

Title	Osteoclasts Modulate Bone Erosion in Cholesteatoma via RANKL Signaling
Author(s)	今井, 隆介
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/73530">https://hdl.handle.net/11094/73530</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		今井 隆介	
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	猪俣 昌典
	副 査	大阪大学教授	古村 真一
	副 査	大阪大学寄附講座教授	玉井 克人
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究で真珠腫に接する骨表面において破骨細胞が増加していることを示した。これまで真珠腫と骨を接着したまま破骨細胞の存在を検証した検討はなく、真珠腫における数的検証は初の報告となった。さらに、真珠腫の線維芽細胞にRANKLの発現し、RNA-sequenceでも真珠腫が破骨細胞分化を進める遺伝子発現環境であることを示した。RANKL発現の上流因子の候補検索を行い、そのうち実際に真珠腫組織中でいくつかのサイトカインの濃度が上昇していることを確かめた。真珠腫における骨破壊はこれらの炎症性サイトカインによって刺激された真珠腫線維芽細胞がRANKLを発現し、破骨細胞が分化・増殖するという機序が考えられた。さらにこの研究は骨破壊抑制を焦点にした分子標的剤、特に現在他疾患で使われている分子標的薬の点耳薬を中耳真珠腫の骨破壊阻止に対して開発する足がかりになり、この研究成果は学位に値するものと認める。</p>			

論 文 内 容 の 要 旨  
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	今井隆介
論文題名 Title	Osteoclasts Modulate Bone Erosion in Cholesteatoma via RANKL Signaling (中耳真珠腫では破骨細胞がRANKLシグナルを介して骨破壊を引き起こす)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>中耳真珠腫は鼓膜より発生し、中耳に囊状の構造物を形成する疾患である。真珠腫は線維芽細胞や炎症性細胞で形成されるperimatrixと呼ばれる層と、角化扁平上皮で形成されるmatrixと呼ばれる層で構成され上皮落屑物が内部に貯留される。耳小骨、頭蓋底、骨迷路などの骨組織と直接接する。中耳内への進展とともに周囲の骨を破壊することが特徴で、それにより様々な合併症を引き起こす。すなわち耳小骨の破壊により伝音難聴をきたし、内耳への進展によって感音難聴やめまい、顔面神経麻痺を引き起こす。さらには頭蓋底破壊で髄膜炎、脳嚢瘍に至ることがあり、中耳真珠腫は致命的な疾患である。現在その治療法は外科的治療しかない。骨破壊機序を阻害する治療が、合併症の発症を阻害する保存的治療となり得るがその機序は解明されていない。仮説として破骨細胞が活性化される説、感染によってpHが低下し周囲の骨を腐食するという説、落屑の貯留で圧迫壊死を引き起こすという説などが挙げられている。本研究の目的はリウマチ性関節炎や歯周病と同様に破骨細胞が活性化しているという仮説に注目し、中耳真珠腫の骨破壊機序を解明し、保存的治療の開発を目指す。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>破骨細胞の存在を検証するため、中耳真珠腫を骨と接着したまま固定・脱灰し、永久標本をTRAP染色した。破骨細胞はTRAP染色では赤色で多核の大型の細胞として観察されるが、真珠腫に接した骨表面には真珠腫から離れた側頭骨の骨表面と比較して有意に増加していた。次に破骨細胞の分化・活性化因子であるreceptor activator of NF-<math>\kappa</math>B ligand (RANKL)の発現を検証した。真珠腫より抽出したmRNAを、対照を皮膚としdroplet digital PCRで定量したところ、有意に真珠腫でRANKLが高発現していることがわかった。さらにRANKLの発現局在を免疫染色で検証したところ、perimatrix領域のvimentin陽性で紡錘形の線維芽細胞で発現していることがわかった。</p> <p>次にperimatrixの遺伝子発現環境を調べ、RANKLが高発現する機序を検討した。具体的には肉眼的にperimatrix領域を切り出すことは困難であるので、Laser microdissection法で顕微鏡下でperimatrixを切り出しRNA-sequenceを行なった。対照として皮膚のdermisを用いた。perimatrix領域で絶対値が2倍以上の発現がある遺伝子は1423遺伝子あった。環境解析をgene ontology enrichment解析(GO解析)で行なったところGO(0045780): positive regulation of bone resorptionというデータセットが有意に上昇していた。次にIngenuity Pathway AnalysisでRANKLの上流因子候補を検索したところ62因子が候補としてあげられた。これまでの報告と組み合わせて候補を選出し、ELISAで真珠腫の発現をELISA法で確認すると、皮膚に比べてIL-1<math>\beta</math>、IL-6、TNF-<math>\alpha</math>、PGE2の濃度が上昇しており、<i>in situ</i> hybridizationでIL-1<math>\beta</math>が真珠腫のperimatrixに浸潤するリンパ球などの炎症性細胞に発現を認めていた。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>真珠腫に接する骨表面において破骨細胞が増加していることを示した。これまで真珠腫と骨を接着したまま破骨細胞の存在を検証した検討はなく、真珠腫における数的検証は初の報告となった。さらに、真珠腫perimatrixの線維芽細胞にRANKLの発現し、RNA-sequenceでも真珠腫が破骨細胞分化を進める遺伝子発現環境であることを示した。RANKL発現の上流因子の候補検索を行い、そのうち実際に真珠腫組織中でTNF-<math>\alpha</math>、IL-1<math>\beta</math>、IL-6、PGE2の濃度が上昇していることを確かめた。さらにIL1<math>\beta</math>が真珠腫に浸潤する炎症性細胞に発現していることを検証した。真珠腫における骨破壊はこれらの炎症性サイトカインによって刺激された真珠腫線維芽細胞がRANKLを発現し、破骨細胞が分化・増殖するという機序が考えられた。さらにこの研究は骨破壊抑制を焦点にした分子標的剤、特に現在他疾患で臨床で使われている抗RANKL抗体、抗IL-1<math>\beta</math>抗体、抗IL-6R抗体、抗TNF<math>\alpha</math>抗体の点耳薬を中耳真珠腫の骨破壊阻止に対して開発する足がかりになると考えられる。</p>	