

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592497

研究課題名(和文)細菌性中耳炎におけるJNKによる中耳粘膜肥厚の分子制御とその治療

研究課題名(英文)The molecular mechanism of mucosal hypertrophy by JNK in middle ear

研究代表者

古川 正幸 (FURUKAWA, MASAYUKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20359524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性中耳炎より移行する慢性中耳炎および癒着性中耳炎において不可逆的な中耳粘膜肥厚が認められる。これまで私は細菌性中耳炎においてMAPキナーゼの一つであるc-junNH2 terminal kinase (JNK)による中耳粘膜肥厚の分子制御の一端を解明してきた。今回C57BL/6マウス(Wild-type JNK+/+, JNK1-/-, JNK2-/-)を用いてJNKによる中耳粘膜肥厚の分子制御を完全に解明する。更にJNK阻害剤を用いて中耳粘膜肥厚の新しい治療を模索する。

研究成果の概要(英文)：The irreversible hypertrophy of the middle ear mucosa was occurred in chronic otitis media and adhesive otitis media. The molecular mechanism of mucosal hypertrophy by JNK in middle ear was clarified

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：急性中耳炎 JNK1 中耳粘膜肥厚 JNK2 分子制御 MAP kinase 癒着性中耳炎

1. 研究開始当初の背景

中耳炎は小児が抗生剤投与を受ける最もありふれた疾患である。急性中耳炎より移行する慢性中耳炎および癒着性中耳炎において、伝音難聴および感音難聴を患い、小児期より様々な悪影響が指摘されている。言語取得のおくれ、学業不振、回復不能な中耳疾患などである。中耳炎において中耳粘膜の肥厚は特有のものであるが、その分子制御に関しては不明な点が多い。一方で JNK は増殖、分化、アポトーシスなどの様々なシグナル伝達に関与していることが明らかになってきている。これまで私は細菌性中耳炎において MAP キナーゼの一つである c-junNH2 terminal kinase (JNK)による中耳粘膜肥厚の分子制御の一端を解明してきた(Jun N-terminal protein kinase enhances middle ear mucosal proliferation during bacterial otitis media. Furukawa M, Ebmeyer J, Pak K, Austin DA, Melhus Å, Webster NJG, Ryan AF. Infect Immun. 75(5):2562-71, 2007.)。更に細菌性中耳炎において肥満細胞が中耳粘膜肥厚に関与することを明らかにしてきた(Role of mast cells in otitis media. Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Ebmeyer U, Sudhoff H, Broide D, Ryan AF, Wasserman S. J Allergy Clin Immunol. 116(5):1129-35, 2005)。従って細菌性中耳炎において中耳粘膜肥厚に深く関連していると考えられる JNK を細菌性中耳炎の中耳粘膜肥厚の新たな治療戦略の基盤にすることを企画するに至った。国内外において中耳粘膜肥厚を解析した報告は少なく、細菌性中耳炎における中耳粘膜肥厚の発生機序の新局面を展開する本研究は全く斬新で、独創的である。今まで、中耳粘膜肥厚の発症機構がブラックボックスであった分子生物学レベルでの解明が可能であり、臨床応用可能な治療法の確立が期待できる。

2. 研究の目的

研究には C57BL/6 マウス (Wild-type JNK+/+, JNK1-/-, JNK2-/-) を用いる。マウス中耳炎モデル(Mouse models of induced otitis media. Ryan AF, Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Melhus Å, Wasserman S, Chung W. Brain Res. 26;1091(1):3-8, 2006.)に従ってこの3種類の C57BL/6 マウス (Wild-type JNK+/+, JNK1-/-, JNK2-/-) に細菌性中耳炎を発症させる。

これまでの私の研究により JNK2 が細菌性中耳炎において中耳粘膜肥厚にもっとも関与している可能性が高い(Jun N-terminal protein kinase enhances middle ear mucosal proliferation during bacterial otitis media. Furukawa M, Ebmeyer J, Pak K, Austin DA, Melhus Å, Webster NJG, Ryan AF. Infect Immun. 75(5):2562-71.)ことが分かっている。

そこで細菌性急性中耳炎を発症した JNK ノックアウトマウス (JNK1-/-, JNK2-/-) にて中耳粘膜肥厚において JNK1 と JNK2 の役割を明らかにする。急性中耳炎は発症後 8 日目には自然軽快してくるが、その時間経過中の中耳粘膜肥厚において JNK1 と JNK2 の役割も明らかにする。本研究の独創的特色は、細菌性中耳炎において引き起こされる中耳粘膜肥厚の分子制御を世界に先駆けて解明する事である。更に JNK 阻害剤により中耳粘膜肥厚の治療を可能にし、癒着性中耳炎等の回復不能な中耳疾患に対する治療を世界に先駆けて開発することである。

3. 研究の方法

1) 3 種の C57BL/6 マウス (Wild-type JNK+/+, JNK1-/-, JNK2-/-) の側頭骨に Haemophilus influenzae 10⁵ 個を注入し急性中耳炎を発症させる。光学顕微鏡、電子顕微鏡にて中耳粘膜肥厚の程度を観察する。Western

blotting 法及び免疫組織化学法により JNK1, phosphorylated JNK1, JNK2 phosphorylated JNK2 の発現を確認する。

20g から 25g までのオスの C57BL/6 マウス (Wild-type JNK^{+/+}, JNK1^{-/-}, JNK2^{-/-}) を米国の Jackson Laboratory より購入する。3種の C57BL/6 マウス (Wild-type JNK^{+/+}, JNK1^{-/-}, JNK2^{-/-}) に急性中耳炎を発症させる (Mouse models of induced otitis media. Ryan AF, Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Melhus Å, Wasserman S, Chung W-H. *Brain Res.* 26;1091(1):3-8, 2006)。wild-type JNK^{+/+}, JNK1^{-/-}, JNK2^{-/-} マウスにそれぞれ手術を施行し、右中耳に Haemophilus influenzae 10⁵ 個を注入する。Haemophilus influenzae に感染したマウス中耳粘膜を時間経過 (1h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h, 5day, 7day) で 8 グループに分ける。対照は Haemophilus influenzae ではなく PBS を注入した左中耳を用いる。対照も時間経過 (1h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h, 5day, 7day) で 8 グループに分ける。

時間経過 (1h, 3h, 6h, 24h, 48, 72h, 5day, 7day) で 8 グループに分けた中耳粘膜を摘出して試料とする。組織は -80℃ に保存し、一部はパラホルムアルデヒドで固定し、OCT compound で包埋する。もう一方はグルタルアルデヒドで固定し、エポキシに包埋する。それぞれの標本を光学顕微鏡、電子顕微鏡で解析する。

Western blotting 法による JNK1 及び phosphorylated JNK1 の発現と JNK2 及び Phosphorylated JNK2 の発現を確認。

Haemophilus influenzae に感染した C57BL/6 マウス (Wild-type JNK^{+/+}, JNK1^{-/-}, JNK2^{-/-}) 中耳粘膜を時間経過 (1h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h, 5day, 7day) で 8 グループに分ける。RIPA buffer 中で中耳粘膜を剥離し、それぞれの時間で中耳粘膜の蛋白を等量測定し、SDS-PAGE を行う。ウエスタンブロット法により JNK1, phosphorylated JNK1, JNK2, phosphorylated

JNK2 の発現を確認する。

Haemophilus influenzae に感染したラット中耳粘膜を時間経過 (1h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h, 5day, 7day) で 8 グループに分ける。免疫組織化学法により phosphorylated JNK1 及び phosphorylated JNK2 の発現を確認する。

2) 急性中耳炎を発症させた C57BL/6 マウスに JNK inhibitor SP 600125 (10 microM) を点耳薬として一日二回投与する。中耳粘膜肥厚の障害を経時的に確認する。

4. 研究成果

我々はこれまで MAP キナーゼの一つである JNK による中耳粘膜肥厚の分子制御の一端を解明してきた。細菌性中耳炎において JNK 阻害剤による研究は国内外においてはまだ施行されておらず、本研究の独創性を示している。以上の事より、中耳粘膜肥厚の臨床症状を呈する疾患の病態解明及びその治療の開発に確信が持てる。

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 0 件)

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 正幸 (FURUKAWA, Masayuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20359524

(2) 研究分担者

楠 威志 (KUSUNOKI, Takeshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30248025

松本 文彦 (MATTUMOTO, Fumihiko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70445584

笠井 美里 (KASAI, Misato)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70549279