

**<投与を受けた後の注意とお願い>**

1. レミケード投与により症状が軽減されても、無理な生活はせず、睡眠を十分にとる等、健康の維持に努めてください。重篤な感染症も報告されていますので、うがいや手洗いを励行するとともに体を清潔に保ってください。また、人ごみの場所に行くことも避けてください。  
さらに、せきやたんが続いたり、発熱、倦怠感、喀血、胸痛等の異常な症状が見られた場合や、かぜがみだなと思ったら決して無理をせず、すぐに担当医に相談してください。その際には、レミケードの投与を受けていることを必ず伝えてください。
2. レミケードの投与後は十分な経過観察をおこなう必要があります。このため、転院される場合は担当医に事前にご連絡いただくとともに、転院後の病院の担当医に『患者手帳』を提示していただき、レミケードの投与を受けたことを必ず伝えてください。  
担当医は、転院される病院に対して、転院後にも適切な経過観察及び処置を行っていただけるように、あなたの病気や治療に関する情報の伝達を行います。また、レミケード販売会社(田辺製薬株式会社)にも、転院される病院へ本剤に関する必要な情報を提供する等、あなたの経過観察が適切に行われるよう協力していただく予定です。このため、担当医から会社にあなたの転院に関する情報を提供することをあらかじめご了承下さい。なお、会社は、入手した情報について、守秘義務の観点から厳重に管理致します。

私はレミケードを使用するにあたり、説明を受け、その内容を十分に理解しました。

<患者>

平成 年 月 日 氏名

<親権者または法定代理人>:患者が未成年の場合

平成 年 月 日

氏名 (続柄: )

平成 年 月 日

氏名 (続柄: )

医療機関名・医師名

説明日: 平成 年 月 日

医療機関名:

医師名:

レミケード初回治療クリニカルパス

第1日目 / (月)	第2日目 / (火)	第3日目 / (水)	第4日目 / (木)	第5日目 / (金)	第6日目 / (土)	第7日目 / (日)	第8日目 / (月)
<input type="checkbox"/> 治療法を理解する	<input type="checkbox"/> 治療法を理解する	<input type="checkbox"/> 治療の不安がなくなる	<input type="checkbox"/> 治療の不安がなくなる	<input type="checkbox"/> 次回の治療を受けられる	<input type="checkbox"/> 次回の治療を受けられる	<input type="checkbox"/> 次回の治療を受けられる	<input type="checkbox"/> 次回の治療を受けられる
<input type="checkbox"/> 入院治療計画書 <input type="checkbox"/> 入院オリエンテーション <input type="checkbox"/> 患者バスオリエンテーション	<input type="checkbox"/> 服薬指導(薬剤師) <input type="checkbox"/> レミケード投与についての説明(医師)			<input type="checkbox"/> 次回レミケード投与についての説明			<input type="checkbox"/> 退院時計書 <input type="checkbox"/> 退院時評価
<input type="checkbox"/> 採血/採尿 <input type="checkbox"/> ECG <input type="checkbox"/> X-P(胸部/関節) <input type="checkbox"/> ツベルクリン反応 <input type="checkbox"/> 体重測定 (kg) <input type="checkbox"/> レミケード量 (瓶)	<input type="checkbox"/> 胸部CT検査(肺内病変の有無) <input type="checkbox"/> ACRコアセット	<input type="checkbox"/> ツベルクリン判定 ( × ) 硬結 ( +, - ) 二重発赤 ( +, - )	<input type="checkbox"/> 採血/採尿				<input type="checkbox"/> ACRコアセット
		<input type="checkbox"/> ルートの確保(両腕2ルート①レミケードルート②予備ルート) <input type="checkbox"/> ①ルート: 生食100ml点滴静注 <input type="checkbox"/> ②ルート: 生食500ml 1本レミケード( )ml 注射用蒸留水( )ml 輸液ポンプにて200ml/hで点滴静注する <input type="checkbox"/> ②ルート: ソリタT3/500mlを100ml/hで点滴静注する					
<input type="checkbox"/> 持参薬 <input type="checkbox"/> 睡眠薬 <input type="checkbox"/> 屯用薬 <input type="checkbox"/> 湿布							<input type="checkbox"/> 持参薬 <input type="checkbox"/> 睡眠薬 <input type="checkbox"/> 屯用薬 <input type="checkbox"/> 湿布
<input type="checkbox"/> 説明の理解度 <input type="checkbox"/> 食事摂取量 <input type="checkbox"/> 入眠状況	<input type="checkbox"/> 説明の理解度 <input type="checkbox"/> 食事摂取量 <input type="checkbox"/> 入眠状況	<input type="checkbox"/> アナフィラキシー症状 <input type="checkbox"/> 頭痛、悪心、眩暈、掻痒感、倦怠感など <input type="checkbox"/> バイタルサイン測定(直後、30分後、60分後、120分後)	<input type="checkbox"/> バイタルサイン測定 <input type="checkbox"/> 頭痛、悪心、眩暈、掻痒感、倦怠感など <input type="checkbox"/> アレルギー症状(注射部位の変化)	<input type="checkbox"/> バイタルサイン測定 <input type="checkbox"/> 頭痛、悪心、眩暈、掻痒感、倦怠感など <input type="checkbox"/> アレルギー症状(注射部位の変化)	<input type="checkbox"/> バイタルサイン測定	<input type="checkbox"/> バイタルサイン測定	<input type="checkbox"/> バイタルサイン測定
<input type="checkbox"/> 院内フリー	<input type="checkbox"/> 院内フリー	<input type="checkbox"/> ベット上安静(トイレ歩行可)	<input type="checkbox"/> 病棟内安静	<input type="checkbox"/> 院内フリー	<input type="checkbox"/> 院内フリー	<input type="checkbox"/> 外出可 <input type="checkbox"/> 院内フリー	<input type="checkbox"/> 院内フリー
<input type="checkbox"/> 入浴可	<input type="checkbox"/> 入浴可	<input type="checkbox"/> 治療後シャワー可	<input type="checkbox"/> シャワー可	<input type="checkbox"/> 入浴可	<input type="checkbox"/> 入浴可	<input type="checkbox"/> 入浴可	<input type="checkbox"/> 入浴可
<input type="checkbox"/> 常食	<input type="checkbox"/> 常食	<input type="checkbox"/> 常食	<input type="checkbox"/> 常食	<input type="checkbox"/> 常食	<input type="checkbox"/> 常食	<input type="checkbox"/> 常食	<input type="checkbox"/> 常食
<input type="checkbox"/> 問診(結核歴、アレルギー歴)	<input type="checkbox"/> 薬局へのレミケード伝票の提出 <input type="checkbox"/> 輸液ポンプの準備(1台)	<input type="checkbox"/> 救急カートの準備 <input type="checkbox"/> 承諾書の確認 <input type="checkbox"/> 問診票の確認			<input type="checkbox"/> 次回外来予約(翌週)		
<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)
<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日動 <input type="checkbox"/> Ns. 夜動	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日動 <input type="checkbox"/> Ns. 夜動	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日動 <input type="checkbox"/> Ns. 夜動	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日動 <input type="checkbox"/> Ns. 夜動	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日動 <input type="checkbox"/> Ns. 夜動	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日動 <input type="checkbox"/> Ns. 夜動	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日動 <input type="checkbox"/> Ns. 夜動	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日動 <input type="checkbox"/> Ns. 夜動

レミケードは、皮内反応、筋注とも不可。  
レミケード投与後1週間以内に次回外来を受信する。

表4：レミケード2週、6週投与用クリニカルパス

日時	第1日 / (月)	第2日 / (火)	第3日 / (水)	第4日 / (木)
アウトカム (期待される結果)	<input type="checkbox"/> 治療法を理解する	<input type="checkbox"/> 治療法を理解する <input type="checkbox"/> 治療の不安がなくなる	<input type="checkbox"/> 次回の治療を受けられる	<input type="checkbox"/> 次回の治療を受けられる
説明/指導	<input type="checkbox"/> 入院治療計画書 <input type="checkbox"/> 入院オリエンテーション <input type="checkbox"/> 患者バスオリエンテーション	<input type="checkbox"/> 服薬指導 (薬剤師) <input type="checkbox"/> レミケード投与についての説明 (医師)	<input type="checkbox"/> 次回レミケード投与についての説明	<input type="checkbox"/> 退院時計画書 <input type="checkbox"/> 退院時評価
検査/処置	<input type="checkbox"/> 採血 (抗核抗体、抗DNA抗体含む) / 採尿 <input type="checkbox"/> ECG <input type="checkbox"/> X-P (胸部/関節) <input type="checkbox"/> 体重測定 ( kg) <input type="checkbox"/> レミケード量 ( mg)	<input type="checkbox"/> ACRコアセット	<input type="checkbox"/> 採血/採尿	
点滴/注射		<input type="checkbox"/> ルートの確保 (両腕2ルート①レミケードルート②予備ルート) <input type="checkbox"/> ①ルート: 生食100ml点滴静注 <input type="checkbox"/> ②ルート: 生食500ml 1本レミケード ( ) ml 注射用蒸留水 ( ) ml 輸液ポンプにて200ml/hで点滴静注する <input type="checkbox"/> ②ルート: ソリタT3/500ml を100ml/hで点滴静注する		
内服	<input type="checkbox"/> 持参薬 <input type="checkbox"/> 睡眠薬 <input type="checkbox"/> 屯用薬 <input type="checkbox"/> 湿布			<input type="checkbox"/> 持参薬 <input type="checkbox"/> 睡眠薬 <input type="checkbox"/> 屯用薬 <input type="checkbox"/> 湿布
観察項目	<input type="checkbox"/> 説明の理解度 <input type="checkbox"/> 食事摂取 <input type="checkbox"/> 入眠状況	<input type="checkbox"/> 説明の理解度 <input type="checkbox"/> アナフィラキシー症状 <input type="checkbox"/> 頭痛、悪心、眩暈、掻痒感、倦怠感など <input type="checkbox"/> バイタルサイン測定 (直後、30分後、60分後、120分後) <input type="checkbox"/> 食事摂取量 <input type="checkbox"/> 入眠状況	<input type="checkbox"/> バイタルサイン測定 <input type="checkbox"/> 頭痛、悪心、眩暈、掻痒感、倦怠感など <input type="checkbox"/> アレルギー症状 (注射部位の変化)	<input type="checkbox"/> バイタルサイン測定 <input type="checkbox"/> 頭痛、悪心、眩暈、掻痒感、倦怠感など <input type="checkbox"/> アレルギー症状 (注射部位の変化)
安静	<input type="checkbox"/> 院内フリー	<input type="checkbox"/> ベット上安静 (トイレ歩行可)	<input type="checkbox"/> 病棟内安静	<input type="checkbox"/> 院内フリー
清潔	<input type="checkbox"/> 入浴可	<input type="checkbox"/> 治療後シャワー可	<input type="checkbox"/> シャワー可	<input type="checkbox"/> 入浴可
食事	<input type="checkbox"/> 常食	<input type="checkbox"/> 常食	<input type="checkbox"/> 常食	<input type="checkbox"/> 常食
必要項目	<input type="checkbox"/> 問診 (前回治療時の副作用) <input type="checkbox"/> 薬局へのレミケード伝票の提出 <input type="checkbox"/> 輸液ポンプの準備 (1台)	<input type="checkbox"/> 救急カートの準備 <input type="checkbox"/> 承諾書の確認 <input type="checkbox"/> 問診票の確認		<input type="checkbox"/> 次回外来予約 (翌週)
バリエーション	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)	<input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり (A, B, C, D, E)
サイン	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日勤 <input type="checkbox"/> Ns. 夜勤	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日勤 <input type="checkbox"/> Ns. 夜勤	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日勤 <input type="checkbox"/> Ns. 夜勤	<input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Ns. 日勤 <input type="checkbox"/> Ns. 夜勤

レミケードは、皮内反応、筋注とも不可

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

サイトカインによるリウマチ破骨細胞の制御に関する研究

分担研究者 高柳 広 東京大学大学院医学系研究科・助手

研究要旨

関節リウマチ（RA）骨破壊においては、破骨細胞による骨吸収の亢進が重要な役割を果たす。TNF ファミリーのサイトカインである RANKL（破骨細胞分化因子）は、破骨細胞分化誘導において必須の因子であるが、その細胞内シグナル伝達機構は不明の点が多く、リウマチ破骨細胞を特異的に抑制する有効な治療法は知られていない。本研究では、RANKL 応答遺伝子の網羅的解析を行い、インターフェロン（IFN） $\beta$ が RANKL によって誘導されることを見いだした。IFN $\beta$ シグナルの遺伝子欠損マウスは、破骨細胞の異常増殖を伴った骨粗鬆症を呈することから、IFN $\beta$ が過剰な破骨細胞分化を抑制し、正常な骨リモデリングを維持するために必須のサイトカインであることが明らかになった。IFN $\beta$ を炎症性骨破壊モデルに投与すると、破骨細胞形成と骨破壊が抑制されたことから、リウマチ骨破壊制御への新たな道を開く可能性が示唆された。さらに、RANKL 標的遺伝子の解析から、RANKL が破骨細胞前駆細胞において転写因子 NFATc1（NFAT2）を特異的に誘導することを見いだした。NFATc1 を欠損した ES 細胞は、破骨細胞分化が完全に障害されていた。また、NFATc1 を過剰発現すると破骨細胞分化を誘導することが可能であったことから NFATc1 は RANKL シグナルの下流で破骨細胞分化を制御するマスターレギュレータと呼べる転写因子と考えることができた。RANKL による NFATc1 の増幅過程は、破骨細胞分化を決定する最重要なステップであることが示された。これらの結果は、破骨細胞分化の分子機構の理解に大きな進展をもたらしただけでなく、骨破壊性疾患の治療標的として臨床的にも高い意義をもつと考えられる。

A. 研究目的

従来のリウマチ治療薬は炎症や疼痛を抑制することを主眼にして開発されてきたため、炎症をコントロールすることに成功しても、長期的には骨破壊による関節機能障害を防止できないことが治療の最大の課題となっている。多くのリウマチ患者が今なお、人工関節手術をうけている現実を考えると、骨破壊を予防する治療の開発は急務である。

RA 骨破壊においては、破骨細胞性骨吸収の異常な亢進が重要な役割を果たす。その重要性は、Csk による Src の抑制や、OPG 投与などの破骨細胞を標的とした治療が実験的関節炎における骨破壊の抑制に奏効したことから明らかとなった。さらに近年では、破骨細胞が欠損したマウスにおいては、炎症がおきても骨破壊は起こらないことが報告されており、リウマチ骨破壊の治療標的としての破骨細胞の重要性が注目を集めている。われわれはこれまで研究により、リウマチ滑膜における破骨細胞形成には、TNF family サイトカインである破骨細胞分化因子(RANKL)の過剰発現が重要な役割をもつことを解明してきた。しかし、RANKL による破骨細胞分化誘導のメカニズムの詳細は明らかでなく、破骨細胞を特異的に抑制する有効な治療法は存在しない。そこで、本研究では、RANKL によって誘

導される標的遺伝子を解析し、破骨細胞分化を特異的に誘導する分子を同定することで新たな治療法開発に結びつけることを目的とした。

B. 研究方法

RANKL によって刺激した骨髄マクロファージの中で誘導される mRNA 発現を、Affymetrix の GeneChip を用いて網羅的に解析を行った。この中で IFN $\alpha/\beta$ によって誘導される遺伝子発現が多数上昇していたことに注目し、IFN $\alpha/\beta$ の骨代謝制御における意義を、IFN $\alpha/\beta$ 受容体の欠損マウス等を用いて生体レベルで解析した。さらに、RANKL でのみ高度に誘導される転写因子に着目して検索を行ったところ、活性化 T 細胞で重要と考えられてきた転写因子である NFATc1 が、RANKL によって非常に高度に誘導されることを見いだした。そこで、NFATc1 の破骨細胞分化における意義を、NFATc1 欠損 ES 細胞を用いた破骨細胞形成系やレトロウイルスを用いた過剰発現系を用いて詳細に検討した。

（倫理面への配慮）

マウスを用いた実験に関しては、東京大学動物実験委員会の承認を受けた実験計画に従い、東京大学医学部動物実験施設の定める倫理規定を遵守して、実験を遂行した。

### C. 研究結果

I 型インターフェロン受容体のコンポーネント IFNAR1 の欠損マウスの破骨細胞前駆細胞では、可溶性 RANKL による破骨細胞形成が亢進しており、前駆細胞自身が RANKL 刺激により IFN- $\beta$  を産生し、過剰な破骨細胞分化を抑制することが明らかになった。IFN- $\beta$  は、破骨細胞分化の必須転写因子である c-Fos の発現をタンパクレベルで抑制したが、TRAF6 経路には影響を与えなかった。レトロウイルスを用いた c-Fos 過剰発現により、IFN- $\beta$  の抑制作用が解除されたことから、IFN- $\beta$  による抑制の標的が c-Fos であることが示された。RANKL による IFN- $\beta$  誘導が Fos 欠損マウスでは認められないことから、RANKL による IFN- $\beta$  の誘導には c-Fos が必須であることが明らかになり、IFN- $\beta$  プロモータに対し、c-Fos が直接結合して活性化することが判明した。即ち、c-Fos は自らの抑制因子である IFN- $\beta$  を誘導し、「自己制御」と呼べるフィードバックループを形成していた。IFN- $\beta$  投与は卵巣摘出マウスや炎症性骨破壊モデルの破骨細胞形成と骨量減少を抑制し、生体レベルでの骨量維持効果が示された。

一方、RANKL によって誘導される転写因子 NFATc1 については、RANKL シグナルの下流で破骨細胞分化を制御するマスターレギュレータと呼べる転写因子であることを示唆するデータが得られている。結果は以下の通りである①RANKL は破骨細胞前駆細胞において転写因子 NFATc1 (NFAT2) を特異的に誘導し、その誘導の程度はあらゆる転写因子の中で最大レベルであり、20 倍を越えていた。②NFATc1 は破骨細胞分化の過程において活性化し、核に集積し転写活性化していた。③生体内においても NFATc1 は破骨細胞において強発現していた。④RANKL による NFATc1 の活性化は、カルシウム依存性の脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを介しており、この抑制剤である FK506 やサイクロスポリン A は破骨細胞分化を協力的に抑制した。⑤NFATc1 を欠損した ES 細胞は、破骨細胞分化が完全に障害されていた。⑥NFATc1 をレトロウイルスベクターで過剰発現すると破骨細胞分化を誘導することが可能であった。NFATc1 は破骨細胞特異遺伝子 TRAP および Calcitonin 受容体遺伝子のプロモータに直接結合し、活性化した。

### D. 考察

IFN 系は、抗ウイルス作用と免疫制御という視点から主に解析がなされてきたが、IFN- $\beta$  は破骨細胞分化の負のフィードバック制御において生理的に重要な役割をはたしていることが明らかになった。IFN- $\beta$  を局所投与することで、生体レベルでも破骨細胞形成と骨破壊を著明に抑制することができたことから IFN- $\beta$  はリウマ

チ骨破壊等の制御にも効果を持つ可能性が高い。IFN- $\beta$  投与は、局所での TNF- $\alpha$  産生などを抑制する作用があることが知られており、関節リウマチ等の炎症性骨破壊疾患においては、抗炎症効果と破骨細胞分化抑制作用が相乗効果を生むことも期待され、現在、関節炎モデルにおいても検討を進めている。また、閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスの系においても有用性を示すデータが得られており、骨粗鬆症に対しても有効性が期待できると考えている。IFN- $\beta$  が投与されている患者における骨動態の検討や、骨量減少と IFN- $\beta$  血中濃度の相関の検討などが進めば、さらに IFN の骨疾患における意義が明らかになっていくと予想される。

一方、RANKL は、これまで考えられてきた TRAF6 や Fos/AP-1 経路以外に、カルシウム-カルシニューリン系を活性化することで、NFATc1 の過剰発現を導き、この増幅過程が、破骨細胞分化を決定する最重要な step であることが示された。この結果から、NFATc1 はリウマチ骨破壊の治療標的として非常に重要な位置を占めることが明らかになった。これまで NFAT を活性化するカルシニューリンの抑制剤 FK506 やサイクロスポリン A は免疫抑制剤として臨床応用されてきたが、破骨細胞特異的に作用させることができれば同様の作用機序で破骨細胞を抑制する新たな戦略に結びつく可能性がある。今後、NFATc1 を標的としたリウマチ骨破壊治療法の開発を試みる予定である。

### E. 結論

破骨細胞分化因子 RANKL の下流シグナルの解析から、IFN- $\beta$  が骨破壊の抑制因子であることを同定し、IFN- $\beta$  を用いた新たな治療法への道を開いた。また、破骨細胞分化で最も重要な転写因子として NFATc1 を同定した。今後のリウマチ骨破壊の治療標的として重要な意義を持つと考えられる。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Takayanagi, H., Kim, S., Koga T., Nishina H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J-I, Wagner, E. F., Mak T. W., , Kodama, T., and Taniguchi, T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling for terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3, 889-901 (2002)

Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura,

K., Ida, N., Wagner, E. F. & Taniguchi, T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of *IFN-β*. *Nature* 416, 744-49 (2002).

Takayanagi, H., Kim, S., and Taniguchi, T. (2002). Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res* 4, S227-232

Nakamura, I., Kadono, Y., Takayanagi, H., Jimi, E., Miyazaki, T., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S., Rodan, G. A. & Duong le, T. IL-1 regulates cytoskeletal organization in osteoclasts via TNF receptor-associated factor 6/c-Src complex. *J Immunol* 168, 5103-9. (2002).

Yamamoto, A., Miyazaki, T., Kadono, Y., Takayanagi, H., Miura, T., Nishina, H., Katada, T., Wakabayashi, K., Oda, H., Nakamura, K. & Tanaka, S. Possible involvement of IκB kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor κB ligand. *J Bone Miner Res* 17, 612-21. (2002).

Ogasawara, K., Hida, S., Weng, Y., Saiura, A., Sato, K., Takayanagi, H., Sakaguchi, S., Yokochi, T., Kodama, T., Naitoh, M., De Martino, J. A. & Taniguchi, T. Requirement of the *IFN-α/β*-induced CXCR3 chemokine signalling for CD8<sup>+</sup> T cell activation. *Genes Cells* 7, 309-320. (2002).

## 2. 学会発表

高柳 広、金宣和、谷口 維紹 : Regulation of bone homeostatis by RANKL and IFNs

第 32 回日本免疫学会学術集会、シンポジウム (Homeostatic regulation and cytokines)、2002.12.5

東京

日本免疫学会総会・学術集会記録 32 15 (2002)

高柳 広 : 免疫細胞と破骨細胞分化の接点

第 44 回歯科基礎医学会学術大会、シンポジウム免疫の最前線、2002.10.4 東京

歯科基礎医学会雑誌 44 (5) 59 (2002)

高柳 広 : インターフェロン系による破骨細胞分化制御

第 75 回日本生化学会、シンポジウム 70 「骨格系細胞の分化制御機構」2002.10.16

生化学 74 (8) 659 (2002)

H. Takayanagi, K. Sunhwa, T. Taniguchi

RANKL signaling network in positive and negative regulation of osteoclastogenesis

Meeting on genetic and molecular biology of skeletal development, Lucca, Italy

2002.10.14

抄録掲載号の雑誌なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

分担研究報告書

関節リウマチの先端的治療に関する研究

分担研究者 妻木 範行 大阪大学大学院医学系研究科助手

骨・軟骨破壊に関する遺伝子制御

研究要旨

骨・軟骨破壊過程に見られる種々の遺伝子の発現制御の破綻を解明するために、本年度はそれらを総合的に制御すると考えられる BMP シグナルの役割について解析を始めた。BMP シグナルをリガンドレベル、細胞内レベルで活性化あるいは不活化したトランスジェニックマウスを作製し、その形態異常とともに遺伝子発現について検討した。BMP シグナルは軟骨・骨の種々のマトリックス遺伝子の発現を制御し、組織分化や形態形成に関与することが判明した。

A. 研究目的

四肢や脊椎の骨格・関節では生涯にわたって機械的負荷がかかり、さらに炎症・加齢による変性が進む一方で、その正常な形と機能を保つべく種々の遺伝子の発現が調節されていると推測される。関節リウマチや変形性関節症において見られるこれらの負荷や変性に対して、遺伝子制御の対応がとれなくなることが、骨・軟骨が破壊されて支持性という骨格の最大の機能を失う理由のひとつだと理解できる。Bone morphogenetic protein (BMP) は内軟骨性骨化において種々の遺伝子発現を制御する重要な分子である。本年度よりまず、骨・軟骨の形成における BMP シグナルの役割を *in vivo* で解明するために、種々のトランスジェニックマウスの作製・解析を行っている。

B. 研究方法

組織特異的プロモーターを用い、軟骨あるいは骨特異的に BMP シグナルを活性化あるいは

不活化させたトランスジェニックマウスを作製した。シグナルの不活化にはアンタゴニストである Noggin を発現させた。また細胞内シ

グナル伝達の遮断を狙い、抑制型 Smad である Smad6 を強制発現させた。当動物実験については大阪大学医学部動物実験委員会の承認を受け、そのガイドラ

インに則って動物の苦痛軽減に努めている。

C. 研究結果と考察

BMP シグナルを不活化すると軟骨の形成が認められず、軟骨の発生には BMP が必須であることが判明した。そして BMP の過剰発現では軟骨が増大し、分化が亢進した。次に、細胞内の BMP シグナルを伝えるメカニズムを解明するために、抑制型 Smad である Smad6 を内軟骨性骨化の過程に強制発現させたトランスジェニックマウスを作製し、解析している。このマウスでは Smad シグナルの伝達が著しく障害されていると推測される。その結果、骨の形成・成長が遅れ、著しく骨量が減少して骨粗鬆症様の変化が認められた。しかしそれに比して軟骨の変化は極程度にとどまっており、BMP シグナルの伝達メカニズムが軟骨と骨とでは異なる可能性を考えている。また BMP の骨形成に対する作用を解析するために、骨芽細胞に特異的に BMP とそのアンタゴニストを過剰発現させたトランスジェニックマウスをそれぞれ作製し終えたところである。以後これらのマウスの解析も進めて行きたい。

D. 結論

内軟骨性骨化において BMP シグナルを操作することにより、骨・軟骨の形成をコントロールできることを示すことができた。今後、各種遺伝子発現の調節

メカニズムとその影響を解析したい。

E. 健康危機情報

F. 研究発表

1. 論文発表

妻木範行, 木全弘治 “軟骨分化と軟骨細胞” 骨と軟骨のバイオロジー (金原出版) 91-99 2002

Tsumaki N, Nakase T, Miyaji T, Kakiuchi M, Kimura T, Ochi T, and Yoshikawa H “BMP signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis” *J Bone Miner Res* 17: 898-906 2002

Tanaka K, Tsumaki N, Kozak CA, Matsumoto Y, Nakatani F, Iwamoto Y, and Yamada Y “A Kruppel-Associated Box-Zinc Finger Protein, NT2, Represses Cell-Type-Specific Promoter Activity of the  $\alpha 2(\text{XI})$  Collagen Gene” *Mol Cell Biol.* 22: 4256-4267 2002

Matsui Y, Chansky HA, Barahmand-Pour F, Zielinska-Kwiatkowska A, Tsumaki N, Myoui A, Yoshikawa H, Yang L, Eyre DR. “COL11A2 collagen gene transcription is differentially regulated by EWS/ERG sarcoma fusion protein and wild-type ERG” *J Biol Chem.* in press 2003

Matsui Y, Araki N, Tsuboi H, Tsumaki N, Nakata K, Kawabata H, Eyre DR, Yoshikawa H. “Differential expression of aggrecan mRNA isoforms by chondrosarcoma cells” *Anticancer Res* 22: 4169-4172 2002

妻木範行 『最新学際情報』 XI 型コラーゲン遺伝子 関節外科 21:1136-1137 2002

妻木範行, 中瀬尚長, 宮地高弘, 越智隆弘, 吉川秀

樹 軟骨形成における BMP の役割 骨・関節・靭帯 15: 255-260 2002

妻木範行, 最新基礎科学/知っておきたい 「トランスジェニックマウス」 臨床整形外科, 36: 778-780 2001

2. 学会発表

2<sup>nd</sup> International Workshop on the Genetics of Bone Metabolism and Disease  
Feb. 2003

F. 知的財産の出願・登録状況  
該当なし



厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)  
分担研究報告書

ES細胞による骨・軟骨再生の研究

分担研究者:戸山 芳昭 慶應義塾大学医学部整形外科学教室 教授

研究協力者:豊田 敬 慶應義塾大学医学部整形外科 助手

研究要旨:ES細胞から関節軟骨組織への分化制御機構の解明を目的として、静水圧が正常関節軟骨組織の細胞外基質代謝に与える影響を検討した。関節軟骨細胞の glycosaminoglycan 合成能, aggrecan mRNA の発現は静水圧負荷により増加したが、培養時期によっては静水圧負荷の影響が一定しない場合もあった。関節軟骨組織の分化制御には静水圧が重要な役割を担っており、軟骨形成能を高めるための負荷刺激には至適条件が存在することが判明した。

A. 研究目的

関節軟骨欠損に対して軟骨細胞移植が行われるようになってきたが、少量の健全軟骨組織から得られる細胞数には限りがあり、これにより修復可能な軟骨欠損の大きさには限界がある。これらの背景から、近年種々の組織に分化可能な未分化幹細胞、特に embryonic stem cells (ES 細胞)を用いた組織再生に期待が高まっている。しかしながら幹細胞から目的の組織への分化制御はいまだ困難とされており、その制御機構の解明が急務である。関節の運動・荷重に常にさらされる軟骨組織においては、機械的負荷が分化制御に極めて重要な役割を担うと考えられ、最近では *in vitro* に機械的負荷を細胞に負荷することにより、移植前に軟骨形成能を高め、より成熟した移植片を作成する mechanical conditioning の概念が提唱されている。本研究ではこの準備段階として、機械的負荷の重要な因子である静水圧が、正常関節軟骨組織の細胞外基質代謝に与える影響を検討した。

B. 研究方法

正常ウシ関節軟骨細胞を agarose gel に包埋し、培養14日目までの glycosaminoglycan 合成能の時間経過を調べた。次に培養 2, 7, 14 日目に自作の装置を用いて 2MPa あるいは 5MPa の圧を持続的あるいは周期的(1 Hz)に 4 時間加え、静水圧負荷による glycosaminoglycan 合成能, proteoglycan の分子サイズおよび凝集能, aggrecan mRNA の発現の変化を調べた。なお、食肉用ウシの屠殺後1時間以内の MTP 関節から軟骨細胞を採取したため、倫理上配慮すべき問題はなかった。

C. 研究結果

静水圧負荷を加えない状態では、関節軟骨細胞の glycosaminoglycan 合成能は培養 2-3 日目が最も高く、5 日目以降は定常状態となった。静水圧負荷の影響をみ

ると、5MPa の圧を持続的に 4 時間負荷することにより glycosaminoglycan 合成能が平均約 11% 増加した。Proteoglycan は分子サイズの大きなものが静水圧負荷により増加していたが、凝集能には変化がなかった。また aggrecan mRNA の発現は約 2.4 倍増加した。培養時期による差を見てみると、5MPa の持続的負荷は培養 2, 7, 14 日目のいずれにおいても glycosaminoglycan 合成能に刺激的に作用したが、glycosaminoglycan 合成能に抑制的に作用した 2MPa の周期的負荷の影響は培養 14 日目のみにおいて見られた。

D. 考察

正常関節軟骨組織の細胞外基質代謝の調節には静水圧負荷が極めて重要な役割を担うことが明らかとなった。また軟骨形成能を高めるための負荷刺激には至適条件が存在することが判明した。しかしながら培養時期によっては静水圧負荷の影響が一定しない場合もあり、関節軟骨細胞の代謝活性自体が静水圧に対する細胞の反応に影響を与える可能性が示唆された。数週間の培養期間における mechanical conditioning の効果を考えた場合、ある一時期に軟骨形成能を高める負荷条件が必ずしも培養期間を通じて同様の効果を得られるとは限らないと予測される。

今後は正常関節軟骨組織におけるこれらの知見を踏まえ、静水圧負荷刺激を ES 細胞の関節軟骨細胞への分化制御に応用し、培養期間を通じて軟骨形成能を高める至適条件を探索する予定である。

E. 結論

関節軟骨組織の分化制御には静水圧が重要な役割を担っている。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし

#### G. 研究発表

1. Nozaki J, Aizawa M, Uchida H, Itatani K, Suemasu H, Nozue A, Okada I, Matsumoto M, Matsumoto H, Toyama Y : Biocompatibility of hydroxyapatite films formed on Ti metal by a simple urea and urease treatment. *Key Engineering Materials* 240-242:603-606,2003
2. Mamoru Aizawa, Hiroki Shinoda, Hiroshi Uchida, Kiyoshi Itatani, Isao Okada, Morio Matsumoto, Hikaru Morisue, Hideo Matsumoto, Yoshiaki Toyama : Development and biological evaluation of apatite fibre scaffolds with large pore size and high porosity for bone regeneration. *Key Engineering Materials* 240-242:647-650,2003
3. Hiroyuki Enomoto, Isao Inoki, Koichiro Komiya, Takayuki Shiomi, Eiji Ikeda, Kenichiro Obata, Hideo Matsumoto, Yoshiaki Toyama, Yasunori Okada : Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *American J Pathology* 162:171-181,2003
4. Yasuo Niki, Hideo Matsumoto, Yasunori Suda, Toshiro Otani, Kyosuke Fujikawa, Yoshiaki Toyama, Noriyuki Hisamori, Akira Nozue : Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophage. *Biomaterials* 24(8):1447-1457,2003
5. Tomonori Abe, Harumoto Yamada, Hideto Nakajima, Toshiyuki Kikuchi, Hironari Takaishi, Takushi Tadakuma, Kyosuke Fujikawa, Yoshiaki Toyama : Repair of full-thickness cartilage defects using liposomal transforming growth factor- $\beta$  1. *J Orthop Sci.* 8:92-101,2003
6. Aizawa M, Ito M, Itatani K, Suemasu H, Nozue A, Okada I, Matsumoto M, Ishikawa M, Matsumoto H, Toyama Y : In vivo and in vitro evaluation of the biocompatibility of the hydroxyapatite-PMMA hybrid materials having mechanical property similar to that of cortical bone. *Key Engineering Materials* 218-220:465-468,2002
7. Kiwamu Horiuchi, Shigeki Momohara, Taisuke Tomatsu, Kazuhiko Inoue, Yoshiaki Toyama : Arthroscopic synovectomy of the elbow in rheumatoid arthritis. *J Bone Joint Surg.(Am)* 84-A(3):342-347,2002
8. Toshiyuki Miyasaka, Hideo Matsumoto, Yasunori Suda, Toshiro Otani, Yoshiaki Toyama : Coordination of the anterior and posterior cruciate ligaments in constraining the varus-valgus and internal-external rotatory instability. *J Orthop Sci.* 7:348-353,2002
9. Toshikichi Hayashi, Toshio Kaneda, Yoshiaki Toyama, Masayoshi Kumegawa, Yoshiyuki Hakeda : Regulation of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-induced osteoclastogenesis by endogenous interferon- $\beta$  (INF- $\beta$ ) and suppressors of cytokine signaling(SOCS). *J Biological Chemistry* 277(31):27880-27886,2002
10. Kensuke Ochi, Grouping Chen, Takashi Ushida, Satoshi Gojo, Kaoru Segawa, Hitoshi Tai, Kenju Ueno, Hiroyuki Ohkawa, Taisuke Mori, Yoshiaki Toyama, Junichi Hata, Akihiro Umezawa : Use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified Poly-DL-Lactic-Co-Glycolic Acid(PLGA)-Collagen sponge. *J Cellular Physiology* 194:45-53,2002
11. Yasuo Niki, Harumoto Yamada, Shuhji Seki, Toshiyuki Kikuchi, Hironari Takaishi, Yoshiaki Toyama, Kyosuke Fujikawa, Norihiro Toda : Macrophage-and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1  $\alpha$  transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 107(9):1127-1135,2001
12. Yasuo Niki, Hideo Matsumoto, Toshiro Otani, Yasunori Suda, Yoshiaki Toyama : Metal ion concentrations in the joint fluid immediately after total knee arthroplasty. *Mod Rheumatol.* 11:192-196,2001
13. Hironori Kaneko, Toshiya Arakawa, Hiroshi Mano, Toshio Kaneda, Aichi Ogasawara, Mari Nakagawa, Yoshiaki Toyama, Yutaka Yabe, Masayoshi Kumegawa, Yoshiyuki Hakeda : Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein(BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 27:479-486,2000

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

核内 IC を用いたリウマチ滑膜細胞の病的状態の理解とその制御の基盤的研究

中島 利博

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター ゲノム医科学研究部門 部門長/助教授

#### 研究要旨

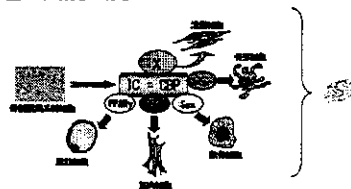
関節リウマチの主病変である滑膜細胞の過増殖と活性化、および軟骨細胞の変性の制御はリウマチ性疾患制圧の標的である。これまで、リウマチ滑膜細胞に転写亢進状態が存在し、その病態に深く関与していることが討議されている。本研究では CREB 結合蛋白質 (CBP) に代表される転写統合装置の機能異常がリウマチ滑膜細胞の転写亢進状態、ひいては同細胞の異常増殖に関与するのではないかと仮定し、本仮説の検証、さらには創薬開発を行うことを目的とする。昨年度、CBP 結合因子としてリウマチ滑膜細胞由来 cDNA ライブラリーより神経系の発生・分化に重要な Notch1 が得られ、リウマチ滑膜細胞では TNF $\alpha$  により Presenilin を介して Notch-1 シグナルが活性化されることが示され、その特異的抑制剤により培養リウマチ滑膜細胞の増殖を制御可能であることを報告した。今年度は、さらに、①本経路の詳細な分子機構を解析した。また、②同様に軟骨細胞のライブラリーより、細胞周期制御因子 p34 が得られ、CBP との複合体形成が CREB 転写系を調節し、同細胞の genesis に影響を与える可能性を報告した (Hirose ら in press)。さらに、CBP 自体の機能亢進現象 (hypernuclear acetylation) がリウマチ滑膜細胞に存在し、その過増殖に関与している可能性を見出した (Nakazawa ら 2002)。今後もこれらの研究を推進しリウマチ制圧法の開発の糸口をしたい。

#### A. 研究目的

ヒト全ゲノム配列が明らかとなり、より明確な“戦略”を用いて膨大なゲノム資源を選択し、有益な情報を抽出することが 21 世紀の基礎生物学、並びに医学研究の発展に最も求められています。これまで、MyoD、ホメオボックス蛋白質などの組織・細胞・分化特異的転写因子が正常な発生過程のみならず、種々の病巣形成に関与していることが明らかにされました。さらに、これらの因子の機能を理解することが理論的再生医学的アプローチの基盤的知識として必要であることは明白です。すなわち「**相手を知ること**」が、学問体系の確立に必要な不可欠であることは自明の理です。関節リウマチの病態を、生体内における多彩な免疫反応と骨破壊を伴った関節滑膜の増殖性疾患という 2 つの側面からとらえた場合、前者の免疫反応に関しては多くの研究がなされ、その分子機構が明らかにされつつあります。しかし後者の関節滑膜細胞の研究に関しては、それが関節リウマチの主座であるのにもかかわらず、その細胞生物学的な特徴すら明らかにされていないのが現状です。

そこで、本研究は“普遍的”転写統合装置を“切り口”として関節リウマチの**病巣形成細胞(リウマチ滑膜細胞)の全トランスクリプトームをスクリーニングし、同細胞を規定する核内因子群の同定とその機能解析を行います。**すなわち、それぞれの細胞の系譜・生物学的性状、そして病的表現型としての**各病変を包括的・根本的に理解し、さらにその分化の人為的制御による治療法の確立を目指す**ものです。

図. 本研究のねらい



#### B. 研究

##### 方法

滑膜細胞は軟骨細胞などと同様に間葉系細胞由来であるとされています(右図)。しかしながら、その分化・増殖の系譜、さらにそこに関与する分子(群)については明らかにされていません。ある組織・細胞に発現している遺伝子のクローニング法には①ディファレンシャルディスプレイ、サブトラクション法、最近では DNA マイクロアレイを用いた包括的な発現解析法など他の組織・細胞との比較を基盤とする方法がよく行われています。一方で、②affinity カラムなどを用いた生化学的精製法、yeast 2 hybrid 法のようにある因子に結合する因子をその結合力を用いて同定する方法も盛んに行われています。後者のストラテジーの場合、もっとも重要な点のひとつが何をプローブ(指標)として行うかであり、そのことがクローニングの成否を左右しているといっても過言ではありません。申請者は一貫として転写統合装置 CREB binding protein (以下、CBP) の研究を行い、同分子をプローブとして用いた医学研究戦略を展開しています。

(倫理面への配慮)

### I 研究等の対象とする個人の人権擁護

研究結果発表や出版に際しては個人が特定されないよう十分に配慮する。具体的には、研究責任者は、被験者のいかなる個人情報も漏出しないように細心の注意を払い、個人情報管理者を通じて試料等の匿名化を行い、検査実施者(申請者)に対しては登録記号のみで対応する。

### II 研究等の対象となる者に理解を求め同意を得る方法

全ての被験者には別紙の「説明文書」と「同意書」を渡し、内容を十分に説明した上で、その自由意思による同意を得る。DNA、またはcDNAを用いて解析する項目を明確に記載し、被験者の同意が得られた項目に限って検討する。各項目については文書で詳細に説明し、被験者の理解が十分に得られるように努め、インフォームドコンセントを確保する。

### III 研究等によって生ずる個人への不利益並びに危険性への配慮

#### (1) 不利益並びに危険性に対する配慮

検体の採取(採血など)に伴う肉体的苦痛、遺伝子解析への不安などの心理的問題、プライバシーの侵害が考えられる。採血は医師など法的に許可された者が携わり、採血時に不快感を訴えた場合は、ただちに採血を中止し、適切な処置を行う。また、遺伝子を解析することにより、後になって被験者が不安になったり相談したいことができた場合は、まず主治医もしくはインフォームドコンセント担当者などに申し出てもらい相談を受ける。更に必要があれば、研究に直接関与しない第三者として遺伝カウンセリングの担当者に紹介し、カウンセリングを行う。プライバシーの侵害に対しては、前述した方法で個人情報を保護することで対処する。

#### (2) 診断及び検査前後の配慮

遺伝子検査を行うことで、遺伝性疾患を持つ家系に属することが明らかになり、被験者に不安あるいは精神的ストレスを与える可能性があるため、被験者に対する検査前後の配慮を十分に行う。被験者が本研究に協力する際などに、研究説明者(主治医あるいは研究責任者や研究分担者)に聞き難いことや相談しにくいことがあることも予想されるので、専門家によるカウンセリングを行う。

### C. 研究結果

リウマチ滑膜細胞由来cDNAライブラリーよりCBPのC/H3領域をbaitとしたyeast two-hybrid screeningにより117個のポジティブクローンが得られました。シークエンス解析およびデータベース(BLASTP)による検索を行ったところ、29個の陽性クローンがNotch-1でした。

Notchは発生において、主として神経系の側方抑制に関与していることが古典的に知られています。器官幹細胞が分化する際、分化する細胞はそのリガ

ンドを発現し、その周囲の細胞はNotchレセプターが活性化され、分化シグナルが抑制されます。Notch-1は神経系細胞の膜表面でヘテロ二量体として存在し、レセプターとしての機能を有する。リガンドと結合し、Notch-1シグナルが活性化される際、同分子はプロセッシングを受け、核内に移行し転写調節因子としNF- $\kappa$ Bなどのシグナルを活性化すると考えられています。

滑膜細胞でのNotch-1の発現と局在を検討した結果、同分子はリウマチ滑膜細胞で強発現し、かつTNF $\alpha$ のシグナルにより細胞表面から核内への移行を示していました。さらに、リウマチ滑膜細胞ではTNF $\alpha$ によりpresenilinを介してNotch-1シグナルが活性化されることが示され、その特異的抑制剤により培養リウマチ滑膜細胞の増殖を制御可能です。すなわち、今後、まったく新しい視点からのリウマチ性疾患の治療薬の開発が可能です。

さらに残り88クローンのうち一つは新規のクローン(Rheumatoid specific Nuclear Factor1:RSNF1と名付けた)であり、MyoDに類似したモチーフを有していました。現在同分子の細胞レベル、トランスジェニックマウスの作成が終了し、さらにはノックアウトマウスの作成が進んでいます。

### D. 考察

アルツハイマー病と $\gamma$ セクレターゼ/プレセニリンの関連については、多くの優れたレビューがあります。要約すると、プレセニリン1は1995年14番染色体に異常を示す家族性アルツハイマー病の原因遺伝子としてクローニングされました。さらに、プレセニリン2とよばれるホモログがクローニングされました。これも1番染色体に異常を示す家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であることが明らかになりました。それぞれ467、448アミノ酸からなる8回貫通型の膜タンパク質で、細胞内では主に小胞体やゴルジ体に局在することが報告されました。これらの遺伝子の一部に突然変異があり、アミノ酸変異が起こると家族性アルツハイマー病を引き起こすことが明らかになりました。その分子機序としてはアルツハイマー病の脳に沈着するアミロイド $\beta$ タンパク質(A $\beta$ )はその前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質(APP)から $\gamma$ 、および $\beta$ セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼ群により分解を受け生成されます。最近の研究の進展により、プレセニリンが $\gamma$ セクレターゼではないかと考えられています。プレセニリン遺伝子に異常が起こると、 $\gamma$ セクレターゼによるAPPの切断部位が2アミノ酸C末側にシフトし、正常ではあまり産生されない長いA $\beta$ が生み出されるようになります。このA $\beta$ (A $\beta$ 42)は正常のA $\beta$ (A $\beta$ 40)よりも凝集しやすく脳に沈着しやすいことが明らかとなりました。家族性アルツハイマー病で見られる多くのプレセニリン変異はA $\beta$ 42の産生を高めることも知られています。これらのことより、 $\gamma$ セクレターゼはアルツハイマー病の治療の標的として注目を浴びています。

一方、Notch は発生において、主として神経系の側方抑制に関与していることが古典的に知られています。すなわち、器官幹細胞が分化する際、分化する細胞は Notch-1 リガンドを発現し、その周囲の細胞は Notch レセプターが活性化され、分化シグナルが抑制されます。Notch-1 は神経系細胞の膜表面で p180/p120 のヘテロ二量体として存在し、レセプターとして機能します。そのリガンドが結合すると p180 による負の制御が解除され、Notch-1 シグナルが活性化されるものと考えられています。その際、シグナルの活性化により p120 はさらにプロセッシングを受け、核内に移行し、転写調節因子として NF- $\kappa$ B などのシグナルを活性化することが報告されました。最近、この核内移行フラグメント (NICD) のプロセッシングを行うプロテアーゼの一つとして前述したプレセニリンが同定されました。また、PS1、PS2 ダブルノックアウトマウスでは  $\gamma$  セクレターゼ活性、および Notch の切断活性の両者が消失することが示されています。従って、これらの報告と私たちの発見を考え合わせると、 $\gamma$  セクレターゼ/プレセニリンはアルツハイマー病と関節リウマチの両方で共通の活性化分子として存在し、かつ、それぞれの治療の標的となる可能性があります。すなわち、NSAIDs がアルツハイマー病の予防として効果があるということだけではなく、逆に、アルツハイマー病の治療薬が、関節リウマチの治療に有効な可能性も示唆されたのではないかと考えます。

#### E. 結論

思わぬ研究の展開からアルツハイマー病の治療薬として用いられるプレセニリン/ $\gamma$  セクレターゼ阻害剤が関節リウマチの治療にも用いられる可能性を見出しました。

#### F. 健康危険情報

特にありません。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

H. Fujita, R. Fujii, S. Aratani, T. Amano, A. Fukamizu, T. Nakajima, "Opposite effects of MBD2a on gene regulation" *Molecular and Cellular Biology* in press 2003

S. Aratani, R. Fujii, H. Fujita, A. Fukamizu, T. Nakajima, "Aromatic residues are required for RNA helicase A mediated transactivation." *International Journal of Molecular Medicine* in press 2003

T. Hirose, R. Fujii, H. Nakamura, A. Aratani, H. Fujita, M. Nakazawa, K. Nakamura, K. Nishioka, T. Nakajima, "Regulation of CREB-mediated

transcription by association of CDK4 binding protein p34 SEI-1 with CBP" *International Journal of Molecular Medicine* in press 2003

N. Araya, K. Hirota, Y. Shimamoto, M. Miyagishi, E. Yoshida, J. Ishida, S. Kaneko, M. Kaneko, T. Nakajima, A. Fukamizu. "Cooperative Interaction of EWS with CBP Selectively Activates HNF4-mediated Transcription." *J Biol Chem.* in press 2003

M. Nakazawa, S. Aratani, M. Hatta, N. Araya, H. Daitoku, K. Kawahara, S. Watanabe, H. Nakamura, S. Yoshino, A. Fukamizu, K. Nishioka T. Nakajima. "TNF  $\alpha$  induces acetylation of p53 but attenuates its transcriptional activation in rheumatoid synoviocytes" *International Journal of Molecular Medicine* 10 : 269-275 2002.

T. Imaizumi, S. Aratani, T. Nakajima, M. Carlson, T. Matsumiya, K. Tanji, K. Ookawa, H. Yoshida, S. Tsuchida, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, G. A. Zimmerman, K. Satoh. "Retinoic Acid-Inducible Gene-1 Is Induced in Endothelial Cells by LPS and Regulates Expression of COX-2." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292 : 274-279 2002

Nguyen Ngoc Chau, H. Nakamura, M. Nakazawa, T. Hirose, T. Kobata, K. Nishioka, T. Nakajima. "Expression of HOXD9 in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients." *International Journal of Molecular Medicine* 10 : 41-48 2002

H. Kitagawa, J. Yanagisawa, H. Fuse, S. Ogawa, Y. Yogiashi, A. Okuno, H. Nagasawa, T. Nakajima, T. Matsumoto, S. Kato. "Ligand Selective Potentiation of Rat Mineralocorticoid Receptor Activation Function-1 (AF-1) by ACBP-containing HAT complex." *Mol. Cell. Biol.* 22 : 3698-3706 2002.

H. Kawabata, K. Kawahara, T. Kanekura, N. Araya, H. Daitoku, M. Hatta, N. Miura, A. Fukamizu, T. Kanzaki, I. Maruyama, T. Nakajima. "Possible role of transcriptional coactivator P/CAF and nuclear acetylation in calcium induced keratinocyte differentiation." *J Biol Chem.* 277 : 8099-8105 2002

H. Ishii, M. Nakazawa, S. Yoshino, H. Nakamura, K. Nishioka, T. Nakajima. "Expression of Notch homologues in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients." *Rheumatology International* 21:10-14 2001.

H. Daitoku, J. Ishida, K. Fujiwara, T. Nakajima,

- A. Fukamizu. "Dimerization of small GTPase Rab5" *International Journal of Molecular Medicine* 8 : 397-404 2001.
- S. Aratani, R. Fujii, T. Oishi, H. Fujita, T. Amano, T. Ohshima, M. Hagiwara, A. Fukamizu, and T. Nakajima. "Dual roles of RNA helicase A in CREB-dependent transcription. " *Mol. Cell. Biol.* 21 : 4460-4469 2001.
- M. Nakazawa, H. Ishii, H. Aono, M. Takai, T. Honda, S. Aratani, A. Fukamizu, H. Nakamura, S-I, Yoshino, T. Kobata, K. Nishioka, T. Nakajima "Role of Notch-1 intracellular domain in activation of rheumatoid synoviocytes." *Arthritis and Rheumatism* 44 : 1545-1554 2001.
- R. Fujii, M. Okamoto, S. Aratani, T. Oishi, T. Ohshima, K. Taira, M. Baba, A. Fukamizu, T. Nakajima "A role for RNA helicase A in TAR-dependent transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1" *J Biol Chem.* 276 : 5445-5451 2001.
- Nguyen Dinh Khoa, Minako Nakazawa, Tomoko Hasunuma, Toshihiro Nakajima, Hiroshi Nakamura, Tetsuji Kobata, Kusuki Nishioka. "Potential role of HOXD9 in synoviocyte proliferation. " *Arthritis and Rheumatism* 44 : 1013-1021 2001
- KP. Sarker, M. Nakata, T. Tokioka, I. Kitajima, T. Nakajima, I. Maruyama. "Inhibition of Caspase-3 Activation by SB203580, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor in Nitric Oxide-Induced Apoptosis of PC-12 Cells. " *Journal of Molecular Neuroscience* 15: 243-250 2001.
- Ohshima T, Yoshida Y, Nakajima T, Yagami K, Fukamizu A. "Effects of interaction between parvovirus minute virus of mice NS1 and coactivator CBP on NS1-and p53 -transactivation. " *International Journal of Molecular Medicine* 7: 49-54 2001.
- Nakazawa M, Ishii H, Nakamura H, Yoshino S, Fukamizu A, Nishioka K, Nakajima T. "NF $\kappa$ B2 (p52) promoter activation via Notch signaling pathway in rheumatoid synoviocytes. " *International Journal of Molecular Medicine* 7: 31-35 2001.
- Miyagishi M, Fujii R, Hatta M, Yoshida E, Araya N, Nagafuchi A, Ishihara S, Nakajima T, Fukamizu A. "Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating  $\beta$ -catenin with CBP/p300. " *J Biol Chem.* 275: 35170-35175 2000.
- Shimohata T, Nakajima T, Yamada M, Uchida C, Onodera O, Naruse S, Kimura T, Koide R, Nozaki K, Sano Y, Ishiguro H, Sakoe K, Ooshima T, Sato A, Ikeuchi T, Oyake M, Sato T, Aoyagi Y, Hozumi I, Nagatsu T, Takiyama Y, Nishizawa M, Goto J, Kanazawa I, Davidson I, Tanese N, Takahashi H. Tsuji S. "Interaction of expanded polyglutamine stretches associated with CAG repeat diseases and hTAFII130 interferes with CREB-dependent transcription. " *Nature Genetics* 26: 29-36 2000
- Pitkanen J, Doucas V, Sternsdorf T, Nakajima T, Aratani S, Jensen K, Will H, Vahamurto P, Ollila J, Vihinen M, Scott HS, Antonarakis SE, Kudoh J, Shimizu N, Krohn K, Peterson P. "APECED protein AIRE has transcriptional transactivating properties and interacts with common co-activator CBP. " *J. Biol. Chem.* 275: 16802-16809 2000.
- Nakazawa m. Hasunuma T. Ohshima T. Tanaka Y. Nishioka k. Nakajima T. "CBP: a target molecule of HTLV-1 Tax in synoviocyte activation. " *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 269: 584-590 2000
- M. Miyagishi, T. Ohshima, J-I. Ishida, R. Fujii, T. Nakajima, A. Fukamizu "Molecular characterization of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/capsulin. " *International Journal of Molecular Medicine* 5: 27-31 2000.
- Miyagishi, M. Nakajima T. Fukamizu A. "Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/Capsulin. " *Molecular and Cellular Biochem.* 205: 141-147 2000.
2. 学会発表  
 ・ 12<sup>th</sup> Annual Joint Meeting on Immunology Teaching and Research 2002/3/4-6  
 ・ Cold Springharbor Laboratory Meeting 2002/5-21-28  
 ・ 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan College of Rheumatology 2002/4/23
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)  
 1. 特許取得  
     特にありません。  
 2. 実用新案登録  
     特にありません。  
 3. その他  
     特にありません。

厚生労働省科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)  
分担研究報告書

関節リウマチの先端的治療に関する研究班  
(分担研究課題:増殖因子による軟骨修復機構)

分担研究者 開 祐司 京都大学再生医科学研究所教授

軟骨は無血管の特殊な結合組織で、胎生期の骨形成予定領域に軟骨性骨原基として広く出現する。しかし、軟骨性骨原基はやがて周囲組織からの血管の侵入を受け、骨に置換される。このために成熟個体では、関節表面に関節軟骨としてわずかに残るのみとなる。しかし、可動関節表面の軟骨は、荷重を支えると同時に可動性を保証する極めて重要な機能を担っている。それにも関わらず、骨とは対照的に、その表面を覆う関節軟骨は再生能力に極めて乏しい。このため、関節軟骨が一旦損傷や壊死に陥ると進行性に組織破壊が起こる。本研究では、軟骨幹細胞株 ATDC5 細胞による *in vitro* 分化モデルと関節軟骨全層欠損による *in vivo* 軟骨再生モデルを駆使して、軟骨再生誘導の分子基盤とこれを応用した軟骨再生技術を開拓する。

これまでの研究により、関節軟骨全層欠損における軟骨修復においては、軟骨下骨の骨髄から供給される間葉系幹細胞の動員と活発な自己複製能の維持が軟骨再生誘導する決定的な要因であることが明らかとなった。特に、欠損周囲組織から供給される FGF-2 シグナルが骨髄内から動員される前駆軟骨細胞の遊走のみならず、欠損部での旺盛な増殖維持に不可欠の役割を果たしている。そこで本年度は、骨髄より遊走する前駆軟骨細胞の分化初期過程を詳細に解析するために、(種々の分子プローブが利用可能な)ラット大腿骨膝蓋窩に関節軟骨全層欠損モデルの作成を目指した。すなわち、1)自然治癒がはかれる小口径の全層欠損を再現性よく作成する実験手技を工夫する。2)分子プローブを用いて軟骨初期分化過程を追跡することを試みた。

## A. 研究目的

軟骨は無血管の特殊な結合組織で、間葉系細胞の軟骨分化により胎生期の骨形成予定領域に広く出現する。このようにして形成された軟骨性骨原基は、やがて周囲組織からの血管の侵入をうけると共に、骨に置換される。そのため、成熟個体の骨格では関節軟骨として骨端にわずかに残る。一般に高い再生能力を有する骨に比べて、その表面を覆う関節軟骨は再生能力の極めて乏しい組織である。本研究では、軟骨・骨発生におけるシグナルネットワークをモデルに、関節軟骨の再生修復制御の分子基盤を確立する。本年度は、これまでに確立したウサギ関節軟骨全層欠損モデルに代わって、分子生物学的解析手法に適したラットを用いて自然修復しうる定量的全層欠損モデルを確立した。

## B. 研究方法

ウサギよりはるかに小さな組織を持つラットに、幅・長さ・深さを正確に且つ再現性よく保ちながら大腿骨膝蓋溝に関節軟骨全層欠損を作成する2枚刃デバイスの設計と作成した。この独自デバイスを用いて作成された、関節軟骨全層欠損の幅・長さ・深さを計測した。次いで、これを用いて6週齢雄 Wister 系ラット (N=105) の大腿骨膝蓋溝に作成した全層欠損 (幅 0.7mm 長さ 4mm 深さ 0.8mm) を対象に、術後 2、4、7 日目および 2、4、8、12、24 週目で屠殺し、safranin-O 染色による組織学的観察、ならびに免疫組織染色、in situ ハイブリダイゼーション法による II 型コラーゲン mRNA (col II)、N-カドヘリン、および PTH/PTHrP 受容体 (以下 PTHR) の経時的な発現を検討した (倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、京都大学再生医科学研究所及び熊本大学医学部の動物実験委員会に提出・審査を経た実験計画に基づき、「動物実験に関する指針」に従って実施され

た。

## C. 研究結果

2日目では欠損の辺縁部に未分化細胞の浸潤がみられ、4日目には欠損全体を未分化細胞が充填し、欠損中心の細胞には N-cadherin の発現がみられた。1週間にはその発現は消失し、同部には type II collagen mRNA を発現する多角形の細胞が出現し、10日目には safranin-O 染色陽性の軟骨基質に囲まれる類円形の軟骨細胞が出現した。以後、軟骨形成が進行するが、欠損深部では4日目より骨形成を認め、2週間には新生骨に接して type X collagen mRNA を発現する肥大軟骨細胞がみられた。4週間には隣接した骨軟骨境界部まで形成された軟骨下骨の表面を軟骨で被覆された本来の組織構築が回復された。12 週目より軟骨基質の染色性の低下がみられたが、24 週までその組織構造は維持されていた。一方、PTHR 受容体は2日目の欠損内の未分化細胞には発現していなかったが、4日目に欠損内を充填した細胞の多くにその発現を認めた。

## D. 考察

今回作成したラット関節軟骨全層欠損モデルでは再現性の高い軟骨修復がみられ、また一定した修復過程が観察された。細胞凝集過程は軟骨初期分化を支配する重要な制御段階であることが知られ、この際 N-cadherin 等の細胞接着分子が重要な働きをしている。本モデルで4日目の欠損中心の細胞が N-cadherin を発現し、その後軟骨細胞への分化がみられたことは、これらの細胞が胎生期肢芽形成や軟骨前駆細胞培養系でみられる細胞凝集領域内の細胞に相当することを示唆している。われわれは既に家兎関節軟骨全層欠損モデルにおいて PTH/PTHrP 受容体が高度に軟骨分化に限定された分化段階の細胞 (軟骨前駆細



胞)に発現することを示したが、今回の結果は、骨髄より欠損部に遊走した細胞はこれより未分化な段階にあることを示唆している。

## E. 結論

大腿骨膝蓋溝に関節軟骨全層欠損を作成するための2枚刃デバイスを独自に設計・作成した。これによって、関節軟骨全層欠損の修復過程を再現性よく追跡することが可能となった。ラットではウサギよりも遥かに充実した分子マーカーを用いた解析ができるので、本ラットモデルは関節軟骨全層欠損の修復制御機構を解明する上で有用なモデルであることが示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) K. Kusafuka, Y. Hiraki, C. Shukunami, T. Kayano, and T. Takemura (2002) *Acta Histochem.*, 104, 167-175; Cartilage-specific matrix protein, chondromodulin-I (ChM-I), is a strong angi-inhibitor in endochondral ossification of human neonatal vertebral tissues in vivo: relationship with angiogenic factors in the cartilage.
- 2) H. Inoue, Y. Hiraki, T. Nawa, and K. Ishizeki (2002) *Anat. Sci. Int.* 77, 237-246; Phenotypic switching of in vitro mandibular chondylar cartilage during matrix mineralization.

### 2. 学会発表

- 1) H. Chuma, H. Mizuta, K. Takagi, and Y. Hiraki (2001) Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of the USA, Canada, Europe and Japan (Greece); The effect of a limited and transient administration of FGF-2 on regeneration

of articular cartilage defects.

- 2) K. Kusafuka, Y. Hiraki, C. Shukunami, A. Yamaguchi, T. Kayano, and T. Takemura (2002) First Congress on Salivary Gland Diseases (Geneva, Switzerland); Chondromodulin-I is associated with hypovascularity of pleomorphic adenomas.
- 3) H. Chuma, H. Mizuta, K. Takagi, and Y. Hiraki (2002) The 48th Annual Meeting of the ORS (Dallas, Texas); Transient administration of FGF-2 promotes regeneration of articular cartilage defects by migration of marrow-derived mesenchymal stem cells.
- 4) 瀬戸口京吾、三崎義堅、川畑仁人、島田浩太、宿南知佐、開祐司、山本一彦(2002) 第46回日本リウマチ学会総会・学術集会(神戸);骨端軟骨由来因子コンドロモジュリン-I(Chondromodulin-I)のT細胞機能抑制を介した関節炎改善.

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

(西岡 久寿樹)

- 1) Yuan GH, Masuko-Hongo K, Nishioka K, Immunological intervention in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Arthritis Rheum* (in press)
- 2) Okamoto N, Yotsuyanagi H, Ooka S, Matsui T, Suzuki-Kurokawa M, Suzuki M, Iino S, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to CD69 in patients with chronic hepatitis type C: A candidate marker for predicting the response to interferon therapy. *Intervirology* 46(1):56-65,2003
- 3) Suzuki-Kurokawa M, Kato T, Nishioka K, Detection of clonally expanded T-cells by RT-PCR-SSCP and nucleotide sequencing of T-cell receptor  $\beta$ -CDR3 regions. *Methods Mol Biol* 193:267-280,2002
- 4) Nakazawa M, Aratani S, Hatta M, Araya N, Daitoku H, Kawahara K, Watanabe S, Nakamura H, Yoshino S, Fujii R, Fujita H, Fukamizu A, Nishioka K, Nakajima T. TNF  $\alpha$  induces acetylation of p53 but attenuates its transcriptional activation in rheumatoid synoviocytes. *Int J Mol* 10(3):269-275,2002
- 5) Matsuno H, Yudoh K, Nakazawa F, Sawai T, Uzuki M, Nishioka K, Yonehara S, Nakayama J, Otsuki M, Kimura T. Antirheumatic effects of humanized anti-Fas monoclonal antibody in human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera. *J Rheumatol* 29(8):1609-1614,2002
- 6) Tsuruha J, Masuko-Hongo K, Kato T, Sakata M, Nakamura H, Sekine T, Takigawa M, Nishioka K. Autoimmunity against YKL-39, a human cartilage derived protein, in patients with osteoarthritis. *J Rheumatol* 29(7):1459-1466,2002
- 7) Chau NN, Nakamura H, Nakazawa M, Hirose T, Kobata T, Nishioka K, Nakajima T. Expression of HOXD9 in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Int J Mol Med* 10(1):41-48,2002
- 8) Sakata M, Masuko-Hongo K, Tsuruha J, Sekine T, Nakamura H, Takigawa M, Nishioka K, Kato T. YKL-39, a human cartilage-related protein, induces arthritis in mice. *Clin Exp Rheumatol* 20(3):345-350,2002
- 9) Yuan GH, Masuko-Hongo K, Nishioka K. Role of chemokines / chemokine receptor systems in cartilage degradation. *Drug News Perspect* 14(10):591-600,2001
- 10) Masuko-Hongo K, Sakata M, Yuan GH, Onuma H, Nakamura H, Aoki H, Kato T, Nishioka K. Expression of Fas-associated death domain-like interleukin-18-converting enzyme (FLICE) inhibitory protein (FLIP) in human articular chondrocytes: possible contribution to the

resistance to Fas-mediated death of in vitro cultured human articular chondrocy. *Rheumatol Int*21(3):112-121,2001

- 11) Nishioka K, Kobayashi T. Regulation of Apoptosis in Rheumatoid Synoviocytes. *Modern Therapeutics in Rheumatic Diseases* (Human Press Inc.)575-582,2001
- 12) Nakazawa M, Ishii H, Aono H, Takai M, Honda T, Aratani S, Fukamizu A, Nakamura H, Yoshino S, Kobata T, Nishioka K, Nakajima T. Role of Notch-1 intracellular domain in activation of rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum*44 (7):1545-1554,2001
- 13) Sakata M, Tsuruha J, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Matsui T, Sudo A, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to osteopontin in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28(7):1492-1495, 2001
- 14) Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha J, Onuma H, Nakamura H, Aoki H, Kato T, Nishioka K. The Role of C-C Chemokines and Their Receptors in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum*44(5):1056-1070,2001
- 15) Khoa ND, Nakazawa M, Hasunuma T, Nakajima T, Nakamura H, Kobata T, Nishioka K. Potential Role of HOXD9 in Synoviocyte Proliferation. *Arthritis Rheum*44(5):1013-1021,2001
- 16) Tsuruha J, Masuko-Hongo K, Kato T, Sakata M, Nakamura H, Nishioka K. Implication of cartilage intermediate layer protein in cartilage destruction in subsets of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44(4):838-845,2001
- 17) Hasunuma T, Kato T, Kobata T, Nishioka K. Apoptosis in Arthritis: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. *Advances in Cell aging and Gerontology*6:81-100,2001
- 18) Sekine T, Masuko-Hongo K, Matsui T, Asahara H, Takigawa M, Nishioka K, Kato T. Recognition of YKL-39, a human cartilage related protein, as a target antigen in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*60(1):49-54,2001
- 19) Masuko-Hongo K, Kurokawa M, Kobata T, Nishioka K, Kato T. Effect of Il-15 on T cell clonality in vitro and in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*59(9):688-694,2000
- 20) Mueller-Ladner U, Nishioka K. p53 in rheumatoid arthritis: friend or foe? *Arthritis Res*2(3):175-178,2000
- 21) Okamoto K, Kobayashi T, Kobata T, Hasunuma T, Kato T, Sumida T, Nishioka K. Fas-associated death domain protein is a Fas-mediated apoptosis modulator in synoviocytes. *Rheumatology*39(5):471-480,2000

- 22) Kobayashi T, Okamoto K, Kobata T, Hasunuma T, Kato T, Hamada H, Nishioka K. Differential Regulation of Fas-Mediated Apoptosis of Rheumatoid Synoviocytes by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Basic Fibroblast Growth Factor Is Associated with The Expression of Apoptosis-Related Molecules. *Arthritis Rheum*43(5):1106-1114,2000
- 23) Kobayashi T, Okamoto K, Kobata T, Hasunuma T, Kato T, Hamada H, Nishioka K. Novel gene therapy for rheumatoid arthritis by FADD gene transfer : induction of apoptosis of rheumatoid synoviocytes but not chondrocytes. *Gene Therapy*7 (6):527-533,2000

(岩倉 洋一郎)

- 1) Nakae, S., Komiyama, K., Yokoyama, H., Nambu, A., Umeda, M., Iwase, M., Homma, I., Sudo, K., Horai, R., Asano, M. and Iwakura, Y. Interleukin-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, (2003)in press.
- 2) Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. Interleukin 1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- 3) Sashinami, H., Nakane, A., Iwakura, Y., and Sasaki, M. Effective induction of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* by immunizing mice with in vivo-infected dendritic cells. *Infect. Immunol.*, (2003) 71, 117-125
- 4) Nakae, S., Horai, R., Komiyama, Y., Nambu, A., Asano, M., Nakane, A., and Iwakura, Y. The role of IL-1 in the immune system. In "Cytokine Knockouts", (ed. G. Fantuzzi), Humana Press, Totowa, NJ, (2003) in press.
- 5) Iwakura, Y. Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I tax gene. *Gann Monograph*, (2003) in press.
- 6) Nakae, S., Komiyama, Y., Narumi, S., Sudo, K., Horai, R., Tagawa, Y., Sekikawa, K., Matsushima, K., Asano, M., and Iwakura, Y. IL-1-induced TNF $\alpha$  elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 in the elicitation phase of contact hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, (2003) 15, 251-260.
- 7) Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H., and Iwakura, Y. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J. Gen. Virol.*, (2002) 83, 141-150
- 8) Yano, A., Mun, H.S., Chin, M., Norose, K., Hata, K., Kobayashi, M., Aosai, F., and Iwakura, Y. Roles of IFN- $\gamma$  on stage conversion of an obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int. Rev. Immunol.*, (2002) 21, 405-421
- 9) Desaki, M., Sugawara, I., Iwakura, Y., Yamamoto, K., and Takizawa, H. Role of