

審査の結果の要旨

氏名 占部 秀典

本研究は、血友病性関節症における骨破壊のメカニズムを明らかにするために、*F8* ノックアウトマウスの右膝関節を穿刺することで出血を誘導した血友病性関節症モデルマウスを用いて、出血に伴う免疫反応や、破骨細胞形成の有無を解析し、以下の結果を得た。

1. 出血を誘導したマウスでは、膝穿刺 1 週後に大腿骨前方に血腫が形成され、血腫の周囲に破骨細胞が形成されることが明らかとなった。血腫周囲組織における網羅的遺伝子発現解析により *Tnfsf11* (RANKL) および破骨細胞の分化に関する遺伝子群の発現上昇が認められた。膝穿刺 3 週間後には血腫は吸収され、血腫周囲に存在していた破骨細胞も消失した。
2. 血腫周囲組織におけるサイトカインおよびケモカインの発現を調査するために、q-PCR および RNA-seq を実施した。その結果、*Il1β* や *Il6*、好中球や単球/マクロファージの遊走に関与するケモカインの発現上昇が認められた。各種炎症性サイトカインおよび *Tnfsf11* (RANKL) の発現細胞を探索した結果、IL-1β は好中球、IL-6 は線維芽細胞と単球/マクロファージ、RANKL は線維芽細胞が主に産生していることが明らかとなった。
3. HA における骨破壊に IL-1β が関与しているか生体レベルで検討した報告はこれまでなかった。そこで、抗 IL-1β 抗体による IL-1β 阻害実験を行い、μCT で骨形態を確認したところ、IL-1β 阻害は骨破壊の軽減しないことが明らかとなった。
4. 出血誘導後、血腫周囲組織には好中球や単球/マクロファージが浸潤した。好中球の浸潤は一過性だったが、単球/マクロファージは血腫が消失した後も長期間残存した。組織学的に穿刺後後期には鉄貪食マクロファージ（ヘモジデリン貪食マクロファージ）が観察されたことから、これらが長期間残存したマクロファージの正体であると考えられた。血腫に近接していた領域の大腿骨皮質骨を裏装する破骨細胞は穿刺後時間が経過するにつれて増加していたことから、詳細なメカニズムは不明だが、ヘモジデリン貪食マクロファージが破骨細

胞を継続的に作り出す環境を作り出している可能性が考えられた。

5. クロドロン酸による単球/マクロファージの除去を実施したところ、*Il1b*、*Il6*、*Tnfsf11* (RANKL) の発現が減少し、破骨細胞形成が抑制された。この結果から、単球/マクロファージが好中球や線維芽細胞に作用することで、炎症性サイトカインや RANKL の分泌を誘導し、HA における炎症および破骨細胞形成に関与していることが示唆された。

6. シングルセル RNA-seq 解析によって血腫周囲に浸潤している単球/マクロファージ系の細胞には、破骨細胞と、炎症を促進する単球/マクロファージの他、赤血球の貪食に関与すると考えられるマクロファージが存在することが明らかとなった。以上から、急性期における単球/マクロファージの集団には炎症および骨破壊を増悪させる悪玉細胞だけでなく、赤血球を除去する善玉細胞も存在することが明らかとなった。

以上、本論文は、血友病性関節症の病態において単球/マクロファージ系の免疫細胞が、炎症惹起と破骨細胞形成による骨破壊の中心的な機能を担うことを明らかにした。血友病性関節症における単球/マクロファージ役割や破骨細胞の誘導メカニズムとその役割の解明は、新たな治療法の確立や、他の出血性関節疾患の病態理解に繋がる可能性があり、学位の授与に値するものと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。