

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11329

研究課題名(和文) マクロファージ遊走阻止因子を介した中耳炎症性疾患の病態解明と新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Role of macrophage migration inhibitory factor in otitis media

研究代表者

假谷 伸 (Kariya, Shin)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10274226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス中耳にエンドトキシンを投与したところ、NLRP3インフラマソームの構成タンパクが誘導された。それらのタンパクは複合体を形成し、NLRP3インフラマソームが形成された。ヒト中耳炎症例の中耳粘膜や中耳肉芽組織の中にNLRP3インフラマソームの構成タンパクが発現していることを確認した。マクロファージ遊走阻止因子ノックアウトマウスを用いた検討により、NLRP3インフラマソームの生成にはマクロファージ遊走阻止因子が必須であることが明らかとなった。本研究により、マクロファージ遊走阻止因子を介してNLRP3インフラマソームを制御することが、中耳炎に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球や薬剤耐性菌が関与する難治性中耳炎症例が増加しており、これらは既存の薬剤や外科的治療では対応困難なケースがある。このため、従来とは異なる視点からの治療選択枝の確立が望まれている。本研究により、中耳におけるマクロファージ遊走阻止因子などのサイトカインの作用機序が明らかとなった。また、炎症性サイトカインの誘導過程におけるマクロファージ遊走阻止因子の作用が明らかとなった。これらの知見は、難治性中耳炎の病態解明に寄与するとともに、中耳炎に対する新規治療法の開発につながってゆくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：NLRP3 inflammasome and macrophage migration inhibitory factor are critical molecules mediating inflammation. Macrophage migration inhibitory factor has an important role in the production of IL-1b and the NLRP3 inflammasome. Controlling the inflammation by modulating macrophage migration inhibitory factor and the NLRP3 inflammasome may be a novel therapeutic strategy for otitis media.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：炎症 中耳炎 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

中耳炎のおもな起炎菌は肺炎球菌やインフルエンザ菌である。その一方で、炎症が慢性化した場合には黄色ブドウ球菌や緑膿菌が検出されることも多い。近年、多数の抗菌薬に対して耐性を持つ多剤耐性菌による中耳炎症例に対する治療をどのように行うかが臨床上的な大きな問題となっている。

また、好酸球性中耳炎という新しい疾患概念が、最近、確立された。好酸球性中耳炎は気管支喘息を高頻度に合併し、中耳腔に多数の好酸球浸潤を認めることが特徴である。非常に難治性の中耳炎であることに加え、内耳への炎症波及によって高度感音難聴となる症例が、一般的な慢性化膿性中耳炎と比較して多いことが報告されている。(Iino Y, et al. *Auris Nasus Larynx* 38:456-61,2011.)

マクロファージ遊走阻止因子は、さまざまな生理活性をもつことが報告されているサイトカインである。従来、細菌の菌体成分や毒素を起点とする炎症シグナル経路において重要な働きを有することが報告されていたが、近年、好酸球が主に関与するアレルギー性炎症においても注目を集めている因子である。(de Souza HS, et al. *Mucosal Immunol* 8:1154-65,2015.)

研究代表者は、マクロファージ遊走阻止因子がヒト中耳炎症例の中耳組織で強く発現していることを報告し、また、グラム陰性菌の主要な病原物質であるエンドトキシンをマウスの鼓室内に投与することによってマクロファージ遊走阻止因子が中耳と内耳の双方で誘導されることを報告してきた。(Acta Otolaryngol 136:1011-6,2016.)

好酸球や薬剤耐性菌が関与する難治性中耳炎症例が増加しており、これらは既存の薬剤や外科的治療では対応困難なケースがある。このため、従来とは異なる視点からの治療選択枝の確立が望まれている。これらの学術的および臨床的背景から、中耳におけるマクロファージ遊走阻止因子などのサイトカインの作用機序を網羅的に検討することが、難治性中耳炎の病態解明と新規治療法の開発に必須であると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト臨床検体やマクロファージ遊走阻止因子ノックアウトマウス、培養細胞などを用いて、中耳炎症性疾患の病態を明らかにする。その上で、従来の治療法では対応が困難な難治性中耳炎が増加している現状を打開するため、中耳炎症性疾患に対する新しい視点からの治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 野生型マウスおよびマクロファージ遊走阻止因子ノックアウトマウスにおける各種サイトカインやケモカインの網羅的解析

野生型マウスの中耳腔にエンドトキシンを経鼓膜投与することによって実験的中耳炎を発症させ、化膿性中耳炎のモデルマウスとして用いる。また、同様に卵白アルブミンと水酸化アルミニウムの腹腔内投与で全身感作させた後、卵白アルブミンを鼓室内投与することにより好酸球性中耳炎モデルマウスを作製する。これらのモデルマウスは、研究代表者が所属する研究室が過去の研究を通して確立済みであり、本検討にすぐに用いることが可能である (Kariya S et al. *Clin Exp Immunol* 163:260-9,2011)。マクロファージ遊走阻止因子ノックアウトマウスにも同様の処置を行う。コントロールマウスの中耳腔には生理食塩水を注入する。マウス中耳を生理食塩水で洗浄し、回収された洗浄液をサンプルとしてサイトカインアレイ解析を行う。インターロイキン(IL)-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17、IL-31、IL-33、KC、MCP-1、TNF、VEGF、IFN、MIP-2 など、マウスのサイトカイン・ケモカインに重点をおいたサイトカインアレイは市販されており、購入予定である。サイトカインアレイを用いることにより多数のサイトカイン・ケモカインを網羅的かつ効率的に解析することが可能である。市販のアレイに含まれていない因子(マクロファージ遊走阻止因子など)については市販のキットを用いてELISA法で個別に定量を行う。

2) ヒト好酸球性中耳炎症例やヒト慢性化膿性中耳炎症例の臨床検体を用いた検討

ヒト好酸球性中耳炎症例の中耳貯留液や炎症性肉芽、ヒト慢性化膿性中耳炎症例の中耳組織などの臨床検体を採取する。正常コントロールとしては、中耳に炎症を認めない症例で、人工内耳手術を行う際に採取した中耳組織を用いる。臨床検体は治療上の必要性から吸引・除去したものをのみを実験に使用し、本研究のために採取を行うことはない。マウスでのサイトカインアレイの結果を参考にして、重要と思われるマクロファージ遊走阻止因子を含む各種サイトカインやケモカインおよびその受容体を選択する。そして、その発現をヒト臨床検体においてリアルタイムPCR法により遺伝子レベルで検討するとともに、タンパクレベルで免疫組織学的に検討する。

また、臨床データとの関連性を調べ、それらの臨床的意義を解析する。

3) ヒト末梢血単核細胞を用いた In vitro の検討

末梢血をヒト正常ボランティアから採取する。ヒト末梢血単核球をエンドトキシンやエオタキシンで刺激し、24時間後および72時間後に培養上清を回収する。本実験系も研究代表者が過去に実施した実績があり、サイトカインの相互作用を検討できる有用な実験系である (Okano M, et al. J Allergy Clin Immunol 127;277-9 e11, 2011)。平成29年度の検討を通して重要と思われた好酸球性炎症または慢性化膿性炎症に関連するサイトカインに関して、その産生と、その産生に対する他のサイトカインや中和抗体による制御機構をELISA法にて解析する。

4) 野生型マウスを用いた In vivo での検討

In vitro での検討を通じて絞り込んだ炎症因子の中和抗体や受容体のアゴニスト・アンタゴニストを野生型マウスに投与したうえで、中耳に炎症を惹起させ、中耳骨胞や中耳洗浄液を採取する。組織学的評価やELISA法でのサイトカイン定量により、炎症に対する各因子の効果を解析する。これらの研究結果をもとに、サイトカインネットワークを基盤とした好酸球性中耳炎および慢性化膿性中耳炎の病態ネットワークを解明し、新規治療法の確立を行う。

4. 研究成果

マウス中耳にエンドトキシンを鼓室内投与したところ、細胞質内の異物や病原体の病原因子がトール様受容体や細胞質内受容体で認識され、NLRP3 インフラマソームの構成タンパクであるNLRP3、ASC (Apoptotic Speck-like protein containing a Card)、カスパーゼ1が誘導された。それらのタンパクは複合体を形成し、NLRP3 インフラマソームが形成された。

ヒト慢性中耳炎や真珠腫性中耳炎症例の中耳粘膜や中耳肉芽組織の中に NLRP3 インフラマソームの構成タンパクやトール様受容体が発現していることを確認した。

マクロファージ遊走阻止因子ノックアウトマウスを用いた検討により、NLRP3 インフラマソームの生成にはマクロファージ遊走阻止因子が必須であることが明らかとなった。

本研究によって、インターロイキン1ベータの産生に必要な因子である NLRP3 インフラマソームが中耳炎の炎症病巣においても産生されていることが示された。マクロファージ遊走阻止因子を介して NLRP3 インフラマソームを制御することが、中耳炎に対する新たな視点からの治療法となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Pengfei Zhao, Yukihide Maeda, Yuko Kataoka, Takaya Higaki, Seiichiro Makihara, Jun Nishihira, Tomoyasu Tachibana, Kazunori Nishizaki	4. 巻 41
2. 論文標題 Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in NLRP3 Inflammasome Expression in Otitis Media	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Otolology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 364-370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MAO.0000000000002537.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Pengfei Zhao, Yukihide Maeda, Yuko Kataoka, Takaya Higaki, Yohei Noda, Seiichiro Makihara, Kazunori Nishizaki	4. 巻 138
2. 論文標題 NLRP3 inflammasome expression in lipopolysaccharide-induced otitis media.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 1061-1065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00016489.2018.1515499.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 假谷伸、岡野光博、西崎和則
2. 発表標題 NLRP3インフラマソームの誘導経路におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割の検討
3. 学会等名 第28回 日本耳科学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	檜垣 貴哉 (Higaki Takaya) (30587407)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	趙 鵬飛 (ZHAO Pengfei)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関