

令和元年6月5日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10759

研究課題名(和文) 全身性自己免疫マウスを用いたANCA関連血管炎による内耳障害機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of Inner ear dysfunction in ANCA-associated vasculitis

研究代表者

吉田 尚弘 (YOSHIDA, Naohiro)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90291260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ANCA(Antineutrophil cytoplasmic antibody：抗好中球細胞質抗体)関連血管炎は、ANCAにより細小、小動脈に血管炎を生ずる疾患である。難治性中耳炎にANCA関連血管炎の関与する耳障害(ANCA関連血管炎性中耳炎)が多く存在する。本研究では、ANCA関連血管炎モデルマウスを作成を試み、モデルマウスを用いることでANCA関連血管炎による内耳・中耳機能障害機序について組織、形態学的に検討したが、内耳組織には明らかな血管炎の所見は認められなかった。ANCA誘導には差がありラット、マウス等の動物種差、系による影響があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ANCA関連血管炎性中耳炎の聴力障害には、蝸牛神経、血管条、中耳の血管炎に伴う血流障害、肉芽増生、炎症が原因となっていると考えられる。作成を試みたANCA関連血管炎モデルマウスでは形態学、生化学的には、内耳に有意な変化は見られなかった。一方で多くのバイオマーカーの発現が観察された。マウスの種類によりANCA発現の変化もあること、ANCA関連血管炎が全身疾患でありながら症状の好発する部位、臓器に差があること、なかでも耳症状が初発しやすいことから、外耳、中耳および蝸牛神経周囲血管における血管炎、好中球細胞外トラップ(NETs)の発現のさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：ANCA(Antineutrophil cytoplasmic antibody) associated vasculitis is defined as a minor arterial vasculitis caused by the ANCA. Most of the intractable otitis media had not been explained by the known etiology may be this ANCA associated vasculitis(OMAAV). This research, aimed to clarify the mechanism of inner ear damage of OMAAV by using the model mice. Propylthiouracil (PTU) is an antithyroid drug for the treatment of hyperthyroidism, and about 30% of the patients received PTU produce MPO positive ANCA associated vasculitis(AAV). The histological findings of MPO-ANCA positive AAV model mice induced by PTU did not show the remarkable vasculitis in the inner ear.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：中耳炎 抗好中球細胞質抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ANCA(Antineutrophil cytoplasmic antibody: 抗好中球細胞質抗体)関連血管炎は、ANCAにより細小、小動脈に血管炎を生ずる疾患である。現在まで原因不明とされていた難治性中耳炎に ANCA 関連血管炎の関与する耳障害 (ANCA 関連血管炎性中耳炎) が多く存在する。日本から新たに発信された疾患概念であるこの ANCA 関連血管炎性中耳炎は平成 25 年度の全国調査 297 例の検討から、急速な難聴の進行、副腎皮質ステロイドや免疫抑制薬の投与により約 6 割で聴力回復、一度聾となると治療により聴力が回復しないため早期の治療開始が重要、ANCA 陰性ではあるが ANCA 陽性の ANCA 関連血管炎性中耳炎と同様の臨床像を呈する症例があるという特徴が示されている。耳症状のない全身型 ANCA 関連血管炎の中にも ANCA 抗体価陽性の ANCA 関連血管炎と同様の臨床像、組織像を呈する ANCA 陰性例もある。ANCA 関連血管炎性中耳炎の聴力予後の検討では 10dB 以上の聴力回復例が約 60%、不変・悪化例が 40%である (吉田ら Otol Jpn 2015)。この ANCA 関連血管炎性中耳炎の内耳障害の発症機序、予後を規定する因子などは不明である。

### 2. 研究の目的

(1) 全身型の多発血管炎性肉芽腫症 (GPA; 旧名 Wegener 肉芽腫) により聾となった側頭骨病理組織像では正円窓から蝸牛への肉芽組織の進展が観察される。内耳には血管条周囲に血管分布が見られ gap junction を介した K<sup>+</sup> recycling、electrical coupling が聴覚受容に重要である。ANCA 関連血管炎性中耳炎の聴覚障害はこの血管条を介する機能障害、あるいは蝸牛神経への血流障害による後迷路性障害の可能性が疑われるが詳細な機序、組織学的変化は不明である。また、ANCA 関連血管炎の一つである好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA) と好酸球性中耳炎の発症機序は異なると考えられるが極めて類似した臨床症状を呈し、局所症状から全身症状発現への移行機序も不明である。内耳の血管炎による機能障害を生じる機序を明らかにすること、局所症状から全身症状への移行の機序、ANCA 関連血管炎性中耳炎の病態を解明し治療法を確立する上で重要である。

(2) ANCA 関連血管炎性中耳炎の病態解明には、全身性自己免疫マウスを用いた内耳機能解析は有効な方法のひとつとなる。ヒトで抗甲状腺薬 Propylthiouracil (PTU) 投与による MPO-ANCA 抗体価の上昇を伴う ANCA 関連血管炎が報告されており、抗甲状腺薬 Propylthiouracil (PTU) と Phorbol Myristate Acetate (PMA) の投与により MPO-ANCA が産生された ANCA 関連血管炎モデルマウス、また好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA) との類似の臨床像を呈する好酸球性中耳炎のモデルマウスとを作成を試み、組織、中耳組織、貯留液中のバイオマーカーを比較検討し中耳、内耳の機能障害機序を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) PTU-PMA 誘導 MPO-ANCA 抗体価の上昇を伴う ANCA 関連血管炎マウス及び好酸球性中耳炎のモデルマウスの作成と中耳、内耳組織の検討

加齢に伴う聴力変化をきたしにくくまた週齢による聴力像が既に知られている CBA 系マウス、その他 BALB/C などの他系のマウスを用いた。WKY ラットを用いた MPO-ANCA 血管炎モデル作成に準じて、Propylthiouracil (PTU) (10 mg/日) を 30 日間経口投与、Phorbol Myristate Acetate (PMA) (1 µg) を 0,7 日目に腹腔内に投与 PTU (10 mg/日) を 30 日間経口投与し、かつ PMA (1 µg) を 0,7 日目に腹腔内に投与した。PTU の経口投与の方法は 50ml ボトルケースに PTU(10mg) を溶かし 5 % glucose となるように調整し投与した。血液を 14,30 日目に採取して MPO-ANCA 抗体価を indirect immunofluorescence 法により測定した。30 日目にマウスを全身麻酔下に蝸牛を固定し側頭骨を採取し、内耳、中耳の組織学的検討を行った。一方、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症と類似の臨床像を呈する好酸球性中耳炎モデルとして卵白アルブミン (OVA) 5 µg/mg+水酸化アルミニウムゲル 0.2 mg/mg を腹腔内投与することにより感作させ、さらにマウスの経乳突洞にプラスチックカニューレを留置、中耳腔への反復感作を可能として好酸球を誘導し、内耳、中耳の組織学的検討を行った (図 1)。



(図 1)

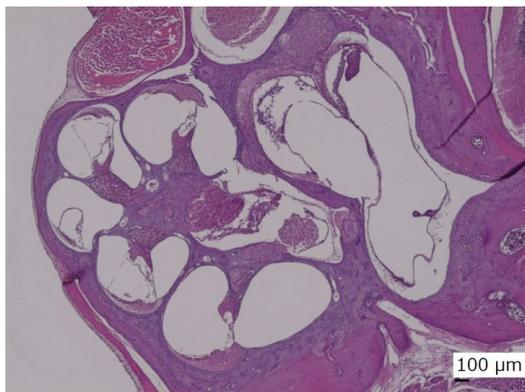
(2) ANCA 関連血管炎性中耳炎における中耳粘膜、貯留液中のバイオマーカーの検討

中耳における特異的な炎症カスケードを検討するため Bio-Plex(BIO RAD) システムを用いて、中耳貯留液、粘膜を採取し以下のバイオマーカー (APRIL/TNFSF13、BAFF/TNFSF13B、sCD30/TNFRSF8、IFN- 2、IFN-、IFN-、IL-2、sIL-6R、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-11、IL-12 (p40)、IL-19、IL-20、IL-22、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-33、TNF-、Eotaxin、TSLP、MMP-1、MMP-2、MMP-3、RANTES) を検討した。

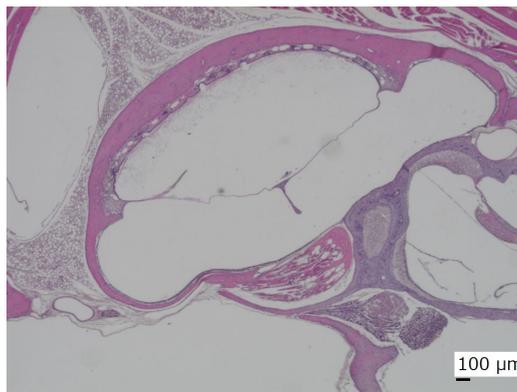
#### 4. 研究成果

(1) PTU-PMA 誘導 MPO-ANCA 抗体価の上昇を伴う ANCA 関連血管炎マウス及び好酸球性中耳炎のモデルマウスの作成と中耳、内耳組織の検討

ラットで示された MPO-ANCA 血管炎モデル作成プロトコールに準じて、CBA 系マウスを用いて PTU (10 mg/日) の 30 日間経口投与、及び phorbol myristate acetate (PMA) (1 µg) を併用した腹腔内投与を行ったが、MPO-ANCA の上昇は明らかではなく、種差による差が考えられた。そこで、マウスの他系として BALB/C、C57BL6 等を用いてモデル動物作成を試み、固定後、中耳、内耳の蝸牛 surface preparation を作成し検討した(図 2, 3)。



(図 2)



(図 3)

ANCA 関連血管炎性中耳炎において感音難聴が生ずる機序として、中耳からの炎症、肉芽の内耳への波及、血管条及び蝸牛神経の血管炎による血流障害が考えられるが、MPO-ANCA が軽度誘導されたマウスでは明確な血管炎所見は血管条には見られなかった。また、好酸球性中耳炎誘導マウスでは中耳粘膜に好酸球の遊走が見られたが粘稠な中耳貯留液は認めず、また血管炎の所見は認められなかった。

(2) ANCA 関連血管炎性中耳炎における中耳粘膜、貯留液中のバイオマーカーの検討

ANCA 関連血管炎性中耳炎におけるバイオマーカーについて、Bio-Plex(BIO RAD)システムを用いて検討した。APRIL/TNFSF13、BAFF/TNFSF13B、sCD30/TNFRSF8、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\alpha$ 、IL-2、sIL-6R、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-11、IL-12(p40)、IL-19、IL-20、IL-22、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-33、TNF- $\alpha$ 、Eotaxin、TSLP、MMP-1、MMP-2、MMP-3、RANTES を測定したところほぼすべてのサイトカイン、ケモカインが測定可能な濃度で存在していた。ANCA 関連血管炎、好酸球性中耳炎におけるバイオマーカーの差異、有意性についてはさらにサンプル数を増やした統計的解析が必要と考えられた。

#### <引用文献>

吉田 尚弘 ANCA 関連血管炎性中耳炎(OMAAV)の臨床像 聴力像、聴力予後に関わる因子の検討 *Otology Japan* 2015; 25(2): 202-207.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Esu Y, Iino Y, Masuda M, Kanazawa H, Yoshida N. Proposal of a Treatment Strategy for Eosinophilic Otitis Media Based on Middle Ear Condition. *Otol Neurotol* 査読有 2018; 39:671-678.

吉田尚弘 小型血管炎-ANCA 関連血管炎性中耳炎-治療 *日本臨床* 査読無 2018 ;1146; 308-312.

Watanabe T, Yoshida H, Kishibe K, Morita Y, Yoshida N, Takahashi H, Harabuchi Y. Cochlear implantation in patients with bilateral deafness caused by otitis media with ANCA-associated vasculitis (OMAAV): A report of four cases. *Auris Nasus Larynx*. 査読有 2018;45(5):922-928.

吉田尚弘 難治性中耳炎 *ENTONI* 査読無 2017;205:12-18.

吉田尚弘 好酸球性中耳炎と好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(EGPA) アレルギーの臨床

査読無 2017; 37: 42-45.

Hasegawa M, Shinnabe A, Kanazawa H, Iino Y, Yoshida N. Clinical characteristics of chronic otitis media in different age groups. J Int Adv Otol 査読有 2017; 13(2):176-180.

Harabuchi Y, Kishibe K, Tateyama K, Morita Y, Yoshida N, Kunimoto Y, Matsui T, Sakaguchi H, Okada M, Watanabe T, Inagaki A, Kobayashi S, Iino Y, Murakami S, Takahashi H, Tono T. Clinical features and treatment outcomes of otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis (OMAAV): A retrospective analysis of 235 patients from a nationwide survey in Japan. Mod Rheumatol. 査読有 2017 Jan;27(1):87-94.

Kanazawa H, Yoshida N, Iino Y. New Insights into Eosinophilic otitis media Curr Allergy Asthma Rep 査読有 2015;15:76-80

〔学会発表〕(計 5 件)

Yoshida N, Iino Y, Hasegawa M. The onset and treatment of otitis media associated with eosinophilic granulomatous polyangiitis(EGPA) 19<sup>th</sup> International Vasculitis and ANCA Workshop 2019 年

吉田尚弘 EGPA の臨床像と取り扱い 第 57 回日本鼻科学会総会・学術講演会 2018 年

Yoshida N. Audiological findings and outcome after immunosuppressive therapy in otitis media with ANCA-associated vasculitis(OMAAV) 18<sup>th</sup> International vasculitis and ANCA work shop 2017 年

Yoshida N. Otitis media with ANCA-associated vasculitis 30<sup>th</sup>Politzer Society Meeting 2015年

Yoshida N. Otitis media with ANCA associated vasculitis :Audiological findings and outcome 18<sup>th</sup> international symposium on recent advances in otitis media 2015年

〔図書〕(計 1 件)

吉田尚弘 他、わかりやすいANCA関連血管炎性中耳炎(OMAAV)-早期診断と治療- 全日本病院出版会 2018年、 75

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。