

## LPS의 파골세포 분화 유도에 미치는 PDE4 저해제의 증강효과

노아롱새미 · 천링 · 임미정\*

숙명여자대학교 약학대학

(Received November 15, 2007; Revised December 6, 2007)

### The Effect of PDE4 Inhibitor on LPS-Induced Osteoclastogenesis

A Long Sae Mi No, Ling Chen and Mijung Yim\*

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

**Abstract** — To determine the regulatory roles of PDE4 inhibitor on LPS-induced osteoclastogenesis, we investigated the effect of a PDE4 inhibitor on osteoclast formation in the presence of LPS. A specific PDE4 inhibitor, rolipram, increased LPS-induced osteoclast formation in cocultures. To verify that whether rolipram acts indirectly on osteoblasts, we investigated the TRANCE and COX-2 mRNA expression levels in osteoblasts. Treatment of rolipram increased the expression of TRANCE and COX-2 mRNA in osteoblasts stimulated by LPS. On the contrary, rolipram did not augment the number of osteoclasts differentiated from bone marrow cells by LPS. In conclusion, the stimulation of LPS-induced osteoclast formation by the PDE4 inhibitor are attributable to its indirect effect on osteoblasts, not to their direct effect on bone marrow-derived osteoclast precursors.

**Keywords** □ LPS, phosphodiesterase 4 inhibitor, osteoblast, osteoclast

골 항상성은 골형성을 담당하는 조골세포(osteoblast)와 골흡수를 담당하는 파골세포(osteoclast)에 의해 균형이 유지된다. 체내 조골세포와 파골세포는 밀접하게 상호 작용하고 있으며, 파골세포의 분화는 조골세포에 의해 엄격하게 조절된다.<sup>1,2</sup> 즉, 조골세포는 파골세포 분화인자인 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor, 또는 CSF-1) 및 TRANCE(TNF-related activation-induced cytokine, OPGL, ODF, 또는 RANKL)를 통해 파골세포의 분화를 조절하며 이로써 체내 골형성과 골흡수의 동적인 평형을 유지한다.<sup>2-5</sup>

파골세포의 분화 촉진은 골흡수를 이상 활성화시켜 골손실을 유도하는데, 그 발병 원인은 하나로 염증 반응을 들 수 있다. 치주염, 골수염 및 관절염 등의 염증성 질환에 수반하는 골손실의 주요 원인으로 그람 음성균의 세포벽 주요 성분인 lipopolysaccharide(LPS)가 제안되었다.<sup>6</sup> LPS에 의한 골손실의 증가는 그 자세한 기전이 밝혀지지 않았으나, LPS가 조골세포에서 toll-like receptor 4(TLR4)를 통한 신호를 매개하여 골흡수에 관여

하는 interleukin-1(IL-1), IL-6, granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF), prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), 그리고 nitric oxide(NO) 등의 분비를 촉진하는 것은 분명하다.<sup>7</sup> 특히 LPS는 표적세포에서 cyclooxygenase-2(COX-2) 발현을 통해 PGE<sub>2</sub> 생성을 유발한다.<sup>8</sup> PGE<sub>2</sub>는 4개의 서로 다른 수용체 EP1, 2, 3, 4에의 결합을 통해 생물학적 작용을 나타내는데 EP4 결손 마우스에서는 LPS에 의한 파골세포 분화가 감소하였으며, LPS 투여시 골흡수가 증가되지 않음이 보고된 바 있다.<sup>9</sup> 이러한 결과들은 PGE<sub>2</sub>가 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 LPS에 의한 파골세포 분화에 중요한 인자임을 보여주는 것이다. 한편 PGE<sub>2</sub>는 그 자체가 골항상성의 중요한 조절자로 cyclic AMP(cAMP)-protein kinase A(PKA) 활성화를 통해 파골세포 분화를 촉진함이 알려져 있다.<sup>10</sup>

본 연구자는 cAMP 분해 효소인 phosphodiesterase(PDE) 저해제가 조골세포내 PGE<sub>2</sub> 생성을 통해 파골세포 분화를 촉진함을 보고한 바 있다.<sup>11</sup> PDE는 adenylate cyclase에 의해 합성된 cAMP를 5'-AMP로 분해시킴으로서 세포내 cAMP 농도를 조절한다.<sup>12,13</sup> 지금까지 PDE family는 PDE1에서 11가지의 isozyme이 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 그 중 PDE4의 역할이 중요시됨에 따라 PDE4 저해제의 생리·병리학적 활성에 대해서도 많

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-710-9572 (팩스) 02-710-9871  
(E-mail) myim@sookmyung.ac.kr

은 연구가 이뤄졌다.<sup>12,13</sup> 특히 최근 LPS의 활성을 매개하는 PDE4의 역할이 규명됨에 따라 LPS와 PDE4 저해제의 상호 작용이 다양한 세포에서 보고되고 있다.<sup>14,15</sup> 그러나 아직 LPS와 PDE4 저해제의 파골세포 분화에 관한 연구는 보고된 바 없다. 이에 본 연구자는 LPS와 PDE4 저해제가 파골세포 분화에 미치는 영향을 조사하여 일련의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험 방법

### 마우스 조골세포의 초기 배양

생후 0~1일의 ICR mouse로부터 두개골 피부를 벗긴 후 두개골을 적출하였다. 이때 후두골 근육 부착부분은 제거하였다. 부착된 근육, 혈구 등을 제거한 후  $\alpha$ -MEM으로 가볍게 세척하였다. 0.1% collagenase와 0.2% dispase 혼합효소 용액에 넣어 37°C에서 5분간 진탕시킨 후 상등액을 버리고 새로운 효소 용액을 가하였다. 37°C에서 약 10분간 진탕하여 상등액을 모으는 조작을 4회 반복하였다. 원심 분리한 후 10% FBS 함유  $\alpha$ -MEM으로 약  $3\sim 5 \times 10^4$  세포/100 mm plastic dish가 되도록 접종하였다. 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 3~4일간 배양한 세포를 이후 조골세포로 실험에 사용하였다.

### 마우스 골수세포의 배양

ICR mouse(6~9주, 수컷)를 경추 탈골한 후 70% 에탄올로 소독하였다. 경골 부분의 피부를 절개하여 부착 근육을 떼어냈다. 경골 원심부를 절단하고 슬개골을 탈골시켜 경골을 적출하였다. 뼈 양끝을 조금 잘라 한 쪽 끝에 25G의 주사바늘을 꽂고  $\alpha$ -MEM을 흘려보내 골수세포를 시험관에 모았다. 원심 분리한 후  $\alpha$ -MEM에 현탁하고 2배의 Gey's solution을 가해 적혈구를 제거했다. 원심 분리한 후 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM으로 재현탁했다.

### 파골세포의 분화유도

초기 배양한 조골세포  $5 \times 10^3$  cells/well와 골수세포  $1 \times 10^5$  cells/well을 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM으로 LPS 20 ng/ml 존재하에서 공배양했다. 또는 RAW 264.7 세포를 TRANCE 50 ng/ml 존재하에서 36시간 배양 후 LPS 20 ng/ml을 첨가해 2일간 추가 배양했다. 배양이 끝난 세포는 10% formalin으로 10분간 고정한 후 ethanol-aceton(1:1)로 1분간 재고정하여 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) staining을 했다. 3개 이상의 핵을 가진 TRAP+ 세포를 다핵 파골세포로 판정했다.

### cAMP 측정

초기배양 마우스 조골세포를 LPS, rolipram 또는 두 시약으로 1시간 처리한 후 회수하여 세포내 cAMP의 양을 cAMP Biotrak

Enzyme immunoassay(Amersham Biosciences, USA)로 측정하였다.

### Northern blot 분석

초기배양 마우스 조골세포를 LPS, rolipram 또는 두 시약으로 처리하여 1시간 또는 3시간 배양한 후, total RNA를 Trizol reagent(Invitrogen)로 회수하였다. Total RNA 20  $\mu$ g을 1.2% agarose-formaldehyde gel로 전기영동한 후 nylon membrane filter에 이동시켰다(Hybond N+, Amersham Biosciences). membrane을 <sup>32</sup>P로 표지한 cDNA probe와 반응시킨 후 세척액으로 세척하고, -70°C에서 x-ray 필름에 노출시켰다.

### 통계처리

실험결과는 평균값+표준편차로 표기하였고, Student's t-test로 분석하여 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 실험 결과 및 고찰

### 공배양계에서 PDE 저해제가 LPS의 파골세포 형성에 미치는 영향

일정 농도의 LPS는 공배양계에서 TRAP+ 다핵 파골세포를 분화 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>16</sup> 먼저 초기 배양한 마우스 조골세포와 골수세포의 공배양계를 이용하여 PDE 저해제가 LPS에 의한 파골세포 분화에 미치는 효과를 조사하였다. 사용한 LPS 20 ng/ml은 공배양계에서 다핵의 파골세포는 형성하지 않았으나 단핵의 파골세포를 형성하였다. 비특이적 PDE 저해제인 isobutylmethylxanthine(IBMX)의 첨가는 LPS 단독처리보다 다핵의 파골세포 형성을 증가시켰으며(Fig. 1A), 이는 PDE4 특이적 저해제인 rolipram의 첨가로도 동일한 효과를 보였다(Fig. 1B).

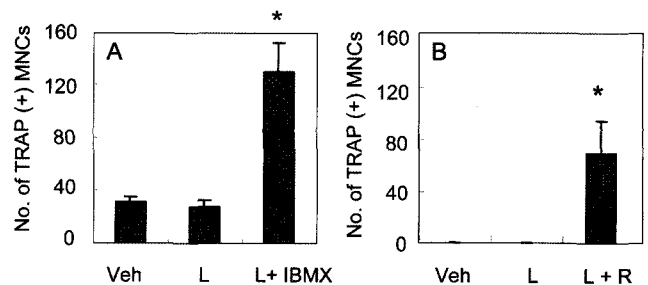


Fig. 1 - Effects of IBMX and rolipram on LPS-induced osteoclast formation in coculture system. Mouse bone marrow cells and calvarial osteoblasts were co-cultured in the presence or absence of 20 ng/ml LPS with/without 10 mM IBMX (A) or rolipram (B) for 6 days. Cells were then fixed and stained for TRAP. TRAP-positive (+) multinucleated cells (MNCs) were counted. Data are expressed as the mean+SD of triplicate cultures. \*:  $p < 0.05$  compared with the vehicle. Veh: Vehicle, L: LPS, R: Rolipram.

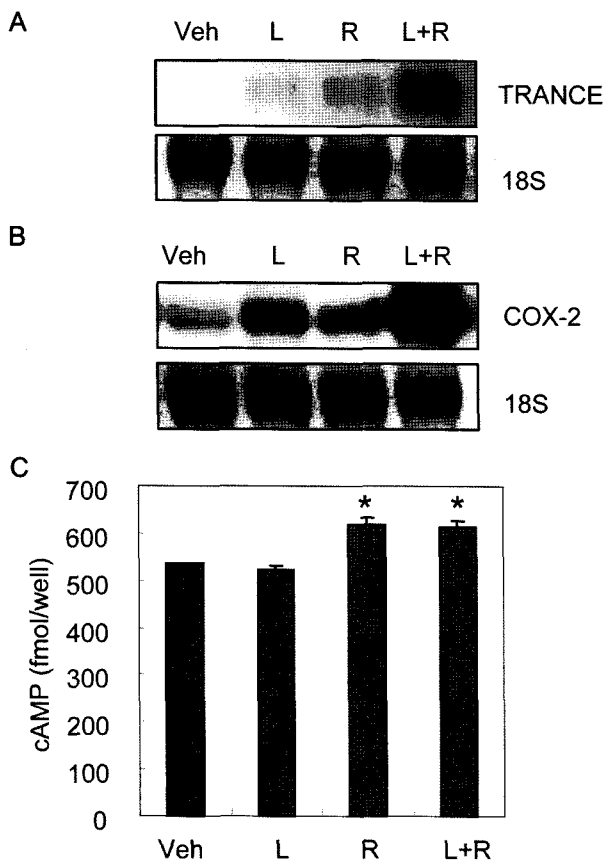
이상의 결과는 공배양계에서 LPS에 의한 파골세포 형성에 PDE 저해제, 특히 PDE4 저해제가 상승적으로 작용함을 의미한다.

### LPS의 조골세포내 TRANCE 및 COX-2 발현에 미치는 PDE4 저해제의 영향

LPS는 조골세포에 대한 간접적인 작용과 파골세포 전구세포에 대한 직접적인 작용을 통해 파골세포 분화를 조절한다.<sup>16,17</sup> 공배양계에서 LPS에 대한 PDE4 저해제의 파골세포 분화 증강 효과는 PDE4 저해제가 조골 또는 파골세포 전구세포에 작용해 LPS의 효과를 증강시켰을 가능성이 있다. 따라서 LPS에 대한 PDE4 저해제 rolipram의 상승적 효과가 조골세포에 대한 간접적 작용인지 또는 파골세포 전구세포에 대한 직접적인 작용인지 각각의 세포를 사용해 알아보았다. 먼저 PDE4 저해제의 조골세포에 대한 작용을 northern blotting 방법으로 조사하였다. LPS와 rolipram은 각각 조골세포에서 파골세포의 분화 인자인

TRANCE의 발현을 촉진함으로써 간접적으로 파골세포 분화를 유도한다.<sup>11,16</sup> 보고된 것과 동일하게 LPS와 rolipram은 각각 조골세포에서 3시간 처리시 TRANCE mRNA 발현을 유도하였다 (Fig. 2A). 또한 LPS와 rolipram의 병용 처리는 동일 시간대 TRANCE mRNA 발현을 급격히 증가시키는 것을 알 수 있다 (Fig. 2A). LPS와 rolipram은 각각 COX-2 발현에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성 증가를 통해 TRANCE 발현을 유도함이 보고된 바 있다.<sup>11,16</sup> 따라서 LPS와 rolipram의 병용 처리에 의한 TRANCE 발현 증강 역시 COX-2 발현 증강을 매개했을 가능성이 있다. 초기 배양한 조골세포를 각각의 시약으로 1시간 처리후 northern blotting으로 COX-2 mRNA 발현을 조사하였다. TRANCE mRNA 발현과 동일하게 LPS와 rolipram은 각각 조골세포내 COX-2 발현을 유도하였으며, 두 시약의 병용 처리에 의해 그 발현이 크게 증가함을 알 수 있다(Fig. 2B). 따라서 LPS와 rolipram에 의한 TRANCE mRNA 발현 증가는 COX-2 mRNA 발현을 증강시킴으로써 유발된 것으로 예상된다. LPS와 rolipram의 TRANCE 발현 유도에 관여하는 COX-2의 역할은 추후 NS398 등의 COX-2 특이적 저해제나 siRNA를 사용한 실험으로 보다 정확히 규명될 것으로 기대된다.

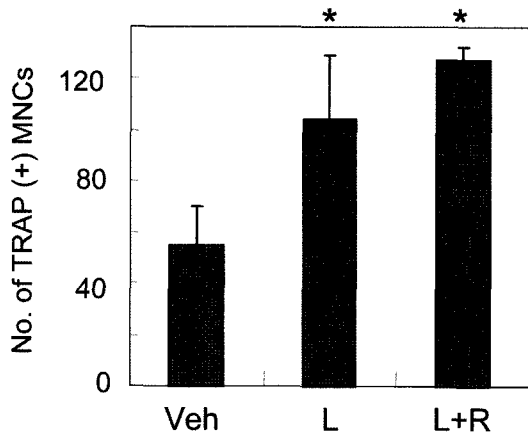
한편, rolipram은 PDE4에 의한 cAMP의 분해를 억제함으로써 세포내 cAMP의 농도를 증가시킨다.<sup>12,13</sup> 따라서 LPS와 rolipram의 TRANCE 및 COX-2 mRNA 발현 증가가 조골세포내 cAMP의 농도 증가를 매개한 것인지 조사하였다. 조골세포를 각각의 시약으로 처리해 1시간 후의 cAMP 농도를 측정하였다. LPS는 세포내 cAMP 농도를 변화시키지 않았으며 rolipram은 cAMP 농도를 상승시켰다(Fig. 2C). 그러나 LPS와 rolipram을 병용 처리했을 때 rolipram 단독 처리에 비해 조골세포내 cAMP 농도가 큰 변화를 보이지 않는 것으로 보아 LPS와 rolipram의 파골세포 형성에 대한 상승적 효과는 조골세포내 cAMP를 매개하지 않는 것으로 추정되었다(Fig. 2C). 그러나 이상의 결과는 LPS와 rolipram 처리 1시간 후의 cAMP 농도를 측정했기므로, 장시간 후의 cAMP 농도가 변화할 가능성은 여전히 존재하며 이는 추가적인 실험을 통해 규명해야 할 부분이다.



**Fig. 2** – Effects of rolipram on osteoblasts. Calvarial osteoblasts were incubated in the presence or absence of 20 ng/ml LPS with/without 10  $\mu$ M rolipram. The expression of TRANCE mRNA (A) and COX-2 mRNA (B) were analyzed by northern blotting assay, and the concentration of intracellular cAMP (C) were measured by EIA. \*:  $p < 0.05$  compared with the vehicle. Veh: Vehicle, L: LPS, R: Rolipram.

### 파골 전구세포에서 PDE4 저해제가 LPS의 작용에 미치는 영향

다음은 파골 전구세포에서 PDE4 저해제가 LPS의 작용에 미치는 영향을 조사하였다. 파골 전구세포는 M-CSF 및 TRANCE 처리로 세포의 증식, 분화, 융합 과정을 거쳐 성숙한 다핵 파골세포로 분화된다. 이 과정에서 LPS는 TRANCE에 비존존적으로 파골세포의 융합을 촉진해 다핵 파골세포의 형성을 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>18</sup> 먼저 단구/대식세포 계열의 RAW264.7 세포를 파골 전구세포로 사용해 LPS의 효과를 확인하였다. TRANCE로 36시간 자극 후 LPS를 처리하였을 때 미처리 세포에서는 단핵 세포가 다량 형성된 것에 반해 LPS 처리 세포는 다



**Fig. 3** - Effects of rolipram on LPS-induced osteoclast formation in bone marrow cultures. Mouse bone marrow cells were cultured with M-CSF for 12 h and the nonadherent cells were then harvested and cultured with M-CSF. After 3 days of culturing, the cells were further cultured with TRANCE for 36 hrs, and then incubated in the presence or absence of 20 ng/ml LPS with/without 10  $\mu$ M rolipram for an additional 2 days. The cells were fixed and stained for TRAP. TRAP-positive cells with more than three nuclei were counted as MNCs. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate cultures. \*:  $p < 0.05$  compared with the vehicle. Veh: Vehicle, L: LPS, R: Rolipram.

핵 파골세포의 형성을 촉진한 것이 관찰되었다(Fig. 3). 동일한 세포를 사용해 PDE4 저해제 처리가 LPS의 작용에 미치는 영향을 조사하였다. Rolipram 병용 처리시 LPS의 다핵 파골세포 형성 효과는 크게 변화하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이상의 결과는 공배양 세포계에서 PDE4 저해제에 의한 LPS의 파골세포 형성 촉진이 파골세포 전구세포에 대한 작용과는 무관하게 주로 조골세포에서의 TRANCE 발현 증가에 기인하는 것을 의미한다.

최근의 보고에 의하면 PDE4 저해제가 난소적출에 의한 골손실 마우스 모델에서 골밀도를 회복시키는 것으로 나타났으며, 따라서 PDE4 저해제를 새로운 골손실 치료제로 개발하고자 하는 노력이 시도되고 있다.<sup>19)</sup> 이는 *in vivo* 상에서 PDE4 저해제의 투여시 골손실 촉진 효과보다 골형성 촉진 효과가 우세해 나타난 결과로 추정되어진다. 그러나 아직 PDE4 저해제의 골형성에 미치는 영향 및 그 작용기전은 충분히 밝혀지지 않았다. 또한 골손실을 유발하는 원인은 다양하여 본 연구에서 밝힌 바와 같이 염증성 골손실에서는 PDE4 저해제의 투여가 LPS의 골손실 효과를 증강시킬 가능성이 있다. 따라서 향후 PDE4 저해제의 골손실 치료제 약물 개발을 위해서는 다양한 골손실 모델 동물을 이용한 효과 및 작용기전의 규명이 필요하다.

## 결 론

본 연구에서는 PDE4 저해제인 rolipram을 사용하여 LPS에

의한 파골세포 분화 유도에 미치는 효과를 알아보았다. 본 연구 결과, rolipram은 초기 배양한 마우스 조골세포와 골수세포의 공배양계에서 LPS에 의한 파골세포 형성을 촉진하는 것으로 나타났다. 이는 rolipram이 LPS의 조골세포내 TRANCE와 COX-2 mRNA 발현을 증강시킨 결과이며, 조골세포내 cAMP 생성 증강 효과는 없었다. 또한 rolipram은 LPS의 파골세포 전구세포에 대한 다핵 파골세포 형성 효과에는 상승적으로 작용하지 않는 것으로 밝혀져, 공배양계에서의 LPS와 rolipram의 파골세포 형성 촉진은 주로 조골세포에 대한 간접적 작용에 기인하는 것으로 밝혀졌다.

## 감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J. and Suda, T. : Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123**, 2600 (1988).
- 2) Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T. and Martin, T. J. : Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* **20**, 345 (1999).
- 3) Wong, B. R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F. S. 3rd, Frankel, W. N., Lee, S. Y. and Choi, Y. : TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 25190 (1997).
- 4) 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. : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3597 (1998).
- 5) Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. and Boyle, W. J. : Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165 (1998).
- 6) Nair, S. P., Meghji, S., Wilson, M., Reddi, K., White, P. and Henderson, B. : Bacterially induced bone destruction:

- mechanisms and misconceptions. *Infect Immun.* **64**, 2371 (1996).
- 7) Wang, P. L. and Ohura, K. : Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and Toll-like receptors. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **13**, 132 (2002).
  - 8) Coon, D., Gulati, A., Cowan, C. and He, J. : The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. *J. Endod.* **33**, 432 (2007).
  - 9) Sakuma, Y., Tanaka, K., Suda, M., Komatsu, Y., Yasoda, A., Miura, M., Ozasa, A., Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Ushikubi, F. and Nakao, K. : Impaired bone resorption by lipopolysaccharide *in vivo* in mice deficient in the prostaglandin E receptor EP4 subtype. *Infect Immun.* **68**, 6819 (2000).
  - 10) Kaji, H., Sugimoto, T., Kanatani, M., Fukase, M., Kumegawa, M. and Chihara, K. : Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity via osteoblasts: role of cAMP-dependent protein kinase. *J. Bone Miner. Res.* **11**, 62 (1996).
  - 11) Park, H., Young Lee, S., Lee, D. S. and Yim, M. : Phosphodiesterase 4 inhibitor regulates the TRANCE/OPG ratio via COX-2 expression in a manner similar to PTH in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 178 (2007).
  - 12) Essayan, D. M. : Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 671 (2001).
  - 13) Bender, A. T. and Beavo, J. A. : Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol. Rev.* **58**, 488 (2006).
  - 14) Jin, S. L., Lan, L., Zoudilova, M. and Conti, M. : Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages. *J. Immunol.* **175**, 1523 (2005).
  - 15) Lagente, V., Martin-Chouly, C., Boichot, E., Martins, M. A. and Silva, P. M. : Selective PDE4 inhibitors as potent anti-inflammatory drugs for the treatment of airway diseases. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **100**, Suppl 1:131 (2005).
  - 16) Suda, K., Udagawa, N., Sato, N., Takami, M., Itoh, K., Woo, J. T., Takahashi, N. and Nagai, K. : Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E<sub>2</sub> is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J. Immunol.* **172**, 2504 (2004).
  - 17) Itoh, K., Udagawa, N., Kobayashi, K., Suda, K., Li, X., Takami, M., Okahashi, N., Nishihara, T. and Takahashi, N. : Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J. Immunol.* **170**, 3688 (2003).
  - 18) Suda, K., Woo, J. T., Takami, M., Sexton, P. M. and Nagai, K. : Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF-alpha, IL-1, and RANKL. *J. Cell Physiol.* **190**, 101 (2002).
  - 19) Yao, W., Tian, X. Y., Chen, J., Setterberg, R. B., Lundy, M. W., Chmielewski, P., Froman, C. A. and Jee, W. S. : Rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, prevented cancellous and cortical bone loss by inhibiting endosteal bone resorption and maintaining the elevated periosteal bone formation in adult ovariectomized rats. *J. Musculoskelet Neuronal Interact.* **7**, 119 (2007).