17 and its role in bone destruction in human middle Ear cholesteatoma. *ORL* 72; 325-331:2010. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kusunoki T: Cathepsin L, RANKL and those inhibitors in human middle ear Cholesteatoma. The 13th Korea-Japan Joint Meeting of Otorhino-laryngology-Head and Neck Surgery. 2010年9月10日 ソウル
- ② Kusunoki T : Cathepsin L, its inhibitor in human otitis media. 6<sup>th</sup> Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media 2009年5月7日 ソウル

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

楠 威志 (KUSUNOKI TAKESHI)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：30248024

### (2) 研究分担者

池田 勝久 (IKEDA KATUHISA)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：70159614

古川 正幸 (HURUKAWA MASAYUKI)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：20359524