

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20249

研究課題名(和文) サイトカイン・ケモカイン産生制御による中耳炎症性疾患に対する新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Role of cytokines and chemokines in otitis media.

研究代表者

野田 洋平 (Noda, Yohei)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：00587404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性化膿性中耳炎や真珠腫性中耳炎は、難治性の中耳炎であり、難聴などの様々な症状の原因となる。薬物治療をはじめとする保存的治療が行われるが、炎症のコントロールが困難で、手術を行う必要がある症例が存在する。本研究では、炎症の病態において重要なサイトカインやケモカインの産生制御におけるHigh-mobility group box protein 1 (HMGB1)やNLRP3インフラマソームの役割に注目して検討を行い、HMGB1やNLRP3インフラマソームが中耳炎の炎症誘導において重要であることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性中耳炎や真珠腫性中耳炎の患者から病的な中耳組織を採取し、それらを用いて中耳炎の炎症を制御している因子の解析を行った。現時点では、慢性中耳炎や真珠腫性中耳炎を薬物療法で根治させることは困難で、手術が必要となる症例が多く認められるが、本研究を進展させることにより、手術を回避できる新規治療法を開発できる基本的なデータが得られた。手術を受けるには入院が必要となるケースが多く、薬物による外来治療で根治できるようになれば、社会的・経済的な意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome is a critical molecule mediating interleukin-1 (IL-1) responses. High mobility group box 1 (HMGB1) is a DNA-binding nuclear protein. However, the role of the NLRP3 inflammasome and HMGB1 in otitis media has not been fully examined. We examined in this study the expression of NLRP3, ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain and a pyrin domain), caspase-1, and HMGB1 in the middle ear in lipopolysaccharide-induced otitis media. NLRP3, ASC, caspase-1, and HMGB1 were observed in infiltrating inflammatory cells induced by lipopolysaccharide in the middle ear cavity. Lipopolysaccharide induces NLRP3 inflammasome components and HMGB1 in the middle ear. The NLRP3 inflammasome and HMGB1 may play an important role in the pathogenesis of otitis media. Modulation of inflammasome-mediated inflammation may be a novel therapeutic strategy for otitis media.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：中耳炎 炎症 サイトカイン ケモカイン

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

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。その一方で、炎症が慢性化した場合にはグラム陽性菌が起炎菌となることも多い。近年、多数の抗菌薬に対して耐性を持つ多剤耐性菌による慢性化膿性中耳炎症例が増加しており、臨床上的の問題となっている。研究代表者は、今までの研究歴のなかでサイトカインを主な研究テーマにしてきた。その過程で、好酸球性炎症を惹起する卵白アルブミンや好中球性炎症を惹起するエンドトキシンをマクロファージ遊走阻止因子ノックアウトマウスの中耳に投与したところ、中耳における炎症細胞浸潤が野生型マウスと比較して減弱していることを予備実験で確認したが、その機序は未解明である。

好酸球や薬剤耐性菌が関与する慢性中耳炎症例が増加しており、これらは既存の薬剤や外科的治療では対応困難なケースがある。このため、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。これらの学術的および臨床的背景から、中耳におけるマクロファージ遊走阻止因子などのサイトカインの作用機序を網羅的に検討することが、難治性中耳炎の病態解明と新規治療法の開発に必須であると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、サイトカインを中心とした炎症シグナル系に重点を置いた上で、中耳炎における炎症因子を網羅的に解析することである。また、モデルマウスを用いることによって各種の阻害剤や受容体に選択的なアゴニスト・アンタゴニストを用いた検討を行う。

サイトカインは複雑な作用機序をもっており、中耳炎症性疾患における発現と機能は、十分には解明されていない。また、エンドトキシンなどの病原物質を danger signal として認識する過程で重要である Toll 様受容体やインフラマソームが慢性中耳炎の病態形成に与える影響は未解明であり、これらの点も明らかとする。

本研究を行うことによって、サイトカインなどの各種炎症因子が中耳炎症性疾患に与える影響が明らかになると予想される。本研究から得られた知見によって、中耳炎症性疾患に対する新規検査・治療法の開発や創薬展開を目指す。

3. 研究の方法

野生型マウスの中耳腔にエンドトキシン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、化膿性中耳炎のモデルマウスとして用いる。野生型コントロールマウスの中耳腔には生理食塩水を注入する。マウス中耳を生理食塩水で洗浄し、回収された洗浄液をサンプルとして ELISA 解析を行う。マウスの側頭骨を採取して病理切片を作成する。ヘマトキシリン・エオジン染色や、免疫組織学的染色を行い、組織学的な検討を行う。

ヒト真珠腫性中耳炎症例の中耳貯留液や炎症性肉芽、ヒト慢性化膿性中耳炎症例の中耳組織などの臨床検体を採取する。正常コントロールとしては、中耳に炎症を認めない症例で、人工内耳手術を行う際に採取した中耳組織を用いる。臨床検体は治療上の必要性から吸引・除去したものののみを実験に使用し、本研究のために採取を行うことはない。マウスを用いた実験での結果を参考にして、重要と思われる各種サイトカインやケモカインおよびその受容体を選択する。そして、その発現をヒト臨床検体においてリアルタイム PCR 法により遺伝子レベルで検討するとともに、タンパクレベルで免疫組織学的に検討する。

4. 研究成果

炎症の病態において重要であるサイトカインやケモカインの産生制御に関与していると報告されている High-mobility group box protein 1 (HMGB1) や NLRP3 インフラマソームの役割に注目して検討を行った。野生型マウスの中耳腔にエンドトキシン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たところ、中耳洗浄液中の HMGB1 や NLRP3 インフラマソーム濃度の有意な上昇を認めた。また、マウスの側頭骨を採取して組織学的な検討を行った結果、炎症局所に浸潤した炎症細胞を中心に HMGB1 や NLRP3 インフラマソームの発現を認めた。

ヒト真珠腫性中耳炎症例やヒト慢性化膿性中耳炎症例の中耳組織を用いて、PCR 法にて HMGB1 や NLRP3 インフラマソームの発現量を検討したところ、正常コントロール症例と比較して、有意な発現亢進を認めた。また、中耳組織を用いた組織学的な検討を行ったところ、マウスでの検討と同様に、局所に浸潤した炎症細胞を中心に HMGB1 や NLRP3 インフラマソームの発現を認めた。

慢性化膿性中耳炎や真珠腫性中耳炎は、難治性の中耳炎であり、難聴などの様々な症状の原因となる。薬物治療をはじめとする保存的治療が行われるが、炎症のコントロールが困難で、手術を行う必要がある症例が存在する。本研究により、HMGB1 や NLRP3 インフラマソームが中耳炎の炎症誘導において重要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Makihara S, Kariya S, Nougima-Harada M, Ohara N, Naito T, Matsumoto J, Noda Y, Okano M, Yoshino T, Nishizaki K.

Methotrexate-associated lymphoproliferative disorder with multiple pulmonary nodules and bilateral cervical lymphadenopathy.

Auris Nasus Larynx. 2019 Feb 7. pii: S0385-8146(18)30735-1.

doi: 10.1016/j.anl.2019.01.010. [Epub ahead of print]

査読有

Uraguchi K, Kariya S, Makihara S, Oka A, Ueeda H, Noda Y, Nishizaki K.

Dangerous noodle: A case of swallowing syncope and a review of 122 cases from the literature.

J Arrhythm. 2018;35(1):145-148.

doi: 10.1002/joa3.12130.

査読有

Kariya S, Okano M, Zhao P, Maeda Y, Kataoka Y, Higaki T, Noda Y, Makihara S, Nishizaki K.

NLRP3 inflammasome expression in lipopolysaccharide-induced otitis media.

Acta Otolaryngol. 2018;138(12):1061-1065.

doi: 10.1080/00016489.2018.1515499.

査読有

Maeda Y, Kariya S, Omichi R, Noda Y, Sugaya A, Fujimoto S, Nishizaki K.

Targeted PCR Array Analysis of Genes in Innate Immunity and Glucocorticoid Signaling Pathways in Mice Cochleae Following Acoustic Trauma.

Otol Neurotol. 2018;39(7):e593-e600.

doi: 10.1097/MAO.0000000000001874.

査読有

Uraguchi K, Kariya S, Makihara S, Okano M, Haruna T, Oka A, Fujiwara R, Noda Y, Nishizaki K.

Pulmonary function in patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis.

Auris Nasus Larynx. 2018;45(3):476-481.

doi: 10.1016/j.anl.2017.07.020.

査読有

Kariya S, Okano M, Oto T, Higaki T, Haruna T, Noda Y, Nishizaki K.

The impact of chronic rhinosinusitis on long-term survival in lung transplantation recipients.

Acta Otolaryngol. 2017 May;137(5):529-533.

doi: 10.1080/00016489.2016.1247497.

査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：

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：假谷 伸

ローマ字氏名：KARIYA Shin

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。