

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16846

研究課題名(和文) ANCA関連血管炎性中耳炎発症トリガーとなる中耳感染の関与とサイトカインの解析

研究課題名(英文) Middle ear microbial profiling and cytokine analysis in otitis media with ANCA associated vasculitis

研究代表者

立山 香織 (Tateyama, Kaori)

大分大学・医学部・病院特任助教

研究者番号：00771958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ANCA関連血管炎性中耳炎(OMAAV)の発症のトリガーとなりうる細菌やウイルス感染の関与を明らかにし、中耳貯留液中のサイトカインの検討によって、病態に関わる因子について検討した。OMAAV患者と、成人滲出性中耳炎患者の中耳貯留液中の細菌、及びウイルス検出率は低く、両群で検出される細菌像に差を認めなかった。OMAAV発症トリガーとして細菌感染の関与は証明できなかった。OMAAV中耳貯留液中のサイトカインの中では、IL-6濃度が突出して高値であった。OMAAVの中耳貯留液中のサイトカイン濃度を成人滲出性中耳炎群と比較すると、IL-6がOMAAV群において有意に高値であった。

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では、通常の滲出性中耳炎と比し局所のIL-6の増加を認めた。炎症性自己免疫疾患では、IL-6の過剰産生によって、炎症局所における血管透過性亢進による炎症性浮腫などの多彩な病態が形成されることが知られている。中耳貯留液中のIL-6の存在は炎症性病変の遷延、慢性化や急性増悪に関わる因子の可能性があり、治療標的分子の一つとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the involvement of bacterial and viral infections, which are considered to trigger the onset of otitis media with ANCA associated vasculitis (OMAAV). As a result, the occurrence of bacterial and viral pathogens in middle ear fluids did not significantly differ between patients suffering from OMAAV and adult otitis media. We also examined the cytokines in the middle ear fluid to identify the important factors involved in OMAAV pathogenesis. The cytokine concentration in the middle ear fluid was compared between the OMAAV and adult otitis media. IL-6 was significantly higher in the OMAAV group. Our study suggested that the presence of IL-6 in the middle ear fluid may be an important factor involved in the prolongation, chronic progression or acute exacerbation of inflammation and may be one of the therapeutic target molecules.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：ANCA関連血管炎 ANCA関連血管炎性中耳炎 中耳貯留液 サイトカイン 抗moesin抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody)関連血管炎性中耳炎は、自己免疫を機序とする難治性中耳炎である。主に proteinase3 (PR3)、myeloperoxidase(MPO)が主要抗原となり、病態と関わっていることが分かっているが、疾患発症のメカニズムや、中耳における病態は未だ不明な点が多い。我々は、全国から協力を得て血清や中耳貯留液を集積し、本疾患の臨床研究を中心に行なっている。本研究では、疾患発症のトリガーとなると言われている細菌やウイルス感染の関与を明らかにし、中耳貯留液中のサイトカインの解析によって、病態に関わる因子について検討した。

2. 研究の目的

本研究では、疾患発症のトリガーとなると言われている細菌やウイルス感染の関与を明らかにし、中耳貯留液中のサイトカインの解析によって、病態に関わる因子について検討した。

研究目的は、(1) 中耳貯留液の細菌及びウイルスを RT-PCR にて解析すること、(2) 患者血清および中耳貯留液中の炎症性サイトカインの解析を行うことである。本研究によって、ANCA 関連血管炎性中耳炎のメカニズムを明らかにし、早期診断に役立つ中耳貯留液中の疾患特異的マーカーの開発から中耳をターゲットとした治療介入へ繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ANCA 関連血管炎性中耳炎のトリガーとなる細菌やウイルスの関与について

・中耳貯留液は遠心分離にて、上清と沈渣に分離し、-80 度に保存する。

・中耳貯留液沈渣より RNA を抽出し、上気道感染の原因となる主な細菌 6 種類と黄色ブドウ球菌、ウイルス 11 種類について RT-PCR 法を用いて解析した。解析した細菌とウイルスと使用した PCR kit は以下の通りである (Table1)。

| | | |
|-----------------|--|---|
| Bacteria | <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenza</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> | Cycleave PCR for respiratory tract infection causative bacteria detection kit |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | Cycleave PCR for S. aureus detection kit |
| | <i>Moraxella catarrhalis</i> | M. Catarrhalis probe, primer |
| Viruses | <i>Human respiratory syncytial virus A, B</i> <i>Human parainfluenza virus 1, 2, 3</i> <i>Human metapneumovirus</i> <i>Influenza virus A, B</i> <i>Human adenovirus</i> <i>Human bocavirus</i> <i>Human rhinovirus</i> | Cycleave PCR for respiratory tract infection causative viruses detection kit |

Table 1 PCR にて解析した細菌、ウイルス

(2) 炎症局所での、血管炎進展に関わる免疫応答の検討

中耳貯留液及び血清中のサイトカインの検討

ANCA 関連血管炎性中耳炎(OMAAV)の病態に関わるサイトカイン動体について調べるため、OMAAV 患者及びコントロールとして通常の成人滲出性中耳炎患者より回収した中耳貯留液及び血清中のサイトカイン濃度について比較検討した。IL-18、IL-2、IL-6、IL-12、IL-17、IFN- γ 、TNF- α について Bio-Plex Human cytokine assay を用いて解析した。

OMAAV 患者の血清中抗 moesin 抗体の存在について

MPO-ANCA 陽性血管炎患者に抗 moesin 抗体が存在することが報告されている。ANCA 関連血管炎性中耳炎患者でも同様の結果が認められるかどうか、血清を用いて検討した。MPO-ANCA 陽性患者 10 例、PR3-ANCA5 例、両 ANCA 陰性 15 例の血清について ELISA を用いて比較した。

4. 研究成果

(1) ANCA 関連血管炎性中耳炎のトリガーとなる細菌やウイルスの関与について
ANCA 関連血管炎性中耳炎患者と、成人滲出性中耳炎患者の中耳貯留液中の細菌、及びウイルス検出率は低く、検出される細菌像にも差はなかった。 ANCA 関連血管炎性中耳炎の発症トリガーとして細菌感染の関与は証明できなかった (Fig1)。

ANCA 関連血管炎の発症には環境、遺伝子、細菌感染といった要因が複合的に関与していると考えられ、しばしば上気道が初発臓器となることから、上気道粘膜への細菌感染がトリガーとなることが推察されている。しかし、OMAAV でも OMAAV 以外の成人滲出性中耳炎であっても、培養で検出される細菌は少数であり、PCR にて検出される細菌像にも両群で差はなかった。

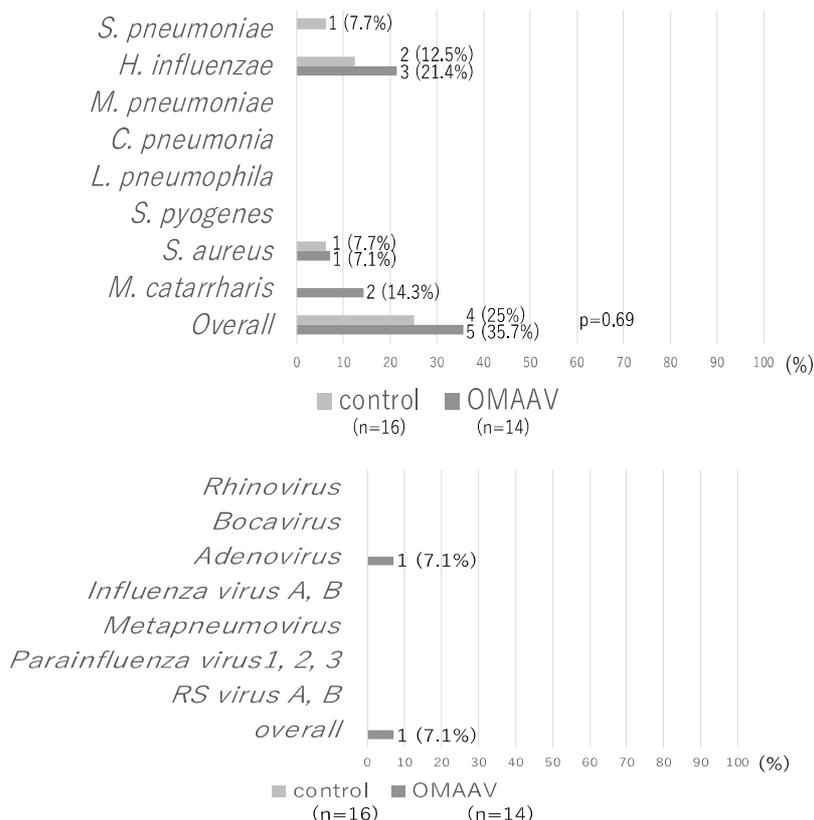


Fig. 1 中耳貯留液中の細菌及びウイルスの解析

(2) 炎症局所での、血管炎進展に関わる免疫応答の検討

中耳貯留液及び血清中のサイトカインの検討

対象は OMAAV 群 11 例 (年齢中央値 70 歳、女性比率 64%、血清 PR3-ANCA 陽性 5 例、MPO-ANCA 陽性 6 例) control 群として成人滲出性中耳炎 12 例 (年齢中央値 73 歳、女性比率 58%) であった。中耳貯留液の性状は OMAAV 群で (serous 9 例/muroid 2 例)、control 群で (serous 10 例/muroid 2 例) であった。

中耳貯留液中のサイトカイン濃度を両群で比較すると、IL-6 が OMAAV 群において有意に高値であった (OMAAV : 平均 57.5 ± 64.5 ng/ml、control : 7.2 ± 9.2 ng/ml、 $p=0.03$)。その他のサイトカインは両群で有意差を認めなかった (Table 2)。

| | OMAAV n=11 | control n=12 | p value |
|---------------|---------------|-----------------|---------|
| IL-1 β | 0.35 | 0.29 | 0.8 |
| IL-2 | 0.18 | 0.19 | 0.6 |
| IL-6 | 57.53 | 7.08 | 0.03 |
| IL-12 | 0.15 | 0.15 | 0.89 |
| IL-17 | 0.66 | 0.63 | 0.58 |
| IFN- γ | 0.57 | 0.55 | 0.5 |
| TNF- α | 0.4 | 0.22 | 0.13 |

Table2. 中耳貯留液中のサイトカイン

OMAAV 中耳貯留液中のサイトカインの中では、IL-6 濃度が突出して高値であった。また、OMAAV 群の中で、MPO-ANCA 陽性群と、PR3-ANCA 陽性群に分けて比較すると、MPO-ANCA

陽性群で TNF- α が高い傾向にあった (MPO : 平均 0.6 ± 0.4 ng/ml、 PR3 : 平均 0.2 ± 0.1 ng/ml、 $p=0.08$)。

OMAAV では、通常の滲出性中耳炎と比し局所の IL-6 の増加を認めた。炎症性自己免疫疾患では、IL-6 の過剰産生によって、炎症局所における血管透過性亢進による炎症性浮腫などの多彩な病態が形成されることが知られている。中耳貯留液中の IL-6 の存在は炎症性病変の遷延、慢性化や急性増悪に関わる因子の可能性があり、治療標的分子の一つとなる可能性が示唆された。

OMAAV 患者の血清中抗 moesin 抗体の存在について

OMAAV 患者の血清 30 例 (MPO-ANCA 陽性 10 例、 PR3-ANCA 5 例、 両 ANCA 陰性 15 例) の抗 moesin 抗体の平均値は、 MPO 群で 258 ± 445 EU/ml、 PR3 群で 636 ± 697 EU/ml、 両 ANCA 陰性群で 306 ± 288 EU/ml であり、 両群間で有意差はなかったが PR3 陽性患者でより高値であった。また、抗 moesin 抗体は ANCA 陰性例でも確認され、病態に影響を与えている可能性が示唆された。今後、正常コントロールや他疾患でも検出されるかどうか、検討する必要がある。

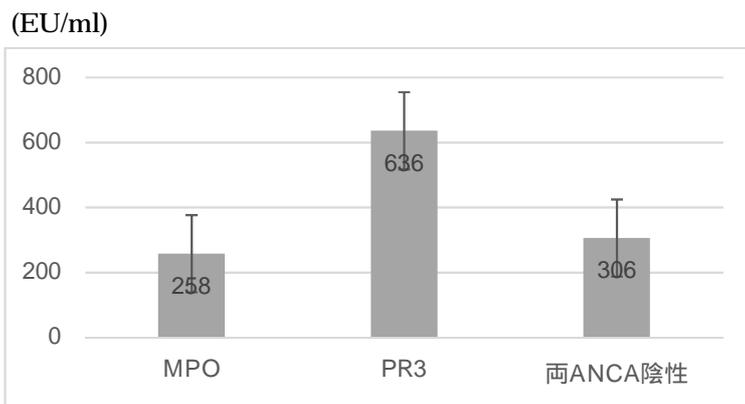


Fig. 2. OMAAV 患者血清中の抗 moesin 抗体

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 立山 香織, 児玉 悟, 渡辺 哲生, 平野 隆, 川野 利明, 梅本 真吾, 鈴木 正志 | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 ANCA関連血管炎性中耳炎の寛解導入治療後の聴力経過 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Otolology Japan | 6. 最初と最後の頁 19-24 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11289/otoljpn.28.19 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 立山香織 | 4. 巻 217 |
| 2. 論文標題 ANCA関連血管炎性中耳炎と肥厚性硬膜炎 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 ENTONI | 6. 最初と最後の頁 47-51 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 立山香織 | 4. 巻 90 |
| 2. 論文標題 耳領域 急性中耳炎だと思っていたらANCA関連血管炎性中耳炎(OMAAV)だった! | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 | 6. 最初と最後の頁 996-999 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1411201862 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 立山 香織, 児玉 悟, 渡辺 哲生, 平野 隆, 川野 利明, 梅本 真吾, 鈴木 正志 |
| 2. 発表標題 ANCA関連血管炎性中耳炎の寛解導入治療後の聴力経過 |
| 3. 学会等名 日本耳科学会(招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kaori Tateyama, Toshiaki Kawano, Takashi Hirano, Kan Kishibe, Masahiro Okada, Yumi Ohta, Hideto Fukui, Yasuaki Harabuchi, Masashi Suzuki |
| 2. 発表標題 Does bacterial or viral infection play a role in the pathogenesis of otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis ? |
| 3. 学会等名 The 19th International Vasculitis and ANCA Workshop (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|