

主論文

Expression of macrophage migration inhibitory factor and CD74 in the inner ear and middle ear in lipopolysaccharide-induced otitis media

(リポポリサッカライド誘発性中耳炎における内耳および中耳におけるマクロファージ遊走阻止因子と CD74 の発現)

【緒言】

中耳炎は耳鼻咽喉科における一般的な疾患であり、難聴の主な原因のひとつである。その中でも中耳炎に続発する内耳炎(中耳炎性内耳炎)は、中耳腔の炎症性メディエーターが経正円窓的に中耳から内耳に広がり蝸牛内の有毛細胞を障害することが原因とされているが、そのメカニズムは詳しくは明らかになっていない。今回我々が注目したマクロファージ遊走阻止因子(MIF)は、炎症性サイトカインであり、また神経発達のために必須の因子である。これまでに、中耳炎患者の中耳貯留液中に MIF が発現していることや、蝸牛機能に MIF が関与していることが報告されている。しかし、内耳における MIF の役割は明らかになっていない。本研究の目的は、リポポリサッカライド(LPS)誘発性の中耳炎における中耳および内耳での MIF およびその受容体である CD74 の発現を調べる事である。

【材料と方法】

動物実験

BALB/c マウスを本研究に使用した。全てのマウスは実験前に耳鏡検査にて中耳貯留液がなく正常鼓膜であることを確認した。マウスを無作為に実験群と対照群に分け、実験群に 1.0mg/ml LPS を 30G の注射針を用いて経鼓膜的に中耳腔に注入した。対照群には、0.01M リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を同様に注射した。LPS または PBS の注入 24 時間後に側頭骨を摘出し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析、組織学的検査および免疫組織化学検査のために処理した。

PCR 分析

摘出した側頭骨より中耳および内耳を切除し、別々に RNA を抽出し定量 PCR 分析を行った。(実験群 6 匹 12 耳、対照群 6 匹 12 耳)。RNA 抽出には RNeasy ミニキットを用いた。リアルタイム PCR のプローブには、*mif* 遺伝子に特異的な既製の TaqMan® プローブを用いた。試薬類は TaqMan® ワンステップ RT-PCR マスターミックスキットを使用した。サーマルサイクラーにはアプライドバイオシステムズ社 7500 リアルタイム PCR システムを用いた。また、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を内在性対照とした。RNA 抽出およびリアルタイム PCR は製造業者推奨のプロトコールで行った。

組織学的検査

側頭骨標本(実験群 2 匹 4 耳、対照群 2 匹 4 耳)を 72 時間 4% パラホルムアルデヒドで処理し、10% エチレンジアミン四酢酸をもちいて 4°C 3 週間で脱灰した。脱水後、標本をパラフィンに包埋し厚さ 10µm で切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い光学顕微鏡下で評価した。

免疫組織学的検査

パラフィン包埋組織(実験群 2 匹 4 耳、対照群 2 匹 4 耳)を厚さ 4µm で切片を作製し、スライドガラスを作成した。脱パラフィン処理をおこない、内因性ペルオキシダーゼ活性を 0.3% 過酸化水素含有メタノール溶液(室温, 30 分)で、非特異性反応をヤギ血清アルブミン(室温, 1時間)でブロッキングした。マイクローウェーブ法で抗原賦活化をおこなった。免疫組織化学染色は、ウサギ抗 MIF 抗体およびウサギ抗 CD74 抗体を用いた。陰性対照にはウサギ免疫グロブリンを使用した。VECTASTAIN Elite ABC キットと 3, 3'-ジアミノベンジジン(DAB)試薬を用いて発色をおこなった。

統計解析

ノンパラメトリックマン・ホイットニーU 検定を用いて、2 群間を解析した。有意差は、 $P < 0.05$ とした。

【結果】

組織学的検査

LPS を中耳腔に注射した実験群マウスの中耳腔には炎症細胞（多核白血球および単球）の著しい浸潤を認めた。また、実験群の内耳においても炎症細胞浸潤を認め、LPS 注射にて中耳炎性内耳炎が誘起されたことを確認した。一方、PBS を注射した対照群では、中耳および内耳に有意な炎症所見は認めなかった。

定量 PCR

実験群マウスは、対照群マウスと比較して中耳および内耳の両方で、*mif* 遺伝子の発現が有意に増加していた。

MIF 発現の局在

免疫組織化学検査にて MIF 発現の局在を調べた。実験群マウス中耳では、粘膜上皮と浸潤した炎症細胞に MIF 陽性細胞を認めた。内耳においては、ラセン靭帯、血管条、ラセン板縁、ラセン神経節細胞、コルチ器、および蝸牛内に浸潤した炎症性細胞で MIF 陽性であった。対照群マウスでは、中耳粘膜に MIF 陽性細胞は認めなかった。また、対照群マウスにおいてもラセン靭帯で血管条、ラセン板縁、ラセン神経節細胞、およびコルチ器で MIF 陽性であった。陰性対照では中内耳ともに MIF 陽性細胞は認めなかった。

CD74 発現の局在

次に我々は、免疫組織化学検査にて MIF の受容体である CD74 の発現について調べた。実験群マウス中耳では、粘膜上皮と浸潤した炎症細胞に CD74 陽性細胞を認めた。実験群マウスの内耳では、ラセン靭帯、血管条、ラセン板縁、ラセン神経節細胞、およびコルチ器で CD74 は陽性であった。対照群マウスにおいては、中耳粘膜に CD74 陽性細胞を認め、これは MIF の免疫組織化学検査とは異なる結果であった。その他、対照群マウスのラセン靭帯、血管条、ラセン板縁、ラセン神経節細胞、およびコルチ器で CD74 陽性細胞を認めた。

【考察】

グラム陰性菌は、中耳炎の主要な病原体である。またエンドトキシンとして知られる LPS は、グラム陰性菌の外膜の構成成分であり、炎症性疾患の重要な病原性メディエーターである。これまでの研究では LPS が中耳炎患者の 96% の中耳貯留液から検出されたことが報告されている。中耳への LPS の注射は内耳炎を誘起する可能性があり、蝸牛損傷を引き起こす。我々は、LPS 誘発性中耳炎における内耳に MIF およびその受容体である CD74 が有意に発現していることを本研究で初めて示した。

急性感染症や慢性炎症性疾患で MIF が重要な役割を示すことは、これまでも報告されている。例えば、敗血症患者での MIF の血漿レベルが重症度と正の相関を示し、敗血症死亡患者では生存者より有意に血漿中の MIF レベルが高いと報告されている。また中耳においても、MIF のダウンレギュレーションは実験的中耳炎での中耳の炎症を減少させたと報告されている。一方で、MIF は正常の蝸牛機能を維持する上でも重要な因子であることが示唆されており、これは PBS で処置した対照マウスの内耳にも MIF が発現していたことを示した我々の研究結果と矛盾しないものである。

また、内耳に浸潤した炎症細胞にも MIF が発現していることが免疫組織化学検査で確認された。これが LPS で処置した実験群の方が対照群と比較して *mif* 遺伝子発現が有意に増加していた PCR の結果と関連していると考えた。

CD74 は II 型膜貫通タンパク質であり MHC クラス II インバリエント鎖としても知られ、MIF 受容体複合体の主要成分である。MIF は、CD74 の表面に結合し、P44/ P42 の MAPK リン酸化を起こす。抗 CD74 抗体の投与は、MIF 誘発性肺炎のマウスにおいて好中球の浸潤および炎症性サイトカインおよびケモカインの産生を阻害したとの報告がある。一方、CD74 はマウスでの正常な肺胞構造の維持のために必要であるとの報告もある。今回、我々は CD74 が LPS 誘発性中耳炎での中耳および内耳の両方で発現していることを示した。

【結論】

LPSの中耳注入は、中耳および内耳にMIFの有意な発現を引き起こした。MIFの受容体であるCD74は、LPSを注射したマウスの中耳および内耳の両方で観察された。MIFおよびCD74は、マウスにおいてリポポリサッカライド誘発性中耳炎での中耳と内耳の両方でいくつかの役割を果たしている可能性がある。我々の研究結果はマクロファージ遊走阻止因子とそのシグナル伝達経路は中耳炎によって誘発される内耳障害の治療標的として役立つことを示唆している。