

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462642

研究課題名(和文)慢性中耳炎におけるインフラマソームおよびToll様受容体を介した炎症病態の解明

研究課題名(英文)Role of inflammasome and Toll-like receptor in chronic otitis media

研究代表者

假谷 伸 (Kariya, Shin)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：10274226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性中耳炎は小児においても成人においても難聴をきたす大きな原因のひとつである。抗生剤が効きにくい薬剤耐性菌による慢性中耳炎症例が増加しており、従来の治療法では治療が困難な症例があることから、今回、我々は新たな視点からの治療法を確立することを目指して研究を行った。その結果、慢性中耳炎において炎症を惹起するシグナル経路としてToll様受容体とインフラマソームが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これらの因子をコントロールすることが難治性慢性中耳炎に対する新たな治療選択肢となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cholesteatoma is a destructive disease consisting of keratinizing squamous epithelium in the middle ear. Cholesteatoma is accompanied by a chronic inflammatory reaction resulting in the destruction of epithelial and bony structures of the middle ear. Chronic otitis media is a persistent inflammation or infection of the middle ear. However, the pathogenic mechanisms of cholesteatoma and chronic otitis media have not been fully understood. This study sought to assess the expression of NLRP3, ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain and a pyrin domain), and caspase-1 in middle ear tissues in patients with cholesteatoma or chronic otitis media. Our findings suggest that NLRP3 inflammasome plays an important role in the pathogenesis of middle ear diseases. Modulation of inflammasome-mediated inflammation may be a novel therapeutic strategy for cholesteatoma and chronic otitis media

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：中耳炎 サイトカイン 炎症 感染症

## 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などのグラム陰性菌である。エンドトキシンはグラム陰性菌の主要な菌体成分であり、強力な炎症惹起物質であることが知られている。研究代表者はエンドトキシンが炎症性サイトカインの産生など、中耳炎の病態形成に重要な役割をはたしていることを報告してきた (Clin Exp Immunol 163: 260-9, 2011) (Laryngoscope 123: 1514-8, 2013)。

Toll様受容体は自然免疫機構の中で重要な役割をもつ因子であり、エンドトキシンなどの病原物質を認識して炎症性サイトカインを産生する作用を有する。近年、インフラマソームという細胞質内タンパク質複合体がToll様受容体を介する炎症シグナル系において決定的な役割をはたしていることが報告された (Cell 150: 606-19, 2012) (Nat Immunol 13: 325-32, 2012)。

抗菌薬治療抵抗性の中耳炎症例が増加しており、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。インフラマソームを含む Toll 様受容体を介した炎症シグナル系は未明な点が多い。これらの学術的背景から、中耳における炎症因子を網羅的に検討することが、難治性中耳炎の病態解明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、ヒトおよびモデルマウスを用いて、慢性中耳炎における Toll 様受容体の発現と機能、および関連する炎症因子を網羅的に明らかとする。近年、病原性微生物の薬剤耐性化により、抗菌薬など既存の薬剤による治療が困難な症例が存在する。本研究は、Toll 様受容体を介する炎症シグナル伝達系をターゲットとした、慢性中耳炎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) ヒト中耳サンプルにおける炎症因子の解析

ヒト慢性中耳炎及び真珠腫性中耳炎症例において、治療上の必要性から切除した中耳粘膜及び中耳肉芽組織をサンプルとして用いた。対照としては、中耳に炎症性病変を認めない人工内耳埋め込み手術症例において、手術時に切除した中耳組織を用いた。インフラマソームを含む、Toll 様受容体関連炎症因子に重点をおいて PCR 解析を行った。その上で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探索した。

### (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

PCR 解析において変化が見られた炎症因子および受容体に関して、遺伝子レベル (in situ hybridization)、および、タンパクレベル (免疫組織化学染色) で組織内の局在を

評価する。また、中耳貯留液などの液性サンプルについては、ELISA での定量解析を行う。これらのデータを基に起炎菌の種類、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) 培養細胞での炎症シグナル系の解析

マウス腹腔内炎症細胞を用いて炎症シグナル経路の検討を行った。具体的には、2 ml の 2%カゼイン・ナトリウムをマウス腹腔内に投与し、6 時間後および 72 時間後に腹腔内を生理食塩水で洗浄した。6 時間後の洗浄液中には好中球、72 時間後の洗浄液中には単球/マクロファージを主とする炎症細胞が認められた。遠心分離にて、それぞれの細胞を採取し、培養した。

マウス培養細胞にエンドトキシンを作用させ、ヒト臨床サンプルを用いた検討でコントロールと比較して有意差を認めた炎症因子の発現に変化があるかどうかをリアルタイム PCR や ELISA 法にて検討した。また、エンドトキシンとともに細胞内シグナル因子の阻害剤を投与し、炎症性サイトカインの産生量を指標として、阻害剤の効果を評価した。とくに、インフラマソームのエフェクター分子である Caspase-1 の阻害剤によってサイトカイン産生に影響があるかどうかを確認した。

### (4) モデルマウスでの炎症機序の解析

マウスの中耳腔にエンドトキシン (1 mg /ml、20  $\mu$ l) 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、モデルマウスとして用いた。コントロールマウスの中耳腔には生理食塩水を注入した。各炎症因子に関して、モデルマウスの中耳骨髄や中耳洗浄液をサンプルとして採取したうえで、リアルタイム PCR や ELISA などの手法を用いて in vivo での検討を行った。また、エンドトキシンとともに炎症因子の中和抗体などを投与した検討も行った。マウス側頭骨を採取し、組織学的な検討を行った。

## 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 Toll 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 Toll 様受容体が発現していることを確認した。

NLRP3 インフラマソームは細胞質内の炎症シグナル伝達物質を介してカスパーゼ 1 の前駆体を活性型のカスパーゼ 1 に変換する。活性型カスパーゼ 1 はインターロイキン 1

ベータの前駆体に作用して生理活性を有する活性型インターロイキン1ベータを生成する。インターロイキン1ベータは炎症病態において重要な役割を果たすことが知られており、中耳炎においてもその重要性は高い。

本研究によって、インターロイキン1ベータの産生に必須の因子であると言われている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。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

(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14件)

① Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Takahiro Oto, Takaya Higaki, Takenori Haruna, Yohei Noda, Kazunori Nishizaki, The impact of chronic rhinosinusitis on long-term survival in lung transplantation recipients, *Acta Otolaryngol*, 2017, 137(5):529-533, doi: 10.1080/00016489.2016.1247497, 査読あり.

② Hisashi Ishihara, Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Pengfei Zhao, Yukihide Maeda, Kazunori Nishizaki, Expression of macrophage migration inhibitory factor and CD74 in the inner ear and middle ear in lipopolysaccharide-induced otitis media, *Acta Otolaryngol*, 2016, 136(10):1011-1016, doi: 10.1080/00016489.2016.1179786, 査読あり.

③ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Pengfei Zhao, Yuko Kataoka, Junko Yoshinobu, Yukihide Maeda, Hisashi Ishihara, Takaya Higaki, Kazunori Nishizaki, Activation of NLRP3 inflammasome in human middle ear cholesteatoma and chronic otitis media, *Acta Otolaryngol*, 2016, 136(2):136-140, doi: 10.3109/00016489.2015.1093171, 査読あり.

④ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Takaya Higaki, Yasuyuki Noyama, Takenori Haruna, Kazunori Nishizaki, Pulmonary function in never-smoker patients with chronic rhinosinusitis, *Int Forum Allergy Rhinol*, 2015, 5(11):990-995, doi: 10.1002/alr.21628, 査読あり.

⑤ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Yukihide Maeda, Haruka Hirai, Takaya Higaki, Yasuyuki Noyama, Takenori Haruna, Jun Nishihira, Kazunori Nishizaki, Macrophage Migration Inhibitory Factor Deficiency Causes Prolonged Hearing Loss After Acoustic Overstimulation, *Otol Neurotol*,

2015, 36(6):1103-1108, doi: 10.1097/MAO.0000000000000755, 査読あり.

⑥ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Kazunori Nishizaki, Biological basis and clinical implications of immunological molecules involved in eosinophilic inflammation in allergic rhinitis, chronic rhinosinusitis, and asthma, *Advances in Cellular and Molecular Otolaryngology*, 2015, 3: 26601, doi:10.3402/acmo.v3.26601, 査読あり.

⑦ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Kazunori Nishizaki, Relationship between chronic rhinosinusitis and lower airway diseases: An extensive review, *World J Otorhinolaryngol*, 2015, 5(2): 44-52, DOI: 10.5319/wjo.v5.i2.44, 査読あり.

⑧ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Yukihide Maeda, Haruka Hirai, Takaya Higaki, Yasuyuki Noyama, Takenori Haruna, Jun Nishihira, Kazunori Nishizaki, Role of macrophage migration inhibitory factor in age-related hearing loss, *Neuroscience*, 2014, 279:132-138, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.042, 査読あり.

⑨ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Takaya Higaki, Yasuyuki Noyama, Takenori Haruna, Hisashi Ishihara, Takuma Makino, Tomoo Onoda, Kazunori Nishizaki, Chronic rhinosinusitis patients have decreased lung function, *Int Forum Allergy Rhinol*, 2014, 4(10):828-833, doi: 10.1002/alr.21370, 査読あり.

⑩ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Takahiro Oto, Takaya Higaki, Seiichiro Makihara, Takenori Haruna, Kazunori Nishizaki, Pulmonary function in patients with chronic rhinosinusitis and allergic rhinitis, *J Laryngol Otol*, 2014, 128(3):255-262, doi: 10.1017/S0022215114000450, 査読あり.

⑪ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Kazunori Nishizaki, An association between *Helicobacter pylori* and upper respiratory tract disease: fact or fiction, *World J Gastroenterol*, 2014, 20(6):1470-1484, doi:10.3748/wjg.v20.i6.1470, 査読あり.

⑫ Kaori Hashimoto, Shin Kariya, Tomoo Onoda, Tetsuo Ooue, Yasuhiko Yamashita, Kikuko Naka, Mitsuhiro Okano, Kazunori Nishizaki, Rosai-Dorfman disease with extranodal involvement, *Laryngoscope*, 2014, 124(3):701-704, doi: 10.1002/lary.24290, 査読あり.

⑬ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Kazunori Nishizaki, An Association Between Upper and Lower Respiratory Tract Diseases, *Ann Otolaryngol Rhinol*, 2014, 1(1):1001, <https://www.jscimedcentral.com/Otolaryngology/otolaryngology-1-1001.pdf>, 査読

あり.

⑭ Haruka Hirai, Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Kunihiro Fukushima, Yuko Kataoka, Yukihide Maeda, Kazunori Nishizaki, Expression of toll-like receptors in chronic otitis media and cholesteatoma, Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2013, 77(5):674-676, doi: 10.1016/j.ijporl.2013.01.010, 査読あり.

[学会発表] (計15件)

① Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Takenori Haruna, Akiko Torigoe, Kensuke Uruguchi, Yasuyuki Noyama, Kazunori Nishizaki, Pulmonary function in chronic rhinosinusitis, 25th Congress of the European Rhinologic Society, 32nd International Symposium of Infection & Allergy of the Nose (ERS-ISIAN 2014), June 22-26, 2014, Amsterdam (The Netherlands)

② Kensuke Uruguchi, Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Takenori Haruna, Akiko Torigoe, Yasuyuki Noyama, Kazunori Nishizaki, Effect of endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis in lung transplant recipients: A single institutional experience, 25th Congress of the European Rhinologic Society, 32nd International Symposium of Infection & Allergy of the Nose (ERS-ISIAN 2014), June 22-26, 2014, Amsterdam (The Netherlands)

③ Mitsuhiro Okano, Tazuko Fujiwara, Shin Kariya, Takenori Haruna, Takaya Higaki, Seiichiro Makihara, Yasuyuki Noyama, Akiko Torigoe, Kensuke Uruguchi, Kazunori Nishizaki, Characterization of Staphylococcus aureus enterotoxin B induced IL-10 production by nasal polyp cells in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps, 25th Congress of the European Rhinologic Society, 32nd International Symposium of Infection & Allergy of the Nose (ERS-ISIAN 2014), June 22-26, 2014, Amsterdam (The Netherlands)

④ Mitsuhiro Okano, Takaya Higaki, Shin Kariya, Takenori Haruna, Yasuyuki Noyama, Kensuke Uruguchi, Akiko Torigoe, Kazunori Nishizaki, Crosstalk of microbial antigens and COX metabolism in the pathogenesis of CRS, 25th Congress of the European Rhinologic Society, 32nd International Symposium of Infection & Allergy of the Nose (ERS-ISIAN 2014), June 22-26, 2014, Amsterdam (The Netherlands)

⑤ Akiko Torigoe, Mitsuhiro Okano, Shin Kariya, Takaya Higaki, Takenori Haruna, Yasuyuki Noyama, Takahisa Koyama, Kazunori Nishizaki, Effects of bepotastine besilate as add-on therapy to

intranasal corticosteroid treatment in japanese cedar/cypress pollinosis, 25th Congress of the European Rhinologic Society, 32nd International Symposium of Infection & Allergy of the Nose (ERS-ISIAN 2014), June 22-26, 2014, Amsterdam (The Netherlands)

⑥ Yasuyuki Noyama, Mitsuhiro Okano, Tazuko Fujiwara, Shin Kariya, Takenori Haruna, Akiko Torigoe, Kensuke Uruguchi, Kazunori Nishizaki, Role of IL-22/IL-22 receptor expression in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis: Association with asthma and aspirin sensitivity, 25th Congress of the European Rhinologic Society, 32nd International Symposium of Infection & Allergy of the Nose (ERS-ISIAN 2014), June 22-26, 2014, Amsterdam (The Netherlands)

⑦ Takenori Haruna, Mitsuhiro Okano, Shin Kariya, Takaya Higaki, Yasuyuki Noyama, Kensuke Uruguchi, Akiko Torigoe, Takahisa Koyama, Kazunori Nishizaki, Characterization of hemolysin, the non-superantigenic exotoxin of Staphylococcus aureus, in chronic rhinosinusitis, 25th Congress of the European Rhinologic Society, 32nd International Symposium of Infection & Allergy of the Nose (ERS-ISIAN 2014), June 22-26, 2014, Amsterdam (The Netherlands)

⑧ 假谷伸、浦口健介、岡野光博、西崎和則、慢性穿孔性中耳炎および真珠腫性中耳炎におけるNLRP3インフラマソームの発現の検討、第24回日本耳科学会総会・学術講演会、2014年10月15日-10月18日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

⑨ 前田幸英、假谷伸、西崎和則、蝸牛でのステロイド薬理作用のプロテオーム解析、第24回日本耳科学会総会・学術講演会、2014年10月15日-10月18日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

⑩ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Yuko Kataoka, Takaya Higaki, Kazunori Nishizaki, Role of NLRP3 inflammasome in cholesteatoma, 118th Triological Society Annual Meeting at COSM (Combined Otolaryngology Spring Meetings), April 22-26, 2015, Boston, Massachusetts (USA)

⑪ Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Shohei Fujimoto, Kensuke Uruguchi, Aiko Shimizu, Aya Murai, Takaya Higaki, Kazunori Nishizaki, Expression of macrophage migration inhibitory factor in the inner and middle ears in lipopolysaccharide induced otitis media in mice, 3rd Congress of European Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery (ORL-HNS), 2015年6月7日-11日, Prague (Czech Republic)

⑫ Aiko Shimizu, Shin Kariya, Mitsuhiro

Okano, Takaya Higaki, Kensuke Uraguchi, Shohei Fujimoto, Aya Murai, Kazunori Nishizaki, Macrophage migration inhibitory factor deficiency causes prolonged hearing loss following acoustic overstimulation, 3rd Congress of European Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery (ORL-HNS), 2015年6月7日-11日, Prague (Czech Republic)

⑬ Shohei Fujimoto, Shin Kariya, Mitsuhiro Okano, Takaya Higaki, Yasuyuki Noyama, Takenori Haruna, Kazunori Nishizaki, Pulmonary function in never-smoker patients with chronic rhinosinusitis, 3rd Congress of European Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery (ORL-HNS), 2015年6月7日-11日, Prague (Czech Republic)

⑭ 假谷伸、岡野光博、檜垣貴哉、春名威範、野山和廉、西崎和則、慢性化膿性中耳炎および真珠腫性中耳炎における NLRP3 インフラマソームの発現、第34回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2016年2月4日-6日、(三重)

⑮ 中耳炎モデルマウスにおける NLRP3 インフラマソームの発現の検討  
假谷伸、片岡祐子、大道亮太郎、西崎和則  
第4回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会 総会・学術講演会  
2016年9月2日-3日 (倉敷)

[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]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

假谷 伸 (KARIYA, Shin)

岡山大学・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・医師薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60304359

### (3) 研究協力者

石原 久司 (ISHIHARA, Hisashi)

趙 鵬飛 (ZHAO, Pengfei)