

## 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24年5月24日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592156

研究課題名（和文） 好酸球性中耳炎における炎症因子の網羅的解析および新規治療戦略の確立

研究課題名（英文） Expression of inflammatory mediators in eosinophilic otitis media

## 研究代表者

假谷 伸 (KARIYA SHIN)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：10274226

研究成果の概要（和文）：ヒト好酸球性中耳炎において中耳腔における炎症性タンパクを網羅的に解析した。その結果、好酸球性中耳炎症例の中耳腔においては多数の炎症性因子が存在していることが明らかとなった。我々は好酸球性炎症に関与するとされているプロスタグランジン D2 の受容体に着目し、この受容体のノックアウトマウスを用いてその機能解析を行った。この結果、プロスタグランジン D2 受容体を介して炎症を制御できる可能性が明らかとなった。また、好酸球性中耳炎モデルマウスの作製を試み、中耳腔に好酸球の誘導を認めるモデルマウスを確立することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We examined the expression of inflammatory proteins in middle ear cavity in patients with eosinophilic otitis media. Multiple factors were observed in middle ear effusion in eosinophilic otitis media. We examined the role of prostaglandin D2 receptors in otitis media, and showed that otitis media was controlled by prostaglandin D2 receptors. We established the model mouse of eosinophilic otitis media.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：好酸球、中耳炎

## 1. 研究開始当初の背景

従来、滲出性中耳炎や慢性中耳炎として治療されていた症例のなかに非常に難治性の症例が存在し、臨床像が大きく異なることから好酸球性中耳炎という独立した疾患として扱うことが提唱されている（Nagamine H, et al. *Auris Nasus Larynx* 29;19-28, 2002）。好酸

球性中耳炎は臨床的には非常に粘度の高い粘液性中耳貯留液を認めることや喘息を高頻度に合併すること、組織学的には中耳腔に多数の好酸球浸潤を認めることが特徴とされている（Iino Y, et al. *Clin Exp Allergy* 35;1370-1376, 2005）。

Th2型サイトカインは好酸球性炎症と密接

に関連しているが好酸球性中耳炎におけるサイトカインやケモカインの発現については十分には解明されておらず、また、動物モデルを用いた検討も行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究は免疫学的な炎症機序が病態の主因であると予想される好酸球性中耳炎の病態解明と治療戦略の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト中耳サンプルにおける炎症因子の網羅的解析

ヒト好酸球性中耳炎症例において治療上の必要性から切除、または吸引除去した中耳貯留液、中耳粘膜をサンプルとして用いる。対照としては炎症病変を認めない人工内耳埋め込み手術症例の中耳サンプルを用いる。DNAマイクロアレイにてサンプルの解析を行い、対照に比べて発現が亢進または低下している炎症因子を網羅的に明らかとする。

### (2) プロスタグランジンD2受容体の機能解析

プロスタグランジンD2受容体のノックアウトマウスに対して炎症惹起物質を中耳腔に注入し、野生型マウスとの反応性の差を検討する。炎症惹起物質投与24時間後にマウス中耳腔を生理食塩水で洗浄し、洗浄液中のサイトカインをELISA方にて定量する。また、組織学的な検討も行う。

### (3) 好酸球性中耳炎マウスモデルの作製

我々の研究医室で開発した好酸球浸潤を伴うアレルギー性鼻炎モデルマウスの作製方法を応用し、その他の気道アレルギーモデルマウスなども参考にして中耳腔に持続的な好酸球浸潤を呈するマウスモデルを作製する。好

酸球性炎症誘導因子としては近年、上気道アレルギー炎症の起炎物質として注目されているブドウ球菌エンテロトキシンやOVAなどを使用する。

投与回数、投与経路、アジュバント使用など種々の条件を変えつつ臨床病態を反映するモデルの作製を試みる。

## 4. 研究成果

(1) 好酸球性中耳炎症例の中耳貯留液中には以下の炎症性タンパクが有意なレベルで存在することが明らかとなった。

IL-6, Angiogenin, PARC, IL-1 $\beta$ , MCP-1, MIP-3 $\alpha$ , NAP-2, MIP-1 $\delta$ , IL-16, IL-5, IL-1 $\alpha$ , IGFBP-1, IL-13, IL-3, MDC, Eotaxin-2, TNF- $\alpha$ , IL-15, LIGHT, TNF- $\beta$ , Leptin, IL-2, BMP-4, RANTES, GCP-2, MIG, BMP-6, GDNF, IFN- $\gamma$ , BLC, BDNF, TGF- $\beta$  1, MCP-2, TARC, IL-7, IL-4, Eotaxin-3, Eotaxin, M-CSF, Fit-3 Ligand, IGFBP-4, EGF, IL-10, SDF-1, PDGF-BB, SCF, CNTF, IL-1ra, Fractalkine, GM-CSF, IGF-I, MCP-3, TGF- $\beta$  3, IGFBP-2, FGF-6, FGF-7, NT-3, MCP-4, I-309, CK $\beta$  8-1, GRO, Acrp30, MIP-1 $\beta$ , TIMP-2, MIP-1 $\alpha$ , IL-8, MIF, TIMP-1, uPAR, IL-6R, TRAIL R3, sTNF RII, GRO- $\alpha$ , sgp130, sTNF-RI, ICAM-1, VEGF, IGFBP-6, IL-2R $\alpha$ , I-TAC, HGF, Fas/TNFRSF6, ENA-78, bFGF, MIP-3 $\beta$ , G-CSF, NT-4, IL-11, Amphiregulin, Angiopoietin-2, IL-1 R4/ST2, Lymphotoactin, IL-17, VEGF-D, Oncostatin M, EGF-R, MSP- $\alpha$ , FGF-4, b-NGF, CTACK, IL-12 p70, GITR, TRAIL R4, IGFBP-3, Osteoprotegerin, IL-12 p40, Thrombopoietin, Ax1, CCL-28, IGF-I SR, AgRP, PIGF, FGF-9, Dtk, IL-1RI, TECK, LIF, IGF-II, MMP-9, CD14, IL-18 BPa, IL-13Ra2, SCF-R, LAP, L-Selectin, ICAM-2, M-CSF R, MMP-1, VEGF R2, MPlF-1, ALCAM, DR6 (TNFRSF21), IL-21R, Siglec-5,

CXCL-16、MMP-3、TGF-b2、BMP-7、Fas Ligand、IP-10、PDGF AA、PDGF Rb、ErbB3、NGF-R、IL-1R II、E-Selectin、IL-2Rb、PECAM-1、Endoglin、B7-1 (CD80)、Activin A、VEGF R3、VE-Cadherin、IL-5 Ra、PDGF-AB、SDF-1b、IL-9、Tie-1、TGF-a、IL-10Rb、Cardiotrophin-1、BMP-5、IL-2 Rg、Prolactin、PDGF Ra、Tie-2、Leptin R

(2) マウスの中耳腔に中耳炎の主要起炎菌であるグラム陰性菌の構成成分のひとつであるエンドトキシンを注入したところ、注入後24時間から72時間にかけてマウスの中耳腔においてプロスタグランディンD<sub>2</sub>の強い発現を認めた。また、中耳腔や中耳粘膜に浸潤した顆粒球にプロスタグランディンD<sub>2</sub>の受容体の強い発現を認めた。マウスの中耳腔にプロスタグランディンD<sub>2</sub>を注入したところ、注入後24時間の時点においてマウスの中耳腔に炎症性サイトカインであるインターロイキン1 $\beta$ 、インターロイキン6、およびmacrophage inflammatory protein 2の誘導を認めた。プロスタグランディンD<sub>2</sub>受容体は主要なものが2つ存在し、それぞれD prostanoid receptor (DP)、the chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper type 2 (Th2) cells (CRTH2)とよばれている。DPおよびCRTH2ノックアウトマウス、DP/CRTH2ダブルノックアウトマウスを用いて、中耳におけるプロスタグランディンD<sub>2</sub>の作用経路を解析したところ、CRTH2ノックアウトマウス、DP/CRTH2ダブルノックアウトマウスではエンドトキシンによる炎症誘導が有意に抑制された。その一方で、DPノックアウトマウスでは野生型マウスと同等の炎症誘導を認めた。以上の結果から、プロスタグランディンD<sub>2</sub>の中耳腔における作用はCRTH2レセプターを介して行われていることが示された。

(3) マウスの腹腔内にOVAを前投与して感作を成立させた後にマウス中耳腔にアラムとOVAを注入した。その結果、マウス中耳腔に好酸球の誘導を認め、IL-4、IL-5、IL-13、EotaxinなどのTh2型/好酸球性関連炎症因子が有意に発現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 17 件)

① Yukihide Maeda, Kunihiro Fukushima, Shin Kariya, Yori-hisa Orita, Kazunori Nishizaki. Intratympanic dexamethasone up-regulates Fkbp5 in the cochleae of mice in vivo. *Acta Otolaryngol.* 2012 Jan;132(1):4-9. 査読あり

② Aya Murai, Kenji Sugiu, Shin Kariya, Kazunori Nishizaki. Transcatheter arterial embolisation for paediatric inflammatory pseudotumour of the maxillary sinus. *J Laryngol Otol.* 2011 Nov;125(11):1189-1192. 査読あり

③ Hirofumi Akagi, Akira Doi, Michiya Kosaka, Kenshi Hattori, Shin Kariya, Kunihiro Fukushima, Mitsuhiro Okano, Kazunori Nishizaki, Yu Masuda. Indication Criteria for Tonsillectomy in IgA Nephropathy Patients. *Adv Otorhinolaryngol.* 2011;72:50-52. 査読あり

④ Shigenobu Nomiya, Sebahattin Cureoglu, Shin Kariya, Norimasa Morita, Rie Nomiya, Kazunori Nishizaki, Michael M. Paparella. Histopathological incidence of facial

canal dehiscence in otosclerosis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2011 Sep;268(9):1267-71. 査読あり

⑤ Mitsuhiro Okano, Tazuko Fujiwara, Takenori Haruna, Shin Kariya, Seiichiro Makihara, Takaya Higaki, Kazunori Nishizaki. Role of fungal antigens in eosinophilia-associated cellular responses in nasal polyps: a comparison with enterotoxin. Clin Exp Allergy. 2011 Feb;41(2):171-8. 査読あり

⑥ Mitsuhiro Okano, Tazuko Fujiwara, Takaya Higaki, Seiichiro Makihara, Takenori Haruna, Yohei Noda, Kengo Kanai, Shin Kariya, Hiroshi Yasueda, Kazunori Nishizaki. Characterization of pollen antigen-induced IL-31 production by PBMCs in patients with allergic rhinitis The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2011;127(1):277-279. e11. 査読あり

⑦ Motoharu Eguchi, Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Takaya Higaki, Seiichiro Makihara, Tazuko Fujiwara, Kinya Nagata, Hiroyuki Hirai, Shuh Narumiya, Masataka Nakamura, Kazunori Nishizaki. Lipopolysaccharide induces proinflammatory cytokines and chemokines in experimental otitis media through the prostaglandin D(2) receptor (DP)-dependent pathway. Clin Exp Immunol. 2011;163(2):260-269. 査読あり

⑧ Shin Kariya, Sebahattin Cureoglu, Hisaki Fukushima, Norimasa Morita, Muzeyyen Y. Baylan, Yukihide Maeda, Kazunori Nishizaki, Michael M. Paparella.

Comparing the Cochlear Spiral Modiolar Artery in Type-1 and Type-2 Diabetes Mellitus: A Human Temporal Bone Study. Acta Medica Okayama. 2010 Dec;64(6):375-383. 査読あり

⑨ Yukihide Maeda, Kunihiro Fukushima, Misato Hirai, Shin Kariya, Richard J.H. Smith, Kazunori Nishizaki. Microarray analysis of the effect of dexamethasone on murine cochlear explants. Acta Otolaryngol. 2010 Dec;130(12):1329-34. 査読あり

⑩ Shigenobu Nomiya, Sebahattin Cureoglu, Shin Kariya, Norimasa Morita, Rie Nomiya, Patricia A. Schachern, Kazunori Nishizaki, Michael M. Paparella. Posterior semicircular canal dehiscence: a histopathologic human temporal bone study. Otol Neurotol. 2010 Sep;31(7):1122-7. 査読あり

⑪ Seiichiro Makihara, Mitsuhiro Okano, Tazuko Fujiwara, Shin Kariya, Yohei Noda, Takaya Higaki, Kazunori Nishizaki. Regulation and characterization of IL-17A expression in patients with chronic rhinosinusitis and its relationship with eosinophilic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2010 Aug;126(2):397-400. e11. 査読あり

[学会発表] (計 30 件)

① Shin Kariya, Motoharu Eguchi, Mitsuhiro Okano, Seiichiro Makihara, Takaya Higaki, Norimasa Morita, Kazunori Nishizaki. Role of prostaglandin D2 receptor in otitis media. The 115th AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO 2011 September 11-14, 2011, (San Francisco, CA, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

假谷 伸 (KARIYA SHIN)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：10274226

(2) 研究分担者

岡野 光博 (OKANO MITSUHIRO)

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