

## 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25年 5月10日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591893

研究課題名（和文） 中耳真珠腫組織における水素イオン濃度と水素イオンセンサー蛋白からみた骨吸収機序

研究課題名（英文） Mechanism of bone resorption in middle ear cholesteatoma in the light of H<sup>+</sup> concentration and H<sup>+</sup>-sensing proteins

研究代表者

鈴木 秀明（SUZUKI HIDEAKI）

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：20187751

研究成果の概要（和文）：

手術時に採取した真珠腫組織の pH を測定したところ弱酸性であった。リン脂質結合 pH 指示薬を用いて基底膜近傍の pH を測定した結果、乳突洞粘膜よりも真珠腫上皮のほうが低かった。ランタンを細胞間隙トレーサーとして用い電顕で観察すると、真珠腫上皮の全層にランタンが侵入していた。真珠腫上皮ではバリア機能が障害されており、内部の酸性 pH が上皮を透過して隣接する骨組織を脱灰・吸収する機序が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

**Objective:** The etiopathology of bone resorption in cholesteatoma is unclear. We studied pH in middle ear cholesteatoma tissue and the permeability of the cholesteatoma epithelium in an attempt to elucidate the mechanism of bone resorption in this disease.

**Methods:** Cholesteatoma tissue was collected from patients with primary acquired middle ear cholesteatoma. The pH of the keratin debris of cholesteatoma was measured using a pH meter. The cholesteatoma epithelium was examined under a confocal laser scanning microscope, and under a transmission electron microscope. Expression of filaggrin in the cholesteatoma tissue was explored by fluorescence immunohistochemistry and by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.

**Results:** The pH of the keratin debris of cholesteatoma was acidic. The pH of the basal layer of the cholesteatoma epithelium was significantly lower than that of the antrum mucosa. Transmission electron microscope showed distinct penetration of lanthanum in the intercellular space of the basal, spinous and granular layers of the cholesteatoma epithelium, but only a small amount of lanthanum in the granular layer in the normal skin. The expression of filaggrin mRNA was significantly lower in the cholesteatoma tissue than in the normal skin.

**Conclusions:** These results indicate that acid leakage through the cholesteatoma epithelium probably participates in the resorption of the underlying bone structure. The increased permeability of the cholesteatoma epithelium may be explained by a decrease in filaggrin expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：中耳真珠腫、水素イオン、骨吸収、バリア機能、pH、フィラグリン、電子顕微鏡、共焦点レーザー操作顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

中耳真珠腫とは、本来表皮が存在しない鼓室内に表皮が入り込んで増殖・拡大していく病態である。その大部分は鼓膜の一部が陥入して形成される後天性一次性真珠腫であり、組織学的には内部にケラチン落屑物を含む表皮嚢胞である。この疾患の大きな特徴の1つは、非真珠腫性慢性中耳炎と比較して著明な骨破壊が生じることである。このため本疾患を放置すると、耳漏、伝音難聴に加えて迷路瘻孔によるめまいや高度感音難聴、顔面神経麻痺、頭蓋内合併症を併発することも稀ではない。きわめて初期の真珠腫では耳処置による経過観察が可能ながあるものの、進行した場合、有効な保存的治療法がなく手術の絶対的適応となることがほとんどである。

真珠腫の骨吸収機序については従来よりさまざまな観点から研究がなされてきた。骨吸収促進や破骨細胞活性化の因子として、真珠腫上皮で発現・産生・分泌される prostaglandin E, interleukin-1, interleukin-6, parathyroid hormone, tumor necrosis factor- $\alpha$ , collagenase, platelet-derived growth factor, cathepsin, nitric oxide synthase, hexosaminidase, matrix metalloproteinase, receptor activator of NF $\kappa$ -B など、種々の物質が報告されてきた。しかしその機序はいまだ十分に解明されておらず、治療法に関しても手術による真珠腫の摘出以外に有効な手段がないのが現状である。

真珠腫塊は種々の有機酸を含み、低い pH を示すことが報告されている [1]。低い pH は骨組織の脱灰を引き起こし、破骨細胞の活性化や生存延長をもたらすことが知られている [2]。近年では transient receptor

potential (TRP) V1, TRPA1, acid-sensing ion channel (ASIC), TWIK-related acid sensitive K (TASK) channel, ovarian cancer G-protein coupled receptor 1 (OGR1) などの水素イオンセンサーイオンチャンネルや G 蛋白についての研究が進んでおり、これら水素イオンセンサー蛋白を介して上皮系細胞が活性化されることも報告されている [3]。これらのことから中耳真珠腫の骨吸収は水素イオン濃度の上昇とこれによる上皮系細胞や破骨細胞の活性化によってもたらされる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、中耳真珠腫において pH が骨吸収に関与している可能性を分子レベルで明らかにすることである。まず真珠腫組織の pH を測定し、次に水素イオンセンサー蛋白の発現と真珠腫上皮の透過性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 対象

当科で鼓室形成術を受けた後天性一次性の真珠腫性中耳炎患者を対象とした。対象患者からは事前に文書による承諾を得た。また本研究は産業医科大学倫理委員会により承認されている。

(2) 真珠腫組織の pH 測定

採取した真珠腫組織に 4 倍量の生理食塩水を加え、かき混ぜて懸濁液にした。この懸濁液の pH を微量用 pH メータ (ThermoOrion model 290A; Orion Research 社) で測定した。

(3) 真珠腫上皮基底面の pH 測定

真珠腫上皮をリン脂質結合 pH 指示分子プローブである fluorescein DHPE (25  $\mu$ M/saline) 溶液中に 60 分間浸し、洗浄後に共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM 5 PASCAL;

Carl Zeiss 社) 下に観察した。励起光として 488 nm と 458 nm の 2 波長を用い、dual excitation ratio 法により検量線に照らし合わせて pH を決定した。蛍光は 505-530 nm の帯域フィルターを通して検出・測定した。対照試料として、真珠腫を伴わない慢性中耳炎患者の乳突洞粘膜を用いた。

#### (4) 電子顕微鏡

真珠腫上皮の透過性を超微形態レベルで調べるため、ランタンを細胞間隙トレーサーとして負荷し、透過型電子顕微鏡にて観察した。試料を 2% 塩化ランタンと 2.5% glutaraldehyde の混合溶液に 2 時間浸した後、1% 四酸化オスミウムにて後固定し、アセトンで脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。超ミクロトームで超薄切片を作成し、クエン酸鉛で染色後、JEM 1200 EX 透過型電子顕微鏡で観察した。

#### (5) 免疫組織染色

真珠腫組織を 4% paraformaldehyde で一晩固定した後、20% ショ糖溶液に移しスクロース化した。標本を OCT compound 中に凍結包埋し、クライオスタットにて 4  $\mu$ m 厚の切片を作成し、シラン処理したスライドガラス上に貼り付けた。1 次抗体は 100~200 倍希釈して使用し、4°C で一晩反応させた。2 次抗体として、Alexa Fluor 488 標識 IgG (Invitrogen, Molecular Probes) を 1000 倍希釈で用い、室温で 2 時間反応させた。切片は DAPI を含む封入剤で封入し、蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss Axioscop 2 plus) 下に観察した。励起光帯域フィルターは 475-495 nm (Alexa Fluor 488) および 340-380 nm (DAPI) とした。蛍光帯域フィルターは 515-565 nm (Alexa Fluor 488) および 435-485 nm (DAPI) とした。

#### (6) RNA 抽出

試料を RNA stabilizing reagent (Qiagen 社) に 4°C で一晩浸し、RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を用いて総 RNA を抽出した。RNA の純度と濃度はそれぞれ 260 nm/280 nm の吸光度比、280 nm の吸光度によって測定した。

#### (7) 定量的 RT-PCR

抽出した総 RNA を High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystem 社) を使って逆転写し cDNA を作成した。定量的 RT-PCR は StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystem 社) を用いて行った。サーマルサイクラーの設定は、95°C 2 分 → (95°C 1 秒 → 60°C 20 秒) × 40 サイクルとした。GAPDH を内部標準として用い、測定された閾サイクル数 ( $C_T$ ) から、標的 mRNA/標準 mRNA を次式により算出した:  $2^{-\Delta C_T}$

ただし、 $\Delta C_T = \text{標的の } C_T - \text{GAPDH の } C_T$

#### (8) pH 刺激による真珠腫上皮細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の変化

真珠腫上皮を  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 (3  $\mu$ M Fluo 3-pentaacetoxymethyl ester; Molecular

Probes 社) に 60 分間浸し、共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM 5 PASCAL; Carl Zeiss 社) 下に経時的に観察しながら、酸性溶液 (10 mM PBS, pH 5.0~6.5) で刺激した。励起光は 488 nm とし、蛍光は  $\geq 515$  nm の長波長フィルターを通して検出・測定した。

#### (9) 真珠腫上皮の in vivo における電氣的インピーダンス測定

鼓室形成術の術中に真珠腫上皮の電気抵抗を測定した。測定器は皮膚科領域の臨床検査で使用されている角層膜厚水分計 ASA-M2 (ASAHI BIOMED 社) で、接地電極は両側前腕内側に装着した。

(10) データは平均  $\pm$  標準誤差として表示し、Mann-Whitney U 検定で有意差検定を行った。  $p < 0.05$  を有意とした。

## 4. 研究成果

(1) 微量用 pH メータで測定した真珠腫組織の pH は 4.95~7.70 で、平均  $6.55 \pm 0.07$  ( $n=55$ ) であった。

(2) 真珠腫上皮基底面の pH は  $6.17 \pm 0.14$  で、真珠腫を伴わない慢性中耳炎の乳突洞粘膜の pH ( $6.67 \pm 0.18$ ) よりも有意に低かった ( $p < 0.05$ )。乳突洞粘膜では比較的均一な蛍光が見られたが、真珠腫上皮では不均一で断続的な蛍光が見られた。

(3) 電子顕微鏡所見では、真珠腫上皮の基底層、有棘層、顆粒層の細胞間隙にランタンが浸透しているのが確認された。これに対し正常皮膚では顆粒層の一部にわずかなランタンの浸透が認められるのみだった。

(4) 免疫組織学的に水素イオンセンサー蛋白である TRPV1, TRPA1, ASIC, TASK channel, OGR1 について検索したが、発現は認められなかった。これに対し、filaggrin は真珠腫上皮の角質層に発現していた。

(5) pH 5.0~6.5 の酸性溶液の刺激に対し、真珠腫上皮細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は変化しなかった。

(6) 真珠腫組織の filaggrin mRNA/GAPDH mRNA は  $0.79 \pm 0.18$  であり、正常皮膚 ( $1.96 \pm 0.41$ ) に比べて有意に filaggrin の発現が低下していた ( $p < 0.05$ )。

(7) In vivo で測定した真珠腫上皮の電氣的インピーダンスは耳後部皮膚や外耳道皮膚に比べて有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。

## 5. 考察・結論

真珠腫組織の pH は弱酸性であり、慢性中耳炎における乳突洞粘膜よりも pH が低かった。ランタンを細胞間隙トレーサーとして用いた電子顕微鏡所見で見られたように真珠腫上皮の透過性は超微形態レベルで亢進していた。このことは in vivo における真珠腫上皮の電氣的インピーダンスが低下していることから裏付けられた。表皮組織のバリ

ア機能を担う物質としては、角質層に存在する filaggrin がよく知られているが、mRNA レベルでの filaggrin の発現は真珠腫上皮では正常皮膚に比べて低下していた。また今回の研究では水素イオンセンサー蛋白は中耳真珠腫の病態に関与しているというエビデンスは得られなかった。

以上より、真珠腫上皮では filaggrin により形成される表皮バリア機能が障害されており、内部の酸性に傾いた pH (水素イオン) が上皮を透過して隣接する骨組織を脱灰・吸収する機序が考えられた。pH の中和や上皮バリア機能の回復・温存を標的とすることにより、中耳真珠腫による骨破壊を阻止する新たな治療法の開発の糸口となり得ると考えられる。

## 6. 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 Nguyen KH, Suzuki H, Ohbuchi T, Wakasugi T, Koizumi H, Hashida K, Baba R, Morimoto H, Doi Y: Possible participation of acidic pH in bone resorption in middle ear cholesteatoma. Laryngoscope (in press). DOI: 10.1002/lary.23245 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

① 鈴木秀明, ゲン カク ホン, 若杉哲郎, 大淵豊明, 小泉弘樹, 橋田光一: 中耳真珠腫組織の pH と骨吸収機序. 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2013 年 5 月 16 日, 札幌.

② 鈴木秀明, ゲン カク ホン, 大淵豊明, 小泉弘樹, 橋田光一: 中耳真珠腫組織 pH の骨吸収機序への関与. 第 22 回日本耳科学会総会学術講演会, 2012 年 10 月 4 日, 名古屋.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 秀明 (SUZUKI HIDEAKI)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20187751

### (2) 研究分担者

若杉 哲郎 (WAKASUGI TETSURO)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20461569  
橋田 光一 (HASHIDA KOICHI)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90389461  
柴田 美雅 (SHIBATA MINORI)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90512187

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号:

## 7. 参考文献

[1] Iino Y, et al.: Organic acids and anaerobic microorganisms in the contents of the cholesteatoma sac. Ann Otol Rhinol Laryngol 92: 91-96, 1983.

[2] Pereverzev A, et al.: Extracellular acidification enhances osteoclast survival through an NFAT-independent, protein kinase C-dependent pathway. Bone 42: 150-161, 2008.

[3] Yamamura H, et al.: Protons activate the  $\delta$ -subunit of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in humans. J Bio Chem 279: 12529-12534, 2004.