

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791900

研究課題名(和文) 好酸球性中耳炎における炎症因子ネットワークの解明と新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) the pathophysiology of the inflammation in the eosinophilic otitis media

研究代表者

江口 元治 (Eguchi, Motoharu)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：30432652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト好酸球性中耳炎の症例より中耳貯留液を採取し、サイトカイン・アレイ法を用いて貯留液中の炎症性タンパクを網羅的に解析した。その結果、ヒト好酸球性中耳炎症例の中耳貯留液中には、多数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。次に、水酸化アルミニウムゲルと卵白アルブミンの混合液を使用して、好酸球性中耳炎モデルマウスを作製した。本モデルマウスの中耳腔にはヒト好酸球性中耳炎症例でみられた炎症性タンパクがみられ、ヒトの病態を近似していると思われた。

研究成果の概要(英文)：The middle ear effusion was collected from the patients with eosinophilic otitis media. The inflammatory factors in middle ear effusion were examined by cytokine array. Multiple inflammatory factors were observed in middle ear effusion in patients with eosinophilic otitis media. The animal study was carried out in BALB/c mice by immunization with ovalbumin mixed with aluminum hydroxide. The mice showed an accumulation of eosinophils in middle ear mucosa, and had many inflammatory factors in middle ear cavity. The mice showed similar pathophysiology as humans with eosinophilic otitis media.

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：サイトカイン 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加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. *Allergol Int* 59:233-238, 2010)。また、好酸球性中耳炎は中耳腔に難治性の炎症が生じるのみでなく、感音難聴などの内耳障害を合併することが問題となっている (Iino Y, et al. *Otol Neurotol* 31:100-104, 2010)。

当該研究者が所属する研究室ではこれまでに粘液性の中耳貯留液を認める滲出性中耳炎症例においては漿液性の中耳貯留液を認める症例に比べて中耳貯留液中のTh2型調節性サイトカインであるインターロイキン(IL)-10が有意に高い濃度で検出され、IL-4とIL-5濃度は有意な正の相関を示すことを報告してきた (*Otol Neurotol* 27:1089-1093, 2006)。

プロスタグランジンはさまざまな炎症に関わる脂質メディエーターである。プロスタグランジンの合成酵素や受容体のクローニングが進んだことにより、その代謝経路を介した各種病態への関与が明らかとなりつつある。当該研究者が所属する研究室ではプロスタグランジンのうちD2およびE2に注目し、これらの合成酵素や受容体が鼻副鼻腔における好酸球性炎症に関与することを報告してきたが、中耳疾患に関しては未明な点が多い (*J Allergy Clin Immunol* 123:868, 2010)。

そのなかで、当該研究者は最近、ヒト好酸球性中耳炎症例の中耳貯留液中からはTh2型サイトカインのみならずIL-8などの好中球関連

因子やIL-18などDanger signal様IL-1ファミリー・サイトカイン、プロスタグランジンなどが高頻度で検出されることを確認した。また、プロスタグランジンD2を介した炎症シグナル系によって中耳炎症が制御されていることを明らかとした。これらの結果は、中耳炎の難治化や好酸球性炎症の誘導にはサイトカインやアラキドン酸代謝産物が複雑に関与し、その炎症機序の解明が好酸球性中耳炎の病態解明に必須であることを強く示唆していると思われ、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

これまでの成果をふまえ、今回の研究では好酸球性中耳炎を対象として以下の検討を行う事を目的とした。

(1) ヒト好酸球性中耳炎症例の臨床検体を用いてサイトカイン抗体アレイやマイクロアレイ解析を行い、発現しているサイトカインやプロスタグランジンなどの炎症因子をタンパクレベル、および遺伝子レベルで網羅的に検出する。

(2) 検出された因子について臨床経過などとの関連を調査し、臨床的意義を検討する。

(3) 臨床検体と類似した遺伝子およびタンパク発現を示すモデルマウスの作製を試み、*in vivo*での炎症シグナル経路を明らかとする。

## 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た。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た。市販されているサイトカイン抗体アレイ、DNA マイクロアレイにてサンプルの解析を行

い、サイトカインやアラキドン酸代謝産物など、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検出した。

#### (2) ヒト中耳サンプルにおける各炎症因子の臨床病態との関連

アレイ解析において変化が見られた炎症因子およびその受容体に関して遺伝子レベル(リアルタイムPCR、in situ hybridization)タンパクレベル(免疫組織化学染色、ウエスタン・ブロッティング、ELISA)での解析を行った。これらのデータを基にアレルギー感作の有無、アレルギー性鼻炎や喘息などの合併の有無、治療への反応性など臨床的所見との関連性を調べ、各炎症因子の臨床的意義づけを行った。

#### (3) 好酸球性中耳炎マウスモデルの作製

我々が作製した好酸球浸潤を伴うアレルギー性鼻炎モデルマウスを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した。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などを使用した。作製されたモデルマウスは炎症因子発現解析を行い、ヒト臨床検体から得られたデータとの整合性を検証し、モデルとしての適格性を検証した。

#### (4) マウスモデルでの好酸球性炎症機序の解析

ヒト臨床検体で検出された炎症因子に関して、中和抗体やそれぞれの受容体の阻害剤などをモデルマウスに投与し、中耳腔におけるサイトカイン・ケモカイン(IL-4、IL-5、IL-13、RANTES、Eotaxin など)などの発現量を測定し、組織学的評価を行った。

#### 4. 研究成果

ヒト好酸球性中耳炎の症例より中耳貯留液を採取し、サイトカイン・アレイ法を用

いて貯留液中の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貯留液中にはIL-1、IL-1ra、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-13、IL-15、IL-16、Angiogenin、PARC、monocyte chemotactic and activating factor、macrophage inflammatory protein-3、neutrophil-activating protein-2、macrophage inflammatory protein-1、Insulin-like growth factor binding protein-1、Macrophage-derived chemokine、Eotaxin-2、Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ 、Tumor Necrosis Factor- $\beta$ 、Leptin、Bone morphogenetic protein 4、Monocyte chemotactic protein 2、thymus and activation-regulated chemokine、Macrophage-colony stimulating factor、Fit-3 Ligand、stem cell factor、Ciliary Neurotrophic Factor、Fractalkine、Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor、Insulin-like growth factor I など、多数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。マウスに対して水酸化アルミニウムゲルと卵白アルブミンの混合液を腹腔内投与することにより卵白アルブミン感作マウスを作製した。卵白アルブミン感作マウスの中耳腔に卵白アルブミンを経鼓膜投与することによって、マウス中耳腔に好酸球の浸潤を認めた。より強い好酸球浸潤の発現を目指して、卵白アルブミンの投与回数や投与濃度の検討を行ったところ、感作後1週間の時点で卵白アルブミンを経鼓膜的に3日間連続投与した場合で、中耳腔に強い好酸球浸潤を認めた。ヒト好酸球性中耳炎症例の中耳腔にはIL-4、IL-5、IL-13などのTh2型サイトカインが高い濃度で存在していることを確認していたため、卵白アルブミン感作マウスの中耳

腔を洗浄し、それらのサイトカインを PCR 法および ELISA 法にて定量した。その結果、コントロール群と比較して、好酸球浸潤マウスでは中耳洗浄液中に Th2 型サイトカインの有意に高い発現を認めた。しかし、卵白アルブミン感作マウスの中耳洗浄液中の Th2 型サイトカイン濃度はヒト好酸球性中耳炎症例の中耳腔で発現しているに Th2 型サイトカインと比較すると低値で、炎症性サイトカイン濃度の観点からも本モデルマウスは好酸球性中耳炎の病態を十分に反映していると考えするにはアレルギー性炎症惹起が不十分と思われた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Takaya Higaki, Seiichiro Makihara, Takenori Haruna, Motoharu Eguchi, Kazunori Nishizaki. Neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibits inflammatory response in experimental otitis media. *Laryngoscope*. 査読あり DOI:10.1002/lary.23795 vol. 123, 2013, pp.1514-1518.

大道亮太郎、假谷伸、岡野光博、牧原靖一郎、小野田友男、江口元治、西崎和則. 鼻出血を契機に発見された鼻腔原発の glomangiopericytoma の 1 例. *頭頸部外科* 査読あり vol.23, 2013, pp.141-144. 牧野琢丸、小野田友男、小山貴久、春名威範、江口元治、假谷伸、西崎和則. 当科における上咽頭癌症例の検討. *口腔咽喉科* 査読あり vol.26, 2013, pp.203-206.

河野達也、小野田友男、江口元治、牧野琢丸、阿部郁、假谷伸、西崎和則. 舌癌

に対する頸部郭清の適応に関する検討. *口腔・咽喉科* 査読あり vol.24, 2011, pp.179-182.

阿部郁、小野田友男、牧野琢丸、河野達也、江口元治、假谷伸、西崎和則. Fanconi 貧血に合併した舌癌の 1 例. *口腔・咽喉科* 査読あり vol.24, 2011, pp.183-186.

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* DOI:10.1111/j.1365-2249.2010.04292.x. 査読あり vol.163, 2011, pp.260-269.

〔学会発表〕(計 4 件)

Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Takaya Higaki, Motoharu Eguchi, Yohei Noda, Kazunori Nishizaki.

Lipopolysaccharide-induced middle ear inflammation is inhibited by neutralization of endogenous granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). The 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery December 8-9, 2011. Kobe, Japan 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 Hisashi Ishihara, Shin Kariya, Motoharu Eguchi, Mitsuhiro Okano, Seiichiro Makihara, Takaya Higaki, Kazunori Nishizaki. Expression of

prostaglandin D2, macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), interleukin (IL)-1beta and IL-6 in lipopolysaccharide-induced otitis media in mice. The 1st Congress of the Confederation of European Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, July 2 - 6, 2011, Barcelona, Spain

Shin Kariya, Motoharu Eguchi, Mitsuhiro Okano, Seiichiro Makihara, Takaya Higaki, Kazunori Nishizaki. Effect of prostaglandin D2 on the expression of macrophage inflammatory protein 2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 by polymorphonuclear leukocytes in mice. The 1st Congress of the Confederation of European Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, July 2 - 6, 2011, Barcelona, Spain

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

江口 元治 ( EGUCHI MOTOHARU )

岡山大学病院・助教

研究者番号 : 30432652