

聴覚・平衡覚研究部

部長 藤井 正人

聴覚障害研究室 松永 達雄 室長

平衡覚障害研究室 藤井 正人 部長兼任

再生医療研究室 落合 博子 室長

[聴覚・平衡覚研究部]

本年は、NHO ネットワーク研究【感覚器】で加齢性難聴に対する共同研究が、新たに開始され、さらに難聴遺伝子の研究もいくつかのプロジェクトで進行している。研究員による基礎的研究では、論文も掲載され実績が上がってきている。一方、頭頸部癌に対する基礎研究と多施設共同研究や、再生医療研究室の癥痕研究も行われている。

聴覚障害研究室（松永達雄室長）では、難聴者における難聴遺伝子の同定、臨床的特徴と病態の解明により効果的な検査・診断・予防・治療法の開発を進めている。系統的難聴遺伝子解析という方法を確立し、難聴の特徴に応じて約30種類の難聴遺伝子から原因の可能性が高い遺伝子と領域を選択して遺伝子診断に活用し、日本人で初めての難聴遺伝子を複数、日本人で初めての遺伝子変異を多数同定している。また、病型のサブタイプ分類やその診断、一部の遺伝性難聴では適正な治療方法の選択を可能とした。Auditory Neuropathy や蝸牛神経低形成症という脳や身体に障害がないにもかかわらず言語の習得がたいへん困難な小児難聴、そして Pendred 症候群という進行性・変動性の経過と10歳以後に甲状腺腫を合併する小児難聴について、全国の小児病院の耳鼻咽喉科医師あるいは大学等の病院の小児難聴担当医師への調査を行い、患者数、原因、早期診断および適切な言語聴覚リハビリテーション方法の解明を進めた。

内耳エネルギー不全および遺伝性難聴のモデル動物を用いた基礎的研究から、蝸牛のイオン恒常性の維持に働く蝸牛外側壁線維細胞の障害と発生・再生のメカニズムの解明、タンパク質の立体構造に基づく病態、新規薬剤の難聴に対する効果を解明した。また、加齢性難聴モデルを用いた研究をおこない、聴力低下に伴うゲノムのメチル化解析、メチル化修飾による聴力保存効果の検討を行なっている。

再生医療研究室（落合博子室長・形成外科医長併任）では、これまでに、骨髄より採取される間葉系幹細胞（MSC）を傷に移植すると傷あとが目立たなくなることを報告してきた。また、マウス胎仔の創傷も早期であれば目立たなく治癒することが報告されている。今後、この研究が先天性疾患の治療や美容形成手術に大きく貢献することが期待されており、さらなる基礎データを積み上げ、この現象の解明を行っていきたい。また、形成外科では組織欠損の再建手術を行うが、これも再生医療の一部に属すると考えられる。再建手術を安全に行うためには血流の付加が必要不可欠であるが、基本の植皮の段階から研究を行っている。あらかじめ、血管を構築し、植皮に組み込むことで生着率、質感に優れた植皮術を行うことを目標としている。また、形成外科・整形外科領域において人工骨が使用される頻度が増えている。人工骨は、再生医療が最も早く実現した素材であり、人体と一体化する特徴を有している。この人工骨の伝導能や親和性のしくみを検討し、適切かつ有効な使用方法を研究している。これらの内容は、形成外科学会のセミナーなどで報告され、臨床に役立てられている。

当研究部では、癌の基礎研究もおこなっており最近では頭頸部癌幹細胞に関する基礎実験や、中咽頭癌におけるヒトパピローマウイルス感染に関する研究を行っています。ヒト

パピローマウイルス感染は以前から子宮頸がんで問題となってきましたが最近では頭頸部癌、特に中咽頭癌における感染率が高いことが世界中で注目されています。我々はわが国で初めて全国組織で研究を開始しており当研究部が中心となって全国 21 施設で症例登録を行い 2011 年 3 月で登録を終了する予定である。

以上、様々な分野で臨床に密着した基礎研究を行っており、今後、新しいエビデンスの構築を目指したデータを世界に発信することを目標としています。

加齢性難聴に対する QOL と酸化ストレスを指標とした個別化治療
の開発に関する研究
補聴器装用による聴覚コミュニケーション環境改善因子の検討

藤井正人 南 修司郎
(聴覚・平衡覚研究部)

研究の概要

加齢性難聴は、きわめて高い有病率を持つ疾患であり、徐々に高音域から中音域、低音域に及んでくる。また、純音のみならず言葉を聞き取る能力（語音弁別能）においても著しい低下がみられ、とりわけ騒音障害のある場所、多人数での会話、残響時間の長い部屋での聞き取りは困難となる。このように純音聴力や語音弁別能が低下した患者は、他人との言葉を介した意思疎通が困難となり、結果的に、不安や抑鬱状態に陥り社会的活動が制限されることが知られている。日常生活や会話場面における聞き取り困難な状況はストレスフルであるとともに日常の行動においても障害物による場合や交通で様々なトラブルに巻き込まれる場合も考えられる。また耳鳴を伴う場合もあり概念的に生活の質に大きな悪影響をおよぼしていると考えられる。

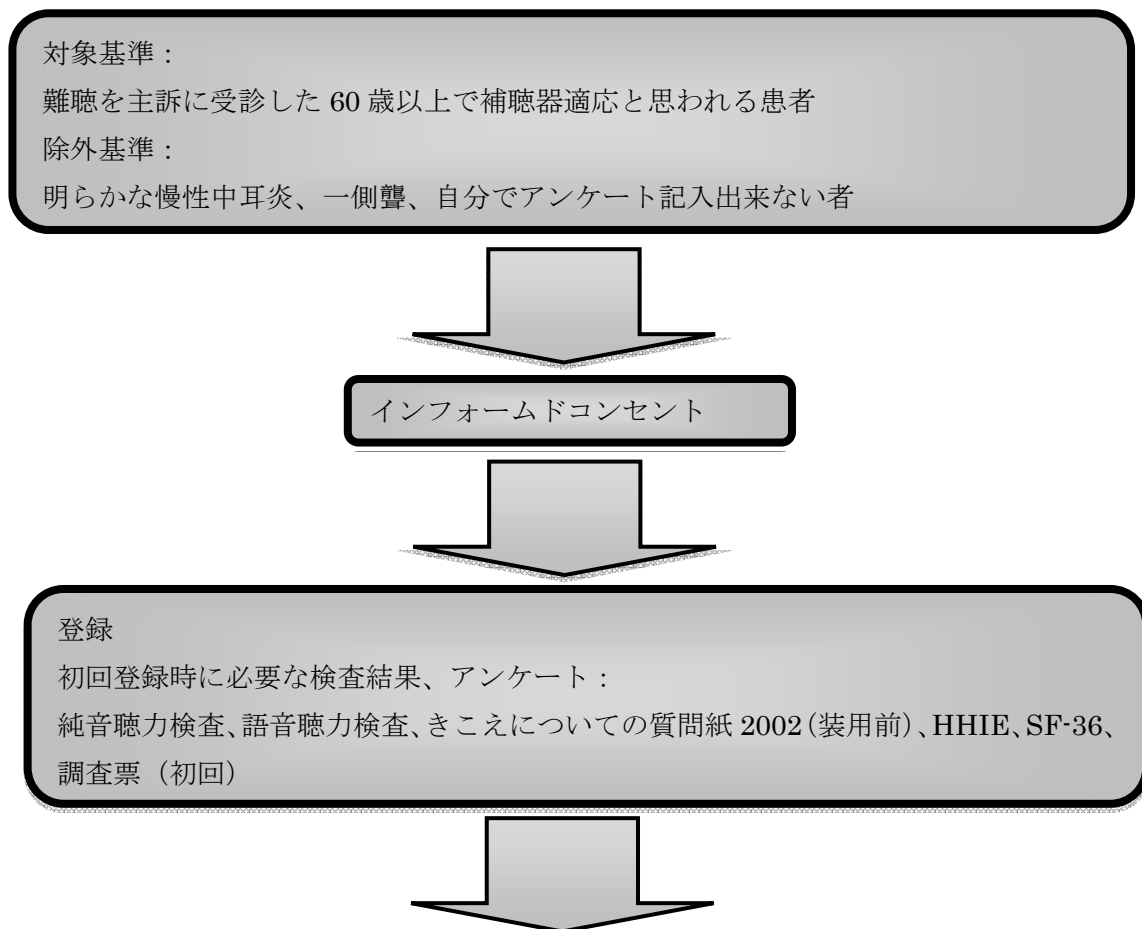
一方、加齢に伴う様々な障害や疾患によって QOL は低下すると考えられるがその中で難聴によって QOL 低下がさらに大きくなることが考えられる。我々は平成 15 年から国立病院機構ネットワーク研究として「加齢性難聴のモデル化と、テーラーメイド医療に向けた治療法選択の根拠開発に関する研究」を行い、聴覚低下と難聴ハンディキャップとは常に相関せず、聴覚低下が比較的軽度であるにもかかわらず難聴ハンディキャップが大きい場合がありその場合は健康関連 QOL も著しく低下することを示してきた。この研究から、聴覚の生理学的評価とともに聴覚に関連する QOL を評価し個別化することで、加齢性難聴患者に対する様々な医療行為を効果的にして QOL 向上につなげることができることが推測された。現在、加齢性難聴の患者に対する医療行為として、日本では補聴器装用が中心であるが、QOL、聴覚コミュニケーション環境の改善が十分みられない患者をしばしば経験する。医療介入としての補聴器装用が一律に効果を上げているとは考えにくい状況である。これまでの研究から、加齢性難聴患者を理学的所見と QOL 関連評価などから個別化し、補聴器などの効果を検討することによって、患者の社会的活動の改善効果を評価しこれからフィードバックして治療を行う際の適合因子を探る必要性があると考えられるため今回の研究を行うこととなった。

今回我々は加齢性難聴の聴覚コミュニケーション環境の現状を次の 3 つの質問紙を用いて把握する。聴覚ハンディキャップを評価する方法として Handicap Inventory for the Elderly (以下 HHIE) を、健康関連 QOL を評価する方法として SF36 を、聴覚コミュニケーション

ン環境・補聴器装用効果を評価する方法として「きこえについての質問紙 2002」を使用する。HHIEでは、Social/Situationalな側面（以下S）と、emotionalな側面（以下E）に対する難聴の影響を自己評定する[3]。難聴のために起こるコミュニケーションの困難と社会生活の制限について、「ない」「たまに」「時々」「多くの場合」「つねに」を1から5の評定得点に当てはめる。Sの評定得点の合計は障害が最も軽い場合の12点から最も重い場合の60点、Eでは13点から65点の範囲である。SF-36は、健康関連QOLを測定するため8つの健康概念〔(1)身体機能、(2)日常役割機能（身体）、(3)日常役割機能（精神）、(4)全体的健康感、(5)社会生活機能、(6)体の痛み、(7)活力、(8)心の健康〕を100点満点で評価する。「きこえについての質問紙 2002」は補聴器を使用しない状態（装用前）と補聴器をした状態（装用後）の二つがある。いずれも23の質問項目と患者状況などに関する質問群の二つから構成されている。23の質問項目は「きこえにくさ」「心理・社会的影響」「コミュニケーションストラテジー」からなり、補聴器装用前後のそれぞれの評価を行うことができる。

本研究は、我が国での加齢性難聴における聴覚コミュニケーション環境の現状につき上記自己評価尺度を用いて把握した上で、前向き研究として補聴器装用を行い聴覚コミュニケーション環境の予後改善因子を明らかにすることを目的とする。

研究の流れ図



補聴器装用開始

(補聴器試聴のみで装用に至らなかった症例はその旨を記載し脱落症例として登録)



3ヶ月後の追跡調査

2回目アンケート：きこえについての質問紙 2002 (装用後)、HHIE、SF-36、
調査票 (2回目以降)、音場検査可能な施設は補聴器適合検査を施行



1年後の追跡調査

3回目アンケート：きこえについての質問紙 2002 (装用後)、HHIE、SF-36、
調査票 2回目以降、音場検査可能な施設は補聴器適合検査を施行

参加施設として 平成 22 年度は、東京医療センター 名古屋医療センター 岡山医療センター 呉医療センター 神戸医療センター 嬉野医療センター 仙台医療センター 栃木病院 慶應義塾大学 国際医療福祉大学三田病院 の 10 施設で倫理委員会審査を行い研究を開始することになった。

参考文献

1. Gates, G.A. and J.H. Mills, *Presbycusis*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1111-20.
2. 藤井正人, *加齢性難聴*. 医療, 2008. **62**: p. 355-360.
3. 岡本, 朗., et al., *HHIE(高齢者のための難聴のハンディキャップ自己評定尺度)を用いた補聴器装用効果の評価*. Audiology Japan, 1996. **39**(5): p. 607-608.
4. Suzuki, K., Y. Hara, and M. Okamoto, *Self-Assessed Hearing Problems : an Aanalysis of the Self-Assessment Scale for Japanese Hearing impaired*. Audiology Japan, 2002. **45**(6): p. 704-715.

Auditory Neuropathy の遺伝子解析とその臨床応用

松永達雄
(聴覚障害研究室)

要 約

日本人小児 AN の遺伝的要因としては、非症候群性 AN では OTOF 遺伝子変異の頻度が高く、人工内耳で良好な言語発達が得られる。症候群性 AN では ADOA の頻度が高く、その場合 OPA1 遺伝子変異が同定される可能性がある。小児 AN の遺伝子診断が、治療およびリハビリテーションの選択に役立つ可能性が示された。

研 究 目 的

新しい感音難聴の疾患概念である Auditory Neuropathy (AN)は、ABR 反応が不良で OAE 反応が良好という点が特徴である。AN では多くの場合で言語の聞き取りが困難であり、このため小児では言語獲得が問題となる。AN は原因および臨床像が多様であり、近年 Auditory Neuropathy Spectrum Disorder という名称も提唱されている。本研究では、わが国の小児 AN の早期診断と治療・リハビリテーションの促進を目指して、日本人小児 AN の遺伝的要因の解明を目的とした。

対象および方法

対象は原因不明の両側性難聴、難聴発症時の年齢が 15 歳以下、ABR および OAE により AN が確定あるいは疑いと診断され、遺伝子解析が行われた 21 家系 21 人とした。この中で難聴以外に症状がない非症候群性 AN が 14 人、難聴以外の症状を伴う症候群性 AN が 7 人であった。遺伝的要因の解析は、非症候群性 AN では一般的な小児難聴遺伝子に加えて OTOF 遺伝子を解析した。症候群性 AN の解析では、視神経萎縮と AN を呈する Autosomal Dominant Optic Neuropathy (ADOA) の難聴者で OPA1 遺伝子を解析した。臨床像の解析として難聴の背景、経過、身体所見、家族歴、その他の臨床所見を検討した。本研究は各施設での倫理審査の承認と難聴児の両親のインフォームドコンセントを受けて、関連する各倫理指針を遵守して行われた。

結 果

非症候群性 AN の 14 人中 8 人で OTOF 遺伝子に病的変異が同定された。一方、OTOF 遺伝子変異による難聴に特異的な所見はなく、他の非症候群性 AN から問診や一般的な検査・診断による鑑別は困難であった。高頻度に同定された一種類の OTOF 遺伝子の病的変異を、原因不明であった先天性高度難聴 53 人で解析したところ、さらに 1 例で同定された。続いて行った本変異のハプロタイプ解析により創始者効果が同定された。OTOF 遺伝子変異が同定された患者の一部では人工内耳が実施され、言語発達は良好であった。海外でも

OTOF 遺伝子変異による小児 AN で人工内耳の良好な効果が報告されており、本遺伝子診断が治療の選択に役立つ可能性がある。

症候群性 AN では ADOA が 3 人で診断され、全て孤発例であった。現時点では 1 人のみで OPA1 遺伝子解析が終了し、病的変異が同定された。本難聴は眼鏡などによる矯正困難な進行性の視力障害が生じるため、リハビリテーションにおける聴覚活用の意義が高い。海外での研究で OPA1 遺伝子変異による ADOA 対しても人工内耳の有効性が報告されており、本遺伝子診断も治療の選択に役立つ可能性がある。

難聴モデル動物内耳におけるエピジェネティック制御機構の解析

務台英樹

聴覚障害研究室

(要約) 加齢性難聴の病態を解明する目的で、動物モデルを用い、聴力維持に関連するエピジェネティック制御機構の主要分子である DNA メチル化酵素、およびヒストン脱アセチル化酵素の発現を検討した。加齢性難聴モデル動物における DNA のメチル化低下と、DNA メチル化酵素発現低下との関連が示唆され、さらにヒトでも同様の機構の存在が予想された。

(目的) 高齢化が進むわが国において、65 歳以上で約 3 分の 1 が患う老人性 (加齢性) 難聴の克服は重要課題である。加齢性難聴発症を説明する分子機序として、酸化ストレス傷害説、加齢性難聴と関連する一塩基多型(SNP)の網羅的探索などが行なわれてきた。務台は生後発達期の聴覚上皮で、DNA メチル化などを分子機序とするエピジェネティック制御機構が存在することを世界に先駆けて証明し (Mutai et al., 2009 *Developmental Neurobiology* vol:69, 913-30) その成果から、加齢性難聴は、環境因子によりエピジェネティック制御機構が調節され、それにより聴覚維持に関わる遺伝子発現量が長期的に変化し、結果として聴力が低下するという新たな分子機序を提唱している (エピゲノム仮説、図 1)。エピジェネティック制御機構は本質的に酵素による修飾反応であり、薬剤治療の標的となりうる。今年度はこの仮説を詳細に検討することを目的とした。

(対象および方法) 感覚細胞・神経障害型の加齢性難聴モデルである DBA/2J マウス、聴力正常の FVB/NJ マウス、C3H/HeJ マウスを用い、定量的 RT-PCR 法を行なった。免疫組織学的解析には、マウスおよびカニクイサル内耳凍結切片をもちいた蛍光免疫染色をおこない、レーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。

(結果) 生後発達期、成熟個体、および難聴モデル蝸牛上皮、および蝸牛軸を用いて定量的 RT-PCR を行ない、エピジェネティック制御機構の主要分子である DNA メチル化酵素 Dnmt1, 3a, 3b 遺伝子の発現変化、およびヒストン脱メチル化酵素 Hdac1,2, 3,4,5,6,7,8,9,10,11 遺伝子の発現変化を解析した。Dnmt1, 3a, 3b はいずれも生後発達に伴い発現が有意に減少していた(図 2)。前年度までに、加齢性難聴モデルにおけるゲノム DNA のメチル化低下減少と発現量の上昇があきらかになっているが、この現象と Dnmt 発現量減少との関連が示唆された。また、ヒストン脱メチル化酵素のうち、少なくとも Hdac1, 2, 3, 4, 8, 9 が発現することも明らかになり、内耳におけるエピジェネティック制御機構は、より広範な調節機構として内耳機能調節を行なっていると予想された。さらに、カニクイサル聴覚上皮で Dnmt3b 発現が免疫染色により確認され、マウスモデルでの本機構の重要

性が、ヒトを含む霊長類でも同様であることが示唆された。今後は聴力維持におけるエピジェネティック制御機構の役割について、DNAメチル化酵素活性の調節やメチル化酵素欠損マウスモデルの解析により、解析を続ける予定である。

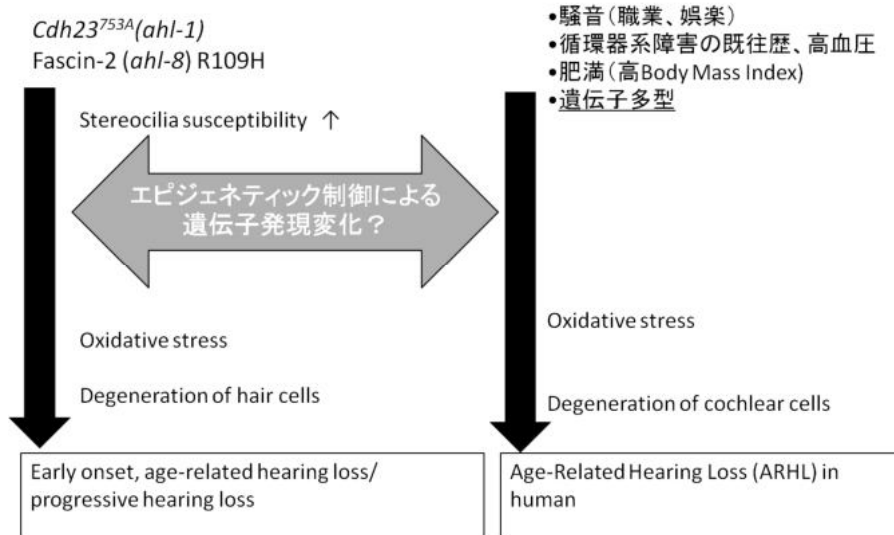


図1 加齢性難聴モデルのエピゲノム仮説。加齢性難聴モデル DBA/2J マウスにおける、聴力低下（左側）と、疫学研究などにより挙げられる様々な要因による聴力低下（右側）の双方は、エピゲノム変化によって説明できると考えている。

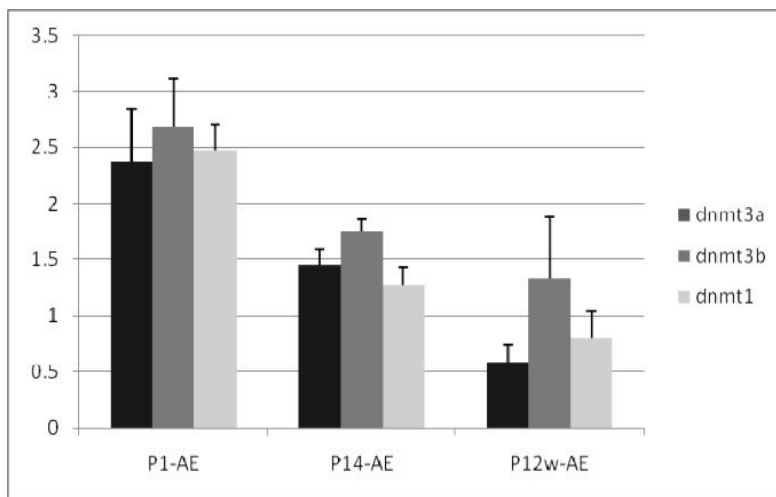


図2 生後発達時のマウス聴覚上皮における、DNAメチル化酵素 Dnmt1, 3a, 3b の発現量変化。生後1日(P1)にくらべ、12週齢(P12w)で発現量が低下している。

新規変異型 KCNQ4 新規変異体蛋白質の立体構造情報による感音性難聴の検証

難波一徳
(聴覚障害研究室)

要 約

KCNQ4 遺伝子は優性遺伝型 DFNA2 の原因遺伝子であり、遺伝子産物は 4 量体を形成し、一つの機能単位としてのチャンネルを形成する。KCNQ4 は蝸牛の有毛細胞が脱分極した後、内リンパより有毛細胞に流入したカリウムイオン(K⁺)を排出させるのに重要と考えられている。今回、純音聴力検査で両側性に高音漸傾型の感音難聴を呈した患者において KCNQ4 蛋白質のアミノ酸配列が 270 番目のチロシン(Y)がヒスチジン(H)に置換された遺伝子変異が同定され、難聴の原因である可能性が考えられた。本研究では KCNQ4 蛋白質構造情報に着目し、難聴原因としての検証することを目的とした。

研 究 目 的

KCNQ4 遺伝子は優性遺伝型 DFNA2 の原因遺伝子であり、遺伝子産物は 4 量体を形成し、一つの機能単位としてのチャンネルを形成する。KCNQ4 は蝸牛の有毛細胞が脱分極した後、内リンパより有毛細胞に流入したカリウムイオン(K⁺)を排出させるのに重要と考えられている。今回、純音聴力検査で両側性に高音漸傾型の感音難聴を呈した患者において KCNQ4 蛋白質のアミノ酸配列が 270 番目のチロシン(Y)がヒスチジン(H)に置換された遺伝子変異が同定され、難聴の原因である可能性が考えられた。本研究では KCNQ4 蛋白質構造情報に着目し、難聴原因としての検証することを目的とした。

対象および方法

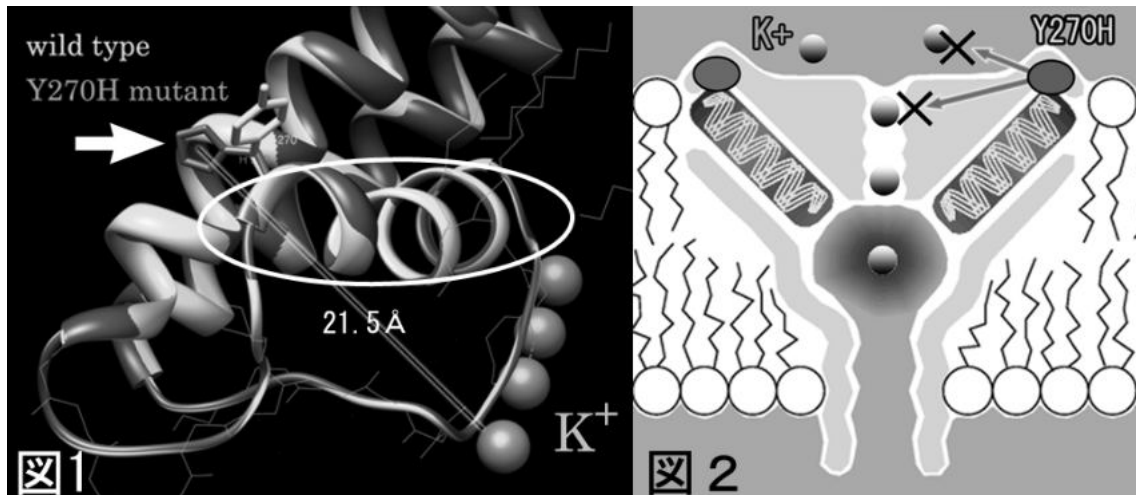
過去の文献およびデータベース検索を行ったところ、本 Y270H 変異は、新規変異であることが解った。また、日本人健聴者 96 検体のシーケンスの比較 (家族の検体なし)、および他種生物種によるアミノ酸保存性の解析の結果、Y270H が病的変異である可能性が示唆された。そこで高いアミノ酸配列の保存性を示した Kv1.2 カリウムチャンネル(Kch)の結晶構造を鋳型にして、動力学演算処理を行うことにより Y270H の立体構造予測を行った。得られた構造情報よりチャンネル機能阻害の要因を考察した。

結 果

この 270 番目の Y は K⁺の透過機能を調整する重要なポアヘリックス[図 1_楕円]の N 末端に存在する[図 1_矢印]。機能低下の原因が 2 つ考えられた。まず、270 番目の Y が H に変異することにより電氣的に中性な環境から塩基性の環境に変化する。そのため K⁺と電氣的に反発しチャンネルの表面領域において K⁺の通過を阻害した可能性が考えられた。2 つ目に、変異部位は脂質に覆われているためクーロン力が作用し、21.5Å 離れたチャンネル中心の

K⁺に電気的な斥力が働く要因となることが示唆された[図1-二重線]。つまり、Y270H変異によってポアヘリックス外側部分の電荷が正となり、ポアの入り口とチャンネル中心でK⁺を二重に阻害するメカニズムが考えられた[図2]。

本研究では、Y270H変異が難聴の原因となる可能性を原子メカニズムにより解説した。Y270H変異によりチャンネル機能が阻害され、有毛細胞内からのK⁺排出機能が異常となり、難聴をきたしたと推察される。



聴覚障害における聴覚伝導路の可塑性に関する研究

南修司郎

(聴覚平衡覚研究部)

要 約

聴覚伝導路の可塑性を調べるため、反復経頭蓋磁気刺激 (rTMS) を用いた臨床および基礎研究を行った。臨床研究では慢性耳鳴患者 16 人を対象とし、左大脳聴覚野に 1 kHz、運動閾値の 110% 強度の rTMS 治療を行った。rTMS 治療直後より耳鳴が有意に改善する結果が認められた。このように臨床研究で、rTMS が耳鳴に対し効果があることが分かったが、rTMS による聴覚野神経細胞への影響変化またその機序について報告はこれまでない。そこで動物モデルに対し rTMS 聴覚野刺激を加え、その聴覚伝導路の可塑性を Immediate early genes (IEGs) の変化で組織学的に調べた。IEGs は様々な細胞刺激により迅速に活性化され、その変化をみることで神経活動を組織学的に調べることが可能である。特に IEGs の一つである c-fos は活動神経の機能解剖的指標としてもっとも広く使われている。Sham 刺激群に比べ、rTMS 刺激群では刺激 1 時間後でマウス左聴覚野に c-Fos の発現を明らかに認めた。その発現は聴覚野に 1 日後までみられ、1 週間後の標本ではコントロール群の状態に戻っていた。一方 rTMS 刺激により c-fos の発現は内側膝状体には認めなかった。IEGs はシナプス可塑性にも関連しており、耳鳴に対する rTMS 効果の重要な機序の可能性として考えられる。

目 的 (または研究目的)

反復経頭蓋磁気刺激 (rTMS) はヒト中枢神経系の興奮性を制御する方法として近年広く臨床に使われてきている。特に低頻度 (1Hz) rTMS は刺激した脳領域の活性を持続的に減少させる事がわかっており、我々も耳鳴患者に対しその聴覚野を低頻度 rTMS にて抑制治療する臨床研究を開始しており一定の効果を認める結果を報告してきた (図 1)。このような耳鳴に対する rTMS 治療の報告は海外でも散見されるが、rTMS による聴覚野神経細胞への影響変化またその機序について報告はこれまでない。Immediate early genes (IEGs) は様々な細胞刺激により迅速に活性化され、その変化をみることで神経活動を組織学的に調べることが可能である。特に IEGs の一つである c-fos は活動神経の機能解剖的指標としてもっとも広く使われている。今回、我々は動物モデルにて rTMS で聴覚野刺激を加え、その聴覚伝導路の可塑性を c-Fos の変化で組織学的に調べた。

対象および方法 (または方法)

動物は CD-1 マウス (雄、6 - 10 週齢) を用いた。磁気刺激には Magstim Rapid® (Magstim 社) と動物用直径 50mm の 8 型刺激コイルを使用した。45% 出力強度で左聴覚野を 1Hz、420 回刺激した。マウス左聴覚野の目安はマウス脳解剖アトラスより Bregma か

ら尾側へ 3mm、左側へ 4mm とした。またコントロールとしてシャム刺激ではコイルを 90 度傾け、刺激が頭蓋内に伝わらないようにした。マウスは刺激 1 時間後、1 日後、1 週間後にそれぞれ脳を摘出固定し、その c-Fos 発現の変化を観察した。

結 果 (または成績)

Sham 刺激群に比べ、rTMS 刺激群では刺激 1 時間後でマウス左聴覚皮質全層に c-Fos の発現を明らかに認めた (図 2)。その発現は聴覚野に 1 日後までみられ、1 週間後の標本ではコントロール群の状態に戻っていた。一方内側膝状体には Sham 刺激に比べて、有意な変化は認めなかった (図 3)。IEGs はシナプス可塑性にも関連しており、rTMS の聴覚皮質刺激による聴覚伝導路への影響は聴覚皮質に留まることが示唆される。rTMS 刺激による耳鳴効果の機序を考える上で、大変興味深い結果と考えられる。

図 1 : 耳鳴患者に対する rTMS 治療効果

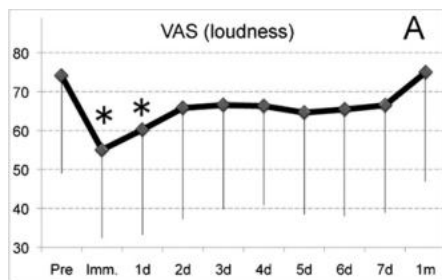


図 3 マウス rTMS 刺激後変化 (内側膝状体)

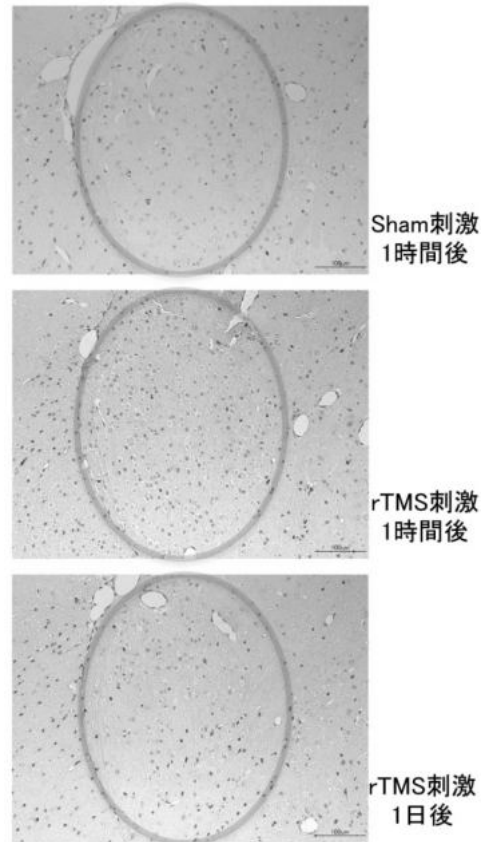
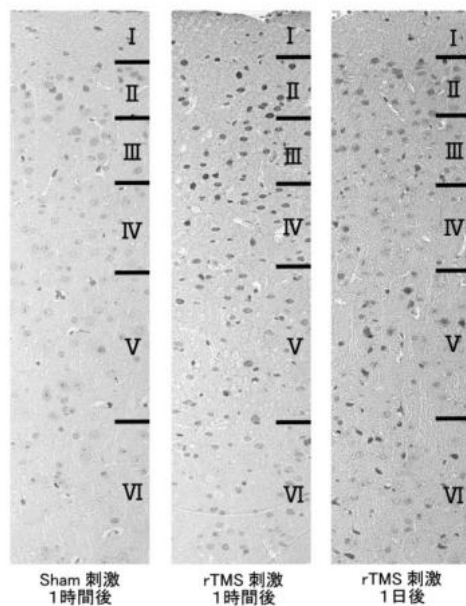


図 2 : マウス rTMS 刺激後変化 (聴覚野)



頭頸部扁平上皮癌におけるヒト乳頭腫ウイルス（HPV）の関与

徳丸 裕、藤井正人
(聴覚平衡覚研究部)

要約

欧米では性活動の多様化、活発化に伴い HPV に関連した中咽頭癌が増加傾向にある。今後、本邦においても欧米の流れを追随し、HPV 関連中咽頭癌が増加すると考えられる。HPV 関連の中咽頭癌は非喫煙者や比較的若年者に多く発生し、また予後が良好であるなど、これまでの頭頸部癌とは異なる臨床像を呈する。HPV 陽性の中咽頭癌は、従来の頭頸部癌とは異なる発癌メカニズムによって発生したと考えられ、これらの中咽頭癌症例に対しては、新たな治療戦略が必要であると考えられた。

背景、目的

ヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus: HPV) はパポバウイルスに属するウイルスで、正二十面体構造のキャプシド構造内に二本鎖環状 DNA をゲノムとして持っており、120 種類以上の型が知られている。大きく低リスク群と高リスク群に分類され、低リスク群にはタイプ 6, 11, 42, 43, 44 などが属し、疣や尖圭コンジローマの発生に関連している。一方、高リスク群にはタイプ 16, 18, 31, 33, 35、などが含まれ、その持続感染は子宮頸癌などの悪性腫瘍の原因になるとされている¹⁾。頭頸部癌と HPV との関連については以前より示されてきたが、最近の喫煙率や飲酒量の低下に伴い、改めて HPV 関連の頭頸部癌、特に中咽頭癌が注目されるようになってきた。当科で加療した頭頸部癌症例を対象に HPV 感染の検討を行うとともに、中咽頭癌と HPV の関連について言及する。

対象および方法

対象は 2005 年から 2009 年に当科にて加療した頭頸部扁平上皮癌症例 71 例で、原発部位別では下咽頭 27 例、喉頭 19 例、中咽頭 16 例、口腔 9 例であった 71 例とした。性別は男性 62 例、女性 9 例で、年齢の中央値は 63 歳であった。病期分類ではステージⅡが 6 例(8%)、ステージⅢが 10 例 (14%)、ステージⅣが 55 例 (74%) と進行癌が大部分を占めた。手術もしくは生検にて採取された検体は、速やかに -80 度で保存し、その後 DNA を抽出した。HPV の検出とタイピングは PCR Human Papillomavirus Detection Set および PCR Human Papillomavirus Typing Set (共にタカラバイオ株式会社)を用いた。Detection set では HPV16、18、および 33 型をそれぞれ特異的に増幅するプライマーを用いて PCR を行い、

HPVを検出した。また Typing Set ではまずHPVの E6 と E7 を含む領域 (228~268 bp) をコンセンサスプライマーにて増幅した。増幅された DNA フラグメントは数種類の制限酵素で処理し、その電気泳動パターンによりHPVのタイプを判別した。高リスクHPVであるタイプ 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58 および低リスクHPVであるタイプ 6, 11 の合計 9 種類のHPVが検出可能である。

結 果

対象症例 71 例中、8 例 (11%) にHPVの感染を認め、いずれも中咽頭癌であった。中咽頭癌のみでは 16 例中 8 例 (50%) にHPVが検出された。HPVのタイピングの結果はタイプ 16 が 7 例、タイプ 33 が 1 例であった。HPV感染の有無と腫瘍の垂部位との関係を見てみると、HPV陽性中咽頭癌では口蓋扁桃 7 例、舌根 1 例であったが、陰性症例は口蓋扁桃 1 例、舌根 2 例で、その他の 5 例は後壁、軟口蓋であった。これまでの報告と同様、口蓋扁桃と舌根がHPV感染と強い関連があることが示された。喫煙状態との関連を見ると、HPV陽性症例は非喫煙者が 6 例、喫煙者もしくは過去の喫煙者が 2 例であったが、HPV陰性症例では非喫煙者が 1 例、喫煙者もしくは過去の喫煙者が 7 例であった。HPV陽性症例は有意に非喫煙者が多い傾向が認められた。またHPV感染の有無とT分類、N分類、病期分類との関連は認められなかった。

考察、今後の検討課題

ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) はヒトに容易に感染するため、女性の約 70 - 80%は一生のうち一度は性器に HPV 感染が生じるとされている。しかしながら、多くの場合は自己の免疫力で排除され約 10-15%が持続感染となり、数年から 10 数年後に高度の細胞異型を起こすのは 5%程度である。最終的に子宮頸癌まで至るのは感染者の約 0.1%程度とされている。このように大部分の HPV 感染が一過性感染に終わるのは、NK 細胞やマクロファージなどの細胞と、インターフェロンなどのサイトカインが機能して生じる宿主の免疫応答による。

高リスク HPV が宿主細胞の DNA に組み込まれると、HPV 中の E2 遺伝子が切断され、その E2 遺伝子により発現が抑制されていた、HPV 由来の癌蛋白 E6、E7 が高発現する。E6、E7 は、癌抑制遺伝子として有名な p53 や Rb といった遺伝子の働きを不活化するため、その結果、癌化につながると考えられている。その他、アポトーシスの抑制、テロメアの増長、細胞増殖の亢進などの癌化に関連した働きも報告されている。

頭頸部癌と HPV との関連については本邦においても以前より示されてきたが、最近の喫煙率や飲酒量の低下に伴い、改めて HPV 関連の頭頸部癌、特に中咽頭癌が注目されるようになってきた。というのも欧米を中心として、HPV が陽性である中咽頭癌の発生率が上昇し

ているからである。その理由としては、若年者の性活動の活発化、多様化が挙げられており、vaginal-sex partners や oral-sex partner の数と HPV-16 感染率や中咽頭癌の発生率との相関が示されている。またスウェーデンにおいても口蓋扁桃原発の扁平上皮癌が急増しており、HPV の陽性率もまた上昇していることが報告されている。

これらの HPV 関連頭頸部癌はこれまでの頭頸部癌と比較し、いくつかの臨床上的の特徴がある。例えば HPV 陽性頭頸部癌患者は、非喫煙者で比較的若年者に発生することや予後が良好であることなどが報告されている。予後が良好である理由ははっきりとは解明されていないが、HPV 陽性頭頸部癌では field cancerization が生じておらず重複癌が発生しにくいことや、癌抑制遺伝子である p53 が E6 で抑制されているもののその遺伝子変異が少なく(16)、化学療法や放射線治療に対する感受性が高いことなどが考えられている。HPV 関連頭頸部癌では、従来から提唱されてきた発癌メカニズムとは異なる機序が働いており臨床的にも生物学的にも従来の頭頸部癌とは異なる特徴を示している。

今後、本邦においても米国での傾向を追従し HPV 関連の頭頸部癌が増加することが予想され、現時点での HPV 感染の頻度やタイピングを検討することは重要であると考えられる。我々は当科にて治療を行った頭頸部癌について HPV 感染の有無を検討したが、結果は中咽頭癌のみに HPV 陽性症例が認められ、その頻度は 50%であった。頭頸部癌の HPV 感染については、喉頭癌や口腔癌での検出も報告されているが、最近ではほとんどが中咽頭癌における報告が多い。また我々の HPV タイピングの結果は大部分の症例が HPV16 であり、それ以外ではタイプ 33 が 1 例認められたただけであった。HPV のタイプは 120 種類以上が知られているが、発癌と関連しているのはいわゆる高リスク群に分類される HPV である。中でも HPV16 の感染が大部分を占めており、米国での報告では頭頸部癌で検出される HPV は 90%以上が HPV16 である。HPV の感染と関連が深い子宮頸癌の場合は、米国では HPV16、18 の感染が大部分をしめるが、本邦では 16、18 のみならず 52、58、33、31 といった他の高リスクタイプの HPV も比較的頻度が高く検出されている。HPV 関連の頭頸部癌が性活動と密接な関連があるのであれば、本邦の頭頸部癌における HPV のタイプは子宮頸癌のタイプ別の割合と同等の分布を示すと推測される。今後の多施設での解析が必要であると考えられる。

最近になり HPV 陽性中咽頭癌の予後が良好であるとの報告が続いている。今後のさらなる検討によって、HPV 感染の有無と（化学）放射線治療に対する感受性や予後などとの関連が明確になれば、HPV 感染の状態が治療方針を決定する上で重要なバイオマーカーになる可能性がある。また HPV 検査の保険適応やより簡便で侵襲の少ない検出方法の開発などについても検討するべきと考えられる。

頭頸部扁平上皮癌におけるがん幹細胞様細胞の存在と maker の発現に関する検討

羽生昇 徳丸裕 藤井正人
(聴覚平衡覚研究部)

【背景と目的】

近年癌幹細胞の概念が提唱され、頭頸部癌に於いても Side Population (SP) 細胞の同定とその癌幹細胞としての可能性が報告されているが、その役割は十分に解明されていない。そこで我々は①舌扁平上皮癌細胞株における SP 細胞の有無、②SP 細胞における癌幹細胞関連遺伝子の発現、③臨床検体における同関連遺伝子の発現とその臨床的意義について検討した。

【方法・結果】

- ① DNA 結合色素 Hoechst33342 を用い舌癌細胞株を flowcytometry にて sorting した結果、SP は SAS にて 0.9%、HSC4 にて 0.9%、SCC 4 にて 10.2%、それぞれ認められた。
- ② RT-PCR にて癌幹細胞関連遺伝子の発現を SCC4 の SP 細胞と non SP 細胞の間で比較した結果、SP 細胞で転写因子 Oct3/4、Nanog、および ABC transporter の ABCG2 の発現が高かった。
- ③ 慶應義塾大学病院で初回治療として舌部分切除のみを行い、3年以上経過観察した stage I/II 舌扁平上皮癌例のうち原発巣標本を入手しえた 41 例を対象に、Oct3/4 と Nanog の発現を免疫染色にて評価し、後発頸部リンパ節転移(delayed neck metastasis: DNM)との関係について検討した。DNM は 13 例(31.7%)に認められ、Oct3/4、Nanog の発現との間に有意な相関が認められた。

【考察】

頭頸部扁平上皮癌には癌幹細胞が存在し、その指標として Oct3/4、Nanog が有用である可能性、およびこれら指標を発現する cancer stem-like cell の存在が DNM に寄与している可能性が示唆された。

ラットを用いた頭蓋感染モデル作成に関する研究

落合博子
(再生医療研究室)

要約

小動物は感染に強く、感染状態を維持することが困難であると指摘されている。今回の頭蓋感染モデルの研究では、実際の臨床における細菌感染の状態を作り出して維持することは困難であったが、細菌接種を伴った場合、スポンジやガーゼなどの異物を骨欠損部に混在させることで細菌数を多く創部にとどめることが可能であることが分かった。これは、頭蓋感染モデルとしては有用であると考えられ、このモデルを用いることで頭蓋形成術に用いる材料による感染の影響を検討できる可能性が示唆された。

目的

私たち形成外科医は頭蓋骨や顔面骨に生じた、外傷や腫瘍切除術後の骨欠損、先天性疾患にともなう頭蓋顔面骨変形の形態を整える目的で、人工骨を用いた手術を行う状況に遭遇する。人工骨は再生医療の発展から、骨伝導能に優れ、生体親和性が良好な素材が工夫されており、一般的な手術法となりつつある。しかしながら、人工骨挿入直後に感染を起こしてしまうと創部に感染が波及し、難治性皮膚潰瘍となり、人工骨の除去を考慮しなければなくなる症例あることも事実である。今後、感染に強い人工骨を開発する必要があるが、その開発にあたり、頭蓋感染モデルの作成が必要であると考えた。ラットなどの小動物は感染に対する抵抗性が強く、感染状態を維持するのが難しいとされている。そこで、ラットを用いた頭蓋感染モデルの作成を試み、いかに感染状態を維持することが可能か、頭蓋感染モデルとして有用かどうかについて検討した。

方法

- ① 実験材料:接種する細菌は、黄色ブドウ球菌を用いた。挿入する異物は2種類用意し、コラーゲンスポンジハニカム（以下、スポンジ）とガーゼを用いた。
- ② オス SD ラット 10-12W を用いた。
- ③ 麻酔後に、頭頂部に皮膚切開を加えて頭蓋骨を露出した。矢状縫合を避けて左右にそれぞれ 5mm の骨全層欠損を作成した（図 1,表 1）。

グループ 1（コントロール）：骨欠損のみ

グループ 2：スポンジ

グループ 3：ガーゼ

を骨欠損部に挿入し、さらに各グループを細菌接種群と非接種群に分類した。感染モデルには、それぞれの骨欠損部に黄色ブドウ球菌を各 15cfu 接種し、4-0 ナイロン糸で縫合・閉創した。

- ④ 創作成後3日目、7日目に骨欠損部の肉眼的観察を行い、肉芽組織を採取してHE染色、グラム染色施行後組織学的に検討した。さらに肉芽組織の細菌培養を行い、細菌数増加の確認を行った。

結果

肉眼的結果では、細菌非接種群は、スポンジとガーゼ挿入群で少量の不良肉芽形成を認めた。また、細菌接種群では、すべての創に浸出液の増多と脆弱で厚い不良肉芽形成を認めた。3日目と7日目はほぼ同様の所見であった。

3日目の細胞培養結果では、グループ1の細菌非接種群と接種群の間に有意差は認めず、グループ2,3において細菌非接種群と接種群の間に有意差を認めた。細菌接種群においてはグループ1と2の間で、またグループ1と3の間に有意差を認めた。グループ2と3の間には有意差は認めなかった(図2)。

7日目の細胞培養結果でも、3日目と同様の傾向を認めた(図3)。

以上より、異物を骨欠損部に混在させることで細菌数を多く創部にとどめることが可能であり、ラットの頭蓋感染モデルとして有用であると考えられた。

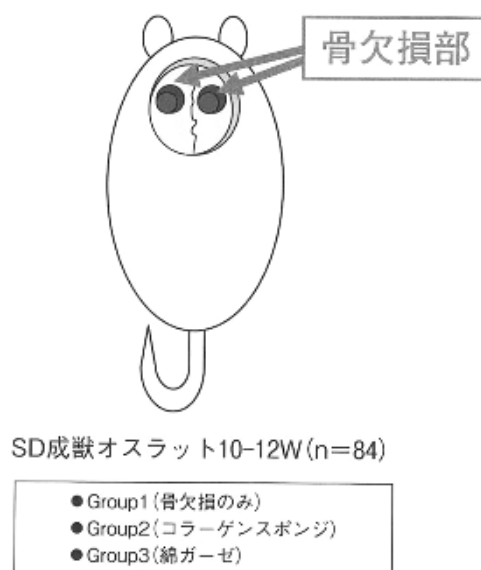


図1 ラット頭頂部に骨欠損を作成

	細菌非接種群	細菌接種群*	
骨欠損のみ	3日目(n=6) 7日目(n=6)	3日目(n=8) 7日目(n=8)	Group1
コラーゲン スポンジ	3日目(n=6) 7日目(n=6)	3日目(n=8) 7日目(n=8)	Group2
綿ガーゼ	3日目(n=6) 7日目(n=6)	3日目(n=8) 7日目(n=8)	Group3

※細菌接種群は黄色ブドウ球菌 (Easy QA Ball®: BTF社製) を15cfu ずつ骨欠損部におく。
3日目および7日目に骨欠損部の肉芽組織を採取し、細菌培養と4%PFA固定後グラム染色を施行。

表1 対象

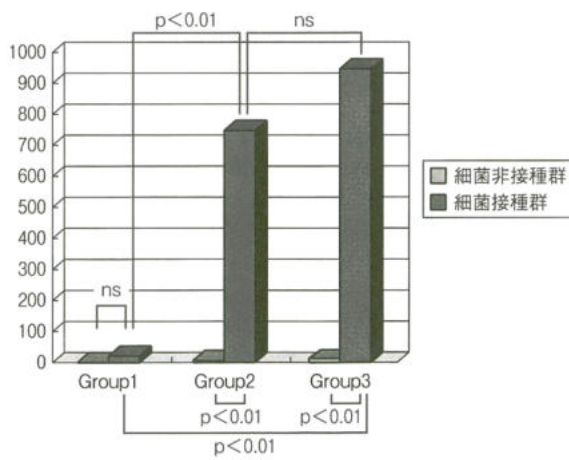


図2 細胞培養結果 (3日目)

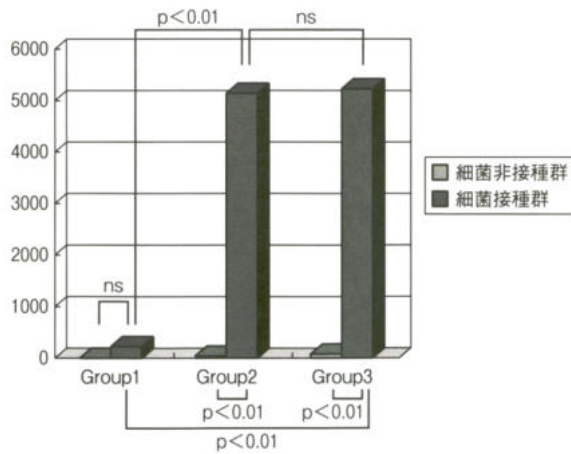


図3 細胞培養結果 (7日目)