



Title	後天性中耳真珠腫に対する診断および治療戦略とNotchシグナルに関する研究
Author(s)	福田 篤
Citation	北海道大学. 博士(医学) 乙第7156号
Issue Date	2022-03-24
DOI	10.14943/doctoral.r7156
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/87704
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 1704
File Information	FUKUDA_Atsumi.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

後天性中耳真珠腫に対する診断および治療戦略と
Notch シグナルに関する研究

(Studies on diagnostic and therapeutic strategies
and Notch signaling in acquired middle ear cholesteatoma)

2022年3月

北海道大学

福田 篤

Atsushi Fukuda

学位論文

後天性中耳真珠腫に対する診断および治療戦略と
Notch シグナルに関する研究

(Studies on diagnostic and therapeutic strategies
and Notch signaling in acquired middle ear cholesteatoma)

2022 年 3 月

北海道大学

福田 篤

Atsushi Fukuda

目次

1. 発表論文目録および学会発表目録	1 頁
2. 要旨	3 頁
3. 略語表	7 頁
4. 本論文全体の緒言	8 頁
5. 第一章	
5-1. 緒言	16 頁
5-2. 方法	17 頁
5-3. 結果	20 頁
5-4. 考察	23 頁
6. 第二章	
6-1. 緒言	25 頁
6-2. 方法	26 頁
6-3. 結果	27 頁
6-4. 考察	30 頁
7. 第三章	
7-1. 緒言	32 頁
7-2. 方法	34 頁
7-3. 結果	36 頁
7-4. 考察	42 頁
8. 総括および結論	45 頁
9. 謝辞	46 頁
10. 利益相反	46 頁
11. 引用文献	47 頁

1. 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

原著論文

1. Atsushi Fukuda, Shinya Morita, Yuji Nakamaru, Kimiko Hoshino, Keishi Fujiwara, Akihiro Homma. Short-Term Hearing Prognosis of Ossiculoplasty in Pars Flaccida Cholesteatoma Using the EAONO/JOS Staging System. *J Int Adv Otol* 15:2–7, 2019.
2. Atsushi Fukuda, Shinya Morita, Taisuke Harada, Keishi Fujiwara, Kimiko Hoshino, Yuji Nakamaru, Akihiro Homma. Value of T1-weighted Magnetic Resonance Imaging in Cholesteatoma Detection. *Otol Neurotol* 38:1440–1444, 2017.
3. Atsushi Fukuda, Satoshi Kano, Yuji Nakamaru, Shinya Morita, Kimiko Hoshino, Keishi Fujiwara, Akihiro Homma. Notch Signaling in Acquired Middle Ear Cholesteatoma. *Otol Neurotol* 42:e1389–e1395, 2021.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

国際学会

1. Atsushi Fukuda, Shinya Morita, Keishi Fujiwara, Takatsugu Mizumachi, Yuji Nakamaru, Akihiro Homma, Satoshi Fukuda. Diffusion-weighted MR imaging for evaluation of cholesteatoma and the value of T1 weighted MR imaging in the exclusion of the false-positive. The 10th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery. Edinburgh, UK. June 5–8, 2016.
2. Atsushi Fukuda, Shinya Morita, Kimiko Hoshino, Keishi Fujiwara, Akihiro Homma, Yuji Nakamaru. Hearing Prognostic Factors of Tympanoplasty Type III for Primary Acquired Pars Flaccida Cholesteatoma. 4th Congress of European ORL-HNS. Barcelona, Spain. October 7–11, 2017.

国内学会

1. 福田篤, 森田真也, 中丸裕爾, 福田諭. 当科における中耳真珠腫の術前MRI 拡散強調像の検討. 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 名古屋市. 2016 年 5 月 18 日-21 日.
2. 福田篤, 森田真也, 干野季美子, 藤原圭志, 中丸裕爾, 本間明宏. EAONO/JOS 中耳真珠腫進展度分類を用いた術後聴力予後因子の検討. 第 28 回日本耳科学会総会・学術講演会, 大阪市. 2018 年 10 月 3 日-6 日.
3. 福田篤, 森田真也, 藤原圭志, 干野季美子, 中丸裕爾, 本間明宏. 後天性中耳真珠腫における Notch シグナル関連分子発現についての検討. 第 31 回日本耳科学会総会・学術講演会, 東京都. 2021 年 10 月 13 日-16 日.

2. 要旨

【背景と目的】

後天性中耳真珠腫は鼓膜の角化扁平上皮が中耳腔に侵入することにより発生する。中耳真珠腫は内部に keratin debris を溜めながら増大し、局所浸潤性で骨溶解により中耳および内耳破壊をもたらし、難聴、めまい、顔面神経麻痺などを引き起こす。頭蓋内に進展した場合には髄膜脳炎や脳膿瘍を合併し死亡する場合がある。根本的治療は外科的治療のみで、病変の根治、および聴力改善・維持を目指して鼓室形成術が施行される。本論文では、まず後天性中耳真珠腫における術後聴覚予後因子について明らかにし、次いでMRI検査による診断精度向上の試みについて検討する。さらに、後天性中耳真珠腫組織標本を用いて Notch シグナル関連分子の発現解析を行い後天性中耳真珠腫と Notch シグナルの関連を検討する。

【対象と方法】

2010年2月から2020年4月までに北海道大学病院耳鼻咽喉科で後天性中耳真珠腫（あるいは疑い症例）に対して手術が施行された症例を対象とした。

1. アブミ骨上部構造が残存しており耳介軟骨で伝音再建が施行できた一期的鼓室形成術症例を対象とした。EAONO/JOS 合意案に従って病期 (Stage) と進展度 (STAM システム) を評価した。聴力結果は、AAO-HNS の基準に従い、0.5・1・2・3kHz を用いて平均純音気骨導差 (PTA-ABG) を算出した。術後1年以上2年未満の聴力結果を術後聴力結果として使用し、術後 PTA-ABG が 20dB 以内を成功と定義した。年齢 (60 歳未満/60 歳以上)、病期 (Stage I-IV)、各解剖学的区分 (STAM) への進展の有無、乳突部の蜂巣発育程度 (MC0-1/MC2-3)、アブミ骨病変の程度 (S0/S1)、術式 (CWU/CWD)、ツチ骨柄の有無、鼓索神経の有無、中耳粘膜の状態 (正常/病変) について、術後聴力結果との関連について検討した。
2. 術前に non-EP DWI および T1WI を含む MRI を実施した初回手術と再手術/段階手術症例を対象とした。MRI での中耳真珠腫を診断するための2つの診断基準を定義した。基準1：中耳または乳突腔内の non-EP DWI において、脳組織の信号と比較して高信号であること、基準2：基準1の所見があり、T1WI 像において大脳白質の信号と比較して同程度または低信号であること。最終診断は手術中の所見で確認した。各診断基準における診断精度について検討した。

3. 真珠腫組織を用いて PCR 法による Notch シグナル関連遺伝子の発現分析を行った。PFPE 組織から厚さ $10\mu\text{m}$ の切片を作成した。マイクロダイセクション法にて真珠腫および正常外耳道皮膚組織から上皮層を回収、mRNA を抽出し、84 の Notch シグナル関連遺伝子のプライマーで構成される RT² mRNA PCR Array (RT² Profiler™ PCR Array Human Notch Signaling Pathway, Qiagen) にて quantitative-realtime-PCR を施行し遺伝子発現解析を行なった。各遺伝子の転写レベルに関しては 2 つのハウスキーパー遺伝子を用いて標準化を行い、それぞれの ΔCt 値を算出し、相対的 mRNA 発現比 (Fold change) に関しては $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法に基づき計算を行った。また、手術時に採取した真珠腫組織を用いて免疫組織化学染色を施行した。FFPE 組織を $4\mu\text{m}$ の厚さで薄切し切片を作成し、抗 Notch1, 抗 HES1, 抗 p53 モノクローナル抗体を用いて免疫化学染色を施行した。いずれの実験も正常外耳道皮膚を対照とした。

【結果】

1. 解析対象は手術で真珠腫と確定診断を得た 34 名 34 耳であった。Stage IV の患者はいなかった。術後 PTA-ABG が 20dB 以下は 55.9% の症例に認められた。EAONO/JOS 合意案の病期上昇に伴い術後聴力成功率は有意に低下し ($p = 0.025$)、アブミ骨病変の程度が S0 (アブミ骨上部構造および周辺粘膜が正常) であることが有意な成功予測因子であった ($p = 0.014$)。
2. 解析対象は 53 名 57 耳であった。57 耳のうち 46 耳 (80.7%) で中耳真珠腫が手術で確認された。non-EP DWI のみを用いた基準 1 では、全体の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率は、それぞれ 93.5, 63.6, 91.5, 70.0% であり、全体の正診率は 87.7% であった。non-EP DWI と T1WI を組み合わせた基準 2 では、全体の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率は、それぞれ 89.1, 100, 100, 68.8% であり、全体の正診率は 91.2% であった。
3. 真珠腫 PFPE 標本は男性 5 耳、女性 1 耳から組織を採取し作製した。対照群として、同患者からそれぞれの正常外耳道皮膚を採取し PFPE 標本作製した。84 遺伝子のうち 48 の遺伝子発現を解析できたが、残りの 36 遺伝子については半数以上の Ct 値が欠損していたため解析ができなかった。真珠腫における *Notch1* の相対的発現比は最も低く、統計的に有意な差が認められた ($p = 0.042$)。Notch シグナルの主要な標的の一つである *HES1* の相対的発現比も減少していた ($p = 0.272$)。 *Notch3* の相対的発現比は増加していた ($p = 0.680$)。真珠腫 FFPE 標本は男性 28 名、女性 13 から組

織を採取し作製した。対照群として、手術を受けた他の男性4名、女性4名の8名の患者から正常外耳道皮膚を採取しFFPE標本を採取した。Notch1の発現陽性率は、真珠腫では $48.5 \pm 32.4\%$ 、外耳道皮膚では $83.4 \pm 17.5\%$ であり、Notch1の発現に統計学的に有意な差が認められた ($p < 0.001$)。HES1の発現陽性率は、真珠腫で $44.9 \pm 17.8\%$ 、外耳道皮膚で $55.7 \pm 7.1\%$ であり、統計学的に有意な差が認められた ($p < 0.01$)。p53の発現陽性率は、真珠腫では $8.5 \pm 11.4\%$ 、外耳道皮膚では $0.5 \pm 0.7\%$ であり、統計学的に有意な差が認められた ($p < 0.001$)。

【考察】

1. 後天性中耳真珠腫に対する鼓室形成術の術後聴力成績に対して、EAONO/JOS合意案の病期が低いこと、アブミ骨周囲に病変が及んでいないことが有利に働く重要な因子であることが示された。病期は中耳真珠腫が初発部位を越えて隣接区分に進展することで進行し、また、病期が進行することでアブミ骨病変の程度も悪化しやすい。従って、有効な聴覚を温存するためには、早期に手術を行うことが重要と考えられた。
2. 中耳真珠腫のMRI診断においてT1WIは偽陽性の除外に有用であり、non-EP DWIとT1WIの組み合わせは、non-EP DWIのみと比較して、特異度と正診率の向上が期待できることが示された。non-EP DWIとT1WIを合わせたMRI検査は、中耳真珠腫の正確な早期診断に寄与すると考えられる。
3. 真珠腫組織における*Notch1*遺伝子の発現、Notch1とHES1の発現は、正常外耳道皮膚に比べて有意に低下していた。Notchシグナルは、セラチノサイトの増殖停止と分化を導くことが報告されているが、真珠腫におけるNotch1とHES1の発現低下は、セラチノサイトが分化から増殖へとバランスを変化させ、病的状態の原因となっている可能性がある。

【結論】

1. 中耳真珠腫に対して有効な聴覚を温存するためには、病期が進行する前に早期に正確な診断を行い、鼓室形成術を行うことが重要である。
2. 鼓膜所見だけでは中耳真珠腫の診断が困難な場合は、non-EP DWIとT1WIを組み合わせたMRI検査も行うことで、中耳真珠腫を正確に早期に診断することが可能となる。
3. 中耳真珠腫ではNotch1-HES1シグナル経路の発現が低下する傾向が示さ

れ，細胞の分化から増殖方向へとバランスを変化させ，病的状態の原因をもたらしている可能性が考えられる．

3. 略語表

本文中，ならびに図表中で使用した略語は以下の通りである。

CSL	Centromere-binding factor 1/Suppressor of Hairless/Lag-1
CT	computed tomography
CWD	canal wall down
CWU	canal wall up
Ct	cycle threshold
DWI	diffusion weighted imaging
Dll	Delta-like
EAONO	European Academy of Otology & Neuro-Otology
FFPE	formalin-fixed paraffin embedded
GADPH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
HASTE	half-Fourier acquisition single-shot turbo-spin-echo
HE	hematoxylin-eosin
HES1	Hairy and enhancer of Split-1
kHz	kilohertz
JOS	Japan Otological Society
Jag	Jagged
MR	magnetic resonance
MRI	magnetic resonance imaging
NCSTN	nicastrin
NICD	notch intracellular domain
PCR	polymerase chain reaction
PFPE	PAXgene Tissue-fixed paraffin embedded
PROPELLER	periodically rotated overlapping parallel lines with enhanced reconstruction
PTA-ABG	pure-tone average air-bone gap
RNA	ribonucleic acid
RPLP0	Ribosomal protein lateral stalk subunit P0
T	tesla
T1W1	T1-weighted imaging
cDNA	complementary DNA
dB	decibel
mRNA	messenger ribonucleic acid
non-EP	non-echo planar

4. 本論文全体の緒言

4-1. 中耳真珠腫

中耳真珠腫 middle ear cholesteatoma とは中耳腔に生じる表皮性嚢胞性病変の総称である。その発生母地によって、胎生期の外胚葉組織の迷入や遺残による先天性中耳真珠腫と鼓膜から生じる後天性中耳真珠腫に分類される。かつては腫瘍と考えられた時期もあったが、真珠腫は腫瘍ではなく角化扁平上皮の落屑 (keratin debris) が増殖堆積したものである。内部にコレステロール結晶を伴うことがあり真珠のような白色塊として観察されることがあるため、このような名称になった。

後天性中耳真珠腫は鼓膜の角化扁平上皮が中耳腔に侵入することにより発生する。その病態生理は未だ不明であるが、最も広く受け入れられている説は1933年に Wittmaack が提唱したもので、鼓膜の陥凹部分 (retraction pocket) の自浄作用が失われ、keratin debris の堆積が始まると真珠腫に進展するとされている (Hamed et al., 2016; Kuo, 2015) (図 1)。その侵入部位の違いから弛緩部型と緊張部型に分類され、弛緩部型は鼓膜上方の弛緩部から侵入し、緊張部型は主に鼓膜の後上部から侵入する。また、慢性中耳炎による鼓膜穿孔から二次性に生じる場合や、外傷後や医原性に生じる場合もある (Yung et al., 2017) (図 2)。中耳真珠腫は内部に keratin debris を溜めながら増大し、局所浸潤性で骨溶解により中耳および内耳破壊をもたらし、難聴、めまい、顔面神経麻痺などを引き起こす。頭蓋内に進展した場合には髄膜炎や脳膿瘍を合併し死亡する場合がある (Kuo, 2015)。

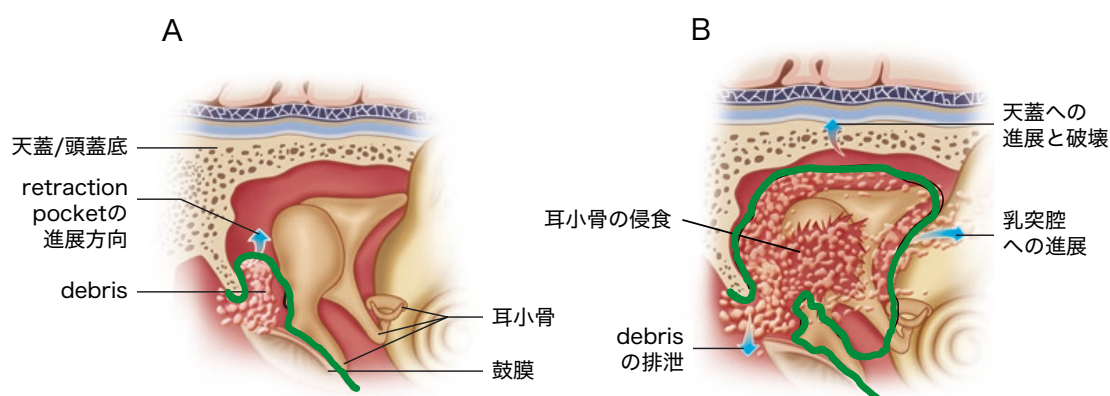


図 1. 弛緩部型中耳真珠腫の進展様式。緑線は中耳に侵入した角化扁平上皮を示す。A：初期の真珠腫。B：進行した真珠腫。(Briddell JW らの論文(Briddell et al., 2018)から改編して引用)

術式選択や手術成績を比較するために、ヨーロッパ耳科学会（EAONO）と日本耳科学会（JOS）の合意案が2017年に作成され、世界的に広く用いられつつある（図2）（Yung et al., 2017）。根本的治療は外科的治療のみで、病変の根治、および聴力改善・維持を目指して後述する鼓室形成術が施行される。

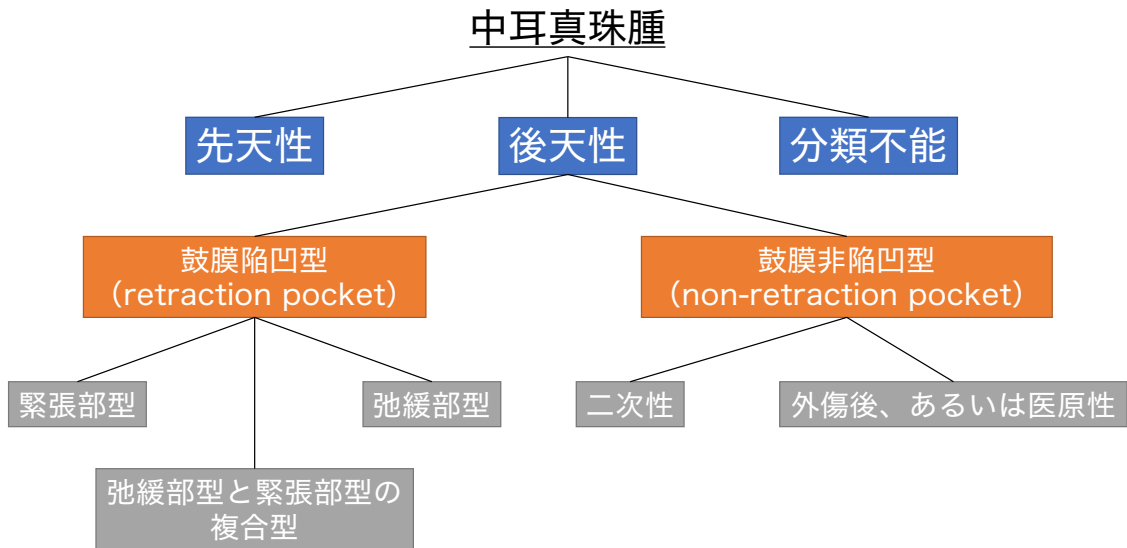


図2. EAONO/ JOS 中耳真珠腫の病態分類(Yung et al., 2017)

4-2. 耳の解剖

耳は外耳，中耳，内耳に分類され，聴器，平衡器と顔面神経が含まれる（図4）．外耳は耳介と外耳道から構成され，音波を中耳へ伝える．中耳は側頭骨内の含気腔で，耳管，鼓室，乳突洞，乳突蜂巣などから成る．外側は鼓膜によって外耳道と，内側は前庭窓と蝸牛窓によって内耳と境されている．鼓室の前方は耳管によって上咽頭に，上方は乳突洞を経て乳突蜂巣に通じる．鼓膜から内耳に向かって，ツチ骨，キヌタ骨，アブミ骨と呼ばれる3つの耳小骨が連鎖しており，アブミ骨底は前庭窓にはまり込んでいる．内耳は蝸牛，前庭，半規管から構成され，側頭骨内に形成された骨迷路という空間とその内部にある膜迷路からできている．両者の間は外リンパ液，膜迷路の中は内リンパ液で満たされている．膜迷路によって蝸牛，前庭，半規管は交通している．顔面神経は内耳道から鼓室内側の側頭骨内を走行する．鼓室，乳突洞，乳突蜂巣の上方には頭蓋底が隣接し，乳突蜂巣の後方には頭蓋底とS状静脈洞が隣接する．

中耳真珠腫において病変が進展すると，耳小骨や内耳骨胞の破壊をもたらす，難聴を引き起こす．半規管（特に外側半規管）の破壊はめまいをもたらす．また顔面神経管に病変が近接・進展すると，顔面神経麻痺を引き起こす．頭蓋底の菲薄化や欠損を生じると細菌感染の波及により髄膜炎や脳炎，脳膿瘍などを形成することがある(Kuo et al., 2015a)．

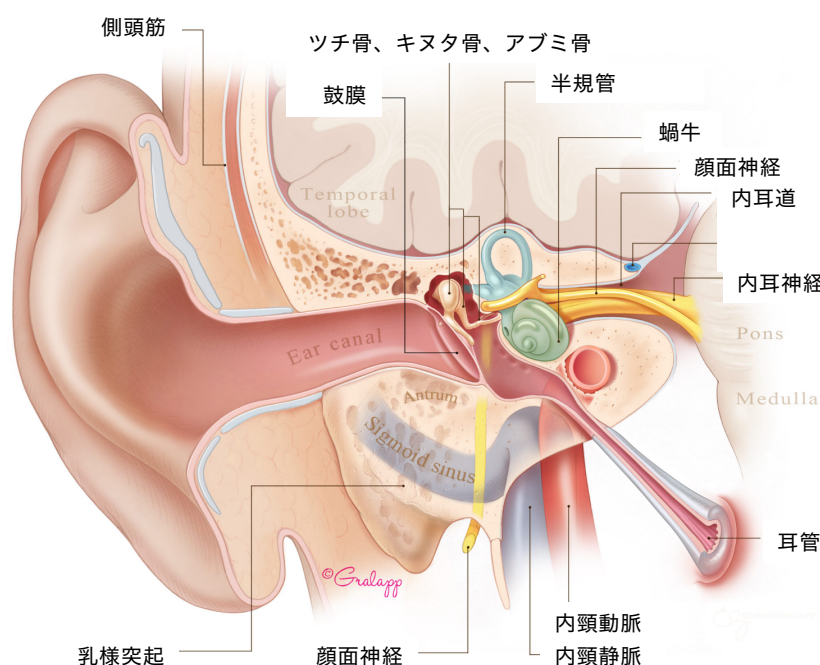


図4. 耳の解剖. (Ear Surgery Illustrated(Jackler and Gralapp, 2020)より改編して引用)

4-3. 聴覚機能と聴力検査

聴覚とは音声の弁別，知覚，理解などの機能のことで，音波としての音を外耳でとらえてから中耳，内耳，聴神経を介して聴覚中枢まで伝え，認識することである．耳介は主に前方からの数千 Hz の音を集音して外耳道に導く．外耳道は一端が鼓膜で閉鎖された共鳴腔で，2,000–4,000 Hz の周波数が最大 10 dB 程度増幅される．中耳には音波を増幅させて内耳に伝える役割がある．鼓膜とアブミ骨底の面積比やツチ骨柄とキヌタ骨長脚のてこ比による中耳インピーダンス整合により約 30 dB の増幅効果がある（図 5）．また，蝸牛窓遮蔽効果により約 12 dB の損失を免れる．アブミ骨底板から内耳に入った液体振動エネルギーは蝸牛コルチ器の有毛細胞の興奮によって，神経活動という電気化学的エネルギーへ変換され，聴覚中枢へと情報伝達が行なわれる．

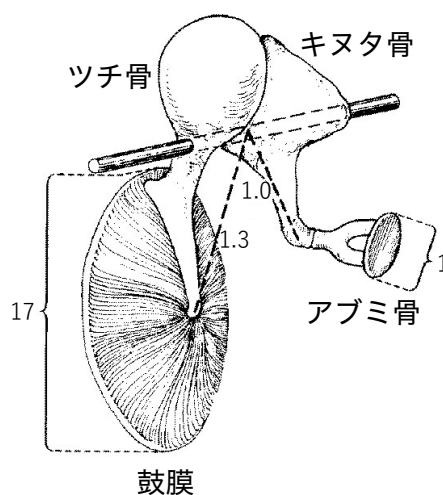


図 5. 中耳伝音器の音圧増強作用．鼓膜とアブミ骨底の面積比は 17:1，ツチ骨とキヌタ骨のてこ比は 1.3:1.0 である．（新耳鼻咽喉科学(切替, 2013)より改編して引用）

純音聴力検査は純音という正弦波で示される波形を持つ音によって聴力を測定する検査である。純音聴力検査には気導聴力検査と骨導聴力検査があり、難聴の程度（聴力閾値）の評価と伝音、感音、混合性難聴の分類が可能である。気導聴力検査はヘッドフォンを装着して外耳道口から純音を提示し、外耳道から鼓膜、耳小骨経由で前庭窓、内耳へと到達した音に対する反応を調べるもので、聴覚伝導路のいずれの部位の障害であっても閾値の上昇がみられる。骨導聴力検査は振動端子を側頭骨乳様突起部に接触させて音を提示し、頭蓋骨を介して直接内耳へと到達した音に対する反応を調べるもので、内耳および内耳より中枢に障害がある場合に起こる感音難聴の際に骨導閾値が上昇する。一方、外耳から中耳に障害がある場合に起こる伝音難聴では骨導閾値は上昇せず、上昇した気導閾値と骨導閾値に気骨導差（air-bone gap）と呼ばれる乖離が認められる（図6）。

中耳真珠腫においては、耳小骨の固着や破壊は伝音難聴の原因となり、内耳骨胞への炎症波及や内耳の破壊は感音難聴の原因となる(Kuo et al., 2015a)。

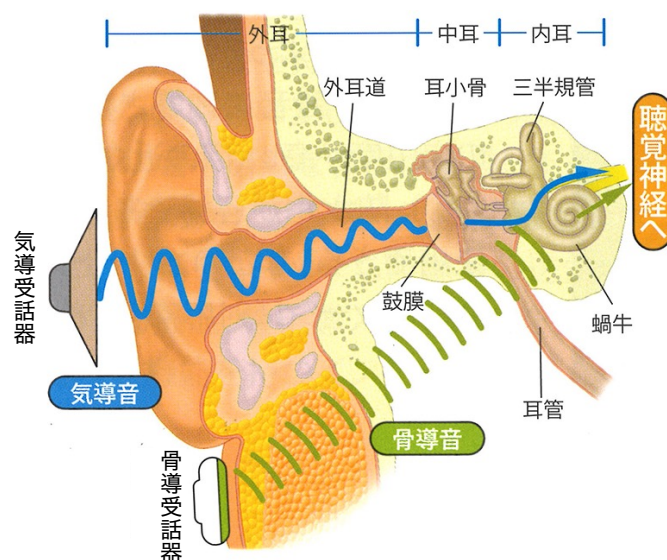


図6. 気導聴力と骨導聴力 (https://www.temco-j.co.jp/bone_conduction/から改編して引用，アクセス日 2021年11月1日)

4-4. 中耳真珠腫に対する外科的治療法と耳小骨連鎖再建

中耳真珠腫に対する外科的治療の第一の目的は、中耳真珠腫病変を摘出して病変の進展を防ぎ、耳漏のない乾燥した外耳道と鼓膜を形成することである。一般的には外耳道後壁保存型 (canal wall up; CWU) 鼓室形成術か外耳道後壁削除型 (canal wall down; CWD) 鼓室形成術が行われる (図7)。CWU 鼓室形成術は生理的な外耳道形態を維持できるのが長所であるが、手術中の視野が取りにくく真珠腫を取り残す恐れがあるため再発率が高いことが欠点である。CWD 鼓室形成術は広い視野が得られるため真珠腫の完全摘出がしやすく再発率が低いことが長所であるが、外耳道後壁が削除されることで乳突腔と本来の外耳道とが共通腔となった広い外耳道が形成されるので、耳漏や痂皮が発生しやすく、生涯に渡り定期的な耳処置が必要になることなどが短所である (Kuo et al., 2015a)。再発率に関するシステマティックレビューでは、CWU 鼓室形成術の再発率は 16.7-61.0%、CWD 鼓室形成術は 0-13.2%との報告がある (Kerckhoffs et al., 2016)。遺残性再発リスクの高度な症例については、初回手術の半年から1年後に二期的手術を計画することがある。

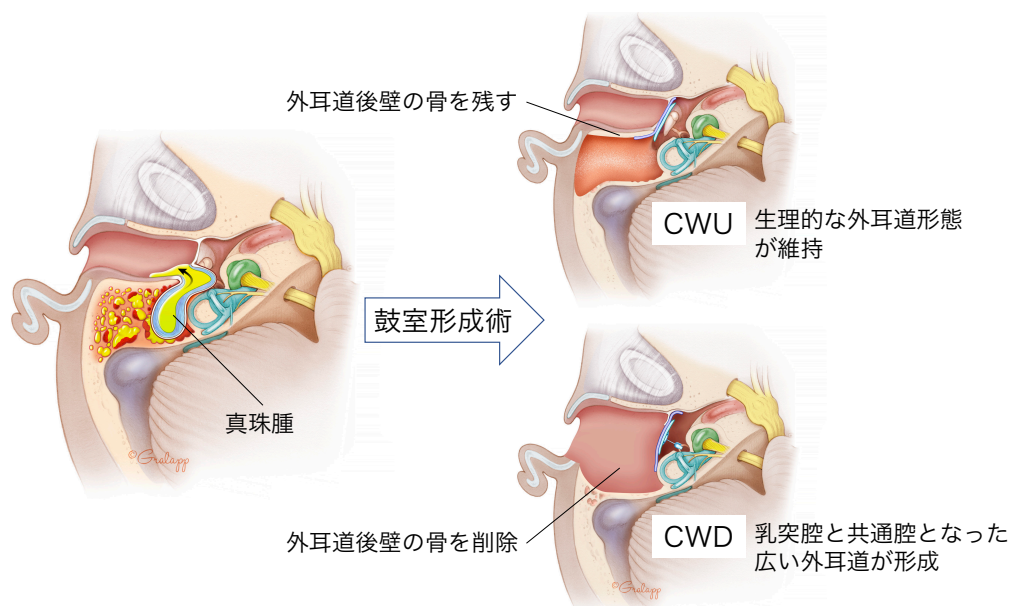


図7. 外耳道後壁保存型 (canal wall up; CWU) 鼓室形成術と外耳道後壁削除型 (canal wall down; CWD) 鼓室形成術の水平断での模式図. (Ear Surgery Illustrated(Jackler and Gralapp, 2020)より改編して引用)

外科的治療の第二の目的は聴力を維持、あるいは改善させることである。中耳真珠腫によって生じた伝音難聴に関しては、自家移植片（軟骨や骨）や人工耳小骨を用いた耳小骨連鎖再建（伝音再建）を行うことで改善させることが可能である。CWD 鼓室形成術では中耳の共鳴が損なわれるため、CWU 鼓室形成術よりも術後聴力が悪くなる傾向があると考えられている (Kuo et al., 2015a)。しかし、両者の間の術後聴力成績に有意な差が見出せなかったという報告も複数あり、どちらの術後聴力が優れているかについてはコンセンサスが得られていない (Kuo et al., 2015b)。術式選択に関しては、解剖学的要因などにより CWD 鼓室形成術を選択せざるを得ない場合もあるが、病変の進展度や患者の社会的背景などに応じて適切に手術計画を立てることが肝要である。

4-5. 本論文の目的

本論文では、第一章において後天性中耳真珠腫における術後聴覚予後因子について明らかにし、第二章において magnetic resonance imaging (MRI) 検査による診断精度向上の試みについて検討し論ずる。さらに第三章において、後天性中耳真珠腫の病態生理解明のため、後天性中耳真珠腫組織標本を用いて Notch シグナル関連分子の発現解析を行った。

4-6. 本論文で明らかになったこと

後天性中耳真珠腫に対する鼓室形成術の術後聴力成績は真珠腫の進展度やアブミ骨病変の程度などに相関することが示された。従って、良好な聴覚を温存するためには早期に正確な診断を行い手術を行うことが重要である。

後天性中耳真珠腫の画像診断においては MRI がその質的診断において有用であるが、non-echo planar (non-EP) 拡散強調像 (DWI) に T1 強調像 (T1WI) を併用することで、従来の non-EP DWI 単独に比べて診断精度の向上に寄与することが示され、正確な早期診断に有用なツールと考えられた。

Notch シグナルは表皮角化細胞において増殖停止と分化をもたらすとされているが、後天性中耳真珠腫上皮における Notch シグナル関連遺伝子とタンパク質の発現解析の結果、中耳真珠腫上皮では Notch1-HES1 シグナル経路に関わる遺伝子発現低下、および Notch1, HES1 タンパク質の発現低下がみられ、その病態生理に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

第一章

後天性中耳真珠腫における聴覚予後因子の探索

5-1. 緒言

後天性中耳真珠腫に対しては現在まで手術以外の有効な治療法は開発されておらず、そのため、病変を除去し聴力を維持・改善するためには鼓室形成術を行うことが唯一の根治治療である。しかし、がんに対しての TNM 分類のような世界的に標準化された病期分類が中耳真珠腫に対しては存在せず、治療成績の比較検討が困難であった。そこで、中耳真珠腫治療に関わる臨床研究の基盤とするため、2015年に日本耳科学会 (JOS) から中耳真珠腫進展度分類 2015 (JOS 2015) が提案された (Matsuda et al., 2018; Tono et al., 2017)。これをもとに、2017年にはヨーロッパ耳科学会 (EAONO) と JOS が協力して、中耳真珠腫の定義、病態分類、病期分類に関する共同合意案が世界に向けて発信され (Yung et al., 2017)、現在この EAONO/JOS 合意案が世界的に広く用いられつつある。

鼓室形成術の術後聴力成績に影響を与えうる様々な因子がこれまでに検討されている。伝音再建後の聴力改善に有利な因子としては、耳漏が少ないこと (Chavan et al., 2014; Dornhoffer and Gardner, 2001) や、ツチ骨柄の存在 (Albu et al., 1998; Bared and Angeli, 2010; Chavan et al., 2014; Dornhoffer and Gardner, 2001; Mishiro et al., 2009; De Vos et al., 2007; Yung and Vowler, 2006)、アブミ骨上部構造の存在 (Albu et al., 1998; Mishiro et al., 2009, 2010; Moon et al., 2007; Umit et al., 2010)、アブミ骨の可動性が正常であること (Mishiro et al., 2009)、鼓索神経の存在 (Yamamoto et al., 2010)、中耳粘膜の状態が正常であること (Dornhoffer and Gardner, 2001; Mishiro et al., 2009; Moon et al., 2007; De Vos et al., 2007)、CWU 鼓室形成術 (Dornhoffer and Gardner, 2001; Martin et al., 2009; Quaranta et al., 2015; Yamamoto et al., 2010)、初回手術 (Albu et al., 1998; Dornhoffer and Gardner, 2001; Martin et al., 2009; Mishiro et al., 2010; Yamamoto et al., 2010)、局所麻酔下手術 (Mishiro et al., 2009) が報告されている。しかし、これらの研究の多くは、対象疾患が中耳真珠腫以外の慢性中耳炎も含まれていて伝音再建法も様々であり、報告によっては有意とならない因子もあるため、その結果の解釈には議論を要する。

中耳真珠腫に対する伝音再建術後の聴力予後因子に関して、標準化された進展度分類に基づいて検討した報告はこれまでになかった。本章では、JOS 2015 と EAONO/JOS 合意案、また過去に報告された予後因子に従って、弛緩部型中耳真珠腫新鮮例に対する鼓室形成術の術後聴力予後因子について検討した。

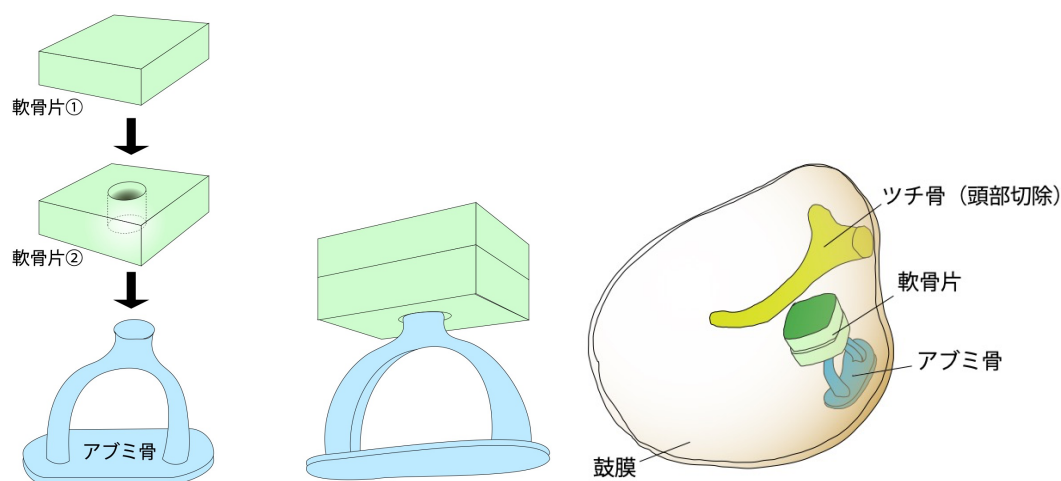
5-2. 方法

(1) 対象

本研究は、2013年4月から2017年7月までに北海道大学病院耳鼻咽喉科で弛緩部型中耳真珠腫新鮮例に対して一期的鼓室形成術が施行された症例を対象とした後方視的研究である。中耳真珠腫の診断は、EAONO/JOS 合意案(Yung et al., 2017)の定義に従った。伝音再建の方法による術後聴力への影響を除くため、アブミ骨上部構造が残存しており耳介軟骨で伝音再建が施行できた症例を対象とした。

(2) 手術方法

全身麻酔下で全ての症例の手術を施行した。耳後部切開をおき、顕微鏡下にCWU鼓室形成術、あるいはCWD鼓室形成術を行い中耳真珠腫を摘出した。これらの術式は、乳突蜂巣の発育程度、天蓋の位置や骨破壊の有無の状態に応じて選択した。すなわち、乳突蜂巣の発育が悪い症例や天蓋の位置が低い症例、天蓋の骨破壊のある症例に対してはCWU鼓室形成術では十分な視野がとれず、真珠腫を取り残す恐れがあるためCWD鼓室形成術を施行した。ツチ骨頭部とキヌタ骨は摘出した。耳甲介腔から採取した軟骨から小軟骨片を2段重ねにしたものを作成し、アブミ骨頭と鼓膜の間に移植して伝音再建とした(図I-1)。鼓索神経が温存された場合は、移植した2段軟骨片を安定化させるためにその上に神経を置いた。



図I-1. 伝音再建方法. 2段軟骨片をアブミ骨の上に乗せ、その上に鼓膜を敷いた。

(3) 病期と分類の基準

EAONO/JOS 合意案 (図 I-2) に従って病期 (Stage) を決定した。中耳真珠腫の進展度については手術所見で確認し, STAM システム (図 I-2) に従って評価した (Yung et al., 2017)。乳突部の蜂巣発育程度は術前の computed tomography (CT) 所見で評価し, JOS 2015 に従い MC0-MC3 の 4 段階に分類した (図 I-3) (Tono et al., 2017)。アブミ骨病変の程度は術中所見で評価し, JOS 2015 に従い S0, S1 の 2 つの状態に分類した (図 I-4)。また, ほかの検討因子としてツチ骨柄と中耳粘膜の状態を定義した。すなわち, ツチ骨柄が残存している場合を「有」, 病変により消失していたか意図的に摘出した場合を「無」と定義した。中耳粘膜の状態は術中所見から「正常」あるいは「病的」(浮腫状, あるいは鼓膜と癒着) に分類した。

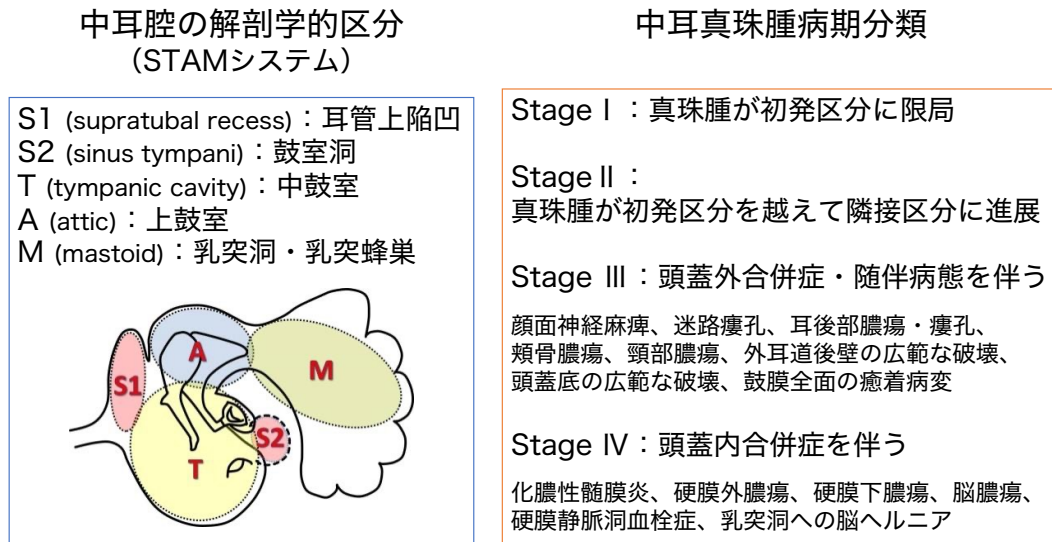


図 I-2. EAONO/JOS 中耳真珠腫の病期分類 (Yung et al., 2017)

- MC0 : 蜂巣構造が殆ど認められないもの
- MC1 : 蜂巣構造が乳突洞周囲に局限しているもの
- MC2 : 乳突蜂巣の発育が良好のもの
- MC3 : 蜂巣発育が迷路周囲まで及んでいるもの

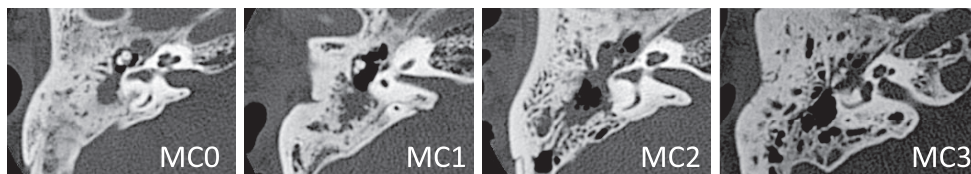


図 I-3. 乳突部の蜂巣発育程度

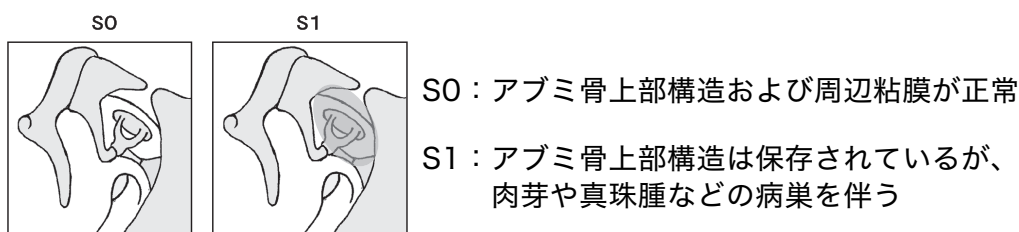


図 I-4. アブミ骨病変の程度

(4) 聴力結果

聴力結果は世界的に頻用されている guidelines of the Committee on Hearing and Equilibrium of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery(American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 1995) に従い、0.5・1・2・3 kilohertz (kHz) の純音気導聴力と純音骨導聴力を測定し、平均純音気骨導差 (pure-tone average air-bone gap; PTA-ABG) を算出した。3kHz が測定されなかった場合は、2 kHz と 4 kHz の平均値で代用した*。術後 1 年以上 2 年未満の聴力結果を術後聴力結果として使用し、術後 PTA-ABG が 20 dB 以内を術後聴力結果の成功と定義した。

*本邦では米国と異なり標準的に行われる純音聴力検査の周波数に 3 kHz が採用されていない。

(5) 統計学的解析

患者の年齢 (60 歳未満/60 歳以上)、病期 (Stage I-IV)、各解剖学的区分 (STAM) への進展の有無、乳突部の蜂巢発育程度 (MC0-1/MC2-3)、アブミ骨病変の程度 (S0/S1)、術式 (CWU/CWD)、ツチ骨柄の有無、鼓索神経の有無、中耳粘膜の状態 (正常/病的) について、術後聴力結果との関連について検討した。病期分類の統計解析には Cochran-Armitage の傾向検定を、その他の因子の統計解析には Fisher の正確確率検定を用いた。統計学的解析には JMP pro 14 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を使用し、 p 値が 0.05 未満である場合を統計学的に有意であると判断した。

(6) 倫理面への配慮

本研究は、北海道大学病院生命・医学系研究倫理審査委員会の審査を受け承認された「耳科手術の術後成績に関する研究 (臨床研究番号 017-0375)」の一環として、「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号) を遵守して実施された。

5-3. 結果

対象は34名34耳，男性は18名，女性は16名であった．年齢中央値は61.5（16-87）歳であった．手術からの平均追跡期間は41（12-63）ヵ月であった．表 I-1 に対象症例の臨床的特徴を示す．Stage IV の患者はいなかった．表 I-2 に全患者の術後聴力結果をまとめた．術後 PTA-ABG が 20 dB 以下という良好な聴力結果は 55.9% の症例に認められた．34 耳中 1 耳は，CWU 鼓室形成術を受けてから 3 年後に中耳真珠腫の遺残性再発が認められ再手術を受けた．術後に局所弁の壊死や乳突腔障害，顔面神経麻痺，髄膜炎，脳膿瘍などの合併症を起こした患者はいなかった．

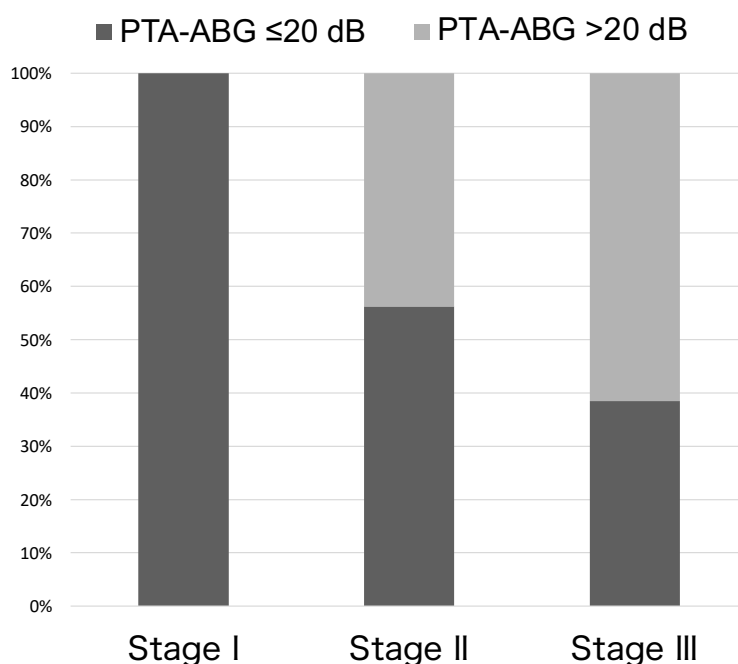
表 I-1. 対象患者の臨床的特徴

		No. (%)
性別	男性	18 (52.9)
	女性	16 (47.1)
年齢 (歳)	中央値 (範囲)	61.5 (16-87)
	<60	15 (44.1)
	≥60	19 (55.9)
病期	Stage I	5 (14.7)
	Stage II	16 (47.1)
	Stage III	13 (38.2)
	迷路瘻孔	3 (8.8)
	頭蓋底の広範な破壊	10 (29.4)
	鼓膜全面の癒着病変	1 (2.9)
	Stage IV	0 (0)
S1 進展	有	1 (2.9)
	無	33 (97.1)
S2 進展	有	3 (8.8)
	無	31 (91.2)
T 進展	有	5 (14.7)
	無	29 (85.3)
M 進展	有	26 (76.5)
	無	8 (23.5)
乳突部の蜂巢発育程度	MC0-1	27 (79.4)
	MC2-3	7 (20.6)
アブミ骨病変の程度	S0	18 (52.9)
	S1	16 (47.1)
術式	CWU	14 (41.2)
	CWD	20 (58.8)
ツチ骨柄	有	30 (88.2)
	無	4 (11.8)
鼓索神経	有	23 (67.6)
	無	11 (32.4)
中耳粘膜	正常	30 (88.2)
	病的	4 (11.8)

表 I-2. 術後聴力結果

平均気骨導差 (標準偏差)	19.2 (10.4) dB
気骨導差	
0–10 dB	8 (23.5 %)
10–20 dB	11 (32.4 %)
20–30 dB	11 (32.4 %)
>30	4 (11.8 %)

図 I-5 と表 I-3 に、術後聴力結果の予後因子の分析結果を示す。EAONO/JOS 合意案の病期上昇に伴い術後聴力成功率は有意に低下し ($p = 0.025$)、また、アブミ骨病変の程度が S0 (アブミ骨上部構造および周辺粘膜が正常) であることが有意な成功予測因子であった ($p = 0.014$)。年齢、各解剖学的区分 (STAM) への進展の有無、術式 (CWU/CWD)、ツチ骨柄の有無、鼓索神経の有無、中耳粘膜の状態は有意な成功因子ではなかった。



Cochran–Armitageの傾向検定, $p = 0.025$

図 I-5. EAONO/JOS 合意案の病期別の術後聴力成功率。成功率は病期上昇に伴い有意に低下した ($p = 0.025$)。

表 I-3. 術後聴力結果の予後因子の分析

因子	<i>p</i> 値*	
	術後平均気骨導差 ≤20 dB vs >20 dB	
年齢, 歳	<60 ≥60	0.738
S1 進展	有 無	0.441
S2 進展	有 無	0.571
T 進展	有 無	0.146
M 進展	有 無	1.0
乳突部の蜂巣発育程度	MC0-1 MC2-3	0.104
アブミ骨病変の程度	S0 S1	0.014
術式	CWU CWD	0.495
ツチ骨柄	有 無	1.0
鼓索神経	有 無	0.475
中耳粘膜	正常 病的	0.299

CWU, canal wall up; CWD, canal wall down.

*Fischer の正確確率検定

5-4. 考察

本研究では、EAONO/JOS 合意案の病期上昇に伴い、聴力改善成功率は有意に低下していた。聴力改善成功率と EAONO/JOS 合意案の病期との間には明確な相関関係があり、EAONO/JOS 合意案の病期は弛緩部型中耳真珠腫新鮮例に対する鼓室形成術の聴力予後を反映していることが示された。一方、STAM システムを用いた場合、聴力予後と真珠腫の特定の部位への進展との間に相関関係は認められなかった。

術後の PTA-ABG が 20 dB 以内を聴力成功とした場合、アブミ骨病変の程度が S0（アブミ骨上部構造および周辺粘膜が正常）であることが有意に良好な予測因子であった。アブミ骨病変の程度が S1（アブミ骨上部構造は保存されているが、肉芽や真珠腫などの病巣を伴う）の場合、肉芽や真珠腫の影響でアブミ骨の可動性が低下しうるため、アブミ骨病変の程度が S0 の聴力成績は S1 のそれより良好であったと考えられる。このことは、アブミ骨の可動性が正常であったことが伝音再建の有意に良好な予測因子であったとの過去報告にも一致する (Mishiro et al., 2009)。

上述のように、後天性中耳真珠腫に対する鼓室形成術の術後聴力成績に対して、EAONO/JOS 合意案の病期が低いこと、アブミ骨周囲に病変が及んでいないことが有利に働く重要な因子であることが示された。病期は中耳真珠腫が初発部位を越えて隣接区分に進展することで進行し、また、病期が進行することでアブミ骨病変の程度も悪化しやすい。従って、有効な聴覚を温存するためには早期に正確な診断を行い、早期に手術を行うことが重要と考えられた。

第二章

中耳真珠腫診断における MRI T1 強調像の有用性の検討

6-1. 緒言

前章において、中耳真珠腫に対して有効な聴覚を温存するためには早期に正確な診断を行い、早期に手術を行うことが重要と考えられた。後天性中耳真珠腫の正確な診断には外耳道・鼓膜所見を詳細にとることが最も重要であるが、外耳道が狭いために鼓膜所見が取りにくい場合や、外耳道・鼓膜所見からだけでは中耳真珠腫かどうか診断に迷う場合がしばしば経験される。その場合、CT や MRI での画像検査が参考になる。CT はその優れた空間分解能により、側頭骨の小さな軟組織病変や骨破壊病変を正確に検出し描出することができるため、側頭骨内の病変の進展範囲を検索するのに有用であり、術前の解剖学的評価のためにも必須の画像検査である。しかし、CT では真珠腫とほかの軟部組織病変とを区別することができない(Baráth et al., 2011)。

軟部組織の質的鑑別には MRI が有用であるが、中耳真珠腫に関しては non-echo planar (non-EP) 拡散強調像 (DWI) の高い組織特異性が診断の助けとなりえる(Más-Estellés et al., 2012)。non-EP DWI の中耳真珠腫の診断性能は比較的高いが、コレステリン肉芽腫(Kösling and Bootz, 2001)、肉芽組織(Venail et al., 2008)、膿瘍(Profant et al., 2012; Toyama et al., 2008)、瘢痕組織(Jeunen et al., 2008)での偽陽性例が報告されている。タンパク質成分を含む液体やコレステリン肉芽腫などの非真珠腫性軟組織は T1 強調像 (T1WI) で高信号を示すが、真珠腫はこれに合致しないため(Lingam et al., 2016)、偽陽性例の除外には T1WI が有用である可能性がある。実際、中耳真珠腫診断に関する non-EP DWI に関するいくつかの報告では、偽陽性例の発生率を下げるために、T1WI も加えた診断基準を採用している(Dubrulle et al., 2006; Lehmann et al., 2009; Profant et al., 2012; Yamashita et al., 2013)。

術前の中耳真珠腫診断における non-EP DWI の診断精度に関するメタアナリシスでは、感度 91%–94%、特異度 92%–94.0%と報告されている(Li et al., 2013; Lingam and Bassett, 2017)。しかし、メタアナリシスに採用された研究には上述のように T1WI を診断基準に組み込んでいるものと組み込んでいないものの両者が含まれており、T1WI がどの程度診断に寄与しているのかは不明である。これまでに T1WI がどの程度中耳真珠腫の診断に寄与しているのかを詳細に検討した研究はなく、その具体的な上乘せ効果は未解明であった。本研究では、non-EP DWI のみと T1WI を併用した場合の中耳真珠腫の術前診断の精度を比較し、中耳真珠腫の MRI 診断における T1WI の有用性について検討を行なった。

6-2. 方法

(1) 対象

本研究は、2012年6月から2017年2月までに北海道大学病院耳鼻咽喉科で手術治療を受けた、中耳真珠腫が疑われる患者を対象とした後方視的研究である。対象には初回手術と再手術/段階手術を含めた。術前に全症例に non-EP DWI および T1WI を含む MRI を実施した。

(2) MRI 撮影条件

1.5tesla (T) magnetic resonance (MR) 装置 (Avanto; Siemens, Erlangen, Germany) と 3.0T MR 装置 (Discovery MR750w ; GE Healthcare, Milwaukee, WI) を用いて、2種類の MR シーケンスを行った。水平断の T1 強調高速スピノエコー画像 (TR/TE, 500-640/12, スライス厚, 4 mm) を取得した。1.5T MR 装置では HASTE (half-Fourier acquisition single-shot turbo-spin-echo), 3.0T MR 装置では PROPELLER (periodically rotated overlapping parallel lines with enhanced reconstruction) を用いて、水平断の non-EP 拡散強調画像 (b factor, 1,000 s/mm; スライス厚, 4mm) を得た。一部の症例では、見かけの拡散係数マップを算出した。

(3) 画像評価と外科的評価

本研究では、MRI での中耳真珠腫を診断するための2つの診断基準を定義した。診断基準1：中耳または乳突腔内の non-EP DWI において、脳組織の信号と比較して高信号であること、診断基準2：基準1の所見があり、T1WI 像において大脳白質の信号と比較して同程度または低信号であること。すべての画像は、手術や臨床情報が盲検化された状態で、長年の経験を有する1名の認定神経放射線科医が評価した。最終診断は手術中の所見で確認した。

(4) 統計学的解析

手術所見と術前の MRI 所見を比較し、MRI プロトコルの感度、特異度、的中率、診断精度を算出した。non-EP DWI で高信号が確認された症例のうち、T1WI で高信号を示した症例の割合を、Fisher の正確確率検定を用いて、真珠腫症例と非真珠腫症例で比較した。統計学的解析には JMP pro 12 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を使用し、 p 値が 0.05 未満である場合を統計学的に有意であると判断した。

(5) 倫理面への配慮

本研究は、北海道大学病院生命・医学系研究倫理審査委員会の審査を受け承認された「MRIによる真珠腫性中耳炎診断の試み（臨床研究番号 016-0024）」の一環として、「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）を遵守して実施された。

6-3. 結果

対象は 53 名 57 耳、男性は 28 名 31 耳、女性は 25 名 26 耳であった。年齢中央値は 53（6–82）歳であった。34 名 37 耳が初回手術を受け、19 名 20 耳が再手術/段階手術を受けた。表 II-1 に 2 つの診断基準の精度をまとめた。

表 II-1. 診断基準 1 と診断基準 2 の精度の比較

	全体		初回手術		再手術/段階手術	
	<i>n</i> = 57		<i>n</i> = 37		<i>n</i> = 20	
	基準 1 (DWI)	基準 2 (DWI + T1WI)	基準 1 (DWI)	基準 2 (DWI + T1WI)	基準 1 (DWI)	基準 2 (DWI + T1WI)
感度	93.5%	89.1%	96.7%	90.0%	87.5%	87.5%
特異度	63.6%	100.0%	57.1%	100.0%	75.0%	100.0%
陽性的中率	91.5%	100.0%	90.6%	100.0%	93.3%	100.0%
陰性的中率	70.0%	68.8%	80.0%	70.0%	60.0%	66.7%
正診率	87.7%	91.2%	89.2%	91.9%	85.0%	90.0%

DWI, non-echo planar diffusion-weighted imaging; T1WI, T1-weighted imaging

手術所見により 57 耳のうち 46 耳（80.7%）で中耳真珠腫が確認された。non-EP DWI のみを用いた診断基準 1 では、真珠腫が確認された 46 耳のうち 43 耳で真珠腫と正しく診断され、真珠腫が確認されなかった 11 耳のうち 7 耳で真珠腫が正しく除外された。全体の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率は、それぞれ 93.5、63.6、91.5、70.0% であり、全体の正診率は 87.7% であった。non-EP DWI と T1WI を組み合わせた診断基準 2 では、真珠腫が確認された 46 耳中 41 耳で真珠腫と正しく診断され（図 II-1）、真珠腫が確認されなかった 11 耳全てで真珠腫が正しく除外された。全体の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率は、それぞれ 89.1、100、100、68.8% であり、全体の正診率は 91.2% であった。

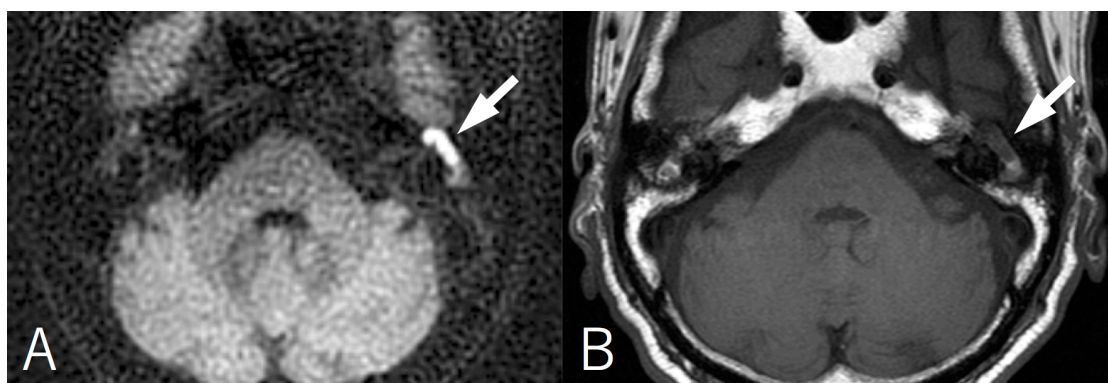


図 II-1. 典型的な MRI 所見を呈した真珠腫. A, non-EP DWI で左中耳に高信号の病変として真珠腫が示されている (矢印). B, T1WI では同病変は低信号を示している (矢印). 病変部の大きさは 11mm.

初回手術群では、手術所見により 37 耳中 30 耳 (81.1%) で真珠腫が確認された. 診断基準 1 による真珠腫診断の感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率は, それぞれ 96.7, 57.1, 90.6, 80.0% であり, 正診率は 89.2% であった. 偽陽性は 3 耳で, コレステリン肉芽腫 (図 II-2) が 2 耳, 線維化病変が 1 耳であった. 偽陰性は 1 耳 (大きさ 3mm 未満の小さな真珠腫) であった. 診断基準 1 で真珠腫陽性と診断できた場合の真珠腫の大きさは 3-18mm であった. 診断基準 2 による真珠腫診断の感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率は, それぞれ 90.0, 100, 100, 70.0% であり, 正診率は 91.9% であった. 診断基準 2 による偽陽性例はなかったが, 偽陰性例が 2 耳追加され, その真珠腫の大きさは 4-6mm であった.

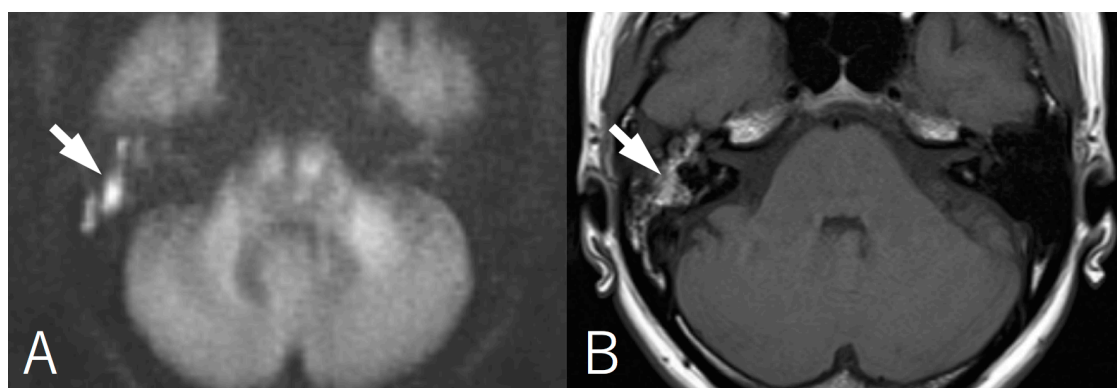


図 II-2. non-EP DWI で高信号を呈したコレステリン肉芽腫. A, non-EP DWI で, 右中耳に高信号のコレステリン肉芽腫が見られる (矢印). B, T1WI では同病変は高信号を呈している (矢印). 病変部の大きさは 12mm.

再手術/段階手術群では、手術所見により 20 耳中 16 耳 (80.0%) で真珠腫が確認された。診断基準 1 による真珠腫診断の感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率は, それぞれ 87.5, 75.0, 93.3, 60.0% であり, 正診率は 85.0% であった。コレステリン肉芽腫の 1 耳が偽陽性であった。偽陰性は 2 耳で, 1 耳は 3mm 未満の小さな真珠腫で, もう 1 耳は湿った感染性 debris を含んだ真珠腫であった。診断基準 1 で真珠腫陽性と診断できた場合の真珠腫の大きさは 2-20mm であった。診断基準 2 による真珠腫診断の感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率は, それぞれ 87.5, 100, 100, 66.7% であり, 正診率は 90.0% であった。診断基準 2 による偽陽性は 0 耳であった。

non-EP DWI で高信号を示した 43 耳の真珠腫のうち, T1WI で高信号を示したのは 2 耳のみ (4.7%) であった。一方, non-EP DWI で高信号を示した非真珠腫の 4 耳は, 全て T1WI で高信号を示し (100%), これらの割合は有意に異なっていた ($p < 0.001$, 表 II-2)。

表 II-2. non-EP DWI で高信号を示した症例の T1WI 高信号の割合の比較

		T1WI 高信号 (+)	T1WI 高信号 (-)	全体	p 値*
non-EP DWI	真珠腫	2 (4.7%)	41 (95.3%)	43	< 0.001
高信号 (+)	非真珠腫	4 (100%)	0 (0%)	4	

*Fisher の正確確率検定

6-4. 考察

本研究では、臨床的に中耳真珠腫と診断された術前 MRI で、non-EP DWI に T1WI を追加することで、中耳真珠腫の診断精度がどの程度向上するかを評価した。その結果、真珠腫の診断において T1WI を診断基準に追加した場合、non-EP DWI のみを用いた評価と比較して、感度は 93.5% から 89.1% とわずかに低下したものの、特異度は 63.6% から 100% へ上昇し、正診率も 87.7% から 91.2% へ向上が認められた。この傾向は、初回手術群と再手術/段階手術群のいずれにも一貫して認められた。従って、non-EP DWI だけではなく T1WI も用いることは、初回手術および術後の真珠腫偽陽性例が効率的に除外され、中耳真珠腫の術前の診断精度向上に寄与することが示された。

手術によって中耳真珠腫が確認されなかった 11 耳のうち、4 耳が non-EP DWI で高信号を示した。このうち 3 耳はコレステリン肉芽腫、もう 1 耳は線維化病変であったが、4 例とも T1WI で高信号を示した (100%)。一方、non-EP DWI で高信号が確認された真珠腫症例のうち、T1WI で高信号を示したものはわずか 4.7% であり、これらの割合は有意に少なかった。従って、中耳真珠腫が T1WI で高信号を示すことはほとんどなく、コレステリン肉芽腫や線維化と真珠腫を区別するためには、T1WI が有用であることが示唆された。

初回手術で最終的に中耳真珠腫と診断された 30 耳のうち、T1WI で高信号を示したのは 2 耳 (大きさ 4-6mm) のみであった。これらの症例のうち 1 耳では、コレステリン肉芽腫が真珠腫周囲の空間から乳突洞まで広がっていた。この症例は真珠腫が小さすぎたため周囲のコレステリン肉芽腫の影響を受けて T1WI で高信号を示した可能性がある。もう 1 耳は、真珠腫以外に鼓室乳突洞内には軟部組織を示す信号は認められなかった。内容物が高タンパク質のため T1WI である程度の高信号を示す真珠腫があると報告されており (Más-Estellés et al., 2012)、この症例は高タンパク質に起因して T1WI で高信号を呈したと考えられた。再手術/段階手術で中耳真珠腫と診断された 16 耳のうち、T1WI で高信号を示した症例はなかった。

上述のように、中耳真珠腫の MRI 診断において T1WI は偽陽性の除外に有用であり、non-EP DWI と T1WI の組み合わせは、non-EP DWI のみと比較して、特異度と正診率の向上が期待できることが示された。丁寧な外耳道・鼓膜の診察を行うことで通常は中耳真珠腫の診断が可能であるが、所見が取りにくく診断に迷う場合もしばしば経験される。その場合は、non-EP DWI と T1WI を合わせて確認することで、中耳真珠腫を正確に早期に診断することができ、早期の手術治療につなげていくことが可能となる。

第三章

中耳真珠腫における Notch シグナル関連分子の発現解析

7-1. 緒言

前章までに述べたように、後天性中耳真珠腫において有効な聴覚を温存するためには、早期に正確な診断を行い、早期に手術を行うことが重要であることが確認された。一方で、根本的治療は依然として外科的治療のみに限られているのが現状である。

中耳真珠腫は腫瘍ではないが、局所浸潤や骨溶解といった腫瘍に似た臨床的特徴を有している。真珠腫は、細胞の過剰増殖へとバランスが変化し、浸潤・骨溶解能が増強された、制御不能な細胞増殖の一例であると考えられている (Kuo, 2015)。細胞増殖制御の異常には、内部のゲノムまたはエピジェネティックな変化と、外部からの刺激が関与しており、細胞内外の様々なシグナル伝達カスケードが関与しているとされる (Kuo, 2015)。真珠腫の病態生理に関わる新たな標的分子、シグナル伝達機構が解明できれば、真珠腫の非外科的治療法の可能性も期待される。

Notch は 1 回膜貫通型の受容体で Notch を介した伝達系は Notch シグナルと呼ばれている。皮膚ケラチノサイトの増殖と分化の統合的制御と、正常皮膚のホメオスタシスの維持に Notch シグナルの関与が報告されている (Lefort and Dotto, 2004)。これまでマウスやヒトのさまざまな細胞上に、膜貫通型分子である 4 つの受容体ホモログ (Notch1-4) と 5 つのリガンドホモログ (Jagged [Jag] 1, Jag2, Delta-like (Dll) 1, Dll3, Dll4) の発現が確認されている (Artavanis-Tsakonas et al., 1999)。Notch 受容体のリガンドによって活性化されると、Notch 受容体の細胞内ドメイン notch intracellular domain (NICD) が γ セクレターゼによって切断され、NICD が核内に移行する。NICD は転写因子 CSL (Centromere-binding factor 1/Suppressor of Hairless/Lag-1) (Pinchot et al., 2011) などと結合して転写因子複合体を形成し、*HES1* (Hairy and enhancer of Split-1) などの標的遺伝子の転写を開始する (Kageyama et al., 2005) (図 III-1)。Notch シグナルの機能は細胞種によって非常に多様である。ある状況では組織の成長や癌を促進する一方で、別の状況では細胞死や腫瘍抑制を誘導する (Bray, 2016)。皮膚癌においては *Notch1* が癌抑制遺伝子として機能することが示唆されている (Nicolas et al., 2003)。

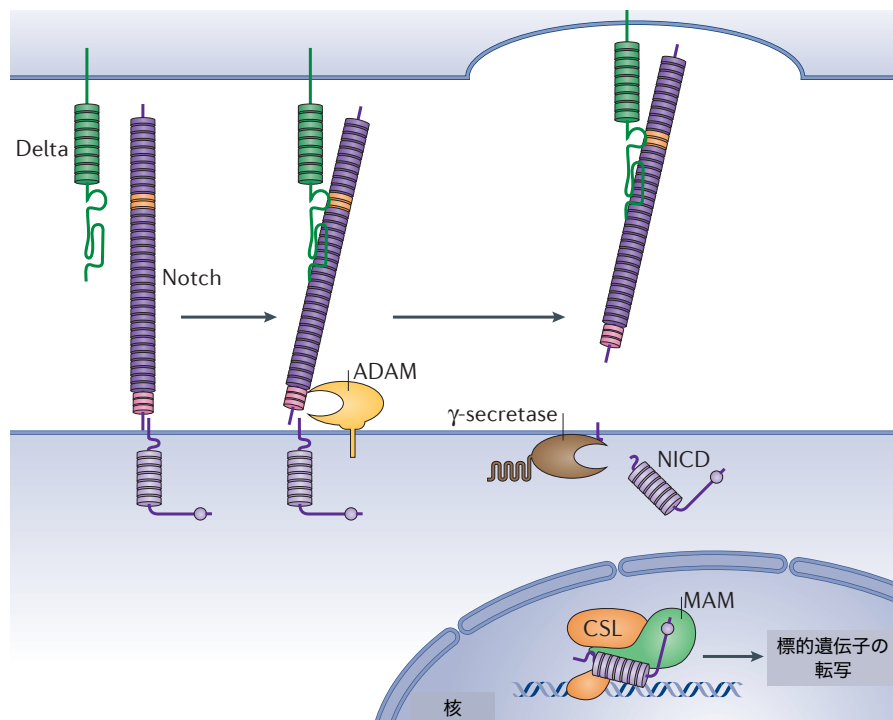


図 III-1. Notch シグナル伝達機構. Notch 受容体がりガンドによって活性化されると, 細胞内ドメイン notch intracellular domain (NICD) が γ セクレターゼによって切断され核内に移行する. NICD は転写因子複合体を形成し標的遺伝子の転写を開始する. (Bray の論文(Bray, 2016)から改編して引用)

一方で *TP53* はよく知られた癌抑制遺伝子の 1 つであり, その欠損は細胞増殖を促進し癌のリスクを高める (Ashcroft and Vousden, 1999). *Notch1* 遺伝子は正常および癌由来ケラチノサイトの両方で *TP53* 遺伝子産物である p53 タンパク質の標的遺伝子であることが示されている (Lefort et al., 2007). *Notch1* の負の制御が p53 の転写抑制によって引き起こされ, ケラチノサイトの増殖や皮膚癌を引き起こす可能性が報告されている (Kolev et al., 2008).

これまでに中耳真珠腫で Notch シグナルがどのように関わっているか検討した報告はない. 本章では Notch シグナルのケラチノサイトにおける働きに着目し, 中耳真珠腫におけるケラチノサイトの増殖亢進に Notch シグナルの異常な変化が関与しているのではないかと仮説を立て, 中耳真珠腫標本を用いて Notch シグナル関連分子の発現解析を行うことで, 真珠腫と Notch シグナルの関連性について検討することを目的とした. さらに, *Notch1* 発現を上流で制御することが報告されている p53 の発現についても評価した.

7-2. 方法

(1) 対象

本研究は、2010年2月から2020年4月までに北海道大学病院耳鼻咽喉科で手術を施行した後天性中耳真珠腫新鮮例を対象とした後方視的研究である。手術時に真珠腫組織と対照として正常外耳道皮膚組織を採取した。中耳真珠腫は良性の角化扁平上皮病変であるため、これまでの中耳真珠腫に関する研究 (Hamed et al., 2017; Liu et al., 2014; Motamed et al., 2002) と同様に正常外耳道皮膚を対照として採用した。これらのサンプルは、病理組織学および免疫組織化学的解析のため、直ちに10%ホルマリンで固定後にパラフィン包埋 (FFPE) した。サンプルの一部は polymerase chain reaction (PCR) 法による遺伝子発現分析のため、添付プロトコールに従い、PAXgene® Tissue System (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland) で固定しパラフィン包埋 (PFPE) した。

(2) Notch シグナル関連遺伝子に関する PCR array

PFPE 組織からマイクロトームを用いて厚さ $10\mu\text{m}$ の切片を作成した。hematoxylin-eosin (HE) 染色を行い適切にサンプルが採取されていることを確認した後に、マイクロダイセクション法にて真珠腫および正常外耳道皮膚組織から上皮層を回収した。まず、PAXgene Tissue RNA Kit (PreAnalytiX) を用いてトータル ribonucleic acid (RNA) 精製を行なった。RNA 精製後、RT² First Strand Kit (Qiagen, Maryland, USA) を用いて complementary DNA (cDNA) を合成した。次に、この cDNA を RT² SYBR Green ROX qPCR MasterMix (Qiagen) と混合し、84 の Notch シグナル関連遺伝子 (および参照用の5つのハウスキーピング遺伝子) のプライマーで構成される96ウェルの RT² mRNA PCR Array (RT² Profiler™ PCR Array Human Notch Signaling Pathway, Qiagen) に加え、StepOnePlus™ real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて quantitative-realtime-PCR を施行し、インターカレーション法 (SYBR green) にて検出を行なった。各遺伝子の転写レベルに関しては、*GAPDH* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) と *RPLP0* (Ribosomal protein lateral stalk subunit P0) の2つのハウスキーピング遺伝子を用いて標準化を行い、それぞれの ΔCt 値を算出した。相対的 messenger ribonucleic acid (mRNA) 発現比 (Fold change) に関しては $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法に基づき計算を行った。すなわち、真珠腫サンプル中の標準化した遺伝子発現量 ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) を同一患者のコントロールサンプル中の標準化した遺伝子発現量 ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) で除した値を Fold change として算出した。

(3) 免疫組織化学染色

FFPE 組織からマイクロトームを用いて $4\mu\text{m}$ の厚さで薄切し切片を作成した。キシレンおよびエタノールで脱パラフィンおよび脱水処理を行なった後、750W の電子レンジを用いて 10mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (10mmol/L, pH6.0) で 15 分間の抗原賦活化を行った。0.1% の過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化し、10% ヤギ正常血清で 30 分間、室温でブロッキングした。一次抗体として、抗 Notch1 ウサギモノクローナル抗体 (#3608; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) および抗 HES1 ウサギモノクローナル抗体 (#11988; Cell Signaling Technology Inc.) を用い、 4°C の湿潤箱で一晩反応させた。また、抗 p53 マウスモノクローナル抗体 (M7001; Dako, 92 Glostrup, Denmark) を用い、室温で 30 分反応させた。二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギまたはヤギ抗マウス抗体 (Histofine MAX-PO (MULTI) kit; Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて、室温で 30 分間反応させた。ジアミノベンジジン溶液に 10 分間浸し、ヘマトキシリンで対比染色を行い、封入し標本を完成させた。

(4) 免疫組織化学的評価

Notch1 発現については細胞膜が明瞭に染色されているものを陽性細胞と判定した。HES1 と p53 については核が明瞭に染色されているものを陽性細胞と判定した。光学顕微鏡の 400 倍の視野において任意の 3 箇所でケラチノサイト層全体の陽性細胞数の割合を計測し、3 箇所の割合の平均値を算出した。正常な皮膚と同様に計測するために、上皮層を含む真珠腫全体ではなく上皮層のみを解析した。染色強度は考慮しなかった。以上の判定については、臨床情報を盲検化した 2 人の医師によって行い、2 人の値の平均値をサンプルの抗原陽性率とした。

(5) 統計学的解析

Welch の t 検定を用いて、それぞれの遺伝子の ΔCt 値と抗原陽性率を真珠腫群と対照群の間で比較した。統計学的解析には JMP pro 14 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) を使用し、 p 値が 0.05 未満である場合を統計学的に有意であると判断した。

(6) 倫理面への配慮

本研究は、北海道大学病院生命・医学系研究倫理審査委員会の審査を受け承認された「後天性真珠腫の発症・増殖メカニズムに関する研究 (臨床研究番号 016-0161)」「中耳真珠腫の発現タンパクに関する研究 (臨床研究番号 020-

0156)」の一環として、「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）を遵守して実施された。

7-3. 結果

(1) 真珠腫における Notch シグナル伝達経路関連遺伝子の発現

本実験のための真珠腫 PFPE 標本は男性 5 耳，女性 1 耳から真珠腫組織を採取し作製した。年齢中央値は 38.5 歳（18–79 歳）であった。対照群として，同患者からそれぞれの正常外耳道皮膚を採取し PFPE 標本を作製した。HE 染色により標本が適切に採取されていることを確認した後，これらの標本から mRNA を抽出し，PCR アレイにて遺伝子発現解析を行った。PCR アレイにおける各遺伝子の相対的 mRNA 発現比（Fold change）と p 値を表 III-1 に示す。遺伝子は Fold change の昇順に並んでいる。遺伝子名と説明は，Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee のデータベースに基づいている。84 遺伝子のうち 48 の遺伝子発現を解析できたが，残りの 36 遺伝子については半数以上の Ct 値が欠損していたため解析ができなかった。真珠腫における *Notch1* の相対的発現比は最も低く，統計的に有意な差が認められた（Fold change = 0.013, $p = 0.042$ ）。また，Notch シグナルの主要な標的遺伝子の一つである *HES1* の相対的発現比も減少していた（Fold change = 0.117, $p = 0.272$ ）。一方，*Notch3* の相対的発現比は増加していた（Fold change = 2.35, $p = 0.680$ ）（図 III-2）。*Notch2* の相対的発現比はごくわずかな減少しかみられなかった（Fold change = 0.484, $p = 0.427$ ）。

表 III-1. 真珠腫における Notch シグナル伝達経路関連遺伝子の発現

遺伝子名	説明	Fold change	p 値
NOTCH1	Notch receptor 1	0.013	0.042
SUFU	SUFU negative regulator of hedgehog signaling	0.063	0.197
PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	0.087	0.288
NFKB2	Nuclear factor kappa B subunit 2	0.108	0.072
HES1	Hes family bHLH transcription factor 1	0.117	0.272
CHUK	Component of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase complex	0.142	0.209
PAX5	Paired box 5	0.226	0.253
ID1	Inhibitor of DNA binding 1, HLH protein	0.236	0.419
NCSTN	Nicastrin	0.249	0.381
NCOR2	Nuclear receptor corepressor 2	0.299	0.177
DLL4	Delta like canonical Notch ligand 4	0.306	0.517
RBPJL	Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region like	0.339	0.396
SEL1L	SEL1L adaptor subunit of ERAD E3 ubiquitin ligase	0.341	0.679
FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	0.342	0.180
TLE5	TLE family member 5, transcriptional modulator	0.386	0.461
VEGFD	Vascular endothelial growth factor D	0.390	0.234
HR	HR lysine demethylase and nuclear receptor corepressor	0.416	0.550
JAG2	Jagged canonical Notch ligand 2	0.420	0.707
KRT1	Keratin 1	0.428	0.255
CDKN1A	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	0.432	0.366
NEURL1	Neuralized E3 ubiquitin protein ligase 1	0.457	0.525
NOTCH2	Notch receptor 2	0.484	0.427
SHH	Sonic hedgehog signaling molecule	0.487	0.629
POFUT1	Protein O-fucosyltransferase 1	0.492	0.346
NOTCH2NL	Notch 2 N-terminal like A	0.509	0.440
CFLAR	CASP8 and FADD like apoptosis regulator	0.521	0.518

CTNNB1	Catenin beta 1	0.528	0.517
RFNG	RFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	0.551	0.682
HOXB4	Homeobox B4	0.561	0.640
NFKB1	Nuclear factor kappa B subunit 1	0.563	0.614
DTX1	Deltex E3 ubiquitin ligase 1	0.632	0.851
JAG1	Jagged canonical Notch ligand 1	0.645	0.412
LFNG	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	0.658	0.800
HDAC1	Histone deacetylase 1	0.661	0.432
CCND1	Cyclin D1	0.676	0.833
GLI1	GLI family zinc finger 1	0.715	0.748
CCNE1	Cyclin E1	0.716	0.763
RUNX1	RUNX family transcription factor 1	0.774	0.750
DLL3	Delta like canonical Notch ligand 3	0.836	0.870
PSENEN	Presenilin enhancer, gamma-secretase subunit	1.004	0.997
SH2D1A	SH2 domain containing 1A	1.555	0.739
HES5	Hes family bHLH transcription factor 5	1.562	0.652
PSEN1	Presenilin 1	1.597	0.607
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	1.839	0.419
NOTCH3	Notch receptor 3	2.350	0.680
MMP7	Matrix metalloproteinase 7	2.430	0.704
LORICRIN	Loricrin cornified envelope precursor protein	2.950	0.455
NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2	6.920	0.484

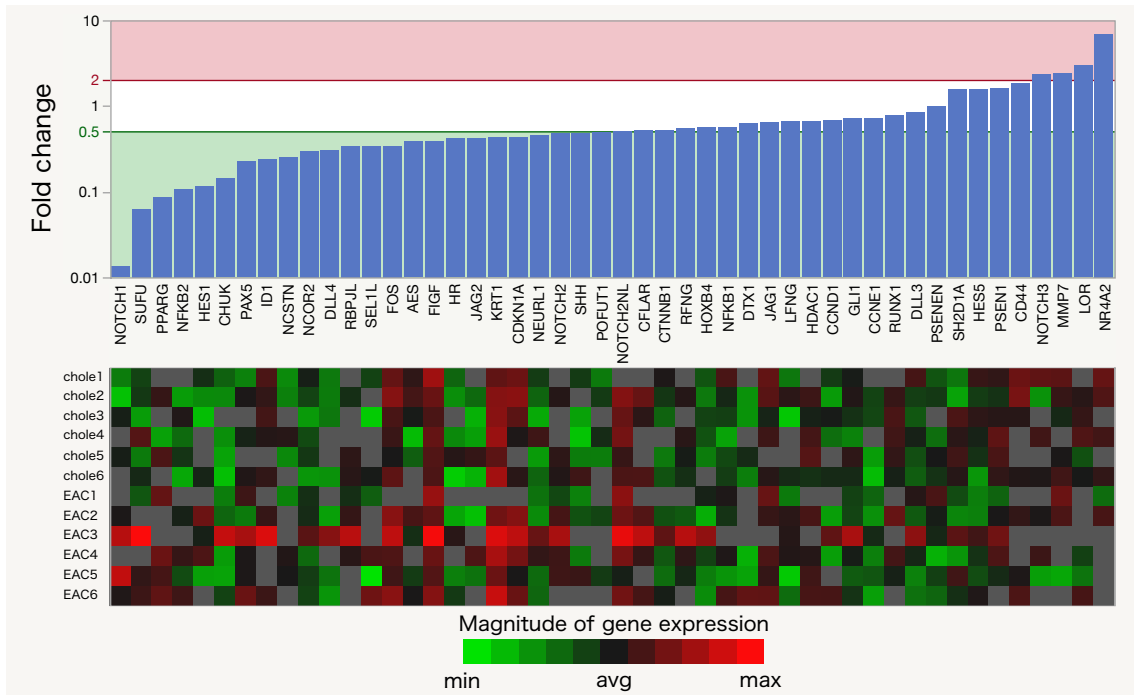


図 III-2. 真珠腫と外耳道（EAC）皮膚における Notch シグナル関連遺伝子発現のヒートマップと Fold change. ヒートマップ上の灰色は欠損値を示す.

(2) Notch1, HES1, p53 の免疫組織化学的発現評価

本実験のための真珠腫 FFPE 標本は男性 28 耳, 女性 13 耳から真珠腫組織を採取し作製した. 年齢中央値は 57 歳 (18–87 歳) であった. 対照群として, 手術を受けた他の男性 4 耳, 女性 4 耳, 年齢中央値 53 歳 (13–82 歳) の 8 耳から正常外耳道皮膚を採取し FFPE 標本を作製した. Notch1 の発現は, 真珠腫上皮と外耳道皮膚上皮の基底層と傍基底層で主に観察された (図 III-3, A, D). しかし, 外耳道皮膚上皮の一部では傍基底層方向に広く発現が観察された. Notch1 の発現陽性率は, 真珠腫では $48.5 \pm 32.4\%$, 外耳道皮膚では $83.4 \pm 17.5\%$ であり, Notch1 の発現に統計学的に有意な差が認められた ($p < 0.001$) (図 III-4). 真珠腫上皮と外耳道皮膚上皮における HES1 の発現は, 傍基底層に局在していた (図 III-3, B, E). HES1 の発現陽性率は, 真珠腫で $44.9 \pm 17.8\%$, 外耳道皮膚で $55.7 \pm 7.1\%$ であり, 統計学的に有意な差が認められた ($p < 0.01$) (図 III-4). p53 の発現は, 真珠腫上皮と外耳道皮膚上皮の基底層と傍基底層で主に観察された (図 III-3, C, F). p53 の発現陽性率は, 真珠腫では $8.5 \pm 11.4\%$, 外耳道皮膚では $0.5 \pm 0.7\%$ であり, 統計学的に有意な差が認められた ($p < 0.001$) (図 III-4).

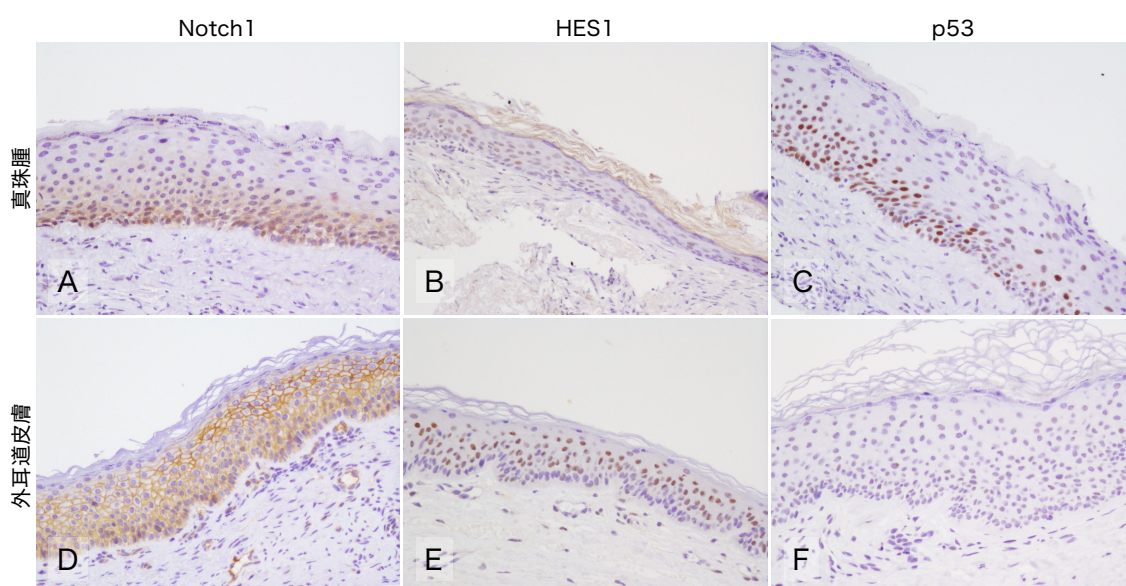


図 III-3. 真珠腫 (A, B, C) と外耳道皮膚 (D, E, F) における Notch1 (A, D) と HES1 (B, E), p53 (C, F) の免疫染色 ($\times 200$)

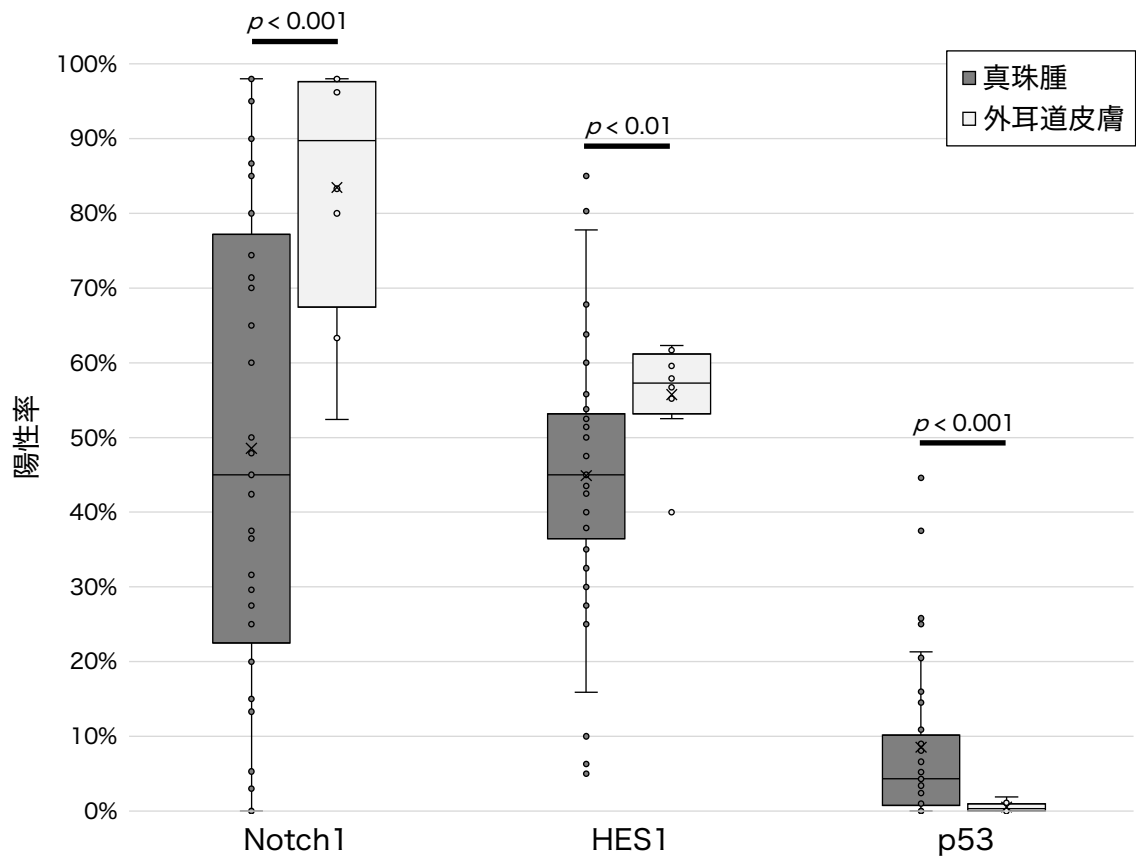


図 III-4. 真珠腫と外耳道皮膚における Notch1, HES1, p53 の発現陽性率.

7-4. 考察

本研究は、後天性中耳真珠腫の病態生理に Notch1 が関与している可能性を明らかにした初めての研究である。真珠腫組織における *Notch1* mRNA の発現は、正常外耳道皮膚組織に比べて有意に低下していた。免疫組織化学的検討の結果、真珠腫上皮における Notch1 と HES1 の主な発現部位は、正常外耳道皮膚上皮と類似していたが、真珠腫上皮での Notch1 と HES1 の発現は、正常外耳道皮膚上皮に比べて有意に低かった。図 III-5 に、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes のパスウェイデータベース(Kanehisa et al., 2017)に基づいた、ヒトの Notch シグナル伝達経路を示す。

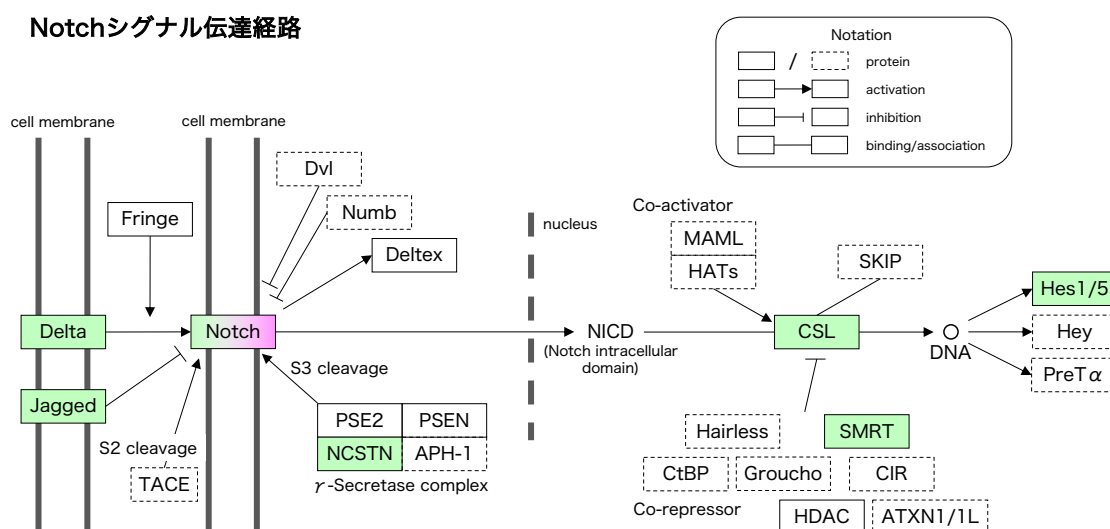


図 III-5. Notch シグナル伝達経路 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes パスウェイデータベースより改編して引用)。タンパク質と対応する遺伝子は以下の通りである: Delta-like: *DLL1* and *DLL4*; Jagged: *JAG1* and *JAG2*; Fringe: *LFNG* and *RFNG*; Notch: *NOTCH1*, *NOTCH2*, and *NOTCH3*; Deltex: *DTX1*; PSE2: *PSENE1*; PSEN: *PSEN1*; NCSTN: *NCSTN*; CSL: *RBPJL* and *RBPJ*; Hes1/5: *HES1* and *HES5*; SMRT: *NCOR2*; and HDAC: *HDAC1* and *HDAC2*.

実線は PCR アレイで解析できた遺伝子がコードするタンパク質を示し、点線は解析できなかった遺伝子がコードするタンパク質を示す。色のついた箱は、2倍以上または2分の1以下に発現変化した遺伝子を示し、ピンクと緑はそれぞれ発現増加と発現減少を示す。Notch1 受容体の発現低下は、核に移行する

NICD を減少させ、転写因子 CSL と相互作用して形成される転写因子複合体を減少させて、標的転写産物である *HES1* mRNA を減少させたと考えられる。さらに、Notch1 の Dll および Jag リガンドや、 γ -セクレターゼ複合体の構成因子である NCSTN(Kaether et al., 2006)の mRNA レベルも低下していることが確認された。一方、*Notch3*の mRNA レベルは上昇していた。*Notch3* の細胞内ドメイン(IC)は、Notch1 の IC に比べて不十分な活性化因子であり、HES1 プロモーターの転写活性を競争的に阻害することで、Notch1 の抑制因子として作用する(Beatus et al., 1999, 2001)。つまり、Notch3 が増加すると、HES1 の発現に抑制的な影響を及ぼす。以上のように、真珠腫では Notch1-HES1 シグナル経路の発現が低下する傾向が認められた。Notch シグナルは、ケラチノサイトの増殖停止と分化を導くことが報告されている(Rangarajan et al., 2001)。さらに、基底細胞から有棘細胞の運命を決定するのにも重要な役割を果たしている(Blanpain et al., 2006)。ケラチノサイトで *HES1* を発現させると、その下流で、分化特異的なタンパク質をコードする有棘細胞層の遺伝子が誘導される(Blanpain et al., 2006)。マウスの皮膚で *Notch1* 遺伝子を欠損させると、表皮と角膜が過形成になり、その後、皮膚腫瘍が発生したり、化学物質による皮膚の発癌も促進したことから、*Notch1* が腫瘍抑制遺伝子として機能していることが示されている(Nicolas et al., 2003)。真珠腫における Notch1 と HES1 の発現低下は、ケラチノサイトが分化から増殖へとバランスを変化させ、病的状態の原因となっている可能性がある。

一方、p53 に関する免疫組織化学的検討では、真珠腫上皮における p53 発現は正常外耳道皮膚よりも有意に高いことが示された。後天性中耳真珠腫では正常外耳道皮膚と比較して p53 の発現が亢進していたという結果がこれまでにいくつか報告されている(Albino et al., 1998; Huisman et al., 2003; Olszewska et al., 2013; Shinoda and Huang, 1995)。p53 は細胞周期の停止やアポトーシスの誘導、あるいはその両方により細胞増殖を抑制する(Albino et al., 1998)。細胞増殖は p53 の発現を上昇させる可能性があり、さらに好中球が活性酸素を放出することで p53 は活性化されうるため、真珠腫における p53 の発現は細胞増殖と活性酸素に反応して増加している可能性があると考えられる(Huisman et al., 2003)。本研究では真珠腫における p53 の増加が認められたにも関わらず、p53 の直接の下流の標的であると報告されている Notch1(Yugawa et al., 2007)の増加はみられず、むしろ、Notch1 は減少していた。これは、最初に何らかの要因で Notch1 の発現減少と細胞増殖が起こったと仮定することで説明できる。すなわち、細胞増殖に対する反応として、負のフィードバック制御を介して p53 が増加したと考えられる。しかし、真珠腫上皮における p53 発現の増加については否定的な意見もあり(Chung et al., 2015; Motamed et al., 2002),

Notch1 の発現低下を誘発する機序は不明であるため、さらなる研究が望まれる。

8. 総括および結論

(1) 研究から得られた知見

- ✓ 後天性中耳真珠腫に対する鼓室形成術に対して，EAONO/JOS 合意案の病期が低いこと，アブミ骨周囲に病変が及んでいないことが術後聴力成績に有利に働く重要な因子であることが示された。
- ✓ 中耳真珠腫の MRI 診断において T1WI は偽陽性の除外に有用であり，non-EP DWI と T1WI の組み合わせは，non-EP DWI のみと比較して，特異度と正診率の向上が期待できることが示された。
- ✓ 中耳真珠腫では Notch1-HES1 シグナル経路の発現が低下する傾向が示された。

(2) 新しい知見の意義

- ✓ 中耳真珠腫に対して有効な聴覚を温存するためには，病期が進行する前に早期に正確な診断を行い，鼓室形成術を行うことが重要である。
- ✓ 鼓膜所見だけでは中耳真珠腫の診断が困難な場合は，CT だけではなく，non-EP DWI と T1WI を組み合わせた MRI も行うことで，中耳真珠腫を正確に早期に診断することが可能となる。
- ✓ 中耳真珠腫における Notch1 と HES1 の発現低下は，細胞の分化から増殖方向へとバランスを変化させ，病的状態の原因をもたらしている可能性がある。

(3) 今後の研究展開と課題

- ✓ 中耳真珠腫に対する術前診断，術後治療成績に関しては，症例数，観察期間を増やし，聴力の長期成績だけではなく病変の再発との関連性についても検討を深める必要性がある。
- ✓ 中耳真珠腫における Notch1 の発現低下を誘発する機序は不明であり，他の主要なシグナル伝達系を含めて制御機構などの検索を行う必要性がある。また，臨床症状との関連についても検討を行い，組織破壊性との関連や，外科的治療後の再発リスクの検討を行う。
- ✓ 現状では中耳真珠腫の根本的治療は外科的治療のみであり，真珠腫発症・増殖・骨溶解メカニズムを分子生物学的側面から解明することで，分子標的治療などの非外科的治療法開発の足掛かりをつかみたい。

9. 謝辞

本論文の執筆にあたり，多くの方々にご支援いただきました。本研究に関する議論，国内外での発表の機会を与えて頂きましたと共に，ご指導賜りました北海道大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室の福田諭名誉教授，および本間明宏教授に厚く御礼を申し上げます。併せて，本研究の遂行にあたり，多大なるサポートを頂きました耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室の教室員，特に中丸裕爾准教授，加納里志講師，森田真也助教に深謝いたします。また，読影実験にご協力いただいた北海道大学大学院医学研究院死因究明教育研究センターの原田太以佑特任助教に多大なる感謝を申し上げます。

本研究の一部は JSPS 科研費 JP16K20221, JP19K18790 の助成を受けたものです。

2021 年 11 月
福田 篤

10. 利益相反

本研究において開示すべき利益相反状態はない。

11. 引用文献

Albino, A.P., Kimmelman, C.P., and Parisier, S.C. (1998). Cholesteatoma: A molecular and cellular puzzle. *Am. J. Otol.* *19*, 7–19.

Albu, S., Babighian, G., and Trabalzini, F. (1998). Prognostic factors in tympanoplasty. *Am. J. Otol.* *19*, 136–140.

American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, C.O.H.A.E. (1995). Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the evaluation of results of treatment of conductive hearing loss. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation, Inc. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* *113*, 186–187.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* *284*, 770–776.

Ashcroft, M., and Vousden, K.H. (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene* *18*, 7637–7643.

Baráth, K., Huber, A.M., Stämpfli, P., Varga, Z., and Kollias, S. (2011). Neuroradiology of cholesteatomas. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* *32*, 221–229.

Bared, A., and Angeli, S.I. (2010). Malleus handle: determinant of success in ossiculoplasty. *Am. J. Otolaryngol.* *31*, 235–240.

Beatus, P., Lundkvist, J., Öberg, C., and Lendahl, U. (1999). The notch 3 intracellular domain represses notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development* *126*, 3925–3935.

Beatus, P., Lundkvist, J., Öberg, C., Pedersen, K., and Lendahl, U. (2001). The origin of the ankyrin repeat region in Notch intracellular domains is critical for regulation of HES promoter activity. *Mech. Dev.* *104*, 3–20.

Blanpain, C., Lowry, W.E., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2006). Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev.* *20*, 3022–3035.

Bray, S.J. (2016). Notch signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 722–735.

Briddell, J.W., Levi, J.R., and O'Reilly, R.C. (2018). Chronic Otitis Media. In

Infections of the Ears, Nose, Throat, and Sinuses, (Cham: Springer International Publishing), pp. 57–66.

Chavan, S.S., Jain, P. V., Vedi, J.N., Rai, D.K., and Kadri, H. (2014).

Ossiculoplasty: a prospective study of 80 cases. *Iran. J. Otorhinolaryngol.* *26*, 143–150.

Chung, J.H., Lee, S.H., Park, C.W., Kim, K.R., Tae, K., Kang, S.-H., Oh, Y.H., and Pyo, J.Y. (2015). Expression of Apoptotic vs Antiapoptotic Proteins in Middle Ear Cholesteatoma. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* *153*, 1024–1030.

Dornhoffer, J.L., and Gardner, E. (2001). Prognostic factors in ossiculoplasty: a statistical staging system. *Otol. Neurotol.* *22*, 299–304.

Dubrulle, F., Souillard, R., Chechin, D., Vaneecloo, F.M., Desaulty, A., and Vincent, C. (2006). Diffusion-weighted MR imaging sequence in the detection of postoperative recurrent cholesteatoma. *Radiology* *238*, 604–610.

Hamed, M.A., Nakata, S., Sayed, R.H., Ueda, H., Badawy, B.S., Nishimura, Y., Kojima, T., Iwata, N., Ahmed, A.R., Dahy, K., et al. (2016). Pathogenesis and Bone Resorption in Acquired Cholesteatoma: Current Knowledge and Future Prospectives. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* *9*, 298–308.

Hamed, M.A., Nakata, S., Shiogama, K., Suzuki, K., Sayed, R.H., Nishimura, Y., Iwata, N., Sakurai, K., Badawy, B.S., Inada, K.-I., et al. (2017). Cytokeratin 13, Cytokeratin 17, and Ki-67 Expression in Human Acquired Cholesteatoma and Their Correlation With Its Destructive Capacity. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* *10*, 213–220.

Huisman, M.A., De Heer, E., and Grote, J.J. (2003). Cholesteatoma epithelium is characterized by increased expression of Ki-67, p53 and p21, with minimal apoptosis. *Acta Otolaryngol.* *123*, 377–382.

Jackler, R.K., and Gralapp, C. (2020). *Ear Surgery Illustrated: A comprehensive Atlas of Otologic Microsurgical Techniques* (New York: Thieme).

Jeunen, G., Desloovere, C., Hermans, R., and Vandecaveye, V. (2008). The value of magnetic resonance imaging in the diagnosis of residual or recurrent acquired cholesteatoma after canal wall-up tympanoplasty. *Otol. Neurotol.* *29*, 16–18.

- Kaether, C., Haass, C., and Steiner, H. (2006). Assembly, trafficking and function of γ -secretase. *Neurodegener. Dis.* *3*, 275–283.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J., and Ohsawa, R. (2005). Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp. Cell Res.* *306*, 343–348.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* *45*, D353–D361.
- Kerckhoffs, K.G.P., Kommer, M.B.J., van Strien, T.H.L., Visscher, S.J.A., Bruijnzeel, H., Smit, A.L., and Grolman, W. (2016). The disease recurrence rate after the canal wall up or canal wall down technique in adults. *Laryngoscope* *126*, 980–987.
- Kolev, V., Mandinova, A., Guinea-Viniegra, J., Hu, B., Lefort, K., Lambertini, C., Neel, V., Dummer, R., Wagner, E.F., and Dotto, G.P. (2008). EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer. *Nat. Cell Biol.* *10*, 902–911.
- Kösling, S., and Bootz, F. (2001). CT and MR imaging after middle ear surgery. *Eur. J. Radiol.* *40*, 113–118.
- Kuo, C.-L. (2015). Etiopathogenesis of acquired cholesteatoma: prominent theories and recent advances in biomolecular research. *Laryngoscope* *125*, 234–240.
- Kuo, C.-L., Shiao, A.-S., Yung, M., Sakagami, M., Sudhoff, H., Wang, C.-H., Hsu, C.-H., and Lien, C.-F. (2015a). Updates and knowledge gaps in cholesteatoma research. *Biomed Res. Int.* *2015*, 854024.
- Kuo, C.-L., Liao, W.-H., and Shiao, A.-S. (2015b). A review of current progress in acquired cholesteatoma management. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* *272*, 3601–3609.
- Lefort, K., and Dotto, G.P. (2004). Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. *Semin. Cancer Biol.* *14*, 374–386.
- Lefort, K., Mandinova, A., Ostano, P., Kolev, V., Calpini, V., Kolfshoten, I., Devgan, V., Lieb, J., Raffoul, W., Hohl, D., et al. (2007). Notch1 is a p53 target

- gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCK α kinases. *Genes Dev.* *21*, 562–577.
- Lehmann, P., Saliou, G., Brochart, C., Page, C., Deschepper, B., Vallée, J.N., and Deramond, H. (2009). 3T MR imaging of postoperative recurrent middle ear cholesteatomas: value of periodically rotated overlapping parallel lines with enhanced reconstruction diffusion-weighted MR imaging. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* *30*, 423–427.
- Li, P.M.M.C., Linos, E., Gurgel, R.K., Fischbein, N.J., and Blevins, N.H. (2013). Evaluating the utility of non-echo-planar diffusion-weighted imaging in the preoperative evaluation of cholesteatoma: a meta-analysis. *Laryngoscope* *123*, 1247–1250.
- Lingam, R.K., and Bassett, P. (2017). A Meta-Analysis on the Diagnostic Performance of Non-Echoplanar Diffusion-Weighted Imaging in Detecting Middle Ear Cholesteatoma: 10 Years On. *Otol. Neurotol.* *38*, 521–528.
- Lingam, R.K., Nash, R., Majithia, A., Kalan, A., and Singh, A. (2016). Non-echoplanar diffusion weighted imaging in the detection of post-operative middle ear cholesteatoma: navigating beyond the pitfalls to find the pearl. *Insights Imaging* *7*, 669–678.
- Liu, W., Yin, T., Ren, J., Li, L., Xiao, Z., Chen, X., and Xie, D. (2014). Activation of the EGFR/Akt/NF- κ B/cyclinD1 survival signaling pathway in human cholesteatoma epithelium. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* *271*, 265–273.
- Martin, T.P.C., Weller, M.D., Kim, D.S., and Smith, M.C.F. (2009). Results of primary ossiculoplasty in ears with an intact stapes superstructure and malleus handle: inflammation in the middle ear at the time of surgery does not affect hearing outcomes. *Clin. Otolaryngol.* *34*, 218–224.
- Más-Estellés, F., Mateos-Fernández, M., Carrascosa-Bisquert, B., Facal de Castro, F., Puchades-Román, I., and Morera-Pérez, C. (2012). Contemporary non-echo-planar diffusion-weighted imaging of middle ear cholesteatomas. *Radiographics* *32*, 1197–1213.
- Matsuda, K., Tono, T., Kojima, H., Yamamoto, Y., Sakagami, M., Mishiro, Y., Hinohira, Y., and Okuno, T. (2018). Practicality analysis of the staging system

proposed by the Japan Otological Society for acquired middle ear cholesteatoma: A multicenter study of 446 surgical cases in Japan. *Auris. Nasus. Larynx* 45, 45–50.

Mishiro, Y., Sakagami, M., Adachi, O., and Kakutani, C. (2009). Prognostic factors for short-term outcomes after ossiculoplasty using multivariate analysis with logistic regression. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 135, 738–741.

Mishiro, Y., Sakagami, M., Kitahara, T., and Kakutani, C. (2010). Prognostic factors of long-term outcomes after ossiculoplasty using multivariate analysis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 267, 861–865.

Moon, I.S., Song, M.H., Kim, H.-N., Chung, M.-H., Lee, W.-S., and Lee, H.-K. (2007). Hearing results after ossiculoplasty using Polycel prosthesis. *Acta Otolaryngol.* 127, 20–24.

Motamed, M., Powe, D., Kendall, C., Birchall, J.P., and Banerjee, A.R. (2002). p53 Expression and keratinocyte hyperproliferation in middle ear cholesteatoma. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 27, 505–508.

Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J.A., Mill, P., van Noort, M., Hui, C., Clevers, H., Dotto, G.P., and Radtke, F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat. Genet.* 33, 416–421.

Olszewska, E., Rutkowska, J., Minovi, A., Sieskiewicz, A., Rogowski, M., and Dazert, S. (2013). The role of p21 and p53 proteins in congenital cholesteatoma. *Otol. Neurotol.* 34, 266–274.

Pinchot, S.N., Jaskula-Sztul, R., Ning, L., Peters, N.R., Cook, M.R., Kunnimalaiyaan, M., and Chen, H. (2011). Identification and validation of Notch pathway activating compounds through a novel high-throughput screening method. *Cancer* 117, 1386–1398.

Profant, M., Sláviková, K., Kabátová, Z., Slezák, P., and Waczulíková, I. (2012). Predictive validity of MRI in detecting and following cholesteatoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 269, 757–765.

Quaranta, N., Taliente, S., Coppola, F., and Salonna, I. (2015). Cartilage ossiculoplasty in cholesteatoma surgery: hearing results and prognostic factors. *Acta Otorhinolaryngol. Ital. Organo Uff. Della Soc. Ital. Di Otorinolaringol. e Chir. Cerv.-Facc.* 35, 338–342.

Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J.C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., et al. (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J.* *20*, 3427–3436.

Shinoda, H., and Huang, C.C. (1995). Expressions of c-jun and p53 proteins in human middle ear cholesteatoma: relationship to keratinocyte proliferation, differentiation, and programmed cell death. *Laryngoscope* *105*, 1232–1237.

Tono, T., Sakagami, M., Kojima, H., Yamamoto, Y., Matsuda, K., Komori, M., Hato, N., Morita, Y., and Hashimoto, S. (2017). Staging and classification criteria for middle ear cholesteatoma proposed by the Japan Otological Society. *Auris. Nasus. Larynx* *44*, 135–140.

Toyama, C., Leite, C. da C., Baraúna Filho, I.S., Brito Neto, R.V. de, Bento, R.F., Cerri, G.G., and Gebrim, E.M.M.S. (2008). The role of magnetic resonance imaging in the postoperative management of cholesteatomas. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* *74*, 693–696.

Umit, T., Ozgur, Y., Bilgehan, G., Volkan, S.A., and Sezim, S.A. (2010). Results of primary ossiculoplasty and prognostic factors in canal wall-down tympanoplasty. *J. Craniofac. Surg.* *21*, 407–410.

Venail, F., Bonafe, A., Poirrier, V., Mondain, M., and Uziel, A. (2008). Comparison of echo-planar diffusion-weighted imaging and delayed postcontrast T1-weighted MR imaging for the detection of residual cholesteatoma. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* *29*, 1363–1368.

De Vos, C., Gersdorff, M., and Gérard, J.-M. (2007). Prognostic factors in ossiculoplasty. *Otol. Neurotol.* *28*, 61–67.

Yamamoto, N., Ogino, E., Hiraumi, H., Sakamoto, T., and Ito, J. (2010). Outcome of ossiculoplasty in Kyoto University Hospital. *Acta Otolaryngol. Suppl.* *6489*, 11–15.

Yamashita, K., Yoshiura, T., Hiwatashi, A., Obara, M., Togao, O., Matsumoto, N., Kikuchi, K., and Honda, H. (2013). High-resolution three-dimensional diffusion-weighted imaging of middle ear cholesteatoma at 3.0 T MRI: usefulness of 3D turbo field-echo with diffusion-sensitized driven-equilibrium preparation (TFE-DSDE) compared to single-shot echo-planar imaging. *Eur. J.*

Radiol. *82*, e471-5.

Yugawa, T., Handa, K., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M., and Kiyono, T. (2007). Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 3732–3742.

Yung, M., and Vowler, S.L. (2006). Long-term results in ossiculoplasty: an analysis of prognostic factors. *Otol. Neurotol.* *27*, 874–881.

Yung, M., Tono, T., Olszewska, E., Yamamoto, Y., Sudhoff, H., Sakagami, M., Mulder, J., Kojima, H., İncesulu, A., Trabalzini, F., et al. (2017). EAONO/JOS Joint Consensus Statements on the Definitions, Classification and Staging of Middle Ear Cholesteatoma. *J. Int. Adv. Otol.* *13*, 1–8.

切替一郎 (2013). 耳の生理. 新耳鼻咽喉科学, 加我君孝(編). (東京都: 南山堂), pp.35.