The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Intercellular communication between keratinocytes and fibroblasts induces local osteoclast differentiation : a mechanism underlying cholesteatoma-induced bone destruction
Author(s)	岩本, 依子
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59565
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	岩本　依子
論文題名 Title	Intercellular communication between keratinocytes and fibroblasts induces local osteoclast differentiation: a mechanism underlying cholesteatoma-induced bone destruction （角化重層扁平上皮と線維芽細胞間の細胞間コミュニケーションが局所での破骨細胞分化を誘導する-真珠腫による骨破壊メカニズム-）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

真珠腫は、中耳内に生じる表皮嚢胞であるが、接する骨を溶かす性質があり、それ故に顔面神経麻痺や髄膜炎など重篤な合併症を生じうる。現在の唯一の治療法は外科的摘出であり、保存的治療の開発が望まれている。真珠腫の骨破壊には破骨細胞の関与が古くより示唆されてきたが、骨表面での破骨細胞分化誘導メカニズムについては未だ解明されていない。

本研究では、真珠腫の構成細胞である角化重層扁平上皮細胞と線維芽細胞のクロストークに着目し、この二者の共役系による破骨細胞の分化誘導モデルを生体内外で構築し、真珠腫による骨破壊機序を解明する事を目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まず、マウス生体内における真珠腫骨破壊モデルの構築を行った。マウス耳介を上皮層と上皮下層に分離し、上皮層より角化扁平上皮細胞を単離した。上皮下層はコラーゲン分解し、得られた細胞を播種し、３回以上継代を重ねることで線維芽細胞を単離した。単離した角化扁平上皮細胞および線維芽細胞を混合し、マウス頭頂骨骨膜下に注射し、１週間後に形成された腫瘤および頭蓋骨を摘出し、組織像の検証を行った。マウス頭蓋骨骨膜下に、重層化した角化上皮層とそれを取り巻く線維芽細胞層からなる真珠腫類似組織を示す腫瘤が形成された。この腫瘤の直下の骨表面には多数の破骨細胞が誘導されていることが確認された。また、免疫染色にて、角化扁平上皮層の周囲の線維芽細胞が破骨細胞の分化調節因子として知られるReceptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)を発現している事が示された。

この腫瘤内でのRANKL発現機序を解明するため、*in vitro*における角化重層扁平上皮・線維芽細胞および破骨細胞の３者の共役系を構築した。まず、気相液相界面法を用い、マウス耳介由来角化扁平上皮細胞の重層培養を行った。得られた角化重層扁平上皮細胞を、マウス耳介由来線維芽細胞と共存培養し、線維芽細胞のmRNA発現を確認した。角化重層扁平上皮細胞と共存培養を行った線維芽細胞は、RANKL発現の増強を認めた。さらには、角化重層扁平上皮細胞と共存培養した線維芽細胞と、マウス骨髄由来単球マクロファージ前駆細胞を共存培養し、成熟破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）陽性細胞の誘導能を確認した。角化重層扁平上皮細胞と共存培養した線維芽細胞は、高いTRAP陽性細胞誘導能を有した。一方で、RANKLノックアウトマウス由来の線維芽細胞との共存培養では、角化重層扁平上皮との共存培養の如何に関わらず、破骨細胞の誘導は見られなかった。サイトカインアレイにて、角化重層扁平上皮細胞から分泌されるサイトカインを調べたところ、18種のサイトカインの上昇を認めた。そのうち線維芽細胞に比べmRNA発現の高かったgalectin-3, Cxcl-1, Cxcl-16, VEGF について、recombinantタンパクによる線維芽細胞への影響を調べたが、RANKL発現の変化は認めなかった。一方で、角化重層扁平上皮より分泌されることが知られているprostaglandin E2の投与では、RANKL発現の増強を認めた。

〔総　括(Conclusion)〕

角化重層扁平上皮から分泌される液性因子が、線維芽細胞に対してRANKL発現促進作用を持ち、局所における破骨細胞分化を誘導しうることが分かった。このことから、真珠腫上皮細胞から分泌される液性因子が、線維芽細胞を介し破骨細胞を誘導することが、真珠腫による骨破壊の一因となっていることが示唆される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　　岩本　依子

論文審査担当者		（職）	氏　　名
	主　査	大阪大学教授	猪原秀典
	副　査	大阪大学教授	大薗恵一
	副　査	大阪大学教授	板見智

論文審査の結果の要旨

真珠腫は中耳に生じる非腫瘍性の疾患である。その最大の特徴は骨破壊をもたらすことである。しかし、現段階では真珠腫による骨破壊のメカニズムは未解明な点が多い。適切な動物モデルがないことが、メカニズム解明が遅れる一因となっている。そこで、マウスの耳介より真珠腫構成細胞であるケラチノサイトとファイブロブラストを単離し、マウス骨膜下に注射することで、マウス生体内で真珠腫様の組織を再現した。この腫瘤は接する骨表面上に破骨細胞を誘導した。更に、*in vitro*におけるケラチノサイトとファイブロブラストの共役系を樹立することで、この破骨細胞誘導メカニズムについて検証を行い、ケラチノサイトから分泌される液性因子が、ファイブロブラストのRANKL発現を上昇させることを示した。このファイブロブラスト由来のRANKLは、in vitroにおいて、単球マクロファージ前駆細胞より破骨細胞を誘導しうる事を示した。このケラチノサイトとファイブロブラストの細胞間コミュニケーションによる破骨細胞誘導が、真珠腫における骨破壊の一要因となっていることが示唆された。この研究成果は、Molecular and Cellular Biology誌に投稿され2016年3月21日に受理され、同年掲載予定である。以上の研究業績は学位に能うものと判断する。