

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09744

研究課題名（和文）ANCA関連血管炎性中耳炎における好中球細胞外トラップの役割と臨床応用

研究課題名（英文）The analysis for clinical utility and role of the myeloperoxidase-deoxyribonucleic acid complex in otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis

研究代表者

森田 真也（Morita, Shinya）

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：80443951

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）：本研究では、免疫蛍光染色にてANCA関連血管炎性中耳炎（OMAAV）患者の全ての中耳貯留液において、好中球細胞外トラップ（NETs）陽性細胞を確認できた。また全身型OMAAV患者と同様に、中耳限局型OMAAV患者の中耳貯留液におけるNETs発現量の上昇が示された。中耳腔におけるNETsの形成は、OMAAVの病態に関して重要な役割を果たすことが示唆される。特に、ANCA陽性例だけでなく陰性例においても、中耳貯留液におけるNETs発現量は上昇していた。中耳貯留液におけるNETs発現量を定量化することは、OMAAVを診断する上で有用性が高く、治療戦略構築に向けて意義深いものになると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ANCA関連血管炎症候群の初期段階として、中耳炎のみを呈している段階での治療が臨床的には重要であるにも関わらず、その診断に難渋するために実際には治療が遅れるケースが珍しくない。本研究にて、中耳腔における好中球細胞外トラップ（NETs）の形成はANCA関連血管炎性中耳炎（OMAAV）の病態に関与し、中耳貯留液におけるNETs発現量を定量化することは、OMAAVを診断する上で有用性が高いことが示唆された。OMAAVに対する早期診断や治療のモニタリングの指標として用いることで、死亡率低減、難聴悪化の防止などANCA関連血管炎症候群全体の克服に向けたアプローチが可能になるという意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：This analysis revealed that neutrophil extracellular traps (NETs) formation was identified in all patients with otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis (OMAAV). The levels of NETs in the middle ear fluid from patients with systemic as well as localized forms of OMAAV were elevated in comparison to those in the middle ear fluid from patients with otitis media with effusion. Excessive formation of NETs has been suggested to be involved in the pathogenesis of OMAAV. It is noteworthy that the levels of NETs were elevated regardless of serum ANCA status. Therefore, the detection and quantification of NETs in the otitis media fluid may aid in providing a definite diagnosis of OMAAV.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：ANCA関連血管炎性中耳炎 好中球細胞外トラップ バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

抗好中球細胞質抗体 (antineutrophil cytoplasmic antibody; ANCA) 関連血管炎症候群は、腎臓・肺・神経・皮膚・眼などに多彩な症状を引き起こす難治性の致死的な全身性疾患であり、多発血管炎性肉芽腫症 (granulomatosis with polyangiitis; GPA)、顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis; MPA)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis; EGPA) などの疾患が含まれる。ANCA 関連血管炎症候群は上気道感染を契機に発症することが知られており、比較的高い頻度で耳鼻咽喉科領域の臨床症状を呈する。このうち ANCA 関連血管炎性中耳炎 (otitis media with ANCA associated vasculitis; OMAAV) は、難聴の進行のみならず急速な全身型への移行をきたして致死的な状態になる難治性中耳炎で、早期の診断確定と治療開始が望まれる。しかし、血液学的検査で ANCA 陰性を示す例や病理組織学的検査で特徴的な血管炎像を認めない例も多く、確定診断に至るまでに時間を要する。特に中耳限局型の OMAAV では、初診時に他の要因で引き起こされる滲出性中耳炎 (otitis media with effusion; OME) と鑑別することは容易ではない。

2004 年に Brinkmann らは、NETosis と呼ばれる特殊な細胞死を起こした好中球から放出される好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps; NETs) を報告した。NETs の内部には、核酸やヒストンとともに ANCA の主たる対応抗原である proteinase 3 (PR3) や myeloperoxidase (MPO) など約 20 種類の細胞質内酵素が含まれ、ANCA 産生と血管炎の発症に重要な役割を果たすことが示唆されている。現在までに、腎臓・肺・神経・皮膚など血管炎の存在部位に NETs が局在することが報告されており、血管炎の活動性にも関与していることが示唆されている。一方、耳鼻咽喉科領域は ANCA 関連血管炎症候群の主たる標的となる部位であるにも関わらず、NETs の局在に関して解析した報告は見られない。そのため、OMAAV の病態であると推測される NETs がどこでどのように産生されるのか不明で、真に ANCA 関連血管炎症候群から引き起こされている中耳病変なのかについては未だに解明されていない。ANCA 関連血管炎症候群の発症に先行する上気道感染、つまり持続的な細菌暴露を受けている中耳腔での NETs の存在を確認および役割を解明することは意義深い。さらに、NETs が OMAAV の確定診断や疾患活動性を評価する有用なバイオマーカーになることが確認できれば、その臨床応用によって既存の血液学的検査や病理組織学的検査と同様な客観的検査となるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OMAAV 患者の臨床検体 (中耳貯留液) を用いて NETs の存在を確認し、中耳腔における NETs 発現量と臨床的側面との関連性を明らかにし、新しい診断バイオマーカーとして測定することの有用性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 対象患者の選択基準

当施設で治療した OMAAV 患者を対象として、OME 患者と比較した。OMAAV は日本耳科学会の全国調査ワーキンググループが作成した診断基準 (案) に基づいて診断した。OME は中耳において急性感染症の所見や症状が無い状態で中耳腔に貯留液が存在するものと定義した。以下の項目

~ に該当する患者は除外した。()後述する MPO-DNA 複合体を定量的に測定できない 0.1ml 未満の試料、()他の耳科学的疾患の既往を持つ患者、()NETs の関与が報告されている悪性腫瘍、糖尿病、深部静脈血栓症、虚血性心疾患、虚血性脳血管障害、Cogan 症候群、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、IgG4 関連疾患、サルコイドーシス、大動脈炎症候群などの疾患を既往に持つ患者。

本研究に適格と判断された患者の臨床情報と中耳貯留液における MPO-DNA 複合体レベル値を解析に用いた。本研究を実施する上で、全ての患者から試料と臨床データの使用に関して文書による同意を得た。また本研究は、「ヘルシンキ宣言」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号)」および「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について(厚生科学審議会答申)」を遵守し、当施設の自主臨床研究委員会(生 021-0230)の審査を受け承認を得ている。

(2) 免疫蛍光染色

本研究では、好中球から伸展する紐状または網状の細胞外 DNA およびシトルリン化ヒストン H3 (Cit-H3) と MPO の共局在化を NETs 陽性細胞と定義した。中耳貯留液をサンプルとしてスライドガラス上に塗布し、4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した。リン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline; PBS)で洗浄した後に、一次抗体として MPO マウスモノクローナル抗体および Cit-H3 マウスモノクローナル抗体を 60 分間インキュベートした。Alexa Fluor 蛍光標識二次抗体を使用して 60 分間インキュベートした後、標本を PBS で洗浄し、DNA を 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩で 5 分間染色した。標本は、共焦点レーザー走査型顕微鏡を使用して分析した。

(3) 中耳貯留液における NETs 測定

本研究では、中耳貯留液を試料として MPO-DNA 複合体を ELISA(enzyme-linked immuno sorbent assay)法にて測定し、NETs 発現量とした。試料を 1500rpm で 5 分間遠心分離し、測定を行うまで上清を -80 で凍結保存した。MPO マウスモノクローナル抗体を 96 穴マイクロプレート上に吸着させ、1%ウシ血清アルブミンを用いてブロッキングした。試料を細胞死検出キット(Cell Death Detection ELISA kit)とともに 96 穴マイクロプレート上に添加して反応させた。PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ基質を用いて発色させ、マイクロプレートリーダーを用いて、405nm で吸光度を測定した。

(4) 統計学的解析法

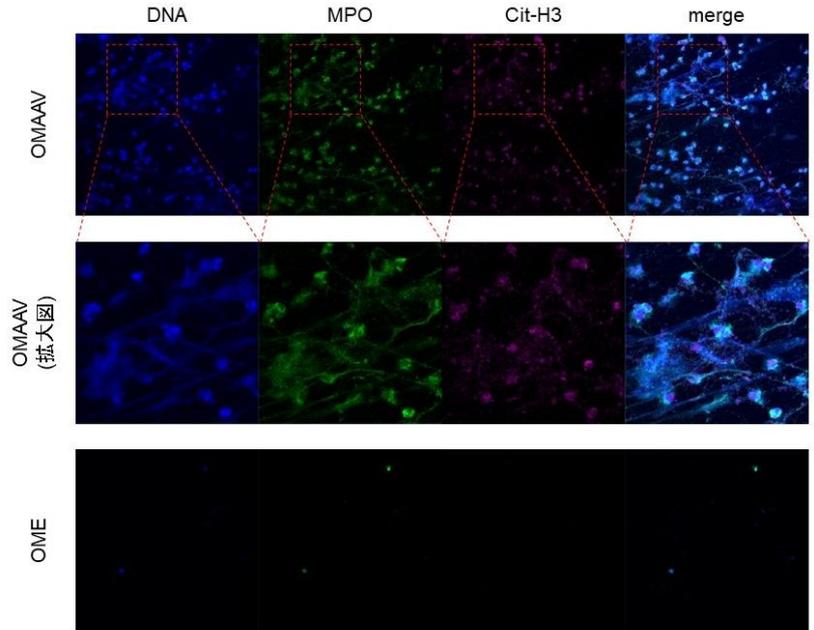
GraphPad Prism ソフトウェア(version 6.0; GraphPad Software)を用いて統計学的解析を行った。独立した 2 群間の差の比較には Mann-Whitney U 検定、独立した 3 群間以上の差の比較には Kruskal-Wallis 検定および一元配置分散分析を用いて検定を行った。 p 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意であると判定した。ROC 曲線を用いて決定された MPO-DNA 複合体の発現量のカットオフ値に基づき、感度、特異度を算出した。

4. 研究成果

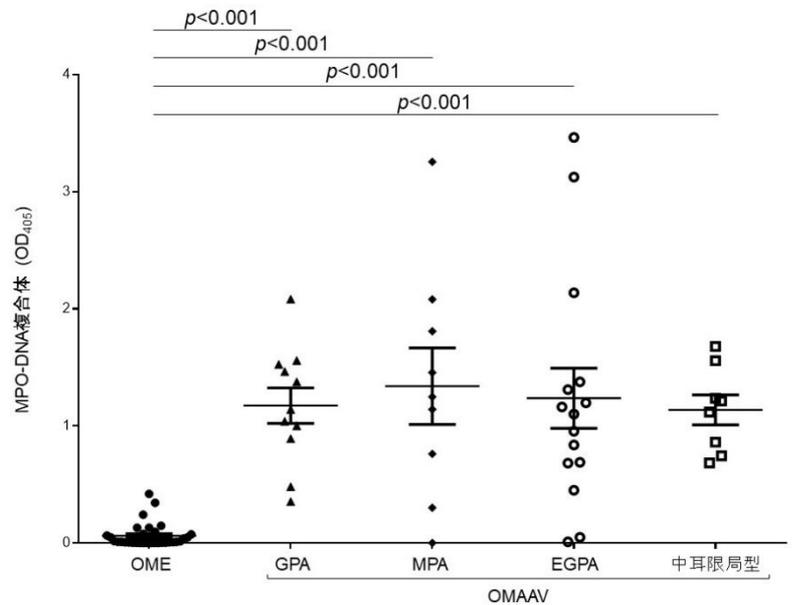
OMAAV 患者は男性 14 例、女性 29 例、年齢は 27~84 歳(中央値 66 歳)であった。OME 患者は男性 14 例、女性 18 例、年齢は 21~82 歳(中央値 65 歳)であった。年齢と性別の分布に

関して、OMAAV 患者と OME 患者の間で有意差を認めなかった。OMAAV 患者の疾患カテゴリー別の内訳は、全身型 OMAAV 35 例 (GPA 11 例、MPA 9 例、EGPA 15 例)、中耳限局型 OMAAV 8 例であった。血液学的検査による ANCA 測定結果については、MPO-ANCA 陽性が 18 例、PR3-ANCA 陽性が 5 例、両者の ANCA 陰性が 20 例であった。

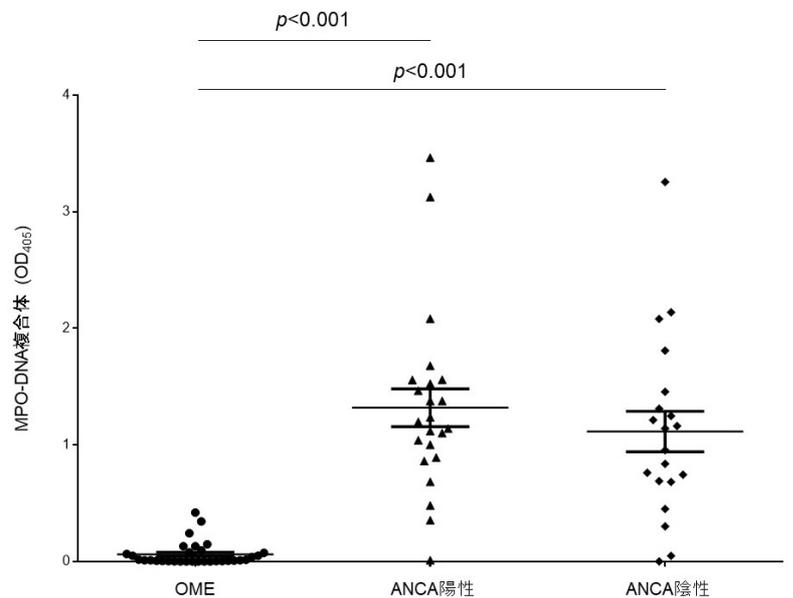
免疫蛍光染色の結果を右図 1 に示す。OMAAV 患者全例の中耳貯留液より、NETs 陽性細胞を確認できた。一方、OME 患者の中耳貯留液からは NETs 陽性細胞は確認できなかった。



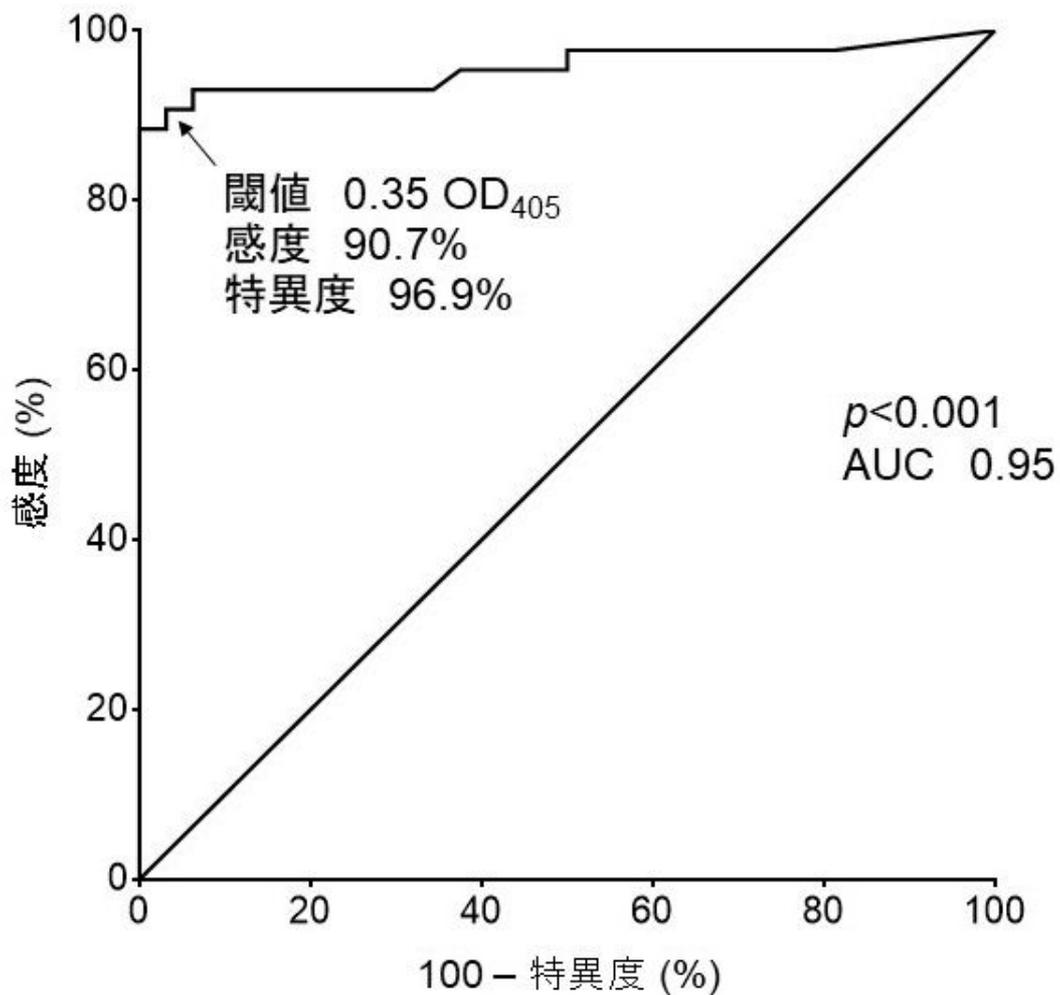
次に、ELISA 法にて測定された中耳貯留液中の MPO-DNA 複合体の発現量を右図 2 に示す。中耳貯留液における MPO-DNA 複合体発現量は、OMAAV 患者では 0.01 ~ 3.46 OD₄₀₅ (中央値 1.14 OD₄₀₅)、OME 患者では 0.01 ~ 0.42 OD₄₀₅ (中央値 0.02 OD₄₀₅) であり、OMAAV 患者で有意に高値を示した。特に全身型 (GPA、MPA、EGPA) と中耳限局型に区分すると、全身型 OMAAV 患者および中耳限局型 OMAAV 患者における MPO-DNA 複合体の発現量は、それぞれ OME 患者と比較して有意に高値を示した。



OMAAV 患者を ANCA 陽性例と陰性例 (右図 3) に分けて検討した。ANCA 陽性・陰性に関わらず、中耳貯留液における MPO-DNA 複合体の発現量は、それぞれ OME 患者と比較して有意に高値を示した。



ROC 曲線を用いて最適な MPO-DNA 複合体レベルのカットオフ値を決定した(図 4)。カットオフ値を 0.35 OD₄₀₅ に設定すると、感度 90.7%、特異度 96.9%を示した。



<総括>

本研究結果では、免疫蛍光染色にて OMAAV 患者の全ての中耳貯留液において、NETs 陽性細胞を確認できた。また全身型 (GPA、MPA、EGPA) OMAAV 患者と同様に、中耳限局型 OMAAV 患者の中耳貯留液における NETs (MPO-DNA 複合体) 発現量の上昇が示された。中耳腔における NETs の形成は、OMAAV の病態に関して重要な役割を果たすことが示唆される。特に、ANCA 陽性例だけでなく陰性例においても、中耳貯留液における NETs (MPO-DNA 複合体) 発現量は上昇していた。中耳貯留液における NETs (MPO-DNA 複合体) 発現量を定量化することは、OMAAV を診断する上で有用性が高く、治療戦略構築に向けて非常に意義深いものになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 森田 真也、中丸 裕爾	4. 巻 76
2. 論文標題 ANCA関連血管炎性中耳炎の診断と治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 1-5
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 Morita Shinya, Nakamaru Yuji, Fukuda Atsushi, Fujiwara Keishi, Suzuki Masanobu, Hoshino Kimiko, Honma Aya, Homma Akihiro	4. 巻 43
2. 論文標題 The Quantification of Extracellular Trap Cell Death-Derived Products as Diagnostic Biomarkers for Otitis Media With Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis and Eosinophilic Otitis Media	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 e337 ~ e343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MAO.0000000000003431	査読の有無 有
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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 森田 真也、中丸 裕爾、干野 季美子、福田 篤、本間 明宏
2. 発表標題 ANCA関連血管炎性中耳炎におけるNETosis解析
3. 学会等名 第32回 日本耳科学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Morita Shinya, Nakamaru Yuji, Fukuda Atsushi, Fujiwara Keishi, Homma Akihiro
2. 発表標題 The diagnostic utility of extracellular trap cell death-derived products as biomarkers for otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis
3. 学会等名 6th Congress of European ORL-HNS（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Morita Shinya, Nakamaru Yuji, Fukuda Atsushi, Homma Akihiro
2. 発表標題 The diagnostic utility of extracellular trap cell death-derived products as biomarkers for otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis
3. 学会等名 15th Asia Oceania ORL-HNS CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森田 真也、中丸 裕爾、干野 季美子、福田 篤、本間 明宏
2. 発表標題 ANCA関連血管炎性中耳炎におけるNETosis検出法の比較
3. 学会等名 第122回 日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田 真也、中丸 裕爾、干野 季美子、福田 篤、本間 明宏
2. 発表標題 ANCA関連血管炎性中耳炎におけるELISA法によるNETs測定 of 検討
3. 学会等名 第31回 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinya Morita, Yuji Nakamaru, Atsushi Fukuda, Kimiko Hoshino, Keishi Fujiwara, Kan Kishibe, Naohiro Yoshida, Akihiro Homma
2. 発表標題 The diagnostic utility of extracellular trap cell death-derived products as biomarkers for OMAAV
3. 学会等名 7th East Asian Symposium on Otology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 真也
2. 発表標題 ANCA関連血管炎性中耳炎における好中球細胞外トラップ測定と臨床応用
3. 学会等名 第30回 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------