



Title	チミジンホスホリラーゼが人工関節術後無菌性緩みの局所骨溶解に及ぼす影響に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	松前, 元
Description	配架番号 : 2717
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14982号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85860
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MATSUMAE_Gen_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 松前 元

主査 准教授 外丸 詩野
審査担当者 副査 教授 清野 研一郎
副査 准教授 山田 雅文

学 位 論 文 題 名

チミジンホスホリラーゼが人工関節術後無菌性緩みの局所骨溶解に及ぼす
影響に関する研究

(Study on thymidine phosphorylase as a potential therapy for bone loss
associated with periprosthetic osteolysis)

人工関節置換術後の無菌性緩みは人工関節置換術における代表的な合併症であるが、未だに薬物治療は開発されていない。本研究では、まず RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析と *in vitro* での破骨細胞分化スクリーニングを行うことで、破骨細胞を最も誘導したチミジンホスホリラーゼ (TYMP) を同定した。TYMP は *in vitro* のみならず、*in vivo* モデルにおいても骨吸収の惹起や炎症反応の促進作用を示した。さらに TYMP の破骨細胞分化メカニズムを検証することで、FYN が破骨細胞分化に関与することが判明した。実際、モデル動物において FYN の抑制剤である Saracatinib を投与することにより骨吸収や炎症反応が抑制される結果となり、無菌性緩みに対する治療可能性が示唆された。

審査にあたり、まず副査の山田雅文准教授から RNA シークエンスにおける RANKL の上昇についての質問があった。申請者は、RANKL についての上昇はなく、本研究で RANKL 非依存性の破骨細胞分化を検討する根拠になったと回答した。次に、siRNA 実験について、TYMP のノックダウンを確認したかどうか質問があった。申請者は、ウェスタンブロッティング法で確認したと回答した。また、TYMP 発現を検討した患者関節液について、関節液の採取時の状況についての質問があった。次に、ヒトマクロファージと TYMP を 3 時間共培養し FYN のタンパク発現を確認したウェスタンブロッティング法の結果において、総タンパク質の検出バンドとその intensity の定量評価が一致していないことを指摘された。申請者は、バンド検出ソフトを用いて行った結果であり、誤りではないと回答した。最後に、リン酸化 FYN を検出する際の刺激時間に関して 3 時間という刺激時間の適切性についての質問があった。元々 RNA シークエンスのための共培養の刺激時間が 8 日間であり、それと

比較すると3時間が破骨細胞分化におけるリン酸化を含む初期の反応として適切であると判断したと回答した。

副査の清野教授からは、TYMPの新規性について質問があり、TYMPは悪性腫瘍や関節リウマチですでに報告されているが、無菌性緩みに対しては世界ではじめての報告という認識で良いかとの確認があり、申請者はその通りであると回答した。次に、TYMPがRANKL非依存的に破骨細胞を誘導すると結論してよいかという質問があった。申請者は、*in vitro*ではその効果が示唆されるものの、最終的な確証はRANKLまたはRANKノックアウトマウスにおけるマクロファージを用いた破骨細胞誘導実験をしないと得られないと回答した上で、本研究ではノックアウトマウスの解析は行っておらず、TYMPのRANKL非依存的な破骨細胞誘導に関しては結論できないと回答した。また、FYNの破骨細胞分化メカニズムの検証について質問があり、本研究ではFYNの抑制剤であるSaracatinibを用いた*in vivo*検証のみ行ったと回答した。

主査の外丸准教授からは、マクロファージ以外の細胞によるTYMPの放出についての質問があった。申請者は、他施設の検討では、線維芽細胞のTYMP産生が報告されており、無菌性緩みにおいてもマクロファージ以外の細胞からTYMPが放出されている可能性はありと回答した。TYMP発現細胞を詳細に検討できてはいないが、無菌性緩みの初期段階ではマクロファージの役割が大きいことから、本研究ではマクロファージに焦点を当てた検討を行ったことを補足説明した。次に、無菌性緩み症例の滑膜に対する免疫組織化学染色は二重染色を行ったかという質問があった。申請者は連続切片でCD68とTYMPを染色しており、二重染色はしていないと回答した。これに対し、TYMP産生細胞がマクロファージと主張する場合、二重染色が適切との指摘を受けた。また、ELISA法における健常コントロールの年齢幅が30～40歳代となっているが、無菌性緩みが増齢による影響も反映されているので、コントロールとして適性であるかとの質問があった。申請者は増齢の影響も無菌性緩みに関連し得るが、本研究では適切な対象として健常者からの血液しか利用できなかったため、これを使用したと回答した。最後に、病理検体として提出される無菌性緩み症例の滑膜に対するコメントで整形外科医が期待するものについての質問があった。申請者は、摩耗粉を食食した多量のマクロファージと炎症細胞の浸潤が確認できれば、手術時点における活動的な骨吸収や炎症反応を示唆しており、手術適応について妥当な判断であったと整形外科医が確認できるのではないかと回答した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。