

201322003B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野)

**関節リウマチにおける骨髄・骨格形成細胞間
ネットワークの解明と根治療法の開発**

平成 23-25 年度 総合研究報告書

研究代表者 西 本 憲 弘

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 構成員名簿	3
----------	---

II. 総合研究報告書

1. 関節リウマチにおける骨髄・骨格形成細胞間ネットワークの解明と 根治療法の開発に関する研究 西本 憲弘	7
---	---

III. 分担研究報告書

RA 患者の骨髄細胞における異常の解析

1. 関節リウマチ (RA) 患者の骨髄細胞異常と RA 特異的 iPS 細胞の樹立 西本 憲弘	35
2. 関節リウマチの病態を制御する末梢血単球分画に関する研究 桑名 正隆	45
3. RA における骨髄造血幹細胞分化異常の解析に関する研究 中畑 龍俊	50

RA における骨髄間葉系由来の骨格形成細胞の増殖・分化を相互に制御するネットワーク異常の解析

4. 骨細胞ネットワークによる骨量調節機構に関する研究 小守 壽文	57
5. 肺線維化モデル動物を用いた骨形成活性化・骨吸収抑制の制御法の開発 松尾 光一	63
6. 破骨細胞における Stat5 の機能に関する研究 田中 栄	67

7. 関節リウマチにおける軟骨・滑膜の病態と細胞間相互作用の解析 吉川 秀樹	73
8. 関節リウマチの病態に対するアディポネクチンの作用 下村伊一郎	79
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	83

I. 構 成 員 名 簿

平成 23-25 年度
 厚生労働科学研究費補助金
 難治性疾患等克服研究事業
 (免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野)
 関節リウマチにおける骨髄・骨格形成細胞間ネット
 ワークの解明と根治療法の開発

構成員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	西本憲弘	東京医科大学 医学総合研究所 難病分子制御学部門	兼任教授
研究分担者 (五十音順)	大平充宣 (平成 23-24 年度)	大阪大学医学系研究科生命機能 研究科 適応生理学教室	教授
	桑名正隆	慶應義塾大学医学部リウマチ内科	准教授
	小守壽文	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命科学講座 細胞生物学分野	教授
	島岡康則 (平成 23 年度)	行岡医学研究会行岡病院	副院長
	下村伊一郎 (平成 24-25 年度)	大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学	教授
	田中 栄	東京大学大学院医学系研究科 整形外科	教授
	中畑龍俊	京都大学 iPS 細胞研究所	副所長
	堀内行雄 (平成 23 年度)	川崎市立川崎病院	院長
	松尾光一	慶應義塾大学医学部 共同利用研究室 細胞組織学	教授
	吉川秀樹	大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学	教授

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究協力者 (五十音順)	越智健介	東京女子医科大学膠原病リウマチ 痛風センター	助教
	斉藤 潤	京都大学 iPS 細胞研究所	准教授
	島岡康則 (平成 24-25 年度)	浜脇整形外科病院	副院長
	中田 研	大阪大学大学院 医学系研究科 健康スポーツ科学	教授
	橋本 淳	国立病院機構大阪南医療センター	部長
	堀内行雄 (平成 24-25 年度)	川崎市立川崎病院	病院長
	行岡正雄	行岡病院	院長

Ⅱ. 総 合 研 究 報 告 書

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野)
平成 23 年度～平成 25 年度 (総合)研究報告書

関節リウマチにおける骨髄・骨格形成細胞間ネットワークの解明と根治療法の開発に関する研究

研究代表者 西本憲弘 東京医科大学医学総合研究所 難病分子制御学部門 (兼任教授)

研究要旨

関節リウマチ(RA)の主病巣と考えられる骨髄の異常と骨髄間葉系細胞由来で骨格を形成・支持する骨細胞、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞ならびに免疫細胞の増殖・分化に関わるネットワーク制御機構をバイオインフォマティクス、iPS細胞、遺伝子改変マウス等を用いて明かにし、病因研究・RA根治療法へ発展させることを目指した。RA患者の骨髄では免疫機能の亢進に加え、アポトーシス機能の亢進と、骨格・筋形成、DNAパッケージング、細胞接着、細胞増殖、細胞移動に関する機能低下が確認された。また癌患者に見られるCD14(+)CD15(+)細胞がRA患者骨髄のみならず末梢血中にも存在することが確認され、RAの病態形成に関与する可能性が示された。RA患者特異的iPS細胞を樹立し、単球へ分化させることにより、CD14(+)CD15(+)細胞が分化の初期に一過性に出現することを明らかにした。RA患者由来iPS細胞と未発症同胞との比較により、CD14(+)CD15(+)細胞はRAでより多く出現した。また、iPS細胞から破骨細胞への分化誘導に成功し、CD14(+)細胞の亜分画のみが破骨細胞に分化することを示した。

間葉系由来細胞のin vitro三次元培養システムの樹立により、力学刺激環境下における細胞応答の研究が可能になった。また、遺伝子改変マウスの研究から、骨細胞が感知するメカニカルストレスによる骨芽細胞と破骨細胞分化の制御機構が解明された。さらに破骨細胞分化の複数の転写因子とその機能が明らかになり、これらは新たな治療標的分子候補でもある。また、脂肪組織由来のアディポネクチンがC1qに直接結合し、補体系を制御することが明らかになった。

臨床的検証においては、補体C1q値がRAの関節破壊の進行と相関することを明らかにした。また、RAでは健常人に比べて単球系細胞の亜分画であるCD16(+),CCR2(+)単球が増加し、CD14(+)単球におけるCXCR4発現は低下、CCR2発現は上昇していた。CD14(+)CCR2(+)はCRPやMMP3と正の相関を示し、CD14(+)CD16(+)はMRIにおける骨びらん・骨髄浮腫と関連し、1年後の関節破壊進行およびRRPと関連した。これらは新たなバイオマーカーとなりうる。

以上の病因・病態研究の成果を、新たな診断法・治療法に発展させることにより、早期診断・予後診断法の開発、ドラッグフリー寛解や根治を見据えた分子標的治療法の開発、さらに予防法の開発へつながる可能性がある。

研究分担者	大平充宣	大阪大学医学系研究科生命機能研究科 適応生理学教室 (教授) (平成 23-24 度)
	桑名正隆	慶應義塾大学医学部リウマチ内科 (准教授)
	小守壽文	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (教授)
	島岡康則	行岡医学研究会行岡病院 (平成 23 年) (副院長) (平成 23 年度)
	下村伊一郎	大阪大学大学院医学系研究科内分泌・代謝内科学 (教授) (平成 24-25 年度)
	田中 栄	東京大学医学部整形外科 (教授)
	中畑龍俊	京都大学 iPS 細胞研究所 (副所長)
	堀内行雄	川崎市立川崎病院 (院長) (平成 23 年度)

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) の治療は、生物学的製剤の登場により大きく変貌したが、根治にはほど遠く、RA の原因解明と根治療法確立は患者の悲願である。従来、厚生労働科学研究の成果として RA の原因病巣は骨髄である可能性が示されてきた (review Ochi et al Arthritis Res Ther 2007)。全身の関節破壊が生じる RA 重症病型や急速に進行するムチランス型 RA 患者の骨髄には、白血病患者の骨髄に見られるような CD14(+)CD15(+) の「まるで癌細胞」が存在する (Tomita et al. J Rheumatol 1997)。骨髄球と単球の両方のマーカーを発現するこの CD14(+)CD15(+) 細胞は、RA 患者の骨髄ストローマ細胞の抱き込みによりアポトーシスを免れ、RA の病態形成にかかわると報告されている。また、RA 患者の身体機能低下は、骨格を形成・支持する骨、軟骨、筋肉、脂肪組織の病変によるが、これらの骨格形成細胞に加え、病態形成にかかわる骨芽細胞、破骨細胞や滑膜細胞は、すべて骨髄間葉系細胞から分化する。したがって、根治療法に結びつけるには、骨髄間葉系細胞からの初期分化における異常の有無を明らかにする必要がある。また、これらの細胞は、ネットワークを形成してその増殖・分化を相互に制御していると考えられ、細胞間相互作用の研究は RA の病態・治療を考える上で不可欠である。そこで、本研究では「RA の主病巣は骨髄」という従来研究成果を元に、病因研究へと発展させるべく、以下の解析を行った。

1) RA 患者の骨髄細胞における異常の解析

- ① RA 患者の骨髄細胞における異常発現遺伝子を網羅的に解析し、バイオインフォマティクスを応用して骨髄における細胞機能の異常を明らかにする。
- ② 骨芽細胞や軟骨細胞への分化能を有する CD14(+) 単球系細胞のフェノタイプを解析する。特に RA や白血病患者の骨髄で見

られ、病態形成に関与すると考えられる CD14(+)CD15(+) の量的および機能的評価を行う。また、癌や胎生期に発現する HLA-E、HLA-F 抗原の陽性細胞を RA 患者骨髄で同定する。

- ③ RA 特異的 iPS 細胞を樹立し、自然免疫担当細胞 (CD14(+) 単球系細胞) を誘導し、その機能を評価する。また、CD14(+)CD15(+) 細胞がどの分化段階で出現するのか、RA 特異的か否かを明らかにする。さらに、病態研究や薬剤反応性の研究に応用する。

2) RA における骨髄間葉系由来の骨格形成細胞の増殖・分化を相互に制御するネットワーク異常の解析

- ① 間葉系細胞の分化増殖機構ならびに骨細胞による骨芽細胞・破骨細胞・軟骨細胞分化のネットワーク制御機構を分子レベルで明らかにする。
- ② 間葉系由来細胞の in vitro 三次元培養システムを構築し、力学刺激による細胞応答、シグナルを解析する。
- ③ 骨髄細胞から筋細胞への分化、損傷筋肉の再生メカニズムを分子レベルで明らかにする。
- ④ アディポネクチンの補体 complement component 1q (C1q) に対する直接的な結合と補体活性化に対する作用を解析する。

3) RA 患者における臨床的検証

上記の研究結果をふまえ、RA 患者の重症度や臨床的特徴との関連を解析する。

B. 研究方法

1) RA 患者の骨髄細胞における異常の解析

- ① RA 患者の骨髄細胞機能異常の研究：DNA マイクロアレイを用い、RA 患者の骨髄細胞における異常発現遺伝子を網羅的に

解析し、バイオインフォーマティクスを応用して細胞機能異常を明らかにした。また、ネットワーク解析により分子間相互作用と遺伝子発現制御に関わる中心分子を決定した (H23年-24年)。

- ② 全身の大関節破壊が生じる RA 重症病型や急速に進行するムチランス型 RA 患者の骨髄には、CD14(+)CD15(+)の「まるで癌細胞」が存在することが報告されている。RA 患者の腸骨骨髄細胞を用い、CD14(+)CD15(+)の存在を確認するとともに、フェノタイプを解析した。また、HLA-E や HLA-F 発現を、フローサイトメトリーを用いて確認した (H23-24年)。
- ③ 親子あるいは同胞内発症の RA 患者と未発症者の血液単核球ならびに皮膚線維芽細胞を用いて、RA 患者特異的ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells:iPS 細胞) を樹立し、血清フリー、フィーダーフリー培養系を用いて、特に自然免疫系の単球・マクロファージへの分化とその機能異常を明らかにした。(H23-25年)

2) RA における骨髄間葉系由来の骨格形成細胞の増殖・分化を相互に制御するネットワーク異常の解析

- ① 間葉系由来細胞の三次元培養を行い、メカニカルストレスによる細胞の増殖・分化のシグナル伝達機構を分子レベルで解析した。種々の RA 治療薬 (ステロイド、非ステロイド性消炎剤、ヒアルロン酸、抗 IL-6 阻害剤、抗 IL-1 阻害剤) に対する細胞の反応性 (マトリックス分解酵素、炎症性サイトカイン発現) を解析した。(H23-25年)
- ② 骨細胞による骨芽細胞・軟骨細胞分化のネットワーク制御機構を種々の遺伝子改変マウスを用い、転写因子レベルで解析した。また、破骨細胞分化におけるシグナル伝達機構ならびにネットワーク制御機構を分子レベルで明らかにした。

(H23-25年)

- ③ 骨髄細胞から筋細胞への分化、損傷筋肉の再生メカニズムをマクロファージ欠損マウス、IL-6KO マウスなどを用いて分子レベルで解析した。(H23-24年)
- ④ アディポネクチンをはじめ、脂肪細胞から産生される因子による炎症制御メカニズムならびに間葉系由来細胞の増殖・分化制御機構を解析した。

3) RA 患者における臨床的検証

患者骨髄の分子発現解析と RA 患者の重症度や臨床的特徴との関連を解析した。また新しい重症度診断マーカーの可能性を検討した。(H23-24年)

(倫理面への配慮)

患者検体の採取はヘルシンキ宣言を遵守し、倫理委員会の承認のもとに行った。

患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針” “疫学研究に関する倫理指針” “臨床研究に関する倫理指針” に沿って、人権の保護について、十分配慮しながら実験を行った。

患者個人情報外部への持ち出しを厳重に禁止し、患者検体は・資料はコード化し匿名化した。

DNA 組み換え実験、動物実験については各施設の倫理指針、動物の愛護及び管理に関する法律などの倫理指針に法り、事前に許可を受けて行った。

C. 研究結果

1) RA 患者の骨髄細胞における異常の解析

- ① RA 患者骨髄全血細胞と健常骨髄の比較で、744 遺伝子の発現が増強し、838 遺伝子の発現が減少していた。これらの遺伝子の機能をバイオインフォーマティクスで検討したところ、免疫応答、ストレス反応、創傷治癒、アポトーシスの機能の亢進が示された。一方、骨格/筋形成、DNA のパッケージング、細胞接着、細胞増殖、

細胞移動の機能低下が示された。免疫応答関連分子のネットワーク解析から、I型インターフェロン(IFN)を中心にTNF、TGFβ、IL-1、IL-12、IL-18等のサイトカインネットワークが描出された。MHC class Iならびにclass II complexの発現が増強し、HLA-Eの発現も確認された。また、骨髄で補体C1qのネットワークも見いだされた。

- ② RA患者の腸骨骨髄のCD14(+)細胞の中で、CD15(+)細胞の割合は18-51%と、患者間で大きく異なった。CD14(+)CD15(+)細胞は殆どがHLA-Gを発現していた。骨髄CD14(+)CD15(+)は、CD14(+)CD15(-)と比べてCD34とCCR5を高発現し、これらは健常人では見られなかった。

末梢血でもCD14(+)CD15が見られ、末梢血CD15(+)単球はCD15(-)単球と比べてCXCR4の発現が有意に低かった。RA患者では健常人に比べ、末梢血CD14(+)CD15(+)CXCR4_{low}とCD14(+)CD15(-)CXCR4_{high}の比は有意に高く、CD14(+)CD15(+)CXCR4_{low}単球ではTNFの産生が亢進した。

CD14(+)CD15(+)CXCR4_{low}細胞は関節を障害するが、CD14(+)CD15(-)CXCR4_{high}細胞には多様な細胞に分化する能力を有する多能性細胞前駆細胞が含まれていた。

- ③ ヒトiPS細胞から、血清フリー、フィーダーフリーで単球系細胞へ安定して、かつ80-90%の純度で分化誘導が可能であった。単球はCD14/CD16を発現していた。さらに、単球、マクロファージ、樹状細胞を分化させることに成功した。樹状細胞はT細胞への抗原提示能を保持していた。マクロファージは刺激に対してM1/M2それぞれに一致するサイトカイン分泌能を示した。

さらにコラーゲンスポンジを用いて、三次元培養でヒトiPS細胞から造血前駆細胞を経て単球・マクロファージ等の自然免疫細胞へ分化させることに成功した。

トシリズマブ使用中の2例、

Methotrexate (MTX)使用中の1例、ならびに健常人コントロールからiPS細胞を複製した。RA患者由来iPS細胞から単球への分化誘導15日目で、CD14(+)CD15(+)細胞が検出された。またRA患者由来iPS細胞と未発症同胞ならびに他の健常人由来iPS細胞でCD14(+)CD15(+)細胞の割合を比較したところRAが最も多かった。

iPS細胞から破骨細胞への分化誘導に成功した。さらにCD14(+)細胞の亜分画のみが破骨細胞に分化した。

2) RAにおける骨髄間葉系由来の骨格形成細胞の増殖・分化を相互に制御するネットワーク異常の解析

- ① 三次元コラーゲン細胞担体を作製し、周期、荷重量をコントロールして鉛直荷重または剪断応力を繰返し負荷できる間葉系由来細胞のin vitro三次元培養システムを構築した。

ヒト滑膜細胞、半月板細胞、骨芽細胞または軟骨細胞からなる三次元培養組織に、力学負荷を反復することによりIL-6、IL-8、Prostaglandin E2 (PGE2)、cyclooxygenase-2 (COX-2)、マトリックス分解酵素Matrix metalloproteinase-3 (MMP)-1、2、3、a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)4の発現は亢進した。また、p38リン酸化が亢進し、COX-2タンパクが発現した。

COX-2阻害剤存在下では力学負荷によるPGE2濃度上昇は抑制された。MMPsの産生は高分子(270万Da以上)ヒアルロン酸にて抑制された。IL-1Ra存在下(1mM)では、力学負荷およびIL-1β刺激によるPGE2濃度上昇は抑制された。

- ② 骨芽細胞特異的B-cell leukemia/lymphoma (bcl)2トランスジェニック(tg)マウスは骨細胞突起が減少し、その結果として、骨細胞ネットワークが破綻した。このマウスでは、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。

網羅的遺伝子発現解析により、野生型マウスの骨芽細胞で誘導され、bcl2tg マウスの骨芽細胞では誘導されない遺伝子として pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4) ならびに FK506 binding protein 5 (Fkbp5) を同定した。Pdk4 の遺伝子欠損マウスの解析から、Pdk4 が RANKL の発現調節を介して骨代謝をコントロールすることがわかった。また、Fkbp5 は骨芽細胞分化を介して骨量維持に不可欠であることがわかった。Fkbp5 は糖質コルチコイドによる骨粗鬆症にも関与する可能性が示された。

Bcl-2 ファミリーである Mcl-1 は、ユビキチン-プロテアソーム系を介して破骨細胞の生存を制御し、骨吸収に関与することを明らかにした。

破骨細胞特異的 Stat5 欠損 (Stat5 Δ OC/ Δ OC) マウスでは骨吸収が亢進した。Stat5 の強制発現では骨吸収能は低下した。

pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) 投与後および微生物感染後に、血中 OPG 濃度が上昇した。樹状細胞、好中球、リンパ節の内皮細胞が LPS に応答して OPG を産生した。OPG 主要な分泌臓器は肝臓であることがわかった。

- ③ GFPtg マウスの骨髄細胞の移入実験から、損傷筋の修復には骨髄細胞が炎症局所に移動し、衛星細胞に分化することがわかった。衛星細胞の分化に IL-6 の関与が示された。また、損傷筋に浸潤する炎症系細胞は殆どが CD68 陽性のマクロファージであり、IL-6 阻害は線維化に関与する IL-10 や Arginase の発現を抑制した。
- ④ アディポネクチンの過剰発現によって、コラーゲン誘導性関節炎が抑制された。アディポネクチンは補体 C1q とドメイン構造が類似しており、アディポネクチンは C1q と結合することが示された。アディポネクチン蛋白をヒトマクロファージに添加す

ると、炎症に関与する COX2 と IL-6 の mRNA 発現量が増加した。一方で MMP の阻害因子である TIMP1 の発現と、リンパ管新生因子である VEGFC の発現量も増加した。アディポネクチン下流のシグナル経路を解析したところ、アディポネクチンが Src ファミリーである Syk を活性化し、その下流で MAPK が活性化した。

3) RA 患者における臨床的検証

- ① 患者血清中 C1q 値は CRP、ESR、RF、抗 CCP 抗体価と比べて、modified total Sharp Score の 1 年間の変化量 (Δ mTSS) を指標とした RA 患者の骨破壊の進行度と最もよく関連した。
- ② RA では健常人に比べて CD14(+)CD16(+), CD14(+)CCR2(+) 単球が増加し、CD14(+) 単球における CXCR4 発現は低下、CCR2 発現は上昇していた。CD14(+)CCR2(+) は CRP や MMP3 と正の相関を示し、CD14(+)CD16(+) は MRI における骨びらん・骨髄浮腫と関連し、1 年後の関節破壊進行および RRP と関連した。

D. 考察

1) RA 患者の骨髄細胞における異常の解析

網羅的遺伝子発現解析とバイオインフォマティクスの応用の結果、骨髄での免疫機能の異常な亢進が確認されるとともに、それを制御するネットワークの中心には IFN をはじめとするサイトカインの存在が明らかになった。また、アポトーシスの亢進が示され、死細胞を貪食するマクロファージの活性化とそれに続くインターフェロンの産生増強につながる可能性がある。これらの所見は DNase II 遺伝子を欠損させた関節炎モデルマウスの骨髄でも確認され、遺伝子発現パターンは RA と酷似していた。さらに、正常な MHC class I、II 分子に加え、癌や胎生期にのみ発現するとされる HLA-E、HLA-G、HLA-F 分子が T、B 細胞、単球に発現しており、骨髄が強い活性化状態にあると考えられた。

癌特異的抗原を発現する CD14(+)CD15(+) 単球系細胞が、RA 患者骨髄で確認されるとともに、一部の患者で末梢血中にも存在することが明らかになった。CD14(+)CD15(+) は殆どが HLA-G 陽性であった。この単球系細胞は、骨芽細胞や軟骨細胞への分化能を有し関節修復に関与する可能性のある単球由来多能性細胞

(monocyte-derived multipotential cell: MOMC) とは異なり、CXCR4 の発現は少なく、修復能の低下が示唆された。さらに、RA の骨髄 CD14(+)CD15(+) 細胞は CCR5 を高発現しており、MIP-1 α や RANTES などのケモカインによってコントロールされている可能性が考えられた。これらの異常が、生物学的製剤治療でどのように変化するか非常に興味深い。もし、骨髄で異常が残存すれば、生物学的製剤中止による再発は必至である。

一方、患者骨髄検体を得るには限界があり、RA 骨髄細胞の分化異常を明らかにするには、患者由来の iPS 細胞が有用である。iPS 細胞は *in vivo* と異なり、様々なサイトカインや薬剤の影響を受けず、*in vitro* での分化が行える。中畑班員が血清フリー、フィーダーフリーで単球、マクロファージ、樹状細胞を分化させることに成功したことから、RA 発症機構のみならず薬剤の反応性の研究にも応用が可能である。実際に、iPS から分化した単球は CD14/CD16 を発現しており、炎症性単球の表現型を取り、樹状細胞は T 細胞への抗原提示能を保持していた。

さらに、RA 患者特異的 iPS 細胞の樹立に成功した。この細胞も *in vitro* で CD14(+) 単球への分化誘導が可能であり約 60-90% の純度が得られた。そこで、RA 患者骨髄で見られた CD14(+)CD15(+) の「まるで癌細胞」が単球系細胞への分化過程で出現するか否かを検討したところ、分化誘導刺激後 15 日目に一過性に現れた。この細胞群は健常人由来 iPS 細胞からも誘導することが可能であったが、健常人由来 iPS 細胞に比べて RA 患者由来 iPS 細胞で出現頻度が高かったことから、RA の病態に関与している可能性がある。現在さらに、別

家系の 3 例の患者から iPS 細胞が樹立しており、その結果と比較したい。また、CD14(+)CD15(+) の細胞の数と発現期間は、環境因子すなわち骨髄ストローマ細胞や越智らが同定した RA ナース細胞との接触、そこから産生されるサイトカインの影響を受ける可能性がある。今後、これらの細胞との共培養や種々のサイトカインによる影響の検討を行いたい。

また、iPS 細胞から破骨細胞への分化に成功した。iPS 細胞から分化した CD14(+) 細胞のうち、破骨細胞へ分化誘導可能なものは一部分であり、今後どのようなフェノタイプを持つ細胞が破骨細胞に分化するかを検討したい。吉川班員、中田研究協力者による三次元培養システムと力学負荷を組み合わせることで、iPS 細胞から骨・軟骨細胞など骨格支持細胞へのより生理的な状況下での細胞分化と細胞機能の研究が可能になると思われる。RA 患者特異的 iPS 細胞は、薬剤感受性の検討や、新規薬物のスクリーニングにも利用することができる。

2) RA における骨髄間葉系由来の骨格形成細胞の増殖・分化を相互に制御するネットワーク異常の解析

骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞、筋細胞や脂肪細胞を含めたすべての骨格形成細胞のネットワークは極めて重要な課題である。小守班員による、骨細胞を中心とする骨芽細胞・破骨細胞ネットワークの研究は、骨細胞によるメカニカルストレスの感知と応答が骨代謝を制御することを証明した。骨芽細胞特異的 *bc12 tg* マウスは骨細胞突起が減少し、骨細胞による骨芽細胞ならびに破骨細胞分化制御が不能となる。網羅的遺伝子発現解析から見出された PDK4 は RANKL 発現調節を介して骨代謝をコントロールするという新たな機能が明らかになった。Fkbp5 は糖質コルチコイド受容体と結合し、糖質コルチコイド受容体の核移行を抑制することが報告されていることから、ステロイド性骨粗鬆症の病態解明と治療に応用できる可能性がある。また、Fkbp5 KO マウ

スでは筋委縮を生じており、大平班員による筋再生研究との融合が期待される。

同様に、田中班員らにより、アポトーシス制御に関わる Mc1-1 の代謝にユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解系が関与することがわかり、さらに、破骨細胞機能における Stat5 の重要性が示され、骨代謝に係る転写因子が明確になりつつある。また、松尾班員によって炎症病態における骨量減少に OPG の関与が示された。OPG 産生は AP-1 が転写因子として働く。田中班員は、AP-1 分子 c Fos は Smad と結合し、NfatC1 の転写調節に働いている可能性を示しており、これらの 2 分子は、互いに共局在することが必要で、協調してゲノム上への結合、転写調節作用を持つと考えられる。これらの分子群が健常人と比べて差があるかどうかを、RA 特異的 iPS 細胞を用いて *in vitro* で検討したい。今後この分子の制御による破骨細胞の制御の可能性がある。

一方、吉川班員、中田研究協力者らにより、力学刺激環境下における細胞応答解析が、*in vitro* 三次元培養システムで可能になった。間葉系由来細胞の *in vitro* 三次元培養システムは、治療薬の反応性を調べる有用な手段であることが示された。また、RA 患者由来の iPS 細胞を三次元培養下で分化実験をすることで、より生理的な状況下での細胞機能の研究が可能になる。

宇宙ステーションに滞在した古川飛行士が、強い骨粗鬆症と筋力低下により歩けなくなったことは、力学的刺激が骨代謝と筋肉代謝に如何に重要かを示す。これは加齢や疾患による寝たきり状態でも同じであり、力学的刺激による骨代謝と筋の再生の研究成果は、RA の病態のみならず、高齢者の寝たきり状態の筋委縮や骨萎縮の予防・治療法の開発など応用範囲は広い。そして介護予防施策につながる可能性がある。すでに我々は骨髄細胞が損傷筋に遊走し衛生細胞に分化すること、衛生細胞の増殖に IL-6 が関わることを明らかにしたが、力学刺激の存在下でのサイトカインの作

用やシグナル伝達の検討は廃用性筋委縮の病態の解明、さらには、筋組織再生の至適条件の解明につながる。

3) RA 患者における臨床的検証

臨床的検証については、C1q と RA 重症化との関連が明らかになった。また、C1q が、アディポネクチンの標的となっていることがわかり、様々な炎症性疾患の病態に C1q を介した作用の関与が明らかになりつつある。また、生物学的製剤の有効性が体脂肪量と逆相関するといわれており、今後の研究結果が待たれる。

桑名班員は、RA 患者で CD14(+)CCR2(+)細胞は滑膜炎、CD14(+)CD16(+)細胞は関節破壊との関連を明らかにした。CD16(+) (FcγRIII+)CD14(+)単球は、炎症性サイトカインの分泌や Th17 分化促進を介して RA 病態に関わることが報告されており興味深い。

以上の病因・病態研究の成果を、今後、新たな診断法・治療法に発展させることにより、早期診断、予後診断法の開発、ドラッグフリー寛解や根治を見据えた分子標的治療法の開発、特に予防法の開発へつながる可能性がある。RA の克服は、難病対策費の大幅な削減、介護予防施策の成果となる。高齢者の寝たきり状態の筋委縮の予防・治療法の開発や肥満と骨粗鬆症の関連も明らかになる可能性があり、厚生労働行政にとって大きな意義があると考えられる。

E. 結論

RA 患者の骨髄細胞の異常が解明されるとともに、骨髄間葉系細胞のネットワーク制御機構が分子レベルで明らかになった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishimoto N, Amano K, Hirabayashi Y, Horiuchi T, Ishii T, Iwahashi M, Iwamoto M, Kohsaka H, Kondo M, Matsubara T, Mimura T, Miyahara H, Ohta S, Saeki Y, Saito K, Sano H, Takasugi K, Takeuchi T, Tohma S, Tsuru T, Ueki Y, Yamana J, Hashimoto J, Matsutani T, Murakami M, Takagi N. Drug free REmission/low disease activity after cessation of tocilizumab (Actemra) Monotherapy (DREAM) study. *Mod Rheumatol*. 24(1):17-25. 2014.
2. Nishimoto N, Amano K, Hirabayashi Y, Horiuchi T, Ishii T, Iwahashi M, Iwamoto M, Kohsaka H, Kondo M, Matsubara T, Mimura T, Miyahara H, Ohta S, Saeki Y, Saito K, Sano H, Takasugi K, Takeuchi T, Tohma S, Tsuru T, Ueki Y, Yamana J, Hashimoto J, Matsutani T, Murakami M, Takagi N. Retreatment efficacy and safety of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis in recurrence (RESTORE) study. *Mod Rheumatol*. 24(1):26-32 2014.
3. Fujita R, Kawano F, Ohira T, Nakai N, Shibaguchi T, Nishimoto N, Ohira Y. Anti-interleukin-6 receptor antibody (MR16-1) promotes muscle regeneration via modulation of gene expressions in infiltrated macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 15. pii: S0304-4165(14)00016-6. 2014.
4. Schoels MM, van der Heijde D, Breedveld FC, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Nishimoto N, Smolen JS. Blocking the effects of interleukin-6 in rheumatoid arthritis and other inflammatory rheumatic diseases: systematic literature review and meta-analysis informing a consensus statement. *Ann Rheum Dis*. 72(4):583-9. 2013
5. Smolen JS, Schoels MM, Nishimoto N, Breedveld FC, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Gabay C, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Jones G, Kvien TK, Murakami M, Betteridge N, Bingham C 3rd, Bykerk V, Choy EH, Combe B, Cutolo M, Graninger W, Lanas A, Martin-Mola E, Montecucco C, Ostergaard M, Pavelka K, Rubbert-Roth A, Sattar N, Scholte-Voshaar M, Tanaka Y, Trauner M, Valentini G, Winthrop KL, de Wit M, van der Heijde D. Consensus statement on blocking the effects of interleukin-6 and in particular by interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis*. 72(4):482-92. 2013.
6. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Takei S, Iwata N, Umebayashi H, Murata T, Miyoshi M, Tomiita M, Nishimoto N, Kishimoto T. Long-term treatment of systemic juvenile idiopathic arthritis with tocilizumab: results of an open-label extension study in Japan. *Ann Rheum Dis*. 72(4):627-8. 2013.
7. Fiala M, Mizwicki MT, Weitzman R, Magpantay L, Nishimoto N. Tocilizumab infusion therapy normalizes inflammation in sporadic ALS patients. *Am J Neurodegener* 2(2):129-39. 2013.
8. Shimane K, Kochi Y, Suzuki A, Okada Y, Ishii T, Horita T, Saito K, Okamoto A, Nishimoto N, Myouzen K, Kubo M, Hirakata M, Sumida T, Takasaki Y, Yamada R, Nakamura Y, Kamatani N, Yamamoto K. An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. *Rheumatology (Oxford)*. 52(7):1172-82. 2013.
9. Chang Q, Bournazou E, Sansone P, Berishaj M, Gao SP, Daly L, Wels J, Theilen T, Granitto S, Zhang X, Cotari J, Alpaugh ML, de Stanchina E, Manova K, Li M, Bonafe M, Ceccarelli C, Taffurelli M, Santini D, Altan-Bonnet G, Kaplan R, Norton L, Nishimoto N, Huszar D, Lyden D, Bromberg J. The IL-6/JAK/Stat3 Feed-Forward Loop Drives Tumorigenesis and Metastasis. *Neoplasia*. 15(7):848-62 2013.
10. Hirao M, Hashimoto J, Nishimoto N. Anti-cytokine agents to combat oxidative stress. In: Alcaraz MJ, Gualillo D, Sánchez-Pernaute, O. *Oxidative Stress in Advanced Basic Research and Clinical*

- Practice. Studies on Arthritis and Joint Diseases. Springer. pp 297-309.2013.
11. 西本憲弘, 村上美帆. 炎症性自己免疫疾患における治療標的としての IL-6. 日本臨床増刊号「血管炎」. 日本臨床社. 2013 : 71 (増刊号 1) : 623-629
 12. 西本憲弘. IL-6 標的薬. 特集/関節リウマチ治療における分子標的薬の進歩. 臨床薬理. 三原医学社. 2013 : 44 (1) : 9-14
 13. 松谷隆治, 村上美帆, 西本憲弘. 水銀による自己抗体産生誘導. 臨床免疫・アレルギー科. 科学評論社. 2013 : 59 (5) : 611-613
 14. 西本憲弘, 村上美帆. 成人病発症 Still 病. 内科. 南江堂. 2013 : 112 (1) : 73-76
 15. 西本憲弘. 技術革新で既存の治療法の枠組みを変える可能性. Medical ASAHI. 朝日新聞社. 2013 : 42 (10) : 16-18
 16. 西本憲弘. キャッスルマン病と IL-6. 血液内科. 2013 : 67 (4) : 467-471
 17. 西本憲弘. リウマチ性疾患 10.1 総論 1) 免疫・炎症に関する細胞分子. 内科学第十版. (矢崎義雄編) 朝倉書店 : 東京 2013 : 1227-1231.
 18. 西本憲弘, 村上美帆. BMS945429 (P274)・Brodalumab (P277)・Ixekizumab (P314)・Sarilimab (P346)・Secukinumab (P348)・Siltuximab (P351)・Sirukumab (P352)・Tocilizumab (P358). 免疫・アレルギー疾患の分子標的と治療薬事典 生物学的製剤、低分子化合物のターゲット分子と作用機序、薬効のすべて. (田中良哉編) 羊土社:東京 2013.
 19. 西本憲弘, 村上美帆. 生物学的製剤使用時の WBC 減少. リウマチ病セミナーXXIV. (監修 七川歡次) 永井書店. 2013 : 217
 20. Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Kunii N, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Kashiwase K, Azuma F, Kulski JK, Inoue T, Inoko H. Exome-sequencing identifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the *BTNL2*. *J. Hum. Genet.* 2013; 58(4): 210-215
 21. Seta N, Okazaki Y, Miyazaki H, Kato T, Kuwana M. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 is required for the transformation of circulating monocytes into multipotential cells. *PLoS One.* 2013; 8(9): e74246
 22. Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T.: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica.* ; 99(1):19-27. 2014 Jan doi: 10.3324/haematol.2013.083873.
 23. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS ONE.* 4/3/ 2013; 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243
 24. Tomizawa D., Akio Tawa A., MD/PhD, Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Excess reduction of anthracyclines results in inferior event-free survival in core binding factor acute myeloid leukemia in children; a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Leukemia.* in press. doi:10.1038/leu.2013.153
 25. Nakazawa Y., Saito S., Yanagisawa R., Suzuki T., Toshiro Ito T., Ishida F., Muramatsu H., Matsumoto K., Kato K., Ishida H., Umeda K., Souichi Adachi S., Nakahata T., Koike K.: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is a highly predictive factor for the development

- of AdV11-induced hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 48:737-739, 2013.
26. Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Sep 30. doi: 10.1038/bmt.2013.147. in press.
 27. 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞。再生医療 12(1) : 19-29, 2013.
 28. Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Rokutanda S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Asahina I, Komori T. Bcl2 Deficiency Activates FoxO through Akt Inactivation and Accelerates Osteoblast Differentiation. *PLoS One.* 9(1) : e86629, 2014.
 29. Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res.* 352 :191-198, 2013.
 30. Hirose J, Masuda H, Tokuyama N, Omata Y, Matsumoto T, Yasui T, Kadono Y, Hennighausen L, Tanaka S. Bone resorption is regulated by cell-autonomous negative feedback loop of Stat5-Dusp axis in the osteoclast. *J Exp Med.* 211(1):153-63, 2014
 31. Matsumoto T, Nagase Y, Hirose J, Tokuyama N, Yasui T, Kadono Y, Ueki K, Kadowaki T, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of bone-resorption and sealing zone formation in osteoclasts occurs through Akt-mediated microtubule stabilization. *J Bone Miner Res.* 28(5):1191-202, 2013
 32. Tanaka S Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World J Orthop.* 18;4(1):1-6, 2013
 33. Matsuo T, Mae T, Kita K, Tachibana Y, Yoshikawa H, Nakata K. Bone Substitutes and Implantation Depths for Subchondral Bone Repair in Osteochondral Defects of Porcine Knee Joints *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014 In press)
 34. 中田 研, 前 達雄, 米谷泰一, 松尾 知彦, 橘 優太, 金本 隆司, 北圭介, 吉川 秀樹 半月板バイオマテリアルの開発 *Clinical Calcium* 23;12 39-47, 2013
 35. Hoshi D, Nakajima A, Inoue E, Shidara K, Sato E, Kitahama M, Seto Y, Tanaka E, Urano W, Ichikawa N, Koseki Y, Momohara S, Taniguchi A, Nishimoto N, Yamanaka H. Incidence of serious respiratory infections in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Mod Rheumatol* 22(1):122-7, 2012
 36. Ozaki S, Atsumi T, Hayashi T, Ishizu A, Kobayashi S, Kumagai S, Kurihara Y, Kurokawa MS, Makino H, Nagafuchi H, Nakabayashi K, Nishimoto N, Suka M, Tomino Y, Yamada H, Yamagata K, Yoshida M, Yumura W. Severity-based treatment for Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: the JMAAV study. *Mod Rheumatol* 22(3):394-404, 2012.
 37. Yamamoto M, Tabeya T, Naishiro Y, Yajima H, Ishigami K, Shimizu Y, Obara M, Suzuki C, Yamashita K, Yamamoto H, Hayashi T, Sasaki S, Sugaya T, Ishida T, Takano KI, Himi T, Suzuki Y, Nishimoto N, Honda S, Takahashi H, Imai K, Shinomura Y. Value of serum IgG4 in the diagnosis of IgG4-related disease and in differentiation from rheumatic diseases and other diseases. *Mod Rheumatol* 22(3):419-25, 2012.
 38. Mori S, Tokuda H, Sakai F, Johkoh T, Mimori A, Nishimoto N, Tasaka S, Hatta K, Matsushima H, Kaise S, Kaneko A, Makino S, Minota S, Yamada T, Akagawa S, Kurashima A; and the NTM-BIORA (NTM infection in Biologic-treated RA patients) Study Investigators. Radiological features and therapeutic responses of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in rheumatoid arthritis patients receiving biological agents: a retrospective multicenter study in Japan. *Mod Rheumatol* 22(5):727-37, 2012.

39. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed OW, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A Genome-Wide Association Study Identified AFF1 as a Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus in Japanese. *PLoS Genet.* 8(1):e1002455. 2012.
40. Terada M, Kawano F, Ohira T, Nakai N, Nishimoto N, Ohira Y. Effects of Mechanical Over-loading on the Properties of Soleus Muscle Fibers, with or without Damage, in Wild Type and Mdx Mice. *PLoS ONE* 7(4):e34557. 2012.
41. Nishimoto N, Murakami M, Matsutani T. IL-6 blocker. In: Maurizio Cutolo eds. Addressing Unmet Medical Needs in RA. the Future Science Group E-Books.
42. Murakami M, Tomiita M, Nishimoto N. Tocilizumab in the treatment of systemic juvenile idiopathic arthritis. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews.* 2012:4
43. Ogata T, Yamazaki H, Teshima T, Tsuchiya T, Nishimoto N, Matsuura N. Anti-IL-6 receptor antibody does not ameliorate radiation pneumonia in mice. *Exp Ther Med.* 4(2):273-276. 2012
44. Imagawa T, Yokota S, Mori M, Miyamae T, Takei S, Imanaka H, Nerome Y, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Nishimoto N, Kishimoto T. Safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6-receptor monoclonal antibody, in patients with polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis. *Mod Rheumatol.* 22(1):109-15 2012.
45. Hoshi D, Nakajima A, Inoue E, Shidara K, Sato E, Kitahama M, Seto Y, Tanaka E, Urano W, Ichikawa N, Koseki Y, Momohara S, Taniguchi A, Nishimoto N, Yamanaka H. Incidence of serious respiratory infections in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Mod Rheumatol* 22(1):122-7 2012.
46. 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* 32(12):4041-5. 2012.
47. Mori S, Tokuda H, Sakai F, Johkoh T, Mimori A, Nishimoto N, Tasaka S, Hatta K, Matsushima H, Kaise S, Kaneko A, Makino S, Minota S, Yamada T, Akagawa S, Kurashima A; and the NTM-BIORA (NTM infection in Biologic-treated RA patients) Study Investigators. Radiological features and therapeutic responses of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in rheumatoid arthritis patients receiving biological agents: a retrospective multicenter study in Japan. *Mod Rheumatol* 22(5):727-37. 2012.
48. 村上美帆, 西本憲弘. IL-6 阻害薬. *医薬ジャーナル*. 医薬ジャーナル社. 2012;48(6):75-80
49. 村上美帆, 西本憲弘. IL-6 を標的とした RA 関節破壊の制御. *医学のあゆみ*. 医歯薬出版. 2012 : 242 (9) : 764-769
50. 西本憲弘, 村上美帆. 抗体を用いた医療-血清療法から抗体医薬まで-「抗 IL-6 抗体」. *臨床と微生物*. 2012 : 39(5):445-450
51. 村上美帆, 西本憲弘. 炎症性サイトカインと関節リウマチ. *CLINICAL CALCIUM*. 医薬ジャーナル社. 2012 : 22(11) : 107-116
52. Seta N, Okazaki Y, Izumi K, Miyazaki H, Kato T, and Kuwana M. Fibronectin binding is required for human circulating monocytes to acquire the mesenchymal/endothelial differentiation potential. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 820827.
53. Yamaguchi Y, and Kuwana M. Proangiogenic

- hematopoietic cells of monocytic origin: roles in vascular regeneration and pathogenic processes of systemic sclerosis. *Histol. Histopathol.* 2013; 28(2): 175-183.
54. Sakai H., Okafuji I., Nishikomori R., Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., Nakahata T., Heike T.: The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol.* 24(1):5-15,2012.
 55. Izawa K., Hijikata A., Tanaka N., Kawai T., Saito M.K., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich I., Yasumi T., Nakahata T., 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.* 19(2):143-152,2012..
 56. Hiejima E., Komatsu H., Takeda Y., Sogo T., Inui A., Okafuji I., Nishikomori R., Nakahata T., Fujisawa T.: Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases. *J. Pediatr. Child Health* 48(3):E122-5,2012.
 57. Kawai T., Nishikomori R., Izawa K., Murata Y., Tanaka N., Sakai H., Saito M., Yasumi T., Takaoka Y., Nakahata T., Mizukami T., Nunoi H., Kiyohara Y., Yoden A., Mutara T., Sasaki S., Ito E., Akutagawa H., Kawai T., Imai C., Okada S., Kobayashi M., Heike T.: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Blood* 119(23):5458-66,2012.
 58. Tsumura M., Okada S., Sakai H., Yasunaga S., Ohtsubo M., Murata T., Obata H., Yasumi T., Kong X., Abhyankar A., Heike T., Nakahata T., Nishikomori R., Al-Muhsen S., Boisson-Dupuis S., Casanova J., AlZahrani M., Shehri MA., ElGhazali G., Takihara Y., Kobayashi M.: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation* 33(9):1377-87,2012.
 59. Tanaka T., Takahashi K., Yamane M., Tomida S., Nakamura S., Oshima K., Niwa A., Nishikomori R., Kambe N., Hara H., Mitsuyama M., Morone N., Heuse J.E., Yamamoto T., Watanabe A., Sato-Otsubo A., Ozawa S., Asaka I., Heike T., Yamanaka S., Nakahata T., Saito M.K.: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 120(6):1299-308,2012.
 60. Kawai T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Izawa K., Murakami T., Okamoto N., Mori Y., Nakagawa N., Imai K., Nonoyama S., Wada T., Yatie A., Oomori K., Nakahata T., Heike T.: Multiple reversions of an IL2RG mutation restore combined immunodeficiency patient. *J. Clin. Immunol.* 32(4):690-7, 2012.
 61. Morishima T., Nomura A., Saida S., Watanabe K., Yagi H., Matsumoto M., Fujimura Y., Heike T., Nakahata T., Adachi S.: Pediatric idiopathic TTP diagnosed with decreased ADAMTS13 activity. *Pediatr. Int.* 54(3):422-3, 2012.
 62. Nakazawa Y., Saito S., Yanagisawa R., Suzuki T., Toshiro Ito T., Ishida F., Muramatsu H., Matsumoto K., Kato K., Ishida H., Umeda K., Souichi Adachi S., Nakahata T., Koike K.: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is highly predictive of the development of hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* in press.
 63. Saida S., Watanabe K., Sato-Otsubo A., Terui K., Yoshida K., Okuno Y., Toki T., Wang RN., Shiraishi Y., Miyano S., Kato I., Morishima T., Fujino H., Umeda K., Hiramatsu H., Adachi S., Ito E., Ogawa S., Ito M., Nakahata T., Heike T.: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood* in press.
 64. 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞、再生医療 (Vol.12 No.1)、19-32、2013
 65. Komori T. Function of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res.* in press.
 66. Moriishi T, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Maeno T, Kawai Y, Komori H, Komori T. Osteocyte network; a negative regulatory

- system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. *PLoS One*. 7(6): e40143, 2012.
67. Masuyama R, Mizuno A, Komori H, Kajiya H, Uekawa A, Kitaura H, Okabe K, Ohyama K, Komori T. Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass. *J Bone Miner Res*. 27(8): 1708-1721, 2012.
 68. Oikawa T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Uehara S, Udagawa N, Saya H, and Matsuo K. Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *J Cell Biol*. 2012;197(4):553-568.
 69. Kuroda Y, Hisatsune C, Mizutani A, Ogawa N, Matsuo K, Mikoshiba K. Cot Kinase promotes Ca²⁺ oscillation/calcineurin-independent osteoclastogenesis by stabilizing NFATc1 protein. *Mol Cell Biol*. 2012;32(14):2954-2963.
 70. Valverde-Franco G, Pelletier JP, Fahmi H, Hum D, Matsuo K, Lussier B, Kapoor M, Martel-Pelletier J. In vivo bone-specific EphB4 overexpression in mice protects both subchondral bone and cartilage during osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(11):3614-3625.
 71. (和文総説) 松尾光一. 骨免疫から見た老化制御 *Clin Calcium*. 2013;23(1):59-64.
 72. Shinohara M, Nakamura M, Masuda H, Hirose J, Kadono Y, Iwasawa M, Nagase Y, Ueki K, Kadowaki T, Sasaki T, Kato S, Nakamura H, Tanaka S, Takayanagi H. Class IA phosphatidylinositol 3-kinase regulates osteoclastic bone resorption through Akt-mediated vesicle transport. *J Bone Miner Res*. 2012 Jul 13. doi: 10.1002/jbmr.1703. [Epub ahead of print]
 73. Miyazaki T, Iwasawa M, Nakashima T, Mori S, Shigemoto K, Nakamura H, Katagiri H, Takayanagi H, Tanaka S. Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption. *J Biol Chem*. 2012 Sep 17. [Epub ahead of print]
 74. Mochizuki A, Takami M, Miyamoto Y, Nakamaki T, Tomoyasu S, Kadono Y, Tanaka S, Inoue T, Kamijo R. Cell Adhesion Signaling Regulates RANK Expression in Osteoclast Precursors. *PLoS One*. 2012;7(11):e48795. doi: 10.1371/journal.pone.0048795. Epub 2012 Nov 6.
 75. Matsumoto T, Nagase Y, Hirose J, Tokuyama N, Yasui T, Kadono Y, Ueki K, Kadowaki T, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of bone-resorption and sealing zone formation in osteoclasts occurs through Akt-mediated microtubule stabilization. *J Bone Miner Res*. 2012 Dec 13. doi: 10.1002/jbmr.1844. [Epub ahead of print]
 76. Tanaka S. Regulation of bone destruction in rheumatoid arthritis through RANKL-RANK pathways. *World J Orthop*. 2013 Jan 18;4(1):1-6. doi: 10.5312/wjo.v4.i1.1. PMID: 23362468 [PubMed - in process]
 77. Akamine Y, Kakudo K, Kondo M, Ota K, Muroi Y, Yoshikawa H, Nakata K. Prolonged matrix metalloproteinase-3 high expression after cyclic compressive load on human synovial cells in three-dimensional cultured tissue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 41(7):874-81 2012
 78. 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* 21:10-15, 2011.
 79. Lee HM, Sugino H, Aoki C, Nishimoto N. Underexpression of mitochondrial-DNA encoded ATP synthesis-related genes and DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 15;13(2):R63, 2011.
 80. Hirao M, Nampei A, Shi K, Yoshikawa H, Nishimoto N, Hashimoto J. Diagnostic features of mild cellulitis phlegmon in patients with rheumatoid arthritis treated with