

原著論文

終末糖化産物 AGEs は、IL-17A 共存下において 破骨細胞の分化を亢進する

豊村 隆男^{1,2)}*, 渡邊 政博^{1,2)}, 森 秀治^{1,2)}

¹⁾ 就実大学薬学部生体情報学研究室, ²⁾ 就実大学大学院医療薬学研究科

AGEs additively enhance the osteoclast differentiation process in the presence of IL-17A.

Takao Toyomura^{1,2)}*, Masahiro Watanabe^{1,2)}, Shuji Mori^{1,2)}

¹⁾ *Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Shujitsu University,*

²⁾ *Graduate School of Clinical Pharmacy, Shujitsu University*

(Received 13 November 2020; accepted 25 December 2020)

Abstract: Osteoclasts are responsible for bone resorption in bone metabolism, and it is known that excessive activity of those cells can lead to osteoporosis. On the other hand, many diseases such as diabetes mellitus are known to cause secondary osteoporosis. In this study, we examined whether the accumulation of AGEs (Advanced glycation end-products) in diabetic patients might be the pathogenesis of osteoporosis. Stimulation of osteoclast progenitor cells with osteoclast differentiation factor (RANKL) and AGEs had no significant effect for osteoclast differentiation although AGEs induced the expression of DC-STAMP and OC-STAMP, both of which are involved in osteoclast progenitor cell fusion, as compared to RANKL stimulation alone. Diabetes mellitus causes systemic chronic inflammation. One of the cytokines seen on chronic inflammation is IL-17A, which is known to promote bone destruction in rheumatoid arthritis. Osteoclastogenesis tended to be increased when osteoclast progenitors were treated with IL-17A and AGEs additionally. These results suggest that accumulation of AGEs had no effect in bone metabolism of early diabetic patients, but may lead to further bone destruction in severe patients with chronic inflammation and insulin resistance.

Keywords: AGEs (Advanced glycation end-products), osteoclast, differentiation, osteoporosis, diabetes mellitus

緒言

骨代謝は、骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収とにより、バランスが調節されている。ヒトの骨代謝が骨形成に偏ると大理石骨病になり、骨吸収に偏った場合は骨粗鬆症になることが知られている¹⁾。骨吸収が活発になる原因として、骨形成能に対して相対的な破骨細胞の過剰な活性化があげられ、特に罹患率の高い女性の場合、閉経に伴うエストロゲン分泌の低下が主な原因とされる(原発性骨粗鬆症)。また、糖尿病や副甲状腺機能亢進症、クッシング症候群といった疾患において、続発性に骨粗鬆症が引き起こされることも知られている²⁾。内分泌疾患については、骨代謝への影響が明らかとなっている場合がほとんどだが、糖尿病については、インスリン欠乏による骨芽細胞の活性が減弱する³⁾以外に、骨の脆弱性を引き起こす機序について報告が少ない。

糖尿病によって引き起こされる合併症の原因因子の一つとして、血糖値依存的に生体内に蓄積する終末糖化産物(Advanced glycation end-products, AGEs)が考えられる。AGEsは、その受容体であるRAGE(Receptor for AGEs)や、パターン認識受容体のTLRs(Toll-like receptors)に結合し、炎症応答を引き起こすことが知られている^{4,6)}。重度の糖尿病患者においては、炎症性メディエーターが生体内に蓄積しており、慢性炎症状態がインスリン抵抗性を誘発することで、さらに病態が増悪化すると考えられている⁷⁾。

慢性炎症と骨代謝についても、密接な関係性が証明されている。骨破壊が認められる慢性炎症性疾患として、関節リウマチが挙げられる。関節リウマチは、自己免疫疾患であり、関節腔内に様々な炎症性メディエーターが放出されており、それらが骨破壊を亢進していることがわかっている⁸⁾。種々のメディエーターの内、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6⁹⁾そしてIL-17A^{10, 11)}が、骨破壊に関与していると報告されており、それらに対応した分子標的薬の開発が進められている。特に、Th17細胞によるIL-17A分泌の骨破壊への影響が、近年注目

されている。滑膜組織に存在するTh17細胞は、IL-17Aを分泌し、炎症応答性のある滑膜細胞を刺激する¹²⁾。さらに、様々な炎症性メディエーターの分泌を促進するとともに、破骨細胞の前駆細胞を刺激し、破骨細胞の分化増殖を促進することが明らかとなっている¹³⁾。

破骨細胞の分化は、その分化因子であるRANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)によって調節されている。しかし、破骨細胞の分化系譜がマクロファージ系であることから、炎症性メディエーターの共刺激によって、破骨細胞の分化増殖が過剰に亢進される。本研究で我々は、糖尿病におけるAGEsの蓄積が、この過剰な破骨細胞の分化増殖に寄与し、骨粗鬆症の発症・増悪化に関与している可能性があると考え、破骨細胞分化能をもつ単球系培養細胞のRAW264.7細胞を用い、AGEs存在下での破骨細胞分化への影響を*in vitro*で評価した。

方法

破骨細胞の分化誘導

RAW264.7細胞(ATCC)を、DMEM(SIGMA)+10%FBS(biosera)の条件で培養したものについて、TrypLE™ Express(gibco)処理で細胞を浮遊させ回収した。 α -MEM(SIGMA)+10%FBS+penicillin/streptomycin(ナカライテスク)+5 nM RANKL(オリエンタル酵母)の培養条件で、96wellのマルチウエルプレートに 2×10^3 cells/wellずつ播種し、37°C、5%CO₂環境下で分化培養を行った。破骨細胞分化の確認については、TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase)染色を行った¹⁴⁾。

TRAP活性測定

培地を取り除き、細胞を10%ホルマリン/PBSで10分間固定した。溶液を捨て、95%エタノールを加え1分間置いた。エタノールを捨て、乾燥させた。TRAP基質混合液(50 mMクエン酸バッファー、10 mM酒石酸(ナカライテスク)、5 mM pNPP(SIGMA))を各ウエルに350 μ l加えた。

表1 リアルタイム PCR に使用したプライマーセット

遺伝子名	forward primer	reverse primer
Actb	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA
Cd44 ¹⁵⁾	AGCCACTCTGGGATTGGTCA	TGTGCTACCAGAATCATCACCACCTA
Csk ¹⁶⁾	AACTTCGGCACAGCAACCTC	TGATCGAAGATAGTCCACCAAACCTC
Dcstamp ¹⁷⁾	GGAAGTTCACTTGAAACTACGTGGA	AGACACACTGAGACGTGGTTTAGGA
Fos ¹⁸⁾	ACGTGGAGCTGAAGGCAGAAC	AGCCACTGGGCCTAGATGATG
Jdp2 ¹⁹⁾	ATGATTGCGCCCTTGACAC	ATCTGGCTGCAGCGACTTTTG
Nfatc1 ²⁰⁾	CAAGTCTCACCACAGGGCTCACTA	TCAGCCGTCCCAATGAACAG
Ocstamp ²¹⁾	CTCTTGGCACAAGCAGCTGTA	ACCGGAGGTTGGTTGAGGAC

30 分間 37°C に置いた後、100 μl 0.1N NaOH を加え、反応を停止した。吸光光度計で、405 nm 波長の吸収を測定した。

TNF-α の ELISA 法定量

96well のマルチウェルプレートに 2 × 10³ cells/well ずつ RAW264.7 細胞を播種し、一晚、37°C、5%CO₂ の条件で培養を行った。上清 100 μl を使用し、TNF-α ELISA キット (BD OptEIA™ ELISA Sets) を用い、Instruction に従い定量を行った。

NF-κB 活性定量

RAW-Blue™ 細胞 (InvivoGen) を 96well のマルチウェルプレートに 2 × 10³ cells/well ずつ播種し、一晚、37°C、5%CO₂ の条件で培養を行った。上清 50 μl と 50 μl QUANTI-Blue 溶液 (InvivoGen) を混合し、30 分間 37°C に置いた。吸光光度計で、620 nm 波長の吸収を測定した。

リアルタイム PCR

96well のマルチウェルプレートに 2 × 10³ cells/well ずつ RAW264.7 細胞を播種し、一晚、37°C、5%CO₂ の条件で培養を行った。トータル RNA を FastGene RNA basic kit (日本ジェネティクス) で回収した。500 ng の全 RNA を用い、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) で cDNA を逆転写合成した。合成した cDNA を鋳型として、Thunderbird qPCR mix (TOYOBO) を用いて PCR を行った。プライマーセットとして表 1 のものを用いた。β-アクチ

ン遺伝子 (Actb) を用いて、標準化を行った。

結果

破骨細胞の分化様式の検討

単球由来の培養細胞である RAW264.7 細胞を培養する際、培地に破骨細胞分化因子である RANKL を添加することで、破骨細胞様細胞 (Osteoclast-like cells, OCLs) へと分化させることができ、破骨細胞で著明に発現している TRAP の活性を利用した基質発色によって、多核で赤い大きな細胞として識別することができる²²⁾。RANKL により刺激された RAW264.7 細胞は、細胞融合を繰り返しながら巨大な OCLs を形成し、アポトーシスによって消滅した。RANKL 刺激後一週間の間、TRAP 活性を測定し、OCLs 数の変動を定量化した (図 1)。OCLs は、刺激後 4 日目に、分化増殖がピークとなっていた。

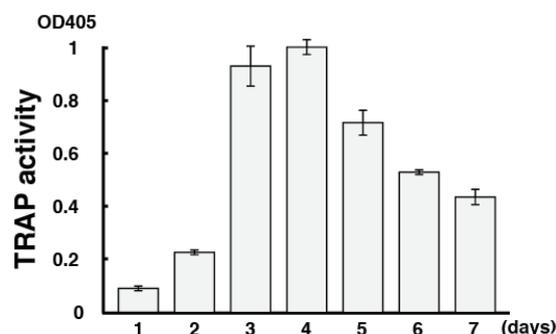


図 1 RANKL 刺激による OCLs の分化増殖 RAW264.7 細胞を破骨細胞分化因子 RANKL で刺激し、1~7 日目まで TRAP 活性の変動を定量した。

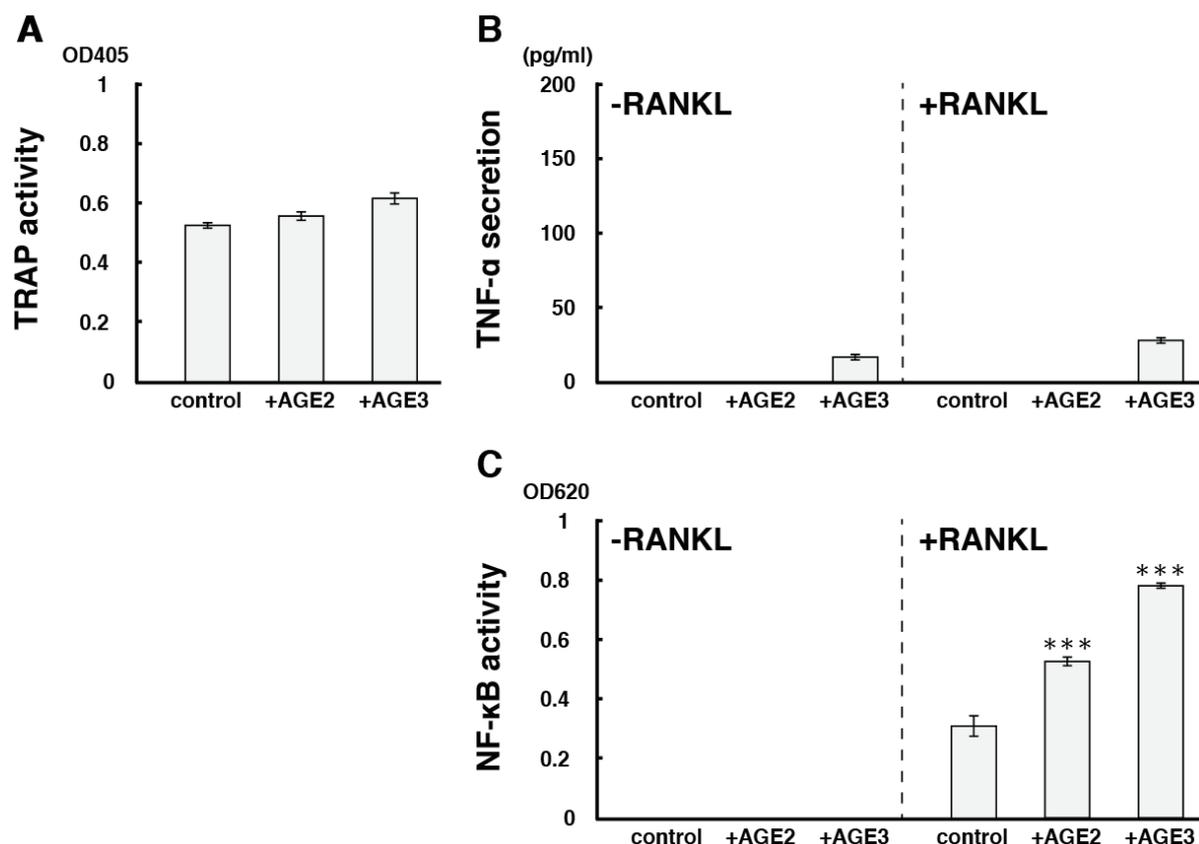


図2 RANKL 存在下・非存在下における AGEs 刺激の効果 A. RAW264.7 細胞を RANKL で刺激し, AGE2 (100 μ g/mL) および AGE3 (100 μ g/mL) を共存させた条件で, 4 日間分化培養を行い, TRAP 活性を定量した. B. RAW264.7 細胞を一晩, RANKL 存在下・非存在下で培養し, AGE2 および AGE3 刺激による TNF- α 分泌への影響を ELISA 法で評価した. C. RAW264.7 細胞を一晩, RANKL 存在下・非存在下で培養し, AGE2 および AGE3 刺激による NF- κ B の活性化を定量した. *** p <0.001 versus control by Dunnett's test (n=3)

AGEs を添加した場合の分化への影響

OCLs の分化培養する際に, 培地に AGE2 または AGE3 を 100 μ g/mL 添加し, 培養 4 日目の TRAP 活性を定量した (図 2A). コントロールと比較したところ, 有意な変化は認められなかった. AGEs の刺激によって, TNF- α が分泌されているか, ELISA 法を用いて定量を行った. AGE2 の刺激では, 検出限界以下であったが, AGE3 の刺激により, 少量の TNF- α 分泌が認められた (図 2B 左). 破骨細胞の分化に影響する転写因子 NF- κ B の活性を, RAW-Blue 細胞を用いて評価を行った. RAW-Blue 細胞は, 活性型 NF- κ B の結合配列の下流に分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) を結合したレポーター遺伝子を, RAW264.7 細胞に形質導入した細胞株で, QUANTI-Blue という

基質を用いた酵素学的定量が行うことができる. AGE 刺激による TNF- α 分泌由来のオートクライン効果が無いためか, NF- κ B の活性化は認められなかった (図 2C 左). しかし, TNF- α の分泌量は, RANKL を加えた条件では, 加えない場合に比べてあまり変化が無い (図 2B 右) のに対し, NF- κ B の活性は, AGE2 および AGE3 の両方で, コントロールに比べて有意に上昇することが明らかになった (図 2C 右).

破骨細胞の分化に関する遺伝子の変動

破骨細胞の分化増殖に関連する遺伝子は, 数多く存在する. 本研究において, 破骨細胞分化に関する 7 種類の遺伝子 [膜タンパク質 3 種類 (Cd44, Dcstamp, Ocstamp), 転写調節因子 4 種類 (Csk, Fos, Jdp2, Nfatc1)] (表 1) について, mRNA の転

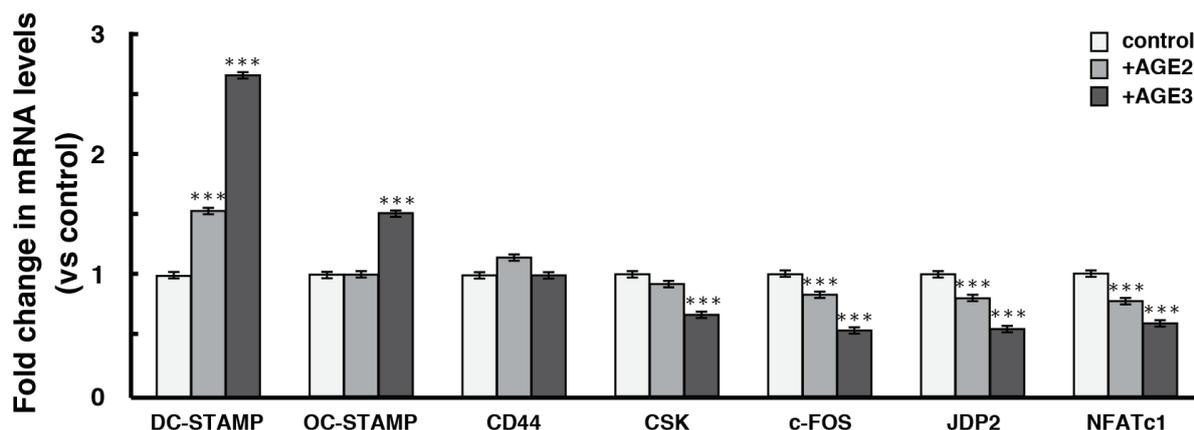


図3 AGE2 または AGE3 で刺激した際の、破骨細胞分化関連遺伝子の転写量の変動 RAW264.7 細胞を RANKL で刺激すると同時に、AGE2 または AGE3 (100 μg/mL) を共存させ、一晚培養を行った。mRNA を調製し、リアルタイム PCR 法により各遺伝子の転写量を評価した。*** $p < 0.001$ versus control by Dunnett's test (n=3)

写量の変動を、リアルタイム PCR 法を用いて評価した。AGE2 または AGE3 による刺激で転写量に増加傾向が認められたものは、DC-STAMP と OC-STAMP であった。特に AGE3 刺激について、有意性が認められる。また、AGE3 共存下の条件で、破骨細胞の分化制御を負に制御するチロシンキナーゼ Csk の転写量が低下していた。また、分化の正の制御因子である c-Fos, JDP2, NFATc1 に

ついては、転写量の低下傾向が認められた (図 3)。IL-17A が共存する条件での AGEs 刺激

IL-17A は、炎症性サイトカインの一つで、破骨細胞の分化増殖に正の影響を与える因子であるとされている。OCLs の分化培養する際に添加すると、有意に分化増殖を亢進する。IL-17A で刺激するとともに、AGE2 または AGE3 で共刺激を行うと、有意差は認められなかったが、IL-17A 単独よりも破骨細胞の分化増殖が亢進する傾向が現れた (図 4)。TNF-α の分泌量を定量したところ、IL-17A 存在下では、AGE-2 または AGE-3 の共刺激により、TNF-α の分泌量が有意に増加することがわかった (図 5A)。また、NF-κB の活性についても有意に上昇傾向が見られた (図 5B)。AGE3 刺激で有意に転写量が増加していた DC-STAMP, OC-STAMP について、IL-17A を共存させた場合をリアルタイム PCR で評価したところ、さらに大きく転写量が上昇することがわかった。DC-STAMP の転写量は 2.5 倍だったものが、IL-17A を共存させると 10 倍にまで転写量が増えている。しかし、Csk については、AGEs 刺激のみと比較して、大きな変動は無かった (図 5C)。

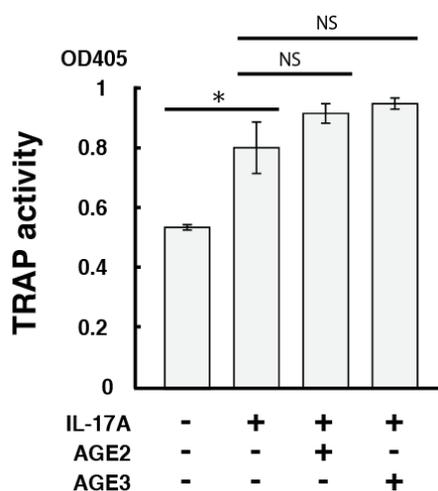


図4 IL-17A 存在下での OCLs の分化増殖 破骨細胞の分化培養の際に、IL-17A (0.1 ng/mL) を加えると同時に、AGE2 または AGE3 (100 μg/mL) を共存させた場合の TRAP 活性の変動を定量した。
* $p < 0.05$ by Tukey-Kramer test (n=3), NS: not significant

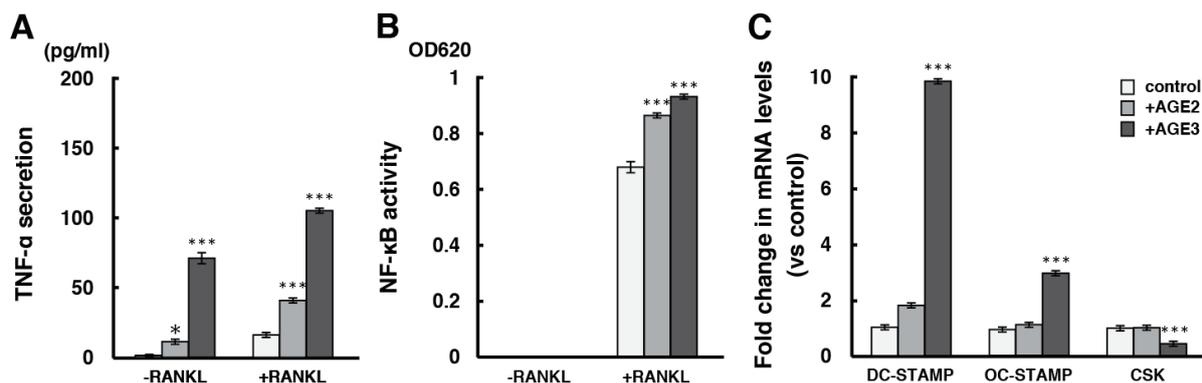


図5 IL-17A の破骨細胞前駆細胞への効果と AGE2, AGE3 の影響 A. IL-17A (0.1 ng/mL) 存在下で RANKL 刺激を行い, さらに AGE2 (100 μg/mL) または AGE3 (100 μg/mL) を加えた条件で, 培地中の TNF-α 濃度を ELISA 法で定量した. B. IL-17A (0.1 ng/mL) 存在下で RANKL 刺激を行い, さらに AGE2 (100 μg/mL) または AGE3 (100 μg/mL) を加えた条件で, NF-κB 活性を定量した. C. IL-17A (0.1 ng/mL) 存在下で RANKL 刺激を行い, さらに AGE2 (100 μg/mL) または AGE3 (100 μg/mL) を加えた条件で一晩培養をした細胞について, リアルタイム PCR 法で解析を行った. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus control by Dunnett's test (n=3)

考察

骨粗鬆症は, 近年問題となっているロコモティブシンドロームを引き起こす原因疾患の代表的なものであり, 罹患者の生活行動範囲を狭め, QOL を著しく下げる. そのため, 骨粗鬆症に関する治療薬発展の一つとして, 分子標的薬デノスマブが登場した²³⁾. 破骨細胞分化因子である RANKL に対する抗体製剤であり, 破骨細胞の過剰活性による骨破壊に対して, 著効を示す. また, 関節リウマチにおいては, 骨破壊の進行を防ぐため, 種々のサイトカインの働きを抑制する分子標的薬があり, 炎症性メディエーターと骨破壊とに密接な関係があることを示している²⁴⁾.

我々は, AGEs による炎症応答の発現・調節について研究をすすめており²⁵⁾, 破骨細胞の分化調節に対しても AGEs が影響している可能性を考えた. 特に, 重度の糖尿病患者では, 骨折リスクが上昇することもあり, 生体内での AGEs の蓄積と骨代謝に何らかの関係性があるかと考え, 本研究を行った.

RAW264.7 細胞は, 単球系の培養細胞で, 破骨細胞の分化培養実験によく用いられる細胞である. 破骨細胞分化因子 RANKL により, 刺激後一

週間以内に TRAP 染色陽性の多核細胞を識別することができる²²⁾. この分化培養系において, AGE2 または AGE3 を添加し, 細胞分化への影響を評価したが, 大きく分化が亢進することはなかった. AGEs 単独では, 炎症を惹起する効果は弱く, TNF-α の分泌量も ELISA 法の検出限界下限程度のため, NF-κB の活性は変動する様子は無かった. しかし, RANKL 刺激を加えた条件において, AGE2 または AGE3 により有意に NF-κB の活性が上昇していることがわかった.

NF-κB は, 破骨細胞の分化過程において活性化する転写因子の一つとして知られている²⁶⁾. NF-κB によって発現制御されている破骨細胞分化に関与する遺伝子について, 転写量が変動するものは無いか, リアルタイム PCR を用いて検討を行った. その結果, 破骨細胞が分化する際に細胞融合に関与する DC-STAMP¹⁷⁾と OC-STAMP²¹⁾という分子について, AGEs 刺激による転写量上昇の傾向が見られた. しかし, AGEs 刺激のみでは, 破骨細胞分化は亢進していない. つまり, それらは, 影響を現すほどの発現ができていない, または, 分化を亢進するにはその因子だけでは不十分であると考えられる.

関節リウマチにおいては、骨破壊の増悪化に炎症性メディエーターが関わっていることがわかっており、抗 TNF- α 抗体や抗 IL-6 受容体抗体といった分子標的薬が、破骨細胞の活性を抑制し、骨破壊を制御できることが明らかになっている²³⁾。近年、骨破壊を伴う関節炎の増悪化因子として IL-17A が注目されている^{27, 28)}。IL-17A は、T 細胞の一種である Th17 細胞から分泌され、免疫担当細胞だけでなく、上皮細胞や滑膜細胞といった非免疫担当細胞を刺激することが明らかになっている。また、刺激された滑膜細胞も IL-17A を発現し、結果として関節腔内に蓄積した IL-17A が骨破壊の病態形成に関与していると考えられている。コラーゲン誘導性の関節炎発症マウスにおいて IL-17A 遺伝子を欠損させたマウスでは、関節炎の発症が大きく抑制されることが報告されている²⁹⁾。

重度の糖尿病患者の合併症の一つとして、網膜症が挙げられる。近年、網膜症を引き起こす原因因子として IL-17A が見つかった³⁰⁾。これは、その他の合併症においても、IL-17A の関与の可能性を示唆している。これまでの研究から、AGEs は直接的に働くより、他の因子と協調的に働く場合、影響を示すことがわかっている。そのため、重度の糖尿病患者においては、全身性の慢性炎症により IL-17A が分泌されていると考え、破骨細胞の活性調節に対して、AGEs の蓄積が相加的に影響を与えているのでは無いかと想定し、実験を行った。

IL-17A 存在下で分化培養を行うと、有意に OCLs の TRAP 活性が上昇していることがわかった。つまり、IL-17A は、破骨細胞の分化増殖を亢進する因子であることが確認できた。また、この分化培養の際に AGE2 または AGE3 を追加すると、さらに分化増殖が亢進する傾向が認められた。これは、IL-17A と AGEs が相加的に働いた結果であると考えられる。TNF- α の分泌量を定量したところ、IL-17A と AGE2 または AGE3 の共存下では、TNF- α の分泌が 2 倍近く増加して

いた。さらに、NF- κ B 活性化も亢進しているため、破骨細胞の分化に関わる遺伝子の転写量も増加し、分化に影響していると考えた。

破骨細胞の分化亢進に関係する因子として、AGEs 単独刺激の結果から、DC-STAMP, OC-STAMP, Csk の発現量に着目した。IL-17A が存在する条件で破骨細胞の分化培養をする際、AGE3 を加えた条件では、有意に DC-STAMP について大きな変動が認められた。しかし、転写量と破骨細胞の分化効率とが比例した関係では無いため、これが大きく影響しているのではなく、TNF- α のオートクライン効果が破骨細胞の分化に対して最も影響していると考えられる。

本研究において、糖尿病患者の生体内に蓄積する AGEs が、破骨細胞の分化・活性の亢進により、骨の脆弱性増悪に寄与していると考え、培養細胞を用いた *in vitro* での検討を行ったが、AGEs 単独で病態を形成しているわけでは無い結果となった。今回 AGEs として、AGE2 および AGE3 を使用したが、その他の AGEs が直接的に関与している可能性は否定できない。今後、その他の AGEs についても検討していきたい。また、共存させるサイトカインとして、IL-17A について検討を行ったが、IL-1 β や IL-6 等、様々なサイトカインが骨破壊に影響していると考えられているため、それらサイトカインとの組み合わせで、どのような現象がみられるかについても、非常に興味深い。

利益相反

本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Ono T, Nakashima T.: Recent advances in osteoclast biology., *Histochem. Cell Biol.*, 149(4) 325-341 (2018)
- 2) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会: 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015 年版 (2015)
- 3) Rathinavelu S., Guidry-Elizondo C., Banu J.:

- Molecular Modulation of Osteoblasts and Osteoclasts in Type 2 Diabetes., *J. Diabetes Res.*, 2018 Article ID 6354787 (2018)
- 4) Schmidt AM., Vianna N., Gerlach M., Brett J., Ryan J., Kao J., Esposito C., Hegarty H., Hurley W., Clauss M., Wang F., Pan YE., Tsang TC., Stern D.: Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface., *J. Biol. Chem.*, 267 (21) 14987-14997 (1992).
- 5) Chen Y.J., Sheu M.L., Tsai K.S., Yang R.S., Liu S.H.: Advanced glycation end products induce peroxisome proliferator-activated receptor γ down-regulation-related inflammatory signals in human chondrocytes via Toll-like receptor-4 and receptor for advanced glycation end products., *PLoS One*, 8(6) e66611 (2013)
- 6) 森秀治, 豊村隆男: AGEsによる炎症関連疾患の増悪化と制御. *就実大学薬学雑誌* 2 31-38 (2015)
- 7) Odegaard J., Chawla A.: Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance., *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, 4(11) 619-626 (2008)
- 8) Marinova-Mutafchiva L., Williams R.O., Mason L.J., Mauri C., Feldmann M., Maini R.N.: Dynamics of proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA)., *Clin. Exp. Immunol.*, 107(3) 507-512 (1997)
- 9) van Leewen M.A., Westra J., Limburg P.C., van Riel P.L., van Rijswijk M.H.: Interleukin-6 in relation to other proinflammatory cytokines, chemotactic activity and neutrophil activation in rheumatoid synovial fluid., *Ann. Rheum. Dis.*, 54(1) 33-38 (1995)
- 10) Chabaud M., Durand J.M., Buchs N., Fossiez F., Page G., Frappart L., Miossec P.: Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium., *Arthritis Rheum.*, 42(5)963-970 (1999)
- 11) Kermanac'h N.S., Bessis N., Cohen-Solal M., De Vernejoul M.C., Boissier M.-C.: Osteoprotegerin and inflammation., *Eur. Cytokine Netw.*, 13(2) 144-153 (2002)
- 12) Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T.: Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages., *Nat. Immunol.*, 6(11) 1123-1132 (2005)
- 13) Lubberts E., van den Bersselaar L., Oppers-Walgreen B., Schwarzenberger P., Coenen-de Roo C.J.J., Joosten L.A.B., van den Berg W.B.: IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance., *J. Immunol.*, 170(5) 2655-2662 (2003)
- 14) Toyomura T., Oka T., Yamaguchi C., Wada Y., Futai M.: Three subunit a isoforms of mouse vacuolar H⁺-ATPase. Preferential expression of the $\alpha 3$ isoform during osteoclast differentiation., *J. Biol. Chem.*, 275(12) 8760-8765 (2000)
- 15) Kania J.R., Kehat-Stadler T., Kupfer S.R.: CD44 antibodies inhibit osteoclast formation., *J. Bone Miner. Res.*, 12(8) 1155-1164 (1997)
- 16) Takayanagi H., Juji T., Miyazaki T., Iizuka H., Takahashi T., Isshiki M., Okada M., Tanaka Y., Koshihara Y., Oda H., Kurokawa T., Nakamura K., Tanaka S.: Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts., *J. Clin. Invest.*, 104(2) 137-146 (1999)
- 17) Kukita T., Wada N., Kukita A., Kakimoto T., Sandra F., Toh K., Nagata K., Iijima T., Horiuchi M., Matsusaki H., Hieshima K., Yoshie O.,

- Nomiyama H.: RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis., *J. Exp. Med.*, 200(7) 941-946 (2004)
- 18) David J.P., Neff L., Chen Y., Rincon M., Horne.: A new method to isolate large numbers of rabbit osteoclasts and osteoclast-like cells: application to the characterization of serum response element binding proteins during osteoclast differentiation., *J. Bone Miner. Res.*, 13(11) 1730-1738 (1998)
- 19) Kawaida R., Ohtsuka T., Okutsu J., Takahashi T., Kadono Y., Oda H., Hikita A., Nakamura K., Tanaka S., Furukawa H.: Jun dimerization protein 2 (JDP2), a member of the AP-1 family of transcription factor, mediates osteoclast differentiation induced by RANKL., *J. Exp. Med.*, 197(8) 1029-1035 (2003)
- 20) Ishida N., Hayashi K., Hoshijima M., Ogawa T., Koga S., Miyatake Y., Kumegawa M., Kimura T., Takeya T.: Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator., *J. Biol. Chem.*, 277(43) 41147-41156 (2002)
- 21) Yang M., Birnbaum M.J., MacKay C.A., Mason-Savas A., Thompson B., Odgren P.R.: Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation., *J. Cell. Physiol.*, 215(2) 497-505 (2008)
- 22) Toyomura T., Murata Y., Yamamoto A., Oka T., Sun-Wada G.-H., Wada Y., Futai M.: From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H⁺-ATPase with the *a3* isoform during osteoclast differentiation., *J. Biol. Chem.*, 278(24) 22023-22030 (2003)
- 23) Bekker P.J., Holloway D.L., Rasmussen A.S., Murphy R., Martin S.W., Leese P.T., Holmes G.B., Dunstan C.R., DePaoli A.M.: A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women., *J. Bone Miner. Res.*, 19(7) 1059-1066 (2004)
- 24) 関節リウマチ診療ガイドライン作成分科会: 関節リウマチ診療ガイドライン 2014 (2014)
- 25) Watanabe M., Toyomura T., Tomiyama M., Wake H., Liu K., Teshigawara K., Takahashi H., Nishibori M., Mori S.: Advanced glycation end products (AGEs) synergistically potentiated the proinflammatory action of lipopolysaccharide (LPS) and high mobility group box-1 (HMGB1) through their direct interactions., *Mol. Biol. Rep.*, 47(9) 7153-7159 (2020)
- 26) Filvaroff E., Derynck R.: Bone remodelling: a signalling system for osteoclast regulation., *Curr. Biol.*, 8(19) R679-682 (1998)
- 27) Zwerina K., Koenders M., Hueber A., Marijiniussen R.J., Baum W., Heiland G.R., Zaiss M., McLnnes I., Joosten L., van den Berg W., Zwerina J., Schett G.: Bone remodelling: Anti IL-17A therapy inhibits bone loss in TNF- α -mediated murine arthritis by modulation of the T-cell balance., *Eur. J. Immunol.*, 42(2) 413-423 (2012)
- 28) Benedetti G., Miossec P.: Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis., *Eur. J. Immunol.*, 44(2) 339-347 (2014)
- 29) Nakae S., Nambu A., Sudo K., Iwakura Y.: Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice., *J. Immunol.*, 171(11) 6173-6177 (2003)
- 30) Xu H., Cai M., Zhang X.: Effect of the blockade of the IL-23-Th17-IL-17A pathway on streptozotocin-induced diabetic retinopathy in rats., *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 253(9) 1485-1492 (2014)