

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18719

研究課題名（和文）モデル動物による好酸球性中耳炎の内耳病態解明

研究課題名（英文）Investigation for inner ear pathology of eosinophilic otitis media with animal model

研究代表者

工藤 直美（Kudo, Naomi）

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30770143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：好酸球性中耳炎は難治性であり、約6%の症例が不可逆的な内耳性難聴をきたす。その病態解明は重要であるが、本疾患の患者の中耳や内耳を直接観察することは困難である。われわれは、本疾患のモデル動物を作成し、その中耳・内耳標本を用いた研究を継続している。その研究を通じて、上皮性サイトカインであるTSLPや樹状細胞、マクロファージなどの自然免疫系における種々の因子が本疾患に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気管支喘息などのアレルギー疾患では、アレルゲンの侵入に対して上皮性サイトカインであるTSLPが産生され、その刺激を受けた樹状細胞が好酸球性炎症を引き起こすことが知られていた。本疾患のモデル動物を用いて検討したところ、モデル動物の中耳粘膜においてTSLPや樹状細胞が検出され、その関与が示唆された。またこれらの因子は鼻腔後方の上咽頭に通じる耳管周囲に多く見られたことから、耳管を介したアレルゲンの侵入が発症に関与している可能性も示唆された。このことから喘息や好酸球性副鼻腔炎などの気道炎症の症状をコントロールし、炎症を抑制することが本疾患の発症予防につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Eosinophilic otitis media is intractable disease, and 6% of patients develop irreversible sensorineural hearing loss. Although investigation for the pathology is important, it is impossible to observe middle ear and inner ear of the patients. In the present study, animal model was conducted and used for the experimental study such as immunohistology. Through the study, involvement of TSLP, one of epithelial derived cytokines, dendritic cells and macrophages was revealed in the pathophysiology of eosinophilic otitis media.

研究分野：アレルギー

キーワード：好酸球性中耳炎 上皮性サイトカイン 樹状細胞 自然免疫 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

好酸球性中耳炎は1992年に「気管支喘息患者に合併する難治性中耳炎」として初めて報告された。本疾患の問題点は従来の抗菌治療、抗炎症治療に抵抗性であること、また中耳炎でありながら不可逆的な内耳性難聴を引き起こすという点である。また、患者のおよそ半数に内耳性難聴を示す骨導の低下が見られ、6%が重度難聴(聾)に至ることがわかっている。内耳性難聴が従来の慢性中耳炎の10倍もの速度で進行するとする報告もある。これらは患者のQOLを著しく阻害する重大な問題である。

これまで患者の中耳から採取した肉芽や貯留液を用いて、炎症に関与する因子を同定した研究が行われており、気管支喘息と共通する好酸球性炎症が主たる病態であることが徐々に明らかとなっている。その一方で中耳炎から内耳障害に至るメカニズムに着目した研究はまれである。これは患者の内耳を採取して研究することが不可能であるためと考えられる。申請者の所属する研究室では、好酸球性中耳炎モデル動物の作成に世界に先駆けて成功しており、その織標本による形態学的研究を継続してきた(文献1)。申請者はCCRリガンドであるエオタキシン3やRANTESを産生する細胞が中耳粘膜において増加することを実証した。その後の関連する研究ではアレルギー反応の初期に産生される上皮性サイトカインであるTSLPも、モデル動物の中耳粘膜においてその発現が増加することを証明した(文献2、3)。また、モデル動物の内耳の形態学的な研究により、炎症の期間が長くなるほどコルチ器の破壊など、内耳の形態学的な変化が顕著になることも明らかとなっている(文献4)。

現在のモデル動物作成はモルモットを用いている。マウスに比べてサイズが大きいため実験操作がしやすいこと、マウスよりも体が強く、長期の抗原刺激に適していることなどが主な理由である。具体的には卵白アルブミン(OVA)を腹腔内に投与して全身感作させ、その後中耳腔内に一定期間(7日~28日間)OVAを連続投与するという方法である。しかし、今後さらに広範囲に詳細な検討を行っていく上で、本疾患のモデルマウスを作成することが望ましいと考えられる。また、長期間にわたって連日鼓膜を穿刺してOVAを投与するため、最終的に鼓膜が欠損し、聴覚評価ができないことも解決すべき課題である。

2. 研究の目的

本研究の核心となる問いは「中耳の炎症がどのように内耳性難聴を進行させるのか」である。実臨床では、適切な治療を開始されるまでの期間が長い症例で内耳性難聴をきたす傾向が強いことから、内耳障害を引き起こす原因の一つとして、中耳における炎症が遷延化する、治療抵抗性、難治性の病態が重要ではないかと考えている。動物モデルの中耳、内耳を含む側頭骨標本に対して、免疫組織学的な検討を行い、本疾患の病態解明を行う。特に、近年ではTSLP、樹状細胞、自然リンパ球などの自然免疫系の関与が気管支喘息などのアレルギー疾患において報告されており、好酸球性中耳炎における自然免疫系の関与に着目した研究が必要であると考えられる。また、好酸球性副鼻腔炎の難治化にマクロファージが関与しているとする報告もなされており、動物モデルによるマクロファージの検討も必要と考えている。

また、現在用いている卵白アルブミンを用いたモデルではなく、より生理的状态に近いモデル動物を作成すること、作成方法の簡略化を図り、聴覚の評価が可能なモデル動物を作成すること、マウスを用いたモデル作成を行うことも本研究の目的である。好酸球性中耳炎の発症には、鼻腔など上気道の抗原が耳管を通して中耳腔に侵入し、抗原に含まれるプロテアーゼ刺激による反応が関与している可能性がある。本研究では好酸球性炎症を促進する因子であるLipopolysaccharide (LPS)、IL-33などの前投与も行いながら中耳腔へのプロテアーゼ刺激を行い、より生理的状态に近いモデル動物の作成を目指す。モデル動物作成法の簡易化により、好酸球性中耳炎モデルマウスの作成も可能となると考えられる。

3. 研究の方法

モデル動物の作成は卵白アルブミン(OVA)をモルモットの腹腔内に投与して全身感作させた後、中耳腔内に一定期間(7日、14日間、28日間)、経鼓膜的にOVAを連日投与して作成した。一定期間の中耳腔刺激の最終日に側頭骨標本を採取、固定したものをを用いた。

(1) TSLPと樹状細胞の関与

抗TSLP抗体、抗TSLP受容体抗体、樹状細胞の表面マーカーに対する抗CD11c抗体を用いて、その分布と染色強度を検討した。また、抗TSLP抗体と抗CD11c抗体を共発現する細胞を検出するために二重蛍光免疫染色を行った。

(2) 新規モデル動物の作成

プロテアーゼの一種であるパピンを経鼓膜的に中耳腔に投与する。day0,1,2,7,8,9,10,11にプロテアーゼ投与を行い、中耳粘膜や中耳貯留液の好酸球浸潤について検討を行う。また、IL-2、IL-33などの前投薬を行うことにより変化が生じるかどうかも検討する。

(3) マクロファージの検討

患者から採取した鼓室内肉芽の標本を用いて、マクロファージのマーカーであるCD68とCCL18

の免疫染色を行う。CCL18 は M2 マクロファージのマーカーとして知られ、アレルギー疾患においてその病態に関与していると考えられている。また免疫染色の結果と骨導聴力低下の有無についても検討する。モデル動物においては CD68 を免疫染色により検討した。

4 . 研究成果

(1) TSLP と樹状細胞の関与

モデル動物の中耳粘膜上皮では TSLP 陽性となる細胞が検出され、粘膜下組織には TSLP 受容体や CD11c 陽性となる細胞が検出された。二重蛍光免疫染色では中耳粘膜下に TSLP 受容体と CD11c を共発現する細胞も見いだされ、TSLP の刺激を受ける樹状細胞が本疾患においても関与していることが示唆された。

また、これらの細胞の分布を検討すると、中耳内でも特に耳管周囲の粘膜に多数観察される傾向がみられた。抗原刺激に対する TSLP 産生はアレルギー反応の初期に起こるものと考えられており、上記の結果は本疾患が鼻腔などの上気道から経耳管的に侵入した抗原により引き起こされるという発症メカニズムを持っている可能性をも示唆する所見と考えられた。

(2) 新規動物モデルの作成

また予備実験の段階であるが、パパインの刺激後にモルモットの中耳貯留液内に好酸球浸潤を認めている。中耳粘膜にも好酸球浸潤を認めており、プロテアーゼ刺激によるモデル動物の作成は実現可能であると思われる。今後は投与期間の短縮、前投薬した場合との好酸球浸潤の程度などについても検討を行い、その結果を論文として投稿する予定である。

(3) マクロファージの検討

鼓室内肉芽の検討からは、M1 マクロファージの発現が優位である群と M2 マクロファージの発現が優位である群にわかれた。興味深いことに、M2 マクロファージの発現が優位な群において骨導聴力の低下を示す患者が多かった。このことから M2 マクロファージが内耳性難聴に関与している可能性が示唆された。モデル動物の検討においても CD68 陽性のマクロファージが観察されている。これらの結果は第 1 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会にて学会発表を行った。さらなる検討を行い、論文化する予定である。

文献

1. Nishizawa H, Matsubara A, et. al. The role of periostin in eosinophilic otitis media. *Acta Otolaryngol* 2012; 132: 838-844
2. Kudo N, Matsubara A, Nishizawa H, et al. Immunohistological analysis of eotaxin and RANTES in the model animal of eosinophilic otitis media. *Acta Otolaryngol*. 2016;137:476-481.
3. Miura T, Matsubara A, Kudo N, et al. The expression of thymic stromal lymphopoietin in patients and animal models with eosinophilic otitis media, *Acta Otolaryngol*. 2018;138(5):447-451
4. Matsubara A, Nishizawa H, et. al. An experimental study of inner ear injury in an animal model of eosinophilic otitis media, *Acta Otolaryngol* 2014; 134: 227-232

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Hara Ryutaro, Kudo Naomi, Suzuki Satoshi, Miura Tomoya, Matsubara Atsushi	4. 巻 10
2. 論文標題 CD11c(+) dendritic cells coexpressing thymic stromal lymphopoietin receptor in animal model of eosinophilic otitis media	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asia Pacific Allergy	6. 最初と最後の頁 e41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5415/apallergy.2020.10.e41	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 工藤 直美
2. 発表標題 好酸球性中耳炎の病態
3. 学会等名 第38回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原 隆太郎、工藤 直美、鈴木 哲史、三浦 智也、松原 篤
2. 発表標題 好酸球性中耳炎モデルにおけるCD11c陽性樹状細胞
3. 学会等名 第37回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryutaro Hara, Naomi Kudoh, Satoshi Suzuki, Tomoya Miura, Atsushi Matsubara
2. 発表標題 Immunohistological analysis of myeloid dendritic cell in the model animals of eosinophilic otitis media
3. 学会等名 15th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤 直美 他
2. 発表標題 好酸球性中耳炎におけるCD68とCCL18の免疫組織学的検討
3. 学会等名 第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 哲史、工藤 直美 他
2. 発表標題 好酸球性副鼻腔炎診断筋非該当例の病態に関する免疫組織学的検討
3. 学会等名 第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 松原 篤、高畑淳子、工藤直美、原 隆太郎、工藤玲子、前田泰則、山内一崇、鈴木哲史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 アレルギーの臨床	

1. 著者名 工藤 直美	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 アレルギーの臨床	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------