

博士論文

論文題目 免疫系による骨形成機構の解析

氏 名 小野 岳人

要旨

免疫系は感染防御に必須だけでなく、組織破壊や修復にも関与する。関節リウマチにおいて、免疫系は炎症性の組織破壊を誘導する。一方、リンパ球による骨折治癒促進やサイトカインによる骨形成促進が報告されているが、骨形成を促進する免疫細胞サブセットや骨形成促進機序は不明である。私は、マウス大腿骨損傷モデルにおいて、損傷後の急性炎症期に骨周囲組織で $V\gamma 6^+$ $\gamma\delta$ T 細胞が IL-17A を発現すること、および IL-17A が損傷組織中の骨芽細胞前駆細胞の増殖と骨形成を促進し、骨再生を誘導することを発見した。本研究により、IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞が免疫系と骨形成とを結びつける新たな役割を有することが明らかになった。

目次

第一章 序文	・・・7
1-1. 免疫系による骨代謝制御	・・・7
1-1-1. 骨の形成と吸収のバランス	・・・7
1-1-2. 免疫系による組織の破壊と再生の制御	・・・7
1-1-3. 免疫系による骨吸収制御	・・・9
1-1-4. 免疫系による骨形成制御	・・・10
1-2. 骨折治癒のメカニズムと免疫系	・・・13
1-2-1. 骨折治癒のプロセス	・・・13
1-2-2. モデルを用いた骨折治癒／骨再生の検討	・・・13
1-2-3. 骨折治癒への免疫系の関与	・・・17
1-3. IL-17A による骨代謝制御	・・・19
1-3-1. IL-17A の受容体とシグナル伝達機構	・・・19
1-3-2. IL-17A の機能	・・・22
1-3-3. IL-17A の骨折治癒への関与	・・・24
1-4. 組織損傷／再生と $\gamma\delta$ T 細胞	・・・25
1-4-1. $\gamma\delta$ T 細胞の発生	・・・25
1-4-2. $\gamma\delta$ T 細胞の活性化	・・・26
1-4-3. $\gamma\delta$ T 細胞によるサイトカイン産生と生体における機能	・・・27
1-5. 研究目的	・・・29

第二章 方法	・・・30
2-1. 実験試薬／器具	・・・30
2-2. マウス	・・・30
2-3 大腿骨損傷モデル	・・・30
2-4. 組織固定法	・・・32
2-4-1. マイクロ CT 解析用検体	・・・32
2-4-2. パラフィン切片作製用検体	・・・32
2-4-3. 凍結切片作製用検体	・・・32
2-5. <i>In vivo</i> 細胞増殖アッセイ	・・・32
2-6. マイクロ CT 解析法	・・・33
2-7. 組織学的解析法	・・・33
2-7-1. パラフィン切片作製法	・・・33
2-7-2. パラフィン切片染色法	・・・33
2-7-3. 非脱灰凍結切片作製法 (川本法)	・・・36
2-7-4. GFP に対する免疫組織化学染色法	・・・37
2-8. 細胞調製法	・・・37
2-8-1. 骨髄細胞の調製	・・・37
2-8-2. 骨周囲組織の細胞の調製	・・・38
2-8-3. 頭蓋冠細胞の調製	・・・38
2-9. 遺伝子発現解析法	・・・38
2-10. <i>In vitro</i> における骨芽細胞分化誘導法	・・・41

2-10-1. 頭蓋冠細胞の骨芽細胞分化誘導	・・・41
2-10-2. 損傷組織間葉系細胞の骨芽細胞分化誘導	・・・42
2-11. アルカリホスファターゼ (ALP) 活性の評価	・・・42
2-11-1. ALP 染色法	・・・43
2-11-2. ALP 活性定量法	・・・43
2-12. 石灰化の評価	・・・44
2-13. 細胞増殖の評価	・・・45
2-14. フローサイトメトリー法	・・・45
2-15. 図中の画像データの表示	・・・46
2-16. 統計解析法	・・・46
第三章 結果	・・・47
3-1. 損傷後骨周囲組織で IL-17A の発現が上昇する	・・・47
3-2. IL-17A は骨再生を促進する	・・・47
3-3. PDGFR α ⁺ Sca-1 ⁺ CD45 ⁻ Ter119 ⁻ (P α S) 細胞を含む間葉系細胞集団が骨再生部位に 集積する	・・・51
3-4. IL-17A は損傷組織の間葉系細胞に直接作用し、細胞増殖と骨形成を促進する	・・・57
3-5. 損傷部周囲の V γ 6 ⁺ γ δ T 細胞が骨再生における IL-17A の産生源である	・・・61

第四章 考察	・・・67
4-1. IL-17A による骨代謝制御について	・・・67
4-1-1. IL-17 ファミリーによる骨代謝制御	・・・67
4-1-2. IL-17A の骨折治癒における直接作用／間接作用	・・・67
4-1-3. IL-17A による骨形成の制御	・・・68
4-1-4. IL-17A による骨吸収の制御	・・・69
4-1-5. IL-17A による骨代謝制御に対する細菌や人工材料の影響	・・・70
4-1-6. IL-17A による細胞増殖の制御	・・・71
4-2. $\gamma\delta$ T 細胞の機能について	・・・71
4-2-1. $\gamma\delta$ T 細胞による組織再生	・・・71
4-2-2. $\gamma\delta$ T 細胞と他の免疫細胞との相互作用	・・・72
4-2-3. $\gamma\delta$ T 細胞活性化のメカニズム	・・・73
4-3. 今後の展望	・・・74
4-3-1. IL-17A を標的とした新規骨折治療法の創出	・・・74
4-3-2. $\gamma\delta$ T 細胞を標的とした新規骨折治療法の創出	・・・75
4-3-3. 異常な骨形成を引き起こす疾患の病態解明・治療法の創出	・・・75
第五章 結論	・・・76
引用文献	・・・78
謝辞	・・・91

第一章 序文

1-1. 免疫系による骨代謝制御

1-1-1. 骨の形成と吸収のバランス

骨は、生体の支持、運動機能、臓器の保護の他に、体液の恒常性維持、造血などの多様な機能を有する。成長発育の停止後、骨は巨視的に見ると形態上の変化が少ないため静的な組織のように思われる。しかし、微視的には、骨では古くなった組織や損傷を受けた組織の除去とそれに代わる新しい骨組織の添加（リモデリング）が常に行われており、実際は動的な組織であることが分かる。リモデリングは骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスにより厳密に制御されている。この形成と吸収のバランスは、筋骨格系だけでなく、内分泌系、神経系、免疫系などの他の組織からの調節を受けることにより複雑に制御される（図 1）。これらの調節因子の中で、免疫系は細胞の起源、サイトカイン、シグナル伝達分子、骨髄環境を共有する点で他の調節因子と一線を画している¹。骨形成と骨吸収のバランスが適正に保たれば骨は正常機能を発揮することができるが、このバランスが攪乱されると異常な骨形成や骨吸収が起こり、各種骨代謝疾患の発症に繋がる²。

1-1-2. 免疫系による組織の破壊と再生の制御

免疫細胞は、病原体や自己抗原による刺激に反応し、サイトカインやケモカイン、ケミカルメディエーターを産生し、組織に炎症を引き起こす。病原体の侵入に際して適正に活性化され、その病原体を排除することが免疫系の主たる役目であるが、自己抗原に対して免疫系が活性化されてしまうと自己免疫疾患を発症し、組織破壊が起こる。

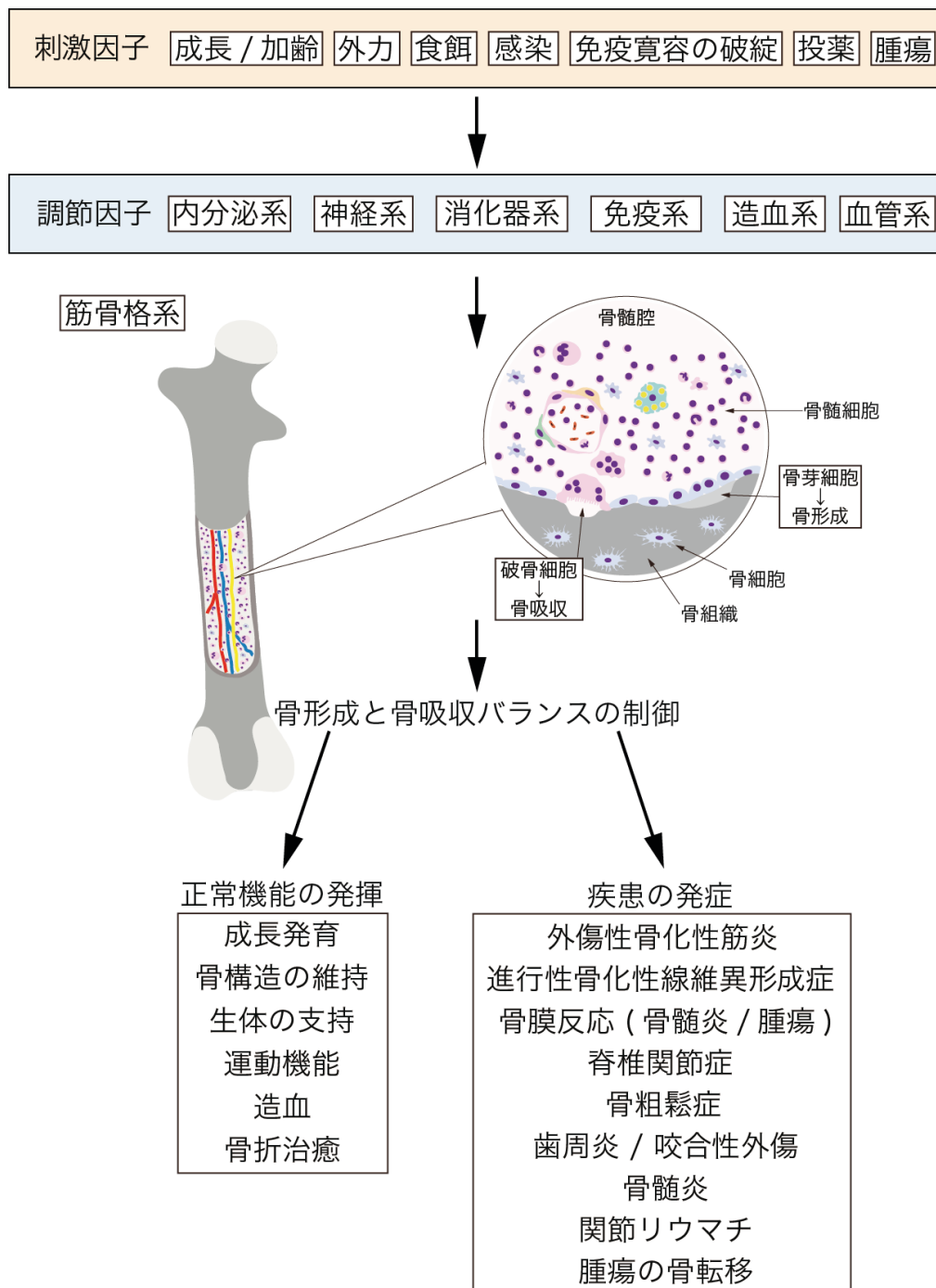


図1 様々な調節因子により制御される骨代謝機構

骨では、古くなった組織や損傷を受けた組織は吸収され、新たな骨組織が添加されている。この吸収と形成のバランスは、筋骨格系だけでなく他の多くの調節因子による影響を受けている。調節因子には、内分泌系、神経系、消化器系、免疫系、造血系、血管系などがある。これらに対して成長/加齢、外力、食餌、感染、免疫寛容の破綻、投薬、腫瘍などの刺激が加わると、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスが変化する。骨吸収と骨形成のバランスの制御が正しく行われることにより、骨はその機能を生涯にわたり発揮することができるが、制御が攪乱されると異常な骨形成や骨吸収が起こり、疾患の発症に繋がる。

また、免疫系は組織破壊だけでなく組織の再生を促進する機能も有しており、近年注目されている³⁴。骨組織において、免疫系は破骨細胞分化と骨芽細胞分化の両方を制御し⁵⁶、骨吸収と骨形成の両方を起こしうる。

1-1-3. 免疫系による骨吸収制御

骨を吸収する破骨細胞は、単球/マクロファージ系の前駆細胞に由来する。骨芽細胞などの破骨細胞分化を支持する細胞は、生存/増殖因子 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) および分化に必須のサイトカイン receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) を産生する。これらの作用により、破骨細胞分化が誘導される。RANKL は破骨細胞分化因子として発見される⁷⁸よりも先に、T 細胞上に発現する樹状細胞の制御因子として報告されており⁹、これらの一連の発見により骨と免疫系が分子レベルで結びつけられた。

関節リウマチは、免疫系と骨代謝制御の関連が見られる疾患の典型例であり、関節リウマチの疾患研究を通じて免疫系による破骨細胞分化の制御機構の解明が進められてきた。関節リウマチでは、炎症性サイトカインの IL-17A (後述) が重要な役割を果たす。IL-17A は、TNF、IL-1 β 、IL-6 といった炎症性サイトカインの産生を促進することが知られていたが^{10,11}、IL-17A がリウマチ患者の関節中から検出され、さらに、培養骨芽細胞による RANKL 発現を亢進し破骨細胞分化を促進したことから⁵、IL-17A の関節リウマチにおける骨破壊への関与が示唆された。そして、関節炎モデルマウスを用いた実験から、実際に IL-17A がマウスの関節炎発症を誘導することが示された¹²。IL-17A の産生細胞として、新規のヘルパーT 細胞サブセット Th17 細胞が

報告され（詳細は後述）、関節リウマチにおいてもこの細胞が IL-17A を介して破骨細胞分化支持細胞の RANKL の発現を亢進させ、破骨細胞を誘導することが明らかになった¹³。さらに、Th17 細胞自体も RANKL を発現し¹³、破骨細胞分化に寄与する可能性が考えられている。

関節リウマチだけでなく、他の疾患でも免疫系が破骨細胞分化を誘導し、骨吸収を起こしうる。歯周炎はその一つで、細菌感染により好中球、マクロファージ、リンパ球などの免疫細胞が歯周組織に浸潤する。これらの細胞が TNF、IL-1 β 、IL-17A といった炎症性サイトカインを産生し、炎症と破骨細胞分化を誘導し、歯周組織の破壊が起こる¹⁴。

1-1-4. 免疫系による骨形成制御

骨形成は間葉系幹細胞に由来する骨芽細胞により行われる。間葉系幹細胞で転写因子 Runx2 および Osterix が誘導されることにより骨芽細胞への分化が決定する¹⁵。分化が進行するに従い、骨芽細胞は骨基質分子であるオステオポンチン、I 型コラーゲン、オステオカルシンなどを産生する。また、アルカリホスファターゼ（ALP）の発現も分化に伴い上昇する。ALP は石灰化阻害物質のピロリン酸を分解する酵素で、石灰化を促進する。骨芽細胞は、分化段階や活性の高さに応じて組織学的に異なる形態を示し、形態を元に I~IV 型骨芽細胞に分類される¹⁶。前骨芽細胞は楕円形で細胞質に乏しく、I 型骨芽細胞と呼ばれる。II 型骨芽細胞は方形または洋梨状を呈し、核周明庭の認められうる基質合成能の高い細胞をさす。III 型骨芽細胞は II 型骨芽細胞よりも平坦で、核周明庭の認められない細胞である。IV 型骨芽細胞は扁平化した骨芽細胞である。

免疫系による骨形成促進現象そのものは古くから認知されてきた。骨折治癒の過程で炎症が起こることは臨床的に広く認められた現象である。また、抗炎症薬であるステロイドの投与は偽関節形成など、治癒不全の原因となる¹⁷。外傷による炎症に継発する骨化現象として他に、外傷性骨化性筋炎や進行性骨化性線維異形成症が知られている。後者に関しては、免疫抑制剤の投与により異所性骨化が長期間抑制されたという症例報告がある¹⁸。また、感染性骨髄炎に継発した骨膜反応、脊椎関節症で認められる靭帯骨化も免疫系による骨形成誘導の例である。近年、脊椎関節症のモデルマウスの腱附着部に、ROR- γ ^tCD3⁺CD4⁺CD8⁻T 細胞 (ROR- γ ^t : Th17 細胞分化のマスター転写因子であり IL-17A や IL-23 受容体などの発現を誘導する) が常在することが見出された。この T 細胞は IL-23 刺激を受け、IL-22 を産生し骨形成を促進することが明らかにされている¹⁹。

免疫系が骨形成に及ぼす影響は、*in vitro* においても検討されている。各種サイトカインを培養間葉系細胞に作用させ、骨芽細胞分化や石灰化などの機能への影響を評価した報告がこれまで多くなされてきた。興味深いことに、破骨細胞分化誘導能を有することから骨吸収性のサイトカインとして位置づけられる IL-1 β 、IL-6、IL-17A、TNF が骨形成を促進するという報告も多い (表 1)。

以上のように、免疫系による骨形成現象についてこれまで多くの報告がなされてきた。しかしながら、生体で実際に免疫系がどのような機序により骨形成を誘導し、骨折治癒や異常な骨形成を引き起こしているのかについては不明な点が多く残されている。

サイトカイン	標的細胞	作用	文献
IL-1 β	ヒト骨髄間葉系幹細胞	ALP 活性 \uparrow 石灰化 \uparrow Runx2 \downarrow	100
	ヒト骨髄間葉系幹細胞	増殖 \uparrow 石灰化 \uparrow	101
	ヒト間葉系幹細胞	Runx2 \uparrow 石灰化 \uparrow	102
	マウス骨髄間葉系幹細胞	増殖 \downarrow 石灰化 \downarrow	103
	MC3T3-E1 マウス骨芽細胞様細胞株	増殖 \uparrow 石灰化 \uparrow	103
	マウス骨組織由来細胞	増殖 \downarrow ALP 活性 \downarrow 石灰化 \downarrow Runx2 \downarrow Sp7 \downarrow Alpl \downarrow Colla1 \downarrow	104
	ヒト骨格筋間質細胞	ALP 活性 \uparrow	105
IL-4	マウス骨髄間葉系幹細胞	石灰化 \downarrow	32
IL-6	ヒト間葉系幹細胞	Runx2 \uparrow 石灰化 \uparrow	102
	マウス骨髄間葉系幹細胞	石灰化 \rightarrow	32
	MG-63 ヒト骨肉腫細胞株	増殖 \downarrow ALP 活性 \uparrow	106
	ヒト骨格筋間質細胞	ALP 活性 \uparrow 遊走 \uparrow	105
	マウス脂肪組織間質細胞	ALP 活性 \uparrow 石灰化 \uparrow	107
IL-17A	ヒト骨髄間葉系幹細胞	ALP 活性 \uparrow 石灰化 \uparrow	108
	ヒト間葉系幹細胞	石灰化 \uparrow Runx2 \uparrow	102
	ヒト間葉系幹細胞	ALP 活性 \uparrow 石灰化 \rightarrow	109
	ヒト間葉系幹細胞	増殖 \uparrow ALP 活性 \uparrow 石灰化 \uparrow	110
	マウス骨髄間葉系幹細胞	石灰化 \rightarrow	32
	ラット新生仔頭蓋冠細胞	ALP 活性 \downarrow 石灰化 \downarrow	26
	C2C12 マウス筋芽細胞株	ALP 活性 \uparrow COX-2 \uparrow 遊走 \downarrow 骨格筋分 \downarrow	6
	C2C12 マウス筋芽細胞株	増殖 \downarrow ALP 活性 \uparrow	111
IL-17F	MC3T3-E1 マウス骨芽細胞様細胞株	Runx2 \uparrow Sp7 \uparrow Coll \uparrow Col2 \uparrow Bsp \uparrow	35
IFN- γ	ヒト骨髄間葉系幹細胞	石灰化 \downarrow	28
	マウス骨髄間葉系幹細胞	石灰化 \downarrow	32
TNF	ヒト骨髄間葉系幹細胞	ALP 活性 \uparrow 石灰化 \uparrow Runx2 \downarrow	100
	ヒト骨髄間葉系幹細胞	石灰化 \uparrow	112
	ヒト骨格筋間質細胞	ALP 活性 \uparrow 遊走 \uparrow	105
	ヒト間葉系幹細胞	石灰化 \uparrow Runx2 \uparrow	102
	ヒト間葉系幹細胞	ALP 活性 \uparrow 石灰化 \uparrow	109
	ヒト骨髄間葉系幹細胞	石灰化 \downarrow アポトーシス \uparrow	28
	マウス骨組織由来細胞	増殖 \rightarrow ALP 活性 \downarrow 石灰化 \downarrow Runx2 \downarrow Sp7 \downarrow Alpl \downarrow Colla1 \downarrow Spp1 \downarrow Sparc \downarrow	104
	マウス骨髄間葉系幹細胞	石灰化 \downarrow アポトーシス \uparrow	32

表1 サイトカインによる骨芽細胞分化制御

各種間葉系細胞の *in vitro* における骨芽細胞分化/機能に対するサイトカインの作用。増殖、ALP 活性、石灰化、遊走、アポトーシス、遺伝子発現の変化を示す (\uparrow : 上昇、 \downarrow : 低下、 \rightarrow : 不変)。生物種、細胞の分化段階などの条件により、サイトカインの作用は必ずしも一致しない。

1-2. 骨折治癒のメカニズムと免疫系

1-2-1. 骨折治癒のプロセス

骨折治癒は、免疫系による骨形成制御現象の中で最も古くから研究されている。過剰な外力により連続性が絶たれた骨は、血腫形成、炎症、骨形成、骨リモデリングの段階を経て、癒痕を形成することなく本来の形態と機能を取り戻す²⁰。骨折直後、損傷組織の血管が断裂し血腫が形成される。血腫中には好中球、マクロファージ、リンパ球が浸潤し、損傷組織の細片や死細胞の貪食と、サイトカイン、ケモカイン、ケミカルメディエーターの産生が起こる。これらの作用により、損傷部位には炎症が起こる。損傷部位では、損傷の条件に応じて骨膜や骨格筋、骨髄などの周囲組織および末梢血中から間葉系細胞が動員される^{21,22}。間葉系細胞は骨欠損の大きさや骨折固定の安定性により、軟骨細胞または骨芽細胞に分化、軟骨基質と骨基質を産生し、仮骨を形成する。仮骨は、石灰化していない軟性仮骨と石灰化した硬性仮骨とに分けられる。仮骨が形成された段階では、骨は形態的にも組織学的にも骨折前とは異なる。すなわち、形態的には元の骨を仮骨が大きく被覆しており、組織学的には未熟な構造の線維骨である。仮骨はリモデリングを経て正常な形態と組織学的構造を有する骨組織に置換され、骨折治癒に至る (図 2)。

1-2-2. モデルを用いた骨折治癒／骨再生の検討

マウスやラットの骨に欠損を形成することで、骨折治癒や骨再生の過程を検討することが出来る。これまでに骨の欠損の作製法や固定法の異なるさまざまなモデルが作出されてきた。主なモデルとして、大腿骨や脛骨に三点曲げ法や骨切り術により横骨折

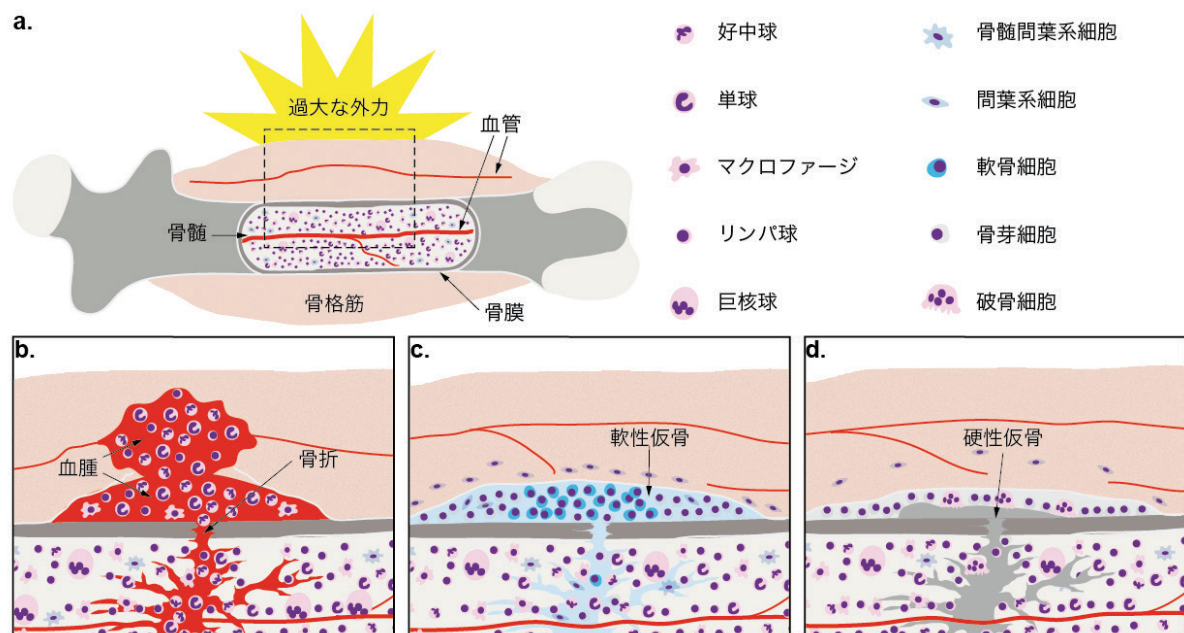


図2 マウス長管骨で見られる骨折治癒の経過

a. 過大な外力により、骨折と周囲組織の損傷が起こる。骨折治癒の経過を点線部を拡大し**b-d**に示す。**b.** 受傷後0～3日。骨折に伴い骨髄や骨周囲の組織で血管の断裂がおき、血腫が形成される。血腫中には好中球、単球、マクロファージ、そしてリンパ球が浸潤する。これらの細胞がサイトカインやケモカインを産生し、損傷組織に急性炎症が起こる。**c.** 受傷後3～10日。損傷部に間葉系細胞が凝集し始める。骨組織の再生に寄与する間葉系細胞は、骨膜、骨髄、骨格筋、末梢血に由来することが報告されている。間葉系細胞が軟骨細胞や骨芽細胞に分化し、それぞれ軟骨基質、骨基質を合成することにより、仮骨形成が始まる。石灰化する前の段階の仮骨は軟性仮骨と呼ばれる。なお、骨片間の距離が小さく、骨片の固定が良好であれば骨形成のみが起こる。**d.** 受傷後10日以降。軟性仮骨が石灰化し、硬性仮骨となる。硬性仮骨は組織学的には層板構造を有さない線維骨であるが、破骨細胞と骨芽細胞によるリモデリングを受け、元の骨構造と機能を回復する。

を引き起こす骨折モデル^{23,24}、大腿骨や脛骨に骨孔を形成する骨損傷モデル²⁵、および頭蓋冠に欠損を形成する頭蓋冠欠損モデルが用いられる²⁶。また、他のマウスより摘出した骨幹部を欠損部に移植する骨移植モデルも存在する²⁷。骨折モデルや骨移植モデルでは骨の連続性が完全に絶たれるため、髄内釘や創外固定装置、プレートによる固定が必要である^{23,28,29}。一方、骨損傷モデルと頭蓋冠欠損モデルでは骨の連続性は部分的に保たれているため固定は不要である。骨欠損の修復機序は、骨片間の距離と固定の安定性により異なることが知られている。骨片間の距離が大きい場合や固定が不安定である場合は軟骨内骨化優位の骨化が起き、逆に骨片間の距離が小さく固定が強固であれば主に膜内骨化による骨化が起き、仮骨が形成される（図 3）。

骨損傷モデルは、大腿骨や脛骨に手術により骨孔を形成し、骨および周囲組織に損傷を引き起こすモデルである（2-3 に術式を示す）²⁵。このモデルでは軟骨形成を伴わない膜内骨化により骨再生が起こるため、治癒機序は前述の一般的な骨折治癒過程（図 2）とは異なる。損傷に伴い血腫形成や炎症が起こることは骨折モデルと共通であるが、骨孔内に凝集する間葉系細胞は骨芽細胞に分化し線維骨が形成され、軟骨形成は認められない。そして、線維骨はリモデリングにより成熟した皮質骨となり治癒に至る（図 4）。骨損傷モデルは臨床的に見られる骨折とは異なるものの、目視下で欠損を形成でき、また、骨折モデルと異なり固定が不要であるため術式が簡便である。また、マイクロ CT を用いた骨再生の解析では、骨孔内の新生骨の体積を骨孔の体積で除することにより、個体間の欠損の大きさの差を排した骨形成の定量的評価が可能である。さらに、骨幹中央部だけでなく骨幹端部や関節にも欠損を形成でき、海綿骨や軟骨組織の再生の解析にも応用できる拡張性の高いモデルでもある³⁰。また、

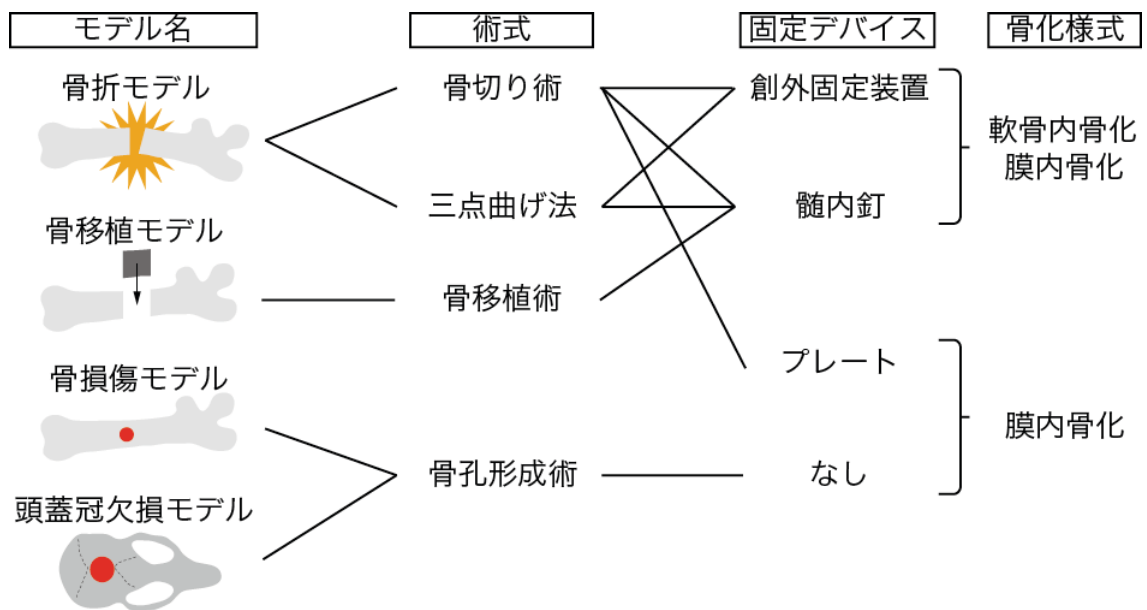


図3 骨折治癒／骨再生のモデル

骨折治癒／骨再生のモデルとして、欠損の形成法や固定法の異なるいくつかのモデルが存在する。骨折モデルは骨切り術や三点曲げ法により横骨折を引き起こすモデルで、固定には創外固定装置、髄内釘、プレートが用いられる。創外固定装置や髄内釘により固定する場合には骨片間の離解や骨片固定が不安定であることが原因で、軟骨内骨化優位の骨化が起こり治癒に至る。一方、プレートを用いた場合は、骨片同士が密着しており、固定も強固であるため膜内骨化により治癒が起こる。骨孔形成により欠損を形成する骨損傷モデルと頭蓋冠欠損モデルでは骨の連続性が保たれているため固定は不要である。これらのモデルでは欠損部は膜内骨化により再生する。

骨の連続性が保たれるため、術後の運動障害による治癒への影響も少ないと考えられている。骨欠損部は膜内骨化により再生するため^{25,30,31}、膜内骨化による骨形成の検討に適している。また、頭蓋冠欠損モデルでは、骨孔内に人工材料を充填し、治療効果の検討が行われているが^{26,32}、骨損傷モデルでも同様の実験が可能と考えられる。本研究では、免疫系の *in vivo* での骨形成に対する影響を解析するにあたり、術式の簡便性と骨形成の定量性という特長に着目し、大腿骨骨損傷モデルを用いた。

1-2-3. 骨折治癒への免疫系の関与

前述の通り、骨折治癒への免疫系の関与が指摘されている。遺伝子改変マウスを用いた研究から、炎症性サイトカインや免疫細胞の関与が検討されている。TNF 受容体を欠損する *Tnfrsf1a*⁺*Tnfrsf1b*⁺マウスや *Il6*⁺マウスの骨折モデルで骨折治癒が遅延することから、TNF や IL-6 が骨折治癒を促進することが示された^{24,33,34}。但し、これらのサイトカインの産生源は同定されていない。骨損傷モデルを用いた解析からは骨組織に常在するマクロファージが骨再生を促進することが示され³¹、免疫系が膜内骨化を促進することが示唆された。また、成熟リンパ球を欠く *Rag1*⁺マウス (*Rag1* : recombination activating gene 1、TCR および BCR を形成する際の VDJ 再編成に必須の酵素) の骨折モデルを用いてリンパ球の機能の解析が行われた。その結果、*Rag1*⁺マウスでは野生型マウスと比較して、治癒経過の骨の密度や強度が上昇し、治癒が促進されると報告された⁴³。しかしその後、別のグループにより *Rag1*⁺マウスの骨折モデルでは野生型マウスと比べ、骨折後、骨形成に関わる遺伝子の発現や骨形成速度が低下し、骨折治癒が遅延すると報告された^{35,36}。両者の違いの原因は不明であるが、近年

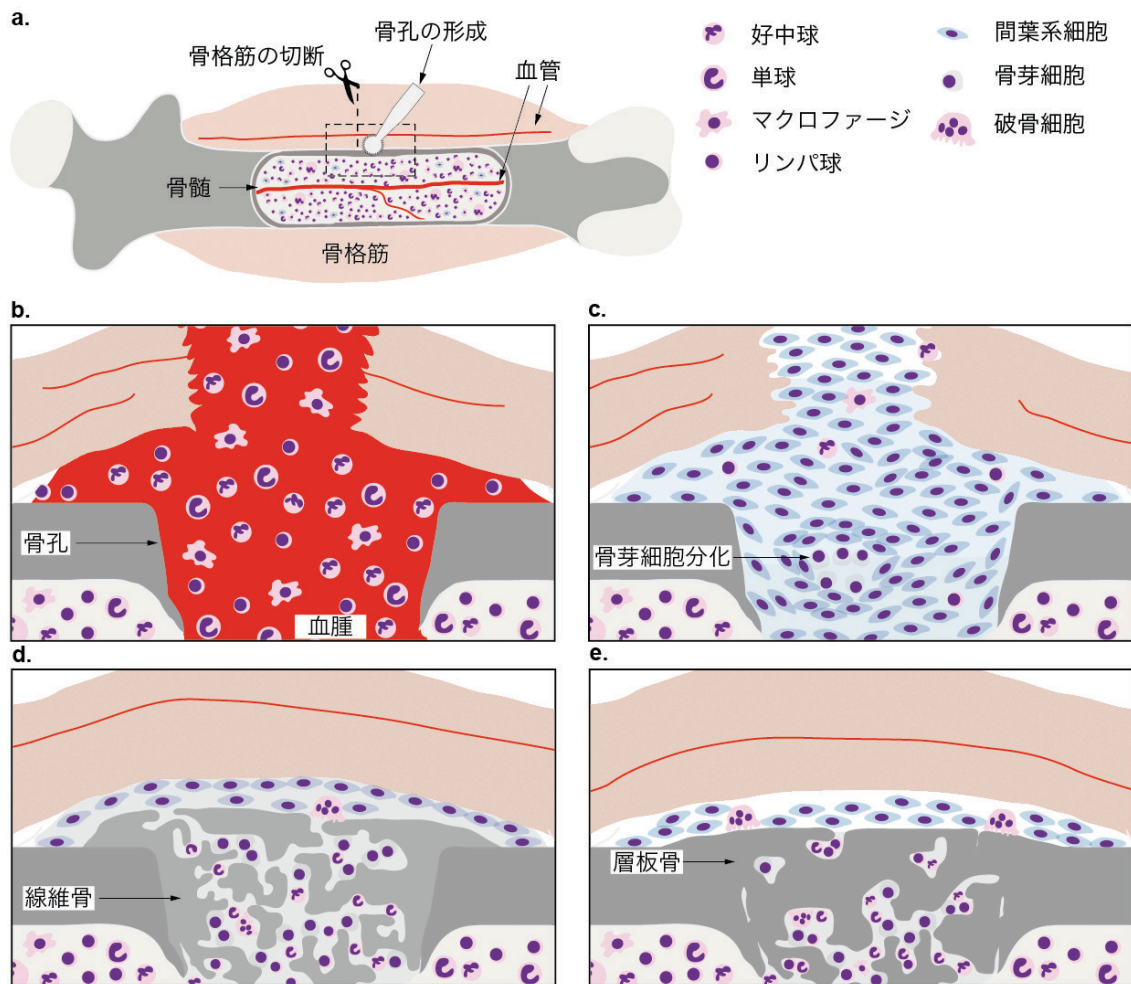


図4 マウス骨損傷モデルにおける骨再生のプロセス

a. 骨損傷モデルにおいては、回転切削器具により皮質骨に骨孔が形成される。また、その過程で骨格筋などの骨周囲組織にも損傷が起こる（術式は2-3 参照）。点線部を拡大し、骨再生の過程を **b-e** に示す。**b.** 損傷後0~5 日。損傷部に血腫が形成され、炎症性細胞が浸潤し炎症が惹起される。**c.** 損傷後約7 日。骨欠損部に間葉系細胞が凝集し、骨芽細胞に分化する。膜内骨化により線維骨が形成され始める。**d.** 損傷後10 日以降。骨欠損内部が線維骨により満たされる。骨組織には骨髓組織の侵入も認められる。破骨細胞も見られるようになり、リモデリングが開始される。**e.** 損傷後約20 日。骨欠損部に形成された線維骨はリモデリングにより成熟し、層板骨となる。

エフェクター記憶 CD8⁺T 細胞が骨折治癒を遅延させることが報告されたことから²⁸、リンパ球には骨形成を促進または抑制する複数のサブセットが存在することが想定される。しかし、骨折治癒を促進するサブセットや、治癒過程で免疫細胞が産生するエフェクター分子については十分解明されていない。

1-3. IL-17A による骨代謝制御

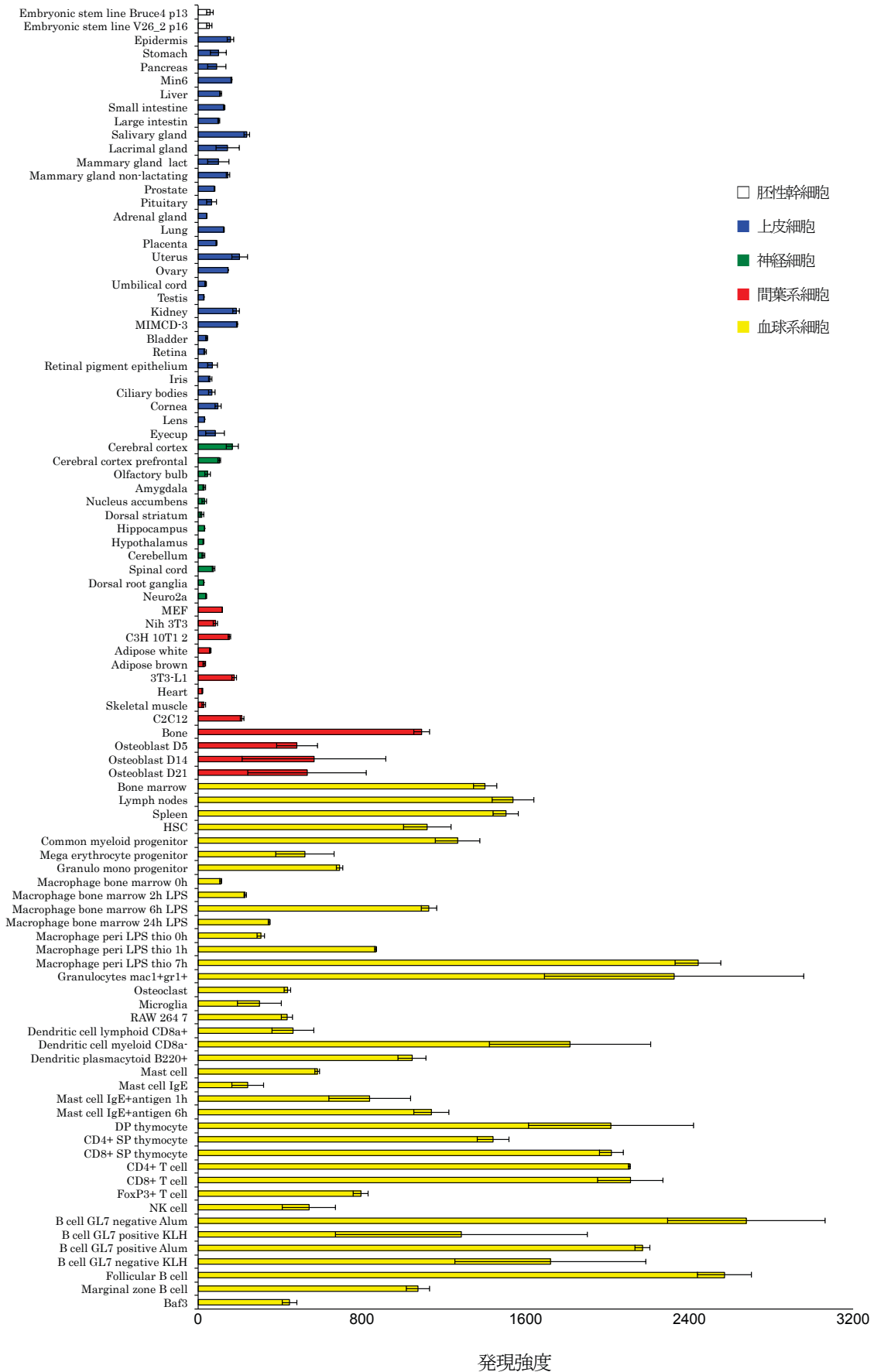
IL-17A は、元々マウス細胞傷害性 T 細胞ハイブリドーマから CTLA8 として単離された分子で¹⁰、その後新規のサイトカインとして IL-17 と命名された。相同性解析により、IL-17 と相同性の高い IL-17 ファミリーが発見され³⁷、これに伴い IL-17 には改めて IL-17A という分子名が付けられた。そして、他のファミリー分子は IL-17B～IL-17F と命名された。

1-3-1. IL-17A の受容体とシグナル伝達機構

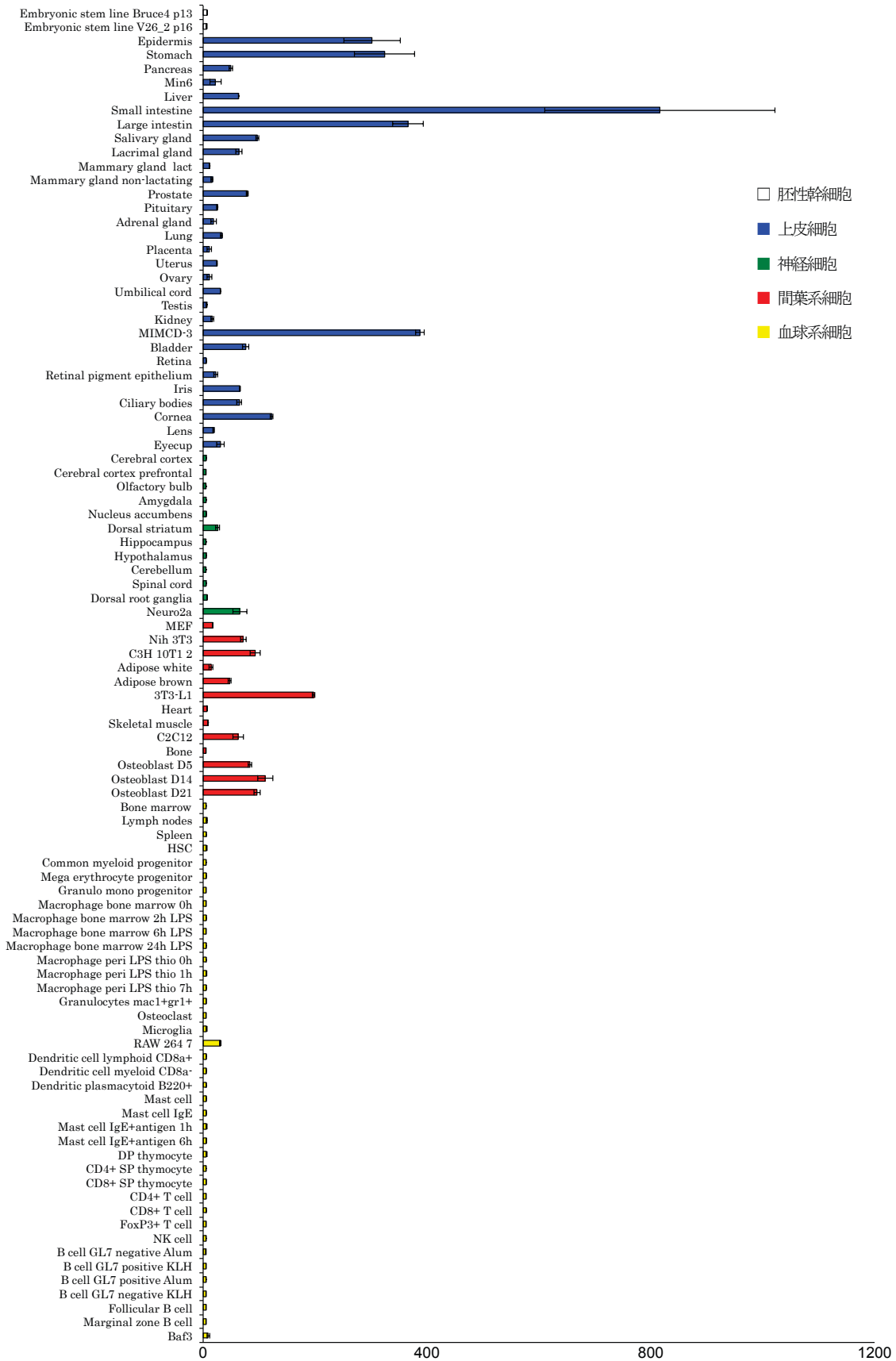
IL-17A は IL-17A 同士または IL-17A と IL-17F とがジスルフィド結合した二量体として分泌され、IL-17RA と IL-17RC とからなる受容体複合体に結合する。これらの受容体分子は多くの組織、細胞で発現が認められ、実際 IL-17A は様々な細胞に対して作用する。IL-17RA は様々な組織や細胞で発現し、骨芽細胞や免疫系の細胞で特に発現が高い (図 5a)。一方、IL-17RC は血球系細胞での発現は認められるものの、そのレベルは低く、上皮組織や脂肪、筋、骨などの間葉系細胞で高く発現している (図 5b)。

IL-17 受容体ファミリー分子は、細胞質領域に similar expression to fibroblast growth factor/ IL-17R (SEFIR) ドメインを有する。このドメインには、アダプター分子 nuclear factor-kappa B (NF-κB) activator 1 (Act1) が会合する³⁸。さらに、IL-17RA

5a. *Ill7ra*



5b. *III7rc*



は細胞質領域末端側に TIR-like loop (TILL) ドメインおよび C/EBP β -activation domain (C-BAD)^{39,40} を有する。Act1 は U-box ドメインを有し、Act1 に会合したアダプター分子 tumor-necrosis factor receptor-associated factor (TRAF6) をユビキチン化により活性化する。活性化した TRAF6 は TGF- β -activated kinase (TAK) 複合体、I κ B kinase (IKK) を介して転写因子 NF- κ B を活性化する⁴¹。NF- κ B により標的遺伝子が発現する。また、Act1 は inducible inhibitor of NF- κ B kinase (IKKi) によるリン酸化を受けることで TRAF2/ TRAF5/ ASF (alternative splicing factor) とも複合体を形成する⁴²。ASF は mRNA を分解するが、この複合体形成によりその作用は阻害され、結果として mRNA が安定化する⁴³。Act1 と他の分子との複合体形成はリガンド結合に伴う Hsp90 (heat shock protein 90) の Act1 への結合により促進される⁴⁴。IL-17 受容体シグナルには抑制機構も存在する。TRAF3 は IL-17RA の C-BAD に直接結合し、IL-17RA-Act1-TRAF6 の複合体形成を阻害する⁴⁵。また、TRAF4 は TRAF6 と Act1 の会合を拮抗的に阻害する。そして、細胞質末端領域は extracellular-signal-regulated kinase (ERK) および glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) を介して CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) をリン酸化し、抑制的に作用することが知られている (図 6)⁴⁰。

1-3-2. IL-17A の機能

IL-17A の機能としては、線維芽細胞に作用して NF- κ B を活性化し、IL-6 の分泌を促

P.20、21 図5 マウス IL-17 受容体の発現分布

各組織/細胞における *Il17ra* および *Il17rc* の発現。**a.** *Il17ra* は様々な組織や細胞で発現が見られ、骨芽細胞や免疫系の細胞で特に発現が高い。**b.** *Il17rc* は血球系細胞での発現は低く、皮膚や腸管など一部の上皮組織、脂肪、筋、骨などの間葉系細胞で発現が高い。

(BioGPS : <http://biogps.org/#goto=welcome> のデータベースを元に作成)

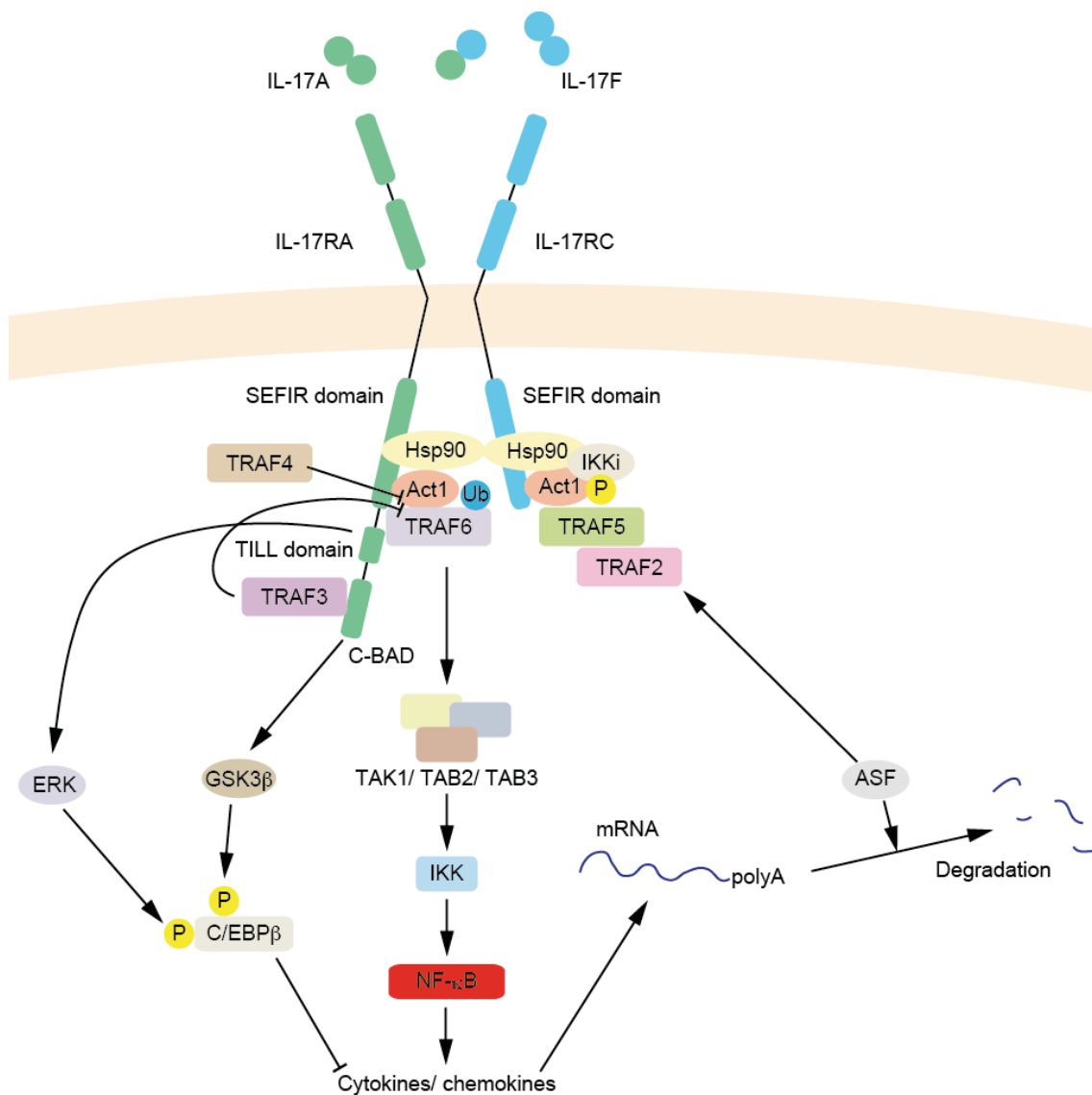


図6 IL-17受容体下流のシグナル伝達機構

IL-17Aは、ホモダイマーまたはIL-17Fとのヘテロダイマーを形成し、IL-17RAとIL-17RCからなる受容体分子の複合体に結合する。IL-17RAおよびIL-17RCの細胞質領域にはSEFIRドメインがある。このドメインにはアダプター分子Act1が会合し、シグナルを伝達する。Act1はU-boxドメインを介してTRAF6をユビキチン化により活性化し、活性化TRAF6はTAK1/TAB2/TAB3からなるTAK複合体を活性化する。TAK複合体はIKKを介してNF- κ Bを活性化し、標的遺伝子の転写が誘導される。Act1は、IKKiによりリン酸化を受けることにより、TRAF2/TRAF5/ASFとも複合体を形成する。この複合体形成により、ASFによるmRNA分解が阻害され、mRNAが安定化する。Act1と他の下流分子との複合体形成はHsp90により促進される。TRAF3はIL-17RAのC-BADに結合することにより、また、TRAF4はAct1とTRAF6の結合を拮抗的に阻害することにより、TRAF6の活性化を抑制する。また、IL-17RAの細胞質末端のTILLドメインおよびC-BADは、それぞれERKおよびGSK-3 β を介してC/EBP β をリン酸化し、標的遺伝子の発現を抑制する。

進することが最初に報告され⁴⁶、以降多くの作用が明らかになった。*Il17a*⁺マウスを用いた生体レベルでの解析から、コラーゲン誘導性関節炎 (CIA)、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) などの自己免疫疾患、接触型過敏症などのアレルギー性疾患の発症や、細菌や真菌に対する感染防御における重要性が明らかになっている^{37,47}。これらの疾患における IL-17 産生細胞として初めて報告されたのは新規のヘルパーT 細胞サブセット、Th17 細胞である。メモリーT 細胞が *in vitro* で IL-23 により IL-17A を産生するという報告⁴⁸、そしてこの細胞はTh1 細胞やTh2 細胞と異なるという報告を経て^{49,50}、Th17 細胞は発見された。Th17 細胞は乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、腸炎、感染症など多くの疾患でその重要性が示されている⁵¹。その後、Th17 細胞だけでなく $\gamma\delta$ T 細胞やNKT 細胞など他の免疫細胞も IL-17A を産生することが判明した³⁷。

1-3-3. IL-17A の骨折治癒への関与

IL-17A の骨組織への作用としては、1-1-3 で述べた通り、骨吸収を促進する作用がよく知られている。一方、*in vitro* での IL-17A による石灰化促進作用も報告されており (表 1)、IL-17A は骨吸収だけでなく、骨形成にも寄与する可能性が示唆されている。これらのことから、IL-17A が骨折治癒に際し、仮骨形成やリモデリングに際して骨形成や骨吸収を制御している可能性が考えられる。

最近、ラット頭蓋冠欠損に対し人工骨を充填し、欠損部を再生するモデルでは IL-17A の局所投与により治癒が遅延することが報告された²⁶。また、近年 Nam らにより IL-17 ファミリー分子の一つで IL-17A と相同性の高い IL-17F が骨芽細胞分化を促進すること、および、*Rag1*⁺マウスでは骨折治癒が遅延することが報告され、これ

らの事実から Th17 細胞が IL-17F を産生することで骨折治癒が促進されるというモデルが提唱されている³⁵。しかし、前者は人工骨を移植している点で通常の骨折治癒とは異なり、後者は *in vitro* の実験結果のみで結論づけている。また、これまで、IL-17A の発現が骨の損傷や再生に伴い変動するかも明らかにされていない。

1-4. 組織損傷／再生と $\gamma\delta$ T 細胞

IL-17A 産生細胞の一つに $\gamma\delta$ T 細胞がある。 $\gamma\delta$ T 細胞は T 細胞の一種で、TCR が γ 鎖と δ 鎖とからなるためこの名で呼ばれ、 α 鎖と β 鎖を発現する $\alpha\beta$ T 細胞と区別される。 $\gamma\delta$ T 細胞は主として胸腺内で成熟すること、その成熟が RAG に依存することなど、 $\alpha\beta$ T 細胞と分化機構の一部を共有している。しかしながら、 $\gamma\delta$ T 細胞は末梢血中には非常に少なく、その一方で皮膚の T 細胞の大部分を占めるという $\alpha\beta$ T 細胞とは異なる分布様式をとる⁵²。この特徴に一致して、 $\gamma\delta$ T 細胞は上皮障壁におけるストレスセンサーとして自然免疫系へ大きく寄与している^{53,54}。また、マウスを用いた実験から、抗原に対して速やかに反応し、感染防御や腫瘍免疫療法に重要であることが明らかにされている。

1-4-1. $\gamma\delta$ T 細胞の発生

$\gamma\delta$ T 細胞は胎生期より発生する。胎仔肝に含まれる造血前駆細胞は胸腺中で成熟 T 細胞へと分化する。T 細胞の分化段階の CD4、CD8 ダブルネガティブ (DN) 2 期に TCR β 、 γ 、および δ 鎖の再構成が始まる。この際、機能的な TCR β 鎖よりも先に機能的な TCR $\gamma\delta$ 鎖が完成すれば、その細胞の運命は $\gamma\delta$ T 細胞に決定する⁵⁵。この過程で発現する *Tcr γ* 遺伝子のセグメントは発生の時期により厳密に制御されており、マウスの場合、胎生

12日より $V\gamma 5^+$ 、 $V\gamma 6^+$ 、 $V\gamma 4^+$ 、 $V\gamma 1^+$ 細胞の順に出現する（図 7）。 $\gamma\delta$ T 細胞の中で、腸管に常在するサブセットである $V\gamma 7^+$ 細胞は胸腺外で分化する。

$\gamma\delta$ T 細胞は発現する TCR γ 鎖により、定着する部位が規定されている。例えば、 $V\gamma 5^+$ 細胞は表皮に、 $V\gamma 6^+$ 細胞は肺、肝、舌、子宮などに存在する（図 7）^{52,56}。 $V\gamma 5^+$ 細胞の表皮への定着には、胸腺髄質上皮細胞からの selection and upkeep of intraepithelial T cells 1 (Skint1) 刺激が関与する。Skint1 刺激により $V\gamma 5^+$ 細胞が成熟し⁵⁷、ケモカイン受容体の発現パターンが変化し皮膚への遊走が起こる⁵⁸。 $V\gamma 7^+$ 細胞の分化には、IL-15 による $V\gamma 7$ セグメントのヒストンアセチル化が必要であることが分かっている⁵⁹。他の $\gamma\delta$ T 細胞の成熟や組織への定着メカニズムについては不明な点が多い。

1-4-2. $\gamma\delta$ T 細胞の活性化

$\gamma\delta$ T 細胞の活性化には、 $\alpha\beta$ T 細胞に見られる抗原提示細胞による抗原の取り込み～提示のプロセスは必要ではなく、細菌などに由来する抗原に対し Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) や dectin1 などのパターン認識受容体 (pattern recognition receptor : PRR) を介して迅速に反応することが可能である^{60,61}。また、他の細胞がストレスに応じて発現するリン酸化抗原などを認識することによっても活性化する⁶²。 $\alpha\beta$ T 細胞は活性化に際し TCR 刺激、共刺激分子、サイトカインの三種類の刺激を同時に受けるが、 $\gamma\delta$ T 細胞では同時である必要はなく、TCR 刺激に遅れて共刺激やサイトカイン刺激を受けても活性化され⁵⁵、さらには TCR 非依存的に活性化することも報告されている^{61,62}。また、表皮や子宮の $\gamma\delta$ T 細胞はモノクローナルであるという報告もある⁶³。これについては、 $\gamma\delta$ T 細胞は特定の臓器に常在するため、限られた種類の抗原としか遭遇せず、

TCR が多様であることはそれほど重要でないためであると考えられている⁵⁵。

1-4-3. $\gamma\delta$ T 細胞によるサイトカイン産生と生体における機能

$\gamma\delta$ T 細胞のサイトカイン発現パターンの一部は、分化の段階で決定されている。発生の際に強い TCR 刺激や Skint1 による刺激を受けた細胞は、CD27⁺の IFN- γ 産生性の細胞に分化し、弱い TCR 刺激を受けた、あるいは TCR 刺激を受けなかった細胞は CD27⁻の IL-17A 産生性の細胞に分化することが分かっている⁶⁴。 $\gamma\delta$ T 細胞が産生するサイトカインはサブセットによっても規定されている。V γ 1⁺細胞、V γ 5⁺細胞、V γ 7⁺細胞は IFN- γ を産生し、V γ 4⁺細胞や V γ 6⁺細胞は IL-17A を産生することが知られている (図 7)⁶⁵。IFN- γ 産生 $\gamma\delta$ T 細胞は、細菌感染⁶⁶やウイルス感染⁶⁷に際して早期に IFN- γ を産生し、感染防御に寄与する。IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞は、細菌感染早期に好中球を感染巣に遊走させ、細菌の排除に寄与することが報告されている⁶⁸。また、腫瘍免疫療法でも、IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の関与⁶⁹や $\gamma\delta$ T 細胞の移入による IFN- γ の誘導⁷⁰が報告されている。

$\gamma\delta$ T 細胞は IFN- γ やIL-17A の他にも、TNF などのサイトカイン、FGF ファミリーの成長因子を産生することで、炎症や組織の再生に関与している。特に、IL-17A は好中球の遊走、マクロファージの活性化、IL-22 など他のサイトカインの産生誘導を介して再生に寄与する^{69,71,56,72}。

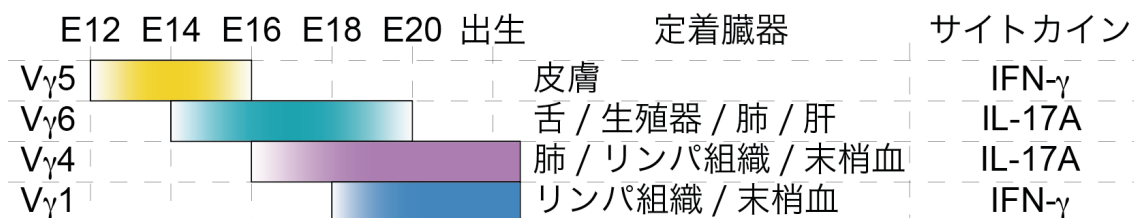


図7 マウス $\gamma\delta$ T 細胞の発生と定着する臓器

マウス胸腺内での $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの分化の時期は厳密に制御されている。胎生 12 日より、約 2 日間隔で、V γ 5⁺細胞、V γ 6⁺細胞、V γ 4⁺細胞、V γ 1⁺細胞の順に分化が始まる。V γ 1⁺細胞および V γ 4⁺細胞は出生後も産生される。成熟後、V γ 5⁺細胞は皮膚に、V γ 6⁺細胞は舌、生殖器、肺、肝に、V γ 4⁺細胞は肺、リンパ組織、末梢血に、V γ 1⁺細胞はリンパ組織と末梢血中に存在する。なお、V γ 7⁺細胞は胸腺外で分化し、腸管に定着する。V γ 1⁺細胞と V γ 5⁺細胞は IFN- γ を産生し、V γ 4⁺細胞と V γ 6⁺細胞は IL-17A を産生する。

1-5. 研究目的

上述の通り、これまでの研究から免疫系による骨折治癒の制御、特にリンパ球や炎症性サイトカインによる制御が報告されてきた。しかしながら、骨折治癒を促進するリンパ球サブセットや骨折治癒過程でリンパ球の産生するエフェクターサイトカインについて不明な点が多く残されている。私は、骨損傷後に免疫系が骨再生を誘導するメカニズム、特に、リンパ球がどのようなサイトカインを産生し骨代謝を制御するのかに注目し、その分子機構の解明を目指した。

私は、骨孔形成によるマウス大腿骨の骨損傷モデルの解析を通じて、免疫系による骨形成制御機構を解明することを目的とし、遺伝子欠損マウスやレポーターマウスを用い、骨再生過程での免疫細胞やサイトカインの関与を解析した。リアルタイム RT-PCR 法、免疫組織化学染色法、フローサイトメトリー法により、損傷した骨および周囲組織におけるサイトカイン発現の解析、損傷部に浸潤する細胞の解析を行い、免疫系の関与を検討した。そして、マイクロ CT や組織学的解析、損傷組織間葉系細胞を用いた *in vitro* の解析により、骨再生動態および骨形成の検討を行った。

本研究を通じて、私はマウス大腿骨の骨損傷モデルにおいて、損傷に伴い骨周囲組織で IL-17A の発現が上昇することを見出した。IL17a^{-/-}マウスでは骨形成の抑制により骨再生が遅延していた。 *In vitro* の解析により、IL-17A は損傷組織の間葉系細胞に直接作用し、増殖と骨形成を促進することを見出した。IL-17A 産生細胞は、V γ 6⁺ γ δ T 細胞であり、IL-1 β および IL-23 が IL-17A の産生に寄与している可能性が示唆された。以上より、IL-17A 産生 γ δ T 細胞が免疫系と骨形成とを結びつける新たな役割を有することが示された。

第二章 方法

2-1. 実験試薬／器具

特に記載のない場合、化学薬品についてはナカライテスク、和光純薬各社の特級試薬を使用した。同様に、チューブ、フィルター、細胞培養のプレートやシャーレ類はBD社の製品を使用した。

2-2. マウス

実験に用いたマウスは specific pathogen-free (SPF) 環境下にて飼育し、全ての実験は「東京大学動物実験実施規則」並びに「東京大学動物実験実施マニュアル」に従い施行した。C57BL/6J 野生型マウスは日本クレアより入手した。*Il17a*⁺マウスおよび *Il17f*⁺マウスは東京理科大学 生命医科学研究所 実験動物学研究部門 岩倉 洋一郎 先生よりご供与頂いた。*IL-17A* レポーターマウス (*Il17a*^{sp/sp} マウス) は BIOCYTOGEN より入手した。*Ccr6*⁺ マウスは Jackson Laboratories より入手した。

2-3. 大腿骨損傷モデル

Nagashima らの大腿骨損傷モデル²⁵に一部改変を加え、マウス右側大腿骨および周囲組織に損傷を引き起こした (図 8)。6~8 週齢のマウスに対し、生理食塩水 (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) により 1/10 希釈したペンタバルビタールナトリウム (ソムノペンチル® ; 共立製薬) を 10 μ l g⁻¹ 腹腔内投与し、全身麻酔を施した。麻酔奏功後、小動物用バリカンを用いて右側大腿部を剃毛した。マウスを手術台上に左側臥位にポジショニングし、右側大腿外側面を消毒用アルコールにより消毒した。大腿骨中央部の直上の

皮膚に大腿骨と平行に約 10 mm の切開を施した。皮下組織を骨格筋より鈍的に剥離し、外側広筋など、大腿前外側面の骨格筋群を切断した。外骨膜を骨表面より鈍的に剥離し、ルーターとダイヤモンドラウンドポイント（松風）により直径約 0.8~1.0 mm の骨孔を形成した。削片を生理食塩水で除去した後、骨孔辺縁部を 25G 注射針の先端部により形成した。削片を生理食塩水で除去した後、骨孔辺縁部を 25G 注射針の先端部により形成した。切断した骨格筋および皮膚を針付き 5-0 ナイロン糸（COVIDIEN）を用いて縫合、閉創した。術後、覚醒まで白熱灯および床敷きを用いてマウスを保温した。

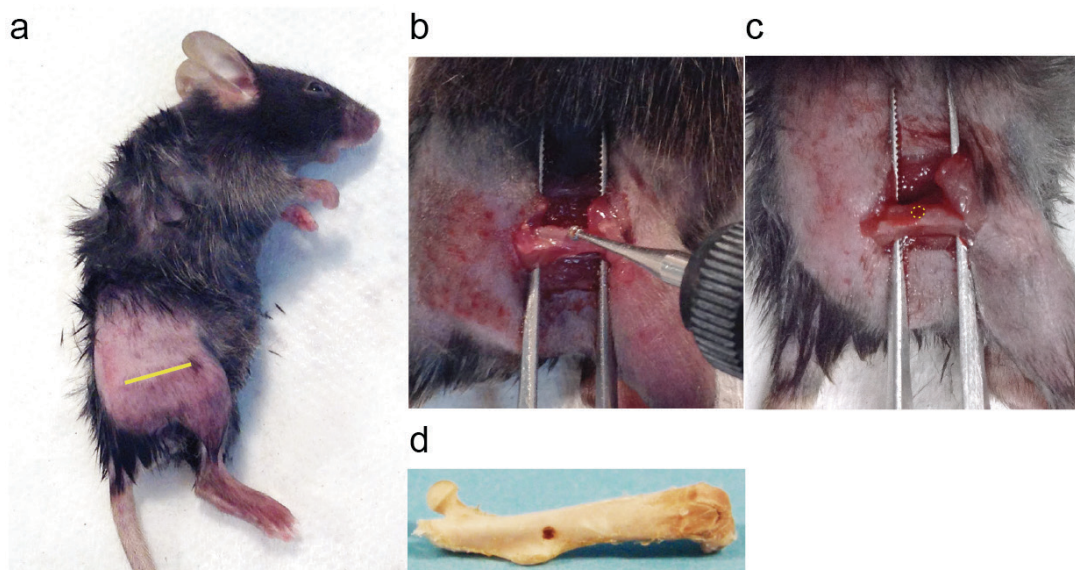


図8 マウス右側大腿骨骨孔形成術

a. マウスの体位および切開線。全身麻酔を施したマウスの右側大腿部を剃毛し、左側臥位にポジショニングした。右側大腿部をエタノールで消毒し、黄線のごとく切開線を設定した。**b.** ダイヤモンドラウンドポイントによる骨孔形成。大腿骨周囲の骨格筋および骨膜を除去し、骨面を露出した後、大腿骨中央部前外側面を研削した。**c.** 形成された骨孔。皮質骨の研削により骨髄からの出血を認めた後、黄点線のごとく骨孔辺縁部を注射針のカット面を利用して形成した。**d.** 骨孔形成直後に摘出した大腿骨。円形の骨欠損が形成された。

2-4. 組織固定法

2-4-1. マイクロ CT 解析用検体

マウスを頸椎脱臼法により屠殺後、大腿部を摘出した。大腿骨周囲の軟組織を除去した後、70%エタノール (4°C) 中で浸漬固定し、解析まで保存した。

2-4-2. パラフィン切片作製用検体

マウスを頸椎脱臼法により屠殺し、大腿部を摘出した。4%パラホルムアルデヒド (PFA) 中で骨周囲の軟組織の一部をトリミングした。さらに、ルーターとダイヤモンドポイントにより、内側上顆を削合し、骨髄を露出した。その後、4% PFA (4°C) 中で一晩浸漬固定した。

2-4-3. 凍結切片作製用検体

マウスを全身麻酔下にて PBS (4°C) で灌流脱血後、4% PFA (4°C) で灌流固定した。4°Cで1時間静置した後、大腿部を摘出し、4% PFA (4°C) 中で1時間浸漬固定した。

2-5. *In vivo* 細胞増殖アッセイ

骨孔形成術施行後6日のマウスに対し生理食塩水により 10 mg ml^{-1} に調製した BrdU (ブロデオキシウリジン、Sigma) を $150 \mu\text{l}$ 腹腔内投与した。パラフィン切片作製のため、術後7日に2-4-2の要領で右側大腿部を摘出、固定した。

2-6. マイクロ CT 解析法

2-4-1 の要領で固定した大腿骨の骨孔部をエックス線 CT 装置 (ScanXmate-D090S105、Comscantecno) および Xsys software (Comscantecno) を用いて CT 撮像し、得られた断面像より coneCT express software (White Rabbit) を用いて三次元画像を構築した。TRI/3D Bon software (Ratoc System Engineering) により解析パラメーターを算出した。

2-7. 組織学的解析法

2-7-1. パラフィン切片作製法

2-4-2 の要領で固定した組織を脱灰液 (OSTEOSOFT[®]、Merck Millipore) 中で 4°C で 3 週間震盪した。この間、3 日に 1 回脱灰液を交換した。脱灰した組織を全自動密閉式ティッシュプロセッサ (Leica) を用いて脱水、脱脂、パラフィン浸透し、パラフィン包埋装置 (Leica) により包埋した。作製したブロックをマイクロトーム (Leica) により厚さ 6 μm の切片に薄切し、約 40°C の温水上で伸展した後、スライドガラス (松浪硝子工業) 上に回収し、約 40°C で一晩静置し、乾燥、伸展、接着した。ブロックおよび切り出した切片は 4°C で保存した。

2-7-2. パラフィン切片染色法

パラフィン切片を用いてヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色、BrdU に対する免疫組織化学染色を行った。パラフィン切

片の染色に際して、以下のステップで脱パラフィンを行った。

<脱パラフィン>

1	キシレン	5 分間	6	99.5%エタノール	30 秒間
2	キシレン	5 分間	7	95%エタノール	30 秒間
3	キシレン	5 分間	8	90%エタノール	30 秒間
4	100%エタノール	30 秒間	9	80%エタノール	30 秒間
5	100%エタノール	30 秒間	10	70%エタノール	30 秒間

HE 染色は以下の手順で行った。切片を純水で3分間洗浄後、ヘマトキシリン (MUTO PURE CHEMICALS) で3分間染色した。流水中で約10分間洗浄した後、エオシンに2分間浸漬した。水道水により洗浄し、脱パラフィンの逆の手順で透徹し、封入剤 (マルチマウント 480、松浪硝子工業) とカバーガラス (松浪硝子工業) により封入した。

TRAP 染色には、以下の要領で用時調製した TRAP 染色液を用いた。切片を純水で3分間洗浄後、切片を室温で約20分間 TRAP 染色液に浸漬、染色した後、純水で洗浄した。その後、ヘマトキシリンに数秒浸漬し対比染色を行った。流水中で約10分間洗浄した後、HE 染色と同じ要領で透徹し、封入した。

<TRAP 染色液調製法 (用時調製) >

・基質原液	ナフトール AS-BI リン酸塩	0.07 g
	N,N-ジメチルホルムアミド	7 ml
・4%パラローズアニリン溶液	パラローズアニリン	5 g
	純水 (50~60℃)	100 ml
	塩酸	25 ml
(冷却後濾過)		

・ 亜硝酸ナトリウム-アニリン溶液	亜硝酸ナトリウム	0.15 g
	超純水	3.75 ml
	4%パラローズアニリン溶液	3.75 ml
・ 0.2 M 酢酸溶液	氷酢酸	2.875 ml
	純水	250 ml
・ 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液	酢酸ナトリウム	8.2 g
	純水	500 ml
・ 0.2 M 酢酸緩衝液	0.2 M 酢酸溶液	250 ml
	0.2 M 酢酸ナトリウム溶液	500 ml
	(1 N 水酸化ナトリウム水溶液により pH 5.0 に調製)	
・ TRAP 染色液	0.2 M 酢酸緩衝液	60 ml
	超純水	45 ml
	基質原液	6 ml
	亜硝酸ナトリウム-アニリン溶液	7.5 ml
	酒石酸ナトリウム	1 g
	(水酸化ナトリウム水溶液により pH を 5.1 に調製後濾過)	

BrdU に対する免疫組織化学染色には、BrdU Immunohistochemistry Kit (abcam) を用いた。メーカーの提供するプロトコールに従い抗原賦活化、ビオチン化一次抗体による標識を行った。次に、1/500 希釈 Alexa Fluor[®] 594 標識ストレプトアビジン (Life technologies) による蛍光標識を行った。抗体反応の条件は室温、1 時間とし、反応後は洗浄 (3 分間×2 回) を行った。核は 1/1000 希釈 Hoechst により染色した。水溶性封入剤 (Fluoromount、Invitrogen) とカバーガラスにより封入した。なお、免疫組織化学染色法において試薬の希釈や洗浄には全て PBS を用いた。以下の実験も同様とした。

骨形態計測に際し、骨形成と骨吸収のパラメーターを Win ROOF software (MITANI Corporation) を用いて算出した。前述の指標に従い、II 型骨芽細胞に覆われた骨面を II 型骨芽細胞面 (Type II osteoblast surface/ bone surface) と定義し、骨形成

の指標とした (図 9)。なお、パラフィン切片では細胞質の収縮により III 型と IV 型の細胞の区別が付きにくいことがあり、本研究では II 型骨芽細胞についてのみ評価した。骨吸収のパラメーターとして、骨吸収面 (eroded surface/ bone surface) および、破骨細胞数 (number of osteoclast/ bone surface) を計測した。

BrdU⁺細胞数は Tissue Quest software (NOVEL SCIENCE) により計測した。解析には 1 体のマウスにつき複数の切片を用いた。

2-7-3. 非脱灰凍結切片作製法 (川本法)

2-4-3 の手順に従い固定した大腿部をヘキサンドライアイス中で OCT コンパウンド (Leica) に包埋し、凍結ブロックを作製した。クライオスタット (Leica) により薄切した厚さ 5 μm の切片を粘着フィルム上に回収し、スライドガラス上にテープで貼付した。作製した切片は -80°C にて保存した。なお、川本法原法では試料を未固定で包埋するが、本研究では 4% PFA 灌流による前固定を行った。

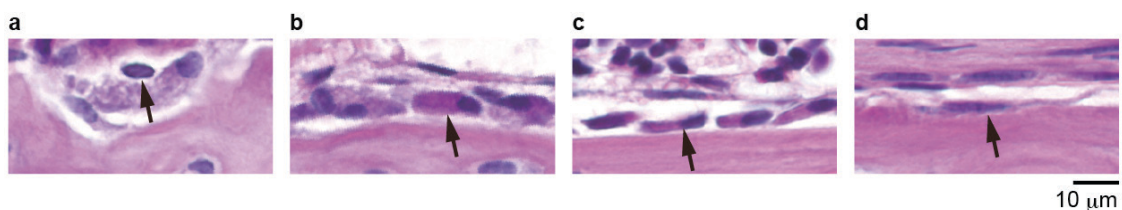


図 9 骨芽細胞の形態による分類

骨芽細胞は分化に伴い形態が変化し、形態学的に I 型~IV 型に分類される。矢印は各形態の骨芽細胞を示す。**a.** I 型骨芽細胞。骨芽細胞前駆細胞で、細胞質に乏しく楕円形の核を有する。**b.** II 型骨芽細胞。基質合成能の高い骨芽細胞で、方形~梨形状を呈する。**c.** III 型骨芽細胞。II 型骨芽細胞と比較して細胞質と核が扁平な形状を呈する。**d.** IV 型骨芽細胞。休止期にある骨芽細胞で、扁平な核と細胞質を有する。

2-7-4. GFP に対する免疫組織化学染色法

凍結切片を洗浄（3 分間×2 回）し、OCT コンパウンドを除去した。切片周囲から余剰な PBS を除いた後、1/2000 希釈 Tween 20 で室温で 20 分間処理した。洗浄後、Image-iT[®] FX signal enhancer（Life technologies）を切片上に滴下し、室温で 20 分間ブロッキングした。洗浄後、一次抗体：1/1000 希釈ウサギ抗 GFP ポリクローナル抗体（abcam）および二次抗体：1/500 希釈 Alexa Fluor[®] 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（Invitrogen）により標識した。抗体反応の条件は室温、1 時間とし、反応後は洗浄（3 分間×2 回）を行った。核を 1/1000 希釈 Hoechst により染色し、水溶性封入剤により封入した。

2-8. 細胞調製法

2-8-1. 骨髄細胞の調製

マウスを全身麻酔または頸椎脱臼法により屠殺し、大腿骨を摘出した。骨周囲の組織を除去した後、両骨端を切除し、骨髄腔内に PBS をシリンジと 30 G 注射針を用いて注入した。細胞をコニカルチューブに回収し、塩化アンモニウム溶血バッファー（Red blood cell lysing buffer、Sigma）を加え約 2 分間室温で静置し、赤血球を除去した。夾雑物は 70 μm メッシュを用いて除去した。

2-8-2. 骨周囲組織の細胞の調製

マウスに全身麻酔を施し、PBS 20 ml (4°C) により灌流脱血した。大腿部の骨周囲組織を摘出し、眼科用剪刀により細断した。組織片を 1 mg ml^{-1} コラゲナーゼを含む DMEM 中で 37°C にて 1 時間震盪した。夾雑物は $70 \mu\text{m}$ メッシュと 40% Percoll[®] (GE Healthcare) を用いた密度勾配遠心法 (加速/減速: 共に最低、1500 rpm、15 分間、 4°C) により除去した。その後、赤血球を 2-8-1 に示した方法で溶血し、除去した。

2-8-3. 頭蓋冠細胞の調製

生後 1~3 日のマウスをジエチルエーテルの吸入により屠殺した。断頭後、皮膚を剥離し、眼窩より後上方の頭蓋冠を摘出した。PBS で洗浄した後、1 体分の頭蓋冠を 10 ml の酵素溶液 (1 mg ml^{-1} コラゲナーゼおよび 2 mg ml^{-1} ディスパーゼを含む α -MEM) 中に浸漬し、 37°C にて 15 分間震盪した。上清を吸引した後、酵素溶液を 10 ml 添加し、15 分間震盪し、上清を別なコニカルチューブに回収した。この操作を計 4 回繰り返し、上清中より頭蓋冠細胞を得た。夾雑物は $70 \mu\text{m}$ メッシュにより除去した。

2-9. 遺伝子発現解析法

2-8 の要領で調製した細胞から TRIzol[®] (Life technologies) を用い、acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法により全 RNA を抽出した。Superscript[®] III reverse transcriptase (Invitrogen) を用い、メーカーの提供するプロトコールに従い全 RNA を鋳

型とした一本鎖 cDNA を合成した。SYBR[®] Green (Toyobo) と LightCycler[®] (Roche) を用いて、リアルタイム RT-PCR 法により遺伝子発現を解析した。目的の遺伝子の発現量は $\Delta\Delta C_t$ 法により相対値として算出した。このとき、内部標準として *Gapdh* を用いた。解析に用いたプライマーの配列以下に示す (表 2)。PCR 反応条件は、熱変性 (95°C、10 秒間)、アニーリング (60°C、10 秒間)、伸長反応 (72°C、10 秒間) を 50 サイクル行った。1 つのサンプルにつき 2 回の解析を行った。

遺伝子	配列	
<i>Gapdh</i>	Forward	5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'
	Reverse	5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'
<i>Ifng</i>	Forward	5'-GCGTCATTGAATCACACCTG-3'
	Reverse	5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3'
<i>Il4</i>	Forward	5'-CCTCACAGCAACGAAGAACA-3'
	Reverse	5'-ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT-3'
<i>Il17a</i>	Forward	5'-TCCCTCTGTGATCTGGGAAG-3'
	Reverse	5'-AGCATCTTCTCGACCCTGAA-3'
<i>Il17f</i>	Forward	5'-ATGGTGCTGTCTTCCTGACC-3'
	Reverse	5'-CAAACCAGGGCATTCTGT-3'
<i>Il22</i>	Forward	5'-TCATCGGGGAGAACTGTTC-3'
	Reverse	5'-CATGTAGGGCTGGAACCTGT-3'
<i>Il17ra</i>	Forward	5'-TGAGCCCGTTGAGTCTCTCT-3'
	Reverse	5'-TCTCGAGCTCCAGAAGAAA-3'
<i>Il17rc</i>	Forward	5'-GCCCTGGACAGCTGTACTTCTA-3'
	Reverse	5'-ACACGAGTGCTACTTGGTTAGGA-3'
<i>Rumx2</i>	Forward	5'-CCCAGCCACCTTTACCTACA-3'
	Reverse	5'-TATGGAGTGCTGCTGGTCTG-3'
<i>Sp7</i>	Forward	5'-ACTGGCTAGGTGGTGGTCAG-3'
	Reverse	5'-GGTAGGGAGCTGGGTAAAGG-3'
<i>Foxm1</i>	Forward	5'-CTGGATGAGCCTGACCTGTT-3'
	Reverse	5'-GTGGAGGAGACAGGCAATGT-3'
<i>Cdc25a</i>	Forward	5'-CGAATGTGCCGATATGTGAG-3'
	Reverse	5'-TGGTGCGGAACTTCTTTAGG-3'
<i>Cdc25b</i>	Forward	5'-AAAGGCGGCTACAAGGAGTT-3'
	Reverse	5'-GCAGCCTGCTACAAAGTTCC-3'
<i>Cdc25c</i>	Forward	5'-GGCTCAGAGCTTCTGATTGG-3'
	Reverse	5'-TTTAAGGCTCCCAGGATGTG-3'
<i>Cdk1</i>	Forward	5'-CTCCACTCCGGTTGACATCT-3'
	Reverse	5'-GACTTCTGGCCACACTTCGT-3'
<i>Cdk2</i>	Forward	5'-ACAGCCGTGGATATCTGGAG-3'
	Reverse	5'-CAAGCTCCGTCCATCTTCAT-3'
<i>Cdk4</i>	Forward	5'-ACTCTGAAGCCGACCAGTTG-3'
	Reverse	5'-TTGTGCAGGTAGGAGTGCTG-3'
<i>Cdk6</i>	Forward	5'-AATCTGCTCAACCCATCGAG-3'
	Reverse	5'-GTTGGATGGCAGGTGAGAGT-3'
<i>Il1b</i>	Forward	5'-CAGGCAGGCAGTATCACTCA-3'
	Reverse	5'-TGTCCTCATCCTGGAAGGTC-3'
<i>Il23p19</i>	Forward	5'-AATAATGTGCCCCGTATCCA-3'
	Reverse	5'-AGGCTCCCGTTTGAAGATGT-3'

表2 プライマー配列一覧

2-10. *In vitro* における骨芽細胞分化誘導法

2-10-1. 頭蓋冠細胞の骨芽細胞分化誘導

頭蓋冠細胞を 10% FBS 含有 α -MEM 中に懸濁し、1 体分の細胞を 10 cm dish 1 枚に播種した。12~24 時間培養した後、浮遊細胞を吸引、除去した。さらに 24~72 時間後、培地を吸引、PBS で洗浄後、トリプシン/EDTA 溶液を 1 ml 添加し、恒温培養器中で 5% CO₂、37°C、5 分間の条件で静置した。剥離した細胞を 10% FBS 含有 α -MEM 中に懸濁し、コニカルチューブ中に回収した。洗浄後、細胞を 24 ウェルプレートに 2×10^4 個 ml⁻¹ の密度で播種した。1 回の実験で 1 つの条件につき、3 つのウェルを用意した。

24~72 時間後 1 ウェルあたり 500 μ l の骨芽細胞分化誘導培地（以下に調製法を記載した 25xOb バッファーを 10% FBS 含有 α -MEM により希釈）に培地交換し、骨芽細胞分化を誘導した。分化誘導培地には、500 ng ml⁻¹ マウス組み替え BMP-2 (Osteogenetics GmbH)、10 または 50 ng ml⁻¹ マウス組み替え IL-17A (PEPROTECH) を添加した。以降、48 時間毎に培地交換を行い、21 日間培養した。

<25xOb バッファー調製法>

• 2 mg ml ⁻¹ デキサメタゾン溶液	デキサメタゾン	20 mg
	エタノール	10 ml
• 25xOb バッファー	アスコルビン酸	50 mg
	β -グリセロリン酸	2.16 g
	2 mg ml ⁻¹ デキサメタゾン溶液	2 μ l
	超純水	40 ml
		(溶解後濾過滅菌)

2-10-2. 損傷組織間葉系細胞の骨芽細胞分化誘導

両側大腿骨に対して片側2箇所ずつ骨孔を形成したマウスより、損傷後3日の時点で損傷組織より2-8-2の要領で細胞を調製した。これらの細胞から、自動磁気細胞分離システム（magnetic activated cell sorting : MACS）により間葉系細胞を得た。細胞をメーカー提供のプロトコールに従い、PE標識ラット抗マウスCD45抗体（eBioscience、30F-11）、磁気標識抗PEマイクロビーズ（Miltenyi Biotec）により標識し、自動磁気細胞分離装置（autoMACS® Pro Separator、Miltenyi Biotec）を用いてプログラム「deplete」によりCD45⁺細胞を除去した。

CD45⁻細胞を12~24時間10% FBS含有DMEM中で培養した後、浮遊細胞を除去した。細胞を骨芽細胞分化誘導培地（25xObバッファーを10% FBS含有DMEMにより希釈）に懸濁し、 2×10^4 個 ml⁻¹の密度で播種した。BrdU取り込み法（後述）には96ウェルプレートを用い、他の実験には24ウェルプレートを用いた。分化誘導培地にはマウス組み替えBMP-2（500 ng ml⁻¹）またはマウス組み替えIL-17A（10または50 ng ml⁻¹）を添加した。培地交換は48時間ごとに行い、14日間培養した。

2-11. アルカリホスファターゼ（ALP）活性の評価

In vitro で培養した頭蓋冠細胞および損傷組織間葉系細胞のALP活性を染色法と定量法により評価した。

2-11-1. ALP 染色法

培養細胞を分化誘導後 7 日目に 4% PFA (4°C) を 15 分間反応させ固定した。PBS により 2 回洗浄後、ALP 染色液を室温で 15 分間反応させ、発色を確認した。細胞を水道水で洗浄後、乾燥した。

<ALP 染色液調製法 (用時調製) >

・ナフトール AS-MX リン酸塩溶液	ナフトール AS-MX リン酸塩 1% N,N-ジメチルホルムアミド	3 mg 0.5 ml
・ALP 染色液	ナフトール AS-MX リン酸塩溶液 ファストブルーBB 塩 Tris-HCl 溶液 [pH 8.0]	0.5 ml 50 mg 50 ml
		(攪拌後、濾過)

2-11-2. ALP 活性定量法

分化誘導後 7 日目に、培養細胞を PBS により 2 回洗浄した後、下記の ALP 細胞溶解バッファーに懸濁した。細胞をホモジナイザー (バイオマッシャー、nippi) 付属のマイクロチューブに回収し、凍結融解処理 (-80°C で凍結 15 分間、室温で融解 15 分間、以上を 3 サイクル)、超音波処理 (4°C、30 秒間 ON、30 秒間 OFF、5 サイクル)、バイオマッシャーによる破碎を行い細胞破碎液を得た。ラボアッセイ ALP キットにより ALP 活性を、DC プロテインアッセイ (Bio-Rad) により総タンパク質量を定量した。プロトコールは各々のメーカーの提供するものに従った。ALP 活性を総タンパク質量で除して、タンパク質量あたりの ALP 活性を算出した。

<ALP 細胞溶解バッファー調製法>

・ALP 細胞溶解バッファー	1M Tris-HCl [pH 8.0]	600 μ l
	1M 塩化マグネシウム水溶液	600 μ l
	Triton X	25 μ l
	超純水	46.3 ml

2-12. 石灰化の評価

培養した頭蓋冠細胞および損傷組織間葉系細胞による石灰化をアリザリンレッド S (ARS) 染色法により評価した。培養細胞を分化誘導後 14 日目 (損傷組織間葉系細胞) または 21 日目 (頭蓋冠細胞) に 4% PFA (4°C) を 15 分間反応させ固定した。下記用量で調製した ARS 染色液で室温で 20 分間染色した。細胞を超純水で洗浄後、乾燥させた。

定量に際して、上記の染色した培養細胞に 10%酢酸水溶液を添加し、石灰化物を溶解した。培養細胞ごと溶液をマイクロチューブに回収し、85°Cにて 10 分間加熱した後、20,000 \times g、15 分間の条件で遠心分離した。上清を別のマイクロチューブに回収、1/5 量の 10%アンモニア水により中和した。その内 150 μ l を 96 ウェルプレートに分注した。マイクロプレートリーダー (iMark、Bio-Rad) により 405 nm の吸光度を測定した。下記に示す ARS バッファーで希釈した ARS の吸光度を基準とし、各サンプルの石灰化度を定量的に評価した。

<ARS 染色液調製法>

・ARS 染色液	アリザリンレッド S	2 g
	超純水 (42°C)	100 ml
	(酢酸またはアンモニア水により pH を 4.2 に調製後濾過)	

<ARS バッファー調製法>

・ARS バッファー	10%酢酸水溶液	30 ml
	10%アンモニア水	約3 ml
	(アンモニア水により pH を 4.2 に調製)	

2-13. 細胞増殖の評価

分化誘導後7日の培養細胞に BrdU を添加した(終濃度 10 μ M)。4時間取り込ませた後、培地を吸引し細胞を乾燥させた。細胞増殖 ELISA、BrdU 化学発光キット (Roche) を用いて、メーカーの提供するプロトコールに従い細胞増殖を定量的に評価した。

2-14. フローサイトメトリー法

細胞の採取後、解析終了まで全ての手順を 4°Cにて行った。試薬の希釈や細胞の洗浄には FACS バッファー (5%FBS、PBS) を用い、洗浄は2回ずつ行った。

細胞を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1.0×10^6 個以下の個数分取し、洗浄した後、1/2000 に希釈した ethidium monoazide bromide (EMA) 100 μ l を添加し、10 分間遮光状態で死細胞を標識した。洗浄後、1/100 に希釈した抗 CD16/32 抗体 (93、Biolegend) 40 μ l を添加し、10 分間蛍光灯を照射してブロッキングした。1/50 に希釈した抗体溶液を 10 μ l 添加し、遮光状態で 20 分間反応させた。二次抗体や蛍光標識ストレプトアビジンを用いた多段階の染色を行った際には、洗浄後 1/80 に希釈した抗体溶液を 20 分間反応させた。洗浄後、FACS CANTO II (BD Bioscience) を用いてデータを取得し、FlowJo ソフトウェア (TREE STAR) によって解析を行った。

細胞表面分子の解析に以下の抗体を用いた。抗マウス CD3 ϵ (145-2C11、eBioscience)、CD11b (M1/70、Biolegend および eBioscience)、CD31 (390、eBioscience)、CD34 (RAM34、eBioscience)、CD45 (30-F11、Biolegend および eBioscience)、CD140 α /PDGFR α (APA5、eBioscience)、CD184/CXCR4 (2B11、eBioscience)、CD196/CCR6 (140706、BD Pharmingen)、Sca-1 (D7、eBioscience)、TCR $\gamma\delta$ (GL3、eBioscience)、TCR V γ 1 (2.11、Biolegend)、TCR V γ 4 (UC3-10A6、Biolegend)、TCR V γ 5 (536、Biolegend)、Ter119 (TER-119、eBioscience)、17D1 (Dr. Tigelaar よりご供与)、抗ラット IgM (MRM-47、Biolegend)、蛍光標識ストレプトアビジン (Biolegend、eBioscience および BD Pharmingen)。

2-15. 図中の画像データの表示

図中のマイクロ CT 画像、顕微鏡写真、細胞培養のウェルの写真、フローサイトメトリー法のドットプロット、ヒストグラムは複数回の実験のうち、典型的な結果を表示した。

2-16. 統計解析法

2 群間の比較には Student の t 検定を適用した。多群間の比較に際しては、analysis of variance (ANOVA) 法による分散分析と Dunnett 検定または Tukey 検定による多重比較を行った。Dunnett 検定を行う際、非処置群を基準とした。解析に適用した検定法はそれぞれの図に示す。 P 値が 0.05 未満である場合、統計的に有意な差があると判定した。グラフの*は P 値が 0.05 未満であることを示し、NS は P 値が 0.05 以上であることを示す。全ての解析において、データは平均値 \pm 標準誤差で表した。

第三章 結果

3-1. 損傷後骨周囲組織で IL-17A の発現が上昇する

はじめに、骨損傷に伴い損傷組織でどのような炎症反応が誘導されるかを解析するため、骨孔形成術により野生型マウスの大腿骨と骨周囲組織に損傷を施した。そして、損傷部位で急性炎症期にどのようなサイトカインの発現が誘導されるか、特に T 細胞の機能に関連する IFN- γ 、IL-4、IL-17A、IL-17F、IL-22 について、リアルタイム RT-PCR 法より解析した。その結果、*Ifng*、*Il4*、*Il17f*、*Il22* の発現は骨髄においても骨周囲組織においても顕著な上昇を認めなかった (図 10a)。一方、*Il17a* の発現は、骨髄では有意な増加が認められなかったが、骨周囲組織では損傷後 2 日目で有意に増加していた (図 10a)。また、*Il17a* と *Il17f* の発現量を比較したところ、損傷後 2 日目における骨周囲組織中の *Il17a* は *Il17f* より有意に高かった (図 10b)。以上より、骨損傷後の急性炎症期に IL-17A の発現が上昇し、組織の炎症や再生に寄与している可能性が考えられた。

3-2. IL-17A は骨再生を促進する

次に、損傷部に誘導された IL-17A が損傷後、骨再生に関与する可能性について検証を行った。マイクロ CT により野生型マウスおよび *Il17a*^{-/-}マウス大腿骨に生じた骨孔の閉鎖を評価した。その結果、*Il17a*^{-/-}マウスでは損傷後 14 日と 21 日の時点で野生型マウスと比較して閉鎖が有意に遅延していた。(図 11a,b)。さらに、骨孔部に新たに形成された骨組織の骨密度を計測したところ、損傷後 21 日の時点で *Il17a*^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して有意に低かった (図 11c,d)。 *Il17f*^{-/-}マウスを用いて同様の検討を行ったところ、骨孔閉鎖及び新生骨の骨密度に有意な差を認めなかった (図 12a - d)。

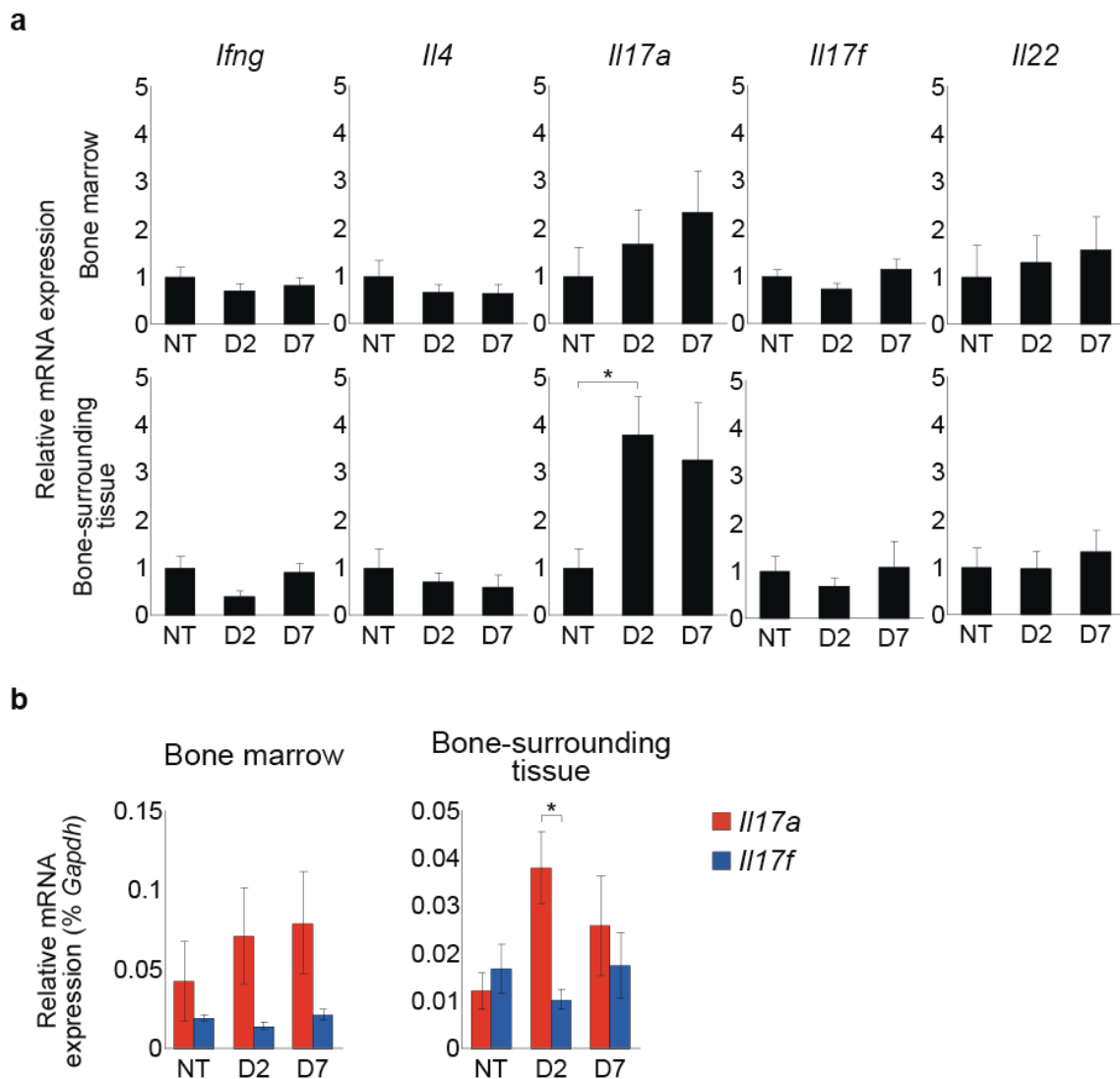


図10 骨損傷後速やかに骨周囲組織で *Il17a* の発現が上昇する。
 野生型マウスにおける炎症性サイトカインの mRNA 発現解析。(N=3~6) エラーバーは標準誤差を示す。**a.** 上段：骨髄細胞、下段：骨周囲組織の細胞。One way ANOVA 法および Dunnett 検定により各群のサイトカイン発現の有意差検定を行った。**b.** *Gapdh* を基準とした *Il17a* と *Il17f* の発現量の比較。左：骨髄細胞、右：骨周囲組織の細胞。Student の *t* 検定により、各タイムポイントでサイトカイン発現の有意差検定を行った。* $P < 0.05$ 。
 NT：非処置、D2~D7：損傷後2~7日。

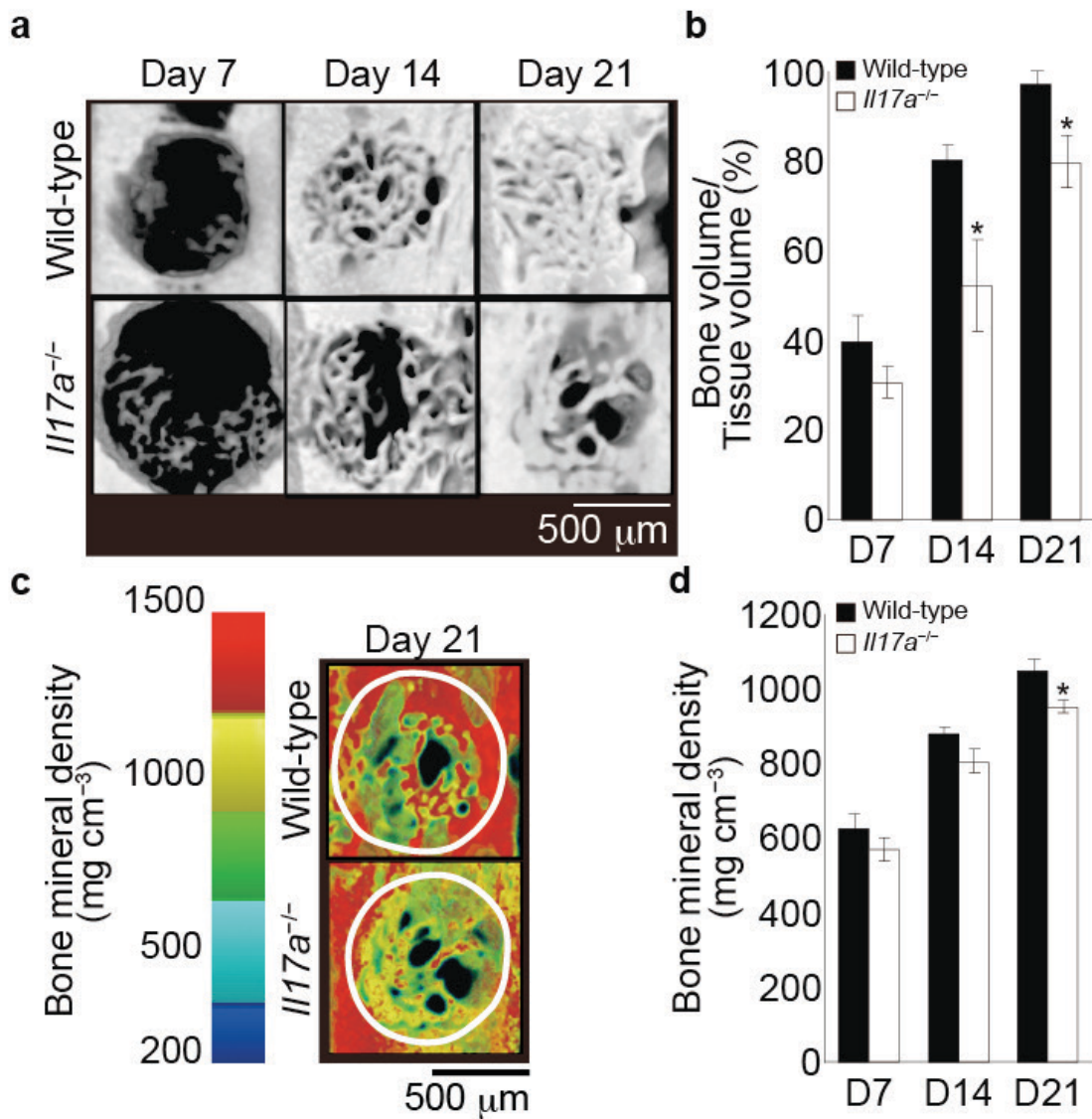


図11 *Il17a*^{-/-}マウスでは骨孔閉鎖の遅延と新生骨の骨密度低下が認められる。マイクロCTを用いた骨再生の解析。野生型マウスおよび*Il17a*^{-/-}マウスについて、損傷後7~21日に評価した。**a.** 骨孔部のマイクロCT画像。**b.** 骨孔閉鎖の定量的評価。骨欠損の体積あたりの新生骨の体積の割合を示す。**c.** マイクロCTデータから作成した骨密度画像。白線は骨孔の外形線を示す。**d.** 新生骨の骨密度の定量的評価。(N=4~8) エラーバーは標準誤差を示す。**b,d.** Studentのt検定により、各タイムポイントのパラメータの有意差検定を行った。*P<0.05。D7~D21: 損傷後7~21日。

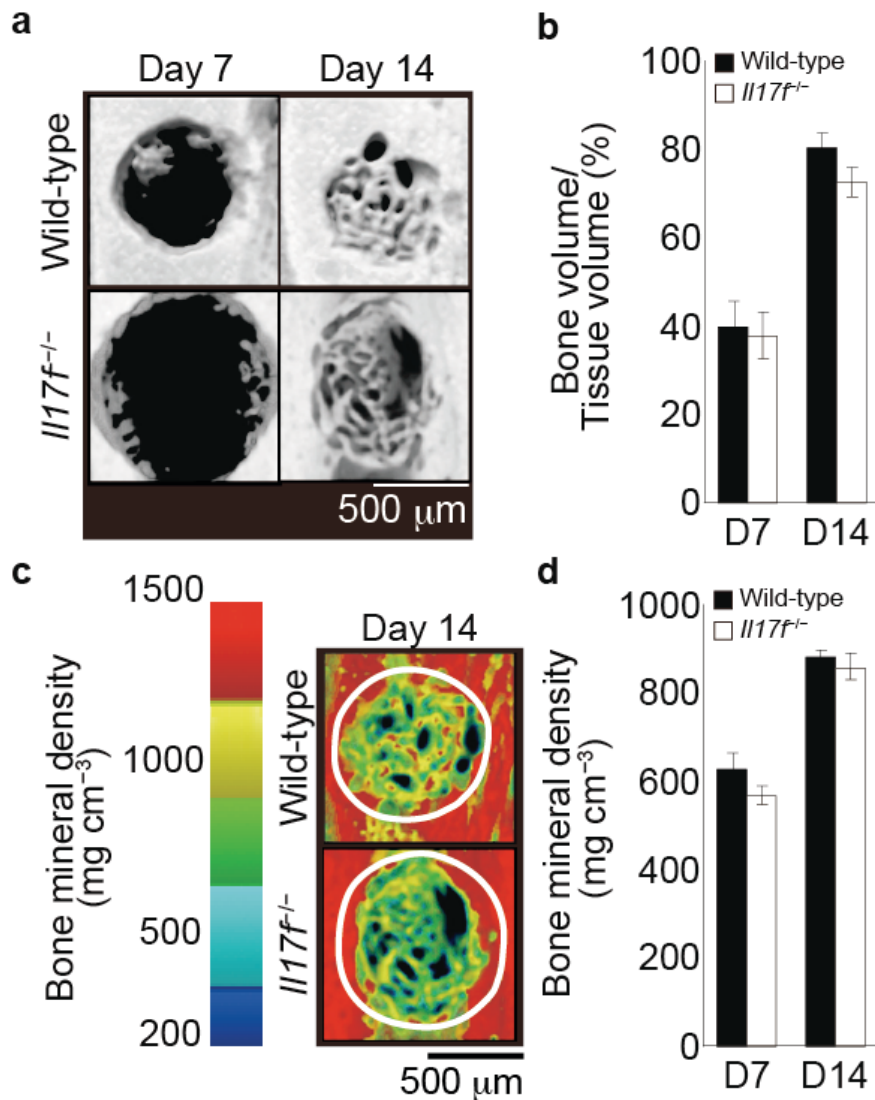


図12 *Il17f^{-/-}*マウスの骨孔閉鎖と新生骨の骨密度は野生型マウスと差がない。マイクロCTによる骨再生の解析。野生型マウスおよび*Il17f^{-/-}*マウスについて、損傷後7日および14日に評価した。**a.** 骨孔部のマイクロCT画像。**b.** 骨孔閉鎖の定量的評価。骨欠損の体積あたりの新生骨の体積の割合を示す。**c.** マイクロCTデータから作成した骨密度画像。白線は骨孔の外形線を示す。**d.** 新生骨の骨密度の定量的評価。(N=4~8) エラーバーは標準誤差を示す。**b,d.** Studentのt検定により、各タイムポイントのパラメーターの有意差検定を行った。D7、D14：損傷後7日、14日。

$Il17a^{+}$ マウスにおける骨再生の遅延が、骨形成や骨吸収の異常によるものである可能性を考え、野生型マウスと $Il17a^{+}$ マウスの骨再生を組織学的に解析した。まず、HE 染色法により骨芽細胞による骨形成を評価したところ、骨孔部に新たに形成された幼弱な骨組織は、野生型マウスの方が $Il17a^{+}$ マウスよりも肥厚していた (図 13a)。また、これらの組織像で骨孔中に軟骨組織は認めなかった (図 13a)。IL-17A の骨形成への作用を定量的に評価するために、骨形態計測法により新生骨の骨芽細胞面を計測した。その結果、II 型骨芽細胞が骨面に占める割合 (type II osteoblast surface/ bone surface) は野生型マウスの方が $Il17a^{+}$ マウスよりも有意に高いことを見出した (図 13b, c)。IL-17A は関節リウマチや歯周炎といった、炎症により骨吸収の起こる疾患において破骨細胞の分化を誘導することが知られており、骨折治癒でも破骨細胞分化に IL-17A が影響することが予想された。しかしながら、野生型マウスと $Il17a^{+}$ マウスとの間で骨吸収面 (eroded surface/ bone surface) や破骨細胞数 (number of osteoclast/ bone surface) に有意な差は認められなかった (図 14a, b)。以上より、IL-17A は骨損傷後、破骨細胞分化には影響を与えず、骨芽細胞を活性化することにより、骨再生を促進していることが明らかになった。

3-3. PDGFR α ⁺Sca-1⁺CD45⁻Ter119⁻ (P α S) 細胞を含む間葉系細胞集団が骨再生部位に集積する。

次に、野生型マウスの損傷後7日の組織染色像を観察したところ、この時点で血腫は消失し、骨孔部には細胞質に富む間葉系細胞が充満していた (図 15a)。この骨孔部を満たす間葉系組織と周囲組織との連続性を注意深く観察した。その結果、損傷部の間葉系組織と骨格筋の間質の境界は不明瞭で、連続していた (図 15b)。同様に、骨膜とも連続

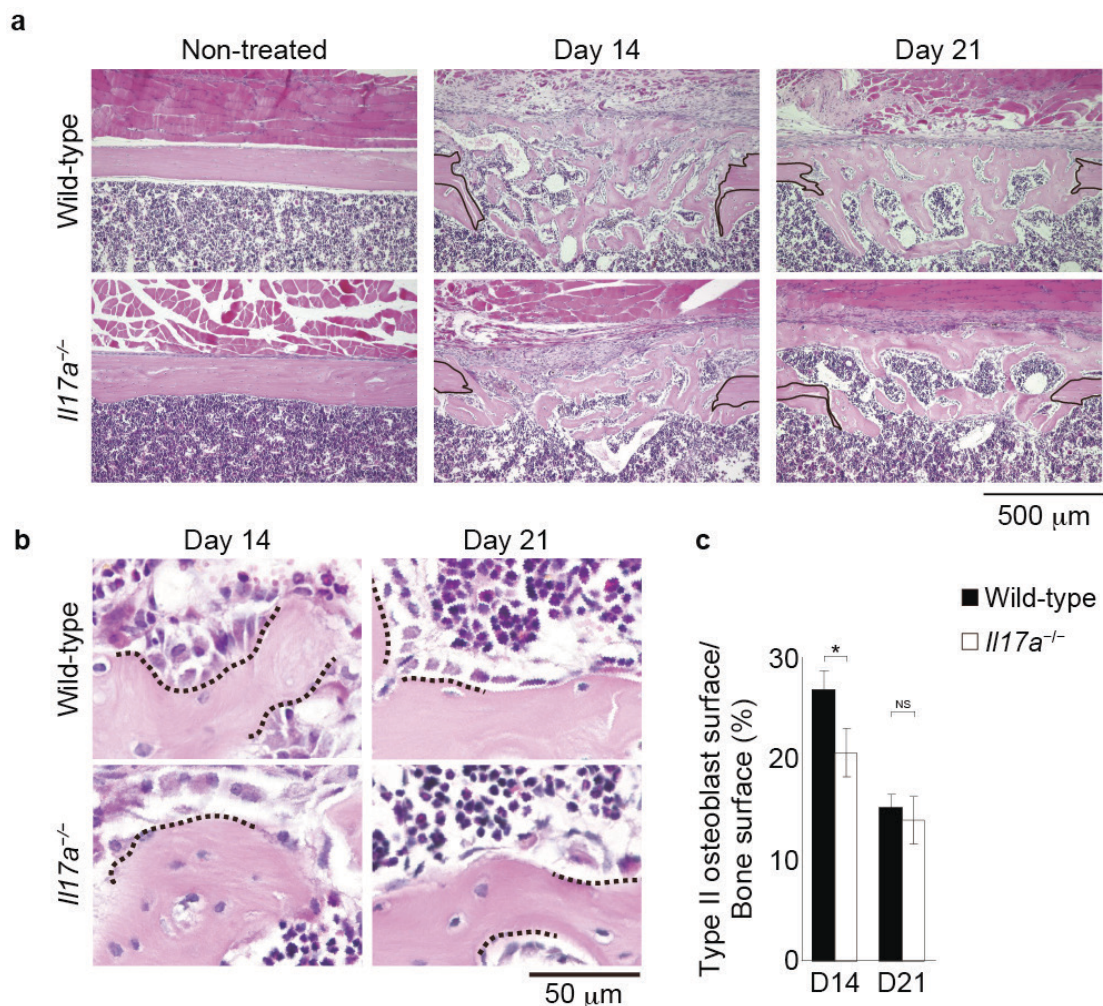


図13 *Il17a*^{-/-}マウスの骨再生においては骨芽細胞の活性が低下する。大腿骨の長軸方向のパラフィン切片をHE染色法により染色し、骨芽細胞による骨形成を評価した。**a.** 骨孔部の全体像。実線は骨孔の外形線を表す。**b.** 骨形成部の拡大像。点線はII型骨芽細胞面を示す。**c.** HE染色像をもとに骨面あたりのII型骨芽細胞面の割合を算出した。各群N=3で、1体につき6枚の異なる切片を染色、計測した。エラーバーは標準誤差を示す。Studentのt検定により各タイムポイントの骨形成パラメーターの有意差検定を行った。*P<0.05、NS：有意差無し。D14~D21：損傷後14~21日。

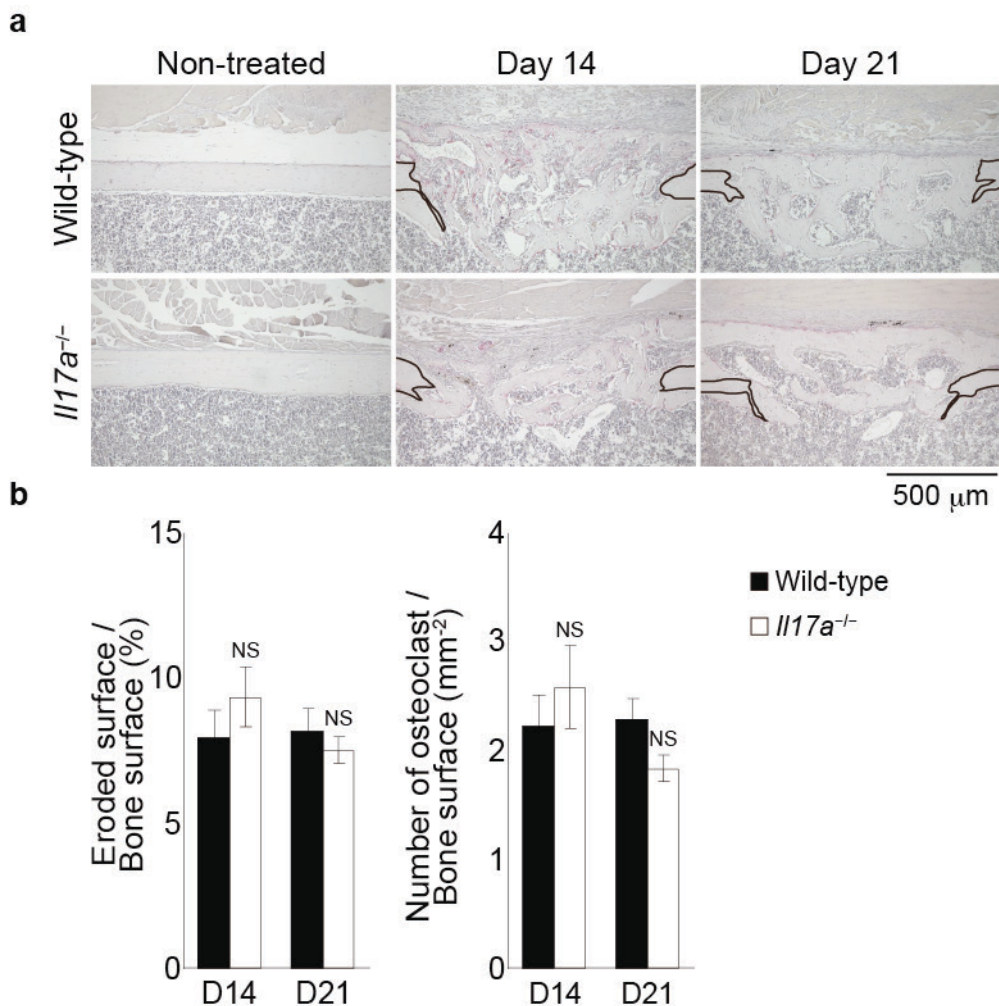


図 14 骨再生過程の骨吸収には野生型マウスと *Il17a*^{-/-}マウスで差は認められない。
a.大腿骨の長軸方向のパラフィン切片を TRAP 染色法により染色し、破骨細胞による骨吸収を評価した。実線は骨孔の外形線を表す。**b.** 骨形態計測法により骨吸収面と破骨細胞数を算出した。各群 N=3 で、1 体につき 4~6 枚の異なる切片を染色、計測した。エラーバーは標準誤差を示す。Student の *t* 検定により各タイムポイントの骨吸収パラメーターの有意差検定を行った。NS：有意差無し。D14~D21：損傷後 14~21 日。

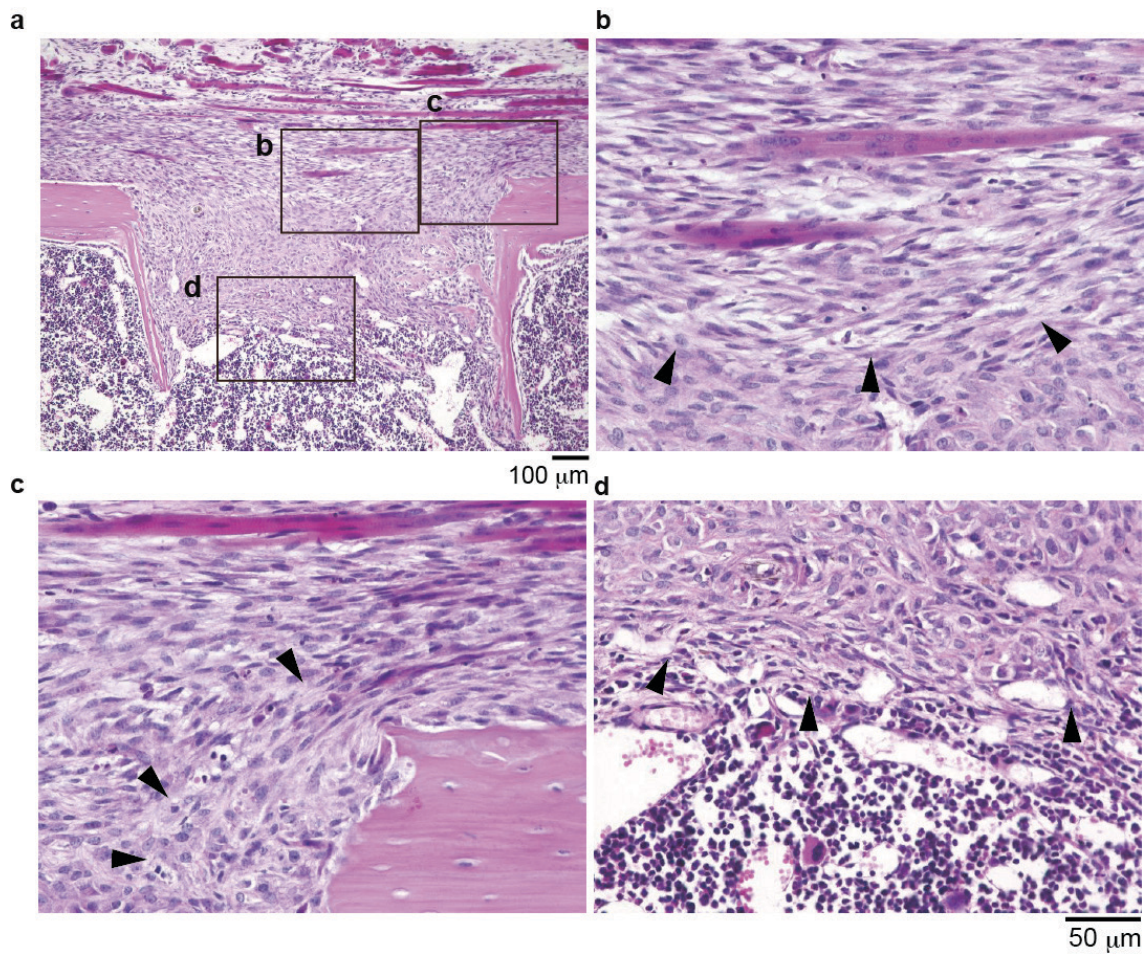


図 15 骨孔部を満たす間葉組織は骨格筋の間質と骨膜に連続する。
 損傷後 7 日の野生型マウス大腿骨の組織染色像。パラフィン切片を HE 染色法により染色した。**a.** 間葉系細胞で満たされた骨孔部の全体像。**b ~ d** の長方形で囲まれた領域を拡大した。**b.** 増殖している骨格筋の間質細胞と骨孔部の間葉系細胞との境界部。**c.** 肥厚している骨膜と骨孔部の間葉系細胞との境界部。**d.** 骨髄と骨孔部の間葉系細胞との境界部。矢頭は境界部を示す。

性が認められた (図 15c)。一方、骨髄細胞とは連続性が認められなかった (図 15d)。

次に、この損傷部の間葉系細胞の性質を明らかにするために、野生型マウスおよび *Il17a*⁺マウスの骨周囲組織より細胞を調製し、フローサイトメトリー法により細胞表面分子の発現を解析した。損傷前後の骨周囲組織中の CD45⁻CD11b⁻CD34⁻TER119⁻CD31⁻間葉系細胞 (図 16a,c) の細胞表面マーカーを解析した。この間葉系細胞集団が骨周囲組織の全細胞に占める割合に、遺伝子型やタイムポイントによる有意な差は認めなかった (図 16a, c)。近年、マウス骨髄中に含まれる PDGFR α ⁺Sca-1⁺CD45⁻TER119⁻細胞中には間葉系幹細胞が多く含まれることが報告され、これらの細胞は P α S 細胞と呼ばれている⁷³。骨周囲の間葉系細胞集団における PDGFR α および Sca-1 の発現を解析したところ、野生型マウスと *Il17a*⁺マウスの両方で PDGFR α ⁺Sca-1⁺細胞を認めた (図 16b,c)。以上より、骨周囲組織には間葉系幹細胞が含まれ、これらの細胞が骨再生に寄与していることが示唆された。間葉系細胞中の P α S 細胞の割合を解析したところ、野生型マウスと *Il17a*⁺マウスとの間に差は認められなかった (図 16b, c)。このことから、IL-17A は、間葉系細胞の損傷部への集積には関与していないと考えられた。

これまでに、末梢血中の骨芽細胞前駆細胞が CXCR4 を発現することや、骨折部位で CXCL12 の発現が上昇すること、そして、CXCL12 の中和抗体や CXCR4 のアンタゴニストにより仮骨形成が低減することから、CXCL12–CXCR4 相互作用が骨折治癒を促進すると考えられている^{22,27,74}。また、IL-17A が腫瘍の転移巣での CXCL12 の発現を誘導することも報告されている⁷⁵。このことから損傷組織中で IL-17A が、CXCL12 発現誘導を介して CXCR4⁺P α S 細胞の集積を引き起こしている可能性を想定した。解析の

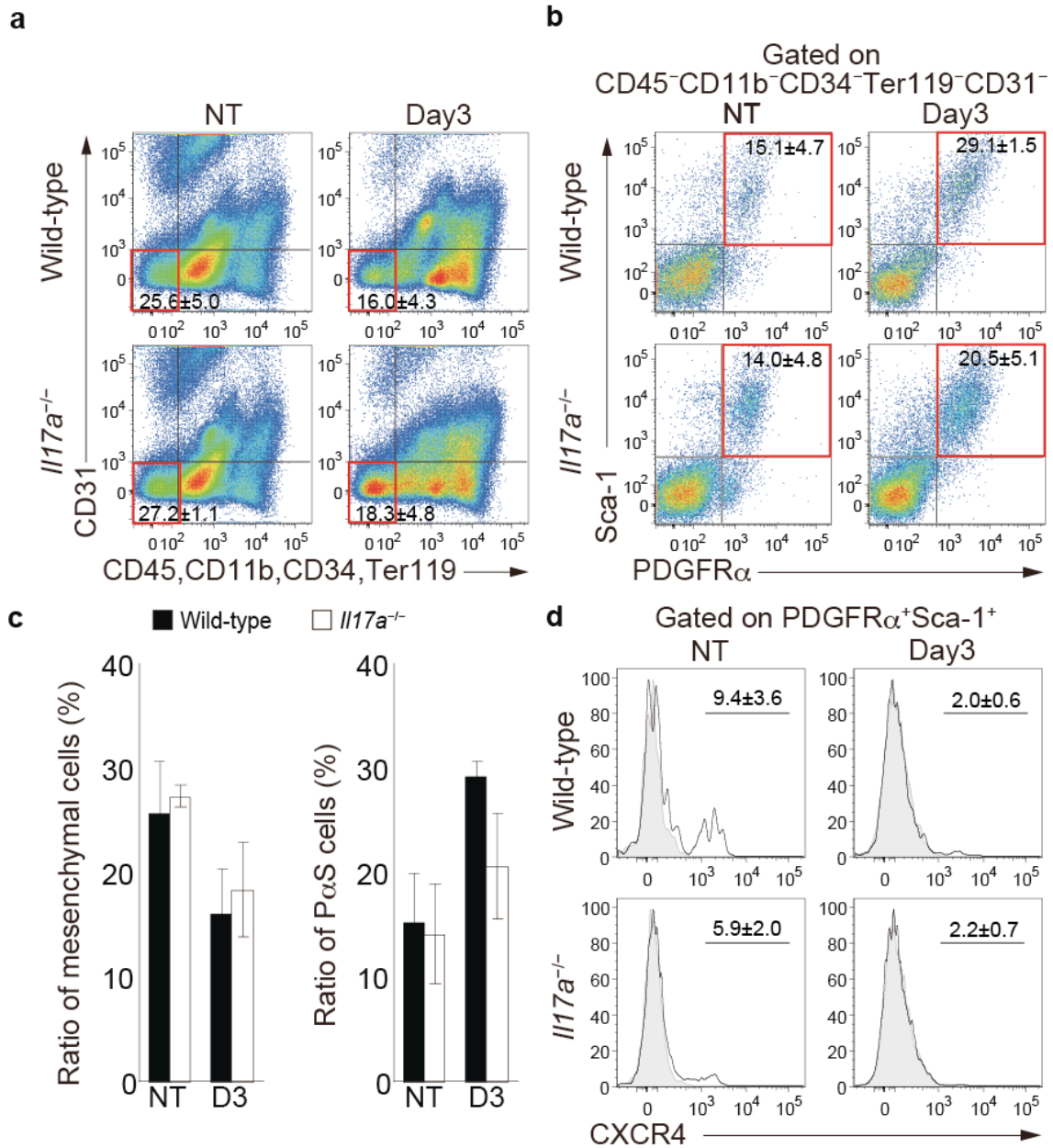


図 16 骨周囲の間葉系細胞には P α S 細胞が含まれる。

骨周囲組織より得られた細胞をフローサイトメトリー法により解析した。(各群 N=3)

a. 間葉系細胞の集団をドットプロットにより表示した。**b.** 間葉系細胞中の P α S 細胞集団をドットプロットにより示した。**c.** **a** および **b** より得られた細胞の割合をグラフにより示した。エラーバーは標準誤差を示す。Two way ANOVA 法および Tukey 検定により、細胞の割合の有意差検定を行った。**d.** P α S 細胞中の CXCR4⁺細胞集団をヒストグラムにより示した。灰色のヒストグラムはアイソタイプコントロール抗体で標識されたサンプル、実線は抗 CXCR4 抗体を用いて標識されたサンプルをそれぞれ表す。NT : 非処置、D3 : 損傷後 3 日。

結果、CXCR4⁺PαS 細胞の割合は野生型マウス、*Il17a*⁺マウス共に損傷前後のどちらでも低く、骨再生過程で CXCL12–CXCR4 シグナルは間葉系幹細胞の損傷部への集積には殆ど関与しないことが明らかになった (図 16d)。

3-4. IL-17A は損傷組織の間葉系細胞に直接作用し、細胞増殖と骨形成を促進する

損傷組織の間葉系細胞は IL-17A の受容体である IL-17RA および IL-17RC を発現することを認めたため (図 17a)、IL-17A が損傷組織間葉系細胞に直接作用を示すことが予想された。また、IL-17A は他のサイトカインやケモカインの発現を制御することが知られており⁷¹、それらのサイトカインの中で IL-6 や TNF は *in vitro* で骨形成制御に関与し (表 1)、骨折治癒を促進することも知られている^{24,33,34}。このことから、IL-17A が IL-6 や TNF を介して間接的に骨再生を誘導する可能性も考えられた。リアルタイム RT-PCR 法により、骨周囲組織における IL-6 および TNF の発現を野生型マウスと *Il17a*⁺マウスとで比較したところ、野生型マウスと *Il17a*⁺マウスとの間で有意な差を認めなかった (図 17b)。このことから、骨再生過程では IL-17A は IL-6 や TNF に依存しない経路によって治癒を促進していることが示された。

次に、IL-17A が損傷組織間葉系細胞による骨形成に与える影響を検討した。野生型マウスの両側大腿骨に 2 箇所ずつ骨孔を形成し、3 日後に損傷組織細胞を採取した。これらの細胞より CD45⁺血球系細胞を除去し、間葉系細胞を単離した。この間葉系細胞を骨芽細胞分化誘導培地中で骨芽細胞に分化誘導し、IL-17A の作用を評価した。ALP の活性は BMP-2 の有無にかかわらず、IL-17A の添加により上昇を示した (図 17c)。また、ARS 染色法により石灰化を評価したところ、IL-17A の添加により石灰化が促進し

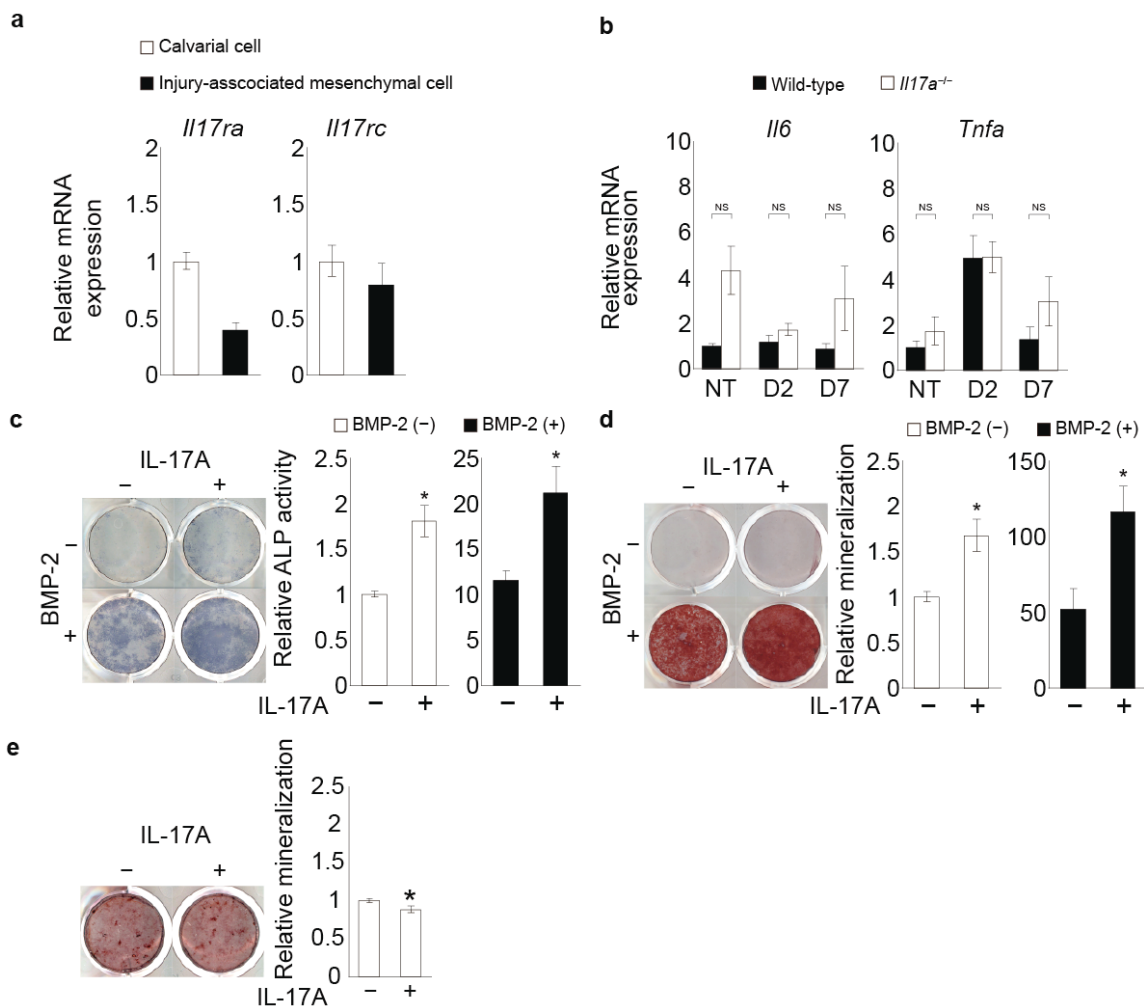


図 17 IL-17A により損傷組織間葉系細胞の石灰化能は促進される。

a. マウス新生仔頭蓋冠細胞および損傷組織間葉系細胞の IL-17 受容体の mRNA 発現解析。(各群 N=3) **b.** 野生型マウスおよび *Il17a*^{-/-}マウスの骨周囲組織細胞における炎症性サイトカインの mRNA 発現解析。(各群 N=3) Student の t 検定により、各タイムポイントの遺伝子発現の有意差検定を行った。 **c - e.** 培養細胞を用いた骨芽細胞分化誘導実験。IL-17A、BMP-2 存在下での骨芽細胞分化を解析した。-は終濃度 0 ng ml⁻¹、+は終濃度 50 ng ml⁻¹ (IL-17A)、または 500 ng ml⁻¹ (BMP-2) を表す。 **c.** 損傷組織間葉系細胞の分化誘導後 7 日の時点での ALP 染色および ALP 酵素活性の定量。 **d.** 損傷組織間葉系細胞の分化誘導後 14 日の時点での ARS 染色および石灰化度の定量。 **e.** マウス新生仔頭蓋冠細胞の分化誘導後 21 日の時点での ARS 染色および石灰化度の定量。(各群 N=3) Student の t 検定により、ALP 活性と石灰化度の有意差検定を行った。各グラフのエラーバーは標準誤差を示す。*P<0.05、NS : 有意差無し。NT : 非処置、D2、D7 : 損傷後 2、7 日。

た (図 17d)。このことから、IL-17A は損傷部の間葉系細胞による骨形成を直接促進することが示された。

最近、ラットの新生仔頭蓋冠細胞の骨芽細胞分化に際し、IL-17A が石灰化を抑制するという報告がなされた²⁶。確かに、私がマウスの新生仔頭蓋冠細胞を用いても、IL-17A による石灰化抑制が確認できた (図 17e)。この結果は上記の損傷組織間葉系細胞への作用と正反対である。以上より、IL-17A は同じ間葉系の細胞でも、標的細胞の違いに応じて異なる作用を発揮しうると考えられた。

次に、IL-17A による骨形成促進機構を検討した。リアルタイム RT-PCR 法により骨芽細胞分化に必須の転写因子 *Runx2* および *Sp7* (*Osterix*) の発現を検討したところ、どちらの転写因子の発現も IL-17A の影響を受けないことが確認された (図 18a)。そこで、細胞増殖に対する IL-17A の効果を BrdU の取り込み法により検討したところ、IL-17A の添加により損傷組織間葉系細胞の増殖の亢進が認められた (図 18b)。さらに、マウスに BrdU を投与することにより、*in vivo* レベルでの細胞増殖を評価したところ、野生型マウスと比較して、*Il17a*⁺マウスでは骨欠損中の細胞の増殖が有意に抑えられていることが判明した (図 18c)。以上より、IL-17A は損傷組織間葉系細胞に直接作用して、細胞増殖を促進させることが示された。次に、IL-17A による細胞増殖促進のメカニズムを遺伝子発現解析により検討した。Cyclin-dependent kinase (Cdk) は細胞周期を進行させる酵素で、Rb タンパク質をリン酸化し転写因子 E2F を遊離させることにより、細胞周期の各チェックポイントの通過を促進する。Cdk ファミリーの内、Cdk2、Cdk4、Cdk6 は G1 期から S 期への進行を、Cdk1 は G2 期から M 期への進行を正に制御する⁷⁶。Cdk の活性化には cell division cycle 25 (Cdc25) ファミリーによる脱リン酸化が必要である⁷⁷。

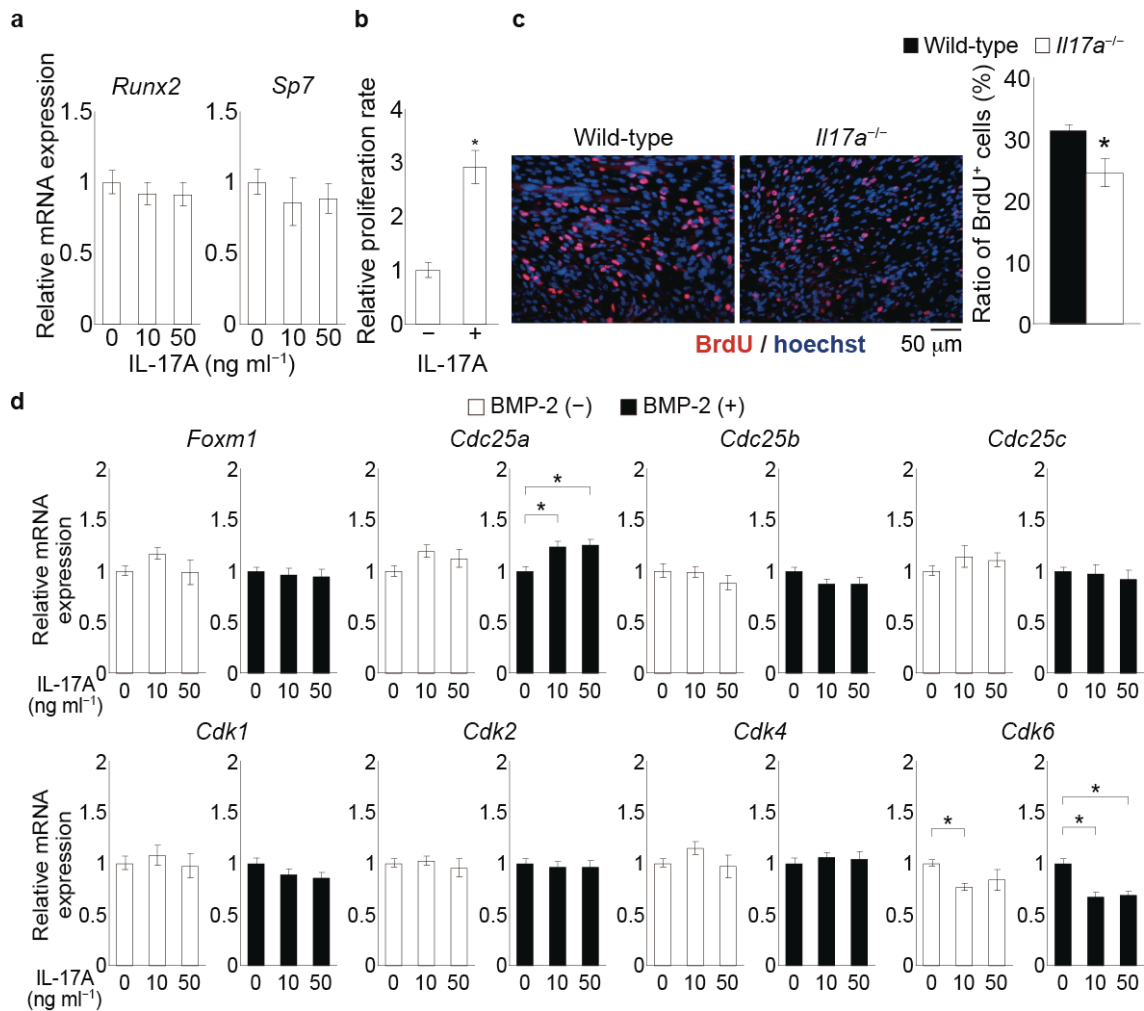


図 18 IL-17A は損傷組織間葉系細胞の増殖を促進する。

a. 損傷組織間葉系細胞の骨芽細胞分化誘導後 7 日の時点での *Runx2* と 14 日の時点での *Sp7* の mRNA 発現。(各群 N=3) **b.** 損傷組織間葉系細胞の細胞増殖の定量解析。骨芽細胞分化誘導後 7 日に BrdU を 4 時間取り込ませ、取り込み量を定量的に解析した。(各群 N=3) - は終濃度 0 ng ml⁻¹、+ は終濃度 50 ng ml⁻¹ を表す。 **c.** *In vivo* における IL-17A の細胞増殖への影響の評価。野生型マウスおよび *Il17a*^{-/-} マウスに骨損傷を施し、7 日の時点での BrdU の取り込みを免疫組織化学染色法により検出した。各群 N=3 で、1 体のマウスにつき異なる 2 枚の切片を解析した。 **d.** 損傷組織間葉系細胞の骨芽細胞分化誘導後 7 日の時点での細胞周期関連遺伝子の mRNA の発現解析。BMP-2 (-) は終濃度 0 ng ml⁻¹、(+) は 500 ng ml⁻¹ を表す。(各群 N=3) 各グラフのエラーバーは標準誤差を示す。 **a, d.** One way ANOVA 法および Dunnett 検定により、遺伝子発現の有意差検定を行った。 **b, c.** Student の *t* 検定により、BrdU 取り込みの有意差検定を行った。*P<0.05。

Forkhead box protein M1 (FOXM1) は Cdc25A および Cdc25B の活性化により細胞周期の進行を促進することが報告されている⁷⁸。そこで損傷組織間葉系細胞における、Cdk ファミリー、Cdc25 ファミリー、および FOXM1 の発現変動を解析した。IL-17A の添加により、*Foxm1* の発現に変化は認められず、Cdc25 ファミリーのうち、*Cdc25a* のみ発現上昇が認められた (図 18d)。このことから、IL-17A により *Cdc25a* の発現が上昇し、細胞増殖が亢進している可能性が考えられた。また、Cdk ファミリーの中で発現上昇を示したものはなく、*Cdk6* の発現は逆に低下していた (図 18d)。Cdk ファミリー分子の中には、細胞増殖以外の作用を有する分子がある^{79,80}。*Cdk6* は、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞では細胞増殖には影響せず、石灰化抑制に寄与していると報告されている⁸¹。損傷部の間葉系細胞でも同様に、IL-17A が *Cdk6* の発現を抑制することにより石灰化の抑制が解除され、結果として石灰化が促進される可能性が考えられる。

3-5. 損傷部周囲の V γ 6⁺ γ δ T 細胞が骨再生における IL-17A の産生源である

骨損傷後、損傷部で IL-17A を産生する細胞は何であろうか。*Il17a* 遺伝子の 3' 部分に IRES-GFP を組み込んだ IL-17A レポーターマウス (*Il17a^{ires/gfp}* マウス) を用いてこの問題にアプローチした。まず、このマウスに骨損傷を施した後に凍結切片を作製し、GFP に対する免疫組織化学染色を行った。IL-17A 産生の指標となる GFP 陽性細胞の骨および周囲組織への浸潤を評価したところ、損傷後 2 日の時点で骨孔周囲および損傷した骨格筋に GFP 陽性細胞の浸潤を認めた (図 19a,b)。対照的に、骨髄内には GFP 陽性細胞は殆ど認められなかった (図 19a)。フローサイトメトリー法により、損傷組織に浸潤する GFP 陽性細胞の表面分子の発現を解析した。その結果、これらの細胞の大部分は

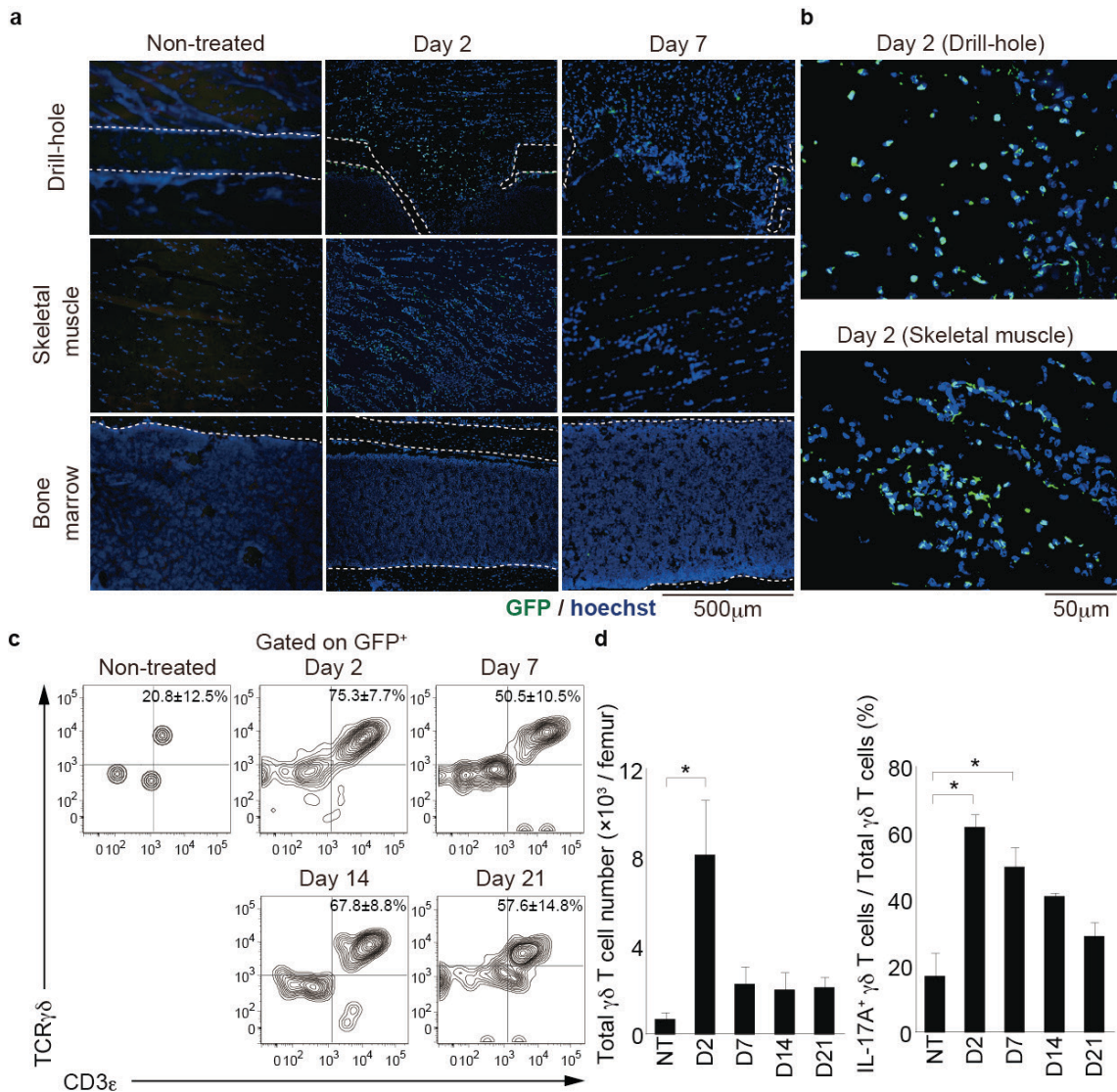


図 19 損傷組織において、IL-17A を産生する $\gamma\delta$ T 細胞が増加する。

a, b. *Il17a^{sfv/sfv}* マウス大腿骨の凍結切片を用いた GFP に対する免疫組織化学染色。 **a.** 骨孔周囲、損傷骨格筋、骨髄の弱拡大像。白点線は皮質骨を示す。 **b.** 損傷後 2 日の時点での骨孔部および損傷骨格筋の強拡大像。 **c, d.** 骨周囲組織細胞中の IL-17A 産生細胞 (GFP 発現細胞) をフローサイトメトリー法により解析した。 (N=3~8) エラーバーは標準誤差を示す。 **c.** IL-17A 産生細胞を CD3 ϵ と TCR $\gamma\delta$ の発現により展開した等高線図。 **d.** $\gamma\delta$ T 細胞数および IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の割合。 One way ANOVA 法および Dunnett 検定により、細胞数、細胞の割合の有意差検定を行った。 *P<0.05。 NT : 非処置、D2~D21 : 損傷後 2~21 日。

CD3 ϵ^+ TCR $\gamma\delta^+$ 細胞、すなわち $\gamma\delta$ T 細胞であることが明らかになった (図 19c)。損傷組織中の $\gamma\delta$ T 細胞数は損傷後 2 日の時点で非処置群よりも有意に増加していた (図 19d)。また、全 $\gamma\delta$ T 細胞中における GFP 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の割合も損傷後 2 日目、7 日目で有意な増加を示した (図 19d)。以上より、 $\gamma\delta$ T 細胞が骨損傷後の IL-17A の主たる産生源であり、損傷によって骨周囲で細胞数が増加し、IL-17A 産生が亢進すると考えられた。

多発性硬化症マウスモデルでは、Th17 細胞が産生する IL-17A が中枢神経細胞のケモカイン発現を誘導し、さらなる Th17 細胞の浸潤を促すことが報告されている^{82,83}。そこで、IL-17A 自体が $\gamma\delta$ T 細胞の損傷組織への浸潤に寄与するかを検討した。*Il17a*⁺マウスと野生型マウスの $\gamma\delta$ T 細胞数を比較した結果、*Il17a*⁺マウスでは損傷後 2 日目でむしろ増加しており、IL-17A は損傷組織に $\gamma\delta$ T 細胞を誘導しないことが示された (図 20a)。 $\gamma\delta$ T 細胞において、IL-17A の産生はケモカイン受容体 CCR6 を発現する細胞に限られること、さらに CCR6 とそのリガンドの CCL20 との相互作用が $\gamma\delta$ T 細胞の遊走に寄与することが知られている⁸⁴。骨損傷モデルでも IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞で CCR6 の発現が認められ (図 20b)、CCR6–CCL20 相互作用が $\gamma\delta$ T 細胞の損傷部位への浸潤に関与すると考えられた。しかしながら、骨髄および骨周囲組織において CCL20 の発現は損傷後上昇しなかった (図 20c)。さらに、*Ccr6*⁺マウスでは骨再生の遅延や新生骨の骨密度低下は認められなかった (図 20d - g)。以上より、骨周囲組織中の IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞は CCR6 を発現するものの、CCR6–CCL20 相互作用は骨再生に寄与しないことが示された。

CCR6⁺ $\gamma\delta$ T 細胞は IL-1 受容体と IL-23 受容体を発現し、IL-1 β および IL-23 の刺激により IL-17A を産生することが知られている^{85,86}。骨周囲組織における *Il1b* および *Il23p19* の発現を解析したところ、両サイトカインの発現が損傷後有意に上昇することを

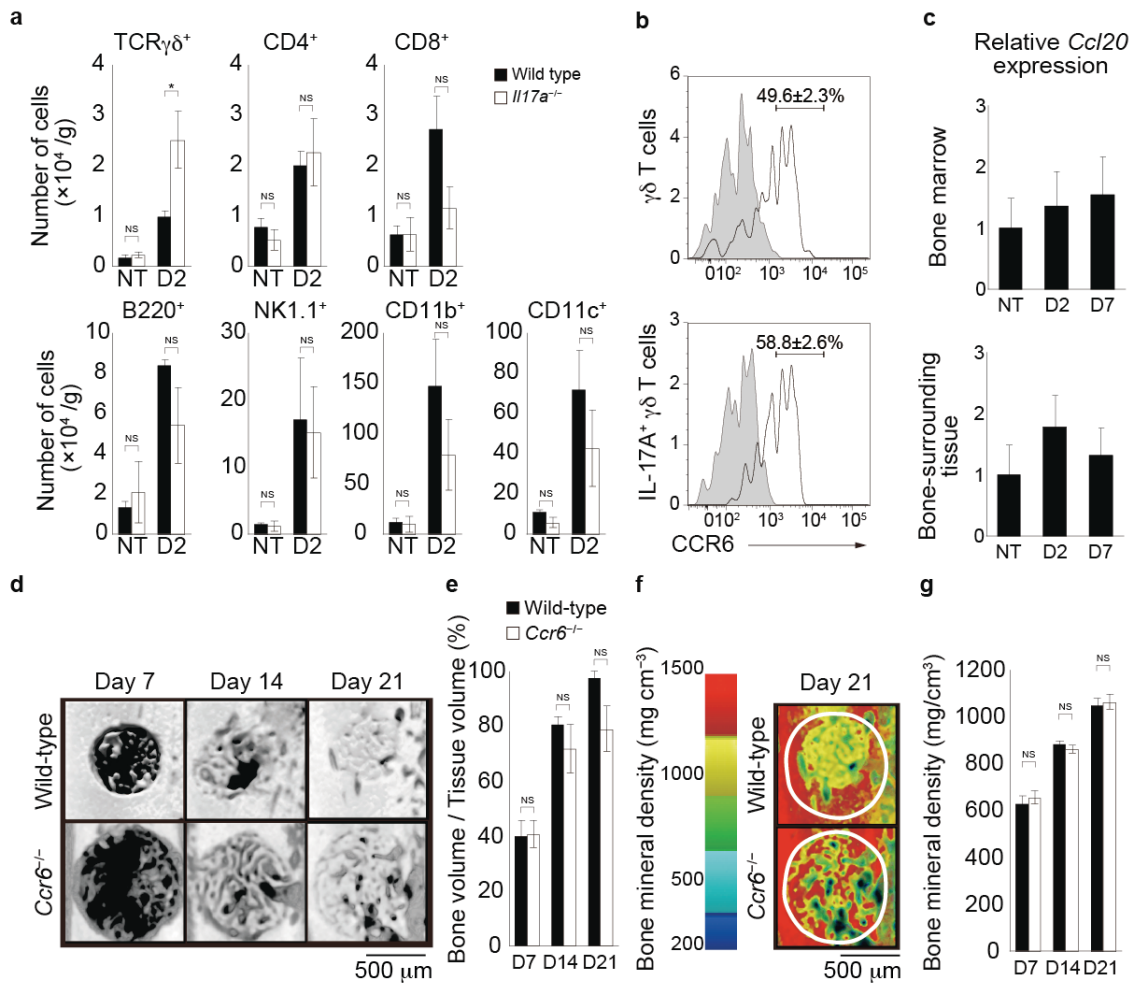


図 20 $\gamma\delta$ T 細胞の損傷部位への集積は IL-17A および CCR6 に依存しない。

a, b. フローサイトメトリー法による骨周囲組織中の細胞の解析。**a.** 野生型マウスと *Il17a*^{-/-}マウスの骨周囲組織に浸潤した免疫細胞数の比較。(N=3~5) Student の *t* 検定により各タイムポイントの細胞数の有意差検定を行った。**b.** 損傷後 2 日の時点での野生型マウス $\gamma\delta$ T 細胞の CCR6 発現を評価した。灰色のヒストグラムはアイソタイプコントロール抗体、実線は抗 CCR6 抗体で標識されたサンプルを表す。(N=4) **c.** 骨髄および骨周囲組織における *Ccl20* mRNA の発現解析。(N=4~7) One way ANOVA 法および Dunnett 検定により、発現量の有意差検定を行った。**d-g.** マイクロ CT による *Ccr6*^{-/-}マウスの骨再生の評価。**d.** 骨孔部の画像。**e.** 新生骨による骨孔閉鎖の定量的評価。**f.** 骨孔部の骨密度画像。白線は骨孔の外形線を示す。**g.** 新生骨の骨密度の定量的評価。(N=4~8) 各グラフのエラーバーは標準誤差を示す。**e, g.** Student の *t* 検定により各タイムポイントのパラメーターの有意差検定を行った。*P<0.05、NS : 有意差無し。NT : 非処置、D2~D21 : 損傷後 2~21 日。

見出した (図 21)。このことから、骨折治癒過程でも IL-17A の産生機構に IL-1 β および IL-23 が関与する可能性が示唆された。

$\gamma\delta$ T 細胞は発現する TCR γ 鎖によりサブセットに分類される。このうち、 $V\gamma 4^+$ 細胞や $V\gamma 6^+$ 細胞が IL-17A を発現することが既に報告されているものの⁶⁵、骨や骨周囲組織に常在あるいは浸潤する $\gamma\delta$ T 細胞サブセットについては報告がない。そこで、骨損傷後に集積する $\gamma\delta$ T 細胞の TCR γ 鎖を解析した。マウス TCR γ 鎖を認識する抗体として、抗 $V\gamma 1$ 抗体、抗 $V\gamma 4$ 抗体、抗 $V\gamma 5$ 抗体、そして、 $V\gamma 5$ 鎖および $V\gamma 6$ 鎖を認識する 17D1 抗体を使用した。損傷後 2 日目で骨周囲組織中に認められた $\gamma\delta$ T 細胞の内、約 70% が 17D1 $^+V\gamma 5^+$ 細胞、すなわち $V\gamma 6^+$ $\gamma\delta$ T 細胞であった (図 22a)。さらに、IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の内、80%以上が $V\gamma 6^+$ であり、 $V\gamma 4^+$ 細胞が残りの数%を占めていた (図 22a)。 $V\gamma 6^+$ $\gamma\delta$ T 細胞は損傷前の骨周囲組織にも認められ、損傷に伴いその数は有意に増加していた (図 22b)。以上より、 $V\gamma 6^+$ $\gamma\delta$ T 細胞は骨損傷後の急性炎症期に増加し、IL-17A の主たる産生源として機能することが明らかになった。

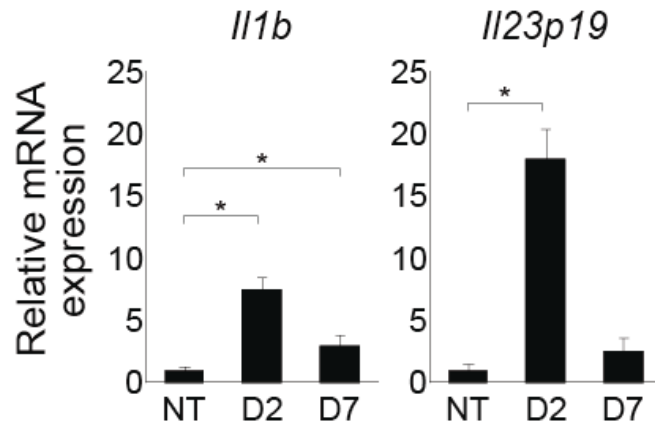


図21 骨周囲組織において *Il1b* および *Il23p19* の発現が損傷に伴い上昇する。骨周囲組織の細胞における *Il1b* および *Il23p19* の mRNA 発現解析。(N=3) エラーバーは標準誤差を示す。One way ANOVA 法および Dunnett 検定により、発現量の有意差検定を行った。*P<0.05。NT : 非処置、D2~D7 : 損傷後 2~7 日。

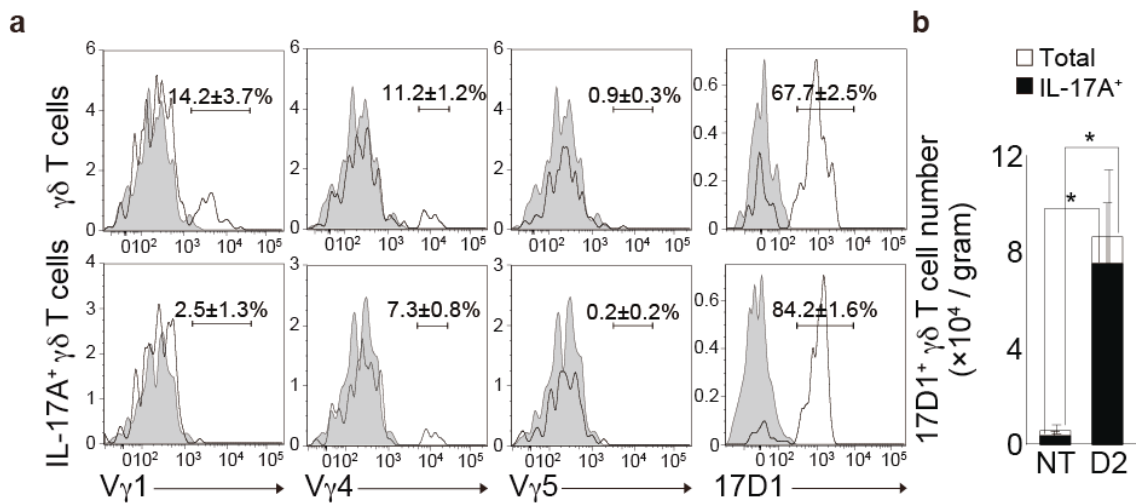


図22 損傷組織のγδ T細胞の大部分はVγ6⁺細胞である。フローサイトメトリー法による骨周囲組織におけるγδ T細胞表面のVγ鎖の発現解析。**a.** 損傷後2日目のγδ T細胞のVγ鎖の発現解析。上段: γδ T細胞。下段: IL-17A産生γδ T細胞。灰色のヒストグラムはアイソタイプコントロール抗体、実線は抗Vγ鎖抗体で標識されたサンプルをそれぞれ表す。17D1抗体は、Vγ5鎖およびVγ6鎖を認識する抗体である。(N=3,4) **b.** 損傷前後の17D1⁺細胞数およびIL-17A産生17D1⁺細胞数。(各群N=3) 各グラフのエラーバーは標準誤差を示す。細胞数のタイムポイント間での差を Student の t 検定により、有意差検定した。*P<0.05。NT : 非処置、D2 : 損傷後 2 日。

第四章 考察

4.1. IL-17A による骨代謝制御について

4-1-1. IL-17 ファミリーによる骨代謝制御

IL-17 ファミリーの中で、IL-17A と IL-17F は 50% のアミノ酸相同性を有し、結合する受容体も共に IL-17RA と IL-17RC からなる複合体である。このため、これらのサイトカインは同じ作用を示しうる。実際、黄色ブドウ球菌などの感染症においては IL-17A と IL-17F の両者が抗菌ペプチドの分泌促進を介して感染防御に寄与する。しかしながら、関節リウマチや遅延型過敏症のモデルでは、*Il17a*⁺マウスでのみ発症が抑制されることから⁴⁷、病態によっては IL-17A と IL-17F の作用が異なることが示唆される。

近年、Nam らが、IL-17F により MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化が促進すること、および、*Rag1*⁺マウスでは骨折治癒が遅延することを報告した³⁵。彼らは Th17 細胞が損傷に伴い IL-17F を産生することで骨折治癒を促進する、というモデルを提唱しているものの、*in vivo* レベルでは IL-17F の関与を実証できていない。本研究により、損傷前後に骨髄および骨周囲組織で *Il17f* の発現は検出されたが、損傷に伴う変動は認められず、むしろ *Il17a* が高く発現誘導されていることが明らかとなった(図 10a, b)。さらに、*Il17f*⁺マウスでは治癒の遅延を認めなかった(図 12a - d)。以上より、骨折治癒には IL-17F よりも IL-17A が主に関与していることを、生体レベルで実証することができた。

4-1-2. IL-17A の骨折治癒における直接作用／間接作用

IL-17A はさまざまな細胞に作用し、さまざまなサイトカインやケモカインの産生を誘導し得る⁷¹。こういったサイトカインのうち、IL-6 と TNF は骨折治癒を促進すること

が骨折モデルを用いた研究から明らかになっている^{24,33,34}。本研究では骨損傷モデルを用いた解析により、IL-17A の骨再生促進作用はIL-6 やTNF を介したものではないこと、また、IL-17A が損傷組織間葉系細胞に直接作用することが示された(図 17a - d)。しかしながら、IL-17A により誘導されるサイトカインやケモカインは他にも存在し、それらの因子が治癒を促進している可能性は残されている。

4-1-3. IL-17A による骨形成の制御

最近、IL-17A がラット新生仔頭蓋冠細胞の骨芽細胞分化に対し抑制的に作用することが報告され²⁶、本研究にてマウス新生仔頭蓋冠細胞を用いて検討した際にも同様の結果が得られた(図 17e)。一方、ヒト間葉系幹細胞やマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いた別のグループの研究では、損傷組織由来の間葉系細胞を用いた本研究の結果と同様に、IL-17A による骨形成促進効果が見出された(表 1、図 17c, d)。これらのことから、間葉系幹細胞や損傷組織の細胞などの未分化な細胞や、C2C12 細胞のように骨芽細胞以外の細胞種に分化が進んだ細胞に対しては、IL-17A は骨形成促進的に作用する傾向が見出された。一方、骨芽細胞分化が既に進んでいる頭蓋冠細胞では、IL-17A は複数の生物種で骨形成抑制的に働いていた。以上より、標的細胞の分化段階が IL-17A の骨芽細胞分化に対する影響を規定する要因の一つであると考えられる。

IL-17A の生体レベルでの骨代謝制御としては、関節リウマチで見られる骨破壊の誘導作用が既に知られており、本研究で得られた骨折治癒過程での骨形成促進作用とは正反対である。関節リウマチの場合、IL-17A は滑膜線維芽細胞の RANKL 発現を増強させ、破骨細胞分化を誘導し骨破壊を惹起する¹。一方、骨折治癒では IL-17A

は損傷組織の間葉系細胞 (図 15a - d) に作用し骨形成を促進した。このことから、IL-17A の標的細胞による作用の違いが正反対の表現型の一因になっていると考えられる。ただし、乾癬性関節炎では関節リウマチとは異なり関節破壊だけでなく骨形成も起こり、抗 IL-17A 抗体の投与により関節の強直が抑制されることから IL-17A は、関節炎において骨吸収だけでなく骨形成も促進する場合があると考えられる⁸⁷。

4-1-4. IL-17A による骨吸収の制御

本研究では、関節炎の例とは異なり、IL-17A は骨吸収には影響していなかった (図 14)。このような結果が得られた理由として、IL-17A が作用するタイミングが骨折治癒と関節炎とは異なることが考えられる。本研究で用いた骨損傷モデルでは IL-17A の発現量は損傷後 2 日の急性炎症期でのみ有意に上昇することが示された (図 10a)。

IL-17A による破骨細胞分化促進作用は小竹らにより、マウス骨髄細胞とマウス新生仔頭蓋冠細胞を用いた共培養系により見出されたが⁵、最近、より高濃度の IL-17A を骨髄細胞と新生仔頭蓋冠細胞の共培養系に添加した場合、破骨細胞分化が抑制されることが報告された⁸⁸。そして、この破骨細胞分化抑制作用は分化初期に IL-17A が作用した場合にのみ見られた⁸⁸。これらのことから、IL-17A の破骨細胞分化に対する作用は濃度や作用するタイミングによって異なることが示唆され、本研究では骨損傷部局所の IL-17A が発現するタイミングや濃度が原因で、破骨細胞分化に影響が見られなかったと考えられる。

4-1-5. IL-17A による骨代謝制御に対する細菌や人工材料の影響

前述の標的細胞の違いの他、細菌や生体材料などの異物の存在も IL-17A の骨代謝制御に影響を及ぼしうる。歯周炎は関節リウマチと同様に炎症に伴い骨吸収の起こる疾患であるが、IL-17A の作用は異なる。関節リウマチでは前述の通り IL-17A が骨破壊を誘導するが、歯周炎では逆に IL-17A が骨に対して保護的に作用する^{89,90}。二つの疾患の違いは炎症組織における細菌感染の有無である。歯周炎の病巣では、IL-17A は好中球を感染巣へ動員し、細菌の増加を防ぐ。細菌の増殖が抑えられることで炎症が低減し、その結果骨吸収の進行が抑えられると考えられている。

また、最近ラット頭蓋冠欠損の人工骨移植による治癒が IL-17A によって遅延するという報告がなされた²⁶。このモデルと本研究で用いたモデルの違いは人工骨の有無である。人工骨移植に際しては、人工骨に対する炎症や移植骨の吸収が起こり⁹¹、通常の骨折治癒とは再生のプロセスが異なる。加えて、IL-17A の投与により人工骨に対する炎症反応が修飾され、骨折治癒とは全く異なる現象が起きていた可能性が高い。なお、TNF の場合も同様に、骨折治癒を促進する一方、人工骨移植による骨再生を遅延させることが報告されており^{32,33}、骨折治癒と人工骨移植による骨再生は異なるものと考えられる。

このように、IL-17A は標的細胞、作用するタイミングや濃度、感染や異物の有無などにより作用が異なるため、適用する状況によっては期待通りの治療効果が得られない可能性がある。従って、臨床応用に際しては、適応症の選定を慎重に行う必要があると考えられる。

4-1-6. IL-17A による細胞増殖の制御

本研究により、IL-17A による骨折治癒促進のメカニズムには、PαS 細胞を含む間葉系細胞集団の細胞増殖の促進が関与していることが明らかになった (図 18b,c)。リアルタイム RT-PCR 法により、IL-17A は損傷組織間葉系細胞における *Cdc25a* の発現を有意に上昇させることを見出し (図 18d)、このことから、IL-17A による細胞増殖の促進には *Cdc25a* が関与すると考えられた。しかし、IL-17A の添加による *Cdc25a* の発現の上昇量は 1.1~1.2 倍程度であった。また、Cdk ファミリー分子は脱リン酸化によって活性化することで細胞周期のチェックポイント通過を促進する。このため、Cdk ファミリー分子のタンパク質レベルの解析やリン酸化の解析は行うことが本来必要であるが、本研究ではそれらの解析を行うことができなかった。今後、これらの解析を行うことにより、IL-17A による細胞増殖促進機構が解明され、異常な骨形成の見られる疾患や骨折の治療に役立つことが期待できる。

4-2. $\gamma\delta$ T 細胞の機能について

4-2-1. $\gamma\delta$ T 細胞による組織再生

骨再生過程で、IL-17A は $V\gamma 6^+$ $\gamma\delta$ T 細胞により産生されることが本研究により明らかになった。 $V\gamma 6^+$ $\gamma\delta$ T 細胞は舌、生殖器、肺などに常在することが報告されていたが、今回新たな存在部位として、骨周囲組織を見出した (図 22a, b)。以前にも、骨折治癒過程の組織学的解析により $TCR\gamma\delta^+$ 細胞の存在が報告されたが、これらの細胞には線維芽細胞、骨芽細胞、骨細胞といった間葉系の細胞が多く含まれており⁹²、今回見出された $\gamma\delta$ T 細胞とは同一でないと考えられる。 $V\gamma 6^+$ $\gamma\delta$ T 細胞は損傷後速やかに損傷組

織で増加し、IL-17A を産生していた (図 22b)。組織再生を促進するエフェクターサイトカインの産生細胞が骨折後早期から機能することにより、骨折後速やかな治癒の開始が可能となり、個体の生存に有利になると考えられる。本研究においてはIL-17A産生細胞の産生源としての $\gamma\delta$ T細胞の重要性を完全には示すことができておらず、今後、*Tcrd*^{-/-}マウスを用いたさらなる検討により、骨折治癒における $\gamma\delta$ T細胞の重要性を示す必要がある。

$\gamma\delta$ T細胞は他にも、皮膚⁹³、目^{72,94}、肝臓⁵⁶、毛包⁹⁵の再生において、IL-17AやIL-22、FGF-9などのサイトカインを介して組織修復を促進することが知られており、今回私が見出した細胞もこれらの組織修復能を有する $\gamma\delta$ T細胞の一群に属すると考えられる。

4-2-2. $\gamma\delta$ T細胞と他の免疫細胞との相互作用

$\gamma\delta$ T細胞は他の多くの細胞と相互作用する⁵⁵。それらの細胞の中には $\gamma\delta$ T細胞同様、損傷刺激に対して早い段階で反応する細胞も含まれる。マクロファージはそういった細胞の一つであり、骨折治癒を促進することが知られている³¹。マクロファージは損傷に伴いサイトカインや傷害関連分子パターン (damage-associated molecular patterns : DAMPs) など、さまざまな刺激で活性化され得る。骨折部位では、早期より BMP2、BMP4、BMP7 の発現が上昇するが、BMP2 や BMP7 が単球系の細胞株に作用し炎症性サイトカインの産生を促進することも報告されている^{96,97}。また、マクロファージは IL-23 を産生し、これを介して $\gamma\delta$ T細胞による IL-17A の産生を促進しうること、そして IL-17A の刺激を受けることで炎症性サイトカインを産生することが報告されてい

る^{98,71}。このため、マクロファージが骨折後早期にサイトカインやDAMPsにより活性化され、 $\gamma\delta$ T細胞によるIL-17A産生を促進し、治癒を誘導する可能性が考えられる。

本研究ではマクロファージや樹状細胞が損傷組織中に見出されたが(図20a)、これらの細胞が $\gamma\delta$ T細胞によるIL-17A産生を介した骨折治癒促進に関与するかは検討できていない。今後、免疫組織化学染色法により骨折部位でのそれぞれの免疫細胞の局在を解析し、フローサイトメトリー法を用いてIL-1 β やIL-23などのサイトカインの産生源を解析することにより、 $\gamma\delta$ T細胞と他の免疫細胞との相互作用を検討する必要がある。これにより、 $\gamma\delta$ T細胞の骨折治癒における位置づけがより明確なものとなり、 $\gamma\delta$ T細胞活性化のメカニズム(後述)の解明に繋がる。

4-2-3. $\gamma\delta$ T細胞活性化のメカニズム

これまでに、TLR1、TLR2、dectin1などのPRRのリガンドやIL-1 β 、IL-23などのサイトカインがIL-17Aの産生を誘導することが明らかにされている^{85,86}。本研究によりIL-1 β およびIL-23がIL-17A産生に関与することが示唆されたが、これらのサイトカインの産生源が何であるか、そしてIL-1 β およびIL-23がV γ 6⁺ $\gamma\delta$ T細胞によるIL-17A産生を促進するかなどは明らかになっていない。また、V γ 6⁺ $\gamma\delta$ T細胞上のPRRの発現や、それに結合するDAMPsの同定もできていない。このように、骨折治癒における $\gamma\delta$ T細胞活性化のメカニズムには検討の余地が残されている。また前述の通り、損傷刺激がマクロファージなどの他の細胞を介して間接的に $\gamma\delta$ T細胞を活性化している可能性もある。今後、*in vitro*での $\gamma\delta$ T細胞に対するリガンド刺激やサイトカイン刺激、他の細胞との共培養系による解析により $\gamma\delta$ T細胞の活性化機構を検討することで、骨

折治癒初期相のメカニズムを解明することができ、 $\gamma\delta$ T 細胞活性化制御による骨折治療法の創出に繋がることを期待できる。

4.3. 今後の展望

4.3-1. IL-17A を標的とした新規骨折治療法の創出

今回、私は自然免疫様リンパ球の一つである $\gamma\delta$ T 細胞がサイトカイン IL-17A を産生することにより骨折治癒を促進することを見出した (図 23)。よって、IL-17A を骨折直後に局所投与したり、IL-17A を徐放する素材を用いたプレートで骨折固定を行うことにより、治癒が促進することが期待できる。また、骨折治癒の過程で IL-17A の下流で発現、活性化される因子を探索し、それらの因子の細胞増殖や骨形成への作用および副作用を検討することにより、骨折部位に局所投与可能な新規治療薬を創出できる可能性がある。

IL-17A を標的とするメリットとして、骨折治癒促進だけでなく感染防御作用も同時に発揮されることが挙げられる。デメリットとしては、前述の通り、骨折部位に存在する間葉系細胞の種類や固定に用いるプレートの材質によっては治癒の遅延が起こりうること、IL-17A が他のサイトカインやケモカインを誘導することにより全身性または局所性の炎症反応が起こりうることを考えられる。したがって、実際に IL-17A を臨床応用するにあたっては、骨折部位や骨折様式の違いにより治癒に関わる間葉系細胞が異なるか、人工材料を併用する場合、その材料に対して IL-17A がどのように作用するかを詳細に検討する必要がある。さらに全身または局所の炎症の制御に細心の注意を払い、IL-17A 投与による患者の苦痛が他剤の併用などにより可能な限

り取り除かれる必要がある。

4-3-2. $\gamma\delta$ T 細胞を標的とした新規骨折治療法の創出

$\gamma\delta$ T 細胞を損傷部局所に動員したり、 $\gamma\delta$ T 細胞による IL-17A 産生を誘導することで骨折治癒は促進出来ると考えられる。しかし、マウスとヒトとでは $\gamma\delta$ T 細胞のサブセットは異なるため、臨床応用に際してはまず IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞がヒトの骨折部位で見出されるかを確認する必要がある。ヒトの場合、末梢血中の $V\gamma 9^+V\delta 2^+$ T 細胞がリン酸化抗原および IL-1 β 、IL-6、IL-23、TGF- β による刺激で IL-17A を産生することや⁶⁹、大腸癌において樹状細胞が産生する IL-23 により刺激を受けた $V\delta 1^+$ 細胞が IL-17A を産生することが明らかになっている⁷⁰。こういった既知のヒト $\gamma\delta$ T 細胞サブセットまたは新規の IL-17A 産生ヒト $\gamma\delta$ T 細胞が骨折部位で見出され、その活性化機構が明らかになれば、 $\gamma\delta$ T 細胞を骨折治療の標的とすることも出来ると考えられる。 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化機構としては、含窒素ビスホスホネート製剤投与により抗原提示細胞からリン酸化抗原が分泌され、 $\gamma\delta$ T 細胞が活性化することが既に知られており⁷⁰、含窒素ビスホスホネート製剤の局所投与により、骨折部位で $\gamma\delta$ T 細胞による IL-17A 産生を促進出来る可能性がある。

4-3-3. 異常な骨形成を引き起こす疾患の病態解明・治療法の創出

骨折治癒の他に免疫系の関与が指摘されている異常な骨形成現象として、外傷性骨化性筋炎、進行性骨化性線維異形成症、骨髄炎や腫瘍で見られる骨膜反応などがある。これらのプロセスでも、骨折治癒と同様に外傷や感染などによる組織のストレスシグ

ナルが直接、あるいはIL-23などのサイトカインを介して $\gamma\delta$ T細胞を活性化、IL-17A産生を促進し骨形成を誘導している可能性があり、疾患発症メカニズムの解明に際し、本研究の知見が役に立つことが期待される。上記の疾患において $\gamma\delta$ T細胞やIL-17Aが病態形成に関与していれば、抗IL-17A抗体製剤や、IL-17受容体シグナルを標的とした新規治療薬が炎症と病的な骨形成の両方を抑制することが期待できる。また、 $\gamma\delta$ T細胞の遊走にかかわるケモカインや、IL-17A産生を誘導するIL-1 β やIL-23に対する抗体や阻害剤も炎症や病的な骨形成を抑制する可能性がある。

第五章 結論

本研究を通じて、私は骨損傷に伴い骨周囲組織でIL-17Aの発現が上昇することを見出した。*Il17a*⁺マウスを用いた解析により、IL-17Aが骨再生を促進することが明らかになった。損傷組織の間葉系細胞を用いた*in vitro*の解析により、IL-17AはP α S細胞を含む間葉系細胞集団の増殖と骨形成を促進することを見出した。そして、骨損傷に伴いV γ 6⁺ $\gamma\delta$ T細胞がIL-17Aを産生することを示した。IL-17Aの産生にはIL-1 β およびIL-23が寄与している可能性が示唆された(図23)。以上より、IL-17A産生 $\gamma\delta$ T細胞が免疫系と骨形成とを結びつける新たな役割を有することが示された。本研究成果が新規の骨折治療法の創出だけでなく、免疫系による異常な骨形成が原因で生じる疾患の病態解明に貢献し、新規の疾患治療法の創出に際して基礎的知見として活用されることが期待される。

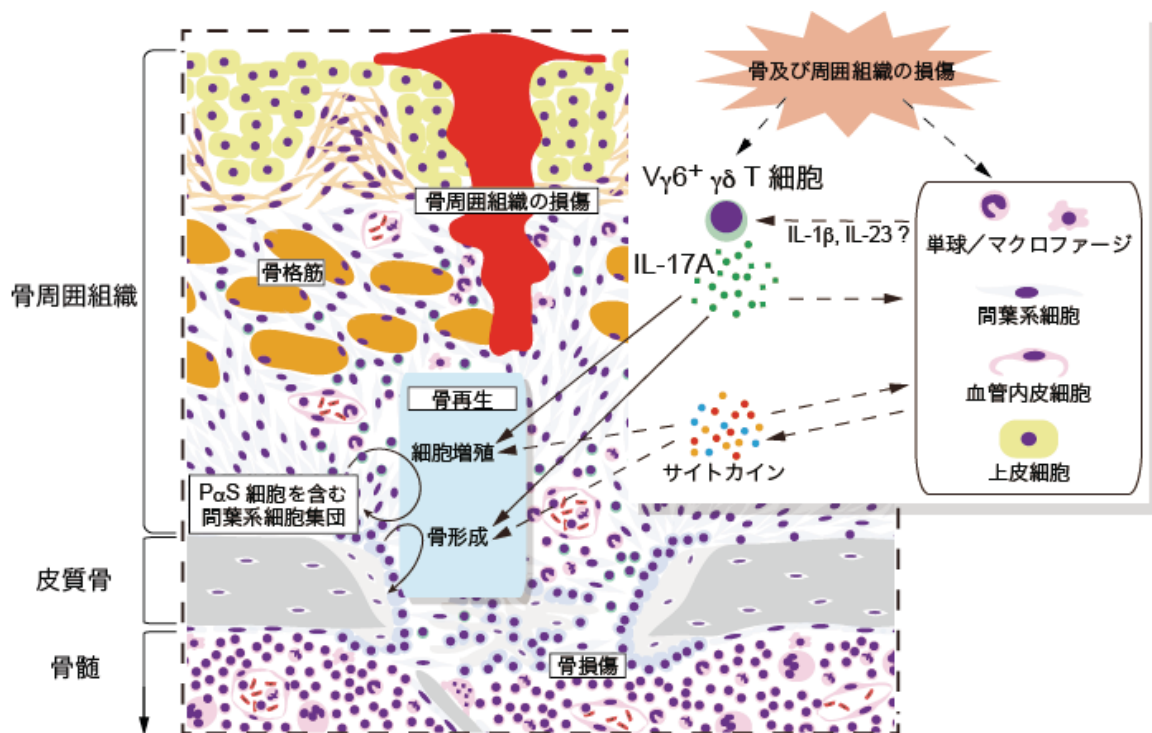


図 23 概念図

骨および周囲組織の損傷に伴い、 $V\gamma 6^+ \gamma\delta$ T 細胞が速やかに損傷部で増加し、IL-17A を産生する。損傷に際して、IL-1 β およびIL-23 の発現が上昇しており、これらのサイトカインが $V\gamma 6^+ \gamma\delta$ T 細胞による IL-17A の産生を誘導している可能性がある。IL-17A は損傷部に集積した P α S 細胞を含む間葉系の細胞集団に直接作用して、細胞増殖と骨形成を亢進し、骨折治癒を促進する。

引用文献

- 1 Takayanagi, H. New developments in osteoimmunology. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 684-689, 2012.
- 2 Ono, T. & Takayanagi, H. 破骨細胞分化と骨免疫学. *月刊カレントセラピー* **32**, 60-66, 2014.
- 3 Burzyn, D. *et al.* A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* **155**, 1282-1295, 2013.
- 4 Heredia, J. E. *et al.* Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* **153**, 376-388, 2013.
- 5 Kotake, S. *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* **103**, 1345-1352, 1999.
- 6 Kocic, J. *et al.* Interleukin 17 inhibits myogenic and promotes osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts by activating ERK1,2. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 838-849, 2012.
- 7 Lacey, D. L. *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165-176, 1998.
- 8 Yasuda, H. *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3597-3602, 1998.
- 9 Anderson, D. M. *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **390**, 175-179, 1997.
- 10 Rouvier, E., Luciani, M. F., Mattei, M. G., Denizot, F. & Golstein, P. CTLA-8, cloned

- from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol.* **150**, 5445-5456, 1993.
- 11 Jovanovic, D. V. *et al.* IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages. *J. Immunol.* **160**, 3513-3521, 1998.
- 12 Nakae, S. *et al.* IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5986-5990, 2003.
- 13 Sato, K. *et al.* Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.* **203**, 2673-2682, 2006.
- 14 Hajishengallis, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystone, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* **35**, 3-11, 2014.
- 15 Komori, T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J. Cell. Biochem.* **112**, 750-755, 2011.
- 16 Parfitt, M., Qiu, S., Palnitkar, S. & Rao, D. S. Abnormal bone remodeling in patients with spontaneous painful vertebral fracture. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 475-485, 2011.
- 17 Pountos, I., Georgouli, T., Calori, G. M. & Giannoudis, P. V. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis. *ScientificWorldJournal* **2012**, 606404, 2012.
- 18 Kaplan, F. S. *et al.* Hematopoietic stem-cell contribution to ectopic skeletogenesis. *J. Bone Joint Surg. Am.* **89**, 347-357, 2007.
- 19 Sherlock, J. P. *et al.* IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ ⁺

- CD3⁺CD4⁺CD8⁻ enthesal resident T cells. *Nat. Med.* **18**, 1069-1076, 2012.
- 20 Einhorn, T. A. & Gerstenfeld, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **11**, 45-54, 2014.
- 21 Liu, R. *et al.* Myogenic progenitors contribute to open but not closed fracture repair. *BMC Musculoskelet. Disord.* **12**, 288, 2011.
- 22 Kumar, S. & Ponnazhagan, S. Mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in vivo augments bone healing in a mouse model of segmental bone defect. *Bone* **50**, 1012-1018, 2012.
- 23 Gerstenfeld, L. C. *et al.* Impaired fracture healing in the absence of TNF- α signaling: the role of TNF- α in endochondral cartilage resorption. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 1584-1592, 2003.
- 24 Wallace, A., Cooney, T. E., Englund, R. & Lubahn, J. D. Effects of interleukin-6 ablation on fracture healing in mice. *J. Orthop. Res.* **29**, 1437-1442, 2011.
- 25 Nagashima, M. *et al.* Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. *Bone* **36**, 502-511, 2005.
- 26 Kim, Y. G. *et al.* IL-17 inhibits osteoblast differentiation and bone regeneration in rat. *Arch. Oral Biol.* **59**, 897-905, 2014.
- 27 Kitaori, T. *et al.* Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum.* **60**, 813-823, 2009.

- 28 Reinke, S. *et al.* Terminally differentiated CD8⁺ T cells negatively affect bone regeneration in humans. *Sci. Transl. Med.* **5**, 177ra136, 2013.
- 29 Histing, T. *et al.* An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J. Orthop. Res.* **28**, 397-402, 2010.
- 30 Monfoulet, L., Rabier, B., Chassande, O. & Fricain, J. C. Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration. *Calcif. Tissue. Int.* **86**, 72-81, 2010.
- 31 Alexander, K. A. *et al.* Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 1517-1532, 2011.
- 32 Liu, Y. *et al.* Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . *Nat. Med.* **17**, 1594-1601, 2011.
- 33 Gerstenfeld, L. *et al.* Impaired Fracture Healing in the Absence of TNF- α Signaling- The Role of TNF- α in Endochondral Cartilage Resorption. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 1584-1592, 2003.
- 34 Yang, X. *et al.* Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* **41**, 928-936, 2007.
- 35 Nam, D. *et al.* T-lymphocytes enable osteoblast maturation via IL-17F during the early phase of fracture repair. *PLoS One* **7**, e40044, 2012.
- 36 Toben, D. *et al.* Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 113-124, 2011.
- 37 Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. & Nakae, S. Functional specialization of

- interleukin-17 family members. *Immunity* **34**, 149-162, 2011.
- 38 Song, X. & Qian, Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine* **62**, 175-182, 2013.
- 39 Ho, A. W. & Gaffen, S. L. IL-17RC: a partner in IL-17 signaling and beyond. *Semin. Immunopathol.* **32**, 33-42, 2010.
- 40 Shen, F. *et al.* IL-17 receptor signaling inhibits C/EBP β by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. *Sci. Signal.* **2**, ra8, 2009.
- 41 Liu, C. *et al.* Act1, a U-box E3 ubiquitin ligase for IL-17 signaling. *Sci. Signal.* **2**, ra63, 2009.
- 42 Bulek, K. *et al.* The inducible kinase IKKi is required for IL-17-dependent signaling associated with neutrophilia and pulmonary inflammation. *Nat. Immunol.* **12**, 844-852, 2011.
- 43 Sun, D. *et al.* Treatment with IL-17 prolongs the half-life of chemokine CXCL1 mRNA via the adaptor TRAF5 and the splicing-regulatory factor SF2 (ASF). *Nat. Immunol.* **12**, 853-860, 2011.
- 44 Wang, C. *et al.* The psoriasis-associated D10N variant of the adaptor Act1 with impaired regulation by the molecular chaperone hsp90. *Nat. Immunol.* **14**, 72-81, 2013.
- 45 Zhu, S. *et al.* Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis through TRAF3-mediated suppression of interleukin 17 receptor signaling. *J. Exp. Med.* **207**, 2647-2662, 2010.
- 46 Yao, Z. *et al.* Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel

- cytokine receptor. *Immunity* **3**, 811-821, 1995.
- 47 Ishigame, H. *et al.* Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* **30**, 108-119, 2009.
- 48 Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* **278**, 1910-1914, 2003.
- 49 Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123-1132, 2005.
- 50 Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* **6**, 1133-1141, 2005.
- 51 McGeachy, M. J. & Cua, D. J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* **28**, 445-453, 2008.
- 52 Carding, S. R. & Egan, P. J. $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 336-345, 2002.
- 53 Hayday, A. C. $\gamma\delta$ T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* **31**, 184-196, 2009.
- 54 Girardi, M. Immunosurveillance and immunoregulation by $\gamma\delta$ T cells. *J. invest. dermatol.* **126**, 25-31, 2006.
- 55 Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 88-100, 2013.

- 56 Rao, R. *et al.* Interleukin 17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Promote Hepatic Regeneration in Mice. *Gastroenterology*, 2014.
- 57 Turchinovich, G. & Hayday, A. C. Skint-1 identifies a common molecular mechanism for the development of interferon- γ -secreting versus interleukin-17-secreting $\gamma\delta$ T cells. *Immunity* **35**, 59-68, 2011.
- 58 Jin, Y. *et al.* Cutting edge: Intrinsic programming of thymic $\gamma\delta$ T cells for specific peripheral tissue localization. *J. Immunol.* **185**, 7156-7160, 2010.
- 59 Zhao, H., Nguyen, H. & Kang, J. Interleukin 15 controls the generation of the restricted T cell receptor repertoire of $\gamma\delta$ intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Immunol.* **6**, 1263-1271, 2005.
- 60 Chien, Y. H. & Bonneville, M. $\gamma\delta$ T cell receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2089-2094, 2006.
- 61 Korn, T. & Petermann, F. Development and function of interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1247**, 34-45, 2012.
- 62 Bonneville, M., O'Brien, R. L. & Born, W. K. $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 467-478, 2010.
- 63 Itohara, S. *et al.* Homing of a $\gamma\delta$ thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* **343**, 754-757, 1990.
- 64 Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 479-489, 2010.
- 65 Kisielow, J. & Kopf, M. The origin and fate of $\gamma\delta$ T cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **25**,

- 181-188, 2013.
- 66 Yamamoto, S., Russ, F., Teixeira, H. C., Conradt, P. & Kaufmann, S. H. Listeria monocytogenes-induced gamma interferon secretion by intestinal intraepithelial gamma/delta T lymphocytes. *Infect. Immun.* **61**, 2154-2161 1993.
- 67 Selin, L. K., Santolucito, P. A., Pinto, A. K., Szomolanyi-Tsuda, E. & Welsh, R. M. Innate Immunity to Viruses: Control of Vaccinia Virus Infection by $\gamma\delta$ T Cells. *J. Immunol.* **166**, 6784-6794, 2001.
- 68 Dejima, T. *et al.* Protective role of naturally occurring interleukin-17A-producing $\gamma\delta$ T cells in the lung at the early stage of systemic candidiasis in mice. *Infect. Immun.* **79**, 4503-4510, 2011.
- 69 Takeuchi, A. *et al.* IL-17 production by $\gamma\delta$ T cells is important for the antitumor effect of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin treatment against bladder cancer. *Eur. J. Immunol.* **41**, 246-251, 2011.
- 70 Wada, I. *et al.* Intraperitoneal injection of in vitro expanded V γ 9V δ 2 T cells together with zoledronate for the treatment of malignant ascites due to gastric cancer. *Cancer Med.* **3**, 362-375, 2014.
- 71 Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S. & Ishigame, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.* **226**, 57-79, 2008.
- 72 Li, Z., Burns, A. R., Han, L., Rumbaut, R. E. & Smith, C. W. IL-17 and VEGF are necessary for efficient corneal nerve regeneration. *Am. J. Pathol.* **178**, 1106-1116, 2011.
- 73 Morikawa, S. *et al.* Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of

- multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J. Exp. Med.* **206**, 2483-2496, 2009.
- 74 Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H. & Kaneda, Y. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. *Stem Cells* **26**, 223-234, 2008.
- 75 Roy, L. D. *et al.* Systemic neutralization of IL-17A significantly reduces breast cancer associated metastasis in arthritic mice by reducing CXCL12:SDF-1 expression in the metastatic niches. *BMC Cancer* **14**, 2014.
- 76 Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 630-641, 2005.
- 77 Rudolph, J. Cdc25 phosphatases: structure, specificity, and mechanism. *Biochemistry* **46**, 3595-3604, 2007.
- 78 Wang, X., Kiyokawa, H., Dennewitz, M. B. & Costa, R. H. The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 16881-16886, 2002.
- 79 Abella, A. *et al.* Cdk4 promotes adipogenesis through PPAR γ activation. *Cell Metab.* **2**, 239-249, 2005.
- 80 Gossel, M. J. & Hinds, P. W. Beyond the cell cycle: a new role for Cdk6 in differentiation. *J. Cell. Biochem.* **97**, 485-493, 2006.
- 81 Ogasawara, T. *et al.* Bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation requires Smad-mediated down-regulation of Cdk6. *Mol. Cell Biol.* **24**, 6560-6568, 2004.

- 82 Meares, G. P., Ma, X., Qin, H. & Benveniste, E. N. Regulation of CCL20 expression in astrocytes by IL-6 and IL-17. *Glia* **60**, 771-781, 2012.
- 83 Kang, Z. *et al.* Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* **32**, 414-425, 2010.
- 84 Mabuchi, T. *et al.* CCR6 is required for epidermal trafficking of $\gamma\delta$ -T cells in an IL-23-induced model of psoriasiform dermatitis. *J. invest. dermatol.* **133**, 164-171, 2013.
- 85 Martin, B., Hirota, K., Cua, D. J., Stockinger, B. & Veldhoen, M. Interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* **31**, 321-330, 2009.
- 86 Sutton, C. E. *et al.* Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* **31**, 331-341, 2009.
- 87 Ebihara, S., Date, F., Dong, Y. & Ono, M. Interleukin-17 is a critical target for the treatment of ankylosing enthesitis and psoriasis-like dermatitis in mice. *Autoimmunity*, Early online, 2014.
- 88 Balani, D., Aeberli, D., Hofstetter, W. & Seitz, M. Interleukin-17A stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor release by murine osteoblasts in the presence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and inhibits murine osteoclast development in vitro. *Arthritis Rheum.* **65**, 436-446, 2013.
- 89 Yu, J. J. *et al.* An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* **109**, 3794-3802, 2007.

- 90 AlShwaimi, E. *et al.* IL-17 receptor A signaling is protective in infection-stimulated periapical bone destruction. *J. Immunol.* **191**, 1785-1791, 2013.
- 91 Velard, F., Braux, J., Amedee, J. & Laquerriere, P. Inflammatory cell response to calcium phosphate biomaterial particles: an overview. *Acta Biomater.* **9**, 4956-4963, 2013.
- 92 Colburn, N. T., Zaal, K. J., Wang, F. & Tuan, R. S. A role for $\gamma\delta$ T cells in a mouse model of fracture healing. *Arthritis Rheum.* **60**, 1694-1703, 2009.
- 93 Witherden, D. A. & Havran, W. L. Cross-talk between intraepithelial $\gamma\delta$ T cells and epithelial cells. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 69-76, 2013.
- 94 Li, Z., Burns, A. R., Miller, S. B. & Smith, C. W. CCL20, $\gamma\delta$ T cells, and IL-22 in corneal epithelial healing. *FASEB J.* **25**, 2659-2668, 2011.
- 95 Gay, D. *et al.* Fgf9 from dermal $\gamma\delta$ T cells induces hair follicle neogenesis after wounding. *Nat. Med.* **19**, 916-923, 2013.
- 96 Tsuji, K. *et al.* BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature Genet.* **38**, 1424-1429, 2006.
- 97 Lee, K. B. *et al.* BMP induced inflammation: a comparison of rhBMP-7 and rhBMP-2. *J. Orthop. Res.* **30**, 1985-1994, 2012.
- 98 Shichita, T. *et al.* Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.* **15**, 946-950, 2009.
- 99 Caccamo, N. *et al.* Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V γ 9V δ 2 T cells. *Blood* **118**, 129-138, 2011.
- 100 Ding, J. *et al.* TNF- α and IL-1 β inhibit RUNX2 and collagen expression but increase

- alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci.* **84**, 499-504, 2009.
- 101 Mumme, M. *et al.* Interleukin-1 β modulates endochondral ossification by human adult bone marrow stromal cells. *Eur. Cell Mater.* **24**, 224-236, 2012.
- 102 Sonomoto, K. *et al.* Interleukin-1 β induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway. *Arthritis Rheum.* **64**, 3355-3363, 2012.
- 103 Lange, J. *et al.* Action of IL-1 β during fracture healing. *J. Orthop. Res.* **28**, 778-784, 2010.
- 104 Lacey, D. C., Simmons, P. J., Graves, S. E. & Hamilton, J. A. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 735-742, 2009.
- 105 Glass, G. E. *et al.* TNF- α promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 1585-1590, 2011.
- 106 Bellido, T., Borba, V. Z., Roberson, P. & Manolagas, S. C. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* **138**, 3666-3676, 1997.
- 107 Huh, J. E. & Lee, S. Y. IL-6 is produced by adipose-derived stromal cells and promotes osteogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 2608-2616, 2013.
- 108 Rifas, L. T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell

- differentiation and mineralization. *J. Cell. Biochem.* **98**, 706-714, 2006.
- 109 Osta, B., Lavocat, F., Eljaafari, A. & Miossec, P. Effects of Interleukin-17A on Osteogenic Differentiation of Isolated Human Mesenchymal Stem Cells. *Front Immunol.* **5**, 1-8, 2014.
- 110 Huang, H. *et al.* IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death Differ.* **16**, 1332-1343, 2009.
- 111 Kocic, J. *et al.* Interleukin-17 modulates myoblast cell migration by inhibiting urokinase type plasminogen activator expression through p38 mitogen-activated protein kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 464-475, 2013.
- 112 Hess, K., Ushmorov, A., Fiedler, J., Brenner, R. E. & Wirth, T. TNF α promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway. *Bone* **45**, 367-376, 2009.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始適切なお助言とご指導を賜りました高柳 広教授に心より感謝申し上げます。また、研究の遂行にあたり、*III17a⁺*マウスおよび *III17f⁺*マウスをご供与頂きました東京理科大学 生命医科学研究所 実験動物学研究部門 岩倉 洋一郎教授、17D1 抗体をご供与頂きました Yale 大学医学部 皮膚科 Robert Tigelaar 教授に、厚く御礼申し上げます。本研究はこれらのマウス、抗体無しには遂行できなかつたと存じます。

当研究室の岡本 一男先生には実験の初歩的な手技から基礎研究における論理的な思考法を丁寧にご指導頂き、実際の研究遂行の際にも研究計画の立案から個々の実験に至るまで適切なお助言を頂きました。中島 友紀先生（現・東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 分子情報伝達学 准教授）には骨損傷モデルをご教授頂き、研究方針につき貴重なお助言を頂きました。新田 剛先生には $\gamma\delta$ T 細胞に関する解析についてご助言、ご指導頂きました。古賀 貴子先生、林 幹人先生（現・東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 分子情報伝達学 助教）、末松 綾子博士、住谷 瑛理子博士には骨芽細胞分化誘導法についてご指導頂きました。澤 新一郎先生、小松 紀子先生、寺島 明日香博士、高場 啓之博士、Matteo Guerrini 博士、Lynett Danks 博士には研究方針や実験方法について様々なお助言を頂きました。大学院の先輩、同級生、後輩の皆様には研究以外にも大学院生活の様々なことで相談にのって頂き、励まして頂きました。技術補佐員の皆様、秘書の皆様、JST 事務の皆様には、実験技術のご指導、実験環境の維持、様々な事務手続きを通して多大な援助をして頂きました。研究室の皆様には心より感謝申し上げます。

また、骨研究の魅力や、医学・歯学における基礎研究の重要性に気付かせて頂き、骨研究に従事するきっかけを与えて下さいました昭和大学 歯学部、東京大学医学部 附属病院 顎口腔外科・歯科矯正歯科の関係者の皆様には心よりお礼申し上げます。

最後に、これまで大学院生活を支えて頂きました両親、祖父母、石川の皆様、そして妻と子供達に感謝致します。本当にありがとうございました。

小野 岳人