

**Kanabinoidné receptory ako cieľ liečby
osteoporózy: Príbeh dvoch terapií
(Voľný preklad)**

Autori:

Aymen I Idris

Publikované:

Online 8.9.2010

Originálny článok dostupný na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3001217/>

Kanabinoidné receptory ako cieľ liečby osteoporózy: Príbeh dvoch terapií

Abstrakt

Centrálny nervový systém hrá dôležitú úlohu pri regulácii metabolizmu kostí v zdraví a pri chorobách, pričom sa uvádza, že množstvo neurotransmiterov ovplyvňuje aktivitu kostných buniek prostredníctvom centrálného relé. V súlade s tým nedávne štúdie preukázali, že endokanabinoidy a ich receptory sa podieľajú na patogenéze osteoporózy. Endokanabinoidy anandamid a 2-arachidonylglycerol sa nachádzajú v kostre a početné štúdie tiež ukázali, že kostné bunky exprimujú kanabinoidné receptory CB1 a CB2 a sirotsky receptor GPR55. Farmakologická a genetická inaktivácia CB1, CB2 a GPR55 u dospelých myší potláča kostnú resorpciu, zvyšuje kostnú hmotu a chráni pred stratou kostnej hmoty, čo naznačuje, že inverzné agonisty/antagonisty týchto receptorov môžu slúžiť ako antiresorpčné činidlá. V starnúcej kostre však receptory CB1 a CB2 majú ochranný účinok proti strate kostnej hmoty závislej od veku u samcov aj samíc myší. Nedostatok receptora CB1 u starých myší vedie k zrýchlenej osteoporóze závislej od veku v dôsledku výrazného zvýšenia kostnej resorpcie a významného zníženia tvorby kosti spojenej so zvýšenou akumuláciou adipocytov v kompartmente kostnej drene. Podobné zrýchlenie úbytku kostnej hmoty bolo hlásené aj u myší s deficitom CB2 podobného veku, ale zistilo sa, že súvisí so zvýšeným kostným obratom. Táto recenzia sumarizuje Nedostatok receptora CB1 u starých myší vedie k zrýchlenej osteoporóze závislej od veku v dôsledku výrazného zvýšenia kostnej resorpcie a významného zníženia tvorby kosti spojenej so zvýšenou akumuláciou adipocytov v kompartmente kostnej drene. Podobné zrýchlenie úbytku kostnej hmoty bolo hlásené aj u myší s deficitom CB2 podobného veku, ale zistilo sa, že súvisí so zvýšeným kostným obratom. Táto recenzia sumarizuje Nedostatok receptora CB1 u starých myší vedie k zrýchlenej osteoporóze závislej od veku v dôsledku výrazného zvýšenia kostnej resorpcie a významného zníženia tvorby kosti spojenej so zvýšenou akumuláciou adipocytov v kompartmente kostnej drene. Podobné zrýchlenie úbytku kostnej hmoty bolo hlásené aj u myší s deficitom CB2 podobného veku, ale zistilo sa, že súvisí so zvýšeným kostným obratom. Táto recenzia sumarizuje in vitro a in vivo zistenia týkajúce sa vplyvu kanabinoidných ligandov na metabolizmus kostí a argumentujú v prospech využitia kanabinoidných receptorov ako cieľov pre anabolickú aj antiresorpčnú terapiu na liečbu komplexných mnohostranných ochorení kostí, ako je osteoporóza.

Kľúčové slová: Kanabinoid, osteoporóza, kosť, antiresorpčné, anabolické, Rimonabant © , CB1, CB2, GPR55.

Úvod

Endokanabinoidný systém je komplexná sieť endogénnych ligandov, membránových receptorov a metabolizujúcich enzýmov (prehľad v [1]). Kanabinoidy prejavujú množstvo farmakologických reakcií v cicavčích bunkách a je známe, že ich receptory sa podieľajú na regulácii mnohých fyziologických procesov vrátane neurotransmisie, vnímania bolesti, učenia, pamäte, kardiovaskulárnej homeostázy, chuti do jedla, motorických funkcií a imunitnej odpovede (prehľad v [1 - 3]). Endokanabinoidné ligandy anandamid (AEA) a 2-arachidonylglycerol (2-AG) sú zodpovedné za väčšinu farmakologických účinkov spojených s kanabinoidnými receptormi v bunkách cicavcov (prehľad v [4]). AEA a 2-AG sú vysoko exprimované v mozgu a sú tiež detekované v mnohých periférnych tkanivách vrátane srdca, pečene, obličiek, semenníkov a krvi [5-12]. Kanabinoidné receptory sú aktivované aj kanabinoidmi získanými

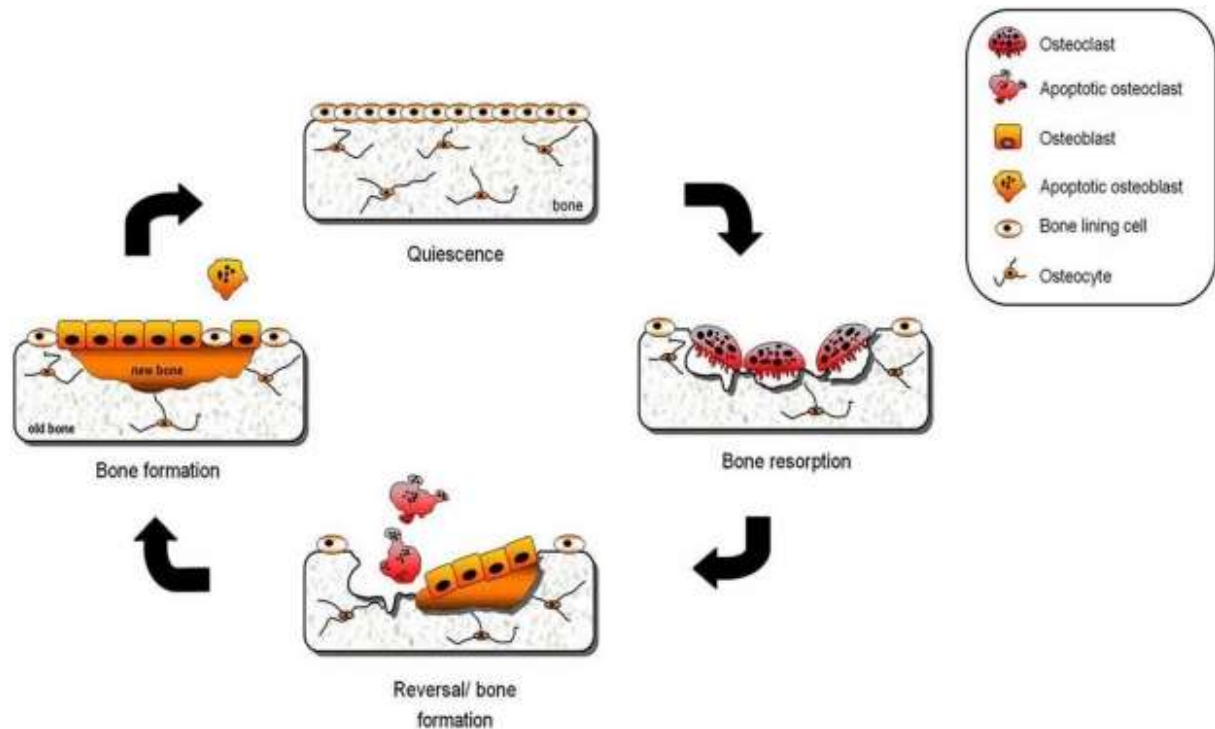
z rastlín (fytokanabinoidy), ako je Δ^9 - tetrahydrokanabinol (Δ^9 - THC) a množstvom syntetických neklasických kanabinoidov, ako sú CP55,940, JWH133 a HU308 [4]. Množstvo syntetických zlúčenín vrátane SR141716A (tiež známeho ako Rimonabant ©), AM251 a AM630 je opísaných ako inverzné agonisty/antagonisty vzhľadom na ich schopnosť down-regulovať aktivitu kanabinoidných receptorov v prítomnosti a neprítomnosti väzby agonistu [13-21]. Endokanabinoidy a ich syntetické analógy viažu a aktivujú dva známe kanabinoidné receptory: CB1 a CB2, pričom oba sú členmi rodiny receptorov spojených s G-proteínom [22 , 23]. Receptory CB1 a CB2 sú spojené s adenyllycyklázou a cyklickým adenosínmonofosfátom (cAMP) spolu s množstvom ďalších druhých poslov vrátane fosfolipázy C, PI3 kinázy/Akt a syntézy ceramidov [24 - 28]. Kanabinoidné receptory typu 1 (CB1) sú exprimované hlavne v mozgu, zatiaľ čo kanabinoidné receptory typu 2 (CB2) sa nachádzajú na periférii prevažne na bunkách imunitného systému [29 , 30]. Nedávne štúdie však uvádzajú, že množstvo ďalších tkanív, orgánov a buniek vrátane kostných buniek a adipocytov tiež exprimuje receptory CB1 a CB2 [31 , 32]. Nedávne zistenia tiež naznačujú, že „orphan“ receptor spojený s G proteínom GPR55 môže predstavovať tretí kanabinoidný receptor [33 , 34]. GPR55 je exprimovaný prevažne v mozgu, ale nachádza sa aj v periférnych tkanivách, ako je slezina [35]. Kanabinoidné ligandy, najmä AEA, sú tiež známe tým, že aktivujú ďalšie ciele, ako je vaniloidný receptor typu 1 s potenciálom prechodného receptora ligandom (TRPV1) [36].

Endokanabinoidy a ich receptory ovplyvňujú diferenciáciu, prežívanie a funkciu kostných buniek. Nami a inými identifikácia úlohy receptorov CB1 a CB2 v kostnej hmote naznačuje, že farmakologická modulácia týchto receptorov je schopná potlačiť nadmernú stratu kostnej hmoty, ktorá je charakteristickým znakom rôznych ochorení kostí vrátane osteoporózy. Nedávno sa ukázalo, že ďalšie receptory a kanály úzko súvisiace s endokanabinoidným systémom – menovite TRPV1 a GPR55 – sa tiež podieľajú na regulácii aktivity kostných buniek a kostnej hmoty. Spolu s predchádzajúcimi zisteniami

Remodelácia kostí

Kosť je na bunky bohaté, metabolicky aktívne a špecializované spojivové tkanivo, ktoré neustále prechádza procesom obnovy a opravy známym ako „remodelácia kostí“. Remodelácia kostí je vysoko koordinovaná rôznymi hormónmi, cytokínmi a peptidmi a je rozdelená do štyroch štádií, resorpcia kosti, reverzná fáza, tvorba kosti a fáza pokoja (obr.11). Resorpcia kosti je proces, pri ktorom sa stará kosť odstraňuje osteoklastom; veľká, mnohojadrová, pohyblivá a vysoko špecializovaná bunka hematopoetického pôvodu [37]. Po chemických stimuloch, mikropoškodení alebo mechanickom strese migrujú zrelé osteoklasty a ich prekursori na miesto, ktoré sa má resorbovať mechanizmom, ktorý ešte nie je úplne objasnený. Niekoľko výskumníkov navrhlo, aby osteocyty zabudované do kostnej matrice cítili potrebu remodelácie a inštruovali kosť tvoriace osteoblasty, aby vylučovali kolagenázy, ktoré odstraňujú nemineralizovanú maticu a smerujú zrelé osteoklasty a ich prekursori do miesta remodelácie [38 , 39]. Tvorba a aktivita osteoklastov je riadená kombinovaným pôsobením receptorového aktivátora ligandu jadrového faktora kappa-B (RANKL) [40], osteoprotegerínu (OPG) [41] a faktora tvoriaceho monocytové kolónie (M-CSF) [42] produkovaného bunkami osteoblastickej línie. RANKL a M-CSF predstavujú minimálne základné stimulačné cytokíny potrebné na tvorbu osteoklastov za normálnych podmienok, zatiaľ čo OPG je inhibičný [41]. Množstvo resorbovanej kosti je diktované počtom, veľkosťou a dĺžkou života novovytvorených osteoklastov, ktoré úplne závisia od úrovne lokálnych a systémových faktorov, ako je 1,25-(OH) 2 vitamín D3 (VD3) a parathormón (PTH) [4344]. Zrelé osteoklasty podliehajú rýchlej apoptóze a sú rýchlo odstránené fagocytmi, čím signalizujú

reverznú fázu, ktorá predstavuje prechodné obdobie po ukončení resorpcie a pred začiatkom tvorby kosti (prehľad v [45]).



Cyklus prestavby kostí . Po stimule priťahujú osteocyty zabudované v kostnej matrici osteoklasty a ich prekurzory do miesta remodelácie. Zrelé osteoklasty sa najskôr prichytia na povrch kosti a potom resorbujú kostnú matricu (resorpcia kosti). Po resorpcii a apoptóze osteoklastov nastáva reverzná fáza, počas ktorej dochádza k náboru a proliferácii osteoblastov. Úplne diferencovaný osteoblast ukladá osteoid na miesto resorpcie, čím sa iniciuje tvorba kosti. Po tvorbe kosti nasleduje fáza, počas ktorej sa čerstvo položený osteoid mineralizuje a pokryje bunkami kostnej výstelky.

Čerstvá kosť je ukladaná mononukleárnymi osteoblastmi, ktoré pochádzajú z mezenchymálnych osteoprogenitorových buniek nachádzajúcich sa v kostnej dreni (BM) [46]. Mezenchymálne osteoprogenitory sú multipotentné bunky, ktoré sa môžu tiež diferencovať na rôzne typy buniek vrátane adipocytov a chondrocytov [46]. Tvorba kosti je iniciovaná priťahovaním prekurzorov osteoblastov na čerstvo resorbované miesto chemotaktickým transformujúcim rastovým faktorom β (TGF β) a proteínmi kostnej matrice, ako je kolagén typu 1, ktoré sa oba uvoľňujú počas procesu resorpcie [47 , 48]. Množstvo systémových hormónov vrátane PTH, estrogénu a VD 3 je tiež známe, že stimulujú diferenciáciu prekurzorových buniek na zrelé osteoblasty schopné syntézy matrice a tvorby kosti [46]. Priemerná dĺžka života ľudských osteoblastov je tri mesiace, po ktorých približne 65 % fungujúcich osteoblastov podstúpi apoptózu [49]. Zvyšné zrelé osteoblasty sú buď pochované v novo deponovanej matrici ako osteocyty, alebo sa premenia na výstelkové bunky, ktoré pokrývajú väčšinu pokojnej kosti [50].

Abnormálna kostná remodelácia a jej vzťah k osteoporóze

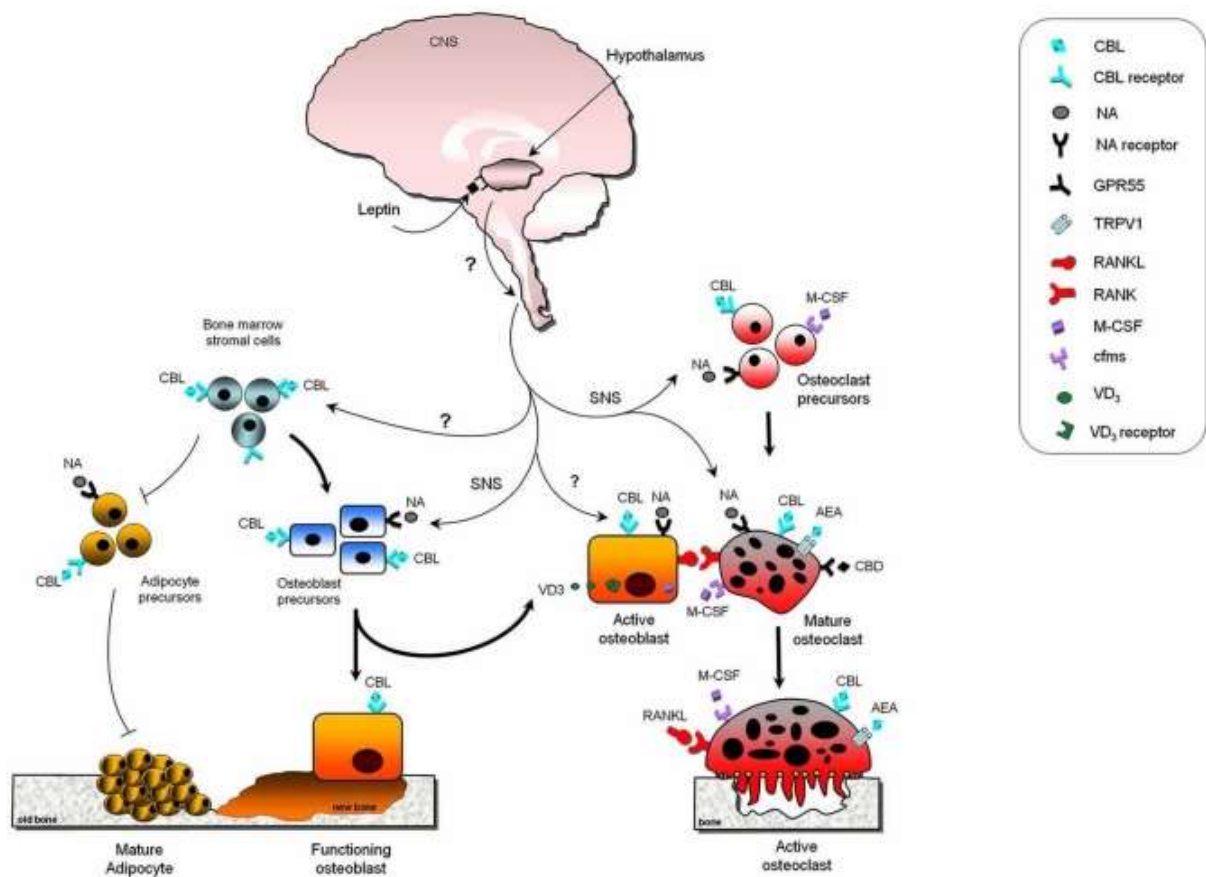
Nerovnováha v tvorbe kostí a kostnej resorpcii spôsobená predovšetkým zmenami lokálnych a systémových faktorov je hlavnou spoločnou príčinou väčšiny – ak nie všetkých – porúch kostí. Osteoporóza je metabolická porucha charakterizovaná rozdielmi v aktivite osteoblastov a osteoklastov, čo vedie k postupnému úbytku kostnej hmoty a zvýšenej krehkosti kostí a riziku zlomenín

(prehľad v [51]). Osteoporotické zlomeniny predstavujú jednu z hlavných príčin morbiditu u starších pacientov v rozvojovom svete [52 – 60]. Najčastejšími príčinami osteoporózy sú nedostatok estrogénu a liečba glukokortikoidmi, pričom obe sú spojené so zvýšenou kostnou resorpciou spojenou s významným znížením tvorby kostí [51]. Pri postmenopauzálnnej osteoporóze je nedostatok estrogénu spojený s dvoma odlišnými fázami úbytku kostnej hmoty charakterizovanými odlišným bunkovým vzorom a správaním [61]. Akútna fáza straty kostnej hmoty, ktorá bezprostredne nasleduje po vysadení estrogénu, je charakterizovaná nadmernou kostnou resorpciou. Je to spôsobené rýchlym nárastom počtu osteoklastov, ktorý je spojený s výrazným zvýšením apoptózy osteocytov a osteoblastov [62 , 63]. Na molekulárnej úrovni je náhly pokles estrogénu spojený so zvýšenými hladinami RANKL a M-CSF spojený s významným poklesom produkcie inhibičných faktorov, ako je OPG [64]. Po tejto fáze nasleduje dlhotrvajúce obdobie trvalého úbytku kostnej hmoty závislej od veku v dôsledku významného zníženia diferenciácie osteoblastov a tvorby kosti spojenej s výrazným zvýšením diferenciácie adipocytov [65 - 67]. Dlhodobá liečba glukokortikoidmi je najčastejšou príčinou sekundárnej osteoporózy (prehľad v [68]). Na bunkovej úrovni glukokortikoidy regulujú tvorbu aj resorpciu kosti inhibíciou diferenciácie osteoblastov a znížením produkcie faktorov, ktoré podporujú tvorbu osteoklastov, ako je RANKL [68 , 69]. Množstvo ďalších porúch skeletu, ako je reumatoidná artritída (prehľad v [70 , 71]) a ochorenia kostí súvisiace s rakovinou (prehľad v [72]) sú tiež charakterizované nadmernou kostnou resorpciou vedúcou k strate kostnej hmoty.

NEURONÁLNE MEDIÁTORY REMODELÁCIE KOSTÍ

Centrálny nervový systém (CNS) hrá dôležitú úlohu pri regulácii prestavby kostí, pričom sa uvádza, že množstvo neurotransmiterov a systémových hormónov ovplyvňuje kostnú hmotu prostredníctvom centrálného relé (tabuľka11) [73 , 74]. Napríklad glutamátové a N-metyl-d-aspartátové receptory sú prítomné na osteoblastoch a osteoklastoch a regulujú kostný obrat stimuláciou diferenciácie a funkcie osteoblastov (prehľad v [75]). Je známe, že oxid dusnatý hrá úlohu pri regulácii kostnej remodelácie na lokálnej úrovni [76], ale nedávne štúdie ukázali, že myši bez neuronálnej syntázy oxidu dusnatého vykazujú vysokú kostnú hmotu v dôsledku nízkeho kostného obratu [77]. Hormóny pochádzajúce z hypofýzy, ako sú hormóny stimulujúce štítnu žľazu a folikuly, sa tiež podieľajú na regulácii kostnej remodelácie ovplyvnením diferenciácie osteoklastov a osteoblastov [78 , 79]. Vzhľadom na to, že kosti cicavcov sú široko inervované sympatickými a zmyslovými nervami [80-83] a je známe, že aktivácia sympatického nervového systému (SNS) reguluje tvorbu a resorpciu kostí [84 , 85] , je rozumné navrhnúť, že rad z týchto faktorov môže regulovať kostný obrat prostredníctvom centrálného relé.

Neuropeptid Y (NPY) je široko exprimovaný v centrálnom a periférnom nervovom systéme. Štúdie ukázali, že špecifická delécia hypotalamických NPY receptorov vedie k fenotypu vysokej kostnej hmoty v dôsledku zvýšenej diferenciácie osteoblastov a tvorby kosti [86], čo potvrdzuje zapojenie CNS do regulácie rastu kostí. Štúdie skúmajúce úlohu hormónu leptínu odvodeného z adipocytov pri remodelácii kostí nedávno priniesli podstatné pokroky v našom chápaní mechanizmov, ktorými centrálny a periférny nervový systém riadi prestavbu kostí (Prehľad v [73 , 74]). Takeda a spol. ukázali, že leptín znížil tvorbu a hmotu kostí prostredníctvom neuronálneho hypotalamického relé zahŕňajúceho inhibíciu β -adrenergných neurónov v sympatickom nervovom systéme (obr.22) [87 , 88]. Neskoršia práca tej istej skupiny dodala, že beta-2-adrenoreceptor nepriamo ovplyvňuje osteoklastickú kostnú resorpciu reguláciou expresie RANKL na osteoblastoch [89]. Nedávno sme našli dôkaz, že farmakologická aktivácia β -adrenergných receptorov môže tiež stimulovať tvorbu osteoklastov priamo pôsobením na prekursorov osteoklastov, čo naznačuje, že β -adrenergné receptory môžu priamo a nepriamo modulovať tvorbu a funkciu osteoklastov (obr.2 2) [90]. Tieto štúdie spolu poskytli dôkazy o takzvanom neurogénom relé, ktoré riadi kostný obrat, a tiež podporili výskum na odhalenie úlohy iných neurotransmiterov pri prestavbe kostí.



Schematické znázornenie súčasného modelu lokálnej a systémovej regulácie diferenciácie a funkcie kostných buniek kanabinoidnými ligandmi. Leptín reguluje kostnú hmotu prostredníctvom neuronálneho hypotalamického relé zahŕňajúceho β -adrenergické neuróny a endokanabinoidný systém v rámci sympatického nervového systému (SNS). Je známe, že noradrenalín zvyšuje stratu kostnej hmoty stimuláciou tvorby a resorpcie osteoklastov. Kanabinoidné receptory pravdepodobne ovplyvňujú hypotalamický účinok leptínu na tvorbu kostí centrálnym relé. Okrem toho zrelé osteoblasty exprimujú receptory CB1 a CB2 a vylučujú AEA a 2-AG, ktoré naopak zvyšujú tvorbu osteoklastov indukovanú RANKL, čím ovplyvňujú spojenie osteoblast-osteoklast. Kanabinoidné ligandy (CBL) sa tiež podieľajú na regulácii prežívania osteoklastov, polarizácia a aktivita pôsobením na receptory CB1 a CB2 exprimované na zreloch osteoklastoch. CBL sú schopné regulovať tvorbu kostí buď priamym pôsobením na receptory CB1 a CB2 na osteoblastoch, alebo nepriamo inhibíciou produkcie katecholamínu noradrenalínu, inhibítora diferenciácie osteoblastov. Agonisty kanabinoidného receptora pôsobiace na receptory CB1 exprimované na stromálnych bunkách BM stimulujú diferenciáciu osteoblastov a inhibujú akumuláciu adipocytov v kostnej dreni. TRPV1 a GPR55 exprimované osteoblastmi a osteoklastmi sú pravdepodobne zodpovedné za niektoré skeletálne pôsobenie AEA a iných kanabinoidných ligandov. Skratka: SNS - sympatický nervový systém; CB – kanabinoid; RANKL - receptorový aktivátor NF κ B ligandu; VD3 – vitamín D3, M-CSF – faktor stimulujúci kolónie makrofágov; cfrms - M-CSF receptor; NA – noreadrenalín; AEA – anandamid; CBD – kanabidiol. Otáznik (?) označuje neznáme faktory.

KOSTROVÝ ENDOKANABINOIDNÝ SYSTÉM

Kanabinoidy a ich receptorová expresia v kostiach

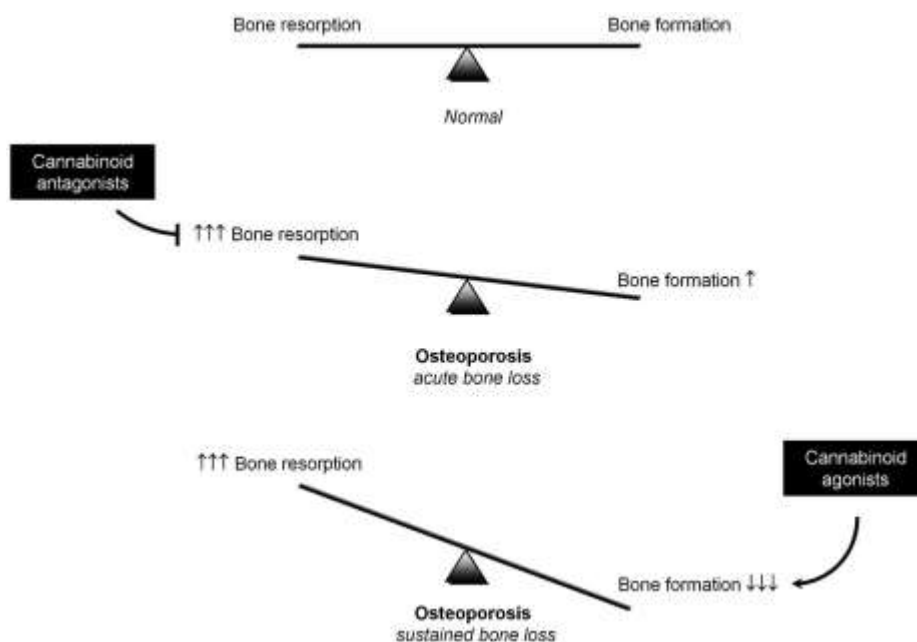
Niekoľko nedávnych štúdií uvádza, že endokanabinoidy a ich metabolizujúce enzýmy sú prítomné v kostre. AEA a 2-AG sú prítomné v kostnej dreni a v metabolicky aktívnom trabekulárnom kompartmente v úrovniach rovnakej veľkosti ako mozog [12 , 91]. Osteoblasty aj osteoklasty sú schopné produkovať AEA a 2-AG v kultúre [12 , 91 , 92]. Ako doplnok k týmto zisteniam sa zistilo, že množstvo typov buniek v mikroprostredí kostí vrátane osteoblastov, osteoklastov, osteocytov, stromálnych buniek a adipocytov exprimuje endokanabinoidy metabolizujúce enzýmy NAPE-fosfolipázu D, hydrolýzu amidu mastných kyselín, diacylglycerollipázy a monoacylglycerollipázu (naše nepublikované údaje; [12 , 93]). Kanabinoídne receptory CB1 a CB2 a množstvo blízko príbuzných receptorov a kanálov, ako sú GPR55 a TRPV1, sa nachádzajú v kostre. Je známe, že receptory CB1 sú exprimované na nervových vláknach zasahujúcich do kosti [12 , 94] a na bunkách imunitného systému v kompartmente BM [2 , 30]. My a iní sme uviedli, že receptory CB1 sú tiež detegované na osteoblastoch, osteoklastoch a adipocytoch odvodených od BM na úrovni proteínu aj mRNA [95 , 96]. Receptory CB2 sú na druhej strane vysoko exprimované na mononukleárných bunkách periférnej krvi a imunitných bunkách vrátane makrofágov, monocytov, B a T lymfocytov [26 , 30 , 97-100] . Osteoblasty, osteoklasty a osteocyty tiež exprimujú receptory CB2 na významne vyššej úrovni, než je úroveň uvádzaná pre CB1 [31 , 32 , 93 , 96]. Nedávne štúdie uvádzajú, že kostné bunky tiež exprimujú GPR55 a TRPV1, o ktorých je známe, že sú zacielené na endokanabinoidy a syntetické kanabinoídne ligandy [36 , 96 , 101 , 102 , 111].

Kanabinoídni inverzní agonisti/antagonisti ako antiresorpčné činidlá

Prevenca a liečba nadmernej kostnej resorpcie je založená na použití antiresorpčných činidiel, ako sú bisfosfonáty a kalcitonín. Antiresorpčné liečivá sú triedou terapeutických činidiel, ktoré selektívne/špecificky cieľajú a inhibujú diferenciáciu osteoklastov a fungujú s minimálnou priamou aktivitou voči osteoblastom (prehľad v [103 , 104]). Zistili sme, že expresia CB1 a CB2 na osteoklastoch a ich prekursorových bunkách BM je vysoko regulovaná u starnúcich myší a po deficite estrogénu u dospelých myší [95]. Aby sme určili relevantnosť tohto zistenia, študovali sme účinky inaktívacie receptora CB1 na stratu kostnej hmoty u myší po ovariektómii, čo je dobre zavedený model akútnej straty kostnej hmoty po nedostatku estrogénu [105]. Uviedli sme, že myši bez receptorov CB1 sú chránené pred úbytkom kostnej hmoty vyvolaným ovariektómiou a vykazujú znížený počet osteoklastov a kostnú resorpciu v porovnaní so súrodencami divokého typu [32]. Tiež sme ukázali, že nedostatok CB1 u zdravých myší vedie k zrýchlenému rastu kostí u novorodencov a vysokej kostnej hmoty u dospelých myší v dôsledku zníženého počtu osteoklastov a kostnej resorpcie [32]. Prekvapivo zostáva počet osteoblastov a všetky parametre tvorby kostí neovplyvnené deficitom CB1 počas rastu a ranej dospelosti [32 , 95]. Naproti tomu myši s deficitom CB2 podobného veku nevykazovali žiadne významné zmeny v kostnej hmoty [31 , 106]. Na základe týchto zistení je jasné, že receptory CB1 regulujú osteoklastickú kostnú resorpciu u dospelých myší a že v podmienkach zvýšeného kostného obratu môžu tieto receptory regulovať stratu kostnej hmoty. Je zaujímavé, že nedávne štúdie uvádzajú, že dospelé myši s deficitom sirotského receptora GPR55 vykazujú zvýšený vrchol kostnej hmoty v dôsledku významného defektu osteoklastogenézy, ale počet osteoblastov zostáva nedotknutý [107]. Kostné abnormality hlásené u myší GPR55 KO boli pozoruhodne podobné tým, ktoré boli pozorované u myší s deficitom CB1 [32]. Majúc na pamäti, že GPR55 je aktivovaný množstvom kanabinoídnych ligandov vrátane endokanabinoidov a CB1 selektívneho agonistu AM251 [108 , 109], je

pravdepodobné, že GPR55 sa podieľa na regulácii účinku endokanabinoidov pri osteoklastickej kostnej resorpcii.

V posledných rokoch sme rozsiahlo testovali, či farmakologické blokovanie kanabinoidných receptorov môže byť cenné pri prevencii akútneho úbytku kostnej hmoty. V našich štúdiách sme preukázali, že liečba CB1 selektívnym inverzným agonistom/antagonistom AM251 a CB2 selektívnym inverzným agonistom/antagonistom AM630 znížila počet osteoklastov a kostnú resorpciu in vivo a chránila pred ovariektómiou indukovanou stratou kostnej hmoty u dospelých myší [32 , 95]. Iní pracovníci uviedli, že nový CB2 selektívny antagonista Sch.036 zabránil zápalu a poškodeniu kostí u artritických myší [110]. Je zaujímavé, že genetická inaktivácia receptorov CB2 u dospelých myší bola len čiastočne chránená pred stratou kostnej hmoty v dôsledku ovariektómie [106]. To naznačuje, že prevencia straty kostnej hmoty po liečbe CB2 selektívnymi inverznými agonistami/antagonistami, ako sú AM630 a Sch.036, môže nastať aspoň čiastočne účinkom na CB1 receptory. Napriek tomu tieto zistenia spolu potvrdzujú antiresorpčné schopnosti blokády kanabinoidného receptora - najmä CB1 - na zvieracích modeloch akútneho úbytku kostnej hmoty (obr.33).



Hypotetický model prevencie a liečby postmenopauzálnnej osteoporózy pomocou kanabinoidných ligandov. Kanabinoidné receptory hrajú úlohu pri regulácii diferenciacie a aktivity osteoklastov a osteoblastov v starnúcej kostre. Aktivita osteoblastov a osteoklastov je vyvážená počas rastu kostry a ranej dospelosti. Po nedostatku estrogénu po menopauze dochádza k akútne úbytku kostnej hmoty v dôsledku výrazného nárastu počtu osteoklastov. Počas tejto fázy môžu inverzné agonisty/antagonisty kanabinoidného receptora zabrániť nadmernému úbytku kostnej hmoty znížením počtu osteoklastov a kostnej resorpcie. Aktivácia kanabinoidných receptorov pomocou kanabinoidného agonistu môže obnoviť stratu kostnej hmoty, ku ktorej dochádza počas predĺženej fázy straty kostnej hmoty, podporou diferenciacie osteoblastov a tvorby kostí.

Množstvo štúdií in vitro nedávno objasnilo mechanizmy, ktorými blokáda kanabinoidných receptorov reguluje osteoklastogenézu. Napríklad CB1 selektívne inverzné agonisty/antagonisty AM251 a Rimonabant © a CB2 selektívne inverzné agonisty/antagonisty AM630 sú schopné prejavovať priame inhibičné účinky na tvorbu, fúziu, polarizáciu a aktivitu osteoklastov [32]. Nedávne štúdie v našich laboratóriách ukázali, že kanabinoidné receptory tiež regulujú osteoklastogenézu tým, že nepriamo

ovplyvňujú „spojenie osteoblast-osteoklast“ (obr.22). Napríklad sme ukázali, že tvorba osteoklastov je významne znížená v kokultúrach osteoblastov a kostnej drene, v ktorých boli osteoblasty pripravené z myší CB1KO [95 , 106]. Ďalšie štúdie ukázali, že kultúry osteoblastov generované z myší CB1KO exprimujú menej RANKL, čo potvrdzuje zníženú schopnosť týchto osteoblastov normálne podporovať tvorbu osteoklastov [95]. Aktivácia kanabinoidného receptora pomocou endokanabinoidov AEA a 2-AG, CB1/2 syntetického agonistu CP55,940 a CB2 selektívneho agonistu JWH133 a HU308 zvyšujú počet osteoklastov, zväčšujú veľkosť osteoklastov a mnohojadrovú a stimulujú kostnú resorpciu [32 , 92 , 106]. Rovnako ako selektívne agonisty CB1 a CB2, agonisty receptora TRPV1 a GPR55 sú tiež schopné zvýšiť počet osteoklastov v ľudských a myších kultúrach [96 , 107]. Nedávna štúdia v našich laboratóriách ukázala, že agonista TRPV1 kapsaicín zvyšuje tvorbu osteoklastov, zatiaľ čo antagonistka kapsazepín potláča diferenciaciu a funkciu osteoklastov a osteoblastov in vitro a inhibuje stratu kostnej hmoty vyvolanú ovariektómiou u myší znížením indexov kostnej resorpcie a tvorby kosti [111]. Tieto výsledky spolu s predchádzajúcimi zisteniami uvádzanými Rossi a kolegami [96] jasne demonštrujú, že farmakologická blokáda iónových kanálov TRPV1 je schopná inhibovať osteoklastickú kostnú resorpciu a v dôsledku toho chráni pred stratou kostnej hmoty na zvieracom modeli osteoporózy [96 , 111]. Vzhľadom na to, že o kanabinoidných receptoroch, TRPV1 a GPR55 je známe, že koexistujú v mnohých bunkách vrátane osteoklastov a osteoblastov [107 , 112-115] , je možné, že niektoré z účinkov kanabinoidov môžu byť skutočne sprostredkované TRPV1, GPR55 a/alebo iný neznámy mechanizmus (mechanizmy). V súlade s tým sme my a iní našli dôkaz, že aktivácia CB2 – pomocou CB2 selektívnych agonistov HU308 a kyseliny ajulemovej – inhibuje tvorbu osteoklastov za určitých podmienok neznámym mechanizmom (mechanizmami) [31 , 106 , 107 , 116]. Bez ohľadu na to je jasné, že inverzné agonisty/antagonisty kanabinoidného receptora vykazujú hodnotu ako antiresorpčné činidlá na prevenciu osteoporózy a iných ochorení kostí charakterizovaných zvýšenou aktivitou osteoklastov (obr.33).

Endokanabinoidy a syntetické agonisty kanabinoidov ako kostné anabolické látky

Tvorba kostí hrá rozhodujúcu úlohu pri strate kostnej hmoty súvisiacej s vekom a patogenéze mnohých ochorení kostí vrátane postmenopauzálnych a liekmi indukovanej osteoporózy [51]. V posledných rokoch rozsiahly výskum dráh zapojených do regulácie diferenciacie a aktivity osteoblastov viedol k objavu množstva kostných anabolických činidiel, ktoré stimulujú tvorbu kostí, ako je exogénny PTH (tiež známy ako teriparatid alebo Forteo©) (Prehľad v [117]). Endokanabinoidy a ich receptory sa podieľajú na regulácii diferenciacie osteoblastov a tvorbe kostí (obr.22). Prvý dôkaz podporujúci potenciálny účinok kanabinoidov na tvorbu kostí pochádza z dvoch nezávislých štúdií skúmajúcich úlohu leptínu na príjem potravy a energetický metabolizmus. Ducy a kol. ukázali, že leptín, pôsobiaci na hypotalamus, ovplyvňuje prestavbu kosti tým, že negatívne reguluje tvorbu kostí [87]. Na doplnenie tohto zistenia Ravinet a kol. uviedli, že genetická inaktivácia CB1 receptorov znižuje hladiny leptínu a telesnú hmotnosť u experimentálnych zvierat [118]. Spoločne tieto štúdie naznačujú, že receptory CB1 ovplyvňujú - aspoň čiastočne - účinky leptínu na aktivitu osteoblastov a tvorbu kostí (obr.22). My a iní sme ukázali, že endokanabinoidy AEA a 2-AG, syntetický agonista CB1/2 CP55,940 a CB2 selektívne agonisty HU308 a JWH133 stimulujú skorú diferenciaciu prekursorov osteoblastov odvodených od BM a zvyšujú tvorbu kostných uzlín v kultúrach osteoblastov in vitro (obr.22) [31 , 93 , 119]. Naopak, liečba inverzným agonistom/antagonistom CB receptora AM251 potláča počet a funkciu osteoblastov pôsobiacich na receptory CB1 [95 , 106 , 119]. My a iní sme tiež ukázali, že stromálne bunky BM z myší s deficitom CB1 a CB2 mali výrazne zníženú kapacitu na tvorbu mineralizovaných kostných uzlín, keď sa kultivovali v osteogénnom médiu a mali nižšiu expresiu alkalickéj fosfatázy špecifickej pre osteoblasty a jadrového väzbového faktora alfa1 (Cbfa1) [31 , 95],

čo naznačuje, že endokanabinoidy a ich receptory sú schopné vykonávať bunkový autonómny účinok na osteoblasty a ich prekurzory (obr.22).

U väčšiny pacientov s osteoporózou je trvalý úbytok kostnej hmoty spôsobený najmä významným znížením počtu osteoblastov a tvorby kostí (obr.33) [65 , 67]. Uvádza sa, že CB2 spôsobuje zrýchlenú osteoporózu súvisiacu s vekom v dôsledku zvýšeného kostného obratu [31]. V našich štúdiách sme však zistili, že úbytok kostnej hmoty u starnúcich myší s deficitom CB2 je spojený so zvýšenou kostnou resorpciou spojenou s významným znížením počtu osteoblastov a tvorby kostí [93]. V súlade s tým aktivácia periférne hojných receptorov CB2 pomocou JWH133 alebo HU308 chránila pred stratou kostnej hmoty u myší po ovariektómii zvýšením markerov tvorby kostí [31 , 93]. Tieto zistenia – spolu s dôkazmi preukazujúcimi silnú asociáciu CB2 polymorfizmov s osteoporózou u žien [120 , 121] – naznačujú, že agonisty CB2 sú sľubné pri liečbe osteoporózy ako stimulátor tvorby kostí (obr. 33). Nedávna štúdia s použitím modelu traumatického poranenia mozgu u myší na skúmanie úlohy kanabinoidných receptorov pri tvorbe kostí však odhalila, že aktivácia receptora CB1 – nie CB2 – je zodpovedná za zvýšenú tvorbu kostí po poranení mozgu [12]. Autori tejto správy ďalej navrhli, že aktivácia CB1 prítomného na presynaptických nervových zakončeníach ovplyvňuje novotvorbu kostí potlačením uvoľňovania noradrenalínu, inhibítora aktivity osteoblastov [12 , 122]. Ak vezmeme do úvahy všetky doterajšie zistenia, je jasné, že aktivácia kanabinoidného receptora – najmä CB1 – reguluje diferenciaciu a funkciu osteoblastov priamym pôsobením na kostné bunky a/alebo nepriamo ovplyvňovaním uvoľňovania systémových mediátorov tvorby kostí, ako je noradrenalín (obr.22).

Povzbudení týmito zisteniami sme nedávno skúmali účinky farmakologickej a genetickej modulácie receptorov CB1 na diferenciaciu a funkciu osteoblastov u starnúcich osteoporotických myší. Uviedli sme, že nedostatok CB1 výrazne zhoršuje osteoporózu u 12-mesačných myších samíc a viedol k výraznému úbytku kostí u samcov myší podobného veku [95]. Podrobná histologická analýza v našich štúdiách ukázala, že nedostatok CB1 v tomto veku bol spojený s významným znížením počtu osteoblastov a tvorby kostí, čo viedlo k významnej strate kostnej hmoty napriek významnému zníženiu počtu osteoklastov (obr.33) [32 , 95]. To nás viedlo k záveru, že osteoporóza súvisiaca s vekom spojená s nedostatkom CB1 nie je spôsobená zvýšenou kostnou resorpciou, ale skôr zníženou diferenciaciou osteoblastov a tvorbou kostí. Osteoporóza u CB1 KO myší bola tiež spojená s nápadnou akumuláciou adipocytov v BM kompartmente [95]. Štúdie uskutočnené na stromálnych bunkách kostnej drene (MSC) – spoločnom prekurzore adipocytov a osteoblastov – odhalili, že kultúry s deficitom receptorov CB1 vykazovali významné zníženie diferencie osteoblastov najmä v dôsledku zvýšenej schopnosti MSC diferencovať sa na adipocyty [95]. Tento posun v záväzku línie je spojený s významnou down reguláciou osteoblastového špecifického génu *Cbfa1* v osteoblastoch a upreguláciou fosforylácie cAMP response element binding (CREB) v preadipocytoch [95]. Všetky tieto účinky boli farmakologicky reprodukované v kultúrach divokého typu ošetrením CB1 selektívnym inverzným agonistom/antagonistom AM251 [95]. Farmakologické účinky modulácie kanabinoidného receptora pri diferenciacii adipocytov uvádzané v literatúre je však ťažké interpretovať. Napríklad sa uvádza, že endokanabinoidy aktivujú expresiu adipogénneho génu receptora gama aktivovaného peroxizómovým proliferátorom (PPAR γ), silného stimulátora diferencie adipocytov [123 , 124]. Konfliktne správy ukázali, že CB1 selektívny agonista/inverzný antagonista Rimonabant © inhibuje bunkovú proliferáciu, ale zvyšuje markery dozrievania adipocytov v kultúrach preadipocytov [125]. V širokej zhode s posledným uvedeným sme ukázali, že liečba selektívnym agonistom/inverzným antagonistom CB1 AM251 inhibuje diferenciaciu stromálnych buniek, ale zvyšuje diferenciaciu adipocytov a zvyšuje expresiu génov špecifických pre adipocyty, ako je proteín 4 viažuci mastné kyseliny, väzba Ccaat-

enhancer proteíny C/EBP β a C/EBP α ([95] a Idris et al .. nezverejnené údaje). Aj keď tieto zistenia zvyšujú možnosť, že dlhodobé používanie inverzných agonistov/antagonistov kanabinoidných receptorov môže potlačiť diferenciáciu osteoblastov a zvýšiť adipogenézu v kostnej dreni, poskytujú aj vysvetlenie stimulačného účinku kanabinoidných agonistov na aktivitu osteoblastov a tvorbu kostí.

ZÁVEREČNÉ POZNÁMKY A POHĽAD DO BUDÚCNOSTI

Neustále sa zvyšuje množstvo dôkazov, ktoré naznačujú, že kostný endokanabinoidný systém hrá dôležitú úlohu pri regulácii kostnej hmoty v zdraví a pri chorobách. Štúdie založené na bunkách a tkanivách ukázali, že kostné bunky exprimujú kanabinoidné receptory a mechanizmus na syntézu a rozklad endokanabinoidov, čo naznačuje, že endokanabinoidy ovplyvňujú postavbu kostí pôsobením na receptory CB1 a CB2 exprimované na kostných bunkách. Expresia CB1 v inervujúcich neurónoch však zvyšuje možnosť, že kanabinoidy regulujú kostnú hmotu neurónovým mechanizmom. Na úplné vyriešenie tohto problému by budúce štúdie mali preskúmať kostný fenotyp zvierat s miestne špecifickou inaktiváciou/nadmernou expresiou kanabinoidných receptorov. Genetické a farmakologické štúdie u dospelých myší, Inverzné agonisty/antagonisty receptorov CB1 a CB2 sú sľubné ako antiresorpčné činidlá. Na základe nedávnych správ o depresii a samovražednom správaní spojených s použitím selektívneho inverzného agonistu receptora CB1 Rimonabant[®], je jasné, že netrpezlivo očakávané periférne aktívne kanabinoidné látky, ktoré neprechádzajú hematoencefalickou bariérou, by mali podstatnú klinickú hodnotu pri liečbe ochorení kostí. Budúce štúdie s takýmito zlúčeninami by mali preskúmať účinky dlhodobého blokovania kanabinoidných receptorov na aktivitu osteoblastov a iných buniek, ako sú osteocyty a adipocyty. Takéto štúdie by mali tiež stanoviť, či je farmakologický účinok kanabinoidných ligandov sprostredkovaný prostredníctvom CB1/CB2 nezávislé ciele, ako sú GPR55 a TRPV1. Úloha kanabinoidných receptorov na aktivitu osteoblastov a tvorbu kostí je zaujímavá a naznačuje, že endokanabinoidy majú kostné anabolické schopnosti. Z doteraz objavených endogénnych kanabinoidných ligandov boli v kostiach skúmané iba AEA a 2-AG. Budúce štúdie by preto mali posúdiť kostné anabolické schopnosti endokanabinoidných štruktúrne príbuzných derivátov, ako sú virodamín, noladín éter, N-arachidonoyl dopamín a Δ 9-THC u starnúcich hlodavcov a čo je najdôležitejšie porovnať ich účinnosť s účinnosťou dobre zavedených kostných anabolických činidiel, ako je PTH. Výsledok takýchto štúdií výrazne zlepší naše chápanie úlohy skeletálneho endokanabinoidného systému v kostných patológiách a podporí vývoj terapie založenej na kanabinoidoch zameranej na poskytovanie antiresorpčných aj anabolických účinkov v kosti.

Referencie

1. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008;7:438–455. [PubMed] [Google Scholar]
2. Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H. The cannabinoid system and cytokine network. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000;225:1–8. [PubMed] [Google Scholar]
3. Grant I, Cahn BR. Cannabis and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges. *Clin. Neurosci. Res.* 2005;5:185–199. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
4. Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2005:1–51. [PubMed] [Google Scholar]
5. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2003;140:790–801. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

6. Di Marzo V, De PL, Fezza F, Ligresti A, Bisogno T. Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2002;66:377–391. [PubMed] [Google Scholar]
7. van der Stelt M, Di Marzo V. Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2005;77:111–122. [PubMed] [Google Scholar]
8. Kondo S, Kondo H, Nakane S, Kodaka T, Tokumura A, Waku K, Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA²⁺-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett*. 1998;429:152–156. [PubMed] [Google Scholar]
9. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 1997;388:773–778. [PubMed] [Google Scholar]
10. Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993;90:7656–7660. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
11. Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggin RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*. 1996;393:231–235. [PubMed] [Google Scholar]
12. Tam J, Trembovler V, Di MV, Petrosino S, Leo G, Alexan-drovich A, Regev E, Casap N, Shteyer A, Ledent C, Karsak M, Zimmer A, Mechoulam R, Yirmiya R, Shohami E, Bab I. The cannabinoid CB₁ receptor regulates bone formation by modulating adrenergic signaling. *FASEB J*. 2008;22:285–294. [PubMed] [Google Scholar]
13. Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, Pertwee R, Makriyannis A. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J. Med. Chem*. 1999;42:769–776. [PubMed] [Google Scholar]
14. Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M, Barth F, Calandra B, Pecceu F, Lupker J, Maffrand JP, Le Fur G, Casellas P. A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J. Biol. Chem*. 1997;272:22330–22339. [PubMed] [Google Scholar]
15. Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol*. 1996;307:331–338. [PubMed] [Google Scholar]
16. Gatley SJ, Lan R, Pyatt B, Gifford AN, Volkow ND, Makriyannis A. Binding of the non-classical cannabinoid CP 55, 940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. *Life Sci*. 1997; 61:L–7. [PubMed] [Google Scholar]
17. Hosohata Y, Quock RM, Hosohata K, Makriyannis A, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. AM630 antagonism of cannabinoid-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding in the mouse brain. *Eur. J. Pharmacol*. 1997;321:R1–R3. [PubMed] [Google Scholar]

18. Hosohata K, Quock RM, Hosohata Y, Burkey TH, Makriyannis A, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. AM630 is a competitive cannabinoid receptor antagonist in the guinea pig brain. *Life Sci.* 1997;61:L115–L118. [PubMed] [Google Scholar]
19. Landsman RS, Makriyannis A, Deng H, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. AM630 is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Life Sci.* 1998;62:L109–L113. [PubMed] [Google Scholar]
20. Ross RA, Brockie HC, Stevenson LA, Murphy VL, Templeton F, Makriyannis A, Pertwee RG. Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br. J. Pharmacol.* 1999;126:665–672. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
21. Meschler JP, Kraichely DM, Wilken GH, Howlett AC. Inverse agonist properties of N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2, 4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide HCl (SR141716A) and 1-(2-chlorophenyl)-4-cyano-5-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylic acid phenylamide (CP-272871) for the CB(1) cannabinoid receptor. *Biochem. Pharmacol.* 2000;60:1315–1323. [PubMed] [Google Scholar]
22. Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2002;66:101–121. [PubMed] [Google Scholar]
23. Maccarrone M, Finazzi-Agro A. Endocannabinoids and their actions. *Vitam. Horm.* 2002; 65:225–255. [PubMed] [Google Scholar]
24. Sanchez MG, Ruiz-Llorente L, Sanchez AM, Diaz-Laviada I. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal.* 2003;15:851–859. [PubMed] [Google Scholar]
25. Guzman M, Galve-Roperh I, Sanchez C. Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001;22:19–22. [PubMed] [Google Scholar]
26. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* 1997;74:129–180. [PubMed] [Google Scholar]
27. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004;3:771–784. [PubMed] [Google Scholar]
28. Howlett AC. Cannabinoid receptor signaling. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2005:53–79. [PubMed] [Google Scholar]
29. Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur. J. Biochem.* 1993;214:173–180. [PubMed] [Google Scholar]
30. Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H. The cannabinoid system and immune modulation. *J. Leukoc. Biol.* 2003;74:486–496. [PubMed] [Google Scholar]
31. Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, Tam J, Attar-Namdar M, Kram V, Shohami E, Mechoulam R, Zimmer A, Bab I. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103:696–701. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

32. Idris AI, Van 't Hof RJ, Greig IR, Ridge SA, Baker D, Ross RA, & Ralston SH. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat. Med.* 2005;11:774–779. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
33. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2007;152:1092–1101. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
34. Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM, Liu J, Kunos G. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol. Ther.* 2005;106:133–145. [PubMed] [Google Scholar]
35. Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999;64:193–198. [PubMed] [Google Scholar]
36. Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1) *Br. J. Pharmacol.* 2000;129:227–230. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
37. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000;289:1504–1508. [PubMed] [Google Scholar]
38. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 2000;21:115–137. [PubMed] [Google Scholar]
39. Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J. Bone Miner. Res.* 1997;12:869–879. [PubMed] [Google Scholar]
40. 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, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95:3597–3602. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
41. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998;93:165–176. [PubMed] [Google Scholar]
42. Sarma U, Flanagan AM. Macrophage colony-stimulating factor induces substantial osteoclast generation and bone resorption in human bone marrow cultures. *Blood.* 1996;88:2531–2540. [PubMed] [Google Scholar]
43. Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T. Vitamin D and bone. *J. Cell Biochem.* 2003;88:259–266. [PubMed] [Google Scholar]
44. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology.* 1999;140:3552–3561. [PubMed] [Google Scholar]
45. Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am. J. Med.* 2000;108:153–164. [PubMed] [Google Scholar]

46. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 2000;289:1501–1504. [PubMed] [Google Scholar]
47. Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J. Cell Biochem*. 1994;55:350–357. [PubMed] [Google Scholar]
48. Partridge NC, Walling HW, Bloch SR, Omura TH, Chan PT, Pearman AT, Chou WY. The regulation and regulatory role of collagenase in bone. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. 1996;6:15–27. [PubMed] [Google Scholar]
49. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J. Bone Miner. Res*. 1998;13:793–802. [PubMed] [Google Scholar]
50. Nefussi JR, Sautier JM, Nicolas V, Forest N. How osteoblasts become osteocytes: a decreasing matrix forming process. *J. Biol. Buccale*. 1991;19:75–82. [PubMed] [Google Scholar]
51. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest*. 2005;115:3318–3325. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
52. Melton LJ, III Adverse outcomes of osteoporotic fractures in the general population. *J. Bone Miner. Res*. 2003;18:1139–1141. [PubMed] [Google Scholar]
53. Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA. Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet*. 1999;353:878–882. [PubMed] [Google Scholar]
54. Amin S. Male osteoporosis: epidemiology and pathophysiology. *Curr. Osteoporos. Rep*. 2003;1:71–77. [PubMed] [Google Scholar]
55. Ismail AA, O'Neill TW, Cooper C, Finn JD, Bhalla AK, Cannata JB, Delmas P, Falch JA, Felsch B, Hozzowski K, Johnell O, Diaz-Lopez JB, Lopez VA, Marchand F, Raspe H, Reid DM, Todd C, Weber K, Woolf A, Reeve J, Silman AJ. Mortality associated with vertebral deformity in men and women: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS) *Osteoporos. Int*. 1998;8:291–297. [PubMed] [Google Scholar]
56. Kannus P, Parkkari J, Sievanen H, Heinonen A, Vuori I, Jarvinen M. Epidemiology of hip fractures. *Bone*. 1996;18:57S–63S. [PubMed] [Google Scholar]
57. Kanis J, Johnell O, Gullberg B, Allander E, Elffors L, Ranstam J, Dequeker J, Dilsen G, Gennari C, Vaz AL, Lyritis G, Mazzuoli G, Miravet L, Passeri M, Perez CR, Rapado A, Ribot C. Risk factors for hip fracture in men from southern Europe: the MEDOS study. *mediterranean osteoporosisstudy. Osteoporos. Int*. 1999;9:45–54. [PubMed] [Google Scholar]
58. Kaufman JM, Johnell O, Abadie E, Adami S, Audran M, Avouac B, Sedrine WB, Calvo G, Devogelaer JP, Fuchs V, Kreutz G, Nilsson P, Pols H, Ringe J, Van Haelst L, Reginster JY. Background for studies on the treatment of male osteoporosis: state of the art. *Ann. Rheum. Dis*. 2000;59:765–772. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
59. Melton LJ, III, Gabriel SE, Crowson CS, Tosteson AN, Johnell O, Kanis JA. Cost-equivalence of different osteoporotic fractures. *Osteoporos. Int*. 2003;14:383–388. [PubMed] [Google Scholar]
60. Riggs BL, Melton LJ, III The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone*. 1995;17:505S–511S. [PubMed] [Google Scholar]

61. Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, Offord KP, Dunn WL, Mazess RB, Johnson KA, Melton LJ. Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *J. Clin. Invest.* 1982;70:716–723. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
62. Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am. J. Med.* 2000;108:153–164. [PubMed] [Google Scholar]
63. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shio-kawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J. Exp. Med.* 1997;186:489–495. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
64. Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone.* 2003;32:136–141. [PubMed] [Google Scholar]
65. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone resorption depth decreases with age: differences between normal males and females. *Bone.* 1985;6:141–146. [PubMed] [Google Scholar]
66. Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J. Cell Biochem.* 2006;98:251–266. [PubMed] [Google Scholar]
67. Lips P, Courpron P, Meunier PJ. Mean wall thickness of trabecular bone packets in the human iliac crest: changes with age. *Calcif. Tissue Res.* 1978;26:13–17. [PubMed] [Google Scholar]
68. Patschan D, Loddenkemper K, Buttgerit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone.* 2001;29:498–505. [PubMed] [Google Scholar]
69. Delany AM, Gabbitas BY, Canalis E. Cortisol downregulates osteoblast alpha 1 (I) procollagen mRNA by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biochem.* 1995;57:488–494. [PubMed] [Google Scholar]
70. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003;423:356–361. [PubMed] [Google Scholar]
71. Green MJ, Deodhar AA. Bone changes in early rheumatoid arthritis. *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2001;15:105–123. [PubMed] [Google Scholar]
72. Coleman RE. Skeletal complications of malignancy. *Cancer.* 1997;80:1588–1594. [PubMed] [Google Scholar]
73. Amling M, Pogoda P, Beil FT, Schilling AF, Holzmann T, Priemel M, Blicharski D, Catala-Lehnen P, Rueger JM, Ducy P, Karsenty G. Central control of bone mass: brainstorming of the skeleton. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001;496:85–94. [PubMed] [Google Scholar]
74. Patel MS, Eleftheriou F. The new field of neuroskeletal biology. *Calcif. Tissue Int.* 2007;80:337–347. [PubMed] [Google Scholar]
75. Skerry TM, Genever PG. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001;22:174–181. [PubMed] [Google Scholar]
76. van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology.* 2001;103:255–261. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

77. van't Hof RJ, Macphee J, Libouban H, Helfrich MH, Ralston SH. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. *Endocrinology*. 2004;145:5068–5074. [PubMed] [Google Scholar]
78. Abe E, Marians RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y, Iqbal J, Eldeiry L, Rajendren G, Blair HC, Davies TF, Zaidi M. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell*. 2003;115:151–162. [PubMed] [Google Scholar]
79. Sun L, Peng Y, Sharrow AC, Iqbal J, Zhang Z, Papachristou DJ, Zaidi S, Zhu LL, Yaroslavskiy BB, Zhou H, Zallone A, Sairam MR, Kumar TR, Bo W, Braun J, Cardoso-Landa L, Schaffler MB, Moonga BS, Blair HC, Zaidi M. FSH directly regulates bone mass. *Cell*. 2006;125:247–260. [PubMed] [Google Scholar]
80. Chenu C, Marenzana M. Sympathetic nervous system and bone remodeling. *Joint Bone Spine*. 2005;72:481–483. [PubMed] [Google Scholar]
81. Cherruau M, Facchinetti P, Baroukh B, Saffar JL. Chemical sympathectomy impairs bone resorption in rats: a role for the sympathetic system on bone metabolism. *Bone*. 1999;25:545–551. [PubMed] [Google Scholar]
82. Sisask G, Bjurholm A, Ahmed M, Kreicbergs A. The development of autonomic innervation in bone and joints of the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1996;59:27–33. [PubMed] [Google Scholar]
83. Serre CM, Farlay D, Delmas PD, Chenu C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone*. 1999;25:623–629. [PubMed] [Google Scholar]
84. Cherruau M, Facchinetti P, Baroukh B, Saffar JL. Chemical sympathectomy impairs bone resorption in rats: a role for the sympathetic system on bone metabolism. *Bone*. 1999;25:545–551. [PubMed] [Google Scholar]
85. Kondo H, Nifuji A, Takeda S, Ezura Y, Rittling SR, Denhardt DT, Nakashima K, Karsenty G, Noda M. Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system. *J. Biol. Chem.* 2005;280:30192–30200. [PubMed] [Google Scholar]
86. Benarroch EE. Neuropeptide Y: its multiple effects in the CNS and potential clinical significance. *Neurology*. 2009;72:1016–1020. [PubMed] [Google Scholar]
87. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000;100:197–207. [PubMed] [Google Scholar]
88. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002;111:305–317. [PubMed] [Google Scholar]
89. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*. 2005;434:514–520. [PubMed] [Google Scholar]
90. Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*. 2002;282:1–17. [PubMed] [Google Scholar]
91. Bab I, Ofek O, Tam J, Rehnelt J, Zimmer A. Endocannabinoids and the regulation of bone metabolism. *J. Neuroendocrinol.* 2008;20(Suppl 1):69–74. [PubMed] [Google Scholar]

92. Ridge SA, Ford L, Cameron GA, Ross RA, Rogers MJ. Endocannabinoids are produced by bone cells and stimulate bone resorption in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 2007;S120. [Google Scholar]
93. Sophocleous A, Landao-Bassonga E, van't Hof R, Ralston SH, Idris AI. The type 2 cannabinoid receptors (CB2) protects against age-related bone loss by affecting bone formation and CB2 agonists exhibit anabolic activity. *Bone.* 2009;44(2):S219. [Google Scholar]
94. Tam J, Ofek O, Fride E, Ledent C, Gabet Y, Muller R, Zimmer A, Mackie K, Mechoulam R, Shohami E, Bab I. Involvement of Neuronal Cannabinoid Receptor, CB1, in Regulation of Bone Mass and Bone Remodeling. *Mol. Pharmacol.* 2006;70:786–792. [PubMed] [Google Scholar]
95. Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, Canals M, Milligan G, Baker D, van't Hof RJ, Ralston SH. Cannabinoid receptor type 1 protects against age-related osteoporosis by regulating osteoblast and adipocyte differentiation in marrow stromal cells. *Cell Metab.* 2009;10:139–147. [PubMed] [Google Scholar]
96. Rossi F, Siniscalco D, Luongo L, De Petrocellis L, Bellini G, Petrosino S, Torella M, Santoro C, Nobili B, Perrotta S, Di MV, Maione S. The endovanilloid/endocannabinoid system in human osteoclasts: possible involvement in bone formation and resorption. *Bone.* 2009; 44:476–484. [PubMed] [Google Scholar]
97. Nong L, Newton C, Friedman H, Klein TW. Neuroimmune Circuits, Drugs of Abuse, and Infectious Diseases. 2001. CB1 and CB2 Receptor mRNA Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from Various Donor Types; pp. 229–233. [PubMed] [Google Scholar]
98. Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 1995; 232:54–61. [PubMed] [Google Scholar]
99. Scutt A, Williamson EM. Cannabinoids stimulate fibroblastic colony formation by bone marrow cells indirectly via CB2 receptors. *Calcif. Tissue Int.* 2007;80:50–59. [PubMed] [Google Scholar]
100. Palazuelos J, Davoust N, Julien B, Hatterer E, Aguado T, Mechoulam R, Benito C, Romero J, Silva A, Guzman M, Nataf S, & Galve-Roperh I. The CB(2) cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis. *J. Biol. Chem.* 2008;283:13320–13329. [PubMed] [Google Scholar]
101. Saunders CI, Kunde DA, Crawford A, Geraghty DP. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Mol. Immunol.* 2007;44:1429–1435. [PubMed] [Google Scholar]
102. Abed E, Labelle D, Martineau C, Loghin A, Moreau R. Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Mol. Membr. Biol.* 2009;26:146–158. [PubMed] [Google Scholar]
103. Chestnut CH. Calcitonin in the prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 1993;3(Suppl 1):206–207. [PubMed] [Google Scholar]
104. Coleman RE. Risks and benefits of bisphosphonates. *Br. J. Cancer.* 2008;98:1736–1740. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
105. Chow JWM. Ovariectomy and estrogen replacement in rodents. In: Helfrich MH, Ralston SH, editors. *Bone Research Protocols*. Totowa: Humana Press; 2004. pp. 361–365. [Google Scholar]

106. Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, van't Hof RJ, Ralston SH. Regulation of bone mass, osteoclast function, and ovariectomy-induced bone loss by the type 2 cannabinoid receptor. *Endocrinology*. 2008;149:5619–5626. [PubMed] [Google Scholar]
107. Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge SA, Mackie K, Greasley PJ, Ross RA, Rogers MJ. The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106:16511–16516. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
108. Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2007;152:567–575. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
109. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2007;152:1092–1101. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
110. Lunn CA, Fine J, Rojas-Triana A, Jackson JV, Lavey B, Kozlowski JA, Hipkin RW, Lundell DJ, Bober L. Cannabinoid CB(2)-selective inverse agonist protects against antigen-induced bone loss. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2007;29:387–401. [PubMed] [Google Scholar]
111. Idris AI, Landao-Bassonga E, Ralston S. The TRPV1 ion channel antagonist capsazepine inhibits osteoclast and osteoblast differentiation in vitro and ovariectomy induced bone loss in vivo. *Bone*. 2010;46:1089–1099. [PubMed] [Google Scholar]
112. De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di MV. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett.* 2000;483:52–56. [PubMed] [Google Scholar]
113. Hermann H, De Petrocellis L, Bisogno T, Schiano MA, Lutz B, Di MV. Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cell Mol. Life Sci.* 2003;60:607–616. [PubMed] [Google Scholar]
114. Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Nagy I. Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 2003;17:2611–2618. [PubMed] [Google Scholar]
115. Rossi F, Siniscalco D, Luongo L, De Petrocellis L, Bellini G, Petrosino S, Torella M, Santoro C, Nobili B, Perrotta S, Di MV, Maione S. The endovanilloid/endocannabinoid system in human osteoclasts: possible involvement in bone formation and resorption. *Bone*. 2009;44:476–484. [PubMed] [Google Scholar]
116. George KL, Saltman LH, Stein GS, Lian JB, Zurier RB. Ajulemic acid, a nonpsychoactive cannabinoid acid, suppresses osteoclastogenesis in mononuclear precursor cells and induces apoptosis in mature osteoclast-like cells. *J. Cell Physiol.* 2008;214:714–720. [PubMed] [Google Scholar]
117. Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 2007;357:905–916. [PubMed] [Google Scholar]
118. Ravinet TC, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2004;28:640–648. [PubMed] [Google Scholar]
119. Scutt A, Williamson EM. Cannabinoids stimulate fibroblastic colony formation by bone marrow cells indirectly via CB2 receptors. *Calcif. Tissue Int.* 2007;80:50–59. [PubMed] [Google Scholar]

120. Karsak M, Cohen-Solal M, Freudenberg J, Ostertag A, Morieux C, Kornak U, Essig J, Erxlebe E, Bab I, Kubisch C, de Vernejoul MC, Zimmer A. Cannabinoid receptor type 2 gene is associated with human osteoporosis. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14:3389–3396. [PubMed] [Google Scholar]
121. Yamada Y, Ando F, Shimokata H. Association of candidate gene polymorphisms with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men. *Int. J. Mol. Med.* 2007;19:791–801. [PubMed] [Google Scholar]
122. Bab I, Zimmer A. Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *Br. J. Pharmacol.* 2008;153:182–188. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
123. Bouaboula M, Hilairet S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 2005;517:174–181. [PubMed] [Google Scholar]
124. Burstein S. PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids. *Life Sci.* 2005;77:1674–1684. [PubMed] [Google Scholar]
125. Gary-Bobo M, Elachouri G, Scatton B, Le Fur G, Oury-Donat F, Bensaid M. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant® (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69:471–478. [PubMed] [Google Scholar]