

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462648

研究課題名(和文) インフルエンザ菌性慢性中耳炎症病態に対する抗サイトカイン療法および分子標的治療

研究課題名(英文) Effect of anti-CD25 monoclonal antibody on chronic otitis media in mice model

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：今回、抗CD25抗体を用いた制御性T細胞に対する分子標的治療の可能性について検討した。BALB/cマウスを用いたインフルエンザ菌性慢性中耳炎モデルを作成し、抗CD25抗体を3回腹腔内投与し、対照マウスにはリン酸緩衝液(PBS)を腹腔内投与した。中耳炎惹起後8週目に中耳洗浄液と中耳粘膜、頸部リンパ節、脾臓を採取した。中耳洗浄液中の生菌数では、抗CD25抗体処置群ではインフルエンザ菌数の著明な減少を認めた。また抗CD25抗体処置群において、各臓器における制御性T細胞数割合の低下を認めた。抗CD25抗体の全身投与により、制御性T細胞が中耳局所における細菌免疫寛容に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) is associated with chronic otitis media (COM). In this study, we generated a murine model of COM by using Eustachian tube obstruction and NTHi inoculation into the tympanic bulla, and we investigated the relationship between regulatory T (T reg) cells and chronic inflammation in the middle ear. Middle ear effusions (MEEs) and middle ear mucosae (MEM) were collected at days 3 and 14 and at 1 and 2 months after inoculation. CD4+ CD25+ FoxP3+ T reg cells accumulated in the middle ear, and the percentage of T reg cells in the MEM increased for up to 2 months after inoculation. T reg cell depletion induced a 99.9% reduction of bacteria counts in MEEs and also significantly reduced the ratio of NTHi culture-positive MEE. The levels of these cytokines were also reduced in MEEs. In summary, we developed a murine model of COM and our findings indicate that T reg cells confer infectious tolerance to NTHi in the middle ear.

研究分野：医歯薬学

キーワード：慢性中耳炎 インフルエンザ菌 制御性T細胞 CD25

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、モラキ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、細菌のバイオフィル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T細胞が複雑に炎症像を修飾している。活性化T細胞のうち、CD4陽性であるヘルパーT細胞は、病原体の種類に応じてTh1、Th2、およびTh17細胞などのようなエフェクターT細胞に分化し、IL-6、TNF- α 、IL-1、IL-17といった多様なサイトカイン産生し、様々な免疫応答を誘導する。一方、免疫応答の抑制的な制御機能を有するCD25陽性CD4陽性T細胞、つまり制御性T細胞は様々な免疫応答を抑制し、自己免疫疾患発症阻止能を有する重要な細胞であることはよく知られている。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、制御性T細胞を中心とした中耳慢性炎症病態における役割とインフルエンザ菌感染に与える影響について検討した。

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、非莢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 μ l)を採取し、中耳洗浄液を遠心後に上清を分離、中耳洗浄液中の炎症性サイトカインであるIL-1 β 、TNF- α 、そして抑制性サイトカインであるIL-10、TGF- β などのサイトカイン濃度をmouse 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FoxP3抗体、Per-CP標識抗マウスCD25抗体にて細胞表面抗原を染色し、制御性Tリンパ球につきフローサイトメトリーにて解析を行った。

3) 抗CD25抗体による慢性中耳炎に与える影響

先程と同様に慢性中耳炎モデルを作成後、2、4、6週目に抗CD25抗体(125 μ g/マウス)を腹腔内投与した。対照はリン酸緩衝液の腹腔内投与のみを行っている。試料採取は中耳洗浄液のみならず、中耳粘膜、頸部リンパ節、脾臓を採取し制御性Tリンパ球の分布についてフローサイトメトリーにて解析を行った。また、中耳洗浄液中のサイトカイン濃度も同様に測定を行っている。

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制御性リンパ球の解析

正常中耳では中耳由来の単核球のうち、FoxP3陽性CD4陽性Tリンパ球(制御性T細胞)は18.2%であったが、感染後14日目から2ヶ月まで漸増し、2ヶ月目においては34.3%が制御性T細胞であった。制御性T細胞のうち、正常中耳粘膜では14.5%であったが、2週目においては40.6%、2ヶ月目においても28.3%と増加していた。制御性T細胞の多くはCD25陽

性細胞であった(図1)

2)抗 CD25 抗体による慢性中耳炎に与える影響

抗 CD25 抗体投与を行っていない慢性中耳炎マウスにおいては、脾臓、頸部リンパ節、中耳粘膜における制御性 T 細胞比率はそれぞれ、7.0%、8.5%、32.4%であったが、抗 CD25 抗体投与により、1.3%、1.3%、18.2%と減少していた。中耳洗浄液中のインフルエンザ菌陽性率は抗 CD25 抗体投与を行っていない慢性中耳炎マウスでは 62.5%(5/8 個体)であったが、抗 CD25 抗体投与した慢性中耳炎マウスでは 12.5%(1/8 個体)であり、平均中耳貯留液中細菌数も 99.9%減少させた。中耳貯留液中のサイトカイン濃度においては、炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF- α 、そして抑制性サイトカインである IL-10、TGF- β 共に、抗 CD25 抗体投与によりすべてのサイトカイン濃度の減少を認めており、特に IL-1 β 濃度は有意に減少していた(図2)。

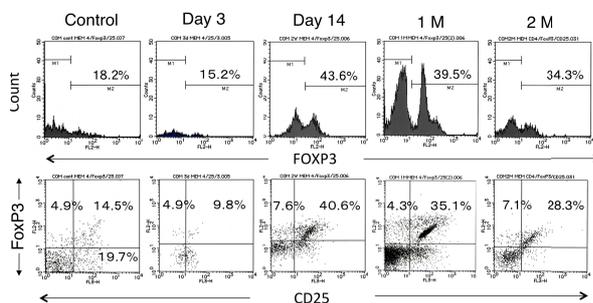


図1：中耳粘膜における制御性細胞

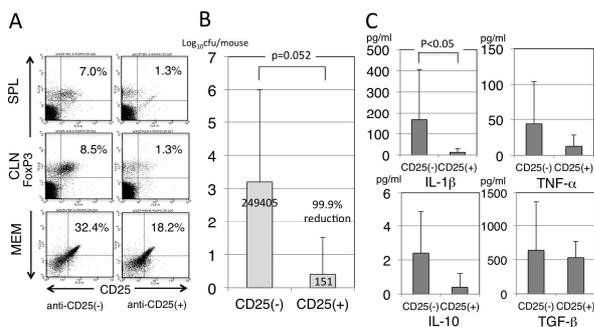


図2：抗 CD25 抗体の効果

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)

Hirano T., Kodama S., Kawano T., Suzuki M.: Accumulation of regulatory T cells and chronic inflammation in a mouse model of chronic otitis media with effusion induced by combined Eustachian tube blockade and middle ear and nontypeable *Haemophilus*

influenzae infection. *Infect Immun*, 84, 356-4364, 2016, 査読あり。

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。

Kawano 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。

Noda 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。

〔学会発表〕(計11件)

Hirano T., Kodama S., Moriyama M., Iwasaki T., Kadowaki Y., Kawano T., Suzuki M. Effect of anti-CD25 monoclonal antibody on chronic otitis media in mice model. 18th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media. 2015. 6.7-11. National Harbor, Maryland, USA.

平野 隆、児玉 悟、鈴木正志：慢性中耳炎病態への抗 CD25 抗体による分子標的治療の可能性. 第 33 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2015.2.26-28, 東武レバントホテル, 東京都

平野 隆、岩崎太郎、門脇嘉宣、森山宗仁、児玉 悟、鈴木正志：Monophosphoryl lipid A を粘膜アジュバントとして用いた中耳炎予防ワクチン. 第 24 回日本耳科学会, 2014. 10. 16-18, 朱鷺メッセ, 新潟市。

Hirano T.: Innate immune responses to common respiratory pathogen in the upper airway. 18th Congress of the Asian Pacific society of Respiriology. 2013. 11.11-14, PACIFICO Yokohama, Yokohama.

Hirano T., Moriyama M., Kawano T., Kadowaki Y., Iwasaki T., Kodama S., Suzuki M.: Neutrophils with TREM-1 expression enhance bacterial clearance from the nose in C3H/HeN mice more than in

C3H/HeJ mice. 7th International Symposium on Recent Advances in Rhinosinusitis and Polyposis, 2013. 10. 4-6, 2013, Kunibiki Messe, Shimane.

〔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

川野 利明 (KAWANO TOSHIAKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：30633424

(3) 連携研究者

なし