

破骨細胞の分化と機能を調節するシグナル伝達系

高橋 直之

松本歯科大学 総合歯科医学研究所 硬組織疾患制御再建学部門

Signal transduction which regulates osteoclast differentiation and function

NAOYUKI TAKAHASHI

Division of Hard Tissue Research, Institute for Oral Science, Matsumoto Dental University

Summary

The recent discovery of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) –RANK interaction confirms the well-known hypothesis that osteoblasts play an essential role in osteoclast differentiation. Osteoblasts express RANKL, a tumor necrosis factor α (TNF- α) family member, as a membrane-associated factor. Osteoclast precursors that express RANK, a receptor for RANKL, recognize RANKL through the cell-cell interaction and differentiate into osteoclasts. Recent studies have shown that lipopolysaccharide and inflammatory cytokines such as TNF- α and interleukin 1 directly regulate osteoclast differentiation and function through a mechanism independent of the RANKL-RANK interaction. Interferon- γ and β are also shown to be important negative regulators in osteoclastogenesis. These findings have opened new areas for exploring the regulatory mechanisms of osteoclast differentiation and function. This review article describes the current knowledge of signal transduction which regulates osteoclast differentiation and function.

はじめに

骨は生体の支持組織として荷重を支えるとともに、カルシウムとリン酸の貯蔵庫としての機能を果たしている。これら2つの役割を果たすために、骨組織は一生涯を通じて骨吸収と骨形成を繰り返し、この現象は骨リモデリングと呼ばれる。骨形成は未分化間葉系細胞から分化した骨芽細胞が、一方、骨吸収は造血系細胞から分化した破骨細胞が担っている。近年の急激な高齢化社会への移行に伴い社会問題化している骨粗鬆症は、破骨細胞による過剰な骨吸収あるいは骨芽細胞による

骨形成の低下により、骨リモデリングのバランスが崩れ、骨量が減少することにより引き起こされる。また、慢性関節リウマチや歯周炎においても骨吸収が骨形成を凌駕し、骨量が減少する。本稿では、骨代謝疾患と深い関わりのある破骨細胞の分化と活性がどのように制御されているか、シグナル伝達系を中心に最近の知見を含めて概説したい。

1. 破骨細胞の形態と機能

破骨細胞は、細胞内に複数の核をもち、骨組織のみに存在する骨を吸収する唯一の細胞である。

骨を吸収している破骨細胞は、骨表面に接した部分に波状縁という刷毛状の膜構造とそれを取り囲む明帯を形成している¹⁾。この明帯を介して骨表面に接着した破骨細胞は、波状縁から水素イオンやカテプシンなどのタンパク分解酵素を分泌し、無機質の溶解と有機質の分解を効率よく行っている。コラーゲンなどの分解産物は、エンドサイトーシスによって破骨細胞に取り込まれる。更に、細胞内を輸送され(トランスサイトーシス)、骨表面とは逆側の膜領域からエキソサイトーシス機構で排出されると考えられている。

2. 骨芽細胞による破骨細胞分化の調節

骨吸収は破骨細胞によって担われる。破骨細胞は単球・マクロファージ系の前駆細胞より分化する。この破骨細胞の分化と機能発現は、骨形成を司る骨芽細胞・骨髄細胞由来間質細胞(本稿では

両細胞群を骨芽細胞とする)により厳密に調節されている^{1,2)}。1998年、骨芽細胞が発現する破骨細胞の分化と機能を調節する破骨細胞分化因子(Osteoclast differentiation factor, ODF)がクローニングされ、骨吸収の調節メカニズムの一端が分子レベルで明らかにされた²⁾。この ODF は、すでに報告されていた TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) あるいは RANKL と同一分子であった(図1)。すなわち、骨芽細胞は破骨細胞の分化に必須な因子である M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) と RANKL (receptor activator of NF-κB) を産生し、破骨細胞の形成を誘導する³⁻⁵⁾。また骨芽細胞は、RANKL のデコイレセプターである分泌型タンパクの OPG (osteoprotegerin) も産生し、破骨細胞の形成と機能を抑制する作用も有する。骨芽細胞による M-CSF の発現は恒常的である

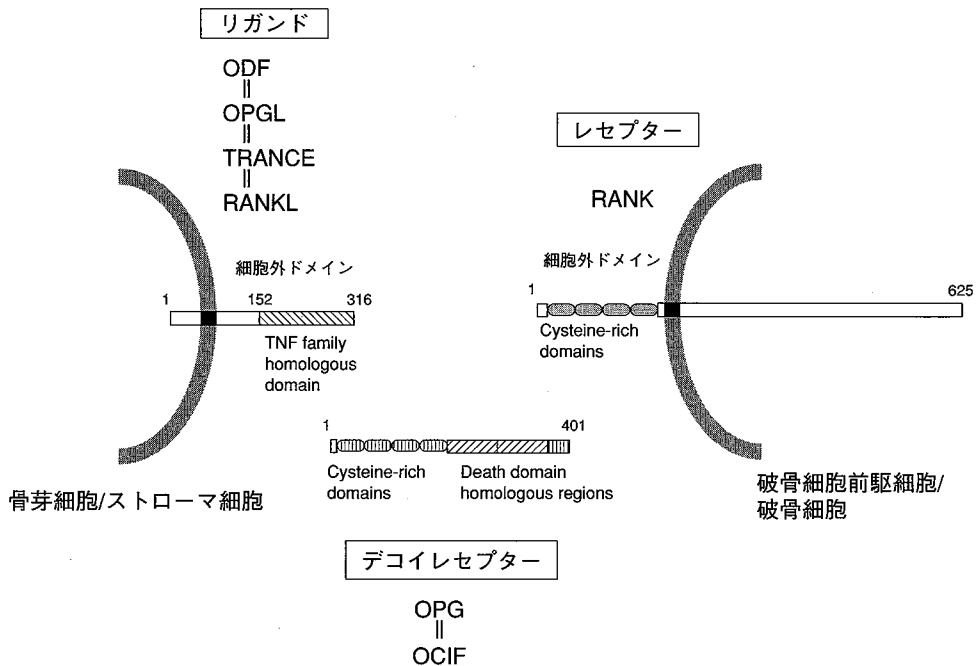


図1：破骨細胞の形成と機能を調節する RANKL, RANK, OPG の構造
破骨細胞分化因子は TNF リガンドファミリーに属する膜結合ドメインを持つサイトカインで、ODF, OPGL, TRANCE, RANKL の 4 つの名前で呼ばれる。その受容体は RANK である。RANK は 4 つの cysteine-rich domain を細胞外領域にもつ受容体である。また、OPG あるいは OCIF と呼ばれるデコイ(おとり)受容体も存在する。OPG は 4 つの cysteine-rich domain と 2 つの death domain-homologous region を持つ分泌型の蛋白で、RANKL-RANK の結合を競合的に阻害する。OPG の death domain-homologous region の機能は良くわかっていない。米国骨代謝学会は、これら因子の名称の混乱を避けるために、リガンドは「RANKL」、受容体は「RANK」、デコイ受容体は「OPG」を用いることを推奨している²⁹⁾。

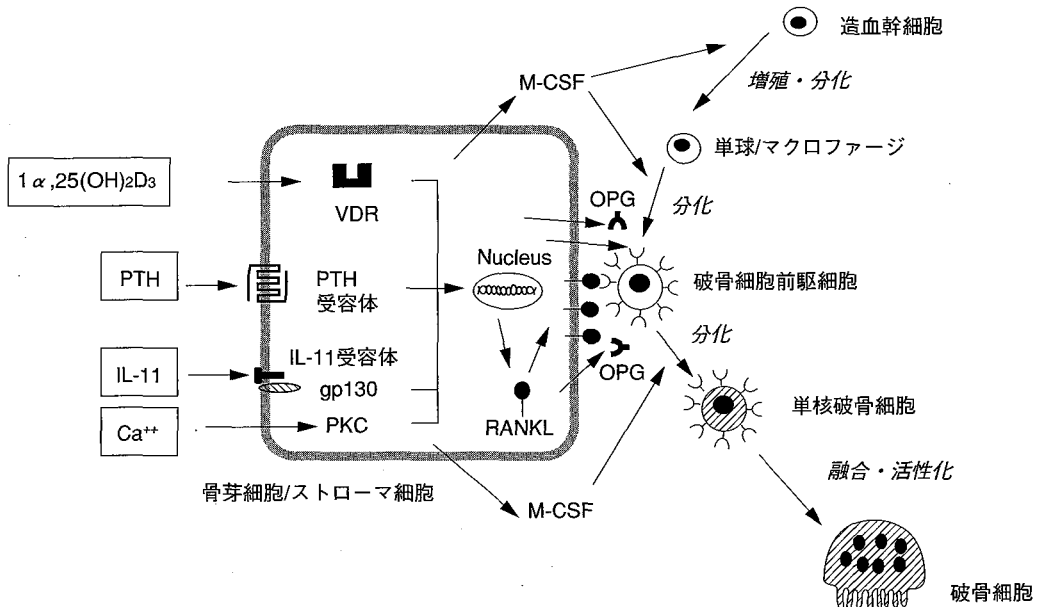


図2：破骨細胞形成の分子機構

造血系の破骨細胞前駆細胞から破骨細胞が分化するとき、骨芽細胞が発現する M-CSF と RANKL の二つの因子が必須である。1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ 、PTH、IL-11等の骨吸収因子の刺激で RANKL の発現は上昇する。さらに細胞内 Ca $^{++}$ の増加も PKC を介して RANKL を誘導する。骨芽細胞は RANKL とともに M-CSF を産生する。M-CSF は破骨細胞前駆の増殖と破骨細胞への分化に必須なサイトカインである。一方、骨芽細胞は RANKL のデコイ受容体である OPG も発現している。OPG が RANKL に結合すると、破骨細胞前駆細胞は RANKL を認識できなくなり破骨細胞への分化は抑制される。

のに対し、RANKL の発現は 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ (1 α , 25-dihydroxyvitamin D $_3$)、PTH (parathyroid hormone)、PGE $_2$ (prostaglandin E $_2$)、IL-11 (interleukin 11) などの骨吸収因子により誘導される^{4,5)}。1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ は 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ レセプター (VDR) を介し、IL-11 や IL-6 は共通のシグナル伝達因子である gp130 を介して RANKL の発現を上昇させる。また、PTH や PGE $_2$ のレセプターからのシグナルは cAMP を介して RANKL 発現を上昇させると考えられる (図 2)。骨吸収を促進する 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ 、PTH、PGE $_2$ は、骨芽細胞による OPG の産生も抑制し、破骨細胞形成を促進する。さらに、骨芽細胞の細胞内 Ca レベルが上昇するような薬物処理や培養液の Ca $^{++}$ 濃度を増加させると RANKL の発現が誘導される^{6,7)}。この RANKL の発現誘導は、細胞内 Ca 濃度の上昇により活性化された PKC (protein kinase C) が仲介すると考えられている。一方、RANKL のレセプターである RANK を発現する破骨細胞前駆細胞は、骨芽細胞との細胞間

接触を介して RANKL を認識し、M-CSF の存在下で破骨細胞に分化する。また、分化した成熟破骨細胞も RANK を発現しており、RANKL からの刺激により骨吸収活性が誘導される⁸⁾。

3. 破骨細胞分化と機能を調節するシグナル伝達系

(1) RANK を介するシグナル

RANK に RANKL が結合すると、TNF (tumor necrosis factor) 受容体ファミリーメンバーのシグナル伝達因子である TNF receptor associate factors (TRAF) が活性化される^{4,5)}。RANK の細胞内ドメインには、TRAF 1、TRAF 2、TRAF 3、TRAF 5 そして TRAF 6 が会合する。なかでも TRAF 6 欠損マウスは典型的な大理石骨病を呈することから、骨吸収において、TRAF 6 は重要な役割を持つ分子であると考えられる^{9,10)}。RANK からのシグナルは、これらの TRAF を介して NF- κ B、JNK (c-Jun N-terminal Kinase)、p38 MAPK (p38 mitogen-acti-

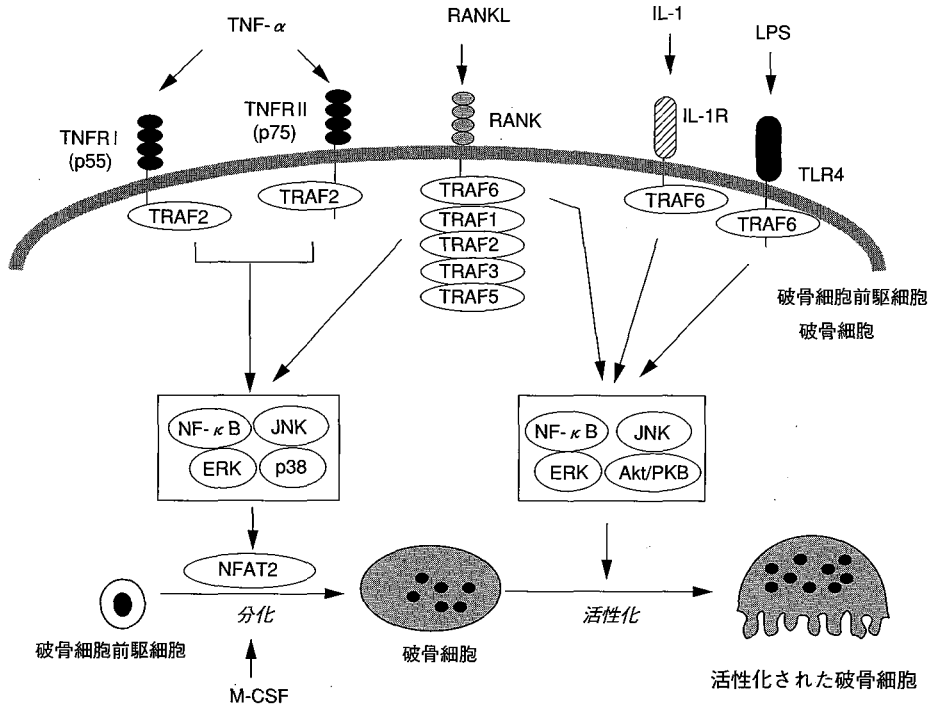


図3：破骨細胞の分化と機能を調節するシグナル伝達系

TNF- α は破骨細胞の分化を促進するが骨吸収活性を誘導しない。一方、RANKLと同様に、IL-1とLPSそれぞれのレセプターを介して、破骨細胞の機能を促進する。以上の知見から、TRAF2は破骨細胞分化、TRAF6は破骨細胞活性化に関与すると予想される。

vated protein kinase), ERK (extracellular signal regulated kinase)などを活性化する(図3)。また、c-SrcとTRAF6がRANKの細胞内ドメインを介して結合し、Akt/PKB(anti-apoptotic serine/threonine kinase/protein kinase B)を活性化する機序も提唱されている¹¹⁾。これらのシグナル伝達系を活性化することにより、破骨細胞の分化や活性化が誘導されていると考えられる。最近、T細胞が発現する転写因子NFAT2(nuclear factor of activated T cells, NFATc1)が破骨細胞の分化に決定的に重要であることが報告された^{12,13)}。高柳らの報告¹³⁾によると、(1)NFAT2はRANKLにより破骨細胞前駆細胞に誘導されること、(2)NFAT2を破骨細胞前駆細胞に強制発現させるとRANKL刺激なしで破骨細胞への分化が誘導されることより、(3)NFAT2をノックアウトしたES細胞は破骨細胞に分化できない。以上のことより、NFAT2は破骨細胞の分化に極めて重要な転写因子かもしれない(図3)。

(2) TNF受容体とIL-1受容体を介するシグナル

炎症性サイトカインであるTNF- α は破骨細胞の前駆細胞である骨髄由来マクロファージに直接作用し破骨細胞への分化を誘導する¹⁴⁾。このTNF- α による破骨細胞形成促進作用はOPGの添加によって抑制されず、TNF I型受容体並びにII型受容体に対する中和抗体によって強力に抑制された。この知見は、TNF- α はRANKL-RANKシステムとは別の経路で破骨細胞の分化を誘導していることを示している。一方、IL-1は破骨細胞の分化を誘導しないが、成熟破骨細胞に直接作用し、その骨吸収活性を誘導する¹⁵⁾(図3)。TNF受容体のシグナルはTRAF2を介して、下流へ伝達されることが報告されており、TNF- α 誘導性の破骨細胞形成におけるTRAF2の重要性が示唆される。一方、IL-1受容体からのシグナルはTRAF6が仲介する。以上の知見から、破骨細胞の分化にはTRAF2を介するシグナルが、一方、破骨細胞の活性化にはTRAF6を介

するシグナルが重要であることを示唆する。しかし、TRAF 6 遺伝子欠損マウスから得られた破骨細胞前駆細胞を TNF- α 処理しても破骨細胞はほとんど形成されないことから、骨吸収に関与するサイトカイン間のクロストークの存在が示唆されている¹⁶⁾。最近、TRAF 6 の受容体認識機構が他の TRAF と大きく異なること、そして TRAF 6 に結合する細胞透過性ペプチドは破骨細胞形成を抑制することが示された¹⁷⁾。このように、破骨細胞の分化誘導にも TRAF 6 を介するシグナルが重要である可能性が指摘された。

(3) TLR 4 を介するシグナル

生体に炎症を誘起するグラム陰性菌の細胞壁成分である LPS (lipopolysaccharide) の受容体が、TLR 4 (Toll-like-receptor 4) であることが示され、TLR を介するシグナル伝達系が注目されている。TLR はファミリーを形成しており、現在マウスでは TLR 1~TLR 9 まで知られている¹⁸⁾。興味深いことは、TLR の細胞内ドメインは IL-1 受容体と類似しておりシグナル伝達因子としてアダプター分子である MyD 88, IRAK (IL 1 receptor associated kinase), TRAF 6 を介する¹⁹⁾。LPS は成熟破骨細胞に直接作用し、破骨細胞の延命や吸収窩形成能を誘導する¹⁹⁾

(図 3)。これらの反応は、TLR 4 遺伝子に異常が認められる C 3 HeJ マウス由来の細胞では起こらないことから、TLR 4 を介するものと推察される。LPS はマクロファージからの TNF- α , IL-1, IL-6 などの炎症性サイトカインを誘導する。これらのサイトカインは破骨細胞の分化や機能を誘導する。以上のように、LPS は直接破骨細胞に作用するのみならず多彩な作用を有しており、炎症性骨吸収に深く関与するものと推察される。

4. 破骨細胞分化における p38 MAPK シグナルの重要性

前述したように、RANKL が破骨細胞前駆細胞 (骨髄由来マクロファージ) が発現する RANK に結合すると、NF- κ B, JNK とともに p38 MAPK が活性化される。p38 MAPK は、JNK や ERK とともに MAP kinase に分類されるセリンスレオニンキナーゼで、胚発生や細胞周期の制御そして細胞の増殖に重要な役割をしている。p38 MAPK の特異的阻害剤である SB 203580 は、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を強力に抑制することが報告された²⁰⁾。しかし興味あること

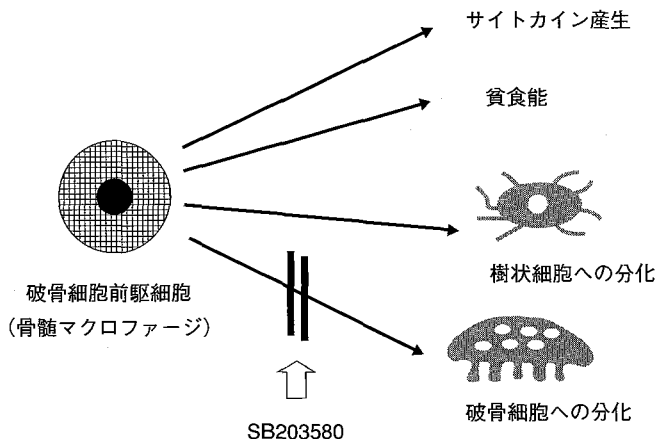


図 4 : p38 MAPK は破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を特異的に抑制する

破骨細胞の前駆細胞である骨髄マクロファージは、LPS 刺激で IL-1 や TNF- α など炎症性サイトカインを産生する。また、強い貪食能を持つ。一方、骨髄マクロファージは M-CSF の存在下で RANKL の刺激で破骨細胞に分化する。さらに、骨髄マクロファージは GM-CSF の存在下で CD 40 L や LPS の刺激で樹状細胞に分化する。p38 MAPK の特異的阻害剤である SB 203580 は、骨髄マクロファージのサイトカイン産生、貪食能、樹状細胞への分化を全く抑制しないが、破骨細胞への分化を特異的に抑制する。そのため、p38 MAPK のシグナルは破骨細胞分化にとってとりわけ重要と思われる。

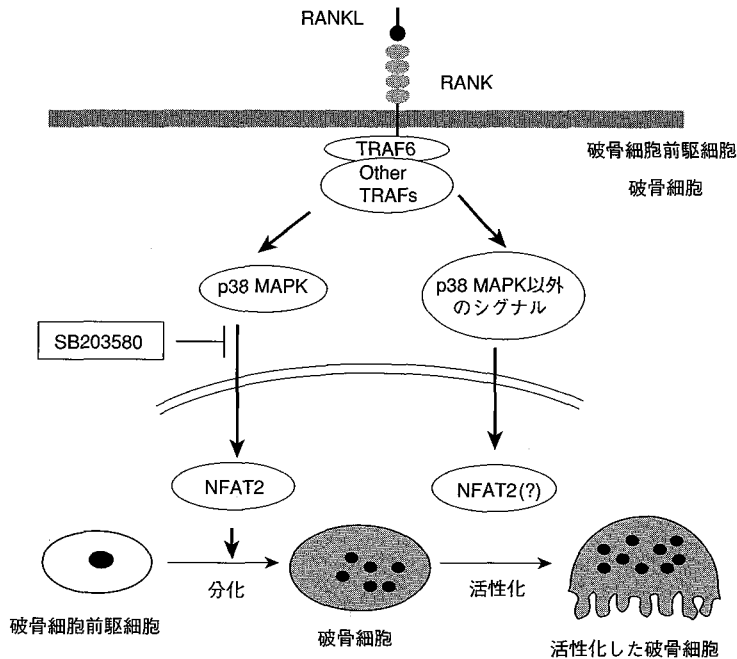


図5：破骨細胞の分化と機能を調節する p38 MAPK シグナル系

p38 MAPK の特異的阻害剤である SB 203580 は、RANKL あるいは TNF- α が誘導する破骨細胞の分化を抑制するが、RANKL や IL-1 が誘導する破骨細胞の活性化は全く抑制しない。また、RANKL や IL-1 は破骨細胞の p38 MAPK を活性化しない。このように、p38 MAPK シグナル系は破骨細胞の分化にのみ必要なシグナルで、その下流には NFAT2 が存在するものと考えられる。一方、破骨細胞の活性化は p38 MAPK 以外のシグナル系によって担われているものと考えられる。この活性化の過程に NFAT2 が関与するか否かは不明である。

に、RANKL が誘導する破骨細胞の延命と骨吸収活性を SB 203580 は全く抑制しなかった²¹⁾。一方、SB 203580 は破骨細胞前駆細胞である骨髄マクロファージのサイトカイン産生や貪食能を阻害しなかった²²⁾。また、SB 208530 は LPS や TNF- α が誘導する骨髄マクロファージから樹状細胞への分化も全く抑制しなかった²³⁾ (図4)。破骨細胞前駆細胞と純化した破骨細胞における p38 MAPK のリン酸化が解析され、破骨細胞前駆細胞の p38 MAPK は RANKL によりリン酸化されるが、破骨細胞の p38 MAPK は RANKL によって全くリン酸化されないことが明らかにされた²¹⁾。すなわち、p38 MAPK のリン酸化は破骨細胞の分化に必要なシグナルであるが、成熟破骨細胞においては、p38 MAPK のシグナル系は作動しないことが示された (図5)。破骨細胞の分化誘導においては、p38 MAPK の下流に NFAT2 が存在すると考えられる。破骨細胞の活性化に p

38 MAPK が関与しないということは、破骨細胞の活性化には NFAT2 以外の転写因子の関与が示唆される。破骨細胞の活性化に必要なシグナル系も今後の研究で明らかにされるであろう。

5. 破骨細胞分化と TGF- β スーパーファミリーサイトカイン

TGF- β (transforming growth factor β) スーパーファミリーに属する TGF- β や BMP (bone morphogenetic protein) は骨基質に大量に存在し、破骨細胞による骨吸収に伴い、骨組織から遊離されると考えられている²³⁾。TGF- β は、RANKL と M-CSF によって誘導される破骨細胞形成を促進することが示された²⁴⁾。また、アクチビンも RANKL による破骨細胞分化を強力に促進すること、この促進作用は可溶性のアクチビン受容体 IIA や可溶性 TGF- β 受容体 IIA で完全に抑制されることが示された²⁵⁾。これらの知見は、

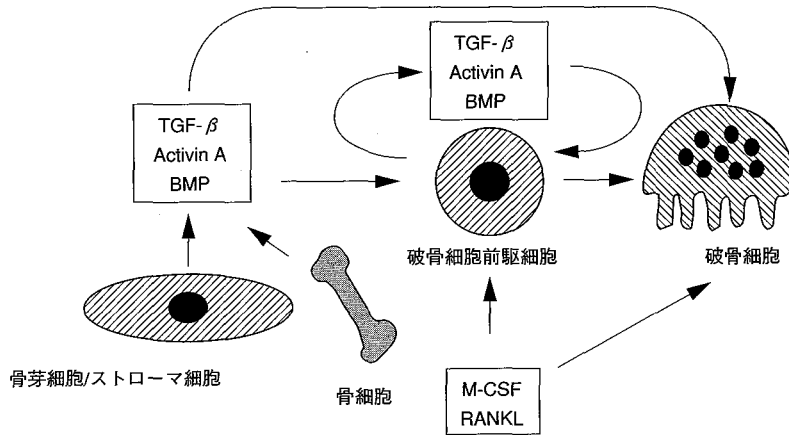


図6：破骨細胞の分化と機能を調節する TGF-β スーパーファミリーサイトカインの作用

TGF-β スーパーファミリーに属する TGF-β、アクチビンおよび BMP は、破骨細胞前駆細胞や破骨細胞に直接作用して RANKL の作用を増強させる。また、破骨細胞前駆細胞であるマクロファージも TGF-β スーパーファミリーのサイトカインを産生している。RANK 介するシグナル伝達に TGF-β や BMP のシグナルがクロストークしている可能性が示唆される。

TGF-β やアクチビンが破骨細胞形成に重要な因子であることを示唆している。さらに、我々も BMP-2 も RANKL により誘導される破骨細胞の分化を促進することを見出した²⁰⁾。BMP-2 や TGF-β は破骨細胞前駆細胞の c-fms (M-CSF 受容体) や RANK の発現に対して、効果を示さなかった。また、TGF-β スーパーファミリーサイトカイン単独では破骨細胞の形成を促進しない。RANKL と TGF-β スーパーファミリーサイトカインによる破骨細胞形成の相乗作用は OPG の添加によって完全に抑制される。以上の結果より、TGF-β スーパーファミリーに属するサイトカインは、破骨細胞前駆細胞に直接作用して RANKL の作用を増強させるものと考えられる。また、その効果が抗 TGF-β 抗体や可溶性 BMP 受容体によっても抑制されたことから、RANK 介するシグナル伝達に TGF-β や BMP のシグナルもクロストークしている可能性が示される。骨組織に大量に存在するこれらのサイトカインによる破骨細胞形成促進メカニズムの解明は今後の重要な研究課題である。

6. 破骨細胞分化を抑制するシグナル

骨吸収は免疫系の細胞によっても制御されている。実際、RANKL の発現は、骨組織のほかにも多くの組織で認められる。胸腺もその1つであ

る。活性化 T 細胞は、RANKL を発現しており、歯周炎や慢性関節リウマチなどの病態における骨吸収に関与している²⁷⁾。一方、活性化 T 細胞は、強力な破骨細胞分化阻害サイトカインである IFN-γ (interferon γ) を産生する。高柳ら²⁸⁾は、遺伝子欠損マウスを用いて、IFN-γ による破骨細胞分化抑制機構を調べた。その結果、IFN-γ は、ユビキチン-プロテアソーム系を介して、TRAF 6 の分解を促進することで、破骨細胞分化を抑制する事を報告した。さらに最近、IFN-β は c-fos の発現を down regulation する事によって破骨細胞形成を抑制することが示された²⁹⁾。このように、T 細胞は骨吸収を促進する一方で、ネガティブフィードバック機構も有しており、炎症性骨吸収を巧妙に調節しているものと考えられる。

おわりに

1997年の OPG の発見とそれに続く1998年の RANKL の発見により、破骨細胞の形成を調節する骨芽細胞の役割の詳細が明らかになってきた。さらに、分子レベルで、慢性関節リウマチや歯周疾患の発症に関与する様々な炎症性サイトカインと RANKL の複雑なクロストークの存在が示され、現在それらの解析が著しい勢いで進んでいる。これらの基礎研究が骨代謝疾患や歯周疾患の

発症機序の解明や創薬におおいに寄与することを期待したい。

文 献

- 1) Suda T, Takahashi N and Martin TJ (1992) Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Rev* **13** : 66–80.
- 2) Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, Boyde A and Suda T (1988) Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* **122** : 1373–82.
- 3) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 3597–602.
- 4) Takahashi N, Udagawa N and Suda T (1999) A new member of TNF ligand family, ODF/RANKL/TRANCE/OPGL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* **256** : 449–55.
- 5) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT and Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* **20** : 345–57.
- 6) Takami M, Woo JT, Takahashi N, Suda T and Nagai K (1997) Ca^{2+} -ATPase inhibitors and Ca^{2+} -ionophore induce osteoclast-like cell formation in the cocultures of mouse bone marrow cells and calvarial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **237** : 111–5.
- 7) Takami M, Suda K, Miyaura C, Takahashi N, Udagawa N, Woo JT, Nagai K and Suda T (2000) Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology* **141** : 4711–9.
- 8) Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi N and Suda T (1999) Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* **163** : 434–42.
- 9) Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Yamamoto T and Inoue J (1999) Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF 6-deficient mice. *Genes Cells* **4** : 353–62.
- 10) Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV and Mak TW (1999) TRAF 6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD 40, and LPS signaling. *Genes Dev* **13** : 1015–24.
- 11) Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaya M, Hanafusa H and Choi Y (1999) TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF 6 and c-Src. *Mol Cell* **4** : 1041–9.
- 12) Ishida N, Hayashi K, Hoshijima M, Ogawa T, Koga S, Miyatake Y, Kumegawa M, Kimura T and Takeya T (2002) Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT 2 as a key regulator. *J Biol Chem* **277** : 41147–56.
- 13) Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Ishiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T and Taniguchi T (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc 1 (NFAT 2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* **3** : 889–901.
- 14) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ and Suda T (2000) Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* **191** : 275–86.
- 15) Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA and Suda T (1999) Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res* **247** : 84–93.
- 16) Kaji K, Katogi R, Azuma Y, Naito A, Inoue JI and Kudo A (2001) Tumor necrosis factor α -induced osteoclastogenesis requires tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *J*

- Bone Miner Res **16** : 1593-9.
- 17) Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, Shevde NK, Segal D, Dzivenu OK, Volodgskaya M, Yim M, Du K, Singh S, Pike JW, Darnay BG, Choi Y and Wu H (2001) Distinct molecular mechanism for initiating TRAF 6 signalling. *Nature* **418** : 443-7.
 - 18) Akira S, Takeda K and Kaisho T (2001) Toll-like receptors : critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2** : 675-80.
 - 19) Suda K, Woo JT, Takami M, Sexton PM and Nagai K (2002) Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF- α , IL-1, and RANKL. *J Cell Physiol* **190** : 101-8.
 - 20) Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H and Tsujimoto M (2000) Involvement of p 38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). *J Biol Chem* **275** : 31155-61.
 - 21) Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, Suda T and Takahashi N (2002) p38 MAP kinase-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology* **143** : 3105-13.
 - 22) Li X, Udagawa N, Takami M, Sato N, Kobayashi Y and Takahashi N (2003) p38 MAPK is crucially involved in osteoclast differentiation but not in cytokine production, phagocytosis or dendritic cell differentiation of bone marrow macrophages. *Endocrinology*, In press.
 - 23) Katagiri T and Takahashi N (2002) Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases* **8** : 147-59.
 - 24) Sells Galvin RJ, Gatlin CL, Horn JW and Fuson TR (1999) TGF- β enhances osteoclast differentiation in hematopoietic cell cultures stimulated with RANKL and M-CSF. *Biochem Biophys Res Commun* **265** : 233-9.
 - 25) Fuller K, Bayley KE and Chambers TJ (2000) Activin A is an essential cofactor for osteoclast induction. *Biochem Biophys Res Commun* **268** : 2-7.
 - 26) Itoh K, Udagawa N, Katagiri T, Iemura S, Ueno N, Yasuda H, Higashio K, Quinn JMW, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T and Takahashi N (2001) Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Endocrinology* **142** : 3656-62.
 - 27) Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ and Penninger JM (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **402** : 304-9.
 - 28) Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K and Taniguchi T (2000) T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* **408** : 600-5.
 - 29) Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, Wagner EF and Taniguchi T (2002) RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon- β . *Nature* **416** : 744-9.
 - 30) The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature (2000) Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* **15** : 2293-6.