



Title	Single-cell transcriptomics of human cholesteatoma identifies an activin A-producing osteoclastogenic fibroblast subset inducing bone destruction
Author(s)	清水, 康太郎
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95974
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	清水 康太郎
論文題名 Title	Single-cell transcriptomics of human cholesteatoma identifies an activin A-producing osteoclastogenic fibroblast subset inducing bone destruction (ヒト真珠腫の一細胞トランスクリプトミクスによる骨破壊を誘導するアクチビンA産生性破骨細胞形成線維芽細胞のサブセットの同定)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕 中耳真珠腫は骨破壊により重篤な合併症を引き起こすが、その骨破壊の機序は未だ解明されていない。我々は先行研究で、真珠腫に接する骨表面上に破骨細胞が多数存在し、真珠腫内の線維芽細胞が骨破壊誘導因子を発現していることを確認した。(Imai, R et al., <i>J Assoc Res Otolaryngol</i>, 20:449-459, 2019) 近年遺伝子解析は一細胞単位で行われており、炎症性骨破壊疾患の関節リウマチにおいてもsingle cell RNA-seq (scRNA-seq) によって線維芽細胞にsubsetがあることが確認されている。(Croft, A. P et al., <i>Nature</i> 570:246-251, 2019) そのため中耳真珠腫を構成する細胞群にもsubpopulationがあることが予想される。ヒト真珠腫検体に対してscRNA-seqを行い明らかになったsubsetを基に、<i>in vivo</i>系(真珠腫モデルマウス)、<i>in vitro</i>系、臨床検体を用いて機能的評価を行い、真珠腫の治療ターゲットを同定する事を目的とする。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 (1) ヒト真珠腫検体のscRNA-seq 三人の患者から採取した真珠腫検体と皮膚検体を用いて、ヒト真珠腫検体のscRNA-seqを行った。真珠腫、皮膚検体ともに角化重曹扁平上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞で主に構成されていた。真珠腫に特異的な細胞種を特定するために、それぞれのクラスターに対して疾患特異性と患者毎の検体バイアスを、カイ2乗値を用いて解析した。その結果、最も病原特異的で検体バイアスが小さい線維芽細胞に着目した。真珠腫線維芽細胞はinhibin β A (INHBA) をコントロールの皮膚線維芽細胞と比較して豊富に発現しており、また線維芽細胞に対してsubclustering解析を行ったところ、INHBAを特に高発現する病源性線維芽細胞のsubsetを同定した。線維芽細胞に対して疑似時系列解析を行ったところ、INHBAを高発現するsubsetは最も分化した細胞群だった。 (2) 線維芽細胞におけるINHBA発現解析 真珠腫と健常皮膚から、線維芽細胞を回収し、droplet digital PCRでINHBAの発現を定量したところ、真珠腫線維芽細胞でINHBAが有意に高発現していた。また真珠腫の蛍光免疫染色で真珠腫線維芽細胞がINHBAを発現していることを確認した。次にヒト皮膚線維芽細胞に炎症性サイトカインと添加したところ、IL1-β、TNF-α、PGE2によってINHBAの発現が誘導された。 (3) 骨髓マクロファージを用いた<i>in vitro</i>機能解析 次にINHBAの二量体であるactivin Aをreceptor activator of NF-κB ligand (RANKL)存在下で骨髓マクロファージに添加し、activin AがRANKLと協調して破骨細胞分化を促進することを<i>in vitro</i>で確認した。 (4) 真珠腫モデルマウスを用いた<i>in vivo</i>機能解析 <i>in vivo</i>解析に使用した真珠腫モデルマウスでは、マウス耳介から採取した角化重曹扁平上皮細胞と線維芽細胞を頭頂骨骨膜下に注入することで腫瘍を形成し、腫瘍直下に破骨細胞を誘導する。(Iwamoto, Y et al., <i>Mol Cell Biol</i> 36:1610-20, 2019) INHBA^{fl/fl}Rosa26^{creERT2}マウス(Ryanto, G.R.T., et al. <i>Nat Commun</i> 12, 1720, 2021)の耳介から線維芽細胞を採取し4-hydroxy Tamoxifenを添加して培養することで、線維芽細胞からINHBA/activin Aの発現を欠損させたconditional knock out マウスを作成した。成熟破骨細胞を特異的に蛍光標識したTRAP-tdTomatoマウスに細胞を注入し、腫瘍直下に誘導されたTRAP陽性破骨細胞の面積を定量したところ、INHBA / activin A欠損真珠腫モデルマウスで破骨細胞分化が減少することを確認した。さらに、activin Aのantagonistであるfollistatinによっても真珠腫モデルマウスで破骨細胞分化が減少することを確認した。 〔総 括(Conclusion)〕 ヒトの真珠腫組織に特異的なactivin A産生線維芽細胞は炎症性サイトカインによって誘導され、局所的な破骨細胞分化を促すことにより骨破壊を引き起こすことが示唆された。当研究により、INHBA / activin Aが真珠腫の治療ターゲットとなる可能性が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 清水康太郎		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	猪 原 孝 典
	副 査 大阪大学教授	日 比 野 浩
	副 査 大阪大学教授	末 乾 行

論文審査の結果の要旨

本研究にて、ヒト真珠腫検体に対してsingle cell RNA-sequence(scRNA-seq)を行い、INHBAを高発現する真珠腫特異的な線維芽細胞が存在する事を発見した。この研究は、真珠腫に対してscRNA-seqを行った世界初の報告である。さらにscRNA-seqをより深く解析すると、真珠腫組織では線維芽細胞がINHBAを特に高発現するサブ集団へ分化していると判明した。また炎症性サイトカインによって線維芽細胞がINHBAを高発現することを、線維芽細胞培養系を用いて証明した。更に、骨髄マクロファージの培養系ではINHBAの二量体であるactvin AがRANKLと協調して破骨細胞分化を促進することを示した。また、真珠腫モデルマウスにおいても線維芽細胞のINHBA発現を低下させることで、骨表面に誘導される破骨細胞の面積が減少することを確認した。この研究で真珠腫の骨破壊機序が解明され、保存的治療を開発する足がかりとなり、学位に値するものと認める。