

審査の結果の要旨

氏名 小野 岳人

本研究は、骨代謝制御の重要な調節因子である免疫系が、骨折治癒を制御するメカニズムを解析したものである。骨孔形成によりマウス大腿骨および周囲組織に損傷を引き起こすモデル（骨損傷モデル）を用いて骨折治癒への免疫系の関与を検討し、以下の結果を得ている。

- リアルタイム RT-PCR 法により大腿骨の骨髄細胞および大腿骨周囲組織の細胞におけるサイトカインの発現を解析し、その結果、骨損傷に伴い骨周囲組織細胞で *Il17a* の発現が上昇していることが示された。
- Il17a*⁺マウスに骨損傷を施し、骨再生過程をマイクロ CT により解析したところ、*Il17a*⁺マウスでは野生型マウスと比較して骨再生が遅延し、新生骨の骨密度も低下していた。骨再生過程の組織学的解析により、*Il17a*⁺マウスでは野生型マウスと比べ欠損部における骨形成が低下することが示された。
- 組織学的解析により、骨損傷後に欠損部を満たす間葉系細胞は損傷骨格筋や骨膜と連続することが認められた。骨周囲組織より間葉系細胞を調製し、細胞表現マーカーの発現をフローサイトメトリー法により解析した結果、骨周囲組織中に間葉系幹細胞を多く含むとされる CD45⁻Ter119⁻PDGFR α ⁺Sca-1⁺細胞（P α S 細胞）が認められた。野生型マウスと *Il17a*⁺マウスの P α S 細胞の割合に差は認められなかった。
- 損傷組織の間葉系細胞における IL-17A 受容体遺伝子（*Il17ra* および *Il17rc*）の発現をリアルタイム RT-PCR 法により検討したところ、これらの受容体の発現が認められた。野生型マウスと *Il17a*⁺マウスの骨周囲組織細胞における *Il6* および *Tnfa* の発現を比較したところ、差は認められず、IL-17A は骨再生過程で損傷部の間葉系細胞に直接作用することが示唆された。
- 損傷組織間葉系細胞を骨芽細胞分化誘導培地中で培養し、IL-17A が骨形成に及ぼす影響を解析したところ、アルカリホスファターゼ（ALP）活性およびアリザリンレッド S（ARS）染色法より石灰化の促進が認められた。リアルタイム RT-PCR 法により骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を解析したところ、*Runx2* および *Sp7* の発現には変化が認められなかった。また、ALP 活性の抑制作用が報告されている *Cdk6* の発現は低下していた。
- BrdU 取り込み法により、損傷組織間葉系細胞の増殖に対する IL-17A の作用を解

析したところ、IL-17A の添加により細胞増殖の促進が認められた。In vivo での BrdU 取り込み法により、*Il17a*⁺マウスは野生型マウスと比較して損傷部における細胞増殖が抑制されていることを認めた。リアルタイム RT-PCR 法により細胞増殖に関わる遺伝子の発現を解析したところ、*Cdc25a* の発現の上昇を認めた。

7. IL-17A レポーターマウスを用いた免疫組織化学染色法により IL-17A 産生細胞の局在を解析したところ、損傷後 IL-17A 産生細胞が骨孔部および損傷骨格筋に浸潤していた。フローサイトメトリー法により IL-17A 産生細胞の細胞表面マーカーの発現を解析したところ、それらの細胞は $\gamma\delta$ T 細胞であった。損傷に伴い、 $\gamma\delta$ T 細胞数は速やかに増加し、IL-17A 陽性 $\gamma\delta$ T 細胞の割合も増加していた。
8. *Il17a*⁺マウスを用いて損傷部での $\gamma\delta$ T 細胞の増加に IL-17A が関与する可能性を検討したところ、*Il17a*⁺マウスでは野生型マウスよりも $\gamma\delta$ T 細胞数がむしろ増加していた。また、損傷部の $\gamma\delta$ T 細胞は CCR6 を発現していたが、*Ccr6*⁺マウスで骨再生の遅延は認めなかった。
9. $\gamma\delta$ T 細胞による IL-17A 産生に IL-1 β および IL-23 が関与する可能性を想定し、リアルタイム RT-PCR 法によりこれらのサイトカインの発現を解析したところ、損傷に伴う発現の上昇を認めた。
10. 損傷部の $\gamma\delta$ T 細胞サブセットを解析したところ、約 7 割の細胞が V γ 6⁺細胞であった。また、IL-17A 産生 $\gamma\delta$ T 細胞については 8 割以上が V γ 6⁺細胞であった。損傷前後での V γ 6⁺細胞数を比較したところ、損傷に伴う増加を認めた。

以上、本論文はマウス骨損傷モデルの解析を通じて、損傷組織で V γ 6⁺ $\gamma\delta$ T 細胞が IL-17A を産生し、IL-17A が損傷組織間葉系細胞の増殖と骨形成を亢進することで骨再生を促進することを明らかにした。本研究は、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を示し、新規の骨折治療法の創出だけでなく、免疫系と骨組織との関連が認められる他の疾患の病態解明や治療法創出にも貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。