

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462566

研究課題名(和文)細菌性中耳炎における p38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)p38 enhances middle ear proliferation during bacterial otitis media

研究代表者

古川 正幸 (FURUKAWA, Masayuki)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：20359524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：急性中耳炎から移行する慢性中耳炎及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マウスを用いてp38による中耳粘膜肥厚の分子制御を完全に解明する。更にp38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 p38 in middle ear was clarified. The new treatment of hypertrophy of the middle ear mucosa by p38 antagonist was suggested.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：急性中耳炎 中耳粘膜肥厚 p38 分子制御

## 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-junNH<sub>2</sub> 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 MAP キナーゼの一つである p38 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 p38<sup>+/+</sup>, p38<sup>+/-</sup>) 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2種類の C57BL/6 マウス (Wild-type p38<sup>+/+</sup>, p38<sup>+/-</sup>) 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。そこで今回は細菌性急性中耳炎を発症した p38 ノックアウトマウス (p38<sup>-/-</sup>) にて中耳粘膜肥厚において p38 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 p38 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 p38 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) 中耳炎モデル動物の作成

20gから25gまでのオスのC57BL/6マウス ( Wild-type p38<sup>+/+</sup>, p38<sup>+/-</sup> ) を米国の Jackson Laboratoryより購入する。2種の C57BL/6 マウス ( Wild-type p38<sup>+/+</sup>, p38<sup>+/-</sup> ) に急性中耳炎を発症させる (Mousemodels of induced otitis media. RyanAF, Ebmeyer J, Furukawa M, Pak K, Melhus Å, Wasserman S, Chung W-H. **Brain Res.** 26;1091(1):3-8, 2006)。Wild-type p38<sup>+/+</sup>, p38<sup>+/-</sup>マウスにそれぞれ手術を施行し、右中耳にHaemophilus influenzae10<sup>5</sup> 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。

#### 2) 光学顕微鏡、電子顕微鏡で解析

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

ハイドで固定し、OCT compoundで包埋する。もう一方はグルタルアルデハイドで固定し、エポンに包埋する。それぞれの標本を光学顕微鏡、電子顕微鏡で解析する。

#### 3) Western blotting法による p38及び phosphorylated p38の発現を確認。

Haemophilus influenzae に感染した C57BL/6マウス ( Wild-type p38<sup>+/+</sup>, p38<sup>+/-</sup> ) 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p38, phosphorylated p38の発現を確認する。

#### 4) 免疫組織化学法による p38 及び phosphorylated p38の発現を確認。

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 p38 及び phosphorylated p38 の発現を確認する。

#### 5) 点耳薬による中耳粘膜肥厚の阻止を確認

C57BL/6 マウスに経鼓膜的に Haemophilus influenzae を中耳に注入する手術を施行する。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。P38 inhibitor (10 µM) を点耳薬として一日二回投与する。中耳粘膜肥厚の阻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。ただ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 MAP キナーゼの一つである p38 の研究は国内外においてはまだ施行されておらず、細菌性中耳炎において p38 阻害剤による研究も施行されていない。以上の事は本研究の独創性を示している。これまでの長年の研究より、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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

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

岡田 弘子 (OKADA, Hiroko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20433774

笠井 美里 (KASAI, Misato)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70549279