

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月8日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010年～2012年

課題番号：22591885

研究課題名（和文）インフルエンザ菌の感染性免疫寛容に伴う慢性炎症化機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of infectious tolerance in chronic middle ear inflammation with nontypeable *Haemophilus influenzae*.

研究代表者

平野 隆 (HIRANO TAKASHI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：20305056

研究成果の概要（和文）：耳管閉塞およびインフルエンザ菌による慢性中耳炎症マウスモデルを用いて、中耳慢性炎症病態における IL-17 産生 T 細胞の動態につき検討した。BALB/c マウスを用いて、中耳炎モデル作成後 3 日目、14 日目、2 ヶ月目に中耳貯留液、中耳粘膜および側頭骨を採取し、中耳貯留液中の IL-17 濃度の測定、中耳粘膜下のリンパ球のフローサイトメトリーによる解析および IL-17mRNA の発現につき解析を行った。中耳粘膜において、Th17 細胞および IL-17 産生 $\gamma \delta$ T 細胞の増加を急性期から慢性期に認め、中耳貯留液中の IL-17 濃度においても 2 週間目から 2 ヶ月の慢性期に至るまで、明らかに対照群と差を認めた。中耳粘膜の単核球細胞の IL-17mRNA の表出も、対象群と比して明らかな強発現を認めた。中耳粘膜における Th17 細胞や IL-17 産生 $\gamma \delta$ T 細胞が中耳局所の慢性炎症に関与している事が推測された。

研究成果の概要(英文): Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is considered a major pathogen underlying middle ear infection. This study aimed to investigate the dynamics of IL-17 in chronic otitis media induced by NTHi in Balb/c mice. NTHi was injected into the tympanic bulla with Eustachian tubal obstruction. Middle ear effusions and tissues were collected at day 3, 14, 2 month after injection. The concentration of IL-17 in middle ear effusions elevated significantly during experiments when compared to control. IL-17 producing $\gamma \delta$ T cells and Th17 cells were also increased up to 6 months in the middle ear. Based on these findings, IL-17 producing T cells existed in chronic state of otitis media, and may play some role for modification of chronic inflammation in the middle ear.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 23 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 24 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：中耳・慢性炎症・インフルエンザ菌・T細胞・粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は小児に好発するがたびたび遷延化し、慢性の経過をたどり治療に難渋する場合を認める。急性中耳炎の起炎菌において、肺炎球菌、インフルエンザ桿菌、モラクセラカタール菌が最も多く検出されている事はよく知られているが、過去においては無菌性中耳炎と考えられていた滲出性中耳炎においても、現在では慢性中耳炎症性疾患と見なされており、細菌のバイオフィーム形成や粘膜組織内寄生に伴い、通常の細菌検査では検出されない状態での慢性感染性炎症が持続している事が報告されている。今までの報告において、反復性滲出性中耳炎により、中耳粘膜下にリンパ球の集簇を認めることはすでにヒト小児の剖検例において証明されているが、どのような機序により慢性炎症が修飾されたり制御されているか不明である。

2. 研究の目的

炎症性疾患の発症・病態形成には、組織に遊走する炎症細胞や組織炎症巣に存在する活性化T細胞が大きな役割を担っており、T細胞が産生するサイトカインはカスケードを形成し、さまざまなTh細胞が複雑に炎症像を修飾している。IL-17は新しく確立されたサイトカインファミリー分子であり、IL-17はIL-6、TNF- α といった炎症性サイトカイン、ケモカインの産生誘導や、matrix metalloproteaseの誘導による細胞の組織浸潤や組織破壊を調整しており、IL-17サイトカインを分泌するTh17細胞や $\gamma\delta$ T細胞からも多量のIL-17が産生される事が知られている。現在、Th17細胞は自己免疫性慢性炎症病態との関連が示唆されており、慢性関節リウマチ、クローン病や潰瘍性大腸炎といった炎症性腸疾患に関与しているとの報告がなされているが、最近では、Th1、Th2細胞とは対照的に、Th17細胞は炎症局所に好中球遊走を促すことにより、細胞外寄生菌に対する防御に重要な働きを持つことも報告されているが、慢性中耳炎症病態におけるIL-17の関与についての検討はほとんど認めない。今回、当科において確立された耳管閉塞およびインフルエンザ菌による慢性中耳炎症マウスモデルを用いて、IL-17を中心とした中耳慢性炎症病態におけるIL-17産生T細胞の動態につき検討した。

3. 研究の方法

1) マウスモデル作成

SPF下にて飼育した、雄性、BALB/cNSeaマウス5週令を用いた。今回中耳炎誘導に用いたインフルエンザ菌は、当科臨床にて中耳貯留液より分離されたものであり、

serotypeおよびX因子V因子にて確認を行い、非莖膜型のインフルエンザ菌

(nontypeable)と同定している。インフルエンザ菌をチョコレート寒天培地にて18時間培養後に回収し、生理食塩水にてインフルエンザ菌懸濁液を作成後、OD600にて吸光度測定した後に、細菌濃度を 10^9 cfu/mlになるように調製した。ペントバルビタール麻酔後に、下顎後方皮膚切開し、顕微鏡下に中耳骨胞を明視下に置き、耳管を切断後にゲルホルムを挿入し耳管閉塞を施行後、29G針にて2個の小孔を作成し、インフルエンザ菌 10^7 cfuを中耳腔に注入した。中耳炎モデル作成後3日目、14日目、2ヶ月目に、マウスから試料を採取している。耳管閉鎖およびインフルエンザ菌注入を行わない非処置マウスを対照群として用いた。

2) 試料採取と処置

鼓膜切開後に、経鼓膜的に生理食塩水にて中耳洗浄液(200 \cdot 1)を採取し、中耳洗浄液を遠心後に上清を分離、中耳洗浄液中のIL-17濃度をmouse IL-17 ELISA kitにて測定した。中耳粘膜組織における炎症反応を調べるため、マウス中耳粘膜を顕微鏡下に粘膜を採取した後に、すべての中耳粘膜を1つの試料にまとめ、コラゲナーゼ処置にて単核球を分離した。採取した単核球をFITC標識抗マウスCD4抗体、PE標識抗マウスCD8抗体、Per-CP標識抗マウスCD3抗体にて細胞表面抗原を染色し、Tリンパ球分画につきフローサイトメトリーにて解析を行った。また、IL-17産生細胞を同定するために、採取した単核球を 1×10^6 cell/mlに10%FCS加RPMI培地にて調整したのちにphorbol myristate acetate (PMA) (50ng/ml)およびionomycin (500ng/ml)を加えて4時間培養を行い、Tリンパ球を刺激することによりIL-17産生を誘導し、培養終了前2時間前に、細胞内サイトカインを蓄積させる為にBrefeldine A (10 \cdot g/ml)の追加投与を行った。その後、FITC標識抗マウスCD4抗体、Per-CP標識抗マウスCD3抗体、FITC標識抗マウス $\gamma\delta$ T細胞レセプター抗体にて細胞表面抗原を染色後にホルムアルデヒド/サポニン膜透過処理にて細胞内IL-17の染色を、PE標識抗マウスIL-17A抗体にて染色し、フローサイトメトリーにてTh17細胞、およびIL-17産生 $\gamma\delta$ T細胞数の推移について解析した。また、単核球よりRNAを抽出し、complementary DNAを作成後に、IL-17A mRNAの表出についてリアルタイムPCRを施行した。リアルタイムPCRの評価は、内部標準である18リボゾームmRNAと中耳粘膜由来IL-17A mRNA

の表出を、対照マウス中耳から採取した単核球を基準として、 $\Delta \Delta CT$ 法にて評価を行い、その比率において各時点での中耳粘膜由来単核球におけるIL-17A mRNAの表出を計算している。

4. 研究成果

1) フローサイトメトリーによる中耳粘膜由来リンパ球の解析

正常中耳では中耳由来の単核球のうち、CD3陽性Tリンパ球は33.6%であったが、感染後3日目から2ヶ月までCD3陽性Tリンパ球は漸増し、2ヶ月目においては64.6%がCD3陽性Tリンパ球であった。CD3陽性T細胞のうち、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、CD4CD8共陰性T細胞(多くは $\gamma\delta$ T細胞を示す)の割合を経時的に比較検討したところ、正常中耳粘膜ではCD4CD8共陰性T細胞は24.1%と低値であり、CD4陽性T細胞が48.4%と優位であったが、2ヶ月目においてはそれぞれ35.9%と51.4%と増加した。一方、CD8陽性T細胞は減少した。次に、IL-17産生細胞についてフローサイトメトリーによる解析を行ったが、IL-17産生CD4陽性T細胞としてTh17細胞を同定しているが、正常中耳粘膜ではTh17細胞は1.1%であり、感染後3日目より著明にIL-17産生細胞の増加を認め、Th17細胞は2ヶ月目まで7.8~9.7%に増加した(図1)。図1に示されるようにCD4陰性T細胞にIL-17産生細胞を多く認めているが、中耳炎惹起後のCD4陰性T細胞の多くは $\gamma\delta$ T細胞(CD4CD8共陰性細胞)であり、 $\gamma\delta$ T細胞中のIL-17産生細胞について検討を行っている。正常中耳粘膜ではIL-17産生 $\gamma\delta$ T細胞は2.7%であったが、感染後3日目には16.3%にまで上昇し、2ヶ月目まで14.1~19.5%に増加した(図2)。

2) 中耳貯留液中のサイトカイン濃度および中耳粘膜由来単核球におけるIL-17AmRNAの表出

今回、中耳炎における炎症性サイトカインのうち、IL-17濃度について計測を行っている。IL-17において感染後3日目では平均13.5pg/mlであり、上昇を認めないものの、2週目以降において著明に上昇し、平均128pg/mlであり、2ヶ月目においても113pg/mlであった。IL-17AmRNAの表出においても同様の傾向を認めており、感染後2週目以降2ヶ月にかけて上昇しており、正常中耳と比較して明らかなIL-17AmRNAの表出増加を認めた。

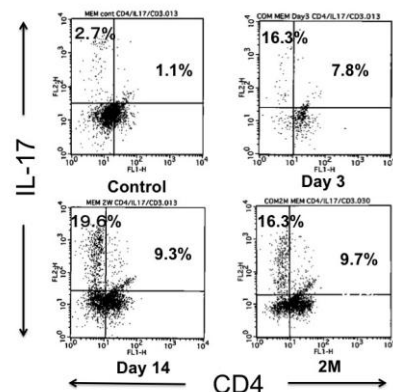


図1：中耳粘膜におけるTh17細胞

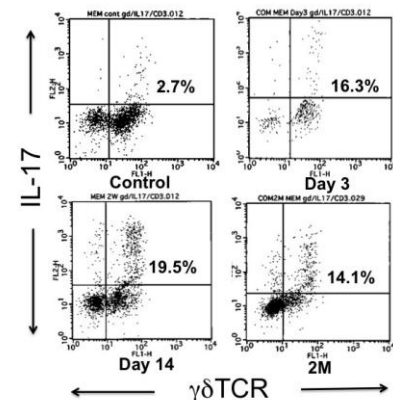


図2：中耳粘膜におけるIL-17産生 $\gamma\delta$ T細胞

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

①平野 隆、児玉 悟、川野利明、森山宗仁、藤田佳吾、鈴木正志、慢性中耳炎症病態におけるTh17細胞およびIL-17産生 $\gamma\delta$ T細胞の動態. 耳科学会、23:6-12;2013. 査読あり。

②Kawano T., Hirano T., Kodama S., Mitsui MT., Ahmed K., Nishizono A., Suzuki M.

Pili play an important role in enhancing the bacterial clearance from the middle ear in a mouse model of acute otitis media with *Moraxella catarrhalis*. DOI: 10. 1111 /2049-632X. 12025, 2013. 査読あり。

③Noda Ka., Hirano T., Noda Ke., Kodama S., Ichimiya I., Suzuki M.: Effect of low-intensity focused ultrasound on the middle ear in a mouse model of acute otitis media, World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology, 39(3), 413-423, 2013. 査読あり。

④平野 隆: 肺炎球菌 一特集 ワクチン一, 耳喉頭頸, 84 (2), 125-130, 2012. 査読なし。

⑤平野 隆 肺炎球菌 一特集 耳鼻咽喉科感染症の完全マスター, 耳喉頭頸, 83 (5), 77-82, 2011, 査読なし。

⑥ Hirano T., Kodama S., Kawano T., Maeda K., Suzuki M.: Monophosphoryl lipid A induced innate immune responses via TLR4 to enhance clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from the nasopharynx in mice, FEMS immunol med microbiol, 63, 407-417, 2011, 査読あり。

⑦Hirano T., Kodama S., Kawano T., Suzuki M.: Effect of regulatory T cells on bacterial clearance in vitro assay, Recent Advances in Otitis media, in press, 2011. 査読なし。

〔学会発表〕(計11件)

①森山宗仁, 平野 隆, 児玉 悟, 川野利明, 鈴木正志: 鼻咽腔局所における好中球機能と TLR4 および TREM-1 の関与についての検討. 第 31 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2013. 2. 7-9, 倉敷市

②平野 隆, 児玉 悟, 川野利明, 鈴木正志: 慢性中耳炎病態における T リンパ球による局所および全身免疫応答. 第 22 回日本耳科学会, 2012. 10. 4-6, 名古屋市

③平野 隆, 児玉 悟, 森山宗仁, 鈴木正志: 中耳局所炎症に対する頸部リンパ節および全身免疫応答の解析. 第 30 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2012. 2. 16-18, 大津市

④平野 隆, 児玉 悟, 鈴木正志: 慢性中耳炎症病態における Th17 細胞の関与. 第 21 回日本耳科学会, 2011. 11. 24-26, 沖縄県宜野湾市

⑤Iwasaki T., Hirano T., Kodama S., Suzuki M.: Effect of phosphorylcholine on mucin production and gene expression in the middle ear in the mice (poster) 10th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, 2011. 6. 5-9, 2011, New Orleans,

U.S.A.

⑥Hirano T., Kodama S., Kawano T., Maeda Ka., Suzuki M.: Effect of regulatory T cells on bacterial clearance in vitro assay (poster)

⑦Kawano T., Hirano T., Mitsui T., Ahmed K., Nishizono A., Suzuki M.: Innate immune response in a mice of acute otitis media with moraxella catarrhalis (poster) 10th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, 2011. 6. 5-9, 2011, New Orleans, U.S.A.

⑧Hirano T., Kodama S., Kawano T., Suzuki M.: Efficacy of monophospholipid A via TLR4 on eliciting nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance from nasopharynx in mice (poster) 10th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, 2011. 6. 5-9, 2011, New Orleans, U.S.A.

⑨岩崎太郎, 平野 隆, 児玉 悟, 川野利明, 藤田佳吾, 鈴木正志: インフルエンザ菌位相変異による phosphorylcholine (PC) の中耳粘膜への影響. 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2011. 2. 10-12, 大分市

⑩川野利明, 平野 隆, 三井孝広, Ahmed K., 西園 晃, 鈴木正志: *Moraxella catarrhalis* 由来中耳炎モデルでの早期免疫誘導の解析. 第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2011. 2. 10-12, 大分市

⑪平野 隆, 川野利明, 児玉 悟, 鈴木正志; Monophosphoryl lipid A を用いた鼻咽腔粘膜局所免疫応答の賦活の試み. 第 20 回日本耳科学会, 2010. 10. 7-9, 松山市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 隆 (HIRANO TAKASHI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号: 20305056

(2) 研究分担者

鈴木 正志 (SUZUKI MASASHI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 60211314

(3) 連携研究者

なし