
受賞講演総説

TACE 活性制御による単球分化の決定

日浅 雅博

キーワード：TACE, TIMP3, 骨髄間質細胞, 樹状細胞, 多発性骨髄腫

Determination of a Differentiation Fate of Monocytes by the TACE Activity

Masahiro HIASA

Abstract : Multiple myeloma (MM) almost exclusively expands in the bone marrow and generates devastating bone destruction. We recently reported that GM-CSF and IL-4, an inducer of dendritic cell (DC) differentiation, up-regulate TNF α converting enzyme (TACE) expression in monocytes to cleave their surface M-CSF receptor (M-CSFR), which drastically disrupts osteoclastogenesis. Because TACE activity is inhibited by TIMP3, we explored the expression of TIMP3 and its role in monocyte differentiation into osteoclasts and DCs in MM. Bone marrow stromal cells (BMSCs) secreted a large amount of TIMP3 protein whose production was further enhanced by IL-6 and TGF β over-produced in MM bone lesions. BMSCs potently suppressed GM-CSF and IL-4-induced DC differentiation and resumed osteoclastogenesis from monocytes along with the suppression of surface M-CSFR and RANK shedding on monocytes. TIMP3 knockdown in BMSCs by TIMP3 siRNA enhanced M-CSFR shedding in monocytes in the presence of BMSCs and resumed GM-CSF and IL-4-mediated DC differentiation from monocytes, suggesting monocyte differentiation skewed by BMSC-derived TIMP3. These results suggest that TIMP3 over-produced in MM bone marrow microenvironment restores surface M-CSFR on monocytes to facilitate their downstream signaling, which causes extensive bone destruction and impaired DC differentiation in MM. TIMP3 may therefore become a novel target in the treatment of MM bone disease.

多発性骨髄腫

多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma) は、B 細胞から分化した形質細胞の腫瘍で、その産物である単クローン性免疫グロブリンおよび骨髄腫細胞によって産生される種々のサイトカイン・ケモカインにより、貧血を主とする造血障害・疼痛や高カルシウム血症を引き起こす。その臨床症状は溶骨性病変の形成・腎障害などの臓器障害、易感染性など多岐にわたる¹⁻³⁾。我が国での多発性骨髄腫の10万人あたりの推計罹病率は、男性2.2、女性1.7と推計されており、年齢階級別罹病率をみると、34歳までの若年者では発症は認められず、50歳以降で5

歳ごとに、その年齢階級より約50%増加し、85歳以上で最も高い。そのため、高齢化社会をむかえる我が国においては、今後の患者数増加が予測されている⁴⁾。

多発性骨髄腫の治療には、メルファランとプレドニゾンによるMP療法やシクロホスファミドとプレドニゾンによるCP療法、ビンクリスチン、ドキソルビシン、デキサメタゾンによるVAD療法などの化学療法が適用されている。しかし、治療中、多くの症例でこれら薬剤に対する薬剤耐性を腫瘍細胞が獲得することが問題点とされている。また、適応がある症例では自家造血幹細胞移植が行われている^{1,3,4)}。

さらに、補助療法として疼痛緩和と腫瘍減量を目的とした放射線療法や、溶骨性骨病変や、これに伴う高カルシウム血症に対し、抗破骨細胞療法としてビスホスホネート製剤が用いられる。ビスホスホネート製剤は、アデノシン三リン酸 (ATP) の競合的阻害やメバロン酸経路の遮断により、破骨細胞にアポトーシスを誘導し骨吸収を抑制するため、溶骨性骨病変を有する骨髄腫患者にビスホスホネート製剤による治療が推奨されている。しかしながら、ビスホスホネート製剤と拔牙を含む侵襲的歯科治療に伴う顎骨壊死の関連についての注意勧告は記憶に新しい^{4,7)}。そのため、ビスホスホネート製剤投与開始前に歯科検診を受け、投与後は予防的歯科処置や口腔衛生状態を良好に保つなど、多発性骨髄腫治療における歯科医療の重要性が問われる。

予後は症例により様々であるが、平均生存期間は3～4年である。このように、治療が困難であり予後も望ましくないことから、本症に対する新規治療の開発が急務とされている。近年、本邦においてもプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブや、サリドマイドおよびサリドマイド誘導体レナリドマイドと相次いで認可され治療薬として使用されていることから、多発性骨髄腫の治療の困難さや現況が読み取れる^{4,8,11)}。

多発性骨髄腫の形成する骨髄微小環境

このような多発性骨髄腫の治療を困難とさせている原因に、骨髄腫細胞と骨髄を構成する細胞群とで形成される特異な微小環境の存在が考えられている^{12,13)}。骨髄腫はその前段階である Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) から、骨破壊病変を形成する骨髄腫へと進展すると骨髄微小環境は大きく変化する。骨破壊病変部では、骨髄腫細胞の増殖が活発に行われる。その栄養路確保のため、骨髄内の血管新生が誘導されるとともに、破骨細胞形成が亢進し旺盛な骨吸収が誘導され腫瘍が進展する¹⁴⁾。

破骨細胞の形成・機能の調節には骨髄間質細胞の発現する破骨細胞分化因子である Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL) とそのおとり受容体である Osteoprotegerin (OPG) が関与する^{15,16)}。広範な骨破壊病変を認める骨髄腫患者では、骨髄間質細胞の RANKL 発現が亢進し OPG の発現が低下しており、骨髄腫細胞の産生する CC ケモカインである Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α や MIP-1 β は骨髄間質細胞の RANKL 発現を亢進する主要な骨吸収促進因子と示唆されている^{17,18)}。

骨髄腫においては、このような骨吸収の増加に加え骨形成の低下が認められる。骨髄腫細胞の産生する canonical Wnt 経路の可溶性阻害因子 Dickkopf (DKK)-1 や secreted Frizzled-Related Protein-2, および骨吸収の亢進により骨組織より放出され活性化した TGF β 等が骨芽細胞の分化や数の低下、骨形成機能の抑制に関与す

る^{19,20)}。このような骨芽細胞抑制に呼応し骨芽細胞前駆細胞である骨髄間質細胞が、骨髄腫細胞と破骨細胞との間に多く介在した骨髄腫患者の組織像では観察される。さらに、骨髄間質細胞は IL-6, IGF-1, VEGF などのサイトカインや成長因子、さらに VLA-4 や CD44 等の接着分子を介し、骨髄腫細胞の活性化や増殖をもたらすとともに、抗癌剤によるアポトーシスを回避することが報告されている^{13,21,22)}。

このように骨髄腫細胞は自らが骨病変部に誘導する破骨細胞、骨髄間質細胞等と密接な相互作用を営み自身に好適な環境を形成し、さらには T 細胞、NK 細胞や樹状細胞などの免疫担当細胞の機能低下も相まって旺盛に増殖する悪循環を形成する。

樹状細胞分化と多発性骨髄腫

樹状細胞は、その豊富な抗原提示能から免疫の中心的役割を担うと考えられており、近年これを利用した癌に対する免疫療法が期待されている²³⁾。樹状細胞は、その分化の起源を破骨細胞と同じく単球系由来としており、その分化は一方が促進すれば他方が抑制されるといった互いに相補的な関係をとる。臨床的にも、骨破壊性病変を形成する多発性骨髄腫の骨髄微小環境では破骨細胞の分化亢進とともに樹状細胞の機能の低下を認め、腫瘍免疫の低下・易感染性の原因と考えられている²⁴⁾。

破骨細胞は Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) と RANKL により、樹状細胞は Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) と IL-4 や IL-3 等により、同一の前駆細胞である単球より分化誘導されることが知られる^{23,25)}。しかしながら、これら破骨細胞と樹状細胞の分化の振り分けについては詳細な機構が解明されていなかった。我々はこれまでに破骨細胞・樹状細胞の新たな分化調節機構として、単球に対し樹状細胞分化誘導因子である GM-CSF と IL-4 は蛋白分解酵素である TNF α Converting Enzyme (TACE) を活性化すること、活性化された TACE は単球の M-CSF 受容体 (M-CSFR) を切断することにより、破骨細胞分化に必須の M-CSF シグナルを遮断することで破骨細胞分化を抑制し、樹状細胞分化を誘導することを示した²⁶⁾。

TACE は膜結合型として合成される TNF α , β -APP, TGF α , L-セレクチン等を細胞外で切断・遊離 (shedding) する多機能酵素であり、炎症性疾患、アルツハイマー病や白血球のローリング・浸潤に関与する可能性が指摘されている²⁷⁾。その活性を直接制御する因子については不明のままであったが、近年 Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase 3 (TIMP3) が TACE を効果的に抑制する因子としての機能をもつことが見いだされ脚光をあびている²⁸⁾。そこで TACE を中心とした破骨細胞・樹状細胞分化制御機構に対して、骨髄微小環境を構成する細胞群と TIMP3 の担う役割を明らかとし、多発性骨髄腫の形成する骨髄微小環境や免疫抑制の病態解明を行うこと

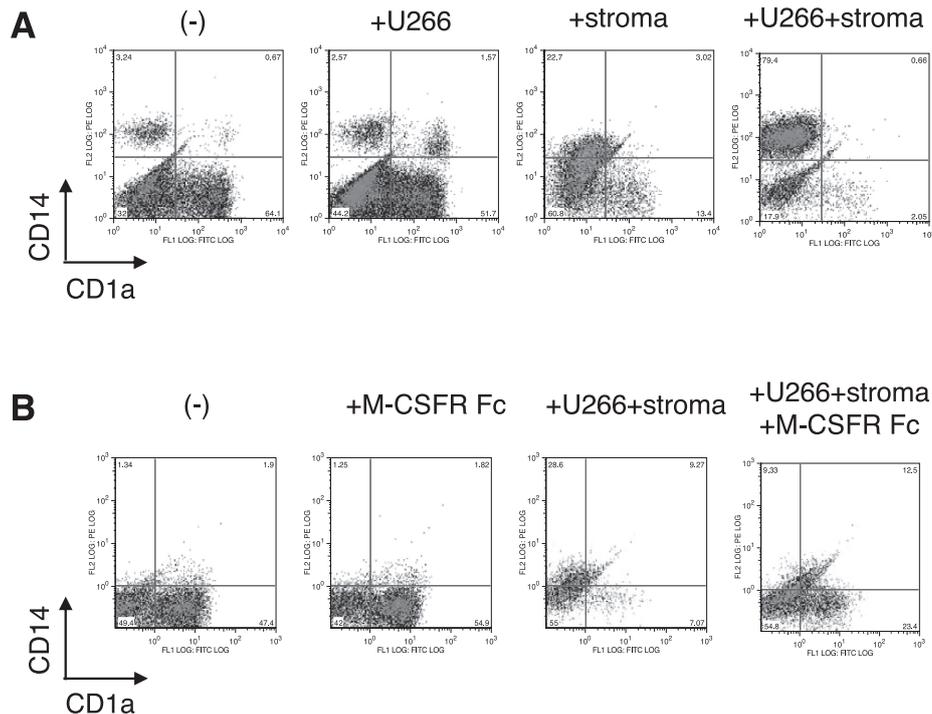


図1 骨髄間質細胞は樹状細胞分化を抑制する

(A) 樹状細胞分化のフローサイトメトリー解析。骨髄腫細胞株 (U266) および骨髄間質細胞 (stroma) の存在下, 非存在下にてヒト CD14⁺ 単球を GM-CSF と IL-4 で刺激し 5 日間培養を行った。

(B) 骨髄腫細胞株と骨髄間質細胞による GM-CSF と IL-4 誘導性樹状細胞分化抑制に対する M-CSFR Fc の効果。

を研究目的とした。

骨髄間質細胞は樹状細胞分化を抑制する

多発性骨髄腫の樹状細胞抑制のメカニズムを解明するため, まず骨髄微小環境の主要な構成成分である骨髄間質細胞と骨髄腫細胞, およびその協調作用の樹状細胞分化への影響を検討した。GM-CSF と IL-4 による CD14⁺ ヒト単球からの CD14⁺ CD1a⁺ 樹状細胞分化は, 骨髄腫細胞株 U266 との共培養にて 64% から 51% と軽度減弱され, 骨髄間質細胞との共培養では 13% と強力に抑制された。さらには, 骨髄腫細胞と骨髄間質細胞と両方と共培養することで CD14⁺ CD1a⁺ 樹状細胞は 2% とほぼ完全な抑制を認めた (図 1 A)。

樹状細胞分化の抑制因子の一つに前述の M-CSF シグナルが考えられている。そこで次に, この骨髄間質細胞による樹状細胞分化抑制が M-CSF シグナルに依存しているかどうかを M-CSFR Fc による M-CSF シグナルのブロックを行い検討した。結果, 骨髄間質細胞との共培養により単球からの CD14⁺ CD1a⁺ 樹状細胞分化は 47% から 10% に減弱するところ, M-CSFR Fc による M-CSF シグナルのブロックにより 23% まで回復を示した (図 1 B)。

これらの結果, 多発性骨髄腫における樹状細胞分化の

抑制には, 骨髄間質細胞が特に重要な役割を担い, その抑制効果は骨髄腫細胞により増強されうること, さらに骨髄間質細胞による樹状細胞分化の抑制のメカニズムの一部に M-CSF シグナルが関与することが明らかとなった。

間質細胞は単球の M-CSFR 発現を亢進する

我々は GM-CSF と IL-4 は TACE の活性化を介し単球の M-CSFR を shedding することで M-CSF シグナルを遮断することを報告した。しかしながら, GM-CSF と IL-4 による樹状細胞分化が骨髄間質細胞との共培養下では抑制され, M-CSF シグナルがそのメカニズムの一翼を担うことが示唆されたため, 骨髄間質細胞による単球の M-CSFR 発現への影響を確認した。

単球表面の M-CSFR 発現をフローサイトメトリーで解析したところ, 単球表面の M-CSFR 発現は骨髄間質細胞との共培養により発現上昇を認めた (図 2 A)。この発現増強のメカニズムを明らかにするため, 遺伝子発現の変化について Real-time PCR で解析すると, 単球は骨髄間質細胞との共培養によって M-CSFR の mRNA 発現が増強されることがわかった (図 2 B)。次いで, 骨髄間質細胞の M-CSFR の shedding への影響について培養上清中の可溶性 M-CSFR の定量を ELISA 法にて評価

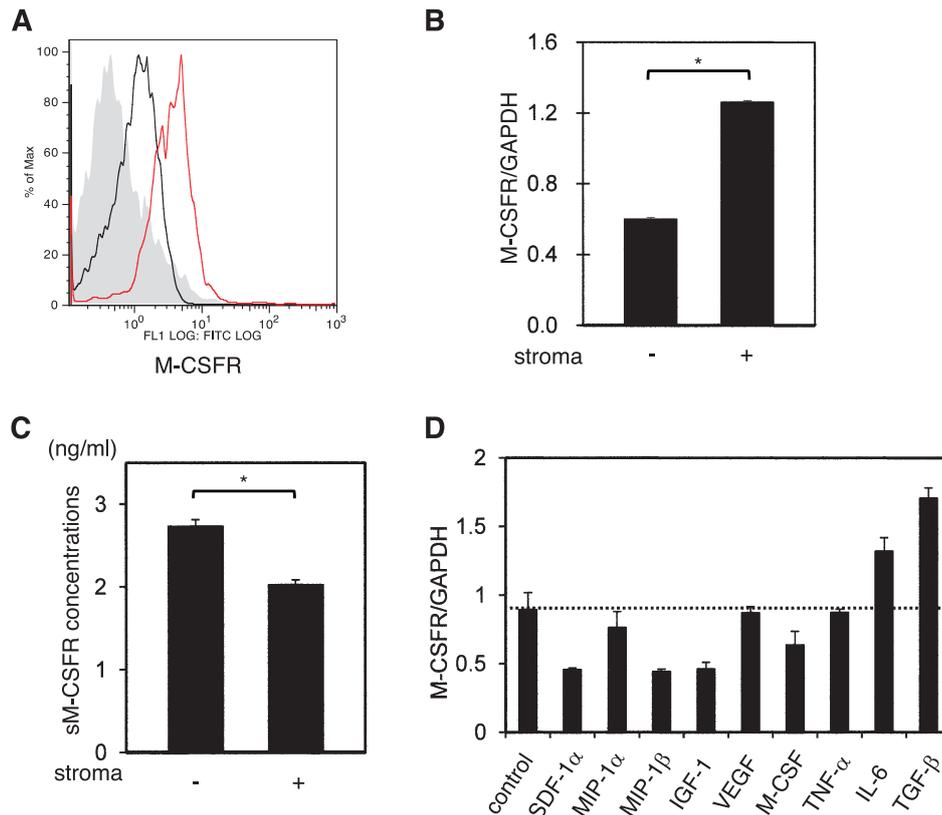


図2 間質細胞は単球の M-CSFR 発現を亢進する

(A) 単球表面の M-CSFR の発現のフローサイトメトリー解析。グレー：ネガティブコントロール，黒：骨髄間質細胞と非共培養時，赤：骨髄間質細胞との共培養時。

(B) Real-time PCR 法による骨髄間質細胞との共培養時の単球 M-CSFR mRNA 発現解析。

(C) ELISA 法による骨髄間質細胞との共培養時の培養上清中の可溶性 M-CSFR (sM-CSFR) の濃度解析。

(D) Real-time PCR 法による各種サイトカインの単球 M-CSFR mRNA 発現に及ぼす影響の解析。

(* $p < 0.01$)

すると、骨髄間質細胞との共培養にて培養上清中の可溶性 M-CSFR の濃度は低下を示した (図 2 C)。これらの結果、間質細胞によってもたらされる M-CSFR の発現上昇には遺伝子発現の上昇と shedding の抑制の双方が関与することが示唆された。

この骨髄間質細胞による単球の M-CSFR 発現上昇のメカニズムの解明のため、まず、多発性骨髄腫の病態形成・腫瘍進展に関与する重要な増殖性サイトカインの M-CSFR の発現に対する影響について Real-time PCR で検討したところ IL-6 および TGF β の添加により、単球の M-CSFR mRNA 発現上昇を認めた (図 2 D)。この結果、間質細胞による単球の M-CSFR の遺伝子発現上昇に IL-6 および TGF β の関与が示唆された。

骨髄間質細胞は TIMP3 を産生し単球の M-CSFR の shedding を抑制する

骨髄間質細胞による単球の M-CSFR の shedding の抑制機序についてさらなる検討を行った。単球の M-CSF

受容体は TACE により shedding を受けることから、単球の TACE 活性が骨髄間質細胞により抑制されている可能性が考えられる。そこで TACE の内因性阻害因子である TIMP3 が骨髄間質細胞で発現しているかどうかを RT-PCR で検討したところ、骨髄間質細胞では TIMP3 の発現が恒定的に認められた。一方、TIMP3 の発現は単球ではわずかに、骨髄腫細胞株では全く認められなかった (図 3 A)。また TIMP3 が可溶性因子として骨髄間質細胞から産生され影響しているかどうかを考慮し、培養上清中に産生される TIMP3 の濃度を ELISA 法で測定した。その結果、単球、骨髄腫細胞では可溶性 TIMP3 は検出できなかったが、間質細胞からは可溶性 TIMP3 産生が豊富に認められた (図 3 B)。興味深いことには、TIMP3 の間質細胞からの産生量は骨髄腫骨髄中に豊富に存在する TGF β によって増強されることが明らかとなった。

次に骨髄間質細胞が産生する TIMP3 が単球の M-CSFR の shedding に対しどのような影響をもたらすかを、骨髄間質細胞の TIMP3 の発現を siRNA にて

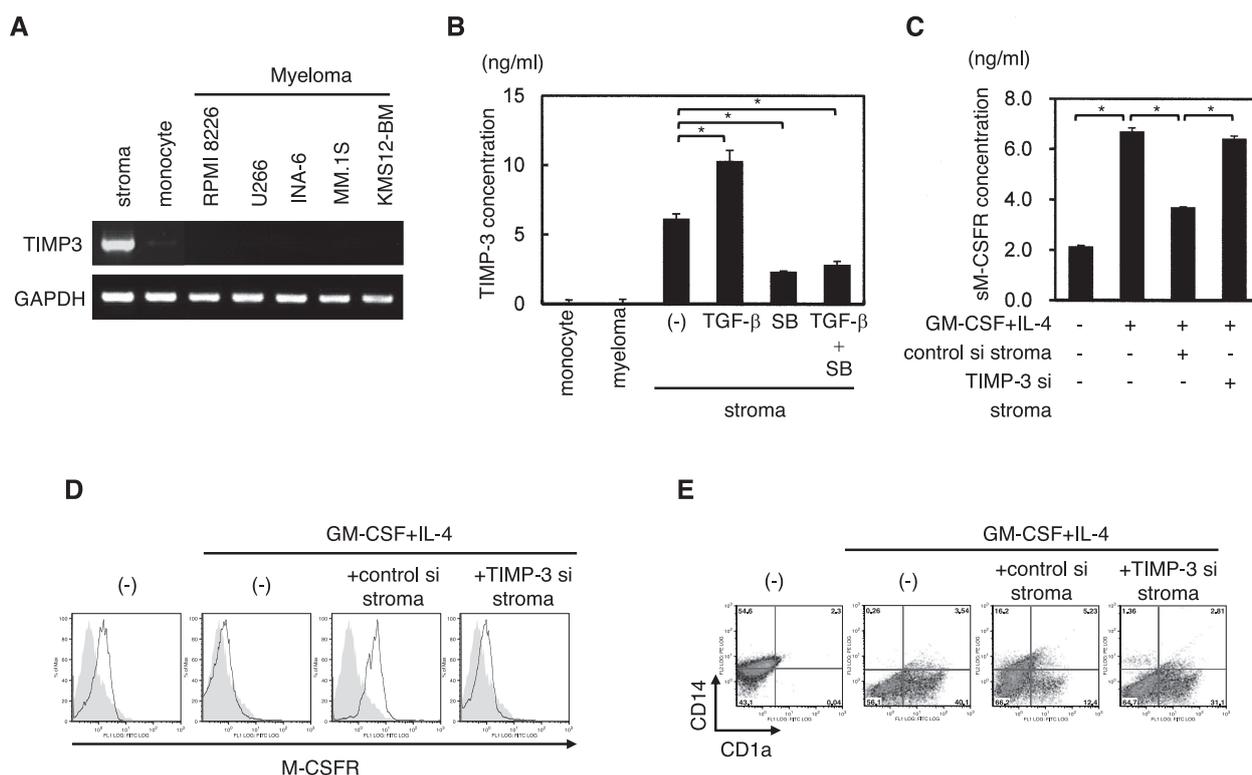


図3 骨髄間質細胞はTIMP3を産生し単球のM-CSFRのsheddingを介し樹状細胞分化を抑制する
 (A) RT-PCR法による骨髄間質細胞、単球(monocyte)、骨髄腫細胞株(RPMI8226, U266, INA-6, MM.1S, KMS12-BM)のTIMP3 mRNA発現解析。
 (B) ELISA法による各細胞の培養上清中の可溶性TIMP3の濃度解析。SB: TGF β type I receptor kinase inhibitor (SB431542)
 (C) ELISA法によるTIMP3 siRNAの骨髄間質細胞への遺伝子導入による培養上清中の可溶性M-CSFR (sM-CSFR)の濃度への影響の解析。
 (D) TIMP3 siRNAの骨髄間質細胞への遺伝子導入による単球表面のM-CSFR発現への影響のフローサイトメトリー解析。
 (E) TIMP3 siRNAの骨髄間質細胞への遺伝子導入による樹状細胞分化への影響のフローサイトメトリー解析。
 (* $p < 0.01$)

ノックダウンを行い、単球表面のM-CSFR発現と培養上清中の可溶性M-CSFR濃度を比較することで検討した。単球をGM-CSFとIL-4で刺激すると単球表面のM-CSFRは発現が低下し、逆に培養上清中の可溶性M-CSFRは濃度上昇を認め、旺盛なM-CSFRのsheddingが確認される。しかし、control siRNAを遺伝子導入した骨髄間質細胞と共培養を行うと、単球表面のM-CSFRは発現が回復し培養上清中の可溶性M-CSFRは濃度が低下することから、単球のM-CSFRのsheddingの抑制が認められた。ところが、TIMP3の発現をsiRNAにてノックダウンした骨髄間質細胞と共培養を行った場合では、培養上清中の可溶性M-CSFRの濃度低下や単球表面のM-CSFRの発現の回復はあまりみられず、単球のM-CSFRのsheddingの抑制は認められなくなった(図3 C, D)。

骨髄間質細胞の産生するTIMP3は樹状細胞分化を抑制する

骨髄間質細胞のTIMP3を抑制すると、単球のM-CSFRのsheddingが回復したため、次に骨髄間質細胞のTIMP3が樹状細胞分化に及ぼす影響を同じくsiRNAを用いた実験で検討した。すると、CD14⁻CD1a⁺樹状細胞分化はcontrol siRNAを遺伝子導入した骨髄間質細胞との共培養では12%に減少するが、TIMP3 siRNAを遺伝子導入した骨髄間質細胞との共培養では12%から31%へと回復を示した(図3 E)。このことから骨髄間質細胞による樹状細胞分化抑制には、骨髄間質細胞が産生するTIMP3が単球のTACE活性を抑制しM-CSF受容体のsheddingを抑制することで部分的に関与することが考えられた。

考察・まとめ

多発性骨髄腫での腫瘍進展に伴う免疫抑制と樹状細胞の数や分化、機能の低下との相関については、臨床知見より明らかとなっている。この原因として、これまで腫瘍細胞の産生する IL-6 や TGF- β 等のサイトカインが直接的に免疫担当細胞に作用することを中心に研究がなされてきた^{29,30)}。しかし、細胞同士の相互作用にはサイトカイン、成長因子等の液性因子のみならず、細胞自身の有する酵素による proteolytic なシグナル伝達制御が関与する徐々に明らかとなってきている。このような酵素は A disintegrin metalloprotease (ADAM) ファミリーとして知られており、TACE はこの ADAM ファミリーの代表的酵素である。本研究で着目した TIMP3 は、この TACE の活性制御を担う因子であり、炎症をコントロールする中心的な因子の一つである。過去の報告では TIMP3 は可溶体としてはほとんど存在せず、細胞外マトリックスと結合して沈着するとの報告もある³¹⁾。しかしながら、本研究において TIMP3 は可溶体として培養上清中に検出された。そのため、検出された TIMP3 が何らかの修飾を受けて可溶体として存在するのか、もしくは過剰産生によって行き場を失ったためなのか、この点のさらなる検討が必要である。

これまで TIMP3 の骨代謝における役割については未だ不明な点が多く、こと多発性骨髄腫における骨破壊病変での機能、樹状細胞分化・破骨細胞分化における役割についての知見は皆無であった。本研究では骨髄間質細胞は IL-6, TGF β による遺伝子レベルでの発現上昇に加え、TIMP3 による shedding の抑制を介して前駆細胞である単球表面の M-CSF 受容体の発現を強く増強することにより、樹状細胞分化を抑制することを明らかにした。このことは、骨髄腫骨病変部での病態の腫瘍免疫能の低下のメカニズムの一つと考えられる。さらに、骨髄間質細胞は骨髄腫細胞との共存により RANKL の発現を亢進し破骨細胞を活性化する。旺盛な骨吸収に伴い TGF β は骨から放出され、骨髄間質細胞の TIMP3 の産生亢進に寄与すると考えられ、抑制された樹状細胞前駆細胞は破骨細胞へと誘導され骨病変形成の悪循環を生むと示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導・御高閲を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体情報内科学分野 松本 俊夫教授、安倍 正博准教授、ならびに生体材料工学分野 浅岡 憲三教授、また、数々の御支援をいただきました諸先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

1) Kyle RA and Rajkumar SV: Multiple myeloma. The New England journal of medicine 351, 1860-1873 (2004)

2) Korde N, Kristinsson SY and Landgren O: Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. Blood 117, 5573-5581 (2011)

3) Roodman GD: Myeloma bone disease: pathogenesis and treatment. Oncology 19, 983-984, 986 (2005)

4) 日本骨髄腫研究会：多発性骨髄腫の診療指針。第2版，文光堂（2008）

5) Bollerslev J, Harris ST and Leder BZ: Bisphosphonates for osteoporosis: benefits and risks. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 96, 27A, 28A (2011)

6) Coleman RE: Risks and benefits of bisphosphonates. British journal of cancer 98, 1736-1740 (2008)

7) Marx RE, Sawatari Y, Fortin M and Broumand V: Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 63, 1567-1575 (2005)

8) 関口直宏，竹迫直樹，芳賀光洋，永田明久，能登俊 and 三輪哲義：血清クレアチニン 2 mg/dl 以上の腎機能障害を有する多発性骨髄腫に対するボルテゾミブ・デキサメサゾン療法の意義。臨床血液 52, 87-89 (2011)

9) 服部豊：Thalidomide を用いた多発性骨髄腫の治療。臨床血液 44, 302-312 (2003)

10) 安倍正博：【骨粗鬆症の薬物療法 薬効評価と臨床研究の進歩】薬物療法各論 続発性骨粗鬆症の薬物療法 多発性骨髄腫。日本臨床 67, 991-995 (2009)

11) 尾崎修治：多発性骨髄腫における新しい治療戦略。臨床血液 50, 1506-1517 (2009)

12) Yaccoby S, Pearce RN, Johnson CL, Barlogie B, Choi Y and Epstein J: Myeloma interacts with the bone marrow microenvironment to induce osteoclastogenesis and is dependent on osteoclast activity. British journal of haematology 116, 278-290 (2002)

13) Roodman GD: Role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 17, 1921-1925 (2002)

14) Tanaka Y, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Nakano A, Takeuchi K, Kitazoe K, Kido S, Inoue D, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S and Matsumoto T: Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and osteopontin. Clinical cancer research:

- an official journal of the American Association for Cancer Research 13, 816-823 (2007)
- 15) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3597-3602 (1998)
 - 16) Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J and Boyle WJ: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176 (1998)
 - 17) Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M and Barille S: Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 98, 3527-3533 (2001)
 - 18) Abe M, Hiura K, Wilde J, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S, Wakatsuki S, Kosaka M, Kido S, Inoue D and Matsumoto T: Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 100, 2195-2202 (2002)
 - 19) Oshima T, Abe M, Asano J, Hara T, Kitazoe K, Sekimoto E, Tanaka Y, Shibata H, Hashimoto T, Ozaki S, Kido S, Inoue D and Matsumoto T: Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood* 106, 3160-3165 (2005)
 - 20) Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B and Shaughnessy JD, Jr.: The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *The New England journal of medicine* 349, 2483-2494 (2003)
 - 21) Abe M, Hiura K, Ozaki S, Kido S and Matsumoto T: Vicious cycle between myeloma cell binding to bone marrow stromal cells via VLA-4-VCAM-1 adhesion and macrophage inflammatory protein-1alpha and MIP-1beta production. *Journal of bone and mineral metabolism* 27, 16-23 (2009)
 - 22) Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA and Dalton WS: Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93, 1658-1667 (1999)
 - 23) Shortman K and Naik SH: Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature reviews. Immunology* 7, 19-30 (2007)
 - 24) Brown RD, Pope B, Murray A, Esdale W, Sze DM, Gibson J, Ho PJ, Hart D and Joshua D: Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood* 98, 2992-2998 (2001)
 - 25) Alnaeeli M, Park J, Mahamed D, Penninger JM and Teng YT: Dendritic cells at the osteo-immune interface: implications for inflammation-induced bone loss. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 22, 775-780 (2007)
 - 26) Hiasa M, Abe M, Nakano A, Oda A, Amou H, Kido S, Takeuchi K, Kagawa K, Yata K, Hashimoto T, Ozaki S, Asaoka K, Tanaka E, Moriyama K and Matsumoto T: GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood* 114, 4517-4526 (2009)
 - 27) Blobel CP: ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 32-43 (2005)
 - 28) Black RA: TIMP3 checks inflammation. *Nature genetics* 36, 934-935 (2004)
 - 29) De AK, Laudanski K and Miller-Graziano CL: Failure of monocytes of trauma patients to convert to immature dendritic cells is related to preferential macrophage-colony-stimulating factor-driven macrophage differentiation. *Journal of immunology* 170, 6355-6362 (2003)
 - 30) Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C and Blay JY: Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92, 4778-4791 (1998)
 - 31) Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP and Edwards DR: Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *The Journal of biological chemistry* 269, 9352-9360 (1994)