

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462562

研究課題名(和文) siRNAにより杯細胞化生を抑制して正常粘膜を温存する難治性中耳炎新治療法の開発

研究課題名(英文) Preventing mucous metaplasia in chronic otitis media by inhibition of Math1

研究代表者

中村 善久 (NAKAMURA, Yoshihisa)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90360023

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)：杯細胞分化に関与するMath1遺伝子を抑制することで杯細胞化生を抑制し、正常な粘膜を再生させることによって、慢性中耳炎を根本的に治療することが可能になると考え研究を行っている。TNF- α とレチノイン酸とともに中耳粘膜細胞を培養することによって多数の杯細胞を誘導するモデルを確立しているが、Math1の活性化はEGF受容体のチロシンキナーゼ阻害剤(AG1478)により有意に抑制された。また、AG1478によってMath1を不活化すると、TNF- α とレチノイン酸を投与しても杯細胞化生が起きなかった。以上より、Math1の抑制によって杯細胞化生を抑制し、正常粘膜を温存できることが示された。

研究成果の概要(英文)：A key issue in otitis media (OM) is mucous cell metaplasia in the middle ear mucosa, a condition for hyperproduction of mucus in the middle ear mucosa and development of chronic OM. We demonstrated that Math1 significantly increased the mucus-like cell numbers in the middle ear mucosa of mice. Math1, in the presence of TNF- α and retinoic acid (RA), synergistically promoted the differentiation of mouse middle ear epithelial cells (mMEEC) into mucus-like cells via upregulation of mucins and their chaperones:trefoil factors (TFFs) in vitro. We also demonstrated that Math1 activation (translocation to nucleus) was inhibited by epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, AG1478. In addition, mucous cell metaplasia induced by TNF- α and RA was abrogated by AG1478. These results suggested that regulation of Math1 could prevent mucous cell metaplasia in chronic otitis media.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：Math1 TNF- α レチノイン酸 杯細胞化生

1. 研究開始当初の背景

慢性中耳炎では、抗菌薬を投与してもなかなか炎症を制御できず、粘稠な耳漏が長期にわたって持続し治癒が遷延する。基本的に中耳の炎症性疾患は、粘膜機能(分泌と繊毛)の障害により生じ、その背後には杯細胞化生とよばれる病態が関与している。すなわち、正常粘膜では繊毛上皮を適度な粘性の粘液が覆い、細菌は粘液によってからめとられ上皮に付着することなく繊毛運動により排除される。しかし、慢性炎症により障害された粘膜は、粘膜局所を守るために粘液を多量に分泌するようになり、繊毛上皮の多くが杯細胞(粘液産生細胞)に変化してしまう(杯細胞化生)。杯細胞化生は粘液で個々の細胞を守ろうとする原始的な生体防御機構であるが、一方で、繊毛による粘膜自浄作用の機構を破綻させてしまう。杯細胞化生した病的粘膜では、繊毛機能が失われており粘液も粘稠なため、粘液は炎症性物質を含んだまま局所に鬱滞する。そしてこの炎症性物質を含んだ粘液が、さらなる杯細胞化生を引き起こすといった悪循環に陥る。この炎症、杯細胞化生、粘膜自浄作用の低下の悪循環が慢性中耳炎における粘膜病変の難治化・遷延化の重要なファクターと考えられる。

我々は、異常な杯細胞分化を制御する分子生物学的なターゲットとそのメカニズムについての基礎研究を行ってきた。その結果、腸の杯細胞発生に必須の遺伝子といわれる Math1 が、中耳炎における杯細胞化生のトリガーになっていることを発見した。杯細胞分化に関与する遺伝子を抑制することで、杯細胞化生を抑制し、正常な粘膜を再生させることによって、慢性中耳炎や好酸球性中耳炎を

根本的に治療することが可能になると考え研究を行っている。

2. 研究の目的

杯細胞化生を抑制するために Math1 を制御するのは有望な治療法であるが、Math1 は内耳有毛細胞の発生に関与していることが知られており、聴覚に影響を及ぼす可能性がある。最近になって、肺の杯細胞分化に関与する遺伝子の研究がすすみ、Math1 の下流にもいくつかの遺伝子が存在することが明らかになってきた(GFI1, SPDEF)。これらの遺伝子は、Math1 によって大まかに分泌系細胞に分化することを運命づけられた細胞(分泌前駆細胞)を、さらに杯細胞へと分化させる。杯細胞のより後期の段階で水分の分泌(Clca1)や粘液産生(Gcnt3, AGR2)に関与する遺伝子も明らかにされている。杯細胞分化のより後期に発現する遺伝子を抑制して杯細胞分化の成熟段階を抑制した方が、分泌前駆細胞から分化する有毛細胞などの分化を妨げないので理想的である。

マウス中耳炎モデルにおいて、Math1 の下流に位置する遺伝子の活性化を RNA 干渉により抑制し、杯細胞化生を抑制して難治性中耳炎を治療できるかどうか検討する。

3. 研究の方法

当初、マウス中耳炎モデルの中耳に Math1 の下流の遺伝子に対する siRNA を投与し、杯細胞化生を抑制して難治性中耳炎を治療できるかどうか検討する計画であったが、現在のところ効果的に遺伝子を抑制する siRNA が作成できておらず、成果は得られていない。

そこで、マウス中耳粘膜上皮細胞にレチノイ

ン酸と TNF- α を投与することにより杯細胞化生を誘導する in vivo の杯細胞化生モデルを用い、シグナル伝達の阻害剤を用いて Math1 の活性化を制御し、杯細胞化生の抑制が可能かを検討した。

4 . 研究成果

我々はすでに、マウス中耳粘膜上皮細胞にレチノイン酸(粘膜分化に必須の栄養素)、TNF- α (炎症性サイトカイン)を単独で投与した場合はごくわずかな杯細胞しか誘導されないのに、レチノイン酸と TNF- α を同時に投与すると、2 週間後に効率的に杯細胞化生が誘導されることを発見している。また、Math1 を遺伝子導入すると、さらに多くの杯細胞を誘導できることから、Math1 は炎症による杯細胞化生においても中心的な役割を果たしていると考えられる。さらに、レチノイン酸と TNF- α のうち、レチノイン酸が主に Math1 の活性化に関与している事を明らかにした。すなわち、マウス中耳粘膜細胞にレチノイン酸を投与すると、12 時間後に Math1 が細胞質から核に移動するのが観察された。今回の研究では、レチノイン酸とともに、EGF(表皮成長因子)受容体のチロシンキナーゼ阻害剤 (AG1478) を投与すると、12 時間後の Math1 の核への移動が抑制されることが示され、Math1 の活性化は EGF 受容体のチロシンキナーゼに依存していることが明らかになった。また、AG1478 によって Math1 を不活化すると、TNF- α とレチノイン酸を投与しても 2 週間後に杯細胞化生を誘導することができなかつた。以上より、Math1 の抑制によって杯細胞化生を抑制し、正常粘膜を温存できることが示された。

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 2 件)

1. Lin J, Hafrén H, Kerschner J, Li JD, Brown S, Zheng QY, Preciado D, Nakamura Y, Huang Q, Zhang Y. Panel 3: Genetics and Precision Medicine of Otitis Media. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017 Apr;156(4_suppl):S41-S50、査読有 doi: 10.1177/0194599816685559
2. Nakamura Y, Hamajima Y, Suzuki M, Esaki S, Yokota M, Oshika M, Takagi I, Yasui K, Miyamoto N, Sugiyama K, Nakayama M, Murakami S. The effect of the leukotriene antagonist pranlukast on pediatric acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 87;34-8, 2016、査読有 doi: 10.1016/j.ijporl.2016.05.027.

[学会発表](計 2 件)

1. 中村 善久、鈴木 元彦、村上 信五：小児急性中耳炎に対するロイコトリエン拮抗薬の効果。耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2016年2月5日、鳥羽国際ホテル(三重県・鳥羽市)
2. Nakamura Y: The effect of the leukotriene antagonist Pranlukast on pediatric acute otitis media. 18th international symposium on recent advances in otitis media, Maryland (USA), 7th Jun 2015 - 11th Jun 2015

[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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 善久 (NAKAMURA, Yoshihisa)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90360023

(2)研究分担者

鈴木 元彦 (SUZUKI, Motohiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50326138