

神経系の骨芽細胞分化・機能への関与について

後藤 哲哉

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
先進治療科学専攻 神経病学講座 歯科機能形態学分野

Involvement of nervous system on the osteoblastic differentiation and function

Tetsuya Goto

Department of Oral Anatomy and Cell Biology, Neurology, Advanced Therapeutics Course,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
8-35-1 Sakuragaoka, 890-8544, Japan

ABSTRACT

Recently the relationships between nervous system and bone metabolism have been revealed. Though recent evidences suggest that both sympathetic and sensory nerves affect bone metabolism, little is known about the involvement of neuropeptides on the differentiation of stem cells into osteoblastic (OB) cells. The aim of our study was to investigate the expression patterns of neuropeptide receptors at each differentiation stage to evaluate the putative effects of neuropeptides during the differentiation from mouse induced pluripotent stem (iPS) cells, embryoid bodies (EBs), to calcified tissue-forming OB cells. Among neuropeptide receptors, $\beta 2$ -adrenergic receptor (AR) and calcitonin gene-related peptide receptor (CGRP-R) were expressed at all stages of cell differentiation, including the iPS cell stage, with peak expression occurring at the early osteoblastic differentiation stage. Another sensory nervous system receptor, neurokinin 1-R (NK1-R), was expressed mainly in the late osteoblastic differentiation stage. Furthermore, the expression of CGRP-R mRNA showed an additional small peak corresponding to EBs cultured for 3 days, suggesting that EBs may be affected by serum CGRP. These evidences suggest that the sympathetic nervous system receptor $\beta 2$ -AR and the sensory nervous system receptor CGRP-R may be involved in the differentiation of iPS cells into the osteoblastic lineage. NK1-R is likely to involve the late stage of osteoblastic cell differentiation. In other words each neuropeptide has an optimal period for the influence during the differentiation process of osteoblastic cells.

Key words: Induced pluripotent stem cells, osteoblastic cells, sympathetic nervous system, sensory nervous system, neuropeptide receptors

はじめに

骨を形成する骨芽細胞は間葉系幹細胞と神経堤由来の幹細胞から分化する。骨芽細胞の分化を研究する場合、これら間葉系幹細胞や神経堤由来幹細胞からの分化を調べた研究はなされているが、間葉系幹細胞や神

経堤由来幹細胞を純粋に分けて培養することは難しい。一方、Yamanakaらは4つの遺伝子、Oct3/4, Sox2, Klf4, および c-Myc を導入することによりマウス皮膚線維芽細胞からES細胞様多分化能をもつiPS細胞を作成した⁹⁾。いままでiPS細胞からいろいろな細胞へ

分化する方法が開発されており、マウスの iPS 細胞から骨芽細胞へと分化させる方法もいくつか報告されている^{10,11)}。この iPS 細胞から骨芽細胞へと分化させる方法を用いて、分化段階における受容体の発現を調べれば、どのような分化段階にどのような生理活性物質が作用する可能性があるのか調べることができるようになった。

骨には自律神経、知覚神経が骨膜のみならず骨端部など隅々まで多く分布している。過去の報告では自律神経または知覚神経は骨代謝との関連が示されており^{1,2)}、自律神経が骨代謝に影響を及ぼす事は実験的にも示されている³⁾。骨芽細胞上の β -adrenaline receptor (β -AR) を活性化することによる骨吸収の促進が認められており⁴⁾、骨芽細胞における interleukin 6 (IL-6)、IL-11、および receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) の発現の促進も認められている^{3,5)}。これらの所見は、 β -AR antagonist が交感神経系の活性に影響して骨粗鬆症の改善をもたらす事と関連している⁶⁾。知覚神経においても神経の軸索が骨組織に分布しており⁷⁾、substance P、calcitonin gene related peptide (CGRP)、neurokinin や hemokinin などの神経ペプチドが骨代謝を調節していることが明らかになっている^{2,8)}。ここでは、神経がどのように骨代謝に関わっているかと、未分化幹細胞である iPS 細胞から骨様組織を形成する成熟骨芽細胞に分化する過程における神経ペプチド受容体の発現を示す事で、神経ペプチドの骨形成への関わりを概説する。

1. 骨における神経分布

知覚神経線維には、有髄の A α / β 線維と A δ 線維、無髄の C 線維があり、A α / β 線維は主に触覚・深部知覚を伝え、A δ 線維は鋭い痛み、C 線維は鈍い痛みを伝える。また、感覚神経の末端は種々の感覚受容器の形態をとり、主に深部知覚を伝える固有感覚受容器と、侵害刺激を感知する侵害受容器がある。特に侵害受容器は自由神経終末の形態をとり、A δ 線維と C 線維に支配されている。骨における神経分布については骨膜以外神経があまり分布していないと考えられていた時期もあったが、神経を標識する技術の進歩により、骨の外表面のみならず骨髄側にも神経が分布していることが明らかとなった¹²⁻¹⁴⁾。骨膜は神経、血管に富み、自由神経終末と固有感覚受容器のいずれにも存在する。また、骨膜の表層や内層に痛覚関連の神経ペプチドである substance P や CGRP 陽性の神経線維が同定されている。さらに骨基質や骨髄中にもハバース

管やフォルクマン管を通じて神経が分布しており、A α / β 、A δ 線維、C 線維のいずれもが骨組織全体に広く分布している。無髄神経の分布密度は骨膜が最も高いが、骨髄腔にも多数の神経細胞が分布している。また、皮質骨や海綿骨内の神経線維は、骨幹部と比較して近位・遠位骨端部に高密度に分布している¹⁴⁾。一方、交感神経は骨膜や骨組織に分布するとともに、ハバース管内を通る血管を取り巻くように分布しており、骨組織内の造血系細胞の分化や機能の調節をしていると考えられている。交感神経の分布密度は骨膜と皮質骨・海綿骨では遠位骨端部が高く、骨髄腔では近位骨端部が高い¹⁴⁾。これらの所見は骨組織においても知覚神経・交感神経が分布しており、直接的もしくは間接的に骨代謝影響を及ぼしている可能性を示唆している。

2. 骨に対する神経分泌物質の作用

骨に神経が分布しているのは明らかになった。どのような神経が、どのように神経分泌物質を介して働いているかについて、現在までいくつか報告されている(表1)。神経から分泌される物質としては、自律神経ではアミン類である noradrenaline、神経ペプチドである vasoactive intestinal peptides (VIP)、pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) や neuropeptide Y などがあり、知覚神経からは C 線維の自由終末から放出される substance P や CGRP などが存在する。従来これらの神経分泌物質は神経伝達物質と考えられていたが、神経伝達物質としての作用以外に侵害刺激を受けた部位にも放出され神経原性炎症 neurogenic inflammation を生じる事が明らかになっている。つまり、侵害刺激を受けた C 線維を有する無髄の知覚神経は後根神経節もしくは三叉神経節で substance P や CGRP を産生し、一部は中枢側に運ばれるが、大部分は軸索を逆行して侵害刺激を受けた部位にそれらを分泌し、血管透過性の亢進などの炎症症状を起こすのが

表1 神経分泌物質による骨形成、骨吸収に対する影響

		骨形成	骨吸収
自律神経	NA	↓	↑
	VIP	↑	↓
知覚神経	CGRP	↑	↓
	SP	↑	↑

NA: noradrenalin; VIP: vasoactive intestinal peptide; CGRP: calcitonin gene-related peptides; SP: substance P

神経原性炎症である。従って、侵害刺激を受けた部位の近くに破骨細胞や骨芽細胞が存在し、それら神経ペプチドの受容体を有すれば、破骨細胞や骨芽細胞に直接的に神経ペプチドが働くことになる(図1)。

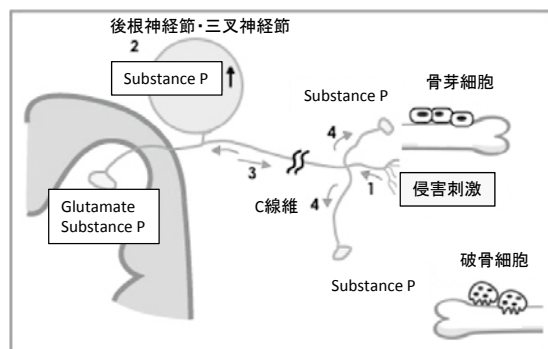


図1. 末梢神経が骨代謝に作用する経路

C線維を有する無髄の知覚神経が侵害刺激を受けると(1)、後根神経節もしくは三叉神経節において substance P等の神経分泌物質の産生が上昇し(2)、逆行性に末梢方向に運ばれ(3)、自由神経終末より放出され(4)、骨芽細胞や破骨細胞に直接はたらく。

A. 交感神経による骨代謝調節

交感神経系による骨代謝調節機構では、交感神経そのものより脂肪細胞から分泌されるレプチンを介しての中樞神経性の調節が報告されている。この、レプチンの骨代謝に対する影響の根拠としては、レプチン欠損マウス (*ob/ob* マウス) や、レプチン受容体欠損マウス (*db/db* マウス) では、肥満に加え、骨量増加が生じていることがあげられている¹⁵⁾。この結果を詳細に調べた結果、肥満や骨量増加が生じた原因は、レプチンの骨芽細胞に対する直接作用に影響したからでなく、中枢神経系の特に関与する交感神経系の活性が低下したためであることが明らかとなった。このことは、交感神経系は通常、骨形成を抑制するが、レプチン欠損マウスでは交感神経の働きが促進されないため、骨形成の抑制が行われず、結果として骨量の増加が生じたと考えられている。

交感神経による直接的な骨芽細胞の骨形成抑制については受容体が重要な働きをする。交感神経より放出された noradrenaline が骨芽細胞上の受容体と結合すると、転写因子 ATF4のリン酸化が増加し、破骨細胞分化に必須の RANKL の発現が亢進するとともに¹⁶⁾、転写因子 CREB (cAMP response element-binding protein) のリン酸化が低下し、骨芽細胞の増殖が低下する¹⁷⁾。このように、adrenaline は骨芽細胞を介して破骨細胞

の骨吸収を促進させるとともに骨形成を低下させるので、交感神経は骨量を低下させると考えられている。

B. 副交感神経による骨代謝調節

副交感神経は交感神経と平衡しながら骨代謝を調節していると考えられるが、実際、M-3ムスカリン受容体欠損マウスでは、交感神経系が活性化され、骨形成の低下と骨吸収の亢進に伴う骨量低下が認められる¹⁸⁾。また、副交感神経単独の作用としては、主として副交感神経終末から放出される神経伝達物質 VIP (vasoactive intestinal peptide) は骨芽細胞に作用し、アルカリフォスファターゼ活性の上昇と石灰化を促進する事が示されている¹⁹⁾。

C. 知覚神経と骨代謝

痛覚の伝達物質である CGRP は脊髄神経節で産生され、CGRP 受容体は骨芽細胞、破骨細胞での発現が確認されている。CGRP の働きとしては、骨芽細胞の分化を促進し、骨芽細胞の増殖を促進する²⁰⁾。同じ痛覚の伝達物質である substance P も骨芽細胞分化を促進する事が明らかとなっている²¹⁾ (表1)。Substance P を始め neurokinin A, neurokinin Bなどはタキキニンファミリーと呼ばれるが、これらもそれぞれの受容体を介して骨芽細胞の分化あるいは骨形成に影響を与えている。特に substance P 以外では neurokinin B が CGRP と同程度の骨形成促進作用があることが示されている (unpublished data)。

また、感覚神経の形成に重要な働きをしている分子とし Sema3A が骨形成に関与していることが報告されている²²⁾。神経特異的 Sema3A 欠損マウスを使った実験ではカプサイシンを投与してもさらなる骨形成の減少が認められなかったことや、骨再生時には神経特異的 Sema3A 欠損マウスでは骨髄の破壊後の骨再生の低下と新生骨への神経形成の低下が認められている。

3. 骨芽細胞と神経分泌物質受容体

A. 骨芽細胞分化における神経分泌物質受容体の発現

ある生理活性物質が作用する時にはその作用点における局所的な濃度のみならず、標的細胞上の受容体の発現に影響される。神経分泌物質の局所濃度を計測することは非常に難しいので、標的細胞つまり骨芽細胞における神経分泌物質の受容体の発現について調べる事はどの神経分泌物質が作用するかを明確にする手助けとなる。骨芽細胞もしくはヒト骨肉腫由来骨芽細胞における神経ペプチドの受容体発現に関して RT-PCR

によって調べられた報告によると、CGRP 受容体、NPY 受容体、VIP-1受容体、 $\beta 2$ adrenaline 受容体 ($\beta 2$ -AR) は確認されたが、substance P 受容体、VIP-2受容体、PACAP 受容体、 $\beta 1$ -AR および $\beta 3$ -AR 受容体は検出されなかった²³⁾。一方、我々のラット長管骨の免疫組織学的検索と、ラット頭蓋冠由来初代培養系骨芽細胞を使った実験では骨芽細胞、破骨細胞ともに substance P 受容体である neurokinin 1 受容体 (NK1-R) の局在および mRNA 発現が確認された^{21, 24)}。また、知覚神経由来の神経ペプチドである CGRP と substance P についての作用を調べた所、骨芽細胞についてはいずれも骨形成を促進するのに対して、破骨細胞は CGRP が骨吸収を抑制したが²⁵⁾ substance P は骨吸収を促進した²⁶⁾。この骨芽細胞の substance P 受容体の発現の相違や substance P の作用の疑問点に関して、当初ヒトとラットの種の違いによることが考えられたが、他の可能性として骨芽細胞における神経ペプチド受容体の発現時期の相違が考えられた。そこで、NK1-R についてラット初代培養骨芽細胞、ラット骨肉腫由来骨芽細胞様細胞を用いて調べた所、初代培養骨芽細胞では NK1-R の発現が認められたが、骨肉腫

由来骨芽細胞様細胞では発現が認められなかった。さらに、初代培養系骨芽細胞を骨芽細胞分化培地で培養したところ、分化の初期ではあまり NK1-R の発現は認められなかったが、分化後期の骨形成期において NK1-R の強い発現が認められた²¹⁾ (図 2)。また、NK1-R の発現時期に応じて、substance P の添加により骨形成の促進が認められた。これらの結果により NK1-R については骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞を含む未分化な骨芽細胞には発現せず、骨芽細胞の分化に従いその発現が増加し、特に骨形成期の骨芽細胞に発現して substance P の影響を受けることが考えられた。実際ヒトで考えると C 線維が関わるような鈍い痛み、もしくは不快感程度の刺激を受け続けると、その刺激を受けた部位の神経終末から substance P 等が分泌され、反応性に骨形成がおこるものと考えられる。例えば、Garre 骨髄炎として知られている軽度の慢性炎症の場合は反応性に骨添加が生じることが知られているが、このような場合に substance P 等の神経分泌物質の影響をうけている可能性が考えられる。

B. iPS 細胞から骨芽細胞への分化における神経ペプチド受容体の発現

CGRP と substance P は同じ C 線維を有する知覚神経由来の神経ペプチドであるが、骨芽細胞への影響は CGRP, substance P の濃度で骨形成を調節しているのではなく骨芽細胞自身がそれらの受容体の発現を分化依存的に変化させてそれらの作用を受けていることが考えられた。そこで、新たな実験として iPS 細胞から成熟骨芽細胞に分化する過程で種々の神経ペプチドがどのように発現変化をするのかを調べた²⁷⁾。iPS 細胞がコロニーを形成した後にフィーダー細胞を除去し、トリプシンで一旦細胞皿よりはがしたのち、非接着性培養皿を用いて胚様体を形成させた。その後、胚様体をフィブロネクチンでコートした培養皿に移し、骨芽細胞用培地で4週間培養し、骨芽細胞を形成させて骨様組織を産生する成熟骨芽細胞まで分化させた (図 3)。分化過程を多分化能維持期、胚様体形成期、骨芽細胞分化期の大きく3段階に分けて、それぞれ RNA 抽出し、RT-PCR および real-time PCR にて、各種神経ペプチド受容体の mRNA 遺伝子発現を調べた。その結果、 $\beta 2$ -AR と CGRP-R は iPS 細胞から成熟骨芽細胞の分化全過程において発現が認められた。 $\alpha 2$ -AR および NPY2-R の発現は認められなかった。 $\alpha 1$ -AR は成熟骨芽細胞にのみ発現が認められた。NPY1-R は iPS 細胞にわずかに認められた。 $\beta 2$ -AR,

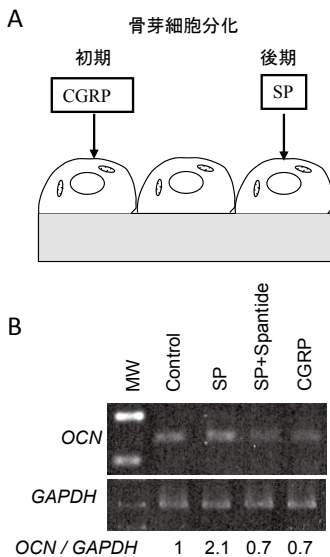


図 2. 骨芽細胞に対する CGRP, SP の作用

A: 知覚神経から分泌される神経ペプチドのうち calcitonin gene-related peptides (CGRP) は骨芽細胞分化初期に作用し、substance P (SP) は骨芽細胞分化後期に作用する。B: 骨芽細胞分化後期に SP, SP および Spantide (SP 受容体 antagonist), CGRP を加えた時の osteocalcin (OCN) と GAPDH の mRNA 発現、および発現比を示す。MW: molecular weight。

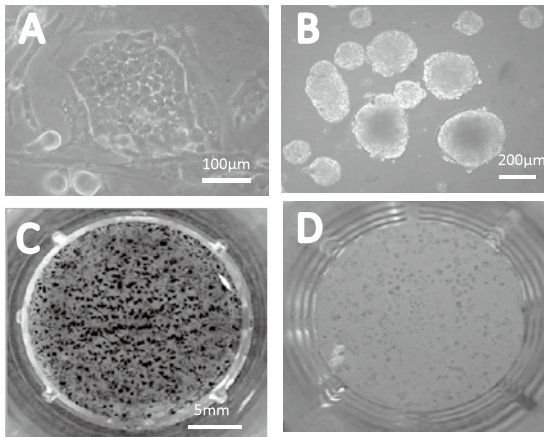


図3. iPS細胞から、胚様体、骨芽細胞の分化過程
 マウス iPS 細胞をフィーダー細胞上で培養した後 (A)、胚様体を形成させた (B)。胚様体をレチノイン酸で処理することにより中胚葉に分化誘導しデキサメタゾン、β グリセロリン酸、アスコルビン酸を含む骨芽細胞用培地で培養し骨様組織を形成させ von Kossa 染色で黒染された骨 (C)。骨芽細胞用培地で培養しなかった場合は骨はわずかしかなら形成されなかった (D)。文献27より、一部改変。

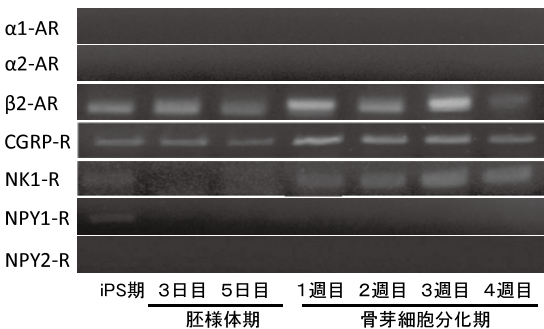


図4. iPS 期、胚様体期、骨芽細胞分化期における各受容体の遺伝子発現

iPS 期から骨芽細胞分化後期までの受容体の mRNA 発現を RT-PCR により検索した。AR: adrenalin receptor, CGRP-R: calcitonin gene-related peptides receptor; NK1-R: neurokinin-1 receptor, NPY: neuropeptide Y。文献27より、一部改変。

CGRP-R, および NK1-R は iPS 細胞から骨芽細胞への分化段階で強く発現していた (図4)。さらに real-time PCR で定量的に調べると、β2-AR, CGRP-R, は骨芽細胞分化1週目目でピークとなり、それ以降骨芽細胞の分化に従って減少した。さらに CGRP-R は胚様体3日目に小さいピークが認められた、これは CGRP

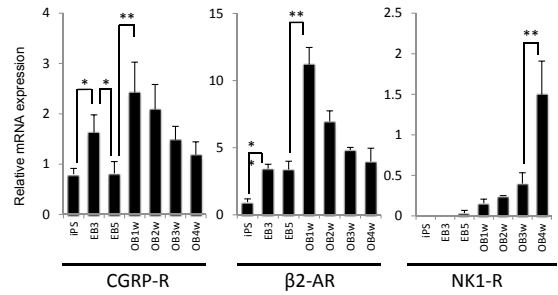


図5. 骨芽細胞分化段階における遺伝子発現の定量的解析
 CGRP-R, β2-AR, および NK1-R の mRNA 発現を、iPS 細胞から骨芽細胞分化まで real-time PCR により定量的解析を行った。グラフは同じ時期の β-actin の発現量を 1 とした時の値 (平均値 ± 標準偏差) を示す。EB3, EB5: 胚様体形成3日目および5日目, OB1w, OB2w, OB3w, OB4w: 骨芽細胞培地による培養1週目, 2週目, 3週目, 4週目。* p < 0.05, ** p < 0.01。

が胚様体の分化にも関与している事を示している。CGRP-R と異なり、知覚神経から分泌される神経ペプチド, substance P の受容体である NK1-R は骨芽細胞分化段階で発現が始まり骨芽細胞の分化4週目では1週目に比べ9倍も発現が増加していた (図5)。これらの発現は免疫蛍光染色法により確かめられた。すなわち、全分化過程において β2-AR および CGRP-R の免疫陽性反応が認められた。

いろいろな神経ペプチドのうち β2-AR および CGRP-R が未分化な iPS 細胞に発現したことは、未分化な幹細胞は知覚神経および交感神経の神経ペプチドから影響を受けていると考えられる。さらに同じ知覚神経から分泌される substance P と CGRP であるが、それらの受容体の発現時期が異なっているため受容体の発現にあわせて異なる作用を示すものと考えられる。これらの所見は、骨代謝が単に神経から神経ペプチドが分泌されるかどうかだけではなく、未分化な細胞を含み骨芽細胞の分化過程によって神経ペプチドの受容体の種類が異なる事で、神経による骨代謝の調節を受けている事が示唆された。

我々は以前 substance P が骨芽細胞の分化後期に働くことを示したが²¹⁾、今回我々は別の神経ペプチドである CGRP の受容体が iPS 細胞に発現していることを示した。以前の研究結果により自律神経の神経ペプチドは骨芽細胞の分化初期に、知覚神経は骨芽細胞分化後期に働くと考えられたが、今回の研究結果は知覚神経ペプチド, CGRP の受容体は骨芽細胞の分化初期および未分化な細胞にも発現していることが明らかと

なった。さらには、知覚神経から逆行性に分泌される substance P と CGRP は同じ知覚神経が産生することが示されている。骨芽細胞に対する substance P, CGRP の作用はいずれも骨形成を促進するが、破骨細胞に対する substance P と CGRP の作用は、substance P が破骨細胞の骨吸収を促進するのに対し CGRP は骨吸収を抑制する反対の作用をすることが示されている。今回の結果より知覚神経ペプチドの substance P と CGRP が同じ神経細胞から産生されるにも関わらず反対の作用を示すのは、標的細胞の分化段階における受容体の発現によって調節されている可能性が示された。

未分化な細胞において神経ペプチドの受容体が発現することが確認されたが、果たしてその時期に近くに神経終末があり、そこから神経ペプチドが放出されて細胞分化に影響しているかは明確ではない。むしろ、神経ではなく血中に含まれる神経ペプチドが影響しているのではないかと考えられる。例えば、ヒトの場合妊娠中の胎盤において CGRP の濃度が上昇することが示されている^{28, 29)}。これらの報告によるとエストロゲンやプロゲステロンが血中の CGRP の濃度を上昇させ、そのことで妊娠中の血管透過性の拡大をもたらしていると考えられている。これらのことは妊娠中の未分化な胎児の細胞に CGRP-R を介して働く CGRP は細胞の近くの神経の軸索から放出されたものではなく、血中の CGRP が細胞分化に関与している可能性を示している。

4. 結論と今後の展望

今回の総説では神経分泌物質がどのように骨芽細胞に影響を及ぼすかを、神経線維の分布と、骨芽細胞の分化段階に応じた神経分泌物質の受容体発現について説明した。特に強い発現がみとめられたのは交感神経系の β 2-AR と知覚神経系の CGRP-R であり、いずれも未分化な iPS 細胞から成熟骨芽細胞に発現しているが、未分化な骨芽細胞に最も多く発現していた。一方、同じ知覚神経由来の SP の受容体である NK1-R は未分化な細胞では発現せず、骨芽細胞の分化に伴い発現が上昇し、成熟骨芽細胞でピークを示した。このように神経による神経ペプチドを介しての骨形成調整は骨芽細胞側の分化依存性に受容体の発現が変化することによって調節されている事が示唆された。受容体の発現変化のまとめを図6に示す。今後は、実際の生体内で神経ペプチドがどの部位の骨形成でどのように調節しているかを明らかにする必要がある。また、再生医療等でも再生組織、特に再生骨組織でどのように神経が関

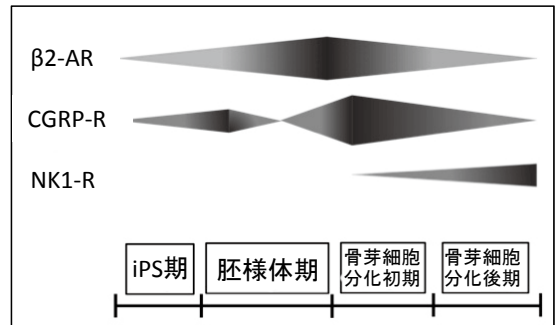


図6. iPS細胞から骨芽細胞に分化する段階における β 2-AR, CGRP-R, NK1-R の発現変化

わっているのかを調べるにより再生医療に関しても新たな展開が期待できる。

文献

- 1) Togari, A., Arai, M.: Pharmacological topics of bone metabolism: the physiological function of the sympathetic nervous system in modulating bone resorption. *J. Pharmacol. Sci.*, 106, 542-546, 2008
- 2) Lerner, U.H., Persson, E.: Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.*, 8, 154-165, 2008
- 3) Kondo, A., Togari, A.: In vivo stimulation of sympathetic nervous system modulates osteoblastic activity in mouse calvaria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 285, E661-667, 2003
- 4) Moore, R.E., Smith, C.K. 2nd, Bailey CS, Voelkel EF, Tashjian AH Jr: Characterization of beta-adrenergic receptors on rat and human osteoblast-like cells and demonstration that beta-receptor agonists can stimulate bone resorption in organ culture. *Bone Miner.*, 23, 301-315, 1993
- 5) Kondo, A., Mogi, M., Koshihara, Y., Togari, A.: Signal transduction system for interleukin-6 and interleukin-11 synthesis stimulated by epinephrine in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 61, 319-326, 2001
- 6) Arai, M., Sato, T., Takeuchi, S., Togari, A.: Dose effects of butoxamine, a selective β 2-adrenoceptor antagonist, on bone metabolism in spontaneously hypertensive rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 701, 7-13, 2013
- 7) Sisask, G., Silfverswård, C.J., Bjurholm, A., Nilsson,

- O.: Ontogeny of sensory and autonomic nerves in the developing mouse skeleton. *Auton. Neurosci.*, 177, 237-243, 2013
- 8) Fukuda, A., Goto, T., Kuroishi, K.N., Gunjigake, K.K., Kataoka, S., Kobayashi, S., Yamaguchi, K.: Hemokinin-1 competitively inhibits substance P-induced stimulation of osteoclast formation and function. *Neuropeptides*, 47, 251-259, 2013
- 9) Takahashi, K., Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676, 2006
- 10) Li, F., Bronson, S., Niyibizi, C.: Derivation of murine induced pluripotent stem cells (iPS) and assessment of their differentiation toward osteogenic lineage. *J. Cell. Biochem.*, 109, 643-652, 2010
- 11) Bilousova, G., Jun, du H., King, K.B., De Langhe, S., Chick, W.S., Torchia, E.C., Chow, K.S., Klemm, D.J., Roop, D.R., Majka, S.M.: Osteoblasts derived from induced pluripotent stem cells form calcified structures in scaffolds both in vitro and in vivo. *Stem Cells*, 29, 206-216, 2011
- 12) Bjurholm, A., Kricbergs, A., Brodin, E., Schultzberg, M.: Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides*, 9, 165-171, 1988
- 13) Bjurholm, A., Kricbergs, A., Terenius, L., Goldstein, M., Schultzberg, M.: Neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in bone and surrounding tissues. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 25, 119-125, 1988
- 14) Mach, D.B., Rogers, S.D., Sabino, M.C., Luger, N.M., Schwei, M.J., Pomonis, J.D., Keyser, C.P., Clohisy, D.R., Adams, D.J., O'Leary, P., Mantyh, P.W.: Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience*, 113, 155-166, 2002
- 15) Takeda, S., Eleftheriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducy, P., Karsenty, G.: Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, 111, 305-317, 2002
- 16) Eleftheriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannon, T.W., Noda, M., Clement, K., Vaisse, C., Karsenty, G.: Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*, 434, 514-520, 2005
- 17) Kajimura, D., Hinoi, E., Ferron, M., Kode, A., Riley, K.J., Zhou, B., Guo, X.E., Karsenty, G.: Genetic determination of the cellular basis of the sympathetic regulation of bone mass accrual. *J. Exp. Med.*, 208, 841-851, 2011
- 18) Shi, Y., Oury, F., Yadav, V.K., Wess, J., Liu, X.S., Guo, X.E., Murshed, M., Karsenty, G.: Signaling through the M(3) muscarinic receptor favors bone mass accrual by decreasing sympathetic activity. *Cell Metab.*, 11, 231-238, 2010
- 19) Lundberg, P., Boström, I., Mukohyama, H., Bjurholm, A., Smans, K., Lerner, U.H.: Neuro-hormonal control of bone metabolism: vasoactive intestinal peptide stimulates alkaline phosphatase activity and mRNA expression in mouse calvarial osteoblasts as well as calcium accumulation mineralized bone nodules. *Regul. Pept.*, 85, 47-58, 1999
- 20) Bo, Y., Yan, L., Gang, Z., Tao, L., Yinghui, T.: Effect of calcitonin gene-related peptide on osteoblast differentiation in an osteoblast and endothelial cell co-culture system. *Cell. Biol. Int.*, 36, 909-915, 2012
- 21) Goto, T., Nakao, K., Gunjigake, K.K., Kido, M.A., Kobayashi, S., Tanaka, T.: Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. *Neuropeptides*, 41, 25-31, 2007
- 22) Fukuda, T., Takeda, S., Xu, R., Ochi, H., Sunamura, S., Sato, T., Shibata, S., Yoshida, Y., Gu, Z., Kimura, A., Ma, C., Xu, C., Bando, W., Fujita, K., Shinomiya, K., Hirai, T., Asou, Y., Enomoto, M., Okano, H., Okawa, A., Itoh, H.: Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations. *Nature*, 497, 490-493, 2013
- 23) Togari, A., Arai, M., Mizutani, S., Mizutani, S., Koshihara, Y., Nagatsu, T.: Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci. Lett.*, 233, 125-128, 1997
- 24) Goto, T., Yamaza, T., Kido, M.A., 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
- 26) Goto, T., Yamaza, T., Kido, M.A., Tanaka, T.: Substance P activates osteoclast formation and osteoclastic bone resorption through the neurokinin-1

- receptor. *Acta Histochem. Cytochem.*, 34, 31-38, 2001
- 27) Nagao S, Goto T, Kataoka S, Toyono T, Joujima T, Egusa H, Yatani H, Kobayashi S, Maki K. Expression of neuropeptide receptor mRNA during osteoblastic differentiation of mouse iPS cells. *Neuropeptides*, 48, 399-406, 2014
- 28) Stevenson, J.C., Macdonald, D.W., Warren, R.C., Booker, M.W., Whitehead, M.I.: Increased concentration of circulating calcitonin gene related peptide during normal human pregnancy. *Br. Med. J.*, 293, 1329-1330, 1986
- 29) Gangula, P.R., Wimalawansa, S.J., Yallampalli, C.: Pregnancy and sex steroid hormones enhance circulating calcitonin gene-related peptide concentrations in rats. *Hum. Reprod.*, 15, 949-953, 2000