

## 破骨細胞の神秘

中村美どり<sup>1</sup>, 松浦 幸子<sup>2</sup>, 宮沢 裕夫<sup>1,3</sup>, 宇田川信之<sup>4</sup>

<sup>1</sup>松本歯科大学 小児歯科学講座

<sup>2</sup>松本歯科大学 口腔解剖学第2講座

<sup>3</sup>松本歯科大学 総合歯科医学研究所健康増進口腔科学部門

<sup>4</sup>松本歯科大学 口腔生化学講座

### Mystery of osteoclasts

MIDORI NAKAMURA<sup>1</sup>, SACHIKO MATSUURA<sup>2</sup>, HIROO MIYAZAWA<sup>1,3</sup> and NOBUYUKI UDAGAWA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Dentistry, Matsumoto Dental University School of Dentistry

<sup>2</sup>Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University School of Dentistry

<sup>3</sup>Division of Oral Health Promotion, Institute for Oral Science, Matsumoto Dental University

<sup>4</sup>Department of Oral Biochemistry, Matsumoto Dental University School of Dentistry

### Summary

Deficiency of osteoprotegerin (OPG), a soluble decoy receptor for the receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL), in mice induces osteoporosis caused by enhanced bone resorption, but also accelerates bone formation. We examined whether bone formation is coupled with bone resorption in OPG-deficient (*OPG*<sup>-/-</sup>) mice treated using risedronate, an inhibitor of bone resorption. Histomorphometric analysis showed that bone formation-related parameters (e.g., mineral apposition rate and osteoblast surface/bone surface) in *OPG*<sup>-/-</sup> mice sharply decreased with suppression of bone resorption by daily injection of risedronate for 30 days. *OPG*<sup>-/-</sup> mice exhibited high serum alkaline phosphatase activity and osteocalcin concentration, both of which were decreased to the levels of wild-type mice by the risedronate injection. Serum levels of RANKL were markedly elevated in the *OPG*<sup>-/-</sup> mice, but were unaffected by risedronate. These results suggest that bone formation is coupled with bone resorption at local sites in *OPG*<sup>-/-</sup> mice, and that serum RANKL levels do not reflect this coupling.

### はじめに

破骨細胞は大変神秘的な細胞である。破骨細胞の形成を培養系で再現させると、クラゲのように

大きく広がった多核巨細胞を容易に観察できる。また、硬組織上で培養した破骨細胞は強く接着して、酸とプロテアーゼを分泌することにより硬組織を活発に吸収する。そして、骨吸収に飽きた破

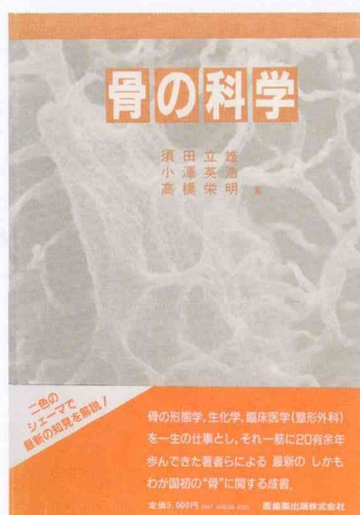
骨細胞は隣接部位に移動して、新しい場所での骨吸収を開始する。1998年、破骨細胞の分化と機能を調節する新しいサイトカインである破骨細胞分化因子（RANKL）が同定され、RANKLの歯周疾患をはじめとする局所性の骨吸収における重要性も明らかになりつつある。

一方、骨組織においては、破骨細胞による骨の吸収と骨芽細胞による骨の形成が絶え間なく繰り返されている。脊椎動物の胎生期にみられるような急速に成長する骨組織では、主に骨形成が進行する。成長が停止した後の脊椎動物の骨組織では、骨吸収と骨形成の量が動的に均衡した共役状態に保たれる<sup>1)</sup>。この骨組織の共役状態を維持する機構として、以前から共役因子（カップリングファクター）が想定されてきたが、その性状などは明らかにされていない。骨粗鬆症における骨量の減少は、骨組織が非共役状態となって骨吸収が亢進した結果と考えることができる<sup>2)</sup>。本稿では、骨の吸収と添加のメカニズムについて、破骨細胞に焦点をあて、我々の最近の実験結果を中心に概説したい。

### 1 骨芽細胞は破骨細胞形成の司令塔である

図1に今から18年前に刊行された「骨の科学」の表紙を示す。この当時は骨に関する研究者も少なく、「骨の科学」は、骨に関するはじめての教科書として発行された。現在のような骨代謝研究の著しい進展は、この本が執筆された頃には想像できなかつたに違いない。破骨細胞は高度に石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である。その起源は、生体に広く分布するマクロファージ系の細胞である（図2）。近年、FosやSrcなどの癌遺伝子を欠損させたマウスは破骨細胞の分化または骨吸収機能に障害をきたし、骨吸収不全により骨形成が亢進する大理石骨病を呈することが報告され、破骨細胞による骨吸収機構の研究が注目されてきた<sup>3)</sup>。

破骨細胞研究の有利な点は、多核巨細胞である破骨細胞の形成を視覚的に判別できる（図2）と共に、骨吸収機能を培養系で簡単に再現できることにある。高橋直之博士（現松本歯科大学総合

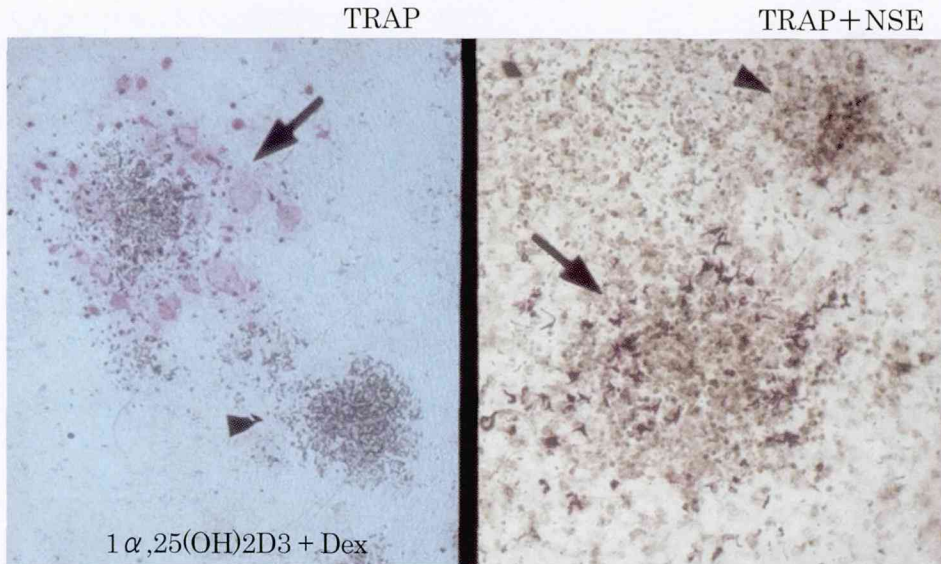


1985年刊行

図1：「骨の科学」

小澤英浩博士（現松本歯科大学学長兼総合歯科医学研究所所長）、須田立雄博士（現埼玉医科大学ゲノム医学研究センター副所長）、高橋栄明博士（現新潟医療福祉大学学長）の3氏によってまとめられた骨に関する我が国最初の成書

歯科医学研究所教授）は、1988年にマウスを用いた破骨細胞の分化を解析する共存培養系を確立した<sup>3)</sup>。この破骨細胞の分化誘導系を用いた実験結果から、破骨細胞の分化には骨形成を司る骨芽細胞（あるいは骨髄間質細胞）の存在が必須であることが明らかとされた。そして、骨芽細胞の細胞膜上に発現する破骨細胞分化因子によって破骨細胞の分化と機能は厳格に調節されているとする仮説を発表した。この破骨細胞分化因子の存在が提唱されたのは1990年頃のことである。破骨細胞分化因子の同定は20世紀中には無理であると思われていたが、1997年に思いもよらない方向からメスが入り、破骨細胞分化因子（RANKL/ODF）の発見という劇的な結末を迎えた<sup>4)</sup>。そして、ODFの真の受容体は、既に報告されていたRANK（receptor activator of NF- $\kappa$ B）とよばれるTNF受容体ファミリーに属する膜結合蛋白質であることが証明された。その後、ODFはRANKリガンド（RANKL）という名称で統一することが米国



Udagawa N et al. : PNAS USA 87:7260-7264, 1990

図2：肺マクロファージと骨髄間質細胞株（ST2細胞）の共存培養  
酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（TRAP）陽性（赤紫色）の破骨細胞は、NSE陽性（茶色）マ  
クロファージから、骨髄間質細胞のシート上において、活性型ビタミンDの存在下で誘導される

骨代謝学会（ASBMR）で決議され、現在 RANKL が一般的に使用されている（図3）<sup>4)</sup>。

破骨細胞とその前駆細胞は RANK（RANKL の受容体）を発現し、細胞間接触を介して RANKL を認識し、破骨細胞に分化する。RANKL または RANK をノックアウトしたマウスでは破骨細胞が全く認められず、重篤な大理石骨病を発症することから、RANKL-RANK シグナル系は破骨細胞の分化に必須であることが証明された<sup>5,6,7)</sup>。オステオプロテゲリン（OPG）は、RANKL と RANK の結合を拮抗阻害する分泌型のデコイ受容体である（図3）。マウスに OPG を過剰発現させると、骨吸収が抑制された重篤な大理石骨病を呈する<sup>8)</sup>。

## 2 OPG は破骨細胞の分化と骨吸収機能を制御する重要なサイトカインである

OPG 遺伝子欠損マウスでは骨吸収が著しく亢進する<sup>9,10)</sup>。興味深いことに OPG 遺伝子欠損マウスは骨吸収のみならず、骨形成のマーカーである血中アルカリホスファターゼ活性が正常値の4倍も高い値を示し、組織学的にも骨形成の著しい亢進が認められた<sup>9)</sup>。RANK が恒常的に活性化され

た遺伝的変異がヒトに見い出されたが、この疾患においても骨吸収とともに骨形成の亢進が認められている<sup>11)</sup>。これらの知見は、骨吸収が亢進すると骨形成も亢進するという骨代謝における共役機構の存在を示している（図4）。

OPG は TNF 受容体に共通した構造を有しているが、膜貫通領域を持たない分泌性の蛋白質である。RANKL に対する OPG の結合親和性は RANK よりも10倍も高く、RANKL と RANK の相互作用を強力に抑制することで、破骨細胞の分化と機能発現を抑制する。OPG mRNA は多くの組織や臓器で普遍的に発現している。骨芽細胞や骨髄間質細胞での発現は、破骨細胞形成を調節する上でとりわけ重要であると考えられている<sup>12)</sup>。

正常ラットに OPG を2週間連続投与したところ、大腿骨や脛骨の骨端部海面骨密度の増加が認められた<sup>13)</sup>。一方、骨組織以外の臓器における OPG の作用は認められなかった。以上の結果は、OPG は生理的に重要な骨吸収抑制因子であることを示すものである。

卵巣摘出したラットに対する OPG 投与は、有意な骨量の増加と破骨細胞数の減少を誘導する<sup>13)</sup>。さらに、尾部懸垂による不動性骨粗鬆症に

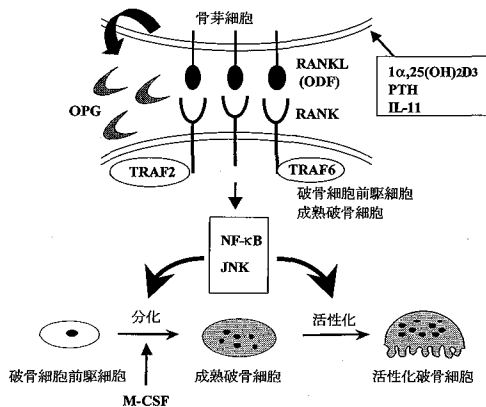


図3：破骨細胞の分化と活性化に関する分子メカニズム

1. 骨吸収の亢進に伴う骨形成の亢進



2. OPG遺伝子欠損マウスにおいては骨吸収が骨形成を凌駕し、骨粗鬆症に似た病態を呈する。

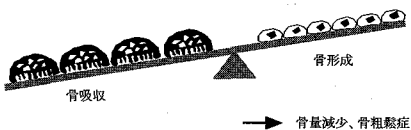


図4：骨代謝共役と骨量減少

においても OPG 投与は有効であることが示された<sup>14)</sup>。また、アジュバント関節炎発症マウスモデルにおいて、OPG 投与が骨破壊を防止することが報告されている<sup>15)</sup>。最近では、癌性高カルシウム血症の治療や癌の骨転移、多発性骨髄腫に対する治療薬の可能性も指摘されている<sup>16)</sup>。

歯科の分野では、歯槽骨の局所性骨吸収の亢進を起こすものとして歯周疾患が知られているが、歯周病原菌を感染させた歯周病モデルマウスを作製したところ、歯槽骨の破壊部位において出現する活性化Tリンパ球にRANKL発現が強く認められた。そこで、この歯周病モデルマウスに対してOPGを腹腔内投与したところ、骨吸収が阻害されたとする実験結果も報告されている<sup>17)</sup>。

### 3 OPG 遺伝子欠損マウスにおけるビスフォスフォネート投与実験によって共役因子の存在が証明された

前述したように、OPG 遺伝子を欠損させたマウスは破骨細胞の形成が促進し骨吸収の亢進が認められるが、同時に骨形成の促進も認められる<sup>9)</sup>。この実験結果は骨吸収と骨形成の共役因子(カップリングファクター)の存在を意味している(図4)。そこで、今回 OPG 遺伝子欠損マウスに対して骨吸収阻害薬(ビスフォスフォネート)により骨吸収を強力に阻害した際に、骨形成がどのような挙動を示すかについて解析した<sup>18)</sup>。

大腿骨切片における骨所見として、破骨細胞のマーカー酵素(TRAP)とトルイジンプルー(TB)の二重染色を図5に示す。OPG 遺伝子欠損マウスでは、骨梁の吸収が著しく、成長板の一部に破壊が認められ、破骨細胞による骨吸収が亢進している様子が認められた(図5A)。OPG 遺伝子欠損マウスにビスフォスフォネートを投与することにより、骨吸収の抑制と成長板の形態回復が認められた(図5A)<sup>18)</sup>。

大腿骨成長板直下において、OPG 遺伝子欠損マウスにおいては立方体のふっくらと厚みを増した大型の骨芽細胞が多数認められた(図5B中央矢印)。これらの立方体を呈する骨芽細胞は、ビスフォスフォネートの投与によって消失し、扁平な形態を示すようになった(図5B右矢印)。つまり、OPG 遺伝子欠損マウスにおいて認められた骨芽細胞の活性化がビスフォスフォネートにより抑制される様子が観察された<sup>18)</sup>。

大腿骨における皮質骨の骨形態計測に用いた組織像(ピラネバ・ボーン染色)を図6Aに示す。OPG 遺伝子欠損マウスにおいて認められる皮質骨の骨粗鬆化(粗鬆化面)の亢進は、ビスフォスフォネートの投与により抑制された(図6A)。また、OPG 遺伝子欠損マウスの皮質骨においては、二重標識の幅が正常マウスと比較して広く認められ、骨内膜面および骨外膜面における骨形成速度は高値を示した。これらの値はビスフォスフォネート投与によって、正常マウスのレベルまで抑制された(図6B)<sup>18)</sup>。

腰椎における骨形態計測の結果、OPG 遺伝子欠損マウスにおいて亢進している各種の骨吸収マーカー(吸収面・破骨細胞数・骨吸収速度)は



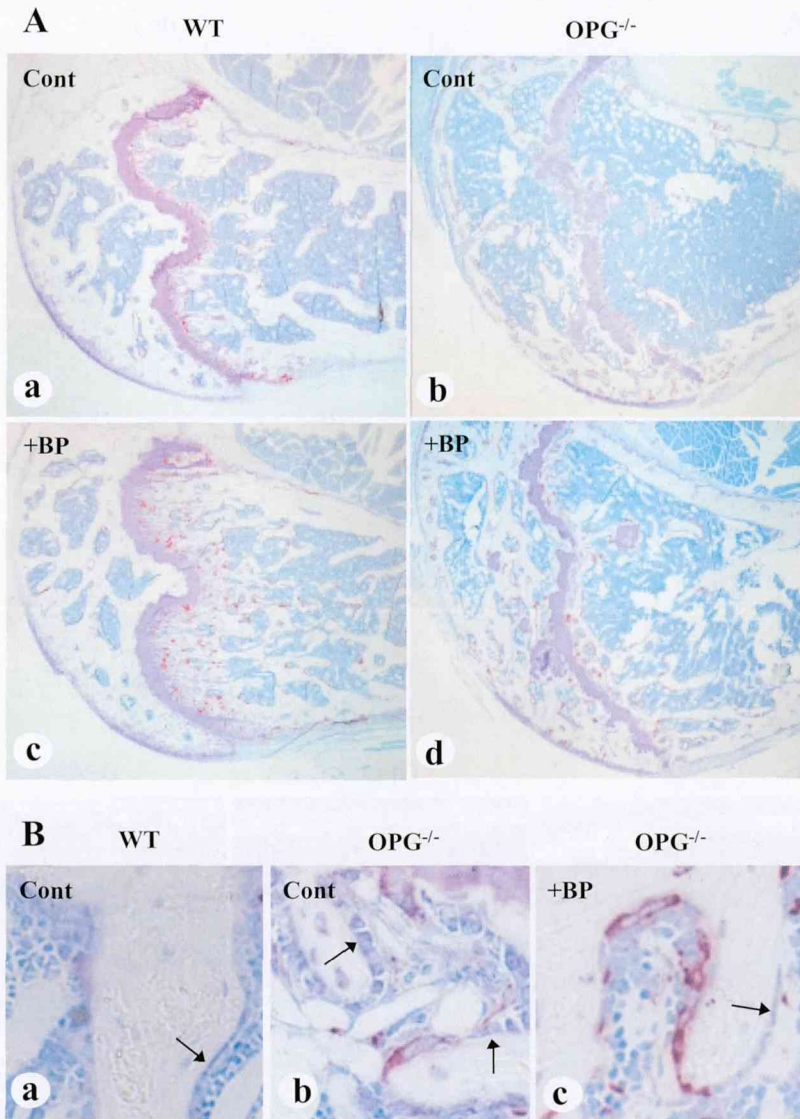


図5：正常マウス (WT) と OPG 欠損マウス (OPG<sup>-/-</sup>) 大腿骨の酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) とトルイジンブルー (TB) の二重染色像

正常マウス (A-a), OPG 欠損マウス (A-b) 共に, ビスフォスフォネート (BP) 投与により骨量の増大が認められた (A-c, d). また, OPG 欠損マウスにおいて認められる立方形で大型の骨芽細胞 (B-b) は, BP の投与によって消失し扁平な形態を示した (B-c).

ビスフォスフォネート投与によって完全に正常化された。OPG 遺伝子欠損マウスにおける骨形成マーカー (類骨量, 骨芽細胞面, 骨石灰化速度, 骨形成速度) の亢進は, ビスフォスフォネート投与により是正された。OPG 遺伝子欠損マウスにおいて減少している腰椎海綿骨の骨量と骨梁数

は, ビスフォスフォネートの投与により増加した<sup>18)</sup>。

骨形成のマーカーである血清中のアルカリフォスファターゼ活性およびオステオカルシン濃度は, OPG 遺伝子欠損マウスにおいて正常マウスと比較して約 3 ~ 4 倍高値を示す。これらのマウ

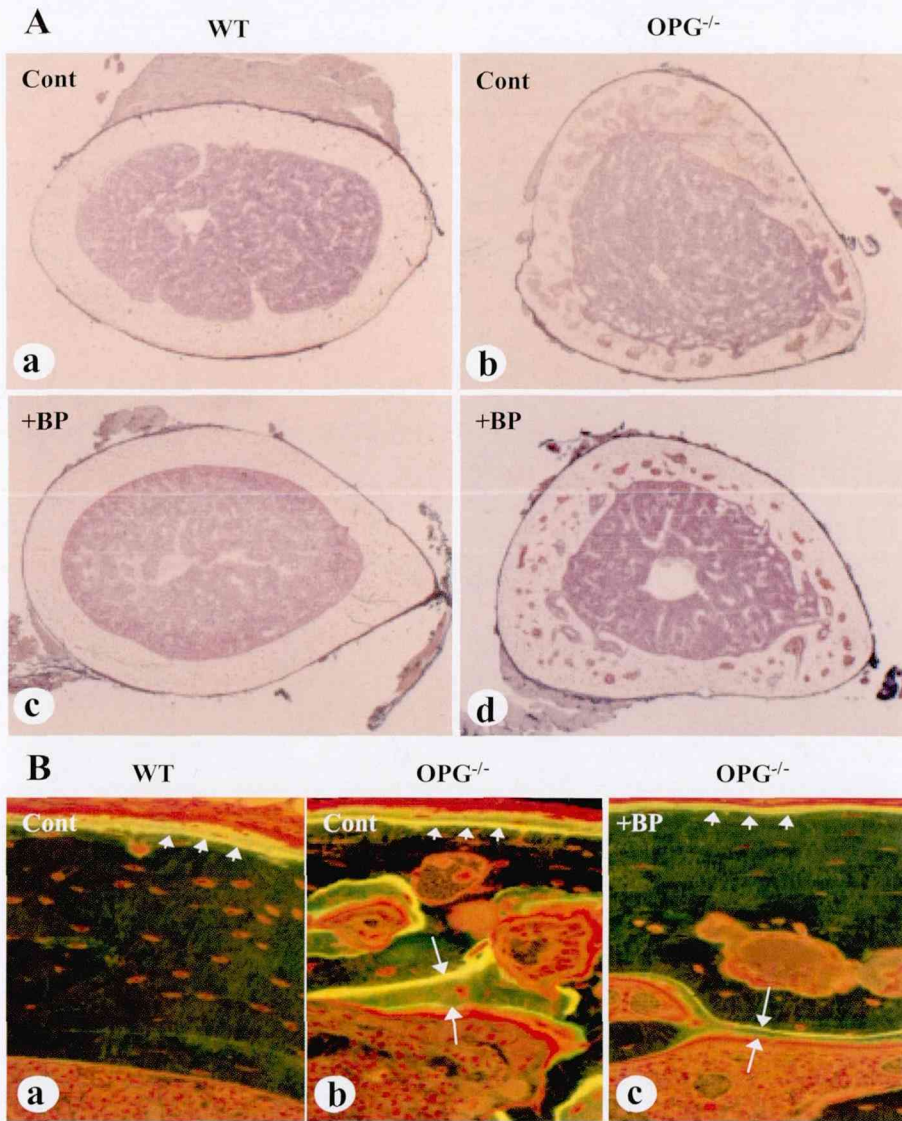


図6：正常マウス (WT) と OPG 欠損マウス (OPG<sup>-/-</sup>) 大腿骨のピラネバ・ボーン染色像 (A) と二重標識像 (B)

OPG 欠損マウスにおいて認められる皮質骨の骨粗鬆化亢進は (A-b), BP の投与により抑制された (A-d). OPG 欠損マウスの皮質骨においては, 二重標識の幅が正常マウス (B-a) と比較して広く認められ (B-b), この幅は BP 投与によって抑制された (B-c).

スに対してビスフォスフォネートを投与することにより, アルカリフォスファターゼ活性とオステオカルシン濃度の低下が認められた (図7)<sup>18)</sup>.

OPG 遺伝子欠損マウスにおける歯の形成に関する解析の報告はなく, 今後の課題である. OPG 遺伝子欠損マウスにおいて, 骨芽細胞の活性化と

同様に, 象牙芽細胞の活性が亢進しているか否かを形態学的に観察する予定である. また, ビスフォスフォネート投与による OPG 遺伝子欠損マウスの顎骨および歯の形成に対する影響についても解析していきたい.



OPG 遺伝子欠損マウス	ビスフォスフォネート	
	-	+
骨吸収パラメーター	▲	▼
骨形成パラメーター	▲	▼
血清アルカリホスファターゼ活性 血清オステオカルシン濃度	▲	▼
血清RANKL濃度	▲	▲

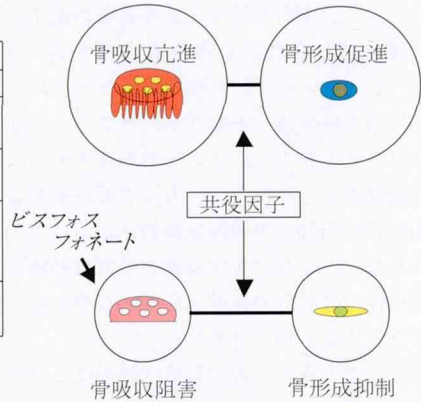


図7：OPG 欠損マウスに対するビスフォスフォネート (BP) 投与の効果

OPG 欠損マウスに BP を投与することにより、骨吸収が抑制され、それに共役し骨形成も抑制される。血清中の可溶性 RANKL の産生亢進は、OPG 欠損マウスの骨代謝回転促進には関与しない。

#### 4 OPG 遺伝子欠損マウスの血清可溶性 RANKL 産生は亢進する

最近、特発性高ホスファターゼ血症 (Idiopathic Hyperphosphatasia : IH) の患者において、OPG 遺伝子の変異が発見された<sup>19)</sup>。興味深いことに、この患者においては、破骨細胞と同様に、骨芽細胞が著しく活性化しており、骨吸収と骨形成が活発に行われている組織所見が認められる。また、血清アルカリホスファターゼ活性 (骨形成マーカー) と尿中コラーゲン分解産物である N-テロペプチド量 (骨吸収マーカー) が共に IH 患者において高い値を示した<sup>19)</sup>。

一方、骨パジェット病は、破骨細胞の機能異常により限局した骨吸収の亢進が生じ、続いて骨形成が促進する疾患として知られている。最近、遺伝性若年性骨パジェット病の原因として OPG 遺伝子の完全な欠損が報告された<sup>20)</sup>。この OPG 欠損患者の血清中には OPG は検知できないが、興味深いことに可溶性 RANKL が高濃度で認められた<sup>20)</sup>。この実験結果は、高回転型の骨代謝病態に可溶性 RANKL の血清レベルでの亢進が関与している可能性を示している。また最近、可溶性 RANKL の in vivo 投与が骨形成促進に作用するとの実験結果が米国骨代謝学会において発表された<sup>21)</sup>。そこで今回、OPG 遺伝子欠損マウスにおける血清中の可溶性 RANKL 濃度を測定した。その結果、正常マウスではほとんど認められない可溶性 RANKL が OPG 遺伝子欠損マウスでは高

値を呈しており、ビスフォスフォネート投与は可溶性 RANKL レベルには全く影響を与えなかった (図7)。また、正常マウス血清中に認められた OPG は、ビスフォスフォネート投与によって変化しなかった<sup>18)</sup>。以上の結果から、可溶性 RANKL の産生亢進が、OPG 遺伝子欠損マウスにおける骨形成促進に関与している可能性は否定された。

以上の実験結果から、OPG 遺伝子欠損マウスの骨組織は高回転型の代謝を呈しており、骨粗鬆症というよりも骨パジェット病の病態を示すことが考えられた。可溶性 RANKL の存在意義とその由来および遊離メカニズムについては今後の大きな研究課題である。

#### 5 力学負荷減少による骨量減少メカニズムについて

力学負荷軽減に伴う骨量の減少は、ベッドレストなどで臨床的に認められる。Morey<sup>22)</sup> は、人工衛星における無重力環境下で19.5日間飼育されたラットの骨形態計測を行った。その結果、力学負荷の減少 (無重力環境下) により、骨外膜および骨内膜で骨形成の停止が起こり、骨吸収に関しては影響が認められないとする知見を報告した。この骨形成の抑制は地上に帰還後には改善し、一過性のものであることが確認された。この結果は、力学負荷軽減による骨量減少が、骨形成の低下に起因することを示している。

一方、力学負荷軽減による骨量の減少に骨吸収亢進の関与を認める報告も存在する。Weinrebら<sup>23)</sup>は、ラットの坐骨神経切除モデルにより6週間にわたり後肢を不動化したところ、大腿骨骨塩量は著しく低下し、この時骨形成率や石灰化率は6週間低下し続けた。一方、骨吸収面および破骨細胞数の増加は実験開始後初期においてのみ認められた。つまり、力学負荷の軽減は初期における一過性の骨吸収の亢進と持続的な骨形成の抑制をもたらすことが示された。

以上のように、力学負荷は骨形成と骨吸収の両者に影響を及ぼし、正常の骨代謝で重要な役割を果たしている。骨のカップリング因子の探索を考える上でも、力学負荷軽減に伴う骨量減少メカニズムを解明することは大変意義深いものである。

#### 6 骨形成の際に出現する破骨細胞が正常な骨の形態形成に重要な役割を果たしている

局所性の骨吸収の亢進が認められる歯周疾患や口蓋裂等における骨欠損症例に対して、骨誘導因子 (Bone morphogenetic protein: BMP) を移植することにより骨組織の補填を行う試みも進行している。そこで、破骨細胞の骨形成における役

割を明らかにすることを目的に、大理石骨病マウスである M-CSF 遺伝子欠損マウス (op/op) を用いて、破骨細胞が存在しない条件における BMP 誘導性の骨形成についての検討を行った (未発表)。

4 週齢雄の op/op マウスと正常マウス (C57 BL/6J) の背筋筋膜下にリコンビナントヒト BMP-2 含有コラーゲンペレットを埋入し、異所性骨形成を誘導した。その結果、BMP 誘導性の異所性骨形成 (骨密度) は op/op マウスにおいて正常マウスと比較して、約 3 倍の促進が認められた。また、op/op マウスにおける異所性骨の外表面は大変粗雑な形態を呈していた (図 8) (未発表)。

以上の結果は破骨細胞が存在しない op/op マウスにおいては、BMP 誘導性の異所性骨形成の著明な亢進を示している。また、これらの異所性骨には形態学的異常が観察されたことより、骨形成の際に出現する破骨細胞が正常な骨の形態形成に重要な役割を果たしていることが示され、破骨細胞の存在の神秘性がさらに深まった。

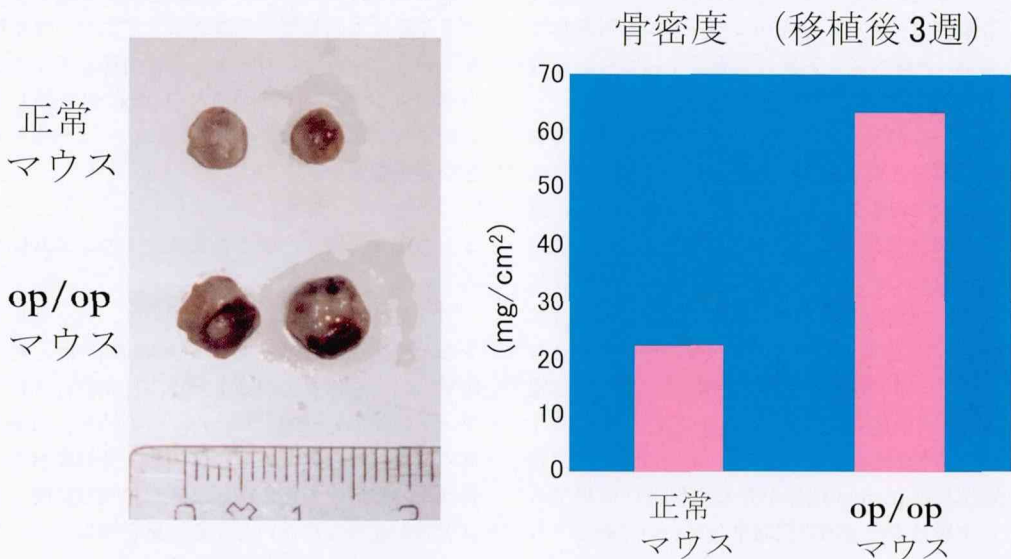


図 8 : op/op マウス (大理石骨病マウス) および正常マウス (C57 BL/6J) における BMP-2 誘導性の異所性骨形成

背筋筋膜下に埋入したペレットを 3 週後に摘出し、形成された異所性骨の BMD (骨密度) の定量的解析を行った。



終わりに

骨吸収の亢進により骨粗鬆症を呈する OPG 遺伝子欠損マウスにおいては、骨芽細胞による骨形成の亢進がカップルして認められ、この骨形成促進活性は、ビスフォスフォネートの投与によって完全に抑制されることが確認された。これは、骨吸収の亢進と骨形成の促進は共役 (カップリング) していることを示しており、何らかの骨代謝共役因子が存在している可能性が立証できた<sup>18)</sup>。図9はこの点に着目した新聞報道である。

Mundy らの研究グループ<sup>24)</sup>は、骨基質中に存在する TGF- $\beta$  を骨代謝共役因子として追及している。彼らは、破骨細胞による骨吸収時に TGF- $\beta$  が活性化されて遊離し、骨芽細胞の分化を促進

する可能性を考えている<sup>24)</sup>。最近、我々は破骨細胞が細胞間接触を介して未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化を誘導する可能性を見出している<sup>25)</sup>。これは、破骨細胞自身が共役因子を産生する可能性を示唆するものである。また、骨代謝共役には重力による機械的負荷が重要な役割を担う可能性も指摘されている。

今日に至るまで多くの研究者が骨のカップリング因子の発見に希望を抱き、その探索を行ってきたが、いまだその因子の全容は見えていない。しかしながら、今回の OPG 遺伝子欠損マウスを用いた実験により、その因子の存在をかいま見ることができた。今後、骨代謝共役因子の存在様式とその発現制御機構がさらに詳しく解析され、共役因子が明らかとなることを期待したい。

骨の「再生」メカニズム

「骨粗しょう症」治療薬に

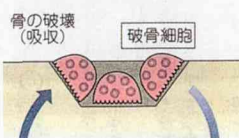
最先端

信州の研究室から



骨が再生する仕組みを分子レベルで研究する宇田川信之・松本歯科大学大学院教授 (右)

破骨細胞と骨芽細胞の連携



科

松本歯科大学大学院 宇田川信之教授

人間の骨は、絶えず古いの骨が壊されて新しい骨を繰り返している。そこで働くのが、骨を壊す「破骨細胞」と、骨をつくる骨芽細胞だ。

働きかけ合う2種類の細胞

“共役因子”を追う

人間の骨は、絶えず古いの骨が壊されて新しい骨を繰り返している。そこで働くのが、骨を壊す「破骨細胞」と、骨をつくる骨芽細胞だ。

このバランスが崩れ、破骨細胞の働きが強まると「歯周病」や「骨粗しょう症」、逆に骨芽細胞の働きが強まると、骨の質の変化で骨折しやすいなどの症状の「大理石骨病」などになる。だが、その

破骨細胞と骨芽細胞は、互いに連絡を取り合い、バランスを保って働いて、骨を再生する仕組みを分子レベルで研究している。

破骨細胞は、RA...

図9：信濃毎日新聞に掲載された研究室紹介 (2003年12月29日)

## 文 献

- 1) Ott SM (2002) Histomorphometric Analysis of Bone Remodeling. Principles of Bone Biology, Second Edition. Volume 1, 303-19, Academic Press, New York.
- 2) Rodan GA, Raisz LG and Bilezikian JP (1996) Pathophysiology of Osteoporosis. Principles of Bone Biology, Second Edition. Volume 1, 979-90, Academic Press, New York.
- 3) Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ and Suda T (1988) Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123** : 2600-2.
- 4) 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.
- 5) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ and Penninger JM (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397** : 315-23.
- 6) Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ and Schuh J (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* **13** : 2412-24.
- 7) Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL and Boyle WJ (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 1566-71.
- 8) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Amgen EST Program and Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin : a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89** : 309-19.
- 9) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ and Simonet WS (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* **12** : 1260-8.
- 10) Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashino K and Ozawa H (1998) Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* **247** : 610-5.
- 11) Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, and Anderson DM (2000) Mutations in TNFRSF 11 A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nature Genetics* **24** : 45-8.
- 12) Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K and Suda T (2000) Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* **141** : 3478-84.
- 13) Yasuda E, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T and Higashio K (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF/OPG) and osteoprotegerin (OPG) : A mechanism by which OCIF/OPG inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **139** : 1329-37.
- 14) Bateman TA, Dunstan CR, Ferguson VL, Lacey DL, Ayers RA and Simske SJ (2000) Osteoprotegerin mitigates tail suspension-induced osteopenia. *Bone* **26** : 443-9.
- 15) Kong YY, Yoshida H, 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.
- 16) Honore P, Luger NM, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, O'keefe PF, Ramnaraine ML, Clohisy DR and Mantyh PW (2000) Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nature Medicine* **6** : 521-8.
- 17) Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, Ellen RP and Penninger JM (2000) Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* **106** : R 59-67.
- 18) Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H and Takahashi N (2003) Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* **144** : 5441-9.
- 19) Cundy T, Hegde M, Naot D, Chong B, King A, Wallace R, Mulley J, Love DR, Seidel J, Fawcner M, Banovic T, Callon KE, Grey AB, Reid IR, Middleton-Hardie CA and Cornish J (2002) A mutation in the gene TNFRSF 11 B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Genet* **11** : 2119-27.
- 20) Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH and Mumm S (2002) Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* **347** : 175-84.
- 21) Lam J, Ross FP and Teitelbaum SL (2001) : RANK ligand stimulates anabolic bone formation. *J Bone Miner Res* **16** : S 150 (Abstract).
- 22) Morey ER and Baylink DJ (1978) Inhibition of bone formation during space flight. *Science* **201** : 1138-41.
- 23) Weinreb M, Rodan GA and Thompson DD (1989) Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decreased bone formation. *Bone* **10** : 187-94.
- 24) Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR and Bonewald LF (2002) Proteolysis of latent transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF- $\beta$  from bone matrix. *J Biol Chem* **277** : 21352-60.
- 25) Udagawa N, Itoh K, Li XT, Ozawa H and Takahashi N (2002) Expression of osteoblast differentiation factor in mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* **17** : S 344 (Abstract).