

論文の内容の要旨

論文題目 免疫系による骨形成機構の解析

小野 岳人

要旨

免疫系は感染や腫瘍に対する重要な防御機構であるが、適切に制御されなければ、時に重大な組織破壊を引き起こす。関節リウマチの病変部では、自己反応性 T 細胞が引き金となって、IL-6 や TNF などの炎症性サイトカインの発現が亢進し、その結果破骨細胞による過剰な骨吸収が起こり病的な骨破壊が生じる。一方、免疫系は骨形成も起こし得る。外傷性骨化性筋炎、骨折治癒、脊椎関節症における骨化には炎症が関与することが古くから知られている。近年、脊椎関節症において、腱付着部に常在する IL-23 受容体陽性の特殊な T 細胞が骨化に関わることが報告されたものの、他の生理的/病的な骨形成を引き起こす免疫細胞のサブセットや、エフェクターとなる分子については不明な点が多い。

骨折治癒は、骨形成が免疫系に大きく依存する生理現象の一つである。骨折治癒の過程で炎症が起こること、さらにステロイド投与が偽関節形成のリスク因子であるといった臨床的知見から、炎症の関与が伺われる。またマウスを用いた研究では、リンパ球を欠損する *Rag1*^{-/-}マウスにて骨折治癒が促進するという報告と、遅延するという報告が異なる二つのグループからなされている。両者の違いの原因は不明であるが、最近 CD8⁺エフェクターメモリー T 細胞が骨折治癒に対し抑制的に作用することが報告されており、リンパ球の中でも治癒に対して正反対の作用を示す複数の細胞群が存在することが想定される。また IL-6 や TNF などの炎症性サイトカインが骨折治癒を促進することが示されているが、これらのサイトカインが損傷時に如何にして産生されるのかも十分に解析されていない。そこで私は T 細胞に着目し、骨折治癒早期に集積する T 細胞が骨損傷後の炎症反応および骨形成にどのように作用するかを、マウス大腿骨の骨損傷モデルを用いて検討した。

骨損傷モデルは、皮質骨にドリルを用いて欠損を形成することにより骨の再生を誘導するモデルであり、骨組織の損傷に加えて、骨膜、骨格筋、皮膚といった骨周囲組織の損傷もおこる。まず、損傷した大腿骨の骨髓および骨周囲組織に含まれる細胞を採取し、T 細胞に関連するサイトカイン IFN- γ 、IL-4、IL-17A、IL-17F、IL-22 の発現が、損傷に伴いどのように変動するかをリアルタイム RT-PCR 法により解析した。すると、骨髓細胞ではいずれのサイトカインでも有意な発現上昇が認められなかったが、骨周囲組

織では *Il17a* が損傷後 2 日目有意に発現上昇することを見出した。

そこで骨組織の再生に対する IL-17A の影響を調べるべく、野生型マウスおよび *Il17a*^{+/+}マウスの骨孔閉鎖をマイクロ CT により評価した。野生型マウスと比較して、*Il17a*^{+/+}マウスでは骨孔閉鎖が遅延していた。また、骨孔部に形成された新生骨の骨密度も *Il17a*^{+/+}マウスでは低下していた。骨孔部周辺を組織学的に検討したところ、*Il17a*^{+/+}マウスでは、基質合成能の高い II 型骨芽細胞に覆われた骨面の割合が野生型マウスと比べて減少している一方、破骨細胞による骨吸収には有意な差を認めなかった。以上より、IL-17A は骨芽細胞による骨形成の促進を介して骨組織の再生を誘導していることが示された。

損傷後 7 日の時点で骨孔部を満たす間葉組織を観察したところ、損傷した骨格筋線維周囲の間葉細胞や肥厚した骨膜と連続していた。フローサイトメトリー法により、野生型マウスおよび *Il17a*^{+/+}マウスの骨周囲の細胞を解析したところ、間葉系幹細胞を多く含む細胞集団として近年脚光を浴びている PDGFR α ⁺Sca-1⁺CD45⁻TER119⁻ (P α S) 細胞が検出された。間葉系細胞に占める P α S 細胞の割合は、野生型マウスと *Il17a*^{+/+}マウスとの間で差を認めなかった。したがって、IL-17A は損傷組織の間葉系幹細胞の集積には関与しないと考えられた。

損傷組織から得られた間葉系細胞では、IL-17A 受容体遺伝子の *Il17ra* および *Il17rc* が発現していることがリアルタイム RT-PCR 法により確認されたため、IL-17A が損傷組織間葉系細胞に対して直接作用する可能性が考えられた。IL-17A の骨芽細胞分化や石灰化に対する影響については標的細胞等の条件により、異なる結果が報告されている。そこで、骨芽細胞分化実験に広く用いられる新生仔マウス頭蓋冠細胞と、損傷組織より採取された間葉系細胞を用いて、骨芽細胞前駆細胞の増殖、骨芽細胞への分化、石灰化作用に対する IL-17A の影響を解析した。すると、頭蓋冠細胞では IL-17A の添加により石灰化が抑制された。一方、損傷組織間葉系細胞を用いた場合には IL-17A は *Runx2* および *Sp7* 遺伝子の発現には影響しないものの、骨芽細胞前駆細胞の増殖と石灰化の促進により骨形成を促進していることが見出された。細胞増殖の促進作用は個体レベルでも認められ、*Il17a*^{+/+}マウスでは野生型マウスと比較して、骨孔内の増殖細胞の割合が有意に低下していた。以上から、IL-17A は損傷組織間葉系細胞に直接的に作用することで、骨折治癒を促進することが示された。

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*^{gfp/gfp}マウス) を用いて、免疫組織化学染色法により IL-17A 産生細胞を探索したところ、損傷に伴い骨孔周囲と損傷骨格筋に IL-17A 産生細胞が浸潤していた。フローサイトメトリー法によりこれらの IL-17A 産生細胞の細胞表面マーカーを解析したところ、T 細胞サブセットの一つ、 $\gamma\delta$ T 細胞が IL-17A の産生源であることが分かっ

た。 $\gamma\delta$ T 細胞は損傷に伴い骨周囲組織中でその数が急激に増加し、そこに含まれる IL-17A 産生細胞の割合も増加していた。

損傷に伴う $\gamma\delta$ T 細胞数の増加の機序について解析したところ、*Il17a*⁺マウスの損傷組織で $\gamma\delta$ T 細胞数は減少しておらず、IL-17A は $\gamma\delta$ T 細胞の増加には関与しないことが分かった。また、IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞はケモカイン受容体 CCR6 を発現することが知られている。損傷組織に浸潤する $\gamma\delta$ T 細胞も多くは CCR6⁺であったが、*Ccr6*⁺マウスの骨孔閉鎖には遅延が認められなかった。 $\gamma\delta$ T 細胞による IL-17A 産生機構として、IL-1 β や IL-23 による刺激が報告されている。骨周囲組織におけるこれらのサイトカインの mRNA の発現は、*Il17a* と同様、損傷後速やかに増加しており、IL-1 β や IL-23 が $\gamma\delta$ T 細胞による IL-17A 産生を促している可能性が示唆された。

$\gamma\delta$ T 細胞は、発現する V γ 鎖の種類によりさらに細かいサブセットに分類され、サブセットの違いにより、分布する臓器や産生するサイトカインが規定される。骨周囲に特定のサブセットが存在するという報告はこれまでなかったため、フローサイトメトリー法によりサブセットの解析を行った。損傷組織に集積する $\gamma\delta$ T 細胞の約 7 割は V γ 6⁺細胞であり、特に、IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞については 8 割以上の細胞が V γ 6⁺細胞であった。以上より、骨周囲組織の V γ 6⁺ $\gamma\delta$ T 細胞が骨損傷後に IL-17A の主たる産生源として機能することが示された。

本研究により、V γ 6⁺IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞が骨折に伴い損傷組織でその数を増やし、骨芽細胞前駆細胞の増殖と骨形成の活性化により骨折治癒を促進することが示された。また、骨折治癒促進機能という、新たな IL-17A の生理機能を明らかにすることができた。

IL-17A は関節リウマチ研究などを通じて、骨吸収促進作用を有することがよく知られているが、本研究では *Il17a*⁺マウスの損傷部位において破骨細胞による骨吸収の抑制は見出されなかった。この理由は、関節リウマチと骨折治癒とでは IL-17A の発現するタイミング、病変部や損傷部における濃度などが異なるためと考えられる。また、IL-17A の骨形成に対する作用は損傷組織の間葉系細胞と新生仔頭蓋冠細胞とでは異なっていた。前者は未分化な間葉系細胞であり、後者は骨芽細胞へ分化が進んだ細胞であることから、IL-17A の骨形成に対する作用はどの分化段階の細胞に作用するかにより影響されると考えられる。以上より、IL-17A は標的細胞の違いや作用するタイミング、濃度の違いなどにより、骨代謝を正または負に制御し、骨折治癒を促進したり関節リウマチなどの疾患を発症させていると考えられる。

$\gamma\delta$ T 細胞は、生体内部と外部の境界に存在し、組織のストレス状態を監視する役割を持ち、ストレスシグナルに迅速に反応する。このような細胞が組織の治癒を促進するサイトカインを産生することは、

骨折後速やかに治癒が開始されることを意味し、個体の生存に非常に有利なメカニズムであると考えられる。 $\gamma\delta$ T 細胞は、目、皮膚、肝など他の組織でも損傷後早期に損傷部に集積し、IL-17A や他の分子を介して組織再生を誘導することが報告されており、骨折治癒の場合もこれらの組織修復と同様に、 $\gamma\delta$ T 細胞が急性炎症期に活性化され、治癒期間の短縮に寄与していると考えられる。

本研究により、組織再生誘導性の $\gamma\delta$ T 細胞が急性炎症期に産生する IL-17A が、免疫系と骨形成とを橋渡しすることが明らかになった。今後、骨芽細胞前駆細胞における IL-17 受容体の下流シグナルや、 $\gamma\delta$ T 細胞の遊走/増殖機構、IL-17A 産生機構を明らかにすることにより、新規骨折治療法の創出だけでなく、異常な骨形成に免疫系が関与する疾患のメカニズムの解明に繋がると考えられる。