Substance P はヒト単球から破骨細胞への 分化を促進する

福 原 栄 司¹ ・ 後 藤 哲 哉² ・ 又 吉 誉 章¹
小 林 繁² ・ 高 橋 哲¹

¹九州歯科大学口腔顎顔面外科学講座形態機能再建学分野

²九州歯科大学生命科学講座頭頸部構造解析学分野

平成 17 年 2 月 7 日受付

平成 17 年 3 月 11 日受理

Substance P stimulates the Formation of Osteoclasts from Human Peripheral Blood Monocytes

Eiji Fukuhara¹, Tetsuya Goto², Takaaki Matayoshi¹,
Shigeru Kobayashi² and Tetsu Takahashi¹

¹Division of Oral and Maxillofacial Reconstructive Surgery,

²Division of Anatomy,

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

E-mail: ef89@kyu-dent.ac.jp

Abstract

Osteoclasts, the multinucleated giant cells that resorb bone, develop from hematopoietic cells of the monocyte-macrophage lineage. Osteoclasts precursors that possess receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) recognize RANK ligand (RANKL) and differentiate into osteoclasts in the presence of macrophage colony stimulating factor (M-CSF). The purpose of this study is to investigate the effects of neuropeptide substance P (SP) on the formation of osteoclasts from human peripheral blood monocytes (PBMC) in the presence of RANKL and M-CSF.

Fluorescent immunostaining using specific antibody against neurokinin-1 receptor (NK₁-R) indicated the localization of punctuate distribution of NK₁-R on the PBMC. PBMC cultured with 10 % FBS containing 1,25(OH)₂D₃, M-CSF, RANKL for 2 weeks formed TRAP (+) mononucleated cells and TRAP (+) multinucleated cells. The addition of 10⁻¹⁰~10⁻⁸ M SP induced the increased number of TRAP (+) mononucleated cells and TRAP (+) multinucleated cells. The increase of TRAP (+) mononucleated cells and TRAP (+) multinucleated by SP was inhibited by the addition of spantide, SP antagonist or FK224, NK₁-R.

These findings suggest that SP stimulated the formation of osteoclast precursors from

PBMC and the formation of osteoclasts through the NK_1 -Rs.

Key words: Substance P (SP)/Human peripheral blood monocytes (PBMC)/Osteoclasts/Neurokinin-1 receptor (NK_1 -R)/Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)

抄 録

破骨細胞は単球/マクロファージ系の血液幹細胞から形成される多核の巨細胞で骨を吸収する。破骨細胞の前駆細胞は receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) を持ち、マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony stimulating factor; M-CSF) の存在下で RANK ligand (RANKL) を認識し破骨細胞へと分化する。この研究の目的は RANKL と M-CSF の存在下でヒト末梢血単球 (peripheral blood monocytes; PBMC) から破骨細胞への形成過程で神経ペプチド Substance P (SP) がどのように影響するのかを調べることである。

NK_1 -R に対する特異抗体を用いた免疫蛍光染色により、PBMC には小さな斑点状に NK_1 -R の局在が示された。10 % の牛胎仔血清および $1,25(OH)_2D_3$, M-CSF, RANKL を含む培養液で PBMC を培養すると 2 週間で単核の TRAP (+) 細胞ならびに破骨細胞である TRAP (+) 多核細胞を形成した。 $10^{-10} \sim 10^{-8}$ M SP 添加により単核の TRAP (+) 細胞ならびに TRAP (+) 多核細胞数の増加が認められた。この SP による単核の TRAP (+) 細胞ならびに TRAP (+) 多核細胞数の増加は SP アンタゴニストである spantide ならびに NK_1 -R アンタゴニストである FK224 の添加により抑制された。

これらの結果により NK_1 -R を介して SP は PBMC からの TRAP 陽性単核細胞 (破骨細胞前駆細胞) の形成を促進し、TRAP 陽性多核細胞である破骨細胞の形成を促進することが示唆された。

キーワード: Substance P (SP) / ヒト末梢血単球 (PBMC) / 破骨細胞 / Neurokinin-1 receptors (NK_1 -R) / Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)

緒 言

Substance P (SP) は 11 残基のアミノ酸からなる神経ペプチドであり、中枢神経系、末梢神経系の両方に広く発現している。SP は主に鈍い痛みを伝える c 線維に含まれ、SP 免疫陽性神経は長管骨¹⁾、ヒト膝関節²⁾、ラット顎関節³⁾、歯根膜⁴⁾ 等に観察されている。SP は知覚神経の末梢刺激により主に後根神経節で作られ、一部順行性に中枢に向かって送られるが、そのほとんどは逆行性に刺激を受けた部位に送られ、刺激部位に放出される。

痛みを伴って骨が変形することは、関節炎等の時にみられるが、神経ペプチドの骨代謝に対する影響、特に SP の影響については詳しくは調べられていない。最近、Shih and Bernard (1997)⁵⁾ によって SP が骨髄細胞の骨芽細胞分化を促進することが報告された。一方、骨吸収に関しては、カプサイシンによる知覚神経遮断により骨吸収が減少する事や⁶⁾、6-hydroxydopamine による

交感神経遮断により末梢の SP レベルが上昇して破骨細胞数の増加が示されている⁷⁾。さらに交感神経遮断によるラット臼歯の抜歯窩の骨吸収の増加^{8,9)}、ならびに中耳においても骨吸収の増加が報告されている¹⁰⁾。これらの所見は末梢神経から放出された SP が破骨細胞の骨吸収と関係があることを示しているが、破骨細胞が SP receptor を持つかどうか、SP が破骨細胞の骨吸収に影響するかどうかは分かっていなかった。最近、Goto ら (1998)¹¹⁾ によって破骨細胞に neurokinin-1 receptors (NK_1 -Rs) (SP receptor) を持つことが NK_1 -R に対する特異抗体を用いた免疫細胞化学によって示された。この所見は SP が破骨細胞上の NK_1 -R を介して破骨細胞に影響を及ぼしている事を強く示唆するものである。

破骨細胞は骨吸収を生じる主たる細胞であり、血液中の単球/マクロファージ系の細胞から分化すると考えられている。単球/マクロファージ系の細胞から破骨細胞に分化するには、macrophage colony stimulating factor (M-CSF), receptor activator of nuclear fac-

tor kappa B ligand (RANKL) や tumor necrosis factor (TNF)- α が深く関わっている。さらに骨吸収を促進する活性型ビタミン D₃ [$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$], 副甲状腺ホルモン (PTH), プロスタグランジン E₂ (PGE₂), インターロイキン 6 (IL-6) は骨芽細胞に作用して破骨細胞の形成を促進することが明らかにされている。神経ペプチドに関しては, SP レセプターが破骨細胞に存在することは示されているが¹¹⁾, その前駆細胞に SP レセプターが存在するか, また, SP は前駆細胞からの破骨細胞分化を促進するかどうかはまだ明らかにされていない。

本研究ではヒト末梢血より単離した単球が破骨細胞に分化するうえで SP が関与しているかどうか調べるため, 破骨細胞前駆細胞に SP レセプターが存在するかどうか, また, SP レセプターが存在するとしたら破骨細胞への分化にどのような影響があるかを検索した。

材料および方法

I. ヒト末梢血単球の単離

ヒト末梢血単球の単離に使う血液は健康な 20 歳代の男女計 5 名 (男 3, 女 2) のボランティアより採取した。なお, ヒト末梢血の研究使用については九州歯科大学倫理委員会の承認を得ており, 毎回血液採取においては本人の同意を得て行った。

ヒト末梢血単球の単離は Kanzaki らの方法¹²⁾ に準じて行った。ヒト末梢血は肘正中皮静脈より 1 回あたり 20 ml 採取した。Ficoll-paque 液 (Amersham Bioscience Corp., NJ, USA) 3 ml に対し血液を 5 ml 加え冷却遠心機で 3000 rpm, 30 分間遠心を行った。遠心終了後, 単核球分画をマイクロピペットで回収し, PBS を加え混和したのち 2000 rpm, 8 分遠心を行い, この操作を 2 回繰り返し, 細胞の洗浄を行った。細胞数を血球計算計で計測したのち実験に用いた。

II. NK₁-R 免疫染色

ヒト末梢血単球に NK₁-R が存在するかどうかを蛍光免疫細胞化学的に調べた。1.5 ml チューブにヒト末梢血単球を 1×10^6 個含む溶液をとり, 細胞を遠沈させたのち, 95 % 冷エタノールにて 10 分間固定した。再度細胞を遠沈させたのち, 0.1 M リン酸緩衝液にて洗浄し, 細胞を 10 % ヤギ血清 (Nichirei, Tokyo, Japan) で 15 分反応させ, 非特異的反応を抑えた。一次抗体として抗 NK₁-R ポリクローナル抗体 (1:1000; Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, USA) を 37°C で 2 時間反応させ, 遠沈・PBS 洗浄を 3 回くり返した。二次抗

体として, fluorescein 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:100; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) を 1 時間室温で反応させた。遠沈・PBS 洗浄を 3 回繰り返したのち, 免疫蛍光染色した単球を含む溶液 50 μ l をスライドグラス上に滴下し, カバーグラスを被せ, 蛍光顕微鏡 (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) にて調べた。

III. 破骨細胞形成測定

ヒト末梢血単球は活性型 Vitamin D₃, RANKL, M-CSF の存在下で破骨細胞に分化できるかを tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色による細胞計測によって調べるために, 以下に述べる条件下において, 位相差顕微鏡 (Olympus) を用い, TRAP 陽性細胞数, および多核 TRAP 陽性細胞数を調べた。

回収した細胞は, 5×10^5 cells/well となるように 24 well プレート (Falcon Labware, Oxnard, CA, USA) に播種し, 10 ng/mL M-CSF (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 ng/mL 活性型 Vitamin D₃ (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan), 10 ng/mL RANKL (Wako) を含有した, α -minimal essential medium (α -MEM; Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) と 10 % fetal bovine serum (FBS; Gibco-BRL) と抗生剤 (167 U/mL penicillin G, 50 mg/mL gentamicin, 0.25 mg/mL fungizone) の培養液中, 37°C, 5 % CO₂ インキュベーターにて 2 週間培養を行った。

SP がヒト末梢血単球からの破骨細胞形成にどのように働くのかを検討するために, 上記の培養液に 10^{-12} ~ 10^{-6} M SP (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan) を加え培養を行った。培養 1 週間目における TRAP 陽性細胞の形成に対する SP の濃度による影響を調べた。

さらに, SP の破骨細胞に対する作用は NK₁-R を介しているのかを検討するために, SP のアンタゴニストである Spantide (Peptide Institute) を, また, NK₁-R のアンタゴニストである FK224 (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japan) を各条件にて培養液に加えて, その TRAP 陽性細胞形成に対する影響ならびに TRAP 陽性細胞の多核化に対する影響を調べた。

IV. 統計処理

データの統計学的有意差は, ノンパラメトリックの分散分析である Kruskal-Wallis の検定と, Bonferroni 型の多重比較によって行った。

結 果

今回, 男性 3 人, 女性 2 人から得た末梢血単球を用い

て実験を行ったが、それぞれサンプル間におけるばらつきはなかったため、全てのサンプルをまとめてデータとした。

抗 NK_1-R 抗体を用いた免疫蛍光染色により、今回単離されたヒト末梢血単球は、 NK_1-R に対する免疫陽性反応が点状に認められた (図1)。つまり、無刺激の血液中の単球においてもすでに SP receptor である NK_1-R が存在することが明らかとなった。

ヒト末梢血単球は活性型 Vitamin D_3 , RANKL, M-CSF の存在下で培養を続けると多核巨細胞を形成し、TRAP 染色により TRAP 陽性を示した (図2)。

図1 ヒト末梢血単球における NK_1-R の免疫蛍光染色像。
ヒト末梢血単球に NK_1-R に対する免疫陽性反応が点状に認められた。右下枠内はヒト末梢血単球の拡大像。複数の点状の NK_1-R に対する免疫陽性反応がみとめられる。スケールバーは $10\mu m$ を示す。

TRAP 陽性細胞数の割合は、培養3日目の段階では SP の各濃度における有意差は認められなかったが、7日目以降、SP の濃度が $10^{-10} \sim 10^{-7}$ M の場合にコントロールに比べ有意に TRAP 陽性細胞の割合が増加した (図3)。さらに TRAP 陽性細胞の多核化に対する SP の作用を調べたところ、全 TRAP 陽性細胞に対する TRAP 陽性多核細胞数の割合は $10^{-10} \sim 10^{-8}$ M の SP 添加によりコントロールと比べ有意な増加が認められた (図4)。

さらに、この SP の影響が NK_1-R を介しているのかどうかを調べるために、 NK_1-R アンタゴニストもしくは SP アンタゴニストを添加し、SP による破骨細胞分化にどのように影響するかを調べた。末梢血単球から TRAP 陽性細胞への分化の SP 添加による促進は、アンタゴニスト FK224 の添加により抑制された (図5)。多核 TRAP 陽性細胞数を測定することによる TRAP 陽性細胞からの破骨細胞への分化は SP 添加により促進されたが、 NK_1-R アンタゴニスト FK224 (図6) により抑制され、コントロール群である SP ならびに FK224 非添加の培養液における破骨細胞分化の割合と同等のレベルとなった。また、SP アンタゴニスト Spantide を加えた場合も NK_1-R アンタゴニスト FK224 を添加した場合と同様に、末梢血単球から TRAP 陽性細胞への分化ならびに TRAP 陽性多核細胞への多核化の SP 添加による促進は Spantide によって抑制された (図7)。

図2 ヒト末梢血単球から形成された破骨細胞の TRAP 陽性像。
ヒト末梢血単球は $1,25(OH)_2D_3$, RANKL, M-CSF の存在下で2週間培養したのち形成された多核細胞を示す。
A: control (SP 非添加)。 B: 10^{-8} M SP 添加。スケールバーは $10\mu m$ を示す。

図3 ヒト末梢血単球から TRAP 陽性細胞への分化に対する SP の影響.

ヒト末梢血単球は $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, RANKL, M-CSF の存在下で 1 週間培養した時, SP の濃度が $10^{-11} \sim 10^{-7}$ M の場合にコントロールに比べ有意に TRAP 陽性細胞の割合の増加が認められた (* $P < 0.01$). グラフは平均値±標準偏差を示す (n=12).

図5 SP による TRAP 陽性細胞への分化促進の対する $\text{NK}_1\text{-R}$ アンタゴニスト FK224 の影響.

FK224 を添加した場合, SP による TRAP 陽性細胞への分化促進は抑制され, SP と FK224 を含まない場合と有意差は認められなかった. グラフは平均値±標準偏差を示す (n=12).

図4 TRAP 陽性細胞から TRAP 陽性多核細胞 (破骨細胞) への多核化に対する SP の影響.

ヒト末梢血単球は $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, RANKL, M-CSF の存在下で 2 週間培養した時, SP の濃度が $10^{-10} \sim 10^{-8}$ M の場合にコントロールに比べ有意に TRAP 陽性細胞に対する TRAP 陽性多核細胞の割合の増加が認められた (* $P < 0.01$). グラフは平均値±標準偏差を示す (n=12).

図6 SP による TRAP 陽性多核細胞への多核化に対する $\text{NK}_1\text{-R}$ アンタゴニスト FK224 の影響.

FK224 を添加した場合, SP による TRAP 陽性多核細胞への多核化は抑制され, SP と FK224 を含まない場合と有意差は認められなかった. グラフは平均値±標準偏差を示す (n=12).

図7 SPによるTRAP陽性細胞への分化促進の対するSPアンタゴニスト Spantideの影響。

Spantideを添加した場合、SPによるTRAP陽性細胞への分化促進は抑制され、SPとSpantideを含まない場合と有為差は認められなかった。グラフは平均値±標準偏差を示す (n=12)。

考 察

今回の研究で、我々は、神経ペプチド SP がヒト末梢血単球に SP レセプターを介して作用することで末梢血単球から破骨細胞への分化を促進させることを示した。

ヒト末梢血単球が神経ペプチド SP の標的細胞であるかどうかは、過去、種々の方法で調べられてきた。Lucy ら (1994)¹³⁾ は¹²⁵I-SP を使ってヒト末梢血より単離した単球に対してその結合を調べているが、serine proteinase inhibitor の存在下でのみ¹²⁵I-SP の単球への結合を認めた。その後、Ho ら (1997)¹⁴⁾ によってヒト単球に NK₁-R が発現することが RT-PCR によって示された。なお、この実験では、ヒト単球に SP も発現することが示されている。今回我々は、ヒト末梢血単球に NK₁-R が存在することを免疫蛍光染色で示したが、以下に述べる SP アンタゴニスト、NK₁-R アンタゴニストの結果より、これら NK₁-R 免疫陽性末梢血単球は破骨細胞の前駆細胞であることが示された。

破骨細胞は血液幹細胞由来であり、その分化に M-CSF と RANKL が関っているがその分化に関っている段階に差異がある。M-CSF は血液幹細胞から Monocyte/macrophage lineage cell, 破骨細胞前駆細胞、単核 TRAP 陽性細胞の各段階に必要とされており、M-CSF の遺伝子異常である op/op mouse では破骨細胞の形成が抑制され大理石病様になることが知られている¹⁵⁾。一方、osteoprotegerin の結合するリガンドとし

て発見された RANKL は骨芽細胞の細胞膜上に発現する分子で¹⁶⁾、破骨細胞の前駆細胞の表面に発現する RANK と結合し TRAP 陽性単核細胞ならびに多核化して破骨細胞となる過程に必要であると考えられている^{17,18)}。NK₁-R はすでに成熟破骨細胞にも存在することが示されており¹¹⁾、今回の結果とあわせると破骨細胞の分化の広い段階で NK₁-R が存在することが明らかとなった。単球は NK₁-R を介した作用により、TNF- α を発現することが示されているが¹⁹⁾、TNF- α は RANKL の非存在下で破骨細胞形成を支持することが明らかとなっており²⁰⁾、SP が M-CSF や RANKL の代わりに破骨細胞形成を支持しようと期待された。我々の予備実験では、M-CSF や RANKL の代わりに SP を添加した実験を行ったが、TRAP 陽性多核細胞である破骨細胞の発現は認められなかった。そこで、SP が M-CSF, RANKL の存在下で単球から TRAP 陽性の単核細胞への分化ならびに TRAP 陽性単核細胞から多核の TRAP 陽性細胞すなわち破骨細胞の分化にどのような影響があるかについて調べた。結果は 10⁻¹¹~10⁻⁷ M SP 添加で TRAP 陽性細胞数の増加が認められ、10⁻¹⁰~10⁻⁷ M SP 添加で多核の TRAP 陽性細胞の割合の増加が認められた。従って、SP は単球から破骨細胞の前駆細胞への分化と多核化の両方に促進的に働くことが示された。SP が単球に対してどのように作用するかはあまりわかっていない。SP はラット leukocyte の TNF- α , Interleukin (IL)-1 β , IL-2 および IL-6 の産生を促進すること²¹⁾やマウスマクロファージに対して NF- κ B の活性化を引き起こす事²²⁾、さらに成熟破骨細胞に対しては細胞内カルシウム濃度を上げ、骨吸収を促進する事²³⁾が報告されている。おそらく、単球においても転写因子である NF- κ B の活性化が SP によって生じ、破骨細胞への分化が促進されたものと考えられる。SP による細胞内シグナルについては今後の研究課題である。

SP は NK₁-R と高い親和性を持つが、他の SP のレセプターである NK₂-R や NK₃-R とも親和性は低いながらも結合することが報告されている²⁴⁾。また、上述のように SP は単球より TNF- α の産生を生じさせることが明らかとなっている。従って、SP が直接的に作用して破骨細胞の分化を促進しているかどうかを明らかにするために、spantide および FK224 を用いて検索した。その結果、spantide, FK224 のいずれを添加した場合も、SP による単球から TRAP 陽性細胞への分化、ならびに TRAP 陽性細胞の多核化の促進作用を減少させること

が明かとなった。つまり、本実験において TRAP 陽性細胞、さらには TRAP 陽性多核細胞に分化した細胞は NK_1-R を持ち、SP によって NK_1-R を介してその分化が促進されたことを示している。最近我々は、ラット膝関節滑膜において SP が滑膜線維芽細胞の増殖とともに RANKL の発現を上昇させることを報告したが²⁵⁾、今回の結果より、SP は膝関節において破骨細胞の前駆細胞にも作用して破骨細胞への分化を促進している可能性が示された。

今回、SP が末梢血単球から破骨細胞分化を促進させたことより、関節炎や矯正力による歯牙移動時などの鈍い痛みが持続した状態において、SP は破骨細胞の分化を促進し、末梢組織の骨破壊を促進しうる可能性が示唆された。

結 論

我々は、破骨細胞前駆細胞であるヒト末梢血単球上に、SP レセプター (NK_1-R) が存在することが明らかにした。SP は NK_1-R を介して、ヒト末梢血単球からの破骨細胞分化を促進すると考えられる。

文 献

- 1) Bjurholm, A., Kreicbergs, A., Brodin, E. and Schultzberg, M.: Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides* 9: 165-171, 1988.
- 2) Wojtys, E. M., Beaman, D. N., Glover, R. A. and Janda, D.: Innervation of the human knee joint by substance-P fibers. *Arthroscopy* 6: 254-263, 1990.
- 3) Kido, M. A., Kiyoshima, T., Kondo, T., Ayasaka, N., Moroi, R., Terada, Y. and Tanaka, T.: Distribution of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat temporomandibular joint. *J. Dent. Res.* 72: 592-598, 1993.
- 4) Silverman, J. D. and Kruger, L.: An interpretation of dental innervation based upon the pattern of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive thin sensory axons. *Somatosens. Res.* 5: 157-175, 1987.
- 5) Shih, C. and Bernard, G. W.: Neurogenic substance P stimulates osteogenesis in vitro. *Peptides* 18: 323-326, 1997.
- 6) Adam, C., Llorens, A., Baroukh, B., Cherruau, M. and Saffar, J. L.: Effects of capsaicin-induced sensory denervation on osteoclastic resorption in adult rats. *Exp. Physiol.* 85: 62-66, 2000.
- 7) Sherman, B. E. and Chole, R. A.: A mechanism for sympathectomy-induced bone resorption in the middle ear. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 113: 569-581, 1995.
- 8) Hill, E. L., Turner, R. and Elde, R.: Effects of neonatal sympathectomy and capsaicin treatment on bone remodeling in rats. *Neuroscience* 44: 747-755, 1991.
- 9) Sandhu, H. S., Herskovits, M. S. and Singh, I. J.: Effect of surgical sympathectomy on bone remodeling at rat incisor molar root sockets. *Anat. Rec.* 219: 32-38, 1987.
- 10) Sherman, B. E. and Chole, R. A.: *In vivo* effects of surgical sympathectomy on intramembranous bone resorption. *Am. J. Otol.* 17: 343-346, 1996.
- 11) Goto, T., Yamaza, T., Kido, M. A. and Tanaka, T.: Light- and electron-microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. *Cell Tissue Res.* 293: 87-93, 1998.
- 12) Kanzaki, H., Chiba, M., Shimizu, Y. and Mitani, H.: Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J. Dent. Res.* 80: 887-891, 2001.
- 13) Lucey, D. R., Novak, J. M., Polonis, V. R., Liu, Y. and Gartner, S.: Characterization of substance P binding to human monocytes/macrophages. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1: 330-335, 1994.
- 14) Ho, W. Z., Lai, J. P., Zhu, X. H., Uvaydova, M. and Douglas, S. D.: Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J. Immunol.* 159: 5654-5660, 1997.
- 15) Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T. and Shultz, L. D.: The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345: 442-444, 1990.
- 16) Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A. *et al.*: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3597-3602, 1998.
- 17) Jimi, E., Akiyama, S., Tsurukai, T., Okahashi, N., Kobayashi, K., Udagawa, N., Nishihara, T., Takahashi, N. and Suda, T.: Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J. Immunol.* 163: 434-442, 1999.
- 18) Itoh, K., Udagawa, N., Matsuzaki, K., Takami, M., Amano, H., Shinki, T., Ueno, Y., Takahashi, N. and Suda, T.: Importance of membrane- or matrix-associated forms of M-CSF and RANKL/ODF in osteoclastogenesis supported by SaOS-4/3 cells expressing recombinant PTH/PTHrP receptors. *J. Bone. Miner. Res.* 15: 1766-1775, 2000.
- 19) Brunelleschi, S., Bordin, G., Colangelo, D. and Viano,

- I.: Tachykinin receptors on human monocytes: their involvement in rheumatoid arthritis. *Neuropeptides* 32: 215-223, 1998.
- 20) Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N. *et al.*: Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J. Exp. Med.* 17: 275-86, 2000.
- 21) Delgado, A. V., McManus, A. T. and Chambers, J. P.: Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 37: 355-61, 2003.
- 22) Marriott, I., Mason, M. J., Elhofy, A. and Bost, K. L.: Substance P activates NF- κ B independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. *J. Neuroimmunol.* 24: 163-171, 2000.
- 23) Mori, T., Ogata, T., Okumura, H., Shibata, T., Nakamura, Y. and Kataoka, K.: Substance P regulates the function of rabbit cultured osteoclast; increase of intracellular free calcium concentration and enhancement of bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262: 418-422, 1999.
- 24) Otsuka, M. and Yoshioka, K.: Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.* 73: 229-308, 1993.
- 25) Matayoshi, T., Goto, T., Fukuhara, E., Takano, H., Kobayashi, S. and Takahashi, T.: Neuropeptide substance P stimulates the formation of osteoclasts via synovial fibroblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 756-764, 2005.