

平成21年5月7日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591970  
 研究課題名（和文）  
 マクロファージ遊走阻止因子による滲出性中耳炎に対する新たな治療戦略の確立  
 研究課題名（英文）  
 Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Otitis Media with Effusion  
 研究代表者  
 假谷 伸（KARIYA SHIN）  
 岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
 研究者番号：10274226

## 研究成果の概要：

ヒト滲出性中耳炎症例の中耳貯留液中のマクロファージ遊走阻止因子（MIF）濃度をELISA法にて測定したところ、90%以上の症例からMIFが検出された。滲出性中耳炎におけるMIFの役割を明らかにすることを目的にマウスの中耳骨胞内にMIFを注入したところMacrophage Inflammatory Protein-2（MIP-2）、Interleukin-1b、Tumor necrosis factor-aが誘導された。MIP-2は強力な好中球誘導因子であり、滲出性中耳炎患者における中耳粘膜や中耳貯留液中にMIFの発現と好中球の浸潤が認められることからMIFはMIP-2の誘導を介して滲出性中耳炎の好中球浸潤に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：耳科学、サイトカイン、中耳炎、免疫

## 1. 研究開始当初の背景

マクロファージ遊走阻止因子は活性化T細胞から分泌され、マクロファージの遊走を阻止し、マクロファージを炎症局所にとどめておく作用をもつ物質として報告された。近年、マクロファージ遊走阻止因子ノックアウトマウスが作製されたことなどから、その機能

解析が進みつつあり、炎症因子としてだけではなく遅延型アレルギーに密接に関与する液性因子としての免疫学的作用や、細胞の分化増殖作用など複数の生理作用をもつ因子として注目されている。(Calandra T et al. Nat Rev Immunol. 3:791-800;2003.)

特に炎症因子としてはエンドトキシンを起

点とする炎症シグナル経路の上流で作用し、かつ、炎症のイニシエーターのひとつであることが推察されている。

中耳腔にマクロファージ遊走阻止因子が存在することを指摘した報告(Bernstein JM. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 85:90-96;1976)は発表されているが、中耳炎の病態への関与に関しては我々の報告(Kariya S, et al. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10:417-422;2003)が現在のところ唯一の報告である。この報告の中で我々はマクロファージ遊走阻止因子が滲出性中耳炎症例における中耳貯留液中から高頻度に検出されることを示した。また、中耳貯留液中のマクロファージ遊走阻止因子濃度は中耳炎の主要な起炎菌の一つであるグラム陰性菌の炎症惹起因子であるエンドトキシンの濃度と有意な正の相関を示すことを明らかとした。

また、我々は滲出性中耳炎症例における中耳貯留液中にインターロイキンなど多数の炎症因子が存在していることを報告している(Kariya S, et al. *Otol Neurotol.* 27:1089-1093, 2006)。しかし、中耳におけるマクロファージ遊走阻止因子の作用に関しては未明な点が多いため本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

マクロファージ遊走阻止因子と各種炎症因子との相互関係を明らかとして滲出性中耳炎の病態を解明し、新たな治療戦略の確立することを目的とする。

ヒトにおいては滲出性中耳炎患者の中耳貯留液中に存在するマクロファージ遊走阻止因子および炎症性サイトカインの発現を観察し臨床的な意義を明らかとする。

また、滲出性中耳炎モデルマウスを用いてマクロファージ遊走阻止因子や各種の炎症性サイトカインの発現を観察し、それらの相互作用を明らかとする。

## 3. 研究の方法

ヒト滲出性中耳炎症例患者より中耳貯留液を採取し、ELISA法にて貯留液中のマクロファージ遊走阻止因子、IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインを測定した。中耳貯留液の性状や、アレルギー性鼻炎の有無などの臨床所見との関連を検討した。

マウスの中耳骨胞内にエンドトキシンを注入し、24時間後に中耳洗浄液を回収し、マクロファージ遊走阻止因子、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、Macrophage Inflammatory Protein - 2などの濃度をELISA法にて測定した。また、同様にマウスの中耳骨胞内にマクロファージ遊走阻止因子を注入し、24時間後、48時間後において中耳洗浄液中のIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、Macrophage Inflammatory Protein - 2の濃度をELISA法にて測定した。また、マウスの中耳骨胞を組織学的に検討した。

## 4. 研究成果

ヒト滲出性中耳炎症例において中耳貯留液の性状別でマクロファージ遊走阻止因子の濃度を比較したところ、粘液性貯留液を認める症例の方が漿液性貯留液を認める症例より有意に濃度が高かった。

マウスの中耳骨胞内にエンドトキシンを注入したところ、中耳粘膜におけるマクロファージ遊走阻止因子の発現が免疫染色にて確認された。(図1)

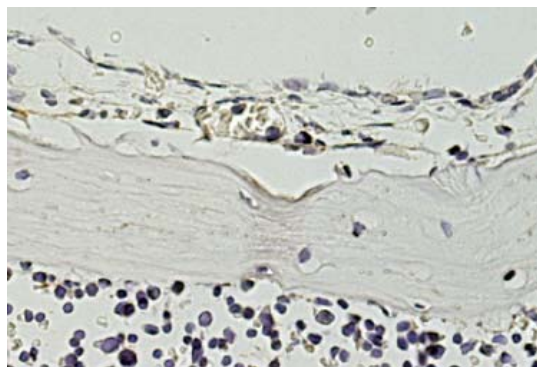


図1 : *Acta Oto-Laryngol* 2008 より引用

同様にマウスの中耳骨胞内にエンドトキシンを注入したところ、中耳粘膜において好中球を中心とした炎症細胞の高度な浸潤と粘膜肥厚を認めた。また、中耳腔内に炎症細胞を豊富に含む浸出液の貯留を認めた。

マウスの中耳骨胞内にエンドトキシンを注入したところ、生理食塩水を注入した対照群に比べて有意に高い濃度でマクロファージ遊走阻止因子が検出された。(図2)

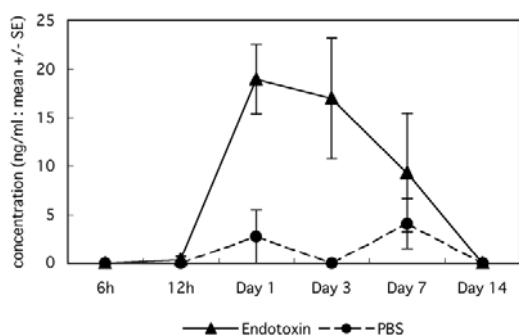


図2 : Acta Oto-Laryngol 2008 より引用

マウスの中耳骨胞内にエンドトキシンを注入したところ、注入後12時間、24時間後において生理食塩水を注入した対照群に比べて有意に高い濃度でIL-1 $\beta$ が検出された。(図3)

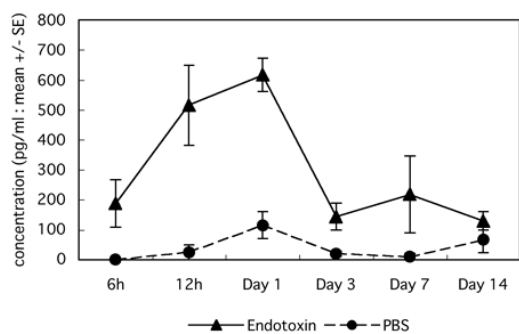


図3 : Acta Oto-Laryngol 2008 より引用

マウスの中耳骨胞内にエンドトキシンを注入したところ、注入後24時間後において生理食塩水を注入した対照群に比べて有意に高い濃度でTNF- $\alpha$ が検出された。(図4)

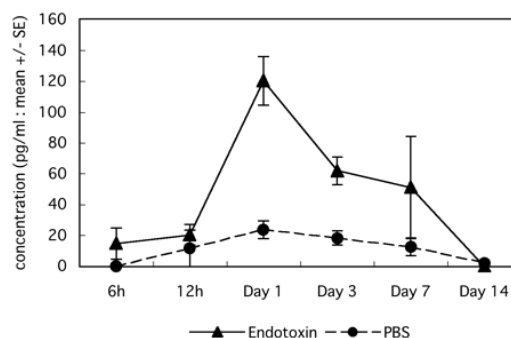


図4 : Acta Oto-Laryngol 2008 より引用

マウス中耳腔内にマクロファージ遊走阻止因子を注入して24時間後、48時間後に中耳洗浄液を回収し、洗浄液中の Macrophage Inflammatory Protein - 2 の濃度をELISA法にて測定したところ、生理食塩水を注入した対照群に比べて有意に高い濃度で検出された。(図5)

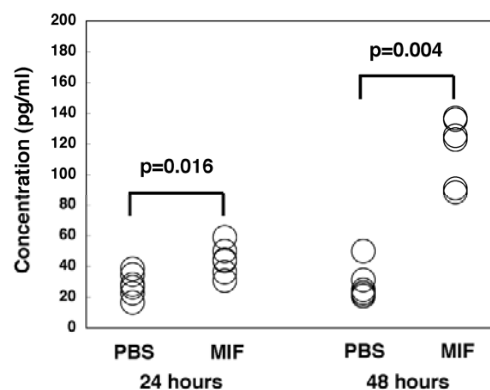


図5 : Clin Exp Immunol 2008 より引用

Macrophage Inflammatory Protein - 2 は強力な好中球誘導因子であり、滲出性中耳炎患者における中耳粘膜や中耳貯留液中に MIF の発現と好中球の浸潤が認められることから MIF は MIP-2 の誘導を介して滲出性中耳炎の好中球浸潤に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

## 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 5 件)

① Prostaglandin E(2) suppresses staphylococcal enterotoxin-induced eosinophilia-associated cellular responses dominantly through an E-prostanoid 2-mediated pathway in nasal polyps.

Okano M, Fujiwara T, Haruna T, Kariya S, Makihara S, Higaki T, Nishizaki K. J Allergy Clin Immunol. 123: 868-74, e13, 2009. 査読あり

② Expression and Characterization of PGD2 Receptors in Chronic Rhinosinusitis: Modulation of DP and CRTH2 by PGD  
Yamamoto M, Okano M, Fujiwara T, Kariya S, Higaki T, Nagatsuka H, Tsujigiwa H, Yamada M, Yoshino T, Urade Y, Nishizaki K. Int Arch Allergy Immunol. 148:127-136, 2009. 査読あり

③ Allergen-specific immunotherapy alters the expression of B and T lymphocyte attenuator, a co-inhibitory molecule, in allergic rhinitis  
Okano M, Otsuki N, Azuma M, Fujiwara T, Kariya S, Sugata Y, Higaki T, Kino K, Tanimoto Y, Okubo K, Nishizaki K. Clin Exp Allergy. 38:1891-1900, 2008. 査読あり

④ Expression of inflammatory mediators in the otitis media induced by Helicobacter pylori antigen in mice  
Kariya S, Okano M, Fukushima K, Nomiya S, Kataoka Y, Nomiya R, Akagi H, Nishizaki K. Clin Exp Immunol. 154:134-40, 2008. 査読あり

⑤ Up-regulation of macrophage migration inhibitory factor induced by endotoxin in

experimental otitis media with effusion in mice

Kariya S, Schachern PA, Cureoglu S, Tsuprun V, Okano M, Nishizaki K, Juhn SK. Acta Oto-Laryngol. 128:750-755, 2008. 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

① The Cytokine Production by Nasal Polyp Cells in Response to Fungal Antigens  
Shin Kariya

Kyung Hee International Rhinologic Symposium (KIRS)

2008年11月7日-9日 (Seoul, Korea)

② プロバイオティクスの末梢血単核細胞に対する作用の網羅的解析と免疫制御機構の機能解析

檜垣貴哉、岡野光博、假谷伸、西崎和則

第47回 日本鼻科学会

2008年9月26日-27日 (名古屋)

③ 鼻茸分離細胞の真菌抗原への反応性とその臨床的意義

春名威範、岡野光博、假谷伸、山本美紀、檜垣貴哉、牧原靖一郎、西崎和則

第47回 日本鼻科学会

2008年9月26日-27日 (名古屋)

④ プロバイオティクスの末梢血単核細胞に対する作用の網羅的解析と免疫制御機構の機能解析

檜垣貴哉、岡野光博、假谷伸、西崎和則

第9回 中四国耳鼻咽喉科アレルギー疾患研究会

2008年7月12日 (岡山)

⑤ エンテロトキシンによる鼻茸細胞からのサイトカイン産生とCOX代謝の関与

岡野光博、服部央、山本美紀、野宮理恵、檜垣貴哉、春名威範、假谷伸、西崎和則

第109回 日本耳鼻咽喉科学会総会

2008年5月15日-17日 (大阪)

⑥ 中耳腔におけるヘリコバクター・ピロリ菌の存在意義

假谷伸、岡野光博、福島邦博、片岡祐子、西崎和則

第109回 日本耳鼻咽喉科学会総会

2008年5月15日-17日 (大阪)

⑦ 滲出性中耳炎マウスモデルにおけるDP、CRT2の関与

江口元治、假谷伸、岡野光博、西崎和則

第109回 日本耳鼻咽喉科学会総会

2008年5月15日-17日 (大阪)

⑧ Expression of inflammatory mediators in the otitis media induced by

*Helicobacter pylori* antigen in mice

Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Kunihiro

Fukushima, Yuko Kataoka, Hirofumi Akagi,

Kazunori Nishizaki

12th Japan-Korea Joint Meeting of

Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery

2008年4月3日-5日 (Nara, Japan)

⑨ 鼻茸分離細胞の真菌抗原への反応性とその臨床的意義

春名威範、岡野光博、藤原田鶴子、假谷伸、

山本美紀、檜垣貴哉、西崎和則

第26回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー

学会

2008年2月21日-23日 (大阪市)

⑩ 慢性副鼻腔炎におけるPGD2レセプター発現の意義

山本美紀、岡野光博、藤原田鶴子、服部央、

菅田裕士、假谷伸、西崎和則

第46回 日本鼻科学会総会・学術講演会

2007年9月27日-29日 (栃木県宇

都宮)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

假谷 伸 (KARIYA SHIN)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：10274226

### (2) 研究分担者

岡野 光博 (OKANO MITUHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准

教授

研究者番号：60304359

### (3) 連携研究者

なし