

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861534

研究課題名(和文)急性中耳炎における粘膜過形成の制御に関わる新たな増殖因子の検索

研究課題名(英文)Detection of novel growth factors that regulate mucosal growth in acute otitis media

研究代表者

鈴川 佳吾 (Suzukawa, Keigo)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：50447398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：急性中耳炎の病理組織学的および分子生物学的メカニズムの解明を解明し、病態解消に向けた新たな治療戦略開発を目指すべく、増殖因子に注目して基礎実験を行った。実験的環境で強力な中耳粘膜増殖効果を示すHB-EGFという増殖因子に着目し、この増殖因子の作用を詳細に検討した。検討により、HB-EGFが作用する際のドミナントなシグナル伝達経路および、実際の細菌性中耳炎においてHB-EGFが粘膜増殖に重要な役割をになっていることを示した。

研究成果の概要(英文)：Several basic experiments are performed in order to explore histopathologic and molecular mechanism of acute otitis media. We focused on HB-EGF, a growth factor that showed strong effect on middle ear mucosal growth. In this experiments we showed dominant downstream signaling pathways on HB-EGF action. Also we showed that HB-EGF played a role on mucosal growth induced by bacterial infection.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：急性中耳炎 増殖因子 粘膜過形成

1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は高頻度に小児が罹患する代表的な上気道炎であり、生後3歳までに約8割の小児が少なくとも1回は急性中耳炎に罹患するといわれている(Teeleら1989)。また近年薬剤耐性菌の増加がみられ、最近のわが国の調査では急性中耳炎の起因菌である肺炎球菌やインフルエンザ菌の60-80%が耐性を獲得しているといわれている。このように小児急性中耳炎は頻度が高く、しかも近年重症化しやすくなってきている。また一部の患児ではこの病態が遷延・反復することで、慢性中耳炎や感音難聴などの晩期合併症を来し、言語発達や学業成績に影響することが知られている(El-Sayedら1998他)。

急性中耳炎の主な病態として中耳粘膜の過形成がある。かなりの量の細胞増殖・分化がその本態であり、また滲出液の産生することで滲出性中耳炎も引き起こす。さらにこの状態が反復・遷延することで慢性中耳炎でみられるような鼓室の換気障害や肉芽形成、線維化などの一部不可逆的な病態を惹起し、上述の晩期合併症に関連することも知られている(Schuknechtら1993他)。それゆえに中耳粘膜過形成の病理組織学的および分子生物学的解明は耳鼻咽喉科学上の重要な課題である。

増殖因子は粘膜過形成を制御する主な因子であり、中耳粘膜の過形成についてはEGFやFGFが関与することが知られているが(Ryanら1993他)、現在まで10種類程度の因子しか調べられておらず、網羅的な検討はされていなかったが、その後細菌性中耳炎モデルマウスにおけるDNAマイクロアレイを用いた増殖因子の検索にて、中耳粘膜の過形成と同様の時間経過でmRNAの発現上昇を呈する7種類の新たな増殖因子が同定された(図1)。その後の検討で、同定した7種の因子の中耳粘膜過形成への関与をラット中耳粘膜器官培養を用いたアッセイにより検討し、その中でHB-EGF(Heparin-binding Epidermal Growth Factor)の中耳粘膜増殖促進作用が認められた(図2)。

HB-EGFはEGFファミリーに属する膜結合型の増殖因子であり、EGFRやErbB4などのErbBファミリーの受容体型チロシンキナーゼに結合する(Mekadaら2008他)。HB-EGFは全身の組織、細胞に広く発現していると考えられているが、HB-EGFは通常状態ではほとんど発現がなく、感染や組織傷害などを契機に発現が惹起される。また刺激を受け膜結合型HB-EGFから分泌型HB-EGFが切り離される(エクストドメイン・シュレディング)されることで活性型となり細胞外へ放出され作用(オートクラインやパラクラインなど)すると考えられている。

他領域で発生過程の器官形成、腫瘍細胞

の増殖、創傷治癒などにHB-EGFが重要な役割を担っていることがすでに解明されている(Iwamotoら2003他)。

以上より、HB-EGFが中耳粘膜過形成に重要な役割があると考えられ、これを制御することで病態改善につながる可能性も考えられた。

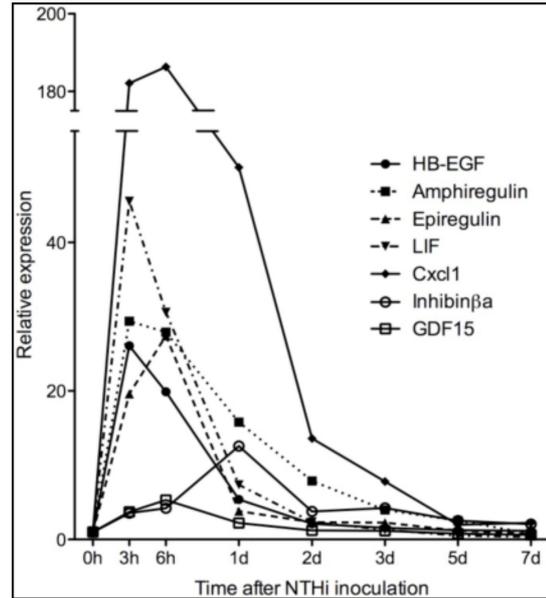


図1: 中耳粘膜の過形成と同様の時間経過でmRNAの発現上昇を呈する7種類の新たな増殖因子

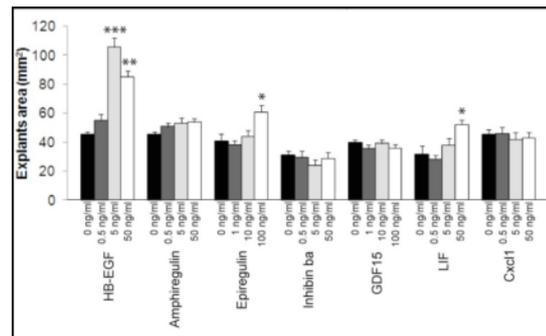


図2: ラット中耳粘膜器官培養を用いたアッセイを用いた7種の増殖因子の中耳粘膜過形成への関与の検討

2. 研究の目的

前項の背景に鑑み、細菌性中耳炎におけるHB-EGFの役割を詳細に解明し、細菌性中耳炎による中耳粘膜過形成の新たな治療戦略の開発を目指すべく以下の3点に焦点をおいて実験を行った。

産生細胞の局在の解明。

HB-EGFが中耳粘膜過形成に作用する際に関わる主なシグナル伝達経路の解明。

実際の細菌性中耳炎におけるHB-EGFの関与の程度の解明。

3. 研究の方法

生理的状態および感染時の中耳粘膜における HB-EGF 産生細胞の分布：
マウスを用い、感染はインフルエンザ菌 (10^5 cfu, 10ul) の鼓室内注入による。コントロールマウスでは同量の生理食塩水を用いる。注入後 3, 6, 12, 24 時間及び 2, 3, 5, 7 日後 (各群 n=2) に断頭・組織採取、免疫組織学的検討を行う。HB-EGF 特異的抗体を用い、組織学的分布を検討した。

HB-EGF の作用発現に関わる主要なシグナル伝達経路の解明：
中耳粘膜器官培養アッセイを用いておこなった。SD ラットを用い、中耳粘膜を採取、 0.5mm^2 の小片に分割し FBS を含む培地で培養した。正常に培養できた器官を HB-EGF を添加/不添加の 2 群に割り振り、それぞれの群に AKT, ERK, JNK, p38MAPK 経路に特異的な各種キナーゼ阻害剤 (AKT inhibitor II 1, 10, 50uM, U0126 0.1, 1, 10uM, JNK inhibitor II 0.1, 1, 10uM, SB203580 0.1, 1, 10uM) を添加、10 日間培養し、最終的な培養粘膜の面積を計測、HB-EGF の作用発現に関わるドミナントなシグナル伝達経路を同定した。

HB-EGF 拮抗物質による細菌性中耳炎における粘膜過形成抑制の試み：
前述の中耳粘膜培養アッセイ用いて、非感染および感染粘膜 (本実験では LPS を用いた、LPS にもインフルエンザ菌とほぼ同様の粘膜過形成が認められることが確認されている) 培養液に HB-EGF の中和抗体を添加し、細菌性中耳炎における HB-EGF の関与の程度を明らかにするとともに粘膜過形成の抑制を目的として実験を行った。

4. 研究成果

生理的状態および感染時の中耳粘膜における HB-EGF 産生細胞の分布：
抗 HB-EGF 抗体を用いた免疫組織染色を行った。非感染時および、感染時の中耳粘膜組織標本を用いた。結果、HB-EGF は中耳粘膜上皮および滲出液中の炎症細胞より産生されていることがわかった。以前の研究の結果と合わせるとこの炎症細胞は好中球と考えられた。

HB-EGF の作用発現に関わる主要なシグナル伝達経路の解明：
HB-EGF は EGF レセプター (EGFR) に結合し、その後のシグナル伝達を行うと考えられている。まず、中耳粘膜過形成に HB-EGF が関与する際に EGFR を介しているのかどうかを確認した。HB-EGF を添加した中耳粘膜培養組織に EGFR 阻害剤を添加しその変化を確認したところ、阻害剤添加により HB-EGF の増殖効果は抑制され、確かに EGFR を介して作用していることが確認された。次に、その下流

のシグナル経路で細胞増殖に関わると思われる経路として、AKT, ERK, JNK, p38MAPK 経路の 4 経路を想定し、各々に特異的なキナーゼ阻害剤を中耳粘膜器官培養組織に添加し、最終的な中耳粘膜培養組織の面積を計測した。結果 AKT 経路および ERK 経路の阻害剤にて有意な粘膜増殖の減少が認められ (図 3、図 4) AKT 経路および ERK 経路が HB-EGF による細胞増殖のドミナントな経路として考えられ、この経路の制御が中耳粘膜過形成の制御に関わる可能性が示唆された。

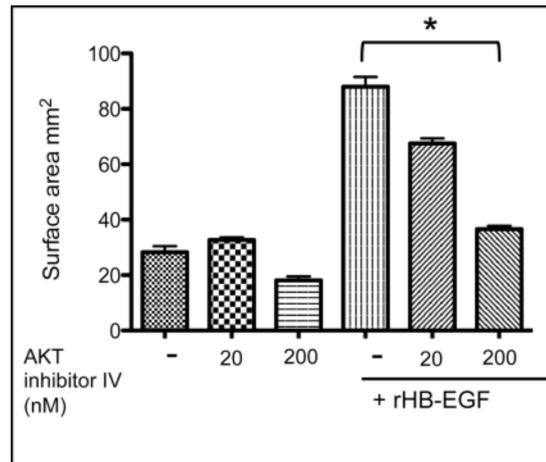


図 3 : AKT 経路阻害剤による HB-EGF の中耳粘膜増殖作用の抑制

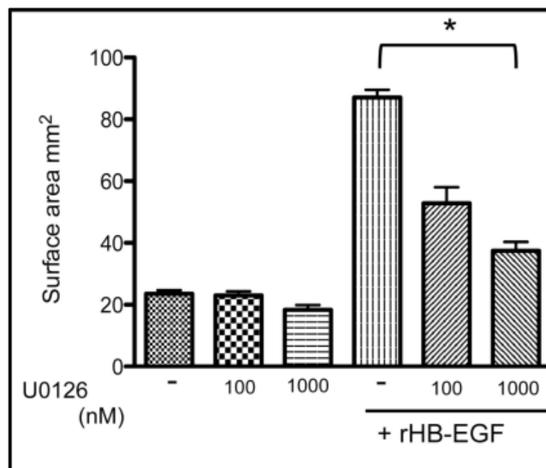
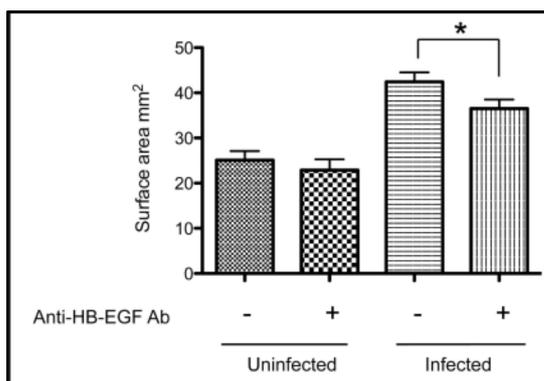


図 4 : ERK 経路阻害剤による HB-EGF の中耳粘膜増殖作用の抑制

HB-EGF 拮抗物質による細菌性中耳炎における粘膜過形成抑制の試み：
急性中耳炎における粘膜過形成において実際の程度 HB-EGF が関与しているかを確認することを試みた。感染を惹起させた中耳粘膜の器官培養組織用意し、HB-EGF に対する中和抗体を培養液に添加し、粘膜増殖の程度を比較した。結果、非感染粘膜では差がみられなかったが、感染組織では有意に増殖が抑制さ

れ、感染時における粘膜過形成に HB-EGF が相応の役割を担っていることが確認された（図5）。以上の結果より急性中耳炎による中耳粘膜過形成を抑制するターゲットとして HB-EGF が有力な候補ではないかと考えられた。

図5：HB-EGF 中和抗体による中耳粘膜器官培養（感染組織）の増殖抑制効果



行われた一連の研究より、実際の細菌性中耳炎にて、HB-EGF が関与している可能性があることが示され、さらにその産生細胞は中耳粘膜上皮および浸出好中球でこれらの HB-EGF 産生を制御すること中耳粘膜過形成を抑制する方法の一つとして考えられた。まだ抑制方法として、下流のシグナル伝達経路である AKT 経路および ERK 経路のシグナル伝達をブロックすることが有効な手段の可能性として示された。

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 1 件)

Suzukawa K, Tomlin J, Pak K, Chavez E, Kurabi A, Baird A, Wasserman SI, Ryan AF.
A mouse model of otitis media identifies HB-EGF as a mediator of inflammation-induced mucosal proliferation.
PLoS One. 2014 Jul 17;9(7):e102739. doi: 10.1371/journal.pone.0102739.
eCollection 2014.
査読：有

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木佳吾 細菌性中耳炎における中耳粘膜過形成を制御する増殖因子の検索
日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2014年2月7日 ホテルクレメント徳島（徳島県・徳島市）

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 佳吾 (Suzukawa, Keigo)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：50447398

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし