

較していくことにより、これまで知られていなかった骨・軟骨における間葉系幹細胞の活性化機構が解明されていくものと期待される。

## E. 結論

転写因子 Fra-1 は、骨芽細胞だけでなく、肺線維芽細胞のような、間葉系細胞の活性化にも寄与していた。Fra-1 は、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの産生を抑制するが、少なくとも肺においては、MCP-1 などの一部のケモカインの発現を誘導してマクロファージの遊走を促していた。

## F. 健康危険情報

ゲフィチニブやエルロチニブなどの EGFR 阻害剤のうちゲフィチニブは、EGFR 以外の標的に対する「特異的なオフターゲット効果」によって Fra-1 を活性化し、間質性肺炎や肺線維症を引き起こしている可能性がある（論文投稿中）。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yasunari Takada, Lionel Gresh, Aline Bozec, Eiji Ikeda, Kazunori Kamiya, Masazumi Watanabe, Koichi Kobayashi, Koichiro Asano, Yoshiaki Toyama, Erwin F. Wagner, Koichi Matsuo. (2011) Interstitial lung disease induced by gefitinib and Toll-like receptor ligands is mediated by Fra-1. *Oncogene* 30, 3821-3832.

### 2. 学会発表

Takada, Y., Matsuo, K. Osteoprotegerin prevents infection-induced bone loss. (Poster) 33rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 16-20, 2011, San Diego, USA.

Valverde-Franco, G., Kapoor, M., Hum, D., Matsuo, K. Lussier, B. Pelletier, J.-P.,

Martel-Pelletier, J. In vivo effect of bone-specific ephB4 overexpression in mice on subchondral bone and cartilage during osteoarthritis. (Oral) 33rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 16-20, 2011, San Diego, USA.

松尾光一（講演）骨細胞による骨溶解について 第29回日本骨代謝学会学術集会. 2011年7月28-30日（大阪）

高田康成、松尾光一（口頭発表）Osteoprotegerinによる感染性骨破壊の抑制 第29回日本骨代謝学会学術集会. 2011年7月28-30日（大阪）

## 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

## 骨細胞ネットワークによる骨量調節機構に関する研究

研究分担者 小守壽文 長崎大学医歯薬学総合研究科 教授  
研究協力者 森石武史 長崎大学医歯薬学総合研究科 技術職員

### 研究要旨

BCL2 を骨芽細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスでは、骨細胞突起の数が減少し骨細胞は徐々にアポトーシスを起こし、4ヶ月齢では骨細胞ネットワークがほぼ全域にわたって破綻した。このマウスを用い、骨細胞ネットワークの機能を解析した。骨細胞ネットワークは、生理的条件下では、骨芽細胞機能を低下させ骨形成を抑制、破骨細胞分化を促進させ骨吸収を促進させることが明らかとなった。さらに、骨細胞ネットワークが破綻すると、野生型マウスで観察される、非荷重時の骨細胞によるスクレロシン誘導による骨形成抑制および骨芽細胞での Rank1 発現誘導と破骨細胞分化促進による骨吸収の増加はともに認められず、骨量は減少しなかった。尾部懸垂により後肢を非荷重状態にした野生型マウスと BCL2 トランスジェニックマウスをマイクロアレイ解析で比較、非荷重を感知した骨細胞ネットワークが、骨芽細胞に Pdk4 を発現誘導させることを見いだした。Pdk4 ノックアウトマウスでは、非荷重時の骨吸収の亢進による骨量減少が起こらなかった。Pdk4 は骨芽細胞で RANKL 発現を誘導、破骨細胞形成、さらに骨吸収に導いていた。また、骨髄細胞も非荷重時に Pdk4 発現を上昇させ、破骨細胞形成に関与していた。

### A. 研究目的

骨形成と骨吸収はカップリングし、バランスが保たれているが、様々な非荷重状態では、骨形成は抑制され、骨吸収が亢進し、骨量が減少する。骨細胞は骨の中でお互いの突起および突起が通る骨細管で連絡している。さらに骨細胞はその突起と骨細管を介して骨表面の骨芽細胞と連絡し、骨全体にネットワークを形成している。骨細胞ネットワークは、その構造からメカニカルストレスを感知、骨芽細胞・破骨細胞にシグナルを伝達し、骨量を調節していると推定されている。しかし、骨細胞機能を解明するためのモデルマウスが存在せず、これまで、その機能は証明されていない。今回、骨細胞ネットワークが骨量調節を行っていることを証明するとともに、その分子メカニズムを明らかにすることを本研究目的とした。

### B. 研究方法

BCL2 を骨芽細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスでは、骨細胞突起の数が減少し骨細胞は徐々にアポトーシスにより死んでいった。骨細胞のない骨小腔が蓄積していき、4ヶ月齢では骨細胞ネットワークがほぼ全域にわたって破綻していた。この骨細胞ネットワークが破綻した4ヶ月齢の骨芽細胞特異的 BCL2 トランスジェニックマウスと野生型マウスで、尾部懸垂により後肢に非荷重状態を作り、骨量を比較するとともに、非荷重時に骨芽細胞系列に誘導される遺伝子をマイクロアレイにて比較した。野生型マウスで誘導され、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは誘導されない遺伝子を探索した。リアルタイム RT-PCR 法により確認し、骨細胞ネットワークにより調節される遺伝子を同定した。さらに、ノックアウトマウスを作製した。マイクロ CT、骨組織形態計測、リアルタイム RT-PCR にてコントロール群と非荷重群を野生型マウスとノックアウトマウスで比較した。

in vitro の破骨細胞形成実験は、骨髄細胞を M-CSF と RANKL 存在下で培養する方法と、骨芽細胞と骨髄細胞の共培養の 2 つの方法で行った。レポーターアッセイで RANKL promoter 活性を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、本学の動物実験委員会で承認されたものであり、国の「動物の保護および管理に関する法律」などに従い、動物愛護の観点に十分配慮して行った。マウスは麻酔薬で安楽死させた。

### C. 研究結果

骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、骨形成が増加、骨吸収が減少していた。すなわち、骨細胞ネットワークは、これまで言われてきたように骨形成を促進し、骨吸収を抑制するのではなく、骨形成を抑制、骨吸収を促進させる機能を持っていた。さらに、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、野生型マウスで見られる非荷重時の骨量減少が起こらなかった。野生型マウスでは、非荷重時に主に破骨細胞形成の促進により、一部骨芽細胞の機能低下により骨量が減少していたが、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、破骨細胞形成の促進も骨芽細胞の機能低下も認められなかった。非荷重時には、野生型マウスでは、限局した部位で、骨細胞でのスクレロスチンの発現が増加していたが、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、認められなかった。野生型マウスでは、非荷重時に骨芽細胞に RANKL が発現誘導されていたが、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは、その発現誘導が見られなかった。野生型マウスで誘導され、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは誘導されない遺伝子をマイクロアレイで探索、pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4) を同定した。Pdk は Pdk1, 2, 3, 4 からなるが、Pdk4 のみが、非荷重時に骨芽細胞、骨細胞、骨髄細胞に発現誘導された。Pdk4 ノックアウトマウスを作製したが、生理的条件下では異常を認めなかった。しかし、

野生型に見られる非荷重時の骨量減少がノックアウトマウスでは見られなかった。さらに、野生型マウスに見られる非荷重時の破骨細胞形成促進が、ノックアウトマウスでは見られなかった。in vitro の破骨細胞形成実験では、Pdk4<sup>-/-</sup>骨髄細胞の破骨細胞への分化が阻害されていた。また、Pdk4<sup>-/-</sup>骨芽細胞と野生型骨髄細胞との共培養での破骨細胞形成も阻害されていた。さらに、Pdk4<sup>-/-</sup>骨芽細胞では RANKL 発現、RANKL promoter 活性ともに低下していた。Pdk4 の過剰発現は、Rank1 発現、RANKL promoter 活性、破骨細胞形成をともに促進させた。

### D. 考察

Pdk4 は、PDC (pyruvate dehydrogenase complex) をリン酸化、PDC の機能を抑制し、糖代謝でのエネルギー産生を抑制する酵素である。飢餓状態で主に筋肉に発現誘導されることが報告されてきた。我々は、非荷重状態を骨細胞ネットワークが感知し、骨細胞および骨芽細胞で Pdk4 を発現誘導することを明らかにした。また、Pdk4 は RANKL を骨芽細胞に発現誘導し、破骨細胞分化を誘導することを明らかにした。しかし、Pdk4 による PDC リン酸化を阻害する DCA (dichloroacetate) の添加や PDC を脱リン酸化する Pdp1 (pyruvate dehydrogenase phosphatase) の過剰発現は、破骨細胞形成や Rank1 発現に影響しなかった。したがって、Pdk4 は、PDC のリン酸化を介さずに、破骨細胞形成や Rank1 発現を誘導すると考えられた。骨細胞ネットワークが Pdk4 発現を誘導する機序および Pdk4 が RANKL 発現を誘導する機序は不明であり、今後明らかにしていかなければならない。

### E. 結論

骨細胞ネットワークが、生理的条件下では、骨芽細胞機能を低下させ骨形成を抑制、破骨細胞分化を促進させ骨吸収を促進させていること、非荷重時には、その機能を増強し、骨量を負に調節していることを証明した。さら

に、非荷重を感知した骨細胞ネットワークは、骨芽細胞に Pdk4 を誘導、Pdk4 は RANKL 発現を誘導し、破骨細胞形成、さらに骨吸収に導いていた。また、骨髄細胞も非荷重時に Pdk4 発現を上昇させ、破骨細胞形成に関与していた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, Furuichi T, Fukuyama R, Mori M, Yamana K, Nakamura K, Liu W, Toyosawa S, Moriishi T, Kawaguchi H, Takada K, Komori T. SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. PLoS One. in press.

2) Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, Ohnishi H, Furuichi T, Kawai Y, Masuyama R, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. Overexpression of bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. PLoS One. 6(11):e27487, 2011.

3) Wang Y, Liu W, Masuyama R, Fukuyama R, Ito M, Zhang Q, Komori H, Murakami T, Moriishi T, Miyazaki T, Kitazawa R, Yoshida CA, Kawai Y, Izumi S, Komori T. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. Bone. 50(1):409-419. 2012.

4) Maeno T, Moriishi T, Yoshida CA, Komori H, Kanatani N, Izumi S, Takaoka K, Komori T. Early onset of Runx2 expression caused craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects. Bone. 49(4):673-682. 2011.

5) Mikasa M, Rokutanda S, Komori H, Ito K,

Tsang YS, Date Y, Yoshida CA, Komori T. Regulation of Tcf7 by Runx2 in chondrocyte maturation and proliferation.

J Bone Miner Metab. 29(3):291-299, 2011.

## 2. 学会発表

1) 小守壽文: Regulation of bone mass through an osteocyte network. Bio-Rheumatology International Congress, 東京, 2011.

2) 王宇英, 小守壽文: PDK4 は骨粗鬆症の破骨細胞分化を促進する, 第 53 回歯科基礎医学会, 岐阜, 2011.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

特願 2011-138935 荷重感知遺伝子

## 破骨細胞における Bcl-2 ファミリー蛋白 Mcl-1 の作用機序に関する研究

研究分担者 田中 栄 東京大学医学部整形外科 教授  
研究協力者 増田 裕也 東京大学医学部整形外科

### 研究要旨

アポトーシスのミトコンドリア経路に深く関与する Bcl-2 ファミリー蛋白は、破骨細胞においてその細胞生存能を制御しているだけでなく、破骨細胞の骨吸収能の制御にも関与していることが報告されている。Bcl-2 ファミリーの中で Bim や Bcl-XL は、その細胞生存能への制御と骨吸収能への制御が相反していることが明らかとなっているが、その制御機構については明らかとなっていない。Bcl-2 ファミリー蛋白による破骨細胞骨吸収能制御機構の解明は、骨吸収能の亢進が原因と考えられる骨粗鬆症、悪性腫瘍の骨転移による骨融解、関節リウマチなどの炎症性疾患における関節破壊といったような病態の解明ばかりでなく、治療薬開発にも貢献するものと考えられる。今回 anti-apoptotic Bcl-2 ファミリー蛋白の中で短い半減期を持つといわれる Mcl-1 の破骨細胞内での動態、over-expression, knockdown, knockout を行った際の細胞活性を評価することで破骨細胞における Mcl-1 の働きを明らかとした。その結果、Mcl-1 はその短い半減期から骨粗鬆症などのいわゆる慢性的な病態というよりは、関節リウマチなどの炎症性疾患における関節破壊や、感染などによる骨吸収などのいわゆる急性・亜急性な病態にかかわる分子として注目に値すると考えられた。

### A. 研究目的

破骨細胞は生体内で骨吸収能を有する唯一の細胞である。正常な骨組織では、骨芽細胞などによる骨形成と破骨細胞による骨吸収によって骨組織は常に新しく再構成されながらも、一定のバランスが保たれている（骨のリモデリング）。一方、生体内の破骨細胞の働きの亢進・低下は骨粗鬆症、悪性腫瘍の骨融解、関節リウマチなどの炎症性疾患における関節の破壊や、大理石骨病などの病態を引き起こすことが明らかとなっている。従って、破骨細胞の働きを制御するメカニズムを解明することはこれらの病態の解明ばかりでなく、これらの病態の治療薬の開発にも貢献するものと考えられる。

我々の研究室では既に破骨細胞における、いくつかの Bcl-2 ファミリー蛋白の働きについての報告を行っており、そのなかで pro-apoptotic な作用をもつ Bim が細胞生存能に対しては負の制御を行っているのに対し、

骨吸収能に対しては正に制御を行っていること、anti-apoptotic な働きを持つ Bcl-XL が細胞生存能に対しては正の制御を行い、骨吸収には負の制御を行っていることを明らかにしている。このように破骨細胞の生存能と骨吸収能に対する制御が乖離している蛋白の作用機序を解析することが、破骨細胞骨吸収能の制御機構の解析につながるものと考えている。

Anti-apoptotic Bcl-2 ファミリー蛋白の中で Bcl-2, Bcl-XL の破骨細胞の制御機構についての報告を行っているが、研究を行っている中でこれらの蛋白の半減期の長さが問題点として残った。破骨細胞は生体内の他の細胞に比し、非常に短い細胞寿命を有しており、*in vitro* の系で実験を行う際に、破骨細胞においてアポトーシスが観察されるタイミングとなっても、破骨細胞内の Bcl-2, Bcl-XL 蛋白の発現量の減少が確認されず、破骨細胞のアポトーシスではこれらの蛋白以外に key

となる蛋白が存在することが示唆された。そこで今回、anti-apoptotic Bcl-2 ファミリー蛋白のなかで特に短い半減期を特徴として持っている Mcl-1 に注目した。この蛋白の破骨細胞における働きを解析することが、破骨細胞の骨吸収能制御機構の解析、破骨細胞が関与すると思われる病態を解明につながると考えた。

## B. 研究方法

破骨細胞における Mcl-1 の作用機序を解明するために以下の3つの系統で実験を行った。

1. Wild type mouse から作製した破骨細胞内の Mcl-1 の動態を評価
2. Wild type mouse から作製した破骨細胞にアデノウイルス・レトロウイルスを用いて Mcl-1 over-expression, knockdown を行い、破骨細胞分化・細胞骨格形成・細胞生存能・骨吸収能を評価
3. Mcl-1 flox/flox mouse から採取した破骨細胞に Cre 遺伝子発現アデノウイルス・レトロウイルスを用いることで Mcl-1 knockout 破骨細胞を作製し、この細胞における細胞分化・細胞生存能・骨吸収能を評価

上記のそれぞれの系において real time PCR, western blotting, TRAP 染色, アクチン染色, survival assay, pit formation assay などを行うことで評価とした。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「動物実験の飼養及び保管などに関する基準(総理府告示)」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って行った。

## C. 研究結果

アポトーシス刺激を加えた状態の破骨細胞の経時的な蛋白発現量を western blotting にて確認した。Bcl-2, Bcl-XL, Bim, Mcl-1 について評価を行ったところ、破骨細胞でアポトーシスが行われている時点においても、

Bcl-2, Bcl-XL の発現量に変化はみられなかった。アポトーシスが開始した時点で見られた変化は pro-apoptotic な Bim の蛋白発現量の増加と anti-apoptotic な Mcl-1 の蛋白発現量の減少のみであった。次に RNA 合成阻害薬であるアクチノマイシン D を添加した状態で同様の実験を行ったところ、同様にアポトーシスが開始した時点の Bcl-2, Bcl-XL 蛋白発現量に変化はみられず、Mcl-1 の蛋白発現量はアポトーシスの開始に合わせて減少を見せていたが、今度は Bim の蛋白量増加はみられなかった。

Mcl-1 蛋白発現の上流シグナル経路を見るために、様々なサイトカイン添加を行い、Mcl-1 の発現を確認した。Mcl-1 は生存・分化因子である M-CSF や RANKL だけでなく、炎症性サイトカインといわれる TNF- $\alpha$  や IL-1 $\alpha$  の添加によっても発現が亢進した。

Mcl-1 の速やかな蛋白代謝の経路を確認するためプロテアソーム阻害剤 (MG132) を添加して蛋白代謝を見てみたところ、MG132 を添加すると Mcl-1 の速やかな蛋白代謝が阻害された。また、同様にプロテアソーム阻害剤を添加した蛋白で免疫沈降法を行ったところ Mcl-1 のユビキチン修飾が確認された。この結果、Mcl-1 の速やかな蛋白代謝にはユビキチン・プロテアソーム系が主に働いていることが明らかとなった。

破骨細胞における Mcl-1 の働きを解明するために、wild type mouse から作製した破骨細胞にレトロウイルス、アデノウイルスを用いた遺伝子導入法で Mcl-1 を over-expression, knockdown し、その破骨細胞について様々な評価を行った。Mcl-1 over-expression 破骨細胞も、knockdown 破骨細胞もその細胞分化能や細胞骨格形成能に明らかな変化はみられなかった。細胞生存能においては Mcl-1 over-expression 破骨細胞は亢進し、knockdown 破骨細胞は有意に低下していた。Mcl-1 over-expression 破骨細胞については pit formation assay により骨吸収能に関しても評価を行ったが、生存能の亢

進が見られているにもかかわらずその骨吸収能は減少を見せた。

さらに破骨細胞における Mcl-1 の働きを調べるために *ex vivo* の実験を計画した。Mcl-1 knockout mouse は胎生致死であるため、Mcl-1 flox/flox mouse を取り寄せた。その mouse から採取した骨髄細胞にレトロウイルス、アデノウイルスを用いて Cre 遺伝子を導入することで Mcl-1 KO 破骨細胞を作製、評価を行った。Mcl-1 KO 破骨細胞の細胞分化能に変化はみられなかったものの、細胞生存能は低下しており、骨吸収能は逆に亢進していた。

#### D. 考察

破骨細胞はその働きの特異性から、様々な疾患の治療ターゲットとして注目されているが、破骨細胞のアポトーシスや骨吸収活性制御機構は未だ十分に解明されたとは言い難い。過去の報告においても Bcl-2 ファミリー蛋白が、破骨細胞の生存能ばかりでなく、その骨吸収能をも制御していることが明らかとなっているが、数ある Bcl-2 ファミリー蛋白の中での key となる分子を決定するには至っていない。今回我々は anti-apoptotic Bcl-2 ファミリー蛋白の一つである Mcl-1 に key 分子となる可能性を見出し、その破骨細胞制御機構の評価を行った。

破骨細胞内の蛋白発現をいくつかの条件下で経時的に観察したところ、生存期間が短いとされる破骨細胞のアポトーシスのタイミングと一致する蛋白発現量の変化は Mcl-1 の減少のみであった。これは、少なくとも *in vitro* の状態で観察される破骨細胞のアポトーシスの key 分子は Mcl-1 であることを強く示唆するものと考えられる。

以前は別個の研究分野として確立されていた免疫学と骨代謝学は、RANKL などの共通するサイトカイン群の発見をきっかけに、分子のクロストークによってお互いに制御しあう関係であることが明らかとなった。このあたらしい研究分野は骨免疫学 (osteimmunology) と名付けられ、現在盛ん

に研究が行われている分野となっている。今回の報告において、Mcl-1 が炎症性サイトカインを含む様々な刺激下に発現が制御されていることが明らかとなった。また、その速やかな蛋白代謝には、炎症性疾患の際に作用が亢進するとの報告もあるユビキチン・プロテアーゼ系が強く働いていることも明らかとなり、炎症性疾患における関節破壊などの病態において Mcl-1 が何らかの重要な働きを担っているものと考えられた。実際関節リウマチや若年性関節リウマチの関節組織像では様々な細胞において Mcl-1 の発現亢進が確認されており、骨免疫学の観点からも非常に興味深い。

破骨細胞における Mcl-1 は、細胞生存能を正に制御し、骨吸収能は負に制御を行っていた。しかしこの結果は *in vitro*, *ex vivo* の実験系によるものであり、今後は Mcl-1 cKO mice の作製・解析を行い *in vivo* における更なる評価が必要と考えている。

#### E. 結論

今回の実験結果を踏まえ、我々は関節リウマチなどの炎症性疾患と、関節破壊などの骨代謝病変を結ぶ key 分子として、破骨細胞の Mcl-1 が有力な候補の一つであると考えている。破骨細胞の Mcl-1 はその細胞生存能を正に、骨吸収能を負に制御していたが、これらの作用機構を明らかにするためにも *in vivo* による更なる評価が必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yasui T, Hirose J, Tsutsumi S, Nakamura K, Aburatani H, Tanaka S. Epigenetic Regulation of Osteoclast Differentiation: Possible Involvement of Jmjd3 in the Histone Demethylation of Nfatc1. *J Bone Miner Res.* 2011 Nov;26(11):2665-2671.

2. Matsumoto T, Nagase Y, Iwasawa M, Yasui T, Masuda H, Kadono Y, Nakamura K, Tanaka S. Distinguishing the pro-apoptotic and anti-resorptive functions of risedronate in osteoclasts: Role of the Akt pathway and the Erk/Bim axis. *Arthritis Rheum.* 2011 Dec;63(12):3908-3917.
3. Furuya Y, Mori K, Ninomiya T, Tomimori Y, Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Uchida K, Yasuda H. Increased bone mass in mice after a single injection of an anti-RANKL neutralizing antibody: evidence for a bone anabolic effect of PTH in mice with few osteoclasts. *J Biol Chem.* 2011 Oct 21;286(42):37023-31.
4. Nagase Y, Yasunaga H, Horiguchi H, Hashimoto H, Shoda N, Kadono Y, Matsuda S, Nakamura K, Tanaka S. Risk factors of pulmonary embolism and the effects of fondaparinux after total hip and knee arthroplasty: a retrospective observational study using a national database in Japan. *J Bone Joint Surg (Am).* 2011 Dec 21;93(24):e1461-1467.
5. Yamada K, Matsumoto K, Tokumura F, Okazaki H, Tanaka S. Are bone and serum cefazolin concentrations adequate for antimicrobial prophylaxis? *Clin Orthop Relat Res.* 2011 Dec;469(12):3486-3494.
6. Miyamoto H, Miura T, Morita E, Morizaki Y, Uehara K, Ohe T, Tanaka S. Fungal arthritis of the wrist caused by *Candida parapsilosis* during infliximab therapy for rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2012 Feb 15. [Epub ahead of print]
- 性疾患の新たな治療「骨粗鬆症治療の新展開」
4. 第 29 回 日本骨代謝学会学術集会 (2011.7.28-30) 大阪 シンポジウム 3 リウマチと炎症、破壊、修復 「関節リウマチにおける骨脆弱性と骨破壊」
5. 第 29 回 日本骨代謝学会学術集会 (2011.7.28-30) 大阪 ランチョンセミナー9 「エストロゲンの骨作用と SERM による骨粗鬆症治療」
6. 第 26 回 日本整形外科学会基礎学術集会 (2011.10.20) 前橋 シンポジウム 3 炎症と関節破壊 「関節リウマチにおける骨脆弱性と骨破壊」
7. 第 117 回 中部日本整形外科災害外科学会学術集会 (2011.10.29) 宇部 長州セミナー6「関節リウマチにおける大関節破壊予防戦略」
8. 第 13 回 日本骨粗鬆症学会 (2011.11.3-5) 大阪 シンポジウム1 骨粗鬆症治療薬の新たな展開「カテプシン K 阻害薬」
9. 第 13 回 日本骨粗鬆症学会 (2011.11.3-5) 大阪 イブニングセミナー2 「新しい活性型ビタミン D3 誘導体による骨粗鬆症治療」
10. 第 13 回 日本骨粗鬆症学会 (2011.11.3-5) 大阪 カレントトピックス 基礎から臨床への架け橋「骨粗鬆症治療 From bench to bedside」
11. 第 39 回日本関節病学会 (2011.11.12, 13) ベイサイドセミナー12 「骨吸収抑制薬による骨粗鬆症治療とその作用機序」

## 2. 学会発表

1. 第 116 回 中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 (2011.4.7) 高知 岡豊セミナー1「新しい作用機序を有する骨粗鬆症治療薬」
2. 第 84 回 日本内分泌学会学術総会 (2011.4.22) 神戸 シンポジウム 8 骨代謝調節研究の進展と臨床展開 「骨吸収抑制薬による骨粗鬆症治療」
3. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (2011.7.18) 神戸 シンポジウム 1 リウマチ

## 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



## 損傷筋の再生における機械的刺激効果に関する研究

研究分担者 大平充宣 大阪大学医学系研究科 教授  
研究協力者 寺田昌弘 JAXA 宇宙医学生物学研究室 プロジェクト研究員  
河野史倫 大阪大学医学系研究科 助教  
大平宇志 大阪大学生命機能研究科 大学院生  
中井直也 大阪大学医学系研究科 准教授  
西本憲弘 和歌山県立医科大学 教授

### 研究要旨

Duchenne 型筋萎縮の動物モデルとしてよく利用される dystrophin 欠損 (*mdx*) マウス筋における損傷と再生を繰り返す機構および wild type マウスにおける薬物投与による損傷からの再生過程における機械的負荷の影響を追求するために、本研究を実施した。Wild type マウスでは、麻酔下で両側のヒラメ筋に cardiotoxin を注入することにより損傷を誘発させた。1 週間の回復後、麻酔下で共働筋である足底筋および腓腹筋の末梢部腱を片側で切断し、2 週間のケージ内飼育によりヒラメ筋に機械的負荷を加えた。同週齢の *mdx* マウスにおいても同様の処置を行った。2 週間後、ヒラメ筋を採取し、単一筋線維および横断切片における組織化学的解析を行った。筋核の分布により、type P（全ての核が周辺部にあった線維）および C+P（周辺核および中心核の両方を保有する線維）の 2 種類の筋線維が *mdx* および wild type マウスにおいて観察された。筋線維横断面積、長さ、総核数等には、*mdx* および wild type マウスにおける type P および C+P 線維間に差はなく、形態的には成熟線維と類似していることが示唆された。一方で、wild type マウスの損傷なし筋線維は機械的刺激を加えることにより肥大した (31.8%) が、*mdx* マウスの type P 線維では逆に 21.3% 萎縮した ( $p>0.05$ )。このような機械的な負荷に対する反応の違いから、*mdx* マウスの筋線維は負荷に対する抵抗性が低いことが明らかになった。

### A. 研究目的

Duchenne 型筋萎縮の動物モデルとしてよく利用される dystrophin 欠損 (*mdx*) マウス筋における損傷と再生を繰り返す機構および wild type マウスにおける薬物投与による損傷からの再生過程における機械的負荷の影響を追求するために、本研究を実施した。

### B. 研究方法

本研究は、大阪大学医学系研究科動物実験委員会の承認を得て実施した (No. 22-071)。使用動物は、5 週齢のオス C57BL/10-*mdx* Jic ( $n=5$ ) および 4 週齢の C57BL/6J Jcl (wild type,  $n=5$ ) である。Wild type マウスでは、sodium

pentobarbital (5 mg/100 g body weight) の腹腔内投与による麻酔下で、両側のヒラメ筋に 0.3 mg/ml cardiotoxin (CTX, Sigma, St. Louis, MO, USA) を 5  $\mu$ l 注入することにより損傷を誘発させた。1 週間の回復後、麻酔下で共働筋である左足底筋および腓腹筋の末梢部腱を切断し、2 週間 (5-7 週齢) のケージ内飼育によりヒラメ筋に機械的負荷を加えた。ビデオ撮影により、各動物の行動パターンや活動量もチェックした。

2 週間後、同様な麻酔下で両側のヒラメ筋を採取し、右側筋は横断切片での分析、左側筋は腱から腱まで採取した単一筋線維における分析を行った。凍結筋における 10- $\mu$ m 厚横

断切片では、筋線維の損傷および再生の程度をチェックするとともに、横断面積を測定した。長軸方向のサンプルにおける分析は、cellbankerに入れて凍結した筋を35°Cで瞬間解凍した後、0.06% type I collagenase、1% antibiotics、および10% new-born calf serum 含有の Dulbecco's modified Eagle's medium に浸し、コラーゲン処理後、単一筋線維を採取した。これらのサンプルでは、筋核および筋衛星細胞の分布パターンや数を分析するとともに、筋線維の形態(分裂 splitting 等)をチェックした。

筋核の分布は、筋線維の中央部に位置するもの(central nuclei)および周辺部に位置するもの(peripheral nuclei)に分け、しかも筋線維全体における central nuclei の分布程度に分けて、損傷や再生の程度を比較した。全ての核が周辺部にあった線維を type P、周辺部および中心部にあった線維を type C+P とした。更に、type C+P 線維の分布度は、単一筋線維における核総数に占める中心核の割合によって、0<~20%、~40%、~60%、~80%、and ~<100%に5種類に分類した。これらの分布パターンは、3次元的なイメージでも比較した。筋線維横断面積、長さ、核分布、衛星細胞数、神経筋接合部サイズ等の分析は、アルゴンレーザー付共焦点顕微鏡(オリンパス)を使って実施した。

#### (倫理面への配慮)

上述したように、本研究は動物実験委員会の承認を得て実施したが、動物に与える苦痛は最大限軽減する努力を払った。CTX 注入やアキレス腱切断、筋のサンプリング等は麻酔下で行った。使用した動物数も、データの統計処理を考慮した最低数に留めた。マウスの行動等に異常が認められたら、sodium pentobarbital の過剰投与による安楽死に処する計画も立てていたが、幸いそのような異常は確認されなかった。

### C. 研究結果および考察

Wild type マウスにおける正常筋線維では、

全ての核が筋線維周辺部に分布していた(type P)。しかし、機械的負荷により type C+P 線維も出現した(0.9%)。CTX 注入による損傷からの再生筋では、逆に全ての筋線維に中心核が認められたが、type P から type C+P 線維へのシフトは、機械的刺激を加えることにより抑制された(14.9%)。

*Mdx* マウスの筋には多くの筋線維に type C+P が認められ、type P および type C+P 線維はそれぞれ 60.3 および 39.7%であった。しかも機械的負荷を加えることにより type P 線維は 77%減少し、特に中心核数が 0<~20%、~40%、and ~60%であった線維の分布が増加する傾向にあり、核が周辺部から中心部に移動したことが示唆された。中心核数が 0<~20%、~40%、and ~60%であった機械的負荷なしの type C+P 線維の分布は type P 線維より有意に低値であった。CTX 注入を受けた wild type マウスの筋における type C+P 線維の分布は、~60% > ~80% > 40% = ~<100% > 0<~20%の順であった。ケージ内でのマウスの行動や活動レベルには、*mdx* および wild type、または損傷の有無による顕著な違いが認められず、これらの反応は機械的負荷に応じたものであることが示唆された。

Wild type マウスの損傷なし筋線維は機械的刺激を加えることにより肥大した(31.8%)が、*mdx* マウスの type P 線維では逆に 21.3%萎縮した( $p>0.05$ )。筋線維当たりの核数は、いずれのマウスにも機械的負荷による変化は見られなかった。しかし、wild type マウスの機械的負荷 type P 筋線維核数は、損傷なしの場合に比べてCTXを注入により有意に減少するという結果も得られた。

Wild type マウスの正常およびCTX注入筋、*mdx* マウス負荷なし筋には、分裂筋線維は見られなかったが、*mdx* マウス筋に機械的負荷を加えると、筋線維が途中から裂けている type C+P 線維数が 51.2%も増加した。

分裂期衛星細胞数には、機械的負荷の影響による変化は見られなかった。しかしながら、CTX 注入 wild type および *mdx* マウスにおける

type P 線維では、機械的負荷を加えることによりこれらの分裂期細胞は消滅した。しかし、これらのマウスにおける type P 線維には、機械的負荷を加えることにより休止期衛星細胞が出現した。筋線維の中心部に分布する神経筋接合部数には、マウス種や機械的負荷とうによる変化は認められなかった。

一般的に未成熟の筋細胞 (Saito ら, Brain Dev, 1981) または再生過程の筋線維は、中心核を有すると報告されている (Bigard ら, J Appl Physiol, 1996)。しかし、筋線維横断面積、長さ、総核数等は、type P および C+P 線維間に差はなく、中心核を有する線維も形態的には成熟線維と類似していることが示唆された。

損傷または機械的負荷に対する筋線維特性の反応には、*mdx* および *wild type* マウス間に顕著な違いが認められた。*Mdx* マウスの筋線維には機械的負荷に対して途中から避ける損傷が誘発されたが、*wild type* マウスには損傷線維にもそのような反応は見られなかった。*Mdx* マウス骨格筋に誘発する損傷と再生に関する研究は数多く報告されているが、メカニズムの詳細な解明にはいたっていない。

#### D. 結論

Dystrophin 欠損 (*mdx*) マウス筋における損傷と再生を繰り返す機構および *wild type* マウスにおける薬物投与による損傷からの再生過程における機械的負荷の影響を追求し、両タイプの損傷筋線維における再生機構等に検討を加えた。その結果、筋線維横断面積、長さ、総核数等には、*mdx* および *wild type* マウスにおける type P および C+P 線維間に差はなく、形態的には成熟線維と類似していることが示唆された。しかし、機械的な負荷に対する反応には顕著な違いが見られ、*mdx* マウス負荷に対する抵抗性が低いことが明らかになった。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Arima, Y et al. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. Cell 148: 447-457, 2012.
2. Kawano, F et al. HSP25 can modulate myofibrillar desmin cytoskeleton following the phosphorylation at Ser15 in rat soleus muscle. J. Appl. Physiol. 112: 176-186, 2012.
3. Terada, M et al. Biomedical analysis of rat body hair after hindlimb suspension for 14 days. Acta Astronaut. 73: 23-29, 2012.
4. Goto, K et al. Responses of muscle mass, strength and gene expressions to long-term heat stress in healthy human subjects. Eur. J. Appl. Physiol. 111: 17-27, 2011.
5. Ohno, Y et al. Possible role of NF- $\kappa$ B signals in heat stress-associated increase in protein content of cultured c2c12 cells. Cells Tissues Organs 194: 363-370, 2011.
6. Ohira, Y et al. Effects of creatine and its analog,  $\beta$ -guanidinopropionic acid, on the differentiation and nucleoli in myoblasts. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75: 1085-1089, 2011.
7. Ohira, T et al. Region-specific responses of adductor longus muscle to gravitational load-dependent activity in Wistar Hannover rats. PLoS ONE 6: e21044, 2011.
8. Oke, Y et al. Effects of inhibited antigravity muscle activity on the expression of hippocampal proteins in growing rats. Jpn. J. Aerosp. Environ. Med., in press.
9. Kawano, F et al. Responses of HSC70 expression in diencephalon to iron deficiency anemia in rats. J. Physiol. Sci., in press.
10. Yasuhara, K et al. Absence of heat shock transcription factor 1 retards the regrowth of atrophied soleus muscle in mice. J. Appl. Physiol., in press.
11. Nomura, S et al. Effects of hindlimb unloading on neurogenesis in the hippocampus of newly weaned rats. Neurosci. Lett., in press.

##### 2. 学会発表

1. Goto, K et al. Adiponectin expression in skeletal muscle cells in response to hypertrophic stimuli. EMBO Myogenesis

- Conference Series, The Molecular and Cellular Mechanisms, Regulating Skeletal Muscle, Development and Regeneration, May, 2011.
2. Goto, K et al. Expression of micro-RNA in mouse skeletal muscle after unloading and reloading. The 7th Congress of the Federations of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Taiwan, Sep., 2011.
  3. Ohira, T et al. Body tilting in response to gravity and/or dorsal light response in carp fishes: roles of skeletal muscles and/or fins. The 7th Congress of the Federations of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Taiwan, Sep., 2011.
  4. Ohira, T et al. Effects of 3-month spaceflight on the characteristics of neck muscle in mice. The 7th Congress of the Federations of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Taiwan, Sep., 2011.
  5. Okabe, H et al. Exercise prescription for stimulated mobilization of soleus muscle in human. The 7th Congress of the Federations of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Taiwan, Sep., 2011.
  6. Shibaguchi, T et al. Effects of 3-month exposure to real microgravity environment on epididymal sperm number in mice. The 7th Congress of the Federations of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS), Taiwan, Sep., 2011.
  7. Yoshioka, T et al. Effects of application of heat-stress for prevention of unloading-related atrophy and stimulation of recovery of skeletal muscle. Space Forum-2011, Dedicated to the 50-th Anniversary of the First Human Space Flight by Yuri Gagarin, Oct., 2011.
  8. Goto, K et al. Effects of 3-month-exposure to microgravity on microRNA expressions in mouse skeletal muscles. 2011 ASGSB/ISGP Joint Conference, American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB) the 27<sup>th</sup> Annual Meeting International Society for Gravitational Physiology (ISGP) the 32<sup>nd</sup> Annual Meeting, (California, U.S.A) Nov., 2011.
  9. Ohno, Y et al. Up-regulation of heat shock proteins in skeletal muscle of heat shock transcription factor 1-null mice. 2011 ASGSB/ISGP Joint Conference, American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB) the 27<sup>th</sup> Annual Meeting International Society for Gravitational Physiology (ISGP) the 32<sup>nd</sup> Annual Meeting, (California, U.S.A) Nov., 2011.
  10. Desaphy, J –F et al. The MDS mission: adaptation of skeletal muscle to long-term microgravity. 2011 ASGSB/ISGP Joint Conference, American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB) the 27<sup>th</sup> Annual Meeting/International Society for Gravitational Physiology (ISGP) the 32<sup>nd</sup> Annual Meeting, (California, U.S.A) Nov., 2011.
  11. Ohira, Y et al. Adaptation of mouse brain, testis & epididymis, upper spinal cord, and hair roots to microgravity. 2011 ASGSB/ISGP Joint Conference, American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB) the 27<sup>th</sup> Annual Meeting International Society for Gravitational Physiology (ISGP) the 32<sup>nd</sup> Annual Meeting, (California, U.S.A) Nov., 2011.
  12. Rizzo, AM et al. Effects of long term space flight on erythrocytes and oxidative stress of mice. 2011 ASGSB/ISGP Joint Conference, American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB) the 27<sup>th</sup> Annual Meeting/International Society for Gravitational Physiology (ISGP) the 32<sup>nd</sup> Annual Meeting, (California, U.S.A) Nov., 2011.
  13. Ohira, T et al. Role of skeletal muscles and/or fins during gravity-and/or light-dependent body tilting in carp fishes. 2011 ASGSB/ISGP Joint Conference, American Society for Gravitational and Space Biology (ASGSB) the 27<sup>th</sup> Annual Meeting/International Society for Gravitational Physiology (ISGP) the 32<sup>nd</sup> Annual Meeting, (California, U.S.A) Nov., 2011.
  14. Shibaguchi, T et al. Long-term exposure to real and simulated microgravity depresses

the number of epididymal sperm in mice.  
2011 ASGSB/ISGP Joint Conference,  
American Society for Gravitational and  
Space Biology (ASGSB) the 27<sup>th</sup> Annual  
Meeting/International Society for  
Gravitational Physiology (ISGP) the 32<sup>nd</sup>  
Annual Meeting, (California, U.S.A) Nov.,  
2011.

15. Okabe, H et al. Limiting factor(s) during  
bicycle ergometer exercise in human subjects  
with altered blood distribution. 2011  
ASGSB/ISGP Joint Conference, American  
Society for Gravitational and Space Biology  
(ASGSB) the 27<sup>th</sup> Annual  
Meeting/International Society for  
Gravitational Physiology (ISGP) the 32<sup>nd</sup>  
Annual Meeting, (California, U.S.A) Nov.,  
2011.

他

#### G. 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

## 関節リウマチの重症度(病型) 予後診断法としての C1q 値に関する研究

研究分担者 島岡 康則 行岡医学研究会行岡病院 副院長

### 研究要旨

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得ることは重要である。C1q 値と関節破壊の重症度に関連がある（越智ら）ことは指摘されていたが、有効な測定方法が確立されていなかった。我々は C1q に対する新たなモノクローナル抗体を作成し、そのうち重症度に相関し、それぞれ別のエピトープを認識する 2 種の抗体を選定し、2 つのモノクローナル抗体を使用する新たなサンドイッチ ELISA 法を開発、検証した。発症から 15 年以内の RA にしぼって解析したところ、今回新たに開発されたサンドイッチ ELISA 法による C1q 値で、骨破壊の進行速度の指標である  $\Delta$ mTSS、 $\Delta$ hand-SS を予測できる可能性が示された。

### A. 研究目的

関節リウマチの重症度、とくに骨破壊の指標を得ることは重要である。以前より、C1q 値と関節破壊の重症度に関連がある（越智ら）ことは指摘されていたが、測定のための抗体がポリクローナル抗体であったり、モノクローナル抗体であっても認識部位、また測定方法の不安定などの理由により、良い結果が再現されなかった。我々はこれまでの研究で、ハイブリドーマを作成し、C1q に対する新たな 10 種類のモノクローナル抗体と 2 種のポリクローナル抗体を得た。それぞれの抗体により抗体固相を調整し、C1q 検出・定量する新たなサンドイッチ法を開発してきた。

関節リウマチの診断については 2009 年 ACR/EULAR の新 RA 分類基準が提唱され、この中では、抗 CCP 抗体価が重要視されている。これも、早期に RA 診断、重症度予測をおこない、生物学的製剤などの有効な治療薬を使用するためと考えられる。我々も、今回の研究で得られた抗体による C1q 値と抗 CCP 抗体価、IL-6 値、さらに骨破壊進行度を総合的に判断し、今後の治療に役立てることを目的として研究を進めた。

### B. 研究方法

これまでの研究では、ポリクローナル抗体を固相化し、ここに HRP ラベルのモノクローナル抗体を加えて C1q を測定する ELISA を使用していた。今年度はこれまでの研究で RA 重症度に良い相関を示し、それぞれ別のエピトープを認識することが証明された 2 つのモノクローナル抗体（No. 76, No. 40）を使用する新たなサンドイッチ ELISA 法を開発、検証した。すなわち、抗 C1q モノクローナル抗体 No. 76 を固相化し、ここに HRP ラベルの抗 C1q モノクローナル抗体 No. 40 を加えて反応させる系を確立した。この系で全 44 例の RA 患者につき、血清中 C1q タンパク質とあわせ、臨床上有用と考えられる他のマーカータンパク（CRP, ESR, RF, 抗 CCP 抗体, IL-6, MMP-3）の測定を同時に行った。また、患者の手および足のレントゲン写真にて患者の骨破壊の指標を得るために modified total sharp score (mTSS)、または手のみの関節破壊の評価として hand sharp score (hand-SS) を算定した。方法は van der Heijde ら (Lancet. 1989 May 13;1(8646):1036-8.) の推奨する方法とした。

（倫理面への配慮）

患者に文章で同意を得るとともに、各検体は無記名にて番号のみで管理し、コンピューター上でのみ、臨床データと照合できるように配慮した。

#### C. 研究結果

発症から15年以内のRAにしぼって解析したところ、 $\Delta$ mTSSとの相関はCRP 0.30, ESR 0.28, RF 0.13, 抗CCP抗体 -0.09, MMP3 0.29, IL6 0.24, C1q 0.42と今回のサンドイッチ法によるC1q値が $\Delta$ mTSSともっとも相関が高かった。また手指のレントゲン変化に限る $\Delta$ hand-mSSとの相関もCRP 0.44, ESR 0.48, RF 0.24, 抗CCP抗体 -0.06, MMP3 0.40, IL6 0.22, C1q 0.42と良い相関を示した。

#### D. 考察

今回新たに開発された2つのモノクローナル抗体を用いたELISAで、発症15年以内のRAの骨破壊の進行が予測できる可能性が示唆された。ステロイドなどの投薬内容や、変動する臨床症状に左右されない、RA関節破壊の進行度の指標が確立されることは、患者の予後判定をする上で非常に重要な知見であり、今後の診療方針を決定する上でも重要であると考ええる。

#### E. 結論

今回新たに開発されたサンドイッチELISA法によるC1q値で、骨破壊の進行速度の指標である $\Delta$ mTSS、 $\Delta$ hand-SSを予測できる可能性が示された。RA患者の骨破壊の進行速度が早期に簡便に判定できれば、必要な患者に選択的に生物学的製剤を含めたRAの有効な治療を早期施行できるようになり、その臨床的意義、また経済的意義は大きいと考える。

#### F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載とする。)

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

申請中である。

##### 2. 実用新案登録

検討中である。

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 〔書 籍〕

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishimoto N, Murakami M, Matsutani T	Addressing Unmet Medical Needs in RA: IL-6 blocker	eBook by the Future Science Group		in press	

### 〔雑 誌〕

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hashimoto J, Garnero P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N.	Humanized anti-interleukin-6-receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study	Mod Rheumatol	21 (1)	10-15	2011
Lee HM, Sugino H, Aoki C, Shimaoka Y, Suzuki R, Ochi K, Ochi T, Nishimoto N	Abnormal networks of immune response-related molecules in bone marrow cells from patients with rheumatoid arthritis as revealed by DNA microarray analysis	Arthritis Res Ther	13 (3)	R89	2011
Hirao M, Yamasaki N, Oze H, Ebina K, Nampei A, Kawato Y, Shi K, Yoshikawa H, Nishimoto N, Hashimoto J.	Serum level of oxidative stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab.	Rheumatol Int		Sep 11. [Epub ahead of print]	2011
村上美帆, 西本憲弘	関節リウマチに対するトシリズマブ療法 : IL-6 受容体標的治療の開発コンセプトから最新治療実績まで	医学のあゆみ	238 (6)	652-658	2011

Kaneko Y, <u>Kuwana M</u> , Kameda H, and Takeuchi T	Sensitivity and specificity of 2010 rheumatoid arthritis classification criteria	Rheumatology	50 (7)	1268-1274	2011
Hattori H, Suzuki S, Okazaki Y, Suzuki N, and <u>Kuwana M</u>	Intracranial transplantation of monocyte-derived multipotential cells enhances recovery after ischemic stroke in rats	J Neurosci Res	90 (2)	479-488	2012
Seta N, and <u>Kuwana M</u>	Potential involvement of human circulating CD14 <sup>+</sup> monocytes in tissue repair and regeneration	Inflam Regen	32 (1)	1-7	2012
Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Adachi S, Suemori H, <u>Nakahata T</u> , Heike T.	Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells	J. Cell. Physiol.	226 (5)	1283-1291	2011
Heike T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, <u>Nakahata T</u> .	Autoinflammatory diseases-a new entity of inflammation.	Inflammation and Regeneration	31 (2)	125-136	2011
Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, <u>Nakahata T</u> , Saito M.	A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors.	PloS ONE	6 (7)	e22261	2011
Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, <u>Nakahata T</u> , Horiuchi H, Heike T.	Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein.	Blood	118 (5)	1225-1230	2011

Tanaka N, Nishikomori R, Saito M, Izawa K, Sakuma M, Morimoto T, Kambe N, Watanabe S, Oshima K, Ohara O, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Arostegui J.I, Yague Jm Joost F, van Gijn M.E, SaintBasile G, Pontillo A, Kawai T, Yasumi T, <u>Nakahata T</u> , Horiuchi H, Heike T.	High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multicenter collaborative study.	Arthritis Rheum.	63 (11)	3625- 3632	2011
Hiejima E, Komatsu H, Takeda Y, Sogo T, Inui A, Okafuji I, Nishikomori R, <u>Nakahata T</u> , Fujisawa T.	Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases. in press.	J. Pediatr. Child Health	in press		
Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, <u>Nakahata T</u> , Heike T.	The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation.	Int. Immunol.	in press		
Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito M.K, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, <u>Nakahata T</u> , Heike T, Nishikomori R, Ohara O.	Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing.	DNA Res.	in press		
<u>中畑龍俊</u>	対談「血液および血液疾患を語る(22) 造血 幹細胞の体外増幅—iPS細胞の応用も含め て—」	最新医学	66 (1)	123- 132	2011
<u>中畑龍俊</u>	小児医療をめぐる最先端医学 iPS 細胞を用い た今後の医療(特集 小児医療の最先端—こ れからの新たな展望—)	東京小児科医 会報	29 (3)	26-33	2011

中畑龍俊	疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子治療・個別化医療	小児科	52 (12)	1743-1749	2011
Tao H, Okamoto M, Nishikawa M, <u>Yoshikawa H</u> , Myoui, A.	mitogen-activated protein kinase inhibitor, FR167653, inhibits parathyroid hormone related protein-induced osteoclastogenesis and bone resorption.	PLoS One	6 (8)	e23199	2011
Akamine Y, Muroi Y, Nakata K, Kakudo K.	Cyclic mechanical loading to human synovial cells in three-dimensional cultured tissue up-regulates inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases	Int J of Oral Maxillofac Surg	in press		
Takada Y, Gresh L, Bozec A, Ikeda E, Kamiya K, Watanabe M, Kobayashi K, Toyama Y, Wagner EF, <u>Matsuo K</u> .	Interstitial lung disease induced by gefitinib and Toll-like receptor ligands is mediated by Fra-1	Oncogene	30 (36)	3821-3832	2011
<u>松尾光一</u>	骨の破壊と再生	臨床検査	55 (13)	1497-1502	2011
Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, Ohnishi H, Furuichi T, Kawai Y, Masuyama R, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, <u>Komori T</u> .	Overexpression of BCL2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis.	PLoS One	6 (11)	e27487	2011
Wang Y, Liu W, Masuyama R, Fukuyama R, Ito M, Zhang Q, Komori H, Murakami T, Moriishi T, Miyazaki T, Kitazawa R, Yoshida CA, Kawai Y, Izumi S, <u>Komori T</u> .	Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis.	Bone	50 (1)	409-419	2012