



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	福田, 篤
Description	配架番号 : 1704
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第7156号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86139
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	FUKUDA_Atsumi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 福田 篤

学位論文題名

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)

【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 μ 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 ProfilerTM 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つのハウスキーピング遺伝子を用いて標準化を行い、それぞれの Δ Ct 値を算出し、相対的 mRNA 発現比 (Fold change) に関しては Δ Δ 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 μ 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 標本を作製した。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 名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、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が、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。

【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。