

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861571

研究課題名(和文) SOCS遺伝子改変アレルギーマウスモデルにおける中耳局所粘膜免疫応答の解明

研究課題名(英文) Analysis of the immune system of middle ear and nose in suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 knockout mouse with allergic rhinitis.

研究代表者

川野 利明 (Kawano, Toshiaki)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30633424

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)：アレルギー感受性を規定するIgE抗体が高値を示す遺伝子改変アレルギーマウス(CD19Cre-SOCS1 flox)を用いて、アレルギー性鼻炎合併中耳炎における病態の詳細な分析を行った。アレルギー性疾患においては通常IL-4やIL-5といったTh2系サイトカインの上昇が中心と考えられるが、アレルギー性鼻炎合併型中耳炎では中耳内においてTh2のみならず、Th1系サイトカインやケモカインの著明な上昇が見られた。中耳炎の病態は通常鼻腔からの細菌やウイルス感染から中耳内の炎症が惹起されると考えられているが、アレルギー性鼻炎の合併は中耳内での炎症病態の著明な増強効果が認められることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Suppressor of cytokine signaling (SOCS) is a negative feedback regulator of IL-4-dependent pathways and might therefore control Th2 immunity associated traits, such as IgE levels and eosinophilic mucosal inflammation, which are implicated in allergic rhinitis. Otitis media and allergic rhinitis is thought to be strongly correlated each other in clinic. To confirm the relationship between these two disease, SOCS1 knockout mice was used as a model of allergic rhinitis, and then artificially caused otitis media. The mucosa of SOCS1 group mice was seen much higher infiltration with eosinophils and inflammation cells. In multiplex ELISA of middle ear washing fluid, many cytokines, not only Th2 but also Th1, were more stimulated in SOCS1 group than control. Th2 type cytokines were thought to be related to allergy, but Th1 type cytokines were also induced by allergic rhinitis. This result may be milestone to improve the treatment against otitis media combined with allergic rhinitis.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：遺伝子改変マウス SOCS遺伝子 アレルギー性鼻炎 中耳炎

1. 研究開始当初の背景

食事形態や環境因子から最近ではアレルギー疾患、特にアレルギー性鼻炎の発症の低年齢化が進み、アレルギー病態を基礎とした中耳炎の遷延化が問題となっている。アレルギー性鼻炎合併中耳炎モデルを作成することは疾患の基礎的病態の理解と治療法の確立に寄与する可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、これを実験的に検証することを目的とし、IgE 抗体レベルが有意に上昇するアレルギー性疾患モデルマウス (SOCS 遺伝子改変マウス) を用いて、我々が開発したマウス中耳炎モデルを作製する。IgE 産生が促進した状態で、アレルギー性鼻炎・中耳炎の病態を形成させ、アレルギー関連慢性感染中耳炎の増悪化について、その分子病態を明らかにする。

(2) アレルギー感受性を規定する IgE 抗体が高値を示すアレルギーマウス (B 細胞特異的 SOCS1 欠損マウス) を用いて、アレルギー合併中耳炎モデルを作製し、中耳や鼻腔などの局所アレルギーが中耳における炎症病態にどのような影響を与えるか解析する。これにより、好酸球性中耳炎の病態悪化の分子メカニズムを明らかにし、ひいては現行の抗菌薬投与に加えアレルギー制御を視野に入れた新たな治療法の開発に寄与することを旨とする。

3. 研究の方法

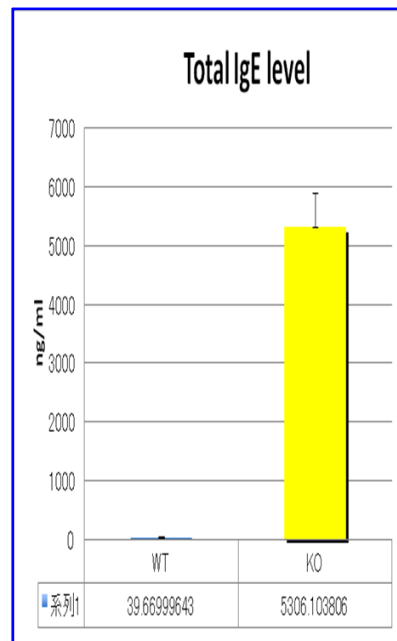
(1) アレルギーマウスモデルを用いたアレルギー性鼻炎合併中耳炎モデルの樹立

(2) 中耳炎モデルマウスにおける中耳炎病態の組織学的解析

(3) 中耳粘膜、および炎症細胞における炎症性カスケードの解明および細胞内シグナル伝達の解析

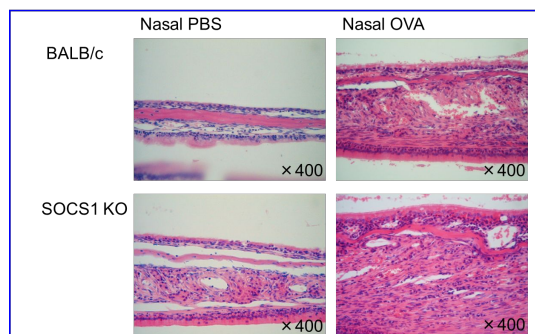
4. 研究成果

(1) B 細胞特異的に SOCS1 を欠損させたマウス (CD19Cre-SOCS1 flox) を作成した。これまでのアレルギーモデルマウスは後天的に抗原特異性 IgE を上昇させたマウスを用いることが多かったが、本実験では先天的に IgE が上昇するマウスを遺伝子改変技術を用いることにより、より臨床に近い形でのアレルギーモデルマウスを作成することに成功した。ELISA 法を用いた血清 IgE 測定ではコントロールマウス群で 39ng/ml に対し、SOCS1 ノックアウトマウス群では 5306ng/ml と有意な差を認めた。マウスの血清総 IgE を次図に示す。

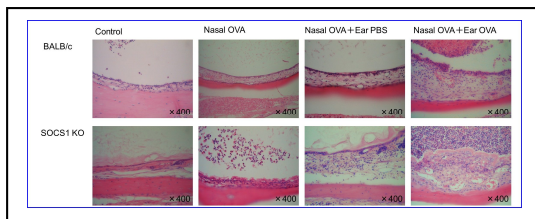


(2) コントロールとして Balb/c マウスを用い SOCS1 ノックアウトマウスとともにオバアルブミン (OVA) の全身投与と鼻腔投与を行い、アレルギー性鼻炎マウスを作成した。1 ヶ月後に OVA 投与後のマウスの鼻かみとくしゃみの回数を計測すると Balb/c マウスで 14.5 ± 2.1 回、SOCS1 群で 32.6 ± 19.8 回と明らかに SOCS1 群が高い傾向を認めた ($p < 0.0001$)。

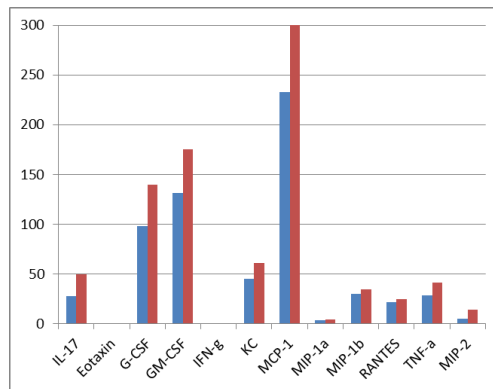
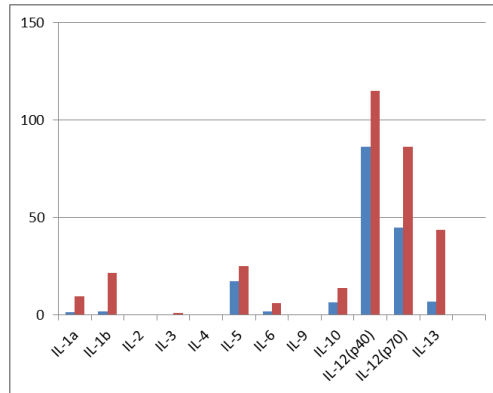
(3) 鼻腔粘膜の腫脹を組織学的に評価した (次図参照)。コントロール群では PBS 投与後に鼻腔粘膜の腫脹は認めなかったが、SOCS1 群では軽度腫脹と炎症細胞の軽度浸潤を認めた。SOCS1 群では PBS 投与後においても中程度の腫脹を認め、アレルギー性鼻炎では炎症に対する閾値が低下する傾向にあることを示した。次に OVA 投与後では Balb/c マウスにおいても高度の粘膜腫脹と炎症細胞の浸潤を認めたが、SOCS1 群においてはさらに腫脹が強い傾向であった。SOCS1 ノックアウトマウスにおいては、これまでのアレルギー性鼻炎モデルマウスよりもさらに局所炎症の強いモデルが作成されていることを示した結果となった。



(4) 中耳に PBS、OVA を投与し中耳炎モデルマウスを作成後、中耳骨胞の組織学的評価を行った。次図は 鼻腔に PBS を投与した群、鼻腔に OVA 投与群、鼻腔 OVA、中耳 PBS、鼻腔 OVA、中耳 OVA を投与したときの中耳粘膜を HE 染色したものである。Balb/c マウスではコントロール、鼻腔 OVA、中耳 PBS 投与群では中耳粘膜に大きな変化は認めなかった。中耳 OVA 投与群では中耳粘膜の中等度の腫脹と炎症細胞の浸潤、中耳腔内への好酸球の中等度浸潤を認めた。これに対し SOCS1 群では鼻腔 OVA のみですでに中耳腔内に好酸球の浸潤を認めており、コントロールマウス群との明らかな差を認めた。また中耳 PBS 投与のみで中耳粘膜の腫脹を認め、OVA 投与後には高度の粘膜腫脹、炎症細胞の大量の浸潤、中耳腔内への好酸球の著明な浸潤を認めた。アレルギー性鼻炎が中耳炎発症、増悪に対し強く関与していることを示す結果であった。



(5) 中耳炎作成後に採取した中耳貯留液のサイトカイン、ケモカイン測定のために Multiplex ELISA を施行した。アレルギー性疾患では通常 Th2 系といわれるサイトカインの上昇を認める。今回の実験においても IL-5 や IL-13 といった Th2 系のサイトカイン上昇が SOCS1 マウスにおいて高い傾向を認めた。それに対し IL-4、IL-10 といった Th2 サイトカインの上昇は軽度であった。特に SOCS1 群においては単球の走化性因子である MCP-1 や NK 細胞に対する著明な活性化作用を有する IL-12 (p40、p70 共に) が高い傾向にあった。IL-12 は B 細胞および単核系細胞により産生される。本研究に使用したマウスは B 細胞特異的に SOCS1 を欠損させているため、これが IL-12 の上昇に関与している可能性も考えられた。また Balb/c マウスにおいては IL-1 の上昇は軽度であったが、SOCS1 群では有意にコントロール群よりも高い傾向にあった。アレルギー疾患においては通常 Th2 系のサイトカインの上昇を認めることが多い。本検討においては Th2 系のみならず多くのケモカインや Th1 系のサイトカインが SOCS1 群において有意に上昇していることが分かった。アレルギー性鼻炎を合併している場合には、多くのサイトカインが中耳炎の発症に関与している可能性が示唆された。今後中耳炎の臨床においてはアレルギー性鼻炎の有無を確認することが重要であることを示した。今後はアレルギー性鼻炎の治療が中耳炎の寛解にどう影響するかを検討する必要がある。



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 4 件)

Kawano. T, Hirano. T, Kadowaki. Y, Moriyama. M, Iwasaki. T, Nogichi. K, Kobayashi. T, Suzuki. M, Analysis of the mucosal immune system of middle ear and nose in suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 knockout mouse model with allergic rhinitis. *Monduzzi Editorore International Proceeding Division*. 査読なし Vol 1, 21-24. 2014

<http://www.medimond.com/proceedings/detail.asp?id=20130612>

Hirano. T, Kodama. S, Kawano. T, Moriyama. M, Suzuki. M. Analysis of dynamics of Th17 cells in chronic middle ear inflammation induced by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Monduzzi Editorore International Proceeding Division*. 査読なし Vol 1, 17-19. 2014

<http://www.medimond.com/proceedings/detail.asp?id=20130612>

Moriyama. M, Hirano. Kodama. S, Kawano. T, Suzuki. M. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 expression on

polymorphonuclear neutrophils enhanced the bacterial clearance from the nose in synergy with TLR4. *Monduzzi Editorore International Proceeding Division*. 査読なし Vol 1, 25-26. 2014 <http://www.medimond.com/proceedings/detail.asp?id=20130612>

Kawano. T, Hirano. T, Kodama. S, Mitsui. MT, Ahmed. K, Nishizono. A, Suzuki. M. Pili play an important role in enhancing the bacterial clearance from the middle ear in a mouse model of acute otitis media with *Moraxella Catarrhalis*. *FEMS Pathogens and Disease*, 査読あり Vol 67 119-131. 2013
DOI: 10.1111/2049-632X.12025

〔学会発表〕(計 6 件)

Kawano. T, Zhu. Y, Zhao. Y, Zhang. A, Ye. Z, Chada. K, Yang. H, Anderson. S, Xie. H. Effects of an MF-59-like adjuvant on T cell development and migration in mice following vaccination with H5N1 monovalent. 33rd Annual Meeting of the American Society for Virology. 6/21/2014-6/25/2014 Fort Collins. USA.

Zhang. A, Zhu. Y, Zhao. Y, Kawano. T, Ye. Z, Xie. H. Impact of avian influenza infection on pregnant mice. 33rd Annual Meeting of the American Society for Virology. 6/21/2014-6/25/2014 Fort Collins. USA.

Zhu. Y, Kawano. T, Zhao. Y, Zhang. A, Ye. Z, Chada. K, Yang. H, Anderson. S, Xie. H. Evaluation of the immunogenicity and safety of an MF59-like adjuvanted H5N1 vaccine in mice using system biology approach. 33rd Annual Meeting of the American Society for Virology. 6/21/2014-6/25/2014 Fort Collins. USA.

Kawano. T, Hirano. T, Kadowaki. Y, Moriyama. M, Iwasaki. T, Nogichi. K, Kobayashi. T, Suzuki. M, Analysis of the mucosal immune system of middle ear and nose in suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 knockout mouse model with allergic rhinitis. *Extraordinary International Meeting on Recent Advances in Otitis Media*. 6/12/2013-6/16/2013

Stockholm, Sweden.

Hirano. T, Kodama. S, Kawano. T, Moriyama. M, Suzuki. M. Analysis of dynamics of Th17 cells in chronic middle ear inflammation induced by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Extraordinary International Meeting on Recent Advances in Otitis Media*. 6/12/2013-6/16/2013 Stockholm, Sweden.

Moriyama. M, Hirano. Kodama. S, Kawano. T, Suzuki. M. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 expression on polymorphonuclear neutrophils enhanced the bacterial clearance from the nose in synergy with TLR4. *Extraordinary International Meeting on Recent Advances in Otitis Media*. 6/12/2013-6/16/2013 Stockholm, Sweden.

〔図書〕(計 2 件)

岡本美孝、川野利明他、中外医学社、耳鼻咽喉科・頭頸部外科 Q&A、2013、総ページ 300
中野重徳、川野利明他、北隆社、アレルギーの臨床、2014、総ページ 100

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

川野利明 (Kawano, Toshiaki)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30633424

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：