慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	中耳疾患と中耳発生における耳小骨の破骨細胞の数と局在に関する解析
Sub Title	Analysis on the number of osteoclasts in auditory ossicles in middle ea disease and middle ear development
Author	神崎, 晶(Kanzaki, Sho) 松尾, 光一(Matsuo, Koichi)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2014
課題番号：２３５９２４９５

研究課題名（和文）中耳疾患と中耳発生における耳小骨の破骨細胞の数と局在に関する解析

研究課題名（英文）analysis on the number of osteoclasts in auditory ossicles in middle ea disease and middle ear development

研究代表者
神崎　晶（Kanzaki, Sho）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：５０２８６５５６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,000,000円

研究成果の概要（和文）：1）マウスにおける破骨細胞の局在 破骨細胞のマーカーであるカテプシンKを蛍光ラベルすることで下記マウスを用いることとした。Cg-Gt(ROSA)26sor<tm14(CAG-tdTomato)Hez/J 4を使用して行った。ツチ骨で（生後）4 日齢の時点では破骨細胞が検出された。それから生後21日齢までツチ骨において破骨細胞が発現することを確認した。
2）ヒト患者検体の観察
真珠腫性中耳炎患者から摘出された耳小骨（キヌタ骨）を摘出しカテプシンKで染色したところ、カテプシンK発現細胞（すなわち破骨細胞と想定している）は正常耳小骨（ご遺体）と比較して有意に増加することを示した（p=0.02)。

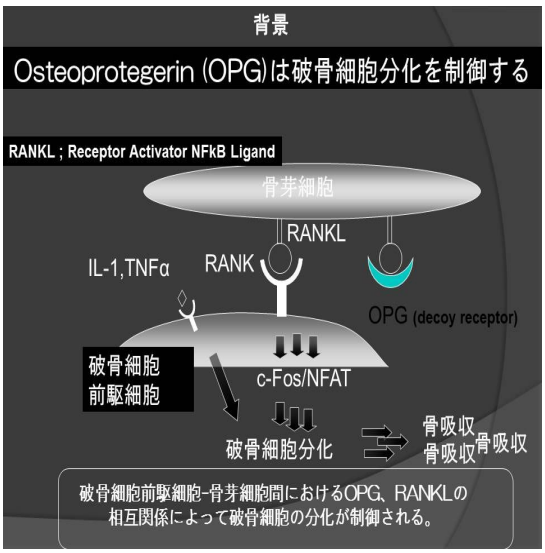
研究成果の概要（英文）：1) Bone remodeling may be important for auditory ossicular structure. Osteoclasts are specialized multinuclear macrophages that secrete HCL and hydrolases causing bone resorption. Therefore, regulating of the number of osteoclastsis critical for maintaining the shape and size of auditory ossicles. We used Cg-Gt(ROSA)26sor<tm14(CAG-tdTomato)Hez/J4 mice to analyze the location of osteoclasts during development. The signals were shown in mice aged postnatal day 4.
2) osteoclasts in patients with cheloesteatoma We counted the number of Cathepsin K positive cells which are markers of osteoclasts. There are significant differences of the number of cathepsin K cells between normal people and patients with cholesteatoma.
The number of Cathepsin K positive cells and/or osteoclasts are significantly increased in the ossicles in cases of cholesteatoma. The anti-bone-resorptive medication may prevent bone resorption of cholesteatoma.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：耳小骨　破骨細胞　中耳炎　真珠腫

１．研究開始当初の背景

骨は骨芽細胞によって骨形成が生じており、破骨細胞によって骨吸収が行われている。これを骨のリモデリングと呼んでいる。骨リモデリングに関するシグナルは分子生物学の進歩によって解明されてきた。
耳小骨は人間の体内で最も小さい骨であり、重力よりは音振動に影響を受けている特殊な環境にある骨である。しかも中耳は空気が入っておりその中に存在する稀有な骨である。耳小骨は音を伝える機能として重要な役割を担っているが、耳小骨のリモデリングについて解明されていない部分が多い。われわれはこれまで、破骨細胞数が過剰な場合（骨粗鬆症に近い）では、アブミ骨の固着が認められ耳硬化症に近い病態が生じることが明らかになった（Kanzaki S et al Bone 2004）。



さらにビスフォスフォネート製剤を用いることでアブミ骨の固着を軽減し聴力の予防に成功することを示した。
一方、破骨細胞が皆無の状態では大理石病と呼ばれるような病態になることを明らかにしてきた。耳小骨は軟骨細胞に占められていた。推測では、貪食能のある破骨細胞がないことによって軟骨細胞が貪食されず、そのまま残存し耳小骨も巨大化することによって振動能力が低下し、難聴になることをドップラー振動計測で示した（Kanzaki S et al American J Pathol 2004）。
このようにここまで代表者らは松尾光一博士とともに、破骨細胞数が正常から逸脱すると、難聴が生じることを示してきた。
中耳の病態と骨リモデリングについて示してきたが、そもそも正常において骨リモデリングがどのように起こっているのか、他の骨と比較してリモヂングが発生しにくいのかどうかが不明のままである。
理由として免疫染色によって破骨細胞を確認する手法が確立されておらず、破骨細胞自体が中耳に少ないのか、小さい検体であるため、同定しにくいのかが不明であった。
さらに耳小骨の発生における破骨細胞の役割が解明されていない。また、中耳や耳小骨が破壊されることで伝音難聴をきたすが、その耳小骨が破壊されるような病態において実際に破骨細胞がどのような動きをするのか？例えば、急性中耳炎においてどのようなタイミングで破骨細胞が現れて姿を消していくのかが不明である。
これらのメカニズムが解明されることによって、慢性中耳炎や耳硬化症など骨吸収が関与する疾患に対する創薬も期待されている。

２．研究の目的

1）ヒト・マウス耳小骨における破骨細胞の局在に関する解析
破骨細胞を蛍光でラベルしたトランスジェニックマウスを活用して、耳小骨における破骨細胞の局在を、発生や成長過程で検討する。
2）ヒト中耳炎・マウス中耳炎モデルにおける耳小骨の破骨細胞数に関する検討
ヒト：真珠腫性中耳炎、耳硬化症患者における耳小骨の破骨細胞数の測定(倫理委員会申請済)
真珠腫が浸潤した耳小骨や耳硬化症で摘出されたアブミ骨に対してカテプシン染色にて破骨細胞数の計測を行う。

３．研究の方法

１）ヒト・マウス耳小骨における破骨細胞の局在に関する検討
マウス:耳小骨破骨細胞を GFP でラベルしたトランスジェニックマウスを作成することができたため、聴力も形状も正常である耳小骨における破骨細胞の局在を検討する。さらに、中耳の発生・成長過程における破骨細胞の局在について検討を行う。
ヒト：同意を得たご遺体から摘出された耳小骨において破骨細胞数とは細胞の局在について解析する。

２）真珠腫性中耳炎において摘出された耳小骨における破骨細胞の観察
ヒト真珠腫性中耳炎で真珠腫被膜に接触し溶解した耳小骨破骨細胞の局在と細胞数を確認し、正常群（ご遺体から得らえた）と比較検討する。

４．研究成果

1）マウスにおける破骨細胞の局在について
破骨細胞のマーカーであるカテプシンKを蛍光ラベルすることで下記マウスを用いることとした。なお、カテプシンKは破骨細胞から分泌されて骨組織のコラーゲンを分解する。
本マウスを入手することと、交配させてからマウスが生まれるまでに多大な時間を要し

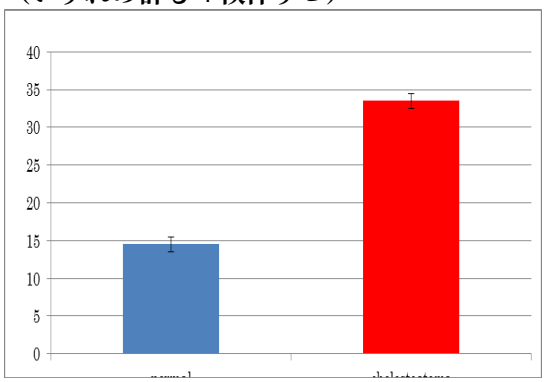
たので、研究機関を当初より延期した経緯がある。
Cg-Gt(ROSA)26sor<tm14(CAG-tdTomato)Hez/J 4を使用して行った。これにより、全身の骨における破骨細胞数を蛍光でラベルすることが可能になり、骨表面だけでなく、立体的に細胞数をカウントすることが可能である。
まずマウスの発生において頭蓋でみると縫合線を中心に破骨細胞が発現している。
鼓膜輪の骨部も破骨細胞が発現している。
ツチ骨の brevis と呼ばれる部位において軟骨から骨化する過程で、(生後) 4 日齢の時点では破骨細胞が検出された。それから生後 21 日齢までツチ骨において破骨細胞が発現することを確認した。すなわち軟骨細胞が消失していくとともに破骨細胞が置き換わって発現していくことを観察している。
破骨細胞を蛍光ラベルして発生を観察する試みは国内外含めてこれまでになく、耳小骨の形成を考える上で重要であると考える。
また成熟マウスの耳小骨にも一部破骨細胞の存在を示すことが可能になった。
これまで耳小骨における破骨細胞の存在を示すことが免疫染色の問題もあって同定が困難であったが、このマウスを応用することによって中耳の病態と破骨細胞の局在との関連性を示すことが可能になる。

今後の課題として、耳小骨の発生における破骨細胞数を定量し、発現部位の推移を観察していく予定である。
さらに1)で使用した破骨細胞をラベルしたマウスの中耳に肺炎球菌を注入し、中耳炎モデルを作成する。中耳炎における耳小骨の破骨細胞数と局在について、1)で行った破骨細胞のラベリング技術を用いて検討していきたい。

ご遺体の耳小骨の観察
検体数も少なく、ご遺体の固定にも時間を要しており、検体の年齢にもばらつきがあるが、キヌタ骨、アブミ骨いずれにも破骨細胞は存在していた。

2) ヒト患者検体の観察
真珠腫性中耳炎患者から摘出された耳小骨(キヌタ骨)を摘出しカテプシンKで染色したところ、カテプシンK発現細胞(すなわち破骨細胞と想定している)は正常耳小骨(ご遺体)と比較して有意に増加することを示した(p=0.02)。パイロットスタディではあるが真珠腫性中耳炎の骨吸収においてカテプシンK細胞が関与していることを示唆する結果となった。今後の課題としては対照群を真珠腫性中耳炎症例の年齢とマッチさせる必要があるが、正常の耳小骨をどうやって入手するかなどを考える必要がある。また、年齢によって耳小骨の破骨細胞数がどのように増減していくかを検討する必要がある。

図　カテプシンK細胞数の比較
(いずれの群も4検体ずつ)



ご遺体　　真珠腫性中耳炎

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計　4件)

1. Watada Y, Yamashita D, Toyoda M,Tsuchiya K,Hida N, Tanimoto A, Ogawa K, Kanzaki S. (CA), Umezawa A . Magnetic resonance monitoring of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled stem cells transplanted into the inner ear Neuroscience Research 2015 Jun;95:21-6. doi:10.1016/j.neures.2015.01.010. (査読有)
2. Cayé-Thomasen P, Hermansson A, Bakaletz L, Hellstrøm S, Kanzaki S, Kerschner J, Lim D, Lin J, Mason K, Spratley J. Panel 3: Recent advances in anatomy, pathology, and cell biology in relation to otitis media pathogenesis.Otolaryngol Head Neck Surg. 2013 Apr;148(4 Suppl):E37-51. doi: 10.1177/0194599813476257. Review. (査読無)
3. Kanzaki S, Takada Y, Ogawa K, Matsuo K, Osteoclasts Regulate for Maintaining Morphology of Auditory Ossicles, Proceedings of Middle Ear and Hearing 9th International Cholesteatoma and Ear Surgery Meeting, 2012 Web. http://www.kuglerpublications.com/Download/dl_files.php?id=16 (査読無)

〔学会発表〕（計　2件）

1. Kanzaki S, Ogawa K, Matsuo K, Regulation of osteoclasts is required to maintain morphology and function of ossicles in middle ear. 1st Global Otology Research Forum, Antalya, Turkey, Nov.13.2013.
2. Kanzaki S, Takada Y, Ogawa K, Matsuo K, Osteoclasts Regulate for Maintaining Morphology of Auditory Ossicles, Proceedings of Middle Ear and Hearing (Symposium) Bone resorption, Cholesteatoma Meeting 2012, Nagasaki Japan 2012.6　9th International Cholesteatoma and Ear Surgery Meeting, 2012 Web.

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕

なし

６．研究組織

(1)研究代表者

神崎晶（Kanzaki Sho）
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：50286556

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

松尾光一
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40229422