

機関番号：3 2 6 2 0

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 9 1 9 9 2

研究課題名（和文）細菌性中耳炎における中耳粘膜肥厚 of 分子制御の解明とその治療

研究課題名（英文）Molecular pathogenesis of middle ear mucosal proliferation during bacterial otitis media

研究代表者

古川 正幸（FURUKAWA MASAYUKI）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：2 0 3 5 9 5 2 4

研究成果の概要（和文）：研究にはマウス中耳炎モデル動物（Mouse models of induced otitis media. Ryan AF,

Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Melhus Å, Wasserman S, Chung W-H. Brain Res. 26;1091(1):3-8, 2006). を用いた。マウスに手術を施行し、右中耳に *Haemophilus influenzae* 10^5 個を注入した。*Haemophilus influenzae* に感染したマウス中耳粘膜を時間経過（3h、6h、24h）で 3 グループに分けた。対照は *Haemophilus influenzae* ではなく PBS を注入した左中耳を用いた。対照も時間経過（3h、6h、24h）で 3 グループに分けた。時間経過（3h、6h、24h）で 3 グループに分けた中耳粘膜を摘出して試料とした。組織は -80°C に保存し、一部はパラホルムアルデヒドで固定し、OCT compound で包埋した。*Haemophilus influenzae* に感染した中耳粘膜および正常中耳粘膜より抽出した mRNA から、逆転写酵素にて cDNA を合成し、蛍光標識した。これを DNA arrayer によって作成した array に反応させ、hybridization した cDNA の有無を DNA array scanner を用いて検出した。これにより 15,000 の遺伝子発現を一度に解析し、候補遺伝子を探索した。候補遺伝子の mRNA 量はリアルタイム PCR によって定量した。mRNA を試料から抽出し、特異的な塩基配列を有するプライマーを作成した。TaqMan PCR キットを用いて伸張反応で DNA ポリメラーゼがプローブを分解し、その結果生成されたレポーター色素の蛍光強度を ABI Prism 7700 にて定量的に測定した。55,000 の遺伝子発現をこれまで解析した。結果は *Haemophilus influenzae* に感染したマウス中耳粘膜と PBS を注入したマウス中耳粘膜を時間経過（3h、6h、24h）で比較すると、3h では発現が上昇している遺伝子群は 513 であり、発現が低下している遺伝子群はわずか 2 であった。6h では発現が上昇している遺伝子群は 658 であり、発現が低下している遺伝子群は 188 であった。24h では発現が上昇している遺伝子群は 1350 であり、発現が低下している遺伝子群は 1632 であった。

研究成果の概要（英文）：

We used gene array to assess gene expression in the mouse middle ear in the first 24 h following exposure to *Haemophilus influenzae*. We observed 513 transcripts that were significantly up-regulated 3 h after inoculation, while only 2 transcripts were down-regulated. At 6 h, 658 up-regulated transcripts were noted, as compared to 188 down-regulated genes. By 24 h after bacterial exposure, 1350 transcripts showed increased expression while 1632 exhibited reduced expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000円	540,000円	2,340,000円
2009年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
2010年度	600,000円	180,000円	780,000円
年度			
年度			
総計	8,900,000円	1,050,000円	4,550,000円

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：DNA microarray・中耳粘膜肥厚・中耳炎

1. 研究開始当初の背景

中耳炎は小児が抗生剤投与を受ける最もありふれた疾患である。急性中耳炎より移行する慢性中耳炎および癒着性中耳炎において、伝音難聴および感音難聴を患い、小児期より様々な悪影響が指摘されている。言語取得のおくれ、学業不振、回復不能な中耳疾患などである。中耳炎において中耳粘膜の肥厚は特有のものであるが、その分子制御に関しては不明な点が多い。これまで私は細菌性中耳炎においてMAPキナーゼの一つであるc-junNH₂ terminal kinase (JNK)による中耳粘膜肥厚の分子制御の解明をしてきた(Jun N-terminal protein kinase enhances middle ear mucosal proliferation during bacterial otitis media. Furukawa M, Ebmeyer J, Pak K, Austin DA, Melhus Å, Webster NJG, Ryan AF. *Infect Immun.* 75(5):2562-71, 2007.)。更に細菌性中耳炎において肥満細胞が中耳粘膜肥厚に関与することを明らかにしてきた(Role of mast cells in otitis media. Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Ebmeyer U, Sudhoff H, Broide D, Ryan AF, Wasserman S. *J Allergy Clin Immunol.* 116(5):1129-35, 2005.)。このことより細菌性中耳炎において中耳粘膜肥厚に深く関連していると考えられる分子をDNA microarrayによる網羅的DNA分析によって同定し、細菌性中耳炎の中耳粘膜肥厚の新たな治療戦略の基盤にすることを企画するに至った。

2. 研究の目的

細菌性中耳炎において中耳粘膜肥厚に深く関連していると考えられる分子をDNA microarrayによる網羅的DNA分析によって同定し、細菌性中耳炎の中耳粘膜肥厚の新たな治療戦略の基盤にすることを企画するに至った。国内外において、DNA microarrayを用いて中耳粘膜を解析した報告は少なく、DNA microarrayを用いて細菌性中耳炎における中耳粘膜肥厚の発生機序の新局面を展開する本研究は全く斬新で、独創的である。今まで、中耳粘膜肥厚の発症機構がブラックボックスであった分子生物学レベルでの解明が可能であり、臨床応用可能な治療法の確立が期待できる。

3. 研究の方法

研究にはマウス中耳炎モデル動物(Mouse models of induced otitis media. Ryan AF, Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Melhus Å, Wasserman S, Chung W-H. *Brain Res.* 26:1091(1):3-8, 2006).を用いる。マウスに手術を施行し、右中耳にHaemophilus influenzae10⁵個を注入する。Haemophilus influenzaeに感染したマウス中耳粘膜を時間経過(3h、6h、24h)で3グループに分ける。対照はHaemophilus influenzaeではなくPBSを注入した左中耳を用いる。対照も時間経過(3h、6h、24h)で3グループに分ける。2時

間経過 (3h, 6h, 24h) で3グループに分けた中耳粘膜を摘出して試料とする。組織は-80℃に保存し、一部はパラホルムアルデハイドで固定し、OCT compoundで包埋する。Haemophilus influenzaeに感染した中耳粘膜および正常中耳粘膜より抽出したmRNAから、逆転写酵素にてcDNAを合成し、蛍光標識する。これをDNA arrayerによって作成したarrayに反応させ、hybridizationしたcDNAの有無をDNA array scannerを用いて検出する。これにより15,000の遺伝子発現を一度に解析し、候補遺伝子を検索する。候補遺伝子のmRNA量はリアルタイムPCRによって定量する。mRNAを試料から抽出し、特異的な塩基配列を有するプライマーを作成する。TaqMan PCRキットを用いて伸張反応でDNAポリメラーゼがプローブを分解し、その結果生成されたレポーター色素の蛍光強度をABI Prism 7700にて定量的に測定する。候補蛋白の分布、局在は免疫組織化学法を用いる。正常中耳粘膜とHaemophilus influenzaeに感染した肥厚中耳粘膜の蛋白の定量はWestern blottingにて行う。粘膜の固定後凍結切片を作成し、候補蛋白に対する免疫染色にて局在を検討する。

4. 研究成果

55,000の遺伝子発現をこれまで解析した。結果はHaemophilus influenzaeに感染したマウス中耳粘膜とPBSを注入したマウス中耳粘膜を時間経過(3h, 6h, 24h)で比較すると、3hでは発現が上昇している遺伝子群は513であり、発現が低下している遺伝子群はわずか2であった。6hでは発現が上昇している遺伝子群は658であり、発現が低下している遺伝子群は188であった。24hでは発現が上昇している遺伝子群は1350であり、発現が低下している遺伝子群は1632であった。

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9件)

1. Furukawa M, Kusunoki T, Onoda J, Ikeda K, Haruyama T, Expression of IL-17 and its role in bone destruction in human middle ear cholesteatoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 72(6):325-331, 2010. 査読有
2. Inosita A, Yokoi H, Matsumoto F, Yao T, Kawano K Furukawa M, Ikeda K. A randomized prospective study of oral levofloxacin vs intravenous flomoxef prophylaxis in postoperative infection after endoscopic sinus surgery. *Am J Otolaryngol.* 31(5): 360-363, 2010. 査読有
3. Ohba S, Fujii H, Ito S, Fujimaki, M, Matsumoto F, Furukawa M, Yokoyama J, Kusunoki T, Ikeda K, Hino O. Overexpression of GLUT-1 in the invasion front is associated with depth of oral squamous cell carcinoma and prognosis. *J Oral Pathol Med.* 39(1): 74-78, 2010. 査読有
4. Narui Y, Minekawa A, Iizuka T, Furukawa M, Kusunoki T, Koike T, Ikeda K. Development of distortion product otoacoustic emissions in C57BL/6J mice. *Int J Audiol.* 48(8): 576-581, 2009. 査読有
5. Ikeda K, Yokoi H, Saito T, kawano K, Yao T, Furukawa M, Kusunoki T. Prevention of ultrasonic coagulator-mediated mucoperiosteal flap injury and defects by using a clip manipulation in the resection of the posterior nasal nerve. *Rhinology.* 47(1):45-47, 2009. 査読有
6. Yao T, Kojima Y, Koyanagi A, Yokoi H, Saito T, Kawano K, Furukawa M, Kusunoki T, Ikeda K. Eotaxin-1, -2, and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. *Laryngoscope.* 119(6):1053-1059, 2009.

査読有

7. Haruyama T, Furukawa M, Matsumoto F, Kawano K, Ikeda K.
Laryngeal stenosis in epidermolysis bullosa dystrophica. *Auris Nasus Larynx*. 36(1): 106-109, 2009. 査読有
8. Furukawa M, Minekawa A, Haruyama T, Narui Y, Sugita G, Sugita R, Kusunoki T, Ikeda K.
Clinical effectiveness of ototopical application of mupirocin ointment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* otorrhea. *Otol Neurotol*. 29(5):676-678, 2008. 査読有
9. Inoshita A, Iizuka T, Okamura H, Minekawa A, Kojima K, Furukawa M, Kusunoki T, Ikeda K.
Postnasal development of the organ of Corti in dominant-negative Gjb2 transgenic mice. *Neuroscience*. 156(4): 1039-1047, 2008. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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

楠 威志 (TAKESHI KUSUNOKI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30248025

横井 秀格 (YOKOI HIDENORI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：80317487